

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年2月28日 (28.02.2002)

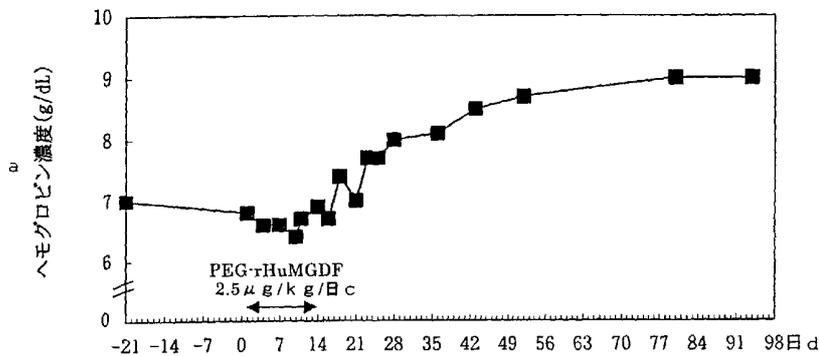
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/15926 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/32, 47/48, A61P 7/06, 43/00
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP01/07283
 - (22) 国際出願日: 2001年8月24日 (24.08.2001)
 - (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2000-254473 2000年8月24日 (24.08.2000) JP
 - (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟
麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)
[JP/JP]; 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10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): 小松則夫 (KO-
MATSU, Norio) [JP/JP]; 〒329-0434 栃木県河内郡南河
内町祇園5-17-2 Tochigi (JP). 浦部晶夫 (URABE, Akio)
[JP/JP]; 〒145-0071 東京都大田区田園調布2-9-20 Tokyo
(JP). 別所正美 (BESSHO, Masami) [JP/JP]; 〒115-0055
東京都北区赤羽西2-21-4-403 Tokyo (JP). 溝口秀昭 (MI-
ZOGUCHI, Hideaki) [JP/JP]; 〒164-0012 東京都中野区
本町1-3-12 金剛マンション602 Tokyo (JP).
 - (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門
5森ビル3階 Tokyo (JP).
 - (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
 - (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: c-mpl LIGAND-CONTAINING MEDICINAL COMPOSITIONS FOR INCREASING PLATELETS AND ERYTHROCYTES

(54) 発明の名称: c-mplリガンドを含有する、血小板及び赤血球を増加させるための医薬組成物



b 骨髓異形成症候群患者 (実施例 2) におけるヘモグロビン濃度の推移

a...HEMOGLOBIN CONCENTRATION (g/dL)

c...DAY

b...CHANGES IN HEMOGLOBIN CONCENTRATION IN PATIENT WITH
MYELODYSPLASTIC SYNDROME (EXAMPLE 2)

d...DAYS

(57) Abstract: Medicinal compositions containing a therapeutically effective amount of c-mpl ligand for increasing platelets and erythrocytes in patients with myelodysplastic syndrome or hypoplastic anemia.

[続葉有]

WO 02/15926 A1



(57) 要約:

本発明は、治療上有効量の c - m p l リガンドを含む、骨髓異形成症候群または再生不良性貧血患者において血小板および赤血球を増加させるための医薬組成物に関する。

明 細 書

c-mplリガンドを含有する、血小板及び赤血球を増加させるための医薬組成物

発明の分野

本発明は、c-mplリガンドを含む、血小板及び赤血球を増加させるための医薬組成物に関する。さらに具体的には、本発明は、骨髓異形成症候群または再生不良性貧血患者においてc-mplリガンドを含む、血小板及び赤血球を増加させるための医薬組成物に関する。

発明の背景

骨髓異形成症候群及び再生不良性貧血は、いずれも造血幹細胞の障害による骨髓機能不全による血球減少状態を特徴とする疾患である。骨髓異形成症候群は、骨髓が一般に正ないし過形成を示すと共に血球の異形成像が認められ、造血幹細胞に質的異常があるために有効な血球産生が行われない病態(いわゆる無効造血)を総称する症候群で、慢性かつ不可逆的に経過し、急性非リンパ性白血病の発症あるいは骨髓不全に伴う感染症及び出血による死亡等予後不良である(吉田弥太郎ら、骨髓異形成症候群。新内科学大系、中山書店 1992; 18: 384)。治療法として確立されたものはなく、移植可能な年齢の患者に対しては同種骨髓移植が施行されたり、高リスク群である芽球増加を伴うRA(RAEB)及び移行期のRAEB(RAEB-t)等では白血病に準じて化学療法が施行される。その他の患者では血球減少に対して、造血刺激のために蛋白同化ホルモン及び男性ホルモン療法ならびにサイトカイン療法、または輸血が施行される。

一方再生不良性貧血は、骨髓は低形成で異型細胞(芽球)の増加を伴わないことから、造血幹細胞の減少ならびに造血微小環境の異常に由来する疾患と考えられている(浦部晶夫、再生不良性貧血、新内科学大系、中山書店 1992; 18: 365)。近年は骨髓不全の原因として免疫的な関与が示唆されており、治療法としては移

植可能な年齢の重症患者に対しては同種骨髄移植が選択され、それ以外の重症患者及び中等症患者に対しては免疫抑制療法としてステロイドパルス療法、シクロスポリン投与、抗胸腺細胞免疫グロブリン及び抗リンパ球グロブリン投与が施行される。また、骨髄異形成症候群と同様に血球減少に対して、造血刺激のために蛋白同化ホルモン及び男性ホルモン療法ならびにサイトカイン療法、または輸血が施行される。

骨髄異形成症候群または再生不良性貧血患者に対し貧血症状を改善するために、これまで顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、エリトロポエチン (EPO)、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン類 (IL-1、IL-3、IL-6 等) などの造血因子による臨床効果が検討されてきた。それにもかかわらず、貧血症状の改善に関しては、赤芽球系特異的な造血因子である EPO であってもその有効率は低く約 15%～約 35%に過ぎなかった (後記の比較例参照)。もちろん EPO 以外の造血因子による改善効果は全く認められないか、ほとんど認められない。

また、c-mpl リガンドとして本発明でも用いられているポリエチレングリコール修飾遺伝子組換えヒト巨核球増殖分化因子 (PEG-rHuMGDF) または遺伝子組換えトロンボポエチン (rHuTPO) の臨床試験が実施されているが、これまで赤血球系の造血に対する影響はないと報告されている (Basser RL et al., "Enhancement of platelet recovery after myelosuppressive chemotherapy by recombinant human megakaryocyte growth and development factor in patients with advanced cancer," J. Clin. Oncol. 2000; 18:2852 他)。

このような状況にあって、本発明は、骨髄異形成症候群または再生不良性貧血患者において血小板および赤血球増加作用を示す医薬組成物を提供することを目的とする。

発明の概要

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、意外にも c-mpl リガンドが血小板増加作用のみならず骨髄異形成症候群または再生不良性貧血患者の貧血症状を顕著に改善しうることを見出した。

したがって本発明は以下のものを含む。

本発明は、治療上有効量の c-mpl リガンドを含む、骨髓異形成症候群または再生不良性貧血患者において血小板および赤血球を増加させるための医薬組成物を提供する。

具体的には、c-mpl リガンドは、配列番号1のアミノ酸配列のうち少なくとも7位～151位のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変異体、またはそれらの誘導体からなり、かつトロンボポエチン(thrombopoetin; TPO) 活性を有するものである。ここで「トロンボポエチン活性」とは、哺乳動物（好ましくはヒト）において巨核球前駆細胞の増殖および分化を促進するか、あるいは該動物生体内で特異的に血小板の産生を刺激または増強する活性を指す。

本発明の実施態様において、該c-mpl リガンドが、配列番号1のアミノ酸配列1～332からなるポリペプチド、その変異体またはそれらの誘導体であって、かつトロンボポエチン活性を有するもの、あるいは、配列番号1のアミノ酸配列1～163からなるポリペプチド、その変異体またはそれらの誘導体であって、かつトロンボポエチン活性を有するものを例示することができる。

本発明の実施態様において、該変異体が、配列番号1のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、付加および/または挿入を含み、かつトロンボポエチン活性を有するポリペプチドである。

本発明の実施態様において、該誘導体が、水溶性ポリマーで修飾されたポリペプチドまたはその変異体である。水溶性ポリマーは、少なくとも該ポリペプチドまたはその変異体のN末端に結合されうる。該水溶性ポリマーの好ましい例はポリエチレングリコールである。

本発明の実施態様において、該c-mpl リガンドは、配列番号2のアミノ酸配列からなる組換えポリペプチドのN末端に1分子のポリエチレングリコールが結合されたPEG-rHuMGDF(後述の実施例参照)である。このPEG-rHuMGDFをタンパク重量で約2.5 μ g(約143pmol)/kg/日の用量で約2週間にわたって骨髓異形成症候群または再生不良性貧血患者に投与したときには、投与開始後約2週間までは網赤血球数の継続的な増加傾向は認められず、約2～約5週間で継続的に増加して最大値に達し、その最大値は投与開始日の値の約1.5～約2.5倍であり、投与開

始後約 10～約 12 週間後にほぼ投与前の値に復する、という治験結果が得られ、またこの治験例において、投与開始の約 2 週間後にヘモグロビン濃度が増加しはじめ、投与開始の約 8～約 12 週後に最大値に達し、その最大値は投与開始日の値に比べて血液 1 dL あたり約 2～約 3.5g の増加を示す、という結果が得られた（後述の実施例参照）。

本明細書中で使用する「c-mpl リガンド」は、c-mpl (TPO 受容体; Vigon, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5640-5644 (1992)) に対して結合し、かつ作用する物質である。

本明細書中で使用する「治療上有効量」とは、骨髓異形成症候群および再生不良性貧血をもつ患者に対して、巨核球前駆細胞の増殖および分化を促進するかまたは生体内で特異的に血小板の産生を刺激もしくは増強することによって血小板を増加させる（所謂トロンボポエチン活性）とともに、有意の赤血球増加作用を提供する用量を意味する。

本明細書中で使用する「変異体」とは、配列番号 1 のアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、付加および/または挿入を含み、かつ、トロンボポエチン活性をもつものを意味する。また「誘導體」とは、水溶性ポリマー（例えばポリエチレングリコール）付加、グリコシル化、リン酸化、硫酸化などの化学修飾を含むタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを意味する。

図面の簡単な説明

図 1 は、骨髓異形成症候群患者（実施例 1）における血小板数の推移を示すグラフである。患者に対しタンパク重量で $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol) /kg/日の PEG-rHuMGDF を 1 日目から 14 日目まで 14 日間投与し、投与開始後 28 日目までは週 3 回、その後 42 日目までは週 1 回血小板数を測定した。なお図に示された期間中に血小板輸血は施行されなかった。

図 2 は、骨髓異形成症候群患者（実施例 1）におけるヘモグロビン濃度の推移を示すグラフである。患者に対しタンパク重量で $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol) /kg/日の PEG-rHuMGDF を 1 日目から 14 日目まで 14 日間投与し、投与開始後 28 日目までは週 3 回、その後 42 日目までは週 1 回ヘモグロビン濃度を測定した。なお図に示さ

れた期間中に赤血球輸血は施行されなかった。

図3は、骨髄異形成症候群患者（実施例1）における網赤血球数の推移を示すグラフである。患者に対しタンパク重量で $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol)/kg/日の PEG-rHuMGDF を1日目から14日目まで14日間投与し、投与開始後28日目までは週3回、その後42日目までは週1回網赤血球数を測定した。なお図に示された網赤血球数は、測定された赤血球1000個あたりの網赤血球の比率（ $\%$ ）を赤血球数に乗じて算出された値である。

図4は、骨髄異形成症候群患者（実施例2）における血小板数の推移を示すグラフである。患者に対しタンパク重量で $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol)/kg/日の PEG-rHuMGDF を1日目から14日目まで14日間投与し、投与開始後28日目までは週3回、その後42日目までは週1回血小板数を測定した。なお図に示された期間中に血小板輸血は施行されなかった。

図5は、骨髄異形成症候群患者（実施例2）におけるヘモグロビン濃度の推移を示すグラフである。患者に対しタンパク重量で $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol)/kg/日の PEG-rHuMGDF を1日目から14日目まで14日間投与し、投与開始後28日目までは週3回、その後42日目までは週1回ヘモグロビン濃度を測定した。なお図に示された期間中に赤血球輸血は施行されなかった。

図6は、骨髄異形成症候群患者（実施例2）における網赤血球数の推移を示すグラフである。患者に対しタンパク重量で $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol)/kg/日の PEG-rHuMGDF を1日目から14日目まで14日間投与し、投与開始後28日目までは週3回、その後42日目までは週1回網赤血球数を測定した。なお図に示された網赤血球数は、測定された赤血球1000個あたりの網赤血球の比率（ $\%$ ）を赤血球数に乗じて算出された値である。

図7は、再生不良性貧血患者における血小板数の推移を示すグラフである。患者に対しタンパク重量で $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol)/kg/日の PEG-rHuMGDF を1日目から14日目まで14日間投与し、投与開始後28日目までは週3回、その後42日目までは週1回血小板数を測定した。なお図に示された期間中に血小板輸血は施行されなかった。

図8は、再生不良性貧血患者におけるヘモグロビン濃度の推移を示すグラフで

ある。患者に対しタンパク重量で $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol) /kg/日の PEG-rHuMGDF を 1 日目から 14 日目まで 14 日間投与し、投与開始後 28 日目までは週 3 回、その後 42 日目までは週 1 回ヘモグロビン濃度を測定した。なお図に示された期間中に赤血球輸血は施行されなかった。

図 9 は、再生不良性貧血患者における網赤血球数の推移を示すグラフである。患者に対し $2.5 \mu\text{g}$ (約 143pmol) /kg/日の PEG-rHuMGDF を 1 日目から 14 日目まで 14 日間投与し、投与開始後 28 日目までは週 3 回、その後 42 日目までは週 1 回網赤血球数を測定した。なお図に示された網赤血球数は、測定された赤血球 1000 個あたりの網赤血球の比率 ($\%$) を赤血球数に乗じて算出された値である。

発明の詳細な説明

本発明の医薬組成物の有効成分である c-mpl リガンドとして、骨髄異形成症候群または再生不良性貧血患者において血小板および赤血球増加作用を示す任意のタンパクもしくはペプチド性物質または非タンパク性物質が使用できる。

タンパク性 c-mpl リガンドの例には、(1) トロンボポエチン (TPO または MGDF)、その変異体およびその誘導体 (W095/18858 または日本国特表平 9-508262 号公報、日本国特許第 2991640 号公報、日本国特許第 2991630 号公報および日本国特許第 2996729 号公報など)、(2) 巨核球の刺激剤としてのアゴニスト抗体 (W099/03495、W099/10494 など)、(3) 造血レセプターアゴニストなどの他のタンパク質 (W096/23888 または日本国特表平 11-500308 号公報、W097/12978、W097/12985 または日本国特表平 11-510062 号公報、W098/17810、W096/34016 または日本国特表平 8-532372 号公報、W000/24770 など) などが含まれる。

ペプチド性 c-mpl リガンドの例には、mpl レセプターに結合可能なペプチド性化合物が含まれる (W096/40189、W096/40750、W098/25965、日本国特開平 10-72492 号公報、W099/42127、W000/24770 など)。

非タンパク性 c-mpl リガンドの例には、(1) ベンゾジアゼピン誘導体 (日本国特開平 11-1477 号公報、日本国特開平 11-152276 号公報など)、(2) 他の低分子系 mpl レセプターリガンド (W099/11262、W099/22733、W099/22734、W000/35446、W000/28987 など) などが含まれる。

特に好ましいc-mp1リガンドは、トロンボポエチン、その変異体およびその誘導体である。本発明で使用するトロンボポエチンの変異体および誘導体は、血小板産生を特異的に刺激又は増大させる生物活性を有することが必要である。

トロンボポエチンとしてはたとえば配列番号1のアミノ酸配列1~332を有するポリペプチドまたはその変異体を挙げるができる。本発明では、部位特異的突然変異誘発法やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む公知の変異導入法(米国特許第4,518,584参照)を用いることによって、トロンボポエチンの種々の変異体を得ることができる。

例えば、そのような変異体の例は、配列番号1のアミノ酸配列において少なくとも7位~151位のアミノ酸配列を含むトランケーション型タンパク質、例えば1~244、1~231、1~211、1~191、1~177、1~174、1~171、1~170、1~169、1~163、1~158、1~157、1~156、1~155、1~154、1~153、1~151、7~163などを含む。また本発明で使用可能な他の変異体の非限定例として、次のものを挙げるができる。

[Thr³³, Thr³³³, Ser³³⁴, Ile³³⁵, Gly³³⁶, Tyr³³⁷, Pro³³⁸, Tyr³³⁹, Asp³⁴⁰, Val³⁴¹, Pro³⁴², Asp³⁴³, Tyr³⁴⁴, Ala³⁴⁵, Gly³⁴⁶, Val³⁴⁷, His³⁴⁸, His³⁴⁹, His³⁵⁰, His³⁵¹, His³⁵², His³⁵³] TPO (1-332)、

[Asn²⁵, Lys²³¹, Thr³³³, Ser³³⁴, Ile³³⁵, Gly³³⁶, Tyr³³⁷, Pro³³⁸, Tyr³³⁹, Asp³⁴⁰, Val³⁴¹, Pro³⁴², Asp³⁴³, Tyr³⁴⁴, Ala³⁴⁵, Gly³⁴⁶, Val³⁴⁷, His³⁴⁸, His³⁴⁹, His³⁵⁰, His³⁵¹, His³⁵², His³⁵³] TPO (1-332)、

[Asn²⁵] TPO (1-332)、

[Thr³³] TPO (1-332)、

[ΔHis³³] TPO (1-163)、

[ΔArg¹¹⁷] TPO (1-163)、

[ΔGly¹¹⁶] TPO (1-163)、

[His³³, Thr³³, Pro³⁴] TPO (1-163)、

[H i s³³, A l a^{33'}, P r o³⁴] T P O (1-163)、
 [H i s³³, G l y^{33'}, P r o³⁴, S e r³⁸] T P O (1-163)、
 [G l y¹¹⁶, A s n^{116'}, A r g¹¹⁷] T P O (1-163)、
 [G l y¹¹⁶, A l a^{116'}, A r g¹¹⁷] T P O (1-163)、
 [G l y¹¹⁶, G l y^{116'}, A r g¹¹⁷] T P O (1-163)、
 [A l a¹, V a l³, A r g¹²⁹] T P O (1-163)、
 [A l a¹, V a l³, A r g¹³³] T P O (1-163)、
 [A l a¹, V a l³, A r g¹⁴³] T P O (1-163)、
 [A l a¹, V a l³, L e u⁸²] T P O (1-163)、
 [A l a¹, V a l³, L e u¹⁴⁶] T P O (1-163)、
 [A l a¹, V a l³, P r o¹⁴⁸] T P O (1-163)、
 [A l a¹, V a l³, A r g⁵⁹] T P O (1-163)、及び
 [A l a¹, V a l³, A r g¹¹⁵] T P O (1-163)。

上記の式において、例えば [A s n²⁵] T P O (1-332) は、T P O のアミノ酸配列 1 ~ 3 3 2 (配列番号 1) の 2 5 位のアミノ酸がアスパラギン (Asn) に置換されていることを示す。また例えば [Δ H i s³³] T P O (1- 163) は、トランケーション型アミノ酸配列 1 ~ 1 6 3 (配列番号 2) の 3 3 位のヒスチジン (His) が欠失されていることを示す。さらに例えば [H i s³³, T h r^{33'}, P r o³⁴] T P O (1-163) は、トランケーション型アミノ酸配列 1 ~ 1 6 3 (配列番号 2) の 3 3 位および 3 4 位のアミノ酸がそれぞれヒスチジン (His)、プロリン (Pro) に置換され、かつそれらのアミノ酸の間にトレオニン (Thr) が挿入 (または付加) されていることを示す。

T P O タンパク質またはその変異体にはさらに、アミノ酸配列 [M e t⁻²-L y s⁻¹]、[M e t⁻¹] または [G l y⁻¹] を含有させることができる。特に Met-Lys は、目的タンパク質を細菌細胞内で発現させて精製した後、ジペプチダーゼ (例えばカテプシン C) 等の酵素による処理によって除去することができる。

あるいは、T P O タンパク質のアミノ酸配列における特異的突然変異体は、グリコシル化の起こる部位 (セリン、スレオニン、またはアスパラギン等) の改変も含み得る。グリコシル化が起こらないかまたは部分的なグリコシル化しか起こ

らないのは、アスパラギン残基を含むグリコシル化認識部位において、あるいは O-結合炭水化物が付加することによって修飾された分子の部位において、アミノ酸の置換または欠失が起こった結果である。アスパラギン残基を含むグリコシル化認識部位は、適切な細胞性グリコシル化酵素によって特異的に認識されるトリペプチド配列から構成される。このトリペプチド配列は、Asn-Xaa-Thr または Asn-Xaa-Ser であり、ここで Xaa はプロリン以外のあらゆるアミノ酸である。さまざまなアミノ酸の置換または欠失が、グリコシル化認識部位の 1 番目または 3 番目のアミノ酸位置のうちいずれか一方または両方において起こった場合（および/または 2 番目の位置においてアミノ酸欠失がおきた場合）、改変されたトリペプチド配列においてはグリコシル化が起こらない。これに対して、TPOタンパク質の立体構造（またはコンホメーション）を大きく変えない程度でかつ生物学的活性を実質的に維持しうる範囲で、TPOタンパク質のアミノ酸配列中に新たにグリコシル化認識部位を導入することもできる。そしてグリコシル化の結果得られる TPOタンパク質は、天然（特にヒト）と同じ炭水化物鎖のみならず非天然の炭水化物鎖を有しうる。

本発明で使用する上記のような TPO およびその変異体からなる c-m p 1 リガンドは、公知の方法（日本国特許第 2991640 号公報、W095/26746 など）または慣用の遺伝子組換え技術（Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989、および Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, U. S. A., 1993)) を用いて得ることができる。トロンボポエチン活性を有するタンパク質をコードする DNA は、本出願人によって独立行政法人産業技術総合研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）、あるいは中華人民共和国（CCTCC）または中華民国（FIRDI）、の寄託機関に寄託されている細胞株、例えば FERM BP-4565、CCTCC-M95002、FIRDI940083（ベクター pEF18S-A2 α ）、FERM BP-4564、CCTCC-M95001、FIRDI940082（ベクター pHT1-231）、FERM BP-4617、CCTCC-M95004、FIRDI940085（ベクター pHTF1）、FERM BP-4616、CCTCC-M95003、FIRDI

940084 (ベクター pHGT1)、FERM BP-4988、CCTCC-C95004、FIRDI960023 (CHO28/1/1/3-C6)、または FERB BP-4989、CCTCC-C95005、FIRDI960024 (CHO163T-63-79-C1) から単離することができる。このようなDNAを出発原料として適当な発現用ベクター (プラスミドなど) に組み込んだ後、このベクターで原核 (大腸菌など) または真核宿主細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞など) を形質転換し、得られた宿主の培養により目的の c-mpl リガンドを製造することができる。c-mpl リガンドは、一般的にタンパク質の精製に用いられる手段、例えばイオン交換クロマトグラフィー、レクチンアフィニティークロマトグラフィー、トリアジン色素吸着クロマトグラフィー、疎水相互クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、硫酸化ゲルクロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、抗体アフィニティークロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、金属キレートリングクロマトグラフィー、分取電気泳動法、等電点電気泳動法などの手段の一つ以上を組み合わせることによって、精製可能である。

本発明で使用する TPO タンパク質の誘導体の例は、少なくとも1つの水溶性ポリマー部分に結合した c-mpl リガンドタンパク質である。水溶性ポリマーは、例えばポリエチレングリコール、モノメトキシーポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ (N-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (すなわちグリセロール) およびポリビニルアルコールからなる群から選択できる。好ましくは、少なくとも1つのポリエチレングリコール (PEG) 分子に結合した PEG 化 c-mpl リガンド分子である。さらに好ましくは、1つのポリエチレングリコール分子をタンパクの N 末端に結合したモノペグ化 c-mpl リガンド分子である。

c-mpl リガンドの PEG 化は、当業界で周知となっている PEG 化反応を利用して達成され得る (たとえば、Focus on Growth Factors 3 (2):4-10 (1992)、EP 0154316、EP 0401384 参照)。好ましくは、反応性ポリエチレングリコール分子

を用いるアシル化またはアルキル化反応を介して、PEG化を行うのがよい。PEGの好ましい平均分子量は約5kDa～約50kDaであり、約12kDa～約25kDaの間であればなおよい。水溶性ポリマー対c-mplリガンドタンパク質の反応モル比は、一般に1:1から100:1ならよく、ポリPEG化の場合1:1～20:1、モノPEG化では1:1～5:1であればなおよい。

アシル化によるPEG化には、一般に、ポリエチレングリコールの活性エステル誘導体と、c-mplリガンドタンパク質との反応を含む。好適な活性化PEGエステルは、PEGをN-ヒドロキシスクシンイミドへエステル化したものである。アシル化によるPEG付加反応では、一般に、多数のPEGが付加したc-mplリガンド産物が生じ、ここではアシル結合基を介してリジンε-アミノ基にPEG付加が起こる。結合はアミドであることが好ましい。また、生じる産物は、実質上、PEG1個の付加物、PEG2個の付加物またはPEG3個の付加物のみ（例えば>95%）であることが好ましい。必要に応じて、透析、塩析、限外濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび電気泳動を含む標準的技術その他の技術を適用することによって、混合物または未反応種の中から、より精製されたPEG付加種を分離することができる。

アルキル化によるPEG付加には、還元アルキル化反応を利用することができる。1個のPEGが付加した産物を得るための還元アルキル化を介した誘導体化では、リジン残基におけるε-アミノ基と、タンパク質におけるN-末端残基のα-アミノ基との間におけるpKa値の差を利用することができる。

本発明で使用するPEG化c-mplリガンドの具体例は、WO95/26746のTable 10に記載されるようなmono-MePEG-MGDFである。

本発明の医薬組成物は、治療上有効量のc-mplリガンドに加えて、賦形剤、担体または希釈剤を含むことができ、投与方法に応じて種々の投薬剤形（例えば錠剤、溶液剤、懸濁剤、座剤、点鼻薬など）としうる。また徐放性を付与した製剤とすることもできる。徐放性製剤は腸溶性物質および/またはユードラジッド等の疎水性ポリマー物質を親水性物質と組み合わせ、それらに薬剤を単に分散させて多粒状化するかまたは多層形態とし、必要に応じて疎水性被覆剤でコーティングすることによって得ることができる。また必要に応じて、防腐剤、界面活性剤、

可溶化剤、酸化防止剤、等張化剤などの添加剤を含有させてもよい。また本発明の医薬組成物は、凍結乾燥または乾燥された剤形であってもよく、使用時に医薬上許容可能な希釈剤に溶解して対象患者に投与しうる。凍結乾燥製剤には安定化剤として糖類や界面活性剤を含有させることができる。希釈剤の例は、種々の pH およびイオン強度から成る緩衝剤（例えばトリス-塩酸、酢酸塩、リン酸塩）、生理食塩水などを含む。

界面活性剤の例は Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆汁酸塩などである。可溶化剤の例はグリセロール、ポリエチレングリコールなどである。酸化防止剤の例はアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウムなどである。防腐剤の例はチメロサル、ベンジルアルコール、パラベンなどである。等張化剤の例はラクトース、マンニトールなどである。その他の添加剤として、容器の表面に吸着しないようにするためのアルブミン、ゼラチン等のタンパク質、プロテアーゼ阻害剤、消化管吸収促進剤などを挙げるができる。

本発明の医薬組成物は、有効成分とポリエチレングリコールのような水溶性ポリマーとの共有結合、有効成分と金属イオンとの錯体化、あるいはポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなどのような重合化合物の粒状製剤中またはその表面上への、あるいはリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層小胞、赤血球ゴースト、またはスフェロプラスト中への有効成分の取り込み、などの形態をとることができる。

本発明の医薬組成物は、非経口（静脈内、動脈内、直腸内、皮下、皮内、経肺、経鼻など）および経口を含めた種々の投与経路で投与しうる。投与量は、有効成分として通常約 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、好ましくは $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～ $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、さらに好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重である。投薬量は年齢、病状、体重、性別、患者の食事状態及び投与経路等に応じて変化し得るし、また一日一回または数回に分けて約 1～2 週間あるいはそれ以上に亘って投与することができる。c-mpl リガンドは、上記の用量範囲に限定されず、副作用を発現しない範囲でかつ目的の治療効果を達成しうる投薬量で組成物中に含有しうる。後述の実施例では N 末端が単一のポリエチレングリコールで修飾された配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチド PEG-rHuMGDF をタンパク重

量で約 2.5 μ g (約 143pmol) /kg/日の用量で使用したときには、他の付加的造血因子を含有させなくとも、骨髓異形成症候群または再生不良性貧血患者の臨床試験において所望の血小板増加効果および赤血球増加効果(すなわち貧血改善効果)をともに達成することができた。

本発明の組成物には、c-mpl リガンドに加えてエリスロポエチン (EPO)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、コロニー刺激因子 (CSF) -1、インターロイキン (IL) -1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、白血球遊走阻止因子 (LIF)、幹細胞因子 (SCF)、インターフェロン α 、 β 、 γ のような因子の 1 つ以上を付加的造血因子として含有させることが可能である。

本発明により、配列番号 1 のアミノ酸配列のうち少なくとも 7 位～151 位のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変異体、またはそれらの誘導体からなりかつトロンボポエチン活性を有する治療上有効量の c-mpl リガンドを含む上記の医薬組成物を、骨髓異形成症候群または再生不良性貧血患者に投与することによって、血小板及び赤血球を増加させるために該患者を治療することができる。たとえば、該患者に対し c-mpl リガンド (後述実施例の PEG-rHuMGDF) をタンパク重量で約 2.5 μ g (約 143pmol) /kg/日の用量で約 2 週間にわたって投与したとき、投与開始後約 2 週間までは網赤血球数の継続的な増加傾向は認められないが約 2～約 5 週間で継続的に増加して最大値に達し、その最大値は投与開始日の値の約 1.5～約 2.5 倍となる。また、投与開始の約 2 週間後にヘモグロビン濃度が増加しはじめ、投与開始の約 8～約 12 週後に最大値に達し、その最大値は投与開始日の値に比べて血液 1 dL あたり約 2～約 3.5g の増加を示す。本発明の治療法は、本発明の医薬組成物を骨髓異形成症候群または再生不良性貧血患者に投与する場合、投与後ある一定のタイムラグ (約 1～約 2 週間) の後に網赤血球数およびヘモグロビン濃度が増加し始め最大値に達するという特徴を有している。使用する c-mpl リガンドの種類、投与量によって網赤血球数およびヘモグロビン濃度の時間あたりの増加量が変化するが、治療効果の推移は類似の傾向を示すと考えられる。

実施例

本発明を以下の実施例、比較例および参考例によってさらに具体的に説明する。

本実施例で使用した薬剤、投与方法および治験方法は以下のとおりである。

1. 薬剤及び投与方法

ポリエチレングリコール修飾遺伝子組換えヒト巨核球増殖発育因子（以下、PEG-rHuMGDF という）は、国際公開 W095/26746 に記載の方法を用いて、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチドを遺伝子組換え技術により大腸菌で生産し、その N 末端にポリエチレングリコール（平均分子量 20kDa）を化学的に結合させて得られたものである。1 バイアル（1.0mL）あたり PEG-rHuMGDF をタンパク量として 250 μ g 含む注射剤を、希釈用溶液（PEG-rHuMGDF を含まない溶媒）で 10 倍希釈後、患者体重 1kg あたり 2.5 μ g（タンパク量として）を 1 日 1 回 14 日間静脈内投与した。

2. 治験方法

本試験の実施に先立って、実施計画の内容に関して実施施設の治験審査委員会で審議され承認された。また、本試験の実施にあたっては実施計画、日本国薬事法第 14 条第 3 項及び第 80 条の 2 に規定する基準、ヘルシンキ宣言ならびに医薬品の臨床試験の実施に関する基準（GCP）及びその省令を遵守した。

バイタルサイン、自覚症状及び他覚所見は、治験薬投与期間中は毎日、投与終了後経過観察第 1 週及び第 2 週は週 3 回以上、経過観察第 3 週及び第 4 週は週 1 回以上実施した。また、投与開始前 6 週間及び治験薬投与期間・経過観察期間中の輸血（血小板及び赤血球）についても調査した。血液学的検査は、治験薬投与期間ならびに経過観察第 1 週及び第 2 週は週 3 回以上、経過観察第 3 週及び第 4 週は週 1 回以上実施した。血液生化学検査、凝固・線溶系検査及び尿検査は、投与開始日及び投与 2 日目以降の全期間で週 1 回実施した。血中 PEG-rHuMGDF 濃度は、投与開始日の投与開始前、投与 15 分後、2 時間後及び 8 時間後、投与 2 日目の投与開始前、投与 4 日目、7 日目、10 日目の投与開始前及び投与 15 分後、投与 14 日目の投与開始前、投与 15 分後、2 時間後及び 8 時間後、投与終了翌日及び投与終了 2 週間後の血清を用い、株式会社エスアールエル・テイジンバイオにて測

定された。また、PEG-rHuMGDF 及び PEG-rHuMGDF のタンパク部分に対する抗体価 (RIA 法) ならびに TPO 中和抗体 (生物活性中和試験) は、投与開始前及び投与終了 2 週間後の血清を用い、株式会社エスアールエル・テイジンバイオにて測定された。

<実施例 1> 骨髄異形成症候群患者における試験例

1. 対象患者

本症例 (49 歳、男性) は平成 6 年 11 月に骨髄異形成症候群 (FAB 分類で不応性貧血 (RA)) と診断され、平成 6 年 12 月から平成 7 年 1 月までは活性型ビタミン D₃ (アルファカルシドロール) 2 μ g/日及びレノグラスチム 100 μ g/日を投与された。また、平成 7 年 1 月から 2 月にプリモボラン 10mg/日投与、平成 7 年 3 月にインターロイキン (IL-) 11 投与、平成 7 年 5 月にステロイドパルス療法及びそれに引き続き 10 月まで維持量のステロイド投与を受けた。以上のいずれの治療に対しても効果は認められなかった。

平成 11 年 3 月から 7 月までの血小板数は平均で約 13,000/mm³ で血小板輸血は施行されていなかった。選択基準 (20 歳以上 75 歳以下、P. S. が 0~2) を満たし、除外基準 (重篤な合併症・感染症ならびに骨髄線維化を有する患者、GOT 及び GPT が施設正常値の 3 倍以上、血清クレアチニンが 2.0mg/dL 以上、血栓症の既往を有し血栓塞栓症を起こす恐れのある患者、生物学的製剤に過敏症の患者、皮内反応試験陽性及び妊娠・授乳中の婦人) に当てはまらなかったため、本人より文書による同意を得て本試験に症例登録された。

2. 血小板数の変動

本症例においては、血小板数は図 1 の通り一過性の増加を示した。2.5 μ g/kg/日の PEG-rHuMGDF を患者に投与した 14 日間は血小板数の持続的な増加傾向は認められなかったが、投与開始後 16 日目から 28 日目の間に血小板数は 16,000/mm³ から 21,000/mm³ まで増加、その後も増加傾向は持続し投与開始後 42 日目には血小板数 25,000/mm³ に達した。その後、投与開始後 57 日目には血小板数 22,000/mm³ と増加傾向が維持されたが、投与開始後 71 日目には血小板数 12,000/mm³ と投与前と同様まで復した。

なお、本症例では出血傾向は認められず、投与開始前 6 週間及び投与開始後 6

週間に血小板輸血は施行されなかった。

3. 赤血球系の変動

図2にヘモグロビン濃度の推移を、図3に網赤血球数の推移を示した。本症例においては、 $2.5 \mu\text{g/kg/日}$ のPEG-rHuMGDF投与開始日にはヘモグロビン濃度 10.0g/dL 、網赤血球数 $59,400/\text{mm}^3$ であったが、投与開始後14日目から網赤血球数の持続的な増加傾向が認められ、投与開始後35日目に網赤血球数 $97,900/\text{mm}^3$ に達した後、投与開始後71日目には網赤血球数 $59,700/\text{mm}^3$ と投与前と同様まで復した。これに対し、ヘモグロビン濃度は投与開始後28日目までは持続的な増加傾向は認められなかったが、投与開始後35日目から57日目の間に 10.8g/dL から 12.1g/dL まで増加し、その後も維持された。

他の赤血球系パラメータに関してもヘモグロビン濃度と同様の推移を示した。赤血球数は投与開始日に $270 \times 10^4/\text{mm}^3$ であったが、投与開始後57日目には $319 \times 10^4/\text{mm}^3$ まで増加した。また、ヘマトクリットも投与開始日に30.6%であったが、投与開始後57日目には36.2%まで増加した。ただし、赤血球恒数である平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量及び平均赤血球ヘモグロビン濃度はPEG-rHuMGDF投与前・中・後を通じて一定の範囲内の変動に留まった。

4. 白血球系の変動

白血球数はPEG-rHuMGDF投与前・中・後を通じて一定の範囲内の変動に留まった。また、白血球分画の変動もPEG-rHuMGDF投与前・中・後を通じて一定の傾向は認められなかった。

5. 血中PEG-rHuMGDF濃度

血中PEG-rHuMGDF濃度は、PEG-rHuMGDF及び内因性TPOを検出するELISA法にて測定した。投与開始前の内因性TPO濃度はPEG-rHuMGDF換算で $1,595\text{pg/mL}$ と健常人と比較し高値であった。投与1日目の投与15分後には $60,730\text{pg/mL}$ まで上昇したが投与2日目の投与前には $7,838\text{pg/mL}$ まで低下した。投与15分後のPEG-rHuMGDF濃度は投与4日目に $78,980\text{pg/mL}$ 、投与7日目に $75,620\text{pg/mL}$ 、投与10日目に $81,320\text{pg/mL}$ 、投与14日目に $81,960\text{pg/mL}$ と、14日間の投与中に定常状態に達した。また、投与前（投与24時間後）のPEG-rHuMGDF濃度も、投与4日目に $11,100\text{pg/mL}$ 、投与7日目に $15,120\text{pg/mL}$ 、投与10日目に $12,250\text{pg/mL}$ 、

投与 14 日目に 13,780pg/mL、投与終了翌日に 13,940pg/mL と、14 日間の投与中に定常状態に達した。投与終了 2 週間後の内因性 TPO 濃度は PEG-rHuMGDF 換算で 1,464pg/mL と投与前値にほぼ復していた。

<実施例 2> 骨髄異形成症候群患者における試験例

1. 対象患者

本症例（54 歳、女性）は昭和 59 年 7 月に骨髄異形成症候群（FAB 分類で RA）と診断され、同年エポエチンアルファ（rHuEPO）20,000 単位/日を 4 週間投与された。また、平成 3 年 8 月から 10 月まで再び rHuEPO を漸増法で 3,000～24,000 単位/日投与されたが、いずれも効果は認められなかった。また、平成 11 年 1 月から酢酸メテノロンを投与されている。

平成 11 年 6 月から 10 月までの血小板数は平均で約 21,000/mm³で血小板輸血は施行されていなかった。選択基準（20 歳以上 75 歳以下、P. S. が 0～2）を満たし、除外基準（重篤な合併症・感染症ならびに骨髄線維化を有する患者、GOT 及び GPT が施設正常値の 3 倍以上、血清クレアチニンが 2.0mg/dL 以上、血栓症の既往を有し血栓塞栓症を起こす恐れのある患者、生物学的製剤に過敏症の患者、皮内反応試験陽性及び妊娠・授乳中の婦人）に当てはまらなかったため、本人より文書による同意を得て本試験に症例登録された。

2. 血小板数の変動

本症例においては、血小板数は図 4 の通り一過性の増加を示した。2.5 μg/kg/日の PEG-rHuMGDF を患者に投与した 14 日間は血小板数の持続的な増加傾向は認められなかったが、投与開始後 21 日目から 28 日目の間に血小板数は 28,000/mm³から 39,000/mm³まで増加した後、投与開始後 52 日目まで血小板数 38,000/mm³と増加傾向が維持されたが、投与開始後 80 日目には血小板数 16,000/mm³と投与前と同様まで復した。

なお、本症例では投与前から時折歯肉からの少量出血または下肢の紫斑が認められたが、特に投与開始前 6 週間及び投与開始後 6 週間に血小板輸血は施行されなかった。

3. 赤血球系の変動

図5にヘモグロビン濃度の推移を、図6に網赤血球数の推移を示した。本症例においては、 $2.5 \mu\text{g/kg/日}$ のPEG-rHuMGDF投与開始日にはヘモグロビン濃度 6.8g/dL 、網赤血球数 $44,300/\text{mm}^3$ であったが、投与開始後11日目の網赤血球数 $49,600/\text{mm}^3$ から持続的な増加傾向が認められ、投与開始後28日目に網赤血球数 $71,400/\text{mm}^3$ に達した後、投与開始後80日目には網赤血球数 $37,700/\text{mm}^3$ まで復した。これに対し、ヘモグロビン濃度は投与開始後16日目までは持続的な増加傾向は認められなかったが、投与開始後18日目から80日目の間に 7.4g/dL から 9.0g/dL まで増加し、その後も維持された。

他の赤血球系パラメータに関してもヘモグロビン濃度と同様の推移を示した。赤血球数は投与開始日に $164 \times 10^4/\text{mm}^3$ であったが、投与開始後57日目には $222 \times 10^4/\text{mm}^3$ まで増加した。また、ヘマトクリットも投与開始日に20.4%であったが、投与開始後57日目には26.7%まで増加した。ただし、赤血球恒数である平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量及び平均赤血球ヘモグロビン濃度はPEG-rHuMGDF投与前・中・後を通じて一定の範囲内の変動に留まった。

なお、自覚症状としては投与前からだるさ及び易疲労感がみとめられ、P.S.は1であったが、投与終了後貧血の改善に伴ってP.S.は0に改善された。

4. 白血球系の変動

白血球数はPEG-rHuMGDF投与前・中・後を通じて一定の範囲内の変動に留まった。また、白血球分画の変動もPEG-rHuMGDF投与前・中・後を通じて一定の傾向は認められなかった。

5. 血中PEG-rHuMGDF濃度

投与開始前の内因性TP0濃度はPEG-rHuMGDF換算で 1653pg/mL と健常人と比較し高値であった。投与15分後のPEG-rHuMGDF濃度は14日間の投与中に定常状態に達した。また、投与前（投与24時間後）のPEG-rHuMGDF濃度も14日間の投与中に定常状態に達した。投与終了2週間後の内因性TP0濃度は投与前値にほぼ復していた。

<実施例3> 再生不良性貧血患者における試験例

1. 対象患者

本症例（48歳、男性）は平成9年2月に再生不良性貧血と診断され、平成9年3月から平成11年7月までシクロスポリン400～300mg/日及び平成11年1月までフィルグラスチム150 μ g/日を投与された。平成9年9月時点でシクロスポリン及びフィルグラスチムの効果は認められなかったため、平成9年11月にさらに抗胸腺細胞免疫グロブリンを投与された。その結果反応（Good Response）が認められ、赤血球及び血小板輸血が不要となった。

平成11年9月から11月までの血小板数は平均で19,000/mm³で血小板輸血は施行されていなかった。選択基準（16歳以上65歳未満、P.S.が0～2）を満たし、除外基準（重篤な合併症・感染症ならびに骨髄線維化を有する患者、GOT及びGPTが施設正常値の3倍以上、血清クレアチニンが2.0mg/dL以上、血栓症の既往を有し血栓塞栓症を起こす恐れのある患者、生物学的製剤に過敏症の患者、皮内反応試験陽性及び妊娠・授乳中の婦人）に当てはまらなかったため、本人より文書による同意を得て本試験に症例登録された。

2. 血小板数の変動

本症例においては、血小板数は図7のような増加を示した。2.5 μ g/kg/日のPEG-rHuMGDFを患者に投与した14日間は血小板数の持続的な増加傾向は認められなかったが、投与開始後17日目から29日目の間に血小板数は22,000/mm³から36,000/mm³まで増加した後、投与開始後68日目まで血小板数33,000/mm³と増加傾向が維持された。

なお、本症例では外傷による左眼下の紫斑以外に出血傾向は認められず、投与開始前6週間及び投与開始後6週間に血小板輸血は施行されなかった。

3. 赤血球系の変動

図8にヘモグロビン濃度の推移を、図9に網赤血球数の推移を示した。本症例においては、2.5 μ g/kg/日のPEG-rHuMGDF投与開始日にはヘモグロビン濃度5.6g/dL、網赤血球数30,200/mm³であったが、投与開始後10日目の網赤血球数39,800/mm³から持続的な増加傾向が認められ、投与開始後47日目に網赤血球数72,500/mm³に達した後、投与開始後68日目には網赤血球数39,500/mm³まで復した。これに対し、ヘモグロビン濃度は投与開始後19日目までは持続的な増加傾向は認められなかったが、投与開始後22日目から68日目の間に6.2g/dLから

8. 9g/dL まで増加した。

他の赤血球系パラメータに関してもヘモグロビン濃度と同様の推移を示した。赤血球数は投与開始日に $145 \times 10^4/\text{mm}^3$ であったが、投与開始後 57 日目には $225 \times 10^4/\text{mm}^3$ まで増加した。また、ヘマトクリットも投与開始日に 17.1%であったが、投与開始後 57 日目には 27.1%まで増加した。ただし、赤血球恒数である平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量及び平均赤血球ヘモグロビン濃度は PEG-rHuMGDF 投与前・中・後を通じて一定の範囲内の変動に留まった。

4. 白血球系の変動

白血球数は PEG-rHuMGDF 投与前・中・後を通じて一定の範囲内の変動に留まった。また、白血球分画の変動も PEG-rHuMGDF 投与前・中・後を通じて一定の傾向は認められなかった。

5. 血中 PEG-rHuMGDF 濃度

投与開始前の内因性 TPO 濃度は PEG-rHuMGDF 換算で 1056pg/mL と健常人と比較し高値であった。本症例においても骨髓異形成症候群の症例と同様に、投与直後及び投与前（投与 24 時間後）の PEG-rHuMGDF 濃度は 14 日間の投与中に定常状態に達し、投与終了後は投与前値に復した。

<結果の考察>

1. 骨髓異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者における血小板数増加作用

本報告の骨髓異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者の血小板数は、症例登録前の平均で $10,000 \sim 20,000/\text{mm}^3$ 程度で安定しており、PEG-rHuMGDF 投与開始後 2 週間は継続的な増加傾向は認められなかったが、その後 2 週間で継続的な増加が認められ最大値（プラトー）に到達した。血小板数の最大値はいずれの症例においても症例登録前の平均値の 1.9 倍であった。この血小板数増加は一過性のもので、4 週間程度維持された後 2~4 週後（PEG-rHuMGDF 投与開始後 10~12 週後）にはほぼ投与前に復した。

これまで実施された単回静脈内投与による第 I 相試験では、前述の通り投与 11 日後に最大値に到達し、癌患者を対象とした反復皮下投与による第 I 相試験では、10 日間の反復皮下投与の 6 日目で血小板数の増加が始まり、12~18 日目に最大値

に到達した (Basser RL et al., "Thrombopoietic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) in patients with advanced cancer," Lancet 1996; 348:1279)。上記の骨髄異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者における血小板数の増加はこれらの場合とは異なっており、PEG-rHuMGDF が作用してから血小板数が増加するまでに健常人あるいは正常な骨髄機能を有する癌患者と比べて時間がかかることが示唆された。

2. 骨髄異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者における貧血改善作用

投与開始日のヘモグロビン濃度及び網赤血球数は、骨髄異形成症候群患者の実施例 1 では 10.0g/dL 及び 59,400/mm³、実施例 2 では 6.8g/dL 及び 44,300/mm³、再生不良性貧血患者の実施例 3 では 5.6g/dL 及び 30,200/mm³と、貧血の重症度としてはそれぞれ grade 1、grade 3 ならびに grade 4 に分類され、ヘモグロビン濃度の低い症例では網赤血球数も低かった。

網赤血球数は血小板数と同様に、PEG-rHuMGDF 投与開始後 2 週間は継続的な増加傾向は認められなかったが、その後 2~5 週間で継続的な増加が認められ最大値に到達した。網赤血球数の最大値は投与開始日の 1.6~2.4 倍であった。この網赤血球数増加は一過性のもので、PEG-rHuMGDF 投与開始後 10~12 週後にほぼ投与前に復した。網赤血球数の増加開始時期は血小板数の増加開始時期と同様かやや早く、PEG-rHuMGDF の作用が巨核球系及び赤芽球系で似ていることが考えられた。

ヘモグロビン濃度は網赤血球数が増加を始めた 1~3 週間後に増加を始め、赤芽球系造血が PEG-rHuMGDF 投与により刺激されたことが示唆された。その後網赤血球数が減少中あるいはほぼ投与前値に復した PEG-rHuMGDF 投与開始後 8~12 週後に、ヘモグロビン濃度は最大値 (プラトー) に到達した。観察されたヘモグロビン濃度の最大値は投与開始日に比べて 2.1~3.4g/dL 増加していた。また、最も重症度の高かった再生不良性貧血の実施例において、最大のヘモグロビン濃度の増加が認められた。本実施例に記載した観察期間内はヘモグロビン濃度の増加は維持されており、血小板に比べ赤血球の寿命がはるかに長いことが、血小板数及びヘモグロビン濃度の増加の維持期間の差に現れたものと考えられた。

PEG-rHuMGDF の赤血球系に与える影響に関して、前臨床試験においては、正常

なマウス (Ulich TR et al., "Systemic hematologic effects of PEG-rHuMP Lligand-induced megakaryocyte hyperplasia in mice," Blood 1996; 87: 5006; Kabaya K et al., "In vivo effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on hematopoiesis in normal mice," Stem Cells 1996; 14:651) またはラット (Harada K et al., "A mild transient decrease of peripheral red blood cell counts induced by a suprapharmacological doses of pegylated human megakaryocyte growth and development factor in rats," J Pharm Pharmacol 1999; 51: 841) に PEG-rHu MGDF を投与した際に赤血球系パラメータの減少が認められた。また、単回静脈内投与による第 I 相試験では赤血球系パラメータに関して顕著な変動は認められなかった。

これらの知見に対し、grade 1~4 の貧血を呈している骨髓異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者においては、赤芽球系造血が刺激され、網赤血球数の増加及びヘモグロビン濃度等の赤血球系パラメータの増加が認められた。これまで骨髓異形成症候群患者由来の骨髓細胞を *in vitro* で IL-3、IL-6、エリスロポエチン (EPO)、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、幹細胞因子 (SCF) 及び PEG-rHu MGDF で培養することで、巨核球コロニーのみならず赤芽球コロニー及び顆粒球単球コロニーの増加が認められているが (Fontenay-Roupie M et al., "Analysis of megakaryocyte growth and development factor (thrombopoietin) effects on blast cell and megakaryocyte growth in myelodysplasia," Leuk Res 1998; 22: 527)、本発明者らは骨髓異形成症候群患者に PEG-rHuMGDF を単独投与することで、*in vivo* で血小板数のみならず赤血球系のパラメータも増加することを初めて見出した。

骨髓異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者における貧血改善効果に関しては、後述の比較例に記載のように、rHuEPO の第 II 相及び第 III 相試験の結果が示されている。ヘモグロビン濃度 10g/dL 未満の骨髓異形成症候群患者に対して rHuEPO を漸増法で計 8 週間 3000~24000 単位/日投与した場合 (浦部晶夫ほか、遺伝子組換えヒトエリトロポエチンの骨髓異形成症候群に伴う貧血に対する第 II 相臨床試験、臨床血液 1993; 34: 928)、貧血改善効果は投与前非輸血例では

5/9 例 (55.6%) で、輸血例では 2/25 例 (8.0%) で認められ、全体の有効率は 20.6% であった。また、同様に rHuEPO 24000 単位/日を 8 週間投与した場合 (浦部晶夫ほか、骨髓異形成症候群に伴う貧血に対する KRN5702 (遺伝子組換えヒトエリスロポエチン) の効果、診断と治療 1993; 81: 2025)、貧血改善効果は投与前非輸血例では 4/10 例 (40.0%) で、輸血例では 9/32 例 (28.1%) で認められ、全体の有効率は 31.0% であった。いずれの試験でも低リスク群の RA 及び環状鉄芽球増加に伴う RA (RARS) では有効率が高く、高リスク群の RAEB、RAEB-t 及び慢性骨髓単球性白血病 (CMML) では有効率は低くなる傾向が認められた。

一方、ヘモグロビン濃度 10g/dL 未満の再生不良性貧血患者に対して rHuEPO を漸増法で計 8 週間 3000~24000 単位/日投与した場合 (浦部晶夫ほか、遺伝子組換えヒトエリスロポエチンの再生不良性貧血に対する効果—第 II 相臨床試験—、臨床血液 1993; 34: 1002)、貧血改善効果は投与前非輸血例では 5/9 例 (55.6%) で、輸血例では 5/20 例 (25.0%) で認められ、全体の有効率は 34.5% であった。また、同様に rHuEPO 24000 単位/日を 8 週間投与した場合 (浦部晶夫ほか、再生不良性貧血に対する KRN5702 (遺伝子組換えヒトエリスロポエチン) の第 III 相臨床試験、診断と治療 1993; 81: 2397)、貧血改善効果は投与前非輸血例では 3/7 例 (42.9%) で、輸血例では 3/24 例 (12.5%) で認められ、全体の有効率は 19.4% であった。いずれの試験でも重症度が高くなると有効率は低くなる傾向が認められた。

これら骨髓異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者においては、ヘモグロビン濃度と内因性 EPO 濃度は負の相関関係を示し (浦部晶夫ほか、遺伝子組換えヒトエリスロポエチンの骨髓異形成症候群に伴う貧血に対する第 II 相臨床試験、臨床血液 1993; 34: 928; Urabe A et al., "Serum erythropoietin titers in hematological malignancies and related diseases," *Int J Cell Cloning* 1992; 10: 333)、輸血例のような重症度の高い患者では内因性 EPO 濃度がより高くなる傾向にある。また、重症度の高い患者ほど EPO 反応性を示す赤芽球系の造血前駆細胞が少ないと考えられる (Aoki I et al., "Responsiveness of bone marrow erythropoietic stem cells (CFU-E and BFU-E) to recombinant human erythropoietin (rh-Ep) in vitro in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome," *Am J Hematol* 1990; 35: 6)。EPO は赤芽球系に分化した前駆細胞に

作用し、赤血球の分化・成熟を促進する (Krantz SB. Erythropoietin. Blood 1991; 77: 419)。EPO あるいは EPO 受容体遺伝子をノックアウトしたマウスは、赤芽球系前駆細胞は存在するものの赤芽球及び赤血球の産生は抑制され、貧血により胎内で死亡する (Wu H et al., "Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor," Cell 1995; 83: 59)。EPO 受容体遺伝子をノックアウトしたマウスの胎児肝細胞を *in vitro* で TPO を含むサイトカインの組合せで培養した場合は赤芽球系前駆細胞コロニーが形成されたが、TPO を含まないサイトカインの組合せまたは TPO 単独で培養した場合は形成されなかった (Kieran MW et al., "Thrombopoietin rescues *in vitro* erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor" Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 9126)。

これらの結果を考え合わせると、TPO は骨髄異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者においては、造血前駆細胞に作用して巨核球系前駆細胞と同様に赤芽球系前駆細胞を増加させ、その結果濃度が上昇している内因性 EPO と協調して赤血球系の造血が亢進した可能性が考えられた。

3. 血中 TPO 濃度

血中 TPO 濃度は血小板数と負の相関関係にあることが既に知られている (Tahara T et al., "A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haemopoietic disorders," Br J Haematol 1996; 93: 783; Ichikawa N et al., "Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura," Thromb Haemost 1996; 76: 156; Tamura H et al., "Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes," Br J Haematol 1998; 103: 778; Schrezenmeier H et al., "Thrombopoietin serum levels in patients with aplastic anaemia: correlation with platelet count and persistent elevation in remission," Br J Haematol 1998; 100: 571; Zwierzina H et al.,

“Endogenous serum thrombopoietin concentrations in patients with myelodysplastic syndromes,” *Leukemia* 1998; 12: 59)。また、健常人を対象とした第 I 相試験では投与前 PEG-rHuMGDF 濃度は 50pg/mL 程度であった。本報告の症例は血小板数が約 13,000/mm³、21,000/mm³ 及び 19,000/mm³ と健常人のほぼ 20 分の 1 程度の極めて高度の血小板減少を呈しているのと同時に、投与前 PEG-rHuMGDF 濃度で表される内因性 TPO 濃度は 1595pg/mL、1653pg/mL 及び 1056pg/mL と健常人と比較して 20~30 倍の高値を示した。14 日間の PEG-rHuMGDF 投与中に血中 PEG-rHuMGDF 濃度は定常状態に達し、トラフレベルは約 10ng/mL であった。in vitro で PEG-rHuMGDF を健常人骨髄細胞に添加して培養した際の巨核球コロニー形成は 10ng/mL でプラトーに達したが、骨髄異形成症候群患者の骨髄細胞ではより高濃度の PEG-rHuMGDF で巨核球コロニー形成が刺激されたことから、2.5 μg/kg/日の PEG-rHuMGDF の投与により観察された血中 PEG-rHuMGDF 濃度は本症例血小板産生を刺激する濃度に達していると考えられた。

4. 総括

骨髄異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者に 2.5 μg/kg/日の PEG-rHuMGDF を 14 日間投与することで、血小板数が一過性に増加すると同時に、網赤血球数も一過性に増加し、さらにその後ヘモグロビン濃度等の赤血球系パラメータの増加が認められた。これまでの研究において、c-mpl リガンドタンパク質は in vitro で EPO 及びその他のサイトカインと相乗的に未分化の造血前駆細胞からの赤芽球系造血を刺激すること (Kobayashi M et al., “Recombinant human thrombopoietin (mpl ligand) enhances proliferation of erythroid progenitors,” *Blood* 1995; 86: 2494; Tanimukai S et al., “Recombinant human c-mpl ligand (thrombopoietin) not only acts on megakaryocyte progenitors, but also on erythroid and multipotential progenitors in vitro,” *Exp Hematol* 1997; 25: 1025; Yoshida M et al., “Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture,” *Br J Haematol* 1997; 98: 254; Birkmann J et al., “Effects of recombinant human thrombopoietin alone and in combination with erythropoietin and early-acting cytokines on human

mobilized purified CD34⁺ progenitor cells cultured in serum-depleted medium,” Stem Cells 1997; 15: 18)、X線等による骨髄抑制状態の動物において血小板数のみならず網赤血球数及び赤血球系パラメータの回復促進ならびに改善をすることが示されている (Kaushansky K et al., “Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy,” J Clin Invest 1995; 96: 1683; Neelis KJ et al., “Prevention of thrombocytopenia by thrombopoietin in myelosuppressed rhesus monkeys accompanied by prominent erythropoietic stimulation and iron depletion,” Blood 1997; 90: 58; Neelis KJ et al., “Simultaneous administration of TPO and G-CSF after cytoreductive treatment of rhesus monkeys prevents thrombocytopenia, accelerates platelet and red cell reconstitution, alleviates neutropenia, and promotes the recovery of immature bone marrow cells,” Exp Hematol 1997; 25: 1084; Shibuya K et al., “Multilineage hematopoietic recovery by a single injection of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in myelosuppressed mice,” Blood 1998; 91: 37)。本発明者らは今回、PEG-rHuMGDF が骨髄異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者において、血小板数のみならず網赤血球数及びヘモグロビン濃度等の赤血球系パラメータの改善に作用することを初めて見出した。本症例では安全性に問題は認められず、PEG-rHuMGDF の投与は骨髄異形成症候群患者及び再生不良性貧血患者の血小板減少症及び貧血の改善に有用であることが示された。

c-mpl リガンドに関して in vitro で EPO 及びその他のサイトカインと相乗的に未分化の造血前駆細胞からの赤芽球系造血を刺激することは示されていたが、in vitro での骨髄細胞の反応性と臨床試験成績との間に乖離があるため、c-mpl リガンドが骨髄異形成症候群及び再生不良性貧血患者で貧血改善効果をもたらすことは予期されなかった。また造血因子のうち、骨髄異形成症候群及び再生不良性貧血で実際に臨床適応となっているのは好中球減少に対する G-CSF のみであり、貧血改善効果に対して臨床適応となっている造血因子はない。骨髄異形成症候群及び再生不良性貧血患者の貧血を改善できる造血因子が事実上ないこ

とから、c-mplリガンドの貧血改善効果の意義は大きいと考えられる。

比較例

1. 骨髄異形成症候群に対する造血因子の臨床効果 (Geissler RG et al., "Clinical use of hematopoietic growth factors in patients with myelodysplastic syndromes," Int J Hematol 1997; 65: 339)

これまでに顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン (IL-) 3、IL-6、エритроポエチン (EPO) の臨床効果が検討されている。貧血改善効果に関しては、G-CSF に関しては殆ど認められず、GM-CSF に関しても殆ど認められなかった。IL-3 に関しては1つの試験を除いて貧血改善効果は殆ど認められず、全体の有効率は12% (10/85例) であった。IL-6 に関しては貧血改善効果は全く認められなかった (Gordon MS et al., "A phase I trial of recombinant human interleukin-6 in patients with myelodysplastic syndromes and thrombocytopenia," Blood 1995; 85: 3066)。赤芽球系特異的な造血因子である EPO の貧血改善効果に関しては様々な用法・用量で検討が加えられたが、全体の有効率は24.3% (125/515例) であった。但し有効性の判定基準は試験によって統一されていないため、これらのうち17試験について有効性の判定基準をヘモグロビン濃度1.5g/dL以上の増加に統一して再判定したところ、有効率は16% (33/205例) であった (Hellström-Lindberg E, "Efficacy of erythropoietin in the myelodysplastic syndromes: a meta-analysis of 205 patients from 17 studies," Br J Haematol 1995; 89: 67)。エритроポエチンアルファ (rHuEPO) の第II相 (浦部晶夫ほか、遺伝子組換えヒトエリトロポエチンの骨髄異形成症候群に伴う貧血に対する第II相臨床試験、臨床血液 1993; 34: 928) 及び第III相 (浦部晶夫ほか、骨髄異形成症候群に伴う貧血に対する KRN5702 (遺伝子組換えヒトエリトロポエチン) の効果、診断と治療 1993; 81: 2025) 試験の結果でも、第II相試験全体の有効率は20.6% (7/34例)、第III相試験全体の有効率は31.0% (13/42例) であった。但し rHuEPO 投与前非輸血例でヘモグロビン濃度2g/dL以上の増加が認められたか、投与前輸血例で輸血を必要としなくなった症例 (著明改善) は、第II相試験では4/34例 (11.8%)、第III相試

験でも 6/42 例 (14.3%) であった。表 1 に rHuEPO の第 II 相及び第 III 相試験の結果をまとめた。

表 1

骨髓異形成症候群における rHuEPO の貧血改善効果 (浦部ら、上掲、より引用)

rHuEPO 投与前		著明改善	改善	やや改善	無効	総数
非輸血 例	第 II 相	2 (22%)	3 (33%)	1 (11%)	3 (33%)	9
	第 III 相	3 (30%)	1 (10%)	1 (10%)	5 (50%)	10
	計	5 (26%)	4 (21%)	2 (11%)	8 (42%)	19
輸血例	第 II 相	2 (8%)	0 (0%)	5 (20%)	18 (72%)	25
	第 III 相	3 (9%)	6 (19%)	6 (19%)	17 (53%)	32
	計	5 (9%)	6 (11%)	11 (19%)	35 (61%)	57
計		10 (13%)	10 (13%)	13 (17%)	43 (57%)	76

著明改善：非輸血例でヘモグロビン濃度 2g/dL 以上の増加、輸血例で輸血を必要としなくなった

改善：非輸血例でヘモグロビン濃度 1g/dL 以上 2g/dL 未満の増加、輸血例で輸血量が 50% 以上減少

やや改善：非輸血例でヘモグロビン濃度 0.5g/dL 以上 1g/dL 未満の増加、輸血例で輸血量の減少が 50% 未満

無効：非輸血例でヘモグロビン濃度 0.5g/dL 未満の増加または輸血施行、輸血例で輸血量の減少を認めない

2. 再生不良性貧血に対する造血因子の臨床効果 (Kojima S, "Use of hematopoietic growth factors for treatment of aplastic anemia," Bone Marrow Transplant 1996; 18, Suppl 3: S36; Marsch JCW, "Hematopoietic growth factors in the pathogenesis and for the treatment of aplastic anemia," Semin Hematol 2000; 37: 81)

これまでに G-CSF、GM-CSF、IL-3、IL-1、IL-6、EPO の臨床効果が検討されている。貧血改善効果に関して G-CSF では殆ど認められなかった。GM-CSF に関しては 4.5% (3/66 例) で貧血改善効果が報告されている。IL-3、IL-1 及び IL-6 に関しては貧血改善効果は全く認められなかった。赤芽球系特異的な造血因子である EPO の貧血改善効果に関しては、rHuEPO の第 II 相 (浦部晶夫ほか、遺伝子組換えヒトエリトロポエチンの再生不良性貧血に対する効果—第 II 相臨床試験—、臨床血液 1993; 34: 1002) 及び第 III 相 (浦部晶夫ほか、再生不良性貧血に対する

KRN5702 (遺伝子組換えヒトエリスロポエチン) の第 III 相臨床試験、診断と治療 1993; 81: 2397) 試験の結果が示されている。第 II 相試験全体の有効率は 34. 5% (10/29 例)、第 III 相試験全体の有効率は 19. 4% (6/31 例) であった。但し rHuEPO 投与前非輸血例でヘモグロビン濃度 2g/dL 以上の増加が認められたか、投与前輸血例で輸血を必要としなくなった症例 (著明改善) は、第 II 相試験では 4/29 例 (13. 8%)、第 III 相試験でも 4/42 例 (12. 9%) であった。

表 2 に rHuEPO の第 II 相及び第 III 相試験の結果をまとめた。

表 2

再生不良性貧血における rHuEPO の貧血改善効果 (浦部ら、上掲、より引用)

rHuEPO 投与前		著明改善	改善	やや改善	無効	総数
非輸血例	第 II 相	1 (11%)	4 (44%)	0 (0%)	4 (44%)	9
	第 III 相	1 (14%)	2 (29%)	1 (14%)	3 (43%)	7
	計	2 (13%)	6 (38%)	1 (6%)	7 (44%)	16
輸血例	第 II 相	3 (15%)	2 (10%)	3 (15%)	12 (60%)	20
	第 III 相	3 (13%)	0 (0%)	6 (25%)	15 (63%)	24
	計	6 (14%)	2 (5%)	9 (20%)	27 (61%)	44
計		8 (13%)	8 (13%)	10 (17%)	34 (57%)	60

著明改善：非輸血例でヘモグロビン濃度 2g/dL 以上の増加、輸血例で輸血を必要としなくなった

改善：非輸血例でヘモグロビン濃度 1g/dL 以上 2g/dL 未満の増加、輸血例で輸血量が 50% 以上減少

やや改善：非輸血例でヘモグロビン濃度 0. 5g/dL 以上 1g/dL 未満の増加、輸血例で輸血量の減少が 50% 未満

無効：非輸血例でヘモグロビン濃度 0. 5g/dL 未満の増加または輸血施行、輸血例で輸血量の減少を認めない

上記造血因子のうち GM-CSF 及び IL-3 について in vitro では、単独あるいは EPO を共存させることで、健常人由来あるいは骨髓異形成症候群及び再生不良性貧血患者由来の骨髓細胞の赤血球系造血が誘導あるいは増幅されることが報告されている (Goodman JW et al., "Interleukin 3 promotes erythroid burst formation in "serum-free" cultures without detectable erythropoietin," Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 3291; Migliaccio AR et al., Bruno M, and Migliaccio G. Evidence for direct action of human biosynthetic (recombinant)

GM-CSF on erythroid progenitors in serum-free culture. *Blood* 1987; 70: 1867; Migliaccio G et al., "In vitro differentiation of human granulocyte/macrophage and erythroid progenitors: comparative analysis of the influence of recombinant human erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, and IL-3 in serum-supplemented and serum-deprived cultures," *Blood* 1988; 72: 248; Sonoda Y et al., "Erythroid burst-promoting activity of purified recombinant human GM-CSF and interleukin-3: studies with anti-GM-CSF and anti-IL-3 sera and studies in serum-free cultures," *Blood* 1988; 72: 1381; Ottmann OG et al., "Stimulation of human hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation by recombinant human interleukin 3. Comparison and interactions with recombinant human granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors," *Exp Hematol* 1989; 17: 191; Aoki A and Shibata A., "In vitro study of erythropoiesis in patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndromes: a possible tool for prospective determination of the clinical effectiveness of growth factors," *Hematol Pathol* 1992; 6: 143)。これら *in vitro* での骨髄細胞に対する作用から予想さ、臨床試験での GM-CSF 及び IL-3 の貧血改善効果は上記の通り非常に限られた有れる結果に反して効率でしかなかった。

参考例

<参考例 1> モノ PEG 化 c-mpl リガンド (PEG-rHuMGDF) の作製

下記のモノ PEG 化 c-mpl リガンド (PEG-rHuMGDF) の製法例は国際公開 W095/26746 に記載される方法に基づいている。

(1) 組換えヒトMGDF (r-HuMGDF) の大腸菌での発現

r-HuMGDF を *E. coli* で発現させるために、成熟タンパク質の初めの 163 アミノ酸をコードしている DNA 配列を、*E. coli* の最適コドンを使って、化学的に合成した。さらに、アミノ酸のメチオニンとリジンをコードしている DNA 配列を、遺伝子の 5' 末端に付加した。したがって、この DNA 配列がコードしている r-HuMGDF タンパク質は、Met-Lys で始まる全長 165 アミノ酸で構成されている (W095/26746

の図 25 参照)。

r-HuMGDF 遺伝子の合成は、数ステップで達成した。最初に、遺伝子の隣接フラグメントに相当する相補的オリゴヌクレオチド (長さ 60-70bp) を、*E. coli* の最適コドンを使って、化学的に合成した。この合成に際して、アミノ酸のメチオニンとリジンのコドンを、成熟遺伝子の 5' 末端に置き、ストップ・コドンを遺伝子の 3' 末端に置いた。さらに、制限酵素 XbaI と HindIII の切断サイトを、それぞれ、遺伝子の 5' と 3' 末端に置き、合成リボソームの結合部位を、初めのメチオニンの上流の適した場所に置いた。次に、各遺伝子フラグメントの相補的なオリゴヌクレオチドをアニールした。さらに、これら個々の合成遺伝子フラグメントを、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) を用いて増幅させた。増幅させたフラグメントを適当なベクターにサブクローニングし、配列を確認した。次に、完全長の r-HuMGDF 遺伝子を再構築できるように、個々のフラグメントを連結し、適当なベクターにサブクローニングした。最後に、再構築した遺伝子の配列を確認した。

5' と 3' 末端において、それぞれ、XbaI と HindIII の制限部位に隣接している、合成 r-HuC-MPL リガンド遺伝子フラグメントは、リボソーム結合部位、ATG 開始コドン、成熟した Met-Lys r-HuMGDF タンパク質をコードしている配列、そしてストップコドンを持っている。

上記のフラグメントを、ラクトース誘導性発現ベクターである pAMG11 の XbaI および HindIII の両部位にクローニングした。pAMG11 ベクターは、pR100-由来の複製起点を持つ、低コピー数のプラスミドである。発現プラスミド pAMG11 は、PCR 重複オリゴ・変位誘発による、一連の部位特異的な塩基変換をすることによって、プラスミド pCFM1656 (ATCC# 69576, 1994. 2. 24 寄託) から、誘導することができる。プラスミド複製プロモーター PcopB の 5' に近接した BglII 部位 (plasmid bp # 180) から始め、プラスミド複製遺伝子に向かうことにより、塩基対の変換は次のようになる:

pAMG11 bp #	pCFM1656 での bp	pAMG11 で置換された bp
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C

3 1

# 509	G/C	A/T
# 617	- -	2G/Cbp を挿入
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
#1004	A/T	C/G
#1007	C/G	T/A
#1028	A/T	T/A
#1047	C/G	T/A
#1178	G/C	T/A
#1466	G/C	T/A
#2028	G/C	bp を欠失
#2187	C/G	T/A
#2480	A/T	T/A
#2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT
#2642	TCCGAGC AGGCTCG	bp を欠失
#3435	G/C	A/T
#3446	G/C	A/T
#3643	A/T	T/A
#4489-4512	- -	以下の bp を挿入 GAGCTCACTAGTGTGACCTGCAG (配列番号 3) CTCGAGTGATCACAGCTGGACGTC (配列番号 4)

そして、各単一の AatII と ClaI の切断部位間の DNA 配列を、次のオリゴヌクレオチドで置換すると：

AatII (#4358)

5' CTCATAATTTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAAATTCTT-
3' TGCAGAGTATTAATAATTTTTTAAGTAAACTGTTTACGATTTTAAGAA-

-GATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTAT 3' (配列番号 5)

-CTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTTAAATAGC 5' (配列番号 6)

ClaI (#4438)

pAMG11 にクローニングされた r-HuMGDF の発現は、以下の配列をもつ Ps4 のような、合成ラクトース誘導性プロモーターによって、推進される：

5' GACGTCTCATAATTTTAAAAAATTCATTTGACAAAATGCTAAA-
-ATTCTTGATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAAATTTATCGAT 3' (配列番号 7)

この Ps4 プロモーターは、*E. coli* lacI 遺伝子の産物であるラクトース・リプレッサー (LacI) によって、抑制される。

pAMG11-r-HuMGDF プラスミドは、続いて lacI q アレルを含んでいる *E. coli* K-12 株に形質転換される。lacI q アレルは、LacI の発現を増大する lacI プロモーター内の変異であり、Ps4 プロモーターからタンパク質の発現のより厳密な制御をもたらす。したがって、この株では、ラクトースがなければ、r-HuMGDF の発現は LacI によって抑制される。ラクトースを加えると、Ps4 プロモーターのオペレーターサイトに結合している LacI タンパク質が減少し、Ps4 から r-HuMGDF の転写が始まる。この参考例で使用された *E. coli* 宿主細胞は、ATCC# 69717 として ATCC (米国) に寄託されている。

E. coli 宿主 ATCC# 69717 は、pAMG11-r-HuMGDF プラスミドで形質転換し、次のような発酵手法にしたがって、生育させた。Luria 肉汁に接種された *E. coli* 株は、およそ 12 時間、30℃でインキュベートされる。菌株はその後、無菌的にバッチ・培地 (20 g/L イースト・エキス; 3.4 g/L クエン酸; 15 g/L K₂HPO₄; 15 ml Dow P2000; 5 g/L グルコース; 1 g/L MgSO₄ · 7H₂O; 5.5 ml/L 微量金属類; 5.5 ml/L ビタミン類) の入った発酵槽に移される。バッチ・フェイズのプロセスは培養が、600nm で 5.0±1.0 の最適密度に達するまで続けられる。流加培養期は、第 1 の流動培地 (feed medium) (700 g/L グルコース; 6.75 g/L MgSO₄ · 7H₂O) の供給開始で、始められる。流量は確立されたスケジュールにあわせて 2 時間毎に調節する。培養が 600nm で 20~25 の最適密度に達すると、第 2 の流動培地 (129 g/L トリプチカーゼ・ペプトン; 258 g/L イースト・エキス) の供給開始が始まる。初めの流動培地が調節され続けたのに対し、第 2 の流動培地は、一定流量を維持

する。全発酵中を通じて、温度はおよそ 30℃を維持する。培養は、必要に応じて、酸や塩基を添加して pH を 7 に維持する。望ましい溶存酸素レベルを、発酵槽の攪拌、空気注入および酸素注入の各速度を調節して維持する。培養の最適密度が 600nm で 57~63 に達すると、第 3 の流動培地の供給が始まる。第 3 の流動培地 (300 g/L ラクトース) は一定流量で発酵槽に導入される; 第 1 の流動培地の供給は中止し、第 2 の流動培地の流量は新たな一定流量に変える。発酵は第 3 の流動培地の供給が始まってから、およそ 10 時間で終わる。発酵の終わりに、培養は 15+/-5℃に冷却する。菌株は遠心分離によって収集される。得られたペーストは、-60℃以下でパックしたまま保存する。

上記のように *E coli* で産生した rHuMGDF の精製は次のように行った。

1, 800g のセル・ペーストを約 18 リットルの 10mM EDTA に懸濁させ、15, 000psi で高圧ホモジナイザーに通した。破碎されたセル懸濁液を遠心分離し、得られたペレット 10 リットルの 10mM EDTA に再懸濁させた。懸濁液を遠心分離し、得られた 200g のペレットを 2 リットルの 10mM Tris、8M グアニジン塩酸塩、10mM DTT、5mM EDTA、pH8.7 に溶解させた。この溶液を、200 リットルの 10mM CAPS、3M 尿素、30% グリセロール、3mM シスタミン、1mM システイン、pH10.5 で穏やかに希釈した。

希釈した溶液を室温で 16 時間、穏やかに攪拌し、pH を 6.8 に調節した。pH を調節した溶液を清浄化して、10mM リン酸ナトリウム、1.5M 尿素、15% グリセロール、pH6.8 で平衡化した 2 リットルの CM Sepharose カラムに加えた。添加後、カラムは 10mM リン酸ナトリウム、15% グリセロール、pH7.2 で洗った。MGDF は 0 から 0.5M の NaCl の勾配、10mM リン酸ナトリウム、pH 7.2 で溶出させた。

CM 溶出液は、分子量 10, 000 カットオフメンブレンを用いて、濃縮し、10mM リン酸ナトリウム、pH6.5 にバッファー交換した。約 2mg/ml に濃縮した溶液をカテプシン C (500:1 のモル比) で室温、90 分間処理した。この溶液を、10mM リン酸ナトリウム、15% グリセロール、pH7.2 で平衡化した 1.2 リットルの SP High Performance Sepharose カラムに添加した。添加後、MGDF (1-163) は 0.1 から 0.25M の NaCl の勾配、10mM リン酸ナトリウム、pH7.2 で溶出させた。SP High Performance カラムからの溶出液に、0.6M になるように硫酸アンモニウムを加えた。この溶出

液を、10mM リン酸ナトリウム、0.6M 硫酸アンモニウム、pH7.2 で平衡化した 1.6 リットルの Phenyl Toyopearl カラム(東ソー製)に添加した。MGDF (1-163) ピークは 0.6 から 0M の硫酸アンモニウムの勾配、10mM リン酸ナトリウム、pH7.2 で溶出させた。Phenyl Toyopearl 溶出液は、分子量 10,000 カットオフメンブレンを用いて、濃縮し、10mM Tris、5%ソルビトール、pH7.5 にバッファー交換した。

(2) N-末端 α -アミノ基に付着部位を有する、モノメトキシポリエチレングリコール MGDF コンジュゲート (PEG-rHuMGDF) の調製

20mM NaCNBH_3 を含む 100mM リン酸ナトリウム (pH5) 中に上記 rHuMGDF (2 ml, 2.5 mg/ml) を溶解した冷却 (4°C) 攪拌溶液に、5 倍モル過剰のメトキシポリエチレングリコールアルデヒド (MePEG) (平均分子量 20kDa) を加えた。反応混合物の攪拌は、同じ温度で続けた。

反応中におけるタンパク質の修飾割合は、Superdex 200 HR 10/30 カラム (Pharmacia Biotech) を用いた、SEC HPLC によってモニターした。溶離は 0.1M リン酸ナトリウムバッファー、pH6.9 を用いて、流速 0.7ml/min で行った。

16 時間後、SEC HPLC 分析は、タンパク質の初めの量の約 90% が修飾されていることを示した。この時点で反応混合物のタンパク質濃度は、滅菌水で希釈することによって、1mg/ml に下げ、0.5M 酢酸で反応混合物の pH を 4 に調整した。

mono-MePEG (20kDa)-rHuMGDF コンジュゲートは、SP Sepharose HP (Pharmacia Biotech) イオン交換樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって、過剰の MePEG と他の反応副生物から分離した。

反応混合物をカラムに添加 (2.5 mg/ml (樹脂)) し、未反応の MePEG を 3 カラム容量の開始バッファー A (20mM リン酸ナトリウム、pH7.2、15% グリセロール) で溶出させた。その後、MePEG-MGDF コンジュゲートを、20 カラム容量で、終バッファー B (バッファー A 中、1M NaCl) の、0% から 25% の直線勾配を用いて溶出した。溶出液は 280nm でモニターした。poly-MePEG-rHuMGDF コンジュゲートを含んでいるフラクションをプールし、濃縮、滅菌濾過した。コンジュゲートの均一性は、4~20% のプレキャスト・勾配・ゲル (NOVEX) を用いた SDS-PAGE (ナトリウム・ドデシル・スルファート・ポリアクリルアミドゲル電気泳動) で判定し、1 本のメジャーバンドとして検出した。

<参考例 2> 全長ヒトTPOの発現

下記の全長ヒトTPOの発現例は国際公開 W095/21919 に記載される方法に基づいている。

(1) ヒトTPO完全長cDNAプラスミド (pHTP1) の作製

配列番号6のように予想されたヒトTPOcDNAのアミノ酸コーディング領域を全て持つ、動物細胞発現ベクターの構築を行なった。

PCRによりヒトTPOcDNAコーディング領域を全てカバーするDNA断片を以下の様に作製した。

用いたプライマーのヌクレオチド配列は次の通りである。

hTPO-I : 5'-TTGTGACCTCCGAGTCCTCAG-3' (配列番号8);

SA : 5'-CAGGTATCCGGGGATTTGGTC-3' (配列番号9)

hTPO-P : 5'-TGCGTTTCCTGATGCTTGTAG-3' (配列番号10);

hTPO-KO : 5'-GAGAGAGCGGCCGCTTACCCTTCCTGAGACAGATT-3' (配列番号11)。

クローンpEF18S-HL34 (W095/21919の実施例16) の300ngを鋳型として1回目のPCRを行なった。プライマーhTPO-I並びにSA各0.5 μ Mを用い、Vent RTM DNA polymerase (New England BioLabs社製) 1ユニットを使用して反応(96°C1分間、62°C1分間、72°C1分間という反応を30サイクル行なった後72°C7分間)を行なった。反応溶液の組成は以下の通り。最終濃度で10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、20mM Tris-HCl (pH8.8)、2mM MgSO₄、0.1% Triton X-100、200 μ M dNTP mix。

市販のヒト正常肝臓由来ポリ(A)+RNA (Clontech社製) 1 μ gを70°Cで10分間加熱後氷上で急冷し、10mM DTT、500 μ M dNTPmix、25ng random primer (宝酒造社製)、10ユニットRNase Inhibitor (ベーリンガーマンハイム社製)、200ユニットSuperScript^{T M} II RNaseH⁻ (LIFE TECHNOLOGIES社製)を加え、37°Cで1時間保温しcDNAを合成した。合成したcDNA反応液の20分の1量を鋳

型として使用して2回目のPCRを行なった。プライマーhTPO-P並びにhTPO-KO各2.5 μ M、2.5ユニットのAmpliTaqTM DNA polymerase（宝酒造社製）を用いて反応（95 $^{\circ}$ C1分間、58 $^{\circ}$ C1分間、72 $^{\circ}$ C1分間の反応を30サイクル）を行なった。

第1及び第2回のPCR溶液を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、それぞれ予想された大きさの主要なバンドをプレップ-A-ジーンDNA精製キット（バイオラッド社製）を用いて精製した。それぞれの精製量のうち各20分の1量を鋳型として3回目のPCRを実施した。Vent RTM DNA polymerase（New England BioLabs社製）1ユニットを使用して反応（96 $^{\circ}$ C2分間加熱後、96 $^{\circ}$ C2分間、72 $^{\circ}$ C2分間、という反応を3サイクル行なった後72 $^{\circ}$ C7分間）を行なった。この反応液にそれぞれ1 μ MとなるようにhTPO-I並びにhTPO-KOを加えた後、96 $^{\circ}$ C2分間の加熱を行ない、そののち96 $^{\circ}$ C1分間、62 $^{\circ}$ C1分間、72 $^{\circ}$ C1分間の反応を25サイクル行なったあと72 $^{\circ}$ Cでさらに7分間反応させた。反応液を等量の水飽和フェノール-クロロホルムで1回抽出後、さらに等量のクロロホルムで1回抽出したのち、エタノール沈殿（0.3M酢酸ナトリウム、0.5 μ l ベーリンガーマンハイム社製グリコーゲン、2.5倍量エタノール存在下）を行なってDNAを回収した。回収したDNAを制限酵素BamHI並びにNotIで消化後1%アガロースゲル電気泳動にかけ、予想された大きさの主要なバンドをプレップ-A-ジーンDNA精製キット（バイオラッド社製）を用いて精製したのち、予め同様に制限酵素BamHI並びにNotIで消化したpBluescriptII SK+ベクター（Stratagene社）に連結後、コンピテントハイE. coli DH5（東洋紡績社製）を形質転換した。得られたコロニーより4クローンを選びプラスミドDNAを調製した。精製したプラスミドDNAについてはTaq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、アプライドバイオシステムズ社製373ADNAシーケンサーによりシーケンスし、BamHIからNotIにかけての領域に塩基配列の置換がなく、予想通りのTPOcDNA配列を持つことが確認できたクローンpBLTPを得た。

pBLTPを制限酵素EcoRI並びにBamHIで消化後1%アガロースゲル電気泳動にかけ、高分子量のバンドをプレップ-A-ジーンDNA精製キット（バイオラッド社製）を用いて精製した。同様にpEF18S-HL34も制限酵素処理し45

0 bp のバンドを精製した。それぞれのDNAを連結しコンピテントハイ E. coli DH5 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られたコロニーよりプラスミドDNAを調製し、ヒトTPO cDNAのインサートを含むクローンpBLTENを得た。得られたpBLTENを制限酵素EcoRI並びにNotIで消化後、1%アガロースゲル電気泳動にかけ、約1200bpのバンドをプレップ-A-ジーンDNA精製キット(バイオラッド社製)を用いて精製した後、同様に制限酵素処理した発現ベクターpEF18Sに連結しコンピテントハイ E. coli DH5 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られたコロニーよりプラスミドDNAを調製し、ヒトTPO cDNAのコーディング領域を全て含むクローンpHTP1を得た。このクローンのプラスミドDNAを大量に調製し以下の実験に使用した。プラスミドDNAの調製は本質的にMolecular Cloning (Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)に記載されているようにして実施した。

(2) CHO細胞内でのヒトTPO発現用の哺乳動物発現プラスミド、pDEF202-hTPO-P1の構築

マウス DHFR ミニ遺伝子を含むプラスミド pMG1、1 μ g を制限酵素 EcoRI と BamHI で処理した後、アガロースゲル電気泳動しマウス DHFR ミニ遺伝子を含む断片 (約 2.5kbp) を回収した。

回収した断片を 50mM Tris-HCl (pH7.5)、7mM MgCl₂、1mM β -メルカプトエタノール、0.2mM dNTP からなる反応液 25 μ l 中に溶解し、Klenow フラグメント 2 単位を加え、室温で 30 分間反応させ、DNA の末端を平滑化した。次いで、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿後、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA からなる TE 溶液 10 μ l に溶解した。

次に、得られたマウス DHFR ミニ遺伝子を含む断片と動物細胞用発現ベクター pEF 18 S を制限酵素 SmaI で処理した後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造製) で脱リン酸化してえられたベクターDNAを T4 DNA リガーゼ (宝酒造製) で結合させ、発現ベクターpDEF202を得た。

次に、このベクターpDEF202を制限酵素EcoRIとSpeIで処理し、アガロースゲル電気泳動で大きい方のベクターフラグメントを回収したのち、このフラグメントとヒトTPO cDNA(P1クローン)を含むプラスミドpHTP1を制限酵素EcoRI

と SpeI で処理して得られたヒト TPO cDNA (P1 クローン) とを T4 DNA リガーゼ (宝酒造製) で結合させ、発現ベクター pDEF 2 0 2-hTPO-P1 得た。このプラスミドは SV40 の複製開始領域、ヒトエロンゲーションファクター 1-アルファプロモーター、SV40 初期ポリアデニル部位、マウス DHFR ミニ遺伝子、pUC 1 8 の複製開始領域、 β -ラクタマーゼ遺伝子 (Amp^r) を含み、ヒトエロンゲーションファクター 1-アルファプロモーター下流にヒト TPO cDNA が接続されている。

(3) CHO細胞でのヒトTPOの発現

CHO細胞 (dhfr-株、Urlaub と Chasin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 77 巻 4 2 1 6 頁、1980) を 6 cm 径のプレート (Falcon 社製) 中 10% 牛胎児血清を含む α 最小必須培地 (α -MEM (-)、チミジン、ヒポキサンチン添加) で培養増殖させ、これをリン酸カルシウム法 (CellPect、ファルマシア社製) によって形質転換した。すなわち、上記 (1) で調製した pDEF 2 0 2-hTPO-P1 プラスミド 10 μ g にバッファー A: 120 μ l および H_2O : 120 μ l を加え混合したのち、室温で 10 分間放置した。つぎに、この溶液にバッファー B: 120 μ l を加え、再度混合したのち、室温で 30 分間放置した。この DNA 溶液をプレートに滴下したのち、 CO_2 インキュベーター中で 6 時間培養した。プレートから培地を除去し、 α -MEM (-) にて 2 回洗浄後、10% ジメチルスルフォオキシド含有 α -MEM (-) を添加し、室温で 2 分間処理した。次いで、10% 透析牛胎児血清含有非選択培地 (前出 α -MEM (-)、ヒポキサンチン、チミジン添加) を添加して 2 日間培養したのち、10% 透析牛胎児血清含有選択培地 (α -MEM (-)、ヒポキサンチン、チミジン無添加) での選択をおこなった。選択は細胞をトリプシン処理した後、6 cm 径プレート 1 枚あたりを、10 cm 径プレート 5 枚あるいは 24 ウエルプレート 20 枚に分割したのち、2 日ごとに選択培地にて培地交換を行いながら培養を続行する事により実施した。細胞が増殖してきたプレートあるいはウエルについてはその培養上清中のヒト TPO 活性を M-07e アッセイ及び Ba/F3 アッセイ (W095/21919) を用いて測定したところ、いずれのアッセイ系においても活性が認められた。培養培地中にヒト TPO を分泌する細胞を、25 nM のメソトレキセートを含む選択培地でさらに選択し、高レベルのヒト TPO を産生する細胞クローンを単離した。

プラスミド pDEF202-hTPO-P1 によって形質転換された CHO 細胞株 (CHO-DUKXB11) は 1995 年 1 月 31 日付で独立行政法人産業技術総合研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に受託番号 FERM B P-4988 として寄託されている。またこの細胞株は中華人民共和国及び中華民国の寄託機関にそれぞれ受託番号 CCTCC-C95004、FIRDI 960023 として寄託されている。

配列表フリーテキスト

配列番号 2-人工配列の説明：配列番号 1 のアミノ酸配列 1~163

配列番号 3-人工配列の説明：インサート (センス鎖)

配列番号 4-人工配列の説明：インサート (アンチセンス鎖)

配列番号 5-人工配列の説明：インサート (センス鎖)

配列番号 6-人工配列の説明：インサート (アンチセンス鎖)

配列番号 7-人工配列の説明：プロモーター

配列番号 8-人工配列の説明：プライマー

配列番号 9-人工配列の説明：プライマー

配列番号 10-人工配列の説明：プライマー

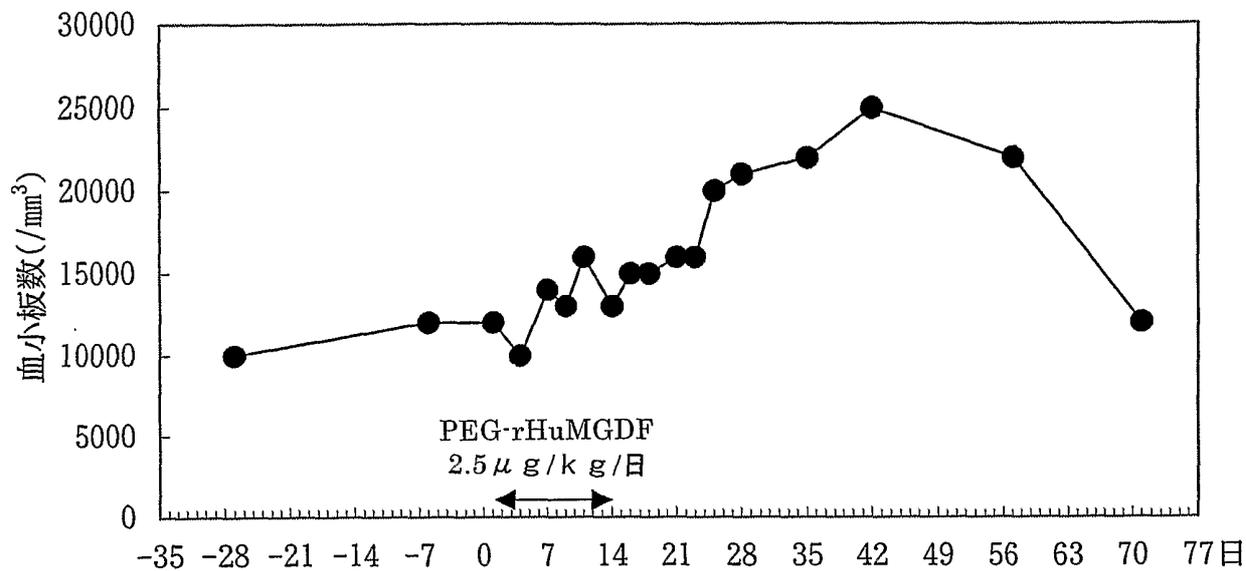
配列番号 11-人工配列の説明：プライマー

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願の全体を参考として本明細書に取り入れるものとする。また、本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願第 2000-254473 号の明細書および図面に記載される内容を包含するものとする。

請求の範囲

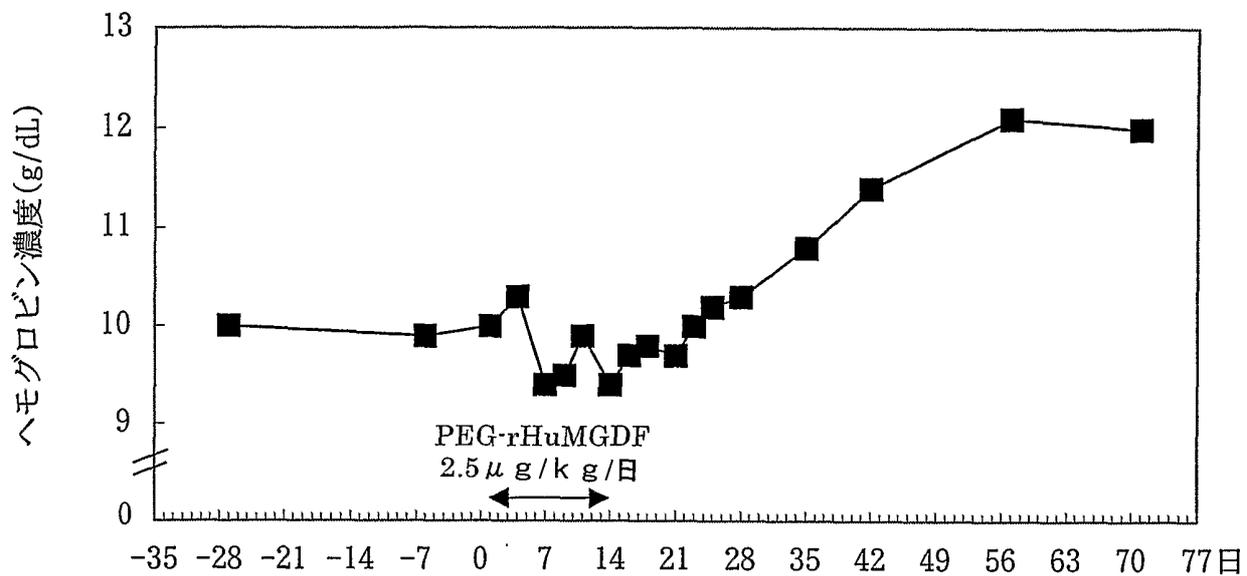
1. 配列番号1のアミノ酸配列のうち少なくとも7位～151位のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変異体、またはそれらの誘導体からなり、かつトロノポポエチン活性を有する治療上有効量のc-mplリガンドを含む、骨髄異形成症候群または再生不良性貧血患者において血小板及び赤血球を増加させるための医薬組成物。
2. 前記c-mplリガンドが、配列番号1のアミノ酸配列1～332からなるポリペプチド、その変異体またはそれらの誘導体であって、かつトロノポポエチン活性を有するものである、請求項1に記載の医薬組成物。
3. 前記c-mplリガンドが、配列番号1のアミノ酸配列1～163からなるポリペプチド、その変異体またはそれらの誘導体であって、かつトロノポポエチン活性を有するものである、請求項1に記載の医薬組成物。
4. 前記変異体が、配列番号1のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、付加および/または挿入を含み、かつトロノポポエチン活性を有するポリペプチドである、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。
5. 前記誘導体が、水溶性ポリマーで修飾されたポリペプチドまたはその変異体である、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。
6. 前記水溶性ポリマーがポリエチレングリコールである、請求項5に記載の医薬組成物。
7. 前記水溶性ポリマーが、少なくとも前記ポリペプチドまたはその変異体のN末端に結合されている、請求項5または6に記載の医薬組成物。
8. 前記c-mplリガンドが、配列番号2のアミノ酸配列からなる組換えポリペプチドのN末端に1分子のポリエチレングリコールが結合されたPEG-rHuMGDFである、請求項1に記載の医薬組成物。

図 1



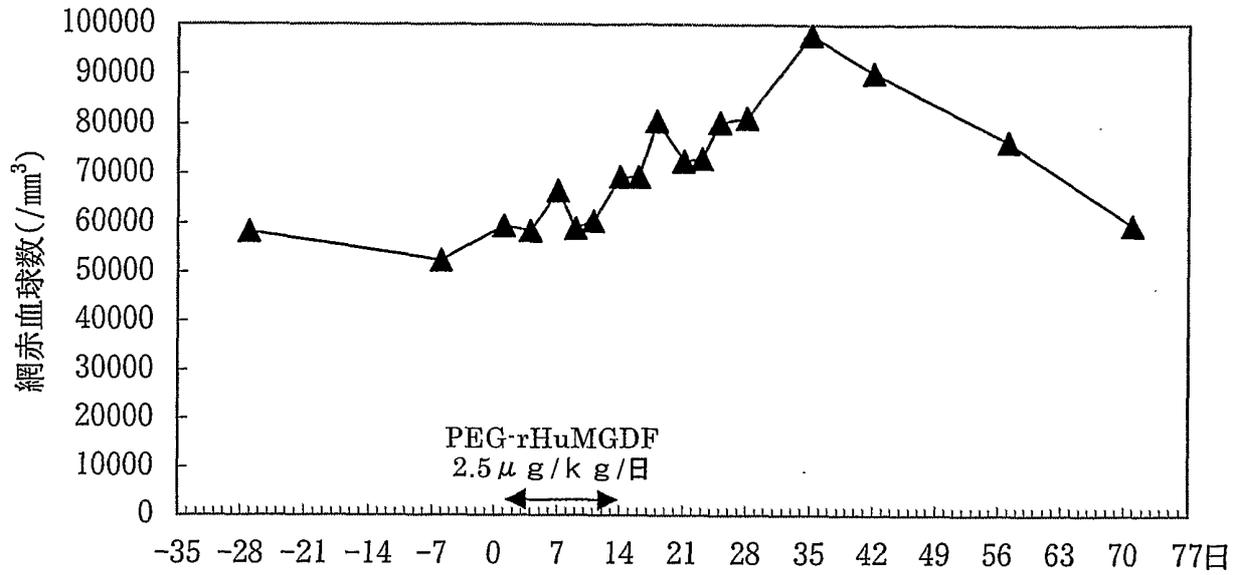
骨髓異形成症候群患者（実施例 1）における血小板数の推移

図 2



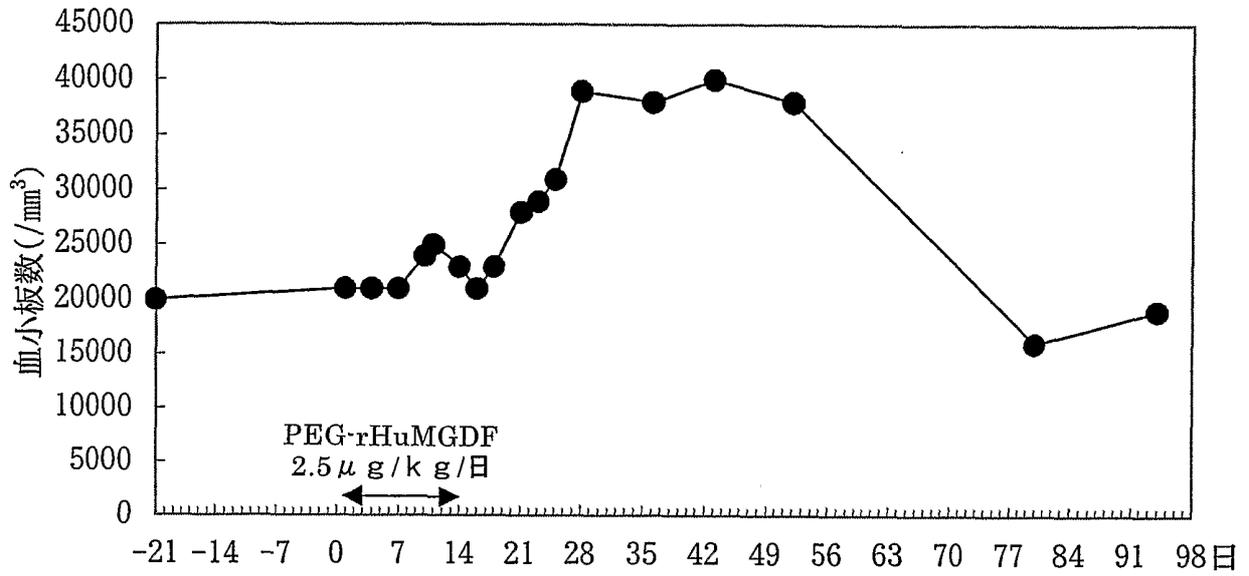
骨髓異形成症候群患者（実施例1）におけるヘモグロビン濃度の推移

図 3



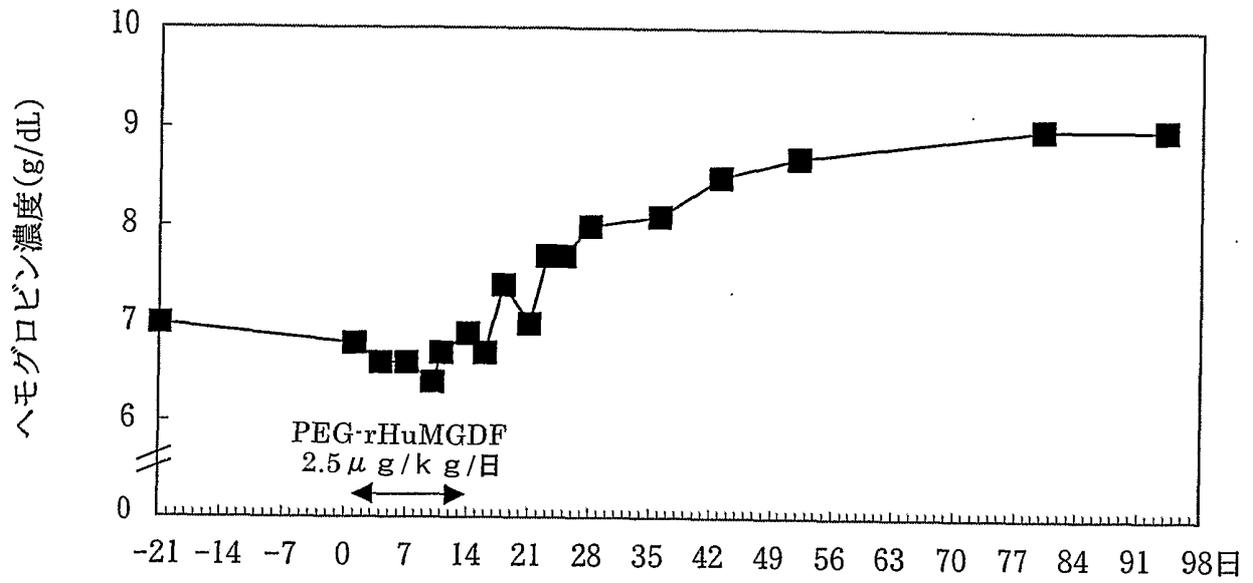
骨髄異形成症候群患者（実施例1）における網赤血球数の推移

図 4



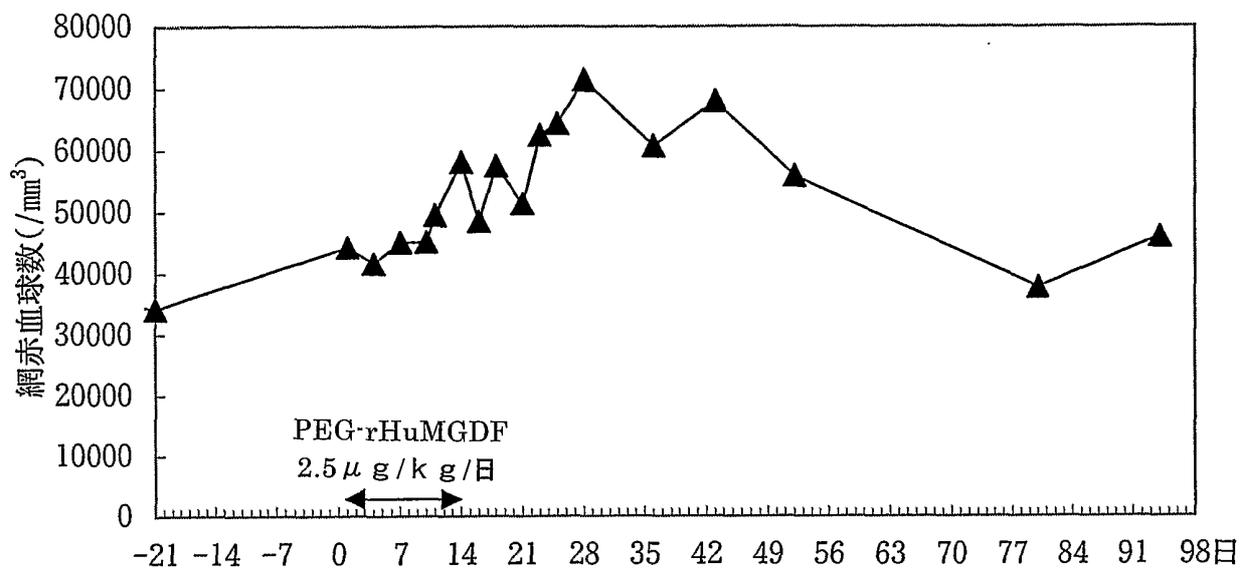
骨髓異形成症候群患者（実施例 2）における血小板数の推移

図 5



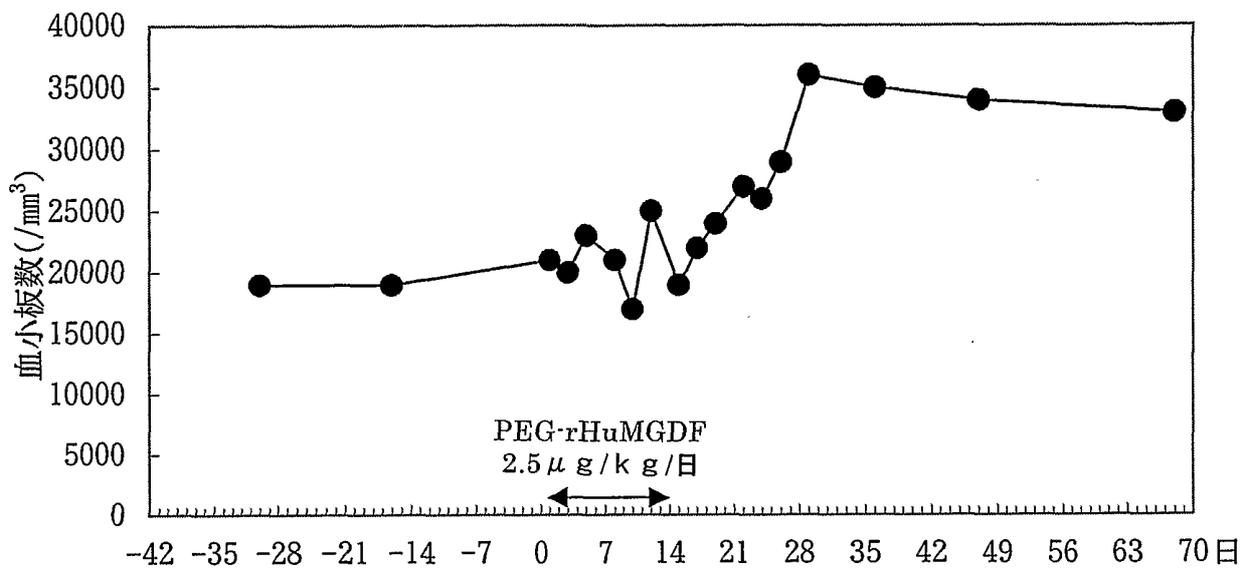
骨髓異形成症候群患者（実施例2）におけるヘモグロビン濃度の推移

図 6



骨髓異形成症候群患者 (実施例 2) における網赤血球数の推移

図 7



再生不良性貧血患者における血小板数の推移

図 8

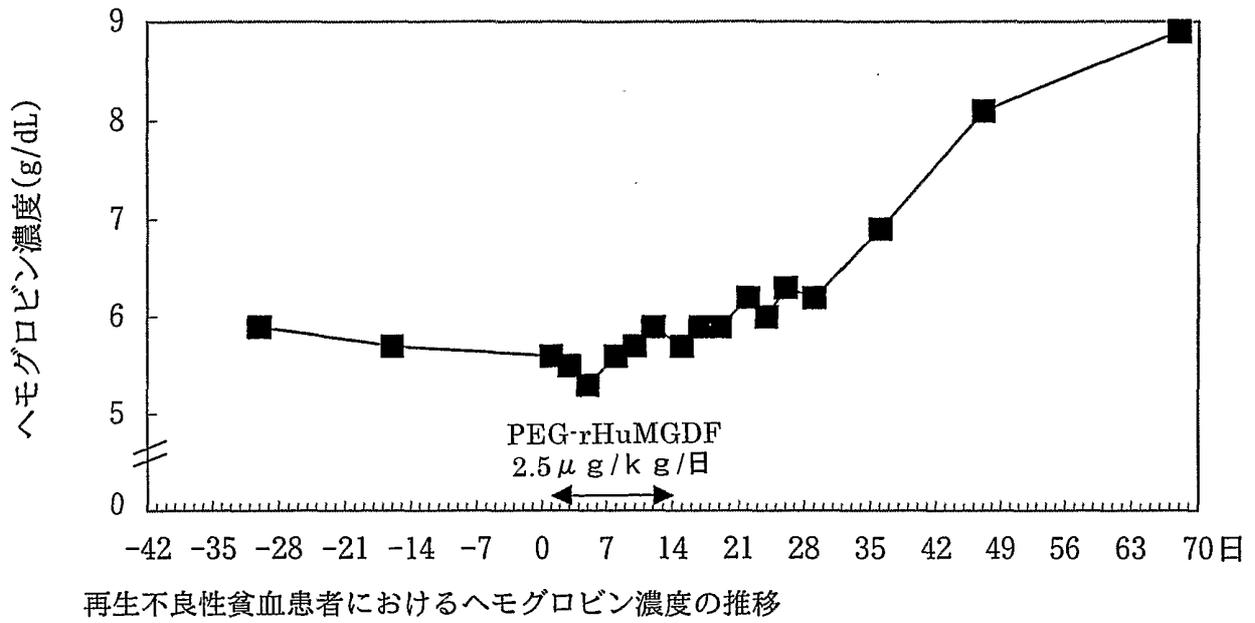
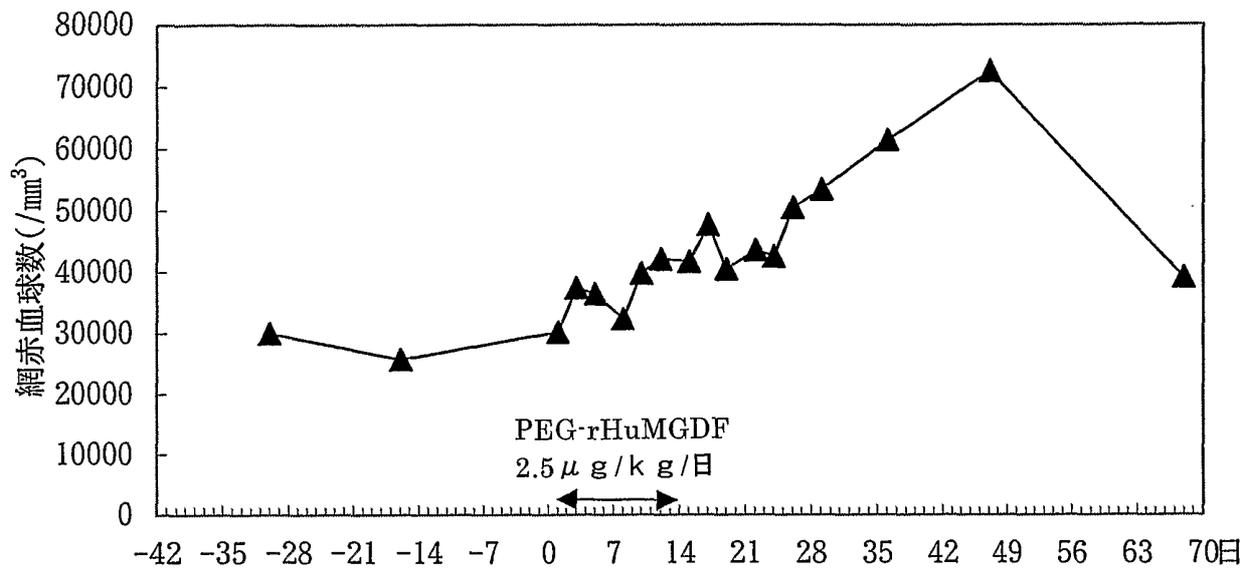


図 9



再生不良性貧血患者における網赤血球数の推移

SEQUENCE LISTING

<110> Kirin Beer Kabushiki Kaisha

<120> Pharmaceutical compositions with platelet- and erythrocyte-increasing effect, comprising c-mpl ligand

<130> PH-1286-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000/254473

<151> 2000-08-24

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 354

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (-21)...(-1)

<400> 1

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
 -21 -20 -15 -10

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
 -5 1 5 10

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
 15 20 25

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
 30 35 40

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys
 45 50 55

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
 60 65 70 75

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
 80 85 90

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
 95 100 105

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
 110 115 120

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
 125 130 135

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
 140 145 150 155

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
 160 165 170

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr
 175 180 185

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly
 190 195 200

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu
 205 210 215

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly
 220 225 230 235

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro
 240 245 250

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu
 255 260 265

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr
 270 275 280

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu

285

290

295

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser

300

305

310

315

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu

320

325

330

Gly

<210> 2

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino acid sequence 1-163 of SEQ

ID NO:1

<400> 2

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu

1

5

10

15

Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val

20

25

30

His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu

35

40

45

Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu

50

55

60

Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln

65

70

75

80

Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln

85

90

95

Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu

100

105

110

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe

115

120

125

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu

130

135

140

Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala

145

150

155

160

Val Pro Ser

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: insert (sense strand)

<400> 3

gagctcacta gtgtcgacct gcag 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: insert (antisense strand)

<400> 4

ctgcaggtcg aactagtaga gctc 24

<210> 5

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: insert (sense strand)

<400> 5

ctcataattt ttaaaaaatt catttgacaa atgctaaaat tcttgattaa tattctcaat 60
tgtgagcgct caccaatttat 80

<210> 6

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: insert (antisense strand)

<400> 6

cgataaattg tgagcgtca caattgagaa tattaatcaa gaatttttagc attigtcaaa 60
tgaatttttt aaaaattatg agacgt 86

<210> 7

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: promoter

<400> 7

gacgtctcat aatttttaaa aaattcattt gacaaatgct aaaattccttg attaatatc 60
tcaattgtga gcgctcaciaa tttatcgat 89

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

ttgtgacctc cgagtcctca g

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9

caggtatccg gggatttggt c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10

tgcgtttcct gatgcttgta g

21

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

gagagagcgg cgccttacc ttcctgagac agatt

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07283

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K38/32, 47/48, A61P7/06, 43/00		
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) Int.Cl ⁷ A61K38/32, 47/48		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1940-1992 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1996 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1992 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARK H. et al., ed., "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 17 th edition, (1997), pages 862 to 865, Aplastic Anemia, Myelodysplasia, Myelodysplastic Syndrome, pages 953 to 954, especially, page 954, right column, Prognosis and Treatment	1-8
X	WO 99/57147 A1 (Kirin Brewery Company, Limited), 11 November, 1999 (11.11.99), (Family: none) the whole document; especially page 5	1-8
X Y	WO 98/14476 A1 (Amgen Inc.), 09 April, 1998 (09.04.98), the whole document; especially, Claims & JP 2001-501619 A	1, 2, 4-8 3
Y	WO 95/26746 A1 (Amgen Inc.), 12 October, 1995 (12.10.95), the whole document; especially, Claims & US 5795569 A & EP 675201 A1 & JP 10-510980 A	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* "A" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date 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) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 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 19 October, 2001 (19.10.01)		Date of mailing of the international search report 06 November, 2001 (06.11.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07283

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/13076 A1 (Amgen Inc.),	1,2,4
Y	18 March, 1999 (18.03.99), the whole document; especially, Claims and page 10 & US 5989538 A & EP 1012284 A1 & JP 2001-515719 A	3,5-8
X	WO 98/6849 A1 (Zymogenetics, Inc.),	1,2
Y	19 February, 1998 (19.02.98), the whole document & EP 920511 A1 & JP 2000-516465 A	3-8
Y	WO 96/23888 A1 (G. D. Searle & Co.), 08 August, 1996 (08.08.96), the whole document; especially, Claims & US 6254870 A	1-8
Y	WO 96/15758 A2 (University of Washington), 30 May, 1996 (30.05.96), the whole document & JP 10-508756 A	1-8
Y	WO 95/21626 A1 (University of Washington), 17 August, 1995 (17.08.95), the whole document; especially pages 4, 5 & EP 723456 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/32, 47/48, A61P7/06, 43/00

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. Cl⁷ A61K38/32, 47/48

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 1940-1992年
 日本国公開実用新案公報 1971-1992年
 日本国登録実用新案公報 1994-1996年
 日本国実用新案登録公報 1996-2001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)

CAPLUS (STN)、BIOSIS (STN)、MEDLINE (STN)、EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MARK H. et. al. 編, THE MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY, 第17版, 1997年, P.862-865のAplastic Anemiaの項, Myelodysplasiaの項, MYELODYSPLASTIC SYNDROMEの項, 953-954, 特にP.954 右欄Prognosis and Treatmentの項	1-8
X	WO 99/57147 A1 (Kirin Brewery Company, Limited) 11. Nov. 1999 (1. 11. 99) (No Family) whole document, especially P. 5	1-8
X Y	WO 98/14476 A1 (Amgen Inc.) 9. Apr. 1998 (09. 04. 98) whole document, especially claims & JP 2001-501619 A	1, 2, 4-8 3

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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

19. 10. 01

国際調査報告の発送日

06.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 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)

田村 聖子

4C 9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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	WO 95/26746 A1 (Amgen Inc.) 12. Oct. 1995 (12. 10. 95) whole document, especially claims & US 5795569 A & EP 675201 A1 & JP 10-510980 A	1-8
X Y	WO 99/13076 A1 (Amgen Inc.) 18. Mar. 1999 (18. 03. 99) whole document, especially claims and P. 10 & US 5989538 A & EP 1012284 A1 & JP 2001-515719 A	1, 2, 4 3, 5-8
X Y	WO 98/6849 A1 (Zymogenetics, Inc.) 19. Feb. 1998 (19. 02. 98) whole document & EP 920511 A1 & JP 2000-516465 A	1, 2 3-8
Y	WO 96/23888 A1 (G. D. Searle & Co.) 8. Aug. 1996 (08. 08. 96) whole document, especially claims & US 6254870 A	1-8
Y	WO 96/15758 A2 (University of Washington) 30. May. 1996 (30. 05. 96) whole document & JP 10-508756 A	1-8
Y	WO 95/21626 A1 (University of Washington) 17. Aug. 1995 (17. 08. 95) whole document, especially P. 4 and p. 5 & EP 723456 A1	1-8