

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

獣医学的デコリンコアタンパク質分子であって、配列番号 4、7、10、13、16、19、22、及び 27 のうちの 1 つと少なくとも 95 % 同一であるが、但し、前記獣医学的デコリンコアタンパク質が、アミノ酸 4 位で突然変異を含むことを条件とする、前記獣医学的デコリンコアタンパク質分子。

【請求項 2】

前記突然変異が、前記分子の GAG 化 (g a g y l a t i o n) を防止する、請求項 1 に記載の前記獣医学的デコリンコアタンパク質分子。

【請求項 3】

前記突然変異が、セリンからアラニンへの突然変異である、請求項 1 に記載の前記獣医学的デコリンコアタンパク質分子。

【請求項 4】

前記タンパク質分子が、配列番号 4、7、10、13、16、19、22、及び 27 のうちの 1 つと少なくとも 98 % 同一であるが、但し、前記獣医学的デコリンコアタンパク質がアミノ酸 4 位で突然変異を含むことを条件とする、請求項 1 に記載の前記獣医学的デコリンコアタンパク質分子。

【請求項 5】

前記タンパク質分子が、配列番号 4、7、10、13、16、19、22、及び 27 のうちの 1 つと少なくとも 99 % 同一であるが、但し、前記獣医学的デコリンコアタンパク質がアミノ酸 4 位で突然変異を含むことを条件とする、請求項 1 に記載の前記獣医学的デコリンコアタンパク質分子。

【請求項 6】

前記タンパク質分子が、配列番号 4、7、10、13、16、19、22、及び 27 のうちの 1 つと 100 % 同一であるが、但し、前記獣医学的デコリンコアタンパク質がアミノ酸 4 位で突然変異を含むことを条件とする、請求項 1 に記載の前記獣医学的デコリンコアタンパク質分子。

【請求項 7】

前記コア分子が、外来シグナルペプチドと作動可能に連結される、請求項 1 に記載の前記獣医学的デコリンコアタンパク質分子。

【請求項 8】

前記外来シグナルペプチドが、ウシラクトアルブミンシグナルペプチドである、請求項 7 に記載の前記獣医学的デコリンコアタンパク質分子。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の獣医学的デコリンコアタンパク質分子を、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む、組成物。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の獣医学的デコリンコア分子をコードする核酸配列を含む、発現ベクター。

【請求項 11】

獣医学的デコリンコア分子をコードする前記核酸配列が、外来シグナルペプチドに作動可能に関連付けられる、請求項 10 に記載の前記発現ベクター。

【請求項 12】

前記外来シグナルペプチドが、ウシラクトアルブミンシグナルペプチドである、請求項 11 に記載の前記発現ベクター。

【請求項 13】

請求項 10 に記載の前記発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 14】

獣医学的デコリンタンパク質の生成方法であって、請求項 10 に記載の前記発現ベクターを宿主細胞中で発現させ、前記獣医学的デコリンタンパク質を生成することと、前記獣

10

20

30

40

50

医学的デコリンタンパク質を精製することと、を含む前記方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 に記載の獣医学的デコリンコアタンパク質分子を含む薬学的製剤であって、前記製剤が、液剤、粉剤、噴霧剤、ゲル剤、軟膏剤、ローション剤、または点眼剤である、前記薬学的製剤。

【請求項 1 6】

治療を、それを必要とする獣医学的対象に施す方法であって、前記対象に、請求項 1 に記載の獣医学的デコリンコアタンパク質を有効量で投与することを含む前記方法。

【請求項 1 7】

前記獣医学的デコリンコアタンパク質が、経腸、非経口、及び局所投与からなる群から選択される方法によって投与される、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 1 8】

前記獣医学的デコリンコアタンパク質が、経口投与、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経皮投与、経鼻投与、筋肉内投与、髄腔内投与、眼内投与、硝子体内投与、膣内投与、及び経粘膜投与からなる群から選択される方法によって投与される、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 1 9】

前記獣医学的対象が、皮膚への創傷または他の損傷を患っており、前記獣医学的デコリンコアタンパク質が、瘢痕形成を阻害するために投与される、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 2 0】

前記創傷が、美容的または一般的外科手術、前記皮膚への損傷、または肉芽を生じる損傷の結果である、請求項 1 9 に記載の前記方法。

【請求項 2 1】

前記瘢痕が、ケロイド瘢痕である、請求項 1 9 に記載の前記方法。

【請求項 2 2】

前記獣医学的対象が、眼に対する損傷または疾患を患っている、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 2 3】

前記眼に対する前記損傷が、角膜手術、眼熱傷、眼感染、及び擦傷性損傷の結果である、請求項 2 2 に記載の前記方法。

【請求項 2 4】

前記獣医学的対象が、肺疾患を患っている、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 2 5】

前記肺疾患が、間質性肺疾患及び肺線維症からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の前記方法。

【請求項 2 6】

前記獣医学的対象が、腎疾患を患っている、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 2 7】

前記腎疾患が、糖尿病性腎症及び腎線維症からなる群から選択される、請求項 2 6 に記載の前記方法。

【請求項 2 8】

前記獣医学的対象が、肝疾患を患っている、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 2 9】

前記肝疾患が、肝硬変及び肝線維症からなる群から選択される、請求項 2 6 に記載の前記方法。

【請求項 3 0】

前記対象が、癌を患っている、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 3 1】

前記癌が、EGF受容体またはIGF-1受容体陽性癌である、請求項 3 0 に記載の前

10

20

30

40

50

記方法。

【請求項 3 2】

前記獣医学的対象が、心疾患を患っている、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 3 3】

前記獣医学的対象が、神経外傷を患っている、請求項 1 6 に記載の前記方法。

【請求項 3 4】

前記神経外傷が、脳損傷及び脊髄損傷から選択される、請求項 3 3 に記載の前記方法。

【請求項 3 5】

対象を治療するための、請求項 1 ~ 9 及び 1 5 のいずれか一項に記載の獣医学的デコリンコアタンパク質、組成物、または薬学的製剤の使用。

10

【請求項 3 6】

前記獣医学的デコリンコアタンパク質が、経腸、非経口、及び局所投与からなる群から選択される方法によって投与される、請求項 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 7】

前記獣医学的デコリンコアタンパク質が、経口投与、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経皮投与、経鼻投与、筋肉内投与、髄腔内投与、眼内投与、硝子体内投与、腔内投与、及び経粘膜投与からなる群から選択される方法によって投与される、請求項 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 8】

前記獣医学的対象が、皮膚への創傷または他の損傷を患っており、前記獣医学的デコリンコアタンパク質が、瘢痕形成を阻害するために投与される、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 3 9】

前記創傷が、美容的または一般的外科手術、前記皮膚への損傷、または肉芽を生じる損傷の結果である、請求項 3 8 に記載の使用。

【請求項 4 0】

前記瘢痕が、ケロイド瘢痕である、請求項 3 8 に記載の使用。

【請求項 4 1】

前記獣医学的対象が、眼に対する損傷または疾患を患っている、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 4 2】

前記眼に対する前記損傷が、角膜手術、眼熱傷、眼感染、及び擦傷性損傷の結果である、請求項 4 1 に記載の使用。

【請求項 4 3】

前記獣医学的対象が、肝疾患を患っている、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 4 4】

前記肺疾患が、間質性肺疾患及び肺線維症からなる群から選択される、請求項 4 3 に記載の使用。

【請求項 4 5】

前記獣医学的対象が、腎疾患を患っている、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の使用。

40

【請求項 4 6】

前記腎疾患が、糖尿病性腎症及び腎線維症からなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の使用。

【請求項 4 7】

前記獣医学的対象が、肝疾患を患っている、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 4 8】

前記肝疾患が、肝硬変及び肝線維症からなる群から選択される、請求項 4 7 に記載の使

50

用。

【請求項 4 9】

前記対象が、癌を患っている、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5 0】

前記癌が、EGF受容体またはIGF-I受容体陽性癌である、請求項 4 9 に記載の使用。

【請求項 5 1】

前記獣医学的対象が、心疾患を患っている、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5 2】

前記獣医学的対象が、神経外傷を患っている、請求項 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5 3】

前記神経外傷が、脳損傷及び脊髄損傷から選択される、請求項 5 2 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、獣医学的デコリン組成物ならびにそれらの生成方法及び使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

1つ以上のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖を有するプロテオグリカンは、コアタンパク質の構造的特性に応じて5つの群に分類され得る大きな遺伝子ファミリーを形成している。これらの群のうちの1つは、デコリン (DCN) 、ビグリカン、フィブロモジュリン、及びルミカンから構成されるスマールロイシンリッチプロテオグリカンファミリーである。これらは、およそ12個のアミノ酸のロイシンリッチリピートを含有する40kDaのコアタンパク質によって特徴付けられる。DCNは、この群の原型であり、PG-S2、PG40、プロテオデルマタン硫酸、及びDS-PGIIとも称される。これは、成熟コアタンパク質のセリンに共有結合した1つのデルマタンコンドロイチン硫酸GAG鎖を含有し、多機能性プロテオグリカンであると考えられている。

【0 0 0 3】

デコリンタンパク質は、大部分の全ての動物組織中に存在する。デコリンの減少または不在は、体内的問題をもたらす。DCNの提唱される機能としては、コラーゲン線維形成の調節、フィブロネクチンとトロンボスponginとの結合を介する組織の完全性の維持、ならびに形質転換増殖因子 (TGF- β) の貯蔵部が含まれるが、これらに限定されない。DCNの後者の機能は、DCNコアタンパク質が、増殖因子を細胞外環境において、細胞表面上で発現される受容体から隔離することにより、達成される。全ての種類の外科手術、切断、熱傷、眼部損傷、脊髄損傷、頭部外傷、肺疾患、腎臓疾患、肝臓疾患及び癌を含む種々の状態は、影響を受けた組織内のデコリンのバランスを崩し得る。

【0 0 0 4】

デコリンのヒトへの治療的使用が提唱されている。こうした使用の例は、デコリンによる細胞増殖の抑制 (US6,046,162) 、TGF- β 活性を阻害するための方法 (US6,277,812) 、デコリンを投与することによる病理または線維性病態の方法 (US6,436,900) 、デコリンまたはビグリカンを用いる瘢痕化の予防または低減の方法 (US6,509,314) 、デコリンによる糸球体腎炎の治療 (US5,726,149) 、デコリンを投与することによる腫瘍細胞増殖の抑制 (US6,524,573) 、及びTGF- β 媒介血管新生を阻害することによる増殖性疾患の阻害 (US6,673,341) を含む。この段落で参照される特許の全ては、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 5】

当該技術分野において必要とされるものは、獣医学治療法において使用するためのデコ

10

20

30

40

50

リン組成物である。

【発明の概要】

【0006】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年4月22日に出願された米国仮特許出願第61/814,405号の利益を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0007】

本発明は、獣医学的デコリン組成物ならびにそれらの生成方法及び使用方法に関する。

【0008】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号4、7、10、13、16、19、22、及び27のうちの1つと少なくとも95%同一である獣医学的デコリンコアタンパク質分子を提供するが、但し、獣医学的デコリンコアタンパク質がアミノ酸4位で突然変異を含むことを条件とする。いくつかの実施形態では、この突然変異は、分子のGAG化(glycation)を防止する。いくつかの実施形態では、この突然変異は、セリンからアラニンへの突然変異である。いくつかの実施形態では、タンパク質分子は、配列番号4、7、10、13、16、19、22、及び27のうちの1つと少なくとも98%同一であるが、但し、獣医学的デコリンコアタンパク質がアミノ酸4位で突然変異を含むことを条件とする。いくつかの実施形態では、タンパク質分子は、配列番号4、7、10、13、16、19、22、及び27のうちの1つと少なくとも99%同一であるが、但し、獣医学的デコリンコアタンパク質がアミノ酸4位で突然変異を含むことを条件とする。いくつかの実施形態では、タンパク質分子は、配列番号4、7、10、13、16、19、22、及び27のうちの1つと100%同一であるが、但し、獣医学的デコリンコアタンパク質がアミノ酸4位で突然変異を含むことを条件とする。いくつかの実施形態では、コア分子は、外来シグナルペプチドに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、外来シグナルペプチドは、ウシラクトアルブミンシグナルペプチドである。

【0009】

いくつかの実施形態では、本発明は、上述による獣医学的デコリンコアタンパク質分子を薬学的に許容される担体との組み合わせで含む、組成物を提供する。

【0010】

いくつかの実施形態では、本発明は、上述の獣医学的デコリンコア分子をコードする核酸配列を提供する。いくつかの実施形態では、獣医学的デコリンコア分子をコードする核酸配列は、外来シグナルペプチドと作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、外来シグナルペプチドは、ウシラクトアルブミンシグナルペプチドである。

【0011】

いくつかの実施形態では、本発明は、上述の発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0012】

いくつかの実施形態では、本発明は、獣医学的デコリンタンパク質を生成する方法を提供し、この方法は、宿主細胞中で上述の発現ベクターを発現し、獣医学的デコリンタンパク質を生成することと、獣医学的デコリンタンパク質を精製することと、を含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、本発明は、上述の獣医学的デコリンコアタンパク質分子を含む薬学的製剤を提供し、この製剤は、液剤、粉剤、噴霧剤、ゲル剤、軟膏剤、ローション剤、または点眼剤である。

【0014】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療を、それを必要とする獣医学的対象に施す方法を提供し、この方法は、請求項1に記載の獣医学的デコリンコアタンパク質を有効量で対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、獣医学的デコリンコアタンパク質は、経腸、非経口、及び局所投与からなる群から選択される方法によって投与される。いくつかの実施形態では、獣医学的デコリンコアタンパク質は、経口投与、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経皮投与、経鼻投与、筋肉内投与、髄腔内投与、眼内投与、硝子体内

10

20

20

30

40

50

投与、腔内投与、及び経粘膜投与からなる群から選択される方法によって投与される。

【0015】

いくつかの実施形態では、獣医学的対象は、皮膚への創傷または他の損傷を患い、獣医学的デコリンコアタンパク質は、瘢痕形成を阻害するために投与される。いくつかの実施形態では、創傷は、美容または一般的な外科手術、皮膚への損傷、もしくは肉芽を生じる損傷からの結果である。いくつかの実施形態では、瘢痕はケロイド瘢痕である。

【0016】

いくつかの実施形態では、獣医学的対象は、眼に対する損傷または疾患を患っている。いくつかの実施形態では、眼に対する損傷は、角膜手術、眼熱傷、眼感染、及び擦傷性損傷の結果である。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、獣医学的対象は、肺疾患を患っている。いくつかの実施形態では、肺疾患は、間質性肺疾患及び肺線維症からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、獣医学的対象は、腎疾患を患っている。

【0018】

いくつかの実施形態では、腎疾患は、糖尿病性腎症及び腎線維症からなる群から選択される。

【0019】

いくつかの実施形態では、獣医学的対象は、肝疾患を患っている。いくつかの実施形態では、肝疾患は、肝硬変及び肝線維症からなる群から選択される。

20

【0020】

いくつかの実施形態では、対象は癌を患っている。いくつかの実施形態では、癌はEGFR受容体またはIGF-1受容体陽性癌である。

【0021】

いくつかの実施形態では、獣医学的対象は、心疾患を患っている。

【0022】

いくつかの実施形態では、獣医学的対象は、神経外傷を患っている。いくつかの実施形態では、神経外傷は、脳損傷及び脊髄損傷から選択される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】最終レトロベクター発現構築物中のイヌデコリンコード配列及び隣接DNAクローニング接合部を示す。Kozak翻訳開始配列をハイライト表示している。クローニング部位HindIII及びXhoIも示す。

30

【図2】GPEX(登録商標)ベクター中のイヌデコリンのマップである。

【図3】最終レトロベクター発現構築物中のネコデコリンコード配列及び隣接DNAクローニング接合部を示す。Kozak翻訳開始配列をハイライト表示している。クローニング部位HindIII及びXhoIも示す。

【図4】GPEX(登録商標)ベクター中のネコデコリンのマップである。

【図5】イヌデコリン成熟タンパク質を発現するプールしたCHO細胞株からの培地のSDS-PAGEゲルである。レーン1は分子量標準である。レーン2は、非還元培地試料である。レーン3は、還元培地試料である。デコリンタンパク質は、図7に示す精製されたヒトデコリンと同様に、両条件下で二重線として示す。

40

【図6】ネコデコリン成熟タンパク質を発現するプールしたCHO細胞系からの培地のSDS-PAGEゲルである。レーン1は分子量標準である。レーン2は、非還元培地試料である。レーン3は、還元培地試料である。デコリンタンパク質は、図7に示す精製されたヒトデコリンと同様に、両条件下で二重線として示す。

【図7】精製されたヒトデコリン成熟タンパク質のSDS-PAGEゲルである。レーン1は、分子量標準である。レーン2は、2mgのヒトデコリン(還元型)である。レーン3は、5mgのヒトデコリン(還元型)である。

【0024】

50

定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語が以下で定義される。

【0025】

本明細書で使用する「獣医学的デコリン」という用語は、愛玩動物または家畜動物、例えば、ニワトリなどの家禽類、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ、及びネコからのデコリン分子を指す。

【0026】

本明細書で使用する「獣医学的デコリンコアタンパク質」という用語は、成熟デコリンのアミノ酸4位における突然変異を有する獣医学的デコリンタンパク質分子であり、アミノ酸4位においてグリコサミノグリカンによる修飾を実質的に欠くもの（GAG、すなわち、非GAG化（non-gagylated））を指す。

10

【0027】

本明細書で使用する「獣医学的対象」という用語は、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ヤギ、ニワトリ、シチメンチョウ、イヌ、及びネコを含むが、これらに限定されない家畜動物及び愛玩動物を包含する。

【0028】

本明細書で使用する「宿主細胞」という用語は、インビトロまたはインビボでの存在を問わず、任意の真核細胞（例えば、哺乳類細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞、及び昆虫細胞）を指す。

20

【0029】

本明細書で使用する「細胞培養物」という用語は、任意のインビトロでの細胞培養物を指す。（例えば、不死の表現型を有する）連続細胞株、初代細胞培養、有限な細胞株（例えば、非形質転換細胞）、ならびにインビトロで維持され、卵母細胞及び胚を含む任意の他の細胞集団がこの用語に含まれる。

30

【0030】

本明細書で使用する「ベクター」という用語は、プラスミド、ファージ、トランスポン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどの任意の遺伝要素を指し、ベクターは、適切な制御エレメントと関連付けられたときに複製可能であり、細胞間で遺伝子配列を転送することができる。したがって、この用語には、クローニング媒体及び発現媒体、ならびにウイルスベクターが含まれる。

【0031】

本明細書で使用する「相補的」または「相補性」という用語は、塩基対合則によって関係しているポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチド配列）への言及で使用される。例えば、配列「5' - A - G - T - 3'」は、配列「3' - T - C - A - 5'」と相補的である。相補性は、「部分的」であってよく、その際、核酸の塩基の一部のみが、塩基対合則にしたがってマッチしている。あるいは、核酸間で「完全（complete）」または「完全（total）」相補性があってもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に著しく影響を与える。これは、增幅反応、及び核酸間の結合に依存する検出法において特に重要である。

30

【0032】

核酸に関して使用される場合の「相同性」及び「パーセント同一性」という用語は、相補性の程度を指す。部分的相同性（すなわち、部分的同一性）または完全相同性（すなわち、完全同一性）があってよい。部分的相補配列は、完全相補配列が標的核酸配列にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害する配列であり、「実質的に相同」という機能的用語を使用するために言及される。完全相補配列の標的配列へのハイブリダイゼーションの阻害は、低ストリンジエンシー条件下でのハイブリダイゼーションアッセイ（サザンプロットまたはノーザンプロット、溶液ハイブリダイゼーションなど）を用いて調べることができる。実質的に相同な配列またはプローブ（すなわち、目的となる別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド）は、競合し、低ストリンジエンシー条件下で完全相同配列の標的配列への結合（すなわち、ハイブリダイゼー

40

50

ション)を阻害する。これは、低ストリンジエンシー条件が非特異的結合を許容すると言っているわけではなく、低ストリンジエンシー条件は、2つの配列の互いへの結合が特異的(すなわち、選択的)相互作用であることを必要とする。非特異的結合が存在しないことは、少しでも部分的な相補性の度合い(例えば、約30%未満の同一性)を欠く第2の標的の使用によって試験することができ、非特異的結合の非存在下で、プローブは、第2の非相補的標的にハイブリダイズしない。

【0033】

本明細書で使用する「作動可能な組み合わせ」、「作動可能な順序」及び「作動可能に連結される」という用語は、特定の遺伝子の転写及び/または所望のタンパク質分子の合成を導くことができる核酸分子が生成されるような方法での核酸配列の結合を指す。この用語は、機能タンパク質が生成されるような方法でのアミノ酸配列の結合も指す。

10

【0034】

本明細書で使用する「シグナル配列」という用語は、組み換えDNA配列に作動可能に連結される場合、組換えポリペプチドの分泌を引き起こすことができるシグナルペプチドをコードする任意のDNA配列を指す。一般に、シグナルペプチドは、一連の約15~30個の疎水性アミノ酸残基を含む(例えば、Zwizinski et al., J. Biol. Chem. 255(16):7973-77[1980]、Gray et al., Gene 39(2):247-54[1985]、及びMartial et al., Science 205:602-607[1979]参照)。かかる分泌シグナル配列は、好ましくは、組織特異的発現を目標とした細胞型から分泌されるポリペプチド(例えば、乳腺分泌細胞での発現及び乳腺分泌細胞からの分泌のための分泌乳タンパク質)をコードする遺伝子に由来する。しかし、分泌DNA配列は、かかる配列に限定されるものではない。多くの細胞型及び生物から分泌されるタンパク質の分泌DNA配列(例えば、t-PA、血清アルブミン、ラクトフェリン、及び成長ホルモンの分泌シグナル、ならびに酵母、糸状菌、及び細菌に由来するものなどの、分泌ポリペプチドをコードする微生物遺伝子の分泌シグナル)もまた用いてよい。

20

【0035】

本明細書で使用する「精製」という用語は、それらの通常の環境から取り除かれるか、単離されるか、または分離される、核酸配列またはアミノ酸配列のいずれかの分子を指す。したがって、「単離される核酸配列」は、精製された核酸配列である。「実質的に精製された」分子は、それらが正常に関連付けられている他の成分を、少なくとも60%含まない、好ましくは、少なくとも75%含まない、より好ましくは少なくとも90%含まない。

30

【発明を実施するための形態】

【0036】

本発明は、獣医学的デコリン組成物ならびにその生成方法及び使用方法に関する。

【0037】

デコリン

【0038】

天然のデコリンは、結合するグリコサミノグリカン及び90~140KDの平均分子量を有する糖タンパク質である。本発明は、組み換え獣医学的デコリンの生成及び使用を企図する。いくつかの好ましい実施形態では、獣医学的デコリンは、獣医学的デコリンコアタンパク質、すなわち、実質的に非GAG化(non-gagylated)獣医学的デコリンである。いくつかの実施形態では、獣医学的デコリンコアタンパク質は、成熟獣医学的デコリンコアタンパク質分子のアミノ酸4位(すなわち、N末端から4番目のアミノ酸)において突然変異を含む。いくつかの実施形態では、この突然変異は、セリンからアラニンへの突然変異である。いくつかの実施形態では、この獣医学的デコリンコアタンパク質分子は、配列番号4(ニワトリ)、配列番号7(ウシ)、配列番号10(イヌ)、配列番号13(ヤギ)、配列番号16(ウマ)、配列番号19(ブタ)、配列番号22(ヒツジ)、及び配列番号27(ネコ)のうちの1つと少なくとも90%、95%、96%、

40

50

97%、98%、99%または100%同一であるが、但し、このデコリンコアタンパク質が、成熟デコリンコアタンパク質分子のアミノ酸4位（すなわち、N末端から4番目のアミノ酸）に突然変異を含むことを条件とする。

【0039】

デコリンは、一般にプレプロタンパク質として発現される。本発明は、獣医学的デコリンプロペプチド及び成熟ペプチド配列と作動可能に関連付けられる異種シグナル配列を含む獣医学的デコリン融合分子を提供する。いくつかの実施形態では、異種シグナルポリペプチドは、アルファ-ラクトアルブミンシグナルポリペプチドである。いくつかの実施形態では、アルファ-ラクトアルブミンシグナルポリペプチドは、ウシアルファ-ラクトアルブミンシグナルポリペプチドである。いくつかの実施形態では、この異種シグナルポリペプチドは、MMSFVSLLLVGILFHATQA（配列番号23）と少なくとも80%、90%、または100%同一である。いくつかの実施形態では、このプロペプチド配列は、配列番号3、6、9、12、15、18、21、及び26と少なくとも80%、90%、または100%同一である。いくつかの実施形態では、融合ポリペプチドのデコリンコアタンパク部分は、配列番号1（成熟デコリンコアタンパク質）と少なくとも90%、95%、99%、または100%同一であるが、但し、このデコリンコアタンパク質が、成熟デコリンコアタンパク質分子のアミノ酸4位（すなわち、N末端から4番目のアミノ酸）において突然変異を含むことを条件とする。いくつかの実施形態では、この融合タンパク質は、配列番号3（ニワトリ）、配列番号6（ウシ）、配列番号9（イヌ）、配列番号12（ヤギ）、配列番号15（ウマ）、配列番号18（ブタ）、配列番号21（ヒツジ）、及び配列番号26（ネコ）（シグナルプロペプチド獣医学的デコリンコアタンパク質）のうちの1つと90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるが、但し、このデコリンコアタンパク質が、成熟デコリンコアタンパク質分子のアミノ酸4位（すなわち、N末端から4番目のアミノ酸）に突然変異を含むことを条件とする。

10

20

30

40

【0040】

本発明は、さらに、この融合タンパク質をコードする核酸配列、ならびにこの核酸配列を含むベクターを提供する。いくつかの実施形態では、この異種シグナルポリペプチドは、ATGATGTCCTTTGTCCTCTCTGCTCCCTGGTAGGGCATCCATA TTCCATGCCACCCAGGCC（配列番号24）と少なくとも80%、90%、または100%同一である。いくつかの実施形態では、このプロペプチド核酸配列は、配列番号1、5、8、11、14、17、20、及び25と少なくとも80%、90%、または100%同一である。いくつかの実施形態では、この融合ポリペプチドの獣医学的デコリンコアタンパク質部分は、配列番号1、5、8、11、14、17、20、及び25と少なくとも90%、95%、99%、または100%同一であるが、但し、デコリンコアタンパク質核酸配列が、成熟デコリンコアタンパク質分子のアミノ酸4位（すなわち、N末端から4番目のアミノ酸）に突然変異を含むことを条件とする。いくつかの実施形態では、この融合タンパク質は、配列番号1、5、8、11、14、17、20、及び25（シグナルプロペプチド獣医学的デコリンコアタンパク質核酸配列）のうちの1つと少なくとも90%、95%、99%、または100%同一であるが、但し、デコリンコアタンパク質核酸配列が、成熟デコリンコアタンパク質分子のアミノ酸4位（すなわち、N末端から4番目のアミノ酸）に突然変異を含むことを条件とする。

30

40

【0041】

本発明の獣医学的デコリンポリヌクレオチドは、組換え技術によって獣医学的デコリンポリペプチドを生成させるために使用することができる。したがって、例えば、このポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現するための様々な発現ベクターのいずれか1つに含まれていてもよい。本発明のいくつかの実施形態では、ベクターには、レトロウイルスベクター、染色体配列、非染色体配列及び合成DNA配列（例えば、SV40の誘導体、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ならびにワクシニア、アデノウイルス、鶏

50

痘ウイルス、及び仮性狂犬病などのウイルスDNA)が含まれるが、これらに限定されない。どのベクターも、宿主内で複製可能であり、かつ生存可能である限り、用いることができると企図される。いくつかの好ましい実施形態では、これらのベクターは、米国特許第6,852,510号及び同第7,332,333号ならびに米国特許公開第200402335173号及び同第20030224415号に記載されているようなレトロウイルスベクターであり、これらの全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの特に好ましい実施形態では、これらのベクターは、偽型のレトロウイルスベクターである。

【0042】

特に、本発明のいくつかの実施形態は、上記で大まかに説明した配列(例えば、配列番号1、5、8、11、14、17、20、及び25のうちの1つ)の1つ以上を含む組換え構築物を提供する。本発明のいくつかの実施形態では、これらの構築物は、本発明の配列が順方向または逆方向に挿入されたプラスミドベクターまたはウイルスベクターなどのベクターを含む。さらに他の実施形態では、異種構造配列(例えば、配列番号1、5、8、11、14、17、20、及び25のうちの1つ)は、適切な段階で翻訳の開始配列及び終結配列と共に組み立てられる。本発明の好ましい実施形態では、適切なDNA配列は、様々な手順のいずれかを用いてベクターに挿入される。一般に、このDNA配列は、当該技術分野において既知の手順によって、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位(複数可)に挿入される。

10

【0043】

多数の適切なベクターが、当業者に既知であり、市販されている。かかるベクターには、以下のベクターが含まれるが、これらに限定されない:1)細菌ベクター-pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、pBS、pD10、phagescript、psiX174、blue-script SK、pBSKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)、2)真核ベクター-pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、PXT1、pSG(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(Pharmacia)、及び3)バキュロウイルスベクター-pPbac及びpMbac(Stratagene)。宿主内で複製可能であり、生存可能である限り、任意の他のプラスミドまたはベクターを用いてもよい。本発明のいくつかの好ましい実施形態では、哺乳動物発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーター及びエンハンサー、任意の必須のリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位及びスプライスアクセプター部位、転写終結配列、ならびに5'隣接非転写配列を含む。他の実施形態では、SV40スプライス部位、及びポリアデニル化部位由来のDNA配列を用いて、必要な非転写遺伝要素を提供してもよい。

20

30

【0044】

本発明の特定の実施形態では、発現ベクター中のDNA配列は、mRNA合成を指示するための適切な発現制御配列(複数可)(プロモーター)に作動可能に連結されている。本発明において有用なプロモーターには、LTRプロモーターまたはSV40プロモーター、大腸菌のlacプロモーターまたはtrpプロモーター、ラムダファージのP_Lプロモーター及びP_Rプロモーター、T3プロモーター及びT7プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)極初期プロモーター、単純ヘルペスウイルス(HSV)チミジンキナーゼプロモーター、及びマウスマタロチオネイン-Iプロモーターならびに原核細胞もしくは真核細胞またはウイルス内で遺伝子発現を制御することが知られている他のプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。本発明の他の実施形態では、組換え発現ベクターには、複製起点及び宿主細胞の形質転換を可能にする選択マーカー(例えば、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性、もしくは大腸菌におけるテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性)を含む。

40

【0045】

50

本発明のいくつかの実施形態では、高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することにより増加する。エンハンサーは、通常約10～300塩基対であり、プロモーターに作用し、その転写を増加させるDNAのシス作用性エレメントである。本発明において有用なエンハンサーには、複製起点の100～270塩基後期側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが含まれるが、これらに限定されない。

【0046】

他の実施形態では、発現ベクターは、翻訳開始のリボソーム結合部位及び転写ターミネーターも含む。本発明のさらに他の実施形態では、このベクターは、発現を増幅するための適切な配列も含んでいてよい。

10

【0047】

さらなる実施形態では、本発明は、上記の構築物を含む宿主細胞を提供する。本発明のいくつかの実施形態では、この宿主細胞は、高等真核細胞（例えば、哺乳動物細胞または昆虫細胞）である。本発明の他の実施形態では、この宿主細胞は、下等真核細胞（例えば、酵母細胞）である。本発明のさらに他の実施形態では、この宿主細胞は、原核細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。宿主細胞の具体例としては、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、及びシュードモナス *Pseudomonas* 属、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属、及びブドウ球菌 (*Staphylococcus*) の中の様々な種、ならびに出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2細胞、スピドロテラ (*Spodoptera*) Sf9細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、サル腎臓線維芽細胞のCOS-7株 (*Guzman, Cell 23: 175 [1981]*)、C127、3T3、293、293T、HeLa及びBHKの細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0048】

宿主細胞でこれらの構築物を従来の方法で使用し、組換え配列によってコードされる遺伝子産物を生成させることができる。いくつかの実施形態では、宿主細胞へのこの構築物の導入は、レトロウイルス形質導入、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、またはエレクトロポレーションによって達成することができる（例えば、Davis et al. [1986] *Basic Methods in Molecular Biology* 参照）。あるいは、本発明のいくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、従来のペプチド合成機により合成によって生成させることができる。

30

【0049】

タンパク質は、適切なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞において発現させることができる。無細胞翻訳系も、本発明のDNA構築物由来のRNAを用いてかかるタンパク質を生成させるために使用することができる。原核生物宿主及び真核生物宿主での使用に適切なクローニングベクター及び発現ベクターについては、Sambrook, et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y.* によって記載されている。

40

【0050】

本発明のいくつかの実施形態では、適切な宿主株の形質転換及び培地中で適切な細胞密度になるまでの宿主株の増殖の後に、タンパク質が分泌され、細胞はさらなる期間培養される。本発明の他の実施形態では、細胞は、典型的には、遠心分離によって収集され、物理的または化学的手段によって破碎され、得られた粗抽出物はさらなる精製のために保持される。本発明のさらに他の実施形態では、タンパク質発現に用いられる微生物細胞は、

50

凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破碎、または細胞溶解剤の使用を含む、任意の好都合な方法によって破碎することができる。

【0051】

本発明は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、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、アフィニティーコロマトグラフィー、ヒドロキシアバタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含むが、これらに限定されない組換え細胞培養物からデコリンを収集し、精製するための方法も提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、デコリン、特に、デコリンコアタンパク質の精製のための改良された方法を提供する。いくつかの実施形態では、これらのプロセスには、2つのカラムクロマトグラフィーステップ及び研磨ステップが含まれる。

10

【0052】

いくつかの好ましい実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて、デコリン含有培地、好ましくは、清澄化培地からデコリンを捕捉する。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー媒体は、SP-セファロースFFである。いくつかの実施形態では、陽イオン交換媒体を、中性pHの約5 mM～15 mMのリン酸ナトリウム、好ましくは、10 mMのリン酸ナトリウム、及び20 mM～70 mMのNaCl、好ましくは、約50 mMのNaClで平衡化する。いくつかの実施形態では、陽イオン交換媒体にデコリン含有培地を添加後、陽イオン交換媒体を洗浄する。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、約5 mM～15 mMのリン酸ナトリウム、好ましくは、10 mMのリン酸ナトリウム、及び20 mM～70 mMのNaCl、好ましくは、約50 mMのNaClを含む。いくつかの実施形態では、デコリンを、その後、陽イオン交換媒体から溶出する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約5 mM～15 mMのリン酸ナトリウム、好ましくは、10 mMのリン酸ナトリウム、及び150 mM～250 mMのNaCl、好ましくは、約200 mMのNaClを含む。

20

【0053】

いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーステップのデコリン含有溶出液を、ヒドロキシアバタイト媒体に適用する。いくつかの実施形態では、このヒドロキシアバタイト媒体は、CHTタイプ1である。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアバタイト媒体を、約5 mM～15 mMのリン酸ナトリウム、好ましくは、10 mMのリン酸ナトリウム、及び150 mM～250 mMのNaCl、好ましくは、約200 mMのNaClで平衡化する。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアバタイト媒体へのデコリン含有培地の添加後、ヒドロキシアバタイト媒体を洗浄する。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、約5 mM～15 mMのリン酸ナトリウム、好ましくは、10 mMのリン酸ナトリウム、及び150 mM～250 mMのNaCl、好ましくは、約200 mMのNaClを含む。いくつかの実施形態では、デコリンを、その後、ヒドロキシアバタイト媒体から溶出する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約0.2 M～0.4 Mのリン酸ナトリウム、好ましくは、0.3 Mのリン酸ナトリウム、及び150 mM～250 mMのNaCl、好ましくは、約200 mMのNaClを含む。

30

【0054】

いくつかの実施形態では、ヒドロキシアバタイトクロマトグラフィーステップのデコリン含有溶出液の緩衝液を交換し、イオン交換膜に適用する。いくつかの実施形態では、このイオン交換膜は、Qイオン交換膜、例えば、ムスタングQイオン交換媒体である。いくつかの実施形態では、この膜を、約30 mM～70 mMのトリス-HCl、好ましくは約50 mMのトリス-HClで平衡化する。いくつかの実施形態では、膜へのデコリン含有溶液の添加後、膜を洗浄し、デコリンは、この膜を通過する。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、約30 mM～70 mMのトリス-HCl、好ましくは、約50 mMのトリス-HClを含む。精製後、デコリンを、好ましくは、例えば、フロー濾過により、所望の濃度まで濃縮する。

40

【0055】

50

本発明の他の実施形態では、デコリン含有溶液を処理して、ウイルスを不活化または除去する。いくつかの実施形態では、デコリン含有溶液を界面活性剤で処理して、ウイルスを不活化する。いくつかの実施形態では、この界面活性剤は、トリトンX-100である。いくつかの実施形態では、この界面活性剤で処理するステップを、陽イオン交換クロマトグラフィーのステップ後に行う。いくつかの実施形態では、デコリン含有溶液を濾過し、ウイルスを除去する。いくつかの実施形態では、これらの溶液を、ウイルスフィルター（例えば、Virosartウイルスフィルター）に通して濾過する。いくつかの実施形態では、濾過ステップを、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーステップ後に行う。

【0056】

本発明のプロセスは、好ましくは、ヒト患者の臨床使用に適するデコリン組成物を提供する。いくつかの実施形態では、これらの組成物は、デコリンタンパク質が実質的にGA G化されないように、成熟デコリンコアタンパク質の4位に突然変異を含む精製されたデコリンコアタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、これらの組成物は、精製されたデコリンタンパク質を提供し、これらの組成物は、組成物中、デコリンコアタンパク質1mg当たり約100、50、20、10、5もしくは2ng未満の残留宿主細胞タンパク質及び/またはデコリンコアタンパク質1mg当たり約20、10、5、または2pg未満の残留宿主細胞DNAを含むことを特徴とする。いくつかの実施形態では、デコリンを水溶液で提供する。いくつかの実施形態では、この水溶液は、pHが約6.5~7.5、好ましくは、約7.0であるリン酸緩衝生理食塩水（例えば、10mMのリン酸ナトリウム、150mMの塩化ナトリウム）である。

10

20

30

40

【0057】

本発明は、上述の通りに精製された獣医学的デコリンを含む薬学的組成物をさらに提供する。薬学的に許容される担体は、当該技術分野において周知であり、生理学的緩衝化生理食塩水などの水性溶液またはグリコール、グリセロール、植物油（例えば、オリーブ油）もしくは注射可能な有機エステルなどの他の溶媒またはビヒクルを含む。薬学的に許容されるさらなる担体は、例えば、ヒアルロン酸、及び重炭酸塩緩衝液、リン酸塩緩衝液、リンガー溶液、ならびに所望の場合5%のデキストロースまたはヒト血清アルブミンで補充された生理食塩水などの水性溶液を含む。薬学的に許容される担体は、デコリンポリペプチドを、インピトロで細胞にまたはインピボで対象に投与するために使用することができる。薬学的に許容される担体は、例えば、ポリペプチドを安定化させもしくは作用物質の吸収を増加または減少させるよう作用する生理学的に許容される化合物を含有することができる。生理学的に許容される化合物は、例えば、グルコース、スクロースまたはデキストランなどの炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンなどの抗酸化剤、キレート剤、低分子量タンパク質もしくは他の安定化剤または賦形剤を含むことができる。他の生理学的に許容される化合物としては、湿潤剤、乳化剤、分散剤または防腐剤を含み、これらは微生物の増殖または作用を防止するために特に有用である。種々の防腐剤が周知であり、例えば、フェノール及びアスコルビン酸を含む。当業者であれば、生理学的に許容される化合物を含む薬学的に許容される担体の選択が、例えば、ポリペプチドの投与の経路に及び特定のポリペプチドの固有の物理化学的特性に依存することを熟知しているであろう。例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンなどの生理学的に許容される化合物は、対象に投与される薬学的組成物の吸収の速度を延長させる遅延剤として特に有用である。

50

【0058】

有効量の獣医学的デコリンを含む薬学的組成物は、例えば、局所的に、経口または静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内などの非経口を含む種々の経路によって、もしくは例えば、それぞれ皮膚パッチまたは経皮イオン導入法を用いる皮膚を通しての受動的または促進性吸収によって、対象に投与することができる。局所投与は、例えば軟膏または粉剤の直接適用により受動的であり得、もしくは例えば鼻内噴霧または吸入剤を用いて能動的であり得る。組成物が局所噴霧として投与される場合、組成物の1つの成分は、適切な推進剤である。薬学的組成物はまた、所望される場合、リポソーム、マイクロスフェアまたは他のポ

50

リマーマトリックス内に組み込まれ得る (*Gregoriadis, Liposome Technology, Vol. 1 (CRC Press, Boca Raton, Fla. 1984)* 、これは参照により本明細書に組み込まれる) 。例えば、リン脂質または他の脂質からなるリポソームは、作成し投与することが比較的簡単である、非毒性の生理学的に許容されかつ代謝可能な担体である。

【 0059 】

獣医学的デコリンを含む薬学的組成物の有効量は、一般的には、約 0.01 ~ 100 mg / kg 体重の範囲である。有効量は、当該技術分野において既知の方法を使用して決定することができる。総有効量を、単回用量として、ボーラスとしてかまたは比較的短期間にわたる注入によるかのいずれかで対象に投与され得るか、もしくは複数回の用量が一層長期の期間にわたって投与される、細分化した処置プロトコルを用いて投与され得る。当業者であれば、対象における有効用量を得るために必要とされるデコリンの量が、対象の年齢及び全般的健康状態ならびに投与の経路及び施される処置の回数を含む多くの要因に依存することを熟知しているであろう。

10

【 0060 】

本発明の獣医学的デコリン含有組成物は、追加の活性作用物質と組み合わせることができる。これらの作用物質としては、デコリン合成促進剤、コラーゲン合成促進剤、マトリックス金属タンパク質分解酵素 (MMP) 阻害剤、抗酸化剤、コラーゲン調節剤、皺防止または老化防止剤、抗生物質、脱色剤、鎮痛剤、抗菌剤、抗炎症剤、保湿剤、美白剤、コルチコステロイド、もしくは日焼け止め剤が含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0061 】

獣医学的デコリン含有組成物は、化粧品的にまたは薬学的にもしくは皮膚科学的に許容される担体と組み合わせることができる。これらの担体としては、水、鉛油、エチレングリコール、プロピレングリコール、ラノリン、グリセリルステアレート、ソルビタンステアレート、イソプロピルミリステート、イソプロピルパルミテート、アセトン、グリセロール、ホスファチジルコリン、コール酸ナトリウム、またはエタノールが含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0062 】

獣医学的デコリン含有組成物は、皮膚浸透促進剤と組み合わせることができる。正常な無償の皮膚を通して活性成分を輸送する上で役立つこれらの促進剤としては、リポソーム、混合脂質ミセル、エトソーム (*ethosomes*) 、トランスファーソーム (*transfersomes*) 、ニオソーム (*niosomes*) 、エタノール、アミド、エーテル、グリコール、炭化水素油、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイン酸、水アルコール溶液、及びダイズホスファチジルコリンまたはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。他の皮膚浸透の促進としては、異なる pH 値、共溶媒、界面活性剤、シクロデキストリン、及びイオン導入が含まれる。

30

【 0063 】

好適な担体またはビヒクルもしくは促進剤は、ゲル剤、クリーム剤、ローション剤、溶液剤、コロイド状分散剤、乳剤 (水中油または油中水) 、発泡剤、噴霧剤、懸濁剤、日焼け止め剤、液剤、及び皮膚への局所塗布用の種々のスキンケア調製物の製剤を含む。デコリン含有組成物は、皮膚への局所適用のための任意の製剤で調製され得る。

40

【 0064 】

上述の製剤はまた、製剤の意図される使用に応じて、他の成分と組み合わせることができる。これらの成分としては、防腐剤、ビタミン、ポリマー、香料、水溶性または油溶性膜形成剤、もしくは香味剤が含まれるが、これらに限定されない。

【 0065 】

本発明の獣医学的デコリン組成物には、様々な用途がある。獣医学的デコリンを利用する方法は、一般的に適用可能であるが、治療され得る病理の特定の例は、癌、線維性疾患、及び糸球体腎炎を含む。例えば、線維性癌では、デコリンは、TGF- β に結合し、癌細胞に対する TGF- β の増殖刺激活性を破壊する。獣医学的デコリン組成物は、EGF

50

受容体及び／またはIGF-1受容体に対して陽性である腫瘍を治療するまでの使用をさらに見出す。他の増殖性病理としては、リウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症、成人呼吸困難症候群、肝硬変、肺、腎臓、または肝臓の線維症、心筋梗塞後症候群、心線維症、血管形成後の再狭窄、間質性腎線維症、ならびにケロイド及び瘢痕化などの特定の皮膚線維性状態が含まれる。いくつかの特に好ましい実施形態では、この組成物は、ウマの肉芽における瘢痕化を治療または阻害するために使用される。さらなる実施形態では、この組成物は、眼に対する損傷、例えば、角膜手術、眼熱傷（化学的または熱性）、眼感染、及び眼に対する擦傷から生じる眼に対する損傷を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、デコリン組成物は、心疾患を治療するために使用される。さらに他の実施形態では、デコリン組成物は、脳または脊髄損傷などの神経外傷を治療するために使用される。

10

実験

【0066】

実施例1

発現構築物を、愛玩動物及び家畜動物のいくつかの異なる種から獣医学的デコリンの突然変異体型に対して設計した。セリンからアラニンへの変更を、それぞれの異なる種について成熟デコリンのアミノ酸4位において行った。この突然変異は、GAGがデコリン分子に結合するのを防止する。この発現構築物は、タンパク質生成及び分泌のための内因性シグナルペプチドの代わりに、ウシ-ラクトアルブミンシグナルペプチドを使用する。この構築物を、以下に概説する。

20

ニワトリデコリン発現遺伝子配列（配列番号1）：

【化1】

```

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
AGGCCGGACCATTCAACAGAAAGGCTTATTGACTTATGCTGGAAGATGAGG
CTGCAGGGATAAGGCCCGGAAGAGCACTTCCTGAAGTCCCTGAAATAGAGCCTA
TGGGCCAGTCTGCCCTCCGCTGTCAGTGCATCTGCGAGTTGCCAGTGTCT
GATCTGGGTCTGGAAAAAGTACCAAAAGACCTCCTCCTGATACTGCGCTGCTGG
ACCTGCAAAACAACAAAATAACTGAGATCAAAGATGGAGACTTTAAGAACCTGA
AGAACCTTCATACACTGATTCTCATCAACAAACAAATTAGCAAAATCAGCCCTGG
GGCATTGCTCCTTGGTGAATTGGAACGACTTATCTTCCAAGAATCAACTG
AAGGAATTGCCAGAGAAAATGCCAAAACCTTCAGGAGCTGCGTGTCCATGAG
AACGAGATCACCAAGTGCAGACTCTGTTCAATGGATTGAACCAGATGATC
GTCGTAGAACTGGCACCAACCCGCTGAAGAGCTCAGGCATTGAAAATGGAGCC
TTTCAGGGAATGAAGAAGCTCTCCTACATCCGCATTGCTGACACAAATATAACTA
CCATCCCTCAAGGTCTCCTCCTTACTGAATTACATCTCGATGGCAACAAA
ATCACCAAAGTTGATGCAGCTAGCCTGAAAGGACTGAATAATTGGCTAAGTTG
GGACTGAGTTCAACAGCATCTGCGGTTGACAATGGCTCTTGGCCAACACTC
CTCATTGAGGAACTTCATTGAACAAACAACAAGCTTGTCAAAGTGCCCGGTGG
GCTGGCCGATCATAAGTACATCCAGGTTGTCTACCTTCACAACAACAATATCTCT
GCAATCGGCTCTAACGACTTCTGCCACCCGGATACAACACCAAAAAGGCTTCTT
ATTCAAGGAGTGAGCCTTTCAGCAACCCAGTCCAGTACTGGGAGATCCAGCCATC
CACCTCCGATGTGTCTATGTGCGTGTGCCGTTAGCTTGGAAACTACAAGTGA

```

30

40

50

配列番号 2 :

【化 2】

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
AGGCCACGCGGTTCCACCAGAAGGGCCTTTGACTTATGATAGAGGATGAAG
 GGGCAGCCGACATGGCTCCAACAGATGATCCTGTCATATCTGGATTGGCCAGT
 GTGCCCCCTCCGCTGCCAGTGTACATCTCGCGTTGCACTGCTCTGACCTAGGTC
 TGGAAAGAGTGCCAAAAGACCTCCCCCTGACACAACTCTGCTGGATTACAGA
 ACAACAAAATCACTGAAATTAAAGAAGGAGATTCAAGAATTGAAGAATCTTC
 ATGCATTGATCCTGTTAACACAAAATCAGCAAAATAAGTCCGGCAGCTTGC
 TCCTCTGAAGAAACTGGAAAGACTGTACCTATCCAAGAATAATTGAAGGAACCT
 CCAGAAAACATGCCAAAGTCTCTCAGGAGATACGTGCTCATGAAAATGAGATC
 TCCAAGTTGAGGAAGGCAGTTTAATGGACTGAATCAAGTGAATTGCTTAGAAC
 TAGGCACCAATCCACTCAAGAGCTCAGGCATTGAAAATGGAGCTTTCAAGGGA
 TGAAGAGGCTTCCTATATCCGCATCGCAGACACCAACATTACTAGCATCCCTAA
 AGGTCTCCTCCATCCCTACTGAGCTCACCTGATGGCAACAAAATTAGCAA
 ATTGATGCGGAAGGTCTGTCTGGACTCACCAACTGGCTAAATTGGGTCTCAGCT
 TCAACAGTATTCTCTGTTGAAAATGGCTCTGAAACAATGTACCTCATCTGAG
 AGAACTTCATCTGAATAACAAACGAACCTGTCAGAGTACCTAGTGGTTGGTGA
 ACACAAATACATCCAGGTGGTCTATCTCATAACAAACAGATTGCTCAATTGGT
 ATCAACGACTTTGCCCTCTGGCTACAACACCAAAAAGGCAACCTATTCTGGTG
 TGAGTCTCTCAGCAACCCCGTGCAGTACTGGAAATCCAGCCCTGCTTCCG
 ATGTATCCATGAACGCTCTGCAGTACAGATCGGAAATTACAAATGA

10

20

30

40

50

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチド領域は、太字の活字で示されている。
 ニワトリデコリンプロペプチド領域には、下線が施されている。

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている。

ニワトリデコリン発現タンパク質配列（配列番号 3）：

【化 3】

MMSFVSLLVGILFHATQATRFHQKGLDFMIEDEGAADMAPTDDPVISGFGPVCP
 FRCQCHLRVVQCSDLGLERVPKDLPPDTLLDLQNNKITEIKEGDFKNLKNLHALILV
 NNKISKISPAAFAPLKKLERLYLSKNNLKELPENMPKSLQEIRAHENEISLRKAVFN
 GLNQVIVLELGTNPLKSSGIENGAFQGMKRLSYIRIADTNITSIPKGLPPSLTELHLDGN
 KISKIDAEGLSGLTNLAKLGLSFNSISSVENSLNNVPHLRELHLNNNELVRVPSGLGE
 HKYIQVYVLHNNKIASIGINDFCPLGYNTKKATYSGVSLFSNPVQYWEIQPSAFRCIH
 ERSAVQIGNYK.

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドは、太字の活字で示されている。

ニワトリデコリンプロペプチドは、下線が施されている。

【0067】

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている（成熟タンパク質への G A G 部分の付加を防止するために、成熟デコリンのアミノ酸番号 4 は、セリンからア

ラニンへ突然変異された。このアミノ酸は、太字の活字で示され、ならびに下線が施されている)。

成熟ニワトリデコリン(配列番号4) :

【化4】

DEGAADMADPTDDPVISGFGPVC^{PFRCQ}CHLRVVQCS^{DLGLER}VPKDLPPDTLLDLQ
NNKITEIKEGDFKNLKNLHALILVNNKISKISPAAFAPLKKLERLYLSKNNLKELPEN
MPKSLQEIRAHENEISKL^{RKA}V^{FNGLNQ}VIVLELGTNPLKSSGIENGAFQGMKRLSYI
RIADTNITSIPKGLPPSLTELHLDGNKISKIDAEGLSGLTNLAKLGLSFNSISSVENGLN
N^{VPHLRELHLNNNEL}RVPSGLGEHKYIQVVYLHNNKIASIGINDFCPLGYNTKKAT
YSGVSLFSNPVQYWEIQPSAFRCIHERSAVQIGNYK

10

ウシデコリン発現遺伝子配列(配列番号5) :

【化5】

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
AGGCCGGACCTTCAACAGAAAGGCTTATTGACTTATGCTGGAAGATGAGG
CTGCAGGGATAAGGCCCGGAAGAGCACTTCCTGAAGTTCC^TGAAATAGAGCCTA
TGGGCCAGTCTGCCCTCCGCTGTCAGTGC^CATCTGCAGTTG^TCCAGTGTCT
GATCTGGTCTGGAAAAAGTACCAAAAGACCTCC^TC^TGATACTGCGCTGCTGG
ACCTGCAAAACAACAAAATACTGAGATCAAAGATGGAGACTTAAGAACCTGA
AGAACCTTCATACACTGATTCTCATCAACAAACAAAATTAGCAAAATCAGCC^TGG
GGCATTGCTCCTTGGTGAATTGGAACGACTTATCTTCCAAGAATCAACTG
AAGGAATTGCCAGAGAAAATGCCAAA^TCTTCAGGAGCTGCGTGTCCATGAG
AACGAGATCACCAAGTGC^GAAAGTCTGTGTTCAATGGATTGAACCAGATGATC
GTCGTAGAACTTGGCACCAACCCGCTGAAGAGCTCAGGCATTGAAAATGGAGCC
TTTCAGGGAAATGAAGAACGACTCTCCTACATCCG^CATTGCTGACACAAATATAACTA
CCATCCCTCAAGGTCTCCTCC^TACTGAATTACATCTCGATGGCAACAAA
ATCACCAAAGT^GATGCA^GC^TAGCCTGAAAGGACTGAATAATTGGCTAAGTTG
GGACTGAGTTCAACAGCATCTCTGCGGTTGACAATGGCTCTTGGCCAACACTC
CTCATTGAGGGAACTTCATTGAACAACAACAGCTTGTCAAAGTGCCCGGTGG
GCTGGCCGATCATAAGTACATCCAGGTTGTCTACCTTCACAACAACAAATATCTCT
GCAATCGGCTCTAACGACTTCTGCCACCCGGATACAACACCAAAAAGGCTTCTT
ATTCA^GGGAGTGAGCCTTTCAGCAACCCAGTCCAGTACTGGAGATCCAGGCCATC
CACCTTCCGATGTGTCTATGTGCGTGCTGCCGTT^CAGCTTGAAACTACAAGTGA

20

30

40

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドコード領域は、太字の活字で示されている。
ウシデコリンプロペプチドコード領域には、下線が施されている。

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている。

ウシデコリン発現タンパク質配列(配列番号6) :

【化6】

MMSFVSLLLVGILFHATQAGPFOOKGLFDFMLEDEAAGIGPEEHFPEVPEIEPMGPV
 CPFRCQCHLRVVQCSDLGLEKVPKDLPPDTALLDLQNNKITEIKDGFKNLKNLHTLI
 LINNKISKISPGAFAPLVKLERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRVHENEITKVRKSVF
 NGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITTIPQGLPPSLTELHLD
 GNKITKVDAASLKGNNLAKLGLSFNSISAVDNGSLANTPHLRELHLNNNKLVKVPG
 GLADHKYIQVVLHNNNISAIGSNDFCOPPGYNTKKASYSVGSLFSNPVQYWEIOPSTF
 RCVYVRAAVQLGNYK.

10

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドは、太字の活字で示されている。

ウシデコリンプロペプチドは下線が施されている。

【0068】

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている（成熟タンパク質へのGAG部分の付加を防止するために、成熟デコリンのアミノ酸番号4は、セリンからアラニンへ突然変異された。このアミノ酸は、太字の活字で示され、ならびに下線が施されている）。

成熟ウシデコリンタンパク質配列（配列番号7）：

20

【化7】

DEAAGIGPEEHFPEVPEIEPMGPVCPFRCQCHLRVVQCSDLGLEKVPKDLPPDTALLD
 LQNNKITEIKDGFKNLKNLHTLILINNKISKISPGAFAPLVKLERLYLSKNQLKELPE
 KMPKTLQELRVHENEITKVRKSVFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLS
 YIRIADTNITTIPQGLPPSLTELHLDGNKITKVDAASLKGNNLAKLGLSFNSISAVDN
 GSLANTPHLRELHLNNNKLVKVPGGLADHKYIQVVLHNNNISAIGSNDFCOPPGYNT
 KKASYSVGSLFSNPVQYWEIOPSTFRCVYVRAAVQLGNYK

30

イヌデコリン発現遺伝子配列（配列番号8）：

【化8】

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
 AGGCCGGGCCGTTCCAACAGAGAGGCTTATTTGACTTATGCTAGAAGATGAGG
 CTGCAGGGATAGGCCCGGAGGACCGTGCACCTGACATGCCTGACCTCGAGCTTC
 TGGGACCTGTGTGTCCCCTCCGCTGTCAGTGCCATCTCCGAGTGGTCCAGTGTCC
 GACCTGGGTCTGGACAAAGTACCAAAAGATCTCCCCCTGACACTACGCTGCTCG
 ACTTGCAAAACAACAAATACCGAAATCAAAGATGGAGACTTCAAGAACCTCA
 AGAACCTGCATAACCTGATTCTGTAAACAAACAAATTAGCAAATCAGCCCTGG
 AGCATTACACCTTGTGAAATTGGAACGACTTTATCTGTCCAAGAACATCATCTG
 AAGGAATTGCCAGAAAAAATGCCAAAACTCTCAGGAGCTGCGTGCCCATGAG
 AATGAGATCACCAAAAGTCGAAAAGCTGTGTTCAATGGACTGAACCAGATGATC
 GTCGTAGAGCTGGCACCAATCCCTGAAGAGTTCAGGGATTGAAAATGGAGCC
 TTCCAGGGAAATGAAGAACGCTCTCCTATATCCGCATTGCTGATACCAATATAACTA
 CCATCCCTCAAGGTCTTCCTCCCTACTGAATTACATCTGAAGGCAACAAA
 ATCACCAAGGTGATGCATCTAGCCTGAAAGGACTGAATAATTGGCTAAGTTGG
 GACTGAGTTAACAGCATCTCCGCTGTTGACAATGGCACTCTAGCCAACACTCC
 TCATCTGAGGGAGCTTACTTGGACAACAATAAGCTCATCAGAGTACCCGGTGG
 GCTGGCGGAGCATAAGTACATCCAGGTTGTCACCTTCATAACAAACAATATCT
 GCAGTCGGATCTAATGACTCTGCCACCTGGATACAACACCAAAAAAGGCTTCTT
 ATTCAGGTGTGAGCCTTCAGCAACCCAGTGCAGTACTGGAGATCCAGCCATC
 CACCTCCGGTGTGCTACGTGCGCTGCCCACCTGGAAATTATAAATGA

10

20

30

40

50

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチド領域は、太字の活字で示されている。

イヌデコリンプロペプチド領域には、下線が施されている。

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている。

イヌデコリン発現タンパク質配列（配列番号9）：

【化9】

MMSFVSLLVGILFHATQAGPFOQRGLFDFMLEDEA**A**GIGPEDRAPDMPDLELLGP
 VCPFRCQCHLRVVQCSDLGLDKVPKDLPPDTLLDLQNNKITEIKDGDFKNLKNLHT
 LILVNNKISKISPGAFPLLKLERLYLSKNHLKELPEKMPKTLQELRAHENEITKVRKA
 VFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITTIPQLPPSLTELH
 LEGNKITKVDASSLKGLNNLAKLGLSFNSISAVDNGTLANTPHLRELHLDNNKLIRVP
 GGLAEHKYIQVVLHNNNISAVGSNDFCPPGYNTKKASYSGVSLFSNPVQYWEIOPS
 TFRCVYVRSAIQLGNYK.

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドは、太字の活字で示されている。

イヌデコリンプロペプチドは下線が施されている。

【0069】

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている（成熟タンパク質へのGAG部分の付加を防止するために、成熟デコリンのアミノ酸番号4は、セリンからアラニンへ突然変異された。このアミノ酸は、太字の活字で示され、ならびに下線が施され

ている)。

成熟イヌデコリン配列(配列番号10) :

【化10】

DEAAGIGPEDRAPDMPDLELLGPVCPFRCQCHLRVVQCSDLGLDKVPKDLPPDTLL
 DLQNNKITEIKDGFKNLKNLHTLILVNNKISKISPGAFPLKLRLYLSKNHLKELP
 EKMPKTLQELRAHENEITKVRKAVFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKK
 LSYIRIADTNITTIPQGLPPSLTELHLEGNKITKVDASSLKGNNLAKLGLSFNSISAVD
 NGTLANTPHLRELHLDNNKLRVPGGLAEHKYIQVVLHNNNISAVGSNDFCPPGYN
 TKKASYSVSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRSAIQLGNYK

10

ヤギデコリン発現遺伝子配列(配列番号11) :

【化11】

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
AGGCCGGACCTTCAACAGAAAGGCTTATTGACTTTATGCTGGAAAGATGAGG
 CTGCAGGGATAGGCCCGGAAGAGCGCTTCATGAAGTTCTGAATTAGAGCCTAT
 GGGCCCAGTCTGCCCTCCGCTGTCAGTGCATCTGCGAGTTGTCAGTGTCTG
 TTCTGGGTCTGGAAAAAGTGCCAAAGACCTCCTCCTGATACCGCGCTGCTGGA
 CCTGCAAAACAACAAAATACTGAGATCAAAGATGGAGACTTTAAGAACCTGAA
 GAACCTTCATACACTGATTCTCATCAACAAACAAAATTAGCAAAATCAGCCCTGGG
 GCATTGCTCCTCTGGTGAATTGGAACGACTTATCTTCCAAGAACATCAACTGA
 AGGAATTGCCAGAGAAAATGCCAAAACTCTTCAGGAGCTGCGTGTCCATGAGA
 ACGAGATCACCAAAAGTGCAGACTGTTCAATGGATTGAACCAGATGATCG
 TCGTAGAACTTGGCACCAACCCACTGAAGAGCTCAGGCATTGAAATGGAGCCT
 TTCAAGGAAATGAAGAAGCTCTCCTACATCCGCATTGCTGACACTAATATAACTAC
 CATTCCCAAGGTCTCCTCCCTACTGAATTACATCTCGATGGCAACAAAA
 TCACCAAAAGTTGATGCAGCTAGCCTGAAAGGACTGAATAATTGGCTAAGTTGG
 GACTGAGTTCAACAGCATCTGCTGTTGACAATGGCTTTAGCCAACACTCC
 TCATTGAGGAAACTCATTGAACAAACAAGCTTGTCAAAGTGCCCGGTGGG
 CTGGCCGACCATAAGTACATCCAGGTTGTCTACCTTCACAACAAACAATATCTCTG
 CAATCGGCTCCAACGACTTCTGCCACCCGGATACAACACCAAAAGGCTTCTTA
 TTCAGGAGTGAGCCTTCAGCAACCCAGTCCAGTACTGGAGATCCAGCCATCC
 ACCTTCCGATGTGTCTACGTGCGCGCTGTTAGCTGGAAACTACAAGTGA

20

30

40

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドコード領域は、太字の活字で示されている。

ヤギデコリンプロペプチドコード領域には、下線が施されている。

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている。

ヤギデコリン発現タンパク質配列(配列番号12) :

【化12】

MMSFV~~LLL~~VGILFHATQAGPFQQKGLFDFMLEDEAAGIGPEERFHEVPELEPMGP
 VCPFRCQCHLRVVQCSVGLEKVPKDLPPDTALLDLQNNKITEIKDGDFKNLKNLHT
 LILINNKISKISPGAFAPLVKLERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRVHENEITKVRKS
 VFNGLNQMI~~V~~ELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITTIPQGLPPSLTELH
 LDGNKITKVDAASLKGLNNLAKLGLSFNSISAVDNGSLANTPHLRELHLNNNKLVKV
 PGGLADHKYIQVVYLHNNNISAIGSNDFCPPGYNTKKASYS~~G~~VSLFSNPVQYWEIQP
 STFRCVYVRAAVQLGNYK.

10

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドは、太字の活字で示されている。
 ヤギデコリンプロペプチドは下線が施されている。

【0070】

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている（成熟タンパク質へのGAG部分の付加を防止するために、成熟デコリンのアミノ酸番号4は、セリンからアラニンへ突然変異された。このアミノ酸は、太字の活字で示され、ならびに下線が施されている）。

成熟ヤギデコリンタンパク質配列（配列番号13）：

【化13】

20

DEAAGIGPEERFHEVPELEPMGPVCPFRCQCHLRVVQCSVGLEKVPKDLPPDTALL
 DLQNNKITEIKDGDFKNLKNLHTLILINNKISKISPGAFAPLVKLERLYLSKNQLKELP
 EKMPKTLQELRVHENEITKVRKS~~V~~FNQMI~~V~~ELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKL
 SYIRIADTNITTIPQGLPPSLTELHLDGNKITKVDAASLKGLNNLAKLGLSFNSISAVDN
 GSLANTPHLRELHLNNNKLVKVPGGLADHKYIQVVYLHNNNISAIGSNDFCPPGYNT
 KKASYS~~G~~VSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRAAVQLGNYK

ウマデコリン発現遺伝子配列（配列番号14）：

30

【化14】

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
AGGCCGGACCATTCAACAGAGAGGCTTATTGACTTCATGCTAGAAGATGAGG
 CTGCAGGGATTGGCCCAGAAGATCGCATTGAGTTCTAGACTTAGAGCCTCT
 GGGACCAGTGTGTCCTTCCGCTGTCAGTGCATCTCGAGTTGTCATGTTCTG
 ATTGGGTCTGGACAAAGTGCCAAAGATCTTCCCCCTGACACCACGCTGCTGGA
 CCTGCAAAACAACAAAATAACCGAAATCAAAGATGGAGACTTTAAGAACCTGAA
 GAATCTTCATGCGTTGATTCTTGTCAACAAACAAAATTAGCAAAATCAGCCCTGGA
 GCATTACACCTTGGTGAACACTGGAACGACTTATCTGTCAGAATCATTGA
 AGGAATTGCCAGAAAAATGCCAAACTCTTCAGGAGCTGCGTGTCCATGAGA
 ACGAGATCACCAAAAGTGCAGGAAAGCGGTGTTCAATGGACTGAACCAGATGATAG
 TCGTAGAACTGGGCACCAACCCACTGAAGAGCTCAGGAATTGAAAATGGAGCCT
 TCCAGGGGATGAAGAAGCTGTCCTACATCCGCATTGCTGACACCAACATAACCA
 CCATCCCTCCAGGTCTCCTCCCTACTGAATTACATCTTGATGGCAACAAA
 ATCACCAAAAGTTGATGCAGCTAGCCTGAGAGGACTGAATAATTGGCTAAATTG
 GGACTGAGITTCAACAGCATCTTGCTGTTGACAATGGCTCTGGCCAACACTC
 CTCATTGAGGAACTTCACITGGACAACAACAAGCTTATCAAAGTGCCTGGTGG
 GCTGGCGGATCATAAGTACATCCAGGTTGTCACCTTCATAACAACAATATCTCT
 GCAGTTGGATCTAATGACTTCTGCCACCTGGATACAACACCAAAAAGGCTTCTT
 ATTGGGTGTGAGCCTTCAGCAACCCAGTCCAGTACTGGAGATCCAGCCATC
 CACCTCCGATGTGTCTATGTCGCTCTGCCATTGAGCTCGAAACTACAAGTGA

10

20

30

40

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチド領域は、太字の活字で示されている。

ウマデコリンプロペプチド領域には、下線が施されている。

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている。

ウマデコリン発現タンパク質配列（配列番号15）：

【化15】

MMSFVSLLLVGILFHATQAGPFQORGLFDFMLEDEA**A**GIGPEDRIHEVLDLEPLGP
 VCPFRCQCHLRVVQCSDLGLDKVPKDLPPDTL~~LL~~DLQNNKITEIKDGDFKNLKNLHA
 LILVNNKISKISPGAFPLVKLERLYLSKNHLKELPEKMPKTLQELRVHENEITKVRKA
 VFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITI~~PP~~GLPPSLTELH
 LDGNKITKVDAASLRGLNNLAKLGLSFNSISAVDNGSLANTPHLRELHLDNNKLIKV
 PGGLADHKYIQQVYVLHNNNISAVGSNDFCPPGYNTKKASYSGVSLFSNPVQYWEIQP
 STFRCVYVRSAIQLGNYK.

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドは、太字の活字で示されている。

ウマデコリンプロペプチドは下線が施されている。

【0071】

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている（成熟タンパク質へのGAG部分の付加を防止するために、成熟デコリンのアミノ酸番号4は、セリンからアラニンへ突然変異された。このアミノ酸は、太字の活字で示され、ならびに下線が施され

50

ている)。

成熟ウマデコリンタンパク質配列(配列番号16) :

【化16】

DEAAGIGPEDRIHEVLDLEPLGPVCPFRCQCHLRVVQCSDLGLDKVPKDLPPDTLLD
LQNNKITEIKDGFKNLKNLHALILVNNKISKISPGAFTPLVKLERLYLSKNHLKELPE
KMPKTLQELRVHENEITKVRKAVFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKL
SYIRIADTNITTIPPGLPPSLTELHLDGNKITKVDAASLRGLNNLAKLGLSFNSISAVDN
GSLANTPHLRELHLDNNKLIKVPGGLADHKYIQVVYLHNNNISAVGSNDFCPPGYNT
KKASYSGVSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRSAIQLGNYK

10

ブタデコリン発現遺伝子配列(配列番号17) :

【化17】

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
AGGCCGGACCATTCAACAGAAAGGCTTATTGACTTATGCTAGAAGATGAGG
CTGCAGGGATAGGCCAGAAGACCGCTTCCCTGAAGTTCCCTGAATTAGAGCCTCT
GGGACCCATGTGTCCCTCCGCTGTCAATGCCATCTCGAGTTGTCATGTTCTG
ATTGGGTCTGGACAAAGTGCCAAAGATCTTCCACCTGACACTGCCCTGCTGGA
TCTGCAAAACAACAAAATACTGAAATCAAAGATGGAGACTTAAGAACCTGAA
GAACCTTCATACACTGATTCTCATCAACAAACAAAATTAGCAAAATCAGCCCTGGA
GCATTTGCACCTTGGTGAATTGGAACGACTTATCTATCCAAGAACATCAACTGA
AGGAATTGCCAGAGAAAATGCCAAAACTCTTCAGGAGCTCGTGTCCATGAGA
ATGAGATCACCAAAAGTGCAGAAAGGCTGTCAATGGATTGAACCAGATGATCG
TCGTAGAACTTGGCACCAACCCGCTGAAGAGCTCAGGATTGAAAACGGAGCTT
TCCAGGGAATGAAGAACGACTCTCCTACATCCGCATCGCTGACACCAACATTACCA
CATCCCTCAAGGTCTCCTCCCTCCCTACTGAATTACATCTTGATGGCAACAAAA
TCAGCAAAGTTGATGCAGCTAGCCTAAAAGGACTGAATAATTGGCTAAGTTGG
GAATGGTTCAATAGCATCTCAACTGTGACAATGGCTCTGGCCAACACTCC
TCATTGAGGAACTTCATCTGAACAAACAAGCTAACAAAGTGCCTGGTGG
GCTGGCAGAGCATAAGTACATCCAGGTTGTCTACCTCATAACAAACAACATCTCT
GCAGTCGGCTTAATGACTTCTGCCGCCTGGATACAACACCAAAAAGGCTTCTT
ATTGGGGGTGAGCCTTTCAGCAACCCAGTCCAGTACTGGGAGATCCAGGCCATC
CACCTCCGATGTGTCTATGTGCGCTCTGCCATTCAAGCTCGAAACTACAAGTGA

20

30

40

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドコード領域は、太字の活字で示されている。

ブタデコリンプロペプチドコード領域には、下線が施されている。

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている。

ブタデコリン発現タンパク質配列(配列番号18) :

【化18】

MMSFV~~LLL~~VGILFHATQAGPFOQKGLFDFMLEDEAAGIGPEDRFPEVPELEPLGP
 MCPFRCQCHLRVVQCS~~DL~~GLDKVPKDLPPDTALLDLQNNKITEIKDGDFKNLKNLHT
 LILINNKISKISPGAFAPLVKLERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRVHENEITKVRKA
 VFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITTIPQGLPPSLTELH
 LDGNKISKVDAASLKGLNNLAKLGLGFNSISTVDNGSLANTPHLRELHLNNNKLNKV
 PGGLAEHKYIQVVYLHNNNISAVGSNDFCPPGYNTKKASYS~~GV~~SLFSNPVQYWEIQP
 STFRCVYVRS~~A~~IQLGNYK.

10

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドは、太字の活字で示されている。

ブタデコリンプロペプチドは下線が施されている。

【0072】

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている（成熟タンパク質へのGAG部分の付加を防止するために、成熟デコリンのアミノ酸番号4は、セリンからアラニンへ突然変異された。このアミノ酸は、太字の活字で示され、ならびに下線が施されている）。

成熟ブタデコリン配列（配列番号19）：

【化19】

20

DEAAGIGPEDRFPEVPELEPLGP~~MC~~PFRCQCHLRVVQCS~~DL~~GLDKVPKDLPPDTALL
 DLQNNKITEIKDGDFKNLKNLHTLILINNKISKISPGAFAPLVKLERLYLSKNQLKELP
 EKMPKTLQELRVHENEITKVRKAVF~~N~~GLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKK
 LSYIRIADTNITTIPQGLPPSLTELHLDGNKISKVDAASLKGLNNLAKLGLGFNSISTVD
 NGSLANTPHLRELHLNNNKLNKVPGGLAEHKYIQVVYLHNNNISAVGSNDFCPPGY
 NTKKASYS~~GV~~SLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRS~~A~~IQLGNYK

ヒツジデコリン発現遺伝子配列（配列番号20）：

30

【化20】

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
 AGGCCGGACCCTTCAACAGAAAGGCTTATTGACTTATGCTGGAAGATGAGG
 CTGCAGGGATAGGCCCGAAGAGCGCTTCATGAGGTCCTGAATTAGAGCCTAT
 GGGCCCAGTCTGCCCTTCCGTTGCCAGTGCCATCTGCGAGTTGCCAGTGTTCTG
 ATCTGGGTCTGGAAAAAGTGCCAAAGACCTCCTCCTGATACCGCGCTGCTGGA
 CCTGCAAAACAACAAATAACTGAGATCAAAGATGGAGACTTTAAAAACCTGAA
 GAACCTTCATACACTGATTCTCATCAACAACAAATTAGCAAAATTAGCCCTGGG
 GCATTGCTCCTCTGGTGAATTGGAACGACTTATCTTCCAAGAATCAACTGA
 AGGAATTGCCAGAGAAAATGCCAAAACTCTCAGGAGCTGCGTGTCCATGAGA
 ACGAGATCACCAAAAGTGCAGAAGTCTGTCAATGGATTGAACCAGATGATCG
 TCGTAGAACTTGGCACCAACCCACTGAAGAGCTCAGGCATTGAAAATGGAGCCT
 TTCAGGGAATGAAGAAGCTCTCCTACATCCGCATTGCTGACACTAATATAACTAC
 CATCCCTCAAGGTCTCCTCCCTACTGAATTACATCTGACGGCAACAAA
 ATCACCAAAGTTGATGCAGCTAGCCTGAAAGGACTGAATAATTGGCTAAGTTG
 GGACTGAGTTCAACAGCATCTCTGCTGTTGACAATGGCTCTTGGCCAACACTC
 CTCATTGAGGAACTTCATTGAACAAACAAGCTTGTCAAAGTGGCCCGGTGG
 GCTGGCCGACCATAAGTACATCCAGGTTGTCACCTTCACAACAACATATCTCT
 GCAATCGGCTCTAACGACTTCTGCCACCTGGATAACAACACCAAAAAGGCTTCTT
 ATTCAAGGAGTGAGCCTTCAGCAACCCAGTCCAGTACTGGGAGATCCAGGCCATC
 CACCTTCCGATGTGTCTACGTGCGCGCTGCTGTTCAGCTGGAAACTACAAGTGA

10

20

30

40

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドコード領域は、太字の活字で示されている。

ヒツジデコリンプロペプチドコード領域には、下線が施されている。

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている。

ヒツジデコリン発現タンパク質配列（配列番号21）：

【化21】

MMSFVSLLLVGILFHATQAGPFQQKGLFDFMLEDEAAGIGPEERFHEVPELEPMGP
 VCPFRCQCHLRVVQCSDLGLEKVPKDLPPDTALLDLQNNKITEIKDGDFKNLKNLHT
 LILINNKISKISPGAFAPLVKLERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRVHENEITKVRKS
 VFNGLNQMVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITTIPQLPPSLTELH
 LDGNKITKVDAASLKGLNNLAKLGLSFNSISAVDNGSLANTPHLRELHLNNNKLVKV
 PGGLADHKYIQQVYVLHNNNISAIGSNDFCPPGYNTKKASYSGVSLFSNPVQYWEIQP
 STFRCVYVRAAVQLGNYK.

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドは、太字の活字で示されている。

ヒツジデコリンプロペプチドは下線が施されている。

【0073】

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている（成熟タンパク質へのGAG部分の付加を防止するために、成熟デコリンのアミノ酸番号4は、セリンからアラニンへ突然変異された。このアミノ酸は、太字の活字で示され、ならびに下線が施され

50

ている)。

成熟ヒツジデコリン配列(配列番号22) :

【化22】

DEAAGIGPEERFHEVPELEPMGPVCPFRCQCHLRVVQCSDLGLEKVPKDLPPDTALL
 DLQNNKITEIKDGFKNLKNLHTLILINNKISKISPGAFAPLVKLERLYLSKNQLKE
 LKMPKTLQELRVHENEITKVRKSVFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKL
 SYIRIADTNITTIPQGLPPSLTELHLDGNKITKVDAASLKGNNLAKLGLSFNSISAVDN
 GSLANTPHLRELHLNNNKLVKVPGGLADHKYIQVVYLHNNNISAIGSNDFCPPGYNT
 KKASYSGVSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRAAVQLGNYK

10

ネコデコリン発現遺伝子配列(配列番号25) :

【化23】

ATGATGTCCTTGTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCATGCCACCC
 AGGCCGGGCCGTCCAACAGAGAGGCTTATTGACTTATGCTAGAAGATGAGG
 CTGCAGGGATAGGCCAGAAGAGCACCGCTCTGTTGATTCTGATTAGACCTCT
 GGGGCCAGTGTGTCCTTCCGCTGTCAGTGCCACCTCGAGTTGTCAGTGTCTG
 ATTTGGGTTGGAAAAAGTCCAAAAGAGCTCCCTCTGACACTACGCTGCTGGA
 CTTGCAAAACAACAAAATAACCGAAATCAAAGATGGAGACTTCAAGAACCTGAA
 GAACCTTCATACGTTGATCCTTGTCAACAAACAAAATTAGCAAAATCAGCCCTGGA
 GCATTTACACCTTGTGAAATTGGAACGACTTTATCTGCCAAGAATCATCTGA
 AGGAATTGCCAGAAAAATGCCAAAACCTTCAGGAGCTGCGTGCTCACGAGA
 ATGAGATCACCAAAGTGCAGAAAGCTGTGTTCAATGGCCTGAACCAGATGATCG
 TCGTAGAACTGGGCACCAACCCGCTGAAGAGCTCGGAATTGAAAATGGAGCCT
 TCCAGGGAATGAAGAAGCTGTCTACATCCGATTGCCGACACCAATATAACCA

20

CCATCCGCAAGGTCTCCTCCTTACTGAATTACATCTGAAGGCAACAA
 AATCTCAAAGTTGATGCAGCTAGCCTGAAAGGACTGAATAATTGGCTAAGTTG
 GGACTGAGTTAACAGCATCTCTGCTATTGACAATGGCACTCTGGCCAACACTC
 CTCATTGAGGGAGCTTCACTGGACAACAATAAGCTTATCAGAGTACCTGGTGG
 GCTGGCGGAGCACAAATACATCCAGGTTGTCTACCTTCATAACAACAATATCTCT
 GCAGTCGGGTCTAACGACTTCTGCCACCTGGATACAACACCAAAAAGGCTTCTT
 ATTCAAGGTGTGAGCCTTTCAGCAACCCAGTCCAGTACTGGAGATCCAACCATC
 CACCTTCCGATGTGTCTATGTGCGTTCCGCCATCCAGCTGGAAATTATAAATGA

30

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドコード領域は、太字の活字で示されている。

40

ネコデコリンプロペプチドコード領域には、下線が施されている。

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている。

ネコデコリン発現タンパク質配列(配列番号26) :

【化24】

MMSFVSLLLVGILFHATQAGPFOQRGLFDFMLEDEAAGIGPEEHAPVDSDLEPLGP
 VCPFRCQCHLRVVQCSDLGLEKVPKELPPDTTLLDLQNNKITEIKDGFKNLKNLHT
 LILVNNKISKISPGAFTPLKLRLYLSKNHLKELPEKMPKTLQELRAHENEITKVRKA
 VFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITTIPQGLPPSLTEH
 LEGNKISKVDAASLKGNNLAKLGLSFNSISAIDNGTLANTPHLRELHLDNNKLIRVP
 GGLAEHKYIQVVLHNNNISAVGSNDFCPPGYNTKKASYSVGSLFSNPVQYWEIQPS
 TFRCVYVRSAIQLGNYK

10

ウシ - ラクトアルブミンシグナルペプチドは、太字の活字で示されている。

ネコデコリンプロペプチドは下線が施されている。

【0074】

突然変異体成熟デコリンコード領域は、普通の字体で示されている（成熟タンパク質へのGAG部分の付加を防止するために、成熟デコリンのアミノ酸番号4は、セリンからアラニンへ突然変異された。このアミノ酸は、太字の活字で示され、ならびに下線が施されている）。

成熟ネコデコリン配列（配列番号27）：

【化25】

DEAAGIGPEEHAPVDSDLEPLGPVCPFRCQCHLRVVQCSDLGLEKVPKELPPDTL LD
 LQNNKITEIKDGFKNLKNLHTLILVNNKISKISPGAFTPLKLRLYLSKNHLKELPE
 KMPKTLQELRAHENEITKVRKAVFNGLNQMIVVELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKL
 SYIRIADTNITTIPQGLPPSLTEHLEGNKISKVDAASLKGNNLAKLGLSFNSISAIDN
 GTLANTPHLRELHLDNNKLIRVPGLAEHKYIQVVLHNNNISAVGSNDFCPPGYNT
 KKASYSVGSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRSAIQLGNYK

20

【0075】

30

実施例2

遺伝子構築物の開発。

イヌ及びネコのデコリンDNA構築ならびにクローニング。イヌ及びネコのデコリンの遺伝子配列を、連結されたウシアルファ - ラクトアルブミンシグナルペプチドを用いて合成した。両方のDNA配列をCatalentのGPEX（登録商標）発現ベクターにクローニングした（図1～4）。例えば、Bleck, G.T. 2005 An alternative method for the rapid generation of stable, high-expressing mammalian cell lines (A Technical Review). Bioprocessing J. Sept/Oct. pp 1-7、Bleck, G.T., 2010. GPEX（登録商標）A Flexible Method for the Rapid Generation of Stable, High Expressing, Antibody Producing Mammalian Cell Lines Chapter 4 In: Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, Edited by: S.J. Shire et al. (著作権) 2010 American Association of Pharmaceutical Scientists, DOI 10.1007/978-0-387-76643-0_4を参照されたい。

40

【0076】

50

C H O 細胞株の開発

レトロベクターの作成。上記に概説した発現構築物を、 M L V g a g タンパク質、 p r o タンパク質、及び p o l タンパク質を構造的に生成する H E K 2 9 3 細胞株に導入した。発現プラスミドを含有するエンベロープもまたデコリン遺伝子構築物でコトランスフェクトした。このコトランスフェクションは、複製不全高力価レトロベクターの生成をもたらし、これを超遠心分離によって濃縮し、細胞形質導入に使用した(1、2)。

【 0 0 7 7 】

レトロベクターによる G C H O 細胞の形質導入。 G P E x (登録商標) チャイニーズハムスター卵巣(G C H O)親細胞株の2つのデコリン分子を発現するよう開発された遺伝子構築物から作成されたレトロベクターによる複数回の形質導入を行うことによって、イヌ及びネコのデコリンをプールした細胞株を作成した。3回の独立した形質導入を行い、2つの生成物のそれについてプールした細胞株を生成した。

10

【 0 0 7 8 】

細胞のプールした集団からのイヌ及びネコの流加バッチ生産。形質導入後に、イヌ及びネコのデコリンについてプールした細胞株を、二通りの 2 5 0 m L の振蕩フラスコ内の流加バッチ試験における生産性評価のためにスケールアップした。各振蕩フラスコに P E C H O L S 培地(H y C l o n e)の 6 0 m L の実行容積当たり 3 0 0 , 0 0 0 個の生細胞を播種し、加湿(7 0 ~ 8 0 %)振蕩インキュベータ内で、 5 % の C O 2 及び 3 7 の温度で 1 3 0 r p m にてインキュベートした。生産実行中に、培養物に2つの異なる補給物質を用いて、4回にわたって供給した。生存率が 5 0 % になったとき(14日目)培養を終了した。イヌ及びネコのデコリンの生産の確認を、 S D S - P A G E 分析によって判定した(図5及び6)。この分子のヒト型に関連付けられる従来の二重線(図7参照)が、イヌ及びネコの両方で観察された。

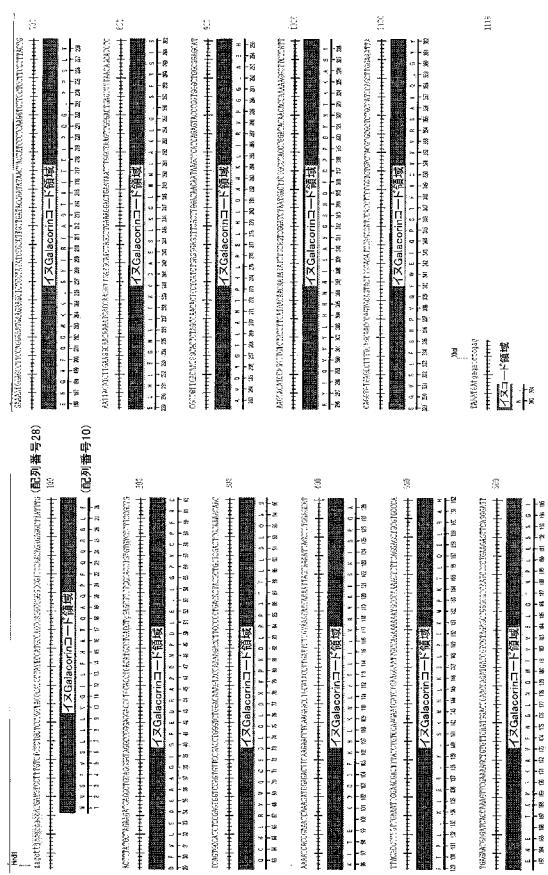
20

【 0 0 7 9 】

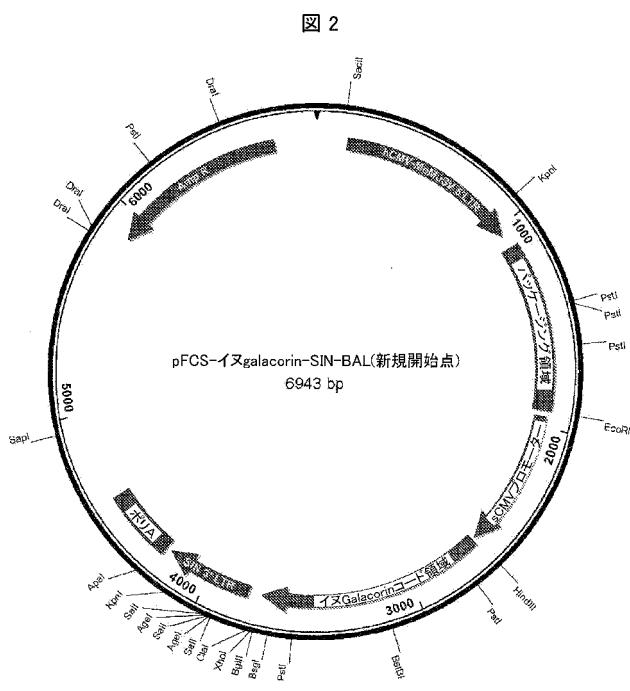
上記明細書で言及した全ての刊行物及び特許は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の範囲及び趣旨から逸脱することのない、本発明に記載の方法及びシステムの様々な変更及び変形は、当業者には明らかであろう。本発明は特定の好ましい実施形態に関連して説明してきたが、特許請求される本発明は、かかる特定の実施形態に不当に限定されるものではないことを理解すべきである。実際に、本発明の分野の当業者に明らかである本発明を実施するための記載された態様の種々の変更は、添付の特許請求の範囲内にあると意図される。

30

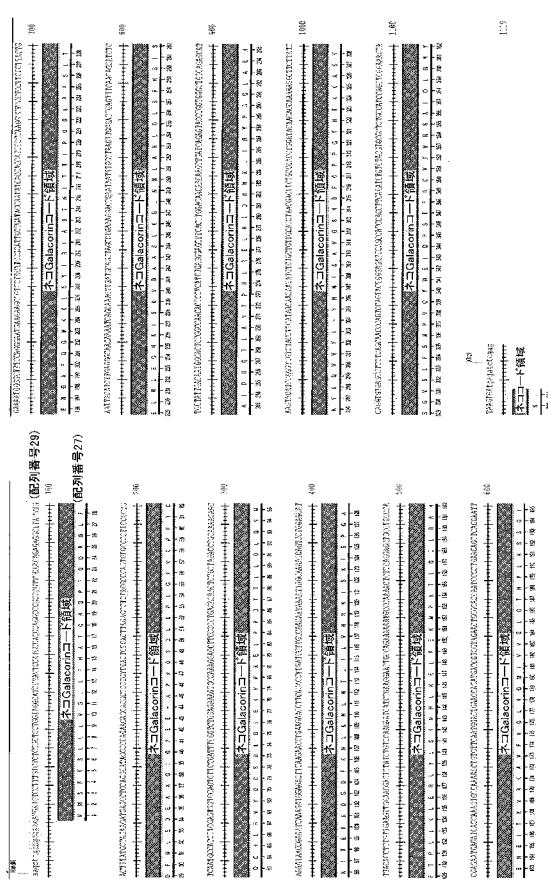
【図1】



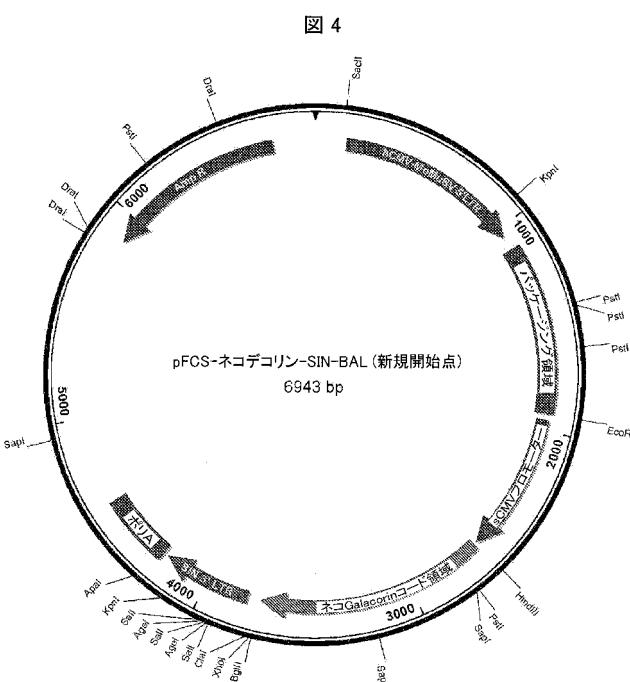
【 図 2 】



【 四 3 】

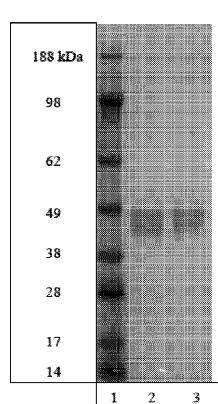


【 4 】



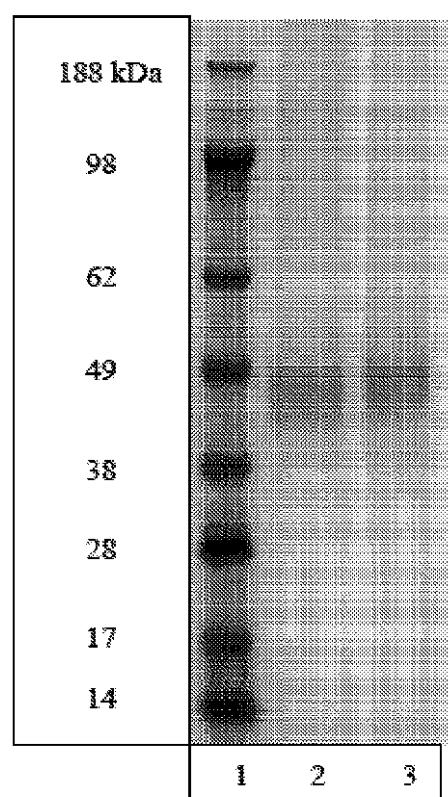
【図5】

FIG. 5



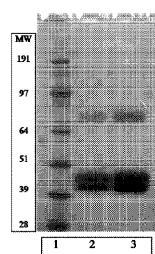
【図6】

FIG. 6



【図7】

FIG. 7



【配列表】

2016519110000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/034877
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 21/02 (2014.01) CPC - A61K 38/1709 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) IPC(8) - C07K 14/47; C12N 1/19, 5/10; C12P 21/00, 21/02; G01N 33/68 (2014.01) USPC - 435/252.3, 325; 530/350, 365, 395		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 8/64, 38/00, 38/17, 38/1709, 38/39, 48/00 (2014.06)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0033493 A1 (TCHERNEV et al) 19 February 2004 (19.02.2004) entire document	1, 3-5, 7, 9-11, 13-21, 24-30, 32-37
-		2, 8, 12, 22, 23, 31
Y	US 2012/0238727 A1 (BLECK et al) 20 September 2012 (20.09.2012) entire document	2, 8, 12
Y	MOHAN et al. 'Decorin transfection suppresses profibrotic genes and myofibroblast formation in human corneal fibroblasts,' Exp Eye Res. 28 May 2010 (28.05.2010), Vol. 91, Pgs. 238-245. entire document	22, 23
Y	IOZZO et al. 'Decorin Antagonizes IGF Receptor I (IGF-IR) Function by Interfering with IGF-IR Activity and Attenuating Downstream Signaling,' J Biol Chem, 12 August 2011 (12.08.2011), Vol. 286, Pgs. 34712-34721. entire document	31
A	HILLIER et al. 'Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution,' Nature, 09 December 2004 (09.12.2004), Vol. 432, Pgs. 695-716. entire document	1-37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 September 2014	Date of mailing of the international search report 30 SEP 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/034877
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:		
a. (means)		
<input type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form		
b. (time)		
<input checked="" type="checkbox"/> in the international application as filed <input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purposes of search		
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments: SEQ ID NOs: 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, and 27 were searched.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/034877

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:

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.: 38-53 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/06 (2006.01)	A 6 1 K 9/06	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	C

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

F ターム(参考) 4B065 AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA43
 4C076 AA06 AA09 AA12 AA24 AA30 AA93 BB01 BB13 BB15 BB16
 BB21 BB24 BB25 BB30 BB31 CC01 CC10 CC11 CC15 CC17
 CC18 CC19 CC27
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA22 BA23 DC50 MA13 MA16 MA17 MA27
 MA28 MA43 MA52 MA56 MA58 MA59 MA63 MA66 NA14 ZA011
 ZA331 ZA361 ZA591 ZA751 ZA811 ZA891 ZB261
 4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 EA20 FA74