

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-507283

(P2008-507283A)

(43) 公表日 平成20年3月13日(2008.3.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/53 (2006.01)	C O 7 K 14/53	4 B O 6 3
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 129 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-522769 (P2007-522769)	(71) 出願人	503244985
(86) (22) 出願日	平成17年7月21日 (2005. 7. 21)		ファイブ プライム セラピューティクス
(85) 翻訳文提出日	平成19年3月5日 (2007. 3. 5)		, インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/025941		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(87) 国際公開番号	W02006/012451		080 サウス サン フランシスコ ゲ
(87) 国際公開日	平成18年2月2日 (2006. 2. 2)		ートウェイ ブールバード 951
(31) 優先権主張番号	60/590, 565	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成16年7月22日 (2004. 7. 22)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/647, 604		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成17年1月27日 (2005. 1. 27)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/664, 932		
(32) 優先日	平成17年3月24日 (2005. 3. 24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 疾患処置におけるMGD-C S Fのための組成物およびその使用方法

(57) 【要約】

開示されるのは、本明細書において「単球、顆粒球および樹状細胞コロニー刺激因子」(MGD-C S F)として同定された、新規に同定された分泌型分子、ポリペプチド配列、およびそのポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドである。また、例えば、ベクターおよび宿主細胞を使用する組み換え技術によって、ポリペプチドを産生するための手順も提供される。さらに、本発明の開示された新規な分子を改変して融合タンパク質を調製する手順が開示される。また、例えば、ガン、自己免疫疾患および炎症性疾患、感染性疾患、および再発性の流産を含む種々の疾患の処置のためにポリペプチドおよびその活性なフラグメントを用いるための方法も開示される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離された核酸分子であって、

(a) 配列番号 1、2、3 および 5；

(b) 配列番号 7、8、9 および 11 から選択される第一のアミノ酸配列を含む第一のポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド；

(c) 該 (a) の第一のヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；ならびに

(d) (a)、(b) または (c) の生物学的に活性なフラグメント、

から選択される第一のヌクレオチド配列を含む第一のポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

10

【請求項 2】

前記生物学的に活性なポリペプチドフラグメントが、配列番号 7、8、9 および 11 から選択される少なくとも 6 つの連続するアミノ酸残基を含み、該連続する 6 つのアミノ酸残基のうち少なくとも 2 つが、それぞれアミノ酸残基位置 80 および 81 のロイシン残基およびアルギニン残基である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記核酸分子が、cDNA 分子、ゲノム DNA 分子、cRNA 分子、siRNA 分子、RNAi 分子、mRNA 分子、アンチセンス分子およびリボザイムから選択される、請求項 1 に記載の核酸分子。

20

【請求項 4】

さらにその相補体を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記第一のヌクレオチド配列が配列番号 3 である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の核酸分子に対して少なくとも約 70 % 同一である、核酸分子。

【請求項 7】

請求項 1 の核酸分子に対して前記分子が少なくとも約 80 % 同一である、請求項 6 に記載の核酸分子。

30

【請求項 8】

前記分子が請求項 1 に記載の核酸分子に対して少なくとも約 90 % 同一である、請求項 7 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

配列番号 1、2 または 3 に記載の配列に対してストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子であって、該核酸分子が顆粒球、単球および樹状細胞の増殖および分化を刺激し得る、ポリペプチドをコードする、核酸分子。

【請求項 10】

配列番号 1、2、3 および 5 に示される配列の相補体に対してストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子であって、該核酸分子が顆粒球、単球および樹状細胞の増殖および分化を刺激し得る、ポリペプチドをコードする、核酸分子。

40

【請求項 11】

さらに第二の配列を含む、請求項 5 に記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記第二のポリヌクレオチド配列が、同種または異種の分泌性リーダーをコードする、請求項 11 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記分泌性リーダーが異種である、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 14】

前記分泌性リーダーが配列番号 14 ~ 211 から選択される、請求項 12 に記載の核酸分子。

50

【請求項 15】

配列番号 7、8、9 および 11 から選択される第一のアミノ酸配列；配列番号 1、2、3 および 5 によってコードされる配列から選択される配列；ならびにそれらのいずれかの生物学的に活性なフラグメントを含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 16】

前記生物学的に活性なフラグメントが、配列番号 7、8、9 および 11 から選択される少なくとも 6 つの連続するアミノ酸残基を含み、該連続する 6 つのアミノ酸残基のうち少なくとも 2 つが配列番号 5 のアミノ酸残基 80 および 81 のロイシンおよびアルギニンである、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

前記ポリペプチドが細胞培養物中に存在する、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 18】

前記ポリペプチドが細胞培養培地に存在する、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

前記細胞培養物が、細菌細胞培養物、哺乳動物細胞培養物、昆虫細胞培養物および酵母細胞培養物から選択される、請求項 17 に記載のポリペプチド。

【請求項 20】

前記ポリペプチドが、植物または非ヒト動物に存在する、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 21】

前記第一のアミノ酸配列が、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列である、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 22】

前記第一のアミノ酸配列が、配列番号 7 のアミノ酸配列であり、位置 167 のシステイン残基が、セリンまたはアラニン残基によって置換される、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 23】

請求項 15 に記載のポリペプチドに対して少なくとも約 70 % および / または少なくとも約 80 % 相同であるポリペプチド。

【請求項 24】

前記ポリペプチドが、請求項 15 に記載のポリペプチドに対して少なくとも約 90 % 相同である、請求項 23 に記載のポリペプチド。

【請求項 25】

第二のアミノ酸配列をさらに含み、該第二のアミノ酸配列が、相同な分泌性リーダーまたは異種の分泌性リーダーであって、第一および第二のアミノ酸配列が作動可能に連結されている、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 26】

前記分泌性リーダー配列が異種のリーダー配列である、請求項 25 に記載のポリペプチド。

【請求項 27】

前記異種のリーダー配列が配列番号 14 ~ 211 より選択される、請求項 26 に記載のポリペプチド。

【請求項 28】

請求項 1 に記載の核酸分子および該核酸分子の発現を調節するプロモーターを含む、ベクター。

【請求項 29】

前記ベクターが、ウイルスベクターまたはプラスミドベクターである、請求項 28 に記載のベクター。

【請求項 30】

前記プロモーターが、前記核酸分子に対して天然に近接しているプロモーターおよび前記

10

20

30

40

50

核酸分子に対して天然には近接していないプロモーターから選択される、請求項 28 に記載のベクター。

【請求項 31】

前記プロモーターが、誘導性プロモーター、条件的活性化プロモーター、構成的プロモーターおよび組織特異的プロモーターから選択される、請求項 28 に記載のベクター。

【請求項 32】

請求項 1 もしくは請求項 5 に記載の細胞、および核酸、請求項 15 もしくは請求項 25 に記載のポリペプチド、および / または請求項 28 に記載のベクターを含む組み換え宿主細胞。

【請求項 33】

前記細胞が原核生物細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞。

【請求項 34】

前記細胞が真核生物細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞。

【請求項 35】

前記真核生物細胞が、ヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、昆虫細胞、魚細胞、植物細胞および真菌細胞から選択される、請求項 34 に記載の宿主細胞。

【請求項 36】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞。

【請求項 37】

前記哺乳動物細胞が 293 細胞株または CHO 細胞株の細胞である、請求項 36 に記載の宿主細胞。

【請求項 38】

前記細胞が 293 細胞である、請求項 37 に記載の宿主細胞。

【請求項 39】

前記 293 細胞が 293 T 細胞または 293 E 細胞である、請求項 38 に記載の宿主細胞。

【請求項 40】

請求項 1 に記載の核酸分子、または請求項 15 に記載のポリペプチドを注入された非ヒト動物。

【請求項 41】

前記動物がげっ歯類、非ヒト霊長類、ウサギ、イヌまたはブタである、請求項 40 に記載の動物。

【請求項 42】

請求項 1 または請求項 5 に記載の核酸分子およびキャリアを含む、核酸組成物。

【請求項 43】

請求項 15 に記載のポリペプチド分子およびキャリアを含む、ポリペプチド組成物。

【請求項 44】

請求項 28 に記載のベクターおよびキャリアを含む、ベクター組成物。

【請求項 45】

請求項 32 に記載の宿主細胞およびキャリアを含む、宿主細胞組成物。

【請求項 46】

前記キャリアが薬学的に受容可能なキャリアである、請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 47】

前記キャリアが薬学的に受容可能なキャリアである、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 48】

前記キャリアが薬学的に受容可能なキャリアである、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 49】

前記キャリアが薬学的に受容可能なキャリアである、請求項 45 に記載の組成物。

【請求項 50】

組み換え宿主細胞を生成する方法であって：

10

20

30

40

50

(a) 請求項 1 または請求項 3 に記載の核酸分子を含むベクターを提供する工程 ; および

(b) 細胞を該ベクターと接触させて、該核酸分子でトランスフェクトされた組み換え宿主細胞を形成させる工程 ;
を包含する、方法。

【請求項 5 1】

ポリペプチドを生成する方法であって :

(a) 請求項 1 または請求項 3 に記載の核酸分子を提供する工程 ; および

(b) 発現系において該核酸分子を発現して、該ポリペプチドを生成する工程
を包含する、方法。

10

【請求項 5 2】

前記発現系が細胞発現系である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記細胞発現系が原核生物発現系である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記細胞発現系が真核生物発現系である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

請求項 5 1 に記載の方法であって、前記発現系が、組み換え宿主細胞を形成する、請求項 1 に記載の核酸分子でトランスフェクトされた宿主細胞を含み、そして該方法は、該組み換え宿主細胞を培養して前記ポリペプチドを生成する工程をさらに包含する、方法。

20

【請求項 5 6】

前記発現系がコムギ胚芽溶解物、ウサギ網状赤血球、リボソームディスプレイおよび E . c o l i 溶解物由来の無細胞発現系である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 7】

請求項 5 1 に記載の方法によって生成される、ポリペプチド。

【請求項 5 8】

前記宿主細胞が、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞および細菌細胞から選択される、請求項 5 4 に記載の方法によって生成される、ポリペプチド。

【請求項 5 9】

請求項 1 に記載の核酸分子、該核酸分子またはその相補体を検出するためのレポーター、およびビヒクルを含む組成物を含む、診断キット。

30

【請求項 6 0】

請求項 1 5 に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体およびキャリアを含む診断キット。

【請求項 6 1】

請求項 1 5 に記載のポリペプチドおよびキャリアを含む診断キット。

【請求項 6 2】

患者サンプル中の請求項 1 5 に記載のポリペプチドに特異的な抗体の存在を決定する方法であって :

(a) 請求項 1 5 に記載のポリペプチドを含む組成物を提供する工程 ;

40

(b) 前記ポリペプチドを前記サンプルと相互作用させる工程 ;

(c) 存在する場合、該サンプル中で該ポリペプチドと該抗体との間に相互作用が生じたか否かを決定する工程 ;

を包含する、方法。

【請求項 6 3】

配列番号 7 ~ 1 2 より選択される少なくとも 6 つの連続するアミノ酸残基を含む抗原に特異的に結合するか、そして / またはその抗原の活性を妨害する、単離された抗体。

【請求項 6 4】

前記連続するアミノ酸残基が、配列番号 7 のアミノ酸位置 8 0 および 8 1 で保存的アミノ酸残基 l e u - a r g、または配列番号 1 2 の連続したアミノ酸残基 l e u - g l n - a

50

r gを含む、請求項 6 3 に記載の抗体。

【請求項 6 5】

前記抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体およびこれらのいずれかの活性なフラグメントから選択される、請求項 6 3 に記載の抗体。

【請求項 6 6】

抗原結合フラグメント、F cフラグメント、c d rフラグメント、V_Hフラグメント、V_Cフラグメントおよびフレームワークフラグメントから選択される、請求項 6 5 に記載の活性フラグメント。

【請求項 6 7】

前記ポリペプチドが少なくとも 1 つの融合パートナーをさらに含む、請求項 1 5 に記載のポリペプチド、または請求項 5 1 ~ 5 6 のいずれかに記載の方法によって生成されるポリペプチド。

【請求項 6 8】

前記融合パートナーが、ポリマー、ポリペプチド、スクシニル基、フェチュイン A、フェチュイン B、ロイシンジッパードメイン、テトラネクチン三量体形成ドメイン、マンノース結合タンパク質および F c 領域から選択される、請求項 6 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 9】

前記ポリマーが、ポリエチレングリコール部分である、請求項 6 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 0】

前記ポリエチレングリコール部分が、前記ポリペプチドのアミノ酸のアミノ基を介して結合される、請求項 6 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 1】

前記ポリエチレングリコール部分が分枝しているか、または直鎖ポリマーである、請求項 6 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 2】

請求項 1 5 に記載のポリペプチドの活性を調節する因子をスクリーニングする方法であって：

(a) 請求項 1 5 に記載のポリペプチドが生物学的活性に影響する試験系を提供する工程；および

(b) 該試験系において請求項 1 5 に記載のポリペプチドの活性に対する影響について複数の因子をスクリーニングする工程；
を包含する、方法。

【請求項 7 3】

前記調節因子が低分子薬物である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記調節因子が抗体である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 5】

免疫細胞を刺激する方法であって：

(a) 請求項 7 ~ 1 2 のいずれかから選択される実質的に純粋なポリペプチド、およびその活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および

(b) 1 つ以上の免疫細胞と該ポリペプチドとを接触させる工程；
を包含する、方法。

【請求項 7 6】

前記免疫細胞が顆粒球、単球、リンパ球、マクロファージ、末梢血単核球、または樹状細胞である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記リンパ球が N K 細胞である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子に

10

20

30

40

50

よってコードされる、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 79】

免疫細胞の集団を増大させる方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 より選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および

(b) 1 つ以上の免疫細胞または免疫細胞前駆体と該ポリペプチドとを接触させる工程；

を包含する、方法。

【請求項 80】

前記免疫細胞の集団が、単球の集団、リンパ球の集団、マクロファージの集団、または末梢血単核球の集団である、請求項 79 に記載の方法。 10

【請求項 81】

前記リンパ球が NK 細胞である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 83】

被験体における免疫応答を刺激する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 より選択されるポリペプチドをコードする実質的に純粋なポリヌクレオチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および 20

(b) 該組成物を該被験体に投与する工程

を包含する、方法。

【請求項 84】

前記ポリペプチドが局所的にまたは全身的に投与される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記ポリペプチドが、静脈内、浣腸によって、腹腔内、皮下、局所的または経皮的に投与される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 86】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項 83 に記載の方法。 30

【請求項 87】

ガン治療を受けている被験体において免疫細胞を増大する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 のいずれかのうちから選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および

(b) 該被験体に対して該組成物を投与する工程

を包含する、方法。

【請求項 88】

前記免疫細胞が、単球、リンパ球、マクロファージ、または末梢血単核球細胞である、請求項 87 に記載の方法。 40

【請求項 89】

前記リンパ球が NK 細胞である、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記ガン治療が、化学療法および放射線療法から選択される、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 91】

前記ポリペプチドが骨髓移植後に投与される、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 92】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 93】

被験体におけるガンを処置または予防する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および

(b) 該被験体に対して該組成物を投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 9 4】

被験体において腫瘍増殖を阻害する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および

(b) 該被験体に対して該組成物を投与する工程
を包含する、方法。

10

【請求項 9 5】

前記腫瘍が、ヒト腫瘍細胞を含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記ヒト腫瘍細胞が、固体腫瘍細胞または白血病腫瘍細胞である、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

被験体における感染を処置または予防する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および

(b) 該被験体に対して該組成物を投与する工程
を包含する、方法。

20

【請求項 9 8】

前記感染が、細菌感染、マイコプラズマ感染、真菌感染、ウイルス感染、細胞内病原体および細胞内寄生生物から選択される、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記組成物が前記被験体に対して局所的にまたは全身的に投与される、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項 9 7 に記載の方法。

30

【請求項 1 0 1】

被験体において免疫応答を調節する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択されるポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントの調節因子を提供する工程；および

(b) 該被験体に対して該調節因子を投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 1 0 2】

前記調節因子が、抗体、可溶性レセプター、およびポリペプチドから選択される、請求項 1 0 1 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 3】

前記調節因子が抗体である、請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記調節因子が、アプタマー、RNAi、アンチセンス分子、およびリボザイムから選択される、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、cdr フラグメント、V_H フラグメント、V_C フラグメント、フレームワークフラグメント、単鎖抗体および抗体の活性フラグメントから選択される、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

50

前記免疫応答の調節が炎症の抑制である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記免疫応答の調節が自己免疫疾患の抑制である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記免疫応答の調節が、関節リウマチ、変形性関節炎、乾癬、炎症性腸疾患、多発性硬化症、心筋梗塞、脳卒中および劇症肝不全より選択される疾患の処置または予防である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

妊娠に対する免疫応答を調節する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 1 2 から選択されるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントの調節因子を提供する工程；および

(b) 該調節因子を被験体に投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 1 1 0】

前記免疫応答の調節が再発性の流産の減少である、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

被験体においてワクチンに対する免疫応答を増強する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 1 2 から選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含むポリペプチド組成物を提供する工程；

(b) ワクチン組成物を提供する工程；および

(c) 該被験体に対して該ポリペプチド組成物および該ワクチン組成物を投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 1 1 2】

前記ポリペプチド組成物が、前記ワクチン組成物を投与する前に前記被験体に投与される、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記ポリペプチド組成物が、前記ワクチン組成物を投与した後に前記被験体に投与される、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記ポリペプチド組成物が、前記ワクチン組成物と実質的に同時に前記被験体に投与される、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

被験体において炎症性疾患を処置または予防する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 1 2 から選択されるポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントの調節因子を提供する工程；および

(b) 該被験体に対して該調節因子を投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 1 1 6】

前記調節因子が、アプタマー、RNAi、アンチセンス分子、およびリボザイムから選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記調節因子が、抗体、可溶性レセプター、およびポリペプチドから選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記調節因子が抗体である、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、cdr フラグメント、V_H フラグメント、V_C フラグメント、フレームワークフラグメント、単鎖抗体および抗体の活性フラグメントから選択される、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

10

20

30

40

50

被験体における自己免疫疾患を処置または予防する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択されるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントの調節因子を提供する工程；および

(b) 該調節因子を該被験体に投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 121】

前記調節因子が、抗体、アプタマー、可溶性レセプター、RNAi 分子、アンチセンス分子、リボザイムおよびポリペプチドから選択される、請求項 120 に記載の方法。

【請求項 122】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、cdr フラグメント、V_H フラグメント、V_C フラグメント、フレームワークフラグメント、単鎖抗体または抗体の活性フラグメントから選択される、請求項 121 に記載の方法。

10

【請求項 123】

被験体における NK 細胞の数を増大する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択されるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを提供する工程；および

(b) 該ポリペプチドを該被験体に投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 124】

被験体における NK 細胞集団を調節する方法であって：

20

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択されるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを提供する工程；および

(b) 該ポリペプチドを該被験体に投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 125】

前記調節因子が、抗体、アプタマー、可溶性レセプター、RNAi 分子、アンチセンス分子、リボザイムおよびポリペプチドから選択される、請求項 124 に記載の方法。

【請求項 126】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、cdr フラグメント、V_H フラグメント、V_C フラグメント、フレームワークフラグメント、単鎖抗体および抗体の活性フラグメントから選択される、請求項 125 に記載の方法。

30

【請求項 127】

前記 NK 細胞集団が免疫応答を刺激する、請求項 124 に記載の方法。

【請求項 128】

前記 NK 細胞集団が流産を抑制する、請求項 124 に記載の方法。

【請求項 129】

前記 NK 細胞集団が抗癌応答を刺激する、請求項 124 に記載の方法。

【請求項 130】

造血幹細胞の集団を増大する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択される実質的に純粋なポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および

40

(b) 該造血幹細胞の集団と該ポリペプチドとを接触させる工程
を包含する、方法。

【請求項 131】

細胞の集団に対して細胞保護作用を提供する方法であって：

(a) 配列番号 7 ~ 12 から選択される実質的に純粋なポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程；および

(b) 該細胞の集団と該ポリペプチドとを接触させる工程
を包含する、方法。

【請求項 132】

50

前記組成物が前記被験体に対して局所的にまたは全身的に投与される、請求項 101、109、111、115、123、124、130または131のいずれかに記載の方法。

【請求項 133】

前記ポリペプチドが、配列番号 1～6 より選択されるヌクレオチド配列およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む核酸分子によってコードされる、請求項 101、109、111、115、120、123、124、130または131のいずれかに記載の方法。

【請求項 134】

前記ポリペプチドが少なくとも 1つの融合パートナーをさらに含む、請求項 101、109、111、115、120、123、124、130または131のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 135】

前記融合パートナーが、ポリマー、ポリペプチド、フェチュインおよび血清アルブミンから選択される、請求項 134に記載の方法。

【請求項 136】

ポリマーおよび/またはスクシニル基をさらに含む、請求項 134に記載の方法。

【請求項 137】

前記ポリマーがポリエチレングリコール部分である、請求項 136に記載の方法。

【請求項 138】

前記ポリエチレングリコール部分が、前記ポリペプチドのアミノ酸のアミノ基を介して結合される、請求項 137に記載の方法。

20

【請求項 139】

前記ポリエチレングリコール部分が分枝したポリマーまたは直鎖ポリマーである、請求項 137に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(優先権の主張)

本出願は、2004年7月22日出願の仮出願第60/590,565号;2005年1月27日出願の同第60/647,604号;2005年3月24日出願の同第60/664,932号;および2005年7月14日出願の「Novel MGD-CSF Polypeptides, Polynucleotides, and Methods of Use Thereof」と題された仮出願に対して優先権を主張する。本出願はまた、2003年10月31日出願のPCT/US03/34811号;2004年4月30日出願のPCT/US04/11270号;2004年7月22日出願の第60/590,565号;2005年1月11日出願の第60/642,604号;2005年1月27日出願の第60/647,013号;および2005年1月18日出願の第60/654,229号の出願に関する。これらの出願はそれらの全体が参照によって全て援用されている。

30

【0002】

40

(技術分野)

本発明は、本明細書において「単球、顆粒球および樹状細胞コロニー刺激因子(monocyte, granulocyte, and dendritic cell colony stimulating factor)」(MGD-CSF)として同定された、新規な分泌型分子に関する。本発明は、MGD-CSFのポリペプチド、およびポリヌクレオチド配列、MGD-CSFを含む融合分子、ベクター、宿主細胞、組成物およびMGD-CSFを含むキット、ならびに免疫関連疾患、感染性疾患およびガンを含む疾患を診断、予防、予後を確認および処置するためにMGD-CSFおよび関連の分子を用いる方法に関する。MGD-CSFは以前には機能が未知である遺伝子MCG34647のスプライシング改変体である。

50

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

生得的な免疫系の細胞、例えば、単球、マクロファージ、ナチュラル・キラー（NK）細胞、および多形核好中球（polymorphonuclear neutrophil）（PMN）は、それらの食作用、細胞溶解性および抗菌性の特性のおかげで、ガンおよび感染性疾患に対する第一選択の防御因子である。単球およびマクロファージは、炎症性メディエータの活性化および分泌を通じて炎症性疾患において重要な役割を果たすと考えられる。例えば、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）は、顆粒球、単球およびマクロファージの増殖および分化を促進することが公知である。顆粒球・コロニー刺激因子（G-CSF）は、顆粒球および好中球の分化および増殖を促進することが公知である（非特許文献1）。現在、G-CSFおよびGM-CSFは両方とも、化学療法、放射線療法および骨髄移植後の血球の回復を促進するためのタンパク質治療剤として用いられている。

10

【0004】

NK細胞は、ガンに対する宿主応答において役割を果たすことが公知である。同系および異種の両方の移植片モデルでは、腫瘍細胞は、NK-/-マウスでより効率的に増殖し、そしてこれらのモデルでのマウスの生存率は、NK細胞を保有しているマウスについての生存率よりも有意に低い。さらに、IL-2またはIL-15のような可溶性のタンパク質因子でのNK応答の増強は、インビトロおよびインビボの両方において、抗腫瘍抗体の存在においてNK細胞が腫瘍細胞を殺傷する効率を増大することが示されている（非特許文献2）。

20

【0005】

さらに、NK細胞はまた、感染性疾患に対する宿主応答においてある役割を果たすことが公知である。例えば、NK細胞を欠くマウスは、ウイルスおよび細胞内病原体に対して感受性が増大していることが公知である。同様に、NK細胞の欠失が天然に生じているヒトも、感染に対して極めて過敏であることが公知である。インビトロでは、ウイルスまたは他の細胞内病原体に感染した細胞のNK媒介性の殺傷は、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターロイキン12およびインターロイキン18のようなサイトカインによって増強されることが公知である（非特許文献3）；非特許文献4；非特許文献5）。

30

【0006】

活性化されたNK細胞は、体外受精（in vitro fertilization）（IVF）の手順を受けている女性の失敗率と相関し得、そして自然流産（pregnancy loss）にさらに関連し得ることも公知である（非特許文献6）。さらに、活性化NK細胞のレベルの上昇は、女性の不妊の背景的な原因として公知の免疫子宮内膜症を有する多数の患者で見出され得る（非特許文献6）。

【0007】

抗原を処理する樹状細胞は、新規な抗原およびリコール抗原の両方に対してT細胞を感作し得る。樹状細胞は、高レベルの主要組織適合複合体クラスIおよびIIの抗原を発現し、この抗原は他の免疫調節性タンパク質、付着因子およびサイトカインとともに、ガンの免疫療法においてある役割を果たす。樹状細胞ガンワクチンは、患者の樹状細胞を抽出すること、およびインビトロまたはエキソビボで免疫細胞刺激因子を用いて大量の樹状細胞を再生することによって生成されることが報告されている。次いで樹状細胞は、患者のガン細胞由来の抗原に曝され得る。樹状細胞および抗原の組み合わせが、患者に注射されて、樹状細胞は患者のT細胞をプログラムする。樹状細胞はガン細胞表面で抗原を破壊し、次いでそれらをキラーT細胞に提示する（非特許文献7）。

40

【0008】

自系の造血細胞移植から回復しているガン患者は、循環中の樹状細胞のレベルの低下を示す。樹状細胞は造血系前駆体から発達し、そしてそれらの発達の促進は、正常な樹状細胞

50

胞レベルの再獲得を補助し得る。単離されたヒト樹状細胞の増殖を誘導すること、ならびに造血幹細胞の増殖および分化を誘導することにより樹状細胞を生成する能力によって、樹状細胞ワクチン接種の有効性試験が容易になり、そして有効なワクチン接種実施が容易になる。樹状細胞増殖および/または造血幹細胞増殖および/または樹状細胞への分化を刺激する因子の必要性が当該分野では存在する。造血細胞移植のための調製物において循環中の樹状細胞を増大するために造血細胞から樹状細胞の生成を促進する因子も当該分野では必要である。

【0009】

破骨細胞は、樹状細胞、マクロファージおよびミクログリアと共通の前駆体を共有する（非特許文献8）。これらの多角性の、粘着性の、骨吸収性の細胞は、骨髄中で分化して、骨再構築およびカルシウムホメオスタシスを調節するように骨の近傍で機能する。破骨細胞の分化および機能は、M-CSFおよびオステオプロテゲリン（osteoprotegerin）（RANKリガンド）を含む分泌因子によって調節されることが報告されている（非特許文献9）。破骨細胞分化および機能の調節においてある役割を果たす因子は、骨粗鬆症および他の骨の疾患を処置するのににおいて治療的であり得る。

【0010】

ミクログリアの細胞は、中枢神経系の免疫エフェクターとして機能し、それらはまた、神経栄養因子を生じて、グルタミン酸取り込みを調節する。これらの単核の食細胞は、白質および灰白質の両方において中枢神経系の実質を通じて分布される。ミクログリアは、アルツハイマー病を有する患者において増大した数で存在し、ここでミクログリアは一酸化窒素生成ならびにIL-1およびMIP1 α を含む炎症性サイトカインの顕著な増大を示すことが報告されている（非特許文献10）。ミクログリアの分化および機能を調節する因子は、アルツハイマー病、ならびに脱髄疾患、例えば、多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎、進行性多病巣性白質脳障害、脳卒中およびパーキンソン病を含む他の神経疾患を処置するのに治療的であり得る。

【0011】

遺伝子MGC34647は、仮説的なタンパク質NP-689669をコードする（非特許文献11）。この遺伝子およびそのコードされたポリペプチドの機能は以前には未知である。MGC34647およびNP-689669の配列は、特許文献1のそれぞれ配列番号49および配列番号103に相当する。それらは、それぞれ機能が未知の分泌タンパク質のアミノ酸配列およびそのコード配列に相当する。

【特許文献1】国際公開第2002/048337号パンフレット

【非特許文献1】Ogawa、Blood、1993年、第81巻、p.3844~2853

【非特許文献2】Carsonら、J. Exp. Med.、1994年、第180巻、p.1395~1403

【非特許文献3】Wuら、Adv. Cancer Res.、2003年、第90巻、p.127

【非特許文献4】Bironら、Rev. Immunol.、1999年、第17巻p.189

【非特許文献5】Naumeら、Scand. J. Immunol.、1994年、第40巻、p.128

【非特許文献6】Dosiouら、Endocr. Rev.、2005年、第26巻、p.44

【非特許文献7】Songら、Yonsei Med. J. 45、2004年、補遺、p.48~52

【非特許文献8】Servet-Delpraら、BMC Immunol.、2003年、第3巻、p.15

【非特許文献9】Miyamotoら、Keio. J. Med.、2003年、第52巻、p.1~7

10

20

30

40

50

【非特許文献10】V i n c e n t ら、N e u r o b i o l . A g i n g、2002年、第23巻、p. 349～362

【非特許文献11】S t r a u s b e r g ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i .、2002年、第99巻、p. 16, p899

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

(産業上の有用性)

免疫疾患、ガン、感染性疾患および免疫媒介性の再発性流産の現在の治療は、不適切で、不十分でかつしばしば毒性である。これらの状態に対する先天性の免疫応答の有効性を増大する新規な治療化合物および治療剤は、さらに十分な治療を提供し得、そして現在の治療剤よりも良好な治療係数を有し得る。

【課題を解決するための手段】

【0013】

(表の簡単な説明)

表1は、配列表に列挙される、配列番号1～271に関する情報を示している。第1列は、内部の指定識別番号 (i n t e r n a l d e s i g n a t i o n i d e n t i f i c a t i o n n u m b e r) (F P I D) を示す。第2列は、核酸配列 (配列番号1) のオープンリーディングフレームのヌクレオチド配列識別番号 (配列番号: (N 1)) を示す。第3列は、ポリペプチド配列のアミノ酸配列識別番号 (配列番号: (P 1)) を示す。第4列は、コード領域および非コード領域を含む、核酸配列全体のヌクレオチド配列識別番号 (配列番号: N 0) を示す。第5列は、対応する命名またはNCBIアクセッション番号 (S o u r c e I D) を示す。第6列は、配列のタイプ、例えば、機能またはベクターの組成 (T y p e) を示す。

【0014】

表2は、最大程度の類似性を有する公的に開示された配列であるNP - 689669に対してMGD - CSFをアノテーションする。第1行は内部の指定識別番号 (i n t e r n a l d e s i g n a t i o n i d e n t i f i c a t i o n n u m b e r) (F P I D) を示す。第2行は、クローンの識別番号 (C l o n e I D) を示す。第3行は、ポリペプチドの予測長さをアミノ酸残基の数で示す (P r e d P r o t L e n) 。第4行は、NCBIの公的データベースに見出されるトップのヒットのヒットの公的なアクセッション識別番号 (T o p H u m a n H i t A c c e s s i o n N o) を示す。第5行は、第4行において示されるトップのヒットのヒットのアノテーション (T o p H u m a n H i t A n n o t a t i o n) を示す。第6行は、アミノ酸残基の数におけるこのトップのヒットのヒットの長さ (T o p H u m a n H i t L e n) を示す。第7行は、FP IDによって示されるクエリー配列とトップのヒットのヒットとの間のアミノ酸残基の数におけるマッチの長さ (M a t c h L e n) を示す。第8行は、発現されたFP IDアミノ酸配列の長さにもたがるFP IDとトップのヒットのヒットとの間の同一性パーセントをパーセンテージとして示す (Q u e r y L e n にまたがる T o p H u m a n H i t I D % (T o p H u m a n H i t % I D o v e r Q u e r y L e n)) 。第9行は、トップのヒットヒットの長さにもたがるFP IDとトップのヒットのヒットとの間の同一性パーセント (H u m a n H i t L e n にまたがる I D % (% I D o v e r H u m a n H i t L e n)) を示す。

【0015】

表3は、MGD - CSFおよびNCBI NP__689669のタンパク質配置を示す。第1行は、ポリペプチドの内部の指定ID番号 (i n t e r n a l d e s i g n a t i o n I D n u m b e r) (F P I D) を示す。第2行は、クローン識別番号またはポリペプチドのNCBIアクセッション番号 (C l o n e I D) を示す。第3行は、このポリペプチドの内部クラスター識別番号 (C L u s t e r) を示す。第4行は、NP - 689669が分泌されることを示す (C l a s s i f i c a t i o n) 。第5行は、

予測タンパク質長をアミノ酸残基の数で示す (Pred Prot Len)。第6行は、FP IDが分泌される確率を予測する内部パラメータを示しており、ここで「1」は、このポリペプチドが分泌される可能性が高く、そして「0」は、分泌の可能性が低い (Treevote)。第7行は、シグナルペプチドの配置の位置 (Signal Peptide Coords) を示す。第8行は、アミノ酸数が1である全長ポリペプチドのN末端で第一のアミノ酸残基を有する成熟ポリペプチドのタンパク質配置を示す (Mature Protei Coords)。

【0016】

表4は、表1に示される分泌リーダー配列のアノテーションを示す。第1列は、このポリペプチドの内部の指定ID番号 (internal designation ID number) (FP ID) を示す。第2列は、参照識別番号 (Source ID) を示す。第3列は、この配列のNCBIアノテーションを示す。

10

【0017】

表5は、表1に示されるMGD-CSF構築物のアノテーションを提供する。第1列は、クローン識別番号 (Clone ID) を示す。第2列は、NCBIアノテーション (Annotation) を示す。第3列は、ベクターのリストを示す (Vector Description)。第4列は、もしあれば、タグを列挙する (Tag)。

【0018】

表6は、実施例9Cにさらに記載されるように、インビトロでの骨髓細胞増殖に対するMGD-CSF構築物の効果を示す。第1列は、クローン識別番号 (Clone ID) を示す。第2列は、このクローンのアミノ酸配列を示す。第3行は、単球増殖を刺激する各々のクローンの活性の力価の半定量的描写 (Potency) を示す。第4行は、各々の構築物の発現の程度の半定量的な描写 (Expression) を示す。

20

【0019】

表7は、インビボでの骨髓細胞増殖に対するMGD-CSF構築物の効果を示す。表7Aは、骨髓細胞増殖に対して3つをコントロールベクターで、3つをヒトMGD-CSF構築物とした、6匹のマウスの群に注射した結果を示している。表7Bは、6つをコントロールベクターで、6つをマウスMGD-CSFとした、12匹のマウスの群に注射した結果を示している。表7Aでも表7Bでも両方とも、第1列は、動物の識別番号を挙げており (Animal ID)、第2列は、ベクターをコントロールまたはMGD-CSFとして (Description) 記載し、そして第3列は、末梢血中の単球の数を示す (単球/μl)。

30

【0020】

表8は、Affymetrix U133チッププローブを用いてGeneLogicデータベースを問い合わせることによって決定したMGD-CSF遺伝子の発現を示す。第1列は、MGC34647が過剰発現された疾患を列挙する (Disease)。第2列は、第1列の疾患に関連する特異的な病理を列挙する (Pathology)。第3列は、MGC34647の存在について陽性と試験された疾患種の数 (MGC34647陽性)。カラム4は、検査された標本の数 (Total Gene Logic)。第5列は、陽性であった、検査された標本の割合 (%Total) を挙げている。第6列および第7列は、3つの急性前骨髓球性白血病サンプル (検査した総数の13%) が、骨髓由来であったことを示す。

40

【0021】

(要旨)

MGD-CSFは、単球、顆粒球、樹状細胞およびNK細胞の増殖、生存および/または分化を促進する。従って、MGD-CSFは、腫瘍細胞と戦うNK細胞、単球、マクロファージ、顆粒球および樹状細胞のような免疫細胞の増殖および/または活性化を刺激する能力を通じてガンを処置するためのタンパク質治療剤としての用途を見出す。MGD-CSFは、ガンを処置するために、単独で、または治療用のモノクローナル抗体 (例えば、Rituxan) と組み合わせて用いられ得る。なぜなら、MGD-CSFは、NK細胞

50

胞、単球または顆粒球によって媒介される抗体依存性の細胞傷害性を促進し得るからである。MGD-CSFはまた、化学療法および骨髄移植に対する補助的な造血系再生を果たすための拮抗的な治療タンパク質として用いられ得る。これはさらに、インビボまたはエキソビボにおいて樹状細胞の数を増やすために用いられ得る。さらに、MGD-CSFは、細菌またはウイルス（例えば、C型肝炎ウイルス（HCV）またはヒト免疫不全ウイルス（HIV））によって生じる疾患のような感染性疾患の処置における抗感染性因子として有用であり得る。

【0022】

MGD-CSFは、免疫細胞の増殖および/または分化を促進し、従って免疫疾患の処置において用途を見出す。これは、自己免疫疾患の発症および処置においてある役割を果たし得る。MGD-CSFアンタゴニストは、免疫疾患を処置するための治療剤として開発され得る。アンタゴニストとしては、MGD-CSFに対するモノクローナル抗体；可溶性レセプターを含むMGD-CSFレセプター；非機能的な変異体；アンチセンスDNA；およびRNAiを挙げることができる。

10

【0023】

本発明は、配列番号1、2、3および5から選択される第一のヌクレオチド配列を含む第一のポリヌクレオチド；配列番号7、8、9および11から選択される第一のアミノ酸配列を含む第一のポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド；この第一のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；ならびにこれらのいずれかの生物学的に活性なフラグメントを含む単離された核酸分子を提供する。ある実施形態では、この生物学的に活性なポリペプチドフラグメントは、配列番号7、8、9および11から選択される少なくとも6つの連続するアミノ酸残基を含み、この連続する6つのアミノ酸残基のうち少なくとも2つがそれぞれアミノ酸残基位置80および81のロイシン残基およびアルギニン残基である。この単離された核酸分子は、cDNA分子、ゲノムDNA分子、cRNA分子、siRNA分子、RNAi分子、mRNA分子、アンチセンス分子およびリボザイムから選択され得る。ある実施形態では、この核酸分子はさらにその相補体を含む。

20

【0024】

ある実施形態では、この第一のヌクレオチド配列は配列番号3である。この実施形態はさらに、第二のポリヌクレオチドを含み得る。この第二のポリヌクレオチドは、相同なまたは異種の分泌リーダーをコードする第二のヌクレオチド配列を含み得る。この分泌リーダーは、配列番号14~211より選択され得る。

30

【0025】

本発明はまた、上記の単離された核酸分子に対して少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%同一な核酸分子を提供する。本発明は、配列番号1、2もしくは3に示される配列に対して、または配列番号1、2、3および5に示される配列の相補体に対してストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子であって、この核酸分子が顆粒球、単球および樹状細胞の増殖および分化を刺激し得る、ポリペプチドをコードする、核酸分子を提供する。

【0026】

本発明はさらに、配列番号7、8、9および11から選択される第一のアミノ酸配列と；配列番号1、2、3および5によってコードされる配列と；それらのいずれかの生物学的に活性なフラグメントとを含む単離されたポリペプチドを提供する。この単離されたポリペプチドは、細胞培養物、例えば細菌の細胞培養物、哺乳動物細胞培養物、昆虫細胞培養物、もしくは酵母細胞培養物中に、または細胞培養培地中に存在し得る。この単離されたポリペプチドはまた、植物または非ヒト動物に存在し得る。

40

【0027】

ある実施形態では、この生物学的に活性なフラグメントは、配列番号7、8、9および11から選択される少なくとも6つの連続するアミノ酸残基を含み、この連続する6つのアミノ酸残基のうち少なくとも2つが配列番号5のアミノ酸残基80および81のロイシ

50

ンおよびアルギニンである。

【 0 0 2 8 】

本発明はさらに、配列番号 7、8、9 および 11 から選択される第一のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドに対して少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、または少なくとも約 90% 相同な単離されたポリペプチド；配列番号 1、2、3 および 5 によってコードされる配列；ならびにこれらのいずれかの生物学的に活性なフラグメントを提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明は、配列番号 7、8、9 および 11 から選択される第一のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド；配列番号 1、2、3 および 5 によってコードされる配列；ならびにこれらのいずれかの生物学的に活性なフラグメントであって、さらに第二のアミノ酸配列を含み、この第二のアミノ酸配列が相同な分泌性リーダーまたは異種の分泌性リーダーであって、この第一および第二のアミノ酸配列が作動可能に連結されている、フラグメントを提供する。この分泌性リーダー配列は、配列番号 14 ~ 211 より選択され得る。

【 0 0 3 0 】

本発明はまた、上記の核酸分子およびその発現を調節するプロモーターを含むベクターを提供する。このベクターは、ウイルスベクターであってもまたはプラスミドベクターであってもよい。このプロモーターは、この核酸分子に対して天然に近接していてもよいし、または、この核酸分子に対して天然に近接していなくてもよい。これは、誘導性プロモーターであっても、条件活性化プロモーターであっても、構成的プロモーターであっても、そして / または組織特異的プロモーターであってもよい。

【 0 0 3 1 】

さらに、本発明は、細胞および上記の 1 つ以上の単離された核酸、ポリペプチドまたはベクターを含む組み換え宿主細胞を提供する。この宿主細胞は、原核生物細胞であっても、または真核生物細胞、例えば、ヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、昆虫細胞、魚細胞、植物細胞または真菌細胞であってもよい。ある実施形態では、この哺乳動物細胞は、CHO 細胞株または 293 細胞株、例えば、293 T 細胞または 293 E 細胞である。

【 0 0 3 2 】

本発明はさらに、本発明の単離された核酸またはポリペプチドを注入された非ヒト動物を提供する。この動物は、例えば、げっ歯類、非ヒト霊長類、ウサギ、イヌまたはブタであってもよい。

【 0 0 3 3 】

本発明はなおさらに、本発明の単離された核酸分子およびキャリアを含む核酸組成物を提供する。本発明は、本発明の単離されたポリペプチドおよびキャリアを含むポリペプチド組成物を提供する。本発明は、本発明のベクターおよびキャリアを含むベクター組成物を提供する。本発明は、本発明の宿主細胞およびキャリアを含む宿主細胞組成物を提供する。ある実施形態では、このキャリアは薬学的に受容可能なキャリアである。

【 0 0 3 4 】

別の局面では、本発明は、組み換え宿主細胞を生成する方法を提供し、この方法は、本発明の単離された核酸分子を含むベクターを提供する工程と、細胞をこのベクターと接触させて、この核酸分子でトランスフェクトされた組み換え宿主細胞を形成させる工程とを包含する。

【 0 0 3 5 】

本発明は、ポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、本発明の単離された核酸分子を提供する工程と、発現系においてこの核酸分子を発現してポリペプチドを生成する工程とを包含する。ある実施形態では、この発現系は細胞発現系、例えば、原核生物発現系または真核生物発現系である。この発現系は、組み換え宿主細胞を形成する、本発明の単離された核酸分子でトランスフェクトされた宿主細胞を包含してもよく、さらに、組み換え宿主細胞を培養してポリペプチドを生成する工程を包含する。ある実施形態では、この発現系は、コムギ胚芽溶解物、ウサギ網状赤血球、リボソームディスプレイおよび E

10

20

30

40

50

． c o l i 溶解物由来の無細胞発現系である。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、このような方法によって生成されるポリペプチドを提供する。例えば、本発明は、上記のような真核生物発現系であって、宿主細胞が哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞および細菌細胞から選択される発現系によって生成されるポリペプチドを提供する。

【 0 0 3 7 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の単離された核酸分子と、この核酸分子またはその相補体を検出するためのレポーターと、ビヒクルとを含む組成物を備える診断キットを提供する。本発明は、本発明の単離されたポリペプチドに特異的に結合する抗体およびキャリアを含む診断キットを提供する。本発明はまた、本発明の単離されたポリペプチドおよびキャリアを含む診断キットを提供する。

10

【 0 0 3 8 】

さらなる局面では、本発明は、患者サンプルにおいて本発明の単離されたポリペプチドに特異的な抗体の存在を検出する方法を提供し、この方法は、本発明の単離されたポリペプチドを含む組成物を提供する工程と、このポリペプチドをこのサンプルと相互作用させる工程と、もし存在するなら、このサンプル中でこのポリペプチドと抗体との間に相互作用が生じたか否かを決定する工程とを包含する。

【 0 0 3 9 】

なお更なる局面においては、本発明は、配列番号 7 ~ 12 より選択される少なくとも 6 つの連続するアミノ酸残基を含む抗原に特異的に結合するか、そして / またはその抗原の活性を邪魔する、単離された抗体を提供する。例えば、これらの連続するアミノ酸残基は、配列番号 7 のアミノ酸位置 8 0 および 8 1 で保存的アミノ酸残基 l e u - a r g、または配列番号 1 2 の保存的アミノ酸残基 l e u - g l n - a r g を含んでもよい。この抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体およびこれらのいずれかの活性なフラグメント、例えば、抗原結合フラグメント、F c フラグメント、c d r フラグメント、V_H フラグメント、V_C フラグメントおよびフレームワークフラグメントから選択され得る。

20

【 0 0 4 0 】

本発明はまた、少なくとも 1 つの融合パートナーをさらに含む、上記のような単離されたポリペプチドを提供する。一例として、この融合パートナーは、ポリマー、ポリペプチド、スクシニル基、フェチュイン A、フェチュイン B、ロイシンジッパードメイン、テトラネクチン三量体形成ドメイン、マンノース結合タンパク質および F c 領域から選択され得る。このポリマーは、例えば、ポリペプチドのアミノ酸のアミノ基を介して結合され得るポリエチレングリコール部分であってもよい。このポリエチレングリコール部分は、分枝したポリマーであっても直鎖のポリマーであってもよい。

30

【 0 0 4 1 】

本発明はさらに、本発明の単離されたポリペプチドの活性を調節する因子をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、本発明の単離されたポリペプチドが生物学的活性に影響する試験系を提供する工程と；この試験系において本発明の単離されたポリペプチドの活性に対する影響について複数の因子をスクリーニングする工程とを包含する。この修飾因子は例えば、低分子薬物であってもよい。この修飾因子はまた、例えば、抗体であってもよい。

40

【 0 0 4 2 】

本発明はさらに、免疫細胞を刺激する方法を提供し、この方法は、請求項 7 ~ 1 2 のいずれかから選択される実質的に純粋なポリペプチド、およびその活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程と；1 つ以上の免疫細胞とこのポリペプチドとを接触させる工程と；を包含する。このポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 より選択されたヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされ得る。適切な免疫細胞としては、顆粒球；単球；リンパ球、例えば、N K 細胞；マクロファージ；末梢血単核球；および樹状細胞が挙げられる

50

。

【 0 0 4 3 】

本発明はなおさらに、免疫細胞の集団を増大させる方法を提供し、この方法は、配列番号 7 ~ 12 より選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程と；1つ以上の免疫細胞または免疫細胞前駆体とこのポリペプチドとを接触させる工程と；を包含する。このポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされ得る。適切な免疫細胞集団としては、顆粒球；単球；リンパ球、例えば、NK細胞；マクロファージ；および末梢血単核球の集団が挙げられる。

【 0 0 4 4 】

本発明はさらに、被験体における免疫応答を刺激する方法を提供し、この方法は、配列番号 7 ~ 12 より選択されるポリペプチドをコードする実質的に純粋なポリヌクレオチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程と；この組成物をこの被験体に投与する工程とを包含する。このポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされ得る。このポリペプチドは、局所的に投与されても全身的に投与されてもよい。これは、静脈内に、浣腸によって、腹腔内的に、皮下的に、局所的にまたは経皮的に投与され得る。

【 0 0 4 5 】

本発明は、ガン治療を受けている被験体において免疫細胞を増大する方法を提供し、この方法は、配列番号 7 ~ 12 のうちのいずれかから選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程と；この被験体に対してこの組成物を投与する工程とを包含する。このポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされ得る。適切な免疫細胞集団としては、単球；リンパ球、例えば、NK細胞；マクロファージ；および末梢血単核球の集団が挙げられる。ガン治療は、化学療法および/または放射線療法であっても、それを含んでもよい。このポリペプチドは骨髄移植後に投与されてもよい。

【 0 0 4 6 】

本発明はまた、被験体におけるガンを処置または予防する方法を提供し、この方法は、配列番号 7 ~ 12 から選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程と；この被験体に対してこの組成物を投与する工程とを包含する。

【 0 0 4 7 】

本発明はさらに、被験体において腫瘍増殖を阻害する方法を提供し、この方法は、配列番号 7 ~ 12 から選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程とこの被験体に対してこの組成物を投与する工程とを包含する。この腫瘍とは、ヒト腫瘍細胞、例えば、固体腫瘍細胞または白血病腫瘍細胞を挙げることができる。

【 0 0 4 8 】

本発明はなおさらに、被験体における感染を処置または予防する方法を提供し、この方法は、配列番号 7 ~ 12 から選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程と；この被験体に対してこの組成物を投与する工程とを包含する。このポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされ得る。この方法は、例えば、細菌感染、マイコプラズマ感染、真菌感染、ウイルス感染、細胞内病原体および/または細胞内寄生生物を処置または予防し得る。この方法は、この被験体に対してこの組成物を局所的にまたは全身的に投与することによって、実行され得る。

【 0 0 4 9 】

さらに、本発明は、被験体において免疫応答を調節する方法を提供し、この方法は、配列番号 7 ~ 12 から選択されるポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントの修飾因子を提供する工程と；この被験体に対してこの修飾因子を投与する工程とを包

10

20

30

40

50

含する。この修飾因子は、例えば、抗体、可溶性レセプター、および/またはポリペプチドであってもよい。適切な抗体修飾因子としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、 $c d r$ フラグメント、 V_H フラグメント、 V_C フラグメント、フレームワークフラグメント、単鎖抗体および抗体の活性フラグメントが挙げられる。この修飾因子はまた、例えば、アプタマー、 $R N A i$ 、アンチセンス分子、および/またはリボザイムであってもよい。この方法は、例えば、炎症性疾患および/または自己免疫疾患を抑制することによって免疫応答を調節し得る。この方法はまた、例えば、関節リウマチ、変形性関節炎、乾癬、炎症性腸疾患、多発性硬化症、心筋梗塞、脳卒中および/または劇症肝不全を処置または予防することによって免疫応答を調節し得る。

【0050】

本発明は、妊娠に対する免疫応答を調節する方法を提供し、この方法は、配列番号7～12から選択されるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントの修飾因子を提供する工程と；この修飾因子をこの被験体に投与する工程とを包含する。この方法は、例えば、免疫応答を調節して再発性の流産を減少させ得る。

【0051】

本発明は、被験体においてワクチンに対する免疫応答を増強する方法を提供し、この方法は、配列番号7～12から選択される実質的に純粋なポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含むポリペプチド組成物を提供する工程と；ワクチン組成物を提供する工程と；この被験体に対してこのポリペプチド組成物およびワクチン組成物を投与する工程とを包含する。このポリペプチド組成物は、ワクチン組成物を投与する前に、実質的に同時に、または後に被験体に投与され得る。

【0052】

本発明はまた、被験体において炎症性疾患を処置または予防する方法を提供し、この方法は、配列番号7～12から選択されるポリペプチドおよびそれらのいずれかの活性なフラグメントの修飾因子を提供する工程と；この被験体に対してこの修飾因子を投与する工程とを包含する。この修飾因子は、例えば、アプタマー、 $R N A i$ 、アンチセンス分子、および/またはリボザイムであってもよい。この修飾因子はまた、例えば、抗体、可溶性レセプター、および/またはポリペプチドであってもよい。適切な抗体修飾因子としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、 $c d r$ フラグメント、 V_H フラグメント、 V_C フラグメント、フレームワークフラグメント、単鎖抗体および抗体の活性フラグメントが挙げられる。

【0053】

本発明はさらに、被験体における自己免疫疾患を処置または予防する方法を提供し、この方法は、配列番号7～12から選択されるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントの修飾因子を提供する工程と；この修飾因子をこの被験体に投与する工程とを包含する。この修飾因子は、例えば、アプタマー、 $R N A i$ 分子、アンチセンス分子、および/またはリボザイムであってもよい。この修飾因子はまた、例えば、抗体、可溶性レセプターおよび/またはポリペプチドであってもよい。適切な抗体修飾因子としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、 $c d r$ フラグメント、 V_H フラグメント、 V_C フラグメント、フレームワークフラグメント、単鎖抗体および抗体の活性フラグメントが挙げられる。

【0054】

本発明はなおさらに、被験体におけるNK細胞の数を増大する方法を提供し、この方法は、配列番号7～12から選択されるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを提供する工程と；このポリペプチドをこの被験体に投与する工程とを包含する。

【0055】

本発明は、被験体におけるNK細胞集団を調節する方法を提供し、この方法は、配列番号7～12から選択されるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントの修飾因子を提供する工程と；この修飾因子をこの被験体に投与する工程とを包含する。

10

20

30

40

50

この修飾因子は、例えば、アプタマー、RNAi分子、アンチセンス分子、および/またはリボザイムであってもよい。この修飾因子はまた、例えば、抗体、可溶性レセプターおよび/またはポリペプチドであってもよい。適切な抗体修飾因子としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、cdrフラグメント、V_Hフラグメント、V_Cフラグメント、フレームワークフラグメント、単鎖抗体および抗体の活性フラグメントが挙げられる。ある実施形態では、NK細胞集団が免疫応答を刺激する。ある実施形態では、NK細胞集団が流産を抑制する。ある実施形態では、NK細胞集団が抗癌応答を刺激する。

【0056】

本発明はまた、造血幹細胞の集団を増大する方法を提供し、この方法は、配列番号7～12から選択される実質的に純粋なポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程と；この造血幹細胞の集団とこのポリペプチドとを接触を接触させる工程とを包含する。

10

【0057】

本発明はさらに、細胞の集団に対して細胞保護作用を提供する方法を提供し、この方法は、配列番号7～12から選択される実質的に純粋なポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを含む組成物を提供する工程と；細胞のこの集団とこのポリペプチドとを接触させる工程とを包含する。

【0058】

免疫応答を調節または増強する、疾患を処置または予防する、NK細胞の数を増大する、NK細胞の集団を調節する、造血幹細胞の集団を増大する、そして細胞保護を提供するための方法は、例えば、上記の組成物を局所的にまたは全身的に投与することによって行われ得る。それらはまた、上記のポリペプチド組成物であって、ポリペプチドが配列番号1～6より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされるポリペプチド、およびそれらのいずれかの活性なフラグメントを提供することによって行われ得る。それらはさらに、上記のポリペプチド組成物であって、ポリペプチドがさらに少なくとも1つの融合パートナーを含むポリペプチド組成物を提供することによって行われてもよい。例えば、この融合パートナーは、ポリマー、ポリペプチド、スクシニル基、フェチュインA、フェチュインB、ロイシンジッパードメイン、テトラネクチン三量体化ドメイン、マンノース結合タンパク質およびFc領域から選択されてもよい。このポリマーは、ポリエチレングリコール部分であってもよく、この部分は、例えば、ポリペプチドのアミノ酸のアミノ基を介して結合してもよい。このポリエチレングリコール部分は、分枝したポリマーであっても、または直鎖ポリマーであってもよい。

20

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0059】

(実施形態の説明)

(定義)

本明細書において用いられる用語は、下に示されるように、その通常の意味を有し、そして本明細書の文脈でさらに理解され得る。

【0060】

「単球、顆粒球および樹状細胞コロニー刺激因子(monocyte, granulocyte, and dendritic cell colony stimulating factor)」(MGD-CSF)とは、新規な、単離された、分泌された分子であって、それぞれ配列番号1および7に示されるような核酸およびアミノ酸配列を有する分子をいう。仮出願60/590,565号および同第60/564,932号は、MGD-CSFをFPT025と呼んだ。「本発明の分子(molecules of the invention)」という用語は、配列番号1～13のいずれか、配列番号1～13のいずれかと配列番号14～211のいずれかの分泌性リーダー、および配列番号212～271の構築物のいずれかを含むものとして本明細書において用いられる。

40

【0061】

「核酸分子(nucleic acid molecule)」、「ヌクレオチド(n

50

ucleotide)」、「ポリヌクレオチド(poly nucleotide)」および「核酸(nucleic acid)」という用語は、ポリマー形態の任意の長さのヌクレオチドを指すものとして本明細書において交換可能に用いられる。それらは、二本鎖および一本鎖の両方の配列を含んでもよく、そして限定はしないが、ウイルス、原核生物および真核生物の供給源由来のcDNA；mRNA；ウイルス（例えば、DNAウイルスおよびレトロウイルス）または原核生物の供給源由来のゲノムDNA配列；RNAi；cDNA；アンチセンス分子；リボザイム；および合成のDNA配列を包含する。この用語はまた、DNAおよびRNAの任意の公知の塩基アナログを含む配列を包含する。

【0062】

「組み換え体(recombinant)」とは、本明細書において用いる場合、核酸分子を表し、ゲノム、cDNA、ウイルス、半合成および/または合成に由来するポリヌクレオチドであって、その起源もしくは操作のおかげでそれが天然に会合しているポリヌクレオチドの全てまたは一部とは会合していないポリヌクレオチドを意味する。「組み換え体」という用語は、タンパク質またはポリペプチドに関して用いられる場合、組み換えポリヌクレオチドの発現によって生成されるポリペプチドを意味する。「組み換え体」という用語は、宿主細胞に関して用いられる場合、組み換えポリヌクレオチドが導入されている宿主細胞を意味する。

10

【0063】

「相補的な(complementary)」ヌクレオチド配列核酸分子とは、その塩基対の相補体からなるものである。塩基アデニンを有するデオキシリボヌクレオチドは、塩基チミジンを有するデオキシリボヌクレオチドに相補的であり、そして塩基チミジンを有するデオキシリボヌクレオチドは、塩基アデニンを有するデオキシリボヌクレオチドに対して相補的である。塩基シトシンを有するデオキシリボヌクレオチドは、塩基グアニンを有するデオキシリボヌクレオチドに相補的であり、そして塩基グアニンを有するデオキシリボヌクレオチドは、塩基シトシンを有するデオキシリボヌクレオチドに対して相補的である。塩基アデニンを有するリボヌクレオチドは、塩基ウラシルを有するリボヌクレオチドに相補的であり、そして塩基ウラシルを有するリボヌクレオチドは、塩基アデニンを有するリボヌクレオチドに対して相補的である。塩基シトシンを有するリボヌクレオチドは、塩基グアニンを有するリボヌクレオチドに相補的であり、そして塩基グアニンを有するデオキシリボヌクレオチドは、塩基シトシンを有するデオキシリボヌクレオチドに対して相補的である。

20

30

【0064】

「プロモーター(promotor)」とは、本明細書において用いる場合、哺乳動物細胞においてRNAポリメラーゼに結合して、それに作動可能に連結された下流(3'方向)のコード配列の転写を開始し得るDNA調節性領域である。本発明の目的のためには、プロモーター配列は、バックグラウンドを超える検出可能なレベルで目的の遺伝子の転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列は転写開始部位内であってもよく、そして同様にRNAポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン(コンセンサス配列)であってもよい。真核生物プロモーターは常にではないが、しばしば、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。プロモーターとしては、核酸分子に対して自然に近接しているプロモーター、および核酸分子に対して自然には近接していないプロモーターが挙げられる。さらに、「プロモーター」という用語は、誘導性プロモーター、条件的活性プロモーター、例えば、cre-loxプロモーター、構成的プロモーターおよび組織特異的プロモーターを包含する。

40

【0065】

「作動可能に連結された(operably linked)」とは、エレメントの配置であって、そのように表された成分が、その所望の機能を行うように構成される配置をいう。従って、あるポリペプチド配列に作動可能に連結された分泌性リーダー配列は、細胞からのこのポリペプチドの分泌を達成し得る。

【0066】

50

「トランスフェクトされた (transfected)」とは、リポフェクタミンのような任意の補助促進因子の使用の有無において、導入されたDNAまたはRNAを保有することを意味する。当該分野で公知であるトランスフェクションの方法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラントランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーションおよびリポフェクションが挙げられる。

【0067】

「核酸分子の発現 (expression of nucleic acid molecule)」とは、この核酸分子に含まれる情報の遺伝子産物への変換をいう。遺伝子産物は、ある遺伝子の直接の転写産物 (例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造的RNAまたは任意の他のタイプのRNA) またはmRNAの翻訳によって生成されるペプチドもしくはポリペプチドであり得る。遺伝子産物としてはまた、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化および編集のようなプロセスによって改変されるRNA; ならびに例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン結合、ADPリボシル化、ミリスチル化およびグリコシル化によって改変されるタンパク質が挙げられる。

【0068】

「ベクター (vector)」とは、遺伝物質を細胞または生物体に変換させるために用いられ得る因子、代表的にはウイルスまたはプラスミドである。

【0069】

「宿主細胞 (host cell)」とは、任意の組み換えベクター (単数または複数) または単離されたポリヌクレオチド (単数または複数) のレシピエントであり得るかまたはレシピエントとなっている、個々の細胞または細胞培養物である。宿主細胞は、単独の宿主細胞の子孫を含み、そしてこの子孫は、天然の、偶発的なもしくは意図的な変異および/または変化に起因してもとの親細胞に対して完全に同一である (形態学的にまたは総DNA相補体において) 必要はない。宿主細胞としては、本発明の組み換えベクターまたはポリヌクレオチドを用いてインビボまたはインビトロでトランスフェクトされるかまたは感染された細胞が挙げられる。本発明の組み換えベクターを含む宿主細胞は、「組み換え宿主細胞 (recombinant host cell)」と呼ばれてもよい。

【0070】

「幹細胞 (stem cell)」とは、自己再生する、未分化のまま残る、そして分化する能力を有する未分化の多能性または多分化能の細胞である。幹細胞は、限定はしないが、幹細胞が天然に存在する動物の少なくともその寿命の間、分裂し得る。幹細胞は、最終分化されず、そのことは分化経路の終わりではないことを意味する。幹細胞が分裂する場合、各々の娘細胞は、幹細胞に残ってもよいし、または娘細胞は、最終分化をもたらす経路に乗り出してもよい。幹細胞は、胚性幹細胞、若年性幹細胞、または成体幹細胞であってもよい。「造血幹細胞 (hematopoietic stem cell)」は、前駆細胞から成熟血球を形成する過程である造血の過程に關与する。

【0071】

「ポリペプチド (polypeptide)」および「タンパク質 (protein)」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために交換可能に用いられ、そして最小の長さには限定されない。従って、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体などがこの定義内に包含される。全長タンパク質およびそのフラグメントの両方とも、この定義によって包含される。この用語はまた、ポリペプチドの発現後改変、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などを包含する。さらに、本発明の目的のためには、「ポリペプチド」とは、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然の配列に対して、欠失、付加および置換 (一般には、事実上保存的) のような改変を含むタンパク質をいう。これらの改変は、部位特異的変異誘発などを通じて意図されてもよいし、または、タンパク質を生成する宿主の変異、もしくはPCR増幅に起因するエラーなどを通じて偶発的であってもよい。

【0072】

10

20

30

40

50

「リーダー配列 (leader sequence)」は、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸残基 1 で開始して、かつタンパク質切断の際に成熟タンパク質の形成を生じる切断部位へ伸長する、アミノ酸残基の配列を含む。リーダー配列は一般には、疎水性であって、いくつかの正に荷電した残基を有する。リーダー配列は、天然であっても、または合成であっても、それらが結合されるタンパク質と異種であっても、または同種であってもよい。「分泌リーダー (secretory leader)」とは、タンパク質が細胞から分泌されることを指示するリーダー配列である。

【0073】

「融合パートナー (fusion partner)」とは、治療用もしくは予防用のポリペプチドの N 末端および / もしくは C 末端でインフレーションに、または治療用もしくは予防用のポリペプチドに対して内部的に融合されたポリペプチドである。

10

【0074】

「レセプター (receptor)」という用語は、特定のリガンドに結合するポリペプチドをいう。このリガンドは通常、細胞外分子であって、これは、レセプターへの結合の際に、通常、シグナル伝達経路の開始のような細胞応答を開始する。「可溶性レセプター (soluble receptor)」とは、膜貫通ドメインのような膜結合ドメインを欠くレセプターである。「可溶性レセプター」は、膜貫通ドメインがスプライシングされてなくなっている、野性型の膜貫通タンパク質レセプターの天然に存在するスプライシング改変体を含んでもよい。「可溶性レセプター」は、膜貫通タンパク質レセプターの細胞外ドメインまたは細胞外ドメインの任意のフラグメントを含んでもよい。可溶性レセプターは、標的タンパク質を調節し得る。それらは、例えば、リガンド結合のための野性型レセプターと競合してもよいし、リガンド / レセプター相互作用に関与してもよく、これによって、レセプターの活性もしくは数、および / またはこのレセプターから下流の細胞活性を調節する。この調節は、細胞内応答、例えば、細胞を活性化するシグナル伝達事象、細胞を阻害するシグナル伝達事象、または細胞の成長、増殖、分化および / もしくは死亡を調節する事象を誘発し得、あるいはこのような活性を順次調節する他の因子の産生を誘導する。

20

【0075】

「単離された (isolated)」、「精製された (purified)」、「実質的に単離された (substantially isolated)」または「実質的に純粋な (substantially pure)」分子 (例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド) とは、天然の状態よりも高濃度で存在するように操作されている分子である。例えば、本発明の抗体は、それが天然に関連している、この抗体ではない物質のうち少なくとも 10 % または 20 % または 40 % または 50 % または 70 % または 90 % が除去されている場合に、単離され、精製され、実質的に単離され、または実質的に精製されている。本明細書において用いる場合、「単離された」、「精製された」、「実質的に単離された」または「実質的に精製された」分子とは、組み換え分子を包含する。

30

【0076】

「生物学的に活性な (biologically active)」な実体、または「生物学的活性 (biological activity)」を有する実体とは、天然に存在する分子の構造的、調節的もしくは生化学的機能、または代謝過程もしくは生理学的過程に関するかもしくは関連する任意の機能を有する実体である。生物学的に活性なポリヌクレオチドフラグメントは、本発明のポリヌクレオチドの活性と同一である必要はないが類似である活性を示すフラグメントである。この生物学的活性は、改善された所望の活性または低下された所望されない活性を含み得る。例えば、ある実体は、別の分子との分子相互作用に関与する場合、例えば、ハイブリダイゼーション、疾患状態を軽減するのに治療的な役割を有する場合、免疫応答を誘導するのににおいて予防的な値を有する場合、ポリヌクレオチド分子について特有であることが決定され得るか、またはポリメラーゼ連鎖反応におけるプライマーとして用いられ得るポリヌクレオチドの生物学的に活性なフラグメントのような分子の存在を決定するのににおいて診断的および / または予防的な価値を有

40

50

する場合、生物学的活性を示す。生物学的に活性なポリペプチドまたはそれらのフラグメントとしては、生物学的反応に關与し得るものが挙げられ、これには、限定はしないが、抗体の産生のような免疫応答を刺激するためのエピトープもしくは免疫原として機能し得るもの；または免疫応答を調節するのに關与し得るものが挙げられる。

【0077】

「抗体 (antibody)」および「免疫グロブリン (immunoglobulin)」という用語は交換可能に用いられて、タンパク質、例えば、免疫系によって、合成的にまたは組み換え的に生成されるタンパク質であって、特定の抗原を認識してそれに結合し得るタンパク質を指す。抗体は通常当該分野で公知である。抗体は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド抗原を認識し得る。この用語は活性なフラグメントを包含し、これには例えば、免疫グロブリンの抗原結合フラグメント、重鎖の可変領域および/または定常領域、軽鎖の可変領域および/または定常領域、相補性決定領域 (cdr)、およびフレームワーク領域が挙げられる。この用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体調製物、ならびにハイブリッド抗体、変更された抗体、キメラ抗体、ハイブリッド抗体分子、F(ab')₂ および F(ab) フラグメント；Fv 分子 (例えば、非共有結合ヘテロ二量体)、二量体および三量体抗体フラグメント構築物；ミニボディ (minibody)、ヒト化抗体分子およびこのような分子から得られた任意の機能的フラグメントであって、このようなフラグメントは特異的な結合を保持するフラグメントを包含する。

10

【0078】

「ワクチン (vaccine)」とは、特定の疾患に対する免疫を生じるかまたは人工的に増大する調製物である。これは、特定の疾患に対する免疫を生じる化合物または人工的に増大するために投与される、例えば、殺傷された微生物、生きている弱毒化された生物体、または生きている病原性の生物体から構成され得る。これは、特定の疾患を生じる種類の弱毒化または殺傷された微生物を含む調製物であって、その疾患に対する抗体を生じるように免疫系を刺激するために投与される調製物を包含する。この用語は核酸およびポリペプチドワクチンを包含する。

20

【0079】

「特異的に結合する (binds specifically)」という用語は、抗体結合の文脈では、特定のエピトープに対する高い結合活性および/または高い親和性の結合をいう。従って、1つのエピトープ (「第一のエピトープ (first epitope)」) に対して特異的に結合して、別の (「第二のエピトープ (second epitope)」) には結合しない抗体は、「特異的な抗体 (specific antibody)」である。第一のエピトープに特異的な抗体は、2つのエピトープが相同性または他の類似性を共有する場合、第二のエピトープと交差反応して結合してもよい。「特異的に結合する」という用語は、ポリヌクレオチドの文脈では、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイズをいう。DNA/DNA および DNA/RNA の両方のハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーを増大する条件は、広く公知であり、そして当該分野で公開されている (Curr. Prot. Molec. Biol., John Wiley & Sons (2001))。

30

【0080】

「被験体 (subject)」、「個体 (individual)」、「宿主 (host)」および「患者 (patient)」という用語は、本明細書において交換可能に用いられて、ヒトおよび非ヒト動物を含む生きた動物を指す。被験体とは、例えば、抗原刺激、ならびに細胞表面レセプター結合を通じた刺激および阻害性のシグナル伝達に应答し得る免疫細胞を保有する生物体であってもよい。この被験体は、哺乳動物、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラットおよびマウスであってもよい。「被験体 (subject)」という用語は、疾患に関して完全に正常であるか、または全ての観点において正常である個体を除外しない。

40

【0081】

「患者サンプル (patient sample)」とは、患者由来の任意の生物学的

50

な標本である。この用語は、限定はしないが、生物学的な液体、例えば、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、涙液、唾液、リンパ液、透析液、洗浄液、精液および他の液体サンプル、ならびに生物学的起源の細胞および組織を包含する。この用語はまた、細胞およびそれに由来する細胞およびその子孫を含み、これには、培養中の細胞、細胞上清および細胞溶解液が挙げられる。これはさらに、器官または組織培養物由来の液体、組織生検サンプル、腫瘍生検サンプル、糞便サンプルおよび生物学的組織から抽出された液体、ならびに固形組織、組織切片および細胞溶解液から分離された細胞を包含する。この定義は、その調達後任意の方法で、例えば、試薬での処置、可溶化または特定の成分、例えばポリヌクレオチドまたはポリペプチドについての富化によって、操作されているサンプルを包含する。またこの用語には、患者サンプルの誘導体および画分も包含される。患者サンプルは、診断、予後または他のモニタリングアッセイにおいて用いられ得る。

10

【0082】

「疾患 (disease)」とは、病理学的状態であって、例えば、健康な状態または正常な状態とは異なるとして症状または他の同定因子によって同定され得る病理学的状態である。「疾患」という用語は、障害、症候群、状態および傷害を包含する。疾患としては、限定はしないが、増殖性、炎症性、免疫、代謝の、感染性の、そして虚血性の疾患が挙げられる。

【0083】

「調節する (modulate)」という用語は、適切なコントロールと比較した場合、測定された活性における、増大または減少、刺激、阻害、干渉、または妨害の、直接的または間接的ないずれかの生成をいう。ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはある「因子 (agent)」の「修飾因子 (modulator)」とは、本明細書において交換可能に用いられて、適切なコントロールと比較した場合、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの測定された活性に影響する、例えば、増大、減少、刺激、阻害、干渉またはブロックする物質を指す用語である。

20

【0084】

「予防する (preventing)」とは、本明細書において用いる場合、疾患の素因があり得るが、その疾患とはまだ診断されていない被験体においてその疾患の発現または再発に関して予防を提供することを包含する。処置および予防は、ヒトを含む生物体に対して、または細胞に対して、インビボ、インビトロもしくはエキソビボで投与され得、そしてその細胞が引き続きその被験体に投与され得る。

30

【0085】

「処置する (treatment)」とは、本明細書において用いる場合、ヒトを含む哺乳動物における疾患のための治療薬の任意の投与または適用を包含し、そして疾患を阻害する工程を包含する。これは、機能の損失、欠失または欠損を抑制または回復または修復を生じること、あるいは不十分なプロセスを刺激することなどによって、疾患の進行を阻止すること、およびこの疾患を救済することを包含する。

【0086】

「キャリア (carrier)」とは、固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化剤、処方物助剤、または任意の従来タイプの賦形剤をいう。「薬学的に受容可能なキャリア (pharmaceutically acceptable carrier)」とは、非毒性の「キャリア (carrier)」をいう。薬学的に受容可能なキャリアは、使用される用量および濃度でレシipientに対して非毒性であって、処方物の他の成分と適合性である。薬学的に受容可能なキャリアは、例えば、ビヒクル、アジュバントまたは希釈剤であってもよい。

40

【0087】

(MGD-CSFおよび関連の核酸およびポリペプチド)

本発明は、新規な単離された分泌分子であって、「単球、顆粒球および樹状細胞コロニー刺激因子 (monocyte, granulocyte, and dendritic cell colony stimulating factor)」(MGD-CSF

50

F)として本明細書において同定された分泌分子を提供する。本発明は、MGD-CSFを用いる方法、ならびにMGD-CSFの改変体および変異体を包含する関連の因子を提供する。MGD-CSFは、下にさらに記載されるように、NP__689669、Molecular Genomics Clone MGC34647、およびIncyte配列番号232、255および257(WO 2002/048337)に関連する。

【0088】

MGD-CSFは、241アミノ酸長であり、そしてシグナルペプチドまたは分泌性リーダー配列を含む。MGD-CSFは、クローンファミリーCLN00212388における、マザークローンCLN00506579由来のサブクローンである。MGD-CSFは、Five Primerのクラスター190647に属する。分泌されたタンパク質のこのクラスターは、単独の遺伝子に相当する全ての発現された配列を含む。その状況は、分泌された分子として、0.92というそのTreevoteによって確認される。このTreevoteは、予測アミノ酸配列が分泌されるか否かを予測する多数の物理的および化学的な属性に基づいて構築されるアルゴリズムの結果である；0.50より大きいTreevoteは、分泌型分子の指標である。

10

【0089】

図1に示されるとおり、MGD-CSFは、National Center for Biotechnology (NCBI)によって命名される、NP__689669のmRNA配列によってコードされると予測される仮定のタンパク質に関する(Straussbergら、Proc. Natl. Acad. Sci. 99:16, 899(2002))。この仮定的なヒトタンパク質は、242アミノ酸を含むことが予測される。NP__689669のコード配列は、MGC34647としてNational Institute of Health(国立衛生研究所)のMammalian Gene Collection(MGC)によって記載されている。MGC34647の核酸配列は、WO 2002/048337に指定される、それぞれ配列番号49および配列番号103に相当しており、ここでは配列番号49は、配列番号103によってコードされる、未知の機能の分泌タンパク質として記載された。MGC34647およびNP__689669の機能は、従来開示されていなかった。MGD-CSFは、MGC34647の新規なスプライシング改変体である。エキソン3とエキソン4との間の接合は、アミノ酸L80にR81が続くように示差的にスプライシングされる。

20

30

【0090】

遺伝子MGC34647は、729ヌクレオチド長の核酸コード配列を有する、242アミノ酸のオープンリーディングフレームを有するタンパク質をコードすることが予測される。この前駆タンパク質は、27,479ダルトンと秤量されて、7.72という等電点を有することが予測される。アミノ酸1~20を含むシグナルペプチドの切断後、この成熟タンパク質は、25,229ダルトンと秤量されて、6.74という等電点を有することが予測される。この成熟タンパク質は、669ヌクレオチドの核酸分子によってコードされる、222アミノ酸長であると予測される。MGC34647は、6つのエキソンを有する。これは、染色体16q22.1上のゲノムに、70456649の開始位置から70470765の停止位置へマッピングする。

40

【0091】

MGC34647発現は、下にさらに記載されるとおり、脾臓、耳下腺、関節の半月板、胆管、精囊、延髄、脳下垂体、唾液腺および配列表で観察されている。これらの局在に基づいて、MGC34647は、いくつかの特異的な治療用途を有することが予測される。これは、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチおよび全身性エリテマトーデス(SLE)の拮抗性の抗体の標的であり得る。これは、例えば、化学療法および骨髄移植の間の造血細胞再生のためのタンパク質治療アゴニストとして、感染性疾患を処置するために細胞媒介性免疫を増強するための拮抗性のタンパク質治療剤として、または細胞保護のためのタンパク質治療アンタゴニストとして用いられ得る。

【0092】

50

(核 酸)

本発明は、表および配列表、例えば、配列番号 1、2、3 および 5 に示されるような新規な MGD - CSF 配列に相当するポリヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。本発明は、これらの核酸分子について、そして関連の核酸分子、例えば、配列番号 4 および 13 に示される核酸分子についての用途を提供する。これらの用途は、本明細書において記載される。

【 0 0 9 3 】

本発明は、MGD - CSF または NP - 688669 をコードする遺伝子に対して作動可能に連結された肝臓発現遺伝子のプロモーターを含み、機能的に活性であるタンパク質を生じるようにインビボで発現され得る DNA 分子を提供する。記載された DNA 分子は、種々の用途を、例えば、人工的に導入された MGD - CSF もしくは NP__688669 のインビボ機能、2 つ以上の人工的に導入された MGD - CSF もしくは NP__688669 の相互作用、人工的に導入された MGD - CSF もしくは NP__688669 融合タンパク質のインビボ動態を研究するため、または人工的に導入された MGD - CSF もしくは NP__688669 タンパク質のインビボ標的を同定するための基礎的な研究におけるツールとして、そして下にさらに記載されるような治療処置として、種々の用途を有する。

10

【 0 0 9 4 】

核酸分子の非限定的な実施形態としては、遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、リボザイム、アンチセンス cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分枝したポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離された DNA、任意の配列の単離された RNA、核酸プローブおよびプライマーが挙げられる。核酸分子としては、mRNA のスプライシング改変体が挙げられる。核酸は、天然に存在する、例えば、DNA もしくは RNA であってもよいし、または当該分野で公知のような合成アナログであってもよい。このようなアナログは、アッセイ条件下で安定性を実証し、従ってそれらは、プローブとして適切である。核酸分子はまた、改変された核酸分子、例えば、メチル化核酸分子および核酸分子アナログを含んでもよい。プリンおよびピリミジンのアナログは当該分野で公知である。

20

【 0 0 9 5 】

本発明の核酸は、生物学的サンプルに存在する組織（単数または複数）または細胞タイプ（単数または複数）の示差的な同定のためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。全長 MGD - CSF 改変体のフラグメントは、全長遺伝子を単離するため、そして高い配列類似性または類似の生物学的活性を有する他の遺伝子を単離するための cDNA ライブラリーについてのハイブリダイゼーションプローブとして用いられ得る。このタイプのプローブは、少なくとも 30 塩基を有してもよいし、そして例えば、50 以上の塩基を含んでもよい。このプローブはまた、全長転写物に相当する cDNA クローン、ならびに調節領域およびプロモーター領域、エキソンおよびイントロンを含む、完全な MGD - CSF 遺伝子を含むゲノムクローン（単数または複数）を同定するためのスクリーニング手順において用いられ得る。このようなスクリーニングの例は、オリゴヌクレオチドプローブを合成するために公知の核酸配列を用いることによって、MGD - CSF 遺伝子のコード領域を単離する工程を包含する。本発明の遺伝子に相補的な配列を有する標識されたオリゴヌクレオチドは、ヒト cDNA、ゲノム DNA または mRNA ライブラリーをスクリーニングして、相補的なライブラリー成分を同定するために用いられ得る。

30

40

【 0 0 9 6 】

本発明はさらに、本明細書において上記される配列であって、その配列の間に少なくとも 91%、少なくとも 92% または少なくとも 95% 同一性がある場合、その配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本発明は、本明細書において上記されるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。ストリンジェントな条件とは一般に、その配列の間に少なくとも 95%、または少なくとも 97% の同一性が存在する場合のみハイブリダイゼーションが生じる条件を

50

包含する。例えば、50%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハート溶液、10%硫酸デキストラン、および20μg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含有する溶液中での42℃での一晚のインキュベーション、その後の0.1×SSC中で約65℃でのフィルターの洗浄がストリンジェントな条件を構成する。

【0097】

表および配列表に示されるポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を実質的に保持するポリペプチドをコードし得る。あるいは、ポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズして、それに対して同一性を有する、少なくとも20塩基、少なくとも30塩基または少なくとも50塩基を有してもよく、そしてこれは成熟ポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を保持してもしなくてもよい。従って、本発明は、配列表に示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも70%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド、ならびにそのフラグメントであって、少なくとも30塩基または少なくとも50塩基を有するフラグメントに、そしてこのようなポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに関する。

10

【0098】

本明細書に提供される情報、例えば、表および配列表に示されるヌクレオチド配列を用い、MGD-CSFポリペプチドをコードする本発明の核酸分子は、標準的なクローニングおよびスクリーニング手順、例えば、開始物質としてmRNAを用いてcDNAをクローニングするための手順を用いて得ることができる。

20

【0099】

(改変体および変異体ポリヌクレオチド)

本発明はさらに、MGD-CSF分子の一部、アナログまたは誘導体をコードする、本発明の核酸分子の改変体に関する。改変体は、例えば、Gene II, Lewin, B 編、John Wiley & Sons, New York (1985)に記載されるように、ある生物体の染色体上の所定の遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの別の形態のうちの1つのような、天然の対立遺伝子改変体のように天然に存在し得る。天然には存在しない改変体は、当該分野で公知の変異誘発技術を用いて生成され得る。

30

【0100】

このような改変体としては、ヌクレオチド置換、欠失または付加によって生成される改変体が挙げられる。この置換、欠失または付加は、1つ以上のヌクレオチドを含んでもよい。この改変体は、コード領域、非コード領域またはその両方において変更され得る。コード領域における変更は、保存的または非保存的なアミノ酸の置換、欠失または付加を生じ得る。これらは、所望のMGD-CSFタンパク質、またはその部分の特性または活性を変更しない、サイレントな置換、付加または欠失の形態をとってもよい。

【0101】

ある実施形態では、本発明は、例えば、配列表に示されるような、切断されたシグナルペプチドまたはリーダー配列を有するタンパク質を含む、成熟タンパク質をコードする核酸分子を提供する。他の実施形態は、配列表由来のポリヌクレオチドに対して少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一もしくは少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子、配列表に示されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、配列表に示されるポリペプチド、またはこれらのいずれかの生物学的に活性なフラグメントを包含する。

40

【0102】

MGD-CSFポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、この参照ヌクレオチド配列の各々100ヌクレオチドあたり最大5つの点変異まで含んでもよいこと以外は、ヌクレオチド配列が参照配列と同一であるポリヌクレオチドである。換言すれば、参照ヌ

50

クレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るためには、この参照配列におけるヌクレオチドの最大5%までが、欠失されるかもしくは別のヌクレオチドで置換されてもよく、またはこの参照配列中の総ヌクレオチドの最大5%までの多数のヌクレオチドがこの参照配列に挿入されてもよい。この参照配列のこれらの変異は、参照ヌクレオチド配列の5'末端もしくは3'末端の位置で、またはそれらの末端位置の間のいずれかで、参照配列におけるヌクレオチドの間で個々に分散されて、もしくは参照配列内の1つ以上の連続する群において、生じてもよい。

【0103】

実際問題として、任意の特定の核酸分子が、例えば、配列表に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、80%、90%または95%同一であるか否かは、Bestfitプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix (登録商標), Genetics Computer Group, Madison, WI)のような公知のコンピュータプログラムを用いて都合よく決定され得る。Bestfitは、SmithおよびWaterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482~489 (1981)の局所相同性アルゴリズムを用いて、2つの配列の間の相同性の最適のセグメントを見出す。特定の配列が、本発明による参照配列に対して例えば95%同一であるか否かを決定するためにBestfitまたは任意の他の配列アラインメントプログラムを用いる場合、そのパラメータは、当然ながら、同一性のパーセンテージが、この参照ヌクレオチド配列の全長にわたって算出され、そして、この参照配列中のヌクレオチドの総数の最大5%までの相同性におけるギャップが許容されるように設定される。

10

20

【0104】

本出願は、核酸分子がMGD-CSF活性を有するポリペプチドをコードするか否かに関わらず、配列表に示される核酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%または95%同一である核酸分子に関する。特定の核酸分子が、MGD-CSF活性を有するポリペプチドをコードしない場合でさえ、当業者は、核酸分子を、例えば、ハイブリダイゼーションプローブ、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のプライマーとして用いる方法を公知である。MGD-CSF活性を有するポリペプチドをコードしない本発明の核酸分子の用途としては、とりわけ、MGD-CSF遺伝子またはその対立遺伝子改変体をcDNAライブラリー中で単離すること; およびVernara, Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)に記載されるような、MGD-CSF遺伝子の正確な染色体位置を予測するために中期染色体開裂に対するハイブリダイゼーション(例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)); および特定の組織においてMGD-CSF mRNA発現を検出するためのノーザンブロット分析が挙げられる。

30

【0105】

本出願はまた、配列表の核酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%または95%同一である配列を有する核酸分子であって、MGD-CSFポリペプチド活性を有するポリペプチドすなわち、特定の生物学的アッセイにおいて測定した場合、本発明のMGD-CSFポリペプチドの活性に対して同一であるかまたは類似である活性を示すポリペプチドをコードする、核酸分子に関する。例えば、本発明のMGD-CSFポリペプチドは、免疫細胞増殖を刺激し、腫瘍増殖を阻害し、そして/または腫瘍細胞を殺傷し得る。

40

【0106】

遺伝子コードの縮重に起因して、当業者は、配列表に示される核酸配列の核酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%または95%同一である配列を有する多数の核酸分子が、MGD-CSFポリペプチド活性を有するポリペプチドをコードすることを直ちに認識する。実際、これらのヌクレオチド配列の複数の縮重改変体が同じポリペプチドをコードするので、上記の比較アッセイを行わなくても当業者にはこれは明白である。縮重

50

改変体でない相当な数の核酸分子がまた、MGD - CSFポリペプチド活性を有するポリペプチドをコードすることが当業者には認識され、そして当業者は、下にさらに記載されるように、タンパク質機能に影響する可能性が低いか、または有意に影響する可能性がないアミノ酸置換（例えば、1つの脂肪族アミノ酸を第二の脂肪族アミノ酸で置換すること）を十分に承知している。

【0107】

（ベクターおよび宿主細胞）

本発明はまた、本発明の単離された核酸分子を含むベクター、組み換えベクターで遺伝子操作される宿主細胞、および組み換え技術によるMGD - CSFポリペプチドまたはそのフラグメントの生成に関する。これは、分泌性リーダー配列（例えば、配列表を参照のこと；分泌性リーダーは、コラーゲン分泌リーダーであってもよい）をコードする例えば核酸構築物を含む組み換えベクター、および目的の選択された異種ポリペプチド、および組み換えベクターで遺伝子操作された宿主細胞を提供する。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミドまたはウイルスベクターであってもよい。レトロウイルスベクターは、複製コンピテントまたは複製欠損であってもよい。後者の場合、ウイルスの伝播は、補完している宿主細胞においてのみ生じる。本発明のベクターは、Kozak配列（Lodishら、Molecular Cell Biology、第4版、1999）を含んでもよい。本発明のベクターはまた、目的の配列のATG開始コドンを含んでもよい。

10

【0108】

ポリヌクレオチドは、宿主における増殖のために選択マーカーを含むベクターに連結され得る。一般には、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿のような沈殿で、または荷電された脂質との複合体において導入される。ベクターがウイルスである場合、適切なパッケージング細胞株を用いてインビトロでパッケージングされ、次いで宿主細胞に形質転換されてもよい。

20

【0109】

DNAインサートは、適切なプロモーター、例えば、2～3例を挙げれば、λファージPLプロモーター；E. coliのlac、trp、phoAおよびtacプロモーター；SV40初期および後期プロモーター；ならびにレトロウイルスLTRのプロモーターに作動可能に連結されてもよい。他の適切なプロモーターは、当業者に公知である。発現構築物はさらに、転写開始、終結および転写領域の部位、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。この構築物によって発現される転写物のコード部分は、翻訳されるポリペプチドの末端に適切に位置する開始コドンおよび終結コドン（UAA、UGAまたはUAG）で翻訳開始コドンを含んでもよい。

30

【0110】

本発明は、とりわけ肝臓において機能するプロモーターの制御下で、ヒトを含む動物において目的の遺伝子の発現を提供する。尾静脈注射の流体力学に基づく手順（Zhangら、Hum. Gene Ther. 10:1735（1999））は、目的の遺伝子を用いて細胞をトランスフェクトすることが実証されている。本発明はまた、血管内のDNA投与の量および頻度を制御することによって遺伝子発現のレベルの操作を提供する。本発明はさらに、肝臓において遺伝子を発現するように機能するプロモーターを提供する。

40

【0111】

肝臓において発現されるタンパク質の1つの大きいファミリーは、チトクロムP450タンパク質ファミリーである。これらのタンパク質は、しばしば、有害な物質をさらに水溶性にさせることによってその物質を処分する身体の機構の一部として、種々の酸化反応を行う一群のヘム・チオレートモノオキシゲナーゼである。チトクロムP450タンパク質の身体の総量のほとんどが、肝臓で、詳細には、肝細胞のミクロソームにおいて見出される。千を超える異なるチトクロムP450タンパク質が存在する。しかし、わずか49の遺伝子および15の偽遺伝子しかヒトでは配列決定されていない。ヒトでは、チトクロムP450 3A4は、酸化的代謝における最も重要なチトクロムP450タンパク質として同定されている。これは身体における最も一般的なチトクロムP450タンパク質で

50

あり、誘導性タンパク質である。

【0112】

肝臓において発現される遺伝子のプロモーター配列、例えば、任意のチトクロム P 4 5 0 タンパク質のプロモーター配列を目的の遺伝子に作動可能に連結させることによって、肝臓およびこのプロモーターが活性である任意の他の部位における遺伝子の発現がもたらされ得る。本発明は、限定はしないが、チトクロム P 4 5 0 遺伝子、例えばチトクロム P 4 5 0 3 A 4 ; c - j u n ; j u n - b ; c - f o s ; c - m y c ; 血清アミロイド A ; アポリポrotein B 編集触媒サブユニット (a p o l i p o p r o t e i n B e d i t t i n g c a t a l y t i c s u b u n i t) ; 肝臓再生因子 ; 例えば、L R F - 1 シグナル伝達因子、および転写活性化因子、例えば、S T A T - 3 ; 血清アルカリホスファターゼ (S A P) ; インスリン様増殖因子結合タンパク質、例えば I G F B P - 1 ; サイクリン D 1 ; 活性タンパク質 - 1 (a c t i v e p r o t e i n - 1) ; C C A A T エンハンサーコア結合タンパク質 ; β オルニチンデカルボキシラーゼ ; 肝臓再生ホスファターゼ - 1 (p h o s p h a t a s e o f r e g e n e r a t i n g l i v e r - 1) ; 早期増殖応答遺伝子 - 1 (e a r l y g r o w t h r e s p o n s e g e n e - 1) ; 肝細胞増殖因子 ; ヘモペキシン ; インスリン様増殖因子 (I G F) 例えば I G F 2 ; 肝細胞核ファミリー 1 ; 肝細胞核ファミリー 4 ; 肝細胞 A r g - S e r - リッチドメイン含有タンパク質 ; グルコース 6 - ホスファターゼ ; および急性期タンパク質、例えば、血清アミロイド A および血清アミロイド P (S A A / S A P) を包含する遺伝子を発現するように機能するプロモーターを包含する。

10

20

【0113】

表 1 および実施例 9 に示されるとおり、M G D - C S F に対してチトクロム P 4 5 0 3 A 4 のプロモーター配列を作動可能に連結させて、得られたこの構築物をマウスの尾静脈へ注射することによって、M G D - C S F の発現、およびそれに伴うマウスによる単球産生の増大が誘導される。従って、本発明は、インビボで送達される、本発明の治療用分子を提供する。本発明は、裸の D N A を、薬学的に受容可能なキャリアの有無において、または目的の配列を有するベクター D N A を送達するために用いられ得る。インビボで送達される本発明の分子の機能を評価する方法は、当該分野で公知であり、そしていくつかの本明細書に記載される。

【0114】

示されたとおり、発現ベクターは、少なくとも 1 つの選択マーカーを包含し得る。このようなマーカーとしては、真核生物細胞培養物については、ジヒドロ葉酸還元酵素、G 4 1 8 またはネオマイシン耐性、そして E . c o l i および他の細菌における培養についてはテトラマイシン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性の遺伝子が挙げられる。適切な宿主の代表的な例としては、限定はしないが、細菌細胞、例えば、E . c o l i , S t r e p t o m y c e s , および S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m 細胞 ; 真菌細胞、例えば、酵母細胞 ; 昆虫細胞、例えば、D r o s o p h i l a S 2 および S p o d o p t e r a S f 9 細胞 ; 動物細胞、例えば、C H O , C O S , 2 9 3 および B o w e s 黒色腫細胞 ; ならびに植物細胞が挙げられる。上記の宿主細胞の適切な培養培地および条件は当該分野で公知である。

30

40

【0115】

選択マーカーは、マーカーを発現する細胞に対して表現型を付与して、その結果この細胞が適切な条件下で同定され得る遺伝子である。一般には、選択マーカーは、必須の細胞機能を阻害する化合物または他の因子の有無において形質転換された細胞が育つ能力に基づいてそれらの形質転換された細胞の選択を可能にする。従って、適切なマーカーとしては、薬物耐性または薬物に対する感受性を付与し、選択マーカーをコードする分子でトランスフェクトされた細胞が、適切な選択培地中で増殖された場合、その細胞に色を与えるかまたは抗原の特徴の変化を付与するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。例えば、選択マーカーとしては、細胞毒性マーカーおよび薬物耐性マーカーであって、これによって細胞が 1 つ以上の細胞毒素または薬物を含む培地上で増殖する能力によって選択さ

50

れるマーカー；栄養要求性のマーカーであって、チミジンおよびヒポキサンチンのような特定の栄養素または補充物の有無において規定の培地で細胞が増殖する能力についてその細胞が選択されるマーカー；代謝マーカーであって、例えば、細胞が唯一の炭素源として適切な糖を含有する規定の培地で増殖する能力について選択されるマーカー、ならびに発色基質上で着色されたコロニーを形成するか細胞が蛍光を発するように細胞の能力を付与するマーカーが挙げられる。

【0116】

なかでも細菌における使用に適切なベクターとしては、Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadaから入手可能なpQE70、pQE60およびpQE-9；Stratagene (La Jolla, CA)から入手可能なpBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH8A、pNH6a、pNH18A、pNH46A；ならびにPharmacia (Peapack, NJ)から入手可能なptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5が挙げられる。とりわけ適切な真核生物ベクターは、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG；ならびにPharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVLである。他の適切なベクターは、当業者に明白である。

【0117】

他の適切なベクターとしては、pTTベクター骨格を使用するベクターが挙げられる（図2、図3およびDurocherら、Nucleic Acids Res. 30 (2002)）。要するに、pTTベクター骨格は、例えば、Clontech (Palo Alto, CA)から、pIRES puro / EGFP (pEGFP) およびpSEAP基本ベクター（単数または複数）を得ることによって調製され得、そしてpcDNA3.1、pcDNA3.1 / Myc - (His)₆（配列番号277に開示される6×Hisタグ）およびpCEP4ベクターは、例えば、Invitrogenから入手され得る。本明細書において用いる場合、pTT5骨格ベクターは、pTT5-Gatewayを生成し得、そして哺乳動物細胞においてタンパク質を一時的に発現するために用いられ得る。pTT5ベクターは、例えば、pTT5-A、pTT5-B、pTT5-D、pTT5-E、pTT5-HおよびpTT5-Iに誘導体化されてもよい。本明細書において用いる場合、pTT2ベクターは、哺乳動物細胞株における適切な発現のための構築物を生成し得る。

【0118】

発現ベクターpTT5は、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターによって駆動されるcDNAの染色体外複製を可能にする。プラスミドベクターpcDNA-pDEST40は、高レベル発現のためのCMVプロモーターを利用し得るGateway適合ベクターである。SuperGlo GFP改変体 (sgGFP) は、Q-Biogene (Carlsbad, CA)から得ることができる。pCEP5ベクターを調製することは、プラスミドpCEP4Δを生じるSalIおよびXbaI酵素を用いる連続的消化および自己連結によりpCEP4のCMVプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを取り除くことによって達成され得る。pAdCMV5由来のGblIIフラグメント (Massieら、J. Virol., 72: 2289~2296 (1998)) は、BglII-直線化pCEP4Δに連結されたCMV5-ポリ (A) 発現カセットをコードしており、pCEP5ベクターが得られる。

【0119】

pTTベクターは、ハイグロマイシン (BsmIおよびSalI切除、それに続く充填および連結) およびEBNA1 (ClaIおよびNsiI切り出し、それに続く充填および連結) 発現カセットを欠失することによって調製され得る。ColEI起点 (βラクタマーゼORFの3'末端を含む、FspI-SalIフラグメント) は、pMBI起点 (βラクタマーゼORFの同じ3'末端) を含むpcDNA3.1由来のFspI-SalIフラグメントで置換されてもよい。Myc - (His)₆（配列番号277として開示

10

20

30

40

50

される6×Hisタグ)C末端融合タグは、HindIIIおよびEcoRVで消化されたpcDNA3.1/Myc-Hisにおけるインフレーム連結後、SEAP(pSEAP-ベシク由来のHindIII-HpaIフラグメント)に付加され得る。プラスミドは引き続き、LB培地中で増殖されたE.coli(DH5α)中で増殖されてもよく、そしてMAXIprepカラム(Giagen, Mississauga, Ontario, Canada)を用いて精製されてもよい。定量するためには、プラスミドは引き続き、50mM Tris-HCl pH7.4中に希釈されて、吸光度が260nmおよび280nmで測定され得る。約1.75~約2.00の間のA₂₆₀/A₂₈₀比を有するプラスミド調製物が適切である。

【0120】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染または他の方法によって達成され得る。このような方法は、Sambrook, J.ら(2001)Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第三版、Cold Spring Harbor Laboratory Pressのような多くの標準的な実験室マニュアルにおいて記載されている。

【0121】

このポリペプチドは、融合タンパク質のような改変形態で発現されてもよいし、分泌シグナルだけでなく、さらなる異種の機能的な領域を含んでもよい。例えば、さらなるアミノ酸の領域、特に荷電されたアミノ酸が、精製の間、またはその後の取り扱いおよび保管の間の、宿主細胞における安定性および永続性を改善するために、このポリペプチドのN末端に付加されてもよい。また、ペプチド部分が精製を容易にするためにこのポリペプチドに付加されてもよい。このような領域は、このポリペプチドの最終調製の前に除去され得る。

【0122】

(ポリペプチド)

本発明はさらに、表および配列表に示されるヌクレオチド配列、例えば、それぞれ、全長ポリペプチド、エキソン4、成熟ポリペプチドおよびフラグメントTRLRAQ(配列番号11)(MGD-CSFのエキソン3とエキソン4との間の接合に存在する)に相当する配列番号7、8、9および11によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたMGD-CSFポリペプチドを提供する。本発明は、配列番号10および12に示されるように、新規なポリペプチドについて、および関連のポリペプチドについて新規な用途を提供する。

【0123】

本発明は、分泌リーダー、シグナルペプチドまたはリーダー配列の結果としてER、分泌小胞または細胞外間隙を指向し得る分泌タンパク質、そしてシグナル配列を含む必要な細胞外間隙に放出されるタンパク質を提供する。分泌されたタンパク質が細胞外間隙に放出される場合、成熟ポリペプチドへの細胞外プロセッシングを受けるかもしれない。細胞外間隙への放出は、エキソサイトーシスおよびタンパク質分解性の切断を含む多くの機構によって生じ得る。

【0124】

図8Aに示されるとおり、MGD-CSFポリペプチドは、周知の方法によって組み換え細胞培養物から取り出されて、単離され得る。このような方法としては、硫酸アンモニウムおよびエタノールの沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーが挙げられる。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が精製のために使用されてもよい。本発明のポリペプチドは、直接単離されてもまたは培養されても、体液、組織および細胞を含む天然の供給源から精製される産物；化学合成手順の産物；な

10

20

30

40

50

らびに、例えば、細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む原核生物宿主または真核生物宿主から組み換え技術によって生成される産物を包含する。組み換え生成手順において使用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化されてもよいし、またはグリコシル化されなくてもよい。さらに、本発明のポリペプチドはまた、最初の改変メチオニン残基を、ある場合には、宿主媒介プロセスの結果として含んでもよい。従って、翻訳開始コドンによってコードされるN末端メチオニンは一般に、真核生物細胞における翻訳後に任意のタンパク質から高い効率で除去されることが当該分野では周知である。ほとんどのタンパク質上のN末端メチオニンはまた、ほとんどの原核生物で効率的に除去されるが、いくつかのタンパク質では、この原核生物の除去過程は、N末端メチオニンが共有結合されているアミノ酸の性質に依存して不十分である。

10

【0125】

代表的には、異種ポリペプチドは、改変されてもされなくても、上記のように、または融合タンパク質として発現されてもよく、そしてこれには分泌シグナルを含むだけでなく、分泌リーダー配列も含んでもよい。本発明の分泌リーダー配列は、小胞体（ER）に対して特定のタンパク質を指向する。このERは、他のタンパク質から膜結合タンパク質を分離する。一旦ERに局在すれば、タンパク質は、分泌小胞を含む小胞；原形質膜；リソソーム；および他のオルガネラへの分布のためにゴルジ装置にさらに指向され得る。

【0126】

分泌リーダー配列によってERに標的化されるタンパク質は、分泌されたタンパク質として細胞外間隙へ放出され得る。例えば、分泌タンパク質を含む小胞は、細胞膜と融合されてもよく、そしてその内容物をエキソサイトーシスを介して細胞外間隙へ放出し得る。エキソサイトーシスは、構成的に、または誘引シグナルの受容の際に生じ得る。後者の場合、タンパク質は、エキソサイトーシスが誘引されるまで分泌小胞（または分泌顆粒）に保管され得る。同様に、細胞膜上に存在するタンパク質はまた、膜に対してタンパク質を保持するリンカーのタンパク質分解による切断によって細胞外間隙に分泌され得る。

20

【0127】

さらに、ペプチド部分および/または精製タグが、精製を容易にするためにポリペプチドに添加され得る。このような領域は、ポリペプチドの最終調製の前に除去され得る。他の理由のうちでもとりわけ、分泌または排出を生じさせるため、安定性を改善するため、そして精製を容易にするためのポリペプチドへのペプチド部分の付加は、当該分野において周知でかつ慣用的な技術である。適切な精製タグとしては、例えば、V5、HISX6（配列番号277）、HISX8（配列番号278）、アビジンおよびビオチンが挙げられる。

30

【0128】

本発明は、タンパク質を安定化して精製するために有用である免疫グロブリン由来の異種領域を含む融合タンパク質を提供する。他のうちでもとりわけ、分泌または排出を生じさせるため、安定性を改善するため、そして精製を容易にするためのポリペプチドへのペプチド部分の付加は、当該分野において周知でかつ慣用的な技術である。例えば、欧州特許第0 464 533号（カナダでの対応は2045869号）は、免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を別のヒトタンパク質またはその一部と一緒に含む融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断における使用に有利であり、従って、例えば、改良された薬物動態的な特性を生じる（欧州特許0 232 262号）。他方では、いくつかの用途については、融合タンパク質は記載された有利な方式で発現され、検出され、そして精製された後、Fc部分を欠失し得ることが所望される。これは、Fcタンパク質が治療および/または診断における用途を妨害するものであることが証明される場合、例えば、融合タンパク質が免疫のための抗原として用いられるべきである場合に特にあてはまる。例えば、薬物開発においては、ヒトのタンパク質、例えばhIL-5は、hIL-5のアンタゴニストを同定するためのハイ-スループットのスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されている。Bennettら、J. Molec. Recogn. 8: 52~58 (1995) および Johans

40

50

onら、J. Biol. Chem., 270: 9459~9471 (1995) を参照のこと。

【0129】

本発明のポリペプチドは、単離型で提供されてもよいし、そして上記のように実質的に精製されてもよい。本明細書に記載されるMGD-CSFポリペプチドの組み換え生成バージョンはまた、例えば、SmithおよびJohnson, Gene, 67: 31~40 (1988) に記載の1工程法に従って、実質的に単離されてもよい。本発明のポリペプチドはさらに、当該分野で周知の方法を用いて生成された本発明の抗MGD-CSF抗体を用いて、天然または組み換えの供給源から単離されてもよい。

【0130】

本明細書に記載のポリペプチドは、当該分野で習慣的であるように、分子の折り畳みを補助するか、または分子の二量体化もしくは三量体化を補助するイオンまたは因子の存在下で精製または単離され得る。例えば、生理学的な折り畳みまたは重合化を促進するためには補因子が添加され得る。

【0131】

本発明のさらなるポリペプチドは、上記のポリペプチドに対して少なくとも70%、80%、90%または95%の同一性を有するポリペプチドを包含する。本発明のポリペプチドはまた、配列表の核酸配列によってコードされるポリペプチドに対して少なくとも70%、80%、90%または95%同一であるポリペプチドを含む。

【0132】

2つのポリペプチドの同一性%は、類似性決定のためのデフォルト設定を用いるBestfitプログラムを用いて2つのポリペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定された類似性スコアによって測定され得る。Bestfitは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482~489 (1981) の局所相同性アルゴリズムを用いて、2つの配列の間の類似性の最適セグメントを見出す。

【0133】

MGD-CSFポリペプチドの参照アミノ酸配列に対して、例えば、少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、このポリペプチドのアミノ酸配列が、この参照ポリペプチドの各々100個のアミノ酸あたり最大5つまでのアミノ酸改変を含んでもよいこと以外は、ポリペプチドのアミノ酸配列がこの参照配列に対して同一であるポリペプチドである。言い換えれば、参照アミノ酸配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、この参照配列におけるアミノ酸残基のうち最大5%までが欠失されるか、もしくは別のアミノ酸と置換されてもよく、または多数のアミノ酸、参照配列における総アミノ酸残基の最大5%までがこの参照配列に挿入されてもよい。参照配列のこれらの変更は、参照アミノ酸配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端位置で生じて、またはそれらの末端位置の間のいずれで生じて、この参照配列の残基の間で個々に、またはこの参照配列内で1つ以上の連続する群で分散されてもよい。

【0134】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、配列表に示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列に対して、またはポリペプチド配列に対して少なくとも70%、80%、90%または95%同一であるか否かは、Bestfitプログラムのような公知のコンピュータープログラムを用いて都合よく決定され得る。特定の配列が、本発明による参照配列に対して例えば95%同一であるか否かを決定するためにBestfitまたは他の配列アラインメントプログラムを用いる場合、そのパラメーターは、当然ながら、同一性のパーセンテージが、この参照アミノ酸配列の全長にわたって算出され、そして、参照配列中のアミノ酸残基の総数の最大5%までの相同性におけるギャップが許容されるように設定される。

【0135】

(改変体および変異体ポリペプチド)

タンパク質操作は、本発明の M G D - C S F ポリペプチドの特徴を改善または変更するために使用され得る。当業者に公知の組み換え D N A 技術は、単一または複数のアミノ酸置換、欠失、付加または融合タンパク質を含む、新規な変異タンパク質または「突然変異タンパク質 (ムテイン) 」を生成するために用いられ得る。このような改変ポリペプチドは、所望の特性、例えば、活性の増強または安定性の増大を示し得る。さらに、それらは、少なくとも特定の精製および保管条件下で、対応する天然のポリペプチドよりも高い収率で精製されて、良好な可溶性を示し得る。

【 0 1 3 6 】

(N 末端および C 末端欠失変異体)

例えば、膜結合タンパク質の細胞外ドメインまたは成熟型の分泌タンパク質を含む多くのタンパク質について、当該分野では、1つ以上のアミノ酸が、生物学的機能の実質的な損失なしに N 末端または C 末端から欠失されることが公知である。例えば、R o n ら、J . B i o l . C h e m . , 2 6 8 : 2 9 8 4 ~ 2 9 8 8 (1 9 9 3) は、3、8または27個のアミノ末端のアミノ酸残基が欠失されていてさえ、ヘパリン結合活性を有する改変された K G F タンパク質を報告した。

【 0 1 3 7 】

しかし、タンパク質の N 末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、このタンパク質の1つ以上の生物学的機能の改変または損失を生じる場合でさえ、他の生物学的活性は依然として保持され得る。従って、短縮されたタンパク質がこのタンパク質の完全なまたは成熟型を認識する抗体を誘導するか、および/またはその抗体に結合する能力は、一般に、この完全なまたは成熟タンパク質の残基の過半数未満が N 末端から除去される場合には保持される。完全なタンパク質の N 末端残基を欠く特定のポリペプチドがこのような免疫学的活性を保持するか否かは、本明細書に記載される慣用的な方法によって、決定され得、そしてそうでなければ当該分野で公知である。従って、本発明はさらに、配列表に示されるように、M G D - C S F 分子のアミノ酸配列のアミノ末端から1つ以上の残基が欠失されているポリペプチドを提供する。

【 0 1 3 8 】

同様に、生物学的に機能的な C 末端欠失突然変異タンパク質 (ムテイン) の多くの例が公知である。例えば、インターフェロン γ は、このタンパク質のカルボキシ末端から8 ~ 10個のアミノ酸残基が欠失された場合、10倍程度、活性を増大する。例えば、D o b e l l i ら、J . B i o t e c h n o l o g y 7 : 1 9 9 ~ 2 1 6 (1 9 8 8) を参照のこと。

【 0 1 3 9 】

しかし、タンパク質の C 末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失がこのタンパク質の1つ以上の生物学的機能の損失の改変を生じる場合でさえ、他の生物学的活性は依然として保持され得る。従って、短縮されたタンパク質がこのタンパク質の完全なまたは成熟型を認識する抗体を誘導するか、および/またはその抗体に結合する能力は、一般に、この完全なまたは成熟タンパク質の残基の過半数未満が C 末端から除去される場合には保持される。完全なタンパク質の C 末端残基を欠く特定のポリペプチドがこのような免疫学的活性を保持するか否かは、本明細書に記載される慣用的な方法によって、決定され得、そしてそうでなければ当該分野で公知である。

【 0 1 4 0 】

(システインからセリンへの突然変異タンパク質 (ムテイン))

M G D - C S F 配列は、アミノ酸位置35、167、176、178、179、190および198に位置する7つのシステイン残基を含む。ある実施形態では、本発明は、システインに対して変異されたセリンを有する変異体 M G C 3 4 6 4 7 分子を提供する。これらの変異体は、表1および配列表に示され、配列番号258 ~ 271と命名される。配列番号14に記載されるコラーゲンシグナルペプチドを用いて、発現されたポリペプチドの分泌を改善した。表1および図8Bに示され、そして実施例18にさらに詳細に例証さ

10

20

30

40

50

れるように、35、167、176、178、179、190および198位置のシステインは、各々がセリンに置換された。これらの構築物は、当該分野で公知のような任意の適切なベクターに、例えば、pTT5-Gベクターにクローニングされてもよい。

【0141】

これらの突然変異タンパク質（ムテイン）を分析する事によって、MGD-CSFのジスルフィド結合パターンが理解され、そして改善された特性、例えば、哺乳動物細胞からの改善された発現および分泌、精製されたタンパク質の凝集の減少、ならびにE.coli中で発現された場合、活性な組み換えMGD-CSFを生成する能力を有するタンパク質が同定され得る。

【0142】

10

（他の変異体）

上記で考察されたタンパク質の末端欠失形態に加えて、MGD-CSFポリペプチドのいくつかのアミノ酸配列は、タンパク質の構造または機能の有意な効果なしに変更され得ることも当業者によって理解される。配列においてこのような相違が意図される場合、活性を決定するタンパク質上の重要な領域が存在することを覚えておくべきである。

【0143】

従って、本発明はさらに、実質的なMGD-CSFポリペプチド活性を示すか、または下に考察されるタンパク質部分のようなMGD-CSFタンパク質の領域を含むMGD-CSFポリペプチドの改変体を包含する。このような変異体は、活性にほとんど影響を有さないような、当該分野で公知の一般的な規則に従って選択された、欠失、挿入、反転、リピートおよびタイプ置換を包含する。例えば、表現型としてサイレントなアミノ酸置換を作製する方法に関する指針は、Bowieら、Science 247:1306~1310(1990)に提供され、この著者は、変化に対するアミノ酸配列の許容性を研究する2つの主なアプローチが存在することを示している。この第一の方法は、進化の過程に依存しており、ここでは変異は、自然の選択によって許容されるかまたは拒絶される。第二のアプローチは、クローニングされた遺伝子および選択の特定の位置でアミノ酸変化を誘導するように、または機能を維持する配列をスクリーニングして同定するように遺伝子操作を用いる。

20

【0144】

これらの研究によって、タンパク質は驚くべき事に、アミノ酸置換に耐性であることが報告される。著者らはさらに、どのアミノ酸変化が、タンパク質中の特定のアミノ酸位置で許容される可能性が高いかを示す。例えば、ほとんどの埋もれているアミノ酸残基は、非極性側鎖を必要とするが、表面側鎖の特徴は、一般にほとんど保存されない。他のこのような表現型としてサイレントな置換は、Bowieら、前出およびそこに引用される参考文献に記載される。代表的には、保存的置換として示されるのは1つのアミノ酸の別のアミノ酸での置換、とりわけ、脂肪族アミノ酸Ala, Val, LeuおよびIle; ヒドロキシル残基SerおよびThrの交換、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnとGlnとの間の置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、ならびに芳香族残基PheとTyrとの間の置き換えである。

30

【0145】

40

従って、配列表のポリペプチドまたは配列表の核酸配列によってコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体またはアナログは、(i) 1つ以上のアミノ酸残基が保存アミノ酸残基または非保存アミノ酸残基で置換されるもの；このような置換されたアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるアミノ酸残基であってもよく、もしくはそうでなくてもよい、もの(ii) 1つ以上のアミノ酸残基が置換基を有するもの；(iii) 成熟ポリペプチドが別の化合物、例えば、ポリペプチドの半減期を増大する化合物（例えば、ポリエチレングリコール）との融合されるもの；あるいは(iv) さらなるアミノ酸が、上記の形態のポリペプチド、例えば、IgG-Fc融合領域ペプチド、リーダー配列もしくは分泌配列、上記の形態のポリペプチドを精製するために使用される配列、または前駆タンパク質配列と融合されるものであってもよい。このようなフラグメント、誘導体

50

およびアナログは、本明細書の教示から、当業者の範囲内であると考えられる。

【0146】

従って、本発明のMGD-CSFポリペプチドは、天然の変異体またはヒトの操作のいずれかに由来する、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失または付加を含んでもよい。示されるとおり、これらの変化は、タンパク質の折り畳みにも活性にも有意に影響しない、保存的アミノ酸置換のような、軽度の変化であり得る。保存的なアミノ酸置換としては、芳香族の置換Phe、TrpおよびTyr；疎水性置換Leu、IsoおよびVal；極性の置換GluおよびAsp；塩基性の置換Arg、LysおよびHis；酸性の置換AspおよびGlu；そして小アミノ酸の置換Ala、Ser、Thr、MetおよびGlyが挙げられる。

10

【0147】

MGD-CSFポリペプチドの機能に必須のアミノ酸は、当該分野で公知の方法、例えば、部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキニング変異誘発によって同定され得る。例えば、CunninghamおよびWells, Science, 244:1081~1085(1989)を参照のこと。後者の手順は、単一アラニン変異を導入する。次いで、得られた変異体分子は、レセプター結合のような生物学的活性について、またはインビトロもしくはインビボの増殖活性について試験される。

【0148】

特別な目的なのは、凝集の低下のような、極めて所望される改善された特徴を有するタンパク質を生成し得る、荷電されたアミノ酸の他の荷電されたまたは中性のアミノ酸での置換である。凝集は、活性を減少させ得るだけでなく、薬学的な処方物を調製する場合にも問題であり得る。なぜなら、例えば、凝集体は、免疫原性であり得るからである、Pinnckardら、Clin. Exp. Immunol., 2:331~340(1967)；Robbinsら、Diabetes 36:838~845(1987)；Clellandら、Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307~377(1993)。

20

【0149】

アミノ酸置換は、細胞表面レセプターに対するリガンドの結合の選択性を変化し得る。例えば、Ostadeら、Nature, 361:266~268(1993)は、2つの公知のタイプのTNFレセプターのうちの1つだけに対するTNF- α の選択的な結合を生じる変異を記載する。リガンド-レセプター結合に重要である部位はまた、結晶化、核磁気共鳴または光親和性標識のような構造の分析によって決定され得る、例えば、Smithら、J. Mol. Biol., 224:899~904(1992)およびde Vosら、Science, 255:306~312(1992)。

30

【0150】

(エピトープ保有部分)

下に詳細に記載されるように、本発明のポリペプチドを用いて、これも下に記載されるように、MGD-CSFタンパク質発現を検出するためのアッセイにおいて、またはMGD-CSFタンパク質機能を増強または阻害し得るアゴニストおよび/もしくはアンタゴニストとして有用であるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を上昇させ得る。これらのポリペプチドはまた、本発明による候補アゴニストおよびアンタゴニストでもある、MGD-CSFタンパク質結合を捕獲するための酵母ツーハイブリッドシステムにおいて用いられ得る。酵母ツーハイブリッドシステムは、FieldsおよびSong, Nature, 340:245~246(1989)に記載される。

40

【0151】

別の局面では、本発明は、本発明のポリペプチドの1つ以上のエピトープ保有部分を含むポリペプチドを提供する。本発明は、MGD-CSFに特異的なポリクローナル抗体を提供し、そして最低でも2つの抗原性エピトープを有するMGD-CSFを提供する。このポリペプチド部分のエピトープは、本発明のポリペプチドの免疫原性または抗原性エピトープである。免疫原性エピトープとは、タンパク質全体が免疫原として提供される場

50

合に抗体応答を惹起するタンパク質の部分である。他方では、抗体が結合し得るタンパク質分子の領域は抗原性エピトープである。タンパク質の免疫原性エピトープの数は一般に、抗原性エピトープの数よりも少ない。例えば、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci., 81:3998~4002 (1983)を参照のこと。

【0152】

抗原性エピトープを保有するポリペプチド（すなわち、抗体が結合し得るタンパク質分子の領域を含むポリペプチド）の選択に関しては、タンパク質配列の一部を模倣する比較的短い合成ペプチドが、この部分的に模倣されたタンパク質と相互作用する抗血清を慣用的に惹起し得ることが当業者に周知である。例えば、Sutcliffeら、Science, 219:660~666 (1983)を参照のこと。タンパク質反応性血清を惹起し得るペプチドはタンパク質の一次配列において頻繁に提示されており、単純な化学的規則のセットによって特徴付けられ得、そしてインタクトなタンパク質のイムノドミナントな領域（すなわち、免疫原性エピトープ）にも、アミノまたはカルボキシル末端にも限定されない。従って、本発明の抗原性エピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を含む抗体を惹起するのに有用である。例えば、Wilsonら、Cell, 37:767~778 (1984)を参照のこと。本発明のエピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドは、任意の従来の方法によって生成され得る。例えば、Houghten、Proc. Natl. Acad. Sci., 82:5131~5135 (1985)および米国特許第4,631,211号(1986)を参照のこと。

10

20

【0153】

本発明のエピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドを用いて、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導し得る。例えば、Bittleら、J. Gen. Virol., 66:2347~2354 (1985)を参照のこと。本発明の免疫原性エピトープ保有ペプチドであって、抗体応答を惹起するタンパク質の一部であるものは、タンパク質全体が抗原である場合、当該分野で公知の方法に従って同定される。例えば、目的の抗体の特定の抗原結合部位（パラトープ）に相補的であるエピトープ（ミモトープ）の位相幾何学的等価物であるモノマー（アミノ酸または他の化合物）の配列を検出または決定する一般的方法を記載する米国特許第5,194,392号(1990)を参照のこと。さらに一般的には、米国特許第4,433,092号(1989)は、目的の特定のレセプターのリガンド結合部位に相補的であるリガンドの位相幾何学的等価物であるモノマーの配列を検出または決定する方法を記載する。同様に、米国特許第5,480,971号(1996)は、直線状のC1-C7-アルキル過アルキル化オリゴペプチド、ならびにこのようなペプチドのセットおよびライブラリー、そして、例えば、目的のアクセプター分子に結合する、過アルキル化オリゴペプチドの配列を決定するためにこのようなオリゴペプチドのセットおよびライブラリーを用いるための方法を開示する。従って、本発明のエピトープ保有ペプチドの非ペプチドアナログはまた、これらの方法によって慣用的に作成され得る。

30

【0154】

（融合分子）

当業者が理解するとおり、本発明のMGD-CSFポリペプチド、およびその上記のエピトープ保有フラグメントは、異種ポリペプチドと組合されてキメラポリペプチドを生じ得る。これらの融合タンパク質は、精製を容易にして、インビボでの半減期の増大を示す。これは、例えば、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質において報告されている、例えば、欧州特許0394827; Traunecckerら、Nature, 331:84~86 (1988)。IgG部分に起因するジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質はまた、例えば、Fountoulakisら、J. Biochem., 270:3958~3964 (1995)によって記載されるように、モノマーMGD-CSFタンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも他の分子に結合および中和するのに効率的であり得る。異種ポリペプチドの誘導体化のための適

40

50

切な化学部分としては、本明細書に記載され、そして米国特許第 6,686,179 号および米国特許出願第 60/589,788 号および 60/654,229 号にさらに記載されるような、例えば、ポリマー、例えば水溶性ポリマー、免疫グロブリンの定常ドメイン、ヒト血清アルブミンの全てまたは一部；フェチュイン A；フェチュイン B；ロイシンジッパードメイン；テトラネクチン三量体化ドメイン；マンノース結合タンパク質（マンノース結合レクチンとしても公知）、例えば、マンノース結合タンパク質 1；および Fc 領域が挙げられる。融合タンパク質を作製する方法は、当業者に周知である。

【0155】

例えば、改変されていないインターフェロン α の短い血漿半減期のせいで、ウイルスおよび増殖性障害を処置するために、長期間にわたって頻繁な投与が必要になる。HSAを融合されたインターフェロン α は、より長い半減期を有し、そして未改変のインターフェロン α よりも必要な投与頻度は少ない；この半減期は 18 倍長く、そしてクリアランス速度は、約 140 倍遅い（Osbornら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 303:540~548, 2002）。HSAと融合されたインターフェロン β はまた、有益な薬物動態学的特性を有する；その半減期は、未改変のインターフェロン β での 8 時間と比較して、36~40 時間であることが報告された（Sungら、J. Interferon Cytokine Res. 23:25~36, 2003）。HSA-インターロイキン-2 融合タンパク質は、未改変のインターロイキン-2 に比較して長い半減期および有益な生体分布の両方を有することが報告されている。この融合タンパク質は、未改変のインターロイキン 2 よりも大きい程度までリンパ球が存在する組織を標的することが観察されており、このことはこの融合タンパク質がより大きい有効性を発揮することを示唆している（Yaoら、Cancer Immunol. Immunother. 53:404~410, 2004）。

10

20

30

40

50

【0156】

ヒト免疫グロブリン G サブクラス 1 の Fc レセプターはまた、治療分子の融合タンパク質として用いられている。これは、2 つの可溶性 p74 腫瘍壊死因子（TNF）レセプター分子に対して組み換え的に結合されている。この融合タンパク質は、単量体の可溶性レセプターよりも長い循環半減期を有すること、および関節リウマチを有する患者の関節における TNF α 誘発性炎症促進活性を阻害することが報告されている（Goldenberg, Clin. Ther. 21:75~87, 1999）。この融合タンパク質は、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎および強直性脊椎炎を処置するために臨床的に用いられている（Nanda および Bathon, Expert Opin. Pharmacother. 5:1175~1186, 2004）。

【0157】

ポリマー、例えば、水溶性ポリマーは、本発明において、ポリペプチドとして有用であり、このポリペプチドには各々のポリマーが結合されて、例えば、代表的には生理学的な環境で見出されるような水溶性の環境では、沈殿しない。本発明において使用されるポリマーは、治療産物または組成物の調製について薬学的に受容可能である。当業者は、このポリマー/タンパク質結合体が治療的に用いられるか、そしてそうである場合、所望の投与量、循環時間およびタンパク質分解に対する耐性のような考慮に基づいて所望のポリマーを選択し得る。

【0158】

適切な、臨床的に受容可能な、水溶性ポリマーとしては、限定はしないが、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリ（ β -アミノ酸）（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、ポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー（PPG）および他のポリアルキレンオキシド、ポリ

プロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (P O G) (例えば、グリセロール) および他のポリオキシエチル化ポリオール、ポリオキシエチル化ソルビトールまたはポリオキシエチル化グルコース、結腸酸 (c o l o n i c a c i d s) または他の炭水化物ポリマー、 F i c o l l 、またはデキストランおよびその混合物が挙げられる。

【 0 1 5 9 】

本明細書において用いる場合、ポリエチレングリコール (P E G) は、モノ - (C 1 - C 1 0) アルコキシ - またはアリアルコキシ - ポリエチレングリコールのような他のタンパク質を誘導するために用いられている任意の形態をほうがんすることを意味する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して製造に利点を有し得る。

10

【 0 1 6 0 】

詳細には、本発明の改変された異種ポリペプチドは、このポリペプチドに対してポリアミノ酸または分岐点アミノ酸を結合することによって調製され得る。例えば、ポリアミノ酸は、ポリペプチドの循環半減期を増大するように機能するキャリアタンパク質であり得る (融合分子を介して達成された利点に加えて) 。本発明の治療目的に関して、このようなポリアミノ酸は理想的には、中和抗原性応答を有するかまたは生じず、他の有害な応答も生じないものでなければならない。このようなポリアミノ酸は、血清アルブミン (例えば、ヒト血清アルブミン) 、そのさらなる抗体または部分、例えば、Fc領域、フェチュイン A 、フェチュイン B 、ロイシンジッパー核因子赤血球誘導因子 - 2 (N F E 2) 、神経網膜ロイシンジッパー、テトラネクチン、または他のポリアミノ酸、例えば、リジンから選択され得る。本明細書において記載されるように、ポリアミノ酸の付着の位置は、N末端もしくはC末端、または間の他の位置であってもよく、そしてまた選択された分子に対して化学的なリンカー部分によって接続されてもよい。

20

【 0 1 6 1 】

本明細書において用いられるポリマー、例えば水溶性ポリマーは、任意の分子量のポリマーであってもよいし、そして分枝してもしなくてもよい。このポリマーは各々代表的には、約 2 k D a ~ 約 1 0 0 k D a の平均分子量を有する (用語「約 (a b o u t) 」とは、ポリマーの調製物においては、ある程度の分子が、述べられた分子量より多いか、ある程度少ないことを示す) 。各々のポリマーの平均分子量は、約 5 k D a ~ 約 5 0 k D a であっても、または約 1 2 k D a ~ 約 2 5 k D a であってもよい。一般には、分子量が高いか、またはより分枝しているほど、ポリマー：タンパク質の比は高い。所望の治療プロファイル；例えば、徐放性の期間；もしあれば、生物学的活性に対する影響；取り扱いの容易さ；抗原性の程度または欠失；および本発明の改変された分子に対するポリマーの他の公知の効果；に依存して、他のサイズも用いられてもよい。

30

【 0 1 6 2 】

本発明において使用されるポリマーは代表的には、ポリペプチドの機能的なドメインまたは抗原性のドメインに対する影響を考慮して異種のポリペプチドに対して結合される。一般には、化学的誘導体は、活性化ポリマー分子とタンパク質を反応させるために用いられる任意の適切な条件下で行われ得る。活性部分に対してポリマーを連結するために用いられ得る活性化基としては、スルホン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート、アジジリン (a z i d i r i n e) 、オキシランおよび 5 - ピリジルが挙げられる。

40

【 0 1 6 3 】

本発明のポリマーは代表的には、アミノ酸のアルファ (α) もしくはイプシロン (ϵ) アミノ基、または反応性のチオール基で異種ポリペプチドに結合されるが、ポリマー基は、適切な反応条件下でポリマー基に結合するように十分に反応性であるタンパク質の任意の反応性基に結合されてもよいことも意図される。従って、ポリマーは、遊離のアミノまたはカルボキシル基のような反応性基を介して異種ポリペプチドに共有結合されてもよい。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基は、ロイシン残基およびN末端アミノ酸残基を含

50

んでもよい。遊離のカルボキシル基を有する残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC末端アミノ酸残基を挙げることができる。反応性チオールを有する残基としては、システイン残基が挙げられる。

【0164】

水溶性ポリマーのようなポリマーと結合体化された融合分子を調製するための方法は、各々一般に、(a)異種ポリペプチドとポリマーとをこのポリペプチドが1つ以上のポリマーと結合するようになる条件下で反応させる工程と、(b)この反応産物を獲得する工程とを包含する。各々の結合のための反応条件は、当該分野で公知の任意の条件、またはその後に関与された条件から選択されてもよいが、改変されるべきタンパク質を不活性化する温度、溶媒およびpHレベルのような反応条件に対する曝露を回避または制限するように選択されなければならない。一般には、反応のための最適の反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて場合によって決定される。例えば、ポリマー：ポリペプチドの結合体の比が大きいほど、結合体化された産物の割合は大きくなる。最適の比(反応の有効性に関して、過剰な未反応のポリペプチドもポリマーも存在しないという点で)は、所望の程度の誘導体化(例えば、モノ-、ジ-トリ-など)、選択されたポリマーの分子量、このポリマーが分枝されるか未分枝であるか、および用いられる反応条件のような要因によって決定され得る。ポリペプチドに対するポリマー(例えば、PEG)の比は一般に、1:1~100:1におよぶ。1つ以上の精製された結合体は、とりわけ透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび電気泳動を含む、標準的な精製技術によって各々の混合物から調製されてもよい。

10

20

【0165】

N末端の化学的に改変されたタンパク質が特に所望され得る。分子量、分岐など、反応混合物中のタンパク質(ポリペプチドまたはペプチド)分子に対するポリマーの割合、行われるべき反応のタイプ、および選択されたN末端の化学的に改変されたタンパク質を得る方法によってポリマーは選択され得る。N末端の化学的に改変されたタンパク質調製物を得る方法(必要に応じて他のモノ誘導体化(monoderivatized)部分からこの部分を分離する)は、化学的に改変されたタンパク質分子の集団からのN末端で化学的に改変されたタンパク質物質の精製によるものであってもよい。

【0166】

選択性のN末端化学改変は、特定のタンパク質における誘導体化について利用可能な異なるタイプの一次アミノ基(リジン対N末端)の異なる反応性を引き出す還元性のアルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下で、カルボニル基含有ポリマーによるN末端でのタンパク質の実質的に選択性の誘導体化が達成される。例えば、このタンパク質のリジン残基のεアミノ基とN末端残基のαアミノ基との間のpKaの相違を利用することができるpHで反応を行うことによってタンパク質のN末端に対してポリマーを選択的に結合してもよい。このような選択的な誘導体化によって、タンパク質に対するポリマーの結合が制御される：ポリマーとの結合体化は、タンパク質のN末端で優先的に生じ、リジン側鎖アミノ基のような他の反応性基の有意な改変は生じない。還元性アルキル化を用い、このポリマーは、上記のタイプであってもよく、タンパク質に対するカップリングのために単一の反応性アルデヒドを有するべきである。単独の反応性アルデヒドを含むポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドも用いられ得る。

30

40

【0167】

1実施形態では、本発明は、化学的に誘導体化されたポリペプチドがモノ-またはポリ(例えば、2-4)PEG部分を含むことを意図する。ペグ化は、当該分野で公知の任意のペグ化反応によって行われてもよい。ペグ化したタンパク質産物を調製するための方法は、一般に、ポリペプチドとポリエチレングリコール(例えば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体)とをこのタンパク質が1つ以上のPEG基に結合するようになる条件下で反応させる工程と；(b)この反応産物を得る工程とを包含する。一般には、この反応の最適の反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて場合によって決定される。

50

【0168】

当業者に利用可能な多数のPEG結合方法が存在する。例えば、欧州特許0 401 384号；Malikら，Exp. Hematol. 20：1028～1035（1992）；Francis，Focus on Growth Factors，3（2）：4～10（1992）；欧州特許0 154 316；欧州特許0 401 384；WO 92/16221；WO95/34326；ならびにペグ化に関する本明細書に引用される他の刊行物を参照のこと。

【0169】

本明細書に記載のようなペグ化の工程は、反応性ポリエチレングリコール分子とのアシル化またはアルキル化を介して行われてもよい。従って、本発明によるタンパク質産物は、PEG基（単数または複数）がアシル基またはアルキル基を介して結合されるペグ化タンパク質を含む。このような産物は、モノペグ化（mono-pegylated）されてもまたはポリペグ化（poly-pegylated）されてもよい（例えば、2-6または2-5 PEG基を含むもの）。このPEG基は一般に、アミノ酸の α アミノ基または ϵ アミノ基でタンパク質に結合されるが、PEG基は、適切な反応条件下でPEG基に結合されるのに十分に反応性であるタンパク質に対して結合された任意のアミノ基に結合され得ることも想定される。

10

【0170】

アシル化によるペグ化は一般に、ポリエチレングリコール（PEG）の活性なエステル誘導体と本発明のポリペプチドとを反応させる工程を包含する。アシル化反応のためには、選択されたポリマー（単数または複数）は代表的には、単独の反応性エステル基を有する。任意の公知のまたは引き続いて開発された反応性PEG分子が、ペグ化反応を行うために用いられてもよい。適切な活性化PEGエステルの例は、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）に対してエステル化されたPEGである。本明細書において用いる場合、アシル化は、限定はしないが、治療タンパク質とポリマーとの間の以下のタイプの結合を包含するものとする：PEG：アミド、カルバメート、ウレタンなど、例えば、Chamow、Bioconjugate Chem.，5：133～140（1994）。反応条件は、ペグ化物において公知の任意の条件、またはその後に関係された条件から選択されてもよいが、改変されるべきポリペプチドを不活性化する温度、溶媒およびpHのような条件は回避しなければならない。

20

30

【0171】

アシル化によるペグ化は一般に、ポリ-ペグ化タンパク質を生じる。接続する結合はアミドであってもよい。得られた産物は、実質的に一、二-または三-ペグ化されたものだけであり得る（例えば>95%）。しかし、高い程度のペグ化を有するいくつかの種は、用いられる特定の反応条件に依存した量で形成され得る。所望の場合、さらに精製されたペグ化種は、とりわけ透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび電気泳動を含む、標準的な精製技術によって混合物（特に未反応の種）から調製されてもよい。

【0172】

アルキル化によるペグ化は、一般に、還元剤の存在下で、PEGの末端アルデヒド誘導体とポリペプチドとを反応させる工程を包含する。還元性のアルキル化反応のためには、選択されたポリマー（単数または複数）は、単独の反応性アルデヒド基を有するべきである。例示的な反応性PEGアルデヒドは、水溶性であるポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、またはそのモノ-C1-C10アルコキシ-もしくはアリーロキシ誘導体であり、例えば、米国特許第5,252,714号を参照のこと。

40

【0173】

さらに、本発明の異種ポリペプチドおよび本明細書に記載のそのエピトープ保有フラグメントは、免疫グロブリン（IgG）の定常ドメインの一部と組み合わされて、キメラポリペプチドを生じ得る。これらの特定の融合分子は、精製を容易にし、そしてインビボにおける半減期の増大を示す。これは、例えば、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのド

50

メインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質中で示されている。例えば、欧州特許 0 3 9 4 8 2 7 号；T r a u n e c k e r ら、N a t u r e , 3 3 1 : 8 4 ~ 8 6 (1 9 8 8) 。 I g G 部分に起因するジスルフィド連結二量体構造を有する融合分子はまた、例えば、単量体のポリペプチドまたはポリペプチドフラグメント単独よりも、他の分子に結合して中和するのに効果的であり得る；例えば、F o u t o u l a k i s ら、J . B i o c h e m . , 2 7 0 : 3 9 5 8 ~ 3 9 6 4 (1 9 9 5) を参照のこと。

【 0 1 7 4 】

別の記載された実施形態では、ヒト血清アルブミン融合分子はまた、本明細書に記載のように、そして米国特許第 6 , 6 8 6 , 1 7 9 号にさらに記載されるとおり調製され得る。

10

【 0 1 7 5 】

さらに、本発明のポリペプチドは、融合ポリペプチドの精製を容易にするペプチドのようなマーカー配列に融合されてもよい。マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、その多くが市販されている、p Q E ベクター (Q i a g e n , M i s s i s s a u g a , O n t a r i o , C a n a d a) に提供されるタグのようなヘキサ - ヒスチジンペプチドであってもよい。G e n t z ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 8 6 : 8 2 1 ~ 8 2 4 (1 9 8 9) に記載されるとおり、例えば、ヘキサ - ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグである赤血球凝集 H A タグは、インフルエンザ赤血球凝集タンパク質由来のエピトープに対応する (W i l s o n ら、C e l l 3 7 : 7 6 7 (1 9 8 4)) 。これらの上記の融合物のいずれかが、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いて操作され得る。

20

【 0 1 7 6 】

(分泌性リーダー配列)

本明細書において、そして米国特許 6 0 / 6 4 7 , 0 1 3 号実証されるように、いくつかの分泌タンパク質が大量に発現および分泌されるためには、別の異なる分泌タンパク質由来の分泌性リーダー配列が所望される。異種の分泌性リーダー配列を使用することは、分泌されたポリペプチドの得られた成熟アミノ酸配列は、分泌過程の間に E R において分泌リーダー配列が除去される場合変更されないという点で有利である。さらに、異種分泌リーダーの付加は、いくつかのタンパク質を発現および分泌するために必要である。

30

【 0 1 7 7 】

従って、タンパク質を分泌して M G D - C S F を発現するために普遍的に用いられ得る潜在的な強固な分泌リーダー配列 (単数または複数) を同定するためには、出願人らは、多数の異なる分泌タンパク質をクローニングして発現し、アデノウイルス 5 で形質転換されているヒト胚性腎細胞株 2 9 3 の細胞の上清中でそれらの発現および分泌のレベルを測定している (G r a h a m ら、J . G e n . V i r o l . 3 6 : 5 9 (1 9 7 7)) 。いくつかの高い発現因子および高レベルの分泌タンパク質が観察された。

【 0 1 7 8 】

1 実施形態では、分泌されたタンパク質コラーゲン I X 型 α I 鎖長型に属する分泌リーダー配列を選択して、異種分泌リーダー配列として用いられた場合、発現および分泌を促進する能力をさらに試験した。本明細書に記載されるとおり、分泌されたタンパク質であるコラーゲン I X 型 α I 鎖長型のアミノ酸配列は、M K T C W K I P V F F F V C S F L E P W A S A (配列番号 1 4) であると予想される。本明細書にさらに記載されるように、この特定の分泌リーダーを含むベクターが構築され、いくつかのタンパク質は、全長コード配列から分泌リーダーを除去して、配列番号 1 4 を含むベクターにそれらをクローニングすることによってクローニングされ、それによって異種分泌性リーダー配列を有する分泌タンパク質が得られた。いくつかの他の選択されたタンパク質の高い発現および分泌も観察された。

40

【 0 1 7 9 】

本明細書に記載される、同定された分泌性リーダー配列としては、例えば、インターロ

50

イキン - 9 前駆体、T 細胞増殖因子 P 4 0、P 4 0 サイトカイン、トリアシルグリセロールリパーゼ、膵臓前駆体、ソマトリベリン前駆体、バソプレッシン - ニューロフィシン 2 - コペプチン前駆体、 β - エノエンドルフィン - ジノルフィン前駆体、補体 C 2 前駆体、小誘導性サイトカイン A 1 4 前駆体、エラスターゼ 2 A 前駆体、血漿セリンプロテアーゼインヒビター前駆体、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子前駆体、インターロイキン 2 前駆体、インターロイキン 3 前駆体、 α - フェトプロテイン前駆体、 α - 2 - H S - 糖タンパク質前駆体、血清アルブミン前駆体、インター - α - トリプシンインヒビター軽鎖、血清アミロイド P 成分前駆体、アポリポプロテイン A - I I 前駆体、アポリポプロテイン D 前駆体、コリパーゼ前駆体、カルボキシペプチダーゼ A 1 前駆体、 α - s 1 カゼイン前駆体、 β カゼイン前駆体、シスタチン S A 前駆体、ホリトロピン β 鎖前駆体、グルカゴン前駆体、補体因子 H 前駆体、ヒスチジン - リッチ糖タンパク質前駆体、インターロイキン - 5 前駆体、 α - ラクトアルブミン前駆体、V o n E b n e r の腺タンパク質前駆体、マトリックス G l a - タンパク質前駆体、 α - 1 - 酸糖タンパク質 2 前駆体、ホスホリパーゼ A 2 前駆体、樹状細胞ケモカイン 1、スタセリン (s t a t h e r i n) 前駆体、トランスサイレチン前駆体、アポリポプロテイン A - 1 前駆体、アポリポプロテイン C - I I I 前駆体、アポリポプロテイン E 前駆体、補体成分 C 8 γ 鎖前駆体、セロトランスフェリン (s e r o t r a n s f e r r i n) 前駆体、 β - 2 - ミクログロブリン前駆体、好中球デフェンシン 1 前駆体、トリアシルグリセロールリパーゼガストリック前駆体、ハプトグロビン前駆体、好中球デフェンシン 3 前駆体、腫瘍原性 1 前駆体の神経芽細胞腫サプレッサー、小誘導性サイトカイン A 1 3 前駆体、C D 5 抗原様前駆体、リン脂質移動タンパク質前駆体、d i c k k o p f 関連タンパク質 - 4 - 前駆体、エラスターゼ 2 B 前駆体、 α - 1 - 酸糖タンパク質 1 前駆体、 β - 2 - 糖タンパク質 1 前駆体、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン前駆体、C 反応性タンパク質前駆体、インターフェロン γ 前駆体、 κ カゼイン前駆体、血漿レチノール結合タンパク質前駆体、インターロイキン - 1 3 前駆体、および表または配列表に示される任意の分泌タンパク質が挙げられる。

【 0 1 8 0 】

本明細書に記載の分泌リーダー配列、ベクターおよび方法は、例えば、分泌ポリペプチド、細胞外タンパク質、膜貫通タンパク質および可溶性レセプターのようなレセプターを含む、種々のポリペプチドの発現に有用である。このようなポリペプチドの例としては、限定はしないが、サイトカインおよび増殖因子、例えば、インターロイキン 1 - 1 8、インターフェロン、リンホカイン、ホルモン、R e g u l a t e d o n A c t i v a t i o n , N o r m a l T E x p r e s s e d a n d S e c r e t e d (R A N T E S)、リンホトキシン - β 、F a s リガンド、f l t - 3 リガンド、N F - κ B のレセプターアクチベータについてのリガンド (l i g a n d f o r r e c e p t o r a c t i v a t o r o f N F - k a p p a B) (R A N K L)、可溶性レセプター、T N F 関連アポトーシス誘導性リガンド (T R A I L)、C D 4 0 リガンド、O x 4 0 リガンド、4 - 1 B B リガンド (および T N F ファミリーの他のメンバー)、胸腺間質由来リンホポイエチン、刺激因子、例えば、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、阻害因子、肥満細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、表皮増殖因子、成長ホルモン、腫瘍壊死因子 (T N F)、白血病抑制因子 (L I F)、オンコスタチン - M、造血因子、例えば、エリスロポイエチンおよびトロポポイエチン、ならびにこれらのいずれかのスプライシング改変体が挙げられる。

【 0 1 8 1 】

本発明によって発現され得るいくつかのタンパク質の説明は、例えば、H u m a n C y t o k i n e s : H a n d b o o k f o r B a s i c a n d C l i n i c a l R e s e a r c h , 第 I I 巻 (A g g a r w a l および G u t t e r m a n、編、B l a c k w e l l S c i e n c e s , C a m b r i d g e M a s s , 1 9 9 8) ; G r o w t h F a c t o r s : A P r a c t i c a l A p p r o a c h (M c K a y および L e i g h 編、O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s I n c . , N e w Y o r k , 1 9 9 3) および T h e C y t o k i n e H a n d b o o k (A . W

. Thompson 編; Academic Press, San Diego Calif. 1991)に見出され得る。

【0182】

任意の上述のタンパク質のレセプターはまた、例えば、両方の形態の腫瘍壊死因子レセプター (p55およびp75と呼ばれる)、インターロイキン-1レセプター (タイプ1および2)、インターロイキン-4レセプター、インターロイキン-15レセプター、インターロイキン-17レセプター、インターロイキン-18レセプター、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子レセプター、顆粒球コロニー刺激因子レセプター、オンスチン-Mおよび白血病阻害因子のレセプター、NF- κ Bのレセプターアクチベータ (receptor activator of NF- κ B) (RANK)、TRAILのレセプター、および死亡ドメインを含むレセプター、例えば、Fasまたはアポトーシス誘導性レセプター (AIR)を含む、本明細書に記載の分泌リーダー配列、ベクターおよび方法を用いて発現され得る。

10

【0183】

本明細書に記載の分泌リーダー配列、ベクターおよび方法を用いて発現され得る他のタンパク質としては、例えば、分化抗原のクラスター (CDタンパク質と呼ばれる)、例えば、Leukocyte Typing VI (Proceedings of the Vth International Workshop and Conference; Kishimoto, Kikutaniら編; Kobe, Japan, 1996)に記載されるもの、またはその後のワークショップで開示されたCD分子が挙げられる。このような分子の例としては、CD27、CD30、CD39、CD40; およびそのリガンド (CD27リガンド、CD30リガンドおよびCD40リガンド) が挙げられる。これらのいくつかは、41BBおよびOX40も含む、TNFレセプターファミリーのメンバーであって; このリガンドはしばしば、TNFファミリーのメンバーである (41BBリガンドおよびOX40リガンドと同じく); 従って、TNFおよびTNFRファミリーのメンバーはまた、本発明を用いて発現され得る。

20

【0184】

酵素的に活性であるタンパク質はまた、本明細書に記載された分泌リーダー配列、ベクターおよび方法を使用して発現されてもよく、そして例えば、メタロプロテイナーゼ-ディスインテグリンファミリーのメンバー、種々のキナーゼ (ストレプトキナーゼおよび組織プラスミノゲンアクチベータ、ならびにアンキリンリピートおよびIKR1および2を含む死亡関連キナーゼを含む)、TNF α 変換酵素、および種々の他の酵素を包含する。酵素的に活性なタンパク質のリガンドはまた、本発明を適用することによって発現され得る。

30

【0185】

本明細書に記載の分泌リーダー配列、ベクターおよび方法はまた、例えば、免疫グロブリン分子またはその部分、およびキメラ抗体 (ヒト定常領域を有する抗体は、マウス抗原結合領域に結合する) またはそのフラグメントを含む他のタイプの組み換えタンパク質の発現について有用である。DNAコード免疫グロブリン分子を操作して、組み換えタンパク質、例えば、単鎖抗体、親和性の増大した抗体、または他の抗体に基づくポリペプチドをコードし得るDNAを生じ得る多くの技術が公知である (例えば、Larrickら、Biotechnology 7: 934~938, 1989; Reichmanら、Nature 332: 323~327, 1988; Robertsら、Nature 328: 731~734, 1987; Verhoeyenら、Science 239: 1534~1536, 1988; およびChaudharyら、Nature 339: 394~397, 1989を参照のこと)。

40

【0186】

(翻訳と同時および翻訳後の改変)

本発明は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化による、公知の保護基/ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解切断、または抗体分子もしくは他

50

の細胞リガンドに対する連結によって、翻訳中または翻訳後に示差的に改変されるポリペプチドを包含する。任意の多数の化学的改変は、限定はしないが、臭化シアン、トリブシン、キモトリブシン、パパイン、V8プロテアーゼによる特定の化学的な切断；NABH₄、アセチル化；ホルミル化；酸化；還元；および/またはツニカマイシンの存在下の代謝合成を含む公知の技術によって行われてもよい。

【0187】

本発明によって包含されるさらなる翻訳後改変としては、例えば、N連結またはO連結された炭水化物鎖（N末端またはC末端を保有する）、アミノ酸骨格に対する化学部分の結合、N連結またはO連結された炭水化物鎖の化学的改変、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加または欠失が挙げられる。ポリペプチドはまた、検出可能な標識、例えば、タンパク質の検出および単離を可能にする酵素、蛍光、同位体またはアフィニティー標識で改変されてもよい。

10

【0188】

また、本発明のポリペプチドの化学的に改変された誘導体であって、このポリペプチドの可溶性、安定性および循環時間の増大、または免疫原性の低下のようなさらなる利点を提供し得る誘導体も本発明によって提供される（米国特許第4,179,337号を参照のこと）。誘導体の化学的部分は、水溶性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどから選択され得る。このポリペプチドは、分子内の無作為な位置で、または分子内の所定の位置で改変されてもよく、そして1、2、3またはそれ以上の結合された化学部分を含んでもよい。

20

【0189】

ポリマーは任意の分子量であってもよく、そして分枝されても未分枝であってもよい。ポリエチレングリコールについては、適切な分子量は、取り扱いおよび製造における容易さのために、約1kDaと約100kDaとの間である（この用語「約（about）」とは、ポリエチレングリコールの調製においては、ある程度の分子が言及された分子量よりも大きく、ある程度は小さいことを意味する）。所望の治療プロフィール（例えば、所望の徐放性の期間、もしあれば生物学的な活性に対する影響、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または欠失、および治療タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知影響）次第で、他のサイズが用いられてもよい。

30

【0190】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学部分）は、このタンパク質の機能的なドメインまたは抗原性のドメインに対する影響を考慮してタンパク質に結合されなければならない。欧州特許0 401 384（G-CSFに対するPEGの結合）のような、当業者に利用可能な多数の結合技術が存在する；またMalikら、Exp. Hematol. 20:1028~1035（1992）（塩化トレスルを用いるGM-CSFのペグ化を報告している）も参照のこと。例えば、ポリエチレングリコールは、遊離のアミノ基またはカルボキシル基のような反応性の基を介してアミノ酸残基を介して共有結合されてもよい。反応性基とは、活性化されたポリエチレングリコール分子が結合され得る基である。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としてはリジン残基およびN末端アミノ酸残基を挙げることができる；遊離のカルボキシル基を有する残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC末端アミノ酸残基を挙げることができる。スルフヒドリル基はまた、ポリエチレングリコール分子を結合するために反応性基として用いられ得る。治療目的に適切なのは、アミノ基での結合、例えば、N末端またはリジン基での結合である。

40

【0191】

当業者は、N末端で化学的に修飾されたタンパク質を特に所望し得る。本発明の組成物の例示としてポリエチレングリコールを用いて、当業者は、種々のポリエチレングリコール分子から（分子量、分枝などによって）反応混合物中のタンパク質（ポリペプチド）分子に対するポリエチレングリコールの割合、行われるべきペグ化反応のタイプ、および選

50

扱われたN末端ペグ化タンパク質を得る方法を選択し得る。N末端でペグ化された調製物を得る（すなわち、必要に応じて他のモノペグ化（monopeglylated）部分からこの部分を分離する）方法は、ペグ化タンパク質分子の集団からのN末端ペグ化物質の精製によるものであってもよい。N末端改変で化学的に改変された選択的なタンパク質は、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な異なるタイプの一次アミノ基（リジン対N末端）の異なる反応性を引き出す還元性のアルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下では、カルボニル基含有ポリマーとのN末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

【0192】

（染色体アッセイ）

染色体マッピングに関する特定の実施形態では、本明細書に開示のcDNAを用いて、MGD-CSFのゲノム核酸をクローニングする。これは、一般に市販される種々の周知の技術およびライブラリーを用いて達成され得る。次いでゲノムDNAを、この目的について周知の技術を用いるインサイチュの染色体マッピングで用いる。従って、本発明の核酸分子はまた、染色体同定のために有用である。この配列は、特異的に標的されて、個々のヒト染色体上の特定の位置とハイブリダイズし得る。さらに、染色体上の特定の部位を同定する必要性が現在ある。実際の配列データ（反復多型）に基く、染色体位置をマーキングするために現在利用できる染色体マーキング試薬は少ない。本発明による染色体に対するDNAのマッピングは、それらの配列と疾患に関連する遺伝子とを関連づけるのにおいて重要な第一の工程である。

【0193】

要するに、配列は、cDNAからPCRプライマーを調製することによって染色体にマッピングされ得る。3'非翻訳領域のコンピューター分析を、これによって増幅プロセスが複雑になるゲノムDNAにおける2つ以上のエキソンにまたがらないプライマーを迅速に選択するために用いる。次いで、これらのプライマーを、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために用いる。プライマーに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが増幅フラグメントを生じる。

【0194】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に対して特定のDNAを割り当てするための迅速な手順である。同じオリゴヌクレオチドプライマーで本発明を用いて、垂局在性を特定の染色体由来のフラグメントのパネルまたは大きいゲノムクローンのプールで類似の方式で達成し得る。染色体をマッピングするために同様に用いられ得る他のマッピングストラテジーとしては、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フローソート染色体でのプレスクリーニング（prescreening with labeled flow-sorted chromosomes）および染色体特異的なcDNAライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる事前選択が挙げられる。

【0195】

中期染色体開裂に対するcDNAクローンの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）を用いて、1工程で正確な染色体位置を得ることができる。この技術は、約50～60塩基程度の長さのcDNAで用いられ得る。この技術の概説については、Vermaら、Human Chromosomes; A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)を参照のこと。

【0196】

正確な染色体位置に対して一旦配列がマッピングされれば、染色体上の配列の物理的な位置は、遺伝子マップデータと相関され得る。（このようなデータは、例えば、Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通じてオンラインで利用可能なV. McKusick, Mendelian Inheritance in Manで見出される）。次いで、同じ染色体領域にマッピングされている遺伝子と疾患との間の関係は、連鎖分析（物理的に隣接する遺伝子の共同相

続)を通じて同定される。

【0197】

次に、相違は、罹患個体および非罹患個体のcDNAまたはゲノム配列において決定され得る。変異が罹患した個体の数例または全てで観察されるが、任意の正常な個体では観察されないならば、この変異はこの疾患の原因因子であると考えられる。物理的なマッピングおよび遺伝子マッピングの技術の現在の分解能では、疾患に関連する染色体領域に正確に局在する1つのcDNAが、50～500の潜在的な原因遺伝子のうちの1つであり得る(1メガベースのマッピング分解能および20kbあたり1遺伝子を仮定する)。

【0198】

MGD-CSFをコードする遺伝子は、染色体16q22.1に位置する。連鎖分析の研究によって、16q22上の遺伝子は、家族性骨髄性白血病の原因に関与することが示唆される(Horwitzら、Am. J. Hum. Genetics 61:873～881(1997))。11例の関係のある減数分裂伝達常染色体優性の急性骨髄性白血病および脊髄形成異常を含む家族でのこの研究においては、周知の白血病転移ブレイクポイント領域である21q22.1-q22.2および9p22-p21に対する連鎖は排除した。Horwitzらは、マイクロサテライトマーカーD16S522を用いて、これらの疾患と、組み換えフラクション $\theta = 0.0$ で2.82という最大2-ポイントロッドスコアとを関連付け、これによって16q22に対する連鎖の証拠を得た。ハプロタイプ分析によって、共通して、罹患した全ての家族のメンバーによって遺伝され、そしてD16S451からD16S289に伸長された、16q22の23.5-cM領域が示された。ノンパラメトリック連鎖分析によって、連鎖の条件付確率について0.00098というP値が得られた。突然変異解析は、多くの増殖応答性遺伝子および増殖促進遺伝子に存在する、ATリッチミニサテライトリピートFRA16B染色体不安定部の伸長およびE2F-4転写因子におけるCAG三ヌクレオチドリピートを排除した。予測に関連する動的突然変異を検出し得る、「反復伸長検出(repeat expansion detection)」法はより一般的に、この家族における白血病の原因として、大きいCAGリピートを排除した。MGD-CSFは、染色体16q22.1に位置する。従って、これは潜在的に、急性骨髄性白血病および脊髄形成異常においてある役割を果たし得、そしてこれらの疾患を処置するために用いられ得る。

【0199】

(治療組成物および処方物)

本発明のポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストは、非経口投与のための薬学的組成物を含むために適切な薬学的なキャリアと組み合わせて使用され得る。このような組成物は、治療上有効な量のポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストおよび薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む。このようなキャリアとしては、限定はしないが、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストラン、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせが挙げられる。この処方物は投与の様式に適合しなければならない。

【0200】

MGD-CSFポリペプチド組成物は、個々の被験体の臨床的な条件、MGD-CSFポリペプチド組成物の送達部位、投与方法、投与の計画、および医師に公知の他の要因を考慮して、適正な医療行為(good medical practice)に一致した方式で処方されて投与される。従って、本明細書の目的のためのMGD-CSFポリペプチドの有効量は、このような考慮によって決定される。

【0201】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の成分の1つ以上で充填された1つ以上の容器を含む薬学的なパックまたはキットを提供する。このような容器(単数または複数)に付随するのは、薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府の機関によって規定された形態の注意書きであり得、この注意書きは、ヒトの投与のための製造、使用または販売の機関による承認を反映する。さらに、本発明のポリペプチド、アゴニ

10

20

30

40

50

ストおよびアンタゴニストは、他の治療化合物と組み合わせて使用され得る。

【0202】

薬学的組成物は、従来の方式で、例えば、経口、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内または皮内の経路によって投与され得る。この薬学的組成物は、特定の適応の処置および/または予防のために有効である量で投与される。一般には、それらの薬学的組成物は、体重1kgあたり少なくとも約10μgの量で投与され、ほとんどの場合、それらは、1日あたり体重1kgあたり約8ミリグラムという過剰でない量で投与される。

【0203】

本発明のポリペプチド、ならびにポリペプチドであるアゴニストおよびアンタゴニスト化合物はまた、インビボにおけるこのようなポリペプチドの発現、すなわち遺伝子治療によって本発明に従って使用され得る。従って、例えば、細胞は、エキソビボにおいてポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)で操作されてもよい；次いで、この操作された細胞は患者に提供される。このような方法は当該分野で周知である。例えば、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルス粒子の使用による当該分野で公知の手順によって、細胞は操作され得る。

10

【0204】

同様に、細胞は、例えば、当該分野で公知の手順によって、インビボでポリペプチドを発現するためにインビボで操作されてもよい。当該分野で公知のとおり、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルス粒子を産生する細胞は、インビボで細胞を操作する、そしてインビボでポリペプチドを発現する目的のために患者に投与されてもよい。類似の方法による本発明のポリペプチドを投与するためのこれらの方法および他の方法は、本発明の教示から当業者には明白であるはずである。例えば、細胞を操作するための発現ベヒクルは、適切な送達ベヒクルとの組み合わせ後にインビボで細胞を操作するために用いられ得る、レトロウイルス粒子以外の、例えば、アデノウイルスであってもよい。

20

【0205】

本明細書において上記で言及されるレトロウイルスプラスミドベクターが由来するレトロウイルスとしては、限定はしないが、モロニーマウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ(Harvey)肉腫ウイルス、サル白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス(HIV)、骨髄増殖性肉腫ウイルスおよび乳腺腫瘍ウイルスが挙げられる。

30

【0206】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、適切なプロモーターの制御下である。本発明のベクターは1つ以上のプロモーターを含む。使用され得る適切なプロモーターとしては、限定はしないが、レトロウイルス長末端反復配列(long terminal repeat)(LTR)；SV40プロモーター；およびMillerら、Biotechniques, 第7巻第9号, 980~990(1989)に記載のヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、または任意の他の相同なまたは異種のプロモーター、例えば、限定はしないが、ヒストン、polIIIおよびβアクチンプロモーターを含む真核生物細胞プロモーターのような細胞プロモーターが挙げられる。使用され得る他のウイルスプロモーターとしては、限定はしないが、アデノウイルスプロモーター、例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター；チミジンキナーゼ(TK)プロモーター；およびB19パルボウイルスプロモーターが挙げられる。

40

【0207】

適切なプロモーターとしては、限定はしないが、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)プロモーター；誘導性プロモーター、例えば、MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーター；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ApoA1プロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター；レトロウイルスLTR(本明細書において上記される改変レトロウイルスLTRを含む)；βアクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモ

50

ンプロモーターが挙げられる。このプロモーターはまた、このポリペプチドをコードする遺伝子を制御する天然のプロモーターであってもよい。適切なプロモーターの選択は、本明細書に含まれる教示から当業者に明白になる。

【0208】

レトロウイルスプラスミドベクターを使用し、パッケージング細胞株を形質導入して、プロデューサー細胞株を形成してもよい。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞の例としては、限定はしないが、Miller, Human Gene Therapy, 1: 5 ~ 14 (1990)に記載されるようにPE501、PA317、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、CRE、CRIP、GP+E-86、GP+envAm12およびDNA細胞株が挙げられる。このベクターは、当該分野で公知の任意の方法を通じてパッケージング細胞を形質導入し得る。このような方法としては、限定はしないが、エレクトロポレーション、リボソームの使用およびCaPO₄沈殿が挙げられる。別の1方法では、レトロウイルスプラスミドベクターは、リボソーム中にカプセル化されてもよいし、または脂質に結合されて、次いで宿主に投与されてもよい。

10

【0209】

プロデューサー細胞株は、このポリペプチドをコードする核酸配列（単数または複数）を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を生成する。次いで、このようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インビトロまたはインビボのいずれかで真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、ポリペプチドをコードする核酸配列（単数または複数）を発現する。形質導入され得る真核生物細胞としては、限定はしないが、胚性幹細胞、胚性癌腫細胞、ならびに造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、骨髓芽球、ケラチノサイト、内皮細胞および気管支上皮細胞が挙げられる。

20

【0210】

ある実施形態では、MGD-CSF組成物は、その広範な種々が当該分野で公知である薬学的に受容可能な賦形剤とともに処方物中に提供される（Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drug Facts Plus, 第20版（2003）；Anselら、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第7版、Lippencott Williams and Wilkins（2004）；Kibbeら、Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版、Pharmaceutical Press（2000））。薬学的に受容可能な賦形剤、例えば、ビヒクル、アジュバント、キャリアまたは希釈剤は、公的に入手可能である。さらに薬学的に受容可能な補助物質、例えば、pH調節剤および緩衝化剤、毒性調節剤、安定化剤、保湿剤などは公的に入手可能である。

30

【0211】

薬学的な剤形では、本発明の組成物は、それらの薬学的に受容可能な塩の形態で投与されてもよく、またはそれらはまた、単独または適切な関連で、そして他の薬学的に活性な化合物と組み合わせて用いられてもよい。本発明の組成物は、潜在的な投与の方式に従って処方される。因子の投与は、経口、口腔内、経鼻、直腸、非経口、腹腔内、皮内、経皮、皮下、静脈内、動脈内、心臓内、心室内、頭蓋内、気管内およびクモ膜下腔内の投与などを含む種々の経路で、そうでなければ移植または吸入によって達成されてもよい。従って、本発明の組成物は、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、溶液、坐剤、浣腸、注射、吸入、およびエアロゾルのような固体、半固体、液体または気体の形態で調製物に処方されてもよい。以下の方法および賦形剤は単に例示であって、決して限定ではない。

40

【0212】

経口投与のための組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、顆粒、カプセル、徐放性処方物、経口リンスまたは粉末を形成し得る。経口調製物のためには、因子、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、単独で、または適切な添加物と、例えば、従来の添加物、例えば、ラクトース、マンニトール、コーンスターチまたはジャガイモデンプンと；結合剤、

50

例えば、結晶性セルロース、セルロース誘導体、アカシア、コーンスターチ、またはゼラチンと；崩壊薬、例えば、コーンスターチ、ジャガイモデンプンまたはカルボキシメチルセルロースナトリウムと；潤滑剤、例えば、滑石またはステアリン酸マグネシウムと；そして必要に応じて、希釈剤、緩衝化剤、保湿剤、防腐剤および香味料と組み合わせられて用いられてもよい。

【0213】

適切な賦形剤ビヒクルは、例えば、水、生理食塩水、デキストラン、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせである。さらに、所望の場合、このビヒクルは、わずかな量の補助物質、例えば、保湿剤または乳化剤またはpH緩衝化剤を含んでもよい。このような剤形を調製する現実的な方法は、公知であるか、または当業者（Gennaro、前出）に明白である。投与されるべき組成物または処方物は、処置されている被験体における所望の状態を達成するために適切な十分な量の因子を含む。

10

【0214】

この因子、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、水性または非水性の溶媒、例えば植物油または他の同様の油、合成脂肪酸グリセリド、より高級の脂肪酸またはプロピレングリコールのエステル中でそれらを溶解、懸濁または乳化することによって；そして所望の場合、従来の添加物、例えば、可溶化剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定化剤および防腐剤とともに、注射のための調製物中に処方され得る。経口または非経口送達のための他の処方物はまた、当該分野における習慣どおりに用いられ得る。

【0215】

抗体、因子、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、吸入を介して投与されるべきエアロゾル処方物中で利用されてもよい。本発明の化合物は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などのような加圧された受容可能な噴霧剤中に処方され得る。さらに、因子、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド組成物は、当該分野の習慣どおり、経鼻的または吸入による投与のための粉末形態に変換されてもよい。

20

【0216】

さらに、この因子は、乳化基剤または水溶性基剤のような種々の基剤と混合することによって坐剤に作成され得る。本発明の組成物は、坐剤を介して直腸投与されてもよい。この坐剤は、室温では凝固したままであるが体温では融ける、ココアバター、カーボワックスおよびポリエチレングリコールのようなビヒクルを含んでもよい。

30

【0217】

ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは他の修飾因子はまた、他の経路、例えば、ウイルス感染、マイクロインジェクションまたは小胞融合によって組織または宿主細胞に導入されてもよい。例えば、発現ベクターは、上記のように細胞に核酸組成物を導入するために用いられ得る。さらに、ジェット注入を、筋肉内投与のために用いてもよい（Furthら、Anal. Biochem. 205: 365~368 (1992)）。DNAは、金粒子上にコーティングされてもよく、そして文献（Tangら、Nature 356: 152~154 (1992)）に記載されるように、金微粒子（gold microprojectiles）がDNAでコーディングされており、次いで皮膚細胞に発射される、微粒子銃デバイスまたは「遺伝子銃（gene gun）」によって皮内に送達されてもよい。

40

【0218】

経口または直腸投与のための単位剤形、例えば、シロップ、エリキシルおよび懸濁剤が提供され得、ここで各々の投与単位、例えば、茶さじ一杯、テーブルスプーン一杯、錠剤または坐剤は、1つ以上の因子を含む組成物の所定の量を含む。同様に、注射または静脈投与のための単位剤形は、滅菌水、生理食塩水または別の薬学的に受容可能なキャリア中の溶液として組成物に因子（単数または複数）を含んでもよい。

【0219】

（因子およびアンタゴニストの同定）

本発明は、ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび他の因子を含む修飾因子であって、

50

それらの標的の活性を増大または減少させる修飾因子を提供する。本発明の修飾因子は、アゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得、そしてポリペプチドまたはポリヌクレオチドの結合または活性を妨げ得る。このような修飾因子、または因子としては、例えば、アゴニストであってもアンタゴニストであっても、ポリペプチド改変体；アゴニストであってもアンタゴニストであっても、抗体；通常アンタゴニストである、可溶性レセプター；アゴニストであってもアンタゴニストであっても、低分子薬物；通常アンタゴニストである、RNAi；通常アンタゴニストである、アンチセンス分子；および通常アンタゴニストであるリボザイムが挙げられる。ある実施形態では、因子は、本発明のポリペプチドであり、この本発明のポリペプチドはそれ自体が個体に投与される。ある実施形態では、因子は、本発明の「標的 (target)」ポリペプチドに特異的な抗体である。ある実施形態では、因子は、経口的に利用可能な薬物として有用であり得る化合物、例えば、低分子である。このような調節としては、調節に直接影響する他の分子の補充を包含する。例えば、細胞表面上のレセプターである本発明のポリペプチドの活性を調節する抗体は、このレセプターに結合して補体を固定し得、補体カスケードを活性化して、細胞の溶解を生じる。本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの生物学的活性を調節する因子は、適切なコントロールと比較した場合、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約80%、または少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍以上、活性または結合を増大または減少する。

10

20

【0220】

本発明はまた、本発明のポリペプチドの生物学的活性を調節する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。本発明のポリペプチドの生物学的活性の例は、本明細書において詳細に、例えば、実施例および図面に記載される。

【0221】

本発明はさらに、上記のような、本発明のポリペプチドのレセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物が、化合物の存在下で本発明の標識されたポリペプチドとともにインキュベートされる方法を提供する。次いで、化合物がこの相互作用を増強またはブロックする能力が測定される。あるいは、スクリーニングされるべき化合物およびMGD-CSFレセプターの相互作用後の公知の第二のメッセンジャー系の応答を測定して、この化合物がレセプターに結合して第二のメッセンジャー応答を惹起する能力を測定し、この化合物が潜在的なアゴニストであるかアンタゴニストであるかを決定する。このような第二のメッセンジャー系としては、限定はしないが、cAMP、グアニル酸シクラーゼ、イオンチャネルおよびホスホイノシチド加水分解によって媒介される系が挙げられる。

30

【0222】

アンタゴニスト化合物の例としては、抗体、またはある場合には、オリゴヌクレオチドが挙げられ、これは、本発明のポリペプチドのレセプターに結合するが、第二のメッセンジャー応答を惹起しないか、またはMGD-CSFポリペプチド自体に結合する。あるいは、潜在的なアンタゴニストは、レセプターに結合するが、第二のメッセンジャー応答を惹起せず、従って、ポリペプチドの作用を効率的にブロックするポリペプチドの変異型であってもよい。

40

【0223】

MGD-CSF遺伝子および遺伝子産物に対して拮抗性の別の化合物は、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンス構築物である。アンチセンス技術を用いて、三重らせん形成またはアンチセンスDNAもしくはRNAを通じて遺伝子発現は制御してもよい；両方の方法とも、DNAまたはRNAに対するポリヌクレオチドの結合に基づく。例えば、本発明の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード部分を用いて、約10~約40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計してもよい。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子のある領域、例えば、三重らせんに対して相補的であるように設計され；Leeら、Nucleic Acids Res., 6:3073(1979)；Cooneyら、Science, 241:456(19

50

88) ; および Dervanら、Science, 251:1360 (1991) を参照のこと ; これによって本発明のポリペプチドの転写および産生を妨げる。このアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズして、Okano, J. Neurochem., 56:560 (1991) ; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988) に記載されるように、mRNA分子のポリペプチドへの翻訳をブロックする。上記のオリゴヌクレオチドはまた、アンチセンスRNAまたはDNAがインビボで発現されてポリペプチド産生を阻害するように、細胞に送達されてもよい。

【0224】

潜在的なアンタゴニスト化合物としてはまた、レセプターの結合部位に結合してこれを専有し、それによってこのレセプターをそのポリペプチドに接近不能にさせ、その結果正常な生物学的活性が妨げられるような低分子が挙げられる。低分子の例としては、限定はしないが、低分子ペプチドまたはペプチド様分子が挙げられる。アンタゴニスト化合物を使用して、実施例および図面にさらに詳細に記載されるように、本発明のポリペプチドの効果を阻害し得る。アンタゴニストは、下にさらに詳細に記載されるように、免疫関連疾患を、診断し、予後を決定し、予防し、そして処置するために使用されてもよい。

【0225】

本発明はまた、細胞上のMGD-CSF分子の作用を増強またはブロックする因子、例えば抗体を同定するための方法を提供する。例えば、これらの因子は、レセプターのよう
なMGD-CSF結合分子の相互作用を増強またはブロックし得る。目的の因子としては、アゴニストおよびアンタゴニストの両方が挙げられる。本発明は、MGD-CSFの天然の生物学的機能を増大し、MGD-CSFと同様の様式で機能するアゴニストを提供する。本発明はまた、MGD-CSFの機能を減少または排除するアンタゴニストを提供する。

【0226】

MGD-CSFアゴニストおよびアンタゴニストを同定する1方法は、細胞下分画後の生化学的アッセイを包含する。例えば、細胞区分、例えば、膜または細胞質調製物は、MGD-CSF分子によって調節されるシグナル伝達または調節経路の分子のようなMGD-CSF分子に結合する分子を発現する細胞から調製され得る。細胞下の分画方法は、細胞生物学の分野で公知であり、そして別個のおよび規定の成分、例えば、オルガネラまたはオルガネラ膜を有する粗画分を生成するために仕立てられてもよい。この調製物は、MGD-CSFアゴニストまたはアンタゴニストであってもよい、候補分子の有無において標識されたMGD-CSF分子とともにインキュベートされる。候補分子が結合分子またはMGD-CSF分子と相互作用する能力は、標識されたりガンドの結合の減少に反映される。根拠も無く結合する、すなわち、MGD-CSF分子の効果を誘導することなく結合する分子はほとんどアンタゴニストであると考えられる。十分に結合してMGD-CSF分子と同じか密接に関連する効果を発揮する分子は潜在的に、アゴニストであることが証明され得る。

【0227】

潜在的なアゴニストおよびアンタゴニストの効果は、例えば、候補分子と細胞または適切な細胞調製物との相互作用後の第二のメッセンジャー系の1つ以上の成分の活性を決定すること、およびこの効果とMGD-CSF分子の効果と、またはMGD-CSFと同じ効果を発揮する分子の効果とを比較することによって測定され得る。これに関して有用であり得る第二のメッセンジャー系としては、限定はしないが、cAMP、cGMP、イオンチャネルおよびホスホイノシチド加水分解第二メッセンジャー系が挙げられる。

【0228】

MGD-CSFアンタゴニストの同定のためのアッセイの別の例は、MGD-CSF分子および潜在的なアンタゴニストの混合物と、膜結合したMGD-CSFレセプター分子とを合わせる競合アッセイである。競合阻害アッセイのための適切な条件下では、このア

10

20

30

40

50

ッセイはまた、組み換えMGD - CSFレセプター分子を用いて行われてもよい。MGD - CSF分子は、レセプター分子に結合されたMGD - CSF分子の数が潜在的なアンタゴニストの有効性を評価するために正確に決定され得るように、放射能などによって標識されてもよい。

【0229】

潜在的なアンタゴニストとしては、本発明のポリペプチドに結合し、それによってその活性を阻害または無効にさせる低有機分子、ポリペプチドおよび抗体が挙げられる。潜在的なアンタゴニストはまた、MGD - CSF誘導性活性を誘導することなく、これによって結合からMGD - CSF分子を排除することによってMGD - CSF分子の作用を防止する、レセプター分子のような結合分子上の同じ部位に結合する密接に関連するタンパク質または抗体のような低有機分子、ポリペプチドであってもよい。本発明のアンタゴニストとしては、配列表に示される核酸およびアミノ酸の配列を有するMGD - CSF分子のフラグメントが挙げられる。

10

【0230】

他の潜在的なアンタゴニストとしては、アンチセンス分子が挙げられる。アンチセンス技術は、例えば、アンチセンスDNAもしくはRNAを通じて、または三重らせん形成を通じて遺伝子発現を制御するために用いられ得る。アンチセンス技術は、例えば、Okano, J. Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla (1988) に考察される。三重らせん形成は、例えば、Leeら、Nucleic Acids Research, 6:3073 (1979); Cooneyら、Science 241:456 (1988); ならびにDervanら、Science, 251:1360 (1991) に考察される。この方法は、相補的なDNAまたはRNAに対するポリヌクレオチドの結合に基づく。例えば、本発明の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'コード部分は、約10~約40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するために用いられ得る。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子の領域に相補的であり、それによってMGD - CSF分子の転写および引き続く生成を妨げるように設計される。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズして、MGD - CSFポリペプチドへのmRNA分子の翻訳をブロックする。上記のオリゴヌクレオチドはまた、細胞に送達され得、その結果、アンチセンスRNAまたはDNAが、インビボで発現されてMGD - CSF分子の生成を阻害し得る。

20

30

【0231】

(診断)

本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列における変異の存在に関する疾患または疾患に対する感受性を検出するための診断アッセイの一部として本発明の遺伝子および遺伝子産物の使用に関する。本発明の遺伝子における変異を担持する個体は、種々の技術によってDNA標識で検出され得る。診断のための核酸は、患者の細胞から、例えば、血液、尿、唾液、組織生検および剖検物質などから得ることができる。ゲノムDNAは、検出のために直接用いられてもよく、または、分析の前に、例えば、Saikiら、Nature, 324:163~166 (1986) によって記載されるように、PCRを用いることによって酵素的に増幅されてもよい。RNAまたはcDNAも、同じ目的のために用いられてもよい。一例として、本発明のポリペプチドをコードする核酸に対して相補的なPCRプライマーを用いて、変異体を同定および分析してもよい。例えば、欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して増幅生成物のサイズの変化によって検出され得る。点変異は、放射性標識されたRNA、あるいは放射性標識されたアンチセンスDNA配列に対して増幅されたDNAをハイブリダイズすることによって同定され得る。完全にマッチした配列は、RNAase A消化によって、または融解温度の相違によってミスマッチの二重鎖から識別され得る。

40

50

【0232】

DNA配列の相違に基づく遺伝子試験は、変性剤の有無でゲル泳動中のDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化を検出することによって達成され得る。小さい配列欠失および挿入は、高い解像度のゲル電気泳動によって可視化され得る。異なる配列のDNAフラグメントは、例えば、Myersら、Science, 230:1242(1985)に記載のように、その特定の融点または部分的な融点に従って種々の位置で、種々のDNAフラグメントの移動度が遅れる変性ホルムアミド勾配ゲルで識別され得る。

【0233】

特定の位置での配列変化はまた、Cottonら、Proc. Natl. Acad. Sci., 85:4397~4401(1988)に示されるように、RNaseおよびS1保護または化学的な切断方法のような、ヌクレアーゼ保護アッセイによって明らかにされ得る。従って、特定のDNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNase保護、化学的切断、直接DNA配列決定または制限酵素の使用、例えば、制限フラグメント長多形性(Restriction Fragment Length Polymorphism)(RFLP)およびゲノムDNAのサザンブロッティングのような方法によって達成され得る。さらに便利なゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、変異はまた、インサイチュの分析によって検出されてもよい。

【0234】

本発明はまた、種々の組織におけるMGD-CSFタンパク質の変化したレベルを検出するための診断アッセイに関する。正常なコントロール組織サンプルと比較したこれらのタンパク質の過剰発現は、異常な細胞増殖、例えば腫瘍の存在を検出し得る。宿主由来のサンプル中のタンパク質レベルを検出するために用いられるアッセイは、当業者に周知であり、そしてこれには、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析、ELISAアッセイ、「サンドイッチ(sandwich)」アッセイ、および当該分野で公知のMGD-CSFタンパク質をコードする遺伝子の発現レベルについての他のアッセイが挙げられる。発現は、生物学的サンプル中において、MGD-CSFタンパク質のレベル、またはMGD-CSFタンパク質をコードするmRNAのレベルを質的にまたは定量的に測定または評価することによってアッセイされ得る。アッセイは、直接的に、例えば、絶対的なタンパク質レベルもしくはmRNAレベルを検出または評価することによって、または第二の生物学的サンプルに対してMGD-CSFタンパク質もしくはmRNAを比較することによって、相対的に行なわれ得る。これらのアッセイを行うことにおいては、第一の生物学的サンプル中のMGD-CSFタンパク質またはmRNAレベルは、測定されるかまたは評価されるか、そして標準的なMGD-CSFタンパク質のレベルまたはmRNAのレベルに対して比較される；適切な標準物としては、目的の障害を有さない個体から得られた第二の生物学的サンプルが挙げられる。標準物は、MGD-CSF発現に関連する障害を有さない個体の集団におけるMGD-CSFのレベルを平均することによって得てもよい。当該分野で理解されるとおり、標準的なMGD-CSFタンパク質のレベルまたはmRNAのレベルが一旦明らかになれば、比較のための標準物として繰り返し用いられ得る。

【0235】

例えば、Colliganら、Current Protocols in Immunology, 1(2)、第6章(1991)によって記載されるようなELISAアッセイは、本発明のポリペプチド抗原に対する特異性で調製された抗体を利用する。さらに、レポーター抗体は、モノクローナル抗体に対して調製される。レポーター抗体に対して、放射性タグ、蛍光タグまたは酵素タグ、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼのような検出試薬が結合される。サンプルを宿主から取り出して、サンプル中のタンパク質に結合する固体支持体、例えば、ポリスチレンのディッシュ上でインキュベートする。次いで、このディッシュ上の任意の遊離のタンパク質結合部位を、非特異的なタンパク質、例えば、ウシ血清アルブミンとともにインキュベートすることによってカバーする。次に、特定の抗体、例えば、モノクローナル抗体を、ディッシュ中でインキュベートして、この間に抗

体は、ポリスチレンディッシュに結合した本発明の任意のポリペプチドに結合する。全ての未結合のモノクローナル抗体を緩衝液で洗い流す。レポーター抗体、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合されたレポーター抗体を、このディッシュに入れて、目的のタンパク質に結合した任意の抗体に対するレポーター抗体の結合を生じる；次いで、未結合のレポーター抗体を取り出す。次いで、基質、例えば、ペルオキシダーゼをこのディッシュに加えて、シグナルを生じた色、例えば、所定の期間で発色した色の量によって、標準に対して比較した場合、所定の容積の患者サンプルに存在する本発明のポリペプチドの量の測定を行う。

【0236】

本発明のポリペプチドに特異的な抗体が固体支持体に結合されており、そして標識されたMGD-CSFが宿主由来のサンプルとともに、この固体支持体を通過される競合アッセイを使用してもよい。標識は、例えば、液体シンチレーションクロマトグラフィーによって検出および定量され得、そしてその測定は、サンプル中に存在する目的のポリペプチドの量に相関し得る。「サンドイッチ(sandwich)」アッセイが、ELISAアッセイと同様に使用されてもよく、ここで本発明のポリペプチドは、固体支持体を通過されて、固体支持体に対して結合された抗体モジュールに結合する。次いで、第二の抗体が目的のポリペプチドに結合される。標識されて第二の抗体に特異的である第三の抗体が次に、固体支持体を通過して、第二の抗体に結合される。抗体結合の量は、定量され得る；その量は、目的のポリペプチドの量と相関する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。

【0237】

本発明の生物学的サンプルは、MGD-CSFのタンパク質またはmRNAを含む被験体、体液、細胞株、組織培養物または他の供給源から得られた任意の生物学的サンプルを包含し得る。示されたとおり、生物学的サンプルとしては、遊離のMGD-CSFタンパク質を含む体液（例えば、血清、血漿、尿、滑液および脊髄液）、完全なまたは成熟MGD-CSFポリペプチドまたはMGD-CSFレセプターを発現することが見出された卵巣または腎臓系の組織および他の組織供給源が挙げられる。哺乳動物から組織生検および体液を得るための方法は当該分野で周知である。生物学的サンプルがmRNAを含むものである場合、組織生検が供給源を提供し得る。

【0238】

総細胞RNAは、ChomczynskiおよびSacchi、Anal. Biochem., 162:156~159(1987)に記載される単一工程グアニジウム-チオシアネート-フェノール-クロロホルム法のような任意の適切な技術を用いて生物学的サンプルから単離され得る。次いで、MGD-CSFタンパク質をコードするmRNAのレベルは任意の適切な方法を用いてアッセイされ得る。これらの方法としては、ノーザンブロット分析、S1ヌクレアーゼマッピング、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、ポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写(RT-PCR)、およびリガーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写(RT-LCR)が挙げられる。

【0239】

総細胞RNAは、ChomczynskiおよびSacchi、Anal. Biochem., 162:156~159(1987)に記載される単一工程グアニジウム-チオシアネート-フェノール-クロロホルム法のような任意の適切な技術を用いて生物学的サンプルから単離され得る。次いで、MGD-CSFタンパク質をコードするmRNAのレベルは任意の適切な方法を用いてアッセイされ得る。これらの方法としては、ノーザンブロット分析、S1ヌクレアーゼマッピング、PCR、PCRと組み合わせた逆転写(RT-PCR)、およびリガーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写(RT-LCR)が挙げられる。

【0240】

生物学的サンプルにおいてMGD-CSFタンパク質レベルをアッセイすることは、抗体ベースの技術を用いて行われ得る。例えば、組織中のMGD-CSFタンパク質発現は

、古典的な免疫組織学的方法、例えば、J a l k a n e n , M ら、J . C e l l . B i o l . , 1 0 1 : 9 7 6 ~ 9 8 5 (1 9 8 5) ; J a l k a n e n , M ら、J . C e l l . B i o l . , 1 0 5 : 3 0 8 7 ~ 0 9 6 (1 9 8 7) を用いて研究され得る。M G D - C S F タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な他の抗体ベースの方法としては、イムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) およびラジオイムノアッセイ (R I A) が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識が当該分野で公知であり、そして酵素標識、例えば、グルコースオキシダーゼ、放射性同位体および蛍光標識、例えば、フルオレセインおよびローダミン、ならびにビオチンが挙げられる。

【 0 2 4 1 】

個体から得られた生物学的サンプルにおいて M G D - C S F タンパク質のレベルをアッセイすることに加えて、M G D - C S F タンパク質はまた、画像化によってインビボで検出されてもよい。M G D - C S F タンパク質のインビボ画像化のための抗体標識またはマーカーとしては、X 線撮影、N M R または E S R によって検出可能なものが挙げられる。X 線撮影のためには、適切な標識としては、検出可能な放射線を照射するが、被験体に対しては露骨に有害ではない放射性同位体、例えば、バリウムまたはセシウムが挙げられる。N M R および E S R に適切なマーカーとしては、検出可能な特徴的なスピンを有するマーカー、例えば、重水素が挙げられ、これは、関連のハイブリドーマの栄養素の標識によって抗体に取り込まれ得る。

【 0 2 4 2 】

放射性同位体、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴によって検出可能な物質などの適切な検出可能な画像化部分で標識されている M G D - C S F タンパク質特異的な抗体または抗体フラグメントは、例えば、免疫系の障害について試験されるべき被験体に、非経口的に、皮下でまたは腹腔内で導入される。当該分野では、用いられる被験体および画像化システムのサイズが、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが理解される。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、M G D - C S F タンパク質を含む細胞の位置で蓄積する。インビボの腫瘍画像化は、B u r c h i e l ら編、第 1 3 章、T u m o r I m a g i n g : T h e R a d i o c h e m i c a l D e t e c t i o n o f C a n c e r , M a s s o n P u b l i s h i n g , I n c . (1 9 8 2) に記載される。

【 0 2 4 3 】

(M G D - C S F の分子、アゴニストおよびアンタゴニストの治療的な使用)

本発明の分子ならびにそのフラグメントおよび改変体は、M G D - C S F の不完全なまたは不十分な量によって、直接または間接的に媒介される任意の障害についての診断、予後予測、予防、処置および処置の開発において用いられ得る。M G D - C S F ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、このような障害に罹患している患者に投与され得る。遺伝子治療アプローチは、このような障害を処置するために適用され得る。本発明の配列の本明細書における開示によって、欠損性の M G D - C S F 関連遺伝子の検出、および正常または修正後の遺伝子でのそれらの置換が可能になる。欠陥遺伝子は、インビトロの診断アッセイにおいて、そして欠損を保有することが疑われる患者由来の遺伝子の配列と本発明の配列との比較によって検出され得る。

【 0 2 4 4 】

本発明の分子、例えば、組み換え M G D - C S F は、種々の細胞タイプの増殖に対して複数の影響を有し得、そして種々の条件下での同じ細胞タイプの増殖および分化に対して複数の影響を有し得る。M G D - C S F が増殖および / または分化を阻害する条件下では、組み換え M G D - C S F または関連の分子は、異常な増殖および / または分化によって特徴付けられる疾患を処置するために用いられ得る。M G D - C S F が増殖および / または分化を促進する条件下では、M G D - C S F または関連の分子に対して阻害性である因子を用いて、異常な増殖および / または分化によって特徴付けられる疾患を処置し得る。適切なインヒビターが本明細書において記載されており、そしてこれには、阻害性抗体、低分子インヒビター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A および可溶性レセプ

ターを挙げることができる。

【0245】

(疾患適用)

本発明の分子は、ガン、免疫疾患、例えば、自己免疫疾患または炎症性疾患、虚血性疾患、感染性疾患、骨疾患および神経疾患を処置するために有用である。本発明の分子は、腫瘍細胞またはガン細胞の増殖を阻害するために、そしてガンを処置するために有用である。従って、本発明の分子は、動物のガンの処置のための種々の設定において用いられ得る。本発明の分子で処置され得る他の特定のライブのガンとしては、限定はしないが、以下に開示されるガンが挙げられる。

【0246】

MGD-CSFは、骨髄での造血細胞の保持、増殖および生存においてある役割を果たし得る。従って、化学療法または放射線療法を受けているガン患者における造血細胞(例えば、好中球)欠損の処置においてMGD-CSFは有用であり得る。

【0247】

本発明の分子は、リンパ節腫脹を生じるリンパ増殖性疾患を処置するために使用され得る。本発明の分子は、T細胞のクローン欠失を刺激することによってアポトーシスを媒介し得、従って末梢寛容を刺激する自己免疫疾患および細胞毒性T細胞媒介性アポトーシスを処置するために使用され得る。本発明の分子はまた、アレルギーの、そして全身性エリテマトーデス(SLE)、グレーブス病、免疫増殖性リンパ節腫脹(PL)、血管免疫増殖性リンパ節腫脹(AIL)、免疫芽球性リンパ節腫脹(IBM)、関節リウマチ、糖尿病、および多発性硬化症を含む自己免疫障害の生物学を解明するのににおける研究ツールとして、そして移植片対宿主病を処置するために使用され得る。

【0248】

本発明の分子は、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患を生じる細胞を殺傷するかもしくはその複製を阻害するために、または自己免疫疾患もしくは炎症性疾患を処置するために有用である。従って、それらは、動物における自己免疫疾患または炎症性疾患の処置のための種々の設定において用いられ得る。

【0249】

本発明の分子はまた、限定はしないが、自己免疫障害、免疫不全障害および移植片対宿主病、および再発性流産を含む疾患を処置、予防、診断および/または予後予測を決定するために有用であり得る。さらに、本発明の分子は、一時的な免疫不全を有する個体の中で免疫応答性をブーストするための因子として使用され得る。本発明の分子を投与することによって寛解または処置され得る一時的な免疫不全を生じる状態としては、限定はしないが、ウイルス感染(例えば、インフルエンザ、感染性単核球症または麻疹)のような感染性疾患からの回復、栄養失調に関連する状態、ストレスからの回復またはそれに関連する状態、輸血からの回復、および手術からの回復が挙げられる。

【0250】

本発明の分子はまた、以下の疾患、障害またはそれに関連する状態のうちの1つ以上を診断、その予後を確認、処置、または予防するために用いられ得る：原発性免疫不全、免疫媒介性血小板減少症、川崎症候群、骨髄移植(例えば、成人または小児での最近の骨髄移植)、慢性B細胞リンパ球白血病、HIV感染(例えば、成人または小児のHIV感染)、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、および輸血後紫斑病。

【0251】

さらに、本発明の分子は、以下の疾患、障害またはそれに関連する状態のうちの1つ以上を診断、その予後を確認、処置、または予防するために用いられ得る：ギラン・バレー症候群、貧血(例えば、パルボウイルスB19に関連する貧血、感染のリスクが高い(例えば、再発性の感染)安定な多発性骨髄腫を有する患者)、自己免疫性溶血性貧血(例えば、温式自己免疫溶血性貧血)、血小板減少症(例えば、新生児血小板減少症)、および免疫媒介性好中球減少症)、移植(例えば、CMV陽性器官のサイトメガロウイルス(CMV)-陰性レシピエント)、低γグロブリン血症(例えば、感染または罹患のリスク要

10

20

30

40

50

因を有する低 γ グロブリン血症新生児)、てんかん(例えば、難治性てんかん)、全身性脈管性症候群、重症筋無力症(例えば、重症筋無力症の代償不全)、皮膚筋炎および多発性筋炎。

【0252】

本発明の分子によって、処置、予防、診断され得るか、そして/またはその予後予測が確認され得るさらなる自己免疫障害およびそれらの障害に関連する状態としては、限定はしないが、自己免疫溶血性貧血、自己免疫新生児血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、抗リン脂質症候群、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、心筋炎、再発性多発性軟骨炎、リウマチ性心疾患、糸球体腎炎(例えば、IgA腎症)、多発性硬化症、神経炎、ブドウ膜炎眼炎、多腺性内分泌障害、紫斑病(例えば、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病)、ライター病、スティフマン症候群、自己免疫肺炎症、ギラン・バレー症候群、インスリン依存性糖尿病および自己免疫炎症性眼疾患が挙げられる。

10

【0253】

本発明の分子によって、処置、予防、診断され得るか、そして/またはその予後予測が確認され得るさらなる自己免疫障害としては、限定はしないが、自己免疫甲状腺炎;橋本甲状腺炎ならびに例えば、細胞媒介性および体液性甲状腺細胞毒性により特徴付けられる甲状腺炎を含む甲状腺機能低下症;SLE(例えば、循環および局所的に生成される免疫複合体によってしばしば特徴付けられる);グッドパスチャー症候群(例えば、抗基底膜抗体によってしばしば特徴付けられる);天疱瘡(例えば、表皮棘融解性抗体によってしばしば特徴付けられる);レセプター自己免疫、例えば、グレーブス病(例えば、甲状腺刺激ホルモンレセプターに対する抗体によってしばしば特徴付けられる;例えば、アセチルコリンレセプター抗体によってしばしば特徴付けられる重症筋無力症)など;インスリン耐性(例えば、インスリンレセプター抗体によってしばしば特徴付けられる);自己免疫溶血性貧血(例えば、抗体感受性の赤血球の食作用によってしばしば特徴付けられる);および自己免疫血小板減少性紫斑病(例えば、抗体感受性血小板の食作用によってしばしば特徴付けられる)が挙げられる。

20

【0254】

本発明の分子によって、処置、予防、診断され得るか、そして/またはその予後予測が確認され得るさらなる自己免疫障害としては、限定はしないが、関節リウマチ(例えば、関節での免疫複合体によってしばしば特徴付けられる);抗コラーゲン抗体を伴う強皮症(例えば、核小体および他の核の抗体によってしばしば特徴付けられる);混合結合組織病(例えば、抽出可能な核抗原、例えば、リボ核タンパク質に対する抗体によってしばしば特徴付けられる);多発性筋炎/皮膚筋炎(例えば、非ヒストン抗核抗体によってしばしば特徴付けられる);悪性貧血(例えば、抗壁細胞、抗ミクロソーム、および抗内因子の抗体によってしばしば特徴付けられる);特発性アジソン病(例えば、体液性および細胞媒介性の副腎細胞毒性によってしばしば特徴付けられる);不妊(例えば、抗精子抗体によってしばしば特徴付けられる);糸球体腎炎(例えば、糸球体基底膜抗体または免疫複合体によってしばしば特徴付けられる);原発性糸球体腎炎による、IgA腎症による;水疱性類天疱瘡(例えば、IgGによっておよび基底膜での補体によってしばしば特徴付けられる);シェーグレン症候群(例えば、複数の組織抗体および/または特異的な非ヒストン抗核抗体(SS-B)によってしばしば特徴付けられる);糖尿病(例えば、細胞媒介性および体液性の島細胞抗体によってしばしば特徴付けられる);および喘息または囊胞性線維症を伴うアドレナリン作動薬耐性を含む、アドレナリン作動薬耐性(例えば、 β アドレナリン作動薬レセプター抗体によってしばしば特徴付けられる)が挙げられる。

30

40

【0255】

そのアンタゴニストで、処置、予防、その予後予測が確認され、そして/またはその診断され得るなおさらなる自己免疫障害としては、限定はしないが、以下の障害が挙げられる:慢性の活動性の肝炎(例えば、平滑筋抗体によってしばしば特徴付けられる);原発性胆汁性肝硬変(例えば、抗ミトコンドリア抗体によってしばしば特徴付けられる);他

50

の内分泌腺不全（例えば、ある場合には特定の組織抗体によって特徴付けられる）；白斑（例えば、抗メラニン形成細胞抗体によってしばしば特徴付けられる）；脈管炎（例えば、免疫グロブリンおよび血管壁における補体および／または低血清補体によってしばしば特徴付けられる）；心筋梗塞後の状態（例えば、抗ミトコンドリア抗体によってしばしば特徴付けられる）；開心術症候群（例えば、抗ミトコンドリア抗体によってしばしば特徴付けられる）；蕁麻疹（例えば、IgEに対するIgGおよびIgM抗体によってしばしば特徴付けられる）；アトピー性皮膚炎（例えば、IgEに対するIgGおよびIgM抗体によってしばしば特徴付けられる）；喘息（例えば、IgEに対するIgGおよびIgM抗体によってしばしば特徴付けられる）；炎症性筋障害；および他の炎症、肉芽腫、変性および萎縮性の障害。

10

【0256】

ある実施形態では、本発明の分子、例えば、抗MGD-CSF抗体は、SLEおよび／または関連の疾患、障害もしくは状態を処置または予防するために用いられる。本発明の分子で処置または予防され得るループス関連の疾患、障害および状態としては、限定はしないが、血液疾患、例えば、溶血性貧血、白血病、リンパ球減少症および血小板減少症；免疫学的障害、例えば、抗DNA抗体および抗Sm抗体、発疹、感光性、口腔潰瘍、関節炎、発熱、疲労、体重減少、漿膜炎、例えば、胸膜炎（pleuritis）（胸膜炎（pleurisy））；腎臓障害、例えば、腎炎；神経学的障害、例えば、てんかん発作、末梢神経障害およびCNS関連障害；胃腸障害；レイノー現象；および心外膜炎が挙げられる。

20

【0257】

本発明の分子はまた、腫瘍細胞増殖のような新生物形成を阻害するために使用され得る。MGD-CSFポリペプチドは、特定の細胞に対するアポトーシスおよび細胞毒性を通じた腫瘍破壊を担い得る。本発明の分子によって、処置、予防、診断されるか、そして／またはその予後予測が確認され得る、細胞生存率の増大またはアポトーシスの阻害に関連する疾患としては、限定はしないが、ガン（例えば、濾胞性リンパ腫、p53変異を有する癌腫およびホルモン依存性の腫瘍であって、限定はしないが、結腸癌、心臓腫瘍、脾臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、グリア芽細胞腫、肺癌、腸癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、巨骨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立腺癌、カポジ肉腫および卵巣癌を含む腫瘍）；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、橋本甲状腺炎、自己免疫糖尿病、胆汁性肝硬変、ベーチエット病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連系球体腎炎、自己免疫胃炎、自己免疫血小板減少性紫斑病および関節リウマチ）およびウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス）、炎症、移植片対宿主病（急性および／または慢性）、急性移植片拒絶、および慢性移植片拒絶が挙げられる。ある実施形態では、本発明は、ガン、詳細には上記で、または以下の段落で列挙されるガンの増殖、進行および／または転移を阻害するために用いられる。

30

【0258】

本発明によって、処置、予防、診断されるか、そして／またはその予後予測が確認され得る、細胞生存率の増大に関連するさらなる疾患または状態としては、限定はしないが、悪性腫瘍および関連の障害、例えば白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病であって、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む）を含む）、および慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病）、骨髄異形成症候群、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病および固形腫瘍であって、限定はしないが、肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫（lymphangioma）、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、脾臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状

40

50

癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌腫、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫 (meningioma)、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫を含む腫瘍の進行および/または転移が挙げられる。

【0259】

本発明の分子によって、処置、予防、診断されるか、そして/またはその予後予測が確認され得る、アポトーシスの増大に関連する疾患としては、限定はしないが、AIDS (例えば、HIV誘発性神経障害およびHIV脳炎)、神経変性障害 (例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または以前に関連した疾患)、自己免疫障害、例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、橋本甲状腺炎、自己免疫糖尿病、胆汁性肝硬変、ベーチェット病 (Behcet's disease)、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデス、免疫関連糸球体腎炎、自己免疫胃炎、血小板減少性紫斑病、および関節リウマチ、脊髄形成異常症候群 (例えば、再生不良性貧血)、移植片対宿主病 (急性および/または慢性)、虚血性傷害 (心筋梗塞、発作および再灌流傷害によって生じるようなもの)、肝臓傷害または疾患 (例えば、肝炎関連肝臓傷害、肝硬変、虚血/再灌流傷害、胆汁うっ滞 (cholestasis) (胆管傷害) および肝臓癌)、毒物誘発性肝臓疾患 (アルコールによって引き起こされるようなもの)、敗血症性ショック、潰瘍性大腸炎、悪液質および食欲不振が挙げられる。

【0260】

本発明の別の実施形態は、HIV感染した患者におけるT細胞のMGD-CSFまたはNP__689669媒介性の死亡を減じるためのMGD-CSFポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはアンタゴニストの使用に関する。AIDSの発達におけるT細胞アポトーシスの役割は、多数の研究の主題である (例えば、Meynardら、Science, 257: 217~219 (1992); Grouxら、J. Exp. Med., 175: 331 (1992); ならびにOyazuraら、Cell Activation and Apoptosis in HIV Infection, AndrieuおよびLu編、Plenum Press, New York, 101~114頁 (1995) を参照のこと)。

【0261】

T細胞のアポトーシスは多数の機構を通じて生じるようである。Fas媒介性アポトーシスは、HIVの個体におけるT細胞の損失に関与している (Katsikisら、J. Exp. Med., 181: 2029~2036 (1995))。活性化されたヒトT細胞は、活性化誘導細胞死 (activated-induced cell death) (AICD) と名付けられた過程である、CD3/T細胞レセプター複合体を通じた誘導の際に、プログラムされた細胞死 (アポトーシス) を受けるように誘導される。HIV感染した無症候性個体から単離されたCD4 T細胞のAICDが報告されている (Grouxら、前出)。従って、AICDは、HIV感染個体におけるCD4 + T細胞の減少およびAIDSへの進行にある役割を果たし得る。従って、本発明は、HIV患者においてMGD-CSF媒介性のT細胞死を阻害する方法を提供し、この方法は、この患者に対して本発明の分子を投与する工程を包含する。ある実施形態では、この患者はMGD-CSFポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはアンタゴニストでの処置が開始するとき無症候性である。必要に応じて、処置の前に、末梢血T細胞をHIV患者から抽出して、当該分野で公知の手順によってMGD-CSF媒介性細胞に対する感受性について試験してもよい。1実施形態では、患者の血液または血漿を本発明の分子、例えば、抗MGD-CSFまたはNP__689669抗体とエキソピボで接触させる。この抗体または他のアンタゴニストは、当該分野で公知の手順によって適切なクロマトグラフィーマトリックスに結合され得る。患者の血液または血漿を、このマトリックスに結合されたアンタゴニストを含むク

ロマトグラフィーカラムを通じて流し、その後患者に戻す。固定されたアンタゴニストが、MGD-CSFまたはNP__689699に結合し、従ってこれらは患者の血液から除去される。

【0262】

さらなる実施形態では、本発明の分子は、T細胞アポトーシスの他のインヒビターと組み合わせ投与される。例えば、上記のように、Fas媒介性アポトーシスはまた、HIV陽性の個体におけるT細胞の減少に関与している(Katsikisら、J. Exp. Med., 181:2029~2036(1995))。従って、Fasリガンド媒介性およびMGD-CSF媒介性のT細胞死の両方に感受性の患者は、MGD-CSFまたはNP__689699とそれらのレセプターとの相互作用をブロックする因子、およびFasリガンド/Fas相互作用をブロックする因子の両方で処置され得る。Fasに対するFasリガンドの結合をブロックするための適切な因子としては、限定はしないが、可溶性Fasポリペプチド；可溶性Fasポリペプチドの多量体型（例えば、sFas/Fcの二量体）；アポトーシスを生じる生物学的シグナルを誘導することなくFasに対して結合する抗Fas抗体；Fasに対するFasリガンドの結合をブロックする抗Fasリガンド抗体；ならびにFasに結合するが、アポトーシスを生じる生物学的シグナルを誘導しないFasリガンドの突然変異タンパク質（ムテイン）が挙げられる。モノクローナル抗体は、本発明に従って使用され得る。抗Fasモノクローナル抗体のブロックを含む、Fasリガンド/Fas相互作用をブロックするために適切な因子の例は、WO95/10540に記載される。

10

20

【0263】

別の例では、レセプターに対するMGD-CSFまたはNP__689699の結合をブロックする因子は、本発明の分子とともに投与される。このような因子としては、限定はしないが、可溶性MGD-CSFレセプターポリペプチド、可溶性レセプターポリペプチドの多量体型、およびアポトーシスを生じる生物学的シグナルを誘導することなくMGD-CSFまたはNP__689699レセプターに結合するMGD-CSFレセプター抗体、1つ以上のレセプターに対するMGD-CSFまたはNP__689699の結合をブロックする抗体、ならびにレセプターに結合するが、アポトーシスを生じる生物学的シグナルを誘導しない突然変異タンパク質（ムテイン）が挙げられる。

30

【0264】

本発明の分子はまた、赤血球新生を含む造血を調節するように使用され得る。造血は、多能性幹細胞のプールで開始する多段階の細胞増殖および分化の過程である。これらの細胞は、種々の刺激に応答して増殖して造血前駆体に分化し得る。本発明の分子は、造血細胞、例えば、赤血球産生細胞の発達を刺激または阻害するために用いられ得る。

【0265】

ある実施形態では、本発明の分子は、骨疾患を処置または予防するために用いられる。本発明の分子は、造血幹細胞の破骨前駆細胞への分化を促進する。従って、本発明の分子は、破骨細胞の分化および機能における欠陥によって特徴付けられる疾患のような骨疾患、例えば骨粗鬆症を処置するために用いられ得る。MGD-CSFおよび関連の分子は、これらの疾患を処置するために、治療剤、例えば、タンパク質治療剤として、または遺伝子療法において用いられ得る。

40

【0266】

ある実施形態では、本発明の分子を用いて、神経疾患を処置または予防する。本発明の分子は、造血幹細胞のミクログリアの前駆細胞への分化を促進する。従って、本発明の分子は、ミクログリアの分化および機能における欠陥によって特徴付けられる神経疾患のような疾患、例えば、アルツハイマー病、多発性硬化症、急性播種性脳脊髄障害、進行性多巣性白質脳症、脳卒中、およびパーキンソン病を処置するために用いられ得る。MGD-CSFおよび関連の分子は、これらの疾患を処置するための治療剤、例えば、タンパク質治療剤として、または遺伝子治療において用いられ得る。

50

【0267】

ある実施形態では、本発明の分子は、肢虚血のような末梢動脈疾患を含む心血管障害を処置または予防するために用いられる。心血管障害としては、心血管異常、例えば、動脈 - 動脈瘤、動静脈フィステル、脳動静脈奇形、先天性心臓欠陥、肺閉鎖症およびシミター症候群が挙げられる。先天性の心臓欠陥としては、大動脈縮窄、三房心、冠状脈管奇形 (coronary vessel anomalies)、十字交差心臓 (crisscross heart)、右胸心、開存性動脈管 (patent ductus arteriosus)、エプスタイン奇形、アイゼンメンガー複合体、左心室発育不全症候群、左胸心、ファロー三徴症、ファロー四徴症、大血管転位症、両大血管右室起始症、三尖弁閉鎖症、動脈管遺残、および心中隔欠損症 (heart septal defects)、例えば、大動脈肺動脈中隔欠損症 (aortopulmonary septal defect)、心内膜床欠損症、リュタンバッシュ症候群、および心室心中隔欠損症 (ventricular heart septal defects) が挙げられる。

10

【0268】

本発明の分子で処置され得る心血管障害としてはまた、心疾患、例えば、不整脈、カルチノイド心臓病、高心拍出量 (high cardiac output)、低心拍出量 (low cardiac output)、心タンポナーデ、心内膜炎 (細菌性を含む)、心臓動脈瘤、心停止、うっ血性心不全、うっ血性心筋症、発作性呼吸困難、心臓水腫、心肥大、うっ血性心筋症、左心室肥大、右心室肥大、梗塞後心破裂 (post-infarction heart rupture)、心室中隔破裂、心臓弁疾患、心筋疾患、心筋虚血、心内膜液浸出、心外膜炎 (梗塞性および結核性を含む)、心嚢内気腫、心膜切開後症候群、右心疾患、リウマチ性心疾患、心室機能不全、充血、心臓血管妊娠合併症 (cardiovascular pregnancy complications)、シミター症候群、心血管梅毒、および心血管結核 (cardiovascular tuberculosis) が挙げられる。

20

【0269】

本発明の分子を用いて処置され得る不整脈としては、洞性不整脈、心房性細動、心房粗動、徐脈、期外収縮、アダムズ - ストークス症候群、脚ブロック、洞房ブロック、QT延長症候群 (long QT syndrome)、副収縮、ローン - ギャノン - レヴァイン症候群、マヘム型早期興奮症候群 (Mahaim-type pre-excitation syndrome)、ウルフ - パーキンソン - ホワイト症候群、洞不全症候群、頻脈、および心室性細動が挙げられる。本発明の分子で処置され得る頻脈としては、発作性頻脈、上室性頻拍、心室固有調律促進、房室結節性回帰性頻拍 (atrioventricular nodal reentry tachycardia)、異所心房性頻拍、異所接合部頻拍、洞房結節性回帰性頻拍 (sinoatrial nodal reentry tachycardia)、洞性頻拍、トルサード・ド・ポワント、および心室性頻拍が挙げられる。心臓弁疾患としては、大動脈弁機能不全症、大動脈弁狭窄症、心雑音 (heart murmurs)、大動脈弁逸脱症、僧帽弁逸脱症、三尖弁逸脱症、僧帽弁機能不全、僧帽弁狭窄症、肺動脈弁閉鎖症、肺動脈弁機能不全、肺動脈弁狭窄症、三尖閉鎖症、三尖弁機能不全、および三尖弁狭窄症が挙げられる。

30

【0270】

本発明の分子で処置され得る心筋疾患としては、アルコール性心筋症、うっ血性心筋症、肥大型心筋症、弁下部性大動脈狭窄症、弁下部性肺動脈狭窄症、拘束型心筋症、シャーガス心筋症、心内膜線維弾性症、心内膜心筋線維症、キーンズ症候群、心筋再灌流障害、および心筋炎が挙げられる。本発明の分子で処置され得る心筋性虚血としては、冠動脈疾患、例えば、狭心症、冠動脈瘤、冠動脈硬化、冠動脈血栓症、冠動脈血管痙攣、心筋梗塞、および心筋気絶 (myocardial stunning) が挙げられる。

40

【0271】

本発明の分子で処置され得る心臓血管疾患としてはまた、血管疾患、例えば、動脈瘤、血管形成異常、血管腫症、細菌性血管腫症状、ヒッペル - リンダラ疾患 (Hippel-Lindau Disease)、クリベル - トルノネー - ウェーバー症候群、スタージ

50

- ウェーバー症候群、血管運動神経性水腫、大動脈疾患、高安動脈炎、大動脈炎、ルリーシュ症候群、動脈閉塞疾患、動脈炎、動脈内膜炎 (enarteritis)、結節性多発性動脈炎、脳血管障害、糖尿病性血管障害、糖尿病性網膜症、塞栓症、血栓症、先端紅痛症、痔、肝静脈閉塞障害、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管障害、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、レイノー病、CREST症候群、網膜静脈閉塞、シミター症候群、上大静脈症候群、毛細血管拡張症、毛細血管拡張性運動失調 (ataxia telangiectasia)、遺伝性出血性毛細管拡張症、精索静脈瘤、拡張蛇行静脈、静脈瘤性潰瘍、脈管炎、および静脈機能不全が挙げられる。動脈瘤としては、解離性動脈瘤、偽動脈瘤、感染した動脈瘤、破裂した動脈瘤、大動脈性動脈瘤、大脳性動脈瘤、冠動脈瘤、心動脈瘤、および腸骨性動脈瘤が挙げられる。

10

【0272】

本発明の分子で処置され得る動脈閉塞疾患としては、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄症、線維筋性形成異常、腸間膜性血管閉塞、モヤモヤ病、腎動脈閉塞、網膜動脈閉塞、および閉塞性血栓性血管炎が挙げられる。

【0273】

本発明の分子で処置され得る脳血管障害としては、頸動脈疾患、脳のアミロイド血管障害、脳動脈瘤、脳無酸素症、脳動脈硬化、脳動静脈先天異常、脳動脈疾患、脳の塞栓症および血栓症、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、脳内出血、硬膜上血腫、硬膜下血腫、クモ膜下出血 (subarachnoid hemorrhage)、脑梗塞、脳虚血 (一過性を含む)、鎖骨下動脈盗血症候群、脳室周囲白質軟化症 (periventricular leukomalacia)、血管性頭痛、群発性頭痛、片頭痛、および椎骨脳底 (vertebrobasilar) 機能不全が挙げられる。

20

【0274】

本発明の分子で処置され得る塞栓症としては、空気塞栓症、羊水塞栓症、コレステロール塞栓症、爪先チアノーゼ症候群、脂肪塞栓症、肺動脈塞栓症、および血栓塞栓症が挙げられる。血栓症としては、冠状動脈血栓症、肝静脈血栓症、網膜静脈閉塞、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、および血栓性静脈炎が挙げられる。

【0275】

本発明の分子で処置され得る虚血としては、脳虚血、虚血性大腸炎、コンパートメント症候群 (compartment syndrome)、前区画症候群 (anterior compartment syndrome)、心筋虚血、再灌流傷害、および末梢四肢虚血が挙げられる。本発明の分子で処置され得る脈管炎としては、大動脈炎、動脈炎、ベーチェット (Behcet) 症候群、チャージ-ストラウス症候群、粘膜皮膚リンパ節症候群、閉塞性血栓性血管炎、過敏性血管炎、シェーンライン-ヘーノホ紫斑病 (Schoenlein-Henoch purpura)、アレルギー性皮膚血管炎およびヴェーゲナー肉芽腫症が挙げられる。

30

【0276】

本発明によってさらに、本発明の分子の投与による新血管新生に関連する疾患の処置が得られる。本発明の分子で処置され得る悪性および転移性の状態としては、限定はしないが、悪性腫瘍、固形腫瘍および本明細書に記載され、そうでなければ当該分野で公知のガンが挙げられる (このような障害の概説については、Fishmanら、Medicine、第4版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1997) を参照のこと)。

40

【0277】

さらに、本発明の分子で処置され得る新血管新生に関連する眼科障害としては、限定はしないが、血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植新生血管形成、ならびに他の眼の炎症性疾患、眼の腫瘍、および脈絡膜または虹彩の新生血管形成に関連する疾患が挙げられる。例えば、Waltmanら、Am. J. Ophthalmol. 85: 704~710 (1978) および Gartnerら、Surv. Ophthalmol. 22: 291~312 (1978) に

50

よる総説を参照のこと。

【0278】

さらに、本発明の分子で処置され得る障害としては、限定はしないが、血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、アテローム性プラーク、遅延型創傷治癒、顆粒化、血友病性関節、過形成性癭痕、偽関節骨折、オースラー-ウェーバー（Osler-Weber）症候群、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコーマ、および血管癒着が挙げられる。

【0279】

本発明の分子そのアンタゴニストは、限定はしないが、ガン（例えば、免疫細胞関連のガン、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、濾胞性リンパ腫、p53変異または改変を伴う癌、脳腫瘍、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、結腸直腸癌、肺の非小細胞癌腫、および肺の小細胞癌腫、胃癌など）を含む広範な種々の疾患および/または状態の診断および処置または予防において有用である。それらはまた、リンパ増殖性障害（例えば、リンパ節腫脹）、微生物障害（例えば、ウイルス、細菌など）、感染、例えば、HIV-1感染、HIV-2感染、ヘルペスウイルス感染（限定はしないがHSV-1、HSV-2、CMV、VZV、HHV-6、HHV-7、EBVを含む）、アデノウイルス感染、ポックスウイルス感染、ヒト乳頭腫ウイルス感染、肝炎感染（例えば、HAV、HBV、HCVなど）、*Helicobacter pylori*感染、侵襲性*Staphylococci*など）および寄生生物感染の診断および処置または予防において有用である。それらはさらに、腎炎、骨疾患（例えば、骨粗鬆症）、アテローム性動脈硬化症、疼痛、心血管障害（例えば、新血管新生、新血管新生低下）、および循環低下（例えば、虚血性疾患、例えば、心筋梗塞、発作など、AIDS、アレルギー、炎症、神経変性執権（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性など、移植片拒絶（急性および慢性）、移植片対宿主病、骨髄形成異常から生じる疾患（例えば、再生不良性貧血）、リウマチの関節組織破壊、肝疾患（例えば、急性および慢性の肝炎、肝障害、胆道疾患、および肝硬変）、自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、SLE、免疫複合体性糸球体腎炎、自己免疫糖尿病、自己免疫血小板減少性紫斑病、グレーブス病、橋本甲状腺炎、など）、心筋症（例えば、拡張型心筋症）、糖尿病、糖尿病性合併症（例えば、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症）、インフルエンザ、喘息、乾癬、糸球体腎炎、敗血性ショックおよび潰瘍性大腸炎の診断および処置または予防において有用である。

【0280】

本発明の分子は、血管形成および創傷治癒（例えば、創傷、火傷および骨折）を促進するのに有用である。それらはまた、特定の抗原および/または抗ウイルス免疫応答に対する免疫応答性を増強するアジュバントとして有用である。

【0281】

さらに詳細には、本発明の分子は、免疫応答を調節するのに有用である。例えば、それらは、外科手術、外傷、放射線療法、化学療法および移植の準備またはそれからの回復に有用であり得、また高齢者および免疫無防備状態の個体において免疫応答および/または回復プロセスをブーストするために用いられ得る。それらは、例えば、自己免疫障害の処置または予防における免疫抑制剤として有用である。特定の実施形態では、本発明の分子は、本明細書において上記されるか、そうでなければ当該分野で公知であるような、慢性の炎症、アレルギーまたは自己免疫状態を処置または予防するために用いられる。

【0282】

本発明の分子の使用としては限定はしないが、成人呼吸窮迫症候群、アナフィラキシー、アレルギー性喘息、アレルギー鼻炎、薬物アレルギー（例えば、ペニシリンまたはセファロスポリンに対する）、原発性中枢神経リンパ腫（PCNSL）、グリア芽細胞腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、リンパ節腫脹、関節リウマチ、変形性関節症、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、ホジキン病および非ホジキン病リンパ腫、眼病、ブドウ膜網膜炎、1型糖尿病の自己免疫段階、重症筋無力症、自己免疫肝臓障害、自己免疫炎症性腸疾患およびクローン病の処置または予防が挙げられる。MGD-CSFタンパク質と免疫

治療剤、例えばIL-2またはIL-12との組み合わせは、樹立された癌を処置するのにおいて有用な相乗効果または相加効果を生じ得る。

【0283】

さらに、本発明の分子は、本明細書に記載のような治療分子だけでなく、さらに、ガンのような腫瘍関連の疾患の生物学を解明するのにおける検索ツールとしても使用され得る。従って、本発明の分子は、腫瘍細胞もしくはガン細胞の操作を阻害するために、または動物においてガンを処置するために有用である。従って、本発明の分子は、動物のガン、例えば、肉腫、腺腫、腺癌、癌腫、乳頭腫、リンパ腫などの処置のために種々の設定において用いられ得る。本発明の分子で処置され得る他の特定のタイプのガンとしては、限定はしないが、前立腺癌、乳癌（例えば、乳管内および炎症性を含む）、結腸癌、結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸部癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、胚性癌腫、子宮癌および精巣癌が挙げられる。

10

【0284】

（抗体およびワクチン）

（抗体）

MGD-CSFまたはNP_689669に特異的な抗体は、本発明における使用のために適切であり、そしてインタクトなMGD-CSFタンパク質またはその抗原性ポリペプチドフラグメントに対して惹起され得る。このタンパク質またはフラグメントは、アルブミンのようなキャリアタンパク質の有無とともに、ウサギまたはマウスのような動物に与えられてもよい。一般には、ポリペプチドフラグメントは、それらが少なくとも約25

20

【0285】

本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製物、ならびにハイブリッド抗体、変更された抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体を含む調製物、ならびにハイブリッド（キメラ）抗体分子（例えば、Winterら、Nature 349:293~299（1991））；および米国特許第4,816,567号を参照のこと）；F(ab')₂、およびF(ab)フラグメント；Fv分子（非共有ヘテロ二量体、例えば、Inbarら、Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2659~1662（1972）を参照のこと）；およびEhrlichら（1980）Biochem 19:4091~4096）；単鎖Fv分子（sFv）（例えば、Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879~5883（1980）を参照のこと）；二量体および三量体の抗体フラグメント構築物；ミニボディ（minobodies）（例えば、Packら、Biochem. 31:1579~1584（1992））；Cumberら、J. Immunology 149B:120~126（1992）を参照のこと）；ヒト化抗体分子（例えば、Riechmannら、Nature 332:323~327（1988））；Verhoeyanら、Science 239:1534~1536（1988）を参照のこと）；異種結合体化抗体および二価特異的な抗体（例えば、米国特許第6,010,902号および米国特許出願第2002/0155604号を参照のこと）；ならびにこのような分子から得られた任意の機能的フラグメントであって、このようなフラグメントが特異的な結合を保持しているフラグメントが挙げられる。

30

40

【0286】

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知である。モノクローナル抗体は一般には、相同な抗体集団を有する抗体である。この用語は、抗体の種または供給源に関して限定されず、それが作成される方式によって限定されることもないものとする。この用語は、免疫グロブリン丸ごとを包含する。ポリクローナル抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジまたはヤギのような適切な動物を、抗原をコードする遺伝子で形質転換された幹細胞のような目的の抗原で免疫することによって生成される。免疫原性を増強するために、抗原は、免疫の前にキャリアと結合されてもよい。適切な

50

キャリアは代表的には、大型のゆっくり代謝される高分子、例えば、タンパク質、ポリサッカライド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集物（例えば、油滴またはリポソーム）および不活性なウイルス粒子である。このようなキャリアは当業者に周知である。さらに、この抗原は、ジフテリア、破傷風、コレラなど由来の毒素のような細菌の毒素に対して、その免疫原性を増強するために結合体化されてもよい。

【0287】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒に適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによる、キメラ抗体の産生のために開発された技術（Morrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 851~855 (1984); Neubergerら、Nature, 312: 604~608 (1984); Takedaら、Nature, 314: 452~454 (1985))を用いてもよい。異なる部分が異なる動物種に由来する抗体であるキメラ抗体、例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体、例えば、ヒト化抗体、ならびにcdrおよびフレームワーク領域に関する挿入/欠失を有する抗体が、本発明における使用に適切である。

10

【0288】

本発明はまた、ヒト化抗体、すなわち、ほとんどヒト免疫グロブリン配列である抗体を包含する。本発明のヒト化抗体は一般には、ヒト配列の部分を組み込むように改変されている非ヒト免疫グロブリンをいう。ヒト化抗体とは、ヒト免疫グロブリン配列全体を含むヒト抗体を包含し得る。

20

【0289】

本発明の抗体は、任意の種々の方法によって調製され得る。例えば、MGD-CSFもしくはNP-689669タンパク質またはその抗原性フラグメントを発現する細胞は、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために動物に投与されてもよい。MGD-CSFまたはNP-689669タンパク質の調製は、天然の汚染が実質的にないように調製および精製され、そしてその調製物は特定の結合活性を有するポリクローナル抗血清を生じるために動物に導入され得る。

【0290】

本発明の抗体はそれらのそれぞれの抗原（単数または複数）に特異的に結合する；それらは、特定のポリペプチドに対する、または正確に言えば、抗原のエピトープに対する、高い結合活性および/または高い親和性を示し得る。本発明の抗体は、1つのエピトープに結合しても、または2つ以上のエピトープに結合してもよい。それらは、1つ以上の分子上の異なるエピトープに対して異なる親和性および/または結合活性を示し得る。抗体が別のエピトープに対してよりも1つのエピトープに強力に結合する場合、結合条件の調節によって結果として、ある場合には、この特定のエピトープに対してほとんど排他的に結合し、同じポリペプチド上の任意の他のエピトープには結合せず、そしてこのエピトープを含まないポリペプチドにも結合し得ない。

30

【0291】

本発明はまた、モノクローナル抗体およびそのMGD-CSFまたはNP-689669タンパク質結合フラグメントを提供する。本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、例えば、Kohlerら、Nature 256: 495 (1975); Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976); Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6: 292 (1976); Hammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., (1981) 563~681頁を用いて調製され得る。一般には、このような手順は、MGD-CSFタンパク質抗原、またはMGD-CSFタンパク質発現細胞を用いて動物（例えば、マウス）を免疫する工程を包含する。適切な細胞は、抗MGD-CSFタンパク質抗体に結合する能力によって認識され得る。このような細胞は、任意の適切な組織培養培地中で；例えば、10%ウシ胎仔血清（約56で

40

50

不活化した)を補充し、そして約10g/lの非必須アミノ酸、約1,000U/mlのペニシリン、および約100μg/mlのストレプトマイシンを補充したEarleの改変イーグル培地中で培養されてもよい。このようなマウスの脾細胞を抽出し、そして適切な骨髓腫細胞株と融合する。任意の適切な骨髓腫細胞株は、本発明に従って使用され得る;例えば、American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VAから入手可能な親骨髓腫細胞株(SP20)。融合後、得られるハイブリドーマ細胞を、HAT培地において選択的に維持し、次いで例えば、Wandsら(Gastroenterology 80:225~232(1981))によって記載されるように限界希釈によってクローニングする。

【0292】

あるいは、MGD-CSFまたはNP__689669タンパク質抗原に結合し得る抗体は、抗イディオタイプ抗体の使用を通じて2工程手順で生成され得る。このような方法は、抗体がそれ自体抗原であり、従って、第二の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法によれば、特定の抗体を用いて、マウスのような動物を免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を用いて、ハイブリドーマ細胞を産生し、そして、このハイブリドーマ細胞をスクリーニングして、抗体が特異的な抗体に結合する能力が抗原によってブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定する。このような抗体は、MGD-CSFまたはNP__689669タンパク質に特異的な抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そして動物を免疫してさらなる特異的な抗体の形成を誘導するために用いられ得る。

【0293】

本発明の抗体のFabおよびF(ab')₂および他のフラグメントは、本明細書に開示の方法に従って用いられ得ることが理解される。このようなフラグメントは代表的には、パパイン(Fabフラグメントを生成するため)またはペプシン(F(ab')₂フラグメントを生成するため)のような酵素を用いて、タンパク質切断によって生成される。あるいは、MGD-CSFタンパク質結合フラグメントは、組み換えDNA技術の適用を通じてまたは合成化学を通じて生成され得る。ヒト化キメラモノクローナル抗体は、ヒトにおける抗MGD-CSFのインビボでの使用に適切である。このようなヒト化抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝的構築物を用いて産生され得る。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野で公知である。概説については、Morrisson, Science 229:1202(1985); Oiら、BioTechniques 4:214(1986); Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Taniguchiら、EP 171496; Morrissonら、EP 173494; Neubergerら、WO 8601533; Robinsonら、WO 8702671; Boulianneら、Nature 312:643(1984); Neubergerら、Nature 314:268(1985)を参照のこと。

【0294】

(ワクチン)

本発明は、被験体に投与され得るワクチンを提供することによって、予防的な処置または治療的な処置が必要であるかまたは所望される被験体のこのような処置のための方法を提供することによって被験体に対する免疫応答を惹起する; ワクチン組成物を提供する、そしてこのポリペプチドおよびワクチン組成物を被験体に投与するための方法も提供する。このワクチンは、ガン、増殖性、炎症性、免疫、代謝性、細菌性またはウイルスの障害を処置するために有用な、本発明の1つ以上のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは修飾因子、例えば、抗体ワクチン組成物、ポリペプチドワクチン組成物またはポリヌクレオチドワクチン組成物を含んでもよい。

【0295】

例えば、ワクチンは、ガンワクチンであってもよく、そしてポリペプチドは、同時にガ

10

20

30

40

50

ン抗原であってもよい。ワクチンは、抗炎症性ワクチンであってもよく、このポリペプチドは同時に、炎症関連抗原であってもよい。ワクチンは、ウイルスワクチンであってもよく、そしてポリペプチドは、同時にウイルス抗原であってもよい。ある実施形態では、このワクチンはポリペプチドフラグメントを含み、このフラグメントは、本発明のポリペプチドの少なくとも1つの細胞外フラグメント、および/または本発明のポリペプチドの少なくとも1つの細胞外フラグメントからシグナルペプチドのないものを、例えば、ガンのような増殖性障害の処置のために含む。特定の実施形態では、このワクチンは、例えば、ガンのような増殖性障害の処置のために投与される、1つ以上のこのようなフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。さらにこのワクチンはアジュバント有りで投与されても無しで投与されてもよい。このワクチンは、表および配列表に示されるポリペプチドとともに投与されてもよい；これは、ポリペプチドを投与する前に、実質的に同時に、または後に投与されてもよい。

10

20

30

40

50

【0296】

ワクチン治療は、腫瘍抗原の免疫原として本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは因子の使用を包含する(Machielsら、Semin. Oncol. 29: 494~502, 2002)。例えば、本発明のペプチドに基づくワクチンは、未変更の本発明のポリペプチド、そのフラグメント、ならびにMHCクラスIおよびクラスII制限ペプチド(Knutsonら、J. Clin. Invest. 107: 477~484, 2001)を包含し、これは例えば、普遍的な、非特異的なMHCクラスII制限エペトープを有する開示された配列を含む。腫瘍抗原を含むペプチドに基づくワクチンは直接、単独で、または他の分子と組み合わせて与えられてもよい。このワクチンはまた、トランスジェニック植物中でこの抗原を生成し、これがその後経口摂取され得ることによって経口的に送達されてもよい(米国特許第6,395,964号)。

【0297】

ある実施形態では、抗体自体が抗イディオタイプワクチンにおける抗原として用いられ得る。すなわち、腫瘍抗原に対する抗体を投与することで、B細胞を刺激して、その抗体に対する抗体を作成し、これが次に腫瘍細胞を認識する。

【0298】

核酸ベースのワクチンは、抗原をコードするポリヌクレオチド構築物として腫瘍抗原を送達し得る。DNAまたはRNAのような遺伝物質を含むワクチンは、直接、単独で、または他の分子と組み合わせて投与されてもよい。本発明の分子を発現するワクチンの投与は、例えばプラスミドDNAとして、所望されない腫瘍増殖を制御することを補助する、治療的な免疫原の持続的な発現および放出を経時的にもたらす。

【0299】

ある実施形態では、核酸ベースのワクチンは、本発明の抗体をコードする。このような実施形態では、このワクチン(例えば、DNAワクチン)は、転写後調節エレメント、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス(Woodchuck Hepatitis Virus)由来の転写後調節作用RNAエレメント(WPRE)を含んでもよい。これらの転写後調節エレメントは、抗体、または抗体および同時刺激分子を含む融合タンパク質を標的するために、腫瘍の微小環境に対して用いられ得る(Pertlら、Blood, 101: 649~654, 2003)。

【0300】

体液性の応答を誘導することにより抗腫瘍免疫応答を刺激することに加えて、本発明のワクチンはまた、腫瘍細胞を直接認識して殺傷するT細胞刺激を誘導する細胞応答を誘導し得る。例えば、腫瘍抗原をコードする本発明のヌクレオチドベースのワクチンは、免疫系のCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球のアームを活性化するために用いられ得る。

【0301】

ある実施形態では、このワクチンはT細胞を直接活性化し、他方では抗原提示細胞がT細胞を活性化することを支持する。キラーT細胞は、部分的には、抗原提示細胞、例えば、樹状細胞との相互作用によってプライムされる。ある実施形態では、本発明の核酸分子

を含むプラスミドは、抗原提示細胞に入り、これが次に、コードされた腫瘍抗原を提示し、これがキラーT細胞活性化に寄与する。ここでも、腫瘍抗原は、プラスミドDNA構築物として、単独で、または他の分子とともに送達され得る。

【0302】

MGD-CSFおよびNP__689669は、ヒト骨髓CD34+幹細胞または末梢血単球のいずれかからのインビトロにおける樹状細胞分化を促進し得るので、本発明の分子は、エキソビボで樹状細胞を増殖させるために用いられ得る。次いで、増殖された細胞集団は、例えば、樹状細胞ワクチンとして患者に戻されてもよい。さらに、本発明の分子は、患者においてインビボで自己の造血幹細胞および/または単球からの樹状細胞分化を促進し得、これが患者の抗原提示能力を増強して、ガンのような特定の疾患と戦う能力に寄与する。

10

【0303】

さらなる実施形態では、RNAがワクチン生成に用いられ得る。例えば、樹状細胞は、腫瘍抗原をコードするRNAでトランスフェクトされてもよい(Heiserら、J. Clin. Invest. 109:409~417, 2002; MitchellおよびNair, J. Clin. Invest. 106:1065~1069, 2000)。このアプローチは、十分な量の腫瘍物質を得るという限界を克服し、そうでなければ臨床試験から排除される患者へと治療を拡大する。例えば、腫瘍から単離される本発明のRNA分子は、RT-PCRを用いて増幅され得る。ある実施形態では、本発明のRNA分子は直接、腫瘍から単離されて、介入するクローニング工程なしに樹状細胞にトランスフェクトされる。

20

【0304】

ある実施形態では、本発明の分子は、ペプチド抗原がその天然の状態よりも高度に抗原性であるように変更される。これらの実施形態は、エピトープ配列の改変を介して腫瘍抗原の免疫原性を増強することによって、ほとんどの腫瘍抗原のインビボにおける劣った免疫原性を克服する当該分野での必要性に取り組む(YuおよびRestifo, J. Clin. Invest. 110:289~294, 2002)。

【0305】

ガンワクチンの別の認識された問題とは、既存の中和抗体の存在である。本発明のいくつかの実施形態は、哺乳動物でない天然の宿主由来のウイルスベクター、例えば、鶏痘ウイルスを用いることによってこの問題を克服する。既存の中和抗体をやはり迂回する別の実施形態としては、遺伝子操作されたインフルエンザウイルス、およびタンパク質に関係しないDNAを含む裸のプラスミドDNAワクチンの使用を包含する(YuおよびRestifo, J. Clin. Invest. 110:289~294, 2002)。

30

【0306】

本発明の全ての免疫原性の方法は、単独で、または他の慣習的なもしくは非慣習的な治療と組み合わせて用いられ得る。例えば、免疫原性分子は、種々の抗増殖効果を有する他の分子と、または免疫応答刺激を補助するさらなる物質、すなわちアジュバントもしくはサイトカインと組み合わされてもよい。

【0307】

例えば、ある実施形態では、核酸ワクチンは、腫瘍抗原に加えて、アルファウイルスレプリカーゼ酵素をコードする。ワクチン療法に対するこのアプローチは、腫瘍細胞のアポトーシス性死亡の誘導をとまなう治療抗原産生と首尾よく組み合わせられる(YuおよびRestifo, J. Clin. Invest. 110:289~294, 2002)。

40

【0308】

ある実施形態では、本発明の分子は、細胞増殖の制御に関与し、そして本発明の因子は、所望されない細胞増殖を阻害する。このような因子は、限定はしないが、ガン、乾癬および強皮症を含む異常な細胞増殖を含む障害を処置するために有用である。本発明の特定の因子および/または治療レジメンが望ましくない細胞増殖を減少させるのにおいて、例えばガンを処置する状況において、有効であるか否かは、標準的な方法を用いて決定され

50

得る。例えば、生物学的サンプル（例えば、血液、生検サンプルなど）におけるガン細胞の数は、決定され得る。腫瘍量は、標準的な放射線学的方法または生化学的方法を用いて決定され得る。

【0309】

本発明の分子は、ガン、新生物および腫瘍随伴性の障害を含む、過剰増殖性の障害の免疫療法において用途を見出す。すなわち、本発明の分子は、そのうち1770以上が現在までに同定されている腫瘍抗原に対応し得る（YuおよびRestifo, J. Clin. Invest. 110: 289~294, 2002）。免疫療法アプローチは、受動免疫療法およびワクチン療法を含み、そして遺伝的および抗原特異的なガン免疫療法の両方を達成し得る。

10

【0310】

受動免疫アプローチは、特定の腫瘍関連抗原に対する本発明の抗体を含む。このような抗体は、正常な細胞を廃することなく、複数の部位で全身性の腫瘍を根絶し得る。ある実施形態では、抗体は、上記のように放射性成分と組み合わせられ、これによって、例えば、抗体が腫瘍を特異的に標識する能力と、腫瘍DNAに対する放射性同位体の致死性の付加とを組み合わせる。

【0311】

有用な抗体は、別個のエピトープまたはネスト化されたエピトープの組み合わせ、すなわち、10マーのエピトープ、ならびに全ての潜在的な8マーおよび9マー、または重複するエピトープを組み込む関連のペプチド多量体を含む（Dutoitら、J. Clin. Invest. 110: 1813~1822, 2002）。従って単独の抗体が1つ以上のエピトープと相互作用し得る。さらに、抗体は、単独で用いられてもよいし、または全てが単独のエピトープもしくは複数のエピトープのいずれかを認識する種々の抗体と組み合わせられて用いられてもよい。

20

【0312】

中和抗体は、ガンおよび増殖障害の治療を提供し得る。本発明のタンパク質またはペプチドを特異的に認識する中和抗体は、タンパク質またはペプチドに対して、例えば、体液中または細胞外間隙で結合し得、それによってこのタンパク質またはペプチドの生物学的な活性を調節する。例えば、癌細胞の増殖を刺激するのにいてある役割を果たすタンパク質またはペプチドに特異的な中和抗体は、癌細胞の増殖を調節するのに有用であり得る。同様に、癌細胞の分化においてある役割を果たすタンパク質またはペプチドに特異的な中和抗体は、癌細胞の分化を調節するのに有用であり得る。

30

【0313】

（MGD-CSF「ノックアウト（knock-out）」および相同組み換え）

内因性の遺伝子発現は、標的相同組み換えを用いて、目的の遺伝子および/またはそのプロモーターを不活性化または「ノックアウト」することによって減少され得る。例えば、Smithiesら、Nature, 317: 230~234 (1985); Thomasら、Cell, 51: 503~512 (1987); およびThompsonら、Cell, 5: 313~321 (1989)。例えば、内因性ポリヌクレオチド配列に対して相同なDNA（遺伝子のコード領域または調節領域のいずれか）に隣接する本発明の変異体、非機能的ポリヌクレオチド（または完全に関係のないDNA配列）は、インビボで本発明のポリペプチドを発現するように細胞をトランスフェクトするために、選択マーカーおよび/または負の選択マーカーの有無とともに用いられてもよい。別の実施形態では、当該分野で公知の技術を用いて、目的の遺伝子を含むが発現しない、細胞におけるノックアウトを生成する。標的された相同組み換えを介する、DNA構築物の挿入によって、標的遺伝子の不活性化が生じる。このようなアプローチは、胚性幹細胞に対する改変を用いて、不活性な標的遺伝子を有する動物子孫を生成し得る、研究および農業の分野に特に適切である。例えば、Thomasら、Cell 51: 503~512 (1987); Thompson (1989)、前出）。しかし、このアプローチは、組み換えDNA構築物が当業者に明確である適切なウイルスベクターを用いてインビボで必要な部位に直接

40

50

投与されるか標的されるという条件で、ヒトにおける使用のために慣用的に適合され得る。

【0314】

本発明のさらなる実施形態では、本発明のポリペプチドを発現するように遺伝子操作されている、あるいは、ノックアウトのように本発明のポリペプチドを発現しないように遺伝子操作されている細胞を、インビボで患者に投与する。このような細胞は、ヒトおよび非ヒト動物を含む患者、またはMHC適合性ドナーから得られてもよく、そしてこれには限定はしないが、線維芽細胞、骨髄細胞、血球（例えば、リンパ球）、脂肪細胞、筋細胞、内皮細胞などを挙げることができる。この細胞は、組み換えDNA技術を用いてインビトロで遺伝子操作されて、細胞へ本発明のポリペプチドのコード配列を導入するか、あるいは、限定はしないが、プラスミド、コスミド、YAC、裸のDNA、エレクトロポレーション、リボソームなどの使用を含む、例えば、形質導入（ウイルスベクター、および/または細胞ゲノムへ導入遺伝子を組み込むベクターを用いる）またはトランスフェクション手順によって、本発明のポリペプチドに関連するコード配列および/または内因性の調節性配列（制御配列）を破壊する。本発明のポリペプチドのコード配列は、本発明のポリペプチドの発現および分泌を達成するために、強力な構成的または誘導性のプロモーターまたはプロモーター/エンハンサーの制御下におかれてもよい。本発明のポリペプチドを発現および分泌する操作された細胞は、患者に全身的に、例えば、循環にまたは腹腔内に導入され得る。あるいは、細胞は、マトリックスに組み込まれ得、そして身体に移植され得てもよく、例えば、遺伝子操作された線維芽細胞は、皮膚移植片の一部として移植され得る；遺伝子操作された内皮細胞は、リンパまたは血管移植片の一部として移植され得る（例えば、Andersonら、米国特許第5,399,349号；およびMulligan & Wilson、米国特許第5,460,959号を参照のこと）。

【0315】

投与されるべき細胞が非自己または非MHC適合性細胞である場合、それらは、導入された細胞に対する宿主免疫応答の発生を妨げる周知の技術を用いて投与され得る。例えば、細胞は、即時の細胞外環境との成分の交換を可能にするが導入される細胞が宿主免疫系によって認識されることを可能にしないカプセル化型で導入されてもよい。

【0316】

（トランスジェニック非ヒト動物）

本発明のポリペプチドはまた、トランスジェニック非ヒト動物において発現され得る。限定はしないが、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ（micro-pig）、ヤギ、ヒツジ、ウシ、および非ヒト霊長類、例えば、ヒヒ、サルおよびチンパンジーを含む任意の種の動物を用いて、トランスジェニック動物を生成してもよい。特定の実施形態では、本明細書に記載されるか、そうでなければ当該分野で公知の技術を、遺伝子治療プロトコールの一部として用いて、ヒトにおいて本発明のポリペプチドを発現する。

【0317】

当該分野で公知の任意の技術は、動物に導入遺伝子（配列表に示されるポリヌクレオチドにおいて具象化される）を導入してトランスジェニック動物の創始株を生成するために用いられ得る。このような技術としては、限定はしないが、前核性マイクロインジェクション（Pattersonら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 691~698 (1994)；Carverら、Biotechnology (NY) 11: 1263~1270 (1993)；Wrightら、Biotechnology (NY) 9: 830~834 (1991)；およびHoppeら、米国特許第4,873,191号 (1989)）；生殖系列へのレトロウイルス媒介性遺伝子移入（Vander Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 6148~6152 (1985)）、胚盤胞または胚；胚性幹細胞における遺伝子標的化（Thompsonら、Cell 56: 313~321 (1989)）；細胞または胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol. 3: 1803~1814 (1983)

)) ; 遺伝子銃を用いる本発明のポリヌクレオチドの導入 (例えば、Ulmerら、Science 259:1745 (1993) を参照のこと) ; 胚性多能性幹細胞への核酸構築物の導入および胚盤胞への幹細胞の戻し移入 ; および精子媒介性遺伝子移入 (Lavitranoら、Cell 57:717~723 (1989) ; などが挙げられる。このような技術の概説については、Gordon, Intl. Rev. Cytol. 115:171~229 (1989) を参照のこと。また、米国特許第5,464,764号 (Capecchiら、Positive-Negative Selection Methods and Vectors) ; 米国特許第5,631,153号 (Capecchiら、Cells and Non-Human Organisms Containing Predetermined Genomic Modifications and Positive-Negative Selection Methods and Vectors for Making Same) 米国特許第4,736,866号 (Lederら、Transgenic Non-Human Animals) および米国特許第4,873,191号 (Wagnerら、Genetic Transformation of Zygotes) も参照のこと。当該分野で公知の任意の技術、例えば、静止状態に誘導された、培養された胚、胎児または成体細胞からの核除去卵母細胞への核移入が、本発明のポリヌクレオチドを含むトランスジェニッククローンを生成するために用いられ得る (Campbellら、Nature 380:64~66 (1996) ; Wilmutら、Nature 385:810~813 (1997)) 。

10

20

【0318】

本発明は、その全細胞に導入遺伝子を担持するトランスジェニック動物、ならびに導入遺伝子を、その全細胞ではないがある程度に担持する動物、例えば、モザイク動物またはキメラ動物を提供する。この導入遺伝子は、コンカテマーにおけるように、単独の導入遺伝子として、または複数のコピーとして組み込まれ得る、例えば、ヘッド・ツー・ヘッド (head-to-head) タンデムまたはヘッド・ツー・テール (head-to-tail) タンデム。この導入遺伝子はまた、例えば、Laskoらの教示に従って、特定の細胞タイプに選択的に導入されて活性化され得る (Proc. Natl. Acad. Sci. 89:6232~6236 (1992))。このような細胞タイプ特異的な活性化に必要な調節性配列 (制御配列) は、目的の特定の細胞タイプに依存し、そして当業者に明白である。内因性遺伝子の染色体部位へポリヌクレオチド導入遺伝子が組み込まれることが所望され得、次いで、遺伝子標的が適切である。要するに、このような技術が利用される場合、内因性遺伝子に相同性であるいくつかのヌクレオチド配列を含むベクターは、染色体配列との相同組み換えを介する内因性遺伝子のヌクレオチド配列への組み込み、およびその機能の目的のために設計される。導入遺伝子はまた、特定の細胞タイプへ選択的に導入され得、これによって、例えば、Guらの教示に従って、その細胞タイプにおいてのみ内因性遺伝子を不活性化する (Science 265:103~106 (1994))。このような細胞特異的な不活性化に必要な調節性配列 (制御配列) は、目的の特定の細胞タイプに依存して、当業者に明白である。

30

40

【0319】

一旦トランスジェニック動物が生成されれば、組み換え遺伝子の発現は、標準的な技術を用いてアッセイされ得る。最初のスクリーニングは、サザンブロット分析またはPCR技術によって達成して、動物組織を分析して導入遺伝子の組み込みが行われたことを確認し得てもよい。トランスジェニック動物の組織における導入遺伝子のmRNA発現のレベルはまた、限定はしないが、その動物から得られた組織サンプルのノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析、および逆転写PCR (RT-PCR) を含む技術を用いて評価されてもよい。トランスジェニック遺伝子発現組織のサンプルはまた、導入遺伝子産物に特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的にまたは免疫組織化学的に評価され得る。

50

【0320】

一旦、創始動物を生成すれば、それらは、特定の動物のコロニーを生じるために、繁殖、同系交配、異系交配または異種交配されてもよい。このような繁殖戦略の例としては、限定はしないが、別の系統を樹立するための2つ以上の組み込み部位を有する創始動物の異系交配；各々の導入遺伝子の相加的な発現の効果のおかげで、高レベルで導入遺伝子を発現する複合トランスジェニック動物を生成するための別の系統の同系交配；発現を増大し、かつDNA分析による動物のスクリーニングの必要性を省くため、所定の組み込み部位についてホモ接合性の動物を生成するためのホモ接合性のトランスジェニック動物の異種交配；複合のヘテロ接合性またはホモ接合性系統を生成するための別のホモ接合性株の異種交配；ならびに目的の実験モデルに適切である別個の背景にこの導入遺伝子を置くための繁殖が挙げられる。

10

【0321】

本発明のトランスジェニックおよび「ノックアウト(knock-out)」動物は、限定はしないが、本発明の分子の異常な発現に関連する状態および/または障害を研究する本発明の分子の生物学的機能を作り込むのにおいて、そしてこのような状態および/または障害を改善させるのに有効な化合物についてスクリーニングするのにおいて、有用な動物モデル系を含む用途を有する。

【0322】

(キット)

本発明は、上記の方法で用いられ得るキットを提供する。1実施形態では、キットは、本発明の抗体、例えば、精製された抗体を1つ以上の容器中に含む。ある実施形態では、本発明のキットは、このキットに含まれる抗体を特異的に免疫反応性であるエピトープを含む実質的に単離されたポリペプチドを含む。本発明のキットはまた、目的のポリペプチドと反応しないコントロールの抗体を含んでもよい。

20

【0323】

ある実施形態では、本発明のキットは、目的のポリペプチドに対する抗体の結合を検出するための手段を含む。例えば、この抗体は、検出可能な基質、例えば、蛍光化合物、酵素基質、反応性化合物もしくは発光化合物に結合体化されてもよいし、または第一の抗体を認識する第二の抗体が、検出可能な基質に結合体化されてもよい。

【0324】

ある実施形態では、このキットは、MGD-CSF関連分子に対して特異的な抗体を含む血清をスクリーニングするのにおける使用のための診断キットである。このようなキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を備え得る。このようなキットは、少なくとも1つの抗ポリペプチド抗原抗体と特異的に免疫反応性であるエピトープを含む、実質的に単離されたポリペプチド抗原を備え得る。さらに、このようなキットは、この抗体の抗原への結合を検出するための手段を備える。この抗体は、フローサイトメトリーによって検出され得る、フルオレセインまたはローダミンのような蛍光化合物に結合体化されてもよい。ある実施形態では、このキットは、組換え的に産生されたポリペプチド抗原または化学的に合成されたポリペプチド抗原を備えてもよい。このキットのポリペプチド抗原はまた、固体支持体に結合されてもよい。

30

【0325】

さらなる実施形態では、上記のキットの検出手段は、このポリペプチド抗原が結合される固体支持体を含む。このようなキットはまた、非結合レポーター標識抗ヒト抗体を備えてもよい。この実施形態においては、ポリペプチド抗原に対する抗体の結合はこのレポーター標識抗体の結合によって検出され得る。

40

【0326】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清をスクリーニングする際の使用のための診断用キットを包含する。この診断用キットは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド抗原と特異的に免疫反応性である実質的に単離された抗体、およびこのポリヌクレオチドまたはポリペプチド抗原の抗体との結合を検出する手段を備える。ある実施形態においては、この抗体は、固体支持体に結合される。ある実施形態にお

50

いては、この抗体は、モノクローナル抗体である。このキットの検出手段は、第二の標識されたモノクローナル抗体を含んでもよい。あるいは、またはさらに、この検出手段は、標識された、競合抗原を含んでもよい。

【0327】

ある診断の構成においては、試験血清は、本発明の方法によって得られる表面結合抗原を有する固相試薬と反応させられる。特異的な抗原抗体をこの試薬と結合させ、そして結合されない血清成分を洗浄により除去した後、この試薬をレポーター標識抗ヒト抗体と反応させて、固体支持体上で結合した抗原抗体の量に応じて、レポーターをこの試薬と結合させる。この試薬を再び洗浄して、結合されない標識抗体を除去し、そしてこの試薬と会合したレポーターの量を決定する。代表的には、レポーターは、適切な蛍光測定基質、

10

【0328】

この固体表面試薬は、タンパク質材料を固体支持体材料、例えば、高分子ビーズ、ディップ・スティック、96ウェルプレートおよび/または濾過材料に付着させるための公知の技術により調製され得る。これらの付着方法としては、一般的に、支持体へのタンパク質の非特異的な吸着または固体支持体上の化学的に活性な基、例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、またはアルデヒド基への、代表的には、遊離アミン基を介する、タンパク質の共有結合、が挙げられる。あるいは、ストレプトアビジンでコーティングされたプレートが、ビオチン化された抗原と共に用いられてもよい。

20

【0329】

本発明のさらなる目的および利点は、以下の詳細な説明に一部は示され、そして一部は詳細な説明から明白であるか、または本発明の実施によって学習され得る。本発明の目的および利点は、添付の特許請求の範囲に特に示される要素および組み合わせの手段によって実現されそして達成される。さらに、詳細な説明の本文に記載される利点は、特許請求の範囲に含まれなくても、特許請求される本発明にそれ自体限定されるものではない。

【0330】

前述の一般的な説明および以下の詳細な説明の両方は、請求される本発明の代表であって、代表でしかなく、制限ではないことが理解されるべきである。さらに、本発明は、記載される特定の実施形態に限定されず、当然ながら変化し得ることが理解されなければならない。さらに、特定の実施形態を記載するために用いられる技術用語は、限定されると解釈されるべきではない。なぜなら、本発明の範囲は、その特許請求の範囲によってのみ限定されるからである。特許請求の範囲は、特許権消滅状態における実施形態を包含しない。

30

【0331】

値の範囲に関しては、本発明は、文脈が明確に他を示すのでない限り、この範囲の上限と下限との間にある各々の値から下限の単位の少なくとも10倍までを包含する。さらに、本発明は、任意の他の言及される介在する値を包含する。さらに、本発明はまた、言及される範囲から特に排除されるのでない限り、この範囲の上限および下限のいずれかまたは両方を除く範囲を包含する。

40

【0332】

他に規定されない限り、本明細書に用いられる全ての技術用語および科学用語の意味は、本発明が属する当該分野の当業者によって通常理解されるものである。当業者はまた、本明細書に記載される方法および材料と同様または等価である任意の方法および材料がまた、本発明を実施または試験するために用いられ得ることを認識する。さらに、本明細書に言及される全ての刊行物は、その全体が参照によって援用される。

【0333】

本明細書において、そして添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単数形である「1つの(a)」、「または(or)」および「この、その(the)」は、文脈が明確に他を示すのでない限り、複数の対象を包含するということに注意しなければならない

50

。従って、例えば、「1つの本発明のポリペプチド (a s u b j e c t p o l y p e p t i d e) 」という言及は、複数のこのようなポリペプチドを含み、そして「この因子 (t h e a g e n t) 」という言及は、当業者に公知の1つ以上の因子およびその等価物などの言及を包含する。

【0334】

さらに、本明細書および特許請求の範囲において用いられる、成分、反応条件、純度%、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さなどの量を表す全ての数は、他に示さない限り、「約 (a b o u t) 」という用語によって修飾される。従って、本明細書および特許請求の範囲で示される数値的なパラメータは、本発明の所望の特性に依存して変化し得る近似値である。最低限、特許請求の範囲に対する等価物の原理の適用を限定するつもりではないが、各々の数値的なパラメータは、通常の実験技術を用いて適用して、報告された有意な桁数の数に照らして少なくとも解釈されるべきである。それにもかかわらず、特定の実施例に示される数値は、できるだけ正確に報告される。しかし、任意の数値は、その実験的な測定の実験的標準偏差から特定の誤差を本質的に含む。

【0335】

本明細書は、本明細書に引用される参考文献に照らしてほとんど完全に理解される。これらの参考文献の各々は、その全体がこの参照によって本明細書に援用される。

【実施例】

【0336】

本実施例は、本発明の例示であることを意図するものであって、従って、いかなる方法でも本発明を限定すると解釈されるべきではなく、また上記で考察される本発明の局面および実施形態の詳細を記載し提供する。本実施例は、以下の実験が行なわれる全ての実験であるとか唯一の実験であるとかを示すものではない。用いられる数 (例えば、量、温度など) に関しては正確性を保障する労力を払っているが、ある程度の実験の誤差および偏差が見込まれるべきである。他に特定しない限り、部分は重量部分であり、分子量は平均の分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧かまたは大気圧付近である。

【0337】

(実施例 1 : M G D - C S F と M C G 3 4 6 4 7 のアミノ酸配列アラインメント)

M G D - C S F および N P _ 6 8 9 6 6 9 は、T - C O F F E E V e r s i o n 1 . 3 7 , c p u = 0 . 0 0 s e c . , スコア = 7 2 、 N s e q = 3 、 l e n = 2 4 2 のプログラムのクラスタル (c l u s t a l) 形式を用いてそれらのアミノ酸を整列することによって比較した。図 1 に示されるとおり、M G D - C S F のアミノ酸配列は、N P _ 6 8 9 6 6 9 (M C G 3 4 6 4 7) のアミノ酸配列とは異なる。後者の配列は、アミノ酸 8 1 の位置にグルタミン (Q) 残基を有する。M C G 3 4 6 4 7 の N C B I 配列におけるアミノ酸 8 1 におよびそのいずれかの側に隣接する、5 つの隣接するアミノ酸残基は、N V T R L Q R A Q V S (配列番号 2 7 9) である。M C G 3 4 6 4 7 のこの公開された配列と対照的に、M G D - C S F は、アミノ酸配列 N V T R L R A Q V S (配列番号 2 8 0) を含む。これらの配列の間の相違は、エキソン 3 とエキソン 4 との間の M C G 3 4 6 4 7 遺伝子の選択的スプライシングから生じる。エキソン 3 ~ 4 の境界のゲノム配列は、コドン a a c g t c a c c a g g c t g g t g (配列番号 2 8 1) および c a g c a g a g g g c c c a g g t g a g c (配列番号 2 8 2) であり、ここで g t g コドン (斜体で示す) は、エキソン 3 の末端での 5 ' スプライスドナーに相当し、そして 2 つの c a g コドン (斜体で示す) は、エキソン 4 の開始での 2 つの選択的スプライスアクセプター部位に相当する。従って、公開された M C G 3 4 6 4 7 配列は、第一の c a g スプライスアクセプター部位の使用から生じる転写物に相当するが、M G D - C S F 配列は、第二の c a g スプライスアクセプター部位の使用から生じる転写物に相当する。

【0338】

M C G 3 4 6 4 7 グルタミン 8 1 残基は、第一の c a g スプライスアクセプター部位が用いられる場合にスプライスアウトされない第二の c a g コドンによってコードされる。対照的に、スプライスアクセプター部位としての第二の c a g の使用では、得られた R N

A 転写物の第一の c a g 配列のスプライシングアウトを生じ、これが次に M G D - C S F スプライス改変体における対応するグルタミンの欠失を生じる。従って、M G D - C S F は、スプライシング改変体であって、M C G 3 4 6 4 7 とは別個である R N A およびタンパク質の種に相当する。

【 0 3 3 9 】

(実施例 2 : M G D - C S F 発現のためのプラスミドベクター)

M G D - C S F 遺伝子を、標準的なクローニング手順を用いて、図 2 および図 3 に示されるように改変された p T T - 5 および p T T - 2 哺乳動物発現ベクターにクローニングした。M G D - C S F 遺伝子はまた、標準的なクローニング手順を用いて、p I B / V 5 H i s - D E S T 昆虫細胞発現ベクター (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d C A) にクローニングした。得られた構築物は、表 1 および表 5 に記載される。それらとしては、ベクター p T T 5 においてタグ化されていないヒト M G D - C S F (M G D - C S F)、ベクター p T T 2 においてタグ化されていないヒト M G D - C S F (C L N 0 0 8 3 9 3 9 5)、ベクター p T T 5 において C 末端 V 5 H 8 タグを有するヒト M G D - C S F (C L N 0 0 7 3 2 6 6 3)、V 5 H 8 でタグ化されたヒト M G D - C S F (C L N 0 0 7 3 2 6 6 3)、ベクター p T T 2 において C 末端 V 5 H 8 タグを有するヒト M G D - C S F (C L N 0 0 8 4 0 3 5 1)、ベクター p I B / V 5 H i s - D E S T において C 末端 V 5 H 8 を有するヒト M G D - C S F (C L N 0 0 7 5 8 5 9 3)、およびベクター p T T 5 - G においてコラーゲン分泌リーダーおよび C 末端 S t r e p t a g を有するヒト M G D - C S F (C L N 0 0 8 1 6 4 2 4) が挙げられる。

【 0 3 4 0 】

M G D - C S F の発現および分泌をモニターするため、そしてその精製を補助するために、構築物 C L N 0 0 8 2 1 8 6 7 を、タンパク質と C 末端切断タグとの間で操作された T o b a c c o E t c h V i r u s (T E V) プロテアーゼ認識部位で生成した。T E V プロテアーゼの 7 つのアミノ酸認識部位は、G l u - A s n - L e u - T y r - P h e - G l n - G l y (配列番号 1 8 3) であり、切断は G l n と G l y との間で生じる。構築物 C L N 0 0 8 2 1 8 6 7 を、M G D - C S F (1 ~ 2 4 1 a a) _ T E V _ V 5 _ S t r e p t a g I I _ H 8 と命名して、ベクター p T T 5 - I 中で C タグ化した。

【 0 3 4 1 】

M G D - C S F の分泌を改善するために、最初の 2 0 アミノ酸によってコードされるその分泌シグナルペプチドを、コラーゲンのシグナルペプチドをコードする 2 3 アミノ酸によって置き換えた (G e n B a n k タンパク質アクセッション番号 N P _ 0 0 1 8 4 2)。この構築物 C L N 0 0 8 4 8 1 4 9 を、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ M G D - C S F (2 1 ~ 2 4 1 a a) と命名して、ベクター p T T 5 - G 中で非タグ化する。別のこのような構築物も、タンパク質と C 末端切断タグとの間で操作された T E V プロテアーゼ認識部位を有する。C L N 0 0 8 1 6 4 2 4 を、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ M G D - C S F (2 1 ~ 2 4 1 a a) _ T E V _ V 5 _ S t r e p t a g I I _ H 8 と命名して、ベクター p T T 5 - G 中で C タグ化する。第三のこのような構築物を N 末端タグとタンパク質との間で操作された T E V 部位で生成した。C L N 0 0 8 1 6 4 2 5 を、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ H 8 _ S t r e p t a g I I _ V 5 _ T E V _ M G D - C S F (2 1 ~ 2 4 1 a a) と命名して、ベクター p T T 5 - H 中で N タグ化する。

【 0 3 4 2 】

アミノ酸が成熟タンパク質の N 末端、C 末端または両方の末端から欠失された欠失構築物を生成した。これらの欠失構築物の M G D - C S F シグナルペプチドを、コラーゲンシグナルペプチドで置き換えた。C L N 0 0 8 4 8 1 6 0 は、2 5 の N 末端アミノ酸が欠失しており；これを、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ M G D - C S F (2 6 ~ 2 4 1 a a) と名付けて、ベクター p T T 5 - G 中で非タグ化する。C L N 0 0 8 4 8 1 7 3 は、3 0 の N 末端アミノ酸を欠失しており；これを、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ M G D - C S F (3 1 ~ 2 4 1 a a) と名付けて、ベクター p

T T 5 - G 中で非タグ化する。C L N 0 0 8 4 8 2 0 9 は、5 個の C 末端アミノ酸および 2 0 個の N 末端アミノ酸（シグナルペプチド）が欠失しており；これを、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ _ M G D - C S F (2 1 ~ 2 3 6 a a) と名付けて、ベクター p T T 5 中で非タグ化する。C L N 0 0 8 4 8 1 9 7 は、1 0 個の C 末端アミノ酸および 2 0 個の N 末端アミノ酸（シグナルペプチド）が欠失しており；これを、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ _ M G D - C S F (2 3 ~ 2 3 1 a a) と名付けて、ベクター p T T 5 中で非タグ化する。C L N 0 0 8 4 8 1 8 5 は、2 8 個の C 末端アミノ酸および 2 0 個の N 末端アミノ酸（シグナルペプチド）が欠失しており；これを、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ _ M G D - C S F (2 1 ~ 2 1 3 a a) と名付けて、ベクター p T T 5 中で非タグ化する。C L N 0 0 8 4 8 2 2 0 は、2 5 個の N 末端アミノ酸および 1 0 個の C 末端アミノ酸が欠失しており；これを、M G D - C S F コラーゲン S P (1 ~ 2 3 a a) _ _ M G D - C S F (2 6 ~ 2 3 1 a a) と名付けて、ベクター p T T 5 中で非タグ化する。

10

【 0 3 4 3 】

M G D - C S F の 2 つのマウスオルソログを同定して、標準的な手順によって、非タグ化 p T T 5 (C L N 0 0 8 4 0 2 5 7 および C L N 0 0 8 4 7 9 4 8) に、そしてこのクローンとタグとの間の T E V 部位でタグ化された p T T 5 - I (C L N 0 0 8 4 0 2 5 3 および C L N 0 0 8 4 2 7 1 2) にクローニングした。これらのオルソログを用いて、マウスの組織および細胞において M G D - C S F の生物学的活性に関する動物研究を行なってもよい。

20

【 0 3 4 4 】

構築物 C L N 0 0 8 4 0 2 5 7 および C L N 0 0 8 4 0 2 3 5 によって示されるマウスのオルソログは、R I K E N 全長富化ライブラリー由来の M u s m u s c u l u s 成体雄性小腸 c D N A クローン 2 0 1 0 0 0 4 A 0 3 に由来した；理論的タンパク質 1 2 8 4 2 0 4 3 ；遺伝子座 A K 0 0 8 0 8 2 。構築物 C L N 0 0 8 4 0 2 5 7 は、ファントムクローン 2 0 1 0 0 0 4 A 0 3 のヌクレオチド配列のオープンリーディングフレーム (O R F) に相当し、そしてベクター p T T 5 にクローニングされたヒト M G D - C S F のマウスオルソログである。構築物 C L N 0 0 8 4 0 2 5 3 は、ファントムクローン 2 0 1 0 0 0 4 A 0 3 のヌクレオチド配列の O R F に相当し、そしてベクター p T T 5 - I にクローニングされた。

30

【 0 3 4 5 】

構築物 C L N 0 0 8 4 7 9 4 8 および C L N 0 0 8 4 2 7 1 2 によって呈示されるマウスオルソログは、遺伝子座 B C 0 1 6 2 5 4 で、R I K E N 全長富化ライブラリー由来の M u s m u s c u l u s c D N A クローン 2 0 1 0 0 0 4 A 0 3 、m R N A (c D N A クローン M G C : 2 8 8 9 1 I M A G E : 4 9 1 2 0 9 7) 、完全 c d s 1 8 9 2 1 4 3 6 に由来した。構築物 C L N 0 0 8 4 7 9 4 8 (1 8 9 2 1 4 3 6) は、ベクター p T T 5 にクローニングされたヒト M G D - C S F の O R F ヌクレオチド配列に相当する。この構築物 C L N 0 0 8 4 2 7 1 2 (1 8 9 2 1 4 3 6) は、ベクター p T T 5 にクローニングされたヒト M G D - C S F の O R F ヌクレオチド配列に相当する。

40

【 0 3 4 6 】

(実施例 3 : 哺乳動物細胞における一過性の発現)

M G D - C S F ポリペプチドをコードする相補的な D N A を、発現ベクター p T T 5 および p C D N A - p D E S T 4 0 にクローニングして、タグ化タンパク質および非タグ化タンパク質の両方として発現した。タンパク質のレベルは、定量的なウエスタンブロット分析により、タグ、例えば V 5 H i s タグのレベルを測定することによって定量した。発現ベクターは、1 0 % ウシ胎仔血清 (F B S) およびペニシリン / ストレプトマイシン (1 0 0 μ g / m l 、 1 0 0 U / m l) を含む D M E M 中に含まれるトランスフェクション剤 F u g e n e 6 (R o c h e , N u l t l e y N J) を用いて、接着性 2 9 3 細胞中にトランスフェクトして、5 % C O ₂ 中において 3 7 ° で 4 0 時間インキュベートし、その後細胞を P B S で洗浄して、完全 D M E M 中でさらに 4 8 時間インキュベートした。

50

細胞上清を回収して、遠心分離によって細胞破砕物を除去して、抗V5抗体を用いるウェスタンブロットアッセイによって生物学的活性（非タグ化cDNA）およびタンパク質発現（V5タグ化cDNA）について試験した。

【0347】

発現研究はまた、懸濁培養物中でタグ化MGD-CSF構築物を一過性に発現している293-6E細胞で行った。細胞は、トランスフェクションの18~24時間前に、25mlのFreeStyle培地（Invitrogen, Carlsbad CA）中で1mlあたり 6×10^5 個の細胞の密度まで希釈した。トランスフェクション複合体は、1.25mlのPBSに25 μ gのDNAを添加すること、1mg/mlの濃度で水中に溶解した50 μ lの直鎖の25kDのポリエチレンイミン（PEI）（Polysciences, Warrington PA）を添加すること、この溶液を混合すること、およびこの混合物を室温で1時間インキュベートしてその後これをトランスフェクトされるべき細胞に添加することによって調製した。細胞およびそれらの上清は、トランスフェクションの3~6日後に回収して、タンパク質発現は、ウェスタンブロット分析によって評価した。

【0348】

細胞懸濁液（1ml）をペレットにし次いで4部のXTサンプル緩衝液（Bio-Rad, Hercules CA）と混合した。99で3分間の変性後、サンプルをCriterion XT SDS-PAGEゲル（Bio-Rad, Hercules CA）にロードするか、または-20で保管した。細胞ペレットを、100 μ lの溶解緩衝液（1%NP-40；50mM Tris-HCl、pH8.0；150mM NaCl；および1錠剤完全プロテアーゼインヒビター（Roche, Indianapolis IN））中での再懸濁によって溶解した。溶解した細胞を14,000rpmでの遠心分離によってペレットにして、得られた透明な溶解物のタンパク質および細胞懸濁液を、SDS-PAGEによって分離して、ニトロセルロース膜に転写した。ウェスタンブロットは、V5エピトープに特異的なHRP結合体モノクローナル抗体（Invitrogen, Carlsbad CA）を用いて、またはポリクローナルのウサギ抗MGD-CSF抗体（Five Prime Therapeutics, Inc., South San Francisco CA）を用いて膜をプローブすることによって行った。結合されたウサギ抗MGD-CSF抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化されたポリクローナルヤギ抗ウサギ（Jackson Immuno Research, West Grove PA）で検出した。化学発光基質（SuperSignal West Femto, Pierce, Rockford IL）中で膜をインキュベートすること、およびこれを感光性のフィルムに曝すことによって免疫複合体を可視化した。

【0349】

図4Aおよび4Bに示されるように、293-6E細胞は、トランスフェクションの3~6日後にタグ化MGD-CSFを発現した。図4Aは、293-6E細胞中への一過性にトランスフェクトされたV5H8（CLN00732663）でタグ化されたMGD-CSFの発現を示す。この左のパネルは、細胞内MGD-CSFを示す。発現はトランスフェクション後3日でほぼ顕著であった。真ん中のパネルは、上清中へ分泌されたMGD-CSFを示す。発現はトランスフェクションの6日後に最も顕著であった。右のパネルは、定量的な陽性コントロール（Positope, Invitrogen, Carlsbad, CA）を示す。

【0350】

図4Bは、コラーゲン分泌配列を有しV5H8でタグ化されたMGD-CSFの発現を示す（CLN00816424）。左パネルは、細胞内MGD-CSFを示す。発現は、3日で観察されて、トランスフェクション後6日にわたって継続して増大した。真ん中のパネルは、上清中へ分泌されたMGD-CSFを示す；その発現はまた3日から6日に増大した。右のパネルは、定量的な陽性コントロール（Positope, Invitrogen, Carlsbad, CA）を示す。

【0351】

図4Aおよび図4Bの両方において、細胞および上清のタンパク質ロードは、左および真ん中のパネルのゲルロードが匹敵する細胞数を反映するように適合された。従って、真ん中のパネルに示されるMGD-CSFの量は、細胞の分泌効率を反映する。上清中で検出された標的化タンパク質は、約40kDの分子量を有したが、細胞内タンパク質は、おそらく不完全なグリコシル化に起因して約37kDの分子量を有した。分泌されたタンパク質の収率は、構築物の設計次第で異なった。CLN00732663は、細胞内で低収率で発現された。37kD型であって40kD型ではないが、おそらく、細胞溶解に起因して、やはり低収率(約5~10ng/ml)で、トランスフェクション6日後に細胞培養上清中で検出された。外因性の分泌シグナルおよび伸長された切断性C末端タグで内因性のシグナルペプチドを置換することで、発現および分泌は少なくとも1倍に増大した(CLN00816424)。さらに、より高分子量のタンパク質バンドのみが、CLN00816424でトランスフェクトされた細胞培養物の上清中で検出可能であり、このことは、このタンパク質が分泌されたものであって、溶解した細胞には由来しなかったことを示した。

10

【0352】

(実施例4：トランスフェクトされた細胞の増殖および生存度)

図5Aおよび表1に示されるように、CLN00816424で一過性にトランスフェクトされた293-6E細胞は、トランスフェクション後3~6日にわたって増殖し続けた。懸濁培養物中の細胞の密度は、CLN00542945(黒)、CLN00732663(薄灰色)、CLN00821867(斜線)、およびCLN00816424(格子)でのトランスフェクションの後3~6日血球計算板を用いて、トリパンブルーを排除した細胞をカウントすることによってモニターし、そして分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)をコードするコントロールの遺伝子(濃灰色)と比較した。コントロールのSEAP細胞およびCLN00816424(コラーゲンリーダーを有するMGD-CSF)でトランスフェクトされた細胞の両方が、3~6日にわたって数が増えた。CLN00542945(非タグMGD-CSF)、CLN00732663(V5H8タグ化MGD-CSF)、またはCLN00821867(ストレプトタグ化MGD-CSF)でトランスフェクトされた細胞は増殖しなかった。

20

【0353】

図5Bに示されるとおり、CLN00816424(コラーゲンリーダーを有するMGD-CSF)で一過性にトランスフェクトされた細胞は生存したままであった。それらは、培養物中で6日間80%を超える生存度を維持した。懸濁培養物中の細胞の生存度は、CLN00542945(黒)、CLN00732663(薄灰色)、CLN00821867(斜線)、およびCLN00816424(格子)でのトランスフェクションの後3~6日にわたって血球計算板を用いて、トリパンブルー排除によってモニターし、そして分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)をコードするコントロールの遺伝子(濃灰色)と比較した。MGD-CSF、CLN00732663およびCLN00821867を発現する細胞は、培養物中での経時的な細胞生存率の減少によって証明される、細胞毒性の増大を示した。この毒性は、宿主293細胞におけるMGD-CSFのcDNAには特異的でないが、特定の培養条件下でのみ観察される。

30

40

【0354】

(実施例5：哺乳動物細胞での安定なトランスフェクション)

MGD-CSFは、トランスフェクトされた接着性293-T細胞によって安定に発現された。安定なトランスフェクションをATCC(Manassas VA)から購入された293-T細胞で行って、完全DMEM培地(10%FBS(Mediatech, Herndon VA); 100U/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシンおよび2mMのグルタミン(Invitrogen, Carlsbad CA)を補充したDMEM培地)中で培養した。トランスフェクションの前日、 1.25×10^5 個の細胞をT-175培養フラスコ(Corning, Acton MA)中に播種し

50

て、5% CO₂ を用いて 37 °C で一晩インキュベートした。細胞を、114 µl の Fugene 6 (Roche, Nutley NJ) と 1.9 ml の RPMI - 1640 培地 (Mediatech, Herndon VA) とを混合することによってトランスフェクトして、室温で 5 分間インキュベートした。プラスミド DNA (19 µg の全長 MGD - CSF を pIRESpuro3 中に) (BD Biosciences, San Jose, CA) を Fugene / 培地混合物に添加して、室温で 15 分間インキュベートした。脂質 / DNA 混合物を T - 175 フラスコに移して、細胞とともに 16 時間インキュベートした。翌日、細胞を 0.25% トリプシン (Invitrogen, Carlsbad CA) で剥離して、3 つの T - 175 フラスコに増殖させた。約 16 時間後、この細胞を培養容器に結合させて、選択試薬ピューロマイシン (Invitrogen, San Diego CA) を 10 µg / ml という最終濃度に添加した。選択培地を 1 週に 1 回交換して、細胞生存率を 4 ~ 6 週間モニターした。発現は、上記のポリクローナルウサギ抗 MGD - CSF 抗体を用いてウエスタンブロット分析によって確認した。

10

【0355】

MGD - CSF を安定に発現する接着性 293 - T 細胞は、低血清または血清なしの培地中での懸濁培養に適合された。細胞を 10⁶ / ml の濃度で Free Style 培地 (Invitrogen, Carlsbad CA) 中で、または Hyq PF CHO LS 培地 (Hyclone, Logan UT) 中で、それぞれ再懸濁して、5% FBS (Mediatech, Herndon, VA) を補充した。懸濁細胞培養を、250 ml の振盪フラスコ中で 50 ml の容積で維持して、37 °C および 5% CO₂ で培養した。この培地を 1 週に 2 回交換して、細胞を約 10⁶ / ml 以下の密度で維持した。細胞生存率は、トリパンブルー排除によって測定した。生存度が 80% を超える場合、血清濃度を、3%、2%、1%、次には血清なしと漸減させた。トランスフェクトされた細胞は、血清の減少した条件、または無血清の条件に適合した。非タグ化 MGD - CSF を一過性に発現する 293 - T 細胞の細胞生存率およびタンパク質収率は、1% FBS を有する Hyq - CHO 培地中での培養中の 4 日後には、3% FBS を有する Free Style 培地中で培養した 293 - E 細胞での一過性の発現の 6 日後に観察された生存度および収率よりもかなり高かった。

20

【0356】

3% FBS を有する Free Style 培地中で維持した接着性 293 - T 細胞は、比較的緩徐に増殖した；それらの生存度は 3 継代後に 67% であった。相対的に、1% FBS を有する Hyq PF CHO LS 培地中で維持した細胞は、さらに迅速に増殖し；それらの生存度は 4 継代後に 85% を超えていた。図 6 A に示されるとおり、Hyq PF CHO LS 培地および 1% FBS 中の培養物のタンパク質収率 (右パネル) は、定量的なウエスタンブロットによって決定されるとおり、3% の FBS を補充した Free Style 培地中で培養した細胞からの収率 (左パネル) に比較して 10 倍より多く増大された。

30

【0357】

図 6 B に示されるように、ウエスタンブロット分析によって示される場合、低血清培地または血清なしの培地の懸濁培養物中で増殖するように適合された安定にトランスフェクトされた MGD - CSF 293 - T 細胞から、高いタンパク質収率が得られた。低血清で懸濁培養物中で増殖するように適合された安定にトランスフェクトされた MGD - CSF 293 - T 細胞は、8 倍より分泌した (1.3 µg / ml) (パネル 1)。血清なしの培地中で増殖された細胞は、4 日間にわたって上記されたとおり、接着して増殖する安定にトランスフェクトされた MGD - CSF 293 - T 細胞 (約 160 ng / ml) (パネル 3) よりも、6 日以内に培養上清中へ 4 倍を超える (650 ng / ml) (パネル 2) MGD - CSF を分泌した。MGD - CSF は、E. coli 中で発現し、次いで精製されて定量的な標準物として機能した (パネル 4)。

40

【0358】

(実施例 6 : バイオリアクター発酵)

50

図7に示されるとおり、バイオリアクター発酵は、10リットルのバイオリアクター中で6～7日の発酵の経過の間、約10 μ g/mlまでMGD-CSFの生産性を改善した。低血清中で増殖するように適合された細胞を、1%FBSを補充された10リットルのHyQ PF CHO LS培地中へ約5 $\times$ 10⁵/mlの濃度で接種した。発酵は6日間モニターして、サンプルを上記のようにゲル電気泳動のために調製した。図7の左パネルは、1レーンあたり22.5 μ lのサンプルをロードされ、接種後1～6日でクマシーブルー染色されたゲルにおけるMGD-CSFの存在を示す。ウシ血清アルブミン(BSA)は、右パネルに定量的コントロールとして示される。矢印は、MGD-CSFの位置を示す。

【0359】

10

(実施例7：タンパク質単離)

MGD-CSFは、上記のように、そして図8に示されるように、タンパク質を安定に発現する懸濁培養物中で増殖した293T細胞から単離した。培養上清は、0.5M NaCl、pH5.0(HClを含む)に調節し、次いで10kDの分子量カットオフを有するセルロース膜(Millipore, Billerica MA)を用いて5倍に濃縮した。その濃縮物を、緩衝液A(10mMの酢酸pH5.0、110mM NaCl)に対して透析して、緩衝液Aで平衡化したSP-Sephacrose FF(Amersham, Piscataway NJ)陽イオン交換カラムで分画した。そのタンパク質は、1.5M NaClへ直線勾配で溶出させて、MGD-CSFを含有する画分を緩衝液B(10mM Tris, 30mM NaCl, pH8.9、30mM NaCl)に対して透析した。

20

【0360】

この透析されたSP-Poolを、緩衝液Bで平衡化したヘパリン Sepharose HP(Amersham, Piscataway, NJ)カラムに加えて、1.5M NaClへ直線勾配で溶出させて、MGD-CSFを含有する画分を緩衝液C(10mM Tris-HCl, pH7.4、30mM NaCl)に対して透析した。この透析されたHep-Poolを、緩衝液C中で平衡化したQ-Sephacrose FF(Amersham, Piscataway, NJ)陰イオン交換カラムで分画して、1.5M NaClへ直線勾配で溶出させて、MGD-CSFを含有する画分をプールして、このQ-Poolを液体窒素中で急速凍結して、-80℃で保管した。この精製手順は、95%を超える純度でこの発現されたタンパク質の12%の収率を回収した。

30

【0361】

(実施例8：システインからセリンの変異分析)

MGD-CSF配列は、アミノ酸位置35、167、176、178、179、190および198に位置する7つのシステイン残基を含む。非還元条件下での変性および未変性のゲル電気泳動の結果の比較に基づけば、MGD-CSFは、ジスルフィド連結オリゴマーを形成しない。従って、天然のタンパク質中のシステイン残基の少なくとも1つは不對であると予想される。不對のシステイン残基によって、不適切なタンパク質折り畳みおよび共有的な凝集体の形成がもたらされ得る。

【0362】

40

MGD-CSFタンパク質の7つの突然変異タンパク質(ムテイン)のセットが構築され、発現され、特徴付けられ、ここでシステインの各々がそのジスルフィド結合パターンを理解するためにセリンに変異された。このジスルフィド結合パターンの分析によって、1つ以上の遊離のシステイン残基の排除が、改善された特性、例えば、哺乳動物細胞からの改善された発現および分泌、精製されたタンパク質の凝集の減少、ならびに/またはEC₅₀で発現された場合活性な組み換えMGD-CSFを生成する能力を有するMGD-CSFタンパク質を生じるか否かが決定され得る。

【0363】

各々の突然変異タンパク質(ムテイン)をコードするDNAは、コラーゲンシグナルペプチドを含む構築物、および成熟MGD-CSFをコードするヌクレオチド配列(CLN

50

00848149)から生成した。タンパク質は、上記のように、293-T細胞で発現された。上清を回収して、還元および非還元のゲル電気泳動に、続いてヒトMGD-CSFにおける真ん中のペプチドエピトープに対して惹起されたポリクローナル抗体でのウエスタンブロッティングに供した。

【0364】

図8Bに示されるとおり、還元ゲルのウエスタンブロットを分析して、野性型ヒトMGD-CSF(天然またはコラーゲンシグナルペプチドを有する)および各々のCysからSerへの突然変異タンパク質(ムテイン)の相対的な発現レベルを決定した。野性型ヒトMGD-CSFの分泌タンパク質収率は、天然のシグナルペプチドよりもコラーゲンシグナルペプチドで高いことが観察された。全ての突然変異タンパク質(ムテイン)が、コラーゲンシグナルペプチドを有する野性型ヒトMGD-CSFに比較した場合、分泌されたタンパク質の収量の少なくともわずかな減少を有することが観察された。C179SおよびC190Sの収率は、有意に減少され、そしてC35Sの発現は検出不能であった。これらの結果に基づいて、C35、C179およびC190は、天然のMGD-CSFにおけるジスルフィド結合に関与すると考えられる。

【0365】

図8Bにさらに示されるとおり、非還元ゲルのウエスタンブロットを、タンパク質標準と比較したMGD-CSF種の相対的な移動によって決定された、みかけの分子量の変化について分析した。ジスルフィド結合が破壊されるとき、タンパク質のみかけのサイズは代表的には、SDS-PAGEの変性条件下で増大し、そしてこの増大の大きさは代表的には、このタンパク質の一次配列における2つのシステイン残基の間の距離と相関している。ジスルフィド結合の破壊は、高分子量凝集種の形成を生じ得る。C167Sは野性型MGD-CSFと同じ移動時間を有することが観察されるが、他の突然変異タンパク質(ムテイン)の全てが移動の挙動が変化している。これによって、C167は、天然のMGD-CSFにおける唯一の不對システインである可能性が高いことが示される。C179SおよびC190Sの両方とも最初により高い分子量の種を形成する。これらの突然変異タンパク質(ムテイン)は、タンパク質の収率および移動において同じ変化を有し、このことは、それらが天然のMGD-CSFにおいてお互いに対であることを示唆する。C176SおよびC178Sは、移動において同じわずかな減少を示し、このことは、それらが、天然のMGD-CSFにおいてお互いに対であり得ることを示唆する。結局、C198Sは、移動においてより大きい変化を有し、このことは、そのパートナーが、タンパク質配列においてかなり離れて位置するC35であり得ることを示唆する。C167が天然のMGD-CSFにおける唯一の不對システインであると考えられるという事実によって、これはセリンまたはアラニンに変異され得、ここで発現されたタンパク質の収率の改善および回収されたタンパク質産物の異質性の減少が生じる。

【0366】

(実施例9:MGD-CSFは、造血細胞増殖を促進する)

(A.MGD-CSFは、NK細胞増殖を促進する)

マウスNK細胞は、製造業者(Miltenyi Biotechnology Inc., Auburn CA)の指示に従ってNK細胞単離キットを用いてC57BL/6の10週齢の雌性マウスの脾臓から精製した。約30,000個の精製されたNK細胞を、精製されたMGD-CSFと0.01~10μg/mlの濃度でインキュベートした。NK細胞数はCell Titer - Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit(Promega #G7571)を用いて決定した。図9に示されるとおり、5%FBSを含むRPMI中でのインキュベーションの4日後、MGD-CSFは特異的に、NK細胞数の増殖および/または生存を用量依存性の様式で増大した。

【0367】

ヒトNK細胞は、Stanford Blood Center(Palo Alto, CA)から入手した被膜形成細胞において富化された血液から単離して精製した。血液

は、PBSで約1:5に希釈して、Ficoll (Ficoll - Paque Plus, Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) を、各々が25mlの希釈血液を含む複数の50mlの円錐管に添加した(12.5ml/チューブ)。このFicoll/血液混合物を、450×gで30分間遠心分離した。末梢血単核球(PBMC)層を除去し、カルシウムおよびマグネシウムなしでDPBS 1×(Mediatech, Inc., Prince William Co. VA)で洗浄して、1000RPMで10分間ベレットにした。PBMCは、1350 RPMで10分間の遠心分離によってPBS中で3回洗浄して、0.5%ウシ胎仔血清(Gibco (Invitrogen)、Carlsbad CA)および2mMのEDTA (Sigma Aldrich, St. Louis MO)を含む40mlのPBS (PBSFE)中に再懸濁した。

10

【0368】

NK細胞は、製造業者によって推奨されるように、ヒトNK細胞 Isolation Kit II (Miltenyi Biotechnology Inc., Auburn CA)を含むPBMCから濃縮した。この濃縮工程は、autoMACSTM Separator (Miltenyi Biotechnology Inc., Auburn CA)の「枯渇(deplete)」プログラムを利用した;濃縮NK細胞に相当する陰性の画分は、出力ポート「neg1」から収集した。これらの細胞は、1350 RPMで10分間遠心分離した。この細胞ベレットを10%ウシ胎仔血清を含むDMEM中に再懸濁して、 1×10^6 細胞/mlの濃度に希釈した。この細胞を、96ウェルの丸底プレート中で、1ウェルあたり10%のウシ胎仔血清を含む50μlのDMEMに 5×10^4 個の細胞濃度で、7%CO₂の雰囲気中で37℃で4日間、下に記載のコントロールおよび試験因子とともにインキュベートした。

20

【0369】

この方式で調製したヒトNK細胞の増殖に対するコントロールおよび試験因子の効果は、Promega CellTitre Glo Technical Bulletin No. 288 (Promega, Madison WI)に記載されるように、ルシフェラーゼ活性を測定することによるATPの定量に基づいて、培養物中の生存細胞の数を測定することによってスクリーニングアッセイにおいて確認した。定量的な結果は、Lmaxプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale CA)で、室温で1ウェルあたり0.6秒で読み取った。このウェルのATP含量は、プレート後4日間測定した。

30

【0370】

図10に示されるように、MGD-CSFでトランスフェクトされた細胞、およびMGD-CSFクローンの供給源であるクラスター190647由来のプラスミドDNAでトランスフェクトされた細胞由来の馴化培地は、NK細胞生成を刺激した。インターフェロンγ(IFN-γ)、インターロイキン1(IL-1)およびGM-CSFを、インターフェロン陽性のコントロールとして用いた。組み換えインターロイキン15を含む外部の陽性コントロール、および培養培地を含む外部陰性コントロールは、図10の右および左に示す。このスクリーニングアッセイによって、NK細胞の生成を刺激するかおよび/または数を安定化する因子としてMGD-CSFは同定された。この結果は、スクリーニングアッセイの4つの独立した繰り返しでみられた。MGD-CSFは、NK細胞からのサイトカインの産生を一貫して誘導はしない。これは単球細胞の数を増大するかまたは安定化するが、単球細胞からのサイトカインの産生を誘導しなかった。MGD-CSFは、活性化されたT細胞またはB細胞の数に影響しなかった。

40

【0371】

(B. MGD-CSFは造血幹細胞増殖を促進する)

MGD-CSFはまた、培養物中で骨髄CD34⁺造血幹細胞(HSC細胞)(Cambrex, Inc., Baltimore MD)の増殖を刺激した。図11に示されるとおり、MGD-CSFは、用量依存性の様式で増殖を増大した。HSC細胞は、5%熱

50

不活化ウシ胎仔血清 (ATCC) および 10 ng/ml 組み換えヒト幹細胞因子 (SCF)、 10 ng/ml Flt3リガンド (Flt3L) (R&D Systems, Minneapolis MN) を補充された 1 ml / ウェルの RPMI (ATCC) を含有する 12 ウェルの組織培養ディッシュ中で 1 ウェルあたり 2.4×10^4 個の細胞密度で間質なしの条件下で、 $5\% \text{ CO}_2$ インキュベーター中で 37 で 1 ~ 2 週間、培養物中で増殖させ、PBS で洗浄し、 0.5 ml の Versene (Gibco BRL, Gaithersburg MD) で剥がして、再度 PBS で洗浄し、 1 ml の PBS / 0.1% の BSA (Sigma, St. Louis MO) 中で再懸濁して、血球計算器でカウントした。精製された MGD-CSF は、用量依存性の様式でその増殖を 20 ng/ml ~ 500 ng/ml に増大した。MGD-CSF は、幹細胞増殖を M-CSF より大きい程度まで、そして G-CSF および GM-CSF と同様の程度まで誘導した。

10

【0372】

(C. MGD-CSF は、インビトロにおいて骨髓球性の細胞増殖を促進する)

ヒト初代単球を、前に記載された方法 (de Almeida ら、Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 221 ~ 223, 2000) とは改変されたプロトコルを用いて PBMC から精製した。血液からヒト PBMC を単離するために、パフィー・コート を 6 倍容積の PBS 中で希釈し、次いで 50 ml のチューブ中で 20 ml の Ficoll に積層した。このチューブを 2,000 rpm で 22 で 20 分間、遠心分離ブレーキの使用なしに遠心分離した。PBMC 細胞を界面から収集して、PBS を用いて 2 回洗浄し、次いで RPMI 5% FBS 中で再懸濁して、BD Falcon 細胞ストレイナーを通して濾過した。PBMC から初代の未結合単球を精製するために、 6 ml の PBMC 懸濁液 ($70 \sim 120 \times 10^6$ 個の細胞を含む) を、 10 ml の高浸透圧性 Percoll 上に注意深くかつ緩徐に積層した。この細胞を遠心分離ブレーキの使用なしに $580 \times g$ の速度で 15 分間、遠心分離した。境界面の細胞を収集して、 50 ml の RPMI 5% FBS を用いて洗浄した。この精製された単球細胞ペレットを 50 ml の RPMI 5% FBS に再懸濁した。

20

【0373】

単球アッセイは、約 30,000 個の精製された単球を上記のように精製された MGD-CSF とともにインキュベートすることによって行った。5% FBS を有する RPMI 中でのインキュベーションの 4 日後、単球増殖は、Cell Titer - Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega #G7571) を用いて決定した。

30

【0374】

MGD-CSF トランスフェクト 293-T 細胞由来の馴化培地 (MGD-CSF CM) は、単球増殖を促進した。スクリーニングアッセイは、マウス IgG2a によって活性化された単球に対して 96 ウェルプレート形式で二重のプレートで行った。表 6 は、各々のクローンが単球増殖および各々の構築物の発現の程度を刺激するという活性の力価の半定量的な記述を示す。MGD-CSF CM は、GM-CSF とほぼ同じ程度まで単球増殖を刺激した。結果は、培地から少なくとも 2 標準偏差の場合、有意であるとみなした。観察された ED_{50} は $3 \sim 5 \text{ ng/ml}$ であった。変異 MGD-CSF タンパク質もこのアッセイで試験した。変異クローン CLN00848185 は、野性型タンパク質に匹敵する活性 (力価) を実証し、そして他の変異クローンは、野性型タンパク質よりもわずかに低い活性を有し、そのことは、いくつかの変異タンパク質が治療タンパク質として用いられ得ることを示唆する。

40

【0375】

図 12A に示されるとおり、単球増殖に対する MGD-CSF CM の刺激性効果は、10,000 倍の範囲にわたって用量依存性であった。試験した MGD-CSF CM の最低用量 $0.01 \mu\text{l}$ は、単球増殖に有意な影響を有さなかった。 $0.1 \mu\text{l}$ への MGD-CSF CM の用量の 10 倍の増大によって、コントロールに比較して有意なレベルへの細胞増殖が誘導された。 $1 \mu\text{l}$ の MGD-CSF CM および $10 \mu\text{l}$ の MGD-CS

50

F C Mへの用量のさらなる増大は、単球増殖を用量依存性の様式でさらに増大した。空のベクターでも陰性のコントロールC L N 0 0 3 7 3 2またはF P T 0 2 6でも用量依存性は観察されなかった。刺激陽性のコントロールであるG M - C S Fの1 0 n g / m lの単独用量の効果が示され、同様に陰性のコントロールI L - 1 0の効果および非馴化培地の効果が示される。

【0376】

図12Bに示されるとおり、精製されたG M - C S FおよびM G D - C S Fでトランスフェクトされた細胞由来の馴化培地は両方とも、ヒト単球増殖を刺激した。従って、M G D - C S Fは、骨髓性細胞および顆粒球の分化および増殖におけるその役割に加えて、単球増殖のアゴニストとして機能する。これは、ガン患者における化学療法または放射線療法および骨髓移植後の造血細胞の回復を強化するための造血因子として用いられ得る。

10

【0377】

(D. M G D - C S Fは、インビボにおいて造血細胞増殖を促進する)

インビボにおけるM G D - C S Fの役割を理解するため、C 5 7 B L 6マウスに、W a n gら、C a n c e r R e s . 6 3 : 9 0 1 6 ~ 9 0 2 2 , 2 0 0 3によって記載される方法を用いて、M G D - C S FプラスミドDNAを注射した。ヒトチトクロムP 4 5 0 3 A 4プロモーターを、M G D - C S Fのヌクレオチド配列を有する核酸分子に対して作動可能に連結して、マウスの尾静脈に注射してマウスの肝臓をM G D - C S Fでトランスフェクトした。ヒト3 A 4プロモーターを用いて、マウス肝臓におけるM G D - C S Fの発現を駆動した。完全血球算定(c o m p l e t e b l o o d c o u n t) (C B C) および異なる分析は、S e r o n o B a k e r 9 0 0 0血液学分析計を用い各々の2つの独立した実験においてコントロール群および実験群で行なった。

20

【0378】

第一の実験におけるコントロール群(表7A、動物1~3)は、実験マウスに年齢適合した3匹の注射していないマウスからなった。第一の実験における実験群(表7A、動物4~6)は、尾静脈を介して裸のM G D - C S F D N Aを注射された3匹のマウスからなった。血液サンプルは注射の14日後収集した。表7Aに示されるとおり、注射されたマウスは、コントロールに比較して上昇した単球カウントを有した。コントロール動物1、2および3は、それぞれ血液1 μ lあたり94、84および52個の単球を有した。実験動物4および6は、それぞれ血液1 μ lあたり216および268個の単球を有した。動物3では意味のある単球カウントは得られなかった。

30

【0379】

第二の実験におけるコントロール群(表7B、動物1~6)は、実験マウスに年齢適合し、L a c Z構築物を尾静脈を介して注射した6匹のマウスからなった。第二の実験における実験群(表7B、動物7~12)は、尾静脈を介して裸のM G D - C S F D N Aを注射された6匹のマウスからなった。血液サンプルは注射の21日後収集した。表7Bに示されるとおり、注射されたマウスは、コントロールに比較して上昇した単球カウントを有した。検出可能な単球レベルを有したコントロール動物はいなかった。6匹の実験動物のうち4匹は、1 μ lあたり50~78個の単球におよぶ検出可能な単球レベルを有した。これらの結果によって、M G D - C S Fは、インビボで骨髓細胞数を増大したことが実証される。

40

【0380】

(実施例10:造血性分化に対するM G D - C S Fの影響のF A C S分析)

インビトロの顆粒球、単球および樹状細胞発達アッセイによってさらに、造血におけるM G D - C S Fの機能が明らかになる。ヒト骨髓C D 3 4 +造血幹細胞(H S C細胞)(C a m b r e x , I n c . , B a l t i m o r e M D)を上記のように培養した。

【0381】

分化は、顆粒球細胞表面上の種々のマーカーを検出するために蛍光標識した抗体を用いる蛍光活性化細胞選別装置(F A C S)分析によって確認した(K a v a t h a sら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 8 0 : 5 2 4 ~ 5 2 8 (1 9 8 3))。M G D -

50

C S F、G - C S F、G M - C S FまたはM - C S Fの有無のいずれかでの1週の培養後、B M C D 3 4 ⁺細胞をP B Sで1回洗浄して、0.5 mlのV e r s e n e (G i b c o B R L、G A i t h e r s b u r g M D)で剥がし、1 ml P B S / 0.1 % B S A (S i g m a、S t . L o u i s M O)で洗浄して、0.2 mlのP B S / 0.1 % B S A (S i g m a、S t . L o u i s M O)中に再懸濁して、F A C S染色のための96ウェルのプレート中にアリコートした(1ウェルあたり50 μ l)。細胞を、蛍光結合抗体を用いて15分間4℃でインキュベートした。150 μ lのP B S / 0.1 % B S Aで2回の洗浄後、細胞を、製造業者(B a c t o n D i c k i n s o n、F r a n k l i n L a k e s N J)の指示に従ってF A C S C a l i b u rで分析した。10 ng / mlのG - C S F、10 ng / mlのM - C S Fまたは30 ng / mlのG M - C S F (R & D S y s t e m s、M i n n e a p o l i s M N由来)が、公知の増殖因子の効果の陽性コントロールとして機能した。顆粒球、単球または樹状細胞系列の特定の表面マーカーに特異的な蛍光標識化抗体をB D B i o s c i e n c e s (S a n J o s e、C A)から購入して、顆粒球、単球および樹状細胞の系列へのH S C細胞の分化に対するM G D - C S Fの効果を確認するために用いた。

10

20

30

40

50

【0382】

(A. 顆粒球分化)

図13に示されるとおり、M G D - C S Fは、未分化の細胞から異なるマーカーC D 6 7 ⁺およびC D 2 4 ⁺を保有する分化した顆粒球への顆粒球の分化を刺激した。陰性コントロールとして、空のベクターの存在下およびサイトカインの非存在下における顆粒球分化のベースラインのレベルは、1.2 %であることが測定された。陽性のコントロールであるG - C S Fは、顆粒球の55 %を分化するように刺激した。M G D - C S F C Mは、顆粒球の41 %を分化するように刺激した(矢印)。M G D - C S Fの効果は、G - C S Fの効果と相乗的であって、両方の存在下では、顆粒球の64 %が分化するように刺激された。

【0383】

C D 2 4およびC D 1 5抗体を用いて、顆粒球分化をモニターした。C D 2 4抗体は、B細胞および顆粒球の表面上で発現された35 ~ 45 k D aの2鎖糖タンパク質と反応した。C D 1 5抗体は、X - h a p t e nとしても公知の220 k D aの炭水化物構造である、3 - フコシル - N - アセチルラクトサミン(3 - F A L)と反応した。3 - F A Lは、好中球および好酸球を含む試験された顆粒球のうち95 %で、そして単球では種々の程度まで発現されたが、リンパ球または好塩基球では発現されなかった。C D 1 5は、食作用、殺菌活性および走化性を媒介する役割を果たす。C D 2 4およびC D 1 5の両方が陽性の細胞は、B M C D 3 4 ⁺造血前駆細胞から分化した顆粒球に相当する。

【0384】

図14に示されるように、20 ng / mlおよび100 ng / mlのM G D - C S Fは、C D 1 5 ⁺ / C D 2 4 ⁺顆粒球へ3 %分化を誘導し、500 ng / mlのM G D - C S Fは、C D 1 5 ⁺ / C D 2 4 ⁺顆粒球へ8 %分化を誘導した。陽性のコントロールG - C S FおよびG M - C S Fの両方とも、骨髓C D 3 4 ⁺細胞のうち12 %をC D 1 5 / C D 2 4陽性の顆粒球へと分化するように誘導した。

【0385】

(B. 単球分化)

図15に示されるとおり、M G D - C S Fは、未分化の細胞からC D 1 4 ⁺マーカーを保有する分化した単球への単球の分化を刺激した。陰性コントロールとして、空のベクターの存在下およびサイトカインの非存在下における単球分化のベースラインのレベルは、24 %であることが測定された。G M - C S Fは、単球の20 %を分化するように刺激した。M G D - C S Fは、単球の45 %を分化するように刺激した(矢印)。G M - C S F単独では、これらの細胞に影響は有さなかったが、M G D - C S Fと組み合わせた場合、その効果は相乗的であった；両方の存在下では、単球の55 %が分化するように刺激された。

【0386】

図16に示されるように、CD14およびCD16抗体を用いて、単球分化をモニターした。CD14抗体は、単球の上で高レベルで発現された53~55kDのグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)-固定単鎖糖タンパク質と反応した。さらにCD14抗体は、ある程度のマクロファージと反応した。CD16抗体は、50~65kDaの膜貫通型のIgG Fcレセプター(FcγRIII)と反応した。CD16抗原は、単球、マクロファージ、顆粒球およびNK細胞上で発現された。単球は、そのCD16発現に応じて2つのサブセットに分割され得る；常在性の単球はCD⁺CD16⁻であって、炎症性の単球はCD14^{low}CD16⁺である。20ng/mlのMGD-CSFは、CD14⁺CD16⁻またはCF14^{low}CD16⁺単球のいずれかへ、分化を30%を、100ng/mlのMGD-CSFは分化を30%、そして500ng/mlは分化を53%誘導した。陽性コントロールG-CSF、GM-CSFおよびM-CSFは、それぞれCD14分化を41%、38%および51%促進した。

10

【0387】

(C. 樹状細胞分化)

図17に示されるように、MGD-CSFは、未分化の細胞からCD86およびCD1マーカーを保有する分化した樹状細胞への樹状細胞の分化を刺激した。陰性コントロールとして、空のベクターの存在下における樹状細胞分化のベースラインのレベルは、4%であることが測定された。MGD-CSFは、未分化細胞の22%を樹状細胞に分化するように刺激した。

20

【0388】

(実施例11: MGD-CSFは、骨髓コロニー形成を促進する)

ヒト骨髓由来骨髓球(CFU-G、CFU-MおよびCFU-GM)前駆体増殖に対するMGD-CSFの刺激性の効果を評価するために、コロニー形成アッセイを行った。骨髓前駆体の刺激のための陽性コントロールは、G-CSFの0.1ng/ml、1ng/mlおよび10ng/mlならびにGM-CSFの0.01ng/ml、0.1μg/mlおよび3ng/mlの添加であった。MGD-CSFタンパク質は、各々の試験濃度のメチルセルロースベースの培地中に20、100および500ng/mlという最終濃度に希釈された。各々の3つの複製培養物が3×10⁴個の細胞を含むように細胞を添加した。複製培養物は、37℃、5%CO₂で14日間インキュベートし、次いで、カウントして、写真に撮り、CFU-G、CFU-MまたはCFU-GMとしての形態に基づいて分類し、そしてFACS分析を行った。統計学的分析を行って、コロニーの数、サイズおよび形態の変化を評価した。MGD-CSFは、CFU-G、CFU-M、CFU-GMの形成、および総コロニー形成を促進した。さらに、下記にさらに記載されるとおり、MGD-CSFは、G-CSFまたはGM-CSFによって促進されるのとは異なる大きいCFU-Mコロニーを促進した。これらの結果によって、MGD-CSFは初期の造血前駆体形成を増強したことが示唆される。

30

【0389】

図18Aおよび図18Bは、外因性のサイトカインの非存在下でのヒト骨髓コロニー形成に対するMGD-CSFの効果を示す。図18Aに示されるとおり、精製されたMGD-CSFは、G-CSFおよびGM-CSFに比較して顆粒球コロニー形成(CFU-G)にほとんど影響を有さなかった。MGD-CSFは、用量依存性の様式で単球コロニー形成(CFU-M)を刺激した。図18Bに示されるとおり、MGD-CSFは、顆粒球-単球コロニー形成CFU-GMを用量依存性の様式で刺激した。MGD-CSFはまた、総コロニー形成能(colony forming capacity)(CFC)を用量依存性の様式で刺激した。図18Cは、サイトカインIL-3および幹細胞因子(SCF)の存在下におけるヒト骨髓コロニー形成に対するMGD-CSFの効果を示す。それらの条件下で、精製したMGD-CSFは、CFU-G、CFU-GM、CFU-Mおよび総CFCを用量依存性の様式で刺激した。MGD-CSFの存在下における骨髓前駆体の分布は、G-CSFまたはGM-CSFのものとは異なった。

40

50

【0390】

(実施例12: MGD-CSFの生物学的活性のプロフィール)

図19に示されるとおり、MGD-CSFを、非活性化B細胞増殖(BPro4)、脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する能力(Gu2Gy3T3)、不活性化単球増殖(MonPro4)、NK細胞増殖および/または生存(NKGl0)、T細胞増殖(TPro4)、活性化初代B細胞増殖(aBPro4)、活性化初代単球増殖(aMonPro3)、および活性化初代T細胞増殖(aTPro4)を測定するアッセイにおいて、その生物学的効果について、試験した。結果は、中央値から少なくとも2標準偏差の場合、有意であるとみなした。MGD-CSFは、活性化された単球の増殖を刺激することも、活性化または不活性化されたB細胞またはT細胞の増殖を刺激することも無く、NK細胞および不活性化単球の増殖を特異的に刺激した。

10

【0391】

(実施例13: MGD-CSF誘導性サイトカイン分泌のプロフィール)

図20に示されるとおり、MGD-CSFを、NK細胞からのサイトカイン分泌に対するその生物学的効果について試験した。実施例11に記載されるとおりにアッセイを行った。製造業者の指示に従って、Lincoc, Inc. (St. Charles, MO)のLuminexサイトカインアッセイキットを用いてサイトカイン分泌のタイプおよび量を決定するために、実験の終わりに馴化培地を取り出した。結果は、中央値から少なくとも2標準偏差の場合、有意であるとみなした。MGD-CSFは、GM-CSF、IL-12およびIL-13の分泌を刺激した。

20

【0392】

(実施例14: MGD-CSFは、HSC細胞からのCFU-M分化を刺激した)

MGD-CSFは、ヒト骨髓細胞から形成された骨髓コロニーのサイズおよび数を用量依存性の様式で増大した。図21の上の左のパネルは、サイトカインの非存在下(緩衝液)で培養した骨髓細胞において観察されたCFU-Mコロニーの代表的な写真を示す。コロニー形成の証拠は弱いかまたは存在しない。上の真ん中のパネルは、GM-CSFによって誘導されたCFU-Mコロニーの代表的な写真を示す;コロニー形成は明らかであった。上の右側のパネルは、G-CSFがCFU-M形成を刺激しないことを示す代表的な写真を示す。図16の下3つのパネルは、MGD-CSFによって誘導されるCFU-Mの代表的な写真を示す。数およびサイズの両方とも20ng/ml~500ng/mlのMGD-CSFで用量依存性の様式で増大した。細胞は、40×のレンズを用いてAxiovert25顕微鏡およびAxioCam HRC(両方ともCarl Zeiss, Göttingen, Germany)で検査して写真を撮った。細胞は、Zeiss KS300 3.0デジタル画像化システムで可視化した。

30

【0393】

MGD-CSFによって誘導されたコロニーのサイズは、GM-CSFによって誘導されたコロニーのサイズより大きかった。MGD-CSFによって誘導されたコロニーの約10%が極めて大きく、100~2000ミクロンの範囲であった。MGD-CSFは、サイトカインSCFおよびIL-3の存在下および非存在下の両方においてこれらの大きいコロニーを誘導した。これらのデータによって、MGD-CSFは、GM-CSFまたはG-CSFよりも早期の前駆体を含む、初期の骨髓前駆体の形成を促進したことが示される。それらによってまた、MGD-CSFが、M1もしくはM2マクロファージ系列のいずれかまたは両方の分化を促進することが示唆される。

40

【0394】

(実施例15: MGD-CSFは、樹状細胞へHSC分化を刺激した)

ヒト骨髓CD34+細胞(Cambrex, Inc., Baltimore MD)を、24ウェル細胞培養プレート上で無血清X-ビボ20培地(Cambrex, Inc., Baltimore MD)中にプレートして、ベクターコントロールの馴化培地(CM)またはMGD-CSF CMで処理した。その細胞を、40×のレンズを用いてAxiovert25顕微鏡およびAxioCam HRC(両方ともCarl Zeiss

50

, G o t t i n g e n , G e r m a n y) で検査して写真に撮った。細胞は、Z e i s s K S 3 0 0 3 . 0 デジタル画像化システムで可視化した。

【 0 3 9 5 】

図 2 2 に示されるとおり、M G D - C S F 濃度の増大につれて M G D - C S F 処理した培養物中で細長い細胞の数の増大が観察された。抗 C D 1 a 抗体を用いて、樹状細胞への分化を確認した。M G D - C S F を用いた 2 週間の培養物の処置によって、ヒト骨髓 C D 3 4 + のうち 2 0 % の C D 1 陽性樹状細胞への分化が誘導された。M G D - C S F は、用量依存性の様式でヒト骨髓細胞から樹状細胞の分化を誘導した (図 2 2) 。 4 つのパネル全部における示された細胞は、4 0 × のレンズを用いて A x i o v e r t 2 5 顕微鏡および A x i o C a m H R c (両方とも C a r l Z e i s s , G o t t i n g e n , G e r m a n y) で検査して写真に撮った。細胞は、Z e i s s K S 3 0 0 3 . 0 デジタル画像化システムで可視化した。

10

【 0 3 9 6 】

図 2 2 の上の左のパネルは、サイトカインの非存在下 (培地) で培養した骨髓細胞の代表的な写真を示す。細胞は代表的には小さく丸くなっている。上の右側のパネルは、2 0 m g / m l の M G D - C S F に応答して、樹状細胞にさらに緊密に似るように細長くかつ平板化している骨髓細胞の代表的な写真を示す。下の左側のパネルは、1 0 0 n g / m l という高用量の M G D - C S F では、H S C 細胞の形態にさらに顕著な効果を有することを実証する代表的な写真を示す。この細胞はより大きくかつ細長い。下の右側のパネルは、5 0 0 n g / m l という濃度の M G D - C S F では、樹状細胞の形態的な外観を有する大きく、平坦で、細長い細胞が生じることを示す。

20

【 0 3 9 7 】

(実施例 1 6 : M G D - C S F 遺伝子発現)

種々のレベルの遺伝子発現を、プローブ 2 3 7 0 4 6 _ x _ a t を用い A f f y m e t r i x G e n e C h i p (登録商標) アレイプラットフォーム、H u m a n G e n o m a U 1 3 3 および U 1 3 3 P l u s _ 2 (A f f y m e t r i x , I n c , S a n t a C l a r a , C A) を用いて、G e n e L o g i c の独自の腫瘍学データベースを問い合わせることによって、個々のヒトガン組織標本において比較した。これはまた、プローブ P R B 1 0 7 3 8 6 および P R B 1 0 7 3 8 6 _ a t . を用い F i v e P r i m e T h e r a p e u t i c s , によって設計されたマイクロアレイチップを問い合わせることによって比較した。これらのプローブを用いて、過剰増殖性の血液学的異常を有する患者の組織における M G D - C S F の発現を確認した。この分析によって、異なる組織タイプと異なる組織段階との間の異なる遺伝子発現パターンを同定した。表 8 、第 3 列は、M G C 3 4 6 4 7 の存在について陽性 (M G C 3 4 6 4 7 陽性) と試験された疾患標本の数挙げる。表 8 の第 4 列は、検査された標本の数 (T o t a l G e n e L o g i c) を挙げる。M G D - C S F は、ほとんどの骨髓異形成症候群の患者で発現された。M G D - C S F を発現する患者の割合は、観察された病理で変化し、そして過剰な芽細胞または環状の鉄芽細胞を有する難治性貧血を有する患者で最高であった。急性 B 細胞リンパ球芽性白血病を有する患者の半分以上が M G D - C S F を発現した。急性骨髓性白血病を有する患者のあるサブセットが M G D - C S F を発現した。この割合は、疾患の病理学的な症状次第で 1 4 ~ 2 5 % の間で変化した。M G D - C S F は一般に、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ球性白血病、または急性前骨髓球性白血病を有する患者では発現されなかった。

30

40

【 0 3 9 8 】

(配列表)

本出願は、配列表送付シートおよび紙の形式の配列表を添付する。

【 0 3 9 9 】

【表 1】

表

表 1. 配列番号 1-271

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源ID	タイプ
HG1015544	配列番号 1	配列番号 7		CLN00542945	
HG1015545	配列番号 2	配列番号 8		CLN00542945 エキソン 4	
HG1015596	配列番号 3	配列番号 9		CLN00542945 成熟ペプチド	
HG1015546	配列番号 4	配列番号 10	配列番号 13	NP 689669	
HG1015597	配列番号 5	配列番号 11		CLN00542945 フラグメント	
HG1019016	配列番号 6	配列番号 12		NP 689669 フラグメント	
HG1018265		配列番号 14		コラーゲン リーダー配列	リーダー配列
HG1018268		配列番号 15		112907:21594845 1-17	HMM SP リーダー配列
HG1018269		配列番号 16		112907:21594845 1-13	リーダー配列
HG1018270		配列番号 17		112907:21594845 1-19	リーダー配列
HG1018271		配列番号 18		112907:21594845 1-16	リーダー配列
HG1018272		配列番号 19		112907:21594845 1-15	リーダー配列
HG1018274		配列番号 20		13325208:13325207 1-30	HMM SP
HG1018275		配列番号 21		13325208:13325207 1-25	リーダー配列
HG1018276		配列番号 22		13325208:13325207 1-33	リーダー配列
HG1018277		配列番号 23		13325208:13325207 1-24	リーダー配列
HG1018278		配列番号 24		13325208:13325207 1-26	リーダー配列
HG1018279		配列番号 25		13325208:13325207 1-32	リーダー配列
HG1018280		配列番号 26		13325208:13325207 1-27	リーダー配列
HG1018281		配列番号 27		13325208:13325207 1-23	リーダー配列
HG1018282		配列番号 28		13325208:13325207 1-35	リーダー配列
HG1018284		配列番号 29		13938307:13938306 1-24	HMM SP リーダー配列
HG1018285		配列番号 30		13938307:13938306 1-21	リーダー配列
HG1018287		配列番号 31		14718453:14718452 1-19	HMM SP リーダー配列
HG1018288		配列		14718453:14718452 1-15	リーダー配列

10

20

30

40

【 0 4 0 0 】

【表 2】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
		番号32			
HG1018289		配列番号 33		14718453:14718452_1-17	リーダー配列
HG1018291		配列番号 34		15929966:15929965_1-23	HMM SP リーダー配列
HG1018293		配列番号 35		16356651:16356650_1-21	リーダー配列
HG1018294		配列番号 36		16356651:16356650_1-17	リーダー配列
HG1018296		配列番号 37		18204192:18204191_1-19	HMM SP リーダー配列
HG1018297		配列番号 38		18204192:18204191_1-22	リーダー配列
HG1018298		配列番号 39		18204192:18204191_1-18	リーダー配列
HG1018299		配列番号 40		18204192:18204191_1-16	リーダー配列
HG1018300		配列番号 41		18204192:18204191_1-14	リーダー配列
HG1018302		配列番号 42		23503038:15778555_1-20	リーダー配列
HG1018303		配列番号 43		23503038:15778555_1-16	リーダー配列
HG1018304		配列番号 44		23503038:15778555_1-21	リーダー配列
HG1018306		配列番号 45		27479535:27479534_1-24	HMM SP リーダー配列
HG1018307		配列番号 46		27479535:27479534_1-20	リーダー配列
HG1018308		配列番号 47		27479535:27479534_1-26	リーダー配列
HG1018309		配列番号 48		27479535:27479534_1-21	リーダー配列
HG1018310		配列番号 49		27479535:27479534_1-23	リーダー配列
HG1018312		配列番号 50		37182960:37182959_1-24	HMM SP リーダー配列
HG1018313		配列番号 51		37182960:37182959_1-19	リーダー配列
HG1018314		配列番号 52		37182960:37182959_1-22	リーダー配列
HG1018315		配列番号 53		37182960:37182959_1-20	リーダー配列
HG1018316		配列番号 54		37182960:37182959_1-26	リーダー配列
HG1018317		配列番号 55		37182960:37182959_1-21	リーダー配列
HG1018319		配列番号 56		7437388:1208426_1-24	HMM SP リーダー配列
HG1018320		配列番号 57		7437388:1208426_1-23	リーダー配列
HG1018322		配列番号 58		NP_000286:NM_000295_1-24	HMM SP リーダー配列

10

20

30

40

【表 3】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
HG1018323		配列番号 59		NP_000286 :NM_000295 1-18	リーダー配列
HG1018324		配列番号 60		NP_000286 :NM_000295 1-23	リーダー配列
HG1018325		配列番号 61		NP_000286 :NM_000295 1-17	リーダー配列
HG1018327		配列番号 62		NP_000396 :NM_000405 1-23	HMM SP
HG1018328		配列番号 63		NP_000396 :NM_000405 1-18	リーダー配列
HG1018329		配列番号 64		NP_000396 :NM_000405 1-25	リーダー配列
HG1018330		配列番号 65		NP_000396 :NM_000405 1-20	リーダー配列
HG1018331		配列番号 66		NP_000396 :NM_000405 1-21	リーダー配列
HG1018333		配列番号 67		NP_000495 :NM_000504 1-23	HMM SP リーダー配列
HG1018334		配列番号 68		NP_000495:NM_000504 1-19	リーダー配列
HG1018335		配列番号 69		NP_000495 :NM_000504 1-20	リーダー配列
HG1018336		配列番号 70		NP_000495 :NM_000504 1-15	リーダー配列
HG1018337		配列番号 71		NP_000495 :NM_000504 1-21	リーダー配列
HG1018338		配列番号 72		NP_000495 :NM_000504 1-17	リーダー配列
HG1018340		配列番号 73		NP_000573 :NM_000582 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018341		配列番号 74		NP_000573 :NM_000582 1-16	リーダー配列
HG1018342		配列番号 75		NP_000573 :NM_000582 1-15	リーダー配列
HG1018344		配列番号 76		NP_000574 :NM_000583 1-16	HMM SP リーダー配列
HG1018345		配列番号 77		NP_000574 :NM_000583 1-14	リーダー配列
HG1018347		配列番号 78		NP_000591 :NM_000600 1-25	HMM SP リーダー配列
HG1018348		配列番号 79		NP_000591 :NM_000600 1-24	リーダー配列
HG1018349		配列番号 80		NP_000591 :NM_000600 1-27	リーダー配列
HG1018351		配列番号 81		NP_000598 :NM_000607 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018353		配列番号 82		NP_000604 :NM_000613 1-19	リーダー配列
HG1018354		配列番号 83		NP_000604 :NM_000613 1-25	リーダー配列
HG1018355		配列番号 84		NP_000604 :NM_000613 1-21	リーダー配列
HG1018356		配列		NP_000604	リーダー配列

10

20

30

40

【表 4】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
		番号 85		:NM 000613 1-23	
HG1018357		配列番号 86		NP_000604 :NM 000613 1-31	
HG1018359		配列番号 87		NP_000726 :NM 000735 1-26	HMM SP リーダー配列
HG1018360		配列番号 88		NP_000726 :NM 000735 1-24	リーダー配列
HG1018362		配列番号 89		NP_000884 :NM 000893 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018363		配列番号 90		NP_000884 :NM 000893 1-19	リーダー配列
HG1018364		配列番号 91		NP_000884 :NM 000893 1-16	リーダー配列
HG1018365		配列番号 92		NP_000884 :NM 000893 1-23	リーダー配列
HG1018367		配列番号 93		NP_000909 :NM 000918 1-17	HMM SP リーダー配列
HG1018369		配列番号 94		NP_000930 :NM 000939 1-23	HMM SP リーダー配列
HG1018370		配列番号 95		NP_000930 :NM 000939 1-26	リーダー配列
HG1018372		配列番号 96		NP_000945 :NM 000954 1-23	HMM SP リーダー配列
HG1018373		配列番号 97		NP_000945 :NM 000954 1-22	リーダー配列
HG1018374		配列番号 98		NP_000945 :NM 000954 1-18	リーダー配列
HG1018376		配列番号 99		NP_001176 :NM 001185 1-18	リーダー配列
HG1018377		配列番号 100		NP_001176 :NM 001185 1-20	リーダー配列
HG1018378		配列番号 101		NP_001176 :NM 001185 1-21	リーダー配列
HG1018379		配列番号 102		NP_001176 :NM 001185 1-17	リーダー配列
HG1018381		配列番号 103		NP_001266 :NM 001275 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018382		配列番号 104		NP_001266 :NM 001275 1-15	リーダー配列
HG1018383		配列番号 105		NP_001266 :NM 001275 1-14	リーダー配列
HG1018385		配列番号 106		NP_001314 :NM 001323 1-26	HMM SP リーダー配列
HG1018386		配列番号 107		NP_001314 :NM 001323 1-18	リーダー配列
HG1018387		配列番号 108		NP_001314 :NM 001323 1-20	リーダー配列
HG1018388		配列番号 109		NP_001314 :NM 001323 1-28	リーダー配列
HG1018389		配列番号 110		NP_001314 :NM 001323 1-21	リーダー配列
HG1018390		配列番号 111		NP_001314 :NM 001323 1-23	リーダー配列

10

20

30

40

【表 5】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
HG1018392		配列番号 112		NP_001822 :NM_001831 1-22	リーダー配列
HG1018393		配列番号 113		NP_001822 :NM_001831 1-18	リーダー配列
HG1018394		配列番号 114		NP_001822 :NM_001831 1-14	リーダー配列
HG1018396		配列番号 115		NP_002206 :NM_002215 1-24	リーダー配列
HG1018397		配列番号 116		NP_002206 :NM_002215 1-29	リーダー配列
HG1018398		配列番号 117		NP_002206 :NM_002215 1-30	リーダー配列
HG1018399		配列番号 118		NP_002206 :NM_002215 1-23	リーダー配列
HG1018400		配列番号 119		NP_002206 :NM_002215 1-31	リーダー配列
HG1018402		配列番号 120		NP_002300 :NM_002309 1-22	HMM SP リーダー配列
HG1018403		配列番号 121		NP_002300 :NM_002309 1-23	リーダー配列
HG1018405		配列番号 122		NP_002336 :NM_002345 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018406		配列番号 123		NP_002336 :NM_002345 1-15	リーダー配列
HG1018407		配列番号 124		NP_002336 :NM_002345 1-17	リーダー配列
HG1018408		配列番号 125		NP_002336 :NM_002345 1-14	リーダー配列
HG1018410		配列番号 126		NP_002402 :NM_002411 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018412		配列番号 127		NP_002505 :NM_002514 1-30	HMM SP リーダー配列
HG1018413		配列番号 128		NP_002505 :NM_002514 1-32	リーダー配列
HG1018414		配列番号 129		NP_002505 :NM_002514 1-28	リーダー配列
HG1018415		配列番号 130		NP_002505 :NM_002514 1-27	リーダー配列
HG1018416		配列番号 131		NP_002505 :NM_002514 1-31	リーダー配列
HG1018418		配列番号 132		NP_002892 :NM_002901 1-26	HMM SP リーダー配列
HG1018419		配列番号 133		NP_002892 :NM_002901 1-22	リーダー配列
HG1018420		配列番号 134		NP_002892 :NM_002901 1-29	リーダー配列
HG1018421		配列番号 135		NP_002892 :NM_002901 1-24	リーダー配列
HG1018422		配列番号 136		NP_002892 :NM_002901 1-23	リーダー配列
HG1018424		配列番号 137		NP_002893 :NM_002902 1-25	HMM SP リーダー配列
HG1018425		配列		NP_002893	リーダー配列

【 0 4 0 4 】

【表 6】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
		番号 138		:NM 002902 1-19	
HG1018426		配列番号 139		NP_002893 :NM 002902 1-22	リーダー配列
HG1018427		配列番号 140		NP_002893 :NM 002902 1-18	リーダー配列
HG1018428		配列番号 141		NP_002893 :NM 002902 1-20	リーダー配列
HG1018429		配列番号 142		NP_002893 :NM 002902 1-21	リーダー配列
HG1018430		配列番号 143		NP_002893 :NM 002902 1-23	リーダー配列
HG1018432		配列番号 144		NP_005133 :NM 005142 1-19	HMM SP リーダー配列
HG1018433		配列番号 145		NP_005133 :NM 005142 1-18	リーダー配列
HG1018434		配列番号 146		NP_005133 :NM 005142 1-20	リーダー配列
HG1018435		配列番号 147		NP_005133 :NM 005142 1-24	リーダー配列
HG1018436		配列番号 148		NP_005133 :NM 005142 1-16	リーダー配列
HG1018437		配列番号 149		NP_005133 :NM 005142 1-17	リーダー配列
HG1018438		配列番号 150		NP_005133 :NM 005142 1-14	リーダー配列
HG1018440		配列番号 151		NP_005445 :NM 005454 1-17	HMM SP リーダー配列
HG1018442		配列番号 152		NP_005555 :NM 005564 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018443		配列番号 153		NP_005555 :NM 005564 1-20	リーダー配列
HG1018444		配列番号 154		NP_005555 :NM 005564 1-15	リーダー配列
HG1018446		配列番号 155		NP_005690 :NM 005699 1-29	HMM SP リーダー配列
HG1018447		配列番号 156		NP_005690 :NM 005699 1-24	リーダー配列
HG1018448		配列番号 157		NP_005690 :NM 005699 1-28	リーダー配列
HG1018450		配列番号 158		NP_006560 :NM 006569 1-19	HMM SP リーダー配列
HG1018451		配列番号 159		NP_006560 :NM 006569 1-18	リーダー配列
HG1018452		配列番号 160		NP_006560 :NM 006569 1-21	リーダー配列
HG1018454		配列番号 161		NP_006856 :NM 006865 1-15	HMM SP リーダー配列
HG1018456		配列番号 162		NP_036577 :NM 012445 1-26	HMM SP リーダー配列
HG1018457		配列番号 163		NP_036577 :NM 012445 1-25	リーダー配列
HG1018458		配列番号 164		NP_036577 :NM 012445 1-24	リーダー配列

10

20

30

40

【表 7】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
HG1018459		配列番号 165		NP_036577 :NM_012445 1-28	リーダー配列
HG1018461		配列番号 166		NP_055070 :NM_014255 1-20	HMM SP リーダー配列
HG1018462		配列番号 167		NP_055070 :NM_014255 1-18	リーダー配列
HG1018463		配列番号 168		NP_055070 :NM_014255 1-16	リーダー配列
HG1018465		配列番号 169		NP_055582 :NM_014767 1-24	HMM SP リーダー配列
HG1018466		配列番号 170		NP_055582 :NM_014767 1-19	リーダー配列
HG1018467		配列番号 171		NP_055582 :NM_014767 1-22	リーダー配列
HG1018468		配列番号 172		NP_055582 :NM_014767 1-20	リーダー配列
HG1018469		配列番号 173		NP_055582 :NM_014767 1-26	リーダー配列
HG1018470		配列番号 174		NP_055582 :NM_014767 1-21	リーダー配列
HG1018472		配列番号 175		NP_055697 :NM_014882 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018474		配列番号 176		NP_056965 :NM_015881 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018475		配列番号 177		NP_056965 :NM_015881 1-19	リーダー配列
HG1018476		配列番号 178		NP_056965 :NM_015881 1-22	リーダー配列
HG1018477		配列番号 179		NP_056965 :NM_015881 1-16	リーダー配列
HG1018478		配列番号 180		NP_056965 :NM_015881 1-21	リーダー配列
HG1018480		配列番号 181		NP_057603 :NM_016519 1-26	リーダー配列
HG1018481		配列番号 182		NP_057603 :NM_016519 1-28	リーダー配列
HG1018483		配列番号 183		NP_149439 :NM_033183 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018484		配列番号 184		NP_149439 :NM_033183 1-20	リーダー配列
HG1018485		配列番号 185		NP_149439 :NM_033183 1-16	リーダー配列
HG1018487		配列番号 186		NP_644808 :NM_139279 1-18	リーダー配列
HG1018488		配列番号 187		NP_644808 :NM_139279 1-20	リーダー配列
HG1018489		配列番号 188		NP_644808 :NM_139279 1-26	リーダー配列
HG1018490		配列番号 189		NP_644808 :NM_139279 1-23	リーダー配列
HG1018492		配列番号 190		NP_660295 :NM_145252 1-13	リーダー配列
HG1018493		配列		NP_660295	リーダー配列

10

20

30

40

【表 8】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
		番号191		:NM 145252 1-16	
HG1018494		配列番号 192		NP_660295 :NM 145252 1-14	リーダー配列
HG1018495		配列番号 193		NP_660295 :NM 145252 1-17	リーダー配列
HG1018497		配列番号 194		NP_689534 :NM 152321 1-25	HMM SP リーダー配列
HG1018498		配列番号 195		NP_689534 :NM 152321 1-21	リーダー配列
HG1018500		配列番号 196		NP_689848 :NM 152635 1-18	HMM SP リーダー配列
HG1018501		配列番号 197		NP_689848 :NM 152635 1-16	リーダー配列
HG1018502		配列番号 198		NP_689848 :NM 152635 1-15	リーダー配列
HG1018504		配列番号 199		NP_689968 :NM 152755 1-21	HMM SP リーダー配列
HG1018506		配列番号 200		NP_766630 :NM 173042 1-29	HMM SP リーダー配列
HG1018507		配列番号 201		NP_766630 :NM 173042 1-24	リーダー配列
HG1018508		配列番号 202		NP_766630 :NM 173042 1-28	リーダー配列
HG1018510		配列番号 203		NP_776214 :NM 173842 1-23	HMM SP リーダー配列
HG1018511		配列番号 204		NP_776214 :NM 173842 1-25	リーダー配列
HG1018513		配列番号 205		NP_783165 :NM 175575 1-32	HMM SP リーダー配列
HG1018514		配列番号 206		NP_783165 :NM 175575 1-34	リーダー配列
HG1018515		配列番号 207		NP_783165 :NM 175575 1-29	リーダー配列
HG1018516		配列番号 208		NP_783165 :NM 175575 1-30	リーダー配列
HG1018517		配列番号 209		NP_783165 :NM 175575 1-27	リーダー配列
HG1018857		配列番号 210		27482680:27482679 1-26	HMM SP リーダー配列
HG1018858		配列番号 211		27482680:27482679 1-24	リーダー配列
HG1015544	配列番号 212	配列番号 235		CLN00542945	ベクター pTT5 中の標識されていない 仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサピエンス]
HG1019453	配列番号 213	配列番号 236		CLN00839395	ベクター pTT2 中の標識されていない 仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサピエンス]
HG1019454	配列番号 214	配列番号 237		CLN00732663	ベクター pTT5 中の標識された 仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサピエンス] C- 末端 V5H8
HG1019455	配列番号 215	配列番号 238		CLN00840351	ベクター pTT2 中の標識された

10

20

30

40

【表 9】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
					仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサビエンス] C-末端 V5H8
HG1019456	配列番号 216	配列番号 239		CLN00758593	pIB/V5His-DEST ベクター (Invitrogen) 中の標識された 仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス] C- 末端 V5H8
HG1019457	配列番号 217	配列番号 240		CLN00848149	仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス], コラーゲン SP(1- 23aa)_MGD-CSF(21 to 241aa). ベクター pTT5-G 中の非標識化
HG1019458	配列番号 218	配列番号 241		CLN00821867	仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス], MGD-CSF (1- 241aa)_TEV_V5_Streptag II_H8. ベクター pTT5-I 中の C-標識化
HG1019459	配列番号 219	配列番号 242		CLN00816424	仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス] コラーゲン SP (1- 23aa)_MGD-CSF(21 ~ 241aa)_TEV_V5_Streptag II_H8. ベクター pTT5-G 中の C-標識化
HG1019460	配列番号 220	配列番号 243		CLN00816425	仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス] コラーゲン SP(1- 23aa)_H8_Streptag II_V5_TEV_MGD-CSF (21 ~ 241aa). ベクター pTT5-H 中の N-標識化
HG1019461	配列番号 221	配列番号 244		CLN00848160	仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス], コラーゲン SP(1- 23aa)_MGD-CSF(26 ~ 241aa). ベクター pTT5 中の非標識化
HG1019462	配列番号 222	配列番号 245		CLN00848173	仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス], コラーゲン SP(1- 23aa)_MGD-CSF(31 ~ 241aa). ベクター pTT5 中の非標識化
HG1019463	配列番号 223	配列番号 246		CLN00848185	仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス] コラーゲン SP(1- 23aa)_MGD-CSF(21 ~ 213aa). ベクター pTT5 中の非標識化
HG1019464	配列番号 224	配列番号 247		CLN00848197	仮想タンパク質 MGD- CSF [ホモサビエンス]

10

20

30

40

【表 10】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
					コラーゲン SP(1-23aa)_MGD-CSF(21 ~ 231aa). ベクター pTT5 中の非標識化
HG1019465	配列番号 225	配列番号 248		CLN00848209	仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサビエンス] コラーゲン SP(1-23aa)_MGD-CSF(21 ~ 236aa). ベクター pTT5 中の非標識化
HG1019466	配列番号 226	配列番号 249		CLN00848220	仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサビエンス] コラーゲン SP(1-23aa)_MGD-CSF(26 ~ 231aa). ベクター pTT5 中の非標識化
HG1019467	配列番号 227	配列番号 250		CLN00840257	ヒト MGC34647 の ファントムクローン 2010004A03 マウスオルソログ ベクター pTT5 中のクローン化
HG1019468	配列番号 228	配列番号 251		CLN00840253	MGC34647 ファントムクローン 2010004A03 マウスオルソログ 12842044(1 ~ 219aa)_TEV_V5_StreptagII _H8. ベクター pTT5-I 中の クローン化
HG1019469	配列番号 229	配列番号 252		CLN00847948	ヒト MGC34647 のマウスオルソログ ベクター pTT5 235aa 中のクローン化
HG1019470	配列番号 230	配列番号 253		CLN00842712	ヒト MGC34647 のマウスオルソログ 18921437(1-235aa)_TEV_V5_StreptagII _H8. pTT5-I 中のクローン化
HG1019471	配列番号 231	配列番号 254		NP_689669_ 成熟ペプチド	
HG1019472	配列番号 232	配列番号 255	配列番号 257	WO02048337_ 配列 49	Incyte 特許 WO 02/048337 (配列 49/103)
HG1019473	配列番号 233	配列番号 256		WO02048337_ 配列 49_ 成熟ペプチド	
HG1019474	配列番号 234			Kozak_ 配列	GCCGCCACC
HG1019600	配列番号 258	配列番号 265		CLN00872284 20-241	コラーゲン SP_C35S- MGC34647(20 ~ 241aa) STP
HG1019601	配列番号 259	配列番号 266		CLN00872342 20-241	コラーゲン SP_C179S- MGC34647(20 ~ 241aa) STP
HG1019602	配列番号 260	配列番号 267		CLN00873848 20-241	コラーゲン SP_C176S- MGC34647(20 ~ 241aa) STP
HG1019603	配列	配列		CLN00873864 20-241	コラーゲン SP_C190S-

10

20

30

40

【表 1 1】

FP ID	配列番号 (N1)	配列番号 (P1)	配列番号 (N0)	供給源 ID	タイプ
	番号 261	番号 268			MGC34647(20 ~ 241aa) STP
HG1019604	配列番号 262	配列番号 269		CLN00873948 20-241	コラーゲン SP_C167S-MGC34647(20 ~ 241aa) STP
HG1019605	配列番号 263	配列番号 270		CLN00873956 20-241	コラーゲン SP_C178S-MGC34647(20 ~ 241aa) STP
HG1019606	配列番号 264	配列番号 271		CLN00873970 20-241	コラーゲン SP_C198S-MGC34647(20 ~ 241aa) STP

10

【 0 4 1 0 】

【表 1 2】

Table 2. MGD-CSF の アノテーション

FP ID	HG1015544	HG1015545	HG1015546
クローン ID	MGD-CSF	MGD-CSF_エキソン4	NP_689669
Pred Prot Len	241	53	242
Top Human Hit アクセッション番号	gi 22748957 ref NP_689669.1	gi 22748957 ref NP_689669.1	gi 22748957 ref NP_689669.1
Top Human Hit アノテーション	仮想タンパク質 MGC34647 [ホモサピエンス]	仮想タンパク質 MGC34647 [ホモサピエンス]	仮想タンパク質 MGC34647 [ホモサピエンス]
Top Human Hit Len	242	242	242
Match Len	241	53	242
Query Len上の Top Human Hit % ID	100	100	100
Human Hit Len 上の % ID	100	22	100

20

30

【 0 4 1 1 】

【表 1 3】

Table 3. MGD-CSF のタンパク質配置

FP ID	HG1015544	HG1015545	HG1015546
クローン ID	MGD-CSF	MGD-CSF_エキソン4	NP_689669
クラスター	190647	190647	190647
分類	分泌された	分泌された	分泌された
Pred Prot Len	241	53	242
Treevote	0.93	0.75	0.92
シグナルペプチドの配置	(1-20)	(9-23)	(1-20)
成熟タンパク質の配置	(21-241)	(24-53)	(21-241)

40

50

【 0 4 1 2 】

【 表 1 4 】

Table 4. 分泌リーダー配列のアノテーション

FP ID	供給源 ID	アノテーション
HG1018265	コラーゲン リーダー 配列	コラーゲン α 1(IX)鎖前駆物質, ロングスプライス形態-ヒト
HG1018268	112907:21594845 1-17	α -2-抗プラスミン前駆物質 (α -2-プラスミンインヒビター)
HG1018269	112907:21594845 1-13	α -2-抗プラスミン前駆物質 (α -2-プラスミンインヒビター)
HG1018270	112907:21594845 1-19	α -2-抗プラスミン前駆物質 (α -2-プラスミンインヒビター)
HG1018271	112907:21594845 1-16	α -2-抗プラスミン前駆物質 (α -2-プラスミンインヒビター)
HG1018272	112907:21594845 1-15	α -2-抗プラスミン前駆物質 (α -2-プラスミンインヒビター)
HG1018274	13325208:13325207 1-30	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018275	13325208:13325207 1-25	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018276	13325208:13325207 1-33	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018277	13325208:13325207 1-24	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018278	13325208:13325207 1-26	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018279	13325208:13325207 1-32	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018280	13325208:13325207 1-27	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018281	13325208:13325207 1-23	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018282	13325208:13325207 1-35	トリヌクレオチドリビート含有5 [ホモサビエンス]
HG1018284	13938307:13938306 1-24	ARMETタンパク質 [ホモサビエンス]
HG1018285	13938307:13938306 1-21	ARMETタンパク質 [ホモサビエンス]
HG1018287	14718453:14718452 1-19	カルメニウム [ホモサビエンス]
HG1018288	14718453:14718452 1-15	カルメニウム [ホモサビエンス]
HG1018289	14718453:14718452 1-17	カルメニウム [ホモサビエンス]
HG1018291	15929966:15929965 1-23	COL9A1タンパク質 [ホモサビエンス]
HG1018293	16356651:16356650 1-21	NBL1 [ホモサビエンス]
HG1018294	16356651:16356650 1-17	NBL1 [ホモサビエンス]
HG1018296	18204192:18204191 1-19	PACAPタンパク質 [ホモサビエンス]
HG1018297	18204192:18204191 1-22	PACAPタンパク質 [ホモサビエンス]
HG1018298	18204192:18204191 1-18	PACAPタンパク質 [ホモサビエンス]
HG1018299	18204192:18204191 1-16	PACAPタンパク質 [ホモサビエンス]
HG1018300	18204192:18204191 1-14	PACAPタンパク質 [ホモサビエンス]
HG1018302	23503038:15778555 1-20	α -1B-糖タンパク質前駆体 (α -1-B糖タンパク質)
HG1018303	23503038:15778555 1-16	α -1B-糖タンパク質前駆体 (α -1-B糖タンパク質)
HG1018304	23503038:15778555 1-21	α -1B-糖タンパク質前駆体 (α -1-B糖タンパク質)
HG1018306	27479535:27479534 1-24	脳特異的血管形成インヒビター2前駆体と類似 [ホモサビエンス]
HG1018307	27479535:27479534 1-20	脳特異的血管形成インヒビター2前駆体と類似 [ホモサビエンス]
HG1018308	27479535:27479534 1-26	脳特異的血管形成インヒビター2前駆体と類似 [ホモサビエンス]
HG1018309	27479535:27479534 1-21	脳特異的血管形成インヒビター2前駆体と類似 [ホモサビエンス]
HG1018310	27479535:27479534 1-23	脳特異的血管形成インヒビター2前駆体と類似 [ホモサビエンス]
HG1018312	37182960:37182959 1-24	SPOCK2 [ホモサビエンス]
HG1018313	37182960:37182959 1-19	SPOCK2 [ホモサビエンス]
HG1018314	37182960:37182959 1-22	SPOCK2 [ホモサビエンス]
HG1018315	37182960:37182959 1-20	SPOCK2 [ホモサビエンス]
HG1018316	37182960:37182959 1-26	SPOCK2 [ホモサビエンス]
HG1018317	37182960:37182959 1-21	SPOCK2 [ホモサビエンス]
HG1018319	7437388:1208426 1-24	タンパク質ジスルフィド イソメラーゼ (EC 5341) ER60前駆体-ヒト
HG1018320	7437388:1208426 1-23	タンパク質ジスルフィド イソメラーゼ (EC 5341) ER60前駆体-ヒト
HG1018322	NP 000286:NM 000295 1-24	セリン (またはシステイン) プロテイナーゼインヒビター、クレードA (α -1
HG1018323	NP 000286:NM 000295 1-18	セリン (またはシステイン) プロテイナーゼインヒビター、クレードA (α -1

【 0 4 1 3 】

【表 15】

FP ID	供給源 ID	アノテーション
HG1018324	NP 000286:NM 000295 1-23	セリン(またはシステイン)プロテアーゼインヒビター、クレードA(α -1
HG1018325	NP 000286:NM 000295 1-17	セリン(またはシステイン)プロテアーゼインヒビター、クレードA(α -1
HG1018327	NP 000396:NM 000405 1-23	GM2 ガングリオシド活性化因子前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018328	NP 000396:NM 000405 1-18	GM2 ガングリオシド活性化因子前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018329	NP 000396:NM 000405 1-25	GM2 ガングリオシド活性化因子前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018330	NP 000396:NM 000405 1-20	GM2 ガングリオシド活性化因子前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018331	NP 000396:NM 000405 1-21	GM2 ガングリオシド活性化因子前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018333	NP 000495:NM 000504 1-23	凝固因子X前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018334	NP 000495:NM 000504 1-19	凝固因子X前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018335	NP 000495:NM 000504 1-20	凝固因子X前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018336	NP 000495:NM 000504 1-15	凝固因子X前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018337	NP 000495:NM 000504 1-21	凝固因子X前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018338	NP 000495:NM 000504 1-17	凝固因子X前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018340	NP 000573:NM 000582 1-18	分泌リンタンパク質 1 (オステオボンチン、骨シアロ蛋白 I、初期)
HG1018341	NP 000573:NM 000582 1-16	分泌リンタンパク質 1 (オステオボンチン、骨シアロ蛋白 I、初期)
HG1018342	NP 000573:NM 000582 1-15	分泌リンタンパク質 1 (オステオボンチン、骨シアロ蛋白 I、初期)
HG1018344	NP 000574:NM 000583 1-16	ビタミンD結合蛋白前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018345	NP 000574:NM 000583 1-14	ビタミンD結合蛋白前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018347	NP 000591:NM 000600 1-25	インターロイキン6(インターフェロン、 β 2) [ホモサビエンス]
HG1018348	NP 000591:NM 000600 1-24	インターロイキン6(インターフェロン、 β 2) [ホモサビエンス]
HG1018349	NP 000591:NM 000600 1-27	インターロイキン6(インターフェロン、 β 2) [ホモサビエンス]
HG1018351	NP 000598:NM 000607 1-18	オロソムコイド1 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018353	NP 000604:NM 000613 1-19	ヘモベキシン [ホモサビエンス]
HG1018354	NP 000604:NM 000613 1-25	ヘモベキシン [ホモサビエンス]
HG1018355	NP 000604:NM 000613 1-21	ヘモベキシン [ホモサビエンス]
HG1018356	NP 000604:NM 000613 1-23	ヘモベキシン [ホモサビエンス]
HG1018357	NP 000604:NM 000613 1-31	ヘモベキシン [ホモサビエンス]
HG1018359	NP 000726:NM 000735 1-26	糖タンパクホルモン、 α ポリペプチド前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018360	NP 000726:NM 000735 1-24	糖タンパクホルモン、 α ポリペプチド前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018362	NP 000884:NM 000893 1-18	キニノーゲン 1 [ホモサビエンス]
HG1018363	NP 000884:NM 000893 1-19	キニノーゲン 1 [ホモサビエンス]
HG1018364	NP 000884:NM 000893 1-16	キニノーゲン 1 [ホモサビエンス]
HG1018365	NP 000884:NM 000893 1-23	キニノーゲン 1 [ホモサビエンス]
HG1018367	NP 000909:NM 000918 1-17	プロリル4-ヒドロキシラーゼ、 β サブユニット [ホモサビエンス]
HG1018369	NP 000930:NM 000939 1-23	プロオピオメラノコルチン [ホモサビエンス]
HG1018370	NP 000930:NM 000939 1-26	プロオピオメラノコルチン [ホモサビエンス]
HG1018372	NP 000945:NM 000954 1-23	プロスタグランジンD2シンターゼ 21kDa [ホモサビエンス]
HG1018373	NP 000945:NM 000954 1-22	プロスタグランジンD2シンターゼ 21kDa [ホモサビエンス]
HG1018374	NP 000945:NM 000954 1-18	プロスタグランジンD2シンターゼ 21kDa [ホモサビエンス]
HG1018376	NP 001176:NM 001185 1-18	α -2-糖タンパク質1、亜鉛 [ホモサビエンス]
HG1018377	NP 001176:NM 001185 1-20	α -2-糖タンパク質1、亜鉛 [ホモサビエンス]
HG1018378	NP 001176:NM 001185 1-21	α -2-糖タンパク質1、亜鉛 [ホモサビエンス]
HG1018379	NP 001176:NM 001185 1-17	α -2-糖タンパク質1、亜鉛 [ホモサビエンス]
HG1018381	NP 001266:NM 001275 1-18	クロモグラニン A [ホモサビエンス]
HG1018382	NP 001266:NM 001275 1-15	クロモグラニン A [ホモサビエンス]
HG1018383	NP 001266:NM 001275 1-14	クロモグラニン A [ホモサビエンス]
HG1018385	NP 001314:NM 001323 1-26	シスタチンM 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018386	NP 001314:NM 001323 1-18	シスタチンM 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018387	NP 001314:NM 001323 1-20	シスタチンM 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018388	NP 001314:NM 001323 1-28	シスタチンM 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018389	NP 001314:NM 001323 1-21	シスタチンM 前駆体 [ホモサビエンス]

10

20

30

40

【表 16】

FP ID	供給源 ID	アノテーション
HG1018390	NP 001314:NM 001323 1-23	システイン M 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018392	NP 001822:NM 001831 1-22	クラステリンアイソフォーム 1 [ホモサビエンス]
HG1018393	NP 001822:NM 001831 1-18	クラステリンアイソフォーム 1 [ホモサビエンス]
HG1018394	NP 001822:NM 001831 1-14	クラステリンアイソフォーム 1 [ホモサビエンス]
HG1018396	NP 002206:NM 002215 1-24	インター- α (グロブリン) インヒビター H1 [ホモサビエンス]
HG1018397	NP 002206:NM 002215 1-29	インター- α (グロブリン) インヒビター H1 [ホモサビエンス]
HG1018398	NP 002206:NM 002215 1-30	インター- α (グロブリン) インヒビター H1 [ホモサビエンス]
HG1018399	NP 002206:NM 002215 1-23	インター- α (グロブリン) インヒビター H1 [ホモサビエンス]
HG1018400	NP 002206:NM 002215 1-31	インター- α (グロブリン) インヒビター H1 [ホモサビエンス]
HG1018402	NP 002300:NM 002309 1-22	白血病抑制因子 (コリン作動性分化因子)
HG1018403	NP 002300:NM 002309 1-23	白血病抑制因子 (コリン作動性分化因子)
HG1018405	NP 002336:NM 002345 1-18	ルミカン [ホモサビエンス]
HG1018406	NP 002336:NM 002345 1-15	ルミカン [ホモサビエンス]
HG1018407	NP 002336:NM 002345 1-17	ルミカン [ホモサビエンス]
HG1018408	NP 002336:NM 002345 1-14	ルミカン [ホモサビエンス]
HG1018410	NP 002402:NM 002411 1-18	分泌グロブリン, ファミリー-2A, メンバー-2 [ホモサビエンス]
HG1018412	NP 002505:NM 002514 1-30	nov 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018413	NP 002505:NM 002514 1-32	nov 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018414	NP 002505:NM 002514 1-28	nov 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018415	NP 002505:NM 002514 1-27	nov 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018416	NP 002505:NM 002514 1-31	nov 前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018418	NP 002892:NM 002901 1-26	レチクロカルビン1前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018419	NP 002892:NM 002901 1-22	レチクロカルビン1前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018420	NP 002892:NM 002901 1-29	レチクロカルビン1前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018421	NP 002892:NM 002901 1-24	レチクロカルビン1前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018422	NP 002892:NM 002901 1-23	レチクロカルビン1前駆体 [ホモサビエンス]
HG1018424	NP 002893:NM 002902 1-25	レチクロカルビン2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン [ホモサビエンス]
HG1018425	NP 002893:NM 002902 1-19	レチクロカルビン2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン [ホモサビエンス]
HG1018426	NP 002893:NM 002902 1-22	レチクロカルビン2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン [ホモサビエンス]
HG1018427	NP 002893:NM 002902 1-18	レチクロカルビン2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン [ホモサビエンス]
HG1018428	NP 002893:NM 002902 1-20	レチクロカルビン2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン [ホモサビエンス]
HG1018429	NP 002893:NM 002902 1-21	レチクロカルビン2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン [ホモサビエンス]
HG1018430	NP 002893:NM 002902 1-23	レチクロカルビン2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン [ホモサビエンス]
HG1018432	NP 005133:NM 005142 1-19	胃内因子 (ビタミンB合成) [ホモサビエンス]
HG1018433	NP 005133:NM 005142 1-18	胃内因子 (ビタミンB合成) [ホモサビエンス]
HG1018434	NP 005133:NM 005142 1-20	胃内因子 (ビタミンB合成) [ホモサビエンス]
HG1018435	NP 005133:NM 005142 1-24	胃内因子 (ビタミンB合成) [ホモサビエンス]
HG1018436	NP 005133:NM 005142 1-16	胃内因子 (ビタミンB合成) [ホモサビエンス]
HG1018437	NP 005133:NM 005142 1-17	胃内因子 (ビタミンB合成) [ホモサビエンス]
HG1018438	NP 005133:NM 005142 1-14	胃内因子 (ビタミンB合成) [ホモサビエンス]
HG1018440	NP 005445:NM 005454 1-17	セルベルス (cerberus) 1 [ホモサビエンス]
HG1018442	NP 005555:NM 005564 1-18	リボカリン2 (発癌遺伝子 24p3) [ホモサビエンス]
HG1018443	NP 005555:NM 005564 1-20	リボカリン2 (発癌遺伝子 24p3) [ホモサビエンス]
HG1018444	NP 005555:NM 005564 1-15	リボカリン2 (発癌遺伝子 24p3) [ホモサビエンス]
HG1018446	NP 005690:NM 005699 1-29	インターロイキン18 結合タンパク質アイソフォーム C 前駆体 [ホモサビエンス]

【表 17】

FP ID	供給源 ID	アノテーション
HG1018447	NP 005690:NM 005699 1-24	インターロイキン18結合タンパク質アイソフォームC前駆体 [ホモサピエンス]
HG1018448	NP 005690:NM 005699 1-28	インターロイキン18結合タンパク質アイソフォームC前駆体 [ホモサピエンス]
HG1018450	NP 006560:NM 006569 1-19	EFハンドドメインを有する細胞成長調節遺伝子 [ホモサピエンス]
HG1018451	NP 006560:NM 006569 1-18	EFハンドドメインを有する細胞成長調節遺伝子 [ホモサピエンス]
HG1018452	NP 006560:NM 006569 1-21	EFハンドドメインを有する細胞成長調節遺伝子 [ホモサピエンス]
HG1018454	NP 006856:NM 006865 1-15	白血球免疫グロブリンロブリン様レセプター、亜科A (TM なし)
HG1018456	NP 036577:NM 012445 1-26	スポンジン2、細胞外マトリックスタンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018457	NP 036577:NM 012445 1-25	スポンジン2、細胞外マトリックスタンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018458	NP 036577:NM 012445 1-24	スポンジン2、細胞外マトリックスタンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018459	NP 036577:NM 012445 1-28	スポンジン2、細胞外マトリックスタンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018461	NP 055070:NM 014255 1-20	膜貫通タンパク質 4 [ホモサピエンス]
HG1018462	NP 055070:NM 014255 1-18	膜貫通タンパク質 4 [ホモサピエンス]
HG1018463	NP 055070:NM 014255 1-16	膜貫通タンパク質 4 [ホモサピエンス]
HG1018465	NP 055582:NM 014767 1-24	sparc/オステオネクチン(osteonectin),CWCYおよびカザール(kazal)-様ドメインプロテオグリカン
HG1018466	NP 055582:NM 014767 1-19	sparc/オステオネクチン ,CWCYおよびカザール(kazal)-様ドメインプロテオグリカン
HG1018467	NP 055582:NM 014767 1-22	sparc/オステオネクチン ,CWCYおよびカザール(kazal)-様ドメインプロテオグリカン
HG1018468	NP 055582:NM 014767 1-20	sparc/オステオネクチン ,CWCYおよびカザール(kazal)-様ドメインプロテオグリカン
HG1018469	NP 055582:NM 014767 1-26	sparc/オステオネクチン ,CWCYおよびカザール(kazal)-様ドメインプロテオグリカン
HG1018470	NP 055582:NM 014767 1-21	sparc/オステオネクチン ,CWCYおよびカザール(kazal)-様ドメインプロテオグリカン
HG1018472	NP 055697:NM 014882 1-18	Rho GTP アーゼ活性化タンパク質 25 アインホーム b [ホモサピエンス]
HG1018474	NP 056965:NM 015881 1-18	dickkopf ホモログ 3 [ホモサピエンス]
HG1018475	NP 056965:NM 015881 1-19	dickkopf ホモログ 3 [ホモサピエンス]
HG1018476	NP 056965:NM 015881 1-22	dickkopf ホモログ 3 [ホモサピエンス]
HG1018477	NP 056965:NM 015881 1-16	dickkopf ホモログ 3 [ホモサピエンス]
HG1018478	NP 056965:NM 015881 1-21	dickkopf ホモログ 3 [ホモサピエンス]
HG1018480	NP 057603:NM 016519 1-26	エナメル芽細胞前駆体 [ホモサピエンス]
HG1018481	NP 057603:NM 016519 1-28	エナメル芽細胞前駆体 [ホモサピエンス]
HG1018483	NP 149439:NM 033183 1-18	絨毛性性腺刺激ホルモン、βポリペプチド8 [ホモサピエンス]
HG1018484	NP 149439:NM 033183 1-20	絨毛性性腺刺激ホルモン、βポリペプチド8 [ホモサピエンス]
HG1018485	NP 149439:NM 033183 1-16	絨毛性性腺刺激ホルモン、βポリペプチド8 [ホモサピエンス]
HG1018487	NP 644808:NM 139279 1-18	多発性凝固因子欠乏2 [ホモサピエンス]
HG1018488	NP 644808:NM 139279 1-20	多発性凝固因子欠乏2 [ホモサピエンス]
HG1018489	NP 644808:NM 139279 1-26	多発性凝固因子欠乏2 [ホモサピエンス]
HG1018490	NP 644808:NM 139279 1-23	多発性凝固因子欠乏2 [ホモサピエンス]
HG1018492	NP 660295:NM 145252 1-13	一般的唾液タンパク質1と類似 [ホモサピエンス]
HG1018493	NP 660295:NM 145252 1-16	一般的唾液タンパク質1と類似 [ホモサピエンス]
HG1018494	NP 660295:NM 145252 1-14	一般的唾液タンパク質1と類似 [ホモサピエンス]
HG1018495	NP 660295:NM 145252 1-17	一般的唾液タンパク質1と類似 [ホモサピエンス]
HG1018497	NP 689534:NM 152321 1-25	仮想タンパク質 FLJ32115 [ホモサピエンス]
HG1018498	NP 689534:NM 152321 1-21	仮想タンパク質 FLJ32115 [ホモサピエンス]
HG1018500	NP 689848:NM 152635 1-18	腫瘍性タンパク質誘発転写転写 3 [ホモサピエンス]
HG1018501	NP 689848:NM 152635 1-16	腫瘍性タンパク質誘発転写転写 3 [ホモサピエンス]
HG1018502	NP 689848:NM 152635 1-15	腫瘍性タンパク質誘発転写転写 3 [ホモサピエンス]
HG1018504	NP 689968:NM 152755 1-21	仮想タンパク質 MGC40499
HG1018506	NP 766630:NM 173042 1-29	インターロイキン18結合プロテインアイソフォームA前駆体 [ホモサピエンス]
HG1018507	NP 766630:NM 173042 1-24	インターロイキン18結合プロテインアイソフォームA前駆体 [ホモサピエンス]

10

20

30

40

【表 18】

FP ID	供給源 ID	アノテーション
HG1018508	NP_766630:NM_173042_1-28	インターロイキン18結合タンパク質アイソフォームA前駆体 [ホモサピエンス]
HG1018510	NP_776214:NM_173842_1-23	インターロイキン1レセプターアンタゴニストアイソフォーム1前駆体 [ホモサピエンス]
HG1018511	NP_776214:NM_173842_1-25	インターロイキン1レセプターアンタゴニストアイソフォーム1前駆体 [ホモサピエンス]
HG1018513	NP_783165:NM_175575_1-32	WFIKKN2 タンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018514	NP_783165:NM_175575_1-34	WFIKKN2 タンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018515	NP_783165:NM_175575_1-29	WFIKKN2 タンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018516	NP_783165:NM_175575_1-30	WFIKKN2 タンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018517	NP_783165:NM_175575_1-27	WFIKKN2 タンパク質 [ホモサピエンス]
HG1018857	27482680:27482679_1-26	仮想タンパク質 9330140G23と類似 [ホモサピエンス]
HG1018858	27482680:27482679_1-24	仮想タンパク質 9330140G23と類似 [ホモサピエンス]

10

【0417】

【表 19】

表 5: MGD-CSF 構成 アノテーション

クローンID	アノテーション	ベクター 分類記載	タグ
CLN00542945	仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサピエンス]	pTT5-ゲートウェイ	標識なし
CLN00732663	仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサピエンス]	pTT5-ゲートウェイ	C-標識 (V5H8)
CLN00839395	仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサピエンス]	pTT2-ゲートウェイ	C-標識 (V5H8)
CLN00840351	仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサピエンス]	pTT2-ゲートウェイ	C-標識 (V5H8)
CLN00843208	仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサピエンス]	ptt2-I	標識なし
CLN00758593	仮想タンパク質 MGD-CSF [ホモサピエンス]	pIB	C-標識 (V5H8)
CLN00848149	SP MGD-CSF(21 ~ 241aa)	pTT5-G	標識なし
	切断可能 C-標識 および N-標識 作生物		
CLN00816424	SP_MGD-CSF(21 ~ 241aa)_TEV_V5_StrecTagII_H8	pTT5-G	C-標識 (TEV_V5_StrecTa gII H8)
CLN00816425	SP_TEV_V5_StrecTagII_H8_MG D-CSF(21 ~ 241aa)	pTT5-H	N-標識 (SP_TEV_V5_Stre cTagII H8)
CLN00821867	MGD-CSF(1 ~ 241)_TEV_V5_StrecTagII_H8	pTT5-I	C-標識 (TEV_V5_StrecTa gII H8)
	マウス相同タンパク質		
CLN00840253	仮想タンパク質 MGC34647 [マウス 660bp]	pTT5-I	C-標識 (TEV_V5_StrecTa gII H8)
CLN00840257	仮想タンパク質 MGC34647 [マウス 660bp]	pTT5-I	標識なし
CLN00842712	仮想タンパク質 MGC34647 [マウス 708bp]	pTT5-I	C-標識 (TEV_V5_StrecTa gII H8)
CLN00847948	仮想タンパク質 MGC34647 [マウス 708bp]	pTT5-I	標識なし
	欠失突然変異体		
CLN00848160	SP_MGD-CSF(26 ~ 241aa)	pTT5-G	標識なし
CLN00848173	MGD-CSF(31 ~ 241aa)	pTT5-G	標識なし
CLN00848185	SP MGD-CSF(21 ~ 213aa)	pTT5-G	標識なし
CLN00848197	SP MGD-CSF(21 ~ 231aa)	pTT5-G	標識なし
CLN00848209	SP MGD-CSF(21 ~ 236aa)	pTT5-G	標識なし
CLN00848220	SP MGD-CSF(26 ~ 231aa)	pTT5-G	標識なし

10

20

30

【表 2 0】

表 6: MGD-CSF がインビトロでの骨髄細胞増殖を促進する

クローンID	分類記載	効力	発現
CLN00542945	MGD-CSF (1-241 aa)	+++	+++
CLN00848149	CSP-025 (20 ~ 241aa)	++	++
CLN00848160	CSP-025 (25 ~ 241aa)	+	+
CLN00848173	CSP-025 (30 ~ 241aa)	++	++
CLN00848185	CSP-025 (20 ~ 213 aa)	+++	++
CLN00848197	CSP-025 (20 ~ 231aa)	++	+++
CLN00848209	CSP-025 (20 ~ 236 aa)	+	+
CLN00848220	CSP-025 (25 ~ 231aa)	++	++
	ベクターコントロール	-	

10

【 0 4 1 9 】

【表 2 1】

表 7: MGD-CSF がインビボでの骨髄増殖を促進する

A: インビボにおいてマウスの骨髄細胞増殖を
促進するヒトMGD-CSF

20

動物 ID	分類記録	単核細胞 /ul
1	ベクターコントロール	94.0
2	ベクターコントロール	84.0
3	ベクターコントロール	52.0
4	ヒト MGD-CSF	216.0
5	ヒト MGD-CSF	0.0
6	ヒト MGD-CSF	268.0

B: インビボにおいてマウスの骨髄細胞増殖を
促進するマウス MGD-CSF

30

動物 ID	分類記録	単核細胞 /ul
1	ベクターコントロール	0.0
2	ベクターコントロール	0.0
3	ベクターコントロール	0.0
4	ベクターコントロール	0.0
5	ベクターコントロール	0.0
6	ベクターコントロール	0.0
7	マウス MGD-CSF	50.0
8	マウス MGD-CSF	0.0
9	マウス MGD-CSF	61.0
10	マウス MGD-CSF	78.0
11	マウス MGD-CSF	0.0
12	マウス MGD-CSF	77.0

40

【 0 4 2 0 】

【表 2 2】

表 8: MGD-CSF 遺伝子発現

疾患	病理	MGC 34647 陽性	総遺伝子 Logic	総数 %
骨髄異形成症候群	過剰芽細胞を伴う 不応性貧血	4	4	100%
骨髄異形成症候群	リング状シテロプラスト を伴う不応性貧血	1	1	100%
骨髄異形成症候群	悪性転換において 過剰芽細胞を伴う 不応性貧血	2	3	67%
骨髄異形成症候群	骨髄異形成症候群 (形態学的異常)	1	2	50%
急性B細胞リンパ芽 球性白血病	前駆体B-細胞 リンパ芽球性リンパ腫	3	6	50%
急性骨髄性白血病	成熟状態の 急性骨髄性白血病	1	4	25%
急性骨髄性白血病	成熟状態でない 急性骨髄性白血病	2	11	18%
急性骨髄性白血病	急性骨髄性白血病 最小分化	1	7	14%
慢性骨髄性白血病	慢性骨髄性白血病	2	45	4%
慢性リンパ性白血病	慢性リンパ性 白血病	1	40	3%
急性前骨髄球性 白血病	急性前骨髄球性白血病	1	36 (骨髄から3)	3% (骨髄から33%)

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【0421】

【図1】図1は、実施例1にさらに記載されるような、MGD-CSF (MGD-CSF __エキソン4) ; 配列番号8) 、MGC34647 (NP__689669) ; 配列番号10) およびMGD-CSF配列番号7) のエキソン4のアミノ酸配列アラインメントを示す。アミノ酸同一性は(*)によって指定する。

【図2】図2は、実施例2にさらに記載されるような、哺乳動物細胞を一過性にトランスフェクトするために用いた、pTT5-Gatewayを生成するために用いたpTT5骨格ベクターのダイアグラムを示す。図2はまた、pTT5-G (配列番号272の残基1182~1265および2984~3127) 、pTT5-H (配列番号273の残基1182~1392および1597~1602) およびpTT5-I (配列番号284および配列番号274の残基2905~3048) のベクターの配列に隣接するマルチクローニング部位の核酸配列を示す。

40

【図3】図3は、実施例2にさらに記載されるような、哺乳動物細胞を安定にトランスフェクトするために用いたpTT2骨格ベクターのダイアグラムを示す。

【図4】図4は、実施例3および表1にさらに記載されるような、トランスフェクションの3~6日後のプラスミドベクターでのMGD-CSFの発現を示す。図4Aは、293-6E細胞における、C末端Hisタグを有するMGD-CSFベクター、細胞内(細胞)および分泌された(上清)CLN00732663の発現を示す。図4Bは、293-

50

6 E 細胞における、C 末端 H i s タグおよびコラーゲンリーダー配列を有する M G D - C S F ベクター、細胞内（細胞）および分泌された（上清）C L N 0 0 8 1 6 4 2 4 の発現を示す。図 4 A および図 4 B の両方とも、発現のための正のコントロールとして P o s i t o p e ^{T M} (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) (右パネル) を示す。分子量は、左側パネルに示す。

【図 5】図 5 は、実施例 4 および表 1 にさらに記載されるような、トランスフェクションの 3 ~ 6 日後の、実施例 2 および表 1 に記載された構築物でトランスフェクトした細胞の増殖の程度および生存度を示す。図 5 A は、C L N 0 0 5 4 2 9 4 5 (黒のバー)、C L N 0 0 7 3 2 6 6 3 (明灰色のバー)、C L N 0 0 8 2 1 8 6 7 (斜線のバー)、および C L N 0 0 8 1 6 4 2 4 (格子模様のバー) でトランスフェクトした細胞、ならびに、分泌型アルカリホスファターゼ (S E A P) をコードするコントロール遺伝子 (濃灰色のバー) と比較した細胞増殖の程度を示している。C L N 0 0 8 1 6 4 2 4 およびコントロールの S E A P の両方でトランスフェクトした細胞とも、実施例 4 にさらに記載されるとおり、トランスフェクションの 3 ~ 6 日後に細胞数が増大した。図 5 B は、C L N 0 0 5 4 2 9 4 5 (黒のバー)、C L N 0 0 7 3 2 6 6 3 (明灰色のバー)、C L N 0 0 8 2 1 8 6 7 (斜線のバー)、および C L N 0 0 8 1 6 4 2 4 (格子模様のバー) でトランスフェクトして、分泌型アルカリホスファターゼ (S E A P) をコードするコントロール遺伝子 (濃灰色のバー) でトランスフェクトした細胞と比較した細胞の生存度の割合を示している。C L N 0 0 8 1 6 4 2 4 およびコントロールの S E A P 細胞でトランスフェクトした細胞は、生きたままであったが、M G D - C S F、C L N 0 0 7 3 2 6 6 3 および C L N 0 0 8 2 1 8 6 7 でトランスフェクトした細胞は、毒性の増大を示し、これは、培養条件に依存したが、遺伝子特異的ではなく、培養物中での経時的なそれらの生存度の低下によって証明された。

【図 6】図 6 は、M G D - C S F を発現する付着性 2 9 3 - T 細胞が、実施例 5 にさらに記載されるとおり、低血清濃度の培養条件に適合され得ることを示す。図 6 A は、実施例 5 にさらに記載されるとおり、3 % F B S を有する F r e e S t y l e 培地中で、そして 1 % F B S を有する H y Q - C H O 培地中で増殖される懸濁物 2 9 3 - T 細胞の培養物中での M G D - C S F の発現を示す。図 6 B は、細菌宿主から生成された精製 M G D - C S F 標準 (パネル 4) に比較した、低血清 (パネル 1) で血清の非存在下 (パネル 2) の懸濁培養中での、そして接着培養中での (パネル 3)、M G D - C S F の発現を示す。

【図 7】図 7 は、実施例 6 にさらに記載されるとおり、バイオリアクター中での M G D - C S F の発現を示す。発酵は 6 日間モニターした。サンプルは、ゲル電気泳動によって試験して、接種の 1 ~ 6 日後にクマーシーブルー染色で染色した。分子量は左のパネルに示す。M G D - C S F の位置は、矢印で示す。ゲル上のタンパク質の量を定量するために、ウシ血清アルブミン (B S A) の漸増量を示す。

【図 8 A】図 8 A は、実施例 7 にさらに記載されるとおり、2 9 3 - T 細胞からの M G D - C S F の単離を示す。細胞培養上清 (S u p t) を S p - S e p h a r o s e F F カラム (S P - P o o l)、H e p a r i n S e p h a r o s e H P カラム (H e p - P o o l)、および Q - S e p h a r o s e カラム (Q - P o o l) に分画した。M F D - C S F はグリコシル化されて、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって 3 9 k D a のみかけの分子量を有する。分子量マーカーは、左のパネルに示す。

【図 8 B】図 8 B は、実施例 8 にさらに詳細に記載されるとおり、還元および非還元の S D S - P A G E 条件下での M G D - C S F の突然変異タンパク質 (ムテイン) の電気泳動遊走パターンを示す。左のパネルは、ジスルフィド結合を還元する条件下で行った S D S - P A G E ゲルを示しており、そして真ん中のパネルは、ジスルフィド結合を還元しない条件下で行った S D S - P A G E ゲルを示す。野性型 M G D - C S F であって、その天然のシグナルペプチド (w t n a t S P) とともに発現された野性型 M G D - C S F、野性型 M G D - C S F であって、コラーゲンシグナルペプチド (w t c o l S P) とともに発現された野性型 M G D - C S F、ならびにシステインからセリンへの突然変異タンパク質 (ムテイン) C 3 5 S、C 1 6 7 S、C 1 7 6 S、C 1 7 8 S、C 1 7 9 S、C 1 9

10

20

30

40

50

0 S および C 1 9 8 S の変異を両方のパネルに示す。精製された M G D - C S F を、定量および比較のための標準として右のパネルに示す。C 1 7 9 S および C 1 9 0 S は、野生型 M G D - C S F よりも低い量で発現され、そして C 3 5 S は、検出可能なレベルでは発現されなかった。

【図 9】図 9 は、実施例 9 A にさらに記載されるように、M G D - C S F が N K 細胞の増殖および / または生存を誘導する能力を示す。N K 細胞数は、負の緩衝液コントロール（ひし形）または M G D - C S F でトランスフェクトされた細胞由来の馴化培地（四角）に曝露した後の 1 ウェルあたりの相対的ルシフェラーゼ単位（R L U）で表した。M G D - C S F は、マウス N K 細胞増殖を刺激した。コントロール緩衝液は、影響なかった。N K 細胞に対する M G D - C S F の増殖活性は、特異的であってかつ用量依存性であった。

10

【図 1 0】図 1 0 は、実施例 9 A にさらに記載されるように、N K 細胞の増殖および / または生存を誘導する因子についてのスクリーニングアッセイの結果を示す。上のパネルおよび下のパネルは、独立して行った 2 つの同一の実験を示す。ヒト N K 細胞の数は、試験因子に対する曝露後の相対ルシフェラーゼ単位（r l u）で表す。M G D - S C F で、または M G D - C S F の供給源であるクラスター 1 9 0 6 4 7 由来のプラスミド D N A でトランスフェクトされた細胞由来の馴化培地は、ヒト N K 細胞の生存および / または増殖を刺激した。正のコントロールである I F N γ および G M - C S F も、N K 細胞増殖を刺激した。

【図 1 1】図 1 1 は、図 9 B にさらに記載されるように、M G D - C S F が造血幹細胞増殖を誘導する能力を示す。幹細胞の数は、血球計算器で細胞をカウントすることによって決定した。M G D - C S F は、用量依存性の方式で増殖を増大させた。M G D - C S F（5 0 0 n g / m l）は、M - C S F よりも大きい程度まで、そして G - C S F および G M - C S F と同様の程度まで幹細胞増殖を誘導した。

20

【図 1 2 A】図 1 2 は、実施例 9 C にさらに記載されるとおり、M G D - C S F が骨髓球性細胞増殖を誘導する能力を示す。図 1 2 A は、M G D - C S F を含有する馴化培地が骨髓増殖を誘導する能力を、陰性コントロールの空のベクター（V e c t o r）および無関係の化合物 C L N 3 7 3 2、F P T 0 2 6、I L - 1 0 および非馴化培地と；そして陽性のコントロール G M - C S F と比較する。単球の数は、試験因子に対する曝露後の 1 ウェルあたりの相対ルシフェラーゼ単位（R L U）で表した。

【図 1 2 B】図 1 2 は、実施例 9 C にさらに記載されるとおり、M G D - C S F が骨髓球性細胞増殖を誘導する能力を示す。図 1 2 B は、精製 G M - C S F（星）および M G D - C S F（四角）でトランスフェクトした細胞由来の馴化培地の両方とも、ヒト単球増殖を刺激したことを示す。コントロールベクター（ひし形）は影響なかった。単球に対する M G D - C S F の増殖活性は、特異的であってかつ用量依存性であった。

30

【図 1 3】図 1 3 は、分化抗原 C D 6 7 および C D 2 4 の存在によって測定し、実施例 1 0 A にさらに詳細に記載されるような、顆粒球分化の蛍光表示式細胞分取（f l u o r e s c e n t a c t i v a t e d c e l l s o r t i n g）（F A C S）分析の結果を示す。負のコントロールベクター（V e c t o r C M）で馴化した培地、および M G D - C S F ベクター（M G D - C S F C M）で馴化した培地に対する応答における顆粒球へ分化するように誘導された造血幹細胞の数を示す。C D 6 7 F I T C（x 軸）は、C D 6 7 に特異的な抗体の蛍光強度による C D 6 7 陽性細胞の数を示す。C D 2 4 P E（y 軸）は、C D 2 4 に特異的な抗体の蛍光強度によって C D 2 4 陽性細胞の数を示す。線で囲んだ三角の領域（矢印）は、4 つのパネルの各々における細胞表面分化抗原 C D 6 7 および C D 2 4 の両方について陽性の細胞数を示す。M G D - C S F C M は、G - C S F の非存在下（サイトカインなし）および存在下の両方で顆粒球分化を刺激した。M G D - C S F によるこの刺激は、G - C S F の効果と相乗的であった。

40

【図 1 4】図 1 4 は、分化抗原 C D 1 5 および C D 2 4 の存在によって測定し、実施例 1 0 A にさらに詳細に記載されるような、顆粒球分化の F A C S 分析の結果を示す。C D 2 4 P E（x 軸）は、C D 2 4 に特異的な抗体の蛍光強度による C D 2 4 陽性細胞の数を示す。C D 1 5 A P C（y 軸）は、C D 1 5 に特異的な抗体の蛍光強度によって C D 1 5 陽

50

性細胞の数を示す。各々のグラフの上の右側の枠は、CD 15 および CD 34 分化マーカーの両方を細胞表面上に有するそれらの細胞の割合を示す。MGD - CSF は、濃度依存性の様式で顆粒球分化を誘導し、ここで 500 ng / ml の用量では、骨髓造血幹細胞のうち 8 % の顆粒球への分化が生じた。

【図 15】図 15 は、分化抗原 CD 14 および CD 3 の存在によって測定し、実施例 10 B にさらに詳細に記載されるような、単球分化の FACS 分析の結果を示す。負のコントロールベクター (Vector CM) で馴化した培地、および MGD - CSF ベクター (MGD - CSF CM) で馴化した培地に対する応答において単球へ分化するように誘導された造血幹細胞の数を示す。CD 14 FITC (x 軸) は、CD 14 に特異的な抗体の蛍光強度による CD 14 陽性細胞の数を示す。CD 3 APC (y 軸) は、CD 3 に特異的な抗体の蛍光強度によって CD 3 陽性細胞の数を示す。線で囲んだ卵形の領域 (矢印) は、4 つのパネルの各々における細胞表面分化抗原 CD 14 および CD 3 の両方について陽性の細胞数を示す。MGD - CSF CM は単球分化を刺激した。MGD - CSF CM は、G - CSF の非存在下 (サイトカインなし) および存在下の両方で単球分化を刺激した。MGD - CSF が単球分化を誘導する能力は、GM - CSF の能力よりも大きかった。MGD - CSF は、GM - CSF と相乗的に作用した。

【図 16】図 16 は、分化抗原 CD 14 および CD 16 の存在によって測定し、実施例 10 B にさらに詳細に記載されるような、単球分化の FACS 分析の結果を示す。CD 14 APC (y 軸) は、CD 14 に特異的な抗体の蛍光強度によって CD 14 陽性細胞の数を示す。CD 16 FITC (x 軸) は、CD 16 に特異的な抗体の蛍光強度による CD 16 陽性細胞の数を示す。各々のグラフの上の右側の枠は、CD 14 および CD 16 分化マーカーの両方を細胞表面上に有するそれらの細胞の割合を示す。MGD - CSF は、濃度依存性の様式で単球分化を誘導し、ここで 100 ng / ml の用量では、骨髓造血幹細胞のうち 10 % の顆粒球への分化が生じた。

【図 17】図 17 は、分化抗原 CD 86 および CD 1 の存在によって測定し、実施例 10 C にさらに詳細に記載されるような、樹状細胞分化の FACS 分析の結果を示す。負のコントロールベクター (Vector CM) で馴化した培地、および MGD - CSF ベクター (MGD - CSF) で馴化した培地に対する応答における樹状細胞へ分化するように誘導された造血幹細胞の数を示す。CD 1a FITC (x 軸) は、CD 1 に特異的な抗体の蛍光強度による CD 1 陽性細胞の数を示す。CD 86 PE (y 軸) は、CD 86 に特異的な抗体の蛍光強度によって CD 86 陽性細胞の数を示す。線で囲んだ卵形の領域は、細胞表面分化抗原 CD 1 および CD 86 の両方について陽性の細胞数を示す。MGD - CSF CM は、樹状細胞分化を刺激した。負のコントロールでトランスフェクトされた細胞のうち 4 % が樹状細胞に分化したが、MGD - CSF ベクターでトランスフェクトした細胞のうち 22 % が樹状細胞に分化した。

【図 18 A】図 18 は、実施例 11 にさらに詳細に記載されるように、ヒト骨髓コロニー形成に対する MGD - CSF の効果を示す。図 18 A は、G - CSF および GM - CSF の効果に比較して、CFU - G (左パネル) および CFU - M (右パネル) の形成に対する MGD - CSF の用量依存性の刺激効果を示す。

【図 18 B】図 18 は、実施例 11 にさらに詳細に記載されるように、ヒト骨髓コロニー形成に対する MGD - CSF の効果を示す。図 18 B は、G - CSF および GM - CSF の効果に比較して、CFU - GM の形成 (左パネル) および総コロニー形成能 (Total CFU) (右パネル) に対する MGD - CSF の用量依存性の刺激効果を示す。

【図 18 C】図 18 は、実施例 11 にさらに詳細に記載されるように、ヒト骨髓コロニー形成に対する MGD - CSF の効果を示す。図 18 C は、サイトカイン IL - 3 および幹細胞因子 (SCF) の存在下における G - CSF および GM - CSF の効果に比較して、CFU - G (上の左パネル)、CFU - GM (上の右パネル)、CFU - M (下の左パネル) の形成および総コロニー形成能 (Total CFU) (下の右パネル) に対する MGD - CSF の用量依存性の刺激効果を示す。

【図 19】図 19 は、実施例 12 にさらに詳細に記載されるように、種々の生物学的活性

10

20

30

40

50

【図 2 2】図 2 2 は、実施例 1 5 にさらに詳細に記載されるように、樹状細胞形成に対する M G D - C S F の効果を示す。培地、2 0 n g / m l の M G D - C S F、1 0 0 n g / m l の M G D - C S F および 5 0 0 n g / m l の M G D - C S F によって誘導される樹状細胞形成の例を示す。M G D - C S F は、球状の未分化造血幹細胞からの細長い分化した樹状細胞の形成を誘導した。

10

【 ㊦ 2 】

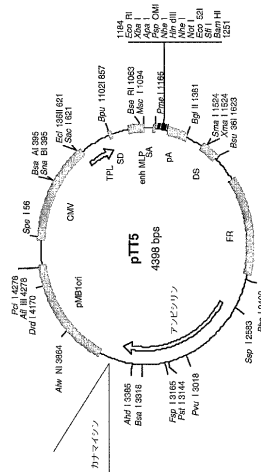


FIG. 2

【図 6】

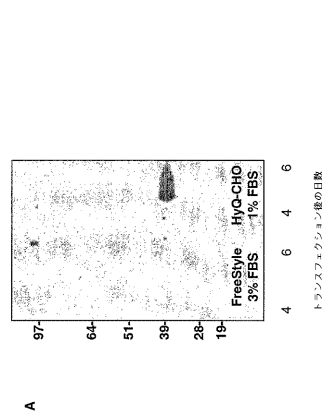
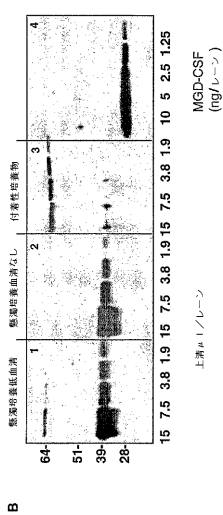


FIG. 6



【図 7】

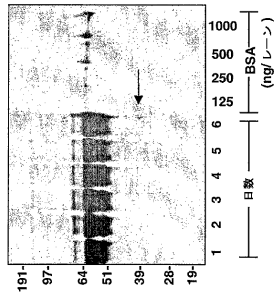


FIG. 7

【図 8 A】

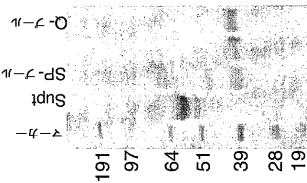
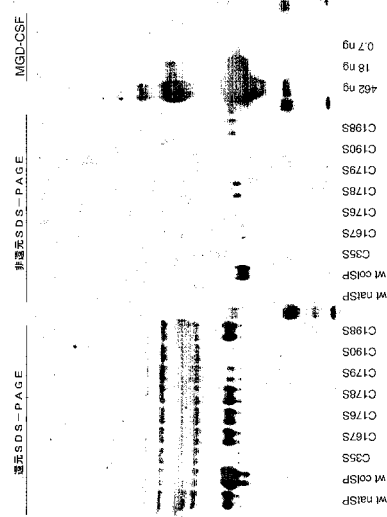


FIG. 8A

【図 8 B】



【図 9】

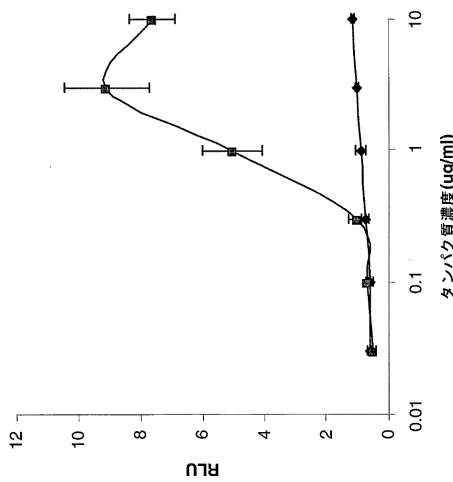


FIG. 9

【図 13】

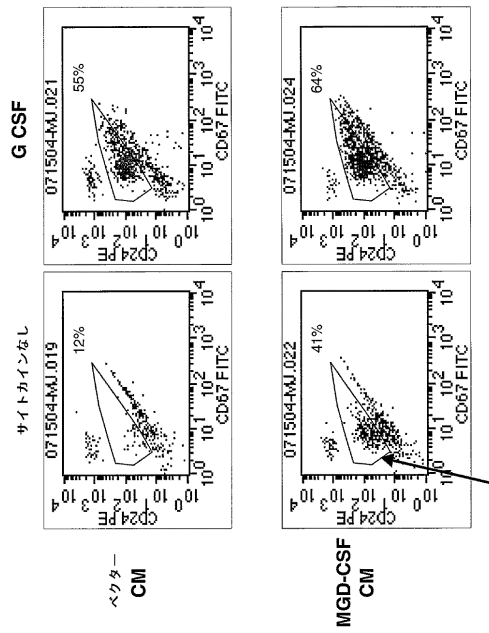


FIG. 13

【図 14】

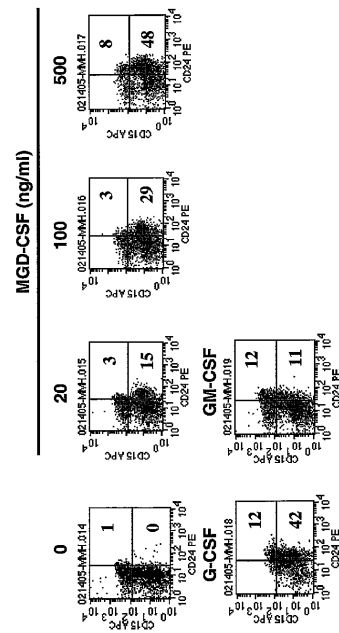


FIG. 14

【図 15】

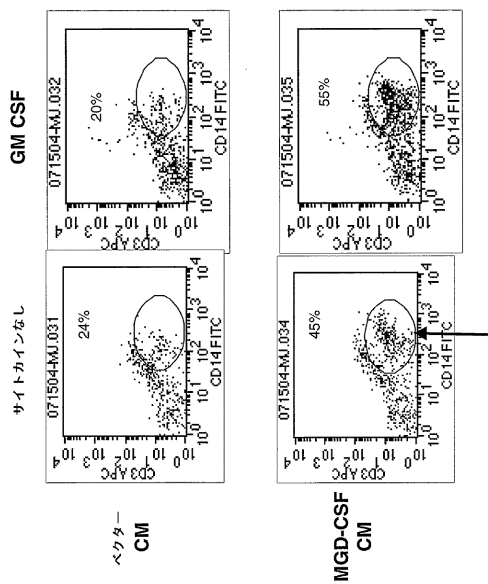


FIG. 15

【図 16】

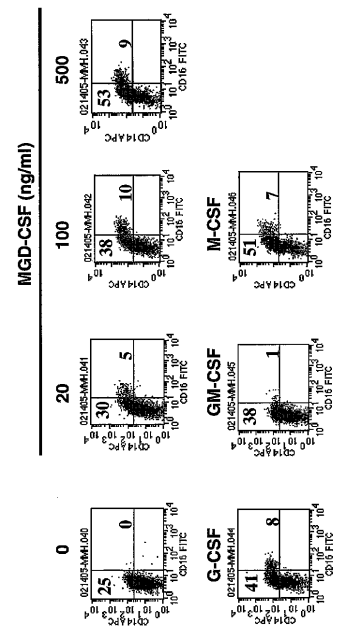


FIG. 16

【図 17】

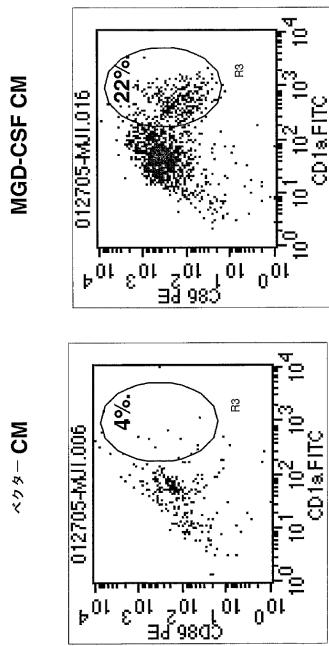


FIG. 17

【図 18 A】

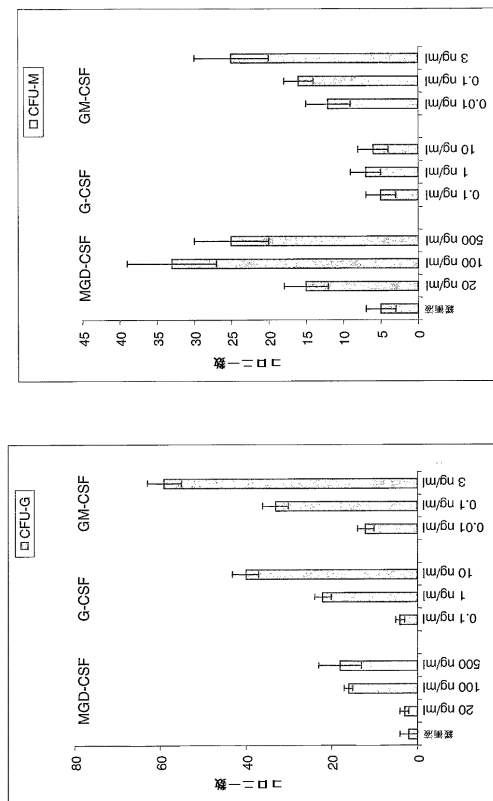


FIG. 18A

【図 18 B】

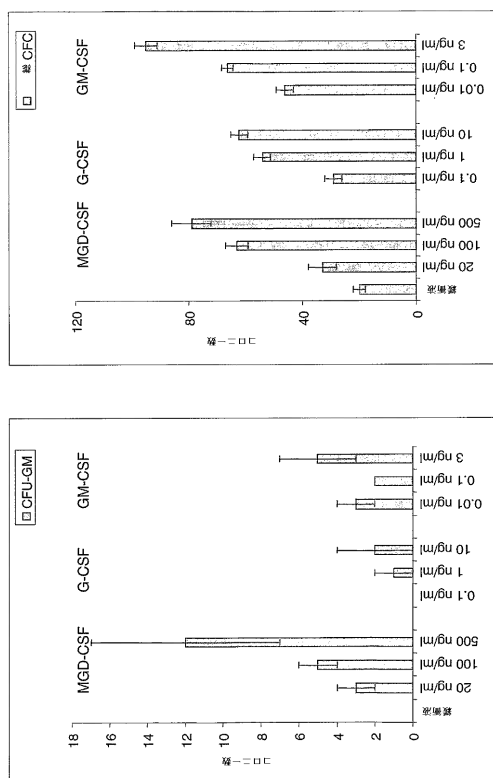


FIG. 18B

【図 18 C】

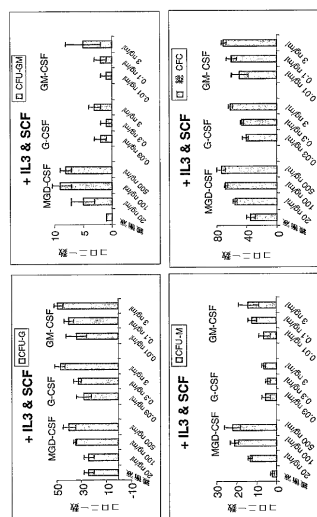


FIG. 18C

【 図 1 9 】

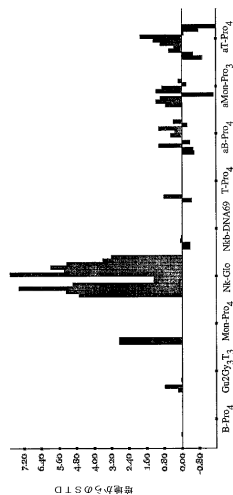


FIG. 19

【 図 2 0 】

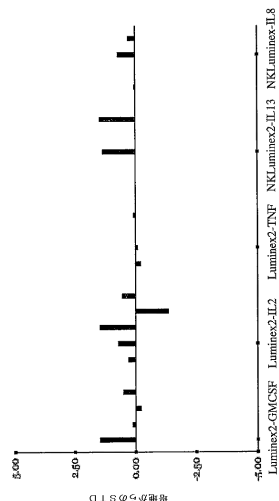


FIG. 20

【 図 2 1 】

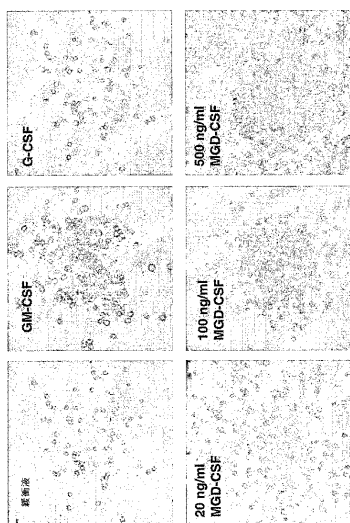


FIG. 21

【 図 2 2 】

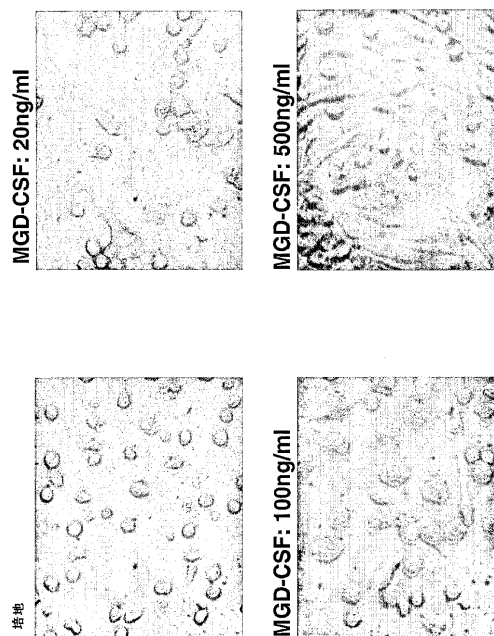


FIG. 22

【配列表】

2008507283000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年4月5日(2007.4.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008507283000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/025941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/27 C12N5/10 C07K14/53 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/68		
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) C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2004/080148 A (NUVELO, INC; TANG, Y., TOM; ASUNDI, VINOD; REN, FEIYAN; ZHANG, JIE; WE) 23 September 2004 (2004-09-23) sequences 663, 1347	1-74
X	WO 2004/009834 A (NUVELO, INC; TANG, Y., TOM; YANG, YONGHONG; WENG, GEZHI; ZHANG, JIE; R) 29 January 2004 (2004-01-29) sequences 141, 385	1-74
X	WO 02/48337 A (INCYTE GENOMICS, INC; GRIFFIN, JENNIFER, A; YAO, MONIQUE, G; DUGGAN, B) 20 June 2002 (2002-06-20) sequences SCEP-49	1-74
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step 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 20 January 2006		Date of mailing of the international search report 08/02/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Guarinos Viñals, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PC17/US2005/025941

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/75067 A (HYSEQ, INC; DRMANAC, RODOJE, T; LIU, CHENGHUA; TANG, Y., TOM) 11 October 2001 (2001-10-11) sequence 16133 -----	1-74
X	WO 02/068579 A (PE CORPORATION) 6 September 2002 (2002-09-06) sequence 11769 -----	1-74
X	STRAUSBERG R L ET AL: "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 99, no. 26, 24 December 2002 (2002-12-24), pages 16899-16903, XP002245220 ISSN: 0027-8424 sequence MGC34647 -----	1-74

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/025941

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 an additional fee, 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 Application No. PCT/US2005 /025941

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 83-129 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 72-82, 130-139, as far as an "in vivo" method is concerned, are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PC17/US2005/025941

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004080148	A	23-09-2004	AU 2003303305 A1 CA 2500521 A1 EP 1556490 A2	30-09-2004 23-09-2004 27-07-2005
WO 2004009834	A	29-01-2004	AU 2002368010 A1 EP 1578989 A2	09-02-2004 28-09-2005
WO 0248337	A	20-06-2002	AU 3259602 A CA 2428216 A1 EP 1409535 A2 JP 2005503106 T	24-06-2002 20-06-2002 21-04-2004 03-02-2005
WO 0175067	A	11-10-2001	AU 4925101 A US 6436703 B1 US 2002061567 A1 US 2002146757 A1	15-10-2001 20-08-2002 23-05-2002 10-10-2002
WO 02068579	A	06-09-2002	NONE	

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	5/06	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	E	4 C 0 8 5	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 H 0 4 5	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15			
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19			
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	A		
C 1 2 P	21/00	(2006.01)	C 1 2 P	21/00	C		
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04			
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00			
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00			
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02			
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10			
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04			
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12			
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	29/00			
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/06			
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1		
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	19/02			
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/06			
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	1/14			
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/00			
A 6 1 P	15/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/10			
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	1/16			
			A 6 1 P	15/06			
			G 0 1 N	33/53	D		

(31)優先権主張番号 60/699,019

(32)優先日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ベーレンス, ディルク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, デルマー コート
5

(72)発明者 ボッシュ, エリザベス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 1 4, クパチーノ, クリケット ヒル ロード 2
3 0 4 7

(72)発明者 ドバースタイン, スティーブン

- アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 0 , サンフランシスコ, エルシー ストリート
1 2 9
- (72)発明者 ヘーレンベック, ロバート フォーガン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 0 3 , サンラファエル, ゴールデン ハインド ブ
ールバード 5 9
- (72)発明者 ヘスティア, ケビン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 7 , ケンジントン, アーリントン アベニュー
2 2 6
- (72)発明者 ファン, ミン メイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 7 9 , サンリアンドロ, アンカレジ ドライブ 1
5 6 8 2
- (72)発明者 リー, アーネスタイン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 7 , ケンジントン, アーリントン アベニュー
2 2 6
- (72)発明者 リン, ハイシャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 2 , カストロバリー, シャーマン ドライブ 2
0 9 4 2
- (72)発明者 リンネマン, トーマス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 5 , サンフランシスコ, ベーカー ストリート
1 3 3 8 , ナンバー 7
- (72)発明者 マーシャル, シャノン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 2 , サンフランシスコ, リンカーン ウェイ 8
2 5 , ナンバー 1 0 6
- (72)発明者 ウォン, ジャスティン ジー . ピー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 1 1 , オークランド, サマセット ロード 3 8 9
, アpartment 3
- (72)発明者 ウー, ジー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 1 2 9 , サンノゼ, プレントウッド ドライブ 9 5
4
- (72)発明者 チョウ, エイリーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 7 9 , サンリアンドロ, フライニング ミスト ロー
ド 1 5 1 3 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA21 BA43 CA02 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA01
GA11 HA08
4B063 QA18 QQ08 QR41 QR48 QR66 QS28 QS36 QX01
4B064 AG01 AG06 AG26 AG27 CA02 CA05 CA10 CA19 CA20 CC24
DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AB01 AB02 BA02 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA22 CA53 MA56 MA60 MA63 MA66
NA14 ZA01 ZA36 ZA39 ZA40 ZA68 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96
ZB02 ZB07 ZB11 ZB15 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZB37
4C085 AA03 AA13 AA14 CC22 DD62 DD88 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA10 DA76 EA20 EA50
FA74

专利名称(译)	用于疾病治疗中MGD-CSF的组合物及其使用方法		
公开(公告)号	JP2008507283A	公开(公告)日	2008-03-13
申请号	JP2007522769	申请日	2005-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	五总理Therapeutics公司		
申请(专利权)人(译)	五总理Therapeutics公司		
[标]发明人	ベーレンスディルク ボッシュエリザベス ドバースタインスティーブン ヘーレンベックロバートフォーガン ヘスティアケビン ファンミンメイ リーアーネスタイン リンハイシャン リンネマントーマス マーシャルシャノン ウォンジャスティンジーピー ウージー チョウエイリーン		
发明人	ベーレンス, ディルク ボッシュ, エリザベス ドバースタイン, スティーブン ヘーレンベック, ロバート フォーガン ヘスティア, ケビン ファン, ミン メイ リー, アーネスタイン リン, ハイシャン リンネマン, トーマス マーシャル, シャノン ウォン, ジャスティン ジー. ピー. ウー, ジー チョウ, エイリーン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/53 C07K16/24 C12P21/08 C07K19/00 C12N5/06 C12Q1/02 C12P21/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/00 A61P37/04 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P31/10 A61P31/04 A61P31/12 A61K39/395 A61P29/00 A61P37/06 A61P19/02 A61P17/06 A61P1/14 A61P25 /00 A61P9/10 A61P1/16 A61P15/06 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P15/00 A61P15/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14 /53 C07K16/243		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/53 C07K16/24 C12P21/08 C07K19/00 C12N5/00.E C12Q1/02 C12P21/02. C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/00.C A61P37/04 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P31/10 A61P31/04 A61P31/12 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P29/00 A61P37/06 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P17/06 A61P1/14 A61P25/00 A61P9/10 A61P1/16 A61P15/06 G01N33 /53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA21 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024 /DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG06 4B064		

/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084 /AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/MA56 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA36 4C084/ZA39 4C084/ZA40 4C084 /ZA68 4C084/ZA75 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB07 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZB37 4C085/AA03 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA74

代理人(译)夏木森下

优先权60/590565 2004-07-22 US
60/647604 2005-01-27 US
60/664932 2005-03-24 US
60/699019 2005-07-14 US

其他公开文献JP5435865B2

外部链接Espacenet

摘要(译)

本发明公开了一种新鉴定的分泌分子，本文鉴定为“单核细胞，粒细胞和树突细胞集落刺激因子”(MGD-CSF)的多肽序列及其多聚体编码肽序列的多核苷酸。此外，还提供了用于产生多肽的方法，例如，通过使用载体和宿主细胞的重组技术。此外，公开了修饰本发明公开的新分子以制备融合蛋白的方法。还公开了使用多肽及其活性片段治疗各种疾病的方法，所述疾病包括例如癌症，自身免疫疾病和炎症疾病，感染性疾病和复发性流产。

特表2008-5 (P2008-5C (43) 公表日 平成20年3月13日(2008				
(51) Int. Cl.		F I	ターマコード (参考	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/53 (2006.01)		C 0 7 K 14/53		4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/24 (2006.01)		C 0 7 K 16/24		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 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00		4 C 0 8 4
審査請求 未請求		予備審査請求 未請求	(全 129 頁) 最終頁	
(21) 出願番号	特願2007-522769 (P2007-522769)	(71) 出願人	503244985	
(86) (22) 出願日	平成17年7月21日 (2005. 7. 21)	ファイブ プライム セラピューテ		
(85) 翻訳文提出日	平成19年3月5日 (2007. 3. 5)	, インコーポレイテッド		
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/025941	アメリカ合衆国 カリフォルニア州		
(87) 国際公開番号	W02006/012451	O S O サウス サン フランシス		
(87) 国際公開日	平成18年2月2日 (2006. 2. 2)	ードウェイ ブールバード 9 5 1		
(31) 優先権主張番号	60/590, 565	(74) 代理人	100078282	
(32) 優先日	平成16年7月22日 (2004. 7. 22)	弁理士 山本 秀策		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409	
(31) 優先権主張番号	60/647, 604	弁理士 安村 高明		
(32) 優先日	平成17年1月27日 (2005. 1. 27)	(74) 代理人	100113413	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 森下 夏樹		
(31) 優先権主張番号	60/664, 932			
(32) 優先日	平成17年3月24日 (2005. 3. 24)			
(33) 優先権主張国	米国 (US)			

最終頁は1