

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-535489

(P2010-535489A)

(43) 公表日 平成22年11月25日(2010.11.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4B064
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B065
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-519515 (P2010-519515)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月4日 (2008.8.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年4月2日 (2010.4.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2008/002640
 (87) 国際公開番号 W02009/019458
 (87) 国際公開日 平成21年2月12日 (2009.2.12)
 (31) 優先権主張番号 0715126.9
 (32) 優先日 平成19年8月3日 (2007.8.3)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 60/956,319
 (32) 優先日 平成19年8月16日 (2007.8.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 0809208.2
 (32) 優先日 平成20年5月21日 (2008.5.21)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 502452978
 アステリオン・リミテッド
 イギリス国, エス10 2ティーエヌ シ
 エフィールド, ウェスタン・バンク, ファ
 ース・コート
 (74) 代理人 100149294
 弁理士 内田 直人
 (74) 代理人 100137512
 弁理士 奥原 康司
 (72) 発明者 ロス, リチャード
 イギリス国, シェフィールド エス10
 2ティーエヌ, ファース コート, ウェス
 タンバンク, アステリオン・リミテッド

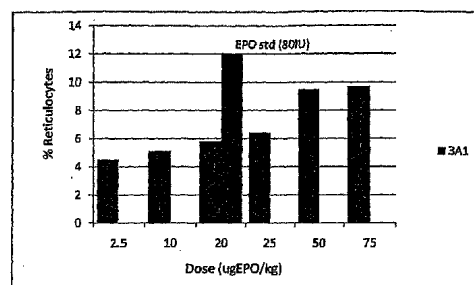
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エリスロポエチン

(57) 【要約】

本開示は、エリスロポエチン (EPO) 融合ポリペプ
 チド、上述のポリペプチドをコードする核酸分子、なら
 びに上述のポリペプチドを使用する治療の方法に関する
 。

Figure 15



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エリスロポエチンの活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子であって、前記ポリペプチドは、エリスロポエチン受容体のエリスロポエチン結合ドメインに直接または間接的に連結されるエリスロポエチンまたはその部分を含む核酸分子。

【請求項 2】

エリスロポエチン受容体のエリスロポエチン結合ドメインに直接または間接的に連結されるエリスロポエチンまたはその活性結合部分のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド。

【請求項 3】

エリスロポエチンは、ペプチドリンカーによってエリスロポエチン受容体の結合ドメインに連結される請求項 2 に記載の融合ポリペプチド。 10

【請求項 4】

前記ペプチド連結分子は、ペプチド Gly Gly Gly Gly Ser の少なくとも 1 コピーを含む、請求項 2 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5】

前記ペプチド連結分子は、ペプチド Gly Gly Gly Gly Ser の 2、3、4、5 または 6 コピーを含む、請求項 4 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6】

分子は、ペプチド Gly Gly Gly Gly Ser の 3 コピーから成る、請求項 5 に記載の融合ポリペプチド。 20

【請求項 7】

前記ペプチド連結分子は、ペプチド Gly Gly Gly Gly Ser の 4 コピーから成る、請求項 5 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 8】

ペプチド連結分子を含まず、エリスロポエチンおよびエリスロポエチン受容体のエリスロポエチン結合ドメインの直接的な融合物である、請求項 2 から 7 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 9】

i) 配列番号 1 で表される核酸配列、
 i i) 配列番号 3 で表される核酸配列、 30
 i i i) 配列番号 5 で表される核酸配列、
 i v) 配列番号 7 で表される核酸配列、または
 v) 配列番号 1、3、5 または 7 とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、エリスロポエチン受容体調節活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子
 から選択される核酸配列を含む核酸分子。

【請求項 10】

前記ポリペプチドは、アゴニストである、請求項 9 に記載の核酸分子。

【請求項 11】

前記ポリペプチドは、アンタゴニストである、請求項 9 に記載の核酸分子。 40

【請求項 12】

配列番号 1 で表される核酸配列を含む、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 13】

配列番号 3 で表される核酸配列を含む、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 14】

配列番号 5 で表される核酸配列を含む、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 15】

配列番号 7 で表される核酸配列を含む、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 16】

請求項 1 または 9 から 15 のいずれか一項に記載の核酸によってコードされるポリペプチド。

【請求項 17】

i) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列、
 ii) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列、
 iii) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列、
 iv) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列、
 v) 配列番号 17 で表されるアミノ酸配列、
 vi) 配列番号 18 で表されるアミノ酸配列
 から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、
 エリスロポエチン受容体調節活性を有するポリペプチド。

10

【請求項 18】

アゴニストである、請求項 17 に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

アンタゴニストである、請求項 17 に記載のポリペプチド。

【請求項 20】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

20

【請求項 21】

配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 22】

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 23】

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 24】

配列番号 17 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 25】

配列番号 18 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

30

【請求項 26】

2 つのポリペプチドから成るホモ二量体であって、前記ポリペプチドはそれぞれ、
 i) エリスロポエチンまたはその受容体結合ドメインを含む第 1 の部分と、ペプチド連結分子によってそれと任意選択で連結される
 ii) エリスロポエチン受容体の少なくとも 1 つのエリスロポエチン結合ドメインを含む第 2 の部分と
 を含むホモ二量体。

【請求項 27】

配列番号 2 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 26 に記載のホモ二量体。

【請求項 28】

前記ホモ二量体は、配列番号 4 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 26 に記載のホモ二量体。

40

【請求項 29】

前記ホモ二量体は、配列番号 6 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 26 に記載のホモ二量体。

【請求項 30】

前記ホモ二量体は、配列番号 8 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 26 に記載のホモ二量体。

【請求項 31】

前記ホモ二量体は、配列番号 17 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 26 に記載

50

のホモ二量体。

【請求項 3 2】

前記ホモ二量体は、配列番号 1 8 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 2 6 に記載のホモ二量体。

【請求項 3 3】

請求項 1 または 9 から 1 5 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 3 4】

請求項 1 もしくは 9 から 1 5 のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項 3 3 に記載のベクターを用いて形質移入または形質転換される細胞。

【請求項 3 5】

真核細胞である、請求項 3 4 に記載の細胞。

【請求項 3 6】

原核細胞である、請求項 3 4 に記載の細胞。

【請求項 3 7】

賦形剤または担体を含む、請求項 2 から 8 または 1 6 または 1 7 から 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 3 8】

さらなる治療薬と組み合わせられる、請求項 3 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 9】

エリスロポエチンアゴニストの投与が有効であろう状態に罹患しているヒト対象を治療するための方法であって、請求項 2 から 8 または 1 6 または 1 7 から 2 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 4 0】

前記状態は、貧血である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記状態は、慢性腎疾患の結果としての貧血である、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記状態は、癌の治療における化学療法の結果としての貧血である、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記状態は、慢性関節リウマチの治療における化学療法の結果としての貧血である、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記状態は、A I D S の治療における化学療法の結果としての貧血である、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記ポリペプチドは、静脈内に投与される、請求項 3 9 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記ポリペプチドは、皮下に投与される、請求項 3 9 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記ポリペプチドは、2 日間隔で投与される、請求項 3 9 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記ポリペプチドは、1 週間隔で投与される、請求項 3 9 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記ポリペプチドは、2 週間隔で投与される、請求項 3 9 から 4 4 のいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 5 0】

前記ポリペプチドは、1 か月間隔で投与される、請求項 3 9 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

貧血の治療のための医薬の製造のための、請求項 2 から 8 または 1 6 または 1 7 から 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 5 2】

請求項 2 から 8、1 6、1 7 から 2 5、または 2 6 から 3 2 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは二量体に結合するモノクローナル抗体。

10

【請求項 5 3】

ポリペプチドまたは二量体に結合するが、エリスロポエチンまたはエリスロポエチン受容体にそれぞれ特異的に結合しない、請求項 5 2 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5 4】

本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を調製するための方法であって、

i) 本発明による少なくとも 1 つのポリペプチドまたはその断片を含む免疫原を用いて免疫応答性哺乳動物を免疫するステップ、

ii) 免疫された免疫応答性哺乳動物のリンパ球を骨髄腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成するステップ、

20

iii) ステップ (ii) のハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体を、(i) のポリペプチドに対する結合活性についてスクリーニングするステップ、

iv) ハイブリドーマ細胞を培養して、前記モノクローナル抗体を量産および/または分泌するステップ、ならびに

v) 培養上清からモノクローナル抗体を回収するステップを含む方法。

【請求項 5 5】

前記免疫応答性哺乳動物は、マウスまたはラットである、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法によって得られるまたは入手可能なハイブリドーマ細胞株。

30

【請求項 5 7】

生体試料において、本発明によるポリペプチドを検出するための診断試験であって、

i) 試験対象となる単離試料を提供するステップ、

ii) 前記試料を、請求項 2 から 8、1 6、および 1 7 から 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドに結合するリガンドと接触させるステップ、ならびに

iii) 前記試料において前記リガンドの結合を検出するステップを含む診断試験。

【請求項 5 8】

前記リガンドは、抗体である、請求項 5 7 に記載の試験。

【請求項 5 9】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 5 8 に記載の試験。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エリスロポエチン (EPO) 融合ポリペプチドおよび二量体、上述のポリペプチドをコードする核酸分子、ならびに上述のポリペプチド/二量体を使用する治療の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サイトカイン受容体は、2 つの別個のクラスに分類することができる。クラス 1 (造血ホルモンファミリーまたは成長ホルモンファミリーと呼ばれる) 受容体は、それらの細胞

50

外ドメインのアミノ末端部分における4つの保存システイン残基およびC末端部分における保存Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフの存在によって特徴づけられる。受容体は、2つのポリペプチド鎖から成る。クラスI受容体は、GM-CSFサブファミリー(IL-3、IL-5、GM-CSF、GCSFを含む)ならびにIL-6サブファミリー(IL-6、IL-11、およびIL-12を含む)に細分することができる。IL-6サブファミリーにおいて、1つまたは2つの異なるサイトカインサブユニットと結合する、共通の伝達サブユニット(gp130)がある。IL-2サブファミリー(IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、およびIL-15を含む)と呼ばれる、さらなるサブファミリーがある。繰り返しCysモチーフはまた、リガンドが、 、 、およびインターフェロンであるが、保存Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフを欠くクラス2(インターフェロン受容体ファミリー)においても存在する。

10

【0003】

ヒトEPOは、骨髄における赤血球産生の調節に關与する35kD糖タンパク質ホルモンである。これは、腎臓によって産生され、1977年に精製され、1985年にクロニングされて以降、これは、慢性腎不全および他の疾患における貧血を治療するために使用されている。EPOに応答する細胞は、内皮細胞、神経細胞、および心臓細胞を含む。EPOの調製物は、特異なグリコシル化により不均一である。EPOのグリコシル化は、インビトロ活性に必要とされず、EPOの成熟形態が、グリコシル化の非存在下においてEPO受容体に結合することができることを示す。しかしながら、EPOのインビボ活性は、その分解を予防し、かつクリアランスを遅らせるための糖部分の追加に依存する。

20

EPOは、赤血球系細胞上で低度なレベルで発現され、成熟赤血球において不在である単一の高親和性受容体の活性化を通して赤血球発生を活性化する。EPO受容体(EPOR)は、クラス1サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する。EPORへのEPOの結合は、多くの細胞質分子およびEPORを含む膜結合分子のチロシンリン酸化を誘発する受容体二量体化をもたらす。EPORは筋細胞、ニューロン細胞、および内皮細胞において検出されており、EPOは、心臓および脳の発生をコントロールする際に作用すると考えられる。EPOはまた、炎症性および虚血性の損傷から心臓および脳を保護することが示された。EPOの血清レベルは、正常および病理学的条件に応じて変動的となり得る。EPOのレベルは、低酸素または失血に応じて100~1000倍、増加し得る。

30

【0004】

貧血は、多くの病理学的状態に起因し得る。たとえば、貧血状態は、失血、溶血、鉄欠乏、骨髄形成不全、または栄養障害に起因し得る。いくつかの病理学的条件において、EPOレベルは、非常に低度となり得、これは、EPOの産生の損失および結果的な貧血をもたらす慢性腎不全に起因する。さらに、EPOレベルは、慢性関節リウマチ、AIDS、および癌(化学療法の結果)などのような疾患に罹患している患者において低度となり得る。組換えEPOが投与される場合(たとえばEpogen、Aransesp、およびEpoGIN)、貧血の治療は非常に有効である。典型的には、組換えEPOは、皮下注射によってまたは静脈内に、1週間に2度または3度投与される。EPOの投与は、リスクがないわけではない。副作用のいくつかは、血圧の増加、悪心、嘔吐、頭痛、および息切れを含む。

40

より低い投薬量の投与およびより少ない副作用をもたらす、少ない頻度で投与することができ、血清安定性が増加している、EPOのさらなる形態を開発する必要がある。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、薬物動態および活性が改善されたEPO組換え形態の同定に関する。新しいEPO分子は、生物学的に活性であり、二量体を形成し、安定性が改善されている。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1a】哺乳動物細胞における発現のための、EPO-L1-EPOR EC((G4S)4を介してEPOR ECに連結されたEPO)をコードする核酸配列を示す図である(

50

ヌクレオチド配列：長さ = 1299 bp、シグナル配列を含む）。配列は、太字および小文字のシグナル配列を含有する。* は、終止コドンを目指す。

【図1b】アミノ酸配列（長さ = 406 aa、シグナル配列なし）を示す図である。シグナル配列は太字で示す。

【図2a】細菌細胞における発現のための、EPO-L1-EPOrEC（(G4S)4を介してEPOrECに連結されたEPO）をコードする核酸配列を示す図である（ヌクレオチド配列：長さ = 1242 bp）。太字は、Xho1および6xHisT残基を指す。* は、終止コドンを目指す。ATG開始コドンは太字イタリック体で示す。

【図2b】アミノ酸配列（長さ = 414 aa）を示す図である。

【図3a】哺乳動物細胞における発現のための、EPO-L2-EPOrEC（(G4S)3を介してEPOrECに連結されたEPO）をコードする核酸配列を示す図である（ヌクレオチド配列：長さ = 1284 bp、シグナル配列を含む）。ヌクレオチド配列およびタンパク質配列は、シグナル配列を有する、哺乳動物細胞株において発現される完全な配列を表す。配列は、太字および小文字のシグナル配列を含有する。* は、終止コドンを目指す。

【図3b】アミノ酸配列（長さ = 401 aa、シグナル配列なし）を示す図である。シグナル配列は太字で示す。

【図4a】細菌細胞における発現のための、EPO-L2-EPOrEC（(G4S)3を介してEPOrECに連結されたEPO）をコードする核酸配列を示す図である（ヌクレオチド配列：長さ = 1227 bp）。ヌクレオチド配列およびタンパク質配列は、6xHisTジントグを有し、シグナル配列を有していない大腸菌において発現される完全な配列を表す。太字は、Xho1および6xHisT残基を指す。* は、終止コドンを目指す。ATG開始コドンは太字イタリック体で示す。

【図4b】アミノ酸配列（長さ = 409 aa）を示す図である。

【図5a】哺乳動物細胞において発現されるEPOをコードする核酸配列を示す図である（ヌクレオチド配列：長さ = 579 bp、シグナル配列を含む）。ヌクレオチド配列およびタンパク質配列は、シグナル配列を有する、哺乳動物細胞株において発現される完全な配列を表す。配列は、太字および小文字のシグナル配列を含有する。* は、終止コドンを目指す。

【図5b】アミノ酸配列（長さ = 166 aa、シグナル配列なし）を示す図である。シグナル配列は太字で示す。

【図6a】細菌細胞における発現のためのEPOをコードする核酸配列を示す図である（ヌクレオチド配列：長さ = 522 bp）。ヌクレオチド配列およびタンパク質配列は、6xHisTジントグを有する、大腸菌において発現される完全な配列を表す。太字は、Xho1および6xHisT残基を指す。* は、終止コドンを目指す。ATG開始コドンは太字イタリック体で示す。

【図6b】アミノ酸配列（長さ = 174 aa）を示す図である。

【図7a】哺乳動物細胞において発現されるEPOrECをコードする核酸配列を示す図である（ヌクレオチド配列：長さ = 732 bp、シグナル配列を含む）。ヌクレオチド配列およびタンパク質配列は、シグナル配列を有する、哺乳動物細胞において発現される完全な配列を表す。

【図7b】アミノ酸配列（長さ = 220 aa、シグナル配列なし）を示す図である。シグナル配列は太字で示す。

【図8a】細菌細胞において発現されるEPOrECをコードする核酸配列を示す図である（ヌクレオチド配列：長さ = 684 bp）。ヌクレオチド配列およびタンパク質配列は、6xHisTジントグを有する、大腸菌において発現される完全な配列を表す。太字は、Xho1および6xHisT残基を指す。* は、終止コドンを目指す。ATG開始コドンは太字イタリック体で示す。

【図8b】アミノ酸配列：（長さ = 228 aa）を示す図である。

【図9】a) PCRは、適した制限部位（プライマーR1~4内に含有される）が側面に

10

20

30

40

50

位置する、興味のある遺伝子から成るDNAを生成するために使用した。b) PCR産物は、リンカー領域の両側に、適したベクターの中にライゲーションした。c) 構築物は、その後、適切なリンカーを導入するために修飾した。リンカーは、いかなる不要な配列(つまり非天然制限部位)も含有していなかった。

【図10】a) オリゴヌクレオチドは、特有のオーバーラップを有する部分的に二本鎖の領域を形成するように設計し、アニールし、処理した場合、リガンドおよび受容体にアニールするであろう隣接領域を有するリンカーをコードするであろう。b) PCRは、LR融合遺伝子を産生するために「メガプライマー」ならびに末端プライマー(R1およびR2)を使用して行った。R1およびR2プライマーは、標的ベクターの中へのライゲーションに有用な隣制限部位を導入するように設計した。

【図11】EPO融合タンパク質のウェスタンブロット分析を示す図である。EPOおよびEPOキメラ構築物を発現するCHO f l p I n安定細胞株のウェスタンブロット分析。レーン1 = 3 B 2 ; レーン2 = 3 B 2 ; レーン3 = E P O ; レーン4 = 3 A 1 ; レーン5 = 偽培地。A = 非還元条件 ; B = 還元条件。

【図12】ヒトEPOと比較したEPO融合タンパク質3 A 1の活性を示す図である。図12 Aは、TF-1細胞増殖アッセイにおけるEPO国際基準に対する用量応答を示し、TF-1細胞増殖アッセイにおけるAFT-EPO 3 A 1の用量応答を示す。

【図13】TF-1細胞増殖アッセイにおけるEPO国際基準に対する用量応答を示すグラフである。

【図14】TF-1細胞増殖アッセイにおけるAFT-EPO融合タンパク質(3 A 1)に対する用量応答を示すグラフである。

【図15】非治療ネガティブコントロールおよびEPOポジティブコントロールと比較した網赤血球%に対する3 A 1の効果を示すグラフである。

【図16】非治療ネガティブコントロールおよびEPOポジティブコントロールと比較したヘモグロビン計数(g/dl)に対する3 A 1の効果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明の一態様によれば、エリスロポエチンの活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子であって、上述のポリペプチドは、エリスロポエチン受容体のエリスロポエチン結合ドメインに直接または間接的に連結されるエリスロポエチンまたはその部分を含む核酸分子が提供される。

本発明の一態様によれば、エリスロポエチン受容体のエリスロポエチン結合ドメインに直接または間接的に連結されるエリスロポエチンのアミノ酸配列またはその活性結合部分を含む融合ポリペプチドが提供される。

本発明の好ましい実施形態において、エリスロポエチンは、ペプチドリナー、好ましくは柔軟なペプチドリナーによって、エリスロポエチン受容体の結合ドメインに連結される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のペプチド連結分子は、ペプチドG l y G l y G l y S e rの少なくとも1コピーを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のペプチド連結分子は、ペプチドG l y G l y G l y S e rの2、3、4、5または6コピーを含む。

好ましくは、上述のペプチド連結分子は、ペプチドG l y G l y G l y S e rの3コピーから成る。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述のペプチド連結分子は、ペプチドG l y G l y G l y S e rの4コピーから成る。

本発明のさらなる代替の実施形態において、上述のポリペプチドは、ペプチド連結分子を含まず、エリスロポエチンおよびエリスロポエチン受容体のエリスロポエチン結合ドメインの直接的な融合物である。

本発明のさらなる態様によれば、

i) 配列番号1で表される核酸配列、

10

20

30

40

50

i i) 配列番号 3 で表される核酸配列、
 i i i) 配列番号 5 で表される核酸配列、
 i v) 配列番号 7 で表される核酸配列、または
 v) 配列番号 1、3、5 または 7 とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、エリスロポエチン受容体調節活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子
 から選択される核酸配列を含む核酸分子が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、アゴニストである。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、アンタゴニストである。

10

核酸分子のハイブリダイゼーションは、2つの相補的な核酸分子が、互いに、かなりの量の水素結合を起こす場合に起こる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、核酸を取り囲む環境条件、ハイブリダイゼーション方法の性質、ならびに使用される核酸分子の組成および長さによって変動し得る。特定の程度のストリンジェンシーを達成するのに必要とされるハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001) および Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes 第I部、第2章 (Elsevier, New York, 1993) において説明される。 T_m は、核酸分子の所与の鎖の50%が、その相補鎖にハイブリダイズする温度である。以下は、ハイブリダイゼーション条件の例示的なセットであり、限定的なものではない。

20

非常に高度なストリンジェンシー (少なくとも90%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

ハイブリダイゼーション: 16時間、65 で $5 \times S S C$

2度洗浄: それぞれ15分間、室温 (RT) で $2 \times S S C$

2度洗浄: それぞれ20分間、65 で $0.5 \times S S C$

高度なストリンジェンシー (少なくとも80%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

30

ハイブリダイゼーション: 16 ~ 20時間、65 ~ 70 で $5 \times \sim 6 \times S S C$

2度洗浄: それぞれ5 ~ 20分間、RTで $2 \times S S C$

2度洗浄: それぞれ30分間、55 ~ 70 で $1 \times S S C$

低度なストリンジェンシー (少なくとも50%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

ハイブリダイゼーション: 16 ~ 20時間、RT ~ 55 で $6 \times S S C$

少なくとも2度洗浄: それぞれ20 ~ 30分間、RT ~ 55 で $2 \times \sim 3 \times S S C$ 。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号1で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

40

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号3で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号5で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号7で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の一態様によれば、本発明による核酸によってコードされるポリペプチドが提供される。

本発明のさらなる態様によれば、

i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列、

50

- i i) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列、
- i i i) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列、
- i v) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列、
- v) 配列番号 17 で表されるアミノ酸配列、
- v i) 配列番号 18 で表されるアミノ酸配列

から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、エリスロポエチン受容体調節活性を有するポリペプチドが提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、アゴニストである。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、アンタゴニストである。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、配列番号 18 で表されるアミノ酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の一態様によれば、2つのポリペプチドから成るホモ二量体であって、上述のポリペプチドはそれぞれ、

i) エリスロポエチンまたはその受容体結合ドメインを含む第 1 の部分と、ペプチド連結分子によってそれと任意選択で連結される

i i) エリスロポエチン受容体のエリスロポエチン結合ドメインを含む第 2 の部分とを含むホモ二量体が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 2 を含むまたはそれから成る 2つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 4 を含むまたはそれから成る 2つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 6 を含むまたはそれから成る 2つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 8 を含むまたはそれから成る 2つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 17 を含むまたはそれから成る 2つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 18 を含むまたはそれから成る 2つのポリペプチドを含む。

本発明のさらなる態様によれば、本発明による核酸分子を含むベクターが提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のベクターは、本発明による核酸分子を発現するように適合された発現ベクターである。

本発明による (1つまたは複数の) 核酸を含むベクターは、特に、ベクターが、安定した形質移入のための、ゲノムの中への組換えのために細胞の中に核酸を導入するために使用されることになっている場合、プロモーターまたは他の調節配列を含む必要はない。好ましくは、ベクターにおける核酸は、適切なプロモーターまたは宿主細胞における転写のための他の調節エレメントに作動可能に連結される。ベクターは、複数の宿主において機能する二機能性発現ベクターであってもよい。「プロモーター」によって、転写開始部位から上流の、転写に必要とされる調節領域をすべて含有するヌクレオチド配列が意味され

10

20

30

40

50

る。適したプロモーターは、真核細胞または原核細胞における発現のための構成的、組織特異的、誘発性、発生的、または他のプロモーターを含む。「作動可能に連結される」は、転写がプロモーターから開始されるように適切に位置し、配向する同じ核酸分子の一部としてつながれていることを意味する。プロモーターに作動可能に連結されるDNAは、プロモーターの「転写開始調節下に」ある。

好ましい実施形態において、プロモーターは、構成的、誘発性、または調節可能プロモーターである。

本発明のさらなる態様によれば、本発明による核酸分子またはベクターを用いて形質移入または形質転換される細胞が提供される。

好ましくは、上述の細胞は、真核細胞である。その代わりに、上述の細胞は、原核細胞である。

本発明の好ましい実施形態において、上述の細胞は、真菌細胞（たとえばピキア種、サッカロミセス種、アカパンカビ種）、昆虫細胞（たとえばスポドプテラ種）、哺乳動物細胞（たとえばCOS細胞、CHO細胞）、植物細胞から成る群から選択される。

本発明のさらなる態様によれば、賦形剤または担体を含む、本発明によるポリペプチドを含む医薬組成物が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述の医薬組成物は、さらなる治療薬と組み合わせられる。

投与される場合、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる調製物で投与される。そのような調製物は、薬学的に許容できる濃度の塩、緩衝剤、防腐剤、適合性の担体、および任意選択で他の治療薬を規定どおりに含有していてもよい。

本発明の医薬組成物は、注射を含む、任意の通常経路によって投与することができる。投与および適用は、たとえば経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、関節内、皮下、局所（目）、皮膚（たとえば皮膚または粘膜へのクリーム状の脂質可溶性挿入物）、経皮、鼻腔内であってもよい。

本発明の医薬組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独でまたはさらなる薬もしくは共力性の薬剤と共に所望の応答をもたらす医薬品/組成物の量である。これは、一時的に疾患の進行を単に遅らせることを伴ってもよいが、より好ましくは、それは、持続的に疾患の進行を食い止めることを伴う。これは、ルーチン的な方法によってモニターすることができるまたは診断方法に従ってモニターすることができる。

対象に投与される医薬組成物の用量は、異なるパラメーターに従って、特に、使用される投与のモードおよび対象の状態（つまり年齢、性別）に従って選ぶことができる。投与される場合、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる量および薬学的に許容できる組成物で適用される。医薬で使用される場合、塩は、薬学的に許容できるはずであるが、薬学的に許容できない塩は、その薬学的に許容できる塩を調製するために好都合に使用されてもよく、本発明の範囲から除外されない。そのような薬理的におよび薬学的に許容できる塩は、以下の酸から調製されるものを含むが、これらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、およびその他同種のもの。さらに、薬学的に許容できる塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、またはカルシウム塩などのようなアルカリ金属塩またはアルカリ土類塩として調製することができる。

医薬組成物は、所望される場合、薬学的に許容できる担体と組み合わせられてもよい。本明細書において使用されるような用語「薬学的に許容できる担体」は、ヒトへの投与に適した1つまたは複数の適合性の固体または液体の増量剤、希釈剤、またはカプセル化する物質を意味する。用語「担体」は、適用を容易にするために有効成分が組み合わせられる天然または合成の有機または無機成分を示す。医薬組成物の構成成分はまた、所望の医薬品効力を実質的に損なうであろう相互作用がない方法で本発明の分子とおよび互いに混合することもできる。

医薬組成物は、塩中の酢酸、塩中のクエン酸、塩中のホウ酸、および塩中のリン酸を含む適した緩衝剤を含有していてもよい。

10

20

30

40

50

医薬組成物はまた、任意選択で、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベン、およびチメロサルなどのような適した防腐剤を含有していてもよい。

医薬組成物は、単位剤形で好都合に与えられてもよく、薬学の技術分野においてよく知られている方法のいずれかによって調製されてもよい。方法はすべて、活性作用物質を、1つまたは複数の補助成分を構成する担体と結合させるステップを含む。一般に、組成物は、活性化化合物を、液体の担体、微粉化した固体の担体、またはその両方と均一におよび完全に結合させることならびにその後、必要であれば、産物を成形することによって調製される。

経口投与に適した組成物は、カプセル、錠剤、ロゼンジなどのように、別々の単位として与えられてもよく、それぞれが、所定の量の活性化化合物を含有する。他の組成物は、シロップ剤、エリキシル剤、または乳剤などのような、水性の液体または非水系の液体中の懸濁剤を含む。

非経口投与に適した組成物は、好ましくは、レシピエントの血液と等張である滅菌した水性または非水系の調製物を好都合に含む。この調製物は、適した分散剤または湿潤剤および懸濁剤を使用して、知られている方法に従って製剤されてもよい。滅菌注射調製物はまた、たとえば1,3-ブタンジオール中の液剤のように、無毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶剤中の滅菌注射液剤または懸濁剤であってもよい。用いられてもよい許容できる溶剤の中には、水、リンガー溶液、および等張食塩水がある。さらに、滅菌した不揮発性油は、溶剤または懸濁化剤として慣習的に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたは合成ジグリセリドを含む任意の無刺激の不揮発性油が用いられてもよい。さらに、オレイン酸などのような脂肪酸は、注射剤の調製物において使用されてもよい。経口、皮下、静脈内、筋肉内などの投与に適した担体制剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、Easton、PAにおいて見つけることができる。

本発明のさらなる態様によれば、エリスロポエチンアゴニストの投与が有効であろう状態に罹患しているヒト対象を治療するための方法であって、本発明による少なくとも1つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が提供される。

本発明の好ましい方法において、上述のポリペプチドは、静脈内に投与される。

本発明の代替の好ましい方法において、上述のポリペプチドは、皮下に投与される。

本発明のさらなる好ましい方法において、上述のポリペプチドは、2日間隔で投与され、好ましくは、上述のポリペプチドは、1週、2週、または1か月間隔で投与される。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、貧血である。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、慢性腎疾患の結果としての貧血である。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、癌の治療における化学療法の結果としての貧血である。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、慢性関節リウマチの治療における化学療法の結果としての貧血である。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、AIDSの治療における化学療法の結果としての貧血である。

本発明の一態様によれば、貧血の治療のための医薬の製造のための、本発明によるポリペプチドの使用が提供される。

本発明のさらなる好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、2日間隔で投与され、好ましくは、上述のポリペプチドは、1週、2週、または1か月間隔で投与される。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、慢性腎疾患の結果としての貧血である。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述の状態は、癌の治療における化学療法の結果としての貧血である。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述の状態は、慢性関節リウマチの治療に

10

20

30

40

50

おける化学療法の結果としての貧血である。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述の状態は、A I D S の治療における化学療法の結果としての貧血である。

本発明のさらなる態様によれば、本発明によるポリペプチドまたは二量体に結合するモノクローナル抗体が提供される。

好ましくは、上述のモノクローナル抗体は、ポリペプチドまたは二量体に結合するが、エリスロポエチンまたはエリスロポエチン受容体にそれぞれ特異的に結合しない抗体である。

モノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドを含む二量体のいずれかによって提示される立体構造抗原 (c o n f o r m a t i o n a l a n t i g e n) に結合する。

本発明のさらなる態様において、本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を調製するための方法であって、

i) 本発明による少なくとも1つのポリペプチドを含む免疫原を用いて免疫応答性哺乳動物を免疫するステップ、
i i) 免疫された免疫応答性哺乳動物のリンパ球を骨髄腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成するステップ、

i i i) ステップ (i i) のハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体を、(i) のポリペプチドに対する結合活性についてスクリーニングするステップ、

i v) ハイブリドーマ細胞を培養して、上述のモノクローナル抗体を量産および/または分泌するステップ、ならびに

v) 培養上清からモノクローナル抗体を回収するステップを含む方法が提供される。

好ましくは、上述の免疫応答性哺乳動物は、マウスである。その代わりに、上述の免疫応答性哺乳動物は、ラットである。

ハイブリドーマ細胞を使用するモノクローナル抗体の産生は、当技術分野においてよく知られている。モノクローナル抗体を産生するために使用される方法は、Nature 256、495~497ページ(1975)におけるKohlerおよびMilsteinならびにDonilardおよびHoffman、Compendium of Immunology V. II、Schwartz編、1981における「Basic Facts about Hybridomas」によって開示され、これらは、参照によって組み込まれる。

本発明のさらなる態様によれば、本発明による方法によって得られるまたは入手可能なハイブリドーマ細胞株が提供される。

本発明のさらなる態様によれば、生体試料において、本発明によるポリペプチドを検出するための診断試験であって、

i) 試験対象となる単離試料を提供するステップ、

i i) 上述の試料を、本発明によるポリペプチドに結合するリガンドと接触させるステップ、および

i i i) 上述の試料において上述のリガンドの結合を検出するステップを含む診断試験が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のリガンドは、抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。

本明細書の説明および請求項の全体にわたって、その用語「~を含む (c o m p r i s e) 」および「~を含有する (c o n t a i n) 」および用語の変化形、たとえば「~を含む (c o m p r i s i n g) 」および「~を含む (c o m p r i s e s) 」は、「~を含むが、これらに限定されない」を意味し、他の部分、添加剤、構成成分、整数、またはステップを除外することを意図しない(および除外しない)。

本明細書の説明および請求項の全体にわたって、文脈上、他の意味に解すべき場合を除き、単数形は複数形を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、明細書は、文脈上、他の意味に解すべき場合を除き、複数および単数を企図するものとして理解されたい。

本発明の特定の態様、実施形態、または実施例に関連して記載される特色、整数、特徴

10

20

30

40

50

、化合物、化学的部分、または化学基は、矛盾しない限り、本明細書において記載される他の態様、実施形態、または実施例に適用可能であることが理解されたい。

本発明の実施形態は、ここで、ほんの一例として、以下の図に関連して記載することとする。

材料および方法

インビトロ試験

EPOのインビトロバイオアッセイは、当技術分野においてよく知られている。これらは、EPORを発現する細胞の増殖および/または分化のEPO誘発性の刺激を測定する。いくつかのアッセイは、EPO応答細胞の源としての骨髓を使用して赤血球系コロニー形成を測定する。他のバイオアッセイは、³H-チミジンを使用する増殖または懸濁培養物におけるヘモグロビンへの放射性的鉄の組み込みの測定による分化を測定する。EPO応答腫瘍細胞株(TF1細胞)またはEPORを用いて形質転換した細胞の使用は、EPOアゴニスト活性を試験するために使用された。

インビボ試験

エリスロポエチンのためのインビボバイオアッセイは、当技術分野においてよく知られており、動物モデル、たとえばラットにおける赤血球形成の外來性EPOによる刺激に基づき、赤血球前駆体プールは、低酸素、出血、または細胞毒性薬によって増えている。応答は、典型的には、脾臓または赤血球への放射性的鉄の組み込みによって測定される。

そのような1つの試験は、超低酸素症赤血球増加症マウス・アッセイ(ex hypoxic polycythemia mouse assay)と呼ばれ、組換えEPOの試験の産業基準である(Colesら Nature 191:1065ページ、1961を参照されたい)。

免疫試験

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体へのEPOの結合を測定するイムノアッセイは、当技術分野において知られている。市販で入手可能なEPO抗体は、試料におけるEPOを検出するためおよびまた競合的阻害研究における使用のためにも入手可能である。たとえば、モノクローナル抗体は、http://www.ab-direct.com/index_AbD_Serotecで購入することができる。

融合タンパク質の組換え産生

融合タンパク質の構成成分は、リガンドまたは受容体にアニールし、標的ベクターの中にクローニングするための適した制限部位を導入するように設計したプライマーを使用して、PCRによって生成した(図8a)。PCRのための鋳型は、標的遺伝子を含み、IMAGEクローン、cDNAライブラリー、または特注合成遺伝子から得た。適切な隣接制限部位を有するリガンドおよび受容体の遺伝子を合成したら、これらは、その後、標的ベクターにおけるリンカー領域の両側にライゲーションした(図8b)。構築物は、その後、リンカー領域の両側の2つの特有の制限部位の間への特注合成長のDNAの挿入によって、ssDNA修飾技術によるリンカー領域の変更によって、適した制限部位の間へのプライマーデュプレックス/マルチプレックスの挿入によって、またはPCR修飾によって、隣接制限部位を有していない適切なリンカーを含有するように修飾した(図8c)。

その代わりに、最適なりガンドまたは受容体のドメインにアニールするように設計した隣接配列を有するリンカーを、オリゴヌクレオチドデュプレックスを作製することによって、最初に合成し、これを、二本鎖のDNAを生成するように処理した(図9a)。その後、「メガプライマー」としてのリンカー配列、「メガプライマー」がアニールするリガンドおよび受容体の反対側の末端に対して設計したプライマーを使用し、鋳型としてのリガンドおよび受容体を用いてPCRを行った。末端プライマーは、最適な発現ベクターへのライゲーションに適した制限部位を用いて設計した(図9b)。

融合タンパク質の発現および精製

発現は、適した系(たとえば哺乳動物CHO細胞および大腸菌)において実行し、これは、EPO融合遺伝子を生成したベクターに依存した。発現は、その後、1つまたは複数の、当技術分野においてよく知られているSDS-PAGE、未変性PAGE、ウェスタ

10

20

30

40

50

ンブロットティング、E L I S Aを含むことができる多種多様の方法を使用して分析した。

安定形質移入C H O F l p - I n細胞株を約3 ~ 4日間、75 cm²フラスコにおいて成長させ、この時点で試料を分析のために採取した。試料を、25 mM D T Tの存在下および非存在下において等容量のl a e m m l i ローディングバッファーと混合し、5分間、沸騰させた。試料を、15% (w/v) ビスアクリルアミドゲル上で分離し、P V D F膜に転写した。P B S - 0.05% (v/v) T w e e n 20中の5% (w/v) 牛乳タンパク質中でブロックした後に、試料検出は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 抱合二次抗体と共に特異的抗E P O抗体を使用して実行した。視覚化は、H R P検出キットを使用する、写真用フィルム上での化学発光によるものとした。図11を参照されたい。

適したレベルの発現が達成されたら、R L融合物は、精製および後の分析のための十分なタンパク質を産生するためにより大規模で発現させた。精製は、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、サイズ排除、および/またはアフィニティークロマトグラフィーなどのような1つまたは複数のクロマトグラフィー手順の適した組合せを使用して実行した(ニッケル/コバルト樹脂、抗体固定化樹脂、および/またはリガンド/受容体固定化樹脂を使用)。精製タンパク質は、1つまたは複数のブラッドフォードアッセイ、S D S - P A G E、未変性P A G E、ウェスタンブロットティング、E L I S Aを含むことができる、多種多様の方法を使用して分析した。

L R融合物の特徴づけ

変性P A G E、未変性P A G Eゲル、およびウェスタンブロットティングは、融合ポリペプチドを分析するために使用し、ウェスタンブロットティングは、L R融合物に対して非立体構造感受性の抗体を用いて行った。未変性溶液状態の分子量情報は、S u p e r o s e G 200分析カラムを使用するサイズ排除クロマトグラフィーおよび分析超遠心法などのような技術から得ることができる。

統計

2つのグループは、それらの分散が正常に分布した場合、スチューデント検定を用いてまたは正常に分布しなかった場合、スチューデント-サタースウェイト検定 (S t u d e n t - S a t t e r t h w a i t e ' s t e s t) によって比較した。分布は、F検定を用いて試験した。一元配置A N O V Aは、3つ以上のグループの平均値を比較するために使用し、有意水準が $p < 0.05$ であった場合、個々の比較はダネット検定を用いて行った。統計的検定はすべて、5%の有意水準で両側とし、欠測値に対するインピュテーションは行わなかった。

インビトロバイオアッセイ

細胞調製物

3 A 1の生物活性は、インビトロT F - 1細胞増殖モデルにおいて決定した。T F - 1細胞 (A T C C、パッチ番号5003310)を、液体窒素貯蔵庫から取り出し、2分間、37 °Cウォーターバスの中に置いた。その後、バイアルの内容物を、9 mlの培養培地を含有する15 mlチューブに移した。(R P M I中、10% F B S、2 mM L - グルタミン、100 U / ml ペニシリン、100 μg / ml ストレプトマイシン、2 ng / ml G M - C S F)。細胞を123 x gで5分間、遠心分離し、細胞ペレットを培養培地中に再懸濁し、細胞密度を 4×10^4 細胞/mlに調節した。

細胞培養

細胞を、 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/mlの密度で、培養培地中で、C O₂ インキュベーター (5% C O₂、37 °C) において培養した。細胞密度が 7×10^5 細胞/mlを超過しないことを確実にしながら、継代接種を1週間に2度行った。細胞生存率をトリパンプルー排除法によって評価した。アッセイに先立って、細胞を、約125 x gで5分間、回転させることによってP B Sを用いて3回洗浄した。その後、ペレットをアッセイ培地において元に戻し (R P M I中、10% F B S、100 U / ml ペニシリン、100 μg / ml ストレプトマイシン、2 mM L - グルタミン)、細胞密度を 2×10^5 細胞/ml

10

20

30

40

50

ml に調節した。

標準 / 試料調製物

EPO (国際基準、NIBSC、バッチ番号 88 / 574) を、アッセイ培地において元に戻し、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ($120 \text{ IU} / \text{ml}$) の濃度にし、 $100 \mu\text{l}$ 一定分量に分け、 -80 で保存した。毎日のアッセイで、1本のバイアルを冷凍庫から取り出し、使用濃度を調製した。

TF - 1 バイオアッセイ

$50 \mu\text{l}$ の試験するそれぞれのタンパク質を 96 ウェルマイクロプレート中の適切なウェルに加えた。その後、 $50 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を追加し、プレートを静かに振盪し、細胞および標準物 / 試料を混合した。コントロールウェルは、アッセイ培地および細胞懸濁液 ($50 \mu\text{l} + 50 \mu\text{l}$) のみを含み、ブランクウェルは、アッセイ培地 ($100 \mu\text{l}$) のみを含み、細胞は、 CO_2 インキュベーター ($5\% \text{ CO}_2$ 、 37) において 72 時間、異なる濃度の試験タンパク質にさらし、その後、 $10 \mu\text{l}$ の MTT をそれぞれのウェルに追加した。インキュベーション ($5\% \text{ CO}_2$ 、 37) の 4 時間後に、可溶性バッファーを追加し ($100 \mu\text{l} / \text{ウェル}$)、プレートは、 CO_2 インキュベーターに一晩置いた。その後、吸光度を 570 nm および 650 nm (参照) で読んだ。

結果の計算

生データはすべて、以下のように変えて、Gen5 ソフトウェアを使用して分析した。

1. 参照 (650 nm) からの結果を 570 nm で得た結果から引いた。
2. その後、コントロールからの結果を、異なる濃度の試験タンパク質にさらした細胞について得た結果から引いた。
3. ステップ 2 から得た結果を、 $\text{OD} / \text{OD}_{\text{max}}$ の比率 (%) としてプロットした。

それぞれの用量応答曲線 (対数、4 パラメーター) に基づいて、それぞれのタンパク質に対する EC_{50} (最大の応答のうちの 50% を引き起こす濃度) の値を計算した。

インビボ バイオアッセイ

EPO-LR 融合物タンパク質 (3A1) は、下記に詳述されるように、正球形 (normocytic haemic) マウスモデルにおいて試験した。正球形マウスモデルは、マウスにおける網赤血球産生の刺激の測定に基づく。さらに、モデルは、エリスロポエチン (EPO) またはその EPO 模倣タンパク質の生物学的活性を検出するために使用することができる。動物タイプ: 32 B6D2F1 / OlaHsd マウス、メス、研究の開始時 6 ~ 9 週齢。4 匹のマウスをそれぞれの治療に使用した。動物は、Harlan Winkelmann GmbH から調達した、コントロールされた完全な壁で維持された飼育系 (SPF) に由来した。アッセイ手順の初めに、マウスは、ケージ当たり 4 匹のマウスに無作為に分けた。これらの動物は、尾を彩色することによって同定のためにマークした (ケージ当たり 1 つの標識)。動物に、 0.5 mL の適切な治療薬 (ケージ当たり 1 つの溶液) を皮下注射し、新しいケージに入れた。治療マウスを収容するそれぞれのケージが、それぞれの異なる治療からの 1 匹のマウスを含み、マウスを組み合わせた。注射の 4 日後に、血液を尾静脈から収集し、網赤血球の数をフローサイトメトリーによって決定した。

(実施例 1)

EPO 遺伝子は、IMAGE クローンとして得て、発現ベクター pET21a+ (大腸菌発現用) および pSecTag (哺乳動物発現用) の中にサブクローニングした。PCR は、ベクターへの挿入に適した制限部位が側面に位置する EPO 遺伝子を含む DNA を産生するために使用した。

細菌発現については、使用したプライマーは、ヒスチジンタグつきタンパク質について NdeEPOF ($5' - \text{aattcaattcatatggcccccaccacgacctcattctg} - 3'$) および EPOXhoR ($5' - \text{aattcttcgagtcctgtccacctgtcctgcagg} - 3'$) ならびにタグなしタンパク質について NdeEPOF および EPO* XhoR ($5' - \text{aattcttcgagctatctgtcctcctgtcctgcagg} - 3'$) とした。その後、PCR 産物は、pET21a+ において Nde

10

20

30

40

50

I および X h o I の部位の間にライゲーションした。結果として生じるクローンは、配列決定によって確認した。

大腸菌からの E P O の発現は、p E T 2 1 a + E P O + / - H i s プラスミドを用いて形質転換した大腸菌 B L 2 1 (D E 3) R I P L 細胞において実行した。発現は、I P T G を用いて誘発し、E P O に対する抗体を使用して、ウェスタンブロットによって確認した (図 2 X) 。

哺乳動物発現については、使用したプライマーは、N h e E P O F (5 ' - a a a t t t g c t a g c c a c c a t g g g g g t g c a c g a a t g t c c t g - 3 ') および E P O * H 3 R (5 ' - a a t t a a g c t t c t a t c t g t c c c c t g t c c t g c a g - 3 ') とした。その後、P C R 産物は、p S e c T a g において N h e I および H i n d I I I の部位の間にライゲーションした。

(実施例 2)

E P O R 遺伝子は、特注で遺伝子合成し / 胎児肝臓 c D N A ライブラリーから得、発現ベクター p E T 2 1 a + (大腸菌発現用) および p S e c T a g (哺乳動物発現用) の中にサブクローニングした。P C R は、ベクターへの挿入に適した制限部位が側面に位置する E P O 遺伝子を含む DNA を産生するために使用した。

細菌発現については、使用したプライマーは、ヒスチジンタグつきタンパク質について N d e E P O R F o r (5 ' - g c g c a t a C A T A T G g c g c c c c c g c c t a a c c t c c c - 3 ') および E P O R X h o R e v 2 (5 ' - g c g c C T C G A G C G T C A G C A G C G A C A C A G G C T - 3 ') ならびにタグなしタンパク質について N d e E P O F および E P O R * X h o R e v 2 (5 ' - g c g c C T C G A G t c a C G T C A G C A G C G A C A C A G G C T - 3 ') とした。その後、P C R 産物は、p E T 2 1 a + において N d e I および X h o I の部位の間にライゲーションした。結果として生じるクローンは、配列決定によって確認した。

哺乳動物発現については、使用したプライマーは、N h e E P O R F o r (5 ' - g c g c G C T A G C c a c c a t g g a c c a c c t c g g g g c g t c - 3 ') および E P O R H i n d R e v 2 (5 ' - g c g c A A G C T T t c a C G T C A G C A G C G A C A C A G G C T - 3 ') とした。その後、P C R 産物は、p S e c T a g において N h e I および H i n d I I I の部位の間にライゲーションした。

(実施例 3)

一方の末端で E P O および他方で E P O R に相補的な隣接配列を有する (G ₄ S)₃ リンカーは、オリゴヌクレオチドのマルチプレックスを形成するために、3つのオリゴヌクレオチド ; E P O l i n k 3 F (5 ' - a g g t a g t g g t g g c g g a g g t a g c g g t g g c g g - 3 ') 、 E P O l i n k 3 R 1 (5 ' - g g g a g g t t a g g c g g g g c g c a g a a c c t c c g c c a c c g c t a c c - 3 ') 、 および E P O l i n k 3 R 2 (5 ' - t c c g c c a c c a c t a c c t c c g c c a c c t c t g t c c c c t g t c c t g c a g - 3 ') を相互にアニールすることによって合成した。その後、このマルチプレックスは、P C R においてプライマーとして使用することができる二本鎖 DNA を作製するために処理した。

その後、P C R は、プライマー B a m N h e E P O F o r (5 ' - a a a t t t g g a t c c g c t a g c c a c c a t g g g g g t g c a c g a a t g t c c t g - 3 ') 、 E P O R H i n d R e v 2 (5 ' - g c g c A A G C T T t c a C G T C A G C A G C G A C A C A G G C T - 3 ') 、 および鑄型としての E P O および E P O R との、先に産生したリンカー「メガプライマー」を使用して行った。これにより、哺乳動物発現ベクター p S e c T a g (N h e I および H i n d I I I) ならびにファージベクター M 1 3 m p 1 8 (B a m H I および H i n d I I I) へのライゲーションに適した制限部位が側面に位置する E P O - (G ₄ S)₃ - E P O r E C 遺伝子を産生した。

細菌発現については、E P O - (G ₄ S)₃ - E P O r E C 遺伝子は、プライマー N d e E P O F (5 ' - a a t t a a t t c a t a t g g c c c c a c c a c g c c t c a t c t g - 3 ') および E P O R * X h o R e v 2 (5 ' - g c g c C T C G A G t c a C

10

20

30

40

50

GTCAGCAGCGACACAGGCT - 3') を使用して、PCRによってNdeI および *XhoI 隣接領域を用いて生成した。その後、これを、pET21a+ の中にライゲーションした。

(実施例4)

図11は、EPO受容体融合タンパク質の2つの例；3A1および3B2の発現および検出を示す。3A1および3B2の両方は75および100kDaの間まで流れる。EPOは、グリコシル化タンパク質について予想されるように37および45kDaの間まで流れる。

3A1の生物学的活性を、ヒトEPOと比較してアッセイし、図12、13、および14に示す。

(実施例5)

3A1について検査した用量範囲は、動物体重1kg当たり2.5~150ug(標準EPOと等価な質量)であった。図15および16は、投薬の4日後の、網赤血球およびヘモグロビンに対する3A1のインビボ活性を示す。

10

【図1a】

Figure 1a

Atgggggtgcacgaatgtctcctggcttggcttctctcctccttggcctccagctct
gggcgcccccaccaccgctcattctgtgacagcggagctctgagagaggtacccttgg
agcccaagagagcccgagaaatcaccagcggcctgtgctgacacactgcagcttgaa
tsagaaatatacctgtcccaagacaaagttaatttctatgcttggaaagagatgga
ggtcggcagcagccgctgagaagctgtggcagggcctggccctgctgtcggaaagc
tgtcttggggggccagccctgttggtaactctccacggcctgggagcccttg
cagctgcatgtgataaagccgtcagtgccctgcagcctcaccacttgccttgc
ggcttgggagcccgagagagccatctccctcagatgcccggcctcagctgct
ccaactcgagaaatcactgctgacacttgggaaactcttccaggtctactccaat
ttctccgggaaagctgagctgacacagggagggcctgacagacaggggaca
gaggtggggaggtagtggggggaggtagccgtgcccggaggttctggtggcg
gaggttccggcccccggcctaacctccggaccccaagttcgagagcaaaagggc
cttggctggggcccccggggcccaagagcttctgtctcaccgaggggtggag
gacttgggtgttctgggagagagggcgagggcctggggctggcccgaggcaac
tacagcttctcctaccagctcagagatgagccatgaaagctgtgtcgcctgcacca
ggctccacggcctgctggtgctgcttctggtgttccgctcaccagccgac
acgtcgagcttctgctgcccctcaggttggcgtcaccagcagcctccggcctccgc
gataaccgctgtctaccacatcaatgagatagtgctctagacgcccctgggg
ctggtggcccggctgctgacagagcccgacagctgagtttggcctggctcccg
ccgctcagacacccatgactctcactccctacagagctggcctgctggccg
gcacagccgacagggagcgtacagagggctgagatcttggagggccacacagat
gtgtgctgacacacttggggggccggagcggctacacacttggccttccggcgc
gtatgctgagccagcttggggccttctggagggcctggtggagcctgtgtc
gctgctgagc*

【図1b】

Figure 1b

Mgvhcepawllwllllsllsllplplvlpvlpapprrlcdsrlyrylleakeaenittgcaeh
cslnenityfdtrknyfaykrmievqcaevwqslallseavlrqoallvnsqfwe
plqlhvdkaavslrlltllralgaqkeaisppdaasaplrittdfrkrlrvysnflr
gkllklytgeactrdrgggsgggsgggsgggsggappnlpdkfeskallaa
rgfpeellcfterledlvcfweeaaagvopgnysfysyledepwklcrlhqaftarg
avrfwclspadtssfvplrlvtaasgppryhrvhihnevllldapvlvarladesg
hvllrwlpptpmtshryevdvsagnagsgvqrveilegrtecvlnlrgrrtryf
avrrarmepfsgfwsawsefvsltt

【図2a】

Figure 2a

ATggcccccaccaccgctcattctgtgacagcggagctctggagaggtacccttgg
agcccaagagagcccgagaaatcaccagcggcctgtgctgacacactgcagcttgaa
tgagaaatatacctgttcccaagacccaagtttaatttctatgcttggaaagagatgga
ggtcggcagcagccgctgagaagctgtggcagggcctggccctgctgtcggaaagc
tgtccttggggggccagccctgttggtaactcttccacggcctgggagcccttg
cagctgcatgtgataaagccgtcagtgcccttgcagcctcaccacttgccttgc
ggcttgggagcccaagagagccatctccctcagatgcccggcctcagctgct
ccaactcgaaagactgctgtagacttccggaaacttccaggtctactccaat
ttctccgggaaagctgagctgacacagggagggcctgacagacaggggaca
gaggtggggaggtagtggggcgaggtagcgggtggggaggttctggtgggg
gaggttccggcccccggcctaacctccggaccccaagttcgagagcaaaagggc
cttggctggggcccccggggcccaagagcttctgtctcaccgaggggtggag
gacttgggtgttctgggagagagccagcggcctggggctggcccgaggcaac
tacagcttctcctaccagctcagagatgagccatgagaaactgtgtcgcctgcacca
ggctccacggcctgctggtgctgcttctggtgttctgctgctcaccagccgac
acgtcgaccttctgctgcccctcaggttggcgtcaccagcagcctccggcctccgc
gataaccgctgtcaccacatcaatgagatagtgctctagacgcccctgggg
ctggtggccggctgctgacagagcccgacagctgagtttggcctggctcccg
ccgctcagacacccatgactctcactccctacagagctggcctgctggccg
gcacagccgacagggagcgtacagagggctgagatcttggagggcccgaccagat
gtgtgctgacacacttggggggccggagcggctacacacttccgcttccggcgc
gtatgctgagccagcttggggccttctggagggcctggtggagcctgtgtgtc
gctgctgagc ctcgac caccaccaccaccacac*

【図2b】

Figure 2b

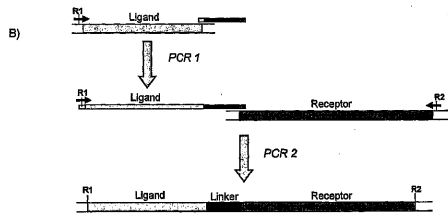
APpRLCDsrlyrylleakeaenittgcaehcslnenityfdtrknyfaykrmievqgg
avevwqslallseavlrqoallvnsqfweplqlhvdkaavslrlltllralgaqke
aisppdaasaplrittdfrkrlrvysnflrgkllklytgeactrdrgggsgggsgg
ggggsgggsgappnlpdkfeskallaaargpeellcfterledlvcfweeaaag
vpgnysfysyledepwklcrlhqaftargavrfwclspadtssfvplrlvtaasg
apryhrvhihnevllldapvlvarladesghvllrwlpptpmtshryevdvsagn
gagsvqrveilegrtecvlnlrgrrtryfavrarmepfsgfwsawsefvsltt
lehhhhhh

【図3a】

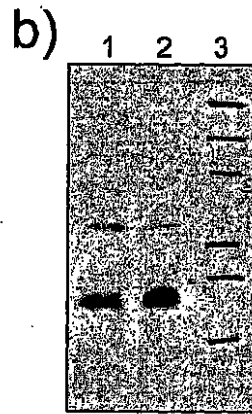
Figure 3a

Atgggggtgcacgaatgtctcctggcttggcttctctcctccttggcctccagctct
gggcgcccccaccaccgctcattctgtgacagcggagctctgagagaggtacccttgg
agcccaagagagcccgagaaatcaccagcggcctgtgctgacacactgcagcttgaa
tgagaaatatacctgttcccaagacccaagtttaatttctatgcttggaaagagatgga
ggtcggcagcagccgctgagaagctgtggcagggcctggccctgctgtcggaaagc
tgtcttggggggccagccctgttggtaactcttccacggcctgggagcccttg
cagctgcatgtgataaagccgtcagtgcccttgcagcctcaccacttgccttgc
ggcttgggagcccaagagagccatctccctcagatgcccggcctcagctgct
ccaactcgaaagactgctgtagacttccggaaacttccaggtctactccaat
ttctccgggaaagctgagctgacacagggagggcctgacagacaggggaca
gaggtggggaggtagtggggcgaggtagcgggtggggaggttctgctggccccc
cgccctaacctccggaccccaagttcgagagcaaaagggccttgcctggggccccc
ggggcccaagagacttctgtgcttccacggaggggttggagacttgggtgttct
tgggagagagcggcgagcgttggggttggggccggcagctacacgcttctcctacc
cagcttggagatgagccatgaaagctgtgtgcttggcctgacacagcctccacggct
gtgtgctgctgcttctggtgttctgctcctcaccagccacagctgacgcttgc
gccccagagttggcgtcaccagagcctcggggcctccggcagatcacctgtct
atccacatcaatgaaagtgtgcttctgagagcccccgtggggcctggtggcgggt
tggctgacagagagccagcctgaggttggcgttggcttggcctccggcctgagacacc
catgagcttctgagatcggtaagctgtgtgcttggcctgacacagcctccacggct
agcctacagaggttggagatcttggagggccgacaccagaggtgtgtgctgacaccc
tggggggcggagcggctacacacttggcctcggcggcgtatgctgagccgca
gcttccggggccttctggagcggccttggcggagcctgtgtgctgctgctgagc*

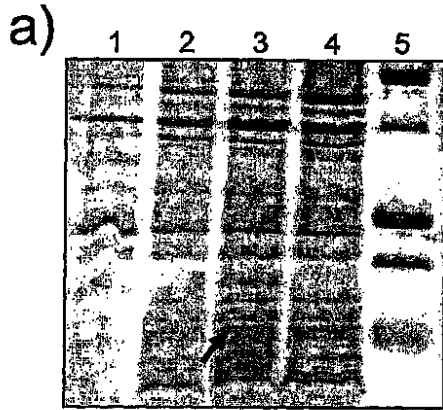
【 図 1 0 B) 】



【 図 1 1 b) 】



【 図 1 1 a) 】



【 図 1 2 A 】

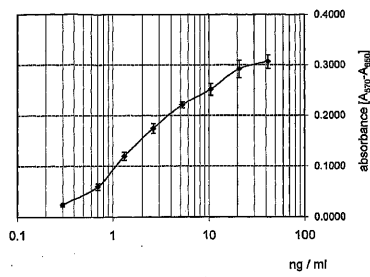


Figure 12 A

【 図 1 2 B 】

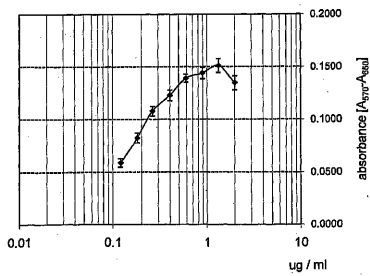


Figure 12B

【 図 1 4 】

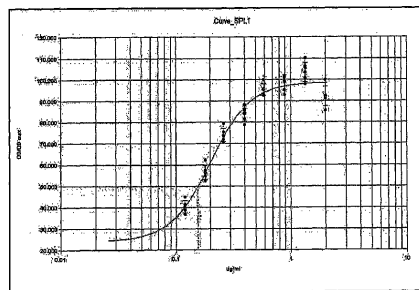


Figure 14

【 図 1 3 】

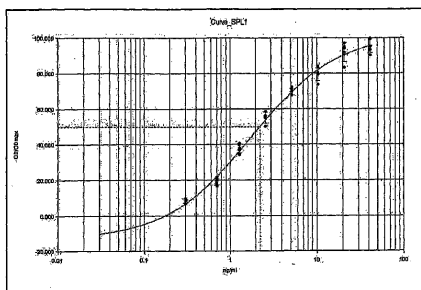
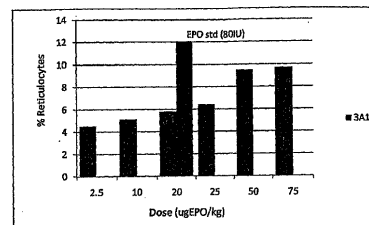


Figure 13

【 図 1 5 】

Figure 15



【 図 16 】

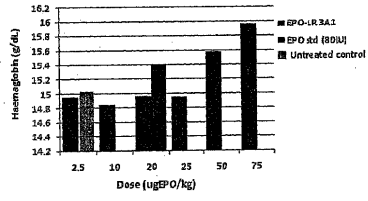


Figure 16

【 配列表 】

2010535489000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2008/002640
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/505 C07K14/71 C12N15/62 ADD. A61K38/18 C07K16/00 G01N33/68 A61P7/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/96565 A (ASTERION LTD [GB]; ROSS RICHARD [GB]; ARTYMIUK PETER [GB]; SAYERS JON) 20 December 2001 (2001-12-20) the whole document	1-5,7, 9-12, 16-20, 26,27, 33-59
A	DATABASE UniProt [Online] 21 July 1986 (1986-07-21), "RecName: Full=Erythropoietin; AltName: INN=Epoetin; Flags: Precursor;" XP002502557 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P01588 Database accession no. P01588 the whole document	
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 November 2008		Date of mailing of the international search report 16/02/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wiame, Ilse

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/GB2008/002640

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE UniProt [Online] 1 November 1990 (1990-11-01), "RecName: Full=Erythropoietin receptor; Short=EPO-R; Flags: Precursor;" XP002502558 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P19235 Database accession no. P19235 the whole document	
A	FRANK STUART J: "Receptor dimerization in GH and erythropoietin action--it takes two to tango, but how?" ENDOCRINOLOGY JAN 2002, vol. 143, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 2-10, XP002502556 ISSN: 0013-7227 the whole document	
X	ANDREA DE A D ET AL: "ANTI-ERYTHROPOIETIN RECEPTOR (EPO-R) MONOCLONAL ANTIBODIES INHIBIT ERYTHROPOIETIN BINDING AND NEUTRALIZE BIOACTIVITY" BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 82, no. 1, 1 July 1993 (1993-07-01), pages 46-52, XP000770106 ISSN: 0006-4971 abstract	52,56
T	WILKINSON IAN R ET AL: "A ligand-receptor fusion of growth hormone forms a dimer and is a potent long-acting agonist" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 13, no. 9, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 1108-1113, XP009089546 ISSN: 1078-8956 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/GB2008/002640**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:

see additional 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 an 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.:

see annex

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 Application No. PCT/GB2008/002640

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5,7,9-11,16-19,26,33-59 (all partially) and 12,20,27 (completely)

The fusion polypeptide of SEQ ID NO:2, the polynucleotide encoding said polypeptide and use thereof.

2. claims: 1-5,7,9-11,16-19,26,33-59 (all partially) and 13,21,24,28,31 (completely)

The fusion polypeptide of SEQ ID NO:4 or 17 [N.B. 4 and 17 are identical], the polynucleotide encoding said polypeptide and use thereof.

3. claims: 1-6,9-11,16-19,26,33-59 (all partially) and 14,22,29 (completely)

The fusion polypeptide of SEQ ID NO:6, the polynucleotide encoding said polypeptide and use thereof.

4. claims: 1-6,9-11,16-19,26,33-59 (all partially) and 15,23,25,30,32 (completely)

The fusion polypeptide of SEQ ID NO:8 or 18 [N.B. 8 and 18 are identical], the polynucleotide encoding said polypeptide and use thereof.

5. claims: 1-7,16,26,33-59 (all partially) and 8 (completely)

A fusion polypeptide comprising: the amino acid sequence of erythropoietin, or active binding part thereof linked directly to the erythropoietin binding domain of the erythropoietin receptor; the polynucleotide encoding said polypeptide and use thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2008/002640

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0196565	A	20-12-2001	AU 7423401 A	24-12-2001
			CA 2447632 A1	20-12-2001
			EP 1290170 A2	12-03-2003
			JP 2004503243 T	05-02-2004
			US 2004071655 A1	15-04-2004

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	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 N	15/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2
A 6 1 K	38/22 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
		C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 アーティミューク, ピーター
イギリス国, シェフィールド エス 1 0 2 ティーエヌ, ファース コート, ウェスタンバンク,
アステリオン・リミテッド

(72)発明者 セイヤーズ, ジョン
イギリス国, シェフィールド エス 1 0 2 ティーエヌ, ファース コート, ウェスタンバンク,
アステリオン・リミテッド

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA53 CA04 CA20 HA14
4B064 AG27 CA10 CA20 DA01
4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA87X AB01 AB02 AC14 BA02 CA24
CA25 CA44
4C084 AA02 BA02 CA53 DB56 MA02 MA66 NA05 NA06 ZA552
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA13 BA41 DA13 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	促红细胞生成素		
公开(公告)号	JP2010535489A	公开(公告)日	2010-11-25
申请号	JP2010519515	申请日	2008-08-04
申请(专利权)人(译)	Asuterion有限公司		
[标]发明人	ロスリチャード アーティミュークピーター セイヤーズジョン		
发明人	ロス,リチャード アーティミューク,ピーター セイヤーズ,ジョン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/06 C07K19/00 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 A61K38/22 A61P7/06 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/505 C07K14/71		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/06 C07K19/00 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N15/00.C A61K37/24 A61P7/06 G01N33/53.P C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/HA14 4B064 /AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/BA02 4C084/CA53 4C084/DB56 4C084/MA02 4C084/MA66 4C084 /NA05 4C084/NA06 4C084/ZA552 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA13 4H045/BA41 4H045/DA13 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	内田直人		
优先权	2007015126 2007-08-03 GB 60/956319 2007-08-16 US 2008009208 2008-05-21 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

技术领域本公开涉及促红细胞生成素 (EPO) 融合多肽, 编码上述多肽的核酸分子, 以及使用上述多肽的治疗方法。

