

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2023年10月26日(26.10.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/203609 A1

(51) 国際特許分類:  
C12N 15/13 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/018051

(22) 国際出願日: 2022年4月18日(18.04.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 株式会社 スカイズ (SKYES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1060032 東京都港区六本木7丁目3番26号307号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 岡崎 克則 (OKAZAKI Katsunori); 〒0610293 北海道石狩郡当別町金沢1757 北海道医療大学薬学部内 Hokkaido (JP). ▲崎▼谷 直義 (SAKITANI Naoyoshi); 〒5648565 大阪府吹田市岸部新町6番1号 国立循環器病研究センター研究所内 Osaka (JP). 今井 祐記 (IMAI Yuuki); 〒7910295 愛媛県東温市志津川454 愛媛大学大学院 医学系研究科病態生理学講座 Ehime (JP). 柳原 裕太 (YANAGIHARA Yuta); 〒7910295 愛媛県東温市志津川454 愛媛大学 学術支援センター 動物実験部門 Ehime (JP).

(74) 代理人: 田中 伸一郎, 外 (TANAKA Shinichiro et al.); 〒1008355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル 中村合同特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,

EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 補正された請求の範囲及び説明書 (条約第19条(1))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO ANGIOTENSIN II TYPE 1 RECEPTOR

(54) 発明の名称: アンギオテンシンII 1型受容体に特異的に結合する抗体

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing an antibody that is applicable to detection of angiotensin II type 1 receptors, does not exhibit non-specific binding such as that of currently commercially available anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies, and specifically binds to angiotensin II type 1 receptors. This problem is solved by an antibody against mammalian angiotensin II type 1 receptors, the antibody being obtained using, as an antigen, a peptide comprising the amino acid sequence of the present invention.

(57) 要約: 本発明は、アンギオテンシンII 1型受容体の検出に適用可能であり、且つ現在商業的に利用可能な抗アンギオテンシンII 1型受容体抗体のような非特異的結合を示さないアンギオテンシンII 1型受容体に特異的に結合する抗体を提供することを課題とする。ほ乳類動物のアンギオテンシンII 1型受容体に対する抗体であって、本発明のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として用いることにより得られる抗体により上記課題を解決する。

WO 2023/203609 A1

## 明 細 書

発明の名称：

アンギオテンシンⅡ 1型受容体に特異的に結合する抗体

### 技術分野

[0001] 本発明はほ乳動物のアンギオテンシンⅡ 1型受容体（AT1R）に特異的に結合する抗体に関するものである。

### 背景技術

[0002] アンギオテンシンⅡの受容体には1型と2型があり、塩分と水分のバランス、血圧、血管緊張などの生理的反応調節、糖尿病、高血圧、心筋梗塞、うっ血性心不全および脳卒中などの病態形成など、多くの従来認識されているアンギオテンシンⅡの作用はアンギオテンシンⅡ 1型受容体（AT1R）を介している。

生理反応や病態形性におけるAT1Rの分子機構の解明には、AT1Rタンパクを正確に検出することが非常に重要である。

これまでにいくつかの商業的に利用可能な抗AT1R抗体がAT1Rのシグナリングや機能の研究に使用されてきたが、近年、それらの商業的に利用可能な抗AT1R抗体のいずれもがAT1Rに対する特異的結合能に欠けることが明らかとなり問題となっている。例えば、AT1Rをコードする遺伝子をノックアウトしたマウスやAT1Rを発現していない細胞由来のサンプルにおいても、ウエスタンブロットを行った場合にAT1Rタンパクと予測される位置に野生型と同様なバンドが検出されたり、免疫細胞染色、免疫組織染色を行った場合に非特異的な染色が観察されたりすることが複数報告されている（非特許文献1～3）。このような商業的に利用可能な抗AT1R抗体を使用した研究はそのデータの信頼性において疑問があると問題視されており、AT1Rの検出に適用可能であり、且つ現在商業的に利用可能な抗AT1R抗体のような非特異的結合を示さないAT1Rに特異的に結合する抗体の開発が求められている。

ここでは乳類動物のうち、ヒト等の霊長類やウシ等のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体（AT1R）は1種類であるが、ラットやマウス等の齧歯類のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体（AT1R）にはアンギオテンシンⅡⅠa型受容体（AT1aR）とアンギオテンシンⅡⅠb型受容体（AT1bR）の2つのサブタイプがある。本明細書において、ラットやマウスのアンギオテンシンⅡⅠ型受容体という場合、この2つのサブタイプを含むものとする。

野性型のラットやマウスの組織においては部位による差はあるものの、AT1aRの発現量がAT1bRの発現量と比較して圧倒的に多い。従ってこれらの動物においてAT1Rの検出は主にAT1aRを標的としている。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0003] 非特許文献1：Hypertension (2013) 61：253-258

非特許文献2：Cell Mol Neurobiol(2012)32:1353-1365

非特許文献3：Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2018)391:883-889

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体の検出に適用可能であり、且つ現在商業的に利用可能な抗アンギオテンシンⅡⅠ型受容体抗体のような非特異的結合を示さない、アンギオテンシンⅡⅠ型受容体に特異的に結合する抗体を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体の細胞内ドメインである317-335位のアミノ酸配列に着目し、この特定のアミノ酸配列を有するペプチドに結合する抗体がアンギオテンシンⅡⅠ型受容体に特異的に結合することを見出し、本発明を完成した。本発明の特定のアミノ

酸配列を有するペプチドに結合する抗体によれば、アンギオテンシンⅡⅠ型受容体を特異的に検出することが可能である。

[0006] すなわち本発明は以下の通りである。

[1] ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体に対する抗体であって、

(a) 配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド、又は

(b) 配列番号1のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなるペプチド、を抗原として用いることにより得られる抗体。

[2] 抗体が、ポリクローナル抗体である、前記[1]に記載の抗体。

[3] 抗体がモノクローナル抗体である前記[1]に記載の抗体

### 発明の効果

[0007] 本発明のほ乳類動物のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体に対する抗体であって、本発明の所定のアミノ酸配列（ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位、「AT1aR（317-335）」と表記する場合がある。）からなるペプチドを抗原として用いることにより得られる抗体により、ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体の検出に適用可能であり、且つ現在商業的に利用可能な抗アンギオテンシンⅡⅠ型受容体抗体のような非特異的結合を示さないアンギオテンシンⅡⅠ型受容体に特異的に結合する抗体を提供することが出来る。

### 図面の簡単な説明

[0008] [図1]試験1における抗rAT1aR（317-335）ポリクローナル抗体についての免疫細胞染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図2]試験1における抗rAT1aR（317-335）モノクローナル抗体についての免疫細胞染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図3]試験1における市販の抗アンギオテンシンⅡⅠ型受容体抗体についての免疫細胞染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図4]試験2における抗rAT1aR（317-335）ポリクローナル抗体

についてのマウス肝臓組織における免疫組織染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。(WT: 野性型マウス、AT1aR KO: アンギオテンシンⅠⅠ1a型受容体遺伝子欠損マウス、AT1bR KO: アンギオテンシンⅠⅠ1b型受容体遺伝子欠損マウス)

[図5]試験2における抗rAT1aR(317-335)モノクローナル抗体についてのマウス肝臓組織における免疫組織染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。(WT: 野性型マウス、AT1aR KO: アンギオテンシンⅠⅠ1a型受容体遺伝子欠損マウス、AT1bR KO: アンギオテンシンⅠⅠ1b型受容体遺伝子欠損マウス)

[図6]試験3における抗rAT1aR(317-335)ポリクローナル抗体についてのウエスタンブロットの結果を示す写真である。(1: ラットアンギオテンシンⅠⅠ1a型受容体を強制発現させていないHEK293細胞(アンギオテンシンⅠⅠ1型受容体を発現していない細胞)、2: ラットアンギオテンシンⅠⅠ1a型受容体を強制発現させたHEK293細胞)

[図7]試験3における抗rAT1aR(317-335)モノクローナル抗体についてのウエスタンブロットの結果を示す写真である。(1: ラットアンギオテンシンⅠⅠ1a型受容体を強制発現させていないHEK293細胞(ラットアンギオテンシンⅠⅠ1型受容体を発現していない細胞)、2: ラットアンギオテンシンⅠⅠ1a型受容体を強制発現させたHEK293細胞)

### 発明を実施するための形態

[0009] 本発明の抗体は、ほ乳類動物のアンギオテンシンⅠⅠ1型受容体に対する抗体であり、ほ乳類動物のアンギオテンシンⅠⅠ1型受容体を特異的に認識する抗体であることが好ましい。ほ乳類動物のアンギオテンシンⅠⅠ1型受容体は、好ましくはヒト、ラット又はマウスのアンギオテンシンⅠⅠ1型受容体であり、より好ましくはラット又はマウスのアンギオテンシンⅠⅠ1型受容体であり、さらに好ましくはラット又はマウスのアンギオテンシンⅠⅠ1a型受容体である。

- [0010] 本発明で得られたほ乳類動物のアンギオテンシンⅡ 1型受容体に対する抗体は、ポリクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体であってもよい。
- [0011] 本発明のほ乳類動物のアンギオテンシンⅡ 1型受容体に対する抗体は、抗原として、
- (a) 配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド、
  - (b) 配列番号1のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなるペプチド、又は
  - (c) 配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるアミノ酸配列を有するペプチドを用いることができる。
- [0012] 本発明のほ乳類動物のアンギオテンシンⅡ 1型受容体に対する抗体は、ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡ 1型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位を認識する。
- [0013] 本発明において、配列番号1で記載されるアミノ酸配列は、配列番号2で示されるラットのアンギオテンシンⅡ 1a型受容体の配列のうち、細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位（又は、「rAT1aR(317-335)」と表記する場合がある。）に相当する。この配列は配列番号3で示されるマウスのアンギオテンシンⅡ 1a型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位と同一である。またこの配列は配列番号4で示されるヒトのアンギオテンシンⅡ 1型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位のうち、329位のアスパラギンをセリンに置換したもの、配列番号5で示されるラットのアンギオテンシンⅡ 1b型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位のうち、325位のスレオニンをリジン、328位のアラニンをセリン、329位のグリシンをセリンに置換したもの、配列番号6で示されるマウスのアンギオテンシンⅡ 1b型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位のうち、325位のアル

ギニンをリジン、328位のアラニンでセリン、329位のグリシンをセリンに置換したものと同一である。

[0014] ペプチド合成の分野において、配列番号1からなるアミノ酸配列を有するペプチドは、従来公知の方法により化学合成することもでき、微生物などを用いて組み換え技術により合成することもできるペプチドである。

[0015] 抗原抗体反応は、上記抗原を用いて、従来公知のように、被免疫動物に抗原となる物質を投与することにより行うことができる。

抗原となる物質を投与して、被免疫動物における免疫反応を惹起することにより、本発明のほ乳類動物のアンギオテンシンII 1型受容体に対する抗体を産生させることができる。

被免疫動物としては、特に限定されるものではないが、実験動物として用いられる、モルモット、ラット、マウス、ウサギ及びヒツジ等が挙げられる。

[0016] 抗原の投与方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内及び皮内等の投与経路が挙げられる。抗原の投与スケジュールとしては、特に限定されるものではないが、例えば、2週間の投与間隔で、抗原を約2~10回投与することにより、ほ乳類動物のアンギオテンシンII 1型受容体に対する抗体を産生させることができる。

投与スケジュールに併せて適宜、被免疫動物から血清サンプルを採取して抗体の産生量を確認して、十分に免疫反応が惹起されているか確認することもできる。

最終免疫後、被免疫動物から血清を採取し、従来公知の方法により精製してほ乳類動物のアンギオテンシンII 1型受容体に対する抗体を得ることができる。

[0017] 初回免疫、追加免疫のための抗原の投与量は、特に限定されるものではないが、抗原の投与量として、例えば、マウス1匹当たり10~200 $\mu$ gとすることができる。

抗原を投与する際に、アジュバンドを同時投与してもよい。このようなア

ジュバントとしては、免疫反応を高力価で惹起することのできる従来公知のアジュバントを用いることができる。例えば、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウム等が挙げられる。

[0018] 本発明の抗体の製造方法により、ポリクローナル抗体を得ることができるが、続いて、従来公知の方法により抗体を精製して、純度の高い抗体とすることができる。

[0019] また、抗体を産生した被免疫動物の脾臓又はリンパ節等から抗体産生細胞を採取することにより、ハイブリドーマを製造することができ、また、モノクローナル抗体を得ることもできる。

[0020] 従来公知の方法として、ペプチドに対する抗体を作製しようとする場合には、キャリアタンパク質にペプチドを多数共有結合させた抗原が用いられる。

該ペプチドと、キャリアタンパク質の結合は、従来公知の方法により形成することができる。

キャリアタンパク質としては、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、ウシ血清アルブミン (B S A)、オボアルブミン (O V A)、マウス血清アルブミン (M S A)、ウサギ血清アルブミン (R S A) 等が挙げられる。

キャリアタンパク質に、上記ペプチドを結合させる場合には、上記ペプチドのN末端にシステインなどを付加し、キャリアタンパク質と結合するリンカーを用いることができる。

斯かるリンカーとしては、キャリアタンパク質と、システインを付加したペプチドとを共有結合できるリンカーであれば特に限定されるものではないが、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル (N H S エステル)、マレイミド、カルボジイミド等の官能基を有するリンカーが挙げられる。

[0021] 本発明の抗体を得るためには、抗原の投与方法としては、特に限定されるものではないが、抗体価を測定して、所望の抗体価が得られるまで抗原を投

与してもよい。

抗体価は、吸光度により測定することができる。抗体価は、被免疫動物から適宜採取した血液サンプルを用いて測定することができ、遠心分離等することにより夾雑物を除いた血清サンプルを用いることが好ましい。

抗体価は、特に限定されるものではないが、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay: 酵素免疫測定法) 等の従来公知の方法により、測定することができる。

追加免疫により所望の抗体価を示す血清が得られた場合には、従来公知の方法により精製して、ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡ 1型受容体に対する抗体を得ることができる。

[0022] 抗体の精製には、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマト精製や、塩析などの方法を用いることができ、このように血清サンプルから得られる抗体は、ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡ 1型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位を認識するポリクローナル抗体である。

ポリクローナル抗体の抗原特異性については、ELISA等の方法により確認することができる。

[0023] ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡ 1型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位を認識する抗体が得られることが分かった場合、従来公知の方法で、被免疫動物の脾臓又はリンパ節等から抗体産生細胞を採取することができる。得られた抗体産生細胞を用いて細胞融合を行うことによりハイブリドーマ(融合細胞)を得ることができる。抗体産生細胞と骨髓腫細胞(ミエローマ細胞)とを融合させることにより、ハイブリドーマを得ることができる。

抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な細胞株を使用することができる。ミエローマ細胞としては、例えば、マウス由来ミエローマP3/X63-AG8、P3/NS1/1-AG4-1、P3/X63-AG8.U1、SP2/O-AG14、F0あるいは

BW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag1.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GML500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15等が挙げられる。

[0024] 細胞融合させた後、スクリーニングすることにより、ハイブリドーマのみ選択的に増殖させることができる。スクリーニングの方法としては、HAT培地等で培養することが好ましい。この時、ハイブリドーマの増殖を助けるため、胸腺細胞等のフィーダー細胞と一緒に培養してもよい。得られたハイブリドーマが産出する抗体の抗原特異性は、培養上清をELISA等の公知の方法により測定して確認することで、所望の抗体産出が確認できたハイブリドーマのみを選択することができる。次いで、得られたハイブリドーマをクローニングすることにより、混在する目的以外の細胞を除き、単クローンからなるハイブリドーマを得ることができる。クローニングの方法としては、例えば、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法等が挙げられる。得られたハイブリドーマは従来公知の方法により凍結保存することができる。クローニング後のハイブリドーマから、従来公知の方法によりモノクローナル抗体を製造することができる。例えば、マウスの腹腔内でハイブリドーマを増殖させ、モノクローナル抗体を含む腹水を精製して製造することができる。また、無血清培地でハイブリドーマを培養し、その培養上清を精製することで製造することもできる。

[0025] 本発明において得られる抗体は、マウスを被免疫動物として用いた場合、マウス抗体であるが、従来公知の方法により、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体とすることができる。

[0026] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0027] 実施例1：抗rAT1aR(317-335)ポリクローナル抗体の作製

(1) ペプチド(rAT1aR(317-335))の合成

Fmoc固相合成法によりラットのアンギオテンシンII 1a型受容体の

細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位のアミノ酸配列を有するペプチド（rAT1aR（317-335）、配列番号1）の化学合成を行った。

#### （2）ポリクローナル抗体の作製

rAT1aR（317-335）のシステイン部分とマレイミド基導入済みキーホールリムペットヘモシアニン（KLH）を水溶液中で架橋し複合体を得た。生成されたペプチド-KLH複合体溶液を当量のフロイント完全アジュバントアジュバントと混合し、ウサギの背部皮下に2週間隔で4回投与した。さらに2週間後全採血を行い、ポリクローナル抗体「rAT1aR（317-335）/p」を得た。ELISAにより力価測定を行った。

#### [0028] 実施例2：抗rAT1aR（317-335）モノクローナル抗体の作製

##### （1）免疫

キーホールリムペットヘモシアニン（KLH）に結合させたペプチド（rAT1aR（317-335））を等量のフロイント完全アジュバントと混合し、マウス（Balb/c、雄、4週齢、日本クレア）の筋肉内に2週間隔で2回投与した。2週間以上経た後、KLH-ペプチドのみを静脈内投与した。

##### （2）細胞融合

静脈投与の4日後、マウスをペントバルビタールの過剰投与によって安楽殺し、脾臓を摘出した。脾細胞を分離して細胞数を計測し、2倍数のSP2/0（マウス骨髄腫由来細胞株、10%牛胎児血清（FCS）加ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）で培養したもの）と混合した。細胞を遠心回収し、37℃下、予め温めた50%ポリエチレングリコール（Roche）1mlを滴下した。37℃下で1分間攪拌した後、予め温めたDMEM 20mlを滴下した。室温下で遠心した後、37℃に5分間放置した。上清を除き、 $2 \times 10^5$ /mlとなるようにHAT培地（15%FCS、1x HAT（Roche）加DMEM）を加えた。100μl/穴となるように96穴マイクロプレートに分注し、37℃で培養した。4日後、HAT培地50μlを加えた。

### (3) スクリーニング

細胞集落の直径が200～300  $\mu\text{m}$ 程度になった時点で上清の一部を回収し、ペプチド (rAT1aR (317-335)) を抗原としたELISAに供した。

### (4) ハイブリドーマの培養

抗体陽性細胞はHT培地 (15%FCS、1xHA (Roche) 加DMEM) で数代継代した後、10%FCS加DMEMに順化させ、モノクローナル抗体「rAT1aR (317-335) /m」を得た。

## [0029] 試験1：免疫細胞染色におけるアンギオテンシンII 1a型受容体に対する抗体の特異性の評価

ラットアンギオテンシンII 1a型受容体を強制発現させたHEK293細胞とアンギオテンシンII AT1a受容体遺伝子が入っていないプラスミド (空ベクター) を導入したHEK293細胞について、実施例1及び実施例2で得られた抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体及び抗rAT1aR (317-335) モノクローナル抗体、導入したアンギオテンシンII 1a型受容体遺伝子を標識しているHA (Hemagglutinin) について免疫細胞染色を行った。またDAPIによる核染色も行った。

抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体についての結果を図1に、抗rAT1aR (317-335) モノクローナル抗体についての結果を図2に示す。

また、ラットアンギオテンシンII 1a型受容体を強制発現させたHEK293細胞について、3種の市販のアンギオテンシンII 1型受容体に対する抗体、c-572 (サンタクルズ社製)、AB15552 (メルク社製) 及びG-3: sc-515884 (サンタクルズ社製) について免疫細胞染色を行った。またラットアンギオテンシンII 1型受容体遺伝子を導入するためのベクターに含まれる蛍光蛋白DsRedの蛍光を測定した。結果を図3に示す。

その結果、抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体及び抗

rAT1aR (317-335) モノクローナル抗体についてはラットアンギオテンシンII 1a型受容体を発現した細胞を特異的に染色できることが示された。一方、市販のアンギオテンシンII 1型受容体に対する抗体については、いずれもベクターが導入されていない細胞についても染色されていることから、市販の抗体による細胞の染色は非特異的なものであることが示された。

[0030] 試験2：免疫組織染色における抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体及び抗rAT1aR (317-335) モノクローナル抗体の特異性の評価

実施例1及び実施例2で得られた抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体及び抗rAT1aR (317-335) モノクローナル抗体を用いて、マウスの肝臓組織について免疫組織染色を行った。

アンギオテンシンII 1a型受容体遺伝子欠損マウス（「AT1aR KOマウス」と称する）、アンギオテンシンII 1a型受容体遺伝子及びアンギオテンシンII 1b型受容体遺伝子欠損マウス（「AT1abR KOマウス」と称する）はそれぞれ染色体上のアンギオテンシンII 1a型受容体遺伝子、アンギオテンシンII 1a型受容体遺伝子とアンギオテンシンII

1b型受容体遺伝子の両方が欠失または機能不全にされたいわゆるノックアウトマウスであり、AT1aR KOマウスについては文献（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 3521-3525）、AT1abR KOマウスについては文献（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95: 15496-15501）記載の方法で作製されたマウスを使用した。コントロールとして野性型マウス（C57BL/6J、日本チャールス・リバー社）を使用した。

図4は抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体、図5は抗rAT1aR (317-335) モノクローナル抗体を用いたマウス肝臓組織の免疫組織染色の結果を示す写真である。その結果、抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色では、野性型マウスでは濃い染色像が認められた一方で、AT1aR KOマウスでは非常に

薄い染色像しか認められなかった。またAT1aR KOマウスでは染色像が認められ無かった。

AT1aR KOマウスにおける染色像は抗体の、マウスアンギオテンシンII 1b型受容体への結合によるものであると考えられる。これはアンギオテンシンII 1b型受容体の細胞内ドメインのアミノ酸残基317-335位アミノ酸配列はラットやマウスのアンギオテンシンII 1a型受容体のものと3残基しか相違しないために、抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体がマウスアンギオテンシンII 1b型受容体をも検出したものと考えられる。

野性型マウス体内のアンギオテンシンII 1型受容体は大部分がアンギオテンシンII 1a型受容体でありアンギオテンシンII 1b型受容体の発現量は非常に小さいため、抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体のアンギオテンシンII 1b型受容体への結合は通常のマウス組織においては問題とならないと考えられるが、AT1aR KOマウスでは、アンギオテンシンII 1b型受容体の発現が上昇するので、AT1aR KOマウスの組織染色で染色像が認められたものと考えられる。

これらの結果から、抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体がマウス肝臓組織の免疫組織染色においてアンギオテンシンII 1型受容体の特異的に染色できることが確認された。

抗rAT1aR (317-335) モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色でも同様の結果であったが、抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体をしたものと比較して染色像がより鮮明であった。

[0031] 試験3：ウエスタンブロットにおける抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体及び抗rAT1aR (317-335) モノクローナル抗体の特異性の評価

ラットアンギオテンシンII 1a型受容体を強制発現させたHEK293細胞におけるアンギオテンシンII 1a型受容体タンパク質の発現量を、実施例1及び実施例2で得られた抗rAT1aR (317-335) ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットの結果を比較した。

ーナル抗体及び抗 r A T 1 a R ( 3 1 7 - 3 3 5 ) モノクローナル抗体、導入したラットアンギオテンシン I I 1 a 型受容体遺伝子を標識している H A ( H e m a g g l u t i n i n ) を用いてウエスタンブロッティングにより測定した。対照としてラットアンギオテンシン I I 1 a 型受容体を強制発現させていない H E K 2 9 3 細胞を使用した。

[0032] 図6は抗 r A T 1 a R ( 3 1 7 - 3 3 5 ) ポリクローナル抗体、図7は抗 r A T 1 a R ( 3 1 7 - 3 3 5 ) モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。その結果、抗 r A T 1 a R ( 3 1 7 - 3 3 5 ) ポリクローナル抗体及び抗 r A T 1 a R ( 3 1 7 - 3 3 5 ) モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングでは、ラットアンギオテンシン I I 1 a 型受容体を強制発現させた H E K 2 9 3 細胞において、ラットアンギオテンシン I I 1 a 型受容体の発現が確認されると共に、ラットアンギオテンシン I I 1 a 型受容体を強制発現させていない H E K 2 9 3 細胞ではラットアンギオテンシン I I 1 a 型受容体タンパク質の発現は認められず、特異的な検出が可能であることが示された。

## 請求の範囲

- [請求項1] ほ乳類動物のアンギオテンシンⅡⅠ型受容体に対する抗体であって、
- (a) 配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド、又は
  - (b) 配列番号1のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として用いることにより得られる抗体。
- [請求項2] 抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。
- [請求項3] 抗体がモノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体

補正された請求の範囲  
[2022年12月23日(23.12.2022)国際事務局受理]

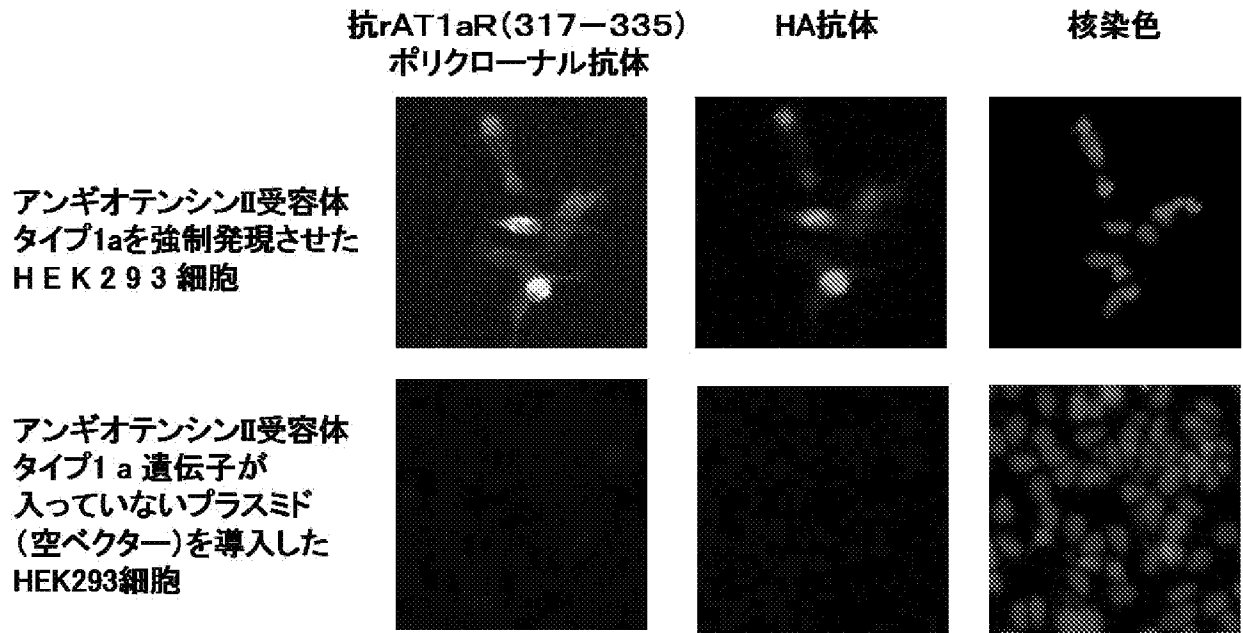
- 【請求項 1】 (補正後) ほ乳類動物のアンギオテンシン I I 1 a 型受容体に対する抗体であって、
- (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチド、又は
  - (b) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として用いることにより得られる抗体。
- 【請求項 2】 抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。
- 【請求項 3】 抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 に記載の抗体

## 条約第 19 条 (1) に基づく説明書

補正前の請求項 1 における「アンギオテンシン I I 1 型受容体」を補正後の請求項 1 において「アンギオテンシン I I 1 a 型受容体」としました。この補正は当初明細書段落 [0002] に根拠があります。

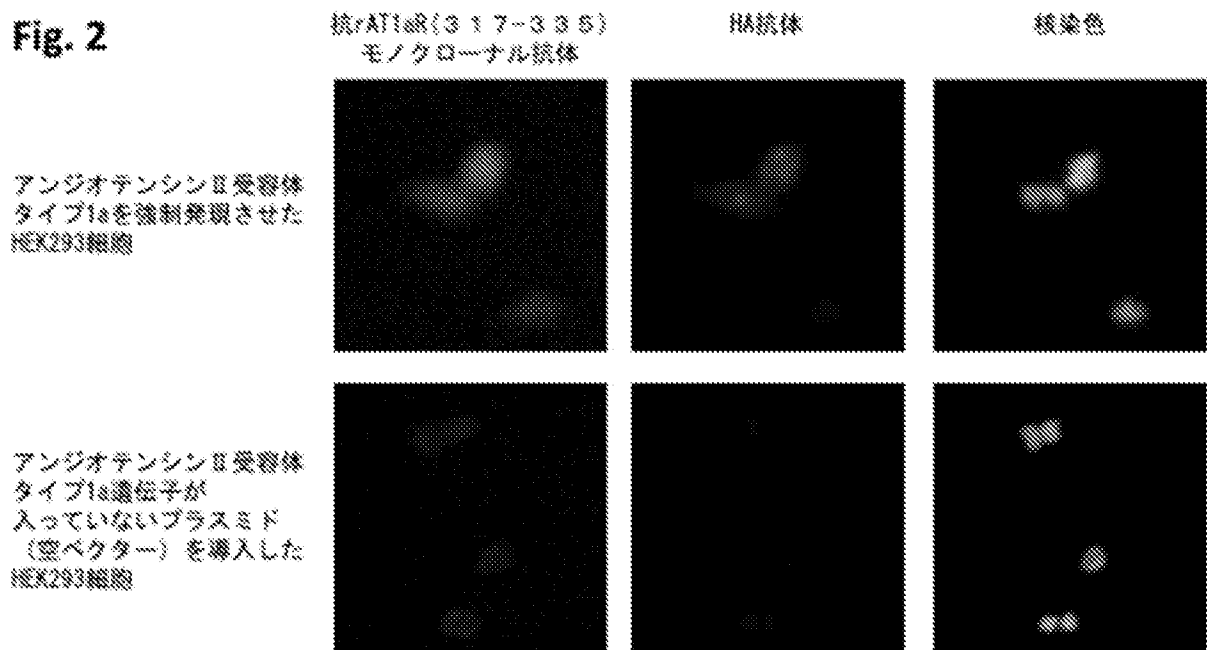
[図1]

Fig. 1



[図2]

Fig. 2



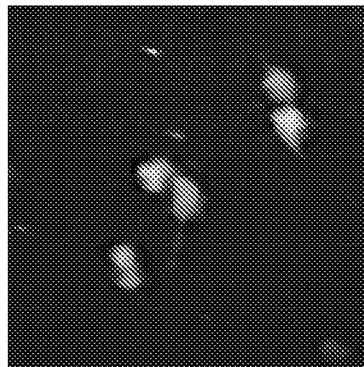
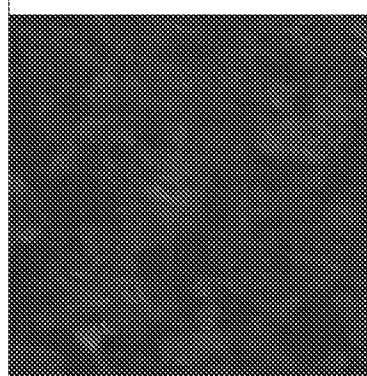
[図3]

Fig. 3

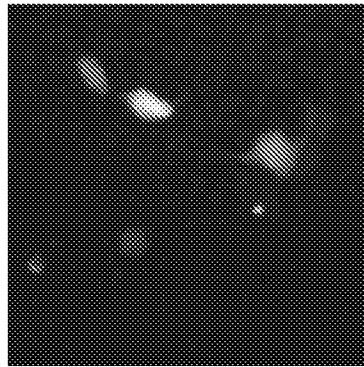
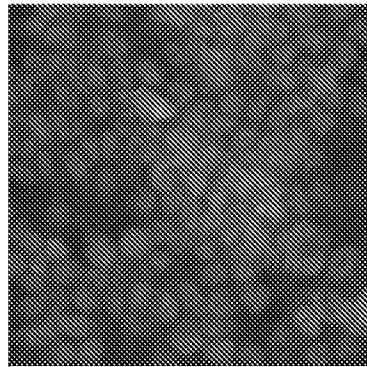
市販の抗AT1R抗体  
による染色

DsRed

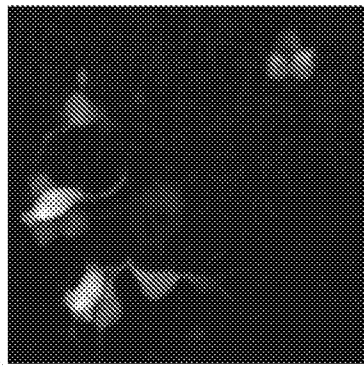
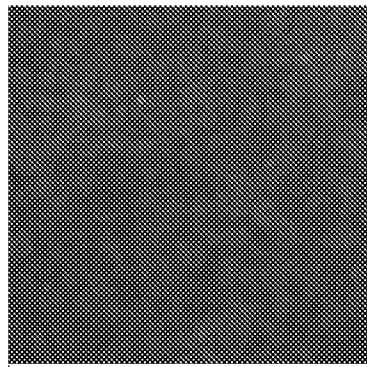
sc-579



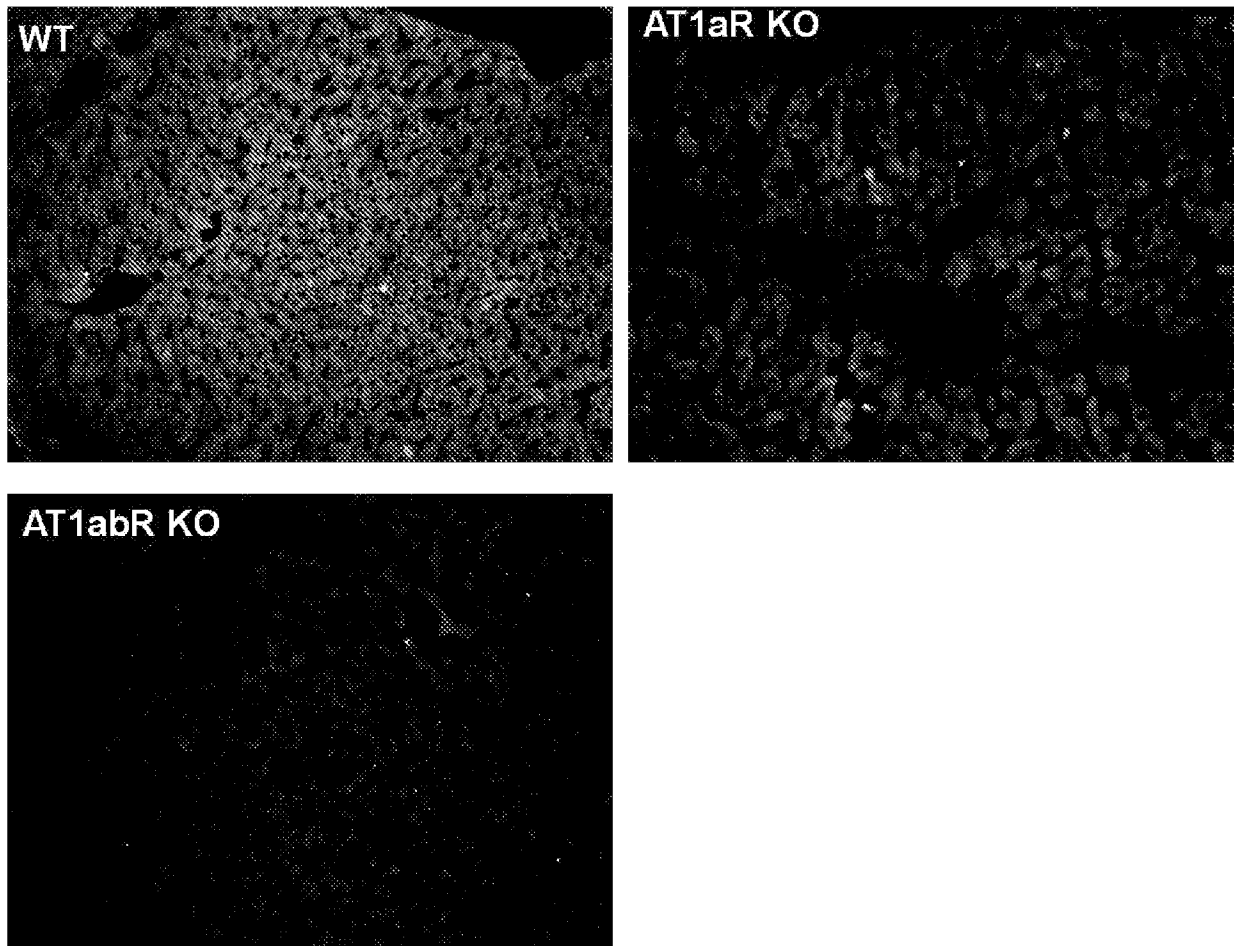
AB15552



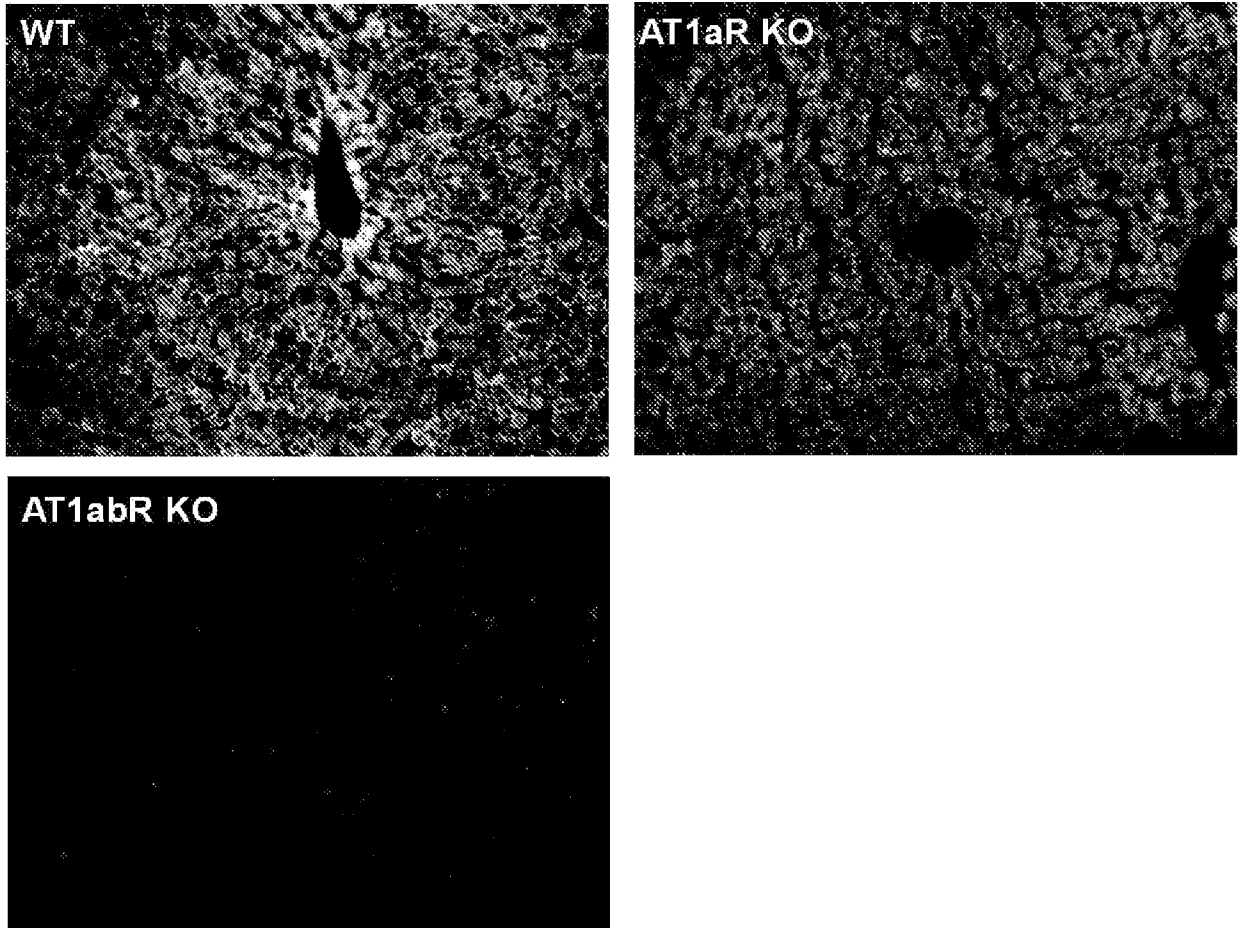
G-3: sc-515884



[図4]

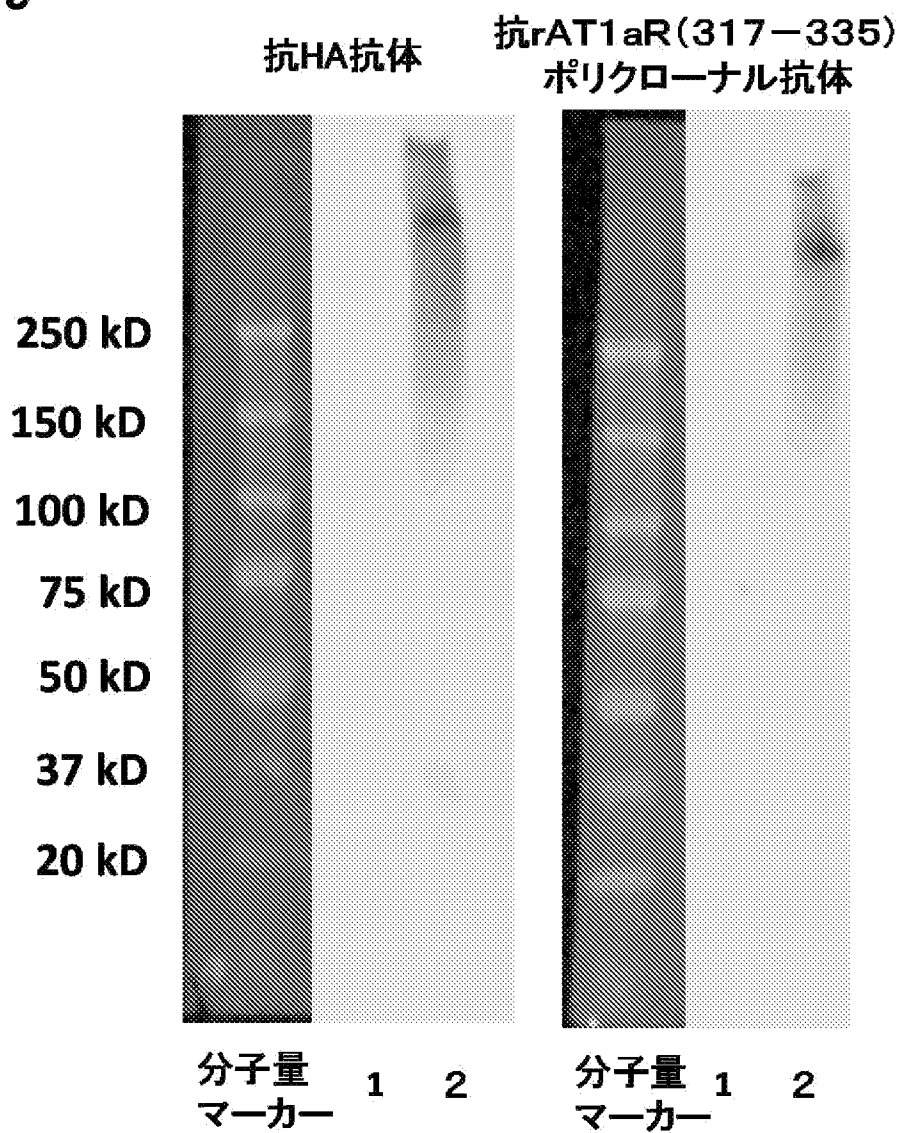
**Fig. 4** 抗rAT1aR(317-335) ポリクローナル抗体

[図5]

**Fig. 5** 抗rAT1aR(317-335) モノクローナル抗体

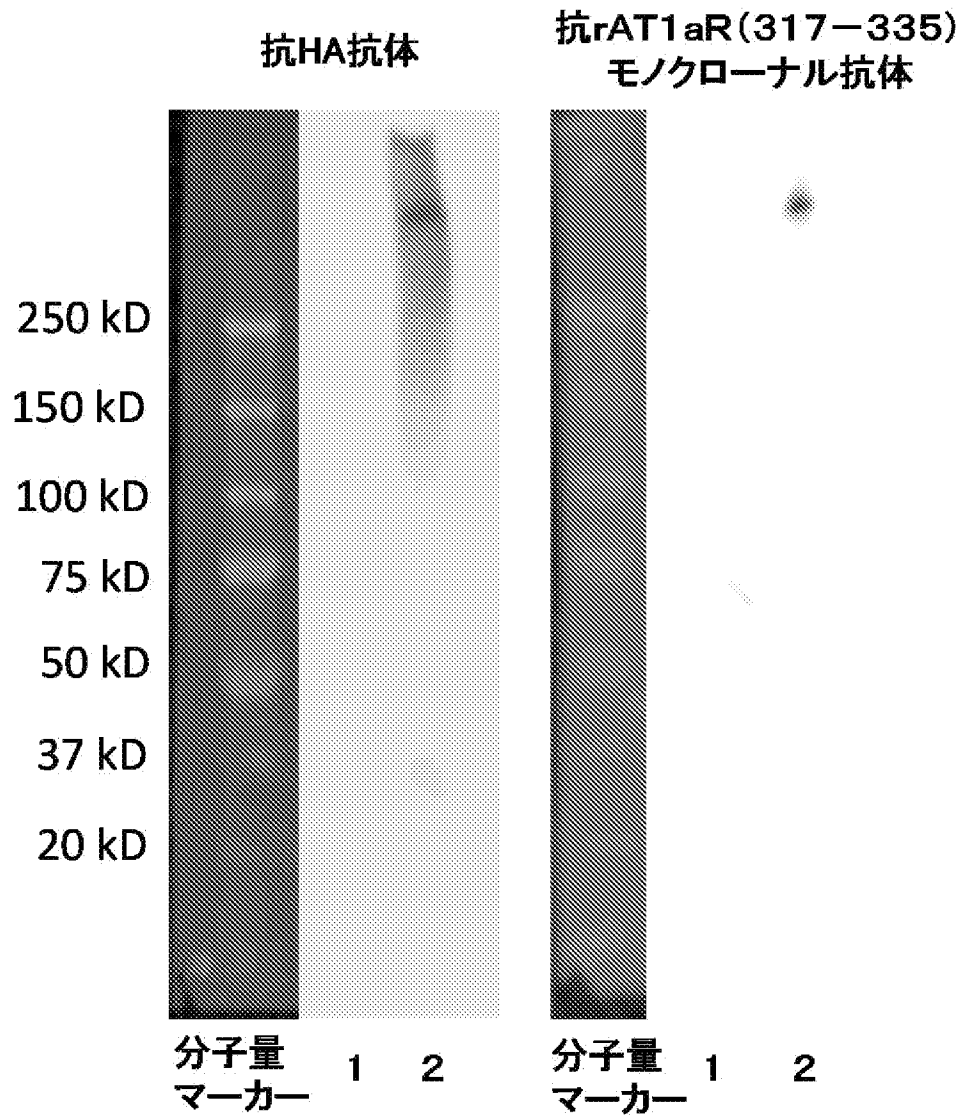
[図6]

Fig. 6



[図7]

Fig. 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/018051

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/13</i> (2006.01)i; <i>C07K 16/28</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/08</i> (2006.01)i FI: C12N15/13; C07K16/28; C12P21/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/13; C07K16/28; C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011-111422 A (SEKISUI CHEM. CO., LTD.) 09 June 2011 (2011-06-09) examples	1-3
X	BARKER, S. et al. A monoclonal antibody to a conserved sequence in the extracellular domain recognizes the angiotensin II AT1 receptor in mammalian target tissues. Journal of Molecular Endocrinology. paragraph [1993], vol. 11, no. 2, pages 241-245 particularly, abstract, Materials and methods	1-3
X	SUN, S. et al. Gentisic acid prevents the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. Sci Rep. 2019, vol. 9, no. 3018, pages 1-14 particularly, Materials and methods	1-3
X	PIZZATTO, L. N. et al. Angiotensin II Regulates Proliferation and Function of Stem Cells of Apical Papilla. J Endod. 2020, vol. 46, no. 6, pages 810-817 particularly, Materials and methods	1-3
A	AT1 (G-3):sc-515884. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. Catalog [online]. [retrieved on 17 June 2022], < <a href="https://datasheets.scbt.com/sc-515884.pdf">https://datasheets.scbt.com/sc-515884.pdf</a> > particularly, section of Source	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>17 June 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>05 July 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2022/018051**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2011-111422 A	09 June 2011	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/13(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i FI: C12N15/13; C07K16/28; C12P21/08		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/13; C07K16/28; C12P21/08 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2011-111422 A (積水化学工業株式会社) 09.06.2011 (2011-06-09) 実施例	1-3
X	BARKER, S. et al., A monoclonal antibody to a conserved sequence in the extracellular domain recognizes the angiotensin II AT1 receptor in mammalian target tissues, Journal of Molecular Endocrinology (1993), Vol. 11, No. 2, pp. 241-245 特にAbstract, Materials and methods	1-3
X	SUN, S. et al., Gentisic acid prevents the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure, Sci Rep, 2019, Vol.9, No. 3018, pp.1-14 特にMaterials and methods	1-3
X	PIZZATTO, L.N. et al., Angiotensin II Regulates Proliferation and Function of Stem Cells of Apical Papilla, J Endod, 2020, Vol.46, No.6, pp.810-817 特にMaterials and methods	1-3
A	AT1(G-3):sc-515884, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC カタログ [online], [検索日2022.6.17], <https://datasheets.scbt.com/sc-515884.pdf> 特にSOURCEの項	1-3
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	17.06.2022	国際調査報告の発送日 05.07.2022
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  林 康子 4B 1195  電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/018051

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2011-111422 A	09.06.2011	(ファミリーなし)	