

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-160696

(P2011-160696A)

(43) 公開日 平成23年8月25日(2011.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 1/22 (2006.01)	C O 7 K 1/22	4 B O 6 5
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22	4 C O 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

審査請求 未請求 請求項の数 19 O L 外国語出願 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-25479 (P2010-25479)
 (22) 出願日 平成22年2月8日 (2010.2.8)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (74) 代理人 100067035
 弁理士 岩崎 光隆
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稜
 (74) 代理人 100144923
 弁理士 中川 将之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾ヒト I G F - 1 / E ペプチドに対する抗体

(57) 【要約】

【課題】本発明は、修飾ヒトインシュリン様増殖因子1タンパク質に免疫特異的に結合する抗体の製造および使用を提供すること。

【解決手段】本発明の高特異性抗体により上記課題を解決する。当該抗体は、修飾(例えば、h I G F - 1 / E a 3 m u t)と内因性ヒト I G F - 1 タンパク質を区別できる。これらの抗体はh I G F - 1 またはh I G F - 2 とわずかしが、または全く交差反応しない。それらはまた齧歯類 I G F - 1 または I G F - 2 とわずかしが、または全く交差反応しない。本抗体はヒトまたは動物に投与されている I G F - 1 / E ペプチドの薬物動態学的(P K) / 薬力学(P D) 評価に使用できる。本発明の抗体を捕捉抗体として使用するサンドイッチ E L I S A アッセイは、サンプル中の変異 I G F - 1 / E タンパク質を定量できる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペプチドGPTLCGAELV(配列番号1)に免疫特異的に結合するが、ペプチドGPETLCGAELV(配列番号2)に免疫特異的に結合しない抗体。

【請求項 2】

ペプチドGPTLCGAELV(配列番号1)を含むポリペプチドに免疫特異的に結合するが、ペプチドGPETLCGAELV(配列番号2)を含むポリペプチドに免疫特異的に結合しない抗体。

【請求項 3】

ペプチドPAKS AVRAQR(配列番号6)に免疫特異的に結合するが、ペプチドPTKAARSIRAQR(配列番号7)に免疫特異的に結合しない抗体。

10

【請求項 4】

ペプチドPAKS AVRAQR(配列番号6)を含むポリペプチドに免疫特異的に結合するが、ペプチドPTKAARSIRAQR(配列番号7)を含むポリペプチドに免疫特異的に結合しない、抗体。

【請求項 5】

QC1(ハイブリドーマDSM ACC3028により発現)、QC2(ハイブリドーマDSM ACC3026により発現)、QQ2(ハイブリドーマDSM ACC3027により発現)、QQ5(ハイブリドーマDSM ACC3024により発現)およびQQ6(ハイブリドーマDSM ACC3025により発現)から成る群から選択される、請求項1から4のいずれかに記載の抗体。

20

【請求項 6】

(i)CDRH1について配列番号12、CDRH2について配列番号13、CDRH3について配列番号14、CDRL1について配列番号15、CDRL2について配列番号16およびCDRL3について配列番号17；

(ii)CDRH1について配列番号18、CDRH2について配列番号19、CDRH3について配列番号20、CDRL1について配列番号21、CDRL2について配列番号22およびCDRL3について配列番号23；

(iii)CDRH1について配列番号24、CDRH2について配列番号25、CDRH3について配列番号26、CDRL1について配列番号27、CDRL2について配列番号28およびCDRL3について配列番号29；

30

(iv)CDRH1について配列番号30、CDRH2について配列番号31、CDRH3について配列番号32、CDRL1について配列番号33、CDRL2について配列番号34およびCDRL3について配列番号35；または

(v)CDRH1について配列番号36、CDRH2について配列番号37、CDRH3について配列番号38、CDRL1について配列番号39、CDRL2について配列番号40およびCDRL3について配列番号41

を含む、請求項1から4のいずれかに記載の抗体。

【請求項 7】

(i)配列番号42を含むVH鎖および配列番号43を含むVL鎖；

40

(ii)配列番号44を含むVH鎖および配列番号45を含むVL鎖；

(iii)配列番号46を含むVH鎖および配列番号47を含むVL鎖；

(iv)配列番号48を含むVH鎖および配列番号49を含むVL鎖；または

(v)配列番号50を含むVH鎖および配列番号51を含むVL鎖

を含む、請求項6に記載の抗体。

【請求項 8】

DSM ACC3028、DSM ACC3026、DSM ACC3027、DSM ACC3024およびDSM ACC3025(これら全てDSMZに寄託)から成る群から選択される、ハイブリドーマ。

【請求項 9】

50

配列 G P T L C G A E L V (配列番号 1)、C P A K S A V R A Q R (配列番号 5)または P A K S A V R A Q R (配列番号 6)を含む、単離ポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 5 - 7 のいずれかに記載の抗体または請求項 9 に記載のポリペプチドをコードする、核酸。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 13】

請求項 1 - 7 のいずれかに記載の抗体を含む、修飾インシュリン様増殖因子 1 / E (I G F - 1) の検出のための改善された酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)。

【請求項 14】

溶液から修飾インシュリン様増殖因子 1 / E (I G F - 1) を精製するための改善された親和性クロマトグラフィー方法であって、この改善が、請求項 1 - 7 のいずれかに記載の抗体による精製を含む、方法。

【請求項 15】

患者から得た血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E を、請求項 1 - 7 のいずれかに記載の抗体を使用して検出する工程を含む、患者における修飾 I G F - 1 / E タンパク質のレベルを測定する方法。

【請求項 16】

A 修飾 I G F - 1 / E を必要とする患者におけるその最適投与量を維持する方法であって：

(i) 請求項 1 - 7 のいずれかに記載の抗体を使用して、修飾 I G F - 1 / E を投与されている患者からの血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E を検出し；そして

(ii) 患者血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E のレベルが予定レベルより低いとき、さらに該修飾 I G F - 1 / E を該患者に投与する

工程を含む、方法。

【請求項 17】

筋肉障害を有する患者の処置方法であって：

(i) 修飾 I G F - 1 / E を以前に投与されている患者から得た血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E の血清濃度を請求項 1 - 7 のいずれかに記載の抗体を使用して測定し；そして

(ii) h I G F - 1 / E a 3 m u t の血清濃度が予定した最適レベルより低いならば、さらに修飾 I G F - 1 / E を患者に投与する。

【請求項 18】

修飾 I G F - 1 / E が W O 2 0 0 7 / 1 4 6 6 8 9 に記載されているものである、請求項 13 に記載のアッセイまたは請求項 14 から 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

h I G F - 1 / E a 3 m u t が W O 2 0 0 7 / 1 4 6 6 8 9 の実施例 1 に記載のもの(ここでは配列番号 8 と記載され、ここでは修飾 I G F - 1 E N o . 1 と記載される)、または W O 2 0 0 7 / 1 4 6 6 8 9 の実施例 4 5 に記載のもの(ここでは配列番号 5 3 と記載され、ここでは修飾 I G F - 1 / E N o . 2 と記載される)である、請求項 15 から 18 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、免疫グロブリン、抗体およびそのフラグメントに関する。特に、本発明は、修飾ヒトインシュリン様増殖因子 1 タンパク質に免疫特異的に結合する抗体の製造および使用に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

インシュリン様増殖因子1 (IGF-1、ソマトメジン)は、筋肉肥大を誘発し、骨格筋萎縮を阻止する小一本鎖タンパク質である。IGF-1は、最初に、ヒト身体でIGF-1/E前駆体として合成され、ここで、Eは成熟IGF-1タンパク質のC末端の伸張ペプチドである。成熟IGF-1は、最初は既知スプライス変異体mRNAの3個のうち1個によりコードされる。各mRNAのオープン・リーディング・フレームは、70アミノ酸IGF-1部分および、C末端に特定のIGF-1 mRNAによってEa、EbまたはEcであり得る特定の伸張(E)ペプチドを含む前駆体タンパク質をコードする。このC末端EペプチドがそのIGF-1成熟体として開裂される。

【0003】

修飾組み換えヒトIGF-1/Eタンパク質は構築され、公開PCT特許出願WO2007/146689に記載されている。これらの修飾IGF-1/Eペプチドは野生型IGF-1と比較して長い半減期、高い安定性、阻害性インシュリン様増殖因子結合タンパク質(IGFBP)への低い親和性、および高い効果を有する。例示的修飾ヒトIGF-1/Eタンパク質は、hIGF-1/Ea 3mutである(図1参照)。“3mut”名は、次の3工程の修飾を有するhIGF-1-E-ペプチド前駆体を意味する：(1)G1、P2、およびE3の欠失；(2)Arg37からAlaへの変異(R37A)；および(3)R71およびS72の欠失。これらのhIGF-1/E 3mutペプチドは骨格筋萎縮の処置用の新規薬剤の可能性があると提案されている。

【0004】

しかしながら、この候補薬剤の薬物動態学(PK)および薬力学(PD)の評価は、野生型と修飾hIGF-1/Eペプチドが、互いに全ペプチド鎖長における3個所の離れた位置での1個または2個のアミノ酸しか異ならないため、困難である(図1)。内因性hIGF-1の同時の検出無しにhIGF-1/Ea 3mutペプチドを認識する抗体は市販されていない。

【発明の概要】

【0005】

発明の要約

本発明は、修飾(例えば、hIGF-1/Ea 3mut)および内因性ヒトIGF-1タンパク質を区別できる高特異性抗体を提供する。本発明の抗体は、hIGF-1またはhIGF-2と交差反応性がわずかしか、または全くない。それらはまた齧歯類IGF-1またはIGF-2と、交差反応性がわずかしか、または全くない。本抗体は、ヒトまたは動物に投与されたIGF-1/Eペプチドの薬物動態学的(PK)および薬力学(PD)評価に有用である。

【0006】

一つの態様において、本発明の抗体は、ペプチドGPTLCGAELV(配列番号1)に免疫特異的に結合するが、ペプチドGPETLCGAELV(配列番号2)には免疫特異的に結合しない。他の態様において、本発明の抗体は、ペプチドPAKSAVRAQR(配列番号6)と免疫特異的に結合するが、ペプチドPTKAAARSIRAQR(配列番号7)とは免疫特異的に結合しない。

【0007】

本発明は、それ故、抗体QC1、QC2、QQ2、QQ5およびQQ6を提供する。

本抗体はモノクローナルでもポリクローナルでもよい。それらは、適当な哺乳動物、例えばマウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ラクダまたはサメの免疫化により製造し得る。

【0008】

さらに本発明の範囲に包含されるのは、本発明の抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードする核酸配列、かかる核酸配列を含むベクター、例えば発現ベクター、ならびにかかるベクターで形質転換した細胞である。

【0009】

本発明はまた、ハイブリドーマDSM ACC3028、DSM ACC3026、D

10

20

30

40

50

S M A C C 3 0 2 7、D S M A C C 3 0 2 4 および D S M A C C 3 0 2 5 (2 0 0 9 年 1 1 月 1 0 日 に D S M Z, I n h o f f e n s t r. 7 B, D - 3 8 1 2 4 B r a u n s c h w e i g, G e r m a n y に 寄 託) を 提 供 し、こ れ ら は 各 々 抗 体 Q C 1、Q C 2、Q Q 2、Q Q 5 および Q Q 6 の 発 現 に 使 用 可 能 である。

【 0 0 1 0 】

本 発 明 は 又 ち、修 飾 組 み 換 え ヒ ト I G F - 1 / E ペ プ チ ド の 薬 物 動 態 学 的 (P K) / 薬 力 学 (P D) 関 係 を 評 価 す る た め の 生 化 学 分 析 ア ッ セ イ も 提 供 す る。

【 0 0 1 1 】

一 つ の 態 様 に お い て、本 発 明 の 抗 体 が 免 疫 吸 着 剤 (捕 捉 抗 体) と し て 使 用 さ れ る、本 ア ッ セ イ は 放 射 免 疫 ア ッ セ イ (R I A) ま た は 酵 素 結 合 免 疫 吸 着 ア ッ セ イ (E L I S A)、例 え ば サ ン ド イ ッ チ E L I S A 前 臨 床 お よ び 臨 床 サ ン プ ル 中 の 変 異 I G F - 1 / E タ ン プ ク 質 を 定 量 す る た め の ア ッ セ イ で あり。こ れ ら の 適 用 に お い て、本 抗 体 を 分 析 に よ り 検 出 可 能 な 試 薬、例 え ば 放 射 性 同 位 体、蛍 光 分 子 ま た は 酵 素 で 標 識 可 能 である。

10

【 0 0 1 2 】

加 え て、本 発 明 の 抗 体 を、例 え ば 親 和 性 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー に よ り、大 量 の I G F - 1 / E 3 m u t ペ プ チ ド を 精 製 す る た め に 使 用 す る。本 発 明 の 抗 体 は、そ れ 故 に、筋 肉 萎 縮 処 置 用 医 薬 の 商 業 規 模 精 製 に 有 用 である。

【 0 0 1 3 】

一 つ の 態 様 に お い て、上 記 方 法 に 使 用 す る 抗 体 は、Q C 1、Q C 2、Q Q 2、Q Q 5 お よ び Q Q 6 か ら 成 る 群 か ら 選 択 さ れ る。

20

【 0 0 1 4 】

発 明 の 詳 細 な 記 載

本 発 明 の 抗 体

定 義。本 明 細 書 に 使 用 す る い く つ か の 用 語 の 定 義 を 以 下 に 記 載 す る。他 の 用 語 の 定 義 は、I l l u s t r a t e d D i c t i o n a r y o f I m m u n o l o g y, 2 n d E d i t i o n, C r u s e, J. M. a n d L e w i s, R. E., e d s. (C R C P r e s s, B o c a R a t o n, F l o r i d a, 1 9 9 5) に 見 る こ と が 可 能 である。

【 0 0 1 5 】

対 象 へ の 薬 剤 ま た は 医 薬 の 投 与 は、自 己 投 与 お よ び 他 者 に よ る 投 与 を 含 む。記 載 の 医 学 的 状 態 の 処 置 ま た は 予 防 の 種 々 の モ ー ド は、完 全 な ま た は 完 全 未 満 の 処 置 ま た は 予 防 を 含 む、そ し て こ こ で、何 ら か の 生 物 学 的 に ま た は 医 学 的 に 関 連 す る 結 果 が 達 成 さ れ る、“実 質 的”を 意 味 す る こ と も 認 識 さ れ よ う。

30

【 0 0 1 6 】

用 語 “ 抗 体 ” は、あ る エ ピ ト ー プ、例 え ば、修 飾 I G F - 1 / E ペ プ チ ド に 見 ら れ る が、野 生 型 I G F で 見 ら れ ない エ ピ ト ー プ、例 え ば 両 方 と も 以 下 に 記 載 す る ペ プ チ ド A お よ び ペ プ チ ド C 抗 原 の エ ピ ト ー プ と 特 異 的 に 結 合 し、認 識 す る 免 疫 グ ロ ブ リ ン 遺 伝 子 ま た は そ の フ ラ グ メ ン ト 由 来 の フ レ ー ム ワ ー ク 領 域 を 含 む、ポ リ ペ プ チ ド を 意 味 す る。用 語 抗 体 の 使 用 は、一 本 鎖 完 全 抗 体 を 含 む 完 全 抗 体、お よ び そ の 抗 原 結 合 フ ラ グ メ ン ト を 意 味 す る。用 語 “ 抗 体 ” は、一 本 鎖 抗 体 を 含 む 抗 原 結 合 抗 体 フ ラ グ メ ン ト を 含 む、こ れ は、可 変 領 域 の み を、ま た は そ れ を、次 の ポ リ ペ プ チ ド 要 素 の 全 て ま た は 一 部 と 組 み 合 わ せ て 含 む 得 る：抗 体 分 子 の ヒ ン ジ 領 域、C H₁、C H₂、お よ び C H₃ ド メ イ ン。ま た 本 発 明 に 包 含 さ れ る の は、可 変 領 域 お よ び ヒ ン ジ 領 域、C H₁、C H₂、お よ び C H₃ ド メ イ ン の 何 ら か の 組 み 合 わ せ で あり。本 発 明 の 結 合 剤 と し て 有 用 な 抗 体 関 連 分 子 は、例 え ば、F a b、F a b' お よ び F (a b')₂、F d、一 本 鎖 F v s (s c F v)、一 本 鎖 抗 体、ジ ス ル フ ィ ド 結 合 F v s (s d F v) お よ び V_L ま た は V_H ド メ イ ン の い ず れ か を 含 む フ ラ グ メ ン ト を 含 む、こ れ に 限 定 さ れ ない。例 は：(i) F a b フ ラ グ メ ン ト、V_L、V_H、C_L お よ び C H₁ ド メ イ ン か ら 成 る 一 価 フ ラ グ メ ン ト；(i i) F (a b')₂ フ ラ グ メ ン ト、ヒ ン ジ 領 域 で ジ ス ル フ ィ ド 橋 に よ り 結 合 し た 2 個 の F a b フ ラ グ メ ン ト を 含 む 二 価 フ ラ グ メ ン ト；(i i i) V_H お よ び C H₁ ド メ イ ン か ら 成 る F d フ ラ グ メ ン ト；(i v) 抗 体 の 1 個 の ア ー ム の V_L お よ び V_H ド メ イ ン か ら 成 る F v フ ラ グ メ ン ト、(v) V_H ド メ イ ン か ら 成 る d A b フ ラ グ メ ン ト (W a r d e t a l., N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 - 5 4 6, 1 9 8 9)；お よ び (v i) 単 離 さ れ た 相 補 性 決 定 領

40

50

域(CDR)。用語“抗体”は、ドメイン抗体、マキシボディ(maxibody)、ミニボディ(minibody)、イントラボディ(intrabody)、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)、テトラボディ(tetrabody)、v-NARおよびビス-scFvを含む(例えば、Hollinger & Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136(2005)参照)。抗体が産生されたら、それをキメラ化またはヒト化し得る。例えば、キメラ抗体を作るために、当分野で既知の方法を使用して、可変領域をヒト定常領域に結合できる(例えば、Cabilly et al.の米国特許4,816,567参照)。ヒト化抗体を作るために、当分野で既知の方法を使用して、CDR領域をヒトフレームワークに挿入できる。例えば、Winterの米国特許5,225,539、およびQueen et al.の米国特許5,530,101; 5,585,089; 5,693,762および6,180,370参照。この代わりに、抗体の抗原結合部分を、フィブロネクチンIII型(Fn3)のようなポリペプチドをベースにした骨格にグラフトできる(フィブロネクチンポリペプチドモノボディ(monobody)を記載する米国特許6,703,199参照)。抗原結合部分を、タンデムFvセグメント(VH-CH1-VH-CH1)の対を含む一本鎖分子に挿入でき、それは、相補的軽鎖ポリペプチドと一体となって、抗原結合領域の対を作る(Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995); および米国特許5,641,870)。

10

【0017】

用語“生物学的サンプル”は、生存細胞由来の、またはそれと接触したサンプル材料を意味する。用語“生物学的サンプル”は、対象から単離された組織、細胞および体液、ならびに対象内に存在する組織、細胞および体液を含むことを意図する。

20

【0018】

用語“エピトープ”は、抗体に特異的結合できるタンパク質決定因子を意味する。エピトープは、通常、化学的に活性な分子の表面基群(surface grouping)、例えばアミノ酸類または糖側鎖を有し、通常特異的三次元構造的な特性、ならびに特異的荷電特性を有する。高次構造および非高次構造エピトープは、変性溶媒存在下で、前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないことにより区別される。

【0019】

用語“免疫学的反応条件”は、抗原の特定のエピトープに対して産生された抗体が、その抗体が実質的に他の全てのエピトープに結合するようにも検出可能に大きな程度で、一般的にバックグラウンド結合の少なくとも2倍、好ましくはバックグラウンドの少なくとも5倍でそのエピトープに結合することを可能にする条件を意味する。免疫学的反応条件は、抗体結合反応に依存し、そして典型的に免疫アッセイプロトコールにおいて用いられるものである。免疫アッセイ形態および条件の詳細についてHarlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988)を参照のこと。

30

【0020】

ここで使用する用語“免疫特異的”は、1個だけの抗原性決定因子と反応する個々の抗体結合部位の能力を意味する。本抗体の結合部位は、分子のFab部分に位置し、重および軽鎖の超可変領域から構築される。抗体の結合親和性は、一抗原性決定因子と抗体上の一結合部位の間の反応の強度である。これは、抗原性決定因子と抗体の結合部位の間に作用する引力および反発力の合計である。IgG抗体についてここで使用する用語“高親和性”は、標的抗原に対して 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、または 10^{-10} M、または 10^{-11} M以下のKDを有する抗体を意味する。しかしながら、“高親和性”結合は、抗体アイソタイプが違えば異なる。例えば、IgMアイソタイプの“高親和性”結合は、 10^{-7} M以下、または 10^{-8} M以下のKDを有する抗体を意味する。用語“モノクローナル抗体”は、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含むクローン由来の抗体を意味し、それが産生された方法を意味しない。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して一結合特異性および親和性を示す。モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ、組み換え、およびファージディスプレイ法を含み、これに限定されない種々の方法を使用して製造できる。

40

50

【0021】

用語“ポリクローナル抗体”は、少なくとも2種の異なる抗体産生細胞株に由来する抗体の調製物を意味する。この用語の使用は、抗原の異なるエピトープまたは領域に特異的に結合する抗体を含む、少なくとも2個の抗体の調製物を含む。

【0022】

用語“ポリペプチド”、“ペプチド”および“タンパク質”は、互いにペプチド結合または修飾ペプチド結合(すなわち、ペプチドアイソスター)により結合された2個以上のアミノ酸を含むポリマーを意味するために、ここで、交換可能に使用される。ポリペプチドは、一般にペプチド、糖ペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および一般的にタンパク質と呼ばれる長鎖の両方を意味する。ポリペプチドは、20種の遺伝子がコードするアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。ポリペプチドは、自然の過程で、例えば翻訳後の過程で、または当分野で既知の化学的修飾技術のいずれかで修飾されたアミノ酸配列を含む。かかる修飾は、基礎的教科書におよびより詳細に研究書に、ならびに無数の学術論文に十分に記載されている。特に、修飾IGF-1/Eタンパク質は、公開PCT特許出願WO2007/146689に記載の任意の修飾IGF-1/Eタンパク質、ならびにその二次的に修飾された(グリコシル化、ペグ化など)タンパク質であり得る。

10

【0023】

用語“組み換え”は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関連して使用したとき、その細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種核酸またはタンパク質の導入により、または、天然核酸またはタンパク質の改変により修飾されているか、またはその物質が、そのように修飾された細胞に由来することを示す。特に、組み換えIGF-1/Eタンパク質は、公開PCT特許出願WO2007/146689に記載の任意の組み換えIGF-1/Eタンパク質、ならびにその二次的に修飾された(グリコシル化、ペグ化など)タンパク質であり得る。

20

【0024】

用語“一本鎖抗体”または“一本鎖Fv(scFv)”は、Fvフラグメントの2個のドメイン、 V_L および V_H の抗体融合分子を意味する。Fvフラグメントの2個のドメイン、 V_L および V_H は、別の遺伝子によりコードされるが、それらを、組み換え法を使用して、 V_L および V_H 領域が対合して一本鎖Fv(scFv)として知られる一価分子を形成する、一タンパク質鎖としてそれらを製造できる合成リンカーにより、結合できる。例えば、Bird et al., Science 242: 423-426 (1988); およびHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)参照。かかる一本鎖抗体は、用語“抗体”フラグメントの中に包含され、組み換え技術によりまたは完全抗体の酵素的または化学的開裂により製造できる。

30

【0025】

用語“特異的結合”は、少なくとも 10^{-6} Mの結合親和性での、本発明の抗体とエピトープの(ここに記載のペプチド(ペプチドA、ペプチドBまたはペプチドC)またはかかるペプチドを含むタンパク質上での)接触を意味する。好ましい結合剤は、少なくとも約 10^{-7} M、好ましくは 10^{-8} M ~ 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} Mの親和性で結合する。

40

【0026】

上記の通り、本発明の抗体を標識してよい。標識抗体は、種々の標識を用いる、種々のアッセイに使用できる。本発明の抗体と目的のエピトープの間の抗体-抗原複合体の検出は、抗体に検出可能な物質を結合させることにより容易にできる。適当な検出手段は、標識、例えば放射性核種、酵素、補酵素、蛍光体(fluorescer)、化学発光体(chemiluminescer)、色原体、酵素基質またはコファクター、酵素阻害剤、補欠分子族複合体、フリーラジカル、粒子、色素などの使用を含む。適当な酵素の例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む; 適当な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含む; 適当な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレ

50

セイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライドまたはフィコエリトリンを含む；発光物質の例はルミノールである；生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンを含む；そして適当な放射活性物質の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H を含む。

【0027】

本発明の抗体の例を、下記表AおよびBに開示する。

【表1】

表A

Ab名	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
A	GYTFTGFWM Q (配列番号12)	AIYPGDGDGT KYTQKFKG (配列番号13)	SNDGPTGFG MDY (配列番号14)	KSSQSLNSR TRKNYLA (配列番号15)	WASTRES (配列番号16)	IQSYNLPWT (配列番号17)
B	GYTFTTYWM Q (配列番号18)	AIYPGDGDTR YTQKFKG (配列番号19)	SNDGSLGYG MDS (配列番号20)	KSSQSLNSR TRKNYLA (配列番号21)	WASTRES (配列番号22)	QQSYNLPWT (配列番号23)
C	GDGFTDYVID (配列番号24)	VINLGSSTTK YNEKFKD (配列番号25)	STIYYDYDVW FAY (配列番号26)	KSSQSLFYSS NQKNYLA (配列番号27)	WAYTRES (配列番号28)	QQYYNYPRT (配列番号29)
D	GYDFSDYVID (配列番号30)	VINLGSVTK YNENFRG (配列番号31)	STIYYDYDVW FGY (配列番号32)	KSSQSLLYSS NQKNYLA (配列番号33)	WASTRES (配列番号34)	QQFYNYPRT (配列番号35)
E	GYDFSDYVID (配列番号36)	VINLGSVTK YNEIFTG (配列番号37)	STIFYDYDVW FGS (配列番号38)	KSSQSLLYGS NQKNYLA (配列番号39)	WASTRES (配列番号40)	QQFYDYPRT (配列番号41)

10

20

【表 2】

表 B

Ab 名	VH	VL
A	VQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYT FTGFWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPG DGDTKYTQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSFLASEDSAVYYCARSNDGPTGFG MDYWGGQTSVTVSSA(配列番号42)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQS LLNSRTRKNYLAWYQQKPRQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN VQAEDLAVYYCIQSYNLPWTFGGGTKL EIKR(配列番号43)
B	VQLQQSGAELARPGASVKLSCTASGYT FTTYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPG DGDTRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSNLASEDSAVYFCARSNDGSLGYGM DSWGQGTSTVTVSSA(配列番号44)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQS LLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDLSVYYCQQSYNLPWTFGGGTK LEIKR(配列番号45)
C	VQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGD GFTDYVIDWIKQRPGQGLEWIGVINLGS GTTKYNEKFKDKSTLTADKSSSTAYMQ LNSLTPDDSAVYFCAESTIYYDYDVF AYWGQGTLSVSVSA(配列番号46)	DIVMTQTPSSLDVSVGEKVTMTCKSSQ SLFYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPRLI YWAYTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SVKAEDLAVYYCQQYYNYPRTFGGGT KLEIKR(配列番号47)
D	VQLKQSGPELVRPGTSVKVSCASGYD FSDYVIDWVKQRPGQGLEWIGVINLGS DVTKYNENFRGKATLTADKSSSTAYMQ VSSLTSDSAVYFCARSTIYYDYDVF YWGQGTSLVTVSAA(配列番号48)	DIVITQTPSSLTVSVGEKVTMNCKSSQS LLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VKAEDLAVYFCQQFYNYPRTFGGGTK LEIRR(配列番号49)
E	VQLQQSGTELVVRPGTSVKVSCASGYD FSDYVIDWVKQRPGQGLEWIGVINLGS GVTKYNEIFTGKATLTADKSSSTAYMQ VSSLTSDSAVYFCARSTIFYDYDVF SWGQGTSLVTVSAA(配列番号50)	DIVMTQSPSSLTVSVGEKVIIVNCKSSQS LLYGSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VKAEDLAVYYCQQFYDYPRTFGGGTK LEIRR(配列番号51)

10

20

30

【0028】

一つの態様において、本発明の抗体は、(i)CDRH1について配列番号12、CDRH2について配列番号13およびCDRH3について配列番号14；(ii)CDRH1について配列番号18、CDRH2について配列番号19およびCDRH3について配列番号20；(iii)CDRH1について配列番号24、CDRH2について配列番号25およびCDRH3について配列番号26；(iv)CDRH1について配列番号30、CDRH2について配列番号31およびCDRH3について配列番号32；または(v)CDRH1について配列番号36、CDRH2について配列番号37およびCDRH3について配列番号38を含む。

40

【0029】

一つの態様において、本発明の抗体は、(i)CDRL1について配列番号15、CDRL2について配列番号16およびCDRL3について配列番号17；(ii)CDRL1について配列番号21、CDRL2について配列番号22およびCDRL3について配列番号23；(iii)CDRL1について配列番号27、CDRL2について配列番号28およびCDRL3について配列番号29；(iv)CDRL1について配列番号33、CDRL2について配列番号34およびCDRL3について配列番号35；または(v)CDRL1について配列番号39、CDRL2について配列番号40およびCDRL3について配列番号41を含む。

50

【0030】

一つの態様において、本発明の抗体は、(i)CDRH1について配列番号12、CDRH2について配列番号13、CDRH3について配列番号14、CDRL1について配列番号15、CDRL2について配列番号16およびCDRL3について配列番号17；(ii)CDRH1について配列番号18、CDRH2について配列番号19、CDRH3について配列番号20、CDRL1について配列番号21、CDRL2について配列番号22およびCDRL3について配列番号23；(iii)CDRH1について配列番号24、CDRH2について配列番号25、CDRH3について配列番号26、CDRL1について配列番号27、CDRL2について配列番号28およびCDRL3について配列番号29；(iv)CDRH1について配列番号30、CDRH2について配列番号31、CDRH3について配列番号32、CDRL1について配列番号33、CDRL2について配列番号34およびCDRL3について配列番号35；または(v)CDRH1について配列番号36、CDRH2について配列番号37、CDRH3について配列番号38、CDRL1について配列番号39、CDRL2について配列番号40およびCDRL3について配列番号41を含む。

10

【0031】

一つの態様において、本発明の抗体は、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48または配列番号50を含むVH鎖を含む。

一つの態様において、本発明の抗体は、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49または配列番号51を含むVL鎖を含む。

20

【0032】

一つの態様において、本発明の抗体は、(i)配列番号42を含むVH鎖および配列番号43を含むVL鎖；(ii)配列番号44を含むVH鎖および配列番号45を含むVL鎖；(iii)配列番号46を含むVH鎖および配列番号47を含むVL鎖；(iv)配列番号48を含むVH鎖および配列番号49を含むVL鎖；または(v)配列番号50を含むVH鎖および配列番号51を含むVL鎖を含む。

【0033】

一つの態様において、本発明の抗体は、配列番号52、54、56、58または60によりコードされるVH鎖を含む。一つの態様において、本発明の抗体は、配列番号53、55、57、59または61によりコードされるVL鎖を含む。

30

【0034】

一つの態様において、本発明の抗体は、(i)配列番号52によりコードされるVH鎖および配列番号53によりコードされるVL鎖；(ii)配列番号54によりコードされるVH鎖および配列番号55によりコードされるVL鎖；(iii)配列番号56によりコードされるVH鎖および配列番号57によりコードされるVL鎖；(iv)配列番号58によりコードされるVH鎖および配列番号59によりコードされるVL鎖；または(v)配列番号60によりコードされるVH鎖および配列番号61によりコードされるVL鎖を含む。

【0035】

ポリペプチド

本発明は、配列GPTLCGAELV(配列番号1)、CPAKSAVRAQR(配列番号5)またはPAKSAVRAQR(配列番号6)を含む、またはそれから成る単離ポリペプチドを提供する。かかるポリペプチドは、本発明の抗体の惹起に有用である。本発明のポリペプチドはまた、より大きなポリペプチドの一部であってもよい。例えば、本発明のポリペプチドの横に、さらにn末端および/またはc末端アミノ酸があってもよい。

40

【0036】

一般に、本発明のポリペプチドは、天然に存在しない環境で提供され、すなわちそれらは、天然に存在する環境から分離される。ある態様において、本ポリペプチドは、コントロールと比較して本ポリペプチドが富化された組成物で存在する。本発明のポリペプチドは、それ故に、好ましくは単離されたまたは実質的に単離された形で提供され、すなわち本ポリペプチドは、実質的に他の発現ポリペプチドが存在しない組成物で存在し、ここで

50

、実質的に存在しないは、組成物の75%(重量)未満、好ましくは50%未満、より好ましくは10%(例えば5%)未満が他の発現ポリペプチドから構成されることを意味する。

【0037】

核酸分子

本発明の他の局面は、本発明のポリペプチドまたは抗体をコードする核酸分子に関する。例示的核酸は、配列番号1-51に記載のいずれか一つのポリペプチドをコードするものを含む。さらなる例示的核酸配列は、配列番号52-61に記載のものである。本核酸は、全細胞中に、細胞ライセートに存在してよく、または部分的に精製されたまたは実質的に精製された形の核酸でよい。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当分野で既知のその他を含む、標準法により、他の細胞成分または他の不純物、例えば、他の細胞性核酸またはタンパク質から精製されたときに、“単離された”または“実質的に純粋にされた”。F. Ausubel, et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York参照。本発明の核酸は、例えば、DNAまたはRNAであってよく、イントロン配列を含んでも含まなくてもよい。一つの態様において本核酸はcDNA分子である。本核酸は、ベクター、例えばファージディスプレイベクター、または組み換えプラスミドベクターに存在してよい。本発明の核酸は、標準分子生物学技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ、例えばここに記載のものにより発現させた抗体について、そのハイブリドーマにより産生された抗体の軽および重鎖をコードするcDNAは、標準PCR増幅またはcDNAクローニング技術により得ることができる。

10

20

【0038】

トランスフェクターマ産生モノクローナル抗体の産生

本発明の抗体をコードする核酸が得られたら、本発明の抗体もまた、例えば、当分野で既知の通りの組み換えDNA技術および遺伝子導入法を使用して、宿主細胞トランスフェクターマで産生できる(例えば、Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

【0039】

例えば、抗体、またはその抗体フラグメントを発現させるために、一部または完全長軽および重鎖をコードするDNAを、標準分子生物学技術(例えば、目的の抗体を発現するハイブリドーマを使用したcDNAクローニング)により得ることができ、そのDNAを、遺伝子が転写および翻訳制御配列に動作可能に連結されるように発現ベクターに挿入し得る。この状況で、用語“動作可能に連結される”は、抗体遺伝子が、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳の制御という意図される機能を遂行するようにベクター内で連結されることを意味する。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用する発現宿主細胞と適合可能なように選択する。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別のベクターに入れてよく、または、より典型的に、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに入れる。抗体遺伝子を、標準法(例えば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しないならば、平滑末端ライゲーション)により、発現ベクターに入れる。ここに記載の抗体の軽および重鎖可変領域を使用して、それらを、既に所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域をコードする発現ベクターに、VHセグメントが、ベクター内でCHセグメントに動作可能に連結され、そしてVLセグメントが、ベクター内のCLセグメントに動作可能に連結されるように挿入することにより、任意の抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を製造できる。それに加えて、または別に、組み換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードできる。抗体鎖遺伝子を、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にフレーム内で結合するようにベクターにクローン化できる。シグナルペプチドは免疫グロブリンシグナルペプチドでも異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド)でもよい。

30

40

【0040】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する制御配列を担持する。用語“制御配列”は、プロモーター、エンハ

50

ンサーおよび抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御する他の発現制御要素(例えば、ポリ
 アデニル化シグナル)を含むことを意図する。かかる制御配列は、例えば、Goeddel (Gene
 Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA
 1990)に記載されている。発現ベクターの設計は、制御配列の選択を含み、形質転換すべ
 き宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得るこ
 とは、当業者には当然である。哺乳動物宿主細胞発現のための制御配列は、哺乳動物細胞に
 おける高レベルのタンパク質発現を指示するウイルス要素、例えばサイトメガロウイルス
 (CMV)、サルウイルス40(SV40)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要
 後期プロモーター(AdMLP))、およびポリオーマ由来のプロモーターおよび/または
 エンハンサーを含む。あるいは、非ウイルス制御配列、例えばユビキチンプロモーターま
 たはP-グロビンプロモーターを使用してよい。なおさらに、異なる供給源由来の配列か
 ら成る制御要素、例えば、SV40早期プロモーター由来の配列およびヒトT細胞白血病
 ウイルス1型の長末端反復を含むSRaプロモーターシステムがある(Takebe, Y. et al.
 , 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

10

20

30

40

50

【0041】

抗体鎖遺伝子および制御配列に加えて、本発明の組み換え発現ベクターは、さらなる配
 列、例えば宿主細胞中でのベクターの複製を制御する配列(例えば、複製起点)および選択
 可能マーカー遺伝子を担持し得る。選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿
 主細胞の選択を容易にする(例えば、全てAxel et al.の米国特許4,399,216、4,
 634,665および5,179,017参照)。例えば、典型的に、選択可能マーカー遺伝
 子は、ベクターが導入された宿主細胞に薬剤、例えばG418、ヒグロマイシンまたはメ
 トトレキサートに対する耐性を付与する。選択可能マーカー遺伝子は、ジヒドロフォレ
 トレダクターゼ(DHFR)遺伝子(メトトレキサート選択/増幅と共にdhfr宿主細胞
 において使用するための)およびneo遺伝子(G418選択のため)を含む。

【0042】

軽および重鎖発現のために、重および軽鎖をコードする発現ベクターを、標準技術によ
 り宿主細胞にトランスフェクトする。用語“トランスフェクション”の種々の形態は、外
 来DNAの原核または真核宿主細胞への導入に一般的に使用される広範な技術、例えば、
 エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAEデキストラントランスフェク
 ションなどを包含することを意図する。本発明の抗体を原核または真核宿主細胞のいづれ
 かで発現させることが理論的に可能である。真核細胞、特に哺乳動物宿主細胞での抗体の
 発現は、真核細胞、および特に哺乳動物細胞が、適切に折りたたまれたおよび免疫学的に
 活性な抗体を集合させ、分泌させる可能性が原核細胞よりも高いため、記載する。抗体遺
 伝子の原核発現での発現は、活性抗体の高収率での産生には無効であると報告されている
 (Boss, M. A. and Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13)。

【0043】

組み換え本発明の抗体を発現するための哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター
 卵巣(CHO細胞)(例えば、R.J. KaufmanおよびP.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-6
 21により記載されたDHFR選択可能マーカーと共に使用する、dhfr-CHO細胞
 を含む、UrlaubおよびChasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220記載)、
 NSO骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2細胞を含む。特に、NSO骨髓腫細胞と使用
 するための、他の発現系は、W087/04462、W089/01036およびEP3
 38,841に示されるGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組み換え発現
 ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入されたとき、本抗体は、宿主細胞内で抗体を発現させ
 るか、または、抗体を、宿主細胞が増殖している培養培地に分泌させるのに十分な時間、
 宿主細胞を培養することにより産生される。抗体を、標準タンパク質精製法を使用して培
 養培地から回収できる。

【0044】

診断法/処置法

上記の通り、本発明の抗体を、サンプル中の修飾IGF-1/Eの濃度を測定するため

の種々のアッセイに使用し得る。

【0045】

それ故、本発明は、患者における修飾 I G F - 1 / E タンパク質のレベルを測定する方法であって：

(i) 該修飾 I G F - 1 / E を投与された患者から血液サンプルを得て、そして

(ii) 本発明の抗体を使用して該サンプル中の修飾 I G F - 1 / E を検出する

工程を含む、方法を提供する。

【0046】

修飾 I G F - 1 / E のレベルは、標準技術を使用して、例えば既知量の修飾 I G F - 1 / E を使用して校正曲線を設定し、試験サンプルで得られた結果と校正マーカ-を使用して得られた結果を比較することにより定量できる(例えば実施例参照)。

10

【0047】

患者の修飾 I G F - 1 / E のレベルタンパク質の測定が可能になることは、医師が治療効果を達成するために適切な量を決定することを可能にする。それ故、本発明はまた修飾 I G F - 1 / E を必要とする患者におけるその最適投与量を維持する方法であって：

(i) 該修飾 I G F - 1 / E を投与された患者から血液サンプルを得て、

(ii) 本発明の抗体を使用して該サンプル中の修飾 I G F - 1 / E を検出し、そして

(iii) 患者血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E のレベルが予定したレベルより低いとき

、さらに該修飾 I G F - 1 / E を該患者に投与する

工程を含む、方法を提供する。

20

【0048】

ある場合において、血液サンプルは患者から既に得られているかもしれないことに注意すべきである。それ故、本発明は、患者における修飾 I G F - 1 / E タンパク質のレベルを測定する方法であって、患者から得た血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E を、本発明の抗体を使用して検出する工程を含む方法を提供する。

【0049】

本発明はまた修飾 I G F - 1 / E を必要とする患者におけるその最適投与量を維持する方法であって：

(i) 修飾 I G F - 1 / E を投与されている患者からの血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E を本発明の抗体を使用して検出し、そして

(ii) 患者血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E のレベルが予定レベルより低いとき、さらに該修飾 I G F - 1 / E を該患者に投与する

工程を含む、方法を提供する。

30

【0050】

本発明はまた修飾 I G F - 1 / E の産生のモニタリングも可能にする。それ故、サンプルを生産プラントから得て、本発明の抗体で検定して、正しい形態の修飾 I G F - 1 / E が産生されていることを確認してよい。

【0051】

本発明はまた筋肉障害を有する患者の処置方法であって：

(i) 修飾 I G F - 1 / E を以前に投与されている患者から得た血液サンプル中の修飾 I G F - 1 / E の血清濃度を本発明の抗体を使用して測定し；そして

(ii) h I G F - 1 / E a 3 m u t の血清濃度が予定した最適レベルより低いならば、さらに修飾 I G F - 1 / E を患者に投与する

ことを含む、方法も提供する。

40

【0052】

上記の態様において、修飾 I G F - 1 / E は h I G F - 1 / E a 3 m u t でも、W O 2 0 0 7 / 1 4 6 6 8 9 に記載されているものでもよい。例えば、修飾 I G F - 1 / E は、W O 2 0 0 7 / 1 4 6 6 8 9 の実施例 1 に記載のもの(そこでは配列番号 8 と記載され、ここでは修飾 I G F - 1 E N o . 1 と記載される)、または W O 2 0 0 7 / 1 4 6 6 8 9 の実施例 4 5 に記載のもの(そこでは配列番号 5 3 と記載され、ここでは修飾 I G F -

50

1 / E No. 2 と記載される)であり得る。

【0053】

タンパク質精製

上記の通り、本発明の抗体はまた修飾 IGF - 1 / E の商業規模精製にも使用できる(すなわち筋肉萎縮に使用するための医薬)。例えば、本発明の抗体は、修飾 IGF - 1 / E を精製するための親和性クロマトグラフィーに使用し得る。

【0054】

組み換えポリペプチドの精製は当分野で既知であり、親和性クロマトグラフィー精製技術などを含む(一般的に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)を参照のこと。またBailon et al., An Overview of Affinity Chromatography, Humana Press (2000)も参照のこと)。バイオセラピューティックタンパク質の商業規模精製のための親和性クロマトグラフィー法(例えば膜ベースの親和性技術)は当分野で既知である。Brandt et al., Bio/Technology 6: 779-782 (1988)参照。

10

【0055】

好ましくは、かかる方法で精製した修飾 IGF - 1 / E は h IGF - 1 / E a 3 mut、または WO 2007 / 146689 に記載のものである。例えば、修飾 IGF - 1 / E は、WO 2007 / 146689 の実施例 1 に記載のもの(ここでは配列番号 8 と記載され、ここでは修飾 IGF - 1 E No. 1 と記載される)、または WO 2007 / 146689 の実施例 45 に記載のもの(ここでは配列番号 53 と記載され、ここでは修飾 IGF - 1 / E No. 2 と記載される)であり得る。

20

【0056】

均等物

本発明の一つ以上の態様の詳細を上記の文章により明示する。ここに記載のものに類似のまたは均等な何等かの方法および材料を本発明の実施または試験に使用できるが、好ましい方法および材料をここに記載する。本発明の他の特性、目的、および利点は、本明細書および特許請求の範囲から明らかである。一般に、酵素的反応および精製工程は製造者の説明書に従い行う。技術および方法は、一般に当分野で寛容の方法および種々の一般的参考書に従い行う。一般に、本明細書に全体を包含させる、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)を参照のこと。

30

【0057】

本発明は、本明細書に記載の特定の態様の観点で限定されず、それは、本発明の個々の局面の一つの説明として解釈される。本発明の多くの修飾および改変が、当業者には明らかな通り、その精神および範囲から逸脱することなく成し得る。本発明の範囲内の機能的に同等な方法および装置は、ここに列記されたものに加えて、前記から当業者には明らかである。かかる修飾および改変は、添付の特許請求の範囲内の範囲内に入ると解釈される。本発明は、特許請求の範囲が権利を与える均等物の完全な範囲に沿って、添付の特許請求の範囲の観点でのみ限定されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】 h IGF - 1、h IGF - 1 / E a wt、h IGF - 1 / E a 3 mut、および h IGF - 2 のアミノ酸配列アラインメント。h IGF - 1 / E wt と h IGF - 1 / E 3 mut の間のアミノ酸差異を太字で強調する。配列中の点線は欠損残基を示す。下記の動物免疫化のための抗原として選択した h IGF - 1 / E a 3 mut からのペプチドに下線を引く。

40

【図2】 ペプチド A 免疫化により産生された h IGF - 1 / E 3 mut 特異的マウスモノクローナル抗体の活性を示す一連のチャート。細胞培養上清をハイブリドーマクローン QC 1 (A) および QC 2 (B) から回収し、h IGF - 1、h IGF - 1 / E a wt、h IGF - 1 / E a 3 mut、h IGF - 2、m IGF - 1 または m IGF - 2 でコートしたマイクロタイターウェルで希釈した。プレートに結合した抗体をホースラディッシュペ

50

ルオキシダーゼ結合ポリクローナルヤギ抗マウスIgG抗体により検出した。

【図3】ペプチドB免疫化により産生されたhIGF-1/E_{3mut}反応性マウスモノクローナル抗体の活性を示す一連のチャート。モノクローナル抗体をハイブリドマクローンBP1(A、mg/ml)およびBP2(B、mg/ml)から産生および精製し、hIGF-1、hIGF-1/E_{wt}、hIGF-1/E_{3mut}、hIGF-2、mIGF-1またはmIGF-2でコートしたマイクロタイターウェルで1:10-1:100,000希釈した。Pプレートに結合した抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ポリクローナルヤギ抗マウスIgG抗体により検出した。

【図4】ペプチドC免疫化により産生されたhIGF-1/E_{3mut}特異的マウスモノクローナル抗体の活性を示す一連のチャート。細胞培養上清をハイブリドマクローンQQ2(A)、QQ5(B)、およびQQ6(C)から回収し、hIGF-1、hIGF-1/E_{wt}、hIGF-1/E_{3mut}、hIGF-2、mIGF-1またはmIGF-2でコートしたマイクロタイターウェルで希釈した。Pプレートに結合した抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ポリクローナルヤギ抗マウスIgG抗体により検出した。

【図5】ペプチドC免疫化から産生されたモノクローナル抗体のサンドイッチELISA分析を示す一連のチャート。種々の濃度のhIGF-1/E_{a3mut}、hIGF-1/E_{c3mut}、グリコシル化hIGF-1/E_{a3mut}、およびhIGF-1ペプチドをQQ2(A)、QQ5(B)、またはQQ6(C)でコートしたマイクロタイタープレートに添加した。プレートに結合したIGF-1ペプチドをホースラディッシュペルオキシダーゼ結合モノクローナルマウス抗hIGF-1抗体で検出した。

【実施例】

【0059】

ペプチドAに対して生じた抗体。2個のモノクローナル抗体を、ペプチドA、GPTLCGAELV(IGF-1/E_{3mut}のaa₁₋₁₀)(配列番号1)(表1参照)でのマウス免疫化により産生した。QC1およびQC2により認識されるエピトープは、1個のアミノ酸のみ野生型hIGF-1およびmIGF-1配列GPETLCGAELV(配列番号2)で異なる。このペプチドを、BiobenchおよびAbie Pro 3.0でのタンパク質構造分析が低表面確率および低抗原性指数を有することを示唆したが、動物免疫化のために選択した。

【表3】

GP-TLCGAELV hIGF-1/E_{3mut}(配列番号1)

GP TLCGAELV

GPETLCGAELV hIGF-1/E_{wt}、hIGF-1、mIGF-1(配列番号2)

【0060】

ハイブリドマを(1)組み換えhIGF-1/E_{3mut}(ポジティブクローン用);(2)組み換えhIGF-1/E_{wt}タンパク質(ネガティブクローン用);(3)組み換えhIGF-2(ネガティブクローン用)、および(4)組み換えmIGF-2タンパク質(ネガティブクローン用)でスクリーニングした。

【0061】

5匹のマウスからのペプチドA-KLHコンジュゲートで3回免疫化した後抗血清力価は、hIGF-1/E_{3mut}を用いたELISAで測定して、1:500~1:16,000の範囲であった。約1,000個のハイブリドマが、最高応答動物であるマウス#3から産生され、そのうち4個はhIGF-1/E_{3mut}と強く反応するが、しかしhIGF-1/E_{wt}、hIGF-1、hIGF-2、mIGF-1、およびmIGF-2とは反応しないかまたは弱くしか反応しないことが判明した。全4個のhIGF-1/E_{3mut}反応性ハイブリドマをサブクロニングの対象とし、各々個別のハイブリドマ由来の2個の最終サブクローン、QC1(7B9C6)およびQC2(8B7A2)を選択し、hIGF-1/E_{3mut}に特異的なモノクローナル抗体の産生につい

10

20

30

40

50

てELISAで確認した(図2、表1)。

【0062】

2個のmAbs、QC1(7B9C6)およびQC2(8B7A2)はhIGF-1/E 3mutに非常に特異的であり、前臨床および臨床サンプルにおける修飾組み換えヒトIGF-1/Eペプチドの定量のためのサンドイッチELISAにおける免疫吸着剤(捕捉抗体)として使用できる。2個のmAbs QC1(7B9C6)およびQC2(8B7A2)を発現するハイブリドーマを、DSMZに各々受託番号DSM ACC3028およびDSM ACC3026の下に寄託する。

【0063】

ペプチドBに対して生じた抗体。2個のモノクローナル抗体を、ペプチドB、CGDRGFYFN-KPTGYGSS(hIGF-1/E 3mutのaa 17-33)(配列番号3)(表1参照)でのマウス免疫化により産生した。このペプチドは、高表面確率および高抗原性指数を有するために選択した。しかしながら、hIGF-1およびhIGF-1/E 3mutは、この領域で同一配列を有するそれ故に、このペプチドに対して生じた抗体は、次のタンパク質の全てを認識する：hIGF-1、hIGF-1/E wt、およびhIGF-1/E 3mut。加えて、mIGF-1およびhIGF-1は、この領域に1個のアミノ酸の差異しか示さない。

10

【表4】

CGDRGFYFNKPTGYGSS hIGF-1/E 3mut、hIGF-1、hIGF-1/E wt(配列番号3)
CG RGFYFNKPTGYGSS
CGPRGFYFNKPTGYGSS mIGF-1(配列番号4)

20

【0064】

ハイブリドーマを(1)組み換えhIGF-1/E 3mut(ポジティブクローン用)；(2)組み換えhIGF-2(ネガティブクローン用)；(3)組み換えmIGF-1(ネガティブクローン用)；および(4)組み換えmIGF-2タンパク質(ネガティブクローン用)でスクリーニングした。

【0065】

ペプチドBに対するマウス免疫応答は強かった。5匹のマウスからのペプチドB-KLHコンジュゲートで4回免疫化した後抗血清力価は、1:1,000から>1:32,000の範囲であった。約1,000個のハイブリドーマが、最高応答動物であるマウス#5から産生され、そのうち21個はhIGF-1、hIGF-1/E wt、およびhIGF-1/E 3mutと強く反応し、hIGF-2、mIGF-1およびmIGF-2に弱い反応性であることが判明した。全13個のハイブリドーマをサブクロニングの対象とした。各々個別のハイブリドーマ由来の2個の最終サブクローン、BP1(2F11D8)およびBP2(3C5D10)を選択し、hIGF-1、hIGF-1/E wtおよびhIGF-1/E 3mutに結合するモノクローナル抗体の産生を確認した(図3、表1)。

30

【0066】

2個のmAbs、BP1(2F11D8)およびBP2(3C5D10)はhIGF-1およびhIGF-1/E 3mutの両方を認識し、hIGF-2およびmIGF-1およびmIGF-2と交差反応する。それにも関わらず、これらのmAbsはIGF-1試験に有用であるはずである。

40

【0067】

ペプチドCに対して生じた抗体：3個のモノクローナル抗体を、ペプチドC、CPAKSAVRAQR(hIGF-1/E 3mutのaa 65-74と、コンジュゲーションのためのN末端C)(配列番号5)(表1参照)でのマウス免疫化により産生した。このhIGF-1/E 3mutのペプチドを、その高表面確率および抗原性指数のために選択した。それは、成熟hIGF-1と変異Eペプチドの間の連結領域に伸びる。

【表 5】

PAKSA--VRAQR hIGF-1/E 3mut (配列番号6)

P K+A +RAQR

PTKAARSIRAQR mIGF-1 (配列番号7)

【0068】

ハイブリドーマを(1)組み換えhIGF-1/E 3mut(ポジティブクローン用); (2)組み換えhIGF-1(ネガティブクローン用); (3)組み換えhIGF-1/E wt(ネガティブクローン用); (4)組み換えmIGF-1(ネガティブクローン用); および (5)組み換えmIGF-2タンパク質(ネガティブクローン用)でスクリーニングした。

10

【0069】

5匹のマウスからのペプチドC-KLHコンジュゲートで4回免疫化した後抗血清力価は、1:400から1:3,200の範囲であった。約1,000個のハイブリドーマが、最高応答動物であるマウス#4、最高応答動物から産生され、そのうち188個は標準ELISAでhIGF-1/E 3mutと反応するが、hIGF-1とは反応しないことが判明した。188個のハイブリドーマのうち、20個をサブクローニングの対象とした。各々個別のハイブリドーマ由来の3個のサブクローン、QQ2(2C10B7)、QQ5(6H6G11)およびQQ6(7B1H12)を選択し、hIGF-1/E 3mutを認識するが、hIGF-1を認識しないモノクローナル抗体の産生を確認した(図4、表1)。

20

【0070】

QQ2、QQ5およびQQ6により認識されるエピトープはPAKSAVRAQR(aa 65-74)(配列番号6)である。これらの3個のmAbs、QQ2(2C10B7)、QQ5(6H6G11)およびQQ6(7B1H12)は、hIGF-1/E 3mutを認識し、hIGF-1/E wtと交差反応性であるが、hIGF-1と結合しなかった。これらのmAbsの各々は、種々の修飾組み換えヒトIGF-1/Eペプチドを定量するためのサンドイッチELISAにおける免疫吸着剤(捕捉抗体)として使用できるであろう。3個のmAbs、QQ2(2C10B7)、QQ5(6H6G11)およびQQ6(7B1H12)を発現するハイブリドーマを、DSMZに各々受託番号DSM ACC3027、DSM ACC3024およびDSM ACC3025の下に寄託する。

30

【0071】

【表 6】

表 1

結果概要

エピトープ	クローンID	hIGF-1/ E 3mut	hIGF-1/ E wt	hIGF-1	hIGF-2	mIGF-1	mIGF-2	mAbアイソ タイプ
ペプチド A (aa 1-10)	QC1 (7B9C6)	+	-	-	-	-	-	IgG1
	QC2 (8B7A2)	+	-	-	-	-	-	IgG2a
ペプチド B (aa 17-33)	BP1 (2F11D8)	+	+	+	+/-	+/-	+/-	IgG2a
	BP2 (3C5D10)	+	+	+	+/-	+/-	+/-	IgG2a
ペプチド C (aa 65-74)	QQ2 (2C10B7)	+	+/-	-	-	-	-	IgG1
	QQ5 (6H6G11)	+	+/-	-	-	-	-	IgG1
	QQ6 (7B1H12)	+	+/-	-	-	-	-	IgG1

10

20

【0072】

本発明の抗体の製造方法

抗体製造の一般法。ある抗原(例えばペプチド A、ペプチド B またはペプチド C)に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を製造するための多くの方法が当分野で既知である。Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988) および上記の他の引用文献を参照のこと。

【0073】

動物免疫化、ハイブリドーマスクリーニング、および mAb 産生。5 匹の BALB/c マウスのグループを、KLH とコンジュゲートした選択したペプチドの各々で免疫化した。ハイブリドーマを、標準 ELISA で (1) 組み換え hIGF-1/E 3mut; (2) 組み換え hIGF-1/E wt; (3) 組み換え hIGF-1; (4) 組み換え hIGF-2; (5) 組み換え mIGF-1; および/または (6) 組み換え mIGF-2 についてスクリーニングし、所望の特異性のハイブリドーマを 3 回のサブクローニングおよび再スクリーニングのために選択した。モノクローナル抗体を、タンパク質 A 親和性カラムを使用して、最終選択ハイブリドーマの細胞培養上清から精製した。

30

【0074】

3 個の抗原ペプチド(ペプチド A、ペプチド B およびペプチド C) を GL Biochem(Shanghai) Ltd., Shanghai, China で化学的に合成し、HPLC 精製した。ペプチド純度を質量分析により免疫グレード(約 85%)であることを決定した。これらのペプチドは、C 残基を含み、Pierce(Cat. No. 77605) から購入したキットでマレイミド活性化 KLH とコンジュゲートさせた。

40

【0075】

6 - 8 週齢の BALB/c マウスを抗体を産生するために使用した。免疫応答を誘発するために、5 匹のマウスのグループに、各 50 μg の 3 個の抗原ペプチド - KLH コンジュゲートの CFA 溶液(最初の注射)および 25 μg の各抗原の IFA 溶液(2 回目および 3 回目の注射)を皮下注射により投与した。25 μg の抗原での最終ブースト免疫化を何のアジュバントも使用せずに腹腔内注射により行った。免疫化スケジュールは下記の通りであった:

0 日目: 免疫化前採血; 1 回目の抗原注射

50

26日目：2回目の抗原注射
 52日目：3回目の抗原注射
 63日目：試験採血；抗血清力価E L I S A
 69日目：最終ブースト注射
 73日目：脾臓摘出

【0076】

免疫化後の抗原特異的抗体の発生をE L I S Aにより試験した。Nunc-Immunoマイクロタイタープレートを1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のh I G F - 1 / E 3 m u t、h I G F - 1 / E w t、h I G F - 1、h I G F - 2、m I G F - 1またはm I G F - 2の炭酸ナトリウム - 重炭酸ナトリウム緩衝液(Pierce, Cat. No. 28382)でコートし、連続的に希釈した免疫化前および抗血清および/またはハイブリドーマ上清サンプルとインキュベートし、抗原結合マウスI g Gをホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ポリクローマルヤギ抗マウスI g G抗体(Sigma, Cat. No. A0168)と、続くB M青色P O基質(Roche Diagnostics, Cat. No. 1.484.281)での発色により検出した。マイクロタイタープレートを、ペルオキシダーゼ反応を2.0 M H_2SO_4 で停止させた後に450 nmで読み、E L I S AデータをソフトウェアSoftMax Pro v5.2(Molecular Devices)で分析した。結果を図2 - 4に示す。

10

【0077】

ハイブリドーマを、免疫化マウスから単離した脾細胞と非分泌性骨髓腫S p 2 / 0 - A g 1 4細胞を標準法を使用して融合させることにより産生した。E L I S Aアッセイを行い、h I G F - 1 / E 3 m u tペプチドに特異的なハイブリドーマを同定した。

20

【0078】

選択したハイブリドーマを無血清増殖培地(Sigma, Cat. No. 24621C-500)に適合させた。モノクローナル抗体を、標準法に従いタンパク質A親和性カラムによりハイブリドーマ上清から精製し、透析を通してP B Sと交換した。精製抗体のアイソタイプをSouthern B iotechから購入したマウスI g Gアイソタイプ分類キット(Cat. No. 5300-05)で決定した。

【0079】

抗原特異的ハイブリドーマを、限界希釈により3回のサブクロニング(およびE L I S Aによる再スクリーニング)の対象とした。

ペプチドA、ペプチドBおよびペプチドCでの免疫化により生じた抗体の結果は上記の通りである。

30

【0080】

本発明の抗体の使用法

サンプル中の修飾I G F - 1 / Eを検出するための免疫アッセイ。本発明は、I G F - 1 / Eタンパク質が投与されている個体からの生物学的サンプル(例えば、血液、血清、細胞、組織)における修飾I G F - 1 / Eタンパク質を測定するための診断的アッセイを提供する。診断的アッセイ、例えば競合アッセイは、標識アナログ(“トレーサー”)が、共通結合パートナー上の限られた数の結合部位について、試験サンプル分析物と競合する能力を利用する。結合パートナーは、一般に競合の前または後は不溶性であり、結合パートナーに結合するトレーサーおよび分析物が非結合トレーサーおよび分析物から分離される。この分離はデカント(結合パートナーが前に不溶性であるとき)または遠心分離(結合パートナーが競合反応後に沈殿するとき)により行う。試験サンプル分析物の量は、マーカ物質の量で測定される結合したトレーサーの量と逆比例する。既知量の分析物との用量応答曲線を製造し、試験サンプル中に存在する分析物の量の定量的測定をするために試験結果と比較する。これらのアッセイは、酵素を検出可能マーカとして使用したとき酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)システムと呼ばれる。特にE L I S A試験の形のかかるアッセイは、臨床環境および日常的な血液スクリーニングに相当な適用がある。免疫アッセイ形態および条件の詳細についてHarlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988)参照。

40

【0081】

50

本発明の免疫アッセイは、診断的アッセイ、予後診断的アッセイ、薬理ゲノミクス、およびモニタリング臨床試験が、予後診断的(予測的)目的で使用される予測医学の分野で有用である。

【0082】

本発明のモノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISAアッセイ。ペプチドC、QQ2、QQ5、およびQQ6に対して産生した3個のmAbsの各々を捕捉抗体としておよび市販のIGF-1 mAbを検出試薬として使用して、QQ2、QQ5およびQQ6の特異性を試験するために行った。図5に示す通り、全ての3個のmAbsはhIGF-1/Ea3mut、hIGF-1/Ec3mutおよびグリコシル化hIGF-1/Ea3mutと結合するが、hIGF-1ペプチドと結合しない。QQ2、QQ5、またはQQ6は、hIGF-1へは、hIGF-1濃度が10nMほど高くても結合しない(図5)。

10

【0083】

ELISA分析のために、連続希釈した抗血清およびハイブリドーマ上清サンプルから得たOD値を、同様に処理した免疫前血清および細胞培地の各々のOD値と比較した。抗血清またはハイブリドーマ上清サンプルは、そのOD値がネガティブコントロールよりも少なくとも2倍高いとき、被覆抗原と反応性であると見なす。

【0084】

“単離”または“精製”ポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分は実質的に細胞性物質または、本発明の抗体が由来する細胞または組織供給源からの他の汚染物がなく、または化学分析したとき実質的に化学前駆体または他の化学物質がない。例えば、単離IGF-1/Eには、この薬剤の診断的または治療的使用を妨げるであろう物質がない。かかる妨害物質は、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質様および非タンパク質様溶質を含み得る。

20

【0085】

抗体選択性の評価

本抗体のwt ヒトIGFと比較した修飾IGF-1/Eに対する選択性を、修飾IGF-1/E No.1またはNo.2を動物に投与し、続いて本発明の抗体を使用して修飾IGF-1/Eを回収することにより確認した。動物に投与した基の量を超える修飾IGF-1/Eが回収されるならば、これは非特異的結合(すなわちwt IGFへの結合)を示す。

30

【0086】

7匹のサルおよび7匹のイヌからの血清サンプルに、80ng/ml変異IGF No.1、または200ng/ml変異IGF No.2を添加し、6匹のラットからの血清に30ng/ml変異IGF No.1を添加した。変異IGFの濃度をvar IGF No.1については抗体QQ2をまたは変異IGF No.2についてはQQ5を使用して分析した。

【0087】

両方の抗体について、アッセイを同じ方法で行った。96ウェルプレートを2.5μg/μlの濃度の100μl抗体(QQ2またはQQ5)でコートし、一夜静置した。次いで、ウェルを300μl遮断緩衝液で2回、および300μl洗浄緩衝液で4回洗浄した。血清サンプルをアッセイ緩衝液で1:10に希釈し、100μlの各サンプルを、100μlのコントロール(10-3000ng/ml濃度)と共にプレートに添加した。次いで、プレートを4時間、室温で振盪させながらインキュベートした。

40

【0088】

次いで100μlのビオチニル化抗ヒトIGF-1(アッセイ緩衝液中75ng/ml濃度)を添加し、プレートをさらに1時間、RTで振盪させながらインキュベートした。次いで、プレートを上記の通り4回洗浄した。

【0089】

100μlのストレプトアビジン-HRPコンジュゲート(100ng/ml)を添加し、プレートをさらに30分間、RTで振盪させながらインキュベートした。次いで、プレート

50

を上記の通り4回洗浄した。

【0090】

次いで100 μ lのTMBを各ウェルに添加し、10分間インキュベートした。次いで100 μ lの停止溶液を添加し、光学密度を30分以内に450nmで読んだ。

コントロールを較正曲線のプロットに使用した(示していない)。

【0091】

抗体QQ2の結果

【表7】

サル血清番号	添加濃度(ng/mL)	実測濃度(ng/mL)	理論値%
1	80.0	85.39	106.74
2	80.0	78.42	98.02
3	80.0	81.38	101.73
4	80.0	76.66	95.82
5	80.0	84.47	105.58
6	80.0	73.64	92.05
7	80.0	86.99	108.74
プール	80.0	80.86	101.08

10

20

【表8】

イヌ血清番号	添加濃度(ng/mL)	実測濃度(ng/mL)	理論値%
1	80.0	90.6	113.25
2	80.0	94.26	117.83
3	80.0	93.79	117.23
4	80.0	99.34	124.18
5	80.0	92.69	115.86
6	80.0	99.84	124.81
7	80.0	94.98	118.73
プール	80.0	91.02	113.78

30

【表9】

ラット血清番号	添加濃度(ng/mL)	実測濃度(ng/mL)	理論値%
1	30.0	30.88	102.93
2	30.0	29.79	99.29
3	30.0	32.30	107.68
4	30.0	33.00	109.99
5	30.0	33.29	110.97
6	30.0	37.38	124.59
プール	30.0	29.71	99.04

40

【0092】

抗体QQ5の結果

【表 10】

サル血清番号	添加濃度(ng/mL)	実測濃度(ng/mL)	理論値%
1	200.0	202.74	101.37
2	200.0	201.96	100.98
3	200.0	197.64	98.82
4	200.0	205.72	102.86
5	200.0	188.96	94.48
6	200.0	211.03	105.52
7	200.0	209.29	104.65
プール	200.0	209.55	104.78

10

【表 11】

イヌ血清番号	添加濃度(ng/mL)	実測濃度(ng/mL)	理論値%
1	200.0	245.11	122.56
2	200.0	230.96	115.48
3	200.0	224.84	112.42
4	200.0	224.11	112.06
5	200.0	211.27	105.64
6	200.0	251.15	125.57
7	200.0	214.18	107.09
プール	200.0	231.13	115.56

20

【0093】

特異性/選択性は、分析方法の、サンプルに存在する他の類似のおよび/または無関連な構成成分の存在下で分析物を測定および区別する能力である。それは、生物学的マトリックスに添加し、そして回収された分析物の量の測定から得られた精度の評価により調べられる。特異性/選択性の標的容認基準は、評価した少なくとも80%のマトリックスについて許容される回収率が得られることである。許容される回収率は、我々の方法では75 - 125%と定義した。全ての試験した個々のマトリックスがこの容認基準内にあるため、我々は、この方法は特異的かつ選択的であると見なした。

30

【 図 1 】

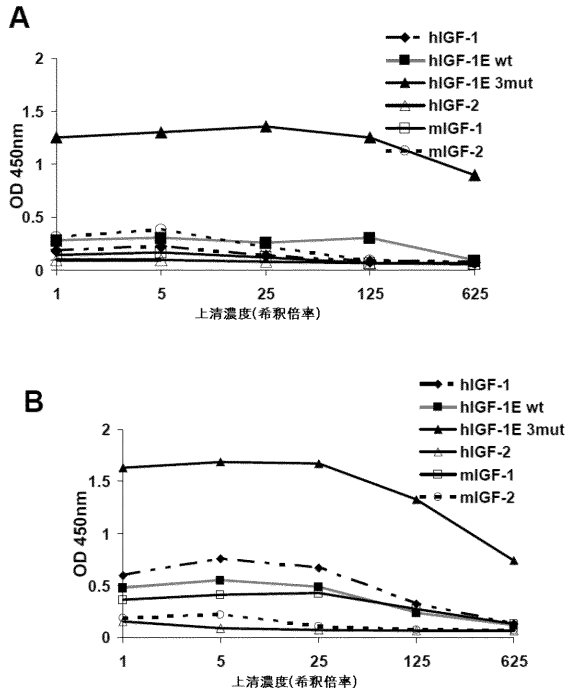
```

hIGF-1      1 ---GFETLGGAEIYDALQFVGGDRGFYFNHPTGYSSSSRAFPQTGIVECCFFSCDLRL 57
hIGF-1/E wt 1 ---GFETLGGAEIYDALQFVGGDRGFYFNHPTGYSSSSRAFPQTGIVECCFFSCDLRL 57
hIGF-1/E 3mut 1 ---GFETLGGAEIYDALQFVGGDRGFYFNHPTGYSSSSRAFPQTGIVECCFFSCDLRL 56
hIGF-2E     1 AYRFSETLGGSELVDTLQFVGGDRGFYFRAEASVSRFR---SRGIVECCFFSCDLALL 56

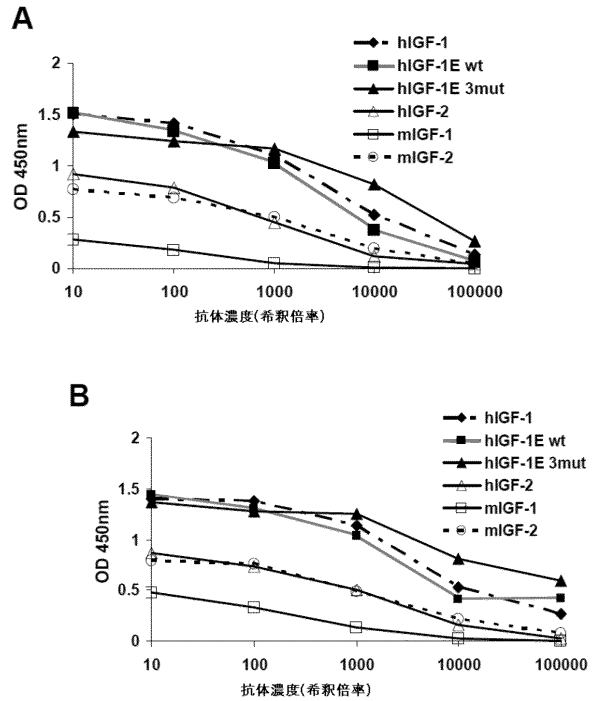
hIGF-1      58 EMYCAPLKEARSA----- 70 (配列番号8)
hIGF-1/Ea wt 58 EMYCAPLKEARSAVFAQRHTIMPKTK 66 (配列番号9)
hIGF-1/Ea 3mut 57 EMYCAPLKEARSA--VFAQRHTIMPKTK 63 (配列番号10)
hIGF-2/Ea    57 ETYCA--TFARSAEDVSTFTVLDFNFFR 63 (配列番号11)

```

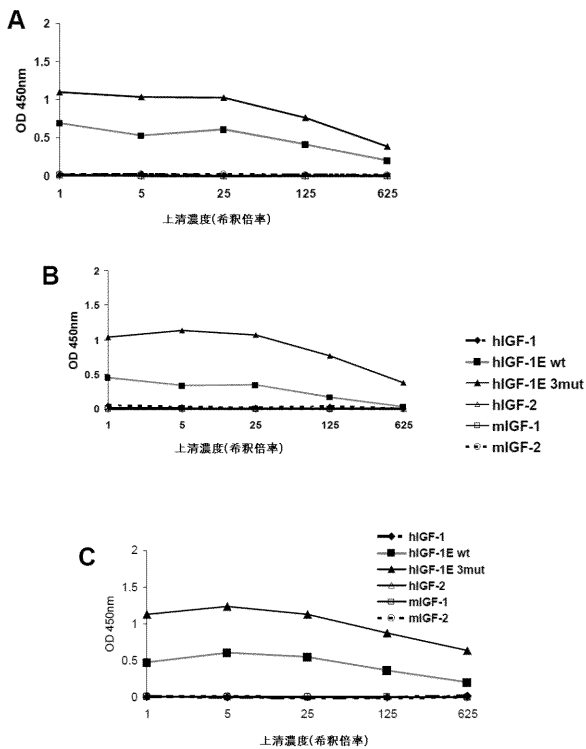
【 図 2 】



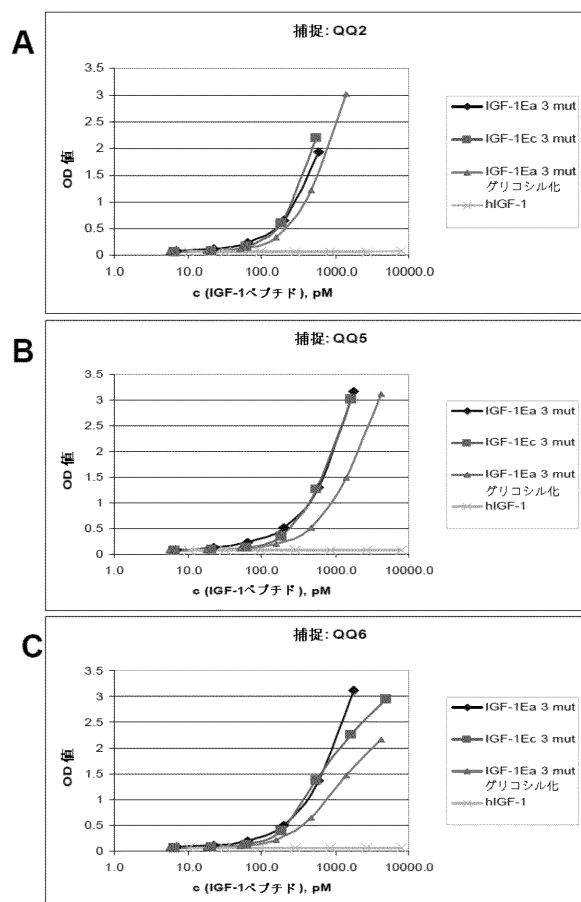
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2011160696000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
G 0 1 N 30/88 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 B	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	G 0 1 N 30/88 2 0 1 R	
C 0 7 K 14/475 (2006.01)	G 0 1 N 30/88 J	
	C 0 7 K 7/06	
	C 0 7 K 14/475	

(74)代理人 100156144

弁理士 落合 康

(72)発明者 マーラ・フォルナーロ

スイス、ツェーハー - 4 0 0 2 バーゼル、ポストファッハ、ノバルティス・ファルマ・アーゲー

(72)発明者 ライナー・ヒレンブランド

スイス、ツェーハー - 4 0 0 2 バーゼル、ポストファッハ、ヴェルク・クリベック、ノバルティス・ファルマ・アーゲー

(72)発明者 フランソワ・ルゲイ

スイス、ツェーハー - 4 0 0 2 バーゼル、ポストファッハ、ヴェルク・クリベック、ノバルティス・ファルマ・アーゲー

(72)発明者 ダニエラ・シュテルナー

スイス、ツェーハー - 4 0 0 2 バーゼル、ポストファッハ、ヴェルク・クリベック、ノバルティス・ファルマ・アーゲー

(72)発明者 ガオ・ユアン

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 シャンハイ、ブドン・ニュー・エリア、チャンジアン・ハイ・テク・パーク、レイン 8 9 8 ハレイ・ロード、ナンバー 8 ビルディング、チャイナ・ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・カンパニー・リミテッド

(72)発明者 ジョン・スー

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 シャンハイ、ブドン・ニュー・エリア、チャンジアン・ハイ・テク・パーク、レイン 8 9 8 ハレイ・ロード、ナンバー 8 ビルディング、チャイナ・ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・カンパニー・リミテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA31 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11

EA04 GA01 GA11 HA08

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 BA02 CA24 CA44

4C084 AA02 AA06 BA01 BA08 BA20 NA14 ZA94

4H045 AA10 AA11 BA09 CA40 DA01 DA75 DA86 EA20 FA20 FA74

GA26

【外国語明細書】

-1-

ANTIBODIES TO MODIFIED HUMAN IGF-1/E PEPTIDES

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates generally to immunoglobulins, antibodies and fragments thereof. In particular, the invention relates to the preparation and use of antibodies that bind immunospecifically to modified human insulin-like growth factor 1 proteins.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1, somatomedin) is a small single-chain protein that induces muscle hypertrophy and blocks skeletal muscle atrophy. IGF-1 is initially synthesized in the human body as an IGF-1/E precursor, where E is an extension peptide at the C-terminus of the mature IGF-1 protein. The mature IGF-1 is initially encoded by one of three known splice variant mRNAs. The open reading frame of each mRNA encodes a precursor protein containing the 70 amino acid IGF-1 moiety and a particular extension (E) peptide at the C-terminus, which can be Ea, Eb or Ec, depending on the particular IGF-1 mRNA. The C-terminal E peptide is later cleaved as IGF-1 matures.

Modified recombinant human IGF-1/E proteins have been constructed and described in published PCT patent application WO2007/146689. These modified IGF-1/E peptides have longer half-life, increased stability, reduced affinity to inhibitory insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), and increased efficacy compared to wild type IGF-1. An exemplary modified human IGF-1/E protein is hIGF-1/Ea 3mut (see FIG. 1). The "3mut" designation refers to a hIGF-1-E-peptide precursor having the following three sets of modifications: (1) deletion of G1, P2, and E3; (2) mutation of Arg 37 to Ala (R37A); and (3) deletion of R71 and S72. These hIGF-1/E 3mut peptides are proposed as being potential new drug for the treatment of skeletal muscle atrophy.

However, assessing the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) for this drug candidate is difficult, because the wild type and modified hIGF-1/E peptides differ with each other in only one or two amino acids at three separate positions over the length of the entire peptide chains (FIG. 1). No commercially available antibody recognizes the hIGF-1/Ea 3mut peptides without also detecting the endogenous hIGF-1.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides high-specificity antibodies that distinguish between modified (e.g. hIGF-1/Ea 3mut) and endogenous human IGF-1 proteins. The antibodies of the invention have little or no cross-reactivity with hIGF-1 or hIGF-2. They also have little or no cross-reactivity with rodent IGF-1 or IGF-2. The antibodies are useful for pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) assessments of IGF-1/E peptides that have been administered to humans or animals.

In one embodiment, the antibody of the invention binds immunospecifically to the peptide GPTLCGAELV (SEQ ID NO:1), but does not bind immunospecifically to the peptide GPETLCGAELV (SEQ ID NO:2). In another embodiment, the antibody of the invention binds immunospecifically to the peptide PAKSAVRAQR (SEQ ID NO:6) but does not bind immunospecifically to the peptide PTKAARSIRAQR (SEQ ID NO:7)

The invention therefore provides the antibodies QC1, QC2, QQ2, QQ5 and QQ6.

The antibodies may be monoclonal or polyclonal. They may be produced by immunisation of a suitable mammal, such as a mouse, rabbit, goat, horse, camel or shark.

Further included within the scope of the invention are hybridomas that produce the antibodies of the invention, nucleic acid sequences encoding said antibodies, vectors, for example expression vectors, comprising such a nucleic acid sequence, as well as cells transformed with such vectors.

The invention also provides the hybridomas DSM ACC3028, DSM ACC3026, DSM ACC3027, DSM ACC3024 and DSM ACC3025 (deposited with DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany on 10th November 2009), which can be used to express the antibodies QC1, QC2, QQ2, QQ5 and QQ6, respectively.

The invention also provides a bioanalytical assay for assessing the pharmacokinetic (PK)/pharmacodynamic (PD) relationship of modified recombinant human IGF-1/E peptides. In one embodiment, the assay is a radioimmunoassay (RIA) or an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), such as a sandwich ELISA, assay to quantify the mutant IGF-1/E proteins in preclinical and clinical samples, in which an antibody of the invention is used as the immunosorbent agent (capture antibody). In these applications, the antibodies can

-3-

be labelled with an analytically-detectable reagent such as a radioisotope, a fluorescent molecule or an enzyme.

In addition, the antibodies of the invention are used to purify large quantities of IGF-1/E 3muu peptides, for example by affinity chromatography. The antibodies of the invention are thus useful for the commercial-scale purification of a pharmaceutical to treat muscle atrophy.

In one embodiment, the antibody used in the methods described above is selected from the list consisting of QC1, QC2, QQ2, QQ5 and QQ6.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Antibodies of the invention

Definitions. The definitions of certain terms as used in this specification are provided below. Definitions of other terms may be found in the *Illustrated Dictionary of Immunology, 2nd Edition*, Cruse, J.M. and Lewis, R.F., eds. (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995).

The administration of an agent or drug to a subject or subject includes self-administration and the administration by another. It is also to be appreciated that the various modes of treatment or prevention of medical conditions as described are intended to mean "substantial", which includes total but also less than total treatment or prevention, and wherein some biologically or medically-relevant result is achieved.

The term "antibody" means a polypeptide comprising a framework region from an immunoglobulin gene or fragments thereof that specifically binds and recognizes an epitope, e.g., an epitope found on a modified IGF-1/E peptide but not on a wild type IGF, such as the epitopes of the Peptide A and Peptide C antigens, both described below. Use of the term antibody is meant to include whole antibodies, including single-chain whole antibodies, and antigen-binding fragments thereof. The term "antibody" includes antigen-binding antibody fragments, including single-chain antibodies, which can comprise the variable regions alone, or in combination, with all or part of the following polypeptide elements: hinge region, CH₁, CH₂, and CH₃ domains of an antibody molecule. Also included in the invention are any combinations of variable regions and hinge region, CH₁, CH₂, and CH₃ domains. Antibody-related molecules useful as binding agents of the invention include, e.g., but are not limited to, Fab, Fab' and F(ab')₂, Fd, single-chain Fvs (scFv), single-chain antibodies, disulphide-linked

-4-

Fvs (scFv) and fragments comprising either a V_L or V_H domain. Examples include: (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L , V_H , C_L and CH_1 domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulphide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the V_H and CH_1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-546, 1989), which consists of a V_H domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). The term "antibody" includes single domain antibodies, minibodies, nanobodies, intrabodies, diabodies, triabodies, tetrabodies, v-NAR and bis-scFv (see, e.g., Hollinger & Hudson, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136 (2005)). Once antibodies have been raised, they may be chimerised or humanised. For example, to create a chimeric antibody, the variable regions can be linked to human constant regions using methods known in the art (see e.g., U.S. Patent No. 4,816,567 to Cabilly *et al.*). To create a humanized antibody, the CDR regions can be inserted into a human framework using methods known in the art. See e.g., U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.* In an alternative to this antigen binding portions of antibodies can be grafted into scaffolds based on polypeptides such as Fibronectin type III (Fn3) (see U.S. Pat. No. 6,703,199, which describes fibronectin polypeptide minibodies). Antigen binding portions can be incorporated into single chain molecules comprising a pair of tandem Fv segments ($VH-CH_1-VH-CH_1$) which, together with complementary light chain polypeptides, form a pair of antigen binding regions (Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995), and U.S. Pat. No. 5,641,870).

The term "biological sample" means sample material derived from or contacted by living cells. The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject.

The term "epitope" means a protein determinant capable of specific binding to an antibody. Epitopes usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. Conformational and nonconformational epitopes are distinguished in that the binding to the former but not the latter is lost in the presence of denaturing solvents.

The term "immunologically reactive conditions" means conditions which allow an antibody, generated to a particular epitope of an antigen, to bind to that epitope to a detectably greater degree than the antibody binds to substantially all other epitopes, generally at least two times above background binding, preferably at least five times above background. Immunologically reactive conditions are dependent upon the format of the antibody binding reaction and typically are those utilized in immunoassay protocols. See, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988) for a description of immunoassay formats and conditions.

The term "immunospecifically" as used herein refers to the ability of an individual antibody combining site to react with only one antigenic determinant. The combining site of the antibody is located in the Fab portion of the molecule and is constructed from the hypervariable regions of the heavy and light chains. Binding affinity of an antibody is the strength of the reaction between a single antigenic determinant and a single combining site on the antibody. It is the sum of the attractive and repulsive forces operating between the antigenic determinant and the combining site of the antibody. As used herein, the term "high affinity" for an IgG antibody refers to an antibody having a KD of 10^{-8} M or less, 10^{-9} M or less, or 10^{-10} M, or 10^{-11} M or less for a target antigen. However, "high affinity" binding can vary for other antibody isotypes. For example, "high affinity" binding for an IgM isotype refers to an antibody having a KD of 10^{-7} M or less, or 10^{-8} M or less. The term "monoclonal antibody" means an antibody that is derived from a single clone, including any eukaryotic, prokaryotic, or phage clone, and not the method by which it is produced. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope. Monoclonal antibodies can be prepared using a wide variety of techniques known in the art including, e.g., but not limited to, hybridoma, recombinant, and phage display technologies.

The term "polyclonal antibody" means a preparation of antibodies derived from at least two different antibody producing cell lines. The use of this term includes preparations of at least two antibodies that contain antibodies that specifically bind to different epitopes or regions of an antigen.

The terms "polypeptide," "peptide," and "protein" are used interchangeably herein to mean a polymer comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres. Polypeptide refers to both short chains,

-6-

commonly referred to as peptides, glycopeptides or oligomers, and to longer chains, generally referred to as proteins. Polypeptides may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. Polypeptides include amino acid sequences modified either by natural processes, such as post-translational processing, or by chemical modification techniques that are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature. In particular, a modified IGF-1/E protein can be any of the modified IGF-1/E proteins described in published PCT patent application WO2007/146689, as well as any secondarily modified (glycosylated, PEGylated, *etc.*) proteins thereof.

The term "recombinant" when used with reference, *e.g.*, to a cell, or nucleic acid, protein, or vector, indicates that the cell, nucleic acid, protein or vector, has been modified by the introduction of a heterologous nucleic acid or protein or the alteration of a native nucleic acid or protein, or that the material is derived from a cell so modified. In particular, a recombinant IGF-1/E protein can be any of the recombinant IGF-1/E proteins described in published PCT patent application WO2007/146689, as well as any secondarily modified (glycosylated, PEGylated, *etc.*) proteins thereof.

The terms "single chain antibodies" or "single chain Fv (scFv)" refer to an antibody fusion molecule of the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H . Although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H , are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules, known as single chain Fv (scFv). See, *e.g.*, Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426 (1988); and Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988). Such single chain antibodies are included by reference to the term "antibody" fragments, and can be prepared by recombinant techniques or enzymatic or chemical cleavage of intact antibodies.

The term "specific binding" means the contact between an antibody of the invention and an epitope (on a peptide described herein (Peptide A, Peptide B or Peptide C) or a protein containing such a peptide) with a binding affinity of at least 10^{-6} M. Preferred binding agents bind with affinities of at least about 10^{-7} M, and preferably 10^{-8} M to 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, or 10^{-12} M.

As noted above the antibodies of the invention may be labeled. Labeled antibodies may be employed in a wide variety of assays, employing a wide variety of labels. Detection of the formation of an antibody-antigen complex between an antibody of the invention and an epitope of interest can be facilitated by attaching a detectable substance to the antibody. Suitable detection means include the use of labels such as radionuclides, enzymes, coenzymes, fluorescers, chemiluminescers, chromogens, enzyme substrates or co-factors, enzyme inhibitors, prosthetic group complexes, free radicals, particles, dyes, and the like. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material is luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and examples of suitable radioactive material include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , or ^3H .

Example antibodies of the invention are disclosed below in Tables A and B.

Table A

Ab name	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
A	GYTFTGFWM Q (SEQ ID NO: 12)	AIYPGDGDT KYTQKFKG (SEQ ID NO: 13)	SNDGPTGFG MDY (SEQ ID NO: 14)	KSSQSLLN SRTRKNYL A (SEQ ID NO: 15)	WASTRES (SEQ ID NO: 16)	IQSYNLPWT (SEQ ID NO: 17)
B	GYTFTTYWM Q (SEQ ID NO: 18)	AIYPGDGDT RYTQKFKG (SEQ ID NO: 19)	SNDGSLGYG MDS (SEQ ID NO: 20)	KSSQSLLN SRTRKNYL A (SEQ ID NO: 21)	WASTRES (SEQ ID NO: 22)	QQSYNLPW T (SEQ ID NO: 23)
C	GDKIFTDYVI D (SEQ ID NO: 24)	VINLGS GTT KYNEKFKD (SEQ ID NO: 25)	STIYYDYDV WFAY (SEQ ID NO: 26)	KSSQSLFY SSNQKNY LA (SEQ ID NO: 27)	WAYTRES (SEQ ID NO: 28)	QQYYNYPR I (SEQ ID NO: 29)

-8-

D	GYDFS DYVI D (SEQ ID NO: 30)	VINLGS DVT KY NENFRG (SEQ ID NO: 31)	STIYYDY DV WFGY (SEQ ID NO: 32)	KSSQS LLY SSNQKNY LA (SEQ ID NO: 33)	WASTRES (SEQ ID NO: 34)	QQFYNYPR T (SEQ ID NO: 35)
E	GYDFS DYVI D (SEQ ID NO: 36)	VINLGS GVT KYNEIFTG (SEQ ID NO: 37)	SIFDYDY DVW FGS (SEQ ID NO: 38)	KSSQS LLY GSNQKNY LA (SEQ ID NO: 39)	WASTRES (SEQ ID NO: 40)	QQFYDYPR T (SEQ ID NO: 41)

Table B

Ab name	VH	VL
A	VQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYT FTGFWMQWVKQRPGGLEWIGAIYPG DGDTKYTQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSFLASEDSAVYYCARSDGPTGFG MDYWGGGTSVTVSSA (SEQ ID NO: 42)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSL LNS RTRKNYLAWYQQKPRQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQAEDLAVYY CIQSYNLPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 43)
B	VQLQQSGAELARPGASVKLSCTASGYT FTTYWMQWVKQRPGQGH EWIGAIYPG DGDTRYTQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSNLASEDSAVYFCARSDGSLGIY GMDSWGQGTSVTVSSA (SEQ ID NO: 44)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSL LNS RTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQAEDLSVYYC QQSYNLPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 45)
C	VQLQQSGAELVRPGTSVKV SCKASGD GFTDYVIDWIKQRPGGLEWIGVINLG SGFTKYNEKFKDKSLTADKSSSIAYM QLNSLTPDSDAVYFC AESTIYYDYDVW FAYWGQGLTVSVSA (SEQ ID NO: 46)	DIVMTQTPSSLDVSVGEKVTMTCKSSQSLFY SSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAYTRE SGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVKAEDLAVYY CQQYNYPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 47)
D	VQLKQSGPELVRPGTSVKV SCKASGYD FSDYVIDWVKQRPGGLEWIGVINLGS DVTKY NENFRGKATLTADKSSSTAYM QVSSI TSEDSAVYFC ARSTIYYDYDVW FGYWGGGTLVTVSAA (SEQ ID NO: 48)	DIVITQTPSSLTVSVGEKVTMNCCKSSQSLLYS SNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVKAEDLAVYFC QQFYNYPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 49)
E	VQLQQSGTELVRPGTSVKV SCKASGYD FSDYVIDWVKQRPGGLEWIGVINLGS GVTKYNEIFTGKATLTADKSSSTAYMQ VSSLTSDSDAVYFCARSTIYYDYDVWF GSWGQGLVTVSAA (SEQ ID NO: 50)	DIVMTQSPSSLTVSVGEKVTMNCCKSSQSLLYG SNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVKAEDLAVYYC QQFYDYPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 51)

In one embodiment, an antibody according to the invention comprises (i) SEQ ID NO: 12 for CDRH1, SEQ ID NO: 13 for CDRH2 and SEQ ID NO: 14 for CDRH3; (ii) SEQ ID NO: 18 for CDRH1, SEQ ID NO: 19 for CDRH2 and SEQ ID NO: 20 for CDRH3; (iii) SEQ ID NO: 24 for CDRH1, SEQ ID NO: 25 for CDRH2 and SEQ ID NO: 26 for CDRH3; (iv) SEQ ID NO: 30 for CDRH1, SEQ ID NO: 31 for CDRH2 and SEQ ID NO: 32 for CDRH3; or (v) SEQ ID NO: 36 for CDRH1, SEQ ID NO: 37 for CDRH2 and SEQ ID NO: 38 for CDRH3.

In one embodiment, an antibody according to the invention comprises (i) SEQ ID NO: 15 for CDRL1, SEQ ID NO:16 for CDRL2 and SEQ ID NO: 17 for CDRL3; (ii) SEQ ID NO: 21 for CDRL1, SEQ ID NO:22 for CDRL2 and SEQ ID NO: 23 for CDRL3; (iii) SEQ ID NO: 27 for CDRL1, SEQ ID NO:28 for CDRL2 and SEQ ID NO: 29 for CDRL3; (iv) SEQ ID NO: 33 for CDRL1, SEQ ID NO:34 for CDRL2 and SEQ ID NO: 35 for CDRL3; or (v) SEQ ID NO: 39 for CDRL1, SEQ ID NO:40 for CDRL2 and SEQ ID NO: 41 for CDRL3.

In one embodiment, an antibody according to the invention comprises (i) SEQ ID NO: 12 for CDRH1, SEQ ID NO:13 for CDRH2, SEQ ID NO: 14 for CDRH3, SEQ ID NO: 15 for CDRL1, SEQ ID NO:16 for CDRL2 and SEQ ID NO: 17 for CDRL3; (ii) SEQ ID NO: 18 for CDRH1, SEQ ID NO:19 for CDRH2, SEQ ID NO: 20 for CDRH3, SEQ ID NO: 21 for CDRL1, SEQ ID NO:22 for CDRL2 and SEQ ID NO: 23 for CDRL3; (iii) SEQ ID NO: 24 for CDRH1, SEQ ID NO:25 for CDRH2, SEQ ID NO: 26 for CDRH3, SEQ ID NO: 27 for CDRL1, SEQ ID NO:28 for CDRL2 and SEQ ID NO: 29 for CDRL3; (iv) SEQ ID NO: 30 for CDRH1, SEQ ID NO:31 for CDRH2, SEQ ID NO: 32 for CDRH3, SEQ ID NO: 33 for CDRL1, SEQ ID NO:34 for CDRL2 and SEQ ID NO: 35 for CDRL3; or (v) SEQ ID NO: 36 for CDRH1, SEQ ID NO:37 for CDRH2, SEQ ID NO: 38 for CDRH3, SEQ ID NO: 39 for CDRL1, SEQ ID NO 40 for CDRL2 and SEQ ID NO: 41 for CDRL3.

In one embodiment, an antibody according to the invention comprises a VH chain comprising SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48 or SEQ ID NO:50.

In one embodiment, an antibody according to the invention comprises a VL chain comprising SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:51.

In one embodiment, an antibody according to the invention comprises (i) a VH chain comprising SEQ ID NO:42 and a VL chain comprising SEQ ID NO:43; (ii) a VH chain comprising SEQ ID NO:44 and a VL chain comprising SEQ ID NO:45; (iii) a VH chain comprising SEQ ID NO:46 and a VL chain comprising SEQ ID NO:47; (iv) a VH chain comprising SEQ ID NO:48 and a VL chain comprising SEQ ID NO:49; or (v) a VH chain comprising SEQ ID NO:50 and a VL chain comprising SEQ ID NO:51.

In one embodiment, an antibody according to the invention comprises a VH chain encoded by SEQ ID NO: 52, 54, 56, 58 or 60. In one embodiment, an antibody according to the invention comprises a VL chain encoded by SEQ ID NO: 53, 55, 57, 59 or 61.

-10-

In one embodiment, an antibody according to the invention comprises (i) a VH chain encoded by SEQ ID NO:52 and a VL chain encoded by SEQ ID NO:53; (ii) a VH chain encoded by SEQ ID NO:54 and a VL chain encoded by SEQ ID NO:55; (iii) a VH chain encoded by SEQ ID NO:56 and a VL chain encoded by SEQ ID NO:57; (iv) a VH chain encoded by SEQ ID NO:58 and a VL chain encoded by SEQ ID NO:59; or (v) a VH chain encoded by SEQ ID NO:60 and a VL chain encoded by SEQ ID NO: 61.

Polypeptides

The invention provides an isolated polypeptide comprising or consisting of the sequence GPTLCGAELV (SEQ ID NO:1), CPAKSAVRAQR (SEQ ID NO:5) or PAKSAVRAQR (SEQ ID NO:6). Such polypeptides are useful for raising antibodies according to the invention. The polypeptides of the invention may also form part of a larger polypeptide. For example, a polypeptide of the invention may be flanked by additional n-terminal and/or c-terminal amino acids.

In general, the polypeptides of the invention are provided in a non-naturally occurring environment, *i.e.* they are separated from their naturally occurring environment. In certain embodiments, the polypeptide is present in a composition that is enriched for the polypeptide as compared to a control. Polypeptides of the invention are thus preferably provided in isolated or substantially isolated form *i.e.* the polypeptide is present in a composition that is substantially free of other expressed polypeptides, whereby substantially free is meant that less than 75% (by weight), preferably less than 50%, and more preferably less than 10% (e.g. 5%) of the composition is made up of other expressed polypeptides.

Nucleic Acid Molecules

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules that encode the polypeptides or antibodies of the invention. Exemplary nucleic acids include those that encode any one of the polypeptides described in SEQ ID NOs:1-51. Further exemplary nucleic acid sequences are those disclosed in SEQ ID NOs:52-61. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or may be nucleic acids in a partially purified or substantially pure form. A nucleic acid is "isolated" or "rendered substantially pure" when

purified away from other cellular components or other contaminants, *e.g.*, other cellular nucleic acids or proteins, by standard techniques, including alkaline/SDS treatment, CsCl banding, column chromatography, agarose gel electrophoresis and others well known in the art. See, F. Ausubel, *et al.*, ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. A nucleic acid of the invention can be, for example, DNA or RNA and may or may not contain intronic sequences. In an embodiment, the nucleic acid is a cDNA molecule. The nucleic acid may be present in a vector such as a phage display vector, or in a recombinant plasmid vector. Nucleic acids of the invention can be obtained using standard molecular biology techniques. For antibodies expressed by hybridomas such as those described herein, cDNAs encoding the light and heavy chains of the antibody made by the hybridoma can be obtained by standard PCR amplification or cDNA cloning techniques.

Generation of Transfectomas producing Monoclonal Antibodies

Once a nucleic acid encoding an antibody of the invention has been obtained, the antibodies of the invention also can be produced in a host cell transfectoma using, for example, a combination of recombinant DNA techniques and gene transfection methods as is well known in the art (*e.g.*, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

For example, to express the antibodies, or antibody fragments thereof, DNAs encoding partial or full-length light and heavy chains, can be obtained by standard molecular biology techniques (*e.g.*, cDNA cloning using a hybridoma that expresses the antibody of interest) and the DNAs can be inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vector or, more typically, both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (*e.g.*,

ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). The light and heavy chain variable regions of the antibodies described herein can be used to create full-length antibody genes of any antibody isotype by inserting them into expression vectors already encoding heavy chain constant and light chain constant regions of the desired isotype such that the VH segment is operatively linked to the CH segment(s) within the vector and the VL segment is operatively linked to the CL segment within the vector. Additionally or alternatively, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (*i.e.*, a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of the invention carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, *etc.* Regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus (*e.g.*, the adenovirus major late promoter (AdMLP)), and polyoma. Alternatively, nonviral regulatory sequences may be used, such as the ubiquitin promoter or P-globin promoter. Still further, regulatory elements composed of sequences from different sources, such as the SRA promoter system, which contains sequences from the SV40 early promoter and the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type I (Takebe, Y. *et al.*, 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors of the invention may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (*e.g.*, origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, all by Axel *et al.*). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr⁻ host cells with methotrexate selection/amplification) and the neo gene (for G418 selection).

For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by standard techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, *e.g.*, electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. It is theoretically possible to express the antibodies of the invention in either prokaryotic or eukaryotic host cells. Expression of antibodies in eukaryotic cells, in particular mammalian host cells, is discussed because such eukaryotic cells, and in particular mammalian cells, are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody. Prokaryotic expression of antibody genes has been reported to be ineffective for production of high yields of active antibody (Boss, M. A. and Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13).

Mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies of the invention include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr⁻ CHO cells, described Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 used with a DHFR selectable marker, *e.g.*, as described in R.J. Kaufman and P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621), NSO myeloma cells, COS cells and SP2 cells. In particular, for use with NSO myeloma cells, another expression system is the GS gene expression system shown in WO 87/04462, WO 89/01036 and EP 338,841. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown.

Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

Diagnostic Methods/Methods of Treatment

As noted above, the antibodies of the invention may be used in various assays to determine the concentration of modified IGF-1/E in a sample.

Thus the invention provides a method of determining the level of modified IGF-1/E protein in a patient, comprising the steps of:

(i) obtaining a blood sample from a patient who has been administered with said modified IGF-1/E, and

(ii) detecting the modified IGF-1/E in said sample using an antibody of the invention.

The level of modified IGF-1/E can be quantified by using standard techniques, such as by setting up calibration curves using known amounts of the modified IGF-1/E and comparing the results obtained with the test samples against the results obtained using the calibration markers (see, e.g. the examples).

Being able to determine the level of modified IGF-1/E protein in a patient also allows a physician to determine an appropriate dose in order to achieve a therapeutic effect. Thus the invention also provides a method of maintaining an optimal dose of modified IGF-1/E in a patient in need thereof, comprising:

(i) obtaining a blood sample from a patient who has been administered with said modified IGF-1/E,

(ii) detecting the modified IGF-1/E in said sample using an antibody of the invention, and

(iii) where the level of modified IGF-1/E in the patient blood sample is below a pre-determined level, administering a further dose of said modified IGF-1/E to said patient.

Note that in certain instances, a blood sample may already have been obtained from a patient. Thus the invention provides a method of determining the level of modified IGF-1/E protein in

a patient, comprising the step of detecting the modified IGF-1/E in a blood sample obtained from a patient using an antibody of the invention.

The invention also provides a method of maintaining an optimal dose of modified IGF-1/E in a patient in need thereof, comprising:

(i) detecting modified IGF-1/E in a blood sample from a patient who has been administered a modified IGF-1/E using an antibody of the invention, and

(ii) where the level of modified IGF-1/E in the patient blood sample is below a pre-determined level, administering a further dose of said modified IGF-1/E to said patient.

The invention also allows the monitoring of the production of modified IGF-1/E. Thus a sample may be obtained from the production plant and probed with an antibody of the invention to confirm that the correct form of modified IGF-1/E is being produced.

The invention also provides a method of treating a patient who is suffering from a muscle disorder comprising:

(i) determining the serum concentration of modified IGF-1/E in a blood sample obtained from a patient who has previously been administered a modified IGF-1/E using an antibody according to the present invention; and

(ii) administering more modified IGF-1/E to the patient if the serum concentration of hIGF-1/Ea 3mut is below a pre-determined optimum level.

In the embodiments described above, the modified IGF-1/E may be hIGF-1/Ea 3mut, or one described in WO2007/146689. For example, the modified IGF-1/E may be that described in example 1 of WO2007/146689 (referred to as SEQ ID NO:8 therein and modified IGF-1E No.1 herein), or that described in example 45 of WO2007/146689 (referred to as SEQ ID NO:53 therein and modified IGF-1/E No.2 herein).

Protein Purification

As noted above, the antibodies of the invention may also be used for commercial scale purification of modified IGF-1/E (*i.e.* a pharmaceutical used to treat muscle atrophy). For example, the antibodies of the invention may be used in affinity chromatography to purify modified IGF-1/E.

Purification of recombinant polypeptides is well known in the art and includes affinity chromatography purification techniques and the like (see generally Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., 1982). See also, Bailor, *et al.*, *An Overview of Affinity Chromatography*, Humana Press (2000)). Affinity chromatography methods (such as membrane-based affinity technology) for commercial scale purification of biotherapeutic proteins are known in the art. See, Brandt *et al.*, *Bio/Technology* 6: 779-782 (1988).

Preferably the modified IGF-1/E purified by such methods may be hIGF-1/E:3mut, or one described in WO2007/146689. For example, the modified IGF-1/E may be that described in example 1 of WO2007/146689 (referred to as SEQ ID NO:3 therein and modified IGF-1/E No.1 herein), or that described in example 45 of WO2007/146689 (referred to as SEQ ID NO:53 therein and modified IGF-1/E No.2 herein).

Equivalents

The details of one or more embodiments of the invention are set forth in the accompanying description above. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described. Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the description and the claims. Generally, enzymatic reactions and purification steps are performed according to the manufacturer's specifications. The techniques and procedures are generally performed according to conventional methods in the art and various general references. See generally, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), which are provided throughout this document.

The present invention is not to be limited in terms of the particular embodiments described in this application, which are intended as single illustrations of individual aspects of the invention. Many modifications and variations of this invention can be made without departing from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. Functionally equivalent methods and apparatuses within the scope of the invention, in addition to those enumerated herein, will be apparent to those skilled in the art from the foregoing descriptions. Such modifications and variations are intended to fall within the scope of the appended

claims. The present invention is to be limited only by the terms of the appended claims along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is an amino acid sequence alignment of hIGF-1, hIGF-1/Ea wt, hIGF-1/Ea 3mut, and hIGF-2. Amino acid differences between hIGF-1/E wt and hIGF-1/E 3mut are highlighted in bold. Dashes in the sequences indicate missing residues. Peptides from hIGF-1/Ea 3mut that were selected as antigens for animal immunizations described below are underlined.

FIG. 2 is a set of charts showing the activity of the hIGF-1/E 3mut-specific mouse monoclonal antibodies generated from Peptide A immunization. Cell culture supernatants were collected from hybridoma clone QC1 (A) and QC2 (B) and diluted into microtiter wells coated with hIGF-1, hIGF-1/Ea wt, hIGF-1/Ea 3mut, hIGF-2, mIGF-1 or mIGF-2. Plate-bound antibody was detected by horse radish peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-mouse IgG antibodies.

FIG. 3 is a set of charts showing the activity of the hIGF-1/E 3mut-reactive mouse monoclonal antibodies generated from Peptide B immunization. Monoclonal antibody was produced and purified from hybridoma clone BP1 (A, mg/ml) and BP2 (B, mg/ml) and diluted 1:10-1:100,000 into microtiter wells coated with hIGF-1, hIGF-1/E wt, hIGF-1/E 3mut, hIGF-2, mIGF-1 or mIGF-2. Plate-bound antibody was detected by horse radish peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-mouse IgG antibodies.

FIG. 4 is a set of charts showing the activity of the hIGF-1/E 3mut-specific mouse monoclonal antibodies generated from Peptide C immunization. Cell culture supernatants were collected from hybridoma clone QQ2 (A), QQ3 (B), and QQ6 (C) and diluted into microtiter wells coated with hIGF-1, hIGF-1/E wt, hIGF-1/E 3mut, hIGF-2, mIGF-1 or mIGF-2. Plate-bound antibody was detected by horse radish peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-mouse IgG antibodies.

FIG. 5 is a set of charts showing the sandwich ELISA analysis of monoclonal antibodies generated from Peptide C immunization. Different concentrations of hIGF-1/Ea 3mut, hIGF-1/Ec 3mut, glycosylated hIGF-1/Ea 3mut, and hIGF-1 peptides were added to microtiter

plates coated with QQ2 (A), QQ5 (B), or QQ6(C). The plate-bound IGF-1 peptides were detected with a horse radish peroxidase-conjugated monoclonal mouse anti-hIGF-1 antibody.

EXAMPLES

Antibodies raised to Peptide A. Two monoclonal antibodies were generated by mouse immunizations with Peptide A, GPTLCGAELV (aa 1-10 of IGF-1/E 3mut) (SEQ ID NO:1) (see TABLE 1). The epitope recognized by QC1 and QC2 differs from wild type hIGF-1 and mIGF-1 sequence GPETLCGAELV (SEQ ID NO:2) in only one amino acid. This peptide was selected for animal immunizations, even though protein structure analysis with Biobench and Abie Pro 3.0 suggested that it has low surface probability and low antigenic index.

GP-TLCGAELV	hIGF-1/E 3mut (SEQ ID NO:1)
GP TLCGAELV	
GPETLCGAELV	hIGF-1/E wt, hIGF-1, mIGF-1 (SEQ ID NO:2)

Hybridomas were screened with (1) recombinant hIGF-1/E 3mut (for positive clones); (2) recombinant hIGF-1/E wt protein (for negative clones); (3) recombinant hIGF-2 (for negative clones), and (4) recombinant mIGF-2 protein (for negative clones).

The antiserum titers after 3 immunizations with Peptide A-KLH conjugate from 5 mice ranged from 1:500 to 1:16,000, as determined by ELISA with hIGF-1/E 3mut. About 1,000 hybridomas were generated from mouse #3, the best responder, and 4 of them were found to be strongly reactive with hIGF-1/E 3mut but not or only weakly reactive with hIGF-1/E wt, hIGF-1, hIGF-2, mIGF-1, and mIGF-2. All 4 hIGF-1/E 3mut-reactive hybridomas were subject to subcloning, and two final subclones, QC1 (7B9C6) and QC2 (8B7A2), each derived from an independent hybridoma, were selected and confirmed by ELISA to produce monoclonal antibody that are specific for hIGF-1/E 3mut (FIG. 2, TABLE 1).

The two mAbs, QC1 (7B9C6) and QC2 (8B7A2), are highly specific for hIGF-1/E 3mut and can be used as an immunosorbent agent (capture antibody) in a sandwich ELISA to quantify the modified recombinant human IGF-1/E peptides in pre-clinical and clinical samples. Hybridomas expressing the two mAbs QC1 (7B9C6) and QC2 (8B7A2) are deposited at DSMZ under accession numbers DSM ACC3028 and DSM ACC3026, respectively.

Antibodies raised to Peptide B. Two monoclonal antibodies were generated from mouse immunizations with Peptide B, CGDRGFYFN-KPTGYGSS (aa 17-33 of hIGF-1/E 3mut) (SEQ ID NO:3) (see TABLE 1). This peptide was selected because it has high surface probability and high antigenic index. However, hIGF-1 and hIGF-1/E 3mut have identical sequences in this region. Thus, antibodies generated against this peptide recognize all of the following proteins: hIGF-1, hIGF-1/E wt, and hIGF-1/E 3mut. In addition, mIGF-1 and hIGF-1 exhibit only one amino acid difference in this region.

```
CGDRGFYFNKPTGYGSS  hIGF-1/E 3mut, hIGF-1, hIGF-1/E wt (SEQ ID NO:3)
CG RGFYFNKPTGYGSS
CGPRGFYFNKPTGYGSS  mIGF-1 (SEQ ID NO:4)
```

Hybridomas were screened with (1) recombinant hIGF-1/E 3mut (for positive clones); (2) recombinant hIGF-2 (for negative clones); (3) recombinant mIGF-1 (for negative clones); and (4) recombinant mIGF-2 protein (for negative clones).

Mouse immune responses to Peptide B were strong. The antiserum titers after 4 immunizations with Peptide B-KLH conjugate from 5 mice ranged from 1:1,000 to >1:32,000. About 1,000 hybridomas were generated from mouse #5, the best responder, and 21 of them were found to be strongly reactive with hIGF-1, hIGF-1/E wt, and hIGF-1/E 3mut and weakly reactive with hIGF-2, mIGF-1 and mIGF-. All 13 hybridomas were subject to subcloning. Two final subclones, BP1 (2F11D8) and BP2 (3C5D10), each derived from an independent hybridoma, were selected and confirmed to produce monoclonal antibody that bind to hIGF-1, hIGF-1/E wt and hIGF-1/E 3mut (FIG. 3, TABLE 1).

The two mAbs, BP1 (2F11D8) and BP2 (3C5D10), recognize both hIGF-1 and hIGF-1/E 3mut and cross-react with hIGF-2 and mIGF-1 and mIGF-2. Nevertheless, these mAbs might be useful for IGF-1 studies.

-20-

Antibodies raised to Peptide C: Three monoclonal antibodies were generated from mouse immunizations with Peptide C, CPAKSAVRAQR (aa 65-74 of hIGF-1/E 3mut, plus an N-terminal C for conjugation) (SEQ ID NO:5) (see TABLE 1). This peptide of hIGF-1/E 3mut was selected because of its high surface probability and antigenic index. It spans the junctional region between mature hIGF-1 and the mutant E peptide.

PAKSA--VRAQR	hIGF-1/E 3mut	(SEQ ID NO: 6)
P K I A +RAQR		
PTKAARSIRAQR	hIGF-1	(SEQ ID NO: 7)

Hybridomas were screened with (1) recombinant hIGF-1/E 3mut (for positive clones); (2) recombinant hIGF-1 (for negative clones); (3) recombinant hIGF-1/E wt (for negative clones); (4) recombinant mIGF-1 (for negative clones); and (5) recombinant mIGF-2 protein (for negative clones).

The antiserum titers after 4 immunizations with Peptide A-KLII conjugate from 5 mice ranged from 1:400 to 1:3,200. About 1,000 hybridomas were generated from mouse #4, the best responder, and 188 of them were found to be reactive with hIGF-1/E 3mut but not with hIGF-1 in standard ELISA. Of the 188 hybridomas, 20 were subject to subcloning. Three final subclones, QQ2 (2C10B7), QQ5 (6H6G11) and QQ6 (7B1H12), each derived from an independent hybridoma, were selected and confirmed to produce monoclonal antibody that recognize hIGF-1/E 3mut but not hIGF-1 (FIG. 4, TABLE 1). However, these mAbs cross-react with hIGF-1/E wt.

The epitope recognized by QQ2, QQ5 and QQ6 is PAKSAVRAQR (aa 65-74). (SEQ ID NO: 6). These three mAbs, QQ2 (2C10B7), QQ5 (6H6G11) and QQ6 (7B1H12), recognize hIGF-1/E 3mut, cross-react with hIGF-1/E wt, but do not bind hIGF-1. Each of these mAbs could be used as an immunosorbent agent (capture antibody) in sandwich ELISA to quantify various modified recombinant human IGF-1/E peptides. Hybridomas expressing the three mAbs, QQ2 (2C10B7), QQ5 (6H6G11) and QQ6 (7B1H12) are deposited at DSMZ under accession numbers DSM ACC3027, DSM ACC3024 and DSM ACC3025, respectively.

-21-

TABLE 1
Results Summary

<u>Epitope</u>	<u>Clone ID</u>	<u>hIGF-1/E</u> <u>3mut</u>	<u>hIGF-1/E wt</u>	<u>hIGF-1</u>	<u>hIGF-2</u>	<u>mIGF-1</u>	<u>mIGF-2</u>	<u>mAb</u> <u>Isotype</u>
Peptide A (aa 1-10)	QC1 (7B9C6)	+	-	-	-	-	-	IgG1
	QC2 (8B7A2)	+	-	-	-	-	-	IgG2a
Peptide B (aa 17-33)	BF1 (2F11D8)	+	+	+	+/-	+/-	+/-	IgG2a
	BF2 (3C5D10)	+	+	+	+/-	+/-	+/-	IgG2a
Peptide C (aa 65-74)	QQ2 (2C10B7)	-	+/-	-	-	-	-	IgG1
	QQ5 (6H6G11)	-	+/-	-	-	-	-	IgG1
	QQ6 (7B1H12)	-	+/-	-	-	-	-	IgG1

Methods of making the antibodies of the invention

General methods of making antibodies. Many methods of making polyclonal and monoclonal antibodies to a defined antigen (such as Peptide A, Peptide B or Peptide C) are known in the art. See, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988) and the other references cited above.

Animal immunizations, hybridoma screening, and mAb production. Groups of 5 BALB/c mice were immunized with each of the selected peptides conjugated to KLH. Hybridomas were screened by standard ELISA with (1) recombinant hIGF-1/E 3mut; (2) recombinant hIGF 1/E wt; (3) recombinant hIGF 1; (4) recombinant hIGF-2; (5) recombinant mIGF-1; and/or (6) recombinant mIGF-2, and hybridomas with desired specificity were selected for three rounds of subcloning and re-screening. Monoclonal antibodies were purified from cell culture supernatants of final selected hybridomas using a Protein A affinity column.

Three antigen peptides (Peptide A, Peptide B and Peptide C) were chemically synthesized and HPLC purified at GL Biochem (Shanghai) Ltd., Shanghai, China. Peptide purity was determined by mass spectrometry analysis to be immuno-grade (about 85%). These peptides

-22-

contained a C residue and were conjugated to maleimide activated KLH with a kit purchased from Pierce (Cat. No. 77605).

BA1.B/c mice at 6-8 weeks of age were used to generate antibodies. To elicit immune responses, groups of 5 mice were administered by subcutaneous injection of 50 μ g of each of the three antigen peptide-KLH conjugates in CFA (for first injection) and 25 μ g of each antigen in IFA (for second & third injections). Final boost immunization with 25 μ g of antigen was performed by intraperitoneal injection without the use of any adjuvant. The immunization schedules were as follow:

Day 0: Pre-immunization bleed; first antigen injection

Day 26: Second antigen injection

Day 52: Third antigen injection

Day 63: Test bleed; antiserum titer ELISA

Day 69: Final boost injection

Day 73: Splenectomy

Development of antigen-specific antibodies after immunizations was examined by ELISA. Nunc-Immuno microtiter plates were coated with 1 μ g/ml of hIGF-1/E 3mut, hIGF-1/E wt, hIGF-1, hIGF-2, mIGF-1 or mIGF-2 in sodium carbonate-bicarbonate buffer (Pierce, Cat. No. 28382), incubated with serially diluted pre immune and antiserum and/or hybridoma supernatant samples, and antigen-bound mouse IgG was detected with horse radish peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-mouse IgG antibodies (Sigma, Cat. No. A0168) followed by color development with BM blue PO-substrate (Roche Diagnostics, Cat. No. 1.484.281). The microtiter plates were read at 450 nm after peroxidase reaction was stopped with 2.0M H₂SO₄, and ELISA data was analyzed with the software SoftMax Pro v5.2 (Molecular Devices). Results are shown in FIGs. 2-4.

Hybridomas were generated by fusing splenocytes isolated from immunized mice with the nonsecreting myeloma Sp2/0-Ag14 cells using standard procedures. ELISA assays were performed to identify hybridomas specific for the hIGF-1/E 3mut peptides.

Selected hybridomas were adapted into serum-free growth medium (Sigma, Cat. No. 24621C-500). Monoclonal antibody was purified from hybridoma supernatant by Protein A affinity

column according to standard procedures and exchanged into PBS through dialysis. The isotype of purified antibodies was determined with a mouse IgG isotyping kit purchased from Southern Biotech (Cat. No. 5300-05).

Antigen-specific hybridomas were subject to three rounds of subcloning by limiting dilution (and re-screening by ELISA).

Results for antibodies generated by immunization with Peptide A, Peptide B and Peptide C are described above.

Methods of using the antibodies of the invention

Immunoassays to detect modified IGF-1/E in a sample. The invention provides diagnostic assays for determining a modified IGF-1/E protein in a biological sample (e.g., blood, serum, cells, tissue) or from individual to whom the IGF-1/E protein has been administered. Diagnostic assays, such as competitive assays rely on the ability of a labeled analogue (the "tracer") to compete with the test sample analyte for a limited number of binding sites on a common binding partner. The binding partner generally is insolubilized before or after the competition and then the tracer and analyte bound to the binding partner are separated from the unbound tracer and analyte. This separation is accomplished by decanting (where the binding partner was preinsolubilized) or by centrifuging (where the binding partner was precipitated after the competitive reaction). The amount of test sample analyte is inversely proportional to the amount of bound tracer as measured by the amount of marker substance. Dose-response curves with known amounts of analyte are prepared and compared with the test results in order to quantitatively determine the amount of analyte present in the test sample. These assays are called Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) systems when enzymes are used as the detectable markers. Such an assay, particularly in the form of an ELISA test has considerable applications in the clinical environment and in routine blood screening. See, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988) for a description of immunoassay formats and conditions.

The immunoassays of the invention are useful in the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, pharmacogenomics, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes.

Sandwich ELISA assays using monoclonal antibodies of the invention. Each of the three mAbs generated against peptide C, QQ2, QQ5, and QQ6, was used as capture antibody and a commercially available IGF-1 mAb was used as detection reagent, were also performed to examine the specificity of QQ2, QQ5 and QQ6. As shown in FIG. 5, all three mAbs bind hIGF-1/Ea 3mut, hIGF-1/Ec 3mut and glycosylated hIGF-1/Ea 3mut, but not hIGF-1 peptide. There was no binding of either QQ2, QQ5, or QQ6 to hIGF-1 even when the hIGF 1 concentration was as high as 10 nM (FIG. 5).

For ELISA analysis, the mean OD value obtained from serially diluted antiserum and hybridoma supernatant samples was compared with the mean OD value of similarly treated preimmune serum and cell growth medium, respectively. An antiserum or hybridoma supernatant sample is considered to be reactive with the coated antigen when its OD value was at least 2 folds higher than that of the negative control.

An "isolated" or "purified" polypeptide or biologically-active portion thereof is substantially free of cellular material or other contaminating polypeptides from the cell or tissue source from which the antibody of the invention is derived, or substantially free from chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. For example, an isolated IGF-1/E would be free of materials that would interfere with diagnostic or therapeutic uses of the agent. Such interfering materials may include enzymes, hormones and other proteinaceous and nonproteinaceous solutes.

Evaluation of antibody selectivity

The selectivity of the antibody for modified IGF-1/E compared to the wt human IGF was confirmed by administering modified IGF 1/E No.1 or No.2 into animals, and then recovering the modified IGF-1/E using an antibody according to the invention. If more than the original amount of modified IGF-1/E administered to the animal is recovered, then this indicates unspecific binding (i.e. binding to wt IGF).

Serum samples from 7 monkeys and 7 dogs were spiked with 80ng/ml mutant IGF No.1, or with 200ng/ml mutant IGF No.2 and serum from 6 rats was spiked with 30ng/ml mutant IGF No.1. The concentration of mutant IGF was analysed using antibody QQ2 for mutant IGF No.1 or QQ5 for mutant IGF No.2.

-25-

For both antibodies, the assay was carried out in the same way. 96 well plates were coated with 100µl antibody (QQ2 or QQ5) at a concentration of 2.5µg/µl and left overnight. The wells were then washed twice with 300µl blocking buffer and four times with 300µl wash buffer. The serum samples were diluted 1:10 with assay buffer and 100µl of each sample were added, along with 100µl of controls (concentration of 10-3000ng/ml) were added to the plate. The plates were then incubated for 4hours at room temperature with shaking.

100µl of a biotinylated anti-human IGF-1 was then added (concentration 75ng/ml in assay buffer) and the plates were incubated for a further hour at RT with shaking. The plates were then washed four times as described above.

100µl of streptavidin-HRP conjugate (100ng/ml) was added and the plates incubated for a further 30 minutes at RT with shaking. The plates were then washed four times as described above.

100µl TMB substrate was then added to each well and incubated for 10 minutes. 100µl stop solution was then added and the optical density read at 450nm within 30 minutes.

The controls were used to plot a calibration curve (no. shown).

Results for antibody QQ2

Monkey serum number	Spike concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/ml)	% Theoretical
1	80.0	85.39	106.74
2	80.0	78.42	98.02
3	80.0	81.38	101.73
4	80.0	76.56	95.82
5	80.0	84.17	105.58
6	80.0	73.54	92.05
7	80.0	86.39	108.74
Pool	80.0	80.36	101.08

-26-

Dog serum number	Spike concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL)	% Theoretical
1	80.0	90.3	113.25
2	80.0	94.26	117.83
3	80.0	93.79	117.23
4	80.0	99.34	124.18
5	80.0	92.69	115.86
6	80.0	99.64	124.81
7	80.0	94.98	118.73
Pool	80.0	91.02	113.78

Rat serum number	Spike concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL)	% Theoretical
1	30.0	30.88	102.93
2	30.0	29.79	99.29
3	30.0	32.30	107.68
4	30.0	33.00	109.99
5	30.0	33.29	110.97
6	30.0	37.38	124.59
Pool	30.0	29.71	99.04

Results for antibody QQ5

Monkey serum number	Spike concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL)	% Theoretical
1	200.0	202.74	101.37
2	200.0	201.96	100.98
3	200.0	197.64	98.82
4	200.0	205.72	102.86
5	200.0	188.96	94.48
6	200.0	211.03	105.52
7	200.0	205.29	104.65
Pool	200.0	200.56	104.78

-27-

Dog serum number	Spiked concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL)	% Theoretical
1	200.0	245.11	122.55
2	200.0	230.96	115.48
3	200.0	224.84	112.42
4	200.0	224.11	112.05
5	200.0	211.27	105.64
6	200.0	251.15	125.57
7	200.0	214.18	107.09
Pool	200.0	231.13	115.56

Specificity/selectivity is the ability of an analytical method to measure and differentiate the analyte in the presence of other similar and/or unrelated constituents in the samples. It is investigated by evaluating the accuracy obtained from measuring an amount of the analyte added to and recovered from the biological matrix. Target acceptance criteria for specificity/selectivity is that acceptable recovery is obtained for at least 80% of the matrices evaluated. Acceptable recovery was defined for our method as 75-125%. Since all of the investigated individual matrices were within the acceptance criteria we consider this method to be specific and selective.

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG
 <120> ANTIBODIES TO MODIFIED HUMAN IGF-1/E PEPTIDES
 <130> PAT052787A
 <150>
 <151>
 <160> 61
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Modified IGF-1 peptide
 <400> 1

Gly Pro Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val
 1 5 10

<210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val
 1 5 10

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Modified IGF-1 peptide

<400> 3

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser
 1 5 10 15

Ser

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Cys Gly Pro Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser
 1 5 10 15

Ser

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> modified IGF-1 peptide

<400> 5

Cys Pro Ala Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg
1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> modified IGF-1 peptide

<400> 6

Pro Ala Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg
1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Pro Thr Lys Ala Ala Arg Ser Ile Arg Ala Gln Arg
1 5 10

<210> 8

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65 70

<210> 9

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp
65 70 75 80

Met Pro Lys Thr Gln Lys
85

<210> 10
<211> 83
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> hIGF-1/Ea triple mutant

<400> 10

Gly Pro Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val
1 5 10 15

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser
20 25 30

Ser Ser Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys
50 55 60

Pro Ala Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys
65 70 75 80

Thr Gln Lys

<210> 11
<211> 83
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Arg Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn

Ile Gln Ser Tyr Asn Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Gln
1 5 10

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

Ser Asn Asp Gly Ser Leu Gly Tyr Gly Met Asp Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

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

Ala

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

Gln Gln Ser Tyr Asn Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24

Gly Asp Gly Phe Thr Asp Tyr Val Ile Asp
 1 5 10

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25

Val Ile Asn Leu Gly Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 26

Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Val Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28

Trp Ala Tyr Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 29

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 30

Gly Tyr Asp Phe Ser Asp Tyr Val Ile Asp
 1 5 10

<210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 31

Val Ile Asn Leu Gly Ser Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 32

Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Val Trp Phe Gly Tyr
 1 5 10

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 33

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 34

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 35

Gln Gln Phe Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 36

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36

Gly Tyr Asp Phe Ser Asp Tyr Val Ile Asp
 1 5 10

<210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37

Val Ile Asn Leu Gly Ser Gly Val Thr Lys Tyr Asn Glu Ile Phe Thr
 1 5 10 15

Gly

<210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38

Ser Thr Ile Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Trp Phe Gly Ser
 1 5 10

<210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 39

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Gly Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 41

Gln Gln Phe Tyr Asp Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 42
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

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

<210> 43

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

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

Lys Arg

<210> 44

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 44

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp
 20 25 30

Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

Gln Leu Ser Asn Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Asn Asp Gly Ser Leu Gly Tyr Gly Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 45
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 45

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 46
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 46

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser
 1 5 10 15

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Gly Phe Thr Asp Tyr Val
 20 25 30

Ile Asp Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Val Ile Asn Leu Gly Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60

Asp Lys Ser Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Leu Thr Pro Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Glu Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Val Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Val Ala
 115 120

<210> 47
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 47

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Asp Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Tyr Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 48
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 48

Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser
 1 5 10 15

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asp Tyr Val
 20 25 30

Ile Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Val Ile Asn Leu Gly Ser Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Arg
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Val Trp Phe Gly Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 115 120

<210> 49
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 49

Asp Ile Val Ile Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95

Phe Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Arg Arg

<210> 50
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 50

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser
 1 5 10 15

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asp Tyr Val
 20 25 30

Ile Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Val Ile Asn Leu Gly Ser Gly Val Thr Lys Tyr Asn Glu Ile Phe Thr
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Thr Ile Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Trp Phe Gly Ser Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 115 120

<210> 51
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Ile Val Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Gly
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Phe Tyr Asp Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

	100	105	110	
Arg Arg				
<210>	52			
<211>	363			
<212>	DNA			
<213>	Mus musculus			
<400>	52			
	gttcagcttc agcagctctgg ggcctgagctg gcaagacctg gggcttcagt gaagttgtcc			60
	tgcaaggott ctggctacac gtttactggt ttctggatgc agtgggtaaa acagagacct			120
	ggacaggctc tggaaatggat tggggctatt tctctggag atggtgatac taagtacct			180
	cagaagtcca agggcaaggc cacattgact gcagataaat cctccagcac agcctacatg			240
	caactcagct tcttggcacc tgaggactct ggggtctatt actgtgcaag atcaaacgat			300
	ggccccacgg ggtttggtat ggaactcagg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctctcca			360
	gcc			363
<210>	53			
<211>	342			
<212>	DNA			
<213>	Mus musculus			
<400>	53			
	gatatttga tgaccacagtc tccatctccc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact			60
	atgagttgca aatccagtcg gactctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct			120
	tggtaccagc agaacaccag gcagctctct aaactgctga tctactgggc ctccactagg			180
	gaatctgggg tccctgatcg ctccacagcg agtggatctg ggacagatti cactctcacc			240
	atcagcaatg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatacaato ttataatctt			300
	ccgtggactt tgggtggagg caccacagctg gaaatcaaaa gg			342
<210>	54			
<211>	363			
<212>	DNA			
<213>	Mus musculus			
<400>	54			
	gttcagcttc agcagctctgg ggcctgagctg gcaagacctg gggcttcagt gaagttgtcc			60
	tgcaaggott ctggctacac ctttactact tattggatgc agtgggtaaa acagaggcct			120
	ggacaggctc tggaaatggat tggggctatt tctctggag atggtgatac tagataacct			180
	cagaagtcca agggcaaggc cacattgact gcagataaat cctccagcac agcctacatg			240
	caactcagca acttggcacc tgaggactct ggggtctatt tctgtgcaag atcaaacgat			300
	ggttctctgg ggtatggtat ggaactcagg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctctcca			360
	gcc			363
<210>	55			
<211>	342			
<212>	DNA			
<213>	Mus musculus			
<400>	55			
	gatatttga tgaccacagtc tccatctccc ctggcgggtg cagcaggaga gaaggtcact			60

atgagctgca aatccagtca gagtctgtc aatagtagaa cccgaaaaa ctacttggct 120
 tggiaaccagc agaagccagg acagtctct aaactactga ictactgggc atocactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttoacagge agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctgtca gtttatttt gccagcaatc ttataatctt 300
 ccgtggacgt tccgtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

<210> 56
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 56
 gtccagctgc agcagctctg agctgaactg gtaagccctg ggacttcagt gaaggtgtcc 60
 tgcaggcgtt ctggagcagg cttoactgat taagtgtat actggataaa acagaggcct 120
 ggacaggccc ttgagtgat tggagtatt aatcttggaa gtggactac taaatataat 180
 gagaattca aggacaagc aacattgact gcagacaat cctccagcac tgcctacatg 240
 cagctcaaca gcttgacacc tgatgactct gcggtctatt tctgtcaga gtgcaccatc 300
 tactatgatt acgagctctg gtttcttcc tggggccaag ggactctggt ctctgtctct 360
 gtagcc 366

<210> 57
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 57
 gatatttga tgacacaaac tccatctcc ctatagtggt cagtggaga gaaggttact 60
 atgacctgca agtccagtca gaccttttc tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggiaaccagc agaaaaccagg acagtctct agactgtctg tttactgggc atacactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttoacagge agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgaaggctga agacctgtca gtttatttact gtcagcaata ttataattat 300
 cctcggacgt tccggcagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

<210> 58
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 58
 atgcagctga agcagctctg acctgagctg gtaagccctg ggacttcagt gaaggtgtcc 60
 tgcaggcgtt ctggatacga ctctctgat taagtgtat aotgggtaaa acagaggcct 120
 ggacaggccc ttgagtgat tggagtatc aatcttggaa gtgatgtcac taatataat 180
 gagaattca gggccaagge aacattgact gcagacaat cctccagcac tgcctacatg 240
 caggtcagca gcttgacacc tgatgattct gcggtctatt tttgtcaag atgcaccatc 300
 tactatgatt acgagctctg gtttcttcc tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360
 gcagcc 366

<210> 59
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 59
gacattgtga tcaccagac tccatctcc ctaactgtgt cagttggaga gaaggttact 60
atgaactgca agtccagica gagccttita tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtaaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atcaactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg ctccacagge agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattct gtcagcaatt ttataactat 300
cctcggacgt tgggtggagg caccagctg gaaatcagac gg 342

<210> 60
<211> 366
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 60
gttcagcttc agcagctcg aactgagttg gtaaggcctg ggacttcagt gaaggtctcc 60
tgcaggcctt ctggatacga cttctctgat taagtgatag actgggtoaa acagaggcct 120
ggacagggcc ttgagtgat tggagtgatc aatcttggaa gtggtgttac taaatacaat 180
gagatttca cgggcaagge aacattgact gcagacaaat cctcagtao tgcctacatg 240
caggtcagca gcctgacalc tgatgactct gcggtctatt ctgtgcaag atgaccatc 300
ttctatgatt acgacgtctg gtttggctcc iggggccaag ggactctggt cactgtctct 360
gcagcc 366

<210> 61
<211> 342
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 61
gatattgtga tgacacagtc tccatctcc ctaactgtgt cagttggaga gaaggttatt 60
gtgaactgca agtccagica gagccttita tatgtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtaaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atcaactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg ctccacagge agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaatt ttatgactat 300
cctcggacgt tgggtggagg caccagctg gaaatcagac gg 342

-28-

CLAIMS

1. An antibody that binds immunospecifically to peptide GPTLCGAELV (SEQ ID NO:1) but does not bind immunospecifically to peptide GPETLCGAELV (SEQ ID NO:2).
2. An antibody that binds immunospecifically to a polypeptide comprising peptide GPTLCGAELV (SEQ ID NO:1) but does not bind immunospecifically to a polypeptide comprising the peptide GPETLCGAELV (SEQ ID NO:2).
3. An antibody that binds immunospecifically to peptide PAKSAVRAQR (SEQ ID NO:6) but does not bind immunospecifically to peptide PTKAARSIRAQR (SEQ ID NO:7).
4. An antibody that binds immunospecifically to a polypeptide comprising peptide PAKSAVRAQR (SEQ ID NO:6) but does not bind immunospecifically to a polypeptide comprising the peptide PTKAARSIRAQR (SEQ ID NO:7).
5. An antibody according to any one of claims 1-4, wherein said antibody is selected from the group consisting of QC1 (expressed by the hybridoma DSM ACC3028), QC2 (expressed by the hybridoma DSM ACC3026), QQ2 (expressed by the hybridoma DSM ACC3027), QQ5 (expressed by the hybridoma DSM ACC3024) and QQ6 (expressed by the hybridoma DSM ACC3025).
6. An antibody according to any one of claims 1-4 comprising:
 - (i) SEQ ID NO: 12 for CDRH1, SEQ ID NO:13 for CDRH2, SEQ ID NO: 14 for CDRH3, SEQ ID NO: 15 for CDRL1, SEQ ID NO:16 for CDRL2 and SEQ ID NO: 17 for CDRL3;
 - (ii) SEQ ID NO: 18 for CDRH1, SEQ ID NO:19 for CDRH2, SEQ ID NO: 20 for CDRH3, SEQ ID NO: 21 for CDRL1, SEQ ID NO:22 for CDRL2 and SEQ ID NO: 23 for CDRL3;
 - (iii) SEQ ID NO: 24 for CDRH1, SEQ ID NO:25 for CDRH2, SEQ ID NO: 26 for CDRH3, SEQ ID NO: 27 for CDRL1, SEQ ID NO:28 for CDRL2 and SEQ ID NO: 29 for CDRL3;
 - (iv) SEQ ID NO: 30 for CDRH1, SEQ ID NO:31 for CDRH2, SEQ ID NO: 32 for CDRH3, SEQ ID NO: 33 for CDRL1, SEQ ID NO:34 for CDRL2 and SEQ ID NO: 35 for CDRL3; or

-29-

(v) SEQ ID NO: 36 for CDRH1, SEQ ID NO:37 for CDRH2, SEQ ID NO: 38 for CDRH3, SEQ ID NO: 39 for CDRL1, SEQ ID NO:40 for CDRL2 and SEQ ID NO: 41 for CDRL3.

7. An antibody according to claim 6, comprising:

- (i) a VH chain comprising SEQ ID NO:42 and a VL chain comprising SEQ ID NO:43;
- (ii) a VH chain comprising SEQ ID NO:44 and a VL chain comprising SEQ ID NO:45;
- (iii) a VH chain comprising SEQ ID NO:46 and a VL chain comprising SEQ ID NO:47;
- (iv) a VH chain comprising SEQ ID NO:48 and a VL chain comprising SEQ ID NO:49; or
- (v) a VH chain comprising SEQ ID NO:50 and a VL chain comprising SEQ ID NO:51.

8. A hybridoma selected from the group consisting of DSM ACC3028, DSM ACC3026, DSM ACC3027, DSM ACC3024 and DSM ACC3025, all of which are deposited at DSMZ.

9. An isolated polypeptide comprising the sequence GPTLCGAELV (SEQ ID NO:1), CPAKSAVRAQR (SEQ ID NO:5) or PAKSAVRAQR (SEQ ID NO:6).

10. A nucleic acid encoding an antibody according to any one of claims 5-7 or a polypeptide according to claim 9.

11. A vector comprising a nucleic acid according to claim 10.

12. A host cell comprising a vector according to claim 11.

13. An improved Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the detection of a modified insulin-like growth factor I/E (IGF-1), comprising an antibody according to any one of claims 1-7.

14. An improved affinity chromatographic method for the purification of a modified insulin-like growth factor I/E (IGF-1) from a solution, wherein the improvement comprises purification by an antibody according to any one of claims 1-7.

-30-

15. A method of determining the level of modified IGF-1/E protein in a patient, comprising the step of detecting the modified IGF-1/E in a blood sample obtained from a patient using an antibody according to any one of claims 1-7.

16. A method of maintaining an optimal dose of modified IGF-1/E in a patient in need thereof, comprising:

(i) detecting modified IGF-1/E in a blood sample from a patient who has been administered a modified IGF-1/E, using an antibody according to any one of claims 1-7; and

(ii) where the level of modified IGF-1/E in the patient blood sample is below a pre-determined level, administering a further dose of said modified IGF-1/E to said patient.

17. A method of treating a patient who is suffering from a muscle disorder comprising:

(i) determining the serum concentration of modified IGF-1/E in a blood sample obtained from a patient who has previously been administered a modified IGF-1/E, using an antibody according to any one of claims 1-7; and

(ii) administering more modified IGF-1/E to the patient if the serum concentration of hIGF-1/Ea 3mut is below a pre-determined optimum level.

18. An assay according to claim 13 or a method according to any one of claims 14-17 wherein said modified IGF-1/E is one described in WO2007/146689.

19. A method according to any one of claims 15-18 wherein said hIGF-1/Ea 3mut is selected from that described in example 1 of WO2007/146689 (referred to as SEQ ID NO:8 therein and modified IGF-1/E No.1 herein), or that described in example 45 of WO2007/146689 (referred to as SEQ ID NO:53 therein and modified IGF-1/E No.2 herein).

ABSTRACT

High-specificity antibodies can distinguish between modified (*e.g.* hIGF-1/Ea 3mut) and endogenous human IGF-1 proteins. These antibodies have little or no cross-reactivity with hIGF-1 or hIGF-2. They also have little or no cross-reactivity with rodent IGF-1 or IGF-2. The antibodies can be used in pharmacokinetic (PK)/pharmacodynamic (PD) assessments of IGF-1/E peptides that have been administered to humans or animals. A sandwich ELISA assay, using the antibody of the invention as a capture antibody, can quantify the mutant IGF-1/E proteins in samples.

1/5

hIGF-1	1	---GPE ^H TLGGAE ^L VDALQ ^F VCGG ^R RSFYFNK ^F PTQYSS ^S SRARQ ^T QIVIE ^C CFR ^S CDL ^A RL	57
hIGF-1/E wt	1	---GPE ^H TLGGAE ^L VDALQ ^F VCGG ^R RSFYFNK ^F PTQYSS ^S SRARQ ^T QIVIE ^C CFR ^S CDL ^A RL	57
hIGF-1/E 3mut	1	---GPE ^H TLGGAE ^L VDALQ ^F VCGG ^R RSFYFNK ^F PTQYSS ^S SRARQ ^T QIVIE ^C CFR ^S CDL ^A RL	56
hIGF-2E	1	AHFE ^H ETLGGELVDILQ ^F VCGG ^R RSFYFNK ^F PTQYSS ^S SRARQ ^T QIVIE ^C CFR ^S CDL ^A LL	56
hIGF-1	58	EMVCA ^L PLPAKSA-----	70 (SEQ ID NO:8)
hIGF-1/Ea wt	58	EMVCA ^L PLPAKSA ^R S ^R VRQ ^R GH ^T IN ^F PTQ ^K	86 (SEQ ID NO:9)
hIGF-1/Ea 3mut	57	EMVCA ^L PLPAKSA---TR ^A GH ^T IN ^F PTQ ^K	83 (SEQ ID NO:10)
hIGF-2/Ea	57	ETVCA---TR ^A RS ^R RV ^S TP ^F PL ^N PF ^R	83 (SEQ ID NO:11)

FIG. 1

2/5

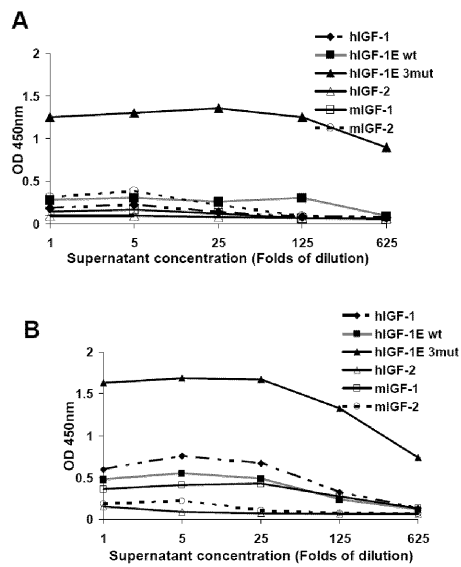


FIG. 2

-34-

3/5

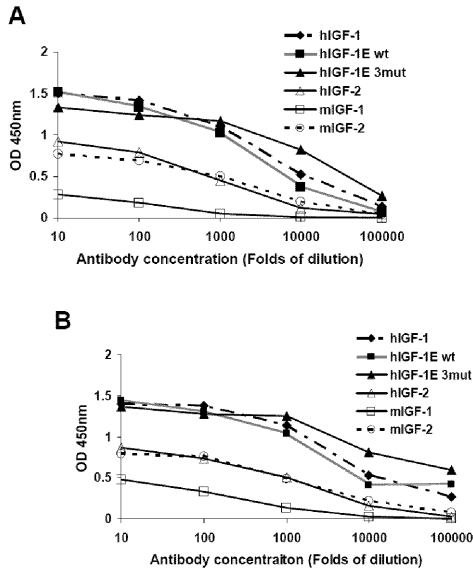


FIG. 3

-35-

4/5

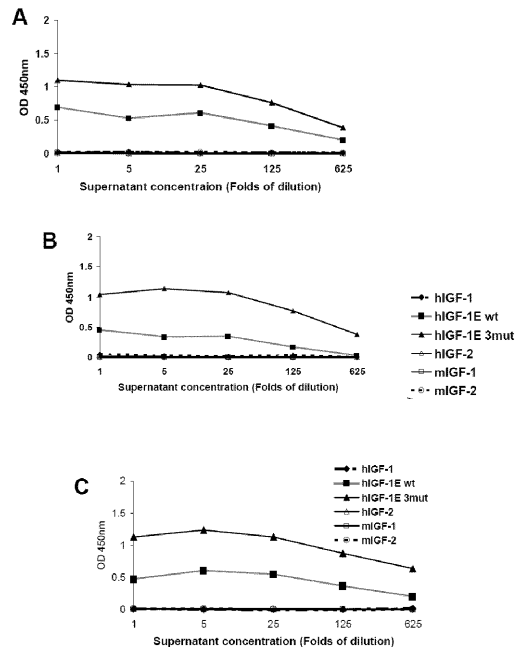


FIG. 4

-36-

5/5

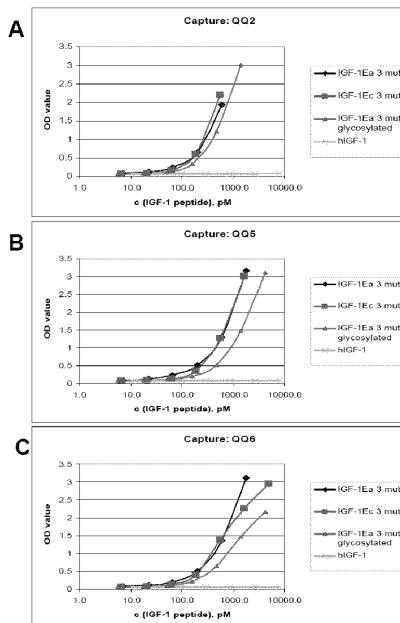


FIG. 5

专利名称(译)	修饰的人igf-1 / e肽抗体		
公开(公告)号	JP2011160696A	公开(公告)日	2011-08-25
申请号	JP2010025479	申请日	2010-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	マーラフォルナー口 ライナーヒレンブラント フランソワルゲイ ダニエラシュテルナー ガオユアン ジョン・スー		
发明人	マーラ・フォルナー口 ライナー・ヒレンブラント フランソワ・ルゲイ ダニエラ・シュテルナー ガオ・ユアン ジョン・スー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K1/22 C07K16/22 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K38/00 A61P21/00 G01N33/53 G01N30/88 C07K7/06 C07K14/475		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K1/22 C07K16/22 C12N5/00.102 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K37/02 A61P21/00 G01N33/53.B G01N30/88.201.R G01N30/88.J C07K7/06 C07K14/475 A61K38/00 A61K38/16 B01J20/281.R C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/12 C12N15/13 C12N15/63.Z C12N5/12		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/NA14 4C084/ZA94 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫 山田卓司 中川正幸 落合靖		
其他公开文献	JP2011160696A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供免疫特异性结合修饰的人胰岛素样生长因子1蛋白的抗体的生产和使用。ŽSOLUTION：问题通过高度特异性的抗体解决。抗体可以将修饰的物质（例如hIGF-1 / Ea 3mut）与内源性人IGF-1蛋白区分开。这些抗体与hIGF-1或hIGF-2轻微或永不交叉反应。此外，它们与啮齿动物IGF-1或IGF-2轻微或永不交叉反应。该抗体可用于对人或动物施用的IGF-1 / E肽的药代动力学（PK）/药效学（PD）评估。使用抗体作为捕获抗体的夹心ELISA测定可以定量样品中的突变IGF-1 / E蛋白。Ž

表A

Ab 名	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
A	GYTFTGFWM Q (配列番号12)	AIYPGDGGDT KYTQKFKG (配列番号13)	SDNGPTGFG MDY (配列番号14)	KSSQSLNSR TRKNYLA (配列番号15)	WASTRES (配列番号16)	IQSYNLPWT (配列番号17)
B	GYTFTTYWM Q (配列番号18)	AIYPGDGDTR YTQKFKG (配列番号19)	SDNGSLGYG MDS (配列番号20)	KSSQSLNSR TRKNYLA (配列番号21)	WASTRES (配列番号22)	QQSYNLPWT (配列番号23)
C	GDGFTDYVID (配列番号24)	VINLGSSTTK YNEKPKD (配列番号25)	STIYYDYDWW FAY (配列番号26)	KSSQSLFYSS NQKNYLA (配列番号27)	WAVTRES (配列番号28)	QQYYNVPRT (配列番号29)
D	GVDFSDYVID (配列番号30)	VINLGSVDTK YNENFRG (配列番号31)	STIYYDYDWW PGY (配列番号32)	KSSQSLYSS NQKNYLA (配列番号33)	WASTRES (配列番号34)	QQFYNVPRT (配列番号35)
E	GVDFSDYVID (配列番号36)	VINLGSVTK YNEIPTG (配列番号37)	STIFYDYDWW PGS (配列番号38)	KSSQSLYGS NQKNYLA (配列番号39)	WASTRES (配列番号40)	QQFYDYFRT (配列番号41)