

(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2014-523920

(P2014-523920A)

(43) 公表日 平成26年9月18日(2014.9.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/28 (2006.01)	CO7K 16/28 ZNA	2GO45
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48 P	4HO45
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 Y	
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
	GO1N 33/574 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-522119 (P2014-522119)	(71) 出願人	500033483
(86) (22) 出願日	平成24年7月30日 (2012.7.30)		ビエール、ファーブル、メディカマン
(85) 翻訳文提出日	平成26年3月12日 (2014.3.12)		フランス国ブローニュ、ピヤンクール、ブ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/064876		ラス、アベル、ガンズ、45
(87) 国際公開番号	W02013/017562	(74) 代理人	100117787
(87) 国際公開日	平成25年2月7日 (2013.2.7)		弁理士 勝沼 宏仁
(31) 優先権主張番号	11306000.8	(74) 代理人	100091487
(32) 優先日	平成23年7月29日 (2011.7.29)		弁理士 中村 行孝
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100107342
(31) 優先権主張番号	61/513,345		弁理士 横田 修孝
(32) 優先日	平成23年7月29日 (2011.7.29)	(74) 代理人	100143971
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 藤井 宏行
		(72) 発明者	クリスティーヌ、クリンゲル-アムール
			フランス国グロワジー、レ、ゴターユ、ル
			ート、ド、シェ、ディオサ、73
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の検出および診断のための抗体 1-3859 の使用

(57) 【要約】

本発明は、癌の診断における新規な単離された抗 CXCR4 抗体の使用に関する。特に、CXCR4 発現に関連する腫瘍形成性障害の診断および / または予後のための方法が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C X C R 4 発現腫瘍の存在および / または位置の検出において使用するための、下記を含んでなる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体 :

i) 次の 3 つの C D R、それぞれ配列番号 1 の配列を有する C D R - H 1、配列番号 2 の配列を有する C D R - H 2、および配列番号 3 の配列を有する C D R - H 3 を含んでなる重鎖、および

i i) 次の 3 つの C D R、それぞれ配列番号 4 の配列を有する C D R - L 1、配列番号 5 の配列を有する C D R - L 2、および配列番号 6 の配列を有する C D R - L 3 を含んでなる軽鎖。

10

【請求項 2】

下記から選択される、請求項 1 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体 :

a) 次の 3 つの C D R、それぞれ配列番号 1 の配列を有する C D R - H 1、配列番号 2 の配列を有する C D R - H 2、および配列番号 3 の配列を有する C D R - H 3 を含んでなる重鎖と、配列番号 8 の配列を含んでなる軽鎖可変領域とを有する抗体、

b) 配列番号 7 の配列を含んでなる重鎖可変領域と、次の 3 つの C D R、それぞれ配列番号 4 の配列を有する C D R - L 1、配列番号 5 の配列を有する C D R - L 2、および配列番号 6 の配列を有する C D R - L 3 を含んでなる軽鎖とを有する抗体、または

c) 配列番号 7 の配列を含んでなる重鎖可変領域と、配列番号 8 の配列を含んでなる軽鎖可変領域とを有する抗体。

20

【請求項 3】

C X C R 4 の発現に関連する腫瘍形成性障害の *in vitro* または *ex vivo* 診断または予後において使用するための、請求項 1 または 2 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体。

【請求項 4】

前記抗体が *in vivo* で抗腫瘍活性を持たない、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体。

【請求項 5】

被験体における C X C R 4 発現腫瘍の存在および / または位置を *in vitro* または *ex vivo* で検出するための方法であって、

30

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを、C X C R 4 と特異的に結合することができる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、および

(b) 前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と、前記生体サンプルとの結合を検出する工程

を含んでなり、

前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体が、i) 次の 3 つの C D R、それぞれ配列番号 1 の配列を有する C D R - H 1、配列番号 2 の配列を有する C D R - H 2 および配列番号 3 の配列を有する C D R - H 3 を含んでなる重鎖と、i i) 次の 3 つの C D R、それぞれ配列番号 4 の配列を有する C D R - L 1、配列番号 5 の配列を有する C D R - L 2、および配列番号 6 の配列を有する C D R - L 3 を含んでなる軽鎖とを含んでなる、方法。

40

【請求項 6】

被験体における C X C R 4 を発現する細胞の割合を *in vitro* または *ex vivo* で検出するための方法であって、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを、C X C R 4 と特異的に結合することができる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、および

(b) 前記生体サンプルにおいて C X C R 4 を発現する細胞の割合を定量する工程

を含んでなり、

前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体が、i) 次の 3 つの C D R

50

、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2、および配列番号3の配列を有するCDR-H3を含んでなる重鎖と、ii)次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2、および配列番号6の配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなることを特徴とする、方法。

【請求項7】

被験体由来のCXCR4発現腫瘍におけるCXCR4の発現レベルを*in vitro*または*ex vivo*で決定するための方法であって、

(a)前記被験体由来の生体サンプルを、CXCR4と特異的に結合することができる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、および

(b)前記生体サンプルにおいて前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体とCXCR4との結合レベルを定量する工程を含んでなり、

前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体が、i)次の3つのCDR、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2、および配列番号3の配列を有するCDR-H3を含んでなる重鎖と、ii)次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2、および配列番号6の配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなることを特徴とする、方法。

【請求項8】

前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体とCXCR4との結合レベルが、優先的には蛍光活性化細胞選別(FACS)または免疫組織化学(IHC)により測定される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

CXCR4発現腫瘍の*in vitro*または*ex vivo*診断または予後の方法であって、

(a)CXCR4の発現レベルを請求項7または8に記載に従って決定する工程、および

(b)工程(a)の発現レベルを、正常組織またはCXCR4非発現組織からのCXCR4の参照発現レベルと比較する工程を含んでなる、方法。

【請求項10】

被験体の腫瘍スコアを*in vitro*または*ex vivo*で決定するための方法であって、

(a)前記被験体由来の生体サンプルを、CXCR4と特異的に結合することができる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、

(b)前記生体サンプルにおいて前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と、CXCR4との結合レベルを定量する工程、および

(c)前記被験体からの、前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の定量された結合レベルを適当な尺度と比較することにより、腫瘍をスコア化する工程を含んでなり、

前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体が、i)次の3つのCDR、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2、および配列番号3の配列を有するCDR-H3を含んでなる重鎖と、ii)次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2、および配列番号6の配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなることを特徴とする、方法。

【請求項11】

前記適当な尺度が、染色強度と陽性細胞の割合である2つのパラメーターに基づく、請求項10に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

前記適当な尺度が、無反応性を 0 とし、および 67 ~ 100 % の割合の強い反応性を 8 とする 0 ~ 8 の尺度である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 1 3】

下記の工程を含んでなる、被験体由来の腫瘍の状態を *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法：

(a) 被験体由来の腫瘍を、請求項 10、11 または 12 のいずれか一項の記載に従ってスコア化する工程、および

(b) スコアが 3 ~ 8 である場合に、腫瘍の状態が [CXCR4 (+)] であると決定する工程、または

(c) スコアが 0 ~ 2 である場合に、腫瘍の状態が [CXCR4 (-)] であると決定する工程。

10

【請求項 1 4】

前記適当な尺度が、腫瘍細胞の膜無反応性を 0 とし、10 % を超える腫瘍細胞における強い完全な反応性を 3⁺ とする 0 ~ 3⁺ の尺度である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 1 5】

下記の工程を含んでなる、被験体由来の腫瘍の状態を *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法：

(a) 被験体由来の腫瘍を、請求項 10、11、または 14 の記載に従ってスコア化する工程、および

(b) スコアが 2⁺ または 3⁺ である場合に、腫瘍の状態が [CXCR4 (+)] であると決定する工程、または

(c) スコアが 0 または 1⁺ である場合に、腫瘍の状態が [CXCR4 (-)] であると決定する工程。

20

【請求項 1 6】

下記工程を含んでなる、腫瘍形成性障害が、抗 CXCR4 抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体による処置に感受性があるか否かを決定するための方法：

(a) 被験体の腫瘍の CXCR4 状態を、請求項 13 または 15 の記載に従って *in vitro* または *ex vivo* で決定する工程、および

(b) 前記状態が CXCR4 (+) である場合に、前記腫瘍形成性障害は抗 CXCR4 抗体、またはそのフラグメントまたは誘導体による処置に感受性があると決定する工程。

30

【請求項 1 7】

下記工程を含んでなる、治療量の CXCR4 阻害剤の投与から利益を受ける、または受けないと予測される癌患者を選択するための方法：

(a) 前記 CXCR4 の発現レベルを請求項 7 または 8 に記載の方法に従って決定する工程、

(b) 前工程 a) の発現レベルを参照発現レベルと比較する工程、および

(c) (a) で得られた発現レベルの参照発現レベルに対する比が 1 より大きい場合に、その患者を CXCR4 阻害剤の治療的投与から利益を受けると予測されるとして選択する工程、または

(d) (a) で得られた発現レベルの参照発現レベルに対する比が 1 以下である場合に、その患者を CXCR4 阻害剤の治療的投与から利益を受けると予測されないとして選択する工程。

40

【請求項 1 8】

下記工程を含んでなる、CXCR4 に関連する腫瘍形成性障害に罹患している被験体において、前記障害を緩和するように計画された治療計画の有効性を *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法：

(a) 前記処置の第一の時点に相当する第一の生体サンプルにおいて、CXCR4 の第一の発現レベルを請求項 7 または 8 の記載に従って決定する工程、

50

(b) 前記処置の後の第二の時点に相当する第二の生体サンプルにおいて、C X C R 4の第二の発現レベルを請求項7または8の記載に従って決定する工程、

(c) 工程(a)で得られた前記第一の発現レベルの、工程(b)で得られた前記第二の発現レベルに対する比を計算する工程、および

(d) 工程(c)の比が1より大きい場合に、前記治療計画の有効性が高いと決定する工程、または

(e) 工程(c)の比が第二の発現レベル以下であるか、または統計学的に同等である場合に、前記治療計画の有効性が低いと決定する工程。

【請求項19】

C X C R 4に関連する腫瘍形成性障害に罹患している被験体において、前記障害を緩和するように設計された治療計画が、C X C R 4阻害剤を前記被験体に投与することを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

下記の少なくとも一つを含んでなる、C X C R 4発現腫瘍の存在および/または位置を検出するためのキット：

a) i) 次の3つのCDR、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2、および配列番号3の配列を有するCDR-H3を含んでなる重鎖と、ii) 次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2、および配列番号6の配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体、

b) 次の3つのCDR、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2、および配列番号3の配列を有するCDR-H3を含んでなる重鎖と、配列番号8の配列を含んでなる軽鎖可変領域とを有する抗体、

c) 配列番号7の配列を含んでなる重鎖可変領域と、次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2、および配列番号6の配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖とを有する抗体、

d) 配列番号7の配列を含んでなる重鎖可変領域と、配列番号8を含んでなる軽鎖可変領域とを有する抗体。

一つ

【請求項21】

前記抗体が標識されている、請求項20に記載のキット。

【請求項22】

前記抗体と、C X C R 4との間の結合の程度を検出するための試薬をさらに含んでなる、請求項20または21に記載のキット。

【請求項23】

前記抗体と、C X C R 4との間の結合のレベルを定量するための試薬をさらに含んでなる、請求項20または21のいずれか一項に記載のキット。

【請求項24】

i) 前記抗体と、C X C R 4との間の結合の程度を検出するための試薬、および

ii) C X C R 4発現レベルをスコア化するために有用な陽性および陰性対照サンプルをさらに含んでなる、請求項20または21に記載のキット。

【請求項25】

ネズミ抗体に特異的なポリクローナル抗体をさらに含んでなり、前記ポリクローナル抗体は好ましくは標識されている、請求項24に記載のキット。

【請求項26】

i) 前記抗体と、C X C R 4との間の結合の程度を検出するために有用な試薬、

ii) C X C R 4阻害剤に対する感受性と相関させた対照レベル、および/または

iii) C X C R 4阻害剤に対する耐性と相関させた対照レベル

をさらに含んでなる、請求項20または21に記載のキット。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

本発明は、患者における増殖性疾患の予後および/または診断および/または治療モニタリングの分野に関する。より詳細には、本発明は、CXCR4と特異的に結合することができる抗体、ならびにCXCR4の発現に関連する病的過剰増殖性腫瘍形成性障害を検出および診断するための前記抗体の使用、および対応する方法を含んでなる。特定の実施形態では、前記障害は、通常より高いCXCR4の発現に関連する腫瘍形成性障害、またはCXCR4の過剰発現と関係がある他の任意の病態である。本発明は最後に、ある特定の癌の予後および/または診断および/または治療モニタリングのための、少なくともこの

10

【0002】

ケモカインは、特に免疫反応中に、ケモカイン勾配として知られるリガンドの化学的勾配に沿った白血球の遊走を制御する小型の分泌型ペプチドである(Zlotnick A. et al., 2000)。ケモカインは、それらのNH₂末端システイン残基の位置に基づいてCCおよびCXという2つの主要なサブファミリーに分かれ、Gタンパク質共役受容体と結合し、その2つの主要なサブファミリーはCCRおよびCXCRと呼ばれている。これまでに50を超えるヒトケモカインと18のケモカイン受容体が見出されている。

【0003】

多くの癌が、腫瘍の免疫細胞浸潤ならびに腫瘍細胞の増殖、生存、遊走および血管新生に影響を与える複雑なケモカインネットワークを有する。免疫細胞、内皮細胞および腫瘍細胞はそれら自体ケモカイン受容体を発現し、ケモカイン勾配に応答することができる。ヒト癌生検サンプルおよびマウス癌モデルの研究により、癌細胞のケモカイン受容体発現が転移能の上昇に関連することが示されている。異なる種類の癌に由来する悪性細胞ではケモカイン受容体発現プロファイルが異なるが、ケモカイン受容体4(CXCR4)が最も多く見られる。上皮、間葉および造血起源の少なくとも23種類の異なる種類のヒト癌細胞がCXCR4受容体を発現する(Balkwill F. et al., 2004)。

20

【0004】

ケモカイン受容体4(フシン(fusin)、CD184、LESTRまたはHUMSTRとしても知られている)は、352または360のアミノ酸を含んでなる2種類のアイソフォームとして存在する。アイソフォームaはGenbank受託番号NP_001008540として表されるアミノ酸配列を有し、アイソフォームbはGenbank受託番号NP_003458として表されるアミノ酸配列を有する。残基Asn11はグリコシル化されており、残基Tyr21は硫酸基の付加によって修飾されており、Cys109および186は受容体の細胞外部分でジスルフィド架橋により結合している(Juarez J. et al., 2004)。

30

【0005】

この受容体は、様々な種類の正常組織、ナイーブ、非記憶T細胞、制御性T細胞、B細胞、好中球、内皮細胞、一次単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、CD34+造血幹細胞によって、また、低レベルではあるが心臓、結腸、肝臓、腎臓および脳において発現される。CXCR4は、白血球輸送、B細胞リンパ球生成および骨髄造血に重要な役割を果たす。

40

【0006】

CXCR4受容体は、限定されるものではないが、リンパ腫、白血病、多発性骨髄腫、結腸癌(Ottaiano A. et al., 2004)、乳癌(Kato M. et al., 2003)、前立腺癌(Sun Y.X. et al., 2003)、肺癌[小細胞および非小細胞癌(Phillips R.J. et al., 2003)]、卵巣癌(Scotton C.J. et al., 2002)、膵臓癌(Koshiba T. et al., 2000)、腎臓癌、脳腫瘍(Barbero S et al., 2002)、膠芽腫およびリンパ腫を含む多数の癌で過剰発現される。

【0007】

これまでに記載されているCXCR4受容体のユニークなリガンドは、間質細胞由来因

50

子1 (SDF-1) またはCXCL12である。SDF-1は、リンパ節、骨髄、肝臓、肺において多量に、また少量であるが腎臓、脳および皮膚によっても分泌される。CXCR4はまた、拮抗性のケモカイン、ヒトIII型ヘルペスウイルスによってコードされるウイルスマクロファージ炎症性タンパク質II (vMIP-II) によっても認識される。

【0008】

CXCR4/SDF-1軸は、癌において重要な役割を果たしており、転移を生じる遊走、浸潤に直接関与している。実際に、癌細胞はCXCR4受容体を発現し、それらは遊走して体循環へと入る。次いで、癌細胞は、高レベルのSDF-1を産生する臓器の血管床に拘束され、そこで増殖し、血管新生を誘導し、転移腫瘍を形成する(Murphy PM., 2001)。この軸は、細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)経路の活性化(Barbero S. et al., 2003)および血管新生(Romagnani P., 2004)を介する細胞増殖にも関与している。実際に、CXCR4受容体およびそのリガンドSDF-1は、VEGF-A発現を刺激することによって明らかに血管新生を促進し、次いで、CXCR4/SDF-1の発現を増強する(Bachelder R.E. et al., 2002)。腫瘍関連マクロファージ(TAM)は、腫瘍の低酸素領域に蓄積し、刺激されて、腫瘍細胞と協同して血管新生を促進することも知られている。低酸素症は、TAMを含む様々な細胞種におけるCXCR4の発現を選択的にアップレギュレートすることが観察された(Mantovani A. et al., 2004)。CXCR4/SDF-1軸は、CXCR4+造血幹/前駆細胞(HSC)の輸送/ホーミングを調節し、新血管形成において一役を担っている可能性があることが最近になって証明された。HSCの他に、機能性CXCR4は、他の組織由来の幹細胞(組織コミット幹細胞(tissue-committed stem cell)=TCS)でも発現されるので、SDF-1は臓器/組織再生に必要なCXCR4+TCSの化学誘引に中枢的役割を果たしている可能性があるが、これらのTCSは癌発生の細胞起源でもあり得る(癌幹細胞理論)ことを示す証拠がある。癌の幹細胞起源は、ヒト白血病について、また最近では脳腫瘍および乳癌などの数種の固形腫瘍について実証されている。白血病、脳腫瘍、小細胞肺癌、乳癌、肝芽腫、卵巣癌および子宮頸癌など、正常なCXCR4+組織/臓器特異的幹細胞に由来する可能性のある数例のCXCR4+腫瘍がある(Kucia M. et al., 2005)。

【0009】

CXCR4受容体に干渉することによる癌転移の標的化が、CXCR4受容体に対するモノクローナル抗体を用いることによって*in vivo*で実証された(Muller A. et al., 2001)。簡単に述べれば、CXCR4受容体に対するモノクローナル抗体(Mab 173 R&D Systems)は、SCIDマウスでの同所性乳癌モデル(MDA-MB 231)においてリンパ節転移の数を有意に減少させることが示された。もう一つの研究(Phillips R.J et al., 2003)でも、SDF-1に対するポリクローナル抗体を用いる同所性肺癌モデル(A549)における転移でのSDF-1/CXCR4軸の決定的役割が示されたが、この研究では、腫瘍増殖にも血管新生にも効果はなかった。いくつかの他の研究では、CXCR4の二本鎖siRNA(Liang Z. et al., 2005)、生体安定性CXCR4ペプチド拮抗薬(Tamamura H. et al., 2003)を用いる*in vivo*での転移が、またはAMD3100(Rubin J.B. et al., 2003、De Falco V. et al., 2007)もしくはMab(特許WO2004/059285A2)のようなCXCR4の小分子拮抗薬を用いる*in vivo*での腫瘍増殖のいずれかの抑制も記載されている。従って、CXCR4は、癌に対するパリデート済みの治療標的である。

【0010】

もう一つのケモカイン受容体であるケモカイン受容体2(CXCR2)も、腫瘍学における興味深い標的として記載されている。実際に、CXCR2は、数種の腫瘍細胞で自己分泌細胞増殖シグナルを伝達し、血管新生を促進することにより間接的に腫瘍増殖に影響を及ぼすこともできる(Tanaka T. et al. 2005)。

【0011】

CXCR2ケモカイン受容体は、360個のアミノ酸を包含する。それは、主として内

10

20

30

40

50

皮細胞内で、特に新血管形成中に発現する。いくつかのケモカインは、E R L + 血管新生誘発ケモカインに属するC X C R 2受容体であるC X C L 5、- 6、- 7、I L - 8、G R O - 、 - および と結合する。C X C R 2受容体は、C X C R 4受容体と配列相同性を有しており、配列同一性は37%、配列相同性48%である。C X C R 2 / リガンド軸は、転移(Singh RK. et al., 1994)、細胞増殖(Owen J.D. et al., 1997)などのいくつかの腫瘍増殖機構およびE R L + ケモカイン介在血管新生(Strieter R.M. et al., 2004)に關与している。最後に、腫瘍関連マクロファージおよび好中球は、炎症誘導性の腫瘍増殖の重要な要素であり、C X C L 5、I L - 8およびG R O - などのケモカインは、好中球動員を誘発する。

【0012】

Gタンパク質共役受容体(これらの中にケモカイン受容体がある)の機能を調節するための一般機構として二量体化が明らかになっている(Wang J. and Norcross M., 2008)。ケモカイン結合に応答するホモおよびヘテロ二量体化は、多数のケモカイン受容体によるシグナル伝達の開始および変更に必要なとされることが示されている。受容体二量体またはオリゴマーはおそらくケモカイン受容体の基本機能単位であるという概念を裏付ける証拠が増えてきている。ケモカイン受容体二量体はリガンドの非存在下で見出されており、ケモカインは、受容体二量体のコンフォメーション変化を誘導する。C X C R 4は、ホモ二量体を形成することが知られているが、例えば、- オピオイド受容体(D O R)(Hereld D., 2008)またはC C R 2(Percherancier Y. et al., 2005)とのヘテロ二量体を形成することも知られている。後者の例では、C X C R 4のトランスメンブラン領域由来のペプチドは、二量体のリガンド誘導コンフォメーション遷移を遮断することにより活性化を阻害した(Percherancier Y. et al., 2005)。別の研究では、C X C R 4のトランスメンブラン領域の合成ペプチドであるC X C R 4 - T M 4ペプチドが、C X C R 4ホモ二量体のプロモーター間のエネルギー移動を減少させ、悪性細胞におけるS D F - 1誘導性の遊走およびアクチン重合を阻害することが示された(Wang J. et al., 2006)。さらに最近では、C X C R 7はC X C R 4と機能的ヘテロ二量体を形成し、S D F - 1誘導性のシグナル伝達を増強することも記載されている(Sierro F. et al., 2007)。構成的ヘテロ二量体の他の例としては、C X C R 1とC X C R 2の相互作用を示すとともに、それぞれのホモ二量体を形成する研究が挙げられる。それらのいずれについても別のG P C R ((1 A) - アドレナリン受容体)との相互作用は見られなかったが、このことはC X C R 1とC X C R 2の相互作用の特異性を示し(Wilson S. et al., 2005)。

【0013】

上述のように、C X C R 4およびC X C R 2受容体は、興味深い腫瘍標的である。これらの受容体に干渉することで、腫瘍細胞の増殖、血管新生、腫瘍細胞の遊走および浸潤、腫瘍による好中球およびマクロファージの動員を減少させることにより、また、C X C R 4癌幹細胞を阻害することにより、腫瘍増殖および転移が極めて効率的に阻害されるはずである。

【0014】

C X C R 4ホモ二量体およびC X C R 4 / C X C R 2ヘテロ二量体の両方に結合してそれにコンフォメーション変換を誘発し、強い抗腫瘍活性を有する2つのモノクローナル抗体(515H7および414H5と呼ばれる)が従前に同定されている(W O 2 0 1 0 / 0 3 7 8 3 1参照)。さらに、本出願者は、このようなC X C R 4 / C X C R 2ヘテロ二量体の存在を証明している。

【発明の概要】

【0015】

本発明は、腫瘍形成性障害の診断または予後ツールとして使用することができる、癌モデルにおいていずれの*i n v i v o*活性も欠く少なくとも一つの試薬、特に、C X C R 4の発現を特徴とするものまたは異常なC X C R 4発現により媒介されるものを提供することを目的とする。

【0016】

10

20

30

40

50

公開特許出願 WO 2 0 1 0 / 1 2 5 1 6 2 号は、5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 と呼ばれる 2 つの抗 C X C R 4 モノクローナル抗体、ならびに H I V 治療の分野におけるそれらの使用を開示している。

【0017】

驚くことに、本発明者らは、今般、前記抗体 3 0 1 a E 5 (本明細書では 3 0 1 E 5 T と呼ばれ、またはより好ましくは、寄託ハイブリドーマ I - 3 8 5 9 を参照：本出願に関しては、これらの用語は同等である)は、強い抗腫瘍活性を提供する他の抗体 5 1 5 H 7 (WO 2 0 1 0 / 0 3 7 8 3 1 号に記載の通り)とは対照的に癌治療の分野において *in vivo* 活性を持たないことを実証した。特に、I - 3 8 5 9 は、C X C R 4 リガンドと受容体との結合を妨げない。

10

【0018】

さらに、本出願者らは、抗体 I - 3 8 5 9 が、

- i) 単量体としての C X C R 4 を認識できること、
- ii) C X C R 4 / C X C R 4 ホモ二量体としての C X C R 4 を認識できること、
- iii) C X C R 4 / C X C R 2 ヘテロ二量体としての C X C R 4 を認識できること、
- iv) 細胞溶解液から C X C R 4 を免疫沈降できること、
- v) 蛍光活性化細胞選別 (FACS) により C X C R 4 発現細胞の表面で C X C R 4 を認識できること、および
- vi) 免疫組織化学法により C X C R 4 を認識できること

を見出した。

20

【0019】

抗体 I - 3 8 5 9 に関してこれまでに開示されたことのないこれらの新規な特性のために、本発明者らは、前記抗体が C X C R 4 発現細胞、特に、C X C R 4 発現腫瘍細胞を同定するために使用可能であることを見出した。

【0020】

よって、本発明は、C X C R 4 発現疾患の存在および/または位置を検出するための前記抗体の使用に関する。本発明は、次いで、C X C R 4 発現疾患の、好ましくは *in vitro* での、診断および/または予後に利用することができる。好ましくは、前記 C X C R 4 発現疾患は癌である。

【0021】

本発明の抗体 I - 3 8 5 9 のもう一つの有利な特性は、それが治療用モノクローナル抗体 5 1 5 H 7 のエピトープに近接したエピトープを認識するということである。より詳細には、実験例に示されるように、I - 3 8 5 9 は、治療用抗体 5 1 5 H 7 のそのエピトープへの結合と競合することができる。よって、前記 I - 3 8 5 9 抗体は、例えば 5 1 5 H 7 M a b で処置すべき患者を選択するために使用することができる。特に、本発明の抗体 I - 3 8 5 9 は、患者の細胞表面に存在する C X C R 4 のコンフォメーションが抗体 5 1 5 H 7 により認識されるコンフォメーションと類似している(すなわち、前記患者は 5 1 5 H 7 抗体に基づく療法に感受性があることを示す)ことを確認するために使用することができる。

30

【0022】

本発明の他の特徴および利点は、以下の実施例および図面を含む説明の中で明らかとなる。図面の説明を以下に示す。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、I - 3 8 5 9 M a b は C X C R 4 単量体および二量体の両方を免疫沈降させることを示す。

【図2A - 2B】図2Aおよび2Bは、I - 3 8 5 9 M a b は C X C R 4 ホモ二量体(A)および C X C R 4 / C X C R 2 ヘテロ二量体(B)の両方を調節することを示す。

【図3】図3は、FACS分析により、I - 3 8 5 9 M a b は細胞膜における C X C R 4 を認識することを示す。

50

【図4A - 4B】図4Aおよび4Bは、FACS分析により、I-3859 Mabは、細胞膜におけるCXCR4との結合に関して、抗CXCR4 515H7治療用Mabとの競合状態に入ることを示す。

【図5】図5は、I-3859 Mabは無胸腺ヌードマウスにおけるMDA-MB-231異種移植腫瘍成長モデルに対して影響が無いことを示す。

【図6】図6は、RAMOS異種移植腫瘍に対する、a) I-3859およびb) mIgG1を用いたIHC染色を示す。

【図7】図7は、KARPAS299異種移植腫瘍に対する、a) I-3859およびb) mIgG1を用いたIHC染色を示す。

【発明の具体的説明】

【0024】

本発明の第一の面は、CXCR4と高親和性で特異的に結合する単離された抗体、またはその抗原結合フラグメント（断片）もしくは誘導体に関し、前記抗体はいずれの*in vivo*活性も欠いている。前記単離された抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体は、CXCR4発現により媒介される病的過剰増殖性腫瘍形成性障害の診断または予後のための方法に使用することができる。特に、前記単離された抗体は、*in vivo*画像法に使用することができる。好ましくは、本発明の単離された抗体はヒトCXCR4と結合する。

【0025】

好ましい実施形態では、単離された抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体は、CXCR4発現腫瘍の存在の検出において使用するために提供され、この場合、前記抗体は、配列番号1～6のアミノ酸配列を含んでなるCDRまたはその配列が最適なアラインメントの後に配列1～6と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する少なくとも一つのCDRから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（CDR）を含んでなる。

【0026】

より好ましくは、本発明は、遺伝子組換えまたは化学合成により得られた、本発明による抗体、それらの抗原結合フラグメントまたは誘導体を含んでなる。

【0027】

好ましい実施形態によれば、本発明による抗体、またはその誘導化合物もしくは抗原結合フラグメントは、モノクローナル抗体からなることを特徴とする。

【0028】

本明細書において「モノクローナル抗体」とは、ほぼ均一な抗体の集団に由来する抗体を意味する。より詳細には、ある集団の個々の抗体は、最小限の割合で見出すことができる少数の潜在的な天然に存在する突然変異以外は同一である。言い換えれば、モノクローナル抗体は、単一細胞クローン（例えば、ハイブリドーマ、均一抗体をコードするDNA分子でトランスフェクトされた真核生物宿主細胞、均一抗体をコードするDNA分子でトランスフェクトされた原核生物宿主細胞など）の増殖から生じる均一抗体からなり、一般に一つかつただ1種のクラスおよびサブクラスの重鎖と、ただ1タイプの軽鎖を特徴とする。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一抗原に対するものである。さらに、典型的には様々な決定基またはエピトープに対する様々な抗体を含むポリクローナル抗体の調製とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一エピトープに対するものである。

【0029】

典型的なIgG抗体は、2本の同じ重鎖と2本の同じ軽鎖がジスルフィド結合により連結されたものから構成される。各重鎖および軽鎖は、定常領域と可変領域を含む。各可変領域は、抗原のエピトープとの結合を主に担う、「相補性決定領域」（「CDR」）または「超可変領域」と呼ばれる3つのセグメントを含む。これらのセグメントは通常、N末端から順番に符番してCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれる。これらの可変領域のより保存性の高い部分は「フレームワーク領域」と呼ばれる。

【0030】

10

20

30

40

50

3つの重鎖CDRと3つの軽鎖CDRが存在する。用語CDRは、本明細書において、場合に応じて、抗体が認識する抗原またはエピトープに対する抗体の親和性により結合を担うアミノ酸残基の大部分を含む、またはこれらの領域の一つ、またはこれらの領域のいくつか、もしくはさらには全部を示すために用いられる。

【0031】

本発明によれば、抗体のCDRは、IMGTナンバリングシステムにより定義される。IMGTによるCDRからKababによるCDRを推定することは、当業者には自明である。KababによるCDRは、本発明の範囲の一部とみなされるべきである。

【0032】

IMGT独自ナンバリングは、抗原受容体、鎖型、または種に関わらず可変領域を比較するために定義されたものである[Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]。IMGT独自ナンバリングでは、保存されているアミノ酸は常に同じ位置になる：例えばシステイン23(1st-CYS)、トリプトファン41(CONSERVED-TRP)、疎水性アミノ酸89、システイン104(2nd-CYS)、フェニルアラニンまたはトリプトファン118(J-PHEまたはJ-TRP)である。IMGT独自ナンバリングは、フレームワーク領域(FR1-IMGT:1~26番、FR2-IMGT:39~55番、FR3-IMGT:66~104番およびFR4-IMGT:118~128番)および相補性決定領域:CDR1-IMGT:27~38、CDR2-IMGT:56~65およびCDR3-IMGT:105~117の標準化された境界を定める。ギャップは非占有位置を表すので、CDR-IMGT長(かぎ括弧中に示されドットで区切られる、例えば[8.8.13])は重要な情報となる。IMGT独自ナンバリングは、IMGT Colliers de Perlesと呼ばれる2次元グラフィック表示[Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)]およびIMGT/3Dstructure-DBの3次元構造[Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucleic Acids Res., 32, D208-D210 (2004)]に用いられる。

【0033】

より詳細には、第一の面によれば、本発明は、i)IMGTナンバリングシステムにより定義される下記のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3(ここで、CDR-H1は配列番号1の配列を含んでなり、CDR-H2は配列番号2の配列を含んでなり、CDR-H3は配列番号3の配列を含んでなる)のうちの少なくとも一つを含んでなる重鎖、および/またはii)IMGTナンバリングシステムにより定義される下記のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3(ここで、CDR-L1は配列番号4の配列を含んでなり、CDR-L2は配列番号5の配列を含んでなり、CDR-L3は配列番号6の配列を含んでなる)のうちの少なくとも一つを含んでなる軽鎖を含んでなる、CXCR4と特異的に結合することができる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体に関する。

【0034】

さらに別の実施形態では、本発明はまた、

IMGTにより定義される次の3つのCDR、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2および配列番号3の配列を有するCDR-H3、または最適なアラインメントの後にそれぞれ配列番号1、2もしくは3の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなる重鎖、および

IMGTにより定義される次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2および配列番号6の配列を有するCDR-L3、または最適なアラインメントの後にそれぞれ配列番号4、5もしくは6の配列

と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなる軽鎖

を含んでなる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体として記載することもできる。

【0035】

本発明の意味において、2つの核酸配列またはアミノ酸配列間の「同一性割合」とは、最適なアラインメントの後に得られる、比較する2つの配列間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の割合を意味し、この割合は純粹に統計学的なものであり、その2配列間の違いはそれらの長さに沿ってランダムに分布している。2つの核酸配列またはアミノ酸配列の比較は従来から、それらを最適にアラインした後に配列を比較することによって行われ、この比較はセグメントによって、または「アラインメントウィンドウ」の使用によって行うことができる。比較のための配列の最適なアラインメントは、手による比較の他、Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482]のローカル・ホモロジー・アルゴリズム、Neddleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443]のローカル・ホモロジー・アルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]の類似性検索法、またはこれらのアルゴリズムを用いたコンピューターソフトウェア (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、または匹敵するソフトウェアBLAST NRもしくはBLAST Pによる) によって行うことができる。

10

【0036】

2つの核酸配列またはアミノ酸配列間の同一性割合は、2つの最適にアラインされた配列を比較することにより決定され、ここで、比較する核酸配列またはアミノ酸配列は、2つの配列間での最適なアラインメントのための参照配列と比較して付加または欠失を持ち得る。同一性割合は、2つの配列間で、アミノ酸またはヌクレオチド残基が同一の箇所の数を決定し、この同一箇所の数をアラインメントウィンドウ内の箇所の総数で割り、その商に100を掛けて2つの配列間の同一性割合を得ることにより計算される。

20

【0037】

例えば、サイト<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>で利用可能なBLASTプログラム「BLAST 2 Sequences」(Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250) をデフォルトパラメーター (特にパラメーター「オープン・ギャップ・ペナルティ」: 5、「エクステンション・ギャップ・ペナルティ」: 2について、選択されるマトリックスは、例えばプログラムによって提案される「BLOSUM 62」マトリックスである) とともに使用することができ、このプログラムにより、比較する2つの配列間の同一性割合が直接計算される。

30

【0038】

参照アミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示すアミノ酸配列の場合、好ましい例として、参照配列、特定の修飾、特に少なくとも一つのアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、末端切断または伸張を含むものが挙げられる。1以上の連続または不連続アミノ酸の置換の場合、被置換アミノ酸が「同等な」アミノ酸により置換される置換が好ましい。ここで、「同等なアミノ酸」という表現は、対応する抗体および以下に定義される具体例の生物活性を改変することなく、構造アミノ酸の一つを置換し得る任意のアミノ酸を示すものとする。

40

【0039】

同等なアミノ酸は、置換されるアミノ酸とのそれらの構造的相同性に基づくか、または生成され得る種々の抗体間の生物活性の比較試験の結果に基づいて決定することができる。

【0040】

非限定的例として、下表1に、対応する修飾抗体の生物活性に有意な改変を生じずに実施し得る可能性のある置換をまとめる。なお、同じ条件下で逆の置換も当然可能である。

50

【 0 0 4 1 】

【 表 1 】

表 1

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

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、アミノ酸配列番号7の配列、もしくは最適なアラインメントの後に配列番号7の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなる重鎖可変領域配列を含んでなり、かつ/または配列番号8のアミノ酸配列、もしくは最適なアラインメントの後に配列番号8の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなる軽鎖可変領域配列を含んでなる、抗体I-3859、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つに関する。

【 0 0 4 3 】

特に、前記抗原結合誘導体は、少なくとも一つのCDRがグラフトされたペプチド足場を含んでなる結合タンパク質からなり、前記CDRは、最初の抗体のパラトープ認識特性を全部または一部保存するような方法でグラフトされる。好ましい実施形態では、前記抗原結合タンパク質は、ペプチド足場と前記少なくとも一つのCDRの融合タンパク質である。

【 0 0 4 4 】

本発明に記載される6つのCDR配列のうち1以上の配列は、様々な免疫グロブリン足場形成時に存在していてもよい。この場合、タンパク質配列は、グラフトしたCDRの適正な折り畳みに適したペプチド骨格を再形成することができ、それらにパラトープ抗原認識特性を保存させることができる。

【 0 0 4 5 】

当業者であれば、CDRグラフトのためのタンパク質足場のタイプを選択する手段を知っている。より詳細には、選択されるには、このような足場は下記の基準：

- ・良好な系統発生的保存、
- ・三次元構造が既知であること（例えば、結晶学、NMR分光法、または当業者に知られている他の任意の技術により決定される）、
- ・小サイズ、
- ・転写後修飾が少ないかまたは全くないこと、および/または
- ・産生、発現および精製が容易であること

をできるだけ多く満たさなければならないことが知られている(Skerra A., J. Mol. Recognition., 2000, 13:167-187)。

【 0 0 4 6 】

このようなタンパク質足場の起源は、限定されるものではないが、フィブロネクチンおよび優先的にはフィブロネクチンIII型領域10、リボカリン、アンチカリン(Skerra A., J. Biotechnol, 2001, 74(4):257-75)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のプロテインAの領域Bに由来するプロテインZ、チオレドキシニンA、または「アンキリンリピート」(Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などのリピートモチーフを有するタンパク質から選択される構造であり得る。このようなタンパク質モチーフは当技術分野で広く同定されており、従って当業者に周知である。

【 0 0 4 7 】

上記のように、このようなペプチド足場は、元の抗体に起源する1~6つのCDRを含んでなる。必要ではないが、好ましくは、当業者は重鎖から少なくとも一つのCDRを選択し、前記は抗体の特異性を主に担うことが知られている。1以上の適切なCDRの選択は当業者には自明であり、当業者ならば次に好適な既知の技術を選択することもできる

(Bes et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74)。

【 0 0 4 8 】

本発明による抗体の抗原結合フラグメントとは、例えば、フラグメントFv、scFv (sc = 一本鎖)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fcもしくはダイアポディー、またはポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコールの付加(PEG化)(PEG化フラグメントは、Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEGおよびFab'-PEGと呼ばれる)などの化学修飾によって、またはリポソーム、ミクروسフェアもしくはPLGAへの封入によって半減期が延長された任意の断片と理解されるべきであり、該断片は、特に一般的な様式で、断片が生じる抗体の活性を部分的にであっても発揮することができる本発明の特徴的CDRの少なくとも一つを有する。

【 0 0 4 9 】

好ましくは、前記抗原結合フラグメントは、それらが由来する抗体の可変重鎖または軽鎖の部分配列を含んでなるか、または含み、該部分配列は、それが由来する抗体と同じ結合特異性および十分な親和性を保持するのに十分なものであり、それが由来する抗体の親和性の好ましくは少なくとも1/100、より好ましくは少なくとも1/10に相当する。

【 0 0 5 0 】

このような抗原結合フラグメントは、それが由来する抗体の配列の少なくとも5個のアミノ酸、好ましくは6個、7個、8個、10個、15個、25個、50個または100個

10

20

30

40

50

の連続するアミノ酸を含む。

【0051】

好ましくは、これらの抗原結合フラグメントは、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、F(ab')、scFv-Fcまたはダイアボディーのタイプであり、一般にフラグメントが生じる抗体と同じ結合特異性を有する。本発明によれば、本発明の抗体の抗原結合フラグメントは、ペプシンまたはパインを含む酵素消化などの方法によって、および/または化学還元によるジスルフィド架橋の切断によって上記抗体から得ることができる。抗体フラグメントは、これもまた当業者に公知の組換え遺伝学的技術によって、または例えば、Applied Biosystemsなどによって販売されているものなどの自動ペプチド合成装置によるペプチド合成によって得ることもできる。

10

【0052】

本発明に従ってモノクローナル抗体を分泌することができるネズミハイブリドーマは、2007年10月22日にI-3859としてCNCM、パスツール研究所、パリ、フランスに寄託された。前記ハイブリドーマは、Balb/C免疫誘導マウス脾細胞と骨髄腫Sp2/0-Ag14系統を融合させることにより得られたものである。

【0053】

本明細書で301aE5またはI-3859と呼ばれるモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体は、前記ハイブリドーマにより分泌されることを特徴とする。

【0054】

抗体I-3859はまた、その核酸配列によって、すなわち、配列番号9の配列によりコードされるCDR-H1、配列番号10の配列によりコードされるCDR-H2および配列番号11の配列によりコードされるCDR-H3を含んでなる重鎖、ならびに/または配列番号12の配列によりコードされるCDR-L1、配列番号13の配列によりコードされるCDR-L2および配列番号14の配列によりコードされるCDR-L3を含んでなる軽鎖を含んでなるとして記載することもできる。

20

【0055】

抗体I-3859は、配列番号15の核酸配列によりコードされる重鎖、もしくは最適なアラインメントの後に配列番号15と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性割合を示す核酸配列、ならびに/または配列番号16の核酸配列、もしくは最適なアラインメントの後に配列番号16と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性割合を示す核酸配列によりコードされる軽鎖を含んでなる。

30

【0056】

本明細書において互換的に使用される用語「核酸」、「核酸配列(nucleic sequence)」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は、修飾されたまたはされていない、核酸のフラグメントまたは領域を定義する、非天然ヌクレオチドを含むまたは含まない、二本鎖DNA、一本鎖DNAまたは前記DNAの転写産物のいずれかである、ヌクレオチドの正確な配列を意味する。

40

【0057】

「最適アラインメント後に、好ましい配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性割合を示す核酸配列」とは、詳しくは、参照核酸配列に対して、特に規則的な欠失、切断、伸張、キメラ融合および/または置換などのある種の修飾を示す核酸配列を意味する。好ましくは、これらは、参照配列と同じアミノ酸配列をコードする配列であり、これは、遺伝コードの縮重、または好ましくは高ストリンジェント条件、特に以下に定義される条件下で、参照配列と特異的にハイブリダイズし得る相補的配列に関するものである。

【0058】

高ストリンジェント条件下でのハイブリダイゼーションは、温度およびイオン強度に関

50

する条件がハイブリダイゼーションを2つの相補的DNAフラグメントの間で保持できるように選択されることを意味する。単に説明として、上記のポリヌクレオチドフラグメントを定義するためのハイブリダイゼーション段階の高ストリンジェント条件は、下記の通りであるのが有利である。

【0059】

DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションは、(1) $5 \times SSC$ ($1 \times SSC$ は $0.15 M NaCl + 0.015 M$ クエン酸ナトリウムの溶液に相当する)、50%ホルムアミド、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10×デンハート溶液、5%デキストラン硫酸および1%サケ精子DNAを含有するリン酸緩衝液(20 mM、pH 7.5)中、42°Cで3時間のプレハイブリダイゼーション、(2)プローブの長さに応じた温度(すなわち、長さが100ヌクレオチドを超えるプローブでは42°C)で20時間の主ハイブリダイゼーションの後、 $2 \times SSC + 2\% SDS$ 中、20°Cで20分2回の洗浄、 $0.1 \times SSC + 0.1\% SDS$ 中、20°Cで20分1回の洗浄の二段階で行う。最後の洗浄は、 $0.1 \times SSC + 0.1\% SDS$ 中、長さが100ヌクレオチドを超えるプローブでは60°Cで30分間行う。定義されたサイズのポリヌクレオチドについて上記した高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、当業者によって、Sambrook, et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd edition, 2001)に記載の手順に従って、より長いまたは短いオリゴヌクレオチドに対して適合させることができる。

10

【0060】

別の面において、本発明は、CXCR4の発現に関連する腫瘍形成性障害*in vitro*または*ex vivo*診断または予後のための、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体に関する。

20

【0061】

よって、本発明は、CXCR4の発現に関連する腫瘍形成性障害の*in vitro*または*ex vivo*診断の予後の方法であって、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体とCXCR4との結合を試験する工程を含んでなる方法に関する。

【0062】

特に、本発明は、CXCR4の発現に関連する腫瘍形成性障害の*in vitro*診断または予後のための、抗体I-3859、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の使用を提供する。

30

【0063】

重要なこととしては、前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体は、*in vivo*で抗腫瘍活性を持たない。この特性は、患者のスクリーニング、または前記患者に対する影響もしくは結果を持たない抗体による処置の進行のモニタリングを可能とするので、診断適用に明らかに有利である。この特性は、それが患者に対して有害な作用を持たないので、本発明の抗体を処置すべき患者をスクリーニングするための好ましいツールとする。本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体は、CXCR4の発現に関連する種々の病態の検出、診断、および病期分類を含む、様々な医学目的または研究目的に使用が見出せる。

40

【0064】

本明細書において疾患を「診断する」とは、CXCR4の発現に関連するまたはCXCR4の発現に媒介される病的過剰増殖性腫瘍形成性障害の存在を同定または検出する、前記疾患の進行をモニタリングする、およびCXCR4の発現に関連する障害の指標となる細胞またはサンプルを同定または検出する方法を意味する。

【0065】

本明細書において「予後」とは、疾患からの回復の見込み、または疾患の確率的発症もしくは転帰の予測を意味する。例えば、被験体からのサンプルが本発明の抗体による染色に対して陰性であれば、その被験体の「予後」は、サンプルがCXCR4染色に対して陽

50

性である場合よりも良好である。以降にさらに詳細に示されるように、サンプルは適当な尺度で C X C R 4 発現レベルに関してスコア化することができる。

【 0 0 6 6 】

前記抗体は、検出可能 / 定量可能なシグナルを得るために免疫複合体または標識抗体の形態で存在することができる。好適な標識または他の適当な検出可能な生体分子もしくは化学物質と併用する場合、本発明の抗体は *in vitro* および *in vivo* 診断および予後適用に特に有用である。

【 0 0 6 7 】

イムノアッセイで使用するための標識は一般に当業者に公知であり、酵素、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質および発色物質（金コロイドまたはラテックスビーズなどの有色粒子を含む）が含まれる。好適なイムノアッセイには、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）が含まれる。様々なタイプの標識およびそれらの標識を本発明の抗体に結合させる方法は、以下に示されるものなど、当業者に周知である。

10

【 0 0 6 8 】

本明細書において用語「C X C R 4 の発現に関連する腫瘍形成性障害」とは、障害に罹患している被験体における高レベルの C X C R 4（異常）の存在が、障害または障害の悪化に關与する因子の病態生理学の原因であることが示されている、またはそのことが疑われる、疾患およびその他の障害を含むことを意図する。あるいは、このような障害は、例えば、障害に罹患している被験体の罹患細胞または組織の細胞表面上の C X C R 4 レベルの増加を証拠とし得る。この C X C R 4 レベルの増加は、本発明の抗体 I - 3 8 5 9 を用いて検出することができる。

20

【 0 0 6 9 】

特定の実施形態では、「発現の増強」とは、C X C R 4 に関する場合、対照に比べて発現の統計学的に有意な増強を示す（RNA 発現またはタンパク質発現により測定される）タンパク質または遺伝子の発現レベルを意味する。

【 0 0 7 0 】

本発明の好ましい面は、被験体において C X C R 4 発現腫瘍の存在を *in vitro* または *ex vivo* で検出するための方法である、前記方法は、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、および

30

(b) 前記抗体と前記生体サンプルとの結合を検出する工程を含んでなる。

【 0 0 7 1 】

本発明の抗体の結合は、当業者に利用可能な様々なアッセイにより検出することができる。これらのアッセイを実施するためのいずれの好適な手段も本発明の範囲内に含まれるが、FACS、ELISA、ウエスタンブロット法および免疫組織化学（IHC）が特に挙げられる。

【 0 0 7 2 】

別の実施形態では、本発明は、被験体において C X C R 4 発現腫瘍の位置を *in vitro* または *ex vivo* で検出するための方法に関し、前記方法は、

40

a) 被験体由来の生体サンプルを本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、および

b) 前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と前記サンプルとの結合を検出する工程を含んでなる。

【 0 0 7 3 】

発現腫瘍の存在の検出については、当業者に公知の多くの技術が使用可能である。好ましい方法としては、IHC および FACS が含まれる。

【 0 0 7 4 】

本発明はまた、被験体において C X C R 4 を発現する細胞の割合を *in vitro* ま

50

たは *ex vivo* で検出するための方法に関し、前記方法は、

(a) 被験体由来の生体サンプルを本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、および

(b) 前記生体サンプルにおいて *CXCR4* を発現する細胞の割合を定量する工程を含んでなる。

【0075】

本発明の別の面は、被験体由来の *CXCR4* 発現腫瘍における *CXCR4* の発現レベルを *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法に関し、前記方法は、

(a) 被験体由来の生体サンプルを本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、および

(b) 前記生体サンプルにおいて抗体と *CXCR4* との結合のレベルを定量する工程を含んでなる。

【0076】

当業者に自明であるように、抗体と *CXCR4* との結合のレベルは、当業者に周知のいずれの手段によって定量してもよい。好ましい方法には、*ELISA* アッセイ、免疫蛍光、*IHC*、ラジオイムノアッセイ (*RIA*)、または *FACS* などの免疫酵素法の使用が含まれる。

【0077】

好ましくは、生体サンプルは、ヒト起源の血清、全血細胞、組織サンプルまたは生検などの体液である。サンプルは例えば生検組織を含んでもよく、これを好都合には *CXCR4* の発現に関連する病的過剰増殖性腫瘍形成性障害の存在に関してアッセイすることができる。

【0078】

本発明のさらに別の面は、被験体由来の腫瘍において *CXCR4* の発現レベルを *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法に関し、前記方法は、

(a) 被験体由来のサンプルを本発明による抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、および

(b) サンプルにおける前記抗体、またはその抗原結合フラグメントまたは誘導体と *CXCR4* との結合のレベルを定量する工程を含んでなる。

【0079】

試験サンプル中に存在する *CXCR4* の量の決定がひと度行われれば、それらの結果を、*CXCR4* の発現に関連する過剰増殖性腫瘍形成性障害を持たない個体からであること以外は試験サンプルと同様の方法で得られた対照サンプルの結果と比較することができる。この *CXCR4* のレベルが試験サンプルで有意に高ければ、それが由来する被験体が前記障害を有するかまたは発症する高い可能性があるかと結論付けることができる。

【0080】

本発明は、より詳細には、*CXCR4* 発現腫瘍の *in vitro* または *ex vivo* 診断または予後の方法に関し、前記方法は、(i) *CXCR4* の発現レベルを上記のように決定する工程、および (ii) 工程 (i) の発現レベルを正常組織または *CXCR4* 非発現組織からの参照 *CXCR4* の発現レベルと比較する工程を含んでなる。

【0081】

標的化抗腫瘍療法の開発に関して、免疫組織学的技術を用いた診断により、受容体の発現レベルに関する *in situ* 情報が得られ、従って、このような処置に必要な受容体発現レベルに従って、処置に感受性のある患者を選択することができる。

【0082】

病期決定は潜在的予後値を持ち、最適な療法を計画するための基準を提供する。Simpson et al, J. Clin. Oncology 18 :2059 (2000)。例えば、固形腫瘍に対する治療選択は腫瘍の病期分類に基づき、通常、American Joint Committee on Cancer (AJCC) からの腫瘍/結節/転移 (TNM) 検査を用いて実施

10

20

30

40

50

される。この検査および病期分類システムは、その患者において固形癌が診断された時点の病期に関していくつかの数値情報を与えるが、それは不正確で不十分であると一般に認知されている。特に、腫瘍進行の最初期段階は同定できない。

【0083】

本発明は、被験体の腫瘍スコアを *in vitro* または *ex vivo* で決定するための方法に関し、前記方法は、

(a) 前記被験体由来の生体サンプルを、CXCR4 と特異的に結合することができる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体と接触させる工程、

(b) 前記生体サンプルにおいて前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体とCXCR4 との結合レベルを定量する工程、および

(c) 前記被験体からの、前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の定量された結合レベルを適当な尺度と比較することにより、腫瘍をスコア化する工程を含んでなり、

前記抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体は、i) 次の3つのCDR、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2 および配列番号3の配列を有するCDR-H3を含んでなる重鎖と、ii) 次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2 および配列番号6の配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなることを特徴とする。

【0084】

好ましい実施形態では、診断のための抗体は、組織サンプルがホルマリン固定、ホルモル置換固定、Glyco-fix固定、パラフィン包埋および/または凍結された場合にも標的受容体と結合することができる。

【0085】

従来のいずれのハザード分析法を用いて、CXCR4 の予後値を評価してもよい。代表的な分析法としてCox回帰分析があり、これは打ち切り例の存在下で生存率または時間-事象データをモデル化するためのセミパラメトリック法である(Hosmer and Lemeshow, 1999、Cox, 1972)。例えば生命表またはKaplan-Meierなどの他の生存率分析とは対照的に、Coxでは、モデルに予測因子変量(共変量)を含むことができる。例えばCoxなどの従来の分析方法を用いて、原発腫瘍におけるCXCR4 発現の状態と、疾病再発(無病生存期間、もしくは転移性疾患までの期間)または疾病を原因とする死亡までの期間(全生存期間)のいずれかの時間-発生との相関に関する仮説を検証することができる。Cox回帰分析は、Cox比例ハザード分析としても知られている。この方法は、患者生存期間に対して腫瘍マーカーの予後値を検定するための標準法である。多変量様式を用いる場合には、いくつかの共変量の効果を、独立した予後値を有する個々の共変量、すなわち、最も有用なマーカーが同定できるように並行して検定する。陰性または陽性の「CXCR4 状態」という用語はまた、[CXCR4(-)]または[CXCR4(+)]とも表すことができる。

【0086】

サンプルは、癌の診断またはモニタリング中に「スコア化」することができる。スコア化は、その最も単純な形で、免疫組織化学によるサンプルの目視検査により判断してカテゴリー的陰性または陽性であり得る。より定量的なスコア化には、染色強度およびサンプリングされた染色「陽性」細胞の割合の2つのパラメーターを判断することを含む。

【0087】

本発明の意味の範囲内で「CXCR4 状態」は、免疫組織化学(IHC)、FACS、または当業者に公知の他の方法などの任意の方法により測定されるCXCR4 の発現レベルの決定に基づく、CXCR4 陽性[CXCR4(+)]またはCXCR4 陰性[CXCR4(-)]クラスへの腫瘍の分類に関する。

【0088】

本発明の一実施形態では、標準化を保証するために、サンプルをCXCR4 発現レベル

10

20

30

40

50

に関して異なる尺度でスコア化することができ、それらのほとんどは反応生成物の強度および陽性細胞の割合の評価に基づくものである (Payne et al., Predictive markers in breast cancer - the present, Histopathology 2008, 52, 82-90)。

【0089】

本発明による方法のより好ましい実施形態では、前記スコア化は、2つのパラメーター、すなわち、染色強度および陽性細胞の割合に基づく適当な尺度を使用することを含んでなる。

【0090】

第一の例として、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体のIHC評価に関するQuick Allredスコア化と同様に、サンプルは、反応性強度に関するスコアと染色細胞の割合に関するスコアを組み合わせた0~8の全体尺度で、CXCR4発現レベルに関してスコア化することができる (Harvey JM, Clarck GM, Osborne CK, Allred DC, J. Clin. Oncol. 1999, 17, 1474-1481)。より詳細には、反応性強度の第一の基準は、「無反応性」を0とし、「強い反応性」を3とする0~3の尺度でスコア化される。反応性比率の第二の基準は、「無反応性」を0とし、「67~100%の割合の反応性」を5とする0~5の尺度でスコア化される。この反応性強度スコアと反応性割合スコアを足して合計スコア0~8とする。

10

【0091】

合計スコア0~2は陰性とみなされ、合計スコア3~8は陽性とみなされる。

【0092】

この尺度によれば、本明細書で使用される腫瘍の陰性または陽性「CXCR4状態」とは、Allred尺度でそれぞれスコア0~2または3~8に相当するCXCR4の発現レベルを意味する。

20

【0093】

下表2は、IHC結果をAllred方法に従って解釈するための指針を示す。

【0094】

【表2】

表2

免疫反応性の強度	スコア1	生成反応性	スコア2
無反応性	0	無反応性	0
弱い反応性	1	<1%	1
中程度の反応性	2	1-10%	2
強い反応性	3	11-33%	3
	-	34-66%	4
	-	67-100%	5
合計スコア(スコア1 + スコア2)		解釈	
0-2		陰性	
3-8		陽性	

30

40

【0095】

好ましい実施形態では、本発明による方法は、適当な尺度、すなわち、無反応性を0とし、67~100%の割合の強い反応性とする0~8の尺度を意味する。

【0096】

本発明の別の実施形態には、被験体由来の腫瘍の状態をin vitroまたはex vivoで決定する方法が記載され、前記方法は、(a)被験体由来の腫瘍をAllred尺度に従ってスコア化する工程、および(b)Allredスコアが3~8である場合

50

に、腫瘍の状態が [C X C R 4 (+)] であると決定する工程、または (c) A l l r e d スコアが 0 ~ 2 である場合に、腫瘍の状態が [C X C R 4 (-)] であると決定する工程を含んでなる。

【 0 0 9 7 】

本発明の特定の面では、A l l r e d スコアが 3 である場合、腫瘍は [C X C R 4 (+)] である。

【 0 0 9 8 】

本発明の特定の面では、A l l r e d スコアが 4 である場合、腫瘍は [C X C R 4 (+)] である。

【 0 0 9 9 】

本発明の特定の面では、A l l r e d スコアが 5 である場合、腫瘍は [C X C R 4 (+)] である。

【 0 1 0 0 】

本発明の特定の面では、A l l r e d スコアが 6 である場合、腫瘍は [C X C R 4 (+)] である。

【 0 1 0 1 】

本発明の特定の面では、A l l r e d スコアが 7 である場合、腫瘍は [C X C R 4 (+)] である。

【 0 1 0 2 】

本発明の特定の面では、A l l r e d スコアが 8 である場合、腫瘍は [C X C R 4 (+)] である。

【 0 1 0 3 】

本発明の別の特定の面では、A l l r e d スコアが 3 ~ 8 である場合、腫瘍は [C X C R 4 (+)] である。

【 0 1 0 4 】

第二の例として、例えば H E R - 2 受容体の I H C 評価のための従来スコア化と同様に、染色強度（優先的には、膜染色）と染色を呈する細胞の割合を統合して 0 ~ 3 + の組合せ尺度とするやや簡単なスコア化法で、サンプルを C X C R 4 発現レベルに関してスコア化することができる。

【 0 1 0 5 】

簡略化尺度と呼ばれるこの尺度では、0 および 1 + は陰性であり、2 + および 3 + は陽性染色を表す。しかしながら、スコア 1 + ~ 3 + は、各陽性スコアがスコア 0（陰性）と比べた場合に再発および致死病的病勢の有意に高いリスクに関連している可能性があるので陽性と記録することができるが、これらの陽性スコア間の強度の増加がさらなるリスク軽減をもたらす得る。

【 0 1 0 6 】

一般に言えば、本明細書で使用される腫瘍の陰性または陽性の「C X C R 4 状態」は、それぞれ簡略化尺度でスコア 0 ~ 1 + または 2 + ~ 3 + に相当する C X C R 4 の発現レベルを意味する。浸潤性腫瘍の完全な周辺膜反応性だけが考慮されるべきであり、多くの場合、「金網」の様相に似ていた。現行の指針の下では、C X C R 4 に関してボーダーライン（スコア 2 + または 3 +）としてスコア化されたサンプルはさらなる評価を受ける必要がある。非限定例として、対照が予測通りではなく、人為的結果がほとんどのサンプルに関わり、サンプルが正常な乳管（内部対照）の強い膜性陽性を有して過剰な抗原賦活を示唆する場合には、I H C 分析は棄却し、繰り返すか、または F I S H または他の任意の方法によって試験すべきである。

【 0 1 0 7 】

より明瞭にするために、下表 3 にこれらのパラメーターをまとめる。

【 0 1 0 8 】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

CXCR4 状態	IHC の説明
0	無反応性または 10%未満の腫瘍細胞の膜反応性
1+	微弱/かろうじて認知できる膜反応性が 10%を超える腫瘍細胞に検出される。これらの細胞には膜部分にのみ免疫反応性がある。
2+	弱～中程度の完全な膜反応性が 10%を超える腫瘍細胞に見られる。
3+	強い完全な反応性が 10%を超える腫瘍細胞に見られる。

10

【0109】

20

好ましい実施形態では、本発明による方法は、適当な尺度、すなわち、腫瘍細胞の膜反応性無しを 0 とし、10%を超える腫瘍細胞の強い完全な反応性を 3+ とする、0~3+ の尺度に関する。

【0110】

より詳細には、上記のように、前記適当な尺度は、腫瘍細胞の膜反応性無しを 0 とし、10%を超える腫瘍細胞のかろうじて認知できる膜反応性を 1+ とし、10%を超える腫瘍細胞の弱～中程度の完全な膜反応性を 2+ とし、および 10%を超える腫瘍細胞の強い完全な反応性を 3+ とする、0~3 の尺度である。

【0111】

本発明の別の実施形態には、被験体由来の腫瘍の状態を *in vitro* または *ex vivo* で決定する方法が記載され、前記方法は、(a) 被験体由来の腫瘍を上記のような簡略化尺度に従ってスコア化する工程、および (b) スコアが 2+ または 3+ である場合に、腫瘍の状態が [CXCR4 (+)] であると決定する工程、または (c) スコアが 0 または 1+ である場合に、腫瘍の状態が [CXCR4 (-)] であると決定する工程を含んでなる。

30

【0112】

本発明の特定の面では、スコアが 2+ である場合、腫瘍は [CXCR4 (+)] である。

【0113】

本発明の特定の面では、スコアが 3+ である場合、腫瘍は [CXCR4 (+)] である。

40

【0114】

本発明の別の特定の面では、スコアが 2+ または 3+ である場合、腫瘍は [CXCR4 (+)] である。

【0115】

一般に、本発明による試験またはアッセイの結果は、様々な形式のいずれで提示してもよい。これらの結果は定性的に提示することができる。例えば、試験報告は特定のポリペプチドが検出されたか否かだけを、おそらくは検出限界の表示も添えて示すことができる。これらの結果は半定量的に表示してもよい。例えば、種々の範囲を定義してもよく、それらの範囲には定量的情報の特定の程度を示すスコア（例えば、使用尺度に応じて 0~3

50

+ または 0 ~ 8) を割り付けることができる。このようなスコアは、例えば、C X C R 4 が検出される細胞の数、シグナル強度 (C X C R 4 または C X C R 4 保持細胞の発現レベルを示し得る) などの種々の因子を反映することができる。これらの結果は、例えば、ポリペプチド (C X C R 4) が検出される細胞の割合、タンパク質濃度などとして、定量的に表示することができる。

【 0 1 1 6 】

当業者に認識されるように、試験により提供される出力のタイプは、その試験の技術的限界およびそのポリペプチドの検出に関連する生物学的有意性によって異なる。例えば、ある種のポリペプチドの場合、純粋に定性的な出力 (例えば、そのポリペプチドがある特定の検出レベルで検出されるか否か) が、有意な情報を与える。より定量的な出力 (例

10

【 0 1 1 7 】

本発明はまた、腫瘍形成性障害が抗 C X C R 4 抗体、またはそのフラグメントまたは誘導体による処置に感受性があるかどうかを決定するための方法も提供し、前記方法は、

(a) 被験体の腫瘍の C X C R 4 状態を本発明の方法に従って *in vitro* または *ex vivo* で決定する工程、および

(b) 前記状態が C X C R 4 (+) である場合に、前記腫瘍形成性障害は抗 C X C R 4 抗体、またはその a フラグメントまたは誘導体による処置に感受性があると決定する工程を含んでなる。

20

【 0 1 1 8 】

別の面において、本発明は、被験体において病的過剰増殖性腫瘍形成性障害または C X C R 4 の発現に関連する病態に対する感受性を診断する方法に関し、前記方法は、

(a) サンプルにおける C X C R 4 保持細胞の有無を決定する工程、および

(b) 前記 C X C R 4 保持細胞の有無に基づいて病態または病態に対する感受性を診断する工程を含んでなる。

【 0 1 1 9 】

本発明の方法において、C X C R 4 発現細胞の検出または C X C R 4 レベルの増加は一般に、C X C R 4 介在障害を有する、またはそれを呈する疑いのある患者の指標となる。

30

【 0 1 2 0 】

よって、本発明は、癌を発症する個体のリスクを予測するための方法を提供し、前記方法は、組織サンプルにおいて C X C R 4 の発現レベルを検出することを含んでなり、この場合、高レベルの C X C R 4 発現が癌を発症する高いリスクの指標となる。

【 0 1 2 1 】

C X C R 4 発現は数種の癌の進行した腫瘍病期と有意に関連していることが見出された (Schimanski et al., J Clin Oncol, ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1., 24(18S): 14018, 2006、Lee et al., Int J Oncol., 34(2):473-480, 2009、Pagano, Tesi di dottorato, Universita degli Studi di Napoli Federico II, 2008)。よって、本発明はまた、腫瘍の侵襲性を評価するための方法にも関する。本明細書において「腫瘍の侵襲性」とは、急速に増殖し、急速に拡散する傾向にある腫瘍を意味する。

40

【 0 1 2 2 】

一実施形態において、前記方法は、

(a) 腫瘍サンプルの細胞により発現された C X C R 4 のレベルを決定する工程、および

(b) 後の時点で同じ個体から採取した同等の組織サンプルにおいて発現された C X C R 4 のレベルを決定する工程、

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

を含んでなり、腫瘍サンプルにおける C X C R 4 発現の経時的な比が、癌進行のリスクに

50

関する情報を提供する。

【0123】

好ましい実施形態では、工程(a)で得られたレベルの、工程(b)で得られたレベルに対する比が1より大きい場合に、侵襲性を示す。別の実施形態では、比が1以下の場合に、非侵襲性を示す。

【0124】

本発明の別の面は、CXCR4標的療法 of 投与に 応答したCXCR4発現のモニタリングである。このようなモニタリングは、前記療法がCXCR4のダウンレギュレーションおよび/または分解を誘発する場合に極めて有用であり得る。

【0125】

特に、細胞表面でのCXCR4発現のモニタリングは、臨床試験および「個別化」療法の際に処置の有効性を評価するための重要なツールとなり得る。

【0126】

よって、本出願は、被験体にとって適当な治療計画を決定するための方法を提供する。

【0127】

CXCR4のレベルの増加または減少は、CXCR4に関連する癌の進展の指標となる。よって、CXCR4を発現する細胞の数の増加または様々な組織もしくは細胞中に存在するCXCR4の濃度の変化を測定することにより、CXCR4に関連する悪性腫瘍の改善を目的とする特定の治療計画が有効であるか否かを決定することができる。

【0128】

従って、本発明はまた、CXCR4に関連する腫瘍形成性障害に罹患している被験体において、前記障害を緩和するように計画された治療計画の有効性を決定するための方法を対象とし、前記方法は、

(a) 前記処置の第一の時点に相当する第一の生体サンプルにおいて、CXCR4の第一の発現レベルを決定する工程、

(b) 前記処置の後の第二の時点に相当する第二の生体サンプルにおいて、CXCR4の第二の発現レベルを決定する工程、

(c) 工程(a)で得られた前記第一の発現レベルの、工程(b)で得られた前記第二の発現レベルに対する比を計算する工程、および

(d) 工程(c)の比が1より大きい場合に、前記治療計画の有効性が高いと決定する工程、または

(e) 工程(c)の比が1以下である場合に、前記治療計画の有効性が低いと決定する工程

を含んでなる。

【0129】

好ましい実施形態では、CXCR4に関連する腫瘍形成性障害に罹患している被験体において前記障害を緩和するように計画された前記治療計画は、前記被験体にCXCR4阻害剤を投与することを含む。

【0130】

本発明の別の好ましい実施形態は、治療量のCXCR4阻害剤の投与から利益を受けるまたは受けないと予測される癌患者を選択するための方法に関し、前記方法は、

(a) CXCR4の発現レベルを本発明の方法に従って決定する工程、

(b) 工程(a)で得られた発現レベルを参照発現レベルと比較する工程、および

(c) (a)で得られた発現レベルの参照発現レベルに対する比が1より大きい場合に、その患者を治療量のCXCR4阻害剤の投与から利益を受けると予測されるとして選択する工程、または

(d) (a)で得られた発現レベルの参照発現レベルに対する比が1以下である場合に、その患者を治療量のCXCR4阻害剤の投与から利益を受けると予測されないとして選択する工程

を含んでなる。

10

20

30

40

50

【0131】

本明細書の意味において、「CXCR4阻害剤」という表現は、CXCR4と結合してリガンドの結合を阻害することができる任意の化合物または分子を包含することを意図する。非限定例として、CXCR4阻害剤には、AMD3100およびAMD3465が含まれる。使用可能な他のCXCR4阻害剤としては、限定されるものではないが、CTCE-0214、CTCE-9908、CP-1221（直鎖ペプチド、環状ペプチド、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、およびペプチド模倣化合物）、T140および類似体、4F-ベンゾイル-TN24003、KRH-1120、KRH-1636、KRH-2731、ポリフェムシン類似体、ALX40-4Cが挙げられる。さらに他のCXCR4阻害剤がWO01/85196、WO99/50461、WO01/94420、およびWO03/090512（これらはそれぞれ引用することにより本明細書の一部とされる）に記載されている。

10

【0132】

好ましい実施形態では、CXCR4阻害剤はモノクローナル抗体515H7からなる。

【0133】

最も好ましい実施形態では、前記CXCR4阻害剤はモノクローナル抗体515H7（WO2010/037831）である。

【0134】

また、単量体および/またはホモ二量体としてのCXCR4の発現に関連する腫瘍形成性障害の*in vivo*画像法を提供することも本発明の目的である。このような方法は、*in vivo*で腫瘍を位置決定するため、ならびにその浸潤性をモニタリングするために有用である。同様に、前記方法は、単量体/ホモ二量体CXCR介在癌を有すると従前に診断された患者において進行および/または処置に対する応答をモニタリングするためにも有用である。

20

【0135】

一実施形態において、本発明は、被験体においてCXCR4発現腫瘍の位置を検出するための方法に関し、前記方法は、

a) 抗体I-3859、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体を前記被験体に投与する工程、および

b) 前記抗体の結合を検出する工程
を含んでなり、前記結合が腫瘍の存在を示す。

30

【0136】

別の実施形態では、本発明は、被験体においてCXCR4発現する腫瘍の位置を検出するための方法に関し、前記方法は、

(a) 抗体I-3859、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体を被験体に投与する工程、および

(b) 前記抗体の結合を検出する工程
を含んでなり、前記結合が腫瘍の位置を示す。

【0137】

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

40

【0138】

別の面において、本発明は、*in vivo*造影試薬を提供し、前記試薬は、本発明による抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体を含んでなり、前記抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体は、好ましくは標識され、より好ましくは放射性標識される。前記試薬は、CXCR4介在癌に罹患している患者に、薬学上有効な担体と組み合わせ投与することができる。

【0139】

本発明はまた、CXCR4介在癌に罹患している患者の医学的画像法における前記試薬の使用を企図する。

50

【0140】

本発明の方法は、

(a) 前記患者に画像法に有効な量の造影試薬を投与する工程、および

(b) 前記試薬を検出する工程

を含んでなる。

【0141】

一実施形態において、本発明の方法は、前記患者におけるCXCR4発現腫瘍の存在の検出を可能とする。別の実施形態では、本発明の方法は、前記患者におけるCXCR4発現腫瘍の位置の検出を可能とする。

【0142】

好ましい実施形態では、造影剤は、標的化部分と活性部分を含んでなる。

【0143】

本明細書において用語「標的化部分」とは、細胞表面のCXCR4を特異的に認識して結合する薬剤を意味する。特定の実施形態では、標的化部分は、CXCR4と特異的に結合する抗体またはそのフラグメントまたは誘導体である。具体的には、この標的化部分は、上記のような抗体またはそのフラグメントまたは誘導体である。好ましくは、標的化部分はI-3859抗体である。

【0144】

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

【0145】

造影剤は、ヒトなどの哺乳動物における診断使用に有効な量で投与され、次いで、造影剤の局在および蓄積が検出される。造影剤の局在および蓄積は、放射性核種画像法、ラジオシンチグラフィ、核磁気共鳴画像法、コンピューター断層撮影法、陽電子放射型断層撮影法、コンピューター体軸断層撮影法、X線または磁気共鳴画像法、蛍光検出、および化学発光検出により検出することができる。

【0146】

標的化抗腫瘍療法の開発については、免疫組織学的技術による診断によって、受容体の発現レベルに関する*in situ*情報が得られる(例えば、腫瘍の大きさおよび/または位置など)。よって、この診断により、このような処置に必要な受容体の発現レベルに従って、処置に感受性のある患者を選択することができる。

【0147】

より詳細には、CXCR4発現レベルは、優先的には蛍光活性化細胞選別(FACS)または免疫組織化学(IHC)により測定される。

【0148】

FACS分析は、免疫学および血液学において、ヘテロな細胞懸濁液内の種々の細胞集団の存在を評価するためにもっぱら使用される。FACS分析に利用可能なモノクローナル抗体の数は極めて多く、それらを種々の蛍光色素と結合させ、容易な多重抗原染色が可能である。免疫表現型は、血液性悪性腫瘍の診断において不可欠なパラメーターである。FACS分析は、血液性悪性腫瘍の疑いのある骨髄、末梢血サンプルおよび組織生検の分析に使用される(Martinez A. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 2003 56B 8-15)。例えば、Fiedler W et al. (Fiedler W. Blood 2003 102 2763-2767)は、AML患者を、VEGF受容体1および2、c-キット、SCF受容体およびfms様チロシンキナーゼ-3(FLT3)のリン酸化を阻害する小分子SU5416による処置の前に、c-キット発現に関してスクリーニングするためのFACS分析の使用を報告している。

【0149】

「生体サンプル」は、被験体から採取され得るいずれのサンプルであってもよい。この

10

20

30

40

50

ようなサンプルは、本発明のバイオマーカーの発現レベルの決定を可能としなければならない。よって、サンプルの性質は、腫瘍の性質に依存する。活性化型の A k t および / または E r k タンパク質の検出による前記バイオマーカーの発現レベルの決定に好ましい生体サンプルとしては、癌が液性腫瘍の場合には、血液サンプル、血漿サンプル、またはリンパ液サンプルなどのサンプルが含まれる。「液性腫瘍」とは、本明細書では、血液または骨髄の腫瘍、すなわち、白血病および多発性骨髄腫などの血液性悪性腫瘍を意味する。好ましくは、生体サンプルは血液サンプルである。実際に、このような血液サンプルは、患者からの全く無害な採血によって得ることができ、従って、C X C R 4 阻害剤応答または不応表現型の非侵襲的診断を可能とする。

【 0 1 5 0 】

本明細書において「生体サンプル」はまた、癌が固形癌である場合には、被験患者の固形癌サンプルも含む。このような固形癌サンプルに対して、当業者は本発明のバイオマーカーのレベルの、いずれのタイプの測定も実施することができる。場合によっては、本発明による方法は、患者から固形癌サンプルを採取する予備工程をさらに含んでなり得る。「固形癌サンプル」とは、腫瘍組織サンプルを意味する。癌患者であっても、腫瘍部位の組織は非腫瘍性の健康な組織をなお含んでいる。よって、「癌サンプル」は、患者から採取された腫瘍組織に限定されるべきである。前記「癌サンプル」は、生検サンプルまたは外科的切除療法から採取されたサンプルであり得る。

【 0 1 5 1 】

一面によれば、患者由来のサンプルは癌細胞または癌組織である。

【 0 1 5 2 】

このサンプルは、当業者に公知の方法によって採取可能であり、必要であれば調製することができる。

【 0 1 5 3 】

本発明において癌細胞または癌組織は特に限定されない。

【 0 1 5 4 】

本明細書において用語「癌」とは、典型的には調節を欠いた細胞増殖を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を意味するか、または表す。本明細書において用語「癌」および「癌性」とは、該疾患の総ての病期を包含することを意味する。よって、本明細書において「癌」は、良性腫瘍および悪性腫瘍の両方を含み得る。癌の例としては、限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ形悪性腫瘍が挙げられる。より具体的には、本発明による癌は、扁平上皮細胞癌（例えば、扁平上皮細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌肺および肺扁平上皮癌を含む）、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)（消化管癌および消化管間質癌を含む）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌(kidney or renal cancer)、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、表在拡大型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、肢端黒子型黒色腫、結節性黒色腫、多発性骨髄腫および B 細胞リンパ腫（低悪性度 / 濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）、小リンパ球型（SL）NHL、中悪性度 / 濾胞性 NHL、中悪性度びまん性 NHL、高悪性度免疫芽球性 NHL、高悪性度リンパ芽球性 NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性 NHL、巨大病変 NHL、マンツル細胞リンパ腫、AIDS 関連リンパ腫、およびワルデンストロームマクログロブリン血症）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、有毛細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病（CML）、急性骨髄芽球性白血病（AML）、および移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびに母斑症に関連する異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍に関連するものなど）、メイグス症候群、脳ならびに頭頸部癌、および関連の転移を含んでなる群から選択される。

【 0 1 5 5 】

好ましい実施形態では、前記癌は、前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、卵巣癌、膵臓癌および結腸癌から選択される。より好まし

10

20

30

40

50

い実施形態では、前記癌は、リンパ腫細胞、白血病細胞または多発性骨髄腫細胞を含んでなる。

【0156】

C X C R 4 の発現レベルは有利には、対照細胞またはサンプルにおけるレベル（「参照レベル」または「参照発現レベル」とも呼ばれる）に対して比較または測定される。「参照レベル」、「参照発現レベル」、「対照レベル」および「対照」は、本明細書では互換的に使用される。「対照レベル」とは、一般に疾病または癌を含まない比較可能な対照細胞において測定される、独立したベースラインレベルを意味する。癌患者であっても、腫瘍部位の組織は非腫瘍性の健康な組織をなお含んでいるので、前記対照細胞は同じ個体由来してもよい。前記対照細胞はまた、正常なまたは罹患もしくは試験サンプルが得られた個体とは同じ疾患を呈さない別の個体由来してもよい。本発明の範囲内で用語「参照レベル」とは、患者の癌細胞含有サンプルにおける C X C R 4 発現の試験レベルを評価するために使用される C X C R 4 発現の「対照レベル」を意味する。例えば、患者の生体サンプルにおける C X C R 4 レベルが C X C R 4 の参照レベルよりも高い場合には、それらの細胞は C X C R 4 の高レベルの発現または過剰発現を有するとみなされる。参照レベルは複数の方法によって決定することができる。従って、発現レベルは、C X C R 4 保有細胞、あるいはまた C X C R 4 発現細胞の数とは独立に C X C R 4 発現レベルを定義することができる。従って、各患者の参照レベルは C X C R 4 の参照比によって規定することができ、この場合、この参照比は、本明細書に記載される参照レベルを決定するための方法のいずれによって決定してもよい。

10

20

【0157】

例えば、対照は所定の値であってもよく、様々な形態を採り得る。対照は、中央値または平均値などの単一のカットオフ値であってもよい。「参照レベル」は、どの患者にも個々に等しく適用可能な単一の数値であってもよく、または参照レベルは、患者の特定の部分集団によって異なってもよい。よって、例えば、同じ癌でも年齢が高い人は若い人とは異なる参照レベルを持つ場合があり、また、同じ癌でも女性は男性とは異なる参照レベルを持つ場合がある。あるいは、「参照レベル」は、試験する新生細胞の組織と同じ組織からの非腫瘍形成性癌細胞における C X C R 4 の発現レベルを測定することにより決定することもできる。同様に、「参照レベル」は、患者の新生細胞における C X C R 4 の、同じ患者内の非腫瘍細胞における C X C R 4 レベルに対する特定の比であってもよい。「参照レベル」はまた、*in vitro* 培養細胞の C X C R 4 レベルであってもよく、これらの培養細胞は腫瘍細胞を模倣するように操作することができるか、または参照レベルを正確に決定する発現レベルをもたらす他の任意の方法で操作することができる。他方、「参照レベル」は、C X C R 4 レベルが上昇していない群と C X C R 4 レベルが上昇している群などの比較群に基づいて設定することができる。比較群のもう一つの例は、特定の疾患、病態または症状を有する群とその疾患を有さない群であろう。この所定の値は、構成/配置された、例えば、集団が低リスク群、中リスク群および高リスク群などの群に均等に（または不均等に）分けられる場合には調整することができる。

30

【0158】

参照レベルはまた、同じ癌を有する患者集団における C X C R 4 レベルの比較によって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って達成することができ、この分析では、患者の全コホートをグラフ表示し、第一軸は C X C R 4 レベルを表し、第二軸はその腫瘍細胞が所与のレベルで C X C R 4 を発現するコホートの患者数を表す。同等または類似の C X C R 4 レベルを有するコホートの亜集団を特定することにより、2以上の独立した患者群を決定することができる。次に、これらの独立した群を最もよく識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。参照レベルはまた、2以上のマーカー（そのうちの一つが C X C R 4 である）のレベルを表すこともできる。2以上のマーカーは、例えば各マーカーのレベルの値の比によって表すことができる。

40

【0159】

同様に、見かけ上健康な集団は、C X C R 4 の発現に関連する病態を有することが知ら

50

れている集団が有するであろうものとは異なる「正常な」範囲を有する。従って、選択される所定の値は、ある個体が属するカテゴリーを考慮することができる。適当な範囲およびカテゴリーは、当業者ならば慣例の実験だけを用いて選択することができる。「上昇した」、「増加した」とは、選択された対照に比べて高いことを意味する。一般に、対照は、適当な年齢層の見かけ上健康な正常個体に基づく。

【0160】

また、本発明による対照は、所定の値の他、試験材料と並行して試験される材料のサンプルであってよいことも理解されよう。例としては、同じ被験体から同時に得られた組織または細胞、例えば、単一の生検の一部、または被験体由来の単一の細胞サンプルの一部が挙げられる。

10

【0161】

別の実施形態では、本発明は、標識されかつ *in vivo* で CXCR4 と結合する上記モノクローナル抗体またはそのフラグメントと、薬学上許容される担体とを含んでなる、CXCR4 の発現に関連する腫瘍形成性障害の *in vivo* 画像法のための医薬組成物に関する。

【0162】

本発明の別の面において、このような診断または予後法に有用なキットが提供され、前記キットは本発明の抗体、またはそのフラグメントまたは誘導体を含んでなる。

【0163】

CXCR4 発現腫瘍の存在および/または位置を検出するために有用なキットは、
 a) i) 次の3つのCDR、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2および配列番号3の配列を有するCDR-H3を含んでなる重鎖と、ii) 次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2および配列番号6の配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体、
 b) 次の3つのCDR、それぞれ配列番号1の配列を有するCDR-H1、配列番号2の配列を有するCDR-H2および配列番号3の配列を有するCDR-H3を含んでなる重鎖と、配列番号8の配列を含んでなる軽鎖可変領域とを有する抗体、
 c) 配列番号7の配列を含んでなる重鎖可変領域と、次の3つのCDR、それぞれ配列番号4の配列を有するCDR-L1、配列番号5の配列を有するCDR-L2および配列番号6の配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖とを有する抗体、
 d) 配列番号7の配列を含んでなる重鎖可変領域と、配列番号8の配列を含んでなる軽鎖可変領域とを有する抗体
 のうちの少なくとも一つを含み得る。

20

30

【0164】

所定量の試薬の組合せを診断アッセイの実施に関する説明書とともに含んでなるパッケージされた材料、例えばキットも本発明の範囲内にある。本キットは、*in vitro* で、例えばELISAにおいて、CXCR4を検出および定量するための抗体を含有する。本発明の抗体は、*in vitro* で、例えばELISAにおいて、CXCR4を検出および定量するためのキット内に提供することができる。抗体を酵素で標識する場合、本キットは、酵素が必要とする基質および補因子（例えば、検出可能な発色団または蛍光団を提供する基質前駆体）を含む。さらに、安定剤、バッファー（例えば、ブロックバッファーまたは溶解バッファー）などの他の添加剤を含んでもよい。このようなキットは、バイアル、試験管などの1以上の容器を収容するための区画化された受器を含んでなるとよく、このような容器は本発明の独立した要素を保持する。例えば、一つの容器は不溶性または部分的可溶性の担体と結合された第一の抗体を含んでよい。第二の容器は、可溶性の検出可能なように標識された第二の抗体を凍結乾燥形態または溶液として含有してよい。受器はまた、検出可能なように標識された第三の抗体を凍結乾燥形態または溶液として保持する第三の容器も含んでよい。この性質のキットは、本発明のサンドイッチアッセイで

40

50

使用可能である。ラベルまたは添付文書により、本組成物の説明ならびに意図される *in vitro* または診断使用に関する説明を提供してもよい。

【0165】

種々の試薬の相対量は、試薬溶液中で、アッセイの感受性を実質的に最適化する濃度を提供するように広範囲で変更可能である。特に、これらの試薬は、賦形剤を含む乾燥粉末、通常は凍結乾燥品として提供することができ、溶解時に適当な濃度の試薬溶液となる。

【0166】

本発明のなおさらなる面では、本明細書で詳細に示されるモノクローナル抗体またはその結合フラグメントは、検出可能な部分で標識されたものが提供され、これにより、上述の抗原を有する細胞を診断または同定するために、例えばキットとしてそれらをパッケージし、使用することができる。このような標識の限定されない例としては、フルオレセインイソチオシアネートなどの蛍光団、発色団、放射性核種、ビオチンまたは酵素が挙げられる。このような標識された抗体または結合フラグメントは、例えば、抗原の組織学的局在、ELISA、細胞選別、ならびにCXCR4およびこの抗原を保持する細胞を検出または定量するための他の免疫学的技術に使用可能である。

10

【0167】

また、細胞からのCXCR4の精製または免疫沈降に対する陽性対照として有用なキットも提供される。CXCR4の単離および精製のため、このキットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）に結合された本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含有し得る。*in vitro*で、例えばELISAにおいて、CXCR4を検出および定量するための抗体を含有するキットを提供することができる。このキットは、容器と、容器上のまたは容器に添えられたラベルまたは添付文書を含んでなる。この容器は、少なくとも本発明の抗体I-3859、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体を含んでなる組成物を保持する。例えば、希釈剤およびバッファー、対照抗体を含む付加的な容器が含まれてもよい。このラベルまたは添付文書は、本組成物の説明ならびに意図される *in vitro* または診断使用に関する説明を提供し得る。

20

【0168】

より詳細には、本発明は、本発明の方法により腫瘍のCXCR4状態を決定するためのキットに関する。好ましい実施形態では、実施例に記載するように、本発明は、IHCおよび/またはFACS法により腫瘍のCXCR4状態を決定するためのキットに関する。

30

【0169】

特定の実施形態では、本発明は、少なくとも上記の抗体I-3859、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体（該抗体は標識されている）を含んでなるキットからなる。

【0170】

好ましい実施形態では、本発明によるキットは、前記抗体I-3859とCXCR4の間の結合の程度を検出するために有用な試薬をさらに含んでなる。

【0171】

別の好ましい実施形態では、CXCR4発現腫瘍において *in vitro* または *ex vivo* でCXCR4の発現レベルを決定するために有用な本発明のキットは、前記標識抗体とCXCR4の間の結合のレベルを定量するために有用な試薬をさらに含んでなる。

40

【0172】

さらに別の実施形態では、本発明によるキットは、i) 前記標識抗体とCXCR4の間の結合の程度を検出するために有用な試薬、およびii) CXCR4発現レベルのスコア化に有用な陽性および陰性対照サンプルをさらに含んでなる。

【0173】

前記キットはネズミ抗体に特異的なポリクローナル抗体をさらに含んでなってもよく、好ましくは、前記のネズミ抗体に特異的なポリクローナル抗体は標識されている。

【0174】

50

本発明の特定の実施形態によれば、CXCR4阻害剤の治療的投与から利益を受けるまたは利益を受けないと予測される癌患者を *in vitro* で選択するためのキットは、
i) 前記抗体とCXCR4の間の結合の程度を検出するために有用な試薬、ii) CXCR4阻害剤に対する感受性と相関させた対照レベル、および/またはiii) CXCR4阻害剤に対する耐性と相関させた対照レベルを含んでなり得る。

【0175】

本発明はまた、好ましくは標識された、特に放射性標識された本発明による抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体から構成される *in vivo* または *ex vivo* における診断試薬、および医学的画像法における、特に、CXCR4の細胞発現または過剰発現に関連する癌の検出のためのその使用にも関する。

10

【実施例】

【0176】

実施例1：抗CXCR4 I-3859モノクローナル抗体(Mab)の作製

CXCR4に対するモノクローナル抗体を作製するために、Balb/cマウスを組換えNIH3T3-CXCR4細胞および/またはCXCR4細胞外N末端およびループに相当するペプチドで免疫した。初回免疫時に6~16週齢のマウスをフロイントの完全アジュバント中の抗原で皮下(s.c.)免疫した後、フロイントの不完全アジュバント中の抗原で2~6回s.c.免疫を行った。後眼窩採血により免疫応答をモニタリングした。血清をELISA(下記の通り)によりスクリーニングし、より高力価の抗CXCR4抗体を有するマウスを融合に用いた。マウスの静脈内に抗原を追加免疫し、2日後に犠牲にし、脾臓を摘出した。

20

【0177】

ELISA

抗CXCR4抗体を産生するマウスを選択するために、免疫マウスからの血清をELISAにより検査した。簡単に述べると、マイクロタイプレートを、BSAに結合された精製[1-41]N末端ペプチド、5μg相当のペプチド/mL、100μL/ウェルでコーティングし、4℃で一晩インキュベートした後、PBS中0.5%ゼラチン250μL/ウェルでブロックした。CXCR4免疫マウスからの血漿の希釈液を各ウェルに加え、37℃で2時間インキュベートした。これらのプレートをPBSで洗浄した後、HRPに結合されたヤギ抗マウスIgG抗体(Jackson Laboratories)とともに37℃で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをTMB基質で発色させ、5分後に100μL/ウェルの1M H₂SO₄を添加することにより反応を停止させた。最も高力価の抗CXCR4抗体を生成したマウス抗体の作製に用いた。

30

【0178】

CXCR4に対するMabを産生するハイブリドーマの作製

最も高い力価の抗CXCR4抗体を生成したBalb/cマウスから単離したマウス脾細胞を、PEGを用いて、マウス骨髄腫細胞株Sp2/Oと融合させた。細胞をマイクロタイプレートにおよそ1×10⁵/ウェルで再播種した後、ultra culture培地+2mM L-グルタミン+1mMピルビン酸ナトリウム+1×HATを含有する選択培地で2週間インキュベートした。次に、ウェルをELISAにより、抗CXCR4モノクローナルIgG抗体に関してスクリーニングした。その後、抗体を分泌するハイブリドーマを限界希釈法により少なくとも2回サブクロニングし、*in vitro* で培養し、さらなる分析のために抗体を作製した。

40

【0179】

実施例2：I-3859 MabはCXCR4単量体およびホモ二量体の両方を免疫沈降させる

NIH3T3-CXCR4細胞ペレットを、100mM(NH₄)₂SO₄を含有する20mM TrisHCl、pH8.5で洗浄した後、溶解バッファー(100mM(NH₄)₂SO₄、10%グリセロール、1%CHAPSおよび10μL/mLプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する20mM TrisHCl、pH8.5)に懸濁させた。

50

細胞をPotter Elvehjemホモジナイザーで破碎した。可溶化した膜を105000gにて+4で1時間の遠心分離により回収した後、+4で一晩、I3859 Mab結合セファロース4Bビーズとともにインキュベートし、混合物をガラスカラムに注ぎ、溶解バッファーで洗浄した。I3859 Mabによって捕捉されたタンパク質を溶出させ、抗CXCR4 Mabを一次抗体として用いるウエスタンブロットにより分析した。注目する画分をプールし、濃縮し、WB分析および分取SDS-PAGE分離(4~12% Bis-Trisゲル)の両方に使用した。

【0180】

銀染色の後、目的のバンドをゲルから切り出し、自動タンパク質消化システム、Mass PREPステーション(Waters、ミルフォード、MA、USA)を用いてゲル内消化を施した。これらのゲルスポットを50 μ Lの25mM NH₄HCO₃(Sigma、シュタインハイム、ドイツ)および50 μ Lのアセトニトリル(Carlo Erba Reactifs-SDS、ヴァル・ド・ルイユ、フランス)で2回洗浄した。システイン残基を25mM NH₄HCO₃中に調製した10mM DTT 50 μ Lにより、60で1時間還元し、25mM NH₄HCO₃中に調製した55mMヨードアセトアミド(Sigma)50 μ Lにより、室温で20分間アルキル化した。これらのゲルスポットをアセトニトリルで脱水した後、室温で、25mM NH₄HCO₃中12.5ng/ μ L修飾ブタトリプシン(Promega、マディソン、WI、USA)10 μ Lを加えることにより、これらのタンパク質をゲル内で一晩消化した。生じたペプチドを、5%ギ酸を含有する60%アセトニトリル(Riedel-de Haen、ゼールツェ、デンマーク)35 μ Lで抽出した後、余分なアセトニトリルを除去し、nano-LC-MS/MSを行った。nanoLC-MS/MS分析中に回収された質量データを処理し、*.mgfファイルに変換し、MASCOT(商標)検索エンジンにかけた。検索はMSおよびMS/MSモードにて測定許容差0.25Daで実施した。

【0181】

図1は、I-3859 Mab結合セファロースビーズを用いた免疫沈降後の、溶出濃縮画分のウエスタンブロット分析を示す。見掛けの分子量43および75kDaの2つのバンドが、一次抗体として用いた抗CXCR4 Mabにより染色された。

【0182】

I-3859 Mab結合セファロースビーズを用いた免疫沈降後の溶出濃縮画分はSDS-PAGEによっても分離し、銀染色により可視化した。43および75kDaのバンドをゲルから切り出し(図2B)、トリプシンで消化し、上記のようにLC-MS/MSにより分析した。採集されたピークリストをMascotのペプチド配列データベース検索にかけた。CXCR4は下記のように両バンドで同定された。

次の5つのCXCR4ペプチドがMASCOT(商標)検索エンジンにより75kDaのバンドで同定された：N末端CXCR4に含まれる31~38のペプチドEENANFNK、細胞内ループ1に含まれる71~77のペプチドSMTDKYR、C末端に含まれる311~322のペプチドTSAQHALLTSVSR、312~322のペプチドSAQHALLTSVSR、313~322のペプチドAQHALLTSVSR。

【0183】

9つのCXCR4ペプチドがMASCOT(商標)検索エンジンにより43kDaのバンドで同定された：N末端に含まれる27~30のペプチドPCFR、31~38のペプチドEENANFNK、細胞内ループ1に含まれる71~77のペプチドSMTDKYR、細胞内ループ2に含まれる135~143のペプチドYLAIVHATNおよび135~146のペプチドYLAIVHATNSQR、C末端に含まれる311~319のペプチドTSAQHALLTS、311~322のペプチドTSAQHALLTSVSR、312~322のペプチドSAQHALLTSVSR、313~322のペプチドAQHALLTSVSR。

【0184】

この試験で得られた結果は明らかに、I-3859 MabがCXCR4を免疫沈降さ

せ得ることを示す。I - 3859 Mabは単量体および二量体の両方としてのCXCR4を認識する。

【0185】

実施例3： BRET分析によれば、I - 3859 MabはCXCR4ホモ二量体およびCXCR4 / CXCR2ヘテロ二量体の両方を調節する

この機能アッセイは、SDF-1および/またはI - 3859 MabがCXCR4受容体に結合する際に誘導される、CXCR4ホモ二量体およびCXCR2 / CXCR4ヘテロ二量体形成のレベルでのコンフォメーション変化の評価を可能とする。

【0186】

従来の分子生物学的技術を適用することにより、検討する各相互作用相手のための発現ベクターを、対応する色素（ウミシイタケ(Renilla reniformis)ルシフェラーゼRlucおよび黄色蛍光タンパク質YFP)との融合タンパク質として構築した。BRET試験を実施する2日前に、HEK293細胞を、対応するBRET相手、すなわち、CXCR4ホモ二量体形成を検討するためには[CXCR4 / Rluc + CXCR4 / YFP]をコードする発現ベクターで、また、CXCR4およびCXCR2ヘテロ二量体形成を検討するためには[CXCR4 - Rluc + CXCR2 - YFP]で一過性にトランスフェクトした。翌日、細胞を、ポリリシンをプレコーティングした白色96MWプレートの完全培養培地[10%FBSを添加したDMEM]に分注した。細胞をまず、37、CO₂ 5%で培養してプレートに細胞を接着させた。次に、細胞を200μl DMEM / ウェルで一晩飢餓状態にした。BRET試験の直前に、DMEMを除去し、細胞をPBSで手早く洗浄した。次に、細胞をPBS中、抗体の存在下または非存在下、37で15分間インキュベートした後、最終容量50μl中、SDF-1を含むまたは含まないセレンテラジンH 5μを添加した。37で5分間インキュベートし、さらに室温で5分間インキュベートした後、Mithras LB940マルチラベルリーダー(Berthold)を用い、485nmおよび530nmで発光取得を開始した(1秒/波長/ウェル、室温で15回反復)。

10

20

【0187】

BRET比の計算は、従前に記載されている通りに行った(Angers et al., 2000): [(放出_{530nm}) - (放出_{485nm}) × Cf] / (放出_{485nm})、ここで、同じ試験条件下でRluc融合タンパク質単独を発現する細胞については、Cf = (放出_{530nm}) / (放出_{485nm})。この式を簡単に見れば、BRET比は、2つのBRET相手が存在する場合に得られる530 / 485nm比を、アッセイ中にRlucと融合した相手だけが存在する場合に同じ試験条件下で得られる530 / 485nm比で補正したものに相当することが示される。読み取りやすくするために、結果は基本シグナルに対する割合で表す。

30

【0188】

SDF1(300nM)を添加すると、CXCR4受容体と融合したアダプターおよびアクセプタータンパク質が空間的に近接することにより、BRETシグナルの約20%の増強が誘発された。この増強はおそらくは、CXCR4 / CXCR4ホモ二量体の形成が既存の二量体のコンフォメーション変化かのいずれかを示す(図2A)。I - 3859 Mabは、SDF-1により誘発されるCXCR4ホモ二量体のコンフォメーション変化を調節することができた(SDF-1により誘発されるBRET増強の69%阻害)。I - 3859 Mabはまた、それ自体により、CXCR4 / CXCR4の空間的近接を調節することもできたが、これはCXCR4 / CXCR4ホモ二量体コンフォメーションへのI - 3859 Mabの影響を示唆する(図2A)。

40

【0189】

CXCR4およびCXCR2受容体の空間的近接によるBRETシグナルは、SDF1(300nM)に应答して約20%低下した。この結果はCXCR4 / CXCR2ヘテロ二量体形成または既存の二量体のコンフォメーション変化を示唆する(図2B)。I - 3859 Mabは、SDF-1により誘発されるCXCR2 / CXCR4ヘテロ二量体の

50

コンフォメーション変化を調節することができ、SDF-1により誘発されるBRETの低下の阻害割合は約100%であり、また、それ自体により、CXCR4/CXCR2の空間的近接を調節することもでき、これはCXCR4/CXCR2ヘテロ二量体コンフォメーションへのI-3859 Mabの影響を示唆する(図2B)。

【0190】

実施例4： FACS分析によれば、I-3859 Mabは細胞表面に存在するCXCR4を認識する

この試験では、I-3859 MabとヒトCXCR4の特異的結合をFACS分析により検討した。

【0191】

NIH3T3、NIH3T3-hCXCR4トランスフェクト細胞、MDA-MB-231、Hela、およびU937癌細胞株をI-3859モノクローナル抗体とともにインキュベートした。次に、これらの細胞を1%BSA/PBS/0.01%NaN₃で洗浄した。次に、Alexaで標識した二次抗体を細胞に加え、4で20分間インキュベートした。その後、これらの細胞を再び2回洗浄した。2回目の洗浄の後、FACS分析を実施した。これらの結合試験の結果は図3に示され、これらの結果は、抗CXCR4 Mab I-3859がヒトCXCR4-NIH3T3トランスフェクト細胞株と結合することを示すが[平均蛍光強度(MFI)]、親NIH3T3細胞は認識しない(示されていない)。このMabはまた、ヒト癌細胞株、例えば、MDA-MB-231乳癌細胞(10μg/ml濃度でのMFI=59)、U937前骨髄球性癌細胞(10μg/ml濃度でのMFI=246)およびHela子宮頸癌細胞(10μg/ml濃度でのMFI=633)も認識することができたが、このことはこれらの細胞株が天然にCXCR4を過剰発現することを示している。

【0192】

実施例5： FACS分析によれば、I-3859 Mabは細胞膜におけるCXCR4との結合に関して、抗CXCR4 515H7治療用Mabとの競合状態に入る

この試験では、I-3859および515H7 MabのヒトCXCR4への結合の競合をFACS分析により検討した。

【0193】

NIH3T3-hCXCR4トランスフェクト細胞を、ビオチン化515H7 Mab(5μg/ml)[NIH3T3-CXCR4細胞を認識した(図4A)]およびI-3859 Mabまたは515H7 Mabのいずれか(0~1mg/ml)とともに4で1時間インキュベートした。次に、これらの細胞を1%BSA/PBS/0.01%NaN₃で洗浄した。次に、標識したストレプトアビジンを細胞に加え、4で20分間インキュベートした。その後、これらの細胞を再び2回洗浄した。2回目の洗浄の後、FACS分析を実施した。これらの結合試験の結果を図4Bに示す。これらの結果は、抗CXCR4 Mab I-3859が、ヒトCXCR4-NIH3T3トランスフェクト細胞への結合に関して、抗CXCR4 515H7治療用Mabと競合するという[平均蛍光強度(MFI)]を示す。予測されたように、非標識515H7 Mabも、ビオチン化515H7 MabのCXCR4との結合を阻害した。

【0194】

実施例6： 無胸腺ヌードマウスにおけるMDA-MB-231異種移植腫瘍成長モデルでのI-3859 Mab活性の評価

この試験の目的は、抗CXCR4 Mab I-3859の、無胸腺ヌードマウスにおけるMDA-MB-231異種移植片の成長を阻害する能力を評価することであった。

【0195】

ECCCから入手したMDA-MB-231細胞をDMEM培地(Invitrogen Corporation、スコットランド、UK)、10%FCS(Sigma、セントルイス、MD、USA)を常法により培養した。細胞群を移植48時間前に分割し、従って、これらの細胞は指数増殖期にあった。PBS中、1千万個のMDA-MB-2

10

20

30

40

50

31細胞を、7週齢の無胸腺ヌードマウス(Harlan、フランス)に移植した。移植5日後に、腫瘍は測定可能であり($34\text{ mm}^3 < V^3 < 40\text{ mm}^3$)、これらのマウスを匹敵する腫瘍サイズを有する12個体の群に分けた。マウスを負荷用量2mg/マウスのI-3859 Mabでi.p.処置した。次に、マウスに1mg/用量/マウスのI-3859 Mabを週に2回注射した。この試験には、対照群としてPBS群を導入した。腫瘍体積は、週に2回測定し、式： $V = \frac{1}{6} \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ により計算した。統計分析は測定ごとにマン・ホイットニー検定を用いて行った。

【0196】

この試験では、処置中に死亡は見られなかった。PBS群に比べ、I-3859 Mab(1mg/用量)の31日目では腫瘍成長の有意な阻害は見られなかった。処置4週間後の平均腫瘍体積は、PBSに対してI-3859 Mabによって減少することは無かった(図5)。

10

【0197】

実施例7：免疫組織化学的研究(IHC)

切片を脱パラフィンし、再水和させ、熱誘導エピトープ賦活化(heat-induced epitope retrieval)のために、37で10分間、予温プロテアーゼ1バッファー(Ventana Medical system)中に置いた。Trisバッファー生理食塩水-0.05% tween 20(TBS-T)(Dako S3006)で3回洗浄した後、内因性のペルオキシダーゼ活性をペルオキシダーゼブロッキング試薬(Dako K4007)を用いて5分間ブロックした。切片をTBS-Tで洗浄し、ブロッキング試薬(Ultra V block-TA-125UB-Lab Vision)中で5分間インキュベートした後、I-3859(15 $\mu\text{g/ml}$ 、クローンI-3859、Pierre Fabre)またはアイソタイプ対照としてのマウスIgG1/(15 g/ml 、X0931、Dako)とともに4で一晚インキュベートした。切片をTBS-Tで洗浄し、室温で30分間、SignalStain Boost IHC検出試薬(HRP、M)とともにインキュベートした。ジアミノベンジジンを用いて褐色反応生成物を発生させた(Dako K3468)。これらのスライドをヘマトキシリン中に4分間浸漬して対比染色を行い(Dako S3309)、PBS中で洗浄した後、Faramount封入剤とカバーガラス中に包埋した。この免疫組織化学的手法において、褐色反応生成物は細胞膜の陽性染色に相関し、褐色反応生成物の欠如は陰性染色および細胞膜が見えないことに相関する。

20

30

【0198】

I-3859 Mabは、種々の腫瘍タイプの細胞膜を差次的に染色する。図6および7に2つの異種移植モデルで行った染色を示したが、これには治療用抗CXCR-4 hz515H7抗体：RAMOSおよびKARPAS299による抗腫瘍活性が表されている。図6および7に示されるように、検出される発現は、KARPAS299(図7)異種移植ではRAMOS(図6)よりも低い。このデータは、フローサイトメトリーによるCXCR-4発現の試験とよく相関している。実際に、RAMOS細胞は、KARPAS299細胞よりも約5倍高いレベルのCXCR-4を発現する(抗体結合能：RAMOSに対しては200000、KARPAS299に対しては40000)。膜染色はKARPAS299では弱く(図7)、一方、RAMOSでは膜性染色は有意に高い(図6)。

40

【 図 1 】

250 KDa
150 KDa
100 KDa
75 KDa

50 KDa
37 KDa
25 KDa
20 KDa
15 KDa

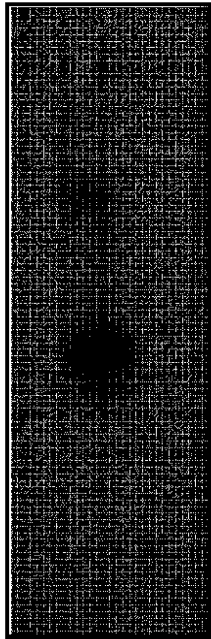
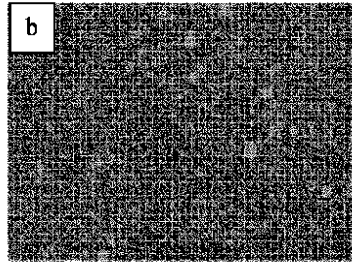


FIGURE 1

【 図 6 a 】



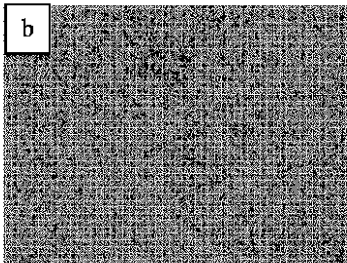
【 図 6 b 】



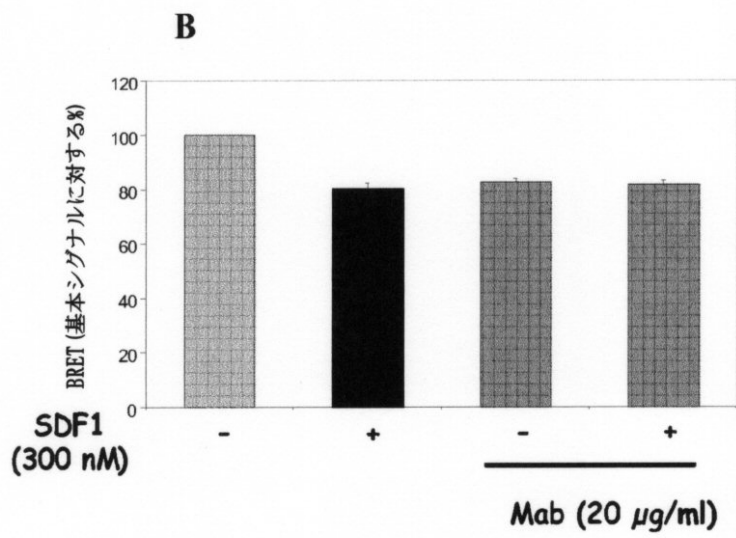
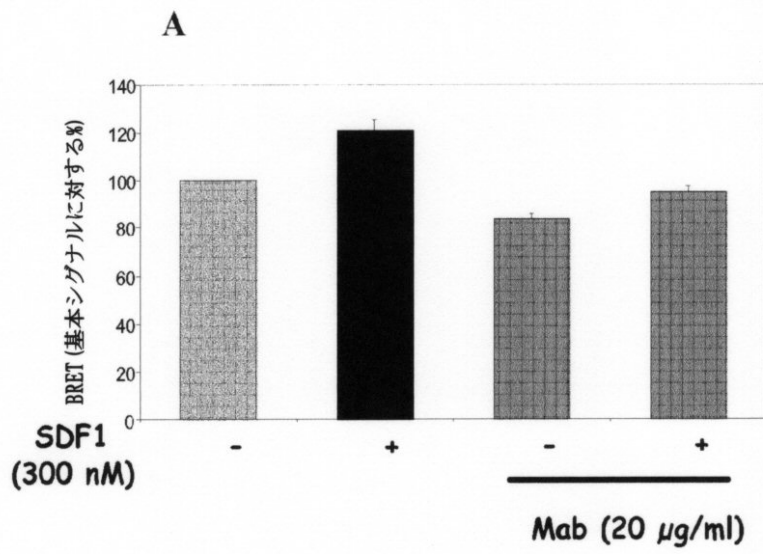
【 図 7 a 】



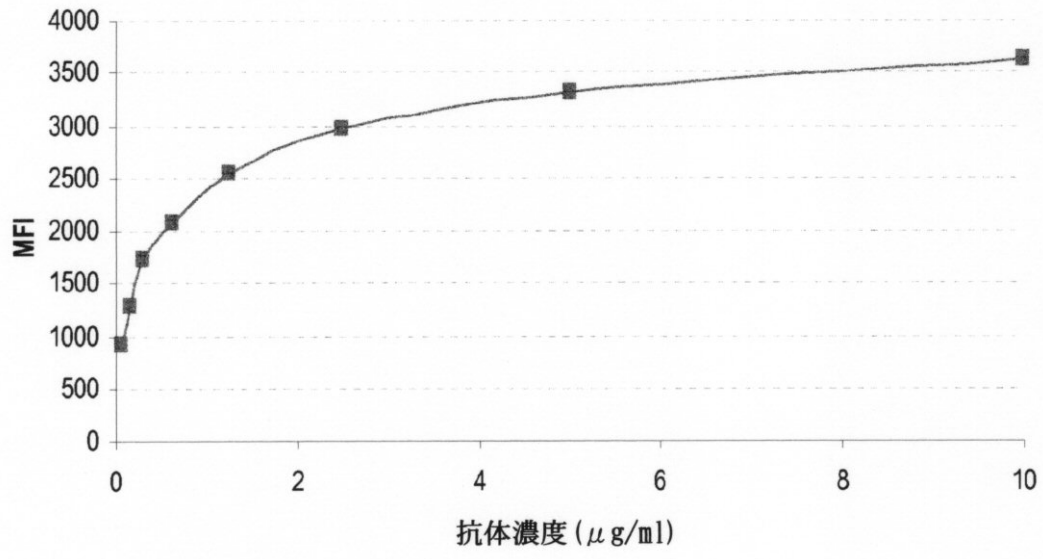
【 図 7 b 】



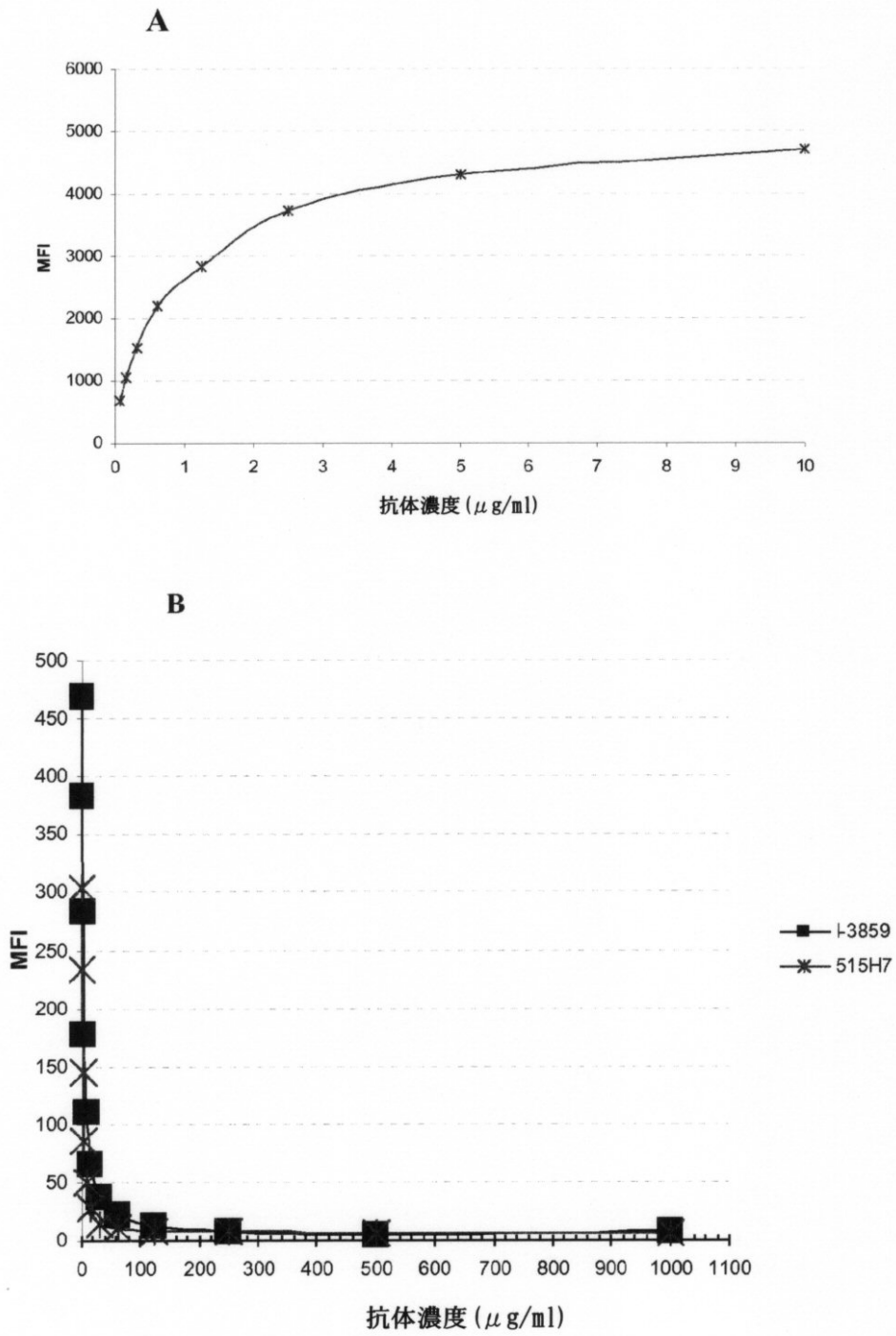
【 図 2 】



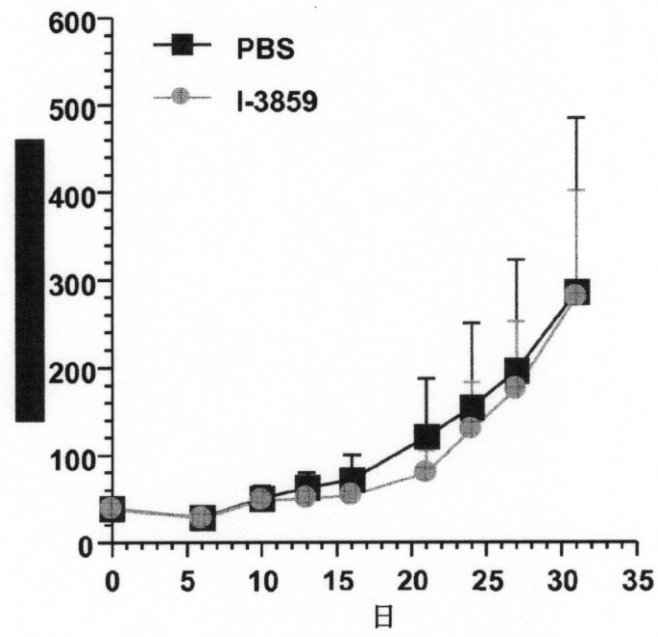
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2014523920000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/064876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD.		
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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 246 364 A1 (PF MEDICAMENT [FR]) 3 November 2010 (2010-11-03)	1-4,20
Y	sequences 34, 35 examples	5-19, 21-26
Y	----- WO 99/50461 A1 (NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS INC [US]; MURPHY GERALD P [US]; BOYNTON ALTO) 7 October 1999 (1999-10-07) pg. 1, 1st paragraph pg. 46-47 -----	5-19, 21-26
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 September 2012		08/10/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Bernhardt, Wiebke

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/064876

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THOMAS FISCHER ET AL: "Reassessment of CXCR4 Chemokine Receptor Expression in Human Normal and Neoplastic Tissues Using the Novel Rabbit Monoclonal Antibody UMB-2", PLOS ONE, vol. 3, no. 12, E4069, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1-7, XP055014166, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0004069 the whole document	5-19, 21-26
A	BUNGO FURUSATO ET AL: "CXCR4 and cancer", PATHOLOGY INTERNATIONAL, vol. 60, no. 7, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 497-505, XP055014218, ISSN: 1320-5463, DOI: 10.1111/j.1440-1827.2010.02548.x the whole document	1-26
A	EP 2 172 485 A1 (PF MEDICAMENT [FR]) 7 April 2010 (2010-04-07) pages 25-26; example 6	1-26
A	SALANGA C L ET AL: "Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk", CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHÄUSER-VERLAG, BA, vol. 66, no. 8, 19 December 2008 (2008-12-19), pages 1370-1386, XP019700808, ISSN: 1420-9071 pages 1375-1376	1-26
A	PERCHERANCIER YANN ET AL: "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC, US, vol. 280, no. 11, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 9895-9903, XP002511383, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M411151200 [retrieved on 2005-01-04] the whole document	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/064876

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/064876

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
EP 2246364	A1	03-11-2010	AU 2010243526 A1	22-12-2011			
			CA 2759989 A1	04-11-2010			
			CN 102459343 A	16-05-2012			
			CO 6390114 A2	29-02-2012			
			EP 2246364 A1	03-11-2010			
			EP 2424897 A1	07-03-2012			
			KR 20120039525 A	25-04-2012			
			MA 33285 B1	02-05-2012			
			SG 175353 A1	28-11-2011			
			US 2011088104 A1	14-04-2011			
			WO 2010125162 A1	04-11-2010			
			WO 9950461	A1	07-10-1999	AT 525477 T	15-10-2011
						AU 766675 B2	23-10-2003
AU 3470299 A	18-10-1999						
AU 2004200560 A1	11-03-2004						
CA 2323525 A1	07-10-1999						
CA 2731416 A1	07-10-1999						
DE 1068357 T1	19-07-2001						
DK 1068357 T3	12-12-2011						
EP 1068357 A1	17-01-2001						
EP 2308996 A1	13-04-2011						
ES 2156581 T1	01-07-2001						
GR 2001300028 T1	29-06-2001						
JP 4786793 B2	05-10-2011						
JP 2002509734 A	02-04-2002						
JP 2011021030 A	03-02-2011						
NZ 507161 A	19-12-2003						
NZ 528767 A	26-08-2005						
US 2005202019 A1	15-09-2005						
US 2010062003 A1	11-03-2010						
WO 9950461 A1	07-10-1999						
EP 2172485	A1	07-04-2010	AR 073748 A1	01-12-2010			
			AU 2009299787 A1	08-04-2010			
			CA 2738782 A1	08-04-2010			
			CN 102209730 A	05-10-2011			
			EP 2172485 A1	07-04-2010			
			EP 2342233 A1	13-07-2011			
			JP 2012504401 A	23-02-2012			
			KR 20110081229 A	13-07-2011			
			MA 32928 B1	02-01-2012			
			NZ 592363 A	31-08-2012			
			TW 201018483 A	16-05-2010			
			US 2011020218 A1	27-01-2011			
			US 2011287451 A1	24-11-2011			
			US 2011294156 A1	01-12-2011			
			WO 2010037831 A1	08-04-2010			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/574 A

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

(72) 発明者 アレクサンドラ、ジュアンオー

フランス国ボンヌビル、アンパス、ド、スイゾン、 8 3

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 AA29 BA13 BB24 CB01 CB02 CB17 DA36 FA11
FA37 FB03 FB08 FB12 FB13 GC12 GC15
4H045 AA11 DA75 EA50 FA74

专利名称(译)	抗体I-3859用于癌症检测和诊断的用途		
公开(公告)号	JP2014523920A	公开(公告)日	2014-09-18
申请号	JP2014522119	申请日	2012-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	皮尔法伯制药公司		
申请(专利权)人(译)	皮埃尔法布尔, 曼药物		
[标]发明人	クリスティーヌクリンゲルアムール アレクサンドラジュアンオー		
发明人	クリスティーヌ、クリンゲル-アムール アレクサンドラ、ジュアンオー		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/2866 C07K2317/565 C07K16/30 G01N33/48 G01N33/574		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N33/574.D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/GC12 2G045/GC15 4H045/AA11 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	中村KoTakashi 藤井裕之		
优先权	2011306000 2011-07-29 EP 61/513345 2011-07-29 US		
其他公开文献	JP2014523920A5 JP6138780B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及新的分离的分离的抗CXCR4抗体在癌症诊断中的用途。特别地, 公开了用于诊断和/或预测与CXCR4表达相关的致瘤性疾病的方法。

元の残基	置換
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys