

(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2017-511330

(P2017-511330A)

(43) 公表日 平成29年4月20日(2017.4.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18 ZNA	4H045
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574 A	
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2016-560438 (P2016-560438)
 (86) (22) 出願日 平成26年7月18日 (2014.7.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年10月20日 (2016.10.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2014/082480
 (87) 国際公開番号 WO2015/149450
 (87) 国際公開日 平成27年10月8日 (2015.10.8)
 (31) 優先権主張番号 201410125627.X
 (32) 優先日 平成26年3月31日 (2014.3.31)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 516291169
 天津市応世博科技发展有限公司
 中華人民共和国、天津市 300384、
 西青高端金属製品工業区盛達二支路29号
 エー区 1009
 (74) 代理人 110001807
 特許業務法人磯野国際特許商標事務所
 (72) 発明者 応 国光
 中華人民共和国、天津市 300384、
 西青高端金属製品工業区盛達二支路29号
 エー区 1009
 (72) 発明者 劉 博
 中華人民共和国、天津市 300384、
 西青高端金属製品工業区盛達二支路29号
 エー区 1009

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 EHD2抗体とその乳がん免疫組織化学的検出試薬の製造への応用

(57) 【要約】

ヒトEHD2タンパク質の発現及び細胞内局在、特に核での発現状況が、顕著に乳がん患者の生存率に相関することから、乳がんの悪性度の診断及び予後の事前判定の一つの分子マーカーとすることができる。本発明では、ヒトEHD2抗体及びその乳がん免疫組織化学的検出試薬の製造への応用を提供する。前記抗体は、ヒトEHD2タンパク質を特異的に認識でき、前記認識部位のアミノ酸配列が503-SEQ ID NO:1~543であることを特徴とする。

【選択図】図6

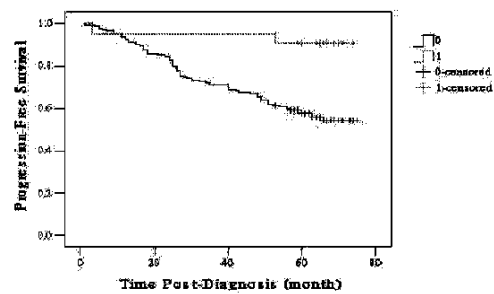


图6 / FIG. 6

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト E H D 2 タンパク質に特異な抗体であって、前記ヒト E H D 2 タンパク質を特異的に認識でき、前記認識部位のアミノ酸配列が 5 0 3 - S E Q I D N O : 1 ~ 5 4 3 である、ことを特徴とするヒト E H D 2 タンパク質に特異な抗体。

【請求項 2】

Gene Bank 国際汎用の配列番号が NM__014601 である遺伝子 E H D 2 及びそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法の診断と予後の事前判定への応用であって、前記遺伝子 E H D 2 のコード化タンパク質の Gene Bank 国際汎用の配列番号が NP__055416 である、ことを特徴とする遺伝子 E H D 2 及びそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法の診断と予後の事前判定への応用。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体を採用した、ことを特徴とする請求項 2 に記載の遺伝子 E H D 2 及びそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法的な診断と予後の事前判定への応用。

【請求項 4】

遺伝子 E H D 2 の Gene Bank 国際汎用の配列番号が NM__014601 である、ことを特徴とする遺伝子 E H D 2 及びそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法診断と予後の事前判定用試薬を製造することへの応用。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の抗体を採用した、ことを特徴とする請求項 4 に記載の遺伝子 E H D 2 及びそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法の診断と予後の事前判定用試薬を製造することへの応用。

20

【請求項 6】

アミノ酸配列が S E Q I D N O : 1 である、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 7】

前記アミノ酸配列をコア配列として修飾する、ことを特徴とする請求項 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記修飾は、ポリペプチドの N 末端に一つのシステイン酸を接続することである、ことを特徴とする請求項 7 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの、請求項 1 に記載の抗体を製造することへの応用。

【請求項 10】

抗体に対して抗原精製を行う、ことを特徴とする請求項 9 に記載の応用。

【請求項 11】

請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの、E H D 2 に特異な抗体を製造することへの応用。

【請求項 12】

抗体に対して抗原精製を行う、ことを特徴とする請求項 11 に記載の応用。

40

【請求項 13】

請求項 1 に記載の抗体を一次抗体又はコア抗体として採用する、ことを特徴とする乳がん診断と予後の事前判定用の免疫組織化学試薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、バイオテクノロジーの分野に係る。具体的には、E H D 2 の発現及び細胞内局在が、顕著に乳がん患者の生存率に相関することから、乳がんの悪性度の診断及び予後の事前判定の一つの分子マーカーとすることができる。

50

【背景技術】

【0002】

乳がんは、女性でよく見られる悪性腫瘍である。毎年、世界中で百万人の女性が罹患し、1970年代末から、中国で乳がんの罹患率は今まで女性の腫瘍の首位を占めている。以前、北アメリカ、北欧が乳がん発生率の高い区域であったが、現在、中国での罹患率は、五年前の十万分の十七から去年の十万分の五十二に増加し、迅速に上昇する傾向にあり、かつ発症年齢もますます低年齢化し、年齢が最も小さいのは十四歳だけである。乳がんを誘発する要因は多方面にあり、遺伝要因以外に、環境要因、精神的要因及び仕事のストレスが高いなどの要因もある。かつ、経済が発達した都市ほど罹患率は農村より高い。現在、世界諸国は、積極的な予防対策をとるように大きな精力と物資を投入して該疾患の発生、進行を研究している。

10

現在、臨床では、主に組織病理学のレベルに基いて腫瘍組織と腫瘍細胞に対して通常の形態観察を行うことにより腫瘍の悪性度を判別し、癌細胞の分化程度と浸潤の特徴に対して高い認識能力を有し、正確率は50%~75%に達することができる。しかしながら、このような形態学に基づいた解釈は、病理学の医師の経験などの人的要因に影響され、他方、患者個体の発症要因に関連するより深いレベルの分子レベルでの証拠が足りないため、判断の正確性と特異性を向上させ、特に個別化治療手段と方案の選択に理論的証拠を提供するために、現代の分子技術と組み合わせる必要がある。

【0003】

腫瘍の発生は多種の要因に関連するが、最終的な根源として、主に遺伝子の増殖、突然変異、欠失、異所発現などを含む遺伝子レベルの異常な変化に起因するため、細胞の正常な生理学的状態を維持することに必要な複数の機能タンパク質が発現レベルの高低、生化学的活性の強弱、さらに細胞内構造での分布などの面で変化し、このような変化により細胞に無制限増殖能力と移転能力を付与し体内外の保護メカニズムで逆転又は殺滅できないと、腫瘍が発生する。したがって、腫瘍の悪性本質を深刻に認識し効果的に抑制するためにこれらの機能タンパク質分子の変異状況を明確にすることは、免疫組織化学的方法を必要とする。

20

免疫組織化学技術は、免疫学の抗原抗体反応の基本的な原理を用いて、抗体による体内のタンパク質分子抗原の特異性の認識、及び化学的に(ルシフェリン、酵素、金属イオン、アイソトープなど)標識した二次抗体の発色などの作用により、組織細胞におけるターゲット抗原(ポリペプチドとタンパク質)の発現量とその細胞内局在を検出する。近年、免疫組織化学技術が発展し様々な特異的抗体が成功裏に開発され、さらに腫瘍分子メカニズムへの認識がますます深くなるにつれて、免疫組織化学の腫瘍の診断及び鑑別における応用価値は普遍的に認められた。例えば、エストロゲン受容体ER、プロゲステロン受容体PR及び上皮成長因子受容体ファミリーのHer2は、既に乳がんの臨床分子病理学的診断に広く応用され、乳がんの病理学的分類と臨床投薬で積極的な指導的役割を果たす。これらの成果は腫瘍の基礎研究の進歩に欠かせず、かつ新たな分子マーカーが開示され臨床で応用され、腫瘍の診断治療レベルをさらに向上させることが期待されている。EHD2遺伝子とそのコード化タンパク質は、このような新たな分子マーカーとなる可能性がある。

30

40

【0004】

EHD2(Epsin homology(EH)-domain-containing proteins)は、EHDタンパク質の一種であり、新規な膜輸送制御タンパク質であり、高度に保守的なEHドメインを含有し、このEHドメインは約100個のアミノ酸残基を含有する断片であり、最初、EGFRの酵素基質Eps15(Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate Clone15)から発見された。EHD2は、細胞膜内輸送、前後封入体の移行及び制御循環経路を含む細胞膜転送の各制御と、消化分解及び循環再生を含む膜及び膜タンパク質の各調節に関与する。細胞膜輸送メカニズム全体の不可欠な重要な一環であり、様々な細胞活動において物質輸送シグナル伝達の動的バランスを維持することに重要な役

50

割を果たし、その異常はシグナルの応答不当、細胞の機能障害をもたらし、さらに病気を引き起こす可能性がある。

非特許文献1には、乳腺腫瘍でEHD2の遺伝子発現異常が減少することが開示され、該遺伝子が新たな乳がん抑制遺伝子である可能性があることが示唆されている。しかし、免疫組織化学の更なる研究により、EHD2の全体的発現量が減少する傾向にあるが、このような傾向は主に核にあり、逆に、細胞質での発現が上昇する傾向にある。また、EHD2の核での発現レベルは患者の生存状況と密接に関連する。したがって、EHD2に対して免疫組織化学的検出を行うと、腫瘍の異化の本質と患者個体の臨床予後状況をより客観的で正確に反映することができる。

【0005】

従来の商業化したEHD2抗体は十数種あり、主流の抗体試薬メーカーのSanta CruzとAbcamなどによって提供されるが、いずれも基礎研究用試薬であり、これらの抗体が我々の抗体のように合格した特異性を有しかつ免疫組織化学的検出に利用できることを証明した依拠がなく、特に、現在、大量の組織標本の免疫組織化学的検証を経てEHD2の細胞内局在異常に対する検出により腫瘍の悪性度と患者の生存状況について予後の事前判定を行うという目的を達成できることを示したどんなEHD2抗体もない。本願の抗体に比べて、それらは以下のような欠点がある。

1、当分野における公知の常識により、免疫組織化学(IHC)に利用できる抗体であればその使用説明に明らかに標識し明記するわけであるが、これらの抗体の説明に示したように、多数は免疫組織化学的(IHC)検出に利用できない。ごく少数の抗体は于免疫組織化学(IHC)に利用できると明示したが、詳細に研究するとそうではない。南京森貝伽会社が代理したEHD2抗体はその1つであるが、膜局在しか検出できないことを明記した。もう1つはProteintech社の製品番号11440-1-APの抗体であるが、この抗体の特異性には、まず、免疫プロット検出で取得した主なシグナルの位置が明らかに60kDより小さく、70kDの正常な位置のシグナルが非常に弱いので、EHD2を検出できるが、その他の未知の分子がより多く検出されることを示し、次に、その社が公表した該抗体の肺癌組織に対する免疫組織化学画像から見えるように、染色シグナルが明らかな基質成分の非特異性着色であるという問題が存在している。

2、これらの抗体はいずれも研究用試薬であり、大量サンプルの臨床症例で試験又は検証されず、キーとなるEHD2に対する核局在検出能力がないので、「EHD2の細胞内局在異常に対する検出により腫瘍の悪性度と患者の生存状況について予後の事前判定を行うという目的を達成できる」ことの前提と条件はない。

【0006】

3、いずれも厳しい免疫プロット特異性の検証、特にEHD2タンパク質の相同タンパク質のEHD1、EHD3、EHD4との交差反応の免疫プロット実験検証を行っていないが、それらの間に高い相同性(>70%)を有するので、これらの検証はEHD2の免疫組織化学的検出方法にとって特に重要である。

非特許文献2には、その自製のEHD2抗体が開示され、この抗体は、我々の抗原精製を行っていない抗体を採用し、免疫プロット検出に用いることができるが、免疫組織化学的検出の高い特異性の要件を満足できない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】「EHD2による不死化乳房上皮細胞の増殖と転位への干渉影響」王洪玉ら、中国腫瘍臨床、2011年第38巻第11期

【非特許文献2】「EHD2低下調節による乳房上皮細胞形質転換促進の研究」田剛ら、現代医学検診雑誌(中国)、2012年第27巻第1期、49~51

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

10

20

30

40

50

我々は、免疫組織化学研究において、正常上皮細胞の中でEHD2が主に細胞核に分布するとともに、細胞質と膜の中でも少量発現されることを発見した。しかし、乳癌組織の中で、EHD2の局在は異変し、核での分布が顕著に低下し、質と膜での分布が上昇する傾向になる。臨床要因の分析結果によると、EHD2の核での分布状況が患者の予後と密接に関連し、核発現が低いほど患者の生存状況が悪いことを表明した。これらの発見は、乳がんの悪性度が癌組織細胞の中のEHD2タンパク質の発現位置及び発現レベルに異変が発生する度合いと密接に関連することを示し、免疫組織化学技術は、このような発現障害の度合いを検出する唯一の信頼できる手段である。したがって、EHD2遺伝子の発現生成物の癌細胞内部での異なる位置、特に核での発現状況を検出する方法を提供することは、従来技術で解決が必要な課題となる。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するために、本発明は以下の技術的手段と方法を提供する。

ヒトEHD2タンパク質に特異な抗体であって、ヒトEHD2タンパク質を特異的に認識でき、前記認識部位のアミノ酸配列が503-SEQ ID NO:1~543であることを特徴とする。

遺伝子EHD2とそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法的診断と予後の事前判定における応用であって、前記遺伝子EHD2のGeneBank国際汎用の配列番号がNM_014601であり、前記遺伝子EHD2のコード化タンパク質のGeneBank国際汎用の配列番号がNP_055416である。

20

遺伝子EHD2とそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法的な診断と予後の事前判定における応用であって、前記抗体を採用したことを特徴とする。

【0010】

遺伝子EHD2とそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法診断と予後の事前判定用試薬の製造における応用であって、前記遺伝子EHD2のGeneBank国際汎用の配列番号がNM_014601である製造。

遺伝子EHD2とそのコード化タンパク質の、乳がん免疫組織化学法的診断と予後の事前判定用試薬の製造における応用であって、前記抗体を採用したことを特徴とする。

ポリペプチドであって、前記ポリペプチドのアミノ酸配列がSEQ ID NO:1であることを特徴とする。

30

好ましくは、前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドのアミノ酸配列をコア配列として修飾し、前記修飾がポリペプチドのN末端に一つのシステイン酸を接続することである。

前記ポリペプチドの、前述の抗体の製造における応用である。

前記応用は、好ましくは抗原として動物に免疫させてEHD2抗体を製造することである。

前記ポリペプチドの、EHD2に特異な抗体の製造における応用である。

前記応用は、好ましくは抗体に対して抗原精製を行うことである。

乳がん診断と予後の事前判定用の免疫組織化学試薬であって、ヒトEHD2タンパク質に特異な前述の抗体を一次抗体又はコア抗体とすることを特徴とする。

【0011】

40

本発明の明細書で用いた用語について、

「遺伝子EHD2のコード化タンパク質」は、「EHD2タンパク質」である。当業者は、明細書で「EHD2の発現」に言及すると、「遺伝子EHD2とそのコード化タンパク質の発現」を指すと理解すべきである。

「コア配列」は、ヒトEHD2タンパク質(genebankタンパク質番号NP-055416)の第503~543位置のアミノ酸配列であり、該コア配列に対応するポリペプチド断片は、化学合成後又は組換え発現後に修飾されるか又は修飾せずに、EHD2に特異な抗体を生成するように免疫に用いることができる。

「修飾」は、上記コア配列に対応するポリペプチド断片に対して化学的方法又はDNA組換えなどの従来の方法でアミノ酸を追加し、化学基をカップリングし、又は媒質を精製

50

することであり、免疫に用いて抗体を生成するか又は抗体に対して抗原精製を行うことを目的とする。

【0012】

我々の研究によると、遺伝子 E H D 2 の発現生成物が乳房上皮細胞の癌化の場合に発現の分散が障害する傾向にあり、その障害度合い、特に核発現状況が患者の生存状況と密接に関連し、免疫組織化学技術で検出しかつ結果を人的に解読することがこのような遺伝子の細胞内の異なる位置での発現障害度合いを理解する唯一の信頼できる手段であることを発見した。しかし、従来 E H D 2 抗体の多くは免疫組織化学的検出に用いることができず、免疫組織化学的検出に用いることができると主張された抗体は、合格した特異性を示した免疫プロットの証拠がなく、特に E H D 2 の相同タンパク質に対する交差反応性を排除できず、実際の応用で、細胞膜の中の E H D 2 タンパク質しかに対して反応せず重要な核の中の E H D 2 タンパク質を認識できず、或いは、検出したのが間質成分に対する非特異性シグナルに過ぎないことを発見した。

10

【0013】

また、従来抗体は、いずれも組織レベルで大量サンプルの検出と統計的分析を行って E H D 2 の核発現局在を認識する特性を有しかつ予後の事前判定に用いる作用を示していない。我々は、E H D 2 に特異な抗原精製を経た抗体とその免疫組織化学的検出試薬の製造における応用を提供する。本発明に係る E H D 2 抗体は、合格した特異性を有し、免疫プロット方法テストによると、E H D 2 タンパク質を特異的に認識し高度に相同のその他のタンパク質を認識できず、免疫プロット方法で E H D 2 タンパク質に対して定量的検出を行うことができ、免疫組織化学試薬として製造することにより組織細胞の中の E H D 2 の発現と局在状況を判断することに直接的に用いることもできる。特に、細胞核の中の E H D 2 の発現局在状況を監視することにより、乳がんの診断と予後の事前判定により上手く用いることができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】特異的検出の実施例1において取得された免疫プロット画像である。

【図2】免疫組織化学的検出の実施例1における正常な組織細胞の免疫組織化学画像である。

30

【図3】免疫組織化学的検出の実施例1における乳癌細胞の免疫組織化学画像である。

【図4】免疫組織化学的検出の実施例1における乳癌細胞の免疫組織化学画像である。

【図5】免疫組織化学的検出の実施例1における乳癌細胞の免疫組織化学画像である。

【図6】免疫組織化学的検出の実施例1における260個のサンプルの無増悪生存曲線図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、図面と実施例を参照しながら本発明を詳細に説明する。

【実施例1】

【0016】

抗体製造の実施例1：E H D 2 に特異な抗体の製造

40

(1) 試料の由来

ニューイングランドウサギは上海強耀生物から購入され、

ポリペプチド C D E E F A L A S H L I E A K L E G H G L P A N L P R R L V P P S K R R H K G S A E (該ポリペプチドは、アミノ酸配列が S E Q I D N O : 1 であるポリペプチドをコア配列として修飾して得られ、その修飾方法は N 末端に一つのシステイン酸を接続することである) は天津賽爾生物技術有限公司にカスタムしかつ K L H とカップリングされ、

C N B r で活性化したゲルビーズ、完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバントは I n v i t r o g e n 社から購入される。

(2) 動物免疫

50

3匹の4月齢のニューイングランドウサギに対して、100ugの抗原のポリペプチドを0.2mlの0.1MのPBS(pH7.2)に溶解し、同体積の完全フロイントアジュバントと十分に混合し、腹部皮下で多点注射する。第一回免疫後の15日と29日に、それぞれ100ugのポリペプチド/0.2mlのPBSを同体積の不完全フロイントアジュバントと十分に混合した後に免疫を強化する。

【0017】

(3) EHD2抗血清の製造

免疫が終了した1週間後に頸動脈から採血し、37℃で3時間静置した後に遠心分離して血清を取得する。

(4) 抗原ゲルビーズの製造

CNBrで活性化したゲルビーズを1mMのHClに30分間浸漬し、カップリング緩衝液(0.1MのpH8.3のNaHCO₃と0.5MのNaClを含む)で洗浄し、1mgのポリペプチドあたりに1mlのゲルを添加する割合で反応系を混合し、4度で一晩カップリングし、1Mのエタノールアミンで3時間浸漬した後に洗浄液1(50mMのTrisと1MのNaClを含み、pH8.0である)と洗浄液2(50mMのグリシンと1MのNaClを含み、pH3.5である)で交代して8回洗浄し、PBSで1回洗浄する。

(5) EHD2抗体の精製

血清と上記抗原ゲルビーズを20:1の体積比で混合し、混合後の系と同体積のPBSを添加し、均一に1時間混合した後に遠心分離し、PBSでゲルビーズを洗浄し、pH3のクエン酸ナトリウム溶液でゲルビーズにカップリングされた抗体を溶離し、pHを6.5~7.5に調節して、精製されたEHD2抗体を得る。

【0018】

検出の実施例1: EHD2抗体に対して免疫プロット法で特異的検出を行う。

(1) 試料の由来

293T細胞はアメリカのAmerican Type Culture Collection(ATCC)社から購入され、RPMI1940培養液、BSA、HRP標識抗ウサギ二次抗体、Lipo2000トランスフェクション試薬、RIPA熱分解液、BCAタンパク質濃度検出試薬、ECL化学発光検出試薬などはInvitrogen社から購入され、EHD1、EHD2、EHD3及びEHD4の発現プラスミドは自製である。

(2) 細胞培養

293T細胞をRPMI1940培養液に培養し、37℃、5%のCO₂で培養して単層で成長させ、細胞が継代する時にまず培養液を除去し、次にリン酸塩緩衝液(phosphate buffered saline、PBS)で2回洗浄し、0.05%のトリプシンを添加して2分間消化し、培養基を添加して消化を停止する。細胞は良好な状態を保ち、2日間で1代継代する。トランスフェクションの時にEHD1、EHD2、EHD3及びEHD4を発現するプラスミド及びトランスフェクション試薬をそれぞれ添加し、2日間後に細胞を収集して免疫プロット実験をする。

【0019】

(3) 免疫プロット方法

十分の数の様々な細胞を遠心管に残し、遠心分離した後にRIPA熱分解液で細胞を熱分解し、サンプルを煮込んで、さらに遠心分離する。サンプルを製造した後、BCA検出試薬でタンパク質濃度の測定を行う。

各サンプルからそれぞれ総量80ugのタンパク質を取ってSDS-PAGE電気泳動を行う。電気泳動が終了した後、ゲル上のタンパク質をPVDF膜に電気泳動で転写し、室温で5%の牛乳で1時間密封する。洗浄した後、一次抗体(実施例1において製造した抗体に1:2000でPBSと5%のBSAを添加する)と室温で1時間培養する。次に1:5000で希釈した抗ウサギ二次抗体と室温で1時間培養する。最後に化学発光検出試薬で検出し、検出結果は図3を参照する。その図から見えるように、本発明に係るEH

10

20

30

40

50

D 2 に特異な抗体は、E H D 2 タンパク質を特異的に認識できるが、相同のその他の E H D タンパク質を認識できない。

【 0 0 2 0 】

(4) 結果 :

抗 E H D 2 抗体は E H D 2 タンパク質に対する特異的免疫認識能力を有し、かつその他の相同タンパク質に対して交差反応しない。検出結果は図 1 を参照し、図面において、サンプル V e は空の発現ベクターであり、シグナルがなく、サンプル 1 は E H D 1 タンパク質を過剰発現し、シグナルがなく、サンプル 2 は E H D 2 タンパク質を過剰発現し、分子量 7 0 k d に対応する位置で一本の主なバンドが出現し、シグナルが明瞭であり、かつその他の明らかなバックグラウンドのバンドがなく、サンプル 3 は E H D 3 タンパク質を過剰発現し、シグナルがなく、サンプル 4 は E H D 4 タンパク質を過剰発現し、シグナルがない。以上から、本実施例に係る抗体は、正常な位置 7 0 k d で強烈なシグナルを有し、またその他の位置でいずれもシグナルがなく、その結果、本発明に係る抗体が優れた特異性を有することを示す。

10

【 0 0 2 1 】

免疫組織化学的検出の実施例 1 : E H D 2 免疫組織化学的検出

(1) 試料の由来 :

乳がん切片は天津市腫瘍病院の腫瘍組織サンプルバンクから入手され、通常のようにパラフィン脱去し、サンプル数が 2 6 0 である。一次抗体希釈液、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) で標識した汎用二次抗体、ジアミノベンジジン (D A B) 基質及び基質希釈液などは中杉金橋から購入される。

20

(2) 免疫組織化学的検出試薬の配合条件とサンプル組織の中の E H D 2 発現及び局在の検出方法

方法の主なステップは、組織切片のパラフィンを脱去して水で浸漬し、抗原を修復し、内在性ペルオキシダーゼをブロッキングし、1 : 2 0 0 で実施例 (1) で製造された抗体を一次抗体として滴下し、4 時間で一晚培養し、緩衝液で 5 m i n × 3 回洗浄し、汎用の H R P 酵素標識二次抗体を滴下し、室温で 3 0 分間培養し、緩衝液で 5 m i n × 3 回洗浄し、D A B が発色すると、再度染色し、脱水して切片を封止した後に顕微鏡で染色状況を観察することである。

【 0 0 2 2 】

(3) 結果 :

正常組織の中の E H D 2 は、上皮細胞核での発現が陽性であり、質又は膜での発現が弱陽性である。癌組織の中で、E H D 2 発現は障害し、かつ核発現が弱くなる傾向にある。典型的な免疫組織化学画像は図 2 ~ 図 5 を参照し、図 2 は正常組織の免疫組織化学画像であり、正常細胞 E H D 2 の上皮細胞核での発現を示し、図 3 ~ 図 5 は異なる乳がん組織サンプルの免疫組織化学画像であり、図 3 に示された乳がん組織サンプルの中の E H D 2 は、癌細胞の核と質でいずれも発現され、図 4 に示された乳癌組織サンプルの中の E H D 2 は、がん細胞核で発現されず、質で強く発現され、図 4 に示された乳がん組織サンプルの中の E H D 2 は、乳癌細胞での発現が全体的に欠失し、E H D 2 の癌細胞での発現が障害しかつ核発現が減少することを示す。2 6 0 例のサンプルの無増悪生存曲線図は図 6 を参照し、該図の凡例について、0 は核発現陰性であり、1 は核発現陽性であり、c e n s o r e d は死亡を示す。横座標は無増悪生存月であり、縦座標は無増悪生存症例パーセントである。

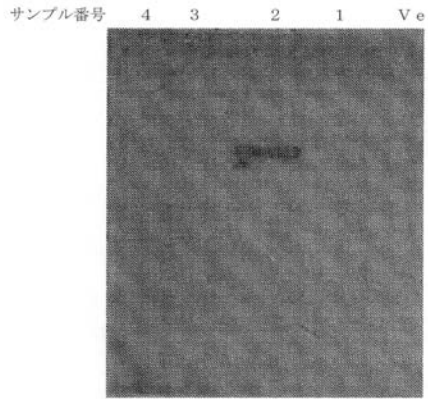
30

40

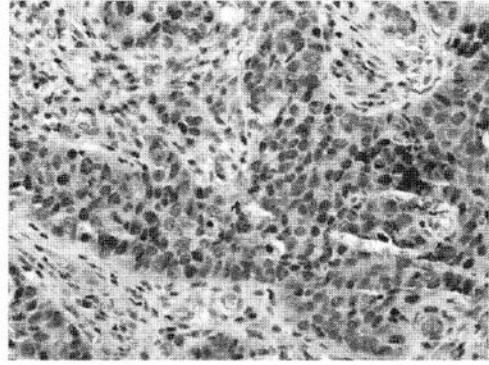
【 0 0 2 3 】

以上の実験結果によると、本発明に係る抗体をコアとした免疫組織化学的検出方法を用いると、乳がん組織細胞の中の E H D 2 の発現量と発現位置をより上手く検出し、免疫組織化学画像から E H D 2 の癌組織細胞核での局在と発現状況を直接的に解釈して乳がんの悪性度と患者生存の見通しを事前に判定できることを表明した。

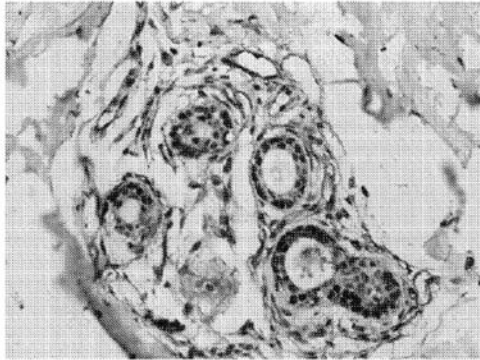
【 図 1 】



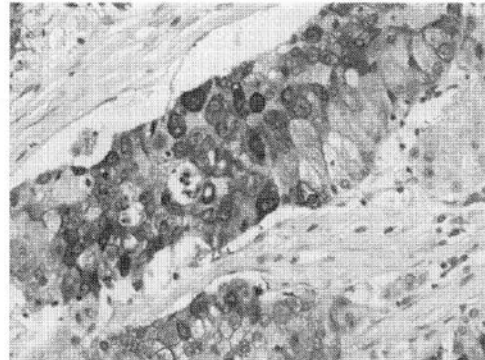
【 図 3 】



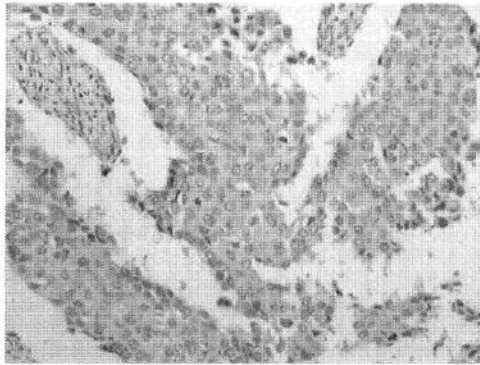
【 図 2 】



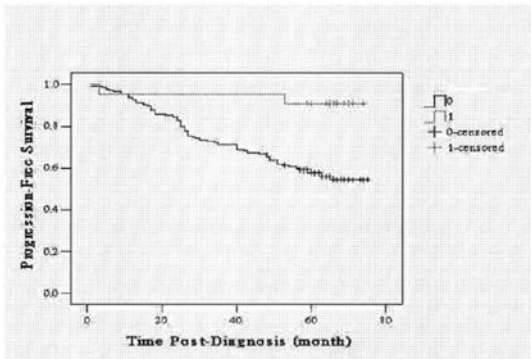
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2014/082480
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/18 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i; G01N 33/68 (2006.01) i; G01N 33/574 (2006.01) i; C07K 14/47 (2006.01) i 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; C12Q; 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 practicable, search terms used)		
CNABS; CNKI; DWPI; ISI Web of knowledge and keywords: ehd2, EH domain, epsin homology domain, antigen, antibod???, breast cancer, breast carcinoma Genbank; EMBL; STN Registry and the amino acid sequence: SEQ ID NO: 1		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008048193 A2 (AGENCY SCIENCE TECH & RES) 24 April 2008 (24.04.2008) see the whole document	1, 4-13
Y	GenBank Accession no. NP_055416, Version NP_055416.2, 02 February 2014 (02.02.2014), [Retrieved on 23 December 2014 (23.12.2014)], Retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_055416>	4
Y	GenBank Accession No. NM_014601, Version NM_014601.3, 02 February 2014 (02.02.2014), [Retrieved on 23 December 2014 (23.12.2014)], Retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/176866316> see the nucleotide sequence	4
<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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&"document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 December 2014	06 January 2015	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer JIA, Tao Telephone No. (86-10) 62411993	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/082480

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TIAN, Gang et al., Down-regulation of EHD2 Enhanced Transformed Growth of Breast Epithelial Cell, <i>Journal of Modern Laboratory Medicine</i>, 31 January 2012 (31.01.2012), vol. 27, no. 1, ISSN: 1671-7414</p> <p>see the abstract</p>	4
Y	<p>WANG, Hongyu et al., Effects of EHD2 Interference on Proliferation and Migration of Immortalized Breast Epithelial Cells HBL100, <i>CHINESE JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY</i>, 30 November 2011 (30.11.2011), vol. 38, no. 11, ISSN: 1000-8179</p> <p>see the abstract</p>	4
Y	<p>GUO, Lisha et al., EHD2 Regulation of the Polarity of Breast Mammary Epithelial Cells in 3D Culture, <i>CHINESE JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY</i>, 30 November 2011 (30.11.2011), vol. 38, no. 11, ISSN: 1000-8179</p> <p>see the abstract</p>	4
PX	<p>CN 103923212A (TIANJIN YINGSHIBO TECHNOLOGY DEV CO., LTD.) 16 July 2014 (16.07.2014)</p> <p>see the whole document, especially claims 1-10</p>	1, 4-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2014/082480**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:2-3

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

[1] Rule 39. 1(iv) PCT—Method for treatment of the human or animal body by therapy.

2. Claims Nos.:

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

3. Claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/082480

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2008048193 A2	24.04.2008	SG 142186 A1	28.05.2008
		EP 2082060 A2	29.07.2009
		WO 2008048193 A3	26.11.2009
		US 2011020317 A1	27.01.2011
		US 2014162254 A1	12.06.2014
CN 103923212 A	16.07.2014	None	

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2014/082480
A. 主题的分类 C07K 16/18(2006.01)i; C12Q 1/68(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12Q; G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS;CNKI和关键词: eh2, 抗原, 抗体, 乳腺癌 DWPI;ISI Web of knowledge和关键词:ehd2, EH domain, epsin homology domain, antigen, antibod???, breast cancer, breast carcinoma Genbank:EMBL:STN Registry和氨基酸序列; SEQ ID NO; 1		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2008048193 A2 (AGENCY SCIENCE TECH & RES) 2008年 4月 24日 (2008-04-24) 见全文	1, 4-13
Y	"GenBank登录号NP_055416, 版本NP_055416.2" , 2014年 2月 02日 (2014-02-02), [检索于23.12.2014(23.12.2014)], 检索自NCBI [联机]:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_055416, 见氨基酸序列	4
Y	"GenBank登录号NM_014601, 版本NM_014601.3" , 2014年 2月 02日 (2014-02-02), [检索于23.12.2014(23.12.2014)], 检索自NCBI [联机]:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/176866316, 见核苷酸序列	4
Y	田刚等. "EHD2下调促进乳腺上皮细胞转化的研究" 现代检验医学杂志, 第27卷卷, 第1期期, 2012年 1月 31日 (2012-01-31), ISSN: ISSN: 1671-7414, 见摘要	4
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2014年 12月 24日		国际检索报告邮寄日期 2015年 1月 06日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451		受权官员 贾涛 电话号码 (86-10)62411993

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/082480

c. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	王洪玉等. "EHD2干扰影响永生化乳腺上皮细胞的增殖和迁移" 中国肿瘤临床, 第38卷卷, 第11期期, 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30), ISSN: ISSN: 1000-8179, 见摘要	4
Y	郭立莎等. "EHD2调节乳腺上皮细胞极性的实验研究" 中国肿瘤临床, 第38卷卷, 第11期期, 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30), ISSN: ISSN: 1000-8179, 见摘要	4
PX	CN 103923212 A (天津市应世博科技发展有限公司) 2014年 7月 16日 (2014 - 07 - 16) 见全文, 特别是权利要求1-10	1, 4-13

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/082480

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求: 2-3
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] PCT实施细则39.1(iv) — 治疗人体或者动物体的外科手术或者疗法。
2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/082480

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2008048193	A2	2008年 4月 24日	SG	142186	A1	2008年 5月 28日
				EP	2082060	A2	2009年 7月 29日
				WO	2008048193	A3	2009年 11月 26日
				US	2011020317	A1	2011年 1月 27日
				US	2014162254	A1	2014年 6月 12日
CN	103923212	A	2014年 7月 16日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA51 FA71

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017511330A5	公开(公告)日	2018-06-14
申请号	JP2016560438	申请日	2014-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	天津市应世博科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津市应世博科技发展有限公司		
[标]发明人	应国光 劉博		
发明人	应国光 劉博		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/47 C07K2317/33 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57415		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/574.A G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA51 4H045/FA71		
优先权	201410125627.X 2014-03-31 CN		
其他公开文献	JP2017511330A		

摘要(译)

由于人EHD2蛋白的表达和亚细胞定位，特别是细胞核中的表达状态，与乳腺癌患者的生存率显著相关，因此它是诊断乳腺癌恶性程度和预后的分子标记之一。本发明提供了人EHD2抗体及其在乳腺癌免疫组织化学检测试剂生产中的应用。该抗体的特征在于其可以特异性识别人EHD2蛋白，并且该识别位点的氨基酸序列是503-SEQ ID NO : 1至543。[选择图]图6