(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-535710
(P2010-535710A)
(43)公表日　平成22年11月25日(2010.11.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA	2G045
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B063
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4B064
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	T	4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 104 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-519215 (P2010-519215)
(86)(22)出願日　平成20年7月25日 (2008.7.25)
(85)翻訳文提出日　平成22年3月11日 (2010.3.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/009065
(87)国際公開番号　WO2009/017679
(87)国際公開日　平成21年2月5日 (2009.2.5)
(31)優先権主張番号　60/962,688
(32)優先日　平成19年7月31日 (2007.7.31)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　390023526
メルク・シャープ・エンド・ドーム・コーポレイション
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・０７０６５－０９０７、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・１２６
(71)出願人　591107942
ピエール　ファブル　メディカマン
フランス国、９２１００　ブロニュ、プラス　アベル　ガンス　４５
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞増殖性疾患の検出及び診断に有用なＩＧＦ－１Ｒ特異抗体

(57)【要約】
本発明はインスリン様成長因子Ｉ受容体（ＩＧＦ－ＩＲ）、好ましくはヒトＩＧＦ－ＩＲと特異的に結合する１２Ｂ１と呼ぶ哺乳動物抗体とその抗原結合部分に関する。本明細書に開示する抗体から誘導されるキメラ抗体、二重特異性抗体、誘導体化抗体、１本鎖抗体も含む。哺乳動物抗体をコードする核酸分子とその使用方法も開示する。これらの抗体を含有する医薬組成物と、ＩＧｆ－１Ｒの発現に関連する病的過増殖性腫瘍性疾患の治療及び診断用としての前記抗体及びその組成物の使用方法も含む。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
インスリン様成長因子Ｉ受容体（ＩＧＦ－ＩＲ）と特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分であって、少なくとも１個の軽鎖配列と少なくとも１個の重鎖配列を含み、前記軽鎖が配列番号１、２もしくは３に記載のアミノ酸配列から構成される群から選択される少なくとも１個の相補性決定領域（ＣＤＲ）、又は配列番号１、２もしくは３に記載の配列に対して少なくとも８０％の一致度をもつアミノ酸配列を含む少なくとも１個のＣＤＲを含み、前記重鎖が配列番号４、５もしくは６に記載のアミノ酸配列から構成される群から選択される少なくとも１個の相補性決定領域（ＣＤＲ）、又は配列番号４、５もしくは６に記載の配列に対して少なくとも８０％の一致度をもつアミノ酸配列を含む少なくとも１個のＣＤＲを含む前記抗体又はその抗原結合部分。
【請求項２】
前記部分がＦａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント及びＦｖフラグメントから構成される群から選択される請求項１に記載の抗原結合部分。
【請求項３】
前記軽鎖が配列番号７に記載のアミノ酸配列を含み、および、前記重鎖が配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
インスリン様成長因子Ｉ受容体（ＩＧＦ－ＩＲ）又は前記抗体の抗原結合部分と特異的に結合するモノクローナル抗体であって、抗体又は抗原結合部分が配列番号７に記載の軽鎖の可変領域に存在するＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３領域から構成される群から選択される少なくとも１個のＣＤＲのアミノ酸配列と、配列番号８に記載の重鎖の可変領域に存在するＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３領域から構成される群から選択される少なくとも１個のＣＤＲのアミノ酸配列を含む前記抗体又は抗原結合部分。
【請求項５】
国立微生物培養センター（ＣＮＣＭ，Ｃｅｎｔｒｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ ｄｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｄｅ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅ）（フランス、パリに所在のパスツール研究所）に寄託番号Ｉ－３５３８で寄託されたハイブリドーマ細胞株。
【請求項６】
前記細胞株が配列番号７に記載の軽鎖および、配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体を産生する請求項５に記載の細胞株。
【請求項７】
対象におけるＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患の診断方法又はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患の発症の予後判定方法であって、対象からのサンプルを請求項１に記載のモノクローナル抗体に接触させる段階と、モノクローナル抗体とサンプルの結合を検出する段階を含み、モノクローナル抗体とサンプルの結合が前記腫瘍形成の診断の指標となる前記方法。
【請求項８】
対象におけるＩＧＦ－ＩＲを発現する腫瘍の存在又は位置の検出方法であって、ａ）請求項１に記載の抗体又は抗原結合部分を対象に投与する段階と；ｂ）前記抗体の結合を検出する段階を含み、前記結合が腫瘍の存在又は位置の指標となる前記方法。
【請求項９】
ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する悪性病変の経過の予後判定方法であって、腫瘍細胞を含む疑いのある対象からサンプルを採取する段階と、前記サンプルを請求項１に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントとに接触させる段階を含み、抗体又はその抗原結合フラグメントとサンプル中の腫瘍細胞の結合が腫瘍の指標となり、前記対象における悪性病変の経過の予後を提供する前記方法。
【請求項１０】
ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連又は介在される腫瘍をもつ患者又は患者集団の治療法の選択方法であって、（ａ）患者の腫瘍が正常に比較してＩＧＦ－１Ｒ含有細胞を過剰発現する

ことが分かっているか否かを判定する段階と、（ｂ）患者の腫瘍が前記ＩＧＦ－１Ｒを過剰発現することが分かっている場合には治療法としてＩＧＦ－１Ｒ阻害剤を選択する段階を含む前記方法。

【請求項１１】

阻害剤が（ｉ）配列番号７に記載のアミノ酸を含む軽鎖可変領域に由来する１個以上のＣＤＲを含むヒトＩＧＦ－１Ｒと特異的に結合する単離抗体もしくはその抗原結合フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８に記載のアミノ酸を含む重鎖可変領域に由来する１個以上のＣＤＲ；又は（ｉｉｉ）ヒトＩＧＦ１Ｒと特異的に結合する単離１本鎖抗体（ｓｃｆｖ）である請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連又は特徴とする腫瘍性疾患を緩和するように設計された治療レジームの進行の追跡方法であって、

（ａ）対象からの生体サンプルを請求項１に記載の抗体と接触させることにより前記サンプルをアッセイし、第１の時点におけるＩＧＦ－１Ｒレベルを測定する段階と；

（ｂ）第２の時点におけるＩＧＦ－１Ｒレベルを測定する段階と；

（ｃ）前記治療レジームの効果の判定として前記第２の時点の前記レベルを（ａ）で測定したレベルに比較する段階を含む前記方法。

【請求項１３】

（ａ）ＩＧＦ－１Ｒポリペプチドを含む疑いのある試験組織サンプルと、（ｂ）同一組織種の対照正常組織サンプルにおけるＩＧＦ－１Ｒポリペプチドの発現の判定方法であって、試験及び対照組織サンプルを請求項１に記載の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体に暴露する段階と、前記サンプルの各々において前記ポリペプチドに対する前記抗体の相対結合を測定する段階を含む前記方法。

【請求項１４】

前記対照サンプルにおけるＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを定量し、正常ないし対照値を得る段階と、前記レベルを試験組織サンプルで得られたレベルと比較し、前記試験組織サンプル中のＩＧＦ－１Ｒの総発現レベルを求める段階を更に含む請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

骨肉腫、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫及び横紋筋肉腫から構成される群から選択される肉腫を示す患者の生存予後の判定方法であって、（ａ）前記患者に由来する癌細胞含有サンプルにおけるＩＧＦ－１Ｒポリペプチドのレベルを測定する段階と、（ｂ）前記サンプル中のＩＧＦ－１Ｒポリペプチドのレベルを正常組織からのＩＧＦ－１Ｒポリペプチドの参照レベルと比較する段階を含み、前記参照レベルに比較して低いＩＧＦ－１Ｒポリペプチドレベルが前記患者の生存増加に相関する前記方法。

【請求項１６】

ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患を示す疑いのある患者の予後評価方法であって、（ａ）腫瘍組織を含む疑いのある患者から採取した生体サンプル中に存在するＩＧＦ－１Ｒの濃度を測定する段階と；（ｂ）生体サンプル中に存在する同一種の正常非腫瘍組織に存在することが分かっているＩＧＦ－１Ｒポリペプチドの濃度範囲と段階（ａ）で測定したレベルを比較する段階と；（ｃ）段階（ｂ）の比較に基づいて前記患者の予後を評価する段階を含み、段階（ａ）における高レベルのＩＧＦ－１Ｒが侵襲性癌、従って予後不良の指標となる前記方法。

【請求項１７】

段階（ａ）の前に生体サンプルからの前記ＩＧＦ－１Ｒポリペプチドを精製する段階を更に含む請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

精製法がイムノアフィニティークロマトグラフィーである請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

腫瘍性疾患をもつ個体の予後又は対象におけるＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する病的過増殖性疾患に対する感受性の判定方法であって、ａ）個体の異なる状態で前記患者から採取

した生体サンプルにおけるＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを測定する段階と；ｂ）異なる状態におけるＩＧＦ－１Ｒの発現プロファイルを比較する段階を含み、初期状態に比較して後期状態の高レベルの発現が予後不良の指標となる前記方法。

【請求項２０】

対象におけるＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する病的過増殖性腫瘍性疾患の検出方法であって、ａ）第１の個体から採取した第１の組織サンプル中のＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを測定する段階と；ｂ）段階（ａ）で得られた前記レベルを前記第１の個体又は第２の非罹患個体から採取した正常組織サンプルのレベルと比較する段階を含み；ＩＧＦ－１Ｒの前記発現に差がある場合には第１の個体は前記病的過増殖性腫瘍性疾患をもつ可能性があると判断する前記方法。

【請求項２１】

前記差が正常組織に対するＩＧＦ－１Ｒの発現レベルの増加である請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

対象におけるＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患の発症、進行又は退縮の判定方法であって、

（ｉ）（ａ）対象から第１の生体サンプルを採取する段階と、

（ｂ）ＩＧＦ－１Ｒ発現をダウンレギュレートするために十分な治療有効量の請求項１に記載の抗体以外の治療用抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体と第１のサンプルを接触させる段階と；

（ｃ）第１のサンプル中の抗体とＩＧＦ－１Ｒ含有細胞の特異的結合を測定する段階と、

（ｉｉ）（ａ）次に対象から第２の生体サンプルを採取する段階と、

（ｂ）第２の生体サンプルを請求項１に記載の抗体と接触させる段階と、

（ｃ）第２のサンプル中の抗体とＩＧＦ－１Ｒ含有細胞の特異的結合を測定する段階と、

（ｉｉｉ）腫瘍形成の発症、進行又は退縮の判定として、第１のサンプルにおける結合の測定を第２のサンプルにおける特異的結合の測定に比較する段階を含む前記方法。

【請求項２３】

ＩＧＦ－１Ｒの増加に関連する腫瘍性疾患を示す対象における異常レベルのＩＧＦ－１Ｒの補正における抗体の効力の監視方法であって、

ｉ）有効量の請求項１に記載の抗体以外の従来のＩＧＦ－１Ｒ抗体を前記対象に投与する段階と；

ｉｉ）従来の抗体の投与後に前記対象におけるＩＧＦ－１Ｒレベルを測定する段階を含み、正常レベルに対するＩＧＦ－１Ｒレベルの変化が前記抗体の効力の指標となる前記方法。

【請求項２４】

段階（ｉｉ）がＩＧＦ－１ｒを発現する細胞と前記抗体の複合体の形成を助長する条件下で前記対象から採取した組織サンプルを請求項１に記載の抗体と接触させる段階と、前記サンプル中のＩＧＦ－１Ｒの発現レベルの測定として前記複合体を検出する段階を含む請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

ＩＧＦ－１Ｒの示差的発現に基づく小児軟組織腫瘍の診断方法であって、ａ）小児患者から生体サンプルを採取する段階と；ｂ）前記サンプルを請求項１に記載の抗体又は抗原結合フラグメントと接触させる段階と；ｃ）ＩＧＦ－１Ｒに対して免疫学的に特異的な前記抗体又は抗原結合フラグメントの局在により示唆されるＩＧＦ－１Ｒの存在を判定する段階を含み、ＩＧＦ－１Ｒ染色の増加が前記軟組織腫瘍の陽性診断指標となる前記方法。

【請求項２６】

前記抗体が検出可能なラベルを含む請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記検出可能なラベルがフルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリン、ビオチン及びストレプトアビジンから構成される群から選択される請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】

前記抗体がフローサイトメトリー分析、免疫化学検出及びイムノブロット分析から構成される群から選択される方法により検出される請求項２５に記載の方法。
【請求項２９】
前記抗体又はフラグメントが溶液である請求項２６に記載の方法。
【請求項３０】
前記生体サンプルが軟組織腫瘍細胞及び非悪性細胞を含む請求項２５に記載の方法。
【請求項３１】
前記生体サンプルが横紋筋肉腫癌細胞、骨肉腫細胞又はユーイング肉腫細胞の１種を含む請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
容器と；容器に貼付したラベルと；容器内に収容された活性剤を含有する組成物を含む製品であって、組成物が新生組織又は異形成細胞中のＩＧＦ－１Ｒを検出するために有効であり、容器に貼付したラベルは組成物が正常組織に比較して前記新生組織におけるＩＧＦ－１Ｒポリペプチドの発現に関連する病態を診断するために有効であることを指示する前記製品。
【請求項３３】
前記活性剤が請求項１に記載の抗体を含む請求項３２に記載の製品。
【請求項３４】
ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患のインビボ撮影方法であって、
（ａ）撮影有効量の請求項１に記載の標識モノクローナル抗体又はそのフラグメントと医薬的に有効なキャリヤーを対象に投与する段階と；
（ｂ）前記標識モノクローナル抗体又はそのフラグメントと前記疾患に関連するＩＧＦ－１Ｒ発現細胞の結合を検出する段階を含む前記方法。
【請求項３５】
前記モノクローナル抗体又はそのフラグメントが放射性標識されている請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記検出が放射線撮影を含む請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
癌が抗腫瘍剤治療に感受性であるか否かの判定方法であって、（ａ）癌のサンプルを採取する段階と、（ｂ）サンプル中のＩＧＦ－１Ｒのレベルを測定する段階と、（ｃ）レベルを所定値と比較する段階と、（ｄ）測定レベルが所定値よりも高い場合には、癌が抗腫瘍剤による治療に感受性であると判定する段階を含む前記方法。
【請求項３８】
ヒトＩＧＦ－１Ｒを細胞表面に発現するＩＧＦ－１Ｒ依存性マウス造血細胞トランスフェクタントをＢａｌｂ／ｃマウスに免疫する段階を含む請求項１に記載のモノクローナル抗体の作製方法。
【請求項３９】
ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患のインビボ撮影用医薬組成物であって、標識され、ＩＧＦ－１Ｒとインビボ結合する請求項１に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントと；医薬的に許容可能なキャリヤーを含有する前記組成物。
【請求項４０】
生体サンプル中におけるＩＧＦ－１Ｒ又はそのアイソフォームの１種又はそのフラグメントの検出方法であって、（ａ）前記生体サンプルを請求項１に記載の抗体と接触させ、抗体－ポリペプチド複合体を形成する段階と；（ｂ）前記サンプル中の前記ＩＧＦ－１Ｒの存在の指標として前記抗体－ポリペプチド複合体を検出する段階を含む前記方法。
【請求項４１】
前記抗体が検出可能に標識されている請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
ａ．サンプルを請求項１に記載のモノクローナル抗体と接触させる段階と；ｂ．前記サ

ンプル中のＩＧＦ－１Ｒの存在を検出する段階を含む、サンプルの分析用イムノアッセイ方法。
【請求項４３】
前記イムノアッセイが直接、間接、捕捉、競合結合及び置換から構成される群から選択される請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
ＩＧＦ－１Ｒの存在を検出する前記段階が定性分析を含む請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
ＩＧＦ－１Ｒの存在を検出する前記段階が定量分析を含む請求項４２に記載の方法。
【請求項４６】
前記結合アッセイが臨床診断アッセイを含む請求項４２に記載の方法。
【請求項４７】
ＩＦＡ、リニアフロー、ラジアルフロー、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、ディップスティック、ＥＩＡ、蛍光偏光法、酵素捕捉及びＲＩＡから構成される群から選択される型である請求項４２に記載の方法。
【請求項４８】
ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患の診断方法であって、ａ）ＩＧＦ－１Ｒと特異的に結合する抗体を使用し、患者から採取したサンプル中のＩＧＦ－１Ｒ蛋白質の量をラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、ＥＬＩＳＡアッセイ又はサンドイッチアッセイにより測定する段階と；ｂ）前記ＩＧＦ－１Ｒ蛋白質と結合した抗体の量を正常対照組織サンプルと比較する段階を含み、正常対照組織サンプルに比較して患者から採取したサンプル中のＩＧＦ－１Ｒが発現増加又は過剰発現している場合にはＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患であると判定し、前記抗体が請求項１に記載のものである前記方法。
【請求項４９】
患者から採取した前記サンプルが組織生検である請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
ａ）癌の診断又は監視を必要とする個体から組織サンプルを採取する段階と；ｂ）前記サンプル中のＩＧＦ－１Ｒ蛋白質レベルを検出する段階と、ｃ）前記サンプルをＩＧＦ－１Ｒ蛋白質レベルについてスコアリングする段階と；ｄ）前記スコアリングを対照組織サンプルから得られたスコアリングと比較し、前記癌に関連する予後を判定する段階を含む診断又は監視方法。
【請求項５１】
前記スコアリングが０から４のスケールを使用し、０は陰性（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照レベルと同等のＩＧＦ－１Ｒレベル）であり、４は大半の細胞における高強度染色であり、１から４のスコアは予後不良に相当し、０のスコアは予後良好に相当する請求項５０に記載の診断又は監視方法。
【請求項５２】
前記癌が乳癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、結腸癌、卵巣癌、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫又は骨肉腫から構成される群から選択される請求項５０に記載の診断又は監視方法。
【請求項５３】
ＩＧＦ－１Ｒのレベルを検出する段階が前記サンプルをＩＧＦ－１Ｒに特異的な抗体と接触させる段階を含み、前記抗体が１２Ｂ１又はその抗原結合フラグメントを含む請求項５０に記載の診断又は監視方法。
【請求項５４】
検出又は測定段階がイムノブロッティング、免疫組織化学法及び免疫細胞化学法から構成される群から選択される請求項５３に記載の診断又は監視方法。
【請求項５５】
段階ｂ）が蛍光励起細胞ソーティング（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ－Ａｃｔｉｖａｔｅ

ｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｉｎｇ：ＦＡＣＳ）により実施される請求項５０に記載の診断又は監視方法。

【請求項５６】

患者における腫瘍を治療するためのＩＧＦ－１Ｒ標的剤を含む化学療法レジメンの判定方法であって、（ａ）腫瘍の組織サンプルを採取する段階と；（ｂ）前記サンプル中のＩＧＦ－１Ｒレベルを検出する段階と、（ｃ）ＩＧＦ－１Ｒの発現レベルについて前記サンプルをスコアリングする段階と、（ｄ）マッチする非悪性組織サンプルで段階（ｂ）～（ｃ）を繰返し、閾値レベルを得る段階と、（ｅ）段階（ｃ）の示差的ＩＧＦ－１Ｒ発現レベルと段階（ｄ）の閾値レベルを比較することにより化学療法レジメンを判定する段階を含み、段階（ｄ）に対して段階（ｃ）の示差的ＩＧＦ－１Ｒ発現レベルが増加している場合には前記患者に化学療法レジメンを適用すると決定する前記方法。

【請求項５７】

前記スコアリングが０から４のスケールを使用し、０は陰性（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照レベルと同等のＩＧＦ－１Ｒレベル）であり、４は大半の細胞における高強度染色であり、１から４のスコア（即ち陽性スコア）は化学療法レジメンに相当する請求項５６に記載の方法。

【請求項５８】

ＩＧＦ－１Ｒレベルを検出する段階が前記サンプルをＧＦ－ＩＲに特異的な抗体と接触させる段階を含み、前記抗体が１２Ｂ１又はその抗原結合フラグメントである請求項５６に記載の方法。

【請求項５９】

ＩＧＦ－１Ｒ発現に関連する腫瘍性疾患を示す患者の無病生存及び総生存の予測方法であって、ａ）前記腫瘍性疾患を示す個体から病変又は癌組織のサンプルを採取する段階と、ｂ）前記サンプルの前記癌細胞又は癌組織中のＩＧＦ－１Ｒ発現細胞のレベルを検出する段階と；ｃ）前記サンプルをＩＧＦ－１Ｒの発現レベルについてスコアリングする段階と；ｄ）前記スコアリングを対照サンプルから得られたスコアリングと比較し、無病生存とＩＧＦ－１Ｒに関連する総生存の可能性を判定する段階を含む前記方法。

【請求項６０】

前記スコアリングが０から４のスケールを使用し、０は陰性（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照レベルと同等のＩＧＦ－１Ｒレベル）であり、４は大半の細胞における高強度染色であり、１から４のスコア（即ち陽性スコア）は前記疾患をもつ患者の無病及び総生存の予後不良を示唆する請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】

ＩＧＦ－１Ｒ発現細胞のレベルを検出する段階が前記サンプルをＧＦ－ＩＲに特異的な抗体と接触させる段階を含み、前記抗体が１２Ｂ１又はその抗原結合フラグメントである請求項５９に記載の方法。

【請求項６２】

ＩＧＦ－１Ｒ介在性癌の治療方法であって、ａ）前記癌の治療を必要とする患者から病変組織のサンプルを採取する段階と；ｂ）前記組織サンプルにおけるＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを測定する段階と；ｃ）前記サンプルをＩＧＦ－１Ｒの発現レベルについてスコアリングする段階と；ｄ）前記スコアリングを対照サンプルから得られたスコアリングと比較することにより前記スコアを相関させ、ＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト治療が有効であると思われる患者を同定する段階と、ｅ）前記癌の予後を改善することが分かっている治療レジームで前記患者を治療する段階と；ｆ）段階「ａ」及び「ｂ」を反復する段階と、ｇ）前記癌の予後を改善することが分かっている治療レジームを調節する段階と；ｈ）適切であるとみなされる頻度で段階ａ～ｆを反復する段階を含む前記方法。

【請求項６３】

前記スコアリングが０から４のスケールを使用し、０は陰性（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照レベルと同等のＩＧＦ－１Ｒレベル）であり、４は大半の細胞における高強度染色である請求項６２に記載の方法。

【請求項６４】
ＩＧＦ－１Ｒレベルを検出する段階が前記サンプルをＧＦ－ＩＲに特異的な抗体と接触させる段階を含み、前記抗体が１２Ｂ１又はその抗原結合フラグメントである請求項６２に記載の方法。
【請求項６５】
ＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患の緩和用治療レジメンの効果の判定方法であって、前記レジメンがＩＧＦ－１Ｒアンタゴニストの使用を含み、前記方法がａ）前記治療レジメンを受けている個体から細胞又は組織サンプルを採取する段階と、ｂ）前記細胞又は組織サンプル中のＩＧＦ－１Ｒレベルを測定する段階と；ｃ）前記サンプルをＩＧＦ－１Ｒ蛋白質レベルについてスコアリングする段階と、ｄ）前記レベルを対照サンプルのレベルと比較し、前記治療レジメンに対する前記ＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患の応答性を予測する段階を含む前記方法。
【請求項６６】
前記スコアリングが０から４のスケールを使用し、０は陰性（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照レベルと同等のＩＧＦ－１Ｒレベル）であり、４は大半の細胞における高強度染色である請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
ＩＧＦ－１Ｒレベルを検出する段階が前記サンプルをＧＦ－ＩＲに特異的な抗体と接触させる段階を含み、前記抗体が１２Ｂ１又はその抗原結合フラグメントである請求項６５に記載の方法。
【請求項６８】
ＩＧＦ－１Ｒに介在される腫瘍性疾患を示す患者を臨床試験用に階層化するための方法であって、ａ）前記患者から組織サンプルを採取する段階と、ｂ）前記サンプル中のＩＧＦ－１Ｒ蛋白質レベルを検出する段階と、ｃ）前記サンプルをＩＧＦ－１Ｒ蛋白質レベルについてスコアリングする段階と；ｄ）スコアリング段階の結果に基づいて前記臨床試験用に前記患者を階層化する段階を含む前記方法。
【請求項６９】
前記スコアリングが０から４のスケールを使用し、０は陰性（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照レベルと同等のＩＧＦ－１Ｒレベル）であり、４は大半の細胞における高強度染色である請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
ＩＧＦ－１Ｒレベルを検出する段階が前記サンプルをＧＦ－ＩＲに特異的な抗体と接触させる段階を含み、前記抗体が１２Ｂ１又はその抗原結合フラグメントである請求項６８に記載の方法。
【請求項７１】
ＩＧＦ－１Ｒの発現を特徴とする乳房腫瘍の階層化又はステージング方法であって、ｉ）乳房腫瘍サンプルを準備する段階と、ｉｉ）サンプル中のＩＧＦ－１Ｒの発現を検出する段階と、ｉｉｉ）サンプルをＩＧＦ－１Ｒ発現レベルについてスコアリングする段階と、ｉｖ）スコアリング段階の結果に基づいて腫瘍を腫瘍サブクラスに分類する段階を含む前記方法。
【請求項７２】
前記スコアリングが０から４のスケールを使用し、０は陰性（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照レベルと同等のＩＧＦ－１Ｒレベル）であり、４は大半の細胞における高強度染色である請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
ＩＧＦ－１ｒの発現を検出する段階が前記サンプルをＧＦ－ＩＲに対して特異性をもつ抗体と接触させる段階を含み、前記抗体が１２Ｂ１又はその抗原結合フラグメントである請求項７１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本発明はバイオテクノロジーの分野、特にインスリン様成長因子１受容体１（ＩＧＦ－１Ｒ）、好ましくはヒトＩＧＦ－１Ｒで発現されるエピトープを認識する新規組換えモノクローナル抗体に関する。
【背景技術】
【０００２】
本発明はＩＧＦ－１Ｒ細胞表面受容体に選択的な新規抗体に関する。本明細書に詳細に記載する「１２Ｂ１」と呼ぶ哺乳動物抗体からの組換え抗体、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体又はベニアド抗体（１本鎖Ｆｖフラグメント（ｓｃＦｖ）を含む）の誘導体化も含む。本発明は同様にＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する病的過増殖性腫瘍性疾患の検出及び診断における上記抗体から誘導されるマウス又は組換え抗体の利用も含む。所定態様において、疾患は正常に対するＩＧＦ－１Ｒポリペプチドの発現増加に関連する腫瘍性疾患又はＩＧＦ－１Ｒの過剰発現に関連する他の任意病態である。ＩＧＦ－１Ｒ受容体の過剰発現に関連する疾患の予後マーカー及び診断用キットとしての組換え抗体の使用も開示する。これらの抗体をコードするアミノ酸及び核酸配列と、ＩＧＦ－１Ｒ特異的調節部分を含む治療レジメンの治療効力の評価方法も開示する。
【０００３】
インスリン様成長因子（ＩＧＦ）、例えばインスリン様成長因子Ｉ及びインスリン様成長因子ＩＩを含む各種成長因子は腫瘍細胞等の各種細胞種にマイトジェン活性を発揮するとみなされている。ＩＧＦはインスリンと構造的に類似しており、各種病変及び傷害の治療ツールとみなされている。インスリン様成長因子Ｉ（ＩＧＦ－Ｉ）はｐＩ８．４の７６４９ダルトンポリペプチドであり、血漿中を高濃度で循環し、大半の組織で検出可能である（Ｒｉｎｄｅｒｋｎｅｃｈｔ ａｎｄ Ｈｕｍｂｅｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７３：２３６５（１９７６）；Ｒｉｎｄｅｒｋｎｅｃｈｔ ａｎｄ Ｈｕｍｂｅｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５３：２７６９（１９７８））。ＩＧＦ－Ｉは細胞分化と細胞増殖を刺激し、大半の哺乳動物細胞種の持続増殖に必要である。これらの細胞種としては特に、ヒト二倍体繊維芽細胞、上皮細胞、平滑筋細胞、Ｔリンパ球、神経細胞、骨髄系細胞、軟骨細胞、骨芽細胞及び骨髄幹細胞が挙げられる。これらの増殖因子は各々インスリン様成長因子受容体－１（ＩＧＦ１Ｒ）と呼ばれる共通の受容体と結合することによりそのマイトジェン作用を発揮する（Ｓｅｐｐ－Ｌｏｒｅｎｚｉｎｏ，（１９９８）Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ４７：２３５）。Ｋｌａｐｐｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（１９８３）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１１２：２２１５及びＲｉｎｄｅｒｋｎｅｃｈｔ，ｅｔ ａｌ．，（１９７８）Ｆｅｂｓ．Ｌｅｔｔ．８９：２８３も参照。ＩＧＦ類（ＩＧＦ－１，ＩＧＦ－２及びＩＧＦ変異体）の作用と活性については多数の文献に記載されている。Ｖａｎ Ｗｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｃｅｎｔ Ｐｒｏｇ．Ｈｏｒｍ．Ｒｅｓ．，３０：２５９（１９７４）；Ｂｉｎｏｕｘ，Ａｎｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．，４１：１５７（１９８０）；Ｃｌｅｍｍｏｎｓ ａｎｄ Ｖａｎ Ｗｙｋ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，５７：１６１（１９８１）；Ｂａｘｔｅｒ，Ａｄｖ．Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．，２５：４９（１９８６）；米国特許第４，９８８，６７５号；ＷＯ９１／０３２５３；ＷＯ９３／２３０７１参照。
【０００４】
ＩＧＦ系は更にＩＧＦ－１、ＩＧＦ－２及びインスリンの膜結合受容体から構成される。１型ＩＧＦ受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）は構造的にインスリン受容体（ＩＲ）と近縁であり、そのシグナル伝達経路の一部が共通であり（Ｊｏｎｅｓ ａｎｄ Ｃｌｅｍｍｏｎｓ，Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．，１６：３－３４（１９９５）；Ｕｌｌｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ６１：２０３ ２１２，１９９０）、インスリン受容体と構造的に類似している（Ｕｌｌｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．５：２５０３ ２５１２，１９８６）。ＩＧＦ－１及びＩＧＦ－２はインスリン受容体よりも著しく高い親和性でＩＧＦ－１Ｒと結合するので、ＩＧＦ－１及びＩＧＦ－２の作用の大半はＩＧＦ－１Ｒに介在され

る可能性が高い（Ｈｕｍｂｅｌ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９０：４４５－４６２（１９９０）；Ｂａｌｌａｒｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｄｏｅｓ ＩＧＦ－Ｉ ｅｖｅｒ ａｃｔ ｔｈｒｏｕｇｈ ｔｈｅ ｉｎｓｕｌｉｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ？”，ｉｎ Ｂａｘｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｅｄｓ．），Ｔｈｅ Ｉｎｓｕｌｉｎ－Ｌｉｋｅ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，（Ａｍｓｔｅｒｄａｍ：Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，１９９４），ｐｐ．１３１－１３８）。ＩＧＦ－１Ｒの最初の３領域の結晶構造は決定されている（Ｇａｒｒｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３９４，３９５－３９９（１９９８））。構造は類似するが、ＩＧＦ－１ＲとＩＲとは生理機能が異なり、ＩＲは主に代謝機能に関与するが、ＩＧＦ－１Ｒは増殖と分化を媒介する。ＩＧＦ－Ｉ／ＩＧＦ－Ｉ受容体相互作用が細胞増殖を媒介する多様な細胞種の概要については、Ｇｏｌｄｒｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｋａｒ．Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓ．，１：３１ ３２６（１９９１）参照。他方、ＩＧＦ－２受容体は細胞内シグナルを伝達しないと思われるクリアランス受容体である（Ｊｏｎｅｓ ａｎｄ Ｃｌｅｍｍｏｎｓ，前出）。

【０００５】

インスリン様成長因子Ｉ受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）は分子量約３５０，０００の糖蛋白質である。これはヘテロ四量体であり、その半分ずつがジスルフィド橋により結合され、細胞外αサブユニットと膜貫通βサブユニットから構成される。ＩＧＦ－Ｉ受容体はαサブユニット（完全に細胞外であり、リガンド結合で機能する１３０～１３５ｋＤ蛋白質）とβサブユニット（膜貫通領域と細胞質領域をもつ９５ｋＤ膜貫通蛋白質）の２種類のサブユニットから構成される。ＩＧＦ－ＩＲは先ず１本鎖受容体前駆体ポリペプチドとして合成され、グリコシル化、蛋白分解開裂及び共有結合によりプロセシングされ、２個のαサブユニットと２個のβサブユニットからなる成熟４６０ｋＤヘテロ四量体となる。βサブユニットはリガンドにより活性化されるチロシンキナーゼ活性をもつ。この活性はβサブユニットの自己リン酸化とＩＧＦ－ＩＲ基質のリン酸化を含むリガンド作用を媒介するシグナル伝達経路に関与している。

【０００６】

ＩＧＦ－ＩＲはＩＧＦ Ｉ及びＩＧＦ ＩＩとナノモルの親和性、例えば1×10^{-9}ｎＭのＫｄで結合するが、インスリンとは１００～１０００分の１の親和性でしか結合することができない。代表的なナノモル親和性値はその開示内容全体を本明細書に援用するＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ，ｖｏｌ．５６５，ｐａｇｅｓ １９－２２（２００４）に記載されている。逆に、ＩＲはインスリンと非常に高い親和性で結合するが、ＩＧＦはインスリン受容体とは１００分の１の親和性でしか結合しない。ＩＧＦ－ＩＲとＩＲのチロシンキナーゼ領域は配列相同度が非常に高いが、相同度の低い領域は夫々αサブユニットに位置するシステインリッチ領域とβサブユニットのＣ末端部分に関連する。αサブユニットに認められる配列の相違はリガンドの結合領域に位置するため、夫々ＩＧＦ及びインスリンに対するＩＧＦ－ＩＲとＩＲの相対親和性の原因となる。βサブユニットのＣ末端部分の相違の結果として、２種の受容体のシグナル伝達経路、ＩＧＦ－ＩＲが介在するマイトジェン作用、分化作用及び抗アポトーシス作用に多様性を生じ、ＩＲの活性化は主に代謝経路レベルに作用する（Ｂａｓｅｒｇａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１３３２：Ｆ１０５－１２６，１９９７；Ｂａｓｅｒｇａ Ｒ．，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ．Ｒｅｓ．，２５３：１－６，１９９９）。

【０００７】

ＩＧＦ－Ｉ刺激による細胞増殖又は分化をもたらす伝達経路の第１段階は生理的濃度のＩＧＦ－Ｉ又はＩＧＦ－ＩＩ（即ちインスリン）とＩＧＦ－Ｉ受容体の結合である。ＩＧＦとＩＧＦ１Ｒの相互作用はチロシン残基上の受容体の自己リン酸化を誘発することにより受容体を活性化する（Ｂｕｔｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ １２１：１９）。活性化後、ＩＧＦ１Ｒは細胞内ターゲットをリン酸化し、細胞シグナル伝達経路を活性化する。この受容体活性化は腫瘍細胞増殖及び生存の刺激に不可欠である。従って、ＩＧＦ１

Ｒ活性の阻害はヒト癌及び他の増殖性疾患の増殖の有望な治療又は予防方法である。

【０００８】

腫瘍細胞のインビトロ及びインビボ維持におけるＩＧＦ－Ｉ及び／又はＩＧＦ－ＩＲの役割もかなり明らかになっている。例えば、ＩＧＦ－Ｉレベルが「高めの正常」値の個体はＩＧＦ－Ｉレベルが「低めの正常」範囲の個体に比較して一般的な癌の危険が高い（Ｒｏｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．１０：１３６ ４１，１９９９）。各種ヒト腫瘍の増殖においてＩＧＦ－Ｉ／ＩＧＦ－Ｉ受容体相互作用が果たす役割の概要については、Ｍａｃａｕｌａｙ，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，６５：３１１ ３２０，１９９２参照。正常細胞増殖及び発生における重要な役割に加え、ＩＧＦ－１Ｒシグナル伝達は腫瘍細胞の増殖、細胞形質転換及び腫瘍形成にも極めて重要な役割を果たすことが分かっている。Ｂａｓｅｒｇａ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５５：２４９－２５２（１９９５）参照；概要についてはＫｈａｎｄｗａｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．２１：２１５－２４４（２０００）；Ｄａｕｇｈａｄａｙ ａｎｄ Ｒｏｔｗｅｉｎ，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｒｅｖ．，１０：６８－９１（１９８９）参照。最近のデータによると、ＩＧＦ－ＩＲは非常に多様な腫瘍及び腫瘍株で発現され、ＩＧＦはＩＧＦ－ＩＲとの結合により腫瘍増殖を増幅すると結論される。実際に、ＩＧＦ－ＩＲが形質転換に果たす重要な役割を明白に立証した重要な発見は、ＩＧＦ－ＩＲをコードする遺伝子を不活性化したＲ細胞がウシパピローマウイルスのＥ５蛋白質、ＥＧＦＲもしくはＰＤＧＦＲの過剰発現、ＳＶ４０のＴ抗原、活性化ｒａｓ又は後者２因子の組合せ等の一般に細胞を形質転換することが可能な各種物質による形質転換に完全に耐性であるという実証であった（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）。この仮説を裏付ける他の重要な例としては、ＩＧＦ－１Ｒに対するアンチセンスＲＮＡで治療することによりマウス癌細胞の転移表現型が失われ（Ｌｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５５：１００６－１００９（１９９５））、ＩＧＦ－１Ｒ抗体の添加によりヒトメラノーマ細胞運動（Ｓｔｒａｃｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４：２１５５４－２１５５９（１９８９））とヒト乳癌細胞増殖（Ｒｏｈｌｉｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１４９：２７６－２８１（１９８７））のインビトロ阻害が生じた。

【０００９】

発癌におけるＩＧＦ－ＩＲの役割を裏付ける他の論拠は受容体に対するマウスモノクローナル抗体又はＩＧＦ－ＩＲのネガティブドミナントを使用した研究で報告されている。実際に、ＩＧＦ－ＩＲに対するマウスモノクローナル抗体は多数の培養細胞株の増殖と腫瘍細胞のインビボ増殖を阻害する（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）。同様に、ＩＧＦ－ＩＲのネガティブドミナントは腫瘍増殖を阻害できることがＪｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．の論文（Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，１８：６０７１－６０７７，１９９９）に示されている。

【００１０】

ＩＧＦ－ＩＲ ＲＮＡに対するアンチセンス発現ベクター又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用すると、ＩＧＦ－ＩＲの妨害によりＩＧＦ－Ｉ介在性又はＩＧＦ－ＩＩ介在性細胞増殖が阻害されることが示されている（例えばＷｒａｉｇｈｔ ｅｔ ａｌ．，

Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１８：５２１　５２６，２０００参照）。アンチセンスストラテジーは数種の正常細胞種とヒト腫瘍細胞株で細胞増殖の阻害に成功している。ＩＧＦ－Ｉのペプチドアナログ（Ｐｉｅｔｒｚｋｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｇｒｏｗｔｈ　＆　Ｄｉｆｆ．３：１９９　２０５，１９９２；及びＰｉｅｔｒｚｋｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１２：３８８３　３８８９，１９９２）、又はＩＧＦ－Ｉ　ＲＮＡに対するアンチセンスＲＮＡを発現するベクター（Ｔｒｏｊａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５９：９４　９７，１９９２）を使用しても増殖が阻害された。

【００１１】

肺（Ｋａｉｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１１９：６６５　６６８，１９９３；Ｍｏｏｄｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　５２：１１６１　１１７３，１９９３；Ｍａｃａｕｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，５０：２５１１　２５１７，１９９０）、乳房（Ｐｏｌｌａｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔ．３８：２２３　２３０，１９８７；Ｆｏｅｋｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４９：７００２　７００９，１９８９；Ｃｕｌｌｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４９：７００２　７００９，１９９０；Ａｒｔｅａｇａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８４：１４１８　１４２３，１９８９）、前立腺及び結腸（Ｒｅｍａｏｌｅ－Ｂｅｎｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．７５：６０９　６１６，１９９２；Ｇｕｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．１０２：１１０１　１１０８，１９９２）の腫瘍ではＩＧＦ－ＩＲレベルが高い。

【００１２】

血清ＩＧＦ－１値の上昇は前立腺癌の危険の増加に関係があることが示されており、前立腺特異抗原よりも初期の発症予測因子であると思われる（ＰＳＡ；Ｊ．Ｍ．Ｃｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７９：５６３－５６６）。

【００１３】

高値のＩＧＦ－１及び／又はＩＧＦ－１Ｒと乳癌の間にも関係があるらしい（Ｌ．Ｃ．Ｈａｐｐｅｒｆｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１８３：４１２－４１７）。乳癌はＩＧＦ－２とＩＧＦ－１Ｒを発現し、オートクラインループに基づく増殖パラダイムに必要な全エフェクターを提供する（Ｑｕｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：１１４７７－１１４８３（１９９６）；Ｓｔｅｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，５６：１７６１－１７６５（１９９６））。実際に、ＩＧＦ－１Ｒは全乳癌細胞株の４０％（Ｐａｎｄｉｎｉ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５：１９３５）と肺癌細胞株の１５％で過剰発現されている。乳癌腫瘍組織において、ＩＧＦ１Ｒは正常組織に比較して６～４倍過剰発現され、ＩＧＦ１Ｒは２～４倍のキナーゼ活性を示す（Ｗｅｂｓｔｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：２７８１及びＰｅｋｏｎｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４８：１３４３）。実際に、閉経前の女性では循環ＩＧＦ－１と乳癌の間に正の相関が認められた（Ｓ．Ｅ．Ｈａｎｋｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，Ｌａｎｃｅｔ　３５１：１３９３－１３９６）。乳癌患者の予後不良はＩＧＦ－１Ｒ陽性でエストロゲン受容体（ＥＲ）陰性の細胞の発現に相関関係があった（Ａ．Ａ．Ｂｕｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８：３０２１－３０２７）。最近、研究者らは数種類の乳癌細胞株に存在するハイブリッドＩＧＦ－１Ｒ／ＩＲ受容体を同定している（Ｇ．Ｐａｎｄｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５：１９３５－１９４４；Ｅ．Ｍ．Ｂａｉｌｙｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３２７（Ｐｔ　１）：２０９－２１５；下記参照）。

【００１４】

結腸直腸癌組織生検の９０％が高いＩＧＦ１Ｒレベルを示しており、ＩＧＦ１Ｒ発現の程度はこの病変の重篤度に相関する。原発性子宮頸癌細胞培養物と子宮頸癌細胞株の分析によると、正常子宮膣部細胞に比較して夫々３倍及び５倍のＩＧＦ１Ｒの過剰発現が判明

した（Ｓｔｅｌｌｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：１７６２）。滑膜肉腫細胞におけるＩＧＦ１Ｒの発現も侵襲性表現型と相関している（即ち転移と高増殖率；Ｘｉｅ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５９：３５８８）。

【００１５】

最近の研究には、ＩＧＦ－１値と卵巣癌の関係も示されている。

【００１６】

アポトーシスを誘導するため、あるいはＩＧＦ－Ｉ増加、ＩＧＦ－ＩＩ増加及び／又はＩＧＦ－ＩＲ受容体レベル増加に関連する細胞増殖を阻害するための潜在的なストラテジーとしては、ＩＧＦ－Ｉレベルもしくは ＩＧＦ－ＩＩレベルの抑制又はＩＧＦ－ＩとＩＧＦ－ＩＲの結合の防止が挙げられる。この目的を達成するためには抗ＩＧＦ－１Ｒ特異抗体も考えられる。

【００１７】

ＩＧＦ－１Ｒ発現細胞の発現レベルと乳癌、結腸癌、膵臓癌、肺癌又は卵巣癌の１種の危険増加の関係は多数の疫学研究で一貫して知見されている。癌進行及び初期検出の解明の進捗は遅れており、癌症候群の複雑で多因子な性格と不均一性により挫折感を引き起こしている。薬剤開発の困難の１つは臨床前開発、臨床試験及び認可薬で抗ＩＧＦ－１Ｒ治療薬が有効であることを立証することである。これを実施するための１つの方法はＩＧＦ－１Ｒ活性が阻害される時点を指示する適切なバイオマーカーを得ることである。医療撮影、組織生検及び酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）による体液の生体分析アッセイ等の現在利用されている診断技術は殆どの種類の初期癌を検出するには感度と特異性が不十分である。更に、これらのアッセイは労働集約的で時間と経費がかかり、多重化できない。今日までに、各種ＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患のいずれか１種以上のマーカーとして、ＩＧＦ－１Ｒ発現細胞を含む腫瘍の検出のみならず、治療の監視と腫瘍侵襲性の測定にも有効な確実な診断又は予後診断ＩＧＦ－１Ｒ特異マーカーは同定されていない。実際に、ＩＧＦ－１Ｒの検出に効力を示す確実なバイオマーカーが少ないため、産業界は多数の抗ＩＧＦ－１Ｒ治療プロトコルの効力を評価できずにいる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１８】

【特許文献１】米国特許第４，９８８，６７５号
【特許文献２】国際公開第９１／０３２５３号
【特許文献３】国際公開第９３／２３０７１号

【非特許文献】

【００１９】

【非特許文献１】Ｒｉｎｄｅｒｋｎｅｃｈｔ　ａｎｄ　Ｈｕｍｂｅｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７３：２３６５（１９７６）
【非特許文献２】Ｒｉｎｄｅｒｋｎｅｃｈｔ　ａｎｄ　Ｈｕｍｂｅｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５３：２７６９（１９７８）
【非特許文献３】Ｓｅｐｐ－Ｌｏｒｅｎｚｉｎｏ，（１９９８）Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ　４７：２３５
【非特許文献４】Ｋｌａｐｐｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，（１９８３）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１１２：２２１５
【非特許文献５】Ｒｉｎｄｅｒｋｎｅｃｈｔ，ｅｔ　ａｌ．，（１９７８）Ｆｅｂｓ．Ｌｅｔｔ．８９：２８３
【非特許文献６】Ｖａｎ　Ｗｙｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｒｅｃｅｎｔ　Ｐｒｏｇ．Ｈｏｒｍ．Ｒｅｓ．，３０：２５９（１９７４）
【非特許文献７】Ｂｉｎｏｕｘ，Ａｎｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．，４１：１５７（１９８０）
【非特許文献８】Ｃｌｅｍｍｏｎｓ　ａｎｄ　Ｖａｎ　Ｗｙｋ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ　Ｅｘ

p. Pharmacol., 57：161（1981）
【非特許文献9】Baxter, Adv. Clin. Chem., 25：49（1986）
【非特許文献10】Jones and Clemmons, Endocr. Rev., 16：3－34（1995）
【非特許文献11】Ullrich et al., Cell 61：203 212, 1990
【非特許文献12】Ullrich et al., EMBO J. 5：2503 2512, 1986
【非特許文献13】Humbel, Eur. J. Biochem. 190：445－462（1990）
【非特許文献14】Ballard et al.,“Does IGF－I ever act through the insulin receptor?”, in Baxter et al.（Eds.）, The Insulin－Like Growth Factors and Their Regulatory Proteins,（Amsterdam：Elsevier, 1994）, pp. 131－138
【非特許文献15】Garrett et al., Nature, 394, 395－399（1998）
【非特許文献16】Goldring et al., Eukar. Gene Express., 1：31 326（1991）
【非特許文献17】FEBS Letters, vol. 565, pages 19－22（2004）
【非特許文献18】Baserga et al., Biochim. Biophys. Acta, 1332：F105－126, 1997
【非特許文献19】Baserga R., Exp. Cell. Res., 253：1－6, 1999
【非特許文献20】Butler, et al.,（1998）Comparative Biochemistry and Physiology 121：19
【非特許文献21】Rosen et al., Trends Endocrinol. Metab. 10：136 41, 1999
【非特許文献22】Macaulay, Br. J. Cancer, 65：311 320, 1992
【非特許文献23】Baserga, Cancer Res., 55：249－252（1995）
【非特許文献24】Khandwala et al., Endocr. Rev. 21：215－244（2000）
【非特許文献25】Daughaday and Rotwein, Endocrine Rev., 10：68－91（1989）
【非特許文献26】Sell C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90：11217－11221, 1993
【非特許文献27】Sell C. et al., Mol. Cell. Biol., 14：3604－3612, 1994
【非特許文献28】Morrione A. J., Virol., 69：5300－5303, 1995
【非特許文献29】Coppola D. et al., Mol. Cell. Biol., 14：4588－4595, 1994
【非特許文献30】DeAngelis T et al., J. Cell. Physiol., 164：214－221, 1995
【非特許文献31】Long et al., Cancer Res., 55：1006－1009（1995）

【非特許文献３２】Ｓｔｒａｃｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４：２１５５４－２１５５９（１９８９）
【非特許文献３３】Ｒｏｈｌｉｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１４９：２７６－２８１（１９８７）
【非特許文献３４】Ａｒｔｅａｇａ Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，４９：６２３７－６２４１，１９８９
【非特許文献３５】Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍ．，１９６：９２－９８，１９９３
【非特許文献３６】Ｚｉａ Ｆ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，２４：２６９－２７５，１９９６
【非特許文献３７】Ｓｃｏｔｌａｎｄｉ Ｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５８：４１２７－４１３１，１９９８
【非特許文献３８】Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，１８：６０７１－６０７７，１９９９
【非特許文献３９】Ｗｒａｉｇｈｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１８：５２１ ５２６，２０００
【非特許文献４０】Ｐｉｅｔｒｚｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ ＆ Ｄｉｆｆ．３：１９９ ２０５，１９９２
【非特許文献４１】Ｐｉｅｔｒｚｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１２：３８８３ ３８８９，１９９２
【非特許文献４２】Ｔｒｏｊａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：９４ ９７，１９９２
【非特許文献４３】Ｋａｉｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１１９：６６５ ６６８，１９９３
【非特許文献４４】Ｍｏｏｄｙ ｅｔ ａｌ．，Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ５２：１１６１ １１７３，１９９３
【非特許文献４５】Ｍａｃａｕｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５０：２５１１ ２５１７，１９９０
【非特許文献４６】Ｐｏｌｌａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｌｅｔｔ．３８：２２３ ２３０，１９８７
【非特許文献４７】Ｆｏｅｋｅｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４９：７００２ ７００９，１９８９
【非特許文献４８】Ｃｕｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４９：７００２ ７００９，１９９０
【非特許文献４９】Ａｒｔｅａｇａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８４：１４１８ １４２３，１９８９
【非特許文献５０】Ｒｅｍａｏｌｅ－Ｂｅｎｎｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．７５：６０９ ６１６，１９９２
【非特許文献５１】Ｇｕｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．１０２：１１０１ １１０８，１９９２
【非特許文献５２】ＰＳＡ；Ｊ．Ｍ．Ｃｈａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７９：５６３－５６６
【非特許文献５３】Ｌ．Ｃ．Ｈａｐｐｅｒｆｉｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１８３：４１２－４１７
【非特許文献５４】Ｑｕｉｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：１１４７７－１１４８３（１９９６）
【非特許文献５５】Ｓｔｅｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５６：１７６１－１７６５（１９９６）
【非特許文献５６】Ｐａｎｄｉｎｉ，ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５：１９３５

【非特許文献５７】Ｗｅｂｓｔｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：２７８１
【非特許文献５８】Ｐｅｋｏｎｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４８：１３４３
【非特許文献５９】Ｓ．Ｅ．Ｈａｎｋｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，Ｌａｎｃｅｔ　３５１：１３９３－１３９６
【非特許文献６０】Ａ．Ａ．Ｂｕｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８：３０２１－３０２７
【非特許文献６１】Ｇ．Ｐａｎｄｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５：１９３５－１９４４
【非特許文献６２】Ｅ．Ｍ．Ｂａｉｌｙｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３２７（Ｐｔ　１）：２０９－２１５
【非特許文献６３】Ｓｔｅｌｌｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：１７６２
【非特許文献６４】Ｘｉｅ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５９：３５８８

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２０】
本発明の目的は腫瘍性疾患、特にＩＧＦ－１Ｒの発現を特徴とするもの又は異常なＩＧＦ０－１Ｒ発現に介在されるものを検出及び／又は監視するための診断又は予後診断バイオマーカーとして使用可能な少なくとも１種の試薬を提供することである。
【００２１】
診断又は予後診断ツールとして使用可能な抗体を開発するための従来の試みは報告されていない。本明細書にはこの基準を満たす新規抗体を記載する。
【００２２】
本発明の他の特徴及び利点は以下の詳細な記載と実施例から理解されよう。
【課題を解決するための手段】
【００２３】
本発明はインスリン様成長因子１受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）、好ましくはヒトＩＧＦ－１Ｒと高親和性で結合し、従って、ＩＧＦ－１Ｒ発現に介在される病的過増殖性腫瘍性疾患又は正常に対するＩＧＦ－１Ｒの発現増加に関連する異形成細胞の治療又は診断方法で有用である思われるモノクローナル抗体を提供する。より好ましくは、本発明はＩＧＦ－１Ｒ含有細胞を診断又は検出すると共に、ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患、特に癌及び肉腫の病理作用の危険のある患者を同定するための、本明細書に記載する１２Ｂ１と呼ぶ抗体の使用に関する。バイオマーカーとしての抗体の使用も開示する。前記方法はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する各種過増殖性腫瘍性疾患を検出又は診断するために使用することができ、このような疾患の例としては限定されないが、卵巣癌、乳癌、腎臓癌、結腸直腸癌、肺癌、子宮内膜癌もしくは脳腫瘍又はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する他の任意癌が挙げられる。本発明の抗体は各種小児軟組織癌を診断するためにも使用することができ、限定されないが、骨肉腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫及び神経芽細胞腫が挙げられる。当業者に自明の通り、特定疾患に関連する抗体発現レベルは既存病態の種類及び／又は重篤度により異なる。
【００２４】
当業者に公知の従来方法（例えば局所、非経口、筋肉内等）のいずれかで本発明の抗体を投与すると、サンプル中の異形成細胞を検出すると共に、臨床医がＩＧＦ－１Ｒの発現に関連又は介在される過増殖性疾患の治療中の患者の治療レジメンを監視することができる非常に有用な方法となる。
【００２５】
広義の１側面において、本発明は配列番号１、２もしくは３に記載のアミノ酸配列のＣ

ＤＲから構成される群から選択されるアミノ酸配列をもつ少なくとも１個の相補性決定領域ＣＤＲ、又は最適整列後に配列番号１、２もしくは３の１種の配列に対して少なくとも８０％、好ましくは８５％、９０％、９５％及び９８％の配列一致度をもつ少なくとも１個のＣＤＲを含む軽鎖、あるいは配列番号４、５もしくは６から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１個のＣＤＲ、又は最適整列後に配列番号４、５もしくは６の１種に対して少なくとも８０％、好ましくは８５％、９０％、９５％及び９８％の配列一致度をもつ少なくとも１個のＣＤＲを含む重鎖を含む抗体又はそのフラグメントを含む。

【００２６】

軽鎖は配列番号７に記載のアミノ酸配列を含むことができ、重鎖は配列番号８に記載のアミノ酸配列を含むことができる。

【００２７】

別の側面において、本発明はＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、（Ｆａｂ’）２、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ－Ｆｃもしくはダイアボディ等の本発明の機能的フラグメント、又は化学修飾、特にＰＥＧ化もしくはリポソーム封入により半減期を延長した任意の機能的フラグメントを提供する。ＩＧＦ－１Ｒと結合し、従って宿主細胞に取込まれる抗体は特にＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患の治療に有用である。

【００２８】

本明細書で使用する「抗体」なる用語はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、１本鎖抗体、二重特異性抗体及びヒト化抗体又は最適化抗体に加え、ＩＧＦ－１Ｒ蛋白質に対する抗体の結合特異性を維持するフラグメント等のＦａｂフラグメントを意味し、本発明の抗体と結合するエピトープと同一エピトープを発現するそのフラグメントを含む。従って、本発明は抗体の可変領域重鎖及び軽鎖等の１本鎖の使用にも関する。これらの型の任意抗体又は抗体フラグメントの作製は当業者に周知である。本発明の場合には、ＩＧＦ－１Ｒ蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製し、単離し、ＩＧＦ－１Ｒに対して高い親和性をもつことが分かった。

【００２９】

ＩＧＦ－１Ｒとの結合に関して１２Ｂ１と競合する抗体も本発明の範囲に含まれる。

【００３０】

本発明は２本の軽鎖と２本の重鎖を含む抗ＩＧＦ－１Ｒキメラ抗体にも関し、各鎖はヒト定常領域の少なくとも一部と、ヒトＩＧＦ－１Ｒに対して特異性をもつ非ヒト起源の可変（Ｖ）領域の少なくとも一部を含み、前記抗体はヒトＩＧＦ－１Ｒの阻害性及び／又は中和性エピトープと高親和性で結合する（例えばマウス１２Ｂ１に由来する抗体）。本発明は更にこのような抗体のフラグメント又は誘導体も含み、例えば抗体鎖の１個以上の部分（例えば重鎖定常領域、結合領域、多様性領域もしくは可変領域、又は軽鎖定常領域、結合領域もしくは可変領域）が挙げられる。

【００３１】

所定態様において、本発明の抗体は例えばＪｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）又はＴｅｍｐｅｓｔ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：２６６－２７３（１９９１）に記載されているように、ハイブリドーマ由来抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）をヒトモノクローナル抗体に移植することにより「ヒト化」してもよいし、例えばＰａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ １ｍｍ．２８：４８９－４９８（１９９１）及び米国特許第６，７９７４９２号に記載されているように、相同ヒトフレームワーク対応部分に類似するように免疫グロブリン可変領域の表面露出マウスフレームワーク残基を改変することにより「ベニアリング」してもよく、上記全文献は本明細書に援用する。従って、本態様によると、１２Ｂ１に由来するヒト化抗体は、前記抗体が軽鎖及び／又は重鎖を含み、前記軽鎖及び／又は重鎖の骨格セグメントＦＲ１～ＦＲ４が夫々ヒト抗体軽鎖及び／又は重鎖の骨格セグメントＦＲ１～ＦＲ４に由来することを特徴とする。

【００３２】

更に、本発明は本発明のモノクローナル抗体を分泌することが可能なマウスハイブリドーマ、特に国立微生物培養センター（ＣＮＣＭ，Ｃｅｎｔｒｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ ｄｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｄｅ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅ）（フランス、パリに所在のパスツール研究所）に２００５年１２月７日付けで寄託番号Ｉ－３５３８として寄託されたマウス由来のハイブリドーマに関する。

【００３３】

本発明の１関連側面はヒトＩＧＦ－１Ｒと高親和性で特異的に結合するモノクローナル抗体又はその機能的フラグメントを提供する。所定態様において、これらの抗体は約１０ｐＭ～約５００ｎＭのＥＤ５０でヒトＩＧＦ－１Ｒと結合する。本明細書で使用する「約」なる用語は±１５％の変動を含むものと定義される。

【００３４】

本発明は更に重鎖及び／又は軽鎖を含む本明細書に開示する本発明の抗体又はその抗原結合部分をコードする単離核酸を提供する。従って、本発明の１側面は（ａ）配列番号１～８の１種に記載のアミノ酸配列をコードする核酸分子；又は（ｂ）中ストリンジェント条件下で（ａ）のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列、又は（ｃ）上記（ａ）もしくは（ｂ）に対して縮重配列であるヌクレオチド配列を含む核酸分子、又は（ｄ）そのスプライス変異体ｃＤＮＡ配列、又は（ｅ）配列番号９、１０もしくは１１の核酸配列のＣＤＲの少なくとも１個、又は配列番号９、１０もしくは１１に記載の配列と最適整列後に少なくとも８０％、好ましくは８５％、９０％、９５％及び９８％の一致度をもつ配列と高ストリンジェント条件下でハイブリダイズすることが可能な少なくとも１８ヌクレオチドの核酸から選択される単離核酸分子を提供する。

【００３５】

場合によりベクターで形質転換された宿主細胞により認識される制御配列と機能的に連結された上記核酸分子を含むベクターと、ベクターで形質転換された宿主細胞も提供する。本発明により形質転換された細胞は本明細書に開示する組換え抗体の作製方法で使用することができる。抗体又はそのフラグメントをコードする核酸分子で各種宿主細胞を形質転換することができる。宿主細胞は原核又は真核系から選択することができ、例えば細菌細胞だけでなく、酵母細胞又は動物細胞、特に哺乳動物細胞が挙げられる。昆虫細胞や植物細胞も使用できる。

【００３６】

上記目的によると、抗体又はその機能的フラグメントの１種の作製方法が提供され、前記方法はポリペプチドの発現を助長する条件下で本明細書に開示する核酸分子で形質転換した宿主細胞を培養する段階と；宿主細胞培養培地から抗体を回収する段階を含む。

【００３７】

本発明は本明細書に記載する抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を産生するハイブリドーマ等の単離細胞株も提供する。

【００３８】

１側面において、本発明は配列番号１、２、３、４、５、６、７又は８の１種以上に記載のアミノ酸配列と少なくとも９０％、９５％、９８％又は９９％一致するアミノ酸配列をもつ単離、精製又は組換えポリペプチドを提供する。より好ましい態様において、本願は配列番号１～８の１種に記載のアミノ酸配列と少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％、９９．３％、９９．５％又は９９．７％一致するアミノ酸配列を提供する。

【００３９】

本発明は同様に、本発明に従って形質転換された少なくとも１個の細胞を含むヒト以外の動物に関する。従って、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の重鎖及び／又は軽鎖又はその抗原結合部分を発現する非ヒトトランスジェニック動物も提供する。

【００４０】

好ましい１態様によると、本発明の抗体はハイブリドーマから直接産生されたり、ハイブリドーマに由来する抗体配列から誘導されるのではなく、組換え法により合成される。

【００４１】

上記のようなＩＧＦ－１Ｒに対する抗体は生産施設で使用することもできるし、アフィニティークロマトグラフィー等により付加量の蛋白質を単離するために実験室で使用することもできる。例えば、本発明の抗体は付加量のＩＧＦ－１Ｒを単離するために利用することもできる。

【００４２】

本明細書に記載する抗体の作製方法も提供する。前記方法は（ａ）検出可能な免疫応答を刺激するために有効な量の有効な免疫原を含有する免疫原性組成物をマウスに投与する段階と；（ｂ）マウスから抗体産生細胞を採取し、抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合し、抗体細胞ハイブリドーマを得る段階と；（ｃ）モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞培養物を培養する段階と；（ｄ）細胞培養物からモノクローナル抗体を得る段階を含む。好ましくは、免疫原はヒトＩＧＦ－１Ｒポリペプチド又は免疫応答を誘発するために十分なそのフラグメント、例えば細胞外ドメインを含む。全長ヒトＩＧＦ－１Ｒのアミノ酸配列は公知である。各々その開示内容全体を本明細書に援用するＲｉｅｄｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｃａｎｃｅｒ，１３：Ｓ３３－Ｓ４３（２００６）及びＢａｓｅｒｇａ，Ｒ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５５：２４９－２５２（１９９５）参照。

【００４３】

本発明は同様に本発明の抗体又はその機能的フラグメントの１種と医薬的に許容可能なキャリヤーを含有する医薬組成物を提供する。医薬組成物には更に抗腫瘍剤又は造影試薬等の別の成分も加えることができる。

【００４４】

別の態様において、本発明はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患のインビボ撮影用医薬組成物として、標識され、ＩＧＦ－１Ｒとインビボ結合する上記モノクローナル抗体又はそのフラグメントと；医薬的に許容可能なキャリヤーを含有する組成物に関する。

【００４５】

当業者に自明の通り、本発明の抗体又はその結合フラグメントはＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する各種病態の検出、診断及びステージングを含む種々の医療又は研究目的に利用される。実際に、このような抗体の使用により実験室研究を容易にすることもできる。

【００４６】

ステージ判定は潜在的な予後値を示し、最適治療法を設計する基準を提供する。Ｓｉｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ １８：２０５９（２０００）。一般に、例えば乳癌の病理ステージングは臨床ステージングよりも正確な予後を提供するので好ましい。しかし、臨床ステージングは病理評価用組織を得るために侵襲的方法に依存しないため、精度が病理ステージングと同等であるならば好ましい。

【００４７】

適切なラベル又は他の適切な検出可能な生体分子もしくは薬剤と併用した場合に、本明細書に記載する抗体はインビトロ及びインビボ診断及び予後診断用として特に有用である。本発明の抗体を特定用途に利用するのに適切な条件としては新生物の検出と診断が挙げられ、限定されないが、卵巣癌、乳癌、腎臓癌、結腸直腸癌、肺癌又は肉腫（例えばユーイング肉腫，横紋筋肉腫，骨肉腫及び神経芽細胞腫）が挙げられる。

【００４８】

イムノアッセイ用ラベルは一般に当業者に公知であり、酵素、放射性同位体、蛍光基質、発光基質及び発色基質（金コロイドやラテックスビーズ等の着色粒子を含む）が挙げられる。適切なイムノアッセイとしては酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）が挙げられる。下記のように、各種ラベルと、前記ラベルを本発明の抗体に結合する方法が当業者に周知である。

【００４９】

本明細書で使用する「ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患」なる用語は疾患に罹患している対象における高値又は異常に低値のＩＧＦ－ＩＲ（異常）の存在が疾患の病態生理に関与しているか又は疾患の増悪に寄与する因子であることが判明しているか又はそ

の疑いがある病変又は他の疾患を意味する。従って、「新生細胞」又は「ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する新生物」又は「ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する異形成細胞」は同義に使用し、正常に対するＩＧＦ－１Ｒ発現レベルの上昇又は低下を特徴とする異常細胞又は細胞増殖を意味する。このような形質転換細胞は正常なホメオスタティック増殖制御なしに増殖し、組織の細胞の異常増殖に特徴付けられる病態である癌に至る。あるいは、このような疾患は例えば疾患に罹患している対象の細胞表面のＩＧＦ－ＩＲレベルの上昇又は疾患細胞もしくは組織におけるＩＧＦ－ＩＲのチロシン自己リン酸化の増加により立証される場合もある。ＩＧＦ－ＩＲレベルの上昇は例えば上記のような抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を使用して検出することができる。更に、上記用語は比較的自律的な増殖を示し、従って、細胞増殖制御の有意低下を特徴とする異常増殖表現型を示す細胞を意味する。あるいは、細胞は正常レベルのＩＧＦ－１Ｒを発現する場合もあるが、異常増殖を特徴とする。全新生細胞が必ずしも所定時点で複製細胞ではない。新生細胞として定義するものは良性新生物の細胞と、悪性（ないし真性）新生物の細胞から構成される。真性新生細胞は癌と呼ばれることが多く、一般に内胚葉又は外胚葉組織起源の細胞に由来する場合には癌と呼び、中胚葉起源の細胞種に由来する場合には肉腫と呼ぶ。本発明の方法により診断することができる新生物の例としては、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫及び骨肉腫が挙げられる。

【００５０】

所定態様において、ＩＧＦ－１Ｒに関して「発現増加」とは、（ＲＮＡ発現又は蛋白質発現として測定した場合に）対照に対して統計的に有意な発現増加を示す蛋白質又は遺伝子発現レベルを意味する。実際に、本発明の広義の側面はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する異形成細胞又は新生組織の同定及び定量を提供する。

【００５１】

本発明の別の広義の側面は対象における病的過増殖性腫瘍性疾患又はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する病態に対する感受性の診断方法に関し、前記方法は、（ａ）サンプル中のＩＧＦ－１Ｒ含有細胞の有無を判定する段階と；（ｂ）前記ＩＧＦ－１Ｒ含有細胞の有無に基づいて病態又は病態感受性を診断する段階を含む。本発明の抗体の診断用途は原発腫瘍及び癌に加え、転移も含む。好ましくは、抗体又はその機能的フラグメントの１種は検出可能及び／又は定量可能なシグナルが得られるように免疫コンジュゲート又は標識抗体として存在することができる。

【００５２】

当業者に自明の通り、ヒトＩＧＦ－１Ｒは各種アッセイ等の多数の方法で検出することができる。アッセイを実施するための任意手段が本発明に適合可能であるが、好ましい方法はＥＬＩＳＡ法による免疫酵素法、免疫蛍光法又はラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）法等を利用する。

【００５３】

上記によると、本発明の１態様はＩＧＦ－ＩＲ受容体の過剰発現又は過少発現、好ましくは過剰発現に関連する疾患の好ましくはインビトロの診断法に関する。患者からサンプルを採取し、ＩＧＦ－１Ｒ特異抗体による適切な任意イムノアッセイに付し、ＩＧＦ－１Ｒの存在を検出する。好ましくは、生体サンプルはヒト起源の血清、全血、細胞、組織サンプル又は生検等の体液により形成される。サンプルとしては、例えばＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する病的過増殖性腫瘍性疾患の存在を適切にアッセイすることができる生検組織が挙げられる。

【００５４】

試験サンプル中に存在するＩＧＦ－１Ｒの量を測定後、ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する過増殖性腫瘍性疾患、例えば卵巣癌をもたないか又は示さない個体から試験サンプルと同様の方法で採取した対照サンプルの量と結果を比較することができる。試験サンプル中のＩＧＦ－１Ｒポリペプチド値が有意に上昇している場合には、サンプルを採取した対象は前記疾患、例えば卵巣癌をもつ可能性又は発症する可能性が高いと推論することができる。

【００５５】
本発明の特定インビトロ法はＩＧＦ－１Ｒ含有細胞をもつ疑いのある生体サンプルを採取する段階と、抗体／ＩＧＦ－１Ｒ複合体の形成を助長する条件下で前記サンプルを本発明の抗体又はその生物活性フラグメントと接触させる段階と、前記サンプル中のＩＧＦ－１Ｒ含有細胞の存在の指標として前記複合体を検出する段階を含む。正常に対するＩＧＦ－１Ｒ発現レベルの存在は癌の存在の指標となる。
【００５６】
ＩＧＦ－１Ｒ介在性新生物疾患をもつ患者の臨床診断又は監視において、ＩＧＦ－１Ｒ発現細胞が検出された場合又は正常対象もしくは非癌組織に由来する対応する生体サンプル中の値に比較してＩＧＦ－１Ｒレベルの上昇が検出された場合には、一般に患者はＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患を示すか又はその疑いがあると判断される。
【００５７】
上記によると、本発明は癌感受性の予測方法を提供し、前記方法は組織サンプル中のＩＧＦ－１Ｒ発現レベルを検出し、その存在により癌感受性を判断し、ＩＧＦ－１Ｒ発現度は感受性の程度と相関する。従って、特定態様では、例えば膵臓組織、結腸組織、乳房組織、卵巣組織又はＩＧＦ－１Ｒを発現する疑いのある細胞の他の任意組織におけるＩＧＦ－１Ｒの発現を試験し、サンプル中のＩＧＦ－１Ｒの存在が癌感受性又は組織特異的腫瘍の発生もしくは存在の指標となる。
【００５８】
腫瘍侵襲度の測定方法と、個体における悪性腫瘍の進行の経時的観察方法も提供する。１態様において、個体における悪性腫瘍の進行の経時的観察方法は腫瘍のサンプル中で細胞により発現されるＩＧＦ－１Ｒのレベルを測定する段階と、こうして測定されたレベルを別の時点で同一個体から採取した等価組織サンプル中で発現されるＩＧＦ－１Ｒレベルと比較する段階を含み、腫瘍サンプル中の経時的なＩＧＦ－１Ｒ発現度が癌の進行に関する情報を提供する。
【００５９】
更に別の態様において、本願は対象に適切な治療プロトコルを決定する方法を提供する。具体的には、本発明の抗体は特に対象がＩＧＦ－１Ｒとの結合に関して本発明の抗体と競合しないＩＧＦ－１Ｒ抗体で治療中である状況において、個体における悪性腫瘍の改善過程を監視するのに非常に有用となろう。エピトープマッピング法は周知である。本発明によるＩＧＦ－１Ｒレベルの有無又は変化は対象がＩＧＦ－１Ｒに関連する癌等の再発性又は進行性又は持続性新生物をもつ可能性があることの指標となり得る。従って、ＩＧＦ－１Ｒを発現する細胞数の増加又は各種組織もしくは細胞中に存在するＩＧＦ－１Ｒ濃度を測定することにより、ＩＧＦ－１Ｒに関連する悪性腫瘍の改善を目的とする特定治療レジメンが有効であるか否かを判定することができる。
【００６０】
薬剤開発において製薬産業に立ちはだかる大きな問題の１つは潜在的治療候補に関連する効力を示すという点である。この問題は抗癌治療薬として抗ＩＧＦ－１Ｒ阻害抗体を作製するために製薬産業で続けられている多大な労力にも当てはまる。これを実施するための１つの方法はＩＧＦ－１Ｒ活性が阻害される時点を示す適切なマーカーを得ることである。理想的には、候補ＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト部分が有効である場合には、ＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト部分を投与後のＩＧＦ－１Ｒ発現レベルの低下が観察されるはずである。従って、ＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト部分による良好な治療では、腫瘍細胞又はこの細胞表面受容体を発現する他の任意細胞上のＩＧＦ－１Ｒ発現レベルが低下すると予測され、不良な結果の場合には発現レベルが変化しないか又はＩＧＦ－１Ｒ発現レベルが増加すると予測される。従って、例えば適切なマーカーを使用して腫瘍細胞上のＩＧＦ－１Ｒ蛋白質発現を測定することにより、ＩＧＦ－１Ｒ活性抑制の指標として発現レベル低下を検出することができる。本発明は腫瘍／癌細胞上のＩＧＦ－１Ｒ発現レベルを個々に測定することによりＩＧＦ－１Ｒ活性及び／又は発現もしくは腫瘍形成状態を測定するための「バイオマーカーストラテジー」で利用するために、本発明のＩＧＦ－１Ｒ抗体がＩＧＦ

－１Ｒと高親和性で結合する性質を活用することができる。具体的には、本発明はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する病的過増殖性腫瘍性疾患の種類、重篤度及び進行を推定するための迅速な手段、例えば高親和性抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を提供する。

【００６１】

上記「バイオマーカーストラテジー」の促進として、本発明は対象におけるＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する新生物の発症、進行又は退縮の判定方法を提供し、前記方法は、第１の時点で第１の生体サンプルを対象から採取する段階と、抗体又はそのフラグメントとサンプルに含まれる疑いのあるＩＧＦ－１Ｒの結合を可能にする条件下で第１のサンプルを有効量の１２Ｂ１抗体と接触させる段階と、抗体と第１のサンプル中のＩＧＦ－１Ｒ含有細胞の特異的結合を測定し、第１の値を得る段階と、その後、第２の時点で第２の生体サンプルを対象から採取する段階と、第２の生体サンプルを１２Ｂ１抗体と接触させる段階と、抗体と前記サンプル中のＩＧｆ－１ｒの特異的結合を測定し、第２の値を得る段階と、結腸癌の発症、進行又は退縮の測定値として、第１のサンプルにおける結合の測定値を第２のサンプルにおける特異的結合の測定値と比較する段階を含み、第１のサンプルに対する第２以降のサンプルにおけるＩＧＦ－１Ｒの発現レベルの増加が前記新生物の進行の指標となり、低下が前記サンプルにおける新生物の退縮の指標となる。

【００６２】

当分野で公知の多様な予後診断及び診断プロトコルのいずれか１種と上記診断アプローチを組合せることができる。例えば、本発明の別の態様は組織サンプルの状態の診断及び予後診断用手段として、ＩＧＦ－１Ｒの発現と悪性腫瘍に関連する因子の一致を観察する方法に関する。悪性腫瘍に関連する多様な因子を利用することができ、例えば悪性腫瘍に関連する遺伝子又は遺伝子産物の発現（例えば前立腺癌ではＰＳＡ、ＰＳＣＡ及びＰＳＭ発現、乳癌ではＨＥＲ２発現等）や、巨視的細胞観察が挙げられる（例えばＢｏｃｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ａｎａｌ．Ｑｕａｎｔ．Ｃｙｔｏｌ．６（２）：７４－８８；Ｅｐｓｔｅｉｎ，１９９５，Ｈｕｍ．Ｐａｔｈｏｌ．２６（２）：２２３－９；Ｔｈｏｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｍｏｄ．Ｐａｔｈｏｌ．１１（６）：５４３－５１；Ｂａｉｓｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ａｍ．Ｊ．Ｓｕｒｇ．Ｐａｔｈｏｌ．２３（８）：９１８－２４参照）。病変に一致する一組の特定因子の存在は組織サンプルの状態を診断及び予後診断するために不可欠の情報となるので、例えば、ＩＧＦ－１Ｒの発現と悪性腫瘍に関連する別の因子の一致を観察する方法は有用である。

【００６３】

所定態様において、ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する異形成細胞又は新生組織の検出はＩＧＦ－１Ｒを発現する細胞を従来のＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト部分に暴露し（治療細胞）、その後、治療細胞を本明細書に開示する抗体と接触させ、従来のＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト部分がＩＧＦ－１Ｒの細胞表面発現をダウンレギュレートする能力を評価することにより可能になる。治療細胞を本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体と接触させる段階は本明細書に開示する抗体と同時に実施してもよいし、後期時点で実施してもよい。あるいは、治療後の数時点にわたって治療細胞におけるＩＧＦ－１Ｒ発現をアッセイし、患者が治療に応答しているか否かを確認してもよい。この方法は経時的である点を除いて上記と同一段階を含む。従って、治療細胞と１２Ｂ１抗体の結合値が低いことによりＩＧＦ－１Ｒ発現のダウンレギュレーションが認められた場合には、患者は従来のＩＧＦ－１Ｒ特異的治療に良好に応答していると判断することができ、発現レベルが変化しない場合又は本発明の抗体と治療細胞上のＩＧＦ－１Ｒの結合によりＩＧＦ－１Ｒ発現レベルの増加が認められた場合には、患者は従来のＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト部分による治療に良好に応答していないと判断することができる。上記アッセイの結果から、治療医は結腸内視鏡検査、外科手術又は化学療法等の集中的又は侵襲的プロトコルが有効な診断又は治療に必要であるか否かの有用な情報を得られる。このような検出は癌等の過増殖性腫瘍性疾患であると過去に診断されていない患者のみならず、ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する任意腫瘍性疾患の病理作用の治療を過去に受けたことがあるか又は現在施療中の患者にも役立つと思われる。

【００６４】
所定態様において、従来のＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト部分は各々その開示内容全体を本明細書に援用するＰＣＴ／ＦＲ０３／００１７８（出願日２００３年１月２０日）のＣＩＰ出願である係属出願ＵＳ　２００５００８４９０６（出願日２００３年１２月１６日）に記載されている７Ｃ１０と呼ばれる抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体である。本明細書に開示するＩＧＦ－１Ｒ抗体は７Ｃ１０と結合するエピトープ以外のエピトープと結合するので、本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体は７Ｃ１０抗体の治療効力を評価するために理想的である。治療効力の評価に提案される用途では、７Ｃ１０がＩＧＦ－１Ｒ発現をダウンレギュレートするか否かを調べるために本発明の抗体を７Ｃ１０と同時に使用してもよいし、７Ｃ１０治療後に使用してもよい。本発明のＩＧＦ－１Ｒ抗体がＡＤＣＣ活性をもたないという点も、７Ｃ１０等の従来の抗体の効力の評価に有用な因子である。更に他の態様では、抗体が同一エピトープでのＩＧＦ－１Ｒとの結合に関して本発明の抗体と競合しない限り、任意ＩＧＦ－１Ｒ特異抗体の効力を評価することができる。

【００６５】
本発明の別の目的はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患のインビボ撮影方法である。このような方法はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患又はその感受性を診断又はその診断を確認するために有用であると思われる。例えば、前記方法は腫瘍性疾患の症状を示す患者で使用することができる。患者の例えばＩＧＦ－１Ｒ発現レベルが上昇している場合には、患者は癌性疾患に罹患している可能性がある。前記方法は無症候患者で使用することもできる。ＩＧＦ－１Ｒの存在は例えば将来の症候性疾患に対する感受性を示すことができる。同様に、前記方法はＩＧＦ－１ｒ介在性癌であると過去に診断された患者における進行及び／又は治療応答を監視するためにも有用である。

【００６６】
上記目的によると、本発明は好ましくは標識、特に放射性標識された本発明の抗体又はその機能的フラグメントの１種を含むインビボ造影試薬と、特にＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患、例えばＩＧＦ－１Ｒの過剰発現を特徴とする癌又は細胞がＩＧＦ－１Ｒを過剰発現する他の病態の検出用の医療撮影におけるその使用を提供する。

【００６７】
造影試薬、例えば診断試薬は静注により患者の体内に投与することもできるし、ＩＧＦ－１Ｒ含有細胞を含む疑いのある組織、例えば結腸又は卵巣又は膵臓に直接投与することもできる。試薬の用量は治療法と同一範囲内とすべきである。一般には、試薬を標識するが、方法によっては、ＩＧＦ－１Ｒに対して親和性をもつ一次試薬は標識せず、二次標識剤を使用して一次試薬と結合させる。ラベルの選択は検出手段により異なる。例えば、光学検出には蛍光ラベルが適切である。外科的介入を伴わない断層写真撮影には常磁性ラベルの使用が適切である。ＰＥＴ又はＳＰＥＣＴを使用して放射性ラベルを検出することもできる。

【００６８】
診断は標識遺伝子座の個数、寸法及び／又は強度を対応する基線値と比較することにより実施される。基線値は１例として非病変個体集団における平均レベルを表すことができる。基線値は同一患者で測定された過去のレベルを表すこともできる。例えば、治療開始前の患者で基線値を測定し、その後、測定値を基線値と比較することができる。基線に対する値の低下は陽性の治療応答を表す。

【００６９】
従って、本発明の一般方法は標識した上記モノクローナル抗体又は抗原結合フラグメント等の造影有効量の造影試薬と医薬的に有効なキャリヤーを患者に投与した後にサンプル中に存在するＩＧＦ－１Ｒと結合後の試薬を検出することにより実施される。所定態様において、前記方法は標的部分と活性部分を含有する造影有効量の造影剤を投与することにより実施される。標的部分はＦａｂ、ＦＡｂ’２、１本鎖抗体又はＩＧＦ－１Ｒ中に存在するエピトープと相互作用する他の結合剤とすることができる。活性部分は放射性テクネチウム、放射性インジウム又は放射性ヨウ素等の放射性物質とすることができる。ヒト等

の哺乳動物の診断用に有効な量の造影剤を投与した後、造影剤の局在と蓄積を検出する。造影剤の局在と蓄積は放射性核種撮影法、ラジオシンチグラフィ、核磁気共鳴画像法、コンピュータ断層撮影法、ポジトロン放射断層撮影法、コンピュータ体軸断層撮影法、Ｘ線又は磁気共鳴画像法、蛍光検出及び化学発光検出により検出することができる。

【００７０】

本発明のインビボ撮影法は癌患者に予後診断を提供するためにも有用である。例えば、侵襲性癌が転移する可能性又は所定治療に応答する可能性の指標となるＩＧＦ－１Ｒの存在を検出することができる。更に、本発明のインビボ撮影法はＩＧＦ－１Ｒ介在性癌、例えば体内の他の部分に転移した癌を検出するためにも使用することができる。

【００７１】

本明細書に開示する抗体は従来の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体により治療後に齧歯類又はウサギに移植された腫瘍の増殖を観察又は監視することにより、抗ＩＧＦ－１Ｒ治療を免れることができるヒト腫瘍の同定方法で使用することもできる。

【００７２】

本発明の抗体は本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体と他の治療剤による併用療法を調査及び評価するために使用することもできる。本発明の抗体及びポリペプチドは類似病変に罹患している動物に抗体又はポリペプチドを投与し、病変の１種以上の症状が緩和されるか否かを判定することにより、他の病変におけるＩＧＦ－１Ｒの役割を調査するために使用することもできる。

【００７３】

本発明は更に包埋生体サンプルがヒトＩＧＦ－１Ｒ蛋白質を含有しているか否かを判定するためのキットも提供し、前記キットは、（ａ）包埋ヒトＩＧＦ－１Ｒ蛋白質と特異的に結合して結合複合体を形成するＩＧＦ－１Ｒ結合剤と；（ｂ）前記結合複合体の形成を指示することが可能な指示薬を含み、前記ＩＧＦ－１Ｒ結合剤は本明細書に記載するモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を使用する診断法は診断研究所、実験研究所、開業医又は個人が実施できる。試験する標的を高濃度化するように場合により臨床サンプルを前処理する。その後、使用者は診断成分のレベル変化又は変性を検出するためにキットに含まれる試薬を添加する。

【００７４】

別の態様において、本発明は容器と；容器に貼付けたラベルと；容器内に収容された活性剤を含有する組成物を含む製品に関し、組成物はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する新生物の検出、診断又は予後診断に有効であり、容器に貼付けたラベルはＩＧＦ－１Ｒ蛋白質受容体の過剰発現を特徴とする病態の診断又は予後診断に組成物を使用できることを指示する。

【００７５】

本発明の他の特徴と利点は以下の記載と実施例及び図面に明示され、図面の説明は以下の通りである。

【００７６】

本特許出願は少なくとも１枚のカラー図面を含む。カラー図面を添付した本願のコピーは要求と必要な料金の納付後に特許商標局から配布される。

【図面の簡単な説明】

【００７７】

【図１】各種ＩＧＦ－１Ｒ特異抗体とＩＧＦ－１Ｒの結合を詳細に示すＦＡＣＳ分析のヒストグラムを示す。

【図２Ａ】ＩＧＦ－１Ｒ特異抗体による非感染及び感染Ｓｆ９細胞の特性決定を詳細に示すヒストグラムを示す。

【図２Ｂ】ＩＧＦ－１Ｒ特異抗体による非感染及び感染Ｓｆ９細胞の特性決定を詳細に示すヒストグラムを示す。

【図２Ｃ】ＩＧＦ－１Ｒ特異抗体による非感染及び感染Ｓｆ９細胞の特性決定を詳細に示すヒストグラムを示す。

【図３】ＮＩＨ　３Ｔ３　ＩＧＦ－１Ｒ＋非還元条件と還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動後にモノクローナル抗体１２Ｂ１でプローブしたＩＧＦ－１Ｒ及びＩＲの膜抽出液及び組換え細胞外領域のウェスタンブロット分析を示す。
【図４】^{125}ＩＧＦ－１結合阻害実験を示す。合計特異的^{125}ＩＧＦ－１結合（％）をリガンド濃度の関数として半対数グラフにプロットした。特異的結合値は３回実施した実験の平均値である。
【図５】２種類のマウスｍＡｂ抗ＩＧＦ１Ｒ　７Ｃ１０及び１２Ｂ１の逐次注射後に得られたソノグラムを示す。系列１：１回目の注射（５分）：７Ｃ１０（８．２４μｇ／ｍｌ）、２回目の注射（１分）：７Ｃ１０（８．２４μｇ／ｍｌ）、及び３回目の注射（１分）：１２Ｂ１（７．４μｇ／ｍｌ）、系列２：１回目の注射（５分）：１２Ｂ１（７．４μｇ／ｍｌ）、２回目の注射（１分）：１２Ｂ１（７．４μｇ／ｍｌ）、及び３回目の注射（１分）：７Ｃ１０（８．２４μｇ／ｍｌ）。７Ｃ１０注射を青色で示し、１２Ｂ１注射を赤色で示す。４３９ＲＵの可溶性ＩＧＦ１ＲをＦＣ２にカップリングし、ＣＭ４センサーチップを使用して流速１０μｌ／分で２５℃にてＢｉｏｃｏｒｅ　Ｘで実験を実施した。
【図６】ＩＧＦ－１Ｒに対する抗体の結合親和性を確認するために１２Ｂ１を含む各種ＩＧＦ－１Ｒ抗体を使用した競合アッセイの結果を詳細に示す。データから明らかなように、１２Ｂ１は７Ｃ１０がＩＧＦ－１ｒを発現するＭＣＦ－７細胞と結合するのを阻害しないため、１２ｂｌ抗体は７Ｃ１０と結合したエピトープ以外のエピトープと結合することが確認された。
【図７】各種細胞株で対照Ａｂ（ＩｇＧ）と１２Ｂ１を使用した免疫組織化学試験（ＩＨＣ）の結果を示す。データから明らかなように、１２Ｂ１は各種細胞株の細胞膜を示差的に染色した。
【図８Ａ】図８～１５はＩＧＦ－１Ｒに特異的なマウスモノクローナル１２Ｂ１抗体と市販のヤギポリクローナル抗体を各種ヒト組織で使用した各種免疫組織化学試験の結果をまとめたものである。図８Ａ上段：扁桃におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（@１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。左上：ヤギＩＧＦ－１Ｒ抗体は上皮陰窩の細胞を原形質膜局在で標識する。右上：扁桃上皮の基底細胞の原形質膜染色が増加している（矢印）。下段：扁桃における１２Ｂ１　ＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（@０．７５μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。左下：１２Ｂ１　ＩＧＦ－１Ｒ抗体は上皮陰窩の細胞を原形質膜局在で標識し、上記ヤギポリクローナルと同様のパターンと強度である。右下：扁桃上皮の基底細胞の原形質膜染色が増加している（矢印）。ヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒに比較すると、染色強度は弱い。ヘマトキシリン対比染色。図８Ｂ上段：扁桃におけるヤギＩｇＧ陰性対照ＩＨＣ（@１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。ここでは図９Ａに示す扁桃と同一領域を示す。染色は検出されない。ヘマトキシリン対比染色。
【図８Ｂ】図８～１５はＩＧＦ－１Ｒに特異的なマウスモノクローナル１２Ｂ１抗体と市販のヤギポリクローナル抗体を各種ヒト組織で使用した各種免疫組織化学試験の結果をまとめたものである。図８Ａ上段：扁桃におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（@１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。左上：ヤギＩＧＦ－１Ｒ抗体は上皮陰窩の細胞を原形質膜局在で標識する。右上：扁桃上皮の基底細胞の原形質膜染色が増加している（矢印）。下段：扁桃における１２Ｂ１　ＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（@０．７５μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。左下：１２Ｂ１　ＩＧＦ－１Ｒ抗体は上皮陰窩の細胞を原形質膜局在で標識し、上記ヤギポリクローナルと同様のパターンと強度である。右下：扁桃上皮の基底細胞の原形質膜染色が増加している（矢印）。ヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒに比較すると、染色強度は弱い。ヘマトキシリン対比染色。図８Ｂ上段：扁桃におけるヤギＩｇＧ陰性対照ＩＨＣ（@１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。ここでは図９Ａに示す扁桃と同一領域を示す。染色は検出されない。ヘマトキシリン対比染色。
【図９Ａ】図９Ａ上段：乳癌＃１，＃２におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨ

Ｃ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも２０倍対物レンズを使用した。左上：乳癌＃２。大半の腫瘍細胞に明色の膜染色が認められる。右上：乳癌＃１。大半の腫瘍細胞に強い膜染色が認められる。下段：乳癌＃１，＃２における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。スライド＃３５２。どちらも２０倍対物レンズを使用した。１２Ｂ１抗体は上記パターンと同様に腫瘍を標識する。２種類の腫瘍は非常に異なる強度の膜染色を示す。腫瘍＃２の１２Ｂ１染色はヤギポリクローナルよりもやや明るい。腫瘍＃１（右）も同じに見える。図９Ｂ上段：乳癌＃１及び＃２におけるヤギＩｇＧ陰性対照ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも２０倍対物レンズを使用した。ここでは図１０Ａに示す乳癌と同一領域を示す。染色は検出されない。下段：乳癌＃１及び＃２における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。どちらも２０倍対物レンズを使用した。ここでは図１０Ａ（下段画像）に示す乳癌と同一領域を示す。染色は検出されない。ヘマトキシリン対比染色。

【図９Ｂ】図９Ａ上段：乳癌＃１，＃２におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも２０倍対物レンズを使用した。左上：乳癌＃２。大半の腫瘍細胞に明色の膜染色が認められる。右上：乳癌＃１。大半の腫瘍細胞に強い膜染色が認められる。下段：乳癌＃１，＃２における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。スライド＃３５２。どちらも２０倍対物レンズを使用した。１２Ｂ１抗体は上記パターンと同様に腫瘍を標識する。２種類の腫瘍は非常に異なる強度の膜染色を示す。腫瘍＃２の１２Ｂ１染色はヤギポリクローナルよりもやや明るい。腫瘍＃１（右）も同じに見える。図９Ｂ上段：乳癌＃１及び＃２におけるヤギＩｇＧ陰性対照ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも２０倍対物レンズを使用した。ここでは図１０Ａに示す乳癌と同一領域を示す。染色は検出されない。下段：乳癌＃１及び＃２における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。どちらも２０倍対物レンズを使用した。ここでは図１０Ａ（下段画像）に示す乳癌と同一領域を示す。染色は検出されない。ヘマトキシリン対比染色。

【図１０Ａ】図１０Ａ上段：結腸癌におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。２０倍（左）と４０倍（右－囲み部分の高倍率画像）の対物レンズを使用した。腫瘍細胞の多様な膜染色が認められる。下段：結腸癌における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。２０倍（左）と４０倍（右－囲み部分の高倍率画像）の対物レンズを使用した。膜染色はヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒと同様であるが、先端の粒状／球状のゴルジ様細胞質染色も認められる。ヘマトキシリン対比染色。図１０Ｂ左：図１０Ａに示した組織と同一領域の結腸癌におけるヤギＩｇＧ陰性対照ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。２０倍の対物レンズを使用した。染色は検出されない。右：図１０Ａに示した組織と同一領域の結腸癌におけるマウスｇＧ陰性対照ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。２０倍対物レンズを使用した。染色は検出されない。

【図１０Ｂ】図１０Ａ上段：結腸癌におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。２０倍（左）と４０倍（右－囲み部分の高倍率画像）の対物レンズを使用した。腫瘍細胞の多様な膜染色が認められる。下段：結腸癌における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。２０倍（左）と４０倍（右－囲み部分の高倍率画像）の対物レンズを使用した。膜染色はヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒと同様であるが、先端の粒状／球状のゴルジ様細胞質染色も認められる。ヘマトキシリン対比染色。図１０Ｂ左：図１０Ａに示した組織と同一領域の結腸癌におけるヤギＩｇＧ陰性対照ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。２０倍の対物レンズを使用した。染色は検出されない。右：図１０Ａに示した組織と同一領域の結腸癌におけるマウスｇＧ陰性対照ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。２０倍対物レンズを使用した。染色は検出されない。

【図１１】左：結腸癌＃２におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。４０倍対物レンズを使用した。腫瘍細胞の原形質膜染色が認められる。右：左に示した腫瘍と同一領域の結腸癌＃２における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ

（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。４０倍対物レンズを使用した。腫瘍細胞には原形質膜と先端の球状ゴルジ様染色が認められる。ヤギＩｇＧ陰性対照に染色は検出されず、マウスＩｇＧ陰性対照では拡散した細胞質染色しか認められない（図示せず）。
【図１２】上段：肺線癌＃２，＃３におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。左上：肺腺癌＃３。腫瘍のこの領域では大半の腫瘍細胞に強い膜染色が認められる。右上：肺腺癌＃２。腫瘍の基底領域（末梢側基質）に腫瘍細胞の膜染色が認められる（矢印）。腫瘍の内部側に位置する他の隣接する腫瘍細胞は全く又は僅かしか標識しない。下段：上記肺腺癌（＃２，３）と同一領域における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。左下：肺腺癌＃３。大半の腫瘍細胞の強い膜染色があり、上記ヤギポリクローナルと非常によく似た反応性を示す。右下：肺腺癌＃２。ヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒで認められたと同様の基質側の腫瘍細胞の膜染色が認められる（太線矢印）。膜染色に加え、腫瘍細胞の非常に強いゴルジ様細胞質染色が認められる（細線矢印）。ヘマトキシリン対比染色。
【図１３】肺扁平上皮癌。上段：ヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。４０倍対物レンズを使用した。大半の腫瘍細胞の強い膜染色が認められる。基質染色も検出される。下段：上記扁平上皮肺癌と同一領域における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。４０倍対物レンズを使用した。染色は上記ヤギポリクローナルと非常によく似ている。腫瘍細胞は強い原形質膜局在で標識され、基質染色も検出される。
【図１４】上段：膵臓癌＃２，＃３におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠１．０μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。左：腫瘍細胞の僅かな膜染色；基質染色。膵島細胞の拡散した細胞質染色と僅かな膜染色（図示せず）。右：腫瘍細胞の明色の断続的な膜染色；多少の基質染色。膵島細胞の細胞質及び膜染色（図示せず）。下段：上記膵臓癌（＃２＆＃３）と同一領域における１２Ｂ１モノクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。どちらも４０倍対物レンズを使用した。左：一部の腫瘍細胞の明色の断続的な膜染色；弱い基質染色。膵島細胞の膜染色（図示せず）。右：一部の腫瘍細胞の明色の断続的な膜染色；多少の基質染色。大半の腫瘍細胞の粒状細胞質染色も認められる。膵島細胞質の膜及び細胞質染色も認められる（図示せず）。ヘマトキシリン対比染色。
【図１５】左上：正常皮膚＃３におけるヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠２．０μｇ／ｍｌ）。４０倍対物レンズ。毛嚢の外部を覆う上皮細胞の膜染色が認められる（細線矢印）。表皮の基底上皮細胞に明色の断続的な膜染色が検出される（太線矢印）。右上：正常皮膚＃３におけるヤギＩｇＧ陰性対照ＩＨＣ（＠２．０μｇ／ｍｌ）。４０倍対物レンズ。染色は検出されない。左下：正常皮膚＃３におけるマウスクローン１２Ｂ１　ＩＧＦ－１Ｒ　ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。４０倍対物レンズ。上記ヤギポリクローナルと同様に、毛嚢の上皮細胞の膜染色と、表皮の基底上皮細胞の明色の断続的な膜染色が認められる。１２Ｂ１モノクローナル染色はヤギポリクローナルよりも明色である。右下：正常皮膚＃３におけるマウスＩｇＧ陰性対照ＩＨＣ（＠０．７５μｇ／ｍｌ）。４０倍対物レンズ。染色は検出されない。
【発明を実施するための形態】
【００７８】
本発明は各種ヒト腫瘍細胞又は癌細胞により発現される細胞表面抗原を特異的に認識してこれと結合するモノクローナル抗体とその結合フラグメントを提供する。表面抗原は癌細胞に単に存在しているだけの場合と高度に発現される場合があるが、発生的に近縁の細胞には存在しないか、又は発現度もしくは提示度が高くない。新規に発見されたＩＧＦ－１Ｒ特異抗体は潜在的治療薬として有用であると共に、診断及び細胞精製目的でも有用になろう。
【００７９】
定義及び一般技術

ＧｅｎＢａｎｋデータベース配列のアクセション番号を含めて本明細書に引用する参考資料、特許、特許出願及び科学文献は当業者の知識を証明するものであり、各々を具体的に個々に援用すると記載すると同程度までその開示内容全体を本明細書に援用する。本明細書に引用する資料と本明細書の個々の教示が矛盾する場合には、後者を優先する。同様に、単語又は表現の当分野で認識されている定義と本明細書に具体的に教示する単語又は表現の定義とが矛盾する場合には、後者を優先する。同様に当然のことながら、本明細書で使用する術語は特定態様の記載のみを目的とし、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲のみに限定される。

【００８０】

なお、本明細書と特許請求の範囲で使用する単数形の「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」はもし文脈が明らかに別のものを指定していなければ、複数形も含む。従って、例えば「遺伝子改変」と言う場合には複数のこのような改変を含み、「プローブ」と言う場合には１個以上のプローブと当業者に公知のその等価物を含み、他の用語についても同様である。

【００８１】

本明細書に引用する全刊行物は刊行物の引用に関連する方法及び／又は材料を開示及び記載するために本明細書に援用する。本明細書に引用する刊行物は本願の出願日前のそれらの開示について引用している。この場合、本発明者らが本発明以前の優先権主張日又は先行日により刊行物よりも以前の日付を主張する権利がないと認めるものと解釈すべきではない。更に、実際の刊行物の日付は表示されている日付と異なる場合もあり、個々に確認が必要であると思われる。

【００８２】

本明細書に特に定義しない限り、本発明に関して使用する科学技術用語は当業者に通常理解されている意味をもつ。更に、内容からその必要がない限り、単数形の用語は複数形も含み、複数形の用語は単数形も含む。一般に、本明細書に記載する細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学並びに蛋白質及び核酸化学及びハイブリダイゼーションに関連して使用する命名法とその技術は当分野で周知の広く使用されているものである。本発明の方法及び技術は一般に当分野で周知の従来の方法に従い、特に指定しない限り、本明細書の随所に引用及び記載する各種一般及び特定文献に記載されているように実施される。例えば本明細書に援用するＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）、及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ（１９９２）、及びＨａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９９０）参照。酵素反応と精製技術は当分野で一般に実施されている方法又は本明細書に記載する方法で製造業者の仕様書に従って実施する。本明細書に記載する分析化学、合成有機化学及び医薬化学に関して使用する命名法とその実験室手順及び技術は当分野で一般に使用されている周知のものである。化学合成、化学分析、医薬製造、製剤化及び送達、並びに患者の治療には標準技術を使用する。

【００８３】

以下の用語は特に指定しない限り、以下の意味をもつのもとする。

【００８４】

本明細書の趣旨では、組織サンプルの「切片」とは組織サンプルの１部分又は１片、例えば組織サンプルから切断した組織又は細胞の薄片を意味する。当然のことながら、組織サンプルの複数の切片を取得し、本発明に従って分析してもよい。

【００８５】

「癌」又は「悪性腫瘍」は同義語として使用し、無制御で異常な細胞増殖、疾患細胞が局所に拡大するか又は血流とリンパ系を通って体内の他の部分に拡大する（即ち転移する）能力並びに多数の特徴的な構造及び／又は分子特徴のいずれかを特徴とする多数の疾患のいずれかを意味する。「癌性」又は「悪性細胞」とは特定の構造特性をもち、分化せず、浸潤と転移が可能な細胞とみなされる。癌の例は腎臓癌、結腸癌、乳癌、前立腺癌及び肝臓癌である（Ｄｅ　Ｖｉｔａ，Ｖ．ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．），２００１，ＣＡＮＣＥＲ　ＰＲＩＮＣＩＰＬＥＳ　ＡＮＤ　ＰＲＡＣＴＩＣＥ　ＯＦ　ＯＮＣＯＬＯＧＹ，第６版，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，Ｐａ．参照；本文献はその開示内容全体を全目的で本明細書に援用する）。より詳細には、癌とは正常に対するＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する癌を意味するものと想定する。

【００８６】

単数形又は複数形で使用する「癌性細胞」又は「癌細胞」なる用語は宿主生物に対して病的な状態にする悪性形質転換を受けた細胞を意味する。悪性形質転換は細胞の遺伝子構成及び／又は遺伝子発現プロファイルの変化を部分的に伴う１段階又は多段階プロセスである。悪性形質転換は自然発生する場合もあるし、薬剤ないし化学療法、放射線、他の細胞との融合、ウイルス感染又は特定遺伝子の活性化もしくは不活性化等のイベント又はイベント組合せにより発生する場合もある。悪性形質転換はインビボでもインビトロでも発生し、必要に応じて実験により誘導することもできる。悪性細胞は明確な腫瘍塊内に存在する場合もあるし、他の物理的位置に転移している場合もある。

【００８７】

癌細胞の特徴は宿主により制御不能に増殖する傾向であるが、特定癌に関連する病態はあらゆる形態をとり得る。原発癌細胞（即ち、悪性形質転換部位の近傍から得られる細胞）は確立した病理技術、特に組織検査により非癌性細胞から容易に区別することができる。本明細書で使用する癌細胞の定義は原発癌細胞のみならず、癌細胞原型から誘導される任意細胞も含む。これは転移癌細胞と、癌細胞から誘導されるインビトロ培養物及び細胞株も含む。

【００８８】

細胞株－「細胞株」又は「細胞培養物」とはインビトロ増殖又は維持された高等真核細胞を意味する。当然のことながら、細胞の子孫は（形態、遺伝子型又は表現型に関して）親細胞と完全に一致しない場合がある。「未培養」と記載する細胞は生体から直接得られ、細胞が実質的に複製するために十分な時間又は条件下ではなく、生体から分離後に限られた時間しか維持されていない。

【００８９】

本明細書で使用する「サンプル」なる用語は新生細胞を含むか又は潜在的に含む任意体液、細胞、組織、臓器又はその一部を意味し、例えば新生細胞を含むか又は含む疑いのある結腸、直腸、乳房、卵巣、前立腺、腎臓、肺、血液、脳又は他の臓器もしくは組織に由来する細胞等が挙げられる。この用語は個体に存在するサンプルに加え、個体から採取されるか又は由来するサンプルを含む。例えば、サンプルは生検により得られた検体の組織切片、又は組織培養物に添加もしくは適応させた細胞とすることができる。サンプルは更に亜細胞フラクションもしくは抽出液、又は粗製もしくは実質的に純粋な核酸分子もしくは蛋白質調製物とすることができる。

【００９０】

臨床サンプルとは対象から得られ、例えばＩＧＦ－１Ｒ発現レベルを測定又は検出する診断又は監視試験等の本発明の方法で有用な各種サンプル種を意味する。この定義は外科的切除により得られた固体組織サンプル、病理検体、保存サンプル又は生検検体、組織培養物又はそれから誘導される細胞及びその子孫、並びにこれらの起源のいずれかから作製された切片又は塗抹標本を包含する。非限定的な例は乳房組織、リンパ節、結腸、膵臓、前立腺等から得られたサンプルである。この定義は更に生体由来の液体サンプルも包含し、これに懸濁した細胞もしくは細胞フラグメント、又は液体媒体とその溶質を意味する場

合もある。

【００９１】

本願で使用する病変の「診断」とは、例えばＩＧＦ－１Ｒの発現に関連又は介在される病的過増殖性腫瘍性疾患の診断又は検出、病変の進行の監視、及びＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する疾患の指標となる細胞又はサンプルの同定を含むものとする。診断、検出、同定等の用語は本明細書では同義に使用する。

【００９２】

「診断法」としては、限定されないが、腫瘍の転移能の判定又はＩＧＦ－１Ｒ介在性腫瘍の発見後の患者の予後の判定が挙げられる。このような診断法はＩＧＦ－１Ｒの存在を伴う癌もしくは他の病変を治療するために使用される治療レジームの有効性を判定するため又はＩＧＦ－１Ｒ発現レベルを検出／判定するために使用することもできる。「診断法」又は「監視法」なる用語は同義に使用されることが多い。

【００９３】

本明細書で使用する「示差的結果」は一般に癌性細胞株と対照細胞株又は癌性組織と対照組織等の２種類の異なるアッセイサンプルの結果を比較するアッセイで得られる。従って、例えば、ＩＧＦ－１Ｒ等のマーカー蛋白質の「示差的レベル」はある組織サンプル中のＩＧＦ－１Ｒレベルが別のサンプルよりも高い場合に認められる。

【００９４】

「無病生存」とは監視する病変をもたない生体を意味する。例えば、この蛋白質ＩＧＦ－１Ｒに介在される癌（例えば乳癌）を診断又は監視するためにＩＧＦ－１Ｒ発現レベルを使用する場合には、無病生存とは検出可能な乳癌をもたないことを意味する。

【００９５】

転移能－「転移」とは癌が発生臓器から患者の他の部位に拡大する病態を意味する。従って、例えば膵臓癌等のＩＧＦ－１Ｒ介在性腫瘍性疾患に関して「転移能」とは局在病変から播種性転移性病変に進行する危険とみなすことができる。

【００９６】

「監視法」としては限定されないが、ＩＧＦ－１Ｒに介在される腫瘍性疾患（例えば乳房腫瘍）の発見後に患者の進行又は治療レジームに対する応答を追跡する方法が挙げられる。このような監視法は癌又はＩＧＦ－１Ｒの存在を伴う他の病変を治療するために使用される治療レジームの有効性を判定するために使用することもできる。このような治療的処置の１例は抗ＩＧＦ－１Ｒ特異抗体の使用である。「診断法」又は「監視法」なる用語は同義に使用することが多い。

【００９７】

本明細書で使用する「病態」－癌細胞により宿主内に誘発される「病態」は宿主の健康又は正常な生理機能を損なう任意状態である。これは限定されないが、癌細胞の異常もしくは無制御な増殖、転移、ＩＧＦ－１Ｒ含有細胞の発現レベルの上昇もしくは不適切なレベルの他の産物、その生理環境に不適切な機能の発現、隣接細胞の正常な機能の妨害、炎症性もしくは免疫応答の悪化もしくは抑制、又は望ましくない化学物質もしくは浸潤性生物の存在を意味する。

【００９８】

本願で使用する「予後」とは病変の回復の可能性又は病変の推定発生もしくは転帰の予測を意味する。例えば、ＩＧＦ－１Ｒに介在される腫瘍性疾患（例えば乳癌）をもつ患者に由来するサンプルがＩＧＦ－１Ｒに対する抗体による核染色に陽性である場合に、その患者の「予後」はサンプルがＩＧＦ－１Ｒ染色に陰性だった場合よりも良好である。抗体染色レベルの０～４のスケールでサンプルのＩＧＦ－１Ｒ発現レベルをスコアリングすることができ、０は陰性であり、１～４は強度が上がるにつれて半定量的な４段階の陽性染色を意味する。各陽性スコアはスコア０（陰性）に比較した場合の再発性及び致命的病変の危険の有意低下に関連付けることができるので、スコア１～４を陽性スコアとして記録することができるが、陽性スコアの強度が増加するにつれて危険低減が増す場合もある。ＩＧＦ－１Ｒの予後値を推定するには従来の任意ハザード分析法を使用することができる

。代表的な分析法としては、打ち切り例の存在下で生存又はイベントまでの時間をモデル化するセミパラメトリック法であるコックス回帰分析が挙げられる（Ｈｏｓｍｅｒ ａｎｄ Ｌｅｍｅｓｈｏｗ，１９９９；Ｃｏｘ，１９７２）。他の生存分析（例えば生命表ないしカプラン・マイヤー法）と異なり、コックス法は予測変数（共変量）をモデルに加えることができる。従来の分析法（例えばコックス法）を使用し、原発性腫瘍におけるＩＧＦ－１Ｒ発現状態と病変再発の発生までの期間（無病生存期間又は転移病変までの期間）、又は病変から死亡までの期間（総生存期間）の相関に関する仮定を試験することができる。コックス回帰分析はコックス比例ハザード分析としても知られる。この方法は患者生存期間について腫瘍マーカーの予後値を試験するための標準である。多変量モードで使用する場合には、個々の予後値をもつ個々の共変量即ち最も有用なマーカーを同定できるように数個の共変量の効果を並行して試験する。腫瘍の陽性又は陰性「ＴＧＦ－１Ｒ状態」なる用語は夫々スコア０又はスコア１～４を意味する。

【００９９】

スコアリング－乳癌の診断又は監視中にサンプルを「スコアリング」することができる。その最も単純な形式では、スコアリングは免疫組織化学によりサンプルの目視試験により判断した場合に陰性又は陽性に分類することができる。より定量的なスコアリングは、サンプリングする染色（「陽性」）細胞の染色強度と比率との２個のパラメーターを判断する。Ａｌｌｒｅｄら（Ａｌｌｒｅｄ，Ｈａｒｖｅｙ ｅｔ ａｌ．１９９８）はこれを実施する１つの方法として、両方のパラメーターを０（陰性）～４のスケールでスコアリングし、個々のパラメーターのスコアを総スコアにまとめる方法を記載している。この結果、０、２、３、４、５、６、７又は８の可能なスコアからなるスケールが得られる（なお、Ａｌｌｒｅｄのスケールではスコア１はあり得ない）。多少簡単なスコアリング法は核染色強度と染色核を示す細胞の比率を０～４の合算スコアに合算する。実際に、Ａｌｌｒｅｄのスケールのスコア７及び８は簡易スケールでは４に対応する。同様に、スコア５及び６は３に対応し、スコア３及び４はスコア２に対応し、スコア２は１に対応し、０はどちらのスケールでも０に対応する。どちらのスコアリング法も細胞核における活性化Ｓｔａｔ５の染色の強度と比率のスコアリングに適用することができる。本明細書で使用する腫瘍の陽性又は陰性「ＩＧＦ－１Ｒ状態」なる用語は簡易スケールの夫々スコア０又は１～４に対応するＩＧＦ－１Ｒレベルを意味する。

【０１００】

一般に、本発明による試験又はアッセイの結果は各種フォーマットのいずれかで表すことができる。定性的に結果を表すことができる。例えば、試験報告は恐らく検出限界の指示と共に、特定ポリペプチドが検出された否かのみを示すことができる。半定量的に結果を表すこともできる。例えば、種々の範囲を定義することができ、所定程度の定量情報を提供するスコア（例えば１＋～４＋）に範囲を割り当てることができる。このようなスコアは種々の因子、例えばＩＧＦ－１Ｒが検出される細胞数、（ＩＧＦ－１Ｒの発現レベル又はＩＧＦ－１Ｒ細胞を指示することができる）シグナルの強度等を反映することができる。例えばポリペプチド（ＩＧＦ－１Ｒ）が検出される細胞の百分率として、結果を蛋白質濃度として定量的に表すこともできる。当業者に自明の通り、試験により提供される出力の種類は試験の技術的制約とポリペプチドの検出に関連する生物学的重要性により異なる。例えば、所定のポリペプチドの場合には、純定性的出力（例えばポリペプチドが所定検出レベルで検出されるか否か）が有意情報を提供する。他の場合には、より定量的な出力（例えば被験サンプル中のポリペプチドの発現レベルと正常レベルの比）が必要である。

【０１０１】

個体又は細胞の「治療」は個体又は細胞の非治療過程を変更しようとする任意型の介入である。例えば、個体の治療は個体に含まれる癌に起因する病態を減少又は制限するように実施することができる。治療としては限定されないが、ａ）ＩＧＦ－１Ｒ特異的ｍＡｂを含有する医薬組成物等の組成物の投与、ｂ）外科的処置（例えば乳腺腫瘤摘出術や変形定型的乳房切除術）の適用、又はｃ）放射線療法の適用が挙げられ、予防的に実施しても

よいし、病変イベントの開始又は病因物質との接触後に実施してもよい。

【０１０２】

「バイオマーカー」とは組織又は細胞中の発現レベルが正常又は健康細胞又は組織に比較して変化している任意遺伝子又は蛋白質である。本発明の趣旨では、バイオマーカーはＩＧＦ－１Ｒである。従って、ＩＧＦ－１Ｒの発現レベルはＩＧＦ－１Ｒに関連する基礎腫瘍性疾患に選択的である。ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する疾患に関して「選択的に過剰発現」又は「発現」とは、該当バイオマーカー（ＩＧＦ－１Ｒ）が選択疾患では過剰発現されるが、異形成が存在しない状態、未成熟化生細胞、及び臨床疾患とみなされない他の状態では過剰発現されないことを意味する。従って、ＩＧＦ－１Ｒの検出は良性増殖、初期ステージ又は軽度異形成を示すサンプルに由来する癌等の特定腫瘍性疾患をもつ傾向を示すサンプルの分化を可能にする。「初期ステージ」とは臨床介入を必要とする病変ステージまで進行していない病態を意味する。本発明の方法は更に高グレード病変を示す細胞を正常細胞、未成熟化生細胞及び臨床病変を示さない他の細胞から区別する。こうして、本発明の方法は従来の診断法では誤って正常として分類された患者（「偽陰性」）でも、ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する高グレード病的過増殖性腫瘍性疾患又はＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患の正確な同定を可能にする。所定態様において、ＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患（例えば結腸癌）の診断方法は異常ないし非定型結腸内視鏡検査結果に対して実施される。即ち、本発明の方法は結腸癌の場合には結腸内視鏡検査で異常であった患者に対して実施することができる。本発明の他の側面では、前記方法は現在実施されている従来の結腸内視鏡検査やマンモグラムと全く同様に、一般集団でＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する腫瘍性疾患の一次スクリーニング試験として実施される。

【０１０３】

「相関する」又は「相関」とは何らかの方法で第１の分析の成績及び／又は結果を第２の分析の成績及び／又は結果と比較することを意味する。例えば、第２の分析を実施する際に第１の分析の結果を使用してもよいし、及び／又は第２の分析を実施すべきか否かを判断するために第１の分析の結果を使用してもよいし、及び／又は第１の分析の結果を第２の分析の結果と比較してもよい。免疫組織化学（ＩＨＣ）分析に属する態様では、正常な組織切片の面積及び／又は癌性面積を測定するために、染色で得られた結果を使用することができる。

【０１０４】

本明細書において「一次抗体」なる用語は組織サンプル中の標的蛋白質抗原と特異的に結合する抗体（例えば１２Ｂ１）を意味する。一次抗体は一般に免疫組織化学法で使用される第１の抗体である。１態様において、一次抗体はＩＨＣ法で使用される唯一の抗体である。

【０１０５】

本明細書において「二次抗体」なる用語は一次抗体と特異的に結合することにより、一次抗体と存在する場合にはその後の試薬との間に橋を形成する抗体を意味する。二次抗体は一般に免疫組織化学法で使用される二次抗体である。

【０１０６】

本発明に関して「形質転換」なる用語は正常細胞が悪性になるにつれて受ける変化を意味する。真核生物では、「形質転換」なる用語は細胞培養における正常細胞から悪性細胞への変換を表すために使用することができる。

【０１０７】

「予防」なる用語は生体が異常状態に罹患又は発症する確率の低下を意味する。

【０１０８】

「治療」なる用語は治療効果をもつこと及び生体における異常状態を少なくとも部分的に緩和又は排除することを意味する。治療は腫瘍増殖の抑制、腫瘍増殖抑制の維持及び寛解の誘導を含む。

【０１０９】

本明細書で使用する「約」なる用語は許容可能な範囲内の指定値の近似値を意味する。

好ましくは、範囲は指定値の±５％である。

【０１１０】

内容からそうでないことが明白な場合を除き、「又は」なる用語は本明細書では「及び／又は」なる用語の意味で使用し、これと同義に使用する。

【０１１１】

「健康」、「正常」及び「非新生物」なる用語は本明細書では同義に使用し、ＩＧＦ－１Ｒの細胞表面発現の増加に関連する新生物等の病変状態を（少なくとも検出限界まで）もたない対象又は特定細胞もしくは組織を意味する。本明細書ではこれらの用語を癌由来組織及び細胞について使用することが多い。従って、本願の趣旨では、重篤な心臓疾患をもつが、ＩＧＦ－１Ｒに関連又は介在される病変をもたない患者を「健康」と言う。

【０１１２】

「ポリペプチド」なる用語は天然又は人工蛋白質、蛋白質フラグメント及び蛋白質配列のポリペプチドアナログを包含する。

【０１１３】

「単離蛋白質」又は「単離ポリペプチド」なる用語はその由来起源により、（１）その天然状態でこれに付随する天然結合成分に結合しておらず、（２）同一種に由来する他の蛋白質を含まず、（３）別の種に由来する細胞により発現され、又は（４）天然には存在しない蛋白質又はポリペプチドである。従って、化学的に合成されるポリペプチド又は天然でその起源となる細胞以外の細胞系で合成されるポリペプチドはその天然結合成分から「単離」されることになる。当分野で周知の蛋白質精製法を使用して単離により蛋白質が天然結合成分を実質的に含まないようにすることもできる。

【０１１４】

サンプルの少なくとも約６０％～７５％が単一種のポリペプチドを示すときに蛋白質又はポリペプチドは「実質的に純粋」、「実質的に均一」又は「実質的に精製状態」である。ポリペプチド又は蛋白質は単量体でも多量体でもよい。実質的に純粋なポリペプチド又は蛋白質は一般に蛋白質サンプルの約５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％Ｗ／Ｗ、より一般には約９５％を含み、好ましくは９９％を上回る純度となる。蛋白質純度又は均一度は蛋白質サンプルのポリアクリルアミドゲル電気泳動後に当分野で周知の色素によるゲルの染色により単一ポリペプチドバンドを可視化する等の当分野で周知の多数の手段により示すことができる。所定目的では、ＨＰＬＣ又は当分野で周知の他の精製手段を使用することにより高分解能を提供することができる。

【０１１５】

本明細書で使用する「ポリペプチドアナログ」なる用語はあるアミノ酸配列の一部に対して実質的な一致度をもち、以下の性質の少なくとも１種、即ち（１）適切な結合条件下でＩＧＦ－ＩＲと特異的に結合する性質、（２）ＩＧＦ－Ｉ又はＩＧＦ－ＩＩがＩＧＦ－ＩＲと結合するのを阻止することができる性質、あるいは（３）ＩＧＦ－ＩＲ細胞表面発現又はチロシンリン酸化をインビトロ又はインビボで低減する性質をもつ少なくとも２５アミノ酸のセグメントから構成されるポリペプチドを意味する。一般に、ポリペプチドアナログは天然配列に対して保存アミノ酸置換（又は挿入又は欠失）を含む。アナログは一般に少なくとも２０アミノ酸長、好ましくは少なくとも５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０又は２００アミノ酸長以上であり、多くの場合には全長天然ポリペプチドと同程度の長さとすることができる。

【０１１６】

好ましいアミノ酸置換は（１）蛋白分解感受性を低減するもの、（２）酸化感受性を低減するもの、（３）蛋白質複合体を形成するための結合親和性を変化させるもの、（４）結合親和性を変化させるもの、及び（４）このようなアナログの他の物理化学的もしくは機能的性質を付与又は改変するものである。アナログは天然ペプチド配列以外の配列の各種変異蛋白質を含むことができる。例えば、天然配列（好ましくは分子間接触を形成する領域の外側のポリペプチドの部分）に１又は複数のアミノ酸置換（好ましくは保存アミノ酸置換）を行うことができる。保存アミノ酸置換は親配列の構造的特徴を実質的に変化さ

せるべきではない（例えば置換アミノ酸は親配列に存在する螺旋を切断する傾向又は親配列を特徴付ける他の型の二次構造を破壊する傾向があってはならない）。当分野で認められているポリペプチド二次及び三次構造の例は各々本明細書に援用するＰｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４））；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｃ．Ｂｒａｎｄｅｎ ａｎｄ Ｊ．Ｔｏｏｚｅ，ｅｄｓ．，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９１））；及びＴｈｏｒｎｔｏｎ ｅｔ ａｔ．Ｎａｔｕｒｅ ３５４：１０５（１９９１）に記載されている。

【０１１７】

本明細書で使用する２０種類の標準アミノ酸とその略語は従来の用法に従う。Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－Ａ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｅ．Ｓ．Ｇｏｌｕｂ ａｎｄ Ｄ．Ｒ．Ｇｒｅｎ，Ｅｄｓ．，Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，Ｍａｓｓ．（１９９１））参照。２０種類の標準アミノ酸の立体異性体（例えばＤ－アミノ酸）、α，α－ジ置換アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、乳酸及び他の非標準アミノ酸等の非天然アミノ酸も本発明のポリペプチドの適切な成分として使用することができる。非標準アミノ酸の例としては、４－ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタメート、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチメルリジン、ε－Ｎ－アセチルリジン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリジン、ｓ－Ｎ－メチルアルギニン並びに他の同様のアミノ酸及びイミノ酸（例えば４－ヒドロキシプロリン）が挙げられる。本明細書で使用するポリペプチド表記では、標準用法及び慣例に従い、左側方向がアミノ末端方向であり、右側方向がカルボキシ末端方向である。

【０１１８】

医薬産業では鋳型ペプチドに類似の性質をもつ薬剤として非ペプチドアナログが広く使用されている。これら型の非ペプチド化合物を「ペプチドミメティクス」と言う。本明細書に援用するＦａｕｃｈｅｒｅ，Ｊ．Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｒｅｓ．１５：２９（１９８６）；Ｖｅｂｅｒ ａｎｄ Ｆｒｅｉｄｉｎｇｅｒ ＴＩＮＳ ｐ．３９２（１９８５）；及びＥｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３０：１２２９（１９８７）。このような化合物は多くの場合にはコンピュータ支援分子モデリングにより開発される。治療薬として有用なペプチドに構造的に類似するペプチドミメティクスを使用して同等の治療又は予防効果を生じることができる。一般に、ペプチドミメティクスはヒト抗体等のパラダイムポリペプチド（即ち所望の生化学的性質又は薬理活性をもつポリペプチド）と構造的に類似しているが、当分野で周知の方法により、１個以上のペプチド結合が場合により－CH_2NH－、－CH_2S－、－CH_2－CH_2－、－ＣＨ＝ＣＨ－（シス及びトランス）、－$COCH_2$－、－ＣＨ（ＯＨ）CH_2－及び－CH_2SO－から構成される群から選択される結合により置換されている。より安定なペプチドを作製するために、コンセンサス配列の１個以上のアミノ酸を同一型のＤ－アミノ酸（例えばＬ－リジンの代わりにＤ－リジン）で合成置換する方法も使用できる。更に、例えばペプチドを環化する分子内ジスルフィド橋を形成することが可能な内部システインを付加することにより、コンセンサス配列又は実質的に一致するコンセンサス配列変異を含む拘束性ペプチドも当分野で公知の方法により作製することができる（本明細書に援用するＲｉｚｏ ａｎｄ Ｇｉｅｒａｓｃｈ Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６１：３８７（１９９２））。

【０１１９】

本明細書で使用する「ポリペプチドフラグメント」なる用語はアミノ末端及び／又はカルボキシ末端欠失をもつが、その他のアミノ酸配列は天然配列における対応位置と一致するポリペプチドを意味する。フラグメントは一般に少なくとも５、６、８又は１０アミノ酸長、好ましくは少なくとも１４アミノ酸長、より好ましくは少なくとも２０アミノ酸長、通常では少なくとも５０アミノ酸長、更により好ましくは少なくとも７０、８０、９０、１００、１５０又は２００アミノ酸長である。

【０１２０】
「ＩＧＦ１Ｒ」、「ＩＧＦＲ１」、「インスリン様成長因子受容体－Ｉ」及び「Ｉ型インスリン様成長因子受容体」は当分野で周知である。ＩＧＦ－１Ｒは任意生物に由来するものでよいが、動物、より好ましくは哺乳動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ又はイヌ）、最も好ましくはヒトに由来するものが好ましい。典型的なヒトＩＧＦ－１Ｒ前駆体のヌクレオチド及びアミノ酸配列はＧｅｎｂａｎｋから入手可能である（例えばＧｅｎｅ ＩＤ ３４８０又はＮＭ０００８７５）。（例えばアミノ酸７１０及び７１１間で）前駆体を開裂すると、αサブユニットとβサブユニットとなり、会合して成熟受容体を形成する。

【０１２１】
「免疫グロブリン」は四量体分子である。天然免疫グロブリンにおいて、各四量体は各々１本の軽鎖（約２５ｋＤａ）と１本の重鎖（約５０～７０ｋＤａ）をもつ同一の２対のポリペプチド鎖から構成される。各鎖のアミノ末端部分は主に抗原認識に関与する約１００～１１０アミノ酸以上の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は主にエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。ヒト軽鎖はκ軽鎖とλ軽鎖に分類される。重鎖はμ、δ、γ、α又はεに分類され、夫々抗体のアイソタイプをＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ及びＩｇＥとして規定する。軽鎖及び重鎖内では、可変領域と定常領域は約１２アミノ酸以上の「Ｊ」領域により相互に結合され、重鎖は更に約１０アミノ酸以上の「Ｄ」領域を含む。一般に（その開示内容全体を全目的で本明細書に援用する）Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｃｈ．７（Ｐａｕｌ，Ｗ．，ｅｄ．，２ｎｄ ｅｄ．Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））参照。各軽鎖／重鎖対の可変領域は無傷の免疫グロブリンが２個の結合部位をもつように抗体結合部位を形成する。

【０１２２】
免疫グロブリン鎖は３個の超可変領域（別称相補性決定領域ないしＣＤＲ）により結合された比較的保存度の高いフレームワーク領域（ＦＲ）からなる同一の一般構造を示す。各対の２本の鎖からのＣＤＲは特定エピトープと結合できるようにフレームワーク領域により整列される。Ｎ末端からＣ末端に向かって、軽鎖と重鎖はいずれもＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４ドメインを含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当てはＫａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７ ａｎｄ １９９１））、又はＣｈｏｔｈｉａ ＆ Ｌｅｓｋ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１ ９１７（１９８７）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７８ ８８３（１９８９）の定義に従う。

【０１２３】
「抗体」とは無傷の免疫グロブリン又は特異的結合に関して無傷の抗体と競合するその抗原結合部分を意味する。抗原結合部分はＤＮＡ技術又は無傷の抗体の酵素もしくは化学開裂により作製することができる。抗原結合部分としては特にＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ｄＡｂ及び相補性決定領域（ＣＤＲ）フラグメント、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、キメラ抗体、ダイアボディ、並びにポリペプチドに対する特異的抗原結合性を付与するために十分な免疫グロブリンの少なくとも一部を含むポリペプチドが挙げられる。

【０１２４】
本明細書で使用する「抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体」なる用語は本明細書に開示するか又は１２Ｂ１から誘導されるか又は本発明の方法を使用して同定された抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を総称する。

【０１２５】
ＦａｂフラグメントはＶＬ、ＶＨ、ＣＬ及びＣＨ１ドメインから構成される１価フラグメントであり；Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントはヒンジ領域でジスルフィド橋により結合した２個のＦａｂフラグメントからなる２価フラグメントであり；ＦｄフラグメントはＶＨドメインとＣＨ１ドメインから構成され；Ｆｖフラグメントは抗体の１本のアームのＶＬ

ドメインとＶＨドメインから構成され；ｄＡｂフラグメント（Ｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３４１：５４４　５４６，１９８９）はＶＨドメインから構成される。

【０１２６】

１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）は、１本鎖蛋白質としての作製を可能にする合成リンカーを介してＶＬ領域とＶＨ領域を対合させて１価分子を形成する抗体である（Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３　４２６，１９８８及びＨｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：５８７９　５８８３，１９８８）。ダイアボディはＶＨ領域とＶＬ領域を１本のポリペプチド鎖で発現させるが、非常に短いリンカーを使用するため、同一鎖で２領域を対合させることができず、これらの領域は別の鎖の相補性領域と対合し、２個の抗原結合部位を形成する２価の二重特異性抗体である（例えばＨｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４　６４４８，１９９３、及びＰｏｌｊａｋ，Ｒ．Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　２：１１２１　１１２３，１９９４参照）。イムノアドヘジンにするために１個以上のＣＤＲを共有的又は非共有的に分子に組込んでもよい。イムノアドヘジンはより大きいポリペプチド鎖の一部としてＣＤＲを組込んでもよいし、ＣＤＲを別のポリペプチド鎖と共有的に結合してもよいし、ＣＤＲを非共有的に組込んでもよい。ＣＤＲはイムノアドヘジンを特定該当抗原と特異的に結合させることができる。

【０１２７】

抗体は１個以上の結合部位をもつことができる。結合部位か２個以上の場合には、結合部位は相互に同一でもよいし、異なっていてもよい。例えば、天然免疫グロブリンは２個の同一の結合部位をもち、１本鎖抗体又はＦａｂフラグメントは１個の結合部位をもち、「二重特異性」又は「二官能性」抗体は２個の異なる結合部位をもつ。

【０１２８】

「単離抗体」とは（１）その天然状態でこれに付随する他の天然結合成分を含む天然結合成分に結合しておらず、（２）同一種に由来する他の蛋白質を含まず、（３）別の種に由来する細胞により発現され、又は（４）天然には存在しない抗体である。単離抗体の例としては、ＩＧＦ－ＩＲを使用してアフィニティー精製された抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体、ハイブリドーマ又は他の細胞株によりインビトロ合成された抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体、及びトランスジェニックマウスから誘導されたヒト抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体が挙げられる。

【０１２９】

「ヒト抗体」なる用語はヒト免疫グロブリン配列に由来する１個以上の可変領域及び定常領域をもつ全抗体を包含する。好ましい１態様において、全可変領域及び定常領域はヒト免疫グロブリン配列に由来する（完全ヒト抗体）。これらの抗体は以下に記載するような各種方法で作製することができる。

【０１３０】

ヒト化抗体、関連フラグメント又は抗体結合構造は抗原結合部位又はその周囲に非ヒト由来アミノ酸配列をもつヒト由来免疫グロブリン配列の構造フレームワークから主に構成されるポリペプチドである（相補性決定領域ないしＣＤＲ；ＣＤＲグラフティングとして知られ、この技術は多少のフレームワーク変異も伴うことが多い。下記実施例参照）。適切な手法は例えばＷＯ９１／０９９６７、ＥＰ０３２８４０４及びＱｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　８６，１００２９，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　ａｎｄ　Ａｄａｉｒ（１９８９）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　１０，１（１９９２）に詳細に記載されているが、抗体等の代替ヒト化方法も考えられる。ヒト化抗体の作製方法の例は米国特許第６，０５４，２９７号、５，８８６，１５２号及び５，８７７，２９３号に記載されている。

【０１３１】

特に、齧歯類抗体を単独又はコンジュゲートとして男性に反復インビボ投与すると、齧歯類抗体に対する免疫応答、所謂ＨＡＭＡ応答（Ｈｕｍａｎ　Ａｎｔｉ　Ｍｏｕｓｅ　Ａ

ｎｔｉｂｏｄｙ：ヒト抗マウス抗体）がレシピエントに発生する。反復投与が必要な場合にはＨＡＭＡ応答は薬剤の有効性を制限する可能性がある。ポリエチレングリコール等の親水性ポリマーで抗体を化学的に修飾するか又は抗体結合構造をよりヒト様にする遺伝子操作法を使用することにより、抗体の免疫原性を低減することができる。例えば、ＣＥＡと結合する齧歯類抗体の可変領域の遺伝子配列をヒトミエローマ蛋白質の可変領域に置換し、組換えキメラ抗体を作製することができる。これらの手法はＥＰ１９４２７６、ＥＰ０１２０６９４、ＥＰ０１２５０２３、ＥＰ０１７１４９６、ＥＰ０１７３４９４及びＷＯ８６／０１５３３に詳細に記載されている。あるいは、ＣＥＡと結合する齧歯類抗体のＣＤＲの遺伝子配列を単離又は合成し、相同ヒト抗体遺伝子の対応する配列領域に置換し、元の齧歯類抗体の特異性をもつヒト抗体を作製することもできる。これらの手法はＥＰ０２３９４０、ＷＯ９０／０７８６１及びＷＯ９１／０９９６７に記載されている。あるいは、齧歯類抗体の可変領域の多数の表面残基を相同ヒト抗体に通常存在する残基に変更し、残基の表面「ベニア」をもち、従ってヒト身体により自己認識される齧歯類抗体を作製することができる。このアプローチはＰａｄｌａｎ　ｅｔ．ａｌ．（１９９１）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２８，４８９により立証されている。

【０１３２】

「中和抗体」ないし「阻害抗体」とは過剰の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体がＩＧＦ－ＩＲと結合したＩＧＦ－Ｉの量を少なくとも約２０％低減するときに、ＩＧＦ－ＩＲとＩＧＦ－Ｉの結合を阻害する抗体である。好ましい１態様において、抗体はＩＧＦ－ＩＲと結合したＩＧＦ－Ｉの量を少なくとも４０％、より好ましくは６０％、更により好ましくは８０％、又は更により好ましくは８５％低減する。結合低減は例えばインビトロ競合結合アッセイで測定するなど、当業者に公知の任意手段により測定することができる。

【０１３３】

抗体のフラグメント又はアナログは本明細書の教示に従って当業者が容易に作製することができる。フラグメント又はアナログの好ましいアミノ及びカルボキシ末端は機能的領域の境界付近に存在する。構造的及び機能的領域はヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列データを公共又は企業の配列データベースと比較することにより同定することができる。好ましくは、コンピュータ比較法を使用し、既知構造及び／又は機能の他の蛋白質に存在する配列モチーフ又は予想蛋白質立体配座領域を同定する。既知三次元構造に折り畳まれる蛋白質配列の同定方法は公知である。Ｂｏｗｉｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５３：１６４（１９９１）。

【０１３４】

本明細書で使用する「表面プラズモン共鳴法」なる用語は例えばＢＩＡｃｏｒｅシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ　ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ及びＰｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ．）を使用してバイオセンサーマトリックス内の蛋白質濃度の変化の検出によりリアルタイム生物特異的相互作用の分析を可能にする光学現象である。詳細については、Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ａｎｎ．Ｂｉｏｌ．Ｃｌｉｎ．５１：１９　２６；Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１１：６２０　６２７；Ｊｏｈｎｓｓｏｎ，Ｂ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．８：１２５　１３１；及びＪｏｈｎｎｓｏｎ，Ｂ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９８：２６８　２７７参照。

【０１３５】

「Ｋｏｆｆ」なる用語は抗体が抗体／抗原複合体から解離する解離速度定数を意味する。

【０１３６】

「Ｋｄ」なる用語は特定抗体－抗原相互作用の解離定数を意味する。

【０１３７】

「エピトープ」なる用語は免疫グロブリン又はＴ細胞受容体と特異的に結合することが可能な任意蛋白質決定基を意味する。エピトープ決定基は通常はアミノ酸や糖側鎖等の化

学的に活性な表面分子群から構成され、通常は特定の三次元構造特性と特定の電荷特性をもつ。抗体は解離定数が≦１μＭ、好ましくは≦１００ｎＭ、最も好ましくは≦１０ｎＭのときに抗原と特異的に結合すると言う。

【０１３８】

ポリペプチドに関して「実質的一致」なる用語は、例えばデフォルトギャップ重みを使用してＧＡＰ又はＢＥＳＴＦＩＴプログラムにより最適に整列させたときに、２個のペプチド配列が少なくとも７５％又は８０％の配列一致度、好ましくは少なくとも９０％又は９５％の配列一致度、更により好ましくは少なくとも９８％又は９９％配列一致度をもつことを意味する。好ましくは、一致しない残基位置は保存アミノ酸置換だけ相違する。「保存アミノ酸置換」とは類似の化学的性質（例えば電荷又は疎水性）をもつ側鎖（Ｒ基）を有する別のアミノ酸残基でアミノ酸残基を置換する置換である。一般に、保存アミノ酸置換は蛋白質の機能的性質を実質的に変化させない。２個以上のアミノ酸配列が保存置換だけ相互に異なる場合には、置換の保存性に合わせて補正するように配列一致度百分率又は類似度百分率を上方に調整することができる。この調整を行う手段は当業者に周知である。例えば本明細書に援用するＰｅａｒｓｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：３０７　３１（１９９４）参照。類似する化学的性質をもつ側鎖を有するアミノ酸群の例としては、１）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；２）脂肪族－ヒドロキシル側鎖：セリン及びスレオニン；３）アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン；４）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン；５）塩基性側鎖：リジン、アルギニン及びヒスチジン；並びに６）硫黄含有側鎖：システイン及びメチオニンが挙げられる。好ましい保存アミノ酸置換基はバリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン、グルタミン酸－アスパラギン酸及びアスパラギン－グルタミンである。

【０１３９】

あるいは、保存置換は本明細書に援用するＧｏｎｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５６：１４４３　４５（１９９２）に開示されているＰＡＭ２５０対数尤度マトリックスの正の値の任意変化である。「中度保存」置換はＰＡＭ２５０対数尤度マトリックスの負以外の値の任意変化である。

【０１４０】

本明細書で使用する「ラベル」又は「標識」なる用語は抗体に別の分子を組込むことを意味する。１態様において、ラベルは検出可能なマーカーであり、例えば放射性標識アミノ酸の組込み又は標識アビジン（例えば光学法又は比色法により検出可能な蛍光マーカー又は酵素活性を含むストレプトアビジン）により検出可能なビオチニル部分をポリペプチドに結合する方法である。別の態様において、ラベル又はマーカーは治療薬、例えば薬剤コンジュゲート又は毒素とすることができる。ポリペプチド及び糖蛋白質の各種標識方法が当分野で公知であり、利用できる。ポリペプチドのラベルの例としては限定されないが、放射性同位体ないし放射性核種（例えば^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、蛍光ラベル（例えばＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素ラベル（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターにより認識される所定ポリペプチドエピトープ（例えばロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、磁性物質（例えばガドリニウムキレート）、毒素（例えば百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びピューロマイシン）及びそのアナログ又はホモログが挙げられる。所定態様では、潜在的立体障害を低減するために種々の長さのスペーサーアームによりラベルを結合する。

【０１４１】
「患者」なる用語はヒト及び動物対象を含む。
【０１４２】
抗体
本発明の抗体はインスリン様成長因子１受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）と特異的に結合する。本発明の好ましい抗体は上記７Ｃ１０と結合するエピトープとは異なるＩＧＦ－１Ｒ上のエピトープと結合する。また、本発明の好ましい抗体は抗体依存性細胞傷害性応答（ＡＤＣＣ）をもたない。ＩＧＦ－１Ｒ含有細胞の例としては限定されないが、卵巣、肺、乳房、結腸直腸、膵臓及び前立腺細胞等が挙げられる。
【０１４３】
本発明の抗体としては、タイプＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＤ、ＩｇＭ（及びそのサブタイプ）を含む任意アイソタイプの無傷の免疫グロブリンが挙げられる。抗体は好ましくは無傷のＩｇＧ、より好ましくはＩｇＧ１を含む。免疫グロブリンの軽鎖はκでもλでもよい。軽鎖はκが好ましい。
【０１４４】
本発明の抗体としては抗原結合特異性を維持する無傷の抗体の部分、例えばＦａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆ（ｖ）フラグメント、重鎖単量体又は二量体、軽鎖単量体又は二量体、重鎖１本と軽鎖１本から構成される二量体等が挙げられる。従って、抗原結合フラグメントと上記抗体から誘導される全長二量体又は三量体ポリペプチド自体が有用である。
【０１４５】
本発明によると、本発明のモノクローナル抗体のフラグメントはペプシンもしくはパパイン等の酵素消化及び／又は化学的還元によるジスルフィド結合の開裂等の方法により、上記のように作製されたモノクローナル抗体から得ることができる。あるいは、本発明に含まれるモノクローナル抗体はＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ等から市販されている自動ペプチド合成器を使用して合成することもできるし、当分野で周知の技術を使用して手動式に作製することもできる。本明細書に援用するＧｅｙｓｅｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１０２：２５９－２７４（１９７８）参照。
【０１４６】
「キメラ抗体」は組換えＤＮＡ技術により作製される抗体であり、免疫グロブリン軽鎖、重鎖又は両方のヒンジ領域と定常領域の全部又は一部を別の動物の免疫グロブリン軽鎖又は重鎖に由来する対応する領域に置換したものである。こうして、親モノクローナル抗体の抗原結合部分を別の種の抗体のバックボーンにグラフトする。ＥＰ０２３９４００（Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ）に記載の１つのアプローチはある種の相補性決定領域（ＣＤＲ）を別の種のＣＤＲに置換すること、例えばヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン可変領域ドメインに由来するＣＤＲをマウス可変領域ドメインに由来するＣＤＲで置換することを記載している。これらの改変抗体をその後、ヒト免疫グロブリン定常領域と結合し、抗原に特異的な置換マウスＣＤＲ以外はヒトである抗体を形成することができる。抗体のＣＤＲ領域をグラフトする方法は例えばＲｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２７及びＶｅｒｈｏｅｙｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４－１５３６に記載されている。更に、フレームワーク領域は同一の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の１個に由来するものでもよいし、ヒト抗体等の１種以上の異なる抗体に由来するものでもよいし、ヒト化抗体に由来するものでもよい。
【０１４７】
齧歯類モノクローナル抗体（ＭＡｂ）をヒト治療剤として直接使用すると、齧歯類由来抗体で治療した有意数の患者でヒト抗齧歯類抗体（「ＨＡＲＡ」）（例えば、ヒト抗マウス抗体（「ＨＡＭＡ」））応答が発生した。（Ｋｈａｚａｅｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９４）Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．１５：４２－５２）。少数のマウスアミノ酸配列を含むキメラ抗体はヒトに免疫応答を誘発する問題を解決すると考えられる。

【０１４８】
ＨＡＲＡ応答の問題を回避するために抗体を改良した結果、「ヒト化抗体」が開発された。ヒト化抗体は組換えＤＮＡ技術により作製され、抗原結合に不要ないヒト免疫グロブリン軽鎖又は重鎖のアミノ酸の少なくとも１個を非ヒト哺乳動物免疫グロブリン軽鎖又は重鎖に由来する対応するアミノ酸に置換している。例えば、免疫グロブリンがマウスモノクローナル抗体である場合には、対応するヒト抗体上でこの位置に存在するアミノ酸を使用して抗原結合に必要ない少なくとも１個のアミノ酸を置換する。特定作用理論に結び付ける意図はないが、モノクローナル抗体の「ヒト化」は外来免疫グロブリン分子に対するヒト免疫反応性を阻害すると考えられる。

【０１４９】
非限定的な１例として、相補性決定領域（ＣＤＲ）グラフティングを実施する方法は、標的抗原（例えばＩＧＦ－１Ｒ）と結合する該当抗体のマウス重鎖及び軽鎖を配列決定し、ＣＤＲ　ＤＮＡ配列を遺伝子組換えし、これらのアミノ酸配列を部位特異的突然変異誘発により対応するヒトＶ領域に加えることにより実施することができる。所望アイソタイプのヒト定常領域遺伝子セグメントを加え、「ヒト化」重鎖及び軽鎖遺伝子を哺乳動物細胞で同時に発現させ、可溶性ヒト化抗体を産生させる。典型的な発現細胞はチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞である。キメラ抗体の適切な作製方法は例えばＪｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５２２－５２５；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２７；Ｑｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１００２９；及びＯｒｌａｎｄｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：３８３３に記載されている。

【０１５０】
Ｑｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１００２９－１００３３及びＷＯ９０／０７８６１はヒト化抗体の作製について記載している。ヒト及びマウス可変領域フレームワーク領域を最適蛋白質配列相同に選択した。マウス可変領域の三次構造をコンピュータモデル化し、アミノ酸残基とマウスＣＤＲの最適な相互作用を示すように相同ヒトフレームワークに重ねた。この結果、抗原に対する結合親和性を改善した抗体が開発された（一般にＣＤＲグラフトキメラ抗体を作製すると、親和性は低下する）。ヒト化抗体作製の代替アプローチも当分野で公知であり、例えば、Ｔｅｍｐｅｓｔ（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：２６６－２７１に記載されている。

【０１５１】
「１本鎖抗体」とは、組換えＤＮＡ技術により形成され、アミノ酸の組換え配列を介して免疫グロブリン重鎖及び軽鎖フラグメントをＦｖ領域に連結した抗体を意味する。１本鎖抗体の各種作製方法が公知であり、米国特許第４，６９４，７７８号；Ｂｉｒｄ（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４４２；Ｈｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：５８７９－５８８３；Ｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ　３３４：５４４５４；Ｓｋｅｒｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：１０３８－１０４１に記載されている方法が挙げられる。

【０１５２】
本明細書に記載するアッセイはＩＧＦ－１Ｒ発現レベルの測定を伴う。本発明の各種方法を実施する際には多数の方法でＩＧＦ－１Ｒレベルを測定することができる。例えば、遺伝子によりコードされるメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の量もしくは合成速度、遺伝子によりコードされる所与アミノ酸配列に対応するポリペプチドの量もしくは合成速度、又は細胞に蓄積した生化学的形態の分子の量もしくは合成速度（例えばポリペプチド、核酸又は小分子等の分子の特定の合成後修飾の量）によりＩＧＦ－１Ｒレベルを表すことができる。これらの測定値は絶対量で表してもよいし、経時的な増加又は減少百分率として表してもよい。ＩＧＦ－１Ｒレベルの測定の１例はＩＧＦ－１Ｒの絶対レベルの測定で

ある。これは、例えば組織サンプル中の細胞１００個当たりのＩＧＦ－１Ｒ陽性細胞数として表すことができる。ＩＧＦ－１Ｒレベルの別の測定はＩＧＦ－１Ｒレベルの経時的変化の測定である。更に別の測定はサンプル中のＩＧＦ－１Ｒを発現する癌性細胞数の測定である。

【０１５３】

対照細胞又はサンプルのレベル（「参照レベル」とも言う）に対してＩＧＦ－１Ｒ発現レベルを比較又は測定すると有利である。「参照レベル」及び「対照」は本明細書では同義に使用する。広義には、「対照レベル」とは一般に無病の同等の対照細胞で測定された別個の基線レベルを意味する。これは同一個体に由来するものでもよいし、正常個体又は病変サンプルもしくは試験サンプルを採取したと同一の病変を示さない別の個体に由来するものでもよい。本発明に関連して、「参照レベル」なる用語は患者の癌細胞含有サンプル中のＩＧＦ－１Ｒの発現の試験レベルを評価するために使用されるＩＧＦ－１Ｒの発現の「対照レベル」を意味する。例えば、患者の生体サンプル中のＩＧＦ－１ＲレベルがＩＧＦ－１Ｒの参照レベルよりも高い場合には、細胞はＩＧＦ－１Ｒの発現レベルが高いか、過剰発現又は発現しているとみなされる。得られる参照レベルが、参照レベルよりも低いＩＧＦ－１Ｒレベルをもつ第２の患者群とは生存確率の異なる第１の患者群がこのレベルを上回るようなＩＧＦ－１Ｒレベルを正確に提供するのであれば、参照レベルは複数の方法により決定することができる。従って、発現レベルはＩＧＦ－１Ｒ含有細胞あるいはＩＧＦ－１Ｒを発現する細胞数から独立したＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを規定することができる。従って、各患者の参照レベルはＩＧＦ－１Ｒの参照比により規定することができ、参照比は本明細書に記載する参照レベル決定方法のいずれかにより決定することができる。

【０１５４】

例えば、対照は所定値とすることができ、各種形態をとることができる。中央値や平均値等の単一カットオフ値とすることができる。「参照レベル」は各患者に個々に等しく適用可能な単一数でもよいし、参照レベルは患者の特定亜集団により異なっていてもよい。従って、例えば、同一の癌でも高齢男子は若年男子と参照レベルが異なり、同一の癌でも女性は男性と参照レベルが異なる。あるいは、「参照レベル」は被験新生細胞の組織と同一組織に由来する非腫瘍性癌細胞におけるＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを測定することにより決定することができる。同様に、「参照レベル」は同一患者内の非腫瘍細胞におけるＩＧＦ－１Ｒレベルに対する患者の新生細胞におけるＩＧＦ－１Ｒの所定比でもよい。「参照レベル」はインビトロ培養細胞のＩＧＦ－１Ｒレベルでもよく、腫瘍細胞をシミュレートするように操作することもできるし、参照レベルを正確に決定する発現レベルを生じる他の任意方法で操作することもできる。他方、ＩＧＦ－１Ｒレベルが上昇していない群とＩＧＦ－１Ｒレベルが上昇している群等の比較群に基づいて「参照レベル」を設定することもできる。比較群の別の例は特定病変、病態又は症状をもつ群と、病変をもたない群である。従って、例えば、結腸癌を示す患者の「参照レベル」を設定したい場合には、比較群は結腸癌を示す患者と示さない患者から構成することができる。別の比較群は例えば乳癌等の病態の家族歴をもつ群とこのような家族歴をもたない群である。所定値を設定することができ、例えば試験集団を低リスク群、中リスク群及び高リスク群又は４段階又は５段階等の群に等分（不等分）し、４段階又は５段階の最低段階が最低リスク又は最高量のＩＧＦ－１Ｒをもつ個体とし、４段階又は５段階の最高段階が最高リスク又は最低量のＩＧＦ－１Ｒをもつ個体とする。

【０１５５】

参照レベルは同一癌をもつ患者集団におけるＩＧＦ－１Ｒレベルの比較により決定することもできる。これは例えばヒストグラム分析により実施することができ、患者全体のコホートをグラフで表し、第１の軸にＩＧＦ－１Ｒレベルを示し、第２の軸にその新生細胞が所与レベルのＩＧＦ－１Ｒを発現するコホートにおける患者数を示す。同一又は類似のＩＧＦ－１Ｒレベルをもつコホートのサブセット集団の同定により２群以上の別個の患者群を測定することができる。その後、これらの別個の群を最良に区別するレベルに基づい

て参照レベルの決定を行うことができる。参照レベルは一方をＩＧＦ－１Ｒとする２個以上のマーカーのレベルを表すこともできる。例えば各マーカーのレベルの値の比により２個以上のマーカーを表すことができる。

【０１５６】

同様に、明白な健康集団は例えば結腸癌等のＩＧＦ－１Ｒの発現に関連する病態をもつことが分かっている集団とは異なる「正常」範囲をもつ。従って、選択した所定値は個体が該当する分類を考慮することができる。適切な範囲と分類は単なる日常的実験で当業者が選択することができる。「上昇」、「増加」とは選択した対照に対して高いことを意味する。一般に、対照は適切な年齢層の明白な健常個体に基づく。

【０１５７】

同様に当然のことながら、本発明の対照は所定値に加え、実験材料と並行して試験する材料のサンプルでもよい。例としては同一対象から同一時点で採取した組織又は細胞が挙げられ、例えば、単一生検の複数の部分、又は対象に由来する単一細胞サンプルの複数の部分が挙げられる。

【０１５８】

本発明の抗体は例えば共有結合によって抗体とそのエピトープの結合を妨げないように任意種の分子と抗体の共有結合により修飾された誘導体を含む。適切な誘導体の例としては限定されないが、フコシル化抗体及びフラグメント、グリコシル化抗体及びフラグメント、アセチル化抗体及びフラグメント、ペグ化抗体及びフラグメント、リン酸化抗体及びフラグメント、並びにアミド化抗体及びフラグメントが挙げられる。本発明の抗体とその誘導体自体を公知保護／ブロッキング基、蛋白分解開裂、細胞リガンド又は他の蛋白質との結合等により誘導体化することができる。本発明の所定態様において、抗体の少なくとも１本の重鎖はフコシル化されている。所定態様において、フコシル化はＮ結合型である。好ましい所定態様において、抗体の少なくとも１本の重鎖はフコシル化Ｎ結合型オリゴ糖を含む。

【０１５９】

本発明の抗体は本発明の抗体の生物学的性質（例えばＩＧＦ－１Ｒとの結合、結合親和性、アビディティ）を維持する１もしくは多重アミノ酸置換、欠失、付加又は置換を有する変異体を含む。当業者は１もしくは多重アミノ酸置換、欠失、付加又は置換を有する変異体を作製することができる。これらの変異体としては、特に（ａ）１個以上のアミノ酸を保存又は非保存アミノ酸で置換した変異体、（ｂ）１個以上のアミノ酸をポリペプチドに付加又はポリペプチドから欠失させた変異体、（ｃ）１個以上のアミノ酸が置換基を含む変異体、及び（ｄ）融合パートナー、蛋白質タグ又はポリペプチドに有用な性質を付与することができる他の化学部分（例えば抗体のエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分等）とポリペプチドを融合した変異体が挙げられる。本発明の抗体はある種に由来するアミノ酸残基を保存又は非保存位置で別の種の対応する残基に置換した変異体を含むことができる。別の態様では、非保存位置のアミノ酸残基を保存又は非保存残基に置換する。これらの変異体を獲得する技術としては遺伝子技術（抑圧、欠失、突然変異等）、化学技術及び酵素技術等が当業者に公知である。本発明の抗体は更に抗体フラグメントを含む。「フラグメント」とは、好ましくは少なくとも約４０、より好ましくは少なくとも約５０まで、より好ましくは少なくとも約６０、より好ましくは少なくとも約７０、より好ましくは少なくとも約８０、より好ましくは少なくとも約９０、より好ましくは少なくとも約１００アミノ酸長であり、全長配列の所定の生物活性又は免疫活性、例えばＩＧＦ－１Ｒとの結合性を維持するポリペプチド配列を意味する。

【０１６０】

本発明の抗体は単独で使用してもよいし、細胞傷害性物質との免疫コンジュゲートとして使用してもよい。所定態様において、前記物質は化学療法剤である。所定態様において、前記物質は限定されないが、鉛－２１２、ビスマス－２１２、アスタチン－２１１、ヨウ素－１３１、スカンジウム－４７、レニウム－１８６、レニウム－１８８、イットリウム－９０、ヨウ素－１２３、ヨウ素－１２５、臭素－７７、インジウム－１１１等の放射

性同位体と、ホウ素－１０やアクチニド等の核分裂性核種である。他の態様において、前記物質は毒素又は細胞傷害性薬剤であり、限定されないが、リシン、修飾型シュードモナスエンテロトキシンＡ、カリケアマイシン、アドリアマイシン、５－フルオロウラシル等が挙げられる。抗体及び抗体フラグメントとこのような物質の結合方法は文献公知である。

【０１６１】

本発明は更に卵巣癌、乳癌、直腸癌、結腸直腸癌、肺癌、子宮内膜癌又は脳腫瘍患者の末梢血単核球に由来するもの等の完全ヒト抗体を包含する。このような細胞をミエローマ細胞と融合し、例えばＩＧＦ－１Ｒに対する完全ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を形成することができる。

【０１６２】

抗体誘導体

本発明の抗体又は抗体結合部分は誘導体化又は別の分子（例えば別のペプチド又は蛋白質）と結合することができる。一般に、抗体又はその部分はＩＧＦ－ＩＲ結合が誘導体化又は標識により悪影響を受けないように誘導体化される。従って、本発明の抗体及び抗体部分とは本明細書に記載するヒト抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の無傷の形態と修飾形態の両者を含むものとする。例えば、（化学結合、遺伝子融合、非共有的結合又は他の手段により）本発明の抗体又は抗体部分を１個以上の他の分子部分と機能的に結合することができ、このような部分としては、別の抗体（例えば二重特異性抗体又はダイアボディ）、検出剤、細胞傷害性物質、薬剤、及び／又は抗体もしくは抗体部分と別の分子の結合を媒介することができる蛋白質もしくはペプチド（例えばストレプトアビジンコア領域又はポリヒスチジンタグ）が挙げられる。

【０１６３】

ある種の誘導体化抗体は（同一型又は例えば二重特異性抗体を作製するためには異なる型の）２個以上の抗体を架橋することにより作製される。適切な架橋剤としては適当なスペーサーにより分離された２個の明確に反応性の基をもつヘテロ二官能性架橋剤（例えばｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）又はホモ二官能性架橋剤（例えばスベリン酸ジスクシンイミジル）が挙げられる。このようなリンカーはＰｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，１１１から市販されている。

【０１６４】

１側面では、当業者に公知の技術及び方法を使用して抗体誘導体を作製するために本明細書に記載する核酸分子を使用することができる。

【０１６５】

ヒト化抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体及びその特性決定

ヒト化抗体はマウス又はラット可変領域及び／又は定常領域をもつ抗体に付随する問題の一部を回避する。このようなマウス又はラット由来配列の存在は抗体の迅速なクリアランスをもたらしたり、抗体に対する免疫応答を患者に発生させる可能性がある。従って、本発明の１態様はヒト化抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を提供する。ヒト化抗体の使用は反復抗体投与が必要であると思われる癌等の慢性及び再発性ヒト病変の治療に実質的な利点を提供すると予想することができる。

【０１６６】

ヒト化技術と適切なライブラリーを使用するディスプレイ技術を使用してある程度まで免疫原性低下を達成することができる。当然のことながら、当分野で周知の技術を使用してマウス抗体又は他の種に由来する抗体をヒト化又は霊長類化することができる。例えばＷｉｎｔｅｒ ａｎｄ Ｈａｒｒｉｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １４：４３ ４６（１９９３）及びＷｒｉｇｈｔ ｅｔ ａｌ．Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２１２５ １６８（１９９２）参照。ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、ヒンジ領域及び／又はフレームワーク領域を対応するヒト配列で置換するように組換えＤＮＡ技術により該当抗体を操作することができる（ＷＯ９２／０２１９０並びに米国特許第５，５３

０，１０１号、５，５８５，０８９号、５，６９３，７６１号、５，６９３，７９２号、５，７１４，３５０号及び５，７７７，０８５号参照）。好ましい１態様では、重鎖、軽鎖、又は重鎖と軽鎖の両方の全ＣＤＲを維持しながら、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、ヒンジ領域及び／又はフレームワーク領域を対応するヒト配列で置換することにより、本明細書に記載する抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体をヒト化することができる。

【０１６７】

ヒト化抗体の一般的な作製方法は（齧歯類宿主に免疫することにより作製した）ＭＡｂに由来するＣＤＲ配列をヒトＩｇバックボーンにグラフトし、キメラ遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞にトランスフェクトし、ＣＨＯ細胞により分泌される機能的Ａｂを産生させる方法である（Ｓｈｉｅｌｄｓ，Ｒ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ａｎｔｉ－ＩｇＥ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｔｈａｔ ｉｎｈｉｂｉｔ ａｌｌｅｒｇｅｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｈｉｓｔａｍｉｎｅ ｒｅｌｅａｓｅ．Ｉｎｔ Ａｒｃｈ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０７：４１２－４１３）。本明細書に記載する方法は齧歯類細胞株、植物、酵母及び原核生物等の宿主細胞内にトランスフェクトしたＩｇ遺伝子又はキメラＩｇ内に遺伝子改変を生じるためにも有用である。（Ｆｒｉｇｅｒｉｏ Ｌ，ｅｔ ａｌ．（２０００）Ａｓｓｅｍｂｌｙ，ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ，ａｎｄ ｖａｃｕｏｌａｒ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ａ ｈｙｂｒｉｄ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ｉｎ ｐｌａｎｔｓ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１２３：１４８３－１４９４）。

【０１６８】

突然変異抗体

別の態様では、核酸分子、ベクター及び宿主細胞を使用して突然変異抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を作製することができる。抗体の重鎖及び／又は軽鎖の可変領域を突然変異させて抗体の結合性を変化させた後に、ＩＧＦ－１Ｒとの結合能を試験し、本明細書に開示する抗体と同一のエピトープと結合するか否かを試験する。例えば、ＩＧＦ－ＩＲに対する抗体のK_dを増減させるため、K_{off}を増減させるため、又は抗体の結合特異性を変化させるためにＣＤＲ領域の１個以上に突然変異を導入してもよい。部位特異的突然変異誘発技術は当分野で周知である。例えばＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，前出参照。本発明の１態様では、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の可変領域の生殖細胞系列に比較して変化していることが分かっているアミノ酸残基に突然変異を導入する。所定態様では、本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体（１２Ｂ１）の可変領域又はＣＤＲ領域の生殖細胞系列に比較して変化していることが分かっているアミノ酸残基に１個以上の突然変異を導入する。

【０１６９】

あるいは、本明細書に記載するアミノ酸配列をもつ可変領域又はＣＤＲ領域の生殖細胞系列に比較して変化していることが分かっているアミノ酸残基に１個以上の突然変異を導入する。

【０１７０】

別の態様では、フレームワーク領域の１個以上で核酸分子を突然変異させる。抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の半減期を延ばすためにフレームワーク領域又は定常領域に突然変異を導入することができる。例えば本明細書に援用するＷＯ００／０９５６０（公開日２０００年２月２４日）参照。１態様では、１、３又は５カ所の点突然変異と、１０カ所以下の点突然変異を導入することができる。抗体の免疫原性を変化させるため、別の分子との共有もしくは非共有的結合部位を提供するため、又は補体結合等の性質を変化させるためにフレームワーク領域又は定常領域に突然変異を導入してもよい。単一の突然変異抗体のフレームワーク領域と定常領域と可変領域の各々に突然変異を導入してもよい。あるいは、単一の突然変異抗体のフレームワーク領域、可変領域又は定常領域の１個のみに突然変異を導入してもよい。

【０１７１】

１態様では、突然変異前の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体に比較して突然変異抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体

のＶＨ又はＶＬ領域に１０カ所以下のアミノ酸置換が存在する。より好ましい態様では、突然変異抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体のＶＨ又はＶＬ領域に５カ所以下のアミノ酸置換が存在し、より好ましくは３カ所以下のアミノ酸置換が存在する。別の態様では、定常領域に１５カ所以下のアミノ酸置換、より好ましくは１０カ所以下のアミノ酸置換、更により好ましくは５カ所以下のアミノ酸置換が存在する。

【０１７２】

修飾抗体

１２ｂ１抗体から誘導されるか又はこれに関連する修飾抗体も提供する。別の態様では、本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の全部又は一部を別のポリペプチドに連結した融合抗体又はイムノアドヘジンを作製することができる。所定態様では、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の可変領域のみをポリペプチドに連結する。別の態様では、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体のＶＨ領域を第１のポリペプチドに連結し、ＶＨ領域とＶＬ領域が相互作用して抗体結合部位を形成することができるように、第１のポリペプチドと結合する第２のポリペプチドに抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体のＶＬ領域を連結する。別の態様では、ＶＨ領域とＶＬ領域が相互作用できるようにリンカーによりＶＨ領域をＶＬ領域から分離する（下記１本鎖抗体の項参照）。次にＶＨ－リンカー－ＶＬ抗体を該当ポリペプチドに連結する。融合抗体はポリペプチドをＩＧＦ－ＩＲ発現細胞又は組織に誘導するために有用である。ポリペプチドは毒素、成長因子又は他の調節蛋白質等の治療剤でもよいし、容易に可視化可能な酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ）等の診断剤でもよい。更に、２個（以上）の１本鎖抗体を相互に連結した融合抗体も作製できる。これは単一ポリペプチド上に２価又は多価抗体を作製したい場合や、二重特異性抗体を作製したい場合に有用である。

【０１７３】

１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）を作製するためには、ＶＨ配列とＶＬ配列を連続する１本鎖抗体として発現させるように、ＶＨとＶＬをコードするＤＮＡフラグメントを、フレキシブルリンカーをコードする別のフラグメントに機能的に連結し、ＶＬ領域とＶＨ領域をフレキシブルリンカーにより結合する（例えばＢｉｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３ ４２６；Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９ ５８８３；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９０）３４８：５５２ ５５４参照）。ＶＨとＶＬを１個だけ使用する場合には１本鎖抗体は１価とすることができ、２個のＶＨとＶＬを使用する場合には２価とすることができ、３個以上のＶＨとＶＬを使用する場合には多価とすることができ。

【０１７４】

別の態様では、抗ＩＧＦ－ＩＲをコードする核酸分子を使用して他の修飾抗体を作製することができる。例えば、本明細書の教示に従って標準分子生物学技術を使用して「κ体」（Ｉｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．１０：９４９ ５７（１９９７））、「ミニボディ」（Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ １３：５３０３ ９（１９９４））、「ダイアボディ」（Ｈｏｌｌｉｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ＵＳＡ ９０：６４４４ ６４４８（１９９３））、又は「ジャヌシン」（Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ １０：３６５５ ３６５９（１９９１）及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．“Ｊａｎｕｓｉｎ：ｎｅｗ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄｅｓｉｇｎ ｆｏｒ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ｒｅａｇｅｎｔｓ”Ｉｎｔ．Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｓｕｐｐｌ．７：５１ ５２（１９９２））を作製することができる。

【０１７５】

第１の結合領域を介してＩＧＦ－ＩＲと特異的に結合し、第２の結合領域を介して第２の分子と特異的に結合する二重特異性抗体を作製することができる。二重特異性抗体は組換え分子生物学技術により作製することもできるし、物理的に結合してもよい。更に、ＩＧＦ－ＩＲと別の分子に特異的に結合する２個以上のＶＨとＶＬを含む１本鎖抗体を作製することもできる。このような二重特異性抗体は周知技術を使用して作製することができ、例えば、（ｉ）及び（ｉｉ）については例えばＦａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｉｍｍｕｎ

ｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ４：７２ ８１（１９９４）及びＷｒｉｇｈｔ ａｎｄ Ｈａｒｒｉｓ，前出を参照し、（ｉｉｉ）については例えばＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ（Ｓｕｐｐｌ．）７：５１ ５２（１９９２）を参照されたい。好ましい１態様において、二重特異性抗体はＩＧＦ－ＩＲと癌又は腫瘍細胞上に高レベルで発現される別の分子（例えばｅｒｂＢ２受容体、ＶＥＧＦ、ＣＤ２０又はＥＧＦ－Ｒ）とに結合する。

【０１７６】

別の態様では、アミノ酸配列を配列番号１～８で表し、核酸配列を配列番号９～１６で表す可変領域の１個以上又はＣＤＲ領域の１個以上を使用して修飾抗体を作製する。

【０１７７】

標識抗体

別の型の誘導体化抗体は標識抗体である。本発明の抗体又は抗体部分を誘導体化することができる有用な検出剤としては上記に挙げた各種化合物が挙げられる。本明細書の別の箇所に記載するように、西洋ワサビペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等の検出に有用な酵素で抗体を標識してもよい。抗体を検出可能な酵素で標識する場合には、酵素が識別可能な反応生成物を生成するために使用する他の試薬を加えることにより検出される。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合には、過酸化水素とジアミノベンジジンを加えると、着色反応生成物が生じ、検出可能である。抗体をビオチンで標識し、アビジン又はストレプトアビジン結合の間接測定により検出してもよい。下記のようにガドリニウム等の磁性物質で抗体を標識してもよい。二次受容体により認識される所定ポリペプチドエピトープ（例えばロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合領域、エピトープタグ）で抗体を標識してもよい。所定態様では、潜在的な立体障害を低減するために各種長さのスペーサーアームによりラベルを結合する。

【０１７８】

放射性標識アミノ酸で抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を標識してもよい。放射性標識は診断目的にも治療目的にも使用できる。

【０１７９】

ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、メチルもしくはエチル基、又は糖鎖基等の化学基で抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を誘導体化してもよい。これらの基は抗体の生物学的特性を改善するため、例えば半減期を延長するため又は組織結合を増加するために有用であると思われる。

【０１８０】

核酸、ベクター、宿主細胞及び抗体の組換え作製方法

本発明は更に本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体の重鎖及び／又は軽鎖をコードする核酸を含む。本明細書で使用する「核酸」又は「核酸分子」とは１本鎖又は２本鎖の任意ＤＮＡ又はＲＮＡ分子を意味し、１本鎖の場合には直鎖又は環状のその相補的配列の分子である。核酸分子について記載する際には、本明細書では５’→３’方向に配列を記載する標準慣例に従って特定核酸分子の配列又は構造を記載することができる。本発明の所定態様において、核酸は「単離」されている。この用語をＤＮＡに適用する場合には、起源である生物の天然ゲノムですぐに隣接する配列から分離されたＤＮＡ分子を意味する。例えば、「単離核酸」はプラスミドやウイルスベクター等のベクターに挿入されるか又は原核細胞もしくは真核細胞もしくは宿主生物のゲノムＤＮＡに組込まれたＤＮＡ分子を含むことができる。ＲＮＡに適用する場合には、「単離核酸」なる用語は主に上記に定義したような単離ＤＮＡ分子によりコードされるＲＮＡ分子を意味する。あるいは、この用語はその天然状態（即ち細胞又は組織中）で結合している他の核酸から十分に分離されたＲＮＡ分子を意味する。単離核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ）は更に生物学的又は合成手段により直接作製され、その作製中に存在する他の成分から分離された分子を意味する場合もある。

【０１８１】

本発明の核酸は本発明の核酸のフラグメントも含む。「フラグメント」とは好ましくは

少なくとも約１０核酸長、より好ましくは約４０核酸長、最も好ましくは約１００核酸長の核酸配列を意味する。「フラグメント」とは、１箇所以上の欠失、挿入又は置換を含む少なくとも約１００個の連続するヌクレオチドの配列を意味する場合もある。「フラグメント」とは更に遺伝子の完全コーディング配列を意味する場合もあり、５’及び３’非翻訳領域を含む場合もある。

【０１８２】

コードされる抗体軽鎖は好ましくは配列番号１、２又は３のアミノ酸配列を含む。コードされる抗体重鎖は好ましくは配列番号４、５又は６のアミノ酸配列を含む。

【０１８３】

本発明の所定態様において、抗体の重鎖は配列番号１６：

【０１８４】

【化１】

CAGGTGCAGC TGAAGGAGTC AGGACCTGAC CTGGTGGCGC CCTCACAGAG
CCTGTCCATC ACTTGCACTG TCTCTGGGTT TTCATTAACC AACTATGGAG
TACACTGGGT TCGCCAGTTT CCAGGAAAGG GTCTGGAGTG GCTGGGAGTA
ATTTGGGCTG GTGGAAACAC AAATTATAAT TCGGCTCTCA TGTCCAGACT
GACCATCAGC AAAGACAATT CCAAGAGCCA AGTTTTCTTA AAAATGAACA
GTCTGCAAAC KGATGACACA GCCGTTTACT ACTGTGCCAG AGAATACGGT
AGTACCTACG TGGCCTGGTT TGCTCACTGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC
TGTCTCGAGC

のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされる。

【０１８５】

本発明の所定態様において、ＩＧＦ－１Ｒ抗体の軽鎖は配列番号１５：

【０１８６】

【化２】

GAAAATGTGC TCACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCTT CTCCAGGGGA
AAAGGTCACT ATGACCTGCG GGGCCAGCTC AAGTGTAAGT TCCAGTTTCT
TGCACTGGTA CCAGCAGAAG TCAGGTGCCT CCCCCAAACT CTGGATTTAT
AGCACATCCA ACTTGGCTTC TGGAGTCCCT ACTCGCTTCA GTGGCAGTGG
GTCTGGGACC TCTTACTCTC TCACAATCAG CAGTGTGGAG GCTGAAGATG
CTGCCACTTA TTACTGCCAG CAGTACAGTG GTTACCCACT CACGTTCGGT
GCTGGGACCA AGCTGGAAAT GAAA

の核酸配列によりコードされる。

【０１８７】

所定態様において、本発明は本発明の抗体の重鎖と軽鎖の両者をコードする核酸を提供する。例えば、本発明の核酸は配列番号１、２又は３のアミノ酸配列をコードする核酸配列と、配列番号４、５又は６のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むことができる。

【０１８８】

本発明の核酸は本発明の核酸に対して少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも約９０％、より好ましくは少なくとも約９５％、最も好ましくは少なくとも約９８％の相同度をもつ核酸を含む。特定配列に関して「類似度百分率」、「一致度百分率」及び「相同度百分率」なる用語はＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ ＧＣＧソフトウェアプログラムに記載されているように使用される。本発明の核酸は更に相補的核酸を含む。場合により、整列させたときに、配列は完全に相補的になる（ミスマッチがない）。他の例では、配列に約２０％までのミスマッチが存在していてもよい。

【０１８９】

本発明は更に、本明細書に記載する軽鎖（ＶＬ）の可変領域をコードする核酸分子に加え、本明細書に記載するＶＬをコードするアミノ酸配列の１種、特に配列番号１、２又は３の１種のアミノ酸配列を含むＶＬと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％一致するアミノ酸配列も提供する。本発明は更に、配列番号９、１０又は１１の１種の核酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％一致する核酸配列も提供する。別の態様において、ＶＬをコードする核酸分子は高ストリンジェント条件下で上記のようなＶＬをコードする核酸配列とハイブリダイズするものである。

【０１９０】

本発明は更に、本明細書に記載する重鎖（ＶＨ）の可変領域をコードする核酸分子に加え、本明細書に記載するＶＨをコードするアミノ酸配列の１種、特に配列番号４、５又は６の１種のアミノ酸配列を含むＶＨと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％一致するアミノ酸配列も提供する。本発明は更に、配列番号１２、１３又は１４の１種の核酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％一致する核酸配列も提供する。別の態様において、ＶＨをコードする核酸分子は高ストリンジェント条件下で上記のようなＶＨをコードする核酸配列とハイブリダイズするものである。

【０１９１】

「選択的にハイブリダイズする」なる用語は本明細書では検出可能且つ特異的に結合することを意味する。本発明のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド及びそのフラグメントは非特異的核酸との検出可能な結合の感知可能な量を最小限にするハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で核酸鎖と選択的にハイブリダイズする。当分野で公知の本明細書に記載する選択ハイブリダイゼーション条件を達成するためには「高ストリンジェンシー」又は「高ストリンジェント」条件を使用することができる。「高ストリンジェンシー」又は「高ストリンジェント」条件の１例はポリヌクレオチドを別のポリヌクレオチドと共にインキュベートし、６×ＳＳＰＥ又はＳＳＣ、５０％ホルムアミド、５×デンハルト試薬、０．５％　ＳＤＳ、１００μｇ／ｍｌ変性断片化サケ精子ＤＮＡのハイブリダイゼーション緩衝液中で４２℃のハイブリダイゼーション温度にて１２～１６時間後、１×ＳＳＣ、０．５％　ＳＤＳの洗浄用緩衝液を使用して５５℃で２回洗浄することにより一方のポリヌクレオチドを膜等の固体表面に結合する方法である。Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，前出，ｐｐ．９．５０　９．５５も参照。

【０１９２】

抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の完全な重鎖及び軽鎖のいずれかもしくは両方又はその可変領域をコードする核酸分子は抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を産生する任意起源から得ることができる。抗体をコードするｍＲＮＡの単離方法は当分野で周知である。例えばＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．参照。抗体遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）又はｃＤＮＡクローニング用のｃＤＮＡを作製するためにｍＲＮＡを使用することができる。本発明の１態様において、核酸分子は上記のように抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を発現するハイブリドーマ、好ましくはＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）等のヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニック動物細胞、非ヒトマウストランスジェニック動物又は非ヒト非マウストランスジェニック動物をその融合パートナーの一方とするハイブリドーマから得られる。別の態様において、ハイブリドーマは例えばヒト化抗体に使用することができる非ヒト非トランスジェニック動物から誘導される。

【０１９３】

重鎖の可変領域又はその抗原結合領域をコードする核酸分子を重鎖の定常領域と融合することにより、本明細書に開示する抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の完全重鎖をコードする核酸分子、例えば配列番号１６を構築することができる。同様に、軽鎖の可変領域又はその抗原結合領域をコードする核酸分子を軽鎖の定常領域と融合することにより、本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の軽鎖をコードする核酸分子、例えば配列番号１５を構築することができる。ＶＨセグメントがベクター内で重鎖定常領域（ＣＨ）セグメントと機能的に連結され、Ｖ

Ｌセグメントがベクター内で軽鎖定常領域（ＣＬ）セグメントと機能的に連結されるように、夫々既に重鎖定常領域と軽鎖定常領域をコードする発現ベクターに挿入することにより、ＶＨ及びＶＬ鎖をコードする核酸分子を全長抗体遺伝子に変換することができる。あるいは、標準分子生物学技術を使用してＶＨ鎖をコードする核酸分子を、ＣＨ鎖をコードする核酸分子と結合（例えばライゲーション）することにより、ＶＨ又はＶＬ鎖をコードする核酸分子を全長抗体遺伝子に変換する。ＶＬ鎖とＣＬ鎖をコードする核酸分子を使用しても同様の結果が得られる。ヒト重鎖及び軽鎖定常領域遺伝子の配列は当分野で公知である。例えばＫａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．，ＮＩＨ Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．９１ ３２４２，１９９１参照。その後、全長重鎖及び／又は軽鎖をコードする核酸分子を導入した細胞からこれらの分子を発現させ、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を単離することができる。

【０１９４】

別の態様では、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し、ＩＧＦ－ＩＲ抗原で免疫された非ヒト非マウス動物から抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の重鎖もしくはその抗原結合領域又は抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の軽鎖もしくはその抗原結合領域をコードする核酸分子を単離することができる。換言するならば、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を産生する非トランスジェニック動物又はヒト患者に由来する抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体産生細胞から核酸分子を単離することができる。抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体産生細胞からｍＲＮＡを単離する方法は、標準技術により単離し、クローニングし、及び／又はＰＣＲ及びライブラリー構築技術を使用して増幅し、標準プロトコルを使用してスクリーニングし、抗ＩＧＦ－ＩＲ重鎖及び軽鎖をコードする核酸分子を得ることができる。

【０１９５】

核酸分子は以下のように大量の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を組換え発現させるために使用することができる。核酸分子は以下に詳述するように、キメラ抗体、１本鎖抗体、イムノアドヘジン、ダイアボディ、突然変異抗体及び抗体誘導体を作製するために使用することもできる。核酸分子が非ヒト非トランスジェニック動物に由来する場合には、同じく以下に記載するように核酸分子を抗体ヒト化に使用することができる。

【０１９６】

別の態様では、本発明の核酸分子を特異抗体配列のプローブ又はＰＣＲプライマーとして使用することができる。例えば、核酸分子プローブを診断法で使用してもよいし、特に抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の可変領域の作製用の核酸配列を単離するために使用することができるＤＮＡの領域を増幅するために核酸分子ＰＣＲプライマーを使用してもよい。好ましい１態様において、核酸分子はオリゴヌクレオチドである。より好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは該当抗体の重鎖及び軽鎖の高度可変領域に由来する。更に好ましい態様において、オリゴヌクレオチドはＣＤＲの１個以上の全部又は一部をコードする。

【０１９７】

本発明の核酸をベクターにクローニングすることができる。「ベクター」とは結合した配列又はエレメントの複製を生じるように別の遺伝子配列又はエレメント（ＤＮＡ又はＲＮＡ）を挿入することができるプラスミド、コスミド、バクミド、ファージ、人工染色体（ＢＡＣ，ＹＡＣ）又はウイルス等のレプリコンである。「レプリコン」とは主にそれ自体の制御下で複製可能な任意遺伝子エレメントであり、例えばプラスミド、コスミド、バクミド、ファージ、人工染色体（ＢＡＣ，ＹＡＣ）又はウイルスである。レプリコンはＲＮＡでもＤＮＡでもよく、１本鎖でも２本鎖でもよい。所定態様において、発現ベクターは構成的に活性なプロモーターセグメント（限定されないが、ＣＭＶ、ＳＶ４０、延長因子又はＬＴＲ配列）又は誘導プロモーター配列（例えばステロイド誘導ｐＩＮＤベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））を含み、核酸の発現を調節することができる。発現ベクターはトランスフェクションにより細胞に導入することができる。

【０１９８】

抗体鎖遺伝子に加え、本発明の組換え発現ベクターは宿主細胞における抗体鎖遺伝子の

発現を制御する調節配列をもつ。当業者に自明の通り、調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は形質転換する宿主細胞の選択、所望の蛋白質発現レベル等の因子により異なる。哺乳動物宿主細胞発現に好ましい調節配列としては哺乳動物細胞に高レベルの蛋白質発現を誘導するウイルスエレメントが挙げられ、例えばレトロウイルスＬＴＲに由来するプロモーター及び／又はエンハンサー、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）（例えばＣＭＶプロモーター／エンハンサー）、サルウイルス４０（ＳＶ４０）（例えばＳＶ４０プロモーター／エンハンサー）、アデノウイルス（例えばアデノウイルス主後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ））、ポリオーマ及び強力哺乳動物プロモーター（例えば天然免疫グロブリン及びアクチンプロモーター）が挙げられる。ウイルス調節因子とその配列に関する詳細な記載については、例えば米国特許第５，１６８，０６２号（Ｓｔｉｎｓｋｉ）、米国特許第４，５１０，２４５号（Ｂｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．）及び米国特許第４，９６８，６１５号（Ｓｃｈａｆｆｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）参照。

【０１９９】

抗体鎖遺伝子及び調節配列に加え、本発明の組換え発現ベクターは宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば複製起点）や、選択マーカー遺伝子等の他の配列を含むことができる。選択マーカー遺伝子はベクターを導入した宿主細胞の選択を容易にする（例えばいずれもＡｘｅｌ　ｅｔ　ａｌ．の米国特許第４，３９９，２１６号、４，６３４，６６５号及び５，１７９，０１７号参照）。例えば、一般に選択マーカー遺伝子はベクターを導入した宿主細胞にＧ４１８、ハイグロマイシン又はメトトレキセート等の薬剤に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子としては（メトトレキセート選択／増幅したｄｈｆｒ－宿主細胞用として）ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子と（Ｇ４１８選択用として）ｎｅｏ遺伝子が挙げられる。

【０２００】

本発明の抗体又は抗体部分を発現させるためには、遺伝子が転写及び翻訳制御配列に機能的に連結されるように、上記のように得られた部分又は全長軽鎖及び重鎖をコードするＤＮＡを発現ベクターに挿入する。発現ベクターとしては、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、ＹＡＣ、ＥＢＶ由来エピソーム等が挙げられる。ベクター内の転写及び翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写と翻訳を調節するその所期機能を発揮するように、抗体遺伝子をベクターにライゲーションする。発現ベクターと発現制御配列は使用する発現宿主細胞と適合可能となるように選択される。抗体軽鎖遺伝子と抗体重鎖遺伝子は別々のベクターに挿入することができる。好ましい１態様では、両方の遺伝子を同一の発現ベクターに挿入する。標準方法（例えば抗体遺伝子フラグメントとベクターの相補的制限部位のライゲーション、又は制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション）により抗体遺伝子を発現ベクターに挿入する。

【０２０１】

本明細書で使用する「組換え宿主細胞」（又は単に「宿主細胞」）なる用語は組換え発現ベクターが導入された細胞を意味する。当然のことながら、このような用語は特定対象細胞のみならず、このような細胞の子孫も意味する。突然変異又は環境の影響により後世代に所定の変異が生じる場合があるので、このような子孫は実際には親細胞と同一でない場合もあるが、やはり本明細書で使用する「宿主細胞」なる用語の範囲に含む。

【０２０２】

「機能的に連結された」配列は該当遺伝子に隣接する発現制御配列と、該当遺伝子を制御するためにトランス又は所定の距離で作用する発現制御配列の両方を含む。本明細書で使用する「発現制御配列」なる用語はこれらの配列がライゲーションされるコーディング配列の発現とプロセシングを行うために必要なポリヌクレオチド配列を意味する。発現制御配列としては、適切な転写開始、終結、プロモーター及びエンハンサー配列；スプライシング及びポリアデニル化シグナル等の効率的なＲＮＡプロセシングシグナル；細胞質ｍＲＮＡを安定化する配列；翻訳効率を強化する配列（即ちコザックコンセンサス配列）；蛋白質安定性を強化する配列；並びに所望により、蛋白質分泌を強化する配列が挙げられる。このような制御配列の種類は宿主生物により異なり、原核生物ではこのような制御配

列としては一般にプロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列が挙げられ、真核生物では、一般にこのような制御配列としてはプロモーターと転写終結配列が挙げられる。「制御配列」なる用語は最低限でその存在が発現とプロセシングに不可欠の全成分を含むものとし、更にその存在が有利である他の成分、例えばリーダー配列や融合パートナー配列を含む場合もある。

【０２０３】

適切なベクターは機能的に完全なヒトＣＨ及びＣＬ免疫グロブリン配列をコードするものであり、上記のように任意ＶＨ又はＶＬ配列を容易に挿入及び発現できるように適切な制限部位を操作されている。このようなベクターでは、通常は挿入されたＪ領域のスプライスドナー部位とヒトＣ領域の前のスプライスアクセプター部位の間でスプライシングが生じるが、更にヒトＣＨエキソン内に存在するスプライス領域でも生じる。コーディング領域の下流の天然染色体部位でポリアデニル化と転写終結が生じる。組換え発現ベクターは宿主細胞からの抗体鎖の分泌を助長するシグナルペプチドをコードすることもできる。シグナルペプチドを抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレーム連結するように抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは免疫グロブリンシグナルペプチドでも異種シグナルペプチド（即ち非免疫グロブリン蛋白質に由来するシグナルペプチド）でもよい。

【０２０４】

ＩＧＦ－１Ｒに対する抗体の作製方法

本発明は更にＩＧＦ－１Ｒと特異的に結合するモノクローナル抗体の作製方法を提供する。蛋白質を単離精製するための各種周知技術を使用して細胞又は組換えシステムからＩＧＦ－１Ｒを精製することができる。例えば、限定されないが、蛋白質をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上に泳動させ、蛋白質を膜にブロットすることにより蛋白質の見掛けの分子量に基づいてＩＧＦ－１Ｒを単離することができる。その後、ＩＧＦ－１Ｒに対応する適切なサイズバンドを膜から切断し、直接又は先に蛋白質を膜から抽出もしくは溶出させることにより動物で免疫原として使用することができる。代替例として、サイズ排除クロマトグラフィーを単独又は他の単離精製手段と併用して蛋白質を単離することもできる。他の精製手段はＺｏｌａ，ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ：ＰＲＥＰＡＲＡＴＩＯＮ ＡＮＤ ＵＳＥ ＯＦ ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ ＡＮＤ ＥＮＧＩＮＥＥＲＥＤ ＡＮＴＩＢＯＤＹ ＤＥＲＩＶＡＴＩＶＥＳ（ＢＡＳＩＣＳ：ＦＲＯＭ ＢＡＣＫＧＲＯＵＮＤ ＴＯ ＢＥＮＣＨ）Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ Ｌｔｄ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２０００；ＢＡＳＩＣ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＡＮＴＩＢＯＤＹ ＰＲＯＤＵＣＴＩＯＮ ＡＮＤ ＣＨＡＲＡＣＴＥＲＩＺＡＴＩＯＮ，Ｃｈａｐｔｅｒ １１，“Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ，”Ｈｏｗａｒｄ ａｎｄ Ｂｅｔｈｅｌｌ，Ｅｄｓ．，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，２０００；ＡＮＴＩＢＯＤＹ ＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ（ＳＰＲＩＮＧＥＲ ＬＡＢ ＭＡＮＵＡＬ．），Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ ａｎｄ Ｄｕｂｅｌ，Ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，２００１等の標準教科書に記載されている。

【０２０５】

ＩＧＦ－１Ｒに対する抗体を作製するための１つのストラテジーはＩＧＦ－１Ｒを動物に免疫する方法である。所定態様では、ＩＧＦ－１Ｒを動物に免疫する。こうして免疫した動物は蛋白質に対する抗体を産生する。モノクローナル抗体を作製するための標準方法は公知であり、限定されないが、ハイブリドーマ法（Ｋｏｈｌｅｒ ＆ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７参照）；トリオーマ法；ヒトＢ細胞ハイブリドーマ法（Ｋｏｚｂｏｒ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ４：７２参照）及びヒトモノクローナル抗体を作製するためのＥＢＶハイブリドーマ法（Ｃｏｌｅ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ ＡＮＤ ＣＡＮＣＥＲ ＴＨＥＲＡＰＹ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８５，ｐｐ．７７－９６参照）が挙げられる。

【０２０６】

本発明の抗体はインビボでもインビトロでも作製することができる。インビボ抗体作製では、一般にＩＧＦ－１Ｒ又はＩＧＦ－１Ｒの免疫原性部分を動物に免疫する。一般に抗原にアジュバントを加え、免疫原性を促進する。アジュバントは免疫に使用する種により異なる。アジュバントの例としては限定されないが、フロイント完全アジュバント（「ＦＣＡ」）、フロイント不完全アジュバント（「ＦＩＡ」）、無機物ゲル（例えば水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン）、ペプチド、油エマルション、キーホールリンペットヘモシアニン（「ＫＬＨ」）、ジニトロフェノール（「ＤＮＰ」）、及び潜在的に有用なヒトアジュバント（例えばカルメット・ゲラン桿菌（「ＢＣＧ」）及びコリネバクテリウム・パルバム）が挙げられる。このようなアジュバントも当分野で周知である。

【０２０７】

免疫は周知手順を使用して実施することができる。用量と免疫レジメンは免疫する哺乳動物種、その免疫状態、体重及び／又は表面積計算値等により異なる。一般に、免疫した哺乳動物から血清をサンプリングし、例えば下記のような適切なスクリーニングアッセイを使用して抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体についてアッセイする。

【０２０８】

当分野で公知の各種技術を使用してＩＧＦ－１Ｒに対する抗体をインビトロで作製することもできる。例えば、限定されないが、インビトロプライミングしたヒト脾細胞を使用してＩＧＦ－１Ｒに対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製することができる（Ｂｏｅｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：８６－９５）。

【０２０９】

（抗体産生Ｂ細胞を含む）脾細胞をミエローマ株等の不死細胞株と融合することにより、免疫した動物からの脾細胞を不死化することができる。一般に、ミエローマ細胞株は脾細胞ドナーと同一種に由来する。１態様において、不死細胞株はヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含有する培地（「ＨＡＴ培地」）に感受性である。所定態様において、ミエローマ細胞はエプスタイン・バール・ウイルス（ＥＢＶ）感染に陰性である。好ましい態様において、ミエローマ細胞はＨＡＴ感受性、ＥＢＶ陰性及びＩｇ発現陰性である。任意の適切なミエローマを使用することができる。マウスミエローマ細胞株（例えばＰ３－ＮＳ１／１－Ａｇ４－１，Ｐ３－ｘ６３－Ａｇ８．６５３又はＳｐ２／Ｏ－Ａｇ１４ミエローマ株）を使用してマウスハイブリドーマを作製することができる。これらのマウスミエローマ株はＡＴＣＣから入手可能である。ポリエチレングリコール（「ＰＥＧ」）、好ましくは１５００分子量ポリエチレングリコール（「ＰＥＧ　１５００」）を使用してこれらのミエローマ細胞をドナー脾細胞と融合する。未融合のミエローマ細胞と非生産的に融合したミエローマ細胞を死滅させるＨＡＴ培地中で融合から得られたハイブリドーマ細胞を選択する。未融合の脾細胞は短時間の培養で死滅する。所定態様において、ミエローマ細胞は免疫グロブリン遺伝子を発現しない。

【０２１０】

例えば以下に記載するもの等のスクリーニングアッセイにより検出される所望の抗体を産生するハイブリドーマを使用し、培養液又は動物中に抗体を産生させることができる。例えば、ハイブリドーマ細胞がモノクローナル抗体を培地に分泌するために十分な条件と時間にわたってハイブリドーマ細胞を栄養培地で培養することができる。これらの技術と培地は当業者に周知である。あるいは、非免疫動物の腹腔にハイブリドーマ細胞を注入してもよい。細胞は腹腔内で増殖し、抗体を分泌し、抗体は腹水として蓄積する。高濃度のモノクローナル抗体源として腹水を腹腔からシリンジで採取することができる。

【０２１１】

ヒト抗体の別の非限定的な作製方法は米国特許第５，７８９，６５０号に記載されており、それ自体の同種免疫グロブリン遺伝子を不活性化して別の種（例えばヒト）の抗体を産生するトランスジェニック哺乳動物を記載している。異種抗体の遺伝子はヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされる。再構成していない免疫グロブリンをコードする領域を含むトランスジーンを非ヒト動物に導入する。得られたトランスジェニック動物はトラン

スジェニック免疫グロブリン配列を機能的に再構成し、ヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされる各種アイソタイプの抗体のレパートリーを産生することができる。次にトランスジェニック動物に由来するＢ細胞を不死性細胞株（例えばミエローマ細胞）との融合を含む各種方法のいずれかにより不死化することができる。

【０２１２】

代表的な１態様はヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部又は全部を含む非ヒト動物にＩＧＦ－ＩＲ抗原を免疫することを想定する。代表的な非ヒト動物はヒト免疫グロブリン遺伝子座の大きなフラグメントを含み、マウス抗体産生能を欠損する遺伝子組換えマウス系列であるＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）である。例えばＧｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ７：１３ ２１（１９９４）並びに米国特許第５，９１６，７７１号、５，９３９，５９８号、５，９８５，６１５号、５，９９８，２０９号、６，０７５，１８１号、６，０９１，００１号、６，１１４，５９８号及び６，１３０，３６４号参照。ＷＯ９１／１０７４１（公開日１９９１年７月２５日）、ＷＯ９４／０２６０２（公開日１９９４年２月３日）、ＷＯ９６／３４０９６及びＷＯ９６／３３７３５（いずれも公開日１９９６年１０月３１日）、ＷＯ９８／１６６５４（公開日１９９８年４月２３日）、ＷＯ９８／２４８９３（公開日１９９８年６月１１日）、ＷＯ９８／５０４３３（公開日１９９８年１１月１２日）、ＷＯ９９／４５０３１（公開日１９９９年９月１０日）、ＷＯ９９／５３０４９（公開日１９９９年１０月２１日）、ＷＯ００ ０９５６０（公開日２０００年２月２４日）及びＷＯ００／０３７５０４（公開日２０００年６月２９日）も参照。ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）は完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトＭａｂを生じる。第２世代ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）はヒト重鎖遺伝子座とκ軽鎖遺伝子座のメガベースサイズの生殖細胞系列構造ＹＡＣフラグメントの導入によりヒト抗体レパートリーの約８０％を含む。その開示内容を本明細書に援用するＭｅｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５：１４６ １５６（１９９７），Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８８：４８３ ４９５（１９９８）参照。これらの特許に開示されている方法は米国特許第５，９９４，６１９号に記載されているように改変することができる。好ましい１態様において、非ヒト動物はラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ又はウマとすることができる。

【０２１３】

あるいは、例えば、本発明の抗体は「レパートリークローニング」（Ｐｅｒｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：２４３２－２４３６；及びＨｕａｎｇ ａｎｄ Ｓｔｏｌｌａｒ（１９９１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４１：２２７－２３６）により作製することができる。更に、米国特許第５，７９８，２３０号はエプスタイン・バール・ウイルス核抗原２（ＥＢＮＡ２）を発現するエプスタイン・バール・ウイルスの感染により不死化したヒトＢ抗体産生Ｂ細胞からヒトモノクローナル抗体を作製する方法を記載している。その後、不死化に必要なＥＢＮＡ２を不活性化すると、抗体力価が上昇する。

【０２１４】

別の態様では、末梢血単核球（「ＰＢＭＣ」）のインビトロ免疫によりＩＧＦ－１Ｒに対する抗体を形成する。これは例えば文献に記載の方法の使用等の当分野で公知の任意手段により実施することができる （Ｚａｆｉｒｏｐｏｕｌｏｓ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２００：１８１－１９０）。

【０２１５】

本発明の抗体産生細胞の作製方法は更に宿主細胞の保存ミスマッチ修復（ＭＭＲ）プロセスを利用することにより超突然変異性抗体産生細胞を開発する方法を含む。このような遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子を細胞又はトランスジェニック動物に導入すると、ＤＮＡ修復効力を低下させることにより自然突然変異率を増加し、従って、細胞又は動物を超変異性にすることができる。限定されないが、ハイブリドーマ；Ｉｇ軽鎖及び重鎖をコードする遺伝子をトランスフェクトした哺乳動物細胞；１本鎖抗体をコードする遺

伝子をトランスフェクトした哺乳動物細胞；Ｉｇ遺伝子をトランスフェクトした真核細胞等の抗体産生細胞におけるＭＭＲをブロックすると、これらの細胞内の突然変異率を増加することができ、抗体産生を強化したクローン、抗原結合の増加等の生化学的性質を強化した遺伝子改変抗体を含む細胞、実質的に本発明の抗体のみを含む抗体を産生する細胞、及び／又はＩＧＦ－１Ｒ結合競合物質を実質的に含まない細胞が得られる。ＭＭＲ法（別称ミスマッチプルーフリーディング）は細菌から哺乳動物細胞に至る細胞中で蛋白質複合体により実施される。ＭＭＲ遺伝子はこのようなミスマッチ修復複合体の蛋白質の１つをコードする遺伝子である。特定の作用機序理論に結び付ける意図はないが、ＭＭＲ複合体はヌクレオチド塩基の非相補的対合に起因するＤＮＡ螺旋の歪みを検出すると考えられる。新たなＤＮＡ鎖上の非相補的塩基を切り出し、切り出した塩基を前のＤＮＡ鎖に相補的な適切な塩基で置換する。こうして、細胞はＤＮＡ複製ミスの結果として生じる多数の突然変異を排除する。

【０２１６】

ドミナントネガティブ対立遺伝子は同一細胞に野生型遺伝子が存在する場合でもＭＭＲ欠損表現型をもたらす。ＭＭＲ遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子の１例はコドン１３４に短縮突然変異をもつヒト遺伝子ｈＰＭＳ２－１３４である。突然変異の結果、この遺伝子の産物は１３４番目のアミノ酸の位置で異常に終結し、その結果、Ｎ末端１３３アミノ酸を含む短縮ポリペプチドとなる。このような突然変異の結果、ＤＮＡ複製後に細胞に蓄積する突然変異率が増加する。ミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子の結果、野生型対立遺伝子の存在下でもミスマッチ修復活性が損なわれる。本発明ではこのような作用を生じる任意対立遺伝子を使用することができる。ＭＭＲ遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子はヒト、動物、酵母、細菌又は他の生物の細胞から得ることができる。このような対立遺伝子は欠損ＭＭＲ活性について細胞をスクリーニングすることにより同定することができる。癌をもつ動物又はヒトの細胞を欠損ミスマッチ修復についてスクリーニングすることができる。結腸癌患者に由来する細胞は特に有用であると思われる。ＭＭＲ蛋白質をコードする任意細胞に由来するゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ又はｍＲＮＡを野生型配列からの変異について分析することができる。ＭＭＲ遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子は例えばｈＰＭＳ２－１３４対立遺伝子又は他のＭＭＲ遺伝子の変異体を作製することにより人工的に作製することもできる。各種部位特異的突然変異技術を使用することができる。天然又は人工に関係なく、超突然変異性細胞又は動物の作製用としてのこのような対立遺伝子の適性は１個以上の野生型対立以上の存在下で対立遺伝子に起因するミスマッチ修復活性を試験し、ドミナントネガティブ対立遺伝子であるか否かを判定することにより評価することができる。ミスマッチ修復蛋白質と、マウスＰＭＳ２、ヒトＰＭＳ２、ヒトＰＭＳ１、ヒトＭＳＨ２、ヒトＭＬＨ１及びヒトＰＭＳ２－１３４をコードする核酸配列の例は、その開示内容全体を本明細書に援用する公開特許出願第ＵＳ２００５－０２３２９１９号（シリアル番号１１／０５６，７７６、出願日２／１１／２００５）に開示されている。

【０２１７】

ミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子を導入した細胞は超突然変異性になる。これは、このような細胞又は動物の自然突然変異率がこのような対立遺伝子をもたない細胞又は動物に比較して上昇していることを意味する。自然突然変異率の上昇の程度は正常細胞又は動物の少なくとも２倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍、２００倍、５００倍又は１０００倍とすることができる。自然突然変異率をＭＭＲ欠損自体の１０～１００倍に増加するために、限定されないが、スルホン酸メタン、スルホン酸ジメチル、０６－メチルベンザジン、ＭＮＵ、ＥＮＵ等の化学的突然変異原をＭＭＲ欠損細胞で使用することができる。

【０２１８】

従って、ドミナントネガティブ形のＭＭＲ蛋白質をコードするポヌクレオチドを細胞に導入する。好ましくは、細胞は抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を産生する。所定態様において、細胞は配列番号４、５又は６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１、２又は３のアミノ酸

配列を含む軽鎖を含む抗体を産生する。好ましい所定態様において、細胞は配列番号７のヌクレオチド配列及び／又は配列番号８のヌクレオチド配列を含む核酸を含む。ドミナントネガティブＭＭＲ遺伝子はＭＭＲ複合体の一部である蛋白質をコードする任意のドミナントネガティブ対立遺伝子、例えば、ＰＭＳ２、ＰＭＳ１、ＭＬＨ１又はＭＳＨ２とすることができる。ドミナントネガティブ対立遺伝子は天然に存在するものでもよいし、実験室で作製したものでもよい。ポリヌクレオチドはゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ又は化学的に合成されたポリヌクレオチドの形態とすることができる。

【０２１９】

ポリヌクレオチドは構成的に活性なプロモーターセグメント（限定されないが、例えばＣＭＶ、ＳＶ４０、延長因子又はＬＴＲ配列）又は誘導プロモーター配列を含む発現ベクター（例えばステロイド誘導ｐＩＮＤベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））にクローニングすることができ、ドミナントネガティブＭＭＲ遺伝子の発現を調節することができる。ポリヌクレオチドはトランスフェクションにより細胞に導入することができる。

【０２２０】

本発明の別の側面によると、免疫グロブリン（Ｉｇ）遺伝子、１組のＩｇ遺伝子又はＩｇ遺伝子の全部もしくは部分を含むキメラ遺伝子をＭＭＲ欠損細胞宿主にトランスフェクトすることができ、細胞を増殖させ、新規表現型及び／又は遺伝子型をもつクローンについてスクリーニングする。ＭＭＲ欠損細胞はヒト、霊長類、哺乳動物、齧歯類、植物、酵母又は原核生物界に由来することができる。新規表現型又は遺伝子型をもつ細胞のＩｇをコードする遺伝子を夫々のクローンから単離し、遺伝的に安定な細胞（即ち正常ＭＭＲをもつ細胞）に導入すると、安定的にＩｇを産生するクローンが得られる。Ｉｇ遺伝子の単離方法は当分野で公知の任意方法とすることができる。Ｉｇをコードする単離ポリヌクレオチドの導入は当分野で公知の任意方法を使用して実施することもでき、限定されないが、Ｉｇをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターのトランスフェクションが挙げられる。Ｉｇ遺伝子、１組のＩｇ遺伝子又はＩｇ遺伝子の全部もしくは部分を含むキメラ遺伝子をＭＭＲ欠損細胞宿主にトランスフェクトする代わりに、ドミナントネガティブミスマッチ修復遺伝子をコードする遺伝子と同時にこのようなＩｇ遺伝子を遺伝的に安定な細胞にトランスフェクトし、細胞を超突然変異性にすることもできる。

【０２２１】

トランスフェクションはポリヌクレオチドを細胞に導入する任意方法である。トランスフェクション法は例えば遺伝子治療用ベクターを使用して生きた動物で実施してもよいし、例えば１個以上の培養単離細胞の懸濁液を使用してインビトロで実施してもよい。細胞は任意型の真核細胞とすることができ、例えばヒト又は他の霊長類、哺乳動物又は他の動物、無脊椎動物及び単細胞生物（例えば原生動物、酵母又は細菌）から単離された細胞が挙げられる。

【０２２２】

一般に、トランスフェクションは細胞懸濁液又はシングルセルを使用して実施されるが、トランスフェクトした細胞を増殖及び利用できるように治療細胞又は組織の十分なフラクションがポリヌクレオチドを組込む限り、他の方法も適用できる。ポリヌクレオチドの蛋白質産物は細胞で一過的又は安定的に発現させることができる。トランスフェクション技術は周知である。ポリヌクレオチドを導入するために利用可能な技術としては限定されないが、エレクトロポレーション、形質導入、細胞融合、塩化カルシウムの使用及び該当細胞との融合用脂質と共にポリヌクレオチドをパッケージングする方法が挙げられる。細胞にＭＭＲ遺伝子をトランスフェクトした後、細胞を培養で増殖及び再生させることができる。遺伝子が多数の細胞世代に一貫したレベルで発現されるようにトランスフェクションが安定的な場合には、細胞株が得られる。

【０２２３】

所望の表現型又は形質が同定されたら、その後、生物を遺伝的に安定化することができる。細胞が遺伝的に安定になり、突然変異を異常に高率で蓄積しなくなるように、ドミナントネガティブ対立遺伝子を遮断したり、誘導性の場合には細胞から除去する等の意味で

ドミナントネガティブ対立遺伝子を発現する細胞を「治癒」することができる。

【０２２４】

本明細書に記載する抗体特異性の判定方法に従って実質的に本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体のみを産生する細胞又はＩＧＦ－１Ｒ結合競合物質を実質的に含まない細胞をクローニング及び増殖用に選択する。このような方法の１例は抗葉酸抗体について詳述している出願公開第ＵＳ２００５－０２３２９１９号，前出の図４に示されている。

【０２２５】

本発明の抗体をコードする核酸は組換え発現させることができる。本発明の発現細胞としては任意の公知昆虫発現細胞株（例えばＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞）が挙げられる。発現細胞株は例えばＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅやＳｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ細胞等の酵母細胞株でもよい。発現細胞は例えばハイブリドーマ細胞（例えばＮＳ０細胞）、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ベビーハムスター腎細胞、ヒト胎児腎細胞株２９３、正常イヌ腎細胞株、正常ネコ腎細胞株、サル腎サル、アフリカミドリザル腎細胞、ＣＯＳ細胞及び非腫瘍マウス筋芽細胞Ｇ８細胞、線維芽細胞株、ミエローマ細胞株、マウスＮＩＨ／３Ｔ３細胞、ＬＭＴＫ３１細胞、マウスセルトリ細胞、ヒト子宮頸癌細胞、バッファローラット肝細胞、ヒト肺細胞、ヒト肝細胞、マウス乳腺腫瘍細胞、ＴＲＩ細胞、ＭＲＣ５細胞及びＦＳ４細胞等の哺乳動物細胞でもよい。本発明の核酸は例えばトランスフェクションにより導入することができる。組換え発現抗体は例えば細胞の増殖培地から回収することができる。

【０２２６】

本発明の１態様では、ＰＭＳ１、ＰＭＳ２、ＰＭＳ２－１３４、ＰＭＳＲ２、ＰＭＳＲ３、ＭＬＨ１、ＭＬＨ２、ＭＬＨ３、ＭＬＨ４、ＭＬＨ５、ＭＬＨ６、ＰＭＳＬ９、ＭＳＨ１及びＭＳＨ２等のミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子を脾細胞の融合後にハイブリドーマ細胞に導入するか、又は融合前にミエローマに導入してハイブリドーマ細胞を指向進化させることによりインビトロ免疫法を補完する。ドミナントネガティブ突然変異体を含む細胞は超突然変異性になり、トランスフェクトしていない対照細胞よりも高率で突然変異を蓄積する。例えばＦＲ－α結合競合物質を実質的に含まないクローン、高親和性抗体を産生するクローン、高力価抗体を産生するクローン、又は単に所定条件下で迅速もしくは良好に増殖するクローンについて、突然変異細胞のプールをスクリーニングすることができる。ミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子を使用して超突然変異性細胞を作製する技術は例えば米国特許第６，８０８，８９４号に記載されている。あるいは、ＮｉｃｏｌａｉｄｅｓらによりＷＯ０２／０５４８５６“Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｍｉｓｍａｔｃｈ Ｒｅｐａｉｒ”（公開日２００２年７月１８日）に記載されているミスマッチ修復の化学阻害剤を使用してミスマッチ修復を阻害することもできる。ミスマッチ修復遺伝子のドミナントネガティブ対立遺伝子又はミスマッチ修復の化学阻害剤を使用して抗体を強化する技術はクローニングした免疫グロブリン遺伝子を発現する哺乳動物発現細胞にも適用できる。細胞がもう一度遺伝的に安定になり、突然変異を異常に高率で蓄積しなくなるように、ドミナントネガティブ対立遺伝子を遮断したり、誘導性の場合には細胞から除去する等の意味でドミナントネガティブ対立遺伝子を発現する細胞を「治癒」することができる。

【０２２７】

更に、多数の公知技術を使用して産生細胞株からの本発明の抗体（又はこれに由来する他の部分）を強化することができる。例えば、グルタミンシンテターゼ遺伝子発現システム（ＧＳシステム）は所定条件下の発現を強化する一般アプローチである。ＧＳシステムについてはヨーロッパ特許第０　２１６　８４６号、０　２５６　０５５号及び０　３２３　９９７号とヨーロッパ特許出願第８９３０３９６４．４号との関連で全体又は一部を記載する。

【０２２８】

異なる細胞株又はトランスジェニック動物で発現される抗体はグリコシル化が相互に異なると思われる。しかし、本明細書に記載する核酸分子によりコードされる全抗体、又は

本明細書に記載するアミノ酸配列を含む全抗体は抗体のグリコシル化に関係なく、本発明の一部である。

【０２２９】

発現後、硫安沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等の当分野の標準手法に従って本発明の完全抗体、その二量体、個々の軽鎖及び重鎖又は他の免疫グロブリン形態を精製することができる（一般に、Ｒ．Ｓｃｏｐｅｓ，“Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ”，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８２）参照）。均一度が少なくとも約９０～９５％の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、医薬用途には９８～９９％又はそれ以上の均一度が最も好ましい。所望により部分的又は均一に精製後、治療用（体外を含む）又はアッセイ手順の開発及び実施、免疫蛍光染色等にポリペプチドを使用することができる（一般にＩｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ｖｏｌｓ．Ｉ　ａｎｄ　ＩＩ，Ｌｅｆｋｏｖｉｔｓ　ａｎｄ　Ｐｅｒｎｉｓ，ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９７９　ａｎｄ　１９８１）参照）。

【０２３０】

本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体又はその抗原結合部分の作製方法としてはファージディスプレイライブラリーが挙げられる。本方法はファージ上でヒト抗体のライブラリーを合成する段階と、ＩＧＦ－ＩＲ又はその一部でライブラリーをスクリーニングする段階と、ＩＧＦ－ＩＲと結合するファージを単離する段階と、ファージから抗体を得る段階を提案する。抗体ライブラリーを作製する１つの方法はヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒト宿主動物にＩＧＦ－ＩＲ又はその抗原部分を免疫し、免疫応答を発生させる段階と、抗体産生に関与する細胞を宿主動物から抽出する段階と、抽出した細胞からＲＮＡを単離する段階と、ＲＮＡを逆転写し、ｃＤＮＡを作製する段階と、プライマーを使用してｃＤＮＡを増幅する段階と、抗体がファージ上に発現されるようにｃＤＮＡをファージディスプレイベクターに挿入する段階を含む。こうして本発明の組換え抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を得ることができる。

【０２３１】

本発明の組換え抗ＩＧＦ－ＩＲヒト抗体はヒトリンパ球に由来するｍＲＮＡから作製したヒトＶＬ及びＶＨ　ｃＤＮＡを使用して作製された組換えコンビナトリアル抗体ライブラリー、好ましくはｓｃＦｖファージディスプレイライブラリーのスクリーニングにより単離することができる。このようなライブラリーの作製及びスクリーニング方法は当分野で公知である。ファージディスプレイライブラリーの作製用キットが市販されている（例えばＰｈａｒｍａｃｉａ　Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｐｈａｇｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｓｙｓｔｅｍ，カタログ番号２７　９４００　０１；及びＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＳｕｒｆＺＡＰ（登録商標）ファージディスプレイキット，カタログ番号２４０６１２）。他の方法及び試薬も抗体ディスプレイライブラリーの作製と単離に使用できる（例えばＬａｄｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．米国特許第５，２２３，４０９号；Ｋａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／１８６１９号；Ｄｏｗｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ公開第ＷＯ９１／１７２７１号，Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／２０７９１号；Ｍａｒｋｌａｎｄ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／１５６７９号；Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ公開第ＷＯ９３／０１２８８号；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０１０４７号；Ｇａｒｒａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０９６９０号；Ｆｕｃｈｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：１３７０　１３７２；Ｈａｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄ．Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ　３：８１　８５；Ｈｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４６：１２７５　１２８１；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９０）３４８：５５２　５５４；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）ＥＭＢＯ　Ｊ　１２：７２５　７３４；Ｈａｗｋｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２６：８８９　８９６；Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４　６２８；Ｇｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９

２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：３５７６ ３５８０；Ｇａｒｒａｄ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７３ １３７７；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９：４１３３ ４１３７；及びＢａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：７９７８ ７９８２参照）。

【０２３２】

あるいは、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．，ＰＣＴ公開第ＷＯ９３／０６２１３号に記載されているエピトープ刷込法に従って所望の特徴をもつ抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を作製することもできる。この方法で使用される抗体ライブラリーは好ましくはＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０１０４７号，ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９０）３４８：５５２ ５５４；及びＧｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．，（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ １２：７２５ ７３４に記載されているように作製及びスクリーニングされたｓｃＦｖライブラリーである。ｓｃＦｖ抗体ライブラリーはヒトＩＧＦ－ＩＲを抗原として使用してスクリーニングすることが好ましい。上記に引用した各文献はその開示内容全体を本明細書に援用する。

【０２３３】

初期ヒトＶＬ及びＶＨセグメントの選択後、初期選択されたＶＬ及びＶＨセグメントの種々の対をＩＧＦ－ＩＲ結合についてスクリーニングする「ミックスアンドマッチ」実験を実施し、好ましいＶＬ／ＶＨ対の組合せを選択する。更に、抗体の品質を更に改善するために、自然免疫応答中の抗体の親和性成熟に関与するインビボ体細胞突然変異プロセスに類似する方法で好ましいＶＬ／ＶＨ対のＶＬ及びＶＨセグメントを好ましくはＶＨ及び／又はＶＬのＣＤＲ３領域内でランダムに突然変異させる。このインビトロ親和性成熟は夫々ＶＨ ＣＤＲ３又はＶＬ ＣＤＲ３に相補的なＰＣＲプライマーを使用してＶＨ及びＶＬ領域を増幅することにより実施することができ、前記プライマーは得られるＰＣＲ産物がランダム突然変異をＶＨ及び／又はＶＬ ＣＤＲ３領域に導入したＶＨ及びＶＬセグメントをコードするように所定位置を４個のヌクレオチド塩基のランダム混合物で「スパイク」しておく。これらのランダムに突然変異させたＶＨ及びＶＬセグメントをＩＧＦ－ＩＲとの結合について再スクリーニングすることができる。

【０２３４】

組換え免疫グロブリンディスプレイライブラリーから本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体をスクリーニング及び単離後、選択した抗体をコードする核酸を（例えばファージゲノムに由来する）ディスプレイパッケージから回収し、標準組換えＤＮＡ技術により他の発現ベクターにサブクローニングすることができる。所望により、下記のように、本発明の他の抗体形態を作製するように核酸を更に操作することができる。組換えコンビナトリアルライブラリーのスクリーニングにより単離した組換えヒト抗体を発現させるためには、上記のように、抗体をコードするＤＮＡを組換え発現ベクターにクローニングし、哺乳動物宿主細胞に導入する。

【０２３５】

抗体特異性のスクリーニング

抗体作製技術については上述した通りである。更に所望に応じて所定の生物学的特徴をもつ抗体を選択することができる。従って、抗体を産生後、ＩＧＦ－１Ｒに対するその結合親和性についてスクリーニングすることができる。ＩＧＦ－１Ｒと特異的に結合する抗体のスクリーニングはマイクロタイタープレートにＩＧＦ－１Ｒをコーティングする酵素抗体法（ＥＬＩＳＡ）を使用して実施することができる。所定態様では、陽性反応クローンに由来するＩＧＦ－１Ｒと結合する抗体をＥＬＩＳＡアッセイで他のＩＧＦ－１Ｒアイソォームに対する反応性についてスクリーニングすることができ、例えば他のＩＧＦ－１Ｒアイソォームをコーティングしたマイクロタイタープレートを使用してＩＧＦ－１Ｒに対する反応性についてスクリーニングする。ＩＧＦ－１Ｒの別のアイソォームに対して反応性の抗体を産生するクローンを排除し、ＩＧＦ－１Ｒのみに対して反応性の抗体を産生するクローンをその後の増殖及び発生用に選択することができる。ＩＧＦ－１Ｒに対する

抗体の反応性の確認は例えば、卵巣癌、乳癌、直腸癌、結腸直腸癌、肺癌、子宮内膜癌又は脳腫瘍細胞に由来する蛋白質と精製ＩＧＦ－１Ｒ及び他のＩＧＦ－１Ｒアイソォームを ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上に泳動させた後に膜にブロットするウェスタンブロットアッセイを使用して実施することができる。その後、推定抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体で膜をプローブすることができる。ＩＧＦ－１Ｒに対して反応性であり、別のインスリン様受容体アイソォームに対して非反応性であるならば、ＩＧＦ－１Ｒに対する反応性の特異性が確認される。

【０２３６】

抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体のクラス及びサブクラス

本明細書に詳細に記載する抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体のクラス及びサブクラスは当分野で公知の任意方法により決定することができる。クラス及びサブクラスはＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット及び他の技術により決定することができる。あるいは、抗体の重鎖及び／又は軽鎖の定常領域の全部又は一部を配列決定し、そのアミノ酸配列を免疫グロブリンの各種クラス及びサブクラスの既知配列と比較し、抗体のクラス及びサブクラスを決定することにより、クラス及びサブクラスを決定することもできる。一般に、抗体のクラス及びサブクラスは抗体の特定クラス及びサブクラスに特異的な抗体を使用して決定することができる。このような抗体は市販されている。

【０２３７】

種及び分子選択性

その結合フラグメントを含めた本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体は種及び分子の両者の選択性を示す。１側面において、本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体はヒトＩＧＦ－ＩＲと結合する。本明細書の教示に従い、当分野で周知の方法を使用して抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体に対する種選択性を決定することができる。例えば、ウェスタンブロット、ＦＡＣＳ、ＥＬＩＳＡ又はＲＩＡを使用して種選択性を決定することができる。好ましい１態様では、ウェスタンブロットを使用して種選択性を決定することができる。

【０２３８】

同様に、本明細書の教示に従い、当分野で周知の方法を使用してＩＧＦ－ＩＲに対する抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体の選択性を決定することができる。例えば、ウェスタンブロット、ＦＡＣＳ、ＥＬＩＳＡ又はＲＩＡを使用して選択性を決定することができる。好ましい１態様では、ウェスタンブロットを使用して分子選択性を決定することができる。

【０２３９】

ＩＧＦ－ＩＲに対する抗ＩＧＦ－ＩＲの結合親和性

所定態様では、抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体の結合親和性を測定する。本発明の抗体は好ましくはＩＧＦ－１Ｒに対する結合親和性（Ｋｄ）が少なくとも約１×１０$^{-7}$Ｍ、より好ましくは少なくとも約１×１０$^{-8}$Ｍ、より好ましくは少なくとも約１×１０$^{-9}$Ｍ、最も好ましくは少なくとも約１×１０$^{-10}$Ｍである。本発明の好ましい抗体産生細胞は実質的にＩＧＦ－１Ｒに対する結合親和性が少なくとも約１×１０$^{-7}$Ｍ、より好ましくは少なくとも約１×１０$^{-8}$Ｍ、より好ましくは少なくとも約１×１０$^{-9}$Ｍ、最も好ましくは少なくとも約１×１０$^{-10}$Ｍの抗体のみを産生する。本発明の好ましい組成物は実質的にＩＧＦ－１Ｒに対する結合親和性が少なくとも約１×１０$^{-7}$Ｍ、より好ましくは少なくとも約１×１０$^{-8}$Ｍ、より好ましくは少なくとも約１×１０$^{-9}$Ｍ、最も好ましくは少なくとも約１×１０$^{-10}$Ｍの抗体のみを含有する。

【０２４０】

本発明の別の側面において、上記方法に従って作製された本発明の抗体は前出の「７Ｃ１０」と呼ぶ抗体と実質的に同一のK_dでＩＧＦ－ＩＲと結合する。代替態様において、本発明の抗体は配列番号１、２、３、４、５、６、７又は８から選択されるアミノ酸配列の１種を含む抗体と実質的に同一のK_dでＩＧＦ－ＩＲと結合する。別の態様において、抗体は配列番号１、２、３、４、５又は６から選択されるアミノ酸配列の１種を含む抗体に由来する１個以上のＣＤＲを含む抗体と実質的に同一のK_dでＩＧＦ－ＩＲと結合する。

【０２４１】

本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体又は本明細書に開示する方法を使用して同定された抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体は解離速度が低い。１態様において、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体はK_{off}が1×10^{-4}以下、好ましくはK_{off}が5×10^{-5}以下である。別の態様において、本発明の抗体又は本発明の方法を使用して同定もしくは作製された抗体は本明細書に開示する１個以上のＣＤＲを含む抗体と実質的に同一のK_{off}でＩＧＦ－ＩＲと結合する。

【０２４２】

ＩＧＦ－ＩＲに対する抗体の結合親和性と解離速度は当分野で公知の任意方法により測定することができる。例えば、結合親和性は競合的ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ又は表面プラズモン共鳴法（例えばＢＩＡｃｏｒｅ）により測定することができる。解離速度も表面プラズモン共鳴法により測定することができる。あるいは、結合親和性と解離速度を表面プラズモン共鳴法により測定する。更に、ＢＩＡｃｏｒｅを使用して結合親和性と解離速度を測定する。

【０２４３】

抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体により認識されるＩＧＦ－ＩＲエピトープの同定

更に他の態様において、本明細書に開示するようなＩＧＦ－１Ｒに対する抗体又は上記に詳述した方法により作製された抗体は前出の「７Ｃ１０」と呼ぶ抗体により認識されるエピトープとは異なるエピトープでＩＧＦ－１Ｒと結合する。

【０２４４】

当分野で公知の各種方法を使用して本発明の抗体から誘導された抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体又は上記方法に従って作製された抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体が１２Ｂ１又は７Ｃ１０と同一の抗原と結合するか否かを判定することができる。例えば、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を使用して抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体と結合することが分かっている抗原（例えばＩＧＦ－ＩＲ）を捕捉し、抗体から抗原を溶出させた後に、試験抗体が溶出した抗原と結合するか否かを判定することにより、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体が同一抗原と結合するか否かを判定することができる。

【０２４５】

飽和条件下で抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体をＩＧＦ－ＩＲと結合させた後に、試験抗体がＩＧＦ－ＩＲと結合する能力を測定することにより、試験抗体が抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体と同一エピトープと結合するか否かを判定することができる。試験抗体（例えば１２Ｂ１から誘導されるか又は本発明の方法に従って同定された抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体）は参照抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体と同時にＩＧＦ－ＩＲと結合した後、試験抗体は抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体とは異なるエピトープと結合する。しかし、試験抗体が同時にＩＧＦ－ＩＲと結合できない場合には、試験抗体はヒト抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体と同一のエピトープと結合する。この実験はＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ又は表面プラズモン共鳴法を使用して実施することができる。好ましい１態様では、表面プラズモン共鳴法を使用して実験を実施する。より好ましい態様では、ＢＩＡｃｏｒｅを使用する。抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体が参照抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体と交差競合するか否かを判定することもできる。例えば、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体が別の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体と同一のエピトープと結合できるか否かを測定するために使用する方法と同一方法を使用することにより、試験抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体が別の抗体と交差競合するか否かを判定することができる。

【０２４６】

抗体の非治療用途

細胞表面増殖受容体蛋白質、特にその発現が腫瘍性疾患に相関するもの（例えばＩＧＦ－１Ｒ）が薬剤候補又は腫瘍（例えば癌）治療の優れたターゲットであることは広く認められている。最新技術によると、このような蛋白質は診断及び予後診断用にも利用できると推定される。従って、本発明は診断及び予後診断剤としての本明細書に開示する抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体の使用を提案する。提案する使用では、（ｉ）その抗原結合フラグメントを含めた本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体は高親和性でＩＧＦ－１Ｒと特異的に結合し、（ｉｉ）本発明の抗体と結合した標的受容体は癌性細胞で高度に発現されるという見解を利用する。従って、１側面において、本明細書に詳細に記載する抗体又はその結合フラグメントは、生検組織等の組織サンプル、液体又は半液体サンプルを含めてどのような種類の「サ

ンプル」中に存在するかに関係なく、当業者がＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを有効に定量できるようにすることにより、癌診断及び予後診断で非常に有用になろう。

【０２４７】

上記によると、本発明のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントは診断環境で多数の用途があり、このような用途としては、（例えばＥＬＩＳＡ又はウェスタンブロットで）ＩＧＦ－１Ｒのインビトロ検出、監視、診断及び定量や、他の細胞の精製における１段階として混合細胞集団からＩＧＦ－１Ｒ発現細胞を死滅及び排除させるために細胞からのＩＧＦ－１Ｒの精製又は免疫沈降が挙げられる。このような診断法は患者からの細胞サンプル（例えば血液サンプル、リンパ節生検又は組織）を使用してインビトロで実施することもできるし、インビボ撮影により実施することもできる。本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体はＩＧＦ－１Ｒを発現する癌を（例えば放射線撮影法で）ステージングするためにも有用であると思われる。前記抗体は単独で使用してもよいし、他のＩＧＦ－１Ｒ関連癌マーカーと併用してもよい。本発明の抗体の診断用途は原発腫瘍及び癌に加え、転移にも及ぶ。前記抗原を含む他の癌及び腫瘍もこれらの診断及び撮影法に適用可能である。

【０２４８】

一般的に言うならば、本発明のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントは癌細胞上のＩＧＦ－１Ｒの存在を定量的又は定性的に検出するために使用することができる。これは例えば蛍光標識抗体を利用する免疫蛍光技術を光学顕微鏡、フローサイトメトリー又は蛍光検出と組合せることにより実施することができる。更に、本発明の抗体又はその結合フラグメントは監視、診断又は検出アッセイ用等の細胞上の癌特異抗原のｉｎ ｓｉｔｕ検出用として免疫蛍光、免疫電子顕微鏡分析又は非免疫アッセイ等で組織学的に利用することもできる。例えば、Ｚｏｌａ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｐｐ．１４７ １５８（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．１９８７）参照。

【０２４９】

非治療用途（例えば診断及び予後診断）では、抗体としては、全長ないし無傷抗体、抗体フラグメント、天然配列抗体又はアミノ酸変異体、ヒト化抗体、キメラ抗体又は融合抗体、免疫コンジュゲート及び機能的そのフラグメントが挙げられる。融合抗体では、抗体配列を異種ポリペプチド配列と融合する。所望のエフェクター機能を提供するように抗体のＦｃ領域を修飾することができる。

【０２５０】

診断及び撮影用途では、本発明の抗体を標識することができる。物理的結合、化学的結合等により抗体と結合してその検出を可能にするものであれば、本発明でどのような標識物質を使用できるかについて特に制限はない。ラベルを抗体又はそのフラグメントに直接結合してもよいし、間接的に結合してもよい。実際に、蛋白質分子を検出可能に標識する多数の方法が当分野で公知であり、実施されている。蛋白質をラベルに間接結合する手段も周知である。ラベルを抗体に間接結合するには、例えば、小さいハプテン（例えばジゴキシン）と結合することにより実施することができ、本明細書に記載する種々の型のラベルの１種を抗ハプテン抗体突然変異体（例えば抗ジゴキシン抗体）と結合する。例えば、本明細書に援用するＷａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．２０：４２８（１９７９）及びＳａｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．６：５４２（１９７６）参照。

【０２５１】

標識物質の特定例としては酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、放射性同位体等が挙げられる。蛍光標識抗体に適切な波長の光を照射すると、その存在を蛍光により検出することができる。本明細書に詳述する放射性同位体と蛍光物質は独立して検出可能なシグナルを発生するが、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは独立して検出可能なシグナルを発生せず、少なくとも１種の他の物質と反応すると、検出可能なシグナルを発生する。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性の測定方法（比色法、蛍光法、生物発光法又は化学発光法）に応じて各種基質を使用する。ビ

オチンの場合には、一般に少なくともアビジン又は酵素修飾アビジンを反応させる。必要に応じて基質に応じて各種色素も使用することができる。

【０２５２】

最も広く使用されている蛍光標識化合物としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ及び他の酵素、フルオレセインイソチオシアネート、フィコビリン蛋白質、希土類金属キレート、ダンシルクロライド、テトラメチルローダミンイソチオシアネート及び他の蛍光物質が挙げられる。^{152}Ｅｕや他のランタニド系列等の検出可能に標識した蛍光発光金属を使用してその後の検出のために抗体又はその結合フラグメントを標識することができる。例えば、Ｉｎ－１１１及びＴｃ－９９ｍについてＫｈａｗ ｅｔ ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０９：２９５［１９８０］）により記載され、Ｓｃｈｅｉｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２１５：１５１１［１９８２］）にも記載されているように、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）等の金属キレート基により金属を抗体にカップリングすることができる。例えばエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等の他のキレート剤も使用できるが、１－（ｐ－カルボキシメトキシベンジル）ＥＤＴＡとＤＴＰＡのカルボキシ炭酸無水物を使用すると抗体の免疫反応性を実質的に変化させずに結合できるので有利である。グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、過ヨウ素酸法等の公知任意方法を使用して標識物質を抗体に結合することができる。

【０２５３】

抗体を化学発光化合物にカップリングすることにより検出可能に標識することもできる。その後、化学反応中に発生する発光の存在を検出することにより化学発光標識抗体の存在を判定する。特に有用な化学発光標識化合物の例としては限定されないが、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及び蓚酸エステルが挙げられる。同様に、生物発光化合物を使用して本発明の抗体を標識してもよい。生物発光は触媒蛋白質が化学発光反応の効率を増加する生物系に認められる１種の化学発光である。発光の存在を検出することにより生物発光蛋白質の存在を判定する。有用な生物発光標識化合物としてはルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンが挙げられる。

【０２５４】

他の各種免疫アッセイもＩＧＦ－１Ｒの検出に利用可能である。例えば、抗体又はその結合フラグメントを放射性同位体で標識することにより、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）を使用して癌特異的抗原を検出することができる（例えばＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １ ａｎｄ ２，Ｃｏｌｉｇｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｄ．Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，Ｐｕｂｓ．（１９９１０，Ｃｏｌｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４１，１４５１ １４５９；Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，“Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ”，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｔｒａｉｎｉｎｇ Ｃｏｕｒｓｅ ｏｎ Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｔｈｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｍａｒｃｈ，１９８６）。ガンマカウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用又は放射線撮影により放射性同位体ラベルを検出することができる。代表的な放射性同位体としては、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ及び^{131}Ｉが挙げられる。生体物質を放射性同位体で標識する手順は当分野で一般に知られている。トリチウム標識法は本明細書に援用する米国特許第４，３０２，４３８号に記載されている。特にマウスモノクローナル抗体に適したヨウ素化法、トリチウム標識法及び^{35}Ｓ標識法が周知である。抗体、その結合部分、プローブ又はリガンド等の生体物質の他のヨウ素化法は本明細書に援用するＨｕｎｔｅｒ ａｎｄ Ｇｒｅｅｎｗｏｏｄ，Ｎａｔｕｒｅ １４４：９４５（１９６２），Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉ

ochemistry 13：1014－1021（1974）、並びに米国特許第3，867，517号及び4，376，110号に記載されている。生体物質のヨウ素化法は本明細書に援用するGreenwood，F. et al.，Biochem. J. 89：114－123（1963）；Marchalonis，J.，Biochem. J. 113：299－305（1969）；及びMorrison，M. et al.，Immunochemistry，289－297（1971）に記載されている。^{99}mTc標識法は本明細書に援用するRhodes，B. et al. in Burchiel，S. et al.（eds.），Tumor Imaging：The Radioimmunochemical Detection of Cancer，New York：Masson 111－123（1982）とその引用文献に記載されている。生体物質の^{111}In標識に適した方法は本明細書に援用するHnatowich，D. J. et al.，J. Immul. Methods，65：147－157（1983），Hnatowich，D. et al.，J. Applied Radiation，35：554－557（1984）、及びBuckley，R. G. et al.，F. E. B. S. 166：202－204（1984）に記載されている。

【0255】

本発明の抗体の別の標識方法は例えば酵素免疫測定法（EIA）用として抗体を酵素に結合する方法である（A. Voller et al.，1978，“The Enzyme Linked Immunosorbent Assay（ELISA）”，Diagnostic Horizons，2：1 7；，Microbiological Associates Quarterly Publication，Walkersville，Md.；A. Voller et al.，1978，J. Clin. Pathol.，31：507 520；J. E. Butler et al.，1981，Meths. Enzymol.，73：482 523；Enzyme Immunoassay，1980，（Ed.）E. Maggio，CRC Press，Boca Raton，FIa.；Enzyme Immunoassay，1981，（Eds.）E. Ishikawa et al.，Kgaku Shoin，Tokyo，Japan）。抗体と結合した酵素は適切な基質、好ましくは発色基質と反応し、例えば分光測光手段、蛍光手段又は目視検出手段により検出可能な化学部分を発生する。抗体を検出可能に標識するめに使用することができる酵素の非限定的な例としては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、Δ5－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、α－グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。検出は酵素の発色基質を利用する比色法、又は同様に作製した標準もしくは対照に比較した基質の酵素反応の程度の目視比較により実施される。多数の他の酵素－基質組合せも当業者に利用可能である。これらの一般概要については、米国特許第4，275，149号及び4，318，980号参照。

【0256】

酵素を抗体に結合する技術はO’Sullivan et al.，Methods for the Preparation of Enzyme－Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay，in Methods in Enzym.（ed J. Langone & H. Van Vunakis），Academic press，New York，73：147－166（1981）に記載されている。

【0257】

酵素－基質組合せの例としては、例えば、

（i）西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）と、基質としての水素ペルオキシダーゼ（ここで、水素ペルオキシダーゼは色素前駆体（例えばオルトフェニレンジアミン（OPD）又は3，3’，5，5’－テトラメチルベンジジン塩酸塩（TMB））を酸化する）

；
（ｉｉ）アルカリホスファターゼ（ＡＰ）と、発色基質としてのパラ－ニトロフェニルリン酸；及び
（ｉｉｉ）β－Ｄ－ガラクトシダーゼ（β－Ｄ－Ｇａｌ）と発色基質（例えばｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ）又は蛍光基質４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ。
【０２５８】
所定態様では、抗体を標識する必要はなく、抗体突然変異体と結合する標識抗体を使用してその存在を検出することができる。
【０２５９】
適切な対象としては、任意過増殖性腫瘍性疾患の病理作用の危険があると疑われる対象が挙げられ、特にＩＧＦ－１Ｒに介在される癌及び肉腫が本発明の検出、診断及び予後診断パラダイムに適している。癌病歴のある対象が特に適切である。診断及び予後診断に適したヒト対象は臨床基準により区別可能な２群に分けられる。「進行病変」又は「高腫瘍負荷」患者は臨床的に測定可能な腫瘍をもつ患者である。臨床的に測定可能な腫瘍とは腫瘍重量に基づいて検出することができる腫瘍である（例えば触診、ＣＡＴスキャン又はＸ線；陽性の生化学的又は組織病理学的マーカーだけではこの集団を同定するには不十分な場合がある）。
【０２６０】
第２群の適切な対象は「アジュバント群」として当分野で知られる。これらは癌病歴をもつが、別の治療方式に応答性であった個体である。過去の治療としては限定されないが、外科的切除、放射線療法及び従来の化学療法が挙げられる。その結果、これらの個体は臨床的に測定可能な腫瘍をもたない。しかし、元の腫瘍部位の近傍又は転移により病変の進行の危険があると疑われる。
【０２６１】
この群を更に高リスク個体と低リスク個体に細分することができる。細分は初期治療前後に観察された特徴に基づいて実施される。これらの特徴は臨床分野で公知であり、個々の癌毎に適切に定義されている。高リスクサブグループの典型的な特徴は腫瘍が隣接組織に浸潤している対象、又はリンパ節の障害を示す対象である。
【０２６２】
別の適切な群の対象は癌の遺伝的素因をもつが、まだ癌の臨床兆候を示していない対象である。例えば乳癌の家族暦をもつが、まだ妊娠可能年齢の女性の乳房組織をＩＧＦ－１Ｒの発現レベルについて試験することができ、試験が陽性の者、例えばＩＧＦ－１Ｒの正常発現レベルよりも高い者は乳癌の発現の監視を希望することができ、あるいは、従来のＩＧＦ－１Ｒ特異的モノクローナル治療による予防処置を利用することができる。
【０２６３】
ＩＧＦ－１Ｒ又はその誘導体を検出するための一般方法
本発明の抗体又はその結合フラグメントを使用してＩＧＦ－１Ｒを検出するアッセイ方法は特に限定されない。被験液体中の抗原量（例えばＩＧＦ－１Ｒのレベル）に対応する抗体、抗原又は抗体－抗原複合体の量を化学的又は物理的手段により検出し、既知量の抗原を含有する標準溶液から作成した標準曲線から抗原の量を計算することができる限り、任意アッセイ方法を使用することができる。本発明に含まれる代表的なイムノアッセイとしては限定されないが、米国特許第４，３６７，１１０号（二重モノクローナル抗体サンドイッチアッセイ）；Ｗｉｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｋｉｒｋｈａｍ ａｎｄ Ｈｕｎｔｅｒ，ｅｄｓ．Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ｅ．ａｎｄ Ｓ．Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ，Ｅｄｉｎｂｕｒｇｈ（１９７０）；米国特許第４，４５２，９０１号（ウェスタンブロット）；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５５：４９８０－４９８３（１９８０）（標識リガンドの免疫沈降）；及びＢｒｏｏｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３９：４７７（１９８０）（免疫細胞化学）に記載されている方法；蛍光標識抗体を利用する免疫蛍光技術と光学顕微鏡、フ

ローサイトメトリー又は蛍光検出の組合せ等が挙げられる。Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ８０’ｓ，Ａ．Ｖｏｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐａｒｋ，１９８１，Ｚｏｌａ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｐｐ．１４７－１５８（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．１９８７）も参照。

【０２６４】

（１）サンドイッチアッセイは検出しようとする蛋白質の異なる免疫原性部分又はエピトープと各々結合することが可能な２種の抗体を使用する。サンドイッチアッセイでは、試験サンプル検体を固体支持体に固定化された第１の抗体と結合させた後に、第２の抗体が検体と結合し、こうして不溶性３部分複合体を形成する。例えば米国特許第４，３７６，１１０号参照。検出可能な部分で二次抗体自体を標識してもよいし（直接サンドイッチアッセイ）、検出可能な部分で標識した抗免疫グロブリン抗体を使用して測定してもよい（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、１種のサンドイッチアッセイはＥＬＩＳＡアッセイであり、その場合には、検出可能な部分は酵素である。

【０２６５】

サンドイッチアッセイでは、本発明の固定化抗体を試験液と反応させ（一次反応）、次に本発明の抗体の標識体と反応させ（二次反応）、固定化担体上の標識剤の活性を測定することにより、試験液中のＩＧＦ－１Ｒレベルを定量することができる。一次反応と二次反応は同時に実施してもよいし、多少の時間間隔をあけて実施してもよい。標識法と固定化法は上記方法の変法により実施することができる。サンドイッチアッセイによるイムノアッセイでは、固定化又は標識抗体に使用する抗体は必ずしも１つの種に由来せず、測定感度等を増加するように２種以上の抗体の混合物を使用してもよい。サンドイッチアッセイによりＩＧＦ－１Ｒをアッセイする方法では、例えば一次反応に使用する抗体がＩＧＦ－１ＲのＣ末端領域の部分ペプチドを認識する場合には、二次反応で使用する抗体はＣ末端領域以外（即ちＮ末端領域）の部分ペプチドを認識するものが好ましい。一次反応に使用する抗体がＩＧＦ－１ＲのＮ末端領域の部分ペプチドを認識する場合には、二次反応で使用する抗体はＮ末端領域以外（即ちＣ末端領域）の部分ペプチドを認識する抗体を利用することが好ましい。

【０２６６】

同様にＩＧＦ－１Ｒの検出に有用であると思われる他の型の「サンドイッチ」アッセイは所謂「同時」アッセイと「リバース」アッセイである。同時アッセイはインキュベーション段階が１段階であり、固体支持体に結合した抗体と標識抗体の両方を被験サンプルに同時に添加する。インキュベーションの完了後、固体支持体を洗浄し、液体サンプルの残渣と複合体化していない標識抗体を除去する。その後、従来の「フォワード」サンドイッチアッセイと同様に、固体支持体に結合した標識固体の存在を判定する。

【０２６７】

「リバース」アッセイでは、段階的添加を利用し、先ず標識抗体の溶液を液体サンプルに添加した後に、適切なインキュベーション時間後に固体支持体に結合した未標識抗体を添加する。第２のインキュベーション後に、固相を従来通りに洗浄し、被験サンプルの残渣と未反応標識抗体の溶液を除去する。その後、「同時」及び「フォワード」アッセイと同様に固体支持体に結合した標識固体を判定する。１態様では、別個のエピトープに特異的な本発明の抗体の組合せを使用して感受性３部位免疫放射定量アッセイを構成することができる。

【０２６８】

この型のアッセイも、どのような「サンプル」中に存在するかに関係なく、ＩＧＦ－１Ｒ発現を定量するために使用することができる。従って、所定側面において、サンドイッチアッセイとしては以下の方法が挙げられる：

（ｉ）試験液中のＩＧＦ－１Ｒの発現レベルの定量方法として、担体に固定化したＩＧＦ－１ＲのＮ末端領域で部分ペプチドと特異的に反応する抗体と、Ｃ末端領域で部分ペプチドと特異的に反応する抗体の標識体と、試験液とを反応させる段階と、ラベルの活性を測

定する段階を含む方法；又は
（ｉｉ）試験液中のＩＧＦ－１Ｒ発現レベルの定量方法として、担体に固定化したＩＧＦ－１ＲのＣ末端領域で部分ペプチドと特異的に反応する抗体と、ＩＧＦ－１Ｒの標識体のＮ末端領域で部分ペプチドと特異的に反応する抗体と、試験液とを反応させる段階と、ラベルの活性を測定する段階を含む方法。
【０２６９】
（２）競合的結合アッセイは標識標準が制限量の抗体との結合について試験サンプル検体と競合する能力に依存する。試験サンプル中のＩＧＦ－１Ｒ蛋白質の量は抗体に結合される標準の量に反比例する。結合される標準の量の測定を容易にするために、競合前後に一般に抗体を不溶化し、標準と抗体に結合する検体を標準と未結合検体から適切に分離できるようにする。
【０２７０】
ＩＧＦ－１Ｒ発現レベルを定量するために、当業者は本発明の抗体又はそのフラグメントと、試験液と、ＩＧＦ－１Ｒの標識体を混合及び／又は競合反応させ、抗体又はそのフラグメントに結合した標識ＩＧＦ－１Ｒの比を測定し、試験液中のＩＧＦ－１Ｒを定量することができる。
【０２７１】
（３）免疫測定アッセイ
免疫測定アッセイでは、試験液中の抗原と固相抗原を所定量の本発明の抗体の標識体と競合反応させた後、液相から固相を分離するか；又は試験液中の抗原と過剰量の本発明の抗体の標識体を反応させた後、固相抗原を加え、本発明の抗体の未反応標識体を固相と結合させた後、固相を液相から分離する。その後、相のいずれかの標識量を測定し、試験液中の抗原レベルを求める。
【０２７２】
典型的な好ましい免疫測定アッセイとしては、固相に結合した抗体を先ず被験サンプルと接触させ、２元固相抗体－ＩＧＦ－１Ｒ複合体の形成によりサンプルからＩＧＦ－１Ｒを抽出する「フォワード」アッセイが挙げられる。適切なインキュベーション時間後、固体支持体を洗浄し、場合により未反応ＩＧＦ－１Ｒを含む液体サンプルの残渣を除去した後、（「レポーター分子」として機能する）既知量の標識抗体を含有する溶液と接触させる。未反応抗体を介して固体支持体に結合したＩＧＦ－１Ｒと標識抗体を複合体化させる第２のインキュベーション時間後に、抗体支持体に２回目の洗浄を実施し、未反応標識抗体を除去する。この型のフォワードサンドイッチアッセイはＩＧＦ－１Ｒの有無を判定する単純な「イエス／ノー」アッセイでもよいし、既知量のＩＧＦ－１Ｒを含有する標準サンプルで得られた測定値と標識抗体の測定値を比較することにより定量的に実施してもよい。このような「２サイト」ないし「サンドイッチ」アッセイはＷｉｄｅ（Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｅ　Ａｓｓａｙ　Ｍｅｔｈｏｄ，Ｋｉｒｋｈａｍ，ｅｄ．，Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ，Ｅｄｉｎｂｕｒｇｈ，１９７０，ｐｐ．１９９　２０６）により記載されている。
【０２７３】
（４）ネフロメトリー
ネフロメトリーでは、ゲル又は溶液中で抗原－抗体反応の結果として生成される不溶性沈渣の量を測定する。試験液中の抗原の量が少なく、少量しか沈渣が得られない場合には、レーザー散乱法を利用するレーザーネフロメトリーを適切に使用することができる。
【０２７４】
標識剤を使用する上記アッセイ方法（１）～（４）で使用することができる標識剤の例としては、放射性同位体（例えば^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{35}Ｓ等）、蛍光物質（例えばシアニン蛍光色素（例えばＣｙ２，Ｃｙ３，Ｃｙ５，Ｃｙ５．５，Ｃｙ７）、フルオレスカミン、フルオレセインイソチオシアネート等）、酵素（例えばβ－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等）、発光物質（例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等）、ビオチン、ランタニド等が挙げられる。更に、ビ

オチン－アビジン系も抗体を標識剤と結合するのに使用することができる。

【０２７５】

抗原又は抗体の固定化には、物理的吸着を使用することができる。あるいは、蛋白質、酵素等の固定化に従来使用されている化学結合も使用できる。担体の例としては不溶性多糖類（例えばアガロース、デキストラン、セルロース等）、合成樹脂（例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコーン等）又はガラス等が挙げられる。

【０２７６】

別の態様において、本発明は血液、血清、血漿、唾液等の体液中のＩＧＦ－１Ｒレベルの同定及び測定により癌及び腫瘍の診断を支援する。ＩＧＦ－１Ｒが正常に存在し、腫瘍性疾患の発生が異常量の細胞表面受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）、例えば正常に対する発現に起因する場合には、アッセイは生体サンプル中のＩＧＦ－１Ｒレベルを同一細胞種の正常な非腫瘍組織で予想される範囲と比較する。従って、対照対象又は対象の基線に対して対象中のＩＧＦ－１Ｒ含有細胞量又はＩＧＦ－１Ｒ発現レベルの統計的に有意な増加は腫瘍性疾患が進行中であるか又はこのような疾患の危険があるという診断を可能にする因子となり得る。同様に、癌の転移の可能性を示す高レベルのＩＧＦ－１Ｒの存在を検出することもできる。本発明の抗体（例えばＩＧＦ－１Ｒ）により認識される抗原を発現する癌では、抗原を検出できると、早期診断が可能になり、早期治療の機会が得られる。初期ステージの診断が困難な癌では、早期検出は特に重要である。

【０２７７】

更に、血液等の体液サンプル中で検出及び測定された抗原レベルは癌又は腫瘍の治療過程を監視するために手段となり、このような治療としては限定されないが、外科手術、化学療法、放射線療法、本発明の治療法及びその併用が挙げられる。体液中の抗原レベルを病変の重篤度に相関させることにより、このような抗原のレベルを使用して例えば原発腫瘍、癌及び／又は転移の除去の成功を示すと共に、他の治療の有効性を経時的に指示及び／又は監視することができる。例えば、癌又は腫瘍特異抗原のレベルの経時的低下は患者の腫瘍負荷の低下を示す。他方、抗原レベルが経時的に変化しない場合又は増加する場合には、治療が無効であるか、又は腫瘍もしくは癌の増殖が続いていると判断される。

【０２７８】

腫瘍が潜在的に癌性である（高レベルのＩＧＦ－１Ｒを発現する場合）か又は良性である（低レベルのＩＧＦ－１Ｒを発現する場合）かを判定するために診断法を使用することもできる。従って、例えば、ＩＧＦ－１Ｒに介在される腫瘍性疾患を示す疑いのある患者から採取した生体サンプルについて、ＩＧＦ－１Ｒ発現細胞の存在をアッセイすることができる。

【０２７９】

上記のように、本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体は組織中又は組織に由来する細胞中のＩＧＦ－１Ｒレベルを測定するために使用することができる。好ましい１態様において、組織は病変組織である。より好ましい態様において、組織は腫瘍又はその生検である。前記方法の好ましい１態様では、組織又はその生検を患者から切除する。その後、組織又は生検をイムノアッセイで使用し、本明細書に記載する方法により、例えばＩＧＦ－１Ｒレベル、ＩＧＦ－１Ｒの細胞表面レベル、ＩＧＦ－１Ｒのチロシンリン酸化レベル、又はＩＧＦ－１Ｒの局在を測定する。前記方法はＩＧＦ－１Ｒを発現する腫瘍を判定するために使用することができる。

【０２８０】

１関連態様において、本発明は好ましくは対照サンプル中の同一種の細胞、組織又は体液におけるレベルに比較して細胞、組織又は体液中のＩＧＦ－１Ｒレベルの変化をアッセイすることによる癌の診断方法を提供する。対照に対する患者のＩＧＦ－１Ｒレベルの変化、特に増加は癌の存在に結び付けられる。一般に、定量的診断アッセイでは、被験患者が癌をもつと判断される陽性結果は、細胞、組織又は体液中のＩＧＦ－１Ｒレベルが対照の同一細胞、組織又は体液中の抗原レベルの少なくとも２倍、好ましくは３～５倍又はそれ以上の場合である。正常対照としては、癌をもたないヒト及び／又は患者に由来する非

癌性サンプルが挙げられる。

【０２８１】

インビトロ診断法としては、当業者に公知の任意方法が挙げられ、（例えばヒト組織上、又は切除した腫瘍検体から分離した細胞上の）腫瘍細胞の免疫組織学的もしくは免疫組織化学的検出、又は（例えば血液サンプル又は他の体液中の）腫瘍関連抗原の血清学的検出が挙げられる。免疫組織化学的方法は、組織検体等の生体検体を本発明の抗体の１種以上で染色した後、コグネイト抗原に結合した抗体を含む抗体－抗原複合体の存在を検体上で検出する。このような抗体－抗原複合体の形成は組織中の癌の存在を示唆する。

【０２８２】

検体上の抗体の検出は免疫酵素法、例えば免疫ペルオキシダーゼ染色法、又はアビジン－ビオチン法、又は免疫蛍光法等の当分野で公知の技術を使用して実施することができる（例えばＣｉｏｃｃａ ｅｔ ａｌ．，１９８６，“Ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ Ｕｓｉｎｇ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ”，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１２１：５６２ ７９及びＩｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｅｄ．Ｋｉｍｂａｌｌ，（２ｎｄ Ｅｄ），Ｍａｃｍｉｌｌａｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９８６，ｐｐ．１１３ １１７参照）。当業者は日常的な実験により操作条件及び最適アッセイ条件を決定することができる。

【０２８３】

ＩＧＦ－１Ｒを検出するための典型的なインビトロイムノアッセイは、ＩＧＦ－１Ｒと選択的に結合することが可能な検出可能に標識した本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体又は抗原結合フラグメントの存在下で生体サンプルをインキュベートする段階と、サンプル中で結合した標識フラグメント又は抗体を検出する段階を含む。抗体と細胞又はその部分の結合後に細胞又はその部分（過形成、異形成及び／又は癌性細胞から放出された例えばＩＧＦ－１Ｒ又はそのフラグメント）の検出を可能にするために有効なラベルと抗体を結合する。生体サンプル中に細胞又はその部分が存在するならば、ラベルの検出により検出される。

【０２８４】

細胞、細胞粒子、膜又は可溶性蛋白質を固定化することが可能なニトロセルロース等の固相支持体もしくは担体又は他の固体支持体もしくはマトリックスに生体サンプルを接触させ、固定化することができる。その後、支持体を適切な緩衝液で洗浄した後、検出可能に標識した抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体で処理する。その後、緩衝液で固相支持体の２回目の洗浄を行い、未反応抗体を除去する。その後、固体支持体に結合したラベルの量を従来の手段により検出することができる。従って、本発明の別の態様では、本明細書に記載するような固相支持体に結合したモノクローナル抗体又はその結合フラグメントを含有する組成物を提供する。

【０２８５】

「固相支持体」又は「担体」とはペプチド、抗原又は抗体と結合することが可能な任意支持体を意味する。周知支持体又は担体としてはガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び改質セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース並びにマグネタイトが挙げられる。担体の種類は本発明の目的にはある程度可溶性でもよいし、不溶性でもよい。支持体材料は結合した分子がＩＧＦ－１Ｒ又は抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体と結合できる限り、ほぼ任意の可能な構造的構成をとることができる。従って、支持体構成はビーズのように球形でもよいし、試験管の内面やロッドの外面のように円筒形でもよい。あるいは、表面はシート、培養皿、試験ストリップ等のように平坦でもよい。好ましい支持体としてはポリスチレンビーズが挙げられる。当業者は抗体、ペプチド又は抗原と結合するための多数の他の適切な担体を認識し、あるいは日常的実験により確認することができる。

【０２８６】

本発明によるインビトロアッセイとしては更に、組換えＩＧＦ－１Ｒ、ＩＧＦ－１Ｒの

リガンド結合セグメントを含む可溶性フラグメント、又は固相支持体に結合したフラグメントを発現する細胞から単離した膜の利用が挙げられる。これらのアッセイは結合セグメント突然変異及び変異、又はリガンド突然変異及び変異（例えばリガンドアナログ）の作用の診断判定を可能にする。

【０２８７】

所定態様では、ＩＧＦ－１Ｒに対する結合親和性について化合物をスクリーニングするように設計されたインビトロアッセイで本発明のモノクローナル抗体及びその結合フラグメントを使用することができる。本明細書に援用するＦｏｄｏｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５１：７６７－７７３（１９９１）参照。この目的によると、本発明は本発明のモノクローナル抗体又はそのフラグメントがＩＧＦ－１Ｒとの結合について試験化合物と競合する競合的薬剤スクリーニングアッセイを想定する。こうして、モノクローナル抗体及びそのフラグメントを使用し、ＩＧＦ－１Ｒの１個以上の結合部位を共有し、他の場合には抗体により占有される受容体上の結合部位を占有するために使用することができる任意ポリペプチドの存在を検出する。

【０２８８】

所定態様では、各種化合物で細胞を処理後の細胞表面のＩＧＦ－１Ｒのチロシンリン酸化、チロシン自己リン酸化及び／又はＩＧＦ－１Ｒの量を測定するために本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を使用することができる。この方法はＩＧＦ－１Ｒを活性化又は阻害するために使用可能な化合物を試験するために使用することができる。この方法では、ある細胞サンプルを試験化合物で一定時間処理し、別のサンプルを未処理のままにする。チロシン自己リン酸化を測定しようとする場合には、細胞を溶解させ、ＥＬＩＳＡ等の本明細書に記載するイムノアッセイを使用してＩＧＦ－１Ｒのチロシンリン酸化を測定する。ＩＧＦ－１Ｒの総レベルを測定しようとする場合には、細胞を溶解させ、上記イムノアッセイの１種を使用して総ＩＧＦ－１Ｒレベルを測定する。

【０２８９】

ＩＧＦ－１Ｒチロシンリン酸化を測定又は総ＩＧＦ－１Ｒレベルを測定するために好ましいイムノアッセイはＥＬＩＳＡ又はウェスタンブロットである。ＩＧＦ－１Ｒの細胞表面レベルのみを測定しようとする場合には、細胞を溶解させずに、当業者に公知のアッセイの１種以上、例えば本明細書に記載するイムノアッセイの１種を使用してＩＧＦ－１Ｒの細胞表面レベルを測定する。ＩＧＦ－１Ｒの細胞表面レベルを測定するための好ましいイムノアッセイは細胞表面蛋白質をビオチンや^{125}Ｉ等の検出可能なラベルで標識する段階と、ＩＧＦ－１Ｒを抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体で免疫沈降させる段階と、その後、標識したＩＧＦ－１Ｒを検出する段階を含む。ＩＧＦ－１Ｒの局在、例えば細胞表面レベルを測定するための別の好ましいイムノアッセイは免疫組織化学の使用である。

【０２９０】

上記診断法はＩＧＦ－１Ｒに関連又は介在される腫瘍が抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体（例えば７Ｃ１０）又は本明細書に開示する抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体１２Ｂ１と競合しない他の任意の従来の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体による治療に良好に応答するか否かを判定するために使用することもできる。更に、上記診断法はより低レベルのＩＧＦ－１Ｒを腫瘍に発現させること、及び／又はより低レベルのチロシン自己リン酸化を発現させることにより、抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体による治療が有効であるか否かを判定するために使用することもでき、従って、治療が成功するか否かを判定するために使用することができる。

【０２９１】

本発明は従来の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体が標的腫瘍組織又は細胞上のＩＧＦ－１Ｒ発現を低下させるか否かを判定する方法も提供する。「従来のＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト」、「ＩＧＦ－１Ｒ分子による従来の治療」なる用語は同義に使用し、ＩＧＦ－１Ｒ発現を特異的に標的とし、本発明の抗体と同一のエピトープに結合しない現在入手可能なＩＧＦ－１Ｒ特異的モノクローナル抗体を意味する。代表的な治療プロトコルは米国シリアル番号２００５／００８４９０６に記載されている７Ｃ１０抗ＩＧＦ－１Ｒモノクローナル抗体の使用を含む。本発明の別の側面は個体がＩＧＦ－１Ｒに介在される癌を発症する感受性の

評価である。前記方法は該当細胞又は組織中のＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを測定する段階と、細胞又は組織を抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体又はその抗原結合部分と共にインキュベートする段階と、その後、細胞又は組織中の本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体又は抗原結合フラグメントによりＩＧＦ－１Ｒ発現レベルを再測定する段階を含む。あるいは、上記例でＩＧＦ－１Ｒのチロシンリン酸化を測定してもよい。患者が従来の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体レジメンによる治療に応答していると予測するために、ＩＧＦ－１Ｒレベルが低いという診断を使用する。逆に、従来の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体による治療後にＩＧＦ－１Ｒレベルが変化しないか又はＩＧＦ－１Ｒの発現が増加する場合には、現在の治療プロトコルに応答していないか又は従来の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体で更に治療しても応答する可能性がないと判断され、早期介入が可能になる。本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体は従来のＩＧＦ－１Ｒ抗体の投与と同時又は従来の抗ＩＧＦ－１Ｒの投与後に上記診断アッセイで使用することができる。好ましくは、従来のＩＧＦ－１Ｒ抗体はＩＧＦ－１Ｒ蛋白質との結合について本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体と競合しない。更に、本発明のＩＧＦ－１Ｒ抗体はＡＤＣＣ活性をもたない。従来の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体に基づく治療プロトコルの治療効力を評価するために上記アッセイを所定期間にわたって反復して実施することができる。こうして、本発明の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を「陰性バイオマーカー」として使用し、従来の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体に基づく治療の治療及び治療プロトコルを評価することができる。

【０２９２】

ＸＸ　染色及び／又は検出レベルをスコアリングするために本明細書に記載する抗体を使用することも考えられる。現在広く認められている充実癌の診断方法は外科的に生検又は切除した組織における異常細胞形態の組織学的判定である。組織を採取後、固定液に保存し、パラフィン蝋に包埋し、厚さ５μｍの切片に切断し、核をヘマトキシリン、細胞質をエオジンの２種類の色素で染色する（「Ｈ＆Ｅ染色」）。このアプローチは簡単で迅速で確実で廉価である。組織病理学は各種組織及び細胞種の診断を可能にする。腫瘍「グレード」（細胞分化／組織アーキテクチャ）及び「ステージ」（臓器侵入深度）の推定を提供することにより、予後診断も可能になる。腫瘍切片の免疫組織化学染色は異種組織における蛋白質の変性を推定する確実な方法であることが分かっている。免疫組織化学（ＩＨＣ）技術は一般に発色法又は蛍光法により細胞抗原をｉｎ　ｓｉｔｕでプローブ及び可視化するために抗体を利用する。免疫組織化学（ＩＨＣ）では、その可視又は蛍光色の強度と面積を通常通りに分類する。あるいは、従来の光学顕微鏡を単色光フィルター及びコンピュータソフトウェアプログラムと組合せて使用する顕微鏡細胞撮影を利用してもよい。光フィルターの波長を抗体染色及び細胞対比染色の色にマッチさせる。フィルターにより、顕微鏡使用者は組織切片の免疫染色部分を透過した光の特定色の光学密度の差を確認し、分類した後、測定することができる。これらの方法の腫瘍蛋白質測定への応用については、いずれも本明細書に援用する米国特許第５，２３５，５２２号及び５，２５２，４８７号参照。更に他の細胞撮影システム（イメージサイトメーター）は輪郭の自動認識が可能であり、輪郭面積の自動計算、自動校正及び平均と積分（ΣＯＤ）光学密度の自動計算を兼備する（例えばいずれも本明細書に援用する米国特許第５，５４８，６６１号、５，７８７，１８９号参照）。

【０２９３】

染色を強度と陽性染色細胞の百分率について評価した実証済みのスコアリング法（Ｄｈａｎａｓｅｋａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｎａｔｕｒｅ　４１２，８２２－８２６；Ｒｕｂｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００２，前出；Ｖａｒａｍｂａｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．，２００２，Ｎａｔｕｒｅ　４１９，６２４－６２９）を使用して蛋白質発現を判定することができる。良性組織と癌が存在する場合には、一方又は他方の組織種のみを分析目的に評価する。本発明の方法はいずれも０から４のスケールを使用することにより分析をスコアリングすることができ、ここで０は陰性であり（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照サンプルと同一の発現レベル）、４は大半の細胞における高強度の染色である。所定態様では、診断又は予後診断目的にスコアリングを使用することができる。例えば、陽性スコアのときのスコア１は例えばスコア３又は４よりも良好な予後を示すと考えられる。

【０２９４】
本発明に従って収集した情報は医師がＩＧＦ－１Ｒ介在性腫瘍性疾患を示す患者の治療コースを決定するのにも役立つであろう。例えば、乳癌の場合には、低スコアはそれ以上の外科手術が是認されないことを意味すると思われる。
【０２９５】
従って、例えば、本発明はＩＧＦ－１Ｒ発現に関連する腫瘍性疾患に関連する予後の一般的な検出又は監視方法を提供する。前記方法は、ａ）癌の診断又は監視を必要とする個体から組織サンプルを採取する段階は；ｂ）前記サンプル中のＩＧＦ－１Ｒポリペプチドレベルを検出する段階と；ｃ）前記サンプルをＩＧＦ－１Ｒ発現レベルについてスコアリングする段階と；ｄ）前記スコアリングを対照組織サンプルから得られたスコアリングと比較し、前記癌に関連する予後を判定する段階を提案する。診断又はモニターすることができる癌としては限定されないが、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、結腸直腸癌、皮膚癌、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫及び骨肉腫が挙げられる。
【０２９６】
所定態様において、本発明の方法は該当サンプルをＩＧＦ－１Ｒに対する抗体と接触させることを提案する。所定態様において、検出は免疫組織化学又は免疫細胞化学により組織切片又は細胞プレパラートで実施される。同様に、ＩＧＦ－１Ｒの検出はイムノブロッティング又は蛍光励起細胞ソーティング（ＦＡＣＳ）により実施することもできる。
【０２９７】
本発明はＩＧＦ－１Ｒ発現に関連する腫瘍性疾患をもつ患者の無病生存及び総生存の予測方法にも関し、ａ）腫瘍性疾患を示す個体から病変又は癌組織のサンプルを採取する段階と、ｂ）サンプルの癌細胞又は癌組織中のＩＧＦ－１Ｒ発現細胞のレベルを検出する段階と、ｃ）サンプルをＩＧＦ－１Ｒの発現レベルについてスコアリングする段階と；ｄ）スコアリングを対照サンプルから得られたスコアリングと比較し、無病生存とＩＧＦ－１Ｒに関連する総生存の可能性を判定する段階を含む。好ましくは、スコアリングは０から４のスケールを使用し、０は陰性（ＩＧＦ－１Ｒを検出できないか又は対照レベルと同等のＩＧＦ－１Ｒレベル）であり、４は大半の細胞における高強度染色であり、１から４のスコア（即ち陽性スコア）は前記疾患をもつ患者の無病及び総生存の予後不良を指示する。
【０２９８】
更に別の態様はＩＧＦ－１Ｒ介在性癌の治療方法を提供し、ａ）前記癌の治療を必要とする患者から病変組織のサンプルを採取する段階と；ｂ）組織サンプルにおけるＩＧＦ－１Ｒの発現レベルを測定する段階と；ｃ）サンプルをＩＧＦ－１Ｒの発現レベルについてスコアリングする段階と；ｄ）前記スコアリングを対照サンプルから得られたスコアリングと比較することによりスコアを相関させ、ＩＧＦ－１Ｒアンタゴニストによる治療が有効であると思われる患者を同定する段階と、ｅ）特定癌の予後を改善することが分かっている治療レジームで前記患者を治療する段階を含む。所定態様において、前記方法は更に、ｆ）段階「ａ」及び「ｂ」を反復する段階と、ｇ）癌の予後を改善することが分かっている治療レジームを調節する段階と；ｈ）適切であるとみなされる頻度で段階ａ～ｆを反復する段階を提案する。
【０２９９】
別の態様において、本発明はＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患の緩和用治療レジメンの効果の判定方法を提供し、レジメンはＩＧＦ－１Ｒアンタゴニストの使用を含み、前記方法は、ａ）治療レジメンを受けている個体から細胞又は組織サンプルを採取する段階と、ｂ）細胞又は組織サンプル中のＩＧＦ－１Ｒレベルを測定する段階と；ｃ）サンプルをＩＧＦ－１Ｒ蛋白質レベルについてスコアリングする段階と、ｄ）レベルを対照サンプルのレベルと比較し、治療レジメンに対するＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患の応答性を予測する段階を含む。従って、低スコア、例えば０又は経時的なスコアの低下はＩＧＦ－１Ｒアンタゴニスト（例えばＩＧＦ－１Ｒ特異抗体）含む治療が腫瘍負荷又はＩＧＦ－１Ｒ発現細胞又はＩＧＦ－１Ｒ発現レベルの低減に有効であることを示唆する。

【０３００】
充実腫瘍の転移能のスクリーニング方法も提供する。前記方法は、ａ）充実腫瘍の転移能のスクリーニングを必要とする個体から腫瘍組織サンプルを採取する段階と；ｂ）ＩＧＦ－１Ｒに対する抗体を患者に由来する腫瘍組織と反応させる段階と；ｃ）抗体と組織の結合程度を検出する段階と、ｄ）抗原の結合程度をその転移能と相関させる段階を含む。
ＸＸ
本発明は更に腫瘍性疾患を示すＩＧＦ－１Ｒ発現細胞の存在を可視化するのに有用なインビボ撮影法を包含する。このような技術は不快な生検や他の侵襲的診断法を使用せずに診断を可能にする。投与する本発明の検出可能に標識した抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体の濃度は、ＩＧＦ－１Ｒ抗原をもつか又は発現する細胞との結合がバックグラウンドに比較して検出可能になるように十分な濃度とすべきである。更に、最良の標的対バックグラウンドシグナル比が得られるように、本発明の検出可能に標識した抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を循環系から迅速に排出できることが望ましい。
【０３０１】
撮影分析は医療分野で周知であり、限定されないが、ｘ線分析、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）又はコンピュータ断層撮影法（ＣＥ）が挙げられる。上記のように、好ましくは、インビボ（及びインビトロ）診断法で使用されるＩＧＦ－１Ｒ抗体は患者で撮影可能な検出可能な物質／ラベルで直接又は間接的に標識される。適切な検出可能な物質としては各種酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質及び放射性物質が挙げられる。原則として、インビボ診断用の本発明の検出可能に標識した抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体の用量はある程度患者特異的であり、年齢、性別及び病変の程度等の因子により異なる。用量は例えば所与注射回数、腫瘍負荷及び当業者に公知の他の因子によっても異なる場合がある。例えば、シアニン標識Ｍａｂを使用して腫瘍をインビボ標識している。Ｂａｌｌｏｕ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．４１：２５７ ２６３。
【０３０２】
放射性標識生体物質の場合には、生体物質を患者に投与し、生体物質が反応する抗原を含む腫瘍に局在させ、例えばガンマカメラ又はエミッショントモグラフィーを使用する放射性核種スキャン等の公知技術を使用してインビボで検出ないし「撮影」する。例えば本明細書に援用するＡ．Ｒ．Ｂｒａｄｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｍａｇｉｎｇ”，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｒ．Ｗ．Ｂａｌｄｗｉｎ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．），ｐｐ．６５－８５（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５）参照。あるいは、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙに所在のＰｅｔ ＶＩと呼ばれるもの等のポジトロン放射体軸断層撮影スキャナーを使用することができ、この場合には放射性ラベルがポジトロンを放出する（例えば^{11}Ｃ，^{18}Ｆ，^{15}Ｏ及び^{13}Ｎ）。
【０３０３】
従って、所定態様において、本発明は具体的にＩＧＦ－１Ｒを発現又はＩＧＦ－１Ｒ発現細胞（例えば癌）を含有する組織を検出及び可視化できるようにすることにより、癌診断におけるＩＧＦ－１Ｒ抗体の使用を提供する。前記方法は、（ｉ）抗体とＩＧＦ－１Ｒの相互作用が生じるような条件下でＩＧＦ－１Ｒと特異的に結合する診断有効量の本発明の検出可能に標識した抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体もしくはその抗原結合フラグメント又は本発明の抗体もしくはその結合フラグメントを活性成分として含有するその医薬組成物を対象（及び場合により対照対象）に投与する段階と；（ｉｉ）結合剤を検出し、例えばＩＧＦ－１Ｒ発現組織を特定又は他の方法でＩＧＦ－１Ｒ発現細胞を同定する段階を含む。「診断有効」なる用語は新生物の検出を可能にするために十分な量の本発明の検出可能に標識した抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を投与することを意味する。
【０３０４】
所定態様では、ｘ線分析に使用可能なバリウム等の造影剤、又はＭＲＩもしくはＣＥに使用可能なガドリニウムキレート等の磁気造影剤で本発明の抗体を標識することができる

。

【０３０５】

前記方法の別の態様では、該当組織がＩＧＦ－１Ｒを発現するか否かを判定するために、患者を画像分析するのでなく、患者から生検を採取する。

【０３０６】

放射性標識抗体又は免疫コンジュゲートは診断撮影に有用なγ線放出放射性同位体又はポジトロン放出物質を含むことができる。使用するラベルは選択する撮影法により異なる。インビボ診断用の抗体の使用は当分野で周知である。Ｓｕｍｅｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，（Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ １７：２４７－２５４（１９９０））はインジウム－１１１をラベルとして使用する腫瘍のラジオイムノシンチグラフィー撮影用の最適化抗体－キレート剤を記載している。Ｇｒｉｆｆｉｎ ｅｔ ａｌ．，（Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃ ９：６３１－６４０［１９９１］）は再発性結腸直腸癌をもつ疑いのある患者で腫瘍を検出するのにこの物質を使用することを記載している。

【０３０７】

本発明の方法はインビボ検出目的で常磁性同位体を使用することもできる。磁気共鳴画像法用ラベルとして常磁性イオンをもつ同様の物質を使用することも当分野で公知である（Ｌａｕｆｆｅｒ，Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ ｉｎ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２２：３３９－３４２［１９９１］）。

【０３０８】

平面スキャン又は単一光子放射断層撮影（ＳＰＥＣＴ）にはインジウム－１１１、テクネチウム－９９ｍ又はヨウ素－１３１等の放射性ラベルを使用することができる。ポジトロン放射断層撮影法（ＰＥＴ）にはフッ素－１９等のポジトロン放出ラベルを使用することもできる。ＭＲＩには、ガドリニウム（ＩＩＩ）又はマンガン（ＩＩ）等の常磁性イオンを使用することができる。

【０３０９】

インビボ診断撮影法では、入手可能な検出機器の種類が所与の放射性同位体を選択する際の重要な因子である。選択される放射性同位体は所与型の機器で検出可能な型の崩壊でなければならない。インビボ診断用に放射性同位体を選択する際に重要な更に別の因子は、放射性同位体の半減期を標的による最大取込み時にも検出可能であるように十分に長く、且つ個体に対する有害な放射線を最小限にするために十分に短くするという点である。理想的には、インビボ撮影に使用される放射性同位体は粒子放出しないが、従来のガンマカメラにより容易に検出できるように、１４０～２５０ｋｅＶ範囲の多数の光子を発生する。

【０３１０】

スカンジウム－４７（３．５日）、ガリウム－６７（２．８日）、ガリウム－６８（６８分）、テクネチウム－９９ｍ（６時間）及びインジウム－１１１（３．２日）等の半減期が１時間～３．５日の放射性金属が抗体修飾に利用可能であり、このうち、ガリウム－６７、テクネチウム－９９ｍ及びインジウム－１１１はガンマカメラ撮影に好ましく、ポジトロン放射断層撮影法にはガリウム－６８が好ましい。平面スキャンや単一光子放射断層撮影（ＳＰＥＣＴ）にはインジウム－１１１、テクネチウム－９９ｍ又はヨウ素－１３１等のラベルを使用することができる。

【０３１１】

特異抗体に結合した放射性金属の場合には、同様に、その免疫特異性を損なわず抗体分子にできるだけ高い比率の放射性ラベルを導入することが望ましい。抗体上の抗原結合部位が保護されるように確保するように、本発明の特異的癌マーカーの存在下で放射性標識を実施することにより更に改善を達成することができる。標識後に抗原を分離する。

【０３１２】

特に６０～４，０００ｋｅＶのエネルギー範囲で適切な放射性同位体としては、^{51}Ｃｒ、^{57}Ｃｏ、^{58}Ｃｏ、^{59}Ｆｅ、１３１Ｉ、１２１Ｉ、１２４Ｉ、８６Ｙ、６２Ｃｕ、６４Ｃｕ、１１１Ｉｎ、６７Ｇａ、６８Ｇａ、９９ｍＴｃ、９４ｍＴｃ、１８Ｆ、１１

Ｃ、１３Ｎ、１５Ｏ、７５Ｂｒ、７５Ｓｅ、９７Ｒｕ、９９ｍＴｃ、１１１Ｉｎ、１１４ｍＩｎ、１２３Ｉ、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１６９Ｙｂ、１９７Ｈｇ及び２０１Ｔｌ等が挙げられる。例えば撮影目的用として１８Ｆ、６８Ｇａ、９４ｍＴｃ等のポジトロン放出物質を開示しており、その開示内容全体を本明細書に援用する米国特許出願（発明の名称“Ｌａｂｅｌｉｎｇ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ａｇｅｎｔｓ　ｗｉｔｈ　Ｇａｌｌｉｕｍ－６８”－発明者Ｇ．Ｌ．Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ及びＷ．Ｊ．ＭｃＢｒｉｄｅ）（米国予備出願第６０／３４２，１０４号）参照。特に有用な診断／検出用放射性核種としては限定されないが、１８Ｆ、５２Ｆｅ、６２Ｃｕ、６４Ｃｕ、６７Ｃｕ、６７Ｇａ、６８Ｇａ、８６Ｙ、８９Ｚｒ、９４ｍＴｃ、９４ｍＴｃ、９９ｍＴｃ、１１１Ｉｎ、１２３Ｉ、１２４Ｉ、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１５４－１５８Ｇｄ、３２Ｐ、９０Ｙ、１８８Ｒｅ及び１７５Ｌｕが挙げられる。

【０３１３】

有用なγ線放出放射性核種の崩壊エネルギーは好ましくは２０～２０００ｋｄＶ、より好ましくは６０～６００ｋｄＶ、最も好ましくは１００～３００ｋｄＶである。

【０３１４】

ポジトロン放射断層撮影に有用な放射性核種としては限定されないが、１８Ｆ、１Ｍｎ、２ｍＭｎ、５２Ｆｅ、５５Ｃｏ、６２Ｃｕ、６４Ｃｕ、６８Ｇａ、７２Ａｓ、７５Ｂｒ、７６Ｂｒ、８２ｍＲｂ、８３Ｓｒ、８６Ｙ、８９Ｚｒ、９４ｍＴｃ、１１０Ｉｎ、１２０Ｉ及び１２４Ｉが挙げられる。有用なポジトロン放出放射性核種の総崩壊エネルギーは好ましくは＜２，０００ｋｅＶ、より好ましくは＜１，０００ｋｅＶ、最も好ましくは＜７００ｋｅＶである。

【０３１５】

本発明は診断剤としての非放射性物質の使用も想定する。適切な非放射性診断剤は磁気共鳴画像法、コンピュータ断層撮影又は超音波に適した造影剤である。磁気造影剤としては例えばマンガン、鉄及びガドリニウム等の非放射性金属が挙げられ、本発明の抗体と併用する場合には２－ベンジル－ＤＴＰＡとそのモノメチル及びシクロヘキシルアナログを含む金属－キレートと組合せと錯形成している。その開示内容全体を本明細書に援用する米国シリアル番号０９／９２１，２９０（出願日２００１年１０月１０日）参照。

【０３１６】

二重特異性抗体もターゲティング方法で有用であり、対象に２種類の診断剤を送達するのに好ましい方法を提供する。その開示内容全体を本明細書に援用する米国シリアル番号０９／３６２，１８６及び０９／３３７，７５６は二重特異性抗体を使用するプレターゲティング方法を開示しており、この方法では二重特異性抗体を^{251}Ｉで標識して対象に送達した後に^{99}ｍＴｃで標識した２価ペプチドを添加している。プレターゲティング方法は同様にいずれもその開示内容全体を本明細書に援用する米国特許第６，９６２，７０２号（Ｈａｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．）、米国シリアル番号１０／１５０，６５４（Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．）、及びシリアル番号１０／７６８，７０７（ＭｃＢｒｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．）にも記載されている。送達の結果、^{125}Ｉと^{99}ｍＴｃの優れた腫瘍／正常組織比が得られ、２種類の放射性同位体の有用性が明らかである。抗体を標識するためには公知診断剤の任意組合せを使用することができる。ＭＡｂコンジュゲートの抗体成分の結合特異性、治療剤又は診断剤の効力及び抗体のＦｃ部分のエフェクター活性はコンジュゲートの標準試験により測定することができる。

【０３１７】

ジスルフィド結合形成により還元抗体成分のヒンジ領域に診断剤を付加することができる。別法として、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオン酸Ｎ－スクシニル（ＳＰＤＰ）等のヘテロ二官能性架橋剤を使用してこのようなペプチドを抗体成分と結合することができる。Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　５６：２４４（１９９４）。このような結合の一般技術は当分野で周知である。例えば、Ｗｏｎｇ，ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ＯＦ　ＰＲＯＴＥＩＮ　ＣＯＮＪＵＧＡＴＩＯＮ　ＡＮＤ　ＣＲＯＳＳ－ＬＩＮＫＩＮＧ（ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ　１９９１）；Ｕｐｅｓｌａｃｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｍｏｄｉ

fication of Antibodies by Chemical Methods,”in MONOCLONAL ANTIBODIES：PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al.（eds.）, pages 187 230（Wiley－Liss, Inc. 1995）；Price,“Production and Characterization of Synthetic Peptide－Derived Antibodies,”in MONOCLONAL ANTIBODIES：PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al.（eds.）, pages 60 84（Cambridge University Press 1995）参照。

【０３１８】

抗体糖鎖を介してペプチドを抗体成分に結合する方法も当業者に周知である。例えば、いずれもその開示内容全体を本明細書に援用するShih et al., Int. J. Cancer 41：832（1988）；Shih et al., Int. J. Cancer 46：1101（1990）；及びShih et al.，米国特許第5，057，313号参照。一般方法は少なくとも１個の遊離アミン官能基をもち、複数のペプチドを組込んだ担体ポリマーと、酸化糖鎖部分をもつ抗体成分を反応させる段階を含む。この反応の結果、初期シッフ塩基（イミン）結合を生じ、二次アミンへの還元により安定化して最終コンジュゲートを形成することができる。

【０３１９】

免疫コンジュゲートの抗体成分として使用される抗体が抗体フラグメントである場合には、Ｆｃ領域は存在しない。しかし、全長抗体又は抗体フラグメントの軽鎖可変領域に糖鎖部分を導入することは可能である。例えば、いずれもその開示内容全体を本明細書に援用するLeung et al., J. Immunol. 154：5919（1995）；Hansen et al.，米国特許第5，443，953号（1995），Leung et al，米国特許第6，254，868号参照。組換え糖鎖部分を使用して治療剤又は診断剤に付加する。

【０３２０】

患者から組織検体を採取し、本発明の標識抗体の組合せをこのような検体に提供することによりＩｎ ｓｉｔｕ検出を実施することができる。標識抗体（又はフラグメント）を生体サンプルに添加又は重層することにより抗体（又はフラグメント）を提供することが好ましい。このような手法を使用することにより、試験組織中のＩＧＦ－１Ｒの存在のみならず、ＩＧＦ－１Ｒの分布を調べることもできる。本発明を使用し、このようなｉｎ ｓｉｔｕ検出を達成するために多様な組織学的方法（例えば染色法）の任意のものを改変できることが当業者に容易に認識されよう。

【０３２１】

更に、本明細書に記載する抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体はアフィニティ精製剤として使用することもできる。この方法では、当分野で周知の方法を使用してＳｅｐｈａｄｅｘ樹脂や濾紙等の固相に抗体を固定化する。精製しようとするＩＧＦ－１Ｒ蛋白質（又はそのフラグメント）を含有するサンプルと固定化抗体を接触させた後、固定化抗体に結合したＩＧＦ－１Ｒ蛋白質以外のサンプル中の実質的に全材料を除去する適切な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、ＩＧＦ－１Ｒ蛋白質を抗体から放出させる別の適切な溶媒（例えばグリシン緩衝液，ｐＨ５．０）で支持体を洗浄する。

【０３２２】

本発明はリアルタイムルシフェラーゼを利用するインビボバイオフォトン撮影法（Ｘｅｎｏｇｅｎ，Ａｌｍｅｄａ，Ｃａｌｉｆ．）も提供する。ルシフェラーゼ遺伝子を（例えば本発明のマーカーとの融合蛋白質として）細胞、微生物及び動物に導入する。活性な場合には、発光反応を生じる。ＣＣＤカメラ及びソフトウェアを使用して画像を取込み、分析する。

【０３２３】

別の態様では、抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を標識せず、抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体と結合することができる検出可能な第２の抗体又は他の分子を投与することにより撮影する。限定されないが、放射性核種撮影法、ポジトロン放射断層撮影法、コンピュータ体軸断層撮影法、Ｘ線又は磁気共鳴画像法、蛍光検出及び化学発光検出等の公知方法を使用して特異的に結合した標識抗体を患者で検出することができる。

【０３２４】

ＩＧＦ－１Ｒに介在される腫瘍性疾患を示す疑いのある患者の病態の予後評価を行うためにインビボ撮影法を使用することもできる。

【０３２５】

治療用使用法

別の態様において、本発明はその必要のある患者に抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を投与することによりＩＧＦ－ＩＲ活性を阻害するための方法を提供する。本明細書に記載する抗体から誘導される抗体のいずれか１種以上（例えばヒト化抗体、キメラ抗体等）を治療用に最適化することができる。好ましい１態様において、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体はヒト抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体である。別の好ましい態様において、ＩＧＦ－ＩＲはヒトであり、患者はヒト患者である。あるいは、患者は抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体と交差反応するＩＧＦ－ＩＲを発現する哺乳動物でもよい。獣医学用又はヒト病変の動物モデルとして、抗体と交差反応するＩＧＦ－ＩＲを発現する非ヒト哺乳動物（即ち霊長類又はカニクイザル又はアカゲザル）に抗体を投与することができる。このような動物モデルは本発明の抗体の治療効力を評価するために有用であると思われる。

【０３２６】

本発明の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体誘導体はＩＧＦ－ＩＲを発現する腫瘍をもつ患者に投与することができる。腫瘍は充実腫瘍でもよいし、リンパ腫等の非充実腫瘍でもよい。より好ましい態様では、癌性のＩＧＦ－ＩＲ発現腫瘍をもつ患者に抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を投与することができる。

【０３２７】

別の好ましい態様では、不適切に高レベルのＩＧＦ－Ｉを発現する患者に抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を投与することができる。ＩＧＦ－Ｉの高レベル発現が種々の一般的な癌につながることは当分野で公知である。

【０３２８】

更に当然のことながら、本明細書に記載する特異的モノクローナル抗体又はその結合フラグメントの混合物等の各種モノクローナル抗体のカクテルを必要又は所望に応じて癌治療用に投与することができる。実際に、癌細胞上の数種の抗原又は異なるエピトープを標的とするようにカクテル状のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントの混合物を使用する方法は、特に抗原の１種のダウンレギュレーションによる腫瘍細胞及び／又は癌細胞の回避を妨ぐために有利なアプローチである。

【０３２９】

１態様において、前記方法は脳腫瘍、扁平上皮癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、乳癌、頭部癌、頸部癌、十二指腸癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、腎臓癌、卵巣癌、婦人科癌又は甲状腺癌等の癌の治療に関する。本発明の方法に従って本発明の化合物で治療することができる患者としては、例えば肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚及び眼球メラノーマ、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、結腸癌、乳癌、婦人科腫瘍（例えば子宮肉腫、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌又は外陰癌）、ホジキン病、十二指腸癌、小腸癌、内分泌系癌（例えば甲状腺、副甲状腺又は副腎癌）、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性もしくは急性白血病、小児充実性腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓又は尿管癌（例えば腎細胞癌、腎盂癌）、又は中枢神経系の新生物（例えば原発性ＣＮＳリンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹グリオーマ又は下垂体腺癌）をもつと診断された患者が挙げられる。

【０３３０】

別の側面において、抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体はその必要のある患者に特定細胞のアポトーシ

スを誘導するために治療薬として使用することができる。多くの場合、アポトーシスの標的細胞は癌細胞又は腫瘍細胞である。この目的によると、本発明の１態様はアポトーシスの誘導を必要とする患者に治療有効量の抗ＩＧＦ－ＩＲ抗体を投与することによりアポトーシスを誘導する方法を提供する。好ましい１態様において、抗体は本明細書に詳細に記載する抗体又は抗原結合フラグメントを含むその誘導体である。

【０３３１】

本発明の抗体は治療薬、放射線を放出する化合物、植物、真菌又は細菌由来分子、生体蛋白質及びその混合物等の各種細胞傷害性薬剤を送達するために使用することができる。細胞傷害性薬剤は例えば、短距離高エネルギーα放射体等の短距離放射線放射体等の細胞内作用性細胞傷害性薬剤とすることができる。

【０３３２】

酵素活性毒素とそのフラグメントの例としては、例えばジフテリア毒素Ａフラグメント、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素Ａ（緑膿菌由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、α－サルシン、所定のシナアブラギリ（Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉ）蛋白質、所定のジアンチン蛋白質、ヨウシュヤマゴボウ（Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａ）蛋白質（ＰＡＰ，ＰＡＰＩＩ及びＰＡＰ－Ｓ）、ツルレイシ（Ｍｏｒｏｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ）インヒビター、クルシン、クロチン、サボンソウ（Ｓａｐｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）インヒビター、ゲロニン、ミトギリン、レストリクトシン、フェノマイシン及びエノマイシンが挙げられる。イムノトキシンの酵素活性ポリペプチドの作製方法は本明細書に援用するＷＯ８４／０３５０８及びＷＯ８５／０３５０８に記載されている。所定の細胞傷害性部分は例えばアドリアマイシン、クロラムブシル、ダウノマイシン、メトトレキセート、ネオカルチノスタチン及び白金から誘導される。

【０３３３】

生体物質と細胞傷害性物質の結合方法は従来記載されている。本明細書に援用するＦｌｅｃｈｎｅｒ，Ｉ，Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，９：７４１－７４５（１９７３）；Ｇｈｏｓｅ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ，３：４９５－４９９（１９７２）；及びＳｚｅｋｅｒｋｅ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｏｐｌａｓｍａ，１９：２１１－２１５（１９７２）にはクロラムブシルと抗体の結合方法が記載されている。本明細書に援用するＨｕｒｗｉｔｚ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，３５：１１７５－１１８１（１９７５）及びＡｒｎｏｎ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｓｕｒｖｅｙｓ，１：４２９－４４９（１９８２）にはダウノマイシンとアドリアマイシンを抗体に結合する方法が記載されている。本明細書に援用する米国特許第４，４１４，１４８号及びＯｓａｗａ，Ｔ．，ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｓｕｒｖｅｙｓ，１：３７３－３８８（１９８２）とその引用文献には抗体－リシンコンジュゲートの作製方法が記載されている。カップリング法も本明細書に援用するＥＰ８６３０９５１６．２に記載されている。

【０３３４】

あるいは、腫瘍部位に局在すると、数個の細胞直径を死滅させる高エネルギー放射線放射体、例えば^{131}Ｉ、γ放射体等の放射性同位体と本発明の抗体をカップリングすることもできる。例えば本明細書に援用するＳ．Ｅ．Ｏｒｄｅｒ，“Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ”，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｒ．Ｗ．Ｂａｌｄｗｉｎ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），ｐｐ ３０３－３１６（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５）参照。他の適切な放射性同位体としては、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ及び^{211}Ａｔ等のα放射体と、^{186}Ｒｅ及び^{90}Ｙ等のβ放射体が挙げられる。前立腺癌は比較的放射線感受性の腫瘍であるため、放射線療法が特に有効であると予想される。

【０３３５】

本発明の抗体、特に本明細書に記載する抗体の誘導体を予防用に使用することを含む殺滅又はアブレーション方法も本発明に含まれる。例えば、前立腺癌の発生又は進行を予防又は遅延させるためにこれらの材料を使用することができる。

【０３３６】

医薬製剤

所望の純度をもつ抗体を最適な医薬的に許容可能なキャリヤー、賦形剤又は安定剤（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０））と混合することにより、本発明に従って使用されるＩＧＦ－１Ｒ結合抗体の治療用製剤を凍結乾燥製剤又は水溶液として保存用に製造する。許容可能なキャリヤー、賦形剤又は安定剤は使用する用量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸やメチオニン等の酸化防止剤；防腐剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンズアルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチルアルコール又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；及びｍ－クレゾール）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン等の蛋白質；ポリビニルピロリドン等の疎水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類及び他の糖質（グルコース、マンノース又はデキストリンを含む）；ＥＤＴＡ等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖類；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えばＺｎ－蛋白質錯体）；及び／又はＴＷＥＥＮ（登録商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標）又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【０３３７】

製剤は治療する特定兆候の必要に応じて２種以上の活性化合物、好ましくは相互に悪影響を与えない相補的活性をもつ化合物を更に含有することができる。例えば、細胞傷害性物質、化学治療剤、サイトカイン又は免疫抑制剤（例えばシクロスポリン等のＴ細胞に作用するもの又はＴ細胞と結合する抗体、例えばＬＦＡ－１と結合するもの）を更に加えると望ましい場合がある。このような他の物質の有効量は製剤中に存在する抗体の量、病変もしくは疾患又は治療の種類、及び他の上記因子により異なる。

従って、所定態様では、抗体を化学治療剤又は細胞傷害性物質と結合する。適切な化学治療剤又は細胞傷害性物質としては限定されないが、鉛－２１２、ビスマス－２１２、アスタチン－２１１、ヨウ素－１３１、スカンジウム－４７、レニウム－１８６、レニウム－１８８、イットリウム－９０、ヨウ素－１２３、ヨウ素－１２５、臭素－７７、インジウム－１１１等の放射性同位体と、ホウ素－１０やアクチニド等の核分裂性核種が挙げられる。他の態様において、前記物質は毒素又は細胞傷害性薬剤であり、限定されないが、リシン、修飾型シュードモナスエンテロトキシンＡ、カリケアマイシン、アドリアマイシン、５－フルオロウラシル等が挙げられる。本発明の医薬組成物は抗葉酸化合物を含有することができ、限定されないが、５－フルオロ－２’－デオキシウリジン－５’－一リン酸（ＦｄＵＭＰ）、５－フルオロウラシル、ロイコボリン、ＺＤ１６４９、ＭＴＡ、ＧＷ１８４３Ｕ８９、ＺＤ９３３１、ＡＧ３３７及びＰＴ５２３が挙げられる。

【０３３８】

本発明の医薬組成物は医薬的に許容可能なキャリヤー又は媒体で製剤化することができる。適切な医薬的に許容可能なキャリヤーとしては水、ＰＢＳ、塩類溶液（例えばリンゲル液）、アルコール、油類、ゼラチン及び糖質（例えばラクトース、アミロース又は澱粉）、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース並びにポリビニルピロリドンが挙げられる。このような製剤は滅菌することができ、所望により滑沢剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧作用性塩、緩衝剤及び着色剤等の添加剤と混合することができる。本発明で使用するのに適した医薬キャリヤーは当分野で公知であり、例えば、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１７th Ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂ．Ｃｏ．，

Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．）に記載されている。

【０３３９】

例えばコアセルベーション技術又は界面重合法により作製されたマイクロカプセルに活性成分を封入してもよく、例えば夫々コロイド状薬剤送達システム（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマイクロエマルションにおけるヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルが挙げられる。このような技術はＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０）に開示されている。

【０３４０】

持続放出製剤を製造してもよい。持続放出製剤の適切な例としては、成形品（例えばフィルム又はマイクロカプセル）状の固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスにアンタゴニストを加えたものが挙げられる。持続放出マトリックスの例としてはポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とＬ－グルタミン酸エチルのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、ＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（登録商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーと酢酸ロイプロリドから構成される注射用マイクロスフェア）等の分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、及びポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【０３４１】

インビボ投与用製剤は無菌でなければならない。これは滅菌濾過膜で濾過することにより容易に実施される。

【０３４２】

製品

本発明の別の態様では、ＩＧＦ－１Ｒの発現増加に関連する腫瘍性疾患の治療及び／又は検出に有用な材料を含む製品が提供される。製品は容器と容器に貼付又は付属したラベル又はパッケージインサートを含む。適切な容器としては、例えばビン、バイアル、シリンジ、試験管等が挙げられる。容器はガラスやプラスチック等の各種材料から形成することができる。容器は病態の治療に有効な組成物を保持し、無菌入口を備えることができる（例えば容器は静脈内溶液バッグ又は皮下注射針により穿孔可能なストッパー付きのバイアルとすることができる）。組成物中の少なくとも１種の活性剤はＩＧＦ－１Ｒ特異抗体、例えば本発明の１２Ｂ１である。容器に貼付又は付属したラベルは組成物が選択病態の診断又は治療用であることを指示する。製品は更にリン酸緩衝食塩水、リンゲル液及びグルコース溶液等の医薬的に許容可能な緩衝液を収容する第２の容器を含むことができる。更に他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び使用説明入りパッケージインサート等の商業的及び使用者の観点から望ましい他の材料も含むことができる。

【０３４３】

パッケージインサートとは治療製品の商品パッケージに慣習的に同梱される説明書を意味し、各治療の使用に関する適応症、用法、用量、投与、禁忌及び／又は警告に関する情報を含む。１態様において、パッケージインサートは組成物が結腸癌、卵巣癌又は膵臓癌等のＩＧＦ－１Ｒ介在性疾患の治療用であることを指示する。

【０３４４】

更に、製品は注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液等の医薬的に許容可能な緩衝液を収容する第２の容器を更に含むことができる。更に他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針及びシリンジ等の商業的及び使用者の観点から望ましい他の材料も含むことができる。

【０３４５】

診断キット

便宜のために、所定量の試薬と診断アッセイを実施するための説明書のパッケージセット、例えばキットも本発明の範囲に含まれる。キットは例えばＥＬＩＳＡ又はウェスタン

ブロットでＩＧＦ－１Ｒをインビトロ検出及び定量するための抗体を含む。本発明の抗体は例えばＥＬＩＳＡ又はウェスタンブロットでＩＧＦ－１Ｒをインビトロ検出及び定量するためのキットとして提供することができる。抗体を酵素で標識する場合には、キットは基質と酵素が必要とする補因子（例えば検出可能なクロモフォア又はフルオロフォアを提供する基質前駆体）を含む。更に、安定剤、緩衝液（例えばブロック緩衝液又は溶解緩衝液）等の他の添加剤も加えることができる。このようなキットは本発明の別個の成分を保持する容器等の１個以上の容器（例えばバイアル、チューブ等）を受容するように区画されたレセプタクルを含むことができる。例えば、第１の容器には不溶性又は部分可溶性キャリヤーに結合した第１の抗体を収容することができる。第２の容器には凍結乾燥又は溶液状の可溶性の検出可能な標識した第２の抗体を収容することができる。レセプタクルは更に凍結乾燥又は溶液状の検出可能に標識した第３の抗体を保持する第３の容器を含むことができる。この種のキットは本発明のサンドイッチアッセイで使用することができる。ラベル又はパッケージインサートは組成物の性状と、所期インビトロ又は診断用の使用説明を提供することができる。

【０３４６】

各種試薬の相対量はアッセイの感度を実質的に最適にする溶液中の試薬濃度となるように広い範囲をとることができる。特に、溶解すると適切な濃度の試薬溶液となる賦形剤を含む通常は凍結乾燥状の乾燥粉末として試薬を提供することができる。

【０３４７】

本発明の更に別の側面では、上記抗原をもつ細胞を診断又は同定するために、例えばキットにパッケージングして使用できるように、本明細書に詳述するモノクローナル抗体又はその結合フラグメントを検出可能な部分で標識して提供する。このようなラベルの非限定的な例としては、フルオレセインイソチオシアネート等のフルオロフォア、クロモフォア、放射性核種又は酵素が挙げられる。このような標識抗体又は結合フラグメントは例えば抗原の組織学的局在、ＥＬＩＳＡ、細胞ソーティング、及びＩＧＦ－１Ｒとこの抗原を含む細胞を検出又は定量するための他の免疫技術に使用することができる。

【０３４８】

細胞からのＩＧＦ－１Ｒの精製又は免疫沈降用にアポトーシスアッセイの陽性対照として有用なキットも提供する。ＩＧＦ－１Ｒの単離精製のために、キットはビーズ（例えばセファロースビーズ）に結合した本明細書に記載する抗体（１２Ｂ１）又はその結合フラグメントを含むことができる。例えばＥＬＩＳＡ又はウェスタンブロットでＩＧＦ－１Ｒのインビトロ検出及び定量用に抗体を含むキットを提供することができる。製品と同様に、キットは容器と、容器に貼付又は付属したラベル又はパッケージインサートを含む。容器は本発明の少なくとも１種の抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体又はその結合フラグメントを含有する組成物を保持する。例えば希釈剤及び緩衝液、対照抗体を収容する他の容器も含むことができる。ラベル又はパッケージインサートは組成物の性状と所期インビトロ又は診断用の使用説明を提供することができる。

【０３４９】

以下の実施例は例証として記載するものであり、限定的ではない。以下の実施例はマウス１２Ｂ１抗体について記載するが、ＩＧＦ－１Ｒのエピトープと結合する他のモノクローナル抗体に由来するＣＤＲを使用してＩＧＦ－１Ｒに対して高い結合親和性をもつヒト化抗体を作製することも考えられると理解されよう。上記に詳述した他の誘導体化抗体も考えられる。

【０３５０】

本明細書に言及する全刊行物は例えば刊行物に記載されている構築物及び手法のうちで本明細書に記載する発明に関連して使用することができるものを記載及び開示する目的で本明細書に援用する。上記及び明細書の随所に記載する刊行物は本願の出願日以前の開示のみについて引用している。本発明者らが先発明によりこのような開示よりも以前の日付を主張する権利がないと認めるものと解釈すべきではない。

【実施例１】

【０３５１】
マウスモノクローナル抗体（ＭＡｂ）の作製及び選択
抗体、特にＩＲと交差反応しないＩＧＦ－ＩＲに特異的なモノクローナル抗体を作製する目的で、４段階のスクリーニング段階を含むプロトコルを実施した。プロトコルは、
－ハイブリドーマを作製するためにマウスにヒト組換えＩＧＦ－ＩＲを免疫する段階と、
－免疫に使用したヒト組換え蛋白質でＥＬＩＳＡにより細胞培養上清をスクリーニングする段階と、
－ＭＣＦ－７腫瘍細胞で過剰発現される天然受容体でこの第１回目のＥＬＩＳＡから得られたハイブリドーマの全陽性上清を試験する段階と、
－夫々ＩＧＦ－ＩＲ又はＩＲを発現するバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞でＩＲに対するＩＧＦ－ＩＲの示差的認識に関して最初の２回のスクリーニングで陽性のハイブリドーマの上清を評価する段階から構成した。
【０３５２】
上記に概説した各種段階を以下に詳述する。
【０３５３】
免疫段階では、マウスにヒト組換えＩＧＦ－ＩＲを皮下注射した。脾細胞とミエローマ細胞（Ｓｐ２０Ａｇ１４）の融合の３日前に、ヒト組換え受容体の静注によりマウス免疫応答を刺激した。融合から１４日後に、ヒト組換えＩＧＦ－ＩＲで感作したプレート上でハイブリドーマ上清をＥＬＩＳＡによりスクリーニングした。上清が陽性であったハイブリドーマを選択し、増幅後、ＦＡＣＳｃａｎ分析により試験し、産生された抗体も天然ＩＧＦ－ＩＲを認識できることを確認した。これを実施するために、ＩＧＦ－ＩＲを過剰発現するエストロゲン依存性乳房腫瘍に由来するＭＣＦ－７細胞をＥＬＩＳＡにより選択されたハイブリドーマにより産生された各培養上清と共にインキュベートした。フルオロクロムとカップリングした二次抗種抗体により細胞の表面の天然／ＭＡｂ受容体複合体が検出された。図１は非染色細胞、二次抗体のみと共にインキュベートした細胞又はアイソタイプ対照ＭＡｂで標識した細胞と比較して、ハイブリドーマ１２Ｂ１の上清で得られた代表的なヒストグラムを示す。１２Ｂ１ハイブリドーマからの上清はＩＧＦ－１Ｒを認識し、細胞単独又は二次抗体単独もしくは無関係なハイブリドーマ上清＋二次抗体（無関係なハイブリドーマ上清と二次抗体の組合せ）と共にインキュベートした細胞で染色は認められなかった。
【０３５４】
選択プロセスのこの段階では、組換え受容体と天然受容体の両方を認識したモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマのみを選択し、クローニングし、産生後に精製し、その後、２種類の受容体の両方を認識するハイブリドーマを排除するために、ＩＧＦ－ＩＲ又はＩＲを発現するＳｆ９昆虫細胞で上記方法に従ってＦＡＣＳｃａｎ分析により試験した。図２は夫々ＩＧＦ－１Ｒ（αＩＲ３）及びＩＲに対する市販抗体で実施した非感染及び感染Ｓｆ９細胞の特性決定を示す。左パネル（２Ａ）では、夫々非感染細胞＋二次抗体（１）、αＩＲ３で標識した非感染細胞＋二次抗体（２）及び抗ＩＲ抗体で標識した非感染細胞＋二次抗体（３）に対応するヒストグラム１，２，３の完全な重複が認められる。
【０３５５】
図２Ａのこのデータから明らかなように、非感染Ｓｆ９細胞の表面に検出可能なＩＧＦ－ＩＲ及びＩＲは存在しない。図２ＢはＩＧＦ－ＩＲを発現するバキュロウイルスによる感染細胞の標識を示す。この２番目の図面では、陽性対照として使用したαＩＲ３　ＭＡｂから明らかなように、これらの細胞はＩＧＦ－１Ｒを発現する（ピーク２）。他方、抗ＩＲ　ＭＡｂで染色すると、予想通り、ＩＲ発現に対応するシグナルは認められなかった（ピーク３）。最後に、図２Ｃは標識抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体により示される良好な染色を実証している（ピーク３）。他方、ＩＧＦ－ＩＲに特異的であるとして文献に記載されているαＩＲ３も同様にＩＲを認識するようであり（ピーク２）、予想外であった。
【０３５６】
第３のスクリーニングシステムで得られた結果を表１にまとめるが、同表から明らかな

ように、１２Ｂ１抗体はＩＧＦ－１Ｒ上のエピトープを認識するが、インスリン受容体（ＩＲ）と特異的に結合することができない。１２Ｂ１抗体のアイソタイピングによると、ＩｇＧ１であることが判明した。

【０３５７】

【表１】

表１

IGF-IR 又は IR を発現する Sf9 昆虫細胞上の MAb 12B1 の比較反応性

	MFI		
	非感染細胞	IGF-1R+細胞	1R+細胞
細胞	8	8	7
抗 IR	4,6	9	91
抗 IGF-1R	9	35	32
EC2(腹水)	12	18	15
抗マウス FITC	4,3	9	13
2D10	7,6	42,5	10,6
11H6	7,3	25	10
12B1	7,3	54	10,5
12D5	7,7	50	10,6
15B9	7,5	25	77,8

【実施例２】

【０３５８】

ウェスタンブロット分析

材料及び手法

蛋白質及び膜抽出物

組換えヒトインスリン受容体（ＩＲ）及びインスリン様成長因子Ｉ受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）細胞外領域（ＥＣＤ）はＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｌｉｌｌｅ，Ｆｒａｎｃｅ）から購入した。ＩＧＦ－１Ｒを過剰発現するＮＩＨ ３Ｔ３細胞の膜抽出物は以下に詳述するように取得した。要約すると、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．５緩衝液中で細胞溶解後、４℃にて１時間１０５，０００ｇで遠心することにより全細胞膜を集めた。１５０ｍＭ ＮａＣｌ，０．５％ ＩＧＥＰＡＬ，０．５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００，０．２５％デオキシコール酸ナトリウム及びプロテアーゼインヒビターを添加した５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．５緩衝液にペレットを再懸濁し、＋４℃で一晩撹拌した。＋４℃にて１０分間１０，０００ｇで遠心することによりｈＩＧＦ－１Ｒを含有する可溶性抽出物から不溶性材料を分離した。ビシンコニン酸アッセイにより可溶性膜抽出物の蛋白濃度を分析した。

【０３５９】

電気泳動とウェスタンブロット

還元条件と非還元条件下にＣｒｉｔｅｒｉｏｎ７％均一ポリアクリルアミドゲル（ＢｉｏＲａｄ，Ｍａｒｎｅｓ ｌａ Ｃｏｑｕｅｔｔｅ，Ｆｒａｎｃｅ）でＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動により蛋白質を分析した。純組換えＩＲ及びＩＧＦ－１Ｒ ＥＣＤには４、２０及び１００ｎｇの等量をロードしたが、膜抽出物でＩＧＦ－１Ｒをウェスタンブロットにより検出するためにはもっと多量の０．２～６μｇの蛋白質が必要であった。蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。０．１％ Ｔｗｅｅｎ ２０を添加したＴｒｉｓ緩衝食塩水中、１％無脂肪乳で室温にて１時間ブロッキング後、膜を一晩４℃にて抗体１２Ｂ１（ブロッキング緩衝液中０．０５μｇ／ｍｌ）でプローブした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスＩｇＧポリクローナル抗体（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，３，０００倍希釈液）と共に室温で１時間インキュベーションし、十分に洗浄後に蛋白

質を更に化学発光（ＥＣＬ，Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｏｒｓａｙ，Ｆｒａｎｃｅ）により検出した。

【０３６０】

図３に示すように、モノクローナル抗体「１２Ｂ１」は非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析後にウェスタンブロットによると、ＩＧＦ－１Ｒの天然α２β２（アルファ２ベータ２）四量体、即ち組換えＩＧＦ－１Ｒ　ＥＣＤとＮＩＨ　３Ｔ３　ＩＧＦ－１Ｒ＋細胞に由来する全長ＩＧＦ－１Ｒを特異的に検出することが明らかである。同一条件下でＩＲＥＣＤに対する反応性が認められないことから、ＩＧＦ－１Ｒに対する１２Ｂ１の特異性が確認された。

【０３６１】

更に、ＩＧＦ－１Ｒの完全還元体で１２Ｂ１の反応性が認められなかったため、そのエピトープは非直鎖状であり、立体配座的であると結論される。

【実施例３】

【０３６２】

モノクローナル抗体（ｍＡｂ）１２Ｂ１の重鎖及び軽鎖可変領域をコードする遺伝子のクローニングストラテジー

（供給業者ＳＩＧＭＡ，Ｔ９４２４の指示に従って）ＴＲＩ　ＲＥＡＧＥＮＴ（登録商標）を使用することにより抗体１２Ｂ１０を分泌するハイブリドーマの細胞１０７個から全ＲＮＡを抽出した。Ａｍｅｒｓｈａｍ－Ｐｈａｒｍａｃｉａの「第１鎖ｃＤＮＡ合成」キット（＃２７－９６２１－０１，供給業者の指示に従う）を利用して第１鎖ｃＤＮＡを合成した。２本の鎖について、キットに同梱されたオリゴヌクレオチドＮｏｔ　Ｉ－ｄ（Ｔ）１８で反応をプライミングした。

【０３６３】

１２Ｂ１　ｍＡｂの重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子のＰＣＲ増幅にこうして得られたｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッドを使用した。マウス免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖（κ）に特異的なオリゴヌクレオチドの組合せを使用することによりＰＣＲを実施した。５’末端に対応するプライマーはシグナルペプチドに対応する領域にハイブリダイズする（重鎖は表２，軽鎖は表２）。これらのプライマーはデータバングに含まれる多数のマウス抗体配列から構築した（Ｊｏｎｅｓ　Ｓ．Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：８８－８９，１９９１）。３’末端に対応するプライマーは重鎖（Ｖ－Ｃ連結部から遠くないサブクラスＩｇＧ１のＣＨ１領域，ＭＨＣ－１プライマー、表４）と軽鎖（Ｖ－Ｃ連結部から遠くないκ領域，ＭＫＣプライマー、表４）の定常領域にハイブリダイズする。

【０３６４】

【表２】

表２

マウス免疫グロブリンの重鎖可変領域(MHV)(「MHV」とは「マウス重鎖可変領域(Mouse Heavy Variable)」の意である)の5'領域のオリゴヌクレオチドプライマー:

MHV-1:
5' ATGAAATGCAGCTGGGTCATSTTCTT 3'(配列番号17)
MHV-2:
5' ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT 3'(配列番号18)
MHV-3:
5' ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTT 3'(配列番号19)
MHV-4:
5' ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRT 3'(配列番号20)
MHV-5:
5' ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT 3'(配列番号21)
MHV-6:
5' ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTG 3'(配列番号22)
MHV-7:
5' ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCU 3'(配列番号23)
MHV-8:
5' ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG 3'(配列番号24)
MHV-9:
5' ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATT 3'(配列番号25)
MHV-10:
5' ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCT 3'(配列番号26)
MHV-11:
5' ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG 3'(配列番号27)
MHV-12:
5' ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT 3'(配列番号28)

注:R=A/G,
Y=T/C,
W=A/T,
K=T/G,
M=A/C,
S=C/G.

【０３６５】

【表３】

表３

マウス免疫グロブリンのκ(軽)鎖可変領域(MKV)(「MKV」とは「マウスκ可変領域(Mouse Kappa Variable)」の意である) の5'領域のオリゴヌクレオチドプライマー:

(配列番号29)MKV-1:
5' ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT 3'
(配列番号30)MKV-2:
5' ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGT 3'
(配列番号31)MKV-3:
5' ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT 3'
(配列番号32)MKV-4:
5' ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGG 3'
(配列番号33)MKV-5:
5' ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTT 3'
(配列番号34)MKV-5A:
5' ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT 3'
(配列番号35)MKV-6:
5' ATGAGGTKCYYTGYTSAGYTYCTGRG 3'
(配列番号36)MKV-7:
5' ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACA 3'
(配列番号37)MKV-8:
5' ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAAT 3'
(配列番号38)MKV-9:
5' ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTT 3'
(配列番号39)MKV-10:
5' ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTC 3'
(配列番号40)MKV-11:
5' ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCT-T 3'
(配列番号41)MKV-12A:
5' ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT 3'
(配列番号42)MKV-12B:
5' ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT 3'
(配列番号43)MKV-13:
5' ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTAT 3'

注:R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.

【０３６６】

【表４】

表４

マウスVH及びVL遺伝子の3'末端のオリゴヌクレオチドプライマー:

軽鎖(MKC):
5' ACTGGATGGTGGGAAGATGG 3'(配列番号44)

マウスκ領域の定常領域:
ADAAPTVSIFPPSS(配列番号45)
GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT(配列番号46)
(MKC)CCA CCA TCC AGT(配列番号47)

重鎖(MHC-1)
5' CCAGTGGATAGACAGATG 3'(配列番号48)

マウスγ-1のCH1領域(IgG1サブクラス):
AKTTPPSVYPL(配列番号49)
GCC AAAACGACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG(配列番号50)
(MHC-1)CT GTC TAT CCA CTG(配列番号51)

【実施例４】
【０３６７】
マウス１２Ｂ１ハイブリドーマからクローニングした免疫グロブリン配列
上記実施例３に記載した増幅ストラテジーに従い、「ｐＧＥＭ－Ｔ　Ｅａｓｙ　Ｖｅｃｔｏｒ　ｓｙｓｔｅｍ」（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用することにより、重鎖（ＶＨ）及び軽鎖（ＶＬ）の可変領域に対応するＰＣＲ産物をクローニングした。
【０３６８】
１２Ｂ１　ＶＬでは、マウスκ遺伝子の定常領域の３’末端に対応するＭＫＣプライマー（上記表４参照）とＭＫＶ－５Ａ（上記表３参照）の組合せでＰＣＲ産物が得られた。
【０３６９】
１２Ｂ１　ＶＨでは、マウスγ遺伝子の定常領域ＣＨ１の３’末端に対応するＭＨＣ－１プライマー（上記表４参照）とＭＨＶ－６（上記表２参照）の組合せでＰＣＲ産物が得られた。
【０３７０】
ＰＣＲ産物を十分に配列決定した処、各軽鎖及び重鎖にユニークな１個の配列が判明した。これらは機能的マウス免疫グロブリン部分の可変領域の特徴を示す。
【０３７１】
１２Ｂ１　ＶＬをコードするｃＤＮＡのＤＮＡ配列とアミノ酸配列を表５に示す。１２Ｂ１　ＶＨをコードするｃＤＮＡのＤＮＡ配列とアミノ酸配列を表５に示す。
【実施例５】
【０３７２】
［^{125}Ｉ］－ＩＧＦ－１結合阻害実験
材料及び方法
蛋白質及び膜抽出物
標識ヒト組換え［^{125}Ｉ］－ＩＧＦ－１（比活性：２，５００　Ｃｉ／ｍｍｏｌｅ）はＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ（Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）から購入した。非放射性標識組換えヒトＩＧＦ－１とインスリンはＳｉｇｍａ（Ｓａｉｎｔ　Ｑｕｅｎｔｉｎ　Ｆａ

ｌｌａｖｉｅｒ，Ｆｒａｎｃｅ）から入手した。抗ｈＩＧＦ－１Ｒモノクローナル抗体１７－６９（ｍＡｂ　１７－６９）はＮｅｏｍａｒｋｅｒｓ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ，ＵＳＡ）から入手した。

【０３７３】

ＩＧＦ－１Ｒを過剰発現するＮＩＨ　３Ｔ３細胞の膜抽出物は次のように得た。１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５緩衝液中で細胞溶解後、４℃にて１時間１０５，０００ｇで遠心することにより全細胞膜を集めた。１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，０．５％　ＩＧＥＰＡＬ，０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００，０．２５％デオキシコール酸ナトリウム及びプロテアーゼインヒビターを添加した５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５緩衝液にペレットを再懸濁し、＋４℃で一晩撹拌した。＋４℃にて１０分間１０，０００ｇで遠心することによりｈＩＧＦ－ＩＲを含有する可溶性抽出物から不溶性材料を分離した。ビシンコニン酸アッセイにより可溶性膜抽出物の蛋白濃度を分析した。

【０３７４】

^{125}Ｉ－ＩＧＦ－１結合アッセイ

先ずＭＡｂ１７－６９をＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ＦｌａｓｈＰｌａｔｅ（登録商標）９６ウェルマイクロプレートにコーティングした。２０μｇ／ｍｌ　ｍＡｂのＰＢＳ溶液２０００μｌを各ウェルに加え、一晩＋４℃でインキュベートした。蛋白質Ａに結合しない残留ｍＡｂ１７－６９を含有する緩衝液を吸引により除去した。更に１００μｇ／ｍｌの膜溶解液２００μｌを加え、２時間室温でインキュベートし、ＩＧＦ－１Ｒを固定化した。捕捉されなかった蛋白質を吸引により除去した。競合アッセイのために、５０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ　ｐＨ７．６，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０，１％ウシ血清アルブミン及び１ｍＭ　ＰＭＳＦを含有する結合用緩衝液中で１ｐＭ～１μＭの各種濃度の抗ｈＩＧＦ－１Ｒモノクローナル抗体１２Ｂ１及び７Ｃ１０又はリガンドＩＧＦ－１、ＩＧＦ－２並びにインスリンの存在下に１００ｐＭの^{125}Ｉ－ＩＧＦ－１と固定化ＩＧＦ－１Ｒの結合を測定した。プレートを室温で２時間インキュベート後、Ｐａｃｋａｒｄ　Ｔｏｐ　Ｃｏｕｎｔ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ｓｃｉｎｔｉｌｌａｔｉｏｎ　Ｃｏｕｎｔｅｒで計数した。１μＭのＩＧＦ－１の存在下で非特異的結合は測定されなかった。ｈＩＧＦ－１Ｒに特異的ではないが、大腸菌蛋白質を特異的に認識するモノクローナル抗体９Ｇ４をマウスＩｇＧ１アイソタイプ対照として使用した。

【０３７５】

結果

全特異的^{125}Ｉ－ＩＧＦ－１結合の百分率を半対数グラフにリガンド濃度の関数としてプロットした。得られたＳ字型競合曲線から放射性リガンド結合を５０％阻害するために必要な各種阻害剤の濃度（IC_{50}）をグラフにより求めた（図４）。

【０３７６】

モノクローナル抗体１２Ｂ１は１００ｎＭ未満の濃度では固定化ｈＩＧＦ－１Ｒとの^{125}Ｉ－ＩＧＦ－１結合を阻害することができなかった。最大試験濃度１μＭで特異的^{125}Ｉ－ＩＧＦ－１結合の４０％阻害が認められた。抗体１２Ｂ１で得られた競合曲線は対照非ＩＧＦ－１ブロッキング抗体９Ｇ４で得られた曲線と同様であった（図４）。モノクローナル抗体７Ｃ１０は０．２ｎＭのIC_{50}で^{125}Ｉ－ＩＧＦ－１結合を効率的に排除し、この値は夫々非放射性標識ＩＧＦ－１及びＩＧＦ－２について測定したIC_{50}値の約１０分の１と１００分の１である（図４）。データから明らかなように、抗体１２Ｂ１及び７Ｃ１０は異なるＩＧＦ－１結合阻害特性を示す。

【実施例６】

【０３７７】

２種の抗ＩＧＦ－１Ｒマウスモノクローナル抗体７Ｃ１０及び１２Ｂ１のエピトープマッピング

抗体と抗原の結合は特異的結合部位又はエピトープを規定し、同一又は近接する結合部位をもつ別の抗体との結合を立体的に妨害する可能性がある。１対の抗体の特異性は抗原とのそれらの同時結合を試験することにより容易に判定することができる。両方の抗体の

並行結合により明確な結合部位を同定することができるが、同一又は近接する結合部位は第２の抗体の結合を妨げる。特定抗体のエピトープ特異性パターンを同定及び決定するために、未標識モノクローナル抗体のパネルを有効に試験することができる生体分子間相互作用解析（Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ：「ＢＩＡ」）によりエピトープマッピングを実施することができる。例えばＳｊｏｌａｎｄｅｒ ａｎｄ Ｕｒｂａｎｉｃｚｋｙ（１９９１）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３：２３３８　２３４５及びＳｚａｂｏ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：６９９　７０５）参照。「ＢＩＡ」又は「表面プラズモン共鳴法」は相互作用物質（例えばＢＩＡｃｏｒｅ）を標識せずにリアルタイムで生物特異的相互作用を検出する。（結合イベントを示す）結合表面の質量変化の結果、表面の近傍の光の屈折率が変化し（表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の光学現象）、その結果、生体分子間のリアルタイム反応の指標として使用可能な検出可能なシグナルが得られる。

【０３７８】

ＢＩＡ技術を使用し、ＩＧＦ－１Ｒ蛋白質の細胞外領域でマウスモノクローナル抗体７Ｃ１０及び１２Ｂ１の各々により認識されるエピトープを判定するように実験を設計した。２種の抗体の各々はＩＧＦ－１Ｒの細胞外領域の別個のエピトープと結合することがデータにより確認された。

【０３７９】

材料及び方法

材料／機器－ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｘ機器、ＣＭ４バイオセンサーチップ、ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液、ｐＨ５及びｐＨ４酢酸緩衝液、グリシン、ＨＣｌ　ｐＨ１．５緩衝液、アミンカップリングキットはＢＩＡｃｏｒｅから入手した。可溶性ヒトＩＧＦ－１ＲはＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（ｒｅｆ　３０５－ＧＲ－ＣＦ）から入手した。

【０３８０】

抗体溶液：精製７Ｃ１０の４．１２ｍｇ／ｍｌ溶液と精製１２Ｂ１の１．８５ｍｇ溶液をストック溶液として使用した。

【０３８１】

Ｂｉａｃｏｒｅアッセイ

センサーチップ作製：製造業者の指示に従い、本実験はＨＢＳ－ＥＰ緩衝液を流速５μｌ／ｍｉｎでランニングバッファーとして使用して２５℃で実施した。

【０３８２】

アミンカップリングキットからのＮＨＳ溶液とＥＤＣ溶液の５０／５０（ｖ／ｖ）混液を使用してフローセル２（ＦＣ２）の活性化後、酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）で調製したＩＧＦ－１Ｒ細胞外領域の３μｇ／ｍｌ溶液を１分間に２回注入した。結合したＩＧＦ－１Ｒの量は十分でなかったため、ｐＨ４．０酢酸緩衝液でＩＧＦ－１Ｒの３μｇ／ｍｌ溶液を調製した。この溶液を１分間に１回と３分間に２回注入した。アミンカップリングキットからのエタノールアミン溶液を使用して飽和後、４３９ＲＵのＩＧＦ－１ＲがＦＣ２に結合した。ＮＨＳとＥＤＣを７分間注入することにより参照フローセル（ＦＣ１）を活性化し、脱活性化した（エタノールアミンを７分間注入）。２００５年１０月２０日に作製したこのセンサーチップを３か月以上４℃で乾燥保存した。

【０３８３】

抗体のワーキング溶液

７Ｃ１０の８．２４μｇ／ｍｌ溶液（ストック溶液の５００倍ＨＢＳ－ＥＰ希釈液に対応）と１２Ｂ１の７．４μｇ／ｍｌ溶液（ストック溶液の２５０倍ＨＢＳ－ＥＰ希釈液に対応）を調製した。各溶液を５分間注入後、１８０ＲＵの７Ｃ１０と１４６ＲＵの１２Ｂ１がセンサーチップに捕捉された。理論上では、４３９ＲＵの結合したＩＧＦ－１Ｒは（４３９／３６５）×１６０＝１９２ＲＵの抗体を捕捉することができる。

【０３８４】

エピトープマッピング実験

ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液を流速１０μｌ／ｍｉｎで２５℃にてランニングバッファーとして

使用した。５分間の注入でＦＣ２の結合部位の飽和を助長するように両方の抗体のワーキング濃度を決定した。一方の抗体で飽和後、飽和を確認するために同一溶液を１分間注入後、第２の抗体を１分間注入した。再生後、抗体の注入順序を変えることにより同一実験を実施した。

【０３８５】

結果－７Ｃ１０と１２Ｂ１の同時結合

７Ｃ１０（５分）、７Ｃ１０（１分）及び１２Ｂ１（系列１）と、１２Ｂ１（５分）、１２Ｂ１（１分）及び７Ｃ１０（１分）（系列２）の順次注入により得られたセンサーグラムを図５に報告する。この実験はその注入位置に関係なくどちらの抗体も同様にＩＧＦ－１Ｒ分子と結合できることを明白に示している。

【０３８６】

上記実験は１２Ｂ１及び７Ｃ１０の結合部位が立体障害なしに両者の同時結合を可能にするために十分な距離にあることを明白に示している。

【実施例７】

【０３８７】

ビオチン化モノクローナル抗体（ｍＡｂｓ）の阻害

ＭＣＦ－７細胞をトリプシン処理し、細胞１　10^6個を９６ウェルプレートの各ウェルでＦＡＣＳ緩衝液（リン酸緩衝食塩水＋１０％　ＦＣＳ）に撒いた。終濃度１０μｇ／ｍｌの１３Ｆ５、２Ｄ１０、７Ａ４、７Ｃ１０、１２Ｂ１又は１３Ｇ５非染色抗体の存在下に細胞を３０分間４℃でインキュベートした。次に、各非染色抗体を全抗体と競合させるように、ビオチン化抗体（終濃度１２μｇ／ｍｌ）をウェルに加えた。ＦＡＣＳ緩衝液中に４℃で保存したＭＣＦ－７細胞を陰性対照として維持し、各ビオチン化抗体のみで染色した細胞を陽性対照として使用した（各被験抗体の最大シグナル）。ストレプトアビジンＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８コンジュゲートを４℃で２０分間加えることによりビオチン化抗体の結合を検出した。次に細胞を洗浄し、ＦＡＣＳ緩衝液に懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。試験した２種類の抗体（染色抗体と非染色抗体）が同一又は重複するエピトープを認識した場合には、得られたシグナルはビオチン化抗体単独で観察されたシグナルに比較して低下する。他方、試験した２種類の抗体が重複しないエピトープに特異的な場合には、単独で使用した染色抗体のシグナルに比較してシグナルの変化は認められなかたった。図６では、非競合抗体を記号（－）で表し、競合抗体をシグナル変動に応じて記号（＋）、（＋＋）、（＋＋＋）で表す。

【実施例８】

【０３８８】

免疫組織化学試験（ＩＨＣ）

細胞株のパラフィン包埋及びＩＨＣ染色手順

細胞回収及びパラフィン包埋－コンフルエントＴ２２５フラスコをトリプシン処理し（ＨｙＣｌｏｎｅ　ＳＨ３０２３６－０１）、得られた細胞懸濁液を１２００ｒｐｍで１０分間遠心によりペレット化した。培地を吸引し、バラバラにした各細胞ペレットに加温したＨｉｓｔｏｇｅｌ（Ｒｉｃｈａｒｄ－Ａｌｌａｎ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＨＧ－４０００－０１２）３～４滴を加えた。Ｈｉｓｔｏｇｅｌペレットを混合し、２～８℃に６０分間冷却し、１０％ホルマリンに１６～２４時間浸した。Ｈｉｓｔｏｇｅｌペレットに７０％エタノール、９５％エタノール、１００％エタノール、キシレン及びパラフィンを一晩浸透させた（Ｓａｋｕｒａ　ＶＩＰ５Ａ－Ｆ１）。次にＨｉｓｔｏｇｅｌペレットをパラフィン（Ｓａｋｕｒａ　ＴＥＣ５ＥＭＡ－１５１０１）に包埋し、５μｍに切断し、Ｓｕｐｅｒｆｒｏｓｔ　ｐｌｕｓスライド（Ｆｉｓｈｅｒ　１２－５５０－１５）にマウントした。

【０３８９】

免疫組織化学－切片を脱パラフィン処理し、再水和し、熱誘導エピトープ回収用のＤｅｃｌｏａｋｉｎｇ　Ｃｈａｍｂｅｒ（Ｂｉｏｃａｒｅ　Ｍｅｄｉｃａｌ　ＤＣ２００２）でＴａｒｇｅｔ　Ｒｅｔｒｉｅｖａｌ　Ｂｕｆｆｅｒ　１Ｘ（Ｄａｋｏ　Ｓ　１６９９）

に１２５℃で３０秒間浸した。Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｄａｋｏ Ｋ４００７）を使用して内在ペルオキシダーゼ活性を１０分間ブロックした。切片をリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で洗浄し、ＩＧＦ－１Ｒマウスモノクローナル抗体（０．３μｇ／ｍｌ，クローン１２Ｂ１，Ｐｉｅｒｒｅ Ｆａｂｒｅ）又は陰性対照としてマウスＩｇＧ１／κ（０．３μｇ／ｍｌ，クローンＮＣＧ０２，Ｌａｂ ｖｉｓｉｏｎ）と共に室温で３０分間インキュベートした。切片をＰＢＳで洗浄し、Ｅｎｖｉｓｉｏｎ＋ポリマーと共に室温で３０分間インキュベートし、ＰＢＳで洗浄し、ジアミノベンジジンを使用して茶色い反応生成物を発色させた（Ｄａｋｏ Ｋ４００７）。スライドをヘマトキシリンに３０秒間浸漬し、対比染色した（Ｓｉｇｍａ ＭＨＳ３２）。

【０３９０】

図７に示すように、ＩＧＦ－１Ｒマウスモノクローナル抗体クローン１２Ｂ１は各種細胞株の細胞膜を示差的に染色する。この免疫組織化学法では、茶色い反応生成物は細胞膜の陽性染色に相関し、茶色い反応生成物の不在は細胞膜の陰性染色と非可視化に相関する。ＩｇＧ対照マウスＩｇＧ１／κはアイソタイプをマッチさせた対照である。

【０３９１】

図７に関して、（Ａ）はＩＧＦ－ＩＲ遺伝子を標的破壊したＮＩＨ ３Ｔ３マウス胚繊維芽細胞であり、従ってＩＧＦ－１Ｒを発現しないＲ細胞と呼ぶ陰性対照を表す。染色の不在はＩＧｆ－ＩＲ発現細胞の不在に相関する。（Ｂ）はヒト乳房上皮腺癌であるＭＣＦ７細胞を表す。対照ＩｇＧ細胞に対する陽性染色はＩＧＦ－１Ｒ発現細胞の存在を示唆している。（Ｃ）ヒト結腸上皮結腸直腸腺癌であるＨＴ２９細胞も陽性染色される。（Ｄ）同様に、ヒト肺上皮癌であるＡ５４９細胞も陽性染色され、パネル（Ｅ）に示すヒト盲腸上皮結腸直腸癌であるＬＳ４１１Ｎ細胞も同様である。他方、パネル（Ｆ）に示すようなＳＷ４０３細胞（ヒト結腸上皮結腸直腸腺癌）は染色しなかったため、ＩＧＦ－１Ｒ発現細胞に陰性であるか、又はこのような細胞の濃度が著しく低いとみなされた。パネル（Ｇ）に詳細に示すようなヒト結腸上皮結腸直腸腺癌であるＬＳ１２３細胞でも同様である。図面から明らかなように、各細胞株のパネル（Ｈ－Ｎ）ＩｇＧ対照は陰性である。原画倍率４０倍。

【０３９２】

【表５】

表5

腫瘍増殖阻害百分率

腫瘍細胞株	腫瘍型	腫瘍増殖阻害%
MCF7	乳房	75%
HT29	結腸	22%
A549	肺	63%
LS411N	結腸	0%
SW403	結腸	0%
LS123	結腸	24%

【実施例９】

【０３９３】

ヤギポリクローナル抗体及びマウスクローン１２Ｂ１によるＦＦＰＥヒト組織中のＩＧＦ－１Ｒの免疫組織化学検出（ＩＨＣ）

ヒト組織におけるＩＧＦ－１Ｒの検出用免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイを開発及び検証するために、１２Ｂ１抗体をＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓから市販されているヤギポリクローナル抗体と併用して各種試験を実施した。

【０３９４】

目的は乳癌、結腸癌、肺癌及び膵臓癌を含む一連のホルマリン固定パラフィン包埋（Ｆ

ＦＰＥ）ヒト腫瘍でこれらの抗体を試験することであった。扁桃を陽性対照として試験した。正常皮膚のサンプルも試験した。

【０３９５】

方法：

材料－抗体－（ｉ）ＩＧＦ－１Ｒ特異的ヤギポリクローナル抗体及び（ｉｉ）１２Ｂ１マウスモノクローナル抗体。多数の条件下で抗体を試験し、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍及び正常組織における最適反応性を調べた。ヤギＩｇＧとマウスＩｇＧを陰性対照として並行して試験した。

【０３９６】

組織前処理：厚さ４ミクロンの切片を多数の異なるヒト組織から作製した。４、５分間キシレンの交換後、等級アルコール系列から蒸留水まで置換することにより組織切片を脱ロウした。多数の前処理を試みた。数種の異なるＳＨＩＥＲ溶液と共に蒸気熱誘導エピトープ回収法（ＳＨＩＥＲ）を使用した。更に、多数の酵素消化法も試験した。Ｂｌａｃｋ ａｎｄ Ｄｅｃｋｅｒ Ｓｔｅａｍｅｒの上部チャンバーのキャピラリーギャップ内で加熱を実施した。詳細な記載については、Ｌａｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６０：３４９３－３５０３，２０００）参照。

【０３９７】

最適前処理及び希釈

Ｒ＆ＤヤギＩＧＦ－１Ｒ：ＳＨＩＥＲ２＋酵素（１：４０）；腫瘍には１．０μｇ／ｍｌ（１時間一次）、皮膚には２．０μｇ／ｍｌ（１時間一次）

１２Ｂ１クローン：ＳＨＩＥＲ２＋酵素（１：４０）；腫瘍及び皮膚に０．７５μｇ／ｍｌ（一晩）

免疫組織化学プロトコル：

アビジン－ビオチン系組織染色システムをＩＧＦ－１Ｒ抗体の検出に使用した。西洋ワサビペルオキシダーゼをレポーター酵素として使用し、ＤＡＢを発色基質として使用した。

【０３９８】

ヤギポリクローナルＩＧＦ－１ＲのＩＨＣ手順（プロトコルＭＩＰＥ－１時間一次インキュベーション）：

１．ブロッキング試薬１５分（正常ウサギ血清）
２．プロテイナーゼＫ消化（１：４０）１０分
３．一次抗体１時間室温でインキュベーション（Ｒ＆Ｄ製品ＩＧＦ－１Ｒ）
４．二次抗体２５分（ビオチン化ウサギ抗ヤギＩｇＧ）
５．内在ペルオキシダーゼブロッキング３×２．５分
６．ＡＢＣ（アビジン－ビオチン複合体）／西洋ワサビペルオキシダーゼ２５分
７．ＤＡＢ発色基質３×５分（茶色い反応生成物）
８．ヘマトキシリン対比染色１分。

【０３９９】

マウスモノクローナル（クローン１２Ｂ１）ＩＧＦ－１RのＩＨＣ手順（プロトコルＭＩＰＥ－ＯＮインキュベーション）：

１．ブロッキング試薬１５分（正常ヤギ血清）
２．プロテイナーゼＫ消化（１：４０）１０分
３．一次抗体－一晩室温（Ｍｅｒｃｋ製品ＩＧＦ－１Ｒ，クローン１２Ｂ１）
４．二次抗体２５分（ビオチン化ウサギ抗ヤギＩｇＧ）
５．内在ペルオキシダーゼブロッキング３×２．５分
６．ＡＢＣ（アビジン－ビオチン複合体）／西洋ワサビペルオキシダーゼ２５分
７．ＤＡＢ発色基質３×５分（茶色い反応生成物）
８．ヘマトキシリン対比染色１分。

【０４００】

上記手順はＴｅｃｈＭａｔｅ ５００及び１０００ Ａｕｔｏｍａｔｅｄ ＩＨＣ Ｉ

ｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（ＢｉｏＴｅｋ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ／Ｖｅｎｔａｎａ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して完全に自動化した。

【０４０１】

染色後にスライドを無水エタノールまでのアルコール系列で脱水後、キシレンでリンスした。スライドに永久的にガラスカバースリップとパーマウントを載せた。各調製後にスライドを顕微鏡試験し、染色を調べ、改良試験を決定した。陽性染色は発色基質（ＤＡＢ－ＨＲＰ反応生成物）として見える濃茶色により示される（図面に「暗色部」染色として認められる）。ヘマトキシリン対比染色は青色核染色を生じ（「明色部」として見える）、細胞及び組織形態を評価する。オリンパス製ビデオカメラを使用して代表的染色のデジタル画像を撮影した。画像を圧縮ｊｐｅｇｓとして保存し、本文書にインポートした。

【０４０２】

ホルマリン固定パラフィン包埋組織はＱｕａｌＴｅｋのヒト組織バンクから入手した。

【０４０３】

結果と考察

ＦＦＰＥ扁桃で多数の組織前処理を試験後に、両方の標識ＩＧＦ－１Ｒ抗体で原形質膜反応性が得られた。ヤギポリクローナル（対照）とマウス１２Ｂ１クローンは同様の細胞種を染色し、扁桃で同様の亜細胞局在であった（図８Ａ）。上皮陰窩の細胞ではどちらの抗体でも強い膜染色が検出された。拡散性細胞質染色は原形質膜染色を伴うことが多い。どちらの抗体も扁桃上皮の基底細胞を優先的に染色し、原形質膜局在である。マウスＩｇＧ又はヤギＩｇＧ陰性対照ではいずれも同様の染色は検出されなかった（図８Ｂ）。

【０４０４】

肺癌と結腸癌でもＩＨＣプロトコルを試験した。各抗体の最適ＩＨＣアッセイ条件は下記に詳述する抗体仕様書に記載する。扁桃（ｎ＝１）、乳癌（ｎ＝２）、肺腺癌（ｎ＝２）、肺扁平上皮癌（ｎ＝２）、結腸癌（ｎ＝３）、膵臓癌（ｎ＝２）及び正常皮膚（ｎ＝５）を含む一連の組織で各抗体の最適プロトコルを異なる２時点で試験した。各抗体の染色の結果を下記反応性の表に詳細に示す。組織種の各々について最適化プロトコルによる代表的なＩＨＣ染色のデジタル顕微鏡写真と図面見出しを図９～１６に示す。

【０４０５】

乳癌におけるＩＧＦ－１Ｒ反応性

２個の異なる乳癌を１２Ｂ１及び対照ヤギポリクローナル抗体の各抗体で試験した。２種の抗体を比較すると、ほぼ同一の染色が観察された。乳癌の一方は弱～中程度の原形質膜局在で染色／標識され、他方の乳癌は強い原形質膜局在で染色された（図９Ａ）。強く明色に染色される腫瘍が一般に２種の抗体の反応性の良好な指標とみなされる。データから明らかなように、乳癌では抗体は同様の強度と百分率の陽性腫瘍細胞と反応し、特異性と感受性の一致が示唆された。どちらの陰性対照でも殆ど～全く染色は検出されなかった（図９Ｂ）。

【０４０６】

結腸癌におけるＩＧＦ－１Ｒ反応性

３個の異なる結腸癌をＩＧＦ－１Ｒ特異抗体、１２Ｂ１モノクローナル抗体及びヤギＩＧＦ－１Ｒポリクローナル抗体の各々で試験した。扁桃と乳癌で認められたほぼ同一の染色パターンと異なり、結腸癌は２種の抗体の各々に対して異なる反応性を示した。どちらの抗体も腫瘍細胞のサブセットを原形質膜局在で染色し、１２Ｂ１は一般に強いゴルシ様粒状／球状細胞質パターンで染色した。この染色は多くの場合には核周囲であり、細胞の先端の内腔側の部分に向かって極局在であった（図１０Ａ及び１１）。この染色パターンは陰性対照では認められなかった（図１０Ｂ）。ヤギポリクローナルは１２Ｂ１に比較してやや高い百分率の細胞を原形質膜パターンで染色するようであった。強いゴルシ様染色は１２Ｂ１膜染色を陽性腫瘍の所定領域で目立たなくしているように見えた。

【０４０７】

上記染色はヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒでは検出されなかったため、特異的であったか否かを調べようとして１２Ｂ１抗体を更に試験した。非ビオチン系検出システムを試

験し（Ｄａｋｏ　Ｅｎｖｉｓｉｏｎ　ａｎｄ　Ｎｅｏｍａｒｋｅｒｓ　ＵｌｔｒａＶｉｓｉｏｎ）、染色が潜在的に内在ビオチンに起因するか否かを調べた。どちらの検出システムでもゴルジ様染色が持続しているようであったため、染色はビオチンの非特異的結合の結果ではないと思われた（データは示さず）。正常ヤギ血清がこの染色の原因であるか否かを調べるために、ＩＨＣ検出試薬中で正常ヤギ血清の存在下と不在下の結腸癌も試験した。やはり、ヤギ血清の不在下でもゴルジ様パターンが持続した（データは示さず）。まとめると、データはゴルジ様染色が１２Ｂ１抗体に特異的であることを裏付けているようである。

【０４０８】

肺癌におけるＩＧＦ－１Ｒ反応性

肺腺癌

２個の異なる肺腺癌を両方のＩＧＦ－１Ｒ抗体で試験した。これらのサンプルの一方ではどちらの抗体でもほぼ同一の染色が認められ、両方の抗体に対する大半の腫瘍細胞の強い原形質膜反応性が実証された（図１２－左画像）。第２のサンプルでもほぼ同一の原形質膜反応性が認められたず、１２Ｂ１抗体はゴルジ様細胞質染色も示した（図１２－右画像）。このサンプルで認められた不均一原形質膜染色はどちらの抗体でもほぼ同一であった。基質側の細胞における腫瘍の基底領域でも原形質膜染色が検出されたが、組織の他の領域で検出された膜染色は少なかった。抗体はこの不均一染色を反映しているようであり、それらの反応性の類似性が更に加わった。

【０４０９】

肺扁平上皮癌

２個の異なる扁平上皮肺癌をＩＧＦ－１Ｒ抗体の各々で試験した。図１３に示すようにほぼ同一の染色パターンが認められた。試験したどちらの腫瘍でも腫瘍細胞の大部分は両方の抗体で染色され、強い原形質膜局在であった。どちらの抗体でも同様の基質染色も検出された。基質染色は他の検出システムでも認められた（図示せず）。

【０４１０】

膵臓癌におけるＩＧＦ－１Ｒ反応性

２個の異なる膵臓癌を両方のＩＧＦ－１Ｒ抗体で試験した。抗体の各々で同様の染色パターンが認められた（図１４）。両方の抗体、例えば対照と１２Ｂ１は腫瘍細胞の明色の断続的な原形質膜染色を示すようであった。両方の抗体は膵島細胞も原形質膜局在で染色した（図示せず）。１２Ｂ１抗体では僅かに強い染色が観察された。患者の１人は１２Ｂ１抗体による腫瘍細胞の粒状細胞質染色を示した。この染色はヤギポリクローナル抗体では検出されなかった（図１４）。

【０４１１】

正常皮膚におけるＩＧＦ－１Ｒ反応性

５個の異なる正常皮膚サンプルを両方のＩＧＦ－１Ｒ抗体で試験した。２種の抗体を比較すると、ほぼ同一の染色が明らかである。上皮の基底細胞はどちらの抗体でも全組織で明色の多くの場合には不完全な原形質膜パターンで染色された。毛嚢周辺の上皮細胞はどちらの抗体でもより強く、より完全な原形質膜染色を示した（図１５）。汗腺の上皮細胞はどちらの抗体ども原形質膜局在で染色された。

【０４１２】

皮膚でより良好な反応性を得るために、ヤギポリクローナルＩＧＦ－１Ｒ抗体の濃度を扁桃と腫瘍で設定した１．０μｇ／ｍｌから２．０μｇ／ｍｌに増加した。皮膚における１２Ｂ１の濃度は他の組織で使用した濃度と同一とした。

【０４１３】

【表６】

抗体反応性仕様書及びIHCプロトコル-IGF-1R特異抗体(12B1クローン)
抗体名:IGF-1R　　クローン:12B1

形態:　　濃度:1.85mg/ml
起源:マウス　　カタログ番号:N/A
ロット番号:BIOtem01
標的組織:扁桃,癌　　標的抗原:IGF-1R

反応性情報

パラフィン反応性:有　　提案希釈度:0.75μg/ml
組織前処理:SHIER2+プロテイナーゼK酵素消化(1:40).
SHIER=Steam Heat Induced Epitope Retrieval
亜細胞局在:原形質膜及び細胞質(場合によりゴルジ様)

TechMateプロトコル:MIPE(室温で一晩インキュベーション)

組織熱前処理後のプロトコル:
ブロッキング試薬15分(正常ヤギ血清)
プロテイナーゼK消化(1:40)10分
一次抗体-室温で一晩(Merck製品IGF-1R,クローン12B1)
二次抗体25分(ビオチン化ウサギ抗ヤギIgG)
内在ペルオキシダーゼブロッキング3×2.5分
ABC(アビジン-ビオチン複合体)/西洋ワサビペルオキシダーゼ25分
DAB発色基質3×5分(茶色い反応生成物)
ヘマトキシリン対比染色1分

【０４１４】

【表７】

抗体反応性仕様書及びIHCプロトコル-R&D Systems製品ヤギポリクローナルIGF-1R
抗体名:IGF-1R(αサブユニット)　クローン:ポリクローナル

形態:精製	濃度: 0.2mg/ml
起源:ヤギ	カタログ番号: AF-305-NA(R&D Systems)
作製日: 2005年10月20日	ロット番号:VL015031
標的組織:扁桃,癌	標的抗原:IGF-1R

反応性情報
パラフィン反応性:有　提案案希釈度:1.0μg/ml(皮膚には2.0μg/ml)
組織前処理:SHIER2+プロテイナーゼK酵素消化(1:40)
亜細胞局在:原形質膜及び細胞質
TechMateプロトコル:MIPE(室温で1時間インキュベーション)

熱前処理後のIHCプロトコル:
ブロッキング試薬で15分(正常ヤギ血清)
プロテイナーゼK消化(1:40)10分
一次抗体-室温で1時間インキュベーション(R&D製品IGF-1R)
二次抗体25分(ビオチン化ウサギ抗ヤギIgG)
内在ペルオキシダーゼブロッキング3×2.5分
ABC(アビジン-ビオチン複合体)/西洋ワサビペルオキシダーゼ25分
DAB発色基質3×5分(茶色い反応生成物)
ヘマトキシリン対比染色1分

【図１】

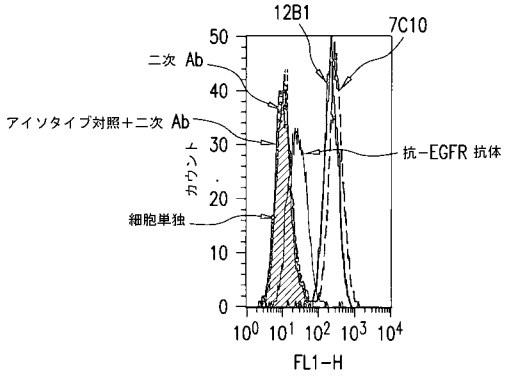


FIG.1

【図２Ａ】

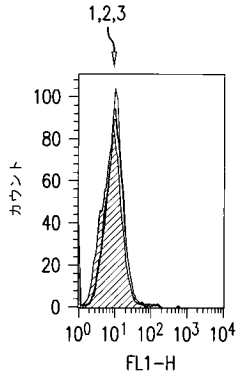


FIG.2A

【図２Ｂ】

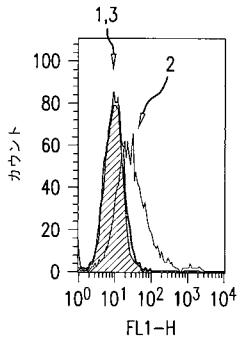


FIG.2B

【図２Ｃ】

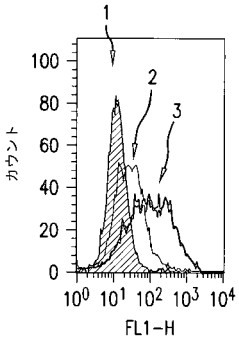
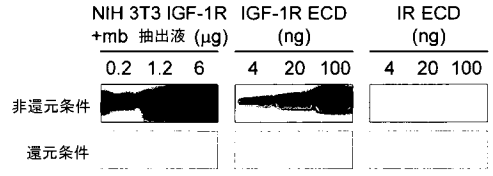


FIG.2C

【図３】

MAb 12B1でプローブしたヒトIGF-1R細胞外領域(R&D Systems)の
ウェスタンブロット分析



12B1は～350kd天然ヘテロ四量体rhIGF-1R ECDを認識するが、
モノマーα及びβサブユニットに還元後には認識せず、立体
配座エピトープであると予想される。

FIG.3

【図４】

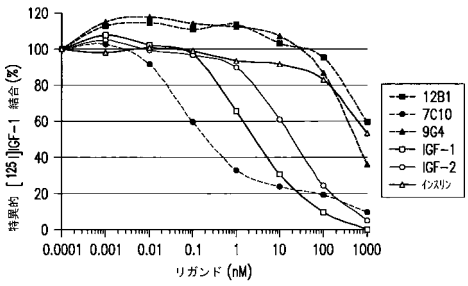


FIG.4

【図５】

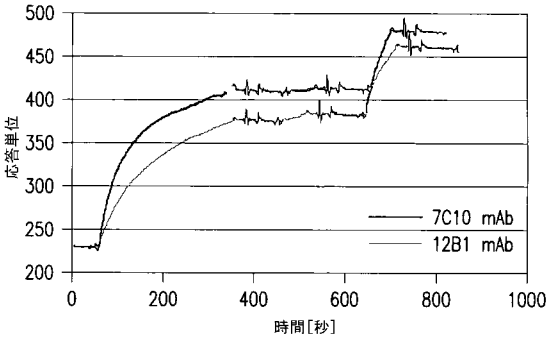


FIG.5

【図６】

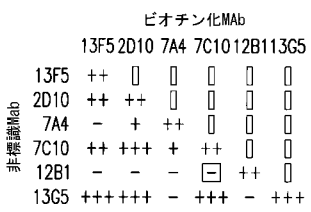


FIG.6

【図７】

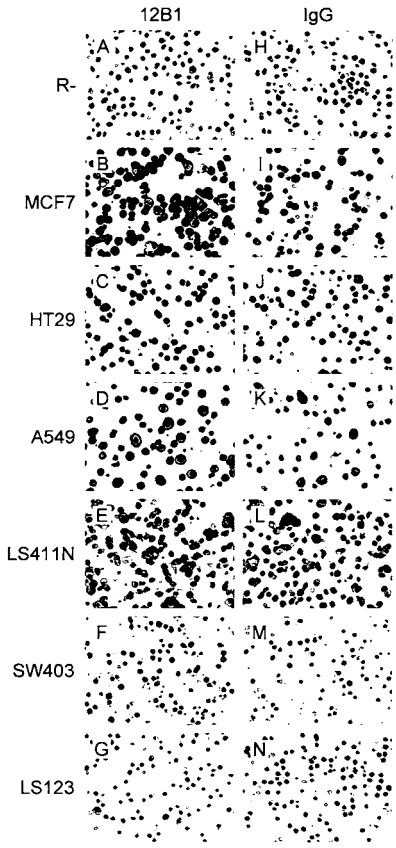


FIG.7

【図８Ａ】

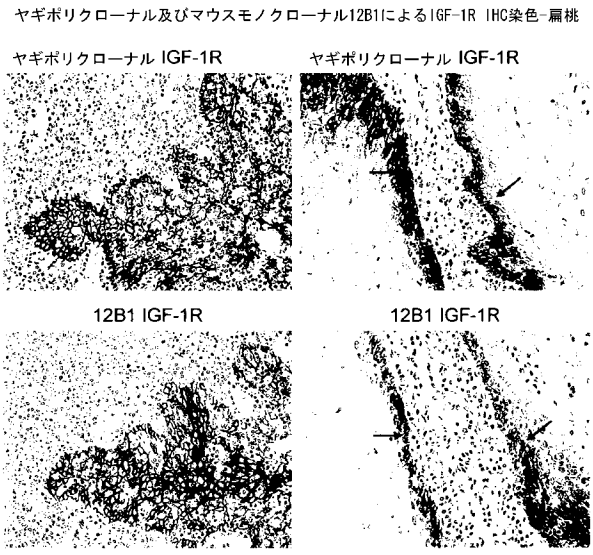


FIG.8A

【図８Ｂ】

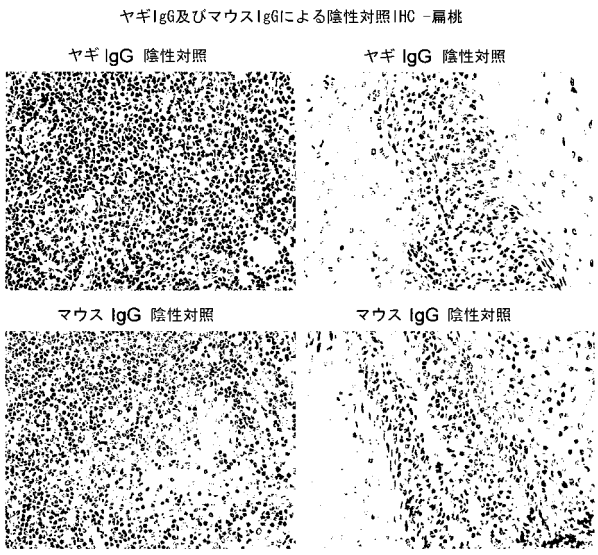


FIG.8B

【図９Ａ】

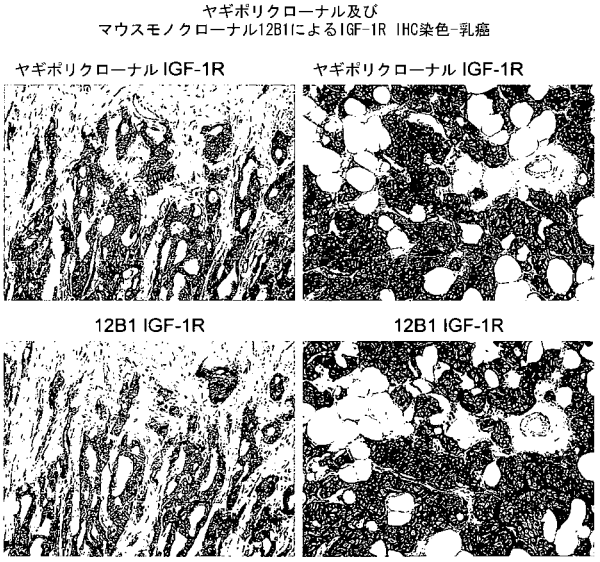


FIG.9A

【図９Ｂ】

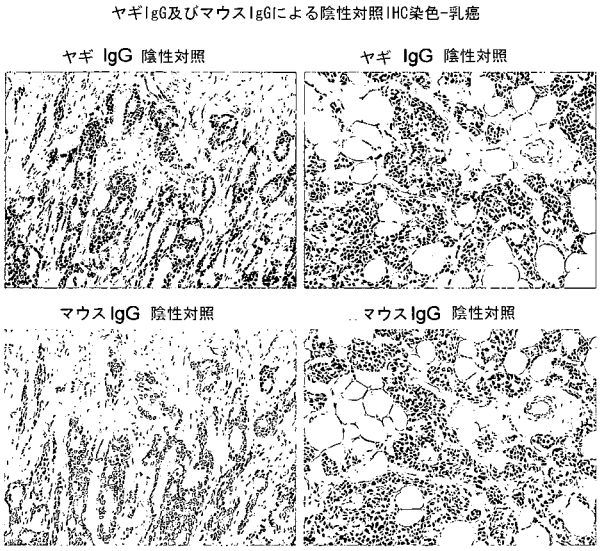


FIG.9B

【図１０Ａ】

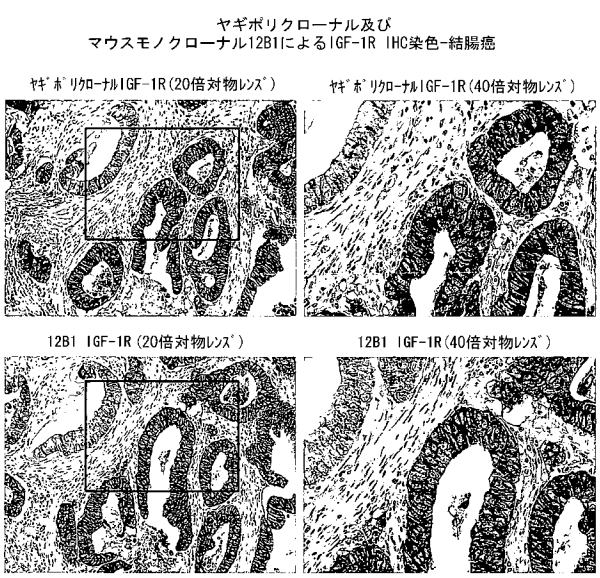


FIG.10A

【図１０Ｂ】

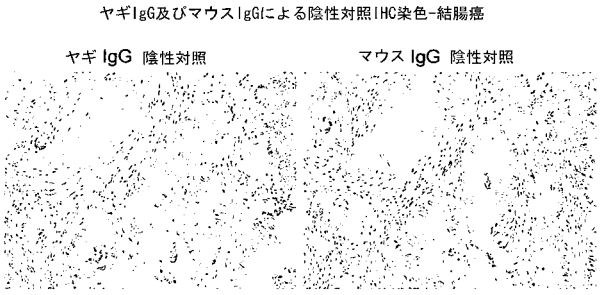


FIG.10B

【図１１】

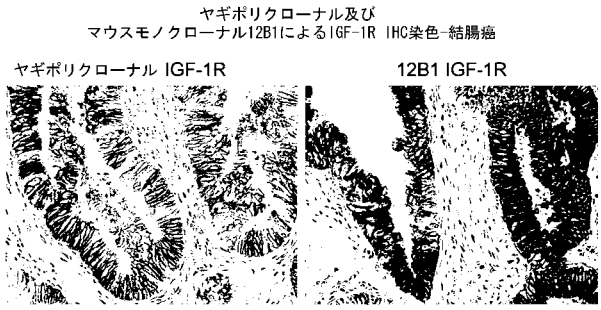


FIG.11

【図１２】

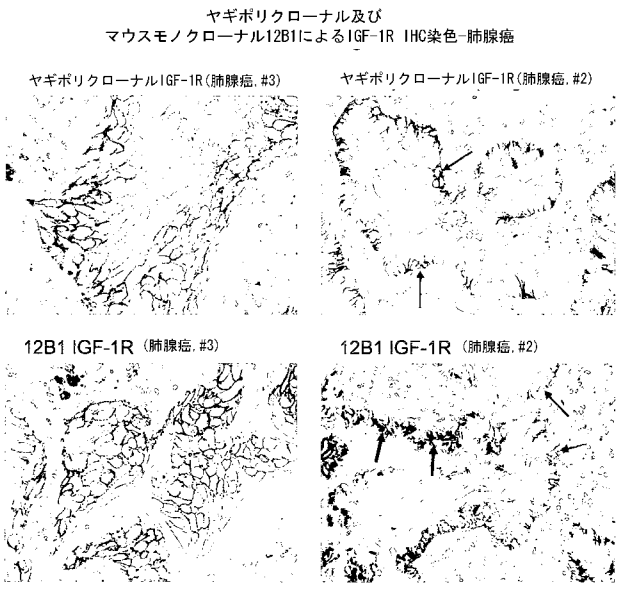


FIG.12

【図１３】

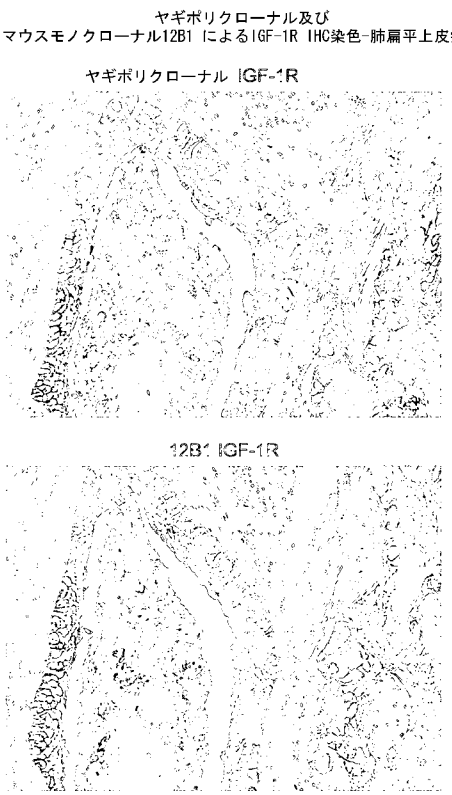


FIG.13

【図１４】

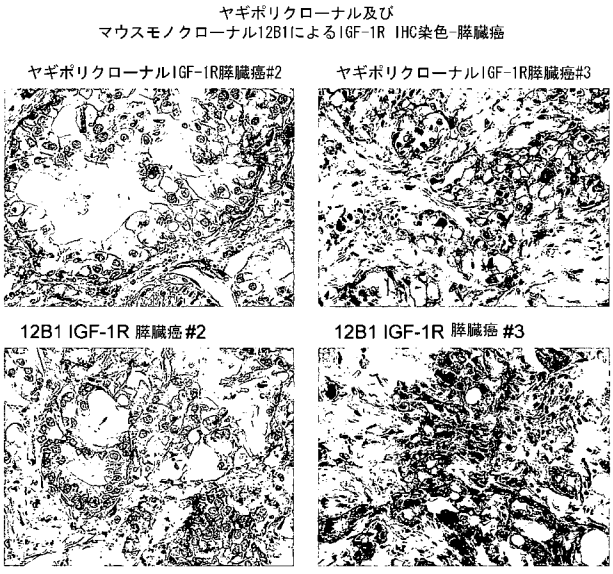


FIG.14

【図１５】

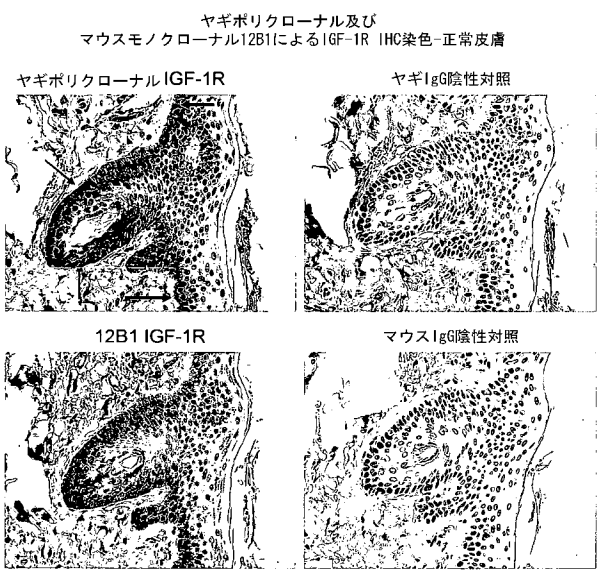


FIG.15

【配列表】
2010535710000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/09065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395; C12P 21/08 (2008.04)
USPC - 424/143.1; 530/388.2
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 39/395 (2008.04); C12P 21/08 (2008.04)
USPC - 424/143.1; 530.388.2

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/142.1; 536/23.53

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWest (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patent/Scholar: cancer therapy/treatment, insulin-like growth factor 1 receptor, antibody, hyperproliferative disorder, biomarker, label, hybridoma, monoclonal, recombinant vector, fluorescein, rhodamine, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma. GenCore: SEQ ID NO:1-8

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0140960 A1 (WANG et al.) 29 Jun 2006 (29.06.2006); para [0024]; [0051]; [0193]-[0196]	32
Y	US 2005/0249730 A1 (GOETSCH et al.) 10 Nov 2005 (10.11.2005); para [0020]; [0023]-[0024]; [0060]; [0061]; [0149]; [0150]]-[0159]; [0172]; [0263]; [0264]; [0329]; [0334]-[0337]; [0450]	1-4, 7-9, 12-14, 22-31, 34-49
Y	US 6,696,620 B2 (HIATT et al.) 24 Feb 2004 (24.02.2004); SEQ ID NO.35	1-3, 7-9, 12-14, 22-31, 34-49
Y	US 2005/0287148 A1 (CHATTERJEE et al.) 29 Dec 2005 (29.12.2005); Example 2, Fig 3B (Accession ID NO. AEF10447)	1-3, 7-9, 12-14, 22-31, 34-49
Y	US 5,260,203 A (LADNER et al.) 09 Nov 1993 (09.11.1993); Disclosure, Fig 22 (Accession ID NO. AAR43674)	3, 4
Y	WO 93/03151 A1 (EMBLETON et al.) 18 Feb 1993 (18.02.1993); Disclosure, Fig 5 (Accession No. AAR32843)	3, 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 January 2008 (02.01.2008)	22 JAN 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/09065

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 33
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I, claims 1-9, 12-14, 22-32, 34-36, 38-49, drawn to an anti-IGF-IR antibody comprising of a light chain CDRs of SEQ IDs NO: 1, 2, 3 and a heavy chain CDRs of SEQ IDs 4, 5, 6 and its uses.

Group II, claims 10 and 11, drawn to selecting an IGF-IR inhibitory agent.

Group III, claims 15-21, 37, 50-73, drawn to measuring a level of IGF-IR polypeptide.

---See Supplemental Sheet---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I - claims 1-9, 12-14, 22-32, 34-36, 38-49

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/09065

Continuation of Box No. III (Observations where unity of invention is lacking):

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Although Groups I-II do share the technical feature of an IGF-IR inhibitory agent, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art. Specifically, the article entitled "Inhibition of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) signaling and tumor cell growth by a fully human neutralizing anti-IGF-IR antibody" by Wang et al. (Mol Cancer Ther 2005, 4(8):1214-1221) teaches said inhibitory agent, a fully human neutralizing anti-IGF-IR antibody (abstract). As the above antibody were known at the time of the invention, as evidenced by the teaching of Wang et al., this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, Groups II and III do not include the inventive concept of an anti-IGF-IR antibody comprising of a light chain CDRs of SEQ IDs NO: 1, 2, 3 and a heavy chain CDRs of SEQ IDs 4, 5, 6, as required by Group I.

Finally, a method of selecting an IGF-IR inhibitory agent is not a method of using claimed inhibitory agents. In the absence of any teaching as to the structure required for a compound to act as a IGF-IR inhibitory/specifically binding agent, there is no single general concept that links the method of screening of said IGF-IR inhibitory agents and the method of using them. Thus, unity of invention is lacking (a priori).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ	*33/574*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｙ	４Ｃ０８５
Ｇ０１Ｎ	*33/577*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/574	Ｂ	４Ｈ０４５
Ｇ０１Ｎ	*33/536*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/577	Ｂ	
Ｇ０１Ｎ	*33/531*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/536	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ	*33/48*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/531	Ａ	
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/48	Ｐ	
Ｇ０１Ｎ	*30/88*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｙ	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/574	Ｄ	
Ｃ１２Ｑ	*1/02*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	30/88	Ｊ	
			Ｃ１２Ｐ	21/08		
			Ｃ１２Ｑ	1/02		

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

(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(72)発明者 ゴエーシユ，リリアンヌ
フランス国、エフ－９２１００・ブローニユ、プラス・アベル・ガンス・４５
(72)発明者 ブルツクス，デイビツド
アメリカ合衆国、ニユー・ジヤージー・０７０６５－０９０７、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニユー・１２６
(72)発明者 チヤステイン，マイケル
アメリカ合衆国、ニユー・ジヤージー・０７０６５－０９０７、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニユー・１２６
(72)発明者 チヤン，チーーチアン
アメリカ合衆国、ニユー・ジヤージー・０７０６５－０９０７、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニユー・１２６
(72)発明者 コルベア，ナタリー
フランス国、エフ－９２１００・ブローニユ、プラス・アベル・ガンス・４５

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 BB14 CB01 CB02 DA36 FA16 FA37 FB03 FB07 FB08
FB12 JA06
4B024 AA01 AA12 CA04 CA20 DA02 GA03 GA11
4B063 QA01 QQ08 QS33
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
4B065 AA92X AA93Y AB05 AC14 BA08 CA25 CA44
4C085 AA14 AA16 AA17 AA19 AA33 BB01 BB11 BB41 BB43 CC02
CC21 CC23 DD62
4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	IGF-1R特异性抗体可用于检测和诊断细胞增殖性疾病		
公开(公告)号	JP2010535710A	公开(公告)日	2010-11-25
申请号	JP2010519215	申请日	2008-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	默克夏普结束圆顶公司 皮尔法伯制药公司		
申请(专利权)人(译)	默克夏普的高端球机公司 皮埃尔Faburu本草人		
[标]发明人	ゴエーシユリリアンヌ ブルツクスデイビツド チヤステインマイケル チヤンチーチアン コルベアナタリー		
发明人	ゴエーシユ,リリアンヌ ブルツクス,デイビツド チヤステイン,マイケル チヤン,チー-チアン コルベア,ナタリー		
IPC分类号	C07K16/28 C12N5/10 C12N15/09 A61P35/00 A61K39/395 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/536 G01N33/531 G01N33/48 G01N33/53 G01N30/88 C12P21/08 C12Q1/02		
CPC分类号	A61P35/00 C07K16/2863 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 G01N33/574 G01N2333/71		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N5/00.102 C12N15/00.A A61P35/00 A61K39/395.T A61K39/395.Y G01N33/574.B G01N33/577.B G01N33/536.D G01N33/531.A G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/574.D G01N30/88.J C12P21/08 C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB14 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/JA06 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA17 4C085/AA19 4C085/AA33 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	Masarushin大崎		
优先权	60/962688 2007-07-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及哺乳动物抗体，命名为12B1及其抗原结合部分，其特异性结合胰岛素样生长因子I受体（IGF-IR），优选人IGF-IR。还包括衍生自本文公开的抗体的嵌合，双特异性，衍生的单链抗体。还公开了编码哺乳动物抗体的核酸分子及其使用方法。还包括含有这些抗体的药物组合物和使用该抗体及其组合物治疗和诊断与IGF-1R表达有关的病理性过度增殖性致癌疾病的方法。

IGF-IR又はIRを発現するSf9昆虫細胞上のMAb 12B1の比較反応性

	MFI		
	非感染細胞	IGF-1R+細胞	1R+細胞
細胞	8	8	7
抗IR	4,6	9	91
抗IGF-1R	9	35	32
EC2(腹水)	12	18	15
抗マウスFITC	4,3	9	13
2D10	7,6	42,5	10,6
11H6	7,3	25	10
12B1	7,3	54	10,5
12D5	7,7	50	10,6
15B9	7,5	25	77,8