

(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2009-517009

(P2009-517009A)

(43) 公表日 平成21年4月30日 (2009.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 14/505 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/505	4 B O 6 4
<b>C O 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 115 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-541750 (P2008-541750)	(71) 出願人	507399427
(86) (22) 出願日	平成18年11月23日 (2006.11.23)		ラボラトワ セローノ エス. エイ.
(85) 翻訳文提出日	平成20年7月7日 (2008.7.7)		スイス国 ヴォー、コインジンス 1 2 6
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/068859		7、インダストリエル センター
(87) 国際公開番号	W02007/060213	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開日	平成19年5月31日 (2007.5.31)		弁理士 浅村 皓
(31) 優先権主張番号	05111262.1	(74) 代理人	100072040
(32) 優先日	平成17年11月24日 (2005.11.24)		弁理士 浅村 肇
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100102897
(31) 優先権主張番号	05111265.4		弁理士 池田 幸弘
(32) 優先日	平成17年11月24日 (2005.11.24)	(74) 代理人	100088926
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 長沼 暉夫
(31) 優先権主張番号	60/753,668		
(32) 優先日	平成17年12月22日 (2005.12.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 エリスロポエチンポリペプチド及びそれらの使用

## (57) 【要約】

本発明は、特にヒト対象における治療的又は予防的処置のための E P O ポリペプチド及びそれらの使用に関する。本発明はまた、前記ポリペプチドをコードする核酸、このような核酸を含むベクター及びそれらを含む組換え細胞に関する。本発明はさらに、このようなポリペプチドを産生する方法、並びに任意のサンプル中のこれらポリペプチドを検出し、又は投薬する方法及びツールを開示する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物において実質的にヘマトクリットレベルを増加させることなく、前記哺乳動物、特にヒトにおける組織保護活性を有する単離エリスロポエチン変異ポリペプチド。

## 【請求項 2】

a) アミノ酸 56 から 193 までの少なくとも 1 つの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は；

b) アミノ酸 1 から 27 までの欠失及びアミノ酸 56 から 193 までの少なくとも 1 つの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は；

c) 配列番号 13 に示された配列を含むポリペプチド又は；

d) 配列番号 13 のアミノ酸 28 から 55 に示された配列を含むポリペプチド又は；

e)

## 【化 1】

E40Q, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F,  
SL131-132NF, T134D, G140R 及び S147C,

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は；

f)

## 【化 2】

I33A, C34S, C34A, R37I, V138S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E,  
R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T,  
C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A,  
F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R,  
K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I,  
L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A, S153A,  
T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y,  
F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A,  
G185A, C187S, C188A, 及び R189A,

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は；

g) 84 位、96 位、113 位、115 位、116 位又は 141 位に少なくとも 1 つの追加 N - 結合グリコシル化部位を含むことにより、a)、b)、c)、d)、e) 又は f) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド

からなる群から選択される請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

## 【請求項 3】

a) アミノ酸 56 から 193 までの少なくとも 1 つの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドからなるポリペプチド又は ;

b) アミノ酸 1 から 27 までの欠失及びアミノ酸 56 から 193 までの少なくとも 1 つの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドからなるポリペプチド又は ;

c) 配列番号 13 に示された配列からなるポリペプチド又は ;

d) 配列番号 13 のアミノ酸 28 から 55 に示された配列からなるポリペプチド又は ;

e)

【化 3】

10

E40Q, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F,

SL131-132NF, T134D, G140R 及び S147C,

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドからなるポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は ;

f)

20

【化 4】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E,

R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T,

C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A,

F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R,

K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I,

L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A, S153A,

30

T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y,

F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A,

G185A, C187S, C188A, 及び R189A,

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドからなるポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は ;

40

g) 84 位、96 位、113 位、115 位、116 位又は 141 位に少なくとも 1 つの追加の N - 結合グリコシル化部位を含むことにより、a)、b)、c)、d)、e) 又は f) とはまったく異なるポリペプチドからなるポリペプチドであって、前記位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は ;

h) a)、b)、c)、d)、e)、f) 又は g) のポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

i) a)、b)、c)、d)、e)、f) 又は g) のポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドからなるポリペプチド

からなる群から選択される請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 4】

50

a) 配列番号 3 のアミノ酸 5 4 (トレオニン) から 8 2 (グルタミン酸) までの少なくとも 1 つの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

b) 配列番号 3 のアミノ酸 5 4 (トレオニン) から 8 2 (グルタミン酸) までの少なくとも 1 つの欠失及びアミノ酸 1 から 2 7 までの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

c) 配列番号 4 に示された配列を含むポリペプチド又は ;

d) 配列番号 4 のアミノ酸 2 8 から 1 6 4 に示された配列を含むポリペプチド又は ;

e)

【化 5】

10

E40Q, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, SL131-

I32NF, T134D, G140R 及び S147C,

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は ;

f)

【化 6】

20

I33A, C34S, C34A, R37I, V138S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A, S153A, T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y, F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A, G185A, C187S, C188A, 及び R189A,

30

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は ;

40

g) 8 4 位、9 6 位、1 1 3 位、1 1 5 位、1 1 6 位又は 1 4 1 位に少なくとも 1 つの追加の N - 結合グリコシル化部位を含むことにより、a)、b)、c)、d)、e) 又は f) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド

からなる群から選択される請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 5】

a) 配列番号 3 のアミノ酸 5 4 (トレオニン) から 8 2 (グルタミン酸) までの少なくとも 1 つの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

b) 配列番号 3 のアミノ酸 5 4 (トレオニン) から 8 2 (グルタミン酸) までの少なく

50

とも 1 つの欠失及びアミノ酸 1 から 27 までの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は；

c) 配列番号 4 に示された配列からなるポリペプチド又は；

d) 配列番号 4 のアミノ酸 28 から 164 に示された配列からなるポリペプチド又は；

e)

【化 7】

E40Q, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, SL131-132NF, T134D, G140R 及び S147C,

10

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とは異なるポリペプチドからなるポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は；

f)

【化 8】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A, S153A, T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y, F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A, G185A, C187S, C188A, 及び R189A,

20

30

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドからなるポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は；

g) 84 位、96 位、113 位、115 位、116 位又は 141 位に少なくとも 1 つの追加の N - 結合グリコシル化部位を含むことにより、a)、b)、c)、d)、又は e) とは異なるポリペプチドからなるポリペプチドであって、前記位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は；

40

h) a)、b)、c)、d)、e)、f) 又は g) のポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含むポリペプチド又は；

i) a)、b)、c)、d)、e)、f) 又は g) のポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドからなるポリペプチド

からなる群から選択される請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

a) 配列番号 3 のアミノ酸 54 (トレオニン) から 142 (グルタミン) までの少なくとも 1 つの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は；

50

b) 配列番号 3 のアミノ酸 5 4 (トレオニン) から 1 4 2 (グルタミン) までの少なくとも 1 つの欠失及びアミノ酸 1 から 2 7 までの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

c) 配列番号 6 に示された配列を含むポリペプチド又は ;

d) 配列番号 6 のアミノ酸 2 8 から 1 0 4 に示された配列を含むポリペプチド又は ;

e)

【化 9】

E40Q, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, SL131-

132NF, T134D, G140R 及び S147C

10

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 1 0 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は ;

f)

【化 1 0】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E,

20

R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T,

C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A,

F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R,

K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I,

L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A, S153A,

T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y,

F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A,

30

G185A, C187S, C188A, 及び R189A,

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 1 0 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド又は ;

g) 8 4 位、9 6 位、1 1 3 位、1 1 5 位、1 1 6 位又は 1 4 1 位に少なくとも 1 つの追加の N - 結合グリコシル化部位を含むことにより、a)、b)、c)、d)、e) 又は f) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド

40

からなる群から選択される請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 7】

a) 配列番号 3 のアミノ酸 5 4 (トレオニン) から 1 4 2 (グルタミン) までの少なくとも 1 つの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドからなるポリペプチド又は ;

b) 配列番号 3 のアミノ酸 5 4 (トレオニン) から 1 4 2 (グルタミン) までの少なくとも 1 つの欠失及びアミノ酸 1 から 2 7 までの欠失により、配列番号 3 に示された配列とは異なるポリペプチドからなるポリペプチド又は ;

c) 配列番号 6 に示された配列からなるポリペプチド又は ;

50

d) 配列番号 6 のアミノ酸 28 から 104 に示された配列からなるポリペプチド又は ;  
e)

【化 1 1】

E40Q, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, SL131-  
132NF, T134D, G140R 及び S147C,

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は  
10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とは異なるポリペプチドを含むポリペプチ  
ドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定されるポリペ  
プチド又は ;

f)

【化 1 2】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E,  
R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T,  
C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A,  
F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R,  
K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I,  
L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A, S153A,  
T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y,  
F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A,  
G185A, C187S, C188A, 及び R189A,

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は  
10 の変異により、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドからなる  
ポリペプチドであって、前記変異の位置が、配列番号 3 のアミノ酸の位置に関して規定さ  
れるポリペプチド又は ;

g) 84 位、96 位、113 位、115 位、116 位又は 141 位に少なくとも 1 つの  
追加の N - 結合グリコシル化部位を含むことにより、a)、b)、c)、d)、e) 又は  
f) とは異なるポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記位置が、配列番号 3 のア  
ミノ酸の位置に関して規定されるポリペプチド ;

h) a)、b)、c)、d)、e)、f) 又は g) のポリペプチドと少なくとも 80 %  
のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

i) a)、b)、c)、d)、e)、f) 又は g) のポリペプチドと少なくとも 80 %  
のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドからなるポリペプチド

からなる群から選択される請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

a) 配列番号 8 に示された配列を含むポリペプチド又は ;

b) 配列番号 8 と少なくとも 75 % のアミノ酸配列同一性を有する配列を含むポリペ  
チド

からなる群から選択される単離ポリペプチド。

【請求項 9】

a) 配列番号 9 に示された配列を含むポリペプチド又は ;

10

20

30

40

50

- b) 配列番号 9 のアミノ酸 28 から 154 に示された配列を含むポリペプチド又は ;  
c)

【化 13】

E40Q, D70N, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F,  
T134D, G140R 及び SL131-132NF

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a) 又は b) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

- d)

【化 14】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E,  
R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T,  
C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A,  
F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R,  
K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I,  
L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A 及び L135S

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により、a) 又は b) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

- e) 57 位、78 位、79 位、80 位、82 位、84 位、96 位、113 位、115 位、116 位又は 141 位に少なくとも 1 つの追加の N 結合グリコシル化部位を含むことにより、a)、b)、c) 又は d) とはまったく異なるポリペプチドを含むポリペプチド ;

- f) a)、b)、c)、d) 又は e) のポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含むポリペプチド

からなる群から選択される請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

- a) 配列番号 8 からなるポリペプチド又は ;

- b) 配列番号 8 と少なくとも 75 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドからなるポリペプチド

からなる群から選択される請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

- a) 配列番号 9 からなるポリペプチド又は ;

- b) 配列番号 9 のアミノ酸 28 から 154 に示された配列からなるポリペプチド又は ;

- c)

【化 15】

E40Q, D70N, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, T134D,  
G140R 及び SL131-132NF

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 50



10 の変異により、a) 又は b) とは異なるポリペプチドからなるポリペプチド又は ;  
d)

【化 16】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E,  
R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T,  
C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A,  
F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R,  
K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I,  
L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A 及び L135S

10

からなる群から選択される 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は  
10 の変異により、a) 又は b) とはまったく異なるポリペプチドからなるポリペプチド  
又は ;

e) 57 位、78 位、79 位、80 位、82 位、84 位、96 位、113 位、115 位  
、116 位又は 141 位に少なくとも 1 つの追加の N - 結合グリコシル化部位を含むこと  
により、a)、b)、c) 又は d) とは異なるポリペプチドからなるポリペプチド ;

20

f) a)、b)、c)、d) 又は e) のポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸配  
列同一性を有するポリペプチドを含むポリペプチド又は ;

g) a)、b)、c)、d) 又は e) のポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸配  
列同一性を有するポリペプチドからなるポリペプチド

からなる群から選択される請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

追加のアミノ酸ドメインに作動可能に結合した請求項 1 から 11 までのいずれか一項に  
記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 13】

前記ポリペプチドが、GST 配列、His タグ配列、多量体化ドメイン、免疫グロブリン  
分子の定常領域又はヒト柔毛膜性生殖腺刺激ホルモン (hCG) などのヘテロ二量体タ  
ンパク質ホルモンに作動可能に結合した請求項 12 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 14】

請求項 1 から 13 までのいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする単離核酸分子

。

【請求項 15】

cDNA 分子である請求項 14 に記載の単離核酸分子。

【請求項 16】

【化 17】

40

配列番号 5, 配列番号 7, 配列番号 10, 配列番号 11, 配列番号 12

又はそれらの相補鎖若しくは縮重配列、或いは

【化 18】

配列番号 4, 配列番号 6, 配列番号 8, 配列番号 9, 配列番号 13

のポリペプチドをコードする核酸又は相補鎖からなる群から選択されるヌクレオチド配列

50

を含むか、又はそれからなる請求項 1 4 又は 1 5 に記載の単離核酸分子。

【請求項 1 7】

請求項 1 4 から 1 6 までのいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 4 から 1 6 までのいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項 1 7 に記載のベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項 1 9】

原核細胞又は真核細胞である請求項 1 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 0】

請求項 1 から 1 3 までのいずれか一項に記載のポリペプチドを産生する方法であって、請求項 1 8 又は 1 9 に記載の組換え宿主細胞を核酸分子の発現を可能にする条件下で培養すること、及び産生されたポリペプチドを回収することを含む方法。

10

【請求項 2 1】

活性な結合体又は複合体の形態である請求項 1 から 1 3 までのいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

ペグ化された請求項 2 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 3】

請求項 1 から 1 3 までのいずれか一項に記載のポリペプチドに選択的に結合する抗体、又はその断片若しくは誘導体。

20

【請求項 2 4】

モノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体である請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 2 5】

ヒト若しくはヒト化抗体、又はその断片若しくは誘導体である請求項 2 3 又は 2 4 に記載の抗体。

【請求項 2 6】

非相同部分に結合した請求項 2 3 から 2 5 までのいずれか一項に記載の抗体を含む免疫結合体。

【請求項 2 7】

薬剤として使用するための、請求項 1 から 1 3 まで又は請求項 2 1 若しくは 2 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 2 8】

請求項 1 から 1 3 まで又は請求項 2 1 若しくは 2 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1 4 から 1 6 までのいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 1 7 に記載のベクター、又は請求項 1 8 又は 1 9 に記載の細胞、及び薬学的に許容できる担体、賦形剤、又は安定化剤を含む医薬組成物。

【請求項 2 9】

患者の障害症状、EPO 発現又は活性の調節不全を含む障害を治療、予防又は改善する方法であって、請求項 2 8 に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む方法。

【請求項 3 0】

40

前記障害が、貧血、慢性腎不全患者の高血圧、小児透析患者、ヘマトクリット濃度不足に関連する疾患又は病態、化学療法治療に関係した障害、癌、循環器病、一次的神経系症状又は精神医学的症状を有する中枢神経系(CNS)疾患又は末梢神経系疾患からなる群から選択される患者の障害症状を治療、予防又は改善する方法であって、請求項 1 から 1 3 まで又は請求項 2 1 若しくは 2 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 2 8 に記載の医薬組成物の治療有効量を患者に投与することを含む方法。

【請求項 3 1】

患者の障害、即ち貧血、慢性腎不全患者の高血圧、小児透析患者、ヘマトクリット濃度不足に関連する疾患又は病態、化学療法治療に関係した障害、癌、循環器病、一次的神経系症状又は精神医学的症状を有する中枢神経系(CNS)疾患又は末梢神経系疾患からな

50

る群から選択される障害を治療するための薬剤の製造における、請求項 1 から 13 まで又は請求項 21 若しくは 22 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 28 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 32】

前記障害が、貧血、癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、虚血性再灌流傷害、心筋梗塞からなる群から選択される請求項 30 又は 31 に記載の方法又は使用。

【請求項 33】

前記障害が、慢性腎不全（CRF）に関連する貧血、ジドブジン治療 HIV 感染患者の貧血、化学療法又は放射線療法に対する癌患者の貧血、非骨髄性癌の進行に関連する貧血、ウィルス性感染（HIV など）に関連する貧血及び慢性疾患の貧血からなる群から選択される貧血であるか、又は腎臓、前立腺、卵巣又は乳房の腺癌、リンパ腫、白血病、多発性骨髄腫、中枢神経系に影響を及ぼす腫瘍からなる群から選択される癌である請求項 32 に記載の方法又は使用。

【請求項 34】

薬剤として使用するための、請求項 23 から 25 までのいずれか一項に記載の抗体、又はその断片若しくは誘導体。

【請求項 35】

請求項 23 から 25 までのいずれか一項に記載の抗体、又はその断片若しくは誘導体、及び薬学的に許容できる担体、賦形剤、又は安定化剤を含む医薬組成物。

【請求項 36】

対象における癌の症状を治療、予防又は改善する方法であって、請求項 23 から 25 までのいずれか一項に記載の抗体、又はその断片若しくは誘導体の治療有効量を患者に投与することを含む方法。

【請求項 37】

癌を治療するための薬剤の製造における、請求項 23 から 25 までのいずれか一項に記載の抗体、又はその断片若しくは誘導体の使用。

【請求項 38】

請求項 14 から 16 までのいずれか一項に記載の核酸又はその相補鎖に選択的にハイブリダイズする核酸プローブ。

【請求項 39】

請求項 1 から 13 までのいずれか一項に記載の EPO ポリペプチドをコードする核酸分子の少なくとも 1 つの特有の断片を増幅させるために使用できる核酸プライマー。

【請求項 40】

神経圧潰後、少なくとも約 0.02 ms の複合性筋活動電位（CMAP）潜伏時間の減少を誘導する請求項 1 から 13 まで又は請求項 21 若しくは 22 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 41】

ミエリン塩基性タンパク質（MBP）の産生を、好ましくは、少なくとも約 5% 刺激する請求項 1 から 13 まで、又は請求項 21 若しくは 22、又は請求項 40 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 42】

野生型 EPO の血液栄養活性の 50% 未満を保持する請求項 1 から 13 まで又は請求項 21 若しくは 22、又は請求項 40 若しくは 41 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 43】

ベースラインのヘマトクリット濃度と比較して、ヘマトクリット濃度を約 10% 未満増加させる請求項 1 から 13 まで、又は請求項 21 若しくは 22、又は請求項 40 から 42 までのいずれか一項に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【0001】

本発明は、特にヒト対象における治療的又は予防的処置のための新規なEPO（エリスロポエチン）ポリペプチド及びそれらの使用に関する。本発明はまた、前記ポリペプチドをコードする核酸、このような核酸を含むベクター及びそれらを含む組換え細胞、並びに対応する医薬組成物に関する。本発明はさらに、このようなポリペプチドを産生する方法、並びに任意のサンプル中のこれらポリペプチドを検出し、又は投薬する方法及びツールに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

エリスロポエチン（EPO）は、腎臓で産生される造血成長ホルモンであり、赤血球細胞（赤血球）の産生を刺激するのに関与している（Carnot, P及びDeflandre, C（1906）C. R. Acad. Sci. 143: 432頁；Erslev, A J（1953）Blood 8: 349頁；Reissmann, KR（1950）Blood 5: 372頁；Jacobson, LO、Goldwasser, E、Freid, W及びPlzak, LF（1957）Nature 179: 6331～4頁）。EPOは、骨髄中の拘束された赤血球前駆体の分裂及び分化を刺激し、赤血球前駆体上の受容体に結合することによりその生物活性を発揮する（Krantz, BS（1991）Blood 77: 419頁）。EPOは、細胞内リン酸化カスケードを作動させる2つの細胞表面エリスロポエチン受容体（EPOR）を結合させ、配向させることによって細胞を活性化する（Damen JE、Krystal G.（1996）Exp Hematol. 24（13）: 1455～9頁）。

10

20

## 【0003】

ヒトエリスロポエチンは、およそ34,000ダルトン（34kDa）分子量の酸性糖タンパク質である。天然のヒトEPOは、3つの形態：アルファ、ベータ及びアシアロで生じ得る。アルファ及びベータ形態は、炭水化物成分がわずかに異なるが、同じ効力、生物活性及び分子量を有する。アシアロ形態は、末端炭水化物（シアル酸）が除去されたアルファ又はベータ形態である。

## 【0004】

身体が健康状態である場合、EPOは、血漿中極めて低濃度で通常存在する。この正常な低濃度は、通常、細胞老化により失われる赤血球細胞の一定の低濃度補充を刺激するためには十分である。循環系中のEPO量は、循環系中の血液細胞による酸素輸送が減少する場合の低酸素状態で増加する。低酸素状態は、出血により血液の大量喪失、過剰の放射線曝露による赤血球細胞の破壊、高高度又は長期意識喪失による酸素摂取の減少、又は種々の形態の貧血により引き起こし得る。低酸素ストレスを受ける組織に応答して、エリスロポエチンは、骨髄中の始原前駆細胞の前赤芽球への変換を刺激することにより赤血球細胞の産生を増加させるが、前赤芽球は、その後成熟し、ヘモグロビンを合成し、赤血球細胞として循環系に放出される。循環系中の赤血球細胞数が、正常な組織酸素必要量よりも大きな場合、循環系中のEPOは減少する。

30

## 【0005】

EPOはまた、神経保護性があり（Siren ALら、（Proc Natl Acad Sci USA. 2001年、98（7）: 4044～9頁）、心保護性（Parsa CJら、（J Clin Invest. 2003年、112（7）: 999～1007頁））があることが報告されている。

40

## 【0006】

組換えヒトEPO（rHuEPO）は、慢性腎不全に関連する貧血患者、ジドブジンを用いる治療によるAIDS貧血患者、化学療法剤により治療を受けた患者の非骨髄性悪性疾患、外科手術中患者、及び自己献血を治療するために現在使用されている。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

50

EPOの生物活性を考慮すると、生物活性EPO変異体を得ることは、極めて価値のあることになるであろう。理想的に言えば、このような変異体としては、EPO受容体に結合し、このタンパク質の生物活性を開始し、阻害し、活性化し、或いは調節するアゴニスト、リバースアゴニスト、部分アゴニスト、混合アゴニスト/アンタゴニスト及び完全アンタゴニストなどのリガンドが挙げられると考えられる。ヒトEPOの新規なアゴニストを得ることが、特に興味深いと考えられる。

【0008】

また、哺乳動物において実質的にヘマトクリットレベルを増加させることなく、前記哺乳動物、特にヒトにおける組織保護活性（特に神経栄養活性）を有する新規な生物活性EPO変異体を得ることが特に興味深いと考えられる。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、特にヒト対象における治療的又は予防的処置のための新規なEPOポリペプチド及びそれらの使用に関する。本発明はさらに、このようなポリペプチドを産生する方法、並びにサンプル中のこれらポリペプチドを検出し、又は投薬する方法及びツールに関する。本発明はまた、前記ポリペプチドをコードする核酸、このような核酸を含むベクター、特に発現ベクター、及びそれらを含む組換え細胞、並びに対応する医薬組成物に関する。さらに、本発明の新規なEPOポリペプチドに特異的な抗体が含まれる。

【0010】

本発明は、部分的には、特定の構造的及び生物学的特性を有するEPOの新規な転写変異体の同定、単離及び特徴付けから生じる。これらの転写変異体及びそれらの誘導体により、価値ある医薬品を提示する。

20

【0011】

本発明はまた、部分的には実質的にヘマトクリットレベルを増加させることなく、組織保護活性を有するEPOの新規な転写変異体及びより短い変種の特徴付けから生じる。EPOのこれらのより短い変種及び転写変異体並びにそれらの誘導体により、価値ある医薬品を提示する。本発明はまた、部分的には組織保護活性（特に神経栄養活性）を有するが、血液栄養活性を欠くEPOのドメインの同定から生じる。

【0012】

したがって本発明の目的は、哺乳動物において実質的にヘマトクリットレベルを増加させることなく、前記哺乳動物、特にヒトにおける組織保護活性を有する単離エリスロポエチン変異ポリペプチドにある。

30

【0013】

本発明の別の目的は、単離エリスロポエチン変異ポリペプチドにあり、前記変異ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸56（システイン）から193（アルギニン）までの少なくとも1つの欠失により、配列番号3に示された配列とは異なるポリペプチド、又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体からなる。特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチン変異ポリペプチドにあり、前記変異ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸56（システイン）から193（アルギニン）までの欠失により、配列番号3に示された配列とは異なるポリペプチド、又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体からなる。配列番号3のアミノ酸56から193までを欠くポリペプチドは、配列番号13（以後EPO $\nu$ と命名される）に示される。好ましい実施形態において、これらのペプチドは、N末端シグナルペプチドを欠く成熟ペプチドである。

40

【0014】

本発明の別の目的は、配列番号3のアミノ酸54（トレオニン）から82（グルタミン酸）までの少なくとも1つの欠失により、配列番号3に示された配列とは異なるEPOポリペプチド、又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体を含むか、又はそれからなるポリペプチドにある。特定の実施形態において、本発明は、配列番号3のアミノ酸54（トレオニン）から82（グルタミン酸）までの欠失により、配列番号3に示された配列とは異なるEPOポリペプチドを含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。配列番号

50

3のアミノ酸54から82までを欠くポリペプチドは、配列番号4（以後EPOv1と命名される）に示され、ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2、4及び5によりコードされるEPOの新規な転写変異体である（したがって、この転写変異体の転写物は、内部エキソン3を欠く）。好ましい実施形態において、これらのペプチドは、N末端シグナルペプチドを欠く成熟ペプチドである。

【0015】

本発明の別の目的は、配列番号3のアミノ酸54（トレオニン）から142（グルタミン）までの少なくとも1つの欠失により、配列番号3に示された配列とは異なるEPOポリペプチド、又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。特定の実施形態において、本発明は、配列番号3のアミノ酸54（トレオニン）から142（グルタミン）までの欠失により、配列番号3に示された配列とは異なるEPOポリペプチドを含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。配列番号3のアミノ酸54から142までを欠くポリペプチドは、配列番号6（以後EPOv2と命名される）に示され、ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2及び5によりコードされるEPOの新規な転写変異体である（したがって、この転写変異体の転写物は、内部エキソン3及び4を欠く）。好ましい実施形態において、これらのペプチドは、N末端シグナルペプチドを欠く成熟ペプチドである。

【0016】

本発明の別の目的は、配列番号8に示された配列を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチド、又は配列番号8に示されたポリペプチドの変異体にある。配列番号8に示された配列を有するポリペプチドは、初めて本明細書に開示されるEPOの新規な転写変異体のC末端部分に相当し、エキソン4Aの3'末端によりコードされる。前記エキソン4Aは、野生型EPOをコードするエキソン4と比較して3'末端がより長い（図3及び6を参照）。

【0017】

さらなる態様において、本発明は、配列番号9に示された配列を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチド、又は前記ポリペプチドの変異体にある。前記配列番号9のポリペプチド（以後EPOv3と命名される）は、EPOの新規な転写変異体であり、ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2、3及び4Aによりコードされる。好ましい実施形態において、これらのペプチドは、N末端シグナルペプチドを欠く成熟ペプチドである。

【0018】

本発明の別の目的は、さらなるアミノ酸ドメインに作動可能に結合した上記に定義されたEPOポリペプチド又は変異体若しくは類似体を含む融合タンパク質にある。

【0019】

本発明の別の目的は、上記のEPOポリペプチド又は変異体或いは類似体若しくは融合タンパク質をコードする核酸、並びに任意のクローニング又はこのような核酸を含む発現ベクターにある。

【0020】

本発明はまた、上記に定義されたベクター又は核酸を含む組換え宿主細胞、並びにこのような組換え細胞を用いる上記のEPOポリペプチド又は変異体若しくは類似体を産生する方法に関する。

【0021】

本発明の別の目的は、活性な結合体又は複合体の形態である上記に定義されたポリペプチドにある。

【0022】

本発明のさらなる目的はまた、上記に定義されたポリペプチドに選択的に結合する抗体、このような抗体の断片又は誘導体に関する。

【0023】

本発明はまた、非相同部分に結合した上記に定義された抗体を含む免疫結合体に関する。

## 【 0 0 2 4 】

本発明のさらなる目的はまた、上記に定義されたポリペプチド、核酸、ベクター又は組換え細胞、及び薬学的に許容できる担体、賦形剤、又は安定化剤を含む医薬組成物にある。

## 【 0 0 2 5 】

本発明はさらに、患者の障害症状を治療、予防又は改善する方法に関するものであり、その障害は、EPO発現又は活性の調節不全を含み、該方法は、上記に定義された医薬組成物を患者に投与することを含む。

## 【 0 0 2 6 】

本発明はまた、患者の障害症状を治療、予防又は改善する方法に関するものであり、その障害は、赤血球細胞の産生の不十分又は欠損を特徴とする血液障害、貧血、慢性腎不全患者の高血圧、外科手術患者、小児透析患者、ヘマトクリット濃度不足に関連する疾患又は病態、AIDS、化学療法治療に関係した障害、癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患並びに障害、発作などの心血管疾患、低血圧、心拍停止、虚血特に虚血-再灌流傷害、急性心筋梗塞などの心筋梗塞、慢性心不全、アングナ、心肥大、心肺疾患、心肺バイパス、呼吸器疾患、腎臓、泌尿器及び生殖器疾患、内分泌及び代謝異常、胃腸疾患、一次的神経系症状又は精神医学的症状を有する中枢神経系(CNS)疾患又は末梢神経系疾患、認知機能の加齢関連喪失、脳性小児麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、認知症、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール依存症、気分障害、不安障害、注意欠損障害、活動亢進、自閉症、統合失調症、うつ病、脳又は脊髄外傷若しくは虚血、クロイツフェルト-ヤコブ病、眼病、発作障害、多発性硬化症、炎症、放射線損傷、黄斑変性症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、及び網膜外傷からなる群から選択され、該方法は、上記に定義されたポリペプチド又は医薬組成物の治療有効量を患者に投与することを含む。

10

20

## 【 0 0 2 7 】

本発明はさらに、患者の障害の治療のための薬剤の製造における、上記に定義されたポリペプチドの使用又は上記に定義された医薬組成物の使用にあり、その障害は、赤血球細胞の産生の不十分又は欠損を特徴とする血液障害、貧血、慢性腎不全患者の高血圧、外科手術患者、小児透析患者、ヘマトクリット濃度不足に関連する疾患又は病態、AIDS、化学療法治療に関係した障害、癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患並びに障害、発作などの心血管疾患、低血圧、心拍停止、虚血特に虚血-再灌流傷害、急性心筋梗塞などの心筋梗塞、慢性心不全、アングナ、心肥大、心肺疾患、心肺バイパス、呼吸器疾患、腎臓、泌尿器及び生殖器疾患、内分泌及び代謝異常、胃腸疾患、一次的神経系症状又は精神医学的症状を有する中枢神経系(CNS)疾患又は末梢神経系疾患、認知機能の加齢関連喪失、脳性小児麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、認知症、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール依存症、気分障害、不安障害、注意欠損障害、活動亢進、自閉症、統合失調症、うつ病、脳又は脊髄外傷若しくは虚血、クロイツフェルト-ヤコブ病、眼病、発作障害、多発性硬化症、炎症、放射線損傷、黄斑変性症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、及び網膜外傷からなる群から選択される。

30

40

## 【 0 0 2 8 】

本発明のさらなる目的はまた、本明細書の上記のとおり、抗体、又はその断片若しくは誘導体、及び薬学的に許容できる担体、賦形剤、又は安定化剤を含む医薬組成物にある。

## 【 0 0 2 9 】

本発明はまた、対象の癌の症状を治療、予防又は改善する方法に関するものであり、該方法は、本明細書の上記のとおり、抗体、又はその断片若しくは誘導体の有効量を患者に投与することを含む。本発明はまた、癌を治療するための薬剤の製造における本明細書の上記のとおり、抗体、又はその断片若しくは誘導体の使用にある。

## 【 0 0 3 0 】

本発明の他の態様は、上記に定義された核酸に特異的なプライマー及びプローブ、並び

50

にサンプル中のこのような核酸の存在を検出又は診断するためのそれらの使用を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

本発明は、部分的には、特定の構造的及び生物学的特性を有するEPOの新規な転写変異体の同定、単離及び特徴付けから生じる。これらの転写変異体及びそれらの誘導体により、価値ある医薬品を提示する。本発明はまた、部分的には組織保護活性（特に神経栄養活性）を有するEPOのドメインの同定、及び組織保護活性（特に神経栄養活性）を有するが、血液栄養活性を欠くEPO変異体の同定から生じる。

【0032】

ヒト参照野生型EPO遺伝子領域を提示する4099のヌクレオチドのゲノム配列は、図1に示される（配列番号1）。該EPO遺伝子は、ヌクレオチド配列の配列番号1上の位置が以下のとおりである5つのエキソンを含有するものとして記載されている：

エキソン1：ヌクレオチド601からヌクレオチド794まで（782位での開始コドンを含む）。

エキソン2：ヌクレオチド1359からヌクレオチド1504まで。

エキソン3：ヌクレオチド1763からヌクレオチド1849まで。

エキソン4：ヌクレオチド2465からヌクレオチド2644まで。

エキソン5：ヌクレオチド2779からヌクレオチド3499まで（2763位での終止コドンを含む）。

【0033】

対応する転写物を図2に示す（ポリA尾部を除く）。開始及び終止コドンは、それぞれ182位及び761位に下線が引かれている。この転写物は、図3に示されるように（配列番号3）、193のアミノ酸の未成熟タンパク質をコードする（以後、EPO<sub>w</sub>tと命名される）。この未成熟タンパク質を処理し、最初の27のアミノ酸を含むN末端シグナルペプチドを開裂する。生じたタンパク質は166のアミノ酸長であり、以後EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>（配列番号3のアミノ酸28から193まで）と命名される。さらに、カルボキシル末端残基は、細胞により発現されるタンパク質が165のアミノ酸長のタンパク質（配列番号3のアミノ酸28から192まで）であるように除去されることが記載されている。

【0034】

エリスロポエチンは、長鎖クラスのもの、例えば、hGH及び顆粒球コロニー刺激因子に類似したヘリックス間角を有するアップ-アップ-ダウン-ダウンの4ヘリックスバンドルトポロジーを有する（Syed R Sら、Nature 395（6701）：511～6頁（1998）を参照）。しかしながら、それはまた、短鎖クラス、例えば、マクロファージのコロニー刺激因子、幹細胞因子、インターロイキン-4及びインターロイキン-5に典型的な2つの小型逆平行鎖を含有する。一对の逆平行長ヘリックス、A（EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>の残基8～26）及びD（EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>の残基138～161）は、ジスルフィド架橋、Cys7からCys161により共に保持される。他の対、B（EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>の残基55～83）及びC（EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>の残基90～112）は、短いループにより結合する。Dヘリックスは、Gly151における小さな屈曲のためわずかに不規則である。長いAB及びCD交差ループからのアミノ酸の短いセグメントは、逆平行シート：1（EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>の残基39～41）及び2（EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>の残基133～135）を形成するために、互いに相互作用する。D-ヘリックスの内面上のPhe138、Phe142、Tyr145、Phe148、Leu153及びTyr156などのいくつかの芳香族及び疎水性残基は、エリスロポエチンの疎水性コアを形成するために、A、B及びCヘリックスから非極性側鎖に対して詰め込まれる。第2のジスルフィド結合、Cys29からCys33は、Aヘリックスの末端とABループの部分とが結合する。エリスロポエチンは、2つのさらなる短いヘリックス、Bに直交したB'ヘリックス（EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>の残基47～52）及びGly113に始まって90°傾斜を有するCに次いでミニヘリックスC'（EPO<sub>w</sub>t<sub>m</sub>の残基114～121）を有する。

【0035】



哺乳動物細胞に発現されるヒト尿由来のEPO(Miyakeら、J. Biol. Chem. 252、5558頁(1977))及び組換えヒトEPOの双方は、糖タンパク質の全重量のうちの約40%と一緒に含む3本のN結合及び1本のO-結合オリゴ糖鎖を含有する。N-結合グリコシル化は、EPOwtmの24位、38位及び83位に配置されるアスパラギン残基に生じるが、一方、O-結合グリコシル化は、126位に配置されるセリン残基に生じる(Laiら、J. Biol. Chem. 261、3116頁(1986); Broudyら、Arch. Biochem. Biophys. 265、329頁(1988))。オリゴ糖鎖は、一本鎖当たり4つまでのシアル酸を典型的に有するN-結合鎖及び2つまでのシアル酸を有するO-結合鎖を持つ末端シアル酸残基により修飾されることが示されている。したがって、EPOポリペプチドは、全部で14までのシアル酸を収容できる。EPO炭水化物鎖の変化により、生物活性に影響を及ぼし得ることが、種々の研究において示されている。例えば、エリスロポエチンのシアリル化は、肝結合タンパク質により、その結合、及び引き続くクリアランスを防止することから、グリコシル化エリスロポエチンからすべてのシアル酸残基の酵素的除去により、インビトロ活性ではなくてインビボ活性の喪失を生じることが示されている。

10

#### 【0036】

ところで本出願者は、ヒトEPOの新規な転写変異体を同定している。これら転写変異体及びそれらの誘導体は、価値ある医薬品を提示する。

#### 【0037】

##### 1. 本発明のEPOポリペプチド及び変異体：

20

本発明の発明者は、組織保護活性(特に神経栄養活性)を有するEPOのドメイン、及び組織保護活性(特に神経栄養活性)を有するが、血液栄養活性を欠くEPO変異体を同定している。EPOのこれら短い変種及び同定されたEPO変異体は、価値ある医薬品を提示する。

#### 【0038】

##### 1. 1 EPO短ポリペプチド及びそれらの変異体：

第1の態様において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記変異ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸56(システイン)から193(アルギニン)までのうちの少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、さらにより好ましくは少なくとも4つ、さらにより好ましくは少なくとも5つ、さらにより好ましくは少なくとも6つ、さらにより好ましくは少なくとも7つ、さらにより好ましくは少なくとも8つ、さらにより好ましくは少なくとも9つ、さらにより好ましくは少なくとも10、さらにより好ましくは少なくとも11、さらにより好ましくは少なくとも12、さらにより好ましくは少なくとも13、さらにより好ましくは少なくとも14、さらにより好ましくは少なくとも15、さらにより好ましくは少なくとも16、さらにより好ましくは少なくとも17、さらにより好ましくは少なくとも18、さらにより好ましくは少なくとも19、さらにより好ましくは少なくとも20、さらにより好ましくは少なくとも21、さらにより好ましくは少なくとも22、さらにより好ましくは少なくとも23、さらにより好ましくは少なくとも24、さらにより好ましくは少なくとも25、さらにより好ましくは少なくとも26、さらにより好ましくは少なくとも27、さらにより好ましくは少なくとも28、さらにより好ましくは少なくとも29、さらにより好ましくは少なくとも30、さらにより好ましくは少なくとも31、さらにより好ましくは少なくとも32、さらにより好ましくは少なくとも33、さらにより好ましくは少なくとも34、さらにより好ましくは少なくとも35、さらにより好ましくは少なくとも36、さらにより好ましくは少なくとも37、さらにより好ましくは少なくとも38、さらにより好ましくは少なくとも39、さらにより好ましくは少なくとも40、さらにより好ましくは少なくとも41、さらにより好ましくは少なくとも42、さらにより好ましくは少なくとも43、さらにより好ましくは少なくとも44、さらにより好ましくは少なくとも45、さらにより好ましくは少なくとも46、さらにより好ましくは少なくとも47、さらにより好ましくは少なくとも48、さらにより好ましくは少なくとも49、さらにより好まし

30

40

50

くは少なくとも50、さらにより好ましくは少なくとも51、さらにより好ましくは少なくとも52、さらにより好ましくは少なくとも53、さらにより好ましくは少なくとも54、さらにより好ましくは少なくとも55、さらにより好ましくは少なくとも56、さらにより好ましくは少なくとも57、さらにより好ましくは少なくとも58、さらにより好ましくは少なくとも59、さらにより好ましくは少なくとも60、さらにより好ましくは少なくとも61、さらにより好ましくは少なくとも62、さらにより好ましくは少なくとも63、さらにより好ましくは少なくとも64、さらにより好ましくは少なくとも65、さらにより好ましくは少なくとも66、さらにより好ましくは少なくとも67、さらにより好ましくは少なくとも68、さらにより好ましくは少なくとも69、さらにより好ましくは少なくとも70、さらにより好ましくは少なくとも71、さらにより好ましくは少なくとも72、さらにより好ましくは少なくとも73、さらにより好ましくは少なくとも74、さらにより好ましくは少なくとも75、さらにより好ましくは少なくとも76、さらにより好ましくは少なくとも77、さらにより好ましくは少なくとも78、さらにより好ましくは少なくとも79、さらにより好ましくは少なくとも80、さらにより好ましくは少なくとも81、さらにより好ましくは少なくとも82、さらにより好ましくは少なくとも83、さらにより好ましくは少なくとも84、さらにより好ましくは少なくとも85、さらにより好ましくは少なくとも86、さらにより好ましくは少なくとも87、さらにより好ましくは少なくとも88、さらにより好ましくは少なくとも89、さらにより好ましくは少なくとも90、さらにより好ましくは少なくとも91、さらにより好ましくは少なくとも92、さらにより好ましくは少なくとも93、さらにより好ましくは少なくとも94、さらにより好ましくは少なくとも95、さらにより好ましくは少なくとも96、さらにより好ましくは少なくとも97、さらにより好ましくは少なくとも98、さらにより好ましくは少なくとも99、さらにより好ましくは少なくとも100、さらにより好ましくは少なくとも101、さらにより好ましくは少なくとも102、さらにより好ましくは少なくとも103、さらにより好ましくは少なくとも104、さらにより好ましくは少なくとも105、さらにより好ましくは少なくとも106、さらにより好ましくは少なくとも107、さらにより好ましくは少なくとも108、さらにより好ましくは少なくとも109、さらにより好ましくは少なくとも110、さらにより好ましくは少なくとも111、さらにより好ましくは少なくとも112、さらにより好ましくは少なくとも113、さらにより好ましくは少なくとも114、さらにより好ましくは少なくとも115、さらにより好ましくは少なくとも116、さらにより好ましくは少なくとも117、さらにより好ましくは少なくとも118、さらにより好ましくは少なくとも119、さらにより好ましくは少なくとも120、さらにより好ましくは少なくとも121、さらにより好ましくは少なくとも122、さらにより好ましくは少なくとも123、さらにより好ましくは少なくとも124、さらにより好ましくは少なくとも125、さらにより好ましくは少なくとも126、さらにより好ましくは少なくとも127、さらにより好ましくは少なくとも128、さらにより好ましくは少なくとも129、さらにより好ましくは少なくとも130、さらにより好ましくは少なくとも131、さらにより好ましくは少なくとも132、さらにより好ましくは少なくとも133、さらにより好ましくは少なくとも134、さらにより好ましくは少なくとも135、さらにより好ましくは少なくとも136、さらにより好ましくは少なくとも137、及びさらにより好ましくは少なくとも138のアミノ酸の欠失により配列番号3に示された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。

【0039】

特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記変異ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸56（システイン）から193（アルギニン）までのうちの少なくとも100の欠失により配列番号3に示された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。別の特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記変異ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸56（システイン）から193（アルギニン）までのうちの少なくとも120又は少なくとも130或いは少なくとも135の欠失により配列番号3に示された配列とはまったく

10

20

30

40

50

異なるポリペプチドからなる。別の特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記変異ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸56（システイン）から193（アルギニン）までのうちの少なくとも136又は少なくとも137の欠失により配列番号3に示された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。別の特定の実施形態において、エリスロポエチンの変異ポリペプチドは、配列番号13に示された配列を有する（以後EPOVと命名される）。本明細書に開示された種々のポリペプチドを記載するために使用される用語の「単離」とは、その天然環境の成分から識別、分離及び/又は回収されるポリペプチドを意味する。したがって、本発明の単離産物は、培養上澄み液に含有させ、部分的に濃縮若しくは精製し、異種供給源から産生し、ベクター中にクローニングし、又は媒体と共に製剤化することができる。

10

#### 【0040】

さらに別の特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記ポリペプチドは、アミノ酸193（アルギニン）の欠失、好ましくはアミノ酸192～193の欠失、より好ましくはアミノ酸191～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸190～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸189～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸188～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸187～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸186～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸185～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸184～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸183～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸182～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸181～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸180～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸179～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸178～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸177～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸176～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸175～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸174～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸173～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸172～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸171～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸170～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸169～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸168～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸167～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸166～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸165～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸164～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸163～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸162～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸161～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸160～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸159～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸158～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸157～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸156～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸155～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸154～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸153～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸152～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸151～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸150～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸149～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸148～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸147～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸146～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸145～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸144～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸143～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸142～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸141～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸140～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸139～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸138～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸137～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸136～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸135～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸134～193の欠失、さらにより好ましくはアミノ酸133～1

20

30

40

50



された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。さらに別の特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記ポリペプチドは、アミノ酸 61 ~ 193 の欠失により配列番号 3 に示された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。さらに別の特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記ポリペプチドは、アミノ酸 60 ~ 193 の欠失により配列番号 3 に示された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。さらに別の特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記ポリペプチドは、アミノ酸 59 ~ 193 の欠失により配列番号 3 に示された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。さらに別の特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記ポリペプチドは、アミノ酸 58 ~ 193 の欠失により配列番号 3 に示された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。さらに別の特定の実施形態において、本発明は、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドにあり、前記ポリペプチドは、アミノ酸 57 ~ 193 の欠失により配列番号 3 に示された配列とはまったく異なるポリペプチドからなる。特定の実施形態において、単離エリスロポエチンの変異ポリペプチドは、配列番号 13 に示された配列を有する（以後 EPOv と命名される）。

10

20

30

40

50

#### 【0041】

さらに好ましい実施形態において、本明細書において上記のペプチドは、N末端シグナルペプチドを欠く成熟ペプチドである。さらに特に、本明細書において上記のペプチドは、配列番号 3 のアミノ酸 1 から 27 までからなるシグナルペプチドを欠く。したがって特定の態様において、本発明は、配列番号 13 のアミノ酸 28 から 55 までのアミノ酸配列からなるポリペプチドにある（以後 EPOvm と命名される）。

#### 【0042】

本明細書において上記の 1.1 節におけるポリペプチドは、以後、「EPO短ポリペプチド」と命名される。別の態様において、本発明は、EPO短ポリペプチドを含む単離ポリペプチドにある。

#### 【0043】

さらなる態様において、本発明は、本明細書において上記の EPO短ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。ポリペプチドとして定義される EPO短ポリペプチドの変異体は、本明細書において上記の EPO短ポリペプチドと比較して 1 つ又はいくつかのアミノ酸置換、典型的には 0 から 10 のアミノ酸置換、さらに典型的には 0 から 5 つ、4 つ、3 つ、2 つ又は 1 つのアミノ酸置換を含む。特定の実施形態において、変異ポリペプチドは、

#### 【化 1】

E40Q, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S,  
S131N, L132F, SL131-132NF, T134D, G140R 及び S147C.

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により本明細書において上記の EPO短ポリペプチドとは異なる。好ましい実施形態において、変異ポリペプチドは、G104S 及び S147C からなる群において選択される 1 つ又は 2 つの変異により本明細書における上記の EPO短ポリペプチドの配列とは異なる。アミノ酸配列の修飾のために本明細書に使用される表記は、示された位置の野生型アミノ酸がそれぞれの番号の直後のアミノ酸に変わることを意味する。所与のナンバリングは、配列番号 3 におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。したがって例えば、E40Q 変異は、配列番号 3 の 40 位のアミノ酸 E（グルタミン酸）のアミノ酸 Q（グルタミン）への変異に相当する。しかしながら、1 つ以上のこれら変異部位は、EPOwt と比較して、EPO短ポリペプチドに欠いているアミノ酸数に依って存

在しないと考えられる。別の実施形態において、EPO短ポリペプチドの変異体は、  
【化2】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B,  
R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N,  
H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A,  
F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K,  
D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A,  
S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A,  
S153A, T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A,  
F175Y, F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A,  
L182A, G185A, C187S, C188A, 及び R189A.

10

からなる群において選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、  
8つ、9つ又は10の変異により本明細書において上記のEPO短ポリペプチドとは異なる。  
さらに別の実施形態において、EPO短ポリペプチドの変異体は、  
【化3】

20

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B,  
R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A 及び N51K.

からなる群において選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、  
8つ、9つ又は10の変異により本明細書において上記のEPO短ポリペプチドとは異なる。  
さらに別の実施形態において、EPO短ポリペプチドの変異体は、  
【化4】

30

K72D/S127E, A57N/H59T, K72D/R177E, R130E/L135S,  
K79A/K167A, K72A/K79A/K167A, K124A/K179A, K72A/K124A/K179A,  
K72A/K79A/K124A/K179A, K72A/K79A/K124A/K167A/K179A,  
K72A/K79A/K124A/K167A/K179A/K181A, N51K/N65K/N110K, 及び Y42A/N51K.

からなる群において選択される1つの組換え変異により本明細書において上記のEPO短  
ポリペプチドの配列とは異なる。好ましい実施形態において、C34Sからなる変異によ  
り本明細書において上記のEPO短ポリペプチドの配列とは異なる。しかしながら、1つ  
以上のこれら変異部位は、EPOwtと比較して、EPO短ポリペプチドに欠いているア  
ミノ酸数に依って存在しないと考えられる。好ましい実施形態において、本明細書におい  
て上記のEPO短ポリペプチドの変異体は、N末端シグナルペプチドを欠く成熟ペプチド  
である。さらに特に、本明細書において上記のペプチドは、配列番号3のアミノ酸1から  
27までからなるシグナルペプチドを欠く。したがって、特定の態様において、本発明は  
、変異C34S（配列番号15のアミノ酸28から55まで）によりEPOvmとは異なる  
アミノ酸配列からなるポリペプチドにある。

40

【0044】

50

別の実施形態において、本発明は、グリコシル化に関して1つから6つまでの追加部位を有するようなポリペプチドとはさらに異なる本明細書において上記のEPO短ポリペプチド又はEPO短ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる単離ポリペプチドに相当するEPOポリペプチドの類似体にある。1つ以上のオリゴ糖基によるタンパク質のグリコシル化は、ポリペプチド骨格に沿って特定の位置に生じ、タンパク質安定性、分泌、細胞下局在化、及び生物活性などのタンパク質の物理的性質に影響を及ぼす。グリコシル化は、通常、2つのタイプがある：O-結合オリゴ糖類は、セリン又はトレオニン残基に結合し、N-結合オリゴ糖類は、アスパラギン残基に結合する。N-結合及びO-結合オリゴ糖類の双方に見られる1タイプのオリゴ糖は、9つ以上の炭素原子を含有するアミノ糖類のファミリーであるN-アセチルノイラミン酸（シアル酸）である。シアル酸は負電荷を有し、糖タンパク質に酸性を付与することから、シアル酸は、通常、N-結合及びO-結合オリゴ糖類上の双方の末端残基である。本発明のポリペプチドは、シアル酸結合に対する部位数の増加をもたらすアミノ酸配列の1つ以上の変化により本明細書において上記のEPO短ポリペプチド又はEPO短ポリペプチド変異体の類似体を含む。これらの糖タンパク質類似体は、グリコシル化に利用できる部位を増加させるか、又は変化させるアミノ酸残基の付加、欠失、又は置換を有する部位特異的変異誘発により作出できる。ヒトエリスロポエチンに見られるものよりも大きなシアル酸レベルを有する本発明のEPO類似体は、生物活性に必要な第二級又は第三級立体配座を摂動しないグリコシル化部位を付加することにより作出される。本発明のポリペプチドはまた、通常、N-結合又はO-結合部位に密接した1つ以上のアミノ酸の置換を含むグリコシル化部位に炭水化物結合の増加レベルを有するEPO類似体を含む。本発明のポリペプチドはまた、エリスロポエチンのカルボキシ末端から伸長する1つ以上のアミノ酸を有し、少なくとも1つの追加炭水化物部位を提供するEPO類似体を含む。本発明のポリペプチドはまた、グリコシル化用に少なくとも1つの部位の転移を含むアミノ酸配列を有するEPO類似体を含む。このようなグリコシル化部位の転移は、本明細書において上記のEPO短ポリペプチド又はEPO短ポリペプチド変異体における1つ以上のグリコシル化部位の欠失及び1つ以上の非天然グリコシル化部位の付加を含む。エリスロポエチン上の炭水化物鎖数の増加、したがって、1エリスロポエチン分子当たりのシアル酸数を増加させることにより、安定性の増加、より大きな耐タンパク分解性、免疫原性の減少、血清中半減期の増加、生物活性の増加など、有利な性質を付与できる。追加のグリコシル化部位を有するエリスロポエチン類似体は、欧州特許出願第640,619号、PCT出願WO0024893及びWO0181405に、さらに詳細に開示されている。

#### 【0045】

好ましい実施形態において、本発明のこのような類似体は、84位、96位、113位、115位、116位又は141位に少なくとも1つの追加N-結合グリコシル化部位を含み、本明細書において上記のEPO短ポリペプチド又はEPO短ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる。既に本明細書の上記に説明されたように、所与の位置は、配列番号3におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。1つ以上のこれらの部位は、EPOwtと比較して、EPO短ポリペプチド、又はEPO短ポリペプチドの変異体に欠いているアミノ酸数に依って存在しないと考えられる。別の実施形態において、このようなEPO類似体は、少なくとも2つの追加グリコシル化部位、又は少なくとも3つの追加グリコシル化部位、或いは少なくとも4つの追加グリコシル化部位を含む。

#### 【0046】

好ましい実施形態において、本発明のこれらEPO類似体は、以下の：

## 【化 5】

G84N 及び Q86T;  
 L96N;  
 L96N 及び S98T;  
 A95S, L96N 及び S98T;  
 Q113N, P114V 及び W115T;  
 P114V, W115N 及び P117T;  
 P114V, W115N 及び P117S;  
 P114A, W115N 及び P117T;  
 P114S, W115N 及び P117T;  
 P114S W115N, E116G 及び P117T;  
 P114V, W115N, E116G 及び P117T;  
 P114S W115N, P117T 及び Q119T;  
 N110Q, P114S, W115N 及び P117T;  
 P114S W115N, P117T, R189A;  
 L96N, S98T, P114S, W115N 及び P117T;  
 E116N, P117I 及び L118T;  
 P114S, E116N, P117I 及び L118T;  
 A141N;  
 A141N 及び K143T;  
 P114V, W115N, P117T, A141N 及び K143T ;  
 A151P 及び A152T;  
 A152T;  
 A152N 及び A154S;  
 D163N 及び F165T;  
 F165N 及び K167T.

10

20

30

から選択される修飾により修飾された、本明細書において上記の EPO 短ポリペプチド、又は EPO 短ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる。

40

## 【0047】

既に本明細書の上記に述べられたように、所与の位置は、配列番号 3 におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。1 つ以上のこれらの部位は、EPO wt と比較して、EPO 短ポリペプチド、又は EPO 短ポリペプチドの変異体に欠いているアミノ酸数に依って存在しないと考えられる。

## 【0048】

さらに本明細書において、本発明は、本明細書において上記の 1 . 1 節に記載された EPO 短ポリペプチドの相同体、前記 EPO 短ポリペプチドの変異体又は EPO ポリペプチドの類似体を含むか、又はそれらからなる単離ポリペプチドにある。特定の実施形態において、前記相同体は、EPO 短ポリペプチド、又は前記 EPO 短ポリペプチドの変異体或いは EPO ポリペプチドの類似体と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する活性な

50



ポリペプチドとして定義される。好ましくは、前記同一性は、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも98%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも99%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも99.5%のアミノ酸配列同一性である。通常、相同体ポリペプチドは、長さが180から28までのアミノ酸、長さが140から28までのアミノ酸、しばしば長さが100から28までのアミノ酸、しばしば長さが75から28までのアミノ酸、さらにしばしば長さが55から28までのアミノ酸、さらに長さが40から28までのアミノ酸、さらにしばしば長さが30のアミノ酸、さらにしばしば長さが29のアミノ酸、さらにしばしば長さが28のアミノ酸である。特定の実施形態において、前記相同体は、配列番号13に示されたポリペプチドと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する活性なポリペプチド(EPOv)又は配列番号13のアミノ酸28から55までの配列を有するポリペプチド(EPOvm)からなるか、又はそれらを含む。好ましくは、前記同一性は、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも98%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも99%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも99.5%のアミノ酸配列同一性である。通常、EPOvの相同体ポリペプチドは、長さが60のアミノ酸、さらにしばしば長さが59のアミノ酸、さらにしばしば長さが58のアミノ酸、さらにしばしば長さが57のアミノ酸、さらにしばしば長さが56のアミノ酸、さらにしばしば長さが55のアミノ酸である。通常、EPOvmの相同体ポリペプチドは、長さが35のアミノ酸、さらにしばしば長さが34のアミノ酸、さらにしばしば長さが33のアミノ酸、さらにしばしば長さが32のアミノ酸、さらにしばしば長さが31のアミノ酸、さらにしばしば長さが30のアミノ酸、さらにしばしば長さが29のアミノ酸、さらにしばしば長さが28のアミノ酸である。

10

20

30

40

50

#### 【0049】

本明細書で同定されたEPOポリペプチド配列に関して「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、必要ならば最大パーセントの配列同一性を達成するために、配列同一性の一部としていずれの保存的置換を考慮せずに、配列の位置合わせをし、ギャップを導入した後、特定のEPOポリペプチド配列においてアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを測定する目的のための位置合わせは、例えば、BLASTなどの公的に利用できるコンピュータソフトウェア(Altschul SF、Gish W、Miller W、Myers EW、Lipman DJ、J Mol Biol.(1990).215(3):403~410頁)を用いて当業界の範囲内にある種々の方法で達成できる。当業者は、比較される配列の完全長にわたって最大位置合わせを達成するために必要な任意のアルゴリズムなど、位置合わせを測定するために適切なパラメーターを決定できる。

#### 【0050】

##### 1.2 EPO短1ポリペプチド及びそれらの変異体

さらなる態様において、本発明は、配列番号3のアミノ酸54(トレオニン)から82(グルタミン酸)までのうちの少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、さらにより好ましくは少なくとも4つ、さらにより好ましくは少なくとも5つ、さらにより好ましくは少なくとも6つ、さらにより好ましくは少なくとも7つ、さらにより好ましくは少なくとも8つ、さらにより好ましくは少なくとも9つ、さらにより好ましくは少なくとも10、さらにより好ましくは少なくとも11、さらにより好ましくは少なくとも12、さらにより好ましくは少なくとも13、さらにより好ましくは少なくとも14、さらにより好ましくは少なくとも15、さらにより好ましくは少なくとも16、さらにより好ましくは少なくとも17、さらにより好ましくは少なくとも18、さらにより好ましくは少なくとも19、さらにより好ましくは少なくとも20、さらにより好ましくは少なくとも21、さらにより好ましくは少なくとも22、さらにより好ましくは少なくとも23、さらにより好ましくは少なくとも24、さらにより好ましくは少なくとも25、さらにより好ましくは少なくとも26、さらにより好ましくは少なくとも2

7、さらにより好ましくは少なくとも28、さらにより好ましくは少なくとも29のアミノ酸の欠失により配列番号3に示された配列とは異なるEPOポリペプチドからなる単離ポリペプチドにある。これらのEPOポリペプチドは、以後「EPO短1」と命名される。別の態様において、本発明は、EPO短1ポリペプチドを含む単離ポリペプチドにある。

#### 【0051】

本明細書に開示された種々のポリペプチドを記載するために用いられる用語「単離」とは、その天然環境の成分から識別、分離及び/又は回収されるポリペプチドを意味する。したがって、本発明の単離産物は、培養上澄み液に含有させ、部分的に濃縮若しくは精製し、異種供給源から産生し、ベクター中にクローニングし、又は媒体と共に製剤化することができる。

10

#### 【0052】

好ましい実施形態において、本発明によるポリペプチドは、配列番号4に示された配列を有し(以後EPOv1と命名される)、EPOの新規な転写変異体に相当する。EPOv1は、ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2、4及び5によりコード化され、エキソン3によりコード化された29のアミノ酸を欠いている(図4を参照)。したがって、この転写変異体は、その未成熟形態で164のアミノ酸長である。N末端シグナルペプチドは、最初の27のアミノ酸を含む。シグナルペプチドが開裂されると、生じたタンパク質は137のアミノ酸長であり、以後EPOv1m(配列番号4のアミノ酸28から164まで)と命名される。既に本明細書の上記に述べられたとおり、カルボキシ末端残基の除去により、細胞により発現されたタンパク質が165のアミノ酸長タンパク質(配列番号3のアミノ酸28から192まで)であるようにEPOwtmに対して記載されている。したがって、成熟EPOv1mタンパク質は、細胞により同じ様式で処理でき、生じたタンパク質は、136のアミノ酸長(配列番号4のアミノ酸28から163まで)であり得る。さらに一般的には、本発明の実施形態において、本明細書の上記のEPO短1ポリペプチドは、このカルボキシ末端アルギニン残基を欠いている。

20

#### 【0053】

本明細書の上記のとおり、EPOv1(図4及び配列番号4に示される)は、エキソン3によりコード化されるEPOwtmのアミノ酸54から82までを欠いている。EPOv1は、逆平行長ヘリックスA(EPOwtmの残基8~26)、C(EPOwtmの残基90~112)、Dヘリックス(EPOwtmの残基138~161)及びBの大部分(EPOwtmの残基55~83)を保持すると結論付けることができる。逆平行シート: 2(EPOwtmの残基133~135)もまた示されるが、逆平行シート: 1(EPOwtmの残基39~41)は、EPOv1mが存在しない。ジスルフィド結合、Cys29からCys33は存在しない。ミニヘリックスC'(EPOwtmの残基114~121)は、EPOv1mに保持されるが、短ヘリックスB'ヘリックス(EPOwtmの残基47~52)は存在しない。Aヘリックス及びDと一緒に結合するジスルフィド結合、Cys7からCys161もまた保持されるはずである。

30

#### 【0054】

さらなる態様において、本発明は、上記のEPO短1ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。ポリペプチドとして定義される変異体は、本明細書において上記のEPO短1ポリペプチドと比較して1つ又はいくつかのアミノ酸置換、典型的には0から10のアミノ酸置換、さらにより典型的には0から5つ、4つ、3つ、2つ又は1つのアミノ酸置換を含む。特定の実施形態において、変異ポリペプチドは、

40

#### 【化6】

E40Q, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, SL131-132NF, T134D, G140R 及び S147C.

50

からなる群において選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ又は１０の変異により本明細書において上記のＥＰＯ短１ポリペプチドとは異なる。好ましい実施形態において、変異ポリペプチドは、Ｇ１０４Ｓ及びＳ１４７Ｃからなる群において選択される１つ又は２つの変異により本明細書における上記のＥＰＯ短１ポリペプチドの配列とは異なる。別の実施形態において、ＥＰＯ短１ポリペプチドの変異体は、

【化７】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A,  
E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K,  
C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A,  
K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T,  
L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I,  
L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K,  
L135A, L135S, K143A, S153A, T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A,  
S173A, N174K, N174A, F175Y, F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A,  
K179W, L180A, K181A, L182A, G185A, C187S, C188A, 及びR189A.

10

20

からなる群において選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ又は１０の変異により本明細書において上記のＥＰＯ短１ポリペプチドとは異なる。さらに別の実施形態において、ＥＰＯ短１ポリペプチドの変異体は、

【化８】

I33A, C34S, C34A, R37I,  
VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E,  
E48A, N51K, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E,  
S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I,  
T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A, S153A, T159A, I160A, T161A,  
K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y, F175A, L176A, R177A,  
R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A, G185A, C187S, C188A,  
及びR189A.

30

40

からなる群において選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ又は１０の変異により本明細書において上記のＥＰＯ短１ポリペプチドとは異なる。さらに別の実施形態において、ＥＰＯ短１ポリペプチドの変異体は、

## 【化 9】

K72D/S127E, A57N/H59T,  
 K72D/R177E, R130E/L135S, K79A/K167A, K72A/K79A/K167A, K124A/K179A,  
 K72A/K124A/K179A, K72A/K79A/K124A/K179A,  
 K72A/K79A/K124A/K167A/K179A, K72A/K79A/K124A/K167A/K179A/K181A,  
 N51K/N65K/N110K, 及び Y42A/N51K.

10

からなる群において選択される 1 つの組換え変異により本明細書において上記の E P O 短 1 ポリペプチドとは異なる。好ましい実施形態において、C 3 4 S からなる変異により本明細書において上記の E P O 短 1 ポリペプチドの配列とは異なる。アミノ酸配列の修飾のために本明細書に用いられる表記は、指定された位置での野生型アミノ酸は、それぞれの番号直後のアミノ酸に変えられることを意味する。所与のナンバリングは、配列番号 3 におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。したがって例えば、E 4 0 Q 変異は、配列番号 3 の 4 0 位におけるアミノ酸 E ( グルタミン酸 ) のアミノ酸 Q ( グルタミン ) への変異に相当する。しかしながら、このナンバリングは、E P O 短 1 ポリペプチドの各々に関して 5 3 位後のアミノ酸 ( トレオニン ) に関して異なり、E P O w t と比較して、E P O 短 1 に欠いているアミノ酸数に依ることは明白である。変異を受ける対応のアミノ酸 ( 複数可 ) は、E P O w t と比較して特定の E P O 短 1 ペプチドに欠いているアミノ酸数を配列番号 3 におけるアミノ酸位置数から差し引くことにより ( 例えば、ポリペプチド E P O 短 1 がアミノ酸 5 4 から 8 2 ( 2 9 のアミノ酸 ) を欠く場合、G 1 0 4 S 変異は、この特定のポリペプチドに関して G 7 5 S に相当する ) 容易に同定される。

20

## 【 0 0 5 5 】

別の実施形態において、本発明は、グリコシル化に関して 1 つから 6 つまでの追加部位を有するようなポリペプチドとはさらに異なる本明細書において上記の E P O 短 1 ポリペプチド又は E P O 短 1 ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる単離ポリペプチドに相当する E P O ポリペプチドの類似体にある。1 つ以上のオリゴ糖基によるタンパク質のグリコシル化は、ポリペプチド骨格に沿って特定の位置に生じ、タンパク質安定性、分泌、細胞下局在化、及び生物活性などのタンパク質の物理的性質に影響を及ぼす。グリコシル化は、通常、2 つのタイプがある：O - 結合オリゴ糖類は、セリン又はトレオニン残基に結合し、N - 結合オリゴ糖類は、アスパラギン残基に結合する。N - 結合及び O - 結合オリゴ糖類の双方に見られる 1 タイプのオリゴ糖は、9 つ以上の炭素原子を含有するアミノ糖類のファミリーである N - アセチルノイラミン酸 ( シアル酸 ) である。シアル酸は負電荷を有し、糖タンパク質に酸性を付与することから、シアル酸は、通常、N - 結合及び O - 結合オリゴ糖類上の双方の末端残基である。2 つの N - 結合グリコシル化部位：E P O w t m の 2 4 位と 8 3 位におけるアスパラギン残基及び O 結合グリコシル化部位：E P O w t m の 1 2 6 位に配置されるセリン残基は、E P O v 1 m に保持される ( 一方、E P O w t m の 3 8 位 ( アスパラギン残基 ) の N 結合グリコシル化部位は、E P O v 1 m に存在しない ) 。本発明のポリペプチドは、シアル酸結合に対する部位数の増加をもたらすアミノ酸配列の 1 つ以上の変化により本明細書において上記の E P O v 1 又は E P O 短 1 ポリペプチドの類似体、或いは E P O 短 1 ポリペプチド変異体の類似体を含む。これらの糖タンパク質類似体は、グリコシル化に利用できる部位を増加させるか、又は変化させるアミノ酸残基の付加、欠失、又は置換を有する部位特異的変異誘発により作出できる。ヒトエリスロポエチンに見られるものよりも大きなシアル酸レベルを有する本発明の E P O 類似体は、生物活性に必要な第二級又は第三級立体配座を損動しないグリコシル化部位を付加することにより作出される。本発明のポリペプチドはまた、通常、N - 結合又は O - 結合部位に密接した 1 つ以上のアミノ酸の置換を含むグリコシル化部位に炭水化物結合の増加レベルを有する E P O 類似体を含む。本発明のポリペプチドはまた、エリスロポ

30

40

50

エチンのカルボキシ末端から伸長する 1 つ以上のアミノ酸を有し、少なくとも 1 つの追加炭水化物部位を提供する E P O 類似体を含む。本発明のポリペプチドはまた、グリコシル化用に少なくとも 1 つの部位の転移を含むアミノ酸配列を有する E P O 類似体を含む。このようなグリコシル化部位の転移は、本明細書において上記の E P O v 1 又は E P O 短 1 ポリペプチド、或いは E P O 短 1 ポリペプチドの変異体における 1 つ以上のグリコシル化部位の欠失及び 1 つ以上の非天然グリコシル化部位の付加を含む。エリスロポエチン上の炭水化物鎖数の増加、したがって、1 エリスロポエチン分子当たりのシアル酸数を増加させることにより、安定性の増加、より大きな耐タンパク分解性、免疫原性の減少、血清中半減期の増加、生物活性の増加など、有利な性質を付与できる。追加のグリコシル化部位を有するエリスロポエチン類似体は、欧州特許出願第 6 4 0 , 6 1 9 号、P C T 出願 W O 0 0 2 4 8 9 3 及び W O 0 1 8 1 4 0 5 に、さらに詳細に開示されている。

10

**【 0 0 5 6 】**

好ましい実施形態において、本発明のこのような E P O 類似体は、8 4 位、9 6 位、1 1 3 位、1 1 5 位、1 1 6 位又は 1 4 1 位において少なくとも 1 つの追加 N - 結合グリコシル化部位を含み、本明細書において上記の E P O 短 1 ポリペプチド又は E P O 短 1 ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる。既に本明細書の上記に説明されたように、所与の位置は、配列番号 3 におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。このナンバリングは、E P O 短 1 又は変異ポリペプチドの各々に関して 5 3 位後のアミノ酸 (トレオニン) について異なり、E P O w t と比較して E P O 短 1 に、又は E P O 短 1 ポリペプチドの変異体に欠いているアミノ酸数に依存する。別の実施形態において、このような E P O 類似体は、少なくとも 2 つの追加グリコシル化部位、又は少なくとも 3 つの追加グリコシル化部位、或いは少なくとも 4 つの追加グリコシル化部位を含む。

20

**【 0 0 5 7 】**

好ましい実施形態において、本発明のこれらの E P O 類似体は、以下の：

## 【化 1 0】

G84N及びQ86T;  
 L96N;  
 L96N及びS98T;  
 A95S, L96N及びS98T;  
 Q113N, P114V及びW115T;  
 P114V, W115N及びP117T;  
 P114V, W115N及びP117S;  
 P114A, W115N及びP117T;  
 P114S, W115N及びP117T;  
 P114S W115N, E116G及びP117T;  
 P114V, W115N, E116G及びP117T;  
 P114S W115N, P117T及びQ119T;  
 N110Q, P114S, W115N及びP117T;  
 P114S W115N, P117T, R189A;  
 L96N, S98T, P114S, W115N及びP117T;  
 E116N, P117I及びL118T;  
 P114S, E116N, P117I及びL118T;  
 A141N;  
 A141N及びK143T;  
 P114V, W115N, P117T, A141N及びK143T;  
 A151P及びA152T;  
 A152T;  
 A152N及びA154S;  
 D163N及びF165T;  
 F165N及びK167T.

10

20

30

から選択される修飾により修飾された、本明細書において上記のEPO短1ポリペプチド、又はEPO短1ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる。

40

## 【0058】

既に本明細書の上記に述べられたように、所与の位置は、配列番号3におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。このナンバリングは、EPO短1ポリペプチドの各々に関して53位後のアミノ酸(トレオニン)について異なり、EPOwtと比較してEPO短1に、又はEPO短1ポリペプチドの変異体に欠いているアミノ酸数に依存する。

## 【0059】

さらに好ましい実施形態において、本明細書の上記のペプチドは、N末端シグナルペプチドを欠く成熟ペプチドである。さらに特に、本発明のポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸1から27までからなるシグナルペプチドを欠いている。したがって、特定の態様において、本発明は、アミノ酸1から27を欠く本明細書の上記に開示されたEPO短1ポリペプチド、又は前記ポリペプチドの変異体或いは類似体を含むか、又はそれらからな

50

るポリペプチドにある。さらに別の特定の態様において、本発明は、上記に定義された配列番号4のアミノ酸28から164の配列又は前記配列の変異体或いは類似体を含むか、又はそれらからなるポリペプチドにある。

#### 【0060】

さらなる態様において、本発明は、本明細書において上記の1.2節に記載されたEPO短1ポリペプチドの相同体、又は前記EPO短1ポリペプチドの変異体或いはEPOポリペプチドの類似体を含むか、又はそれらからなる単離ポリペプチドにある。特定の実施形態において、前記相同体は、EPO短1ポリペプチド、又は前記EPO短1ポリペプチドの変異体或いはEPOポリペプチドの類似体と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する活性なポリペプチドとして定義される。好ましくは、前記同一性は、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも98%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも99%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも99.5%のアミノ酸配列同一性である。通常、相同体ポリペプチドは、長さが180から136までのアミノ酸、長さが170から136までのアミノ酸、しばしば長さが160から136までのアミノ酸、さらにしばしば長さが164のアミノ酸、さらにしばしば長さが140のアミノ酸、さらにしばしば長さが139のアミノ酸、さらにしばしば長さが138のアミノ酸、さらにしばしば長さが137のアミノ酸、さらにしばしば長さが136のアミノ酸である。特定の実施形態において、前記相同体は、配列番号4に示されたポリペプチドと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する活性なポリペプチド(EPOv1)又は配列番号4のアミノ酸28から164までの配列を有するポリペプチド(EPOv1m)からなるか、又はそれらを含む。好ましくは、前記同一性は、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも98%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも99%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも99.5%のアミノ酸配列同一性である。通常、EPOv1の相同体ポリペプチドは、長さが180のアミノ酸、さらにしばしば長さが170のアミノ酸、さらにしばしば長さが166のアミノ酸、さらにしばしば長さのアミノ酸、さらにしばしば長さが165のアミノ酸、さらにしばしば長さが164のアミノ酸である。通常、EPOv1mの相同体ポリペプチドは、長さが150のアミノ酸、さらにしばしば長さが140のアミノ酸、さらにしばしば長さが139のアミノ酸、さらにしばしば長さが138のアミノ酸、さらにしばしば長さが137のアミノ酸、さらにしばしば長さが136のアミノ酸である。

#### 【0061】

本明細書で同定されたEPOポリペプチド配列に関して「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、必要ならば最大パーセントの配列同一性を達成するために、配列同一性の一部としていずれの保存的置換を考慮せずに、配列の位置合わせをし、ギャップを導入した後、特定のEPOポリペプチド配列においてアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを測定する目的のための位置合わせは、例えば、BLASTなどの公的に利用できるコンピュータソフトウェア(Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. J Mol Biol. (1990). 215(3): 403~410頁)を用いて当業界の範囲内にある種々の方法で達成できる。当業者は、比較される配列の完全長にわたって最大位置合わせを達成するために必要な任意のアルゴリズムなど、位置合わせを測定するために適切なパラメーターを決定できる。

#### 【0062】

##### 1.3 EPO短2ポリペプチド及びそれらの変異体

さらなる態様において、本発明は、配列番号3のアミノ酸54(トレオニン)から142(グルタミン)までのうちの少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、さらにより好ましくは少なくとも4つ、さらにより好ましくは少なくとも5つ、さらにより好ましくは少なくとも6つ、さらにより好ましくは少なくとも7

つ、さらにより好ましくは少なくとも 8 つ、さらにより好ましくは少なくとも 9 つ、さらにより好ましくは少なくとも 10、さらにより好ましくは少なくとも 11、さらにより好ましくは少なくとも 12、さらにより好ましくは少なくとも 13、さらにより好ましくは少なくとも 14、さらにより好ましくは少なくとも 15、さらにより好ましくは少なくとも 16、さらにより好ましくは少なくとも 17、さらにより好ましくは少なくとも 18、さらにより好ましくは少なくとも 19、さらにより好ましくは少なくとも 20、さらにより好ましくは少なくとも 21、さらにより好ましくは少なくとも 22、さらにより好ましくは少なくとも 23、さらにより好ましくは少なくとも 24、さらにより好ましくは少なくとも 25、さらにより好ましくは少なくとも 26、さらにより好ましくは少なくとも 27、さらにより好ましくは少なくとも 28、さらにより好ましくは少なくとも 29、さらにより好ましくは少なくとも 30、さらにより好ましくは少なくとも 31、さらにより好ましくは少なくとも 32、さらにより好ましくは少なくとも 33、さらにより好ましくは少なくとも 34、さらにより好ましくは少なくとも 35、さらにより好ましくは少なくとも 36、さらにより好ましくは少なくとも 37、さらにより好ましくは少なくとも 38、さらにより好ましくは少なくとも 39、さらにより好ましくは少なくとも 40、さらにより好ましくは少なくとも 41、さらにより好ましくは少なくとも 42、さらにより好ましくは少なくとも 43、さらにより好ましくは少なくとも 44、さらにより好ましくは少なくとも 45、さらにより好ましくは少なくとも 46、さらにより好ましくは少なくとも 47、さらにより好ましくは少なくとも 48、さらにより好ましくは少なくとも 49、さらにより好ましくは少なくとも 50、さらにより好ましくは少なくとも 51、さらにより好ましくは少なくとも 52、さらにより好ましくは少なくとも 53、さらにより好ましくは少なくとも 54、さらにより好ましくは少なくとも 55、さらにより好ましくは少なくとも 56、さらにより好ましくは少なくとも 57、さらにより好ましくは少なくとも 58、さらにより好ましくは少なくとも 59、さらにより好ましくは少なくとも 60、さらにより好ましくは少なくとも 61、さらにより好ましくは少なくとも 62、さらにより好ましくは少なくとも 63、さらにより好ましくは少なくとも 64、さらにより好ましくは少なくとも 65、さらにより好ましくは少なくとも 66、さらにより好ましくは少なくとも 67、さらにより好ましくは少なくとも 68、さらにより好ましくは少なくとも 69、さらにより好ましくは少なくとも 70、さらにより好ましくは少なくとも 71、さらにより好ましくは少なくとも 72、さらにより好ましくは少なくとも 73、さらにより好ましくは少なくとも 74、さらにより好ましくは少なくとも 75、さらにより好ましくは少なくとも 76、さらにより好ましくは少なくとも 77、さらにより好ましくは少なくとも 78、さらにより好ましくは少なくとも 79、さらにより好ましくは少なくとも 80、さらにより好ましくは少なくとも 81、さらにより好ましくは少なくとも 82、さらにより好ましくは少なくとも 83、さらにより好ましくは少なくとも 84、さらにより好ましくは少なくとも 85、さらにより好ましくは少なくとも 86、さらにより好ましくは少なくとも 87、さらにより好ましくは少なくとも 88、さらにより好ましくは少なくとも 89 のアミノ酸の欠失により配列番号 3 に示された配列とは異なる EPO ポリペプチドからなる単離ポリペプチドにある。

#### 【0063】

本明細書に開示された種々のポリペプチドを記載するために用いられる用語の「単離」とは、その天然環境の成分から識別、分離及び/又は回収されるポリペプチドを意味する。したがって、本発明の単離産物は、培養上澄み液に含有させ、部分的に濃縮若しくは精製し、異種供給源から産生し、ベクター中にクローニングし、又は媒体と共に製剤化することができる。

#### 【0064】

好ましい実施形態において、本発明によるポリペプチドは、配列番号 6 に示された配列を有し（以後 EPO v 2 と命名される）、EPO の新規な転写変異体に相当する。EPO v 2 は、ヒト遺伝子 EPO のエキソン 1、2 及び 5 によりコード化され、エキソン 3 によりコード化された 29 のアミノ酸及びエキソン 4 によりコード化された 60 のアミノ酸を

10

20

30

40

50



欠いている（図 5 を参照）。したがって、この転写変異体は、その未成熟形態で 104 のアミノ酸長である。N 末端シグナルペプチドは、最初の 27 のアミノ酸を含む。シグナルペプチドが開裂されると、生じたタンパク質は 77 のアミノ酸長であり、以後 EPOv2m（配列番号 6 のアミノ酸 28 から 104 まで）と命名される。既に本明細書の上記に述べられたとおり、カルボキシ末端残基の除去により、細胞により発現されたタンパク質が 165 のアミノ酸長タンパク質（配列番号 3 のアミノ酸 28 から 192 まで）であるように EPOwtm に対して記載されている。したがって、成熟 EPOv2m タンパク質は、細胞により同じ様式で処理でき、生じたタンパク質は、76 のアミノ酸長（配列番号 6 のアミノ酸 28 から 103 まで）であり得る。さらに一般的には、本発明の実施形態において、本明細書の上記の EPO 短 2 ポリペプチドは、このカルボキシ末端アルギニン残基を欠いている。

10

#### 【0065】

本明細書の上記のとおり、EPOv2（図 5 及び配列番号 6 に示される）は、エキソン 3 及び 4 によりコード化される EPOwt のアミノ酸 54 から 142 までを欠いている。EPOv2 は、逆平行長ヘリックス A（EPOwtm の残基 8 ~ 26）及び D ヘリックス（EPOwtm の残基 138 ~ 161）を保持するが、逆平行長ヘリックス B（EPOwtm の残基 55 ~ 83）及び C（EPOwtm の残基 90 ~ 112）は、EPOv2m が存在しない。逆平行シート：2（EPOwtm の残基 133 ~ 135）もまた存在するが、逆平行シート：1（EPOwtm の残基 39 ~ 41）は、EPOv2m が存在しない。ジスルフィド結合、Cys 29 から Cys 33 は存在しない。ミニヘリックス C' の大部分（EPOwtm の残基 114 ~ 121）は、EPOv2m に保持されるが、短ヘリックス B' ヘリックス（EPOwtm の残基 47 ~ 52）は存在しない。A ヘリックス及び D を一緒に結合するジスルフィド結合、Cys 7 から Cys 161 もまた保持されるはずである。

20

#### 【0066】

さらなる態様において、本発明は、上記の EPO 短 2 ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。ポリペプチドとして定義される変異体は、本明細書において上記の EPO 短 2 ポリペプチドと比較して 1 つ又はいくつかのアミノ酸置換、典型的には 0 から 10 のアミノ酸置換、さらにより典型的には 0 から 5 つ、4 つ、3 つ、2 つ又は 1 つのアミノ酸置換を含む。さらに特に、変異ポリペプチドは、

30

#### 【化 11】

E40Q, Q85QQ,

G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, SL131-132NF, T134D, G140R 及び S147C.

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により本明細書において上記の EPO 短 2 ポリペプチドとは異なる。好ましい実施形態において、変異ポリペプチドは、G104S 及び S147C からなる群において選択される 1 つ又は 2 つの変異により本明細書における上記の EPO 短 2 ポリペプチドの配列とは異なる。別の実施形態において、EPO 短 2 ポリペプチドの変異体は、

40

## 【化 1 2】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A, L135S, K143A, S153A, T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y, F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A, G185A, C187S, C188A, 及び R189A.

10

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により本明細書において上記の EPO 短 2 ポリペプチドとは異なる。さらに別の実施形態において、EPO 短 2 ポリペプチドの変異体は、

## 【化 1 3】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, K143A, S153A, T159A, I160A, T161A, K167A, F169I, R170A, S173A, N174K, N174A, F175Y, F175A, L176A, R177A, R177E, G178A, K179A, K179W, L180A, K181A, L182A, G185A, C187S, C188A, 及び R189A.

20

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により本明細書において上記の EPO 短 2 ポリペプチドとは異なる。さらに別の実施形態において、EPO 短 2 ポリペプチドの変異体は、

30

## 【化 1 4】

K72D/S127E, A57N/H59T, K72D/R177E, R130E/L135S, K79A/K167A, K72A/K79A/K167A, K124A/K179A, K72A/K124A/K179A, K72A/K79A/K124A/K179A, K72A/K79A/K124A/K167A/K179A, K72A/K79A/K124A/K167A/K179A/K181A, N51K/N65K/N110K, 及び Y42A/N51K.

からなる群において選択される 1 つの組換え変異により本明細書において上記の EPO 短 2 ポリペプチドとは異なる。好ましい実施形態において、EPO 短 2 ポリペプチドの変異体は、C34S からなる変異により本明細書において上記の EPO 短 2 ポリペプチドの配列とは異なる。アミノ酸配列の修飾のために本明細書に用いられる表記は、指定された位置での野生型アミノ酸は、それぞれの番号直後のアミノ酸に変えられることを意味する。所与のナンバリングは、配列番号 3 におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。したがって例えば、E40Q 変異は、配列番号 3 の 40 位におけるアミノ酸 E (グルタミン酸) のアミノ酸 Q (グルタミン) への変異に相当する。しかしながら、このナンバリングは、EPO 短 2 ポリペプチドの各々に関して 53 位後のアミノ酸 (トレオニン) に関して異なり、EPO wt と比較して、EPO 短 2 に欠いているアミノ酸数に依ることは明白である。変異を受ける対応のアミノ酸 (複数可) は、EPO wt と比較して特定の EPO 短 2 ペ

40

50

プチドに欠いているアミノ酸数を配列番号3におけるミノ酸位置数から差し引くことにより（例えば、ポリペプチドEPO短2がアミノ酸54から142（89のアミノ酸）を欠く場合、S147C変異は、この特定のポリペプチドに関してS58Cに相当する）容易に同定される。

【0067】

別の実施形態において、本発明は、グリコシル化に関して1つから6つまでの追加部位を有するようなポリペプチドとはさらに異なる本明細書において上記のEPO短2ポリペプチド又はEPO短2ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる単離ポリペプチドに相当するEPOポリペプチドの類似体にある。1つ以上のオリゴ糖基によるタンパク質のグリコシル化は、ポリペプチド骨格に沿って特定の位置に生じ、タンパク質安定性、分泌、細胞下局在化、及び生物活性などのタンパク質の物理的性質に影響を及ぼす。グリコシル化は、通常、2つのタイプがある：O-結合オリゴ糖類は、セリン又はトレオニン残基に結合し、N-結合オリゴ糖類は、アスパラギン残基に結合する。N-結合及びO-結合オリゴ糖類の双方に見られる1タイプのオリゴ糖は、9つ以上の炭素原子を含有するアミノ糖類のファミリーであるN-アセチルノイラミン酸（シアル酸）である。シアル酸は負電荷を有し、糖タンパク質に酸性を付与することから、シアル酸は、通常、N-結合及びO-結合オリゴ糖類上の双方の末端残基である。1つのN-結合グリコシル化部位：EPOwtmの24位におけるアスパラギン残基及びO結合グリコシル化部位：EPOwtmの126位に配置されるセリン残基は、EPOv2mに保持される（一方、EPOwtmの38位と83位（アスパラギン残基）のN結合グリコシル化部位は、EPOv2mに存在しない）。本発明のポリペプチドは、シアル酸結合に対する部位数の増加をもたらすアミノ酸配列の1つ以上の変化により本明細書において上記のEPOv2又はEPO短2ポリペプチド或いはEPO短2ポリペプチド変異体の類似体を含む。これらの糖タンパク質類似体は、グリコシル化に利用できる部位を増加させるか、又は変化させるアミノ酸残基の付加、欠失、又は置換を有する部位特異的変異誘発により作出できる。ヒトエリスロポエチンに見られるものよりも大きなシアル酸レベルを有する本発明のEPO類似体は、生物活性に必要な第二級又は第三級立体配座を摂動しないグリコシル化部位を付加することにより作出される。本発明のポリペプチドはまた、通常、N-結合又はO-結合部位に密接した1つ以上のアミノ酸の置換を含むグリコシル化部位に炭水化物結合の増加レベルを有するEPO類似体を含む。本発明のポリペプチドはまた、エリスロポエチンのカルボキシ末端から伸長する1つ以上のアミノ酸を有し、少なくとも1つの追加炭水化物部位を提供するEPO類似体を含む。本発明のポリペプチドはまた、グリコシル化用に少なくとも1つの部位の転移を含むアミノ酸配列を有するEPO類似体を含む。このようなグリコシル化部位の転移は、本明細書において上記のEPOv2又はEPO短2、或いはEPO短2ポリペプチドの変異体における1つ以上のグリコシル化部位の欠失及び1つ以上の非天然グリコシル化部位の付加を含む。エリスロポエチン上の炭水化物鎖数の増加、したがって、1エリスロポエチン分子当たりのシアル酸数を増加させることにより、安定性の増加、より大きな耐タンパク分解性、免疫原性の減少、血清中半減期の増加、生物活性の増加など、有利な性質を付与できる。追加のグリコシル化部位を有するエリスロポエチン類似体は、欧州特許出願第640,619号、PCT出願WO0024893及びWO0181405に、さらに詳細に開示されている。

【0068】

好ましい実施形態において、本発明のこのようなEPO類似体は、84位、96位、113位、115位、116位又は141位において少なくとも1つの追加N-結合グリコシル化部位を含み、本明細書において上記のEPO短2ポリペプチド又はEPO短2ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる。既に本明細書の上記に説明されたように、所与の位置は、配列番号3におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。このナンバリングは、EPO短2又は変異ポリペプチドの各々に関して53位後のアミノ酸（トレオニン）について異なり、EPOwtと比較してEPO短2に、又はEPO短2ポリペプチドの変異体に欠いているアミノ酸数に依存する。別の実施形態において、このようなEPO

Ｏ類似体は、少なくとも２つの追加グリコシル化部位、又は少なくとも３つの追加グリコシル化部位、或いは少なくとも４つの追加グリコシル化部位を含む。

【 ０ ０ ６ ９ 】

好ましい実施形態において、本発明のこれらＥＰＯ類似体は、以下の：

【 化 １ ５ 】

G84N及びQ86T;

L96N;

L96N及びS98T;

A95S, L96N及びS98T;

10

Q113N, P114V及びW115T;

P114V, W115N及びP117T;

P114V, W115N及びP117S;

P114A, W115N及びP117T;

P114S, W115N及びP117T;

P114S W115N, E116G及びP117T;

P114V, W115N, E116G及びP117T;

20

P114S W115N, P117T及びQ119T;

N110Q, P114S, W115N及びP117T;

P114S W115N, P117T, R189A;

L96N, S98T, P114S, W115N及びP117T;

E116N, P117I及びL118T;

P114S, E116N, P117I及びL118T;

A141N;

30

A141N及びK143T;

P114V, W115N, P117T, A141N及びK143T ;

A151P及びA152T;

A152T;

A152N及びA154S;

D163N及びF165T;

F165N及びK167T.

40

から選択される修飾により修飾された、本明細書において上記のＥＰＯ短２ポリペプチド、又はＥＰＯ短２ポリペプチドの変異体を含むか、又はそれらからなる。

【 ０ ０ ７ ０ 】

既に本明細書の上記に述べられたように、所与の位置は、配列番号３におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。このナンバリングは、ＥＰＯ短２ポリペプチドの各々に関して５３位後のアミノ酸（トレオニン）について異なり、ＥＰＯ<sub>w t</sub>と比較してＥＰＯ短２に、又はＥＰＯ短２ポリペプチドの変異体に欠いているアミノ酸数に依存する。

【 ０ ０ ７ １ 】

さらに好ましい実施形態において、本明細書の上記のペプチドは、Ｎ末端シグナルペプ

50

チドを欠く成熟ペプチドである。さらに特に、本発明のポリペプチドは、配列番号 3 のアミノ酸 1 から 27 までからなるシグナルペプチドを欠いている。したがって、特定の態様において、本発明は、アミノ酸 1 から 27 を欠く本明細書の上記に開示された EPO 短 2 ポリペプチド、又は前記ポリペプチドの変異体或いは類似体を含むか、又はそれらからなるポリペプチドにある。さらに別の特定の態様において、本発明は、上記に定義された配列番号 6 のアミノ酸 28 から 104 の配列又は前記配列の変異体或いは類似体を含むか、又はそれらからなるポリペプチドにある。

#### 【0072】

さらなる態様において、本発明は、本明細書において上記の 1. 3 節に記載された EPO 短 2 ポリペプチドの相同体、又は前記 EPO 短 2 ポリペプチドの変異体或いは EPO ポリペプチドの類似体を含むか、又はそれらからなる単離ポリペプチドにある。特定の実施形態において、前記相同体は、EPO 短 2 ポリペプチド、又は前記 EPO 短 2 ポリペプチドの変異体或いは EPO ポリペプチドの類似体と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する活性なポリペプチドとして定義される。好ましくは、前記同一性は、少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも 99.5 % のアミノ酸配列同一性である。通常、相同体ポリペプチドは、長さが 120 から 77 までのアミノ酸、長さが 110 から 77 までのアミノ酸、しばしば長さが 105 から 77 までのアミノ酸、さらにしばしば長さが 104 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 80 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 79 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 78 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 77 のアミノ酸である。特定の実施形態において、前記相同体は、配列番号 6 に示されたポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する活性なポリペプチド (EPO v 2) 又は配列番号 6 のアミノ酸 28 から 104 までの配列を有するポリペプチド (EPO v 2 m) からなるか、又はそれらを含む。好ましくは、前記同一性は、少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも 99.5 % のアミノ酸配列同一性である。通常、EPO v 2 の相同体ポリペプチドは、長さが 125 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 115 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 110 のアミノ酸、さらにしばしば長さのアミノ酸、さらにしばしば長さが 109 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 108 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 107 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 106 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 105 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 104 のアミノ酸である。通常、EPO v 2 m の相同体ポリペプチドは、長さが 90 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 85 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 80 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 79 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 78 のアミノ酸、さらにしばしば長さが 77 のアミノ酸である。

#### 【0073】

本明細書で同定された EPO ポリペプチド配列に関して「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、必要ならば最大パーセントの配列同一性を達成するために、配列同一性の一部としていずれの保存的置換を考慮せずに、配列の位置合わせをし、ギャップを導入した後、特定の EPO ポリペプチド配列においてアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを測定する目的のための位置合わせは、例えば、BLAST などの公的に利用できるコンピュータソフトウェア (Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. J Mol Biol. (1990). 215 (3): 403 ~ 410 頁) を用いて当業界の範囲内にある種々の方法で達成できる。当業者は、比較される配列の完全長にわたって最大位置合わせを達成するために必要な任意のアルゴリズムなど、位置合わせを測定するために適切なパラメーターを決定できる。

#### 【0074】

#### 1.4 EPOv3ポリペプチド及びそれらの変異体

さらなる態様において、本発明は、配列番号8に示された配列を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。配列番号8に示された配列を有するポリペプチドは、初めて本明細書に開示されたEPOの新規な転写変異体のC末端部分に相当し、エキソン4Aの3'末端によりコード化される。前記エキソン4Aは、野生型EPOをコードするエキソン4と比較して3'末端がより長い(図3及び6を参照)。

##### 【0075】

本明細書に開示された種々のポリペプチドを記載するために用いられる用語の「単離」とは、その天然環境の成分から識別、分離及び/又は回収されるポリペプチドを意味する。したがって、本発明の単離産物は、培養上澄み液に含有させ、部分的に濃縮若しくは精製し、異種供給源から産生し、ベクター中にクローニングし、又は媒体と共に製剤化することができる。

10

##### 【0076】

さらなる態様において、本発明は、配列番号8に示されたポリペプチドの変異体を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。変異体は、配列番号8と少なくとも75%のアミノ酸配列同一性、好ましくは、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドとして定義される。通常、変異ポリペプチドは、長さが少なくとも8つのアミノ酸、しばしば長さが少なくとも10のアミノ酸、さらにしばしば長さが少なくとも12のアミノ酸である。より好ましくは、該変異体は、2つ、さらにより好ましくは1つのアミノ酸により配列番号8とは異なる。

20

##### 【0077】

本明細書で同定されたEPOポリペプチド配列に関して「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、必要ならば最大パーセントの配列同一性を達成するために、配列同一性の一部としていずれの保存的置換を考慮せずに、配列の位置合わせをし、ギャップを導入した後、特定のEPOポリペプチド配列においてアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを測定する目的のための位置合わせは、例えば、BLASTなどの公的に利用できるコンピュータソフトウェア(Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, J Mol Biol. (1990). 215(3): 403~410頁)を用いて当業界の範囲内にある種々の方法で達成できる。当業者は、比較される配列の完全長にわたって最大位置合わせを達成するために必要な任意のアルゴリズムなど、位置合わせを測定するために適切なパラメーターを決定できる。

30

##### 【0078】

さらなる態様において、本発明は、配列番号9に示された配列を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。配列番号9のポリペプチド(以後EPOv3と命名される)は、ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2、3及びより長いエキソン4(本明細書においてエキソン4Aと命名される)によりコード化されるEPOの新規な転写変異体である(図6を参照)。このより長いエキソン4(エキソン4A)は、EPOの新規な転写変異体のC末端部分をコードし、最初に本明細書に開示される。前記エキソン4Aは、野生型EPOをコードするエキソン4と比較して3'末端がより長い(図3及び6を参照)。

40

##### 【0079】

図6において、示されるヒト転写変異体のヌクレオチド1から607までは、エキソン1、2、3の接合点及びエキソン4Aの5'末端を表し、ヌクレオチド608から647までは、エキソン4Aの3'末端を表す。EPOv3は、その未成熟形態での154のアミノ酸のポリペプチドである。N末端シグナルペプチドは、最初の27のアミノ酸を含む。シグナルペプチドが開裂されると、生じたタンパク質は127のアミノ酸長であり、以後EPOv3m(配列番号9のアミノ酸28から154まで)と命名される。EPOv3

50

の配列は、アミノ酸 1 から 142 までの E P O w t ( 図 3 及び配列番号 3 に示される ) に共通しており、その C 末端 ( アミノ酸 143 から 154 まで ) において異なる。E P O v 3 ( 図 4 及び配列番号 9 に示される ) は、逆平行長ヘリックス、 A ( E P O w t m の残基 8 ~ 26 )、 B ( E P O w t m の残基 55 ~ 83 ) 及び C ( E P O w t m の残基 90 ~ 112 ) を保持すると結論付けることができる。 D ヘリックス ( E P O w t m の残基 138 ~ 161 ) は、E P O v 3 m に存在しない。逆平行 シート : 1 ( E P O w t m の残基 39 ~ 41 ) 及び 2 ( E P O w t m の残基 133 ~ 135 ) もまた存在する。ジスルフィド結合、A B ループの一部と A ヘリックスの末端とを結合する C y s 29 から C y s 33 もまた保持されるはずである。2 つの追加の短いヘリックス、 B ' ヘリックス ( E P O w t m の残基 47 ~ 52 ) 及びミニヘリックス C ' ( E P O w t m の残基 114 ~ 121 ) もまた E P O v 3 m に保持される。システイン C y s 7 は保持されるが、C y s 7 とジスルフィド架橋を形成するシステイン C y s 161 は存在しない。しかしながら、エキソン 4 A の新規な 3 ' 末端は、C y s 7 とジスルフィド架橋を形成し得る配列番号 9 ( E P O v 3 ) の 150 位、又は E P O v 3 m の 123 位におけるシステインをコードする。

10

#### 【0080】

さらなる態様において、本発明は、E P O v 3 の変異体を含むか、又はそれからなる単離ポリペプチドにある。特定の実施形態において、配列番号 9 に示されたポリペプチドの変異体 ( E P O v 3 ) は、配列番号 9 の配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性、好ましくは、少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも 99 . 5 % のアミノ酸配列同一性を有する活性なポリペプチドとして定義される。通常、E P O v 3 変異ポリペプチドは、少なくとも長さが 125 のアミノ酸、しばしば少なくとも長さが 140 のアミノ酸、しばしば少なくとも長さが 145 のアミノ酸、しばしば少なくとも長さが 150 のアミノ酸、さらにしばしば少なくとも長さが 154 のアミノ酸である。さらに好ましくは、本発明の E P O v 3 変異体は、配列番号 9 と比較して 1 つ又はいくつかのアミノ酸置換、典型的には 0 から 10 のアミノ酸置換、さらにより典型的には 0 から 5 つ、4 つ、3 つ、2 つ又は 1 つのアミノ酸置換を含むポリペプチドにある。さらに特に、E P O v 3 変異ポリペプチドは、

20

30

#### 【化 16】

E40Q, D70N, Q85QQ, G104S, L129G,  
L129P, L129S, S131N, L132F, T134D, G140R 及び SL131-132NF.

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により配列番号 9 に示された配列とは異なる。別の実施形態において、E P O v 3 変異ポリペプチドは、D 7 0 N 及び G 1 0 4 S からなる群において選択される 1 つ又は 2 つの変異により配列番号 9 に示された配列とは異なる。さらに別の実施形態において、E P O v 3 変異ポリペプチドは、

40

## 【化 1 7】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S,  
 L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A,  
 N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I,  
 K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N,  
 E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A,  
 G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K,  
 L135A 及び L135S.

10

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、  
 8 つ、9 つ又は 10 の変異により配列番号 9 に示された配列とは異なる。さらに別の実施  
 形態において、EPOV3 変異ポリペプチドは、K72D/S127E、A57N/H5  
 9T、R130E/L135S、N51K/N65K/N110K、及び Y42A/N5  
 1K からなる群において選択される変異の組合せの 1 つにより配列番号 9 に示された配列  
 とは異なる。好ましい実施形態において、EPOV3 変異ポリペプチドは、C34S から  
 なる変異により配列番号 9 に示された配列とは異なる。

20

## 【0081】

特定の実施形態において、EPOV3 変異ポリペプチドは、グリコシル化に関して 1 つ  
 から 6 つの追加の部位を有するものなど、記載された上記のポリペプチド（配列番号 9 に  
 示されたポリペプチド；又は

## 【化 1 8】

E40Q, D70N, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F,  
 T134D, G140R 及び SL131-132NF;

30

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、  
 8 つ、9 つ又は 10 の変異により配列番号 9 に示された配列とは異なるポリペプチド；又  
 は D70N 及び G104S からなる群において選択される少なくとも 1 つ及び 2 つの変異  
 により配列番号 9 に示された配列とは異なるポリペプチド；又は

## 【化 1 9】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A,  
 Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y,  
 N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A,  
 Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A,  
 S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A,  
 T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A 及び L135S;

40

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、  
 8 つ、9 つ又は 10 の変異により配列番号 9 に示された配列とは異なるポリペプチド；又  
 は



【化 2 0】

K72D/S127E, A57N/H59T, R130E/L135S,  
N51K/N65K/N110K, 及び Y42A/N51K;

からなる群において選択される変異の組合せの 1 つにより配列番号 9 に示された配列とは異なるポリペプチド；又は C 3 4 S からなる変異により配列番号 9 に示された配列とは異なるポリペプチド）とは異なる。1 つ以上のオリゴ糖基によるタンパク質のグリコシル化は、ポリペプチド骨格に沿って特定の位置に生じ、タンパク質安定性、分泌、細胞下局在化、及び生物活性などのタンパク質の物理的性質に影響を及ぼす。グリコシル化は、通常、2 つのタイプがある。O - 結合オリゴ糖類は、セリン又はトレオニン残基に結合し、N - 結合オリゴ糖類は、アスパラギン残基に結合する。N - 結合及び O - 結合オリゴ糖類の双方に見られる 1 タイプのオリゴ糖は、9 つ以上の炭素原子を含有するアミノ糖類のファミリーである N - アセチルノイラミン酸（シアル酸）である。シアル酸は負電荷を有し、糖タンパク質に酸性を付与することから、シアル酸は、通常、N - 結合及び O - 結合オリゴ糖類上の双方の末端残基である。N - 結合グリコシル化部位：E P O w t m の 2 4 位、3 8 位及び 8 3 位におけるアスパラギン残基は、E P O v 3 m に保持される（一方、O - 結合グリコシル化部位：E P O w t m の 1 2 6 位に配置されるセリン残基は、E P O v 3 m に存在しない）。特定の実施形態において、本発明の E P O v 3 変異体は、シアル酸結合に対する部位数の増加をもたらすアミノ酸配列の 1 つ以上の変化を有する類似体を含む。これらの糖タンパク質類似体は、グリコシル化に利用できる部位を増加させるか、又は変化させるアミノ酸残基の付加、欠失、又は置換を有する部位特異的変異誘発により作出できる。特定の実施形態において、ヒトエリスロポエチンに見られるものよりも大きなシアル酸レベルを有する E P O v 3 変異体は、生物活性に必要な第二級又は第三級立体配座を摂動しないグリコシル化部位を付加することにより作出される。特定の実施形態において、本発明の E P O v 3 変異体はまた、通常、N - 結合又は O - 結合部位に密接した 1 つ以上のアミノ酸の置換を含むグリコシル化部位に炭水化物結合の増加レベルを有する類似体を含む。特定の実施形態において、本発明の E P O v 3 変異体はまた、エリスロポエチンのカルボキシ末端から伸長する 1 つ以上のアミノ酸を有し、少なくとも 1 つの追加の炭水化物部位を提供する類似体を含む。特定の実施形態において、本発明の E P O v 3 変異体はまた、グリコシル化用に少なくとも 1 つの部位の転移を含むアミノ酸配列を有する類似体を含む。このようなグリコシル化部位の転移は、E P O v 3 において（又は

【化 2 1】

E40Q, D70N, Q85QQ, G104S, L129G,  
L129P, L129S, S131N, L132F, T134D, G140R 及び SL131-132NF;

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 1 0 の変異により；又は D 7 0 N 及び G 1 0 4 S からなる群において選択される少なくとも 1 つ及び 2 つの変異により；又は

10

20

30

40

## 【化 2 2】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A 及び L135S;

10

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により；又は

## 【化 2 3】

K72D/S127E, A57N/H59T, R130E/L135S, N51K/N65K/N110K, 及び Y42A/N51K;

20

からなる群において選択される変異の組合せの 1 つにより；又は C 3 4 S からなる変異により、配列番号 9 に示された配列とは異なるポリペプチドにおいて) 1 つ以上のグリコシル化部位の欠失及び 1 つ以上の非天然グリコシル化部位の付加を含む。エリスロポエチン上の炭水化物鎖数の増加、したがって、1 エリスロポエチン分子当たりのシアル酸数を増加させることにより、安定性の増加、より大きな耐タンパク分解性、免疫原性の減少、血清中半減期の増加、生物活性の増加など、有利な性質を付与できる。追加のグリコシル化部位を有するエリスロポエチン類似体は、欧州特許出願第 6 4 0 , 6 1 9 号、P C T 出願 W O 0 0 2 4 8 9 3 及び W O 0 1 8 1 4 0 5 に、さらに詳細に開示されている。

## 【0 0 8 2】

特定の実施形態において、本発明の E P O v 3 変異体は、5 7 位、7 8 位、7 9 位、8 0 位、8 2 位、8 4 位、9 6 位、1 1 3 位、1 1 5 位、1 1 6 位又は 1 4 1 位に少なくとも 1 つの追加 N - 結合グリコシル化部位を含み、配列番号 9 のアミノ酸配列（又は

30

## 【化 2 4】

E40Q, D70N, Q85QQ, G104S,  
L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, T134D, G140R 及び SL131-132NF;

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により；又は D 7 0 N 及び G 1 0 4 S からなる群において選択される少なくとも 1 つ及び 2 つの変異により；又は

40

## 【化 2 5】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A 及び L135S;

10

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により; 又は

## 【化 2 6】

K72D/S127E, A57N/H59T, R130E/L135S, N51K/N65K/N110K, 及び Y42A/N51K;

からなる群において選択される変異の組合せの 1 つにより; 又は C 3 4 S からなる変異により、このような配列とは異なるアミノ酸配列)を含むか、又はこれらからなる。別の実施形態において、このような E P O v 3 変異体は、少なくとも 2 つの追加グリコシル化部位、又は少なくとも 3 つの追加グリコシル化部位、或いは少なくとも 4 つの追加グリコシル化部位を含む。

20

## 【0 0 8 3】

好ましい実施形態において、本発明の E P O v 3 変異体は、配列番号 9 の配列 (又は

## 【化 2 7】

E40Q, D70N, Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, T134D, G140R 及び SL131-132NF;

30

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により; 又は D 7 0 N 及び G 1 0 4 S からなる群において選択される 1 つ又は 2 つの変異により; 又は

## 【化 2 8】

I33A, C34S, C34A, R37I, VI38S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A 及び L135S;

40

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により; 又は

50

## 【化 2 9】

K72D/S127E, A57N/H59T, R130E/L135S, N51K/N65K/N110K, 及び Y42A/N51K;

からなる群において選択される変異の組合せの 1 つにより ; 又は C 3 4 S からなる変異により、配列番号 9 とは異なるアミノ酸配列) を含むか、又はこれらからなり、以下の :

## 【化 3 0】

A57N 及び H59T;

W78N 及び R80T;

K79N 及び M81T;

R80N 及び E82T;

A57N, H59T, R80N 及び E82T ;

E82N 及び G84T;

G84N 及び Q86T;

L96N;

L96N 及び S98T;

A95S, L96N 及び S98T;

Q113N, P114V 及び W115T;

P114V, W115N 及び P117T;

P114V, W115N 及び P117S;

P114A, W115N 及び P117T;

P114S, W115N 及び P117T;

P114S W115N, E116G 及び P117T;

P114V, W115N, E116G 及び P117T;

A57N, H59T, R80N, E82N, P114V, W115N 及び P117T;

N110Q, P114S, W115N 及び P117T;

P114S W115N, P117T 及び Q119T;

L96N, S98T, P114S, W115N 及び P117T;

A57N, H59T, P114V, W115N 及び P117T;

E116N, P117I 及び L118T;

P114S, E116N, P117I 及び L118T;

A141N.

10

20

30

40

から選択される修飾により修飾される。

## 【 0 0 8 4】

アミノ酸配列の修飾のために本明細書に用いられる表記は、指定された位置での野生型アミノ酸は、それぞれの番号直後のアミノ酸に変えられることを意味する。このナンバリ

50

ングは、配列番号 9 におけるアミノ酸のナンバリングに関連する。したがって例えば、A 57N 変異は、配列番号 9 の 57 位におけるアミノ酸 A (アラニン) のアミノ酸 N (アスパラギン) への変異に相当する。

【0085】

EPOV3 変異体はまた、グリコシル化のために少なくとも 1 つの部位の転移を含むアミノ酸配列を有する類似体であり得る。この転移は、ヒトエリスロポエチンにおける任意の N - 結合炭水化物部位の欠失及び配列番号 9 の 115 位における N - 結合炭水化物部位の付加を含むことができる。好ましくは、これらの EPOV3 変異体は、配列番号 9 の配列 (又は

【化 3 1】

10

E40Q, D70N,

Q85QQ, G104S, L129G, L129P, L129S, S131N, L132F, T134D, G140R 及び SL131-132NF;

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により; 又は D70N 及び G104S からなる群において選択される 1 つ又は 2 つの変異により; 又は

【化 3 2】

20

I33A, C34S, C34A, R37I, V138S, L39A, E40A, R41A, R41B, R41E, R41Q, Y42A, Y42F, Y42I, K47A, K47E, E48A, N51K, C56S, C56Y, A57N, H59T, C60S, C60Y, N65K, P69N, P69A, D70A, T71I, K72A, K72D, V73A, N74A, F75A, F75I, Y76A, Y76S, W78F, W78N, K79A, Q86N, E89T, L94S, L97A, N110K, D123R, K124A, S127R, S127E, S127A, S127T, G128A, G128I, L129A, R130A, S131A, S131I, L132A, T133A, T133I, T134A, T134L, L135K, L135A 及び L135S;

30

からなる群において選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ又は 10 の変異により; 又は

【化 3 3】

K72D/S127E, A57N/H59T, R130E/L135S, N51K/N65K/N110K, 及び Y42A/N51K;

40

からなる群において選択される変異の組合せの 1 つにより; 又は C34S からなる変異により、配列番号 9 のアミノ酸配列) を含むか、又はこれらからなり、以下の:

【化 3 4】

N51Q, P114S, W115N 及び P117T;

N65Q, P114S, W115N 及び P117T;

N110Q, P114S, W115N 及び P117T.

50

から選択される修飾により修飾される。

【0086】

好ましい実施形態において、上記のペプチドは、N末端シグナルペプチドを欠く成熟ペプチドである。さらに特に、本発明のポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸1から27までからなるシグナルペプチドを欠いている。したがって、特定の態様において、本発明は、1から27までのアミノ酸を欠くEPOV3ポリペプチド又は上記に開示された前記ポリペプチドの変異体又は類似体を含むか、又はそれらからなるポリペプチドにある。さらに別の特定の態様において、本発明は、上記に定義された配列番号9のアミノ酸28から154までの配列又は前記配列の変異体を含むか、又はそれらからなるポリペプチドにある。

10

【0087】

さらなる態様において、本発明は、本明細書において上記の1.4節に記載されたポリペプチドの相同体を含むか、又はそれらからなる単離ポリペプチドにある。特定の実施形態において、前記相同体は、参照のポリペプチド、又は前記ポリペプチドの変異体或いは前記ポリペプチドの類似体と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する活性なポリペプチドとして定義される。好ましくは、前記同一性は、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも98%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも99%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも99.5%のアミノ酸配列同一性である。通常、相同体ポリペプチドは、長さが170から127までのアミノ酸、しばしば長さが160から127までのアミノ酸、さらにしばしば長さが154から127までのアミノ酸、さらにしばしば長さが130のアミノ酸、さらにしばしば長さが129のアミノ酸、さらにしばしば長さが128のアミノ酸、さらにしばしば長さが127のアミノ酸である。特定の実施形態において、前記相同体は、配列番号9に示されたポリペプチドと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する活性なポリペプチド(EPOV3)又は配列番号9のアミノ酸28から154までの配列を有するポリペプチド(EPOV3m)からなるか、又はそれらを含む。好ましくは、前記同一性は、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも98%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも99%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも99.5%のアミノ酸配列同一性である。通常、EPOV3の相同体ポリペプチドは、長さが170のアミノ酸、さらにしばしば長さが160のアミノ酸、さらにしばしば長さが159のアミノ酸、さらにしばしば長さが158のアミノ酸、さらにしばしば長さが157のアミノ酸、さらにしばしば長さが156のアミノ酸、さらにしばしば長さが1155のアミノ酸、さらにしばしば長さが154のアミノ酸である。通常、EPOV3mの相同体ポリペプチドは、長さが150のアミノ酸、さらにしばしば長さが140のアミノ酸、さらにしばしば長さが130のアミノ酸、さらにしばしば長さが129のアミノ酸、さらにしばしば長さが128のアミノ酸、さらにしばしば長さが127のアミノ酸である。

20

30

【0088】

本明細書で同定されたEPOポリペプチド配列に関して「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、必要ならば最大パーセントの配列同一性を達成するために、配列同一性の一部としていずれの保存的置換を考慮せずに、配列の位置合わせをし、ギャップを導入した後、特定のEPOポリペプチド配列においてアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを測定する目的のための位置合わせは、例えば、BLASTなどの公的に利用できるコンピュータソフトウェア(Altschul SF、Gish W、Miller W、Myers EW、Lipman DJ. J Mol Biol. (1990). 215(3): 403~410頁)を用いて当業界の範囲内にある種々の方法で達成できる。当業者は、比較される配列の完全長にわたって最大位置合わせを達成するために必要な任意のアルゴリズムなど、位置合わせを測定するために適切なパラメータを決定できる。

40

50

## 【 0 0 8 9 】

## 1 . 5 E P Oポリヌクレオチドの生物活性及び本発明の変異体

上記又は下記のEPOポリヌクレオチド、変異体及び類似体のいずれも、少なくともいくつかの生物活性を保持することが好ましい。より好ましくは、前記生物活性は、以下の項目の少なくとも1つである：EPOに対する結合、EPO発現細胞におけるJAK2のチロシンリン酸化の誘導、EPO発現細胞の増殖刺激、哺乳動物、特にヒトにおける赤血球細胞の産生刺激、哺乳動物起源、特にヒト起源のインビトロ及び／又はインビボでの赤血球細胞の増殖及び／又は終末成熟の誘導、哺乳動物（特にヒトにおける）における血管作動性作用（血管収縮又は血管拡張）特に高血圧の誘導、哺乳動物、特にヒトにおけるヘマトクリットの増加、活性化過剰血小板、凝血原活性、血小板の産生増加、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの神経保護活性、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの神経栄養活性、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの神経細胞の生存の増強、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの心保護活性、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの心筋細胞の生存の増強、哺乳動物起源、特にヒト起源のインビトロ及び／又はインビボでの癌細胞（好ましくは、腎、前立腺、卵巣又は乳房に由来する細胞、又はリンパ腫細胞（特に濾胞性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫）、又は白血病細胞（特に慢性リンパ球性リンパ腫又は慢性骨髄性リンパ腫）、又は多発性骨髄腫細胞、又は中枢神経系に影響を及ぼす腫瘍細胞（特に神経膠芽腫又は神経芽腫））の増殖刺激、インビトロ及び／又はインビボ抗ウィルス活性（特にB型又はC型肝炎或いはHIVに対して）。 10 20

## 【 0 0 9 0 】

さらにより好ましくは、前記生物活性は、以下の項目の少なくとも1つである：哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの神経保護活性、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの神経栄養活性、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの神経細胞の生存の増強、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの心保護活性、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの心筋細胞の生存の増強。

## 【 0 0 9 1 】

これらの生物活性は、それ自体当業界に知られているいくつかの生物学的アッセイを用いて立証できる（このようなアッセイの非限定例は、本明細書における下記の実施例に記載されている）。より好ましくは、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体のいずれも、天然／非修飾／野生型EPOタンパク質（このタンパク質の未成熟形態は、配列番号3に示される）の生物活性と比較して、少なくとも（又は少なくともおよそ）50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、又は100%保持する。この態様の本発明のいくつかの実施形態において、このタンパク質は、天然／非修飾／野生型タンパク質よりも高い生物活性を有することができる。 30

## 【 0 0 9 2 】

本発明の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、実質的に哺乳動物においてヘマトクリット濃度を増加させることなく、前記哺乳動物、特にヒトにおける組織保護活性を有する。用語「組織保護」とは、虚血／低酸素症、精神的外傷、毒性及び／又は炎症の組織又は臓器による経験に対し典型的に関連する細胞損傷作用に対する組織防御のことである。細胞損傷は、アポトーシス及び／又は壊死（即ち、毒性細胞死）に導き得る。このように、「組織保護」効果は、通常、所与の精神的外傷、炎症、毒性又は虚血傷害と関連するアポトーシス及び／又は毒性細胞死の程度を経験することから組織を保護する。例えば、EPOは、神経保護性（Siren ALら、(Proc Natl Acad Sci USA, 2001年、98(7): 4044~9頁)及びBrines MLら(Proc Natl Acad Sci USA, 2000年、97(19): 10526~31)、及び心保護性（Parsa CJら(J Clin Invest, 2003年、112(7): 999~1007頁、Moon 40 50

Cら (Proc Natl Acad Sci USA, 2003年; 100(20): 11612~7頁) 及び Calvillo Lら、(Proc Natl Acad Sci USA, 2003年、100(8): 4802~6頁)) であることが判明している。したがって、このような条件下のEPOは、通常、虚血傷害(例えば、虚血発作)に関連する壊死及び/又はアポトーシスを有効に減少させることにより「組織保護」効果を呈する。「組織保護」とはまた、細胞損傷作用及び、引き続く網膜症、又は神経変性疾患などの変性疾患に関連する細胞死に対する組織の防御のことである。

#### 【0093】

本発明の好ましい態様において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、実質的に前記哺乳動物においてヘマトクリット濃度を増加させることなく組織保護活性を有し、前記組織保護活性は、以下の項目の少なくとも1つである：神経保護活性、神経栄養活性、心保護活性、肝保護活性、網膜の保護、筋肉の保護、肺の保護、腎臓の保護、小腸の保護、副腎皮質の保護、副腎髄質の保護、毛細血管内皮の保護、精巣の保護、卵巣の保護、及び子宮内膜組織の保護。本発明のさらなる好ましい態様において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、実質的に前記哺乳動物においてヘマトクリット濃度を増加させることなく組織保護活性を有し、前記組織保護活性は、以下の項目の少なくとも1つである：神経保護活性、神経栄養活性、心保護活性。本発明のさらなる好ましい態様において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、実質的に前記哺乳動物においてヘマトクリット濃度を増加させることなく組織保護活性を有し、前記組織保護活性は、神経保護活性及び/又は神経栄養活性である。これらの活性は、それ自体当業界に知られているいくつかの生物学的アッセイを用いて試験することができる(このようなアッセイの非限定例は、本明細書における下記の実施例に記載されている)。

#### 【0094】

本発明の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、哺乳動物、特にヒトにおける神経保護活性を有する。前記神経保護活性は、生物学的試験、特に実施例11に記載された生物学的試験(坐骨神経圧潰)を用いて測定できる。したがって本発明の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、神経圧潰後、少なくとも約0.02ms、好ましくは少なくとも約0.05ms、好ましくは少なくとも約0.1ms、さらに好ましくは少なくとも約0.15msの複合筋肉活動電位(CMAP)潜伏時間の減少を誘導する。本発明の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、実施例11に記載された生物学的試験(坐骨神経圧潰実験)を用いて測定された非処理動物と比較して、7日目に少なくとも約0.02ms、好ましくは少なくとも約0.05ms、好ましくは少なくとも約0.1ms、さらに好ましくは少なくとも約0.15msの複合筋肉活動電位(CMAP)潜伏時間の減少を誘導する。本発明の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、実施例11に記載された生物学的試験(坐骨神経圧潰実験)を用いて測定された非処理動物と比較して、14日目に少なくとも約0.02ms、好ましくは少なくとも約0.05ms、好ましくは少なくとも約0.1ms、さらに好ましくは少なくとも約0.15msの複合筋肉活動電位(CMAP)潜伏時間の減少を誘導する。

#### 【0095】

本発明の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、以下の生物活性の少なくとも1つを有する：哺乳動物のシュワン細胞(特にヒトのシュワン細胞)の増殖刺激、哺乳動物(特にヒト)における軸索再生刺激、哺乳動物のシュワン細胞によるTNFアルファ発現の減少(特に神経損傷後のヒトシュワン細胞により産生されたTNFアルファの減少)、特に哺乳動物の乏突起神経膠細胞及び/又は哺乳動物のシュワン細胞(特にヒトの乏突起神経膠細胞及び/又はヒトのシュワン細胞)におけるミエリン塩基性タンパク質(MBP)の発現刺激。

#### 【0096】

10

20

30

40

50



本発明の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)の産生を刺激する。前記ミエリン塩基性タンパク質(MBP)の産生刺激は、生物学的試験、特に実施例15に記載された生物学的試験を用いて測定できる。したがって本発明の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、実施例15に記載された生物学的試験を用いて測定されたように、16日目に少なくとも約5%、好ましくは少なくとも7%、さらに好ましくは少なくとも10%まで産生を誘導する。

#### 【0097】

本発明の好ましい実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、上記又は下記のいずれの生物活性、特に上記に定義された組織保護活性を有するが、哺乳動物、特にヒトにおけるヘマトクリット濃度を実質的に増加させない。特定の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、前記ポリペプチドが野生型EPO(特に市販の製品Eprex)の90%未満、好ましくは80%未満、好ましくは70%未満、好ましくは60%未満、好ましくは50%未満、好ましくは40%未満、好ましくは30%未満、好ましくは20%未満、好ましくは10%未満、好ましくは5%未満、好ましくは2%未満、好ましくは1%未満、さらに好ましくは0.5%未満の血液栄養活性を保持する場合にヘマトクリット濃度を実質的に増加させない。血液栄養活性の判定は、十分に当業者のレベル内にある。本発明のEPOポリペプチドの血液栄養活性は、例えば、実施例12に記載された技法を用いて野生型EPOの血液栄養活性と比較して測定できる。

10

20

#### 【0098】

特定の実施形態において、上記又は下記のEPOポリペプチド、変異体及び類似体は、前記ポリペプチドがベースラインのヘマトクリット濃度(即ち、処置前のヘマトクリット濃度)と比較して、約20%未満、好ましくは約15%未満、好ましくは約10%未満、好ましくは約5%未満、さらに好ましくは約1%未満、ヘマトクリット濃度を増加させる場合には実質的にヘマトクリット濃度を増加させない。ヘマトクリット濃度の増加は、ベースラインのヘマトクリット濃度(即ち、処置前)と処置後のヘマトクリットとを比較することにより測定される。一実施形態において、前記処置は、ヒトにおいて1回の注射当たり0.84 µg/kgの用量で8週間、1週3回の静脈内処置である。別の実施形態において、ヘマトクリット濃度の増加は、実施例12に記載されたとおりに測定される。図10に示されるように、野生型EPOは、マウスにおける12日目に約27%のヘマトクリットの増加を示す(約50%のヘマトクリット濃度を示すpDEST12.2単独で処置された群と、約77%のヘマトクリット濃度を示すEPOwt-pDEST12.2で処置された群との比較)。

30

#### 【0099】

##### 2. 融合タンパク質:

本発明はまた、追加のアミノ酸ドメインに作動可能に結合した、上記に開示されたポリペプチド(特にEPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、EPOv3ポリペプチド又はその変異体)を含む融合タンパク質に関する。追加のアミノ酸ドメインは、本明細書の上記のポリペプチドの配列から上流(N末端)又は下流(C末端)に配置され得る。この追加のドメインは、例えば、融合タンパク質の安定性、ターゲティング又は生物学的利用能の増加を提供する機能性領域を含むことができ;精製又は産生を容易にし、又は分子に追加の生物活性を付与する。このような追加のアミノ酸配列の特定の例としては、米国特許第6,193,972号に記載されたGST配列、Hisタグ配列、多量体化ドメイン、免疫グロブリン分子の定常領域又はヒト絨毛膜性生殖腺刺激ホルモン(hCG)などのヘテロ二量体タンパク質ホルモンを含む。用語の「作動可能に結合した」とは、ポリペプチド及び追加のアミノ酸ドメインは、直接的又はスペーサー残基を介してペプチド結合により結合することを示す。この様式で、融合タンパク質は、下記のとおり、同じものをコードする核酸分子の宿主細胞における直接発現により組換え的に産生できる。また、必要ならば、融

40

50

合タンパク質に含まれた追加のアミノ酸配列は、産生／精製過程の終末、又はインビボで例えば、適切なエンド－／エキソ－ペプチダーゼの手段により除去できる。例えば、融合タンパク質に含まれたスパーサー配列は、インビボ又はインビトロのいずれかで追加のアミノ酸ドメインから所望のポリペプチド変異体の酵素的開裂により分離するために使用できるエンドペプチダーゼ（カスパーゼなど）に対する認識部位を含むことができる。

#### 【0100】

特定の実施形態において、本発明による融合タンパク質は、免疫グロブリンを含み、即ち上記に開示された本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体（特に、EPO短ポリペプチド若しくはその変異体、EPO短1ポリペプチド若しくはその変異体、EPO短2ポリペプチド若しくはその変異体、又はEPOv3ポリペプチド若しくはその変異体）は、免疫グロブリンのすべて又は一部、特にヒト免疫グロブリンのFc部分に融合される。免疫グロブリン融合タンパク質を作製する方法は、例えば、WO01/03737に記載されたものなど当業界によく知られている。本発明の生じた融合タンパク質が、本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体の生物活性を実質的に保持することを当業者は認識するであろう。前記生物活性は、上記の生物活性の少なくとも1つである。特定の実施形態において、前記生物活性は、哺乳動物、特にヒトにおけるインビトロ及び／又はインビボでの神経保護活性である。

10

#### 【0101】

この融合は、直接的か、又は長さが1つから3つと短いか、又はそれ以上長いアミノ酸残基、例えば、長さが13のアミノ酸残基であり得る短いリンカーペプチドを経由できる。前記リンカーは、EPOポリペプチド（特にEPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、又はEPOv3ポリペプチド又はその変異体）配列と免疫グロブリン配列との間で導入されたGlu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Metを含む13-アミノ酸リンカー配列であり得る。免疫グロブリンに由来するアミノ酸配列は、本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体のC末端又はN末端、好ましくはC末端に結合できる。生じた融合タンパク質は、体液中の滞留時間（半減期）の延長、特定の活性増加、発現レベルの増加などの性質を改善するか、又は融合タンパク質の精製を容易にする。

20

#### 【0102】

好ましい実施形態において、本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体（特にEPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、EPOv3ポリペプチド又はその変異体）は、Ig分子の定常領域、例えば、免疫グロブリンのFc部分に融合する。場合によっては、例えば、ヒトIgG1のヒンジ領域を有するCH2及びCH3ドメインのような重鎖領域に融合することが好ましい。Fc部分は、例えば、Fc受容体などに結合する補体結合など、求められていない活性を防止するために変異できる。Ig分子の他のイソ体は、例えば、IgG2又はIgG4、或いはIgM又はIgAのような他のIgクラスなど、本発明による融合タンパク質の作出にも好適である。融合タンパク質は、モノマー又は多量体、ヘテロ多量体又はホモ多量体であり得る。

30

40

#### 【0103】

本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体のさらなる融合タンパク質は、その形成又はダイマー、トリマーなどを可能にする他のタンパク質から単離されたドメインを融合することにより調製できる。本発明のポリペプチドの多量化を可能にするタンパク質配列に関する例としては、hCG（WO97/30161）、コラーゲンX（WO04/33486）、C4BP（WO04/20639）、Erbタンパク質（WO98/02540）、又は多重ペプチド（WO01/00814）などのタンパク質から単離されたドメインである。

#### 【0104】

本発明はまた、このようなタンパク質をコードする対応のDNA配列と共にシグナルペ

50

プチドを含有する本明細書に開示された融合タンパク質に関する。このシグナルペプチドは、本明細書に開示された天然シグナルペプチド、又は異種或いは合成シグナルペプチドであり得る。

#### 【0105】

本発明はまた、さらなるN末端アミノ酸残基、好ましくはメチオニンを含む上記に開示されたEPOポリペプチド、変異体又は類似体（特にEPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、EPOv3ポリペプチド又はその変異体）のいずれかに関する。実際、発現系及び条件に依って、本発明のポリペプチドは、組換え宿主細胞内で出発のメチオニンにより発現できる。次いでこの追加のアミノ酸は、生じた組換えタンパク質に維持できるか、又は文献（Van Valkenburgh HA及びKahn RA、Methods Enzymol. (2002) 344: 186~93頁；Ben-Bassat A、Bioprocess Technol. (1991) 12: 147~59頁）に開示された方法に従ってメチオニンアミノペプチダーゼなどのエキソペプチダーゼの手段により除去できる。

10

#### 【0106】

##### 3. 本発明のポリペプチド及び融合タンパク質の調製

A. 本発明のポリペプチド、タンパク質及び融合タンパク質をコードする核酸及びベクター類：

本発明のさらなる目的は、上記に定義されたポリペプチド、タンパク質及び融合タンパク質をコードする単離核酸分子である。これに関して、用語「核酸分子」は、限定はしないが、デオキシリボ核酸（例えば、DNA、cDNA、gDNA、合成DNAなど）、リボ核酸（例えば、RNA、mRNAなど）及びペプチド核酸（PNA）など、すべて異なるタイプの核酸を包含する。好ましい実施形態において、核酸分子は、二本鎖DNA分子又はcDNA分子などのDNA分子である。用語の「単離」とは、通常、天然源に結合する少なくとも1種の不純物の核酸分子から同定及び分離された核酸分子を意味する。単離核酸分子は、天然に見られる形態又は設定以外のものである。したがって、単離核酸分子は、天然細胞に存在する特異的核酸分子と区別される。

20

#### 【0107】

本発明の特定の目的は、より具体的に

30

#### 【化35】

配列番号5, 配列番号7, 配列番号10, 配列番号11及び配列番号12,

からなる群又は相補鎖又はその縮重鎖、又は

#### 【化36】

配列番号4, 配列番号6, 配列番号8, 配列番号9及び配列番号13,

40

のポリペプチドをコードする核酸、又はその相補鎖を含むか、又はそれらからなる単離核酸分子にある。縮重配列とは、参照ヌクレオチド配列として同じアミノ酸配列をコードするが、遺伝子コード縮重の結果、異なるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を称す。好ましい実施形態において、核酸分子は、二本鎖DNA分子又はcDNA分子などのDNA分子である。

#### 【0108】

本発明のさらなる目的は、任意の上記又は下記ポリヌクレオチドをコードするDNAを含むベクターである。該ベクターは、クローニング又は発現ベクターであり、任意の原核細胞又は真核細胞において組込み又は自己複製の機能的であり得る。特に、該ベクターは

50

、プラスミド、コスミド、ウィルス、ファージ、エピソーム、人工染色体などであり得る。該ベクターは、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、複製起点などの調節要素を含むことができる。このようなベクターの具体的な例としては、下記に考察されるように、pBR、pUC又はpcDNAプラスミドなどの原核細胞プラスミド；レトロウィルス、アデノウィルス又はAAVベクターなどのウィルスベクター類；バクテリオファージ；バキュロウィルス；BAC又はYACなどが挙げられ得る。

#### 【0109】

適切な核酸配列は、種々の手法によりベクターに挿入できる。一般に、DNAは、当業界に知られた技法を用いて適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（複数可）に挿入される。ベクター成分としては、限定はしないが一般に、1つ以上のシグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列が挙げられる。1つ以上のこれらの成分を含有する好適なベクターの構築は、当業者に知られている標準的な連結技法を使用する。

10

#### 【0110】

##### B．宿主細胞

本発明のさらなる態様は組換え宿主細胞であり、前記細胞は、上記に定義された核酸分子又はベクターを含む。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。原核細胞の例としては、大腸菌（*E. coli*）などの細菌を含む。真核細胞の例としては、任意の一次的細胞培養又は確立された細胞系（例えば、3T3、ペロ、HEK293、TN5など）を含む酵母細胞、植物細胞、哺乳動物細胞及び昆虫細胞である。グリコシル化タンパク質の発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエ（*Drosophila*）S2及びスポドプテラ（*Spodoptera*）Sf9などの昆虫細胞、並びに植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞系の例としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞及びCOS細胞が挙げられる。さらに具体的な例としては、SV40（COS-7、ATCC CRL 1651）により変換されたサル腎臓CV1系；ヒト胎仔腎臓系（懸濁培地中の増殖用にサブクローン化された293又は293細胞、Grahamら、*J. Gen. Virol.*、36：59頁（1977））；チャイニーズハムスター卵巣細胞ノ-DHFR（CHO、Urlaub及びChasin、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、77：4216頁（1980））；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather、*Biol. Reprod.*、23：243～251頁（1980））；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2、HB 8065）；及びマウス乳房腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL 51）が挙げられる。本発明の特に好ましい哺乳動物細胞はCHO細胞である。

20

30

#### 【0111】

##### C．本発明のポリペプチド及び融合タンパク質の産生

本発明のポリペプチド及び融合タンパク質は、組換えテクノロジー、化学合成、クローニング、連結又はそれらの組合せによるなど、それ自体当業界に知られている任意の技法により産生できる。特定の実施形態において、ポリペプチド又は融合タンパク質は、組換えテクノロジー、例えば、好適な宿主細胞における対応する核酸の発現により産生される。したがって、本発明の別の目的は、本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体（特にEPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、EPOv3ポリペプチド又はその変異体）を産生する方法であり、該方法は、核酸分子の発現を可能にする条件下、本発明の組換え宿主細胞を培養すること、及び産生されたポリペプチドを回収することを含む。産生されたポリペプチドは、グリコシル化されていてもされてなくてもよく、又は使用される宿主細胞タイプに依って他の翻訳後の修飾を含有してもよい。多数の書籍及びレビュー、例えば、オックスフォード大学プレスにより出版された「実用的アプローチ（*A Practical Approach*）」シリーズにおけるいくつかのタイトル（「DNAクローニング2：発現系（*DNA Cloning 2: Expression Systems*）」

40

50

、1995年；「DNAクローニング4：哺乳動物系（DNA Cloning 4：Mammalian Systems）」、1996年；「タンパク質発現（Protein Expression）」、1999年；「タンパク質精製技法（Protein Purification Techniques）」、2001年）などで、ベクター及び原核細胞又は真核細胞を用いた組換えタンパク質をクローン化する方法及び産生する方法を教示している。

#### 【0112】

本発明によるポリペプチドを産生する方法に使用されるベクター類は、任意の好適な手段（形質転換、形質移入、接合、原形質融合、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、直接的ミクロ注入など）により適切な宿主細胞に導入できるエピソーム又は非-相同的／相同的組込みベクターであり得る。特定のプラスミド、ウィルス又はレトロウィルスベクターを選択するのに重要な因子としては：ベクターを含有するレシピエント細胞が、ベクターを含有しないこれらのレシピエント細胞から認識し、選択できる容易性；特定の宿主に望まれるベクターのコピー数；異なる種の宿主細胞間でベクターを「輸送」できることが望ましいかどうか、が挙げられる。該ベクター類は、前記細胞において構成的に活性又は誘導性であるように選択される適切な転写開始／終結調節配列の制御下、原核又は真核宿主細胞において本発明のポリペプチド又は融合タンパク質の発現を可能にするはずである。次いでこのような細胞中に実質的に豊富な細胞系を単離して安定な細胞系を提供できる。

#### 【0113】

宿主細胞は、タンパク質産生のために本明細書に記載された発現又はクローニングベクターにより形質移入されるか、又は形質転換され、プロモーターを誘導、形質転換体を選択、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅させるために適切に修飾された従来の栄養培地中で培養される。培地、温度、pHなどの培養条件は、過度の実験をすることなく当業者により選択できる。一般に、細胞培養の生産性を最大にする原理、プロトコル、及び実用的技法は、哺乳動物細胞のバイオテクノロジー：実用的アプローチ（Mammalian Cell Biotechnology：a Practical Approach）、M. Butler 編集（IRL Press、1991年）及び Sambrookら、上記文献に見ることができる。

#### 【0114】

真核宿主細胞（例えば、酵母、昆虫又は哺乳動物細胞）に関して、異なる転写及び翻訳調節配列を、宿主の性質に依って使用できる。それらは、アデノウィルス、パピローマウィルス、シミアンウィルスなどのウィルス源に由来することができ、この調節シグナルは、高レベルの発現を有する特定の遺伝子に関連する。例としては、ヘルペスウィルスのTKプロモーター、SV40早期プロモーター、酵母gal4遺伝子プロモーターなどである。遺伝子発現が調節できるように、抑制及び活性化を可能にする転写開始調節シグナルを選択できる。導入されたDNAにより安定に形質転換された細胞は、発現ベクターを含有する宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによっても選択できる。このマーカーはまた、栄養要求性宿主、耐殺生剤性、例えば、抗生物質、又は銅などの重金属に対する光合成を提供できる。選択性マーカー遺伝子は、発現される（例えば、同じベクター上の）DNA配列に直接結合できるか、又は共形質移入により同じ細胞に導入できる。追加の要素もまた、本発明のタンパク質の最適合成に必要と考えられる。

#### 【0115】

特に好適な原核細胞としては、組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌（枯草菌（*Bacillus subtilis*）又は大腸菌（*E. coli*）など）が挙げられる。このような細胞は、典型的にN末端メチオニン残基を含むタンパク質を産生し、このようなタンパク質は、本発明の特定の目的物を表す。適正な折りたたみ又は適正な部位でのグリコシル化など、タンパク質分子に翻訳後の修飾を供することから、本発明の用いられる好ましい細胞は、真核宿主細胞、例えば、ヒト、サル（例えば、COS細胞）、マウス及びチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳動物細胞である。代替の真核宿主細胞は、酵母発現ベクターに

より形質転換された酵母細胞（例えば、サッカロミセス属（*Saccharomyces*）、クルイベロミセス属（*Kluyveromyces*）など）である。また、酵母細胞は、グリコシル化などの翻訳後のペプチド修飾を実施できる。酵母において所望のタンパク質の産生を利用できる、強力なプロモーター配列及びプラスミドの高いコピー数を利用する多くの組換えDNA方式が存在する。酵母細胞は、クローン化哺乳動物遺伝子産物においてリーダー配列を認識し、リーダー配列を有するポリペプチド（即ち、プレペプチド）を分泌する。

#### 【0116】

組換えポリペプチドの長期の高収率産生に関して、安定な発現が好ましい。例えば、対象のポリペプチドを安定に発現する細胞系は、ウイルス複製起点及び／又は内因性発現要素及び同じか又は別個のベクター上の選択性マーカー遺伝子を含む発現ベクターを用いて形質転換できる。ベクターの導入後、細胞を、濃縮培地中で1～2日間増殖させてから、それらを選択性培地に切り替える。選択性マーカーの目的は、耐選択性を付与することであり、その存在は、導入配列を首尾よく発現する細胞の増殖及び回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、細胞タイプに適切な組織培養技法を用いて増殖できる。次に実質的にこのような細胞に富んだ細胞系を単離して安定な細胞系を提供できる。

#### 【0117】

本発明の組換えポリペプチドの高収率産生の特に好ましい方法は、米国特許第4,889,803号に記載されているメトトレキサートの連続濃度増加の使用により、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）欠損CHO細胞においてDHFR増幅の使用による。得られたポリペプチドは、グリコシル化形態であり得る。

#### 【0118】

発現のための宿主として利用できる哺乳動物の細胞系は、当業界に知られており、限定はしないが、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、HeLa、ベビーハムスター腎臓（BHK）、サル腎臓（COS）、C127、3T3、BHK、HEK293、パウエス（Bowes）黒色腫及びヒト肝細胞癌（例えば、Hep G2）細胞並びに多数の他の細胞系などAmerican Type Culture Collection（ATCC）から入手できる多数の継代細胞系が挙げられる。バキュロウイルス系において、バキュロウイルス／昆虫細胞発現系に関する材料は、とりわけInvitrogenからキット形態で市販されている。

#### 【0119】

組換えDNAテクノロジーに加えて、本発明のポリペプチド又は融合タンパク質は、化学合成テクノロジーにより調製できる。化学合成テクノロジーの例としては、固相合成及び液相合成である。固相合成として、例えば、合成されるポリペプチドのカルボキシ末端に相当するアミノ酸は、有機溶媒に不溶性の支持体に結合し、反応の交互の繰返し（例えば、それらのアミノ基と適切な保護基により保護された側鎖官能基との連続縮合）により、ポリペプチド鎖を伸長する。固相合成法は、使用される保護基のタイプに依ってtBOC法及びFmoc法により主として分類される。EPOと同等のサイズの全合成タンパク質は、文献に開示される（Brown Aら、1996年）。

#### 【0120】

本発明のポリペプチドは、製造、製剤化、投与、或いは使用及び／又は製造の所望の方法に従って好ましくなり得る他の代替形態で一般に使用できる。本発明のタンパク質は、例えば、グリコシル化により翻訳後に修飾できる。本発明のポリペプチド又はタンパク質は、単離（又は精製）された生物活性形態、又は前駆体、それらの誘導体及び／又は塩類として提供できる。前記生物活性は、本明細書の上記の生物活性の少なくとも1つである。

#### 【0121】

「前駆体」は、細胞又は生物にそれらの投与前又は投与後に代謝及び／又は酵素処理により本発明のポリペプチドに変換できる化合物である。本明細書の用語「塩類」とは、本

10

20

30

40

50

発明のポリペプチドのカルボキシル基の塩類及びアミノ基の酸付加塩類の双方のことである。カルボキシル基の塩類は、当業界に知られた手段により形成でき、無機塩類、例えば、ナトリウム、カルシウム、アンモニウム、鉄又は亜鉛の塩類など、例えば、トリエタノールアミン、アルギニン又はリシン、ピペリジン、プロカインなどのアミン類により形成されたものとしての有機塩基による塩類が挙げられる。例えば、酸付加塩類としては、例えば、塩酸又は硫酸などの鉱酸による塩類、例えば、酢酸又はシュウ酸などの有機酸による塩類が挙げられる。任意のこのような塩類は、本発明のポリペプチドと実質的に同様の活性を有する必要がある。本明細書に用いられる用語「誘導体」とは、それ自体が当業界に知られている方法に従ってアミノ酸部分の側鎖又はアミノ - ノ又はカルボキシ末端基に存在する官能基から調製できる誘導体のことである。このような誘導体としては、例えば、カルボキシル基のエステル類又は脂肪族アミド類及び遊離アミノ基の N - アシル誘導体又は遊離ヒドロキシル基の O - アシル誘導体が挙げられ、例えば、アルカノイル - 又はアロイル基としてアシル基により形成される。本発明のポリペプチドの精製は、限定はしないが、抽出、沈殿、クロマトグラフィー、電気泳動など、それら自体当業界に知られた種々の方法により実施できる。特定の精製法としては、ポリペプチドに選択的に結合し、カラム内に含まれるゲルマトリックスに典型的に固定化される（モノクローナル）抗体又は親和性基を用いるアフィニティークロマトグラフィーである。本明細書に用いられる本発明のタンパク質の精製調製とは、15%未満の不純物を含有し、より好ましくは、少なくとも90、95又は97%のポリペプチドを含む調製のことである。

10

20

30

40

50

#### 【0122】

##### 4. 活性結合体又は複合体

本発明のポリペプチド又は融合タンパク質（特にEPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、EPOv3ポリペプチド又はその変異体）は、共有結合又はそうでなく、直接的又はカップリング剤若しくはリンカーの使用により、細胞毒性剤、標識（例えば、ビオチン、蛍光標識）、薬物又は他の治療剤から選択できる異種部分による活性な結合体又は複合体の形態であり得る。有用な結合体又は複合体は、例えば、EPO受容体との相互作用の検出（放射性又は蛍光標識、ビオチン）、サンプル中のEPO受容体発現細胞の検出（放射性又は蛍光標識、ビオチン）、治療効力（細胞毒性剤、薬物又は他の治療剤）を可能にするために、それら自体当業界に知られている分子及び方法を用いて作出できる。細胞毒性剤としては、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、又は動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同位元素（即ち、放射性結合体）が挙げられる。使用できる酵素活性毒素及びそれらの断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）に由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデッシンA鎖、アルファ - サルシン、アレウリテスフォルジ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチン（*dianthin*）タンパク質、フィトラカアメリカナ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、モモルジカカランチャ（*momordica charantia*）阻害剤、クルシン、クロチン、サボナリアオフィシナリス（*saponaria officinalis*）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセン類が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合タンパク質の製造に利用できる。例としては、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、及び $^{186}\text{Re}$ が挙げられる。

#### 【0123】

有用な結合体又は複合体はまた、薬物送達効力の観点から薬剤を改善するために作出できる。この目的のために、本発明のポリペプチド又は融合タンパク質（特にEPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、EPOv3ポリペプチド又はその変異体）は、ポリエチレングリコール及び他の天然又は合成ポリマー類との活性な結合体又は複合体の形態であり得る（*Harris JM*及び*Chess RB, Nat Rev Drug Discov.*（

2003)、2(3):214~21頁;Greenwald RBら、Adv Drug Deliv Rev.(2003)、55(2):217~50頁;Pillai O及びPanchagnula R、Curr Opin Chem Biol.(2001)、5(4):447~51頁)。これに関して、本発明は、本明細書に開示された化学的に修飾されたポリペプチド及びタンパク質を考慮し、ポリペプチド及びタンパク質はポリマーと結合する。生理的環境などで、該結合体が水性環境で沈殿しないように、ポリマーは典型的には水溶性である。好適なポリマーの例は、アシル化に関しては活性エステル、又はアルキル化に関してはアルデヒドなどの単一の反応性基を有するように修飾されたものである。この様式で、重合度を調節できる。反応性アルデヒドの例は、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、又はモノ-(C1~C10)アルコキシ、又はそのアリールオキシ誘導体である(例えば、Harrisら、米国特許第5,252,714号を参照)。このポリマーは分枝状であっても又は非分枝状であってもよい。さらに、ポリマーの混合物は、結合体を製造するために使用できる。治療に用いられる結合体は、薬学的に許容できる水溶性ポリマー部分を含むことができる。好適な水溶性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメトキシ-PEG、モノ-(C1~C10)アルコキシ-PEG、アリールオキシ-PEG、ポリ-(N-ビニルピロリドン)PEG、トレシルモノメトキシPEG、PEGプロピオンアルデヒド、ビス-スクシンイミジルカーボネートPEG、プロピレングリコールホモポリマー類、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール類(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、デキストラン、セルロース、又は他の炭水化物ベースポリマー類が挙げられる。好適なPEGは、例えば、5,000、12,000、20,000及び25,000など、約600から約60,000までの分子量を有することができる。結合体はまた、このような水溶性ポリマーの混合物を含むことができる。

10

20

30

40

#### 【0124】

結合体の例は、配列番号13のポリペプチド(EPOv)又は配列番号13のアミノ酸28から55(EPOvm)、配列番号15のポリペプチド又は配列番号15のアミノ酸28から55、配列番号4のEPOv1ポリペプチド又は配列番号4のアミノ酸28から164(EPOv1m)、配列番号6のEPOv2ポリペプチド又は配列番号6のアミノ酸28から104(EPOv2m)、又は配列番号9のEPOv3ポリペプチド又は配列番号9のアミノ酸28から154(EPOv3m)、及び前記EPOポリペプチド部分のN末端に結合したポリアルシルオキシド部分を含む。PEGは1つの好適なポリアルキルオキシドである。引例として、本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体(特にEPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、EPOv3ポリペプチド又はその変異体)は、「ペグ化」として知られている工程である、PEGにより修飾できる。ペグ化は、当業界に知られている任意のペグ化反応により実施できる(例えば、EPO 154 316、Delgadoら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249頁(1992)、Duncan及びSpreafico、Clin.Pharmacokinet.27:290頁(1994)、及びFrancisら、Int J Hematol 68:1頁(1998)を参照)。例えば、ペグ化は、アシル化反応により、又は反応性ポリエチレングリコール分子とのアルキル化反応により実施できる。代替りのアプローチにおいて、結合体は、PEGの末端ヒドロキシ又はアミノ基が、活性化リンカーにより置換されている活性化PEGを縮合することにより形成される(例えば、Karasiwiczら、米国特許第5,382,657号を参照)。

#### 【0125】

##### 5. 抗EPO変異体ポリペプチド抗体:

本発明の組成物及び方法に使用するためのいくつかの薬物候補は、任意の上記又は下記のポリペプチドに選択的に結合する抗体、抗体断片又はそれらの誘導体である。

#### 【0126】

50



特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 及び / 又は E P O 短ポリペプチド及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に選択的に結合する。

【 0 1 2 7 】

特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 1 及び / 又は E P O 短 1 ポリペプチド及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に選択的に結合する。

【 0 1 2 8 】

別の特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 2 及び / 又は E P O 短 2 ポリペプチド及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に選択的に結合する。

10

【 0 1 2 9 】

別の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の配列番号 8 及び / 又は配列番号 9 のポリペプチド及び / 又は前記ポリペプチドの変異体に選択的に結合する。さらに具体的な実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 3 及び / 又は前記ポリペプチドの変異体に選択的に結合し、前記ポリペプチドは E P O w t 及び / 又は E P O w t m とは区別される。なおさらに具体的には、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 3 及び / 又は前記ポリペプチドの変異体に存在するエピトープに結合するが、E P O w t 及び / 又は E P O w t m を欠いている。なおさらに具体的には、抗体、その断片又は誘導体は、E P O v 3 の C 末端部分に配置されるエピトープに結合し、さらに特にこのエピトープは、配列番号 9 のアミノ酸 1 4 3 から 1 5 4 までに配置される。

20

【 0 1 3 0 】

本発明の文脈内で、用語の「選択的」結合とは、抗体が標的ポリペプチド又はエピトープを優先的に、即ち、任意の他の抗原又はエピトープに対する結合よりも高親和力で結合することを示している。言い換えれば、標的ポリペプチドに対する結合は、他の抗原に対する非特異的結合と区別することができる。本発明による抗体は、標的ポリペプチド又はエピトープに対して  $10^6 M^{-1}$  超、好ましくは  $10^7 M^{-1}$  超、さらに好ましくは  $10^8 M^{-1}$  超、最も好ましくは  $10^9 M^{-1}$  超の結合親和力 ( K a ) を示すことが好ましい。抗体の結合親和力は、通常の当業者によって、例えば、スキャチャード解析 ( S c a t c h a r d G . , A n n N Y A c a d . S c i . 5 1 : 6 6 0 ~ 6 7 2 頁、1949 年 ) により容易に測定できる。

30

【 0 1 3 1 】

特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 及び / 又は E P O 短ポリペプチド及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に選択的に結合し、前記ポリペプチドは E P O w t 及び / 又は E P O w t m とは区別される。なおさらに具体的には、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 及び / 又は E P O 短及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に存在するエピトープに結合するが、E P O w t 及び / 又は E P O w t m を欠いている。

40

【 0 1 3 2 】

別の特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 1 及び / 又は E P O 短 1 ポリペプチド及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に選択的に結合し、前記ポリペプチドは E P O w t 及び / 又は E P O w t m とは区別される。なおさらに具体的には、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 1 及び / 又は E P O 短 1 及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に存在するエピトープに結合するが、E P O w t 及び / 又は E P O w t m を欠いている。

【 0 1 3 3 】

別の特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 2 及び / 又は E P O 短 2 ポリペプチド及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に選択的に結合し、前記ポリペプチドは E P O w t 及び / 又は E P O w t m とは区

50

別される。なおさらに具体的には、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の E P O v 2 及び / 又は E P O 短 2 及び / 又は前記ポリペプチドの変異体及び / 又は類似体に存在するエピトープに結合するが、E P O w t 及び / 又は E P O w t m を欠いている。

【 0 1 3 4 】

本発明の抗体は、同じ抗原特異性を実質的に有するモノクローナル又はポリクローナル抗体、或いはその断片若しくは誘導体であり得る。

【 0 1 3 5 】

A . ポリクローナル抗体 :

げっ歯類、霊長類及びウマなど、種々の種からポリクローナル抗体を調製する方法は、例えば、V a i t u k a i t i s ら ( J Clin Endocrinol Metab . 3 3 ( 1 9 7 1 ) 9 8 8 頁 ) に記載されている。ポリクローナル抗体は、例えば、1 回以上の免疫剤、及び所望ならば、アジュバントの注射により哺乳動物において増加させることができる。典型的には、免疫剤及び / 又はアジュバントは、複数回の皮下又は腹腔内注射により哺乳動物に注入される。

10

【 0 1 3 6 】

特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号 1 3 のポリペプチド ( E P O v ) 又は配列番号 1 3 のアミノ酸 2 8 から 5 5 ( E P O v m ) 、配列番号 1 5 のポリペプチド又は配列番号 1 5 のアミノ酸 2 8 から 5 5 、又は E P O 短ポリペプチド、或いはその変異体若しくは類似体又はその融合タンパク質を挙げるができる。

20

【 0 1 3 7 】

別の特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号 4 のポリペプチド又は配列番号 4 のアミノ酸 2 8 から 1 6 4 ( E P O v 1 m ) 、又は E P O 短 1 ポリペプチド、或いはその変異体若しくは類似体又はその融合タンパク質を挙げるができる。

【 0 1 3 8 】

別の特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号 6 のポリペプチド又は配列番号 6 のアミノ酸 2 8 から 1 0 4 ( E P O v 2 m ) 、又は E P O 短 2 ポリペプチド、或いはその変異体若しくは類似体又はその融合タンパク質を挙げることができる。

【 0 1 3 9 】

別の特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号 9 のポリペプチド ( E P O v 3 ) 又は配列番号 9 のアミノ酸 2 8 から 1 5 4 ( E P O v 3 m ) 、又は変異体若しくはその融合タンパク質を挙げるができる。特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号 8 のポリペプチド又はその変異体又はその融合タンパク質を挙げることができる。

30

【 0 1 4 0 】

免疫化される哺乳動物において、免疫原性であることが知られているタンパク質に免疫剤を結合することは有用であり得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、限定はしないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、及びダイズトリプシン阻害剤が挙げられる。使用できるアジュバントの例としては、フロイント完全アジュバント及び M P L - T D M アジュバント ( モノホスホリル脂質 A 、合成トレハロースジコリノミコレート ) が挙げられる。反復注射を実施できる。血液サンプルを採取し、免疫グロブリン又は血清を分離する。

40

【 0 1 4 1 】

B . モノクローナル抗体 :

抗体は、代わりにモノクローナル抗体であってもよい。本明細書に用いられる用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体集団から得られた抗体のことであり、即ち、該集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る天然変異の可能性を除いて同一である。モノクローナル抗体は高特異的であり、単一の抗原部位に対して向けられる。モディファイヤー「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法により抗体の産生を必要とするものと解すべきではない。

【 0 1 4 2 】

50

モノクローナル抗体を産生する方法は、例えば、参照として本明細書に組み込まれているHarlowら（抗体：実験室マニュアル（Antibodies：A Laboratory Manual）、CSH Press、1988年）又はKohlerら（Nature 256（1975）495頁）に見ることができる。

【0143】

ハイブリドーマ法において、マウス、ハムスター、又は他の適切な宿主動物は、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生するか、又は産生できるリンパ球を誘発する免疫剤により典型的に免疫化される。

【0144】

特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号13のポリペプチド（EP Ov）又は配列番号13のアミノ酸28から55（EP Ov m）、配列番号15のポリペプチド又は配列番号15のアミノ酸28から55、又はEP O短ポリペプチド、或いはその変異体若しくは類似体又はその融合タンパク質を挙げることができる。

【0145】

別の特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号4のポリペプチド又は配列番号4のアミノ酸28から164（EP Ov 1 m）、又はEP O短1ポリペプチド、或いはその変異体若しくは類似体又はその融合タンパク質を挙げることができる。

【0146】

別の特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号6のポリペプチド又は配列番号6のアミノ酸28から104（EP Ov 2 m）、又はEP O短2ポリペプチド、或いはその変異体若しくは類似体又はその融合タンパク質を挙げることができる。

【0147】

別の特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号9のポリペプチド（EP Ov 3）又は配列番号9のアミノ酸28から154（EP Ov 3 m）、又は変異体若しくはその融合タンパク質を挙げることができる。特定の実施形態において、免疫剤としては、上記の配列番号8のポリペプチド又はその変異体又はその融合タンパク質を挙げることができる。

【0148】

或いは、リンパ球はインビトロで免疫化できる。一般に、末梢血リンパ球（「PBL」）は、ヒト起源の細胞が望まれる場合に用いられるか、又は脾細胞或いはリンパ節細胞は、非ヒト哺乳動物源が望まれる場合に用いられる。次いでリンパ球は、ポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を用いて継代細胞系と融合してハイブリドーマ細胞を形成する（Goding、モノクローナル抗体：原理と実施（Monoclonal Antibodies：Principles and Practice）、Academic Press、（1986）59～103頁）。継代細胞系は、通常、形質転換哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシ及びヒト起源の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫細胞系が用いられる。好ましくは、非融合の継代細胞の増殖又は生存を阻害する1種以上の物質を含有する好適な培養培地中で、ハイブリドーマ細胞を培養できる。例えば、親細胞が、酵素であるヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPRT）を欠く場合、ハイブリドーマに対する培養培地には、物質がHGPRT欠損細胞の増殖を防止するヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン（「HAT培地」）を典型的に含む。好ましい継代細胞系は、選択された抗体産生細胞により、安定な高レベル発現の抗体を効率的に融合し、支えるものであり、HAT培地などの培地に対して感受性がある。さらに好ましい継代細胞系は、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center、サンディエゴ、カリフォルニア州及びAmerican Type Culture Collection、マナサス、バージニア州から入手できるマウス骨髓腫系である。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞系はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている（Kozbor、J. Immunol.、133：3001頁（1984）；Brodeurら、モノクローナル抗体産生技法と応用（Monoclonal Antibody P

10

20

30

40

50

roduction Techniques and Applications)、Marcel Dekker社、ニューヨーク、(1987)51~63頁)。

【0149】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、次に免疫ペプチドに対して向けられるモノクローナル抗体の存在に関してアッセイできる。ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、ラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)など、免疫沈殿又はインビトロ結合アッセイにより判定されることが好ましい。このような技法及びアッセイは当業界に知られている。モノクローナル抗体の結合親和力は、例えば、Munson及びPollardのスクヤード解析、Anal. Biochem.、107:220頁(1980)により測定できる。

10

【0150】

所望のハイブリドーマ細胞が確認されたら、このクローンは、希釈手法を制限することによりサブクローン化でき、標準的な方法(Godding、上記文献)により増殖できる。この目的のために好適な培養培地としては、例えば、ダルベッコ修飾イーグル培地及びRPMI-1640培地が挙げられる。或いは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物の腹水中インビボで増殖できる。

【0151】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、タンパク質A-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手法により、培養培地又は腹水から単離又は精製できる。

20

【0152】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4,816,567号に記載されたものなど組換えDNA法により作製できる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手法を用いて(例えば、マウス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できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)、容易に単離及び配列決定できる。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。単離されたら、次にDNAを、サルCOS細胞、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は他に免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞など、宿主細胞形質移入される発現ベクターに入れて、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成することができ。

30

【0153】

「モノクローナル抗体」は、例えば、Clacksonら、Nature、352:624~628頁[1991]及びMarksら、J. Mol. Biol.、222:581~597頁(1991)に記載された技法を用いてファージ抗体ライブラリーからも単離できる。

【0154】

該抗体は一価の抗体である。一価の抗体を調製する方法は、当業界によく知られている。例えば、一方法としては、免疫グロブリンの軽鎖及び修飾重鎖の組換え発現が挙げられる。重鎖架橋を防ぐために、一般に重鎖は、Fc領域の任意の点で切断される。或いは、架橋を防ぐために、関連するシステイン残基を別のアミノ酸残基で置換するか、又は欠失する。

40

【0155】

インビトロ方法はまた、一価の抗体を調製するのに好適である。その断片、特にFab断片を産生するための抗体の消化は、当業界に知られたルーチンの技法を用いて達成できる。

【0156】

抗体はまた、例えば、Wardら(Nature 341(1989)544頁)に開示されている免疫グロブリン類の組合せライブラリーの選択により製造できる。

【0157】

50

### C. ヒト及びヒト化抗体：

本発明の抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含むことができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又は非ヒト免疫グロブリンに由来する最少配列を含有するその断片（Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>又は抗体の他の抗原結合部分配列など）である。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含み、レシピエントの相補決定領域（CDR）からの残基は、所望の特異性、親和力及び能力を有するマウス、ラット又はウサギなど、非ヒト種（ドナー抗体）のCDRからの残基により置換される。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基により置換される。

#### 【0158】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当業界によく知られている。ヒト化は、Winter及び共同研究者（Jonesら、Nature、321：522～525頁（1986）；Riechmannら、Nature、332：323～327（1988）；Verhoeyenら、Science、239：1534～1536頁（1988））の方法に従って、げっ歯類CDR又はCDR配列を、対応するヒト抗体の配列に置き換えることによって本質的に実施できる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第4,816,567号）であり、実質的に無処置のヒト可変性ドメイン未満が、非ヒト種からの対応する配列により置換されている。

#### 【0159】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーなど、当業界に知られた種々の技法（Hoogenboom及びWinter、J. Mol. Biol.、227：381頁（1991）；Marksら、J. Mol. Biol.、222：581頁（1991））を用いて産生できる。Coleら及びBoernerらの技法は、ヒトモノクローナル抗体の調製にも利用できる（Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁（1985）及びBoernerら、J. Immunol.、147（1）：86～95頁（1991））。同様に、ヒト抗体は、遺伝子導入動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全不活化されているマウスに、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することにより作製できる。誘発の際に、遺伝子転移、組立て、及び抗体レパートリーなど、すべての点でヒトに見られるものに非常に似ているヒト抗体産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号；米国特許第5,545,806号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,661,016号、及び以下の科学出版物：Marksら、Bio/Technology、10：779～783頁（1992）；Lonbergら、Nature、368：856～859頁（1994）；Morrison、Nature、368：812～13頁（1994）；Fishwildら、Nature Biotechnology、14：845～51頁（1996）；Neuberger、Nature Biotechnology、14：826頁（1996）；Lonberg及びHuszar、Intern. Rev. Immunol.、13：65～93頁（1995）に記載されている。

#### 【0160】

### D. 免疫結合体：

本発明はまた、直接的又はカップリング剤或いはリンカーの使用を介して、共有結合又は非共有結合の細胞毒性剤、標識、薬物又は他の治療剤などの異種部分に結合した抗体を含む免疫結合体に関する。細胞毒性剤としては、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、又は動物起源の酵素活性毒素、又はその断片）、又は放射線同位元素（即ち放射性結合）が挙げられる。

#### 【0161】

使用できる酵素活性毒素及びそれらの断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌（Pseudomonas aeruginos

10

20

30

40

50

a) に由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデッシンA鎖、アルファ - サルシン、アレウリテスフォルジ (*Aleurites fordii*) タンパク質、ジアンチン (*dianthyn*) タンパク質、フィトラカアメリカナ (*Phytolacca americana*) タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルジカカラランチア (*momordica charantia*) 阻害剤、クルシン、クロチン、サボナリアオフィシナリス (*saponaria officinalis*) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセン類が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合抗体の製造に利用できる。例としては、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y、及び<sup>186</sup>Reが挙げられる。

#### 【0162】

別の実施形態において、抗体は、腫瘍ブレータージェッティングへの利用のために「受容体」(ストレプトアビジンなど)に結合でき、抗体 - 受容体結合体を患者に投与し、次いで清浄剤を用いて循環系から非結合の結合体を除去し、次に細胞毒製剤(例えば、放射性核種)に結合する「リガンド」(例えば、アビジン)を投与する。

#### 【0163】

さらに、本発明の抗体又は抗体断片は、当業界の方法及び本明細書に記載された方法を用いてペグ化できる。本明細書に開示された抗体は、免疫リボソーム類としても形成できる。抗体を含有するリボソーム類は、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:3688頁(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4030頁(1980); 及び米国特許第4,485,045号及び米国特許第4,544,545号に記載されたものなど当業界に知られた方法により調製される。循環時間の増強があるリボソーム類は、米国特許第5,013,556号に開示されている。

#### 【0164】

##### E. 抗体断片

本発明はまた、無処置抗体、好ましくは抗原結合又は無処置抗体の可変性領域の一部を含む「抗体断片」に関する。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片; ジア体; 線状抗体(Zapataら、Protein Eng.、8(10):1057~1062頁[1995]); 単鎖抗体分子; モノボディ; 及び抗体断片から形成された多特異的抗体が挙げられる。

#### 【0165】

「Fv」は、完全抗原認識及び抗原結合部位を含有する最小抗体断片である。この領域は、硬非共有結合において1本の重鎖及び1本の軽鎖可変性ドメインの二量体からなる。各々の可変性ドメインの3つのCDRは、VH-VL二量体の表面に抗原結合部位を規定するために相互作用することがこの形状にある。6つのCDRは、集散的に抗体に対する抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変性ドメイン(又は抗原に特異的な3つだけのCDRを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和力が低い、抗原を認識し、結合する能力を有する。

#### 【0166】

Fab断片はまた、軽鎖の一定ドメイン及び重鎖の第1の一定ドメイン(CH1)を含有する。Fab断片は、抗体ヒンジ領域から1つ以上のシステインなど、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端で2、3の残基の付加によりFab'断片とは異なる。Fab'-SHは、本明細書においてFab'と呼称され、一定ドメインのシステイン残基(複数可)は、遊離チオール基を有する。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、元来それらの間でヒンジシステインを有するFab'断片の対として製造された。抗体断片の他の化学的カップリングもまた知られている。任意の脊椎動物種に由来の抗体(免疫グロブリン類)の「軽鎖」は、それらの一定ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ及びラムダと呼ばれる2種の明確に異なるタイプの1つに帰することができる。

#### 【0167】

「単鎖抗体分子」は、前記抗体のVH及びVLドメインを含む抗体の断片であり、これ

10

20

30

40

50

らのドメインは、単一ポリペプチド鎖に存在する。単鎖抗体分子が、抗体結合に対して所望の構造を形成できるVHドメインとVLドメインとの間で、Fvポリペプチドはポリペプチドリッカーをさらに含むことが好ましい。単鎖抗体分子のレビューに関して、Pluckhuthunのモノクローナル抗体の薬理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies) 113巻、Rosenburg及びMoore編集、Springer-Verlag、ニューヨーク、269～315頁(1994)を参照されたい。

#### 【0168】

用語「ジア体」とは、断片が、同じポリペプチド鎖内で軽鎖可変性ドメイン(VL)に結合した重鎖可変性ドメインを含む(VH-VL)、2つの抗原結合部位を有する小型の抗体断片のことである。同じ鎖上の2つのドメイン間で対合させるのに短かすぎるリンカーを用いることにより、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合することになり、2つの抗原結合部位を創製させる。ジア体は、例えば、EP404,097; WO93/11161; 及びHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444～6448頁(1993)に、より完全に記載されている。

#### 【0169】

本明細書に用いられる用語「モノボディ」とは、重鎖可変性ドメインを有し、軽鎖可変性ドメインのない抗原結合分子のことである。モノボディは、軽鎖の不在の抗原に結合でき、CDRH1、CDRH2及びCDRH3と称される3つのCDR領域を典型的に有する。モノボディとしては、2本の足指及び皮のような足裏の脚を有する動物など、ラクダ科の動物源から得られる「ラクダモノボディ」が挙げられる。ラクダ科の動物としては、ラクダ、ラマ、及びアルパカが挙げられる。ラクダ(Camelus dromedaries及びCamelus bactrianus)は、血清からの物質を分析する際に、しばしば可変性軽鎖ドメインを欠くことが報告されており、十分な抗体特異性及び親和力は、VHドメイン(3つのCDRループ)単独に由来し得ることを示唆している。モノボディはまた、VLの不在下、抗原に特異的に結合できる種々の動物源、特に哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ又はヒト)からの修飾VHを含む。VHは、VLの不在下、抗原にVHの結合を提供するためにVL界面での位置で修飾されることが好ましい。Davies及びRiechmannは、例えば、高親和力(標的ポリペプチドに対して $10^7 \text{ M}^{-1}$ 超の結合親和力( $K_a$ ))及び高特異性を有する「ラクダ化モノボディ」を作出できることを立証している(Davies及びRiechmann、1995年、Biotechnology(ニューヨーク州)、13(5):475～9頁)。軽鎖可変性ドメイン(VL)に関してその界面を介してVHの非特異的結合は、この界面内の3つの変異(G44E、L45R及びW47G)により防止された。これらの変異は、軽鎖パートナーがなくて自然のラクダ抗体の重鎖を模倣するために導入された。

#### 【0170】

F. 本発明の抗体及び抗体断片の使用:

本発明の抗体及び抗体断片は、種々の有用性を有する。例えば、抗体は、本明細書に上記された本発明の任意のEPOポリペプチド又は変異体を検出、投薬、精製又は中和に使用できる。特定の態様において、本発明はこのように、サンプル中の上記に定義された本発明のEPOポリペプチド又は変異体を検出又は投薬する方法にあり、この方法は、このようなサンプルを、上記に開示された抗体、その断片又は誘導体と接触させること、及び免疫複合体の形成を判定するか、又はその(関連する)量を投薬することを含む。サンプルは、例えば、場合によっては、任意選択で希釈及び/又は処理された血液、血漿、血清などの任意の生体液であり得る。抗体、その断片又は誘導体を懸濁液中にあるか、又は支持体上に固定できる。免疫複合体の存在又は量は、例えば、レポーター抗体、標識抗体などを用いて、例えば、ELISA、RIAなどにより、それ自体当業界に知られている任意の技法により測定できる。特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記のEPOv及び/又はEPO短ポリペプチド及び/又は前記ポリペプチドの

変異体及び／又は類似体に選択的に結合する。別の特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記のEPOv1及び／又はEPO短1ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの変異体及び／又は類似体に選択的に結合する。別の特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記のEPOv2及び／又はEPO短2ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの変異体及び／又は類似体に選択的に結合する。別の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の配列番号8及び／又は配列番号9のポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの変異体に選択的に結合する。

#### 【0171】

本発明の抗体及び抗体断片はまた、組換え細胞培養又は天然源から本明細書の上記の本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体の親和性精製に有用である。この工程において、本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体に対する抗体は、当業界によく知られた方法を用いて、セファデックス樹脂又はろ紙などの好適な支持体上に固定される。次に固定化抗体を、精製されるべきEPOポリペプチド、変異体又は類似体を含むサンプルと接触させ、その後、この支持体を、固定化抗体に結合しているEPOポリペプチド、変異体又は類似体を除いてサンプル中のすべての物質を実質的に除く好適な溶媒で洗浄する。最後に、この支持体を、抗体からEPOポリペプチド、変異体又は類似体を放出する別の好適な溶媒で洗浄する。特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記のEPOv及び／又はEPO短ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの変異体及び／又は類似体に選択的に結合する。別の特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記のEPOv1及び／又はEPO短1ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの変異体及び／又は類似体に選択的に結合する。別の特定の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記のEPOv2及び／又はEPO短2ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの変異体及び／又は類似体に選択的に結合する。別の実施形態において、抗体、その断片又は誘導体は、本明細書の上記の配列番号8及び／又は配列番号9のポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの変異体に選択的に結合する。

#### 【0172】

本発明の抗体及び抗体断片は、特に特定のヒト疾患の治療において本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体の活性を遮断し、阻止し、軽減し、アンタゴナイズし、又は中和するために使用できる。したがって本発明の抗体は、特に治療剤として有用である。EPOは、赤血球細胞（赤血球）の産生を刺激するなど、種々の生理的作用に関与する。EPO受容体（EPOR）は、骨髄由来の赤血球前駆体及び筋細胞、皮質ニューロン及び前立腺、乳房並びに卵巣上皮などのいくつかの非造血組織に発現される。EPOはまた、中枢神経系の特定の受容体を活性化することが報告されており、インビトロ及びインビボ双方のモデルにおいて神経栄養性及び神経保護性であることが判明した。

#### 【0173】

したがって、本発明のさらなる目的は、上記に定義された抗体又は抗体断片、及び薬学的に許容できる担体、賦形剤、又は安定化剤を含む医薬組成物である。本発明はまた、好ましくは、ヒト対象を治療するための薬剤の製造のために上記に定義された抗体又は抗体断片の使用に関する。本発明はまた、患者の障害症状を治療し、予防し、又は改善する方法に関するものであり、該障害はEPO発現又は活性のアップレギュレーションを含み、該方法は、上記に定義された抗体又は抗体断片を含む医薬組成物を患者に投与することを含む。別の態様内で本発明は、対象、好ましくはヒト対象の癌の症状を治療し、予防し又は改善する方法を提供し、本明細書に開示された抗体の治療有効量を投与することを含み、それによって前記病的状態を治療する。本発明はまた、癌及び腫瘍の治療用薬剤の製造において本明細書に開示された抗体の使用に関する。治療のための癌の例としては、限定はしないが、腺癌、リンパ腫、芽腫、肉腫、黒色腫及び白血病などの癌が挙げられる。本明細書における治療のためのさらに好ましい癌としては、腎細胞癌、特に転移腎癌及びウィルムス腫瘍などの腎臓癌、濾胞性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、ホジキン及び非ホジ



キンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、A I D S の場合にカポジ肉腫を含む免疫不全後に現れる腫瘍、扁平上皮癌、中枢神経系に影響を及ぼす腫瘍、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌及び肝細胞癌などの肝臓癌、膀胱癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、及び種々のタイプの頭頸部癌である。中枢神経系に影響を及ぼす腫瘍としては、特にアストロサイト腫瘍（未分化星細胞腫又はグリア芽細胞腫など）、未分化乏突起膠腫、未分化オリゴ星細胞腫、髄芽腫又は神経芽腫が挙げられる。本明細書における治療に好ましい癌は、腺癌、より好ましくは、腎臓の腺癌（腎細胞癌、特に転移腎癌及びウィルムス腫瘍など）、前立腺癌、卵巣癌又は乳癌、又はリンパ腫（特に濾胞性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、ホジキン又は非ホジキンリンパ腫）、又は白血病（特に慢性リンパ球性白血病又は慢性骨髄性白血病）、又は多発性骨髄腫、又は中枢神経系に影響を及ぼす腫瘍（特にグリア芽細胞腫又は神経芽腫）である。

10

#### 【0174】

6．上記に定義されたポリペプチド又はタンパク質、核酸分子、ベクター又は細胞の薬学的使用：

E P O は種々の生理学的作用に関与してきた。特に、E P O は、赤血球細胞（赤血球）の産生刺激に関与してきた。組換えヒトE P O ( r H u E P O ) は現在、慢性腎不全に関連した貧血を有する患者、ジドブジンを用いた治療による貧血を有するA I D S 患者、化学療法剤を用いて治療されている患者における非骨髄性悪性疾患、外科手術中の患者、及び自己血液供与の処置に用いられている。

20

#### 【0175】

また、E P O は、中枢神経系における特定の受容体を活性化することが報告されており、インビトロモデル及びインビボモデルの双方で、神経栄養性であり、神経保護的であることが判明している（W o l f g a n g J . 編、E r i t h r o p o e t i n : M o l e c u l a r B i o l o g y a n d C l i n i c a l U s e . におけるM a r t i H H 、B e r n a u d i n M . 、脳におけるエリスロポエチンの機能（F n c t i o n o f e r y t h r o p o i e t i n i n t h e b r a i n ））、ジョンソンシティー、テネシー州、F . P . G r a h a m P u b l i s h i n g 社、195～215頁、2002年；J u u l S . A c t a P a e d i a t r 438（増補）：36～42頁、2002年）。E P O 及びE P O 受容体は共に、大脳皮質、小脳、海馬、脳下垂体及び脊髄内に報告されている。E P O が神経保護効果を生じる機序として提案されているのは：グルタメート毒性の減少、神経抗アポトーシス因子の産生増加、一酸化窒素媒介損傷の減少、抗炎症効果、及び抗酸化性である。

30

#### 【0176】

また、E P O は、インビトロモデルとインビボモデルの双方で心臓保護を有することが報告されている（C a l v i l l o L . ら、( P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 2003年；100（8）：4802～6頁）、P a r s a C J ら（J C l i n I n v e s t . 2003年、112（7）：999～1007頁）及びM o o n C ら（P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 2003年；100（20）：11612～7頁））。

40

#### 【0177】

本発明のポリペプチドの生物活性を考慮すると（例えば、本明細書上記の1．5節を参照）、本発明のE P O ポリペプチド、変異体及び類似体は、ヒト対象における治療的又は予防的処置において、特に有用である。

#### 【0178】

したがって、本発明のさらなる目的は、上記で定義されたポリペプチド又はタンパク質、核酸、ベクター又は組換え細胞を含む医薬組成物、及び薬学的に許容できる担体、賦形剤、又は安定化剤である。本発明の医薬組成物は、上記で定義された本発明のE P O ポリペプチド又は変異体又は類似体を含むことが好ましい。

50

## 【0179】

特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、EPO短ポリペプチド又はその変異体、EPO短1ポリペプチド又はその変異体、EPO短2ポリペプチド又はその変異体、又はEPOv3ポリペプチド又はその変異体を含む。他の特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、本明細書上記で定義したEPOvm（配列番号13のアミノ酸28から55）又は変異体又は類似体、又はそのようなポリペプチドを含む、本明細書上記で定義した融合タンパク質を含む。他の特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、本明細書上記で定義したEPOv1m（配列番号4のアミノ酸28から164）又は変異体又は類似体、又はそのようなポリペプチドを含む、本明細書上記で定義した融合タンパク質を含む。他の特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、本明細書上記で定義したEPOv2m（配列番号6のアミノ酸28から104）又は変異体又は類似体、又はそのようなポリペプチドを含む、本明細書上記で定義した融合タンパク質を含む。他の特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、本明細書上記で定義したEPOv3m（配列番号9のアミノ酸28から154）又は変異体又は類似体、又はそのようなポリペプチドを含む、本明細書上記で定義した融合タンパク質を含む。

10

## 【0180】

本発明の他の態様は、薬剤、好ましくは、ヒト対象の治療用薬剤を製造するために、上記で開示したポリペプチド又はタンパク質、核酸分子、ベクター又は細胞の使用に関する。

## 【0181】

本発明はまた、患者、好ましくはヒト対象における障害の症状を治療、予防又は改善する方法に関するものであり、該障害は、EPOの発現又は活性の調節障害を含み、該方法は、該患者に上記で定義した医薬組成物を投与することを含む。該方法は、本明細書上記に開示した本発明のEPOポリペプチド、変異体又は類似体の治療有効量を、該患者に投与することを含むことが好ましい。特定の実施形態において、該ポリペプチドは、EPO短ポリペプチド又はその変異体であるか、該ポリペプチドは、EPO短1ポリペプチド、又はその変異体であるか、EPO短2ポリペプチド、又はその変異体であるか、EPOv3ポリペプチド又はその変異体である。他の特定の実施形態において、該ポリペプチドは、本明細書上記に定義したEPOvm（配列番号13のアミノ酸28から55）又は変異体又は類似体、又はそのようなポリペプチドを含む上記に定義した融合タンパク質を含むか、それらよりなる。他の特定の実施形態において、該ポリペプチドは、本明細書上記に定義したEPOv1m（配列番号4のアミノ酸28から164）又は変異体又は類似体、又はそのようなポリペプチドを含む上記に定義した融合タンパク質を含むか、それらよりなる。他の特定の実施形態において、該ポリペプチドは、本明細書上記に定義したEPOv2m（配列番号6のアミノ酸28から104）又は変異体又は類似体、又はそのようなポリペプチドを含む上記に定義した融合タンパク質を含むか、それらよりなる。他の特定の実施形態において、該ポリペプチドは、本明細書上記に定義したEPOv3m（配列番号9のアミノ酸28から154）又は変異体又は類似体、又はそのようなポリペプチドを含む上記に定義した融合タンパク質を含むか、それらよりなる。

20

30

## 【0182】

別の態様において、本発明は、患者、好ましくはヒト対象における障害症状を治療し、予防し又は改善する方法を提供し、該障害としては、赤血球細胞の産生の不十分又は欠損を特徴とする血液障害、貧血、慢性腎不全患者の高血圧、外科手術患者、小児透析患者、ヘマトクリット濃度不足に関連する疾患又は病態、AIDS、化学療法治療に関係した障害、癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患並びに障害、発作などの心血管疾患、低血圧、心拍停止、虚血特に虚血-再灌流傷害、急性心筋梗塞などの心筋梗塞、慢性心不全、アングナ、心肥大、心肺疾患、心肺バイパス、呼吸器疾患、腎臓、泌尿器及び生殖器疾患、内分泌及び代謝異常、胃腸疾患、一次的神経系症状又は精神医学的症状を有する中枢神経系（CNS）疾患又は末梢神経系疾患、認知機能の加齢関連喪失、脳性小児麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、認知症

40

50

、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール依存症、気分障害、不安障害、注意欠損障害、活動亢進、自閉症、統合失調症、うつ病、脳又は脊髄外傷若しくは虚血、クロイツフェルト-ヤコブ病、眼病、発作障害、多発性硬化症、炎症、放射線損傷、黄斑変性症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、及び網膜外傷からなる群から選択され、該方法は、本発明のポリペプチド又は医薬組成物の治療有効量を患者に投与することを含む。さらなる態様において、本発明は、患者、好ましくはヒト対象における障害の治療用薬剤の製造において本発明のポリペプチド又は医薬組成物の使用を考慮しており、該障害としては、赤血球細胞の産生の不十分又は欠損を特徴とする血液障害、貧血、慢性腎不全患者の高血圧、外科手術患者、小児透析患者、ヘマトクリット濃度不足に関連する疾患又は病態、A I D S、化学療法治療に関係した障害、癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び／又は自己免疫疾患並びに障害、発作などの心血管疾患、低血圧、心拍停止、虚血特に虚血-再灌流傷害、急性心筋梗塞などの心筋梗塞、慢性心不全、アンギナ、心肥大、心肺疾患、心肺バイパス、呼吸器疾患、腎臓、泌尿器及び生殖器疾患、内分泌及び代謝異常、胃腸疾患、一次的神経系症状又は精神医学的症状を有する中枢神経系（C N S）疾患又は末梢神経系疾患、認知機能の加齢関連喪失、脳性小児麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、認知症、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール依存症、気分障害、不安障害、注意欠損障害、活動亢進、自閉症、統合失調症、うつ病、脳又は脊髄外傷若しくは虚血、クロイツフェルト-ヤコブ病、眼病、発作障害、多発性硬化症、炎症、放射線損傷、黄斑変性症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、及び網膜外傷からなる群から選択される。

10

20

**【0183】**

一実施形態において、治療される障害は、貧血、慢性腎不全患者の高血圧、透析を受けている小児科患者、不十分なヘマトクリットレベルに関連した疾患又は病態、化学療法に関係した障害、癌、心臓血管疾患、主に神経学的又は精神医学的症状を有する、中枢神経系（C N S）又は末梢神経系の疾患である。

**【0184】**

好ましい一実施形態において、治療される障害は、中枢神経系（C N S）の疾患である。好ましい一実施形態において、前記治療される障害は、急性虚血性発作、又は脳若しくは脊髄の外傷又は虚血である。さらに他の好ましい実施形態において、前記治療される障害は、アルツハイマー病、又はパーキンソン病などの神経変性疾患である。さらに他の好ましい実施形態において、前記治療される障害は、統合失調症、癲癇、冠状動脈バイパス損傷及びくも膜下出血からなる群から選択される。さらに他の好ましい実施形態において、前記治療される障害は、多発性硬化症又はアルツハイマー病、又はパーキンソン病である。さらに他の好ましい実施形態において、前記治療される障害は、多発性硬化症である。

30

**【0185】**

他の好ましい実施形態において、治療される障害は、末梢神経系の疾患である。好ましい一実施形態において、前記治療される障害は、ニューロパシー、糖尿病性ニューロパシー、椎骨盤圧迫症又は手根管症候群である。

**【0186】**

他の好ましい実施形態において、治療される障害は、ニューロパシー痛である。好ましい一実施形態において、治療される障害は、アルコール中毒症、及び／又は切断術、及び／又は坐骨神経症、及び／又は癌の化学療法、及び／又は糖尿病及び／又は顔面神経問題（三叉神経痛）、及び／又はH I V感染即ちA I D S、及び／又は多発性硬化症及び／又は帯状疱疹（帯状疱疹ウィルス感染）及び／又は脊椎外科手術、に関連したニューロパシー痛である。

40

**【0187】**

治療される心臓血管疾患は、好ましくは特定の虚血-再灌流損傷における虚血又は急性心筋梗塞などの心筋梗塞である。他の特定の実施形態において、治療される心臓血管疾患は、慢性心不全である。

50

## 【 0 1 8 8 】

他の好ましい一実施形態において、治療される障害は、網膜の疾患である。好ましい一実施形態において、前記治療される障害は、糖尿病性網膜症、網膜外傷、黄斑変性症、網膜虚血又は糖尿病性黄斑浮腫である。

## 【 0 1 8 9 】

他の好ましい一実施形態において、治療される障害は、腎臓の疾患である。好ましい一実施形態において、前記治療される障害は、糖尿病性ニューロパシー、腎毒性傷害、移植又は腎不全である。

## 【 0 1 9 0 】

本明細書における治療のための癌の例としては、限定はしないが、腺癌、リンパ腫、芽腫、肉腫、黒色腫及び白血病などの癌が挙げられる。本明細書における治療のためのさらに好ましい癌としては、腎細胞癌、特に転移腎癌及びウィルムス腫瘍などの腎臓癌、濾胞性リンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、ＡＩＤＳの場合にカポジ肉腫を含む免疫不全後に現れる腫瘍、扁平上皮癌、中枢神経系に影響を及ぼす腫瘍、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌及び肝細胞癌などの肝臓癌、膀胱癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、及び種々のタイプの頭頸部癌である。中枢神経系に影響を及ぼす腫瘍としては、特にアストロサイト腫瘍（未分化星細胞腫又はグリア芽細胞腫など）、未分化乏突起膠腫、未分化オリゴ星細胞腫、髄芽腫又は神経芽腫が挙げられる。本明細書における治療に好ましい癌は、腺癌、より好ましくは、腎臓の腺癌（腎細胞癌、特に転移腎癌及びウィルムス腫瘍など）、前立腺癌、卵巣癌又は乳癌、又はリンパ腫（特に濾胞性リンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、ホジキン又は非ホジキンリンパ腫）、又は白血病（特に慢性リンパ球性白血病又は慢性骨髄性白血病）、又は多発性骨髄腫、又は中枢神経系に影響を及ぼす腫瘍（特にグリア芽細胞腫又は神経芽腫）である。

10

20

## 【 0 1 9 1 】

本明細書において、治療される感染性疾患の例としては、慢性Ｂ型及びＣ型肝炎並びにＨＩＶ／ＡＩＤＳを含んでなるウィルス感染、感染性肺炎、及び性器いぼなどの性病が挙げられる。

## 【 0 1 9 2 】

本明細書において、治療される免疫学的及び自己免疫学的関連疾患の例としては、組織又は臓器移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎が挙げられる。

30

## 【 0 1 9 3 】

一実施形態において、本明細書において、治療される疾患は貧血であり、より好ましくは、慢性腎不全（ＣＲＦ）に関連した貧血、ジドブジン処置ＨＩＶ感染患者における貧血、化学療法又は放射線療法を受けている癌患者における貧血、非骨髄系癌の進行に関連した貧血、ウィルス感染（ＨＩＶなど）に関連した貧血又は慢性疾患に関連した貧血である。

## 【 0 1 9 4 】

また、本発明のポリペプチド又は医薬組成物は、異なる自己血液採取プログラムに關与している患者において、他の人からの血液の使用を避けるために、自己血液の産生を増加させる目的の治療用化合物の調製にも使用できる（これは、例えば、外科手術の際に出血が想定される場合である）。

40

## 【 0 1 9 5 】

本発明の医薬組成物は、活性成分としての本発明のポリペプチド又はタンパク質と組み合わせ、好適な薬学的に許容できる希釈剤、担体、生物適合性媒体及び動物への投与に好適な添加物（例えば、生理学的生理食塩溶液）を含有でき、並びに任意に、薬剤的に使用できる製剤へ活性化化合物を処理することを助ける助剤（賦形剤、安定化剤、又はアジュバントなど）を含む。該医薬組成物は、投与様式の必要性に合致するように、任意の許容

50

できる方法で製剤化できる。例えば、薬剤送達のための生体材料及び他のポリマーの使用、並びに特定の投与様式を検証するための種々の技法及びモデルが、文献に開示されている(Luo B及びPrestwich GD、2001年; Cleland JLら、Curr Opin Biotechnol. (2001)、12(2): 212~9頁)。「薬学的に許容できる」は、該活性成分の生物活性の有効性を妨害せず、投与される宿主に毒性でない任意の担体を包含することを意味している。例えば、非経口投与用に、上記活性成分は、生理食塩水、デキストロス溶液、血清アルブミン及びリンガー液などの媒体中、注射用の単位用量形態において製剤化できる。担体はまた、澱粉、セルロース、タルク、ブドウ糖、乳糖、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール、及び石油、動物源、植物源又は合成源のものを含む種々の油類(落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油)からも選択できる。

10

20

30

40

50

#### 【0196】

該医薬組成物は、液体形態又は凍結乾燥形態であり得、種々のpH値及びイオン強度を有する希釈剤(トリス、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液又はリン酸緩衝液)、ツウィーン又はポリソルベートなどの可溶化剤、ヒト血清アルブミン又はゼラチンなどの担体、チメロサル、パラベン類、塩化ベンジルアルコニウム又はベンジルアルコールなどの保存剤、アスコルビン酸又はメタ重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、及びリシン又はグリシンなどの他の成分を含む。具体的な組成物の選択は、治療されている病態、投与経路及び所望の薬物動態パラメーターなどの多数の要因に依存する。医薬組成物に好適な成分のより広範な概論は、Remington's Pharmaceutical Science、第18版、A. R. Gennaro編、マック、イーストン、ペンシルベニア州(1980)に見られる。好ましい実施形態において、本発明のEPOポリペプチド及び変異体は、ヒトアルブミンを含有する、且つ任意に、保存剤としてベンジルアルコールを含有する等張塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム緩衝液中、液体形態で製剤化される。

#### 【0197】

活性成分の所望の血中濃度を確立するために、任意の許容された投与様式を使用でき、当業者により決定できる。例えば、投与は、皮下、静脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、経皮、経直腸、経口、又は頰側経路などの種々の非経口経路によるものであり得る。本発明の医薬組成物は、皮下又は静脈内の注射によって投与されることが好ましい。最終的に選択された投与経路は、多数の要因に依存し、当業者によって確認できる。

#### 【0198】

また、本発明の医薬組成物は、好ましくは、正確な投与量の単回投与に好適な単位用量形態で、予め決定された速度における該ポリペプチドの長期投与のために、蓄積注射、浸透圧ポンプなどの持続された又は制御された放出投与形態においても投与できる。

#### 【0199】

非経口投与は、大量瞬時注射又は経時的に漸次的灌流によるものであり得る。非経口投与用の製剤としては、滅菌水性又は非水性液剤、懸濁剤、及び乳剤が挙げられ、それらは、当業者に知られた助剤又は賦形剤を含有でき、ルーチン法によって調製できる。さらに、適切な油性注射用懸濁剤として、該活性化合物の懸濁剤が投与できる。好適な親油性溶媒又は媒体としては、脂肪油、例えば、ゴマ油、又は合成脂肪酸エステル、例えば、ゴマ油、又は合成脂肪酸エステル、例えば、オレイン酸エチル又はトリグリセリドが挙げられる。該懸濁剤の粘度を増加させる物質を含有し得る水性注射用懸濁剤としては、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、及び/又はデキストランが挙げられる。該懸濁剤はまた、任意に、安定化剤も含有し得る。医薬組成物には、注射による投与のための好適な液剤が含まれ、賦形剤と共に、約0.01パーセントから99.99パーセント、好ましくは、約20パーセントから75パーセントの活性化合物を含有する。

#### 【0200】

当然のことながら、投与される用量は、レシピエントの年齢、性別、健康状態、及び体重、存在する場合は、併用治療の種類、治療の頻度、及び所望の効果の性質に依存する。当業者によって理解され、決定されるように、用量は、個々の対象によって調整される。各治療に必要な総用量は、複数用量又は単回用量によって投与できる。

#### 【0201】

例えば、貧血（ＣＲＦに関連した貧血、ジドブジン処置ＨＩＶ感染患者における貧血、化学療法又は放射線療法を受けている癌患者における貧血、非骨髄系癌の進行に関連した貧血、ウィルス感染（ＨＩＶなど）に関連した貧血又は慢性疾患に関連した貧血など）の治療の場合、本発明のＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体の投与頻度は、治療されている病態及び標的ヘマトクリットに依って変わるが、一般に、週に３回未満となろう。投与頻度は、週に約２回、週に約１回となろう。また、投与頻度は、週に約１回未満、例えば、２週ごとに約１回（１４日当たり約１回）、１カ月に１回又は２カ月ごとに１回でもよい。当然のことながら、実際に用いられる投与回数は、該ＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体に対する異なる個体による応答の変動によって、本明細書に開示された頻度からいくらか変化することがあり得；用語「約」は、このような変動を反映することが意図されている。本発明のＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体による貧血の治療の場合、治療有効量とは、標的ヘマトクリットへの、又は患者に利益を提供する標的ヘマトクリット範囲へのヘマトクリット増加を提供するか、又は標的ヘマトクリットに、又は標的ヘマトクリット範囲内に患者を維持するＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体（又は本明細書上記の融合タンパク質）の量を称する。この量は、個体によって変動し、患者の全体的な身体状態、貧血の重症度及び基礎となっている原因及び個々の患者にとっての最終的な標的ヘマトクリットなど、多数の要因に依存する。標的ヘマトクリットは典型的に、３０％～６０％の範囲、又は３０％～４５％の範囲、より好ましくは、４０％～４５％の範囲である。当然のことながら、このような標的は、所与の患者にとっての実際の標的ヘマトクリット決定において、医師の裁量が適切であり得るように、個体によって変動する。しかしながら、標的ヘマトクリットの判定は、十分に当業者のレベル内にある。

#### 【0202】

本発明の医薬組成物は、単独で、又は該病態に向けられた、又は該病態の他の症状に向けられた他の療法と関連付けて投与できる。通常、本発明によるＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体の週１回投与の用量範囲は、１用量、１ｋｇ当たり、約０．０５μｇから約１０μｇのエリスロポエチンペプチドである。週３回投与の用量範囲は通常、１用量、１ｋｇ当たり、０．０２μｇから２．５μｇとなろう。該個体に投与された最初の、又は以前の用量と同一、それ未満、又はそれより超の投与量で、引き続いての投与が実施できる。

#### 【0203】

好ましい実施形態において、本発明のＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体は、ｒＨｕＥＰＯよりも大きな効力を有する治療薬である。このような組成物の利点は、より低頻度で、及び／又はより低用量で投与し得ることである。貧血を患っている患者に対する現行の治療は、週３回のＥＰＯ投与、外科手術患者では１日１回の投与を要する。より低頻度の投与計画は、医師と患者の双方にとって、特に、医師のオフィス又は診療所に定期的に来られない患者、又はＥＰＯを自己注射する患者にとって、より便利になると思われる。より強力な分子の他の利点は、ヘマトクリットの同等な増加のために、患者に導入される薬剤がより少ないことである。したがって、好ましい実施形態において、本発明のＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体は、ｒＨｕＥＰＯに比較して、貧血の治療に関してより強力な分子であり、より低頻度の投与計画を可能にする。他の好ましい実施形態において、本発明のＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体は、より低用量で投与された際、少なくともｒＨｕＥＰＯと同等なレベルに、ヘマトクリットを増加及び維持する。さらに他の好ましい実施形態において、本発明のＥＰＯポリペプチド又は変異体又は類似体は、少なくともｒＨｕＥＰＯと同様に忍容され、一部の患者では、より忍容される可能性がある。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 0 4 】

さらに、極めて好ましい実施形態において、本発明の E P O ポリペプチド又は変異体又は類似体は、哺乳動物におけるヘマトクリットレベルを実質的に増加させることなく、前記哺乳動物、特にヒトにおいて、組織保護的活性を有する。このようなポリペプチドは、治療される患者のヘマトクリットレベルに対し、野生型 E P O に比較してより少ない効果で、又はさらに無効果で投与できるため、特に有利である。このようなポリペプチドの利点は、ヘマトクリットに関連した副作用及び危険のある高すぎるレベルへと増加させることなく、野生型 E P O に比較して、より高い頻度で、及び / 又はより高い用量で投与し得ることである。このような本発明のポリペプチド又は変異体又は類似体は、患者において、より忍容される可能性がある。

10

## 【 0 2 0 5 】

7. 本発明の E P O ポリペプチド又は変異体をコードする核酸の検出：

本発明のさらなる態様は、サンプル中、本発明の E P O ポリペプチド又は変異体又は類似体をコードする核酸、好ましくは、RNA 又は cDNA を検出又は投与する組成物及び方法に関する。このような組成物としては、例えば、本明細書における上記の E P O ポリペプチド又は変異体又は類似体をコードする核酸を特異的に認識する任意の特異的核酸プローブ又はプライマーが挙げられる。

## 【 0 2 0 6 】

特定の実施形態は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用できる、本発明による E P O ポリペプチド又は変異体又は類似体をコードする核酸配列の断片に関するものである。このような核酸断片は、20 から 80 ヌクレオチドの長さ、好ましくは、20 から 60 ヌクレオチドの長さ、より好ましくは、20 から 50 ヌクレオチドの長さ、最も好ましくは、20 から 38 ヌクレオチドの長さである。

20

## 【 0 2 0 7 】

特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的には、本明細書上記で定義された配列番号 4 のポリペプチド又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体をコードする配列又はその相補鎖に由来する。さらなる特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションプローブは、配列番号 4 のポリペプチドをコードする 20 から 38 ヌクレオチドの長さの核酸又はその相補鎖であり、さらに好ましくは、配列番号 5 の 20 から 38 ヌクレオチドの核酸又はその相補鎖である。

30

## 【 0 2 0 8 】

他の特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的には、本明細書上記で定義された配列番号 6 のポリペプチド又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体をコードする配列又はその相補鎖に由来する。さらなる特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションプローブは、配列番号 6 のポリペプチドをコードする 20 から 38 ヌクレオチドの長さの核酸又はその相補鎖であり、さらに好ましくは、配列番号 7 の 20 から 38 ヌクレオチドの核酸又はその相補鎖である。

## 【 0 2 0 9 】

他の特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的には、本明細書上記で定義された配列番号 8、又は配列番号 9 のポリペプチド又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体をコードする配列又はその相補鎖に由来する。さらなる好ましい実施形態において、ハイブリダイゼーションプローブは、配列番号 8、又は配列番号 9 のポリペプチドをコードする 36 から 38 ヌクレオチドの長さの核酸又はその相補鎖であり、さらに好ましくは、配列番号 10、又は配列番号 11 の 20 から 36 又は 38 ヌクレオチドの核酸又はその相補鎖である。

40

## 【 0 2 1 0 】

他の特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的には、本明細書上記で定義された配列番号 13 のポリペプチド又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体をコードする配列又はその相補鎖に由来する。さらなる特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションプローブは、配列番号 13 のポリペプチドをコードする

50

20 から 38ヌクレオチドの長さの核酸又はその相補鎖であり、さらに好ましくは、配列番号 12 の 20 から 38ヌクレオチドの核酸又はその相補鎖である。

【0211】

これに関して、用語「核酸分子」は、限定はしないが、デオキシリボ核酸（例えば、DNA、cDNA、gDNA、合成DNAなど）、リボ核酸（例えば、RNA、mRNAなど）及びペプチド核酸（PNA）などの種々のタイプのすべての核酸を包含する。好ましい実施形態において、該核酸分子は、二本鎖DNA分子又はcDNA分子などのDNA分子である。ハイブリダイゼーションプローブは、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P又は<sup>35</sup>Sなどの放射性ヌクレオチド、又はアビジン/ビオチン結合系により該プローブに結合したアルカリホスファターゼなどの酵素標識など、種々の標識によって標識できる。本発明のcDNAの配列に相補的な配列を有する標識プローブを用いて、ヒトcDNA、ゲノムDNA又はmRNAのライブラリーをスクリーンし、該プローブがハイブリダイズするのは、このようなライブラリーのどのメンバーかを判定することができる。ハイブリダイゼーション技術は当業界でよく知られている。

10

【0212】

本発明によるEPOポリペプチド又は変異体又は類似体をコードする核酸配列の他の有用な断片としては、標的mRNA（センス）又はDNA（アンチセンス）配列に結合することのできる一本鎖核酸配列（RNA又はDNA）を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。特定の実施形態において、前記断片は、本明細書上記で定義した配列番号4のポリペプチド又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体をコードする核酸若しくはその相補鎖、又は配列番号5の核酸若しくはその相補鎖の断片である。他の特定の実施形態において、前記断片は、本明細書上記で定義した配列番号6のポリペプチド又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体をコードする核酸若しくはその相補鎖、又は配列番号7の核酸若しくはその相補鎖の断片である。他の特定の実施形態において、前記断片は、本明細書上記で定義した配列番号13のポリペプチド又は前記ポリペプチドの変異体又は類似体をコードする核酸若しくはその相補鎖、又は配列番号12の核酸若しくはその相補鎖の断片である。他の特定の実施形態において、前記断片は、本明細書上記で定義した配列番号8又は配列番号9のポリペプチド又は前記ポリペプチドの変異体をコードする核酸若しくはその相補鎖、又は配列番号10又は配列番号11の核酸若しくはその相補鎖の断片である。

20

30

【0213】

本発明によるアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、EPO DNAのコード領域の断片を含む。このような断片は一般に、少なくとも14ヌクレオチド、好ましくは14から36又は38ヌクレオチド、さらに好ましくは、14から30ヌクレオチドを含む。所与のタンパク質をコードするcDNA配列に基づいたアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えば、Stein及びCohen（Cancer Res. 48:2659頁、1988年）及びvan der Kroftら（Bio Techniques 6:958頁、1988年）に記載されている。標的核酸へのアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの結合により、二重鎖分解の増加、転写又は翻訳の早期終結などのいくつかの手段の1つにより、又は他の手段により、標的配列の転写又は翻訳を遮断する二重鎖の形成がもたらされる。したがって、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、EPOタンパク質（特に本発明によるEPOポリペプチド又は変異体又は類似体）の発現を遮断するために、より具体的には、特定の転写変異体の発現、特に、EPOv1、EPOv2又はEPOv3の発現を遮断するために使用できる。特定の実施形態において、エキソン2からエキソン4の間の連結部領域（該連結部を覆っているような）におけるEPOv1をコードするmRNAに結合するような、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが選択される。他の特定の実施形態において、エキソン2からエキソン5の間の連結部領域（該連結部を覆っているような）におけるEPOv2をコードするmRNAに結合するような、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが選択される。

40

【0214】

50



本明細書上記に定義した核酸配列の断片のさらなる使用は、上記に定義したEPOポリペプチド又は変異体又は類似体をコードする核酸分子の少なくとも特有の断片を増幅するためのプライマーとして、それらを使用することである。「プライマー」とは、標的ヌクレオチド配列に相補的であり、該標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズさせるために使用される特異的オリゴヌクレオチド配列を意味する。プライマーは、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ又は逆転写酵素のいずれかによって触媒されるヌクレオチド重合のための開始ポイントとして働く。本発明の典型的なプライマーは、6から50ヌクレオチドの長さ、より好ましくは、8から40ヌクレオチドの長さ、さらに好ましくは、12から30ヌクレオチドの長さの一本鎖核酸分子である。プライマーの配列は、標的核酸分子の配列から直接引き出すことができる。高い特異性を確実にするためには、プライマー配列と標的遺伝子との間の完全相補性が好ましい。しかし、一定の誤対合は許容できる。特定の実施形態において、該プライマーは、12から30ヌクレオチド、より好ましくは、15から20ヌクレオチドの長さであり、配列番号5又はその相補鎖の断片である。これらのプライマーは、エキソン2からエキソン4の間の連結部領域（該連結部を覆っているような）におけるEPOv1をコードするcDNAに結合し、当業界に知られた方法によって上流又は下流に選択された他のプライマーに結合するように選択された場合、転写変異体EPOv1を特異的に増幅するためのRT-PCRプライマーとして特に好適である。他の特定の実施形態において、該プライマーは、12から30ヌクレオチド、より好ましくは、15から20ヌクレオチドの長さであり、配列番号7又はその相補鎖の断片である。これらのプライマーは、エキソン2からエキソン5の間の連結部領域（該連結部を覆っているような）におけるEPOv1をコードするcDNAに結合し、当業界に知られた方法によって上流又は下流に選択された他のプライマーに結合するように選択された場合、転写変異体EPOv2を特異的に増幅するためのRT-PCRプライマーとして特に好適である。さらに他の特定の実施形態において、該プライマーは、12から30ヌクレオチド、より好ましくは、15から20ヌクレオチドの長さであり、配列番号11又はその相補鎖の断片である。これらのプライマーは、当業界に知られた方法によって上流又は下流に選択された他のプライマーに結合した場合、エキソン4Aの3'端によって少なくとも部分的にコードされた転写変異体の特異的に増幅するためのRT-PCRプライマーとして特に好適である。他の特定の実施形態において、該プライマーは、12から30ヌクレオチド、より好ましくは、15から20ヌクレオチドの長さであり、配列番号12若しくはその相補鎖、又は配列番号14若しくはその相補鎖の断片である。

#### 【0215】

本発明はまた、RNA干渉（RNAi）技術にも関する。RNA干渉（RNAi）とは、対象となっている遺伝子又はmRNAに対応する二本鎖RNA（dsRNA）が、生体内に導入されて、対応するmRNAの分解がもたらされる転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）の機序を称する。RNAi反応においては、dsRNA分子のセンス鎖とアンチセンス鎖の双方が、19から25ヌクレオチド（nt）、好ましくは、21から23ヌクレオチドの長さの範囲にあり、2-ヌクレオチド3'尾部を有する小型RNA断片又はセグメントに処理される。これらのdsRNAは、「ガイドRNA」又は「短干渉RNA」（siRNA）として知られている。siRNAはまた、siRNAの二重鎖の双方の鎖が単一のRNA分子内に含まれる短いヘアピンRNA（shRNA）も含み得る。或いは、19から25nt、好ましくは、21から23ntの長さであり、2-ヌクレオチド3'尾部を有する合成dsRNAを合成し、精製し、該反応に用いることができる。次いで、siRNAは、ヌクレアーゼ複合体内にsiRNAに対して相同性を有する内因性mRNAを標的とし、破壊するタンパク質を含む該複合体に結合する。この様式で、特定のmRNAを標的化し、分解することができ、それによって、標的mRNAからのタンパク質発現の減少がもたらされる。dsRNAの具体的な要件及び修飾は、PCT国際公開第01/75164号（参照として本明細書に組み込まれている）に記載されている。dsRNA分子は長さが変わり得るが、19から25ntの長さ、最も好ましくは、21から23ヌクレオチドの長さであり、2-から3-ヌクレオチド3'オーバーハングが、典型

10

20

30

40

50

的に(2'-デオキシ)チミジン又はウラシルで終わる特徴を有する siRNA 分子を用いることが好ましい。siRNA は典型的に、3' ヒドロキシル基を含む。一本鎖 siRNA 並びに dsRNA の平滑末端形態もまた使用できる。RNA の安定性をさらに増強させるために、3' オーバーハングを分解に対して安定化させることができる。このような一実施形態において、アデノシン又はグアノシンなどのプリンヌクレオチドを含むことによって、RNA を安定化させる。或いは、修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば、(2'-デオキシ)チミドによるウリジン 2 -ヌクレオチドオーバーハングの置換が許容され、RNA i の有効性に影響を及ぼさない。2' ヒドロキシル基の不在により、組織培養培地中のオーバーハングのヌクレアーゼ耐性が著しく増強する。siRNA は、PCT 国際公開第 01/75164 号に記載されている方法などの当業界に知られた任意の方法を用いて、又は、RNA のインビトロ転写に関する標準的方法及び Elbashir (Genes & Dev., 15: 188~200 頁、2001 年)に記載された dsRNA アニリング法を用いて調製できる。本発明において、dsRNA、又は siRNA は、本明細書に記載された EPO ポリペプチド又は変異体又は類似体 mRNA の mRNA 配列の少なくとも一部に実質的に相補的であり、本明細書に記載された EPO 変異体の発現又は生物活性を減少又は抑制することができる。siRNA は、本明細書に記載された EPO 変異体(特に EPO v 1、EPO v 2 又は EPO v 3)の 18 から 25 の連続ヌクレオチドに 100% 相補的であることが望ましい。本明細書に記載された EPO ポリペプチド又は変異体又は類似体の生物活性の減少は、対照の dsRNA、shRNA、又は siRNA で処置された細胞と比較して、好ましくは、少なくとも 5%、より好ましくは、少なくとも 10%、20%、又は 25%、最も好ましくは、少なくとも 50% である。タンパク質発現のレベルをアッセイする方法もまた、当業界に知られており、ウェスタンブロット、免疫沈降、及び ELISA が挙げられる。EPO ポリペプチド又は変異体又は類似体の生物活性をアッセイする方法としては、本明細書に記載されたアッセイが挙げられる。

10

20

#### 【0216】

本明細書に引用された特許及び参考文献はすべて、参照として、それらの全体が本明細書に組み込まれている。

#### 【0217】

本発明のさらなる態様及び利点は、以下の実施例に開示されるが、それらは、単に例示として考えるべきであって、本出願を限定するものではない。

30

#### 【実施例】

#### 【0218】

##### (実施例 1)

ヒト遺伝子 EPO のエキソン 1、2、4 及び 5 によってコードされた EPO の転写変異体のクローニング

エキソン 1、2、4 及び 5 によってコードされた EPO 転写変異体(EPO v 1)が、EPO のヒト遺伝子において予想された(図 4 を参照)。我々の予想により、4 つのエキソンにまたがっている 492 bp に対応する、164 のアミノ酸(配列番号 4)においてコードされた EPO v 1 タンパク質が導かれる。この予想には、開始メチオニン、シグナル配列及び停止コドンが含まれた(図 4)。

40

#### 【0219】

EPO v 1 タンパク質を作出するために、該エキソンを、ゲノム DNA から PCR によって増幅することができる。次いで、増幅されたエキソンを、当業界によく知られたクローニング技法により再組立てする。次いで、EPO v 1 コード配列に対応する PCR 産物(図 4)を、哺乳動物発現ベクター内にサブクローン化する。

#### 【0220】

EPO v 1 タンパク質作出のための他の可能性は、本明細書下記のとおり、RNA のプールからのクローニングである。

#### 【0221】

50

1. 1 : RNAのプールからのエキソン1、2、4及び5によってコードされたEPO v1のクローニング

逆転写及びクローニングの技法を用い、EPO v1を、RNAのプールからクローン化した。用いられたRNAのプールは、種々の組織からのRNAの混合物である。用いられた混合物は、以下のとおりである：ヒト脾臓のポリA RNA (Clontech; カタログ照会番号：636119)、ヒト骨格筋のポリA RNA (Clontech; カタログ照会番号：636120)、ヒト小腸のポリA RNA (Clontech; カタログ照会番号：636125)、ヒト精巢のポリA RNA (Clontech; カタログ照会番号：636115)、ヒト肝臓のポリA RNA (Clontech; カタログ照会番号：636101)、ヒト脳(全体)のポリA RNA (Clontech; カタログ照会番号：636102)及びヒト正常脂肪の総RNA (Invitrogen組織コレクション、(ロットA5040004)、Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州、米国)。

10

#### 【0222】

1. 1. 1. cDNAの合成(プールの作出)

A) 第1鎖cDNAの合成：

該cDNAの合成には、ClontechからのSMART(商標) RACE cDNA Amplification Kit(マウンテンビュー、カリフォルニア州、カタログ照会番号：634914)を、製造元の推奨に従って使用した。用いられたプロトコルは以下のとおりであった：

20

1 - 混合物調製

- 0.5 µlのRNAプール(上記参照)
- 1 µlの3' SMART CDS Primer IIA (10 µM)
- 1 µlのSMART IIA オリゴヌクレオチド(10 µM)
- 2.5 µlの脱イオン化H<sub>2</sub>O

2 - 内容物を混合し、該管をマイクロ遠心分離機内で簡単に回転させる

3 - 72 °Cで2分間インキュベートする

4 - 該管を氷上で2分間冷却する

5 - 各反応管に以下のものを加える

- 2 µlの5×第1鎖緩衝液
- 1 µlのDTT (20 mM)
- 1 µlの50×dNTP (10 mM)
- 1 µlのPowerScript Reverse Transcriptase

30

6 - 該管を42 °Cで1時間インキュベートする

7 - 190 µlのTE 1×(pH 7.5)を加える

8 - 72 °Cで7分間インキュベートする

9 - -20 °Cで保存する

#### 【0223】

B) Advantage - GC PCRプロトコル

Clontech(マウンテンビュー、カリフォルニア州、カタログ照会番号：639119)からのAdvantage - GC 2 PCR Kit & Polymerase Mixを用いたPCRを実施した。用いられたプロトコルは以下のとおりであった：

40

1 - 混合物調製

- 29 µlのH<sub>2</sub>O
- 10 µlの5×GC×2 PCR緩衝液
- 5 µlのGC Melt (5 M)
- 2 µlの入れ子ユニバーサルプライマーA 10 mM
- 1 µlの50×dNTP (各10 mM)
- 1 µlのAdvantage - GC Pol. Mix

50

2 - ステップ A ) で得られた産物 2  $\mu$  l を加える

3 - P C R 反応 :

9 4            1 分間            1 サイクル

9 4            1 5 秒間            )

6 5            5 秒間            ) 2 0 サイクル

6 8            1 2 分間            )

6 8            1 2 分間            1 サイクル

4 - 使用された管 : 0 . 4 n g /  $\mu$  l

#### 【 0 2 2 4 】

1 . 1 . 2 . E P O v 1    c D N A のクローニング

10

G a t e w a y クローニング法 ( I n v i t r o g e n から商品として入手できる G a t e w a y    P C R クローニングシステム ) の第 1 段階は、本明細書上記でテンプレートとして作出された c D N A を用いて、5 ' 末端に a t t B 1 組換え部位及び K o z a k 配列が隣接し、3 ' 末端にインフレーム 6 ヒスチジン ( 6 H i s ) タグをコードする配列、停止コドン及び a t t B 2 組換え部位 ( G a t e w a y 適合性 c D N A ) が隣接した E P O v 1 の O R F を作出する 2 ステップの P C R 反応を含む。

#### 【 0 2 2 5 】

A ) 第 1 の P C R

プライマーとして、R e c F 1 ( T G A G G G A C C C C G G C C A G G C G C G G A G ( 配列番号 1 6 ) ) 及び R e c R 1 ( A T G C C C A G G T G G A C A C A C C T G G T C A ( 配列番号 1 7 ) ) 、マトリックスとして、本明細書上記のステップ B ) で得られた産物並びに以下の条件を用いて、第 1 の P C R を実施した。

20

1 - 混合物調製

- 5  $\mu$  l の本明細書上記ステップ B ) で得られた産物

- 4 5  $\mu$  l の H <sub>2</sub> O

- 5  $\mu$  l の緩衝液「T a q P l u s ( 登録商標 ) P r e c i s i o n」1 0 x、S t r a t a g e n e ( ラジョーラ、カリフォルニア州、カタログ照会番号 : 6 0 0 2 1 1 )

- 0 . 4  $\mu$  l の d N T P    2 5 m M、I n v i t r o g e n ( カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号 : 1 0 2 9 7 - 0 1 8 )

- 各 1 0  $\mu$  M で 1  $\mu$  l のプライマー、R e c F 1 及び R e c R 1 ( 上記参照 )

30

- 0 . 2 5  $\mu$  l の T a q P l u s ( 登録商標 ) P r e c i s i o n、S t r a t a g e n e ( ラジョーラ、カリフォルニア州、カタログ照会番号 : 6 0 0 2 1 1 )

- 2 . 5  $\mu$  l の D M S O    1 0 0 %

2 - P C R 反応 :

9 4            1 分間            1 サイクル

9 4            4 0 秒間            )

4 5            4 0 秒間            ) 3 サイクル

7 2            1 分間            )

9 4            4 0 秒間            )

5 5            4 0 秒間            ) 9 サイクル

40

7 2            1 分間            )

7 2            5 分間

4            終了

#### 【 0 2 2 6 】

B ) 第 2 の P C R

プライマーとして、c l o F 1 ( G G G G A C A A G T T T G T A C A A A A A A G C A G G C T T C G C C A C C A T G G G G G T G C A C G A A T G T C C ( 配列番号 1 8 ) ) 及び c l o R 1 ( G G G G A C C A C T T T G T A C A A G A A A G C T G G G T T T C A A T G G T G A T G G T G A T G G T G T C T G T C C C C T G T C C T G C A G G ( 配列番号 1 9 ) ) 、マトリックスとして、本明細書上記のステップ A ) で得られた産

50

物並びに以下の条件を用いて、第2のPCRを実施した：

- 1 - 混合物調製
  - 10  $\mu$ lの本明細書上記ステップA)で得られた産物
  - 31.5  $\mu$ lのH<sub>2</sub>O
  - 4  $\mu$ lの緩衝液「Taq Plus (登録商標) Precision」10x、Stratagene (ラジオーラ、カリフォルニア州、カタログ照会番号：600211)
  - 0.32  $\mu$ lのdNTP 25mM、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：10297-018)
  - 各10  $\mu$ Mで4  $\mu$ lのプライマー、cloF1及びcloR1 (上記参照)
  - 0.2  $\mu$ lのTaq Plus (登録商標) Precision、Stratagene (ラジオーラ、カリフォルニア州、カタログ照会番号：600211) 10
- 2 - PCR 反応
 

94	1 分間	1 サイクル	
94	40 秒間	)	
45	40 秒間	) 3 サイクル	
72	1 分間	)	
94	1 分間		
94	40 秒間	)	
50	40 秒間	) 3 サイクル	
72	1 分間	)	20
94	40 秒間	)	
55	40 秒間	) 7 サイクル	
72	1 分間	)	
72	5 分間		
4	終了		

#### 【0227】

##### C) BP 反応

Gateway クローニング法の第2段階 (BP 組換えによるGateway エントリークローニング、Invitrogen) は、Gateway エントリーベクターpDONR (商標) 201 へのGateway 修飾PCR 産物 (即ち、上記ステップB) で得られたPCR 産物) のサブクローニングを含む。 30

- 1 - 混合物調製
  - 1  $\mu$ lの本明細書上記ステップB)で得られた産物
  - 4  $\mu$ lのTE10.1
  - 1  $\mu$ lのベクターpDONR201 (300ng/ $\mu$ l)、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：11798-014)
  - 2  $\mu$ lの緩衝BP 反応液5x、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：11789-013)
  - 2  $\mu$ lのBP クロナーゼ酵素、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：11789-013) 40
- 2 - 25 で1時間インキュベートする
- 3 - 1  $\mu$ lのプロテイナーゼKを加える (Merck KGaA (ダルムシュタット、ドイツ国、カタログ照会番号：1.24568))
- 4 - 37 で10分間インキュベートする
- 5 - 4 で保存する

#### 【0228】

##### D) 形質転換

本明細書上記のステップC)で得られた反応産物を用い、電気穿孔により、大腸菌DH10B細胞を形質転換した。

- 1 - 混合物組成：

- 1  $\mu$  l の本明細書上記ステップ C ) で得られた B P - 反応産物
- 30  $\mu$  l の E l e c t r o M a x D H 1 0 B 細胞、I n v i t r o g e n ( カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：18290-015 )

該混合物を冷却した 0 . 1 c m の電気穿孔キュベットに移し、製造元のプロトコルに従って、該細胞を電気穿孔した。

- 電気穿孔直後に、500  $\mu$  l の S O C 培地を加えた。
- 2 - 攪拌下、37 で 1 時間インキュベートする
- 3 - L B アガープレート上に 30  $\mu$  l を塗布する ( + 50  $\mu$  g / m l のカナマイシン )
- 4 - 37 で一晩インキュベートする

#### 【0229】

10

スプライス変異体の同定：

150  $\mu$  l の L B 培養物 + カナマイシンを接種するために、96 のクローンを取り出して用い、37 で 20 時間インキュベートした。p D O N R 特異的プライマー ( 正プライマー、5' - T C G C G T T A A C G C T A G C A T G G A T C T C - 3' ( 配列番号 32 ) ; 逆プライマー、5' - G T A A C A T C A G A G A T T T T G A G A C A C - 3' ( 配列番号 33 ) ) による P C R のために、各培養物 2 マイクロリットルを用いた。

P C R 条件：

P C R 混合物：

2  $\mu$  l の培養物

10  $\times$  P C R 緩衝液 2  $\mu$  l

20

20 m M の d N T P 0 . 2  $\mu$  l

10  $\mu$  M の p D O N R 正プライマー 1  $\mu$  l

10  $\mu$  M の p D O N R 逆プライマー 1  $\mu$  l

T a q DNA ポリメラーゼ ( 5 U /  $\mu$  l ) 0 . 1  $\mu$  l

d d H <sub>2</sub> O を 20  $\mu$  l まで加える

P C R プログラム

95 で 2 分間

95 で 30 秒間 )

56 で 30 秒間 } 35 サイクル

72 で 60 秒間 )

30

#### 【0230】

T A E 中、50 c m の 2 % アガロースゲル上、5 V / c m で 3 時間、5  $\mu$  l の P C R 産物を処理した。二者択一的スプライス変異体構造の配列決定及び確認のために、カノニカルの予想されたサイズとは異なる断片サイズを示す P C R 産物を選択した ( 5 m l の培養物 ) 。

#### 【0231】

得られたコロニーのいくつかの 5 m l の培養物から、プラスミドミニプレップ DNA を調製し、DNA 配列決定に供した。次いで、10  $\mu$  l の最終容量中、1 . 5  $\mu$  l の p E A K 1 2 d ベクター ( 0 . 1  $\mu$  g /  $\mu$  l ) 、2  $\mu$  l の L R 緩衝液及び 1 . 5  $\mu$  l の L R クロナーゼ ( I n v i t r o g e n ) を含有する組換え反応液中、正しい配列 ( p D O N R 201 \_ E P O v 1 - H I S ) を含有するクローンの 1 つからのプラスミド DNA ( 1 . 5  $\mu$  l 又は約 100 n g ) を用いた。該混合物を、室温で 1 時間インキュベートした。プロテイナーゼ K ( 2  $\mu$  g ) の添加により該反応を停止させ、さらに 10 分間 37 でインキュベートした。各反応液のアリコート ( 1  $\mu$  l ) を用い、電気穿孔により、大腸菌 D H 10 B 細胞を形質転換した。アンピシリン ( 100  $\mu$  g / m l ) を含有する L - プロス ( L B ) プレート上に、形質転換混合物のアリコートを塗布し、37 で一晩インキュベートした。

40

#### 【0232】

得られたコロニーのいくつかの 5 m l の培養物から、プラスミドミニプレップ DNA を調製した。p E A K 1 2 d ベクター内のプラスミド DNA ( 200 ~ 500 n g ) を、D

50

NA配列決定に供した。Q i a g e n P l a s m i d M E G A K i t ( Q I A G E N )を用い、製造元の指示に従って、配列を検証したクローン ( p E A K 1 2 d \_ \_ E P O v 1 - H I S ) の培養物 5 0 0 m l から、プラスミドマキシプレップDNAを調製した。滅菌水 ( 又は、1 0 m M の トリス - H C l 、p H 8 . 5 ) 中、1  $\mu$  g /  $\mu$  l の濃度でプラスミドDNAを再懸濁し、- 2 0 で保存した。

#### 【 0 2 3 3 】

プラスミド p E A K 1 2 d \_ \_ E P O v 1 - H I S の配列は、配列番号 2 0 で示されている。

#### 【 0 2 3 4 】

##### ( 実施例 2 )

##### E P O v 1 ( H i s - タグ化 ) の発現

ヒト細胞、例えば、エプスタインバーウィルス核抗原を発現するヒト胚腎臓 2 9 3 細胞 ( H E K 2 9 3 - E B N A 、 I n v i t r o g e n ) に、このような細胞に E P O v 1 の発現を可能にさせる発現ベクター ( p E A K 1 2 d \_ \_ E P O v 1 - H I S ) をトランスフェクトした。E P O v 1 を発現する細胞を増殖させ、該培養培地から該組換えタンパク質を抽出した。

#### 【 0 2 3 5 】

##### 2 . 1 クローン化 E P O v 1 ( H i s - タグ化 ) の哺乳動物細胞における機能的ゲノム発現

エプスタインバーウィルス核抗原を発現するヒト胚腎臓 2 9 3 細胞 ( H E K 2 9 3 - E B N A 、 I n v i t r o g e n ) を、E x - 細胞 V P R O 無血清培地 ( シードストック、維持培地、J R H ) 中、懸濁してルーチンに維持した。トランスフェクション前に、5 0 m l の F E M E 1 % F B S に、5 0 0  $\mu$  g の E P O v 1 コードプラスミドDNA ( p E A K 1 2 d \_ \_ E P O v 1 - H I S ) 及び 1 0  $\mu$  g のレポーター遺伝子プラスミドを加えた。次いで、1 m l の P E I ( 1 m g / m l P o l y s c i e n c e s 、米国 ) を加えた。攪拌後、該混合物を室温で 1 0 分間インキュベートした。該細胞接種物をトランスフェクション混合溶液と再懸濁し、1 % F B S ( I n v i t r o g e n ) を添加した 2 0 0 m l の F E M E ( 1 9 m M の H E P E S 、5 g / L のグルコース、7 . 5 m M の L - グルタミン、4 m l / L の I T S - X に D M E M / ハムの F - 1 2 、1 : 1 を補足 ) ( すべて I n v i t r o g e n - L i f e T e c h n o l o g i e s ) 培地に加え、好適な容器中、1  $\times$  1 0 <sup>6</sup> 細胞 / m l の細胞密度にする。該培養物を、5 % C O <sub>2</sub> 大気、及び少なくとも 7 0 % の相対湿度のインキュベーター中、3 7 で 9 0 分間、さらにインキュベートした。最後に、該容量に、4 m l / L の I T S - X を補足した 2 5 0 m l の化学的に規定された無血清 F r e e S t y l e 2 9 3 ( I n v i t r o g e n ) 培地をつぎ足した。トランスフェクションのため、該トランスフェクトした培養物を、同一条件でさらに 6 日間インキュベートした。採集日に、定性的蛍光試験 ( A x i o v e r t 1 0 Z e i s s ) によって、陽性トランスフェクションの確認を行った。上澄み液 ( 5 0 0 m l ) を、遠心分離し ( 1 8 0 0  $\times$  g 、4 、6 ~ 1 0 分間 ) 、0 . 2 2  $\mu$  m のフィルターユニット ( M i l l i p o r e 、5 0 0 m l フィルターユニット ) を通して滅菌ろ過し、I M A C ( I m m o b i l i s e d M e t a l A f f i n i t y C h r o m a t o g r a p h y ) クロマトグラフィーにより精製した。該上澄み液の 1 つのアリコート ( 5 0 0  $\mu$  l ) を、6 H i s - タグ化タンパク質の Q C 用に保持した。

#### 【 0 2 3 6 】

##### 2 . 2 クローン化 E P O v 1 ( H i s - タグ化 ) の精製

C 末端 6 H i s タグを有する E P O v 1 組換えタンパク質を含有する 5 0 0 m l の培養培地サンプルを、1 容量の冷緩衝液 A ( 5 0 m M の N a H 2 P O 4 ; 6 0 0 m M の N a C l ; 8 . 7 % ( w / v ) のグリセロール、p H 7 . 5 ) で希釈し、1 0 0 0 m l の最終容量にした。該サンプルを、0 . 2 2 m m の滅菌フィルター ( M i l l i p o r e 、5 0 0 m l フィルターユニット ) を通してろ過し、1 リットルの滅菌角形培地瓶 ( N a l g e n e ) 中、4 で保持した。自動サンプル充填器 ( L a b o m a t i c ) に接続した V I S

10

20

30

40

50

IONワークステーション (Applied Biosystems) 上、4 で精製を行った。精製操作は、2つの連続的ステップ、Niイオンを充填したPoros 20 MC (Applied Biosystems) カラム (10×50 mm、3.93 ml) 上での金属アフィニティークロマトグラフィー、引き続いて、Sephadex G-25 培地 (Amersham Pharmacia) ゲルろ過カラム (1.0×15 cm) 上での緩衝液交換を含んだ。第1のクロマトグラフィーステップでは、金属アフィニティークラムを、30カラム容量のEDTA液 (100 mMのEDTA; 1 MのNaCl; pH 8.0) で再生し、15カラム容量の100 mM NiSO<sub>4</sub> 溶液を用いた洗浄によってNiイオンによる再荷電を行い、10カラム容量の緩衝液A、続いて7カラム容量の緩衝液B (50 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 600 mMのNaCl; 8.7% (w/v) のグリセロール、400 mM; イミダゾール、pH 7.5) により洗浄し、最後に、15 mMのイミダゾールを含有する15カラム容量の緩衝液Aによって平衡化した。該サンプルをLabomaticサンプル充填器により、200 mlのサンプルループ内に移し、引き続き、20 ml / 分の流速で、Ni金属アフィニティークラム上に充填した。該Niカラム上にサンプル全体 (1000 ml) を移すために、該充填操作を5回繰り返した。引き続いて、12カラム容量の緩衝液A、続いて、20 mMのイミダゾールを含有する28カラム容量の緩衝液Aによって該カラムを洗浄した。20 mMのイミダゾール洗浄の間に、緩く結合した混入タンパク質をカラムから溶出させた。最後に、組換えEPOv1 Hisタグ化タンパク質を、2 ml / 分の流速で10カラム容量の緩衝液Bにより溶出させ、溶出した該タンパク質を、2.7 mlのフラクション中に採集した。第2のクロマトグラフィーステップでは、Sephadex G-25ゲルろ過カラムを、2 mlの緩衝液D (1.137 MのNaCl; 2.7 mMのKCl; 1.5 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7.2) で再生し、引き続き、4カラム容量の緩衝液C (137 mMのNaCl; 2.7 mMのKCl; 1.5 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20% (w/v) のグリセロール; pH 7.4) で平衡化した。該Niカラムから、積分サンプル充填器を通して、ピークフラクションをVISION上に自動的に溶出させ、Sephadex G-25カラム上に充填し、該タンパク質を、2 ml / 分の流速で緩衝液Cにより溶出させた。脱塩サンプルを、2.7 mlのフラクション中に採集した。該フラクションを、0.22 mmの滅菌遠心分離フィルター (Millipore) を通してろ過し、分割し、凍結し、-80 で保存した。サンプルのアリコート、クーマシーブルー染色及び抗His抗体を用いたウェスタンブロットによりSDS-PAGE (4~12%のNuPAGEゲル; Novex) 上で分析した。レベルLPSエンドトキシンの判定用にさらなるアリコートを採取した。

#### 【0237】

クーマシーブルー染色。該NuPAGEゲルを、0.1%のクーマシーブルーR250染色溶液 (30%メタノール、10%酢酸) 中、室温で1時間で染色し、引き続き、20%メタノール、7.5%酢酸中、背景が明瞭になり、タンパク質のバンドがはっきり見えるようになるまで脱染色した。

#### 【0238】

ウェスタンブロット。電気泳動後、該タンパク質を、4 で1時間、290 mAで、該ゲルからニトロセルロース膜へ電子移動させた。該膜を、室温で1時間、緩衝液E (137 mMのNaCl; 2.7 mMのKCl; 1.5 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.1%ツウィーン20、pH 7.4) 中、5%粉乳によりブロックし、引き続き、緩衝液E中、2.5%粉乳中の2種のウサギポリクローナル抗His抗体 (G-18及びH-15、各0.2 µg/ml; Santa Cruz) の混合物と共に、4 で一晩インキュベートした。室温でさらに1時間インキュベーション後、該膜を、緩衝液Eで洗浄 (3×10分) してから、2.5%粉乳を含有する緩衝液E中、1/3000に希釈した第2のHRP結合抗ウサギ抗体 (DAKO、HRP 0399) と共に室温で2時間インキュベートした。緩衝液Eで洗浄 (3×10分) 後、該膜をECLキット (Amersham) により、1分間展開させた。引き続き、該膜を、Hyperfilm (Ame



r s h a m) に曝し、該フィルムを展開させ、ウェスタンブロット画像を可視的に解析した。

【0239】

タンパク質アッセイ。標準どおり、BCAタンパク質アッセイキット(Pierce)を用いて、ウシ血清アルブミンにより、該タンパク質濃度を判定した。収量は520mgの精製EPOv1-6HISであった。

【0240】

LPSに関するアッセイ。The Endosafe-Portable Test System(Charles River PTS100)を用い、製造元の指示に従って、LPS含量を推定した。サンプルは四重に試験し、LPSは、U/mgタンパク質として表した。EPOv1のLPS濃度は、5.32U/mgと判定され、これは、動物への注射に許容できる。

10

【0241】

(実施例3)

ヒト遺伝子EPO(EPOv2)のエキソン1、2、及び5によってコードされたEPOの変異体のクローニング

実施例1に記載された方法を用いて、EPOのヒト遺伝子のエキソン1、2、及び5を含有し、EPOv2をコードする配列(図5を参照)を同定し、クローン化した。得られた発現プラスミド、pEAK12d\_\_EPOv2-HISの配列は、配列番号21で示される。

20

【0242】

(実施例4)

EPOv2(Hisタグ化)の発現

EPOv2タンパク質は、3つのエキソンにまたがる312bpに対応する、104のアミノ酸長(配列番号6)である。該配列は、開始メチオニン、シグナル配列及び停止コドンを含む(図5)。

【0243】

ヒト細胞、例えば、エプスタインバーウィルス核抗原を発現するヒト胚腎臓293細胞(HEK293-EBNA、Invitrogen)に、このような細胞にEPOv2の発現を可能にする発現ベクター(pEAK12d\_\_EPOv2-HIS)をトランスフェクトした。実施例2に記載されたプロトコルに従って、該タンパク質を作出した。

30

【0244】

(実施例5)

ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2、3及びより長いエキソン4(本明細書においてエキソン4Aと称される)によってコードされるEPOの転写変異体のクローニング

坐骨神経圧潰におけるEPOv1及びEPOv2の効果を試験することにより、本試験における野生型タンパク質で見られた活性と同様な活性を双方とも有することが判明した(実施例11及び図9参照)。該変異タンパク質は、2つのドメイン、即ち、エキソン2及びエキソン5によってコードされたドメインを、完全長分子と共有する。坐骨神経圧潰モデルにおいて保護を与える該タンパク質の領域をより正確に規定する目的で、変異タンパク質EPOv3の活性を調べた。この変異体は、エキソン5を欠いており、下記のとおりクローン化された。

40

【0245】

EPOのヒト遺伝子において、エキソン1、2、3及び4AによってコードされたEPO変異体(EPOv3)が予測された。前記エキソン4Aは、野生型EPOをコードするエキソン4と比較して、3'端でより長い(図3及び6参照)。我々の予測により、4つのエキソン(同定された新規エキソンは、エキソン4Aと称された)にまたがっている462bpに対応する、154のアミノ酸(配列番号9)においてコードされたEPOv3タンパク質が導かれる。この予測は、開始メチオニン、シグナル配列及び停止コドンを含む(図6)。

50

## 【0246】

5.1: RNA プールからのエキソン 1、2、3 及びわずかにより長いエキソン 4 によってコードされた EPOv3 のクローニング

逆転写及びクローニング技法を用いて RNA のプールから EPOv3 をクローン化した。用いられた RNA のプールは、種々の組織からの RNA の混合物である。用いられた混合物は、以下のとおりであった：ヒト脾臓のポリ A RNA (Clontech; カタログ照会番号：636119)、ヒト骨格筋のポリ A RNA (Clontech; カタログ照会番号：636120)、ヒト小腸のポリ A RNA (Clontech; カタログ照会番号：636125)、ヒト精巢のポリ A RNA (Clontech; カタログ照会番号：636115)、ヒト肝臓のポリ A RNA (Clontech; カタログ照会番号：636101)、ヒト脳（全体）のポリ A RNA (Clontech; カタログ照会番号：636102) 及びヒト正常脂肪の総 RNA (Invitrogen 組織コレクション、(ロット A5040004)、Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州、米国)。

10

## 【0247】

5.1.1 cDNA の合成（プールの作出）

A) 第 1 鎖 cDNA の合成：

cDNA 合成のために、Clontech (マウンテンビュー、カリフォルニア州、カタログ照会番号：634914) からの SMART (商標) RACE cDNA Amplification Kit を、製造元の推奨に従って用いた。用いられたプロトコルは、以下のとおりであった：

20

1 - 混合物調製

- 0.5 µl の RNA プール（上記参照）
- 1 µl の 3' SMART CDS プライマー IIA (10 µM)
- 1 µl の SMART IIA オリゴヌクレオチド (10 µM)
- 2.5 µl の脱イオン化 H<sub>2</sub>O

2 - 内容物を混合し、該管をマイクロ遠心管中で簡単に回転させる

3 - 72 で 2 分間インキュベートする

4 - 該管を氷上で 2 分間冷やす

5 - 各反応管に以下のものを加える：

30

- 2 µl の 5 × 第 1 鎖緩衝液
- 1 µl の DTT (20 mM)
- 1 µl の 50 × dNTP (10 mM)
- 1 µl の PowerScript 逆転写酵素

6 - 該管を 42 で 1 時間インキュベートする

7 - 190 µl の TE1X (pH 7.5) を加える

8 - 72 で 7 分間インキュベートする

9 - -20 で保存する

## 【0248】

B) Advantage - GC PCR プロトコル

40

Clontech (マウンテンビュー、カリフォルニア州、カタログ照会番号：639119) からの Advantage - GC 2 PCR キット & Polymerase Mix を用いた PCR を実施した。用いられたプロトコルは、以下のとおりである：

1 - 混合物調製

- 29 µl の H<sub>2</sub>O
- 10 µl の 5 × GCX 2 PCR 緩衝液
- 5 µl の GC 溶解液 (5 M)
- 2 µl の入れ子ユニバーサルプライマー 10 mM
- 1 µl の 50 × dNTP (各 10 mM)
- 1 µl の Advantage - GC Pol. Mix

50

2 - ステップ A ) で得られた産物の 2  $\mu$  l を加える

3 - P C R 反応 :

9 4      1 分間                  1 サイクル

9 4      1 5 秒間              )

6 5      5 秒間                  ) 2 0 サイクル

6 8      1 2 分間              )

6 8      1 2 分間                  1 サイクル

4 - 使用する管 : 0 . 4 n g /  $\mu$  l

#### 【 0 2 4 9 】

5 . 1 . 2 E P O v 3 c D N A のクローニング :

10

G a t e w a y クローニング法 ( I n v i t r o g e n から商品として入手できる G a t e w a y P C R クローニングシステム ) の第 1 段階は、テンプレートとして本明細書上記で作製した c D N A を用いて、5 ' 末端に a t t B 1 組換え部位及び K o z a k 配列が隣接し、3 ' 末端にインフレーション 6 ヒスチジン ( 6 H i s ) タグをコードする配列、停止コドン及び a t t B 2 組換え部位 ( G a t e w a y 適合性 c D N A ) が隣接した E P O v 3 の O R F を作出する 2 ステップの P C R 反応を含む。

#### 【 0 2 5 0 】

A ) 第 1 の P C R

プライマーとして、R e c F 1 ( T G A G G G A C C C C G G C C A G G C G C G G A G ( 配列番号 1 6 ) ) 及び R e c R 1 ( A T G C C C A G G T G G A C A C A C C T G G T C A ( 配列番号 1 7 ) ) 、マトリックスとして、本明細書上記ステップ B ) で得られた産物及び以下の条件を用いる第 1 の P C R を実施した :

20

1 - 混合物調製

- 5  $\mu$  l の本明細書上記ステップ B ) で得られた産物

- 4 5  $\mu$  l の H <sub>2</sub> O

- 5  $\mu$  l の緩衝液「T a q P l u s ( 登録商標 ) P r e c i s i o n」1 0 x、S t r a t a g e n e ( ラジョーラ、カリフォルニア州、カタログ照会番号 : 6 0 0 2 1 1 )

- 0 . 4  $\mu$  l の d N T P 2 5 m M、I n v i t r o g e n ( カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号 : 1 0 2 9 7 - 0 1 8 )

- 各 1 0  $\mu$  M のプライマー 1  $\mu$  l、R e c F 3 及び R e c R 3 ( 上記参照 )

30

- 0 . 2 5  $\mu$  l の T a q P l u s ( 登録商標 ) P r e c i s i o n、S t r a t a g e n e ( ラジョーラ、カリフォルニア州、カタログ照会番号 : 6 0 0 2 1 1 )

- 2 . 5  $\mu$  l の D M S O 1 0 0 %

2 - P C R 反応 :

9 4      1 分間                  1 サイクル

9 4      4 0 秒間              )

4 5      4 0 秒間                  ) 3 サイクル

7 2      1 分間                  )

9 4      4 0 秒間              )

5 5      4 0 秒間                  ) 9 サイクル

40

7 2      1 分間                  )

7 2      5 分間

4      終了

#### 【 0 2 5 1 】

B ) 第 2 の P C R

プライマーとして、c l o F 1 ( G G G G A C A A G T T T G T A C A A A A A A G C A G G C T T C G C C A C C A T G G G G G T G C A C G A A T G T C C ( 配列番号 1 8 ) ) 及び c l o R 3 ( G G G G A C C A C T T T G T A C A A G A A A G C T G G G T T T C A A T G G T G A T G G T G A T G G T G C A G A A A G G G C A A G C A G A A G T ( 配列番号 2 2 ) ) 、マトリックスとして、本明細書上記ステップ A ) で得られた産物

50

及び以下の条件を用いて、第2のPCRを実施した：

- 1 - 混合物調製
  - 本明細書上記ステップA)で得られた産物 10 µl
  - 31.5 µlのH<sub>2</sub>O
  - 4 µlの緩衝液「TaqPlus (登録商標) Precision」10x、Stratagene (ラジオーラ、カリフォルニア州、カタログ照会番号：600211)
  - 0.32 µlのdNTP 25mM、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：10297-018)
  - 各10 µMのプライマー4 µl、cloF3及びcloR3 (上記参照)
  - 0.2 µlのTaqPlus (登録商標) Precision、Stratagene (ラジオーラ、カリフォルニア州、カタログ照会番号：600211) 10
- 2 - PCR 反応：
 

94	1 分間	1 サイクル	
94	40 秒間	)	
45	40 秒間	) 3 サイクル	
72	1 分間	)	
94	1 分間	)	
94	40 秒間	)	
50	40 秒間	) 3 サイクル	
72	1 分間	)	20
94	40 秒間	)	
55	40 秒間	) 7 サイクル	
72	1 分間	)	
72	5 分間		
4	終了		

#### 【0252】

##### C) BP 反応

Gateway クローニング法 (BP 組換えによる Gateway エントリー クローニング、Invitrogen) の第2段階は、Gateway エントリーベクター pDONR (商標) 201 内への Gateway 修飾 PCR 産物 (即ち、本明細書上記ステップ B) で得た PCR 産物) のサブクローニングを含む。 30

- 1 - 混合物調製
  - 本明細書上記ステップ B) で得られた産物 1 µl
  - 4 µlのTE10.1
  - 1 µlのベクター pDONR201 (300 ng / µl)、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：11798-014)
  - 2 µlの緩衝BP反応液5x、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：11789-013)
  - 2 µlのBPクローナーゼ酵素、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号：11789-013) 40
- 2 - 25 で1時間インキュベートする
- 3 - 1 µlのプロテイナーゼKを加える
- 4 - 37 で10分間インキュベートする
- 5 - 4 で保存する

#### 【0253】

##### D) 形質転換

本明細書上記のステップC)で得られた反応産物を用いて、電気穿孔により、大腸菌 DH10B 細胞を形質転換した。

- 1 - 混合物組成
  - 本明細書上記ステップC)で得られたBP反応産物 1 µl 50

- 30  $\mu$ l の ElectroMax DH10B 細胞、Invitrogen (カールスバッド、カリフォルニア州、カタログ照会番号: 18290-015)

該混合物を 0.1 cm の冷電気穿孔キュベットに移し、製造元のプロトコルに従って該細胞を電気穿孔した。

- 電気穿孔直後に、500  $\mu$ l の SOC 培地を加えた

2 - 攪拌下、37 で 1 時間、インキュベートする

3 - LB 寒天プレート上に 30  $\mu$ l を塗布する (+ 50  $\mu$ g / ml のカナマイシン)

4 - 37 で一晩インキュベートする

#### 【0254】

得られたコロニーのいくつかからの 5 ml の培養物から、プラスミドミニプレップ DNA を調製し、DNA 配列決定に供した。次いで、正しい配列 (pDONR201\_\_EPOv3-HIS) を含有したクローンの 1 つからのプラスミド DNA (1.5  $\mu$ l 又は約 100 ng) を、10  $\mu$ l の最終容量中、1.5  $\mu$ l の pEAK12d ベクター (0.1  $\mu$ g /  $\mu$ l)、2  $\mu$ l の LR 緩衝液及び 1.5  $\mu$ l の LR クロナーゼ (Invitrogen) を含有する組換え反応液中に用いた。該混合物を室温で 1 時間インキュベートした。該反応をプロテイナーゼ K (2  $\mu$ g) の添加により停止させ、37 でさらに 10 分間インキュベートした。各反応液 (1  $\mu$ l) のアリコートを用いて、電気穿孔により大腸菌 DH10B 細胞を形質転換した。形質転換混合物のアリコートを、アンピシリン (100 mg / ml) を含有する LB プレート上に塗布し、37 で一晩インキュベートした。

10

20

#### 【0255】

得られたコロニーのいくつかからの培養物 5 ml から、プラスミドミニプレップ DNA を調製した。pEAK12d ベクター内のプラスミド DNA (200 ~ 500 ng) を、DNA 配列決定に供した。Qiagen Plasmid MEGA Kit (QIAGEN) を用い、製造元の指示に従って、配列を検証したクローン (pEAK12d\_\_EPOv3-HIS) の 500 ml の培養物からプラスミドマキシプレップ DNA を調製した。滅菌水 (又は 10 mM のトリス-HCl、pH 8.5) 中、1  $\mu$ g /  $\mu$ l の濃度で、プラスミド DNA を再懸濁させ、-20 で保存した。

#### 【0256】

プラスミド pEAK12d\_\_EPOv3-HIS の配列は、配列番号 23 で与えられる。

30

#### 【0257】

##### (実施例 6)

EPOv3 (HIS タグ化) の発現

ヒト細胞、例えば、エプスタインバーウィルス核抗原を発現するヒト胚腎臓 293 細胞 (HEK293-EBNA、Invitrogen) に、このような細胞に EPOv3 の発現を可能にする発現ベクター (pEAK12d\_\_EPOv3-HIS) をトランスフェクトする。EPOv3 を発現する該細胞を増殖させ、該組換えタンパク質を培養培地から抽出する。

40

#### 【0258】

6.1 クローン化 EPOv3 (HIS タグ化) の哺乳動物細胞における機能的ゲノム発現

エプスタインバーウィルス核抗原を発現するヒト胚腎臓 293 細胞 (HEK293-EBNA、Invitrogen) を、Ex-cell VPRO 無血清培地 (シードストック、維持培地、JRH) 中、懸濁してルーチンに維持する。トランスフェクション前に、50 ml の FEME 1% FBS に、500  $\mu$ g の EPO コードプラスミド DNA (pEAK12d\_\_EPOv3-HIS) 及び 10  $\mu$ g のレポーター遺伝子プラスミドを加える。次いで、1 ml の PEI (1 mg / ml Polysciences、米国) を加える。攪拌後、該混合物を室温で 10 分間インキュベートする。該細胞接種物をトランスフェクション混合溶液と再懸濁し、1% FBS (Invitrogen) を添加した 200 ml

50

1のFEME(19mMのHEPES、5g/Lのグルコース、7.5mMのL-グルタミン、4ml/LのITS-XにDMEM/ハムのF-12、1:1を補足)(すべてInvitrogen-Life Technologies)培地に加え、好適な容器中、 $1 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞密度にする。該培養物を、5%CO<sub>2</sub>大気、及び少なくとも70%の相対湿度のインキュベーター中、37℃で90分間、さらにインキュベートする。最後に、該容量に、4ml/LのITS-Xを補足した250mlの化学的に規定された無血清FreeStyle293(Invitrogen)培地をつぎ足す。トランスフェクションのため、該トランスフェクトした培養物を、同一条件でさらに6日間インキュベートする。採集日に、定性的蛍光試験(Axiovert 10 Zeiss)によって、陽性トランスフェクションの確認を行う。上澄み液(500ml)を、遠心分離し(1800×g、4℃、6~10分間)、0.22µmのフィルターユニット(Millipore、500mlフィルターユニット)を通して滅菌ろ過し、IMAC(Immobilised Metal Affinity Chromatography)クロマトグラフィーにより精製する。該上澄み液の1つのアリコート(500µl)を、6His-タグ化タンパク質のQC用に保持する。

#### 【0259】

##### 6.2 クローン化EPOv3(Hisタグ化)の精製

C末端6Hisタグを有するEPOv3組換えタンパク質を含有する500mlの培養培地サンプルを、1容量の冷緩衝液A(50mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;600mMのNaCl;8.7%(w/v)のグリセロール、pH7.5)で希釈し、1000mlの最終容量にする。該サンプルを、0.22µmの滅菌フィルター(Millipore、500mlフィルターユニット)を通してろ過し、1リットルの滅菌角形培地瓶(Nalgen)中、4℃で保持する。自動サンプル充填器(Labomatic)に接続したVISIONワークステーション(Applied Biosystems)上、4℃で精製を行う。精製操作は、2つの連続的ステップ、Niイオンを充填したPoros 20MC(Applied Biosystems)カラム(10×50mm、3.93ml)上での金属アフィニティークロマトグラフィー、引き続いて、Sephadex G-25培地(Amersham Pharmacia)ゲルろ過カラム(1.0×15cm)上での緩衝液交換を含む。第1のクロマトグラフィーステップでは、金属アフィニティークラムを、30カラム容量のEDTA液(100mMのEDTA;1MのNaCl;pH8.0)で再生し、15カラム容量の100mM NiSO<sub>4</sub>溶液を用いた洗浄によってNiイオンによる再荷電を行い、10カラム容量の緩衝液A、続いて7カラム容量の緩衝液B(50mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;600mMのNaCl;8.7%(w/v)のグリセロール、400mM;イミダゾール、pH7.5)により洗浄し、最後に、15mMのイミダゾールを含有する15カラム容量の緩衝液Aによって平衡化する。該サンプルをLabomaticサンプル充填器により、200mlのサンプルループ内に移し、引き続き、20ml/分の流速で、Ni金属アフィニティークラム上に充填する。該Niカラム上にサンプル全体(1000ml)を移すために、該充填操作を5回繰り返す。引き続いて、12カラム容量の緩衝液A、続いて、20mMのイミダゾールを含有する28カラム容量の緩衝液Aによって該カラムを洗浄する。20mMのイミダゾール洗浄の間に、緩く結合した混入タンパク質をカラムから溶出させる。最後に、組換えEPOv3 Hisタグ化タンパク質を、2ml/分の流速で10カラム容量の緩衝液Bにより溶出させ、溶出した該タンパク質を、2.7mlのフラクション中に採集した。第2のクロマトグラフィーステップでは、Sephadex G-25ゲルろ過カラムを、2mlの緩衝液D(1.137MのNaCl;2.7mMのKCl;1.5mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;8mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;pH7.2)で再生し、引き続き、4カラム容量の緩衝液C(137mMのNaCl;2.7mMのKCl;1.5mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;8mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;20%(w/v)のグリセロール;pH7.4)で平衡化した。該Niカラムから、積分サンプル充填器を通して、ピークフラクションをVISION上に自動的に溶出させ、Sephadex G-25カラム上に充填し、該タンパク質を、2ml/分の流速で緩衝液

10

20

30

40

50

Cにより溶出させた。脱塩サンプルを、2.7 mlのフラクション中に採集した。該フラクションを、0.22 mmの滅菌遠心分離フィルター(Millipore)を通してろ過し、分割し、凍結し、-80℃で保存した。サンプルのアリコートをし、クーマシーブルー染色及び抗His抗体を用いたウェスタンブロットによりSDS-PAGE(4~12%のNuPAGEゲル; Novex)上で分析した。

#### 【0260】

クーマシーブルー染色。該NuPAGEゲルを、0.1%のクーマシーブルーR250染色溶液(30%メタノール、10%酢酸)中、室温で1時間で染色し、引き続き、20%メタノール、7.5%酢酸中、背景が明瞭になり、タンパク質のバンドがはっきり見えるようになるまで脱染色する。

10

#### 【0261】

ウェスタンブロット。電気泳動後、該タンパク質を、4℃で1時間、290 mAで、該ゲルからニトロセルロース膜へ電子移動させる。該膜を、室温で1時間、緩衝液E(137 mMのNaCl; 2.7 mMのKCl; 1.5 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.1%ツウィーン20、pH 7.4)中、5%粉乳によりブロックし、引き続き、緩衝液E中、2.5%粉乳中の2種のウサギポリクローナル抗His抗体(G-18及びH-15、各0.2 µg/ml; Santa Cruz)の混合物と共に、4℃で一晩インキュベートする。室温でさらに1時間インキュベーション後、該膜を、緩衝液Eで洗浄(3×10分)してから、2.5%粉乳を含有する緩衝液E中、1/3000に希釈した第2のHRP結合抗ウサギ抗体(DAKO、HRP 0399)と共にインキュベートする。緩衝液Eで洗浄(3×10分)後、該膜をECLキット(Amersham)により、1分間展開させる。引き続き、該膜を、Hyperfilm(Amersham)に曝し、該フィルムを展開させ、ウェスタンブロット画像を可視的に解析する。

20

#### 【0262】

タンパク質アッセイ。標準どおり、BCAタンパク質アッセイキット(Pierce)を用いて、ウシ血清アルブミンにより、該タンパク質濃度を判定する。

#### 【0263】

##### (実施例7)

##### ヒトEPO変異体の組織分布

予測されたEPOv1、EPOv2及びEPOv3 mRNAの発現パターンを、RT-PCR解析によって判定する。該変異体の組織発現を判定するために、種々の特異的プライマーを用いて、種々の組織のcDNAテンプレートを増幅する。

30

#### 【0264】

##### (実施例8)

ヒト遺伝子EPO(本明細書において、EPOv及びその成熟形態においてEPOvmと称する)のエキソン1、2、及びエキソン3の最初の2つのアミノ酸によってコードされたEPOの切断変異体のクローニング

配列番号12で示された配列を作出するために、オリゴヌクレオチド特異的欠失変異誘発を実施した。以下のPCR反応を実施するために、4種のオリゴヌクレオチドプライマー、AS671からAS674(表1を参照)を用いた。1及び2のPCR反応において、テンプレートDNAは、pDEST12.2発現ベクターにクローン化された完全長野生型エリスロポエチンcDNA(Invitrogen、カタログ番号11808011)であった。反応1では、図8に示された配列のN末端部分を増幅するために、プライマーAS671及びAS674が用いられ; 反応2では、図8に示された配列のC末端部分を増幅するために、プライマーAS672及びAS673が用いられた。双方の場合とも、反応混合物は、1×PCR緩衝液、0.2 mMの各dNTP、0.5 mMの各PCRプライマー、50 ngのテンプレートDNAを含有するように設定し、反応は、5 UのPfuTurbo(Stratagene)の添加により開始させた。サイクリング条件は、95℃2分間(1サイクル); 95℃15秒間、50℃30秒間、72℃70秒間(25サイクル); 75℃7分間(1サイクル)であった。PCRの効率及び収率を推定するた

40

50

めに、0.8%アガロースゲル中電気泳動により、各PCR反応物のアリコート进行分析した。第3のPCR反応において、反応1及び2の等モル量の重複産物を共に混合し、PCRプライマーAS671及びAS672の存在下、増幅して、完全長の0.9kb断片を作出した。反応1及び2に関し、PCR反応条件は上記のとおりであった。精製PCR反応物のアリコートを、製造元により供給された酵素緩衝液を用い、37℃で2時間、NdeI(New England Biolabs)により消化した。並行して、適切な量のpDEST12.2発現ベクターを、NdeIにより消化した。消化されたベクター及び挿入体を各々、0.8%アガロースゲル上で分離し、対応する断片を切除し、Wizard Cleanup System(Promega)を用い、製造元により提供されたプロトコルに従って精製した。精製したベクターDNA及びPCR産物を、1:3のモル比で混合し、2.5容量のエタノールの添加により、-20℃で一晩沈殿させた。沈殿したDNAを、遠心分離により回収し、70%エタノール中で洗浄し、減圧乾燥し、Rapid Ligation Kit(Roche Diagnostics)を用い、製造元によって供給されたプロトコルに従って、最終容量10µlにおいて結合させた。

10

20

30

40

50

#### 【0265】

次いで、該結合混合物を用いて、大腸菌株JM101を以下のとおり形質転換した。競合JM101細胞の50µlアリコートを氷上で解凍し、該結合混合反応液の1µl又は5µlを加えた。該細胞を氷上で40分間インキュベートしてから、42℃で2分間インキュベーションすることによって熱ショックを行った。1mlの温(室温)LBプラス(LB)を加え、サンプルを37℃でさらに1時間インキュベートした。次いで、形質転換混合物をアンピシリン(100µg/ml)を含有するLBプレートに塗布し、37℃で一晩インキュベートした。プラスミド単離のために、単一コロニーを採取した。

#### 【0266】

プラスミドDNA調製、制限消化及び配列解析

Biorobot 8000ロボットシステム(Qiagen)又はWizard Plus SV Miniprepsキット(Promega、カタログ番号:1460)を用い、製造元の指示に従って、5mlの培養物からミニプレッププラスミドDNAを調製した。プラスミドDNAを、80µlの滅菌水中に溶出させた。Eppendorf BO光度計又はSpectramax 190光度計(Molecular Devices)を用いて、DNA濃度を測定した。

#### 【0267】

ミニプレッププラスミドDNAのアリコート(100~200ng)を、NdeIにより、37℃で2時間消化し、0.8%アガロースゲル中、電気泳動により分析した。適切なサイズの挿入体を有するプラスミドを、DNA配列解析のために選択した。200~500ngのプラスミドDNAを、21M13又はM13revいずれかの配列決定プライマー(表1を参照)と混合することにより、挿入体を双方向で配列決定し、BigDye Terminatorシステム(Applied Biosystems、カタログ番号:4390246)を用い、製造元の指示に従って処理した。Dye-Exカラム(Qiagen)又はMontage SEQ96クリーンアッププレート(Millipore、カタログ番号:LSKS09624)を用いて、配列決定反応物を精製してから、Applied Biosystems 3700シーケンサーで解析した。pDEST12.2のNdeI部位間に正しく挿入された、配列番号12で示される配列を含有したプラスミドの中で、大規模プラスミドDNA調製用に、ミニプレップ#6を選択した。プラスミドDNAの大規模調製は、Qiagen ENDO-free Megaprepキット(カタログ番号:12381)を用いて実施した。上記のミニプレップ#6によって形質転換した大腸菌株JM101を、100µg/mlのアンピシリンを含有する500mlのLB培地中で一晩増殖させ、製造元により供給されたプロトコルに従って、プラスミドDNAを飽和培養液から単離した。ファーストラップ電気穿孔プロトコル用に、DNA濃度を、調製物中、5mg/mlに調整した(下記の実施例11を参照)。

#### 【0268】



## (実施例 9)

成熟タンパク質の 7 位における遊離システイン残基がセリンに置換されているヒト遺伝子 E P O (本明細書において、その成熟形態において、E P O v C 3 4 S 及び E P O v m C 3 4 S と称される) のエキソン 1、2、及びエキソン 3 の最初の 2 つのアミノ酸によってコードされた、E P O の切断変異体のクローニング

完全長エリスロポエチンを切断して E P O v m 変異体を作出した 1 つの結果は、完全長分子において通常は対になっている、成熟タンパク質の 7 位 (E P O v の 3 4 位) におけるシステイン残基が、遊離のままであり、したがって、分子間対合に利用し得ることである。したがって、この小型ペプチド断片の凝集の問題が生じる可能性を回避するために、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発により、誘導体 C 3 4 S が構築された。

10

## 【0269】

2 種の相補的変異誘発 P C R プライマー A S 6 7 5 及び A S 6 7 6 (表 1 を参照) が設計され、P C R 反応を以下のとおり実施した。P C R 反応 1 及び 2 では、テンプレート D N A は、p D E S T 1 2 . 2 発現ベクターにクローン化した E P O v であった (本明細書上記の実施例 8 を参照)。反応 1 では、図 8 に示された配列の N 末端部分を増幅するために、プライマー A S 6 7 1 及び A S 6 7 6 が用いられ; 反応 2 では、図 8 に示された配列の C 末端部分を増幅するために、プライマー A S 6 7 5 及び A S 6 7 2 が用いられた。双方の場合とも、反応混合物は、1 x P C R 緩衝液、0 . 2 m M の各 d N T P、0 . 5 m M の各 P C R プライマー、5 0 n g のテンプレート D N A を含有するように設定し、反応は、5 U の P f u T u r b o ( S t r a t a g e n e ) の添加により開始させた。サイクリング条件は、9 5 2 分間 (1 サイクル); 9 5 1 5 秒間、5 0 3 0 秒間、7 2 7 0 秒間 (2 5 サイクル); 7 5 7 分間 (1 サイクル) であった。P C R の効率及び収率を推定するために、0 . 8 % アガロースゲル中電気泳動により、各 P C R 反応物のアリコート进行分析した。第 3 の P C R 反応において、反応 1 及び 2 の等モル量の重複産物を共に混合し、P C R プライマー A S 6 7 1 及び A S 6 7 2 の存在下、増幅して、完全長の 0 . 9 k b 断片を作出した。反応 1 及び 2 に関し、P C R 反応条件は上記のとおりであった。精製 P C R 反応物のアリコートを、製造元により供給された酵素緩衝液を用い、3 7 で 2 時間、N d e I (N e w E n g l a n d B i o l a b s ) により消化した。並行して、適切な量の p D E S T 1 2 . 2 発現ベクターを、N d e I により消化した。消化されたベクター及び挿入体を各々、0 . 8 % アガロースゲル上で分離し、対応する断片を切除し、W i z a r d C l e a n u p S y s t e m (P r o m e g a ) を用い、製造元により提供されたプロトコルに従って精製した。精製したベクター D N A 及び P C R 産物を、1 : 3 のモル比で混合し、2 . 5 容量のエタノールの添加により、- 2 0 で一晩沈殿させた。沈殿した D N A を、遠心分離により回収し、7 0 % エタノール中で洗浄し、減圧乾燥し、R a p i d L i g a t i o n K i t (R o c h e D i a g n o s t i c s ) を用い、製造元によって供給されたプロトコルに従って、最終容量 1 0 µ l において結合させた。

20

30

## 【0270】

次いで、該結合混合物を用いて、大腸菌株 J M 1 0 1 を以下のとおり形質転換した。競合 J M 1 0 1 細胞の 5 0 µ l アリコートを氷上で解凍し、該結合混合反応液の 1 µ l 又は 5 µ l を加えた。該細胞を氷上で 4 0 分間インキュベートしてから、4 2 で 2 分間インキュベーションすることによって熱ショックを行った。1 m l の温 (室温) L ブロス (L B ) を加え、サンプルを 3 7 でさらに 1 時間インキュベートした。次いで、形質転換混合物をアンピシリン (1 0 0 µ g / m l ) を含有する L B プレートに塗布し、3 7 で一晩インキュベートした。プラスミド単離のために、単一コロニーを採取した。

40

## 【0271】

プラスミド D N A 調製、制限消化及び配列解析

B i o r o b o t 8 0 0 0 ロボットシステム (Q i a g e n ) 又は W i z a r d P l u s S V M i n i p r e p s キット (P r o m e g a、カタログ番号: 1 4 6 0 ) を用い、製造元の指示に従って、5 m l の培養物からミニプレッププラスミド D N A を調

50

製した。プラスミドDNAを、80  $\mu$ lの滅菌水中に溶出させた。Eppendorf BO光度計又はSpectramax 190光度計(Molecular Devices)を用いて、DNA濃度を測定した。

#### 【0272】

ミニプレッププラスミドDNAのアリコート(100~200 ng)を、Nde Iにより、37 で2時間消化し、0.8%アガロースゲル中、電気泳動により分析した。適切なサイズの挿入体を有するプラスミドを、DNA配列解析のために選択した。200~500 ngのプラスミドDNAを、21M13又はM13 rev又はAS673の配列決定プライマー(表1を参照)と混合することにより、挿入体を双方向で配列決定し、Big Dye Terminatorシステム(Applied Biosystems、カタログ番号: 4390246)を用い、製造元の指示に従って処理した。Dye-Exカラム(Qiagen)又はMontage SEQ96クリーンアッププレート(Millipore、カタログ番号: LSKS09624)を用いて、配列決定反応物を精製してから、Applied Biosystems 3700シーケンサーで解析した。pDEST12.2のNde I部位間に正しく挿入された配列を含有したプラスミドの中で、大規模プラスミドDNA調製用に、ミニプレップ#2を選択した。プラスミドDNAの大規模調製は、Qiagen ENDO-free Megaprepキット(カタログ番号: 12381)を用いて実施した。上記のミニプレップ#2によって形質転換した大腸菌株JM101を、100  $\mu$ g/mlのアンプシリンを含有する500 mlのLB培地中で一晚増殖させ、製造元により供給されたプロトコルに従って、プラスミドDNAを飽和培養液から単離した。高速追跡電気穿孔プロトコル用に、DNA濃度を、調製物中、5 mg/mlに調整した(下記の実施例11を参照)。

#### 【0273】

#### 【表1】

表 I

プライマー	配列
AS671	CAAGTGTATCATATGCCAAG (配列番号 24)
AS672	CAAGCAGCAAGCATATGCAG (配列番号 25)
AS673	CACGACGGGCCACCATCACCATCACCATTGAAACC (配列番号 26)
AS674	GGTGGCCCGTCGTGATATTCTCG (配列番号 27)
AS675	CCACGCCTCATCAGTGACAGCCGAG (配列番号 28)
AS676	CTCGGCTGTCACTGATGAGGCGTGG (配列番号 29)
21M13	GTAAAACGACGGCCAGT (配列番号 30)
M13rev	CAGGAAACAGCTATGACC (配列番号 31)

#### 【0274】

#### (実施例10)

本発明のEPOポリペプチド及び変異体の生物活性

本発明のポリペプチドの生物活性は、当業界にそれ自体知られているいくつかの生物学的アッセイを用いて検証できる。

#### 【0275】

10.1 インビトロ細胞試験におけるエリスロポエチン受容体に対する本発明のポリペプチドの結合:

EPO受容体へのEPO結合のスクヤッチャード解析は、例えば、Nagao Mら、Blood. 1993年; 81(10): 2503~10頁におけるものなど、当業界に十分記載されている。

## 【0276】

エリスロポエチン受容体発現細胞に対する放射ヨウ素標識 ( $^{125}\text{I}$ ) ポリペプチドの結合がアッセイされる。参照番号 CCL-10 の下での BHK-21 細胞 (American Type Culture Collection (ATCC) (マナサス、バージニア州、米国) でアクセス可能) を、組織培養プレートに接種し、48 時間培養する。次いで、各ウェル内の培養培地を、新鮮培養培地、及び種々の濃度の非標識ポリペプチドを有するか、又は有さない  $^{125}\text{I}$ -ポリペプチドからなる結合混合物により置換する。10 でのインキュベーション後、各ウェルを氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄する。細胞を分離させるために、各ウェルにトリプシンを加える。細胞懸濁液の放射活性をカウントする。1 ウェル当たりの細胞数もまたカウントする。所与の  $^{125}\text{I}$ -ポリペプチド濃度における特異的結合は、非標識 EPO の非存在下、又は過剰な非標識ポリペプチドの存在下でインキュベートしたサンプル間の結合放射活性の違いとして定められる。結合データのスキッチャードプロット解析を実施する。

10

## 【0277】

10.2 エリスロポエチン受容体発現細胞における本発明のポリペプチドによる JAK2 のチロシンリン酸化の誘導：

JAK2 のチロシンリン酸化を試験するための種々の試験が当業界に記載されており、これらの技法は当業者に知られている。例えば、エリスロポエチン受容体発現細胞における本発明のポリペプチドによる JAK2 のチロシンリン酸化の誘導は、Cell, 1993 年；74(2)：227～36 頁における Witthuhn BA らによって開示されている試験によって試験することができる。

20

## 【0278】

10.3 本発明のポリペプチドによるエリスロポエチン受容体 (EpoR) 発現細胞の増殖刺激：

10.3.1 ヒトエリスロポエチン細胞系 TF-1 を用いた細胞ベースの増殖アッセイ：

この目的のため、試験すべき少量のポリペプチドを、例えば、実施例 2、4 又は 6 に記載された方法に従って作出する。次いで、エリスロポエチン受容体を発現し、増殖のために IL-3、GM-CSF 又は EPO に依存性である (Hammerling, U. ら、J. Pharma. Biomed. Anal., 12：1455～69 頁 (1996)) ヒトエリスロポエチン細胞系 TF-1 を用いて、該タンパク質を、生物学的応答を誘発するその能力に関して試験する。この因子依存性細胞系を用いた細胞ベースの増殖アッセイを、エリスロポエチンのインビトロ生物活性測定のための工業標準として用いる (Kitamura, T. ら、J. Cell Physiol., 140：323 (1989))。このアッセイは極めて鋭敏であり、極めて少量の生物活性タンパク質を検出することができる。このアッセイのさらなる利点は、純粋なタンパク質を得るために大規模な精製法を使用せずに、本発明の修飾エリスロポエチン分子を発現する細胞培養物からの未精製の上澄み液を、生物活性の試験に使用できることである。類似タンパク質各々の活性を野生型タンパク質の活性と比較して、市販の ELISA キットを用いて必要な定量化を行うことができる。

30

40

## 【0279】

10.3.2 Ba/F3-EpoR 細胞系を用いた細胞ベースの増殖アッセイ：

Ba/F3-EpoR 細胞の増殖を測定することにより、本発明のポリペプチドの生物活性を評価できる。この目的のために、ヒト EPO 受容体 (EpoR) の全コード配列に対応する DNA 断片を PCR によって得て、チミジンキナーゼ (tk) - ネオマーカーを含有する発現ベクターにクローン化する。制限酵素による消化によって線形化した後、該ベクター構築体を、Ba/F3 (末梢血から確立した IL-3 依存性マウスプロ B 細胞系；Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ、ブラウンシュバイク、ドイツ国) で参照番号 ACC300 でアクセス可能) 内に導入する。2 mg/ml の G418 中、

50

EpoR構築体を発現するネオマイシン耐性細胞を選択し、限界希釈により個々のクローンを得る。Ba/F3-EpoR細胞の増殖刺激を測定する生物学的アッセイにおいて、EpoRを発現するクローンを、組換えヒトEPO(rhEPO)(Amgen)又は試験される本発明のポリペプチドに対するそれらの応答に関して解析する。rhEPO及び試験される本発明のポリペプチドそれぞれに応答してのBa/F3-EpoR細胞の増殖刺激を、細胞DNA内への $[^3\text{H}]$ -チミジンの組込みの程度によって測定する。細胞は始め、16時間、IL-3飢餓とし、引き続き、rhEPO又は試験される本発明のポリペプチドを含有する培地中、25,000細胞/ウェルの密度で、96ウェルプレート内に接種する。22時間のインキュベーション後、 $[^3\text{H}]$ -チミジン/ウェルの $1\mu\text{Ci}$ を該ウェルに加え、該細胞をさらに6時間インキュベートしてから採集する。例えば、Top Count Counter(Packard Instruments)を用いて、 $40\mu\text{l}$ のシンチレーション液(例えば、icroscint 20)の存在下、細胞組込み放射活性を判定する。Ba/F3-EpoR細胞内トリチウム化チミジンの組込み刺激における本発明のポリペプチドの効率を、rhEpoによる刺激の効率と比較できる。

10

#### 【0280】

10.3.3 シュワン細胞増殖アッセイ:

Liら(Li X、Gnias SL、Campana WM、Glia、第51巻(4):254~65頁)は、シュワン細胞がEpo受容体を発現することを示している。本明細書下記のとおり、BrdU組込みの判定により、本発明のポリペプチドの生物活性を評価できる。

20

#### 【0281】

シュワン細胞一次培養

シュワン細胞を、Hiraiwara(Hiraiwa Mら、1997年、Proc Natl Acad Sci USA 94:4778~4781頁)及びCampanaら(Campana WMら、1998年、FASEB J 12:307~314頁)によって記載されたとおり1日齢のSDラットの坐骨神経から単離する。シュワン細胞をさらに、抗フィブロネクチン抗体及びウサギ補体を用いて、線維芽細胞から分離する。これにより、S-100免疫蛍光によって評価できるとおり、およそ99%純粋なシュワン細胞培養物が生じる。10%ウシ胎仔血清(FBS)、100U/mlのペニシリン、100mg/mlのストレプトマイシン、21mg/mlのウシ下垂体抽出物及び4mMのホルスコリン(完全培地)を含有するDMEM中で一次シュワン細胞を維持し、加湿5.0%CO<sub>2</sub>下、37℃でインキュベートする。該培養物を確立後、シュワン細胞を3~4回継代することにより増殖させる。

30

#### 【0282】

シュワン細胞増殖アッセイ

シュワン細胞を、完全培地中、96ウェルプレート内に、1ウェル当たり5,000細胞で塗布する。細胞を一晩付着させてから、洗浄し、引き続き、rhEpo又は試験される本発明のポリペプチドと共に、又はそれなしで、DMEM中、1%FBSと共に、37℃で24時間培養する。増殖対照として、完全培地(ウシ下垂体抽出物、BPEを含有)を用いる。次いで、Cell Proliferation ELISA キット(Roche Applied Science、インディアナポリス、インディアナ州)を用い、S期の間のDNA合成の指標として、BrdU組込みを測定する。24時間のrhEpo又は試験される本発明のポリペプチド処理時間の最後の20時間、BrdUを加える。

40

#### 【0283】

10.4 赤血球産生の刺激(正常赤血球マウスアッセイによって判定された本発明のポリペプチドのインビボ活性):

正常赤血球マウスバイオアッセイは当業界に知られており(Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin Brp Bio、1997年(2))、方法は、Ph. Eur. BRPのエリスロポエチンのモノグラフにおいて知ら

50

れている。7～15週齢の正常な健康マウスに、BSA-PBS溶液中、0.2mlの被験ポリペプチド又は対照としての緩衝液を、皮下投与する。6日間にわたって、尾部静脈の穿刺により血液を採取し、0.15μモルのアクリジンオレンジ染色液の1ml中に1μlの血液が存在するように、希釈する。染色時間は3分から10分である。赤色蛍光ヒストグラムの解析により、フローサイトメーターにおいて、マイクロ蛍光定量的に網状赤血球のカウントを実施する。網状赤血球カウントは、絶対数によって与えられる（分析される30,000個の血球当たり）。

#### 【0284】

結果は、網状赤血球の量を増加させる能力に関する本発明のポリペプチドのインビボ活性の指標を与える。

#### 【0285】

10.5 本発明のポリペプチドによる赤血球細胞の増殖の誘導：

本発明のポリペプチドの生物活性は、ヒト骨髓細胞からの赤血球コロニーの産生を刺激する本発明のポリペプチドの能力を測定することによって評価できる。

#### 【0286】

新鮮なヒト骨髓吸引物を、健康なドナーから得る。免疫磁気陽性選択によって、単核フラクションのCD34を高濃度にする。メチルセルロース培養は、エリスロポエチンなしの完全メチルセルロース培地中、1000個の細胞で開始する（Stem Cell Technologies、バンクーバー、BC）。培養培地は後で、50ng/mlのrhEpo又は本発明の被験ポリペプチド、及び幹細胞因子として作用し、これらのアッセイにおいてEpoと協力して赤血球コロニーの形成を促進する50ng/mlのキットリガンド（KL）を添加する。12～14日後、コロニーを数え、倒立光学顕微鏡で表現型決定する。ヒト骨髓細胞の赤血球コロニー産生刺激における本発明のポリペプチドの有効性を測定し、rhEPOによるアッセイの結果と比較する。

#### 【0287】

10.6 本発明のポリペプチドによる赤血球細胞の成熟誘導：

本発明のポリペプチドの生物活性は、骨髓細胞の培養液中の未成熟及び成熟赤血球細胞の形成を刺激する本発明のポリペプチドの能力を測定することによって評価することができる。CF、50ng/mlのキットリガンド（KL）及び50ng/mlのrhEpo（Amgen）又は本発明の被験ポリペプチドの存在下、IMDM/10%FCS中、上記のとおり単離した20,000個のCD34+細胞を培養する。培養細胞の7～10インチのプレートを血球計数器によりカウントし、引き続き、赤血球細胞表面マーカーCD36、CD71及びグリコホリンAの発現に関してアッセイする。その結果により、骨髓培養液中の未成熟及び成熟赤血球細胞の形成を刺激する本発明のポリペプチドの能力を判定することが可能となる。

#### 【0288】

10.7 本発明のポリペプチドの血管作動作用：

本発明のポリペプチドの生物活性は、本発明のポリペプチドで処置した哺乳動物の血圧を、非処置対象と比較して測定することによって試験することができる。このような哺乳動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ウシ又はサル（例えば、チンパンジー）であり得る。これらの哺乳動物の血圧を測定する種々の方法は当業者によく知られている。

#### 【0289】

10.8 ヘマトクリットレベルに及ぼす本発明のポリペプチドの効果：

本発明のポリペプチドの生物活性は、本発明のポリペプチドで処置した哺乳動物のヘマトクリットレベルを、非処置対象と比較して測定することによって試験することができる。このような哺乳動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ウシ又はサル（例えば、チンパンジー）であり得る。

#### 【0290】

ヘマトクリットは、赤血球の測定値の1つであり、赤血球からなる総血液容量のパーセ

10

20

30

40

50

ンテージとして一般に表される。ヘマトクリットを測定するためのいくつかの試験が当業界に記載されており、当業者によく知られている。例えば、校正直径を有する特定のヘパリン毛細管を用いた後眼窩放血を実施する。毛細管を、マイクロヘマトクリット遠心分離管 (Stat Spin - I R I S 社) 中、室温で2分間遠心分離する。0、3、5、7、10及び12日目に末梢血サンプルを採集する。ヘマトクリットを測定するために、赤血球容量対総血液容量の比 (%) を算出する。

#### 【0291】

10.9 本発明のポリペプチドの神経保護活性：

10.9.1 神経保護活性のインビボ試験：

本発明のポリペプチドの神経保護活性は、例えば、大脳中央動脈閉鎖モデルにおいて試験できる。体重250gのオスSDラットを、Morishita, E.ら、1997年、Neuroscience 76、105~116頁に記載されているとおり、60分の可逆的虚血により生じた極めて広い境界域内の狭いコア損傷部からなる中央脳動脈閉鎖に供する。該動物は、閉鎖の時点で、本発明の被験ポリペプチド、陽性対照としての組換え野生型ヒトEPO (rhEPO) (5,000ユニット/kg体重) 又は陰性対照としての生理食塩水のいずれかを、腹腔内注射により投与される。製造元のプロトコル (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics) に従って、該脳を24時間後に取り出し、連続切片とし (厚さ50nm)、メタノール中3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中で10分間ブロックし、4℃で0.1%トリトンX-100/クエン酸ナトリウム中で2分間透過処理し、TUNEL反応混合物によって処理する。展開後に陽性ニューロンを同定する (ジアミノベンジジン中30分、脱水、及びカバーガラス化)。陰性対照として、末端トランスフェラーゼを除外する。

10

20

#### 【0292】

Siren ALら、(Proc Natl Acad Sci USA, 2001年、98(7):4044~9頁) 及びBrines MLら、(Proc Natl Acad Sci USA, 2000年; 97(19):10526~31頁) は、rhEPOが、このようなモデルにおいて、神経保護活性を有することを示している。

#### 【0293】

10.9.2 EAEモデルにおける神経保護活性のインビボ試験：

脱髄性疾患、例えば、本明細書上記で特定した多発性硬化症 (MS) 又はギラン - バレ症候群の治療における本発明のポリペプチドの有用性は、例えば、本発明後記の方法に従って、動物試験法において実証することができる。多発性硬化症の最も広く使用されている動物モデルは、ヒト疾患と共有された組織病理学的及び臨床的特徴に基づいた実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) である。

30

#### 【0294】

C57B1/6マウスにおける慢性EAEモデルは、MSの一次的進行 (PP) 形態又は二次的進行 (SP) 形態といくつかの共通した特質を共有している。マウスを、0日目と7日目に、完全フロイントアジュバント (CFA) 中、200µg皮下のミエリン突起膠細胞糖タンパク質 (MOG) により、両側に免疫化した後、500ng腹腔内の百日咳菌 (B. pertussis) 毒素を2回注射する (0日目と2日目)。

40

#### 【0295】

群は10匹から13匹のEAEマウスからなる。臨床スコア、全体的な健康状態、体重及び死亡数を毎日記録する。7日目から開始して、該動物を、臨床スコア：0 = 疾患の徴候なし、1 = 尾部麻痺、2 = 尾部麻痺 + 後肢脱力又は後肢部分的麻痺、3 = 尾部麻痺 + 後肢完全麻痺、4 = 尾部麻痺 + 後肢麻痺 + 脱力又は前肢の部分的麻痺、5 = 瀕死又は死亡、によって、麻痺の存在に関して個々に検査する。

#### 【0296】

10日目~12日目から始まって、たいていの動物で、麻痺が増加していく。病状は慢性であり、動物は、身体障害の最初の臨床的徴候の後、及びその後の28日から30日の観察の間、寛解の徴候を示さない。

50

## 【0297】

治療処置は、疾患の発症時に開始される。したがって、いったん疾患が確立されても、28日から30日間、依然として進行し継続している。20,000 U / マウスの用量での mIFN (Serono Pharmaceutical Research Institute, Geneva) による毎日の皮下処置によって、後肢の完全麻痺から部分的麻痺へと、疾患の重症度の有意な低下による臨床的結果の有益な効果が示される。本発明のポリペプチドは、このモデルにおけるそれらの活性に関して、該被験ポリペプチドの異なる用量によるマウスの毎日の二重処置によって試験することができる。実験には、同一投与経路による対照の媒体処置 EAE 群が含まれる。

## 【0298】

10

## 10.9.3 神経保護活性のインビトロ試験：

本発明のポリペプチドの神経保護活性は、例えば、Siren ALら (Proc Natl Acad Sci USA, 2001年、98(7): 4044~9頁) によって記載された培養物中に一次運動神経を用いることによって、インビトロで試験できる。15日齢のSDラット胚から脊髄を得る。前角をトリプシン処理し、4% BSA クッションにより、300 x g で10分間遠心分離する。細胞 (混合神経膠培養物を表す) を、ポリ-DL-オルニチン及びラミニンでプレコートした24 mmのウェルプレートに、2,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で接種する。運動神経を、免疫パニングによりさらに精製し (Metzling, C.ら、1995年、J. Neurosci. 15、3128~3137頁によって記載されているとおり)、細胞を、ポリ-DL-オルニチン及びラミニンでプレコートし、完全培養培地 (Neurobasal / B27 (2%) / 0.5 mM の L-グルタミン / 2% ウマ血清 / 25 μM の 2-メルカプトエタノール / 25 μM の グルタメート / 1% ペニシリン及びストレプトマイシン / 1 ng / ml の BDNF) を含有する24 mmのウェルプレートに、低密度 (20,000細胞/cm<sup>2</sup>) で接種する。この培地 (グルタメートなし) を、4日目と6日目、培養液に再添加する。48時間の血清 / BDNF 欠乏により、又は48時間のカイニン酸 (混合ニューロン / グリア培養物では5 μM ; 精製培養物では50 μM) とのインキュベーションにより、培養物において、6日目に細胞死を誘導する。本発明の被験ポリペプチド、又は陽性対照としての rhEPO (10ユニット/ml) 又は陰性対照としての媒体を、細胞死誘導の72時間前に、該培養物に添加し、処置を48時間継続する。次いで、該培地を廃棄し、細胞を、PBS中、4% (容量 / 容量) パラホルムアルデヒドにより40分間固定し、0.2% トリトン X-100 により透過化処理し、PBS中、10% (容量 / 容量) FCS によりブロックし、非リン酸化神経フィラメントに対する抗体 (SMI-32; 1:9,000) と共に一晩インキュベートし、ジアミノベンジジンによるアビジン-ビオチン法を用いることによって可視化する。運動神経の生存度を、カバーガラスの4つの側面にわたってSMI-32陽性細胞をカウントすることによって、形態学的に評価する。H33258を用いることによって (Galli, G & Fratelli, M. (1993) Exp. Cell Res. 204、54~60頁に記載されているとおり) アポトーシス体の染色を行う。

20

30

## 【0299】

40

Siren ALら (Proc Natl Acad Sci USA, 2001年、98(7): 4044~9頁) は、rhEPOが、このようなモデルにおいて、神経保護活性を有することを示している。

## 【0300】

10.10 本発明のポリペプチドのインビトロ及び / 又はインビボでの心臓保護活性：

インビトロ及びインビボ双方でのポリペプチドの心臓保護活性を試験するための種々の試験が当業界に記載されており、これらの技法は当業者に知られている。このような技法の例は、本明細書下記に、及び参照として組み込まれている引用文献に記載されている。

## 【0301】

50

10.10.1 本発明のポリペプチドによるインビトロでの心筋細胞の生存の増強：

本発明のポリペプチドの心臓保護活性は、例えば、以下のモデルにおいて試験することができる。記載されているとおり (Fiordaliso, F. ら、(2001) Diabetes 50、2363~2375 頁及び Leri, A. ら、(1998) J. Clin. Invest. 101、1326~1342 頁)、3カ月齢のオスSDラットから左心室の心筋細胞を単離する。簡単に述べると、抱水クロラル麻酔下 (300 mg / kg 体重)、心臓を切除し、コラゲナーゼにより心筋細胞を分離する。心筋細胞 (98~99% 純粋) を、 $0.5 \mu\text{g} / \text{cm}^2$  のラミニンでコーティングしたペトリ皿に、 $1 \text{ cm}^2$  当たり  $2 \times 10^4$  細胞の密度で塗布する。非必須アミノ酸、トランスフェリン (10  $\mu\text{g} / \text{ml}$ )、BSA (0.1%)、及び抗生物質を有する修飾イーグル培地 (MEM) からなる無血清培地中で、細胞をインキュベートする。非結合心筋細胞を除去するために、この培地を塗布30分後、新たな培地に交換する。窒素を継続的にフラッシュさせた気密チャンバー内に曝すことにより、低酸素条件を作り出し、28時間維持する。この操作により、該培地中の酸素圧は5 mmHg (約 = 通常の3%; 1 mmHg = 133 Pa) に低下する。低酸素状態は28時間維持される。本発明の被験ポリペプチド又は陽性対照としての rhEPO (100 ng / ml)、Hepes (20 mM)、又は双方を、低酸素誘導の30分前に該培地に加える。長時間低酸素により生じたアシドーシスを補正するために Hepes が用いられる。

10

【0302】

2つの独立した方法 (エチジウムモノアジドプロマイド; Molecular Probes) 及び平滑末端を有するヘアピンオリゴヌクレオチドプローブ (hairpin 2; Synthetic Genetics、サンディエゴ) を用いることによって、細胞壊死を定量化する。単一塩基3'オーバーハングを有するヘアピンオリゴヌクレオチドプローブ (hairpin 1; Synthetic Genetics) 及び末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) アッセイの使用によって、アポトーシスを評価する (Cigola, E. ら、(1997年) Exp. Cell Res. 231、363~371 頁)。各調製物中の測定筋細胞の数は、最少300である。

20

【0303】

Calvillo L. ら (Proc Natl Acad Sci USA. 2003年; 100 (8): 4802~6 頁) は、rhEPOは、このようなモデルにおいて、心臓保護活性を有することを示している。

30

【0304】

また、Parsa CJ ら (J Clin Invest. 2003年、112 (7): 999~1007 頁) 及び Moon C ら (Proc Natl Acad Sci USA. 2003年; 100 (20): 11612~7 頁) も、他のモデルを用いて、インビトロでの rhEPO の心臓保護活性を示している。これらのモデルは、本発明のポリペプチドの心臓保護活性を試験するためにも使用することができる。

【0305】

10.10.2 本発明のポリペプチドによるインビボでの心筋細胞生存の増強：

オスSDラット (約250 g) を、抱水クロラル (150 mg / kg、腹腔内) 及びジエチルエーテルで麻酔し、気管内カニューレにより人工呼吸にかける (1分当たり61呼吸、1回呼吸量1.2 ml / 100 g の体重)。第5肋間空間における15 mmの開口部を通して、心臓を外に出した後、左前下降冠状動脈 (LAD) を、5-S 絹縫合糸に結さつする。2つの縫合糸上にプレインノットを結び、30分後にそれを除去して、再灌流を開始させる。胸部を陰圧下で閉鎖し、継続的な心電図モニタリング下で、ラットを人工呼吸器から外す。心室転位症及び心筋の白化の発現により虚血が確認される。通常の潮紅により再灌流の成功が示される。偽操作のラットは、同一の外科手術操作を受けるが、LADの結さつは行わない。虚血の誘導 (処置前) 前、又は再灌流時 (処置後) のいずれかに、本発明の被験ポリペプチド又は陽性対照としての rhEPO (5,000 ユニット / kg 体重) を腹腔内投与する。各動物が、試験完了まで、本発明の被験ポリペプチド又

40

50



は r h E P O の追加用量を毎日投与される。

【0306】

30 分の L A D 閉塞を 7 日間生き延びたラットは、血液動態評価、続いて、C a l v i l l o L . ら ( P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 2 0 0 3 年 ; 1 0 0 ( 8 ) : 4 8 0 2 ~ 6 頁 ) に記載されているとおり、組織形態計測のために、心臓の固定灌流を受ける。また、P a r s a C J ら ( J C l i n I n v e s t . 2 0 0 3 年、1 1 2 ( 7 ) : 9 9 9 ~ 1 0 0 7 頁 ) 及び M o o n C ら ( P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 2 0 0 3 年 ; 1 0 0 ( 2 0 ) : 1 1 6 1 2 ~ 7 頁 ) も、他のモデルを用いて、インビボでの r h E P O の心臓保護活性を示している。これらのモデルは、本発明のポリペプチドの心臓保護活性を試験するためにも使用することができる。

10

【0307】

10 . 1 1 本発明のポリペプチドによる癌細胞の増殖刺激 :

癌細胞の増殖を刺激するポリペプチドの能力を試験するためのインビトロ及びインビボモデルは、当業界によく知られている。例えば、試験される癌に由来する 1 つ以上の細胞系の増殖を、当業界によく知られた種々の技法を用いて、インビトロで測定することができる。このような技法としては、例えば、[ <sup>3</sup> H ] - チミジンの組み込み、M T T 細胞増殖アッセイ、細胞数のカウントが挙げられる。

【0308】

インビボモデルとしては、例えば、無胸腺マウスに異種移植されたヒト腫瘍細胞が挙げられる。これらのモデルはまた、本発明の抗体の抗腫瘍形成活性を試験するためにも使用できる。

20

【0309】

( 実施例 1 1 )

本発明の E P O v 1、E P O v 2、E P O v 3 及び E P O v の神経保護活性

E p o 変異体の神経保護効果を、「F a s t T r a c k ( 高速追跡 )」によるタンパク質送達後、マウス坐骨神経圧潰モデルを用いて試験した。E P O v 1、E P O v 2、E P O v 3 及び E P O v をコードする c D N A を、発現ベクター p D E S T 1 2 . 1 2 内にクローン化又はサブクローン化した。F a s t T r a c k 操作において、発現ベクター p D E S T 1 2 . 1 2 内にクローン化した c D N A を、レシピエントマウスの筋肉内に電気穿孔し、コードされたタンパク質を、該筋肉の細胞によって発現させ、宿主マウスの循環内に分泌させる。これらの実験において、各 c D N A を 6 匹のマウスに電気穿孔し、観察結果の統計的有意性を提供した。電気穿孔後、赤血球容量 ( ヘマトクリット ) 及びひ腹筋における複合筋活動電位 ( C M A P ) 測定値に及ぼす効果をモニターした。

30

【0310】

坐骨神経圧潰に関する筋肉内への E p o 変異体 c D N A の電気穿孔

原 F a s t T r a c k プロトコルにおいて、c D N A の電気穿孔部位として、ひ腹筋を用いた。しかし、坐骨神経圧潰モデルにおいて、ひ腹筋を用いた電気筋運動記録読取り ( E M G ) も実施されるため、電気生理学的読取りを妨害しないように、他の電気穿孔部位を試験した。これらの試験の結果、前肢上部の筋肉を選択して、本明細書に記載の実験に用いた。神経圧潰の 4 日前の 0 日目に、6 匹のメス C 5 7 B L / 6 マウス ( E l e v a g e J a n v i e r ) の群を、イソフラン ( イソフラン B a x t e r、照会番号 : Z D G 9 6 2 3 ) により麻酔し、右前肢への最初の電気穿孔を、以下のとおり実施した : 0 . 9 % N a C l、6 m g / m l の L - グルタメート ( S i g m a、照会番号 : P 4 7 6 1 ) 中、c D N A を 2 m g / m l で調製した。電気穿孔前に、2 5 µ l のヒアルラニダーゼ ( 1 0 0 U / m l ) を、2 0 分後に 2 5 µ l ( 5 0 m g ) の c D N A を筋肉内に注射した。超音波検査ゲルを適用し、筋肉を、E l e c t r o S q u a r e P o r a t o r B T X ( 照会番号 : E C M 8 3 0 ) の 2 つの円形電極 ( 直径 0 . 5 m m ) 間に保持した。7 5 ボルトの電場を 2 0 ミリ秒加え、これを、各パルス間 1 秒の間隔で 1 0 回繰り返した。

40

【0311】

実験 1 2 日目、第 1 回目の E M G 読取りの 1 日後、左前肢に、上記のとおり、第 2 の電

50

気穿孔を実施した。実験 18 日目に、2 回目の E M G 読取りを実施した。

#### 【0312】

マウスにおける坐骨神経圧潰

メスマウス (C57BL/6 マウス、Elevage Janvier) を、イソフルランで麻酔し、体温をチェックした。コッハー鉗子を用いて右坐骨神経を圧潰した (2 × 30 秒)。圧潰の 7 日後及び 14 日後、電気筋運動記録パラメーター、即ち、振幅、潜伏時間及び持続時間を、Medtronic の装置 (Keypoint モデル) を用いて評価した。過最大強度 (12.8 mA) での坐骨神経の単一 0.2 ミリ秒刺激後に、複合筋活動電位 (CMAP) を、ひ腹筋において測定した。振幅 (mV) は、活性運動単位数に関連し、軸索変性により影響される。潜伏時間 (ミリ秒) は、運動神経伝導及び神経筋伝達速度に関連し、脱髄に影響される。持続時間 (1 つの脱分極 / 再分極サイクルに必要な時間) は、電導の定性的指数であり、やはり脱髄によって影響される。

10

#### 【0313】

Fast Track 送達後の神経圧潰実験の結果

エリスロポエチン及び EPO 変異体によって最も改善され易い CMAP パラメーターは潜伏時間である。図 9 に示された実験で、すべての EPO 変異体は、潜伏時間において、野生型タンパク質の活性に比較して、統計的に有意な改善を示す。他方、ベクター単独も、非関連タンパク質 IL4 の発現も、潜伏時間に正の効果を示さない。興味深いことに、すべての変異体に共通のエリスロポエチンの N 末端の 28 個のアミノ酸だけを発現する EPOv は、野生型タンパク質と同様に活性であり、すべての神経保護活性がこの配列 (図 7 及び配列番号 13 を参照) 内に包含されていることを示唆している。

20

#### 【0314】

また、EPOvC34S も Fast Track 送達により試験し、神経圧潰後、7 日目に試験した際、EPOv と同等の活性を有した。

#### 【0315】

(実施例 12)

ヘマトクリット濃度に及ぼす本発明の EPOv1、EPOv2、EPOv3 及び EPOv の効果

実施例 11 に記載された Fast Track プロトコルに従って処置されたマウスのヘマトクリット濃度を測定した。

30

#### 【0316】

ヘマトクリット読取り：

血液サンプルをヘパリン化ガラス毛细管に移し、CrittSpin 遠心分離管中、16000 rpm で 120 秒間遠心分離する。ヘマトクリット読取りは、サンプルの総容量のパーセンテージとして表される沈降赤血球容量として行われる。

#### 【0317】

ヘマトクリット実験の結果

図 10 に示された結果から、野生型エリスロポエチンのみが造血経路を活性化でき、一方、EPO 変異体 (EPOv1、EPOv2、EPOv3 及び EPOv) のいずれも赤血球カウントに影響を及ぼさないことが結論付けられる。

40

#### 【0318】

(実施例 13)

ヒト赤白血病細胞系 TF-1 を用いた細胞ベースの増殖アッセイ：

TF-1 (ATCC # CRL-2003) は、生存及び増殖のために、GM-CSF などのサイトカインの存在に依存することが知られている赤白血病細胞系である。TF-1 細胞増殖に及ぼすエリスロポエチンの効果を調べるために試験を行った。図 11 において、rEPOwtm (実施例 2 と同様のプロトコルに従って得られた、His タグ化した組換え野生型 EPO) 及び rEPOv1m (実施例 2 に記載されたとおり得られた、His タグ化した組換え EPOv1m) の効果を、市販製品、Eprex の活性と比較した。その結果は、1 ng/ml での GM-CSF は、およそ 20 時間の培養増殖時間で細胞増

50

殖を支持することができる一方、市販のエリスロポエチン (Eprex 1000) は、 $0.2 \text{ U/ml}$  ( $1.7 \text{ ng/ml}$ ) 以上の濃度で TF-1 細胞の用量依存的生存を示すが、増殖は示さないこと (上枠) を示している。組換え EPOwtm-6His タンパク質は、Eprex (中央の枠) の活性と同一の活性を示す。他方、EPOvlm は、 $170 \text{ ng/ml}$  で部分的保護を示すが、より低用量 (下枠) では保護を示さない。この赤血球細胞系においてアッセイされた EPOvlm の活性は、完全長 EPOwtm の活性のおよそ 1% であることが結論付けられる。この活性低下は、ヘマトクリットアッセイにおいて活性の減少を示すインビボデータ (図 10) と一致する。

#### 【0319】

(実施例 14)

本発明の EPOv1 及び EPOv の神経保護活性

坐骨神経圧潰の回復に及ぼす EPOwt 及び EPO 変異タンパク質の皮下注射の効果を試験した。

#### 【0320】

EPOvlm-6His は、実施例 2 に記載されるとおりに HEK293 細胞において作出した。EPOwtm-6His は、同じ方法を用いて作出した。EPOvm-C34S-6His ペプチドは、化学的に合成された (Eurogentec)。EPOvm-C34S-6His は、6His タグに結合した EPOvmC34S (配列番号 15 のアミノ酸 28 から 55) に対応する。「混合」ペプチド (EPOvm-C34S の 28 の同じアミノ酸だが、順序はランダム) もまた化学的に合成された (Eurogentec)。

#### 【0321】

$50 \mu\text{g/Kg}$  ( $6000 \text{ U/Kg}$ ) Eprex と等価な等量のタンパク質を、PBS 中で希釈して、1 グラムのマウス体重当たり  $10 \mu\text{l}$  の最終容量とし、背上部筋肉内に注射した。実験の間、注射は毎日 1 回、1 週当たり 5 日を繰り返した。ひ腹筋において測定された複合筋活動電位 (CMAP) に及ぼす処置の効果を、神経圧潰後の 8 日目及び 15 日目にモニターした。

#### 【0322】

注射によるタンパク質送達後の神経圧潰実験の結果

図 12 に示されているとおり、精製 EPOv1 及び EPOv の注射は双方とも、潜伏時間パラメーターに関して、野生型タンパク質と同等の活性を示すが、媒体だけの注射後には効果が見られなかった。Fast Track 実験で先に判明したとおり、持続時間及び振幅に及ぼす効果の明白さはより少ない。

#### 【0323】

「混合」ペプチドもまた活性に関して試験した。このペプチドは、この実験において活性を示した。推測によって限定されることは望まないが、これは、機能的モチーフの保持、汚染又は実験誤差のいずれかによるものであると考えられる。この「混合」ペプチドの観察された活性を解明するために、さらなる実験が必要と考えられる。

#### 【0324】

(実施例 15)

圧潰後の坐骨神経の MBP 含量に及ぼす EPOwt 及び EPO 変異タンパク質の効果

CMAP に及ぼす EPO 及び EPO 変異体の観察された主な効果は、髄鞘形成の程度に大きく影響される潜伏時間に対するものであるため、電気生理学的読取りと、髄鞘の再生において生じる生化学的变化との関連付けに努めた。これを行うために、坐骨神経におけるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) の濃度を判定するための新規な方法が開発された。坐骨神経切開後、圧潰部位はより厚い瘢痕組織として容易に確認できるが、MBP 測定のために、それを回避することにした。したがって、各動物に関して、圧潰部位と遠位の圧潰神経のおよそ 2 mm のセクションを、対側神経の対応するセクションと共に除去した。切開した神経セクションを、ドライアイス上に保持した 96 ウェルの丸底細胞培養皿に移した。抽出のため、 $20 \mu\text{l}$  の 10% SDS を加え、該プレートを、 $4 \times 10$  秒パルス

10

20

30

40

50

を用いレベル5に出力を設定したX2020マイクロタイタープレート超音波処理器(Misonix社)において超音波処理した。次いで、180 $\mu$ lのTrizol(Invitrogen)を添加し、室温で1時間インキュベーションすることによって、各サンプルを抽出した。該マイクロタイタープレートを、出力設定7で上記のとおり再超音波処理し、各ウェルの内容物を、エッペンドルフ管に移した。該管に50 $\mu$ lのクロロホルムを添加後、激しくボルテックスし、14Krpmで10m、遠心分離することによって相を分離させた。ペレット化した不溶物質を乱すことなく、下部の有機相を慎重に除去し、5容量のアセトンを加え、室温で1時間インキュベーションすることによって該タンパク質を沈殿させる。沈殿したタンパク質を、遠心分離によって採集し、70%エタノール中で洗浄し、減圧下遠心分離により簡単に乾燥させた。ペレットは、0.2%SDS、140mMのNaCl、50mMのトリス pH8.0中、4で一晩、続いて95で10mインキュベートすることによって可溶化した。次いで、50 $\mu$ lの2%NP40、1%デオキシコレート、140mMのNaCl、50mMのトリス pH8.0をさらに添加して、MBP Elisaに用いるトリプルディタージャント緩衝液を再構成した。

#### 【0325】

この操作を用いて、実施例14に記載された実験の16日目、2回目のCMA P測定の完了後、36匹すべての動物の両四肢の坐骨神経からタンパク質を抽出した。

#### 【0326】

MBP Elisa

BCAタンパク質アッセイ(Pierce)を用い、製造元により推奨された操作に従って、各サンプル中のタンパク質濃度を判定した。すべてのサンプルを同一のタンパク質濃度に希釈し、各サンプルの連続希釈のMBP含量を、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって判定した。Elisaのために、96ウェルプレート(Nunc Immunoplate、#439545)を、PBS中1:5000に希釈した抗MBPモノクローナル抗体(Mab382、Chemicon)で一晩コーティングした。プレートを空にし、PBS中、0.1%BSA(Sigma、A9647)でブロックした。Triple Detergent緩衝液(1%NP40、0.5%デオキシコレート、0.1%SDS、140mMのNaCl、50mMのトリス pH8.0)中、神経抽出物の連続希釈液を、コーティングしたウェルに加え、ロッカーブラットホーム上、室温で2時間インキュベートした。検量標品として、精製マウスMBP(Invitrogen、13228-010)の連続希釈液をプレート中に入れた。インキュベーション後、該ウェルを、0.5%ツウィーン20を含有するPBSで3回洗浄し、検出抗体、PBS0.1%BSA中1:300に希釈したウサギ抗MBPポリクローナル抗体(Zymed 18-0038)を加え、ロッカーブラットホーム上で2時間インキュベートした。該検出抗体を除去し、ウェルを、上記のとおり、PBS、ツウィーン20中、再度洗浄した。PBS0.1%BSA中、1:10,000に希釈したビオチン化ヤギ抗ウサギポリクローナル(Vector、BA-1000)を1時間加え、ウェルを上記のとおり洗浄し、1:8000に希釈したストレプトアビジン-HRP(Amersham、RPN1051V)を加えた。1時間後、ウェルを、上記のとおり、PBS、ツウィーン20中、3回洗浄し、Sigmafast OPD(Sigma、P9187)と共に、室温で30分間インキュベーションすることにより、シグナルを展開させた。この時間の最後に、等容量の2M H2SO4の添加により反応を停止させ、該プレートを492nmにおいて読み取った。

#### 【0327】

MBP標品の曲線を参照して、各サンプルのMBP含量を判定し、ngMBP/ $\mu$ g総タンパク質として表した。圧潰神経に関して得られた値を、対応する対側神経に関して得られた値に対して正規化した。ANOVA試験を用いて、統計的解析を実施した。

#### 【0328】

EPOwt及びEPO変異体によって処置した圧潰坐骨神経のMBP含量についての結果

10

20

30

40

50

上記のとおり判定された坐骨神経のMBP含量は、各群内の標準偏差の小ささにより判断して再現性が高かった。正常な媒体処置坐骨神経においては、MBPは総抽出タンパク質のおよそ5%であるが、圧潰された媒体処置坐骨神経の遠位セクションでは、圧潰16日後、MBPは、総抽出タンパク質のおよそ1%である。EPOwtm、EPOvlm又はEPOvm C34Sで処置された群はすべて、媒体処置群に比較して、圧潰神経におけるMBPの濃度の増加を示す。本発明に記載されたEPOwt及びEPO変異体は、MBP産生を刺激することができ、これは恐らく、坐骨神経圧潰後のミエリン再生の改善を反映していると思われる。このように、CMAA読取りにより判定されるEPOwt及びEPO変異体の電気生理学的結果は、MBPの増加に関連しており、したがって、恐らくミエリン含量に関連していると思われる。

10

#### 【0329】

「混合」ペプチドもまた、この実験において活性を示した。推測に限定されることは望まないが、これは、機能的モチーフの保持、汚染又は実験誤差のいずれかによるものと考えられる。この「混合」ペプチドの観察された活性を解明するために、さらなる実験が必要とされると考えられる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0330】

【図1】ヒトの参照野生型EPO遺伝子領域（配列番号1）を表す4099ヌクレオチドのゲノム配列を示す図である。EPO遺伝子は、図1のヌクレオチド配列上の位置が以下のとおりである5つのエキソンを含有するものとして記載されている：エキソン1：ヌクレオチド601からヌクレオチド794まで（782位での開始コドンを含む）、エキソン2：ヌクレオチド1359からヌクレオチド1504まで、エキソン3：ヌクレオチド1763からヌクレオチド1849まで、エキソン4：ヌクレオチド2465からヌクレオチド2644まで、エキソン5：ヌクレオチド2779からヌクレオチド3499まで（2763位での終止コドンを含む）。各エキソンは灰色に着色されている。開始及び終止コドンは、下線が引かれている。

20

【図2】野生型EPOの1328ヌクレオチドの転写物配列（ポリA尾部を除く）（配列番号2）を示す図である。開始及び終止コドンは、それぞれ182位及び761位に下線が引かれている。

【図3】野生型EPO並びにコード化タンパク質の転写物配列を示す図である。開始及び終止コドンは、それぞれ182位及び761位にある。該転写物は、193のアミノ酸の未成熟タンパク質をコードする（以後、EPOwtと命名される）（配列番号3）。

30

【図4】EPOv1の転写物配列並びにコード化タンパク質EPOv1を示す図である。開始及び終止コドンは、それぞれ182位及び674位にある（したがって、このコード化配列は、開始及び終止コドン双方を含む182位及び676位までである）。該転写物は、164のアミノ酸の未成熟タンパク質をコードする（以後、EPOv1と命名される）（配列番号4）。EPOv1は、ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2、4及び5によりコードされるEPOの新規な転写変異体である。

【図5】EPOv2の転写物配列並びにコード化タンパク質EPOv2を示す図である。開始及び終止コドンは、それぞれ182位及び494位にある（したがって、このコード化配列は、開始及び終止コドン双方を含む182位及び496位までである）。該転写物は、164のアミノ酸の未成熟タンパク質をコードする（以後、EPOv2と命名される）（配列番号6）。EPOv2は、ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2、及び5によりコードされるEPOの新規な転写変異体である。

40

【図6】EPOv3の転写物配列並びにコード化タンパク質EPOv3を示す図である。開始及び終止コドンは、それぞれ182位及び644位にある（したがって、このコード化配列は、開始及び終止コドン双方を含む182位及び646位までである）。該転写物は、154のアミノ酸の未成熟タンパク質をコードする（以後、EPOv3と命名される）（配列番号9）。EPOv3は、ヒト遺伝子EPOのエキソン1、2、3及び4AによりコードされるEPOの新規な転写変異体である。配列番号8に示された配列を有するバ

50

リペプチドは、初めて本明細書に開示された E P O の新規な転写変異体の C 末端部分に相当し、エキソン 4 A の 3' 末端によりコードされる。エキソン 4 A は、野生型 E P O をコードするエキソン 4 と比較して 3' 末端がより長い (図 3 を参照)。

【図 7】E P O v の転写物配列並びにコード化タンパク質 E P O v を示す図である。開始及び終止コドンは、それぞれ 1 8 2 位及び 3 4 7 位にある (したがって、このコード化配列は、開始及び終止コドン双方を含む 1 8 2 位及び 3 4 9 位までである)。該転写物は、5 5 のアミノ酸の未成熟タンパク質をコードする (以後、E P O v と命名される) (配列番号 1 3)。E P O v は、ヒト遺伝子 E P O のエキソン 1、2、及びエキソン 3 の最初の 6 つのヌクレオチドによりコードされる E P O の合成切断変異体である。その成熟形態 (E P O v m) において、それは、第 1 のアルファヘリックスモチーフを形成する E P O 成熟ポリペプチドの N 末端 2 8 のアミノ酸に相当する。

【図 8】E P O v の変異体 (E P O v C 3 4 S 変異体) の配列を示す図である。この変異体において、成熟タンパク質の 7 位 (未成熟形態の 3 4 位) のシステイン残基はセリンにより置換される。該転写物は 5 5 のアミノ酸の未成熟タンパク質をコードする (以後、E P O v C 3 4 S と命名される) (配列番号 1 5)。

【図 9】神経圧潰後の時点で C M A P に対して電気穿孔 E p o 及び E p o 変異体 c D N A 類の効果を示す図である。6 匹のメス C 5 7 B L / 6 匹マウス群は、E P O 野生型 (斑点) 又は E P O v 1 (水平線)、E P O v 2 (斜線)、E P O v 3 (空四角)、及び E P O v (斜影線) に対して c D N A 類を含有する p D E S T 1 2 . 2 発現ベクターにより注入された。陰性対照として、p D E S T 1 2 . 2 単独 (黒色バー) 又はヒト I L 4 に対して c D N A を含有するもの (縞バー) を電気穿孔した。神経圧潰後 7 日目と 1 4 日目に、潜伏時間、持続時間及び振幅の C M A P パラメーターを、すべての動物の圧潰肢、また p D E S T 1 2 . 2 ベクター単独 (空シンボル) により注入された動物の対側性肢において記録した。

【図 1 0】赤血球数 (ヘマトクリット) に対する E p o 変異体の効果を示す図である。血液サンプルは、図 9 に記載されたすべての動物から、電気穿孔 1 2 日目に採血された。ヘマトクリット (赤血球容量は、全血容量のパーセンテージとして算出された) を測定した。

【図 1 1】T F - 1 の増殖に対する E p o 変異体の効果を示す図である。T F - 1 細胞 (A T C C # C R L - 2 0 0 3) を、A T C C により推奨され、1 n g / m l の G M - C S F 又は指定された用量の E p r e x (上部パネル)、r E P O w t m - 6 H i s (中央パネル) 又は r E P O v 1 m (下部パネル) のいずれかで補足された培地中、6 ウェル細胞培養用皿内で培養した。細胞培養は、およそ  $5 \times 10^4$  細胞 / m l に設定され、生存細胞数は、ノイバウエル改良血球計算器の二重チャンバーをカウントすることにより 4 日間にわたり毎日算出された。

【図 1 2】神経圧潰後の時点で C M A P に対して注入された E p o W T 及び E p o 変異体タンパク質の効果を示す図である。6 匹のメス C 5 7 B L / 6 匹マウス群は、5 0  $\mu$  g / k g の E p r e x (縞バー)、5 2 . 4  $\mu$  g / k g の E P O w t m (斑点)、4 3 . 5  $\mu$  g / k g の E P O v 1 m (水平線)、又は 1 0 . 7  $\mu$  g / k g の E P O v m (斜影線)、又は 1 0 . 7  $\mu$  g / k g の E P O v C 3 4 S 混合 (垂直線) により注入された。陰性対照として、媒体 (P B S) を単独 (黒色バー) で注入した。神経圧潰後 8 日目と 1 5 日目に、潜伏時間、持続時間及び振幅の C M A P パラメーターを、すべての動物の圧潰肢、また媒体単独 (空シンボル) により注入された動物の対側性肢において記録した。M a n n - W h i t n e y 検定を用いて統計解析を実施する。

【図 1 3】神経圧潰後の坐骨神経の M B P 含量を示す図である。図 1 2 に記載された実験の 1 6 日目に、動物を殺処理し、圧潰部位に遠位の坐骨神経の切片を取り出した。各動物の対側性部位から対応する神経切片もまた取り出し、平行して処理した。各サンプルのタンパク質含量は、B C A 法により測定され; M B P 含量は E l i s a により測定された。各サンプルの M B P 含量は、n g M B P /  $\mu$  g の総タンパク質として表され、圧潰神経の M B P 含量は、対応する対側性神経の M B P 含量に正規化された (対側性%)。O n e



## 【 図 3 】

```
1 CCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGGCCCGCTCTGCTCGACACCGGCCCGCTGGACAG
61 CCGCCCTCTCTCTCCAGGCCCGTGGGGCTGGCCCTGACCGCCGAGCTTCCGGGATGAGG
121 GCGCCCGGTGTGTCTCAGCGGGGCCCGCAGGTCTGAGGACCGCGCGCAGCGCGGA
181 GATGGGGGTGACGAATGTCTGCGGGCTGTGGTCTCTCTGCTGCTGCTGTGGTCTCC
-M-G-V-H-E-D-C-P-A-M-L-M-W-L-L-L-S-L-L-P
241 TCTGGGCTCCAGCTCTGGGGGCCCGACCGCTCATCTGTGACAGCGAGTCTGGGA
20 --L-G-L-P-V-L-G-A-P-P-P-L-I-C-D-S-R-V-L-E
301 GAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAATATACAGCGGGCTGTGTGAACCTG
40 --R-Y-L-L-E-A-K-E-A-E-N-I-T-T-G-G-C-A-E-H-C
361 CAGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCAGACACCAAGTAAATTCTATGCGCTGGAAGAG
60 --S-L-N-N-B-N-I-T-T-V-P-P-D-T-T-K-V-N-P-F-Y-A-M-K-R
421 GATGGAGGTGCGGAGCAGAGCGGTGAGTCTGGGCGGCTGCGCTCTGCTGCGAAGC
80 --M-E-V-G-Q-Q-Q-A-V-V-E-V-M-Q-G-L-A-L-L-S-E-A
481 TGTCTGGGGGCCAGGCCCTGTGTGCACTCTTCCAGCTGTGGAGGCCCTGAGCT
100 --V-L-R-R-G-Q-A-L-L-V-N-S-S-Q-P-M-S-P-P-L-Q-L
541 GATGTGGATTAAGCGCTCAGTGGCTTGCAGGCTCAGCACTCTGCTGGGCTCTGGG
120 --H-V-D-R-A-A-V-S-G-L-R-S-B-L-T-T-L-L-R-A-A-L-L-G
601 AGCCGAGGAGGAGCGCATCTCCCTCCAGATGGCGGCTCAGCTGCTCAGCTCCGAACAAT
140 --A-Q-K-E-A-A-I-T-S-P-P-D-A-A-S-A-A-P-L-R-T-I
661 CAGTCTGACACTTTCGCGAATCTTCCGAGCTCTCCAACTTCTCCGGGGAAGCT
160 --T-A-D-T-P-R-R-K-L-P-R-V-Y-S-N-F-L-R-L-G-K-I
721 GAAGCTGTACAGAGGGAGGCTGACAGCAGAGGACAGTACAGAGGTGTGTCAACTG
180 --K-L-Y-T-T-G-E-A-C-R-T-G-D-R-A-
781 GGCATATCCACCACTCTCTCACCACATTTGCTGTGGCACACCTCCCGCGCACTCT
841 GAGCCCGGTGTGGGGCTTCACTCAGGGCCAGCTCTGCTGACAGGAGCTTAACTGAC
901 GCAATGACATCTCAGGGGCGAGGAGCTGCTCAGAGGACCACTTGAATCTAAGATG
961 TCCAGGAGCTGAGGGGCTTCACTCAGGGGCGAGCTTCAAGAGAGCTTAACTGAC
1021 GGACAGGAGCTGTGGGAGAGCGCTGAGCTCAGTGGAGCTGCAAAATTTGATGCC
1081 AGGACAGCTTGGGGGCTTCACTCAGGGGCGAGCTTCAAGAGAGCTTAACTGAC
1141 TGGATAACTTAGTGAGCTGTGACTTCTCCAGCTTCCAGGGTATGGGCACTCCCTT
1201 GCTCCAGAGCGCTTGAACAGCGGCTGTGGAGCATGAGAGCTGAGTGGGCTG
1261 GCTCTGGCTCTCATGGGTCAGAGTTTGTGTATTCTCAACTCATTGACAGAGCTG
1321 AAACCAAC
.....
```

Figure 3

## 【 図 4 】

```
1 CCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGGCCCGCTCTGCTCGACACCGGCCCGCTGGACAG
61 CCGCCCTCTCTCTCCAGGCCCGTGGGGCTGGCCCTGACCGCCGAGCTTCCGGGATGAGG
121 GCGCCCGGTGTGTCTCAGCGGGGCCCGCAGGTCTGAGGACCGCGCGCAGCGCGGA
181 GATGGGGGTGACGAATGTCTGCGGGCTGTGGTCTCTCTGCTGCTGCTGTGGTCTCC
-M-G-V-H-E-D-C-P-A-M-L-M-W-L-L-L-S-L-L-P
241 TCTGGGCTCCAGCTCTGGGGGCCCGACCGCTCATCTGTGACAGCGAGTCTGGGA
20 --L-G-L-P-V-L-G-A-P-P-P-L-I-C-D-S-R-V-L-E
301 GAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAATATCAGCGTGGGCGACCGCGCTAGA
40 --R-Y-L-L-E-A-K-E-A-E-N-I-T-T-V-G-Q-Q-A-V-E
361 AGTCTGGGAGGCGCTGGGCTGTGTGCGAAGCTGTCTGCGGGCGCAGGCCCTGTGGT
60 --V-M-Q-G-L-A-L-L-L-S-E-A-V-L-L-R-G-Q-A-L-L-L-V
421 CAACTCTTCCAGCGCTGGGAGCGCTGCACTGCACTGGAATAAGCGCTCAGTGGCT
80 --N-S-S-Q-P-P-M-E-P-P-L-Q-L-H-V-D-K-A-V-S-G-L
481 TCGAGGCTCAGCACTCTGCTTGGGCTCTGGAGGCCAGGAGGCAATCTCCCTCC
100 --R-S-L-T-T-T-L-L-L-R-A-L-L-G-A-Q-K-E-A-I-S-P-P
541 AGATGGGCGCTCAGCTGTCTCACTCCGAGCAATCACTGCGACACTTTCGCAAACTCTT
120 --D-A-A-A-S-A-A-P-L-R-R-T-I-T-A-D-T-F-R-R-K-L-F
601 CCGAGCTCTACTCAATTTCTCCGGGGAAGCTGAAGCTGTACAGAGGGAGGCTGCGAG
140 --R-V-Y-S-N-F-L-L-R-G-K-L-R-K-L-L-Y-T-G-E-A-A-C-R
661 GACAGGGGACAGATGACAGGCTGTGTCCAGCTGGGATATCCACCACTCTCCCTCAGCAAC
160 --T-G-D-R-F-
721 ATTGCTGTGGCAGCGCTCTCCCGGCACTCTGAGCCGCTGGAGGGCTCTCAGCTCA
781 GCGCAGCGCTGTCCATGGACACTCCAGTGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAGAA
841 CTGTCCAGAGCAGCACTCTGAGCTTAAGGCTGACAGAGGCACTTGAAGGCCAGAGC
901 TAGGAAGCATTCAGAGAGCAGCTTAAACTCAGGACAGAGCCATCTGGGAGAGCGCT
961 GAGCTCACTTGGGCGCTGCAAAATTTGAAGGCGAGCACTTGGAGGAGTATTAAGCT
1021 GTTTTGCACCTACCATCAGGACAGGATGACCTGGATAACTTAGGTGGCAGCTGTGAC
1081 TTCTCCAGGCTCAGGGATGGGCACTCTGCTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
1141 GTGGGGGAGCAGCAATGTCTGCTGCTGTGGCTTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
1201 TTGTGATATCTCACTCATTTGAGAGGAGCTGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
.....
```

Figure 4

## 【 図 5 】

```
1 CCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGGCCCGCTCTGCTCGACACCGGCCCGCTGGACAG
61 CCGCCCTCTCTCTCCAGGCCCGTGGGGCTGGCCCTGACCGCCGAGCTTCCGGGATGAGG
121 GCGCCCGGTGTGTCTCAGCGGGGCCCGCAGGTCTGAGGACCGCGCGCAGCGCGGA
181 GATGGGGGTGACGAATGTCTGCGGGCTGTGGTCTCTCTGCTGCTGCTGTGGTCTCC
-M-G-V-H-E-D-C-P-A-M-L-M-W-L-L-L-S-L-L-P
241 TCTGGGCTCCAGCTCTGGGGGCCCGACCGCTCATCTGTGACAGCGAGTCTGGGA
20 --L-G-L-P-V-L-G-A-P-P-P-L-I-C-D-S-R-V-L-E
301 GAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAATATCAGGAGGAGCGCATCTCCCTTCC
40 --R-Y-L-L-E-A-K-E-A-E-N-I-T-T-G-G-C-A-E-H-C
361 AGATCCAGCTCAGCTGTCTCACTCCGAGCAATCACTGCGACACTTTCGCAAACTCTT
60 --D-A-A-A-S-A-A-P-L-R-R-T-T-T-P-A-D-T-T-P-E-K-L-L-T
421 CCGAGTCTACTCCAAATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACAGAGGGAGGCTCGAG
80 --R-V-Y-S-N-T-L-R-G-K-L-K-L-Y-T-G-E-A-A-C-R
481 GACAGGGGACAGATGACAGGCTGTGCACTGGCATATCAGCACTCTCAGCTCA
100 --T-G-D-R-R-
541 ATTGCTGTGGGACAGCGCTTCCCGCCACTCTGAGACCGGCTGAGGGGCTCTCAGCTCA
601 GCGCAGGCTGTCCATGAGCACTCAGTGGCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAGGAA
661 CTGTCCAGAGCGAGCTCTGAGCTTAAGGATGACAGGGCCAACTGAGGGGCCAGAGC
721 TAGGAAGCATTCAGAGAGCAGCTTAAACTCAGGAGCAGGCACTGCTGGGAGAGCGCT
781 GAGCTCACTCAGCCCTCGAAATTTGATGCGAGGAGCGCTTGAAGGAGTATTAAGCT
841 GTTTTGCACUTACCATCAGGAGCAGATGACCTGGATAACTTTAGGTGCGAGCTGTGAC
901 TTCTCCAGCTCTCAGGGGATGGGCACTCCCTTGTGGCAGAGCGCCCTTGACAGGGG
961 GTGGTGGGAACATGAAGACAGGATGGGGCTGCGCTGTGCTCTCATGGGTCCAAGTT
1021 TTGTGTATTCTTCAACTCATTTGACAGAACTGAAGACCAAC
.....
```

Figure 5

## 【 図 6 】

```
1 CCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGGCCCGCTCTGCTCGACACCGGCCCGCTGGACAG
61 CCGCCCTCTCTCTCCAGGCCCGTGGGGCTGGCCCTGACCGCCGAGCTTCCGGGATGAGG
121 GCGCCCGGTGTGTCTCAGCGGGGCCCGCAGGTCTGAGGACCGCGCGCAGCGCGGA
181 GATGGGGGTGACGAATGTCTGCGGGCTGTGGTCTCTCTGCTGCTGCTGTGGTCTCC
-M-G-V-H-E-D-C-P-A-M-L-M-W-L-L-L-S-L-L-P
241 TCTGGGCTCCAGCTCTGGGGGCCCGACCGCTCATCTGTGACAGCGAGTCTGGGA
20 --L-G-L-P-V-L-G-A-P-P-P-L-I-C-D-S-R-V-L-E
301 GAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAATATCAGCGCGGCTGTGTGAACCTG
40 --R-Y-L-L-E-A-K-E-A-E-N-I-T-T-T-G-C-A-E-H-C
361 CAGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCAGACACCAAGTAAATTCTATGCGTGAAGAG
60 --S-L-N-E-M-I-T-V-P-P-D-T-T-R-V-N-F-T-Y-A-A-N-K-R
421 GATGAGGTGCGGAGCAGGCGCTGAGAAGCTTGGCAGGGCTTGGGCTGTGTGGAAGC
80 --M-E-V-G-Q-Q-A-A-V-S-V-N-Q-G-L-A-L-L-S-E-A
481 TGTCTCGGGGCCAGGCCCTGTGTGCACTTTCAGCGCGTGGAGGCCCTGCACT
100 --V-L-R-R-Q-A-A-L-L-L-V-N-S-S-Q-P-M-E-P-L-L-Q-L
541 GATGTGATGAAGCGCTCAGTGGGCTTCCAGGCTCAGCACTCTGCTGGGCTCTGGG
120 --H-V-D-N-A-A-V-S-G-L-L-R-S-L-T-T-L-L-L-R-A-L-L-G
601 AGCCGAGTGAAGAGGAGGAGCACTTCTGCTGGCCTTCTGTAA
140 --A-Q-V-S-R-R-S-G-H-P-C-L-L-T-P-P-L-L-F-
.....
```

Figure 6

## 【 図 7 】

```
1 CCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGGCCCGCTCTGCTCGACACCGGCCCGCTGGACAG
61 CCGCCCTCTCTCTCCAGGCCCGTGGGGCTGGCCCTGACCGCCGAGCTTCCGGGATGAGG
121 GCGCCCGGTGTGTCTCAGCGGGGCCCGCAGGTCTGAGGACCGCGCGCAGCGCGGA
181 GATGGGGGTGACGAATGTCTGCGGGCTGTGGTCTCTCTGCTGCTGCTGTGGTCTCC
-M-G-V-H-E-D-C-P-A-M-L-M-W-L-L-L-S-L-L-P
241 TCTGGGCTCCAGCTCTGGGGGCCCGACCGCTCATCTGTGACAGCGAGTCTGGGA
20 --L-G-L-P-V-L-G-A-P-P-P-L-I-C-D-S-R-V-L-E
301 GAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAATATCAGCGCGGCTGA 349
40 --R-Y-L-L-E-A-K-E-A-E-N-I-T-T-T-G-G-
.....
```

Figure 7



## 【 図 8 】

```

1  CCCGAGCCCGACCCGGGCGACCGCGCTCTGCTCCGACACCGCGCCCTGGACAG
61  CCGCCCTCTCTCCAGGCCCTGGGCTGGGCTGCAACCGCGAGCTTCCCGGATGAGG
121  GCCCCGGTGTGTACCCGGGCGCGCCAGGTCGTAGGGACCCCGCGAGGCGCGGA
181  GATGGGGTGCACGAATGTCTGCTGGCTGTGGCTTCTCTGTCCCTGTGTGTGCTCC
-M--G--V--H--E--C--P--A--W--L--W--L--L--S--L--S--L--P
241  TCTGGGCTCCAGTCTTGGGCGCCACACGCTCATCAGTGACAGCGAGTCTTGA
20  --L--G--L--P--V--L--G--A--P--P--R--L--I--S--D--S--V--L--E
301  GAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGAGGCGGAGATATCACGACGGGCTGA 349
40  --R--Y--L--L--E--A--K--E--A--E--N--I--T--T--G--

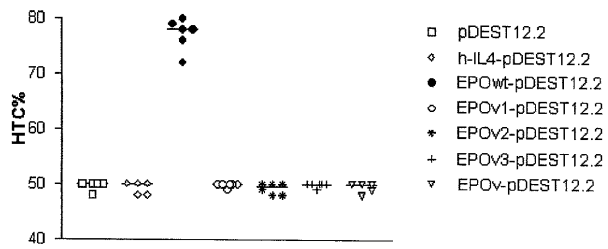
```

Figure 8

## 【 図 10 】

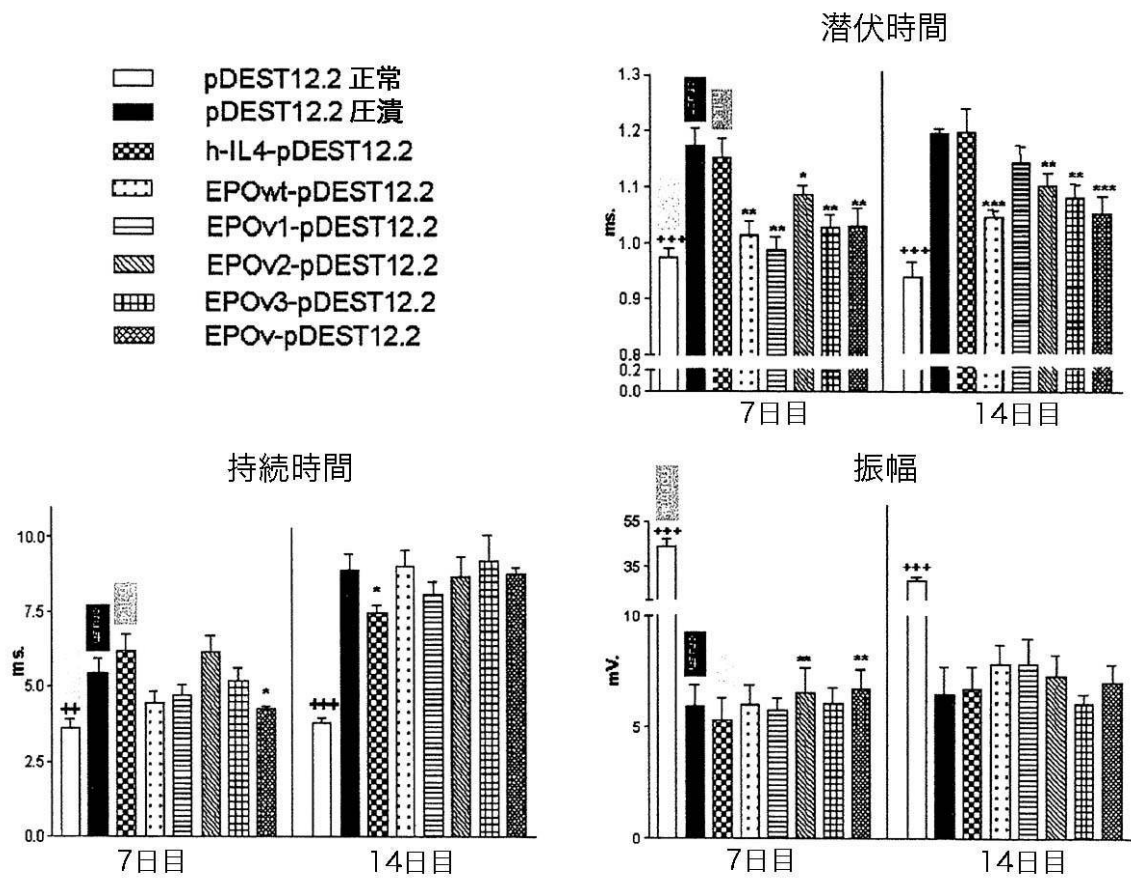
坐骨神経圧潰-ヘマトクリット読取り

電気穿孔後12日目／神経圧潰後8日目

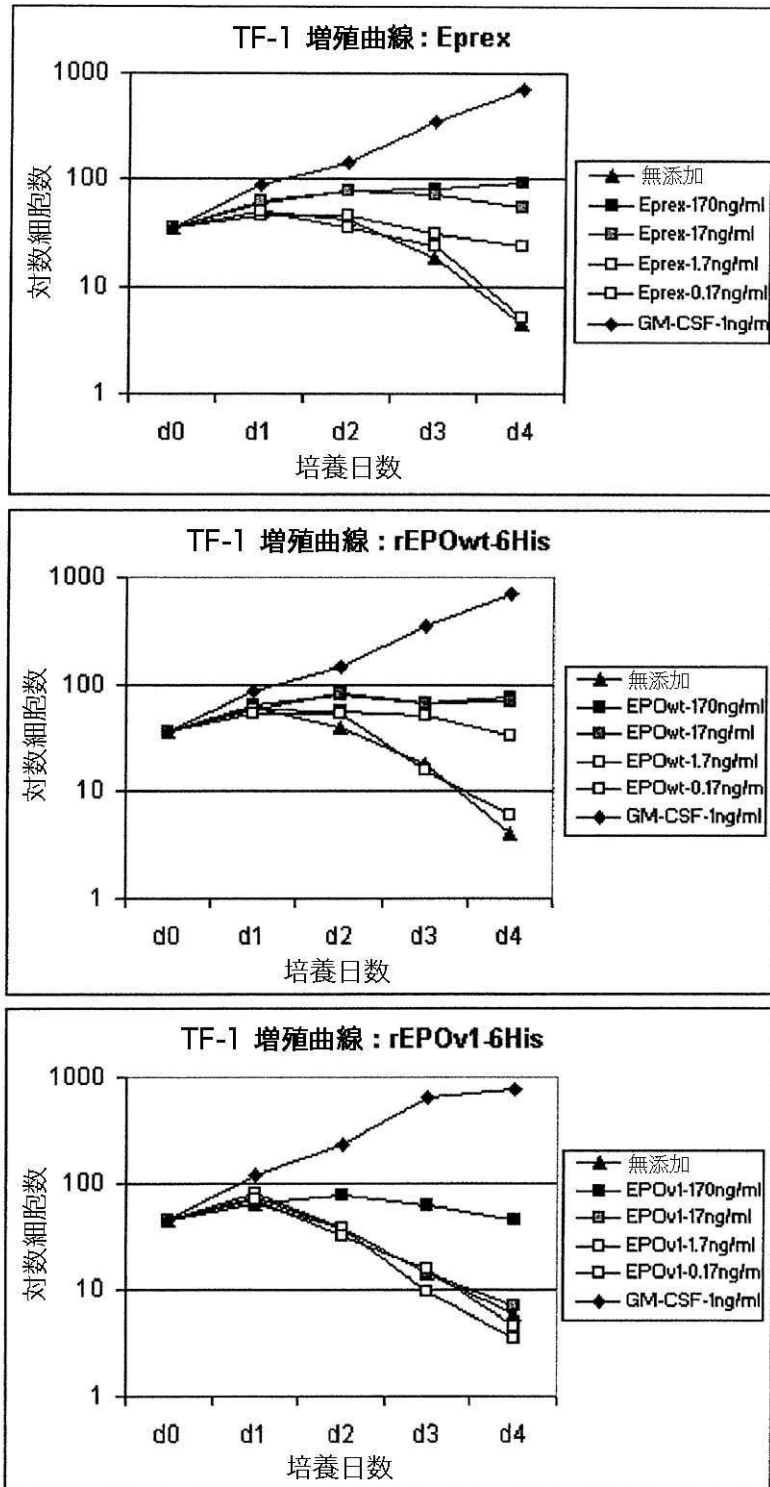


【図 9】

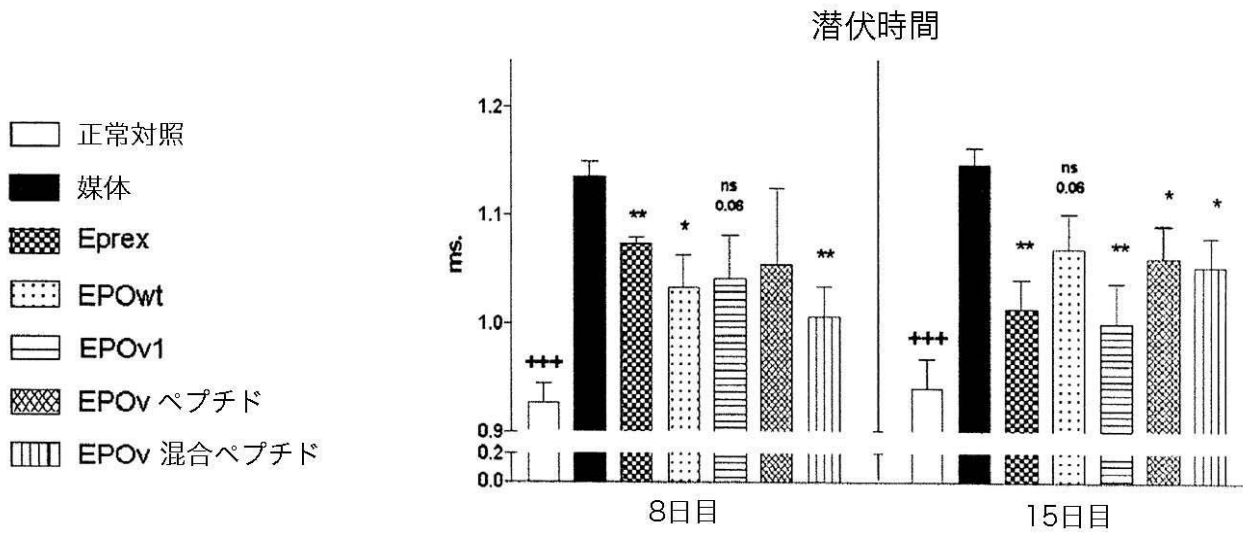
## 坐骨神経圧潰-CMAP読取り



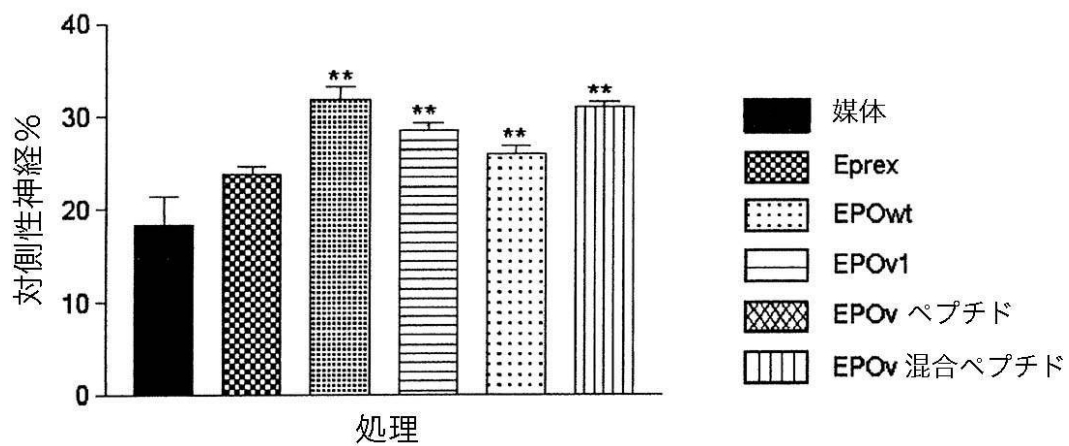
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 配列表 】

2009517009000001.app

## 【国際調査報告】

60800550015



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/068859

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/505 C12N15/01

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 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, 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 98/18926 A (SEARLE & CO [US]; MCWHERTER CHARLES A [US]; FENG YIQING [US]; SUMMERS) 7 May 1998 (1998-05-07) page 2, lines 11,12 pages 11-16; sequence 6	1-3, 12-43
X	US 5 441 868 A1 (LIN FU-KUEN [US]) 15 August 1995 (1995-08-15)	1,12-43
Y	column 37, lines 25-29; figure 6	2,3
X	WO 2004/089282 A (CURAGEN CORP [US]) 21 October 2004 (2004-10-21)	1,12-43
Y	see in particular NOV3a, an Erythropoietin precursor of 104 aa; pages 15, page 146, page 209, line 18.	2,3
	-/-	

☒ 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 document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*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
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 2007

Date of mailing of the international search report

04/06/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 940-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 940-3016

Authorized officer

Ury, Alain

07.10.2008

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/068859

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/229779 A1 (KEKUDA RAMESH [US] ET AL) 18 November 2004 (2004-11-18)	1,12-43
Y	see in particular NOV3a, an Erythropoietin precursor of 104 aa; pages 7, page 96, page 100-101 and paragraph [0416].	2,3
X	BOISSEL J-P ET AL: "ERYTHROPOIETIN STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 268, no. 21, 25 July 1993 (1993-07-25), pages 15983-15993, XP000199309 ISSN: 0021-9258	1
Y	the whole document	2,3, 12-43
X	BITTORF THOMAS ET AL: "Structural and functional characterisation of recombinant human erythropoietin analogues" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 336, no. 1, 1993, pages 133-136, XP002212979 ISSN: 0014-5793	1
Y	the whole document	2,3, 12-43
X	EP 0 409 113 A1 (BEHRINGWERKE AG [DE]) 23 January 1991 (1991-01-23)	1
Y	page 2, line 49 - page 3, line 15; claims 1,2; table 1	2,3, 12-43
X	ELLIOTT S ET AL: "Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 89, no. 2, 15 January 1997 (1997-01-15), pages 493-502, XP002354909 ISSN: 0006-4971	1
Y	figure 1	2,3, 12-43

International Application No. PCT/EP2006/068859

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box II.1

Although claims 29-33 and 36 are directed to a method of treatment of the human/animal body (Article 52(4) EPC), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2-7 (partially)

The present claims 2, 3, 4, 5, 6, 7 (parts a, b and as a consequence parts e, f, g and when present parts h, i) relate to an extremely large number of possible polypeptides. The claimed polypeptides are not clearly defined because the claims contain so many permutations ("the lack of at least one of the amino acids...") making the claims unclear and inconcise to the extent that the presentation of the claims unduly obscures the subject-matter for which protection is sought. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the polypeptides claimed, see Examples 11-15 wherein only EPOv, EPOv1, EPOv2 and EPOv3 are substantially supported. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search is to be performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claims 2, 3, 4, 5, 6, 7 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claims 2, 3, 4, 5, 6, 7 is to be restricted to those claimed polypeptides which appear to be supported (i.e. EPOv, EPOv1 and EPOv2 as claimed in parts c and d of said claims) and a generalisation of their structural formulae as reflected in parts e, f, g and when present parts h, i insofar as they refer back to parts c and d of said claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2006/068859

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

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

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 29-33 and 36 are directed to a method of treatment of the human/animal body (Article 52(4) EPC), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 2-7 (partially)  
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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
2-3 (restricted to subject matter to be searched), 1, 12-43 (partially)

## Remark on Protest

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



International Application No. PCT/EP2006/068859

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 2-3 (restricted to subject matter to be searched), 1, 12-43 (partially)

An isolated polypeptide comprising a polypeptide differing from the sequence set forth at SEQ ID NO:3 by the lack of at least one of the amino acids 56 to 193, in particular a polypeptide comprising the sequence set forth at SEQ ID NO:13 and subject-matter related to EPOv.

2. claims: 4-5 (restricted to subject matter to be searched), 1, 12-43 (partially)

An isolated polypeptide comprising a polypeptide differing from the sequence set forth at SEQ ID NO:3 by the lack of at least one of the amino acids 54 to 82, in particular a polypeptide comprising the sequence set forth at SEQ ID NO:4 and subject-matter related to EPOv1.

3. claims: 6-7 (restricted to subject matter to be searched), 1, 12-43 (partially)

An isolated polypeptide comprising a polypeptide differing from the sequence set forth at SEQ ID NO:3 by the lack of at least one of the amino acids 54 to 142, in particular a polypeptide comprising the sequence set forth at SEQ ID NO:6 and subject-matter related to EPOv2.

4. claims: 8, 10, 12-43 (partially)

An isolated polypeptide comprising the sequence set forth at SEQ ID NO:8 and subject-matter related to the 3' end of Exon 4A.

5. claims: 9, 11, 1, 12-43 (partially)

A polypeptide comprising the sequence set forth at SEQ ID NO:9 and subject-matter related to EPOv3.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 C 0 8 6	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	H	
C 0 7 K	16/22	(2006.01)	C 0 7 K	16/22		
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02		
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06		
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12		
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/02		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16		
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 3	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
			A 6 1 K	39/395	N	
			C 1 2 P	21/08		

(31)優先権主張番号 60/753,706

(32)優先日 平成17年12月22日(2005.12.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 アブデルラヒーム、ハーディ  
フランス国、メゾン - アルフォール、リュベルドゥラロゼール、14ビス

(72)発明者 プリマス、グエナエル  
フランス国、オーヴェルサンジョルジュ、シュマンデュゲッテリーヴル、7

(72)発明者 クヴァトクコ、ヨランドゥ  
スイス国、コンフィグノ、シュマンデュヴュイロンヌ 46

(72)発明者 マウンドレル、キンゼー  
スイス国、シェヌ - ブジェリエ、シュマンデュラグラデッレ 16

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA43 CA04 CA07 CA09 DA01 DA02 DA05  
DA11 EA04 GA11 HA03 HA14  
4B064 AG18 AG27 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20 CC24 CE12  
DA01

4B065	AA01X	AA57X	AA88X	AA90X	AA90Y	AB01	AC14	BA02	CA24	CA44
4C084	AA02	AA07	AA13	BA01	BA08	BA19	BA21	BA23	DC50	NA14
	ZA011	ZA021	ZA161	ZA181	ZA201	ZA221	ZA361	ZA391	ZA401	ZA421
	ZA511	ZA551	ZA941	ZB261	ZB271	ZC022				
4C085	AA13	AA14	CC22	CC23						
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA01	ZA02	ZA16	ZA20
	ZA22	ZA36	ZA39	ZA40	ZA42	ZA51	ZA55	ZA94	ZB21	ZB26
	ZB27	ZC02								
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA13	DA76	EA24
	EA50	FA72	FA74	GA26						