

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年4月2日 (02.04.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/041734 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/068003
- (22) 国際出願日: 2008年9月26日 (26.09.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-249687 2007年9月26日 (26.09.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和発酵キリン株式会社 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 甲斐正之 (KAI,

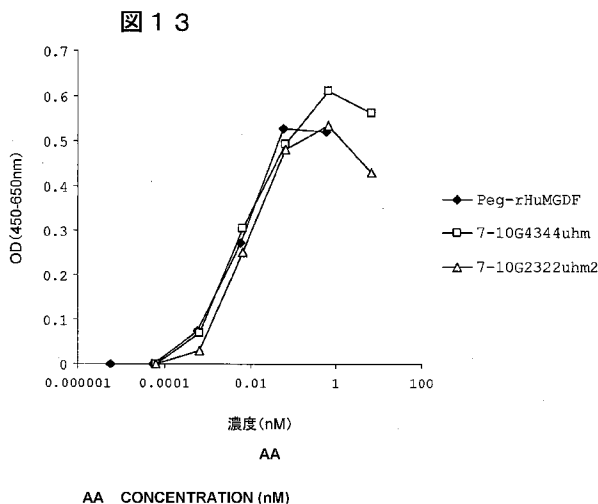
Masayuki) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地キリンファーマ株式会社 探索研究所内 Gunma (JP). 元木一宏 (MOTOKI, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地キリンファーマ株式会社 探索研究所内 Gunma (JP). 片岡之郎 (KATAOKA, Shiro) [JP/JP]; 〒1508011 東京都渋谷区神宮前六丁目2番1号キリンファーマ株式会社内 Tokyo (JP). 吉田英明 (YOSHIDA, Hideaki) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地キリンファーマ株式会社 探索研究所内 Gunma (JP). 萩原哲也 (HAGIWARA, Tetsuya) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地キリンファーマ株式会社 探索研究所内 Gunma (JP).

- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

[続葉有]

(54) Title: AGONISTIC ANTIBODY AGAINST HUMAN THROMBOPOIETIN RECEPTOR

(54) 発明の名称: ヒトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体



(57) Abstract: Disclosed is an agonistic antibody against a human thrombopoietin receptor (also referred to as "human c-Mp1"). Specifically disclosed are: an agonistic antibody against a human thrombopoietin receptor, which has constant regions comprising amino acid sequences selected from the following items (1) to (3): (1) an amino acid sequences for a heavy-chain constant region of a human antibody and an amino acid sequence for a light-chain constant region of a human antibody, (2) an amino acid sequence for a heavy-chain constant region of a human antibody in which the places of domains in the heavy-chain constant region are changed among subclasses of the human antibody and an amino acid sequence for a light-chain constant region of a human antibody; and (3) amino acid sequences of the item (1) or (2) wherein each of the amino acid sequences has the deletion, substitution, addition or insertion of one or several amino acid residues; and which also has variable regions capable of binding to the human thrombopoietin receptor to activate the receptor. Also disclosed is a pharmaceutical composition for the treatment of thrombocytopenia, which comprises the antibody.

[続葉有]



WO 2009/041734 A1



GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(57) 要約: 本発明は、ヒトロンボポエチン受容体 (別名: ヒトc-Mpl) に対するアゴニスト抗体を提供する。抗体の定常領域が、(1)ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、(2)ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは(3)前記(1)又は(2)のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の変換領域がヒトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、ヒトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体、並びに、その抗体を含む血小板減少症治療用医薬組成物。

明 細 書

ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体

技術分野

本発明は、ヒトトロンボポエチン受容体（別名：ヒト c-Mpl）に対するアゴニスト抗体に関する。

さらに本発明は、抗ヒト c-Mpl アゴニスト抗体を有効成分とする、臨床上血小板を増多させる必要のある患者／疾患に対する治療剤、特に血小板減少症治療剤に関する。

背景技術

<TPO と TPO 受容体について>

トロンボポエチン (Thrombopoietin: TPO) は、生体内で巨核球および血小板の増殖を促進する造血因子である。ヒト TPO は全長 332 アミノ酸残基からなる糖タンパク質であり、その活性には N 末端側の配列が重要であることが知られている。細胞膜上の TPO 受容体と結合することで機能を発揮する。

c-Mpl は、現在知られている唯一の TPO 受容体である。ヒト c-Mpl は、シグナルペプチドを含むと 635 アミノ酸、成熟型は 610 アミノ酸からなる膜一回貫通型糖タンパク質であり、I 型のサイトカイン受容体ファミリーに属している。ヒト c-Mpl のメッセンジャーRNA およびタンパク質の配列は既に報告されている (Genbank: NM_005373, NP_005364 参照)。同じファミリーの分子としてエリスロポエチン受容体 (EpoR) や、G-CSF 受容体 (G-CSFR)、インターロイキン 3 受容体 (IL-3R) などを挙げるができる。ヒト c-Mpl は細胞外に 2 つの CRH (Cytokine Receptor Homologue) ドメイン (N 末端側から CRH1, CRH2 と呼ばれる) を持ち、そのなかにサイトカイン受容体ファミリーに特徴的な WSXWS モチーフを含んでいる。細胞内ドメインには Box1, Box2 と呼ばれる二つの配列があり、これらはシグナル伝達に必須である。TPO は CRH1 に結合し、c-Mpl を二量体化することでシグナルを入れると考えられているが、詳細な結合および活性化の様式は解明されて

いない。c-Mpl が二量体化すると、細胞内ドメインに結合したシグナル伝達キナーゼが活性化され、リン酸化シグナルが細胞内に伝えられる。TPO-Mpl シグナルによって Jak-STAT, PI3K-Akt, Ras-MAPK の各経路が動かされることが知られている。TPO または c-Mpl を欠損したマウスは、血小板数が野生型マウスの 10-20%程度まで減少することが報告されており、TPO-Mpl システムが血小板数を調節する主要なシステムであることを示している。c-Mpl の発現は、巨核球のみならず、さらに未分化な造血前駆細胞や造血幹細胞にも認められる。骨髄中の c-Mpl 陽性細胞画分は、c-Mpl 陰性画分に比べ、高い骨髄再構築能を持っていることが示されており、また、c-Mpl 欠損マウスでは巨核球・血小板だけではなく造血幹細胞も減少していることが判っている（非特許文献 1, 2 参照）。これらの知見から、TPO-Mpl システムが造血系に幹細胞レベルから関与していることが示唆されている。

TPO がクローニングされて以来、血小板減少症の治療薬としての利用が期待され、これまでに二種類の組換え型 TPO の臨床試験が行われている（非特許文献 3 参照）。完全長のヒト TPO (rhTPO) と、ヒト TPO の活性部位である N 末端側 163 アミノ酸のペプチド配列をポリエチレングリコール (PEG) 化した PEG-rHuMGDF (Pegylated Recombinant Human Megakaryocyte Growth and Development Factor) である。臨床試験において、これらの組換え型 TPO は健常人および特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura : ITP) 患者の血小板を増加させることに成功している。また、骨髄非破壊的な化学療法に伴う血小板減少症を軽減させる効果が示されている。さらに、例数は少ないながらも、再生不良性貧血 (Aplastic Anemia : AA)、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic Syndrome : MDS) の患者に対しても組換え型 TPO の有効性が報告されている（非特許文献 4, 5）。

<c-Mpl アゴニスト抗体について>

TPO と同様に c-Mpl を介してシグナルを入れる性質を持ちながら、分子としては全く異なる種々の TPO ミメティクスが研究されている（非特許文献 6, 7 参照）。ミメティクスには大きく分けて、ペプチド性低分子、非ペプチド性低分子、抗体由来分、アゴニスト抗体などが知られている。

公知の抗 c-Mpl アゴニストヒト抗体として、12B5, 12E10, 12D5 (特許文献 1 参照) を挙げるができる。これらは全長抗体 (Whole antibody、例えば Whole IgG) の形態でプライマリーヒト細胞に対する活性を持たない。なお、本明細書で使用するプライマリーヒト細胞とは、TPO に対して高感受性を有する樹立された特殊な株化細胞や TPO 受容体遺伝子を遺伝子組換え技術により導入し該受容体を高発現させた細胞ではなく、ヒト臍帯血やヒト骨髓由来の CD34+細胞等の本来生体内で TPO の作用対象となっている細胞を意味する。

また、公知のアゴニストマウス抗体として、BAH-1 (特許文献 2, 非特許文献 8 参照), VB22B (特許文献 3 参照) を挙げるができるが、マウス抗体はヒト血中において抗原性を示すことが知られており、医薬品としての利用には適さない。また、一般に、アゴニスト抗体を、全長抗体で、例えば CDR grafting 等の方法を用いて、その活性を保ったままヒト化することは困難である (特許文献 3, 非特許文献 9 参照)。従って、上記のような公知のアゴニスト抗体が存在するとしても、プライマリー細胞に作用するアゴニストヒト抗体の創出は容易ではない。

また前述の TPO ミメティクスで述べた抗体由来の低分子も、ある種のアゴニスト抗体であり、抗体の一部を利用改変した Diabody, 一本鎖 (Fv)₂ (sc(Fv)₂) が報告されている (特許文献 1, 3 参照)。しかしながら、この方法によって作出された改変抗体は、分子の大幅な改変による抗原性が懸念されるうえ、全長抗体に比べ血中半減期が短縮される等、医薬品として利用するためには課題が多い。

以上、全長抗体は低抗原性や血中半減期の長さ等、医薬品として有用な性質を備えている一方、上述のように、全長抗体で十分な活性を持つアゴニストヒト抗体を作製するのは容易ではない。

そこで、以下に述べるように、本発明者らは、抗体の構造に大幅な改変を加えることなく、十分な活性を持ったアゴニストヒト抗体の取得を試み、その取得に至った。さらに抗体のヒンジ領域に改変を加え、アゴニスト活性を増強することに成功した。本発明によって作出された抗体は血小板減少症治療薬としての利用に適していると考えられる。

非特許文献 1 宮崎洋, 「トロンボポエチンの将来展望」, Japanese Journal of Transfusion Medicine, 46(3), 311-316, 2000

- 非特許文献 2 Murone M ら, Stem Cell 16:1-6, 1998
- 非特許文献 3 Kuter DJ ら, Blood 100(10):3457-69, 2002
- 非特許文献 4 Yonemura Y ら, Int J Hemat (82) 307-309, 2005
- 非特許文献 5 Komatsu N ら, Blood 96 296a, 2000
- 非特許文献 6 Broudy VC ら, Cytokine. 25(2):52-60, 2004
- 非特許文献 7 Wang B ら, Clin Pharmacol Ther. 76(6):628-38, 2004
- 非特許文献 8 Deng B ら, Blood 92(6):1981-1988, 1998
- 非特許文献 9 Ji Hee Son ら, Journal of Immunological Methods
286:187-201, 2004
- 特許文献 1 国際公開第 WO 99/10494 号パンフレット
- 特許文献 2 国際公開第 WO 99/03495 号パンフレット
- 特許文献 3 国際公開第 WO 2005/056604 号パンフレット

発明の開示

本発明の目的は、新規な抗ヒト c-Mpl アゴニスト抗体を提供することである。

本発明において、抗体とは、これまで全長抗体では困難であった、ヒト c-Mpl に対し天然のリガンドである TPO とほぼ同等のシグナルを入れることができ、プライマリーヒト細胞に対する増殖刺激活性を有する抗体である。

本発明の第 2 の目的は、抗体の断片化を行わずにアゴニスト抗体の活性を高める技術を提供することにより、抗体分子が本来持つ長半減期、低抗原性といった医薬品として望ましい性質を有する新規な抗ヒト c-Mpl アゴニスト抗体を提供することである。

上記課題を解決するため、本発明者らは、抗ヒト c-Mpl アゴニスト抗体の研究に鋭意取り組んだ。その結果、全長抗体で、天然リガンドとほぼ同等のシグナルを生じ、ヒトプライマリー細胞に対する活性を有するヒト抗体を取得した。また、取得したアゴニスト抗体につき更に鋭意検討を行い、抗体の断片化を行わずにそのアゴニスト活性を高める改変方法を見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、要約すると、以下の特徴を含む。

[1] 抗体の定常領域が、以下の(1)～(3)：

- (1) ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
- (2) ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
- (3) 前記(1)又は(2)のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
- のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び/又は(b)：

- (a) ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法において、10,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、
- (b) UT7/TPO 細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、そのN末端がPEG(PEG)化された配列番号1のアミノ酸配列からなる下記の構造：

PEG-NH-SPAPPACDLRVLKLLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILG
AVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRG
KVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH

を有する PEG-rHuMGDF の50%以上であり、且つ50%有効濃度 (EC50) が100nM以下であること、

の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体であって、以下の(1)～(2)：

- (1) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号3で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
- (2) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号3で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
- からなる群から選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有し、
- 重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側が、ヒトイムノグロブリンG2のアミノ酸配列において、Kabat EU 番号付けにおける331位プロリンがセリンに置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体。

[2] 抗体の定常領域が、以下の(1)～(3)：

(1) ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
 (2) ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
 (3) 前記(1)又は(2)のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
 のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び/又は(b)：

(a) ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法において、10,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、

(b) UT7/TP0細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、そのN末端がペグ(PEG)化された配列番号1のアミノ酸配列からなる下記の構造：

PEG-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILG
 AVTLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRG
 KVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH

を有する PEG-rHuMGDF の50%以上であり、且つ50%有効濃度 (EC50) が100nM以下であること、

の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体であって、以下の (a) ~ (d)：

(a) 配列番号95のアミノ酸配列である重鎖、及び配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖

(b) 配列番号95のアミノ酸配列である重鎖、及び配列番号3のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖

(c) 配列番号96のアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含む重鎖定常領域、及び配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖

(d) 配列番号96のアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含む重鎖定常領域、及び配列番号3のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖

からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を有する抗体。

[3] ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、前記[1]又は[2]に記載の抗体。

[4] 前記[1]～[3]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

[5] 前記[1]～[3]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む血小板増多剤。

[6] 骨髄移植又は臍帯血移植時の血小板回復促進用である、前記[5]に記載の血小板増多剤。

[7] 前記[1]～[3]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む血小板減少症治療剤。

[8] 血小板減少症が、以下の(1)～(6)：

- (1) 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、
- (2) 癌化学療法後の血小板減少症、
- (3) 再生不良性貧血、
- (4) 骨髄異形性症候群 (MDS)、
- (5) 肝疾患にともなう血小板減少症、及び
- (6) 骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症、

からなる群から選択される疾患のいずれか1つである、請求項7に記載の血小板減少症治療剤。

[9] 以下の(1)～(4)：

- (1) 配列番号95のアミノ酸配列である重鎖と、配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (2) 配列番号95のアミノ酸配列である重鎖と、配列番号3のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (3) 配列番号96のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (4) 配列番号96のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号3のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

からなる群から選択される、重鎖をコードする塩基配列を含む DNA 及び軽鎖をコードする塩基配列を含む DNA と、それらの DNA の発現を制御する塩基配列を含む 1 又は複数の DNA とを保持する哺乳動物細胞を作製し、該哺乳動物細胞を培養した培養液から、該重鎖及び軽鎖からなる抗体をコードする DNA の発現産物を単離精製することを含む、ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体の製造方法。

[10] 以下の(1)～(2)：

(1) 配列番号 95 で示されるアミノ酸配列、

(2) 配列番号 96 で示されるアミノ酸配列、及び

からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA。

[11] 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖をコードする DNA であつて、抗体重鎖のミドルヒンジ部以降の C 末端側が、ヒトイムノグロブリン G2 のアミノ酸配列或いは該 G2 のアミノ酸配列において Kabat EU 番号付けにおける 331 位プロリンがセリン置換されたアミノ酸配列を有する DNA。

[12] 前記[1]～[3]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む造血幹細胞移植後の血球回復促進用である血球増多剤。

1. ヒトトロポポエチン受容体に対するアゴニスト抗体

本発明にかかるヒトトロポポエチン受容体に対するアゴニスト抗体は、以下の(1)～(6)に示す抗体を含む。

(1) 抗体の定常領域が以下の(i)～(iii)：

(i) ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、

(ii) ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは

(iii) 前記(i)又は(ii)のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、

のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロポポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び/又は(b)：

(a) ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法において、10,000ng/mL 以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、

(b) UT7/TPO 細胞を用いた増殖能測定法において、活性が下記の構造を有する PEG-rHuMGDF の 50%以上であり、かつ 50%有効濃度 (EC50) が 100nM 以下であること、

の性質を有する、ヒトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体。

本明細書中、ヒト抗体サブクラスは、IgG1, IgG2, IgG3 及び IgG4 を含む。ヒトイムノグロブリンの定常領域等の配列は、例えば NCBI ホームページ (GenBank、UniGene など) から入手可能であり、例えばヒト IgG1 重鎖定常領域については登録番号 J00228、ヒト IgG2 重鎖定常領域については登録番号 J00230、ヒト IgG3 重鎖定常領域については登録番号 X03604、ヒト IgG4 重鎖定常領域については登録番号 K01316、ヒト軽鎖 κ 定常領域については登録番号 V00557, X64135, X64133 など、ヒト軽鎖 λ 定常領域については登録番号 X64132, X64134 などを含むことができる。

本明細書中、ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法とは、後述の実施例 6 に記載した測定法を意味し、コロニー形成に必要な抗体の濃度は、この測定法に基づき求めることができる。

本明細書中、UT7/TPO 細胞を用いた増殖能測定法とは、後述の実施例 5 に記載した測定法を意味し、増殖活性及び EC50 はこの測定法に基づき求めることができる。

本明細書中、PEG-rHuMGDF とは、ヒト TPO のアミノ末端受容体結合ドメインを含むトランケート化タンパク質をコードする cDNA を含有するプラスミドで形質転換された大腸菌 (*E. coli*) を使用して産生される (Ulich ら, Blood 86:971-976 (1995)) ポリペプチドを抽出し、リフォールディングし、精製し、そのアミノ末端にポリエチレングリコール (PEG) 部分を共有結合させた配列番号 1 のアミノ酸配列を有する分子であり、以下の構造：

PEG-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILG
AVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRG
KVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH

を有するものである。

本明細書中、ヒト c-Mpl を活性化するには、ヒト c-Mpl を発現している細胞に

においてヒト c-Mpl に係る細胞内シグナル伝達を起こすことをいう。

本明細書中、数個なる用語は、2～約10個、例えば2～9個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個、又は2～3個の整数を意味する。

(2) 上記コロニー形成測定法によりコロニー形成を誘導する活性を有し、及び／又は、上記 UT7/TPO 細胞を用いた増殖能測定法により細胞増殖活性を有する抗体のうち、コロニー形成活性については 10,000ng/mL 以下の濃度でコロニー形成を誘導する活性を有する、好ましくは 1,000ng/mL 以下の濃度で該活性を有する、より好ましくは 100ng/mL 以下の濃度で該活性を有する上記 (1) の抗体。

(3) 上記細胞増殖活性が PEG-rHuMGDF の 50%以上、好ましくは 70%以上、より好ましくは 90%以上の活性を示し、50%有効濃度 (EC50) が、100nM 以下、好ましくは 10nM 以下、より好ましくは 1nM 以下のものである上記 (1) の抗体。

(4) 上記コロニー形成測定法及び上記増殖能測定法の両者の測定方法によりそれぞれ以下の活性を示す上記 (1) の抗体。

(i) 以下の(a)および(b)の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体。

(a) ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法において、10,000ng/mL 以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

(b) UT7/TPO 細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が下記の構造を有する PEG-rHuMGDF の 50%以上であり、かつ 50%有効濃度 (EC50) が 100nM 以下である。

(ii) 以下の(a)および(b)の性質を有する、ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体。

(a) ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法において、1,000ng/mL 以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

(b) UT7/TPO 細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が PEG-rHuMGDF の 70%以上であり、かつ EC50 が 10nM 以下である。

(iii) 以下の(a)および(b)の性質を有する、ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体。

(a) ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法において、100ng/mL 以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

(b) UT7/TPO 細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が PEG-rHuMGDF の 90%

以上であり、かつ EC50 が 1nM 以下である。

(5) 以下の (a) ~ (h) からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列可変領域及び軽鎖アミノ酸配列可変領域を有する上記 (1) の抗体。(カッコ内に、各可変領域配列が由来する後述実施例の抗体の名称を示す。)

(a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。(抗体の名称 : 7-10)

(b) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 5 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。(抗体の名称 : 4-49)

(c) 配列番号 6 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 7 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。(抗体の名称 : 6-4-50)

(d) 配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。(抗体の名称 : 6-5-2)

(e) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 3 で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

(f) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 5 で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

(g) 配列番号 6 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 7 で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

(h) 配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 9 で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

(6) 以下の (a) ~ (d) からなる群から選択される上記 (1) の抗体

(a) 配列番号 9 5 で示されるアミノ酸配列である重鎖、及び配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体

(b) 配列番号 9 5 で示されるアミノ酸配列である重鎖、及び配列番号 3 で示され

るアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体

(c) 配列番号96で示されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域、及び配列番号3で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体

(d) 配列番号96で示されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域、及び配列番号3で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体

(7) ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、上記(1)～(6)に記載の抗体。

2. 重鎖改変アゴニスト抗体

本発明に係る重鎖改変アゴニスト抗体とは、以下のものを含む。

(1) 重鎖定常領域のアップーヒンジ部が、以下の(a)～(b)のアミノ酸配列から選択されるいずれか1つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側がヒトイムノグロブリンG4のアミノ酸配列或いは該G4のアミノ酸配列においてADCC(抗体依存性細胞障害)活性等に係るアゴニスト抗体として好ましくない性質に関する部位を変異させたアミノ酸配列を有するアゴニスト抗体。

(a) 配列番号10で示されるアミノ酸配列。

(b) 配列番号11で示されるアミノ酸配列。

本明細書の中で用いるアップーヒンジ(Upper hinge)とは、Kabat EU番号付け(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991))による表記で216位以降、226位よりN末端側の配列を指す。ミドルヒンジ(Middle hinge)とは、同表記で226位以降、231位よりN末端側の配列を指す。ヒトイムノグロブリンG4を含む各サブタイプにつき、アップーヒンジ、ミドルヒンジ及びその前後のアミノ酸配列を図4Bに示す。図中、CH1はアップーヒンジに隣接するCH1領域の一部、CH2はCH2領域中のローワーヒンジ(lower hinge)と称される部分である。

(2) 上記重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側が、ヒトイムノグロブ

リン G4 のアミノ酸配列において、Kabat EU 番号付けにおける 228 位セリンがプロリンに且つ 235 位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体。

(3) 以下の(i)又は(ii)に示された、ヒト c-Mpl に対するアゴニストヒト抗体である上記(2)の重鎖改変抗体。

(i) 重鎖定常領域のアップーヒンジ部が以下の(a)～(b)のアミノ酸配列から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降の C 末端側がヒトイムノグロブリン G4 のアミノ酸配列或いは該 G4 のアミノ酸配列において Kabat EU 番号付けにおける 228 位セリンがプロリンに且つ 235 位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含むヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体。

(a) 配列番号 10 で示されるアミノ酸配列。

(b) 配列番号 11 で示されるアミノ酸配列。

(ii) 更に好ましい実施形態としては、以下 (a) ～ (h) からなる群から選択される、上記(i)に記載のヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体を挙げることができる。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

(b) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

(c) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

(d) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

(e) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

(f) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 5 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

(g) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号7のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

(h) 配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号9のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

(4) 上記重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側が、ヒトイムノグロブリンG2のアミノ酸配列において、Kabat EU番号付けにおける331位プロリンがセリンに置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(5) 以下の(a)又は(b)に示される、ヒトc-Mplに対するアゴニストヒト抗体である上記(4)の重鎖改変抗体

(a) 配列番号95のアミノ酸配列である重鎖、及び配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体

(b) 配列番号95のアミノ酸配列である重鎖、及び配列番号3のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体

(c) 配列番号96のアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含む重鎖定常領域、及び配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体

(d) 配列番号96のアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含む重鎖定常領域、及び配列番号3のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体

3. ヒトc-MPLに対するアゴニスト抗体の医薬用途及び医薬組成物

本発明に係るヒトc-MPLに対するアゴニスト抗体は、c-Mpl受容体に結合しそれを活性化する能力、および/または(インビゴおよびインビトロの両方で)血小板の産生を刺激する能力(「血小板生成活性」)および血小板前駆体の産生を刺激する能力(「巨核球生成活性」)を有する。

本発明に係るヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物/医薬用途としては、具体的には次のものを挙げることができる。

(1) 上記1.(1)～(6)及び同2.(3)のいずれかの抗体を有効成分とする医薬組成物。

(2) 上記1.(1)～(6)及び同2.(3)のいずれかに記載の抗体を有効成分とする血小板増多剤。

(3) 骨髄移植、臍帯血移植時の血小板回復促進用であることを特徴とする上記(2)に記載の血小板増多剤

(4) 上記1.(1)～(6)及び同2.(3)のいずれかの抗体を有効成分とする血小板減少症治療剤。

(5) 血小板減少症が、以下の(a)～(f)のいずれか1つである、上記(4)に記載の血小板減少症治療剤。

(a) 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、

(b) 癌化学療法後の血小板減少症、

(c) 再生不良性貧血、

(d) 骨髄異形性症候群 (MDS)、

(e) 肝疾患にともなう血小板減少症、又は

(f) 骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症。

(6) 造血幹細胞移植後の血球回復促進用であるヒト c-Mpl アゴニスト抗体を有効成分として含む血球増多剤。

(7) 上記1.(1)～(6)及び同2.(3)のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む上記(6)に記載の血球増多剤。

4. 本発明に係る抗体の製造方法

本発明の抗体は、本発明に係る抗体を産生するハイブリドーマを用いて抗体を製造してもよいし、又は、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を製造することもできる。本発明の抗体の製造方法として、好ましくは、以下の方法が挙げられる。

下記の(a)～(1)：

(a) 配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

- (b) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (c) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (d) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (e) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (f) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 5 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (g) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 7 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、及び
- (h) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 9 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (i) 配列番号 9 5 のアミノ酸配列である重鎖と、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列
- (j) 配列番号 9 5 のアミノ酸配列である重鎖と、配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列
- (k) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含む重鎖定常領域と、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列
- (l) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含む重鎖定常領域と、配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列からなる群から選択される、重鎖をコードする塩基配列を含む DNA 及び

軽鎖をコードする塩基配列を含む DNA と、それらの DNA の発現を制御する塩基配列を含む 1 又は複数の DNA とを保持する哺乳動物細胞を作製し、該哺乳動物細胞を培養した培養液から、該重鎖及び軽鎖からなる抗体をコードする DNA の発現産物を単離精製することを含む、ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体の製造方法。

5. 本発明に係る DNA

本発明に係る DNA として、以下のものを挙げるができる。

(1) ヒト Mpl に対するアゴニスト抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む新規な DNA であって、以下の (a)～(d) からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA:

- (a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列;
- (b) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列;
- (c) 配列番号 6 で示されるアミノ酸配列;
- (d) 配列番号 8 で示されるアミノ酸配列。

(2) ヒト Mpl に対するアゴニスト抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む新規な DNA であって、以下の (a)～(h) からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA:

- (a) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列;
- (b) 配列番号 5 で示されるアミノ酸配列;
- (c) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列;
- (d) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列;
- (e) 配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
- (f) 配列番号 5 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
- (g) 配列番号 7 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
- (h) 配列番号 9 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列。

(3) 上記 (1) 又は (2) の DNA が、それぞれ可変領域及び定常領域を含む抗

体重鎖或いは軽鎖をコードする DNA。

(4) 抗体の重鎖定常領域のアップーヒンジ部が、以下の(a)及び(b)のアミノ酸配列から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側がヒトイムノグロブリンG4のアミノ酸配列或いは該G4のアミノ酸配列において Kabat EU 番号付けにおける 228 位セリンがプロリンに且つ 235 位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する、上記(3)に記載の抗体重鎖をコードする DNA。

(a) 配列番号 10 で示されるアミノ酸配列。

(b) 配列番号 11 で示されるアミノ酸配列。

(5) 抗体の重鎖が配列番号 95 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA。

(6) 抗体の重鎖定常領域が配列番号 96 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA。

(7) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖をコードする DNA であって、抗体重鎖のミドルヒンジ部以降のC末端側が、ヒトイムノグロブリンG2のアミノ酸配列或いは該G2のアミノ酸配列において Kabat EU 番号付けにおける 331 位プロリンがセリン置換されたアミノ酸配列を有する DNA。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2007-249687 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、アゴニスト抗体結合活性を示す。FDCP-hMpl 細胞と FDCP2 細胞 (FDCP parent) を用いたフローサイトメトリー (実施例 2) で、図示した各抗体の結合活性を調べた。各抗体はヒト c-Mpl 特異的に結合することが示された。

図 2 は、UT7/TP0 アッセイ結果を示す。図 A~D に示した各精製抗体 (IgG1) の UT7/TP0 細胞増殖アッセイ (実施例 5) における各抗体の増殖曲線を示した。

図 3 は、CFU-Mk アッセイ結果を示す。これは、ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いたコロニー形成アッセイ (実施例 6) の結果である。

図 4 A は、組換え抗体作製に関する N5KG1 ベクターの構造を示す。図中、C は サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー、B は ウシ成長ホルモンポリ

アデニル化領域、N1はネオマイシンホスホトランスフェラーゼのエクソン1、Kはヒトイムノグロブリン κ 定常領域、G1はヒトイムノグロブリン γ 1定常領域、BTはマウス β グロブリン主要プロモーター、N2はネオマイシンホスホトランスフェラーゼのエクソン2、Dはジヒドロ葉酸レダクターゼ、VHは重鎖可変領域、VLは軽鎖可変領域をそれぞれ表す。

図4Bは、組換え抗体作製に関する、天然型のヒトイムノグロブリンと、IgG4PE, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhmのCH1領域とヒンジ領域（アッパーヒンジ及びミドルヒンジ）のアミノ酸配列を示す。

図4C-1（すなわち、図4C-1～図4C-3）は、組換え抗体作製に関する、N5KG1_7-10, N5KG1_4-49発現ベクター作製工程図を示す。

図4C-2は、図4C-1の続き。

図4C-3は、図4C-2の続き。

図4D-1は、この図（すなわち、図4D-1～図4D-3）は、組換え抗体作製に関する、N5KG1_6-4-50, N5KG1_6-5-2発現ベクター作製工程を示す。

図4D-2は、図4D-1の続き。

図4D-3は、図4D-2の続き。

図4Eは、組換え抗体作製に関する、図示した各種改変重鎖の定常領域の配列を示す。

図4F-1（すなわち、図4F-1～図4F-2）は、組換え抗体作製に関する、7-10G4344uhm重鎖の核酸およびアミノ酸配列を示す。

図4F-2は、図4F-1の続き。

図4Gは、組換え抗体作製に関する、7-10G4344uhm軽鎖の核酸およびアミノ酸配列を示す。

図5は、ヒンジ改変抗体の活性を示す。A：UT7/TPO細胞増殖アッセイにおける4-49G1, 4-49G3311, 4-49G3331の活性。B：UT7/TPO細胞増殖アッセイにおける7-10G4344uhm, 4-49G4344uhmの活性。

図6Aは、シグナル伝達解析（実施例11）における、アゴニスト抗体7-10G4344uhm, 4-49G4344uhmのシグナル伝達解析結果を示す。

図6Bは、シグナル伝達解析（実施例11）における、アゴニスト抗体6-5-2G1,

6-5-2G3344 のシグナル伝達解析結果を示す。

図 7 は、ヒト血小板プライミング作用を示す。これは、実施例 12 記載の試験の結果を示す。アゴニスト抗体 7-10G3311, 4-49G3311 によるヒト血小板プライミング作用が示された。また、アゴニスト抗体のみ (ADP 非添加) では血小板の凝集は起こらないことが示された。

図 8 は、カニクイザルへのアゴニスト抗体投与による血小板数の変化を示したグラフである。実施例 13 に記載のように、カニクイザルにアゴニスト抗体を投与し、血小板数をモニターした。矢印は一回目 (PEG-rHuMGDF) および二回目 (アゴニスト抗体) の投与日を示す。

図 9 A は、NOG 臍帯血移植モデルマウスにおいて CD34+細胞を 1,000 個 (右図) 又は 10,000 個 (左図) を移植した後に被検物質を投与したときの末梢血ヒト血小板数の経時的推移を示す。図中、Pre は投与前の血小板数を示す。

図 9 B は、NOG 臍帯血移植モデルマウスにおいて CD34+細胞を 1,000 個 (右図) 又は 10,000 個 (左図) を移植した後に被検物質を投与したときの、移植後 6 週における骨髓ヒト前駆細胞数 (colony count; GM+E+GEM) を示す。前駆細胞数は、巨核球系以外の合計細胞数であり、GM は顆粒球・マクロファージ系、E は赤血球系、GEM は Colony-forming-unit-granulocyte-macrophage-erythroid を表わす。結果は、平均±標準偏差 (mean±SD) で表わしている。また、ベヒクル (Vehicle) はコントロールとしての PBS (リン酸緩衝塩水) を表わし、また、NT は非処理 (Non-treated) を表わす。

図 9 C は、NOG 臍帯血移植モデルマウスにおいて CD34+細胞を 1,000 個 (右図) 又は 10,000 個 (左図) を移植した後に被検物質を投与したときの、移植後 6 週における末梢血ヒト細胞キメラ率を示す。ベヒクル (Vehicle) は対照としての PBS (リン酸緩衝塩水) を表わし、また、NT は非処理 (Non-treated) を表わす。

図 10 は、ヒト Mpl Tg マウスへのアゴニスト抗体投与後の血小板数の経日推移を示す。対照として、該 Tg マウスへの TPO 又はベヒクル (PBS) の投与、並びに、非 Tg (野生型; Non-Tg) マウスへの 7-10G4344uhm (10 μg) の投与実験を行い、その結果も示した。結果は、平均±SEM で表わした。

図 11 は、アゴニスト抗体 7-10G4344uhm (軽鎖変異抗体) の FM3A-hMpl 細胞へ

の結合性を示す。

図 1 2 は、アゴニスト抗体 7-10G4344uhm (軽鎖変異抗体) に関する UT-7/TPO 細胞を用いた細胞増殖アッセイの結果を示す。

図 1 3 は、アゴニスト抗体 7-10 の重鎖定常領域を G2322uhm2 に変異させたアゴニスト抗体 7-10G2322uhm2 に関する UT-7/TPO 細胞を用いた細胞増殖アッセイの結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、プライマリーヒト細胞に作用する抗ヒト c-Mpl アゴニストヒト抗体を提供する。

本発明における抗体は、ヒト抗体産生マウス (例えば、KM マウス™ (キリンビール社)) をヒト Mpl 組換えタンパク質もしくはヒト Mpl 発現細胞で免疫し、通常の方法で単離することができる。また、ハイブリドーマから抗体遺伝子を単離し、発現ベクターを構築し、発現細胞を作製し、その過程で、種々の定常領域を有する組換え抗体を作製することができる。

1. 本発明に係る抗体について

本明細書において抗体とは、Fab 領域、ヒンジ領域、Fc 領域を有する抗体を意味し、天然に存在する抗体、及び、同様の構成を有する範囲において、それ自体公知の方法で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマにより産生される、或いは、一旦抗体遺伝子を取得しそれを用いて遺伝子工学的に産生される抗体、更に部位特異的突然変異誘発法により一部改変され遺伝子工学的に産生される抗体を含む。そして本発明に係るヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体及び重鎖改変アゴニスト抗体は前述した通りのものである。

一般に、アゴニスト抗体は細胞膜上の標的分子に結合し、複合体を形成させることでシグナルを伝える。ホモ二量体を形成するサイトカイン受容体ファミリー、例えばエリスロポエチン受容体 (EpoR)、G-CSF 受容体 (G-CSFR)、トロンボポエチン受容体 (c-Mpl) 等に対するアゴニスト抗体は、二価の抗体が、二つの分子と結合することで二量体を形成させると考えられる。多くのアゴニスト抗体が Fab

断片のみでは活性を示さないこともそれを示唆している。

複合体形成には、二つの抗原結合部位が接近し易いことが重要と考えられる。全長抗体では十分な活性を持たない抗体でも、sc(Fv)₂等の形態に低分子化することでアゴニスト活性が上昇するのはこのことを示唆している。一方で、低分子化抗体は、分子の大幅な改変による抗原性が懸念されるうえ、血中半減期が短縮される等、医薬品として利用するためには課題が多い。全長抗体の持つ、低抗原性や血中半減期の長さ等、医薬品として有用な性質を生かすためには、抗体の構造に大幅な改変を加えることなく、高い活性を持ったアゴニスト抗体が望まれる。

後述の実施例2に示すように、本発明者らは、免疫の方法に工夫をこらし、全長抗体で高い活性を持った抗ヒト c-Mpl アゴニスト抗体を取得した。工夫とは、例えば高発現細胞株による免疫や恒常活性型の変異受容体発現細胞を用いた免疫である。該アゴニスト抗体は後述の実施例6に記載のヒト臍帯血 CD34+細胞を用いたコロニーアッセイでコロニー形成を誘導することが示されており、医薬品として有用であることが期待される。

さらに、本発明者らはヒンジ部分の柔軟性を高めることで、複合体形成の効率を高め、アゴニスト活性を増強することを考案した。柔軟性の高い配列は、例えばグリシンリンカーのような配列を考えることができる。もしくは、ヒト IgG の中でも、最も柔軟性が高い IgG3 のヒンジ領域を用いることができる。抗体の低抗原性を損なわないためには、なるべく天然に存在する配列を用いることが望ましい。そこで、IgG3 のヒンジ配列がより好ましい。

また、遺伝子工学的改変により、細胞傷害活性が低く、かつ、高いヒンジの柔軟性を持った、アゴニスト抗体に最適な定常領域として、ヒト IgG3 のアッパーヒンジ領域を持ち、ミドルヒンジ以降 C 末端側の領域はヒト IgG4 もしくは IgG2 の配列とするような抗体の作製も可能である。

より具体的には、当業者に周知である遺伝子工学的改変（例えば、欧州特許 EP314161 公報を参照のこと）により異なるサブクラスのものに変換し、即ち、本発明の抗体の可変領域をコードする DNA を用いて遺伝子工学的手法を用いて元のサブクラスとは異なるサブクラスの抗体に変更することができる。更にヒト IgG4 重鎖定常部分の EU 番号付け (Sequences of proteins of immunological interest,

NIH Publication No. 91-3242 を参照) における 228 番目のセリンをプロリンに変異させることにより、IgG4 の分子内架橋 (S-S 結合) による単量体形成を抑制することが、また、同じく 235 番目ロイシンをグルタミン酸に変異させることにより、抗体依存性細胞傷害 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) 活性を低減させることができる。上記二つの変異を持った IgG4 を IgG4PE と呼ぶ。また、IgG2 の 331 番目のプロリンをセリンに変異させることにより、補体依存性細胞傷害 (Complement-dependent cytotoxicity: CDC) 活性を低減させることができる。この変異を持った IgG2 を IgG2_Ser と呼ぶ。

上記の事柄を考慮し、本発明者らは細胞傷害活性が低く、かつ、高いヒンジの柔軟性を持った、アゴニスト抗体に最適な定常領域を作製した。本定常領域は、ヒト IgG3 のアッパーヒンジ領域を持ち、ミドルヒンジ以降 C 末端側の領域はヒト IgG4 又は IgG2 の配列となっている。この定常領域と抗 c-Mpl アゴニスト抗体の可変領域を組み合わせることにより、安全性と高活性を兼ね備えたアゴニスト抗体を作製することができる。

2. 本発明に係る抗体の製造方法

本発明の抗体は、種々の方法により生産できるが、まずは本発明抗体産生ハイブリドーマを得る必要がある。後述の実施例 1 に記載するような本発明の抗原を用い、マウス等を免疫し、特にヒト抗体を得る場合にはヒト抗体産生トランスジェニックマウスなどの非ヒト哺乳動物に免疫する。モノクローナル抗体は、定法に従い、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と、自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞 (ミエローマ細胞) を融合することにより得られるハイブリドーマを培養し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって取得することができる。取得した抗体群から更にアゴニスト抗体を選択する必要があるが、アゴニスト抗体の作用対象受容体に対するリガンドの活性測定方法として確立した方法を用いればよく、ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体を選択する場合は、後述の実施例 5 に示した UT 7 / TPO 細胞増殖アッセイ等の TPO 活性測定方法として既に確立された方法を用いて適宜行うことができる。

本発明に係るヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体、特にモノクローナル抗体の

製造にあたっては、下記の工程を包含する。すなわち、(1) 免疫原として使用する、生体高分子の精製及び/又は抗原タンパク質を細胞表面に過剰に発現している細胞の作製、(2) 抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓等の摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、(3) 骨髓腫細胞（ミエローマ）の調製、(4) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、(5) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、(6) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）、(7) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、(8) このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性及びその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、(9) モノクローナル抗体遺伝子のクローニングと組換え抗体作製等である。

以下、ヒト c-Mpl に対するアゴニストモノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

(1) 抗原

一般にヒト c-mpl 抗体を得る場合には、ヒト c-Mpl タンパク質の一次構造が公知（Genbank: NP_005364 参照）であるので、当業者に周知の方法により、c-Mpl のアミノ酸配列からペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することができ、また c-Mpl の細胞膜貫通領域および細胞内領域を欠損した可溶化 c-Mpl 組換えタンパク質を抗原として用いることもできる。

或いは、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株等のヒト c-Mpl 発現細胞株の抗原としての利用が挙げられる。但し、ヒト c-Mpl 発現細胞株としては、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株が知られているが、これらの細胞株の c-Mpl 発現量は細胞あたり数千分子と低く、抗原には不向きである。実際、マウス造血系細胞株である FDCP2 にヒト c-Mpl を導入した発現株 FDCP-hMpl（FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34 参照）をヒト抗体産生マウス（KM マウス™）に免疫した場合、抗体価上昇が不十分であり、hMpl 特異的なヒト抗体を得ることができなかった。また、ヒト巨核球系細胞株を抗原として用いる場合、他の膜分子に対する抗体も誘導されるため、c-Mpl 特異的な抗体を効率良く誘導するには必ずしも適切でな

い。従って、目的とするものが単にヒト c-mpl 抗体でなくアゴニスト活性を有する抗体の取得に際し抗原タンパク質を発現する細胞株を免疫に用いる場合には、発現量が高い細胞を選択することが望ましい。特に、マウス細胞株、しかも可能な限り MHC 適合した細胞株を宿主に、ヒト c-Mpl を導入した高発現株を用いるのが望ましい。例として、後述の実施例 1 に記載の細胞（発現ベクターとしてヒト c-mpl 全長遺伝子が担持された pEF-MPL635 或いは pCMV-MPL635 を、宿主としてマウス細胞株 L929 および FM3A を用いたもの）を挙げるができる。

また、野生型のヒト c-mpl に代えて、ヒト c-mpl の恒常活性型変異体（例えば、508 番目 Trp が Ser に変異しリガンド非依存性に恒常的にアゴニストシグナルを伝達する変異体；Abe M ら、Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506）を同様の方法で強制発現させた細胞株を用いてもよい。このような変異体は野生型とは立体構造が異なることが予想され、そのような恒常活性型変異体に親和性が高い抗体は、強力なアゴニスト活性を示す可能性がある。

また、これら強制発現細胞株は、ヒト cMPL 或いはその細胞外可溶性領域等と適宜組み合わせて抗原として用いることもできる。

(2) 抗体産生細胞の調製工程

上記(1)で得られた抗原と、フロインドの完全若しくは不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、遺伝子改変によってヒト抗体を産生する能力を有するマウス（ヒト抗体産生マウス）が最適である。

本発明において用いられたヒト抗体産生マウス（例えば KM マウス™）は、内在性マウスイムノグロブリン（Ig）重鎖及びマウス κ 軽鎖を欠損しており、かつ、ヒト Ig 重鎖遺伝子を含む 14 番染色体断片（SC20）及びヒト Ig κ 鎖トランスジェーン（KCo5）を同時に保持する。このマウスはヒト Ig 重鎖遺伝子座を持つ系統 A のマウスと、ヒト Ig κ 鎖トランスジェーンを持つ系統 B のマウスとの交配により作製される。系統 A は、内因性 Ig 重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な 14 番染色体断片（SC20）を保持するマウス系統（Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol197:722）である。また、系統 B は内在性マウス Ig 重鎖及び κ 軽鎖欠損の両者についてホモ接合体であり、ヒト Ig κ 鎖トラン

スジーン (KCo5) を保持するマウス系統 (Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845) である。従って、KM マウスはヒト抗体を産生する能力を持ち、マウス Ig 重鎖およびκ鎖を欠損したマウスである。

マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、足蹠注射などいずれでもよいが、腹腔内注射、足蹠注射又は静脈内注射が好ましい。

免疫は、一回、又は、適当な間隔で（好ましくは2週間から4週間間隔で）複数回繰返し行うことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後3~5日後の動物由来の抗体産生細胞を、後の細胞融合に用いることが好ましい。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、フローサイトメトリー法、放射性同位元素免疫定量法（以下、「RIA法」という）、固相酵素免疫定量法（以下、「ELISA法」という）、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性、等の観点から、フローサイトメトリー法又はELISA法がより好適である。

本発明における抗体価の測定は、例えばフローサイトメトリー法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、抗原を発現した細胞とヒト抗体を含む検体（例えばマウス血清、ハイブリドーマの培養上清、精製抗体等）と反応させる。さらに二次抗体として蛍光標識されたヒト抗体に対する抗体を加えてヒト抗体に結合させ、洗浄後、細胞に結合した二次抗体の量を蛍光によって測定することにより、抗体価を算出する。

(3) ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることができるが、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) ミエローマ株 P3X63Ag8U.1 (P3-U1) [Yelton, D. E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)], P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1) [Kohler, G. et al. European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)], Sp2/0-Ag14

(SP-2) [Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270 (1978)], P3X63Ag8.653 (653) [Kearney, J. F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)], P3X63Ag8 (X63) [Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975)] などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば 8-アザグアニン培地 [グルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清 (以下、「FCS」という) を加えた RPMI-1640 培地に 8-アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下、「IMDM」という)、又はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下、「DMEM」という) で継代培養するが、細胞融合の 3~4 日前に正常培地 (例えば、10% FCS を含む DMEM 培地) で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

(4) 細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾臓、リンパ節、骨髄、扁桃、末梢血、又はこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。次いで、脾細胞とミエローマを融合させればよい。この脾細胞と工程 (3) で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単な、ポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

脾細胞とミエローマとを無血清培地 (例えば、DMEM)、又はリン酸緩衝生理食塩液 (以下、「PBS」という) でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が 5:1 ~ 10:1 程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら 1mL の 50% (w/v) ポリエチレングリコール (分子量 1000~4000) を含む無血清培地を滴下する。その後、10mL の無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (以下「HAT」という) 液及びヒトインター

ロイキン-6（以下、「IL-6」という）を含む正常培地（以下、「HAT 培地」という）中に懸濁して培養用プレート（以下、「プレート」という）の各ウェルに分注し、5%炭酸ガス存在下、37℃で2週間程度培養する。途中適宜 HAT 培地を補う。

(5) ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、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) 欠損株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、及びミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT 含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、HAT 含有培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合細胞であるハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地（以下、「HT 培地」という）への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、フローサイトメトリー法により抗ヒト c-Mpl 抗体価を測定する。以上、8-アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する培地組成も変化する。

(6) クローニング工程

前述 (2) の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を産生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニピレーターによって1個ずつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクロン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便であり、よく用いられる。

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2~4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗ヒト c-Mpl モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(7) アゴニスト抗体の選択

得られた抗ヒト c-Mpl モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株の培養上清或いは後記(8)に従って該上清より精製した抗体を、種々の TPO 活性測定系にて測定することにより、アゴニスト抗体を選択することができる。スクリーニングとして好適な方法として、哺乳動物細胞にヒト Mpl を発現させ、細胞増殖アッセイを行う方法が挙げられる。例えばマウス細胞株 BaF3 にヒト Mpl を発現させた細胞による増殖アッセイ (Orita et al. Blood. 2005 Jan 15;105(2):562-6.) 等も使用し得るが、マウス細胞を用いた場合に、ヒト細胞の反応を反映しているとは限らないことを考慮すると、よりヒト細胞に強い活性を持つ抗体を選抜するにはヒト Mpl が発現しているヒト細胞を用いる増殖アッセイ方法がより好ましい。ヒト細胞による系として具体的には、後述の実施例 5 に記載の UT7/TPO 細胞を用いた細胞増殖アッセイを挙げるができる。

(8) ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地を HT 培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、スピナー培養、あるいはホローファイバーシステム等を用いた培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲルろ過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、抗ヒト c-Mpl モノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス (例えば BALB/c) 若しくは nu/nu マウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等の腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、抗ヒト c-Mpl モノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット (例えば、MAbTrap GII キット; アマシャムファルマシアバイオテック社製) 等を利用することもできる。かくして得られるモノクローナル抗体は、ヒト c-Mpl に対して高い抗原特異性を有する。

(9) モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー (Ouchterlony) 法、ELISA 法、又は RIA 法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。

一方、ELISA 法又は RIA 法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、及び 280nm における吸光度 $[1.4 (OD_{280}) = \text{イムノグロブリン } 1\text{mg/mL}]$ より算出する方法等により行うことができる。また、ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、配列を決定することでサブクラスを特定することもできる。

(10) モノクローナル抗体をコードする遺伝子のクローニングと組換え型抗体作製

また、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えば哺乳類細胞細胞株、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することもできる（P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS）。

本発明は、本発明の抗体を産生するハイブリドーマが保有する抗体の遺伝子配列を含む核酸、特に後述の、本発明のハイブリドーマが産生する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の核酸も包含する。ここで、核酸には DNA 及び RNA が含まれる。

ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を調製するには、モノクローナル抗体の L 鎖 V 領域、L 鎖 C 領域、H 鎖 V 領域及び H 鎖 C 領域をそれぞれコードする DNA を PCR 法等により調製する方法が採用される。プライマーは、抗体遺伝子又はアミノ酸配列から設計したオリゴ DNA を、鋳型としてはハイブリドーマから調製した DNA を使用することができる。これらの DNA を 1 つの適当なベクターに組み込み、これを宿主に導入して発現させるか、あるいはこれらの DNA をそれぞれ適当なベクターに組み込み、共発現させる。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使

用される。プラスミド DNA としては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージ DNA としては λ ファージが挙げられる。

形質転換に使用する宿主としては、抗体の立体構造を正しく構成できることから、真核細胞を挙げることができ、例えば、酵母、動物細胞（COS 細胞、CHO 細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。特に動物細胞宿主を用いる場合、ベクターとしては、例えば N5KG1-Val Lark ベクター（IDEC pharmaceuticals: US patent 6001358）を用いることができる。本ベクターは、組換え抗体を動物細胞に発現させる目的で使用される発現ベクターで、2つの CMV プロモーター／エンハンサーを持ち、それぞれの 下流に重鎖および軽鎖可変領域のクローニングサイトを持つ。さらにその下流には、ヒト γ 1 鎖定常領域とヒト κ 鎖定常領域をコードする遺伝子配列をあらかじめ持っている。本ベクターの可変領域クローニングサイトに任意の重鎖および軽鎖可変領域を、読み枠（フレーム）をあわせて組み込むことにより、軽鎖可変領域がヒト κ 鎖定常領域と、重鎖可変領域がヒト γ 1 定常領域と連結された抗体を発現させることができる。本ベクターを導入された動物細胞は培養液中に抗体（ヒト IgG1）を産生する。また、異なる重鎖定常領域遺伝子を含むベクターも使用することができる。例えば N5KG4PE ベクター（IDEC pharmaceuticals 社製）は定常領域遺伝子として、ヒト γ 4 に、上述した二つの変異（Ser228Pro, Leu235Glu）が入った配列を持っている。N5KG4PE ベクターに任意の重鎖および軽鎖可変領域遺伝子配列を組み込むことで、任意の可変領域を持つ IgG4PE を発現させることができる。さらに、重鎖または軽鎖遺伝子に改変を加えることで、様々な定常領域を持った抗体を作製することが可能である。例えば、抗体ドメイン間のサブクラスの入れ替えによるものが考えられる。抗体重鎖定常領域は、N 末端側から CH1-ヒンジ-CH2-CH3 というドメイン構造を持っている。実施例 8 において、示すようなヒンジ領域がヒト IgG3 の配列であり、CH1、CH2 および CH3 がヒト IgG2 又はヒト IgG4 の配列であるような重鎖定常領域を作成することが可能である。図 12 又は図 13 に示すように、ヒンジ領域以外の重鎖定常領域（CH1、CH2 および CH3）を IgG2 または IgG4 にした場合において、両者のアゴニスト活性に大きな差はない。しかし、E. Garber と S. J. Demarest, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 355:751-757 及び G.-F. Zhang と E. Lilly, “Assessing conformational stability

of protein therapeutics using circular dichroism and other biophysical tools,” BioProcess Analytical and Quality Summit June 4-6, 2007, Hilton La Jolla Torrey Pines San Diego, CA (<http://www.ibclifesciences.com/analytical/5762.xml>)において記載されるように、IgG2を用いた場合は、IgG4を用いた場合に比し、高濃度状態で凝集体が生産されにくいという性質を有する。

もちろん、本発明に用いる哺乳動物細胞用発現ベクターは上記のものに限定されるものではない。例えば発現を制御する塩基配列として前述 CMV プロモーター/エンハンサーを利用した他の発現ベクターを用いてもよいし、これとは異なった公知のプロモーター/エンハンサー（1若しくは複数）を発現制御配列として使ってもよい。プロモーターとしては、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（1989年7月5日公開のUK2211504）、アデノウイルス（例えばアデノウイルス2）、ウシ乳頭腫ウイルス、鳥の肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス 40 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、ヘテロローガスな哺乳動物プロモーター（例えばアクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱衝撃プロモーター）を挙げることができる。プロモーターに作用し転写を増大させるエンハンサーとしては、公知の哺乳動物遺伝子由来のエンハンサー（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインシュリン）、および、真核細胞ウイルス由来のエンハンサー（複製起点の後期側のSV40エンハンサー（bp100-270）、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサー）を用いることができる。

また、発現ベクターには、転写の終止および mRNA の安定化に必要な配列を含むことができる。このような配列は普通、真核生物のまたはウイルスの DNA または cDNA の 5' および時には 3' 非翻訳領域から取得することができる。

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、電圧ポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ES 細胞

にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

本発明において、目的とする抗体は、形質転換体を培養し、その培養上清から採取することにより得ることができる。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。

培養後、細胞外に生産された抗体の精製は、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により細胞を除去して行う。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である (Wright, G., et al. (1991) *Bio/Technology* 9, 830-834)。

本発明に係るヒト Mpl に対するアゴニスト抗体の製法として、好ましい方法は、前述の[課題を解決するための手段]の4. にて例示した遺伝子組換え技術による方法であるが、これに限定されるものではない。

3. 本発明に係る DNA

本発明は、上で述べたように、

(1) ヒト Mpl に対するアゴニスト抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列であって以下の (a) ~ (d) から選択されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA:

- (a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列;
- (b) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列;
- (c) 配列番号 6 で示されるアミノ酸配列;
- (d) 配列番号 8 で示されるアミノ酸配列;

及び、

(2) ヒト Mpl に対するアゴニスト抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列であって以下の (a)～(h) から選択されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA :

- (a) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列;
- (b) 配列番号 5 で示されるアミノ酸配列;
- (c) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列;
- (d) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列;
- (e) 配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
- (f) 配列番号 5 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
- (g) 配列番号 7 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
- (h) 配列番号 9 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;

及び、

- (3) 抗体の重鎖が配列番号 9 5 で示されるアミノ酸配列;

及び、

- (4) 抗体の重鎖定常領域が配列番号 9 6 で示されるアミノ酸配列;

を提供するものであり、上記 2. の本発明に係るヒト Mpl に対するアゴニスト抗体の製法、より具体的には、遺伝子組換え技術を用いた抗体の製造において、用いることができる。

これら可変領域のアミノ酸配列 (a)～(d) をコードする DNA は、前述のヒト Mpl に対するアゴニスト抗体産生ハイブリドーマ取得方法によって得られたハイブリドーマ株より、後述実施例 7 の通り、定法により mRNA を抽出し既知である抗体定常領域のアミノ酸配列に基づくプライマーを用いて 5' RACE 法により取得したものであり、その可変領域をコードする各 DNA を含むプラスミドは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1-1-1

つくばセンター中央第6) に2006年3月14日付にてブダペスト条約に基づく国際寄託がされている。

表1

配列番号 (プラスミド名称)	受託番号	受託日
2 (Anti-hMpl 7-10_HV/pCR4)	FERM BP-10559	2006年3月14日
4 (Anti-hMpl 4-49_HV/pCR4)	FERM BP-10553	2006年3月14日
6 (Anti-hMpl 6-4-50_HV/pCR4)	FERM BP-10555	2006年3月14日
8 (Anti-hMpl 6-5-2_HV/pCR4)	FERM BP-10557	2006年3月14日
3 (Anti-hMpl 7-10_LV/pCR4)	FERM BP-10560	2006年3月14日
5 (Anti-hMpl 4-49_LV/pCR4)	FERM BP-10554	2006年3月14日
7 (Anti-hMpl 6-4-50_LV/pCR4)	FERM BP-10556	2006年3月14日
9 (Anti-hMpl 6-5-2_LV/pCR4)	FERM BP-10558	2006年3月14日

本発明のアゴニスト抗体を構成する軽鎖の可変領域は、その特定例として、配列番号3、5、7又は9に示されるアミノ酸配列を含むが、これらのアミノ酸配列のフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、付加又は挿入を含んでもよいし、或いはこれらのアミノ酸配列のフレームワーク領域の配列と少なくとも85%、86%、87%、88%又は89%、好ましくは少なくとも90%、92%、93%又は94%、より好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する配列を含んでもよい。フレームワーク領域は、可変領域において3つのCDR(相補性決定部位; complementarity-determining region)、すなわち配列番号3、5又は7に示されるアミノ酸配列においては、RASQGISS(A又はT)LA(アミノ酸位置24-34)、DASSLES(アミノ酸位置50-56)、及びQQFNSTP(L又はY又はW)T(アミノ酸位置89-97)、を除く領域を指し、配列番号9に示されるアミノ酸領域においては、RASQSVSSSYLA(アミノ酸位置24-35)、DASSRAT(アミ

ノ酸配列 51-57)、及び QQYGSSPIT (アミノ酸位置 90-98)、を除く領域を指す。後述の実施例 17 で実証するとおり、フレームワーク領域内にアミノ酸変異が存在しても、変異型抗体は非変異型抗体の場合とほぼ同等のアゴニスト活性、すなわち、FM3A-hMpl 細胞など FM3A-hMpl 細胞の細胞のヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力及び/又は UT-7/TPO 細胞の増殖能を有することができる。

そのような変異の例は、保存的アミノ酸間での置換である。保存的アミノ酸は、電荷、構造、極性などの性質が類似したアミノ酸群であり、例えば塩基性アミノ酸 (Arg、His、Lys)、酸性アミノ酸 (Glu、Asp)、非極性アミノ酸 (Ala、Leu、Ile、Val、Gly、Pro)、極性アミノ酸 (Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln)、芳香族アミノ酸 (Phe、Tyr、Trp) に分類することができる。

また、配列同一性は、2つ又はそれ以上の配列を、ギャップを導入して又はギャップを導入しないで整列比較したときのアミノ酸 (又はヌクレオチド) 配列間の一致率を表わし、一般に全アミノ酸 (又はヌクレオチド) 数に対する同一アミノ酸 (又はヌクレオチド) 数のパーセンテージである。配列同一性は、必要に応じて NCBI (米国) などのデータバンクにアクセスし、配列検索用の BLAST、FASTA などの公知のアルゴリズムを利用して決定することができる。

変異の導入は、変異を含まないアミノ酸配列をコードする DNA に対して、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR 法 (変異を含むプライマーを使用する) などを適用することによって実施することができる。変異導入法は、例えば Sambrook ら、Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) などに記載されている。

本発明の上記 DNA はさらに、可変領域に加え、それぞれ重鎖或いは軽鎖の定常領域をコードする塩基配列を含むものであってもよい。例えば、上記の重鎖可変領域と本発明に係る抗体の製造方法の項で述べた重鎖定常領域の改変がされた重鎖定常領域をコードする塩基配列である。

また、本発明に係る抗体の製造方法の項で述べた重鎖定常領域の改変は、寄託した DNA 及び公知のヒト抗体定常領域の配列に基づき、周知の遺伝子工学的改変手法により得ることができる。

4. ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体の医薬用途及び医薬組成物

本発明に係るヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体は、c-MPL 受容体に結合しそれを活性化する能力、および／または（インビボおよびインビトロの両方で）血小板の産生を刺激する能力（「血小板生成活性」）および血小板前駆体の産生を刺激する能力（「巨核球生成活性」）を有する。

また、ヒト c-Mpl 受容体は、巨核球のみならず造血幹細胞においても発現しているとされている。正常動物において、PEG-rHuMGDF 投与により骨髄中の赤芽球系や顆粒球／マクロファージ系の前駆細胞が増加したとの報告もある（Stem Cell, 14:651-660, 1996）。しかし、ヒト臍帯血移植マウスにおいては、PEG-rHuMGDF の投与によりマウスの巨核球系以外の前駆細胞の増殖は見られたが、ヒトの前駆細胞の増殖は認められなかった。一方、ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体においては骨髄中のヒト赤血球および顆粒球／マクロファージ系の前駆細胞の数が有意に高かった（実施例 14）。このことは、ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体がヒト細胞に選択的にシグナルを入れ、巨核球系のみならず、他系列の細胞の生着も促進できる可能性を示唆している。

本発明に係るヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物により治療される状態は、一般には、存在する巨核球／血小板の欠乏または将来において予期または予想される巨核球／血小板の欠乏（例えば、計画されている手術または血小板供与によるもの）を伴う状態である。そのような状態は、インビボにおける活性 Mpl リガンドの（一時的または永久的な）欠乏により生じうる。したがって本発明の組成物は、血小板欠乏状態即ち血小板減少症の治療を要する患者において血小板減少症を予防的または治療的な治療するために利用可能である。さらに、汎血球減少を長期間に渡って伴う造血幹細胞移植（骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植）後の血球回復のための治療を要する患者において、汎血球減少症を予防的または治療的な治療をするためにも利用可能である。

血小板減少症（血小板欠乏症）は、化学療法および種々の薬物での他の療法、放射線療法、手術、不慮の出血、および他の具体的な病態を含む種々の理由により生じうる。血小板減少症を伴い本発明に従い治療されうる典型的な具体的な病態としては以下のものが挙げられる：無形成貧血；特発性または免疫血小板減少

症（ITP）、例えば乳癌に伴う特発性血小板減少性紫斑病；HIVに伴うITPおよびHIVに関連した血栓性血小板減少性紫斑病；血小板減少症を引き起こす転移性腫瘍；全身性エリテマトーデス、例えば新生児ループス症候群脾腫；ファンコーニ症候群；ビタミンB12欠乏症；葉酸欠乏症；メイ-ヘグリンの異常；ウイスコット-アルドリッチ症候群；慢性肝疾患；血小板減少症に関連した骨髄形成異常症候群；発作性夜間ヘモグロビン尿症；C7E3 Fab (Abciximab) 療法後の急性深部血小板減少症；同種免疫血小板減少症、例えば母性同種免疫血小板減少症；抗リン脂質抗体および血栓症に関連した血小板減少症；自己免疫血小板減少症；薬物により誘発された免疫血小板減少症、例えばカルボプラチンにより誘発された血小板減少症、ヘパリンにより誘発された血小板減少症；胎児血小板減少症；妊娠血小板減少症；ヒュージー症候群；ルポイド血小板減少症；不慮の及び／又は大量の失血；骨髄増殖性異常症；悪性疾患を有する患者における血小板減少症；血栓性血小板減少紫斑病、例えば癌患者において血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒症性症候群として現れる血栓性細小血管症；自己免疫性溶血性貧血；潜在性空腸憩室穿孔；真正赤血球系無形成症；自己免疫血小板減少症；流行性 (epidemic) 腎障害；ラファンピシンに関連した急性腎不全；Paris-Trousseau 血小板減少症；新生児同種免疫血小板減少症；発作性夜間ヘモグロビン尿症；胃癌における血液学的変化；小児における溶血性尿毒症性症候群；A型関連ウイルスを含むウイルス感染に関連した血液学的徴候およびCMVに関連した血小板減少症。また、ある種のエイズ治療は血小板減少症を引き起こす（例えば、AZT）。また、ある種の創傷治療障害は、血小板数の増加が有益であろう。なお上記疾患においては、血小板減少のみならず、その他の血球減少を伴う疾患も存在する。

予想される血小板の欠乏（例えば、将来の手術によるもの）に対して、血小板が必要となる前に数日から数時間にわたり有効成分としての本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。緊急の状況（例えば、不慮の及び大量の失血）では、血液または精製血小板と共に本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。あるいは、汎血球の欠乏（例えば、臍帯血移植によるもの）に対しても、有効成分としての本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。

特に好ましい治療対象としては、(1)特発性血小板減少性紫斑病もしくは肝疾患にともなって起こる血小板減少症、(2)癌化学療法、再生不良性貧血、骨髄異形性症候群 (MDS)、骨髄移植もしくは臍帯血移植にともなって起こる血小板減少症および／または汎血球減少症を挙げることができる。

本発明のヒト c-MPL に対するアゴニスト抗体はまた、血小板および／または巨核球および関連細胞の生存能または保存寿命を維持するのに有用で有り得る。したがって、そのような細胞を含有する組成物中に有効量を含有させるのが有用であろう。

本発明にかかるヒト c-MPL に対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物は、注射用または経口、鼻、経皮または他の投与形態のためののものであってもよい。それらには、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内、鞘内、眼内、延髄後方、肺内（例えば、エアゾール化薬）または皮下注射（長期にわたる放出のためのデポ投与を含む）、舌下、肛門、膣または外科的移植、例えば脾漿膜下、脳または角膜内の埋め込みによる投与が含まれる。該治療は、単回投与または一定期間にわたる複数回の投与よりなるものであってもよい。一般には、本発明にかかるヒト c-MPL に対するアゴニスト抗体の有効量と医薬上許容される希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、佐剤および／または担体とを含む医薬組成物が本発明に含まれる。そのような組成物は、種々のバッファー含有物（例えば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pH およびイオン強度の希釈剤；添加物、例えば界面活性剤および可溶化剤（例えば、Tween 80、Polysorbate 80）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（例えば、Thimersol、ベンジルアルコール）および増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）；ポリ乳酸、ポリグリコール酸などの重合体化合物の粒子状製剤内またはリポソーム内に該物質が封入されたものを含む。所望により、医薬ビヒクル、賦形剤または媒体として働く更に他の医薬上許容される液体、半固体または固体希釈剤を含んでもよい。それらには、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ステアリン酸マグネシウム、メチル-およびプロピルヒドロキシベンゾアート、デンプン、スクロース、デキストロース、アラビアゴム、リン酸カルシウム、鉱油、カカオ脂およびテオブロマの油が含まれるが、これらに限定されるものではない。

該組成物は、液体形態または乾燥粉末（例えば、凍結乾燥形態）として製造することができる。移植可能な徐放製剤、および経皮製剤も意図される。

上記の状態の治療方法にかかわる投与計画は、薬物の作用を改変する種々の要因（例えば、患者の年齢、状態、体重、性別および食事、いずれかの感染の重症度、投与時間ならびに他の臨床的要因）を考慮して担当医師により決定されるであろう。一般には、該用量は、1日当たり本発明抗体 $100 \mu\text{g} \sim 1\text{mg/kg}$ 体重、好ましくは $10 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 体重、より好ましくは $1 \sim 10 \mu\text{g/kg}$ 体重であり、これらを、1日量で、あるいはより長い又はより短い間隔で（例えば、1日おき、1週間に2回、毎週、または毎日2回または3回）同等量で投与する。

また、本発明にかかるヒト c-MPL に対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物は、単独で又は他のサイトカイン、可溶性 Mpl 受容体、造血因子、インターロイキン、増殖因子と組合せて、血小板の欠乏および他の症状により特徴づけられる病態の治療において使用することができる。造血の一般的な刺激因子（例えば、IL-3 または GM-CSF）と組合せて、いくつかの形態の血小板減少症を治療するのに有用であると予想される。また、他の巨核球刺激因子、すなわち meg-CSF、幹細胞因子（SCF）、白血病阻害因子（LIF）、オンコスタチン M（OSM）または巨核球刺激活性を有する他の分子を、Mpl リガンドと共に使用することができる。そのような共投与のための追加的な代表的なサイトカインまたは造血因子には、IL-1 アルファ、IL-1 ベータ、IL-2、IL-3、IL-4、IL5、IL-6、IL-11、コロニー刺激因子-1（CSF-1）、M-CSF、SCF、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、EPO、インターフェロン-アルファ（IFN-アルファ）、コンセンサスインターフェロン、IFN-ベータ、IFN-ガンマ、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、トロンボポエチン（TPO）、アンジオポエチン、例えば Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4、Ang-Y、ヒトアンジオポエチン様ポリペプチド、血管内皮増殖因子（VEGF）、アンジオゲニン、骨形成因子（bone morphogenic protein）-1、骨形成因子-2、骨形成因子-3、骨形成因子-4、骨形成因子-5、骨形成因子-6、骨形成因子-7、骨形成因子-8、骨形成因子-9、骨形成因子-10、骨形成因子-11、骨形成因子-12、骨形成因子-13、骨形成因子-14、骨形成因子-15、骨形成因子受容体 IA、骨形成因子受容体 IB、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体

神経栄養因子 α 、サイトカイン誘導性好中球走化因子 1、サイトカイン誘導性好中球走化因子 2 α 、サイトカイン誘導性好中球走化因子 2 β 、 β 内皮細胞増殖因子、エンドセリン 1、上皮増殖因子、上皮由来好中球誘引物質、繊維芽細胞増殖因子 4、繊維芽細胞増殖因子 5、繊維芽細胞増殖因子 6、繊維芽細胞増殖因子 7、繊維芽細胞増殖因子 8、繊維芽細胞増殖因子 8b、繊維芽細胞増殖因子 8c、繊維芽細胞増殖因子 9、繊維芽細胞増殖因子 10、酸性繊維芽細胞増殖因子、塩基性繊維芽細胞増殖因子、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体 α 1、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体 α 2、成長関連タンパク質 (growth related protein)、成長関連タンパク質 α 、成長関連タンパク質 β 、成長関連タンパク質 γ 、ヘパリン結合性上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様増殖因子 I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子 II、インスリン様増殖因子結合タンパク質、角質細胞増殖因子、白血病阻害因子、白血病阻害因子受容体 α 、神経成長因子、神経成長因子受容体、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子 2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子 A 鎖、血小板由来増殖因子 AA、血小板由来増殖因子 AB、血小板由来増殖因子 B 鎖、血小板由来増殖因子 BB、血小板由来増殖因子受容体 α 、血小板由来増殖因子受容体 β 、プレ B 細胞増殖刺激因子、幹細胞因子受容体、TNF (TNF0、TNF1、TNF2 を含む)、トランスフォーミング増殖因子 α 、トランスフォーミング増殖因子 β 、トランスフォーミング増殖因子 β 1、トランスフォーミング増殖因子 β 1.2、トランスフォーミング増殖因子 β 2、トランスフォーミング増殖因子 β 3、トランスフォーミング増殖因子 β 5、潜在 (latent) トランスフォーミング増殖因子 β 結合タンパク質 I、トランスフォーミング増殖因子 β 結合タンパク質 II、トランスフォーミング増殖因子 β 結合タンパク質 III、腫瘍壊死因子受容体 I 型、腫瘍壊死因子受容体 II 型、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体、血管内皮増殖因子、ならびにそれらのキメラタンパク質が含まれる。

したがって、本発明にかかるヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物の投与 (成熟巨核球の数を増加させるためのもの) は、血小板の産生を刺激する特に有効な手段であると予想される。さらに造血幹細胞の産生を

刺激することにおいても有用な手段であると予想される。前記で列挙した用量は、該治療用組成物中のそのような追加的な成分を補償するように調節されるであろう。治療された患者の経過は、通常の方法によりモニターすることができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] 抗原の調製

1-1 ヒト c-Mpl 発現細胞の作製

抗原タンパク質を発現する細胞株を免疫に用いる場合、一般的に発現量が高いほど抗体作製には有利である。ヒト c-Mpl 発現細胞株としては、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株が知られているが、これらの細胞株の c-Mpl 発現量は細胞あたり数千分子と低く、抗原には不向きである。実際、マウス造血系細胞株である FDPC2 にヒト c-Mpl を導入した発現株 FDCP-hMpl (FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34. 参照) をヒト抗体産生マウス (KM マウスTM) に免疫した場合、抗体価上昇が不十分であり、hMpl 特異的なヒト抗体を得ることができなかった。また、ヒト巨核球系細胞株を抗原として用いる場合、他の膜分子に対する抗体も誘導されるため、c-Mpl 特異的な抗体を効率良く誘導するためには、マウス細胞株、しかも可能な限り MHC 適合した細胞株を宿主に、ヒト c-Mpl を導入した高発現株を用いるのが望ましい。そこで、ヒト c-Mpl (hMpl) 高発現株を作製するために、hMpl 発現ベクターを以下の通り作製し、かつ 2 種類のマウス細胞株 (L929 および FM3A) へ導入を行った。

更に、hMpl にはリガンド非依存性に恒常的にアゴニストシグナルを伝達する変異型受容体が報告されている (508 番目 Trp が Ser に変換している変異体、Abe M ら、Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506) が、このような変異体は野生型とは立体構造が異なることが予想される。このような恒常活性型変異体に親和性が高い抗体は、強力なアゴニスト活性を示す可能性がある。そこで、恒常活性型変異体 (以下 hMpl-Ser) の発現ベクターも作製し、発現細胞を作製して免疫に用いた。

1) 抗ヒト c-Mpl (hMpl) 発現ベクターの調製

hMpl の全長 cDNA を保持するプラスミド DNA である humpl-Pas12 (Bartley TD ら、Cell 1994 Jul 1;77(7):1117-1124. 或は Morita H ら、FEBS Lett. 1996 Oct

21;395(2-3):228-234.)のDNAを鋳型としてhMplのコーディング領域全域を増幅するPCR反応を実施した。プライマーとして、末端に連結のための制限酵素部位(5'末側EcoRI、3'末側XbaI)を付加するようにデザインした、Mpl_F1及びMpl_R2を用いて、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ(東洋紡績(株)製、日本)によるPCRで増幅した。以下、実施例中のPCRの反応温度調節は、ジーンアンプPCRシステム9700((株)パーキンエルマー・ジャパン社製)を使用した。反応温度条件としては、94°Cの初期温度で5分間の加熱後、98°C/10秒間と68°C/3分間のサイクルを30回反復し、最後に72°C/7分間加熱した。増幅したPCR断片は、エタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で分離し、メンブランを用いるDNA精製キットであるQIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社製)にて精製した。精製したDNA断片をpCR4Blunt-TOPOベクター(東洋紡績(株)製)にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。DNA塩基配列決定のためのプライマーとして、M13-20FW及びM13RVを用いた。挿入部分のDNA塩基配列解析を行い、hMplの配列(GenBank ACCESSION:M90102)と相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミドDNAを選択した。次に、hMplの配列を含むプラスミドDNAを精製した後、制限酵素EcoRIとXbaIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約2kb弱のDNAを回収し精製した。他方、ヒトEFプロモーターとブラストサイジン(Bsd)選択マーカートを有する発現ベクターであるpEF6/Myc-His(インビトロジェン(株)社製)、及び、CMVプロモーターとネオマイシン(Neo)選択マーカートを有するpEGEP-N1ベクター(ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製)についても、同様に制限酵素EcoRI、とXbaIでの消化処理を行った後、脱リン酸化のためにAlkaline Phosphatase(E. coli C75)(タカラバイオ(株)、日本)で処理した後に、アガロースゲル電気泳動とDNA精製キットでDNAを回収した。精製したhMplの全領域DNA断片を、それぞれの発現ベクターDNAにT4 DNA ligaseを用いてライゲーションして、大腸菌DH10Bへ導入し、それぞれ形質転換体を得た。インサートDNAを含む形質転換体のプラスミドDNAについてDNA塩基配列を解析して、hMplの全長cDNAが挿入されたpEF-MPL635及びpCMV-MPL635を取得した。

Mpl_F1 : 5' -AGAGAGAGAG GAATTCGCCA CCATGCCCTC CTGGGCCCTC TT-3' (配列番号 12)

Mpl_R2 : 5' - AGAGAGAGAG CGGCCGCTCA AGGCTGCTGC CAATAGCTTA GTG -3' (配列番号 13)

M13-20FW: 5' -GTAAAACGACGGCCAGTG-3' (配列番号 14)

M13RV : 5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3' (配列番号 15)

2) 恒常活性型ヒト c-Mpl (hMpl-Ser) 発現ベクターの調製

TPO 非依存性に細胞内のシグナル活性化が報告されている hMpl 変異体 (508 番目 Trp が Ser に変換している変異体、Abe M ら、Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506) の発現ベクターを作製した。508 番目のアミノ酸残基をコードするコドンを変更 (TGG→TCG) するために、pEF-MPL635 の DNA を鋳型として、GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (プロメガ社) を用いた部位特異的変異導入法を実施した。変異導入用オリゴヌクレオチド (5' 末端リン酸化済み) としては、Mut_MplSer508 を用いた。目的の変異導入用オリゴヌクレオチドと上記キット付属の Selection Oligonucleotide を鋳型 DNA とアニーリングさせて変異導入鎖を合成した後、GeneEditor™ Antibiotic Selection Mix 存在下では変異体のみが増殖することを利用して変異体を選択した。より具体的には、dsDNA テンプレートをアルカリ条件下 (0.2M NaOH、0.2 mM EDTA (最終濃度)) 室温で 5 分間インキュベートした後、2M 酢酸アンモニウム (pH4.6) を 10 分の 1 容量加えて中和してからエタノール沈殿により回収した。アルカリ変性処理した鋳型 DNA に、変異導入用オリゴヌクレオチドと新しい抗生物質耐性獲得用 Selection Oligonucleotide (5' 末端リン酸化)、及び、キット添付のアニーリングバッファーを加えた後、75°C で 5 分間保温し、37°C にゆっくり下げることによりアニーリングを行なった。次に、変異鎖の合成と連結のために、キット付属の Synthesis 10×buffer、T4 DNA Polymerase、及び T4 DNA ligase を加えて、37°C で 90 分反応を行なった。GeneEditor™ Antibiotic Selection Mix 存在下でコンピテントセル BMH 71-18 mutS に形質転換して培養した形質転換体大腸菌よりプラスミド DNA を調製し、更にその DNA によりコンピテントセル JM109 を形質転換後、GeneEditor™ Antibiotic Selection Mix を含む LB プレートに播種した。プレー

トに生じた形質転換体を培養して、プラスミド DNA の DNA 塩基配列を解析して、508 番目のアミノ酸が変換 (Trp から Ser) した hMpl を発現する pEF-MPL635-Ser ベクターを取得した。

Mut_MplSer508 : 5' -CTGCTGCTGC TGAGGTCGCA GTTCCTGCA CACTAC-3' (配列番号 16)

3) 全長ヒト c-Mpl 発現 L929 細胞の作製

作製した pEF-MPL635 ベクター (1 μ g) を、Lipofectamine 試薬 (Invitrogen より購入) および Lipofectamine PLUS (Invitrogen より購入) 試薬と混合し、さらに無血清 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地と混合した。混合液を 1.5x10⁵cells/well で 6-well plate に培養した L929 細胞に添加し、3 時間培養することで細胞に DNA を導入した。10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加 DMEM 培地にて一晚培養し、翌日より、培地に 10 μ g/mL Blasticidin (Invitrogen より購入) を加えて薬剤耐性細胞を選抜した。その後、抗 c-Mpl 抗体を用いた Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) 法にて c-Mpl 発現細胞を単離し、全長ヒト c-Mpl 発現 L929 細胞株 (以下、L929-hMpl) を樹立した。FACS は FACS-Vantage (Becton Dickinson 社製) によって行った。選抜後は 5 μ g/mL Blasticidin, 10%FBS 添加 DMEM 培地にて培養、維持した。

4) 全長ヒト c-Mpl 発現 FM3A 細胞の作製

上記 3) と同様の方法で pEF-MPL635 ベクターを FM3A 細胞に導入し、全長ヒト c-Mpl 発現 FM3A 細胞株 (以下、FM3A-hMpl) を樹立した。5 μ g/mL Blasticidin, 10%FBS 添加 Roswell-Park Memorial Institute (RPMI) 培地にて培養、維持した。

5) 恒常活性型ヒト Mpl 発現 FM3A 細胞作製

上記、pEF-MPL635-Ser ベクターを、3) と同様の方法で、FM3A 細胞に導入し、hMpl-Ser 発現 FM3A 細胞株 (以下、FM3A-hMpl-Ser) を樹立した。5 μ g/mL Blasticidin, 10%FBS 添加 RPMI 培地にて培養、維持した。

1-2 可溶化ヒト c-Mpl 組換えタンパク質の作製

ヒト c-Mpl の細胞膜貫通領域および細胞内領域を欠失させた、下記配列の可溶化型ヒト c-Mpl をコードする DNA を発現ベクター pEAK8 (EdgeBioSystems 社製) に結合し、トランスフェクタム試薬 (Promega 社より入手可能) にて Hek293 細胞

に導入した。安定発現株を選択後、その培養上清を抗 Mpl 抗体カラムにて精製し、可溶化型ヒト c-Mpl 組換えタンパク質（以下 soluble Mpl-x、sMpl-x と略記）を調製した。

NH₂-MPSWALFMVTSCLLLPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTEFDLTCFWDEEEAAPSGTYQLLYA
 YPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIK
 AMGGSQPGELQISWEEPAPPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCA
 QPTMPWQDGPQKQTSRSEASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGSWSLPVTVDLPGDA
 VALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGGFFYHSRARCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS
 RNSDIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSFVIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYT
 GEGHQDWKVLPEPLGARGGTLELRPRSRYLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW-COOH（配
 列番号 17）

[実施例 2] モノクローナル抗体の作製

本発明の抗体は、遺伝子改変によってヒト抗体を産生する能力を持つヒト抗体産生マウス（KM マウス™）を免疫し、モノクローナル抗体を作製することで得られた。KM マウスは、内在性マウスイムノグロブリン（Ig）重鎖及びマウス κ 軽鎖を欠損しており、かつ、ヒト Ig 重鎖遺伝子を含む 14 番染色体断片（SC20）及びヒト Ig κ 鎖トランスジーン（KCo5）を同時に保持する。即ち、KM マウスはヒト抗体を産生する能力を持ち、マウス Ig 重鎖および κ 鎖を欠損したマウスである。このマウスはヒト Ig 重鎖遺伝子座を持つ系統 A のマウスと、ヒト Ig κ 鎖トランスジーンを持つ系統 B のマウスとの交配により作製される。系統 A は、内因性 Ig 重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な 14 番染色体断片（SC20）を保持するマウス系統（Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol197:722 参照）である。また、系統 B は内在性マウス Ig 重鎖及び κ 軽鎖欠損の両者についてホモ接合体であり、ヒト Ig κ 鎖トランスジーン（KCo5）を保持するマウス系統（Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845 参照）である。

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、公知の方法によって行った（単クローン抗体実験操作入門 安東民衛ら著作、講談社（東京、日本）発行 1991 参照）。

1) 免疫

免疫原としてのヒト c-Mpl は、実施例 1 で作製した L929-hMpl 細胞、FM3A-hMpl 細胞、恒常活性型 c-Mpl 発現 FM3A-hMpl-Ser 細胞、sMpl-x 組換えタンパク質を用いた。被免疫動物は、実施例 2 で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウス使用し、下記の免疫方法で行った。

免疫方法 1 : 9 週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例 1 で作製した L929-hMpl 細胞 (5×10^6 細胞) を Ribi アジュバンドと混合し、腹腔内に初回免疫した。初回免疫以降、一週間ごとに、同細胞 (2×10^6 細胞) を、インターロイキン 6 (IL-6) ($5 \mu\text{g}$) と同時に、尾静脈経路で 7 回免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得 3 日前に同細胞を尾静脈経路で最終免疫した。

免疫方法 2 : 9 週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例 1 で作製した FM3A-hMpl-Ser 細胞 (5×10^6 細胞) に紫外線照射し、Ribi アジュバンドを加え腹腔内に初回免疫した。初回免疫から以降、同細胞 (5×10^6 細胞) を腹腔内投与で、一週間ごとに 7 回免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得 3 日前に、実施例 1 で作製した FM3A-hMpl 細胞 (2×10^6 細胞) を IL-6 ($5 \mu\text{g}$) を加えて、尾静脈経路で最終免疫した。

免疫方法 3 : 9 週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例 1 で作製した sMpl-x 組換えタンパク質 ($10 \mu\text{g}$) を、完全フロイントアジュバンド (CFA) と混合して皮下投与で初回免疫した。2 回目から 5 回目の免疫は、一週間に一度、sMpl-x 組換えタンパク質 ($5 \mu\text{g}$) を不完全フロイントアジュバンド (IFA) と混合して皮下投与で免疫した。6 回目から 8 回目の免疫では、L929-hMpl 細胞 (5×10^6 細胞) を腹腔内に免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得 3 日前に、sMpl-x 組換えタンパク質 ($5 \mu\text{g}$) および IL-6 ($5 \mu\text{g}$) を、尾静脈経路で最終免疫した。

2) ハイブリドーマ作製

最終免疫の 3 日後にマウスから脾臓及び/又はリンパ節を外科的に取得し、350mg/ml 炭酸水素ナトリウム、50 単位/ml ペニシリン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを含む無血清 DMEM 培地 10ml 中に入れ、メッシュ (セルストレイナー: フェルコン社製) 上でスパーテルを用いてつぶした。メッシュを通過した細胞懸濁液を遠心して細胞を沈澱させた後、この細胞を無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄してから、無血清 DMEM 培地に懸濁して細胞数を測定した。一方、10%FCS を含む DMEM 培地

にて、37°C、5%炭酸ガス存在下で細胞濃度が 1×10^8 細胞/mlを越えないように培養したミエローマ細胞 SP2/0 (ATCC No. CRL-1581) を同様に無血清 DMEM 培地で洗浄し、無血清 DMEM 培地に懸濁して細胞数を測定した。回収した細胞の懸濁液とマウスミエローマ懸濁液とを細胞数 5:1 で混合し、遠心後、上清を完全に除去した。このペレットに、融合剤として 50% (w/v) ポリエチレングリコール 1500 (ペーリンガーマンハイム社製) 1ml を、ピペットの先で攪拌しながらゆっくり添加した後、予め 37°C に加温しておいた無血清 DMEM 培地 1ml を 2 回に分けてゆっくり添加し、さらに 7ml の無血清 DMEM 培地を添加した。遠心後、上清を除去して得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供した。ハイブリドーマの選択は、10% のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum、FCS) とヒポキサンチン (H)、アミノプテリン (A)、チミジン (T) (以下「HAT」という。: シグマ社製) を含有する DMEM 培地中で培養することによって行った。さらに、10% FCS と HT (シグマ社製) とを含有する DMEM 培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、96 穴マイクロタイタープレート (ベクトンディッキンソン社製) 中で行った。抗ヒト c-Mpl ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択 (スクリーニング) 及び各々のハイブリドーマが産生するヒトモノクローナル抗体の特徴付けは、実施例 4 に記載のフローサイトメトリー、あるいは実施例 5 に記載の UT7/TPO 細胞を用いた細胞増殖アッセイによって行った。アゴニスト抗体の活性評価系として、BaF3 等のマウス細胞株にヒト Mpl を発現させ、細胞増殖アッセイを行うことができる (Orita et al. Blood. 2005 Jan 15; 105(2):562-6.) が、そのような細胞の反応が、ヒト細胞の反応を反映しているとは限らない。UT7/TPO はヒト由来細胞株であるため、これをスクリーニングに用いることで、よりヒト細胞に強い活性を持つ抗体を選抜し易いと考えられる。

スクリーニングの結果、抗ヒト Mpl アゴニスト抗体産生ハイブリドーマとして、免疫方法 1 によるハイブリドーマ 7-10、免疫方法 2 によるハイブリドーマ 4-49、免疫方法 3 によるハイブリドーマ 6-4-50, 6-5-2 の 4 クローンが選抜された。また、非アゴニスト抗体産生ハイブリドーマとして 2-35 (免疫方法 1 により得たもの) をコントロールとして選抜した。

[実施例 3] ハイブリドーマ培養上清からの精製抗体調製

ハイブリドーマの培養上清からの抗ヒト c-Mpl モノクローナル抗体の精製は以下の方法で行った。抗体を含む培養上清を rmp Protein A (アマシャムファルマシアバイオテック社製) 及び 0.8×40cm カラム (バイオラッド社製) を用い、吸着緩衝液として PBS、溶出緩衝液として 0.02M グリシン緩衝液 (pH 3) を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は 1M Tris (pH 9.0) を添加して pH7.2 付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜 (10000 カット、Spectrum Laboratories 社製) を用いて PBS に置換し、孔径 0.22 μm のメンブランフィルター MILLEX-GV (ミリポア社製) でろ過滅菌し、精製抗ヒト c-Mpl モノクローナル抗体を得た。精製抗体の濃度は 280nm の吸光度を測定し、1mg/ml を 1.4 OD として算出した。

抗ヒト c-Mpl モノクローナル抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。

まず、抗体産生ハイブリドーマを 10ng/ml Recombinant Human IL-6 (R&D Systems 社製)、10% Low IgG Fetal Bovine Serum (HyClone 社製) 含有 eRDF 培地 (極東製薬社製) に馴化した。この馴化したハイブリドーマを凍結保存した。次に、その一部を、ウシインシュリン (5 $\mu\text{g/ml}$ 、ギブコビーアールエル社製)、ヒトトランスフェリン (5 $\mu\text{g/ml}$ 、ギブコビーアールエル社製)、エタノールアミン (0.01mM、シグマ社製)、亜セレン酸ナトリウム (2.5 $\times 10^{-5}$ mM、シグマ社製)、10ng/ml Recombinant Human IL-6 (R&D Systems 社製)、1% Low IgG Fetal Bovine Serum (HyClone 社製) 含有 eRDF 培地 (極東製薬社製) に馴化した。フラスコにて培養し、ハイブリドーマの生細胞率が 90% になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、10 μm と 0.2 μm のフィルター (ゲルマンサイエンス社製) に供し、きょう雑物を除去した。

[実施例 4] フローサイトメトリーによる抗ヒト c-Mpl 抗体の結合活性評価

ハイブリドーマ培養上清もしくは精製抗体を用いたフローサイトメトリーによって、抗ヒト c-Mpl 抗体の結合活性を測定した。手順は以下の通りである。細胞は FM3A-hMpl 細胞もしくはヒト Mpl 発現 FDCP2 細胞 (FDCP-hMpl) (FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34. 参照) を用いた。

反応あたり 4×10^5 個の細胞を 50 μL の FACS staining medium (2%FBS, 0.1%Na₃, 1mM EDTA in PBS) に懸濁し、50 μL のハイブリドーマの培養上清もしくは精製ヒ

ト抗体 (終濃度 $0.1-1 \mu\text{g/mL}$) を加え、氷上にて 30 分間反応させた。FACS staining medium による洗浄後、二次抗体である R-phycoerythrin (RPE) 標識ヤギ抗ヒト Ig γ F (ab') 抗体 (Southern Biotechnology 社製 Cat#2043-09) を加え、再び氷上で 30 分遮光反応させた後、再び洗浄した。細胞を Propidium Iodide (PI) を加えた FACS staining medium に懸濁し、解析を行った。解析は FACS Calibur (Becton Dickinson 社製) にて行った。

図 1 に各抗体の精製抗体を用いたフローサイトメトリーの結果を示す。各抗体は FDCP-hMpl 細胞に結合したが、その親細胞である FDCP2 細胞 (FDCP parent) には結合しなかった。従って、これらの抗体はヒト Mpl 特異的に結合していることが示された。

[実施例 5] UT7/TPO 細胞を用いた抗ヒト c-Mpl 抗体のアゴニスト活性評価

ハイブリドーマ上清もしくは精製抗体を用いて、UT7/TPO 細胞増殖アッセイを行い、アゴニスト活性を評価した。UT7/TPO 細胞は TPO 依存性のヒト巨核球系細胞株である (Ozaki K et al. Blood. 1998 Dec 15;92(12):4652-62. 参照)。通常は 10%FBS, 5ng/mL PEG-rHuMGDF 添加 Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium (IMDM) で培養、維持した。細胞増殖アッセイの手順は以下の通りである。

(1) UT7/TPO 細胞培養液を 50mL チューブに移し、遠心分離 (1, 500rpm, 5min, 4°C) により細胞をペレットにした。培地を除き、サイトカイン非添加, 10%FBS 添加 IMDM 培地 (以下、増殖アッセイ用培地) でペレットを懸濁した。再び遠心し、新しい増殖アッセイ用培地で懸濁した。遠心、懸濁をもう一度繰り返した。

(2) 上記 1. で増殖アッセイ用培地に懸濁した細胞を 37°C, 5%CO₂ 条件下で 6 時間培養した。

(3) 培養後、細胞を遠心してペレットにし、増殖アッセイ用培地にて懸濁した。このとき、細胞濃度を 6×10^5 cells/mL にあわせ、細胞懸濁液を、各ウェル 50 μL で 96-well plate に播いた。

(4) 次に、ハイブリドーマ培養上清 10 μL に、増殖アッセイ用培地 40 μL を加え、各ウェルに添加する。精製抗体の場合は、増殖アッセイ用培地 50 μL に検体を終濃度の 2 倍の濃度で加え、各ウェルに添加した。

(5) 37°C, 5%CO₂ にて、48 時間培養する。

(6) WST-8 試薬 (同仁化学研究所社製) を $10 \mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、2 時間培養する。

(7) 吸光マイクロプレートリーダー (TECAN 社製 SUNRISE RAINBOW) にて各ウェルの吸光度を測定する。(測定波長 450nm, 参照波長 600nm 以上)

図 2 に 7-10 (図 2A), 4-49 (図 2B), 6-4-50 (図 2C), 6-5-2 (図 2D) 各精製抗体を用いた UT7/TPO 細胞増殖アッセイにおける増殖曲線を示す。また、スクリーニングの結果得られた抗ヒト c-Mpl 抗体のサブクラス、活性の強さ (UT7/TPO 細胞増殖アッセイにおける 50%有効濃度 (EC₅₀)、最大活性(Max))、各抗体が得られた実施例 2 に記載の免疫方法を表 2 に示す。

表 2

ハイブドーマ	サブクラス	UT7/TPO (EC ₅₀)	UT7/TPO(Max)	免疫方法
2-35 非アゴニスト	IgG1	-	-	1
7-10	IgG1	++	>90%	1
4-49	IgG1	++	>80%	2
6-4-50	IgG1	+	>80%	3
6-5-2	IgG1	+	>50%	3
PEG-rHuMGDF	-	0.001-0.01nM	100%	-

+: EC₅₀ 1-10nM

++: EC₅₀ 0.1-1nM

[実施例 6] コロニーアッセイ

ヒト臍帯血由来 CD34+ 細胞を用いた CFU-Mk コロニー形成アッセイを行い、精製抗体のヒトプライマリー細胞に対する作用を検討した。アッセイには MegaCultTM-C (Stem Cell Technologies 社製 Cat#04972) を使用した。手順は以下の通りである。

(1) 検体を含んだ 0.15mL の IMDM に、0.85mL の MegaCultTM-C 培地を加え 1mL とした。

(2) ヒト臍帯血より調製した CD34+細胞を 1.1×10^5 cells/mL の濃度で、IMDM に懸濁し、上記 1. の培地が入ったチューブに 0.05mL ずつ添加した。

(3) 細胞を加えた各チューブをボルテックスで攪拌し、0.6mL の氷冷したコーゲン液を加え、再びボルテックスで攪拌した。

(4) 上記 3. までの細胞、検体混合液をチャンバースライドの各ウェルに 0.75mL ずつ添加した。

(5) チャンバースライドを、100mm ペトリディッシュ中に入れた。乾燥を防ぐために、3mL の精製水を入れた 35mm ペトリディッシュを同じ 100mm ペトリディッシュ中に入れた。

(6) チャンバースライドが入ったペトリディッシュをインキュベーター中に静置し、37°C、5%CO₂ 条件下で 10～12 日間培養した。

(7) 培養後、固定液（メタノール：アセトン＝1：3）にて固定した。

(8) 抗ヒト CD41 抗体による免疫染色を行い、CFU-Mk コロニーを検出した。顕微鏡下でコロニー数をカウントし、各検体の CFU-Mk コロニー形成能を比較した。

図 3 にコロニーアッセイの結果を示した。7-10_IgG1, 4-49_IgG1 によってコロニー形成が誘導された。

[実施例 7] 抗体遺伝子クローニングと配列決定

組み換え抗体を作製するために、選抜された抗ヒト c-Mpl アゴニスト抗体産生ハイブリドーマから抗体遺伝子、具体的には重鎖（H 鎖）をコードするヒト Ig γ cDNA および軽鎖（L 鎖）をコードするヒト Ig κ cDNA を単離し、配列を決定した。

1) 各モノクローナル抗体の cDNA 合成

各ハイブリドーマで発現するヒト抗体重鎖、及び軽鎖の抗体の可変領域を含む DNA 断片を取得するために、ヒト Ig γ 、及びヒト Ig κ の各々の定常領域に特異的なプライマーを用いた 5' RACE (5' rapid amplification of cDNA ends) 法によるクローニングを行なった。具体的には、BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製) を用い、添付の説明書にしたがって実施した。

cDNA 合成の材料としては、ハイブリドーマ 7-10, 4-49, 6-4-50, 6-5-2 細胞に RNA 抽出用試薬である ISOGEN (日本ジーン社製、日本) を添加し、取扱説明書にしたがって Total RNA を精製した。精製した total RNA より各約 1 μ g を鋳型として用いて、1st strand cDNA を作製した。

1st strand cDNA の合成は、

Total RNA 1 μ g/3 μ l

5' CDS 1 μ l

SMART Oligo 1 μ l

上記組成の反応液を 70°C で 2 分間インキュベートした後、

5×Buffer 2 μ l

DTT 1 μ l

DNTP mix 1 μ l

PowerScript Reverse Transcriptase 1 μ l

を加え 42°C で 1.5 時間インキュベートした。

さらに、50 μ l の Tricine-EDTA Buffer を加えた後、72°C で 7 分間インキュベートし、1st strand cDNA を取得した。

2) PCR による重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅と塩基配列の確認

2-1) PCR による重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅

ヒト抗体遺伝子の cDNA を増幅するために、ヒト抗体特異的配列を有する 3' プライマー (具体的な配列は後記) と BD SMART RACE cDNA Amplification Kit で合成された cDNA の 5' 末端に付加された配列に特異的にハイブリダイズする 5' プライマー (Universal primer A mix) を PCR 用のプライマーセットとして、また PCR 用酵素として KOD-Plus-DNA ポリメラーゼ (東洋紡績 (株) 社製) を用いて、下記の反応液を調製して PCR に供した。

sterile H₂O 28 μ l

cDNA 2.5 μ l

KOD-Plus-buffer (10X) 5 μ l

dNTP Mix (2mM) 5 μ l

MgSO₄ (25mM) 2 μ l

KOD-Plus-(1 unit/ μ l) 1 μ l

Universal primer A mix (UPM) (10X) 5 μ l

Gene specific primers (GSP) (10 μ M) 1.5 μ l

Total volume 50 μ l

重鎖遺伝子の増幅反応には、SMART RACE cDNA Amplification Kit 付属の UPM プライマーと IgG1p プライマーを用い、他方、軽鎖遺伝子の増幅には UPM プライ

マーと hk-2 プライマーの各セットを使用した。

IgG1p プライマー : 5' -TCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTG TG-3' (配列番号 18)

hk-2 : 5' -GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC -3' (配列番号 19)

また反応温度条件は次のとおりである。

94°C /30 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復、

94°C /30 秒間、70°C/30 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 5 回反復、

94°C /30 秒間、68°C/30 秒間、72°C/3 分間のサイクルを 25 回反復した。

さらに、この反応液 2 μ l に Tricine-EDTA Buffer 98 μ l を加えて希釈したもの 5 μ l を鋳型とし、第一 PCR よりも内側にプライマーを設定した第二 PCR (Nested PCR) を実施した。PCR 反応溶液の組成を次に示す。

sterile H₂O 30 μ l

第一 PCR 反応液 (50 倍希釈) 5 μ l

KOD-Plus-buffer(10X) 5 μ l

dNTP Mix (2mM) 5 μ l

MgSO₄(25mM) 2 μ l

KOD-Plus-(1unit/ μ l) 1 μ l

Nested Universal primer A (NUP;10 μ M) 1 μ l

Gene specific primers (GSP) (10 μ M) 1 μ l

Total volume 50 μ l

上記反応のプライマーセットとして、重鎖遺伝子増幅用の場合は、NUPM プライマー (SMART RACE cDNA amplification Kit 付属 ; ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製) と hh2 プライマー (4-49、6-4-50、6-5-2 の場合)、或は IgG2p₁₃₄ (7-10 の場合) を使用して、また、軽鎖遺伝子の増幅の場合は、UPM プライマーと hk-5 プライマーを用いた。反応温度条件としては、94°C の初期温度で 1 分間の後、94°C/5 秒間、68°C/10 秒及び 72°C/3 分間のサイクルを 20 回反復、最後に 72°C/7 分間加熱した。

2-2) 抗体遺伝子の塩基配列決定

上記の方法で増幅した重鎖 PCR 断片 (以下 HV[C]と記載) は、重鎖の 5' 非翻訳領域、リーダー配列 (分泌シグナル配列)、可変領域 (HV) 及び定常領域の一部 ([C])

より構成される。同様に、軽鎖の PCR 増幅断片（以下 LV[C]と記載）は、軽鎖の 5' 非翻訳領域、リーダー配列（分泌シグナル配列）、可変領域（LV）及び定常領域の一部（[C]）より構成される。ここでリーダー配列（分泌シグナル）とは抗体の分泌に必要で、成熟抗体タンパク質からは切り離されるアミノ酸配列である。HV[C]断片および LV[C]断片は、PCR 反応液からエタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で分離し、メンブランを用いる DNA 精製キットである QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社製）にて精製した。精製した HV[C]増幅断片あるいは LV[C]増幅断片は、それぞれ Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit（インビトロジェン社製）の pCR 4Blunt-TOPO ベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。DNA 塩基配列決定のためにプライマーとして、M13-20FW 及び M13RV を用いた。

hk-5 : 5' - AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA GAT TTC-3' (配列番号 20)

hh2 プライマー : 5' - GCT GGA GGG CAC GG TCA CCA CGC TG -3' (配列番号 21)

IgG2p_134 : 5' - TGCACGCCGC TGGTCAGGGC GCCTGAGTTC C -3' (配列番号 22)

アゴニスト抗体 7-10 の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<7-10 重鎖核酸配列> (ATG 開始コドンより可変領域 C 末端アミノ酸残基をコードする DNA 配列まで)

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTG
GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT
GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG
AATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC
TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAAATCTATGG
TTCGGGGAGTTCGGTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTCTCA (配列
番号 23)

<7-10 重鎖アミノ酸配列> (リーダー配列及び可変領域まで)

(下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW
 NSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKNLWFGEFRYWYFD LWGRGTLVTV SS
 (配列番号 24)

<7-10 軽鎖核酸配列> (ATG 開始コドンより可変領域 C 末端アミノ酸残基をコードする DNA 配列まで)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC
 CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
 CAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT
 GCCTCCAGTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
 ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTC
 GCGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (配列番号 25)

<7-10 軽鎖アミノ酸配列> (リーダー配列及び可変領域まで)

(下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW
 NSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKNLWFGEFRYWYFDLWGRGTLVTVSS
 (配列番号 26)

アゴニスト抗体 4-49 の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<4-49 重鎖核酸配列> (ATG 開始コドンより可変領域 C 末端アミノ酸残基をコードする DNA 配列まで)

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGAGCAGCTGGTG
 GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACCTTT
 GATGATTATGCCATGTAAGTGGTCCGGCAAGTTCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG
 AACAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGTTTCCAGAGACAACGCCAAGAAC
 TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAGCCCTATGG
 TTCGGGGAGTTCCCCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 27)

<4-49 重鎖アミノ酸配列> (リーダー配列及び可変領域まで)

(下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す)

MELGLSWIFLVAILKGVQCEEQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMYWVRQVPKGGLEWVSGISW
NSGSIGYADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKALWFGGEFPHYYGMDVWVGQTTVTVSS

(配列番号 28)

<4-49 軽鎖核酸配列> (ATG 開始コドンより可変領域 C 末端アミノ酸残基をコードする DNA 配列まで)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC
CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
CAGGGCATTAGCAGTACTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT
GCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTT
GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGT (配列番号 29)

<4-49 軽鎖アミノ酸配列> (リーダー配列及び可変領域まで)

(下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSTLAWYQQKPGKAPKLLIYD
ASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 30)

アゴニスト抗体 6-4-50 の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<6-4-50 重鎖核酸配列> (ATG 開始コドンより可変領域 C 末端アミノ酸残基をコードする DNA 配列まで)

ATGGAATTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTG
GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACCTTT
GATAATTATGCCATGTACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG
AATAGTGGTGACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC
TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGGGATGCGGGG
TTCGGGGAGTTCCACTACGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号
31)

<6-4-50 重鎖アミノ酸配列> (リーダー配列及び可変領域まで)

(下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGFTFDNYAMYWVRQAP
 GKGLEWVSGISWNSGDIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDAG
 FGEFHYGLDVWGQTTVTVSS (配列番号 32)

<6-4-50 軽鎖核酸配列> (ATG 開始コドンより可変領域 C 末端アミノ酸残基をコードする DNA 配列まで)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC
 CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
 CAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT
 GCCTCCAGTTTGAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
 ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAATAGTTACCCGTGGACGTTCC
 GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGT (配列番号 33)

<6-4-50 軽鎖アミノ酸配列> (リーダー配列及び可変領域まで)

(下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKVPKLLIYD
 ASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPWFQGGTKVEIKR (配列番号 34)

アゴニスト抗体 6-5-2 の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<6-5-2 重鎖核酸配列> (ATG 開始コドンより可変領域 C 末端アミノ酸残基をコードする DNA 配列まで)

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTG
 GAGTGTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT
 GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG
 AATAGTGGTAGTATAGGTTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC
 TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAACCTATATGG
 TTCGGGGAGTGGGGAAACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 35)

<6-5-2 重鎖アミノ酸配列> (リーダー配列及び可変領域まで)

(下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVECGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW
NSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPIWFGGEWGNYYGMDVWGQGTITVTVSS

(配列番号 36)

<6-5-2 軽鎖核酸配列>(ATG 開始コドンより可変領域 C 末端アミノ酸残基をコードする DNA 配列まで)

ATGGAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTG
ACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT
GTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA
TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC
AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAACGT (配列番号 37)

<6-5-2 軽鎖アミノ酸配列> (リーダー配列及び可変領域まで)

(下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す)

METPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSPITFGQGRLEIKR (配列番号 38)

[実施例 8] 組換え抗体発現ベクターの構築

上記の方法でハイブリドーマからクローニングした抗体の可変領域を、ヒト抗体発現用ベクターに組み込み、様々な定常領域を持った組換え抗体発現ベクターを作製した。

ヒト抗体発現用ベクター、N5KG1-Val Lark (以下 N5KG1 と略記) (IDEC Pharmaceuticals 社製, US patent 6001358 参照) は、組換え抗体を動物細胞に発現させる目的で使用されるプラスミドベクターである。N5KG1 の構造を図 4 A に示した。N5KG1 は、2つの CMV プロモーター/エンハンサーを持ち、それぞれの下流に重鎖および軽鎖可変領域遺伝子のクローニングサイトを持つ。さらにその下流には、ヒト重鎖定常領域 ($\gamma 1$) およびヒト軽鎖定常領域 (κ) をコードする遺伝子配列をあらかじめ持っている。本ベクターの可変領域クローニングサイトに任意の重鎖および軽鎖可変領域 (リーダー配列=分泌シグナル配列を含む) を、読み枠 (フレーム) をあわせて組み込むことにより、軽鎖可変領域がヒト κ

鎖定常領域と、重鎖可変領域がヒト γ 1 鎖定常領域と連結された抗体を発現させることができる。従って、本ベクターを導入された動物細胞は培養液中に IgG1 抗体を産生する。

同様に、発現ベクターN5KG4PE (IDEC Pharmaceuticals 社製) は、IgG4PE の重鎖定常領域を持っている。IgG4PE とは IgG4 に二つの変異 (Ser228Pro, Leu235Glu) が入った配列である。Ser228Pro は IgG4 の分子内架橋 (S-S 結合) による単量体形成を抑制する変異である。また、Leu235Glu は抗体依存性細胞傷害 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) 活性を低減させる変異である。

また、N5KG1 の IgG1 定常領域を IgG3 に変換し、N5KG3 を作製した。

さらに本実施例では、N5KG1, N5KG3, N5KG4PE をもとに、重鎖定常領域 (特にヒンジ領域) に種々の改変を加えた発現ベクターを作製した。

本実施例で定常領域に加えた改変は、第一に、抗体ドメイン間のサブクラスの入れ替えによるものである。抗体重鎖定常領域は、N 末端側から CH1-ヒンジ-CH2-CH3 というドメイン構造を持っている。本実施例では、このドメイン単位で各サブクラスの配列を組み合わせた重鎖定常領域を作製した。例えば、CH1 およびヒンジ領域はヒト IgG3 の配列であり、CH2 および CH3 はヒト IgG1 である重鎖定常領域を作製した。そして、このような重鎖定常領域を持つ抗体を、CH1/ヒンジ/CH2/CH3 の順にサブクラスを表記し、IgG3/3/1/1 と名付けた (以降は IgG3311 というように "/" を省略して表記する)。また、例えば、ヒンジ領域はヒト IgG3 の配列であり、CH1, CH2 および CH3 はヒト IgG4PE である重鎖定常領域を作製した。このような重鎖定常領域を持つ抗体を IgG4344 と名付けた。

第二に、ヒト IgG3 ヒンジ領域の改変体を作製した。抗体のヒンジ領域はアッパー (upper) ヒンジとミドル (middle) ヒンジに分けることができる。アッパーヒンジとは Kabat EU numbering (Kabat ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5thEd. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)) による表記で 216 以降、226 より N 末端側の配列を指す。ミドルヒンジとは、同表記で 226 以降、231 より N 末端側の配列を指す。ヒト IgG3 のヒンジ領域は、アッパーヒンジが 12 アミノ酸、ミドルヒンジが 50 アミノ酸

から成る。さらにミドルヒンジは、5アミノ酸と15アミノ酸×3回のリピート配列に分けられる(5+15×3=50)。本実施例では、IgG3ミドルヒンジの繰り返し配列を1回に短縮した変異体を作製した。このようなヒンジをG3h1と名付け、このタイプのヒンジを持つ抗体を、前述のドメイン単位の変異とあわせて、IgGx3xxh1(xは任意)というように表記した。

また、IgG3のミドルヒンジ後半の繰り返し配列を無くした重鎖定常領域も作製した。このようなヒンジをG3uh(upper hingeの略)と名付け、IgGx3xxuhというように表記した。

さらにG3uhヒンジにL217SとR228Pの変異を加えた重鎖定常領域を作製した。この変異にはG3uhヒンジをよりIgG4PEの配列に近づける意図がある。これをG3uhm(upper hinge mutationの略)と名付け、これを持つ抗体をIgGx3xxuhmと表記した。

また、本発明者らは、IgG2のアップパーヒンジとミドルヒンジの間に、IgG3アップパーヒンジの一部配列(TPLGDTTHT(配列番号99))を挿入した重鎖定常領域を作製した。このようなヒンジをG3uhm2と名付け、これをもつ抗体をIgGx3xxuhm2と表記した。

図4Bに天然型のヒトイムノグロブリンと、IgG4PE, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhmのヒンジ領域のアミノ酸配列を示す。

本実施例では抗Mplアゴニスト抗体の可変領域を用いて、以下の定常領域を持つ抗体の発現ベクターを作製した。

IgG1, IgG4PE, IgG3311, IgG3331, IgG3344, IgG3344h1, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhm, IgG2322uhm2

以下に各発現ベクターの作製法を記載する。

1) IgG1サブクラスの抗c-Mpl抗体発現ベクターの作製

1-1) 抗ヒトc-Mpl抗体4-49_IgG1及び7-10_IgG1発現ベクターの作製

7-10と4-49については、N5KG1ベクターに最初に重鎖可変領域、次に、軽鎖可変領域の順に挿入して発現ベクターを作製した。

発現ベクター作製の工程を図4Cに示す。7-10及び4-49それぞれのHV[C]およびLV[C]断片(実施例7に記載)を含むプラスミドDNAを鋳型として、末端に連

結のための制限酵素部位 (5' 末側 SalI、3' 末側 NheI) を付加するようにデザインしたプライマーセットを用いて、重鎖および軽鎖のリーダー配列と可変領域の DNA を KOD-Plus-DNA ポリメラーゼによる PCR で増幅した。この PCR により増幅された、重鎖および軽鎖のリーダー配列+可変領域を、それぞれ HV 断片、LV 断片と表す。

まず、N5KG1 に 7-10HV、4-49HV 断片の挿入を行った。HV 断片増幅用のプライマーは、以下の通りである。

7-10 ;

HV 断片 5' 用プライマー : 40-3H5Sal

5' - AGAGAGAGAG GTCGACCACC ATGGAGTTGG GACTGAGCTG GATTT -3' (配列番号 39)

HV 断片 3' 用プライマー : 40-3H3Nhe

5' - AGAGAGAGAG GCTAGCTGAG GAGACAGTGA CCAGGGTGCC A -3' (配列番号 40)

4-49 ;

HV 断片 5' 用プライマー : F24HSal

5' -AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTT -3' (配列番号 41)

HV 断片 3' 用プライマー : C15H3Nhe

5' - AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3' (配列番号 42)

反応温度条件としては、94°Cの初期温度で1分間の加熱後、94°C/5秒間と68°C/45秒間のサイクルを35回反復し、最後に72°C/7分間加熱した。増幅されたDNA断片を制限酵素SalIとNheIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約430bpのDNAを回収し精製した。他方、N5KG1ベクターについては制限酵素SalI、NheI処理を順次行った後、脱リン酸化のためにAlkaline Phosphatase (E. coli C75) (宝酒造社製、日本)にて処理した後に、アガロースゲル電気泳動とDNA精製キットで約8.9kbのDNAを回収した。これら2つの断片をT4 DNA ligaseを用いてライゲーションして、大腸菌DH10Bへ導入して形質転換体を得た。得られた形質転換体のプラスミドDNAについてDNA塩基配列を解析して、重鎖定常領域の5'上流に、HV断片がフレームを合わせて挿入されたプラスミドDNA、N5KG1_7-10_Hv、及びN5KG1_4-49_Hvを取得した。

続いて、これらHV断片が挿入されたプラスミドベクターにLV断片(軽鎖リー

ダー配列+可変領域)の挿入を行なった。LV[C]断片を含むプラスミドDNAを鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位(5'末側BglIII、3'末側BsiWI)を付加するようにデザインしたプライマーを用いて、LV断片をPCRで増幅した。LV増幅用プライマーは以下の通りである。

7-10 ;

LV断片5'用プライマー : 165-1B_L18Bgl

5' - AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC-3' (配列番号 43)

LV断片3'用プライマー : 165_1B_L18_Bsi

5' - AGAGAGAGAG CGTACGTTTG ATCTCCACCT TGGTCCCTCC -3' (配列番号 44)

4-49 ;

LV断片5'用プライマー : DNP_L1Bglp

5' - AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC -3' (配列番号 45)

LV断片3'用プライマー : A27_R_N202

5' - AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGC-3' (配列番号 46)

反応は94°Cの初期温度で1分間の加熱後、94°C/5秒間と68°C/45秒間のサイクルを35回反復し、最後に72°C/7分間の保温という条件で実施した。精製したLVの増幅DNA断片は、pCR4Blunt-TOPOベクター(東洋紡績(株)製)にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。DNA塩基配列決定のためにプライマーとして、M13-20FWとM13RVを用いた。挿入部分のDNA塩基配列解析を行い、鋳型としたLVと相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミドDNA(TOPO_7-10_Lv、及びTOPO_4-49_Lv)を選択した。次に、それぞれのDNAを制限酵素BglIIIとBsiWIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約400bpのDNAを回収し精製した。その精製DNA断片と、制限酵素処理(BglIII, BsiWI)及び、脱リン酸化処理を施した7-10或は4-49のHVが挿入されたベクター(約9.3kb)をT4DNA ligaseによりライゲーションした後、大腸菌DH10Bへ導入して形質転換体を得た。形質転換体について、DNA配列解析や制限酵素切断パターンを解析し、目的のプラスミドDNAを含むクローンを選択した。更に、得られた抗体発現プラスミドDNAの大量精製を行い、重鎖全領域と軽鎖全領域、及び、その挿入部位周辺

の DNA 塩基配列にクローニング工程での変異がないことを確認した。7-10_IgG1 および 4-49_IgG1 発現ベクターは、各々 N5KG1_7-10、及び N5KG1_4-49 と名付けた。

図 4 C に N5KG1_7-10、及び N5KG1_4-49 の作製工程を図示した。

1-2) 抗ヒト c-Mpl 抗体 6-4-50_IgG1 及び 6-5-2_IgG1 抗体発現ベクターの作製

6-4-50、及び、6-5-2 については、ヒト抗体発現用ベクターに最初に軽鎖可変領域、次に、重鎖可変領域の順に挿入して発現ベクターを作製した。

6-4-50、及び、6-5-2 抗体それぞれの LV[C]断片を含むプラスミド DNA（実施例 7）を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5' 末側 BglIII、3' 末側 BsiWI）を付加するようにデザインしたプライマーセットを用いて、LV 断片（軽鎖のリーダー配列+可変領域）の DNA を KOD-Plus-DNA ポリメラーゼによる PCR で増幅した。プライマーは以下の通りである。

6-4-50 ;

LV 断片 5' 用プライマー : 208LF

5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGC -3' (配列番号 47)

LV 断片 3' 用プライマー : 62LP3Bsi

5' - AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCACCTTGGTCCCTTG -3' (配列番号 48)

6-5-2 ;

LV 断片 5' 用プライマー : A27_F

5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTC -3' (配列番号 49)

LV 断片 3' 用プライマー : 202LR

5' - AGAGAGAGAGCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGCCCTTGGC -3' (配列番号 50)

反応温度条件としては、94°Cの初期温度で1分間の加熱後、94°C/5秒間と68°C/45秒間のサイクルを35回反復し、最後に72°C/7分間加熱した。増幅されたDNA断片を制限酵素BglIIIとBsiWIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約400bpのDNAを回収し精製した。他方、N5KG1ベクターについては制限酵素BglIIIとBsiWI処理を順次行った後、脱リン酸化処理としてAlkaline Phosphatase (E. coli C75) (宝酒造社製)にて処理した後に、アガロースゲル電気泳動とDNA精製キットで約8.9kbのDNAを回収した。これら2つの断片をT4 DNA ligaseを用いてライゲーションして、大腸菌DH10Bへ導入して形質転換体を得た。インサートDNAを含

む形質転換体のプラスミド DNA について DNA 塩基配列を解析して、LV 断片が N5KG1 のヒト抗体軽鎖定常領域をコードする 5' 上流にフレームを合わせて挿入されたプラスミド DNA、N5KG1_6-4-50_Lv、及び N5KG1_6-5-2_Lv を取得した。引き続き、この LV 断片が挿入されたプラスミドベクターに HV 断片（重鎖のリーダー配列+可変領域）の挿入を行なった。HV[C]を含むプラスミド DNA（実施例 7）を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5' 末側 SalI、3' 末側 NheI）を付加するようにデザインしたプライマーを用いて、HV 断片を PCR で増幅した。使用したプライマーは以下の通りである。

6-4-50 ;

HV 断片 5' 用プライマー : 50-5-7Hsal

5' - AGAGAGAGAG GTCGACCACC ATGGAATTGG GACTGAGCTG GATTTT -3' (配列番号 51)

HV 断片 3' 用プライマー : C15H3Nhe

5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3' (配列番号 52)

6-5-2 ;

HV 断片 5' 用プライマー : F24HSal

5' - AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTT-3' (配列番号 53)

HV 断片 3' 用プライマー : L66H3Nhe

5' - AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTC-3' (配列番号 54)

反応は 94°C の初期温度で 1 分間の加熱後、94°C/5 秒間と 68°C/45 秒間のサイクルを 35 回反復し、最後に 72°C/7 分間の保温という条件で実施した。精製した HV 断片の増幅 DNA 断片は、一度 pCR4Blunt-TOPO ベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。DNA 塩基配列決定のためにプライマーとして、M13-20FW と M13RV を用いた。挿入部分の DNA 塩基配列解析を行い、鋳型とした HV と相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミド DNA（TOPO_6-4-50_Hv、及び TOPO_6-5-2_Hv）を選択した。次に、それぞれの DNA を制限酵素 SalI と NheI で消化して、アガロースゲル電気泳動で約 430 bp の DNA を回収し精製した。並行して制限酵素処理（SalI と NheI）、及び、脱リン酸化処理した 6-4-50 或は 6-5-2 の LV 断片が挿入されたベクター（約 9.3kb）に、

インサートしたい DNA 断片をライゲーションした後、大腸菌 DH10B へ導入して、得られた形質転換体から目的のプラスミド DNA を持つクローンを選択した。こうして得られた抗体発現プラスミド DNA の大量精製を行い、重鎖全領域と軽鎖全領域、及び、その挿入部位周辺の DNA 塩基配列にクローニング工程での変異がないことを確認した。6-4-50_IgG1 及び 6-5-2_IgG1 抗体発現ベクターを、それぞれ N5KG1_6-4-50、及び N5KG1_6-5-2 と名付けた。

図 4 D に N5KG1_6-4-50、及び N5KG1_6-5-2 の作製工程を図示した。

2) IgG4PE サブクラスの抗ヒト c-Mpl 抗体の作製

IgG4PE サブクラス抗体の発現ベクター作製には前述の N5KG4PE ベクターを用いた。N5KG4PE のプラスミド DNA を制限酵素 *NheI* と *BamHI* で切断して、重鎖定常領域を含む断片を精製して、抗 c-Mpl 抗体である N5KG1_7-10、及び N5KG1_4-49 の同じ制限酵素部位内につなぎ換えることにより、N5KG4PE_7-10、及び N5KG4PE_4-49 を作製した。

3) N5KG3 の作製

ヒト IgG3 用発現ベクター N5KG3 は N5KG1 の IgG1 重鎖定常領域を下記配列の IgG3 定常領域に置換することで作製した。

IgG3 定常領域アミノ酸配列：

STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SSLGTQYTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
 EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA
 KTKLREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEHA
 LHNRYTQKSLSLSPGK* (配列番号 55)

IgG3 定常領域塩基配列：

CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
 TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCG
 GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
 CCAGCAGTTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
 GAGTTGAGCTCAAACCCCACTTGGTGACACAACCTCACACATGCCACGGTGCCAGAGCCCAATCTTGTG

ACACACCTCCCCCGTGCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCATGCCACGGTGCC
 CAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCGTGCCAAGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGACCGT
 CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGATACCCTTATGATTTCCCGGACCCCTGAGGTACCGTGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 CCAAGACAAAGCTGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACC
 AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAAACCAAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
 CCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAACACCACGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
 ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
 CTCTGCACAACCGCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (配列番号 56)

4) IgG3311 発現ベクターの作製

IgG3311 発現ベクターは、N5KG3 を鋳型として、プライマーlinkH, 13ch1-R で 98°C 1 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 15 回行った。同時に、N5KG1 を鋳型として、プライマー13ch1、linkH2 を用いて、98°C 1 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 15 回行った。増幅した DNA 断片を PCR purification kit で精製し、2 つの精製 DNA 断片を等量混合したのち、98°C 1 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 5 回行い、プライマーlinkH、linkH2 を加えて、15 回反応した。増幅した DNA 断片を NheI, BamHI で切断し、N5KG1 ベクターの IgG1 定常領域と置き換えた。この発現ベクターを N5KG3311 と名づけた。

linkH: GGG TAC GTC CTC ACA TTC AGT GAT CAG (配列番号 57)

13ch1-R: GTC TTC GTG GCT CAC GTC CAC CAC GCA (配列番号 58)

13ch1: TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC (配列番号 59)

linkH2: TGA TCA TAC GTA GAT ATC ACG GC (配列番号 60)

5) IgG3331 発現ベクターの作製

IgG3331 発現ベクターは、N5KG3 を鋳型として、プライマーlinkH, CH3consR で 98°C 1 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 15 回行った。同時に、N5KG1 を鋳型として、プライマーCH3cons、linkH2 を用いて、98°C 1 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 15 回行った。増幅した DNA 断片を PCR purification kit で精製し、2 つ

の精製 DNA 断片を等量混合したのち、98°C 1 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 5 回行い、プライマー linkH、linkH2 を加えて、15 回反応した。増幅した DNA 断片を NheI、BamHI で切断し、N5KG1 ベクターの IgG1 定常領域と置き換えた。この発現ベクターを N5KG3331 と名づけた。

CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (配列番号 61)

CH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (配列番号 62)

以下に、IgG3344, IgG3344h1, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhm, IgG2322uhm2 の作製法を記す。これらについては、各定常領域を PCR 法によって増幅し、それをクローニングしたプラスミドを作製した。ついで、それら改変定常領域を N5KG1_7-10 等の IgG1 定常領域と置換した。

6) IgG3344, IgG3344h1 定常領域の作製

IgG3344 発現ベクターは、N5KG3331 および N5KG4PE を鋳型として、PCR を用いた変異導入 (Overlap Extension 法による部位特異的変異導入法) によって以下の手順で行った。

N5KG3331 を鋳型として、プライマーとして G3G4_P1_F と G3G4_P2_R を用いて 94°C の初期温度で 1 分間の加熱後、94°C/15 秒間、55°C/10 秒間、そして 68°C/1 分間のサイクルを 35 回反復し、最後に 72°C/7 分間加熱した。同時に、前述発現ベクター N5KG4PE を鋳型として、プライマーとして G3G4_P3_F と G3G4_P4_R を用いて同条件にて PCR を実施した。増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) にて精製した。これらの精製 DNA 断片を等量混合した後、最初の 5 サイクルについては、2 DNA 断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて 94°C の初期温度で 1 分間の加熱後、94°C/10 秒間、55°C/10 秒間、そして 68°C/1.5 分間という 5 サイクルの伸長反応を行なった後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとして G3G4_P1_F と G3G4_P4_R を加えて、更に 94°C/5 秒間と 68°C/2 分間のサイクルを 20 回反復し、最後に 72°C/7 分間の加熱を行なった。G3G4_P1_F と G3G4_P4_R のプライマーは、ヒト抗体定常領域のコード部分を切りだして、抗体の発現ベクターの該当する部分に変更可能とするために制限酵素部位 (G3G4_P1_F に NheI、G3G4_P4_R に BamHI 部位) が存在する。増幅した PCR 断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、

QIAquick Gel Extraction Kit にて精製した。精製した増幅断片は、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製)の pCR 4 Blunt-TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。塩基配列の解析より IgG3344 および IgG3344h1 定常領域を持つクローンを選択した。

G3G4_P1_F : 5' -AGAGAGGCTA GCACCAAGGG CCCATCG-3' (配列番号 63)

G3G4_P2_R : 5' -GAACTCAGGT GCTGGGCACC TTGGGCACG-3' (配列番号 64)

G3G4_P3_F : 5' - CCAAGGTGCC CAGCACCTGA GTTCGAGGGG GGA -3' (配列番号 65)

G3G4_P4_R : 5' - AGAGAGGGAT CCTCATTAC CCAGAGACAG GGA -3' (配列番号 66)

7) IgG4344 定常領域の作製

IgG4344 発現ベクターの作製においては、N5KG3331 を鋳型として、プライマーとして G434_P5_F と G434_P6_R を用いて 94°C の初期温度で 1 分間の加熱後、94°C /15 秒間、55°C /10 秒間、そして 68°C /1 分間のサイクルを 35 回反復し、最後に 72°C /7 分間加熱した。同時に、N5KG4PE を鋳型として、プライマーとして G434_P7_F と G3G4_P2_R を用いて同条件にて PCR を実施した。増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) にて精製した。これらの精製 2 DNA 断片と、前述した N5KG4PE を鋳型として、G3G4_P3_F と G3G4_P4_R をプライマーとして増幅・精製しておいた DNA 断片の計 3 種類の Overlap Extension 反応を実施した。すなわち、3 種類の DNA 断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて 94°C の初期温度で 1 分間の加熱後、94°C /10 秒間、55°C /10 秒間 68°C /1.5 分間のサイクルを 5 回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとして G434_P5_F と G3G4_P4_R を加えて、94°C /5 秒間と 68°C /2 分間のサイクルを 20 回反復し、最後に 72°C /7 分間の加熱を行なった。増幅した PCR 断片は QIAquick Gel Extraction Kit にて精製した後、pCR 4 Blunt-TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。塩基配列の解析より IgG4344 定常領域を持つクローンを選択した。

G434_P5_F : 5' - AGAGAGGCTA GCACCAAGGG GCCATCC -3' (配列番号 67)

G434_P6_R : 5' - GGTTTTGAGC TCAACTCTCT TGTCCACCTT GGTGTTGC -3' (配列番号

68)

G434_P7_F : 5' - GTGGACAAGA GAGTTGAGCT CAAAACCCCA CTTGGTGACA C -3' (配列番号 69)

8) IgG4344h1 定常領域の作製

IgG4344h1 発現ベクターの作製は、N5KG4344 を鋳型として、プライマーとして G434_P5_F, G434_P6_R を用いて 98°C の初期温度で 10 秒間の加熱後、98°C/10 秒間、55°C/30 秒間、そして 72°C/1 分間のサイクルを 7 回反復し、次いで 98°C/10 秒間、68°C/1 分間のサイクルを 30 回反復して、最後に 72°C/7 分間加熱した。PCR 用酵素としては、Pyrobest DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を使用した。同時に、N5KG3344h1 を鋳型として、プライマーとして G434_P7_F と G3G4_P4_R を用いて同条件にて PCR を実施した。増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) にて精製した。これらの精製 DNA 断片を等量混合した後、2 DNA 断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、98°C の初期温度で 10 秒間の加熱後、98°C/10 秒間、55°C/30 秒間、そして 72°C/1 分間のサイクルを 7 回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとして G434_P5_F と G3G4_P4_R を加えて、更に 98°C/10 秒間と 68°C/1 分間のサイクルを 30 回反復し、最後に 72°C/7 分間の加熱を行なった。増幅した PCR 断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit にて精製した。精製した増幅断片は、pCR 4 Blunt-TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。塩基配列の解析より G4344h1 定常領域持つクローンを選択した。

9) IgG4344uh 定常領域の作製

G4344uh の作製は、N5KG4344 を鋳型として、プライマーとして G434_P5_F と 17-1R を用いて 98°C の初期温度で 10 秒間の加熱後、98°C/10 秒間、50°C/30 秒間、そして 72°C/1 分間のサイクルを 5 回反復し、次いで 98°C/10 秒間、55°C/30 秒間、そして 72°C/1 分間のサイクルを 5 回反復し、98°C/10 秒間、68°C/1 分間のサイクルを 25 回反復して、最後に 72°C/7 分間加熱した。PCR 用酵素としては、Pyrobest DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を使用した。並行して、N5KG3344h1 を

鋳型として、プライマーとして 17-2F と G3G4_P4_R を用いて同条件にて PCR を実施した。増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit にて精製した。これらの精製 DNA 断片を等量混合した後、2 DNA 断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、98°Cの初期温度で 10 秒間の加熱後、98°C/10 秒間、68°C/1 分間のサイクルを 5 回、さらに 98°C/10 秒間、55°C/30 秒間、そして 72°C/1 分間のサイクルを 5 回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとして G434_P5_F と G3G4_P4_R を加えて、更に 94°C/30 秒間と 68°C/1 分間のサイクルを 30 回反復し、最後に 72°C/7 分間の加熱を行なった。増幅した PCR 断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit にて精製した。精製した増幅断片は、pCR 4 Blunt-TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。塩基配列の解析より IgG4344uh 定常領域を持つクローンを選択した。

17-1R : 5' - AGGTGCTGGG CACCGTGGGC ATGTGTGAGT TGT -3' (配列番号 70)

17-2F : 5' - CACACATGCC CACGGTGCCC AGCACCTGAG TTC -3' (配列番号 71)

10) IgG4344uhm 定常領域の作製

IgG4344uhm 発現ベクターの作製は、N5KG4PE を鋳型として、プライマーとして G434_P5_F と 17m-1R を用いて 98°Cの初期温度で 10 秒間の加熱後、98°C/10 秒間、50°C/30 秒間、そして 72°C/1 分間のサイクルを 5 回反復し、次いで 98°C/10 秒間、55°C/30 秒間、そして 72°C/1 分間のサイクルを 5 回反復し、98°C/10 秒間、68°C/1 分間のサイクルを 25 回反復して、最後に 72°C/7 分間加熱した。PCR 用酵素としては、Pyrobest DNA Polymerase を使用した。並行して、N5KG4PE を鋳型として、プライマーとして 17m-2F と G3G4_P4_R を用いて同条件にて PCR を実施した。増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit にて精製した。これらの精製 DNA 断片を等量混合した後、2 DNA 断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、94°C/30 秒間、55°C/30 秒間、そして 72°C/1 分間のサイクルを 7 回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとして G434_P5_F と G3G4_P4_R を加えて、更に 94°C/30 秒間と 68°C/1 分間のサイクルを 30 回反復し、最後に 72°C/7 分間の加熱を行なった。増幅した PCR

断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit にて精製した。精製した増幅断片は、pCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。塩基配列の解析より IgG4344uhm 定常領域を持つクローンを選択した。

17m-1R : 5' - TGTGTGAGTT GTGTCACCAA GTGGGGTTTT GGA CTCAACT CTCTTGCCA CCTGGT
-3' (配列番号 72)

17m-2F : 5' - ACCCCACTTG GTGACACAAC TCACACATGC CCACCATGCC CAGCACCTGA GTTCGAG
-3' (配列番号 73)

図 4 E に各種改変重鎖のアミノ酸配列を示した。

11). N5KG2_Ser の作製

ヒト IgG2 用発現ベクター-N5KG2_Ser は N5KG1 の IgG1 重鎖定常領域を下記配列の IgG2 定常領域に置換することで作製した。なお、下記定常領域配列には補体活性を低下させるために 331 番目のプロリンをセリンにする変異が入っている。

IgG2 重鎖定常領域アミノ酸配列 :

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPEPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTIS
KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 97)

IgG2 重鎖定常領域塩基配列 :

GCTAGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACCGTGCCTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGG

CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCC
 AAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG
 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

(配列番号 98)

12) IgG2322uhm2 定常領域の作製

IgG2322uhm2 発現ベクターは、N5KG2_Ser を鋳型として、PCR を用いた変異導入 (Overlap Extension 法による部位特異的変異導入法) によって、IgG2 のアッパ
 ーヒンジとミドルヒンジの間に、IgG3 アッパーヒンジの一部配列 (TPLGDTTHT (配
 列番号 99)) を挿入することで作製した。下に IgG2322uhm2 定常領域のアミノ酸
 配列を示す。

IgG2322uhm2 重鎖定常領域アミノ酸配列

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKTPLGDTTHTCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 PASIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 96)

また、以下に、7-10_IgG2322uhm2 の重鎖配列を示す。

配列番号 95 (配列番号 2 (可変領域; 下線部) + 配列番号 96) :

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIQYADSVKGRFTISR
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKNLWFGEFQRYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK
 VDKTKVERK[TPLGDTTHT]CCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTIKTKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(ここで、[]の配列は、IgG3 アッパーヒンジの一部配列 (配列番号 99) を表す。)

13) 各種改変重鎖定常領域を持った抗体発現ベクターの作製

作製した各種改変重鎖定常領域を持つプラスミド DNA を、制限酵素 NheI, BamHI で切断後、定常領域配列を精製分離した。続いて、抗ヒト c-Mpl 抗体発現ベクター N5KG1_7-10, N5KG1_4-49, N5KG1_6-4-50, N5KG1_6-5-2 を同酵素で処理し、定常領域を置換した。

図 4 F に 7-10_IgG4344uhm の重鎖配列を示した。

図 4 G に 7-10_IgG4344uhm の軽鎖配列を示した。

[実施例 9] 抗ヒト c-Mpl 抗体の 293F 細胞での一過性発現、及び精製

実施例 8 で作製した発現ベクター DNA を EndoFree Plasmid Kit (キアゲン社) にて調製し、FreeStyle™ 293 Expression System (インビトロジェンライフテクノロジー社) を用いて浮遊性 293 細胞 (インビトロジェンライフテクノロジー社) に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター (MILLIPORE 製) で濾過した培養上清 (IgG として約 500 μ g) を抗体精製用アフィニティーカラムである HiTrap rProtein A FF (カラム体積 1ml) (アマシャムバイオサイエンス社) にチャージし、PBS (-) で洗浄後 20mM クエン酸バッファー (pH3.4) により溶出し、200 mM リン酸バッファー (pH7.0) を含むチューブに回収した。

[実施例 10] 組換え型抗体の作製

構築した抗体発現ベクターを宿主細胞に導入して、抗体発現細胞を作製した。発現のための宿主細胞には、dhfr 欠損の CHO DG44 細胞 (IDEC Pharmaceuticals Corporation) を無血清培地である EX-CELL325PF (JRH) に馴化した細胞株を用いた。宿主細胞へのベクターの導入はエレクトロポレーションにより実施した。エレクトロポレーションは抗体発現ベクター約 2 μ g を制限酵素 AscI で線状化し、Bio-Rad electrophoreter をもちいて 350V、500 μ F の条件で、 4×10^6 個の CHO 細胞に遺伝子を導入し、96well culture plate に播種した。ベクターの導入処理後、G418 を添加して培養を継続した。コロニーを確認した後、抗体発現株を選別した。選択した CHO 細胞株を EX-CELL325-PF 培地 (JRH) (2mM glutamine、100units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、hypoxanthine and thymidine (HT) サプリメント (1:100) (Invitrogen) を含む) で 5%CO₂ 条件下で培養した。培養上清を

Mabselect Protein A カラム (Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.) に吸着後、PBS で洗浄して、20mM クエン酸-Na、50mM NaCl (pH3.4) バッファーで溶出した。溶出液は 50mM Phosphate-Na, pH7.0 にて中和した。Milli-Q 水にて、約 1.5 倍に希釈して Conductivity を 4.0ms/cm 以下に調製した。次に、Q-Sepharose (Hitrap Q HP) (Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.) と、SP-Sepharose (HiTrap SP FF) (Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.) を連結したカラムに、サンプルをチャージして吸着後、20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) にて洗浄後、1×PBS バッファーにて溶出した。調製された抗体溶液は、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター MILLEX-GV (ミリポア社製) でろ過滅菌した。精製した抗体の濃度は 280nm の吸光度を測定し、1mg/mL を 1.4 OD として算出した。

組換え型の改変抗体を用いて、UT7/TP0 アッセイ (実施例 5) における活性を測定した。4-49_IgG1 に比べ、IgG3311 と IgG3331 は活性の増強が見られた (図 5 A)。7-10_IgG4344uhm および 4-49_IgG4344uhm は PEG-rHuMGDF と同等の活性を示した。

表 3 に各種改変抗体の活性をまとめた。全てのアゴニスト抗体に関して、定常領域改変による活性の増強が見られた。7-10, 4-49 に関しては、IgG1 と IgG4PE は同等の活性であったが、IgG4344uhm は IgG4PE に比べ高活性であった。IgG4344uhm は、IgG4PE のアッパーヒンジ部 7 アミノ酸配列中の C 末側 4 - 7 位が IgG3 のアッパーヒンジ 1 2 アミノ酸配列中の 4 - 1 2 位の配列に置き換わっている (図 4 B 参照)。従って、この部分が活性の増強に重要であると考えられる。

表 3

	2-35	7-10	4-49	6-4-50	6-5-2
IgG1	-	++	++	+	+
IgG4PE	NT	++	++	NT	NT
IgG3311	NT	+++	+++	++	++
IgG3331	NT	+++	+++	NT	NT
IgG3344	NT	+++	NT	NT	++
IgG3344h1	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344h1	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344uh	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344uhm	NT	+++	+++	NT	NT

+: EC₅₀ 1-10nM
 ++: EC₅₀ 0.1-1nM
 +++: EC₅₀ 0.01-0.1nM
 NT: 試験せず

[実施例 1 1] アゴニスト抗体によるシグナル伝達

TPO が受容体である c-Mpl に結合すると、細胞内タンパク質のリン酸化が起こる。TPO によって活性化する主要な経路は、Jak-STAT, Ras-MAPK, PI3K-Akt の 3 つが知られている。アゴニスト抗体による c-Mpl 下流のリン酸化シグナル伝達の解析を行った。解析は、リン酸化タンパク質特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法で行った。以下に使用した抗体を列記する。抗 STAT5 (Cell Signaling 社製, Cat#9352), 抗 phospho-STAT5 (Cell Signaling 社製, Cat#9351L), 抗 JAK2 (Upstate 社製, Cat#06-255), 抗 phospho-JAK2 (Upstate 社製, Cat#07-606), 抗 Erk1/2 (Cell Signaling 社製, Cat#9272), 抗 phospho-Erk1/2 (Cell Signaling 社製, Cat#9271L), 抗 Akt (Cell Signaling 社製, Cat#9102), 抗 phospho-Akt (Cell Signaling 社製, Cat#9101S)。

これら抗体を使用し、以下の手順でアッセイを行った。

- 1) UT7/TPO 細胞をサイトカイン非添加 IMDM 培地で洗浄し、6 時間培養した。
- 2) 培養後、細胞を 1×10^6 cells/mL に調製し、6-well プレートに 2mL/well で播いた。
- 3) ウェルに、アゴニスト抗体または陽性コントロールとして PEG-rHuMGDF を添加し、細胞を刺激した。
- 4) 最短 5 分～最長 2 時間の刺激時間の後に細胞を回収し、氷冷 PBS にて細胞を

洗浄した。

5) 遠心分離で細胞をペレットにし、上清を除去後、PhosphoSafe™ Extraction Reagent (Novagen 社製, Cat#71296) でペレットを溶解したのち、再度遠心して、上清 (細胞抽出液) を回収した。

6) 上記 5. の細胞抽出液を用いて、ウェスタンブロット法でリン酸化タンパク質を検出した。

結果を図 6 に示す。アゴニスト抗体 7-10G4344uhm および 4-49G4344uhm によって、TPO シグナルと同様の経路のリン酸化が見られた (図 6 A)。抗体 6-5-2 については、IgG1 は Jak2, STAT5 のリン酸化が観察されなかったが、IgG3344 は Jak2, STAT5 のリン酸化が見られた (図 6 B)。

[実施例 1 2] ヒト血小板に対するプライミング作用検討

TPO はそれ自体では血小板凝集を起こさないが、ADP 等の凝集惹起物質による血小板凝集を促進する作用 (プライミング作用) がある。アゴニスト抗体によるヒト血小板プライミング作用を以下の手順で調べた。

1) 抗凝固剤として、3.1%(w/v)クエン酸三ナトリウムを 10 分の 1 容量加えた、健常人の末梢血を遠心分離 (140g, 15min) し、多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma、以下 PRP) を調製した。

2) さらに遠心分離 (2500g, 15min) して血球成分を沈殿させ、血漿を採取した。

3) PRP に含まれる血小板数を測定し、血漿を用いて血小板数を $3 \times 10^5 / \mu\text{L}$ にあわせた。

4) 上記 3. で調製した血小板浮遊液 $100 \mu\text{L}$ に検体を加え、攪拌しながら 3 分間インキュベーションした。

5) $30 \mu\text{M}$ ADP (SIGMA 社製) を $5 \mu\text{L}$ 添加し、血小板凝集による濁度の低下を測定した。測定には MC メディカル社製、Hematracer801 を用いた。

結果を図 7 に示す。ADP 添加条件下で、アゴニスト抗体によるプライミング作用が観察された。抗体単独 (ADP なし) では、血小板凝集は起こらなかった。

[実施例 1 3] カニクイザル投与

アゴニスト抗体をカニクイザルに投与し、血小板数の変動を解析した。使用個体の TPO に対する反応性を確かめるため、初日 (Day0) に PEG-rHuMGDF ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$)

を静脈内投与し3週間経過を観察した後、初回投与後21日目に精製アゴニスト抗体7-10G4PE(個体A)7-10G3344h1(個体B)を用量1mg/kgで静脈内投与した。

結果を図8に示す。A,B両方の個体でPEG-rHuMGDFによる一過性の血小板上昇が見られた。個体Bではアゴニスト抗体7-10G3344h1投与後に、血小板数の上昇が見られた。また、抗体投与による重篤な毒性は見られなかった。

[実施例14] ヒト臍帯血移植モデルにおける作用検討

実施例10で作製したアゴニスト抗体が、ヒト臍帯血移植モデルにおけるヒト造血系の構築を促進することを確認するため、以下の手順で実験を行った。

・NOG(NOD/SCID/IL2- γ R KO)マウス(実験動物中央研究所(日本国神奈川県川崎市)より購入)に移植前処置として放射線照射(2グレイ)を行い、ヒト臍帯血由来CD34+細胞を1,000ないし10,000個、尾静脈より注入移植した。

・移植後一日目に最初の被検物質投与を行い、その後、週に一回投与を実施した。群構成と各々の被検物質および投与量は下記のとおりである。匹数は各群6匹、投与は腹腔内投与で行った。また、毎週の投与時に体重測定を行った。

<群構成, 被検物質, 投与量>

I: 移植数10,000, PBS(コントロール)投与

II: 移植数1,000, PBS投与

III: 移植数10,000, 抗体7-10G4344uhm投与, 100 μ g/head/week

IV: 移植数1,000, 抗体7-10G4344uhm投与, 100 μ g/head/week

V: 移植数10,000, TPO(PEG-rHuMGDF)投与, 5 μ g/head/week

VI: 移植数1,000, TPO(PEG-rHuMGDF)投与, 5 μ g/head/week

・移植前1日と移植後2、4、6週に末梢血の解析を行った。末梢血解析の手順は下記のとおりである。

<末梢血解析手順>

- ・キャピラリーを用いて、マウス眼窩静脈より末梢血(約70 μ L)を採取した。
- ・KX-21自動血球解析システム(Sysmex社製)を用いて血球数を測定した。
- ・ヒト血小板および白血球のキメラ率を調べるため、以下のAおよびBに挙げた各抗体の組み合わせで染色し、FACS Caliburで解析した。A(血小板解析用): PE標識-抗ヒトCD41抗体(Dako社製R7058)+FITC標識-抗マウスCD41

抗体 (BD Pharmingen 社製#553848)、B (白血球解析用) : A P C 標識 - 抗ヒト CD45 抗体 (ベックマン・コールター社製 IM2473) + F I T C 標識 - 抗マウス CD45 抗体 (BD Pharmingen 社製#553080)。また、解析の際に定量用の蛍光ビーズ (フローカウントビーズ) を加え、一定量の血液を解析できるようにした。

・血小板・白血球ともに、 $\text{ヒト細胞数} / (\text{ヒト細胞数} + \text{マウス細胞数}) \times 100$ (%)、という式でキメラ率を算出した。末梢血中の全血小板数とキメラ率を乗じることにより、ヒト血小板数を算出した。

・6週目にマウスを屠殺し、大腿骨から骨髓細胞を採取した。それを用いてコロニーアッセイを行い、ヒトの巨核球系 (MK) および赤血球系 (E)、顆粒球・マクロファージ系 (GM) の前駆細胞の数を測定した。巨核球系前駆細胞 (CFU-Mk) を検出するコロニーアッセイは、培養中に TPO (50ng/mL) と SCF (100ng/mL) を加えて行った。37°C、5%CO₂ 条件下で 12 日間の培養を行った。コロニーの検出は実施例 6 と同様に抗ヒト CD41 抗体を用いて行った。赤血球系、顆粒球・マクロファージ系の前駆細胞を検出するコロニーアッセイは、Methocult system (Stem Cell Technologies 社製) を用いて、培養中に EPO (4IU/mL) , SCF (100ng/mL) , IL-3 (20ng/mL) , GM-CSF (10ng/mL) を加えて行った。37°C、5%CO₂、5%O₂ 条件下で 14 日間の培養を行った。培養後、顕微鏡下でコロニーのカウントを行った。

図 9A、9B 及び 9C に本実験の結果を図示した。

移植後 6 週の時点において、抗体投与群では、他群に比べ、末梢血ヒト血小板数が有意に高かった (図 9A)。これにより、アゴニスト抗体 7-10G4344uhm は臍帯血移植時の血小板回復を促進することが示唆された。さらに抗体投与群では、骨髓中のヒト赤血球系および顆粒球・マクロファージ系前駆細胞の数が有意に高かった (図 9B)。またマウス白血球に対するヒト白血球の割を示す CD45 キメラ率においても有意に高かったことから、抗体投与群においてヒト白血球が増加していることがわかる (図 9C)。このことは 7-10G4344uhm が巨核球系のみならず、他系列の細胞の生着も促進できる可能性を示唆している。

これらの知見から、アゴニスト抗体は、血球が巨核球系・赤血球系・顆粒球・マクロファージ系に分かれるより上流の細胞に作用していることが示唆された。Mpl が造血幹細胞に発現しているという知見とあわせて考えると、アゴニスト抗

体は造血幹細胞の増殖を促進している可能性が高い。

ちなみに本実験では TPO 投与群では同様の効果が見られなかった。これに対しては、TPO がマウス造血細胞にも作用するため、TPO 投与群では骨髄中でヒト細胞とマウス細胞の競合が起こり、純粋にヒト細胞に対する作用を観察できていない可能性を考慮しなければならない。本アゴニスト抗体は、ヒト Mpl にしか作用しないことを特徴とすることから、Mpl を介したシグナルがヒト臍帯血造血幹細胞の増幅に効果があることを、*in vivo* で初めて明らかにすることができた。

[実施例 15] ヒンジ改変抗体の抗原性解析

本発明のアゴニスト抗体はヒンジ部分の改変によって活性を増強していることを特徴としているが、改変による抗原性の上昇が懸念された。そこで、ヒンジ改変体である 7-10G4344uhm のアミノ酸配列をもとに、コンピュータ上での抗原性予測を実施した。

体内に投与された外来タンパク質は樹状細胞、マクロファージ等の抗原提示細胞 (APC) に取り込まれ、分解された後、ペプチドが主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラス II 分子 (ヒトの場合 HLA class II, HLA-DR, DQ, DP) によって抗原提示される。APC によって提示されたペプチドは T 細胞受容体 (TCR) によって認識され、T 細胞を活性化させる。活性化された T 細胞 (ヘルパー T 細胞) は同抗原を認識する抗体を発現する B 細胞を活性化し、外来タンパク質に対する抗体が産生される。この機構の中で、ペプチドと MHC クラス II 分子との親和性が抗原性を規定する大きな要因となっている。ヒトの MHC クラス II 分子には多くの型 (多型) があり、同じペプチドであってもクラス II 分子の型によって親和性は大きく異なることが知られている。

そこで、7-10G4344uhm と IgG4PE の定常領域を持つ別のヒト抗体のアミノ酸配列を、様々な型のヒト HLA-DR, DQ, DP 分子との親和性を解析した (HLA 分子のデータベースおよび、解析のアルゴリズムは AlgoNomics 社より提供された)。

その結果、ヒンジ改変による新たなエピトープ出現はなかった。本改変抗体を医薬品として利用する際に抗原性の問題はないことが示唆された。

[実施例 16] ヒト Mpl トランスジェニックマウスへの抗体投与

本発明の抗体はマウス Mpl には交叉しないため、薬効を測定するため、外来遺

伝子としてヒト Mpl を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、抗体を投与する実験を行った。まず、マウス Mpl のプロモータ領域 5.5kb を PCR で増幅し、pBluescript プラスミドベクターにクローニングした。次に、ヒト Mpl の翻訳領域および 3' 側非翻訳領域を PCR で増幅し、マウス Mpl プロモーター下流に連結した。このコンストラクトを C57BL/6 マウス受精卵に注入し、受精卵を仮親に戻し出産させた。生後 3 週経過した時点で尻尾からゲノム DNA を抽出し、PCR で Tg マウスを選別した。得られた Tg マウス個体を C57BL/6 と交配し、系統化した。骨髄でのヒト Mpl の発現解析を行った。

その結果、複数のヒト Mpl を持つ Tg マウス系統が得られた。そのうち、39L 系統の骨髄ではヒト Mpl が発現していることが RT-PCR で確認された。39L 系統のマウスを用いて抗体の薬効を確認した。

アゴニスト抗体 7-10G4344uhm を単回投与 (3 又は 10 μ g/mL) し、末梢血中の血小板数の推移を、KX-21 自動血球解析装置を用いて調べた。末梢血の採取は眼窩静脈より行い、毎週測定を行った。陽性コントロールとして TPO (PEG-rHuMGDF) を用いた。群構成は以下のとおりである (各群 6 匹)。

I: 7-10G4344uhm 10 μ g 投与群

II: 7-10G4344uhm 3 μ g 投与群

III: TPO 3 μ g 投与群

IV: PBS 投与群

VI: 野生型マウス 7-10G4344uhm 10 μ g 投与群

結果を図 10 に示す。抗体投与群、TPO 投与群で血小板が増加した。TPO 投与群は投与後 2 週間でほぼベースラインに戻った。これに対して抗体投与群は投与後一ヶ月を経過しても血小板数は上昇したままであった。この結果から、アゴニスト抗体は血中で非常に安定であり、単回投与で長期にわたって血小板造血を促進できることが示唆された。このことから、特にアゴニスト抗体は慢性血小板減少症の治療に適していることが示唆された。

[実施例 17] 7-10G4344uhm 軽鎖変異体の活性評価

アゴニスト抗体 7-10 の軽鎖可変領域(7-10VL)のフレームワーク領域に変異を導入し、結合活性及びアゴニスト活性に与える影響を調べた。軽鎖の変異体はア

ゴニスト抗体 4-49 の軽鎖 (V104L)、アゴニスト 6-4-50 の軽鎖のアミノ酸を 1 つ置換したもの (A43V, G100Q) の 3 種である。これら変異軽鎖と 7-10G4344uhm 重鎖を組み合わせた抗体を作製したところ、全て、結合活性、アゴニスト活性ともにオリジナルの 7-10G4344uhm と同等であった。一方で、アゴニスト抗体 7-10 の軽鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR 領域) に変異 (Y94F) を導入した場合、結合活性、アゴニスト活性ともに 10 分の 1 程度に低下した。この結果から軽鎖アミノ酸配列には、ある程度の自由度があることが示された。

各変異体の軽鎖アミノ酸配列及び 7-10VL のアミノ酸配列は、以下のとおりである。なお、変異部は太字と下線で示した。

7-10VL (配列番号 3) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGG**TK**VEIK

7-10VL_V104L (4-49VL; 配列番号 85) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGG**TK**LVEIK

7-10VL_G100Q (6-4-50VL 置換体 1; 配列番号 86) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFG**Q**TKVEIK

7-10VL_A43V (6-4-50VL 置換体 2; 配列番号 87) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGK**V**PKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGG**TK**VEIK

7-10VL_Y94F (CDR 置換体; 配列番号 88) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQFNS**F**PLTFGGG**TK**VEIK

結合活性解析 : 各抗体の濃度を 1, 0.1, 0.01 μ g/mL に調製し、FM3A-hMpl 細胞を用いたフローサイトメトリーを行った。実験方法は実施例 4 に記載の方法で行った。コントロールに抗 DNP (ジニトロフェノール) 抗体を用いた。軽鎖変異抗体は 7-10G4344uhm と同等の結合活性を示した (図 11)。

アゴニスト活性解析 : 実施例 5 に記載の方法で、UT-7/TPO 細胞を用いた細胞

増殖アッセイを行った。軽鎖変異抗体は 7-10G4344uhm と同等のアゴニスト活性を示した (図 12)。

[実施例 18] 7-10G2322uhm2 の活性評価

実施例 10 で記載した方法と同様の方法で、アゴニスト抗体 7-10 の重鎖定常領域を G2322uhm2 にした 7-10G2322uhm2 抗体を作製し、実施例 5 に記載の方法で UT-7/TPO 細胞を用いた細胞増殖アッセイを行なった。その結果、7-10G2322uhm2 は、7-10G4344uhm および Peg-rhMGDF とほぼ同等のアゴニスト活性を持っていることが示された (図 13)。従って、ヒンジ領域以外の重鎖定常領域に関し、アゴニスト活性に変化を与えず、IgG2 と IgG4 を変換できることが示された。

[実施例 19] ヒトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体の重鎖及び軽鎖の組合せ

実施例 17 で示されたように、軽鎖の可変領域のフレームワーク領域を構成するアミノ酸を 1 つ置換したものにおいても結合活性、アゴニスト活性に変化がないことを考慮すると、アゴニスト抗体 7-10 (7-10VL) の軽鎖可変領域のフレームワーク領域に変異を有し、重鎖定常領域を G2322uhm2 にした抗体も作製することができる。アゴニスト抗体 7-10 の軽鎖可変領域のフレームワーク領域の望ましい変異としては、実施例 17 で示す 7-10VL_V104L (4-49VL; 配列番号 85)、7-10VL_G100Q (6-4-50VL 置換体 1; 配列番号 86)、及び 7-10VL_A43V (6-4-50VL 置換体 2; 配列番号 87) の軽鎖可変領域置換体が挙げられる。

以上を考慮すると、ほぼ同等の結合活性、アゴニスト活性を有する重鎖定常領域のサブクラス及び軽鎖可変領域を入れ替えた、さまざまなバリエーションのヒトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体が作製可能なことが示唆される。

産業上の利用可能性

本発明は、長半減期、低抗原性といった医薬品として望ましい性質を有する、また、プライマリーヒト細胞に作用する新規な抗ヒト c-Mpl アゴニスト抗体を提供し、この抗体は、血小板増多剤や血小板減少症治療剤として使用可能である。

本発明により、全長抗体でヒトロンボポエチン受容体(c-Mpl)を活性化しうる

ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体が提供される。このアゴニスト抗体は、種々の血小板減少症に対する治療薬として使用可能であり、医療産業上多大な寄与が期待される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

配列表フリーテキスト

配列番号 11 : 変異ヒンジドメイン UH2G3uhm

配列番号 12~16 : プライマー

配列番号 18~22 : プライマー

配列番号 39~54 : プライマー

配列番号 57~73 : プライマー

配列番号 74 : G3344h1

配列番号 75 : G3344

配列番号 76 : G4344

配列番号 77 : G4344h1

配列番号 78 : G4344uh

配列番号 79 : G4344uhm

配列番号 80 : G4PE

配列番号 81 : 7-10G4344uhm H 鎖

配列番号 82 : 7-10G4344uhm H 鎖

配列番号 83 : 7-10G4344uhm L 鎖

配列番号 84 : 7-10G4344uhm L 鎖

配列番号 85 : 7-10VL_V104L (変異体)

配列番号 86 : 7-10VL_G100Q (変異体)

配列番号 87 : 7-10VL_A43V (変異体)

配列番号 95 : 変異重鎖

配列番号 96 : IgG2322uhm2 定常領域

配列番号 97 : 変異 IgG2 重鎖定常領域

配列番号 98 : 変異 IgG2 重鎖定常領域をコードする DNA

請求の範囲

1. 抗体の定常領域が、以下の(1)～(3)：

- (1) ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
 - (2) ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
 - (3) 前記(1)又は(2)のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
- のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び/又は(b)：

- (a) ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法において、10,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、
- (b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、そのN末端がペグ(PEG)化された配列番号1のアミノ酸配列からなる下記の構造：

PEG-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILG
AVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLGTLPPQGRTTAHPKDPNAIFLSFQHLLRG
KVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH

を有する PEG-rHuMGDF の50%以上であり、且つ50%有効濃度 (EC50) が100nM以下であること、

の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体であって、以下の(1)～(2)：

- (1) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号3で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
 - (2) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号3で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
- からなる群から選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有し、重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側が、ヒトイムノグロブリンG2のA

ミノ酸配列において、Kabat EU 番号付けにおける 331 位プロリンがセリンに置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体。

2. 抗体の定常領域が、以下の(1)～(3)：

- (1) ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
 - (2) ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
 - (3) 前記(1)又は(2)のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
- のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び/又は(b)：

- (a) ヒト臍帯血 CD34+細胞を用いた CFU-MK コロニー形成測定法において、10,000ng/mL 以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、
 - (b) UT7/TPO 細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、その N 末端がペグ(PEG)化された配列番号 1 のアミノ酸配列からなる下記の構造：
- PEG-NH-SPAPPACDLRVLKLLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILG
AVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRG
KVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH

を有する PEG-rHuMGDF の 50%以上であり、且つ 50%有効濃度 (EC50) が 100nM 以下であること、

の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体であって、以下の (a) ～ (d)：

- (a) 配列番号 95 のアミノ酸配列である重鎖、及び配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖
- (b) 配列番号 95 のアミノ酸配列である重鎖、及び配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖
- (c) 配列番号 96 のアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含む重鎖定常領域、及び配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖

(d) 配列番号 96 のアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含む重鎖定常領域、及び配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を有する抗体。

3. ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

4. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

5. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体を有効成分として含む血小板増多剤。

6. 骨髄移植又は臍帯血移植時の血小板回復促進用である、請求項 5 に記載の血小板増多剤。

7. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体を有効成分として含む血小板減少症治療剤。

8. 血小板減少症が、以下の(1)～(6)：

- (1) 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、
- (2) 癌化学療法後の血小板減少症、
- (3) 再生不良性貧血、
- (4) 骨髄異形性症候群 (MDS)、
- (5) 肝疾患にともなう血小板減少症、及び
- (6) 骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症、

からなる群から選択される疾患のいずれか 1 つである、請求項 7 に記載の血小板減少症治療剤。

9. 以下の(1)～(4)：

- (1) 配列番号 95 のアミノ酸配列である重鎖と、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
- (2) 配列番号 95 のアミノ酸配列である重鎖と、配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

(3) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

(4) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 3 のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に 1 若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

からなる群から選択される、重鎖をコードする塩基配列を含む DNA 及び軽鎖をコードする塩基配列を含む DNA と、それらの DNA の発現を制御する塩基配列を含む 1 又は複数の DNA とを保持する哺乳動物細胞を作製し、該哺乳動物細胞を培養した培養液から、該重鎖及び軽鎖からなる抗体をコードする DNA の発現産物を単離精製することを含む、ヒト c-Mpl に対するアゴニスト抗体の製造方法。

10. 以下の(1)～(2)：

(1) 配列番号 9 5 で示されるアミノ酸配列、

(2) 配列番号 9 6 で示されるアミノ酸配列、及び

からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA。

11. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖をコードする DNA であって、抗体重鎖のミドルヒンジ部以降の C 末端側が、ヒトイムノグロブリン G2 のアミノ酸配列或いは該 G2 のアミノ酸配列において Kabat EU 番号付けにおける 331 位プロリンがセリン置換されたアミノ酸配列を有する DNA。

12. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体を有効成分として含む造血幹細胞移植後の血球回復促進用である血球増多剤。

図 1

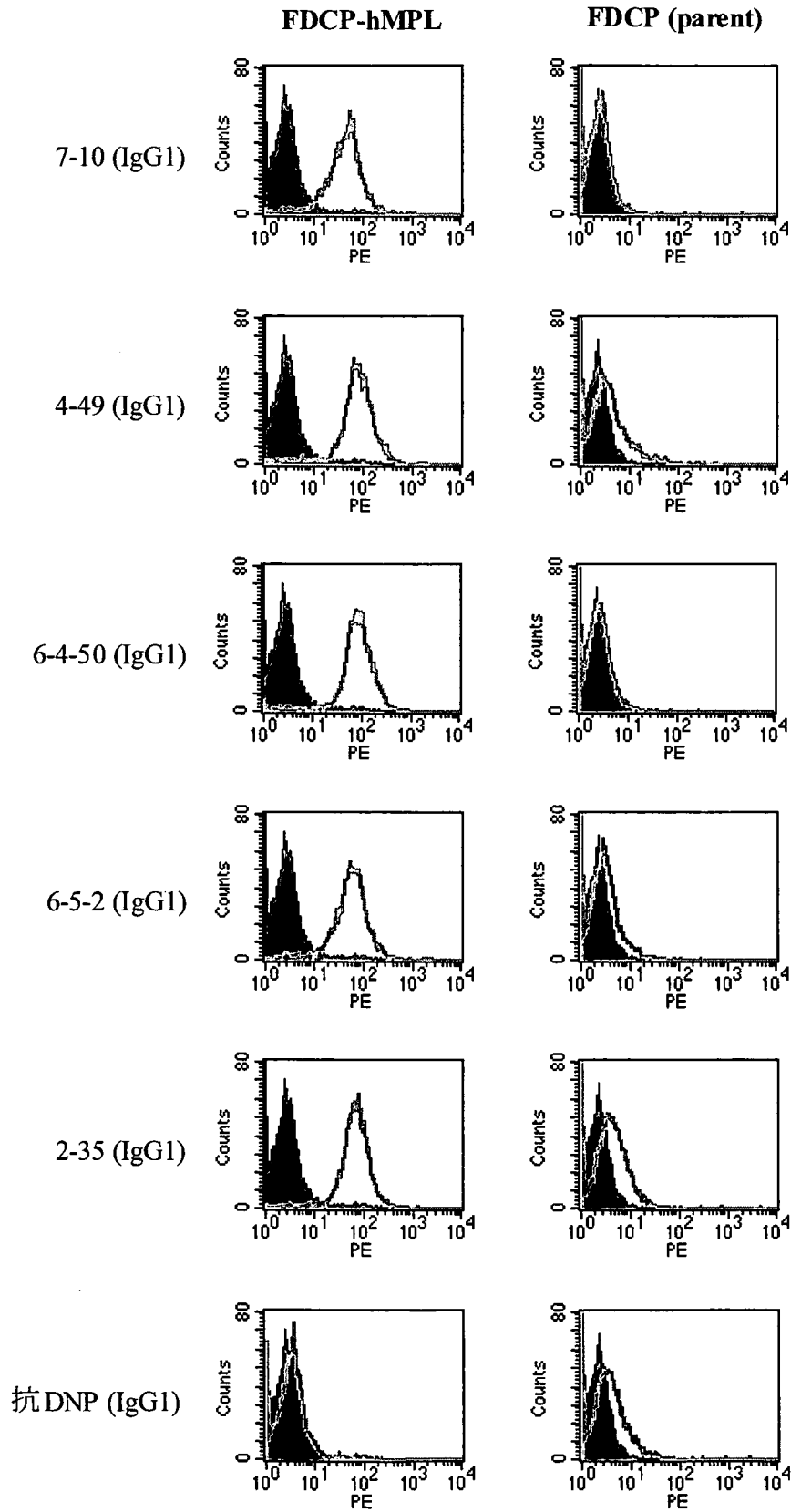


図2

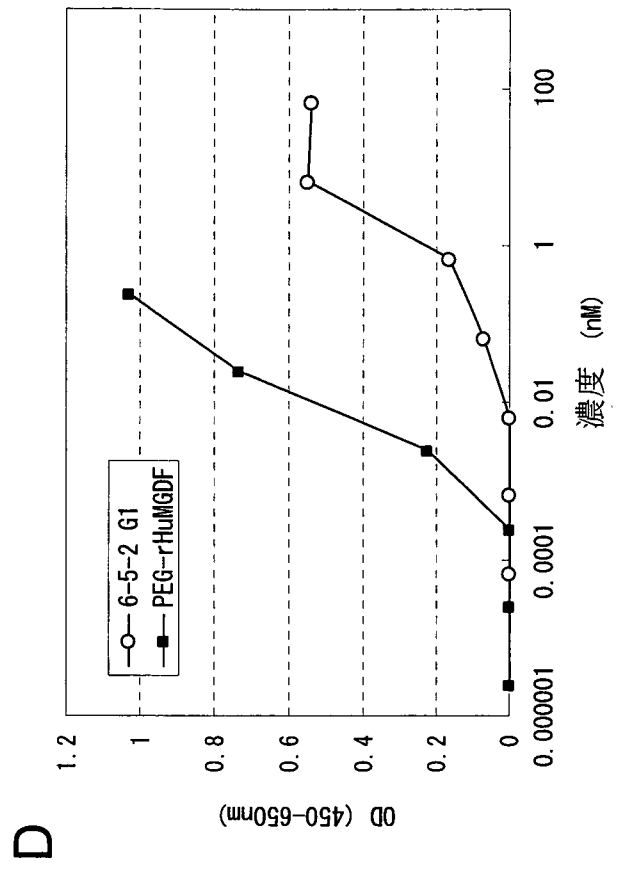
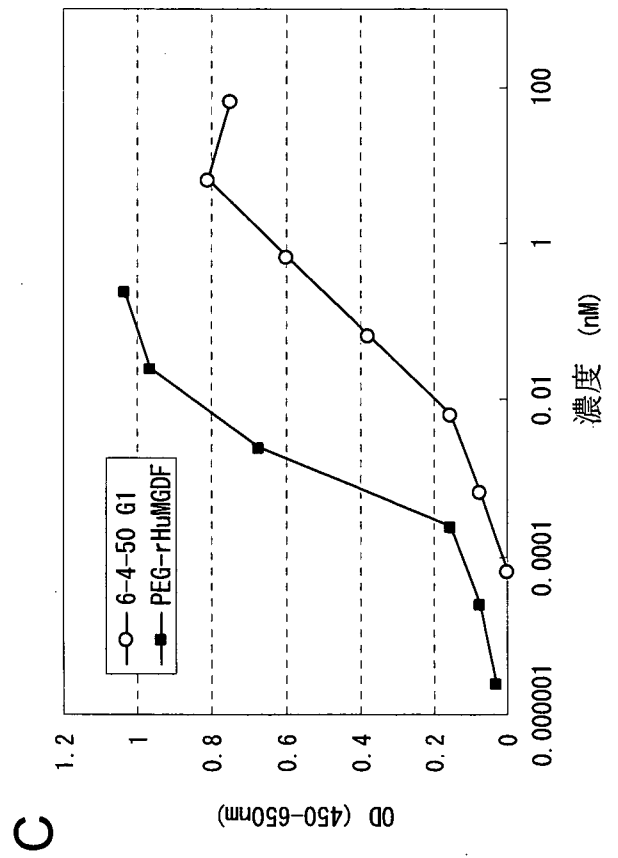
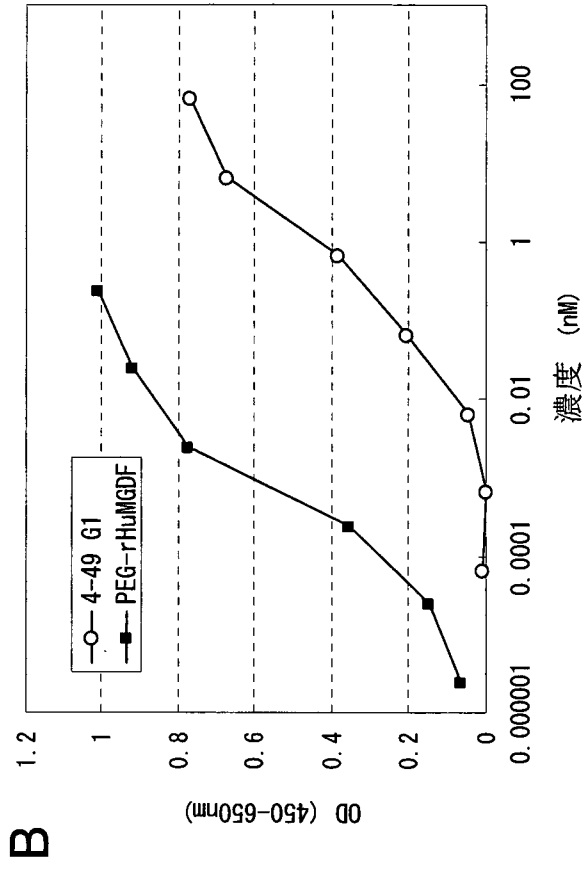
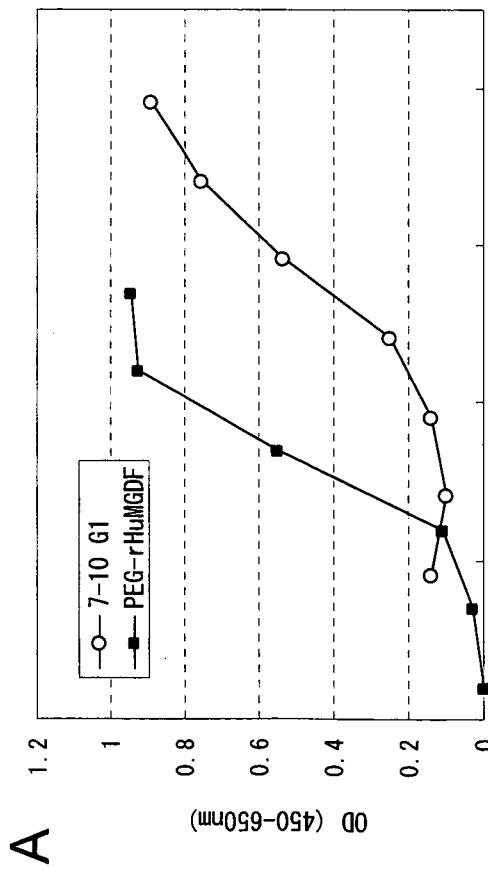


図 3

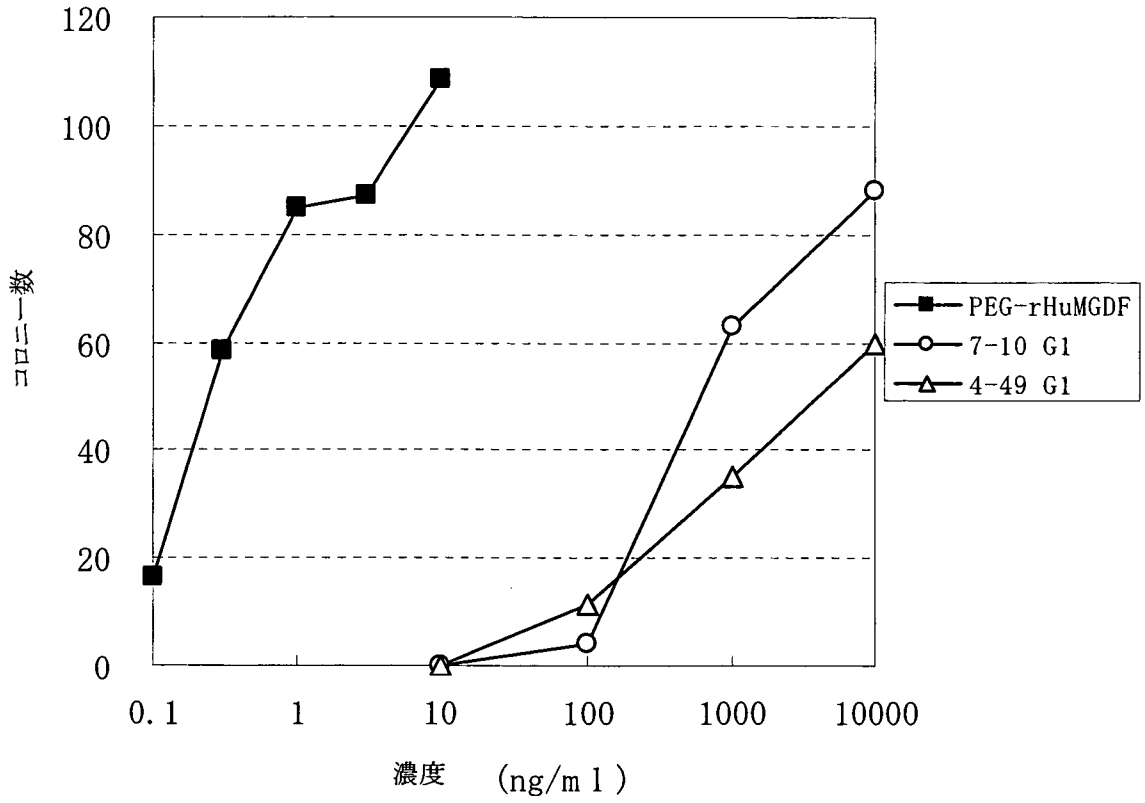


図 4 A

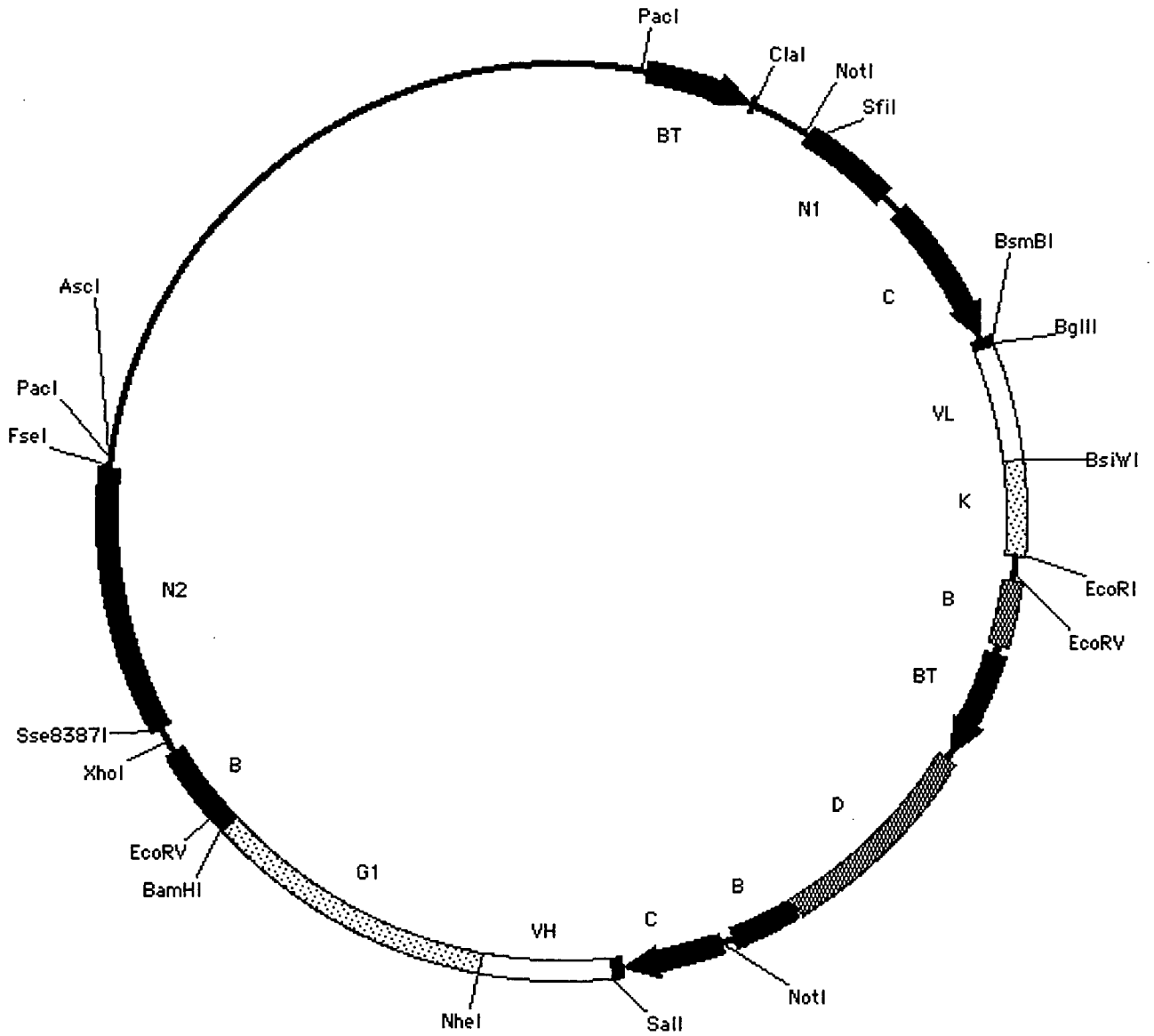


図 4 B

	CH1	アッパーヒンジ	ミドルヒンジ	CH2
IgG1	VDKRV	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
IgG2	VDKTV	ERK	CCVECPCP	APPVAGP
IgG3	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)x3	APELLGGP
IgG4	VDKRV	ESKYGPP	CPSCP	APEFLGGP
G4PE	VDKRV	ESKYGPP	CPPCP	APEFEGGP
G4344	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)x3	APEFEGGP
G4344h1	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	APEFEGGP
G4344uh	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP	APEFEGGP
G4344uhm	VDKRV	ESKTPLGDTTHT	CPPCP	APEFEGGP

図 4C-1

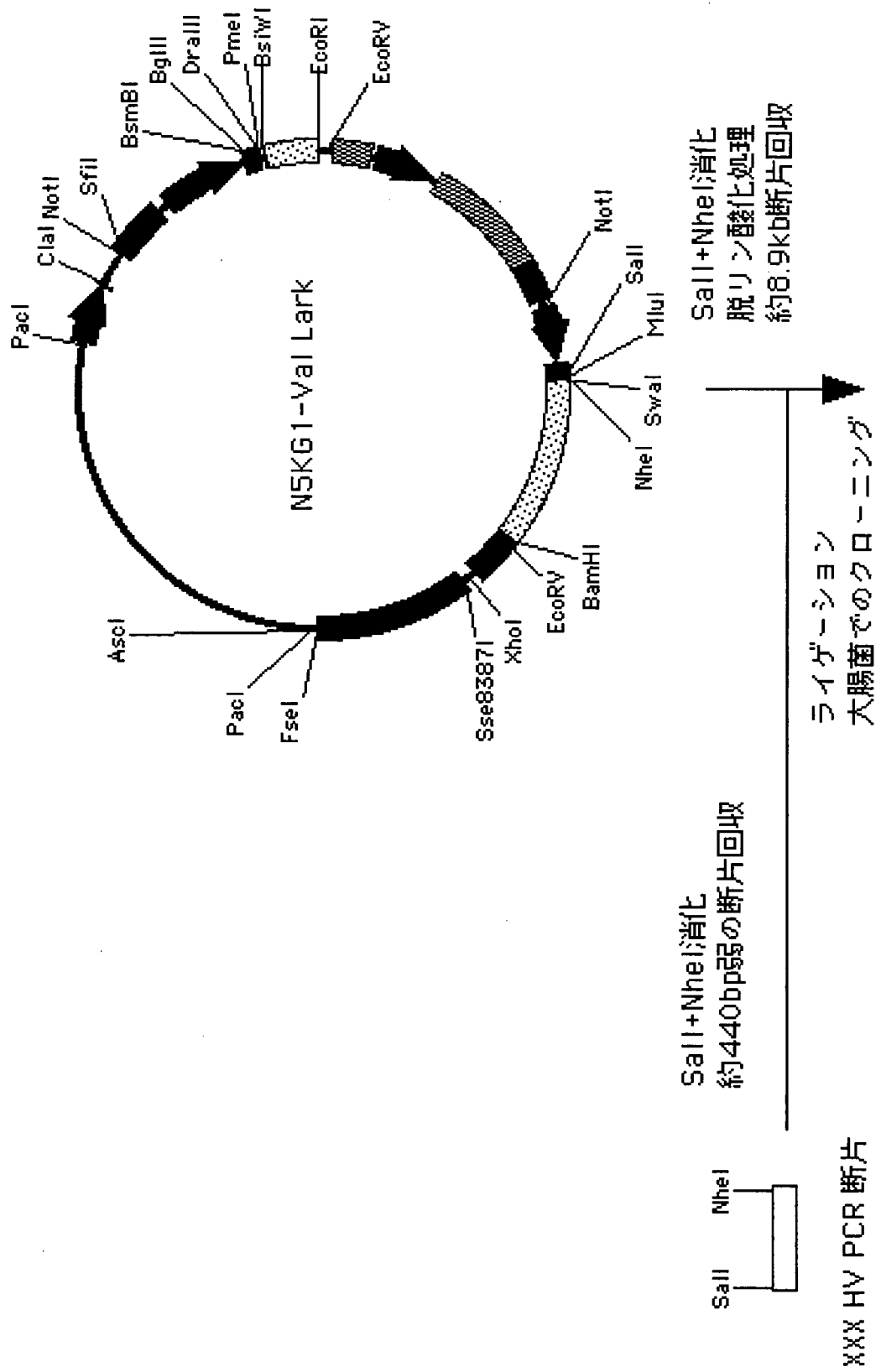


図4C-2

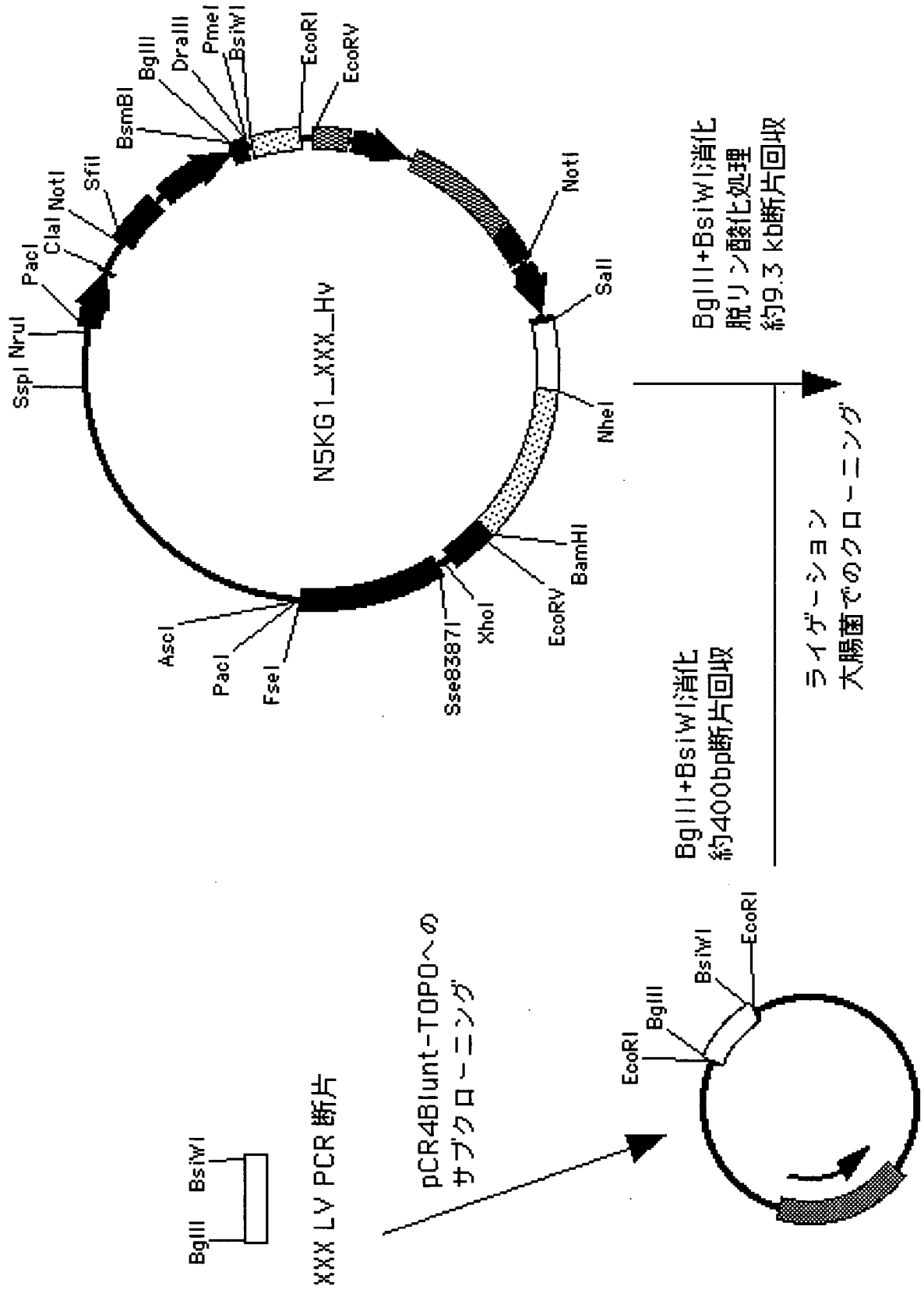
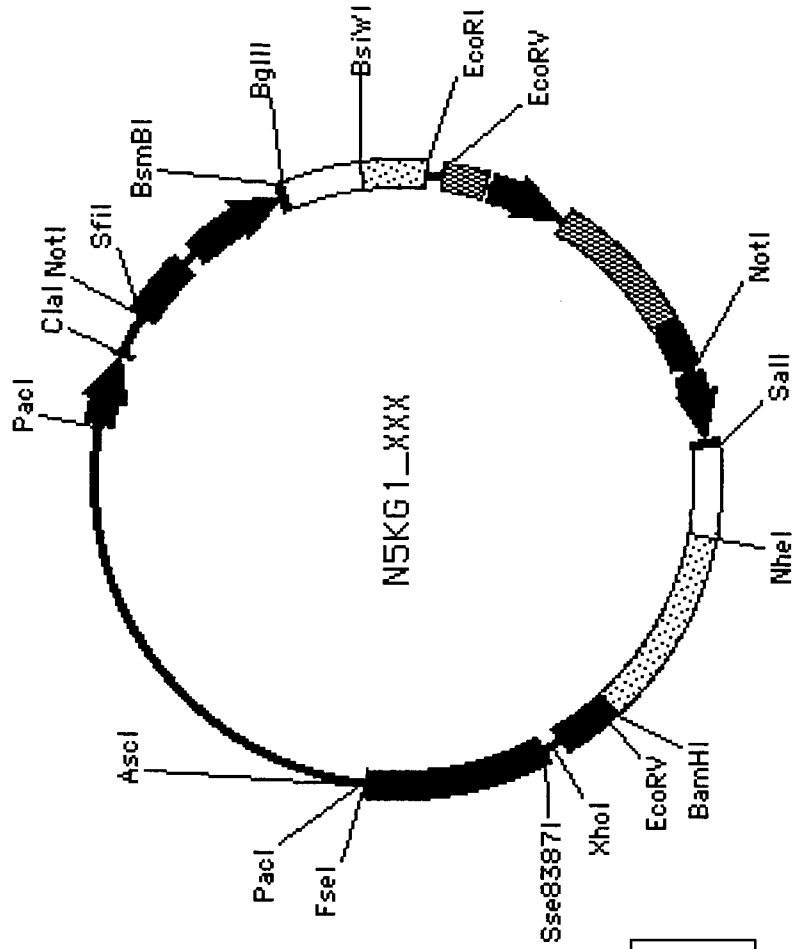


図 4C-3



TOPO_XXX_LV

(XXX: 7-10、4-49のいずれか、ただし一つの工程
では1種類の抗体発現ベクターが作成される)

図 4D-1

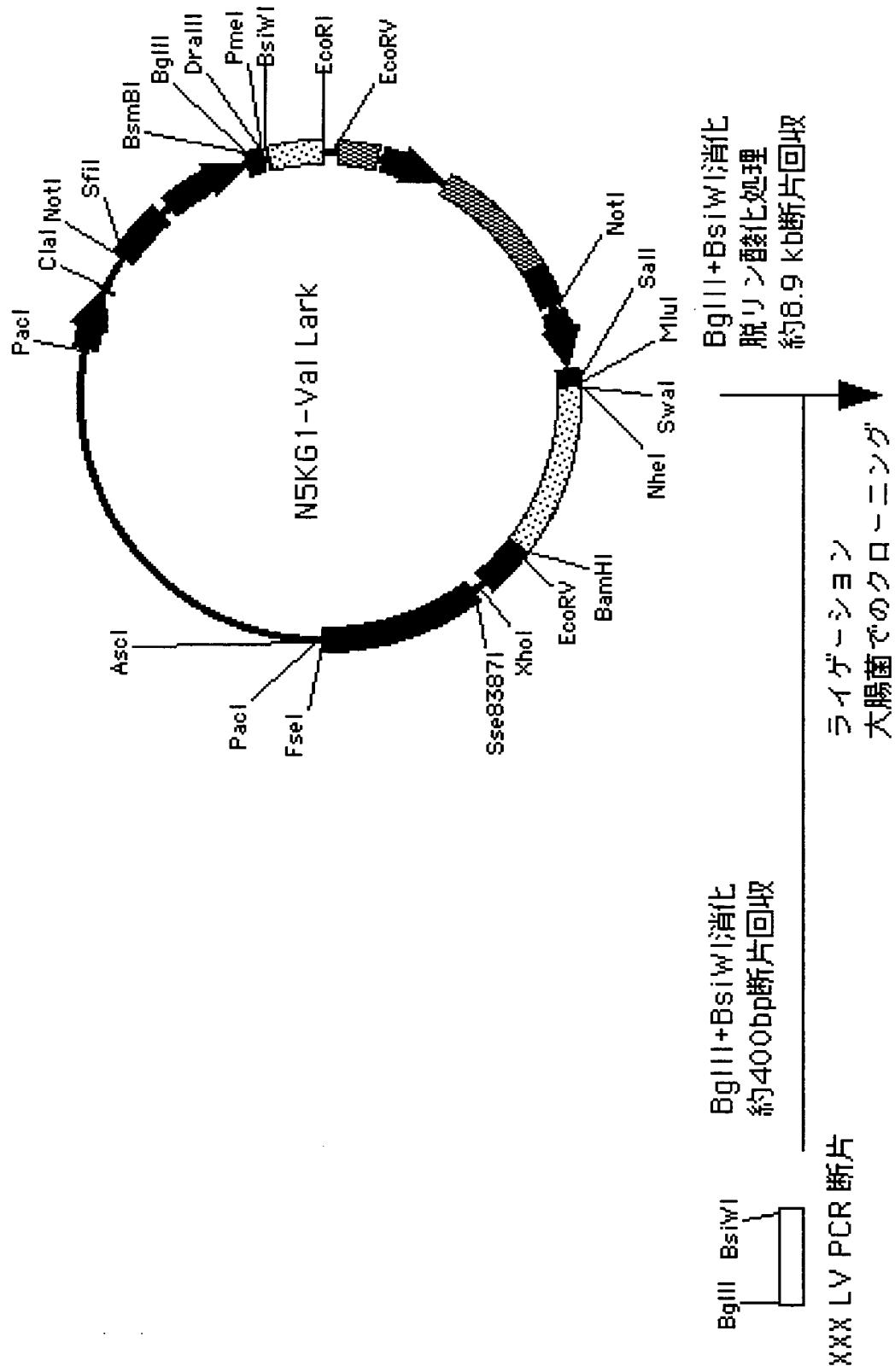


図 4D-2

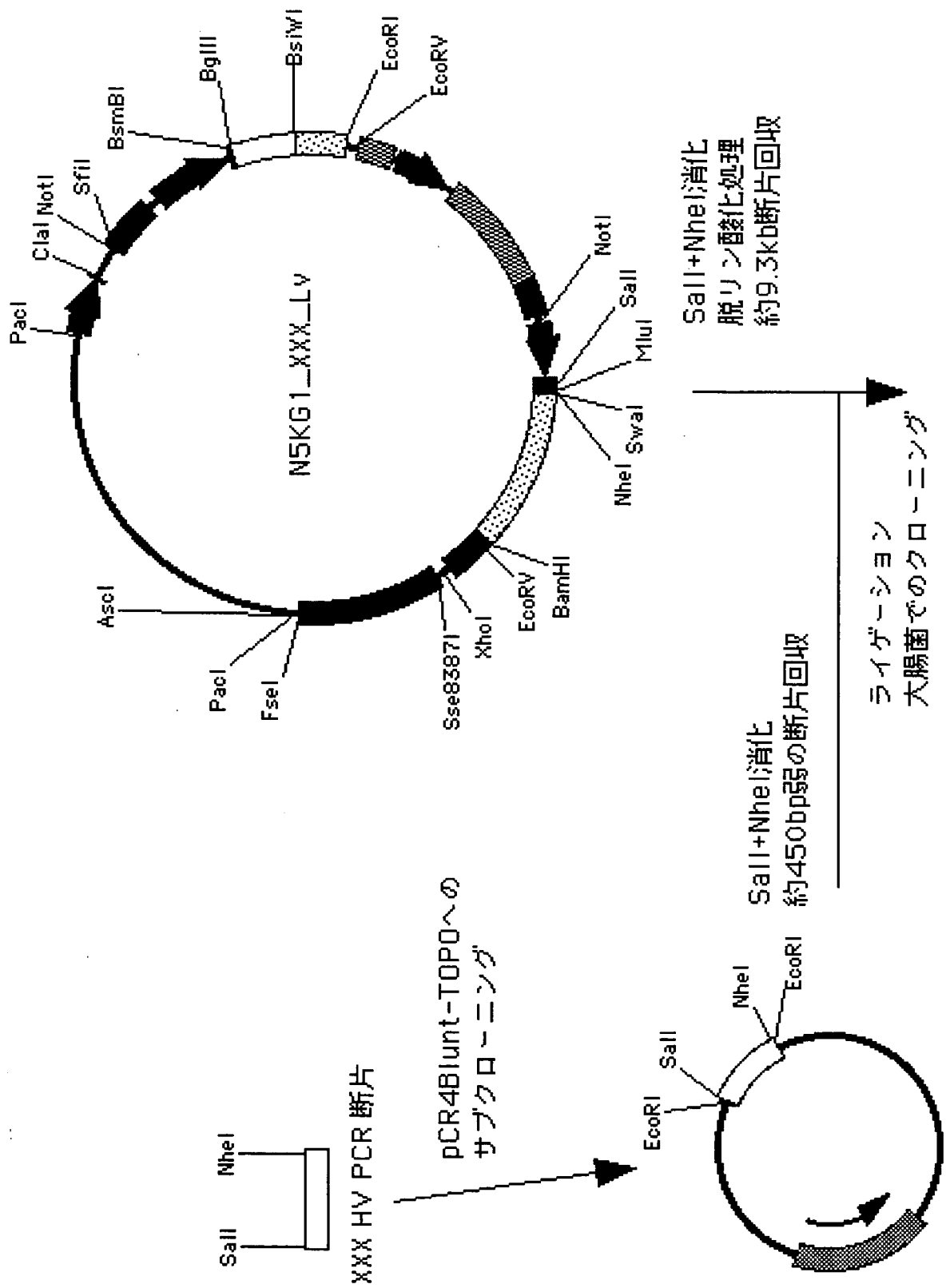
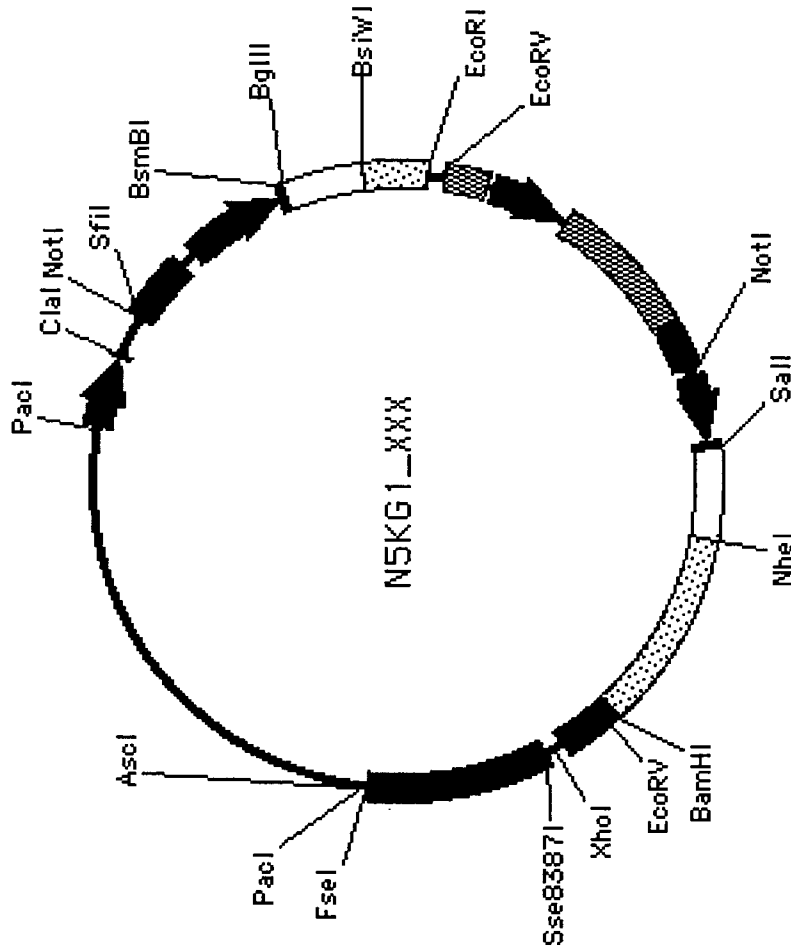


図 4D-3



(XXX: 6-4-50、6-5-2のいずれか、ただし一つの工程では1種類の抗体発現ベクターが作成される)

図 4 E

G3344h1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 G3344 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 G4344 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 G4344h1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 G4344uh ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 G4344uhm ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 G4PE ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

G3344h1 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
 G3344 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
 G4344 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
 G4344h1 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
 G4344uh GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
 G4344uhm GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKTPLGDTTHTCPPCP
 G4PE GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP-----CPPCP-----

G3344h1 DTPPPCPRCP-----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT
 G3344 DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT
 G4344 DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT
 G4344h1 DTPPPCPRCP-----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT
 G4344uh -----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT
 G4344uhm -----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT
 G4PE -----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT

G3344h1 LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 G3344 LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 G4344 LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 G4344h1 LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 G4344uh LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 G4344uhm LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 G4PE LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH

G3344h1 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 G3344 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 G4344 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 G4344h1 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 G4344uh QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 G4344uhm QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 G4PE QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK

G3344h1 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE
 G3344 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE
 G4344 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE
 G4344h1 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE
 G4344uh GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE
 G4344uhm GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE
 G4PE GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE

G3344h1 ALHNHYTQKSLSLGLK
 G3344 ALHNHYTQKSLSLGLK
 G4344 ALHNHYTQKSLSLGLK
 G4344h1 ALHNHYTQKSLSLGLK
 G4344uh ALHNHYTQKSLSLGLK
 G4344uhm ALHNHYTQKSLSLGLK
 G4PE ALHNHYTQKSLSLGLK

4 F - 2

902 CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG
GGG CTC CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC
298▶ P E Y Q F N W Y Y D G Y E Y H N A K T K P R E E Q
977 TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC ACC ATG CAC TCG AGC GTC ACC GAC TGG CTG AAG GGC AAG GAG GAG TAC AAG
AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CCG TTG CCG TTC CTC ATG TTC
323▶ F N S T Y R Y S Y L T Y L H Q D W L N G K E Y K
1052 TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC ATC GAG AAR ACC ATC TCC AAA GGC AAA GGC CAG CCC CGA GAG
ACG TTC CAG AAG TTG TTT CCG GAG GGC AAG TAG CTC TTT TGG TAG AAG TTT CCG TTT CCC GTC GGC GCT CTC
348▶ C K Y S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E
1127 CCA CAG GTG TAC ACC ACG GAC ATC CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC GGC AAG AAC TAC AAG ACC TGC CTG GTC AAR
GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGC GGT AAG GTC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT
373▶ P Q Y Y T L P P S Q E E M T K N Q Y S L T C L Y K
1202 GGC TTC TAC CCC ACG GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC ART GGG CAG CCG GAG AAC TAC AAG ACC ACG CCT
CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA
398▶ G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
1277 CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC ART ACC GTG GAC AAG AGC AAG TGG CAG GAG GGG
GGG CAC GAC CTG AAG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TCG GAT TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC CTC CCC
423▶ P Y L D S D G S F F L Y S R L T Y D K S R W Q E G
1352 ART GTC TTC TCA TGC TCC GCT CTG CAT GAG GGT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG
TTA CAG AAG AGT ACG AAG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AAG GAC AGA GAC
448▶ N Y F S C S Y M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L
1427 GGT AAR TGAGGATCC BamHI
CCA TTT ACTCCTAGG
473▶ G K

4 G

BgIII

1 AGATCTCTCACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTT CTG CTG CTC TGG CTC
 TCTAGAGAGTGG TAC CTG TAC TCC CAG GGG CGA GTC GAG GAC CCC GAR GAC GAC GAG ACC GAG
 1 M D M R Y P A Q L L G L L L L W L

64 CCA GGT GCC AGA TGT GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA
 GGT CCA CGG TCT ACA CGG TAG GTC AAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG GAC AGA CGT AGA CAT CCT
 18 P G A R C A I Q L T Q S P S S L S A S Y G
 127 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT CAG
 CTG TCT CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC CCG TAA TCG TCA CGA AAT CCG ACC ATA GTC
 39 D R Y T I T C R A S Q G I S A L A W Y Q
 190 CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC
 GTC TTT GGT CCC TTT CGA GGA TTC GAG GAC TAG ATA CTA CGG AGG TCA AAC CTT TCA CCC CAG
 60 Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G Y
 253 CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG
 GGT AGT TCC AAG TCG CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG TCG GAC GTC
 81 P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q
 316 CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAR CAG TTT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA
 GGA CTT CTA AAA CGT TGA ATA ATG ACA GTT GTC AAA TTA TCA ATG GGC GAG TGA ARG CCG CCT
 102 P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P L T F G G

BsIWI

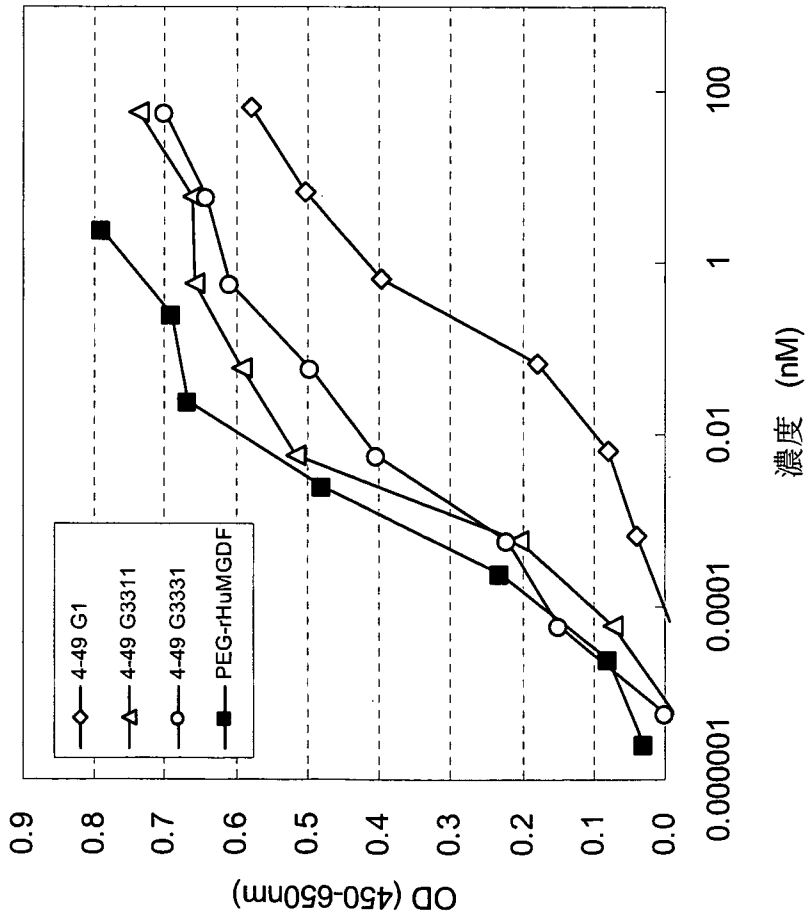
379 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT TTC ATC TTC CCG CCA TCT
 CCC TGG TTC CAC CTC TAG TTT GCA TGC CAC CGA CGT GGT AGA CAG ARG TAG ARG GGC GGT AGA
 123 G T K Y E I K R T Y A A P S Y F I F P P S
 442 GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG ART AAC TTC TAT CCC AGA
 CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CCG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG ARG ATA GGG TCT
 144 D E Q L K S G T A S Y Y C L L N F Y P R
 505 GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC
 CTC CCG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CCG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC TCA CAG
 165 E A K Y Q W K Y D N A L Q S G N S Q E S Y
 568 ACA GAG CAG AGC ARG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG AGC CTG AGC AAA GCA
 TGT CTC GTC CTC TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC GAC TCG TTT CGT
 186 T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A
 631 GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC
 CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CCG ACC CTG TGG GTC CCG GAC TCG AGC GGC GGC CAG
 207 D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P Y

EcoRI

694 ACA ARG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGAATTC
 TGT TTC TCG ARG TTG TCC CCT CTC ACA ACTTAG
 228 T K S F N R G E C

図5

A



B

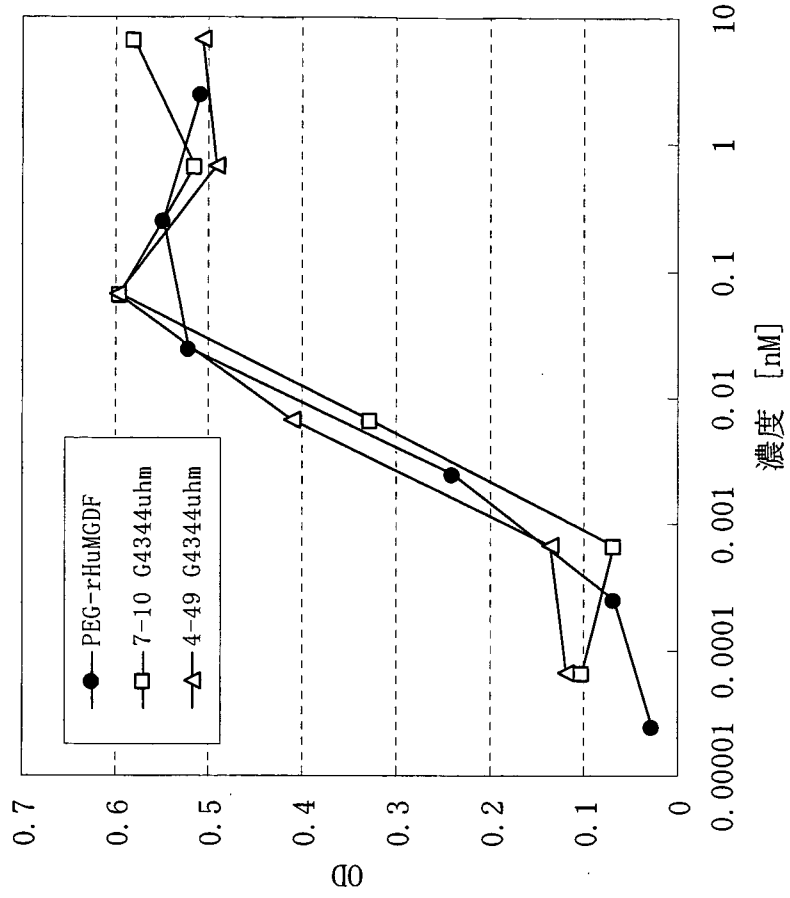


図 6 A

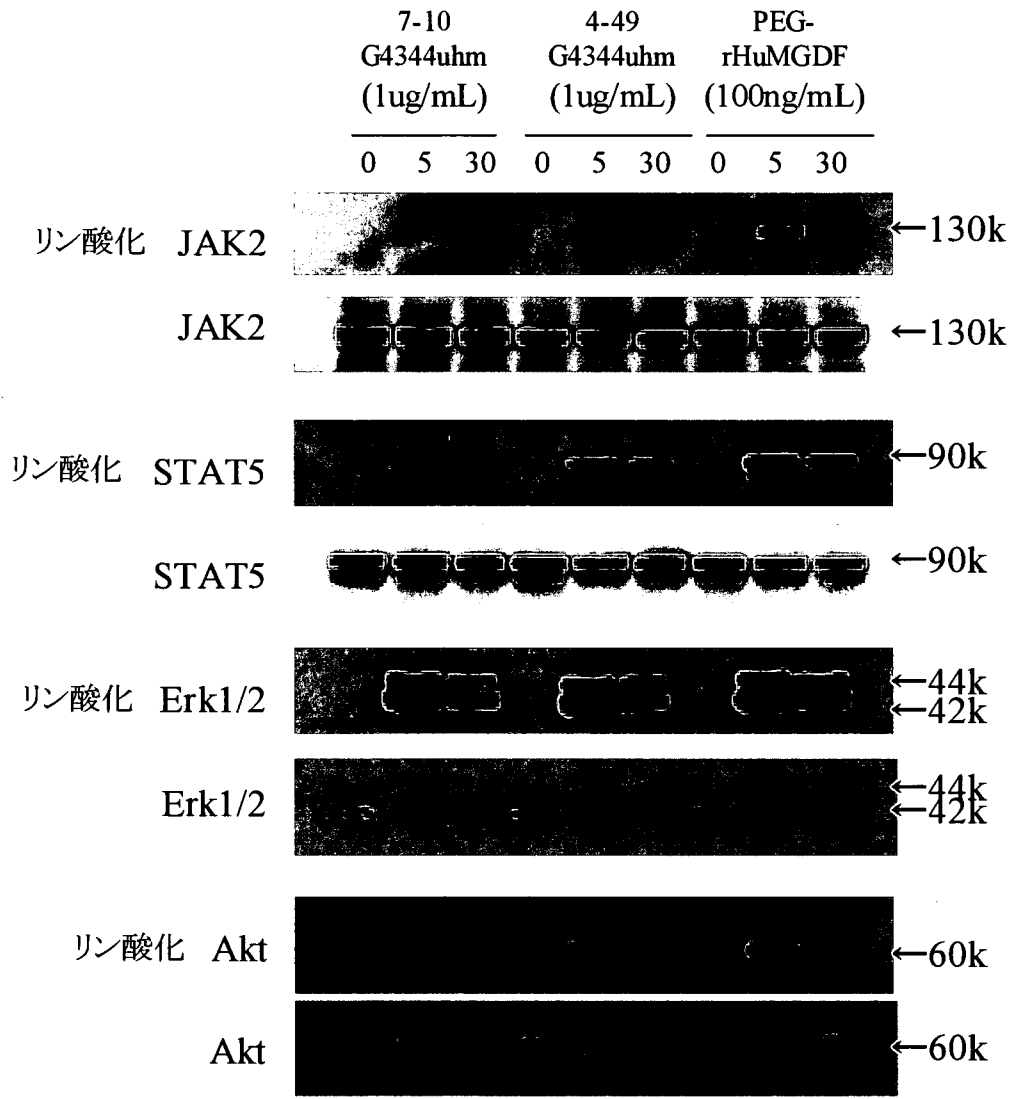


図 6 B

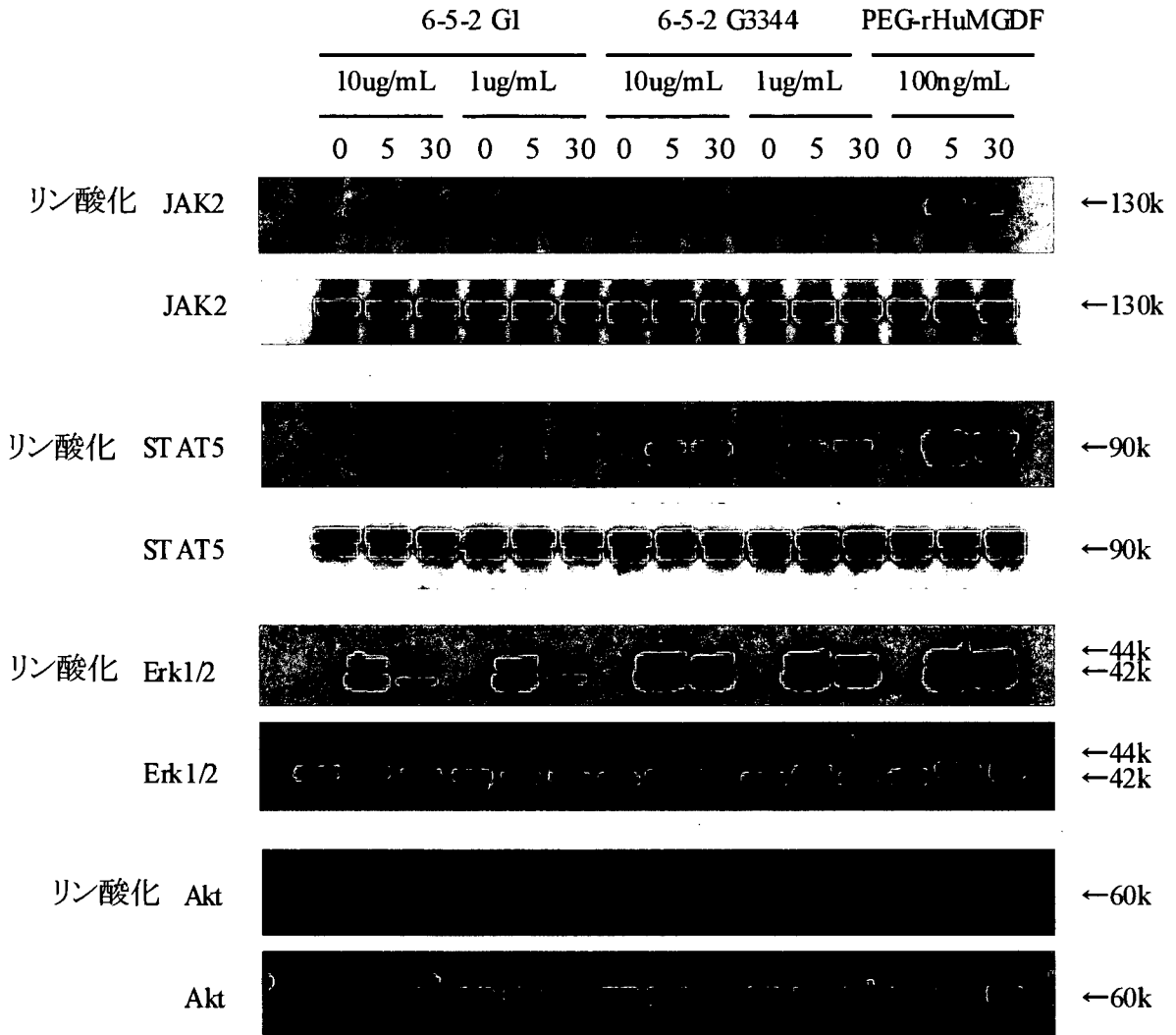
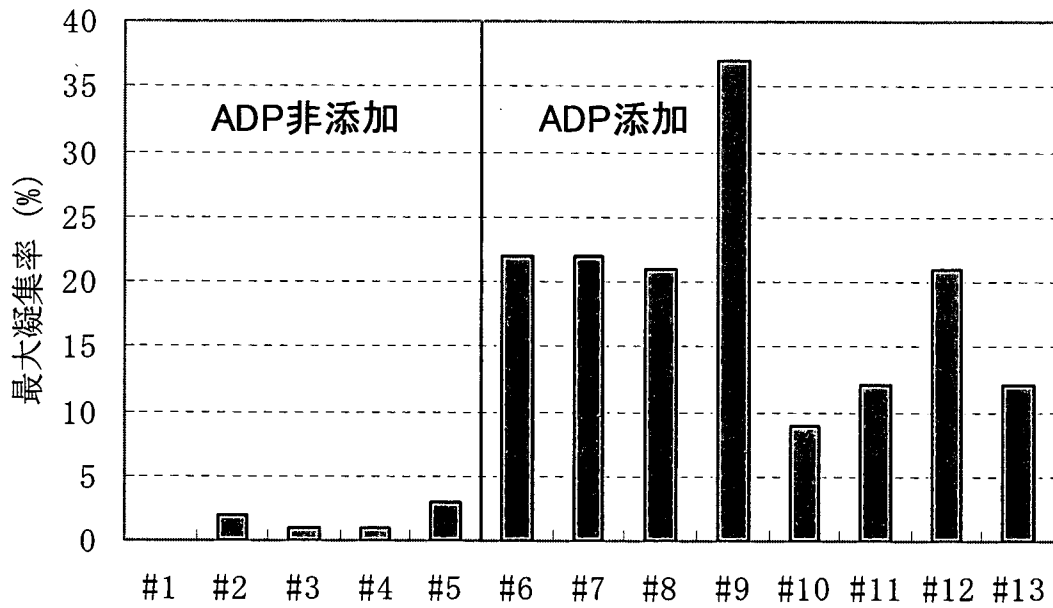


图 7



- #1 7-10 G1 (10ug/ml)
- #2 7-10 G3311 (10ug/ml)
- #3 4-49 G1 (10ug/ml)
- #4 4-49 G3311 (10ug/ml)
- #5 2-35 G1 (10ug/ml)
- #6 ADP + 7-10 G1 (10ug/ml)
- #7 ADP + 7-10 G3311 (10ug/ml)
- #8 ADP + 4-49 G1 (10ug/ml)
- #9 ADP + 4-49 G3311 (10ug/ml)
- #10 ADP + 2-35 G1 (10ug/ml)
- #11 ADP + PEG-rHuMGDF (0.01ug/ml)
- #12 ADP + PEG-rHuMGDF (0.1ug/ml)
- #13 ADP + PBS

図 8

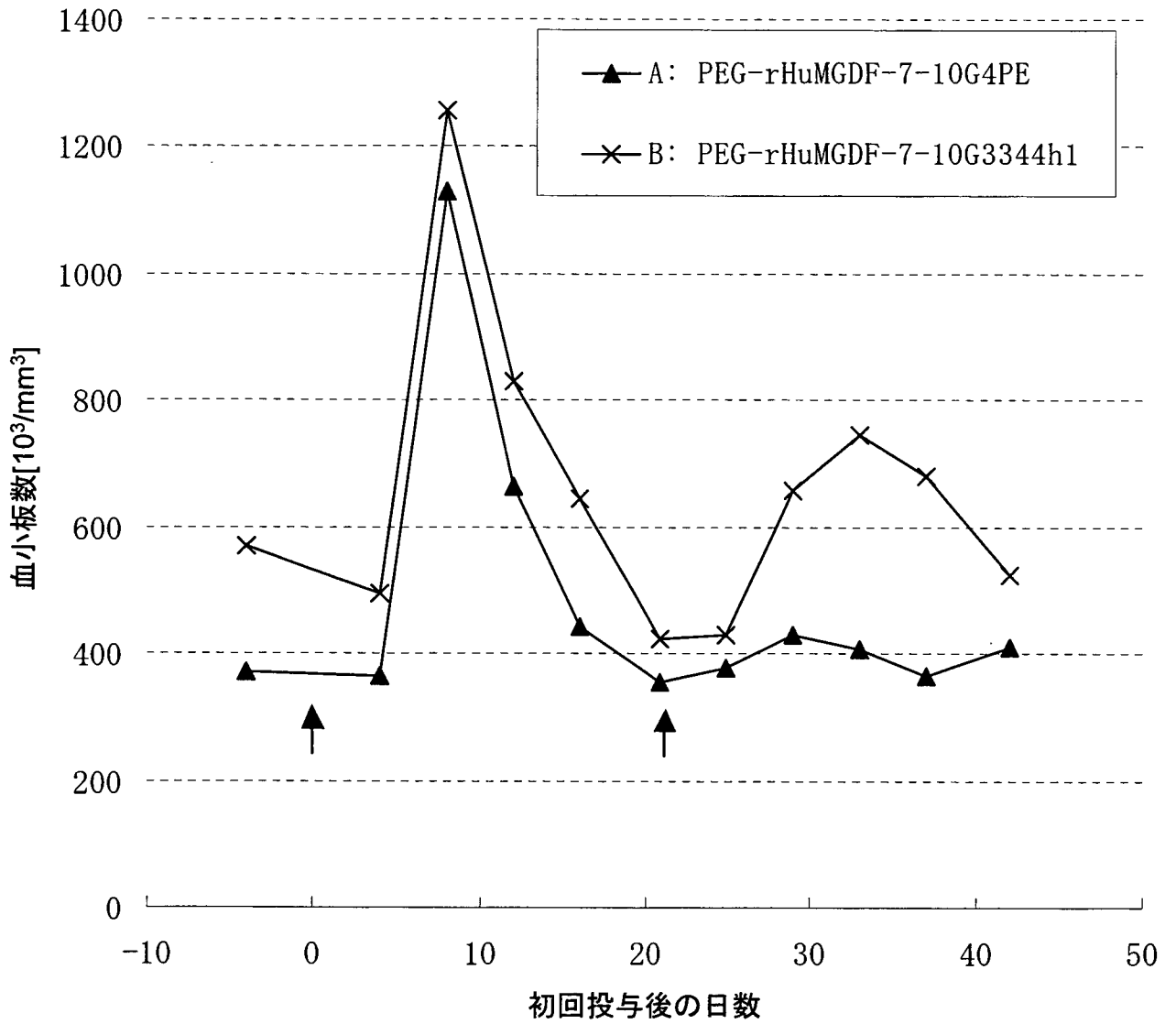


図9A

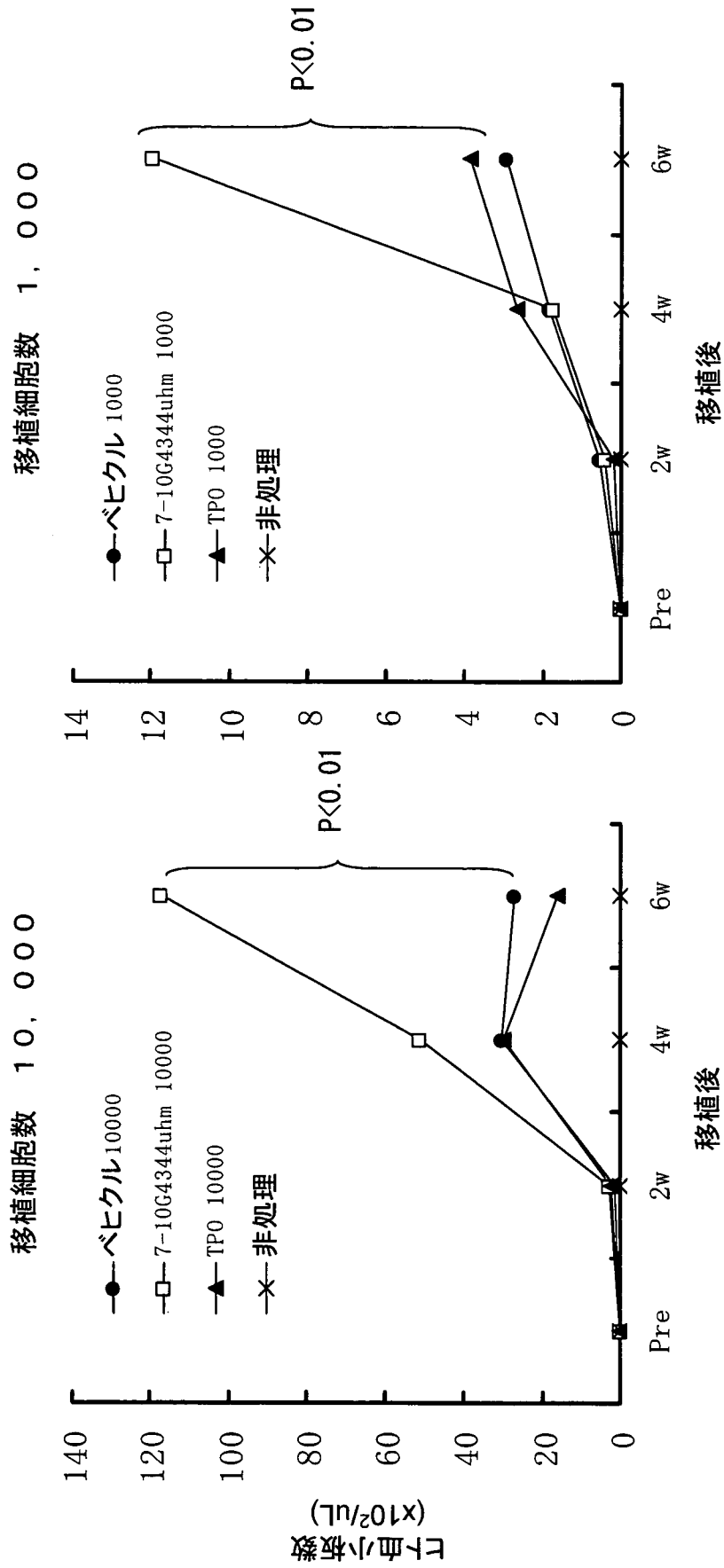


図9B

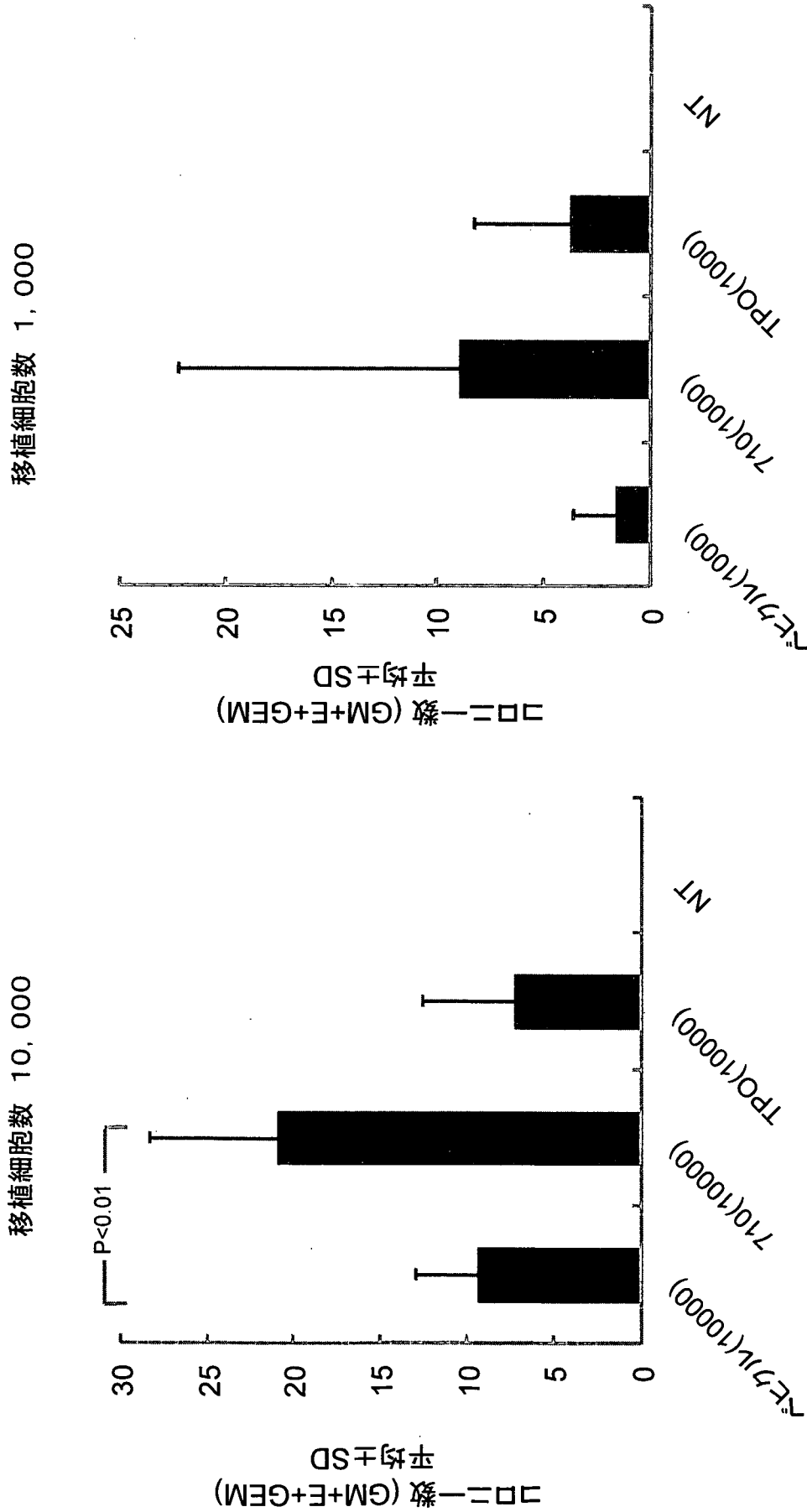


図 10

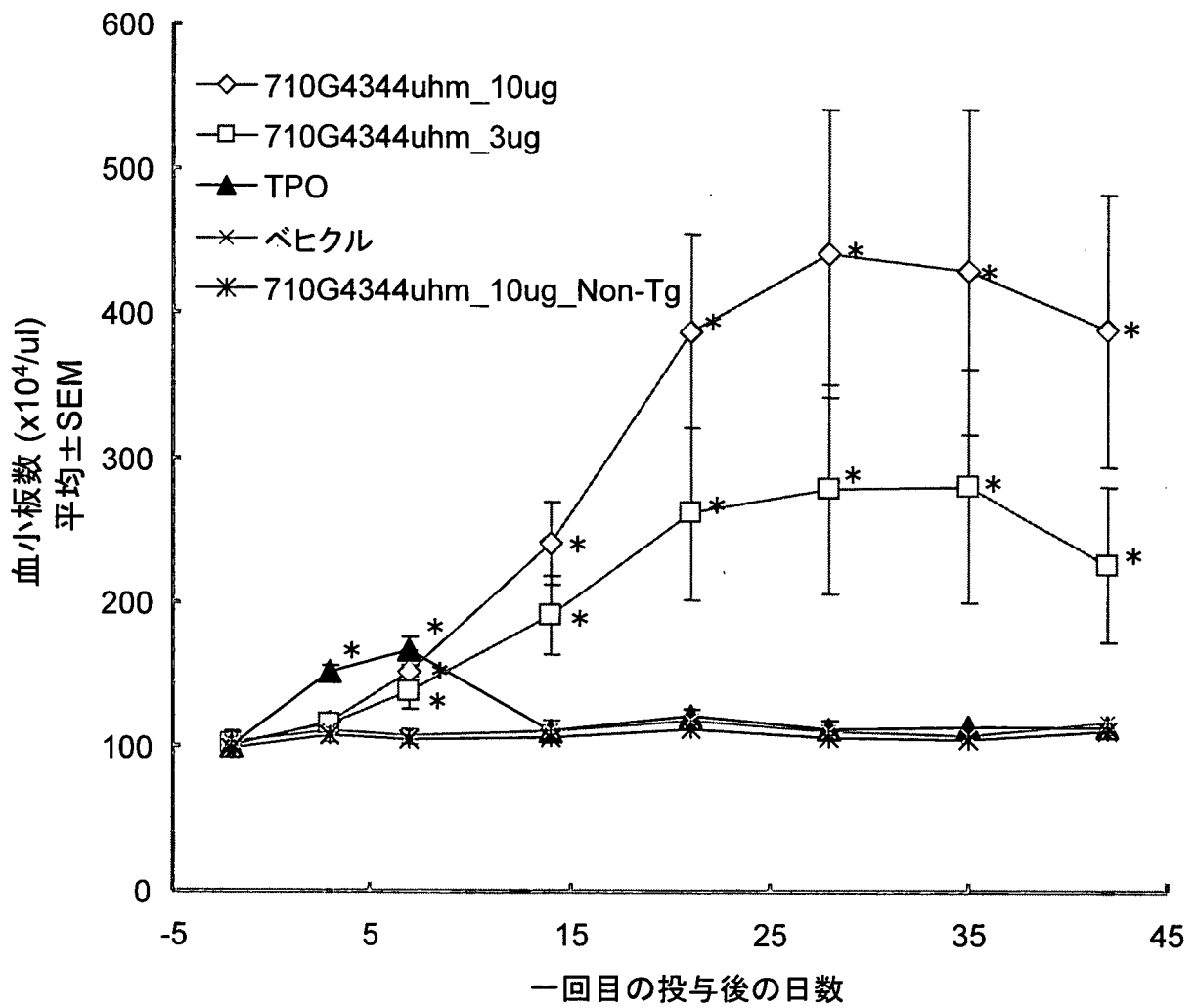


図 1 1

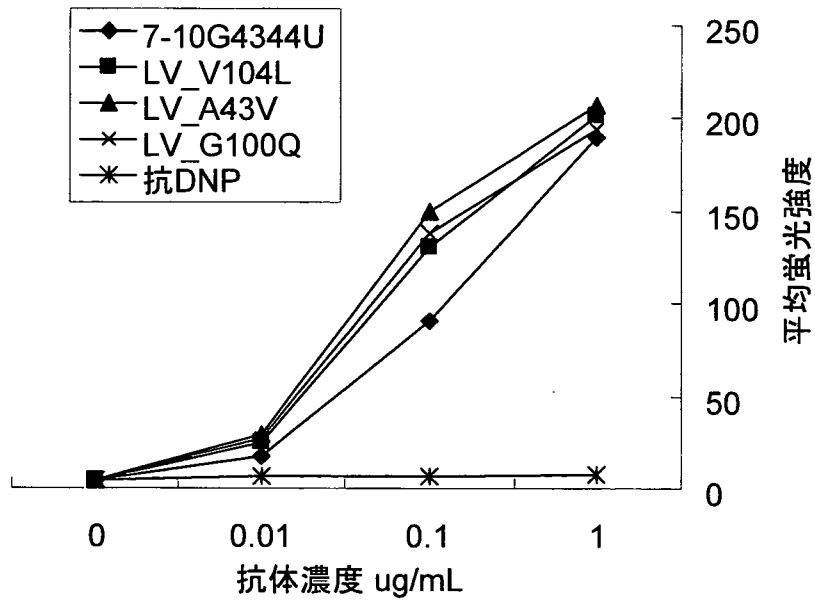


図 1 2

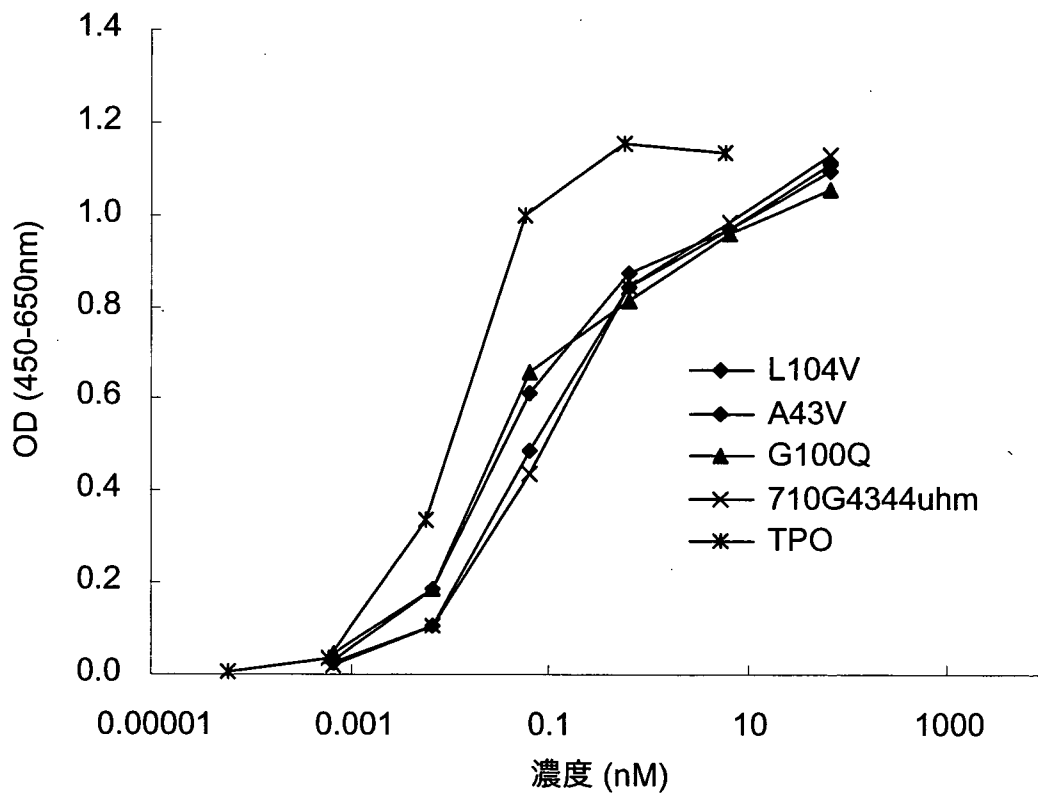
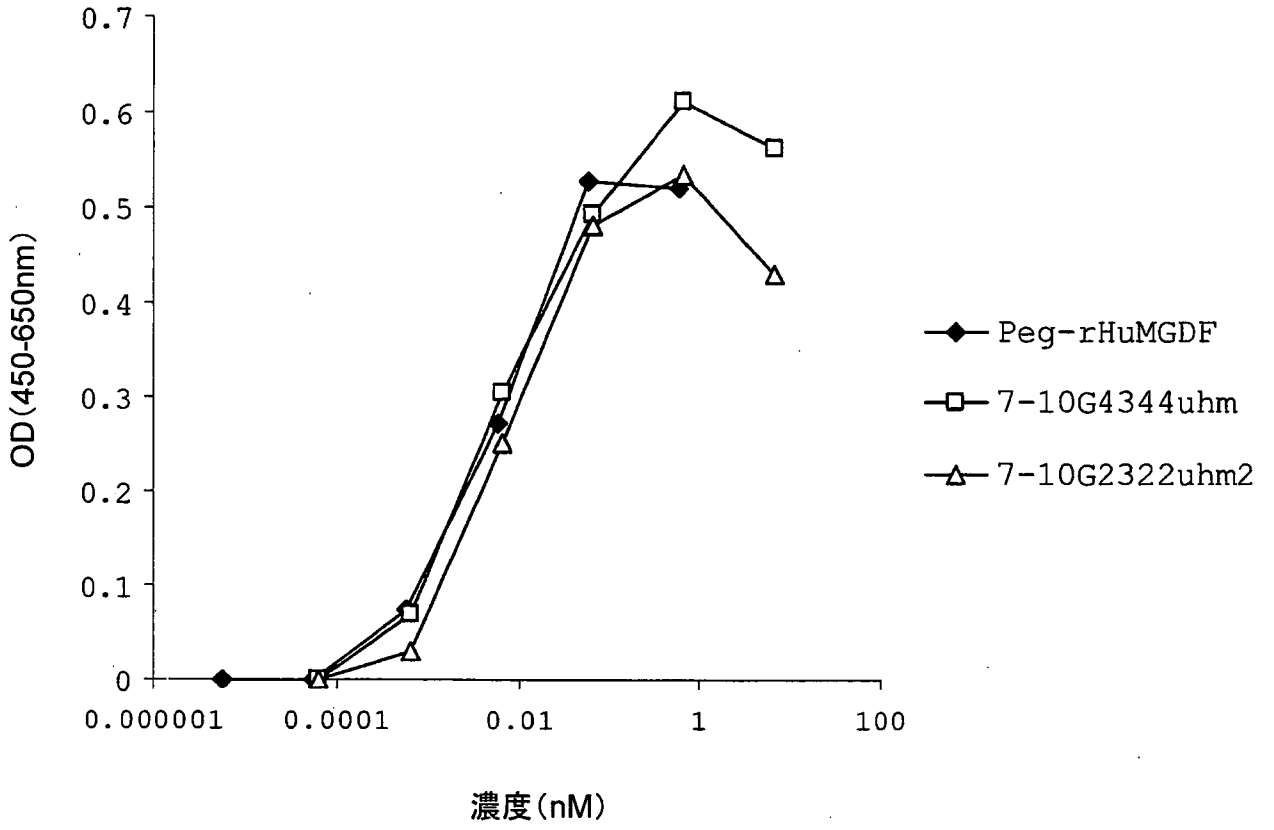


図 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/068003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i, A61P7/06(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/28, A61K39/395, A61P7/00, A61P7/06, C12N15/09, C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CPlus (STN), REGISTRY (STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Deng B. et al., An agonist murine monoclonal antibody to the human c-Mpl receptor stimulates megakaryocytopoiesis., Blood, 1998, 92(6), 1981-1988	1,3-8,11-12/ 2,9-10
Y/A	WO 1999/003495 A1 (Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc.), 28 January, 1999 (28.01.99), & US 5980893 A & EP 1003547 A1 & AU 8383598 A	1,3-8,11-12/ 2,9-10
Y/A	Kazuhiro MOTOKI, Shiro KATAOKA, "Hito Senshokutai Donyu Mouse o Mochiita Hito Kotai Sakusei to sono Rinsho Oyo", Igaku no Ayumi, 2004, 211(7), 733-736	1,3-8,11-12/ 2,9-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 15 December, 2008 (15.12.08)		Date of mailing of the international search report 22 December, 2008 (22.12.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/068003

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Murone M. et al., Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice., Stem Cells, 1998, 16, 1-6	12/1-11
Y/A	Hiroshi MIYAZAKI, "Thrombopoietin no Shorai Tenbo", Japanese Journal of Transfusion Medicine, 2000, 46(3), 311-316	12/1-11
A	WO 2006/075668 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 20 July, 2006 (20.07.06), Par. Nos. [0008] to [0013] & EP 1847602 A1	1-12
A	WO 2005/063981 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 14 July, 2005 (14.07.05), Page 12, line 11 to page 13, line 12 & US 2007/0148163 A1 & EP 1707627 A1 & CA 2551008 A & NO 20063197 A & KR 10-2006-0130615 A & CN 1922316 A	1-12
P,Y	WO 2007/108559 A1 (Kirin Pharma Kabushiki Kaisha), 27 September, 2007 (27.09.07), Full text (Family: none)	1-12
P,Y	Kai M. et al., Switching constant domains enhances agonist activities of antibodies to a thrombopoietin receptor., Nature Biotechnology, 2008.02, 26(2), 209-211	1-12
P,Y	Masayuki KAI, Shiro KATAOKA, "Teijo Ryoiki Subclass no Henkan ni yoru Ko Thrombopoietin Juyotai Agonist Kotai no Kassei Kojo", Bio Industry, 2008.07, 25(7), 83-91	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i, A61P7/06(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i		
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)) Int.Cl. C07K16/28, A61K39/395, A61P7/00, A61P7/06, C12N15/09, 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 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CPlus(STN), REGISTRY(STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)		
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 請求の範囲の番号
Y / A	Deng B. et al., An agonist murine monoclonal antibody to the human c-Mpl receptor stimulates megakaryocytopoiesis., Blood, 1998, 92(6), 1981-1988	1, 3-8, 11-12/ 2, 9-10
Y / A	WO 1999/003495 A1 (Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc.) 1999.01.28, & US 5980893 A & EP 1003547 A1 & AU 8383598 A	1, 3-8, 11-12/ 2, 9-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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矛盾するものではなく、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 15.12.2008	国際調査報告の発送日 22.12.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 3 8 4 6

C (続き) . 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 請求の範囲の番号
Y / A	元木一宏、片岡之郎, ヒト染色体導入マウスを用いたヒト抗体作製 とその臨床応用, 医学のあゆみ, 2004, 211(7), 733-736	1, 3-8, 11-12/ 2, 9-10
Y/ A	Murone M. et al., Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice., Stem Cells, 1998, 16, 1-6	12/ 1-11
Y/ A	宮崎洋, トロンボポエチンの将来展望, Japanese Journal of Transfusion Medicine, 2000, 46(3), 311-316	12/ 1-11
A	WO 2006/075668 A1 (麒麟麦酒株式会社) 2006.07.20, [0008]-[0013] & EP 1847602 A1	1-12
A	WO 2005/063981 A1 (麒麟麦酒株式会社) 2005.07.14, 第12頁第11行-第13頁第12行 & US 2007/0148163 A1 & EP 1707627 A1 & CA 2551008 A & NO 20063197 A & KR 10-2006-0130615 A & CN 1922316 A	1-12
P, Y	WO 2007/108559 A1 (キリンファーマ株式会社) 2007.09.27, 全文 (ファミリーなし)	1-12
P, Y	Kai M. et al., Switching constant domains enhances agonist activities of antibodies to a thrombopoietin receptor., Nature Biotechnology, 2008.02, 26(2), 209-211	1-12
P, Y	甲斐正之、片岡之郎, 定常領域サブクラスの変換による抗トロンボ ポエチン受容体アゴニスト抗体の活性向上, Bio Industry, 2008.07, 25(7), 83-91	1-12