

(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2010-517024

(P2010-517024A)

(43) 公表日 平成22年5月20日(2010.5.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	
	A 6 1 P 3/10	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2009-546703 (P2009-546703)	(71) 出願人	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツァーヘルストラッセ124
(86) (22) 出願日	平成20年2月25日 (2008. 2. 25)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成21年7月27日 (2009. 7. 27)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/001457	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02008/104344	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成20年9月4日 (2008. 9. 4)		
(31) 優先権主張番号	07003948.2		
(32) 優先日	平成19年2月27日 (2007. 2. 27)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

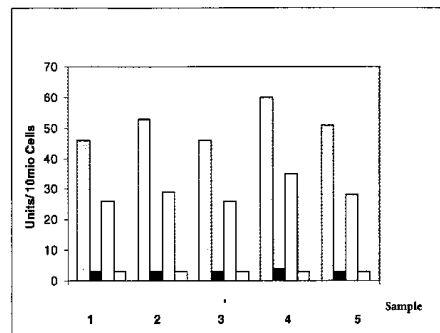
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン様成長因子 I 受容体に対する抗体の阻害活性の評価方法

(57) 【要約】

抗体で処理されている哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R に対する I G F - 1 及び / 又は I G F - 2 の結合を阻害するための抗体の阻害活性を評価するための方法であって、該 P B L の I G F - 1 R タンパク質レベルが、該抗体の阻害活性の指標として測定されることを特徴とする、方法。

Fig. 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

固相免疫アッセイにより試料中の I G F - 1 R を測定するための方法であって、該試料が溶解した哺乳類の末梢血リンパ球の調製物（溶解 P B L 試料）であることを特徴とする方法。

**【請求項 2】**

前記哺乳類がヒト又は類人猿であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記 I G F - 1 R タンパク質レベルが、前記哺乳類に投与された I G F - 1 R に対する抗体の生体内活性の指標として測定される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

**【請求項 4】**

前記抗体で処理された哺乳類における I G F - 1 R に対する抗体の生体内活性の評価のための方法であって、前記哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルが前記抗体の生体内活性の指標として測定されることを特徴とする方法。

**【請求項 5】**

前記抗体で処理された哺乳類における I G F - 1 R に対する抗体の薬力学的又は薬物動態学的な特性を予測するための方法であって、前記哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルが前記予測の指標として測定されることを特徴とする方法。

**【請求項 6】**

I G F - 1 R に対する抗体を投与された患者における臨床転帰を予測するため、あるいは治療方針を決定するための方法であって、前記患者の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルを最初に測定し、該タンパク質レベルと次に測定したレベルを比較する工程を含むことを特徴とする方法。

20

**【請求項 7】**

採血時期が、投与前、投与中及び / 又は投与後のいずれかであることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記 I G F - 1 R タンパク質レベルが E L I S A により測定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

使用される一次抗体及び二次抗体が、I G F - 1 R に対する異なるエピトープに結合する 2 つのモノクローナル抗体であるか、あるいはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

**【請求項 10】**

I G F - 1 R に対する三次抗体の生体内活性の評価のための免疫アッセイを製造するための I G F - 1 R に対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、ここで哺乳類が前記三次抗体で処理されており、前記哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルが前記三次抗体の生体内活性の指標として測定されることを特徴とする使用。

**【請求項 11】**

三次抗体で処理された哺乳類における I G F - 1 R に対する三次抗体の薬力学的又は薬物動態学的な特性を予測するための免疫アッセイの製造のための I G F - 1 R に対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、前記哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルが前記予測の指標として測定されることを特徴とする使用。

40

**【請求項 12】**

哺乳類における臨床転帰を予測するため、又は治療方針を決定するための免疫アッセイの製造のための I G F - 1 R に対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、ここで三次抗体が患者に投与され、前記哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルを最初に測定し、該タンパク質レベルと次に測定したレベルを比較する工程を含むことを特徴とする使用。

**【請求項 13】**

50

採血時期が、三次抗体の投与前、投与中及び/又は投与後のいずれかであることを特徴とする、請求項12に記載の使用。

【請求項14】

前記免疫アッセイにおいて使用される抗体が、IGF-1Rに対する異なるエピトープに結合する2つのモノクローナル抗体であるか、あるいはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項10～13のいずれか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はインスリン様成長因子I受容体(IGF-1R)に対する抗体の阻害活性の評価方法、かかる抗体の薬力学的又は薬物動態学的な特性を予測する方法、及びかかる抗体が投与される患者の治療方針の臨床転帰を予測する方法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

インスリン様成長因子I受容体(IGF-1R、EC2.7.1.12、CD221抗原)は、膜貫通タンパク質チロシンキナーゼのファミリーに属する(LeRoith, D., et al., *Endocrin. Rev.* 16 (1995) 143-163; and Adams, T.E., et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093)。IGF-1Rは高い親和性を伴いIGF-1と結合し、そして生体内において該リガンドに対する生理学的応答を開始する。IGF-1RはIGF-2にも結合するが、その親和性は僅かに低いものである。IGF-1Rの過剰発現は細胞の悪性形質転換を促進し、IGF-1Rが細胞の悪性転換に関連する証拠も存在するため、癌治療の治療剤の開発のための有用な標的となる(Adams, T. E., et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093)。インスリン様成長因子I(IGF-1)は、血管平滑筋細胞(VSMC)の重要なミトジェンである。IGF-1受容体は2つの架橋性細胞外鎖とチロシンキナーゼドメインを含有する2つの膜貫通性鎖から構成されるヘテロ四量体である。これはインスリン受容体(IR)と高い配列類似性を有し、推定されるリガンド特異的結合部位は鎖のシステインリッチ領域(CRR)に存在するとされている(Adams, T. E., et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093)。 20

【0003】

当業界においてIGF-1Rに対する抗体は周知であり、試験管内又は生体内においてこれらの抗腫瘍効果が調査されている(Benini, S., et al., *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1790-1797; Scotlandi, K., et al., *Cancer Gene Ther.* 9 (2002) 296-307; Scotlandi, K., et al., *Int. J. Cancer* 101 (2002) 11-16; Brunetti, A., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 (1989) 212-218; Prigent, S.A., et al., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9970-9977; Li, S.L., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252; Pessino, A., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989) 1236-1243; Surinya, K.H., et al., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16718-16725; Soos, M.A., et al., *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 12955-12963; Soos, M.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5217-5221; O'Brien, R.M., et al., *EMBO J.* 6 (1987) 4003-4010; Taylor, R., et al., *Biochem. J.* 242 (1987) 123-129; Soos, M.A., et al., *Biochem. J.* 235 (1986) 199-208; Li, S.L., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 92-98; Delafontaine, P., et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26 (1994) 1659-1673; Kull, F.C. Jr., et al., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566; Morgan, D.O., and Roth, R.A., *Biochemistry* 25 (1986) 1364-1371; Forsayeth, J.R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 3448-3451; Schaefer, E.M., et al., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13248-13253; Gustafson, T.A., and Rutter, W.J., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18663-18667; Hoyne, P.A., et al., *FEBS Lett.* 469 (2000) 57-60; Tulloch, P.A., et al., *J. Struct. Biol.* 125 (1999) 11-18; Rohlik, Q.T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149 (1987) 276-281; and Kalebic, T., et al., *Cancer Res.* 54 (1994) 5531-5534; Adams, T. E., et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093; 30 40 50

Dricu, A., et al., *Glycobiology* 9 (1999) 571-579; Kanter-Lewensohn, L., et al., *Melanoma Res.* 8 (1998) 389-397; Li, S.L., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252)。またIGF-IRに対する抗体は多くの文献、例えば、Arteaga, C.L., et al., *Breast Cancer Res. Treatment* 22 (1992) 101-106; 及び Hailey, J., et al., *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 1349-1353)に記載されている。

#### 【0004】

特に、IR3と称されるIGF-1Rに対するモノクローナル抗体は、IGF-1Rが介するプロセス及びIGF-1Rが介する疾患、例えば癌の研究において広く使用されている。IR-3はKull, F.C, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566に記載されている。一方、抗腫瘍効果に関してIR3単独、又は細胞増殖抑制剤、例えばドキソルビシン及びピンクリスチンとの併用における研究及び治療的使用に関してはおよそ100の刊行物が出版されている。IR3はIGF-1のIGF受容体に対する結合を阻害するが、IGF-2のIGF-1Rに対する結合は阻害しないことが知られるマウスモノクローナル抗体である。IR3は高濃度において腫瘍細胞増殖及びIGF-1Rリン酸化を刺激する(Bergmann, U., et al., *Cancer Res.* 55 (1995) 2007-2011; Kato, H., et al., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2655-2661)。IGF-1結合よりも強くIGF-2のIGF-1Rに対する結合を阻害するほかの抗体も存在する。抗体ならびにこれらの特性及び特徴の先行技術についての概要は、Adams, T. E., et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093 に記載されている。

10

#### 【0005】

先行技術に記載されるほとんどの抗体はマウス起源である。このような抗体は、先行技術において周知であるように、キメラ化又はヒト化等の更なる改変なしではヒトの患者の治療には有用ではない。これらの欠点によって、ヒト患者の治療における治療剤としては明らかにヒト抗体が好ましい。ヒト抗体は当業界において周知である(van Dijk, M.A., and van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374)。このような技術に基づき、極めて多様な標的に対するヒト抗体を産生することができる。IGF-1Rに対するキメラ、ヒト化及びヒト治療用抗体は、US2005/0084906、WO2005/058967、WO2006/013472、US2003/0165502、WO2005/082415、WO2005/016970、WO03/106621、WO04/083248、WO2003/100008、WO2004/087756、WO2005/005635及びWO2005/094376に言及されている。

20

30

#### 【0006】

モノクローナル抗体による標準的な固相免疫アッセイは、固相上に吸着した抗体、抗原、及び酵素に接合した抗原のほかのエピトープに対する抗体(トレーサー抗体)における複合体の形成に関する。したがって、固相-捕捉抗体-抗原-トレーサー抗体のサンドイッチが形成される。このサンドイッチにより触媒される反応において、抗体接合酵素の活性はインキュベーション媒体における抗原濃度に比例する。標準的なサンドイッチ法は捕捉抗体及びトレーサー抗体が抗原の異なるエピトープに結合することから二重抗原ブリッジ免疫アッセイとも称される。

#### 【0007】

本発明は、インスリン様成長因子I受容体(IGF-1R)に対する抗体の阻害活性の評価方法、かかる抗体の薬力学的又は薬物動態学的な特性を予測する方法、及びかかる抗体が投与された患者の治療方針の臨床転帰を予測する方法に関する。IGF-1Rの測定のためのアッセイは当業界において周知であるが(例えば、WO02/053596、WO2004/087756及びWO2005/005635)、試料としてIGF-1R過剰発現細胞(3T3細胞)が使用されており、測定はフローサイトメトリーにより行われる(Cohen, B.D., *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 2063-2073)。

40

#### 【0008】

IGF-1Rに対する抗体による患者の治療における薬力学的又は薬物動態学的結果を測定及びモニタリングする必要がある。このような測定及びモニタリングは、例えば、腫

50

瘍バイオプシー中の I G F - 1 R 発現レベルを測定するか(Kornprat, P., J. Clin. Path. 59 (2006) 202-206)、あるいは I G F - 1 R リン酸化状態を測定することにより行うことができる(Chen, J.W., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 284 (2003) e1149-e1155)。また、患者における I G F - 1 R 減少を測定することも示唆されている(Cohen, B.D., Clin. Cancer Res. 11 (2005) 2063-2073)。フローサイトメトリーによりモニターしたところ、I G F - 1 R に対する抗体の血液の生体外処理はヒト末梢血液単核細胞において I G F - 1 R の下方制御をもたらした。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、固相免疫アッセイにより試料中の I G F - 1 R を測定するための方法であって、該試料が溶解した哺乳類の末梢血リンパ球の調製物(溶解 P B L 試料)であることを特徴とする方法を含む。このような試料は、さらに「溶解 P B L 試料」又は「溶解 P B L」として表される。哺乳類は好ましくはヒト又は類人猿(ape)である。

10

【0010】

P B L における I G F - 1 R 発現の範囲は 2 5 0 ~ 2 , 3 0 0 分子であるが(Cohen, B. D., Clin. Cancer Res. 11 (2005) 2063-2073)、本発明の固相免疫アッセイによって溶解 P B L における I G F - 1 R を測定することが可能となる、という驚くべき知見が得られた。

【0011】

本発明は、前記 I G F - 1 R タンパク質レベルが前記哺乳類に投与された I G F - 1 R に対する抗体の生体内活性の指標として測定されることを特徴とする方法を含む。

20

【0012】

本発明は、前記抗体で処理された哺乳類における I G F - 1 R に対する抗体の生体内活性を評価するための方法であって、前記哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルが前記抗体の生体内活性の指標として測定されることを特徴とする方法を含む。

【0013】

本発明は、前記抗体で処理された哺乳類における I G F - 1 R に対する抗体の薬力学的又は薬物動態学的な特性を予測するための方法であって、前記哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルが前記予測の指標として測定されることを特徴とする方法を含む。

30

【0014】

本発明は、I G F - 1 R に対する抗体を投与された患者における臨床転帰を予測するため、あるいは治療方針を決定するための方法であって、前記患者の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タンパク質レベルを最初に測定し、該タンパク質レベルと次に測定したレベルを比較する工程を含むことを特徴とする方法を含む。

【0015】

本発明は、採血時期が、投与前、投与中及び/又は投与後のいずれかであることを特徴とする方法を含む。

【0016】

本発明は、I G F - 1 R タンパク質レベルが E L I S A により測定されることを特徴とする方法を含む。

40

【0017】

本発明は、E L I S A において使用される一次抗体及び二次抗体が、I G F - 1 R に対する異なるエピトープに結合する2つのモノクローナル抗体であるか、あるいはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体であることを特徴とする方法を含む。

【0018】

本発明は、I G F - 1 R に対する三次抗体の生体内活性の評価のための免疫アッセイを製造するための I G F - 1 R に対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、ここで哺乳類が前記三次抗体で処理されており、前記哺乳類の溶解 P B L 試料中の I G F - 1 R タン

50

パク質レベルが前記三次抗体の生体内活性の指標として測定されることを特徴とする使用を含む。

【0019】

本発明は、三次抗体で処理された哺乳類におけるIGF-1Rに対する三次抗体の薬力的又は薬物動態学的な特性を予測するための免疫アッセイの製造のためのIGF-1Rに対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、前記哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルが前記予測の指標として測定されることを特徴とする使用を含む。

【0020】

本発明は、哺乳類における臨床転帰を予測するため、又は治療方針を決定するための免疫アッセイの製造のためのIGF-1Rに対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、ここで三次抗体が患者に投与され、前記哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルを最初に測定し、該タンパク質レベルと次に測定したレベルを比較する工程を含むことを特徴とする使用を含む。

10

【0021】

本発明は、採血時期が、三次抗体の投与前、投与中及び/又は投与後のいずれかであることを特徴とする使用を含む。

【0022】

本発明は、前記免疫アッセイ、好ましくはELISAにおいて使用される抗体が、IGF-1Rに対する異なるエピトープに結合する2つのモノクローナル抗体であるか、あるいはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体であることを特徴とする使用を含む。

20

【0023】

本発明は、哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rを測定するための方法であって、前記PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルが、好ましくは前記哺乳類に投与されたIGF-1Rに対する抗体の生体内活性の指標として測定されることを特徴とする方法を含む。

【0024】

本発明は、哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rに対する抗体の生体内活性を評価するための方法であって、前記哺乳類が前記抗体で処理されており、前記PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルが、前記抗体の生体内活性の指標として測定されることを特徴とする方法を含む。

30

【0025】

本発明は、前記抗体で処理された哺乳類におけるIGF-1Rに対する抗体の生体内活性を評価するための方法であって、前記処理された哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルを前記抗体の生体内活性の指標として測定することを特徴とする方法を含む。

【0026】

本発明はさらに、前記抗体で処理された哺乳類におけるIGF-1Rに対する抗体の薬力的又は薬物動態学的な特性を予測するための方法であって、前記哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルが前記予測の指標として測定されることを特徴とする方法を含む。

40

【0027】

本発明はさらに、IGF-1Rに対する抗体を投与された患者における臨床転帰を予測するため、あるいは治療方針を決定するための方法であって、前記患者の溶解PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルを最初に測定し、該タンパク質レベルと次に測定したレベルを比較する工程を含むことを特徴とする方法を含む。採血時期は、投与前、投与中及び/又は投与後のいずれかである。

【0028】

これらのすべての方法は哺乳類の外部において行われ、IGF-1Rタンパク質レベルは試験管内で測定される。

50

## 【0029】

好ましくは、PBLは、測定方法が行われる前に、通常Ficoll勾配を使用する遠心分離により試料、好ましくは軟膜から単離される。本発明の方法のための試料は、好ましくは $10^6 \sim 10^8$  PBL細胞/250 $\mu$ lとして使用される。溶解は、例えばアルキルアールポリエーテルアルコール、例えばオクチルフェノキシポリエトキシエタノール(トリトン(登録商標)X-100)又はCHAPS(例えば1%(v/v))の使用により行われる。

## 【0030】

本発明はさらに、IGF-1Rに対する三次抗体の生体内活性の評価のための免疫アッセイを製造するためのIGF-1Rに対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、ここで哺乳類が前記三次抗体で処理されており、前記哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルが前記三次抗体の生体内活性の指標として測定されることを特徴とする使用を含む。

10

## 【0031】

本発明はさらに、三次抗体で処理された哺乳類におけるIGF-1Rに対する三次抗体の薬学的又は薬物動態学的な特性を予測するための免疫アッセイの製造のためのIGF-1Rに対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、前記哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルが前記予測の指標として測定されることを特徴とする使用を含む。

## 【0032】

本発明はさらに、哺乳類における臨床転帰を予測するため、又は治療方針を決定するための免疫アッセイの製造のためのIGF-1Rに対する一次抗体及び二次抗体の使用であって、ここで三次抗体が患者に投与され、前記哺乳類の溶解PBL試料中のIGF-1Rタンパク質レベルを最初に測定し、該タンパク質レベルと次に測定したレベルを比較する工程を含むことを特徴とする使用を含む。

20

## 【0033】

本発明の測定方法において使用することができる抗体は、異なるエピトープに結合する2つのモノクローナル抗体、又はモノクローナル抗体とポリクローナル抗体である。一次抗体は固定化され、そして二次抗体は検出抗体であり、検出可能な標識を含有する。

## 【0034】

本発明に使用することができる抗体は、ヒトIGF-1R(EC 2.7.1.112, SwissProt P08069)に結合し、そして好ましくは該受容体の鎖に結合する。本発明に有用なこのようなモノクローナル抗体は、例えばWO2004/087756及びWO2005/005635に記載されている。このような抗体はまた、三次(治療)抗体としても有用である。

30

## 【0035】

有用なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Germanyに寄託した。

## 【0036】

## 【表1】

40

細胞株	寄託番号	寄託日
<IGF-1R>HUMAB-Clone22	DSM ACC 2594	09. 05. 2003
<IGF-1R>HUMAB-Clone18	DSM ACC 2587	10. 04. 2003
<IGF-1R>HUMAB Clone1a	DSM ACC 2586	10. 04. 2003
<IGF-1R>HUMAB Clone23	DSM ACC 2588	10. 04. 2003
<IGF-1R>HUMAB-Clone8	DSM ACC 2589	24. 04. 2003

50

## 【 0 0 3 7 】

本発明のために使用することができる抗体は、さらに  $10^{-8}$  M ( $K_D$ ) 又はそれ以下の IGF - 1 R に対する親和性、好ましくは  $10^{-9}$  M、そしてより好ましくは約  $10^{-10}$  ~  $10^{-13}$  M の親和性により特徴付けられる。

## 【 0 0 3 8 】

IGF - 1 R タンパク質レベルは、免疫アッセイ、より好ましくは E L I S A により測定され、これにより 1 つの抗体が固定化される。免疫化は、好ましくは生物学的結合ペア、好ましくはハプテン - 抗ハプテン (例えば、ジゴキシゲニン - ジゴキシゲニンに対する抗体) 又はビオチン - (ストレプト) アビジンを介して行われる。本発明の好ましい態様において、一次抗体はビオチニル化され、そしてストレプトアビジン (又はほかのアビジン類似体) マトリックス上で固定化される。ビオチニル化又はハプテンカップリングは、該抗体が  $10^{-9}$  M ( $K_D$ )、そしてより好ましくは約  $10^{-10}$  ~  $10^{-13}$  M の IGF - 1 R に対する親和性を維持するように行われる。

10

## 【 0 0 3 9 】

好ましい哺乳類は、腫瘍治療を必要とするヒト患者、又は生体内動物試験のために処理される非ヒト哺乳類である。

## 【 0 0 4 0 】

本発明の詳細な説明

用語「抗体」は、抗体の様々な形態を包含し、例えば制限することなく、全ての抗体、抗体フラグメント、ヒト抗体、ヒト化抗体及び遺伝子組み換え抗体を含む。好ましくは、一次抗体及び二次抗体の一方はモノクローナル抗体であり、そして他方は非ヒト動物、例えばウサギ又はヤギに由来するほかのポリクローナル形態である。

20

## 【 0 0 4 1 】

「抗体フラグメント」は、完全長の抗体の一部を含み、一般に少なくとも本発明のアッセイに適当かつ有用であるその抗原結合部分又は可変領域を含む。抗体フラグメントの例は F a b 及び F ( a b )<sub>2</sub> フラグメントを含む。

## 【 0 0 4 2 】

本明細書において使用される用語「IGF - 1 R に対する抗体」又は「IGF - 1 R 抗体」はヒト IGF - 1 R に特異的に結合し、そして好ましくはこれによりほかのタンパク質と検出可能な交差反応を示さない抗体を意味する。

30

## 【 0 0 4 3 】

本明細書において使用される用語「IGF - 1 R に対する結合」は、試験管内アッセイ、好ましくは抗体が表面に結合し、そして IGF - 1 R の結合が表面プラズモン共鳴 ( S P R ) により測定される結合アッセイにおける IGF - 1 R に対する抗体の結合を意味する。結合は  $10^{-8}$  M 又はそれ以下、好ましくは  $10^{-8}$  M ( $K_D$ ) 又はそれ以下、そしてより好ましくは約  $10^{-13}$  ~  $10^{-10}$  M の結合親和性 ( $K_D$ ) を意味する。

## 【 0 0 4 4 】

本明細書において使用される用語「IGF - 1 R に対する抗体の生体内活性」は、IGF - 1 R に対して結合し、そしてリガンド結合を阻害するような抗体のための周知の活性を意味する。IGF - 1 R に結合するリガンドの抗体媒介障害は、2 つの主なインスリン様成長因子 ( I G F ) 経路の下流シグナル伝達、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ及びホスファチジルイノシトール 3 ' - キナーゼ / A k t を阻害する。その結果、IGF - 1 及び IGF - 2 の細胞分裂及び増殖能力が有意に減少した。さらに、該抗体は腫瘍細胞に対する特異的な結合における IGF - 1 R 内在化及び低下を誘発し、その結果受容体分子を供する細胞表面中で有意な (少なくとも 80 %) の減少をもたらす (例えば、Mitsiades, C.S., Cancer Cell 5 (2004) 221-230; Grimberg, A., Cancer Biology & Therapy 2 (2003) 630-635 を参照のこと)。

40

## 【 0 0 4 5 】

末梢血単核細胞 / リンパ球は先行技術に従い軟膜から単離した。例えば Rees, G. and Gough R., J. Med. Lab. Tech. 25 (1968) 117-118 and Figdor, C, et al., J. Immunol.

50

Methods 55 (1982) 221-229を参照のこと。

【 0 0 4 6 】

I G F - 1 R に対する抗体の免疫学的測定は、好ましくは捕捉抗体（一次抗体）及び検出可能な標識に接合したトレーサー抗体（二次抗体）を含む二重抗原ブリッジング免疫アッセイにより生じる。サンドイッチ E L I S A 法は、抗原の異なるエピトープを認識する 2 種類のモノクローナル I G F - 1 R 抗体（一次及び二次抗体）を使用して、あるいは 1 種類のモノクローナル I G F - 1 R 抗体及び 1 種類のポリクローナル I G F - 1 R 抗体により、抗原の濃度を測定することにより特徴付けられる。このサンドイッチ E L I S A の手順は通常 3 段階からなる。例えば、第 1 段階において、抗原含有試料を一次モノクローナル / ポリクローナル抗体が吸着している測定プレート上に注ぐ；該試料中の I G F - 1 R を一次抗体に結合させる。第 2 段階において、該試料中の抗原以外の物質を洗浄剤で洗浄する。その後第 3 段階において、レポーター分子、例えば酵素又はラジオアイソトープで標識した二次抗体の溶液をプレートに注ぎ；標識された抗体が一次抗体と結合している I G F - 1 R と結合し、そして標識が検出される。E L I S A 法は当業界で周知であり、例えば Hildebrand R.L., Rapid diagnosis in infectious disease, Rytel, M.W. (ed.), Boca Raton (1979) pp. 71-88 に概説される。

10

【 0 0 4 7 】

好ましくは、抗体のその接合パートナーに対する接合は、抗体のアミノ酸バックボーンの N - 末端及び / 又は - アミノ基（リジン）、異なるリジンの - アミノ基、カルボキシ - 、スルフィドリル - 、ヒドロキシ - 、及び / 又はフェノール性官能基、及び / 又は抗体の炭化水素構造の糖アルコール基を介する化学結合により行われる。

20

【 0 0 4 8 】

好ましくは、一次抗体は、特異的な結合ペアを介して固定化される。このような結合ペア（一次成分 / 二次成分）は、例えばストレプトアビジン又はアビジン / ビオチン、抗体 / 抗原（例えば、Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc. (1996) を参照のこと）、レクチン / 多糖、ステロイド / ステロイド結合タンパク質、ホルモン / ホルモン受容体、酵素 / 基質、I g G / タンパク質 A 及び / 又は G 等である。好ましくは、一次抗体はビオチンに接合し、そして固定化は固定化アビジン又はストレプトアビジンを介して行われる。

【 0 0 4 9 】

あるいは、一次抗体は受動吸着により固相に接合される。受動吸着は、例えば Butler, J. E., Solid Phases in Immunoassay, In: Immunoassay, Diamandis, E.P., and Christopoulos, T.K. (eds.), Academic Press, Inc., San Diego, California (1996), pp. 205-225 に記載される。

30

【 0 0 5 0 】

本発明の好ましい態様において、二次抗体は検出可能な標識に接合する。好ましくは、特異的な結合ペアを介して接合される。このような結合ペア（一次成分 / 二次成分）は、例えばストレプトアビジン又はアビジン / ビオチン、抗体 / 抗原（例えば、Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc. (1996) を参照のこと）、レクチン / 多糖、ステロイド / ステロイド結合タンパク質、ホルモン / ホルモン受容体、酵素 / 基質、I g G / タンパク質 A 及び / 又は G 等である。好ましくは、二次抗体は、ジゴキシゲニン及びジゴキシゲニンに対する抗体を介して検出可能な標識に接合される。あるいは、二次抗体は電気化学発光標識、例えばルテニウムビスピリジル錯体に接合される。

40

【 0 0 5 1 】

モノクローナル抗体は、タンパク質として複数の反応性側鎖を含有する。このような抗体の反応性化学基は、例えばアミノ基（リジン、 - アミノ基）、チオール基（シスチン、システイン、及びメチオニン）、カルボン酸基（アスパラギン酸、グルタミン酸）、及び糖 - アルコール基である。

【 0 0 5 2 】

本発明の免疫アッセイのための固体支持体は、先行技術において広く記載されている（

50

例えば、Butler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23を参照のこと)。

【0053】

異なる免疫アッセイの原理は、例えば Hage, D. S., in Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R. Lu, B., et al., in Analyst. 121 (1996) 29R-32Rにおいて記載されており、免疫アッセイに使用するための抗体の配向された固定化が報告される。アビジン - ビオチン - 媒介免疫アッセイは、例えば Wilchek, M., and Bayer, E.A., Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469において報告される。

【0054】

モノクローナル抗体及びこれらの定常領域は、タンパク質として、結合パートナー、例えば表面、タンパク質、ポリマー、例えばPEG、セルロース又はポリスチロール、酵素又は結合ペアのメンバーに結合するための複数の反応性側鎖を含有する。抗体の化学反応基は、例えばアミノ基（リジン、 $\epsilon$ -アミノ基）、チオール基（シスチン、システイン、及びメチオニン）、カルボン酸基（アスパラギン酸、グルタミン酸）、及び糖 - アルコール基である。このような方法は、例えば Aslam, M. and Dent, A., Bioconjugation, MacMillan Reference Ltd. (1999), pp. 50-100において記載される。

10

【0055】

用語「固相」は、非液体物質であり、そしてポリマー、金属（常磁性粒子、強磁性粒子）、ガラス、及びセラミックから作成される粒子（微粒子及びビーズを含む）；ゲル物質、例えばシリカ、アルミナ、及びポリマーゲル；ポリマー、金属、ガラス及び／又はセラミックから作成できるキャピラリー；ゼオライト及びほかの多孔性物質；電極；マイクロタイタープレート；固体ストリップ；及びキュベット、チューブ又はほかのスペクトロメーター試料容器を含む。アッセイの固相要素は、該アッセイが接触される内部固相表面と区別され、「固相」はその表面上に少なくとも1つの部分を含有し、これは二次抗体と相互作用することを意図する。固相は、固定要素、例えばチューブ、ストリップ、キュベット又はマイクロタイタープレートであってよく、あるいは非固定要素、例えばビーズ、及び微粒子であってよい。微粒子はまた、均一なアッセイフォーマットのための固相として使用することができる。タンパク質とほかの物質との非共有結合又は共有結合のいずれかを許容する多様な微粒子を使用することができる。このような粒子は、ポリマー粒子、例えばポリスチレン及びポリ（メチルメタクリレート）；金粒子、例えば金ナノ粒子及び金コロイド；及びセラミック粒子、例えばシリカ、ガラス、金属酸化物粒子を含む。例えば参考により本明細書に組み込まれる、Martin, C.R., et al., Anal. Chem. 70 (1998) 322A-327Aを参照のこと。

20

30

【0056】

色原体（蛍光性又は発光性群及び色素）、酵素、NMR - 活性群又は金属粒子、ハプテン、例えばジゴキシゲニンは検出可能な標識の例である。該検出可能な標識はまた光活性化可能な架橋基、例えばアジド又はアジリン基である。電気化学発光により検出することができる金属錯体はまた、好ましくはシグナル放射基であり、特に、ルテニウム錯体、例えばルテニウム（ビスピリジル） $_3^{2+}$ が好ましい。適当なルテニウム標識基は、例えば E P 0 5 8 0 9 7 9、W O 9 0 / 0 5 3 0 1、W O 9 0 / 1 1 5 1 1 及び W O 9 2 / 1 4 1 3 8 に記載される。

40

【0057】

以下の実施例及び図面は、付属の特許請求の範囲に記載される真の範囲である、本発明の理解を助けるために提供される。本発明の精神から離れることなく記載される手順において改変できることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】1～5に標識した5つの独立した実験において同じ試料のレベルが測定された。同じ色は同一の試料を示す。標準偏差は11～14%の範囲であった。

【図2】カニクイザルから単離した新しい末梢白血球（出発個体数）を、これらのIGF-1R濃度について試験し、そして細胞の一晚培養（未処理）と抗体18で処理した細胞

50

の一晚培養（処理）とを比較した。左のパネルにおいて、1 mgあたりの任意単位をプロットする。

【実施例】

【0059】

例 1

P B L 単離及び溶解

a) ヒト P B L の単離

200  $\mu$ l のリクエミン (Liquemine) (Roche Diagnostics GmbH, DE) を 160 ml の R P M I / ヘペス (R P M I 中 10 mM のヘペス緩衝液) 中に添加した。0.5 l の血液からの末梢血細胞 (「パフィーコート」) を該溶液に再懸濁した。血液細胞タイプの分離は 50 ml の GREINER Leucosep チューブ中で行った (Article No. 7.227.290)。パフィーコートからの P B L の単離のために 6 本のチューブを使用した。該チューブを調製するために 15 ml のリンパ球選択培地 (LSM, ICN No. 50494) を各チューブに移し、そして該チューブを 1000  $\times$  g で 30 秒間遠心分離した。39 ml の血液懸濁液を LSM 溶液の上部において層を形成させ、そして 1000  $\times$  g において 18 分で 10 分間遠心分離した。P B L は上部に白色のバンドとして直接的に現れ、10 ml ピペットで回収し、そして 4 本の 50 ml チューブに移した。その後、該チューブを 50 ml の R P M I / ヘペスで満たし、そして 250  $\times$  g において 18 分で 10 分間遠心分離した。上清を捨て、そして細胞を少量の R P M I / ヘペス中に再懸濁した。全ての細胞を単一の 50 ml チューブ中に集め、そして R P M I / ヘペスで再度洗浄した。上清を捨て、そして混入した赤血球を溶解するために細胞を 10 ml の予め温めた A L T 中に再懸濁した。A L T は 300 ml の溶液 A (0.16 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) と 100 ml の溶液 B (0.16 M  $\text{Tris-HCl}$ , pH 7.65) と混合し、pH を 7.2 に調節し、そして濾過 (0.22  $\mu$ m) により溶液を滅菌することにより調製した。A L T 中の細胞懸濁液を 37 分で 3 分間インキュベーションした後、チューブを R P M I / ヘペスで 50 ml に満たし、そして該細胞を 250  $\times$  g で 5 分間遠心分離した。該細胞を R P M I / ヘペスで 2 回再度洗浄し、そして 50 ml の R P M I / ヘペス中に再懸濁した。最後に、該細胞を集計した。新たに調製した細胞に代えて、場合により凍結させた P B L もまた使用することができた。凍結のために、細胞は 1000 万細胞/ml の密度において凍結培地 (熱不活性化ヒト血清中の 10% DMSO) 中に再懸濁した。懸濁液をゆっくりと -80 度に冷却する。解凍のために、細胞を素早く解凍し、その後培地の段階的な添加によって、攪拌することなくゆっくりと希釈した。

【0060】

b) カニクイザル P B L の単離

血液 (24 ml, 3 ml 8 匹の異なる類人猿に各々由来する) を、ヘパリンを含有するバキュテナー中に回収した。56 ml の P B S を添加し、そして懸濁液は LSM (ICN No. 50494) のクッションの上部に層を形成した。チューブを 1000  $\times$  g で 10 分間回転させた。P B L を除去し、そして P B S 中で 2 回洗浄し、そして集計した。

【0061】

c) P B L 処置

ウェルあたり 200 万 ~ 1000 万の細胞を、6 ウェル細胞培養プレートにおいて 2 ml の培地 (10% FCS を伴う R P M I) 中で播種した。対照は未処理のままにした。最終濃度が 100 nm になるように I G F - 1 R (2.0 mg/ml) に対する抗体をウェルの半分まで添加した。該細胞を 5% の  $\text{CO}_2$  と共に 37 度で一晩インキュベートした。対照として細胞のアリコットを遠心分子し、さらなる分析のための細胞培養工程の前に凍結させた。

【0062】

d) P B L 溶解

細胞を遠心分離により回収し、そして P B S 中で 2 回洗浄した。ペレットを凍結させた。分析の直前に該細胞ペレットを解凍し、そしてボルテックスした 200  $\mu$ l の溶解緩衝

10

20

30

40

50

液 ( 5 0 m M Tris - HCl , pH 7 . 5 , 1 m M EDTA , 1 m M EGTA , 1 0 0 m M NaF , 1 % Triton - X - 1 0 0 , 2 0 % グリセロール ) 中に再懸濁し、超音波水浴中に 2 分間入れ、そして遠心分離した。

【 0 0 6 3 】

例 2

ELISA アッセイ

末梢血リンパ球中の IGF - 1 受容体を、ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロプレート ( SA - MTP ) 中の該受容体の ドメインに対するビオチニル化抗体 ( 抗体 1 8 ) により捕捉する。ウサギポリクローナル IGF - 1 R 抗体及び抗ウサギ - HRP 結合抗体により結合した IGF - 1 R を検出する。

10

【 0 0 6 4 】

細胞の全タンパク質量に対する IGF - 1 R タンパク質量として IGF - 1 R レベルを測定した。細胞可溶化液を産生し、同じタンパク質濃度に調節し、そして ELISA アッセイにおいて測定した。該圧制の直線範囲において、450 nm における吸収シグナルは、IGF - 1 R レベルの相対量に対応する。

【 0 0 6 5 】

材料：

- 96-ウェル・ストレプトアビジンコーティングポリスチレンプレート (Nunc)
- PBST: H<sub>2</sub>O で 1:10 に希釈した 10 × PBS - 緩衝溶液 + 0.2% Tween20
- BSA
- PAK <IGF-1R > Ra-C20-IgG (Santa Cruz Biotechnology, #sc-713)
- PAK <ウサギ> G-IgG-HRP (Cell Signaling #7074)
- 3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン
- 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- ビオチニル化 MAK <IGF-1R > Hu-AK1a-IgG (DSM ACC 2586)

20

【 0 0 6 6 】

プレートコーティング：

- 3% BSA/PBST 中希釈ビオチニル化抗体 1:200
- SA-MTP に 100 μ l / ウェル 添加
- シェーカー上室温で 1 時間インキュベート
- 200 μ l PBST / ウェル で 洗 浄

30

【 0 0 6 7 】

試料調製：

- PBS で 洗 浄 後、末梢血リンパ球 (PBL, 1 × 10<sup>7</sup> 細胞) を遠心分離により再単離し、そして該細胞ペレットを 250 μ l の溶解緩衝液中に溶解する。ELISA アッセイの直線範囲となる溶解物の IGF-1R 濃度を保証するために、希釈系列を行う。

【 0 0 6 8 】

アッセイ手順：

- 100 μ l / ウェルの試料をアッセイプレートに添加
- 室温で 1 時間インキュベート
- 200 μ l の PBST / ウェル で 洗 浄
- 3% BSA / PBST 中 1:1000 の 100 μ l / ウェルの PAK <IGF-1R > Ra-C20-IgG (Santa Cruz Biotechnology, #sc-713) をプレートに添加
- 室温で 1 時間インキュベート
- 200 μ l の PBST / ウェル で 洗 浄
- 3% BSA / PBST 中 1:5000 の 100 μ l / ウェルの PAK <ウサギ> G-IgG-HRP をプレートに添加
- 室温で 1 時間インキュベート
- 200 μ l の PBST / ウェル で 洗 浄
- 100 μ l / ウェルの 3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジンをアッセイプレートに添加

40

50

- 室温で0.5 時間インキュベート
- 250  $\mu$ l/ウェルの1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で反応を停止
- 450 nm で吸光度を測定

## 【0069】

純粋な組み換えタンパク質の不存在下において、1 : 100の希釈の陽性対照により得られたELISAシグナルを任意単位「U」として定義した。試料の異なる希釈を測定し、そして少なくとも2つの値の平均値を計算した。

## 【0070】

IGF-1Rに対する抗体で処理したPBL培養液中のIGF-1Rレベルにおける変化の測定：

20人のドナー由来のPBLを抗体18の存在下及び不存在下において培養した。9つのサンプルは凍結ストックに由来し、11のサンプルは新たに調製した細胞で測定した。IGF-1Rに対する抗体の処理から24時間後、IGF-1Rレベルの下方制御を測定する。全ての細胞培養液中、抗体処理においてIGF-1Rのレベルは未処理細胞と比較して低下した。処理後のIGF-1Rのレベルは対照培養液中で検出したレベルの0~62%のレベル範囲だった。したがって、該受容体の下方制御は治療抗体によるシグナル伝達カスケードの下方制御の一般現象であるように見える。受容体発現のベースライン値はドナー間で強く変化し、したがって「閾値」レベルは確立することができず、そして該レベルの経時変化は各患者についての処理期間を通してベースライン対照としての処理前の値を含み、測定しなければならないものと考えられる。20ドナー中19ドナーでは、細胞培養前のレベルは細胞培養後（処理なし）のレベルよりも低かった。しかしながら、20ドナー中17ドナーでは、これらのレベルは治療抗体で処理後の細胞培養液中で測定したものよりも依然高かった。

## 【0071】

2つの細胞調製物について、異なる濃度のhuMab IGF-1Rにより、IGF-1Rレベルの低下が試験された。低濃度においてさらに低いレベルのIGF-1Rが検出された（図1及び2）。

## 【0072】

アッセイが前臨床試験におけるカニクイザルに適用できることを確認するために、治療抗体の有無において類人猿PBLのインキュベーションを行った。ヒト試料のように、カニクイザルリンパ球においてIGF-1R濃度の下方制御が検出された。受容体レベルの下方制御の割合はヒトにおいて検出されるものと比較可能であった。

10

20

30

【 図 1 】

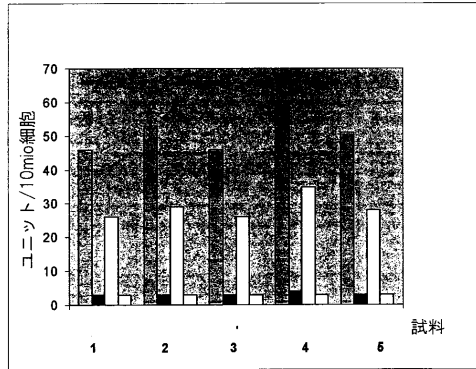


Fig. 1

【 図 2 】

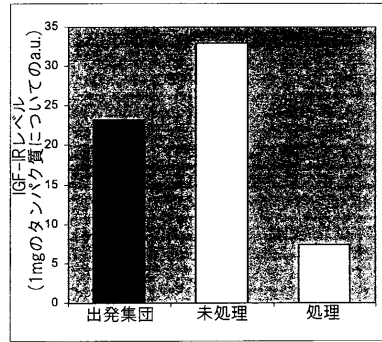


Fig. 2

【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2008/001457
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 G01N33/74		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/053596 A (PFIZER [US]; ABGENIX INC [US]; COHEN BRUCE D [US]; BEEBE JEAN [US]; MI) 11 July 2002 (2002-07-11) cited in the application the whole document page 65, line 1 - page 66, line 33 page 67, line 1 - page 68, line 16 example XVII	1-14
<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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 April 2008		Date of mailing of the international search report 23/05/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tuyman, Antonin

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/001457

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>COHEN B ET AL: "Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871". CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 11, no. 5, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 2063-2073, XP002433667 ISSN: 1078-0432 cited in the application the whole document</p>	1-14
A	<p>WO 2005/005635 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; GRAUS YVO [NL]; KOPETZKI ERHARD [DE]; KUENKELE) 20 January 2005 (2005-01-20) cited in the application the whole document in particular: abstract examples 1,7,12,13 claims 17,18</p>	1-14
A	<p>KOOIJMAN RON ET AL: "Differential expression of type I insulin-like growth factor receptors in different stages of human T cells" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 4, 1995, pages 931-935, XP002478574 ISSN: 0014-2980 the whole document in particular: abstract</p>	1-14
A	<p>WO 2004/087756 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; GRAUS YVO [NL]; KOPETZKI ERHARD [DE]; KUENKELE) 14 October 2004 (2004-10-14) cited in the application the whole document example 14</p>	1-14
P,A	<p>DOUGLAS RAYMOND S ET AL: "Aberrant expression of the insulin-like growth factor-1 receptor by T cells from patients with Graves' disease may carry functional consequences for disease pathogenesis" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 178, no. 5, March 2007 (2007-03), pages 3281-3287, XP002478630 ISSN: 0022-1767 abstract</p>	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/001457

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02053596	A	11-07-2002	AR 032028 A1 22-10-2003
			BG 108037 A 30-04-2005
			BR 0116728 A 12-04-2005
			CA 2433800 A1 11-07-2002
			CN 1564829 A 12-01-2005
			CN 1854157 A 01-11-2006
			CZ 20032131 A3 14-01-2004
			EE 200300318 A 15-10-2003
			EP 1399483 A2 24-03-2004
			HK 1072059 A1 18-01-2008
			HR 20030627 A2 30-06-2005
			HU 0302525 A2 28-10-2003
			IS 6866 A 04-07-2003
			JP 2004531217 T 14-10-2004
			MA 26040 A1 01-04-2004
			MX PA03006034 A 01-07-2005
			NO 20033074 A 04-07-2003
			NZ 527302 A 27-10-2006
			OA 12589 A 08-06-2006
			PL 366340 A1 24-01-2005
			SG 138469 A1 28-01-2008
			SK 9932003 A3 08-06-2004
			UY 27087 A1 20-06-2002
			YU 54203 A 03-03-2006
			ZA 200305995 A 04-08-2004
			WO 2005005635
BR PI0412478 A 19-09-2006			
CA 2532173 A1 20-01-2005			
CN 1823163 A 23-08-2006			
KR 20060054296 A 22-05-2006			
MX PA06000270 A 07-04-2006			
SG 129437 A1 26-02-2007			
TW 290147 B 21-11-2007			
US 2005008642 A1 13-01-2005			
WO 2004087756	A	14-10-2004	
			EP 1613658 A2 11-01-2006
			JP 2006526388 T 24-11-2006

## フロントページの続き

(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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 エフェルス, シュテファン

ドイツ連邦共和国, 7 9 3 7 9 ミュールハイム, パウラ - ホレンベガー - シュトラッセ 2 3

(72)発明者 ヒンツ, アンドレアス

ドイツ連邦共和国, 8 2 3 7 7 ペンツベルク, アホルンシュトラッセ 5 8

(72)発明者 キュンケレ, クラウス - ペーター

ドイツ連邦共和国, 8 3 6 7 1 ベネディクトボイエレン, カルベンデルシュトラッセ 9

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB41 BB43 CC22

专利名称(译)	抗胰岛素样生长因子I受体抗体抑制活性的评价方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010517024A</a>	公开(公告)日	2010-05-20
申请号	JP2009546703	申请日	2008-02-25
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	エフェルスシュテファン ヒンツアンドレアス キュンケレクラウスペーター		
发明人	エフェルス,シュテファン ヒンツ,アンドレアス キュンケレ,クラウス-ペーター		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P3/10		
CPC分类号	G01N33/5044 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/53.D A61K39/395.D A61K39/395.N A61P3/10		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC22		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中村弘 池田 达则		
优先权	2007003948 2007-02-27 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种评估抗体抑制活性的方法，所述抗体用于抑制用抗体处理的哺乳动物的裂解的PBL样品中IGF-1和/或IGF-2与IGF-1R的结合，其中所述PBL其特征在于测量IGF-1R蛋白水平作为抗体抑制活性的指示。

