

(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2010-535487

(P2010-535487A)

(43) 公表日 平成22年11月25日 (2010.11.25)

(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 14/535 (2006.01)	C O 7 K 14/535	4 B O 6 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-519511 (P2010-519511)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月31日 (2008.7.31)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年4月2日 (2010.4.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2008/002594
 (87) 国際公開番号 W02009/019441
 (87) 国際公開日 平成21年2月12日 (2009.2.12)
 (31) 優先権主張番号 0715133.5
 (32) 優先日 平成19年8月3日 (2007.8.3)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 60/956,303
 (32) 優先日 平成19年8月16日 (2007.8.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 0724013.8
 (32) 優先日 平成19年12月8日 (2007.12.8)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 502452978
 アステリオン・リミテッド
 イギリス国, エス10 2ティーエヌ シ
 ェフィールド, ウェスタン・バンク, ファ
 ース・コート
 (74) 代理人 100149294
 弁理士 内田 直人
 (74) 代理人 100137512
 弁理士 奥原 康司
 (72) 発明者 アーティミューク, ピーター
 イギリス国, シェフィールド エス10
 2ティーエヌ, ファース コート, ウェス
 タンバンク, アステリオン・リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 顆粒球コロニー刺激因子

(57) 【要約】

本発明者らは、顆粒球コロニー刺激因子融合ポリペプチド、上述のポリペプチドをコードする核酸分子、および上述のタンパク質を使用する治療の方法を開示する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの少なくとも 1 つのサイトカイン結合ドメインに直接または間接的に連結される顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドを含む、顆粒球コロニー刺激因子の活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子。

【請求項 2】

顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの少なくとも 1 つのサイトカイン結合ドメインに直接または間接的に連結される顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドのアミノ酸配列またはその活性部分を含む融合ポリペプチド。

【請求項 3】

顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの 2 つのサイトカイン結合ドメインを含む、請求項 2 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4】

免疫グロブリン様ドメインをさらに含む、請求項 2 または 3 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5】

少なくとも 1 つのフィブロネクチン I I I ドメインを含む、請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 3 1 で表されるアミノ酸残基 9 7 から 2 0 1 を含む、請求項 2 から 5 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 3 1 のアミノ酸残基 2 0 2 から 3 1 3 を含む、請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 3 1 のアミノ酸残基 9 7 から 3 1 3 を含む、請求項 2 から 7 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 3 1 のアミノ酸残基 1 から 9 7 を含む、請求項 2 から 8 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 10】

顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドは、サイトカイン結合ドメインに連結され、前記顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドは、前記融合ポリペプチドにおいて前記サイトカイン結合ドメインのアミノ末端側に位置する、請求項 2 から 9 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 11】

顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドは、サイトカイン結合ドメインに連結され、前記顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドは、前記融合ポリペプチドにおいて前記サイトカイン結合ドメインのカルボキシル末端側に位置する、請求項 2 から 9 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 12】

顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドは、ペプチドリinkerによって、顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの結合ドメインに連結される、請求項 2 から 11 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 13】

前記ペプチド連結分子は、ペプチド G l y G l y G l y G l y S e r の少なくとも 1 コピーを含む、請求項 12 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 14】

前記ペプチド連結分子は、ペプチド G l y G l y G l y G l y S e r の 2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 コピーを含む、請求項 13 に記載の融合ポリペプチ

10

20

30

40

50

ド。

【請求項 15】

前記ペプチド連結分子は、ペプチド Gly Gly Gly Gly Ser の 6 コピーから成る、請求項 14 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 16】

ペプチド連結分子を含まず、顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドおよび顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの結合ドメインの直接的な融合物である、請求項 2 から 11 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 17】

i) 配列番号 5 で表される核酸配列、10
 i i) 配列番号 7 で表される核酸配列、
 i i i) 配列番号 9 で表される核酸配列、
 i v) 配列番号 11 で表される核酸配列、
 v) 配列番号 13 で表される核酸配列、
 v i) 配列番号 15 で表される核酸配列、
 v i i) 配列番号 17 で表される核酸配列、
 v i i i) 配列番号 19 で表される核酸配列
 から選択される核酸配列を含む核酸分子、または
 配列番号 5 ~ 配列番号 19 とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、顆粒球コロニー刺激因子受容体調節活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子。20

【請求項 18】

アゴニスト活性を有するポリペプチドをコードする、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 19】

アンタゴニスト活性を有するポリペプチドをコードする、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 20】

配列番号 5 で表される核酸配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 21】

配列番号 7 で表される核酸配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。30

【請求項 22】

配列番号 9 で表される核酸配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 23】

配列番号 11 で表される核酸配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 24】

配列番号 13 で表される核酸配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 25】

配列番号 15 で表される核酸配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 26】

配列番号 17 で表される核酸配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。40

【請求項 27】

配列番号 19 で表される核酸配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 28】

請求項 17 から 27 のいずれか一項に記載の核酸によってコードされるポリペプチド。

【請求項 29】

配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、25、26、27、28、29、または 30 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 30】

アゴニスト活性を有する、請求項 29 に記載のポリペプチド。

【請求項 31】

50

アンタゴニスト活性を有する、請求項 29 に記載のポリペプチド。

【請求項 32】

2 つのポリペプチドから成るホモ二量体であって、前記ポリペプチドはそれぞれ、

i) 顆粒球コロニー刺激因子またはその受容体結合ドメインを含む第 1 の部分と、ペプチド連結分子によってそれと任意選択で連結される

ii) 顆粒球コロニー刺激因子受容体のサイトカイン相同性結合ドメインまたはその部分を含む第 2 の部分と

を含むホモ二量体。

【請求項 33】

前記ホモ二量体は、配列番号 6 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

10

【請求項 34】

前記ホモ二量体は、配列番号 8 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 35】

前記ホモ二量体は、配列番号 10 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 36】

前記ホモ二量体は、配列番号 12 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

20

【請求項 37】

前記ホモ二量体は、配列番号 14 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 38】

前記ホモ二量体は、配列番号 16 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 39】

前記ホモ二量体は、配列番号 18 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 40】

30

前記ホモ二量体は、配列番号 20 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 41】

前記ホモ二量体は、配列番号 25 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 42】

前記ホモ二量体は、配列番号 26 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 43】

前記ホモ二量体は、配列番号 27 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

40

【請求項 44】

前記ホモ二量体は、配列番号 28 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 45】

前記ホモ二量体は、配列番号 29 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

【請求項 46】

前記ホモ二量体は、配列番号 30 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 32 に記載のホモ二量体。

50

【請求項 47】

請求項 1 または 17 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 48】

請求項 1 もしくは 17 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項 47 に記載のベクターを用いて形質移入または形質転換される細胞。

【請求項 49】

真核細胞である、請求項 48 に記載の単離細胞。

【請求項 50】

原核細胞である、請求項 48 に記載の細胞。

【請求項 51】

賦形剤または担体を含む、請求項 2 から 16 または 28 から 31 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 52】

さらなる治療薬と組み合わせられる、請求項 51 に記載の組成物。

【請求項 53】

顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドの投与が有効であろう状態に罹患しているヒト対象を治療するための方法であって、請求項 2 から 16 または 28 から 31 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 54】

前記ポリペプチドは、静脈内に投与される、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記ポリペプチドは、皮下に投与される、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 56】

前記ポリペプチドは、2 日間隔で投与される、請求項 53 から 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

前記ポリペプチドは、1 週間隔で投与される、請求項 53 から 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記ポリペプチドは、2 週間隔で投与される、請求項 53 から 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記ポリペプチドは、1 カ月間隔で投与される、請求項 53 から 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記状態は、好中球減少症である、請求項 53 から 59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

ヒト対象における造血前駆細胞の増殖および / または分化を刺激するための方法であって、請求項 2 から 16 または 28 から 31 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 62】

インビボの方法である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

インビトロの方法である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 64】

造血前駆細胞の刺激に続いて、前記ヒト対象から骨髓が摘出され、造血前駆細胞移植に使用される、請求項 61 または 62 に記載の方法。

【請求項 65】

前記摘出された骨髓は、骨髓移植を必要とするヒト対象に投与される、請求項 64 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 6】

好中球減少症の治療のための医薬の製造のための、請求項 2 から 1 6 または 2 8 から 3 1 のいずれか一項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 6 7】

ヒト対象における造血前駆細胞の増殖および/または分化の刺激のための医薬の製造における、請求項 2 から 1 6 または 2 8 から 3 1 のいずれか一項に記載のポリペプチドの有効量の使用。

【請求項 6 8】

請求項 2 から 1 6 または 2 8 から 4 6 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは二量体に結合するモノクローナル抗体。

10

【請求項 6 9】

ポリペプチドまたは二量体に結合するが、顆粒球コロニー刺激因子または顆粒球コロニー刺激因子受容体にそれぞれ特異的に結合しない抗体である、請求項 6 8 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7 0】

本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を調製するための方法であって、

i) 本発明による少なくとも 1 つのポリペプチドまたはその断片を含む免疫原を用いて免疫応答性哺乳動物を免疫するステップ、

i i) 免疫された免疫応答性哺乳動物のリンパ球を骨髓腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成するステップ、

i i i) ステップ (i i) のハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体を、(i) のポリペプチドに対する結合活性についてスクリーニングするステップ、

i v) ハイブリドーマ細胞を培養して、前記モノクローナル抗体を量産および/または分泌するステップ、ならびに

v) 培養上清からモノクローナル抗体を回収するステップを含む方法。

20

【請求項 7 1】

請求項 7 0 に記載の方法によって得られるまたは入手可能なハイブリドーマ細胞株。

【請求項 7 2】

生体試料において、本発明によるポリペプチドを検出するための診断試験であって、

i) 試験対象となる単離試料を提供するステップ、

i i) 前記試料を、請求項 2 から 1 6 または 2 8 から 4 6 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは二量体に結合するリガンドと接触させるステップ、および

i i i) 前記試料において前記リガンドの結合を検出するステップを含む診断試験。

30

【請求項 7 3】

前記リガンドは、抗体である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 7 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

40

【0 0 0 1】

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子 (G C S F) 融合ポリペプチドおよび二量体、上述のポリペプチドをコードする核酸分子、ならびに上述のタンパク質/二量体を使用する治療の方法に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

サイトカイン受容体は、3 つの別個のグループに分類することができる。クラス 1 (ヘマトポエチンまたは成長ホルモンファミリーと呼ばれる) 受容体は、それらの細胞外ドメインのアミノ末端部分における 4 つの保存システイン残基および C 末端部分における保存 T r p - S e r - X a a - T r p - S e r モチーフの存在によって特徴づけられる。受容

50

体は、2つのポリペプチド鎖から成る。クラスI受容体は、GM-CSFサブファミリー（IL-3、IL-5、GM-CSF、GCSFを含む）ならびにIL-6サブファミリー（IL-6、IL-11、およびIL-12を含む）に細分することができる。IL-6サブファミリーにおいて、1つまたは2つの異なるサイトカインサブユニットと結合する、共通の伝達サブユニット（gp130）がある。IL-2サブファミリー（IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、およびIL-15を含む）と呼ばれる、さらなるサブファミリーがある。繰り返しCysモチーフはまた、リガンドが、 α 、 β 、および γ インターフェロンであるが、保存Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフを欠くクラス2（インターフェロン受容体ファミリー）においても存在する。

【0003】

GCSFは、顆粒球前駆細胞の増殖および分化を刺激する。GCSFは、mRNAの差次的スプライシングに起因する2つのポリペプチドをコードする単一遺伝子によってコードされる。ポリペプチドは、長さが177および180のアミノ酸であり、成熟ポリペプチドは19.6kDの分子量を有する。GCSFは、内皮およびマクロファージによって産生され、活性化された場合に、顆粒球へのそれらの成熟をもたらす、骨髄における顆粒球前駆細胞上で発現されるGCSF受容体（GCSFR）を通して作用する。これらは、その後、好中球前駆体および成熟好中球に分化することができる。組換えGSCFの主な治療的応用は、好中球の消失および結果的に好中球減少症の発症をもたらす、癌のための化学療法を受けている患者の治療におけるものである。好中球減少症は、免疫抑制をもたらす、患者を感染症および敗血症にさらす。さらに、組換えGCSFは、造血幹細胞移植における摘出および使用に先立ってインビボにおいて造血幹細胞の数を増加させるために使用される。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、薬物動態（PK）および活性が改善されたGCSF組換え形態の同定に関する。新しいGCSF分子は、生物学的活性を有し、二量体を形成し、安定性が改善されている。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1a】哺乳動物細胞株において発現されるGCSFをコードする核酸配列を示す図である。シグナル配列は、太字および小文字で示す。*は、終止コドンを目指す。ヌクレオチド長=522bp（シグナル配列を含まず）。

【図1b】アミノ酸配列長=174aa（シグナル配列を含まず）を示す図である。

【図2a】6×ヒスチジンタグを有する、大腸菌（pET21a（+））において発現されるGCSFをコードする核酸配列を示す図である。ATG開始コドンは、太字で示す。

*は、終止コドンを目指す。太字イタリック体の文字は、Hist-タグによる5'末端の超過配列を目指す。

【図2b】成熟アミノ酸配列長=182aa（メチオニン開始を含まず）を示す図である。

【図3a】GCSF-L6-GCSFR EC（1~3）をコードする核酸配列は、G4S×6を介してGCSF細胞外受容体ドメイン1~3（Ig、BN、およびBC）に連結されるGCSFを含有する。*は、終止コドンを目指す。シグナル配列は、太字および小文字で示す。

【図3b】アミノ酸配列長=511aa（シグナル配列を含まず）を示す図である。

【図4a】大腸菌において発現されるGCSF-L6-GCSFR EC（1~3）をコードする核酸配列は、G4S×6を介してGCSF細胞外受容体ドメイン1~3（Ig、BN、およびBC）に連結されるGCSFを含有する。*は、終止コドンを目指す。ATG開始コドンは、太字で示す。*は、終止コドンを目指す。太字イタリック体の文字は、Hist-タグによる5'末端の超過配列を目指す。

【図4b】アミノ酸配列長=519aa（メチオニン開始を含まず）を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 5 a】哺乳動物細胞株において発現される G C S F - L 8 - G C S F r E C (1 ~ 3) をコードする核酸配列は、G 4 S × 8 を介して G C S F 細胞外受容体ドメイン 1 ~ 3 (I g、B N、および B C) に連結される G C S F を含有する。* は、終止コドンを指す。シグナル配列は、太字および小文字で示す。

【図 5 b】アミノ酸配列長 = 5 2 1 a a (シグナル配列を含まず) を示す図である。

【図 6 a】大腸菌において発現される G C S F - L 8 - G C S F r E C (1 ~ 3) をコードする核酸配列は、G 4 S × 8 を介して G C S F 細胞外受容体ドメイン 1 ~ 3 (I g、B N、および B C) に連結される G C S F を含有する。* は、終止コドンを指す。

【図 6 b】アミノ酸配列長 = 5 2 9 a a (メチオニン開始を含まず) を示す図である。

【図 7 a】G C S F - L 6 - G C S F r E C (1 ~ 2) をコードする核酸は、G 4 S × 6 を介して G C S F 細胞外受容体ドメイン 1 ~ 2 (I g および B N) に連結される G C S F を含有する。* は、終止コドンを指す。シグナル配列は、太字および小文字で示す。

10

【図 7 b】アミノ酸配列長 = 4 0 4 a a (シグナル配列を含まず) を示す図である。

【図 8 a】G C S F - L 6 - G C S F r E C (2 ~ 3) をコードする核酸は、G 4 S × 6 を介して G C S F 細胞外受容体ドメイン 2 ~ 3 (B N および B C) に連結される G C S F を含有する。* は、終止コドンを指す。シグナル配列は、太字および小文字で示す。

【図 8 b】アミノ酸配列長 = 4 1 6 a a (シグナル配列を含まず) を示す図である。

【図 9 a】G C S F r E C (1 ~ 3) - L 6 - G C S F をコードする核酸は、G 4 S × 6 を介して G C S F に連結される G C S F r E C (ドメイン 1 ~ 3) を含有する。* は、終止コドンを指す。シグナル配列は、太字および小文字で示す。

20

【図 9 b】アミノ酸配列長 = 5 1 1 a a (シグナル配列を含まず) を示す図である。

【図 1 0 a】哺乳動物細胞株において発現される G C S F r E C (2 ~ 3) - L 6 - G C S F をコードする核酸は、G 4 S × 6 を介して G C S F に連結される G C S F r E C (ドメイン 2 ~ 3) を含有する。* は、終止コドンを指す。シグナル配列は、太字および小文字で示す。

【図 1 0 b】アミノ酸配列長 = 4 1 6 a a (シグナル配列を含まず) を示す図である。

【図 1 1 a】哺乳動物細胞株において発現される G C S F r E C をコードする核酸配列は、G C S F 受容体細胞外ドメイン 1 ~ 3 を含有する。シグナル配列は、太字および小文字で示す。* は、終止コドンを指す。

【図 1 1 b】アミノ酸配列長 = 3 0 7 a a (シグナル配列を含まず) を示す図である。

30

【図 1 2 a】6 × ヒスチジンタグを有する、p E T 2 1 a (+) において発現される核酸配列 G C S F r E C (細胞外ドメイン 1 ~ 3) を示す図である。(* は、終止コドンを指し、太字の文字は、追加の X h o 1 制限部位および 6 × H i s t タグを指す)。

【図 1 2 b】アミノ酸配列長 = 3 1 5 a a (M e t を含まず) を示す図である。

【図 1 3】a) P C R は、適した制限部位 (プライマー R 1 ~ 4 内に含有される) が側面に位置する、興味のある遺伝子から成る D N A を生成するために使用した。b) P C R 産物は、リンカー領域の両側に、適したベクターの中にライゲーションした。c) 構築物は、その後、適切なリンカーを導入するために修飾した。リンカーは、いかなる不要な配列 (つまり非天然制限部位) も含有しなかった。

【図 1 4】a) オリゴヌクレオチドは、特有のオーバーラップを有する部分的に二本鎖の領域を形成するように設計し、アニールし、処理した場合、リガンドおよび受容体にアニールするであろう隣接領域を有するリンカーをコードするであろう。b) P C R は、L R 融合遺伝子を産生するために「メガプライマー」ならびに末端プライマー (R 1 および R 2) を使用して行った。R 1 および R 2 プライマーは、標的ベクターの中へのライゲーションに有用な隣接制限部位を導入するように設計した。

40

【図 1 5】顆粒球コロニー刺激因子受容体の完全アミノ酸配列を示す図である。

【図 1 6】G C S F キメラ構築物を発現する C H O f l p I n 安定細胞株のウェスタンブロット分析を示す図である。レーン 1 = 4 A 1 ; レーン 2 = 4 D 1 ; レーン 3 = 偽培地 ; レーン 4 = 4 A 1 ; レーン 5 = 4 D 1 ; レーン 6 = 偽培地 ; A = 非還元条件 ; B = 還元条件。4 A 1 および 4 D 1 の両方は 7 5 および 1 0 0 k D a の間まで流れる。G C S F は

50

、グリコシル化タンパク質について予想されるように 37 および 45 kDa の間まで流れる。

【図 17】GCSF-LR 融合構築物の模式図を示す図である。

【図 18】4A1 および 4D1 構築物を発現する CHO Flp-In 安定細胞株の免疫ブロット分析を示す図である。レーン M = マーカー (250、150、100、75、50、37、25、および 20 kDa)；レーン 1 = 4A1；レーン 2 = 4D1；レーン 3 = 偽培地；レーン 4 = 4A1；レーン 5 = 4D1；レーン 6 = 偽培地。レーン 1 ~ 3 = 還元条件およびレーン 4 ~ 6 = 非還元条件。

【図 19】GCSF、4B1、4C1、4C2、および 4E1 構築物を発現する CHO Flp-In 安定細胞株の免疫ブロット分析を示す図である。レーン M = マーカー (250、150、100、75、50、37、25、20、および 15 kDa)；- = DTT なし (非還元)；+ = DTT あり (還元)。

【図 20】(A) 4A1 精製ステップのクーマシー染色ゲルを示す図である。レーン M = マーカー (250、150、100、75、50、37、25、20、および 15 kDa)；レーン 1 = 粗製培地 10 × 濃縮物；レーン 2 = pH 4.5 沈殿ペレット；レーン 3 = pH 4.5、沈殿上清、レーン 4 = pH 5.5、SP 非結合、レーン 5 = pH 5.5、SP 結合、レーン 6 ~ 8 = pH 8.0 Q カラムからの画分 4 ~ 6、レーン 9 = 50% 硫酸アンモニウム沈殿ペレット。(B) 精製 4A1 の免疫ブロットを示す図である。レーン M = マーカー (上記)、レーン 1 = 4A1 (DTT あり；還元)、レーン 2 = 4A1 (DTT なし；非還元)。

【図 21】GCSF、Neulasta、および GCSF-LR 融合物 4A1 の活性を測定するインビトロバイオアッセイを示す図である。材料および方法

【発明を実施するための形態】

【0006】

本発明の一態様によれば、顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの少なくとも 1 つのサイトカイン結合ドメインに直接または間接的に連結される顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドを含む、顆粒球コロニー刺激因子の活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子が提供される。

本発明の一態様によれば、顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの少なくとも 1 つのサイトカイン結合ドメインに直接または間接的に連結される顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドのアミノ酸配列またはその活性部分を含む融合ポリペプチドが提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの 2 つのサイトカイン相同性結合ドメインを含む。

本発明のさらなる好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、免疫グロブリン様ドメインをさらに含む。

本発明のさらなる好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、少なくとも 1 つのフィブロネクチンドメイン III、好ましくは 2 つまたは 3 つのフィブロネクチン III ドメインを含む。

GCSFR は、複雑であり、その分子構造に寄与する一連のドメインを含む。GCSFR は、構造的におよび機能的に定義されるいくつかの領域に細分することができる。受容体は、長さが 812 のアミノ酸であり、それが、細胞外ドメイン、単一膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む限り、典型的なサイトカイン受容体である。細胞外ドメインは、成熟ポリペプチドにおけるアミノ末端から、免疫グロブリン様ドメイン (アミノ酸 1 ~ 97)、第 1 のサイトカイン相同性ドメイン (97 ~ 201) および第 2 のサイトカインドメイン (202 ~ 313)、ならびに 3 つのフィブロネクチン III ドメインを含む分子構造を有する。機能的に、第 1 および第 2 のサイトカインドメインは、GCSF に結合する。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 31 で表されるアミノ酸残基 97 ~ 201 を含む。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 31

のアミノ酸残基 202 ~ 313 を含む。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 31 のアミノ酸残基 97 ~ 313 を含む。

本発明のさらなる好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 31 のアミノ酸残基 1 ~ 97 を含む。

本発明の好ましい実施形態において、ポリペプチドは、サイトカイン結合ドメインに連結され、上述の顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドは、上述の融合ポリペプチドにおいて上述のサイトカイン結合ドメインのアミノ末端側に位置する。

本発明の代替の好ましい実施形態において、顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドは、サイトカイン結合ドメインに連結され、上述の顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドは、上述の融合ポリペプチドにおいて上述のサイトカイン結合ドメインのカルボキシル末端側に位置する。

本発明の好ましい実施形態において、顆粒球コロニー刺激因子は、ペプチドリinker、好ましくは柔軟なペプチドリinkerによって、顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの結合ドメインに連結される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のペプチド連結分子は、ペプチド Gly Gly Gly Ser の少なくとも 1 コピーを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のペプチド連結分子は、ペプチド Gly Gly Gly Ser の 2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 コピーを含む。

好ましくは、上述のペプチド連結分子は、ペプチド Gly Gly Gly Gly Ser の 6 コピーから成る。

本発明の代替の実施形態において、上述のポリペプチドは、ペプチド連結分子を含まず、顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドおよび顆粒球コロニー刺激因子受容体ポリペプチドの結合ドメインの直接的な融合物である。

本発明の一態様によれば、

- i) 配列番号 5 で表される核酸配列、
- ii) 配列番号 7 で表される核酸配列、
- iii) 配列番号 9 で表される核酸配列、
- iv) 配列番号 11 で表される核酸配列、
- v) 配列番号 13 で表される核酸配列、
- vi) 配列番号 15 で表される核酸配列、
- vii) 配列番号 17 で表される核酸配列、
- viii) 配列番号 19 で表される核酸配列

から選択される核酸配列を含む核酸分子、または

配列番号 5 ~ 配列番号 19 とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、顆粒球コロニー刺激因子受容体調節活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、アゴニスト活性を有するポリペプチドをコードする。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、アンタゴニスト活性を有するポリペプチドをコードする。

核酸分子のハイブリダイゼーションは、2つの相補的な核酸分子が、互いに、かなりの量の水素結合を起こす場合に起こる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、核酸を取り囲む環境条件、ハイブリダイゼーション方法の性質、ならびに使用される核酸分子の組成および長さによって変動し得る。特定の程度のストリンジェンシーを達成するのに必要とされるハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001) および Tijssen、Laborator

10

20

30

40

50

y Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes 第I部、第2章 (Elsevier、New York、1993) において説明される。 T_m は、核酸分子の所与の鎖の50%が、その相補鎖にハイブリダイズする温度である。以下は、ハイブリダイゼーション条件の例示的なセットであり、限定的なものではない。

非常に高度なストリンジェンシー (少なくとも90%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

ハイブリダイゼーション: 16時間、65 で $5 \times \text{SSC}$

2度洗浄: それぞれ15分間、室温 (RT) で $2 \times \text{SSC}$

2度洗浄: それぞれ20分間、65 で $0.5 \times \text{SSC}$

高度なストリンジェンシー (少なくとも80%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

ハイブリダイゼーション: 16 ~ 20時間、65 ~ 70 で $5 \times \sim 6 \times \text{SSC}$

2度洗浄: それぞれ5 ~ 20分間、RTで $2 \times \text{SSC}$

2度洗浄: それぞれ30分間、55 ~ 70 で $1 \times \text{SSC}$

低度なストリンジェンシー (少なくとも50%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

ハイブリダイゼーション: 16 ~ 20時間、RT ~ 55 で $6 \times \text{SSC}$

少なくとも2度洗浄: それぞれ20 ~ 30分間、RT ~ 55 で $2 \times \sim 3 \times \text{SSC}$ 。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号5で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号7で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号9で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号11で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号13で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号15で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号17で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号19で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の一態様によれば、本発明による核酸によってコードされるポリペプチドが提供される。

本発明のさらなる態様によれば、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、25、26、27、28、29、または30から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれから成るポリペプチドが提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、アゴニスト活性を有する。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、アンタゴニスト活性を有する。

本発明の一態様によれば、2つのポリペプチドから成るホモ二量体であって、上述のポリペプチドはそれぞれ、

i) 顆粒球コロニー刺激因子またはその受容体結合ドメインを含む第1の部分と、ペプチド連結分子によってそれと任意選択で連結される

ii) 顆粒球コロニー刺激因子受容体のサイトカイン相同性結合ドメインまたはその部分

を含む第 2 の部分と

を含むホモ二量体が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 6 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 8 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 10 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 12 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

10

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 14 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 16 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 18 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 20 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 25 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

20

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 26 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 27 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 28 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 29 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 30 を含むまたはそれから成る 2 つのポリペプチドを含む。

30

本発明のさらなる態様によれば、本発明による核酸分子を含むベクターが提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のベクターは、本発明による核酸分子を発現するように適合された発現ベクターである。

本発明による (1 つまたは複数の) 核酸を含むベクターは、特に、ベクターが、安定した形質移入のための、ゲノムの中への組換えのために細胞の中に核酸を導入するために使用されることになっている場合、プロモーターまたは他の調節配列を含む必要はない。好ましくは、ベクターにおける核酸は、適切なプロモーターまたは宿主細胞における転写のための他の調節エレメントに作動可能に連結される。ベクターは、複数の宿主において機能する二機能性発現ベクターであってもよい。「プロモーター」によって、転写開始部位から上流の、転写に必要とされる調節領域をすべて含有するヌクレオチド配列が意味される。適したプロモーターは、真核細胞または原核細胞における発現のための構成的、組織特異的、誘発性、発生的、または他のプロモーターを含む。「作動可能に連結される」は、転写がプロモーターから開始されるように適切に位置し、配向する同じ核酸分子の一部としてつながれていることを意味する。プロモーターに作動可能に連結される DNA は、プロモーターの「転写開始調節下に」ある。

40

好ましい実施形態において、プロモーターは、構成的、誘発性、または調節可能プロモーターである。

本発明のさらなる態様によれば、本発明による核酸分子またはベクターを用いて形質移入または形質転換される細胞が提供される。

好ましくは、上述の細胞は、真核細胞である。その代わりに、上述の細胞は、原核細胞

50

である。

本発明の好ましい実施形態において、上述の細胞は、真菌細胞（たとえばピキア種、サッカロミセス種、アカパンカビ種）、昆虫細胞（たとえばスポドブレラ種）、哺乳動物細胞（たとえばCOS細胞、CHO細胞）、植物細胞から成る群から選択される。

本発明の好ましい実施形態において、上述の細胞は、安定して形質移入または形質転換される。

本発明のさらなる態様によれば、賦形剤または担体を含む、本発明によるポリペプチドを含む医薬組成物が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述の医薬組成物は、さらなる治療薬と組み合わせられる。

投与される場合、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる調製物で投与される。そのような調製物は、薬学的に許容できる濃度の塩、緩衝剤、防腐剤、適合性の担体、および任意選択で他の治療薬を規定どおりに含有していてもよい。

本発明の医薬組成物は、注射を含む、任意の通常の経路によって投与することができる。投与および適用は、たとえば経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、関節内、皮下、局所（目）、皮膚（たとえば皮膚または粘膜へのクリーム状の脂質可溶性挿入物）、経皮、鼻腔内であってもよい。

本発明の医薬組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独でまたはさらなる薬もしくは共力性の薬剤と共に所望の応答をもたらす医薬品／組成物の量である。これは、一時的に疾患の進行を単に遅らせることを伴ってもよいが、より好ましくは、それは、持続的に疾患の進行を食い止めることを伴う。これは、ルーチン的な方法によってモニターすることができるまたは診断方法に従ってモニターすることができる。

対象に投与される医薬組成物の用量は、異なるパラメーターに従って、特に、使用される投与のモードおよび対象の状態（つまり年齢、性別）に従って選ぶことができる。投与される場合、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる量および薬学的に許容できる組成物で適用される。医薬で使用される場合、塩は、薬学的に許容できるはずであるが、薬学的に許容できない塩は、その薬学的に許容できる塩を調製するために好都合に使用されてもよく、本発明の範囲から除外されない。そのような薬理学的におよび薬学的に許容できる塩は、以下の酸から調製されるものを含むが、これらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、およびその他同種のもの。さらに、薬学的に許容できる塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、またはカルシウム塩などのようなアルカリ金属塩またはアルカリ土類塩として調製することができる。

医薬組成物は、所望される場合、薬学的に許容できる担体と組み合わせられてもよい。本明細書において使用されるような用語「薬学的に許容できる担体」は、ヒトへの投与に適した1つまたは複数の適合性の固体または液体の増量剤、希釈剤、またはカプセル化する物質を意味する。用語「担体」は、適用を容易にするために有効成分が組み合わせられる天然または合成の有機または無機成分を示す。医薬組成物の構成成分はまた、所望の医薬品効力を実質的に損なうであろう相互作用がない方法で本発明の分子とおよび互いに混合することもできる。

医薬組成物は、塩中の酢酸、塩中のクエン酸、塩中のホウ酸、および塩中のリン酸を含む適した緩衝剤を含有していてもよい。

医薬組成物はまた、任意選択で、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベン、およびチメロサルなどのような適した防腐剤を含有していてもよい。

医薬組成物は、単位剤形で好都合に与えられてもよく、薬学の技術分野においてよく知られている方法のいずれかによって調製されてもよい。方法はすべて、活性作用物質を、1つまたは複数の補助成分を構成する担体と結合させるステップを含む。一般に、組成物は、活性化化合物を、液体の担体、微粉化した固体の担体、またはその両方と均一におよび完全に結合させることならびにその後、必要であれば、産物を成形することによって調製される。

10

20

30

40

50

経口投与に適した組成物は、カプセル、錠剤、ロゼンジなどのように、別々の単位として与えられてもよく、それぞれが、所定の量の活性化合物を含有する。他の組成物は、シロップ剤、エリキシル剤、または乳剤などのような、水性の液体または非水系の液体中の懸濁剤を含む。

非経口投与に適した組成物は、好ましくは、レシビエントの血液と等張である滅菌した水性または非水系の調製物を好都合に含む。この調製物は、適した分散剤または湿潤剤および懸濁剤を使用して、知られている方法に従って製剤されてもよい。滅菌注射調製物はまた、たとえば1, 3 - ブタンジオール中の液剤のように、無毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶剤中の滅菌注射液剤または懸濁剤であってもよい。用いられてもよい許容できる溶剤の中には、水、リンガー溶液、および等張食塩水がある。さらに、滅菌した不揮発性油は、溶剤または懸濁化剤として慣習的に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたは合成ジグリセリドを含む任意の無刺激の不揮発性油が用いられてもよい。さらに、オレイン酸などのような脂肪酸は、注射剤の調製物において使用されてもよい。経口、皮下、静脈内、筋肉内などの投与に適した担体制剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、Easton、PAにおいて見つけることができる。

本発明のさらなる態様によれば、顆粒球コロニー刺激因子アゴニストの投与が有効であろう状態に罹患しているヒト対象を治療するための方法であって、本発明による少なくとも1つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が提供される。

本発明の好ましい方法において、上述のポリペプチドは、静脈内に投与される。

本発明の代替の好ましい方法において、上述のポリペプチドは、皮下に投与される。

本発明のさらなる好ましい方法において、上述のポリペプチドは、2日間隔で投与され、好ましくは、上述のポリペプチドは、1週、2週、または1カ月間隔で投与される。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、好中球減少症である。

本発明のさらなる態様によれば、ヒト対象における造血前駆細胞の増殖および/または分化を刺激するための方法であって、本発明による少なくとも1つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が提供される。

本発明の好ましい方法において、上述の方法は、インビトロの方法である。

本発明の代替の好ましい方法において、上述の方法は、インビボの方法である。

本発明の好ましい方法において、造血前駆細胞の刺激に続いて、上述のヒト対象から骨髓が摘出され、造血前駆細胞移植に使用される。

好ましくは、上述の摘出された骨髓は、骨髓移植を必要とするヒト対象に投与される。

本発明の一態様によれば、好中球減少症の治療のための医薬の製造のための、本発明によるポリペプチドの使用が提供される。

本発明のさらなる好ましい実施形態において、上述のポリペプチドは、2日間隔で投与され、好ましくは、上述のポリペプチドは、1週、2週、または1カ月間隔で投与される。

本発明のさらなる態様によれば、ヒト対象における造血前駆細胞の増殖および/または分化の刺激のための医薬の製造における、本発明によるポリペプチドの有効量の使用が提供される。

本発明のさらなる態様によれば、本発明によるポリペプチドまたは二量体に結合するモノクローナル抗体が提供される。

好ましくは、上述のモノクローナル抗体は、ポリペプチドまたは二量体に結合するが、顆粒球コロニー刺激因子または顆粒球コロニー刺激因子受容体にそれぞれ特異的に結合しない抗体である。

モノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドを含む二量体のいずれかによって提示される立体構造抗原 (conformational antigen) に結合する。

本発明のさらなる態様において、本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を調製するための方法であって、

10

20

30

40

50

i) 本発明による少なくとも1つのポリペプチドを含む免疫原を用いて免疫応答性哺乳動物を免疫するステップ、ii) 免疫された免疫応答性哺乳動物のリンパ球を骨髓腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成するステップ、

iii) ステップ(ii)のハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体を、(i)のポリペプチドに対する結合活性についてスクリーニングするステップ、

iv) ハイブリドーマ細胞を培養して、上述のモノクローナル抗体を量産および/または分泌するステップ、ならびに

v) 培養上清からモノクローナル抗体を回収するステップを含む方法が提供される。

好ましくは、上述の免疫応答性哺乳動物は、マウスである。その代わりに、上述の免疫応答性哺乳動物は、ラットである。

ハイブリドーマ細胞を使用するモノクローナル抗体の産生は、当技術分野においてよく知られている。モノクローナル抗体を産生するために使用される方法は、Nature 256、495~497ページ(1975)におけるKohlerおよびMilsteinならびにDonilardおよびHoffman、Compendium of Immunology V. II、Schwartz編、1981における「Basic Facts about Hybridomas」によって開示され、これらは、参照によって組み込まれる。

本発明のさらなる態様によれば、本発明による方法によって得られるまたは入手可能なハイブリドーマ細胞株が提供される。

本発明のさらなる態様によれば、生体試料において、本発明によるポリペプチドを検出するための診断試験であって、

i) 試験対象となる単離試料を提供するステップ、

ii) 上述の試料を、本発明によるポリペプチドまたは二量体に結合するリガンドと接触させるステップ、および

iii) 上述の試料において上述のリガンドの結合を検出するステップを含む診断試験が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のリガンドは、抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。

本明細書の説明および請求項の全体にわたって、その用語「~を含む(comprise)」および「~を含有する(contain)」および用語の変化形、たとえば「~を含む(comprising)」および「~を含む(comprises)」は、「~を含むが、これらに限定されない」を意味し、他の部分、添加剤、構成成分、整数、またはステップを除外することを意図しない(および除外しない)。

本明細書の説明および請求項の全体にわたって、文脈上、他の意味に解すべき場合を除き、単数形は複数形を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、明細書は、文脈上、他の意味に解すべき場合を除き、複数および単数を企図するものとして理解されたい。

本発明の特定の態様、実施形態、または実施例に関連して記載される特色、整数、特徴、化合物、化学的部分、または化学基は、矛盾しない限り、本明細書において記載される他の態様、実施形態、または実施例に適用可能であることが理解されたい。

本発明の実施形態は、ここで、ほんの一例として、以下の図に関連して記載することとする。

インビトロ試験

GCSF融合ポリペプチドの活性を試験するためのインビトロの方法は、当技術分野において知られている。たとえば、GCSFのコロニー形成能力を試験するために動物から血液、骨、および脾臓細胞を摘出することが知られている(Liuら Blood、2000年3月15日; 95(10)、3025~3031ページを参照されたい)。さらに、GCSFRを発現する細胞、たとえばM-NFS-60細胞および³H-チミジンによって測定されるように、増殖するように刺激される細胞の使用が知られている。

インビボ試験

様々な動物モデルは、GCSFの活性を試験するために入手可能である。たとえば、Ha

10

20

30

40

50

radar (Nature . Medicine 11 : 305 ~ 311 ページ、2005) は、投与した組換え G C S F の、心臓機能に対する効果をモニターするために、G C S F の効果を試験した心筋梗塞のマウスモデルを記載する。

免疫試験

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体への顆粒球コロニー刺激因子の結合を測定するイムノアッセイは、当技術分野において知られている。市販で入手可能な顆粒球コロニー刺激因子抗体は、試料における顆粒球コロニー刺激因子を検出するためにおよびまた競合的阻害研究における使用のためにも入手可能である。たとえば <http://www.scbt.com/index.html>、Santa Cruz Biotechnology Inc. を参照されたい。

10

融合タンパク質の組換え産生

融合タンパク質の構成成分は、リガンドまたは受容体にアニールし、標的ベクターの中にクローニングするための適した制限部位を導入するように設計したプライマーを使用して、P C R によって生成した (図 13 a)。P C R のための鋳型は、標的遺伝子を含み、I M A G E クローン、c D N A ライブラリー、または特注合成遺伝子から得た。適切な隣接制限部位を有するリガンドおよび受容体の遺伝子を合成したら、これらは、その後、標的ベクターにおけるリンカー領域の両側にライゲーションした (図 13 b)。構築物は、その後、リンカー領域の両側の 2 つの特有の制限部位の間への特注合成長の D N A の挿入によって、s s D N A 修飾技術によるリンカー領域の変更によって、適した制限部位の間へのプライマーデュプレックス / マルチプレックスの挿入によって、または P C R 修飾によって、隣接制限部位を有していない適切なリンカーを含有するように修飾した (図 13 c)。

20

その代わりに、最適なりガンドまたは受容体のドメインにアニールするように設計した隣接配列を有するリンカーを、オリゴヌクレオチドデュプレックスを作製することによって、最初に合成し、これを、二本鎖の D N A を生成するように処理した (図 14 a)。その後、「メガプライマー」としてのリンカー配列、「メガプライマー」がアニールするリガンドおよび受容体の反対側の末端に対して設計したプライマーを使用し、鋳型としてのリガンドおよび受容体を用いて P C R を行った。末端プライマーは、最適な発現ベクターへのライゲーションに適した制限部位を用いて設計した (図 14 b)。

30

融合タンパク質の発現および精製

発現は、適した系 (たとえば哺乳動物 C H O 細胞および大腸菌) において実行し、これは、L R 融合遺伝子を生成したベクターに依存した。発現は、その後、1 つまたは複数の S D S - P A G E、未変性 P A G E、ウェスタンブロッティング、E L I S A を含むことができる多種多様の方法を使用して分析した。

適したレベルの発現が達成されたら、L R 融合物は、精製および後の分析のための十分なタンパク質を産生するためにより大規模で発現させた。

精製は、イオン交換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、硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、サイズ排除、および / またはアフィニティークロマトグラフィーなどのような 1 つまたは複数のクロマトグラフィー手順の適した組合せを使用して実行した (ニッケル / コバルト樹脂、抗体固定化樹脂、および / またはリガンド / 受容体固定化樹脂を使用)。

40

精製タンパク質は、1 つまたは複数のブラッドフォードアッセイ、S D S - P A G E、未変性 P A G E、ウェスタンブロッティング、E L I S A を含むことができる、多種多様の方法を使用して分析した。

L R 融合物の特徴づけ

変性 P A G E、未変性 P A G E ゲル、およびウェスタンブロッティングは、融合ポリペプチドを分析するために使用し、ウェスタンブロッティングは、L R 融合物に対して非立体構造感受性の抗体を用いて行った。未変性溶液状態の分子量情報は、Superose G 200 分析カラムを使用するサイズ排除クロマトグラフィーおよび分析超遠心法などのような技術から得ることができる。

50

統計

2つのグループは、それらの分散が正常に分布した場合、スチューデント検定を用いてまたは正常に分布しなかった場合、スチューデント・サタースウェイト検定 (Student-Satterthwaite's test) によって比較した。分布は、F検定を用いて試験した。一元配置ANOVAは、3つ以上のグループの平均値を比較するために使用し、有意水準が $p < 0.05$ であった場合、個々の比較はダネット検定を用いて行った。統計的検定はすべて、5%の有意水準で両側とし、欠測値に対するインピュテーションは行わなかった。

キメラクロノンの構築

GCSF細胞外受容体ドメイン1~3は、Image Consortiumから得たクローンから直接PCRし、哺乳動物発現ベクターpSecTag-linkの中にクローニングした。4A1 (図3a; 図3b) および4D1 (図9a; 図9b) の遺伝子の両方は、遺伝子合成を使用して構築し、哺乳動物発現ベクターpSecTag-linkの中にクローニングして、pGCSFsecTag-4A1および4A5を形成した。

GCSFおよびキメラクロノンの哺乳動物安定発現

哺乳動物発現系は、改良InvitrogenベクターpSecTag-V5/FRT-Histを使用して確立した。この系は、高度な発現のための、宿主ゲノム内の特異的な部位への安定したクロノンの迅速な生成を可能にする。これは、分泌または細胞質発現タンパク質で使うことができる。Flp-In宿主細胞株 (Flp-In CHO) は、転写活性ゲノム座に位置する単一のFlpリコンビナーゼ標的 (FRT) 部位を有する。安定細胞株は、Flp-In細胞株の中へのベクター (FRT標的部位を含有) およびpOG44 (Flpリコンビナーゼを一時的に発現するプラスミド) の同時形質移入によって生成する。選択はハイグロマイシンBを用いる。DNAの統合が指示されるので、クローン選択の必要はない。Flp-In細胞株の培養: 基本的な細胞培養技術を使用するメーカーの指示に従う。

Fugene-6を使用するCHO Flp-In細胞の安定した形質移入

形質移入の前日、CHO Flp-In細胞を、10% (v/v) ウシ胎仔血清、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、および4mM L-グルタミンを含有する10mlのHam's F12培地の全容量で100mmペトリ皿当たり 6×10^5 で接種した。翌日、1.5mlポリプロピレンチューブに570 μ lの無血清培地 (抗生物質を含有せず) を追加した。その後、30 μ lのfugene-6を追加し、緩やかな回転によって混合した。プラスミドの別個の混合物は、興味のある2 μ gプラスミドを18 μ g pOG44 (プラスミドは、宿主ゲノムの中へのプラスミドの適切な統合に必要なリコンビナーゼ酵素を含有する) と組み合わせるそれぞれの形質移入のために準備した。コントロールプレートにはプラスミドを加えなかった。これは、緩やかな回転によってfugene-6と混合し、15分間、室温に置き、その後、F12培地+10% FC中にCHO Flp-In細胞を含有するそれぞれのペトリ皿の表面に液滴をかけた。プレートは、十分な混合を確実にするために穏やかに回転させ、37/5% CO₂で24時間置いた。翌日、培地は、600 μ g/mlのハイグロマイシンBを含有する選択培地と交換した。細胞は、60%以下の培養密度にルーチン的に保った。コントロールプレート細胞 (非形質移入細胞) が死滅する (つまり非ハイグロマイシン抵抗性) まで、細胞は、600 μ g/mlハイグロマイシンBの存在下に置いておいて、成長させた。

SDS-PAGE分析およびウェスタンブロッティング

安定形質移入CHO Flp-In細胞株を約3~4日間、75cm²フラスコにおいて成長させ、この時点で試料を分析のために採取した。試料を、25mM DTTの存在下および非存在下において等容量のLaemmliローディングバッファーと混合し、5分間、沸騰させた。試料を、4~20% (w/v) ビスアクリルアミドゲル上で分離し、PVD膜に転写した (図16)。PBS-0.05% (v/v) Tween 20中の5% (w/v) 牛乳タンパク質中でブロックした後に、試料検出は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合二次抗体と共に特異的抗GCSF抗体を使用して実行した

。視覚化は、HRP検出キットを使用する、写真用フィルム上での化学発光によるものとした。

LR融合物の構築

4A1および4D1は、遺伝子合成社(Genecust, France)、哺乳動物発現ベクターpSegTagに挿入した。4B1および4E1は、それぞれ、4A1および4D1の遺伝子を切断するためにPCRを使用することによって生成した。4A2、4C1、および4C2は、リンカー領域のプライマーデュプレックスを合成し、GCSEおよびGCSEFRの配列の方へこれを伸長させるためにPCRを使用することによって生成した。4A2は、完全長遺伝子の方へ(G4S)。リンカー配列を伸長させるPCRが失敗したため合成されなかった。4C2は、4C1の合成の副産物として生成した。GCSE-LR融合物タンパク質のための構築物の概略図を図17に示す。

10

LR融合物の発現

哺乳動物発現系は、改良InvitrogenベクターpSecTag-V5/FRTHistを使用して確立した。このベクターは、宿主細胞株への標的遺伝子の統合を指示するためにInvitrogenのFlp-In系において使用し、高度な発現のための、宿主ゲノム内の特異的な部位への安定したクローンの迅速な生成を可能にする。

Flp-In細胞株の培養：基本的な細胞培養技術を使用するメーカーの指示に従う。

安定細胞株は、形質移入試薬としてFugene-6を使用して、6ウェルプレートにおいて生成した。CHO Flp-In細胞は、発現ベクターおよび細胞染色体の「ホットスポット」へのLR融合物遺伝子の組換えを引き起こす酵素であるflpリコンビナーゼを発現するプラスミドであるpOG44を用いて同時形質移入した。ハイグロマイシンBは、陽性組換え体を有する細胞を選択するために使用した。

20

安定細胞株が確立されたら、それらを、50~70%の培養密度で75cm²培養プレート上で成長させ、培地を無血清培地に交換した。培養物を、さらに2~4日間、インキュベートし、その後、培地試料を採取した。これらを、13%SDS-PAGEゲル上で流し、免疫プロットングのためにPVDF膜に転写した。PBS+0.05%(v/v)Tween20中の5%(w/v)牛乳タンパク質中でブロックした後に、試料検出は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合二次抗体と共に特異的抗GCSE抗体を使用して実行した。視覚化は、HRP検出キットを使用する、写真用フィルム上での化学発光によるものとした。LR融合物の発現を示す免疫プロットを図18および19に示す。

30

LR融合物の精製

GCSE-LRのための精製手法を下記に詳述し、図20に示す。

- プロテアーゼ阻害剤を、4A1を発現する細胞からの10×濃縮培地に追加した。
- 10×濃縮培地を、50mM TRIS、1mM EDTA、pH8.0に対して、2~4時間、透析した。
- (2)からのタンパク質および透析チューブを、10mM TRIS、1mM EDTA、pH8.0の溶液に16時間(一晚)移した。
- 0.1M酢酸バッファー、pH4.5の0.25容量を追加した。pHは、pH指標ストリップを使用して確認し、0.1M酢酸バッファー、pH4.5を、pHが4.5に達するまで、0.1mlの一定分量でさらに追加した。
- その後、これを、定期的に混合して、2時間、氷上でインキュベートした。
- 遠心分離を、沈殿物を除去するために行い、上清を新しいチューブに移した。
- 0.5M/0.1M NaOHを、pHが5.5に変化するまで0.1mlの一定分量で上清に追加し、pH指標ストリップを使用して、pHを分析した。
- その後、溶液を、25mM酢酸バッファー、pH5.5を用いてあらかじめ平衡化した5ml SPFFカラム上に装填した。非結合タンパク質を収集した。
- 非結合画分を、25mM TRIS、1mM EDTA、pH8.0に対して16時間(一晚)透析した。
- 透析した試料を、25mM TRIS、pH8.0を用いてあらかじめ平衡化した5

40

50

m l Q F F カラム上に装填した。

k) カラムを、20 カラム容量の 25 mM T R I S、p H 8 . 0 を用いて洗浄した。

l) その後、タンパク質を、20 カラム容量を超える 0 ~ 1 M N a C l 勾配を使用してカラムから溶出し、1 カラム容量画分を収集した。[4 A 1 は、5 m l のカラム上で画分 4 ~ 7 に溶出される]。

m) > 70 % 純粋な 4 A 1 を含有する画分を、プールし、氷上でインキュベートした。

n) 等容量の氷冷飽和硫酸アンモニウム溶液を追加して、50 % 硫酸アンモニウム飽和度とした。2 ~ 3 時間、氷上でインキュベート。

o) その後、タンパク質試料を、遠心分離して、沈殿タンパク質をペレットにした。

p) ペレットを P B S 中に再懸濁し、P B S に対して透析した。

q) その後、タンパク質試料を分析した。

インビトロバイオアッセイ

細胞調製物

A M L - 193 細胞 (A T C C、バッチ番号 3475266) を、液体窒素貯蔵庫から取り出し、2 分間、37 ° ウォーターバスの中に置いた。その後、バイアルの内容物を、9 m l の培養培地を含有する 15 m l チューブに移した。(イスコフ改変ダルベッコ培地中、5 % F B S、4 mM L - グルタミン、100 U / m l ペニシリン、100 μ g / m l ストレプトマイシン、5 n g / m l G M - C S F、5 μ g / m l インスリン、5 μ g / m l トランスフェリン)。細胞を 123 × g で 5 分間、遠心分離し、細胞ペレットを培養培地中に再懸濁し、細胞密度を 2.3×10^5 細胞 / m l に調節した。

細胞培養

細胞を、 $3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞 / m l の密度で、培養培地中で、CO₂ インキュベーター (5 % CO₂、37 °) において培養した。細胞密度が 2.5×10^6 細胞 / m l を超過しないことを確実にしながら、継代接種を 1 週間に 2 度行った。細胞生存率をトリパンブルー排除法によって評価した。アッセイに先立って、細胞を、約 125 × g で 5 分間、回転させることによって P B S を用いて 3 回洗浄した。その後、ペレットをアッセイ培地において元に戻し (イスコフ改変ダルベッコ培地中、5 % F B S、4 mM L - グルタミン、100 U / m l ペニシリン、100 μ g / m l ストレプトマイシン、5 μ g / m l インスリン、5 μ g / m l トランスフェリン)、細胞密度を 5×10^6 細胞 / m l に調節した。

標準 / 試料調製物

4 A 1 の G C S F タンパク質溶液の適切な希釈溶液を生物活性試験のために P B S (1 % B S A) 中で作製した。G C S F (国際基準、N I B S C、バッチ番号 88 / 502) を、リン酸緩衝生理食塩水および水 (共に滅菌) の 50 % 溶液において元に戻し、10 n g / m l (10000 U / m l) の濃度にし、40 μ l 一定分量に分け、- 80 ° で保存した。毎日のアッセイで、1 本のバイアルを冷凍庫から取り出し、使用濃度を調製した。

G C S F - L R (4 A 1) のインビトロ生物活性を図 21 に示す。

10

20

30

Figure 1a

Figure 1b

Figure 2a

Figure 2b

Figure 4a

Figure 4b

Figure 3a

Figure 3b

Figure 5a

【 义 5 b 】

MGAGPAGTSPKMLMALQLLWHSAALWVTEATPLGPASSLPQSFLKCLEQYKIQGGGAALQEKQLATYIQQ
FEVLHLSHGIPWALSPPSCQALQAGLSQHSGLYVQGLQALGEGSPGPTDLTDLVDVAFATYIWHQ
EELGMAGPLQCTQPGMAAFASQIRAGGVASHVQISFLEVSYRIJHAAGQGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GG
SDGTGSLTIPLHNLNGLKSNWNSGLDLQVLEARGAPAIHNLNSLTSUCCQVEGPGPTHLPTFS
TSLKFSRGNQCTQGGSLDCKPGKGGGCKPRKHLIYGNMGYVQALNLTMSQPLDQPMVDVKLEP
LQIRCTWDPSPAAPAGCQLQALVWPGHLNHQKCELRHPQRGEASWALGPLLEALQYELGCLPATATY
LQIRCTWDPSPAAPAGCQLQALVWPGHLNHQKCELRHPQRGEASWALGPLLEALQYELGCLPATATY

【 図 7 a 】

Figure 7a

[illegible]

【 図 7 b 】

Figure 7b

MAGPATQSPMKMLALQLLWHSALVTVQEQTRIPASSLPQSFLKCLEQVKRIQGDGAALQEKCLATYKLCHP
EELVLVLSGLIPWAPSPQSQDALQAGHSLQVHSLFYQLQGLALQEGSPGPTDGLDQVADFATVQVQGM
EENGMALAPQLOQAMPAPASQAFQRRAGGLVSLQVSLQVLEFVYLRHLQAQVSLQSGGGGGGGGGGGGG
SGGGGGGGGGGSECGHISQVQVQLDQGPITASCCKNSHLDPEQILLWRGLAQEGPGRQQLSDGQTQESITLHP
LHNTQAFSLCSLQVWNSQLPQVHLQVHGAIPPAIHCNLSCLMNLTTSSLCQWEPGFTPLTSTFKFSKRGNCQ
LQNTDQSLDCKPDGQSGHCCPRKHLHLYQNMGWVQAEALNLTSSPQLCDLPMVD*

【 図 9 a 】

Figure 9a

[illegible]

【 図 9 b 】

Figure 9b

[illegible]

Figure 10a

Figure 10b

Figure 12b

Figure 13

Figure 11a

Figure 11b

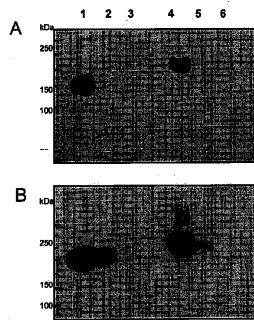
Figure 12a

Figure 15

[illegible]

【 図 1 6 】

Figure 16



【 図 1 7 】

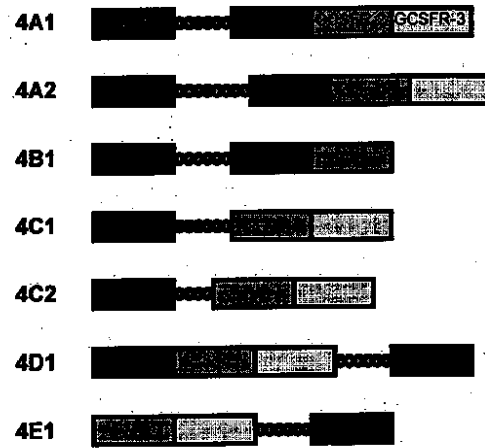


Figure 17

【 図 1 8 】

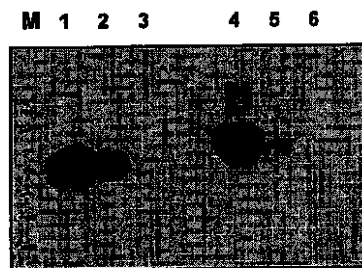


Figure 18

【 図 1 9 】

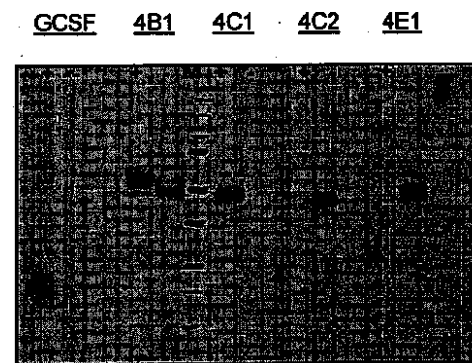
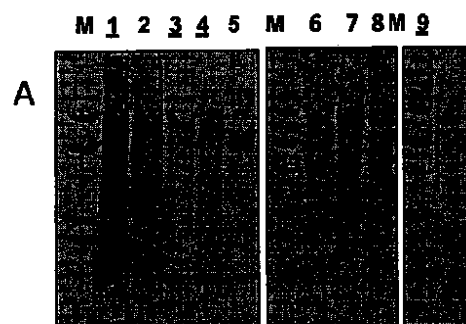


Figure 19

【 図 2 0 A 】



【図 20 B】



【図 21】

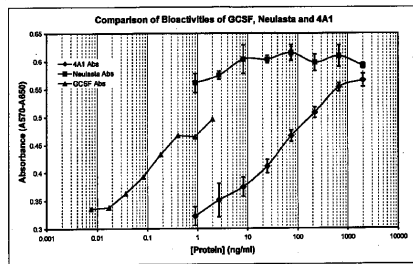


Figure 21

【配列表】

2010535487000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/002594

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/535 C07K14/715 C12N15/62		
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) C07K C12N		
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, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/96565 A (ASTERION LTD [GB]; ROSS RICHARD [GB]; ARTYMIUK PETER [GB]; SAYERS JON) 20 December 2001 (2001-12-20) page 13, paragraph 4; claims 1-6 page 16, paragraph 2-6 page 5, line 1 - page 6, line 3 page 11	1-74
X	EP 0 225 583 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 16 June 1987 (1987-06-16) claims 1-14	68,70,71
Y	DE 196 08 813 A1 (ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYST [DE]) 18 September 1997 (1997-09-18) claims 1,5,8	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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 January 2009		26/01/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Offermann, Stefanie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/002594

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/02552 A (YEDA RES. & DEV [IL]; REVEL MICHEL [IL]; CHEBATH JUDITH [IL]; LAPIDOT T) 21 January 1999 (1999-01-21) claims 1-37 -----	1-74
T	WILKINSON IAN R ET AL: "A ligand-receptor fusion of growth hormone forms a dimer and is a potent long-acting agonist" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 13, no. 9, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 1108-1113, XP009089546 ISSN: 1078-8956 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2008/002594

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0196565	A	20-12-2001	AU 7423401 A	24-12-2001
			CA 2447632 A1	20-12-2001
			EP 1290170 A2	12-03-2003
			JP 2004503243 T	05-02-2004
			US 2004071655 A1	15-04-2004
EP 0225583	A	16-06-1987	CA 1330768 C	19-07-1994
			JP 6030619 B	27-04-1994
			JP 62130698 A	12-06-1987
DE 19608813	A1	18-09-1997	AT 229542 T	15-12-2002
			WO 9732891 A2	12-09-1997
			DK 888384 T3	24-03-2003
			EP 0888384 A2	07-01-1999
			ES 2188935 T3	01-07-2003
			JP 2000506014 T	23-05-2000
			PT 888384 T	30-04-2003
			US 7112436 B1	26-09-2006
WO 9902552	A	21-01-1999	AT 342915 T	15-11-2006
			AU 758161 B2	20-03-2003
			AU 8127198 A	08-02-1999
			BG 64680 B1	30-11-2005
			BG 104070 A	30-11-2000
			BR 9812096 A	18-07-2000
			CA 2295936 A1	21-01-1999
			CN 1269835 A	11-10-2000
			DE 69836217 T2	23-08-2007
			DK 0991661 T3	05-02-2007
			EA 4793 B1	26-08-2004
			EE 200000012 A	15-08-2000
			EP 0991661 A2	12-04-2000
			ES 2271999 T3	16-04-2007
			HK 1031895 A1	09-09-2005
			HU 0002426 A2	28-11-2000
			JP 2001509371 T	24-07-2001
			NO 20000086 A	08-03-2000
			NZ 502139 A	28-03-2002
			PL 338002 A1	25-09-2000
			SK 62000 A3	11-07-2000
			US 7198781 B1	03-04-2007
			US 2007172455 A1	26-07-2007

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 H 0 4 5		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1			
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	C 0 7 K	16/24				
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08				
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2			
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02				
A 6 1 K	35/28	(2006.01)	A 6 1 P	7/00				
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	35/28				
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M			
			G 0 1 N	33/53	D			
			G 0 1 N	33/577	B			

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ロス, リチャード

イギリス国, シェフィールド エス 1 0 2 ティーエヌ, ファース コート, ウェスタンバンク, アステリオン・リミテッド

(72) 発明者 セイヤーズ, ジョン

イギリス国, シェフィールド エス 1 0 2 ティーエヌ, ファース コート, ウェスタンバンク, アステリオン・リミテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA30 CA02 CA07 DA02 EA04 HA01 HA15
 4B064 AG06 AG26 CA10 CA19 CC24
 4B065 AA90 AB01 AC12 BA02 BB19 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 DC50 MA66 NA14 ZA512
 4C087 AA01 AA02 BB44 CA04 DA27 MA66 NA14 ZA51
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA11 EA24 EA50 FA74

专利名称(译)	粒细胞集落刺激因子		
公开(公告)号	JP2010535487A	公开(公告)日	2010-11-25
申请号	JP2010519511	申请日	2008-07-31
申请(专利权)人(译)	Asuterion有限公司		
[标]发明人	アーティミュークピーター ロスリチャード セイヤーズジョン		
发明人	アーティミューク,ピーター ロス,リチャード セイヤーズ,ジョン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/535 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/24 C12P21/08 A61K38/00 A61P7/00 A61K35/28 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61P7/00 A61P37/04 C07K14/535 C07K14/715 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/535 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K16/24 C12P21/08 C12N5/00.102 A61K37/02 A61P7/00 A61K35/28 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/577. B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA30 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024 /HA01 4B024/HA15 4B064/AG06 4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/AC12 4B065/BA02 4B065/BB19 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084 /AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB44 4C087/CA04 4C087/DA27 4C087 /MA66 4C087/NA14 4C087/ZA51 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA11 4H045/EA24 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	内田直人		
优先权	2007015133 2007-08-03 GB 60/956303 2007-08-16 US 2007024013 2007-12-08 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

我们公开了粒细胞集落刺激因子融合多肽。编码所述多肽的核酸分子和使用所述蛋白质的治疗方法。

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公 報 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-5354

(P2010-535487)

(43) 公表日

平成22年11月25日(2010.11.25)

(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

C 0 7 K 14/535 (2006.01)

C 0 7 K 14/535

4 B 0 2 4

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

4 B 0 6 4

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

4 C 0 8 4

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

4 C 0 8 7

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

(全 28 頁)

最終頁に続

(21) 出願番号

特願2010-519511 (P2010-519511)

(71) 出願人

502452978

(36) (22) 出願日

平成20年7月31日 (2008. 7. 31)

アステリオン・リミテッド

(85) 翻訳文提出日

平成22年4月2日 (2010. 4. 2)

イギリス国、エス10 2チーエヌ、

(86) 国際出願番号

PCT/GB2008/002594

シェフィールド、ウェスタン・バンク、フ

(87) 国際公開番号

W02009/019441

ース・コート

(87) 国際公開日

平成21年2月12日 (2009. 2. 12)

(74) 代理人

100149294

(31) 優先権主張番号

0715133.5

弁理士 内田 西人

(32) 優先日

平成19年8月3日 (2007. 8. 3)

(74) 代理人

100137512

(31) 優先権主張国

英国 (GB)

弁理士 奥原 康司

(31) 優先権主張番号

607955, 303

(72) 発明者

アーティミューク、ビーター

(32) 優先日

平成19年8月16日 (2007. 8. 16)

イギリス国、シェフィールド、エス10

(31) 優先権主張国

米国 (US)

2チーエヌ、ファース コート、ウェ

(31) 優先権主張番号

0724013. 8

スタンバンク、アステリオン・リミテ

(32) 優先日

平成19年12月8日 (2007. 12. 8)

(31) 優先権主張国

英国 (GB)

最終頁に続