

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/007198

発行日 平成28年6月2日 (2016.6.2)

(43) 国際公開日 **平成26年1月9日 (2014.1.9)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 85 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2014-523730 (P2014-523730)	(71) 出願人	000001029 協和発酵キリン株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2013/067994	(74) 代理人	110002000 特許業務法人栄光特許事務所
(22) 国際出願日	平成25年7月1日 (2013.7.1)	(74) 代理人	100090343 弁理士 濱田 百合子
(31) 優先権主張番号	61/666, 981	(74) 代理人	100129160 弁理士 古館 久丹子
(32) 優先日	平成24年7月2日 (2012.7.2)	(74) 代理人	100177460 弁理士 山崎 智子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	清水 清 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗BMP9抗体を有効成分とする、腎性貧血、がん性貧血などの貧血に対する治療剤

(57) 【要約】

本発明は、ヒトBMP9 (Bone morphogenetic protein-9) に結合する、抗BMP9モノクローナル抗体又はその抗体断片、該抗体又は該抗体断片を産生するハイブリドーマ、該抗体又は該抗体断片をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマ又は該形質転換体を用いる該抗体又は該抗体断片の製造方法、該抗体又は該抗体断片を有効成分とする治療薬を提供する。また本発明は、該抗体又は該抗体断片を有効成分として含有する、腎性貧血、がん性貧血などの貧血の治療に使用するための医薬組成物及びそれを用いた腎性貧血、がん性貧血などの貧血の治療方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) ~ (e) から選ばれる 1 の抗体、もしくは該抗体と競合してヒト BMP 9 に結合し、かつ、ヒト BMP 9 への結合解離定数が $1 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 以下であるモノクローナル抗体又は該抗体断片。

(a) 相補鎖決定領域 (complementarity determining region、以下 CDR と記す) 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 54 ~ 56 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖を含み、かつ CDR 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 57 ~ 59 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖を含む抗体

(b) CDR 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 60 ~ 62 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖を含み、かつ CDR 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 63 ~ 65 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖を含む抗体

(c) 配列番号 48 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域を含み、かつ配列番号 51 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域を含む抗体

(d) 配列番号 49 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域を含み、かつ配列番号 52 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域を含む抗体

(e) 配列番号 128 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域を含み、かつ配列番号 132 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域を含む抗体

【請求項 2】

前記 (a) ~ (e) から選ばれる 1 の抗体が結合するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片。

【請求項 3】

遺伝子組換え抗体である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片。

【請求項 4】

ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片。

【請求項 5】

以下の (a) ~ (c) から選ばれる 1 のモノクローナル抗体又は該抗体断片。

(a) CDR 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 54 ~ 56 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖を含み、かつ CDR 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 57 ~ 59 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖を含むモノクローナル抗体及び該抗体断片

(b) CDR 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 60 ~ 62 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖を含み、かつ CDR 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 63 ~ 65 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖を含むモノクローナル抗体及び該抗体断片

(c) 配列番号 128 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域を含み、かつ配列番号 132 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域を含む抗体及び抗体断片

【請求項 6】

配列番号 67 で表されるヒト BMP 9 mature 領域のアミノ酸配列のうち、少なくとも、87 番目 Lys、89 番目 Asp、90 番目 Met、及び 93 番目 Pro に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体及び該抗体断片。

【請求項 7】

Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (scFv)、二量体化 V 領域 (diabody)、ジスルフィド安定化 V 領域 (dsFv) 及び CDR を含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片をコードする DNA。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

請求項 9 に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片を生成蓄積させ、培養物から該抗体又は該抗体断片を採取することを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片の製造方法。

【請求項 1 2】

ヒト BMP 9 に結合し、かつヒト BMP 9 とヒト BMPRII との結合を阻害するモノクローナル抗体又は該抗体断片を有効成分として含有する、BMP 9 が関与する貧血を伴う疾患の治療剤。

10

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片を用いるヒト BMP 9 の免疫学的検出又は測定方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片と薬理的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片を投与することを含む、ヒト BMP 9 が関与する貧血の治療方法。

【請求項 1 6】

ヒト BMP 9 に結合し、かつヒト BMP 9 とヒト BMPRII との結合を阻害するモノクローナル抗体又は該抗体断片を投与することを含む、BMP 9 が関与する貧血の治療方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト BMP 9 (Bone morphogenetic protein - 9) に結合する、抗 BMP 9 モノクローナル抗体又はその抗体断片、該抗体又は該抗体断片を産生するハイブリドーマ、該抗体又は該抗体断片をコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマ又は該形質転換体を用いる該抗体又は該抗体断片の製造方法、該抗体又は該抗体断片を有効成分とする治療薬に関する。

30

【0002】

また本発明は、該抗体又は該抗体断片を有効成分として含有する、腎性貧血、がん性貧血などの貧血の治療に使用するための医薬組成物及びそれを用いた腎性貧血、がん性貧血などの貧血の治療方法に関する。

【背景技術】

【0003】

BMP 9 は、Bone morphogenetic protein 9 の略で、別名 GDF 2 と呼ばれる。BMP 9 は約 20 種類からなる BMP (骨形成タンパク質) ファミリー分子に属し、ヒト BMP 9 は 429 アミノ酸からなる分泌タンパク質である (非特許文献 1)。

40

【0004】

BMP 9 は、胎児期では脊髄または体節間膜で、成体期では肝臓で主に発現し (非特許文献 2、3、4)、ヒト BMP 9 は血液中に 2 - 12 ng / mL の濃度で存在する血中循環因子であることが知られている (非特許文献 5)。

【0005】

生体内における BMP 9 の役割について、これまで BMP 9 欠損マウスまたは動物への抗 BMP 9 抗体投与に基づく報告は行われたことがないが、in vitro の知見に基づく報告はいくつか行われている。例えば、肥大軟骨細胞の形成または間葉細胞から軟骨

50

への分化に対する促進作用の発現（非特許文献6、7、8）、または血液前駆細胞の産生若しくはコロニー形成に対する促進作用の発現（非特許文献9）である。しかしながら、これらの報告から、抗BMP9抗体が生体内における赤血球造血作用を有することを予想することは極めて困難であった。

【0006】

また、抗BMP9モノクローナル抗体として、R&Dシステムズ社よりBMP9に対する中和活性を有するモノクローナル抗体（クローンNo.360107）が市販されているが、その他の抗体は知られていなかった。

【0007】

貧血とは“単位容積血液中の赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値が正常より低下した状態”を指す（非特許文献10）。赤血球産生調節には種々な因子が働くが、最も重要かつ特異的な因子はエリスロポエチン（以下、EPOと表記する）である。

【0008】

EPOは後期赤芽球コロニー形成細胞（colony-forming unit-erythroid: CFU-E）の増殖・分化を促進し、結果的に生体内の赤血球を増加させる（非特許文献10）。EPOは165アミノ酸からなる分子量30kDaの糖タンパク質ホルモンであり、主に腎臓から産生される（非特許文献10）。

【0009】

腎疾患に伴う貧血（腎性貧血）は、EPOの産生組織である腎臓が障害を受けることによりEPOの産生が低下し、赤血球数が低下する、慢性腎疾患（CKD）患者に最も頻度の多い合併症である（非特許文献11）。腎性貧血は、QOLに影響を与えるだけでなく、心血管病変の発症・進展・腎機能障害の進行にも影響を与えることが知られている（非特許文献11、12）。

【0010】

腎性貧血治療薬である遺伝子組換えヒトエリスロポエチンと、最近発売された血中半減期が長い持続型の第二世代EPO製剤は、広くESA（erythropoiesis-stimulating agent）と称される（非特許文献13）。

【0011】

ESAは強力な赤血球造血作用を有するが、腎不全透析患者の15-20%にはESAを投与しても貧血改善効果が乏しい症例が存在する（これをESA抵抗性貧血もしくはESA低反応性貧血と呼ぶ）（非特許文献13）。

【0012】

このようなESA抵抗性を呈する患者へのESAの過剰投与は、生命予後の悪化を引き起こすことが大規模介入臨床試験（CREATE試験及びCHOIR試験）の結果より示されている（非特許文献11、12、13）。このような背景から、ESA抵抗性の克服は腎性貧血治療の大きな課題となっており、EPOとは異なる機序を有する新たな赤血球造血薬の開発が強く望まれている。

【0013】

一方、悪性腫瘍に伴う貧血（がん性貧血）は、種々のがんで認められる症状であり、その原因としては、失血を含む病状の進行に伴うものと、化学療法または放射線療法などに関連したものとの2つがある（非特許文献14）。

【0014】

がん性貧血に対してもESAは有効であることが示されているが、ESA投与によるがん増殖促進の可能性または血栓梗塞症の増加の懸念も指摘されており（非特許文献14）、がん性貧血に対してもEPOとは異なる機序を有する新たな赤血球造血薬の開発が望まれている。

【0015】

上述のように、腎性貧血、及びがん性貧血では、EPOとは異なる機序を有する赤血球造血薬が求められている。当然ながら、薬剤には薬効の強さも必要となる。具体的には、日本のESAの投与開始基準は、透析患者では、ヘモグロビン濃度が10g/dL未満と

10

20

30

40

50

され、薬剤にはヘモグロビン濃度を10 - 11 g / d Lの間にコントロールできる薬効が求められる。一方、保存期慢性腎臓病患者では、11 g / d L未満となった時点とされ、ヘモグロビン濃度を11 - 13 g / d Lの間にコントロールできる薬効が求められる（非特許文献15）。

【0016】

すなわち、新しい赤血球造血薬には、EPO非依存性のほか、ヘモグロビン濃度を少なくとも1 - 2 g / d L上昇させられる程度の薬効という2つの特徴が求められている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】J. Biol. Chem., 280, 26, 25111 (2005)

【非特許文献2】Nat. Biotechnology, 21, 294 (2003)

【非特許文献3】J. Biol. Chem., 275, 24, 17937 (2000)

【非特許文献4】J. Physiology - Paris, 96, 53 (2002)

【非特許文献5】Circ. Res., 102, 8, 914 (2008)

【非特許文献6】Gene Ther., 11, 17, 1312 (2004)

【非特許文献7】J. Biol. Chem., 284, 1, 649 (2009)

【非特許文献8】J. Boneminer. Res., 26, 6, 1166 (2011)

【非特許文献9】Growth Factors, 21, 2, 71 (2003)

【非特許文献10】標準血液病学（医学書院）（2000）

【非特許文献11】血液フロンティア, 18, 2, 17 (2008)

【非特許文献12】腎と透析, 71, 2, 247 (2011)

【非特許文献13】臨床透析, 26, 2, 59 (2010)

【非特許文献14】臨床透析, 26, 2, 276 (2010)

【非特許文献15】日本透析医学会雑誌, 41, 10, 661 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明が解決する課題は、抗BMP9抗体を有効成分とする、治療剤を提供することにより、腎性貧血、がん性貧血などの貧血を改善することにある。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明者らは、抗BMP9抗体の生体内における作用を明らかにする目的で、BMP9欠損マウスを用いて抗BMP9抗体の取得を試みたところ、既存抗体に比して、著しくBMP9に対する結合性が向上した抗BMP9抗体の取得に成功した。

【0020】

更に取得した抗体を用いて、抗BMP9抗体の生体内における作用について鋭意検討した結果、驚くべきことに、それらの抗BMP9抗体には、赤血球造血作用があること、更にその赤血球造血作用は、既存抗体の作用強度より優れていること、それらの抗体はヒトBMP9とヒトBMPRIIの結合を阻害することを見出した。

【0021】

またその作用機序解析から、取得抗体の赤血球造血作用は、血中EPO濃度の上昇を介したのではないこと、すなわちEPOとは異なった機序によるものであることを明らかにした。更に腎性貧血モデルである5/6腎摘ラットを用いた解析から、抗BMP9抗体に、腎性貧血に対する改善作用があることも明らかにした。

【0022】

本発明者らはこれらの知見に基づき、抗BMP9抗体を有効成分とする、腎性貧血、がん性貧血などの貧血に対する治療剤を提供できると考え、本発明を完成させるに至った。

【0023】

すなわち、本発明は以下の(1)～(16)に関する。

10

20

30

40

50

(1) 以下の(a)~(e)から選ばれる1の抗体、もしくは該抗体と競合してヒトBMP9に結合し、かつ、ヒトBMP9への結合解離定数が 1×10^{-10} mol/L以下であるモノクローナル抗体又は該抗体断片。

(a) 相補鎖決定領域(complementarity determining region、以下CDRと記す)1~3がそれぞれ配列番号54~56で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖を含み、かつCDR1~3がそれぞれ配列番号57~59で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖を含む抗体

(b) CDR1~3がそれぞれ配列番号60~62で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖を含み、かつCDR1~3がそれぞれ配列番号63~65で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖を含む抗体

(c) 配列番号48で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域を含み、かつ配列番号51で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域を含む抗体

(d) 配列番号49で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域を含み、かつ配列番号52で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域を含む抗体

(e) 配列番号128で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域を含み、かつ配列番号132で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域を含む抗体

(2) 前記(a)~(e)から選ばれる1の抗体が結合するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、(1)に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片。

(3) 遺伝子組換え抗体である、(1)に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片。

(4) ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、(3)に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片。

(5) 以下の(a)~(c)から選ばれる1のモノクローナル抗体又は該抗体断片。

(a) CDR1~3がそれぞれ配列番号54~56で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖を含み、かつCDR1~3がそれぞれ配列番号57~59で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖を含むモノクローナル抗体及び該抗体断片

(b) CDR1~3がそれぞれ配列番号60~62で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖を含み、かつCDR1~3がそれぞれ配列番号63~65で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖を含むモノクローナル抗体及び該抗体断片

(c) 配列番号128で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域を含み、かつ配列番号132で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域を含む抗体及び抗体断片

(6) 配列番号67で表されるヒトBMP9 mature領域のアミノ酸配列のうち、少なくとも、87番目Lys、89番目Asp、90番目Met、及び93番目Proに結合する、(1)~(5)のいずれか1に記載のモノクローナル抗体及び該抗体断片。

(7) Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(dibody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)及びCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である(1)~(6)のいずれか1に記載の抗体断片。

(8) (1)~(7)のいずれか1に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片をコードするDNA。

(9) (8)に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(10) (9)に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(11) (10)に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に(1)~(7)のいずれか1に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片を生成蓄積させ、培養物から該抗体又は該抗体断片を採取することを特徴とする(1)~(7)のいずれか1に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片の製造方法。

(12) ヒトBMP9に結合し、かつヒトBMP9とヒトBMPRIIとの結合を阻害するモノクローナル抗体又は該抗体断片を有効成分として含有する、BMP9が関与する貧血を伴う疾患の治療剤。

(13) (1)~(7)のいずれか1に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片を用いるヒトBMP9の免疫学的検出又は測定方法。

(14) (1)~(7)のいずれか1に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片と薬理

10

20

30

40

50

学的に許容される担体を含む医薬組成物。

(15)(1)~(7)のいずれか1に記載のモノクローナル抗体又は該抗体断片を投与することを含む、ヒトBMP9が関与する貧血の治療方法。

(16)ヒトBMP9に結合し、かつヒトBMP9とヒトBMPRIIとの結合を阻害するモノクローナル抗体又は該抗体断片を投与することを含む、BMP9が関与する貧血の治療方法。

【発明の効果】

【0024】

本発明の抗体は、既存抗体に比して、著しくBMP9に対する結合性が向上した抗BMP9抗体であり、既存抗体の作用強度より優れた赤血球造血作用を有し、ヒトBMP9とヒトBMPRIIの結合を阻害する。また、本発明の抗体の赤血球造血作用は、血中EPO濃度の上昇を介したものではない。更に、本発明の抗体は、腎性貧血に対する改善作用を有する。このような特性を有する本発明の抗体を有効成分とすることにより、腎性貧血、がん性貧血などの貧血に対する治療剤を提供することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、マウスBMP9遺伝子ノックアウト用ベクターの構造を示す図である。マウス5'ゲノムは、BMP9遺伝子ノックアウトベクター5'相同領域を、Neo^rはネオマイシン耐性遺伝子を、マウス3'ゲノムはBMP9遺伝子ノックアウトベクター3'相同領域を、DT-AはジフテリアトキシンA鎖遺伝子を、T3はT3プロモーターを、T7はT7プロモーターを、pBluescriptはクローニングベクターをそれぞれ表す。

20

【図2】図2は、取得した抗BMP9モノクローナル抗体のヒトBMP9への結合特異性を酵素結合免疫吸着法(ELISA)によって測定した図である。縦軸は吸光度(450-570nm)を示す。固相化した抗原がヒトBMP9の場合を黒、ヒトBMP10の場合を白で示す。

【図3】図3は、取得した抗BMP9モノクローナル抗体のヒトBMP9への結合性をELISAによって測定した図である。横軸に抗体濃度(ng/mL)を、縦軸に各抗体濃度における吸光度(450-570nm)を示す。それぞれ、6D10-1-1抗体は、10D5-2-3抗体は、3B7-3-3抗体は、R&D抗体はで示す。

30

【図4】図4は、取得した抗BMP9モノクローナル抗体のヒトBMP9と標識R&D抗体の結合に対する阻害作用を示す図である。横軸に標識をしていない抗体濃度(ng/mL)を、縦軸に阻害活性(%)を示す。それぞれ、6D10-1-1抗体は、10D5-2-3抗体は、3B7-3-3抗体は、R&D抗体はで示す。

【図5】図5は、取得した抗BMP9モノクローナル抗体のヒトBMP9とBMPRIIの結合に対する阻害作用を示す図である。縦軸は阻害活性(%)を示す。

【図6A】図6Aは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の短期投与(2週間)による、マウス赤血球造血に対する作用を示す図である。図6Aのグラフは赤血球数の変化を示す。グラフの横軸は抗体投与量(mg/kg)を、縦軸は赤血球数($\times 10^4/\mu\text{L}$)を示す。6D10-1-1抗体は、10D5-2-3抗体は、R&D抗体はで示す。図内の0mg/kgの値は媒体投与群のものを、エラーバーは標準誤差(SE、n=6)を示す。

40

【図6B】図6Bは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の短期投与(2週間)による、マウス赤血球造血に対する作用を示す図である。図6Bのグラフはヘモグロビン濃度の変化を示す。グラフの横軸は抗体投与量(mg/kg)を、縦軸はヘモグロビン濃度(g/dL)を示す。6D10-1-1抗体は、10D5-2-3抗体は、R&D抗体はで示す。図内の0mg/kgの値は媒体投与群のものを、エラーバーは標準誤差(SE、n=6)を示す。

【図7A】図7Aは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の長期投与(2ヶ月間)による、マウス赤血球造血に対する作用を示す図である。図7Aのグラフは赤血球数の変化

50

を示す。グラフの縦軸は赤血球数 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$) を示す。図内のエラーバーは標準誤差 (SE、 $n = 8$) を示す。媒体投与群に対する各種抗体投与群の測定値の統計学的有意差検定は Student's t-test を用いて解析し、** は $P < 0.01$ 、*** は $P < 0.001$ を示す。

【図7B】図7Bは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の長期投与(2ヶ月間)による、マウス赤血球造血に対する作用を示す図である。図7Bのグラフはヘモグロビン濃度の変化を示す。グラフの縦軸はヘモグロビン濃度 (g/dL) を示す。図内のエラーバーは標準誤差 (SE、 $n = 8$) を示す。媒体投与群に対する各種抗体投与群の測定値の統計学的有意差検定は Student's t-test を用いて解析し、** は $P < 0.01$ 、*** は $P < 0.001$ を示す。

10

【図8】図8は、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の長期投与による、血中マウスエリスロポエチン (EPO) 濃度に対する影響を示す図である。縦軸はマウスEPO濃度 (pg/mL) を示す。図内のエラーバーは標準誤差 (SE、 $n = 8$) を示す。

【図9A】図9Aは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の短期投与(2週間)による、ラット赤血球造血に対する作用を示す図である。図9Aのグラフは赤血球数の変化を示す。グラフの縦軸は赤血球数 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$) を示す。図内のエラーバーは標準誤差 (SE、 $n = 6$) を示す。媒体投与群に対する各種抗体投与群の測定値の統計学的有意差検定は Student's t-test を用いて解析し、* は $P < 0.05$ 、** は $P < 0.01$ 、*** は $P < 0.001$ を示す。

【図9B】図9Bは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の短期投与(2週間)による、ラット赤血球造血に対する作用を示す図である。図9Bのグラフはヘモグロビン濃度の変化を示す。グラフの縦軸はヘモグロビン濃度 (g/dL) を示す。図内のエラーバーは標準誤差 (SE、 $n = 6$) を示す。媒体投与群に対する各種抗体投与群の測定値の統計学的有意差検定は Student's t-test を用いて解析し、* は $P < 0.05$ 、** は $P < 0.01$ 、*** は $P < 0.001$ を示す。

20

【図10A】図10Aは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の投与による、腎性貧血ラットモデルに対する作用を示す図である。図10Aのグラフは赤血球数の変化を示す。グラフの横軸は抗体投与後の経過時間(週)を示し、グラフの縦軸は赤血球数 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$) を示す。偽手術個体への媒体投与群は、5/6腎摘手術個体への媒体投与群は、5/6腎摘手術個体への6D10-1-1抗体投与群は、5/6腎摘手術個体への10D5-2-3抗体投与群はでそれぞれ示す。図内 0 mg/kg の値は媒体群のものを、エラーバーは標準偏差 (SE、媒体投与群 $n = 5$ 、それ以外の群 $n = 8$) を示す。

30

【図10B】図10Bは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体の投与による、腎性貧血ラットモデルに対する作用を示す図である。図10Bのグラフはヘモグロビン濃度の変化を示す。グラフの横軸は抗体投与後の経過時間(週)を示し、グラフの縦軸はヘモグロビン濃度 (g/dL) を示す。偽手術個体への媒体投与群は、5/6腎摘手術個体への媒体投与群は、5/6腎摘手術個体への6D10-1-1抗体投与群は、5/6腎摘手術個体への10D5-2-3抗体投与群はでそれぞれ示す。図内 0 mg/kg の値は媒体群のものを、エラーバーは標準偏差 (SE、媒体投与群 $n = 5$ 、それ以外の群 $n = 8$) を示す。

40

【図11A】図11Aは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体とヒトBMP9との複合体のヒトBMP10依存性ヒトALK1由来シグナルに対する作用を示す図である。図11Aのグラフは6D10-1-1抗体とヒトBMP9との複合体の結果を示す。グラフの横軸はヒトBMP10の添加濃度を示し、縦軸は相対的なルシフェラーゼ発光量 (Relative Luciferase Unit) を示す。抗BMP9モノクローナル抗体 ($3 \mu\text{g/mL}$) 単独添加群を、抗BMP9モノクローナル抗体 ($3 \mu\text{g/mL}$) と 2 ng/mL ヒトBMP9との複合体添加群を、抗BMP9モノクローナル抗体 ($3 \mu\text{g/mL}$) と 10 ng/mL ヒトBMP9との複合体添加群をで示す。

【図11B】図11Bは、取得した抗BMP9モノクローナル抗体とヒトBMP9との複合体のヒトBMP10依存性ヒトALK1由来シグナルに対する作用を示す図である。図

50

11Bのグラフは10D5-2-3抗体とヒトBMP9との複合体の結果を示す。グラフの横軸はヒトBMP10の添加濃度を示し、縦軸は相対的なルシフェラーゼ発光量(Relative Luciferase Unit)を示す。抗BMP9モノクローナル抗体(3 μ g/mL)単独添加群を、抗BMP9モノクローナル抗体(3 μ g/mL)と2ng/mLヒトBMP9との複合体添加群を、抗BMP9モノクローナル抗体(3 μ g/mL)と10ng/mLヒトBMP9との複合体添加群をで示す。

【図12】図12は作製した10D5-2-3抗体ヒト化抗体の重鎖可変領域を示す。

【図13】図13は作製した10D5-2-3抗体ヒト化抗体の軽鎖可変領域を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、ヒトBMP9に結合するモノクローナル抗体に関する。

【0027】

本発明において、抗体と競合してヒトBMP9に結合する抗体とは、ヒトBMP9に本発明のモノクローナル抗体と同一又は部分的に同一のエピトープ(抗原決定基ともいう)を有し、該エピトープに結合する抗体をいう。

【0028】

本発明のモノクローナル抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体とは、本発明のモノクローナル抗体が認識するヒトBMP9のアミノ酸配列と同じ配列を認識し結合する抗体をいう。

【0029】

ヒトBMP9は、配列番号66で表されるアミノ酸配列を持つ、一本鎖の前駆体タンパク質(Pre-Pro体)として合成される。この一本鎖のPre-Pro体は、配列番号66で表されるアミノ酸配列のうち、ゴルジ体にて、1から22番目までのシグナルペプチド領域が切断された後、392番目に存在するシステイン残基間によるジスルフィド結合を介し、2量体(Pro2量体)を形成する。

【0030】

その後、furin様プロテアーゼにより、配列番号66で表されるアミノ酸配列の319番目と320番目のアミノ酸残基間で切断がおり、ジスルフィド結合を持たないN末側断片のプロペプチド領域(配列番号66で表されるアミノ酸配列のうち、23番目のアミノ酸から319番目のアミノ酸までを含むペプチド)と配列番号67で表されるアミノ酸配列からなるC末側断片(mature領域)に分割される。

【0031】

前記mature領域は、プロペプチド領域の切断後も、配列番号67の73番目に残るシステイン残基間によるジスルフィド結合を介し、2量体を形成する(以下、mature2量体と表記する)。切断されたN末側のプロペプチド領域の2分子は、このmature2量体1分子と非共有結合を介し複合体を形成し、その複合体の形で細胞から分泌される[J. Biol. Chem., 280(26), 25111(2005)]。mature2量体及びmature2量体にN末プロペプチド領域が結合した複合体のいずれも、BMP9の機能を有している。

【0032】

従って、本発明におけるヒトBMP9としては、配列番号66又はGenBankアクセス番号NP_057288で示されるアミノ酸配列のうち、mature領域に相当する320番目から429番目までのアミノ酸配列(配列番号67)を含み、かつヒトBMP9の機能を有するポリペプチド、mature領域に相当する320番目から429番目までのアミノ酸配列(配列番号67)において、1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつヒトBMP9の機能を有するポリペプチド、及び配列番号67で示されるアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトBMP9の機能を有するポリペプチド、ならびに上述のmature2量体、及びmature2量体にN末プロペ

10

20

30

40

50

プチド領域が結合した複合体も包含される。

【0033】

前述のBMP9の機能としては、BMP9の細胞内のシグナル伝達への関与をいう。細胞内のシグナル伝達では、BMP9がTGFスーパーファミリーに属するタイプI及びタイプIIの2つの受容体に結合することにより、当該受容体が活性化され、Smad1/5/8がリン酸化され、さらにリン酸化により活性化されたSmad1/5/8が、Smad4と複合体を形成後、核内に移行し、転写因子として機能する。

【0034】

タイプI受容体としては、ALK1及びALK2が挙げられる。また、タイプII受容体としてはBMPタイプII受容体(BMPRII)、activinタイプIIa受容体(ActRIIa)、及びactivinタイプIIb受容体(ActRIIb)が挙げられる。

10

【0035】

配列番号67で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得る方法としては、部位特異的変異導入法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315(1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488(1985)]などを用いて、例えば、配列番号67で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子に部位特異的変異を導入する方法が挙げられる。

20

【0036】

欠失、置換又は付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個~数十個、例えば、1~20個、より好ましくは1個~数個、例えば、1~5個のアミノ酸である。

【0037】

ヒトBMP9をコードする遺伝子としては、配列番号68又はGenBankアクセッション番号NM_016204で示される塩基配列が挙げられる。そのうち、mature領域に相当する配列番号69で示される塩基配列において、1以上の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなり、かつヒトBMP9の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、配列番号69で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有する塩基配列、好ましくは80%以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつヒトBMP9の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、ならびに配列番号69で示される塩基配列を有するDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAからなり、かつヒトBMP9の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子なども、本発明のヒトBMP9をコードする遺伝子に包含される。

30

40

【0038】

ストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、配列番号69で示される塩基配列を有するDNAをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、又はDNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAを意味する。

【0039】

具体的には、ハイブリダイズしたコロニーもしくはブランク由来のDNA、又は該配列を有するPCR産物又はオリゴDNAを固定化したフィルター又はスライドガラスを用いて、0.7~1.0mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーション

50

ン[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 - 1997)、DNA Cloning 1: Core techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)]を行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルター又はスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAを挙げる事ができる。

10

【0040】

前記ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号69で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げる事ができる。

【0041】

真核生物の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明のBMP9をコードする遺伝子に包含される。

【0042】

本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙げられる。

20

【0043】

デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap) が塩基配列の場合は5、アミノ酸配列の場合は11、-E (Cost to extend gap) が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、-q (Penalty for nucleotide mismatch) が-3、-r (reward for nucleotide match) が1、-e (expect value) が10、-W (wordsize) が塩基配列の場合は11残基、アミノ酸配列の場合は3残基、-y [Dropoff (X) for blast extensions in bits] がblastnの場合は20、blastn以外のプログラムでは7、-X (X dropoff value for gapped alignment in bits) が15及びZ (final X dropoff value for gapped alignment in bits) がblastnの場合は50、blastn以外のプログラムでは25である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

30

40

【0044】

配列番号66又はGenBankアクセッション番号NP_057288で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができ、例えば、配列番号66で示されるアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。

【0045】

また、上記の方法で作製されるポリペプチド又はDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号66又はGenBankアクセッション番号NP_057288で示さ

50

れるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

【0046】

さらに、配列番号66又はGenBankアクセッション番号NP_057288で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチド、又は配列番号66又はGenBankアクセッション番号NP_057288で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)法、t-ブチルオキシカルボニル(tBoc)法などの化学合成法によって製造することもできる。

【0047】

本発明のモノクローナル抗体(以下、本発明の抗体ともいう。)は、ヒトBMP9のアミノ酸配列、又はその立体構造を認識し、かつ結合する抗体又はその抗体断片、もしくはヒトBMP9のアミノ酸配列、又はその立体構造に結合し、BMP9とBMPRIIとの結合を阻害し、BMP9とALK1との結合を阻害しない性質を有している。本発明のモノクローナル抗体としては、ヒトBMP9に結合し、さらに、ヒトBMP9への結合解離定数が 1×10^{-10} mol/L以下であるモノクローナル抗体又は該抗体断片が挙げられる。

【0048】

本発明の抗体としては、具体的には、配列番号67で表されるヒトBMP9 mature領域のアミノ酸配列のうち、少なくとも、84番目Val、95番目Leu、97番目Tyr、及び98番目Hisに結合する抗体、又は、少なくとも、87番目Lys、89番目Asp、90番目Met、及び93番目Proに結合する抗体が挙げられる。より好ましくは、87番目Lys、89番目Asp、90番目Met、及び93番目Proに結合する抗体が挙げられる。

【0049】

本発明におけるヒトBMP9のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号67で表されるヒトBMP9 mature領域のアミノ酸配列を2つ含み、73番目のシステイン残基間がジスルフィド結合を形成しているものが挙げられる。

【0050】

本発明におけるヒトBMP9の立体構造としては、配列番号66、GenBankアクセッション番号NP_057288又は配列番号67で示されるアミノ酸配列を含むヒトBMP9が天然状態でとりうる構造と同等の構造を有していればいずれの構造でもよい。ヒトBMP9が天然状態でとりうる立体構造とは、ヒトBMP9の天然型の立体構造のことをいう。

【0051】

本発明におけるBMPRIIとしては、配列番号70又はGenBankアクセッション番号NP_001195で示されるアミノ酸配列のうち、細胞外領域に相当する27番目から150番目までのアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。

【0052】

本発明におけるALK1としては、配列番号71又はGenBankアクセッション番号AAH42637で示されるアミノ酸配列のうち、細胞外領域に相当する22番目から118番目までのアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。

【0053】

本発明の抗体の結合解離定数(Kd値)は、Biacoreシステム(GE Healthcare社製)を用いて測定したセンサーグラムから、シングルサイクルキネティクス算出法(BIAevaluation Software ver. 3、GE Healthcare社製)により解析することで、算出することができる。

【0054】

前記抗体として、具体的には、以下の(i)~(ii)のモノクローナル抗体及びその抗体断片が挙げられる。

10

20

30

40

50

(i) C D R 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 5 4 ~ 5 6 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖 (以下、H 鎖と記す) を含み、かつ C D R 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 5 7 ~ 5 9 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖 (以下、L 鎖と記す) を含むモノクローナル抗体及びその抗体断片

(i i) C D R 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 6 0 ~ 6 2 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の H 鎖を含み、かつ C D R 1 ~ 3 がそれぞれ配列番号 6 3 ~ 6 5 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の L 鎖を含むモノクローナル抗体及びその抗体断片

【 0 0 5 5 】

また、本発明のモノクローナル抗体としてより具体的には、以下の (a)、(b) 及び (c) のモノクローナル抗体及びその抗体断片が挙げられる。

(a) 配列番号 4 8 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域 (以下、V H と記す) を含み、かつ配列番号 5 1 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域 (以下、V L と記す) を含むモノクローナル抗体及びその抗体断片

(b) 配列番号 4 9 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V H を含み、かつ配列番号 5 2 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V L を含むモノクローナル抗体及びその抗体断片

(c) 配列番号 1 2 8 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V H を含み、かつ配列番号 1 3 2 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V L を含む抗体及びその抗体断片

さらに、本発明のモノクローナル抗体としては、前記モノクローナル抗体が結合するヒト B M P 9 に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体及びその抗体断片を挙げることができる。

【 0 0 5 6 】

本発明の抗体又はその抗体断片が、ヒト B M P 9 のアミノ酸配列、又はその立体構造に結合することは、固相抗原を用いた酵素結合免疫吸着法 (E L I S A) など、ヒト B M P 9 またはヒト B M P 9 を発現した組織に対する公知の免疫学的検出法、特定の抗原と特定抗原に対する抗体の結合性を調べる方法などにより確認することができる。

【 0 0 5 7 】

例えば、B i a c o r e システム (G E H e a l t h c a r e 社製) などを用いた表面プラズモン共鳴、I T C (D K S H 社製) などを用いた等温滴定カロリーメトリーなどの方法が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

抗原に対する抗体の結合解離定数 (K d 値) は、E L I S A、表面プラズモン共鳴、等温滴定カロリーメトリー、いずれの方法からも、スキャッチャード・プロット、または各装置の添付文書に従った解析を行うことで、求めることができる。

【 0 0 5 9 】

また、公知の免疫学的検出法 [M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s - P r i n c i p l e s a n d p r a c t i c e , T h i r d e d i t i o n , A c a d e m i c P r e s s (1 9 9 6) , A n t i b o d i e s - A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y (1 9 8 8) , 単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1 9 8 7)] など を組み合わせることも確認することもできる。

【 0 0 6 0 】

ヒト B M P 9 を発現した組織としては、該 B M P 9 を発現していればいずれの組織でもよく、例えば血液、肝臓などが挙げられる。

【 0 0 6 1 】

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、又は抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体を挙げることができる。

【 0 0 6 2 】

モノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ (抗原決定基ともいう) を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ

10

20

30

40

50

酸配列（１次構造）が均一であることが特徴である。

【 0 0 6 3 】

エピトープとしては、例えば、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列及び糖鎖が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。

【 0 0 6 4 】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒト B M P 9 のアミノ酸配列に結合することが好ましい。

【 0 0 6 5 】

本発明のモノクローナル抗体が結合するエピトープは、ヒト B M P 9 のアミノ酸配列に含まれることが好ましい。

10

【 0 0 6 6 】

ハイブリドーマは、例えば、上記のヒト B M P 9 を抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体生産細胞を誘導し、さらに、該抗体生産細胞と骨髓腫細胞とを融合させることにより、調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、又は該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水がん化させ、該培養液又は腹水を分離、精製することにより抗 B M P 9 モノクローナル抗体を取得することができる。

【 0 0 6 7 】

抗原を免疫する動物としては、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、ニワトリ又はラビットなどが用いられる。また、このような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞に *in vitro* で免疫を施した後に、骨髓腫細胞と融合して作製したハイブリドーマが生産する抗体なども本発明の抗体に包含される。

20

【 0 0 6 8 】

本発明における遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 C D R 移植抗体、ヒト抗体又は抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。遺伝子組換え抗体は、例えば上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものが挙げられる。

【 0 0 6 9 】

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の V H 及び V L とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、C H と記す）及び軽鎖定常領域（以下、C L と記す）からなる抗体をいう。本発明のヒト型キメラ抗体は、前記のハイブリドーマより、V H 及び V L をコードする c D N A を取得し、ヒト抗体の C H 及び C L をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

30

【 0 0 7 0 】

ヒト型キメラ抗体の C H としては、ヒトイムノグロブリン（以下、h I g と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、好ましくは h I g G クラスのものが用いられ、さらに h I g G クラスに属する h I g G 1、h I g G 2、h I g G 3 又は h I g G 4 といったサブクラスの内いずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の C L としては、h I g に属すればいずれのものでもよく、 μ クラス又は λ クラスのものをを用いることができる。

40

【 0 0 7 1 】

本発明のヒト型キメラ抗体として具体的には、配列番号 4 8 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V H を含み、配列番号 5 1 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V L を含むキメラ抗体が挙げられる。また、配列番号 4 9 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V H を含み、配列番号 5 2 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V L を含むキメラ抗体が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

50

ヒト型 C D R 移植抗体とは、ヒト化抗体という場合もあり、ヒト以外の動物の抗体の V H 及び V L の C D R のアミノ酸配列をヒト抗体の V H 及び V L の適切な位置に移植した抗体をいう。本発明のヒト型 C D R 移植抗体は、ヒト B M P 9 を特異的に認識し、かつヒト B M P 9 のアミノ酸配列、又はその立体構造に結合するヒト以外の動物のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから産生されるヒト以外の動物の抗体の V H 及び V L の C D R のアミノ酸配列を任意のヒト抗体の V H 及び V L のフレームワーク領域（以下、F R と表記する）に移植した可変領域（以下、V 領域と表記する）をコードする c D N A を構築し、ヒト抗体の C H 及び C L をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 C D R 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

10

【0073】

ヒト型 C D R 移植抗体の C H としては、h I g に属すればいかなるものでもよいが、好ましくは h I g G クラスのものが用いられ、さらに h I g G クラスに属する h I g G 1、h I g G 2、h I g G 3 又は h I g G 4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 C D R 移植抗体の C L としては、h I g に属すればいずれのものでもよく、クラス又は クラスのものをを用いることができる。

【0074】

本発明のヒト型 C D R 移植抗体として具体的には、C D R 1 ~ 3 が配列番号 5 4 ~ 5 6 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V H を含み、かつ C D R 1 ~ 3 が配列番号 5 7 ~ 5 9 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V L を含むヒト化抗体が挙げられる。また、C D R 1 ~ 3 が配列番号 6 0 ~ 6 2 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V H を含み、かつ C D R 1 ~ 3 が配列番号 6 3 ~ 6 5 で表されるアミノ酸配列を含む抗体の V L を含むヒト化抗体が挙げられる。

20

【0075】

本発明のヒト化抗体として、具体的には、以下の (a) V H 及び (b) V L の少なくとも一方を含むヒト化抗体が挙げられる。

(a) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列、又は配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列の 8 番目の G l y、1 8 番目の L e u、4 9 番目の G l y、7 9 番目の A s n、8 1 番目の L e u、9 4 番目の A l a、9 5 番目の V a l、9 9 番目の A l a、及び 1 0 0 番目の A r g から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の V H

30

(b) 配列番号 1 1 8 のアミノ酸配列、又は配列番号 1 1 8 アミノ酸配列中の 4 番目の M e t、4 0 番目の T y r、8 1 番目の S e r、8 2 番目の L e u、8 9 番目の V a l、及び 9 1 番目の T y r から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の V L

【0076】

更に、本発明のヒト化抗体に含まれる V H としては、以下の (1) ~ (6) が好ましい。

(1) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の 8 番目の G l y、1 8 番目の L e u、4 9 番目の G l y、7 9 番目の A s n、8 1 番目の L e u、9 4 番目の A l a、9 5 番目の V a l、9 9 番目の A l a、及び 1 0 0 番目の A r g が、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む V H

40

(2) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の 8 番目の G l y、1 8 番目の L e u、4 9 番目の G l y、8 1 番目の L e u、9 4 番目の A l a、9 9 番目の A l a、及び 1 0 0 番目の A r g が、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む V H

(3) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の 8 番目の G l y、1 8 番目の L e u、4 9 番目の G l y、7 9 番目の A s n、9 4 番目の A l a、9 9 番目の A l a、及び 1 0 0 番目の A r g が、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む V H

(4) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の 4 9 番目の G l y、9 5 番目の V a l、9 9 番目の A l a、及び 1 0 0 番目の A r g が、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を

50

含むV H

(5) 配列番号116のアミノ酸配列中の8番目のG l y、18番目のL e u、79番目のA s n、及び100番目のA r gが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むV H

(6) 配列番号116のアミノ酸配列中の49番目のG l y、99番目のA l a、及び100番目のA r gが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むV H

【0077】

前記V Hのアミノ酸配列としては、例えば、配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のG l yをA r gに、18番目のL e uをM e tに、49番目のG l yをA l aに、79番目のA s nをS e rに、81番目のL e uをV a lに、94番目のA l aをG l yに、95番目のV a lをI l eに、99番目のA l aをT h rに、又は100番目のA r gをG l yに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列が挙げられる。

【0078】

9個の改変が導入されたV Hのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のG l yをA r gに、18番目のL e uをM e tに、49番目のG l yをA l aに、79番目のA s nをS e rに、81番目のL e uをV a lに、94番目のA l aをG l yに、95番目のV a lをI l eに、99番目のA l aをT h rに、及び100番目のA r gをG l yに置換したアミノ酸配列が挙げられる。

【0079】

8個の改変が導入されたV Hのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)~(9)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号116のアミノ酸配列中の、18番目のL e uをM e tに、49番目のG l yをA l aに、79番目のA s nをS e rに、81番目のL e uをV a lに、94番目のA l aをG l yに、95番目のV a lをI l eに、99番目のA l aをT h rに、及び100番目のA r gをG l yに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のG l yをA r gに、49番目のG l yをA l aに、79番目のA s nをS e rに、81番目のL e uをV a lに、94番目のA l aをG l yに、95番目のV a lをI l eに、99番目のA l aをT h rに、及び100番目のA r gをG l yに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のG l yをA r gに、18番目のL e uをM e tに、79番目のA s nをS e rに、81番目のL e uをV a lに、94番目のA l aをG l yに、95番目のV a lをI l eに、99番目のA l aをT h rに、及び100番目のA r gをG l yに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のG l yをA r gに、18番目のL e uをM e tに、49番目のG l yをA l aに、81番目のL e uをV a lに、94番目のA l aをG l yに、95番目のV a lをI l eに、99番目のA l aをT h rに、及び100番目のA r gをG l yに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のG l yをA r gに、18番目のL e uをM e tに、49番目のG l yをA l aに、79番目のA s nをS e rに、94番目のA l aをG l yに、95番目のV a lをI l eに、99番目のA l aをT h rに、及び100番目のA r gをG l yに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のG l yをA r gに、18番目のL e uをM e tに、49番目のG l yをA l aに、79番目のA s nをS e rに、81番目のL e uをV a lに、95番目のV a lをI l eに、99番目のA l aをT h rに、及び100番目のA r gをG l yに置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号116アミノ酸配列中の、8番目のG l yをA r gに、18番目のL e uをM e tに、49番目のG l yをA l aに、79番目のA s nをS e rに、81番目のL e uをV a lに、94番目のA l aをG l yに、99番目のA l aをT h rに、及び100番目のA r gをG l yに置換したアミノ酸配列

10

20

30

40

50

(8) 配列番号 1 1 6 アミノ酸配列中の、 8 番目の G l y を A r g に、 1 8 番目の L e u を M e t に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 7 9 番目の A s n を S e r に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 5 番目の V a l を I l e に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(9) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 8 番目の G l y を A r g に、 1 8 番目の L e u を M e t に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 7 9 番目の A s n を S e r に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 5 番目の V a l を I l e に、 及び 9 9 番目の A l a を T h r に置換したアミノ酸配列

【 0 0 8 0 】

7 個の改変が導入された V H のアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の (1) ~ (8) のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 8 番目の G l y を A r g に、 1 8 番目の L e u を M e t に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 8 番目の G l y を A r g に、 1 8 番目の L e u を M e t に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 7 9 番目の A s n を S e r に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 8 番目の G l y を A r g に、 1 8 番目の L e u を M e t に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 8 番目の G l y を A r g に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 7 9 番目の A s n を S e r に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 8 番目の G l y を A r g に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 5 番目の V a l を I l e に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 1 8 番目の L e u を M e t に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 7 9 番目の A s n を S e r に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 1 8 番目の L e u を M e t に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 5 番目の V a l を I l e に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(8) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 4 9 番目の G l y を A l a に、 7 9 番目の A s n を S e r に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 5 番目の V a l を I l e に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

【 0 0 8 1 】

6 個の改変が導入された V H のアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の (1) ~ (7) のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 1 8 番目の L e u を M e t に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列中の、 8 番目の G l y を A r g に、 4 9 番目の G l y を A l a に、 7 9 番目の A s n を S e r に、 8 1 番目の L e u を V a l に、 9 4 番目の A l a を G l y に、 9 5 番目の V a l を I l e に、 9 9 番目の A l a を T h r に、 及び 1 0 0 番目の A r g を G l y に置換したアミノ酸配列

10

20

30

40

50

yをAlaに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、18番目のLeuをMetに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、18番目のLeuをMetに、49番目のGlyをAlaに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、18番目のLeuをMetに、49番目のGlyをAlaに、81番目のLeuをValに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、18番目のLeuをMetに、49番目のGlyをAlaに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、18番目のLeuをMetに、49番目のGlyをAlaに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、及び99番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

【0082】

5個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)~(6)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、18番目のLeuをMetに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号116のアミノ酸配列中の、18番目のLeuをMetに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号116のアミノ酸配列中の、18番目のLeuをMetに、49番目のGlyをAlaに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、49番目のGlyをAlaに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

【0083】

4個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)~(7)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、18番目のLeuをMetに、79番目のAsnをSerに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、95番目のValをIleに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号116のアミノ酸配列中の、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

10

20

30

40

50

(4) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、81番目のLeuをValに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、及び99番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

10

【0084】

3個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)~(6)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、81番目のLeuをValに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、94番目のAlaをGlyに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

20

(4) 配列番号116のアミノ酸配列中の、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号116のアミノ酸配列中の、81番目のLeuをValに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号116のアミノ酸配列中の、94番目のAlaをGlyに、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

【0085】

2個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)~(12)のアミノ酸配列が挙げられる。

30

(1) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号116のアミノ酸配列中の、18番目のLeuをMetに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号116のアミノ酸配列中の、81番目のLeuをValに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号116のアミノ酸配列中の、94番目のAlaをGlyに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

40

(6) 配列番号116のアミノ酸配列中の、99番目のAlaをThrに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、及び49番目のGlyをAlaに置換したアミノ酸配列

(8) 配列番号116のアミノ酸配列中の、18番目のLeuをMetに、及び49番目のGlyをAlaに置換したアミノ酸配列

(9) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、及び81番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列

(10) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、及び94番目のAlaをGlyに置換したアミノ酸配列

50

(11) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、及び99番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

(12) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに、及び100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

【0086】

1個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)~(9)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号116のアミノ酸配列中の、18番目のLeuをMetに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号116のアミノ酸配列中の、49番目のGlyをAlaに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号116のアミノ酸配列中の、79番目のAsnをSerに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号116のアミノ酸配列中の、81番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号116のアミノ酸配列中の、94番目のAlaをGlyに置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号116のアミノ酸配列中の、95番目のValをIleに置換したアミノ酸配列

(8) 配列番号116のアミノ酸配列中の、99番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

(9) 配列番号116のアミノ酸配列中の、100番目のArgをGlyに置換したアミノ酸配列

【0087】

また、本発明のヒト化抗体に含まれるVLとしては、以下の(1)~(4)が好ましい。

(1) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMet、40番目のTyr、81番目のSer、82番目のLeu、89番目のVal、及び91番目のTyrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体のVL

(2) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMet、81番目のSer、82番目のLeu、及び89番目のValが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体のVL

(3) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyr、81番目のSer、及び91番目のTyrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体のVL

(4) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyr、及び91番目のTyrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体のVL

【0088】

前記VLのアミノ酸配列としては、例えば、配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、又は91番目のTyrをPheに置換する変更から選ばれる少なくとも1つの変更が導入されたアミノ酸配列が挙げられる。

【0089】

6個の変更が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列が挙げられる。

【0090】

10

20

30

40

50

5個の変更が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(6)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、40番目のTyrをPheに、82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列

【0091】

4個の変更が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(6)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号118のアミノ酸配列中の81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列

【0092】

3個の変更が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(6)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、82番目のLeuをMetに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、82番目のLeuをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

10

20

30

40

50

- (4) 配列番号118のアミノ酸配列中の82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列
- (5) 配列番号118のアミノ酸配列中の81番目のSerをProに、89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列
- (6) 配列番号118のアミノ酸配列中の81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列

【0093】

2個の変更が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)~(10)のアミノ酸配列が挙げられる。

- (1) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、及び81番目のSerをProに置換したアミノ酸配列 10
- (2) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、及び82番目のLeuをMetに置換したアミノ酸配列
- (3) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列
- (4) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列
- (5) 配列番号118のアミノ酸配列中の81番目のSerをProに、及び82番目のLeuをMetに置換したアミノ酸配列
- (6) 配列番号118のアミノ酸配列中の81番目のSerをProに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列 20
- (7) 配列番号118のアミノ酸配列中の81番目のSerをProに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列
- (8) 配列番号118のアミノ酸配列中の82番目のLeuをMetに、及び89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列
- (9) 配列番号118のアミノ酸配列中の82番目のLeuをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列
- (10) 配列番号118のアミノ酸配列中の89番目のValをMetに、及び91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

【0094】

1個の変更が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)~(6)のアミノ酸配列が挙げられる。

- (1) 配列番号118のアミノ酸配列中の4番目のMetをLeuに置換したアミノ酸配列 30
- (2) 配列番号118のアミノ酸配列中の40番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列
- (3) 配列番号118のアミノ酸配列中の81番目のSerをProに置換したアミノ酸配列
- (4) 配列番号118のアミノ酸配列中の82番目のLeuをMetに置換したアミノ酸配列 40
- (5) 配列番号118のアミノ酸配列中の89番目のValをMetに置換したアミノ酸配列
- (6) 配列番号118のアミノ酸配列中の91番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

【0095】

また、本発明のヒト化抗体の具体例としては、抗体のVHが配列番号116及び/又は抗体のVLが配列番号118のアミノ酸配列を含むヒト化抗体、抗体のVHが配列番号116及び/又は抗体のVLが図12で示されるいずれかのアミノ酸配列を含むヒト化抗体、又は、抗体のVHが図11で示されるいずれかのアミノ酸配列及び/又は抗体のVLが配列番号118のアミノ酸配列を含むヒト化抗体などが挙げられる。 50

【0096】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリー及びヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

【0097】

ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルスなどを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。

【0098】

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFvなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的的手法により2本の完全なH鎖及び2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

10

【0099】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞をマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体は、通常

20

【0100】

のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法を用い、ヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることにより作製できる。

【0101】

上述の抗体又は抗体断片を構成するアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸が欠失、付加、置換又は挿入され、かつ上述の抗体又はその抗体断片と同様な活性を有するモノクローナル抗体又はその抗体断片も、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片に含まれる。

【0101】
欠失、置換、挿入及び/又は付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、部位特異的変異導入法 [Molecular Cloning 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] などの周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数である。例えば、好ましくは1~数十個、より好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個、特に好ましくは1~5個である。

30

40

【0102】

上記の抗体のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたとは、次のことを示す。即ち、同一配列中の任意、かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1又は複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入又は付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入又は付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入又は付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。

【0103】

天然型アミノ酸残基としては、例えば、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロ

50

イシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、又はL-システインなどが挙げられる。

【0104】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2、4-ジアミノブタン酸、2、3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

【0105】

本発明において、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(dibody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)及びCDRを含むペプチドなどが挙げられる。

【0106】

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素であるパインで処理して得られる断片のうち(H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0107】

本発明のFabは、本発明のモノクローナル抗体をパインで処理して得ることができる。また、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することもできる。

【0108】

F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域のジスルフィド結合の下部を蛋白質分解酵素であるペプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有する断片である。

【0109】

本発明のF(ab')₂は、本発明のモノクローナル抗体をペプシンで処理して得ることができる。また、下記のFab'をチオエーテル結合又はジスルフィド結合させ、作製することもできる。

【0110】

Fab'は、前記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFab'は、本発明のF(ab')₂をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することもできる。

【0111】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリンカー(以下、Pと表記する)を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0112】

10

20

30

40

50

本発明の s c F v は、本発明のモノクローナル抗体の V H 及び V L をコードする c D N A を取得し、s c F v をコードする D N A を構築し、該 D N A を原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0113】

d i a b o d y は、s c F v が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

【0114】

本発明の d i a b o d y は、本発明のモノクローナル抗体の V H 及び V L をコードする c D N A を取得し、s c F v をコードする D N A をペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように構築し、該 D N A を原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0115】

d s F v は、V H 及び V L 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は既知の方法 [P r o t e i n E n g i n e e r i n g 、 7 、 6 9 7 (1 9 9 4)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

【0116】

本発明の d s F v は、本発明のモノクローナル抗体の V H 及び V L をコードする c D N A を取得し、d s F v をコードする D N A を構築し、該 D N A を原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0117】

C D R を含むペプチドは、V H 又は V L の C D R の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の C D R を含むペプチドは、直接又は適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

【0118】

本発明の C D R を含むペプチドは、本発明のモノクローナル抗体の V H 及び V L の C D R をコードする D N A を構築し、該 D N A を原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、C D R を含むペプチドは、F m o c 法、又は t B o c 法などの化学合成法によって製造することもできる。

【0119】

本発明のモノクローナル抗体には、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質などを化学的又は遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。抗体の誘導体を検出方法、定量方法、検出用試薬、又は定量用試薬として使用する場合には、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片に結合する薬剤として、通常の免疫学的検出又は測定法で用いられる標識体が挙げられる。

【0120】

本発明における、抗体の誘導体は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片の H 鎖又は L 鎖の N 末端側又は C 末端側、抗体又はその抗体断片中の適当な置換基又は側鎖、さらにはモノクローナル抗体又はその抗体断片中の糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質などを化学的手法 [抗体工学入門、地人書館 (1 9 9 4)] により結合させることにより製造することができる。

【0121】

また、本発明における、抗体の誘導体は、本発明のモノクローナル抗体又は抗体断片をコードする D N A と、結合させたい蛋白質をコードする D N A を連結させて発現ベクター

10

20

30

40

50

に挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的手法より製造することができる。

【0122】

放射性同位元素としては、例えば、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 、又は ^{211}At などが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンT法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)などが挙げられる。

【0123】

低分子の薬剤としては、例えば、アクリジニウムエステルもしくはロフィンなどの発光物質、又はフルオレセインイソチオシアネート(FITC)もしくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート(RITC)などの蛍光物質などが挙げられる。

10

【0124】

低分子の薬剤と抗体とを結合させる方法としては、例えば、グルタルアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、又は水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などが挙げられる。

【0125】

高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(以下、PEGと表記する)、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、又はヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。これらの高分子化合物を抗体又は抗体断片に結合させることにより、(1)化学的、物理的又は生物的な種々の因子に対する安定性の向上、(2)血中半減期の顕著な延長、(3)免疫原性の消失又は抗体産生の抑制、などの効果が期待される[バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店(1993)]。例えば、PEGと抗体を結合させる方法としては、PEG化修飾試薬と反応させる方法などが挙げられる[バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店(1993)]。PEG化修飾試薬としては、リジンのe-アミノ基への修飾剤(日本国特開昭61-178926号公報)、アスパラギン酸及びグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤(日本国特開昭56-23587号公報)、又はアルギニンのグアニジノ基への修飾剤(日本国特開平2-117920号公報)などが挙げられる。

20

30

【0126】

蛋白質としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼもしくはルシフェラーゼなどの酵素が挙げられる。

【0127】

また、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を有効成分として含有するBMP9が関与する貧血を伴う疾患の治療剤に関する。

【0128】

BMP9が関与する貧血を伴う疾患としては、血液または造血機能自体に原因がある一次性貧血と、他の病気が原因で引き起こされる二次性貧血が挙げられる。一次性貧血には、鉄欠乏性貧血、巨大赤芽球性貧血、溶血性貧血、再生不良性貧血などがあり、二次性貧血には、腎疾患、感染症(結核、感染性心内膜炎、肝膿瘍など)、膠原病(慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、がんなどの悪性疾患、肝疾患、内分泌疾患などがある。

40

【0129】

がんとしては、例えば、血液がん、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌又は膵臓癌などが挙げられ、好ましくは血液がん、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌又は前立腺癌が挙げられる。

【0130】

血液がんとしては、例えば、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia、AML)、慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leuk

50

emia、CML)、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes、MDS)、多発性骨髄腫(multiple myeloma)、皮膚T細胞性リンパ腫(cutaneous T cell lymphoma、CTCL)、末梢T細胞性リンパ腫(peripheral T cell lymphoma、PTCL)、未分化大細胞型リンパ腫(anaplastic large cell lymphoma、ALCL)、急性リンパ性白血病(acute lymphatic leukemia、ALL)、慢性リンパ性白血病(chronic lymphatic leukemia、CLL)、その他リンパ性白血病、NK細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、又は、バーキットリンパ腫をはじめとする非ホジキンリンパ腫などが挙げられる。

【0131】

肝疾患としては、例えば、慢性肝炎、肝硬変、肝不全などが挙げられ、内分泌疾患としては、例えば、甲状腺機能低下症、副腎皮質機能低下症、下垂体機能低下症、副甲状腺機能亢進症などが挙げられる。

【0132】

本発明の治療剤としては、上述した本発明のモノクローナル抗体又は該抗体断片を有効成分として含有する。

【0133】

本発明の抗体又は該抗体断片、又はこれらの誘導体を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、又はこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0134】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、経口投与、又は口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内もしくは静脈内などの非経口投与が挙げられ、好ましくは静脈内投与もしくは皮下投与を挙げられる。

【0135】

投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、坐剤、注射剤、軟膏、又はテープ剤などが挙げられる。

【0136】

投与量又は投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、及び体重などにより異なるが、通常成人1日当たり10 μ g/kg~10mg/kgである。

【0137】

さらに、本発明は、BMP9のアミノ酸配列、又はその立体構造を特異的に認識し、かつ結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を有効成分として含有する、BMP9の免疫学的検出又は測定方法に関する。

【0138】

本発明においてBMP9の量を検出又は測定する方法としては、任意の公知の方法が挙げられる。例えば、免疫学的検出又は測定方法などが挙げられる。

【0139】

免疫学的検出又は測定方法とは、標識を施した抗原又は抗体を用いて、抗体量又は抗原量を検出又は測定する方法である。免疫学的検出又は測定方法としては、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA又はELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、発光免疫測定法(luminescent immunoassay)、ウェスタンブロット法又は物理化学的手法などが挙げられる。

【0140】

以下に、本発明の抗体の製造方法、疾患の治療方法、及び疾患の診断方法について、具体的に説明する。

1. モノクローナル抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

抗原となるBMP9又はBMP9を発現した組織は、BMP9全長又はその部分長をコ

10

20

30

40

50

ードするcDNAを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、又は動物細胞などに導入することにより、得ることができる。また、BMP9を多量に発現しているヒト組織からBMP9を精製し、得ることが出来る。また、該組織などをそのまま抗原として用いることもできる。さらに、Fmoc法、又はtBoc法などの化学合成法によりBMP9の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。

【0141】

本発明で用いられるBMP9は、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)又はCurrent Protocols in molecular Biology、John Wiley & Sons(1987-1997)などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該BMP9をコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

10

【0142】

まず、BMP9をコードする部分を含む完全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長cDNAの代わりに、完全長cDNAをもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を用いてもよい。次に、得られた該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

20

【0143】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製又は染色体中への組込みが可能で、ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置に、適当なプロモーターを含有しているものであればいずれも用いることができる。

【0144】

宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵母、昆虫細胞、又は動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

【0145】

大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、BMP9をコードする部分を含むDNA、及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

30

【0146】

該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列(SD配列ともいう)と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

【0147】

また、該BMP9をコードするDNAの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするBMP9の生産率を向上させることができる。

40

【0148】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(以上、ロシュ・ダイアグノスティクス社製)、pKK233-2(ファルマシア社製)、pSE280(インビトロジェン社製)、pGEMEX-1(プロメガ社製)、pQE-8(キアゲン社製)、pKYP10(日本国特開昭58-110600号公報)、pKYP200[

50

(1984)]、pLSA1 [Agricbiol. Chem.、53、277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82、4306 (1985)]、pBluescript IISK(-) (ストラタジーン社製)、pTrs30 [大腸菌JM109 / pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [大腸菌JM109 / pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [大腸菌IGHA2 (FERM BP-400) より調製、日本国特開昭60-221091号公報]、pGKA2 [大腸菌IGKA2 (FERM BP6798) より調製、日本国特開昭60-221091号公報]、pTerm2 (米国特許第4686191号明細書、米国特許第4939094号明細書、米国特許第5160735号明細書)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol.、172、2392 (1990)]、pGEX (ファルマシア社製)、pETシステム (ノバジェン社製)、又はpME18SFL3などが挙げられる。

10

【0149】

プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、又はT7プロモーターなどの、大腸菌又はファージなどに由来するプロモーターを挙げることができる。また、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、又はlet Iプロモーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

20

【0150】

宿主細胞としては、例えば、大腸菌XL-1Blue、大腸菌XL2-Blue、大腸菌DH1、大腸菌MC1000、大腸菌KY3276、大腸菌W1485、大腸菌JM109、大腸菌HB101、大腸菌No. 49、大腸菌W3110、大腸菌NY49、又は大腸菌DH5などが挙げられる。

【0151】

宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、69、2110 (1972)、Gene、17、107 (1982)、Molecular & General Genetics、168、111 (1979)] が挙げられる。

30

【0152】

動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pcDNA I、pcDM8 (フナコシ社製)、pAGE107 [日本国特開平3-22979号公報; Cytotechnology、3、133 (1990)]、pAS3-3 (日本国特開平2-227075号公報)、pcDM8 [Nature、329、840 (1987)]、pcDNA I/Amp (インビトロジェン社製)、pcDNA3.1 (インビトロジェン社製)、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103 [J. Biochemistry、101、1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、又はpKANTEX93 (国際公開第97/10354号)などが挙げられる。

40

【0153】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の immediate early (IE) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター、又はモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーターもしくはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0154】

宿主細胞としては、例えば、ヒト白血病細胞 Namalwa細胞、サル細胞COS細胞

50

、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞CHO細胞 (Journal of Experimental Medicine、108、945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA、60、1275 (1968); Genetics、55、513 (1968); Chromosoma、41、129 (1973); Methods in Cell Science、18、115 (1996); Radiation Research、148、260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77、4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA、60、1275 (1968); Cell、6、121 (1975); Molecular Cell Genetics、Appendix I、II (pp. 883-900))、CHO/DG44、CHO-K1 (ATCC番号: CCL-61)、DukXB 11 (ATCC番号: CCL-9096)、Pro-5 (ATCC番号: CCL-1781)、CHO-S (Life Technologies、Cat# 11619)、Pro-3、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (又はYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞NSO、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14、シリアンハムスター細胞BHK又はHBT5637 (日本国特開昭63-000299号公報)、などが挙げられる。

10

【0155】

宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology、3、133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (日本国特開平2-227075号公報)、又はリポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84、7413 (1987)] などが挙げられる。

20

【0156】

以上のようにして得られるBMP9をコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、又は動物細胞などの由来の形質転換体を培地に培養し、培養物中に該BMP9を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、BMP9を製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0157】

真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖又は糖鎖が付加されたBMP9を得ることができる。誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピル-D-チオガラクトピラノシドなどを、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを培地に添加してもよい。

30

【0158】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association、199、519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science、122、501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology、8、396 (1959)]、199培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med.、73、1 (1950)]、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、又はこれら培地に牛胎児血清 (FBS) などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常pH6~8、30~40、5%CO₂存在下などの条件下で1~7日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン又はペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

40

【0159】

BMP9をコードする遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産又は融合蛋白質発現などの方法 [Molecular Cloning、A Laborator

50

y Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor or Laboratory Press (1989)]を用いることができる。

【0160】

BMP9の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、又は宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞、又は生産させるBMP9の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

【0161】

BMP9が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンの方法[J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、日本国特開平05-336963号公報、又は国際公開第94/23021号などに記載の方法を用いることにより、BMP9を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

10

【0162】

また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系(日本国特開平2-227075号公報)を利用してBMP9の生産量を上昇させることもできる。得られたBMP9は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。BMP9が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、又はダイノミルなどを用いて細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

20

【0163】

前記無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、又は等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独又は組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

30

【0164】

BMP9が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該BMP9の不溶体を回収する。回収した該BMP9の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、該BMP9を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0165】

BMP9又はその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該BMP9又はその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

40

【0166】

また、本発明において用いられるBMP9は、Fmoc法、又はtBoc法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンストケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジー・インストルメント社製、シンセル・ベガ社製、パーセプチブ社製、又は島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【0167】

(2) 動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウス、ラット又はハムスターなどの動物に、(1)で得られる抗原を

50

免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で十分な抗体価の上昇が認められない場合には、BMP9ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

【0168】

免疫は、動物の皮下、静脈内又は腹腔内に、例えば、フロインドの完全アジュバント、又は水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA（ウシ血清アルブミン）、又はKLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

【0169】

抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間おきに2～10回行う。各投与後3～7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

【0170】

抗原の最終投与後3～7日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

【0171】

(3) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を用い、例えば、8 - アザグアニン耐性マウス (Balb/C由来) 骨髄腫細胞株 P3 - X63Ag8 - U1 (P3 - U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3 - NS1/1Ag41 (NS - 1) [European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/0 - Ag14 (SP - 2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3 - X63 - Ag8653 (653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、又はP3 - X63 - Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)]などが用いられる。

【0172】

該骨髄腫細胞は、正常培地 [グルタミン、2 - メルカプトエタノール、ジェンタマイシン、FBS、及び8 - アザグアニンを加えたRPMI 1640培地] で継代し、細胞融合の3～4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【0173】

(4) 細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

(2) で得られる融合用抗体産生細胞と(3) で得られる骨髄腫細胞をMinimum Essential Medium (MEM) 培地又はPBS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髄腫細胞 = 5～10：1になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。

【0174】

沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール - 1000 (PEG - 1000)、MEM培地及びジメチルスルホキシドの混液を37 で、攪拌しながら加える。さらに1～2分間毎にMEM培地1～2mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにする。遠心分離後、上清を除く。沈澱した細胞群をゆるやかにほぐした後、融合用抗体産生細胞にHAT培地 [ヒポキサンチン、チミジン、及びアミノプテリンを加えた正常培地] 中にゆるやかに細胞を懸濁する。この懸濁液を5%CO₂インキュベーター中、37 で7～14日間培養する。

【0175】

10

20

30

40

50

培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のバインディングアッセイなどのハイブリドーマの選択方法により、BMP9を含む抗原に反応し、BMP9を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し[1回目はHT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

【0176】**(5) 精製モノクローナル抗体の調製**

プリスタン処理[2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(Pristane) 0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する]した8~10週令のマウス又はヌードマウスに、(4)で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。10~21日でハイブリドーマは腹水がんに化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、40~50%硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラム又はゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgG又はIgM画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

10

【0177】

また、(4)で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、10%FBS添加を添加したRPMI1640培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Hybridoma-SFM培地に懸濁し、3~7日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテインA-カラム又はプロテインG-カラムによる精製を行ない、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Hybridoma-SFM培地には5%ダイゴGF21を添加することもできる。

20

【0178】

抗体のサブクラスの設定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法又は280nmでの吸光度より算出する。

【0179】**(6) モノクローナル抗体の選択**

モノクローナル抗体の選択は以下に示す酵素免疫測定法によるバインディングアッセイ、及びBiacoreによるkinetics解析により行う。

(6-a) バインディングアッセイ

30

抗原としては、(1)で得られるBMP9をコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、又は動物細胞などに導入して得られた遺伝子導入細胞、リコンビナント蛋白質、又はヒト組織から得た精製ポリペプチド又は部分ペプチドなどを用いる。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA又はKLHなどのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製して、これを用いても良い。

【0180】

抗原を96ウェルプレートなどのプレートに分注し、固相化した後、第1抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清又は精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。PBS又はPBS-Tweenなどでよく洗浄した後、第2抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質又は放射線化合物などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。PBS-Tweenでよく洗浄した後、第2抗体の標識物質に応じた反応を行ない、免疫原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

40

【0181】

また、本発明のモノクローナル抗体は、上述のバインディングアッセイ系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被検抗体を加えた時にモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、BMP9のアミノ酸配列、又はその立体構造への結合について、取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

【0182】

さらに、本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープと、同じエピトープに結合

50

する抗体は、上述のバインディングアッセイ系で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの、部分的な合成ペプチド、又はエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

【0183】

(6-b) Biacoreによるkinetics解析

Biacore T100を用い、抗原と被験物の間の結合におけるkineticsを測定し、その結果を機器付属の解析ソフトウェアで解析をする。抗マウスIgG抗体をセンサーチップCM5にアミンカップリング法により固定した後、ハイブリドーマ培養上清又は精製モノクローナル抗体などの被験物質を流し、適当量結合させ、さらに濃度既知の複数濃度の抗原を流し、結合、解離を測定する。

10

【0184】

得られたデータを機器付属のソフトウェアを用い、1:1バインディングモデルによりkinetics解析を行い、各種パラメータを取得する。又は、ヒトBMP9をセンサーチップ上に、例えばアミンカップリング法により固定した後、濃度既知の複数濃度の精製モノクローナル抗体を流し、結合、解離を測定する。得られたデータを機器付属のソフトウェアを用い、パイバレントバインディングモデルによりkinetics解析を行い、各種パラメータを取得する。

【0185】

2. 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の作製方法を示す。

20

【0186】

(1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体のCH及びCLをコードするDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCH及びCLをコードするDNAをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0187】

ヒト抗体の定常領域(以下、C領域と表記する)は任意のヒト抗体のCH及びCLを用いることができる。例えば、ヒト抗体の1サブクラスのCH及びクラスのCLなどを用いる。ヒト抗体のCH及びCLをコードするDNAには、cDNAを用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることもできる。

30

【0188】

動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnol., 3, 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)], pSG1bd2-4 [Cytotechnol., 4, 173 (1990)], 又はpSE1UK1Sed1-3 [Cytotechnol., 13, 79 (1993)]などを用いる。

40

【0189】

動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーには、SV40の初期プロモーター [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], モロニー Maus 白血病ウイルスLTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)], 又は免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] などを用いる。

【0190】

遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ

50

、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体H鎖及びL鎖が同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム型)の遺伝子組換え抗体発現用ベクター[J. Immunol. Methods、167、271(1994)]を用いるが、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプを用いることもできる。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、pKANTEX93(国際公開第97/10354号公報)、pEE18[Hybridoma、17、559(1998)]などを用いる。

【0191】

(2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得及びアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のVH及びVLをコードするcDNAの取得及びアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。

【0192】

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ又はプラスミドなどのベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。

【0193】

前記ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分又はV領域部分をコードするDNAをプローブとして用い、VH又はVLをコードするcDNAを有する組換えファージ又は組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ又は組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVH又はVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVH又はVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

【0194】

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスター、又はラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

【0195】

ハイブリドーマ細胞からの全RNAの調製には、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法[Methods in Enzymol.、154、3(1987)]、又はRNA easy kit(キアゲン社製)などのキットなどを用いる。

【0196】

全RNAからのmRNAの調製には、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法[Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]、又はOligo-dT30<Super>mRNA Purification Kit(タカラバイオ社製)などのキットなどを用いる。また、Fast Track mRNA Isolation Kit(インビトロジェン社製)、又はQuick Prep mRNA Purification Kit(ファルマシア社製)などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からmRNAを調製することもできる。

【0197】

cDNAの合成及びcDNAライブラリーの作製には、公知の方法[Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Current Protocols in Molecular Biology、Supplement 1、John Wiley & Sons(1987-1997)]、又はSperScript plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(インビトロジェン社製)、又はZAP-cDNA Synthesis Kit(ストラタジーン社製)などのキットなどを用いる。

10

20

30

40

50

【0198】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターには、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [Strategies、5、58 (1992)]、pBluescript IISK (+) [Nucleic Acids Research、17、9494 (1989)]、ZAPII (ストラタジーン社製)、gt10、gt11 [DNA Cloning: A Practical Approach、I、49 (1985)]、Lambda BlueMid (クローンテック社製)、Ex Cell、pT7T3-18U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol.、3、280 (1983)]、又はpUC18 [Gene、33、103 (1985)]などを用いる。

10

【0199】

ファージ又はプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌には、該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL-1Blue MRF [Strategies、5、81 (1992)]、C600 [Genetics、39、440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science、222、778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol.、166、1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol.、16、118 (1966)]、又はJM105 [Gene、38、275 (1985)]などを用いる。

20

【0200】

cDNAライブラリーからの非ヒト抗体のVH又はVLをコードするcDNAクローンの選択には、アイソトープ又は蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、又はブランク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]などを用いる。

【0201】

また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA又はcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction法 [以下、PCR法と表記する、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987 - 1997)]を行うことよりVH又はVLをコードするcDNAを調製することもできる。

30

【0202】

選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK (-) (ストラタジーン社製)などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該cDNAの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、74、5463 (1977)]などの反応を行った後、ABI PRISM3700 (PEバイオシステムズ社製)又はA.L.F. DNAシーケンサー (ファルマシア社製)などの塩基配列自動分析装置などを用いる。

40

【0203】

決定した塩基配列からVH及びVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列 [A.L.F. DNA, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。

50

【0204】

分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列[A.L.F.DNA、US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、さらにはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH及びVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVH及びVLのアミノ酸配列[A.L.F.DNA、US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することによって見出すことができる。

【0205】

また、得られたVH及びVLの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、SWISS-PROT又はPIR-Proteinなどの任意のデータベースに対してBLAST法[J. Mol. Biol.、215、403 (1990)]などの同源性検索を行い、VH及びVLの完全なアミノ酸配列が新規なものかを確認できる。

【0206】

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクターのヒト抗体のCH又はCLをコードするそれぞれの遺伝子の5'上流に、それぞれ非ヒト抗体のVH又はVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

【0207】

非ヒト抗体のVH又はVLをコードするcDNAの3'末端側と、ヒト抗体のCH又はCLの5'末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したVH及びVLのcDNAを作製する。

【0208】

作製されたVH及びVLのcDNAを、(1)で得られるヒト型CDR移植抗体発現ベクターのヒト抗体のCH又はCLをコードするそれぞれの遺伝子の5'上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

【0209】

また、非ヒト抗体VH又はVLをコードするcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法によりそれぞれ増幅し、(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクターにクローニングすることもできる。

【0210】

(4) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVH又はVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。

【0211】

非ヒト抗体のVH又はVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVH又はVLのFRのアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するFRのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。

【0212】

例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のFRのアミノ酸配列、又はヒト抗体のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[A.L.F.DNA、US Dept. Health and Human Services (1991)]などを用いる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のVH又はVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い同源性(少なくとも60%以上)のFRのアミノ酸配列を選択する。

【0213】

次に、選択したヒト抗体のVH又はVLのFRのアミノ酸配列に、もとの抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト型CDR移植抗体のVH又はVLのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[A.L.F.DNA、US Dept. Health and Human Services(1991)]を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVH又はVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列をそれぞれ設計する。

【0214】

設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR反応を行う。この場合、PCR反応での反応効率及び合成可能なDNAの長さから、好ましくはH鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計する。

10

【0215】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1)で得られるヒト型CDR移植抗体発現用ベクターに容易にヒト型CDR移植抗体のVH又はVLをコードするcDNAをクローニングすることができる。

【0216】

又は、設計したDNA配列に基づき、1本のDNAとして合成された各H鎖、L鎖全長合成DNAを用いることで実施できる。

【0217】

PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK(-)(ストラタジーン社製)などのプラスミドにそれぞれクローニングし、(2)に記載の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のVH又はVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

20

【0218】

(5)ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、非ヒト抗体のVH及びVLのCDRのみをヒト抗体のVH及びVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する[BIO/TECHNOLOGY、9、266(1991)]。

【0219】

ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、及び抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

30

【0220】

抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を同定するために、X線結晶解析[J.Mol.Biol.、112、535(1977)]又はコンピューターモデリング[Protein Engineering、7、1501(1994)]などを用いることにより、抗体の立体構造の構築及び解析を行うことができる。また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有する改変ヒト型CDR移植抗体を取得できる。

40

【0221】

ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて(4)に記載のPCR反応を行うことにより、改変させることができる。PCR反応後の増幅産物について(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

【0222】

(6)ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH又はCLをコードするそれぞれの遺伝子上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVH又はVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築すること

50

ができる。

【0223】

例えば、(4)及び(5)で得られるヒト型CDR移植抗体のVH又はVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1)で得られるヒト型CDR移植抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH又はCLをコードするそれぞれの遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

【0224】

(7) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

(3)及び(6)で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、又はそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類のヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

10

【0225】

発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばCOS-7細胞(ATCC番号:CRL1651)を用いる[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283(1991)]。COS-7細胞への発現ベクターの導入には、DEAE-デキストラン法[Methods in Nucleic Acid Res., CRC Press, (1991)]、又はリポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)]などを用いる。

20

【0226】

発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法[Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)]などを用いて測定する。

【0227】

(8) 遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製

(3)及び(6)で得られた遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

30

【0228】

宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法[日本国特開平2-257891号公報、Cytotechnology, 3, 133(1990)]などを用いる。遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

【0229】

例えば、CHO-K1(ATCC番号:CCL-61)、DUkXB11(ATCC番号:CCL-9096)、Pro-5(ATCC番号:CCL-1781)、CHO-S(Life Technologies, Cat#11619)、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(又はYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞NSO、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14(ATCC番号:CRL1581)、マウスP3-X63-Ag8653細胞(ATCC番号:CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子が欠損したCHO細胞[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)]、レクチン耐性を獲得したLec13[Somatic cell and Molecular Genetics, 12, 55(1986)]、1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞(国際公開第2005/035586号、国際公開第02/31140号)、ラットYB2/3HL

40

50

・ P 2 . G 1 1 . 1 6 A g . 2 0 細胞 (A T C C 番号 : C R L 1 6 6 2) などを用いる。

【 0 2 3 0 】

発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、G 4 1 8 硫酸塩などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する (日本国特開平 2 - 2 5 7 8 9 1 号公報) 。

【 0 2 3 1 】

動物細胞培養用培地には、R P M I 1 6 4 0 培地 (インビトロジェン社製)、G I T 培地 (日本製薬社製)、E X - C E L L 3 0 1 培地 (ジェイアールエイチ社製)、I M D M 培地 (インビトロジェン社製)、H y b r i d o m a - S F M 培地 (インビトロジェン社製)、又はこれら培地に F B S などの各種添加物を添加した培地などを用いる。

10

【 0 2 3 2 】

得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は E L I S A 法などにより測定できる。また、形質転換株は、D H F R 増幅系 (日本国特開平 2 - 2 5 7 8 9 1 号公報) などを利用して遺伝子組換え抗体の発現量を上昇させることができる。

【 0 2 3 3 】

遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A - カラムを用いて精製する [M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s - P r i n c i p l e s a n d p r a c t i c e , T h i r d e d i t i o n , A c a d e m i c P r e s s (1 9 9 6) , A n t i b o d i e s - A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y (1 9 8 8)] 。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過などの蛋白質の精製で用いられる方法を組み合わせることできる。

20

【 0 2 3 4 】

精製した遺伝子組換え抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 [N a t u r e , 2 2 7 , 6 8 0 (1 9 7 0)]、又はウェスタンブロッティング法 [M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s - P r i n c i p l e s a n d p r a c t i c e , T h i r d e d i t i o n , A c a d e m i c P r e s s (1 9 9 6) , A n t i b o d i e s - A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y (1 9 8 8)] など用いて測定することができる。

30

【 0 2 3 5 】

3 . 精製モノクローナル抗体又はその抗体断片の活性評価

精製した本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。

【 0 2 3 6 】

B M P 9 及び B M P 9 発現組織に対する結合活性は、前述の 1 - (6 - a) 記載のバインディングアッセイ及び (6 - b) 記載の B i a c o r e システムなどを用いた表面プラズモン共鳴法を用いて測定する。また、蛍光抗体法 [C a n c e r I m m u n o l . I m m u n o t h e r . , 3 6 , 3 7 3 (1 9 9 3)] などを用いて測定できる。

40

【 0 2 3 7 】

4 . 本発明の抗 B M P 9 モノクローナル抗体又はその抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、B M P 9 が関与する貧血を伴う疾患の治療に用いることができる。

【 0 2 3 8 】

本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片、又はこれらの誘導体を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、又はこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される 1 以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

【 0 2 3 9 】

50

投与経路としては、例えば、経口投与、又は口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内もしくは静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、坐剤、注射剤、軟膏、又はテープ剤などが挙げられる。

【0240】

経口投与に適切な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、又は顆粒剤などが挙げられる。

【0241】

乳剤又はシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトールもしくは果糖などの糖類、ポリエチレングリコールもしくはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油もしくは大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、又はストロベリーフレーバーもしくはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

10

【0242】

カプセル剤、錠剤、散剤又は顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖もしくはマンニトールなどの賦形剤、デンプンもしくはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムもしくはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロースもしくはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤又はグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

【0243】

非経口投与に適切な製剤としては、例えば、注射剤、坐剤又は噴霧剤などが挙げられる。

20

【0244】

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、又はその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。

坐剤はカカオ脂、水素化脂肪又はカルボン酸などの担体を用いて製造する。

【0245】

噴霧剤は受容者の口腔及び気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖又はグリセリンなどを用いる。また、エアロゾル又はドライパウダーとして製造することもできる。

30

【0246】

さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適切な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0247】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。使用する試薬類は、特に記載がない限り、添付文書に従い使用するものとする。

【実施例】

【0248】

40

[実施例1]

マウスBMP9 遺伝子ノックアウト用ターゲティングベクターの構築

1-1) カセットベクターpBlueLAB-LoxP-Neo-DT-Aの構築

ノックアウト(KO)用ターゲティングベクターを作製するための基本ベクターとなるカセットベクターpBlueLAB-LoxP-Neo-DT-Aは、pBluescriptに制限酵素サイトを付加した後、ネオマイシン耐性マーカー遺伝子発現ユニットの両端にLoxP配列を有するLoxP-Neo及びジフテリア毒素A鎖遺伝子(DT-A)を挿入したベクターで、国際公開第2006/078072号公報の実施例7で記載したベクターと同一である。以下に、当該ベクター作製の概略を記載する。

【0249】

50

pBluescript IISK(-) (東洋紡社製) ベクターに新たな制限酵素サイトを付加するため以下のオリゴDNA (LinkA1: 配列番号1、LinkA2: 配列番号2、LinkB1: 配列番号3、及びLinkB2: 配列番号4) を合成した。

【0250】

pBluescript IISK(-) を制限酵素SalI及びXhoIで処理し、反応液からプラスミド断片をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。このプラスミド断片に、新たな制限酵素サイト、NruI、SgrAI及びAscIを付加するため、LinkA1及びLinkA2からなるリンカーを挿入し、大腸菌DH5に導入した。得られた形質転換体よりプラスミドpBlueLAを取得した。

【0251】

pBlueLAを制限酵素NotI及びEcoRIで処理し、反応液からプラスミド断片をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。このプラスミド断片に新たな制限酵素サイト、PacI、FseI及びSalIを付加するため、LinkB1及びLinkB2からなるリンカーを挿入し、大腸菌DH5に導入した。得られた形質転換体よりプラスミドpBlueLABを取得した。

【0252】

国際公開第00/10383号に記載されたプラスミドpLoxP-STneoをXhoIで酵素消化し、両端にLoxP配列を持つNeo耐性遺伝子(LoxP-Neo)を取得した。T4DNAポリメラーゼを用いてLoxP-Neoの両末端を平滑化しLoxP-Neo-Bを取得した。

【0253】

pBlueLABをEcoRVで酵素消化し、反応液からプラスミド断片をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。得られたプラスミド断片に、LoxP-Neo-Bを挿入し、大腸菌DH5に導入した。得られた形質転換体よりプラスミドpBlueLAB-LoxP-Neoを取得した。

【0254】

pMC1DT-A (ライフテックオリエンタル社製) をXhoI及びSalIで酵素消化後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いてDT-A遺伝子を含む断片を回収した。

【0255】

pBlueLAB-LoxP-NeoをXhoIで酵素消化し、反応液からプラスミド断片をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。得られたプラスミド断片に、DT-A遺伝子を含む断片を挿入し、大腸菌DH5に導入した。得られた形質転換体よりカセットベクターpBlueLAB-LoxP-Neo-DT-Aを取得した。

【0256】

1-2) マウスBMP9遺伝子3'側ゲノム領域断片の取得

Ensemble Genome Browserより取得したマウスBMP9 (GDF2) 遺伝子を含むゲノムDNA配列 (アクセッション番号: ENSMUSG00000072625) よりプライマー (配列番号5、6) を設計した。

【0257】

大腸菌人工染色体 [Bacterial Artificial Chromosome (BAC)] のうちC57BL/6JマウスBMP9遺伝子を含むクローンRP23-181N8由来のDNAを鋳型とし、配列番号5及び6のプライマーを各10pmol、KOD-plus- (東洋紡社製) を含む50µLの反応液を調製し、94で3分間保温した後、98で10秒間、及び68で5分間を1サイクルとして35サイクルPCRを行った。

【0258】

得られたPCR増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて2.1kbpの断片を回収した。回収したPCR増幅断片をClaI及びAscIで酵素消化し、アガロースゲル

10

20

30

40

50

電気泳動に供した後、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t を用いて酵素処理断片 (C l a I - A s c I 断片) を回収した。

【 0 2 5 9 】

p B l u e L A B を C l a I 及び A s c I で酵素消化し、S h r i m p A l k a l i n e P h o s p h a t a s e (S A P) 処理した後、この C l a I - A s c I 断片をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。上記で回収した C l a I - A s c I 断片を挿入し、大腸菌 D H 5 に導入した。

【 0 2 6 0 】

得られた形質転換体より、P C R に起因する変異がない挿入遺伝子を有するクローンを選択した。このプラスミド D N A を C l a I 及び A s c I で酵素消化し、アガロースゲル電気泳動に供した後、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t を用いて 2 . 1 k b p のマウス B M P 9 遺伝子の 3 ' 側ゲノム配列を含む酵素処理断片を回収した。

10

【 0 2 6 1 】

1 - 3) マウス B M P 9 遺伝子 5 ' 側ゲノム領域断片の取得

E n s e m b l e G e n o m e B r o w s e r より取得したマウス B M P 9 遺伝子を含むゲノム D N A 配列 (アクセション番号 : E N S M U S G 0 0 0 0 0 0 7 2 6 2 5) よりプライマー (配列番号 7 、 8) を設計した。

【 0 2 6 2 】

B A C クローン R P 2 3 - 1 8 1 N 8 由来の D N A を鋳型とし、配列番号 7 及び 8 のプライマーを各 1 0 p m o l 、 K O D - p l u s - (東洋紡社製) を含む 5 0 μ L の反応液を調製し、9 4 で 3 分間保温した後、9 8 で 1 0 秒間、及び 6 8 で 5 分間を 1 サイクルとして 3 5 サイクル P C R を行った。

20

【 0 2 6 3 】

得られた P C R 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t (キアゲン社製) を用いて 5 . 1 k b p の断片を回収した。回収した P C R 増幅断片を P a c I 及び F s e I で酵素消化し、アガロースゲル電気泳動に供した後、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t を用いて酵素処理断片 (P a c I - F s e I 断片) を回収した。

【 0 2 6 4 】

p B l u e L A B を P a c I 及び F s e I で酵素消化し、S A P 処理した後、この P a c I - F s e I 断片をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。上記で回収した P a c I - F s e I 断片を挿入し、大腸菌 D H 5 に導入した。

30

【 0 2 6 5 】

得られた形質転換体より、P C R に起因する変異がない挿入遺伝子を有するクローンを選択した。このプラスミド D N A を P a c I 及び F s e I で酵素消化し、アガロースゲル電気泳動に供した後、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t を用いて 5 . 1 k b p のマウス B M P 9 遺伝子の 5 ' 側ゲノム配列を含む酵素処理断片を回収した。

【 0 2 6 6 】

1 - 4) カセットベクターへのマウス B M P 9 遺伝子 3 ' 側ゲノム領域断片の挿入

実施例 1 - 1 で得られた p B l u e L A B - L o x - N e o - D T - A を C l a I 及び A s c I で酵素消化し、アガロースゲル電気泳動に供した後、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t を用いて D N A 断片を回収した。回収した約 7 . 6 k b p の D N A 断片に、実施例 1 - 2 で得られた酵素処理断片を挿入した後、大腸菌 D H 5 に導入した。得られた形質転換体より D N A 断片が挿入されているクローンを選択した。連結部分の塩基配列に問題がないことを確認した。

40

【 0 2 6 7 】

1 - 5) マウス B M P 9 遺伝子 3 ' 側ゲノム領域断片を持つカセットベクターへのマウス B M P 9 遺伝子 5 ' 側ゲノム領域断片の挿入

50

実施例 1 - 4 で得られたプラスミドを Pac I 及び Fse I で酵素消化し、アガロースゲル電気泳動に供した後、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて酵素処理断片を回収した。回収した 9.7 kbp の DNA 断片に、実施例 1 - 3 で作製した酵素処理断片を挿入した後、大腸菌 DH5 に導入した。

【0268】

得られた形質転換体より DNA 断片が挿入されているクローンを選択した。連結部分の塩基配列に問題がないことを確認し、マウス BMP9 遺伝子ノックアウト用のターゲティングベクター pBluemBmp9 - Lox - Neo - DT - A - 3' KO - 5' KO (図 1) を取得した。

【0269】

[実施例 2]

マウス BMP9 遺伝子ターゲティングベクターの調製

実施例 1 - 5 で得られた pBluemBmp9 - Lox - Neo - DT - A - 3' KO - 5' KO 60 µg を、終濃度が 1 mmol/L となるようにスペルミジン(シグマ社製)を添加し、pH を 7.0 に調製した、制限酵素用 H バッファー(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)中で、Not I で酵素消化した。

【0270】

反応液から、ベクター断片をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。DNA 濃度が 0.5 µg/µL となるよう、pH 7.05 の HBS 溶液 [1 リットルあたり、HEPES 5 g、NaCl 8 g、KCl 0.37 g、Na₂HPO₄ · 2H₂O 0.125 g、Dextrose (D-Glucose) 1 g を含む溶液] を加え、1 時間室温で保存することによって、電圧ポレーション用マウス BMP9 遺伝子ターゲティング用ベクター pBluemBmp9 - Lox - Neo - DT - A - 3' KO - 5' KO - Not I を調製した。

【0271】

[実施例 3]

ゲノムサザンプロット解析用プローブの調製

3 - 1) マウス BMP9 遺伝子の 5' 側ゲノム確認用プローブの作製

BAC クローン RP23 - 181N8 の塩基配列情報を基に、マウス BMP9 遺伝子の 5' 側ゲノム領域約 500 bp を含むプローブを取得するため、プライマー(配列番号 9、10)を設計した。

【0272】

BAC クローン RP23 - 181N8 由来の DNA を鋳型とし、配列番号 9 及び 10 のプライマーを各 10 pmol、Takara Z Taq (宝酒造社製)を含む 50 µL の反応液を調製し、94 で 2 分間保温した後、94 で 30 秒間、60 で 20 秒間、及び 72 で 1 分間を 1 サイクルとして 25 サイクル PCR を行った。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて約 500 bp の 5' 側ゲノムサザンプロット用プローブ(5' KO - probe)を回収した。

【0273】

3 - 2) マウス BMP9 遺伝子の 3' 側ゲノム確認用プローブの作製

BAC クローン RP23 - 181N8 の塩基配列情報を基に、マウス BMP9 遺伝子の 3' 側ゲノム領域約 500 bp を含むプローブを取得するため、プライマー(配列番号 11、12)を設計した。

【0274】

BAC クローン RP23 - 181N8 由来の DNA を鋳型とし、配列番号 11 及び 12 のプライマーを各 10 pmol、Takara Z Taq (宝酒造社製)を含む 50 µL の反応液を調製し、94 で 2 分間保温した後、94 で 30 秒間、60 で 20 秒間、及び 72 で 1 分間を 1 サイクルとして 25 サイクル PCR を行った。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、QIAquick Gel Extra

10

20

30

40

50

ction Kit (キアゲン社製)を用いて約500bpの3'側ゲノムサザンプロット用プローブ(3' KO-probe)を回収した。

【0275】

[実施例4]

マウスBMP9 KO ES細胞株の取得

相同組換えを用いたマウスBMP9遺伝子KO ES細胞の取得のため、確立されている方法(相沢慎一著、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲットティング、羊土社、1995)に従って、実施例2において調製したpBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KO-NotIをマウスES細胞TT2(Yagiri, Analytical Biochem., 214:70, 1993)へ導入した。詳細な方法を以下に記載する。

10

【0276】

栄養細胞としてマイトマイシンC(シグマ社製)で処理したG418耐性初代培養細胞(インビトロジェン社製)を用いてTT2細胞の培養増殖を37、5%CO₂の条件下に行った。TT2細胞をトリプシン処理し、 3×10^7 個/mLとなるように実施例2に記載したHBS溶液で懸濁した。細胞懸濁液を0.5mLと、pBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KO-NotIを10 μ g混和し、ジーンパルサーキューベット(電極距離:0.4cm、パイオラッド社製)に入れ、エレクトロポレーションを行った(容量:960 μ F、電圧:240V、室温)。

【0277】

20

エレクトロポレーションした細胞を、ES培地[1リットルあたり、牛胎仔血清(FBS)180mL、D-グルコース3.5g、ダルベッコ改変イーグル培地粉末(インビトロジェン社製)10g、非必須アミノ酸溶液(100倍濃縮液;インビトロジェン社製)10mL、炭酸水素ナトリウム1.9gを含む溶液]10mLに懸濁し、あらかじめ前述の栄養細胞を播種した100mm組織培養用プラスチックシャーレ(ファルコン社製)1枚に播種した。24時間後、培地を200 μ g/mLのネオマイシン(シグマ社製)を含むES培地に置き換えた。7日後に生じたコロニーをピックアップし、それぞれ24穴プレートに播種した。

【0278】

30

コンフルーエントになるまで増殖させた後、3分の1の細胞を12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養することにより、 $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kits(Gentra System社製)で調製した。これらネオマイシン耐性TT2細胞ゲノムDNAをEcoRIで酵素消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。次に、実施例3-2で得た3'KO-probeを用いたサザンプロットを行った。野生型TT2細胞では、1本のバンド(約15.5kbp)が検出され、相同組換え体においては、2本のバンド(約11.5kbpと約15.5kbp)が検出された。

【0279】

40

更に、相同組換えが確認されたクローンのゲノムDNAをNcoIで酵素消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。次に、実施例3-1で得た5'KO-probeを用いたサザンプロットを行った。野生型TT2細胞では、1本のバンド(約13.4kbp)が検出され、相同組換え体においては、2本のバンド(約8.5kbpと約13.4kbp)が検出された。

【0280】

以上の結果、マウスBMP9遺伝子を脱落したことが予想される相同組換え体は7株見出された。次に、相同組換え体の核型解析を既報(相沢慎一著、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲットティング、羊土社、1995)に従い行った結果、見出された7株のうち5株は正常核型を有するマウスBMP9遺伝子KO ES細胞であることが確認された。

【0281】

50

[実施例 5]

BMP9 KOヘテロ接合型マウスの作製

実施例4において取得したES細胞は、毛色が濃茶色CBA×C57BL/6 F1マウス由来(Yagira, Analytical Biochemistry, 214:70-76, 1993)のTT2細胞である。そこで、ES細胞由来の遺伝子を有するキメラマウスと、ES細胞由来の遺伝子を有さない宿主マウスを簡便に判別するため、宿主マウスには、毛色が白色のICRマウスを選択した。

【0282】

まず、実施例4において正常核型を持つことが確認できたマウスBMP9遺伝子KO ES細胞のうち4株を、ICR系統の雌雄マウスの交配により得られた8細胞期胚に、それぞれ胚1つあたり8~10個注入した。その後、ES培地を用いて一晚培養することで、インジェクション胚を胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス(日本クレア社)の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約10個の胚盤胞まで発生させたインジェクション胚を移植した。

10

【0283】

胚盤胞まで発生させたインジェクション胚を計260個移植した結果、102匹の子キメラマウスが誕生した。誕生した102匹のうち毛色が濃茶色を含むマウス、すなわちES細胞の貢献が認められたキメラマウスは89匹であった。これら89匹のうち、毛色が全て濃茶色で白色部分を含まないマウス、すなわち、ES細胞由来のキメラ率の高いキメラマウスは40匹であった。

20

【0284】

次に、これらのキメラ率の高いオスのキメラマウスをC57BL/6のメスと交配させた結果、毛色が濃茶色の子マウスが誕生したことから、ES細胞ゲノムの生殖細胞系列への伝達を確認された。

【0285】

BMP9遺伝子がターゲティングされたヘテロ接合型マウスのスクリーニングは、尾部生検由来DNAを鋳型としたPCR解析により行った。そのために、実施例1にて作製したマウスBMP9遺伝子ノックアウト用ベクターpBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KO内のネオマイシン耐性遺伝子領域に特異的なプライマーであるmBMP9__FW5915(配列番号13)及びmBMP9__RV17165(配列番号14)を作製した。

30

【0286】

出生後3週以上を経たマウスから尻尾を取得し(勝木元也著、発生工学実験マニュアル、講談社サイエンティフィック、1987)、Puregene DNA Isolation Kitを用いてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型とし、配列番号13及び14のプライマーを各10pmol、EX Taq(宝酒造社製)を含む50μLの反応液を調製し、95℃で30秒間、60℃で1分間、及び72℃で2分間を1サイクルとして35サイクルPCRを行った。

【0287】

アガロースゲル電気泳動を行った結果、約1.3kbpの増幅産物が検出される個体が複数存在した。この結果は、内在性BMP9遺伝子が相同組換えされ、ネオマイシン耐性遺伝子が挿入されたヘテロ接合型マウス[BMP9KO(+/-)]が複数得られたことを示している。

40

【0288】

[実施例 6]

BMP9 KOホモ接合型マウスの作製

実施例5で作製されたBMP9KO(+/-)の雌雄個体を交配させ、子マウスを得た。実施例5と同様に、マウスの尻尾からPuregene DNA Isolation Kitを用いてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型とし、実施例5と同様にPCRを行った。さらに、アガロース電気泳動を行うことにより、BMP9KOヘテ

50

口接合型 [B M P 9 K O (+ / -)] とホモ接合型 [B M P 9 K O (- / -)] を選抜した。

【 0 2 8 9 】

選抜した個体のゲノム DNA を鋳型とし、配列番号 1 5 及び 1 6 のプライマーを各 1 0 p m o l、E X T a q (宝酒造社製) を含む 5 0 μ L の反応液を調製し、9 5 ° C で 3 0 秒間、6 0 ° C で 3 0 秒間、及び 7 2 ° C で 1 分間を 1 サイクルとして 3 5 サイクル P C R を行った。アガロースゲル電気泳動を行った結果、約 2 0 0 b p の増幅産物が検出される個体、及び検出されない個体が存在することが明らかとなった。

【 0 2 9 0 】

野生型対立遺伝子をもつ B M P 9 K O (+ / -) では約 2 0 0 b p の増幅産物が検出されるが、B M P 9 K O (- / -) では検出されないことから、この結果は、B M P 9 K O (- / -) が得られたことを示している。抗 B M P 9 モノクローナル抗体取得には、得られた雌雄のホモ接合型 [B M P 9 K O (- / -)] のうち、雌マウスを 1 0 匹用いた。

10

【 0 2 9 1 】

[実施例 7]

抗ヒト B M P 9 モノクローナル抗体の作製

7 - 1) 免疫原の調製

免疫原として用いたヒト B M P 9 組換えタンパク質は、国際公開第 2 0 1 0 / 1 2 6 1 6 9 号の実施例 1 2 に記載された方法に従い調製した。

【 0 2 9 2 】

20

7 - 2) 動物への免疫と抗体産生細胞の調製

アジュバントに、R I B I アジュバント (C o r i x a 社製)、又は T i t e r M a x G o l d (T i t e r m a x 社製) を用いて、実施例 7 - 1 で調製したヒト B M P 9 組換えタンパク質を、実施例 6 で得られた B M P 9 K O (- / -) マウスに免疫した。具体的には、R I B I アジュバントの添付文書に従って、ヒト B M P 9 組換えタンパク質の懸濁液を調製した後、1 匹あたり 2 5 μ g のヒト B M P 9 組換えタンパク質が投与されるよう、該懸濁液を K O マウスの腹腔内に投与した。

【 0 2 9 3 】

T i t e r M a x G o l d を用いる際も同様に、添付文書に従い、ヒト B M P 9 組換えタンパク質の懸濁液を調製した後、1 匹あたり 2 5 μ g のヒト B M P 9 組換えタンパク質が投与されるよう、該懸濁液を K O マウスの皮下に投与した。免疫は最終ブーストを含めていずれも計 3 回行った。脾臓は、最終投与の 3 日後に摘出した。

30

【 0 2 9 4 】

摘出した脾臓を P B S (p h o s p h a t e - b u f f e r e d s a l i n e) 中で細断した後、脾細胞を遠心分離 (1 5 0 0 r p m、3 分間) により回収した。得られた脾細胞画分は、赤血球を含むことから、R E D B l o o d C e l l L y s i n g B u f f e r (シグマ社製) を添加し、氷上で処理することにより、赤血球を除去した。得られた脾細胞は、D M E M (D u l b e c c o ' s m o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m ; インビトロジェン社製) 培地で 2 回洗浄した後、細胞融合に供した。

【 0 2 9 5 】

40

7 - 3) マウス骨髄腫細胞の調製

マウス骨髄腫細胞株 (S p 2 / 0 , A T C C : C R L 1 5 8 1) を 1 0 % ウシ胎児血清添加 D M E M にて培養し、細胞融合の親株として用いた。

【 0 2 9 6 】

7 - 4) ハイブリドーマの作製

実施例 7 - 2 で得られたマウス脾細胞と実施例 7 - 3 で得られた骨髄腫細胞を 5 : 1 になるよう混合し、遠心分離 (1 5 0 0 r p m、3 分間) した。得られた沈殿画分 (細胞群) に対して、ポリエチレングリコール - 1 5 0 0 (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) 1 m L を、穏やかに揺らしながら、徐々に加えた。次に、該細胞液に D M E M 培地 5 m L を穏やかに揺らしながら加え、更に D M E M 培地を 1 0 m L 添加した。次に、上記の該

50

細胞液を含むチューブを37℃で5分間インキュベートし、遠心分離(1500rpm、3分間)した。

【0297】

得られた沈殿画分(細胞群)をコンプリート培地(FCS 10V/v%、メルカプトエタノール 50 μ mol/L、インシュリン 50 μ g/mL、及びIL-6 10ng/mLを含むDMEM培地]を用いて脾細胞数が 1×10^6 個/mLになるように懸濁した後、96ウェルプレートに100 μ Lずつ播種した。

【0298】

その1.5時間後、メーカーが推奨する終濃度の2倍のHAT media supplement(シグマ社製、Cat#H0262-10VL)を含むコンプリート培地を各ウェルに100 μ Lずつ加え、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。培地交換は、ウェル内の細胞がスクリーニングに適した細胞数になるまで、メーカーが推奨する終濃度のHAT media supplementを含むコンプリート培地を用いて週3回の頻度で行った。

10

【0299】

7-5) ALK1/BMP9サンドイッチELISAの構築

ALK1/BMP9サンドイッチELISAは、抗ヒトBMP9マウスモノクローナル抗体(R&Dシステムズ社製、クローンNo.360107、以下R&D抗体と記載)、及びヒトBMP9のタイプI受容体として知られているヒトALK1細胞外領域ヒトIgG1 Fc領域フュージョンタンパク質(hsALK1-Fc)を用いて、以下のように構築した。

20

【0300】

まず、96ウェルのELISA用プレート(F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE、Thermo Fisher Scientific社製、Cat#439454)に、国際公開第2010/126169号の実施例1に記載の方法に従い調製したhsALK1-Fcを、50mmol/L NaHCO₃緩衝液(Wako社製、Cat#191-01305)で0.05 μ g/mLに調製したものを100 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩静置して吸着させた。

【0301】

固相化液を取り除いた後、SuperBlock(Thermo SCIENTIFIC社製、Cat#37535)を250 μ L/ウェル加え、室温で1時間静置してブロッキングし、0.1%のTween-20を含むPBS(PBS-T)で3回洗浄した。

30

【0302】

次に、ヒトmature 2量体BMP9組換えタンパク質(R&Dシステムズ社製Cat#3209-BP)をSuperBlockとPBS-Tを1:9の割合で混合した10% SuperBlock in PBS-Tで1ng/mLの濃度に調製したものを100 μ L/ウェルで分注し、室温で1時間静置し、PBS-Tで4回洗浄した。

【0303】

次に、SureLINK Chromophoric Biotin Labeling Kit(KPL社製)を用いてビオチン標識したR&D抗体を10% SuperBlock in PBS-Tで30ng/mLに調製した後、100 μ L/ウェルで分注し、室温で1時間静置した。このプレートをPBS-Tで4回洗浄した後、10% SuperBlock in PBS-Tで500倍希釈したStreptavidin-polyHRP80(Stereospecific Detection Technologies社製、Cat#SP80D50)を100 μ L/ウェルで分注し、室温で30分~1時間静置した。

40

【0304】

このプレートをPBS-Tで4回洗浄し、TMB発色液(TMB+ Substrate-Chromogen、Dako社製、Cat#S1599)を100 μ L/ウェル添加して発色させ、適当な発色が得られたところで、1N 硫酸溶液(Wako社製、Ca

50

t # 1 9 2 - 0 4 7 5 5) を 1 0 0 μ L / ウェル 添加し、A R V O (パーキンエルマー社製) を用いて 4 5 0 n m の吸光度を測定した。

【 0 3 0 5 】

7 - 6) A L K 1 / B M P 9 サンドイッチ E L I S A を用いた抗ヒト B M P 9 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

実施例 7 - 5 で構築したサンドイッチ E L I S A において、ヒト m a t u r e 2 量体 B M P 9 組換えタンパク質の添加の際に、1 n g / m L 濃度のヒト m a t u r e 2 量体 B M P 9 組換えタンパク質、及び 5 0 % 濃度の実施例 7 - 4 で作製したハイブリドーマの培養上清を含むように調製した 1 0 % S u p e r B l o c k i n P B S - T 溶液を、1 0 0 μ L / ウェルで分注した。

【 0 3 0 6 】

陰性コントロールには、ハイブリドーマ用培地を用いた。ハイブリドーマ用培地を添加したウェルを基準として、発色が抑制されたウェルを陽性と判断し、h s A L K 1 - F c とヒト m a t u r e 2 量体 B M P 9 組換えタンパク質、又は、ヒト m a t u r e 2 量体 B M P 9 組換えタンパク質と R & D 抗体の相互作用を阻害する抗体を産生するハイブリドーマ株を選抜した。

【 0 3 0 7 】

選抜したハイブリドーマについては、H T (シグマ社製、C a t # H 0 1 3 7 - 1 0 V L) を含むコンプリート培地にて限界希釈し、9 6 ウェルプレートに播種しクローン化を行った。クローン化は、1 回目に陽性と判断したウェル由来のハイブリドーマに対して計 3 回行った。以上の操作により、6 D 1 0 - 1 - 1 抗体、1 0 D 5 - 2 - 3 抗体及び 3 B 7 - 3 - 3 抗体を産生するハイブリドーマ株を単離した。

【 0 3 0 8 】

7 - 7) ハイブリドーマの e R D F 培地への馴化

抗体を大量取得するため、ハイブリドーマの培地をコンプリート培地から e R D F 培地 [U l t r a - L o w I g G F B S (G I B C O 社製) 1 v / v % 、 T r a n s f e l i n 5 μ g / m L 、 イ n シュリン 5 μ g / m L 、 エタノールアミン 1 0 μ m o l / L 、 及び S o d i u m S e l e n i t e 2 5 n m o l / L を含む e - R D F 培地 (極東製薬製)] に、段階的に置換し、ハイブリドーマ細胞の e R D F 培地への馴化を行った。

【 0 3 0 9 】

7 - 8) ハイブリドーマからの抗体の大量取得

実施例 7 - 8 で馴化したハイブリドーマを、細胞密度 1 ~ 2 \times 1 0 ⁵ c e l l s / m L でローラーボトル (8 5 0 c m ² 、 B D サイエンス社製) 1 0 0 本に播種した。培地には e R D F 培地を用いた。播種したローラーボトルをローラーボトル回転培養機で転回させながら、3 7 ° C で 6 - 8 日間培養した後、細胞を含む培地を回収した。回収した培地を遠心分離し、得られた培養上清を 0 . 2 2 μ m フィルターによりろ過した。

【 0 3 1 0 】

フィルターでろ過した培養上清から、P r o t e i n g S e p h a r o s e 4 F a s t F l o w (G E H e a l t h c a r e 社製) を充填したオープンカラムを用いて、抗ヒト B M P 9 抗体を精製した。得られた抗体は、0 . 2 2 μ m フィルターを用いて滅菌した後、i n v i v o 試験に供した。

【 0 3 1 1 】

[実施例 8]

固相抗原を用いた酵素結合免疫吸着法 (E L I S A) による取得抗体の特異性の評価

取得した抗体のヒト B M P 9 への特異性を確かめるため、ヒト B M P 9 及びヒト B M P 9 とホモロジーが最も高い分子であるヒト B M P 1 0 への結合性を比較する実験を行った。まず、9 6 ウェルの E L I S A 用プレート (F 9 6 M A X I S O R P N U N C - I M M U N O P L A T E 、 T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社製、C a t # 4 4 2 4 0 4) に、ヒト m a t u r e 2 量体 B M P 9 組換えタンパク質 (R & D シ

10

20

30

40

50

ステムズ社製、Cat # 3209 - BP)、又はヒトmature 2量体BMP10組換えタンパク質(R&Dシステムズ社製Cat # 2926 - BP)を、50 mmol/L NaHCO₃緩衝液(Wako社製、Cat # 191 - 01305)で100 ng/mLに調製したものを50 µL/ウェルで分注し、4 で一晩静置して吸着させた。

【0312】

固相化液を取り除いた後、Super Block(Thermo Scientific社製、Cat # 37535)を200 µL/ウェル加え、室温で1時間静置してブロッキングし、TBST(Tris Buffered Saline with Tween 20; SANTA CRUZ社製、SC - 24953)で3回洗浄した。

【0313】

次に、Biotin Labeling Kit - NH₂(コスモ・バイオ社製、Cat # LK03)を用いてビオチン標識した6D10 - 1 - 1抗体、10D5 - 2 - 3抗体、3B7 - 3 - 3抗体、R&D抗体、又は抗BMP10抗体(R&Dシステムズ社製、Cat # MAB2926)を、Super BlockとTBSTを1:9の割合で混合した10% Super Block in TBSTで100 ng/mLに調製した後、一次抗体として50 µL/ウェルで分注し、室温で1時間静置した。

【0314】

このプレートをTBSTで3回洗浄した後、10% Super Block in TBSTで500倍希釈したStreptavidin - polyHRP80(Stereospecific Detection Technologies社製、Cat # SP80D50)を100 µL/ウェルで分注し、室温で1時間静置した。

【0315】

このプレートをTBSTで5回洗浄し、TMB基質液(TMB + Substrate - Chromogen, Dako社製、Cat # S1599)を50 µL/ウェル添加して発色させ、適当な発色が得られたところで、1N 硫酸溶液(Wako社製、Cat # 192 - 04755)を50 µL/ウェル添加し、サンプル波長450 nm、リファレンス波長570 nmにおける吸光度(450 nm - 570 nm)をプレートリーダー(Spectra Max, Molecular Devices社製)を用いて測定した。

【0316】

結果を図2に記載する。図2に示すように、6D10 - 1 - 1抗体、10D5 - 2 - 3抗体及び3B7 - 3 - 3抗体は、R&D抗体と同様に、ヒトBMP9に強く結合すること、またヒトBMP10には結合しないことが示された。この結果は、6D10 - 1 - 1抗体、10D5 - 2 - 3抗体及び3B7 - 3 - 3抗体が、ヒトBMP9に特異的に結合する抗体であることを示している。

【0317】

[実施例9]

取得抗体のヒトBMP9組換えタンパク質に対する結合性の評価

取得された抗ヒトBMP9抗体のヒトBMP9への結合活性を測定するために、以下の実験を行った。

【0318】

まず、96ウェルのELISA用プレート(F96 MAXISORP NUNC - IMMUNO PLATE, Thermo Fisher Scientific社製、Cat # 439454)に、ヒトmature 2量体BMP9組換えタンパク質(R&Dシステムズ社製、Cat # 3209 - BP)を50 mmol/L NaHCO₃緩衝液で100 ng/mLに調製したものを50 µL/ウェルで分注し、4 で一晩静置して吸着させた。

【0319】

固相化液を取り除いた後、Super Block(Thermo Scientific社製、Cat # 37535)を200 µL/ウェルで加え、室温で1時間静置してブロッキングし、TBSTで3回洗浄した。次に、ビオチン標識した6D10 - 1 - 1抗体

10

20

30

40

50

、10D5-2-3抗体、3B7-3-3抗体又はR&D抗体を、10% Super Block in TBSTでそれぞれ1、5、20、100、300 ng/mLになるように調製したものを、それぞれ50 µL/ウェルで分注し、室温で1時間静置した。

【0320】

このプレートをTBSTで3回洗浄した後、10% Super Block in TBSTで500倍希釈したStreptavidin-polyHRP80を100 µL/ウェルで分注し、室温で1時間静置した。

【0321】

このプレートをTBSTで5回洗浄し、TMB基質液(TMB+ Substrate - Chromogen、Dako社製、Cat#S1599)を50 µL/ウェル添加して発色させ、適当な発色が得られたところで1N硫酸溶液(Wako社製、Cat#192-04755)を50 µL/ウェル添加し、サンプル波長450 nm、リファレンス波長570 nmにおける吸光度(450 nm - 570 nm)をプレートリーダー(Spectra Max、Molecular Devices社製)を用いて測定した。

10

【0322】

結果を図3に記載する。図3に示すように、6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体及び3B7-3-3抗体は、R&D抗体と同様に、抗体濃度が高くなるに従ってヒトBMP9に結合した。さらに6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体のヒトBMP9に対する結合活性はR&D抗体に比して高いことが明らかとなった。

20

【0323】

[実施例10]

ヒトBMP9とR&D抗体の結合に対する取得抗体の作用

実施例7で用いた系の特徴より、取得抗体はhsALK1-Fcとヒトmature 2量体BMP9組換えタンパク質の相互作用、もしくはヒトmature 2量体BMP9組換えタンパク質とR&D抗体の相互作用のいずれかを阻害する抗体であると考えられる。そこで、まず、ヒトBMP9とR&D抗体の結合アッセイ系を構築した。

【0324】

96ウェルのELISA用プレート(F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE、Thermo Fisher Scientific社製、Cat#439454)に、実施例7-1で調製したヒトBMP9組換えタンパク質を50 mmol/L NaHCO₃緩衝液で100 ng/mLに調製したものを100 µL/ウェルで分注し、室温で1時間静置して吸着させた。固相化液を取り除いた後、Super Blockを250 µL/ウェル加え、室温で1時間静置しブロッキングし、PBS-Tで3回洗浄した。

30

【0325】

次に、10% Super Block in PBS-Tでそれぞれ100~300 ng/mLに調製した取得抗体及び50 ng/mLのビオチン標識したR&D抗体を含む溶液を100 µL/ウェルで分注し、室温で1時間静置した。このプレートをPBS-Tで4回洗浄した後、10% Super Block in PBS-Tで500倍希釈したStreptavidin-polyHRP80(Stereospecific Detection Technologies社製、Cat#SP80D50)を100 µL/ウェルで分注し、室温で30分~1時間静置した。

40

【0326】

このプレートをPBS-Tで4回洗浄し、TMB発色液(TMB+ Substrate - Chromogen、Dako社製、Cat#S1599)を100 µL/ウェル添加して発色させ、適当な発色が得られたところで、1N硫酸溶液(Wako社製、Cat#192-04755)を100 µL/ウェル添加し、ARVO(パーキンエルマー社製)を用いて450 nmの吸光度を測定した。結果を図4に記載する。

【0327】

図4に示すように、ヒトBMP9とビオチン標識R&D抗体の結合は、非標識のR&D

50

抗体の添加で阻害され、10D5-2-3抗体又は6D10-1-1抗体の添加でも、阻害された。一方、3B7-3-3抗体では阻害は認められなかった。

【0328】

この結果は、10D5-2-3抗体及び6D10-1-1抗体のヒトBMP9認識部位(エピトープ)は、R&D抗体の認識部位と同じか、もしくはその近傍であり、3B7-3-3抗体のヒトBMP9認識部位(エピトープ)は、R&D抗体の認識部位とは異なることを示唆している。

【0329】

また阻害活性がR&D抗体と比してより低濃度より認められたことより、10D5-2-3抗体及び6D10-1-1抗体のヒトBMP9に対する結合活性(アフィニティー)はR&D抗体と比して高いことが明らかとなった。

10

【0330】

[実施例11]

ヒトBMP9とヒトALK1の結合に対する取得抗体の作用

次に、ヒトBMP9とヒトALK1の結合アッセイ系を構築した。

96ウェルのELISA用プレート(F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE、Thermo Fisher Scientific社製、Cat# 439454)に、実施例7-1で調製したヒトBMP9組換えタンパク質を50mmol/L NaHCO₃緩衝液で100ng/mLに希釈したものを100μL/ウェルで分注し、室温で1時間静置して吸着させた。

20

【0331】

固相化液を取り除いた後、Super Blockを250μL/ウェルに加え、室温で1時間静置しブロッキングし、PBS-Tで3回洗浄した。次に、10% Super Block in PBS-Tでそれぞれ100、1000又は10000ng/mLに調製した取得抗体もしくはR&D抗体、及び100ng/mLのビオチン標識したhsALK1-Fcタンパク質を含む溶液を100μL/ウェルで分注し、室温で1時間静置した。

【0332】

このプレートをPBS-Tで4回洗浄した後、10% Super Block in PBS-Tで500倍希釈したStreptavidin-polyHRP80(Stereospecific Detection Technologies社製、Cat# SP80D50)を100μL/ウェルで分注し、室温で30分~1時間静置した。

30

【0333】

このプレートをPBS-Tで4回洗浄し、TMB発色液(TMB+ Substrate-Chromogen、Dako社製、Cat# S1599)を100μL/ウェル添加して発色させ、適当な発色が得られたところで、1N硫酸溶液(Wako社製、Cat# 192-04755)を100μL/ウェル添加し、ARVO(パーキンエルマー社製)を用いて450nmの吸光度を測定した。

【0334】

100、1000又は10000ng/mL濃度の3B7-3-3抗体は、ヒトBMP9とヒトALK1との結合をそれぞれ10.3%、29.2%、64%と阻害したのに対し、6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体及びR&D抗体は、最高用量の10000ng/mL濃度の添加においても、阻害しなかった。

40

【0335】

以上の結果から、3B7-3-3抗体はヒトBMP9とヒトALK1との結合を阻害する抗BMP9抗体であるのに対し、6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体及びR&D抗体は、ヒトBMP9とヒトALK1との結合を阻害しない抗BMP9抗体であることが明らかとなった。

【0336】

[実施例12]

50

ヒトBMP9とヒトBMPRIIの結合に対する取得抗体の作用

BMP9の受容体はBMPタイプI受容体とBMPタイプII受容体から構成され、BMP9はそれら両方のタイプの受容体に結合することが知られている。実施例11から、10D5-2-3抗体、6D10-1-1抗体及びR&D抗体は、ヒトBMP9とヒトALK1の結合を阻害しないことが明らかとなり、これらの抗体は、BMP9とBMPタイプI受容体の結合を阻害しないことが示唆された。

【0337】

次に、これらの抗体がBMP9とBMPタイプII受容体の結合を阻害するか検討するため、ヒトBMP9とヒトBMP9タイプII受容体のひとつであることが知られているヒトBMPRIIとの結合アッセイ系を構築した。

10

【0338】

96ウェルのELISA用プレート(F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE、Thermo Fisher Scientific社製、Cat# 439454)に実施例7-1で調製したヒトBMP9組換えタンパク質を50mmol/L NaHCO₃緩衝液で3µg/mLに調製したものを、100µL/ウェルで分注し、室温で1時間静置して吸着させた。固相化液を取り除いた後、Super Blockを260µL/ウェル加え、室温で1時間静置しブロッキングし、TBSTで4回洗浄した。

【0339】

次に、10% Super Block in TBSTで1000ng/mLに調製した取得抗体、R&D抗体もしくは陰性対照マウスIgG1モノクローナル抗体(DAKO社製、X0931)及び3µg/mLに調製したBMPRII-Fc(ヒトBMPRIIの細胞外領域とヒトIgG1Fc領域のフュージョン組換えタンパク質、R&Dシステムズ社製)を含む10% Super Block in TBST溶液を100µL/ウェルで分注し、室温で1時間静置した。

20

【0340】

このプレートをTBSTで4回洗浄した後、10% Super Block in TBSTで20000倍希釈したGoat anti-human IgG HRP(Thermo Scientific社製)を100µL/ウェルで分注し、室温で30分~1時間静置した。

30

【0341】

このプレートをTBSTで4回洗浄し、TMB発色液(TMB+ Substrate-Chromogen、Dako社製、Cat# S1599)を100µL/ウェル添加して発色させ、適当な発色が得られたところで、1N硫酸溶液(Wako社製、Cat# 192-04755)を100µL/ウェル添加し、Multiskan Ascent(Thermo Lab systems社製)を用いて450nmの吸光度を測定した。結果を図5に記載する。

【0342】

図5に示すように、ヒトBMP9とヒトBMPRIIの結合は、6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体及びR&D抗体によって阻害されたことから、これらの抗体は、BMP9とBMPRII受容体の結合を阻害する抗ヒトBMP9抗体であることが明らかとなった。

40

【0343】

[実施例13]

取得抗体のヒトBMP9組換えタンパク質に対する結合活性(ピアコア解析)

取得抗体のヒトBMP9組換えタンパク質に対する結合活性(アフィニティー)をBIAcore 2000(GE Healthcare社製)を用いて検討した。Mouse Antibody Capture Kit(GE Healthcare社製)を用いて、抗マウスIgG抗体をセンサーチップCM5上に固定化した後、抗ヒトBMP9抗体をRU値として700-1100になるように結合させた。

50

【0344】

その後、実施例7-1で調製したヒトBMP9組換えタンパク質をHBS-EP溶液(GE Healthcare社製)を用いて0.152nmol/L、0.457nmol/L、1.37nmol/L、4.1nmol/L、12.3nmol/L、36.89nmol/L、110.67nmol/L、322nmol/Lの濃度に調製したものをアナライトとして添加し、結合強度を測定した。

【0345】

結合解離定数(Kd値)は、得られた値を基にシングルサイクルキネティクス算出法(BIAevaluation Software ver.3、GE Healthcare社製)にて算出した。結果を表1に記載する。

10

【0346】

【表1】

抗体名	Kd (M)	相対結合強度 (対R&D抗体)
R&D抗体	6.16×10^{-10}	1倍
6D10-1-1抗体	2.97×10^{-11}	20.7倍
10D5-2-3抗体	9.69×10^{-12}	63.6倍

20

【0347】

表1に示すように、R&D抗体のKd値は、 6.16×10^{-10} mol/Lであったのに対し、6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体のKd値は、それぞれ 2.97×10^{-11} mol/L、 9.69×10^{-12} mol/Lを示し、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体のヒトBMP9への結合活性は、R&D抗体に比して、20.7倍、63.6倍と著しく高いものであることが明らかとなった。また、以上の結果は、実施例9及び10の結果と矛盾しないものであった。

30

【0348】

[実施例14]

正常BALB/cマウスの赤血球造血に対する取得抗体の作用(短期投与)

実施例9で明らかとなったように、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体は、ヒトBMP9 mature 2量体に結合する抗体である。配列番号67で表される、ヒトBMP9のmature領域110アミノ酸のうち、マウスBMP9は106アミノ酸、ラットBMP9は104アミノ酸が完全一致することから、BMP9は種間の保存性が非常に高いことが知られている。従って、これらの抗体は、げっ歯類のBMP9にヒトBMP9と同様に結合することが推測される。

40

【0349】

そこで、BALB/cマウスを用いて6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体の赤血球造血に対する作用を評価した。6週齢の雄性BALB/cマウス(日本チャールズリバー社製)を購入し、実験に供した。飲水は滅菌水道水を、食餌は固形飼料FR-2(フナバシファーム社製)を自由摂取で与えた。

【0350】

予備飼育後、体重を指標にして、7群に群分けし(各群n=6)、6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体及びR&D抗体を1mg/kg、3mg/kgの投与量になるように皮下投与した。具体的には、各々の抗体を生理食塩水にて0.1mg/mL又は0.3mg/mLになるように調製したものを10mL/kgの用量にて投与した。媒体群

50

には生理食塩水を10 mL/kgの用量にて皮下投与した。

【0351】

抗体又は媒体は、週1回の頻度で計2回投与した。初回投与から2週間後、イソフルラン麻酔下にて開腹後、後大静脈より採血を行い、EDTA入り採血管に加えて血液サンプルとした。

【0352】

得られた血液サンプルについて、全自動血球計数器Celltac（日本光電社製）を用いて、血球数及びヘモグロビン濃度を測定した。結果を図6Aと図6Bに記載する。

【0353】

図6Aおよび図6Bに示すように、赤血球数及びヘモグロビン濃度は、いずれの抗ヒトBMP9抗体の投与によっても増加し、抗ヒトBMP9抗体に赤血球造血作用があることが見出された。R&D抗体は、投与量1 mg/kgと3 mg/kgともに、ほぼ同程度の赤血球数及びヘモグロビン濃度の増加を示したことから、R&D抗体の最大活性は投与量1 mg/kg以下であることが分かった。なお、最大活性を示す投与量1 mg/kgにおけるヘモグロビン濃度の増加は、約0.7 g/dLであった。

【0354】

一方、6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体は、R&D抗体の約2倍の最大活性を示し、特にヘモグロビン濃度の増加は、約1.5-2 g/dL程度認められた。以上の結果より、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体は、BMP9に対する結合活性だけでなく、赤血球造血作用においても、R&D抗体を凌駕する抗体であることが示された。

【0355】

[実施例15]

正常BALB/cマウス赤血球造血に対する取得抗体の作用（長期投与）

BALB/cマウスを用いて、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体の赤血球造血に対する長期投与の効果を検討した。6週齢の雄性BALB/cマウス（日本チャールズリバー社製）を購入し、実験に供した。飲水は滅菌水道水を、食餌は固形飼料FR-2（フナバシファーム社製）を自由摂取で与えた。

【0356】

予備飼育後、体重を指標にして、3群に群分けし（各群n=8）、高脂肪食（HFD-32；日本クレア社製）の自由摂取に切り替えた。次に、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体を、1 mg/kgの投与量になるように皮下投与した。具体的には、各々の抗体を生理食塩水にて0.1 mg/mLになるように調製したものを10 mL/kgの用量にて投与した。媒体群には生理食塩水を10 mL/kgの用量にて皮下投与した。

【0357】

抗体又は媒体は、週1回の頻度で計8回投与した。初回投与から8週間後、イソフルラン麻酔下にて、開腹後、後大静脈より採血を行い、一部をEDTA入り採血管に加えて血液サンプルとし、残りを血清サンプルとした。

【0358】

得られた血液サンプルについて、全自動血球計数器Celltac（日本光電社製）を用いて、血球数及びヘモグロビン濃度を測定した。結果を図7Aと図7Bに記載する。

【0359】

図7Aおよび図7Bに示すように、赤血球数及びヘモグロビン濃度は、6D10-1-1抗体又は10D5-2-3抗体の投与により有意に増加し、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体は、短期だけでなく、長期投与（2ヶ月間投与）によっても、持続的な赤血球造血作用を示すことが確認された。なお、体重に対する影響は、いずれの抗体ともに認められなかった。

【0360】

次に、抗ヒトBMP9抗体の赤血球造血作用が、赤血球増加因子である血中エリスロポエチン(EPO)を介したものであるか否かを確認するため、得られた血清サンプルを用いて血中EPO濃度を測定した。測定にはQuantikine Mouse/Rat Erythropoietin ELISAキット(R&Dシステムズ社製)を用いた。結果を図8に記載する。

【0361】

図8に示すように、血中EPO濃度は、抗ヒトBMP9抗体投与により減少傾向のみで有意な変化は観察されなかった。従って、抗ヒトBMP9抗体の赤血球造血作用はEPO産生上昇を介したものではない可能性が示された。

【0362】

[実施例16]

種々のマウス系統の赤血球造血に対する抗ヒトBMP9抗体の作用

BALB/c以外の系統のマウスを用いて、10D5-2-3抗体の赤血球造血に対する作用を検討した。BALB/c以外の系統として、CBA/J及びICRマウスを用いた。いずれも7週齢の雄性マウス(日本チャールズリバー社製)を購入し、実験に供した。飲水は滅菌水道水を、食餌は固形飼料FR-2(フナバシファーム社製)を自由摂取で与えた。

【0363】

予備飼育後、体重を指標にして、2群に群分けし(各群n=6)、10D5-2-3抗体を、1mg/kgの投与量になるように皮下投与した。具体的には、生理食塩水にて0.1mg/mLになるように調製した10D5-2-3抗体を10mL/kgの用量にて投与した。媒体群には生理食塩水を10mL/kgの用量にて皮下投与した。

【0364】

抗体又は媒体は、週1回の頻度で計2回投与した。初回投与から14日後、イソフルラン麻酔下にて、開腹後、後大静脈より採血を行い、一部をEDTA入り採血管に加えて血液サンプルとし、残りを血清サンプルとした。

【0365】

得られた血液サンプルについて、全自動血球計数器Celltac(日本光電社製)を用いて、血球数及びヘモグロビン濃度を測定した。その結果、赤血球数($\times 10^4 / \mu\text{L}$)は、BALB/c、CBA/J及びICRにおいて、媒体群はそれぞれ 958 ± 8.0 、 789 ± 25.3 及び 717 ± 22.9 (平均値 \pm 標準誤差)であったのに対し、10D5-2-3抗体投与群は、それぞれ 1028 ± 18.1 、 853 ± 8.1 及び 777 ± 13.2 (平均値 \pm 標準誤差)であり、10D5-2-3抗体投与により、それぞれ70、64及び60増加した。

【0366】

また、ヘモグロビン濃度(g/dL)は、BALB/c、CBA/J及びICRにおいて、媒体群はそれぞれ 15.4 ± 0.16 、 12.9 ± 0.13 及び 13.1 ± 0.50 (平均値 \pm 標準誤差)であったのに対し、10D5-2-3抗体投与群ではそれぞれ 16.6 ± 0.26 、 13.6 ± 0.13 及び 13.7 ± 0.25 (平均値 \pm 標準誤差)であり、10D5-2-3抗体投与により、それぞれ1.2、0.7及び0.6増加した。

【0367】

10D5-2-3抗体の赤血球造血作用は、いずれの系統においても認められたことより、抗ヒトBMP9抗体の赤血球造血作用は系統を超えた作用であることが示唆された。

【0368】

次に、10D5-2-3抗体の赤血球造血作用が、EPO増加を介したものであるか否かを確認するため、得られた血清サンプルを用いて血中EPO濃度を測定した。測定にはQuantikine Mouse/Rat Erythropoietin ELISAキット(R&Dシステムズ社製)を用いた。

【0369】

血中EPO濃度(pg/mL)は、BALB/c、CBA/J及びICRにおいて、媒

10

20

30

40

50

体群はそれぞれ 88.5 ± 8.7 、 181.2 ± 28.5 及び 291.5 ± 106.4 (平均値 \pm 標準誤差) であつたのに対し、10D5-2-3抗体投与群は、それぞれ 77.6 ± 5.7 、 126.1 ± 20.1 及び 236.2 ± 46.1 (平均値 \pm 標準誤差) であり、10D5-2-3抗体投与により、それぞれ 10.9、55.1 及び 55.3 減少した。

【0370】

このことより、10D5-2-3抗体の赤血球造血作用はEPO産生上昇を介したものであることが、実施例15同様に示唆された。

【0371】

[実施例17]

正常ラットの赤血球造血に対する取得抗体の作用

Wistarラットを用いて、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体のラットの赤血球造血に対する作用を評価した。5週齢の雄性Wistarラット(日本クレア社製)を購入し、実験に供した。飲水は滅菌水道水を、食餌は固形飼料FR-2(フナバシファーム社製)を自由摂取で与えた。

【0372】

予備飼育後、体重を指標にして、4群に群分けし(各群 $n = 6$)、6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体及びR&D抗体を $1 \text{ mg} / \text{ kg}$ の投与量になるように皮下投与した。具体的には、各々の抗体を生理食塩水にて $0.5 \text{ mg} / \text{ mL}$ になるように調製したものを $2 \text{ mL} / \text{ kg}$ の用量にて投与した。媒体群には生理食塩水を $2 \text{ mL} / \text{ kg}$ の用量にて皮下投与した。

【0373】

抗体又は媒体は、週1回の頻度で計2回投与した。初回投与から2週間後、イソフルラン麻酔下にて、開腹後、腹大動脈より採血を行い、一部をEDTA入り採血管に加えて血液サンプルとし、残りを血清サンプルとした。

【0374】

得られた血液サンプルについて、全自動血球計数器Celltac(日本光電社製)を用いて、血球数及びヘモグロビン濃度を測定した。結果を図9Aと図9Bに示す。

【0375】

図9Aおよび図9Bに示すように、赤血球数及びヘモグロビン濃度は、いずれの抗ヒトBMP9抗体の投与によっても増加し、抗ヒトBMP9抗体の赤血球造血作用は、マウスだけでなく、ラットにおいても認められることが明らかとなった。また6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体の赤血球造血作用は、マウスと同様、ラットでも、R&D抗体と比して強い傾向が認められた。

【0376】

[実施例18]

腎不全ラットの貧血に対する抗ヒトBMP9抗体の作用

Wistarラットに5/6腎摘手術を施した腎不全ラットを用いて、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体の腎性貧血に対する作用を検討した。5週齢の雄性Wistarラット(日本クレア社製)を購入し、実験に供した。飲水は滅菌水道水を、食餌は固形飼料FR-2(フナバシファーム社製)を自由摂取で与えた。

【0377】

予備飼育後、まず、ペントバルビタール麻酔下にて左側背部を切開し、左腎臓を露出して腎臓の2/3を切除した。腎切除部からの出血がなくなったことを確認した後、切開部を縫合した。1週間後、同ラットをペントバルビタール麻酔下にて、右側背部を切開し、右腎臓を結紮後、右腎臓を摘出することにより、5/6腎摘ラットを作製した。正常対照群として設定した偽手術ラットには、背部切開、縫合手術のみを施した。

【0378】

5/6腎摘ラット作製2週間後、各ラットから無麻酔下で尾静脈より採血し、一部をEDTA入り採血管に加えて血液サンプルとし、残りを血清サンプルとした。

10

20

30

40

50

【0379】

得られた血液サンプルについて、全自動血球計数器 *Celltac* (日本光電製) を用いて、血球数及びヘモグロビン濃度を測定した。

【0380】

次に、得られた血清サンプルについて、日立自動分析装置 7170 (日立社製) を用いて、尿素窒素 (BUN) 濃度及びクレアチニン濃度を測定した。

【0381】

得られた赤血球値、ヘモグロビン濃度、BUN濃度、クレアチニン濃度を基に、各群の平均値ができるだけ均等になるように、3群に群分けし (各群 $n = 8$)、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体を 1 mg/kg の投与量になるように皮下投与した。

10

【0382】

具体的には、各々の抗体を生理食塩水にて 0.5 mg/mL になるように調製したものを、 2 mL/kg の用量にて投与した。媒体群には生理食塩水を 2 mL/kg の用量にて投与した。さらに、正常対照としての媒体投与偽手術ラット群 ($n = 5$) には生理食塩水を 2 mL/kg の用量にて投与した。

【0383】

抗体又は媒体は、週1回の頻度で投与した。初回投与から2週間、4週間、6週間及び8週間後に尾静脈より採血を行い、一部をEDTA入り採血管に加えて血液サンプルとし、残りを血清サンプルとした。

【0384】

得られた血液サンプルについて、全自動血球計数器 *Celltac* (日本光電社製) を用いて、血球数及びヘモグロビン濃度を測定した。結果を図10Aと図10Bに示す。また、5/6腎摘ラット媒体投与群に対する各種抗体投与群の測定値の統計学的有意差検定は *Student's t-test* を用いて解析し、 $P < 0.05$ を有意とした。

20

【0385】

図10Aおよび図10Bに示すように、媒体投与5/6腎摘群の赤血球数及びヘモグロビン濃度は、媒体投与偽手術ラット群に比して、0週から8週までの全ての実験期間において減少した。一方、6D10-1-1抗体又は10D5-2-3抗体を投与された5/6腎摘群の赤血球数及びヘモグロビン濃度は、抗体投与後2週以降8週まで、610D-1-1抗体の抗体投与後6週のサンプルを除き、媒体投与5/6腎摘群に比して有意に増加した。なお、いずれの抗体も体重に対して影響を与えなかった。

30

【0386】

この結果より、6D10-1-1抗体及び10D5-2-3抗体に腎性貧血に対する改善作用があることが明らかになった。

【0387】

[実施例19]

抗ヒトBMP9モノクローナル抗体のVH及びVLをコードする遺伝子配列の単離

19-1) 抗ヒトBMP9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞からの総RNAの調製

実施例7に記載の6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体及び3B7-3-3抗体を産生するハイブリドーマ 1×10^6 個より、RNAeasy Mini Kit (QIAGEN社製、Cat#74104) 及びQIA shredder (QIAGEN社製、Cat#79654) を用いて、総RNAを調製した。

40

19-2) 抗ヒトBMP9モノクローナル抗体のVH及びVLの遺伝子クローニング

【0388】

実施例19-1で取得した各ハイブリドーマの総RNA $1 \mu\text{g}$ から、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社製、Cat#634924) を用いて、cDNAを作製した。得られたcDNAを鋳型として、キット添付のユニバーサルプライマーA mix (フォワードプライマーを含有する) と、マウスのIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c重鎖定常領域をコードする

50

特異的な異なる2種のリバープライマーを組み合わせて使用することで、VHのcDNA配列決定を行った。

【0389】

具体的には、マウスIgG1に特異的なプライマー（配列番号17及び18）、マウスIgG2aに特異的なプライマー（配列番号19及び20）、マウスIgG2bに特異的なプライマー（配列番号21及び22）、マウスIgG2cに特異的なプライマー（配列番号23）、又はマウスIgG3に特異的なプライマー（配列番号24及び25）を用いてそれぞれユニバーサルプライマーAと組み合わせることでPCR反応を行い、各抗体のVHのcDNA断片を増幅した。

【0390】

また、マウスIg（ ）特異的なプライマー（配列番号26及び27）又は、マウスIg（ ）特異的なプライマー（配列番号28及び29）を同様に用いてそれぞれユニバーサルプライマーAと組み合わせることでPCRを行い、各抗体のVLのcDNA断片を増幅した。

【0391】

PCRは、94 で30秒間、72 で3分間からなる反応サイクルを5回、94 で30秒間、70 で30秒間、72 で3分間からなる反応サイクルを5回、94 で30秒間、68 で30秒間、72 で3分間からなる反応サイクルを25回行った。

【0392】

アガロースゲル電気泳動を行った結果、6D10-1-1抗体、10D5-2-3産生及び3B7-3-3抗体ハイブリドーマ由来のcDNAは、IgG1重鎖定常領域をコードする特異的なプライマーを用いたときにPCR増幅産物が得られた。

【0393】

また、両ハイブリドーマ由来のcDNAは、マウスIg（ ）特異的なプライマーを用いたときにもPCR増幅産物が得られた。それぞれのPCR増幅産物をGel Extraction Kit（QIAEX II、QIAGEN社製、Cat#20021）を用いて精製した。

【0394】

得られた遺伝子断片を、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing（インビトロジェン社製、Cat#K287540 SP）を用い、pCR4ベクター（インビトロジェン社製）に挿入した。

【0395】

得られたプラスミドを、大腸菌DH5 株に導入した。得られた形質転換体より自動プラスミド抽出機（クラボウ社製）を用いてプラスミドを抽出し、塩基配列を解析した。その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する完全長のVH cDNA、及びVL cDNAが取得されたことを確認した。

【0396】

19-3) 抗ヒトBMP9モノクローナル抗体V領域の遺伝子配列の解析

実施例19-2で得られた6D10-1-1抗体、10D5-2-3抗体、3B7-3-3抗体のVHの全塩基配列を配列番号30、31、32に、該配列から推定された、シグナル配列を含んだVHの全アミノ酸配列を配列番号33、34、35に、VLの全塩基配列を配列番号36、37、38に、該配列から推定された、シグナル配列を含んだVLの全アミノ酸配列を配列番号39、40、41にそれぞれ示す。

【0397】

また、配列番号30、31、32からシグナル配列を除いた塩基配列を配列番号42、43、44に、配列番号36、37、38からシグナル配列を除いた塩基配列を配列番号45、46、47に、配列番号33、34、35からシグナル配列を除いたアミノ酸配列を配列番号48、49、50に、配列番号39、40、41からシグナル配列を除いたアミノ酸配列を配列番号51、52、53にそれぞれ示す。

【0398】

10

20

30

40

50

既知のマウス抗体の配列データ [SEQUENCES of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] との比較から、単離した各々の cDNA は分泌シグナル配列を含む 6D10-1-1 抗体、10D5-2-3 抗体、3B7-3-3 抗体をコードする完全長 cDNA であることが確認できた。

【0399】

各モノクローナル抗体の V_H 及び V_L の CDR を、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。6D10-1-1 抗体の V_H の CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 のアミノ酸配列を配列番号 54、55 及び 56 に、V_L の CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 のアミノ酸配列を配列番号 57、58 及び 59 にそれぞれ示す。

10

【0400】

10D5-2-3 抗体の V_H の CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 のアミノ酸配列を配列番号 60、61 及び 62 に、V_L の CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 のアミノ酸配列を配列番号 63、64 及び 65 にそれぞれ示す。

【0401】

[実施例 20]

取得抗体のエピトープ解析

20-1) 取得抗体の組換え発現

6D10-1-1、10D5-2-3 抗体の軽鎖、重鎖可変領域 (シグナル配列含む) の塩基配列を、それぞれマウス軽鎖 (鎖)、重鎖 (IgG1) 定常領域の塩基配列と結合させ、抗体発現用のベクターにサブクローニングした。BMP9 抗体の可変領域部分の塩基配列の増幅には、実施例 19 にて作製したプラスミドを鋳型として、それぞれ配列番号 72 ~ 79 で示される塩基配列からなるプライマーを用いて PCR を行った。

20

【0402】

マウス軽鎖 (鎖)、重鎖 (IgG1) 定常領域部分の塩基配列の増幅は、それぞれ人工遺伝子合成 (タカラバイオ社) によって作製された、配列番号 80、81 で示される塩基配列を鋳型として、配列番号 82 ~ 85 で示されるプライマーを用いて PCR を行った。

【0403】

いずれの PCR も、PrimeSTAR HS (Premix) (タカラバイオ社製、R040A) を用い、96 で 2 分間保温した後、98 で 10 秒間、55 で 5 秒間、及び 72 で 1 ~ 2 分間 (増幅物のサイズによって調整した) を 1 サイクルとして 30 サイクル反応を行った。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて精製し、インサートとした。

30

【0404】

N5KG1 ベクター (Biogen IDEC 社) を BglII、EcoRI を用いて酵素処理し、上記と同様の手順にて精製し、インサート挿入用ベクターとした。

【0405】

6D10-1-1 抗体の軽鎖可変領域およびマウス軽鎖定常領域のインサートを In-fusion Advantage PCR Cloning Kit (タカラバイオ社製) を用いて酵素処理した N5KG1 ベクターに組み込み、大腸菌に導入した。

40

【0406】

得られた形質転換体より、正しい配列が挿入されたクローンを選択した。このプラスミド DNA を SalI、BamHI を用いて酵素消化し、上記と同様の手順によって精製した。6D10-1-1 抗体の重鎖可変領域およびマウス重鎖定常領域のインサートを、既に軽鎖が挿入された上記のベクターに組み込み、大腸菌に導入した。

【0407】

得られた形質転換体より、正しい配列が挿入されたクローンを選択した。得られた 6D10-1-1 抗体発現ベクターと同様の手順で、10D5-2-3 抗体の発現ベクターも

50

作製した。軽鎖可変領域は制限酵素 B g l I I、B s i W I 切断サイト間に、重鎖可変領域は制限酵素 S a l I、N h e I 切断サイト間に挿入した。

【0408】

作製した 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体または、1 0 D 5 - 2 - 3 抗体発現ベクターを用いて大腸菌を形質転換し、N u c l e o B o n d X t r a M a x i (タカラバイオ社製)によってベクターを調製した。F r e e S t y l e 2 9 3 E x p r e s s i o n S y s t e m (ライフテクノロジーズ社製)を用いて一過性発現を行い、組換え抗体を発現させた。培養上清を、遠心分離と 0 . 2 2 μ m フィルターを用いた濾過により培養液から取得した。

【0409】

続いて、P r o t e i n g S e p h a r o s e 4 F a s t F l o w (GEヘルスケア社製)を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって抗体を精製した。N A P - 2 5 カラム (GEヘルスケア社製)を用いてバッファーをクエン酸バッファー (1 0 m M クエン酸 - N a O H (p H 6 . 0)、1 5 0 m M N a C l) に置換した。2 8 0 n m の吸光度を測定して濃度を決定した。分子吸光係数として、1 . 4 m L / (m g · c m) を使用した。

【0410】

2 0 - 2) ヒト B M P 9 / B M P 1 0 キメラタンパク質の作製

ヒト B M P 9 m a t u r e 領域のうち、配列番号 8 6 で表されるアミノ酸配列をヒト B M P 9 領域 C、ヒト B M P 1 0 m a t u r e 領域のうち、配列番号 1 3 9 で表されるアミノ酸配列をヒト B M P 1 0 領域 C と定義する。

【0411】

ヒト B M P 9 と最も相同性の高い分子はヒト B M P 1 0 であるが、取得した 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体、1 0 D 5 - 2 - 3 抗体および R & D 抗体は B M P 1 0 に交差性を持たない。ヒト B M P 9 領域 C に含まれるアミノ酸残基のうち、ヒト B M P 1 0 領域 C と異なるのは、配列番号 6 7 で表されるヒト B M P 9 m a t u r e 領域において、8 0 番目 S e r、8 4 番目 V a l、8 7 番目 L y s、8 9 番目 A s p、9 0 番目 M e t、9 3 番目 P r o、9 5 番目 L e u、9 7 番目 T y r、9 8 番目 H i s、1 0 3 番目 S e r、1 0 5 番目 A l a である。

【0412】

この領域 C の違いに基づいて、B M P 9 のアミノ酸残基を対応する B M P 1 0 のアミノ酸残基に置換することで、ヒト B M P 9 / 1 0 のキメラタンパク質 1 ~ 5 を設計した。

【0413】

キメラタンパク質 1 は、ヒト B M P 9 のうち、m a t u r e 領域の 8 7、8 9、及び 9 3 番目のアミノ酸残基を、それぞれ、L e u、L y s、V a l に置き換え、9 0 番目のアミノ酸残基を欠損させたものである。キメラタンパク質 2 は、ヒト B M P 9 のうち、m a t u r e 領域の 8 4、9 5、9 7 及び 9 8 番目のアミノ酸残基を、それぞれ、I l e、T y r、P h e 及び L y s に置き換えたものである。

【0414】

キメラタンパク質 3 は、ヒト B M P 9 のうち、m a t u r e 領域の 8 0、1 0 3 及び 1 0 5 番目のアミノ酸残基を、それぞれ、G l u、A l a 及び S e r に置き換えたものである。キメラタンパク質 4 は、ヒト B M P 9 のうち、m a t u r e 領域の 8 4、8 7、8 9、9 3、9 5、9 7 及び 9 8 番目のアミノ酸残基を、それぞれ、I l e、L e u、L y s、V a l、T y r、P h e 及び L y s に置き換え、9 0 番目のアミノ酸残基を欠損させたものである。

【0415】

キメラタンパク質 5 は、ヒト B M P 9 のうち、m a t u r e 領域の 8 0、8 4、9 5、9 7、9 8、1 0 3 及び 1 0 5 番目のアミノ酸残基を、それぞれ、G l u、I l e、T y r、P h e、L y s、A l a 及び S e r に置き換えたものである。キメラタンパク質 1 ~ 5 における、ヒト B M P 9 領域 C 及びヒト B M P 1 0 領域 C に相当するアミノ酸配列を配

10

20

30

40

50

列番号78～91に示す。

【0416】

国際公開第2010/126169号の実施例12及び図7に記載のN末His型hBMP9 complex組換え体発現ベクター（以下、pLN1V5__ヒトBMP9ベクターと記載）をStuIおよびXhoIを用いて酵素処理し、アガロースゲル電気泳動に供した後、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて精製した。

【0417】

ヒトBMP9/10領域Cのキメラタンパク質1～5は、配列番号92～101に示すキメラタンパク質作製用プライマーの各Fwd、Rvを1/6、2/7、3/8、4/9、5/10の組み合わせで混合してハイブリダイズさせたものを、精製したベクターにIn-fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ社製、Z9649N）を用いて挿入し、作製した。

10

【0418】

また、pLN1V5__ヒトBMP10ベクターは以下の手順で作製した。pLN1V5__ヒトBMP9ベクターをNheIおよびXhoIを用いて酵素処理し、アガロースゲル電気泳動に供した後、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて精製した。

【0419】

Human Heart PCR-Ready cDNA（Ambion社、3326）をテンプレートとして、配列番号102～105に示すFwd-1/Rv-1、Fwd-2/Rv-2のプライマーの組み合わせでPCRを行った。

20

【0420】

PCRは、PrimeSTAR HS（Premix）（タカラバイオ社製、R040A）を用い、96℃で2分間保温した後、98℃で10秒間、55℃で5秒間、及び72℃で2分間を1サイクルとして32サイクル反応を行った。

【0421】

得られた2つのPCR増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製し、インサートとした。In-fusion HD Cloning Kitを用いて、インサートを先に精製したpLN1V5ベクターに挿入してサブクローニングを行い、pLN1V5__ヒトBMP10ベクターとした。

30

【0422】

配列番号106～109に、ヒトBMP10とそのmature領域のアミノ酸配列および塩基配列を示す。配列番号110、111に、pLN1V5__ヒトBMP10ベクターによって発現する、N末にHisタグを付与したBMP10のアミノ酸配列および塩基配列を示す。

【0423】

前項で作製したpLN1V5__ヒトBMP10ベクター、およびpLN1V5__ヒトBMP9ベクターを用いて大腸菌を形質転換し、NucleoBond Xtra Maxi（タカラバイオ社製）によってベクターを調製した。

40

【0424】

FreeStyle 293 Expression System（ライフテクノロジーズ社製）を用いて一過性発現を行い、ヒトBMP9、ヒトBMP10、およびヒトBMP9/10領域Cのキメラタンパク質1～5を発現させた。

【0425】

培養上清を、遠心分離と0.22μmフィルターを用いた濾過により培養液から取得した。続いて、Ni-NTA Agarose（QIAGEN社製）を用いて各タンパク質を精製した。Binding bufferとして20mM HEPES-NaOH（pH 7.4）、500mM NaCl 40mM Imidazoleを用い、Elut

50

ion bufferとして20mM HEPES - NaOH (pH 7.4)、500mM NaCl 200mM Imidazoleを用いた。NAP-25カラム(GEヘルスケア社製、17-0852-02)を用いて、バッファをPBSに置換した。

【0426】

280nmの吸光度を測定して各タンパク質溶液の濃度を決定した。分子吸光係数として、ヒトBMP9、ヒトBMP10はそれぞれ1.05、0.96mL/(mg・cm)、キメラ1~5は1.055mL/(mg・cm)を使用した。

【0427】

20-3) 取得抗体のキメラタンパク質に対する特異的結合性

キメラタンパク質を用いて、取得抗体の固相抗原ELISAを行った。実施例20-2で調製したヒトBMP9、BMP10、BMP9/10キメラ組換えタンパク質を50mmol/L NaHCO₃緩衝液で3μg/mLに調製し、96ウェルのELISA用プレート(F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE、Thermo Fisher Scientific社製、Cat#442404)に50μL/ウェル加えて4で一晚静置して吸着させた。

10

【0428】

固相化液を取り除いた後、1%BSA-PBSを200μL/ウェル加え、室温で1時間静置してブロッキングし、PBSTで5回洗浄した。次に、1%BSA-PBSで1000ng/mLに調製した取得抗体(実施例20-1で作製したもの)、R&D抗体、BMP10抗体(R&D社製、MAB2926)、BMP9ヤギポリクロ抗体(R&D社製、AF3209)、陰性対照マウスIgG1、IgG2bモノクローナル抗体(MAB002、MAB004(ともにR&D社製))を50μL/ウェル加え、室温で1時間静置した。

20

【0429】

このプレートをPBSTで5回洗浄した後、1%BSA-PBSで2000倍希釈したGoat anti-mouse IgG HRP(DAKO社製、P0447)またはRabbit anti-goat IgG HRP(DAKO社製、P0160)を50μL/ウェル加え、室温で1時間静置した。

【0430】

プレートをPBSTで10回洗浄し、TMB発色液(TMB+ Substrate-Chromogen、Dako社製、Cat#S1599)を50μL/ウェル添加して発色させ、十分な発色が得られたところで、1N硫酸溶液(Wako社製、Cat#192-04755)を50μL/ウェル添加し、Multiskan Spectrum(Thermo Lab systems社製)を用いて450、570nmの吸光度を測定した。

30

【0431】

結果を表2に記載する。表内の+および-は、吸光度の値が1以上であった場合を+とし、1未満であった場合を-とした。

【表2】

抗体	ヒト BMP9	ヒト BMP10	キメラ 1	キメラ 2	キメラ 3	キメラ 4	キメラ 5
マウスIgG1コントロール抗体	-	-	-	-	-	-	-
マウスIgG2b コントロール抗体	-	-	-	-	-	-	-
BMP9ヤギ ポリクロ抗体	+	-	+	+	+	+	+
6D10-1-1抗体	+	-	+	-	+	-	-
10D5-2-3抗体	+	-	-	+	+	-	+
R&D抗体	+	-	+	-	+	-	-
BMP10抗体	-	+	-	-	-	-	-

40

50

【0432】

表2に示すように、抗原が適量固相化されていることを確認するために用いたBMP9ヤギポリクロー抗体については、ヒトBMP9およびキメラ1~5のいずれのタンパク質に対しても結合を示し、プレート上に十分な抗原が固相化できていることを確認した。

【0433】

一方、6D10-1-1抗体とR&D抗体はキメラタンパク質1、キメラタンパク質3に特異的に結合したのに対し、10D5-2-3抗体はキメラタンパク質2、キメラタンパク質3、キメラタンパク質5に特異的に結合することが分かった。

【0434】

これらの結果は、6D10-1-1抗体とR&D抗体はヒトBMP9 mature領域の少なくとも84番目Val、95番目Leu、97番目Tyr、98番目Hisに結合すること、10D5-2-3抗体はヒトBMP9 mature領域の少なくとも87番目Lys、89番目Asp、90番目Met、93番目Proに結合することを示している。以上のことから、少なくとも、10D5-2-3抗体は、既存のR&D抗体とは異なるBMP9のエピトープを認識する抗体であることが明らかとなった。

10

【0435】

[実施例21]

BMP9と取得複合体のBMP10シグナル阻害作用

実施例11、12の結果より、10D5-2-3抗体、6D10-1-1抗体は、ともに、ヒトBMP9とヒトALK1との結合は阻害せず、ヒトBMP9とヒトBMPRIIとの結合を特異的に阻害する抗体であることが判明した。

20

【0436】

また実施例20の結果からは、10D5-2-3抗体、6D10-1-1抗体のBMP9エピトープが異なることが明らかとなった。ALK1レセプターのリガンドとしては、BMP9の他、BMP10が知られている。6D10-1-1抗体もしくは10D5-2-3抗体が結合したBMP9はALK1に結合することにより、BMP10のALK1への結合を阻害し、BMP10によるALK1シグナルを減弱させる可能性が想定された。

【0437】

その可能性を検証するため、ヒトALK1発現レポーター細胞株を作製し、BMP9と取得抗体複合体のヒトBMP10依存性ヒトALK1由来シグナルに対する阻害作用を評価した。また同時に両者の認識エピトープの違いによる抗体間での作用の違いについても検証した。

30

【0438】

21-1) ヒトALK1発現レポーター細胞株の作製

ヒトALK1発現レポーター細胞は、国際公開第2010/126169号の実施例2に記載のBMPシグナル検出株[p(GCCG)12-Luc/HepG2(38.5)]に全長ヒトALK1遺伝子を強制発現させることにより[ALK1/p(GCCG)12-Luc/HepG2(38.5)]、作製した。

【0439】

ヒトALK1発現ベクターは、両端にEcoRIおよびNotI制限酵素サイトを持つヒトALK1の全長cDNAをEcoRIおよびNotIで消化したものを、pEAK8発現ベクター(Edg biosystems社製)に組み込むことにより、作製した。ヒトALK1の全長cDNA(cDNAのGenbankアクセッション番号:BC042637.1、配列番号112、アミノ酸配列のGenBankアクセッション番号:AAH42637、配列番号71)は、ヒト肺cDNAライブラリーとプライマー(配列番号113、114)を用いたPCRにより作製した。

40

【0440】

21-2) ヒトBMP9と取得抗体からなる複合体のBMP10依存性ALK1由来シグナルに対する作用

上記の方法により作出したヒトALK1レポーター細胞株[ALK1/p(GCCG)]

50

12-Luc/HepG2(38.5)]を1 μ g/mLのhsALK1-Fcを含むDMEM増殖培地[FCsを10%になるように添加したDMEM(Invitrogen社製)]に懸濁し、 1.5×10^4 個/ウェルになるように96ウェル白色プレート(パーキンエルマー社製)に播種した。

【0441】

翌日、ウェル内を200 μ Lの血清を含まないDMEMで洗浄した後、2ng/mLもしくは10ng/mLのヒトmature2量体BMP9組換え蛋白質(R&Dシステムズ社製、Cat#3209-BP)および3 μ g/mLの6D10-1-1抗体または10D5-2-3抗体を含む0.1%BSA(Bovine serum albumin)含有DMEM培地を、100 μ Lずつ添加した。

10

【0442】

その30分後、終濃度で0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10ng/mLになるように0.1%BSA(Bovine serum albumin)を用いて調整したヒトmature2量体BMP10組換え蛋白質(R&Dシステムズ社製、Cat#2926-BP-0255)を5 μ Lずつ添加し、6時間培養した。6時間後、化学発光試薬[Steadygluciferase assay system、プロメガ社製]を50 μ L添加し、Luciferase活性を測定した。陰性対照ウェルには、0.1%BSA含有DMEM培地を添加した。結果を図11に示す。

【0443】

図11に示すように、ヒトBMP9と6D10-1-1抗体との複合体は、BMP10依存性ALK1由来シグナルに対して抑制的に作用したのに対し、ヒトBMP9と10D5-2-3抗体との複合体は抑制しないことが明らかとなった。BMP10は遺伝子欠損動物を用いた試験により心臓の発生に重要な分子であることが知られており[Development, 131(9), 2219(2004)]、副作用の観点から、抗BMP9抗体としては、心臓形成に重要なBMP10シグナルには影響しない抗体であることが求められる。

20

【0444】

従って、10D5-2-3抗体は、6D10-1-1抗体またはR&D抗体より、副作用の観点において好ましい抗BMP9抗体であることが示唆された。

【0445】

30

[実施例22]

10D5-2-3キメラ抗体(c10D5-2-3抗体)及びヒト化抗体の作製

22-1)10D5-2-3ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

10D5-2-3ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。10D5-2-3VHのCDR1~3のアミノ酸配列(配列番号60、61及び62)の移植に適したヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を以下のようにして選択した。

【0446】

まず、既知のヒト抗体重鎖可変領域配列はThe National Center for Biotechnology Informationが提供するIg Germ line Genesデータベースにより、10D5-2-3抗体VHのFR配列と相同性の高いヒト抗体配列を検索した。その結果、IGVH3-72が最も相同性の高いヒト抗体配列であったため、この抗体のFRを選択した。以上のようにして決定したヒト抗体FR配列の適切な位置に配列番号60、61及び62で示す10D5-2-3抗体VHのCDR1~3のアミノ酸配列を移植することで、HV0(配列番号116)を設計した。

40

【0447】

次に、10D5-2-3抗体ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。10D5-2-3抗体VLのCDR1~3のアミノ酸配列(配列番号63、64及び65)を移植に適したヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を、以下のようにして選択した。

50

【0448】

カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ(HSGI~IV)に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept Health and Human Services (1991)]。そこで、ヒト抗体のVLのサブグループI~IVの共通配列のFRのアミノ酸配列と10D5-2-3抗体VLのFRのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

【0449】

相同性を検索した結果、HSGI、HSGII、HSGIII、およびHSGIVの相同性はそれぞれ67.1%、67.1%、68.4%、75.9%であった。従って、10D5-2-3抗体VLのFRのアミノ酸配列はサブグループIVと最も高い相同性を有していた。

10

【0450】

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIVの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に、10D5-2-3抗体VLのCDR1~3のアミノ酸配列(配列番号63、64及び65)を移植した。しかし、10D5-2-3抗体VLのアミノ酸配列(配列番号52)中の108番目のLeuは、カバットらがあげるヒト抗体FRのアミノ酸配列の相当する部位において、最も使用される頻度が高いアミノ酸残基ではないが、比較的高い頻度で使用されるアミノ酸残基であるため、上記の10D5-2-3抗体VLのアミノ酸配列で認められるアミノ酸残基を用いることとした。このようにして、10D5-2-3抗体ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列である10D5-2-3抗体LV0(配列番号118)を設計した。

20

【0451】

上記で設計した10D5-2-3抗体のVHのアミノ酸配列10D5-2-3抗体HV0、およびVLのアミノ酸配列10D5-2-3抗体LV0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に、マウスモノクローナル抗体である10D5-2-3抗体由来のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列である。

【0452】

しかし、一般に、ヒト化抗体を作製する場合には、単にヒト抗体のFRへマウス抗体のCDRのアミノ酸配列を移植するのみでは、結合活性が低下してしまうことが多い。このような結合活性の低下を回避するため、CDRのアミノ酸配列の移植とともに、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えられられるアミノ酸残基を改変することが行われている。そこで、本実施例においても、結合活性に影響を与えられられるFRのアミノ酸残基を以下のようにして同定し、改変することとした。

30

【0453】

まず、上記で設計した10D5-2-3抗体ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列10D5-2-3抗体HV0、およびVLのアミノ酸配列10D5-2-3抗体LV0より成る抗体V領域(以下、HV0LV0と表す)の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製および三次元構造の表示には、Discovery Studio(アクセルリス社)を用いた。

40

【0454】

また、10D5-2-3抗体のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様に構築した。更に、HV0LV0のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、10D5-2-3抗体と異なっているアミノ酸残基を選択し、10D5-2-3抗体のアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列を作製し、同様に三次元構造モデルを構築した。

【0455】

これら作製した10D5-2-3抗体、HV0LV0および改変体の各V領域の三次元構造を比較し、抗体の結合活性に影響を与えると予測されるアミノ酸残基を同定した。

50

【0456】

その結果、HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、10D5-2-3抗体HV0では、配列番号116のアミノ酸配列の8番目のGly、18番目のLeu、49番目のGly、79番目のAsn、81番目のLeu、94番目のAla、95番目のVal、99番目のAla、及び100番目のArgを、10D5-2-3抗体LV0では、配列番号118のアミノ酸配列の4番目のMet、40番目のTyr、81番目のSer、82番目のLeu、89番目のVal、及び91番目のTyrを、それぞれ選択した。

【0457】

これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上のアミノ酸配列を10D5-2-3抗体の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト化抗体のVHおよびVLを設計した。

【0458】

具体的には、VHについては、配列番号116のアミノ酸配列中の、8番目のGlyをArgに、18番目のLeuをMetに、49番目のGlyをAlaに、79番目のAsnをSerに、81番目のLeuをValに、94番目のAlaをGlyに、95番目のValをIleに、99番目のAlaをThrに、又は100番目のArgをGlyに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。

【0459】

また、VLについては、配列番号118のアミノ酸配列中の、4番目のMetをLeuに、40番目のTyrをPheに、81番目のSerをProに、82番目のLeuをMetに、89番目のValをMetに、又は91番目のTyrをPheに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。

【0460】

HV0LV0のFRに存在する、少なくとも1つのアミノ酸残基を改変した10D5-2-3抗体ヒト化抗体の抗体V領域として、HV0LV0、HV0LV2、HV0LV3、HV0LV4、HV0LV6、HV9LV0、HV9LV2、HV9LV3、HV9LV4、HV9LV6、HV3LV0、HV4aLV0、HV4bLV0、HV7aLV0、HV3LV2、HV3LV3、HV3LV6、HV4bLV2、HV4bLV3、HV4bLV6、HV7aLV2、およびHV7bLV2をそれぞれ設計した。

【0461】

以降の記述においては、上述のV領域を含む10D5-2-3抗体ヒト化抗体をそれぞれHV0LV0、HV0LV2、HV0LV3、HV0LV4、HV0LV6、HV9LV0、HV9LV2、HV9LV3、HV9LV4、HV9LV6、HV3LV0、HV4aLV0、HV4bLV0、HV7aLV0、HV3LV2、HV3LV3、HV3LV6、HV4bLV2、HV4bLV3、HV4bLV6、HV7aLV2、およびHV7bLV2と略記する。

【0462】

H鎖可変領域HV3（配列番号120）、HV4a（配列番号122）、HV4b（配列番号124）、HV7a（配列番号126）、HV7b（配列番号128）、HV9（配列番号130）、およびL鎖可変領域LV2（配列番号132）、LV3（配列番号134）、LV4（配列番号136）、LV6（配列番号138）のアミノ酸配列をそれぞれ図12および図13に示す。

【0463】

22-2) 10D5-2-3抗体ヒト化抗体の可変領域遺伝子の設計

ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードするDNAは、10D5-2-3抗体VHおよび10D5-2-3抗体VLのアミノ酸配列をコードするDNA（それぞれ配列番号31、37）で用いられているコドンを利用して設計し、アミノ酸改変を行う場合には、哺乳動物細胞で高頻度に使用されるコドンを用いて設計し、各々作製した。これらDN

10

20

30

40

50

A配列を用いて、抗体発現ベクターの構築およびヒト化抗体の発現を行った。

【0464】

22-3) c10D5-2-3抗体、およびヒト化抗体のVHをコードするcDNAの構築

配列番号49で示される10D5-2-3抗体のVH、および実施例22-1)で設計した10D5-2-3抗体ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0(配列番号116)、および実施例22-1)の方法により設計したHV3、HV4a、HV4b、HV7a、HV7b、HV9をコードするcDNAを全合成にて作成した。

【0465】

22-4) c10D5-2-3抗体、およびヒト化抗体のVLをコードするcDNAの構築

配列番号52で示される10D5-2-3抗体のVL、および実施例22-1)で設計した10D5-2-3抗体ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列LV0(配列番号118)、および実施例22-1)の方法により設計したLV2、LV3、LV4、LV6をコードするcDNAを全合成にて作成した。

【0466】

22-5) c10D5-2-3抗体、およびヒト化抗体発現ベクターの構築

国際公開第97/10354号に記載のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の適当な位置に10D5-2-3抗体のVH、実施例22-3)で得られたHV0、HV3、HV4a、HV4b、HV7a、HV7b、HV9のいずれかをコードするcDNA、および10D5-2-3抗体のVL、実施例22-4)で得られたLV0、LV2、LV3、LV4、LV6のいずれかをコードするcDNAを挿入し、各種10D5-2-3抗体ヒト化抗体発現ベクターを構築した。

【0467】

22-6) 動物細胞を用いたc10D5-2-3抗体、および10D5-2-3抗体ヒト化抗体の発現

実施例22-5)にて構築した動物細胞用の抗体発現ベクターの遺伝子導入は、CHO-S細胞株(invitrogen社製)を用いた。

【0468】

CHO-Sを宿主細胞とし、FreeStyleTM MAX CHO Expression System(invitrogen社製)の説明書に基づいて、一過性に導入した。312.5μLのFreeStyleTM MAX Transfection Reagent(invitrogen社製)を、OptiProTM SFMと混合して計5mLとした。発現ベクタープラスミド溶液とFreeStyleTM MAX Transfection Reagent 溶液を混合し、室温で10分間静置した。FreeStyleTM CHO Expression Medium(invitrogen社製)にて、 1.0×10^6 cells/mLの密度で培養したCHO-S 250mLに対して、全量を加えた後、37、8%CO₂、135rpmの設定条件下で、5日~7日間培養した。

【0469】

培養後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4の条件で20分間の遠心分離を行い、培養上清を回収した後、0.22μm孔径Millex GVフィルター(MILLIPORE社)を通して濾過滅菌した。

【0470】

22-7) 精製c10D5-2-3抗体および10D5-2-3抗体ヒト化抗体の取得
0.8cm径のカラムにMabSelect SuRe(GE Healthcare社製)0.5mLを充填し、精製水3.0mL、0.1Mクエン酸緩衝液(pH 3.5)2.0mL、および150mM NaCl, 0.2Mホウ酸ナトリウム酸緩衝液(pH 7.5)1.5mLを順次通塔し、担体の平衡化を行った。

【0471】

10

20

30

40

50

次に、実施例 22 - 6) で回収した培養上清をカラムに通塔した後、150 mM NaCl, 0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 5.0 mL で洗浄した。洗浄後、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 3.5) 2.0 mL を用いて担体に吸着した抗体の溶出を行った。溶出は 500 μ L ずつ、4 画分に分けて取得した。

【0472】

次に、得られた精製画分の SDS - PAGE 解析を行い、目的蛋白質の溶出が確認された画分をまとめ、150 mM NaCl、10 mM クエン酸 Na 溶液 (pH 6.0) を用いて、4 で一昼夜透析を行った。

【0473】

透析後、c10D5 - 2 - 3 抗体、ヒト化抗体溶液を回収し、0.22 μ m 孔径 Millig V (MILLIPORE 社) を用いて滅菌濾過した後に、280 nm の吸光度 (OD 280 nm) を吸光度計 (SHIMADZU UV - 1700) を用いて測定し、各精製 c10D5 - 2 - 3 抗体、ヒト化抗体の濃度を算出した。

10

【0474】

その結果、10D5 - 2 - 3 抗体の VH、および 10D5 - 2 - 3 抗体の VL からなる 1 種類のキメラ抗体 c10D5 - 2 - 3 抗体、および抗体の VH が HV0、および VL が LV0、または LV2、または LV3、または LV4、または LV6 からなるヒト化抗体 HV0LV0、HV0LV2、HV0LV3、HV0LV4、HV0LV6、抗体の VH が HV9、および VL が LV0、または LV2、または LV3、または LV4、または LV6 からなるヒト化抗体 HV9LV0、HV9LV2、HV9LV3、HV9LV4、HV9LV6、抗体の VH が HV3、および VL が LV0、または LV2、または LV3、または LV6 からなるヒト化抗体 HV3LV0、HV3LV2、HV3LV3、HV3LV6、抗体の VH が HV4a、および VL が LV0 からなるヒト化抗体 HV4aLV0、抗体の VH が HV4b、および VL が LV0、または LV2、または LV3、または LV6 からなるヒト化抗体 HV4bLV0、HV4bLV2、HV4bLV3、HV4bLV6、抗体の VH が HV7a、および VL が LV0、または LV2 からなるヒト化抗体 HV7aLV0、HV7aLV2、抗体の VH が HV7b、および VL が LV2 からなるヒト化抗体 HV7bLV2、の 22 種類が作製されたことを確認した。

20

【0475】

[実施例 23]

30

抗 BMP9 ヒト化抗体の活性評価

23 - 1) ビアコアによる c10D5 - 2 - 3 抗体およびヒト化抗体のヒト BMP9 蛋白質への結合活性評価

実施例 22 - 7 で得られた c10D5 - 2 - 3 抗体および 22 種類の 10D5 - 2 - 3 抗体ヒト化抗体のヒト BMP9 に対する反応性を比較することを目的とし、ヒト BMP9 組換え蛋白質 (R&D systems 社) に対する結合活性を、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) による Biacore T100 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いて測定した。

【0476】

Anti-human IgG antibody を、Human Antibody Capture Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いて添付のプロトコルに従い、CM5 センサーチップ (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) に固定化した。Anti-human IgG antibody を固定化したフローセルに、0.4 μ g/mL に調製した c10D5 - 2 - 3 抗体または各ヒト化抗体を 10 μ L / 分の流速で 2 分間添加した。

40

【0477】

次いで、1 nM より 2 倍希釈で段階的に 5 濃度調製したヒト BMP9 組換え蛋白質 (R&D システムズ社製、Cat # 3209 - BP) を 10 μ L / 分の流速で、結合反応を 3 分間、解離反応を 3 分間モニターした。取得したセンサーグラムは、BiaEvaluation Software (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いて解析し、各

50

抗体の速度論定数を算出した。

【 0 4 7 8 】

算出された各抗体の結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d) および解離定数 [$k_d / k_a = K_D$] を表 3 に記載した。その結果、17種類の10D5-2-3抗体ヒト化抗体は、ヒトBMP9蛋白質に対し、 $10E-11$ 以下の特異的な反応性を有していることが確認された。

【表 3】

抗体	Kd(1/MS)	Ka(1/s)	KD(M)
c10D5-2-3抗体	5.32 X 10E7	2.40 X 10E-4	4.52 X 10E-12
HV0LV0			N. D.
HV0LV2			N. D.
HV0LV3			N. D.
HV0LV4			N. D.
HV0LV6			N. D.
HV9LV0	13.3 X 10E7	8.59 X 10E-4	6.45 X 10E-12
HV9LV2	8.91 X 10E7	3.47 X 10E-4	3.89 X 10E-12
HV9LV3	7.91 X 10E7	2.79 X 10E-4	3.52 X 10E-12
HV9LV4	11.6 X 10E7	7.39 X 10E-4	6.38 X 10E-12
HV9LV6	6.34 X 10E7	3.25 X 10E-4	5.13 X 10E-12
HV3LV0	15.1 X 10E7	17.2 X 10E-4	11.4 X 10E-12
HV4aLV0	15.7 X 10E7	14.5 X 10E-4	9.24 X 10E-12
HV4bLV0	14.4 X 10E7	16.4 X 10E-4	11.4 X 10E-12
HV7aLV0	14.7 X 10E7	14.2 X 10E-4	9.69 X 10E-12
HV3LV2	5.12 X 10E7	5.96 X 10E-4	11.6 X 10E-12
HV3LV3	5.43 X 10E7	5.16 X 10E-4	9.49 X 10E-12
HV3LV6	4.67 X 10E7	5.55 X 10E-4	11.9 X 10E-12
HV4bLV2	5.39 X 10E7	5.88 X 10E-4	10.9 X 10E-12
HV4bLV3	5.50 X 10E7	5.56 X 10E-4	10.1 X 10E-12
HV4bLV6	4.46 X 10E7	5.31 X 10E-4	11.9 X 10E-12
HV7aLV2	4.98 X 10E7	4.77 X 10E-4	9.57 X 10E-12
HV7bLV2	6.25 X 10E7	3.07 X 10E-4	4.91 X 10E-12

N. D. : Not Detected

【 0 4 7 9 】

[実施例 2 4]

正常BALB/cマウスの赤血球造血に対する10D5-2-3抗体ヒト化抗体の作用次に10D5-2-3抗体ヒト化抗体に実際に赤血球増加作用が保持されているか、BALB/cマウスを用いて4種類のヒト化抗体(HV9LV2, HV9LV3, HV7aLV2, HV7bLV2)の赤血球造血に対する作用を評価した。7週齢の雄性BALB/cマウス(日本チャールズリバー社製)を購入し、実験に供した。飲水は滅菌水道水を、食餌は固形飼料FR-2(フナバシファーム社製)を自由摂取で与えた。

【 0 4 8 0 】

予備飼育後、体重を指標にして、7群に群分けし(各群n=6)、4種類のヒト化抗体(HV9LV2, HV9LV3, HV7aLV2, HV7bLV2)に加え、c10D5-2-3抗体及び10D5-2-3抗体を1mg/kgの投与量になるように皮下投与した。

【 0 4 8 1 】

具体的には、各々の抗体を生理食塩水にて0.1mg/mLになるように調製したものを10mL/kgの用量にて投与した。媒体群には生理食塩水を10mL/kgの用量にて皮下投与した。抗体投与から1週間後、イソフルラン麻酔下にて眼窩静脈より採血を行い、EDTA入り採血管に加えて血液サンプルとした。

10

20

30

40

50

【0482】

得られた血液サンプルを生理食塩水にて2倍希釈し、自動血球計数装置 ADVIA 120 (パイエルメディカル社製)を用いて、各種血球数を測定した。各群の赤血球数 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$) は、saline群が 1036.3 ± 10.9 であったのに対し、HV9LV2投与群、HV9LV3投与群、HV7aLV2投与群、HV7bLV2投与群、c10D5-2-3抗体投与群、10D5-2-3抗体投与群は、それぞれ、 1168.0 ± 13.4 、 1157.3 ± 8.7 、 1145.3 ± 12.8 、 1144.3 ± 14.4 、 1127.7 ± 10.9 、 1106.0 ± 7.5 (平均値 \pm 標準誤差) の値を示し、いずれのヒト化抗体にも有意な赤血球増加作用があることが確認された。

【0483】

本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2012年7月2日付けで出願された米国仮出願 (61/666,981号) に基づいており、その全体が引用により援用される。

【配列表フリーテキスト】

【0484】

配列番号1: Link A1の塩基配列

配列番号2: Link A2の塩基配列

配列番号3: Link B1の塩基配列

配列番号4: Link B2の塩基配列

配列番号5: Bmp9KOCl a I - 3' Fwの塩基配列

配列番号6: Bmp9KOAsc I - 3' Rvの塩基配列

配列番号7: Bmp9KOPac I - 5' Fwの塩基配列

配列番号8: Bmp9KOFse I - 5' Rvの塩基配列

配列番号9: Bmp9KO5' probe FW2の塩基配列

配列番号10: Bmp9KO5' probe RV2の塩基配列

配列番号11: Bmp9KO3' probe FW2の塩基配列

配列番号12: Bmp9KO3' probe RV2の塩基配列

配列番号13: mBMP9__FW5915の塩基配列

配列番号14: mBMP9__RV17165の塩基配列

配列番号15: mBMP9__FW1の塩基配列

配列番号16: mBMP9__RV1の塩基配列

配列番号17: マウスIgG1に特異的なプライマーRV1の塩基配列

配列番号18: マウスIgG1に特異的なプライマーRV2の塩基配列

配列番号19: マウスIgG2aに特異的なプライマーRV1の塩基配列

配列番号20: マウスIgG2aに特異的なプライマーRV2の塩基配列

配列番号21: マウスIgG2bに特異的なプライマーRV1の塩基配列

配列番号22: マウスIgG2bに特異的なプライマーRV2の塩基配列

配列番号23: マウスIgG2cに特異的なプライマーRVの塩基配列

配列番号24: マウスIgG3に特異的なプライマーRV1の塩基配列

配列番号25: マウスIgG3に特異的なプライマーRV2の塩基配列

配列番号26: マウスIg () 特異的プライマーRV1の塩基配列

配列番号27: マウスIg () 特異的プライマーRV2の塩基配列

配列番号28: マウスIg () 特異的なプライマーRV1の塩基配列

配列番号29: マウスIg () 特異的なプライマーRV2の塩基配列

配列番号30: 6D10-1-1抗体のVH全塩基配列

配列番号31: 10D5-2-3抗体のVH全塩基配列

配列番号32: 3B7-3-3抗体のVH全塩基配列

配列番号33: 6D10-1-1抗体のVH全アミノ酸配列 (シグナル配列を含む)

配列番号34: 10D5-2-3抗体のVH全アミノ酸配列 (シグナル配列を含む)

10

20

30

40

50

配列番号 35 : 3 B 7 - 3 - 3 抗体の V H 全アミノ酸配列 (シグナル配列を含む)	
配列番号 36 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の V L 全塩基配列	
配列番号 37 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の V L 全塩基配列	
配列番号 38 : 3 B 7 - 3 - 3 抗体の V L 全塩基配列	
配列番号 39 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の V L 全アミノ酸配列 (シグナル配列を含む)	
配列番号 40 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の V L 全アミノ酸配列 (シグナル配列を含む)	
配列番号 41 : 3 B 7 - 3 - 3 抗体の V L 全アミノ酸配列 (シグナル配列を含む)	
配列番号 42 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の V H 塩基配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 43 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の V H 塩基配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 44 : 3 B 7 - 3 - 3 抗体の V H 塩基配列 (シグナル配列を除く)	10
配列番号 45 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の V L 塩基配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 46 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の V L 塩基配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 47 : 3 B 7 - 3 - 3 抗体の V L 塩基配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 48 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の V H アミノ酸配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 49 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の V H アミノ酸配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 50 : 3 B 7 - 3 - 3 抗体の V H アミノ酸配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 51 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の V L アミノ酸配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 52 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の V L アミノ酸配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 53 : 3 B 7 - 3 - 3 抗体の V L アミノ酸配列 (シグナル配列を除く)	
配列番号 54 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体 V H の C D R 1 アミノ酸配列	20
配列番号 55 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体 V H の C D R 2 アミノ酸配列	
配列番号 56 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体 V H の C D R 3 アミノ酸配列	
配列番号 57 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体 V L の C D R 1 アミノ酸配列	
配列番号 58 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体 V L の C D R 2 アミノ酸配列	
配列番号 59 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体 V L の C D R 3 アミノ酸配列	
配列番号 60 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体 V H の C D R 1 アミノ酸配列	
配列番号 61 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体 V H の C D R 2 アミノ酸配列	
配列番号 62 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体 V H の C D R 3 アミノ酸配列	
配列番号 63 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体 V L の C D R 1 アミノ酸配列	
配列番号 64 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体 V L の C D R 2 アミノ酸配列	30
配列番号 65 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体 V L の C D R 3 アミノ酸配列	
配列番号 66 : ヒト B M P 9 蛋白質のアミノ酸配列 (シグナル配列を含む)	
配列番号 67 : ヒト B M P 9 m a t u r e 領域のアミノ酸配列	
配列番号 68 : ヒト B M P 9 蛋白質をコードする塩基配列 (シグナル配列含む)	
配列番号 69 : ヒト B M P 9 m a t u r e 領域をコードする塩基配列	
配列番号 70 : ヒト B M P R I I のアミノ酸配列	
配列番号 71 : ヒト A L K 1 のアミノ酸配列	
配列番号 72 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の軽鎖の増幅に用いたプライマー F w d の塩基配列	
配列番号 73 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の軽鎖の増幅に用いたプライマー R v の塩基配列	
配列番号 74 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の重鎖の増幅に用いたプライマー F w d の塩基配列	40
配列番号 75 : 6 D 1 0 - 1 - 1 抗体の重鎖の増幅に用いたプライマー R v の塩基配列	
配列番号 76 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の軽鎖の増幅に用いたプライマー F w d の塩基配列	
配列番号 77 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の軽鎖の増幅に用いたプライマー R v の塩基配列	
配列番号 78 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の重鎖の増幅に用いたプライマー F w d の塩基配列	
配列番号 79 : 1 0 D 5 - 2 - 3 抗体の重鎖の増幅に用いたプライマー R v の塩基配列	
配列番号 80 : マウス軽鎖 (鎖) 定常領域の鋳型とした塩基配列	
配列番号 81 : マウス重鎖 (I g G 1) 定常領域の鋳型とした塩基配列	
配列番号 82 : マウス軽鎖 (鎖) 定常領域の増幅に用いたプライマー F w d の塩基配列	
配列番号 83 : マウス軽鎖 (鎖) 定常領域の増幅に用いたプライマー R v の塩基配列	
配列番号 84 : マウス重鎖 (I g G 1) 定常領域の増幅に用いたプライマー F w d の塩基	50

配列

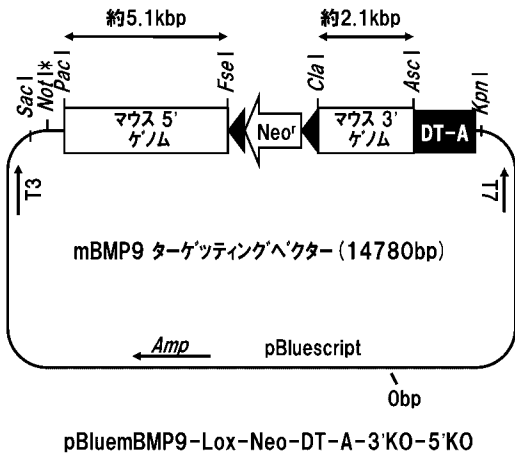
- 配列番号 85 : マウス重鎖 (I g G 1) 定常領域の増幅に用いたプライマー R v の塩基配列
- 配列番号 86 : ヒト B M P 9 領域 C のアミノ酸配列
- 配列番号 87 : ヒト B M P 9 / B M P 10 キメラタンパク質 1 の領域 C のアミノ酸配列
- 配列番号 88 : ヒト B M P 9 / B M P 10 キメラタンパク質 2 の領域 C のアミノ酸配列
- 配列番号 89 : ヒト B M P 9 / B M P 10 キメラタンパク質 3 の領域 C のアミノ酸配列
- 配列番号 90 : ヒト B M P 9 / B M P 10 キメラタンパク質 4 の領域 C のアミノ酸配列
- 配列番号 91 : ヒト B M P 9 / B M P 10 キメラタンパク質 5 の領域 C のアミノ酸配列
- 配列番号 92 : キメラタンパク質作製用プライマー 1 の塩基配列 10
- 配列番号 93 : キメラタンパク質作製用プライマー 2 の塩基配列
- 配列番号 94 : キメラタンパク質作製用プライマー 3 の塩基配列
- 配列番号 95 : キメラタンパク質作製用プライマー 4 の塩基配列
- 配列番号 96 : キメラタンパク質作製用プライマー 5 の塩基配列
- 配列番号 97 : キメラタンパク質作製用プライマー 6 の塩基配列
- 配列番号 98 : キメラタンパク質作製用プライマー 7 の塩基配列
- 配列番号 99 : キメラタンパク質作製用プライマー 8 の塩基配列
- 配列番号 100 : キメラタンパク質作製用プライマー 9 の塩基配列
- 配列番号 101 : キメラタンパク質作製用プライマー 10 の塩基配列
- 配列番号 102 : ヒト B M P 10 クロニーニング用プライマー F w d - 1 の塩基配列 20
- 配列番号 103 : ヒト B M P 10 クロニーニング用プライマー R v - 1 の塩基配列
- 配列番号 104 : ヒト B M P 10 クロニーニング用プライマー F w d - 2 の塩基配列
- 配列番号 105 : ヒト B M P 10 クロニーニング用プライマー R v - 2 の塩基配列
- 配列番号 106 : ヒト B M P 10 蛋白質のアミノ酸配列 (シグナル配列を含む)
- 配列番号 107 : ヒト B M P 10 m a t u r e 領域のアミノ酸配列
- 配列番号 108 : ヒト B M P 10 蛋白質をコードする塩基配列 (シグナル配列含む)
- 配列番号 109 : ヒト B M P 10 m a t u r e 領域をコードする塩基配列
- 配列番号 110 : p L N 1 V 5 __ ヒト B M P 10 ベクターによって発現されるタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 111 : p L N 1 V 5 __ ヒト B M P 10 ベクターにより発現されるアミノ酸をコードする塩基配列 30
- 配列番号 112 : ヒト A L K 1 の全長 c D N A
- 配列番号 113 : h A L K 1 F P N の塩基配列
- 配列番号 114 : h A L K 1 R P 配列番号 115 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 0) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 116 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 0) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 117 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 0) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 118 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 0) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く) 40
- 配列番号 119 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 3) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 120 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 3) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 121 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 4 a) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 122 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 4 a) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 123 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 4 b) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 124 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 4 b) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 125 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 7 a) の塩基配列 (シグナル配列を除く) 50

- 配列番号 1 2 6 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 7 a) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 2 7 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 7 b) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 2 8 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 7 b) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 2 9 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 9) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 0 : ヒト化抗体改変体 V H (H V 9) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 1 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 2) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 2 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 2) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 3 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 3) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 4 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 3) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 5 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 4) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 6 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 4) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 7 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 6) の塩基配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 8 : ヒト化抗体改変体 V L (L V 6) のアミノ酸配列 (シグナル配列を除く)
- 配列番号 1 3 9 : ヒト B M P 1 0 領域 C のアミノ酸配列

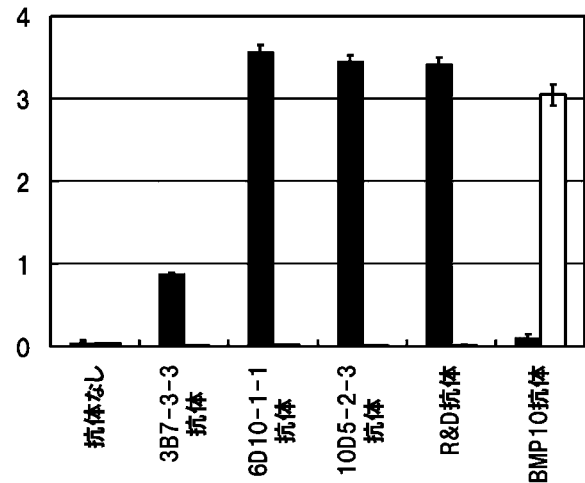
10

20

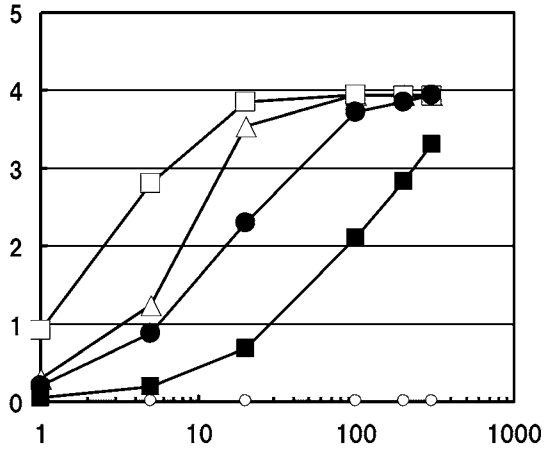
【 図 1 】



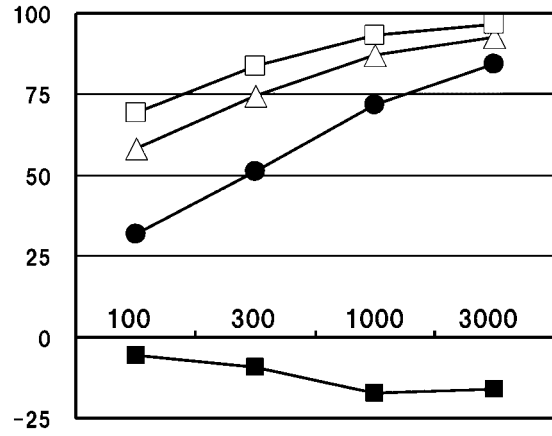
【 図 2 】



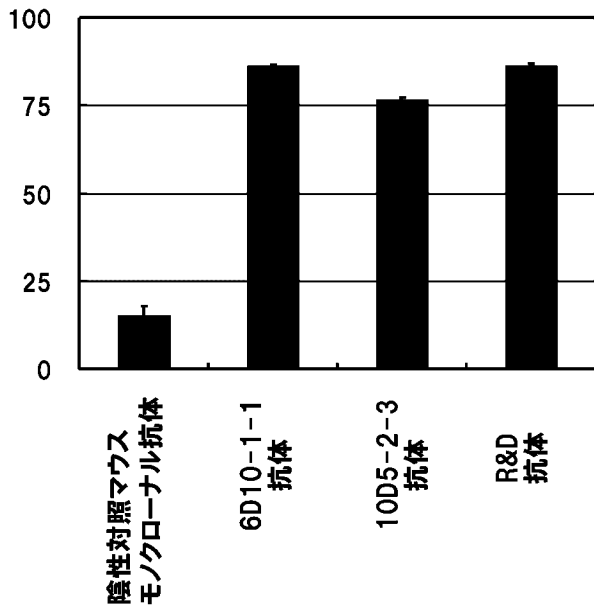
【 図 3 】



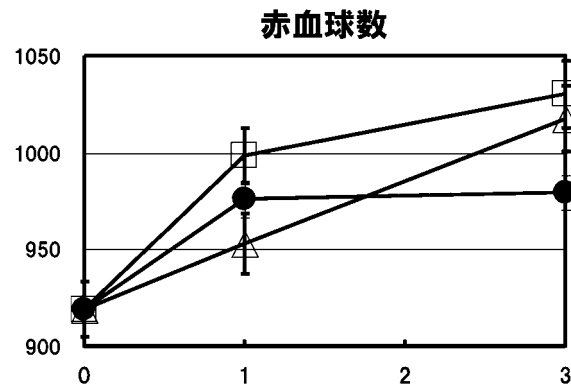
【 図 4 】



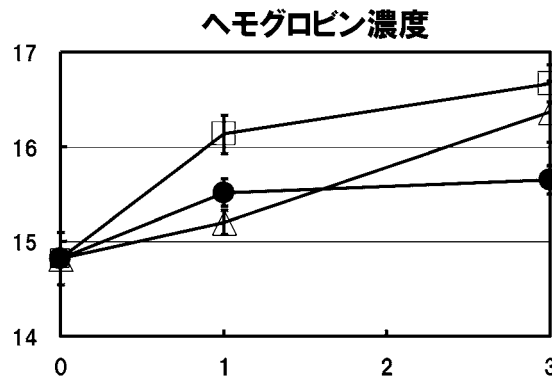
【 図 5 】



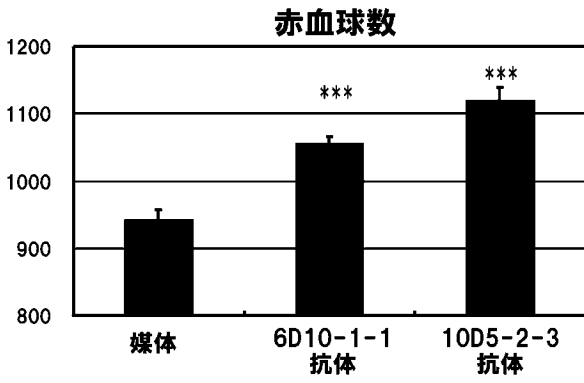
【 図 6 A 】



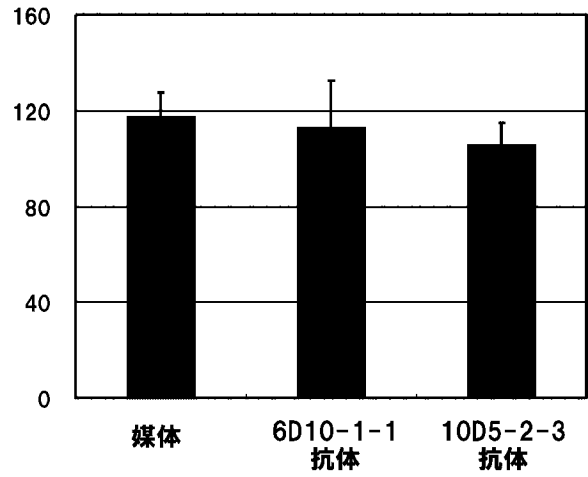
【 図 6 B 】



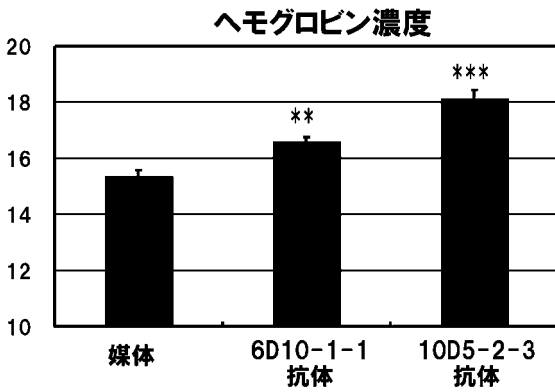
【 図 7 A 】



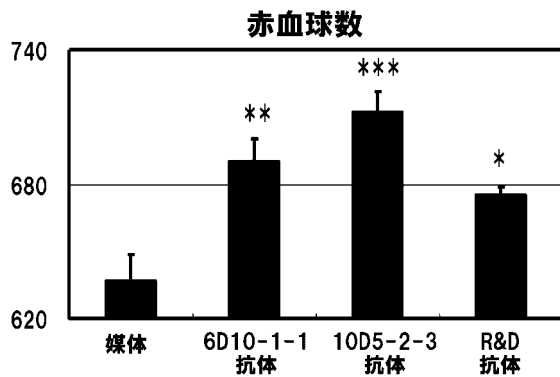
【 図 8 】



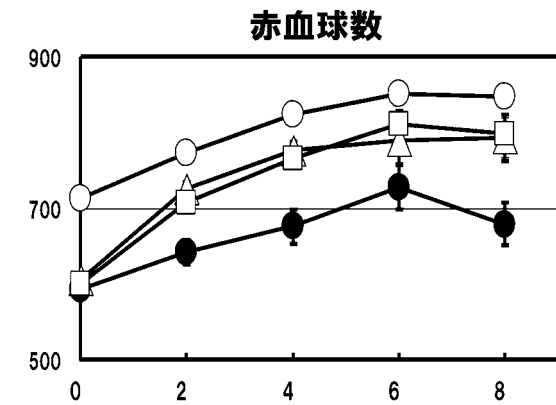
【 図 7 B 】



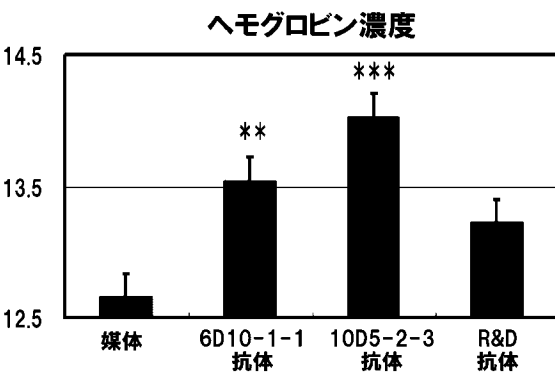
【 図 9 A 】



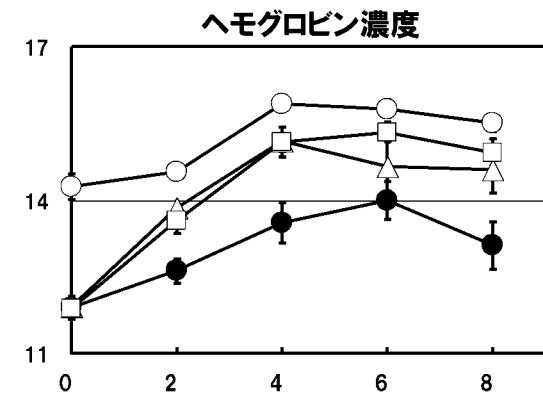
【 図 10 A 】



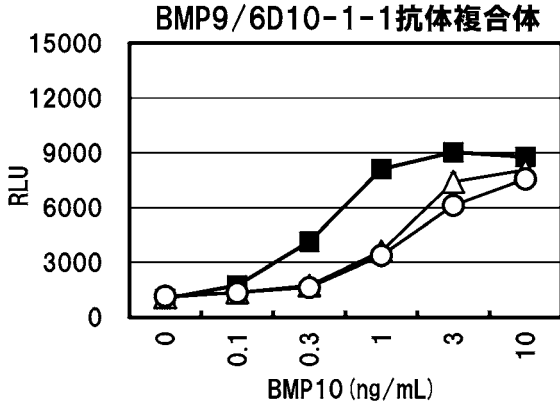
【 図 9 B 】



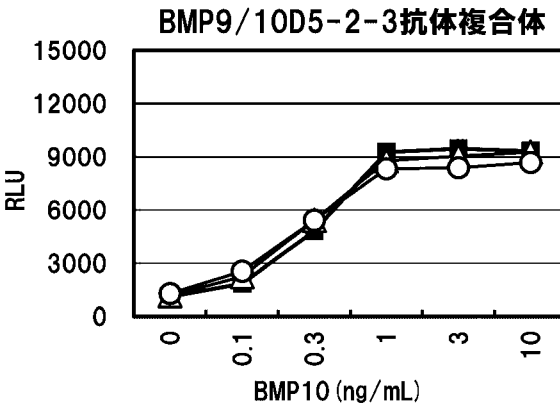
【 図 10 B 】



【 図 1 1 A 】



【 図 1 1 B 】



【 図 1 2 】

123456789012345678901234567890	13345	67890123456789	012345678901234
10D5抗体 HV3 HV4a HV4b HV7a HV7b HV9	CDR1	CDR2	
5678	90123456789012345678901234567890	12345678	90123456789
10D5抗体 HV3 HV4a HV4b HV7a HV7b HV9	CDR2	CDR3	

【 図 1 3 】

12345678901234567890123	456789012345678	901234567890123	4567890
10D5抗体 LV2 LV3 LV4 LV6	CDR1	CDR2	
1234567890123456789012	345678901	2345678901	
10D5抗体 LV2 LV3 LV4 LV6	CDR3		

【 配 列 表 】

2014007198000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/067994
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 2010/128158 A1 (NOVARTIS AG), 11 November 2010 (11.11.2010), entire text & JP 2012-526087 A & US 2012/0183543 A1 & EP 2427494 A	1-11,13,14/ 12
Y/A	WO 2009/084738 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 09 July 2009 (09.07.2009), entire text (Family: none)	1-11,13,14/ 12
Y/A	WO 2010/126169 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 04 November 2010 (04.11.2010), pages 12 to 17 (Family: none)	1-11,13,14/ 12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 July, 2013 (26.07.13)		Date of mailing of the international search report 06 August, 2013 (06.08.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067994

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Sara I.Cunha.et al., Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis., J.Exp.Med., 2010, Vol.207, p.85-100	1-11,13,14/ 12
Y/A	GDF2 / BMP9 Rabbit anti-Human Polyclonal (N-Terminus) Antibody, LSBio Catalog, 2012.03.16, CatalogID:LS-C97992	1-11,13,14/ 12
Y/A	Human/Mouse BMP-9 Antibody, R and D Systems Catalog, 2011, Catalog No.AF3209	1-11,13,14/ 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067994

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

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

1. Claims Nos.: 15-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067994

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

The inventions of claims 15 to 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy or the like and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2) (a) (i) and [PCT Rule 39.1(iv)].

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 7 9 9 4	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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/MEDLINE/BIOSIS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y/A	WO 2010/128158 A1 (NOVARTIS AG) 2010.11.11, 全文 & JP 2012-526087 A & US 2012/0183543 A1 & EP 2427494 A	1-11, 13, 14/12	
Y/A	WO 2009/084738 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2009.07.09, 全文 (ファミリーなし)	1-11, 13, 14/12	
Y/A	WO 2010/126169 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2010.11.04, p.12-17 等 (ファミリーなし)	1-11, 13, 14/12	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		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 26.07.2013		国際調査報告の発送日 06.08.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松原 寛子	4 N 4 1 5 4
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 7 9 9 4
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 請求項の番号
Y/A	Sara I.Cunha. et al., Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis., J.Exp.Med., 2010, Vol.207, p.85-100	1-11、1 3、14/12
Y/A	GDF2 / BMP9 Rabbit anti-Human Polyclonal (N-Terminus) Antibody, LSBio Catalog, 2012.03.16, CatalogID:LS-C97992	1-11、1 3、14/12
Y/A	Human/Mouse BMP-9 Antibody, R and D Systems Catalog, 2011, Catalog No. AF3209	1-11、1 3、14/12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 7 9 9 4

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 15-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項15-16に係る発明は、治療などによる人体の処置方法に関するものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及び[PCT規則39.1(iv)]の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度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。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B

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

(72) 発明者 山崎 雄司
東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

(72) 発明者 久保田 麗夫
東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

(72) 発明者 木村 要
東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA01 GA01 GA11 HA01
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA14 CC01 CC07 DD21 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04 GG08
GG10
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	一种抗贫血症的治疗剂，例如肾性贫血和癌性贫血，其含有抗BMP9抗体作为活性成分		
公开(公告)号	JPWO2014007198A1	公开(公告)日	2016-06-02
申请号	JP2014523730	申请日	2013-07-01
申请(专利权)人(译)	协和発酵キリン株式会社		
[标]发明人	清水清 山崎雄司 久保田麗夫 木村要		
发明人	清水 清 山崎 雄司 久保田 麗夫 木村 要		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P7/06 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K39/3955 A61K2039/505 C07K16/18 C07K16/22 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/92 C12N15/09		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N15/00.A C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.N A61P7/06 G01N33/53.D G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/CC01 4C085/CC07 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	山崎朋子		
优先权	61/666981 2012-07-02 US		
其他公开文献	JP6298762B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明结合人BMP9 (骨形态发生蛋白-9)，抗BMP9单克隆抗体或其抗体片段，产生该抗体或抗体片段的杂交瘤，编码该抗体或抗体片段的DNA，该DNA 以及通过导入载体而获得的转化体，使用杂交瘤或转化体的抗体或抗体片段的制造方法，以及以该抗体或抗体片段为有效成分的治疗剂。要做。本发明还包含作为活性成分的抗体或抗体片段，肾性贫血，用于治疗贫血例如癌性贫血的药物组合物和使用其的肾性贫血，癌症 提供了一种治疗贫血如先天性贫血的方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許 (A1)	(11) 国際公開番号
発行日 平成28年6月2日 (2016.6.2)		(43) 国際公開日 平成26年1月9日 (2014.1.9)
(51) Int. Cl.	F 1	ターマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 ZNA	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁)	最終頁に続く
出願番号 特願2014-523730 (P2014-523730)	(71) 出願人 000001029	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/067994	協和発酵キリン株式会社	
(22) 国際出願日 平成25年7月1日 (2013.7.1)	東京都千代田区大手町1丁目6番1号	
(31) 優先権主張番号 61/666,981	(74) 代理人 110002000	
(32) 優先日 平成24年7月2日 (2012.7.2)	特許業務法人栄光特許事務所	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100090343	
	弁理士 濱田 百合子	
	(74) 代理人 100129160	
	弁理士 古館 久丹子	
	(74) 代理人 100177460	
	弁理士 山崎 智子	
	(72) 発明者 清水 清	
	東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗BMP9抗体を有効成分とする、腎性贫血、がん性贫血などの貧血に対する治療剤