

(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2012-500818
(P2012-500818A)

(43) 公表日 平成24年1月12日(2012.1.12)

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
CO7K 16/28 (2006.01) CO7K 16/28 ZNA 4H045
GO1N 33/53 (2006.01) GO1N 33/53 Y

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2011-524247 (P2011-524247)
 (86) (22) 出願日 平成21年8月26日 (2009. 8. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年4月15日 (2011. 4. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/006174
 (87) 国際公開番号 W02010/022924
 (87) 国際公開日 平成22年3月4日 (2010. 3. 4)
 (31) 優先権主張番号 08015178.0
 (32) 優先日 平成20年8月28日 (2008. 8. 28)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 09000500.0
 (32) 優先日 平成21年1月15日 (2009. 1. 15)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 09002001.7
 (32) 優先日 平成21年2月13日 (2009. 2. 13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

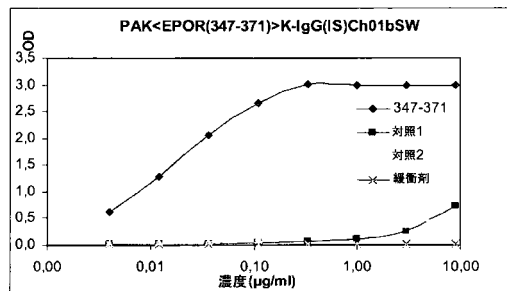
(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツァーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

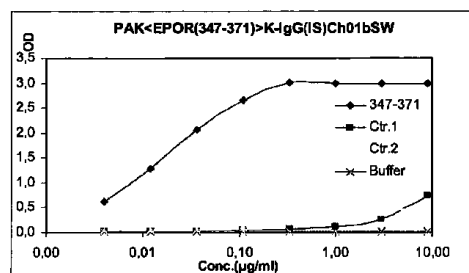
(54) 【発明の名称】 ヒトEPO受容体に対する抗体

(57) 【要約】

EPO受容体断片LDKWLLPRNPPSEDLPGGGSVDIV (SEQ ID NO : 1)、CSSALASKPSPEGASAASFEY (SEQ ID NO : 2)、またはGGLSDGPYSNPYENSLIPAAEP (SEQ ID NO : 3) への特異的な結合に特徴付けられる、ヒトEPO受容体に結合する抗体は、ヒト組織におけるEPO受容体の解析に関して有用である。



A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

EPO受容体断片

LDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIV

(SEQ ID NO:1), CSSALASKPSPEGASAASFEY (SEQ ID NO:2),または
GGLSDGPYSNPYENSLIPAAEP (SEQ ID NO:3)

に特異的に結合することに特徴付けられる、ヒトEPO受容体に結合する抗体。

【請求項 2】

重鎖可変ドメインCDR3領域として、SEQ ID NO : 4または12のCDR3領域を含むことに特徴付けられる、請求項1記載の抗体。 10

【請求項 3】

重鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 4のCDR3領域、SEQ ID NO : 5のCDR2領域およびSEQ ID NO : 6のCDR1領域、またはSEQ ID NO : 12のCDR3領域、SEQ ID NO : 13のCDR2領域およびSEQ ID NO : 14のCDR1領域を含むことに特徴付けられる、請求項2記載の抗体。

【請求項 4】

重鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 4のCDR3領域、SEQ ID NO : 5のCDR2領域およびSEQ ID NO : 6のCDR1領域を含むこと、ならびに軽鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 7のCDR3領域、SEQ ID NO : 8のCDR2領域およびSEQ ID NO : 9のCDR1領域を含むことに特徴付けられる、請求項3記載の抗体。 20

【請求項 5】

重鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 12のCDR3領域、SEQ ID NO : 13のCDR2領域およびSEQ ID NO : 14のCDR1領域を含むこと、ならびに軽鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 15のCDR3領域、SEQ ID NO : 16のCDR2領域およびSEQ ID NO : 17のCDR1領域を含むことに特徴付けられる、請求項4記載の抗体。

【請求項 6】

重鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 10または18を含むことに特徴付けられる、請求項1記載の抗体。

【請求項 7】

重鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 10を含むこと、および軽鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 11を含むことに特徴付けられる、請求項1記載の抗体。 30

【請求項 8】

重鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 18を含むこと、および軽鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 19を含むことに特徴付けられる、請求項1記載の抗体。

【請求項 9】

請求項1~8のいずれか一項記載の抗体を含む診断キットの製造のための方法。

【請求項 10】

ヒト組織試料におけるEPO受容体の解析のための、請求項1~8のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項 11】

試料がヒト組織の溶解産物であることに特徴付けられる、請求項10記載の使用。 40

【請求項 12】

解析が免疫化学解析または免疫組織化学的解析によって遂行されることに特徴付けられる、請求項10または11記載の使用。

【請求項 13】

解析がウェスタンブロットによって遂行されることに特徴付けられる、請求項10または11記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

ヒトエリスロポエチン（EPO）は、赤血球前駆細胞の増殖および分化に關与する166-aaの糖タンパク質である。これらの細胞応答は、508-aaの糖タンパク質であるヒトEPO受容体（EPO受容体、EPO-R）によって媒介される。EPO-Rは、単一の膜貫通ドメインを含む508アミノ酸長のタンパク質であり（Swiss Prot P19235）、かつクラスIサイトカイン受容体の成長ホルモンサブファミリーのメンバーとして分類されている。EPO-Rは、例えば、Winkelmann, J. C., et al., Blood 76 (1990) 24-30、およびJones, S. S., et al., Blood 76 (1990) 31-35に記載されている。

【 0 0 0 2 】

EPO-Rに対する抗体は、例えば、D' Andrea, A. D., Blood 82 (1993) 46-52 ; Elliott, S., Blood 107 (2006) 1892-1895 ; Kirkeby, A., J. Neurosci. 164 (2007) 50-58 ; Miura, O., Arch. Biochem. 306 (1993) 200-208 ; およびEP1 146 056号、EP 1 327 681号、EP 0 773 962号、EP 0 776 370号、US 2002 / 0031806号、US 2003 / 0215444号、US 2004 / 0058393号、US 2004 / 0071694号、US 2004 / 0175379号、US 2005 / 0227289号、US 2005 / 0244409号、US 2006 / 0018902号、US 6,998,124号、US 7,053,184号、US 7,081,523号、WO 1995 / 005469号、WO 1996 / 003438号、WO 2000 / 061637号、WO 2004 / 035603 A2号、WO 2005 / 100403 A2号より公知である。しかしながら、EPO-Rに対する公知の抗体が特異性を欠如しているため、組織試料においてEPORの発現および局在を調査する研究は、多岐的かつ往々にして人為現象的な結果を産み出す（Jelkmann, W., et al., Crit. Rev. Onc / Hematol. 67 (2008) 39-61 ; Elliott, S., et al., Blood 107 (2006) 1892-1895 ; Jelkmann, W. and Laugsch, M., J. Clin. Oncol. 25 (2007) 1627-1628 ; Kirkeby, A., et al., J. Neurosci. Methods 164 (2007) 50-58 ; Laugsch, M. et al., Int. J. Cancer 122 (2008) 1005-1011を参照のこと）。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 3 】

本発明は、とりわけヒト組織（例えば、生検または組織）においてEPO-Rの特異的な解析を可能にするEPO-Rに結合する抗体を含む。

【 0 0 0 4 】

本発明は、ヒトEPO受容体断片
LDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIV (SEQ ID NO:1),
CSSALASKPSPEGASAASFY (SEQ ID NO:2), または
GGLSDGPYSNPYENSLIPAAEP (SEQ ID NO:3)

への特異的な結合に特徴付けられる、ヒトEPO受容体に結合する抗体を含む。

【 0 0 0 5 】

抗体は、好ましくはモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体である。

【 0 0 0 6 】

好ましくは、本発明に係る抗体は、重鎖可変ドメインCDR3領域として、SEQ ID NO : 4または12のCDR3領域を含むことに特徴付けられる。

【 0 0 0 7 】

好ましくは、抗体は、重鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 4のCDR3領域、SEQ ID NO : 5のCDR2領域、およびSEQ ID NO : 6のCDR1領域、またはSEQ ID NO : 12のCDR3領域、SEQ ID NO : 13のCDR2領域、およびSEQ ID NO : 14のCDR1領域を含むことに特徴付けられる。

【 0 0 0 8 】

好ましくは、抗体は、重鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 4のCDR3領域、SEQ ID NO : 5のCDR2領域、およびSEQ ID NO : 6のCDR1領域を含むこと、ならびに軽鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 7のCDR3領域、SEQ ID NO : 8のCDR2領域、およびSEQ ID NO : 9のCDR1領域を含むことに特徴付けられる。

【 0 0 0 9 】

好ましくは、抗体は、重鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 12のCDR3領域、SEQ ID NO : 13

10

20

30

40

50

のCDR2領域、およびSEQ ID NO : 14のCDR1領域を含むこと、ならびに軽鎖可変ドメインが、SEQ ID NO : 15のCDR3領域、SEQ ID NO : 16のCDR2領域、およびSEQ ID NO : 17のCDR1領域を含むことに特徴付けられる。

【 0 0 1 0 】

好ましくは、抗体は、重鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 10または18を含むことに特徴付けられる。

【 0 0 1 1 】

好ましくは、抗体は、重鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 10を含むこと、および軽鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 11を含むことに特徴付けられる。

【 0 0 1 2 】

好ましくは、抗体は、重鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 18を含むこと、および軽鎖可変ドメインがSEQ ID NO : 19を含むことに特徴付けられる。

【 0 0 1 3 】

本発明に係る抗体は、ELISA、ウェスタンブロット、免疫細胞化学的アッセイおよび免疫組織化学的アッセイにおいて、EPO受容体に特異的に結合する。

【 0 0 1 4 】

本発明に係る抗体は、内在的または組換え的にEPO受容体を発現するUT7細胞において、EPO受容体に特異的に結合する。

【 0 0 1 5 】

好ましくは、本発明に係る抗体は、少なくとも $10^{-8}M^{-1} \sim 10^{-12}M^{-1}$ の結合親和性で、EPO-Rに結合することに特徴付けられる。

【 0 0 1 6 】

抗体が、マウス、ウサギまたはヒト起源であることが、さらに好ましい。

【 0 0 1 7 】

本発明は、EPO受容体を保持する / 発現する細胞を解析するための、本発明に係る抗体の使用をさらに含む。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、本発明に係る抗体は、ヒト組織試料においてEPO受容体を解析するために使用される。好ましくは、そのような解析は、ウェスタンブロット、免疫細胞化学法、または免疫組織化学法によって遂行される。

【 0 0 1 9 】

そのような解析は、定性的に（例えば、細胞がEPO受容体を含むか否かを検出するため）、または定量的に（例えば、EPO受容体の発現を検出するため）遂行され得る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 ELISAにより決定される、ビオチン化EPORペプチドに対する、MabおよびPabの特異的結合を示す。0.1 μ g/mlでの、Maxisorpマイクロタイタープレート上に固定されたビオチン化ペプチド347-371（成熟EPORに対応する）に対するPAK < EPOR (347-371) > K-IgG (IS) Ch01bSWの結合を示す。Mab Cl.21.3.1は、使用した条件下でELISAに適さないため、示していない。Maxisorpマイクロタイタープレート上に固定されたビオチン化ペプチド382-402（成熟EPORに対応する）に対するMab Cl.19.1.2、Cl.19.3.7およびPAK < EPOR (382-402) > K-IgG (IS) Ch01bSWの結合を示す。Maxisorpマイクロタイタープレート上に固定されたビオチン化ペプチド454-475（成熟EPORに対応する）に対するPAK < EPOR (454-475) > K-IgG (IS) Ch01bSWの結合を示す。

【 図 2 】 HELAwt、HELA-EPORおよびUT-7細胞由来の溶解産物のWB解析を示す（特異性を示すため）。（a）Mab Cl.21.3.1（エピトープaa347位～371位）およびPAK < EPOR (347-371) > K-IgG (IS) Ch01bSWの特異的結合を示す。（b）Mab Cl.19.3.7、およびMab Cl.19.1.2（エピトープaa382位～402位）、およびPAK < EPOR (382-402) > K-IgG (IS) Ch01bSWの特異的結合を示す。（c）PAK < EPOR (454-475) > K-IgG (IS) Ch01bSW（エピトープaa454位～475位）の特異的結合を示す。

10

20

30

40

50

【図3】HELAwtおよびHELA-EPORの免疫細胞化学的解析を示す。組換えヒトEPOR-GFP（緑色）および抗体免疫反応性（赤色）の二重免疫蛍光を示す。赤色シグナルおよび緑色シグナルの共同在によって、特異的標識が示される。HELAwtはEPORを発現せず、かつ陰性対照として使用される。（a）Mab Cl.21.3.1.（aa347位～371位）、（b）Mab Cl.19.1.2（aa382位～402位）、（c）Mab Cl.19.3.7（aa382位～402位）を用いた染色を示す。

【図4】HELAwtおよびHELA-EPORの免疫組織化学的解析、および市販抗体C-20（SantaCruz）との比較を示す。（a）Santa-Cruz製のポリクローナル抗体C-20を示す；（b）親和精製されたポリクローナル抗体PAK<EPOR（347-371）>K-IgG（IS）Ch01bSWを示す。

【図5】比較ウェスタンブロット解析を示す。1レーン当たり、 2.5×10^4 細胞をローディングした。抗体濃度は：（A）PAK<EPOR（347-371）（10 ng/ml）；（B）C-20（0.4 μ g/ml）；（C）ABIN98954（0.4 μ g/ml）；（D）M-20（0.4 μ g/ml）；（E）ab10653（0.4 μ g/ml）および（F）BAF307（0.4 μ g/ml）であった。レーンは左から右へ：Hela親細胞（1）、未処置（2）、OptiMem（3）、非コードsiRNA（4）、EPO-R siRNA（5）、EPO-R siRNA（6）であった。

【図6】MAB307のウェスタンブロット解析を示す。1レーン当たり、 2.5×10^4 細胞の全タンパク質をローディングし、一次抗体を0.4 μ g/mlの濃度で使用した。変性条件（A）および未変性条件（B）下で、解析を遂行した。レーンは左から右へ：Hela親細胞（1）、未処置（2）、OptiMem（3）、非コードsiRNA（4）、EPO-R siRNA（5）、EPO-R siRNA（6）であった。

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

「抗体」という用語は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびに抗体全体および抗体断片を含むが、これらに限定されない様々な形態の抗体構造を包含する。

【0022】

「抗体断片」とは、全長抗体の一部、好ましくはその可変ドメイン、または少なくともその抗原結合部位を含む。抗体断片の例は、ダイアボディ、単鎖抗体分子、および抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。scFv抗体は、例えば、Houston, J. S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96に記載されている。さらに、抗体断片は、 V_H ドメインの特性、すなわち V_L ドメインと共に集合することが可能であること、またはEPO-Rに結合する V_L ドメインの特性、すなわち V_H ドメインと共に機能的抗原結合部位に集合することが可能であること、という特性を有する単鎖ポリペプチドを含み、それによりヒトEPO-Rに特異的に結合する特徴を有する抗体を提供する。

【0023】

本明細書において使用される、「ヒトEPO受容体断片 LDKWLLPRNPPSEDLPGGGSVDIV (SEQ ID NO:1), CSSALASKPSPEGASAASFY (SEQ ID NO:2),または GGLSDGPYSNPYENSLIPAAEP (SEQ ID NO:3)

に特異的に結合する」という用語は、0.1 μ g/mlの抗体濃度で、10またはより大きいS/N比で、ELISAにおけるそのような断片への結合を意味する。

【0024】

本明細書において使用される「EPO-Rに結合する抗体」という用語は、細胞当たり100,000～500,000受容体の量で組換え的にEPO-Rを発現する細胞（EPO-R発現細胞）を使用して、顕微鏡解析により測定される細胞結合アッセイにおける、ヒトEPO-Rへの抗体の結合を意味する。0.1 μ g/mlの抗体濃度で、抗体が400（またはより大きい）のS/N（シグナル/ノイズ）比を引き起こす場合、結合が見出される。

【0025】

本明細書において使用される「EPO受容体へのEPOの結合」という用語は、EPO-Rを発現する細胞を使用する顕微鏡解析により測定される細胞結合アッセイにおいて、ヒトEPO-

RへのEPOの結合を意味する。0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のEPO濃度で、EPOが400またはより大きいS/N(シグナル/ノイズ)比を引き起こす場合、結合が見出される。

【0026】

本明細書において使用される「本発明に係る抗体の、細胞化合物へのいかなる非特異的結合もない」という用語は、EPO-Rを発現しない細胞を使用する顕微鏡解析により測定される細胞結合アッセイにおいて、本発明に係る抗体が細胞化合物に結合しないことを意味する。化合物が、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体濃度で10を超えないS/N(シグナル/ノイズ)比を引き起こす場合、いかなる結合も見出されない。

【0027】

EPO-R発現細胞を使用する顕微鏡解析によって測定される細胞結合アッセイにおいて、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体濃度で、抗体が400のS/N(シグナル/ノイズ)比を引き起こし、かつ細胞がEPO-Rを発現しない状態(細胞当たり、1,000またはそれより少ない受容体、例えば100またはそれより少ない受容体等)の細胞を使用する顕微鏡解析によって測定される細胞結合アッセイにおいて、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体濃度で、抗体が10を超えないS/N(シグナル/ノイズ)比を引き起こす場合、EPO-Rへの抗体の特異的結合が見出される。

【0028】

顕微鏡解析の免疫蛍光シグナルは、陽性蛍光試料と陰性(対照、ノイズシグナル)蛍光試料との重複領域を、形態計測学的に測定することによって定量される。有用な手段は、MetaMorph Imagingソフトウェア(www.moleculardevices.com)の「Measuring Colocalization」アルゴリズムである。

【0029】

本発明に係る抗体は、EPO受容体へのEPOの結合を阻害しない。本発明に係る抗体は、ヒト細胞および組織試料におけるEPO受容体を特異的に決定することが可能である。本発明に係る抗体のEpo-Rへの結合は、EPO-Rを活性化(リン酸化)しない。

【0030】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することが可能なタンパク質決定因子を表す。エピトープは通常、分子の化学的に活性な表面群類、例えばアミノ酸または糖側鎖等からなり、かつ通常エピトープは、特異的な三次元構造特性、および特異的な電荷特性を有する。高次構造的エピトープおよび非高次構造的エピトープは、前者への結合は変性溶媒の存在下において喪失されるが、後者ではそうでないという点で区別される。

【0031】

本発明は、ヒト細胞、組織または生検におけるEPO-Rの検出のための、本発明に係る抗体の使用をさらに含む。

【0032】

別の局面において、本発明は、ヒト細胞、組織または生検におけるEPO-Rの検出のための、本発明に係る抗体を含む診断組成物を提供する。

【0033】

配列の説明

- SEQ ID NO : 1 合成ペプチド
- SEQ ID NO : 2 合成ペプチド
- SEQ ID NO : 3 合成ペプチド
- SEQ ID NO : 4 重鎖CDR3クローン21.3.1
- SEQ ID NO : 5 重鎖CDR2クローン21.3.1
- SEQ ID NO : 6 重鎖CDR1クローン21.3.1
- SEQ ID NO : 7 軽鎖CDR3クローン21.3.1
- SEQ ID NO : 8 軽鎖CDR2クローン21.3.1
- SEQ ID NO : 9 軽鎖CDR1クローン21.3.1
- SEQ ID NO : 10 重鎖クローン21.3.1
- SEQ ID NO : 11 軽鎖クローン21.3.1
- SEQ ID NO : 12 重鎖CDR3クローン19.1.2

10

20

30

40

50

SEQ ID NO : 13 重鎖CDR2クローン19.1.2
 SEQ ID NO : 14 重鎖CDR1クローン19.1.2
 SEQ ID NO : 15 軽鎖CDR3クローン19.1.2
 SEQ ID NO : 16 軽鎖CDR2クローン19.1.2
 SEQ ID NO : 17 軽鎖CDR1クローン19.1.2
 SEQ ID NO : 18 重鎖クローン19.1.2
 SEQ ID NO : 19 軽鎖クローン19.1.2

【実施例】

【0034】

実施例1

ヒトEPORの細胞内ドメインに対して指向された (directed) モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の生成

Mab Cl.21.3.1およびPAK < EPOR (347-371) > K-IgG (IS) Ch01bSW : 成熟ヒトエリスロポエチン受容体の残基347位 ~ 371位に対応する25アミノ酸の合成ペプチド

(LDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIV)

を、免疫抗原 (EPOR前駆体のaa371位 ~ 395位に対応) として使用した。

【0035】

Mab Cl.19.3.7、Mab Cl.19.1.2、およびPAK < EPOR (382-402) > K-IgG (IS) Ch01bSW : 成熟ヒトエリスロポエチン受容体の残基382位 ~ 402位に対応する21アミノ酸の合成ペプチド

(CSSALASKPSPEGASAASFY)

を、免疫抗原 (EPOR前駆体のaa406位 ~ 426位に対応) として使用した。

【0036】

PAK < EPOR (454-475) > K-IgG (IS) Ch01bSW : 成熟ヒトエリスロポエチン受容体の残基454位 ~ 475位に対応する22アミノ酸の合成ペプチド

(GGLSDGPYSNPYENSLIPAAEP)

を、免疫抗原 (EPOR前駆体のaa478位 ~ 499位に対応) として使用した。

【0037】

免疫処置のため、C末端システインを介して、ペプチドをKLHに共役した。ウサギおよびBalb/cマウスを、4週間毎に3~5回に渡って、タンパク質で免疫処置した。さらにBalb/cマウスは、融合4日前に静脈内注射で免疫処置を受け、脾細胞を収集し、Ag8ミエローマ細胞と融合させた。タンパク質で被覆されたELISAマイクロタイタープレートで試験することによって、特異的抗体についてスクリーニングを遂行した (図1)。細胞溶解産物のウェスタンブロット上のEPORに対応する一つの特異的バンドの検出に基づいて、Mabクローンおよびウサギのポリクローナル血清を選択した。

【0038】

実施例2

EPOR過剰発現HELA細胞の生成

組換えEPORを発現する安定に形質移入されたHELA細胞を生成するため、EPORまたはEPOR/EGFPをコードする (細胞内C末端への融合タンパク質として、Invitrogen) レトロウイルス発現ベクター、およびpVSV-G (ラドウイルス水疱性口内炎ウイルスのG糖タンパク質をコードする発現ベクター) で一過的に形質移入されたGP2-293細胞 (Clontech Laboratories, Inc) 由来の上清を用いて、細胞を形質導入した。形質導入後2日目に、0.2 mg/mlゼオシンを含む新鮮補足 (fresh supplemented) RPMIと、培地を交換した。

【0039】

一過的形質移入実験に関して、Fugene Transfection試薬 (Roche Molecular Biochemicals Cat. No. 1815075) を使用して、12ウェルプレート中でカバースリップ上に、1mlの培地中で8 x 10E4 HELA細胞をプレーティングした。詳細には、FCSを含まない97 µlのRPMI 1640に3 µlのFugene 6を添加し、RTで5分間に渡って保温した。続いて、1 µgのDNA混合

10

20

30

40

50

物を添加し、RTで15分間に渡って保温した。最終的に、カバースリップ上の細胞を含む1 mlの細胞培養培地に、50 µlのDNA / FuGene 6溶液を添加した。

【 0 0 4 0 】

実施例3

EPOR過剰発現UT7細胞の生成

UT-7細胞株は、長期増殖のためにEPOを要するヒト因子依存性赤血球白血球細胞株（ヒト骨髄急性骨髄性白血病細胞株DSMZ：ACC 137）である。L-グルタミン（2 mM）、非必須アミノ酸（1×）、ピルビン酸ナトリウム（1 mM）、10%ウシ胎児血清および10 U/mlのGM-CSFを添加したRPMI培地中で、UT7細胞を維持した。形質導入された細胞（UT7 / EPOR）を、非形質導入細胞と同一の培地（10 U/mlの代わりに25 U/mlのGM-CSF）に、0.4 mg / mlのゼオシンを添加して維持した。各刺激の前に、L-グルタミン（2 mM）、非必須アミノ酸（1×）、ピルビン酸ナトリウム（1 mM）、および0.1%ウシ胎児血清を添加したRPMI培地中で一晩保温することによって、細胞を飢餓させた。

10

【 0 0 4 1 】

EPO-Rをコードするレトロウイルス発現ベクター、およびpVSV-G（ラドウイルス水疱性口内炎ウイルスのG糖タンパク質をコードする発現ベクター）で一過的に形質移入されたGP2-293細胞（Clontech Laboratories, Inc）由来の上清を用いて、UT-7細胞を形質導入した。形質導入後2日目に、0.4 mg / mlのゼオシンおよび25 U / ml GM-CSFを含む新鮮補足RPMIと培地を交換した。選択後、その表面にEPORを安定に発現するUT-7細胞の細胞株を得た。

20

【 0 0 4 2 】

実施例4

免疫沈降

氷冷溶解緩衝剤 [Tris 20 mM (pH7.4), NaCl 137 mM、グリセロール10%、Nonidet P-40 1%、プロテアーゼ阻害剤1× (Pierce、# 78410)、ホスファターゼ阻害剤1× (Pierce、# 78420)] 中で、30分間に渡って4 でUT7細胞を溶解し、続いて13000 rpmで10分間に渡って4 で遠心分離した (Eppendorf遠心分離)。事前処理された (precleared) 溶解産物の上清を、MAB307抗体 (マウスモノクローナル抗ヒトEPO-R細胞外ドメイン、R&D Systems) およびプロテインGアガロースビーズと共に、4 で一晩保温した。溶解緩衝剤中でビーズを3回洗浄し、還元条件においてNupageサンプル緩衝剤 (Invitrogen) 中で、70 で10分間に渡って加熱した。

30

【 0 0 4 3 】

実施例5

SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング

標準的手法およびInvitrogenのNupageゲルシステムに従って、SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングを遂行した。Nupage Novex 4-12% Bis-Trisゲルの各ライン中に、異なる細胞数に対応する抽出産物をローディングした。続いてタンパク質をPVDFメンブレン上に移し、各々の抗体と共に4 で一晩保温した。洗浄後、コンジュゲート抗マウスIgG-PODまたは抗ウサギIgG-PODと共にメンブレンを保温し、ECL試薬 (Lumi-Light (登録商標) PLUSウェスタンブロッティング基質、Roche Diagnostics GmbH) を使用して現像した：結果を図2に示す。

40

【 0 0 4 4 】

実施例6

BIACORE解析

25 で、HBS-EP-緩衝剤、pH 7.4 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005% ポリソルベート20 (w/v)) において、BIACORE 3000で測定を行った。非特異的結合を減少させるため、1.0 mg / mlのCMDを添加した。結果を表1に示す。

【 0 0 4 5 】

【表1】

ペプチド	抗体	1/Ms	1/sec	Min	1/M	nM
382-402	Mab	1.7x10 ⁶	2.2x10 ⁻³	5	9.9x10 ⁸	1
	19.3.7	1.9x10 ⁶	2.1x10 ⁻³	5	1.1x10 ⁹	1
	Mab					
	19.1.2					
347-371	ポリクローナル	2.9x10 ⁵	1.1x10 ⁻⁴	109	2.8x10 ⁹	0.4
382-402	ポリクローナル	3.1x10 ⁶	1.0x10 ⁻⁴	117	3.5x10 ⁹	0.03
454-475	ポリクローナル	2.6x10 ⁵	2.0x10 ⁻⁴	57	1.3x10 ⁹	0.8

10

表1：BIACORE解析による結合親和性/結合力の決定。固定されたビオチン化ペプチドへの結合により決定される結合力。全ての抗体（21.3.1を除く）は、対応するEPORペプチドに対して、ナノモル/ナノモルより少ない結合力を呈する。

【0046】

実施例7

免疫細胞化学法および免疫組織化学法

免疫蛍光研究に関して、RPMI1640、10%FCS中、ガラスカバースリップ（170 μmの厚さ）上で、細胞を80%の集密度まで増殖させた。10 μg/mlの抗体試料と培養液を45分間に渡って保温し、洗浄し、4%PFAで固定した。Alexa Fluor 488ヤギ抗ヒトIgG二次抗体によって、結合した抗体を検出した。Alexa Fluor 488およびAlexa Fluor 633に関して、各々488 nmおよび633 nmの励起を使用して、LEICA共焦点レーザー走査顕微鏡SP2で検体を画像解析した。結果を図3および図4に示す。

20

【0047】

一過的に形質移入されたHELA_EPOR細胞についての、EPORに対して指向された親和精製ポリクローナル抗体PAK<EPOR（347-371）>K-IgG（IS）Ch01bSW（A）およびPAK<EPOR（454-475）>K-IgG（IS）Ch01bSW（B）の免疫細胞化学的解析を、以下のように遂行した：EPOR-GFPを一過的に発現させるため、ガラスカバースリップ上で培養されたHELA細胞を形質移入し、PFAで固定し、EPORに対して指向された1.0 μg/mlのPAK<EPOR（347-371）>K-IgG（IS）Ch01bSWの精製IgGで染色した。抗EPOR抗体の免疫反応性は、緑色蛍光の組換えEPORに密接して共局在することを見出した。抗体はまた、ER/ゴルジ領域に限定される新規に合成されたEPORも認識する。形質移入されていない細胞においては、いかなる検出可能な標識も欠如していることによっても、抗EPOR抗体PAK<EPOR（347-371）>K-IgG（IS）Ch01bSWおよびPAK<EPOR（454-475）>K-IgG（IS）Ch01bSWの高い特異性が確認される。

30

【0048】

実施例8

PAK<EPOR（347-371）>K-IgG（IS）Ch01bSWの特異性の定量的評価

EPOR-GFPを一過的に発現させるため、ガラスカバースリップ上で培養されたHELA細胞を形質移入し、PFAで固定し、EPORに対して指向された1.0 μg/mlのPAK<EPOR（347-371）>K-IgG（IS）Ch01bSWの精製IgGで染色した。抗EPOR抗体免疫反応性と緑色蛍光組換えEPORの密接した共局在に注目されたい。抗体はまた、ER/ゴルジ領域に限定される新規に合成されたEPORも認識する。視野中の形質移入されていない細胞において、いかなる検出可能な標識も欠如していること（DAPIで標識される青色細胞核により示される）によっても、抗EPOR抗体PAK<EPOR（347-371）>K-IgG（IS）Ch01bSW、およびPAK<EPOR（454-475）>K-IgG（IS）Ch01bSWの高い特異性が確認される。PAK<EPOR（347-371）>K-IgG（IS）Ch01bSWの免疫反応性と、組換えEPOR-GFPの蛍光との重複のパーセンテージを、MetaMorph Imagingソフトウェアの「Measuring Colocalization」アルゴリズムを使用して、97%超と決定する（図5）。

40

【0049】

50

実施例9

EPORに対する市販抗体との比較

表2の抗体を調査した。

【 0 0 5 0 】

【表 2】

名称	起源	イソタイプ	供給元
ABIN166173	マウスモノクローナル	IgG2b κ	Abnova GmbH
ABIN170186	マウスポリクローナル	IgG	Abnova GmbH
ABIN98954	ヒツジポリクローナル	IgG	Abnova GmbH
BAF307	ヤギポリクローナル	IgG	R&D Systems GmbH
MAB307	マウスモノクローナル	IgG2b	R&D Systems GmbH
H-194	ウサギポリクローナル	IgG	Santa Cruz Inc.
C-20	ウサギポリクローナル	IgG	Santa Cruz Inc.
M-20	ウサギポリクローナル	IgG	Santa Cruz Inc.
Ww-12	マウスモノクローナル	IgG2b	Santa Cruz Inc.
PA1-20180	ヤギポリクローナル	IgG	Dianova GmbH
ab10653	ヤギポリクローナル	IgG	Abcam plc
ab54659	マウスモノクローナル	IgG2b κ	Abcam plc
ab56310	マウスモノクローナル	IgG2b κ	Abcam plc

10

20

【 0 0 5 1 】

図8は、EPO-R RNA干渉に基づいて、5つの市販抗体が約60 kDのサイズでEPORを検出することを示す（C-20、ABIN98954、M-20、ab10653およびBAF307）。類似のEPORバンド強度で、4つの抗体（C-20、ABIN98954、ab10653およびM-20）は、腫瘍細胞株において、60 kDaバンドの他に、さらなるウェスタンブロットのバンドを検出した。4つの抗体は、EPOR siRNAにより影響される約60 kDの分子量を有するタンパク質バンドを検出しない（H-194、ab54659、ab56310、ABIN170186およびABIN166173）。抗体Ww-12およびPA1-20180は、IgGの存在にも関わらず、0.4 μ g/mlの抗体濃度でいかなる検出可能な化学発光シグナルも示さなかった。

30

【 0 0 5 2 】

図6は、HeLa細胞溶解産物およびHeLa-EpoR細胞溶解産物中で、変性条件下または未変性条件下で、MAB307が60 kDaバンドをもたらさなかったことを示す。抗体は、変性条件下で、約80 kDaの非特異的タンパク質を検出する。未変性試料中で、抗体は、20 kDaのタンパク質を認識する。

40

【 0 0 5 3 】

加えて、抗体C-20は、Hsp70タンパク質に有意な交差反応性を示す。ウェスタンブロットアッセイを使用して（ 2.5×10^4 細胞由来の全タンパク質および10 ng/ml抗体）、試験された全ての市販抗体と対照的に、PAK < EPOR (347-371) > は、約60 kDaの顕著なEPOR特異的バンドを特異的に検出する。

【 0 0 5 4 】

様々なEPOR抗体を使用するウェスタンブロットアッセイの感度の調査に関して、1レーン当たり 1×10^5 細胞の全細胞数までHeLa親細胞を添加した減少性（decending）細胞数で、HeLa-EpoR細胞のマトリックスを確立した。細胞数の減少は、1レーン当たり 1×10^5 、3

50

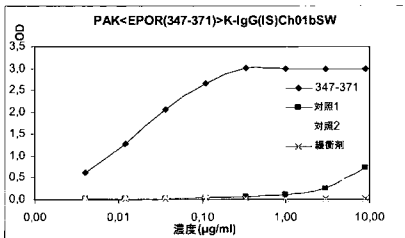
× 10⁴、1 × 10⁴、3 × 10³、1 × 10³、および0のHeLa-EpoR細胞で段階的に生じる。抗体濃度は、0.4 μg/mlであって、かつ1.5分間に渡って光曝露した(Lumi Imager(商標))。結果を表3に示す。

【 0 0 5 5 】

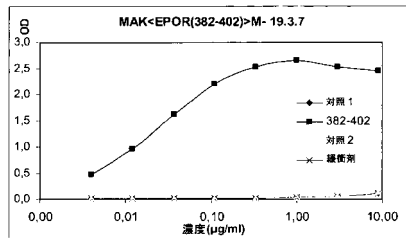
【 表 3 】

名称	検出限界 [HeLa-EPOR細胞の数]
ABIN98954	1x10 ⁴
BAF307	3x10 ⁴
C-20	1x10 ⁴ ~ 3x10 ³
M-20	3x10 ⁴
ab10653	3x10 ³
PAK<EPOR(347-371)	1x10 ³

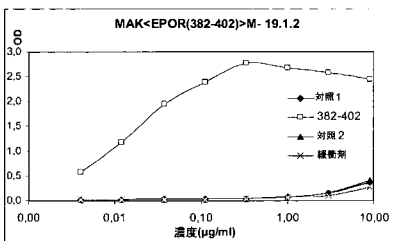
【 図 1 A 】



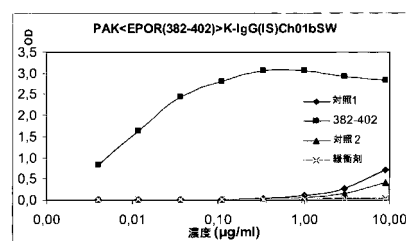
【 図 1 D 】



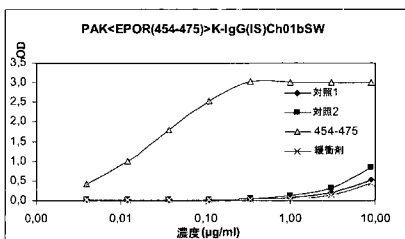
【 図 1 B 】



【 図 1 E 】



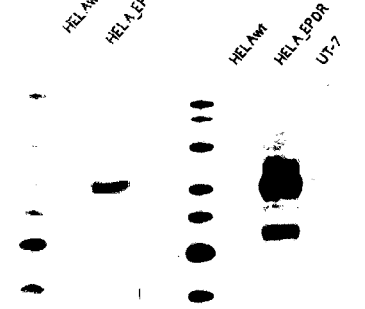
【 図 1 C 】



【 図 2 A 】

Mab Cl.21.3.1 PAK<EPOR(347-371)>

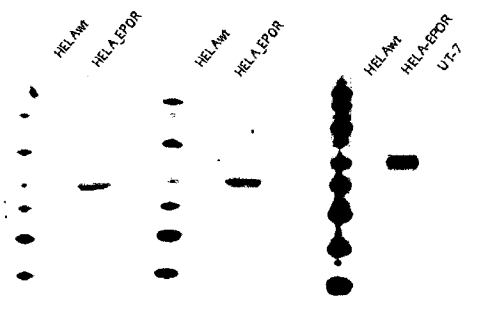
K-IgG(IS)Ch01bSW



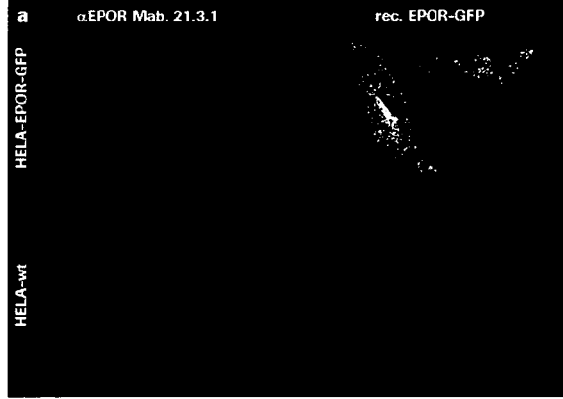
【 図 2 B 】

Mab Cl.19.3.7 Mab Cl.19.1.2

PAK<EPOR(382-402)>
K-IgG(IS)Ch01bSW



【 図 3 A 】



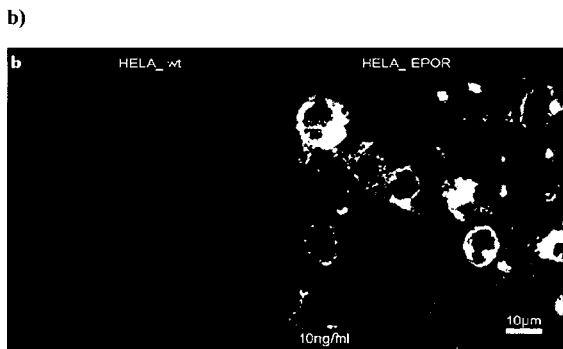
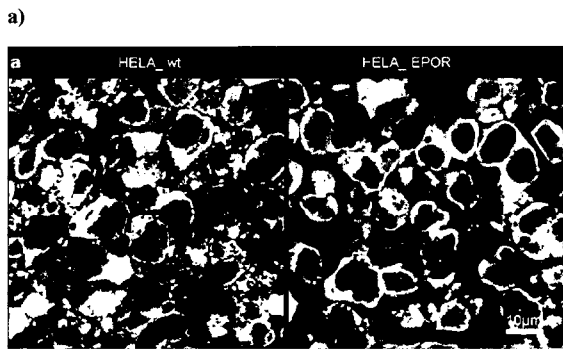
【 図 3 B 】



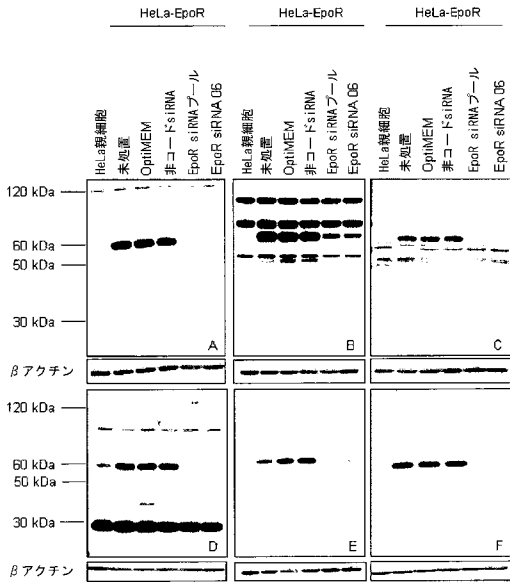
【 図 3 C 】



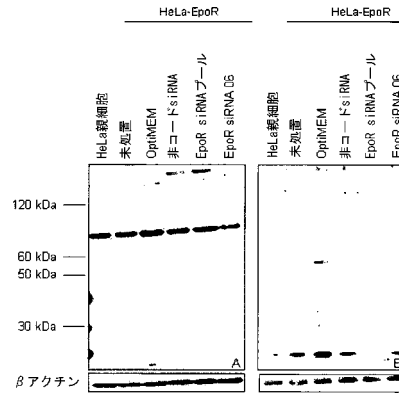
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

[2012500818000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 G01N33/577		
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 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, 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	ANONYMOUS: "Anti human EPOR antibody C-20:SC-695 datasheet" SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY CATALOG, [Online] 2000, XP002511497 internet Retrieved from the Internet: URL: http://datasheets.scbt.com/sc-695.pdf [retrieved on 2009-01-19] the whole document	1-13
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* 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 2 November 2009		Date of mailing of the international search report 09/11/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Siaterli, Maria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2009/006174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANONYMOUS: "Anti mouse EPOR antibody M-20:SC-695 datasheet" SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY CATALOG, [Online] 2000, XP002511498 internet Retrieved from the Internet: URL:http://datasheets.scbt.com/sc-697.pdf> [retrieved on 2009-01-19] the whole document	1,9-13
X	KIRKEBY ET AL: "Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor" JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 164, no. 1, 21 June 2007 (2007-06-21) , pages 50-58, XP022125338 ISSN: 0165-0270 cited in the application paragraphs [02.1], [03.1], [03.2]; table 1	1,9-13
X	WO 2004/035603 A (ABBOTT LAB [US]) 29 April 2004 (2004-04-29) cited in the application	1-13
Y	page 35, line 4 - line 24; examples 1,8,10	1-13
X	WO 00/61637 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; ERICKSON MILLER CONNIE L [US]; HOLMES ST) 19 October 2000 (2000-10-19) cited in the application example 1	1-13
X	US 6 153 190 A (YOUNG PETER RONALD [US] ET AL) 28 November 2000 (2000-11-28) column 21; example 1	1-13
X	WO 2005/100403 A (ABBOTT LAB [US]; REILLY EDWARD B [US]; LACY SUSAN E [US]; FUNG EMMA [U] 27 October 2005 (2005-10-27) cited in the application page 33, line 1 - line 29; examples 8,18-20	1-13
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>D'ANDREA A D ET AL: "Anti-erythropoietin receptor (EPO-R) monoclonal antibodies inhibit erythropoietin binding and neutralize bioactivity." BLOOD 1 JUL 1993, vol. 82, no. 1, 1 July 1993 (1993-07-01), pages 46-52, XP002511499 ISSN: 0006-4971 cited in the application page 46, right-hand column, paragraph 3; figure 1 page 48, right-hand column, paragraph 2 page 49, right-hand column, paragraph 4</p>	1-13
Y	<p>MAYEUX P ET AL: "Structure of the murine erythropoietin receptor complex. Characterization of the erythropoietin cross-linked proteins." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 5 DEC 1991, vol. 266, no. 34, 5 December 1991 (1991-12-05), pages 23380-23385, XP002511500 ISSN: 0021-9258 page 23380, right-hand column, last paragraph - page 23381, left-hand column, paragraph 2</p>	1-13
X	<p>WESTPHAL G ET AL: "Detection and quantification of the soluble form of the human erythropoietin receptor (sEpoR) in the growth medium of tumor cell lines and in the plasma of blood samples." CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE MAY 2002, vol. 2, no. 1, May 2002 (2002-05), pages 45-52, XP002511501 ISSN: 1591-8890 page 46, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 4</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/006174

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2004035603	A	29-04-2004	AU 2003282588 A1	04-05-2004
			BR 0315275 A	30-08-2005
			CA 2501984 A1	29-04-2004
			EP 1578779 A2	28-09-2005
			JP 2006523083 T	12-10-2006
			JP 2009149665 A	09-07-2009
			KR 20050059263 A	17-06-2005
			MX PA05003997 A	22-06-2005
			NZ 539263 A	31-07-2009
WO 0061637	A	19-10-2000	EP 1169352 A1	09-01-2002
			JP 2002544123 T	24-12-2002
			US 2005244409 A1	03-11-2005
US 6153190	A	28-11-2000	AU 6163196 A	30-12-1996
			CA 2224174 A1	19-12-1996
			EP 0871477 A1	21-10-1998
			JP 11507819 T	13-07-1999
			WO 9640231 A1	19-12-1996
			ZA 9604820 A	11-03-1997
WO 2005100403	A	27-10-2005	CA 2563295 A1	27-10-2005
			EP 1732950 A2	20-12-2006
			EP 2062917 A2	27-05-2009
			JP 2008505612 T	28-02-2008
			US 2005227289 A1	13-10-2005

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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, 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

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ジャルシュ マイケル

ドイツ連邦共和国 バッド ヘイルブルン アンターカープフッセ 11

(72)発明者 クビーズ マンフレッド

ドイツ連邦共和国 ベンツベルク グラスワンドストラッセ 7シー

(72)発明者 ムンディグル オラフ

ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム タッシーロリング 16

(72)発明者 トレス ナゲル ノラ

ドイツ連邦共和国 ハーバッハ アエーレンアンガー 7

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 DA50 DA75 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	抗人EPO受体的抗体		
公开(公告)号	JP2012500818A	公开(公告)日	2012-01-12
申请号	JP2011524247	申请日	2009-08-26
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ジャルシュマイケル クビーズマンフレッド ムンディグルオラフ トレスナゲルノラ		
发明人	ジャルシュマイケル クビーズマンフレッド ムンディグルオラフ トレスナゲルノラ		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/2863 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2008015178 2008-08-28 EP 2009000500 2009-01-15 EP 2009002001 2009-02-13 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

结合人EPO受体的抗体，其特征在于特异性结合EPO受体片段 LDKWLLPRNPPSEDLPGGGSVDIV (SEQ ID NO : 1) ， CSSALASKPSPEGASAASFEY (SEQ ID NO : 2) 或 GGLSDGPYSNPYENSLIPAAEP (SEQ ID NO : 3) ，可用于分析EPO受体。在人体组织中。

A

