

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680026553.8

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 101238149A

[51] Int. Cl. (续)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2006.7.21

[21] 申请号 200680026553.8

[30] 优先权

[32] 2005. 7. 22 [33] FR [31] 0507829

[32] 2005. 7. 22 [33] US [31] 60/701,622

[86] 国际申请 PCT/EP2006/064543 2006.7.21

[87] 国际公布 WO2007/012614 英 2007.2.1

[85] 进入国家阶段日期 2008.1.21

[71] 申请人 皮埃尔法布尔制药公司

地址 法国布洛涅 - 比扬古

[72] 发明人 利利亚纳·格奇 纳塔莉·科尔瓦亚

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘晓东 彭鲲鹏

权利要求书 9 页 说明书 45 页 序列表 6 页
附图 7 页

[54] 发明名称

新抗 IGF - IR 抗体及其用途

[57] 摘要

本发明涉及新的抗体，其能够特异性结合人胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF - IR)。本发明还包括这些抗体作为药物的用途，所述药物用于预防性和/或治疗性处理受 IGF1 和/或 IGF2 刺激、过表达 IGF - IR 的癌症、或者与所述受体过表达相关的任何疾病，以及用于诊断与 IGF - IR 和/或 IGF - I/胰岛素杂合受体过表达相关疾病的方法或试剂盒。

1. 一种分离的抗体或者其功能性免疫原性片段，其具有针对人胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF-IR) 的结合亲和性，其特征在于，在结合所述 IGF-IR 时，它以小于 0.3 nM、优选小于 0.03 nM 的 IC₅₀ 抑制天然结合伴侣 IGF1 与所述 IGF-IR 的结合，并且它还以小于 0.3 nM、优选小于 0.1 nM 的 IC₅₀ 抑制天然结合伴侣 IGF2 与所述 IGF-IR 的结合。

2. 一种分离的抗体或者其功能性免疫原性片段，其具有人胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF-IR) 酪氨酸激酶抑制活性，其特征在于，在结合所述 IGF-IR 时，它以小于 0.3 nM、优选小于 0.03 nM 的 IC₅₀ 抑制天然结合伴侣 IGF1 与所述 IGF-IR 的结合，并且它还以小于 0.3 nM、优选小于 0.1 nM 的 IC₅₀ 抑制天然结合伴侣 IGF2 与所述 IGF-IR 的结合。

3. 根据权利要求 1 或 2 的抗体或其一种功能片段，其特征在于，它能够 100% 抑制 IGF1 和/或 IGF2 诱导的 IGF-IR β 链的磷酸化。

4. 根据权利要求 1-3 的抗体或其一种功能片段，其特征在于，它不存在任何内在性激动活性。

5. 根据权利要求 1-4 的抗体或其一种功能片段，其特征在于，通过同样的 FACS 分析方法表明，它能够诱导：

- i) HT29 细胞上至少 30% 的 IGF-IR 内化，和/或
- ii) MCF-7 细胞上至少 85% 的 IGF-IR 内化。

6. 根据权利要求 1-5 的抗体或其一种功能片段，其特征在于，通过同样的 FACS 分析方法表明，它能够诱导：

- i) HT29 细胞上至少 50% 的 IGF-IR 降解，和/或
- ii) MCF-7 细胞上至少 65% 的 IGF-IR 降解。

7. 根据权利要求 1-6 的抗体或其一种功能片段，其特征在于，它能够以至少等于 1 nM、并优选针对 IGF1 和 IGF2 分别至少等于 0.7 和 0.5 nM 的 IC₅₀ 抑制 IGF1 和 IGF2 诱导的 MCF-7 细胞的体外增殖。

8. 根据权利要求 1-7 的抗体或其一种功能片段，其特征在于，它包含一种轻链，该轻链包含选自序列 SEQ ID No. 1、3 或 5 之互补性决定区 CDR 的至少一个 CDR、或者序列经最优比对后与序列 SEQ ID No.

1、3或5具有至少80%一致性的至少一个CDR；或者其特征在于，它包含一种重链，该重链包含选自序列SEQ ID No. 2、4或6之CDR的至少一个CDR、或者序列经最优比对后与序列SEQ ID No. 2、4或6具有至少80%一致性的至少一个CDR。

9. 根据权利要求1-8的抗体或其一种功能片段，其特征在於，它包含一种重链，该重链包含序列SEQ ID No. 2、4和6的三个CDR中的至少两个或者三个CDR、或者经最优比对后与序列SEQ ID No. 2、4和6分别具有至少80%一致性之序列的三个CDR中的至少两个或者三个CDR。

10. 根据权利要求1-9之任一项的抗体或其一种功能片段，其特征在於它包含一种轻链，该轻链包含序列SEQ ID No. 1、3和5的三个CDR中的至少两个或者三个CDR、或者经最优比对后与序列SEQ ID No. 1、3和5分别具有至少80%一致性之序列的三个CDR中的至少两个或者三个CDR。

11. 根据权利要求1-10之任一项的抗体或其一种功能片段，其特征在於，它包含一种重链，该重链包含序列SEQ ID No. 2、4和6的三个CDR、或者经最优比对后与序列SEQ ID No. 2、4和6分别具有至少80%一致性之序列的三个CDR，并且它还包含一种轻链，该轻链包含序列SEQ ID No. 1、3和5的三个CDR、或者经最优比对后与序列SEQ ID No. 1、3和5分别具有至少80%一致性之序列的三个CDR。

12. 根据权利要求1-11之任一项的抗体或其一种功能片段，其特征在於它不以显著方式附着于人胰岛素受体（IR）。

13. 根据权利要求1-12之任一项的抗体，其特征在於所述功能片段选自片段Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc和双功能抗体、或者其半衰期已增加的任何片段比如聚乙二醇化片段。

14. 能够分泌权利要求1-13之任一项的抗体的鼠杂交瘤。

15. 根据权利要求14的鼠杂交瘤，其于2005年6月23日以编号I-3466保藏在巴黎的巴斯德研究所的CNCM。

16. 一种抗体或其一种功能片段，其特征在於所述抗体由权利要求15所述的杂交瘤细胞分泌。

17. 根据权利要求 1-13 或 16 之任一项目的抗体或其一种功能片段, 其特征不在于所述抗体包含一种轻链, 该轻链序列包含氨基酸序列 SEQ ID No. 7 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 7 具有至少 80%一致性的序列, 或/和其特征不在于它包含一种重链, 该重链序列包含氨基酸序列 SEQ ID No. 8 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 8 具有至少 80%一致性的序列。

18. 根据权利要求 17 的抗体或其一种功能片段, 其特征不在于所述抗体是嵌合抗体并且还包含源于对小鼠为异源物种之抗体的轻链和重链恒定区。

19. 根据权利要求 18 的嵌合抗体或其一种功能片段, 其特征不在于所述异源物种是人。

20. 根据权利要求 17-19 的嵌合抗体或其一种功能片段, 其特征不在于源于人抗体的轻链和重链恒定区分别是 κ 和 γ -1、 γ -2 或 γ -4 区。

21. 根据权利要求 19 或 20 的人源化抗体或其一种功能片段, 其特征不在于它包含一种轻链, 该轻链包含氨基酸序列 SEQ ID No. 17 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 17 具有至少 80%一致性的序列, 或/和其特征不在于它包含一种重链, 该重链序列包含氨基酸序列 SEQ ID No. 18 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 18 具有至少 80%一致性的序列。

22. 根据权利要求 21 的人源化抗体或其一种功能片段, 其特征不在于它包含一种轻链, 该轻链包含氨基酸序列 SEQ ID No. 17, 并且它包含一种重链, 该重链序列包含氨基酸序列 SEQ ID No. 18。

23. 一种分离的核酸, 其特征不在于它选自以下核酸:

- a) 编码权利要求 1-13 和 16-22 之任一项目的抗体或其一种功能片段的核酸、DNA 或者 RNA;
- b) 如 a) 所定义核酸的互补核酸;
- c) 能够在高严谨条件下与序列 SEQ ID No. 9、10、11、12、13 或 14 的至少一个 CDR、或者与经最优比对后与序列 SEQ ID No. 9、10、11、12、13 或 14 具有至少 80%一致性的序列杂交的至少 18 个核苷酸的核酸;
- d) 能够在高严谨条件下与至少核酸序列 SEQ ID No. 15 的轻链和/或核

酸序列 SEQ ID No. 16 的重链、或者与经最优比对后与序列 SEQ ID No. 15 和/或 16 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列杂交的至少 18 个核苷酸的核酸；

- e) 能够在高严谨条件下与至少核酸序列 SEQ ID No. 19 的轻链和/或核酸序列 SEQ ID No. 20 的重链、或者与经最优比对后与序列 SEQ ID No. 19 和/或 20 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列杂交的至少 18 个核苷酸的核酸。

24. 包含权利要求 23 所述核酸的载体。

25. 包含权利要求 24 所述载体的宿主细胞。

26. 除人以外的转基因动物，其包含至少一个由权利要求 25 所述载体转化的细胞。

27. 生产权利要求 1-13 和 16-22 之任一项所述抗体或其一种功能片段的方法，其特征在于它包括以下阶段：

- a) 在培养基中和适当的培养条件下培养权利要求 25 的细胞；和
b) 从培养基或者所述培养细胞回收由此产生的所述抗体或其一种功能片段。

28. 通过权利要求 27 所述方法能够获得的抗体或其一种功能片段。

29. 根据权利要求 1-13 和 16-22 和 28 的抗体或其一种功能片段，其特征在于它还能够特异性结合酪氨酸激酶家族的人受体和/或能够抑制所述受体的酪氨酸激酶活性。

30. 根据权利要求 29 的抗体或其一种功能片段，其特征在于它由双特异性抗体组成，所述双特异性抗体包含能够特异性抑制 EGF 与人表皮生长因子受体 (EGFR) 结合的和/或抑制所述 EGFR 的酪氨酸激酶活性的第二基序。

31. 根据权利要求 30 的抗体或其一种功能片段，其特征在于所述第二抗 EGFR 基序是由鼠单克隆抗体 225、其嵌合衍生物 C225 或者源于此抗体 225 的任何人源化抗体而产生的。

32. 根据权利要求 29 的抗体或其一种功能片段，其特征在于它由双特异性抗体组成，所述双特异性抗体包含能特异性抑制由 HER2/neu

受体调节之活性的和/或抑制所述 HER2/neu 受体的酪氨酸激酶活性的第二基序。

33. 根据权利要求 32 的抗体或其一种功能片段, 其特征在于所述第二抗 HER2/neu 基序是由鼠单克隆抗体 4D5 或 2C4 或者人源化抗体 Trastuzumab 或者 Pertizumab 产生的。

34. 根据权利要求 29 的抗体或其一种功能片段, 其特征在于它由双特异性抗体组成, 所述双特异性抗体包含能够特异性抑制肝细胞生长因子 (HGF) 与 cMET 受体结合的和/或抑制所述 cMET 受体的酪氨酸激酶活性的第二基序。

35. 根据权利要求 29 的抗体或其一种功能片段, 其特征在于它由双特异性抗体组成, 所述双特异性抗体包含能够特异性抑制巨噬细胞刺激蛋白 (MSP) 与 RON 受体结合的和/或抑制所述 RON 受体的酪氨酸激酶活性的第二基序。

36. 根据权利要求 1-13、16-22 和 28-35 的抗体或其一种功能片段, 其特征在于它能够与涉及肿瘤发展的任何种类的受体比如、例如 VEGFR、FGF (成纤维细胞生长因子) 或 CXCR4 或 2 (趋化因子受体 4 或 2 型)) 相互作用。

37. 根据权利要求 28-36 之任一项的抗体, 其特征在于所述第二基序选自片段 Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fab'PEG、scFv、scFv-Fc 和双功能抗体、或者其半衰期已增加的任何形式。

38. 根据权利要求 1-13、16-22 和 28-37 之任一项的抗体或其一种功能片段, 作为药物。

39. 包含作为活性成分的化合物的组合物, 所述化合物由权利要求 1-13、16-22 和 28-38 之任一项的抗体或其一种功能片段组成。

40. 根据权利要求 39 的组合物, 其特征在于它包含至少第二化合物, 所述第二化合物选自能够特异性抑制 IGF-IR、EGFR、HER2/neu、cMET 和/或 RON 的酪氨酸激酶活性的化合物。

41. 根据权利要求 40 的组合物, 其特征在于所述第二化合物选自分离的抗-EGFR、-IGF-IR、-HER2/neu、-cMET 和/或-RON 抗体或其功能片段, 其能够抑制由所述受体介导的增殖性和/或抗凋亡性和/或血

管生成性和/或转移性弥散诱导活性。

42. 根据权利要求 39-41 的组合物, 其特征在于, 作为用于同时、分开或者依次应用的组合产物, 它包含 IR、IGF-IR、EGFR、HER2/neu、cMET 和/或 RON 的酪氨酸激酶活性的至少一种抑制剂。

43. 根据权利要求 42 的组合物, 其特征在于所述的酪氨酸激酶活性的抑制剂选自衍生的天然试剂、二苯胺基邻苯二甲酰亚胺类化合物、吡唑并-或者吡咯并吡啶并嘧啶类化合物或者喹唑啉类化合物。

44. 根据权利要求 39-43 的组合物, 其特征在于, 作为用于同时、分开或者依次应用的组合产物, 它还包含细胞毒性剂/细胞生长抑制剂。

45. 根据权利要求 44 的组合物, 其特征在于所述细胞毒性剂/细胞生长抑制剂选自与 DNA 相互作用的试剂、抗代谢物、拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂、或者纺锤体抑制剂或稳定剂或者其它能够用于化疗的任何试剂。

46. 根据权利要求 44 或 45 的组合物, 其特征在于所述细胞毒性剂/细胞生长抑制剂被化学偶联至所述组合物的至少一种组分用于同时应用。

47. 根据权利要求 44-46 的组合物, 其特征在于所述细胞毒性剂/细胞生长抑制剂选自纺锤体抑制剂或稳定剂, 优选长春瑞滨、长春氟宁或长春新碱。

48. 根据权利要求 39-47 之任一项的组合物, 其特征在于所述抗体或其一种功能片段的至少一种与细胞毒素和/或放射性元素缀合。

49. 根据权利要求 39-48 之任一项的组合物, 作为药物。

50. 根据权利要求 1-13、16-22 和 28-38 之任一项的抗体或其一种功能片段和/或权利要求 39-49 之任一项的组合物用于制备预防或治疗疾病的药物中的用途, 所述疾病与 IGF-IR 的过表达和/或异常活化有关, 和/或与由 IGF1 或 IGF2 与 IGF-IR 相互作用所介导信号之转导途径的过度活化有关。

51. 根据权利要求 50 的用途, 其特征在于施用所述药物不引起或者仅轻微地引起与胰岛素受体 IR 的抑制有关的副作用。

52. 根据权利要求 50 或 51 的用于制备药物的用途, 所述药物用于抑制正常细胞转化成具有肿瘤特性的细胞和/或肿瘤细胞的生长和/或增殖, 所述细胞优选 IGF 依赖性的、至少 IGF2 依赖性的细胞。

53. 根据权利要求 50-52 之任一项的用于制备药物的用途, 所述药物用于预防或治疗癌症。

54. 根据权利要求 53 的用途, 其特征在於所述癌症选自前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、卵巢癌或者结肠癌。

55. 根据权利要求 54 的用途, 其特征在於所述癌症是结肠癌。

56. 根据权利要求 50-52 之任一项的用于制备药物的用途, 所述药物用于预防或者治疗银屑病或者动脉粥样硬化。

57. 一种体外诊断特征在於相对于正常情形而言 IGF-IR 异常表达的病理状况的方法, 所述方法包括让怀疑含有 IGF-IR 的生物学样品与权利要求 1-13、16-22 和 28-38 之任一项的抗体在有利于形成 IGF-IR/抗体复合物的条件下接触, 并且检测作为指示在所述样品中存在所述 IGF-IR 的所述复合物。

58. 根据权利要求 57 的方法, 其中所述抗体以可检测的方式被标记。

59. 根据权利要求 57 或 58 的方法, 其中 IGF-IR 的异常表达是 IGF-IR 的过表达。

60. 根据权利要求 57 或 58 的方法, 其中 IGF-IR 的异常表达是 IGF-IR 的欠表达。

61. 一种用于预测前列腺细胞样品的致癌性潜力的诊断方法, 其包括以下步骤:

(a) 提供人肺或乳房组织的样品; 和

(b) 确定样品中是否存在 IGF-IR, 所述步骤包括让所述样品与权利要求 1-13、16-22 或 28-38 之任一项的抗体在有利于形成 IGF-IR/抗体复合物的条件下接触, 其中所述复合物的存在指示所述细胞在所述组织中的致癌性潜力。

62. 根据权利要求 61 的方法, 其中所述复合物的存在指示患者具有发展或发作其特征在於所述 IGF-IR 过表达的病理疾病的风险。

63. 跟踪治疗方案进程的方法, 所述治疗方案设计用来减轻特征在于 IGF-IR 表达异常的病理疾病, 该方法包括以下步骤:

- (a) 分析来自对象的样品以确定在第一时间点的 IGF-IR 水平;
- (b) 分析在第二时间点的所述样品; 和
- (c) 对在所述第二时间点的所述水平与在 (a) 中所确定水平进行比较, 作为对所述治疗方案效果的确定, 其中在所述样品中 IGF-IR 水平的下降确定了在所述患者中所述病理疾病的消退, 或者 IGF-IR 水平的增加确定了在所述患者中所述病理疾病的进展。

64. 一种用于实施诊断由于 IGF-IR 过表达或者欠表达所引起疾病的方法或者用于实施检测和/或定量生物学样品中 IGF-IR 过表达或者欠表达的方法的试剂盒或者组合, 其中优选所述受体的过表达, 所述试剂盒或组合的特征在于它包括以下成分:

- a) 权利要求 1-13、16-22 和 28-38 之任一项的抗体或其一种功能片段;
- b) 任选地, 用于形成有助于免疫反应的介质的试剂;
- c) 任选地, 允许证实由免疫反应产生的 IGF-IR/抗体复合物的试剂。

65. 权利要求 1-13、16-22 和 28-38 之任一项的抗体或其一种功能片段用于制备旨在将生物活性化合物特异性靶向到表达或者过表达 IGF-IR 的细胞处的药物的用途。

66. 一种调节 IGF-IR 反应性哺乳动物细胞中 IGF-IR 活性的方法, 其包括: 让细胞与权利要求 1-13、16-22 和 28-38 之任一项的抗体在相对于非 IGF-IR 反应性细胞而言足以调节所述 IGF-IR 活性的条件下接触。

67. 一种相对于正常细胞而言降低 IGF-IR 反应性哺乳动物细胞中 IGF-IR 活性的方法, 其包括: 让细胞与权利要求 1-13、16-22 和 28-38 的抗体接触。

68. 一种鉴定 IGF-IR 调节剂的方法, 其包括以下步骤:

- a) 让 IGF-IR 与权利要求 1-13、16-22 和 28-38 的抗体接触;
- b) 让 (a) 的复合物与化合物库接触;
- c) 鉴定破坏 (a) 的复合物的化合物; 和
- d) 确定所述化合物是否表现出针对 IGF-IR 的激动剂或者拮抗剂活性, 其中该活性表明 IGF-IR 调节剂的鉴定。

69. 一种检测样品中针对权利要求 1-13、16-22 或 28-38 所述抗体的结合伴侣的方法，该方法包括：a) 在足以允许所述抗体与其结合伴侣特异性结合的条件下，将权利要求 1-13、16-22 或 28-38 所述抗体与得自患者的生物学样品一起孵育，所述患者表现出特征在于人 IGF-IR 的异常水平表达和/或活化的细胞增殖性疾病，和 b) 检测特异性结合，其中特异性结合指示在样品中结合伴侣的存在。

70. 一种从样品纯化 IGF-IR 的方法，该方法包括：a) 在允许抗体和受体特异性结合的条件下将权利要求 1-13、16-22 或 28-38 的抗体与样品一起孵育，和 b) 从所述样品中分离抗体并获得纯化的受体。

新抗 IGF-IR 抗体及其用途

本发明涉及新的抗体，其能够特异性结合人胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF-IR) 和/或能够特异性抑制所述 IGF-IR 的酪氨酸激酶活性，尤其是鼠的、嵌合的和人源化来源的单克隆抗体，以及编码这些抗体的氨基酸和核酸序列。在一个具体的方面，本发明涉及新的抗体，其不但能够有效地抑制配体 IGF1 与 IGF-IR 的结合，而且还能够有效地抑制其它配体 (例如，IGF2) 与所述相同受体的结合。本发明还包括这些抗体作为药物的用途，所述药物用于预防性和/或治疗性处理受 IGF1 和/或 IGF2 刺激的、过表达 IGF-IR 的癌症、或者与所述受体过表达相关的任何疾病，以及用于诊断与 IGF-IR 和/或 IGF-I/胰岛素杂合受体过表达相关疾病的方法或试剂盒。本发明最后还包括包含这些抗体与例如抗 EGFR 抗体和/或化合物和/或抗癌剂或者缀合毒素的试剂的产物和/或组合物，以及它们用于预防和/或治疗某些癌症的用途。

被称为 IGF-IR 的胰岛素样生长因子 I 受体是已经充分描述的受体，具有与胰岛素受体 IR 70% 同源性的酪氨酸激酶活性。IGF-IR 是分子量约为 350,000 的糖蛋白。它是异四聚体受体，其中通过二硫桥连接的每一半由细胞外 α -亚基和跨膜 β -亚基组成。IGF-IR 以非常高亲和力 (Kd # 1 nM) 结合 IGF1 和 IGF2，但也能够以低 100-1000 倍的亲和力结合胰岛素。相反，IR 以非常高亲和力结合胰岛素，而 IGF 仅以低 100 倍的亲和力结合至胰岛素受体。尽管位于 α -亚基的富含半胱氨酸区域和 β -亚基 C-端部分分别具有较低同源性区段，但是 IGF-IR 和 IR 的酪氨酸激酶结构域具有非常高的序列同源性。在 α -亚基中观察到的序列差异位于配体结合区段，因此是在 IGF-IR 和 IR 分别对 IGF 和胰岛素的相对亲和力的起源处。 β -亚基 C-端部分的差异导致两种受体信号途径的分化；IGF-IR 介导促有丝分裂、分化和抗凋亡作用，而 IR 活化主要涉及代谢途径水平的作用 (Baserga et al., Biochim. Biophys. Acta, 1332:F105-126, 1997; Baserga R., Exp. Cell. Res., 253:1-6, 1999)。

配体与受体细胞外结构域的结合活化了细胞质酪氨酸激酶蛋白质。激酶活化又涉及刺激不同的细胞内底物，包括 IRS-1、IRS-2、Shc 和 Grb 10 (Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173,

1999)。IGF-IR 的两种主要底物是 IRS 和 Shc, 其通过活化大量的下游效应物, 介导与 IGF 附着至该受体相关的大部分生长和分化作用。因此底物可用性可控制与 IGF-IR 活化相关的最终生物作用。当 IRS-1 占优势时, 细胞趋向增殖和转化。当 Shc 占优势时, 细胞趋向分化 (Valentinis B. et al., J. Biol. Chem. 274:12423-12430, 1999)。似乎参与抗凋亡保护作用的主要途径是磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI 3 激酶) 途径 (Prisco M. et al., Horm. Metab. Res., 31:80-89, 1999; Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999)。

近十年中 IGF 系统在癌症发生中的作用已经成为大量研究的主题。这种兴趣是在发现以下事实之后: 除了促有丝分裂和抗凋亡特性以外, 建立和维持转化表型似乎也需要 IGF-IR。事实上, 已经在大量不同的细胞中明确, IGF-IR 过量表达或者组成性活化, 导致细胞在无胎牛血清的培养基中不依赖于支持物的生长, 并导致在裸鼠中形成肿瘤。这本身不是独有性质, 因为大量不同的过表达基因的产物可以转化细胞, 包括很多的生长因子受体。然而, 已经明确证实 IGF-IR 在转化中主要作用的关键发现已经证实, IGF-IR 编码基因已经灭活的 R-细胞对通常能转化细胞的不同因子完全有抗性, 这些因子如牛乳头瘤病毒的 E5 蛋白、EGFR 或 PDGFR 的过表达、SV40 的 T 抗原、活化 ras 或最后两种因子的组合 (Sell C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:11217-11221, 1993; Sell C. et al., Mol. Cell. Biol., 14:3604-3612, 1994; Morrione A. J., Virol., 69:5300-5303, 1995; Coppola D. et al., Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595, 1994; DeAngelis T. et al., J. Cell. Physiol, 164:214-221, 1995)。

IGF-IR 在大量不同肿瘤和肿瘤系中表达, 并且 IGF 通过其与 IGF-IR 的附着促进肿瘤生长。IGF-IR 在癌症发生中作用的其他争论来自使用抗该受体的鼠单克隆抗体或者使用 IGF-IR 显性负突变体的研究。实际上, 抗 IGF-IR 的鼠单克隆抗体抑制大量培养细胞系的增殖和体内肿瘤细胞的生长 (Arteaga C. et al., Cancer Res., 49:6237-6241, 1989; Li et al., Biochem. Biophys. Res. Com., 196:92-98, 1993; Zia F. et al., J. Cell. Biol., 24:269-275, 1996; Scotlandi K. et al., Cancer Res., 58:4127-4131, 1998)。与之相似在 Jiang 等人的工作中 (Oncogene, 18:6071-6077, 1999) 也已经显示 IGF-IR 的显性负突变体能够抑制肿瘤增殖。

这些能够特异性结合 IGF-IR 抗体已有描述并且已申请了几个专利申请。作为举例，我们可以提及由本申请人申请的专利申请 WO 03/059951，其中描述了能够结合 IGF-IR 的单克隆抗体（称为 7C10）。可以提及的其它专利申请有如 WO 02/053596（PFIZER INC. 和 ABGENIX INC.）、WO 03/100008（SCHERING CORPORATION）或者 WO 03/106621（IMMUNOGEN INC.）。所有这些申请都要求保护能够特异性结合 IGF-IR 和/或抑制其活性的抗体。

尽管它被认为是这些抗体中每一种的明显特性，但是在这些申请的说明书中清楚地表明，这些抗体能够有效地抑制两种天然配体与 IGF-IR 的结合，尤其是 IGF2 与 IGF-IR 的结合。在这些申请中显示了体外数据，比如对由 IGF1 和 IGF2 诱导增殖的抑制，并且表明所述抗体能够有效地抑制 IGF1 和 IGF2 诱导的增殖。然而，因为所述抗体的主要部分表现出诱导 IGF-IR 部分下调的能力，所述抗增殖特性与从 IGF-IR 上置换 IGF1 和 IGF2 直接相关并不是显而易见的。

实际上，例如，在 WO 03/106621 中显示的数据只涉及 IGF1 并且没有涉及 IGF2 与 IGF-IR 结合的最终抑制作用（见 33-35 页实施例 C 和图 3，以及 35-37 页实施例 D 和图 4-6）。

WO 02/053596 得到同样的观测结果（见 78-79 页实施例 IV 和图 3，以及 82 页实施例 VII 和图 4）。

在所有目前描述过的发现抗人 IGF-IR（hIGF-IR）的单克隆或者重组抗体的专利申请中，只有两个（WO 2004/087756 和 WO 2005/005635）真正地显示了所述抗体（分别为 AK1a 和 AK18）抑制^[125I]IGF2 结合 hIGF-IR 的功效。

试验的方法在这两个实例中是相同的，均基于对人结直肠腺癌（HT29）完整细胞的竞争结合。尽管所述方法是合理的，但是其中没有阳性对照，比如天然 hIGF-IR 配体（IGF1 和 IGF2）的竞争，这导致竞争结合数据的不可信。另一方面，所显示的只是不完全竞争（对^[125I]IGF2 结合 AK1a 和 AK18 抗体的抑制最大为 80%），即使在高抗体浓度条件下，这使得需要开发更有效的抗体以提高在人体中的疗效。最近关于由 AK1a 和 AK18 所致的对 IGF2 介导应答的推定抑制作用的争议点是缺乏显示由 hIGF-IR 介导的功能性 IGF2 刺激信号的抑制作用的

实例。实际上，即使发生 IGF2 结合的竞争，这一定与下游 hIGF-IR 信号伴随而来的抑制相关，并且必须例举这些证据以提供针对抗体功能效果的实质证据。

本发明的目的是能提供可用的鼠单克隆抗体，优选嵌合的或者人源化抗体，其以高亲和性特异性地识别 IGF-IR 并且其不但能够抑制 IGF1 与 IGF-IR 的结合而且还抑制 IGF2 与 IGF-IR 的结合。该抗体几乎或者完全不与 IR 相互作用。它的附着将能够抑制过表达 IGF-IR 细胞系的体外生长，这主要是通过通过与 IGF1/IGF-IR 和 IGF2/IGF-IR 相互作用期间活化的信号转导途径的相互作用所致。该抗体在体内对所有表达 IGF-IR 的肿瘤类型将能是有活性的，所述肿瘤类型包括雌激素依赖性乳房癌和前列腺癌，其不是目前可用的抗 IGF-IR 单克隆抗体（写作 MAb 或者 MAB）的情形。实际上， α IR3（其指 IGF-IR 的结构域）完全地抑制乳房的雌激素依赖性肿瘤（MCF-7）的体外生长，但是对相应的体内模型却没有效果（Arteaga C. et al., J. Clin. Invest. 84:1418-1423, 1989）。同样地，源于鼠单克隆 1H7 的 scFv-Fc 片段对乳房 MCF-7 的肿瘤只有微弱的活性并且对不依赖于雄激素的前列腺肿瘤完全没有活性（Li S. L. et al., Cancer Immunol. Immunother., 49:243-252, 2000）。

以一种令人惊奇的方式，本发明人已产生鼠单克隆抗体（被称为 I-3466），其识别 IGF-IR 并且符合上述所有标准，也就是说识别胰岛素的受体，在体外阻断 IGF1 和尤其是 IGF2 诱导的增殖，而且同样地在体内抑制表达 IGF-IR 的不同肿瘤的生长，所述肿瘤是骨肉瘤和前列腺癌。此外，已显示出这些抗体抑制 IGF1-和/或 IGF-2 诱导的对 MCF-7 和 HT29 细胞上 IGF-IR 的 β 链的酪氨酸的磷酸化。此外，还同样地确定这些抗体引起所述受体的内化及其降解，这与针对天然配体通常所观测到的结果相反，天然配体允许所述的细胞表面上受体的快速再循环。已经有可能通过它们的肽和核酸序列，尤其是通过它们针对 IGF-IR 的互补性决定区（CDR）的序列来表征这些抗体。

因此，根据第一实施方案，本发明的一个主题是分离的抗体、或其一种功能片段，所述抗体或其一种所述片段能够特异性结合人胰岛素样生长因子 I 受体和/或能够特异性抑制所述 IGF-IR 受体的酪氨酸激酶活性，其特征在于它能够以小于 0.3 nM、优选小于 0.03 nM 的 IC_{50} 抑制其第一配体 IGF1 的天然附着并且还能够在小于 0.3 nM、优选小于 0.1

nM 的 IC_{50} 抑制其第二配体 IGF2 的天然附着。

更具体地，本发明涉及分离的抗体，或者其功能性免疫原性片段，其具有针对人胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF-IR) 的结合亲和性，其特征在于在与所述 IGF-IR 结合时，它以小于 0.3 nM、优选小于 0.03 nM 的 IC_{50} 抑制天然结合伴侣 IGF1 与所述 IGF-IR 的结合并且它还以小于 0.3 nM、优选小于 0.1 nM 的 IC_{50} 抑制天然结合伴侣 IGF2 与所述 IGF-IR 的结合。

此外，本发明涉及分离的抗体，或者其功能性免疫原性片段，其具有人胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF-IR) 的酪氨酸激酶抑制活性，其特征在于在与所述 IGF-IR 结合时，它以小于 0.3 nM、优选小于 0.03 nM 的 IC_{50} 抑制天然结合伴侣 IGF1 与所述 IGF-IR 的结合并且它还以小于 0.3 nM、优选小于 0.1 nM 的 IC_{50} 抑制天然结合伴侣 IGF2 与所述 IGF-IR 的结合。

在本申请中，如实施例 2 所解释， IC_{50} 已经以图表方式确定。

关于现有技术，称为 18 的 Roche 抗体 (WO 2004/087756 和 WO 2005/005635) 针对 IGF1 和 IGF2 具有平均 0.3 nM 的 IC_{50} (见 WO 2005/005635 的实施例 6)，即超过从抗体 I-3466 获得的 IC_{50} (见实施例 2)。

在本说明书中，术语“结合”和“附着”具有相同的意思并且可以互换使用。

根据本发明的另一实施方案，所述抗体还能够结合 IGF-I/胰岛素杂合受体。

实际上，IGF-IR 显示出与胰岛素受体 (IR) 的高同源性，后者以两种亚型 A 和 B 存在。

在 NCBI GenBank 中，IR 亚型 A 和 B 的序列分别注册为登记号 X02160 和 M10051。没有限制的、与 IR 相关的其他数据在此引入作为参考 (Vinten et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:249-252; Belfiore et al., 2002, The Journal of Biological Chemistry, 277:39684-39695; Dumesic et al., 2004, The Journal of Endocrinology &

Metabolism, 89(7):3561-3566).

IGF-IR 和 IR 是四聚体糖蛋白, 由通过二硫键连接的两个细胞外 α -和两个跨膜 β -亚基组成。包含配体结合位点的每个 α -亚基大约是 130-135 kDa, 而包含酪氨酸激酶结构域的每个 β -亚基大约是 90-95 kDa。这些受体具有超过 50% 的总体氨基酸序列相似性和在酪氨酸激酶结构域中 84% 的相似性。在配体结合后, 磷酸化受体募集并磷酸化停靠蛋白 (docking protein), 包括胰岛素受体底物-1 蛋白质家族 (IRS1)、Gab1 和 Shc (Avruch, 1998, Mol. Cell. Biochem., 182, 31-48; Roth et al., 1988, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 53, 537-543; White, 1998, Mol. Cell. Biochem., 182, 3-11; Laviola et al., 1997, J. Clin. Invest. 99, 830-837; Cheatham et al., 1995, Endocr. Rev. 16, 117-142), 导致不同细胞内介质的活化。尽管 IR 和 IGF-IR 相似地活化主要信号途径, 但是两种受体之间在募集某些停靠蛋白和细胞内介质中存在差异 (Sasaoka et al., 1996, Endocrinology 137, 4427-4434; Nakae et al., 2001, Endocr. Rev. 22, 818-835; Dupont and Le Roith 2001, Horm. Res. 55, Suppl. 2, 22-26; Koval et al., 1998, Biochem. J. 330, 923-932)。这些差异是 IR 活化引起的主要代谢作用的基础、和 IGF-IR 活化引起的主要促有丝分裂、转化和抗凋亡作用的基础 (De Meyts et al., 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci., 766, 388-401; Singh et al., 2000, Prisco et al., 1999, Horm. Metab. Res. 31, 80-89; ICido et al. 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab., 86, 972-979)。胰岛素以高亲和力结合至 IR (比结合至 IGF-IR 高 100 倍), 而胰岛素样生长因子 (IGF1 和 IGF2) 以比结合至 IR 高 100 倍的亲和力结合至 IGF-IR。

人 IR 存在两种亚型 IR-A 和 IR-B, 其由 IR 基因的选择性剪接产生, 其在 IR α -亚基的 C-端排除或者包括由小外显子 (外显子 11) 所编码的 12 个氨基酸残基。IR 亚型的相对丰度受组织特异性和未知因子调节 (Moller et al., 1989, Mol. Endocrinol., 3, 1263-1269; Mosthaf et al., 1990, EMBO J., 9, 2409-2413)。IR-B 是在正常成人组织 (脂肪组织、肝脏和肌肉) 中占优势的 IR 亚型, 所述组织是胰岛素代谢作用的主要靶组织 (Moller et al., 1989; Mosthaf et al., 1990)。IR-A 是在胎儿组织中占优势的亚型并介导对 IGF2 应答的胎儿生长 (Frasca et al., 1999, Mol. Cell. Biol., 19, 3278-3288), 正如在转基因小鼠中实施的遗传研究所提示的 (DeChiara et al., 1990, Nature 345, 78-80; Louvi et al., 1997, Dev.

Biol. 189, 33-48)。而且,当细胞转化并变成恶性时,去分化经常与 IR-A 相对丰度增加相关 (Pandini et al., 2002, The Journal of Biological Chemistry, Vol.277, N°42, pp39684-39695)。

基于其高度同源性,胰岛素和 IGF-I 半受体(由一个 α -亚基和一个 β -亚基组成)可以异二聚化,导致胰岛素/IGF-I 杂合受体(杂合体-R)的形成 (Soos et al., 1990, Biochem J., 270, 383-390; Kasuya et al., 1993, Biochemistry 32, 13531-13536; Seely et al., 1995, Endocrinology 136, 1635-1641; Bailyes et al., 1997, Biochem J. 327, 209-215)。

两种 IR 亚型都能够与 IGF-IR 形成杂合体。然而,杂合体-R 具有不同的功能特征。杂合体-RsB 对 IGF1 并且尤其是对 IGF2 的亲合力降低。相反,杂合体-RsA 对 IGF1 具有高亲合力,并且在生理浓度范围内也结合 IGF2 和胰岛素。杂合体-RsA 的表达通过两种不同机制上调 IGF 系统, i) (以高亲合力)结合 IGF1 和 IGF2 并被其活化(对杂合体-RsB 这不发生), ii) 胰岛素结合以后活化 IGF-IR 途径。胰岛素结合杂合体-RsA 磷酸化 IGF-IR β -亚基并活化 IGF-IR-特异性底物 (Crk II), 使得杂合体-RsA 转换胰岛素至 IGF-IR 信号传递 (Pandini et al., 2002)。

在几种组织中,例如肝、脾或胎盘中,杂合体-R 比 IGF-IR 更具代表性 (Bailyes et al., 1997)。当肿瘤组织过表达或者出现异常活化 IGF-IR 和 IR-A 时 (Frasca et al., 1999; Sciacca et al., 1999, Oncogene 18, 2471-2479; Vella et al., 2001, Mol. Pathol., 54, 121-124), 杂合体-RsA 也可以在多种人恶性肿瘤包括甲状腺和乳癌中过表达,对能对由生理浓度 IGF1 和/或 IGF2 以及胰岛素刺激后 IGF-IR 信号传递类型作出应答的恶性细胞提供选择性生长优势 (Bailyes et al., 1997; Pandini et al., 1999, Clin. Cancer Res., 5, 1935-1944; Belfiore et al., 1999, Biochimie (Paris) 81, 403-407; Frasca et al. 1999, Sciacca et al., 1999; Vella et al., 2001)。

根据本发明,这些抗体的特征还在于它们能够结合杂合体-R, 并且如果需要的话,另外优选能够抑制杂合体-R 的配体胰岛素、IGF1 和/或 IGF-2 的天然附着,和/或能够特异性抑制所述杂合体-R 的酪氨酸激酶活性。

本发明的一个主题是抗体、或其一种功能片段,其特征在于它还能够 100%抑制由 IGF1 和/或 IGF2 诱导的 IGF-IR β -链(优选 HT29 细胞

上的)磷酸化。

在另一方面中,根据本发明的抗体、或其一种功能片段的特征在于,它不表现任何内在拮抗活性。

此外,根据本发明的抗体、或其一种功能片段的特征在于,应用同样的 FACS 分析方法,它能够诱导:

i) 在 HT29 细胞上至少 30%的 IGF-IR 内化, 和/或

ii) 在 MCF-7 细胞上至少 85%的 IGF-IR 内化。

根据本发明的抗体, 或其一种功能片段的特征在于, 应用同样的 FACS 分析方法, 其能够诱导:

i) 在 HT29 细胞上至少 50%的 IGF-IR 降解, 和/或

ii) 在 MCF-7 细胞上至少 65%的 IGF-IR 降解。

在另一实施方案中, 根据本发明的抗体, 或其一种功能片段的特征在于, 它能够以至少等于 1 nM 的 IC_{50} 以及针对 IGF1 和 IGF2 试验分别优选至少 0.7 和 0.5 nM 的 IC_{50} 抑制由 IGF1 和 IGF2 诱导的 MCF-7 细胞的体外增殖。

根据本发明的抗体, 或其一种功能片段的特征还在于, 它能够抑制肿瘤细胞系的体内生长。

根据本发明的抗体优选为特异性单克隆抗体, 尤其是鼠、嵌合或者人源化来源的, 其可以根据本领域技术人员熟知的标准方法而获得。

通常, 对于制备单克隆抗体其功能片段, 尤其是鼠源的而言, 可以参照在手册“抗体 (antibodies)” (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) 中具体描述的技术, 或者参照 Kohler 和 Milstein 所述从杂交瘤制备的技术 (Nature, 256:495-497, 1975)。

例如, 可以从用 IGF-IR 或其包含有表位 (由本发明所述单克隆抗体特异性识别的表位) 的一种片段免疫的动物细胞获得本发明的单克隆抗体。尤其可以根据通常的操作方法, 通过以包含于 cDNA 序列中编码

IGF-IR 的核酸序列开始的遗传重组方法或者通过从包含有 IGF-IR 肽序列的氨基酸序列开始的肽合成方法，产生所述 IGF-IR 或其一种所述片段。

例如，本发明的单克隆抗体可以在亲和柱上被纯化，IGF-IR 或其一种片段（其包含由本发明所述单克隆抗体特异性识别的表位）已被预先固定在所述柱上。更具体地，可以通过在蛋白质 A 和/或 G 上色谱纯化所述单克隆抗体，在该色谱纯化之后可以跟随或者不跟随离子交换色谱，其目的在于去除残留的蛋白质污染物以及 DNA 和 LPS，其本身跟随或不跟随 Sepharose 凝胶排阻色谱，其是为了去除由于存在二聚体或者其它多聚体所致的潜在聚集物。以甚至更优选的方式，所有这些技术可以同时或者相继使用。

嵌合或者人源化抗体同样包括在本发明的抗体范围内。

嵌合抗体意指含有源于特定物种抗体的天然可变（轻链和重链）区并且与对于所述特定物种而言为异源物种抗体的轻链和重链恒定区相组合的抗体。

可以通过应用遗传重组技术制备本发明的嵌合型抗体或者它们的片段。例如，可以通过克隆含有启动子和根据本发明的编码非人的尤其是鼠的单克隆抗体的可变区的序列来产生嵌合抗体。例如，由该重组基因编码的本发明嵌合抗体将是鼠-人嵌合体，该抗体的特异性由源于鼠 DNA 的可变区决定并且它的亚型由源于人 DNA 的恒定区所确定。例如，对于制备嵌合抗体的方法而言，可以参照文献 Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988)。

人源化抗体意指含有源于非人起源抗体的 CDR 区的抗体，该抗体分子的其它部分源于一种（或者源于多种）人抗体。此外，可以修饰骨架（被称为 FR）片段的一些残基，从而保留结合的亲和力（Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyn et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988）。

可以通过本领域技术人员熟知的技术（比如，例如在以下文献中所描述的 Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992; 或者 Bebbington et al.,

Bio/Technology, 10:169-175, 1992) 制备本发明的人源化抗体或者它们的片段。本发明的这些人源化抗体优选用于体外诊断方法、或者体内预防性和/或治疗性处理的用途。本领域技术人员公知的其它人源化方法有, 例如, 由 Protein Design Lab (PDL) 在专利申请 EP 0 451 261、EP 0 682 040、EP 0 9 127、EP 0 566 647 或者 US 5,530,101、US 6,180,370、US 5,585,089 和 US 5,693,761 中描述的 “CDR 嫁接” (CDR Grafting) 方法。还可以涉及以下专利申请: US 5,639,641、US 6,054,297、US 5,886,152 和 US 5,877,293。本发明的抗体功能片段具体意指抗体片段, 比如 Fv、scFv (sc 指单链)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 片段或者双功能抗体 (diabody)、或者通过化学修饰而使半衰期时间增加的任何片段, 所述化学修饰比如添加聚(亚烷基)二醇比如聚乙二醇 (“PEG 化”) (PEG 化的片段被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 或者 Fab'-PEG) (“PEG” 指聚乙二醇), 或者通过掺入脂质体, 所述片段具有本发明序列 SEQ ID No. 1、2、3、4、5 或 6 的至少一种特征性 CDR, 并且尤其地它能够以通常方式发挥其来源抗体的即使一部分活性, 比如尤其是识别和结合 IGF-IR 的能力, 如果需要的话, 以及抑制 IGF-IR 的活性。

优选地, 所述功能片段的组成为或者包含其来源抗体的重链可变区或者轻链可变区的部分序列, 所述部分序列足以保持与其来源抗体相同的结合特异性以及足够的亲和力, 优选至少等于其来源抗体针对 IGF-IR 的亲合力的 1/100、更优选至少 1/10。

这种功能片段将包含其来源抗体序列的最少 5 个氨基酸, 优选 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

优选地, 这些功能片段将是 Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、F(ab')、scFv-Fc 型或者双功能抗体的片段, 其通常具有与其来源抗体相同的结合特异性。根据本发明, 可以通过比如酶 (比如胃蛋白酶或者木瓜蛋白酶) 消化的方法和/或通过比如化学还原切割二硫键桥的方法从抗体 (如上述抗体) 开始获得本发明的抗体片段。以另一方式, 可以通过本领域技术人员同样所熟知的遗传重组技术或者通过肽合成方法 (例如自动肽合成仪, 比如由 Applied Biosystems 公司所提供) 等获得本发明所包括的抗体片段。

以更优选的方式, 本发明包括通过遗传重组或者化学合成获得的根

据本发明的抗体或者它们的功能片段，尤其是嵌合或者人源化抗体。

更具体地，根据本发明的一个优选实施方案，所述抗体的特征在于，它包含一种轻链，该轻链包含选自序列 SEQ ID No. 1、3 或 5 的互补性决定区 (CDR) 的至少一个 CDR 或者序列经最优比对后与序列 SEQ ID No. 1、3 或 5 具有至少 80%一致性的至少一个 CDR，或者所述抗体的特征在于，它包含一种重链，该重链包含选自序列 SEQ ID No. 2、4 或 6 的 CDR 的至少一个 CDR 或者序列经最优比对后与序列 SEQ ID No. 2、4 或 6 具有至少 80%一致性的至少一个 CDR。

在本说明书中，术语附着至抗体化合物或其序列的多肽、多肽序列、肽和蛋白质是可以互换的。

必须理解本发明不涉及天然形式的抗体，即是说，它们不是在其天然环境中，但是它们已经能够通过从天然来源中纯化而分离或获得，或者也可通过基因重组或化学合成获得，并且然后它们能够包含将进一步描述的非天然氨基酸。

CDR 区或 CDR 意思是指免疫球蛋白的重链和轻链的高变区，如 Kabat et al. 所定义 (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 以及以后版本)。存在三种重链 CDR 和三种轻链 CDR。根据情况，本文所用术语 CDR 或 CDRs 是为了指示这些区域之一、或者这些区域的几个或者甚至全部，所述区域包含通过抗体对抗原或其识别表位的亲和力而负责结合的大部分氨基酸残基。

对本发明来说，两种核酸或者氨基酸序列间的“一致性百分数”是指，在最佳比对 (最优比对) 后所获得的、待比较的两序列之间相同核苷酸或相同氨基酸残基的百分数，该百分数是纯粹统计学的并且两种序列间的差异随机分布并覆盖其全长。两种核酸或者氨基酸序列之间的序列比较通常是在以最优方式使它们匹配以后，通过比较这些序列而进行，所述比较能够通过区段或者通过“比较窗”实施。除了能够手工实施外，用于比较序列的最优比对，还能够通过 Smith 和 Waterman(1981) [Ad. App. Math. 2:482] 的局部同源性算法、通过 Needleman 和 Wunsch 的 (1970) [J. Mol. Biol. 48:443] 局部同源性算法、通过 Pearson 和 Lipman 的 (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] 相似性搜索方法、通过使用这些算法的计算机软件实施 (GAP、BESTFIT、FASTA

和 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, 或者通过 BLAST N or BLAST P 比较软件)。

通过比较以最优方式匹配的两种序列, 并且其中待比较核酸或氨基酸序列可以针对这两种序列间最优匹配的参考序列包含添加或者缺失, 从而确定两种核酸或者氨基酸序列之间的一致性百分数。一致性百分数如下计算: 通过确定两种序列间核苷酸或者氨基酸残基相同的一致性位置的数目, 通过将该一致性位置数目除以“比较窗”中的总位置数并将所得结果乘以 100, 而获得这两种序列之间的一致性百分数。

例如, 可以使用 BLAST 程序, “BLAST 2 sequences” (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), 该程序可以从网址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> 获得, 参数使用默认值 (尤其是对于参数 “open gap penalty”: 5, 和 “extension gap penalty”: 2; 所选择矩阵为例如该程序建议的矩阵 “BLOSUM 62”), 通过该程序直接计算待比较的两种序列间的一致性百分数。

通过与参考氨基酸序列具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的氨基酸序列, 优选那些相对于参考序列具有某些修饰的序列, 尤其是至少一个氨基酸的缺失、添加或替换、截短或延长。在替换一或多个连续或不连续氨基酸的情况下, 优选“等同”氨基酸替代被替换的氨基酸。表述“等同氨基酸”在此意思是指能够被基本结构的氨基酸之一所替换的任何氨基酸, 然而, 所述基本结构的氨基酸基本上不改变相应抗体的生物活性, 并且例如将稍后定义, 尤其是在实施例 1 中。

本发明的一些替代实施方案提供其中具有其它氨基酸序列修饰的抗 IGF-IR 抗体。例如, 可以期望来改善抗体的结合亲和性和/或其它的生物学特性。通过在抗 IGF-IR 抗体的核酸中引入适当的核苷酸变化或者通过肽合成来制备抗 IGF-IR 抗体的氨基酸序列变体。这些修饰包括例如抗 IGF-IR 抗体的氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或替换。应用缺失、插入和替换的任何组合来获得最终的构建体, 只要最终构建体具有期望特性即可。氨基酸变化还可以改变抗 IGF-IR 抗体的翻译后加工, 比如改变糖基化位点的数目或者位置。

鉴定抗 IGF-IR 抗体的某些残基或者区域的优选诱变位置的有用方

法被称为“丙氨酸扫描诱变”，如 Cunningham 和 Wells 在 Science, 244:1081-1085 (1989)中所描述的。在此，鉴定残基或者靶残基组（例如，带电的残基，比如 arg、asp、his、lys 和 glu）并用中性或者带负电氨基酸（最优选丙氨酸或者多聚丙氨酸）替换以影响氨基酸与 IGF-IR 抗原的相互作用。随后，通过在替换位置进一步引入其它变异来改进那些证明对替换具有功能敏感性的氨基酸位置。因此，当用于引入氨基酸序列变异的位点被预先确定时，突变本身的特性并不需要被预先确定。例如，为了分析特定位点突变的性能时，在靶密码子或者区域上实施 ala 扫描或者随机诱变并且筛选表达的抗 IGF-IR 抗体变体的期望活性。

氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基-末端融合，其长度范围从一个残基至包含一百个或更多残基的多肽，以及单或多氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有 N-末端甲硫氨酰残基的抗 IGF-IR 抗体或者融合有细胞毒素多肽的所述抗体。所述抗 IGF-IR 抗体分子的其它插入变体包括在抗 IGF-IR 抗体的 N-或 C-末端融合有酶（例如，ADEPT）或者多肽（其增加所述抗体的血清半衰期）的融合体。

另一类型的变体是氨基酸替换变体。在抗 IGF-IR 抗体分子的这些变体的至少一个氨基酸残基被不同的残基所替换。对于替换诱变而言的最感兴趣位置包括高变区，此外 FR 转换（FR alteration）也在考虑之内。在表 1 中“优选替换”标题下显示保守性替换。如果这些替换导致生物学活性的变化，那么就可以引入更多的改变（在表 1 中被命名为“典型替换”，或者参照以下氨基酸类别的进一步描述），并且对该产物进行筛选。

表 1 氨基酸替换

<u>初始残基</u>	<u>典型替换</u>	<u>优选替换</u>
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

可以通过选择替换实现抗体生物学特性的显著变化，所述选择替换在它们对保持以下各项的影响方面有显著不同：(a) 在替换区域中的多肽骨架结构，例如片层或者螺旋构象，(b) 在靶位点处分子的电荷或者疏水性，或者 (c) 侧链大小 (the bulk of the side chain)。根据共同侧链的特性将天然残基分成以下几组：

- (1) 疏水的：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;
- (2) 中性亲水的：cys、ser、thr;
- (3) 酸性：asp、glu;
- (4) 碱性：asn、gln、his、lys、arg;
- (5) 影响链取向的残基：gly、pro; 和
- (6) 芳香族的：trp、tyr、phe。

非保守性替换使这些类别之一的成员与另一类别进行交换。

通常还可以用丝氨酸替换不参与维持抗 IGF-IR 抗体适当构象的任

何半胱氨酸残基,从而改进分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反地,可以向抗体加入半胱氨酸键以改善它的稳定性(尤其在所述抗体是抗体片段比如 Fv 片段的情形)。

替换变体的尤其优选类型包括替换亲本抗体(例如人源化或者人抗体)高变区的一个或多个残基。通常,所选择用于进一步开发的所得变体将具有相对于亲本抗体(所述变体从该抗体产生)而言改进的生物学特性。用于产生这种替换变体的便捷方式包括应用噬菌体展示技术的亲和力成熟。简单地说,使几个高变区位点(例如,6-7个位点)突变以产生每个位点的所有可能氨基酸替换。因此,作为包装在每个颗粒内的与 M13 的基因 III 产物相融合的形式,从丝状噬菌体颗粒以单价方式展示由此产生的抗体变体。随后筛选噬菌体展示变体的如本文所公开的生物学活性(例如,结合亲和性)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可以实施丙氨酸扫描诱变以鉴定明显有助于抗原结合的高变区残基。作为替代或者除此之外,分析抗原抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和人 IGF-IR 之间的接触点可以是有益的。根据本文详述的技术,这些接触残基和邻近残基是候选的替代。一旦产生这类变体,根据本文所述筛选这些变体集合并且可以选择在一个或多个相关测定中具有优越特性的抗体用于进一步的开发。

抗体另一类型的氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化模式。改变意指抗体中缺失了一个或多个糖类部分,和/或添加抗体中本来没有的一个或多个糖基化位点。

抗体的糖基化通常是 N-连接的或者 O-连接的。N-连接表示糖类部分连接于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸以外的任何氨基酸)是将糖类部分经酶连接至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,在多肽中存在这些三肽序列的任一种就产生潜在的糖基化位点。O-连接糖基化表示将糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或者木糖连接至羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸和苏氨酸,而且还可以应用 5-羟基脯氨酸或者 5-羟基赖氨酸。

通过改变氨基酸序列以使得抗体包含一个或多个上述三肽序列(针对 N-连接的糖基化位点)可以便捷地实现向所述抗体添加糖基化位点。也可以通过向原始抗体序列添加或替换一个或多个丝氨酸或者苏氨酸残基(针对 O-连接的糖基化位点)来实现所述改变。

通过本领域公知的多种方法制备编码所述抗 IGF-IR 抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在存在天然氨基酸序列变体的情形）或者通过对先前制备的抗 IGF-IR 抗体的变体或非变体形式实施寡核苷酸介导（或者位点指导的）的诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

有时，可能希望改善本发明抗体的效应功能，例如，从而增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）和/或抗体的补体依赖性细胞毒性（CDC）。这可以通过在抗体 Fc 区引入一个或多个氨基酸替换来实现。作为替代或者除此之外，可以在 Fc 区引入半胱氨酸残基，由此允许在该区中形成链间二硫键。由此产生的同源二聚体抗体可以具有改善的内化能力和/或增强的补体介导的细胞杀伤力和抗体依赖性的细胞毒性（ADCC）。见 Caron et al., *J. Exp Med.*, 176:1191-1195 (1992) 和 Shopes, B. J. *Immunol.*, 148:2918-2922 (1992)。也可以应用异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同源二聚体抗体，如 Wolff et al., *Cancer Research*, 53:2560-2565 (1993) 所述。或者，可以改造抗体，以使其具有双 Fc 区并且可以由此具有增强的补体溶血和 ADCC 能力。见 Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

同样地，为了增加抗体的血清半衰期，可以向抗体（尤其是抗体片段）掺入补救受体结合表位（salvage receptor binding epitope），如美国专利 No. 5,739,277 所述。如本文使用的，术语“补救受体结合表位”是指 IgG 分子（例如，IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或者 IgG₄）的 Fc 区的表位，其负责增加 IgG 分子的体内血清半衰期。

以一种更优选的方式，本发明涉及根据本发明的抗体或其一种功能片段，其特征在于，它包含一种重链，该重链包含序列 SEQ ID No. 2、4 和 6 的三个 CDR 的至少两个或者三个，或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 2、4 和 6 分别具有至少 80%一致性的序列的三个 CDR 的至少两个或者三个。

在一个更优选的实施方案中，本发明的目标是根据本发明的抗体或其一种功能片段，其特征在于，它包括一种轻链，该轻链包含序列 SEQ ID No. 1、3 和 5 的三个 CDR 的至少两个或者三个，或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 1、3 和 5 分别具有至少 80%一致性的序列的三个 CDR 的至少两个或者三个。

以一个更优选的方式,本发明的抗体或其一种功能片的特征在于,它包含一种重链,该重链包含序列 SEQ ID No. 2、4 和 6 的三个 CDR,或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 2、4 和 6 分别具有至少 80%一致性的序列的三个 CDR,并且它还包含一种轻链,该轻链包含序列 SEQ ID No. 1、3 和 5 的三个 CDR,或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 1、3 和 5 分别具有至少 80%一致性的序列的三个 CDR。

根据现有技术,已知对于重链的 3 个 CDR 并且更具体地为 CDR-H3 观察到 6 个 CDR 之间的最大可变异性(长度和组成)。因而,应当理解本发明抗体的优选典型 CDR 是重链的 3 个 CDR,即由序列 SEQ ID No. 2、4 和 6 编码的 CDR 并且更优选对应于由 SEQ ID No. 6 编码的 CDR-H3 的 CDR。

根据另一方面,本发明的一个主题是根据本发明的抗体或其一种功能片,其特征在于它不附着于或者不以显著方式附着于人胰岛素受体 IR。

以一个优选的方式,根据本发明的所述功能片将选自 Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 或者双功能抗体的片,或者通过化学修饰、尤其通过 PEG 化或者通过掺入脂质体而使半衰期增加的任何功能片。

根据另一方面,本发明涉及鼠杂交瘤,其能够分泌本发明的单克隆抗体,尤其是比如在 2005 年 6 月 23 日以 I-3466 号保藏在国家微生物保藏中心(CNCM, National Center of Microorganism Culture)(Institut Pasteur, Paris, France)的鼠源杂交瘤,该杂交瘤源于经免疫小鼠的 Balb/c 脾细胞与 Sp2O Ag 14 骨髓瘤细胞系的融合。

在本文中被称作 I-3466 的单克隆抗体或其一种功能片的特征在于,通过于 2005 年 6 月 23 日以 I-3466 号保藏在 CNCM 的杂交瘤分泌所述抗体,当然,该杂交瘤是本发明的一部分。

在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的鼠抗体或其一种功能片,其特征在于,所述抗体包含一种轻链,该轻链序列包含氨基酸序列 SEQ ID No. 7 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 7 具有至少 80%一致性的序列,或/和在于它包含一种重链,该重链序列包含氨基酸

序列 SEQ ID No. 8 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 8 具有至少 80%一致性的序列。

根据另外的特定方面，本发明涉及根据本发明的嵌合抗体或者它的一个功能片段，其特征在于，所述抗体还包含源于对小鼠为异源物种（尤其是人）的抗体的轻链和重链恒定区，并且优选源于人抗体的轻链和重链恒定区分别是 κ 和 γ -1、 γ -2 或 γ -4 区。

在对应于同种型 IgG1 的一个特定实施方案中，所述抗体的补充特性是潜在地展示出如 ADCC（抗体依赖性细胞毒性）和/或 CDC（补体依赖性细胞毒性）的效应功能。

根据另外的特定方面，本发明涉及根据本发明的人源化抗体或其一种功能片段，其特征在于，所述抗体包含轻链和/或重链，其中所述轻链和/或重链的骨架片段 FR1-FR4 分别源于人抗体轻链和/或重链的骨架片段 FR1-FR4。

根据一个优选实施方案，根据本发明的人源化抗体或者它的一个功能片段的特征在于，所述人源化抗体包含一个轻链，该轻链包含氨基酸序列 SEQ ID No. 17 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 17 具有至少 80%一致性的序列，或/和在于它包含一个重链，该重链序列包含氨基酸序列 SEQ ID No. 18 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 18 具有至少 80%一致性的序列。

优选地，根据本发明的人源化抗体或者它的一个功能片段的特征在于，所述人源化抗体包含一个轻链，该轻链包含氨基酸序列 SEQ ID No. 17，并且在于它包含一个重链序列，该重链序列包含氨基酸序列 SEQ ID No. 18。

根据一个新的方面，本发明涉及分离的核酸，其特征在于它选自以下核酸：

- a) 编码本发明的抗体或其一种功能片段的核酸、DNA 或者 RNA；
- b) 如 a) 定义的核酸的互补核酸；
- c) 能够在高严谨条件下与核酸序列 SEQ ID No. 9、10、11、12、13 或 14 的至少一个 CDR 或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 9、10、11、

12、13 或 14 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列杂交的至少 18 个核苷酸的核酸；

d) 能够在高严谨条件下与核酸序列 SEQ ID No. 15 的至少轻链和/或核酸序列 SEQ ID No. 16 的重链或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 15 或 16 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列杂交的至少 18 个核苷酸的核酸；

e) 能够在高严谨条件下与核酸序列 SEQ ID No. 19 的至少轻链和/或核酸序列 SEQ ID No. 20 的重链或者经最优比对后与序列 SEQ ID No. 19 或 20 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列杂交的至少 18 个核苷酸的核酸。

核酸、核序列或核酸序列、多核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸序列、核苷酸序列，这些术语将在本说明书中无差异地使用，意思是指准确连接的核苷酸，其被修饰或未被修饰，其允许定义核酸片段或区域，包含或不包含非天然核苷酸，并且能够对应双链 DNA、单链 DNA 以及所述 DNA 的转录产物。

这里也必须应该理解，本发明不涉及在天然染色体环境即是说天然状态中的核苷酸序列。本发明涉及已经被分离和/或纯化的序列，即是说所述序列已经被直接或间接选择，例如通过拷贝，它们的环境至少已经被部分改变。从而，本发明也旨在指示通过例如宿主细胞的基因重组或者化学合成所获得的分离核酸。

经最优比对后与优选序列具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性百分率的核酸序列意指，相对于参照核酸序列具有某些修饰比如特别是缺失、截短、延长、嵌合融合和/或替换、尤其是点替换的核酸序列。优选涉及编码与参照序列相同的氨基酸序列的序列，这涉及到遗传密码的简并性，或者能够与参照序列特异性杂交的互补序列，优选在高严谨条件下，尤其是如以下定义的。

在高严谨度条件下的杂交表示选择温度条件和离子强度条件，使得它们允许维持两个互补 DNA 片段之间的杂交。作为实例，对于定义上述多核苷酸片段目的的杂交步骤的高严谨度条件，有利地是以下条件。

以两个步骤实施 DNA-DNA 或者 DNA-RNA 杂交：(1) 在 42℃下，

在含 5x SSC (1x SSC 对应 0.15 M NaCl + 0.015 M 柠檬酸钠溶液)、50 % 甲酰胺、7 % 十二烷基硫酸钠 (SDS)、10x Denhardt's、5 % 硫酸葡聚糖和 1 % 鲑精 DNA 的磷酸缓冲液 (20 mM, pH 7.5) 中预杂交 3 小时;

(2) 在取决于探针大小的温度下实际杂交 20 小时 (即: 对于探针大小 >100 个核苷酸, 42℃), 接着在 20℃ 在 2x SSC + 2 % SDS 中洗涤 20 分钟进行 2 次, 在 0.1x SSC + 0.1 % SDS 中洗涤 20 分钟进行 1 次。对于探针大小 >100 个核苷酸在 60℃ 下, 在 0.1 x SSC + 0.1 % SDS 中进行 30 分钟的最后洗涤。根据 Sambrook et al. 的教导 (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor), 对于更大或更小的寡核苷酸, 上述对于确定大小多核苷酸的高严谨度杂交条件可以被本领域技术人员进行适应性修改。

本发明同样涉及包含根据本发明核酸的载体。

本发明目的尤其在于包含根据本发明核苷酸序列的克隆和/或表达载体。

根据本发明的载体优选包含允许在确定的宿主细胞中表达和/或分泌所述核苷酸序列的元件。因此所述载体必须包含启动子、翻译起始和终止信号、以及适当的转录调节区。它必须能够以稳定方式在宿主细胞中维持, 并且能任选地具有指定所翻译蛋白质分泌的特定信号。作为所用宿主细胞的函数, 由本领域技术人员选择和优化这些不同元件。为此, 根据本发明的核苷酸序列可以被插入所选宿主的自主复制载体中, 或者是所选宿主的整合载体。

这些载体由本领域技术人员通过当前使用的方法制备, 并且通过标准方法可将所得克隆导入适当宿主中, 所述标准方法例如脂转染、电穿孔、热休克、或者化学方法。

根据本发明的载体例如是质粒或病毒来源的载体。它们可用于转化宿主细胞, 以克隆或表达根据本发明的核苷酸序列。

本发明也包含用根据本发明的载体转化或者包含根据本发明的载体的宿主细胞。

宿主细胞可以选自原核或者真核系统, 例如细菌细胞以及酵母细胞或者动物细胞尤其是哺乳动物细胞。也可以使用昆虫细胞或者植物细

胞。

本发明也涉及动物，人除外，其包含至少一种根据本发明转化的细胞。

根据另一个方面，本发明的主题是生产根据本发明的抗体或其功能片段之一的方法，其特征在于其包含以下步骤：

- a) 在培养基中和适当的培养条件下培养本发明的宿主细胞；和
- b) 从培养基或者所述培养细胞回收由此产生的所述抗体或其一种功能片段。

根据本发明转化的细胞可以被用于根据本发明制备重组多肽的方法。根据本发明以重组方式制备多肽的方法本身被包含在本发明中，所述方法特征在于其利用根据本发明的载体和/或由载体转化的细胞。优选在允许表达所述多肽的条件下培养由根据本发明的载体转化的细胞并回收所述重组肽。

正如所说，宿主细胞可以选自原核或者真核系统。具体而言，可以鉴定根据本发明的核苷酸序列，辅助在这些原核或真核系统中的分泌。因此，携带这种序列的根据本发明载体可以有利地被用于生产旨在被分泌的重组蛋白质。对此，这些感兴趣重组蛋白质的纯化将受益于以下事实：它们存在于细胞培养物的上清液中而不是在宿主细胞内部。

也可以通过化学合成制备根据本发明的多肽。这种制备方法也是本发明的主题。本领域技术人员已知化学合成方法，例如使用固相的技术（尤其见 Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed. (1984)）或者使用部分固相的技术、通过片段缩合或者通过经典的溶液中合成。通过化学合成获得并能够包含相应非天然氨基酸的多肽同样也包含在本发明中。

通过根据本发明的方法能够获得的抗体或其功能片段之一同样包含在本发明中。

根据第二实施方案，本发明涉及根据本发明的抗体比如如上所述的抗体，其特征在于，它还能够特异性结合人的酪氨酸激酶家族的受体和/或能够抑制该受体的酪氨酸激酶活性。

在第一实施方案中，这样的抗体由双特异性抗体组成，其包含能够特异性抑制 EGF 与人表皮生长因子受体 (EGFR) 结合的和/或抑制所述 EGFR 酪氨酸激酶活性的第二基序。在本发明的一个更优选实施方案中，所述第二抗 EGFR 基序是由鼠单克隆抗体 225、其嵌合衍生物 C225 或者源于此抗体 225 的任何人源化抗体产生的。

在第二实施方案中，这样的抗体由双特异性抗体组成，其包含能够特异性抑制由 HER2/neu 受体所调节活性的和/或抑制所述 HER2/neu 受体酪氨酸激酶活性的第二基序。在本发明的一个更优选实施方案中，所述第二抗 HER2/neu 基序是由鼠单克隆抗体 4D5 或 2C4 或者人源化抗体 Trastuzumab 或者 Pertuzumab 产生的。

在第三实施方案中，这样的抗体由双特异性抗体组成，其包含能够特异性抑制肝细胞生长因子 (HGF) 与 cMET 受体结合的和/或特异性抑制所述 cMET 受体酪氨酸激酶活性的第二基序。

最终，在最后的实施方案中，这样的抗体由双特异性抗体组成，其包含能够特异性抑制巨噬细胞刺激蛋白 (MSP) 与 RON 受体结合的和/或抑制所述 RON 受体酪氨酸激酶活性的第二基序。

根据本发明的另一实施方案，还考虑根据本发明的抗体能够与涉及肿瘤发生的任何种类受体 (比如，例如不限于 VEGFR、FGF (成纤维细胞生长因子)、PDGF (血小板衍生生长因子) 或者 CXCR4 或 2 (趋化因子受体 4 或 2 型)) 相互作用。

双特异性或者双功能抗体形成第二代单克隆抗体，其中两个不同的可变区在同一个分子中组合 (Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis, rev. 18:411-419)。在诊断领域和在治疗领域中已证明了它们的用途，这是由于它们募集新效应因子的功能或者靶向肿瘤细胞表面上几种分子的能力所致。可以通过化学方法 (Glennie MJ et al., 1987, J. Immunol., 139, 2367-2375; Repp R. et al., 1995, J. Hemat., 377-382) 或者体细胞法 (Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, PNAS 83, 1453-1457; Suresh M.R. et al., 1986, Method Enzymol., 121:210-228) 但同样地和优选地通过遗传工程技术 (其允许异二聚体化被加强并因此有利于纯化所寻找抗体的纯化过程 (Merchand et al., 1998 Nature Biotech., 16:677-681)) 获得这些抗体。

可以将这些双特异性抗体构建为完整的 IgG、双特异性 Fab'2、Fab'PEG 或者双功能抗体或者其它的双特异性 scFv, 以及同样的四价双特异性抗体或者存在有针对各个目标抗原的两个附着位点的抗体 (Park et al., 2000, Mol. Immunol., 37 (18): 1123-30) 或者其如上所述的片段。

除了由于生产和施用双特异性抗体比生产两种特异性抗体较省力所致的经济益处之外, 应用这样的双特异性抗体还具有降低治疗毒性的优点。这是因为应用双特异性抗体允许循环抗体的总量减少, 并因此降低可能的毒性。

在本发明的一个优选实施方案中, 双特异性抗体是二价或者四价抗体。

本发明同样涉及药物组合物, 其包含由本发明抗体或其一种功能片段组成的活性形式的化合物, 优选混合有赋形剂和/或药物可接受载体。

仍根据另一实施方案, 本发明同样涉及如上所述的药物组合物, 其包含至少一种第二化合物, 该第二化合物选自能特异性抑制 IGF-IR、EGFR、HER2/neu、VEGFR、cMET 和/或 RON 的酪氨酸激酶活性的化合物。

在本发明的第二优选方面中, 所述第二化合物选自分离的抗 EGFR、抗 IGF-IR、抗 HER2/neu、抗 VEGFR、抗 cMET 和/或抗 RON 抗体或者它们的功能片段, 其能够抑制由所述受体介导的增殖和/或抗凋亡和/或血管生成和/或转移弥散诱导活性。

根据本发明的另一实施方案, 所述组合物包含至少一种 IGF-IR、EGFR、HER2/neu、VEGFR、cMET 和/或 RON 的酪氨酸激酶活性的抑制剂, 作为用于同时、分开或者依次应用的组合物。

在另一优选实施方案中, 所述的受体的酪氨酸激酶活性的抑制剂选自衍生的天然试剂、二苯胺基邻苯二甲酰亚胺类化合物 (dianilinophthalimides)、吡唑并-或者吡咯并吡啶并嘧啶类化合物或者喹唑啉类化合物 (quinazolines)。这些抑制剂对于本领域的技术人员是众所周知的并且在文献 (Ciardiello F., Drugs 2000, Suppl. 1, 25-32) 中

有描述。

本发明的另一个补充实施方案是如上述的组合物，作为同时、分开或依次使用的组合产品，其还包含细胞毒性剂/细胞静止剂和/或分别对应于 IGF-I 和/或 EGF 受体的酪氨酸激酶活性的抑制剂。

“同时使用”被理解为意指在单个和同一药物形式中施用根据本发明组合物的两种化合物。

“分开使用”被理解为意指在同时、在不同的药物形式中施用根据本发明组合物的两种化合物。

“依次使用”被理解为意指各自在不同的药物形式中依次施用根据本发明组合物的两种化合物。

在常用方式中，根据本发明的组合物显著增加癌症治疗的功效。换句话说，通过施用细胞毒性剂，根据本发明的抗-IGF-IR 抗体的治疗作用以出乎意料的方式被增强。根据本发明的组合物产生的另一个主要的相应优点涉及使用较低功效剂量的活性成分的可能性，其允许避免或者降低次要作用出现的风险，尤其是细胞毒性剂的作用。

另外，根据本发明的这种组合物允许更快获得期望的治疗效果。

“抗癌治疗剂”或者“细胞毒性剂”意指当施用给对象时，治疗或者预防对象身体中癌症发生的物质。作为这类试剂的非限制性实例，它可以是烷基化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、有丝分裂抑制剂、染色质功能抑制剂、抗血管发生剂、抗雌激素、抗雄激素或者免疫调节剂。

这样的化合物有，例如，在引用的 2001 版 VIDAL 中关于癌学和血液学栏的“细胞毒素”的页上涉及的化合物，这些在该文献中引用的细胞毒性化合物在本文中被引用作为优选的细胞毒性剂。

更具体地，以下试剂是本发明优选的。

“烷基化剂”是指能够交联或者使任何分子（优选细胞内的核酸（例如，DNA））烷基化的任何物质。烷基化剂的实例包括氮芥比如二氯甲基二乙胺（mechlorethamine）、chlorambucol、苯丙氨酸氮芥、chlorydrate、哌泊溴烷、泼尼莫司汀、磷酸氢二钠（disodic-phosphate）

或者雌氮芥；oxazophorins 比如环磷酰胺、六甲蜜胺（altretamine）、曲磷胺、sulfofosfamide 或者异环磷酰胺；氮丙啶类（aziridines）或者吖丙啶类（imine-ethylenes）比如硫替派、三乙撑胺（triethylenamine）或者 altetramine；亚硝基脲类比如卡氮芥（carmustine）、链脲霉素、福莫司汀（fotemustin）或者洛莫司汀（lomustine）；烷基磺酸盐比如白消安（busulfan）、苏消安（treosulfan）或者英丙舒凡（improsulfan）；三氮烯类（triazenes）比如氮烯唑胺（dacarbazine）；或者铂类络合物比如顺铂、奥克赛铂（oxaliplatin）和卡波铂（carboplatin）。

“抗代谢物”是指通过干扰某些活性（通常为 DNA 合成）阻断细胞生长和/或代谢的物质。抗代谢物的实例包括氮甲蝶呤、5-氟尿嘧啶、2-脱氧氟尿苷（floxuridine）、5-氟脱氧尿苷、卡培他滨（capecitabine）、阿糖胞苷、氟阿糖腺苷（fludarabine）、胞嘧啶阿拉伯糖苷、6-巯基嘌呤（6-MP）、6-巯鸟嘌呤（6-TG）、氯脱氧腺苷（chlorodesoxyadenosine）、5-氮胞苷、吉西他滨（gemcitabine）、克拉屈滨（cladribine）、脱氧柯福霉素（deoxycoformycin）和喷妥司汀。

“抗肿瘤抗生素”是指可以防止或者抑制 DNA、RNA 和/或蛋白质合成的化合物。抗肿瘤抗生素的实例包括阿霉素、道诺红菌素（daunorubicin）、黄胆素（idarubicin）、戊柔比星、米托蒽醌（mitoxantrone）、放线菌素 D、光神霉素、普卡霉素（plicamycin）、丝裂霉素 C、博莱霉素和甲基苄肼。

“有丝分裂抑制剂”阻止细胞周期和有丝分裂的正常进程。通常，微管抑制剂或者紫杉醇化合物（taxoides）比如紫杉醇（paclitaxel）和紫杉特尔（docetaxel）能够抑制有丝分裂。长春花属生物碱（vinca alkaloid）比如长春茂碱、长春新碱、去乙酰长春酰胺（vindesine）和长春瑞滨（vinorelbine）也能够抑制有丝分裂。

“染色质功能抑制剂”或者“拓扑异构酶抑制剂”是指抑制染色质建构蛋白（modeling proteins）正常功能的物质，比如拓扑异构酶 I 或者拓扑异构酶 II。染色质功能抑制剂的实例包括，针对拓扑异构酶 I 的喜树碱和其衍生物比如托泊替康（topotecan）或者伊立替康（irinotecan）和针对拓扑异构酶 II 的依托泊苷（etoposide）、磷酸依托泊苷（etoposide phosphate）和替尼泊苷（teniposide）。

“抗血管发生剂”是指抑制血管生长的任何药物、化合物、物质或者试剂。示例性抗血管发生剂包括但不限于雷佐生 (razoxin)、马立马司他 (marimastat)、巴马司他 (batimastat)、prinomastat、tanomastat、伊洛马司他 (ilomastat)、CGS-27023A、卤夫酮 (halofuginon)、COL-3、新伐司他 (neovastat)、BMS-275291、萨利多胺 (thalidomide)、CDC 501、DMXAA、L-651582、鲨胺、内皮抑素 (endostatin)、SU5416、SU6668、干扰素- α 、EMD121974、白介素-12、IM862、血管生成抑制素和 vitaxin。

“抗雌激素”或者“抗雌激素剂”是指降低、拮抗或者抑制雌激素作用的任何物质。抗雌激素剂的实例有他莫西芬、托瑞米芬 (toremifene)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、iodoxyfene、阿纳曲唑 (anastrozole)、来曲唑 (letrozole) 和依西美坦 (exemestane)。

“抗雄激素”或者“抗雄激素剂”是指降低、拮抗或者抑制雄激素作用的任何物质。抗雄激素的实例有氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、sprironolactone、醋酸环丙孕酮 (cyproterone acetate)、非那雄胺 (finasteride) 和甲氧咪呱 (cimetidine)。

免疫调节剂是刺激免疫系统的物质。

免疫调节剂的实例包括干扰素、白介素比如阿地白介素 (aldesleukine)、OCT-43、denileukin diflitox 和白介素-2、肿瘤坏死因子比如 tasonermine 或者其它免疫调节剂比如香菇多糖、西佐喃、罗喹美克、匹多莫德 (pidotimod)、培加酶、胸腺喷丁、多聚 I:C 或者左旋四咪唑连同 5-氟尿嘧啶。

对于更多的细节，本领域的技术人员可以参照由“Association Francaise des Enseignants de Chimie Therapeutique”编辑并且题目为“traite de chimie therapeutique, vol. 6, Medicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edition TEC & DOC, 2003”的手册。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的作为组合产品的所述组合物的特征在于，所述细胞毒性剂与所述抗体化学偶联用于同时应用。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的所述组合物的特征在于，

所述细胞毒性剂/细胞生长抑制剂选自纺锤体抑制剂或者稳定剂，优选长春瑞滨（vinorelbine）和/或长春氟宁（vinflunine）和/或长春新碱。

为了促进所述细胞毒性剂和本发明所述抗体之间的偶联，尤其可以在待偶联的两个化合物之间引入间隔分子，比如聚亚烷基二醇如聚乙二醇，或者其它的氨基酸，或者在另一实施方案中，能够应用所述细胞毒性剂的衍生物，并已向其引入能够与本发明所述抗体反应的功能。这些偶联技术对于本领域的技术人员是众所周知的并且将不在本说明书中详述。

其它的EGFR抑制剂能够没有任何限制的由抗EGFR单克隆抗体C225 和 22Mab（ImClone Systems Incorporated）、ABX-EGF（Abgenix/Cell Genesys）、EMD-7200（Merck KgaA）或者化合物 ZD-1834、ZD-1838 和 ZD-1839（AstraZeneca）、PKI-166（Novartis）、PKI-166/CGP-75166（Novartis）、PTK 787（Novartis）、CP 701（Cephalon）、来氟米特（leflunomide）（Pharmacia/Sugen）、CI-1033（Warner-Lambert Parke-Davis）、CI-1033/PD 183、805（Warner-Lambert Parke-Davis）、CL-387、785（Wyeth-Ayerst）、BBR-1611（Boehringer Mannheim GmbH/Roche）、Naamidine A（Bristol-Myers Squibb）、RC-3940-II（Pharmacia）、BIBX-1382（Boehringer Ingelheim）、OLX-103（Merck & Co）、VRCTC-310（Ventech Research）、EGF 融合毒素（Seragen Inc.）、DAB-389（Seragen/Lilgand）、ZM-252808（Imperial Cancer Research Fund）、RG-50864（INSERM）、LFM-A12（Parker Hughes Cancer Center）、WHI-P97（Parker Hughes Cancer Center）、GW-282974（Glaxo）、KT-8391（Kyowa Hakko）或者“EGFR 疫苗”（York Medical/Centro de Immunologia Molecular）组成。

根据本发明另一个实施方案，如上述的组合物也可以包含另一种抗-HER2/neu 受体细胞外结构域的抗体化合物，作为用于同时、分开或者依次使用的组合产品，其旨在预防和治疗癌症，尤其是过表达所述HER2/neu 受体和受体 IGF-IR 和/或 EGFR 的癌症，例如尤其是乳癌。

尤其可以参考 Albanell et al.（J. of the National Cancer Institute, 93(24):1830-1831, 2001）和 Lu et al.（J. of the National Cancer Institute, 93(24):1852-1857, 2001）的出版物，其支持将抗-HER2/neu 抗体与根据本发明的抗-IGF-IR 抗体相组合的意外兴趣。

在一种具体方式中,根据本发明组合物的所述抗-HER2/neu 抗体是被称为 Trastuzumab (也被称为 Herceptin) 的抗体。

在另一个方面中,本发明涉及一种组合物,其特征在于一种、至少一种所述抗体或其功能片段之一与细胞毒性剂和/或放射性元素偶联。

优选所述毒素或者所述放射性元素能够抑制表达 IGF-IR 的细胞的至少一种细胞活性,在更优选的方式中,能够阻止所述细胞的生长或者增殖,尤其是能够完全灭活所述细胞。

还优选,所述毒素是肠细菌毒素,尤其是假单胞菌外毒素 A。

优选与所用抗体偶联用于治疗放射性元素(或者放射性同位素)是发射 γ 射线的放射性同位素,并且优选碘 ¹³¹、钇 ⁹⁰、金 ¹⁹⁹、钷 ¹⁰⁰、铜 ⁶⁷、铋 ²¹³、和锑 ²¹¹。发射 β 和 α 射线的放射性同位素也可以用于治疗。

与根据本发明至少一种抗体或其功能片段之一偶联的毒素或者放射性元素,意思是指允许所述毒素或者所述放射性元素结合至所述至少一种抗体的任何方式,尤其是通过两种化合物间的共价偶联,可以引入或不引入连接分子。

在允许以化学(共价)、静电或者非共价方式结合偶联物的全部或部分组分的试剂中,尤其要提及的是苯醌、碳二亚胺并且更尤其是 EDC (1-乙基-3-[3-二甲基氨丙基]-碳二亚胺盐酸盐)、二马来酰亚胺、二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)、N-琥珀酰亚胺基 S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)、具有一个或多个可与紫外线(U.V.)反应的叠氮苯基团的桥联剂,并优选 N-[4-(叠氮基水杨基氨基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)-丙酰胺(APDP)、N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、6-胍基-烟酰胺(HYNIC)。

另一种形式的偶联,尤其对于放射性元素而言,可以存在于使用双功能离子螯合剂。

在这些螯合剂中,可以提及来源于 EDTA(乙二胺四乙酸)或者 DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)的螯合剂,其已经被开发用于结合金属尤其是放射性金属、和免疫球蛋白。因此,为了增加配体金属络合物的稳定性和刚度,可以在碳链上用不同基团取代 DTPA 及其衍生物(Krejcerek et al., 1977; Brechbiel et al., 1991; Gansow, 1991; US

patent 4,831,175)。

例如，二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA) 及其衍生物，其已经以游离形式或者以与金属离子络合物的形式长期广泛用于医药和生物学中，具有与金属离子形成稳定螯合物的显著特性并且能与治疗或诊断兴趣的蛋白质如抗体偶联，以开发用于癌症治疗的放射性免疫偶联物 (Meases et al., 1984; Gansow et al., 1990)。

同样优选，根据本发明形成所述偶联物的所述至少一种抗体选自其功能片段，尤其是截除其 Fc 部分的片段、如 scFv 片段。

本发明还包含根据本发明的组合物用于制备药物的用途。

更具体而言，根据另一个实施方案，本发明涉及抗体或其功能片段之一、和/或组合物用于制备药物的用途，所述药物旨在预防或者治疗由 IGF-IR 的过表达和/或异常活化所诱导的疾病、和/或与由 IGF1 或 IGF2 与 IGF-IR 相互作用所介导的信号转导途径的过度活化相关的疾病。

仍根据另一优选实施方案，本发明涉及抗体或其一种功能片段和/或组合物用于制备预防或治疗疾病的药物的用途，所述疾病是由于 IGF-IR 的过表达和/或异常活化引起的，和/或与由 IGF2 与 IGF-IR 相互作用所介导信号的转导途径的过度活化有关的。

优选地，根据本发明的所述用途，其特征在于施用所述药物不诱导或者仅仅诱导与胰岛素受体 IR 抑制有关的轻微次级作用，即是说，由于存在所述药物抑制 IR 与其天然配体的相互作用，尤其是通过与所述药物与 IR 附着相关的竞争性抑制。

本发明还包含根据本发明的抗体优选人源化抗体或其功能片段之一、和/或组合物用于制备药物的用途，所述药物旨在抑制正常细胞向具有肿瘤特征细胞的转化，所述肿瘤细胞优选具有 IGF-依赖性、尤其是至少 IGF2-依赖性细胞。

本发明也涉及根据本发明的抗体优选人源化抗体或其功能片段之一、和/或组合物用于制备药物的用途，所述药物旨在抑制肿瘤细胞生长和/或增殖，所述肿瘤细胞优选具有 IGF-依赖性、尤其是至少 IGF2-依赖性细胞。

在通常方式中，本发明的一个主题是根据本发明的抗体优选人源化抗体或其功能片段之一、和/或组合物用于制备药物的用途，所述药物旨在预防或者治疗癌症，所述癌症优选表达 IGF-IR 和/或优选具有通过 IGF1 和/或 IGF2 与 IGF-IR 相互作用所介导信号转导途径的过度活化，例如 IRS1 的过量表达。

本发明的一个主题也是根据本发明的抗体优选人源化抗体或其功能片段之一、和/或组合物用于制备旨在预防或者治疗牛皮癣的药物的用途，所述牛皮癣的表皮过度增殖可以与 IGF-IR 的表达或过表达有关，和/或与 IGF-IR 与其天然配体(Wraight CJ. et al., Nat. Biotechnol., 2000, 18(5):521-526. 通过胰岛素样生长因子 I 受体反义寡核苷酸逆转牛皮癣中的表皮过度增殖) 和/或 EGFR 与其天然配体的相互作用所介导信号转导途径的过度活化有关。

本发明还涉及抗体或者其任何功能片段(优选人源化的) 和/或包含所述抗体的任何组合物用于制备治疗或者预防动脉粥样硬化的药物的用途。

在能够预防和/或治疗的癌症中，优选前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳癌、子宫内膜癌、结肠癌、多发性骨髓瘤或者卵巢癌或者其它任何过表达 IGF-IR 的癌症。

在一个更优选的实施方案中，由于置换 IGF2 的特定能力，本发明涉及根据本发明的抗体或者其片段用于预防、诊断或者治疗结肠癌的用途，因为已知该癌症尤其涉及 IGF2。

根据另一个方面，本发明的一个主题是与 IGF-IR 过表达或低表达、优选过表达、相关的疾病诊断方法，优选体外诊断方法，所述 IGF-IR 来源于被怀疑异常存在 IGF-IR 的生物样品，其特征在于所述生物样品与根据本发明的抗体或其功能片段之一相接触，如果必要，所述抗体可以被标记。

优选地，在所述诊断方法中与 IGF-IR 过表达相关的疾病是癌症。

所述抗体或其功能片段之一可以免疫偶联物或者标记抗体的形式存在，以便获得可检测和/或可定量的信号。

本发明的一个主题是体外诊断特征在于相对于正常情形而言 IGF-IR 异常表达的病理状况的方法，所述方法包括让怀疑含有 IGF-IR 的生物样品与本发明的抗体在有利于形成 IGF-IR/抗体复合物的条件下接触，并且检测所述复合物以指示在所述样品中存在所述 IGF-IR。在一个优选实施方案中，所述抗体以可检测的方式被标记。

在第一方面中，IGF-IR 的异常表达是 IGF-IR 的过表达。在第二方面中，IGF-IR 的异常表达是 IGF-IR 的欠表达 (underexpression)。

根据本发明的标记抗体或其功能片段包括，例如被称为免疫偶联物的抗体，例如其可以偶联酶或分子，所述酶例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、 α -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖淀粉酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶或者葡萄糖 6-磷酸脱氢酶，所述分子例如生物素、地高辛或者 5-溴脱氧尿苷。荧光标记物也可以偶联至根据本发明的抗体或其功能片段，并且尤其包括荧光素及其衍生物、荧光染料、罗丹明及其衍生物、GFP (GFP 指“绿色荧光蛋白”)、丹磺酰基、伞形酮等。在这些偶联物中，本领域技术人员可以通过已知方法制备本发明的抗体或其功能片段。它们可以被直接偶联到酶或荧光标记物，或者通过间隔基团或连接基团介导，例如聚醛如戊二醛、乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)，或存在偶联剂如上面提及用于治疗性偶联物的偶联剂。含荧光素类型标记的偶联物可以通过与异硫氰酸酯反应制备。

其他偶联物也可以包括化学发光标记如鲁米诺、二氧杂环丁烷类 (dioxetanes)，生物发光标记如萤光素酶和萤光素，也或者放射性标记如碘 ¹²³、碘 ¹²⁵、碘 ¹²⁶、碘 ¹³³、溴 ⁷⁷、镅 ^{99m}、铟 ¹¹¹、铟 ^{113m}、镓 ⁶⁷、镓 ⁶⁸、钐 ⁹⁵、钐 ⁹⁷、钐 ¹⁰³、钐 ¹⁰⁵、汞 ¹⁰⁷、汞 ²⁰³、镱 ^{99m}、镱 ¹⁰¹、镱 ¹⁰⁵、钐 ⁴⁷、铈 ^{121m}、铈 ^{122m}、铈 ^{125m}、铪 ¹⁶⁵、铪 ¹⁶⁷、铪 ¹⁶⁸、氟 ¹⁸、钇 ¹⁹⁹、碘 ¹³¹。通过直接或者通过螯合剂如上面提及的 EDTA、DTPA，本领域技术人员已知的将治疗性放射性同位素偶联至抗体上的现有方法可用于在诊断中可用的放射性元素。还可以提及的是通过氯胺 T 方法用 Na[I¹²⁵] 标记 [Hunter W.M. and Greenwood F.C., 1962, Nature 194:495]，也或者通过 Crockford et al. 的技术用镅 ^{99m} 标记 (US patent 4,424,200)，或者如 Hnatowich 所述通过 DTPA 附着 (US patent 4,479,930)。

因此，根据本发明的抗体或其功能片段可以用于检测和/或定量生

物样品中 IGF-IR 的过表达或欠表达、优选过表达的方法，其特征在于其包含以下步骤：

- a) 让生物学样品与本发明的抗体或其一种功能片段相接触；和
- b) 证明可能形成的 IGF-IR/抗体复合物。

在一个具体实施方案中，根据本发明的抗体或其功能片段可以用于检测和/或定量生物样品中的 IGF-IR 的方法，用于监测 IGF 依赖性癌症或者牛皮癣或粥样硬化的预防和/或治疗性处理的功效。

更通常地，根据本发明的抗体或其功能片段可以有利地用于必须以定性和/或定量方式观察 IGF-IR 表达的任何情况中。

优选地，生物样品由生物流体形成，例如人来源的血清、全血、细胞、组织样品或者活组织检查样品。

本发明的另一方面是用于预测前列腺细胞样品致癌潜力的诊断方法，其包括以下步骤：

- (a) 提供人前列腺组织的样品；和
- (b) 确定样品中存在 IGF-IR，所述步骤包括让所述样品与本发明的抗体在有利于形成 IGF-IR/抗体复合物的条件下接触，其中所述复合物的存在指示所述细胞在所述组织中有致癌性潜力。

在另一实施方案中，所述复合物的存在指示患者具有发生或发作特征在于所述 IGF-IR 过表达的病理疾病的风险。

本发明的一个目的还是跟踪治疗方案进程的方法，所述治疗方案设计用来减轻特征在于 IGF-IR 表达的异常表达的病理疾病，该方法包括以下步骤：

- (a) 分析来自对象的样品以确定在第一时间点的 IGF-IR 水平；
- (b) 分析在第二时间点的所述样品；和
- (c) 对在所述第二时间点的所述水平与在 (a) 中所确定水平进行比较作为对所述治疗方案效果的确定，其中在所述样品中 IGF-IR 水平的下

降可确定在所述患者中所述病理疾病的消退，或者 IGF-IR 水平的增加可确定在所述患者中所述病理疾病的进展。

为了实施这种检测和/或给药，可以使用任何方法或者常规测试。所述测试可以是竞争或者三明治测试，或者是本领域技术人员已知的依赖于抗体-抗原型免疫复合物形成的任何测试。根据本发明施用以后，抗体或其功能片段之一可以被固定或者标记。可以在本领域技术人员已知的很多支持物上实施固定。这些支持物尤其可以包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、或者天然或修饰细胞。这些支持物可以是可溶或者不可溶的。

作为实例，一种优选方法使用根据 ELISA 技术免疫酶方法、通过免疫荧光或放射免疫测定（RIA）技术或者等同技术。

因此，本发明也包含试剂盒或套装，其是实施由 IGF-IR 过表达或低表达所诱导疾病的诊断方法所必要的、或者实施检测和/或定量生物样品中 IGF-IR 过表达或低表达的方法所必要的，其特征在于所述试剂盒或者套装包含以下要素：

- a) 本发明的抗体或其一种功能片段；
- b) 任选地，用于形成有助于免疫反应的介质的试剂；
- c) 任选地，允许验证由免疫反应产生的 IGF-IR/抗体复合物的试剂。

本发明还涉及组合物作为根据本发明的组合产品用于制备药物的用途，所述药物旨在预防或者治疗癌症，尤其是一般处方所述细胞毒性剂或所述抗-HER2/neu 抗体的癌症，对该癌症所述肿瘤细胞表达或者过表达 IGF-IR。

本发明的另一个主题是根据本发明的抗体用于制备药物的用途，所述药物旨在将生物活性化合物特异性靶向至表达或过表达 IGF-IR 的细胞。

本文中生物活性化合物意思是指能够调节尤其是抑制细胞活性尤其是其生长、增殖、转录或者基因翻译的任何化合物。

本发明的另一个主题是包含根据本发明的抗体或其功能片段之一的体内诊断试剂，所述抗体优选被标记尤其是放射标记，及其在医学影像中的用途，尤其是用于检测与细胞表达或过表达 IGF-IR 相关的癌症。

本发明也涉及作为组合产品的根据本发明的组合物，或者涉及作为药物的根据本发明的抗-IGF-IR/毒素偶联物或放射性元素。

优选作为组合产品的根据本发明所述组合物或者所述偶联物，将与赋形剂和/或药用可接受的载体混合。

在本说明书中，药用可接受的载体意思是指进入药物组合物中而不激发次级反应的化合物或者化合物组合，并且其允许例如促进活性化合物的施用、增加其使用期限和/或体内功效、增加其在溶液中的溶解度或者改善其保存性能。这些药用可接受的载体是公知的并且将被本领域技术人员作为所选活性化合物的本性和施用模式的函数进行适应性修改。

优选地，通过系统途径施用这些化合物，尤其通过静脉途径、肌肉、皮内、腹膜内或者皮下途径、或者通过口服途径。在一种更优选方式中，包含根据本发明抗体的组合物将以依次方式几次施用。

可以根据确定适用于患者的治疗一般所考虑的标准来确定其施用模式、剂量和最优药物形式，这些标准例如患者年龄或者体重、其一般健康状况的严重性、对治疗以及所提及次级作用的耐受性。

本发明的其它特征和优点将与实施例和附图一起出现在说明书下面的连续部分中，其附图说明如下所示。

附图说明

图 1: 单克隆抗体 I-3466 对 [125 I]-IGF-1 结合 IGF-IR 的竞争。

作为配体浓度的函数，在半对数图上对 [125 I]-IGF-1 的特异性结合 (%) 作图。特异性结合的值是实施试验三次的平均值。

图 2: 单克隆抗体 I-3466 对 [125 I]-IGF-2 结合 IGF-IR 的竞争。

作为配体浓度的函数，在半对数图上对 [125 I]-IGF-2 的特异性结合 (%) 作图。特异性结合的值是实施试验三次的平均值。

图 3A 和 3B: I-3466 抗体对 IGF1 或者 IGF2 诱导的 MCF-7 生长的体外影响。

图 4A 和 4B: I-3466 Mab 对 IGF1 (图 4A) 或者 IGF2 (图 4B) 诱导的

MCF-7 细胞上 IGF-IR β 链的磷酸化的影响。

图 5A 和 5B: I-3466 Mab 对 IGF1 (图 5A) 或者 IGF2 (图 5B) 诱导的 HT29 细胞上 IGF-IR β 链的磷酸化的影响。

图 6A-6C: I-3466 在 DU145 (图 6A)、SK-ES-1 (图 6B)、HT29 (图 6C)、A549 (图 6D) 和 MCF-7 (图 6E) 异种移植肿瘤模型中的体内活性。

图 7: 小鼠 I-3466 (SEQ ID No. 7) 的和经 CDR 移植 I-3466 人源化的 (SEQ ID No. 20) 的轻链 (VL) 可变区氨基酸序列的比较。

符号* (星号) 表示对维持 CDR 环构象重要的残基, 符号# (井号) 表示在 VL/VH 界面上发现的保守残基。

图 8: 小鼠 I-3466 (SEQ ID No. 8) 的和经 CDR 移植 I-3466 人源化的 (SEQ ID No. 21) 的重链 (VH) 可变区氨基酸序列的比较。

符号* (星号) 表示对维持 CDR 环构象重要的残基, 符号# (井号) 表示在 VL/VH 界面上发现的保守残基。

图 9: 纯化的 I-3466 抗体的 SDS-PAGE 分析。图例如下:

M: 标志物,

泳道 1: I-3466 人源化可变区,

泳道 2: I-3466 小鼠可变区,

图 A: 还原 SDS-PAGE,

图 B: 非还原 SDS-PAGE。

小鼠和人源化 3466 的恒定区都是人的。

图 10: 生物传感器捕获测定的示意图。

抗恒定 Fc 部分的人 IgG1 Mab 共价地附着至 CM5 传感器表面上。固定有限量的待检测 Mab 并用来捕获分析物 hIGF-IR-ECD。分别用结合和解离率的常数 K_a 和 K_d 来表征 Mab 与分析物的结合。通过解离和结合率常数的比来计算平衡解离常数 (KD)。

图 11: 针对 5 个不同浓度的 hIGF-IR-ECD, IgG1 人源化 I-3466/hIGF-IR-ECD 复合物的结合和解离期的传感器结果图。

实施例 1: 鼠单克隆抗体 (MAb) 的产生和选择

为了产生特异性抗 IGF-IR 并且不识别 IR 的 MAb, 实施一个包括 6 个筛选阶段的方案。

它由以下阶段组成:

- 用人重组 IGF-IR 免疫小鼠, 从而产生杂交瘤,
- 对用作免疫的重组蛋白通过 ELISA 筛选培养上清液,
- 对 MCF-7 肿瘤细胞表面上过表达的天然受体通过 ELISA 检验阳性杂交瘤的所有上清液,
- 实施结合试验以选择特异性识别 IGF-IR 的抗体,
- 验证在此阶段选择的抗体能够在体外抑制由 IGF1 诱导的 MCF-7 细胞的增殖,
- 在裸鼠中确认根据对肿瘤 MCF-7 生长的影响而保留的候选物的体内活性。

所有这些不同的阶段和获得的结果将在实施例 1 中进行简要描述。

对于免疫阶段, 用 8 μ g 重组 IGF-IR 通过皮下途径注射小鼠两次。在脾细胞与鼠骨髓瘤 Sp2OAg14 细胞融合前 3 天, 小鼠通过静脉内注射接受 3 μ g 的重组受体。融合后 14 天, 在由重组 IGF-IR 致敏的平板上, 通过 ELISA 筛选杂交瘤的上清液。保留上清液为阳性的杂交瘤并在通过 FACScan 分析检验之前进行扩增, 从而确认产生的抗体同样能够识别天然 IGF-IR。

实施例 2: [125 I]-IGF1 和 [125 I]-IGF2 结合人 IGF-1 受体的抑制

制备膜裂解物

在补充有 10%胎牛血清的 DMEM 中培养用人 IGF-IR cDNA 稳定

转染的 NIH 3T3 细胞。通过刮除使其脱离后，通过离心进一步收集血清饥饿的细胞。用磷酸盐缓冲液清洗细胞沉淀并重悬在裂解缓冲液中：10 mM Tris-HCl pH 7.5 缓冲液，其含有蛋白酶抑制剂。将约 1 ml 缓冲液添加到 25×10^6 个细胞中。通过 3 个冻融循环进一步裂解细胞，接着在 1,900 rpm 条件下进行 30 次 Potter 均质器处理。在经超声处理后，在 +4℃ 通过 1,000 g 离心 15 分钟来去除核和大的细胞碎片。通过在 +4℃ 以 105,000 g 离心 1 小时来获得总细胞膜。在裂解缓冲液中清洗膜沉淀并在 +4℃ 以 105,000 g 离心 1 小时。终沉淀被重悬在 50 mM Tris-HCl 缓冲液中，该缓冲液包含 150 mM NaCl、0.5 % IGEPAL、0.5 % Triton X-100、0.25 % 去氧胆酸钠和蛋白酶抑制剂，并在 +4℃ 搅拌过夜。通过在 +4℃ 以 10,000 g 离心 10 分钟使不溶的物质从含有 hIGF-IR 的可溶提取物中分离。通过 BCA (bicinchoninic) 法测定分析膜裂解产物的蛋白质浓度，利用 Western 印迹分析 IGF-IR。

$[^{125}\text{I}]$ -IGF1 和 $[^{125}\text{I}]$ -IGF2 结合的测定

首先用商品单克隆抗体 17-69 (Neomarkers, Fremont, CA, USA) (已表明其识别 IGF-IR α 亚基) 包被在 Protein A FlashPlate® 96 孔微量培养板上 (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) 以固定 IGF-IR。向各个孔加入 200 μl 的溶于 PBS 的 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗体溶液，并在 +4℃ 孵育过夜。通过抽吸去除含未与蛋白质 A 结合的残余 17-69 的缓冲液。再添加 200 μl 的 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的膜裂解物并在室温下孵育 2 小时以固定 IGF-IR。通过抽吸去除未被捕获的蛋白质。对于竞争测定，在含有 50 mM Hepes pH 7.6、150 mM NaCl、0.05 % Tween 20、1 % 牛血清白蛋白和 1 mM PMSF 的结合缓冲液中，在存在从 1 pM 至 1 μM 的不同浓度的单克隆抗体 I-3466 或者配体 IGF1、IGF2 和胰岛素 (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) 的条件下测量 100 pM 的 $[^{125}\text{I}]$ -IGF1 (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) 或 $[^{125}\text{I}]$ -IGF2 (Amersham Biosciences, Saclay, France) 与固定的 IGF-IR 的结合。在室温下孵育板 2 小时，然后在 Packard Top Count 微板闪烁计数器上计数。在存在 1 μM IGF1 的条件下确定非特异性结合。应用单克隆抗体 9G4 (其不针对 hIGF-IR，但是特异性识别大肠杆菌的蛋白质) 作为小鼠 IgG1 亚型对照。

结果

作为配体浓度的函数，在半对数图上对 $[^{125}\text{I}]$ -IGF1 和 $[^{125}\text{I}]$ -IGF2

的特异性结合百分率作图。从获得的 S 形竞争曲线（图 1 和 2）图示确定以 50%（ IC_{50} ）抑制放射性配体结合所需的各种抑制剂的浓度。

IGF1 和 IGF2 配体有效地置换了 [^{125}I]-IGF1 与固定化 hIGF-IR 的结合，而胰岛素和亚型对照抗体 9G4 不能以低于 500 nM 的浓度抑制 [^{125}I]-IGF1 的结合（图 1）。单克隆抗体 I-3466 能够以 0.021 nM 的 IC_{50} （其比针对非放射性标记的 IGF1 所确定的 IC_{50} 低 30 倍）抑制 [^{125}I]-IGF1 的结合（图 1）。

此外，抗体 I-3466 还表现出 [^{125}I]-IGF2 对于固定化 hIGF-IR 的强结合抑制活性（图 2）。在该情形中，从竞争曲线推导出的 IC_{50} 值约为 0.1 nM。I-3466 的这种 IGF2 阻断活性近似于由 IGF2 诱导的抑制活性（ $IC_{50}=0.06$ nM）。这稍低于 IGF1 的抑制活性（ $IC_{50}=0.03$ nM）并明显大于胰岛素的抑制活性（ $IC_{50} \sim 200$ nM）。正如所预料的，对照抗体 9G4 没有显示出任何 IGF2 阻断活性。

实施例 3：I-3466 抗体对 IGF1 或者 IGF2 诱导的 MCF-7 生长的体外影响

如上面所指出的，多种肿瘤细胞过表达 IGF-IR，而且有报道在乳癌和结肠癌中的量非常显著，通过 IGF2（有时被写为 IGF-2、IGF-II 或者 IGFII）对该受体提供增殖信号。因此必须确保 MAb I-3466 能够同样抑制 IGF1 和 IGF2 诱导的 MCF-7 细胞的体外生长。为了这点，将 200 μ l 无血清培养基（无酚红 RPMI 培养基加 L-谷氨酰胺）中的细胞以 5×10^4 个细胞/孔的浓度接种在 96 孔板中。接种后 24 小时，在存在或者缺少 I-3466 或者鼠非中和性抗 IGF-IR 抗体（7G3）（用作亚型对照）的条件下，将终浓度 50 μ g/ml（6.6 nM）的 IGF1 或者 IGF2（终浓度 100 ng/ml（13.2 nM））添加至 MCF-7 细胞，再孵育约 52 小时。

在终浓度范围从 10 μ g/ml（66 nM）至 0.0097 μ g/ml（0.065 nM）的条件下检测抗体。随后，用 0.25 μ Ci 的 [3H]胸苷脉冲细胞 16 小时并通过液体闪烁计数定量掺入 DNA 的 [3H]胸苷的量。IGF-1 和 IGF-2 显著地刺激 MCF-7 细胞的生长（表 2）。

当用剂量逐渐增加的亚型对照抗体处理细胞时，没有观察到明显的抑制。

相反，当用剂量逐渐增加的 I-3466 抗体孵育细胞时，观察到对由

IGF1 (90%) 和 IGF2 (84%) 所诱导增殖的明显剂量依赖性的抑制, 其中 IC_{50} 分别为 0.7 nM 和 0.5 nM (表 2 和图 3A-3B)。

表 2

I-3466 抗体对 IGF1(A)或者 IGF2(B)诱导的 MCF-7 的生长的体外影响

A		B	
cpm		cpm	
单独的细胞	1449	单独的细胞	1877
IGF1 50 ng/ml	67356	IGF2 100 ng/ml	39541
7G3 0,0097 μ g/ml + IGF1	72144	7G3 0,0097 μ g/ml + IGF2	60902
7G3 0,0195 μ g/ml + IGF1	63200	7G3 0,0195 μ g/ml + IGF2	67617
7G3 0,039 μ g/ml + IGF1	53391	7G3 0,039 μ g/ml + IGF2	56688
7G3 0,078 μ g/ml + IGF1	56523	7G3 0,078 μ g/ml + IGF2	60787
7G3 0,156 μ g/ml + IGF1	46147	7G3 0,156 μ g/ml + IGF2	49111
7G3 0,312 μ g/ml + IGF1	54582	7G3 0,612 μ g/ml + IGF2	48619
7G3 0,625 μ g/ml + IGF1	53000	7G3 0,625 μ g/ml + IGF2	51277
7G3 1,25 μ g/ml + IGF1	58341	7G3 1,25 μ g/ml + IGF2	54369
7G3 2,5 μ g/ml + IGF1	51107	7G3 2,5 μ g/ml + IGF2	53564
7G3 5 μ g/ml + IGF1	45938	7G3 5 μ g/ml + IGF2	54188
7G3 10 μ g/ml + IGF1	34391	7G3 10 μ g/ml + IGF2	55125
I-3466 0,0097 μ g/ml + IGF1	63047	I-3466 0,0097 μ g/ml + IGF2	45066
I-3466 0,0195 μ g/ml + IGF1	56376	I-3466 0,0195 μ g/ml + IGF2	43890
I-3466 0,039 μ g/ml + IGF1	48403	I-3466 0,039 μ g/ml + IGF2	31063
I-3466 0,078 μ g/ml + IGF1	38986	I-3466 0,078 μ g/ml + IGF2	27852
I-3466 0,156 μ g/ml + IGF1	33595	I-3466 0,156 μ g/ml + IGF2	18115
I-3466 0,312 μ g/ml + IGF1	27966	I-3466 0,312 μ g/ml + IGF2	13708
I-3466 0,625 μ g/ml + IGF1	17166	I-3466 0,625 μ g/ml + IGF2	9400
I-3466 1,25 μ g/ml + IGF1	10791	I-3466 1,25 μ g/ml + IGF2	7465
I-3466 2,5 μ g/ml + IGF1	8281	I-3466 2,5 μ g/ml + IGF2	6210
I-3466 5 μ g/ml + IGF1	5721	I-3466 5 μ g/ml + IGF2	6128
I-3466 10 μ g/ml + IGF1	6823	I-3466 10 μ g/ml + IGF2	7427

实施例 4: I-3466 抑制 IGF1 和 IGF2 诱导的 IGF-IR β 链的磷酸化

在 20 ml 无酚红的 RPMI 中以 5×10^4 个细胞/ cm^2 ($75 cm^2$ 的板, COSTAR) 的量培养 MCF7 或者 HT29 细胞 24 小时, 所述 RPMI 中混有 5 mM 的谷氨酰胺、青霉素/链霉素 (分别为 100 U/100 μ g/ml) 和 10% 胎牛血清。在 PBS 中清洗三次后, 在无酚红培养基 (RPMI) 中孵育细胞 12 小时, 所述培养基不含有胎牛血清并混有 5 mM 谷氨酰胺、青霉素/链霉素、0.5 μ g/ml 牛血清白蛋白 (Sigma A-8022) 和 5 μ g/ml 转铁蛋白 (Sigma T8158)。

为了活化, 细胞首先与待检测的封闭抗体 (10 μ g/ml) 在 37 $^{\circ}$ C 孵

育 15 分钟, 随后加入 IGF1 或者 IGF2 再孵育 2 分钟。通过吸出孵育介质停止反应并将平板置于冰上。通过加入 0.5 ml 裂解缓冲液 (50 mM tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1 % Nonidet P40、0.5 % 脱氧胆酸钠) 来裂解细胞, 其中混有蛋白酶抑制剂 (每 50 ml 一片, Boehringer Ref: 1697 498) 和磷酸酶抑制剂 (Calbiochem Ref: 524625 (1/100))。刮除细胞并回收悬液并且置于混合器上于 4℃ 保持 1.5 小时。以 12,000 rpm 离心溶液 10 分钟 (4℃) 并且通过 BCA 定量上清液的蛋白质浓度。

将 500 µg 的细胞裂解物蛋白质与抗 IGF-IR (Santa cruz Ref: sc-713) 混合用于免疫沉淀并且置于混合器上, 于 4℃ 保持 1.5 小时。通过加入蛋白 A-琼脂糖 (Boehringer Ref: 1 134 515) 回收免疫沉淀物并于 4℃ 放置在混合器上过夜。琼脂糖珠用 1 ml 的裂解缓冲液清洗两次, 用清洗缓冲液 1 (50 mM tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.1 % Nonidet P40; 0.05 % 脱氧胆酸钠(Boehringer 1 332 597), 混合有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂) 清洗两次并用清洗缓冲液 2 (50 mM tris-HCl; 0.1 % Nonidet P40; 0.05 % 脱氧胆酸钠(Boehringer Ref: 1 332 597), 混合有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂 (1/100)) 清洗一次。免疫沉淀物被重悬于 Laemmli 缓冲液中, 加热至 100℃ 持续 5 分钟。通过聚丙烯酰胺 SDS 凝胶 (8 % Novex EC6015) 电泳分析上清液。将蛋白质转移至硝酸纤维膜上, 接着用偶联 HRP 的抗磷酸酪氨酸抗体 (BD transduction Labs PY20) 或者抗 IGF-IR β 链抗体 (Santa Cruz Ref: sc 713) 然后是偶联 HRP 的抗兔抗体进行免疫印迹。通过化学发光物 (Amersham RPN 2209) 接着通过在 Kodak X-mat AR 胶片上的放射自显影来显示印迹。

图 4A 和 4B 表示未经刺激的 (泳道 1, 图 A 和 B) 或者单独用 50 ng/ml IGF1 (泳道 2, 图 A) 或者 100 ng/ml IGF2 (泳道 2, 图 B) 刺激的 MCF-7 细胞。正如所料, 在 MCF-7 细胞中没有观测到 IGF-IR 的基础水平刺激, 而当 MCF-7 细胞与 IGF1 或者 IGF2 一起孵育时, 观测到 IGF-IR β 链的显著磷酸化。当细胞用 IgG1 亚型对照 (泳道 3, 图 A 和 B) 或者单独用 I-3466 抗体 (泳道 4, 图 A 和 B) 进行处理时没有观测到刺激, 这表明 I-3466 对 IGF-IR 没有表现出激动作用。当 I-3466 与 IGF1 或者 IGF2 一起添加时, 观测到对配体诱导的磷酸化的完全抑制 (泳道 5, 图 A 和 B)。被用作同种型对照的 9G4 抗体对 IGF1 或者 IGF2 诱导的磷酸化没有任何作用 (泳道 6, 图 A 和 B)。

观测到 I-3466 对用 IGF1 或者 IGF2 刺激的 HT29 细胞的同样抑制活性 (图 5A 和 5B)。这些结果与实施例 2 中描述的结果一致, 实施例 2 显示了 I-3466 能够从 IGF-IR 置换 IGF1 和 IGF2。

实施例 5: IGF-IR 的内化和降解研究

通过 FACS 分析来分析内化和降解。应用鼠生物素化的抗 IGF-IR 单克隆抗体 (Mab) (以后被称为 12B1 Mab) 以及与来自被 I-3466 抗体所识别抗原的不同表位的结合来实施内化研究。引入 9G4 Mab 作为亚型对照。在我们的实验室中制备这两种抗体。用胰蛋白酶处理汇合的 MCF-7 细胞并将来自每种细胞悬液的 1×10^6 个细胞接种于 96 孔板上的 FACS 缓冲液中。在 37℃, 用 IGF1 (50 ng/ml) 或者用 30 µg/ml 的 I-3466、9G4、mIgG1 孵育平板 4 小时。

单独用 FACS 缓冲液孵育的细胞用来确定 IGF-IR 表达的基础水平。

随后清洗细胞两次并且将 20 µg/ml 的生物素化 12B1 Mab 加入板中。为避免受体内化而在 4℃ 孵育 30 分钟后, 在 4℃ 清洗细胞 3 次并通过添加链亲和素 Alexa Fluor® 488 偶联物 (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands) 进行染色。对于降解试验, 在用生物素化 12B1 和链亲和素 Alexa Fluor® 488 偶联物染色细胞之前, 另外加入了细胞渗透性处理的步骤。

表 3 显示, 在孵育 4 小时后, I-3466 导致对 MCF-7 和 HT29 细胞上 IGF-IR 的下调。当细胞与 9G4 Mab (被用作亚型对照) 一起孵育时, 没有观测到下调。

表 3

应用 I-3466 抗体的 IGF-IR 的内化/降解试验

A-内化试验

细胞系 ID	检验的 Mab	MFI 12B1-mIgG1	%, 内化
MCF-7	PBS	247	86
	9G4	226	
	I-3466	31	
HT29	PBS	69	33
	9G4	63	
	I-3466	42	

B-降解试验

细胞系 ID	检验的 Mab	MFI 12B1-mIgG1	%, 降解
MCF-7	PBS	112	65
	9G4	105	
	I-3466	37	
HT29	PBS	34	52
	9G4	48	
	I-3466	23	

实施例 6: I-3466 Mab 对 DU145、SK-ES-1、HT29、A549 和 MCF-7 异种移植肿瘤模型的抗肿瘤作用

为探究 I-3466 抗体对体内肿瘤生长的活性, 应用 5 种异种移植肿瘤模型: 不依赖于雄激素的 DU145 前列腺癌、骨肉瘤 SK-ES-1、结肠癌 HT29、非小细胞肺癌 A549 和乳癌 MCF-7。为此目的, 对于 DU-145、SK-ES-1、HT29、A549 和 MCF-7, 分别用 2×10^6 、 5×10^7 、 5×10^6 、 10×10^6 和 5×10^6 个细胞对 6-8 周大的雌性无胸腺裸鼠进行皮下注射。对于 DU-145 和 SK-ES-1, 在细胞注射后 24 小时, 用 200 μg 的未纯化抗体处理小鼠。

一周重复处理两次。对于 HT29, 当肿瘤体积达到 49-59 mm^3 时开始处理, 一周 3 次用 0.5 mg 的纯化抗体对小鼠进行腹膜内注射。

对于 A549, 肿瘤初始体积介于 38-43 mm^3 , 对于 MCF-7 试验, 肿瘤初始体积在处理开始时介于 42-59 mm^3 。一周一次或两次评价肿瘤体积并通过以下公式进行计算: $\pi/6 \times \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{高度}$ 。

图 6A-6E 显示用非纯化抗体实施的部分结果, 其表明 I-3466 能够

明显地抑制 5 种检验细胞系的体内肿瘤生长。

实施例 7：人源化 I-3466 IgG1 抗体的克隆、制备和表征

PCR 扩增人源化抗体 I-3466 轻链和重链的化学合成可变区，并克隆至抗体表达载体，所述载体分别携带有人轻链 κ 和重链 IgG1 恒定区。PCR 引物含有 36 个核苷酸，其中 15 个核苷酸用于与载体重叠克隆区的融合内（IN-Fusion）退火和 21 个核苷酸用于与可变区的退火。确切的核苷酸序列显示如下：

用于轻链可变区克隆：

IF-人源化 I-3466-LCK-F (SEQ ID No. 21)

[5'-ACAGATGCCAGATGCGACATTGTGATGACCCAGTCC],

IF-人源化 I-3466-LCK-R (SEQ ID No. 22)

[5'-TGCAGCCACCGTACGCTTGATCTCCACCTTGGTGCC],

用于重链可变区克隆：

IF-人源化 I-3466-HCG1-F (SEQ ID No. 23)

[5'-ACAGGTGTCCACTCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT],

IF-人源化 I-3466-HCG1-R (SEQ ID No. 24)

[5'-GCCCTTGGTGGATGCGGAGGAGACTGTCACCAGGGT]

用 BmtI 和 FspI 消化载体，使载体线性化。根据销售商推荐的方案实施融合内反应（In-Fusion reaction）。通过测序验证所得克隆。应用轻链和重链质粒 DNA 转染人胚肾 293 细胞。收集含有所分泌抗体的培养基并浓缩。应用蛋白 A/G 柱亲和纯化抗体并浓缩，以及在 PBS 中透析。通过 OD280 nm 来确定蛋白质浓度并通过还原和非还原 SDS-PAGE 分析纯度（图 9）。

实施例 8：人源化 I-3466 IgG1 抗体的 BIACore 分析

设备和材料

BIAcore T100 仪器、CM5 生物传感器芯片、HBS-EP 缓冲液、乙酸缓冲液 (pH 5)、甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH 1.5)、胺偶联试剂盒都来自 BIAcore (Upsala, Sweden)。抗人 IgG Fc 来自 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, USA)，可溶性人胰岛素样生长因子-1 受体 (hIGF-IR) 胞外结构域 (ECD) 来自 R&D Systems (Minneapolis, USA)。

Biacore 测定

在 25℃ 以 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速实施所有试验。为准备 BIAcore 测定 (见图 10)，按照使用说明的描述应用胺偶联方法将抗人 IgG-Fc 抗体 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，溶于乙酸缓冲液，pH 5) 固定在羧甲基葡聚糖传感器芯片上 (CM5)。11042 和 11111 共振单位 (RU) 的抗 IgG Fc 抗体被分别连接于流动池 (Flowcells, FC) 1 和 3 上。以 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度将待检验的纯化 Mab 稀释于 0.5% P20，HBS-EP 缓冲液，并被注射至 FC3 上以达到 500-1000 RU。应用 FC1 作为参照池。特异性信号 (specific signals) 对应于在 FC2 对 FC1 上所获得信号的差异。在 90 秒期间，以 5 种不同浓度 (100、50、25、12.5 和 6.25 nM) 注射溶于 0.5% P20、HBS-EP 缓冲液的分析物 (可溶性 hIGF-IR，表观分子量 365 kDa)。从溶于 0.5% P20、HBS-EP 缓冲液的贮备液制备这些浓度物。在 10 分钟期间，监测分析物的解离阶段。还在相同条件下注射工作缓冲液 (Running buffer) 作为双对照。每个循环 (抗体 + hIGF-IR 注射) 后，通过注射 20-45 μl 的甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH 1.5) 使两个流动池再生。这样的再生足以去除所有在传感器芯片上捕获的 Mab 和 Mab/hIGF-IR 复合物。

结果

分别通过结合和解离率常数 k_a 和 k_d 表征 Mab 人源化 I-3466 与分析物 hIGF-IR-ECD 的结合。通过解离和结合率常数的比值来计算平衡解离常数 (KD)。在下表 4 中给出结果。在图 11 中显示对应于不同分析物浓度的传感器结果图。

表 4

IGF-IR Abs	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
IgG1 HI3466	1.84E+05	6.29E-05	3.42E-10

<110> 皮埃尔法布尔制药公司
利利亚纳·格奇
纳塔莉·科尔瓦亚

<120> 新抗IGF-IR抗体和其用途

<130> D23693

<150> FR 05/07829

<151> 2005-07-22

<150> US 60/701,622

<151> 2005-07-22

<160> 24

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Asn Asn Tyr Ile Met Ser
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 5
 Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Phe Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 6
 Asn Gln Leu Leu Thr Gly Met Ile Asn Pro Leu Thr Thr Pro Arg Ala
 1 5 10 15
 Trp Phe Thr Tyr
 20

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 7
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Leu Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 8
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 8
 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys

				85					90					95					
Thr	Arg	Asn	Gln	Leu	Leu	Thr	Gly	Met	Ile	Asn	Pro	Leu	Thr	Thr	Pro				
			100					105					110						
Arg	Ala	Trp	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser				
		115					120					125							

Ala

<210> 9
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 9
 aaatccagtc agagtctact cgacagtaga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 10
 aataactata tcatgtct 18

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 11
 tgggcatcca ctagggaatc t 21

<210> 12
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 12
 accattagtg gtggtggtag ttataccttc tatccagaca gtgtgaaggg a 51

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 13
 aagcaatctt ataatctggt cacg 24

<210> 14
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 14
 aatcaattac ttactgggat gatcaatccc ctgactacgc ctagagcctg gtttaacttac 60

<210> 15
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```
<400> 15
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact    60
atgaactgca aatccagtc gagtctactc gacagtagaa ccgaaagaa ctacttggct    120
tgggtaccagc agaagccagg acagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg    180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc    240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg    300
ttcacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa                                336
```

<210> 16
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```
<400> 16
gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctaaaactc    60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcaat aactatatca tgtcttgggt tcgccagact    120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggt gtggtagtta taccttctat    180
ccagacagtg tgaaggagcg attctccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat    240
ctgcaaataa gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt atttctgtac aaggaatcaa    300
ttacttactg ggatgatcaa tcccctgact acgcctagag cctgggtttac ttactggggc    360
caagggactc tggtcactgt ctctgca                                387
```

<210> 17
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗体, 轻链

```
<400> 17
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20          25          30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35          40          45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50          55          60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85          90          95
Ser Tyr Asn Leu Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105         110
```

<210> 18
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体, 重链

<400> 18

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20          25          30
Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85          90          95
Thr Arg Asn Gln Leu Leu Thr Gly Met Ile Asn Pro Leu Thr Thr Pro
100         105         110
Arg Ala Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115         120         125
Ser

```

<210> 19

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体, 轻链

<400> 19

```

gacattgtga tgacccagtc ccoctgactcc ctggctgtct ccoctgggcga gcgggccaacc 60
atcaactgca agtcctccca gtccctgctg gactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtaccagc agaagcctgg ccagccccc aagctgctga tctactgggc ctccaccogg 180
gagtcctggcg tgcctgaccg gttctctggc tctggctctg gcacagactt caccctgacc 240
atctcctccc tgcaggetga ggatgtggct gtctactact gcaagcagtc ctacaacctg 300
ttcacctttg gcggcggcac caaggtggag atcaag 336

```

<210> 20

<211> 387

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体, 重链

<400> 20

```

gaggtgcagc tggtggagtc tggcggcgac ctgggtgcagc ctggcggctc cctgcggctg 60
tcctgtgctg cctctggctt caccttcaac aactacatca tgcctgggt gcggcaggcc 120
cctggcaagg gcctggagtg ggtggccacc atctctggcg gcggctccta caccttctac 180
cctgactctg tgaagggccg gtccaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg ggctgaggac acagctgtct acttctgcac ccggaaccag 300
ctgctgacag gcatgatcaa cccoctgacc acccccggg cctgggtcac ctactggggc 360
cagggcaccc tggtgacagt ctccctcc 387

```

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体I-3466轻链扩增的IF-人源化I-3466-LCK-F引物

<400> 21

acagatgcc gatgacacat tgtgatgacc cagtcc 36

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体I-3466轻链扩增的IF-人源化I-3466-LCK-R引物

<400> 22

tgacgccacc gtacgcttga tctccacctt ggtgcc 36

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体I-3466重链扩增的IF-人源化I-3466-HCG1-F引物

<400> 23

acaggtgtcc actcggaggt gcagctggtg gagtct 36

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体I-3466重链扩增的IF-人源化I-3466-HCG1-R引物

<400> 24

gcccttggtg gatgcggagg agactgtcac cagggt 36

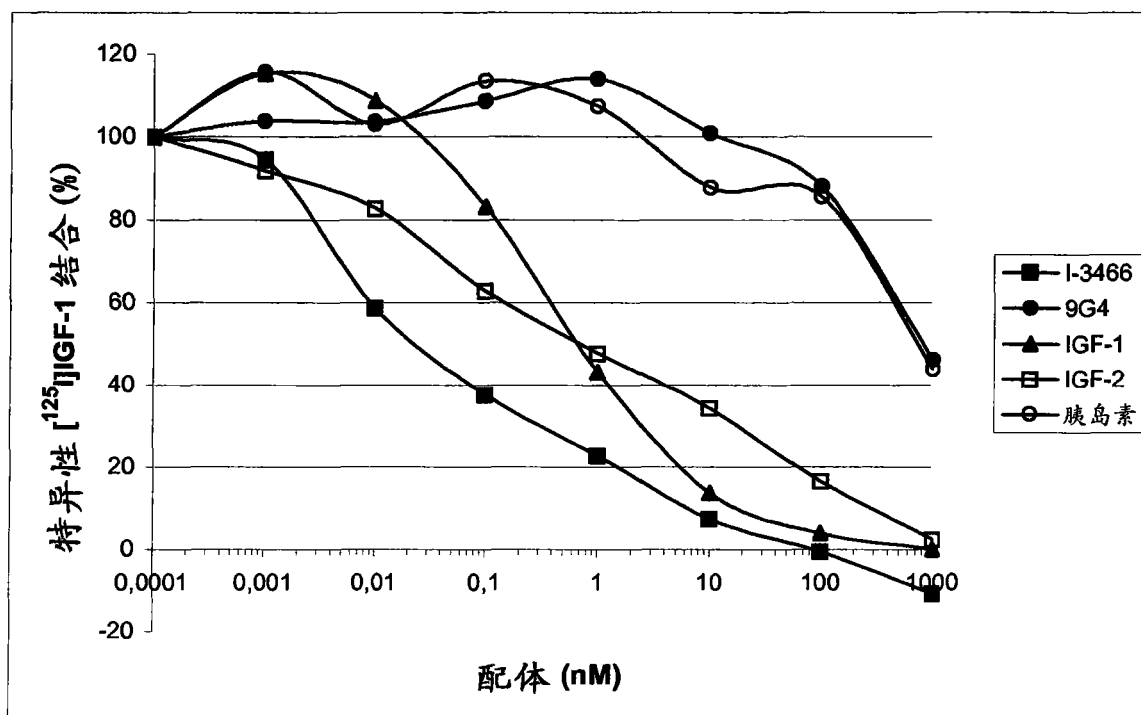


图1

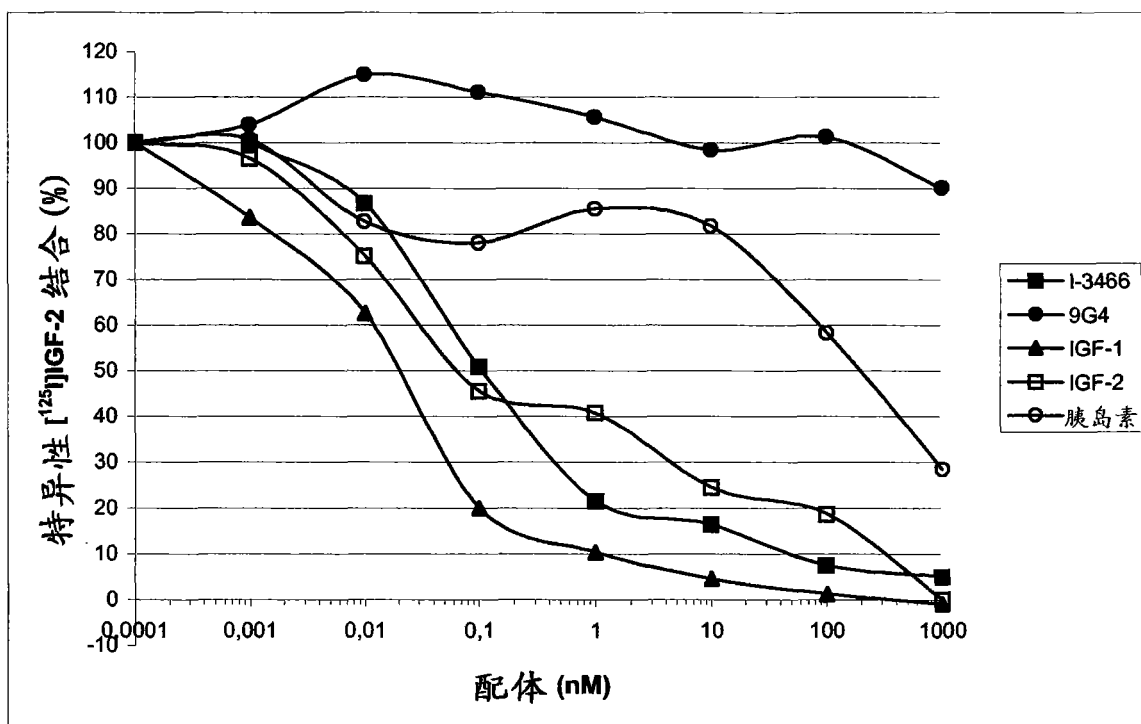


图2

IGF1-诱导的增殖

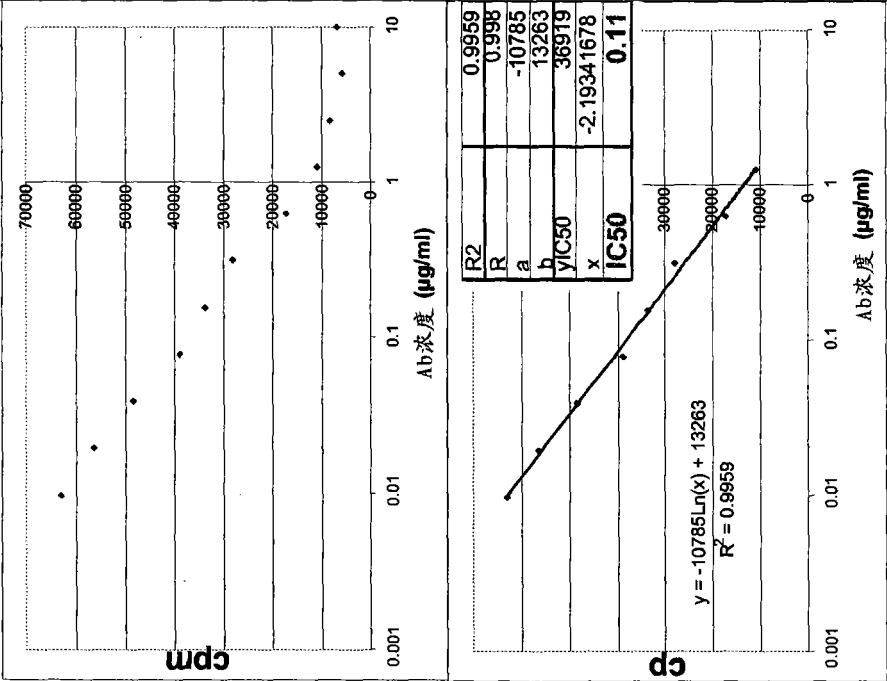


图3A

IGF2-诱导的增殖

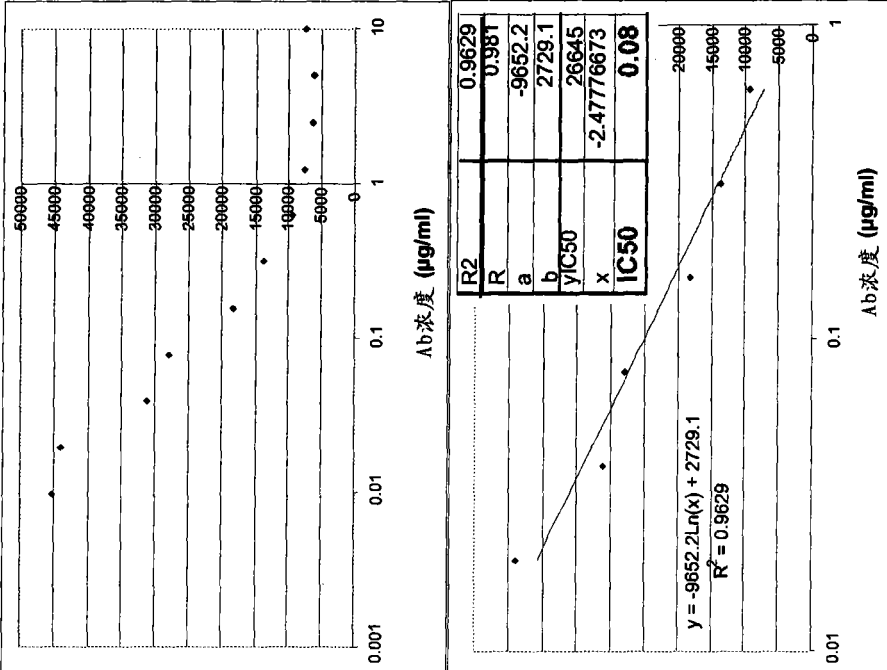


图3B

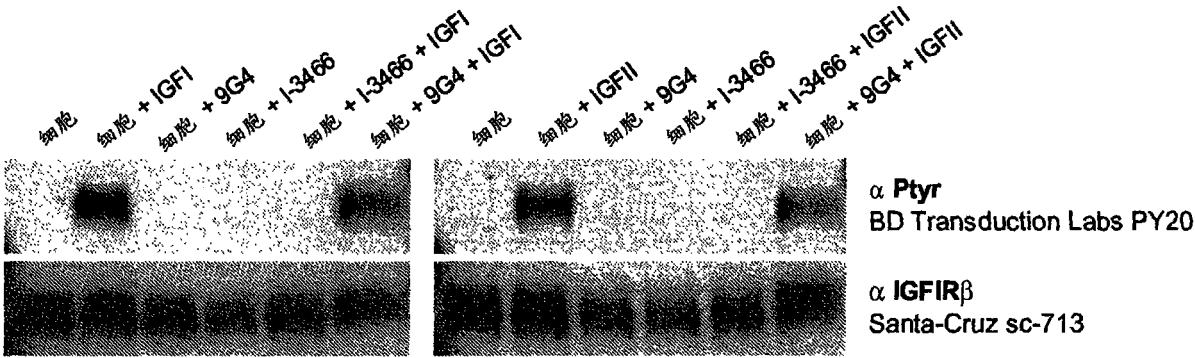


图 4A

图 4B

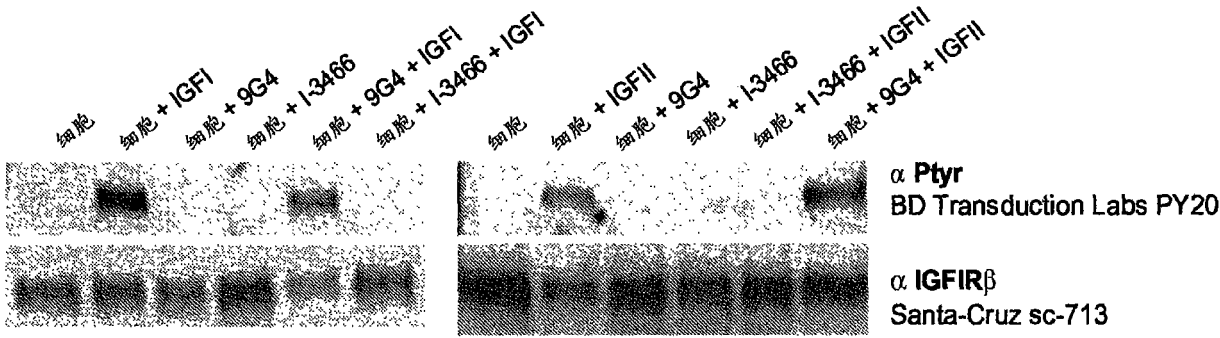


图 5A

图 5B

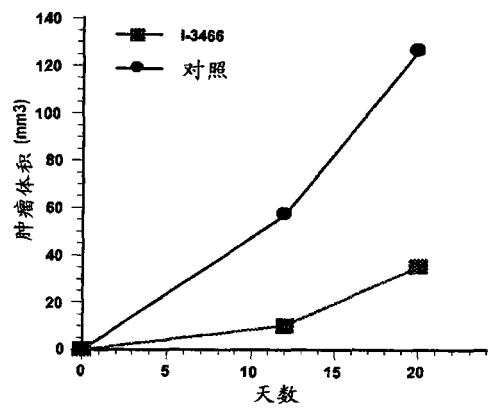


图 6A

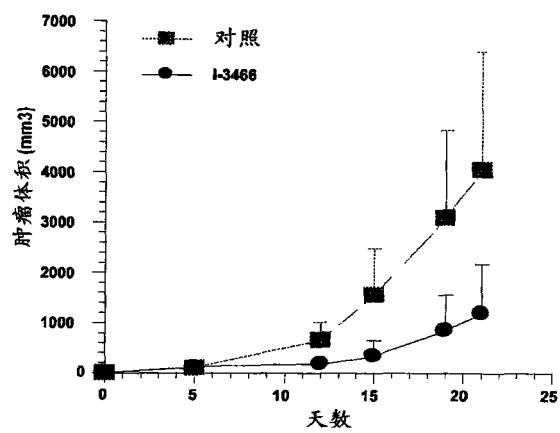


图 6B

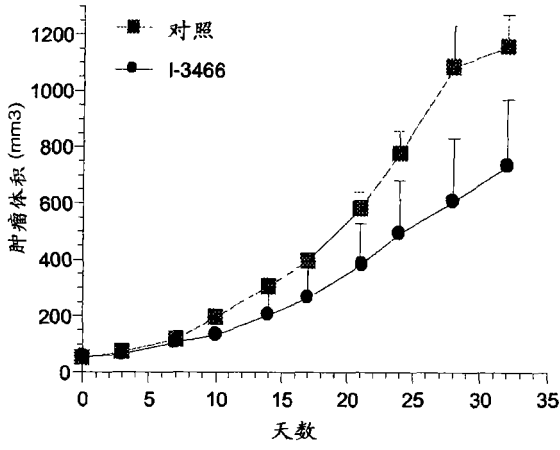


图 6C

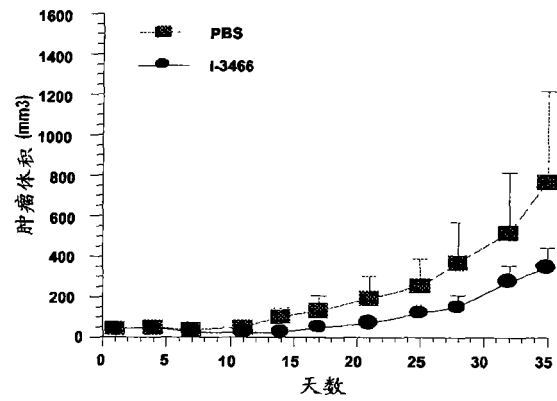


图 6D

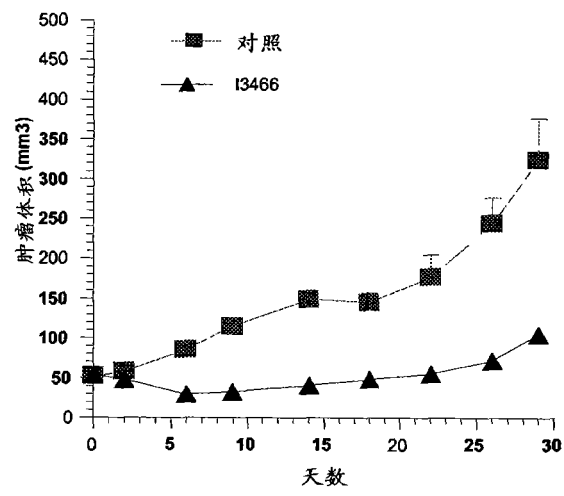


图 6E

小鼠 I-3466 LCVR P06313	1*		*	*		*#	#	#	#
VKII 3-1-(1) 011	DIVMSQSPSS	LAVSAGEKVT	MNCKSSQSLL	DSRTRKNYLA	WYQQKPGQSP				
人源化 I-3466 LCVR	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQS SVL	YSSNNKNYLA	WYQQKPGQPP				
	DIVMTQTPLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSQSLL	DSDDGNTYLD	WYLQKPGQSP				
	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSLL	DSRTRKNYLA	WYQQKPGQPP				
小鼠 I-3466 LCVR P06313	#	*	**	*	*		#	#	#
VKII 3-1-(1) 011	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDLA	VYYCKQSYNL				
人源化 I-3466 LCVR	KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQ QY DTI				
	QLLIYTLSYR	ASGVPDRFSG	SGSGTDFTLK	ISRVEAEDVG	VYYCMQRIEF				
	KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCKQSYNL				
小鼠 I-3466 LCVR P06313	*##	113							
VKII 3-1-(1) 011	FTFGGGTKLE	IK-							
人源化 I-3466 LCVR	FTFGGGTKVE	IKR							
	FTFGGGTKVE	IKR							

图 7

小鼠 I-3466 HCVR BAC02119	1		*	*	*	*	*#	#	#	#	50
VH3 1-3 3-30	EVMLVESGGD	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFN	NYIMSWVRQT	PEKRLEWVAT						
人源化 I-3466 HCVR	EVQLVESGGD	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFT	NYAMSWVRQA	PGKGLEWVSA						
	QVQLVESGGG	VVQPGSRSLRL	SCAASGFTFS	SYGMN SWVRQA	PGKGLEWVAV						
	EVQLVESGGD	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFN	NYIMSWVRQA	PGKGLEWVAT						
小鼠 I-3466 HCVR BAC02119	51	*		*				#	#	#	
VH3 1-3 3-30	ISGGGSYTFY	PDSVKGRFSI	SRDNAKNTLY	LQMSSLRSED	TAMFYCTRNO						
人源化 I-3466 HCVR	ISGGGSYTFY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKDP						
	ISYDGSNKKY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAK						
	ISGGGSYTFY	PDSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAMFYCTRNO						
小鼠 I-3466 HCVR BAC02119	101										129
人源化 I-3466 HCVR	LLTGMINPLT	TPRAWFTYWG	QGTLVTVSA								
	RIRLWLG---	-DPYYFDYWG	QGTLVTVSS								
	LLTGMINPLT	TPRAWFTYWG	QGTLVTVSS								

图 8

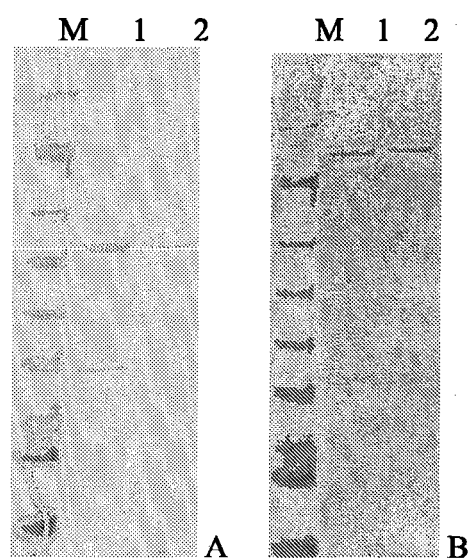


图9

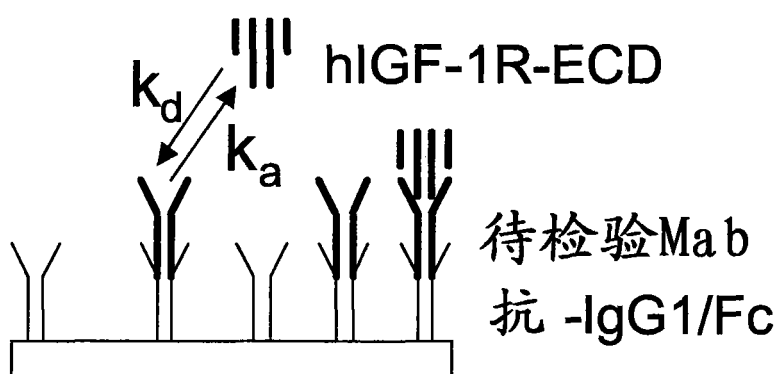


图10

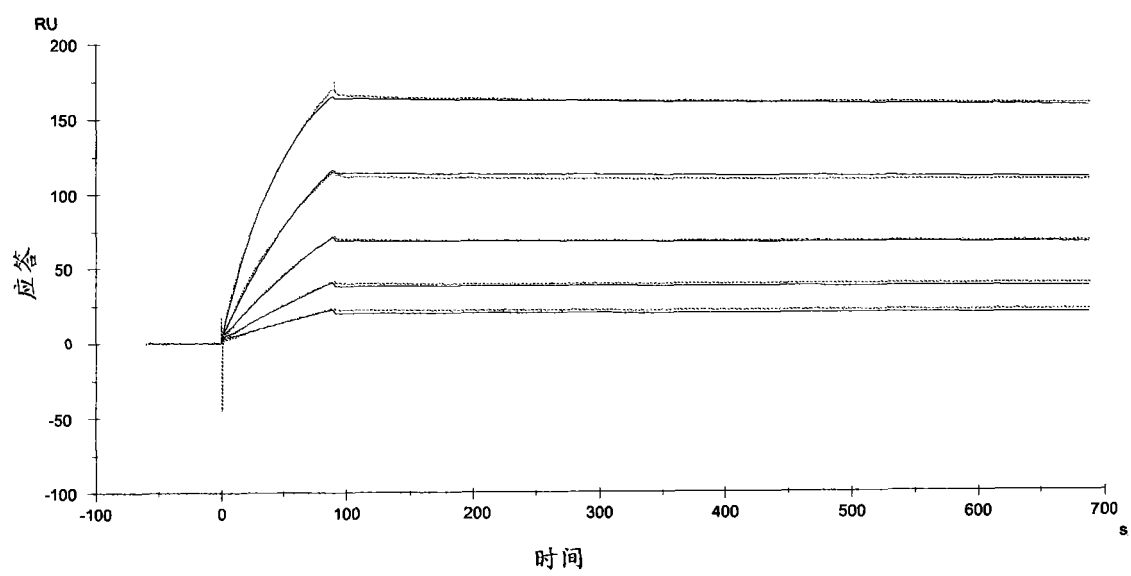


图 11

专利名称(译)	新抗IGF - IR抗体及其用途		
公开(公告)号	CN101238149A	公开(公告)日	2008-08-06
申请号	CN200680026553.8	申请日	2006-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	皮埃尔法布尔制药公司		
申请(专利权)人(译)	皮埃尔法布尔制药公司		
当前申请(专利权)人(译)	皮埃尔法布尔制药公司		
[标]发明人	利利亚纳格奇 纳塔莉科尔瓦亚		
发明人	利利亚纳·格奇 纳塔莉·科尔瓦亚		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 C12N5/20 C12N15/13 C12N15/63 A01K67/027 C12P21/08 A61K39/395 G01N33/53 A61P35/00		
CPC分类号	C07K16/2863 A61K2039/505 C07K2316/96 C07K2317/24 A61P9/10 A61P17/06 A61P35/00 A61P43/00 C07K2317/73 C07K2317/76		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	2005007829 2005-07-22 FR 60/701622 2005-07-22 US		
其他公开文献	CN101238149B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及新的抗体，其能够特异性结合人胰岛素样生长因子I受体 (IFG - IR)。本发明还包括这些抗体作为药物的用途，所述药物用于预防性和/或治疗性处理受IGF1和/或IGF2刺激、过表达IGF - IR的癌症、或者与所述受体过表达相关的任何疾病，以及用于诊断与IGF - IR和/或IGF - I/胰岛素杂合受体过表达相关疾病的方法或试剂盒。

