

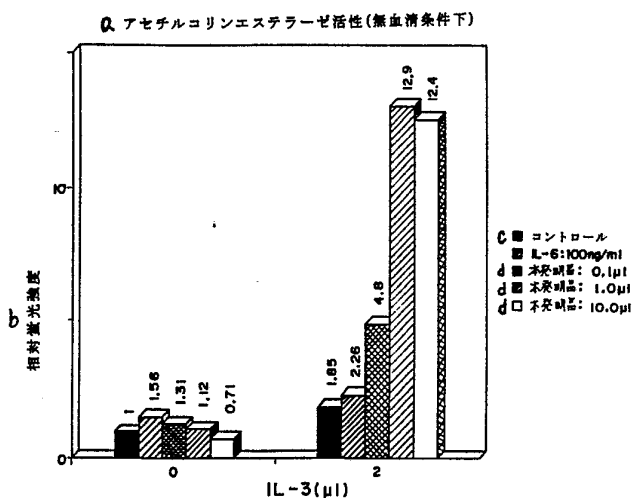


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07K 15/04, C12P 21/00 A61K 37/02 // C12N 15/19 (C12P 21/00, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/12177 (43) 国際公開日 1992年7月23日 (23. 07. 1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP91/01803 (22) 国際出願日 1991年12月27日 (27. 12. 91) (30) 優先権データ 特願平2/415440 1990年12月28日 (28. 12. 90) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 近藤修平 (KONDO, Shuhei) [JP/JP] 〒410-03 静岡県沼津市西椎路139-1-607 Shizuoka, (JP) 小川行平 (OGAWA, Kohei) [JP/JP] 〒417 静岡県富士市青島町68 遠藤アパートB23 Shizuoka, (JP) (74) 代表者 旭化成工業株式会社 特許部 〒100 東京都千代田区有楽町1丁目1番2号 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), KR, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US		

(54) Title : NOVEL MEGAKARYOCYTE AMPLIFIER AND PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称 新規な巨核球増幅因子およびその製造方法



a ... acetylcholine esterase activity (under serum-free condition)
 b ... relative fluorescence intensity
 c ... control
 d ... invention sample

(57) Abstract

A substantially pure, novel megakaryocyte amplifier protein which has a molecular weight of $25,000 \pm 8,000$ as determined by gel filtration and an isoelectric point of 8 ± 1 as determined by isoelectric electrophoresis, can be discriminated from human erythropoietin, interleukin 1α , interleukin 1β , interleukin 6 and interleukin 7, does not have any megakaryocyte colony stimulating factor activity, and can activate megakaryocyte amplification. This protein can be produced by the cell culture or genetic engineering technologies. Since it has activities of promoting megakaryocyte amplification and increasing platelets in the peripheral blood, it is effective in preventing and treating thrombocytopenia.

(57) 要約

ゲル濾過で測定した分子量が $25,000 \pm 8,000$ であり、等電点電気泳動で測定した等電点が 8 ± 1 であって、ヒトのエリトロポエチン、インターロイキン 1α 、インターロイキン 1β 、インターロイキン6及びインターロイキン7とは免疫学的に区別され、且つ巨核球コロニー刺激因子活性を有さない、巨核球増幅を活性化する活性を有する実質的に純粋な新規な巨核球増幅因子蛋白質が開示される。本発明の巨核球増幅因子蛋白質は、細胞培養技術または遺伝子工学的技術によって製造することができる。本発明の巨核球増幅因子蛋白質は、巨核球の増幅を促進し且つ末梢血中の血小板を増加させる活性を有しているので、血小板減少症等の予防及び治療に有効に用いることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナファソ	GN	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SD	スーダン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CH	スイス	KR	大韓民国	SN	セネガル
CI	コート・ジボワール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルク	TG	トーゴ
DE	ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

明細書

新規な巨核球増幅因子およびその製造方法

技術分野

本発明は新規な巨核球増幅因子およびその製造方法に関する。更に詳しくは、本発明は、血小板の前駆細胞である巨核球の増幅を促進する活性を有し血小板産生を促進する作用を有する新規な巨核球増幅因子蛋白質、および細胞培養または遺伝子工学的技術によるその製造方法に関する。本発明はまた、血小板減少症等の疾患の予防及び治療に有用な巨核球増幅因子としての上記の新規な蛋白質を含む医薬組成物に関する。

背景技術

血小板は、血管の破れによって起こる出血を生体が自然に止める血栓形成および血液凝固の過程において、その促進に重要な働きを担っている。血小板の産生を特異的に促進する因子とされるトロンボポエチン（TPO）は、過去20年以上もの間数多くの研究者がその取得に情熱を燃やして当たってきているが、いまだに成功にはいたっていない。

血小板減少動物の血しょうを健常動物に投与すると、血小板産生がこう進し、逆に血小板を輸注すると血小板産生が低下することから、血小板の増減に応じてその産生を調節する作用を有するTPOの存在が古くから提唱されてきた。その後の研究結果から、血小板は骨髓幹細胞から巨核球前駆細胞

より骨髓中で分化・成熟して生じた巨核球より血液中に放出されることが明かにされ、また *in vitro* の成績から巨核球の分化・増幅過程の早期には巨核球コロニー刺激因子 (Megakaryocyte Colony Stimulating Factor; Meg-CSF) が作用し、後期には巨核球の成熟を促進させる活性を有する TPO が作用することも明かにされた。即ち、まず Meg-CSF の作用で、前駆細胞が細胞分裂を繰返し巨核球コンパートメントが増大し、次に TPO の作用によってそれぞれの巨核球前駆細胞は *endomitosis* を行ない、その染色体倍数を増大させていく ($\rightarrow 32N$) と共に細胞質が成熟・増大して、血小板産生がなされるようになる。TPO はまた巨核球増幅因子 (Megakaryocyte Potentiator; Meg-POT) と呼ばれることもある。

Meg-CSF の活性は、*in vitro* のヒトまたはマウスの骨髓細胞の軟寒天培養において巨核球コロニーを形成させる活性を測定することにより *determine* される。現在 Meg-CSF の活性は、再生不良性貧血患者及び突発性血小板減少性紫斑病患者の尿中、骨髓巨核球無形成性血小板減少症患者の血しょう中、インゲンマメレクチン刺激ヒト白血球培養上清、マウス白血病細胞株 WEHI-3 培養上清等に見いだされている。

種々のサイトカインのうち、インターロイキン 3 (IL-3) (以下インターロイキンは IL と略す) が巨核球を含む多くの系統に非特異的に作用する Multi-CSF であることが明らかとなってきた。また WEHI-3 培養上清中の Meg-CSF が IL-3 と完

全に一致するなど、従来の細胞培養上清中のMeg-CSF活性の多くがIL-3によるとされている。しかしながら、血小板系に特異的に作用することが明らかにされたMeg-CSFは未だに知られていない。

一方TPOの活性は、Meg-CSFのコロニー形成活性の増強作用及び／または巨核球の成熟促進作用を測定することによりdetermineされる。これまでにいくつかのTPO様活性を有する因子の提供が試みられてきた。ヒト胎児腎細胞株の培養上清中より調製される、SDS-PAGEでの分子量が15000、等電点が5.1の巨核球系の細胞中の蛋白質合成を促進する作用を有する巨核球促進因子 (Megakaryocyte Stimulatory Factor; MSF) 及びその製造方法が報告されている (米国特許第4, 894, 440参照)。また最近、B細胞の抗体産生を誘導する糖蛋白質として見いだされ、免疫系、急性期反応系及び悪性腫瘍にも関与することが明らかにされている多機能サイトカインであるIL-6が、造血系にも関与しており、in vitroにおいてMeg-POT活性及び巨核球成熟促進活性を示し (Ishibashi, T. et al. 「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」 86, 5953 (1989))、in vivoにおいて血小板産生促進作用を示すことが確認されている (Asano, S. et al. 「Blood」 75, 1602 (1990))。更に、IL-7やIL-11等も巨核球増幅活性を有することが報告されている。しかしながら、これらの因子の巨核球増幅活性は微弱なものであり、またこれらが生体に本来備わった構成的 (constitutiv

e)な造血因子であるかどうかは不明である。

本発明者等は、上述の技術的背景にあつて、特異的に且つ強力に巨核球の増幅を促進する作用及び血小板産生を促進する作用を有する新規な巨核球増幅因子を見いだすべく鋭意研究を重ねた結果、意外にも動物細胞の培養上清中に全く新規な巨核球増幅因子を発見すると共に、適当な産生促進剤を培地に添加することにより、大量の該因子が生産されることを見いだした。更に回収した培養上清より、該因子を単離・精製し、その諸性質を明らかにすると共に、その薬剤としての有用性を示した。また遺伝子工学的技術を応用し、該巨核球増幅因子を発現させることもできる。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

発明の開示

したがって、本発明の1つの目的は、強力な作用を有する実質的に純粋な新規な巨核球増幅因子を提供することにある。

また、本発明の他の目的は、動物細胞を培地中にて培養し、その培養液中に巨核球増幅因子を産生させ、培養液から培養上清を回収し、回収した培養上清から巨核球増幅因子を精製することを含む巨核球増幅因子の製造方法を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、上記の細胞培養において培地中に巨核球増幅因子産生促進剤を添加して細胞培養を行うことにより、産生される該巨核球増幅因子の量を増大させる、巨

核球増幅因子の製造方法を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、巨核球増幅因子を遺伝子工学的技術により製造する方法を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、治療的に有効な量の巨核球増幅因子を活性成分として含有する医薬組成物及びそれを用いた治療方法を提供することにある。

本発明の上記及びその他の諸目的、該特徴ならびに諸利益は、添付の図面を参照しながら述べる次の詳細な説明及び請求の範囲の記載から明かになる。

本発明によれば、巨核球増幅を活性化する活性を有し且つ末梢血中の血小板を増加させる活性を有する巨核球増幅因子が提供される。更に詳しくは、巨核球増幅を活性化する活性を有し且つ下記の諸性質を有する実質的に純粋な巨核球増幅因子蛋白質が提供される。

(a) 分子量： $25,000 \pm 8,000$ (ゲル濾過で測定)

(b) 等電点： 8 ± 1 (等電点電気泳動で測定)

(c) ヒトのエリトロポエチン、インターロイキン 1α 、インターロイキン 1β 、インターロイキン 6 及びインターロイキン 7 に対する各抗体を用いた巨核球増幅活性中和試験において活性が実質的に低下しない。

(d) 巨核球コロニー刺激因子活性を有さない。

上記のヒトのエリトロポエチン、インターロイキン 1α 、インターロイキン 1β 、インターロイキン 6 及びインターロ

イキン 7 に対する各抗体としては、米国ジェンザイム社の抗体を用いることができる (the 1991 Genzyme Catalog; Cytokine Research Products)。

また本発明の他の態様によれば、動物細胞を培地中にて培養し、その培養液中に巨核球増幅因子を産生させ、培養液から培養上清を回収し、回収した培養上清から該巨核球増幅因子を分離・精製することを含む巨核球増幅因子の製造方法が提供される。

本発明の方法において用いられる動物細胞としては、巨核球増幅を活性化する活性を有し、且つ末梢血中の血小板を増加させる活性を有する巨核球増幅因子を産生する能力を有する各種の細胞を用いることができる。正常二倍体細胞を有利に使用でき、例えば、ヒトの腎、腸、肺、心臓、輸尿管、皮膚、包皮、舌、甲状腺、胎盤、子宮由来の細胞を、好ましくはヒト胎児腎、肺、包皮由来の細胞を、更により好ましくはヒト胎児肺由来の細胞を使用できる。

該巨核球増幅因子は、これらの組織抽出液から分離精製することも可能であるが、より好ましくは、これらの細胞を適当な生育培体中で培養し、その培養液に巨核球増幅因子を産生させ、培養液から培養上清を回収し、回収した組織培養液から分離精製することができる。これらの細胞は、通常の細胞の培養に用いられる培養方法例えば「組織培養」(中井準之助他編集昭和 51 年刊朝倉書店)記載の方法で増殖させ、

本発明に供することが望ましい。細胞は炭素類、窒素源及び必要な場合には、無機塩類及び／またはその他の添加物を含む培地溶液中で培養することによって、巨核球増幅因子を生産せしめることができる。また、本発明によれば、培地中に巨核球増幅因子産生促進剤、好ましくは動物肉酵素分解ペプトンを添加し、細胞を培養することにより、培養液中に産生される該巨核球増幅因子の量を飛躍的に増大せしめることができる。動物肉酵素分解ペプトンの濃度としては培地に対し、0～4w/v%、好ましくは0.1～2w/v%を用いることができる。動物肉酵素分解ペプトンは、一般に細菌の培養培地に用いられるものであり、通常プロテオースペプトン、プロテオーゼペプトン、獣肉ペプトンと呼ばれるものである。

この動物肉酵素分解ペプトンの調製法は公知であり、例えば「細菌培地学講座第二集」（坂崎利一著、納谷書店、1967年刊）記載の方法に従えばよい。即ち、動物肉としては、牛、豚、ニワトリ、羊、クジラ等の肉または内臓が用いられるが、このうち牛肉が最も普通に用いられる。分解用の酵素としては、トリプシン、パパイン、ペプシン、パンクレアチン等がある。これらの動物肉は、破碎され、水と混合され、炭酸ナトリウム、濃塩酸等で酵素分解に適したpHに調製される。これに酵素を加え、20～40℃で1～20日間、通常は37℃で2～3日間酵素分解を行なう。消化後は分解酵素を不活性化するためと、未消化の蛋白を熱凝固させるために、1

0 0℃以上に加熱し、濾過によってこれを除去した後、濃縮、乾固、細末化する。濃縮、乾固の方法には、煮つめて粉末にするのと、真空乾燥装置を用いて低温で濃縮後、細末化するのがある。市販品としては、米国ディフコ社製のプロテオースペプトンNo.1 (Protease Pepton No.1)、プロテオースペプトンNo.2、プロテオースペプトンNo.3、チオペプトン (Thiopepton)、英国オキシイド社製のプロテオースペプトンL46、ペプトンPL46、英国B B L社製のチオトン (Thioton)、日本国大五栄養化学社製のプロテオースペプトン等がある。

次に、巨核球増幅因子の細胞培養法による生産の例を示す。直接組織から取り出した核因子を産生する初代培養細胞あるいは市販の細胞を用い、付着培養あるいは浮遊培養で培養する。一例を示せば、適当な細胞密度、好ましくは 10^5 cells/mlの密度で、0.1~10 mg/mlの細胞培養用ビーズ担体と共に植込み、有血清下15~45℃、好ましくは25~40℃の温度範囲で、5~9好ましくは6~8の培養液pH範囲で、通常5%CO₂を含む空気中で培養される。巨核球増幅因子産生促進剤を用いる場合は無血清条件下とし、0~4%好ましくは0.1~2%の濃度で添加して生産培養が行なわれるが、好ましくは細胞を十分に増殖させ、より好ましくはコンフルエントの状態での生産培養に移される。生産の培養日数は通常1~60日であるが、60日を越えることも可能である。巨核球増幅因子の生産速度は、生産の後半においては次第に遅くなるので、工業的生産の場

合には最も効率のよい日数が選ばれる。巨核球増幅因子は、前記の条件下で細胞から溶液中に産生される。その生成量の測定は、参考例 1 (a), (b) に示した巨核球増幅活性測定法で行ない、その巨核球の成熟度合は、参考例 2 に示した巨核球 DNA 量測定法で確認できる。

本発明の更に他の態様によれば、通常使用される遺伝子工学的技術を用いて該巨核球増幅因子を適当な宿主細胞に発現させ、これを回収し、更に精製することを含む該巨核球増幅因子の製造方法が提供される。

即ち、巨核球増幅を活性化する活性を有し、且つ末梢血中の血小板を増加させる活性を有する巨核球増幅因子を産生する能力を有する、各種の細胞例えば、ヒトの腎、腸、肺、心臓、輸尿管、皮膚、包皮、舌、甲状腺、胎盤、子宮由来の細胞を、好ましくはヒト胎児腎、肺、包皮由来の細胞を、更に好ましくはヒト胎児肺由来の細胞から全 RNA を抽出し、更にこれによりポリ A⁺RNA を精製する。適当な発現用ベクター、好ましくは真核生物発現用ベクターとポリ A⁺RNA 及びリンカーを用いて cDNA ライブラリーを作製し、このライブラリーを用いて適当な宿主細胞、例えば、大腸菌を形質転換し、その培養液よりプラスミド DNA を調製する。このプラスミド DNA を用いて適当な宿主細胞を、好ましくは動物由来の細胞を、更に好ましくは、サル由来の COS 細胞をトランスフェクトし、巨核球増幅因子の遺伝子を発現さ

せ、これを回収し、更に精製することにより巨核球増幅因子を製造することができる。

次に、その具体的一例について説明する。適当量の巨核球増幅因子細胞、例えば、ヒト胎児肺細胞好ましくは 10^8 cellsより、RNAアイソレーションキット例えば米国、インビトロゲン社製のもの(カタログNo. K1592-01)を用いて、付属のマニュアルに従い全RNAをグアニジンイソチオシアネート法により抽出し、常法にしたがってポリA⁺RNAを得る。この際オリゴデックス-dT30 (日本国、日本合成ゴム社製)を用いることができる。通常上記方法によれば約200 μ gの全RNAが、1ないし2 μ gのポリA⁺RNAが得られる。次に岡山-バーグの方法に従い、cDNAライブラリーを調製する。例えば、真核生物発現用ベクター3'-oligo(dT)-tailed pcDV-1 (スウェーデン国、ファルマシア社製No. 27-4955-01) と上記で得たポリA⁺RNA及び3'-oligo(dG)-tailed pL1リンカー (スウェーデン国、ファルマシア社製No. 27-4957)を用いることができる。あるいはpcDL-SR α 296を用いてもよい。得られたcDNAライブラリーを含む溶液を適当数のプール、好ましくは10~200更に好ましくは50~100のプールに分け、それぞれについて大腸菌MC1061 (ATCC 53338)への形質転換を行う。形質転換した大腸菌をアンピシリン存在下で一晩培養する。集菌、溶菌後、例えばキアゲン-tip-100 (米国、キアゲン社製)を用い、付属のマニユ

アルに従いプラスミドDNAを調製する。得られた組換え体DNAを、例えばジエチルアミノエチルーデキストラン法 (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 9.2.1-9.2.6) により、適当な宿主細胞、好ましくはサル腎細胞COS1細胞 (ATCC, CRL1650) に導入した後、W088/05053明細書、実施例2に記載の方法とほぼ同様にして遺伝子を発現させる。即ち、適当な培養条件例えば10%牛胎児血清を含むD-MEM培地 (米国、フローラボラトリー社製) で、37℃、40時間、5%CO₂の条件で培養後、無血清のD-MEM培地に交換し、2日毎に3回培養液を回収する。

また本発明によれば、巨核球増幅因子遺伝子を組込んだ発現細胞を巨核球増幅因子の活性を指標にスクリーニングし、巨核球増幅因子遺伝子をクローニングすることもできる。

即ち、回収したそれぞれの培地を濃縮した後、液体培養によるアセチルコリンエステラーゼ活性測定法等により巨核球増幅因子活性を測定しこれを指標にして、本物質遺伝子を含むプールの絞り込みを行うことができる。更に陽性であったDNAについて、再度大腸菌の形質転換を行ない、得られるコロニー (約2000個) を10個程度を一まとめとして培養し、上記と同様にしてDNAの調製、COS1細胞への導入、発現及びアセチルコリンエステラーゼ活性測定を行ない、二次のcDNAライブラリーの絞り込みを行うこともできる。通常本方法を数回繰り返すことにより、該巨核球増幅因子活性

を発現する c D N A プラスミドを持つ大腸菌が単離される
(Hayashida, K. et al. 「Hematopoietic Factor」 1, No. 2, 1
02-108(1990))。

更にまた本発明によれば、巨核球増幅因子の蛋白質一次構造の一部をコードする遺伝子プローブを調製し、これを用いてその巨核球増幅因子遺伝子をクローニングすることもできる。

更にまた本発明によれば、クローニングされた巨核球増幅因子遺伝子を用いて、例えば、大腸菌、酵母、サルの腎細胞 (C O S 細胞)、チャイニーズハムスターの卵巢細胞 (C H O 細胞)、マウス C 1 2 7 細胞、ヒト胎児腎細胞株、カイコ細胞 S F 9 等の宿主細胞をトランスフェクトし、更に効率的に該巨核球増幅因子を発現させ、これを回収し、更に精製することにより巨核球増幅因子を製造することができる。

本発明による巨核球増幅因子蛋白質の製造方法において、例えば細胞培養による製造の場合、生産細胞による巨核球増幅因子の産生が所望の生成量または日数に達したときに、培養上清を回収する。該巨核球増幅因子の分離・精製方法としては、蛋白質化学において通常使用される方法、例えば、担体による吸着法、塩析法、電気泳動法、およびイオン交換、ゲル濾過、適当なりガンドへのアフィニティーを応用した各種のクロマトグラフィー法等を単独で、または組み合わせて使用できる。クロマトグラフィー法として、好ましくは、カ

ルボキシメチル基を結合させたセファロースを用いるCMセファロースカラムクロマトグラフィー、架橋したデキストランゲル等の粒子をもちいるゲル濾過カラムクロマトグラフィー、色素吸着カラムクロマトグラフィー、本発明物質と特異的に結合する抗体を結合させた抗体アフィニティーカラムクロマトグラフィーを使用できる。

このようにして得られる新規な巨核球増幅因子は巨核球の増幅を活性化する活性を有し、且つ末梢血中の血小板を増加させる活性を有するものである。該巨核球増幅因子は、骨髓幹細胞あるいは骨髓巨核球前駆細胞からの巨核球の分化、増殖並びに巨核球の成熟の研究用試薬として、また該巨核球増幅因子単独で、あるいは治療的に有効な量の該巨核球増幅因子に製薬剂的に許容される担体、希釈液および賦形剤から選ばれる少なくとも1種を添加して適当な剤形とし、医薬品としても使用することができる。担体、希釈剤および賦形剤としては通常この分野で用いられているものを用いることができる。また該巨核球増幅因子、IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF, IFNs, LIF, TNFおよびEPOから選ばれる少なくとも1種の因子、および製薬的に許容される担体、希釈液および賦形剤から選ばれる少なくとも1種を添加して適当な剤形とし、医薬品として使用することができる。

本発明の巨核球増幅因子は、ある種の血小板減少症、例えば抗癌剤投与後の血小板減少症、放射線治療後の血小板減少症、巨核球増幅因子欠損による血小板減少症、再生不良性貧血の血小板減少症、骨髄移植後の血小板減少症、自己免疫疾患の血小板減少症の治療及び／または予防に用いることができる。また白血病の治療にも用いることができる。更に血小板輸血の代替、補助剤として、あるいは輸血用骨髄細胞の *in vitro* での増殖培養にも用いることができる。

本発明の巨核球増幅因子は、注射剤としても用いることができる。この場合は、ショ糖、グリセリン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース等の増粘剤、各種無機塩の pH 調整剤等を添加剤として加えることができる。

本発明の巨核球増幅因子の成人 1 回当りの投与量は、年齢、性別、体重、症状などによって異なるが、一般に $0.1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg}$ であり、1 日当り 1 回または必要に応じて数回投与することができる。

発明を実施するための最良の形態

本発明をより詳細に記述するために、実施例により説明するが、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。

参考例 1 巨核球増幅活性測定法

本発明によって得られる新規な蛋白質の巨核球増幅因子活性は、下記の 2 つの方法 (a)、(b) で測定した。

(a) 軟寒天培養法によるMeg-POT活性測定法

骨髓細胞懸濁液の調製

以下の骨髓細胞懸濁液の調製法に用いるIMDM液 (Isocove's modification of Dallbecco's medium) は、粉末IMDM (1ℓ用) (米国、ギブコ社製) に重曹3.024g、 β -メルカプトエタノール3.04 μ ℓを加え、pHを7.1に調製した後、1ℓにメスアップし、更に50IU/mℓペニシリン及び50 μ g/mℓストレプトマイシン (いずれもフローラボラトリーズ社製) を加えて調製したものである。

6～9週令のC57BL/6マウス (雄) の大腿骨を採取し、その上部を切断し、10mℓのIMDM液を入れた10mℓのプラスチック注射器 (22G針) を用いて、膝関節側から100mmプラスチックディッシュ中に、勢いよく骨髓を押し出した。8回 (19G針6回、22G針2回) のピペッティング操作によって、細胞を分散した後、15mℓのファルコンチューブに移し、非沈降性の細胞を採り、これを10mℓのIMDM液で2回洗浄し、最後にマウス1匹当たり2.5mℓのIMDM液にサスペンドし、更によく分散させて得た骨髓細胞懸濁液を次のコロニーアッセイの実験に供した。細胞濃度は、トリパンプルー (米国、フローラボラトリーズ社製) 染色にて血球計算盤で測定した。

コロニーアッセイ

次の実験において用いるアセチルコリンエステラーゼ染色

液としては、1.73mMヨウ化アセチルチオコリン、0.5mMフェリシアン化カリウム、5mMクエン酸ナトリウム、3mM硫酸銅（いずれも日本国、和光純薬社製）を含む400mℓのpH 6.0の75mMリン酸緩衝液に溶解したものを用いた。

10⁵個の骨髓細胞を100mmプラスチックディッシュ中で、15v/v%となるように馬血清（米国、J.R.サイエンティフィック社製）を加え、更にIL-3（米国、ジェンザイム社製）50ngまたはIL-3含有COS1細胞培養上清を1v/v%となるように加えた500μℓのIMDM液培地中に被検液を加え、0.3%バクトアガー（米国、ディフコ社製）の条件で軟寒天状態とし、37℃、5%CO₂の条件下で7日間培養した。IL-3含有COS1細胞培養上清としては、マウスIL-3 cDNAをSV-40のプロモーターに連結したプラスミドDNAを用いて、COS1細胞（ATCC CRK1650）を形質転換し、W088/05053、実施例2に記載の方法と同様にして発現させた、IL-3含有培養上清を用いた。

なお、無血清状態で培養を行なう際には、上記の15v/v%馬血清含有IMDM液培地の代りに、1w/v%牛血清アルブミン、360μg/mℓヒトトランスフェリン、0.98μg/mℓコレステロール、及び50ngIL-3または1v/v%IL-3含有COS1細胞培養上清を含む500μℓのIMDM液培地中で培養した。培養終了後、アガーディスクをスライドガラス上に移し、乾燥させた後、2%グルタルアルデヒドでアガーディスクを固定

した。固定後リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄し、アセチルコリンエステラーゼ染色液で巨核球の特異的染色を行った。コロニー数は日本国、オリンパス社製AHB型顕微鏡を用いて、6個以上の陽性細胞からなっているものを1コロニーとして計数した。

（b）液体培養によるアセチルコリンエステラーゼ活性測定法

上記（a）の測定法におけるのと同様に調製したマウス骨髄細胞懸濁液に、最終濃度0.4mMとなるようにジイソプロピルフルオロフォスフェート（DFP）（米国、シグマ社製）を加え、時々攪拌しながら室温で20分置き、骨髄細胞の内在性のアセチルコリンエステラーゼ活性を消去した。細胞数は上記と同様に血球計算盤計数した。

骨髄細胞懸濁液の細胞密度を $2.5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mlとなるようにDFPで内在性アセチルコリンエステラーゼ活性を消去(J. Cell. Physiol. 122 159 (1985))した馬血清を15v/v%含むIPDM液に懸濁し、96穴培養用ディッシュ（日本国、住友ベークライト社製）に、1穴当たり0.2mlを分注した。試料溶液を20 μ l加え、37℃、5%CO₂の条件下で7日間培養した。

培養後、遠心で細胞を沈め上清を除去した後、各穴に20 μ lの5.6mMヨウ化アセチルチオコリン（米国、シグマ社製）、及び180 μ lの0.12M食塩、1mMエチレンジアミン四酢酸、

0.2%トリトンX-100を含むpH7.5の50mM HEPES緩衝液を加えて、室温で3～4時間反応させた。反応液の20 μ lを96穴の蛍光測定用プレート（独国、グライナー社製）に移し、160 μ lの1mMエチレンジアミン四酢酸、0.2%トリトンX-100を含むpH5.0の酢酸緩衝液及び20 μ lの0.4mM CPM (7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin)（米国、モレキュラープローブ社製）のアセチルコリンエステラーゼ溶液を加えて、室温で1時間反応させた。アセチルコリンエステラーゼ活性は、365nmの励起光による450nmの蛍光をPANDEx FCA（米国、バクスター社製）を用いて測定した。

測定を無血清条件で行なう際には、1.0%ニュートリドーマーSP（独国、ベーリンガーマンハイム社製）を含むIMDM液を用いて行った。

参考例2 巨核球染色体DNA含量測定法

ヒト由来細胞を培養して得られる本発明による巨核球増幅因子の巨核球成熟促進活性は、以下の方法で直接確認した。

上述のようにして作製したアセチルコリンエステラーゼ染色顕微鏡標本を、DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 染色液に約10時間浸漬して二重染色した。コロニーを形成している巨核球約200個を無作為に抽出し、日本国オリンパス社製BH2落射型顕微鏡及びOSP-1細胞内DNA蛍光顕微測光装置を用いて、それら細胞の染色体倍化数の分布

を測定した。なおD A P I 染色液は、下記の保存液1、2、3を 0.5:98.5:1.0mℓの割合で混合し、100mℓとしたものを用いた。

保存液1 ; D A P I 10mgを1000mℓの蒸留水に溶解したもの。

保存液2 ; 0.1M食塩、10mMエチレンジアミン四酢酸を含むpH7.4の10mMトリスヒドロキシメチルアミノメタン緩衝液

保存液3 ; 1M 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩液

実施例1 ヒト細胞培養法による巨核球増幅因子の生産

市販のヒト胎児肺正常二倍体細胞（米国、フローラボラトリーズ社製）を100ℓ容のガラスボトルに、 10^5 cells/mℓの密度で2.5mg/mℓ濃度のサイトデックスI（細胞培養用ビーズ担体）（スウェーデン国、ファルマシア社製）と共に植え込み、37℃、5%CO₂を含む空気中で、生育培地として10%牛胎児血清を含むメジウムMEM培地を60ℓ添加し、60rpmの回転数で攪はんしながら懸濁培養した。8日間培養し、細胞を十分に増殖させた後、生理食塩液で細胞が接着したビーズ担体を洗浄し、血清を含まない0.75%のプロテオースペプトンNo. 3を含む、あるいは含まない、メジウム199培地60ℓに置き換え、60rpmの回転数で攪はんしながら培養した。3日目毎にこの培地を交換しながら、本発明物質を含む培養液（conditioned medium）を回収した。培養液を10倍に濃縮し、

その中に含まれる巨核球増幅因子活性を、参考例 1 (a) に示した軟寒天培養法による M e g - P O T 活性測定法によって評価した。その結果を表 1 に示す。なお参考までに、いくつかの他の細胞の培養液についてもこれを評価した。ヒト胎児肺細胞は巨核球増幅因子を産生する能力を有すること、またプロテオースペプトン存在下で培養すると著しく巨核球増幅因子活性の産生量が増大することが示された。

(表 1)

培養液試料	コロニー数/ 10^5 cells
ヒト胎児肺細胞培養液 1回目回収液	38
(+ P P) 2回目回収液	35
5回目回収液	26
10回目回収液	33
ヒト胎児肺細胞培養液 1回目回収液	6
(- P P) 5回目回収液	7
T H P - 1 (白血病細胞)	2
H e p G 2 (肝癌細胞)	3
T 2 4 (膀胱癌細胞)	3
M C F 7 (乳癌細胞)	0

[註] 1) 回数は上記した培養 3 日目毎の回数を示す。

2) P P ; プロテオースペプトン

各試料のコロニー数は、アッセイ系に添加した I L - 3 のみの時に生じるコロニー数、3 を差し引いて算出した。

実施例 2 巨核球増幅因子の精製 I

実施例 1 で得たヒト胎児肺正常二倍体細胞の培養上清170 ℓ に、酢酸約1.1 ℓ を添加し、p Hを4に調製した後、濾過によって細胞断片及び生じた不溶物を除去した。予め0.2M食塩を含むp H4.0の20mM酢酸緩衝液で十分に平衡化したカルボキシメチルセファロース（CMセファロース；スウェーデン国、ファルマシア社製）カラム（直径9cm×高さ23.5cm）に吸着させ、同平衡化緩衝液13.5 ℓ 及び0.4M食塩を含むp H4.0の20mM酢酸緩衝液6 ℓ で洗浄後、0.75M食塩及び10mM塩酸リジンを含むp H4.0の20mM酢酸緩衝液12 ℓ で吸着している蛋白を溶出させた。本操作によって巨核球増幅因子活性を含む粗精製液 I として約5 ℓ の溶出液を得た。培養上清中に多量に含まれるプロテオースペプトン成分は、1%以下にまで減少した。

溶出液には通常、多量の組織プラスミノージェンアクチベーター（t P A）が含まれているので、これを特異的に除去した。即ち、5M水酸化ナトリウム溶液を加え、p Hを7.0に調製した後、予め0.5M食塩を含むp H7.5の20mMトリス塩酸緩衝液で十分に平衡化した、t P Aに対するモノクローナル抗体をセファロースに結合させた（3mg/m ℓ ゲル）、抗体カラム（直径9cm×高さ29cm）を素通りさせた。本操作によって、粗精製液 II として約6 ℓ の素通り液を得た。本カラムクロマトグラフィーによって、巨核球増幅因子活性はほぼ定量

的に回収された。また粗精製液 I に多量に含まれる t P A 活性は除去された。

粗精製液 II 5.9 ℓ を限外濾過モジュール S I P - 1 0 1 3 (日本国、旭化成社製) で 300mℓ にまで濃縮し、10倍容の p H 8.5 の 20mM トリス塩酸緩衝液を加え、再び 300mℓ にまで濃縮し、緩衝液交換を行った。予め p H 8.5 の 20mM トリス塩酸緩衝液で十分に平衡化した、C M セファロースカラム (直径 5cm × 高さ 15cm) に吸着させ、約 600mℓ の同緩衝液で洗浄した後、約 600mℓ の 0.05M の食塩を含む同緩衝液 (E 1) 、約 600mℓ の 0.1M の食塩を含む同緩衝液 (E 2) 、更に 1M の食塩を含む同緩衝液 (E 3) でそれぞれ溶出を行った。流速は 200mℓ / 時間で行った。溶出画分の巨核球増幅因子活性を測定したところ、活性は主に E 2 、E 3 の各画分に認められたが、E 2 画分の活性は無担体等電点電気泳動法により 7 ないし 9 の等電点を有することが確認できた。一方 E 3 に含まれる活性は更に塩基性の等電点を持つ成分を含んでいた。この約 600mℓ の E 2 画分を粗精製液 III とした。巨核球増幅活性はこの画分に 20 ~ 40% の回収率で回収された。図 1 - (a) に精製 1 段目の C M セファロースカラムクロマトグラフィー、及び図 1 - (b) に精製 3 段目の C M セファロースカラムクロマトグラフィーの結果の一例を示した。

上記粗精製液 III を 10mM 食塩を含む p H 9.5 の 20mM トリス塩酸緩衝液に十分透析した。予め同緩衝液に平衡化した Q

セファロースカラム（5cm×5cm）に吸着させ、約1ℓの50mM食塩を含む同緩衝液で洗浄した後、約300mℓの0.2M食塩を含むpH9.5の2mMトリス塩酸緩衝液で巨核球増幅因子を溶出した。流速は50mℓ／時間で行った。即ち約300mℓの粗精製液Ⅳとして、活性回収率40～60%で回収された。図2にQセファロースカラムクロマトグラフィーの結果の一例を示した。

上記粗精製液Ⅳを限外濾過中空糸を用いて10倍に濃縮し、これを予めPBSで十分に平衡化したセファクリルS-200（スウェーデン国、ファルマシア社製）カラム（直径2.6cm×高さ92cm）でゲル濾過した。巨核球増幅因子活性は溶出分子量が約25kd付近にピークを有する画分、即ち約50mℓの精製標品として、活性回収率40～60%で回収された。総蛋白質量は約5mgであった。精製度は約10000倍であった。図3はセファクリルS-200カラムクロマトグラフィーの結果の一例を示した。各精製工程における精製度を表2に示す。

（表2）

試料名	容積(ml)	蛋白回収(%)	活性回収(%)	精製度(倍)
培養上清	170000	100	100	1
粗精製液Ⅰ	5120	0.40	68	170
粗精製液Ⅱ	5900	0.28	61	218
粗精製液Ⅲ	615	0.02	25	1250
粗精製液Ⅳ	303	0.005	12	2400
精製標品	50	0.0007	7	10000

各試料の蛋白質濃度は、粗精製液Ⅳ及び上記精製標品については、280nmにおける紫外吸光係数 $A_{280}^{1\%} = 10$ と仮定して算出した。またそれ以外の試料については、ローリー法で測定した。

実施例3 巨核球増幅因子の精製Ⅱ

巨核球増幅因子はまた以下のようにしても精製できる。粗精製液Ⅱ6ℓを限外濾過モジュールSIP-1013（日本国、旭化成社製）で300mℓにまで濃縮し、10倍容の約0.1M食塩を含むpH7.6の20mMリン酸緩衝液を加え、再び300mℓにまで濃縮し、緩衝液交換を行った。試料を直前にpH=5に調整した後、予め0.05M食塩を含むpH5.0の20mMクエン酸・リン酸緩衝液で十分に平衡化した、CMセファロースカラム（直径5cm×高さ5cm）に吸着させ、400mℓの同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液中で0.05～0.5Mの食塩濃度の直線濃度勾配による溶出を行った。流速は60mℓ/時間で行った。巨核球増幅因子活性は食塩濃度が約0.2～0.4Mの間にピークを有する画分、即ち約100mℓの粗精製液Ⅲ'として、30～50%の回収率で回収された。

粗精製液Ⅲ' 100mℓを上記限外濾過中空糸を用いて5倍に濃縮し、これを予めPBSで十分に平衡化したセファクリルS-200（スウェーデン国、ファルマシア社製）カラム（直径2.6cm×高さ92cm）でゲル濾過した。巨核球増幅因子活性は溶出分子量が約25kd付近にピークを有する画分、即ち

約50mℓの粗精製液IV'として、40～60%の回収率で回収された。

粗精製液IV'を、10mℓ容のオレンジセファローズ（米国、アミコン社製）に吸着させ、1Mの食塩濃度で溶出される画分を取り、巨核球増幅因子の精製標品を約8mg得た。精製度は7000倍であった。

各精製工程に於ける精製度を表3に示す。

各試料の蛋白質濃度は、粗精製液IV'及び精製標品については、280nmにおける紫外吸光係数 $A_{280}^{1\%} = 10$ と仮定して算出した。またそれ以外の試料については、ローリー法で測定した。

（表3）

試料名	容積 (ml)	蛋白回収 (%)	活性回収 (%)	精製度 (倍)
培養上清	170000	100	100	1
粗精製液 I	5050	0.38	64	168
粗精製液 II	6120	0.30	58	193
粗精製液 III'	97	0.05	21	420
粗精製液 IV'	46	0.005	10	2000
精製標品	52	0.001	7	7000

実施例 4 巨核球増幅因子の物性

本物質の以下の諸性質を測定した。

分子量

予め P B S で十分に平衡化したセファクリル S - 2 0 0 H R (スウェーデン国、ファルマシア社製) カラム (直径 2.6 cm × 高さ 94 cm) を用い、実施例 2 および 3 で得た精製標品を P B S で展開し (流速 27.6 ml/h)、これを 4.6 ml ずつ分画した。各画分の巨核球増幅因子活性は、予めゲル濾過用低分子量マーカー蛋白質キット (スウェーデン国、ファルマシア社製、B S A ; 67kd、オブアルブミン ; 43kd、キモトリプシノーゲン ; 25kd、リボヌクレアーゼ A ; 14kd) 及びブルーデキストラン 2000 の溶出位置を確認し、これらとの溶出位置の比較から分子量を測定した。本物質は、25kd 付近にピークをもって溶出された。

等電点

実施例 2 および 3 で得た精製標品 1 ml を 2 mM 磷酸緩衝液に対して一晚透析し、溶媒置換した後、グリセロール密度勾配等電点電気泳動法を用いて、下記条件で等電点を測定したところ、本物質は p H = 7 ~ 9 の領域に等電点を有していた。

等電点電気泳動用カラム ; 110 ml 容量 (日本国、加藤祥一商店製)

両性担体 ; 1% アンフォライン 3.5-10 (スウェーデン国、L K B 社製)

グリセロール密度勾配；0-60%

電力；3W

泳動時間；40時間

熱、及びトリプシン処理に対する安定性

実施例2および3で得た精製標品をPBS中で100℃、10分間処理し、残存する巨核球増幅因子活性から安定性を評価した。本物質の活性は、5%以下に失活し、不安定であった。また本物質は、0.125mg/mlのトリプシンで37℃、1時間の処理に対しても感受性が高かった。

抗原性

本物質が既知のサイトカインと免疫学的に反応するかどうかを、実施例2および3で得た精製標品を用いて検討した。抗ヒトエリトロポエチン抗体、抗ヒトIL-1 α 抗体、抗ヒトIL-1 β 抗体、抗ヒトIL-6抗体、抗ヒトIL-7抗体（全て米国、ジェンザイム社製）を用い、本物質の巨核球増幅因子活性の中和実験を行った。その結果、本物質はこれらの抗体で処理しても、活性は低下せず、これらの抗体とは反応しないことが示された。また本物質は、抗IL-1抗体カラム及び抗IL-6抗体カラム（米国、エンドジェン社製）に対しても、吸着性を示さなかった。このことは、本発明の巨核球増幅因子がこれら既知のサイトカインとは免疫的に区別されるものであることを示す。

実施例5 巨核球増幅因子活性

本物質の巨核球増幅活性を、実施例2および3で得た精製標品を用いて軟寒天培養法で検討した。またIL-6及びIL-11の活性と比較測定した。CHO細胞由来のrhIL-6は市販の物（米国、ジェンザイム社製）を用いた。またrhIL-11はCOS1細胞由来の物及びCHO細胞由来の物を下記のようにそれぞれ調製し、用いた。

ヒト胎児肺（HEL）細胞cDNAライブラリーの作製

ヒト胎児肺細胞約 2×10^8 より、グアニジウムイソチオシアネート変法に従い全RNA約200 μ gを抽出した。この際、全RNAアイソレーションキット（米国、インビトロゲン社製）を用いた。次いで、全RNAよりオリゴテックスによりポリA付加RNA約1.6 μ gを単離した。cDNA合成は岡山-Berg法により行った。即ち、このポリA付加RNAを用い、3'オリゴdTテール付加pCDV-1（スウェーデン国、ファルマシア社製）をベクタープライマーとしcDNA合成キット（独国、ベーリンガー社製）にて、添付のマニュアルに従いcDNA合成を行った。合成反応終了後フェノール抽出、エタノール沈澱を行い、次にテーリングキット（独国、ベーリンガー社製）にてdCテールを付加させた。さらにフェノール抽出、エタノール沈澱後、制限酵素HindIIIで消化し、反応終了後フェノールクロロホルム抽出し、エタノール沈澱した。次に3'オリゴdGテール付加pL-1HindIIIリンカー（スウェーデン国、ファルマシア社製）

0.5ngと65℃、5分、続いて42℃、60分加熱後、室温にまで冷却した。次いで大腸菌DNAリガーゼにより環状化させた。その後、RNase H、DNAポリメラーゼ I、DNAリガーゼによりRNA鎖をDNA鎖に変換させた。このようにして合成したcDNAにより、大腸菌K12MC1061（米国、ベックマン シティ オブ ホープ メディカル イン スティテュートより入手）を常法に従い形質転換した。

HEL細胞cDNAライブラリーからのIL-11のスクリーニング

先ず、次の配列を有するオリゴヌクレオチド：

5' - C C G A G G G T C T G G G G A A A C T C - 3'

をDNA合成機（米国、アプライドバイオシステム社製DNAシンセサイザー、モデル980-A）を用いて常法どおり合成した。ついで、上記オリゴヌクレオチドの5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、IL-11合成DNAプローブとした。本プローブにて、上記にて作製したcDNAライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを実験書（Maniatisら、Molecular Cloning 2nd. Edition 1.85、1989年、Cold Spring Harbor Laboratory）に従って実施した。その結果、約70,000個の形質転換体をスクリーニングしたところ、本プローブと反応する数個のクローンが得られた。そのうちの1クローンについて、実験書に従いプラスミドDNA（pcDIL-11-12と称する）を調

製した。

塩基配列の決定

取得したプラスミド上で I L - 1 1 遺伝子のコード領域を含むと推定される領域を中心に、制限酵素を用い M 1 3 m p 1 8 および M 1 3 m p 1 9 のマルチクローニング部位へサブクローニングした。次いで、各々の塩基配列を蛍光 DNA シーケンサー（米国、アプライドバイオシステム社の DNA シーケンサー 3 7 3 A）を用い、その添付プロトコールに従って蛍光プライマーサイクルシーケンシングキット（米国、アプライドバイオシステム社製、カタログ番号 4 0 1 1 1 9）を用いて決定した。得られた塩基配列をヒト I L - 1 1 c D N A と比較したところ、塩基配列から予想されるアミノ酸の一次構造はヒト I L - 1 1 のものと完全に一致した。従って、本プラスミドが含んでいる遺伝子は確かにヒト I L - 1 1 遺伝子であると考えられた。

プラスミド p c D I L - 1 1 - 1 2 の C O S - 1 細胞での発現

C O S 細胞へのトランスフェクションは、常法に従い、以下のように実施した。C O S - 1 細胞（A T C C C R L 1 6 5 0）を組織培養用ディッシュ中で、10%（v/v）のウシ胎児血清（以下 F C S と称する。米国、ギブコ社製）を加えたダルベッコ改変最小必須培地（以下 D M E M と称する。米国、フローラボラトリーズ社製）を用いて、37℃で5% C O ₂ イン

キュベーター内で約50%コンフルエントになるまで培養した。

トランスフェクション直前に、添付のマニュアルどおりに調製したPBS (-) (日本国、ニッスイ社製) で細胞を洗浄し4mℓの10% (v/v) のN u s e r u m I (米国、コラボレイティブ社製) を加えたDMEMに置き換えた。一方、120μℓの10mg/mℓDEAE-デキストラン溶液中に、60μℓのTBSに溶解させたプラスミドp c D I L - 1 1 - 1 2 DNA (10μg) 溶液を滴下混合しDNA/DEAE-デキストラン溶液を調製した。次いでこのDNA/DEAE-デキストラン溶液を先のディッシュ上へ均一にゆきわたるように滴下した後、37℃で5%CO₂インキュベーター内で4時間培養した。培養上清を吸引除去後、5mℓの10% (v/v) DMSO (米国、メルク社製) を加えたPBS (-) を添加し室温で1分間放置した後、吸引除去した。さらに5mℓのPBS (-) で細胞を洗浄後、7mℓの100μMクロロキン (日本国、和光純薬社製) および2% (v/v) のFCSを加えたDMEMを添加し、37℃で5%CO₂インキュベーター内で3時間培養した。培養上清を除去し10mℓのPBS (-) で細胞を洗浄した後、10%FCSを加えたDMEMを添加し37℃で5%CO₂インキュベーター内で2日培養した。以後、血清を抜いたDMEMに置換し2日ごとに培養上清を回収した。

プラスミドp c D I L - 1 1 - 1 2 のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞への導入と発現

CHO-dhfr⁻細胞株はコロンビア大学Dr.L.Chasin, Dr.G.U.Chasinより入手した。まず、CHO-dhfr⁻細胞 5×10^5 を組織培養用ディッシュ中で、増殖培地（10%のFCSを加えたHam's F-12培地（米国、フローラボラトリーズ社製）にて37℃1日培養した。

取得したプラスミドpCDIL-11-12とプラスミドpSV2-dhfr（ATCC番号37146）をF.L.Grahamらの方法（F.L.Graham「Virology」52, 456(1973)）に従い、リン酸カルシウム法によりCHO-dhfr⁻細胞株への導入を行った。3日間増殖培地にて培養後、選択培地（DMEM）（米国、フローラボラトリーズ社製）にプロリンが $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、透析ウシ胎児血清（米国、ギブコ社製）が10%となるように加えたものに置換した。その後、約3日ごとに培地交換を行い、約2週間後には形質転換細胞コロニーが出現した。数個のコロニーをピックアップし拡大培養後、参考例1(a)に従い、その上清の巨核球増幅因子活性を測定したところ、いくつかのクローンで活性が検出された。活性の検出されたクローンについて、さらに20 nMのメソトレキセート（MTX）（日本国、和光純薬社製）を含む選択培地にて、約2週間培養しMTX耐性コロニーを取得した。数個のコロニーをピックアップし拡大培養後、参考例1(a)に従い、その上清の巨核球増幅因子活性を測定したところ、いくつかのクローンでさらに活性の高まったものが検出された。さらに、20

0 n M に M T X の濃度を上昇させ同様の操作により耐性株を取得した。そのうちの1株を I L - 1 1 産生株として以下の実験に用いた。この株を選択培地にてコンフルエントになるまで培養し、次いで血清を抜いた選択培地にて培養後上清を回収した。

巨核球増幅因子活性の測定

巨核球増幅因子活性を軟寒天培養法で検討した。結果を表4に示す。I L - 6 (米国、ジェンザイム社製) の M e g - P O T 活性は 1 n g / m l 及び 50 n g / m l でははっきりとした活性が検知出来ず、200 n g / m l の高濃度を用いても、I L - 3 のみの時のわずか約3倍であった。これに対し本物質の精製標品は、1 n g / m l で既に I L - 3 のみの時の6倍の活性を示し、10 n g / m l では約50個ものコロニーを与え飽和していた。また I L - 1 1 の活性を C O S 1 及び C H O 細胞による発現培養上清を用いて調べた。I L - 1 1 によって得られる最大コロニー数は I L - 6 よりはやや高いものの、本物質の 1/2 程度であり明らかに活性が低いことが示された。また本物質は単独では、巨核球増幅因子活性を示さなかった。更にヒト顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) 及びヒトマクロファージ刺激因子 (M - C S F) の活性も併せて測定したが、これらの物質は I L - 3 に加えても巨核球増幅活性は実質的に示さず、また単独でも M e g - C S F 活性を示すこともなかった。

また I L - 3 のみ及び I L - 3 + 本物質 (10 n g / m l) の試

料について、巨核球染色体DNA含量測定法により、染色体倍数の測定を行ったところ、IL-3のみの時には $4n \sim 8n$ の細胞が最も多かったのに対し、本物質では $16n$ 以上の細胞の割合が60%以上に達し、本物質の強い巨核球増幅因子活性が示された。

(表 4)

試料名	コロニー数
IL-3のみ(10ng/ml)	3
IL-3 + 本物質(1ng/ml)	1 8
IL-3 + 本物質(10ng/ml)	4 8
IL-3 + 本物質(100ng/ml)	4 7
本物質(10ng/ml)	0
IL-3 + IL-6(1ng/ml)	3
IL-3 + IL-6(50ng/ml)	5
IL-3 + IL-6(200ng/ml)	9
IL-3 + IL-11(COS1)(1 μ l/ml)	7
IL-3 + IL-11(COS1)(50 μ l/ml)	2 4
IL-3 + IL-11(COS1)(100 μ l/ml)	2 0
IL-3 + IL-11(CHO)(1 μ l/ml)	8
IL-3 + IL-11(CHO)(50 μ l/ml)	2 5
IL-3 + IL-11(CHO)(100 μ l/ml)	2 6
IL-3 + GCSF(50ng/ml)	2
GCSF(50ng/ml)	0
IL-3 + MCSF(10ng/ml)	3
GCSF(10ng/ml)	0

更にまた、本物質の巨核球増幅因子活性を液体培養によるアセチルコリンエステラーゼ活性 (AchE activity) 測定法により評価した。比較のために IL-6 についても評価した。この測定法においては、IL-3をMeg-CSFとして $2\mu\text{l}$ を加えた。その時のコントロールは、IL-3のみを添加した場合である。結果を図4-(a) および図4-(b) に示す。図4-(a) および図4-(b) の左側の棒グラフは、IL-3を全く加えない場合のデータである。Relative fluorescenceは、被検試料に何も加えない場合 (コントロール) を1とした相対値で示してある。図4-(a) は無血清条件での培養結果を、図4-(b) は15%のDFP処理した馬血清(HS)を含む条件での培養結果を示す。この測定方法においても本物質の強い巨核球増幅因子活性が示された。

実施例 6 巨核球増幅因子のトロンボポエチン作用

本精製物質をマウス (C 5 7 B L 雄、7 週令、一群 5 匹) の腹腔内に 5 日間連続投与し、最終投与後 3 時間後に採血して血小板数及び赤血球数を測定した。表 5 に示したように、本物質は血小板数を危険率 (P) 1% 以下で有意に増加させトロンボポエチン作用を示すことが明らかとなった。なおこの時赤血球数は増加しなかった。表 5 において、グループ 1 及び 2 は本精製物質を一投与当りそれぞれ $1\mu\text{g}$ 及び $0.2\mu\text{g}$ を $150\mu\text{g}/\text{ml}$ の牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS 中に溶かしたものを投与し、グループ 3 にはコントロールとして、BSA のみ

を投与した。

(表 5)

	血小板数 ($\times 10^4 / \mu\text{l}$)	赤血球 ($\times 10^4 / \mu\text{l}$)
グループ1 (本物質 $1 \mu\text{g}$)	┌ 146.2 ± 9.9	1135 ± 44
グループ2 (本物質 $0.2 \mu\text{g}$)	P<0.01 122.5 ± 10.5	1074 ± 32
グループ3 ($150 \mu\text{g}/\text{m l BSA}$)	└ 98.4 ± 12.1	1030 ± 120

〔註〕 B S A : 牛血清アルブミン

実施例 7

以下に本発明の巨核球増幅因子を活性成分とする医薬組成物の配合例と該医薬組成物の調製法を示すが、本発明はそれらの配合例に限定されるものではない。

(配合例 1)

精製した本発明の巨核球増幅因子	1 mg
精製ゼラチン	20 mg
マンニトール	100 mg
塩化ナトリウム	7.8 mg
リン酸ナトリウム	15.4 mg

上記成分を注射用蒸留水 2m l に溶解し、無菌バイアルに入れ、 -35°C で真空度 0.075 Torr で35時間一次乾燥し、次いで 30°C 、真空度 0.03 Torr で5時間二次乾燥して、注射用バイアルを製造した。得られた組成物は、投与直前に生理食塩水もしくはブドウ糖注射液 500m l に溶解して点滴静注するのに用

いられる。

(配合例 2)

精製した本発明の巨核球増幅因子	10 μ g
アルブミン	5mg
マンニトール	25mg
塩化ナトリウム	1.95mg
リン酸ナトリウム	3.85mg

上記成分にて、配合例 1 と実質的に同様の方法により注射用バイアルを製造した。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 2 の各精製工程に於けるクロマトグラムを示す。図 4-(a) は精製 1 段目の CM セファロース カラム クロマトグラフィー、図 4-(b) は精製 3 段目の CM セファロース カラム クロマトグラフィーの結果を示す。

図 2 は、実施例 2 の精製工程 4 段目の Q セファロース カラム クロマトグラフィーの結果を示す。

図 3 は、実施例 2 のゲル濾過の結果を示す。

図 4 は、本発明による巨核球増幅因子及び IL-6 の巨核球増幅因子活性を、液体培養によるアセチルコリンエステラーゼ活性 (AChE activity) 測定法により評価した結果を示す。

図 4-(a) は無血清条件での培養結果を、図 4-(b) は 15% の DFP 処理した馬血清 (HS) を含む条件での培養結果を示す。

産業上の利用可能性

本発明の巨核球増幅因子蛋白質は、巨核球の増幅を促進し且つ末梢血中の血小板を増加させる活性を有しており、その活性は類似の活性を有する既知の諸因子に比べて強力である。従って、本発明の巨核球増幅因子蛋白質は、そのまま単独で、あるいはそれを活性成分として含有する医薬組成物の形態で、血小板減少症等の予防及び治療に有効に用いることができる。

請求の範囲

1. 巨核球増幅を活性化する活性を有し且つ下記の諸性質を有する実質的に純粋な巨核球増幅因子蛋白質。

(a) 分子量：25,000 ± 8,000 (ゲル濾過で測定)

(b) 等電点：8 ± 1 (等電点電気泳動で測定)

(c) ヒトのエリトロポエチン、インターロイキン1 α 、インターロイキン1 β 、インターロイキン6及びインターロイキン7に対する各抗体を用いた巨核球増幅活性中和試験において活性が実質的に低下しない。

(d) 巨核球コロニー刺激因子活性を有さない。

2. ヒト細胞由来である請求項1に記載の巨核球増幅因子蛋白質。

3. ヒト細胞が正常二倍体細胞である請求項2に記載の巨核球増幅因子蛋白質。

4. 正常二倍体細胞が肺由来である請求項3に記載の巨核球増幅因子蛋白質。

5. 動物細胞を培養し、その培養液中に巨核球増幅因子蛋白質を産生させ、培養液から培養上清を回収し、回収した培養上清から巨核球増幅を活性化する活性を有し且つ下記の諸性質を有する巨核球増幅因子蛋白質を分離・精製することを含む巨核球増幅因子蛋白質の製造方法。

(a) 分子量：25,000 ± 8,000 (ゲル濾過で測定)

(b) 等電点：8 ± 1 (等電点電気泳動で測定)

(c) ヒトのエリトロポエチン、インターロイキン 1α 、インターロイキン 1β 、インターロイキン6及びインターロイキン7に対する各抗体を用いた巨核球増幅活性中和試験において活性が実質的に低下しない。

(d) 巨核球コロニー刺激因子活性を有さない。

6. 動物細胞がヒト細胞である請求項5に記載の製造方法。

7. ヒト細胞が正常二倍体細胞である請求項6に記載の製造方法。

8. 正常二倍体細胞が肺由来の細胞である請求項7に記載の製造方法。

9. 該細胞の培養を培地中に巨核球増幅因子産生促進剤を添加して行なう請求項5に記載の製造方法。

10. 巨核球増幅因子産生促進剤が獣肉ペプトンである請求項9に記載の製造方法。

11. 動物細胞がヒトの肺由来の細胞である請求項10に記載の製造方法。

12. 動物細胞から

(a) RNAを抽出し、

(b) 得られた該RNAよりポリA⁺RNAを得、

(c) 発現用ベクター及び工程(b)で得られたポリA⁺RNAとからcDNAライブラリーを調製し、

(d) 得られたcDNAライブラリーより宿主細胞を用いてプラスミドDNAを調製し、

(e) 得られたプラスミドDNAを用いて宿主細胞をトランスフェクトし、

(f) 該宿主細胞、あるいは巨核球増幅因子活性を指標に該宿主細胞をスクリーニングして得た細胞を用いて、巨核球増幅因子蛋白質を発現させ、

(g) 発現した該巨核球増幅因子を回収し精製することを含む該巨核球増幅因子蛋白質の製造方法。

13. 治療的に有効な請求項1の巨核球増幅因子蛋白質、及び製薬剂的に許容される担体、希釈液および賦形剤少なくとも1種を含有する医薬組成物。

14. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF, IFNs, LIF, TNFおよびEPOよりなる群から選ばれる少なくとも1種の因子を更に含有する請求項13に記載の医薬組成物。

FIG. 1 - (a)

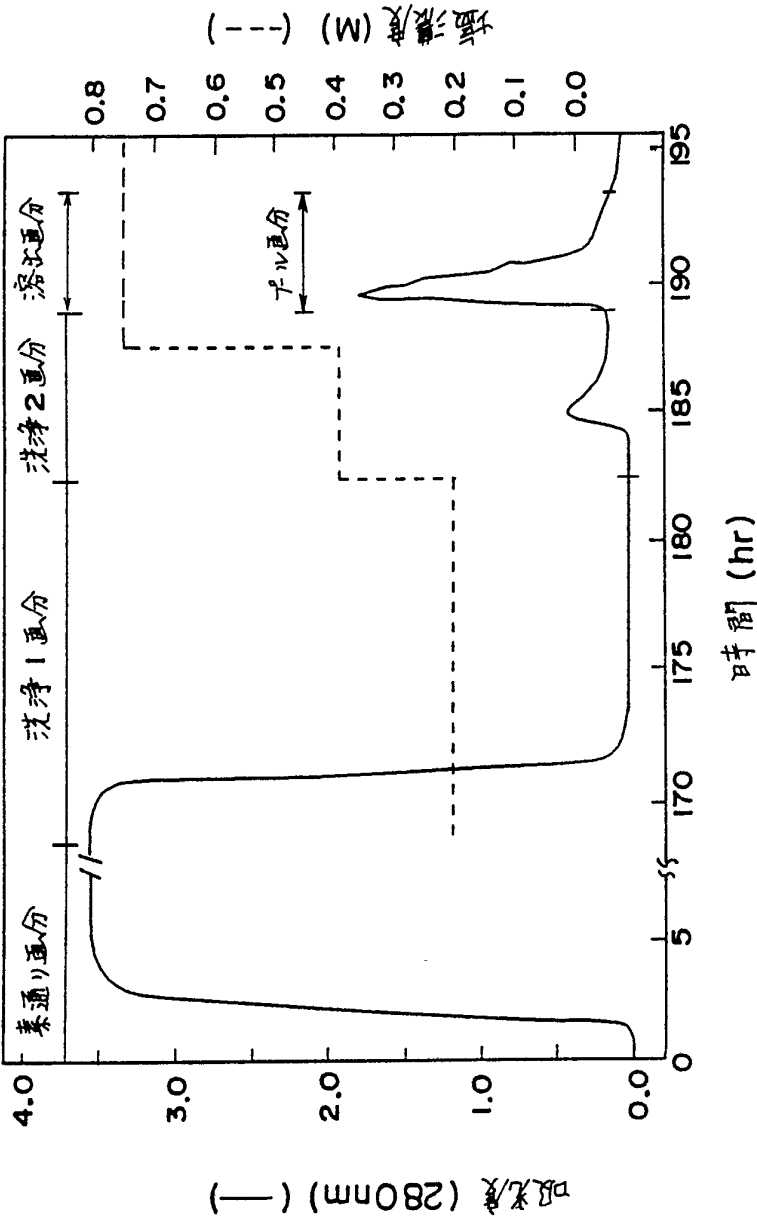


FIG. 1-(b)

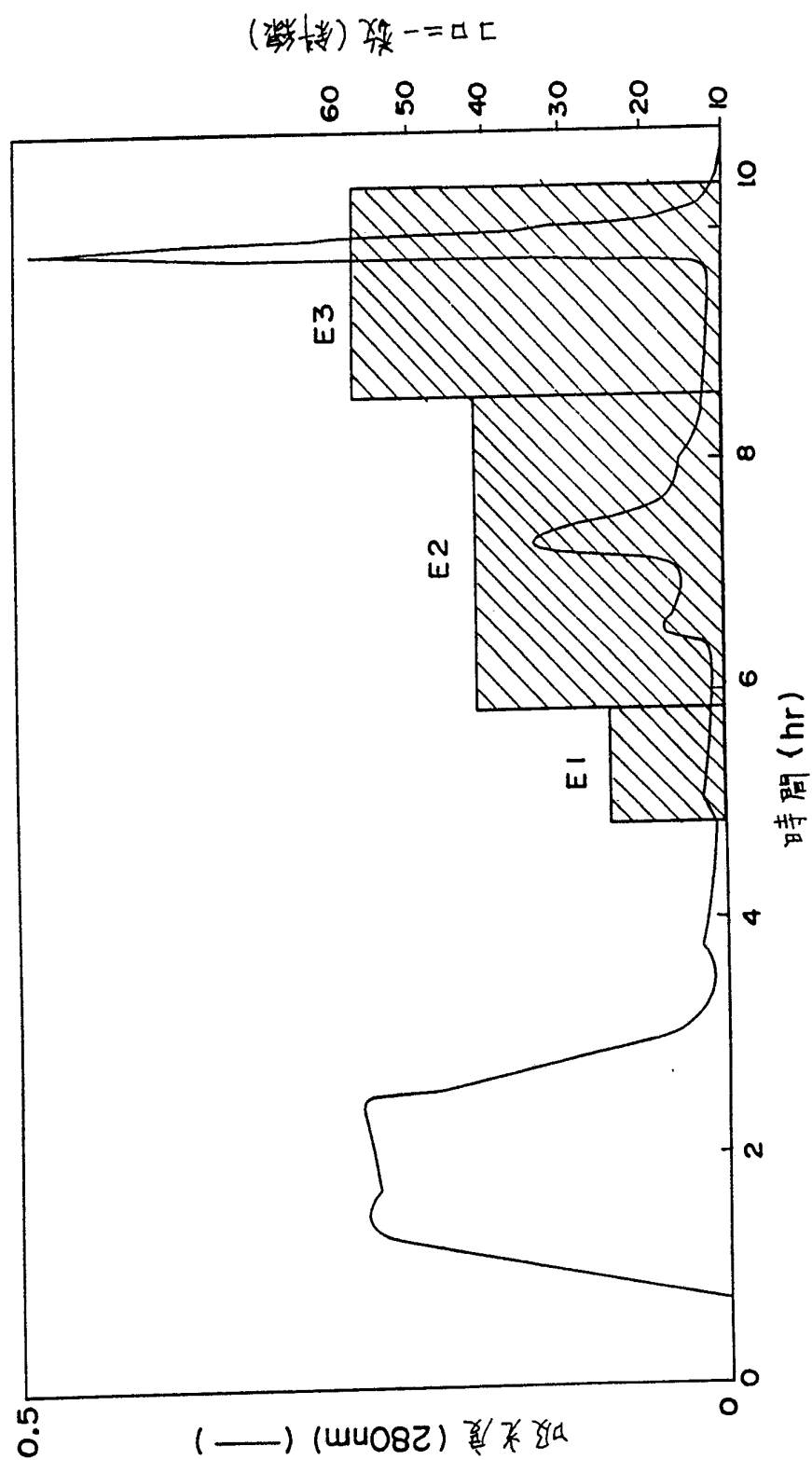


FIG. 2

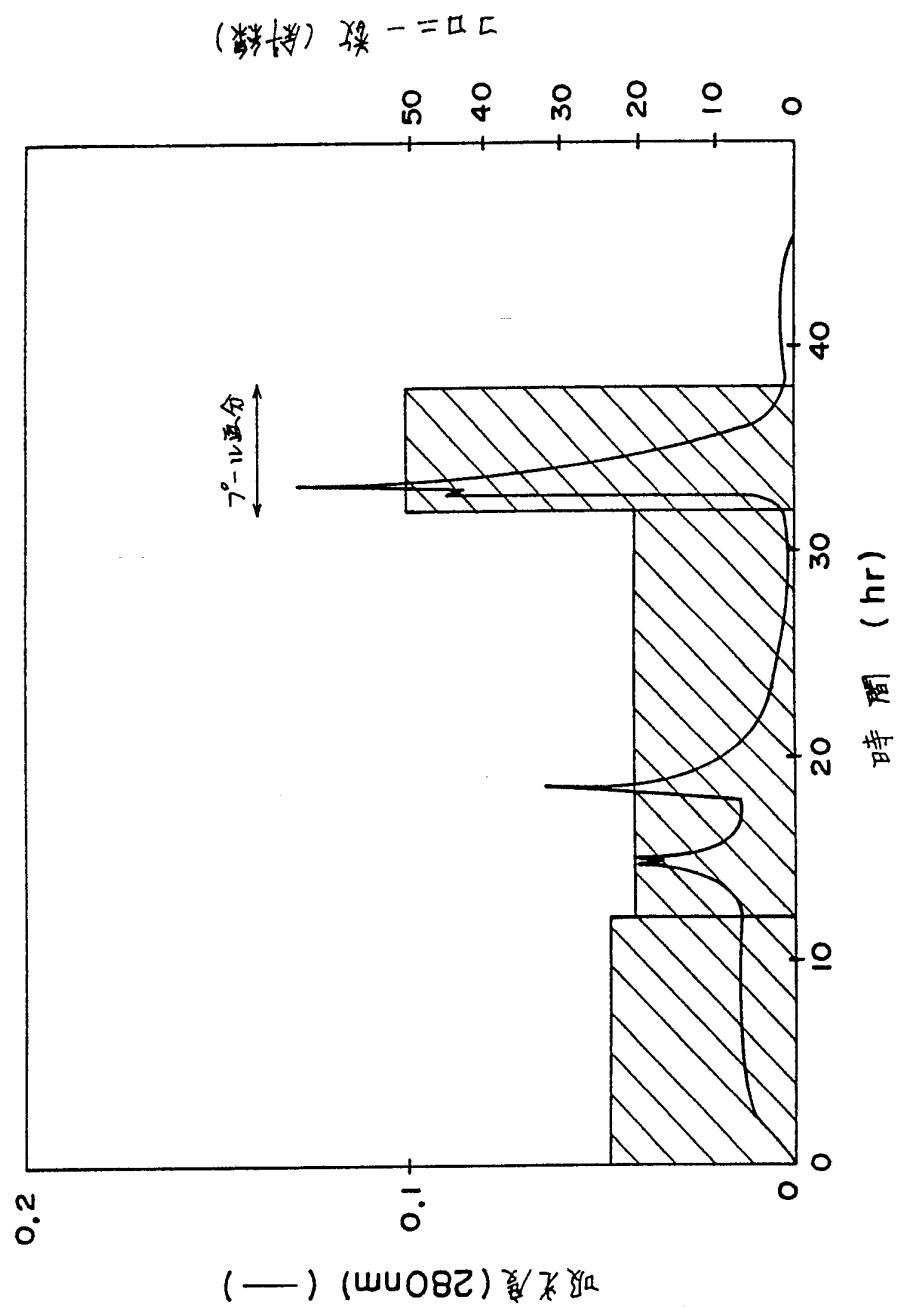


FIG. 3

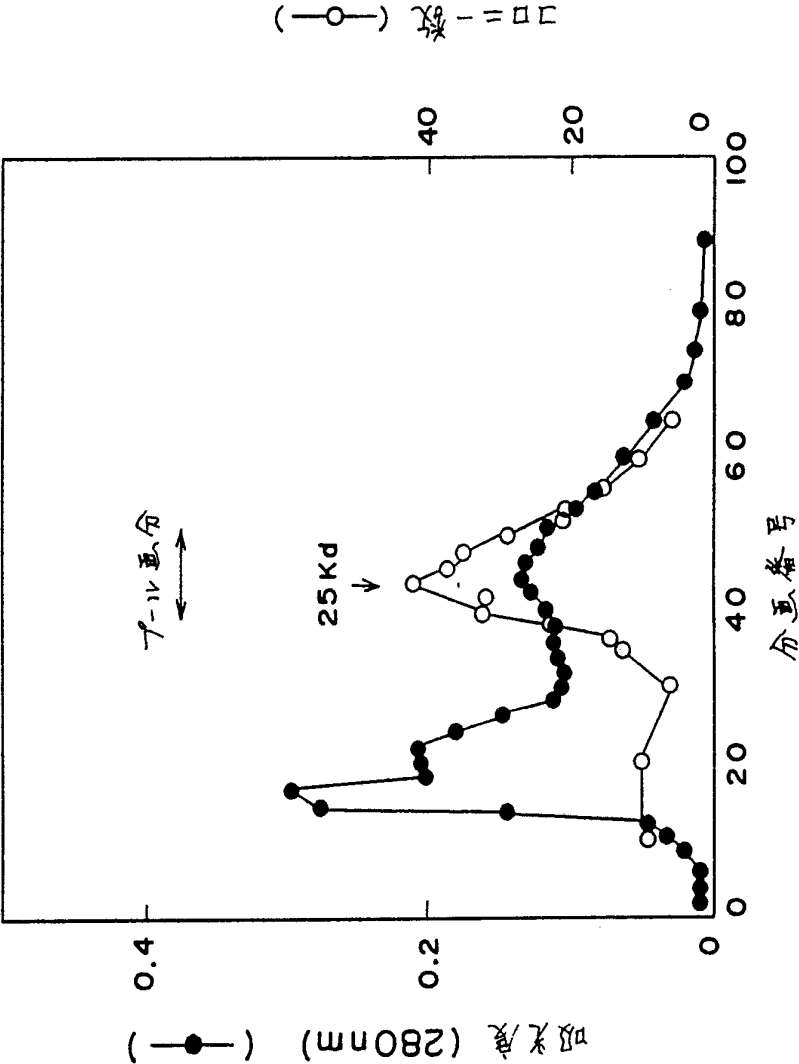


FIG. 4-(a)

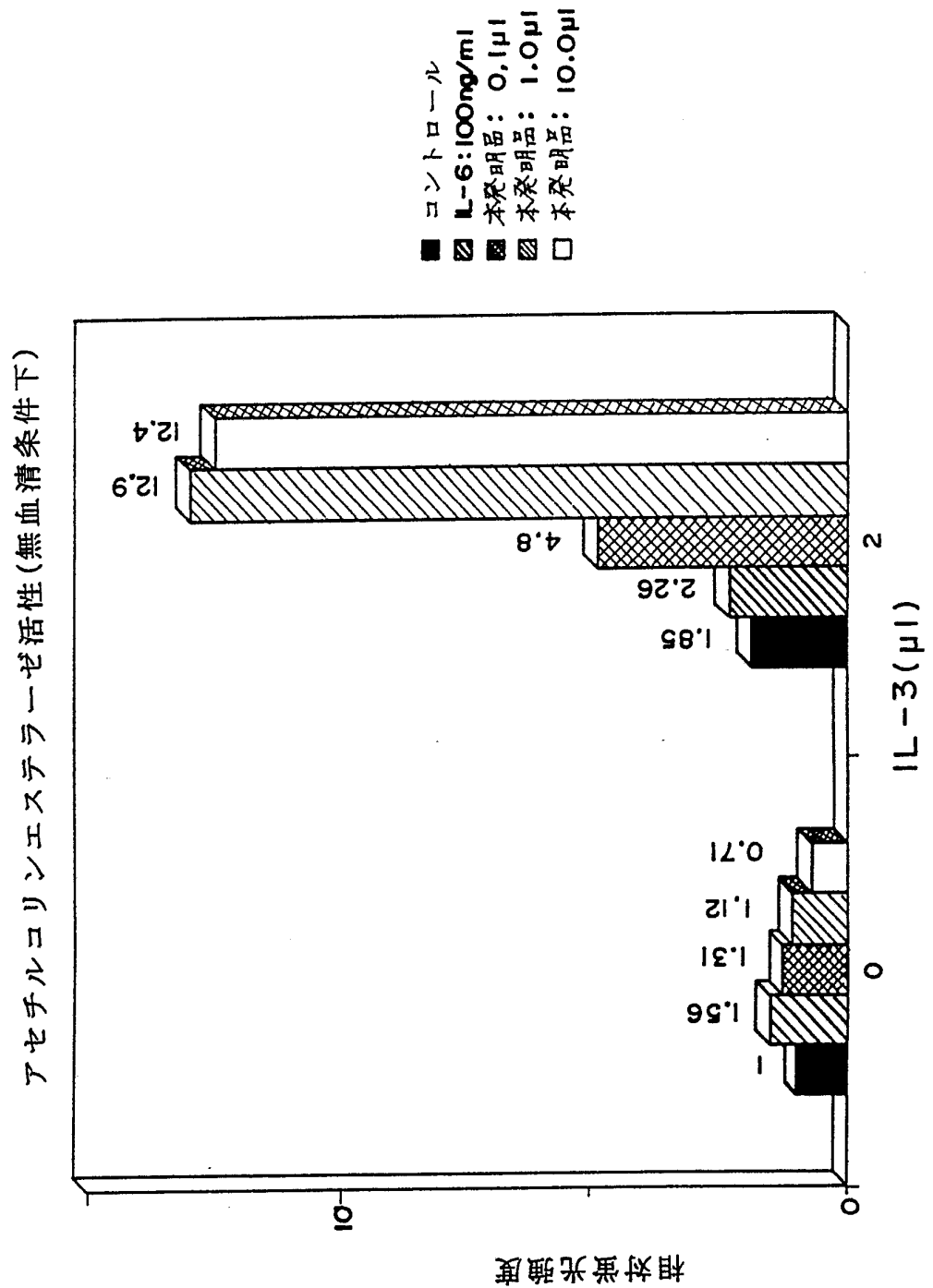
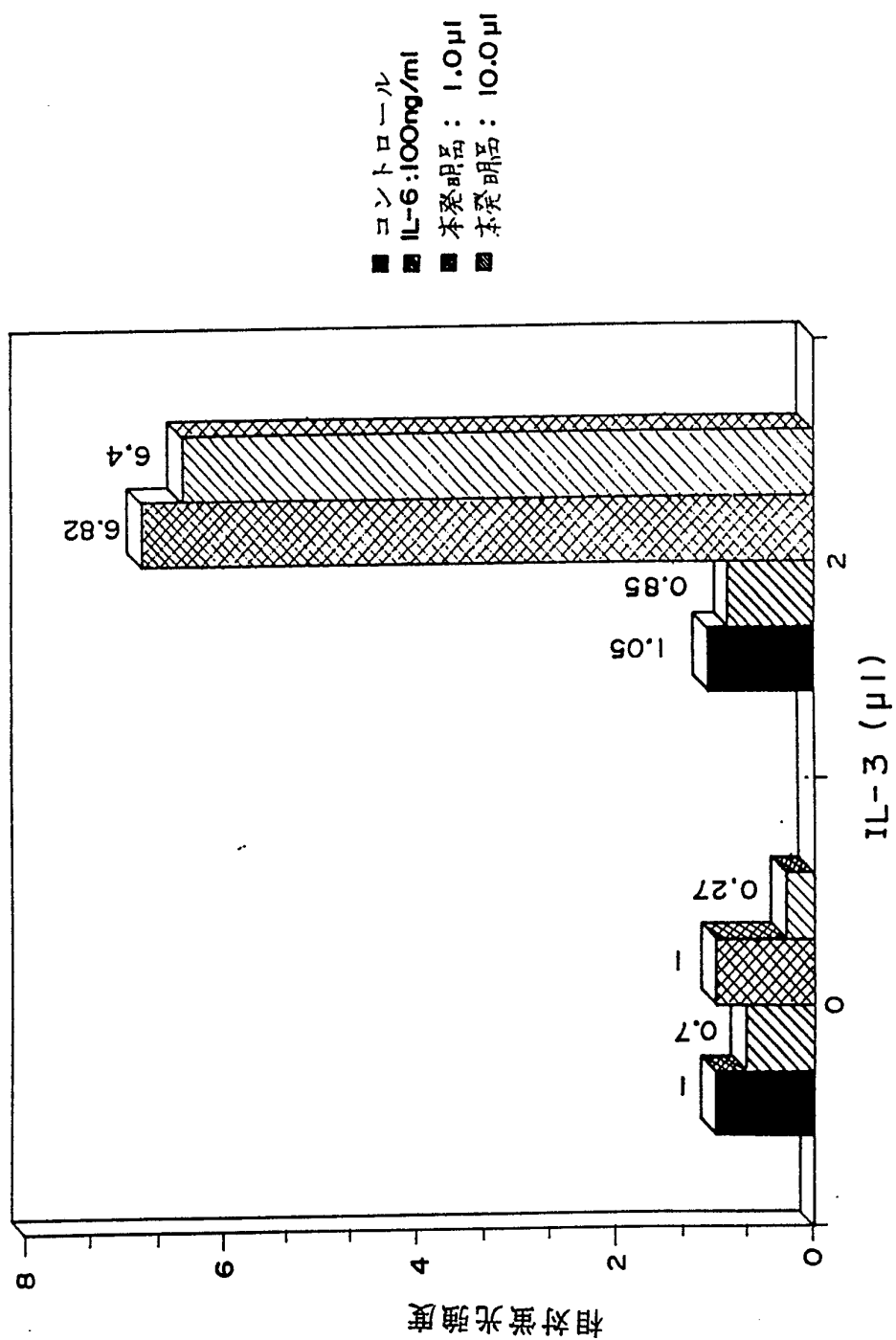


FIG. 4-(b)

アセチルコリンエステラーゼ活性 (15%DFP-馬血清条件下)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01803

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl ⁵ C07K15/04, C12P21/00, A61K37/02//C12N15/19 (C12P21/00, C12R1:91)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K15/04, C12P21/00-21/02, A61K37/02, C12N15/19	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 63-239298 (Massachusetts Institute of Technology), October 5, 1988 (05. 10. 88), & EP, A2, 260918 & US, A, 4894440	1-14
A	Leukemia Research, Vol. 10, No. 4, (1986), O. S. Huat et al. "Biochemical characterization of an in-vitro murine megakaryocyte growth activity: megakaryocyte potentiator" p. 403-412	1-14
A	Journal of Biological Chemistry, Vol. 262, No. 7, (1987), G. Tayrien et al. "Purification and properties of a Megakaryocyte Stimulatory Factor Present both in the serum-free conditioned and medium of human embryonic kidney cells and in Thrombocytopenic plasma" p. 3262-3268	1-14
[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "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		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
March 24, 1992 (24. 03. 92)	April 21, 1992 (21. 04. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C07K15/04, C12P21/00, A61K37/02/C12N15/19 (C12P21/00, C12R1:91)			
II. 国際調査を行った分野			
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料			
分 類 体 系	分 類 記 号		
IPC	C07K15/04, C12P21/00-21/02, A61K37/02, C12N15/19		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)			
III. 関連する技術に関する文献			
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		請求の範囲の番号
A	JP, A, 63-239298 (マサチューセッツ インスチ チュート オブ テクノロジー), 5. 10月. 1988 (05. 10. 88), &EP, A2, 260918&US, A, 4894440		1-14
A	Leukemia Research, 第10巻, 第4号, (1986), O.S.Huat et al. "Biochemical characteriza- tion of an in-vitro murine megakaryocyte growth activity:megakaryocyte potentiator" p. 403-412		1-14
A	Journal of Biological Chemistry, 第262巻, 第7号 (1987), G. Tayrien et al. "Purification and properties of a Megakar- yocyte Stimulatory Factor Present both in the serum-free conditioned medium of human		1-14
※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」 先行文献ではあるが、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の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の文献			
IV. 認 証			
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日	
24. 03. 92		21.04.92	
国際調査機関		権限のある職員	
日本国特許庁 (ISA/JP)		特許庁審査官	
		4 B 8 2 1 4	
		内 田 俊 生	

第2ページから続く情報

(欄の続き)

embryonic kidney cells and in Thrombocyto-
penic plasma " p. 3262-3268

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲_____は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. ☐ 請求の範囲_____は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. ☐ 請求の範囲_____は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲_____
3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲_____
4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。