

(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2014-528693

(P2014-528693A)

(43) 公表日 平成26年10月30日(2014.10.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-515188 (P2014-515188)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月14日 (2012.6.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年2月12日 (2014.2.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/061288
 (87) 国際公開番号 WO2012/171996
 (87) 国際公開日 平成24年12月20日 (2012.12.20)
 (31) 優先権主張番号 11170020.9
 (32) 優先日 平成23年6月15日 (2011.6.15)
 (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 110001508
 特許業務法人 津国
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100131808
 弁理士 柳橋 泰雄
 (74) 代理人 100119079
 弁理士 伊藤 佐保子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトEPO受容体抗体及び使用方法

(57) 【要約】

本明細書において、EPO受容体フラグメントLPGGGSVDIV(配列番号01)に結合するが、ヒト内皮細胞から得ることができる約66kDの分子量を有するタンパク質に特異的に結合しない、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体を報告する。

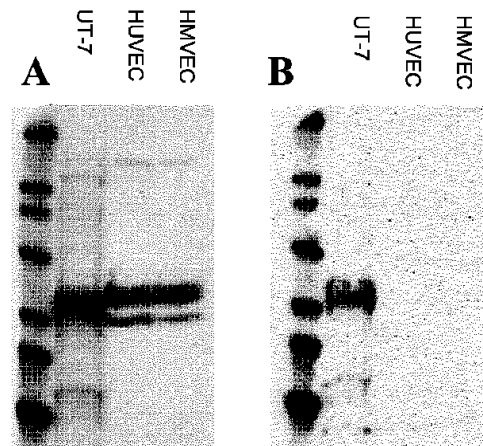


Figure 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

*in vitro*でヒトEPO受容体を検出するための方法であって、

サンプルと、ヒトEPO受容体フラグメントLPGP GGSVDIV（配列番号01）に特異的に結合するEPO受容体抗体をインキュベートすることによって、該サンプル中のヒトEPO受容体の存在を*in vitro*で決定し、それによって、*in vitro*でヒトEPO受容体を検出する工程を含み、

ここで、EPO受容体フラグメントLPGP GGSVDIV（配列番号01）に特異的に結合するEPO受容体抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができる約66kDの分子量を有するタンパク質に特異的に結合しない、方法。

10

【請求項 2】

ヒトEPO受容体フラグメントLPGP GGSVDIV（配列番号01）に結合し、かつ、ヒト内皮細胞から得ることができる約66kDの分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体。

【請求項 3】

請求項1に記載の方法で使用することができる、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体。

【請求項 4】

EPO受容体フラグメントLPGP GGSVDIV（配列番号01）に結合し、かつ、ヒト内皮細胞から得ることができる約66kDの分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする、請求項3に記載の抗体。

20

【請求項 5】

ヒトEPO受容体を検出するための、EPO受容体フラグメントLPGP GGSVDIV（配列番号01）に結合し、かつ、ヒト内皮細胞から得ることができる約66kDの分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体の使用。

【請求項 6】

赤血球の数を増加させるための医薬に対する患者の反応性を予測又は決定するための方法であって、

- 患者のサンプルと請求項2～4に記載のEPO受容体抗体を*in vitro*でインキュベートすること、及び請求項2～4に記載の抗体の該サンプルへの結合を*in vitro*で決定することにより、患者の癌細胞上のヒトEPO受容体の存在を*in vitro*で決定すること、及び

30

- 患者の癌細胞上のヒトEPO受容体の存在と赤血球の数を増加させるための医薬に対する患者の反応性を関連付けることを含む、方法。

【請求項 7】

ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体を産生するための方法であって、

- EPO受容体フラグメントLDKWL LPRNPPSEDLPGPGGSVDIV（配列番号02）を含むポリペプチドで動物を免疫する工程、及び

- EPO受容体フラグメントLPGP GGSVDIV（配列番号01）に特異的に結合する抗体を選択し、それによって、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体を産生する工程を含む、方法。

40

【請求項 8】

抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができる約58kD～約70kDの分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする、請求項1もしくは6もしくは7に記載の方法、請求項2～4のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項5に記載の使用。

【請求項 9】

抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができるタンパク質に 10^{-3} M以上の親和性で結合することを特徴とする、請求項1もしくは6～8のいずれか一項に記載の方法、請求項2～4もしくは8のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項5もしくは8に記載の使用。

50

【請求項 10】

抗体が、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である、請求項 1 もしくは 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法、請求項 2 ~ 4、8 もしくは 9 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 5 もしくは 8 もしくは 9 に記載の使用。

【請求項 11】

抗体が、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体である、請求項 1 もしくは 6 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法、請求項 2 ~ 4 もしくは 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 5 もしくは 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 12】

抗体が、ヒト EPO 受容体に結合する抗体フラグメントである、請求項 1 もしくは 6 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法、請求項 2 ~ 4 もしくは 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 5 もしくは 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 13】

請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体と薬学的に許容しうる担体を含む、医薬製剤。

【請求項 14】

請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離された核酸。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 16】

請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体を含む、診断キット。

20

【請求項 17】

ヒトの組織又は細胞サンプル中の EPO 受容体を分析するための、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 18】

サンプルが、ヒトの組織もしくは細胞の溶解物、又はヒトの組織の切片、又は新鮮なヒトの組織の切片、又はヒトの凍結組織、又はヒトの凍結組織の切片、又はヒトのホルマリン固定パラフィン包埋組織、又はヒトのホルマリン固定パラフィン包埋組織の切片であることを特徴とする、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

分析が、免疫化学、免疫蛍光又は免疫組織化学により実施されることを特徴とする、請求項 17 又は 18 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 20】

分析が、ウエスタンブロットにより実施される、請求項 17 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗ヒト EPO 受容体抗体及びその使用方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

ヒトエリスロポエチン (EPO) は、赤血球前駆細胞の増殖及び分化に關与する 166 - a a の糖タンパク質である。これらの細胞応答は、508 - a a の糖タンパク質であるヒト EPO 受容体 (EPO 受容体、EPOR) により媒介される。EPO 受容体は、単一の膜貫通ドメインを含有する 508 アミノ酸長のタンパク質であり (Swiss Prot P19235)、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 受容体は、例えば、Winkelmann, J.C., et al., Blood 76 (1990) 24-30、及び Jones, S.S., et al., Blood 76 (1990) 31-35 に記載されている。

【0003】

EPO 受容体に対する抗体は、例えば、D'Andrea, A.D., Blood 82 (1993) 46-52; Ell 50

50

Elliott, S., Blood 107 (2006) 1892-1895; Kirkeby, A., J. Neurosci. Methods 164 (2007) 50-58; Miura, O., Arch. Biochem. 306 (1993) 200-208; Mayeux, P., et al., J. Biol. Chem. 266 (1991) 23380-23385; Westphal, G., et al., Clin. Exp. Med. 2 (2002) 45-52; Elliott, S., et al., J. Immunol. Meth. 352 (2010) 126-139、ならびに EP 1 146 056、EP 1 327 681、EP 0 773 962、EP 0 776 370、US 2002/0031806、US 2003/0215444、US 2004/0058393、US 2004/0071694、US 2004/0175379、US 2005/0227289、US 2005/0244409、US 2006/0018902、US 6,153,190、US 6,998,124、US 7,053,184、US 7,081,523、WO 1995/005469、WO 1996/003438、WO 2000/061637、WO 2004/035603、WO 2005/100403、及び WO2010/022924から公知である。しかし、組織サンプル中の E P O 受容体の発現及び局在を調べる研究は、E P O 受容体に対する公知の抗体の特異性が低いために、一致しない、しばしば人為的な結果をもたらす (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)、又は研究が疑わしい特異性を有する抗体を用いていること及び観測の有意性に議論の余地があることが報告された (上記 Elliott, S.)。

10

【0004】

発明の概要

本明細書において報告される抗体が、内皮細胞上/内皮細胞内に存在する類似のサイズのタンパク質に交差反応することなく、ヒト E P O 受容体に特異的に結合することによって、明確な検出結果を可能にすることが見い出された。

20

【0005】

本明細書において報告される一局面は、in vitroでヒト E P O 受容体を検出するための方法であって、サンプルと、ヒト E P O 受容体フラグメント L P G P G G S V D I V (配列番号 01) に特異的に結合する E P O 受容体抗体をインキュベートすることにより、該サンプル中のヒト E P O 受容体の存在を in vitroで決定し、それによって、in vitroでヒト E P O 受容体を検出する工程を含み、ここで、E P O 受容体フラグメント L P G P G G S V D I V (配列番号 01) に特異的に結合する E P O 受容体抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができる約 58 kD ~ 約 70 kD の分子量を有するタンパク質に特異的に結合しない、方法である。

30

【0006】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができる約 66 kD の分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする。

【0007】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができるタンパク質に 10^{-3} M 以上の親和性で結合することを特徴とする。

【0008】

一態様において、該方法は、抗体が、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であることを特徴とする。

【0009】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体であることを特徴とする。

40

【0010】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト E P O 受容体に結合する抗体フラグメントであることを特徴とする。

【0011】

本明細書において報告される1つの局面は、ヒト E P O 受容体フラグメント L P G P G G S V D I V (配列番号 01) に結合し、かつ、ヒト内皮細胞から得ることができる約 58 kD ~ 約 70 kD の分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする、ヒト E P O 受容体に特異的に結合する抗体である。

50

【 0 0 1 2 】

一態様において、該抗体は、ヒト内皮細胞から得ることができる約 6 6 k D の分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする。

【 0 0 1 3 】

一態様において、該抗体は、ヒト内皮細胞から得ることができるタンパク質に $1 0^{-3}$ M 以上の親和性で結合することを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

一態様において、該抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であることを特徴とする。

【 0 0 1 5 】

一態様において、該抗体は、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体であることを特徴とする。

【 0 0 1 6 】

一態様において、該抗体は、ヒト E P O 受容体に結合する抗体フラグメントであることを特徴とする。

【 0 0 1 7 】

本明細書において報告される 1 つの局面は、本明細書において報告される方法で使用することができる、ヒト E P O 受容体に特異的に結合する抗体である。

【 0 0 1 8 】

本明細書において報告される 1 つの局面は、本明細書において報告される方法を使用するための、ヒト E P O 受容体に特異的に結合する抗体である。

【 0 0 1 9 】

一態様において、該抗体は、E P O 受容体フラグメント L P G P G G S V D I V (配列番号 0 1) に結合し、かつ、ヒト内皮細胞から得ることができる約 5 8 k D ~ 約 7 0 k D の分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

一態様において、該抗体は、ヒト内皮細胞から得ることができる約 6 6 k D の分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする。

【 0 0 2 1 】

一態様において、該抗体は、ヒト内皮細胞から得ることができるタンパク質に $1 0^{-3}$ M 以上の親和性で結合することを特徴とする。

【 0 0 2 2 】

一態様において、該抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であることを特徴とする。

【 0 0 2 3 】

一態様において、該抗体は、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体であることを特徴とする。

【 0 0 2 4 】

一態様において、該抗体は、ヒト E P O 受容体に結合する抗体フラグメントであることを特徴とする。

【 0 0 2 5 】

本明細書において報告される 1 つの局面は、ヒト E P O 受容体を検出するための、E P O 受容体フラグメント L P G P G G S V D I V (配列番号 0 1) に結合し、かつ、ヒト内皮細胞から得ることができる約 5 8 k D ~ 約 7 0 k D の分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする、ヒト E P O 受容体に特異的に結合する抗体の使用である。

【 0 0 2 6 】

一態様において、該使用は、抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができる約 6 6 k D の分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする。

【 0 0 2 7 】

一態様において、該使用は、抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができるタンパク質に $1 0^{-3}$ M 以上の親和性で結合することを特徴とする。

10

20

30

40

50

【0028】

一態様において、該使用は、抗体が、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であることを特徴とする。

【0029】

一態様において、該使用は、抗体が、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体であることを特徴とする。

【0030】

一態様において、該使用は、抗体が、ヒトEPO受容体に結合する抗体フラグメントであることを特徴とする。

【0031】

本明細書において報告される1つの局面は、赤血球の数を増加させるための医薬に対する患者の反応性を予測又は決定するための方法であって、

- 患者のサンプルと本明細書において報告されるEPO受容体抗体をin vitroでインキュベートすること、及び該抗体の該サンプルへの結合をin vitroで決定することにより、患者の癌細胞上のヒトEPO受容体の存在をin vitroで決定することを含み、それによって、患者の癌細胞上のヒトEPO受容体の存在が、赤血球の数を増加させるための医薬に対する患者の反応性の指標となる、方法である。

【0032】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができる約58kD～約70kD、一態様においては、約66kDの分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする。

【0033】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができるタンパク質に 10^{-3} M以上の親和性で結合することを特徴とする。

【0034】

一態様において、該方法は、抗体が、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であることを特徴とする。

【0035】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体であることを特徴とする。

【0036】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒトEPO受容体に結合する抗体フラグメントであることを特徴とする。

【0037】

本明細書において、アミノ酸配列LPGP GGSVDIV（配列番号01）を有するヒトEPO受容体フラグメントに特異的に結合し、かつ、ヒト内皮細胞に結合しない抗体を報告する。そのような抗体は、アミノ酸配列LDKWL LPRNPPSEDLPGPGGSVDIV（配列番号02）を有するEPO受容体フラグメントで実験動物を免疫し、その後、交差吸着、すなわち、実験動物から得られる、アミノ酸配列LPGP GGSVDIV（配列番号01）を有するEPO受容体フラグメントに対する抗体を選択することにより得ることができるが見い出された。

【0038】

本明細書において報告される1つの局面は、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体を産生するための方法であって、

- EPO受容体フラグメントLDKWL LPRNPPSEDLPGPGGSVDIV（配列番号02）を含むポリペプチドで動物を免疫する工程、及び

- EPO受容体フラグメントLPGP GGSVDIV（配列番号01）に結合する抗体を選択し、それによって、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体を産生する工程を含む、方法である。

【0039】

10

20

30

40

50

一態様において、該選択は、免疫した動物から得られる、固定化した配列番号01のEPO受容体フラグメントに対する抗体を交差吸着することによる選択である。

【0040】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができる約58kD～約70kD、一態様においては、約66kDの分子量を有するタンパク質に特異的に結合しないことを特徴とする。

【0041】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト内皮細胞から得ることができるタンパク質に 10^{-3} M以上の親和性で結合することを特徴とする。

【0042】

一態様において、該方法は、抗体が、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であることを特徴とする。

【0043】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体であることを特徴とする。

【0044】

一態様において、該方法は、抗体が、ヒトEPO受容体に結合する抗体フラグメントであることを特徴とする。

【0045】

本明細書において報告される1つの局面は、EPO受容体フラグメントLPGP GGSVDIV(配列番号01)に結合する、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体である。

【0046】

一態様において、該抗体は、ヒトEPO受容体に対して、 10^{-7} M以下の親和性を有する。一態様において、該抗体は、ヒトEPO受容体に対して、 10^{-8} M以下の親和性を有する。一態様において、該抗体は、ヒトEPO受容体に対して、 5×10^{-9} M以下の親和性を有する。一態様において、該抗体は、ヒトEPO受容体に対して、 2×10^{-9} M以下の親和性を有する。一態様において、該抗体は、ヒトEPO受容体に対して、約 1.8×10^{-9} Mの親和性を有する。一態様において、該抗体は、ヒトEPO受容体に対して、少なくとも 5×10^{-10} Mの親和性を有する。一態様において、該抗体は、ヒトEPO受容体に対して、少なくとも約 6.3×10^{-10} Mの親和性を有する。

【0047】

全ての局面の一態様において、該抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である。

【0048】

全ての局面の一態様において、該抗体は、マウス、又はラット、又はウサギ、又はハムスター、又はヒツジ、又はヤギ、又はニワトリ、又はサル、又はブタ、又はヒト、又はヒト化抗体である。一態様において、該抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体である。

【0049】

一態様において、該抗体は、ヒトEPO受容体に特異的に結合する、抗体フラグメントである。

【0050】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告される抗体をコードする、単離された核酸である。

【0051】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告される抗体をコードする核酸を含む、宿主細胞である。

【0052】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告される抗体を産生す

10

20

30

40

50

る方法であって、該抗体が産生されるように、本明細書において報告される宿主細胞を培養することを含む、方法ある。

【0053】

一態様において、該方法は、宿主細胞又は培養培地から抗体を回収する工程を含む。

【0054】

一態様において、該宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞である。一態様において、該細胞は、CHO細胞、又はHEK細胞、又はBHK細胞、又はSp2/0細胞、又はNS0細胞である。

【0055】

一態様において、該細胞は、E.coli細胞又はBacillus細胞である。

10

【0056】

本明細書において報告される1つの局面は、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体を産生するための方法であって、

- EPO受容体フラグメントLDKWL LPRNPPSEDLPGPGGSVDIV (配列番号02)を含むポリペプチドで動物を免疫する工程、及び
- EPO受容体フラグメントLPGPGGSVDIV (配列番号1)に結合する抗体を選択する工程、及び

それによって、ヒトEPO受容体に特異的に結合する抗体を産生する工程を含む、方法である。

【0057】

20

一態様において、該方法は、下記の追加の工程の1つ又は複数を含む：

- 選択された抗体をコードする核酸を含む細胞を培養する工程、及び/又は
- 該細胞又は培養培地から該抗体を回収する工程。

【0058】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告される抗体と検出可能な標識又は細胞毒性薬を含む、免疫コンジュゲートである。

【0059】

本明細書において報告される1つの局面は、本明細書において報告される抗体と場合により薬学的に許容しうる担体を含む、医薬製剤である。

【0060】

30

本明細書において報告される1つの局面は、検出可能な標識にコンジュゲートした本明細書において報告される抗体を含む、診断製剤である。

【0061】

本明細書において報告される1つの局面は、医薬として使用するための、本明細書において報告される抗体である。

【0062】

本明細書において報告される1つの局面は、貧血を処置するのに使用するための、本明細書において報告される抗体である。

【0063】

40

本明細書において報告される1つの局面は、患者の赤血球の数を変化させるのに使用するための、本明細書において報告される抗体である。

【0064】

本明細書において報告される1つの局面は、医薬の製造における、本明細書において報告される抗体の使用である。

【0065】

一態様において、該医薬は、貧血を処置するための医薬である。

【0066】

一態様において、該医薬は、患者の赤血球の数を変化させるための医薬である。

【0067】

本明細書において報告される1つの局面は、貧血を有する個体を処置する方法であって

50

、該個体の赤血球の数を変化／増加させるために、本明細書において報告される抗体の有効量を該個体に投与することを含む、方法である。

【 0 0 6 8 】

本明細書において報告される１つの局面は、個体の赤血球の数を変化させる方法であって、該個体の赤血球の数を変化させるために、本明細書において報告される抗体の有効量を該個体に投与することを含む、方法である。

【 0 0 6 9 】

本明細書において報告される１つの局面は、本明細書において報告される抗体を含む、診断キットである。

【 0 0 7 0 】

本明細書において報告される１つの局面は、本明細書において報告される抗体を含む診断キットを製造するための方法である。

【 0 0 7 1 】

本明細書において報告される１つの局面は、ヒトの組織サンプル中のヒト E P O 受容体を決定又は分析するための、本明細書において報告される抗体の使用である。

【 0 0 7 2 】

全ての局面の一態様において、該サンプルは、ヒトの組織又はヒトの細胞の溶解物である。

【 0 0 7 3 】

全ての局面の一態様において、該サンプルは、組織の切片、又は新鮮な組織の切片、又は凍結組織、又は凍結組織の切片、又はホルマリン固定パラフィン包埋組織、又はホルマリン固定パラフィン包埋組織の切片である。

【 0 0 7 4 】

全ての局面の一態様において、該分析は、免疫化学、免疫蛍光又は免疫組織化学により実施される。一態様において、該分析は、ウエスタンブロットにより、又は F A C S により、又は N I R F もしくは P E T を使用する in-vivo イメージングにより実施される。

【 0 0 7 5 】

全ての局面の一態様において、該決定は、組織サンプルと本明細書において報告される抗体をインキュベートすること、及び該抗体の該組織サンプルへの結合を検出することによる決定である。

【 0 0 7 6 】

本明細書において報告される１つの局面は、赤血球の数を増加させるための医薬に対する患者の反応性を予測又は決定するための方法であって、

- 患者の癌細胞上のヒト E P O 受容体の存在を in vitro で決定すること、及び
- 患者の癌細胞上のヒト E P O 受容体の存在と赤血球の数を増加させるための医薬に対する患者の反応性を関連付けることを含む、方法である。

【 0 0 7 7 】

本明細書において報告される１つの局面は、癌患者を処置するための、赤血球の数を増加させるための医薬の用量を決定するための方法であって、

- 患者の癌細胞上のヒト E P O 受容体の存在を in vitro で決定すること、ならびに
- ヒト E P O 受容体が存在することが決定された場合、赤血球の数を増加させる医薬を投与しないか、又はより少ない用量で投与することを決めること、及び
- ヒト E P O 受容体が存在しないことが決定された場合、赤血球の数を増加させる医薬を一用量投与することを決めることを含む、方法である。

【 0 0 7 8 】

本明細書において報告される１つの局面は、赤血球の数を増加させるための医薬に対する患者の反応性を予測又は決定するための方法であって、

- 患者の癌細胞上のヒト E P O 受容体の密度を in vitro で決定すること、
- 患者の癌細胞上のヒト E P O 受容体の密度と赤血球の数を増加させるための医薬に対する患者の反応性を関連付けることを含む、方法である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 9 】

本明細書において報告される1つの局面は、癌患者を処置するための、赤血球の数を増加させるための医薬の用量を決定するための方法であって、

- 患者の癌細胞上のヒトEPO受容体の存在をin vitroで決定すること、ならびに
- ヒトEPO受容体が存在する場合、赤血球の数を増加させる医薬を投与しないか、又はより少ない用量で投与することを決めること、及び
- ヒトEPO受容体が存在しない場合、赤血球の数を増加させる医薬の通常の一用量を投与することを決めることを含む、方法である。

【 0 0 8 0 】

全ての局面の一態様において、癌細胞上のヒトEPO受容体の存在を決定すること、又は癌細胞上のヒトEPO受容体の密度を決定することは、患者の組織サンプルと本明細書において報告されるEPO受容体抗体をin vitroでインキュベートすること、及び該抗体の該サンプルへの結合をin vitroで決定することによる。

10

【 0 0 8 1 】

一態様において、赤血球の数を増加させる医薬は、エリスロポエチンである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 2 】

【 図 1 】 図 1 は、wt - H E L A、H E L A - E P O R 及び U T - 7 細胞からの溶解物のウェスタンブロット分析を示す。

【 図 2 】 図 2 は、wt - H E L A 及び H E L A - E P O R 細胞の免疫細胞化学分析：A：EPO受容体 - G F P 融合タンパク質；B：本明細書において報告される例示的抗体を示す。

20

【 図 3 】 図 3 は、wt - H E L A 及び H E L A - E P O R 細胞の免疫組織化学的分析：A：野生型 H E L A 細胞；B：E P O R - H E L A を示す。

【 図 4 】 図 4 は、U T - 7、H U V E C (ヒト臍帯静脈内皮細胞) 及び H M V E C 細胞 (ヒト微小血管内皮細胞) からの溶解物のウェスタンブロット分析を示す。

【 0 0 8 3 】

配列の簡単な説明

配列番号 0 1 は、アミノ酸配列 L P G P G G S V D I V を有するヒトEPO受容体のフラグメントを示す。

30

配列番号 0 2 は、アミノ酸配列 L D K W L L P R N P P S E D L P G P G G S V D I V を有するヒトEPO受容体のフラグメントを示す。

配列番号 0 3 は、ヒトEPO受容体前駆体のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 4 】

発明の態様の詳細な説明

I . 定義

本明細書の目的に関して、「アクセプターヒトフレームワーク」は、下記に定義するような、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン (V L) フレームワーク又は重鎖可変ドメイン (V H) フレームワークのアミノ酸配列を含む、フレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに「由来する」アクセプターヒトフレームワークは、それらの同じアミノ酸配列を含むか、又はアミノ酸配列変化を含有しうる。いくつかの態様において、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。いくつかの態様において、V L アクセプターヒトフレームワークは、V L ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一の配列である。

40

【 0 0 8 5 】

「親和性」は、分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原) 間の非共有相互作用の強さの合計を指す。特に断りのない限り、本明細書において使用されるように、「結合親和性」は、結合対 (例えば、抗体と抗原) のメンバー間の

50

1 : 1 の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、一般的に、解離定数（同様に、 K_d 又は K_D 又は平衡定数）により表すことができる。親和性は、本明細書に記載する方法を含む、当技術分野において公知の一般的な方法により測定することができる。ポリクローナル抗体の親和性が決定された場合、親和性は、また、「見掛けの親和性」として示される。結合親和性を測定するための具体的説明及び例示的態様は以下に記載される。

【0086】

用語「抗ヒト EPO 受容体抗体」及び「ヒト EPO 受容体に結合する抗体」は、抗体がヒト EPO 受容体を標的とする診断薬及び / 又は治療薬として有用であるように十分な親和性で、配列番号 03 のヒト EPO 受容体に結合することができる抗体を指す。特定の態様において、ヒト EPO 受容体に結合する抗体は、 10 nM 、 1 nM 、 0.1 nM 、 0.01 nM 、又は 0.001 nM （例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 $10^{-8}\text{ M} \sim 10^{-13}\text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{ M} \sim 10^{-13}\text{ M}$ ）の解離定数（ K_d ）を有する。特定の態様において、抗ヒト EPO 受容体抗体は、異なる種のヒト EPO 受容体の中で保存されているヒト EPO 受容体のエピトープに結合する。

10

【0087】

用語「抗体」は、本明細書において最も広範な意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限り、非限定的に、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）及び抗体フラグメントを含む、様々な抗体構造を包含する。

20

【0088】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例としては、 F_v 、 F_{ab} 、 F_{ab}' 、 $F_{ab}'-SH$ 、 $F(ab')_2$ ；ダイアボディ；直鎖抗体；単鎖抗体分子（例えば、 $scFv$ ）；及び抗体フラグメントから生成される多特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0089】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び / 又は軽鎖の一部が特定の起源又は種に由来し、重鎖及び / 又は軽鎖の残りの部分が異なる起源又は種に由来する、抗体を指す。

【0090】

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の 5 つの主要なクラス： IgA 、 IgD 、 IgE 、 IgG 及び IgM があり、これらのいくつかは、さらに、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、 IgG_1 、 IgG_2 、 IgG_3 、 IgG_4 、 IgA_1 及び IgA_2 に分けることができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 及び μ と呼ばれる。

30

【0091】

用語「細胞毒性薬」は、本明細書において使用されるように、細胞の機能を阻害もしくは抑制し、かつ / 又は細胞死もしくは破壊を引き起こす物質を指す。細胞毒性薬としては、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位体）；化学療法剤又は化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド（ピンクリスチン、ピンプラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシン C、クロラムブシル、ダウノルビシン又はその他のインターカレート剤）；増殖阻害剤；酵素及びそれらのフラグメント、例えば、核酸分解酵素；抗生物質；毒素、例えば、細菌、真菌、植物又は動物起源の小分子毒素又は酵素的に活性な毒素（それらのフラグメント及び / 又は変異体を含む）；ならびに下記に開示される様々な抗腫瘍剤又は抗癌剤が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0092】

「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプによって異なる、抗体の F_c 領域に起因する生物学的活性を指す。抗体のエフェクター機能の例としては、 $C1q$ 結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）； F_c 受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；

50

食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンレギュレーション；ならびにB細胞活性化が挙げられる。

【0093】

薬剤、例えば、医薬製剤の「有効量」は、所望の治療的又は予防的結果を達成するために必要な用量及び期間における有効な量を指す。

【0094】

用語「Fc領域」は、本明細書において、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語には、天然配列のFc領域及び変異体のFc領域が含まれる。一態様において、ヒトIgG重鎖のFc領域は、Cys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端まで伸長している。しかし、Fc領域のC末端リシン(Lys447)は存在しても、存在しなくてもよい。本明細書において、特に指定されない限り、Fc領域又は定常領域中のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載されるような、EUナンバリングシステム(EUインデックスとも呼ばれる)に従う。

10

【0095】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に、4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3及びFR4からなる。従って、HVR及びFR配列は、一般的に、VH(又はVL)の配列：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4で表示される。

20

【0096】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、本明細書において互換的に使用され、天然の抗体の構造と実質的に類似する構造を有する抗体、又は本明細書に定義されるようなFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

【0097】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」は互換的に使用され、外因性核酸が導入されている細胞(そのような細胞の子孫を含む)を指す。宿主細胞としては、初代形質転換細胞及びその細胞に由来する子孫(継代数に関わらない)を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれる。子孫は、親細胞と核酸含量が完全に同一でなくてもよく、突然変異を含有してもよい。最初に形質転換された細胞においてスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異子孫が本明細書に含まれる。

30

【0098】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞により産生される抗体のアミノ酸配列、又はヒト抗体レパートリーもしくはその他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト起源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。このヒト抗体の定義は、特に、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【0099】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において、最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的に、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからの選択である。一般的に、配列のサブグループは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3に記載されるようなサブグループである。一態様において、VLの場合、サブグループは、前記のKabatらに記載されるようなサブグループC₁Iである。一態様において、VHの場合、サブグループは、前記のKabatらに記載されるようなサブグループI₁I₁I₁である。

40

【0100】

50

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基とヒトFRからのアミノ酸残基を含む、キメラ抗体を指す。特定の態様において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には、2つの可変ドメインの全てを実質的に含み、その中で、HVR（例えば、CDR）の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、そして、FRの全て又は実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、場合により、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

【0101】

用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変であり、かつ/又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する、抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、天然の4鎖抗体は、VH（H1、H2、H3）に3つ、VL（L1、L2、L3）に3つの6つのHVRを含む。HVRは、一般的に、超可変ループからのアミノ酸残基及び/又は「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、後者は、配列変動性が最も高く、かつ/又は抗原認識に関与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26-32（L1）、50-52（L2）、91-96（L3）、26-32（H1）、53-55（H2）及び96-101（H3）に存在する（Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917）。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3）は、アミノ酸残基L1の24-34、L2の50-56、L3の89-97、H1の31-35B、H2の50-65、及びH3の95-102に存在する（Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242）。VHのCDR1を除いて、CDRは、一般的に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRは、また、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「SDR」を含む。SDRは、略称（abbreviated）CDR又はa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及びa-CDR-H3）は、アミノ酸残基L1の31-34、L2の50-55、L3の89-96、H1の31-35B、H2の50-58、及びH3の95-102に存在する（Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633 を参照）。特に断りのない限り、可変ドメイン中のHVR残基及びその他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書において、前記のKabatらに従ってナンバリングされる。

【0102】

「免疫コンジュゲート」は、非限定的に細胞毒性薬を含む、1つ又は複数の異種分子にコンジュゲートした抗体である。

【0103】

「個体」又は「被験体」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、例えば、サル）、ウサギ及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。特定の態様において、個体又は被験体は、ヒトである。

【0104】

「単離された」抗体は、その天然環境の成分から分離された抗体である。いくつかの態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相HPLC）により決定して、95%以上又は99%の純度に精製される。抗体純度を評価する方法については、例えば、Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87 を参照されたい。

【0105】

「単離された」核酸は、その天然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸としては、核酸分子を通常含有する細胞に含有される核酸分子が含まれるが、核酸

10

20

30

40

50

分子は、染色体外又はその天然の染色体位置と異なる染色体位置に存在する。

【0106】

「抗ヒトEPO受容体抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の重鎖及び軽鎖（又はそのフラグメント）をコードする1つ又は複数の核酸分子を指し、単一のベクター又は別々のベクター内のそのような核酸分子、及び宿主細胞内の1つ又は複数の位置に存在するそのような核酸分子を含む。

【0107】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において使用されるように、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、該集団を含む個々の抗体は、例えば、天然の突然変異を含有するか、又はモノクローナル抗体調製物の生産の過程で生じる可能性のある変異体抗体（そのような変異体は、一般的に、少量で存在する）を除いて、同一であり、かつ/又は同じエピトープと結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。従って、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の性質を表し、任意の特定の抗体を産生する必要があるものとして解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、非限定的に、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージディスプレイ法及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む、種々の技術によって製造してもよく、モノクローナル抗体を製造するためのそのような方法及びその他の例示的な方法は、本明細書に記載される。

10

20

【0108】

「天然の抗体」は、様々な構造を有する天然の免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然のIgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。N末端からC末端に、各重鎖は、可変領域（VH）（また、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインと呼ばれる）を有し、3つの定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3）が続く。同様に、N末端からC末端に、各軽鎖は、可変領域（VL）（また、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインと呼ばれる）を有し、定常軽鎖（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる2つのタイプのいずれかに割り当てることができる。

30

【0109】

用語「ヒト内皮細胞から得ることができる」は、全細胞の場合、パラホルムアルデヒド固定のプロセスを示し、組織切片の場合、脱パラフィン化、続く、クエン酸緩衝液中、97で45分間のエピトープ回復のプロセスを示す。

【0110】

用語「パッケージ挿入物」は、治療薬品の商用パッケージ内に慣習的に含まれる指示書を指すために使用され、その指示書には、適応、用法、用量、投与方法、併用療法、禁忌及び/又は該治療薬品の使用に関する注意についての情報が記載されている。

【0111】

「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、参照ポリペプチド配列に対して、配列をアラインし、必要であれば、最大の配列同一性パーセントを達成するために、ギャップを導入した後、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮しないとした場合の、該参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当技術分野の範囲内の様々な方法、例えば、公的に入手可能なコンピューターソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign（DNASTAR）ソフトウェアを使用することにより達成することができる。当業者であれば、配列をアラインするための適切なパラメーター（比較される配列の全長にわたって最大アライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む）を決定することができ

40

50

る。しかし、本明細書の目的のために、アミノ酸配列同一性%の値は、配列比較コンピュータープログラム A L I G N - 2 を使用して生成する。A L I G N - 2 配列比較コンピュータープログラムは、Genentech, Inc. により作成され、そのソースコードは、U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559 に使用者文書でファイルされており、U.S. Copyright Registration No. TXU510087 で登録されている。A L I G N - 2 プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, California から公的に入手可能であるが、あるいはそのソースコードからコンパイルしてもよい。A L I G N - 2 プログラムは、UNIXオペレーティングシステム(デジタルUNIX V4.0D を含む)で使用するためにコンパイルされるべきである。配列比較パラメーターは全て、A L I G N - 2 プログラムによって設定され、変更されない。

10

【0112】

アミノ酸配列の比較に A L I G N - 2 が用いられる状況では、所与のアミノ酸配列 A の、所与のアミノ酸配列 B との又はそれに対する、アミノ酸配列同一性% (あるいは、所与のアミノ酸配列 B と又はそれに対して、特定のアミノ酸配列同一性%を有する又はそれを含む所与のアミノ酸配列 A と表現することもできる) は下記のように計算される：

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

式中、X は、配列アライメントプログラム A L I G N - 2 により、A と B のそのプログラムのアライメントにおいて、完全な一致として採点されたアミノ酸残基の数であり、Y は、B のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列 A の長さが、アミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対するアミノ酸配列同一性%は、B の A に対するアミノ酸配列同一性%と異なると理解されるであろう。特に断りのない限り、本明細書において使用される全てのアミノ酸配列同一性%の値は、A L I G N - 2 コンピュータープログラムを使用して、直前の段落に記載するように得られる。

20

【0113】

用語「医薬製剤」は、そこに含まれる活性成分の生物学的活性が有効となるような形態であり、かつ、該製剤を投与する被験体に対して許容できない毒性を示す追加の成分を含有しない、調製物を指す。

【0114】

「薬学的に許容しうる担体」は、被験体に対して非毒性である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容しうる担体としては、緩衝剤、賦形剤、安定剤又は保存剤が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0115】

用語「EPO受容体」は、特に断りのない限り、哺乳動物、例えば、霊長類(例えば、ヒト)及びげっ歯類(例えば、マウス及びラット)を含む、任意の脊椎動物起源からの任意の天然のEPO受容体を指す。この用語は、「完全長」の未処理ヒトEPO受容体、ならびに細胞内のプロセッシングから生じる任意の形態のヒトEPO受容体を包含する。この用語は、また、ヒトEPO受容体の天然の変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を包含する。例示的なヒトEPO受容体のアミノ酸配列は、配列番号03に示される。

【0116】

用語「処置(treatment)」(及びその文法上の変形、例えば、「処置する(treat)」又は「処置する(treating)」)は、処置される個体の自然経過を変えようとする臨床的介入を指し、予防のために又は臨床病理の過程のいずれかで実施することができる。処置の所望の効果としては、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行を遅延させること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるために、又は疾患の進行を遅らせるために使用される。

40

【0117】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖

50

又は軽鎖のドメインを指す。天然の抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、VH及びVL）は、一般的に、類似の構造を有し、その各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む（例えば、Kindt, T.J. et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91を参照）。単一のVH又はVLドメインであっても、抗原結合特異性を十分に付与しうる。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、該抗原に結合する抗体からのVH又はVLドメインを使用して単離し、相補的なVL又はVHドメインのライブラリーをスクリーニングすることもできる（例えば、Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628を参照）。

【0118】

用語「ベクター」は、連結している別の核酸を伝搬することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造体としてのベクター、ならびにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。特定のベクターは、動作可能なように連結されている核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と呼ばれる。

【0119】

II. 組成物及び方法

一局面において、本発明は、ヒトEPO受容体、特に、配列番号01のヒトEPO受容体フラグメントに特異的に結合する抗体が、ヒトの上皮細胞又は内皮細胞に交差反応性又は交差結合を示さないという知見の一部に基づいている。特定の態様において、ヒトEPO受容体に結合する抗体が提供される。本発明の抗体は、例えば、貧血又は癌の診断又は処置に有用である。本発明の抗体は、また、赤血球の数を増加させる医薬を投与する前、特に、エリスロポエチンを投与する前の患者の層別化に有用である。

【0120】

A. 例示的な抗ヒトEPO受容体抗体

一局面において、本発明は、ヒトEPO受容体に結合する単離された抗体を提供する。特定の態様において、抗ヒトEPO受容体抗体は、ヒトEPO受容体フラグメントLPGPGGSVDIV（EpoR（361-371）；配列番号01）に結合する。

【0121】

【表1】

ペプチド	抗体	ka [1/Ms]	kd [1/秒]	t/2 _{解離} [分]	KA [1/M]	KD [nM]
EpoR (347-371)	GBb	7.9*10 ⁵	5*10 ⁻⁴	23	1.6*10 ⁹	0.63
EpoR (361-371)	GBb	6.4*10 ⁵	1.1 *10 ⁻³	10	5.7*10 ⁸	1.8

【0122】

一態様において、ここで提供されるヒトEPO受容体に結合する抗体は、EPO受容体フラグメント347-371と同等の親和性（同じ大きさの同等のKd値）で、ヒトEPO受容体フラグメント361-371に結合する。

【0123】

一態様において、ここで提供されるヒトEPO受容体に結合する抗体は、ヒトEPO受容体フラグメント361-371への結合とヒトEPO受容体フラグメント347-371への結合の親和性比（Kd値比）が10未満、又は5未満、又は約3である。

【0124】

1. 抗体親和性

特定の態様において、本明細書において提供される抗体は、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nM（例えば、10⁻⁸M以下、例えば、10⁻⁸

10

20

30

40

50

M ~ 10⁻¹³ M、又は例えば、10⁻⁹ M ~ 10⁻¹³ M) の解離定数 (K_d) を有する。

【0125】

一態様において、K_dは、放射性標識抗原結合アッセイ (RIA) によって決定され、対象の抗体の Fab 型及びその抗原を用いて、下記のアッセイにより記載するように実施される。抗原に対する FAB の溶液結合親和性は、未標識抗原の力価測定系列の存在下で、Fab を最少濃度の (¹²⁵I) 標識抗原で平衡化し、次に、抗 Fab 抗体でコートしたプレートと結合している抗原を捕捉することによって測定する (例えば、Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881 を参照)。アッセイ条件を確立するために、MICROTITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific) を、5 µg/ml の捕捉抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) の 50 mM 炭酸ナトリウム溶液 (pH 9.6) で一晩コートし、その後、2% (w/v) ウシ血清アルブミンの PBS 溶液で、室温 (およそ 23 °C) にて 2 ~ 5 時間ブロッキングする。非吸着プレート (Nunc #269620) 中、100 pM 又は 2.6 pM の [¹²⁵I] 抗原を、段階希釈した対象の Fab と混合する (例えば、Presta, L.G. et al., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599 の抗 VEGF 抗体、Fab-12 の評価と一致する)。次に、対象の Fab を一晩インキュベートするが、インキュベートは、確実に平衡に達するようにより長い期間 (例えば、約 65 時間) 続けてもよい。その後、混合物を捕捉プレートに移し、室温でインキュベートする (例えば、1 時間)。次に、溶液を除去し、0.1% ポリソルベート 20 (TWEEN-20 (登録商標)) の PBS 溶液でプレートを 8 回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 µl / ウェルのシンチラント (MICROSCINT-20 (商標); Packard) を加え、プレートを TOPCOUNT (商標) ガンマカウンター (Packard) で 10 分間カウントする。最大結合の 20% 以下を示す濃度の各 Fab を選択し、競合結合アッセイに使用する。

【0126】

別の態様によれば、K_d 値は、BIACORE (登録商標) 2000 又は BIACORE (登録商標) 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を使用する、表面プラズモン共鳴アッセイを用いて、25 °C にて、約 10 反応単位 (RU) の固定化した抗原 CM5 チップを用いて決定される。簡潔に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, BIAcore, Inc.) を、販売業者の説明書に従って、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N-ヒドロキシスクシンイミド (NHSS) を用いて活性化する。抗原を 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.8) で 5 µg/ml (~ 0.2 µM) に希釈した後、結合したタンパク質がおよそ 10 反応単位 (RU) になるように 5 µl / 分の流速で注入する。抗原を注入した後、1 M エタノールアミンを注入し、未反応基をブロッキングする。反応速度の測定のために、2 倍段階希釈した Fab (0.78 nM ~ 500 nM) を、25 °C にて、およそ 25 µl / 分の流速で、0.05% ポリソルベート 20 (TWEEN-20 (商標)) 界面活性剤 (PBST) を含有する PBS に注入する。会合速度 (k_{on}) 及び解離速度 (k_{off}) は、単一 1 対 1 Langmuir 結合モデル (BIACORE (登録商標) Evaluation Software version 3.2) 使用して、会合と解離のセンサーグラムを同時にフィッティングすることによって計算する。平衡解離定数 (K_d) は、比 k_{off} / k_{on} として計算する (例えば、Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881 を参照)。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる会合速度が 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ を超える場合、会合速度は、漸増濃度の抗原の存在下、25 °C で、PBS (pH 7.2) 中の 20 nM の抗抗原抗体 (Fab 型) の蛍光発光強度 (励起 = 295 nm; 発光 = 340 nm、帯域通過 16 nm) の増減を測定する蛍光消光技術を用いて決定することができ、これは、分光計、例えば、ストップフローを搭載した分光光度計 (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた 8000 系 SLM-AMINCO (商標) 分光光度計 (ThermoSpectronic) で測定される。

【0127】

2. 抗体フラグメント

特定の態様において、本明細書において提供される抗体は、抗体フラグメントである。

抗体フラグメントとしては、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b')₂、F v 及び s c F v フラグメント、ならびに後述するその他のフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。特定の抗体フラグメントに関しては、Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134 を参照されたい。s c F v フラグメントに関しては、例えば、Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg 及び Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315 を参照されたい; また、WO 93/16185; ならびに米国特許第5,571,894号及び第5,587,458号を参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつ、in vivo半減期が増加した F a b 及び F (a b')₂ フラグメントの考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

10

【 0 1 2 8 】

ダイアボディは、二価又は二重特異性でありうる2つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントである。例えば、EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; 及び Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448 を参照されたい。また、トリアボディ及びテトラボディが、Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134 に記載されている。

【 0 1 2 9 】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部、又は軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む、抗体フラグメントである。特定の態様において、単ドメイン抗体は、ヒトの単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照)。

20

【 0 1 3 0 】

抗体フラグメントは、非限定的に、本明細書に記載するような、インタクトな抗体のタンパク質分解、ならびに組み換え宿主細胞 (例えば、E. coli又はファージ) による産生を含む、様々な技術によって製造することができる。

【 0 1 3 1 】

3. キメラ及びヒト化抗体

特定の態様において、本明細書において提供される抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号; 及び Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855 に記載されている。一例として、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域) とヒト定常領域を含む。さらなる例として、キメラ抗体は、そのクラス又はサブクラスが親抗体のものから変更されている、「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体には、その抗原結合フラグメントが含まれる。

30

【 0 1 3 2 】

特定の態様において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性は保持したままで、ヒトに対する免疫原性を低下させるためにヒト化されている。一般的に、ヒト化抗体は、H V R、例えば、C D R (又はその部分) が非ヒト抗体に由来し、かつ、F R (又はその部分) がヒト抗体配列に由来する、1つ又は複数の可変ドメインを含む。また、ヒト化抗体は、場合により、ヒト定常領域の少なくとも一部を含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体のいくつかの F R 残基は、例えば、抗体の特異性及び親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体 (例えば、H V R 残基が由来する抗体) からの対応する残基で置換されている。

40

【 0 1 3 3 】

ヒト化抗体及びそれらを製造する方法は、例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633 に概説されており、さらに、例えば、Riechmann, I. et al., Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; 米国特許第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号及び第7,087,409号; Kashmiri, S.V. et al., Methods 36 (2005) 25-34 (S D R (a - C D R) グラフティングを記載); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (「リ

50

サーフェッシング」を記載) ; Dall'Acqua, W.F. et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (「FR シャッフリング」を記載) ; ならびに Osbourn, J. et al., *Methods* 36 (2005) 61-68 及び Klimka, A. et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (FR シャッフリングのための「誘導選択」アプローチを記載) に記載されている。

【0134】

ヒト化に使用されうるヒトフレームワーク領域としては、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域(例えば、Sims, M.J. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308 を参照) ; 軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域(例えば、Carter, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; 及び Presta, L.G. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632 を参照) ; ヒト成熟(体細胞変異)フレームワーク領域又はヒト生殖細胞系フレームワーク領域(例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633 を参照) ; ならびにスクリーニングFRライブラリーに由来するフレームワーク領域(例えば、Baca, M. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 及び Rosok, M.J. et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618 を参照) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0135】

4. ヒト抗体

特定の態様において、本明細書において提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において公知の様々な技術を使用して生産することができる。ヒト抗体は、一般的に、van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374 及び Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459 に記載されている。

20

【0136】

ヒト抗体は、抗原接種に応答してインタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製してもよい。そのような動物は、典型的には、内因性の免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するもしくは動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒトの免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含有する。そのようなトランスジェニックマウスでは、内因性の免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法に関しては、Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125 を参照されたい。また、例えば、XENOMOUSE (商標) 技術を記載する、US 6,075,181及び6,150,584 ; H U M A B (登録商標) 技術を記載する米国特許第5,770,429号 ; K-M MOUSE (登録商標) 技術を記載する米国特許第7,041,870号、ならびにVELOCIMOUSE (登録商標) 技術を記載する米国特許出願公開第US 2007/0061900号も参照されたい。そのような動物から産生されるインタクトな抗体からのヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによってさらに改変してもよい。

30

【0137】

ヒト抗体は、また、ハイブリドーマベースの方法により製造することができる。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのヒトミエロマ及びマウス-ヒトヘテロミエロマ細胞株が記載されている(例えば、Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; 及び Boerner, P. et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95 を参照)。また、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体が、Li, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562 に記載されている。追加の方法としては、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載する)及びNi, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268(ヒト-ヒトハイブリドーマを記載する)に記載される方法が挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオマ技術)は、また、Vollmers, H.P.

40

50

and Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937 及び Vollmers, H.P. and Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191 に記載されている。

【 0 1 3 8 】

ヒト抗体は、また、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択される Fv クローン可変ドメイン配列を単離することにより生成してもよい。そのような可変ドメイン配列は、次に、所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択する技術を後述する。

【 0 1 3 9 】

5 . ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性（1つ又は複数）を有する抗体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより単離してもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリーを生成し、そして、所望の結合特性を有する抗体のライブラリーをスクリーニングするための種々の方法が、当該技術分野において公知である。そのような方法は、例えば、Hoogenboom, H.R. et al., *Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37 に概説されており、さらに、例えば、McCafferty, J. et al., *Nature* 348 (1990) 552-554; Clackson, T. et al., *Nature* 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. and Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. et al., *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472; 及び Lee, C.V. et al., *J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132 に記載されている。

【 0 1 4 0 】

特定のファージディスプレイ法では、VH及びVL遺伝子のレパートリーをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により別々にクローニングして、ファージライブラリーにランダムに組み換えて、次に、Winter, G. et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455 に記載されるように、抗原結合ファージをスクリーニングすることができる。ファージは、典型的には、抗体フラグメントを単鎖Fv（scFv）フラグメント又はFabフラグメントのいずれかとして提示する。免疫された起源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なく、免疫原に対して高い親和性の抗体を提供する。あるいは、Griffiths, A.D. et al., *EMBO J.* 12 (1993) 725-734 に記載されるように、任意の免疫化なしで、ナイーブなライブラリーをクローニングし（例えば、ヒトから）、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対する単一起源の抗体を提供することができる。最後に、ナイーブなライブラリーは、また、Hoogenboom, H.R. and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388 に記載されるように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して、高度な可変CDR3領域をコードし、かつ、*in vitro*で再配列を達成することによって合成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許公報としては、例えば、米国特許第5,750,373号、ならびに米国特許出願公開第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号及び第2009/0002360号が挙げられる。

【 0 1 4 1 】

ヒト抗体ライブラリーから単離される抗体又は抗体フラグメントは、本明細書において、ヒト抗体又はヒト抗体フラグメントと考えられる。

【 0 1 4 2 】

6 . 多特異性抗体

特定の態様において、本明細書において提供される抗体は、多特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の態様において、結合特異性の一方はヒトEPO受容体に対してであり、もう一方は任意のその他の抗原に対してである。特定の態様に

10

20

30

40

50

において、二重特異性抗体は、ヒトEPO受容体の2つの異なるエピトープに結合しうる。二重特異性抗体は、また、ヒトEPO受容体を発現する細胞に細胞毒性薬を局在化させるために使用されうる。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメントとして調製することができる。

【0143】

多特異性抗体を製造するための技術としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の組み換え共発現 (Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, 及びTraunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659 を参照)、及び「knob-in-hole」エンジニアリング (例えば、米国特許第5,731,168号を参照) が含まれるが、これらに限定されない。多特異性抗体は、また、抗体Fc-ヘテロ二量体分子を製造するために静電ステアリング効果を操作すること (WO 2009/089004); 2つ以上の抗体又はフラグメントを架橋すること (例えば、米国特許第4,676,980号、及びBrennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83 を参照); 二重特異性抗体を生成するためにロイシンジッパーを使用すること (例えば、Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553 を参照); 二重特異性抗体フラグメントを製造するために「ダイヤボディ」技術を使用すること (例えば、Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448 を参照); 及び単鎖Fv (sFv) 二量体を使用すること (例えば、Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374 を参照); ならびに、例えば、Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69) に記載されるような三重特異性抗体を調製することにより製造してもよい。

10

20

【0144】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の官能性抗原結合部位を有する改変抗体もまた、本明細書に含まれる (例えば、US 2006/0025576を参照)。

【0145】

本明細書の抗体又はフラグメントは、また、ヒトEPO受容体ならびに別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む、「二重作用性Fab」又は「DAF」を含む (例えば、US 2008/0069820を参照)。

【0146】

本明細書の抗体又はフラグメントは、また、WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792及びWO 2010/145793に記載される多特異性抗体を含む。

30

【0147】

7. 抗体変異体

a) グリコシル化変異体

特定の態様において、本明細書において提供される抗体は、該抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少するように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、1つ又は複数のグリコシル化部位が作製又は除去されるようにアミノ酸配列を改変することにより簡便に達成することができる。

【0148】

抗体がFc領域を含む場合、その領域に連結している糖が改変されうる。哺乳動物細胞によって産生される天然の抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN結合により一般的に連結している、分岐した二分岐オリゴ糖を含む (例えば、Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32 を参照)。オリゴ糖は、様々な糖、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「stem」中のGlcNAcに連結しているフコースを含みうる。いくつかの態様において、本発明の抗体中のオリゴ糖の修飾は、特定の特性が改善された抗体変異体を作製するために行われうる。

40

【0149】

一態様において、Fc領域に (直接的又は間接的に) 連結されたフコースを欠く糖構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、そのような抗体中のフコースの量は、1% ~

50

80%、1%~65%、5%~65%、又は20%~40%でありうる。フコースの量は、例えば、WO 2008/077546 に記載されているように、Asn 297 に連結している全て糖構造（例えば、複合体、ハイブリッド及び高マンノース構造）の合計に対して、Asn 297 における糖鎖中のフコースの平均量を、MALDI-TOF 質量分析によって測定して計算することにより決定される。Asn 297 は、Fc 領域の約 297 位に位置しているアスパラギン残基を指すが（Fc 領域残基の EU ナンバリング）、Asn 297 は、また、抗体の小さな配列変異に起因して、297 位の約 ±3 アミノ酸上流又は下流に、すなわち、294 位~300 位に位置しうる。そのようなフコース化変異体は、ADCC 機能が改善しうる（例えば、US 2003/0157108; US 2004/0093621 を参照）。「脱フコース化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関する出版物の例としては、US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2005/031140; Okazaki, A. et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622 が挙げられる。脱フコース化抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコース化を欠損する Lec 13 CHO 細胞 (Ripka, J. et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; US 2003/0157108; 及び WO 2004/056312、特に実施例 11) 及びノックアウト細胞株、例えば、-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (FUT8) ノックアウト CHO 細胞 (例えば、Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; 及び WO 2003/085107 を参照) が挙げられる。

【0150】

さらに、分割オリゴ糖（例えば、抗体の Fc 領域に連結している二分岐オリゴ糖が GlcNAc によって分割されている）を有する抗体変異体が提供される。そのような抗体変異体は、フコース化が減少し、かつ/又は ADCC 機能が改善しうる。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO 2003/011878; 米国特許第 6,602,684 号; 及び US 2005/0123546 に記載されている。また、Fc 領域に連結しているオリゴ糖中に少なくとも一つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。そのような抗体変異体は、CDC 機能が改善しうる。そのような抗体変異体は、例えば、WO 1997/30087; WO 1998/58964; 及び WO 1999/22764 に記載されている。

【0151】

b) Fc 領域変異体

特定の態様において、1つ又は複数のアミノ酸修飾を本明細書に提供される抗体の Fc 領域に導入して、それによって、Fc 領域変異体を生成してもよい。Fc 領域変異体は、1つ又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含む、ヒト Fc 領域配列（例えば、ヒト IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4 Fc 領域）を含みうる。

【0152】

特定の態様において、本発明は、抗体の *in vivo* での半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能（補体及び ADCC）が不要又は有害である用途において望ましい候補となるエフェクター機能の全てではないがいくつかを有する、抗体変異体を意図する。*in vitro* 及び/又は *in vivo* の細胞毒性アッセイは、CDC 及び/又は ADCC 活性の減少/枯渇を確認するために実施することができる。例えば、Fc 受容体 (FcR) 結合アッセイは、抗体が FcR 結合を欠いているが（従って、ADCC 活性を欠いている可能性が高い）、FcRn 結合能を保持していることを確認するために実施することができる。ADCC に介在する初代細胞の NK 細胞は、FcRIII のみを発現するが、単球は、FcRI、FcRII 及び FcRIII を発現する。造血細胞上の FcR 発現は、Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492 の 464 ページの表 3 にまとめられている。対象分子の ADCC 活性を評価するための *in vitro* アッセイの非限定例は、米国特許第 5,500,362 号（例えば、Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. A

cad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; 及び Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502 を参照); 米国特許第5,821,337号 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361 を参照) に記載されている。あるいは、非放射能アッセイ法を用いてもよい (例えば、フローサイトメトリー用の A C T I (商標) 非放射能細胞毒性アッセイ (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 及び CytoTox 96 (登録商標) 非放射能細胞毒性アッセイ (Promega, Madison, WI) を参照)。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞 (P B M C) 及びナチュラルキラー (N K) 細胞が挙げられる。あるいは、又は追加的に、対象分子の A D C C 活性は、Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656 に開示されているように、in vivo、例えば、動物モデルで評価してもよい。また、抗体が、C 1 q に結合することができず、そのために、C D C 活性を欠いていることを確認するために C 1 q 結合アッセイを行ってもよい。例えば、WO 2006/029879 及び WO 2005/100402 の C 1 q 及び C 3 c 結合 E L I S A を参照されたい。補体活性化を評価するために、C D C アッセイを実施してもよい (例えば、Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052; 及び Cragg, and M. S. M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743 を参照)。F c R n 結合及び in vivo クリアランス / 半減期の決定は、当技術分野において公知の方法を使用して実施することもできる (例えば、Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769 を参照)。

10

【 0 1 5 3 】

20

エフェクター機能が低下した抗体には、F c 領域の残基 2 3 8、2 6 5、2 6 9、2 7 0、2 9 7、3 2 7 及び 3 2 9 の 1 つ又は複数の置換を有する抗体が含まれる (米国特許第6,737,056号)。そのような F c 突然変異体には、アミノ酸 2 6 5、2 6 9、2 7 0、2 9 7 及び 3 2 7 位の 2 つ以上に置換を有する F c 突然変異体 (残基 2 6 5 及び 2 9 7 がアラニンに置換されている、いわゆる「D A N A」F c 突然変異体を含む) (米国特許第7,332,581号) が含まれる。

【 0 1 5 4 】

F c R への結合が改善又は低下した特定の抗体変異体が記載されている (例えば、米国特許第6,737,056号; WO 2004/056312 及び Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604 を参照)。

30

【 0 1 5 5 】

特定の態様において、抗体変異体は、A D C C を改善する、1 つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、F c 領域の 2 9 8、3 3 3 及び / 又は 3 3 4 位 (残基の E U ナンバリング) に置換を有する F c 領域を含む。

【 0 1 5 6 】

いくつかの態様において、例えば、米国特許第6,194,551号、WO 99/51642 及び Idusoyie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184 に記載されるように、C 1 q 結合及び / 又は補体依存性細胞傷害 (C D C) が改変 (すなわち、改善又は低下) するように F c 領域が改変される。

【 0 1 5 7 】

40

半減期が増加し、かつ、新生児 F c 受容体 (F c R n) (母体 I g G の胎児への移動に参与する) への結合が改善した抗体 (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, 及び Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434) が、US 2005/001493 4 に記載されている。これらの抗体は、F c 領域の F c R n への結合を改善する、1 つ又は複数の置換を有する F c 領域を含む。そのような F c 変異体には、F c 領域の残基 2 3 8、2 5 6、2 6 5、2 7 2、2 8 6、3 0 3、3 0 5、3 0 7、3 1 1、3 1 2、3 1 7、3 4 0、3 5 6、3 6 0、3 6 2、3 7 6、3 7 8、3 8 0、3 8 2、4 1 3、4 2 4 又は 4 3 4 の 1 つ又は複数の置換、例えば、F c 領域の残基 4 3 4 の置換を有する F c 変異体が含まれる (米国特許第7,371,826号)。

【 0 1 5 8 】

50

また、その他のFc領域変異体の例に関しては、Duncan, A.R. and Winter, G., *Nature* 322 (1988) 738-740; 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; 及びWO 94/29351を参照されたい。

【0159】

c) 抗体誘導体

特定の態様において、本明細書において提供される抗体は、当該技術分野において公知の容易に得ることができる追加の非タンパク性部分を含有するようにさらに改変されうる。抗体の誘導体化に適するその部分としては、水溶性ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコール共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(ホモ重合体又はランダム共重合体のいずれか)及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモ重合体、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコールならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、その水中安定性のために製造に有利でありうる。ポリマーはどんな分子量のポリマーであってもよく、また、分岐であっても非分岐であってもよい。抗体に連結するポリマーの数は変更可能であり、二つ以上のポリマーが連結しているならば、これらは同じ分子であっても異なる分子であってもよい。一般的に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又は種類は、非限定的に、改善される抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が規定の条件下で治療に使用されるかどうかなどの検討事項に基づいて決定することができる。

【0160】

別の態様において、放射線で曝露することにより選択的に加熱されうる、抗体と非タンパク性部分のコンジュゲートが提供される。一態様において、非タンパク性部分は、カーボンナノチューブである(Kam, N.W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 11600-11605)。放射線は、いずれの波長の放射線であってもよく、その波長としては、非限定的に、一般的な細胞に有害ではないが、抗体-非タンパク性部分に近接する細胞が死滅する温度まで非タンパク性部分を加熱する波長が挙げられる。

【0161】

実質的に(又はほとんど)非免疫原性である結合がもたらされるコンジュゲーション法が特に好適である。従って、ペプチド-(すなわち、アミド-)、スルフィド-(立体的に込み合った)、ジスルフィド-、ヒドラゾン-又はエーテル結合が特に好適である。これらの結合は、ほとんど非免疫原性であり、血清中で適度な安定性を示す(例えば、Senter, P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886を参照)。

【0162】

該部分及び抗体の生化学的性質に応じて、異なるコンジュゲーション戦略がすぐに利用できる。該部分が50~500アミノ酸の天然又は組み換え部分である場合、当業者であれば、タンパク質コンジュゲートを合成する化学を記載している教科書の標準的な手順を容易に遂行することができる(例えば、Hackenberger, C.P.R., and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074を参照)。一態様において、抗体又は部分内でのマレインイミド部分とシステイン残基の反応が使用される。これは、例えば、抗体のFab又はFab'フラグメントが使用される場合に、特に好適なカップリング化学である。あるいは、一態様において、抗体又は部分のC末端へのカップリングが実施される。タンパク質、例えば、FabフラグメントのC末端の修飾を、例えば、記載されるように実施することができる(Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371)。

【0163】

一般的に、部位特異的反応及び共有カップリングは、天然アミノ酸を、存在するその他の官能基の反応性に直交する反応性を有するアミノ酸に変換することに基づいている。例えば、珍しい配列関係内の特定のシステインをアルデヒドに酵素変換することができる (Frese, M.A., and Dierks, T., *ChemBioChem*. 10 (2009) 425-427 を参照)。また、特定の酵素の特異的な酵素反応性と所与の配列関係の天然アミノ酸を利用することにより所望のアミノ酸修飾を得ることが可能である (例えば、Taki, M. et al., *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al. *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; 及び Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403 によって使用される、プロテアーゼ触媒による C - N 結合形成を参照)。

【0164】

10

部位特異的反応及び共有カップリングは、また、末端アミノ酸と適切な修飾試薬の選択的反応により達成することができる。

【0165】

部位特異的共有カップリングを達成するために、N末端システインとベンゾニトリルの反応性を使用することができる (Ren, H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662 を参照)。

【0166】

天然の化学ライゲーションは、また、C末端のシステイン残基に依存しうる (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (*Protein Engineering*), 65-96)。

20

【0167】

EP 1 074 563は、一連の負の電荷を帯びたアミノ酸内のシステインと一連の正の電荷を帯びたアミノ酸に位置しているシステインがより速く反応することに基づくコンジュゲーション法を記載している。

【0168】

該部分は、また、合成ペプチドであってもペプチド模倣体であってもよい。ポリペプチドが化学合成される場合、直交化学反応性を有するアミノ酸をそのような合成の間に組み込むことができる (例えば、de Graaf, A.J. et al., *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295 を参照)。多様な直交官能基が議論されており、合成ペプチドに導入することができることから、そのようなペプチドのリンカーへのコンジュゲーションは標準的な化学である。

30

【0169】

単標識ポリペプチドを得るために、1 : 1の化学量論コンジュゲートを、クロマトグラフィによってその他のコンジュゲーション副生成物と分離してもよい。この手順は、色素標識結合対メンバーと荷電リンカーを使用して促進することができる。この種類の標識された及び高度に負の電荷を帯びた結合対メンバーを使用することによって、電荷と分子量の違いを分離に使用することができるので、単コンジュゲートしたポリペプチドは、未標識ポリペプチド及び二つ以上のリンカーを有するポリペプチドから容易に分離される。蛍光色素は、標識された一価の結合剤のような複合体を非結合成分から精製するために有用でありうる。

40

【0170】

一態様において、エフェクター部分は、結合部分、標識部分及び生物活性部分からなる群より選択される。

【0171】

B. 組み換え法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されているように、組み換え法及び組成物を使用して産生してもよい。一態様において、本明細書に記載される抗ヒトEPO受容体抗体をコードする単離された核酸が提供される。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列及び/又は抗体のVHを含むアミノ酸配列 (例えば、抗体の軽鎖及び/又は重鎖) をコードしうる。さらなる態様において、そのような核酸を含む1つ又は複数の

50

ベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる態様において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。一つのそのような態様において、宿主細胞は、（１）抗体のV_Lを含むアミノ酸配列及び抗体のV_Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は（２）抗体のV_Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一のベクター及び抗体のV_Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二のベクターを含む（例えば、そのベクターで形質転換されている）。一態様において、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又はリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp2/0細胞）である。一態様において、抗ヒトEPO受容体抗体を製造する方法であって、上記に提供される抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を該抗体の発現に適する条件下で培養すること、及び場合により該宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から該抗体を回収することを含む、方法が提供される。

10

【0172】

抗ヒトEPO受容体抗体の組み換え産生のために、例えば、上記に記載される抗体をコードする核酸を単離して、1つ又は複数のベクターに挿入し、さらに宿主細胞でクローニング及び/又は発現させる。そのような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）、容易に単離され、配列決定することができる。

【0173】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適する宿主細胞には、本明細書に記載される原核又は真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要でない場合、細菌で産生してもよい。細菌で抗体フラグメント及びポリペプチドを発現するために、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号及び第5,840,523号を参照されたい（また、E. coliでの抗体フラグメントの発現を記載する、Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254 を参照）。発現後、抗体を可溶性画分の細菌細胞ペーストから単離して、さらに精製することもできる。

20

【0174】

原核生物の他に、糸状菌（filamentous fungi）又は酵母などの真核微生物も、抗体をコードするベクター用の適切なクローニング又は発現宿主であり、部分的又は完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす、グリコシル化経路が「ヒト化」されている真菌及び酵母株が含まれる（Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; 及び Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215 を参照）。

30

【0175】

グリコシル化抗体を発現するための適切な宿主細胞は、また、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のパキウウイルス株が同定されており、これらは、特に、ポドプテラフルギペルダ（Spodoptera frugiperda）細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせで使用することができる。

【0176】

植物細胞培養物を宿主として利用することもできる。例えば、米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号及び第6,417,429号（トランスジェニック植物で抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術を記載する）を参照されたい。

40

【0177】

脊椎動物細胞を宿主として使用してもよい。例えば、懸濁液中で成長するように適合させた哺乳動物細胞株が有用でありうる。その他の有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40（COS-7）により形質転換されたサル腎臓CV1株；ヒト胎児腎臓株（例えば、Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74 に記載されるような293又は293細胞）；ベビーハムスター腎細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252に記載されるようなTM4細胞）；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸癌細胞（H

50

E L A) ; イヌ腎細胞 (M D C K) ; バッファローラット肝細胞 (B R L 3 A) ; ヒト肺細胞 (W 1 3 8) ; ヒト肝細胞 (H e p G 2) ; マウス乳腺腫瘍 (M M T 060562) ; 例えば、Mather, J.P. et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68 に記載されるような T R I 細胞 ; M R C 5 細胞 ; 及び F S 4 細胞である。その他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞 (D H F R - C H O 細胞 (U r l a u b , G . et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220) を含む) ; ならびに Y 0 , N S 0 及び S p 2 / 0 などのミエローマ細胞株が含まれる。抗体産生に適する特定の哺乳動物宿主細胞株に関しては、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268 を参照されたい。

10

【 0 1 7 8 】

C . アッセイ

本明細書において提供される抗ヒト E P O 受容体抗体は、当該技術分野において公知の様々なアッセイによって、それらの物理的 / 化学的特性及び / 又は生物学的活性を同定、スクリーニング又は特徴付けしてもよい。

【 0 1 7 9 】

1 . 免疫組織化学染色アッセイ

一局面において、組織切片を、脱パラフィン化、すなわち、パラフィンを除去し、続いて、例えば、クエン酸緩衝液 (Vector Laboratories から入手可能である) を使用して、高温で処理、例えば、97 °C で 45 分間処理するエピトープ回復を行う。ブロッキング (例えば、Protein Block Serum-Free (カタログ番号 X0909、DAKO Deutschland GmbH から入手可能) を用いて) した後、組織切片を、一次抗体と、例えば、本明細書において報告される抗体の場合、127.5 ng/ml の濃度で 60 分間インキュベートする。その後、結合した抗体を、例えば、Envision ポリクロナルウサギ検出キット (DAKO Deutschland GmbH) で決定する。最後に、標本を対比染色、脱水及びマウントする。

20

【 0 1 8 0 】

2 . 癌細胞の E P O 受容体の状態を決定することによる患者の層別化

患者からのサンプル材料は、例えば、癌疾患を処置するために実施される腫瘍摘出からの組織材料から又は腫瘍生検によるかのいずれかで採取する。採取した腫瘍組織は、ホルマリンで固定し、標準的な組織学的手順に従ってパラフィンに包埋する。本明細書において報告される抗 E P O 受容体抗体を使用する免疫組織化学は、この腫瘍材料の切片で実施する (上記及び実施例を参照) 。染色した組織切片の組織病理学的評価から、その腫瘍組織が、E P O 受容体に陽性であるか又は陰性であるかを決定することができる。この評価は、規定した断面積における腫瘍細胞の染色強度及び染色した腫瘍細胞の数を考慮する採点システムに基づくことができる。

30

【 0 1 8 1 】

患者の腫瘍組織の E P O 受容体の状態を評価することは、癌患者の最適な処置を決定するための基準となりうる。これには、腫瘍進行の予後、放射線療法、化学療法、特異的な抗腫瘍剤による療法のような抗腫瘍療法の強さ、腫瘍性疾患関連貧血の化学療法の処置、患者の貧血症状を治すために使用される赤血球生成促進剤 (E S A) の用量又は投与計画の変更、E S A を用いた抗貧血処置の中断、ある特定の種類の E S A から別の種類の E S A への変更、E S A を用いた抗貧血処置から血液又は分離もしくは濃縮した赤血球 (濃厚赤血球) の輸血への切り替え、あるいは、E S A を用いた今後の処置の延期又は中止の決定が含まれる。

40

【 0 1 8 2 】

E S A は、例えば、エリスロポエチン受容体の刺激によって赤血球生成を刺激する薬剤、例えば、組み換えヒトエリスロポエチン又はエポエチン、改変エリスロポエチン、連続エリスロポエチン受容体刺激薬、小分子もしくはペプチド性エリスロポエチン受容体アゴニスト、低酸素誘導因子の安定剤などである。

【 0 1 8 3 】

50

D. 診断及び検出のための方法及び組成物

特定の態様において、本明細書において提供される任意の抗ヒトEPO受容体抗体は、生体サンプル中のヒトEPO受容体の存在を検出するために有用である。用語「検出する」は、本明細書において使用されるように、定量的又は定性的検出を包含する。特定の態様において、生体サンプルは、細胞又は組織、例えば、PBMC（末梢血単球細胞）、正常もしくは疾患組織、新鮮な組織、凍結組織、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織からの組織切片又はサンプルを含む。

【0184】

一態様において、診断又は検出方法で使用するための抗ヒトEPO受容体抗体が提供される。さらなる局面において、生体サンプル中のヒトEPO受容体の存在を検出する方法が提供される。特定の態様において、該方法は、生体サンプルと本明細書に記載される抗ヒトEPO受容体抗体を、抗ヒトEPO受容体抗体のヒトEPO受容体への結合を許容する条件下で接触させること、及び抗ヒトEPO受容体抗体とヒトEPO受容体間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。そのような方法は、*in vitro*での方法であっても、*in vivo*での方法であってもよい。一態様において、抗ヒトEPO受容体抗体は、例えば、ヒトEPO受容体が、患者の選択及び/もしくは層別化のための、又は治療で使用される用量を調整するためバイオマーカーである場合、組み換えヒトEPO（エポエチン）、高グリコシル化ヒトエリスロポエチン、エリスロポエチン受容体アゴニスト、エリスロポエチン模倣ペプチド、化学エリスロポエチン受容体活性化化合物又はその他の赤血球生成促進剤（ESA）を用いる治療に適する被験体を選択するために使用される。

10

20

【0185】

本発明の抗体を使用して診断されうる例示的な障害としては、例えば、癌、又は組織再生のための幹細胞のEPO受容体状態が含まれる。

【0186】

特定の態様において、標識した抗ヒトEPO受容体抗体が提供される。標識としては、直接的に検出される標識又は部分（蛍光、色素体、高電子密度、化学発光及び放射性標識など）、ならびに、例えば、酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドなどの部分が含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識としては、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H及び¹³¹I、フルオロフォア、例えば、希土類元素キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、蛍ルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、単糖類オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ（色素前駆体を酸化するために過酸化水素を用いる酵素、例えば、HRP、ラクトペルオキシダーゼ又はミクロペルオキシダーゼに結合したもの）、ピオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定フリーラジカルなどが含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0187】

E. 医薬製剤

本明細書に記載される抗ヒトEPO受容体抗体の医薬製剤は、所望の純度を有するそのような抗体と1つ又は複数の任意の薬学的に許容しうる担体（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)）を混合することにより凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製される。薬学的に許容しうる担体は、一般的に、用いられる用量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、該担体としては、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸及びその他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シ

50

クロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリシン；グルコール、マンノース又はデキストリンを含む、単糖類、二糖類及びその他の糖；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/又は非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）が含まれるが、これらに限定されない。本明細書の例示的な薬学的に許容しうる担体は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rhupH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）などの介在性薬物分散剤をさらに含む。rhupH20を含む、特定の例示的なSHASEGP及び使用方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号及び第2006/0104968号に記載されている。一局面において、SHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つ又は複数の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

10

【0188】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤には、米国特許第6,171,586号及びWO 2006/044908に記載される製剤が含まれ、後者の製剤には、ヒスチジン-酢酸緩衝液が含まれる。

20

【0189】

本明細書の製剤は、また、処置される特定の適応のために必要に応じて、二つ以上の活性成分、好ましくは、互いに悪影響を与えない補体活性を有する二つ以上の活性成分を含有してもよい。そのような活性成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせさせて適切に存在する。

【0190】

活性成分は、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）、又はマクロエマルジョンにおいて、例えば、コアセルベーション技術により又は界面重合により調製されるマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に封入してもよい。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980) に開示されている。

30

【0191】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例としては、抗体を含有する固体の疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、そのマトリックスは、造形品、例えば、フィルム又はマイクロカプセルの形態である。

【0192】

in vivo投与に使用される製剤は、一般的に、滅菌されている。滅菌は、例えば、滅菌濾過膜に通す濾過により容易に達成されうる。

40

【0193】**F. 治療法及び組成物**

本明細書において提供される任意の抗ヒトEPO受容体抗体は、治療法において使用してもよい。

【0194】

さらなる局面において、本発明は、医薬の製造又は調製における、抗ヒトEPO受容体抗体の使用を提供する。

【0195】

さらなる局面において、本発明は、本明細書において提供される任意の抗ヒトEPO受容体抗体を含む医薬製剤を提供する。一態様において、医薬製剤は、本明細書において提

50

供される任意の抗ヒトEPO受容体抗体と薬学的に許容しうる担体を含む。別の態様において、医薬製剤は、本明細書において提供される任意の抗ヒトEPO受容体抗体と、例えば、後述される少なくとも1つの追加の治療薬剤を含む。

【0196】

本発明の抗体は、治療において、単独で又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体は、少なくとも1つの追加の治療薬剤と同時に投与してもよい。

【0197】

上記のそのような併用療法は、併用投与（2つ以上治療薬剤が同じ又は別々の製剤中に含まれる場合）及び個別投与を包含し、個別投与の場合、本発明の抗体の投与は、追加の治療薬剤及び/又は補助剤を投与する前、同時及び/又は後に行うことができる。本発明の抗体は、また、放射線療法と組み合わせて使用することができる。

10

【0198】

本発明の抗体（及び任意の追加の治療薬剤）は、非経口、肺内及び鼻腔内、局所処置が望まれる場合の病巣内投与を含む、任意の適切な手段により投与することができる。非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与が挙げられる。投薬は、任意の適切な経路、例えば、注射、例えば、投与が短期であるか長期であるかに一部依存して、静脈内又は皮下注射によって行うことができる。非限定的に、単回投与又は様々な時点における複数回投与、ボラス投与及びパルス注入を含む、様々な投薬計画が本明細書において意図される。

20

【0199】

本発明の抗体は、医療実施基準（good medical practice）に合致するように製剤化、調薬及び投与されうる。この状況において考慮される要因としては、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与計画及び医師に公知の他の要因が挙げられる。抗体は、必ずしも必要でないが、場合により、問題の障害を予防又は治療するために現在使用されている1つ又は複数の薬剤と共に製剤化される。そのようなその他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は処置の種類、及び上記で考察されるその他の要因に依存する。これらは、一般的に、本明細書に記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又は本明細書に記載される用量の約1～99%で、又は適切であると実験的に/臨床的に決定された任意の用量及び任意の経路で使用される。

30

【0200】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体の適切な用量（単独で又は1つもしくは複数のその他の追加の治療薬剤と組み合わせて使用する場合）は、処理される疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防又は治療目的で投与されるかどうか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び抗体に対する応答、ならびに担当医の判断に依存するであろう。抗体は、一回又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。患者に投与する初期候補用量は、例えば、1回又は複数回の個別投与によるか、連続注入によるかに関わらず、疾患の種類及び重症度に依存して、抗体約1 µg/kg～15 mg/kg（例えば、0.1 mg/kg～10 mg/kg）でありうる。1つの典型的な一日用量は、前述の要因に応じて、約1 µg/kg～100 mg/kg以上の範囲でありうる。数日以上にわたって繰り返し投与する場合、状態に応じて、処置は、一般的に、疾患症状の所望の抑制が現れるまで持続されうる。抗体の一つの例示的な用量は、約0.05 mg/kg～約10 mg/kgの範囲でありうる。従って、約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg又は10 mg/kgの1つ又は複数の用量（又はそれらの任意の組み合わせ）を患者に投与してもよい。そのような用量は、断続的、例えば、毎週又は三週毎に投与してもよい（例えば、患者が、約2～約20用量、又は例えば、約6用量の抗体を摂取するように）。初期のより高い負荷用量に続いて、1つ又は複数のより低い用量が投与されうる。しかし、その他の用量レジメンも有用でありうる。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニタリングされる。

40

【0201】

50

任意の上記製剤又は治療法は、抗ヒトEPO受容体抗体の代わりに又は追加して、本発明の免疫コンジュゲートを使用して行ってもよいことが理解される。

【0202】

III. 製造品

本発明の別の局面において、上述される障害の治療、予防及び/又は診断に有用な材料を含有する製造品が提供される。製造品は、容器と容器上又は容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を含んでもよい。適切な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが含まれる。容器は、様々な材料、例えば、ガラス又はプラスチック製であってもよい。容器は、組成物を単独で、又は状態を治療、予防及び/もしくは診断するために効果的な別の組成物と組み合わせて保持し、また、無菌接続ポートを有していてもよい(例えば、容器は、皮下注射針で穿孔可能なストッパーを有する静脈注射用輸液バッグ又はバイアルであってもよい)。組成物中の少なくとも1つの活性剤が本発明の抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が選択された状態を処置するために使用されることを表示する。さらに、製造品は、(a)組成物を含有する第一の容器(該組成物は、本発明の抗体を含む);及び(b)組成物を含有する第二の容器(該組成物は、さらなる細胞毒性薬又はその他の治療薬剤を含む)を含んでもよい。本発明のこの態様の製造品は、組成物が特定の状態を処置するために使用することができることを表示するパッケージ挿入物をさらに含んでもよい。あるいは、又は追加的に、製造品は、注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液などの薬学的に許容しうる緩衝液を含む、第二(又は第三)の容器をさらに含んでもよい。これは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む、商業上及び使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含んでもよい。

10

20

【0203】

任意の上記の製造品は、抗ヒトEPO受容体抗体の代わりに又は追加して、本発明の免疫コンジュゲートを含んでもよいことが理解される。

【0204】

IV. 実施例

下記は、本発明の方法及び組成物の実施例である。様々なその他の態様が、上記に提供される一般的な説明を考慮して実施されることが理解される。

30

【0205】

実施例1

ヒトEPORの細胞内ドメインに対する抗体の生成

成熟ヒトエリスロポエチン受容体の残基347-371に対応する25アミノ酸合成ペプチド(LDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIV、配列番号02)を、免疫原(EPO受容体前駆体のアミノ酸残基371-395に対応する、配列番号03)として使用した。

【0206】

免疫化のために、C末端のシステイン残基を介して、ペプチドをKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)に結合した。ウサギを該タンパク質で4週毎に3~5回免疫した。特異的抗体の一次レベルスクリーニングを、確立された手順に従って、タンパク質又はビオチン化ペプチドのいずれかでコートしたELISAマイクロタイタープレートで試験することにより行った。

40

【0207】

ポリクロール血清を硫酸アンモニウムで沈殿させた。IgGをDEAEクロマトグラフィにより分離し、成熟hEPO受容体のアミノ酸残基361-371(配列番号01)を含有するペプチド提示カラム(peptide presenting column)で免疫親和性吸着することによりさらに精製した。プロピオン酸(pH2.6)を使用してIgGをカラムから回収した。TRIS緩衝液(2.5M、pH8.5)を使用して、得られた溶液をpH7.3に調整した。次に、精製したIgGを50mMリン酸カリウム/150mM KCl緩衝液で透析し、続いて、同じ緩衝液を使用してSuperdex 200カラム(GE Healthcare)でゲ

50

ル濾過し、最後に、0.2 μmのメンブランフィルターを使用して滅菌濾過した。

【0208】

実施例 2

EPO受容体を発現するHEL A細胞の生成

組み換えヒトEPO受容体(EPOR)を発現する安定にトランスフェクトされたHEL A細胞を生成するために、EPO受容体又はEPO受容体-eGFPをコードするレトロウイルス発現ベクター(細胞内C末端への融合タンパク質として、Invitrogen)及びpVSV-G(ラドウイルス科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)で一過性にトランスフェクトしたHEK293細胞からの上清を用いて、細胞を形質導入した。形質導入の2日後、培地を、0.2 mg/mlゼオシンを含有する新しい補填RPMIに交換した。

10

【0209】

一過性のトランスフェクション実験のために、FuGENEトランスフェクション試薬(Roche Molecular Biochemicals Cat. No. 1815075)を使用して、12ウェルプレート中のカバースリップ上に、1ml培地中、 8×10^4 のHEL A細胞をプレーティングした。詳しく述べると、97 μlのFCS不含RPMI 1640に3 μlのFuGENE 6を加え、室温で5分間インキュベートした。その後、1 μgのDNAミックスを加え、室温で15分間インキュベートした。最後に、カバースリップ上の細胞を含有する1mlの細胞培養培地に50 μlのDNA/FuGENE 6溶液を加えた。

20

【0210】

実施例 3

EPO受容体を発現するUT7細胞の生成

UT-7細胞株は、長期の増殖にEPOを必要とするヒト因子依存性赤白血病細胞株(ヒト骨髄急性骨髄性白血病細胞株DSMZ:ACC137)である。UT7細胞を、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%ウシ胎仔血清及び10 U/ml GM-CSFを補填したRPMI培地中に維持した。形質導入細胞(UT7/EPOR)を、0.4 mg/mlゼオシンを添加した非形質導入細胞と同じ培地(10 U/mlの代わりに25 U/ml GM-CSF)中で維持した。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)及び0.1%ウシ胎仔血清を補填したRPMI培地中で一晩インキュベートすることにより細胞を餓死させた。

30

【0211】

EPO受容体をコードするレトロウイルス発現ベクター及びpVSV-Gで一過性にトランスフェクトしたHEK293細胞からの上清を用いてUT-7細胞を形質導入した。形質導入の2日後、培地を、0.4 mg/mlゼオシン及び25 U/ml GM-CSFを含有する新しい補填RPMIに交換した。選択後、表面にEPO受容体を安定に発現するUT-7細胞の細胞株を得た。

【0212】

実施例 4

SDS-PAGE及びウエスタンブロッティング

標準的な手順及びInvitrogenのNuPAGEゲルシステムに従って、SDS-PAGE及びウエスタンブロッティングを実施した。異なる細胞数に対応する抽出物を、NuPAGE Novex 4-12% Bis-Trisゲルの各ラインにロードした。ゲル電気泳動後、タンパク質をPVDFメンブランに転写し、実施例1で得られた抗EPO受容体抗体と4℃で一晩インキュベートした。洗浄後、メンブランをコンジュゲート抗マウス又は抗ウサギIgG-HRPとインキュベートし、ECL試薬(LUMI-Light(登録商標)PLUSウエスタンブロッティング基質、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を使用して現像した。結果を図1に示す。

40

【0213】

実施例 5

50

B I A C O R E 分析

【 0 2 1 4 】

【 表 2 】

ペプチド	抗体	ka [1/Ms]	kd [1/秒]	t/2 解離 [分]	KA [1/M]	KD [nM]	Chi ² RU ²
EPOR (347-371)	GBb	7.9E+05	5.0E-04	23	1.6E+09	0.63	0.3
EpoR (361-371)	GBb	6.4E+05	1.1E-03	10	5.7E+08	1.8	0.1

10

【 0 2 1 5 】

EPO受容体フラグメントに結合する抗EPO受容体抗体GBbの動力学を25 で決定した。

【 0 2 1 6 】

抗体GBbは、EPO受容体フラグメント361-371に対してナノモルの親和性を示し、EPO受容体フラグメント347-371に対してナノモルの親和性を示す。該抗体は、高い解離定数(t/2解離)を示す。

【 0 2 1 7 】

ヤギ抗ウサギFc抗体を使用して、抗体GBbをセンサーチップのフローセルに捕捉し、続いて、EPO受容体フラグメント347-371又は361-371でそれぞれ灌流した。

20

【 0 2 1 8 】

測定は、B I A C O R E (登録商標) 3000装置により、HBS-EP-緩衝液(pH7.4)(10mM HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005%ポリソルベート20(w/v))中、25で行った。非特異的結合を減少させるために1.0mg/ml CMD(カルボキシメチルデキストラン)を加えた。GBb抗体は、対応する配列番号01のEPO受容体フラグメントに対してナノモルの結合親和性を示す。

【 0 2 1 9 】

実施例 6

30

免疫細胞化学 I

一過性にトランスフェクトしたHELA EPOR細胞上のEPO受容体に対する、親和性精製したポリクローナル抗体の免疫細胞化学分析を下記のように実施した。ガラスカバースリップ上で培養したHELA細胞を、EPO受容体-GFP融合タンパク質を一過性に発現するようにトランスフェクトし、PFA(パラホルムアルデヒド)で固定して、EPO受容体に結合したポリクローナル抗体の1.0~10µg/mlの精製IgGで染色した。CY3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。LEICA走査型共焦点レーザー顕微鏡SP2により、Alexa Fluor 488及びCY3で、それぞれ、488nm及び543nm励起を使用して標本を画像解析した。抗EPO受容体抗体の免疫反応性が、EPO受容体-GFP融合タンパク質の緑色蛍光と近接して共局在化することが見い

40

【 0 2 2 0 】

結果を図2に示す。

【 0 2 2 1 】

実施例 7

免疫組織化学 I I

HELA EPOR又はwt-HELA細胞(EPOR発現について陰性)のいずれか

50

からの異種移植組織の組織切片を脱パラフィン化し、続いて、クエン酸緩衝液 (Vector Laboratories) 中、97 で45分間エピトープ回復した。Labvision装置で自動染色を実施した。抗EPO受容体抗体を127.5 ng/mlの最終濃度で使用した。Envisionポリクローナルウサギ検出キット (DAKO Deutschland GmbH) を使用して一次抗体を検出した。Zeiss Axiovision Rel 4.8, Microscopeで撮像した (図3を参照)。

【0222】

実施例 8

UT-7細胞、ヒト臍帯静脈 (HUVEC) 及びヒト微小血管内皮 (HMVEC) 細胞のウエスタンブロット分析

実施例4に記載する方法を使用した。

10

【0223】

図4のパネルAは、EPO受容体フラグメントLDKWL LPRNPPSEDLPGPGGSVDIV (配列番号02) に結合する抗体の免疫反応性を示す。

【0224】

図4のパネルBは、EPO受容体フラグメントLPGPGGSVDIV (配列番号01) に交差吸着した抗体の免疫反応性を示す。

【0225】

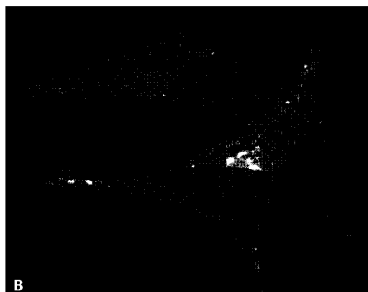
前述の発明は、理解の明確化を目的として、例示及び実施例によっていくらか詳しく記載したが、その説明及び実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。本明細書に引用される全ての特許及び科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み入れられる。

20

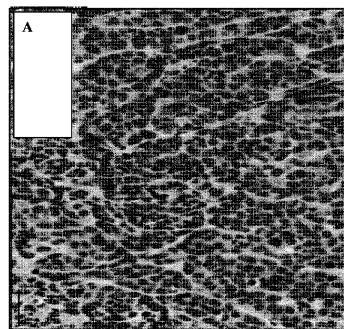
【図2A】



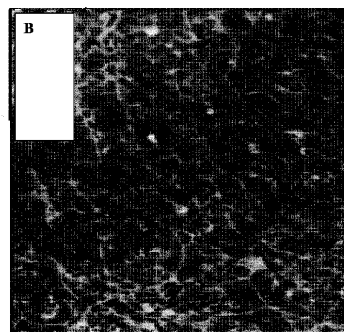
【図2B】



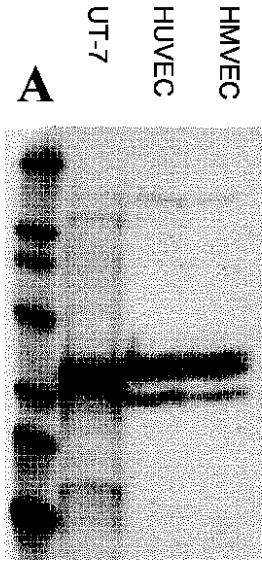
【図3A】



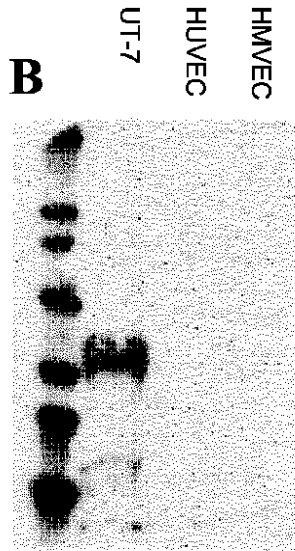
【図3B】



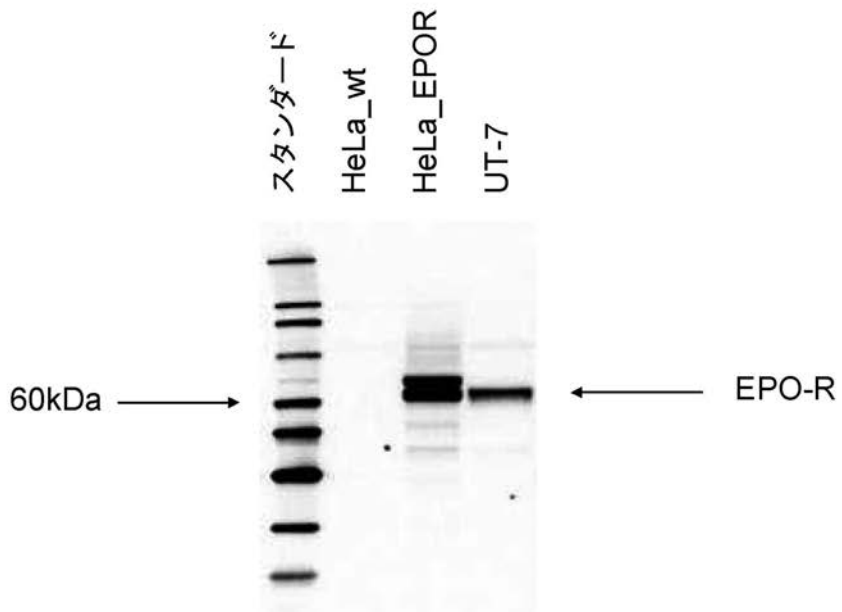
【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 1 】



【 配列表 】

[2014528693000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/061288

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/061288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K16/28
 ADD.

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/022924 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; JARSCH MICHAEL [DE]; KUBBIES MANFRED [DE]; MUN) 4 March 2010 (2010-03-04) cited in the application	1-6,8-20
A	the whole document in particular abstract page 1, line 25 - page 3, line 15 claims 1-13; figures 1-6; examples 1-9; sequence 01 ----- -/--	7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2012

Date of mailing of the international search report

31/08/2012

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

Ferreira, Roger

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/061288

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2010/054007 A1 (FABRUS LLC [US]; SMIDER VAUGHN [US]; GRAZIANO JAMES [US]; MAO HELEN HO) 14 May 2010 (2010-05-14) the whole document in particular abstract page 2, line 14 - page 28, line 13 page 329, line 18 - page 334, line 1 claims 1-305; figures 1-20; examples 12-15,18; table 18I -----</p>	1-20
A	<p>WO 2010/136192 A1 (ALEPOR GMBH & CO KG [DE]; JACKSON DAVID B [DE]; STEIN MARTIN [DE]; VOS) 2 December 2010 (2010-12-02) the whole document in particular abstract page 1, line 24 - page 10, line 29 page 71, line 31 - page 81, line 13 claims 1-21; figures 1-44; examples 1-17 -----</p>	1-20
A	<p>WO 2005/100403 A2 (ABBOTT LAB [US]; REILLY EDWARD B [US]; LACY SUSAN E [US]; FUNG EMMA [U]) 27 October 2005 (2005-10-27) cited in the application the whole document in particular abstract page 2, line 26 - page 6, line 6 page 32, line 1 - page 38, line 25 claims 1-61; figures 1-16; examples 1-21 -----</p>	1-20
A	<p>WO 2004/035603 A2 (ABBOTT LAB [US]) 29 April 2004 (2004-04-29) cited in the application the whole document in particular abstract page 3, line 1 - page 7, line 17 claims 1-60; figures 1-51; examples 1-12 -----</p>	1-20
A	<p>EP 1 146 056 A1 (AMGEN INC [US]) 17 October 2001 (2001-10-17) cited in the application the whole document in particular abstract paragraphs [0019], [0020] claims 1-15; figures 1-8; examples 1-9 -----</p>	1-20
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/061288

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 00/61637 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; ERICKSON MILLER CONNIE L [US]; HOLMES ST) 19 October 2000 (2000-10-19) cited in the application the whole document in particular abstract page 3, line 35 - page 5, line 6 claims 1-39; figures 1-9; examples 1-7 -----</p>	1-20
A	<p>WO 95/05469 A1 (LEE JONG Y [US]) 23 February 1995 (1995-02-23) cited in the application the whole document in particular abstract page 4, line 5 - page 5, line 13 claims 1-7; figures 1-6; examples 1-6 -----</p>	1-20
A	<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, SPRINGER VERLAG, MILAN, IT, vol. 2, no. 1, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 45-52, XP002511501, ISSN: 1591-8890, DOI: 10.1007/S102380200006 cited in the application the whole document -----</p>	1-20
A	<p>WU H ET AL: "Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 94, no. 5, 4 March 1997 (1997-03-04), pages 1806-1810, XP002526125, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.94.5.1806 the whole document -----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/061288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2010022924 A1	04-03-2010	CA 2733140 A1	04-03-2010		
		CN 102131829 A	20-07-2011		
		EP 2321350 A1	18-05-2011		
		JP 2012500818 A	12-01-2012		
		US 2011143372 A1	16-06-2011		
		US 2011165592 A1	07-07-2011		
		WO 2010022924 A1	04-03-2010		
		WO 2010054007 A1	14-05-2010	AU 2009313551 A1	14-05-2010
AU 2009313560 A1	14-05-2010				
CA 2742968 A1	14-05-2010				
CA 2742969 A1	14-05-2010				
EP 2356146 A1	17-08-2011				
EP 2356270 A1	17-08-2011				
JP 2012508016 A	05-04-2012				
JP 2012508017 A	05-04-2012				
US 2011318339 A1	29-12-2011				
US 2012058906 A1	08-03-2012				
WO 2010054007 A1	14-05-2010				
WO 2010054010 A1	14-05-2010				
WO 2010136192 A1	02-12-2010			AU 2010252304 A1	08-12-2011
				CA 2763278 A1	02-12-2010
		EP 2435581 A1	04-04-2012		
		US 2009306186 A1	10-12-2009		
		WO 2010136192 A1	02-12-2010		
WO 2005100403 A2	27-10-2005	AT 509953 T	15-06-2011		
		CA 2563295 A1	27-10-2005		
		EP 1732950 A2	20-12-2006		
		EP 2062917 A2	27-05-2009		
		JP 2008505612 A	28-02-2008		
		US 2005227289 A1	13-10-2005		
		WO 2005100403 A2	27-10-2005		
WO 2004035603 A2	29-04-2004	AU 2003282588 A1	04-05-2004		
		AU 2010214778 A1	23-09-2010		
		BR 0315275 A	30-08-2005		
		CA 2501984 A1	29-04-2004		
		EP 1578779 A2	28-09-2005		
		JP 4411472 B2	10-02-2010		
		JP 2006523083 A	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		
		TW I320716 B	21-02-2010		
		WO 2004035603 A2	29-04-2004		
		EP 1146056 A1	17-10-2001	AT 209218 T	15-12-2001
AT 356148 T	15-03-2007				
AU 697369 B2	01-10-1998				
CA 2195868 A1	08-02-1996				
CN 1158134 A	27-08-1997				
DE 69524102 D1	03-01-2002				
DE 69524102 T2	04-07-2002				
DE 69535419 T2	08-11-2007				
DK 0773962 T3	21-05-2002				

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/061288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		DK 1146056 T3	02-07-2007	
		EP 0773962 A1	21-05-1997	
		EP 1146056 A1	17-10-2001	
		ES 2168376 T3	16-06-2002	
		ES 2283355 T3	01-11-2007	
		JP 3225493 B2	05-11-2001	
		JP H09508535 A	02-09-1997	
		JP 2000095800 A	04-04-2000	
		NZ 290689 A	28-07-1998	
		PT 773962 E	31-05-2002	
		PT 1146056 E	31-05-2007	
		SI 773962 T1	30-06-2002	
		US 5885574 A	23-03-1999	
		US 6319499 B1	20-11-2001	
		US 2003215444 A1	20-11-2003	
		US 2007014793 A1	18-01-2007	
		US 2008182976 A1	31-07-2008	
		WO 9603438 A1	08-02-1996	
		ZA 9506215 A	03-01-1997	

WO 0061637	A1	19-10-2000	EP 1169352 A1	09-01-2002
			JP 2002544123 A	24-12-2002
			US 2005244409 A1	03-11-2005
			WO 0061637 A1	19-10-2000

WO 9505469	A1	23-02-1995	AT 323771 T	15-05-2006
			CA 2169629 A1	23-02-1995
			DE 69434704 T2	19-10-2006
			EP 0776370 A1	04-06-1997
			JP H09501833 A	25-02-1997
			US 5843726 A	01-12-1998
			US 2002031806 A1	14-03-2002
			WO 9505469 A1	23-02-1995

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 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 P 35/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, 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, I D, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

(74)代理人 100135873

弁理士 小澤 圭子

(74)代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(72)発明者 ヤルシュ, ミハエル

ドイツ国、8 3 6 7 0 パート・ハイルブルン、ウンターカルプフェー 1 1

(72)発明者 ムンディグル, オラフ

ドイツ国、8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、タッシーロリング 1 6

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 AA40 BA13 BB22 BB24 CB01 CB02 CB17 DA36

FA11 FA16 FA37 FB03 FB08 FB12 FB13 FB15 GC11 GC15

4B024 AA01 AA11 BA44 CA01 GA11 HA01 HA15

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 AA16 BB36 BB41 BB43 BB50 CC23 EE01 GG02

GG03 GG04 GG06

4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	抗人EPO受体抗体和使用方法		
公开(公告)号	JP2014528693A	公开(公告)日	2014-10-30
申请号	JP2014515188	申请日	2012-06-14
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ヤルシュミハエル ムンディグルオラフ		
发明人	ヤルシュ,ミハエル ムンディグル,オラフ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/28 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/48 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	C07K16/2863 C07K2317/34 C07K2317/92 C07K16/2869 G01N33/56966		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 C07K16/28 G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/531.A G01N33/48.P A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC11 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 田中洋子 阿基奥·希巴达		
优先权	2011170020 2011-06-15 EP		
其他公开文献	JP5984919B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文报道了特异性结合人EPO受体的抗体，其中所述抗体与EPO受体片段LPGPGGSVDIV (SEQ ID NO : 01) 结合，但不与可从人内皮细胞获得的蛋白质特异性结合，所述蛋白质的分子量为约66 kD。

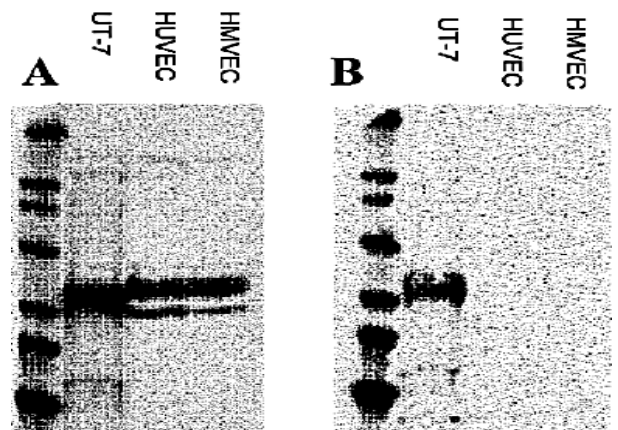


Figure 4

