

(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2005-522988  
(P2005-522988A)

(43) 公表日 平成17年8月4日(2005.8.4)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76		4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00		4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/10		4 B O 6 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 11/00		4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 99 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2003-538192 (P2003-538192)  
 (86) (22) 出願日 平成14年10月25日 (2002.10.25)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年6月28日 (2004.6.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/004824  
 (87) 国際公開番号 W02003/035679  
 (87) 国際公開日 平成15年5月1日 (2003.5.1)  
 (31) 優先権主張番号 0125638.7  
 (32) 優先日 平成13年10月25日 (2001.10.25)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 0209619.6  
 (32) 優先日 平成14年4月26日 (2002.4.26)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

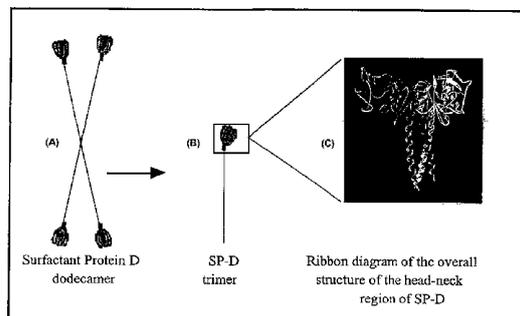
(71) 出願人 597166578  
 メディカル リサーチ カウンシル  
 イギリス国 ダブリュ1エヌ 4エイエル  
 ロンドン, パーク クレセント 20  
 (74) 代理人 100099623  
 弁理士 奥山 尚一  
 (74) 代理人 100096769  
 弁理士 有原 幸一  
 (74) 代理人 100107319  
 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子

(57) 【要約】

本発明者らは、疾患の治療方法または予防方法で使用するための rSPD (n/CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を記載する。治療または予防有効量の rSPD (n/CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、罹患個体の治療方法または個体の疾患の発症を予防する方法も記載する。好ましくは、rSPD (n/CRD) ポリペプチドおよび核酸は、それぞれ配列番号1および配列番号2を含む。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

疾患の治療方法または予防方法で使用するための r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体。

## 【請求項 2】

治療または予防有効量の r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、罹患個体の治療方法または個体の疾患の発症を予防する方法。

## 【請求項 3】

前記疾患には炎症性疾患、好ましくは湿疹が含まれる、特定の用途のための請求項 1 に記載の r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体、または請求項 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記炎症性疾患が、新生児慢性肺疾患、新生児呼吸窮迫症候群 ( R D S )、成人呼吸窮迫症候群、慢性閉塞性気道疾患 ( C O P D )、喘息、嚢胞性線維症、肺線維症、気腫、間質性炎症性肺疾患、サルコイドーシス、肺炎、慢性炎症性肺疾患、新生児慢性炎症性肺疾患からなる群から選択される炎症性肺疾患である、特定の用途のための r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体、または請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記疾患がアレルギーを含む、特定の用途のための請求項 1 に記載の r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体、または請求項 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記アレルギーが、イエダニ ( ヒョウヒダニ属 )、好ましくはヤケヒョウヒダニまたはコナヒョウヒダニ、または菌類もしくは菌類胞子、好ましくはアスペルギルス・フミゲーツスによるものである、特定の用途のための r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体、または請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記アレルギーが、季節性呼吸器アレルギー、アレルギー性鼻炎、花粉症、非アレルギー性鼻炎、血管運動神経性鼻炎、刺激性鼻炎、草本の花粉、木本の花粉、または動物の鱗屑に対するアレルギー、アレルギー性喘息に関連するアレルギー、食品アレルギー、およびアレルギー性眼疾患からなる群から選択される、特定の用途のための r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体、または請求項 5 に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

前記疾患が、細菌感染およびウイルス感染を含む微生物感染に関連し、好ましくは肺の微生物感染である、特定の用途のための請求項 1 に記載の r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体、または請求項 2 に記載の方法。

40

## 【請求項 9】

r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、個体の気道過敏症、血清 I g E レベル、または好酸球増多症を軽減する方法。

## 【請求項 10】

r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、好ましくはアポトーシス肺胞マクロファージのクリアランスの増強もしくは壊死肺胞マクロファージのクリアランスの増強またはその両方による個体の肺胞マクロファージ数を減少させる方法。

## 【請求項 11】

50

前記 r S P D ( n / C R D ) ポリペプチドが、配列番号 1 に記載の配列を含むか、好ましくは配列番号 1 に記載の配列からなる、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体、または疾患の治療方法もしくは予防方法。

【請求項 1 2】

前記 r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体をコードする核酸、好ましくは配列番号 2 に記載の配列を含む核酸を個体に投与する、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法または使用。

【請求項 1 3】

疾患の治療方法または予防方法における r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の使用。 10

【請求項 1 4】

配列番号 1 に記載の配列、またはそのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を有する S P - D フラグメントを含む、組換えポリペプチド。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の組換えポリペプチドをコードする配列を含む核酸。

【請求項 1 6】

前記核酸が配列番号 2 に記載の配列を含む、請求項 1 5 に記載の核酸。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 または 1 6 に記載の核酸配列を含む、ベクター、好ましくは発現ベクター。 20

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 1 9】

薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤と共に、請求項 1 4 に記載の組換えポリペプチド、請求項 1 5 または 1 6 に記載の核酸、請求項 1 7 に記載のベクター、または請求項 1 8 に記載の宿主細胞を含む医薬組成物。

【請求項 2 0】

候補分子に r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を曝露するステップと、前記候補分子が r S P D ( n / C R D ) ポリペプチドなどに結合するかどうかを検出するステップとを含む、 r S P D ( n / C R D ) ポリペプチドに結合する分子の識別方法。 30

【請求項 2 1】

( a ) 細胞または生物を得るステップと、  
 ( b ) 前記細胞または生物を r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体に曝露するステップと、  
 ( c ) 前記細胞を候補分子に曝露するステップと、  
 ( d ) r S P D ( n / C R D ) 媒介効果を検出するステップと  
 を含む、 r S P D ( n / C R D ) ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法。

【請求項 2 2】

前記 r S P D ( n / C R D ) 媒介効果が、末梢血好酸球増多症の軽減、血清 I g E レベルの低下、血清 I g G 1 レベルの低下、気道過敏症の軽減、肺胞マクロファージ数の減少、洗浄物中のリン脂質レベルの低下、エオタキシン発現のダウンレギュレーション、M C P - 1 発現の減少、M I P - 1 発現のダウンレギュレーション、および M I P - 2 発現のダウンレギュレーションからなる群から選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記方法が、選択または同定された分子を単離または合成するステップをさらに含む、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の方法を使用して同定または選択された分子。 50

## 【請求項 25】

1つまたは複数の以下の成分：肺抽出物（好ましくは、ウシ、好ましくは子牛肺抽出物）もしくはその成分、リン脂質（好ましくは、ホスファチジルコリンもしくは飽和ホスファチジルコリン）、脂肪酸、サーファクタント関連タンパク質（好ましくは、サーファクタント関連タンパク質Bまたはサーファクタント関連タンパク質C）、セチルアルコール、長鎖反復アルコール、チロキサポール、パルミチン酸コルホセリル（ジパルミトイルホスファチジルコリン）、パルミチン酸、トリパルミチン、ポラクタント、および塩化ナトリウムと共に、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体を含む組成物。

## 【請求項 26】

サーファクタント補充療法における、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の使用。

10

## 【請求項 27】

サーファクタント補充療法で使用するためのサーファクタント補充療法におけるrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体。

## 【請求項 28】

前記疾患が、アテローム性動脈硬化症、成長異常、早産後の新生児肺疾患における異常な出生後の肺発達、炎症組織の再造形欠損に関連する疾患、細胞増殖、および癌からなる群から選択される、特定の用途のための請求項1～27のいずれかに記載の使用のためのrSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体または疾患の治療もしくは予防方法。

20

## 【請求項 29】

細胞表面上への遊離DNAの産生に関する病態の治療のための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用。

## 【請求項 30】

前記SP-Dまたはそのフラグメントがその炭水化物結合ドメインを介して核酸に結合する、請求項29に記載の使用。

## 【請求項 31】

薬学的有効量のSP-Dまたはそのフラグメントを治療を必要とする患者に投与するステップを含む、細胞表面上への遊離DNAの産生に関する病態を罹患した患者の治療方法。

30

## 【請求項 32】

肺内に遊離核酸が蓄積する慢性感染の治療のための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用。

## 【請求項 33】

嚢胞性線維症の治療のための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用。

## 【請求項 34】

壊死およびアポトーシス細胞のクリアランスのための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用。

40

## 【請求項 35】

薬学的有効量のSP-Dまたはそのフラグメントを治療を必要とする患者に投与するステップを含む、嚢胞性線維症、肺疾患、COPD、慢性炎症、慢性細菌感染、慢性ウイルス感染、慢性菌類感染、および慢性喘息からなる群から選択される疾患を罹患した患者の治療方法。

## 【請求項 36】

自己免疫疾患における自己抗体産生の治療のための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用。

## 【請求項 37】

50

薬学的有効量の S P - D またはそのフラグメントを治療を必要とする患者に投与するステップを含む、自己免疫疾患を罹患した患者の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾患の治療および診断方法ならびにこのような方法で使用するための分子および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明者らは、サーファクタントタンパク質 D の組換えフラグメントおよびこのタンパク質をコードする核酸を開示する。本発明者らは、このフラグメントはサーファクタントタンパク質 D の有利な性質を保持することを証明し、種々の疾患の治療に使用することができることを示す。これらの疾患には、慢性肺疾患、新生児慢性肺疾患、特にイエダニに起因するアレルギー喘息を含む喘息ならびに他の疾患を含む炎症性疾患が含まれる。本発明者らが開示する組換えサーファクタントタンパク質 D フラグメントを使用して、種々のアレルギーを治療することもできる。

10

【発明の開示】

【0003】

本発明者らは、S P - D はその炭水化物結合活性を介して遊離核酸、特に DNA に結合すると判断した。遊離 DNA の認識は、少なくともいくつかの S P - D の有利な効果を担うと考えられる。さらに、本発明者らは、S P - D の DNA 結合特性およびこの分子の他の性質は、r S P - D ( n / C R D ) と命名した組換えフラグメントで保持されると判断した。したがって、本発明の第 1 の態様によれば、本発明者らは、疾患の治療方法または予防方法で使用するための r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を提供する。

20

【0004】

本発明の第 2 の態様によれば、治療または予防有効量の r S P D ( n / C R D ) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、罹患個体の治療方法または個体の疾患の発症を予防する方法を提供する。

【0005】

疾患には、好ましくは炎症性疾患、好ましくは湿疹が含まれる。

30

【0006】

疾患には、炎症性疾患、好ましくは、新生児慢性肺疾患、新生児呼吸窮迫症候群 ( R D S )、成人呼吸窮迫症候群、慢性閉塞性気道疾患 ( C O P D )、喘息、嚢胞性線維症、肺線維症、気腫、間質性炎症性肺疾患、サルコイドーシス、肺炎、慢性炎症性肺疾患、新生児慢性炎症性肺疾患からなる群から選択される炎症性肺疾患を含んでもよい。

【0007】

好ましくは、疾患は、新生児慢性肺疾患、肺気腫、慢性閉塞性気道疾患、嚢胞性線維症、および喘息からなる群から選択される。

【0008】

疾患には、アレルギーを含み得る。アレルギーは、好ましくはイエダニ ( ヒョウヒダニ属 : Dermatophagoides )、好ましくはヤケヒョウヒダニ ( Dermatophagoides pteronyssinus ) またはコナヒョウヒダニ ( Dermatophagoides farinae )、または菌類もしくは菌類胞子、好ましくはアスペルギルス・フミガーツス ( Aspergillus fumigatus ) によるものである。アレルギーは、好ましくは、季節性呼吸器アレルギー、アレルギー性鼻炎、花粉症、非アレルギー性鼻炎、血管運動神経性鼻炎、刺激性鼻炎、草本の花粉、木本の花、または動物の鱗屑に対するアレルギー、アレルギー性喘息に関連するアレルギー、食品アレルギー、およびアレルギー性眼疾患からなる群から選択される。

40

【0009】

疾患は、細菌感染およびウイルス感染を含む微生物感染、好ましくは肺の微生物感染に

50

関連する疾患であり得る。

【0010】

本発明者らは、本発明の第3の態様によれば、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、個体の気道過敏症、血清IgEレベル、または好酸球増多症を軽減する方法を提供する。

【0011】

本発明の第4の態様として、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、好ましくはアポトーシス肺胞マクロファージのクリアランスの増強もしくは壊死肺胞マクロファージのクリアランスの増強またはその両方による個体の肺胞マクロファージ数を減少させる方法を提供する。 10

【0012】

好ましい実施形態では、rSPD(n/CRD)ポリペプチドが、配列番号1に記載の配列を含むか、好ましくは配列番号1に記載の配列からなる。

【0013】

好ましくは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体をコードする核酸、好ましくは配列番号2に記載の配列を含む核酸を個体に投与する。

【0014】

本発明者らは、本発明の第5の態様によれば、疾患の治療方法または予防方法におけるrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体の使用を提供する。 20

【0015】

本発明は、第6の態様では、配列番号1に記載の配列、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を有するSP-Dフラグメントを含む組換えポリペプチドを提供する。

【0016】

本発明の第7の態様では、本発明の第6の態様の組換えポリペプチドをコードする配列を含む核酸を提供する。好ましくは、核酸は、配列番号2に記載の配列を含む。

【0017】

本発明の第8の態様によれば、本発明者らは、本発明の第7の態様の核酸配列を含むベクター、好ましくは発現ベクターを提供する。 30

【0018】

本発明者らは、本発明の第9の態様によれば、本発明の第8の態様のベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0019】

本発明の第10の態様によれば、薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤と共に、本発明の第6の態様の組換えポリペプチド、本発明の第7の態様の核酸、本発明の第8の態様の核酸を含むベクター、または本発明の第9の態様の宿主細胞を含む医薬組成物を提供する。 40

【0020】

本発明の第11の態様として、本発明者らは、候補分子にrSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、またはは誘導体を曝露するステップと、前記候補分子がrSPD(n/CRD)ポリペプチドなどに結合するかどうかを検出するステップとを含む、rSPD(n/CRD)ポリペプチドに結合する分子の識別方法を提供する。

【0021】

本発明の第12の態様によれば、本発明者らは、(a)細胞または生物を得るステップと、(b)前記細胞または生物をrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体に曝露するステップと、(c)前記細胞を 50

候補分子に曝露するステップと、(d) rSPD (n/CRD) 媒介効果を検出するステップとを含む、rSPD (n/CRD) ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを識別する方法を提供する。

【0022】

rSPD (n/CRD) 媒介効果は、好ましくは、末梢血好酸球増多症の軽減、血清IgEレベルの低下、血清IgG1レベルの低下、気道過敏症の軽減、肺泡マクロファージ数の減少、洗浄物中のリン脂質レベルの低下、エオタキシン発現のダウンレギュレーション、MCP-1発現の減少、MIP-1発現のダウンレギュレーション、およびMIP-2発現のダウンレギュレーションからなる群から選択される。この方法は、好ましくは、選択または同定された分子を単離または合成するステップをさらに含む。

10

【0023】

本発明の第13の態様によれば、本発明の第12の態様の方法を使用して同定または選択された分子を提供する。

【0024】

本発明者らは、本発明の第14の態様によれば、1つまたは複数の以下の成分：肺抽出物（好ましくは、ウシ、好ましくは子牛肺抽出物）もしくはその成分、リン脂質（好ましくは、ホスファチジルコリンもしくは二飽和ホスファチジルコリン）、脂肪酸、サーファクタント関連タンパク質（好ましくは、サーファクタント関連タンパク質Bまたはサーファクタント関連タンパク質C）、セチルアルコール、長鎖反復アルコール、チロキサポール、パルミチン酸コルホセリル (colfosceril palmitate)、ジパルミトイルホスファチジルコリン）、パルミチン酸、トリパルミチン、ポラクタント (poractant alfa)、および塩化ナトリウムと共にrSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体を含む組成物を提供する。

20

【0025】

本発明の第15の態様として、サーファクタント補充療法におけるrSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の使用を提供する。

【0026】

本発明者らは、本発明の第16の態様によれば、サーファクタント補充療法で使用するためのサーファクタント補充療法におけるrSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を提供する。

30

【0027】

第17の態様によれば、細胞表面上への遊離DNAの産生に関する病態の治療のための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用を提供する。rSP-D (n/CRD) を含むSP-Dおよびそのフラグメントは、その炭水化物結合能力を介してDNAに結合する。したがって、SP-Dのフラグメントは、天然のSP-Dの炭水化物結合活性を有利に保持する。本発明は、さらに、薬学的有効量のSP-Dまたはそのフラグメントをこのような治療を必要とする患者に投与するステップを含む、細胞表面上への遊離DNAの産生に関する病態を罹患した患者の治療方法を提供する。

【0028】

本発明は、肺内に遊離核酸が蓄積する慢性感染の治療のための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用を提供する。例えば、感染は、細菌、ウイルス、または菌類感染であり得る。

40

【0029】

本発明は、さらに、嚢胞性線維症の治療のための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用を提供する。嚢胞性線維症では、肺内の細菌細胞によって遊離核酸が産生されて、細菌バイオフィルムの形成および持続的な細菌肺感染を起こす。SP-Dおよびそのフラグメントはまた、嚢胞性線維症治療の有効性が増大する多数の肺病原体をオプソニン化するように作用する。

【0030】

50

さらなる態様では、壊死およびアポトーシス細胞のクリアランスのための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用を提供する。このような細胞は、その表面に、食細胞媒介クリアランスのためのSP-Dおよびそのフラグメントによって結合されたDNAを有する。したがって、本発明は、SP-Dまたはそのフラグメントを使用したCOPD、慢性炎症、および慢性喘息などの肺疾患および病態の治療のための組成物ならびに薬学的有効量のSP-Dまたはそのフラグメントをこのような治療を必要とする患者に投与するステップを含む、嚢胞性線維症、肺疾患、COPD、慢性炎症、慢性細菌感染、慢性ウイルス感染、慢性菌類感染、および慢性喘息からなる群から選択される疾患を罹患した患者の治療方法に拡大される。

【0031】

なおさらなる態様では、自己免疫疾患における自己抗体産生の治療のための組成物の製造におけるSP-Dまたはそのフラグメントの使用ならびに薬学的有効量のSP-Dまたはそのフラグメントをこのような治療を必要とする患者に投与するステップを含む、自己免疫疾患を罹患した患者の治療方法を提供する。

【0032】

壊死またはアポトーシス細胞由来の遊離DNAまたはDNAの破片は、自己抗体を産生させる自己抗原として作用することができる。SP-Dおよびそのフラグメントによるこのような遊離DNAのクリアランスにより、自己抗体産生が減少する。

【0033】

本発明の他の態様を、以下の説明だけでなく、独立請求項および従属請求項に記載する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

本発明者らは、本明細書中で、「rSPD(n/CRD)ポリペプチド」と呼ばれる組換えSP-Dフラグメントの配列、および産生方法を開示する。本発明者らが承知している限りでは、rSPD(n/CRD)ポリペプチドの配列および産生は、以前に公知ではなかった。本発明者らは、rSPD(n/CRD)ポリペプチドは、溶液中で互いに会合して三量体を形成することができることを示す。

【0035】

非常に好ましい実施形態では、本発明者らは、特に新生児のサーファクタント補充療法として使用するための、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の使用を記載する。新生児肺疾患、特に新生児慢性肺疾患の治療のために、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を適切に使用することができる。

【0036】

本発明者らは、サーファクタントタンパク質Dを欠くアレルギーで攻撃誘発されたノックアウトマウスに投与された場合、rSPD(n/CRD)ポリペプチドは末梢血好酸球増多症、総血清IgEレベル、およびIgG1レベルを減少させることを証明する。したがって、rSPD(n/CRD)ポリペプチドは、個体のアレルギー性過敏反応のモジュレーターとしての使用に適切である。rSPD(n/CRD)ポリペプチドはまた、末梢血好酸球増多症、血清IgEレベルの上昇、IgG1レベルの上昇、またはこれらの任意の組み合わせで特徴付けられる任意の疾患または症候群の治療での使用に適切である。

【0037】

rSPD(n/CRD)ポリペプチドを、肺のマクロファージ媒介炎症の制御、病原体の侵入からの防御、ならびに感染およびアレルギー性刺激に対する炎症反応の調整で使用することもできる。

【0038】

イエダニアレルギーで感作および攻撃誘発したマウス(例えば、C57B116野生型マウス)は、アレルギー性喘息に特徴的な気道過敏症を示す。このようなマウスへのrSPD(n/CRD)ポリペプチドの投与により、気道過敏症が軽減する。したがって、ア

10

20

30

40

50

アレルギー性喘息を含む気道過敏症を発症する任意の疾患または症候群を治療するために rSPD (n/CRD) ポリペプチドを個体に投与することができる。

【0039】

rSPD (n/CRD) ポリペプチド処置を使用することができる他の疾患には、皮膚病（例えば、湿疹（Th2 媒介疾患））および一般的なアレルギーが含まれる。このようなアレルギーには、食品アレルギー（例えば、卵、ナッツ類、ピーナッツ、およびミルクなどのアレルゲンに対するもの）が含まれる。他の一般的なアレルゲンには、花粉、塵、カビ、白カビ、ならびに昆虫、ペット（イヌ、ネコ、トリ）、ならびに植物アレルゲンが含まれる。一般に花粉症と呼ばれる季節性呼吸器アレルギー、空気アレルゲン（イエダニ、菌類孢子、草本の花粉、木本の花粉、および動物の鱗屑が含まれる）に対するアレルギーも含まれる。

10

【0040】

rSPD (n/CRD) で処置することができるアレルギーの他のカテゴリーは、アレルギー症状を引き起こす主な要因である気道過敏症、血清 IgE、および好酸球増多症の軽減から利益が得られるものである。これには、アレルギー性喘息の治療が含まれる。rSPD (n/CRD) を、細胞媒介免疫系のアップレギュレーションから恩恵を受ける病態のための有効な治療として使用することもできる。これには、抗細菌作用および肺感染治療が含まれる。

【0041】

ナチュラルキラー細胞の活性および免疫系細胞によるサイトカイン IFN の分泌のアップレギュレーションから恩恵を受ける病態の有効な治療として rSPD (n/CRD) を使用することができる。これには、肺癌および他の癌ならびに新生物の治療が含まれる。

20

【0042】

rSPD (n/CRD) での内因性の天然 SP-D の補足から恩恵を受ける病態の有効な治療として rSPD (n/CRD) を使用することもできる。これには、内因性の天然の SP-D レベルが異常に低い病態の治療が含まれる。また、これには、内因性の天然 SP-D レベルが異常に低い肺サーファクタント系障害を有する新生児の治療が含まれる。また、これには、内因性の天然の肺 SP-D レベルが異常に低い嚢胞性線維症患者の治療も含まれる。また、これには、内因性の天然 SP-D レベルが異常に低い他の肺感染症患者の治療も含まれる。

30

【0043】

さらなる実施形態では、SP-D の抗アレルギー性を利用して、アレルギー性眼疾患と戦うことができる。したがって、本発明は、アレルギー性眼疾患の治療のための SP-D、rSPD (n/CRD) などのそのフラグメントを提供する。

【0044】

本発明者らは、ヒトの涙液に含まれるサーファクタントタンパク質 D レベルを測定し、これが 132 ng/ml であることを見出した。SP-D が本明細書中に記載のように抗アレルギー性を有し、ヒト涙液に存在するという事実により、このタンパク質が涙液の天然の抗アレルギー効果に関与することが示唆される。SP-D または rSP-D (n/CRD) を、例えば、コンタクトレンズによる刺激/炎症の補正を補助するためのコンタクトレンズ用溶液添加することができる。さらに、例えば、シェーグレン症候群（ヒト唾液および涙腺成分に対する自己抗体によって生じる）ドライアイおよび口内乾燥によって特徴付けられる自己免疫疾患）の治療に有益に付加される。現在、これは人工涙液の補足（hypermellose eye drops など）で治療されており、このような製剤への SP-D またはそのフラグメントの添加により眼感染症および角膜炎に対する人工涙液の保護効果が向上する。

40

【0045】

基準を上記の rSPD (n/CRD) に合わせる場合、これを、ポリペプチド自体、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を指称するように使用すべきである。

50

## 【0046】

基準を疾患の治療に合わせる場合、これを、この疾患の症状の緩和の基準を含むように使用すべきである。好ましくは、この疾患を有する個体の実質的に全ての症状を緩和または除去する。「疾患」は、個体の健康または健康状態 (well-being) に影響を与える任意の症状および任意の病態を含むように使用すべきである。好ましくは、rSPD (n/CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を投与された個体が、疾患または病態の少なくとも1つの症状が緩和する (すなわち、実質的に正常な非罹患状態の個体に戻る)。これを、医師が関連する臨床パラメータを使用して評価することができる。例えば、気道過敏症を、実施例に記載の方法を使用して測定することができる。

10

## 【0047】

本発明の実施には、特記しない限り、当業者の能力の範囲内の化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を使用する。このような技術は、文献中に例示されている。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, 「分子クローニング: 実験マニュアル」、第2版、1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. ら、1995および定期増補版、「現代の分子生物学プロトコール」、第9、13、および16章、John Wiley & Sons, New York, N. Y.; B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, 「DNAの単離と配列決定: 基本的技術」、John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, 「インサイチュハイブリッド形成: 原理と実践」; Oxford University Press; M. J. Gait 編、1984, 「オリゴヌクレオチド合成: 実践アプローチ」、Irl Press; および D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, 「酵素学方法論: DNA構造パートA: DNAの合成と物理的分析」、Methods in Enzymology, Academic Press (これらの各一般書は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする) を参照のこと。

20

## 【0048】

[サーファクタントタンパク質DのrSPD (N/CRD)]

サーファクタントタンパク質Dは、例えば、Rustら、1991, 「ヒトサーファクタントタンパク質D: SP-DはC型レクチン炭水化物認識ドメインを含む」、Archives of biochemistry and biophysics, 290(1), 116~126; Luら、1992, 「ヒト肺サーファクタントタンパク質Dの精製、キャラクタリゼーションとcDNAクローニング」、Biochem. J., 284, 785~802; Crouchら、1993, 「ヒトサーファクタントタンパク質D (SP-D) のゲノム組織。SP-Dは染色体10q.22.2-23.1にコードされている」、The Journal of biological chemistry, 268(4), 2976~2983; Kolbleら、1993, 「ヒト肺サーファクタントタンパク質D遺伝子 (SFTP4) のサーファクタントタンパク質A遺伝子クラスター付近の10q22-q23への割り当て」、Genomics, 17(2), 294~298, 1993で以前に同定およびキャラクタライズされている。

30

40

## 【0049】

用語「サーファクタントタンパク質D」、「SP-D」、「hSP-D」、および「天然のSP-D」を使用する場合、これらを、任意のサーファクタントタンパク質Dのポリペプチドまたは核酸をいうために使用すべきである (文脈により必要な場合)。しかし、好ましくは、これらの用語を、ヒトサーファクタントタンパク質D (例えば、上記引例またはGenBank 寄託番号NM\_003019.1, XM\_005776.2, X65018.1, およびL05485.1に開示の配列) をいうために使用すべきである。より好ましくは、サーファクタントタンパク質Dは、GenBank 寄託番号NM\_003019.1のヒトサーファクタントタンパク質Dである。このようなヒトSP-Dの核酸

50

およびアミノ酸配列を、それぞれ配列番号3および配列番号4に示す。

【0050】

[組換えサーファクタントタンパク質DのRSPD(N/CRD)ポリペプチド]

本発明者らは、本発明者らがrSPD(n/CRD)と呼ぶサーファクタントタンパク質D(SP-D)のポリペプチドフラグメントを提供する。このようなrSPD(n/CRD)ポリペプチドの配列を、配列番号1に示す。rSP-D(n/CRD)を、本明細書中で「rhSP-D」ともいい、2つの用語を同意語と見なすべきである。

【0051】

用語rSP-Dを使用する場合、これを、一般に、全長SP-Dに対応するかに関係なく、組換えSP-D、好ましくはヒトSP-D(組換え様式で発現する)またはこのフラグメントをいうために使用すべきである。好ましくは、用語rSP-Dを、SP-D、好ましくはヒトSP-Dの組換えフラグメントをいうために使用すべきである。好ましくは、文脈が必要な場合、「rSP-D」を、上記の組換えSP-DフラグメントrSPD(n/CRD)をいうために使用すべきである。

10

【0052】

本明細書中に開示のポリペプチドは、配列番号1に記載の特定のrSPD(n/CRD)配列に限定されないが、そのフラグメントも含むと理解される。特に好ましいフラグメントには、1つまたは複数のrSPD(n/CRD)の生物活性を有するものが含まれる。

【0053】

さらに、rSPD(n/CRD)ポリペプチドには、一般に、N末端ドメインおよび/またはコラーゲンドメイン、好ましくはその両方を欠くSP-D、好ましくはヒトSP-Dの任意の組換えフラグメントが含まれる。したがって、好ましい実施形態では、rSPD(n/CRD)ポリペプチドは、実質的に残基1~178を欠く配列番号4に記載のSP-D、好ましくはヒトSP-Dの組換えフラグメントである。さらに好ましい実施形態では、rSPD(n/CRD)ポリペプチドは、実質的に残基179~355を含む配列番号4に記載のSP-D、好ましくはヒトSP-D配列の組換えフラグメントである。

20

【0054】

好ましい実施形態では、ヒトSP-D配列(配列番号4)の200位に対応するプロリン残基が別の残基に置換されている。好ましくは、プロリン残基を非荷電の極性残基(例えば、システイン、セリン、トレオニン、またはメチオニン残基)に置換する。非常に好ましい実施形態では、プロリン残基を、セリン残基に置換する。したがって、rSPD(n/CRD)ポリペプチドは、配列番号1に記載の配列を含み得る。

30

【0055】

上記の各配列のフラグメント、ホモログ、変異体、および誘導体もまた含まれる。

【0056】

好ましい実施形態では、rSPD(n/CRD)ポリペプチドは、実質的に以下の残基を含む「ヘッド」領域または炭水化物認識ドメイン(CRD)を含む。

【化1】

VELFPNGQSVGEEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAEAENAALQ  
QLVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSED  
CVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF

40

【0057】

好ましくは、rSPD(n/CRD)ポリペプチドは、別のrSPD(n/CRD)ポリペプチドとの多量体化手段、好ましくは三量体化を含む。このような手段には、例えば、別のrSPD(n/CRD)ポリペプチド上で、アビジンまたはストレプトアビジン部分と相互作用および結合するビオチン部分を含み得る。

【0058】

50

さらに好ましい実施形態では、rSPD (n / CRD) ポリペプチドは、実質的に以下の残基を含む「ネック」領域を含む。

【化2】

**DVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKK**

【0059】

好ましくは、このようなネック領域は、炭水化物認識ドメイン (CRD) のN末端である。

【0060】

好ましい実施形態では、rSPD (n / CRD) ポリペプチドは、少なくとも1つの Gly - Xaa - Yaa ストレッチ、好ましくは複数の Gly - Xaa - Yaa 反復を含む配列、最も好ましくは8つの Gly - Xaa - Yaa 反復を含む配列をさらに含む。好ましい実施形態では、rSPD (n / CRD) ポリペプチドは、実質的に

【化3】

**GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLP.**

を含むN末端配列をさらに含む。

【0061】

大いに好ましい実施形態では、rSPD (n / CRD) ポリペプチドは、配列番号1に記載の配列を含み、好ましくは配列番号1に記載の配列からなる。したがって、本明細書中で使用される、用語「rSPD (n / CRD) ポリペプチド」を、好ましくは、以下の配列、

【化4】

**GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQ  
YKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAEN  
AALQQLVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDG  
GSEDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF**

(配列番号1)、ならびにそのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体をいうために使用すべきである。

【0062】

開示のポリペプチドには、任意の供給源 (例えば、関連ウイルス / 細菌タンパク質) から得た相同配列、細胞ホモログ、および合成ペプチド、ならびにその変異体または誘導体も含まれる。したがって、ポリペプチドには、哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、またはウサギ)、詳細には霊長類、より詳細にはヒトなどの動物を含む他の種由来の rSPD (n / CRD) のホモログをコードするポリペプチドも含まれる。より詳細には、ホモログには、ヒトホモログが含まれる。

【0063】

したがって、本発明者らは、配列番号1に記載の rSPD (n / CRD) 配列のアミノ酸配列の変異体、ホモログ、または誘導体ならびにこのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の変異体、ホモログ、または誘導体を開示する。

【0064】

好ましくは、本明細書中に開示の rSPD (n / CRD) ポリペプチド、変異体、ホモログ、フラグメント、および誘導体は、rSPD (n / CRD) の1つまたは複数の性質、好ましくは rSPD (n / CRD) の1つまたは複数の生物活性を含む。したがって、変異体などは、好ましくは、1つまたは複数の活性 (炭水化物結合活性、多量体化活性 (三量体化活性を含む)、ケモカインのダウンレギュレーション、気道過敏症の軽減、肺胞マクロファージ数の減少、リン脂質レベルの低下 (SP - D を欠く動物に投与した場合)

10

20

30

40

50

、アポトーシスおよび/または壊死マクロファージのクリアランスの増大、末梢血好酸球増多症の軽減、血清 I g E の減少、血清 I g G 1 の減少、および実施例に開示の任意の生物活性または性質が含まれるが、これらに限定されない)を含む。

#### 【0065】

本明細書の文脈では、相同配列とは、配列番号1に記載の r S P D ( n / C R D ) 配列を含む少なくとも50または100超、好ましくは200、300、400、または500個のアミノ酸のアミノ酸レベルで少なくとも15、20、25、30、40、50、60、70、80、または90%同一、好ましくは少なくとも95%または98%同一のアミノ酸配列を含むように使用する。特に、典型的には、必須ではない周辺配列よりもむしろタンパク質機能に必須であることが公知の配列領域に関して相同と見なすべきである。遠縁の生物由来の相同配列を考慮する場合、これは特に重要である。

10

#### 【0066】

相同性を類似性(すなわち、類似の化学的性質/機能を有するアミノ酸残基)という用語で考慮することもできるが、本発明の文脈では、相同性は配列同一性の用語で示すことが好ましい。

#### 【0067】

目視、より一般的には、容易に利用可能な配列比較プログラムの支援によって相同性比較を行うことができる。このような公的に、および有料で利用可能なコンピュータプログラムは、2つまたはそれ以上の配列の間の相同%を計算することができる。

#### 【0068】

連続した配列に対して相同性%を計算することができる(すなわち、一方の配列を他の配列に整列させ、一方の配列中の各アミノ酸を他方の配列の対応するアミノ酸と一度に1残基ずつ直接比較する)。これを、「非ギャップ(ungapped)」アラインメントという。典型的には、このような非ギャップアラインメントを、比較的少ない残基数(例えば、50個未満の連続するアミノ酸)に対してのみ行う。

20

#### 【0069】

これは非常に単純且つ一貫した方法であるにもかかわらず、例えば、同一の配列対でなければ1つの挿入または欠失以降のアミノ酸残基がアラインメントから除外されることを考慮できないので、アラインメント全体で行った場合相同性%は大きく減少するかもしれない。したがって、ほとんどの配列比較法は、全体の相同性スコアに過度にペナルティーを科すことなく可能な挿入および欠失を考慮する至適アラインメントが得られるようにデザインされている。局所相同性を最大にしようとするために配列アラインメントに「ギャップ」を挿入することによってこれを行う。

30

#### 【0070】

しかし、これらのより複雑な方法では、同数の同一のアミノ酸について可能な限り少数のギャップ(2つの比較配列間でより高い関連性を反映する)を含む配列アラインメントが多数のギャップを含む配列アラインメントよりも高いスコアが得られるようにアラインメント中に生じる各ギャップに「ギャップペナルティー」を割り当てる。典型的には、ギャップの存在に比較的高いコストを課し、ギャップ中のその後の各残基のペナルティーをより小さくする「アフィンギャップコスト」を使用する。これは、最も一般的に使用されているギャップスコアリングシステムである。勿論、高いギャップペナルティーにより、より少ないギャップを含む最適化アラインメントが得られる。ほとんどのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティーを修正可能である。しかし、このような配列比較ソフトウェアを使用する場合、デフォルト値を使用することが好ましい。例えば、G C G W i s c o n s i n B e s t f i t パッケージ(以下を参照のこと)を使用した場合、アミノ酸配列のデフォルトギャップペナルティーは、ギャップについては-12であり、各伸長については-4である。

40

#### 【0071】

したがって、最大相同性%の計算には、ギャップペナルティーを考慮した最適なアラインメントの作製が最初に必要である。このようなアラインメントを実行するための適切な

50

コンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ (University of Wisconsin, U.S.A., Devereuxら、1984, Nucleic Acids Research, 12, 387) である。それ以外の配列比較を行うことができるソフトウェアの例には、BLASTパッケージ (Ausubelら、1999、前出、第18章を参照のこと)、FASTA (Atschulら、1990、J. Mol. Biol., 403~410)、および比較ツールのGENEWORKS総合ソフトウェアが含まれるがこれらに限定されない。BLASTおよびFASTAは共にオフラインおよびオンライン検索が可能である (Ausubelら、1999、前出、7-58~7-60頁を参照のこと)。しかし、GCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい。

10

**【0072】**

最終相同性%を同一性に関して測定することができるにもかかわらず、アラインメントプロセス自体は、典型的には全か無かの対比較に基づいていない。そのかわり、一般に、化学的類似性または進化距離に基づく各対比較にスコアを割り当てる比較類似性スコア行列を使用する。一般的に使用されるこのような行列の例は、BLOSUM62行列-BLASTプログラムパッケージのデフォルト行列である。GCG Wisconsinプログラムは、一般に、公表されたデフォルト値または供給されている場合はあつらえのシンボル比較を使用する (さらなる詳細についてはユーザマニュアルを参照のこと)。GCGパッケージの公表されたデフォルト値または他のソフトウェアの場合には、BLOSUM62などのデフォルト行列を使用することが好ましい。

20

**【0073】**

一旦ソフトウェアにより最適なアラインメントが得られると、相同性%、好ましくは配列同一性%を計算可能である。典型的には、ソフトウェアは配列比較の一部としてこれを行い、数値として結果を示す。

**【0074】**

本発明のアミノ酸配列に関する用語「変異体」または「誘導体」には、得られたアミノ酸配列が非改変配列と実質的に同一の活性を保持する (好ましくは、配列番号1に記載のrSPD (n/CRD) ポリペプチドと同一の活性を有する) 場合、配列からまたは配列への1つ (または複数の) アミノ酸の任意の置換、変化、改変、置換、欠失、または付加が含まれる。

30

**【0075】**

実施例に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそのフラグメントもしくはホモログを、本明細書中に記載の方法および組成物で使用するために改変することができる。典型的には、配列の生物活性が維持されるように改変を行う。改変配列が改変されていない配列の生物活性を保持する場合、アミノ酸置換 (例えば、1、2または3~10、20、または30個の置換) を行うことができる。あるいは、本明細書中に記載のポリペプチドの1つまたは複数の機能ドメインを意図的に不活化させるように改変することができる。rSPD (n/CRD) の機能ドメインには、カラーゲンドメイン、ネック領域、および炭水化物認識ドメインが含まれる。アミノ酸置換には、例えば、治療目的で投与したポリペプチドの血漿半減期を増大させるための非天然類似体の使用を含んでもよい。

40

**【0076】**

例えば、以下の表にしたがって、保存的置換を行うことができる。第2列中の同一のブロックおよび好ましくは第3列中の同一行中のアミノ酸を互いに置換することができる。

【表 1】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性-非荷電	CSTM
		NQ
	極性-荷電	DE
KR		
芳香族		HFVY

10

## 【0077】

ポリペプチドには、サーファクタントタンパク質Dの全長配列のフラグメントも含まれる。好ましくは、フラグメントは、少なくとも1つのエピトープを含む。エピトープの識別方法は、当分野で周知である。フラグメントは、典型的には、少なくとも6個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも10、20、30、50、または100個のアミノ酸を含む。

## 【0078】

r-SP-D (n/CRD)、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を含む組換えSP-Dを、典型的には、組換え手段（例えば、以下の実施例に記載の手段）によって作製する。しかし、固相合成などの当業者に周知の技術を使用した合成手段によってこれらを作製することもできる。タンパク質を、例えば、抽出および精製を補助するために融合タンパク質として産生することもできる。融合タンパク質パートナーの例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、6xHis、GAL4 (DNA結合および/または転写活性化ドメイン)、および -ガラクトシダーゼが含まれる。融合タンパク質配列を除去するために、融合タンパク質パートナーと目的のタンパク質配列との間にタンパク質分解部位を含むように変換することもできる。好ましくは、融合タンパク質は、目的のタンパク質配列の機能を妨害しない。動物細胞由来の細胞抽出物の精製によってタンパク質を得ることもできる。

20

## 【0079】

本明細書中に開示のrSPD (n/CRD)ポリペプチド、その変異体、ホモログ、フラグメント、および誘導体は、実施的に単離した形態であり得る。このようなポリペプチドを、タンパク質の意図する目的を妨害しないキャリアまたは希釈剤と混合することができ、依然として実質的に単離されていると見なされると理解される。rSPD (n/CRD)の変異体、ホモログ、フラグメント、または誘導体はまた、実質的に精製された形態であり得る（この場合、一般に、調製物中に90%を超える（例えば、調製物中に95%、98%、または99%のタンパク質がタンパク質である）タンパク質を含む）。

30

## 【0080】

本明細書中に開示のrSPD (n/CRD)ポリペプチド、その変異体、ホモログ、フラグメント、および誘導体を、標示標識 (revealing label) で標識することができる。標示標識は、ポリペプチドなどを検出可能な任意の適切な標識であり得る。適切な標識には、放射性同位体（例えば、<sup>125</sup>I）、酵素、抗体、ポリヌクレオチド、ビオチンなどのリンカーが含まれる。標識されたポリペプチドを、サンプル中のポリペプチドの量を決定するための免疫アッセイなどの診断方法において使用することができる。ポリペプチドまたは標識ポリペプチドを、標準的なプロトコールを使用した動物およびヒトでのポリペプチドに対する免疫反応の検出のための血清学的または細胞媒介免疫アッセイで使用することもできる。

40

## 【0081】

任意選択的に標識された本明細書中に開示のrSPD (n/CRD)ポリペプチド、その変異体、ホモログ、フラグメント、および誘導体を、固相（例えば、免疫アッセイウェルまたはディップスティックの表面）に固定することもできる。このような標識ポリペ

50

チドおよび/または固定ポリペプチドを、安定な試薬、コントロール、および説明書などと共に適切な容器中のキットにパッケージングすることができる。このようなポリペプチドおよびキットを、免疫アッセイによるポリペプチドまたはその対立遺伝子もしくは種変異体に対する抗体の検出方法で使用することができる。

【0082】

免疫アッセイ法は当分野で周知であり、一般に、(a)タンパク質に対する抗体によって結合することができるエピトープを含むポリペプチドを得るステップと、(b)抗体-抗原複合体が形成する条件下で生体サンプルとポリペプチドをインキュベートするステップと、(c)ポリペプチドを含む抗体-抗原複合体が形成されるかどうかを判断するステップとを含む。

10

【0083】

本明細書中に開示のrSPD(n/CRD)ポリペプチド、その変異体、ホモログ、フラグメント、および誘導体をインビトロまたはインビボ細胞培養系で使用して、疾患での機能を含む細胞機能におけるその対応する遺伝子およびホモログの役割を研究することができる。例えば、短縮ポリペプチド(truncated polypeptide)または改変ポリペプチドを、細胞に組み込んで、細胞で生じる正常な機能を破壊することができる。組換え発現ベクターからのポリペプチドのインサイチュウ発現によって、ポリペプチドを細胞に組み込むことができる(以下を参照のこと)。発現ベクターは、任意選択的に、ポリペプチド発現を調節するための誘導プロモーターを含む。

【0084】

組換え発現産物に対して最適な生物活性を付与することが必要であり得るので、昆虫細胞または哺乳動物細胞などの適切な宿主細胞の使用により、このような翻訳後修飾(例えば、ミリスチル化、グリコシル化、短縮、脂質化、ならびにチロシン、セリン、またはトレオニンのリン酸化)が得られることが予想される。本明細書中に開示のrSPD(n/CRD)ポリペプチド、その変異体、ホモログ、フラグメント、および誘導体を発現するこのような細胞培養系をアッセイ系で使用して、細胞中のポリペプチドの機能を妨害または増強する候補物質を同定することができる。

20

【0085】

[組換えサーファクタントタンパク質DのRSPD(N/CRD)核酸]

本発明者らは、本発明者らが「rSPD(n/CRD)核酸」と呼ぶrSPD(n/CRD)ポリペプチドをコードする核酸を提供する。本発明者らはまた、rSPD(n/CRD)の変異体、ホモログ、誘導体、およびフラグメントをコードする核酸、ならびにrSPD(n/CRD)核酸のフラグメント、ホモログ、誘導体、および変異体を提供する。

30

【0086】

好ましくは、rSPD(n/CRD)核酸は、天然のSP-D配列(例えば、配列番号3に記載のヒトSP-D配列)に由来する。より好ましくは、rSPD(n/CRD)核酸は、N末端ドメインおよび/またはコラーゲンドメイン、好ましくはそれらの両方をコードする配列を欠く。好ましい実施形態では、rSPD(n/CRD)核酸は、実質的に残基1~594、その任意のフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を欠く配列番号3に記載のSP-D、好ましくはヒトSP-Dの組換えフラグメントである。さらに好ましい実施形態では、rSPD(n/CRD)核酸は、実質的に残基595~1128を含む配列番号3に記載のSP-D、好ましくはヒトSP-D配列の組換えフラグメントである。上記各配列のフラグメント、ホモログ、変異体、および誘導体もまた含まれる。

40

【0087】

好ましい実施形態では、ヒトSP-D配列(配列番号4)の200位に対応するプロリン残基をコードするトリプレットを、別の残基をコードするコドンに置換する。好ましくは、プロリン残基を、非荷電の極性残基(例えば、システイン、セリン、トレオニン、またはメチオニン残基)に置換する。非常に好ましい実施形態では、プロリン残基を、セリン残基に置換する。したがって、好ましくは、rSPD(n/CRD)核酸は、配列番号

50

3に記載のヒトSP-D配列の598~560位にセリンをコードするコドンを含み得る。したがって、このような置換コドンは、AGC、AGT、TCA、TCC、TCG、およびTCTを含み得る。最も好ましくは、置換コドンは、AGCを含む。

【0088】

好ましくは、このようなrSPD(n/CRD)核酸は、配列番号1に記載の配列を有するrSPD(n/CRD)ポリペプチドをコードする。rSPD(n/CRD)核酸は、好ましくは配列番号2に記載の配列を含み、より好ましくは配列番号2に記載の配列からなる。

【0089】

本明細書中で使用される、用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、および「核酸」は、互いに類義であることが意図される。「ポリヌクレオチド」は、一般に、改変されていないRNAもしくはDNA、または改変されたRNAもしくはDNAであってよい任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをいう。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、および一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるRNA、一本鎖、より典型的には二本鎖、または一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が含まれるが、これらに限定されない。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNA、またはDNA、あるいはRNAとDNAとの両方を含む三本鎖領域をいう。用語「ポリヌクレオチド」はまた、1つまたは複数の改変された塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性もしくは他の理由のために改変された骨格を有するDNAまたはRNAを含む。「改変された」塩基には、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの通常でない塩基が含まれる。DNAおよびRNAに対して種々の改変が行われているので、「ポリヌクレオチド」は、天然で典型的に見出されるポリヌクレオチドの化学的、酵素的、または代謝的に改変された形態ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を含む。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドを含む。

【0090】

多数の異なるポリヌクレオチドおよび核酸は、遺伝コードの縮重の結果として同一のポリペプチドをコードすることができることが当業者に理解される。さらに、通常の技術を使用して、当業者によって、ポリペプチドが発現される任意の特定の宿主生物のコドン使用頻度を反映するための本明細書中に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列に影響を与えないヌクレオチドの置換が行われることが理解される。

【0091】

rSPD(n/CRD)核酸、変異体、フラグメント、誘導体、およびホモログは、DNAまたはRNAを含んでもよい。これらは、一本鎖または二本鎖であり得る。これらはまた、合成ヌクレオチドまたは改変ヌクレオチドの範囲内に含まれるポリヌクレオチドであり得る。オリゴヌクレオチドに対する多数の異なる改変型が当分野で公知である。これらには、メチルホスホネート骨格およびホスホロチオエート骨格、分子の3'および/または5'末端へのアクリジンまたはポリリジン鎖の付加が含まれる。本発明の目的のために、ポリヌクレオチドを当分野で利用可能な任意の方法によって改変することができる」と理解される。目的のポリヌクレオチドのインビボ活性または寿命を増大させるためにこのような改変を行うことができる。

【0092】

ヌクレオチド配列に関する用語「変異体」、「ホモログ」、または「誘導体」には、配列由来または配列に対するの1つ(または複数の)核酸の任意の置換、変形、改変、置換、欠失、または付加が含まれる。好ましくは、変異体、ホモログ、または誘導体は、生物活性を有するポリペプチドをコードする。

【0093】

上記のように、配列相同性に関して、本明細書中の配列表に記載の配列と好ましくは少なくとも50%または75%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なく

10

20

30

40

50

とも90%相同である。より好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%相同である。上記のように、核酸相同性を比較することができる。好ましい配列比較プログラムは、上記のGC G W i s c o n s i n B e s t f i tプログラムである。デフォルトスコアリング行列は、各同一のヌクレオチドについては10、各ミスマッチについては-9の適合値を有する。各ヌクレオチドについてのデフォルトギャップ作製ペナルティーは-50であり、デフォルトギャップ伸長ペナルティーは-3である。

#### 【0094】

本発明者らは、本明細書中に示す配列またはその任意の変異体、フラグメント、もしくは誘導体または任意の上記の相補物に選択的にハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列をさらに記載する。ヌクレオチド配列は、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも20、30、40、または50ヌクレオチド長である。

10

#### 【0095】

本明細書中で使用される、用語「ハイブリッド形成」は、「核酸の鎖が塩基の組み合わせ (pairing) によって相補鎖と連結するプロセス」ならびにポリメラーゼ連鎖反応技術で実施される増幅プロセスを含む。

#### 【0096】

本明細書中に記載のヌクレオチド配列またはその相補物と選択的にハイブリッド形成することができるポリヌクレオチドは、本明細書中に記載の対応するヌクレオチド配列に対して、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個または30個、例えば少なくとも40個、60個、または100個またはそれ以上の連続したヌクレオチド領域に対して一般に少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%または90%、およびより好ましくは少なくとも95%または98%相同である。

20

#### 【0097】

用語「選択的にハイブリッド形成可能な」は、プローブとして使用されるポリヌクレオチドを、標的ポリヌクレオチドがバックグラウンドを有意に超えるレベルでプローブとハイブリッド形成することが見出される条件下で使用することを意味する。例えば、スクリーニングされるcDNAまたはゲノムDNAライブラリー中に存在する他のヌクレオチドのために、バックグラウンドハイブリッド形成が起こり得る。この事象では、バックグラウンドは、標的DNAで認められる特異的相互作用の1/10未満、好ましくは1/100未満の強度のプローブとライブラリーの非特異的DNAメンバーとの間の相互作用によって得られるシグナルレベルを意味する。相互作用の強度を、例えば、プローブの放射性標識 (例えば、<sup>32</sup>Pを使用する) によって測定することができる。

30

#### 【0098】

ハイブリッド形成条件は、Berger and Kimmel (1987、「分子クローニング技術ガイド」、Methods in Enzymology、第152巻、Academic Press、San Diego、CA)で教示されている核酸結合複合体の融解温度 (T<sub>m</sub>) に基づき、以下に説明のように「ストリンジェンシー」の定義を参照のこと。

#### 【0099】

最大ストリンジェンシーは、典型的には、約T<sub>m</sub> - 5 (プローブのT<sub>m</sub>より5低い) ; 高ストリンジェンシーはT<sub>m</sub>より約5 ~ 10 低い温度、中程度のストリンジェンシーはT<sub>m</sub>より約10 ~ 20 低い温度、低ストリンジェンシーはT<sub>m</sub>より約20 ~ 50 低い温度で得られる。当業者が理解するように、最大ストリンジェンシーハイブリッド形成を使用して、同一のポリヌクレオチド配列を同定または検出することができ、中程度 (または低) ストリンジェンシーハイブリッド形成を使用して、類似のまたは関連ポリヌクレオチド配列を同定または検出することができる。

40

#### 【0100】

好ましい態様では、本発明者らは、ストリンジェントな条件下 (例えば、65 および0.1 x SSC (1 x SSC = 0.15 MのNaCl、0.015 Mのクエン酸ナトリウ

50

ム ( pH 7 . 0 ) ) で、 r S P D ( n / C R D ) 核酸、フラグメント、変異体、ホモログ、または誘導体とハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列を提供する。

【 0 1 0 1 】

ポリヌクレオチドが二本鎖である場合、二重鎖の両鎖 ( 個別または組み合わせのいずれか ) は、本明細書中に記載の方法および組成物に含まれる。ポリヌクレオチドが一本鎖の場合、ポリヌクレオチドの相補配列も含まれると理解される。

【 0 1 0 2 】

本発明の配列に 1 0 0 % 相同ではないが本発明の範囲内に含まれるポリヌクレオチドを、多数の方法で得ることができる。配列の他の変異体を、例えば、一定範囲の個体 ( 例えば、異なる集団由来の個体 ) から作製した DNA ライブラリーの探索によって得ることができる。例えば、 S P - D ホモログを、他の個体または他の種から同定することができる。さらなる組換え S P - D 核酸およびポリペプチドを、ホモログ中の対応する位置の同定および本明細書中に記載の分子の合成または産生によって産生することができる。さらに、このようなホモログ中のコラーゲン領域、ネック領域、および炭水化物結合ドメインを、例えば、配列の目視またはコンピュータ支援比較によって同定し、非ヒトであるが 1 つまたは複数の r S P D ( n / C R D ) の生物活性を有する組換え S P - D への組み合わせまたは産生について選択することができる。

10

【 0 1 0 3 】

さらに、 S P - D の他のウイルス / 細菌または細胞ホモログ、特に哺乳動物細胞 ( 例えば、ラット、マウス、ウシ、および霊長類の細胞 ) で見出される細胞ホモログを得ることができ、このようなホモログおよびそのフラグメントは、一般に、ヒト S P - D と選択的にハイブリッド形成することができる。このようなホモログを使用して、非ヒト r S P D ( n / C R D ) 核酸、フラグメント、変異体、およびホモログをデザインすることができる。さらなる変種 ( variety ) を産生するために、当分野で公知の手段によって変異誘発を行うことができる。

20

【 0 1 0 4 】

S P - D ホモログ配列を、中程度から高ストリンジェンシー条件下での他の動物種由来のゲノム DNA ライブラリーから作製した c DNA ライブラリーの探索および r S P D ( n / C R D ) 核酸、フラグメント、変異体、およびホモログの全部もしくは任意の一部、または S P - D の他のフラグメントを含むプローブでのこのようなライブラリーの探索によって得ることができる。

30

【 0 1 0 5 】

類似の検討材料を適用して、本明細書に開示のポリペプチドまたはヌクレオチド配列の種ホモログおよび対立遺伝子変異体を得る。

【 0 1 0 6 】

変異体および株 / 種ホモログを、 r S P D ( n / C R D ) 核酸配列内の保存アミノ酸配列をコードする変異体およびホモログ内の配列を標的するようにデザインしたプライマーを使用する縮重 P C R を使用しても得ることができる。例えば、アミノ酸配列のいくつかの変異体 / ホモログとの整列によって保存配列を予想することができる。当分野で公知のコンピュータソフトウェアを使用して、配列アラインメントを行うことができる。例えば、 G C G W i s c o n s i n P i l e U P プログラムが広く一般に使用されている。

40

【 0 1 0 7 】

縮重 P C R で使用されるプライマーは、 1 つまたは複数の縮重点を含み、既知の配列に対して 1 つの配列プライマーを使用した配列のクローニングで使用したものよりも低いストリンジェンシー条件で使用される。遠縁の生物由来の配列間の総ヌクレオチド相同性が非常に低いようなので、これらの条件下では、縮重 P C R は、標識フラグメント ( r S P D ( n / C R D ) 配列 ) を使用したライブラリーのスクリーニングよりもむしろ最適な方法であり得る。

【 0 1 0 8 】

さらに、 B L A S T プログラムスーツなどの検索アルゴリズムを使用したヌクレオチド

50

および/またはタンパク質データベースの検索によって相同配列を同定することができる。

【0109】

あるいは、このようなポリヌクレオチドを、特定決定された配列（例えば、rSPD（n/CRD）核酸、またはその変異体、ホモログ、誘導體、またはフラグメント）の部位特異的変異誘発によって得ることができる。これは、例えば、ポリヌクレオチド配列が発現される特定の宿主細胞のコドン優先度を最適化するために配列のサイレントなコドンを変化させる必要がある場合に有用であり得る。制限酵素認識部位を導入するためまたはポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの性質または機能を変化させるために、他の配列の変化を所望することができる。

10

【0110】

本明細書中に記載のポリヌクレオチドを使用して、プライマー（例えば、PCRプライマー（別の増幅反応用のプライマー））、プローブ（例えば、放射性または非放射性標識を使用して従来の手段によって標示標識を使用して標識）を産生することができるか、ポリヌクレオチドをベクターにクローン化することができる。このようなプライマー、プローブ、および他のフラグメントは、少なくとも8、9、10、または15、好ましくは少なくとも20、例えば少なくとも25、30、または40ヌクレオチド長であり、これらもまた本明細書中で使用される用語「ポリヌクレオチド」に含まれる。

【0111】

DNAポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドおよびプローブを、組換え、合成、または当業者が利用可能な任意の手段によって作製することができる。これらを、標準的な技術によってクローン化することもできる。

20

【0112】

一般に、プライマーを、所望の核酸配列の一度に1ヌクレオチドの段階的製造を含む合成手段によって産生する。自動化技術を使用してこの手段を行う技術は、当分野で容易に利用可能である。

【0113】

一般に、組換え手段（例えば、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）クローニング技術の使用）を使用してより長いポリヌクレオチドを産生する。これは、クローン化を所望する脂質ターゲティング配列領域に隣接するプライマー対（例えば、約15～30ヌクレオチド）を作製するステップと、プライマーを動物またはヒト細胞から得たmRNAまたはcDNAと接触させるステップと、所望の領域を増幅する条件下でポリメラーゼ連鎖反応を行うステップと、増幅されたフラグメントを単離するステップ（例えば、アガロースゲルでの反応混合物の精製）と、増幅されたDNAを回収するステップとを含む。プライマーを、増幅されたDNAを適切なクローニングベクターにクローン化することができる適切な制限酵素認識部位を含むようにデザインすることができる。

30

【0114】

ポリヌクレオチドまたはプライマーは、標示標識を保有することができる。適切な標識には、<sup>32</sup>Pおよび<sup>35</sup>Sなどの放射性同位体、酵素標識、ビオチンなどの他のタンパク質標識が含まれる。このような標識をポリヌクレオチドまたはプライマーに付加し、それ自体公知の技術を使用して検出することができる。当業者は、ヒトまたは動物体内のポリヌクレオチドの検出または配列決定のための核酸ベースの試験において、標識または非標識のポリヌクレオチドもしくはプライマーまたはそのフラグメントを使用することができる。

40

【0115】

このような検出試験は、一般に、ハイブリッド形成条件下でDNAまたはRNAを含む生体サンプルをポリヌクレオチドまたはプローブを含むプローブと接触させるステップと、サンプル中でプローブと核酸との間に形成された任意の二重鎖を検出するステップとを含む。PCRなどの技術を使用するか、固体支持体上のプローブの固定、サンプル中のプローブとハイブリッド形成しない核酸の除去、およびプローブとハイブリッド形成した核酸の検出によって、このような検出を行うことができる。あるいは、サンプル核酸を、固

50

体支持体に固定し、このような支持体に結合したプローブの量を検出することができる。これの適切なアッセイ方法および他の形式を、例えば、WO 89 / 0 3 8 9 1 および WO 9 0 / 1 3 6 6 7 で見出すことができる。

【0116】

ヌクレオチド（例えば、rSPD（n/CRD）核酸）の配列決定試験は、ハイブリッド形成条件下で標的DNAまたはRNAを含む生体サンプルをポリヌクレオチドまたはプライマーを含むプローブと接触させるステップと、例えば、サンガーのダイデオキシ法（Sambrookらを参照のこと）によって配列を決定するステップとを含む。

【0117】

このような方法は、一般に、適切な試薬の存在下で標的DNAまたはRNAに相補的な鎖の合成によってプライマーを伸長させて、1つまたは複数のA、C、G、またはT/U残基で伸長反応を選択的に停止させるステップと、鎖伸長反応および停止反応を起こさせるステップと、伸長産物をサイズによって分離して選択的に終結したヌクレオチド配列を決定するステップとを含む。適切な試薬には、DNAポリメラーゼ酵素、デオキシヌクレオチドdATP、dCTP、dGTP、およびdTTP、緩衝液、ならびにATPが含まれる。ダイデオキシヌクレオチドを、選択的終結のために使用する。

10

【0118】

[核酸ベクター]

ポリヌクレオチド（例えば、本明細書中に記載のもの）を、組換え複製ベクターに組み込むことができる。ベクターを使用して、適合する宿主細胞中で核酸を複製することができる。したがって、さらなる実施形態では、本発明者らは、複製ベクターにポリヌクレオチドを移入するステップと、適合する宿主細胞にベクターを移入するステップと、宿主細胞をベクターが複製する条件下で増殖させるステップとによってポリヌクレオチドを作製する方法を提供する。ベクターを宿主細胞から回収することができる。適切な宿主細胞には、大腸菌などの細菌、酵母、哺乳動物細胞株、および他の真核細胞株（例えば、昆虫Sf9細胞）が含まれる。

20

【0119】

好ましくは、ベクター中のポリヌクレオチドを、宿主細胞によってコード配列を発現することができる調節配列に作動可能に連結する（すなわち、ベクターは発現ベクターである）。用語「作動可能に連結された」は、記載の成分がその意図する様式で機能する関係にあることを意味する。コード配列に、「作動可能に連結された」調節配列を、調節配列に適合する条件下でコード配列が発現する方法でライゲーションする。

30

【0120】

例えば、さらなる転写調節エレメントの付加によって調節配列を改変して、転写モジュレーターに、より反応性を示す調節配列によって指示された転写レベルを得ることができる。

【0121】

ベクターを、以下に記載のように、適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトして、タンパク質を発現させることができる。このプロセスは、タンパク質をコードするコード配列のベクターによって発現する条件下で上記の発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養するステップと、任意選択的に発現したタンパク質を回収するステップとを含み得る。使用した宿主細胞に適合するベクターを選択する。

40

【0122】

ベクターは、例えば、複製起点、任意選択的にポリヌクレオチド発現用のプロモーター、および任意選択的にプロモーターのレギュレーターを使用して得たプラスミドまたはウイルスベクターであり得る。ベクターは、1つまたは複数の選択マーカー遺伝子（例えば、細菌プラスミドの場合は、アンピシリン耐性遺伝子または哺乳動物ベクターにはネオマイシン耐性遺伝子）を含み得る。例えば、ベクターを使用して、宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換することができる。

【0123】

50

ポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結された調節配列には、プロモーター/エンハンサーおよび他の発現調節シグナルが含まれる。これらの調節配列を、発現ベクターが使用されるようにデザインされた宿主細胞に適合するように選択することができる。用語「プロモーター」は、当分野で周知であり、最小プロモーターから上流エレメントおよびエンハンサーを含むプロモーターまでの、サイズおよび複雑さの範囲の核酸配列を含む。

#### 【0124】

プロモーターは、典型的には、哺乳動物細胞において機能するプロモーターから選択されるが、原核プロモーターおよび他の真核細胞（昆虫細胞など）において機能するプロモーターを使用することができる。プロモーターは、典型的には、ウイルスまたは真核生物遺伝子のプロモーター配列由来である。例えば、発現する細胞のゲノム由来のプロモーターであり得る。真核プロモーターに関して、これらは普遍的様式（アクチン、アクチン、チュープリンプロモーターなど）または組織特異的様式（ピルビン酸キナーゼ遺伝子のプロモーターなど）で機能するプロモーターであり得る。これらはまた、特異的な刺激に反応するプロモーター（例えば、ステロイドホルモン受容体に結合するプロモーター）であり得る。ウイルスプロモーターも使用することができる（例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス長末端反復（MMLV LTR）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター、またはヒトサイトメガロウイルス（CMV）IEプロモーター）。

10

#### 【0125】

細胞の生存期間中に異種遺伝子の発現レベルを調節することができるように誘導可能なこともまたプロモーターに有利であり得る。「誘導可能な」とは、プロモーターを使用して得られた発現レベルを調節することができることを意味する。

20

#### 【0126】

さらに、任意のこれらのプロモーターを、さらなる調節配列（例えば、エンハンサー配列）の付加によって改変することができる。上記の2つまたはそれ以上の異なるプロモーター由来の配列エレメントを含むキメラプロモーターを使用することもできる。

#### 【0127】

アンチセンスRNAを産生するために、ポリヌクレオチドを、アンチセンス方向で上記のベクターに挿入することができる。合成手段によって、アンチセンスRNAまたは他のアンチセンスポリヌクレオチドを産生することもできる。このようなアンチセンスポリヌクレオチドを、本明細書中に記載の任意の1つのポリヌクレオチドを含む遺伝子から転写されたRNAのレベルを調製する方法に使用することができる。

30

#### 【0128】

##### [ 宿主細胞 ]

ベクター/ポリヌクレオチドを複製し、そして/またはポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを発現する目的で、rSPD(n/CRD)核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導體を含むかコードするベクターおよびポリヌクレオチドを宿主細胞に移入することができる。宿主細胞として原核細胞を使用してポリペプチドを産生することができるが、真核細胞（例えば、酵母、昆虫、または哺乳動物細胞（特に、哺乳動物細胞など））を使用することが好ましい。

40

#### 【0129】

ベクター/ポリヌクレオチドを、当分野で公知の種々の技術（トランスフェクション、形質転換、およびエレクトロポレーションなど）を使用して適切な宿主細胞に移入することができる。ベクター/ポリヌクレオチドを動物に投与する場合、いくつかの技術が当分野で公知である（例えば、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、およびアデノウイルスなどの組換えウイルスベクターでの感染、核酸の直接注射、および遺伝子銃形質転換など）。

#### 【0130】

##### [ タンパク質の発現および精製 ]

50

ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を使用して、rSPD(n/CRD)ポリペプチドなどのポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を発現することができる。宿主細胞を、タンパク質が発現する適切な条件下で培養することができる。ポリペプチドの発現は、これらが継続的に産生されるような構成性、または誘導性であって、発現を開始させる刺激を必要とし得る。誘導発現の場合、例えば、培養培地へのインデューサー物質(例えば、デキサメタゾンまたはIPTG)の添加が必要な場合に、タンパク質産生を開始することができる。

**【0131】**

ポリペプチドを、当分野で公知の種々の技術(酵素溶解、化学的および/または浸透圧溶解、ならびに物理的破壊を含む)によって宿主細胞から抽出することができる。

10

**【0132】**

ポリペプチドを、TnT(登録商標、Promega社製)ウサギ網状赤血球系などのインビトロ無細胞系で組換え産生することもできる。

**【0133】****[抗体]**

本発明はまた、ポリペプチドまたはそのフラグメントに対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を提供する。したがって、本発明は、さらに、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の産生プロセスを提供する。

**【0134】**

ポリクローナル抗体を所望する場合、選択した哺乳動物(例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど)を、ポリペプチド由来のエピトープを保有する免疫原性ポリペプチドで免疫する。免疫動物由来の血清を回収し、公知の手順にしたがって処理する。ポリペプチド由来のエピトープに対するポリクローナル抗体を含む血清が他の抗原に対する抗体を含む場合、ポリクローナル抗体を、免疫親和性クロマトグラフィによって精製することができる。ポリクローナル抗血清の産生および処理技術は、当分野で公知である。このような抗体を作製することができるように、本発明はまた、動物またはヒトにおける免疫原として使用するための別のポリペプチドに対して八プテン化したポリペプチドまたはそのフラグメントを提供する。

20

**【0135】**

ポリペプチド中のエピトープに対するモノクローナル抗体を、当業者は容易に産生することもできる。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の一般的な作製方法は周知である。不死化抗体産生細胞株を、細胞融合、癌性DNAでのBリンパ球の直接的な形質転換、またはエプスタイン・バーウイルスでのトランスフェクションなどの他の技術によっても作製することができる。ポリペプチド中のエピトープに対して産生されたモノクローナル抗体のパネルを、種々の性質(すなわち、イソ型およびエピトープ親和性)についてスクリーニングすることができる。

30

**【0136】**

別の技術は、例えば、ファージがその外殻表面上にscFvフラグメントを発現するファージディスプレイライブラリーを非常に多様な相補性決定領域(CDR)でスクリーニングするステップを含む。この技術は、当分野で周知である。

40

**【0137】**

ポリペプチド由来のエピトープに対する抗体(モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方)は特に診断で有用であり、中和する抗体は、受動免疫治療で有用である。特にモノクローナル抗体を使用して、抗イディオタイプ抗体を惹起することができる。抗イディオタイプ抗体は、保護が望まれる薬剤の抗原の「内部イメージ」を有する免疫グロブリンである。

**【0138】**

抗イディオタイプ抗体を惹起する技術は、当分野で公知である。これらの抗イディオタイプ抗体もまた、治療に有用であり得る。

50

## 【0139】

本発明の目的のために、用語「抗体」は、特記しない限り、標的抗原への結合活性を保持する全抗体のフラグメントが含まれる。このようなフラグメントには、Fv、F(ab')、およびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントならびに単鎖抗体(scFv)が含まれる。さらに、抗体およびそのフラグメントは、例えば、欧州特許第239400号に記載のヒト化抗体であり得る。

## 【0140】

(a)抗体を得るステップと、(b)抗体-抗原複合体を形成する条件下で生体サンプルを抗体とインキュベートするステップと、(c)抗体を含む抗体-抗原複合体が形成されたかを判断するステップとを含む方法による生体サンプル中に存在するポリペプチドの検出方法で抗体を使用することができる。

10

## 【0141】

適切なサンプルには、脳、乳房、卵巣、肺、結腸、膵臓、精巣、肝臓、筋肉、および骨組織などの組織由来の抽出物またはこのような組織由来の新生物成長物由来の抽出物が含まれる。

## 【0142】

抗体を、固体支持体に結合させ、そして/または適切な試薬、コントロール、および説明書などを含む適切な容器中のキットにパッケージングすることができる。

## 【0143】

## [アッセイ]

本発明者らは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体に結合する物質の同定に適切なアッセイを開示する。

20

## 【0144】

一般に、このような結合アッセイは、候補分子にrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を曝露するステップと、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体と候補分子との間の相互作用または結合を検出するステップを含む。結合アッセイを、インビトロまたはインビボで行うことができる。

## 【0145】

本発明者らは、rSPD(n/CRD)ポリペプチドの活性を増強することができる物質の同定アッセイを開示する。このような化合物を、rSPD(n/CRD)ポリペプチドのアゴニストとして使用することができ、例えば、任意の所望の効果を増強するために個体に同時投与することができる。

30

## 【0146】

一般に、このような物質または化合物の同定アッセイは、細胞または生物を得るステップと、細胞または生物をrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体に曝露するステップと、細胞を候補分子に曝露するステップと、rSPD(n/CRD)に関連する効果を検出するステップとを含む。本明細書中(特に、実施例)に開示の任意のrSPD(n/CRD)ポリペプチド媒介効果を検出することができる。

40

## 【0147】

特に、rSPD(n/CRD)ポリペプチド媒介効果を、末梢血好酸球増多症の軽減、血清IgEレベルの低下、血清IgG1レベルの低下、気道過敏症の軽減、肺胞マクロファージ数の減少、洗浄物中のリン脂質レベルの低下、エオタキシン発現のダウンレギュレーション、MCP-1発現の減少、MIP-1発現のダウンレギュレーション、およびMIP-2発現のダウンレギュレーションからなる群から選択することが好ましい。

## 【0148】

アゴニストを同定するために、さらなる効果、または好ましくは相乗効果を検出する。したがって、rSPD(n/CRD)ポリペプチドのみで、例えば、分子のレベルまたは数を減少させるか分子発現をダウンレギュレーションすることができ、アッセイは分子の

50

レベルまたは数をさらに減少させるか分子発現をさらにダウンレギュレーションする分子を同定する。したがって、好ましくは、候補分子は、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体と共に、rSPD(n/CRD)ポリペプチドのみと比較して、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、またはそれ以上の発現をダウンレギュレーションするかレベルまたは数を減少させる。したがって、例えば、アゴニストとしての使用に適切な候補分子は、rSPD(n/CRD)ポリペプチドのみで達成される肺胞マクロファージ数の減少を10%超増強することができる分子である。

【0149】

逆に、アンタゴニストの同定アッセイは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド媒介効果の減少の検出を含む。好ましくは、rSPD(n/CRD)ポリペプチドによって達成される発現のダウンレギュレーションまたは数もしくはレベルの低下は、適切な候補分子の存在下で減少する。好ましくは、減少は、rSPD(n/CRD)ポリペプチドのみのみと比較して、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、またはそれ以上である。したがって、例えば、アンタゴニストとしての使用に適切な候補分子は、rSPD(n/CRD)ポリペプチドのみで達成される肺胞マクロファージ数の減少を10%超減少することができる分子である。

【0150】

例示のように、N1が非処置生物中の肺胞マクロファージ数であり、N2はrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体に曝露した生物中の数であり場合、肺胞マクロファージ数は、 $R = (N1 - N2) / N1 \times 100\%$ 減少する。アゴニストはxが1以上である因数x(例えば、x = 1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、10、20、50、100など)でRを増加させ、アンタゴニストはxが1未満である因数x(例えば、x = 0.9、0.9、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1など)でRを減少させる。

【0151】

例えば、生物を、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体および候補分子に曝露し、末梢好酸球レベル、血清IgE、血清IgG1、または任意の組み合わせを検出することができる。候補分子と共にrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体に曝露した生物の気道過敏症または肺胞マクロファージ数を検出することもできる。

【0152】

好ましい候補分子は、rSPD(n/CRD)と組み合わせてさらなる効果または相乗効果を提供する分子である。

【0153】

rSPD(n/CRD)ポリペプチドのアンタゴニストを同定するためのアッセイもまた開示する。このようなアッセイは、候補分子と組み合わせたrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体への細胞または生物の曝露に対する効果の減少を検出するステップを含む。

【0154】

好ましい実施形態では、細胞よりもむしろ生物全体に対してアッセイを行う。好ましくは、生物は、本明細書中に開示の疾患を罹患しているか、このような疾患の1つまたは複数の症状を示す生物である。非常に好ましい実施形態では、生物は、サーファクタントタンパク質Dを発現しない生物である。好ましくは、このような生物は、SP-D遺伝子が破壊または欠失している。より好ましくは、生物は、マウス(Mus musculus)、好ましくは、Botas, C.ら、「サーファクタントタンパク質Dを欠くマウスの

10

20

30

40

50

サーファクタントのホメオスタシスの変化および肺胞II型細胞の形態学」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1998、95(20)、11869~74頁に記載のように作製したSP-Dノックアウトマウスである。

【0155】

[候補分子]

上記アッセイで使用するための適切な候補分子には、特にアミノ酸サイズが約5~30または10~25のペプチドが含まれる。ランダムな配列または最大に多様なペプチドパネルを一貫して得るために変化させた配列を含むペプチドパネル由来のペプチドを使用することができる。

【0156】

適切な候補分子には、抗体産物(例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、およびCDRグラフト抗体)も含まれる。さらに、コンビナトリアルライブラリー、ペプチド、ペプチド模倣物、定義された化学物質、オリゴヌクレオチド、および天然物のライブラリーを活性についてスクリーニングすることができる。候補分子を、例えば、反応あたり10種の分子のバッチおよび個別に試験したrSPD(n/CRD)ポリペプチド媒介効果の増強または減少を示すバッチの分子における最初のスクリーニングで使用することができる。

【0157】

[ライブラリー]

ポリペプチドまたは核酸のライブラリーなどの候補分子のライブラリーを、本明細書中に記載の方法および組成物で使用するすることができる。このようなライブラリーを、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体の存在下で細胞または生物に曝露し、rSPD(n/CRD)ポリペプチド媒介効果を検出する。

【0158】

ファージディスプレイ技術に代表される巨大ライブラリーの所望のメンバーを単離するための選択プロトコールは当分野で公知である。種々のペプチド配列が糸状バクテリオファージの表面上にディスプレイされるような系(Scott and Smith, 1990, 前出)は、標的抗原に結合する特異的抗体フラグメントのインビトロ選択および増幅のための抗体フラグメント(およびこれをコードするヌクレオチド配列)のライブラリーの作製に有用であることが証明されている。V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域をコードするヌクレオチド配列は、大腸菌の原形質周囲の空間に指向させるリーダーシグナルをコードする遺伝子フラグメントに連結し、結果として、典型的にはバクテリオファージ外殻タンパク質(例えば、pIIIまたはpVII)への融合物として得られた抗体フラグメントがバクテリオファージの表面上にディスプレイされる。あるいは、抗体フラグメントは、ファージのキャプシド(ファージボディ)の外面上にディスプレイされる。ファージベースのディスプレイ系の利点は、生物系であるので、細菌細胞中に選択されたライブラリーメンバーを含むファージの成長によって選択されたライブラリーメンバーを単純に増幅することができるという点である。さらに、ポリペプチドライブラリーメンバーをコードするヌクレオチド配列がファージまたはファージミドベクター上に含まれるので、配列決定、発現、およびその後の遺伝子操作が比較的簡単である。

【0159】

バクテリオファージ抗体ディスプレイライブラリーおよびファージ発現ライブラリーの構築方法は、当分野で周知である(McCaffertyら, 1990, 前出; Kangら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4363; Lacksonら, 1991, Nature, 352, 624; Lowmanら, 1991, Biochemistry, 30, 10832; Burtonら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10134; Hoogenboomら, 1991, Nucleic Acids Res., 19, 4133; Changら, 1991, J. Immunol., 147, 3610; Breitlingら, 1991

10

20

30

40

50

, Gene, 104, 147; Marksら, 1991, 前出; Barbassら, 1992, 前出; Hawkins and Winter, 1992, J. Immunol., 22, 867; Marksら, 1992, J. Biol. Chem., 267, 16007; Lernerら, 1992, Science, 258, 1313 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする)。一般にポリペプチドライブラリーの発現のためにこのような技術を必要に応じて修正することができる。

#### 【0160】

1つの特に有利なアプローチは、scFvファージ-ライブラリーの使用であった(Bird, R. E.ら, 1988, Science, 242, 423~6; Hustonら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879~5883; Chaudharyら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1066~1070; McCaffertyら, 1990, 前出; Clacksonら, 1991, 前出; Marksら, 1991, 前出; Chiswellら, 1992, Trends Biotech., 10, 80; Marksら, 1992, 前出)。バクテリオファージ外殻タンパク質上にディスプレイされるscFvライブラリーの種々の実施形態が記載されている。ファージディスプレイアプローチの改良も公知である(例えば、WO96/06213号およびWO92/01047(Medical Research Councilら)およびWO97/08320号(Morphosys、前出)(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に記載)。

#### 【0161】

別のライブラリー選択技術には、バクテリオファージブランクまたは溶原菌コロニー(共に以前に記載されている)として直接スクリーニングすることができるバクテリオファージ発現系が含まれ(Huseら, 1989, Science, 246, 1275; Cation and Koprowski, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87; Mullinaxら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8095; Perssonら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2432)、本発明で使用されている。これらの発現系を使用して、ライブラリーの多数の異なるメンバーを約 $10^6$ またはそれ以上のオーダーでスクリーニングすることができる。他のスクリーニング系は、例えば、ライブラリーメンバーの直接的化学合成に依存する。1つの初期の方法は、WO84/03564号などに記載のピンまたはロッドのセットでのペプチド合成を含む。各ビーズが各ライブラリーメンバーであるペプチドライブラリーを形成するビーズ上でのペプチド合成を含む類似の方法は、米国特許第4,631,211号に記載されており、関連する方法は、WO92/00091号に記載されている。ビーズベースの方法の有意な改良は、各ライブラリーメンバーのアミノ酸配列の同定を容易にするためのオリゴヌクレオチドなどの固有の識別タグでの各ビーズのタグ化を含む。これらの改良されたビーズベースの方法は、WO93/06121号に記載されている。

#### 【0162】

別の化学合成法は、アレイ中の不連続の所定の位置にそれぞれ異なるライブラリーメンバー(例えば、固有のペプチド配列)を位置付ける様式での表面上でのペプチドアレイ(またはペプチド模倣物)の合成を含む。各ライブラリーメンバーの同一性を、アレイ中のその空間的位置によって決定する。所定の分子(例えば、受容体)と反応性ライブラリーメンバーとの間で結合相互作用が起こるアレイ中の位置を決定し、それにより、空間的位置を基本として反応性ライブラリーメンバーの配列を同定する。これらの方法は、米国特許第5,143,854号; WO90/15070号およびWO92/10092号; Fodorら, 1991, Science, 251, 767; Dower and Fodor, 1991, Ann. Rep. Med. Chem., 26, 271に記載されている。

#### 【0163】

ポリペプチドまたはヌクレオチドのライブラリーを作製するための他の系は、ライブラ

リーメンバーのインビトロ合成のための無細胞酵素機構の使用を含む。1つの方法では、RNA分子を、標的リガンドに対する別ラウンドの選択およびPCR増幅によって選択する(Tuerk and Gold, 1990, Science, 249, 505; Ellington and Szostak, 1990, Nature, 346: 818)。類似の技術を使用して、所定のヒト転写因子に結合するDNA配列を同定することができる(Thiesen and Bach, 1990, Nucleic Acids Res., 18, 3203; Beaudry and Joyce, 1992, Science, 257, 635; WO92/05258およびWO92/14843)。類似の方法では、巨大ライブラリーの作製方法としてインビトロ翻訳を使用して、ポリペプチドを合成することができる。一般に安定化ポリソーム複合体を含むこれらの方法は、WO88/08453号、WO90/05785号、WO90/07003号、WO91/02076号、WO91/05058号、およびWO92/02536号にさらに記載されている。WO95/22625号およびWO95/11922(Affymax)などに開示のファージベースではない別のディスプレイ系は、選択のためのポリペプチドのディスプレイのためにポリソームを使用する。これらおよび全ての上記の書類はまた、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

10

【0164】

[コンビナトリアルライブラリー]

ライブラリー(特に、候補分子のライブラリー)は、コンビナトリアルライブラリー(コンビナトリアル化合物ライブラリーとしても公知)の形態で適切に存在し得る。

20

【0165】

本明細書中で使用される、用語「コンビナトリアルライブラリー」は、ランダムに選択されたサブユニットからなる多種の化合物の集団である。コンビナトリアルライブラリーを、細胞または生物に曝露した場合にrSPD(n/CRD)ポリペプチド媒介効果を増大、増強、減少、または最小化することができる分子についてスクリーニングすることができる。

【0166】

タンパク質分解もしくは非タンパク質分解酵素に活性なライブラリー、Gタンパク質共役受容体(GPCR)のアゴニストおよびアンタゴニストのライブラリー、非GPCR標的(例えば、インテグリン、イオンチャネル、ドメイン相互作用、核受容体、および転写因子)に活性なライブラリー、ならびにホールセル腫瘍学および抗感染性標的のライブラリーなどを含む化合物の種々のコンビナトリアルライブラリーが現在利用可能である。コンビナトリアルライブラリーの概説、特にその構築および使用は、Dolle and Nelson, 1999, Journal of Combinatorial Chemistry, 第1巻, 第4号, 235~282に記載されている。「コンビナトリアルペプチドライブラリープロトコール」(Shmuel Cabilly, Totowa, N.J. 編、Humana Press, c1998, Methods in Molecular Biology, 第87巻)も参照のこと。

30

【0167】

コンビナトリアル化合物ライブラリー、その産生および使用を記載したさらなる引例には、「分子多様性の化学的作製」、Michael R. Pavia, Sphinx Pharmaceuticals, A Division of Eli Lilly(1995年7月公開);「コンビナトリアルケミストリー: 未来へのストラテジー MDL Information Systemsはそのプロジェクトライブラリーが多様性ライブラリーを管理する役割を果たすと考察する」(1995年7月公開);「リード化合物の発見およびSAR組織化における固相コンビナトリアルケミストリー」、Adnan M.M. Mjalli and Barry E. Toyonaga, Ontogen Corporation(1995年7月公開);「構造的に指示された非ペプチドライブラリー由来の非ペプチドブラジキニン受容体アンタゴニスト」, Sarvajit Chakravarty, Babu J. Mavunkel, Robin Andy, D

40

50

onald J. Kyle\*, Scios Nova Inc. (1995年7月公開) ; 「薬理作用団の多様性を使用したコンビナトリアルケミストリーライブラリーのデザイン」、Keith Davies and Clive Briant, Chemical Design Ltd. (1995年7月公開) ; 「組み合わせ合成実験のためのデータベースシステム」、Craig James and David Weininger, Daylight Chemical Information Systems, Inc. (1995年7月公開) ; 「コンビナトリアルケミストリーのための情報管理機構」、Keith Davies and Catherine White, Chemical Design Ltd. (1995年7月公開) ; 「化学的多様性に取り組むための新規のソフトウェアツール」、R. S. Pearlman, Laboratory for Molecular Graphics and Theoretical Modeling, College of Pharmacy, University of Texas (1996年6月/7月公開) ; 「創薬の新規のストラテジーによって付与される計算機化学の機会：見解」、Yvonne Connolly Martin, Computer Assisted Molecular Design Project, Abbott Laboratories (1996年6月/7月公開) ; 「ルイビル大学でのコンビナトリアルケミストリーおよび分子多様性コース：説明」、Arno F. Spatola, Department of Chemistry, University of Louisville (1996年6月/7月公開) ; 「化学的に作製したスクリーニングライブラリー：現在と未来」、Michael R. Pavia, Sphinx Pharmaceuticals, A Division of Eli Lilly (1996年6月/7月公開) ; 「創薬プロセスへの炭水化物分子の多様性を導入するための化学的ストラテジー」、Michael J. Sofia, Transcell Technologies Inc. (1996年6月/7月公開) ; 「コンビナトリアルケミストリーのためのデータ管理」、Maryjo Zaborowski, Chiron Corporation and Sheila H. DeWitt, Parke-Davis Pharmaceutical Research, Division of Warner-Lambert Company (1995年11月公開) ; および「バイオベースの産業におけるR&Dに対する高処理有機合成の影響」、John P. Devlin (1996年3月公開) を含むURL <http://www.netsci.org/Science/Combichem/> から利用可能な引例が含まれる。

**【0168】**

コンビナトリアルケミストリーにおける技術は、新規の薬学的リード化合物の作製のための現代的な方法で広範に許容されつつある (Gallop, M. A. ら, 1994, J. Med. Chem., 37, 1233~1251; Gordon, E. M. ら, 1994, J. Med. Chem., 37, 1385~1401)。1つのコンビナトリアルアプローチの使用は、固相支持体の各粒子上に異なる構造を含むライブラリーの合成、ライブラリーの可溶性受容体との相互作用、高分子標的と相互作用する「ビーズ」の同定、および同定した「ビーズ」によって保有される構造の決定を含むストラテジーに基づく (Lam, K. S. ら, 1991, Nature, 354, 82~84)。このアプローチの代替法は、固体支持体からの定義された化合物アリコート連続的放出、およびその後の溶液中の活性の決定、活性な化合物が放出される粒子の同定、直接的配列決定によるその構造の解明 (Salmon, S. E. ら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11708~11712)、またはそのコードの解読 (Kerr, J. M. ら, 1993, J. Am. Chem. Soc., 115, 2529~2531; Nikolaiev, V. ら, 1993, Pept. Res., 6, 161~170; Ohlmeyer, M. H. J. ら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10922~10926) である。

**【0169】**

可溶性のランダムなコンビナトリアルライブラリーを、Furka (Furka, A.ら, 1988, 第10回医薬品化学国際シンポジウム, Budapest, 1988; Furka, A.ら, 1988, 第14回国際生化学会議, Prague, 1988; Furka, A.ら, 1991, Int. J. Peptide Protein Res., 37, 487~493) によって最初に記載されたペプチドの等モル混合物の作製のための簡単な原理を使用して合成することができる。反復性スクリーニングのための可溶性ライブラリーの構築も記載されている (Houghten, R. A.ら, 1991, Nature, 354, 84~86)。K. S. Lamは、不溶性のランダムなコンビナトリアルライブラリーの新規且つ予想外に強力な使用技術を開示した。Lamは、固相支持体上でランダムなコンビナトリアルライブラリーを合成し、その結果、各支持体は均一な分子構造の試験化合物を有し、固相結合プロトコールによる支持体からの試験化合物の事前の除去を行うことなくライブラリーをスクリーニングした (Lam, K. S.ら, 1991, Nature, 354, 82~84)。

10

## 【0170】

したがって、候補分子のライブラリーは、合成コンビナトリアルライブラリー (例えば、コンビナトリアル化合物ライブラリー)、細胞抽出物、体液 (例えば、尿、血液、涙液、汗、または唾液)、または合成産物もしくは天然産物の他の混合物 (例えば、小分子または発酵混合物のライブラリー) であり得る。

## 【0171】

分子のライブラリーには、例えば、アミノ酸、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはペプチドもしくはタンパク質のフラグメント; 核酸 (例えば、アンチセンス; DNA; RNA; またはペプチド核酸、PNA); アプタマー; または炭水化物もしくは多糖類を含み得る。ライブラリーの各メンバーは単独であるか、混合物の一部 (例えば、圧縮ライブラリー (compressed library)) であり得る。ライブラリーは、精製化合物を含み得るか、「汚れて」いてもよい (すなわち、有意な量の夾雑物を含む)。本明細書中に記載の方法と共に市販のライブラリー (例えば、Affymetrix、ArQule、Neose Technologies、Sarco、Ciddco、Oxford Asymmetry、Maybridge、Aldrich、Panlabs、Pharmacopoeia、Sigma、またはTripose) を使用することもできる。

20

## 【0172】

上記のライブラリーに加えて、多様性ファイル (diversity file) と呼ばれる特定のライブラリーを使用して、新規の方法の特異性、信頼性、または再現性を評価することができる。多様性ファイルは、多数の化合物 (例えば、1000またはそれ以上の小分子) (アッセイにおいて潜在的に非特異的に検出することができる多数のクラスの化合物の代表) を含む。多様性ファイルは市販されているか、上記の業者から市販されている各化合物から構築することもできる。

30

## 【0173】

## [候補物質]

適切な候補物質には、特に、実施例に記載のポリペプチド配列に基づいて約5~30個または10~25個のアミノ酸サイズのペプチドまたは1つまたは複数の残基が置換されたこのようなペプチドの変異体が含まれる。ランダムな配列または最大に多様なペプチドパネルを一貫して得るために変化させた配列を含むペプチドパネル由来のペプチドを使用することができる。

40

## 【0174】

適切な候補物質には、ポリペプチドに特異的な抗体産物 (例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、およびCDRグラフティング抗体) も含まれる。さらに、コンビナトリアルライブラリー、ペプチド、ペプチド模倣物、定義された化学物質、オリゴヌクレオチド、および天然物のライブラリーを、細胞分裂周期機構 (例えば、分裂/減数分裂装置 (微小管など)) へのポリペプチド結合のインヒビターとしての活性についてスクリーニングすることができる。候補物質を、例えば、反応あたり1

50

0種の分子のバッチおよび個別に試験した阻害を示すバッチの物質において、最初のスクリーニングで使うことができる。次いで、下記などのインビトロスクリーニングで活性を示す候補物質を、インヒビターに曝露して細胞周期の任意の段階における阻害について試験する哺乳動物細胞などのホールセル系で試験することができる。

【0175】

[ポリペプチド結合アッセイ]

ポリペプチドに結合する物質を同定するための1つのアッセイ型は、固体支持体上に固定したポリペプチドを固定されていない候補物質に接触させるステップと、ポリペプチドおよび候補物質が互いに結合したかどうかおよび/または結合範囲を決定するステップを含む。あるいは、候補物質を固定し、ポリペプチドを固定しないことが可能である。これを使用して、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体に結合することができる物質を検出することができる。

10

【0176】

好ましいアッセイ法では、ポリペプチドをアガロースビーズなどのビーズに固定する。典型的には、細菌、酵母、または高等真核細胞株中のGST-融合タンパク質としてのrSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の発現およびグルタチオン-アガロースビーズを使用した粗細胞抽出物からのGST-融合タンパク質の精製によってこれを行う(Smith and Johnson, 1988)。コントロールとして、固定化ポリペプチドへのGST-融合タンパク質ではない候補物質の結合を、ポリペプチドの非存在下で決定する。次いで、固定化ポリペプチドへの候補物質の結合を決定する。このアッセイ型は、GSTプルダウンアッセイとして当分野で公知である。また、候補物質を固定化し、ポリペプチドを固定化されないようにすることができる。

20

【0177】

1つの成分(例えば、Ni-NTAアガロースおよびヒスチジンタグ化成分)の固定化のための異なる親和性精製系を使用して、このアッセイ型を実施することも可能である。

【0178】

候補物質へのrSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の結合を、当分野で周知の種々の方法によって決定することができる。例えば、固定化されていない成分を、標識することができる(例えば、放射性標識、エピトープタグ、または酵素-抗体複合体を使用)。あるいは、免疫学的検出技術によって結合を決定することができる。例えば、反応混合物をウェスタンブロットティングし、ブロットを固定化されていない成分を検出する抗体で探索することができる。ELISA技術を使用することもできる。

30

【0179】

候補物質を、典型的には、1~1000nmol/ml、より好ましくは1~100nmol/mlの最終濃度まで添加する。抗体の場合、使用最終濃度は、典型的には、100~500μg/ml、より好ましくは200~300μg/mlである。

【0180】

[DNA結合]

核環境から放出した場合、DNAなどの核酸により、周辺組織が炎症を起こし得る。いくつかのDNA結合タンパク質が公知であるが、肺および他の組織からのDNAのクリアランスに関連するタンパク質または受容体は、明確に確立されていない。本発明者らは、SP-Dが細菌、バクテリオファージ、および染色体起源のDNA(および全RNA)に有効に結合することを発見した。

40

【0181】

電子顕微鏡法は、rSPD(n/CRD)の組換えフラグメント(rSPD(n/CRD))が有効にDNAに結合することができることを示す。理論に拘束されることを望まないが、本発明者らは、ヌクレオチド(DNAの基礎単位)は、マンナンとrSPD(n/CRD)への結合を競合することができるかと判断し、これにより、このタンパク質はそ

50

の炭水化物結合活性を解してDNAに結合することができることが示唆される。さらに、この組換えフラグメント中の短いコラーゲン様フラグメントの存在により、DNAに有効に結合するさらなる能力が得られる。さらに、rSPD(n/CRD)は、ヨウ化プロピジウムとアポトーシス細胞上のDNAの結合を競合し、タンパク質がこれらの細胞表面上で見出されるDNAに結合することを示す。表面上のDNA認識は、肺からのアポトーシス細胞の重要なクリアランス様式の1つのようである。

#### 【0182】

SP-Dおよびそのフラグメント(詳細には、rSPD(n/CRD))へのいくつかの適用は、これらの分子のDNA結合性を介して媒介される。例えば、

1) いくつかの疾患(その多くは慢性細菌、菌類、およびウイルス感染に関する)により肺内の遊離核酸が蓄積される。嚢胞性線維症は、このような疾患の1つであり、細胞外遊離DNAを必要とする細菌のバイオフィーム形成後のみに肺内の感染が持続する。天然のSP-DおよびrSPD(n/CRD)は遊離DNAに結合するので、これらのタンパク質はDNAのクリアランスを増強し、バイオフィーム形成を最小にする。rSPD(n/CRD)はまた、多数の肺内微生物をオプソニン化し、潜在的に嚢胞性線維症患者の病原体コロニー形成を減少または排除するように作用する。

2) SP-DおよびrSPD(n/CRD)は、DNAに結合することができる。したがって、アポトーシス細胞および壊死細胞などのその表面上にDNAを含む細胞はまた、SP-DおよびrSPD(n/CRD)によって認識される。これらの事実により、炎症起因細胞がインビボでの食細胞媒介クリアランスについてrSPD(n/CRD)によって認識されるという機械的な説明が得られる。SP-Dおよびそのフラグメントを使用して、COPE、慢性炎症、および慢性喘息などの肺疾患および病態を治療することができる。

3) 壊死細胞およびアポトーシス細胞由来の遊離DNAまたはDNA破片は、自己抗原として作用することができる。したがって、遊離DNA(またはRNA)のクリアランスでは、rSPD(n/CRD)は、自己免疫疾患における自己抗原産生の減少を補助する。

#### 【0183】

##### [炎症性疾患]

用語「炎症」は、損傷に対する生きた組織の反応をいうために本明細書中で使用される。rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、このような疾患を罹患する個体へのrSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の投与によって、炎症(炎症性疾患を含む)を治療することができる。

#### 【0184】

炎症の原因には、物理的損傷、化学物質、微生物、または他の作用因子が含まれる。好ましい実施形態では、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、炎症性疾患を治療するが、これを使用して任意の原因に起因する任意の炎症を治療することができる。

#### 【0185】

炎症反応は、血流の変化、血管透過性の増加、および血液から組織への細胞の脱出からなる。急性炎症は、持続時間が短く、数日間しか持続しない。しかし、持続時間がより長い場合、慢性炎症という。認識することができる急性炎症の種々の例は、咽頭痛、擦過傷または火傷もしくは虫刺されに対する皮膚の反応、および急性肝炎などである。しかし、肺炎などの散発性の歴史的例外(historical exception)、肺炎および胸膜炎よりもむしろ肺の炎症、胸膜炎よりもむしろ胸膜の炎症が存在する。

#### 【0186】

##### 微生物感染

ウイルスは、細胞内増殖によって各細胞を死滅させる。細菌は、特異的外毒素(細菌によって合成される、特異的に炎症を引き起こす化合物)または細胞壁に結合する内毒素を

10

20

30

40

50

放出する。さらに、いくつかの生物は、過敏反応を介した免疫学的に媒介された炎症を引き起こす。寄生虫感染および結核菌感染は、過敏症が重要な例である。

【0187】

過敏反応

免疫学的応答状態の変化により組織に損傷を与える不適切または過剰な免疫反応が引き起こされた場合に過敏反応が起こる。全て炎症に関連するものに類似の細胞または化学的メディエーターを有する。

【0188】

物理的作用因

炎症に対して誘導される組織損傷は、身体外傷、紫外線、または他の電離放射線、火傷、または過剰な冷却（「凍傷」）を介して引き起こされる。 10

【0189】

刺激物および腐食性薬品

腐食性薬品（酸、アルカリ、酸化剤）は、全身的な組織損傷を介して炎症を引き起こす。しかし、感染菌は、直接的に炎症を引き起こす特定の化学的刺激物を放出することができる。

【0190】

炎症は、典型的には、少なくとも1つの以下の特徴を含む。

組織壊死：不適切な血流（梗塞）に起因する酸素および栄養素の欠如由来の組織の死滅は、強力な炎症刺激である。新しい梗塞の端部は急性炎症反応を示す。赤み（紅潮）：急性に炎症を起こした組織は赤くなる（例えば、日焼けに影響を受けた皮膚、細菌感染による蜂巣炎、または急性結膜炎）。これは、損傷領域内の毛細血管の拡張による。熱（熱）：身体の末梢部（皮膚など）のみで温度上昇が認められる。これは、血管が拡張して領域に温血を送達させる領域を介した血流の増加（充血）による。炎症のいくつかの化学的メディエーターに起因する全身性の熱もまた、局所温度に寄与する。腫脹（腫瘍）；腫脹は、浮腫、滲出物の一部としての過剰な血管中の空間中の流動物の蓄積、さらにより狭い範囲では、領域に移動する炎症細胞の物理的質量に起因する。痛み（痛覚）：患者について、痛みは、急性炎症の最も公知の特徴の1つである。これは、炎症性浮腫による組織の拡大および変形、特に、膿瘍の空洞中の圧力下での膿に部分的に起因する。ブラジキニン、プロスタグランジン、およびセロトニンを含む急性炎症のいくつかの化学的メディエーターは、痛みを誘導することが知られている。機能不全：炎症領域の移動は、痛みによって故意且つ反射的に阻害され、重篤な浮腫は組織を物理的に固定化することができる。 20 30

【0191】

したがって、本発明者らは、炎症または炎症性疾患を罹患した固体への rSPD (n / CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の投与による、上記の症状を含む炎症の症状の緩和を提供する。

【0192】

[炎症性肺疾患]

非常に好ましい実施形態では、rSPD (n / CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、炎症性肺疾患を治療する。 40

【0193】

本明細書中で使用される、用語「炎症性肺疾患」は、肺、肺の任意の部分、または気道、気管などの関連系の炎症を含む任意の疾患または病態を意味するために使用すべきである。炎症性肺疾患は急性または慢性であってよく、いくつかの他の疾患または症候群の結果またはこれらに伴って発症し得る。好ましい実施形態では、炎症性肺疾患は、慢性炎症性肺疾患を含む。

【0194】

炎症性肺疾患の例には、新生児慢性肺疾患、新生児呼吸窮迫症候群 (RDS)、成人呼吸窮迫症候群、慢性閉塞性気道疾患 (COPD)、喘息、嚢胞性線維症、肺線維症、気腫、間質性炎症性肺疾患、サルコイドーシス、肺炎、慢性炎症性肺疾患、新生児慢性炎症性 50

肺疾患が含まれる。

【0195】

個体への rSPD (n/CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の投与によってこのような疾患を罹患した個体を治療するか、その症状を緩和することができる。好ましくは、このような治療により、肺胞マクロファージ、好ましくはアポトーシス肺胞マクロファージがクリアランスされる。治療により、壊死マクロファージもさらにまたは代わりにクリアランスすることができる。下記のアッセイによって壊死およびアポトーシス細胞を検出および区別することができる。

【0196】

[ 新生児慢性肺疾患 ]

新生児慢性肺疾患は、早産後の再発性炎症および感染に関連する多因子病態である。早産、換気、新生児期の再発性感染症、サーファクタント欠損、および新生児期の炎症マーカーの増加（気管吸引サンプル中の肺胞マクロファージ数を含む）を含む、慢性肺疾患の発症リスクを増大させる多数の因子が存在する。早産児は、SP-Dを含むサーファクタントタンパク質の欠損が公知である。

【0197】

ヒト新生児慢性肺疾患は、典型的には早産後、長期間の補助換気後の炎症性損傷および酸化ストレスから発症する。新生児呼吸窮迫症候群治療のための人工サーファクタント補充療法の出現以来、早産後の生存率は劇的に増加したが、妊娠28週未満での出生後に生存した乳児の40%までが慢性炎症性肺疾患を発症する。現在のサーファクタント補充ストラテジーは、サーファクタントタンパク質Dを含まない。この背景での肺損傷は、活性化肺胞マクロファージによって媒介される。SP-D欠損マウスは、多数の活性化肺胞マクロファージの存在によって特徴づけられる肺内のマクロファージ媒介炎症モデルを提供する。

【0198】

本発明者らは、実施例で、SP-D欠損マウスへの rSP-D (N/CRD) の鼻腔内投与によって、活性化マクロファージ数の減少およびその表現型の変化による肺の炎症プロセスを調整されることを証明する。この結果は、rSP-D (n/CRD) の強力な抗炎症性を証明し、rSP-D (N/CRD) の直接投与または現在のサーファクタント療法の製剤への rSP-D (N/CRD) の含有によって、新生児の慢性炎症性肺疾患の予防における rSP-D (N/CRD) の直接的臨床適用を示す。rSPD (n/CRD) をコードする核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、および誘導体を使用することもできる。気腫を発症する慢性肺炎症（例えば、天然のSP-Dレベルの不十分な喫煙者）を、rSP-D (N/CRD) の投与によって治療することも可能である。

【0199】

したがって、本発明者らは、rSPD (n/CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の投与による新生児慢性肺疾患またはこのような疾患の任意の症状の治療を提供する。

【0200】

[ サーファクタント補充療法 ]

本節は、本明細書中に開示の rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を適切に使用するサーファクタント補充療法を記載する。特に、rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を、新生児のサーファクタント補充療法に使用することができる。

【0201】

サーファクタント補充療法は、Respir Care, 1994, 39(8), 824~829に記載されており、本節はこれに由来する。サーファクタント補充療法のガイダンス（例えば、AARC臨床的治療法ガイドライン）が発行されている。臨床医は、このようなガイダンスにしたがって、サーファクタント補充療法プログラムの一部として、

10

20

30

40

50

rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を投与することができる。

#### 【0202】

天然の内因性サーファクタントは、肺胞表面と肺胞気との間に層を形成し、肺胞内の表面張力の減少によって肺胞虚脱を軽減する(3~5)、リン脂質、中性脂質、およびタンパク質(1~5)から構成される化合物である。サーファクタント欠損症は、そのほとんどが未熟な肺の硝子膜の形成および呼吸窮迫症候群(RDS)(未熟児の罹患および死亡の主な原因)の発症に関連する(3)。サーファクタントがない場合、肺胞は決して膨張することができないか、呼気時に虚脱し得るので、吸気時の再拡大に法外な力が必要となり、RDSを発症する(3、5)。RDSの罹患率は、在胎齢よりも肺の未熟さに関連する(6)。しかし、一般に、より未熟な乳児ほどサーファクタント産生が低く、RDSの可能性が増大する(4、6)。サーファクタントの直接気管内点滴注入により、RDS乳児の死亡率および罹患率が減少することが示されている(7~25)。

10

#### 【0203】

サーファクタントを、動物の肺洗浄物およびヒト羊水から抽出するか、合成物質から生成することができる。本明細書中に記載の方法および組成物によれば、特に新生児のサーファクタント補充療法にrSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用することができる。rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を、単独または公知のサーファクタント補充療法と組み合わせて使用することができる。

20

#### 【0204】

以下の2つの基本的なサーファクタント補充ストラテジーが明らかとなっている。(1) RDS発症リスクの高い乳児の出生時または出生直後にサーファクタントを投与する予防治療および(2) RDSが臨床的に確認された乳児における機械換気開始後にサーファクタントを投与する救助または治療の執行(2、10~12、26、27)。

#### 【0205】

サーファクタント補充療法を、典型的には、分娩室または新生児集中治療室で訓練された人材によって施す。

#### 【0206】

サーファクタント補充療法の適応

30

(4.1)(4.1.1) 肺の未熟が強く示唆される、短い妊娠期間(32週未満)(8、10~12、21、25~29)または低出生時体重(1,300g未満)(21~25、28)のためにRDS発症リスクが高い乳児、(4.1.2) レシチン/スフィンゴミエリン比が2:1未満(11、14、28、30、31)、肺未熟を示すバブル安定試験(15、32)、またはホスファチジルグリセロールの非存在(11、14、22~24、28、30)などのサーファクタント欠損の実験的証拠が存在する乳児に予防的投与を指示することができる。(4.2)(4.2.1)(4.2.1.1) 呼吸数の増加、胸骨下および胸骨上の退縮、グランティング、および鼻発赤(8、11、14~16、29、33~35)(4.2.1.2) 青白い皮膚の色、動揺、および0を超えるFIO<sub>2</sub>の増加を指示するPaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>、またはSpO<sub>2</sub>の減少(4011、12、15、26、33、36~38)によって示される酸素の必要性の増加のために気管内挿管および機械換気が必要であり、(4.2.2)(4.2.2.1) RDSに特徴的な胸部X線写真(8、11~16、33、34、36、37、40~42)、(4.2.2.2) 適切なPaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>、またはSpO<sub>2</sub>を維持するための7cm H<sub>2</sub>Oを超える気道内圧(11、14、15、26、43)を含むRDSの臨床的証拠(13、39)を有する早産または満期産の乳児に救助または治療の執行を指示する。

40

#### 【0207】

禁忌

以下の病態へのサーファクタント補充療法を禁忌する。(5.1) 新生児期を超えた生存に不適合な先天性奇形の存在(8、14、15、26、28、29、31、33、36

50

、41、44)、(5.2)肺未熟と実験で証明された乳児の呼吸窮迫(9、14、27~29、33、36、41)。

#### 【0208】

サーファクタント補充療法から生じる危険性および厄介な問題には以下が含まれる。(6.1)サーファクタント投与に起因する手順の複雑さには、(6.1.1)サーファクタントによる気管内チューブ(ETT)の挿入(2);(6.1.2)ヘモグロビン脱飽和および追加O<sub>2</sub>の必要性の増加(11、33、41);(6.1.3)低酸素症による徐脈(9、33、41、45);(6.1.4)ETTへのサーファクタントの逆流にともなう動揺による徐脈(34、41);(6.1.5)サーファクタントの咽頭沈着;(6.1.6)一方の肺のみへのサーファクタントの投与;(6.1.7)再構成における計算ミスまたはエラーに対する最適下限用量の二次的投与が含まれる。(6.2)サーファクタント補充療法の生理学的に厄介な問題には、(6.2.1)無呼吸(7、13、15);(6.2.2)肺出血(12、15、18、32、34、38、46、47);(6.2.3)粘液栓(48);(6.2.4)PDA治療の必要性の増大(18、29、30);(6.2.5)未熟児の網膜症の限界的増加(11);(6.2.6)サーファクタント補充後の肺コンプライアンスの増加およびそれによる人工呼吸器の設置の変化の失敗に起因する気圧障害(30、49)が含まれる。

10

#### 【0209】

RDSを発症していない数人の乳児にサーファクタントを予防的に投与することができる(10、12、26、33)。分娩室でサーファクタントを予防的に投与した場合、ETTの配置がX線写真によって確認することができず、その結果、肺の一方のみまたは胃へ不注意に投与された(26)。サーファクタントの予防投与は、患者の安定化を遅延し得る(26)。治療投与前にアテレクターゼおよび肺損傷が起こり得る(26、33)。サーファクタント投与後は気管吸引を回避すべきである(9、11、13、14、27、33、38、44、50)。サーファクタントの単回投与で処置した全ての乳児が正の反応を示すわけでも(39)、反応が一過性であるわけでもない。サーファクタント投与に推奨される位置決めにより、乳児をさらに不安定にし得る(9、11、12、14、16、28、33、38~40)。

20

#### 【0210】

臨床医は、適応が妥当であるかを決定するために必要な評価を行うことができる。典型的には、これのために以下を行う。(8.1)妊娠期間および出生時体重ならびに/または気管もしくは胃の吸引の実験評価によるサーファクタントの予防的投与前の肺未成熟の評価、(8.2)胸部X線写真の基準および短期の妊娠および/または低出生時体重における機械換気要件によるRDS診断の確立。

30

#### 【0211】

以下に従って結果を評価する。(9.1)FIO<sub>2</sub>要件の減少(12、33、34、36~39、41、44)、(9.2)呼吸の減少(51)、(9.3)胸部X線写真によって示された肺容量および肺野の改善(13、16、33、40)、(9.4)肺機構(例えば、コンプライアンス、気道耐性、VT、VE、経肺圧)および肺容量(すなわち、FRC)の改善(42、43、50、52~59)、(9.5)換気要件(PiP、PEEP、Paw)の減少(2、8、9、12、13、27、30、33、36~39、41、44、50、52)、(9.6)動脈:肺泡PO<sub>2</sub>比(a/A PO<sub>2</sub>)の改善、酸素指数(13、16、28、30、33、34、37~41、44)。

40

#### 【0212】

##### 供給源

サーファクタントの特定の調製物で推奨される投与手順は、以下に従うべきである。(10.1)装置(10~14、16、26~28、33、34、39、40、50、60)((10.1.1)投与装置((10.1.1.1)室温に加温した一定用量のサーファクタントを含むシリンジ(11、12、16、38、40)、(10.1.1.2)送達ポートに接続した5-Fr栄養管またはカテーテルまたは気管内チューブ、(10.1

50

． 1． 3 ) 機械人工呼吸器または手動人工呼吸器 ( 蘇生バッグ ) ( 8、 16、 33、 36、 38 ~ 40、 44、 50、 52 ) )、 ( 10． 1． 2 ) 蘇生装置 ( ( 10． 1． 2． 1 ) 咽頭鏡および気管内チューブ ( 10 ~ 12、 14、 16、 26、 38 )、 ( 10． 1． 2． 2 ) 手動蘇生バッグ ( 9 ~ 12、 16、 26 ~ 28、 36、 39、 40、 50 )、 および気道マノメーター、 ( 10． 1． 2． 3 ) ブレンドした酸素供給源 ( 9、 16、 28、 44 )、 ( 10． 1． 2． 4 ) 吸引装置 ( すなわち、 カテーテル、 滅菌グローブ、 回収ボトル、 およびチューピング、 真空発生装置 ) ( 9、 33、 50、 60 )、 ( 10． 1． 2． 5 ) 完成品の放射熱ウォーマー )、 ( 10． 1． 3 ) モニタリング装置 ( ( 10． 1． 3． 1 ) 利用可能な場合の 1 回換気量のモニター ( 50 ) )、 ( 10． 1． 3． 2 ) 気道圧モニター、 ( 10． 1． 3． 3 ) パルス酸素濃度計または経皮 P C O 2 モニター ( 10． 1、 26、 34、 39 ~ 41、 52 )、 ( 10． 1． 3． 4 ) 心臓性呼吸モニター )、 ( 10． 2 ) 人材。 サーファクタント補充療法を医師の指示の下で、 以下を的確に証明する認定された人材 ( 例えば、 C R T T、 R R T、 R N ) によって行われるべきである。 ( 10． 2． 1 ) サーファクタント補充療法の装置および技術的知識を適切に使用、 理解、 および精通している者、 ( 10． 2． 2 ) 新生児人工呼吸器管理ならびに肺解剖学および病態生理学の包括的知識および理解を有する者、 ( 10． 2． 3 ) 副作用および / または手順の厄介な問題を認識して対応する能力を含む、 新生児患児評価スキルを有する者、 ( 10． 2． 4 ) 患者の病歴および臨床症状の知識および理解を有する者、 ( 10． 2． 5 ) 気道管理の知識および理解を有する者、 ( 10． 2． 6 ) モニターおよび測定された血液ガスの変化および生命徴候を解釈する能力を有する者、 ( 10． 2． 7 ) 救急蘇生装置および手順を適切に使用、 理解、 および精通している者、 ( 10． 2． 8 ) 結果を評価および報告する能力を有する者 ( 第 9． 0 節 )、 ( 10． 2． 9 ) 普遍的予防手段を理解し、 適切に適用する者。

#### 【 0 2 1 3 】

##### モニタリング

サーファクタント補充療法の一部として、 以下をモニターすべきである。 ( 11． 1 ) サーファクタント投与時にモニターすべき変数 ( ( 11． 1． 1 ) 送達デバイスの適切な位置付けおよび位置、 ( 11． 1． 2 ) F I O 2 および人工呼吸器の設定 ( 8、 9、 11、 13 ~ 15、 27 ~ 29、 33、 36、 38、 44 )、 ( 11． 1． 3 ) E T T へのサーファクタントの逆流 ( 34、 41 )、 ( 11． 1． 4 ) 患者の位置 ( すなわち、 頭部の方向 ) ( 9、 11、 13 )、 ( 11． 1． 5 ) 胸壁の動き ( 61 )、 ( 11． 1． 6 ) パルス酸素濃度計による酸素飽和 ( 11、 26、 34、 39 ~ 41、 52 )、 ( 11． 1． 7 ) 心拍数、 呼吸、 胸部拡張、 皮膚の色、 および活力 ( 16、 26、 27、 34、 41、 45、 52 ) )、 ( 11． 2 ) サーファクタント投与後にモニターすべき変数 ( ( 11． 2． 1 ) 動脈血液ガスの侵襲性および非侵襲性の測定 ( 8、 9、 11、 12 ~ 16、 26 ~ 29、 33、 36、 38、 39、 41、 44 )、 ( 11． 2． 2 ) 胸部 X 線写真 ( 11 ~ 16、 28、 36、 38 ~ 40、 44 )、 ( 11． 2． 3 ) 人工呼吸器の設定 ( P I P、 P E E P、 P a w ) および F I O 2 ( 8、 9、 11、 13 ~ 16、 28、 29、 33、 36、 38 )、 ( 11． 2． 4 ) 肺の機構および容量、 ( 11． 2． 5 ) 心拍数、 呼吸、 胸部拡張、 皮膚の色、 および活力 ( 16、 26、 27、 34、 41、 45、 52 )、 ( 11． 2． 6 ) 呼吸音 ( 11、 38 )、 ( 11． 2． 7 ) 血圧 ( 3、 16、 33、 40、 44、 45 ) ) )。

#### 【 0 2 1 4 】

##### 頻度

サーファクタントの反復投与は、 R D S の連続診断を条件とする。 サーファクタント補充を行う頻度は、 患者の臨床状態および手順実施の指示に依存すべきである。 6 ~ 24 時間間隔でのサーファクタントのさらなる投与を、 人工呼吸器の必要性が増し、 最初の投与後にその病態を改善できない乳児に指示することができる ( 7、 9、 11、 12、 14、 15、 26、 30、 34、 37、 39、 52 )。

#### 【 0 2 1 5 】

## 感染予防

(13.1) 普遍的な予防手段(62)を実施すべきである。(13.2) 無菌法を実施すべきである。(13.3) 患者のための適切な感染予防ガイドンスを入手してそれに従うべきである。

### 【0216】

#### [ 嚢胞性線維症 ]

本発明者らは、rSPD(n/CRD)ポリペプチドが肺胞マクロファージ数を減少させることができることを実施例に示す。したがって、肺胞マクロファージが炎症プロセスで役割を果たす肺疾患(例えば、嚢胞性線維症、喘息、および気腫)にrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、もしくは誘導体を投与することができる。rSPD(n/CRD)はまた、他の部位でのマクロファージ媒介炎症プロセス(例えば、アテローム性動脈硬化症)で治療特性を有する。

10

### 【0217】

嚢胞性線維症は、小児および成人のほぼ両方で罹患する遺伝病である。

### 【0218】

嚢胞性線維症により、肺および膵臓などの器官の管壁細胞内からその外面へのナトリウムおよび塩化物(塩)の誤った輸送により身体に異常に多量の粘液が産生される。多量の嚢胞性線維症粘液はまた、膵臓を妨害し、食物の分解および消化を補助するための腸への酵素の到達を妨害する。

### 【0219】

嚢胞性線維症は、種々の症状を有する。最も一般的には、非常に塩辛い皮膚; 持続的な咳、喘鳴、または肺炎; 食欲は過剰であるが体重増加は軽微であること; および大量の排泄物である。汗試験は、汗中の塩分を測定する嚢胞性線維症の標準的な診断試験である。高塩レベルは、患者が嚢胞性線維症であることを示す。

20

### 【0220】

嚢胞性線維症治療は、疾患の段階および関連する器官に依存する。1つの治療手段である胸部理学療法は、肺由来の多量の粘液を除去するための背中および胸部の(カップ状にした手による)積極的な軽打按摩を必要とする。抗生物質を使用して、肺感染症を治療し、これを静脈内、丸薬、および/または詰まった気道を開けるために吸入するための薬剤混入蒸気で投与する。嚢胞性線維症が消化系に影響を与える場合、身体は十分な栄養分を吸収しない。したがって、嚢胞性線維症患者は、栄養価を高めた食事を摂取し、代替ビタミンおよび酵素の両方を摂取する必要がある。

30

### 【0221】

本明細書中に記載の方法および組成物によれば、嚢胞性線維症患者の症状を、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の投与によって緩和する。嚢胞性線維症の症状には、好ましくは、上記の任意の症状が含まれる。好ましくは、嚢胞性線維症患者を、このようなポリペプチド、ホモログ、フラグメント、または誘導体の投与によって治療する。

### 【0222】

#### [ アレルギー ]

既存のアレルギー治療は、典型的には、免疫系を弱めるためのステロイドの長期使用を含む。長期ステロイド治療には、望ましくない副作用が存在する。本発明者らは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、アレルギーの症状を緩和するかアレルギーを治療することができることを証明する。

40

### 【0223】

rSPD(n/CRD)での治療では、マウスでは病的影響は認められないようであり、ヒトでは望ましくない副作用は認められないようである。rSPD(n/CRD)での短期治療単位により、根本的なアレルギー感作を逆転して有効な免疫療法を得ることができる。これは、典型的に何年にもわたる一連のアレルゲン注射を含む既存の感作免疫治療

50

プロトコールを有意に改良する。

【0224】

rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体での治療に適切なアレルギーには、季節性呼吸器アレルギー、アレルギー性鼻炎、花粉症、非アレルギー性鼻炎、血管運動神経性鼻炎、刺激性鼻炎、草の花粉、木の花、または動物の鱗屑に対するアレルギー、アレルギー性喘息に関連するアレルギー、および食品アレルギーが含まれる。特に、本明細書中に記載のように、rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、イエダニ(ヒョウヒダニ属)、好ましくはヤケヒョウヒダニまたはコナヒョウヒダニ、または菌類もしくは菌類胞子、好ましくはアスペルギルス・フミガーツスに対するアレルギーを治療することができる。好ましくは、アレルギーは、ヒョウヒダニ属の排泄物から構成される。

10

【0225】

[喘息]

喘息は、気管支の気道閉塞の発作によって特徴づけられる呼吸器疾患である。この閉塞によって引き起こされる症状には、咳、胸苦しさ、喘鳴、および息切れが含まれる。問題はしばしば無症状器官によって分けられるが、喘息は慢性疾患である。

【0226】

広範な種々の「要因」により、喘息が誘発され得る。最も一般的な要因は、アレルギー、アスピリン、およびタルトラジン、刺激物、食品添加物および防腐剤、ウイルスの呼吸器感染、ならびに身体活動である。

20

【0227】

アレルギーは、感受性個体がアレルギーを引き起こし得る物質である。これらは、小児および成人における問題の主な原因である。一般的なアレルギーには、植物の花粉(木、草、および雑草)、動物の鱗屑、イエダニ類、カビ、および一定の食品が含まれる。アレルギー個体がこれらのアレルギーの1つに接触した場合、一連の事象により、一定の化学物質類(メディエーター)が身体に放出され、喘息を誘発する。

【0228】

喘息患者の10~20%が、アスピリンの摂取後に有意な肺機能の低下を経験し、非ステロイド系抗炎症薬と呼ばれる薬物の関連群およびタルトラジン(食用色素の黄色5号)で類似の反応が起こり得る。冷気、煙、工業用化学薬品、香水、塗料、およびガソリンの臭気は、全ておそらく気道での刺激物受容体の刺激によって喘息を引き起こし得る刺激物の例である。これらの受容体は、その後、気道周囲の筋肉を収縮させて喘息発作を起こす。稀に、亜硫酸塩などの食品添加物が喘息を誘発し得る。ウイルスの呼吸器感染は、急性喘息発作の主な原因である。

30

【0229】

喘息発作時に、一定の誘発物に反応して喘息患者の過剰反応した気管支が狭まる。発作時に、気管支周囲の筋肉が収縮し、気道を狭める。気道上皮が炎症も起こし、腫れてさらに気道サイズが減少する。さらに、気道内部の粘膜腺から過剰な粘液が生成されて、既に狭まった気道に蓄積する。最終的な結果として、呼吸、特に呼気が非常に困難になる。狭まった気道の後ろに空気が捕捉され、身体が利用可能な酸素が減少する。

40

【0230】

気管支拡張薬は、喘息治療に最も一般的に処方されている薬物である。これらは、気道周囲の筋肉を弛緩させて、気管支を拡張させる。気管支拡張薬を、吸入、経口、または注射で投与することができる。例えば、口腔を介した運動中に吸入した乾いた冷気によっても喘息を発症し得る。

【0231】

喘息症状の治療で使用されている現在の薬物には、持続性テオフィリン、吸入もしくは経口 アゴニスト(クロモリン)、または吸入もしくは経口ステロイドが含まれる。アレルギー性喘息患者のために、免疫療法(アレルギー注射)により、回避できないアレルギー

50

ンを軽減することができる。免疫療法により、喘息症状を促す患者のアレルゲンへの耐性が増大される。

【0232】

[アレルギー性喘息]

喘息を、アレルゲンへの曝露によって誘発することもできる(「アレルギー性喘息」)

アレルギー性喘息は、アレルゲン刺激に反応して初期および後期過敏反応を引き起こす気道過敏症(AHR)期によって特徴付けられる。初期反応は、ヒスタミンおよび他の気管支収縮薬の放出と共に気道肥満細胞の脱顆粒によって媒介される。後期の反応は、好酸球およびリンパ球などの炎症細胞の流入後に開始され、その後炎症メディエーターおよびサイトカインが放出され、慢性AHRを発症する。

10

【0233】

イエダニは、アレルギー性喘息の主な原因の1つである(Platts-Mills, T. A. and M. D. Chapman, 1987, 「チリダニ類:免疫学、アレルギー性疾患、および環境制御」, J. Allergy Clin. Immunol., 80, 755~75; Platts-Mills, T. A., E. B. Mitchell, M. D. Chapman, and P. W. Heymann, 1987, 「チリダニアレルギー;その臨床的有意性」, Hops Pract (Off Ed), 22, 91~3, 97~100; Pollart, S. M., M. D. Chapman, and T. A. Platts-Mills, 1987, 「ハウスダスト感受性および環境制御」, Prim Care, 14, 591~603)。

20

【0234】

例えば、本明細書中に記載のrSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、アレルギー性喘息を治療することができる。好ましくは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、イエダニに起因するアレルギーまたはアレルギー性喘息を治療する。

【0235】

イエダニは、ヒョウヒダニ属の任意の生物をいう。好ましくは、ヒョウヒダニ属生物は、ヤケヒョウヒダニまたはコナヒョウヒダニである。アレルギー性喘息はまた、個体への菌類または菌類孢子への曝露の結果として発症することができ、本明細書中に記載の方法および組成物には、アスペルギルス・フミガーツス抗原に対するアレルギーを含むこのような喘息またはアレルギーの治療が含まれる。

30

【0236】

[肺気腫および慢性閉塞性肺疾患]

特定の実施形態では、例えば、本明細書中に記載のrSPD(n/CRD)ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、肺気腫または慢性閉塞性肺疾患を治療する。

【0237】

気腫は、満身に治療されない大きな公衆衛生上の問題である。タバコの煙は、インビトロ(Aoshiba, K., Tamaoki, J. and Nagai, A., 2001, 「急性のタバコの煙への曝露により、肺胞マクロファージのアポトーシスが誘導される」, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 281, L1392)およびインビボ(Aoshibaら、前出)で、肺胞マクロファージアポトーシスを誘導し、Majoraらは、最近、喫煙者由来の肺組織サンプルのアポトーシスは、気腫を有する喫煙者で急速に増加する喫煙量との双一次関係を示すことを報告しており、アポトーシスが気腫を発症する肺破壊機構の1つであり得ると結論付けている(Majo, J., Ghezzeo, H., and Cosio, M. G., 2001, 「喫煙者の肺におけるリンパ球の産生およびアポトーシスならびに気腫とのその関係」, Eur. Respir. J., 17, 946)。本発明者らは、喫煙者でSP-Dが欠損している

40

50

ことおよびこれによりアポトーシスが促進され、この患者群で気腫に寄与することを提案する。本発明者らは、SP-D欠損マウスへのrSPD(N/CRD)の投与によりアポトーシス細胞数が減少するので、ヒトにおけるrSPD(N/CRD)治療により喫煙によって誘発される気腫に寄与する機構を阻害することができることを証明する。

【0238】

[サイトカイン]

さらなる実施形態では、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、個体のサイトカインレベルを調整する。好ましくは、炎症性サイトカインがダウンレギュレーションされる。炎症性サイトカインの例には、顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)および肺への肺胞マクロファージの移動を媒介して細胞増殖を増加させるように作用する任意のサイトカインが含まれる。

10

【0239】

rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の投与によるGM-CSFレベルの調整を、実施例9に示す(図14)。

【0240】

用語「サイトカイン」を、免疫応答を調節するための特異的受容体を介して非酵素的に作用する免疫系細胞によって放出される任意の多数の可溶性分子(例えば、糖タンパク質)をいうために使用することができる。サイトカインは、低濃度で作用して特異的受容体と高親和性で結合するという点でホルモンに類似する。好ましくは、用語「サイトカイン」は、ナノモル濃度からピコモル濃度で体液性レギュレーターとして作用し、正常または病理学的条件下で各細胞および組織の機能的活性を調整する多様な可溶性タンパク質およびペプチド群をいう。

20

【0241】

本発明に記載の方法および組成物での使用に適切なサイトカインの特定の例には、インターロイキン、リンホカイン、インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、および顆粒-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)などのコロニー刺激因子(CSF)、GSF、血小板活性化因子(PAF)、腫瘍壊死因子(TNF)が含まれる。

【0242】

したがって、IL1、IL2、およびIL4などのインターロイキンならびにIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、およびIFN- $\gamma$ などのインターフェロンが含まれる。腫瘍壊死因子TNF(カシエチン(cachetin))、TNF- $\alpha$ (リンホトキシン)を、適切に使用することもできる。

30

【0243】

好ましいサイトカインは、免疫応答(例えば、樹状細胞または細胞傷害性T細胞活性の刺激)を補強することができるか、マクロファージを標的部位に補強することができるものである。非常に好ましい実施形態では、サイトカインは、IL-2、GM-CSF、またはGSFを含む。

【0244】

[アポトーシス]

本明細書中に記載の方法および組成物によれば、個体へのrSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の投与により、肺胞マクロファージ数、特にアポトーシス肺胞マクロファージ数、もしくは壊死肺胞マクロファージ数またはその両方を減少させることができる。特定の理論には拘束されることを意図しないが、本発明者らは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体は、個体の身体のアポトーシスおよび/または壊死マクロファージのクリアランスの増強によってこれを達成すると予想する。

40

【0245】

好ましくは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモロ

50

グ、変異体、または誘導体での処置により、アポトーシスおよび/または壊死マクロファージの少なくとも10%を超えるクリアランス、好ましくは、少なくとも20%超がクリアランスされる。より好ましくは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体での処置により、アポトーシスおよび/または壊死マクロファージの少なくとも40%、60%、80%、またはそれ以上がクリアランスされる。

【0246】

2つの個別の機構(壊死またはアポトーシス)のいずれかによって細胞死が起こり得る。さらに、一定の化合物および細胞が、細胞に細胞傷害性を示す、すなわち、その細胞死を招くといわれている。

10

【0247】

「壊死」(「偶発的」細胞死ともいわれる)は、細胞が重篤な物理的または化学的損傷に曝された場合に起こる病理学的プロセスをいう。細胞が原形質膜に損傷を与え得る生理学的条件(例えば、低体温症、低酸素症)由来の極端な変化に曝された場合に壊死が起こる。生理学的条件下で、原形質膜への直接的損傷は、補体および溶菌ウイルスのような作用因子によって誘発される。壊死は、水および細胞外イオンが流入する細胞のホメオスタシスの維持能力の欠陥から開始される。細胞内オルガネラ(最も顕著には、ミトコンドリア)および細胞全体が膨張して破裂する(細胞融解)。原形質膜の決定的な破壊により、リソソーム酵素を含む細胞質の内容物が、細胞外液に放出される。したがって、インビボでは、壊死性細胞死は、しばしば強い炎症反応を起こす広範な組織損傷に関連する。

20

【0248】

「アポトーシス」(「通常の」または「プログラムされた」細胞死)は、発達および他の正常な生物学的プロセスの間に望ましくないか、または無用の細胞を除去する生理学的プロセスをいう。アポトーシスは、正常な生理学的条件下で起こす細胞死様式であり、細胞は、細胞自体の死(「細胞自殺」)に積極的に関与する。これは、正常な細胞の代謝回転および組織ホメオスタシス、胚形成、免疫寛容の誘導および維持、神経系の発達、および内分泌腺依存性組織萎縮時に最も頻繁に認められる。アポトーシスを受けた細胞は、特徴的な形態学および生化学的特徴を示す。これらの特徴には、クロマチン凝集、核および細胞質の濃縮、リボゾーム、形態学的にインタクトなミトコンドリア、および核物質を含む膜結合小胞(アポトーシス体)への細胞質および核の分配が含まれる。インビボでは、これらのアポトーシス体は容易に認識され、マクロファージまたは隣接する上皮細胞のいずれかによって食菌される。この有効なインビボでのアポトーシス細胞の除去機構により、炎症反応は誘発されない。インビトロでは、アポトーシス体および残存する細胞フラグメントは、最終的に膨張して最後に溶解する。インビトロ細胞死のこの終末過程は、「二次的壊死」と呼ばれている。

30

【0249】

表1は、壊死およびアポトーシスの間の、種々の観察可能な相違をまとめている。細胞死がアポトーシスまたは壊死のいずれかによって起こったかを決定するために、任意のこれらの相違(単独または組み合わせ)をアッセイすることができる。

【0250】

40

## 【表 2】

表 1 : 壊死およびアポトーシスの異なる特徴および意義

	壊死	アポトーシス	
形態学的特徴	<p>膜の完全性の喪失</p> <p>細胞質およびミトコンドリアの膨張から開始される</p> <p>全細胞の溶解で終了する</p> <p>小胞形成せず、完全に溶解する</p> <p>オルガネラの分解 (膨張)</p>	<p>膜に気泡が認められるが、完全性は喪失していない</p> <p>核膜でのクロマチンの凝集</p> <p>細胞質の収縮および核の濃縮から開始される</p> <p>細胞のより小さな物質への断片化で終了する</p> <p>膜結合小胞 (アポトーシス体) の形成</p> <p>bcl-2ファミリータンパク質を含む空隙の形成によってミトコンドリアが漏出しやすくなる</p>	10
生化学的特徴	<p>イオンホメオスタシス制御の喪失</p> <p>エネルギーが不要 (受動的プロセス、4℃でも起こる)</p> <p>DNAのランダムな消化 (アガロースゲル電気泳動後のDNAのスミア)</p> <p>溶解後のDNA断片化 (=細胞死の後期事象)</p>	<p>活性化ステップおよび酵素ステップを含む厳格に制御されたプロセス</p> <p>エネルギー (ATP) 依存性 (能動的プロセス、4℃で起こらない)</p> <p>DNAのランダムでないモノヌクレオソーム長およびオリゴヌクレオソーム長の断片化 (アガロースゲル電気泳動後のラダーパターン)</p> <p>溶解前のDNA断片化、ミトコンドリアによる細胞質への種々の因子 (シトクロムC、AIF) の放出</p> <p>カスパーゼカスケードの活性化</p> <p>膜非対称性 (asymmetry) の変化 (すなわち、細胞質から膜の細胞外へのホスファチジルセリンの翻訳)</p>	20
生理学的意義	<p>隣接した細胞群が影響を受ける</p> <p>非生理学的障害 (補体攻撃、溶解ウイルス、低体温症、低酸素症、虚血、代謝毒素) によって誘発される</p> <p>マクロファージによる食食細胞</p> <p>有意な炎症反応</p>	<p>各細胞が影響を受ける</p> <p>生理学的刺激 (成長因子の欠如、ホルモン環境の変化) によって誘導される</p> <p>隣接細胞またはマクロファージによる食食作用</p> <p>炎症反応なし</p>	30

## 【0251】

アポトーシスおよびアポトーシスによる細胞死についての種々の測定アッセイを詳細に記載している以下の文献を参照のこと。Schwartzman, R. A. and Cidlowski, J. A., 1993, *Endocrine Rev.*, 14, 133; Vermes, I. and Haanan, C., 1994, *Adv. Clin. Chem.*, 31, 177; Berke, G., 1991, *Immunol. Today* 12, 396; Kraehenbuehl, O. and Tschopp, J., 1991, *Immunol. Today*, 12, 399; Van Furth, R. and Van Zwet, T. L., 1988, *J. Immunol. Methods* 108, 45; Cohen, J. J., 1993, *Apoptosis. Immunol. Today* 14, 126; Savill, J. S. 5, 1989, *J. Clin. Invest.*, 83, 865; Wyllie, A. H., 1980, *Nature*, 284, 555; Leist, M. 5, 1994, *Biochemica*, 第3号, 18~20; Fraser, A. and Evan, G., 1996, *Cell*, 85, 781~784; Duk 50

e, R. C., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 6361; Duke, R. C. & Cohen, J. J., 1986, Lymphokine Res., 5, 289; Trauth, B. C. & 1994, Eur. J. Cell Biol., 63, 32, 増補40; Matzinger, P., 1991, J. Immunol. Methods, 145, 185; Kaeck, M. R., 1993, Anal. Biochem., 208, 393; Prigent, P. & 1993, J. Immunol.; Methods, 160, 139; Huang, P. & Plunkett, W., 1992, Anal. Biochem., 207, 163; Bortner, C. D. & 1995, Trends Cell Biol., 5, 21; Gold, R. & 1994, Lab. Invest., 71, 219.

10

## 【0252】

アポトーシスおよび細胞媒介細胞傷害性は、膜分解前のゲノムDNAの個別のフラグメントへの切断によって特徴づけられる。したがって、アポトーシスを、例えば、DNAラダーの存在の観察によるDNA断片化の測定によってアッセイすることができる。DNAフラグメントを、例えば、細胞集団由来の「ラダー」(ラダーの「段」としての180bpの複合物)として、または例えばELISAによるヒストン複合体化DNAフラグメントの定量化によってアッセイすることができる。このようなアッセイは、ヌクレオソーム検出のためのワンステップサンドイッチ免疫アッセイに依存する。手順は、遠心分離による細胞のペレット化および上清(インキュベーション中に膜から漏れた壊死細胞由来のDNAを含む)の破棄を含む。細胞は、溶解緩衝液にし懸濁し、インキュベートする。溶解後、インタクトな核を、遠心分離によってペレット化する。上清のアリコートをし、マイクロタイタープレートのストレプトアビジンで被覆されたウェルに移し、上清中のヌクレオソームを、2つのモノクローナル抗体、抗ヒストン(ピオチン標識)および抗DNA(ペルオキシダーゼ結合)に結合させる。抗体-ヌクレオソーム複合体を、ストレプトアビジンによってマイクロタイタープレートに結合させる。固定化された抗体-ヒストン複合体を、3回洗浄して免疫反応性を示さない細胞成分を除去し、サンプルをペルオキシダーゼ基質(ABTS(登録商標))とインキュベートした。染色産物(固定化された抗体-ヒストン複合体)の量を、分光光度法で測定する。

20

## 【0253】

いくつかのプロテアーゼは、初期アポトーシスに関連する。したがって、アポトーシスを、カスパーゼ(例えば、カスパーゼ3)などのアポトーシス誘導プロテアーゼの存在の検出、さらにまたはその代わりにその活性のアッセイによってアッセイすることもできる。カスパーゼの活性化を、異なる方法(例えば、カスパーゼの捕捉による細胞溶解物のインビトロ酵素アッセイおよび適切な基質のタンパク質分解の測定)で分析することができる。さらに、カスパーゼを、PARP(ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼ)などのインビボカスパーゼ基質の切断の検出によってアッセイすることができる。PARPの切断フラグメントを、抗PARP抗体などの適切な抗体を使用して検出することができる。プロテアーゼアッセイおよびDNA断片化アッセイは、細胞集団のアポトーシスのアッセイに特に適切である。

30

## 【0254】

ISNTおよびTUNEL酵素標識アッセイなどの各細胞のアポトーシスの研究方法も利用可能である。上記のように、広範なDNA分解は、アポトーシスの初期段階でしばしば起こる特徴的な事象である。DNAの切断により、二本鎖の低分子量のDNAフラグメント(モノおよびオリゴヌクレオソーム)および高分子量DNA中の一本鎖分解物(「ニック」)が得られる。TUNELでは、このようなDNA鎖の分解物を、適切な修飾ヌクレオチド(X-dUTP、X=ピオチン、DIG、または蛍光色素など)での遊離3'-OH末端の酵素標識によって検出する。適切な標識酵素には、ISNT(「インサイチュ-ニック翻訳」)でのDNAポリメラーゼ(ニック翻訳)およびTUNEL(「TdT媒介X-dUTPニック末端標識」)での末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(末端標識; Huang, P & Plunkett, W., 1992, Anal. Biochem.

40

50

hem., 2007, 163; Bortner, C. D. 5, 1995, Trends Cell Biol., 5, 21) が含まれる。

【0255】

アポトーシスを、膜の変化(細胞表面糖タンパク質の側鎖由来の末端シアル酸残基の喪失を含む)の測定、新規の糖残基の曝露、トロンボスポンジンなどのマクロファージ分泌接着分子の受容体として作用することができる表面糖タンパク質の出現、および細胞膜リン脂質の非対称性の喪失、膜表面の疎水性および電荷の変化によってアッセイすることもできる。特に、ヒト抗凝結薬アネキシンVは、35~36kDaで、ホスファチジルセリン(PS)に対する親和性が高いCa<sup>2+</sup>依存性リン脂質結合タンパク質である。正常な生存細胞では、PSは、細胞膜の細胞質表面に存在する。しかし、アポトーシス細胞では、PSは内部から原形質膜の外側の小葉状部分(outer leaflet)に移行し、それによりPSが外部細胞環境に曝される。したがって、アネキシンVを使用して、アポトーシス細胞表面上に非対称に曝露されたホスファチジルセリンを検出することができる(Homburg, C. H. E. 5, 1995, Blood, 85, 532; Verhoven, B. 5, 1995, J. Exp. Med., 182, 1597)。さらに、感染のためにDAPI、臭化エチジウム、およびヨウ化プロピジウムなどのDNA色素を使用して、生存細胞と非生存細胞とを区別することができる。DNA含有率のプロフィールを使用することができるので、透過アポトーシス細胞は低分子量のDNAを漏出し、「サブG1ピーク」または「A0」細胞(G1細胞よりもDNA染色が低い細胞)を、例えば、フローサイトメトリーによって検出することができる。アポトーシスに特徴的な形態学的変化を、この様式で検出することもできる。

【0256】

抗体の使用によるアポトーシス関連タンパク質(ced-3、ced-4、ced-9 (Ellis, H. M. and Horvitz, H. R., 1986, Cell, 44, 817~829; Yuan, J. Y. and Horvitz, H. R., 1990, Dev. Biol., 138, 33~41; Hentgartner, M. O., Ellis, R. E. and Horvitz, H. R., 1992, Nature, 356, 494~499)、Fas (CD95/Apo-1; Enari 5, 1996, Nature, 380, 723~726)、Bcl-2 (Baffy, G. 5, 1993, J. Biol. Chem., 268, 6511~6519; Miyashita, T. and Reed, J. C., 1993, Blood, 81, 151~157; Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J., 1993, Cell, 74, 609~619)、p53 (Yonish-Rouach, E. 5, 1991, Nature, 352, 345~347)など)の検出を使用して、アポトーシスをアッセイすることもできる。

【0257】

[他の適応症]

実施例に示した所見は、アポトーシスおよび壊死肺胞マクロファージのクリアランスまたは制御の欠損が慢性肺炎に寄与する疾患におけるrSP-D(N/CRD)の治療上の役割を支持する。このような適応症の例(特に、慢性肺炎による気腫の発症リスクを有する未熟な新生児および喫煙者(SP-Dレベルが低下している)の慢性肺疾患などの相対SP-D欠損の背景)を上で考察した。

【0258】

実施例に示したデータは、SP-Dがアポトーシス細胞の制御およびクリアランスに関与し、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、アポトーシス肺胞マクロファージなどのアポトーシス細胞のクリアランスを増強することができることを示す。したがって、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を使用して、アテローム性動脈硬化症、成長異常(例えば、早産後の新生児肺疾患における異常な出生後の肺発達)、炎症組織の再造形欠損に関連する疾患、細胞増殖、および癌を治療する

ことができる。

【0259】

アテローム性動脈硬化症

本発明の好ましい実施形態では、炎症性疾患は、アテローム性動脈硬化症を含む。

【0260】

アテローム性動脈硬化症は、適切な遺伝的背景に有効となる種々のリスク因子の作用に基づく多因子疾患である。アテローム性動脈硬化症は、泡沫細胞（すなわち、化学修飾された例えば酸化低密度リポタンパク質（oxLDL）を取り込んだマクロファージおよび平滑筋細胞）の形成によって特徴付けられる。本発明者らは、特にマクロファージが非常に異常且つ泡状であり、肺のリン脂質代謝回転が妨害されている、実施例に記載のSP-Dノックアウトマウスの肺表現型を証明した。特に、一定の疾患状態でSP-Dが血清中に大量に存在することが知られている。

10

【0261】

したがって、本発明者らは、血清中の脂質代謝回転の妨害によりアテローム性動脈硬化症のリスクが増大することを提供する。したがって、rSPD（N/CRD）を使用して、アテローム性動脈硬化症を治療することができる。

【0262】

本発明者らは、野生型マウスおよびノックアウトマウスの血清コレステロールレベルを測定し、ノックアウトマウスでコレステロールレベルが高いことを示す（図17を参照のこと）。高レベルのコレステロールは、アテローム性動脈硬化症の発症リスクを増大させることが公知である。したがって、本発明者らは、組換えSP-D（例えば、rSPD（N/CRD））を静脈内に補給することによりこの異常を矯正することを開示する。

20

【0263】

さらに、最近、アポトーシスが血管細胞のアテローム硬化性病変の発症を調整する役割を果たすことが示されている（Martinet W, Kockx MM., 「アテローム硬化症のアポトーシス：酸化脂質および炎症の注目」、Curr. Opin. Lipidol., 2001年10月, 12(5), 535~41; Kockx MM., Herman AG., 「アテローム性硬化症のアポトーシス：有利か有害か?」、Cardiovasc. Res., 2000年2月, 45(3), 736~46）。アポトーシス体が除去された場合、マクロファージのアポトーシスは、プラーク安定性に有利であり得る。しかし、プラーク中で除去されないアポトーシス細胞は、トロンピンを活性化してプラーク内血栓症をさらに誘導し得る。プラーク破裂および血栓症を引き起こし得るので原発性アテローム性動脈硬化症のアポトーシスは有害であると結論付けることができる。本発明者らは、実施例で組換えSP-Dでの治療より、SP-Dノックアウトマウスの肺のアポトーシスマクロファージ数が減少することを示す。

30

【0264】

したがって、静脈内投与した組換えSP-Dの潜在的適用は、アテローム性動脈硬化症の発症リスクを減少させることができる血管内の有害なアポトーシス細胞（例えば、マクロファージ）の減少である。したがって、rSPD（N/CRD）を使用して、アテローム性動脈硬化症の1つまたは複数の任意の症状を治療または予防することができる。

40

【0265】

[医薬組成物]

本発明者らは、サーファクタント製剤を含むrSPD（N/CRD）またはエアゾール適用、噴霧、鼻腔内または気管支内投与によるrSPD（N/CRD）の個別の同時投与を最初に開発可能にする、生物活性形態のrSPD（n/CRD）ポリペプチドを、低コストで大量に産生することができることを示す。凍結乾燥および再懸濁後に調製物は安定であり、生物活性が保持され、保存が容易である。望ましくない全身性副作用を有する副腎皮質ステロイドを使用した現在の治療と異なり、rSPD（N/CRD）は、マウスでは病的影響は認められないようであり、ヒトでは副作用は認められないようである。

50

## 【0266】

rSPD (n/CRD) ポリペプチドまたは核酸を含む組成物を単独で投与することが可能であるが、医薬製剤として有効成分を処方することが好ましい。したがって、本発明者らはまた、rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を含む医薬組成物を開示する。このような医薬組成物は、記載の症状の治療または緩和のための個体へのrSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の送達に有用である。

## 【0267】

組成物は、rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体、構造的に関連する化合物、またはその酸性塩を含んでもよい。10  
医薬製剤は、1つまたは複数の薬学的に許容可能なキャリアと共に有効量のrSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を含む。「有効量」のrSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体は、記載の疾患（例えば、炎症性疾患（好ましくは、湿疹）、炎症性肺疾患、新生児慢性肺疾患、新生児呼吸窮迫症候群（RDS）、成人呼吸窮迫症候群、慢性閉塞性気道疾患（COPD）、喘息、嚢胞性線維症、肺線維症、気腫、間質性炎症性肺疾患、サルコイドーシス、肺炎、慢性炎症性肺疾患、新生児慢性炎症性肺疾患、イェダニ（ヒョウヒダニ属）に対するアレルギー、好ましくはヤケヒョウヒダニまたはコナヒョウヒダニ、または菌類もしくは菌類胞子、好ましくはアスペルギルス・フミガーツスによる、季節性呼吸器アレルギー、アレルギー性鼻炎、花粉症、非アレルギー性鼻炎、20  
血管運動神経性鼻炎、刺激性鼻炎、草本の花粉、木本の花粉、または動物の鱗屑に対するアレルギー、アレルギー性喘息に関連するアレルギー、食品アレルギー、細菌感染およびウイルス感染を含む微生物感染（好ましくは肺の微生物感染））などの疾患の少なくとも1つの症状の緩和に十分な量である。

## 【0268】

有効量は、治療または緩和すべき特定の疾患または症候群、患者の年齢および体重、疾患などの病態がどのようにして進行するか、患者の身体全体の健康、症候群の重症度、およびrSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体が単独または他の治療薬との組み合わせのいずれで投与されるかを含む他の要因によって変化する。30

## 【0269】

適切な薬学的に許容可能なキャリアは当分野で周知であり、医薬製剤の所望の投与形態および様式によって変化する。例えば、これらは、希釈剤または充填剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤、および潤滑剤などの賦形剤を含み得る。典型的には、キャリアは、固体、液体、または蒸発可能なキャリアまたはその組み合わせである。各キャリアは、製剤中の他の成分と適合可能であり、且つ患者に有害でないという意味で「許容可能」でなければならない。キャリアは、宿主に投与した場合に副作用（例えば、免疫応答）を誘発しないで生物学的に許容可能でなければならない。

## 【0270】

本明細書中に記載の医薬組成物には、局所および経口投与に適切なものが含まれ、影響を受ける組織が主に皮膚または表皮（例えば、乾癬、湿疹、および他の表皮疾患）である局所用製剤が好ましい。局所用製剤には、組成物を治療すべき皮膚表面との直接的接触によって外部から適用する薬学的形態が含まれる。局所用のための従来の薬学的形態には、浸漬（soak）、軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ゲル、スティック、スプレー、エアゾール、バスオイル、および溶液などが含まれる。局所用治療薬を、種々の賦形剤（賦形剤の選択は、重要であり、一般に治療される疾患が急性または慢性のいずれであるかに関連する）によって送達させる。例として、急性皮膚増殖疾患を、一般に、水性乾燥調製物で治療し、慢性皮膚増殖疾患を、水和調製物で治療する。浸漬は、急性湿性発疹の最も簡単な乾燥方法である。ローション（粉末を含む水性懸濁物）および溶液（溶媒中に溶解させた薬物）は、被毛部および間擦部に理想的である。軟膏または油中水型乳濁液は 40  
50

、最も有効な水和剤であり、乾燥発疹に適切であるが、ベタベタし、病変部位によっては望ましくない場合がある。必要に応じて、特に、病変への薬剤組成物の浸透性を増大させることが望ましい場合、これらを、包帯と組み合わせて適用することができる。クリームまたは水中油滴型乳濁液ならびにゲルは、吸収性を示し、患者に最も美容的に許容されている (Guzzoら、Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版, 1593~15950, 1996)。クリーム製剤には、一般に、石油、ラノリン、ポリエチレングリコール、鉱物油、グリセリン、パルミチン酸イソプロピル、ステアリン酸グリセリル、セテアリルアルコール、酢酸トコフェロール、イソプロピルミリスレート、ラノリンアルコール、シメチコン、カルボメン、メチルクロリソチアゾリノン、メチルイソチアゾリノン、シクロメチコン、およびヒドロキシプロピルメチルセルロース、ならびにその混合物などの成分が含まれる。

10

## 【0271】

他の局所適用製剤には、シャンプー、石鹸、およびシェイクローション (shake lotion) など、特に、頭皮などの基礎となる皮膚上の残渣を除去するために処方された製剤が含まれる (Arndtら、Dermatology In General Medicine, 2, 2838, 1993)。

## 【0272】

一般に、局所用製剤中の rSPD (n/CRD) ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の組成物濃度は、組成物の約 0.5~50 重量%、好ましくは約 1~30 重量%、より好ましくは約 2~20 重量%、および最も好ましくは約 5~10 重量%の量である。使用濃度は、上限からはじめ、治療を継続するにつれて濃度を減少させるか、製剤の適用頻度を減少させることができる。1日2回局所適用する場合もある。しかし、高用量を1日1回投与するか、低用量をより頻繁に投与すると有効であり得る。角質層は、貯蔵所として作用することができ、長期間にわたり生存している皮膚層に薬物を段階的に浸透させることができる。

20

## 【0273】

局所適用では、所望の薬理的効果を得るために十分量の有効成分を患者の皮膚に浸透させなければならない。一般に、皮膚への薬物の吸収は、薬物の性質、賦形剤の挙動、および皮膚の機能であると理解される。以下の3つの主要な可変要素は、異なる局所用薬物または異なる賦形剤中の同一の薬物の吸収速度または流動速度の相違を説明する；賦形剤中の薬物濃度、角質層と賦形剤との間の薬物の分配係数；角質層中の薬物の拡散係数。治療に有効であるために、薬物は、皮膚のバリア機能を担う角質層を通過しなければならない。一般に、高いインビトロ透過性を発揮する局所用製剤は、インビボで有効である。Ostrengaら、(J. Pharm. Sci., 60, 1175~1179, 1971) は、局所的に適用したステロイドのインビボでの有効性は、インビトロでの皮節化した (dermatomed) ヒト皮膚へのステロイド浸透速度に比例することを証明した。

30

## 【0274】

皮膚表面から表皮角化細胞への活性化化合物の浸透を増大させるために、皮膚科学的に許容可能且つ薬剤と適用可能な皮膚浸透増強剤を製剤に組み込むことができる。皮膚への活性化化合物の吸収を増大させる皮膚増強剤により、有効な治療に必要な薬剤の量が減少し、製剤の効果がより長く持続する。皮膚浸透増強剤は、当分野で周知である。例えば、ジメチルスルホキシド (米国特許第 3,711,602号)；オレイン酸、1,2-ブタンジオールサーファクタント (Cooper, J. Pharm. Sci., 73, 1153~1156, 1984)；エタノールとオレイン酸またはオレイルアルコールとの混合物 (欧州特許第 267,617号)、2-エチル-1,3-ヘキサジオール (WO 87/03490)；デシルメチルスルホキシドおよび Azone RTM (Hadgraft, Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet., 21, 165~173, 1996)；アルコール、スルホキシド、脂肪酸、エステル、Azone RTM、ピロリドン、尿素、およびポリオール (Kalbitzら、Pharmazie, 40

50

51, 619 ~ 637, 1996)。

【0275】

1, 8 - シネオール、メンソン、リモネン、ネロリドール (Yamane, J. Pharmacy & Pharmacology, 47, 978 ~ 989, 1995); Azon e . RTM および トランスクトール (Harrisonら, Pharmaceutical Res., 13, 542 ~ 546, 1996); ならびに オレイン酸、ポリエチレン グリコール、および プロピレングリコール (Singhら, Pharmazie, 51, 741 ~ 744, 1996) などのテルペンは、有効成分の皮膚浸透を改善することが公知である。

【0276】

薬剤または組成物の浸透レベルを、当業者に公知の技術によって測定することができる。例えば、当業者は、試験化合物の皮膚浸透を決定するいくつかの方法を使用して、活性な化合物の放射性標識およびその後の皮膚によって吸収された放射性標識化合物の量の測定によって吸収された組成物レベルを決定することができる。皮膚浸透研究に関する刊行物には、Reinfeinrath, W. G. and G. S. Hawkins., 「経皮浸透を測定するための動物モデルとしての離乳ヨークシャーブタ」、Swine in Biomedical Research (M. E. Tumbleson 編)、Plenum, New York, 1986 および Hawkins, G. S., 「インビトロ皮膚浸透の実施方法」、Methods for Skin Absorption, B. W. Kempainen and W. G. Reifeinrath 編, CRC Press, Boca Raton, 1990, 67 ~ 80 頁; および W. G. Reifeinrath, Cosmetics & Toiletries, 110, 3 ~ 9, 1995 が含まれる。

【0277】

いくつかの応用のために、ポリマーなどの当分野で公知の製剤を使用した薬剤または組成物の長期作用形態を投与することが好ましい。処置すべき領域への薬物の送達効率を増大させるために、当分野で公知の方法にしたがって薬剤を皮膚パッチ (Junginger, H. E., Acta Pharmaceutica Nordica, 4, 117, 1992; Thachrodiら, Biomaterials, 16, 145 ~ 148, 1995; Niedner R., Hautarzt, 39, 761 ~ 766, 1988) または包帯に組み込むことができる。

【0278】

任意選択的に、本発明の局所製剤は、さらなる賦形剤 (例えば、メチルパラベン、ベンジルアルコール、ソルビン酸、または第四級アンモニウム化合物などの防腐剤; EDTA などの安定剤; プチル化ヒドロキシトルエンまたはプチル化ヒドロキシアニソールなどの抗酸化剤; およびクエン酸塩およびリン酸塩などの緩衝液) を有することができる。

【0279】

医薬組成物を、錠剤、カプセル、または溶液の形態の経口製剤で投与することができる。有効量の経口製剤を、疾患の症状が緩和するまで患者に1日1 ~ 3回投与する。薬剤の有効量は、患者の年齢、体重、および病態に依存する。一般に、薬剤の1日の経口投与量は、1200 mg 未満且つ100 mg 超である。好ましい1日の経口用量は、約300 ~ 600 mg である。経口製剤は、単位投与形態で存在することが都合がよく、薬学分野で公知の任意の方法によって調製することができる。組成物を、適切な薬学的に許容可能なキャリアと共に任意の所望の投与形態に処方することができる。典型的な単位投与形態には、錠剤、丸薬、粉末、溶液、懸濁液、乳濁液、顆粒、カプセル、座剤が含まれる。一般に、製剤を、薬剤組成物を液体キャリアまたは細かく砕いた固体キャリアまたはその両方と均一且つ十分に合わせ、必要に応じて、生成物を成形することによって調製する。有効成分を、液体、粉末、錠剤、またはカプセル形態の種々の基剤に組み込んで疾患を治療するための有効量の有効成分を得ることができる。

【0280】

10

20

30

40

50

本明細書中の使用に適切な他の治療薬は、意図する目的で有効な任意の適合可能な薬物または薬製剤 (agent formulation) に相補的な薬物である。併用療法で使用される製剤を、組み合わせ効果が得られるように他の治療と同時または連続的に投与することができる。

【0281】

[サーファクタント治療組成物]

サーファクタント治療薬を含む r S P - D ( N / C R D ) の開発を、現在の製剤の代わりまたは現在の製剤と組み合わせることで新生児呼吸窮迫症候群の治療に適用することができる。

【0282】

新生児呼吸窮迫症候群のための現在のサーファクタント療法には、以下が含まれる。

【0283】

Beractant (Survanta)

Beractant (Survanta) は、リン脂質、脂肪酸、およびサーファクタント関連タンパク質 B (7 mcg / mL) および C (203 mcg / mL) を含む半合成ウシ肺抽出物である。Beractant は、100 mg (すなわち、4 mL) / kg の小児用量を4つのアリコートに分けて少なくとも6時間あけて投与する (気管内)。

【0284】

Calfactant (Infasurf)

Calfactant (Infasurf) は、リン脂質、脂肪酸、およびサーファクタント関連タンパク質 B を含む新生児ウシ肺抽出物である。Ross が製造しており、(260 mcg / mL) および C (390 mcg / mL) で投与する。

【0285】

SURVANTA (登録商標) (beractant) 気管内用懸濁液

SURVANTA (登録商標) (beractant) は、気管内使用を意図する滅菌無発熱物質肺サーファクタントである。これは、組成物を標準化し、天然の肺サーファクタントの表面張力低下性を模倣するために、パルミチン酸コルホセリル (colfosceril palmitate) (ジパルミトイルホスファチジルコリン)、パルミチン酸、およびトリパルミチンを添加した、リン脂質、中性脂質、脂肪酸、およびサーファクタント関連タンパク質を含む天然のウシ肺抽出物である。得られた組成物から、25 mg / mL リン脂質 (11.0 ~ 15.5 mg / mL の二飽和ホスファチジルコリン)、0.5 ~ 1.75 mg / mL トリグリセリド、1.4 ~ 3.5 mg / mL 遊離脂肪酸、および 1.0 mg / mL 未満のタンパク質が得られる。これを、0.9% の塩化ナトリウム溶液中に懸濁し、熱滅菌する。SURVANTA は、防腐剤を含まない。そのタンパク質は、一般に S P - B および S P - C として公知の2種の疎水性で低分子量のサーファクタント関連タンパク質からなる。S P - A として公知の、親水性で高分子量のサーファクタント関連タンパク質は含まない。

【0286】

INFRA SURF 気管内懸濁液 (Forest)

Infasurf (登録商標) (calfactant) 気管内懸濁液は、気管内点滴注入のみを意図する滅菌無発熱物質肺サーファクタントである。これは、リン脂質、中性脂質、および疎水性サーファクタント関連タンパク質 B および C (S P - B および S P - C) を含むウシ肺由来の天然サーファクタントの抽出物である。これは、防腐剤を含まない。

【0287】

Infasurf は、0.9% の塩化ナトリウム水溶液中に calfactant を含むオフホワイトの懸濁液である。pH は 5.0 ~ 6.0 である。各 Infasurf は、35 mg の総リン脂質 (26 mg のホスファチジルコリンを含み、そのうちの 16 mg が二飽和ホスファチジルコリンである) および 0.26 mg の S P - B を含む 0.65 mg のタンパク質を含む。

10

20

30

40

50

## 【0288】

気管内懸濁液用のEXOSURF Neonatal (Glaxo Wellcome)

気管内懸濁液用のEXOSURF NEONATAL (パルミチン酸コルホセリル、セチルアルコール、チロキサポール)は、滅菌凍結乾燥粉末として真空下で保存した無タンパク質合成肺サーファクタントである。EXOSURF NEONATALは、気管内点滴注入による投与前に注射用無防腐剤滅菌水で再構成する。各10mLのバイアルは、108mgパルミチン酸コルホセリル(一般に、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC))として公知)、12mgセチルアルコール、8mgチロキサポール、および47mg塩化ナトリウムを含む。pHを調製するために、水酸化ナトリウムまたは塩酸を添加することができる。8mLの注射用滅菌水で再構成した場合、EXOSURF NEONATAL懸濁液は、0.1NのNaCl中に13.5mg/mLパルミチン酸コルホセリル、1.5mg/mLセチルアルコール、および1mg/mLチロキサポールを含む。懸濁液は、pH5~7で乳白色であり、浸透圧185mOsm/kgである。

10

## 【0289】

EXOSURF NEONATAL化合物の化合物名は、以下である。パルミチン酸コルホセリル：(R)-4-ヒドロキシ-N,N,N-トリメチル-10-オキソ-7-[(1-オキソヘキサデシル)オキシ]-3,5,9-トリオキサ-4-ホスファペンタコサン-1-水酸化アルミニウム内部塩4-オキシド；セチルアルコール：(1-ヘキサデカノール)；およびチロキサポール：ホルムアルデヒドおよびオキシランを含む4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールポリマー。

20

## 【0290】

タンパク質を含まないEXOSURF NEONATALでは、セチルアルコールは、気体-液体境界でのDPPCの展着剤として作用する。チロキサポール(高分子長鎖反復アルコール)は、DPPCおよびセチルアルコールの両方を分散させるように作用する非イオン性サーファクタントである。浸透圧を調整するために塩化ナトリウムを添加する。

## 【0291】

CUROSURF (登録商標)

商標名：Curosurf Active Ingredient：poractant の力価：120mgリン脂質/1.5mLまたは240mgリン脂質/3mL、ウイルス投薬形態：気管内懸濁液、会社名：Dey, LP、利用可能性：処方箋薬、業務用、FDA承認日：1999年11月18日。

30

## 【0292】

したがって、本発明者らは、サーファクタント治療薬として、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体と組み合わせた上記開示の治療薬の任意の成分(好ましくは、有効成分)を含む組成物の使用を開示する。したがって、本発明者らは、rSPD(n/CRD)ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体と組み合わせた肺抽出物を含む組成物を開示する。肺抽出物は、リン脂質(ホスファチジルコリンおよび二飽和ホスファチジルコリン)および/または脂肪酸を含むウシ、好ましくは子牛の肺抽出物を含み得る。組成物は、さらに、サーファクタント関連タンパク質(例えば、サーファクタント関連タンパク質Bまたはサーファクタント関連タンパク質C)を含み得る。セチルアルコール、長鎖反復アルコール、チロキサポール、パルミチン酸コルホセリル(ジパルミトイルホスファチジルコリン)、パルミチン酸、およびトリパルミチン、poractant、および塩化ナトリウムなどの他の成分を添加することもできる。

40

## 【0293】

特に、本発明者らは、それぞれBeractant(Survanta)；Calfactant(Infasurf)；SURVANTA(登録商標)(beractant)；INFRASURF；EXOSURF Neonatal；およびCUROSURFに対応する組成物を開示し、各組成物は、さらに、治療有効量のrSPD(n/CRD)

50

ポリペプチド、核酸、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を含む。

【0294】

[さらなる態様]

さらなる態様には、以下が含まれる。

rSPD (n/CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、個体のMCP-1レベルまたはMIP1レベルまたはその両方を増加させる方法。

【0295】

rSPD (n/CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体を個体に投与するステップを含む、個体のサイトカインレベル、好ましくはIFNレベルを増加させる方法。 10

【0296】

rSPD (n/CRD) ポリペプチド、そのフラグメント、ホモログ、変異体、または誘導体の投与による、個体の細胞媒介免疫系の成分をアップレギュレーションする方法、ナチュラルキラー細胞の活性をアップレギュレーションする方法、またはその両方も開示する。

【実施例1】

【0297】

[材料と方法]

組換えサーファクタントタンパク質Dフラグメント (rSP-D (N/CRD)) 20

これらの実施例で使用される組換えサーファクタントタンパク質Dフラグメント (rSP-D (N/CRD)) は、ヒトSP-Dの短縮形態である。標準的な発酵手順を使用してpETベクターに挿入し、大腸菌に形質転換したヒトSP-D (構築物) のフラグメントのcDNAを含むプラスミド由来の大腸菌中のフラグメントを発現させる。

【0298】

構築物は、2位でプロリンがセリンに置換された8個のN末端Gly-Xaa-Yaaトリプレット (斜体で示す) およびその後の28残基のネック領域 (太字で示す) およびヒトSP-Dの125残基の炭水化物認識ドメイン (CRD) の短ストレッチから構成される。

【化5】

30

*GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQH*  
**LQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQA**  
**GGQLASPRSAENAALQQLVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYP**  
**TGESLVYSNWAPGEPNDDGGSSEDCVEIFTNGKWNDRACGEKRL**  
**VVCEF**

【0299】

rSPD (N/CRD) の構造を示す略図を、図1Aに示す。(A)はサーファクタントタンパク質Dの十二量体であり、(B)はSP-Dの三量体であり、(C)はSP-Dのヘッド-ネック領域の全構造のリボン図である。 40

【0300】

rSPD (n/CRD) ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号2に記載の配列を有する。

【0301】

pETベクター-pET21d中でのrSPD (N/CRD) の発現構築物の作製

ヒトSP-D (ネック/CRD) をコードし、8個のN末端Gly-Xaa-Yaaトリプレットをコードする短ストレッチを含む配列を、XbaIおよびHind-3での消化によって前に作製したヒトSP-DクローンpBCSK1 (Kishore, U.ら、 50

「ヒト肺サーファクタントタンパク質Dのヘリックスネック領域はリポ多糖類およびリン脂質への炭水化物認識ドメインの結合に不可欠である」、Biochem. J., 1996, 318 (Pt 2), 505~11頁)から切り出した。次いで、得られたフラグメントを、アガロース電気泳動によって精製し、NheIおよびHind3で消化したpET-21dベクター(Novagen製)にライゲーションする。pET-21dベクターは、Novagen(カタログ番号69743-3)から利用可能である。その配列は当分野で公知であり、例えば、Novagenの文献(例えば、http://www.novagen.com/で見出される)に記載されている。

#### 【0302】

rSPD(N/CRD)の調製

このようにして作製した新規の構築物を使用して、コンピテント細胞(DH5)と形質転換した。rSP-D(ネック/CRD)についてこの構築物を含むプラスミドDNAを、細胞成長後に標準的方法によって形質転換コロニーから精製する。

#### 【0303】

pETベクター中のrSPD(n/CRD)(ネック/CRD)のcDNAを含むプラスミドを、BL21(DE3)pLysSに形質転換し、1つのコロニーを選択し、100µg/mlのアンピシリンおよび25µg/mlのクロラムフェニコール(LB<sup>+</sup>)を補足した1mlのLBで希釈する。これを、1000倍に希釈し、100µlをアガロースプレート上に広げ、一晚インキュベートする。得られたコロニーのローンを、平たいスパチュラでの掻爬によって回収し、50mlのLB<sup>+</sup>に懸濁する。これの5mlアリコートを使用して、500mlのLB<sup>+</sup>を含む2Lフラスコをインキュベートする。この手順は、成長培地中での成長および一晚の培養のより一般的な操作よりも優れていることが見出された。静止期でのコロニー成長により、細胞間の接触が軽減され、摂取物中の発現プラスミドを保有しない変異体の比率が減少する。

#### 【0304】

至適発現レベルを達成するために、500ml LB/2Lフラスコを超えないことが重要であることも見出された。

#### 【0305】

培養物を、A<sub>600</sub>で0.6~0.8に成長させ、その後0.4mMのIPTGと2~3時間インキュベートする。

#### 【0306】

組換えサーファクタントタンパク質Dフラグメント(rSP-D(N/CRD))の精製

遠心分離によって細胞を採取し、20mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM EDTA、0.1% v/v Triton X-100、0.1mM PMSF(pH7.5)に溶解し、3分間超音波処理を行う。不溶性封入体中でrSPD(n/CRD)を発現させ、10000×gの遠心分離によって採取する。このステップを3回繰り返し、rSPD(n/CRD)を含む精製封入体ペレットを、100mlの8M尿素、100mMの2-メルカプトエタノール(pH7.5)に溶解し、高速遠心分離によって明澄化した。

#### 【0307】

尿素溶液を、1Lの20mL Tris-HCl(pH7.5)で希釈し、および50mlのQ-Sepharose陰イオン交換樹脂(Pharmacia製)を添加し、20で30分混合する。吸着した樹脂を、FPLCカラムに詰め、20mMのTris-HCl、150mMのNaCl(pH7.5)で十分に洗浄し、rSPD(n/CRD)を50mMのTris-HCl、500mMのNaCl(pH7.5)で溶出する。

#### 【0308】

ピーク画分由来のタンパク質を、4で30分間のアセトンでの10倍希釈によって沈殿させる。沈殿物を、高速遠心分離で採取し、100mlの8M尿素に溶解し、10Lの20mM Tris-HCl、150mMのNaCl、2mMのCaCl<sub>2</sub>(pH7.4

10

20

30

40

50

) に対して4 で一晩透析する。

【0309】

次いで、透析物を、20mlのマルトース-アガロースを含む20mMのTris-HCl、10mMのCaCl<sub>2</sub>(pH7.4)と数時間から一晩混合する。この長時間インキュベーションステップにより、最終段階の活性タンパク質への再折りたたみが適切に促進される。

【0310】

マルトース-アガロースをFPLCカラムに詰め、1MのNaClを含む同一の緩衝液で洗浄して、非特異的タンパク質を除去する。高塩洗浄により、カラムに結合していた全OD<sub>280</sub>吸着物質の約25~50%が溶出する。SDS-PAGEは、おそらく正確な三  
次元構造に完全に折りたたまれなかった低親和性rSPD(n/CRD)である微量(約10%)のrSPD(n/CRD)を示す。これらのrSPD(n/CRD)調製物を、マウスでの構造研究および実験で使用すべきであり、この画分を含まないことが望ましいと見なされる。さらに、高塩中の全OD<sub>280</sub>吸着物質は、このrSPD(n/CRD)に寄与することができるものよりもはるかに大量であり、おそらく細菌DNAおよび動物への投与用調製物で望ましくないと考えられる他の物質による。

10

【0311】

次いで、結合したrSPD(n/CRD)を、5mMのEDTAを含む20mMのTris-HCl、150mMのNaCl、0.02%(w/v)のアジ化ナトリウム(pH7.4)で溶離して、rSPD(n/CRD)CRD媒介結合に必要なCaを除去した。

20

【0312】

ピーク画分を、10000MWCOメンブレンを具備したAmiconを使用して攪拌細胞を5mlに濃縮し、20mMのTris-HCl、150mMのNaCl、5mMのEDTA、0.02%(w/v)のアジ化ナトリウム(pH7.4)の溶離緩衝液を含む、100mlのSuperose12ゲル濾過カラム(Pharmacia製)にロードする。分子量60kDaに対応する単一ピークとしてrSPD(n/CRD)が溶出された。

【0313】

このステップにより、この段階で同時に精製されたと考えられる全ての夾雑物が最終的に分離され、EDTAの存在下で任意の炭水化物がrSPD(n/CRD)から分離され、低分子量であるので、カラムの総封入体積(100ml)に溶離されたと予想される。

30

【0314】

このステップにより、タンパク質ピークの対称性およびショルダーの非存在によるタンパク質調製物の均一性も評価される。主ピークの外側の画分を破棄する。プールした画分を回収し、2mg/mlに濃縮し、次のステップに進む。ゲル濾過後のrSPD(n/CRD)の回収率は、典型的にはロードした全OD<sub>280</sub>吸収物質の80%である。これは、これの少なくとも20%はrSPD(n/CRD)に起因せず、最終ステップとしてゲル濾過を含める必要が強まることを示す。

【0315】

精製rSPD(n/CRD)を含む20mMのTris-HCl、150mMのNaCl、5mMのEDTA、0.02%(w/v)のアジ化ナトリウム(pH7.4)の10mMのPolymixinBカラム(Detoxi-Gel, Pierce)への通過によって内毒素レベルが減少する。

40

【0316】

FITC標識によるrSP-Dの修飾

マウスのBALによって単離されたマクロファージへのインビトロ結合を評価するために、rSP-Dを、製造者の説明書に従って、アミン反応性プローブFITC(Sigma)で標識する。簡単に述べれば、50μgのFITCを、1mgのrSP-Dを含む200mlの0.1Mの重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)と室温で2時間インキュベートする。

50

## 【0317】

次いで、標識したタンパク質を、G-25カラムを使用してFITCから分離する。FITC-rSP-D (20 µg/ml) を、野生型マウスおよびSP-Dノックアウトマウスから新たに単離した肺胞マクロファージと結合緩衝液 (10 mMのHepes、140 mMのNaCl、2.5 mMのCaCl<sub>2</sub>) 中でインキュベートし、Consort 32 FACSシステムでのフローサイトメトリーによって以下に概説するようにヨウ化プロピジウムまたはPE標識アネキシンVとの同時標識について評価する。

## 【0318】

アスペルギルス・フミガーツス抗原の調製 (Afu l w c f)

アスペルギルス・フミガーツス (Afu) を、合成培地 (M199、Sigma Chemicals) にて静置培養として37 °Cで1週間成長させる。Arrundaら (Arruda, L. K., B. J. Mann, and M. D. Chapman, 1992, 「アスペルギルス・フミガーツスにおける主要なアレルゲンおよび細胞毒素 (Asp f I) の選択的発現: Aspergillus 関連疾患の免疫病原性の影響」、J. Immunol., 149, 3354~9) は、Asp f 1 (主要なアレルゲン) の発現は1週間後が最大であり、それより長いインキュベーションで減少する傾向があることを証明している。

## 【0319】

1週間培養物は、12時間の0.1%チメロサールの添加によって死滅する。培養物をガラスウールで濾過し、最終的に0.45 µmのメンブレンで濾過して、全ての微粒子および可能な胞子を除去し、その後、3回緩衝液を交換しながら水に対して透析した。透析物を凍結乾燥して褐色粉末を得た。

## 【0320】

Asp f 1に対応する18 kDaの主バンドが存在する。Asp f 2に対応するバンド (37 kDa) も明白である。18 kDaのバンドのN末端配列決定を行って、Asp f 1のN末端配列に対応する配列ATWTCINQQLNPを得た。

## 【0321】

1週間培養物の濾過物 (l w c f) は、英国国立生物学的製剤研究所から入手したAfuアレルギー患者由来のヒト血清によって認識されることもELISAによって証明された。

## 【0322】

トランスジェニック株

本発明者らは、以前に、遺伝子ターゲティングSP-D欠損マウスの作製を報告している (Botas, C., Poulain, F., Akiyama, J., Brown, C., Allen, L., Goerke, J., Clements, J. Carlson, E., Gillespie, A. M., Epstein, C. & Hawgood, S., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 11869~74)。

## 【0323】

C57B16バックグラウンドに10世代戻し交配したSP-D欠損マウスに自由に餌を与え、Biomedical Services Unit, Oxford Universityの無病原体環境下で隔離飼育器に格納する。コントロール実験のための無病原体C57B16野生型マウスを、Harlan-OLAC、Shaw's farm、Bicester、Oxfordshireから入手する。全実験プロトコールは、適切なU.K. Home Office licensing authoritiesおよびオックスフォード大学倫理委員会に承認されている。

## 【0324】

rSP-D、rSP-A、およびウシ血清アルブミン (BSA) の投与

6週齢のSP-D欠損マウスに、3つのプロトコールのうちの1つを使用して3~6週間にわたりタンパク質またはPBSのみを複数鼻腔内投与した。

10

20

30

40

50

## 【0325】

各タンパク質投与のために、マウスをイソフルランで軽く麻酔し、その後 r S P - D またはコントロールタンパク質 ( 3 0 μ g 、 2 5 μ g 、 または 1 0 μ g の r S P - D 、 r S P - A 、 または B S A を含む 5 0 μ l の P B S ) を、滅菌マイクロピペットを使用して鼻孔に投与する。全流動物が吸入されるまでマウスを直立させたままにする。最初の処置プロトコールでは、12匹のマウスに6週齢から30μgのrSP-Dを3日間毎日投与した。3週間後に肺胞マクロファージ数および肺胞リン脂質含有量のアッセイのために6匹のマウスを屠殺する。治療群の残りの6匹のマウスは6週間の治療を完了させ、その後屠殺およびアッセイを行った。第2の治療プロトコールでは、マウスに12週齢から10μgのrSP-D、rSP-A、BSAで1週間に5回を3週間処置し、その後屠殺およびアッセイを行った。さらなるコントロールは非処置マウスであり、マウスをPBSで処置した。4週齢から処置効果を評価するために、肺胞マクロファージ数が有意に増加する前に、第3のプロトコールにて6匹のマウスを30μgのrSP-Dで2週間処置する。リン脂質および肺胞マクロファージ数のアッセイのためにこれらのマウスを6週齢で屠殺し、非処置の年齢の適合したコントロールと比較した。

10

## 【0326】

## 気管支肺胞洗浄 ( B A L )

肺胞マクロファージの単離のために ( 例えば、アポトーシスアッセイのため ) 、各治療群の4~6匹のマウスを二酸化炭素での窒息によって屠殺し、滅菌RPMIを使用して気管支肺胞洗浄 ( B A L ) を行う。

20

## 【0327】

滅菌カニューレを気管に挿入し、縫合糸で所定の位置に連結する。2mlシリンジを使用して、1mlの洗浄緩衝液で4回肺を洗浄して、全部で約3mlの洗浄液を得る。次いで、BAL液を、室温にて5分間、250gで遠心分離して、肺胞マクロファージをペレット化する。細胞を、1mlのPBSへの再懸濁によって洗浄し、ベンチトップ遠心分離機での1000rpmで2分間の遠心分離によって再度ペレット化する。次いで、細胞を再懸濁し、FITC標識アネキシンVおよびヨウ化プロピジウムと10分間インキュベートする。次いで、サンプルを、FACSフローサイトメトリーによって染色について分析する。

## 【0328】

## 肺胞マクロファージのサイトスピン調製物

0.25mMのEDTAを含むPBSを使用した気管支肺胞洗浄および250gでの遠心分離によって単離した肺胞マクロファージを、1mlのPBSに再懸濁する。標準的な手順を使用したマラカイトグリーンまたはクリスタルバイオレットでの染色、およびサイトスピンスライドの調製後に、血球計による全細胞の計数のためにアリコートを採用する。Diff-Quik ( Scientific Products , McGaw Park , IL ) での染色後のサイトスピン調製物による細胞数の相違により、この方法で単離された細胞の98%が肺胞マクロファージであることが確認される。

30

## 【0329】

## マウス肺胞マクロファージのインビトロ標識

野生型およびノックアウトマウスのBALから単離した肺胞マクロファージを、蛍光グリーンおよびオレンジ細胞追跡色素でインビトロ標識する。Cell Tracker ( 商標 ) Orange は、CMTMR ( 5 - ( および 6 - ) - ( ( 4 - クロロメチル ) ベンゾイル ) アミノ ) テトラメチルローダミン ) 混合異性体およびCell Tracker ( 商標 ) からなる。

40

## 【0330】

CMFDA ( 5 - クロロメチルフルオレセイン二酢酸 ) からなるGreen ( Molecular probes , Eugene , Oregon ) は、穏やかなチオール反応性クロロメチル基を含む。一旦細胞内に入ると、クロロメチル基が細胞内チオールと反応し、プローブが細胞不透過性蛍光色素のエーテル付加物に変換される。過剰な非抱合試薬は

50

、細胞外培地に受動拡散する。Cell Tracker Orangeは、蛍光性を示すエステラーゼ活性を必要とせず、細胞内エステラーゼが切断されるまでcell tracker greenは無色である。

#### 【0331】

気管支肺胞洗浄液の総リン脂質およびタンパク質の測定

各実験で示された測定点で、各治療群の4～6匹のマウスを、二酸化炭素での窒息によって屠殺し、0.25 mMのEDTAを含むPBSでの気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。1 mlで肺を4回洗浄して、全部で約3 mlの洗浄液を得る。BAL液を、室温にて5分間、250 gで遠心分離する。無細胞上清中の総タンパク質濃度を、基質としてピシニコニン酸を使用して測定する。無細胞BAL液を、クロロホルム-メタノールに抽出し、リン濃度から総リン脂質を測定した。

10

#### 【0332】

マウスBAL液のrSP-Dレベル

rSP-D処置マウス由来の無細胞BALFの連続希釈物を、組換えヒトSP-Dに対して生じたビオチン化および非ビオチン化単一特異性ポリクローナル抗体を使用した標準的なサンドイッチELISA法によってrSP-D含有量について分析する。この抗体は、マウスSP-AやマウスSP-Dと交差反応性を示さなかった。組換えヒトSP-Dを使用した検量線を使用して、投与後の特定の測定点で回収された肺胞rSP-Dの絶対量を計算する。

20

#### 【0333】

アポトーシス細胞および壊死細胞のフローサイトメトリーおよび検出

RPMIでSP-D欠損マウスのBALから単離した細胞を、PBSに再懸濁し、サイズおよび粒度によってマクロファージ集団をキャラクタライズするために、Censort 32 FACSシステム(Becton Dickinson Immunocytometry)で分析する。明らかに血液染色された細胞集団を破棄する。アポトーシス細胞および壊死細胞を、Annexin-V-FLUOS染色キット(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用したアネキシンVおよびヨウ化プロビジウム(PI)染色によって検出する。アポトーシス細胞および壊死細胞を、通常は細胞内細胞膜の小葉状部分から外型の小葉状部分に存在するホスファチジルセリン(PS)に曝露し、アネキシンVが細胞表面でPSに結合する(Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C., 1995, J. Immunol. Methods, 184, 39~51)。細胞アリコートをし、蛍光標識アネキシンVで染色し、PIで対比染色して、一次または二次壊死細胞を検出する。同時標識実験では、蛍光シグナルの重複についての補正後にPIまたはPE標識アネキシンV(Pharmingen, San Diego, CA)で染色した細胞へのFITC標識rSP-Dの結合も評価する。

30

#### 【0334】

データ分析

結果を、平均±平均の標準誤差( $x \pm SE$ )として示す。不平等な分散(unequal variance)を推測する両側t検定を使用して、各測定点での動物群間の比較を行う。 $P < 0.05$ で有意と見なす。

40

#### 【実施例2】

#### 【0335】

[アスペルギルス・フミガーツスに対するアレルギー性過敏症のマウスモデルにおけるアレルギー性過敏症の調整]

大腸菌で発現および精製され、rSPD(n/CRD)と呼ばれるネックおよびCRDドメインの三量体から構成されるヒトSP-Dの短縮形態は、マウスにおけるアレルギー性過敏反応のモジュレーターとして機能的に活性である。本研究では、好酸球増多症、血清IgEおよびIgG1の調整を、C57BL/6で再現し、効果はBALB/cマウスに固有でないことを証明した。

50

## 【0336】

本研究で測定したパラメータは、アスペルギルス・フミガーツスアレルゲンに対するアレルギーのマウスモデル全てで有意に増加し、rSPD(n/CRD)での鼻腔内処置によって全て有意に減少する血清IgEおよびIgG1ならびに末梢血好酸球増多症である。

## 【0337】

任意の特定の理論に拘束されることを意図するわけではないが、rSPD(n/CRD)は、Th2からTh1へのTリンパ球集団の変化を促進すると提案する。これにより、アレルギーの主な構成要素である血清IgEおよび好酸球増多症の減少が認められる。

## 【0338】

rSPD(n/CRD)の調製

コラーゲンストーク(8-Gly-X-Y)の短領域および成熟タンパク質配列の代表的な残基179~355を含むネック/CRDのcDNAを、ヒト肺ライブラリーDNAからクローン化し、pET-21dベクター(Novagen, Nottingham)に挿入する。プラスミドをBL21(DE3)pLysSに形質転換し、1つのコロニーを選択し、再プレatingして100~400コロニー/プレートを得る。これらを掻き取り、これを使用して100μg/mlアンピシリンおよび25μg/mlクロラムフェニコールを補足した500mlのLB培地を含む震盪フラスコに接種し、0.6~0.8のOD600まで成長させ、その後0.4mMのIPTGで2~3時間誘導する。細胞を遠心分離によって回収し、20mMのTris-HCl、150mMのNaCl、5mMのEDTA、0.1%v/vTritonX-100、0.1mMのPMSF(pH7.5)に溶解し、3分間超音波処理を行う。不溶性封入体中でrSPD(n/CRD)が発現し、遠心分離で回収し、10000×gで4回洗浄した。ペレットを、100mlの8M尿素、100mMの2-メルカプトエタノール(pH7.5)に溶解し、遠心分離によって明澄化し、10Lの20mM Tris-HCl、150mMのNaCl、5mMのCaCl<sub>2</sub>(TBC)に対する一晩の透析によって再折りたたみを行う。再折りたたみされたrSPD(n/CRD)を、マルトース-アガロース(Sigma-Aldrich, Poole, UK)への吸着によって変性rSPD(n/CRD)から分離し、夾雑物を除去するための1MのNaClを含むTCBでの第1のカラム洗浄後に5mMのEDTAを含む20mMのTris-HCl、150mMのNaClで溶離する。最終精製は、20mMのTris-HCl、150mMのNaCl、5mMのEDTA、0.02%(w/v)アジ化ナトリウム(pH7.4)(TSE)の溶離緩衝液でのゲル濾過カラム(Superose 12, Amersham Pharmacia, UK)による。分子量60kDaに対応する単一のピークとしてrSPD(n/CRD)が溶離された。精製rSPD(n/CRD)の10ml Polymixin Bカラム(Detoxi-Gel, Pierce & Warriner, UK)への通過によって内毒素レベルが減少し、5pg/μg未満のrSPD(n/CRD)を含む調製物のみを使用する。

## 【0339】

アスペルギルス・フミガーツス抗原(Afu 1wcf)

アスペルギルス・フミガーツス(Afu)を、合成培地(M199, Sigma Chemicals)にて静置培養として37°Cで1週間成長させる。Arrundaら(Arruda, L.K., Mann, B.J., Chapman M.D., 「アスペルギルス・フミガーツスにおける主要なアレルゲンおよび細胞毒素(Asf f I)の選択的発現: Aspergillus 関連疾患の免疫病原性の影響」、J. Immunol, 1992, 149, 3354~9)は、Asp f 1(主要なアレルゲン)の発現は1週間後が最大であり、それより長いインキュベーションで減少する傾向があることを証明している。1週間培養物を、4°Cで12時間の0.1%(w/v)チメロサールの添加によって死滅させる。培養物をガラスウールで濾過し、最終的に0.45μmのメンブレンで濾過して、全ての微粒子および胞子を除去し、その後、3回緩衝液を交換しながら水に対して透析した。透析物を凍結乾燥して褐色粉末を得た。1wcfのSDS-PAGE(図1B)

10

20

30

40

50

によってA s p f 1に対応する18kDaの主バンドが明らかとなった。A s p f 2に対応するバンド(37kDa)も明白である。18kDaのバンドのN末端配列決定を行って、A s p f 1のN末端に対応する配列A T W T C I N Q Q L N Pを得た。1週間培養物の濾過物(1wcf)は、国立生物学的製剤研究所から入手したA f uアレルギー患者由来のヒト血清によって認識されることもE L I S Aによって証明された。

#### 【0340】

##### 感作

本研究では、6週齢の雌C57BL/6マウスを、腹腔内(i.p.)注射によってミョウバンと混合した200 $\mu$ g A f u 1wcf(1:4v/v)を含む100 $\mu$ l P B Sで1週間に1回を4週間感作する。

10

#### 【0341】

##### アレルギーでの攻撃誘発および処置

感作マウスを、10 $\mu$ gのA f u 1wcfを含む50 $\mu$ lにて鼻腔内(i.n.)に攻撃誘発する。これの後に、P B Sまたは10 $\mu$ gのr S P D(n/C R D)を含む50 $\mu$ lのP B Sでi.n.で処置する。結果に記載のように、攻撃誘発および処置を毎日行う。いくつかの実験では、全長組換えヒトS P - Aのコントロールタンパク質(Byk Gulden Pharmaceuticalより贈与)を、10 $\mu$ g/50 $\mu$ lの濃度で使用する。個別の実験では、r S P D(n/C R D)の運命を、r S P D(n/C R D)を含む50 $\mu$ lのP B Sでの鼻腔内適用後の種々の時間での異なるマウスからのB A Lの獲得およびマウスS P - DまたはS P - Aを認識しないr S P D(n/C R D)に対して生じたポリクローナル抗体を使用したr S P D(n/C R D)のアッセイによってモニターする。これらの結果は、投与から30分後に採取したB A Lにおいてはr S P D(n/C R D)の少なくとも50%を占め得るが、24時間後では測定することができないことを示す。

20

#### 【0342】

##### 末梢血好酸球

好酸球の評価のために、マウス(n=4~6/群)の尾静脈から採血する。自動細胞計数器で総白血球数を測定し、M a y - G r u n w a l d - G i e m s a染色血液塗抹標本の分画によって好酸球の比率を測定する。結果を、10<sup>6</sup>細胞/mlで示す。

30

#### 【0343】

##### 血清I g EおよびA f u特異的I g G 1

マウスI g Eの検量線に関して線形である値を得るために最大で20倍に希釈した連続希釈血液におけるサンドイッチE L I S A(B D P h a r M i n g e n、C o w l e y、U K)によって総血清I g Eを測定する。結果を、 $\mu$ g/mlで示す。A f u特異的I g G 1を、A f uアレルギー抽出物で被覆した96ウェルプレートを使用したE L I S Aによって測定する。抗体を、H R P標識抗マウスI g G 1で検出する。結果を、相対吸収単位(O D 4 5 0)として示す。

#### 【0344】

##### 肺内の内因性マウスS P - DおよびS P - A

C O<sub>2</sub>窒息による無痛屠殺の直後に、3 $\times$ 1ml P B Sを使用して、気管支肺胞洗浄を行い、これをプールし、全サンプルについてP B Sの添加によって体積を4mlに調整し、遠心分離して細胞を除去する。組換えマウスS P - DおよびS P - Aに対して生じたポリクローナル抗体(P. L a w s o n博士から提供)を使用したE L I S AによってS P - DおよびS P - Aを測定する。これらの抗体は、ヒトS P - DまたはS P - Aとの交差反応性を示さず、それぞれマウスS P - DまたはS P - Aに特異的である。結果を、 $\mu$ g/ml B A Lで示す。

40

#### 【0345】

##### 細胞内サイトカイン染色

処置後、マウスをC O<sub>2</sub>窒息によって無痛屠殺し、その脾臓を取り出し、P B S中でホモジナイズする。ホモジネートを濾過し、赤血球を塩化アンモニウム溶解試薬(B D P

50

harming en)で溶解し、4% (v/v) パラホルムアルデヒドで20分間固定する。細胞を、0.1% (w/v) アジ化ナトリウムを含む3% (v/v) 熱変性ウシ胎児血清を補足したPBS (FSB)で洗浄し、10% DMSO (v/v)を含むFSBに再懸濁し、-80 で保存する。細胞を、Cytoperm洗浄緩衝液 (CPB、BD Biosciences、Cowley、UK)にて4 で15分間浸透させ、 $10^6$ 細胞のアリコート、50  $\mu$ g/mlラットIgGを補足したCPBとの4 で30分間のインキュベーションによってブロックする。細胞内サイトカインを、4 で60分間インキュベートした1  $\mu$ g PE 抱合抗マウスサイトカインモノクローナル抗体 (BD Biosciences)で染色する。細胞をCPBで洗浄後、FSBで洗浄し、500mlのFSBに再懸濁する。Cell Questソフトウェアを使用したFACSscanフローサイトメーター (Beckton Dickinson、Mountain View、California)を使用して、フローサイトメトリーを行う。20000個の細胞についてデータを収集する。脾臓細胞の平均FSCは、全ての場合で100である。染色細胞 (FSC > 100、FL2 > 100)がゲーティングし、これらの細胞染色強度比 (PE > 1000)を計算する。結果を、ラットIgG (%PE > 1000)と共にインキュベートした非染色細胞のバックグラウンド蛍光の差し引き後に強力に染色された細胞の%として示す。

10

## 【0346】

## 肺組織学

処置直後、各治療群由来の2~4匹の肺を、10% (v/v) 中性緩衝化ホルマリンで固定し、個別の分析に供する。肺を、パラフィンに包埋し、区分化し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色する。気管支周囲の炎症についてスライドを評価し、それぞれ正常から重症までのスコアに対応する0~4のスケールで割り当てる (Sur. S, Wild JS, Choudhury BKら、「CpGオリゴデオキシヌクレオチドによるマウス喘息モデルのアレルギー性肺炎の長期予防」, J. Immunol., 1999, 162, 6284~93)。

20

## 【0347】

## 全身プレチスモグラフィ

この研究では、気道過敏症を、4つのチャンパーシステム (Buxco, Sharon, Connecticut)を備えた非制御 (unrestrained) 全身プレチスモグラフィ法 (Hamelmann E., Schwarze J., Takeda K.ら、「気圧プレチスモグラフィを使用したアレルギーマウスの気道反応の非侵襲性測定」, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1997, 156, 766~75)を使用して測定する。最初に、マウスを鼻腔内抗原で攻撃誘発し、2時間で回収し、その後チャンパーに置き、その呼吸を10分間モニターする。順応した時点で、そのベースライン反応を5分間測定する。次いで、マウスにエアゾール化したPBSに1分間供し、その後メタコリンの用量を漸増させる (5、10、20、30、40 mg/ml、PBS)。それぞれの場合においてベースラインPenhに戻らせる短い間隔で反応を5分間記録する。

30

## 【0348】

各群は、4~8匹のマウスを含んでいた。結果を、メタコリンの攻撃誘発後のベースラインを超えるPenhの平均上昇%として示す。

40

## 【0349】

## 統計

結果は、4~8匹マウス/群の平均であり、エラーバーは、 $\pm$ SEMである。スチューデント両側t検定によって有意性を決定する。P < 0.05で有意とみなす。

## 【0350】

## [実施例2の結果]

組換えSP-Dでの感作マウスの処置の結果を、図2、3、4、および5に示す。

## 【0351】

50

血清 I g E、A f u 特異的 I g G、および末梢血好酸球増多症は、異なる遺伝的背景で r S P D ( n / C R D ) によって軽減される。

【 0 3 5 2 】

r S P D ( n / C R D ) での処置が異なる遺伝的背景で有効であるかを決定するために C 5 7 B L / 6 マウスにおいて A B P A モデルを確立し、r S P D ( n / C R D ) がアレルギー攻撃誘発時にアレルギー性過敏症を調整することができるかを決定するために、感作マウスを最初に 1 0 μ g の A f u 1 w c f で攻撃誘発し、1 時間後に処置する。アレルギー攻撃誘発マウスへの 1 0 μ g の r S P D ( n / C R D ) での 5 日間の鼻腔内処置後に 3 日間測定した血清 I g E は有意に減少し ( P < 0 . 0 0 1 )、この減少は、1 週間後に 1 0 μ g の A f u 1 w c f を 3 日間毎日投与する再攻撃誘発後に維持される ( 図 2 A )。アレルギー攻撃誘発マウスの処置および 1 週間後のアレルギーのみでの再攻撃誘発後に ( 図 3 ) A f u 特異的 I g G 1 ( 図 2 B ) および末梢血好酸球増多症でも類似の有意な減少が測定された。

10

【 0 3 5 3 】

r S P D ( n / C R D ) での処置により、I L - 1 2 および I F N - が上昇し、I L - 4 が低下する

【 0 3 5 4 】

I g E および末梢血好酸球増多症の減少により、サイトカインレベルの全身性調整が示唆され、これらのサイトカインを細胞内染色によって測定する。アレルギー攻撃誘発マウスへの 1 0 μ g の r S P D ( n / C R D ) での 2 日間の鼻腔内投与から 1 日後に脾臓中で測定された I L - 1 2 ( 図 4 A ) は、I F N - ( 図 4 B ) のように有意に減少する ( P < 0 . 0 5 )。I L - 4 の測定は、非感作マウスで測定されたレベルまでの減少を示した ( 図 4 C )。r h S P - A ( 組換えヒトサーファクタントタンパク質 A、S P - A ) での同一の処置では、これらの効果は認められなかった。

20

【 0 3 5 5 】

r S P D ( n / C R D ) での処置により、気道過敏症が緩和する

アレルギー攻撃誘発から 1 ~ 2 時間後に 1 0 μ g の r S P D ( n / C R D ) で 4 日間毎日処置したマウスは、試験した全てのメタコリン用量での処置 ( 7 日目 ) の完了後の 3 日間のアレルギーでの再攻撃誘発に対して気道過敏症の有意な軽減 ( P < 0 . 0 5 ) を示した ( 図 5 A )。同一の方法で 1 0 μ g の r h S P - A ( 組換えヒトサーファクタントタンパク質 A ) で処置したマウスでは、A H R の有意な軽減は認められなかった ( 図 5 B )。

30

【 0 3 5 6 】

r S P D ( n / C R D ) での処置により肺炎が軽減する

本研究での感作マウスのうち、6 匹の P B S 処置マウスのうちの 4 匹のスコアは 2 + であり、r S P D ( n / C R D ) 処置群の 5 匹のうち 4 匹のスコアが 1 であった。非感作マウスのスコアは 0 である。肺切片は、肺への細胞侵襲の軽減を示す ( 図 6 )。

【 0 3 5 7 】

内因性マウス S P - D および S P - 4

アレルギーマウスの B A L 中で測定された S P - D の内因性レベルは、正常なマウス由来の B A L 中の 0 . 2 5 ± 0 . 0 1 5 μ g / m l から 1 . 4 ± 0 . 1 5 μ g / m l までのレベルに 6 倍上昇し、正常な感作および処置されたマウス B A L で 1 . 3 ± 0 . 1 μ g / m l の測定された内因性 S P - A レベルについての相違は認められない。1 0 μ g の r S P D ( n / C R D ) での 5 日間の毎日の処置では、内因性 S P - D または S P - A レベルにおいていかなる変化も認められなかった。

40

【 実施例 3 】

【 0 3 5 8 】

[ マウスアレルギー性過敏症モデルにおけるイエダニ ( ヤケヒョウヒダニ ) に対するアレルギー性過敏症の調整 ]

D e r p / I L - 2 / 肺

図 7 A は、r S P D ( N / C R D ) での鼻腔内処置により、D e r p アレルギーマウス

50

スの肺におけるアレルゲン攻撃誘発に対する I L - 1 2 の応答が増強されることを示す。

【 0 3 5 9 】

細胞内サイトカイン染色およびその後の I L - 1 2 陽性の高度に染色された細胞 ( P E > 1 0 0 0 ) の割合についての F A C S 分析によって測定された、処置後の D e r p 感作マウスの肺ホモジネート中の I L - 1 2 の分析。P B S とは、P B S で処置した非感作マウスである。H P とは、P B S で処置した感作マウスである。H R とは、1 0 μ g の r S P - D ( N / C R D ) で処置した感作マウスである。感作マウスを、最初に、5 0 A U の D e r p アレルゲン抽出物で鼻腔内に攻撃誘発した。処置は、攻撃誘発直後に投与した 1 0 μ g の r S P - D ( N / C R D ) の鼻腔内点滴注入による。4 日間連続して攻撃誘発および処置を繰り返した。処置の 4 日後にマウスを D e r p のみで再攻撃誘発し、翌日に屠殺した。

10

【 0 3 6 0 】

D e r p / I L - 2 / 脾臓

図 7 B は、r S P - D ( N / C R D ) での鼻腔内処置により D e r p アレルギーマウスの脾臓におけるアレルゲン攻撃誘発に対する I L - 1 2 の応答が増強されることの証拠を示す。

【 0 3 6 1 】

細胞内サイトカイン染色およびその後の I L - 1 2 陽性の高度に染色された細胞 ( P E > 1 0 0 0 ) の割合についての F A C S 分析によって測定された、処置後の D e r p 感作マウスの脾臓ホモジネート中の I L - 1 2 の分析。P B S は、P B S で処置した非感作マウスである。H P は、P B S で処置した感作マウスである。H R とは、1 0 μ g の r S P - D ( N / C R D ) で処置した感作マウス。H B = 1 0 μ g の B S A で処置した感作マウスである。感作マウスを、最初に、5 0 A U の D e r p アレルゲン抽出物で鼻腔内に攻撃誘発した。処置は、攻撃誘発直後に投与した 1 0 μ g の r S P - D ( N / C R D ) の鼻腔内点滴注入による。4 日間連続して攻撃誘発および処置を繰り返した。処置の 4 日後にマウスを D e r p のみで再攻撃誘発し、翌日に屠殺した。( n = 4 ~ 8 / 群。1 . 7 倍上昇)。

20

【 0 3 6 2 】

D e r p / I N F - / 脾臓

図 7 C は、r S P - D ( N / C R D ) での鼻腔内処置により D e r p アレルギーマウスの脾臓におけるアレルゲン攻撃誘発に対する I F N - の応答が増強されることの証拠を示す。

30

【 0 3 6 3 】

細胞内サイトカイン染色およびその後の I F N - 陽性の高度に染色された細胞 ( P E > 1 0 0 0 ) の割合についての F A C S 分析によって測定された、処置後の D e r p 感作マウスの脾臓ホモジネート中の I F N - の分析。P B S とは、P B S で処置した非感作マウスである。H P とは、P B S で処置した感作マウスである。H R とは、1 0 μ g の r S P - D ( N / C R D ) で処置した感作マウスである。感作マウスを、最初に、5 0 A U の D e r p アレルゲン抽出物で鼻腔内に攻撃誘発した。処置は、攻撃誘発直後に投与した 1 0 μ g の r S P - D ( N / C R D ) の鼻腔内点滴注入による。4 日間連続して攻撃誘発および処置を繰り返した。処置の 4 日後にマウスを D e r p のみで再攻撃誘発し、翌日に屠殺した。( n = 4 ~ 8 / 群。P < 0 . 0 5 。2 . 7 倍上昇)。

40

【 0 3 6 4 】

D e r p / T N F - / 脾臓

図 7 D は、r S P - D ( N / C R D ) での鼻腔内処置により D e r p アレルギーマウスの脾臓におけるアレルゲン攻撃誘発に対する T F N - の応答が増強されることの証拠を示す。

【 0 3 6 5 】

細胞内サイトカイン染色およびその後の T F N - 陽性の高度に染色された細胞 ( P E > 1 0 0 0 ) の割合についての F A C S 分析によって測定された、処置後の D e r p 感

50

作マウスの脾臓ホモジネート中のTFN- の分析。PBSとは、PBSで処置した非感作マウスである。HPとは、PBSで処置した感作マウスである。HRとは、10 µgのrSP-D (N/CRD)で処置した感作マウスである。感作マウスを、最初に、50 AUのDer pアレルゲン抽出物で鼻腔内に攻撃誘発した。処置は、攻撃誘発直後に投与した10 µgのrSP-D (N/CRD)の鼻腔内点滴注入による。4日間連続して攻撃誘発および処置を繰り返した。処置の4日後にマウスをDer pのみで再攻撃誘発し、翌日に屠殺した。(n = 4 ~ 8 / 群。1.5倍上昇)。

【実施例4】

【0366】

[マウスアレルギー性過敏症モデルにおけるイエダニ(ヤケヒョウヒダニ)に対する気道過敏症に対するrSPD(n/CRD)での治療効果] 10

アレルギー性喘息は、気道過敏症(AHR)期間によって特徴付けられる。AHRは、呼気時間の延長を含む呼吸パターンが変化することが公知である。この変化を、呼気停止の増大の測定によって定量することができる(Penh)。

【0367】

この研究では、気道過敏症を、4つのチャンパーシステム(Buxco, Sharon, CT, USA)を備えた非制御全身プレチスモグラフィ法を使用して測定する。CO<sub>2</sub>の蓄積を防止するために、上記システムによって、一定の空気のバイアス流れを生じさせる。マウスチャンパー中でマウスが呼吸するにつれて、トランスデューサによって圧力変動を測定し、基準チャンパーと比較する。これらの変動は、呼吸周期の間の胸郭体積の変化によって生じる。気管支収縮により、圧力可動域の形状の相違が生じ、呼気中に最も明らかである。これらの形状の変化を、呼気の困難さを示し、喘息における呼吸に特徴的である休止増強(enhanced pause)アルゴリズム(Penh)によって定量することができる。 20

【数1】

$$\text{Penh} = \frac{\text{Te} - \text{Tr} \times \text{PEP}}{\text{Tr} \quad \text{PIP}}$$

(Teは、呼気時間であり、Trは弛緩時間であり、PEPはピーク呼気圧であり、PIPはピーク吸息圧である) 30

【0368】

AHRは、インサイチューでのマウスの噴霧メタコリンへの曝露によって誘発される。メタコリン(アセチル- -メチルコリンクロリド)は、神経伝達物質アセチルコリンの代謝的に安定な類似体であり、平滑筋を収縮させて気管支収縮を誘発する。喘息マウスの誘発されたAHRを、正常なマウスと比較したPenhの増加によって測定する。

【0369】

方法

感作。雌C57BL/6マウスを、ミョウバンを含む標準化Der p抽出物(Greer Labs., USA)の4週間毎のi.p.注射によって感作する。 40

【0370】

気道炎症の誘導および治療。感作マウスに、4日間連続して先にPBSまたは10 µgのrSPD(n/CRD)をi.n.投与し、その後、50アレルギー単位のDer p抽出物を含むPBSを鼻腔内投与する(連続的同時投与という)。動物を少なくとも30分間回復させ、その後、第2のi.n.投与を行う。

【0371】

全身プレチスモグラフィ。マウスを4つのチャンパーに入れ、その呼吸を10分間モニターする。順応後、そのベースライン反応を、5分間測定する。次に、マウスにPBSを1分間噴霧し、その後メタコリン用量を段階的に増加させる。ベースラインに回復するまで短期間の間隔をおいてそれぞれの場合の応答を5分間記録する。 50

## 【0372】

統計。各群は、4～8匹のマウスを含む。Penhを、各群のマウスのベースライン値に対する増大%として示す。エラーバーは、 $\pm$ SEMである。両側t検定によって有意性を決定する。

## 【0373】

[実施例4の結果]

rSPD (n/CRD)での処置により、処置終了時の全身プレチスモグラフィにおけるPenh応答によって測定したところ、AHRが有意に減少する ( $p < 0.001$ ) (図8A; 20mg/mlメタコリン)。図8Bに示すように、治療から4日後にアレルギーでマウスを再攻撃誘発した場合に、この有意な減少が維持された ( $p < 0.002$ )。 10

## 【0374】

マウスイエダニアレルギーモデルに対するこの研究は、rSPD (n/CRD)の鼻腔内投与により、喘息の主な特徴である気道過敏症が有意に軽減することをはじめて示す。これは、アレルギー性喘息を含む呼吸器アレルギー性過敏反応の症状の治療でのrSPD (n/CRD)の有用性の証拠を提供する。

## 【0375】

Derpアレルギーとの連続的同時投与時のその有効性によって証明されるように、持続的なアレルギーの曝露においてさえもrSPD (n/CRD)はAHRを軽減することができることは有意である。これは、季節性アレルギーの被験体またはイエダニアレルギーの主な問題である空気アレルギーに常に曝露された被験体が遭遇する条件を反映する 20

## 【0376】

最も顕著な所見は、rSPD (n/CRD)での処置は、アレルギーのみでの再攻撃誘発に対するAHRの有意な軽減によって示されるように、基礎となる機構に対して長期間有効であることである。したがって、rSPD (n/CRD)での処置により、アレルギーおよびアレルギー性喘息患者のための有効な脱感作ストラテジーが得られる。

## 【実施例5】

## 【0377】

[ノックアウトマウスに対する組換えSP-Dの効果]

以下の3つの実施例は、組換えヒトSP-Dを使用してSP-DノックアウトマウスのSP-D機能が置換されるのを記載する。 30

## 【0378】

SP-Dを発現しないSP-Dノックアウトマウスは、マクロファージ数が増加し、その多くの外観が異常である。肺胞空隙中に過剰なサーファクタントリン脂質が存在し、SP-Dの非存在下で慢性的な低レベルの炎症過程を示す。これらのマウスは、肺損傷、線維症、および気腫を発症し、SP-D欠損による肺損傷および肺炎モデルが得られる(それぞれ先天性および後天性SP-D欠損症の患者群である早産児および喫煙者で認められる)。この炎症過程に対する組換え発現短縮フラグメント(ヒトrSP-D (N/CRD))での治療効果を、SP-Dノックアウトマウスで評価する。

## 【0379】

Botas, C.ら、「サーファクタントタンパク質D欠損マウスにおけるサーファクタントホメオスタシスおよびII型肺胞細胞の形態学の変化」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(20), 11869~74に記載のように、SP-Dノックアウトマウスを作製する。上記のように組換えヒトSP-Dを作製する。 40

## 【0380】

組換えSP-DまたはBSAコントロールを、6週齢のマウスに鼻腔内投与する。動物が12週齢になるまで、6週間にわたり30 $\mu$ gを全部で7回投与する。処置3週間後に4匹のマウスを屠殺し、肺胞マクロファージ数およびリン脂質の評価のために気管支肺胞を洗浄した。記載の実験を、3回繰り返した。

## 【0381】

これらの実験は、炎症性肺疾患の有効な治療として r S P D ( n / C R D ) を使用することができることを証明する。

【実施例 6】

【0382】

[ 肺胞マクロファージ数によってアッセイした、ノックアウトマウスに対する組換え S P - D の効果 ]

マラカイトグリーンまたはクリスタルバイオレットで染色したマクロファージ数を血球計で計数し、マクロファージの形態学をサイトスピン後に評価する。

【0383】

図 9 は、非処置マウスで計数された肺胞マクロファージ数を示し、6 週間で細胞数は野生型マウスの約 3 倍であり、9 週間および 12 週間では野生型のほぼ 4 倍であることを証明する。非処置マウスでマクロファージ数は維持され、16 週での洗浄液から採取した細胞数に匹敵する。しかし、r S P - D ( N / C R D ) での処置後、S P - D ノックアウト B A L 中の肺胞マクロファージ数は、約 50% 減少する ( 匹敵する年齢の野生型マウスで認められる数の約 2 倍のレベル )。図 9 はまた、S P - D 欠損マウスの肺胞マクロファージ数が 15 週齢の野生型マウスと比較して増加することを示す。

【0384】

B A L 液から単離した肺胞マクロファージ数に対する r S P - D での処理効果を示す。r h S P - A、B S A、または P B S での処置と対照的に、マクロファージ数は、9、12、および 15 週齢の r S P - D 処置 S P - D 欠損マウスで有意に減少する。r S P - D 処置動物におけるマクロファージ数は、全年齢の野生型マウスよりも高いままである。

【0385】

図 10 A は、気管支肺胞洗浄における細胞のサイトスピンを示す。細胞を、マラカイトグリーン ( 上のパネル ) またはクリスタルバイオレット ( 下のパネル ) で染色する。非処置または B S A 処置マウスと比較して r S P - D ( N / C R D ) 処置マウスで肺胞マクロファージ数はより少なく、より多数が正常な外観を有し、高倍率で非常に少数の拡大した泡状のマクロファージが認められることが明らかである。

【0386】

図 10 B は、気管支肺胞洗浄における細胞のサイトスピンを示す。S P - D 欠損マウス由来の細胞は、巨大で、泡状で、しばしば多核である。B S A または S P - A 処置マウスと対照的に、r S P - D 処置マウス由来の肺胞マクロファージは、より多数の外観正常であり、巨大化した泡状の細胞はより少ない。この効果を、前記および側方散乱フローサイトメトリーによって定量する。

【実施例 7】

【0387】

[ サーファクタントリン脂質分析によってアッセイした、ノックアウトマウスに対する組換え S P - D の効果 ]

B A L からリン脂質を抽出し、B a r t l e t t リンアッセイ ( B a r t l e t t , G . R . , 「カラムクロマトグラフィでのリンアッセイ」、J . B i o l . C h e m . , 1959、234、466 ~ 468 ) によってリン脂質を定量した。

【0388】

結果を図 11 に示す。9 週齢に達した治療 3 週間後のマウスで検出可能なリン脂質の相違は認められず、処置 6 週間後の洗浄液中の回収可能なリン脂質の量は非常に減少する。

【0389】

無細胞 B A L 中の総リン脂質およびタンパク質測定に関するさらなる結果を、図 11 B に示す。6 週齢の S P - D 欠損マウスで B A L リン脂質レベルの顕著な増加が認められる。未処理の 6 週齢のマウスと比較して、4 週齢マウス由来の 2 週間の r S P - D 処理を受けたマウスでリン脂質レベルの相違は認められない。

【0390】

6 週齢から 3 週間または 6 週間処置する肺胞マクロファージ数実験 ( 図 9 ) で使用した

同一のマウスも、無細胞BALリン脂質についてアッセイする。非処置の9週齢コントロールと比較して、処置3週間後(屠殺年齢は9週齢)でBALリン脂質に相違は認められない。しかし、6週間処置したマウス(アッセイ年齢12週齢で屠殺)は、非処理の12週齢コントロールと比較して過剰なリン脂質の減少(50%)を示す( $P < 0.05$ )。いかなる年齢においても洗浄液の総タンパク質レベルに対して有意な処置効果は認められない。

【0391】

図17に示すように、SP-D欠損マウスにおける血漿コレステロールレベルを決定する。この図は、野生型マウスとSP-D欠損マウスとの間で血漿コレステロール(mM)を比較する。仮定した相違を0とする両側検定を行った。平均差は、0.988であり、DFは8であり、T値は-2.885であり、P値は0.0204である。

10

【実施例8】

【0392】

[ケモカインレベルによってアッセイした、ロックアウトマウスに対する組換えSP-Dの効果]

肺胞マクロファージ数減少の所見を説明することができる機構を評価するために、rSP-D(N/CRD)処置ロックアウトマウス肺および非処置コントロールから総RNAを単離し、走化性因子数についてのmRNAレベルを、製造者の説明書に従ってPharminogenから入手したmCK-5マルチプロンプテンプレートを使用したりボヌクレアーゼ保護アッセイによってアッセイした。総肺RNAについてリボヌクレアーゼ保護アッセイを行う。

20

【0393】

L32およびGAPDHのmRNAシグナルを使用して総肺RNAの等しい負荷をチェックするために、結果をサンプルに合わせて標準化する。各群あたり3匹のマウスを使用して、各サンプルを2つの濃度で2回負荷する。

【0394】

結果を図12に示す。SP-Dロックアウトマウスと野生型マウスとの間でベースラインmRNAレベルの有意な相違が存在することが認められる。詳細には、エオタキシンレベル(特異的な好酸球走化性因子)は、野生型と比較してロックアウトマウスで100%増加する。さらに、rSP-D(N/CRD)での処理によってこれが減少する。これらの所見は、対応のないデータについてのt検定を使用した5%レベルで統計的に有意である。MCP-1 mRNAレベルは、野生型と比較してロックアウトマウスで6倍に増加し、これもrSP-D(N/CRD)での処理によって減少する。MIP-2 mRNAレベルについてrSP-D(N/CRD)処置が有意な効果を示さないこと以外は、MIP-1レベルおよびMIP2に対して類似の効果が認められる。最終的な所見は、野生型マウスに対してロックアウトマウスでTCA-3レベルが4倍に増加するが、rSP-D(N/CRD)での処置ではTCA-3発現の増加に効果がないことである。

30

【実施例9】

【0395】

[rSP-D(N/CRD)はアポトーシス肺胞マクロファージのクリアランスを促進する]

40

アポトーシスによる細胞死の制御過程により、細胞壊死およびその後の炎症後の細胞内容物の放出が回避される。SP-Dロックアウトマウスにおける過剰な肺胞マクロファージ数が過剰である場合、ロックアウトマウスにおけるアポトーシスを受けた細胞数を測定し、野生型と比較する。

【0396】

多数の肺胞マクロファージの存在によって媒介された肺損傷は、アポトーシス肺胞マクロファージのクリアランスの低下に一部起因し、その結果肺胞マクロファージ壊死の増加によって炎症反応が誘発されると仮定した。

【0397】

50

アポトーシス細胞および壊死細胞のフローサイトメトリーおよび検出

上記の気管支肺胞洗浄によってマウスから肺胞マクロファージを単離する。

【0398】

図13Aは、野生型マウスと比較したSP-D欠損マウスにおける前方散乱（細胞サイズ）および側方散乱（粒度）フローサイトメトリーの代表的な結果を示す。各群（n = 6 / 群）由来の各マウスで10000個の細胞を計数する。ヒストグラムは、野生型マウスから単離されたものと比較したSP-D欠損マウス中の巨大化した泡状マクロファージのサイトスピンの外観と一致するSP-D欠損マウスのより巨大且つ多数の顆粒細胞集団を示す。

【0399】

細胞集団の前方散乱および側方散乱に対するrSP-D処置の効果を代表的なヒストグラムの重複を使用して示し、サイトスピンの外観と一致した異常に巨大且つ顆粒状の肺胞マクロファージがより少ない細胞集団を示す。rhSP-A、PBS、またはBSAでの処置は、前方散乱および側方散乱ヒストグラムの形状に影響を与えなかった。

【0400】

肺胞マクロファージのアポトーシスおよび壊死

上記の気管支肺胞洗浄によってマウスから肺胞マクロファージを単離し、FACS分析によるFITC標識アネキシンV（アポトーシス細胞上に曝された表面ホスファチジルセリンに結合する）およびヨウ化プロピジウム（壊死細胞に結合する）結合の測定によってアポトーシスおよび壊死についてアッセイする。

【0401】

図13B、13C、および13Dに示すように、野生型と比較してSP-Dノックアウトマウス由来の洗浄液中のアポトーシスおよび壊死マクロファージの数に大きな相違が認められる。

【0402】

新たに単離した肺胞マクロファージのアネキシンVおよびPI染色

図13Bは、野生型マウスと比較したSP-D欠損マウス由来のマクロファージのアネキシンVおよびPIの典型的な染色パターンを示す。一貫して、アネキシンVで染色されたマクロファージ数は、野生型と比較してSP-D欠損マウスで有意に多く、SP-D欠損マウスにおいてアネキシンVおよびPIの両方に染色された細胞数は3~4倍である。細胞集団を4つに分割した図に示す任意の分割により、それぞれの場合におけるPIまたはアネキシンVで染色された細胞の比率を計算する。

【0403】

アネキシンVおよび/またはPI陽性細胞のFITC標識rSP-Dでの同時標識

図13Cは、アネキシンVおよび/またはPI陽性細胞でのFITC標識rSP-Dの同時標識範囲を示す。結果は、3つの実験の代表である。ドットプロットは、初期アポトーシス（アネキシンV陽性）および壊死（PI陽性）細胞へのFITC-rSP-D結合の優先度を示す。概して、野生型と比較して、ノックアウトマウスから単離したより多くの細胞集団がFITC-rSP-Dに結合する（15+/-1.8%に対して45+/-6%）。野生型マウスの少数のアネキシンV陽性細胞のうち、アネキシンV陰性細胞のたった1+/-0.5%と比較して80+/-6%がFITC-rSP-Dに結合する。ノックアウトマウスでは、アネキシンV陰性細胞のたった3.5+/-1.7%と比較して、55+/-4%のアネキシンV陽性AMがFITC-rSP-Dに結合する。野生型またはノックアウトマウス由来のPIで染色された全ての細胞は、FITC-rSP-Dに結合する。したがって、アネキシンVまたはPI陽性細胞への結合と比較して、野生型マウスおよびノックアウトマウス由来の健全な細胞（PI陰性、アネキシンV陰性）へのFITC-rSP-Dの結合レベルは低い。新たに単離した細胞のFITC-アネキシンVおよび非標識rSP-Dとの同時インキュベーションでは、アネキシンV結合に有意に影響を与えず（示さず）、アネキシンVとrSP-Dとの間に直接的な相互作用もrSP-DによるそのホスファチジルセリンリガンドへのアネキシンV結合のいかなる競合も存在

10

20

30

40

50

しないことを示す。

【0404】

rSP-Dでの分析および処置

図13Dは、SP-D欠損マウスは、野生型欠損マウスと比較して、気管支肺胞洗浄物中のアポトーシス肺胞マクロファージの比率が10倍であり(野生型6%+/-2%に対してノックアウトでは74%+/-8%)、壊死肺胞マクロファージの比率が6倍である(野生型4%+/-2%に対してノックアウトでは25%+/-8%)ことを示す。rSP-D(N/CRD)での3~6週間の鼻腔内補充療法により、SP-D欠損動物中の肺胞空隙からのアポトーシスおよび壊死肺胞マクロファージのクリアランスが増加するが、ウシ血清アルブミンまたはサーファクタントタンパク質A(SP-A)での類似の処置では効果がなかった。

10

【0405】

PIまたはアネキシンVのいずれかでの細胞染色率に対するrSP-Dでの処置効果も図に示す。

【0406】

アポトーシスマクロファージの割合は、コントロールで76%+/-10%であるのに対してrSP-D(N/CRD)処置マウスでは25%+/-4%である。rSP-D(N/CRD)での処置により、SP-Dノックアウトマウスの洗浄物中の壊死マクロファージの割合(約25%)は、野生型に匹敵するレベルに減少する(4%に対して5%)。rSP-D(N/CRD)での全処置効果は、炎症性サイトカインレベルおよび50%過剰なサーファクタントリン脂質と共に肺内の肺胞マクロファージの絶対数が減少することである。

20

【0407】

アネキシンVおよび/またはPIで染色された細胞の比率に対するrhSP-A、B SA、またはPBSでの有意な処置効果は認められない。対照的に、rSP-D処置により、アネキシンVおよび/またはPI陽性細胞数が依然として野生型より有意に多いにもかかわらず、SP-D欠損マウスのBAL中のアネキシンVおよび/またはPI陽性細胞数は有意に減少する。

【0408】

気管支肺胞洗浄物中のGM-CSFレベルの調整

気管支肺胞洗浄物中のGM-CSFレベルの調整を、図14に示す。認められるように、野生型マウスの気管支肺胞洗浄物中のGM-CSF濃度は、SP-Dノックアウトマウスの約185pg/mlと比較して50pg/mlである。このようなノックアウトマウスのrSP-D(N/CRD)での処置により、GM-CSFレベルが約120pg/mlに減少する。

30

【0409】

フローサイトメトリーおよび生化学的分析由来の結果は、気管支肺胞洗浄物から採取した肺胞マクロファージの肺組織学およびサイトスピン実験の結果と一致する。

【0410】

共焦点顕微鏡法

図15は、FITC-dUTP(緑)で染色した野生型(パネルAおよびB)およびノックアウトマウス(パネルCおよびD)由来のマクロファージの共焦点顕微鏡法を示す。アポトーシスが進行した細胞は緑色に染色され、初期アポトーシス細胞を、末端標識DNAフラグメントの特徴的な点状染色によって同定する。

40

【0411】

緑色に染色された新たに単離したマクロファージによる橙色染色壊死およびアポトーシスマクロファージの貪食作用の検出

細胞を、上記のようにノックアウトマウスから単離し、Orange cell tracker色素と室温で一晩インキュベートする。アネキシンV-FITCでの同時標識により、これらの細胞の80~90%が橙色素と二重標識され、アネキシンV陽性である

50

ことが確認される。新たに単離された細胞を、製造者の説明書に従ってCell tracker Greenとインキュベートする。多数の細胞が生きた細胞に依存してCell tracker greenで染色されず(図16、四分割した左下、パネルA)、細胞の集団(proporportion)は首尾よく標識された(図16、四分割した右下、パネルA)。

#### 【0412】

パネルAは、橙色および緑色細胞集団の直接混合の結果を示す。非染色細胞およびバックグラウンド二重蛍光(パネルBに示す)を排除するために示したゲートを使用して、パネルCおよびDは、37度で15分間、無SP-D(パネルC)および4mcg/mlのSP-D(パネルD)との細胞の同時インキュベーション後の二重標識細胞数は、SP-Dの存在下で80%増加する。

10

#### 【0413】

SP-Dノックアウトマウスにおけるこれらの結果によりアポトーシスおよび壊死マクロファージのクリアランスの制御におけるSP-Dの重要な役割が明らかとなり、rSP-D(N/CRD)ベースの処置により肺泡マクロファージ媒介炎症過程および他の疾患を含む肺疾患領域における新規のアプローチが得られることを示す。

#### 【0414】

しかし、アポトーシス細胞の制御およびクリアランスにおけるSP-Dの関与に関して示したデータはまた、異常発達(例えば、早産後の新生児肺疾患における異常な出生後肺発達)、炎症組織の再整形、細胞増殖、および癌にも関与する。

20

#### 【実施例10】

#### 【0415】

SP-DおよびrSPD(n/CRD)(SP-Dの組換えフラグメント(rSPD(n/CRD))という)のDNAへの結合を、種々の方法で試験する。第1のアッセイでは、電子顕微鏡法を使用して、DNAとSP-Dとの間およびDNAとrf-SP-Dとの間の複合体形成を示す。図18を参照のこと。電子顕微鏡法から得た画像は、SP-DおよびrSPD(n/CRD)はDNAに有効に結合することを証明する。

#### 【0416】

図19に示す第2のアッセイでは、rSPD(n/CRD)と炭水化物であるマンナンとの結合はデオキシリボヌクレオチドと競合するので、SP-Dは炭水化物結合能力によってDNAに結合することが示唆される。デオキシリボヌクレオチドは、固定化マンナンとSP-Dへの結合を有効に競合し、溶液中でヌクレオチドが結合することを示す。

30

#### 【0417】

図20に示す第3のアッセイでは、SP-Dノックアウトマウスから単離した肺泡マクロファージ(主に、アポトーシス)を、表示濃度のrSPD(n/CRD)およびその後ヨウ化プロピジウムとインキュベートし、細胞に結合した赤色ヨウ化プロピジウムを、FACS分析で測定した。4および20μg/mlのrSPD(n/CRD)の存在下で、タンパク質の非存在下での16.8%と比較して、それぞれ11.4%および2.1%の細胞を含んでいた。これらの結果は、rSPD(n/CRD)がアポトーシス細胞上のDNAに結合することを示す。

40

#### 【0418】

インビボでのDNAのクリアランスの欠損を証明するために、本発明者らは、SP-Dノックアウトマウス(SP-D<sup>(-/-)</sup>)から肺泡マクロファージを単離し、野生型およびSP-Aノックアウトマウス(SP-A<sup>(-/-)</sup>)とDNA取り込み能力について比較した。データ(図21)は、SP-D欠損マウスから単離した肺泡マクロファージのDNA除去(4.0%)は、野生型(10.5%)またはSP-A欠損マウス(13.2%)と比較して低いことを示す。これらの結果により、SP-Dは肺内のDNA除去経路で重要な役割を果たすことが示唆される。

#### 【0419】

#### [参考文献]

50

## 【表 3 A】

Platts-Mills, T. A., and M. D. Chapman. 1987. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. *J Allergy Clin Immunol.* 80:755-75.

Platts-Mills, T. A., E. B. Mitchell, M. D. Chapman, and P. W. Heymann. 1987. Dust mite allergy: its clinical significance. *Hosp Pract (Off Ed).* 22:91-3, 97-100.

Pollart, S. M., M. D. Chapman, and T. A. Platts-Mills. 1987. House dust sensitivity and environmental control. *Prim Care.* 14:591-603. 10

Arruda, L. K., B. J. Mann, and M. D. Chapman. 1992. Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f I, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. *J Immunol.* 149:3354-9.

Cai, G. Z., G. L. Griffin, R. M. Senior, W. J. Longmore, and M. A. Moxley. 1999. Recombinant SP-D carbohydrate recognition domain is a chemoattractant for human neutrophils. *Am J Physiol.* 276:L131-6. 20

Hickling, T. P., H. Bright, K. Wing, D. Gower, S. L. Martin, R. B. Sim, and R. Malhotra. 1999. A recombinant trimeric surfactant protein D carbohydrate recognition domain inhibits respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Eur J Immunol.* 29:3478-84.

Kishore, U., L. E. A. Leigh, P. Eggleton, P. Strong, M. V. Perdikoulis, A. C. Willis, and K. B. Reid. 1998. Functional characterization of a recombinant form of the C-terminal, globular head region of the B-chain of human serum complement protein, C1q. *Biochem J.* 333:27-32. 30

Madan, T., U. Kishore, A. Shah, P. Eggleton, P. Strong, J. Y. Wang, S. S. Aggrawal, P. U. Sarma, and K. B. Reid. 1997. Lung surfactant proteins A and D can

## 【表 3 B】

inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol.* 110:241-9.

Madan, T., U. Kishore, M. Singh, P. Strong, H. Clark, E. M. Hussain, K. B. Reid, and P. U. Sarma. 2001. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J Clin Invest.* 107:467-75. 10

Madan, T., U. Kishore, M. Singh, P. Strong, E. M. Hussain, K. B. Reid, and P. U. Sarma. 2001. Protective role of lung surfactant protein d in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 69:2728-31.

Awasthi S, Coalson JJ, Yoder BA, Crouch E, King RJ. Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Feb;163(2):389-97. 20

Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 23;97(11):5972-7.

Madan, T., et al., *Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by Aspergillus fumigatus antigens and allergens.* *J Clin Invest,* 2001. 107(4): p.467-75. 30

The following numbered citations are referred to in the section on “Surfactant Replacement Therapy”:

1. Jobe A. Surfactant treatment for respiratory distress syndrome. *Respir Care* 1986;31(6):467-476. 40

## 【表 3 C】

2. Berry D. Neonatology in the 1990's: surfactant replacement therapy becomes a reality. *Clin Pediatr* 1991;30(3):167-170.
3. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 1959;97:517-523.
4. von Neergard K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik: die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Ges Exp Med* 1929;66:373. 10
5. Hallman M, Teramo K, Ylikorkala O, Merritt TA. Natural surfactant substitution in respiratory distress syndrome. *J Perinat Med* 1987;15:463-468.
6. Stableman MT. Acute respiratory disorders in the newborn. In: Avery G, ed. *Neonatology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1975:221-249. 20
7. Horbar JD, Wright EC, Onstad L. Decreasing mortality associated with the introduction of surfactant therapy: an observational study of neonates weighing 601 to 1300 grams at birth. *Pediatrics* 1993;92(2):191-196.
8. Lang MJ, Hall RT, Reddy NS, Kurth CG, TA Merritt. A controlled trial of human surfactant replacement therapy for severe respiratory distress syndrome in very low birth weight infants. *J Pediatr* 1990;116(2):295-300. 30
9. Hoekstra RE, Jackson JC, Myers TF, Frantz ID III, Stern ME, Powers WF, et al. Improved neonatal survival following multiple doses of bovine surfactant in very premature neonates at risk for respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1991;88(1):10-18.
10. Kattwinkel J, Bloom BT, Delmore P, Davis CL, Farrell E, Friss H, et al. Prophylactic administration of calf lung surfactant extract is more effective than early 40

## 【表 3 D】

treatment of respiratory distress syndrome in neonates of 29 through 32 weeks' gestation. *Pediatrics* 1993;92(1):90-98.

11.Merritt TA, Hallman M, Berry C, Pohjavuori M, Edwards DK, Jaaskelainen J, et al. Randomized, placebo-controlled trial of human surfactant given at birth versus rescue administration in very low birth weight infants with lung immaturity. *J Pediatr* 1991;118(4):581-594. 10

12.Dunn MS, Shennan AT, Zayack D, Possmayer F. Bovine surfactant replacement therapy in neonates of less than 30 weeks' gestation: a randomized controlled trial of prophylaxis versus treatment. *Pediatrics* 1991;87(3):377-386.

13.Long W, Thompson T, Sundell H, Schumacher R, Volberg F, Guthrie R, et al. Effects of two rescue doses of a synthetic surfactant on mortality rate and survival without bronchopulmonary dysplasia in 700- to 1350-gram infants with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1991;118(4):595-605. 20

14.Liechty EA, Donovan E, Purohit D, Gilhooly J, Feldman B, Noguchi A, et al. Reduction of neonatal mortality after multiple doses of bovine surfactant in low birth weight neonates with respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1991;88(1):19-28.

15.Long W, Corbet A, Cotton R, Courtney S, Mc Guinness G, Walter D, et al. A controlled trial of synthetic surfactant in infants weighing 1250 g or more with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1991;325(24):1696-1703. 30

16.Fujiwara T, Konishi M, Chida S, Okuyama K, Ogawa Y, Takeuchi Y, et al. Surfactant replacement therapy with a single postventilatory dose of a reconstituted bovine surfactant in preterm neonates with respiratory distress syndrome: final analysis of a multicenter, double-blind, randomized trial and comparison with similar trials. *Pediatrics* 1990;86(5):753-764. 40

## 【表 3 E】

17.The OSIRIS Collaborative Group. Early versus delayed neonatal administration of a synthetic surfactant--the judgement of OSIRIS. *Lancet* 1992;340(8832):1363-1369.

18.Ferrara TB, Hoekstra RE, Couser RJ, Gaziano EP, Calvin SE, Payne NR, et al. Survival and follow-up of infants born at 23 to 26 weeks of gestational age: effects of surfactant therapy. *J Pediatr* 1994;124(1):119-124.

10

19.Hallman M, Merritt TA, Jarvenpaa A-L, Boynton B, Mannino F, Gluck L, et al. Exogenous human surfactant for treatment of severe respiratory distress syndrome: a randomized prospective clinical trial. *J Pediatr* 1985;106(6):963-969.

20.Berry DD, Pramanik AK, Phillips JB III, Buchter DS, Kanarek KS, Easa D, et al. Comparison of the effect of three doses of a synthetic surfactant on the alveolar-arterial oxygen gradient in infants weighing  $\geq$  1250 grams with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1994;124(2):294-301.

20

21.Gortner L, Bartmann P, Pohlandt F, Bernsau U, Porz F, Hellwege HH, et al. Early treatment of respiratory distress syndrome with bovine surfactant in very preterm infants: a multicenter controlled clinical trial. *Pediatr Pulmonol* 1992;14(1):4-9.

22.Corbet AJ, Long WA, Murphy DJ, Garcia-Prats JA, Lombardy LR, Wold DE. Reduced mortality in small premature infants treated at birth with a single dose of synthetic surfactant. *J Paediatr Child Health* 1991;27(4):245-249.

30

23.Bose C, Corbet A, Bose G, Garcia-Prats J, Lombardy L, Wold D, et al. Improved outcome at 28 days of age for very low birth weight infants treated with a single dose of a synthetic surfactant. *J Pediatr* 1990;117:947-953.

24.Corbet A, Bucciarelli R, Goldman S, Mammel M, Wold D, Long W, and the American Exosurf Pediatric Study Group. Decreased mortality rate among small

40

## 【表 3 F】

premature infants treated at birth with a single dose of synthetic surfactant: a multicenter controlled trial. *J Pediatr* 1991;118(2):277-284.

25.Merritt TA, Hallman M, Bloom BT, Berry C, Benirschke K, Sahn D, et al. Prophylactic treatment of very premature infants with human surfactant. *N Engl J Med* 1986;315(13):785-790.

10

26.Kendig JW, Notter RH, Cox C, Reubens LJ, Davis JM, Maniscalco WM, et al. A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as rescue therapy in newborns of less than 30 weeks' gestation. *N Engl J Med* 1991;324(13):865-871.

27.Egberts J, de Winter JP, Sedin G, deKleine MJ, Broberger U, van Bel F, et al. Comparison of prophylaxis and rescue treatment with Curosurf in neonates less than 30 weeks' gestation: a randomized trial. *Pediatrics* 1993;92(6):768-774.

20

28.Soll RF, Hoekstra RE, Fangman JJ, Corbet AJ, Adams JM, James LS, et al. Multicenter trial of single-dose modified bovine surfactant extract (Survanta) for prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1990;85(6):1092-1102.

29.Heldt GP, Pesonen E, Merritt TA, Elias W, Sahn DJ. Closure of the ductus arteriosus and mechanics of breathing in preterm infants after surfactant replacement therapy. *Pediatr Res* 1989;25(3):305-310.

30

30.Hallman M, Merritt TA, Bry K, Berry C. Association between neonatal care practices and efficacy of exogenous human surfactant: results of a bicenter randomized trial. *Pediatrics* 1992;91(3):552-560.

31.Lotze A, Knight GR, Martin GR, Bulas DI, Hull WM, O'Donnell RM, et al. Improved pulmonary outcome after exogenous surfactant therapy for respiratory failure in term infants requiring extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr* 1993;122(2):261-268.

40

## 【表 3 G】

- 32.Raju TN, Langenberg P. Pulmonary hemorrhage and exogenous surfactant therapy: a meta-analysis. *J Pediatr* 1993;123(4):603-610.
- 33.Horbar JD, Soll RF, Sutherland JM, Kotagal U, Philip AGS, Kessler DL, et al. A multicenter randomized, placebo-controlled trial of surfactant therapy for respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1989;320(15): 959-965. 10
- 34.Horbar JD, Wright LL, Soll RF, Fanaroff AA, Korones SB, Shankaran S, et al. A multicenter randomized trial comparing two surfactants for the treatment of neonatal respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1993;123(5): 757-766.
- 35.Hazan J, Chessex P, Piedboeuf B, Bourgeois M, Bard H, Long W. Energy expenditure during synthetic surfactant replacement therapy for neonatal respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1992;120(2, Part 2):S29-S33. 20
- 36.Speer CP, Harms K, Herting E, Neumann N, Curstedt T, Robertson B. Early versus late surfactant replacement therapy in severe respiratory distress syndrome. *Lung* 1990;168(Suppl):870-876.
- 37.Khammash H, Perlman M, Wojtulewicz, J, Dunn M. Surfactant therapy in full-term neonates with severe respiratory failure. *Pediatrics* 1993;92(1):135-139.
- 38.Stevenson D, Walther F, Long W, Sell M, Paul T, Gong A, et al. Controlled trial of a single dose of synthetic surfactant at birth in premature infants weighing 500 to 699 grams. *J Pediatr* 1992;120(2, Part 2):S3-S12. 30
- 39.Dunn MS, Shennan AT, Possmayer F. Single- versus multiple-dose surfactant replacement therapy in neonates of 30 to 36 weeks' gestation with respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1990;86(4):564-571. 40

## 【表 3 H】

40. Hellstrom-Westas L, Bell AH, Skov L, Greisen G, Svenningsen NW. Cerebroelectrical depression following surfactant treatment in preterm neonates. *Pediatrics* 1992;89(4):643-647.
41. Zola EM, Gunkel JH, Chan RK, Lim MO, Knox I, Feldman BH, et al. Comparison of three dosing procedures for administration of bovine surfactant to neonates with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1992;122(3):453-459. 10
42. Annibale DJ, Hulsey TC, Wallin LA, Engstrom PC. Clinical diagnosis and management of respiratory distress in preterm neonates: effect of participation in a controlled trial. *Pediatrics* 1992;90(3):397-400.
43. Goldman SL, Bosque E, McCann E, Lewis K. Pulmonary mechanics in premature infants one month after treatment with synthetic surfactant. *J Pediatr* 1992;120(2, Part 2):S25-S28. 20
44. Speer CP, Robertson B, Curstedt T, Halliday HL, Compagnone D, Gefeller O, et al. Randomized European multicenter trial of surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: single versus multiple doses of Curosurf. *Pediatrics* 1992; 89(1):13-20.
45. Gunkel JH, Banks PL. Surfactant therapy and intracranial hemorrhage: review of the literature and results of new analyses. *Pediatrics* 1993;92(6):775-786. 30
46. Zola EM, Overbach AM, Gunkel JH, Mitchell BR, Nagle BT, DeMarco NG, et al. Treatment investigational new drug experience with Survanta (beractant). *Pediatrics* 1993;91(3):546-551.
47. van Houten J, Long W, Mullett M, Finer N, Derleth D, McMurray B, et al. Pulmonary hemorrhage in premature infants after treatment with synthetic surfactant: an 40

## 【表 3 I】

autopsy evaluation. *J Pediatr* 1992;120(2, Part 2):S40-S44. Erratum appears in *J Pediatr* 1992;120(5):762.

48. Rubin BK, Ramirez O, King M. Mucus rheology and transport in neonatal respiratory distress syndrome and the effect of surfactant therapy. *Chest* 1992;101(4):1080-1085.

10

49. Goldsmith LS, Greenspan JS, Rubenstein SD, Wolfson MR, Shaffer TH. Immediate improvement in lung volume after exogenous surfactant: alveolar recruitment versus increased distention. *J Pediatr* 1991;119(3):424-428.

50. Bhutani VK, Abbasi S, Long WA, Gerdes JS. Pulmonary mechanics and energetics in preterm infants who had respiratory distress syndrome treated with synthetic surfactant. *J Pediatr* 1992;120(2, Part 2):S18-S24.

20

51. Bhat R, Dziedzic K, Bhutani VK, Vidyasagar D. Effect of single dose surfactant on pulmonary function. *Crit Care Med* 1990;18(6):590-595.

52. Abbasi S, Bhutani VK, Gerdes JS. Long-term pulmonary consequences of respiratory distress syndrome in preterm infants treated with exogenous surfactant. *J Pediatr* 1993;122:446-452.

30

53. Davis JM, Veness-Meehan K, Notter RH, Bhutani VK, Kendig JW, Shapiro DL. Changes in pulmonary mechanics after the administration of surfactant to infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1988;319(8):476-479.

54. Armsby DH, Bellon G, Carlisle K, Rector D, Baldwin R, Stevenson DK, et al. Delayed compliance increase in infants with respiratory distress syndrome following synthetic surfactant. *Pediatr Pulmonol* 1992;14(4):206-213.

40

## 【表 3 J】

55. Couser RJ, Ferrara TB, Ebert J, Hoekstra RE, Fangman JJ. Effects of exogenous surfactant therapy on dynamic compliance during mechanical breathing in preterm infants with hyaline membrane disease. *J Pediatr* 1990;116(1):119-124.

56. Svenningsen NW, Bjorklund L, Vilstrup C, Werner O. Lung mechanics (FRC and static pressure-volume diagram) after endotracheal surfactant instillation: preliminary observations. *Biol Neonate* 1992;61(Suppl 1):44-47. 10

57. Pfenninger J, Aebi C, Bachmann D, Wagner BP. Lung mechanics and gas exchange in ventilated preterm infants during treatment of hyaline membrane disease with multiple doses of artificial surfactant (Exosurf). *Pediatr Pulmonol* 1992;14(1):10-15.

58. Kelly E, Bryan H, Possmayer F, Frndova H, Bryan C. Compliance of the respiratory system in newborn infants pre- and postsurfactant replacement therapy. *Pediatr Pulmonol* 1993;15(4):225-230. 20

59. Yuksel B, Greenough A, Gamsu HR. Respiratory function at follow-up after neonatal surfactant replacement therapy. *Respir Med* 1993;87(3):217-221.

60. Käpä P, Seppänen M, Kero P, Saraste M. Pulmonary hemodynamics after synthetic surfactant replacement in neonatal respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1993;123(1):115-119. 30

61. Sitler CG, Turnage CS, McFadden BE, Smith EO, Adams JM. Pump administration of exogenous surfactant: effects on oxygenation, heart rate, and chest wall movement of premature infants. *J Perinatol* 1993;13(3):197-200.

62. Centers for Disease Control. Update: Universal Precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR* 1988;37:377-382,387-388. 40

## 【 0 4 2 0 】

本明細書中に記載の各特許出願および特許、これらの各特許出願および特許で引用または参照した書類（各特許出願および特許の実施中を含む）（「出願引用書類」）、ならびに各特許出願および特許ならびに任意の出願引用書類に引用もしくは記載された任意の生成物についての任意の製造者の説明書またはカタログは、本明細書中で引用することにより本明細書の一部をなすものとする。さらに、本明細書中で引用された全ての書類、本明細書中で引用された書類で引用もしくは参照された全ての書類、ならびに本明細書中で引用もしくは記載された任意の生成物についての任意の製造者の説明書もしくはカタログは、本明細書中で引用することにより本明細書の一部をなすものとする。 50

## 【 0 4 2 1 】

本発明の記載の方法および系の種々の修正形態および変形形態は、本発明の範囲および精神を逸脱することなく当業者に自明である。本発明は、特定の好ましい実施形態と共に記載されているが、このような特定の実施形態に特許請求の範囲に記載の本発明が過度に制限されないと理解すべきである。実際、分子生物学分野または関連分野の当業者に自明の本発明の記載の実施様式の修正形態が特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

## 【 0 4 2 2 】

[ 配列表 ]

## 【 化 6 A 】

10

## SEQUENCE LISTONG

SEQ ID NO: 1

Amino acid sequence of rSPD(n/CRD)

*GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKV*  
*ELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAENAALQQLVVA*  
*KNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKW*  
*NDRACGEKRLVVCEF*

20

SEQ ID NO: 2

Nucleotide sequence of rSPD(n/CRD)

*GGAAGCCCGGATTGAAGGGGACAAAGGCATTCCTGGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGAA*  
*AGTGGGCTTCCAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTA*  
*CAGCACCTCCAGGCTGCTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTTCCCAAATGGCCAA*  
*AGTGTGGGGGAGAAGATTTTCAAGACAGCAGGCTTTGTAAAACCATTTACGGAGGCACAG*  
*CTGCTGTGCACACAGGCTGGTGGACAGTTGGCCTCTCCACGCTCTGCCGCTGAGAATGCC*  
*GCCTTGCAACAGCTGGTCGTAGCTAAGAACGAGGCTGCTTTCCTGAGCATGACTGATTCC*  
*AAGACAGAGGGCAAGTTCACCTACCCACAGGAGAGTCCCTGGTCTATTCCAACCTGGGCC*  
*CCAGGGGAGCCCAACGATGATGGCGGGTTCAGAGGACTGTGTGGAGATCTTCACCAATGGC*  
*AAGTGGAATGACAGGGCTTGTGGAGAAAAGCGTCTTGTGGTCTGCGAGTTCTGA*

30

SEQ ID NO: 3

Nucleotide sequence of human SP-D cDNA clone (accession number NM\_003019.1)

*ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCCCCTGGGCTACCTGGAA*  
*GCAGAAATGAAGACCTACTCCACAGAACAATGCCAGTGCTTGACCCCTGGTCATGTGT*  
*AGCTCAGTGGAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGACGGGATGGGAGAGAGGGCCCTCGG*  
*GGCGAGAAGGGGGACCCAGGTTTGCCAGGAGCTGCAGGGCAAGCAGGGATGCCTGGACAA*  
*GCTGGCCCAGTTGGGCCAAAAGGGGACAATGGCTCTGTTGGAGAACCTGGACCAAAGGGA*  
*GACACTGGGCCAAGTGGACCTCCAGGACCTCCCGGTGTGCCTGGTCCAGCTGGAAGAGAA*  
*GGTGCCCTGGGGAAGCAGGGGAACATAGGACCTCAGGGCAAGCCAGGCCAAAAGGAGAA*  
*GCTGGGCCTAAAGGAGAAGTAGGTGCCCCAGGCATGCAGGGCTCGGCAGGGGCAAGAGGC*  
*CTCGCAGGCCCTAAGGGAGAGCGAGGTGTCCCTGGTGAGCGTGGAGTCCCTGGAAACACA*  
*GGGGCAGCAGGGTCTGCTGGAGCCATGGGTCCCCAGGGAAGTCCAGGTGCCAGGGGACCC*  
*CCGGGATTGAAGGGGGACAAAGGCATTCCTGGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGAAAGTGGG*

40

50

## 【化 6 B】

CTTCCAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCAC  
 CTCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTCTTCCCAAATGGCCAAAGTGTG  
 GGGGAGAAGATTTTCAAGACAGCAGGCTTTGTAAAACCATTTACGGAGGCACAGCTGCTG  
 TGCACACAGGCTGGTGGACAGTTGGCCTCTCCACGCTCTGCCGCTGAGAATGCCGCCTTG  
 CAACAGCTGGTTCGTAGCTAAGAACGAGGCTGCTTTCCTGAGCATGACTGATTCCAAGACA  
 GAGGGCAAGTTCACCTACCCACAGGAGAGTCCCTGGTCTATTCCAACCTGGGCCCCAGGG  
 GAGCCCAACGATGATGGCGGGTCAGAGGACTGTGTGGAGATCTTACCAATGGCAAGTGG  
 AATGACAGGGCTTGTGGAGAAAAGCGTCTTGTGGTCTGCGAGTTCTGA

10

SEQ ID NO: 4

Amino acid sequence of human SP-D (translated from SEQ ID NO: 3)

MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVESGLPGRDGRDGREGPR  
 GEKGDPLPGAAGQAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPGPAGRE  
 GALGKQGNIGPQKPGPKGEAGPKGEVGPMPQGSAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNT  
 GAAGSAGAMGPQGSFGARGPPGLKGDKGI PGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQH  
 LQAAFSQQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAENAAL  
 QQLVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKW  
 NDRACGEKRLVVCEF\*

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0423】

【図1A】ヒトSP-D (rSPD (n/CRD)) の組換えフラグメントの構造を示す図である。これは、ネック領域および炭水化物認識ドメイン (CRD) の三量体から構成され、オックスフォード大学のMRC免疫化学研究所 (Unit) で発現、精製、およびキャラクタライズした。

【図1B】主に18kDaのバンドを示すアスペルギルス・フミガーツスの1週間培養濾過物のSDS-PAGEを示す図である。

【図2A】Afu<sub>1wcf</sub>での鼻腔内攻撃誘発後および1週間後にAfuのみでの再攻撃誘発後に10μgのrSPD (n/CRD) またはPBSを5日間毎日鼻腔内投与する処置から3日後に測定したAfuマウスモデルの血清IGEを示す図である。Pは、PBS処置非感作マウス、APは、PBS処置感作マウス、ARは、rSPD (n/CRD) 処置感作マウス、APrcは、PBSで処置したAfu再攻撃誘発マウス、ARrcは、rSPD (n/CRD) で処置したAfu再攻撃誘発マウスである。

30

【図2B】AfuマウスモデルにおけるAfu特異的IGEを示す図である。上記の図2Aと同様であるが、Afu特異的IGG1を測定する。

【図3】Afu<sub>1wcf</sub>での鼻腔内攻撃誘発後および1週間後にAfuのみでの再攻撃誘発後に10μgのrSPD (n/CRD) またはPBSを4日間毎日鼻腔内投与する処置から1日後に測定したAfuマウスモデルの末梢血好酸球増多症を示す図である。Pは、PBS処置非感作マウス、APは、PBS処置感作マウス、ARは、rSPD (n/CRD) 処置感作マウス、APrcは、PBSで処置したAfu再攻撃誘発マウス、ARrcは、rSPD (n/CRD) で処置したAfu再攻撃誘発マウスである。

40

【図4A・4B・4C】Afu<sub>1wcf</sub>での鼻腔内攻撃誘発後に10μgのrSPD (n/CRD) で2日間毎日鼻腔内投与する処置から1日後に測定したAfuマウスモデルのサイトカインを示す図である。図4A：脾臓中で測定したIL-12、図4B：脾臓中で測定したIFN-、図4C：脾臓中で測定したIL-4。P = PBS処置非感作マウス、APは、PBS処置感作マウス、ARは、rSPD (n/CRD) 処置感作マウス、AAは、rhSP-A処置感作マウス。

【図5A・5B】Afuマウスモデルの気道過敏症。マウスに、Afu<sub>1wcf</sub>での鼻

50

腔内攻撃誘発後に10 $\mu$ gのrSPD(n/CRD)で4日間毎日鼻腔内投与する処置を行う。処置の完了後にAfu1wcfのみを3日間投与する鼻腔内攻撃誘発から2時間後にプレチスモグラフィを測定した。図A：漸増用量のメタコリンに対する用量応答。図5B：Afu1wcfでの鼻腔内攻撃誘発後に10 $\mu$ gのrSPD(n/CRD)またはrhSP-4を4日間毎日鼻腔内投与する処置後の30mg/mlメタコリンに対する応答。Pは、PBS処置非感作マウス、APは、PBS処置感作マウス、ARは、rSPD(n/CRD)処置感作マウス、AAは、rhSP-A処置感作マウスである。

【図6】処置(図6A：PBS、図6B：rSPD(n/CRD)、またはc：PBSで処置した非感作マウス)後の感作マウスのAfuマウスモデルのH&E染色肺切片を示す図である。

【図7A】細胞内サイトカイン染色およびその後のIL-12陽性の高度に染色された細胞(PE>1000)の割合についてのFACS分析によって測定された、処置後のDerp感作マウスの肺ホモジネート中のIL-12の分析を示す図である。PBSは、PBSで処置した非感作マウス。HPは、PBSで処置した感作マウス。HRは、10 $\mu$ gのrSP-D(N/CRD)で処置した感作マウス。

【図7B】細胞内サイトカイン染色およびその後のIL-12陽性の高度に染色された細胞(PE>1000)の割合についてのFACS分析によって測定された、処置後のDerp感作マウスの脾臓ホモジネート中のIL-12の分析を示す図である。PBSは、PBSで処置した非感作マウス。HPは、PBSで処置した感作マウス。HRは、10 $\mu$ gのrSP-D(N/CRD)で処置した感作マウス。HBは、10 $\mu$ gのBSAで処置した感作マウス。

【図7C】細胞内サイトカイン染色およびその後のIFN- $\gamma$ 陽性の高度に染色された細胞(PE>1000)の割合についてのFACS分析によって測定された、処置後のDerp感作マウスの脾臓ホモジネート中のIFN- $\gamma$ の分析を示す図である。PBS = PBSで処置した非感作マウス。HP = PBSで処置した感作マウス。HR = 10 $\mu$ gのrSP-D(N/CRD)で処置した感作マウス。

【図7D】細胞内サイトカイン染色およびその後のTFN- $\alpha$ 陽性の高度に染色された細胞(PE>1000)の割合についてのFACS分析によって測定された、処置後のDerp感作マウスの脾臓ホモジネート中のTFN- $\alpha$ の分析を示す図である。PBSは、PBSで処置した非感作マウス。HPは、PBSで処置した感作マウス。HRは、10 $\mu$ gのrSP-D(N/CRD)で処置した感作マウス。

【図8A】(タイトル「処置4日目の20mg/mlメタコリンでの1分間の攻撃誘発に対する平均Penh応答」)は、処置の最後の4日間に測定したアレルギーマウスの気道過敏症(AHR)に対するrSPD(n/CRD)での処置の効果を示すグラフである。アレルギーマウスを、ヤケヒョウヒダニで感作する。PBSコントロールは、PBSで処置した非感作マウスを示す。処置4日目の20mg/mlメタコリンでの1分間の攻撃誘発に対する平均Penh応答を示す。X軸：左：PBSコントロール、中央：Derp-PBS、右：Derp-rSPD；Y軸：バックグラウンドを越えるPenhの%。

【図8B】(タイトル「メタコリン攻撃誘発によって誘導されたアレルギーマウスの気道過敏症」)は、PBSまたはrSPD(n/CRD)での処置から4日後のアレルゲンでの再攻撃誘発後のメタコリンに対する用量応答を示すグラフである。アレルギーマウスを、ヤケヒョウヒダニで感作する。PBS-PBSコントロールは、PBSで処置した非感作マウスを示す。メタコリン攻撃誘発によって誘導されたアレルギーマウスで気道過敏症(AHR)を測定する。X軸：メタコリン(mg/ml)；菱形：PBS-PBS、四角：Derp-PBS、三角：Derp-rSPD。

【図9】洗浄後の肺胞マクロファージ数に対するrSPD(n/CRD)処置の効果を示すグラフである。X軸：週齢；Y軸：肺胞マクロファージ数 $\times 10^4$ /マウス洗浄物。

【図10A】気管支肺胞洗浄物中の細胞のサイトスピンを示す図である。サイトスピン後に肺胞マクロファージをマラカイトグリーン(上のパネル)またはクリスタルバイオレット(下のパネル)で染色する。処置なし(左上のパネル)、BSA処置(右上のパネル)

10

20

30

40

50

、および r - S P - D 処置 (下のパネル) についての形態学を示す。

【図 10 B】気管支肺胞洗浄物中の細胞のサイトスピンを示す図である。左上: S P - D 欠損マウス由来の非処置細胞; 右上: 野生型マウス由来の細胞; 左下: B S A で処置した S P - D 欠損マウス由来の細胞; 右下: r S P - D で処置した S P - D 欠損マウス由来の細胞。

【図 11】(タイトル「マウスあたりの無細胞洗浄物上清中のリン脂質」) は、総 B A L リン脂質レベルに対する r S P D ( n / C R D ) 処置の効果を示すグラフである。マウスあたりの無細胞洗浄液上清中のリン脂質を示す。X 軸: 週齢; Y 軸: リン脂質 (  $\mu$  g ) / マウス。

【図 12】(タイトル「WT と比較した S P - D K O マウスのケモカイン m R N A レベルおよび r S P - D 処置の効果」) は、野生型と比較した S P - D ノックアウトマウスのケモカイン m R N A レベルおよび r S P - D ( N / C R D ) 処置の効果を示すグラフである。 10

【図 13 A】野生型マウスと比較した S P - D 欠損マウスにおける前方散乱 (細胞サイズ) および側方散乱 (粒度) フローサイトメトリーの代表的な結果を示す図である。

【図 13 B】野生型マウスと比較した S P - D 欠損マウス由来のマクロファージの典型的なアネキシン V および P I 染色パターンを示す図である。

【図 13 C】アネキシン V および / または P I 陽性細胞での F I T C 標識 r S P - D の同時標識範囲を示す図である。

【図 13 D】非処置 S P - D ノックアウトマウス、野生型マウス、r S P - D ( n / C R D ) 処置マウス、P B S 処置マウス、S P - A 処置マウス、および B S A 処置マウスの気管支肺胞洗浄物中のアポトーシス細胞 (上のパネル) および壊死細胞 (下のパネル) の割合を示すグラフである。 20

【図 14】野生型マウス、S P - D ノックアウトマウス、および r S P - D ( n / C R D ) で処置した S P - D ノックアウトマウスの気管支肺胞洗浄物中の G M - C S F 濃度を示すグラフである。

【図 15】F I T C - d U T P (緑) で染色した野生型 (パネル A および B) および ノックアウトマウス (パネル C および D) 由来のマクロファージの共焦点顕微鏡法を示す図である。アポトーシスが進行した細胞は緑色に染色され、初期アポトーシス細胞を、末端標識 D N A フラグメントの特徴的な点状染色によって同定する。 30

【図 16】新たに単離した緑色のマクロファージによるアポトーシス (橙色標識) マクロファージの貪食作用の増強を示す図である。

【図 17】野生型および S P - D ノックアウトマウスにおける血漿コレステロールレベル (m M) を示す図である。

【図 18】ゲノム D N A および S P - D と D N A との複合体の陰性染色された透過型電子顕微鏡画像を示す図である。A: ゲノム D N A。B および C: r S P - D ( n / C R D ) と複合体化したゲノム D N A。D: 天然の S P - D と複合体化したゲノム D N A。

【図 19】r S P - D ( n / C R D ) とマンナンとの間の結合が、デオキシリボヌクレオチドと競合することを示す図である。固定濃度の r S P - D ( n / C R D ) (  $100 \mu$  g / m L ) は、表示濃度のヘキソース (A) または d N T P (B) を含む 5 m M C a C l <sub>2</sub> 含有生理食塩水緩衝液の存在下で S A B I A c o r e チップ上に固定したビオチン化マンナンに結合した。 40

【図 20】r S P D ( n / C R D ) によるヨウ化プロピジウム結合の阻害を示す図である。

【図 21】S P - D ノックアウトマウスから単離した肺胞マクロファージが D N A 除去で欠損することを示す図である。肺胞マクロファージを、野生型 (A、D) または S P - A ノックアウトマウス ( S P - A <sup>(-/-)</sup> ) (B、E)、または S P - D ノックアウトマウス ( S P - D <sup>(-/-)</sup> ) (C、F) の肺洗浄物から単離し、洗浄し、緩衝液 (A、B、C) または C y 3 標識 (赤色) 肺 D N A (D、E、F) のいずれかとインキュベートした。D N A 取り込みを、F L 2 - H での F A C S によってモニターし、非特異的 F L 1 - H に対し 50

てグラフ化した。DNAを取り込んだ肺胞マクロファージの割合を、図に示した(D、E、F)。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1

Amino acid sequence of rSPD(n/CRD)

*GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKV*  
 5 ELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAENAALQQLVVA 10  
 KNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKW  
 NDRACGEKRLVVCEF

SEQ ID NO: 2

10 Nucleotide sequence of rSPD(n/CRD)

GGAAGCCCGGGATTGAAGGGGGACAAAGGCATTCCTGGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGAA  
 AGTGGGCTTCCAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTA  
 CAGCACCTCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTCTTCCCAAATGGCCAA  
 AGTGTGGGGGAGAAGATTTCAAGACAGCAGGCTTTGTAAAACATTTACGGAGGCACAG 20  
 15 CTGCTGTGCACACAGGCTGGTGGACAGTTGGCCTCTCCACGCTCTGCCGCTGAGAATGCC  
 GCCTTGCAACAGCTGGTTCGTAGCTAAGAACGAGGCTGCTTTCTGAGCATGACTGATTCC  
 AAGACAGAGGGCAAGTTCACCTACCCACAGGAGAGTCCCTGGTCTATTCCAACCTGGGCC  
 CCAGGGGAGCCCAACGATGATGGCGGGTCAGAGGACTGTGTGGAGATCTTCACCAATGGC  
 AAGTGGAAATGACAGGGCTTGTGGAGAAAAGCCTCTTGTGGTCTGCGAGTTCTGA  
 20

SEQ ID NO: 3

Nucleotide sequence of human SP-D cDNA clone (accession number NM\_003019.1)

ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCCTGCTCACACAGCCCTGGGCTACCTGGAA 30  
 GCAGAAATGAAGACCTACTCCACAGAACAAATGCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGT  
 25 AGCTCAGTGGAGAGTGGCCTGCCTGGTCCGATGGACGGGATGGGAGAGAGGGCCCTCGG  
 GGCGAGAAGGGGGACCCAGGTTTGCCAGGAGCTGCAGGGCAAGCAGGGATGCCTGGACAA  
 GCTGGCCCAGTTGGGCCAAAAGGGGACAATGGCTCTGTTGGAGAACCCTGGACCAAAGGGA  
 GACACTGGGCCAAGTGGACCTCCAGGACCTCCCGGTGTGCCTGGTCCAGCTGGAAGAGAA  
 GGTGCCCTGGGGAAGCAGGGGAACATAGGACCTCAGGGCAAGCCAGGCCAAAAGGAGAA  
 30 GCTGGGCCTAAAGGAGAAGTAGGTGCCCCAGGCATGCAGGGCTCGGCAGGGGCAAGAGGC  
 CTCGCAGGCCCTAAGGGAGAGCGAGGTGTCCCTGGTGGAGCGTGGAGTCCCTGGAAACACA  
 GGGGCAGCAGGGTCTGCTGGAGCCATGGGTCCCCAGGGAAGTCCAGGTGCCAGGGGACCC  
 CCGGGATTGAAGGGGGACAAAGGCATTCCTGGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGAAAAGTGGG 40

```

CTTCCAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCAC
CTCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTCTTCCCAAATGGCCAAAGTGTG
GGGAGAAAGATTTTCAAGACAGCAGGCTTTGTAAAACCATTTACGGAGGCACAGCTGCTG
TGCACACAGGCTGGTGGACAGTTGGCCTCTCCACGCTCTGCCGCTGAGAATGCCGCCTTG
5 CAACAGCTGGTCGTAGCTAAGAACGAGGCTGCTTTCTGAGCATGACTGATTCCAAGACA
GAGGGCAAGTTCACCTACCCACAGGAGAGTCCCTGGTCTATTCCAAC TGGGCCCCAGGG
GAGCCCAACGATGATGGCGGGTCAGAGGACTGTGTGGAGATCTTCACCAATGGCAAGTGG
AATGACAGGGCTTGTGGAGAAAAGCGTCTTGTGGTCTGCGAGTTCTGA

```

10

10 SEQ ID NO: 4

Amino acid sequence of human SP-D (translated from SEQ ID NO: 3)

```

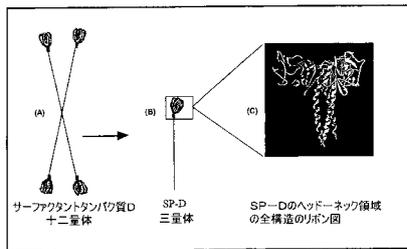
MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVESGLPGRDGRDREGPR
GEKGDPLPGAAGQAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPGPAGRE
GALGKQGNIGPQKPKGPKGEAGPKGEVGAAPGMQGSAGARGLAGPKGERGVPERGVPNT
15 GAAGSAGAMGPQGSPPGARGPPGLKGDKGI PGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQH
LQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAENAAL
QQLVVAKNEAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKW
NDRACGEKRLVVCEF*

```

20

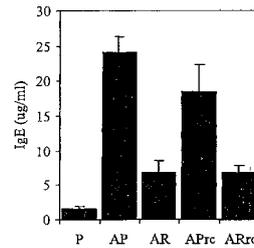
【 図 1 A 】

FIGURE 1A



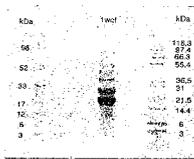
【 図 2 A 】

FIGURE 2A



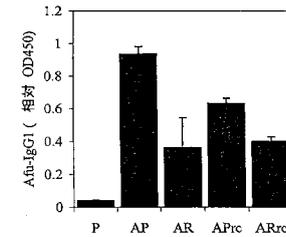
【 図 1 B 】

FIGURE 1B



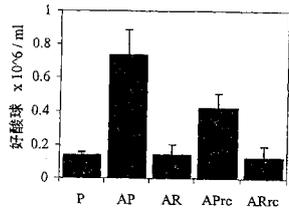
【 図 2 B 】

FIGURE 2B



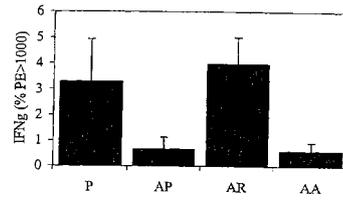
【 図 3 】

FIGURE 3



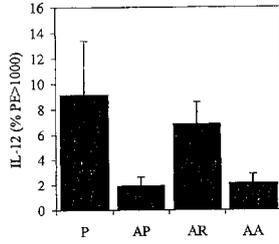
【 図 4 B 】

FIGURE 4B



【 図 4 A 】

FIGURE 4A



【 図 4 C 】

FIGURE 4C

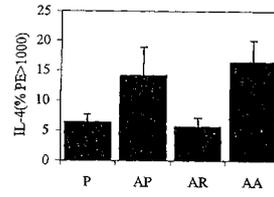
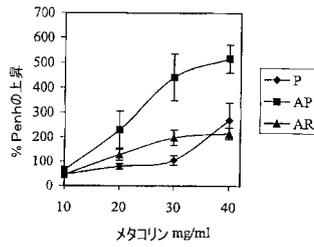


Fig.4c

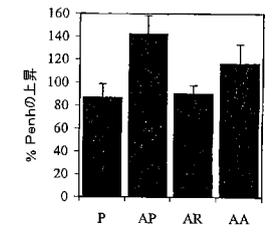
【 図 5 A 】

FIGURE 5A



【 図 5 B 】

FIGURE 5B



【 図 6 】

FIGURE 6A

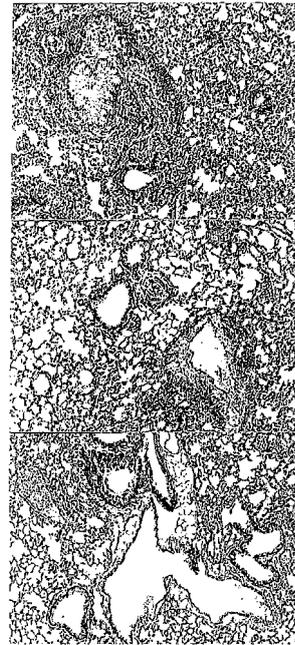
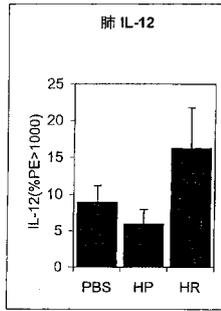


FIGURE 6B

FIGURE 6C

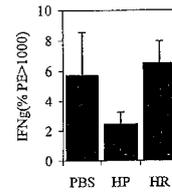
【 図 7 A 】

FIGURE 7A



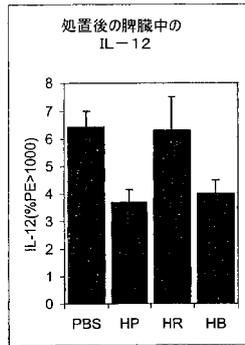
【 図 7 C 】

FIGURE 7C



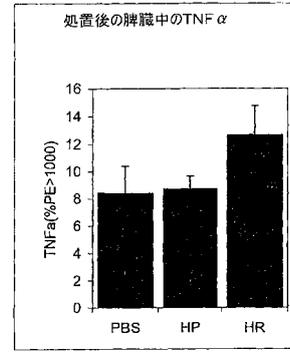
【 図 7 B 】

FIGURE 7B



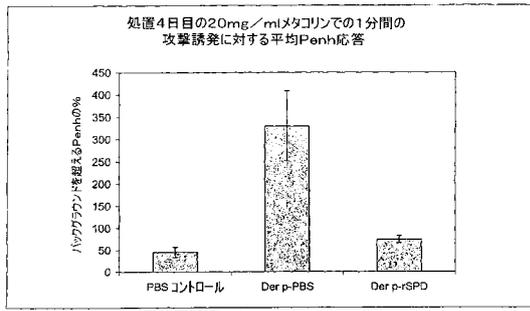
【 図 7 D 】

FIGURE 7D



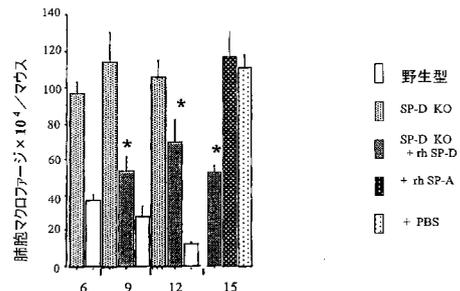
【 図 8 A 】

FIGURE 8A



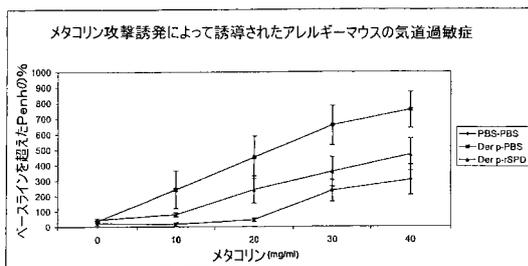
【 図 9 】

FIGURE 9



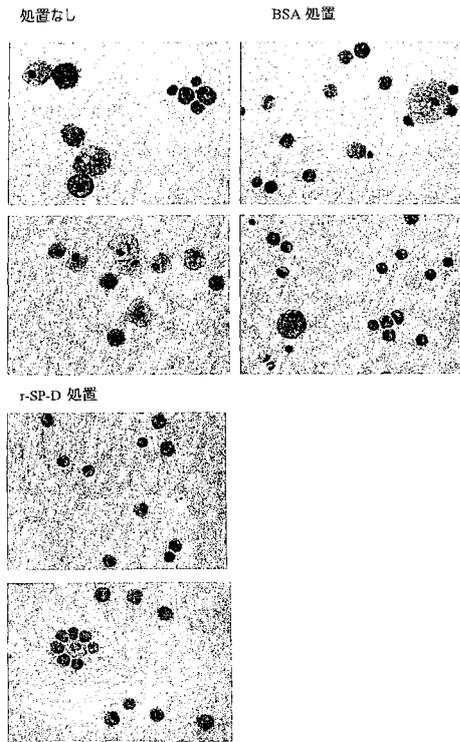
【 図 8 B 】

FIGURE 8B



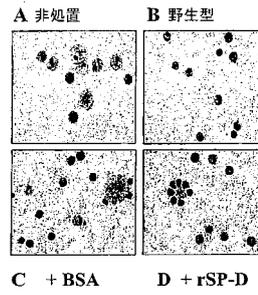
【 図 1 0 A 】

Figure 10A



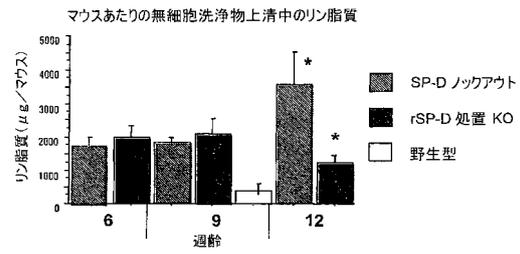
【 図 1 0 B 】

FIGURE 10B



【 図 1 1 】

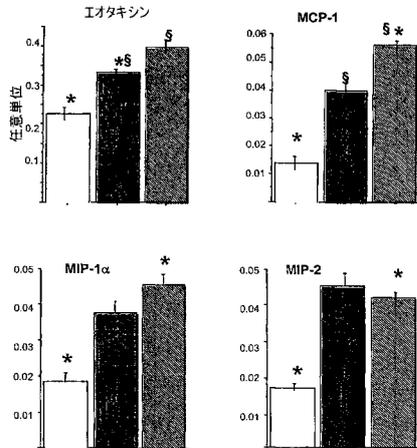
FIGURE 11



【 図 1 2 】

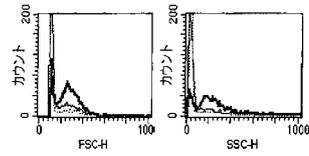
FIGURE 12

WTと比較したSP-D KOマウスのケモカインmRNAレベルおよびrSP-D処置の効果



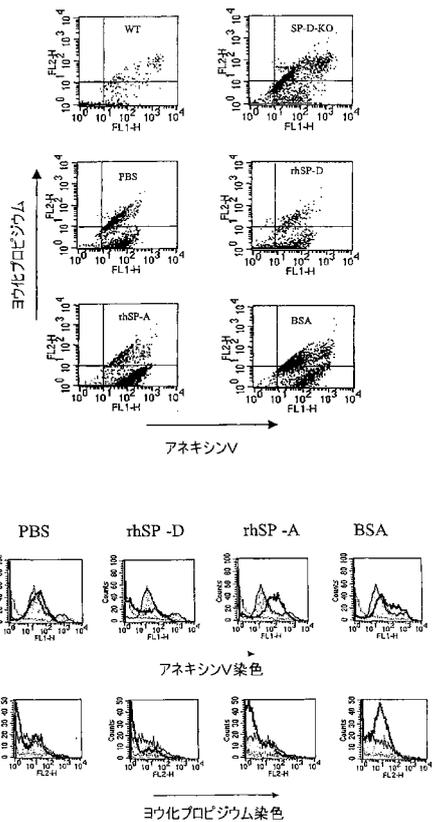
【 図 1 3 A 】

FIGURE 13A



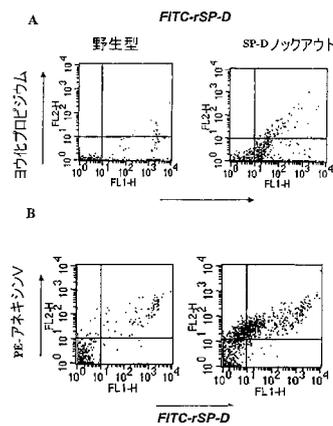
【 図 1 3 B 】

FIGURE 13B



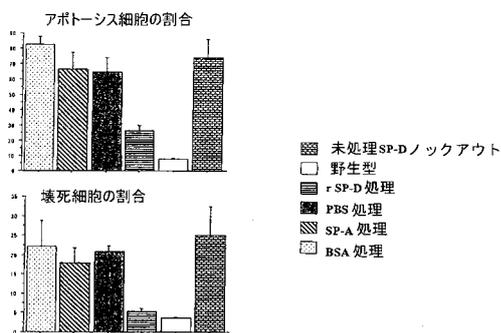
【 図 1 3 C 】

FIGURE 13C



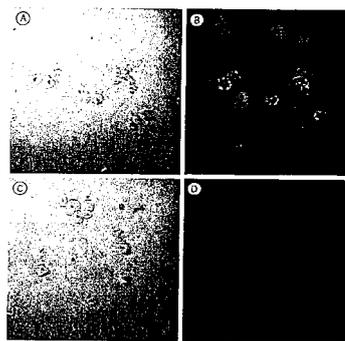
【 図 1 3 D 】

FIGURE 13D



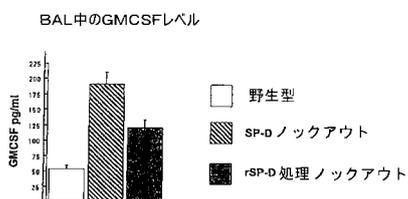
【 図 1 5 】

FIGURE 15



【 図 1 4 】

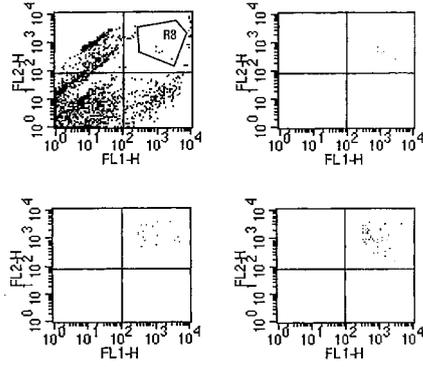
FIGURE 14



【 図 16 】

FIGURE 16

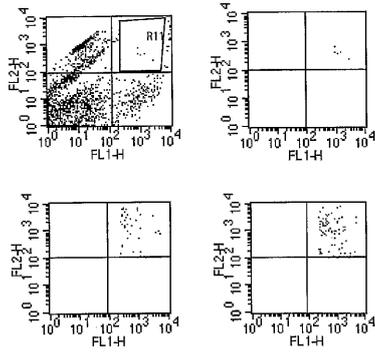
橙色染色



緑色染色

【 図 16 】

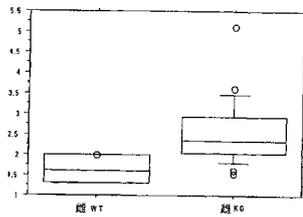
FIGURE 16



【 図 17 】

FIGURE 17

野生型およびSP-Dノックアウトマウスにおける血漿コレステロール(mM)

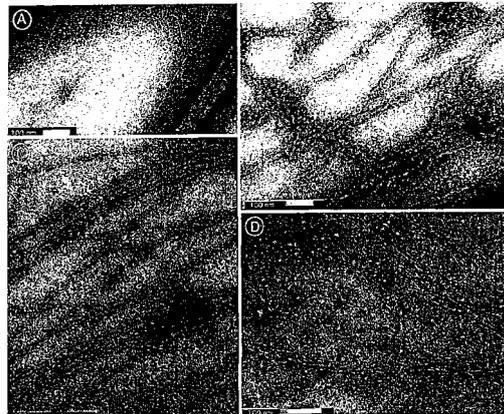


近似t検定  
検定相違=0

群	平均相違	DF	t値	P値
雄 WT, 雄 KO	0.688	8	2.895	.0204

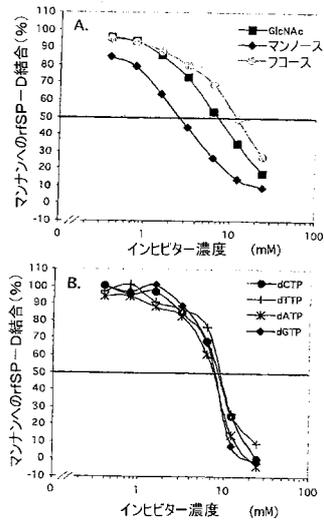
【 図 18 】

FIGURE 18



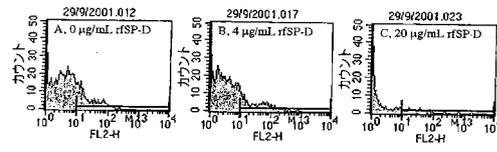
【 図 19 】

FIGURE 19



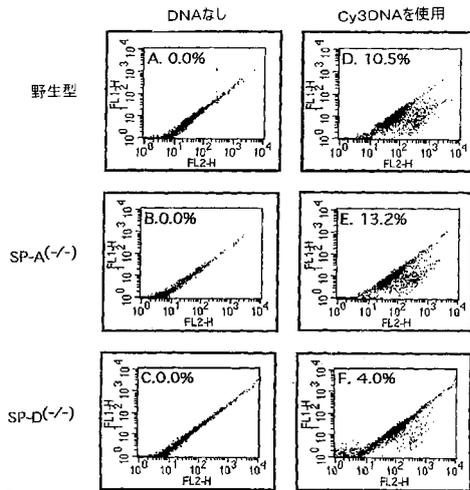
【 図 20 】

FIGURE 20



【 図 21 】

FIGURE 21



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB 02/04824
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C07K14/785		
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 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KISHORE UDAY ET AL: "The alpha-helical neck region of human lung surfactant protein D is essential for the binding of the carbohydrate recognition domains to lipopolysaccharides and phospholipids." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 318, no. 2, 1996, pages 505-511, XP008016789 ISSN: 0264-6021 the whole document  ---  -/--	1-8, 11, 13-19, 25-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<sup>a</sup> 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. *S* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  2 June 2003		Date of mailing of the international search report  18/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Panzica, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/GB	02/04824

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LU J ET AL: "PURIFICATION CHARACTERIZATION AND CDNA CLONING OF HUMAN LUNG SURFACTANT PROTEIN D" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 284, no. 3, 1992, pages 795-802, XP008016793 ISSN: 0264-6021</p>	1-8, 11-19, 25-28
A	<p>abstract figures 4,5 page 81, column 1, paragraph 3</p>	33,34
X	<p>EDA SOUJI ET AL: "Structure of a truncated human surfactant protein D is less effective in agglutinating bacteria than the native structure and fails to inhibit haemagglutination by influenza A virus." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 323, no. 2, 1997, pages 393-399, XP008016790 ISSN: 0264-6021 the whole document</p>	1-8, 11-19, 25-28
X	<p>EP 1 108 786 A (FUSO PHARMACEUTICAL IND) 20 June 2001 (2001-06-20)</p> <p>abstract figures 1,2 examples claims</p>	1-8, 14-19, 25-28
A	<p>REID K B M: "Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL, vol. 1408, no. 2-3, 19 November 1998 (1998-11-19), pages 290-295, XP004276809 ISSN: 0925-4439 the whole document</p>	1-37
A	<p>EGGLETON P ET AL: "Lung surfactant proteins involved in innate immunity" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, vol. 11, no. 1, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 28-33, XP004257653 ISSN: 0952-7915 the whole document</p>	1-37

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internati  
 application No  
 PCT/GD 02/04824

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CROUCH EDMOND ET AL: "Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D): SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 4, 1993, pages 2976-2983, XP002240809 ISSN: 0021-9258 abstract figures 1,2 page 2976, column 1 -column 2	1-8, 14-19, 25-28
X	MADAN TARUNA ET AL: "Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by Aspergillus fumigatus antigens and allergens." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 107, no. 4, February 2001 (2001-02), pages 467-475, XP002240810 ISSN: 0021-9738 cited in the application the whole document	1-9, 11-20, 25-28, 33-37
X	HARTSHORN KEVAN L ET AL: "Enhanced anti-influenza activity of a surfactant protein D and serum conglutinin fusion protein." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 278, no. 1 part 1, January 2000 (2000-01), pages L90-L98, XP002240811 ISSN: 0002-9513 the whole document	1-8,11, 13-19, 25-28
X	CAI GUANG-ZUAN ET AL: "Recombinant SP-D Carbohydrate recognition domain is a chemoattractant for human neutrophils." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 276, no. 1 PART 1, January 1999 (1999-01), pages L131-L136, XP002240812 ISSN: 0002-9513 cited in the application the whole document	1-8, 11-19, 25-28, 35-37

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat application No  
 PCT/US 02/04824

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WANG JIU-YAO ET AL: "Inhibitory effect of pulmonary surfactant proteins A and D on allergen-induced lymphocyte proliferation and histamine release in children with asthma."            AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE,            vol. 158, no. 2, August 1998 (1998-08),            pages 510-518, XP002240813            ISSN: 1073-449X            the whole document</p>	1-9, 11-19, 25-28
X,P	<p>CLARK HOWARD ET AL: "Surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis in vivo."            JOURNAL OF IMMUNOLOGY,            vol. 169, no. 6,            15 September 2002 (2002-09-15), pages            2892-2899, XP002240814            September 15, 2002            ISSN: 0022-1767            the whole document</p>	1-19, 25-28, 34-37
A	<p>WANG JIU-YAO ET AL: "A recombinant polypeptide, composed of the alpha-helical neck region and the carbohydrate recognition domain of conglutinin, self-associates to give a functionally intact homotrimer."            FEBS LETTERS,            vol. 376, no. 1-2, 1995, pages 6-10,            XP001148999            ISSN: 0014-5793            the whole document</p>	1-8
A	<p>POSTLE ANTHONY D ET AL: "Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis."            AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY,            vol. 20, no. 1, January 1999 (1999-01),            pages 90-98, XP002241054            ISSN: 1044-1549            abstract</p>	33-37

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB 02/04824

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:  
  
Although claims 26, 35 and 37 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
on patent family members

International Application No  
PCT/JP 02/04824

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1108786	A	20-06-2001	AU 751173 B2 08-08-2002
			AU 5305699 A 14-03-2000
			CA 2340934 A1 02-03-2000
			EP 1108786 A1 20-06-2001
			CN 1320164 T 31-10-2001
			WO 0011161 A1 02-03-2000

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 27/04	
A 6 1 P 27/04	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00 1 0 1	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00 A	
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 クラーク, ハワード

イギリス国, オーエックス1 3キューユー オックスフォード, サウス・パークス・ロード, ユニヴァーシティ・オヴ・オックスフォード, デパートメント・オヴ・バイオケミストリー, エムアールシー・イムノケミストリー・ユニット

(72) 発明者 ナデサリンガム, パラニヤル

イギリス国, オーエックス1 3キューユー オックスフォード, サウス・パークス・ロード, ユニヴァーシティ・オヴ・オックスフォード, デパートメント・オヴ・バイオケミストリー, エムアールシー・イムノケミストリー・ユニット

(72) 発明者 リード, ケネス・バナーマン・ミルン

イギリス国, オーエックス1 3キューユー オックスフォード, サウス・パークス・ロード, ユニヴァーシティ・オヴ・オックスフォード, デパートメント・オヴ・バイオケミストリー, エムアールシー・イムノケミストリー・ユニット

(72) 発明者 ストロング, ピーター

イギリス国, オーエックス1 3キューユー オックスフォード, サウス・パークス・ロード, ユニヴァーシティ・オヴ・オックスフォード, デパートメント・オヴ・バイオケミストリー, エムアールシー・イムノケミストリー・ユニット

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA36 FB03  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11  
4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ13 QQ42 QQ79 QR32 QR33 QR48 QR72  
QR77 QR80 QS03 QS38 QX01  
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 BA01 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA18 DA40  
DC50 NA14 ZA331 ZA341 ZA591 ZA891 ZB021 ZB111 ZB131 ZB211  
ZB212 ZB261 ZB331 ZB351 ZC411 ZC412 ZC511  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA33 ZA34 ZA59 ZA89 ZB02  
ZB11 ZB13 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35 ZC41 ZC51  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74 GA23