

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/008595

発行日 平成25年9月9日 (2013.9.9)

(43) 国際公開日 **平成24年1月19日 (2012.1.19)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	Z 4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

出願番号	特願2012-524618 (P2012-524618)	(71) 出願人	390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/066277	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(22) 国際出願日	平成23年7月15日 (2011.7.15)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(31) 優先権主張番号	特願2010-161038 (P2010-161038)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
(32) 優先日	平成22年7月15日 (2010.7.15)	(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗LR11抗体の製造法及び免疫学的測定用標準品

(57) 【要約】

抗LR11抗体を大量かつ効率的に製造するための手段及び免疫学的測定におけるLR11標準品を提供する。

悪性腫瘍細胞由来又は尿由来LR11を用いることを特徴とする抗LR11抗体の製造法。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

悪性腫瘍細胞由来又は尿由来 L R 1 1 を用いることを特徴とする抗 L R 1 1 抗体の製造法。

【請求項 2】

悪性腫瘍細胞由来又は尿由来 L R 1 1 が、免疫原として及び / 又は抗 L R 1 1 抗体の特異性評価用として使用される請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】

悪性腫瘍細胞由来 L R 1 1 が、細胞表面に発現しているものである請求項 1 又は 2 記載の製造法。

【請求項 4】

悪性腫瘍細胞由来 L R 1 1 が、培養上清中に分泌されるものである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の製造法。

【請求項 5】

悪性腫瘍細胞が、造血器腫瘍細胞又は上皮性悪性腫瘍細胞である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の製造法。

【請求項 6】

造血器腫瘍細胞が、急性白血病由来又は悪性リンパ腫由来である請求項 5 記載の製造法。

【請求項 7】

上皮性悪性腫瘍細胞が、胃癌、肝臓癌、膵臓癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸癌、大腸癌、腎臓癌、胆嚢癌、神経腫瘍、黒色細胞腫からなる群より選択される、請求項 5 記載の製造法。

【請求項 8】

尿由来 L R 1 1 が、ヒト尿由来可溶性 L R 1 1 である請求項 1 又は 2 記載の製造法。

【請求項 9】

悪性腫瘍細胞由来又は尿由来 L R 1 1 を含有する L R 1 1 の免疫学的測定用標準品。

【請求項 10】

悪性腫瘍細胞由来 L R 1 1 が、培養上清中に分泌されるものである請求項 9 記載の標準品。

【請求項 11】

悪性腫瘍細胞が、造血器腫瘍細胞又は上皮性悪性腫瘍細胞である請求項 9 又は 10 記載の標準品。

【請求項 12】

造血器腫瘍細胞が、ヒト急性白血病由来又はヒト悪性リンパ腫由来である請求項 11 記載の標準品。

【請求項 13】

上皮性悪性腫瘍細胞が、胃癌、肝臓癌、膵臓癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸癌、大腸癌、腎臓癌、胆嚢癌、神経腫瘍、黒色細胞腫からなる群より選択される、請求項 11 記載の標準品。

【請求項 14】

尿由来 L R 1 1 が、ヒト尿由来可溶性 L R 1 1 である請求項請求項 8 又は 9 記載の標準品。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、効率的な抗 L R 1 1 抗体の製造法及び L R 1 1 の免疫学的測定用標準品に関する。

【背景技術】**【0002】**

10

20

30

40

50

LR11 (LDL receptor relative with 11 ligand-binding repeats、SorLA、SORL1とも称される)は、LDL受容体ファミリーに特徴的な構造を有する新規なLDL受容体類似タンパク質として同定された(特許文献1、非特許文献1)。免疫組織化学分析やin situ hybridization分析の結果、LR11は平滑筋細胞の遊走及び増殖によって形成された血管内膜肥厚部位で特異的に発現が亢進していることが報告されている(非特許文献2)。

本発明者らは、哺乳動物の血液中に可溶性LR11が存在していること、及び動脈硬化性疾患患者血液中の可溶性LR11濃度が健常者と比較して有意に高値であることを見出した(特許文献2)。本発明者らはさらに、特定の界面活性剤で試料中のLR11を処理することにより、抗LR11抗体を用いて血液中あるいは骨髄液中の可溶性LR11を簡便に測定する方法(特許文献3、非特許文献4)を開発し、様々な疾患における血液中若しくは骨髄液中の可溶性LR11の濃度を測定した結果、悪性腫瘍、特に白血病や悪性リンパ腫のような造血器腫瘍疾患で異常高値を示すことを確認し、LR11が新たな腫瘍マーカーになり得ることを見出した(特許文献4)。

【0003】

LR11の遺伝子配列は解明されている(特許文献1、非特許文献1)ものの、全長LR11は250kDaという大きな分子量を有しているため、組換え全長LR11タンパク質の大量発現には成功していない。また、LR11を分泌する培養細胞、LR11遺伝子を安定的に発現するLDL受容体欠損CHO細胞、全長LR11遺伝子を導入したCOS-7細胞も報告されている(非特許文献5)が、LR11の発現量が非常に僅かであるか、遺伝子工学的な処理が必要であった。このように、抗体を作製するための免疫原の供給源は限られているか、LR11産生細胞とするための加工が必要であった。

【0004】

抗LR11抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体ともすでに市販されているが、上記した事情より、免疫原としてLR11の部分アミノ酸配列を有する合成ペプチドを使用して作製されている。そのため、当該市販抗体は、全長LR11など生物試料中のLR11に対する反応性が非常に弱いものであるか又はLR11を固相に固定化した場合にしか反応しないものであるなど、実用的に十分な性能を有する抗体とは言い難いものであった。

【0005】

また、血液中の可溶性LR11を、抗体を作製するための免疫原の供給源とするためには、大量の採血が必要であり供血者への負担を考慮すると非現実的である。

【0006】

上記した各事情は、LR11の免疫学的測定用標準品を作製する際の標品LR11の供給源として考えた場合においても同様である。

以上のように、抗LR11抗体を作製する際の免疫原の供給源、あるいは免疫学的測定用標準品を作製する際の標品LR11の供給源として、侵襲性が低い手段で大量かつ簡便にLR11を収集することができ、さらに生物試料中の存在状態を維持した状態でLR11を収集できる供給源が求められていたのである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開平9-163988号公報

【特許文献2】WO2008/155891

【特許文献3】WO2009/116268

【特許文献4】特許2009-285492号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】J. Biol. Chem. 1996; 271, 24761-24768

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999; 19, 2687-2695

【非特許文献3】J. Clin. Invest. 2008; 118, 2733-2746

【非特許文献4】Clin. Chem. 2009; 55, 1801-1808

【非特許文献5】Circ. Res. 2004; 94, 752-758

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、抗LR11抗体を大量かつ効率的に製造するための手段、特に生物試料中のLR11に反応する抗LR11抗体を製造するための手段、及び免疫学的測定におけるLR11の標準品を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、LR11の新たな供給源について検討した結果、悪性腫瘍細胞の表面にLR11が発現すること及び悪性腫瘍細胞の培養上清中にLR11が分泌されること、また、ヒトの尿中にも可溶性LR11が存在していることを見出した。さらに悪性腫瘍細胞由来及びヒト尿由来のLR11を免疫原や抗体の特異性評価用抗原として使用することにより、全長LR11など生物試料中のLR11に反応する抗体の作製に成功した。また、これらの悪性腫瘍細胞由来及びヒト尿由来LR11は、LR11の免疫学的測定用標準品としても有用であることを見出した。本発明はかかる知見に基づいて完成したものである。

20

【0011】

すなわち、本発明は、悪性腫瘍細胞由来又は尿由来のLR11を用いることを特徴とする抗LR11抗体の製造法を提供するものである。

また、本発明は、悪性腫瘍細胞由来又は尿由来のLR11を含有するLR11の免疫学的測定用標準品を提供するものである。

なお、本明細書において、「LR11」とは、特にことわらない限り抗LR11抗体との反応性を有するタンパク質を指す。すなわち、「全長LR11」や「可溶性LR11」として公知のタンパク質やそれらが部分的に断片化されたり、修飾されたものをいう。

【発明の効果】

30

【0012】

本発明の方法によれば、LR11が細胞表面に発現している悪性腫瘍細胞自体、若しくは前記悪性腫瘍細胞の培養上清中に分泌される可溶性LR11、又はヒトの尿中に存在している可溶性LR11を、免疫原や特異性評価用抗原として用いることにより、工業的に有利にLR11に対する特異抗体の作製が可能となる。

また、悪性腫瘍細胞由来又は尿由来のLR11を含有する標準品を用いることで、正確にLR11を免疫学的測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】各種造血器腫瘍細胞株におけるLR11の発現を、細胞溶解液及び細胞培養液を用いて、ウェスタンブロット法で検出した図である。

40

【図2】各種造血器腫瘍細胞株の培養液中の可溶性LR11をELISAで測定した結果を表すグラフである。

【図3】各種造血器腫瘍細胞株における細胞表面でのLR11の発現を、フローサイトメトリーで解析した結果を示した図である。

【図4】各種上皮性悪性腫瘍細胞株における細胞表面でのLR11発現を、膜画分溶解液を用いて、ウェスタンブロット法で検出した図である。

【図5】各種上皮性悪性腫瘍細胞株の培養液中の可溶性LR11をELISAで測定した結果を表すグラフである。

【図6】ヒト尿由来の可溶性LR11、CCRF-SB細胞株由来の可溶性LR11、ヒ

50

ト血清由来可溶性LR11、COLO201細胞株由来の可溶性LR11を、ウェスタンブロット法で比較した図である。

【図7】NB-4細胞株を腹腔内免疫したマウスの血清中の抗LR11抗体価を測定した結果を表すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明において抗LR11抗体の作製又はLR11の免疫学的測定用標準品に用いられるLR11は、悪性腫瘍細胞由来又は尿由来である。

【0015】

本発明者らの知見によれば、悪性腫瘍細胞表面にはLR11が顕著に発現しており、また悪性腫瘍細胞の培養液中には高濃度の可溶性LR11が分泌されている。従って、細胞表面にLR11を発現している悪性腫瘍細胞を直接免疫原として用いることや、当該細胞の培養液から可溶性LR11を採取して、免疫原、抗LR11抗体の特異性評価、あるいは免疫学的測定用標準品として使用することができる。

【0016】

本発明で使用できる悪性腫瘍細胞は、例えば、ATCC (American Type Culture Collection) やヒューマンサイエンス研究資源バンク (Health Science Research Resources Bank) 等に登録されている細胞株で、LR11が細胞表面に発現しているものであれば特に制限されることなく使用することができる。悪性腫瘍の種類としては、造血器腫瘍または上皮性腫瘍が挙げられ、造血器腫瘍が好ましい。

【0017】

造血器腫瘍の例として、白血病及び悪性リンパ腫が挙げられる。白血病には急性白血病及び慢性白血病が含まれ、悪性リンパ腫には非ホジキンリンパ腫が含まれる。このうち、急性白血病及び悪性リンパ腫が好ましい。さらに具体的には、造血器腫瘍細胞のうち、急性骨髄性白血病由来株のHL-60、ML-2、NB-4、急性リンパ性白血病由来株のNAL-1、MOLT-4、CCRF-SB、悪性リンパ腫由来株のDaudi、U937などが好ましく、特に、HL-60、ML-2、NB-4、MOLT-4、CCRF-SB、U937が好ましい。また、前記株化された細胞以外に、白血病患者および悪性リンパ腫患者由来の腫瘍細胞の細胞溶解液または細胞培養液から精製等して使用することもできる。

【0018】

上皮性悪性腫瘍の例として、胃癌、肝臓癌、膵臓癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸癌、大腸癌、腎臓癌、胆嚢癌、神経腫瘍 (グリオーマ)、黒色細胞腫 (メラノーマ) が含まれる。特に、上皮性悪性腫瘍のうち、胃癌由来株のMKN1、GCIY、肝臓癌由来株のHLE、HepG2、HuH-7、JHH-6、膵臓癌由来株のAsPC-1、BxPC-3、肺癌由来株のOkac-1、前立腺癌由来株のPC-3、膀胱癌由来株のKMBC-2、食道癌由来株のT.Tn、乳癌由来株のYMB-1、子宮頸癌由来株のHeLa、卵巣癌由来株のOVISE、結腸癌・大腸癌由来株のCOLO201、腎臓癌由来株のCaki-1、胆嚢癌由来株のOCUG-1、神経腫瘍由来株のKINGS-1、黒色細胞腫由来株のG-361などが好ましい。また、前記株化された細胞以外に、上皮性悪性腫瘍患者由来の腫瘍細胞の細胞溶解液または細胞培養液から精製等して使用することもできる。

【0019】

また、本発明者らは、尿中にも可溶性LR11が高濃度で存在することを見出した。尿としては、ヒト尿が特に好ましい。尿は、一般に夾雑タンパク質が少なく、また侵襲性が実質的に存在せず、かつ、大量に収集することが容易であるため、本発明におけるLR11の供給源として好適である。

【0020】

前記のように、免疫原として細胞表面にLR11を発現している悪性腫瘍細胞を直接用

10

20

30

40

50

いることができる。一方、免疫原、抗LR11抗体の特異性評価用および免疫学的測定用標準品としては、悪性腫瘍細胞の溶解液若しくは培養液、又は尿から採取されたLR11を用いるのが好ましい。

悪性腫瘍細胞の溶解液若しくは培養液、又は尿からLR11を採取するには、例えば、RAP（受容体関連タンパク質）等のLR11親和性物質を担持させた不溶性担体に尿中の可溶性LR11を吸着させ、適当な緩衝液を用いて洗浄した後、前記不溶性担体に吸着した可溶性LR11を溶出させればよい。

【0021】

これらのLR11は、さらに、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水クロマトグラフィー法、ゲルろ過法及び特異抗体によるアフィニティ法などにより精製して用いてもよい。

10

【0022】

当該悪性腫瘍細胞由来又はヒト尿由来のLR11は、多量かつ安定して製造できるので、LR11の免疫学的測定用標準品として有用であり、また抗LR11抗体製造時の免疫原として、あるいは抗LR11抗体の特異性評価用として有用である。

抗LR11抗体作製時の免疫原と特異性評価には、由来の異なるLR11を組み合わせ用いてもよく、例えば、細胞表面にLR11が発現している悪性腫瘍細胞を免疫原に使用する場合は、抗LR11抗体の特異性評価では、尿由来の可溶性LR11を用いること、更に尿由来可溶性LR11を免疫原に使用する場合は、抗LR11抗体の特異性評価では、悪性腫瘍細胞から分泌された可溶性LR11を用いるか、若しくは細胞表面にLR11が発現している悪性腫瘍細胞そのものを用いることが考えられる。また、免疫原にLR11の部分アミノ酸配列を有する合成ペプチドを用いた場合においても、特異性評価用悪性腫瘍細胞由来又はヒト尿由来のLR11を用いることによって、全長LR11など生物試料中のLR11に対する反応性が強い抗体を得ることができる。上記したように、本発明における免疫原あるいは標準品の供給源は、生物試料の形態としても、存在するLR11の形態としても、いわゆる天然の状態に極めて近いものであるため、合成ペプチドであったり遺伝子組み換えであったりした従来の供給源に対して、LR11の性状の保存の観点から特に有利であるといえる。

20

【0023】

前記LR11は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれに対しても免疫原ともなりうる。当該抗体は周知の方法にて作製することができる。例えば、ポリクローナル抗体の作製には、免疫する動物としてマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなどが用いられる。抗LR11ポリクローナル抗体を含有する抗血清は、前記LR11を動物の皮下、皮内、腹腔などに一回又は複数回投与し得ることができる。また、免疫賦活効果を有する補液との混合物の免疫がより好ましい。

30

【0024】

また、モノクローナル抗体の作製には、公知のモノクローナル抗体作製方法、例えば、長宗香明、寺田弘共著、「単クローン抗体」廣川書店（1990年）や、James W. Golding, "Monoclonal Antibody", 3rd edition, Academic Press, (1996年)に従い作製することができる。

40

当該モノクローナル抗体は、常法に従い作製したハイブリドーマを培養し、培養上清から分離する方法、該ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与し、腹水として回収する方法により製造できる。

【0025】

抗LR11抗体は、必要に応じて精製して使用することができる。抗体を精製・単離する手法としては、従来公知の方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、プロテインAカラムなどによるアフィニティ精製法などがある。

【0026】

LR11を用いて抗LR11抗体の特異性を評価するには、免疫染色（ウエスタンブロ

50

ット法)、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、フローサイトメトリーなどが挙げられる。

【0027】

また、LR11を標準品として用いるLR11の免疫学的測定法は特に限定されないが、抗LR11抗体を用いた免疫学的方法、RAP等の親和性を利用した方法、並びにそれらを組み合わせた方法により測定することが望ましい。免疫学的方法としては、例えば免疫染色(ウエスタンブロット法)、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、免疫比濁法(TIAやLTIA)、エンザイムイムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどに加えて、抗体とRAP等のLR11に親和性を有する物質を用いたサンドイッチELISAも利用できる。

本発明者らが構築した、界面活性剤により検体の前処理を行うELISA(特許文献3、非特許文献4)は、非常に簡便かつ精度よく測定できることから、特に好ましい。

【実施例】

【0028】

以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0029】

参考例1 ELISAによる可溶性LR11の測定

抗LR11モノクローナル抗体(M3:特許文献3)をPBSで10 μ g/mLに希釈し、マイクロプレート(NUNC社製)に1ウエルあたり100 μ L添加して室温で2時間静置した。0.05% Tween20を含むPBS(PBST)で洗浄後、1% BSAを含むPBST(BSA-PBST)を1ウエルあたり200 μ L添加し室温で1時間ブロッキングした。7% MEGA-9(同仁化学社製)とHBR(Scantibodies Laboratory社製)を3:1に混合した検体処理液で、測定対象検体を希釈した。ウサギ血清から精製した可溶性LR11も前記検体処理液で段階希釈し、キャリアプレートとした(0~4ng/mL)。これら希釈検体を、1ウエルあたり100 μ L添加し、室温で一晩反応させた後、ビオチン標識した抗LR11モノクローナル抗体(R14:特許文献3)をBSA-PBSTで希釈し0.4 μ g/mLとして、1ウエルあたり100 μ L添加し室温で4時間反応させた。PBSTで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(PIERCE社製)をBSA-PBSTで希釈して0.2 μ g/mLとして1ウエルあたり100 μ L添加し、室温で1時間反応させた。PBSTで洗浄後、TMB基質液を1ウエルあたり100 μ L加え室温で30分間反応させ、1.5N硫酸を1ウエルあたり100 μ L加えて反応を停止させた。測定は、マイクロプレートリーダー(Abs.450nm)を用いて行った。キャリアプレートによる検量線より、検体中の可溶性LR11濃度を算出し、希釈倍率を掛けて、検体中の可溶性LR11濃度とした。

【0030】

実施例1 ヒト尿中の可溶性LR11の測定

健常者ボランティア(10名)の随時尿を数日間ランダムに収集し、参考例1に記載の検体処理液で4倍希釈した。参考例1に記載のELISA法と同様に、ヒト尿中の可溶性LR11濃度を測定した。濃度分布は0.1~8.4ng/mLで、平均3.1ng/mLであった。ヒト尿中には、健常域の血中濃度(非特許文献4などによる)に匹敵する濃度で可溶性LR11が存在することが判明した。

【0031】

実施例2 ヒト尿からの可溶性LR11の精製

ヒトRAP遺伝子を組み込んだpGEX2T(GEヘルスケア社製)ベクターを導入して形質転換した大腸菌DH5を培養し、遠心分離により菌体を回収した。3Lの培養液から回収した菌体を、リゾチーム及びTritonX-100を含むPBSに懸濁して超音波処理により菌体を破碎した。この破碎液をGlutathione Sepharose 4 FF(GEヘルスケア社製)200mLに通して遠心上清中のRAP/GST

10

20

30

40

50

融合タンパク質を吸着させた後、PBSで洗浄してRAP-セファロース樹脂を調製した。

1 バッチ分として、このRAP-セファロース樹脂200 mLに、ヒトボランティアブール尿を5~8 L通した。PBSで洗浄後、150 mM NaClを含む、50 mMクエン酸緩衝液(pH 5.0)にてヒト尿由来可溶性LR11を溶出した。濃縮後、PBSで透析した。さらに、この液を、rProtein Sepharose A FF (GEヘルスケア社製) 5 mLに通し、得られた非吸着画分に、抗可溶性LR11モノクローナル抗体(M3)結合樹脂を加え、一晚攪拌した。樹脂をPBSで洗浄した後、150 mM NaClを含む50 mMクエン酸緩衝液(pH 3.0)にてヒト尿由来可溶性LR11を溶出した。さらに、溶出液をゲルろ過クロマトグラフィー(Superdex 200; GEヘルスケア社製)により、PBSで分離精製した。可溶性LR11の溶出フラクションを集め濃縮したものを、精製ヒト尿由来可溶性LR11とした。LR11含量は、参考例1に記載の方法に基づき算出された。最終的に12バッチ分の精製工程を行った結果、平均でヒト尿1 Lあたり約0.8 µgの精製ヒト尿由来可溶性LR11が得られた。参考例1においてキャリブレーションの一番高い濃度は4 ng/mLであり、ヒト尿から免疫学的測定の標準品として十分な量の可溶性LR11を容易に確保できることが分かった。

【0032】

実施例3 各種造血器腫瘍細胞株におけるLR11発現の確認

各種造血器腫瘍細胞株でのLR11の発現を、LR11の部分アミノ酸配列を有するペプチドを免疫して作製した抗LR11モノクローナル抗体(A2-2-3:特許文献3)を用いたウェスタンブロット法で確認した。細胞株は、急性骨髄性白血病由来3株(HL-60、ML-2、NB-4)、急性リンパ性白血病由来3株(NALL-1、MOLT-4、CCRF-SB)、リンパ腫由来2株(Daudi、U937)の合計8種を用いた。これらの細胞株は、HT培地(15% fetal bovine serum、HT supplement、penicillin/streptomycinを含むRPMI-1640)に懸濁し、5% 炭酸ガスインキュベーター内で37 °Cにて培養し、増殖させた。それぞれの細胞株の細胞数をカウントし、 1×10^7 個となるように分取し、1% プロテアーゼインヒビター(シグマアルドリッチ社製; P8340)を含むRIPAバッファー(25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS)を加えて、細胞を溶解させた。不溶物を遠心分離にて除去した後、細胞溶解液中のタンパク質濃度を測定して、1レーン当たり20 µg分をSDS含有還元条件下で煮沸処理し、SDS-PAGE(2-15%)の各レーンにアプライして電気泳動した。泳動終了後、タンパク質をゲルからPVDF膜へ転写し、抗LR11モノクローナル抗体(A2-2-3)を反応させ、マウスIgG ABCキット(Vector社製)を用いてLR11を検出した。

一方、各細胞株の培養上清中に分泌された可溶性LR11の検出は、以下のように行った。上記と同様にHT培地で培養したそれぞれの細胞株を 1×10^7 個となるように分取し、RPMI-1640培地2 mLにてさらに14時間培養した。培養上清中の可溶性LR11を、ウェスタンブロット法及び参考例1と同様のELISAで測定した。

各細胞株の細胞溶解液を用いたウェスタンブロットでは、分子量230 kDa付近に若干異なる分子量を示す2本のバンドが検出された(図1)。さらに、NALL-1を除き培養上清中にも可溶性LR11が存在していることが確認され、図2に示すようにHL-60、ML-2、NB-4、CCRF-SB、Daudi、U937の6株においては、可溶性LR11の分泌量が培養上清2 mLあたり1 ngを越えていた。中でも、CCRF-SBでは分泌量が5 ng/2 mLを越えており、造血器腫瘍細胞を培養することによって、可溶性LR11を容易に得られることが分かった。

【0033】

実施例4 各種造血器腫瘍細胞株のフローサイトメトリー

実施例3で用いた細胞株8種について、細胞表面にLR11が発現しているか否かを、

フローサイトメトリーにて解析した。各細胞株を、 5×10^5 個になるよう $50 \mu\text{L}$ *Staining Medium* (1% *FBS* / *PBS*) に浮遊させた。 1500rpm で5分間遠心分離した後、上清を除去し、ペレットに、 1mg/mL *FITC* 標識抗LR11モノクローナル抗体 (M3) を $3 \mu\text{L}$ 添加して、4 で60分間反応させた。細胞を *Staining Medium* にて2回洗浄後、使用説明書に従い *JSAN* (*Bay Bioscience* 社製) を用いて、フローサイトメトリー解析を実施した。*FITC* 標識抗LR11モノクローナル抗体の陰性コントロールには、正常マウス *IgG* (*BD Pharmingen* 社製) を用いた。結果を図3に示す。実施例3で可溶性LR11の分泌が確認された7株の内、HL-60、ML-2、NB-4、MOLT-4、CCRF-SB、U937の6株については、強陽性から弱陽性の反応が見られ、これらの細胞の表面には、LR11が顕著に発現していることが判明した。

10

【0034】

実施例5 各種上皮性悪性腫瘍細胞株のLR11タンパク質発現の確認

各種上皮性腫瘍細胞株でのLR11タンパク質発現を、実施例1で用いた抗LR11モノクローナル抗体 (A2-2-3) によるウェスタンブロットで確認した。細胞株は、HLE (肝臓癌由来)、MKN1 (胃癌由来)、T.Tn (食道癌由来)、COLO201 (大腸癌由来)、AsPC-1 (膵臓癌由来)、Caki-1 (腎臓癌由来)、Okac-1 (肺癌由来)、PC-3 (前立腺癌由来)、KMBC-2 (膀胱癌由来)、Hela (子宮頸癌由来)、OVISE (卵巣癌由来)、YMB-1 (乳癌由来)、KINGS-1 (神経腫瘍由来)、G-361 (黒色細胞腫由来) の合計14種を用いた。これら細胞株は、指定された培地 (例えば、10% fetal bovine serum、penicillin/streptomycin を含む *RPMI-1640*) に懸濁し、5% 炭酸ガスインキュベーター内で37 にて適当な時間培養し、増殖させた。培養フラスコからの増殖した細胞の回収は、細胞を *PBS* で数回洗浄した後、トリプシン-EDTA 溶液 (*インビトロジェン* 社製、25200-072) を用いて行った。それぞれの細胞株の細胞数をカウントし、 1×10^7 個となるように分取後、*PBS* を適量加え懸濁させ、遠心分離で細胞を回収した。この操作を3回繰り返して細胞を洗浄した。その後、回収した細胞に、1% プロテアーゼインヒビター (*シグマアルドリッチ* 社製、P8340) を含む *PBS* $100 \mu\text{L}$ を加え、超音波振動器 (ホモジナイザー) で細胞を破碎した。細胞の破碎断片を遠心分離にて除去した後、上清を超遠心分離 ($100,000 \text{g}$ 、10分間) にて膜画分を沈殿させた。上清を除去し、*PBS* にて沈殿を洗浄した後、1% プロテアーゼインヒビター (*シグマアルドリッチ* 社製; P8340) 及び1% *MEGA-9* を含む *PBS* $100 \mu\text{L}$ を加え、超音波振動器 (ホモジナイザー) にて膜画分を懸濁・溶解させ、再び超遠心分離 ($100,000 \text{g}$ 、10分間) にて不溶の膜画分を除去することで、可溶性膜画分溶液を得た。

20

30

各細胞株の可溶性膜画分溶液を、1レーン当たり $2 \mu\text{L}$ 分を *SDS* 含有還元条件下で煮沸処理し、その各処理液を *SDS-PAGE* (2-15%) の各レーンにアプライし分離した。泳動終了後、ゲルよりタンパク質を *PVDF* 膜へ転写し、一次抗体として抗LR11モノクローナル抗体 (A2-2-3) を反応させ、その後は、*Biotinylated anti-mouse IgG* ポリクローナル抗体 (*DAKO* 社製) 及び *HRP* 標識ストレプトアビジンを組み合わせて、最終的にジアミノベンチジンで発色させて、LR11タンパク質を検出した。その結果、14種すべての細胞株について、LR11タンパク質のバンドが検出された (図4)。

40

一方、各細胞株の培養上清中に分泌された可溶性LR11の検出は、以下のように行った。上記でLR11の発現が確認された細胞株の中から、HLE、COLO201、AsPC-1、KINGS-1、PC-3、KMBC-2 を選択し、 75cm^2 の培養フラスコを用いて、それぞれ指定された培地 40mL でコンフルエントになるまで培養した。また、COLO201は別途無血清の *RPMI 1640* 培地 20mL に 1×10^6 個/ mL になるように撒き、2日間培養した。培養上清中の可溶性LR11を、参考例1と同様に *ELISA* 法で測定した。結果、すべての細胞株の培養上清中に可溶性LR11が存在し

50

ていることが確認された(図5)。検討した細胞株の中でも、C O L O 2 0 1細胞株は、無血清培地で培養することにより分泌量が1 mL当たり5 ngを越えていた。このように、培養細胞を用いる場合、培養条件を工夫することで産出量を増加させることもでき、また、血清成分などの夾雑物が存在しない条件でL R 1 1を効率よく簡便に得ることが出来るので、抗体作製の免疫原あるいは標準品の作製手段として有効である。

【0035】

実施例6 各種可溶性L R 1 1の比較

実施例2で得られたヒト尿由来の可溶性L R 1 1と、実施例3で得られた培養細胞(C C R F - S B)由来可溶性L R 1 1、及び実施例5で得られた培養細胞(C O L O 2 0 1)由来可溶性L R 1 1を、ウェスタンブロット法にて比較した。対照には、ヒト血清から抽出された可溶性L R 1 1(非特許文献4)を用いた。その結果、図6に示すように、いずれの場合も分子量230 kDa付近にバンドが認められた。

10

【0036】

実施例7 細胞免疫

フローサイトメトリーで試験した実施例4でL R 1 1を細胞表面に顕著に発現していた造血器腫瘍由来細胞の1つであるN B - 4株をH T培地で拡大培養し、P B Sにて2回洗浄後、 $1 \sim 2 \times 10^7$ 個をP B Sに懸濁して、B A L B / cマウス(メス)の腹腔内に注入し、免疫した。隔週又は毎週免疫し、適切な時期に、次に示す方法によりマウス血清中の抗L R 1 1抗体価を確認した。

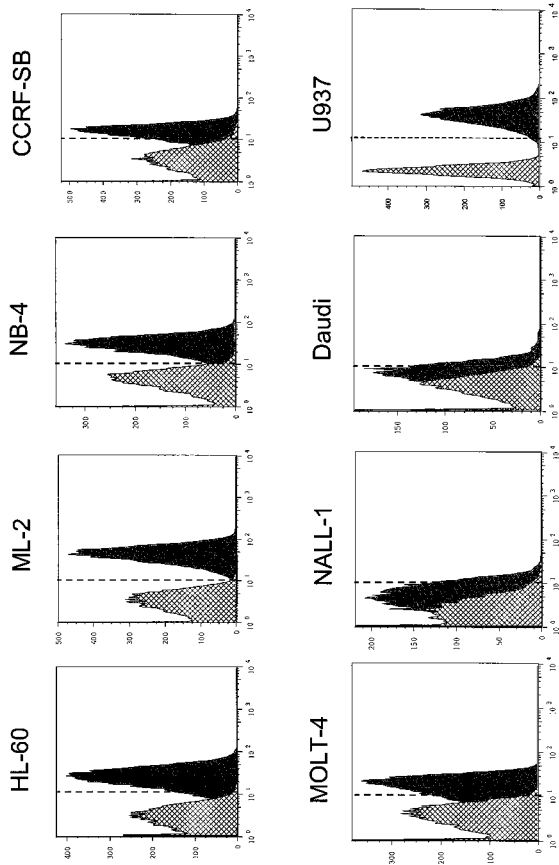
マイクロプレート(N U N C社製)に、実施例2で得られたヒト尿由来精製可溶性L R 1 1をP B Sで50 ng/mLに希釈して1ウエルあたり50 μ L添加し、室温で2時間静置した。0.05% Tween 20を含むP B S(P B S T)で洗浄後、1% B S Aを含むP B S T(B S A - P B S T)を1ウエルあたり200 μ L添加し、室温で1時間ブロックした。マウスの尻尾より採血して得られた血清を、B S A - P B S Tにより200、400、800、1600倍希釈して1ウエルあたり50 μ L添加し、室温で1時間反応させた。ウエルをP B S Tで洗浄後、H R P標識抗マウスI g Gポリクローナル抗体(R o c k l a n d社製)を10000倍希釈して1ウエルあたり50 μ L添加し、室温で1時間反応させた。P B S Tで洗浄後、o - フェニレンジアミン基質液を1ウエルあたり50 μ L加えて室温で20分間発色させ、1.5 N硫酸を1ウエルあたり50 μ L加えて反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー(A b s . 492 nm)で測定した。

20

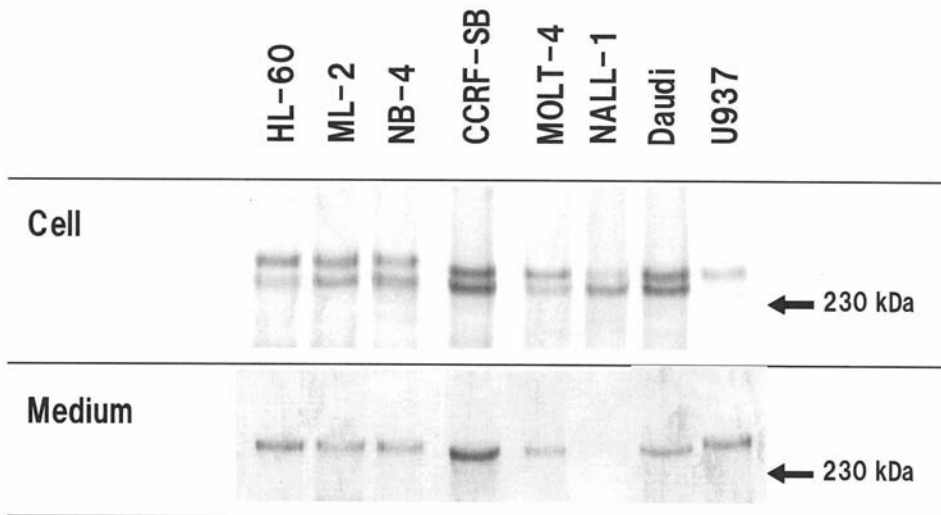
30

5回免疫した後のマウス血清中の抗L R 1 1抗体価を測定した結果を図7に示す。免疫前のマウス血清では、固相化したヒト尿由来精製可溶性L R 1 1への反応は認められないのに対し、N B - 4細胞株を免疫したマウスの血清では、希釈濃度変化に応じた吸光度変化が認められたことから、抗L R 1 1抗体が産生されたことが確認された。

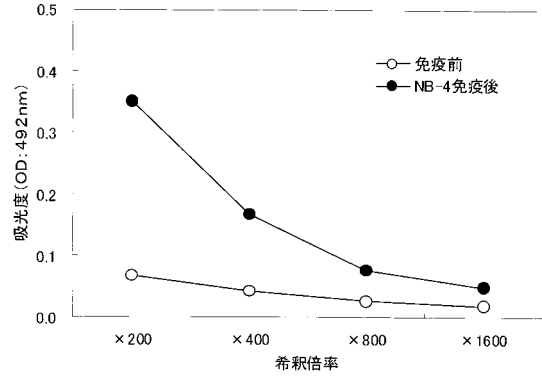
【 図 3 】



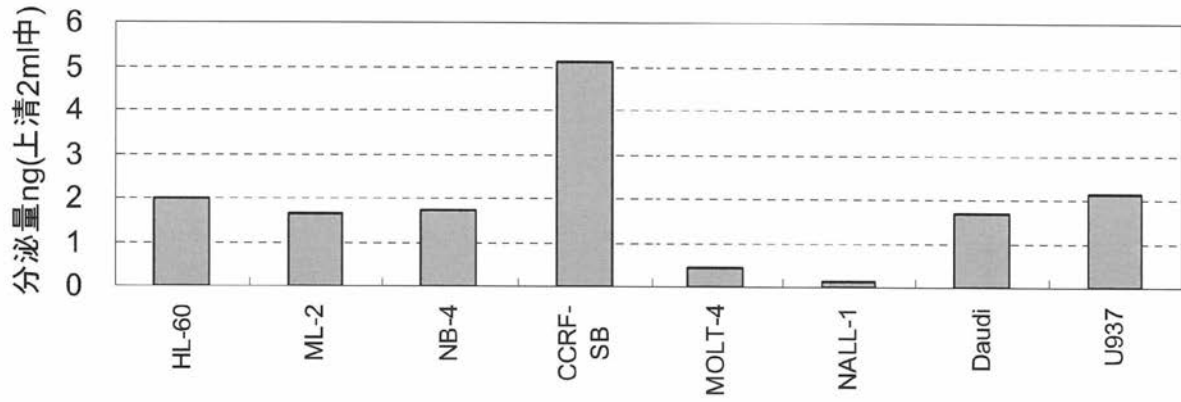
【 図 1 】



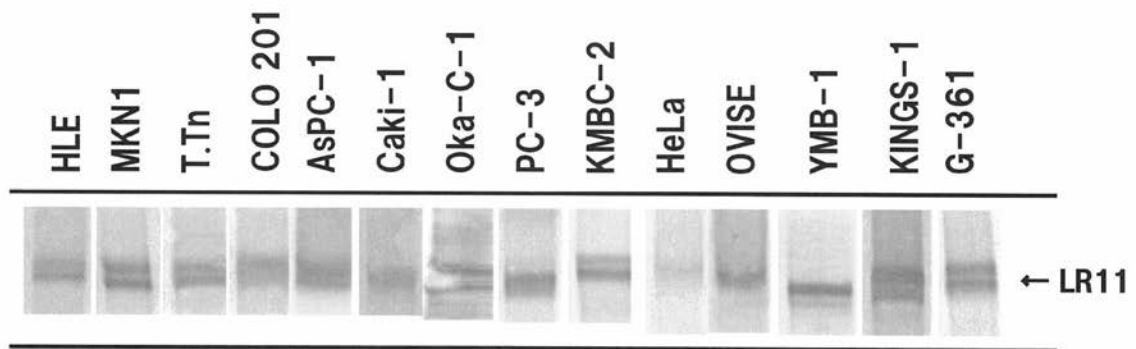
【 図 7 】



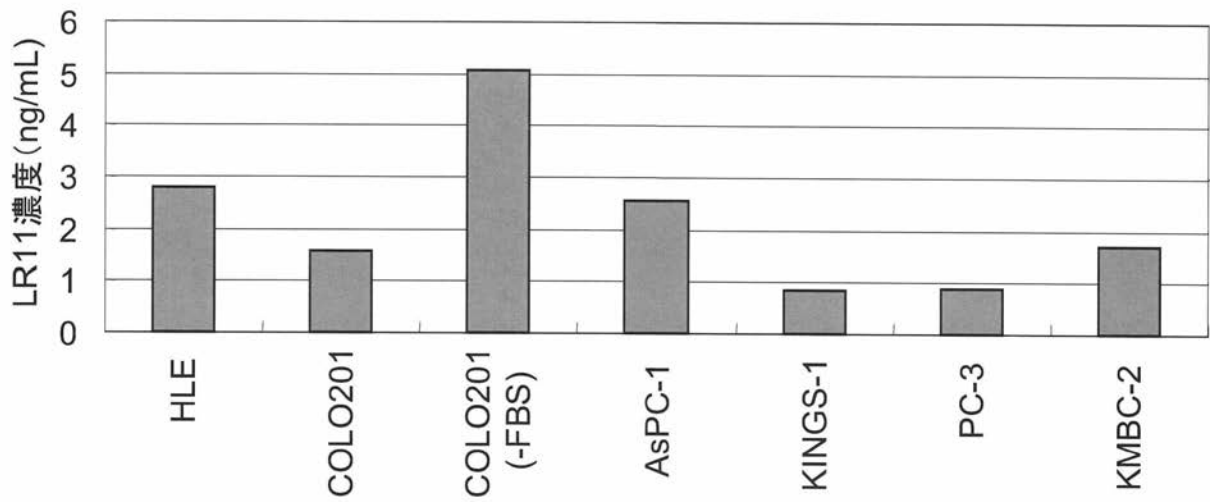
【 図 2 】



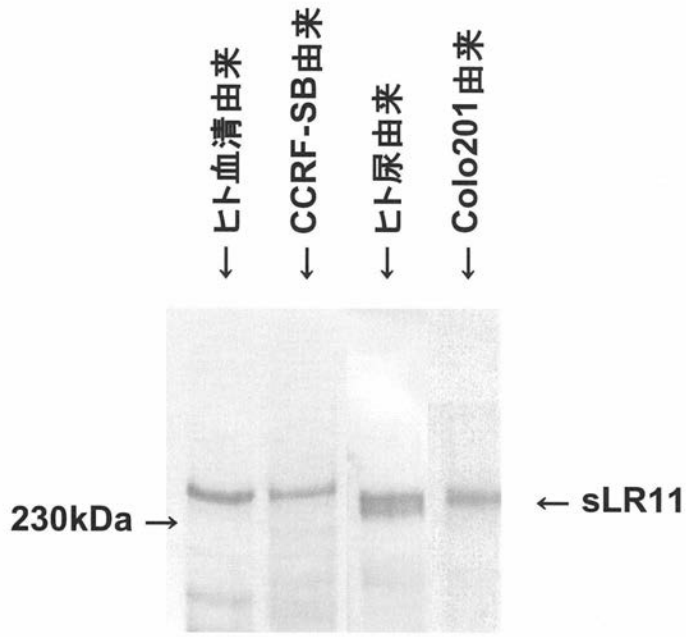
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P21/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P21/00, G01N33/53, C07K16/28, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIRAYAMA S. et al., Differential expression of LR11 during proliferation and differentiation of cultured neuroblastoma cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000.08.28, Vol.275, No.2, pp.365-373	1-7, 9-13
X	HAMPE W. et al., Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator, J. Cell Sci., 2000.12, Vol.113, No.24, pp.4475-4485	1-7, 9-13
Y	WO 2008/155891 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), 24 December 2008 (24.12.2008), claim 4; paragraph [0015] & EP 2159577 A1	1-2, 8-9, 14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 October, 2011 (04.10.11)		Date of mailing of the international search report 18 October, 2011 (18.10.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066277

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/116268 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), 24 September 2009 (24.09.2009), claim 2; paragraph [0017] & EP 2256497 A1 & JP 4459299 B	1-2, 8-9, 14
Y	RIEDEL I.B. et al., SorLA, a member of the LDL receptor family, is expressed in the collecting duct of the murine kidney, Histochem. Cell Biol., 2002.09, Vol.118, No.3, pp.183-191	1-2, 8-9, 14
Y	FIETE D. et al., N-linked oligosaccharides on the low density lipoprotein receptor homolog SorLA/LR11 are modified with terminal GalNAc- 4-SO ₄ in kidney and brain, J. Biol. Chem., 2007.01.19, Vol.282, No.3, pp.1873-1881	1-2, 8-9, 14
P, X	WO 2011/074594 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), 23 June 2011 (23.06.2011), the entire description (Family: none)	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066277

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

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

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

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

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

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

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

It is publicly known that LR11 derived from a living organism is utilized as an antigen. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 28 August 2000 (28.08.2000), vol. 275, no. 2, pp. 365-373, fig. 1 and fig. 6; J. Cell Sci., December 2000, vol. 113, no. 24, pp. 4475-4485, fig. 4 and the like; WO 2008/155891 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), 24 December 2008 (24.12.2008), paragraph [0015]) Consequently, the technical feature of the inventions of claims 1 and 9 does not make a contribution over the prior art, and thus it cannot be considered as a special technical feature. In addition, there is no other same or corresponding special technical feature among those inventions.

(Continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066277

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The claims of this international application therefore contain the following two groups of inventions.

(Invention group 1) claims 1-7 and 9-13: inventions wherein LR11 derived from malignant tumor cells is used as an antigen

(Invention group 2) claims 1, 2, 8, 9 and 14: inventions wherein LR11 derived from urine is used as an antigen

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/066277									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P21/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P21/00, G01N33/53, C07K16/28, C12N15/09											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	HIRAYAMA S. et al., Differential expression of LRI1 during proliferation and differentiation of cultured neuroblastoma cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000.08.28, Vol.275, No.2, pp.365-373	1-7, 9-13									
X	HAMPE W. et al., Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator, J. Cell Sci., 2000.12, Vol.113, No.24, pp.4475-4485	1-7, 9-13									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 04.10.2011		国際調査報告の発送日 18.10.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小金井 梧	4N 3961								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 6 6 2 7 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2008/155891 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 2008.12.24, 請求項4, 【0015】 & EP 2159577 A1	1-2, 8-9, 14
Y	WO 2009/116268 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 2009.09.24, 請求項2, 【0017】 & EP 2256497 A1 & JP 4459299 B	1-2, 8-9, 14
Y	RIEDEL I.B. et al., SorLA, a member of the LDL receptor family, is expressed in the collecting duct of the murine kidney, Histochem. Cell Biol., 2002.09, Vol.118, No.3, pp.183-191	1-2, 8-9, 14
Y	FIETE D. et al., N-linked oligosaccharides on the low density lipoprotein receptor homolog SorLA/LR11 are modified with terminal GalNAc-4-SO ₄ in kidney and brain, J. Biol. Chem., 2007.01.19, Vol.282, No.3, pp.1873-1881	1-2, 8-9, 14
P, X	WO 2011/074594 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 2011.06.23, 明細書全体 (ファミリーなし)	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 6 6 2 7 7

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

生体由来のLR11が抗原として利用されることは公知である (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000. 08. 28, Vol. 275, No. 2, pp. 365-373 の図1及び図6、J. Cell Sci., 2000. 12, Vol. 113, No. 24, pp. 4475-4485 の図4等、WO 2008/155891 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 2008. 12. 24 の【0015】)。したがって、請求項1及び9に係る発明が有する技術的特徴は、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。そして、請求の範囲には、以下に示す2の発明が含まれる。

(発明1) 請求項1-7, 9-13: 発明悪性腫瘍細胞由来LR11を抗原として用いる発明。
(発明2) 請求項1-2, 8-9, 14: 尿由来LR11を抗原として用いる発明。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

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

(72) 発明者 海老沼 宏幸

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 田久保 耕平

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 深町 勇

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 吉田 彩舟

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 武城 英明

千葉県千葉市中央区青葉町1-2-4-2-9

(72) 発明者 中世古 知昭

千葉県千葉市中央区汐見丘町6-9

(72) 発明者 齋藤 康

千葉県千葉市中央区葛城2-4-2-2

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 CA02 DA06

4B064 AG26 CA02 CA19 CC15 CC24 CE10 CE12 DA13

4H045 DA75 EA50

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	抗LR11抗体的制备方法和免疫学测定标准		
公开(公告)号	JPWO2012008595A1	公开(公告)日	2013-09-09
申请号	JP2012524618	申请日	2011-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	海老沼宏幸 田久保耕平 深町勇 吉田彩舟 武城英明 中世古知昭 齋藤康		
发明人	海老沼 宏幸 田久保 耕平 深町 勇 吉田 彩舟 武城 英明 中世古 知昭 齋藤 康		
IPC分类号	C12P21/00 C07K16/28 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/28 G01N33/574 G01N33/92		
FI分类号	C12P21/00.Z C07K16/28 G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/DA06 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/DA75 4H045/EA50		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2010161038 2010-07-15 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2012/008595
	発行日 平成25年9月9日 (2013. 9. 9)	(43) 国際公開日 平成24年1月19日 (2012. 1. 19)	
提供了用于大量有效生产抗LR11抗体的方法，以及用于免疫测定的LR11标准品。一种生产抗LR11抗体的方法，其包括使用源自恶性肿瘤细胞或尿液的LR11。	(51) Int. Cl. C12P 21/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)	FI C12P 21/00 Z C07K 16/28 D G01N 33/53 A C12N 15/00 A	テーマコード (参考) 4B024 4B064 4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)		
	出願番号 特願2012-524618 (P2012-524618) (2) 国際出願番号 PCT/JP2011/066277 (2) 国際出願日 平成23年7月15日 (2011. 7. 15) (3) 優先権主張番号 特願2010-161038 (P2010-161038) (3) 優先日 平成22年7月15日 (2010. 7. 15) (3) 優先権主張国 日本国 (JP)	(7) 出願人 390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋3丁目1番5号 (7) 代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所 (7) 代理人 100077562 弁理士 高野 登志雄 (7) 代理人 100096736 弁理士 中嶋 俊夫 (7) 代理人 100117156 弁理士 村田 正樹 (7) 代理人 100111028 弁理士 山本 博人	最終頁に続く
	(54) 【発明の名称】 抗LR11抗体の製造方法及び免疫学的測定用標準品		