(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2007-524671
(P2007-524671A)
(43)公表日　平成19年8月30日(2007.8.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	ZNA	2G045
A61K 31/663	(2006.01)	A61K	31/663		4B024
A61P 35/04	(2006.01)	A61P	35/04		4B063
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C084
A61P 35/02	(2006.01)	A61P	35/02		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 49 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-551223 (P2006-551223)
(86)(22)出願日　平成17年1月21日 (2005.1.21)
(85)翻訳文提出日　平成18年7月14日 (2006.7.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/001630
(87)国際公開番号　WO2005/070447
(87)国際公開日　平成17年8月4日 (2005.8.4)
(31)優先権主張番号　60/537,985
(32)優先日　平成16年1月21日 (2004.1.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　505177221
カイロン　コーポレイション
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４６６２－８０９７，エミリーヴィル，　ピー．オー．ボックス　８０９７，インテレクチャル　プロパティー　アール３３８
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｍ－ＣＳＦムテインおよびその使用

(57)【要約】
Ｍ－ＣＳＦムテインが、Ｍ－ＣＳＦムテインを含む薬学的組成物、薬学的組成物を含むキット、転移性癌に罹患する被験体における骨転移を防ぐ方法および処置する方法、ならびにＭ－ＣＳＦムテインをスクリーニングする方法と共に提供される。１つの局面において、転移性癌に罹患する被験体に、治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を投与し、それによってこの転移性癌に関連する骨の減少を防ぐ工程を包含する、骨転移を防ぐ方法が提供される。本発明の別の局面において、被験体に治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を投与し、それによってこの転移性癌に関連する骨の減少の重症度を減少させる工程を包含する、骨への転移性癌に罹患する患者を処置する方法が提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
骨転移を防ぐ方法であって、該方法は、転移性癌に罹患する被験体に、治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を投与し、それによって該転移性癌に関連する骨の減少を防ぐ工程を包含する、方法。
【請求項２】
骨への転移性癌に罹患する被験体を処置する方法であって、該方法は、該被験体に治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を投与し、それによって該転移性癌に関連する骨の減少の重症度を減少させる工程を包含する、方法。
【請求項３】
前記被験体が哺乳動物である、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記哺乳動物がヒトである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記ムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプター（Ｍ－ＣＳＦＲ）との間の相互作用を阻害する、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、腫瘍細胞によって誘導される破骨細胞の増殖および／または分化を阻害する、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
請求項５に記載の方法であって、前記転移性癌が、乳癌、肺癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、白血病およびリンパ腫を含む血球悪性疾患；頭部癌および頚部癌；胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌を含む胃腸の癌；卵巣癌、子宮内膜癌、および子宮頸癌を含む、女性の生殖管の悪性疾患；膀胱癌；神経芽細胞種を含む脳腫瘍；肉腫、骨肉種；ならびに悪性黒色腫または扁平上皮細胞癌を含む皮膚癌である、方法。
【請求項８】
Ｍ－ＣＳＦムテインをスクリーニングする方法であって、該方法は、以下の工程：
ａ）転移性腫瘍細胞培地、破骨細胞、および候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を接触させる工程；
ｂ）破骨細胞の形成、増殖、および／または分化を検出する工程；ならびに
ｃ）破骨細胞の形成、増殖、および／または分化の減少が検出される場合、該候補をＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物として同定する工程
を包含する、方法。
【請求項９】
前記転移性腫瘍細胞培地が腫瘍細胞を含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
請求項８に記載の方法であって、ここで、前記接触させる工程（ａ）はインビボで起き、前記検出する工程（ｂ）は、骨転移の大きさおよび／または数を検出する工程を包含し、そして前記候補は、骨転移の大きさおよび／または数の減少が検出される場合に、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物として同定される、方法。
【請求項１１】
前記候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプターであるＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用を阻害するか否かを決定する工程をさらに包含する、請求項８に記載の方法。
【請求項１２】
骨への転移性癌を防ぎ得るか、または処置し得る、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の、Ｍ－ＣＳＦＲへの結合を検出する工程；および
（ｂ）該候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の、骨への転移性癌を防ぐか、

または処置する能力を、インビトロまたはインビボでアッセイする工程
を包含する、方法。
【請求項１３】
骨への転移性癌を防ぎ得るか、または処置し得る、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）Ｍ－ＣＳＦとＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用を阻害する、候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を同定する工程；および
（ｂ）該候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の、骨への転移性癌を防ぐか、または処置する能力を、インビトロまたはインビボでアッセイする工程
を包含する、方法。
【請求項１４】
骨転移および腫瘍の増殖を防ぐ方法であって、該方法は、転移性癌に罹患する被験体に、治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物および治療剤を投与し、それによって、該転移性癌に関連する骨の減少を防ぎ、そして腫瘍の増殖を防ぐ工程を包含する、方法。
【請求項１５】
転移性癌に罹患する患者を処置する方法であって、該方法は、該被験体に治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物および治療剤を投与し、それによって、該転移性癌に関連する骨の減少の重症度を減少させ、そして腫瘍の増殖を阻害する工程を包含する、方法。
【請求項１６】
前記被験体が哺乳動物である、請求項１４または請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記哺乳動物がヒトである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプターであるＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用を阻害する、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、腫瘍細胞によって誘導される破骨細胞の増殖および／または分化を阻害する、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記治療剤がビスホスホネートである、請求項１４または請求項１５に記載の方法。
【請求項２１】
前記ビスホネートが、ゼレドロネート、パミドロネート、クロドロネート、エチドロネート、チルンドロネート、アレンドロネート、またはイバンドロネートである、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記治療剤が化学療法剤である、請求項１４または請求項１５に記載の方法。
【請求項２３】
前記被験体が、ビスホスホネート処置を受けることから妨げられる、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、治療効果を達成するために必要な治療剤の投薬量を減少するために効果的である、請求項１４または請求項１５に記載の方法。
【請求項２５】
非Ｍ－ＣＳＦコロニー刺激因子（例えば、Ｇ－ＣＳＦ）を投与する工程をさらに包含する、請求項１４または請求項１５に記載の方法。
【請求項２６】
Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および癌治療剤を含む薬学的組成物。
【請求項２７】

Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を含む医薬、および該医薬が手術または放射線治療と組み合わせて用いられるべきであることの使用説明書を含む、パッケージ、バイアル、または容器。

【請求項２８】

Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を被験体に投与する工程、および該被験体を手術または放射線治療によって処置する工程を包含する、骨への転移性癌を防ぐか、または処置する方法。

【請求項２９】

癌に罹患した被験体を処置する方法であって、ここで、該癌を含む細胞はＭ－ＣＳＦを分泌せず、該方法は、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項３０】

転移性癌に罹患する被験体における骨転移を防ぐための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。

【請求項３１】

転移性癌に罹患する被験体における、該癌と関連する骨の減少を防ぐための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。

【請求項３２】

骨への転移性癌に罹患する被験体を処置するための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。

【請求項３３】

骨への転移性癌に罹患する被験体における、該癌に関連する骨の減少の重症度を減少させるための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。

【請求項３４】

前記被験体が哺乳動物である、請求項３０～３３に記載の使用。

【請求項３５】

前記哺乳動物がヒトである、請求項３４に記載の使用。

【請求項３６】

前記ムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプター（Ｍ－ＣＳＦＲ）との間の相互作用を阻害する、請求項３５に記載の使用。

【請求項３７】

前記ムテインまたはムテイン産物が、腫瘍細胞によって誘導される破骨細胞の増殖および／または分化を阻害する、請求項３６に記載の使用。

【請求項３８】

請求項３０に記載の使用であって、前記転移性癌が、乳癌、肺癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、白血病およびリンパ腫を含む血球悪性疾患；頭部癌または頸部癌；胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌を含む胃腸の癌；卵巣癌、子宮内膜癌、または子宮頸癌を含む、女性の生殖管の悪性疾患；膀胱癌；神経芽細胞種を含む脳腫瘍；肉腫、骨肉種；あるいは悪性黒色腫または扁平上皮細胞癌を含む皮膚癌である、使用。

【請求項３９】

転移性癌に罹患する被験体における、骨転移および腫瘍の増殖を防ぐための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療剤の使用。

【請求項４０】

転移性癌に罹患する被験体における、該癌に関連する骨の減少を防ぐための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療剤の使用。

【請求項４１】

骨への転移性癌の処置のための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療剤の使用。

【請求項４２】

転移性癌に罹患する被験体における、該癌に関連する骨の減少の重症度を減少させ、そして腫瘍の増殖を阻害するための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療剤の使用。

【請求項４３】

癌の処置における使用のための合わせられた調製物として、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療剤を含む生産物。

【請求項４４】

骨への転移性癌を防ぐか、または処置するための医薬の調製における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用であって、ここで該医薬は、第二の治療剤と同時にか、別々にか、または連続して投与される、使用。

【請求項４５】

骨への転移性癌を防ぐか、または処置するための医薬の調製における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用であって、ここで該医薬は、第二の治療剤を用いた処置と調和される、使用。

【請求項４６】

骨への転移性癌に罹患する被験体を処置するための医薬の調製における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用であって、ここで該被験体は、第二の治療剤で前処置される、使用。

【請求項４７】

骨溶解性疾患を有する患者の処置のための医薬の製造における、ＭＣＳＦムテインまたはムテイン産物の共力作用の組み合わせの使用であって、ここで該医薬は、抗ＭＣＳＦ抗体、抗ＲＡＮＫＬ抗体、可溶性ＲＡＮＫＬレセプター、またはビスホスホネートを用いる処置と調和される、使用。

【請求項４８】

骨への転移性癌を防ぐか、または処置するための医薬の調製における、癌治療剤の使用であって、ここで該医薬は、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物と同時にか、別々にか、または連続して投与される、使用。

【請求項４９】

Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を含む医薬、および該医薬が手術または放射線治療と組み合わせて用いられるべきであることの使用説明書を含む、パッケージ、バイアル、または容器。

【請求項５０】

前記被験体が哺乳動物である、請求項３９～４８に記載の使用。

【請求項５１】

前記哺乳動物がヒトである、請求項４７に記載の使用。

【請求項５２】

前記ムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプターであるＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用を阻害する、請求項４８に記載の使用。

【請求項５３】

前記ムテインまたはムテイン産物が、腫瘍細胞によって誘導される破骨細胞の増殖および／または分化を阻害する、請求項３９～４８に記載の使用。

【請求項５４】

前記第二の治療剤がビスホスホネートである、請求項３９～４８に記載の使用。

【請求項５５】

前記ビスホネートが、ゼレドロネート、パミドロネート、クロドロネート、エチドロネート、チルンドロネート、アレンドロネート、またはイバンドロネートである、請求項５４に記載の使用。

【請求項５６】

前記第二の治療剤が化学療法剤である、請求項３９～４８に記載の使用。

【請求項５７】

前記被験体が、ビスホスホネート処置を受けることから妨げられる、請求項５６に記載の使用。
【請求項５８】
前記第二の治療剤が非Ｍ－ＣＳＦコロニー刺激因子である、請求項５６に記載の使用。
【請求項５９】
前記非Ｍ－ＣＳＦコロニー刺激因子がＧ－ＣＳＦである、請求項５８に記載の使用。
【請求項６０】
骨転移および腫瘍の増殖を処置するか、または防ぐために、被験体に投与される第二の治療剤の用量を減少させるための、医薬の製造におけるＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。
【請求項６１】
骨転移を防ぐための医薬の製造における、癌細胞によって産生されるＭ－ＣＳＦを中和するために効果的な量より大きな量の、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。
【請求項６２】
被験体の細胞により産生されるＭ－ＣＳＦを中和するための医薬の製造における、癌細胞によって産生されるＭ－ＣＳＦを中和するために効果的な量より大きな量の、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。
【請求項６３】
骨への転移性癌に罹患する被験体を処置するための医薬の製造における、癌細胞によって産生されるＭ－ＣＳＦを中和するために効果的な量より大きな量の、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。
【請求項６４】
癌を処置するための医薬の製造における、癌細胞によって産生されるＭ－ＣＳＦを中和するために効果的な量より大きな量の、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２００４年１月２１日出願の、米国仮出願第６０／５３７，９８５号の利益を主張する。
【０００２】
（技術分野）
本発明は、Ｍ－ＣＳＦムテインを被験体に投与することによる、癌転移および癌転移に関連する骨の減少の防止および処置のための方法に関連する。
【背景技術】
【０００３】
（発明の背景）
癌転移は、癌患者における手術後または治療後の再発の主要な原因である。処置を開発するための集中的な努力にもかかわらず、癌転移は実質的に治療が難しいままである。骨は、種々の型のヒトの癌（例えば、乳癌、肺癌、前立腺癌、および甲状腺癌）の転移の最も一般的な部位の一つである。骨溶解性の骨転移の発生は、難治性の痛み、高い骨折の罹患性、神経の圧縮、および高カルシウム血症に起因して、重篤な罹患率の原因となる。これらの臨床的な問題の重要性にもかかわらず、癌転移に関連する骨の減少に利用可能な処置はほとんどない。
【０００４】
破骨細胞は、骨の破壊吸収（ｒｅａｄｓｏｒｐｔｉｏｎ）を媒介する。破骨細胞は、造血性細胞から分化する多核細胞である。破骨細胞が、不完全な細胞分裂ではなく、骨髄内の造血幹細胞に由来する単核の前駆体の融合によって形成されることが、一般に認められる（非特許文献１；非特許文献２；非特許文献３、非特許文献４；非特許文献５；非特許文献６；非特許文献７）。これらは、単球－マクロファージ系統細胞と共通の幹細胞を共有する（非特許文献８、非特許文献９）。破骨細胞前駆体の成熟した多核の破骨細胞への

分化は、ホルモン性刺激および局所性刺激を含む異なる因子を必要とし（非特許文献１０；非特許文献１１；非特許文献７；非特許文献１２）、そして生きた骨および骨細胞が、破骨細胞の発達において重大な役割を果たすことが示されている（非特許文献１３）。骨芽細胞または骨髄間質細胞もまた、破骨細胞の分化に必要である。破骨細胞形成を支持する、これらの細胞により産生される因子の１つは、マクロファージ－コロニー刺激因子、Ｍ－ＣＳＦ（非特許文献１４；非特許文献１５）である。ＮＦ－κＢリガンドのためのレセプター活性化因子（ＲＡＮＫＬ、ＴＲＡＮＣＥ、ＯＤＦ、およびＯＰＧＬとしても公知）は別のシグナルであり（非特許文献４）、これを通して、骨芽細胞／間質細胞が破骨細胞の形成、ならびに、破骨細胞および破骨細胞前駆体上に局在するレセプターＲＡＮＫ（ＴＲＡＮＣＥＲ）を介した再吸収を刺激する（非特許文献１６；非特許文献１７；非特許文献１８；非特許文献１９；非特許文献２０；非特許文献２１）。骨芽細胞はまた、オステオプロテゲリン（ＯＰＧ、ＯＣＩＦとしても公知）と呼ばれる破骨細胞の形成を強力に阻害するタンパク質を分泌し、これはＲＡＮＫＬの囮のレセプターとしてはたらいて、従ってＲＡＮＫおよびＲＡＮＫＬを介する破骨細胞と骨芽細胞との間の陽性のシグナルを阻害する。

【０００５】

破骨細胞は、無機的骨マトリックスおよび有機的骨マトリックス両方の骨マトリックス溶解の原因である（非特許文献２２）。破骨細胞は、分化した膜領域を有する独特の極性化した形態、ならびにいくつかの膜マーカーおよび細胞質マーカー（例えば、酒石酸塩耐性酸ホスファターゼ（ＴＲＡＰ）（Ａｎｄｅｒｓｏｎら（１９７９））、炭酸脱水素酵素ＩＩ（非特許文献２３）、カルシトニンレセプター（非特許文献２４）、およびビトロネクチンレセプター（非特許文献２５））を発現する、最終分化細胞を表す。多核性の破骨細胞は、通常１０個未満の核を含むが、直径が１０μｍと１００μｍとの間である核を１００個まで含み得る（非特許文献２）。このことは、これらを、光学顕微鏡によって比較的容易に同定させる。これらは、活性な状態にある場合、高度に空胞化し、そして多くのミトコンドリアを含み、高い代謝速度を示す（非特許文献２６）。破骨細胞は、骨溶解性の骨転移において主要な役割を果たすので、当該分野において、破骨細胞の刺激を防ぐための新たな因子および方法について必要性がある。

【０００６】

従って、当該分野において、骨溶解性の骨転移を含む癌転移を防ぐか、または処置するための新たな因子および方法を同定するための必要が依然存在する。

【非特許文献１】Ｃｈａｍｂｅｒｓ、Ｂｏｎｅ ａｎｄ Ｍｉｎｅｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（１９８９）６：１－２５
【非特許文献２】Ｇｏｅｔｈｌｉｎｇら、Ｃｌｉｎ Ｏｒｔｈｏｐ Ｒｅｌａｔ Ｒ.（１９７６）１２０：２０１－２２８
【非特許文献３】Ｋａｈｎら、Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５８：３２５－３２７
【非特許文献４】Ｓｕｄａら、Ｅｎｄｏｃｒ Ｒｅｖ（１９９２）１３：６６－８０
【非特許文献５】Ｗａｌｋｅｒ、Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９７３）１８０：８７５
【非特許文献６】Ｗａｌｋｅｒ、Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９７５）１９０：７８５－７８７
【非特許文献７】Ｗａｌｋｅｒ、Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９７５）１９０：７８４－７８５
【非特許文献８】Ａｓｈら、Ｎａｔｕｒｅ（１９８０）２８３：６６９－６７０
【非特許文献９】Ｋｅｒｂｙら、Ｊ．Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ Ｒｅｓ（１９９２）７：３５３－６２
【非特許文献１０】Ａｔｈａｎａｓｏｕら、Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ（１９８８）３：３１７－３３３
【非特許文献１１】Ｆｅｌｄｍａｎら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ（１９８０）１０７：１１３７－１１４３
【非特許文献１２】Ｚｈｅｎｇら、Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ Ｊ（１９９１）２３：１８０－１８８
【非特許文献１３】Ｈａｇｅｎａａｒｓら、Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ（１９８９）６：１７

９－１８９
【非特許文献１４】Ｗｉｋｔｏｒ－Ｊｅｄｒｚｅｊｃｚａｋら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ（１９９０）８７：４８２８－４８３２
【非特許文献１５】Ｙｏｓｈｉｄａら、Ｎａｔｕｒｅ（１９９０）３４５：４４２－４４４
【非特許文献１６】Ｌａｃｅｙら、Ｃｅｌｌ（１９９８）９３：１６５－１７６
【非特許文献１７】Ｔｓｕｄａら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏ（１９９７）２３４：１３７－１４２
【非特許文献１８】Ｗｏｎｇら、Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ（１９９７）１８６：２０７５－２０８０
【非特許文献１９】Ｗｏｎｇら、Ｊ Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ（１９９７）２７２：２５１９０－２５１９４
【非特許文献２０】Ｙａｓｕｄａら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ（１９９８）１３９：１３２９－１３３７
【非特許文献２１】Ｙａｓｕｄａら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳ（１９９８）９５：３５９７－３６０２
【非特許文献２２】Ｂｌａｉｒら、Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ（１９８６）１０２：１１６４－１１７２
【非特許文献２３】Ｖａｅａｅｎａｅｎｅｎら、Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９８３）７８：４８１－４８５
【非特許文献２４】Ｗａｒｓｈａｆｓｋｙら、Ｂｏｎｅ（１９８５）６：１７９－１８５
【非特許文献２５】Ｄａｖｉｅｓら、Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ（１９８９）１０９：１８１７－１８２６
【非特許文献２６】Ｍｕｎｄｙ、Ｐｒｉｍｅｒ ｏｎ ｔｈｅ ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ｂｏｎｅ ｄｉｓｅａｓｅｓ ａｎｄ ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ ｏｆ ｍｉｎｅｒａｌ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ（１９９０）第１８～２２頁

【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
（発明の要旨）
骨転移を防ぐ方法が、本発明によって提供される。１つの局面において、転移性癌に罹患する被験体に、治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を投与し、それによってこの転移性癌に関連する骨の減少を防ぐ工程を包含する、骨転移を防ぐ方法が提供される。本発明の別の局面において、被験体に治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を投与し、それによってこの転移性癌に関連する骨の減少の重症度を減少させる工程を包含する、骨への転移性癌に罹患する患者を処置する方法が提供される。
【０００８】
本発明の関連する局面において、被験体が哺乳動物またはヒトである、前述の方法が提供される。別の関連する局面において、上記のムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプター（Ｍ－ＣＳＦＲ）との間の相互作用を阻害する方法が提供される。さらに別の局面において、上記のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、腫瘍細胞により誘導される破骨細胞の増殖および／または分化を阻害する方法が提供される。なお別の関連する局面において、上記の転移性癌が、乳癌、肺癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、白血病およびリンパ腫を含む血球悪性疾患；頭部癌および頚部癌；胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌を含む胃腸の癌；卵巣癌、子宮内膜癌、および子宮頸癌を含む、女性の生殖管の悪性疾患；膀胱癌；神経芽細胞種を含む脳腫瘍；肉腫、骨肉種；ならびに悪性黒色腫または扁平上皮細胞癌を含む皮膚癌である方法が提供される。
【０００９】
Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物をスクリーニングする方法が、本発明によって

提供される。１つの局面において、転移性腫瘍細胞培地、破骨細胞、および候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を接触させる工程；破骨細胞の形成、増殖、および／または分化を検出する工程；ならびに、破骨細胞の形成、増殖、および／または分化の減少が検出される場合、上記の候補をＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物として同定する工程を包含する、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物をスクリーニングする方法が提供される。関連する局面において、上記の転移性腫瘍細胞培地が腫瘍細胞を含有する方法が提供される。なお別の関連する局面において、接触させる工程（ａ）はインビボで起き、検出する工程（ｂ）は、骨転移の大きさおよび／または数を検出する工程を包含し、そして上記の候補は、骨転移の大きさおよび／または数の減少が検出される場合に、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物として同定される、方法が提供される。さらに別の関連する実施形態において、上記の候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプターであるＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用を阻害するか否かを決定する工程をさらに包含する方法が提供される。

【００１０】

本発明の別の局面において、候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の、Ｍ－ＣＳＦＲへの結合を検出する工程；および、上記の候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の、骨への転移性癌を防ぐか、または処置する能力を、インビトロまたはインビボでアッセイする工程を包含する、骨への転移性癌を防ぎ得るか、または処置し得る、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を同定する方法が提供される。別の局面において、Ｍ－ＣＳＦとＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用を阻害する、候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を同定する工程；および、上記の候補のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の、骨への転移性癌を防ぐか、または処置する能力を、インビトロまたはインビボでアッセイする工程を包含する、骨への転移性癌を防ぎ得るか、または処置し得る、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を同定する方法が提供される。

【００１１】

別の局面において、転移性癌に罹患する被験体に、治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物および治療剤を投与し、それによって、上記の転移性癌に関連する骨の減少を防ぎ、そして腫瘍の増殖を防ぐ工程を包含する、骨転移および腫瘍の増殖を防ぐ方法が提供される。別の局面において、被験体に治療有効量のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物および治療剤を投与し、それによって、上記の転移性癌に関連する骨の減少の重症度を減少させ、そして腫瘍の増殖を防ぐ工程を包含する、転移性癌に罹患する患者を処置する方法が提供される。関連する局面において、上記の被験体が哺乳動物またはヒトである方法が提供される。別の関連する局面において、上記のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプターであるＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用を阻害する方法が提供される。さらに別の関連する局面において、上記のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、腫瘍細胞によって誘導される破骨細胞の増殖および／または分化を阻害する方法が提供される。

【００１２】

なお別の関連する局面において、上記治療剤がビスホネート（ｂｉｓｐｈｏｎａｔｅ）である方法が提供される。関連する局面において、上記のビスホスホネートは、ゼレドロネート（ｚｅｌｅｄｒｏｎａｔｅ）、パミドロネート、クロドロネート、エチドロネート、チルンドロネート（ｔｉｌｕｎｄｒｏｎａｔｅ）、アレンドロネート、またはイバンドロネート（ｉｂａｎｄｒｏｎａｔｅ）である。なお別の関連する局面において、上記の治療剤が化学療法剤である、前述の方法が提供される。さらに別の関連する局面において、被験体がビスホスホネート処置を受けることから妨げられる、前述の方法が提供される。本発明の関連する局面において、上記のＭ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物が、治療効果を達成するために必要な治療剤の投薬量を減少するために効果的である、前述の方法が提供される。なお別の関連する局面において、非Ｍ－ＣＳＦコロニー刺激因子（例えば、Ｇ－ＣＳＦ）を投与する工程をさらに包含する方法が提供される。

【００１３】

本発明の１つの局面において、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および癌治療剤を含む薬学的組成物が提供される。本発明の別の局面において、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を含む医薬、およびこの医薬が手術または放射線治療と組み合わせて用いられるべきであることの使用説明書を含む、パッケージ、バイアル、または容器が提供される。

【００１４】

本発明の別の局面において、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を被験体に投与する工程、およびこの被験体を手術または放射線治療によって処置する工程を包含する、骨への転移性癌を防ぐか、または処置する方法が提供される。別の局面において、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を投与する工程を包含する、癌に罹患した被験体を処置する方法であって、ここで、この癌を含む細胞はＭ－ＣＳＦを分泌しない方法が提供される。

【００１５】

多数の使用がまた、本発明によって企図される。例示の目的として、転移性癌に罹患する被験体における骨転移を防ぐための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用が、本発明によって提供される。別の実施形態において、転移性癌に罹患する被験体における、この癌と関連する骨の減少を防ぐための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用が提供される。なお別の実施形態において、骨への転移性癌に罹患する被験体を処置するための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用が本発明によって提供される。さらに別の実施形態において、骨への転移性癌に罹患する被験体における、この癌に関連する骨の減少の重症度を減少させるための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用が提供される。

【００１６】

多くの被験体が、本発明の使用から利益を得ることを企図される。１つの実施形態において、この被験体は哺乳動物である。別の実施形態において、この哺乳動物はヒトである。

【００１７】

本発明の別の実施形態において、上記のムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプター（Ｍ－ＣＳＦＲ）との間の相互作用を阻害する、前述の使用が提供される。関連する実施形態において、上記のムテインまたはムテイン産物は、腫瘍細胞によって誘導される破骨細胞の増殖および／または分化を阻害する。別の関連する実施形態において、上記の転移性癌が、乳癌、肺癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、白血病またはリンパ腫を含む血球悪性疾患；頭部癌または頚部癌；胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌を含む胃腸の癌；卵巣癌、子宮内膜癌、または子宮頸癌を含む、女性の生殖管の悪性疾患；膀胱癌；神経芽細胞種を含む脳腫瘍；肉腫、骨肉種；あるいは悪性黒色腫または扁平上皮細胞癌を含む皮膚癌である、前述の使用が提供される。

【００１８】

本発明のなお別の実施形態において、転移性癌に罹患する被験体における、骨転移および腫瘍の増殖を防ぐための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療薬の使用が提供される。別の実施形態において、転移性癌に罹患する被験体における、この癌に関連する骨の減少を防ぐための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療剤の使用が提供される。さらに別の実施形態において、骨への転移性癌の処置のための医薬を製造するための、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療剤の使用が提供される。なお別の実施形態において、転移性癌に罹患する被験体における、癌に関連する骨の減少の重症度を減少させ、そして腫瘍の増殖を阻害するための医薬の製造における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物、および第二の治療剤の使用が提供される。

【００１９】

本発明の１つの実施形態において、合わせられた調製物として、Ｍ－ＣＳＦムテインま

たはムテイン産物、および第二の治療剤を含む生産物が、癌の処置における使用のために提供される。別の実施形態において、骨への転移性癌を防ぐか、または処置するための医薬の調製における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用であって、ここでこの医薬は、第二の癌治療剤と同時にか、別々にか、または連続して投与される、使用が提供される。

【００２０】

本発明の別の実施形態において、骨への転移性癌を防ぐか、または処置するための医薬の調製における、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用であって、ここでこの医薬は、第二の治療剤を用いた処置と調和される、使用が提供される。なお別の実施形態において、骨への転移性癌に罹患する被験体を処置するための医薬を調製するための、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用であって、ここでこの被験体は、第二の治療剤で前処置される、使用が提供される。さらに別の実施形態において、骨溶解性疾患を有する患者の処置のための医薬の製造における、ＭＣＳＦムテインまたはムテイン産物の共力作用の組み合わせの使用であって、ここでこの医薬は、抗ＭＣＳＦ抗体、抗ＲＡＮＫＬ抗体、可溶性ＲＡＮＫＬレセプター、またはビスホスホネートを用いる処置と調和される、使用が提供される。

【００２１】

なお別の実施形態において、骨への転移性癌を防ぐか、または処置するための医薬の調製における、第二の治療剤の使用であって、ここでこの医薬は、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物と同時にか、別々にか、または連続して投与される、使用が提供される。

【００２２】

Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物を含む医薬、およびこの医薬が手術または放射線治療と組み合わせて用いられるべきであることの使用説明書を含む、パッケージ、バイアル、または容器が、本発明によって企図される。多数の被験体が、前述の本発明の使用の利益を得ることが企図される。１つの実施形態において、上記の被験体は哺乳動物である。別の実施形態において、上記の哺乳動物はヒトである。

【００２３】

本発明の別の実施形態において、上記のムテインまたはムテイン産物が、Ｍ－ＣＳＦとそのレセプターであるＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用を阻害する、前述の使用が提供される。関連する実施形態において、上記のムテインまたはムテイン産物は、腫瘍細胞によって誘導される破骨細胞の増殖および／または分化を阻害する。なお別の関連する実施形態において、上記の第二の治療剤はビスホスホネートである。別の関連する実施形態において、上記のビスホネートは、ゼレドロネート、パミドロネート、クロドロネート、エチドロネート、チルンドロネート、アレンドロネート、またはイバンドロネートである。さらに別の関連する実施形態において、上記の第二の治療剤は化学療法剤である。別の関連する実施形態において、上記の被験体は、ビスホスホネート処置を受けることから妨げられる。本発明の別の実施形態において、上記の第二の治療剤が非Ｍ－ＣＳＦコロニー刺激因子である、前述の使用が提供される。関連する実施形態において、上記の非Ｍ－ＣＳＦコロニー刺激因子がＧ－ＣＳＦである、前述の使用が提供される。

【００２４】

本発明はまた、骨転移および腫瘍の増殖を処置するか、または防ぐために、被験体に投与される治療剤の用量を減少させるための、医薬の製造におけるＭ－ＣＳｆムテインまたはムテイン産物の使用を企図する。本発明の別の実施形態において、骨転移を防ぐための医薬の製造における、癌細胞によって産生されるＭ－ＣＳＦを中和するために効果的な量より大きな量の、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用が提供される。なお別の実施形態において、癌細胞によって産生されるＭ－ＣＳＦを中和するために効果的な量より大きな量の、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用が、被験体の細胞により産生されるＭ－ＣＳＦを中和するための医薬の製造のために提供される。

【００２５】

本発明はまた、骨への転移性癌に罹患する被験体を処置するための医薬の製造における

、癌細胞によって産生されるＭ－ＣＳＦを中和するために効果的な量より大きな量の、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用を企図する。別の実施形態において、癌を処置するための医薬の製造における、癌細胞によって産生されるＭ－ＣＳＦを中和するために効果的な量より大きな量の、Ｍ－ＣＳＦムテインまたはムテイン産物の使用が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２６】

（詳細な説明）

転移する能力は、癌の決定的な特徴である。転移とは、癌細胞の、体の他の部分への広まり、またはこの広まりにより生じる状態をいう。転移は、細胞の遺伝物質における変化、一次的な腫瘍を形成するための、この変化した細胞の制御されない増殖、この一次的な腫瘍への新たな血液の供給の発達、一次的な腫瘍に由来する細胞による循環系の浸潤、一次的な腫瘍細胞の小さな凝集塊の体の他の部分への分散、およびこれらの部位における二次的な腫瘍の増殖を含む、複合的な多段階のプロセスである。

【００２７】

骨は、ヒトの乳癌、肺癌、前立腺癌、および甲状腺癌、ならびに他の癌における転移の最も普通の部位の一つであり、剖検において６０％もの癌患者が、骨転移を有することを示す。骨溶解性の骨転移は、他の器官への転移では見られない、独特の破骨細胞性骨吸収の段階を示す。癌転移に関連する骨の減少は、破骨細胞（無機化された組織を再吸収する能力を有する多核性巨大細胞）によって媒介され、腫瘍の産物によって活性化されるようである。

【００２８】

マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）としても公知であるコロニー刺激因子（ＣＳＦ１）は、破骨細胞形成に重要であることが分かっている。さらにＭ－ＣＳＦは、成熟した破骨細胞の破骨細胞性機能、他の可溶性因子と連携しての移動および生存、ならびに、骨芽細胞および線維芽細胞により提供される細胞間相互作用を調節することが示されている（ＦｉｘｅおよびＰｒａｌｏｒａｎ、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ １０：３－７、１９９８；Ｍａｒｔｉｎら、Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖ．ｉｎ Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ８：１０７－２３（１９９８））。

【００２９】

全長ヒトＭ－ＣＳＦｍＲＮＡは、５５４アミノ酸（配列番号４）の前駆体タンパク質をコードする。選択的ｍＲＮＡスプライシング、および異なる翻訳後のタンパク質分解性プロセシングを通して、Ｍ－ＣＳＦは糖タンパク質またはコンドロイチン硫酸含有プロテオグリカンとして循環中に分泌されるか、あるいは、Ｍ－ＣＳＦ産生細胞の表面上の膜貫通（ｍｅｍｂｒａｎｅ ｓｐａｎｎｉｎｇ）糖タンパク質として発現されるかのいずれかであり得る。ヒトＭ－ＣＳＦの、細菌で発現されたアミノ末端の１５０アミノ酸（完全なインビトロの生物学的活性に必要な最小の配列）の三次元構造は、このタンパク質がジスルフィド結合された二量体であり、それぞれの単量体が４つのαヘリックス性束および１つの逆平行βシートからなることを示す（Ｐａｎｄｉｔら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５８：１３５８－６２（１９９２））。３つの明確なＭ－ＣＳＦ種が、選択的ｍＲＮＡスプライシングを通して産生される。これらの３つのポリペプチド前駆体は、２５６アミノ酸のＭ－ＣＦＳα（配列番号１および配列番号２においてＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示す）、５５４アミノ酸のＭ－ＣＳＦβ（配列番号３および配列番号４においてＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示す）、および４３８アミノ酸のＭ－ＣＳＦγ（配列番号５および配列番号６においてＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示す）である。Ｍ－ＣＳＦβは、膜結合形態としては存在しない分泌タンパク質である。Ｍ－ＣＳＦαは、タンパク質分解性切断によって徐放される、完全な膜タンパク質として発現される。Ｍ－ＣＳＦαは、配列番号２のアミノ酸の１９１～１９７において切断される。Ｍ－ＣＳＦの膜結合形態は、近隣の細胞上のレセプターと相互作用し得、それゆえ特異的な細胞間接触を媒介する。

【００３０】

Ｍ－ＣＳＦの様々な形態が、標的細胞上のそのレセプターであるＭ－ＣＳＦＲと結合することによって機能する。Ｍ－ＣＳＦＲ（配列番号７および配列番号８においてＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示す）は、５つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン、１つの膜貫通ドメイン、および１つの細胞内遮断性Ｓｒｃ関連チロシンキナーゼドメインを有する膜貫通分子である。Ｍ－ＣＳＦＲは、ｃ－ｆｍｓ癌原遺伝子によってコードされる。Ｍ－ＣＳＦＲの細胞外ドメインへのＭ－ＣＳＦの結合が、このレセプターの二量体化につながり、このことが、細胞質性キナーゼドメインを活性化して、他の細胞性タンパク質の自己リン酸化およびリン酸化につながる（Ｈａｍｉｌｔｏｎ Ｊ．Ａ．、Ｊ Ｌｅｕｋｏｃ Ｂｉｏｌ．６２（２）：１４５－５５（１９９７）；Ｈａｍｉｌｔｏｎ Ｊ，Ａ．、Ｉｍｍｕｎｏ Ｔｏｄａｙ．１８（７）：３１３－７（１９９７））。

【００３１】

リン酸化された細胞性タンパク質は、細胞の応答：有糸分裂、サイトカインの分泌、膜の波うち、およびそれ自身のレセプターの転写調節につながる生化学的な事象のカスケードを誘導する（ＦｉｘｅおよびＰｒａｌｏｒａｎ、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ １０：３２－３７（１９９８））。

【００３２】

Ｍ－ＣＳＦは、間質細胞、骨芽細胞、および他の細胞で発現される。乳房腫瘍細胞、子宮腫瘍細胞、および卵巣腫瘍細胞においても発現される。これらの腫瘍における発現の程度は、高いグレードおよび乏しい予後に相関する（Ｋａｃｉｎｓｋｉ Ａｎｎ．Ｍｅｄ．２７：７９－８５（１９９５）；Ｓｍｉｔｈら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１：３１３－２５（１９９５））。乳癌において、Ｍ－ＣＳＦの発現は、腺管内の（侵襲前の）癌とは対照的に、侵襲性の腫瘍細胞において優勢である（Ｓｃｈｏｌｌら、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８６：１２０－６（１９９４））。さらに、Ｍ－ＣＳＦは乳房の腫瘍の悪性疾患への進行を促進することが示される（Ｌｉｎら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．９３：７２７－３９（２００１））。乳癌および卵巣癌について、Ｍ－ＣＳＦの産生は、マクロファージの腫瘍への動員の原因となるようである。

【００３３】

Ｍ－ＣＳＦ中和抗体が、転移型癌細胞によって産生される因子による破骨細胞の誘導を阻害することが見い出されている（米国特許出願第１０／７１３，８９５号（その全体が参考として援用される）の開示を参照のこと）。リガンド－レセプター相互作用をブロックするような手段を通しての、活性なＭ－ＣＳＦ活性の中和を介して、Ｍ－ＣＳＦムテインが転移性癌細胞による破骨細胞の誘導をブロックすることが期待される。従って、本発明は、癌転移、および癌転移に関連する骨の減少を処置するか、または防ぐための組成物および方法を提供する。

【００３４】

本明細書中で用いられる場合、「腫瘍」は、悪性であろうと良性であろうと、全ての新生物形成細胞の成長および増殖、そして全ての前癌性の細胞および組織ならびに癌性の細胞および組織をいう。

【００３５】

用語「癌」および「癌性の」は、制御されない細胞増殖によって代表的には特徴付けられる、哺乳動物の生理学的状態をいい、または記載する。癌の例としては、癌；リンパ腫、芽細胞種、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のより特定の例としては、乳癌、前立腺癌、結腸癌、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸の癌、膵臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、ならびに種々の型の頭部癌および頸部癌が挙げられる。

【００３６】

「処置」は、障害の病理の進展または変化を妨げる意図で行われる介入である。従って、「処置」は、治療的処置および予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）または予防的（ｐｒｅｖｅｎｔａｔｉｖｅ）な処置の両方をいう。処置を必要とするものとしては、既に障

害を有するもの、およびその障害が防がれるべきものが挙げられる。腫瘍（例えば癌）の処置において、治療剤は直接腫瘍細胞の病理を減少しても、腫瘍細胞を、他の治療剤（例えば、放射線および／または化学療法）による処置に、より感受性にしてもよい。癌の「病理」は、患者の満足のいく状態を損なう全ての現象を含む。この事としては、異常な細胞増殖または制御されない細胞増殖、転移、近隣の細胞の正常な機能の干渉、異常なレベルでのサイトカインまたは他の分泌性産物の放出、炎症または免疫学的応答の抑制または悪化などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３７】

本明細書中で用いられる場合、「転移性癌」という句は、体の他の領域、特に骨へ広がる能力を有する癌として定義される。種々の癌が骨へ転移し得るが、ほとんどの通常の転移性癌は乳癌、肺癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、および前立腺癌である。例示として、骨へ転移する能力を有する他の癌としては、腺癌、白血病およびリンパ腫を含む血球悪性疾患；頭部癌および頚部癌；胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌を含む胃腸の癌；卵巣癌、子宮内膜癌、および子宮頸癌を含む、女性の生殖管の悪性疾患；膀胱癌；神経芽細胞種を含む脳腫瘍；肉腫、骨肉種；ならびに悪性黒色腫または扁平上皮細胞癌を含む皮膚癌が挙げられるが、これらに限定されない。本発明は特に、腫瘍誘導性の骨における骨溶解性病変の予防および処置を企図する。

【００３８】

（Ｍ－ＣＳＦムテイン）

本発明は、本発明の方法に従ってＭＣＳＦアンタゴニストとして使用され得るＭ－ＣＳＦムテインを提供する。

【００３９】

ポリペプチドに関して本明細書中で用いられる場合、「ムテイン」とは、インタクトな天然の分子の改変体、または天然の分子のフラグメントの改変体を意味し、これらは、１つ以上のアミノ酸が置換、挿入または欠失され、そしてＭ－ＣＳＦの破骨細胞刺激活性を阻害する能力を示す。このような置換、挿入または欠失は、その分子のＮ末端にあっても、Ｃ末端にあっても、内部にあってもよい。従って、用語「ムテイン」は、天然の分子のフラグメントをその範囲に含む。挿入性のムテインとしては、Ｎ末端またはＣ末端における融合（例えば、半減期を増加させるための、免疫グロブリンのＦｃ部分への融合）が挙げられる。

【００４０】

本明細書中で用いられる場合、「ムテイン産物」は、所望の活性を保持する、ムテインまたはその改変体を意味する。

【００４１】

本明細書中で用いられる場合、「フラグメント」は、インタクトな天然の分子の一部分を意味し；例えば、フラグメントポリペプチドは、Ｎ末端またはＣ末端のいずれかに由来する１つ以上のアミノ酸が欠失された、天然のポリペプチドのフラグメントである。

【００４２】

本発明における好ましいムテインは、ＭＳＰＲＣＨプログラム（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ）において実行されるように、以下の検索パラメーター：１２のギャップオープンペナルティー、および１のギャップ伸長ペナルティを用いる、アフィンギャップ検索を使用して、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ相同性検索アルゴリズム（Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．７０：１７３－１８７（１９９７））によって決定される、天然のポリペプチドと少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、またはそれ以上の配列同一性（相同性）を示す。他の周知であり、かつ慣用的に用いられる相同性／同一性走査アルゴリズムプログラムとしては、ＰｅａｒｓｏｎおよびＬｉｐｍａｎ、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ、８５：２４４４－２４４８（１９８８）；ＬｉｐｍａｎおよびＰｅａｒｓｏｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２２：１４３５（１９８５）；Ｄｅｖｅｒｅａｕｘら、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１２：３８７－３９５（１９８４）；あるいは、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２１５：４０３－４１０（１９９０）のＢ

ＬＡＳＴＰアルゴリズム、ＢＬＡＳＴＮアルゴリズムまたはＢＬＡＳＴＸアルゴリズムが挙げられる。これらのアルゴリズムを用いるコンピュータープログラムもまた利用可能であり、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ）パッケージ、Ｖｅｒｓｉｏｎ ８、Ｍａｄｉｓｏｎ Ｗｉｓ．、ＵＳＡから市販される、ＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴＦＡＳＴＡ；および、Ｉｎｔｅｌｌｅｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ ＣａｌｉｆによるＰＣ／Ｇｅｎｅプログラム内のＣＬＵＳＴＡＬが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、配列同一性の百分率は、このプログラムによって決定されるデフォルトのパラメーターを用いることで決定される。

【００４３】

本明細書中で用いられる場合、「改変」とは、所望の活性（アゴニストまたはアンタゴニスト）が保持される限り、例えば、グリコシル化、リン酸化、ポリマーとの（例えば、ポリエチレングリコールとの）結合体化、または外来の部分の他の付加のような、天然のポリペプチド、フラグメントまたはムテインの任意の改変を意味する。

【００４４】

米国特許第６，０２５，１４６号およびＫｏｔｈｓ、Ｍｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｄｅｖ．１９９７ Ｊａｎ；４６（１）：３１－３８（両方が、本明細書中で、その全体が参考として援用される）は、Ｍ－ＣＳＦ単独、およびＭＣＳＦ－Ｒと複合体化されたＭ－ＣＳＦの結晶化を記載し、そして、Ｍ－ＣＳＦの三次元構造、ならびにレセプター結合に関与する残基を特徴付ける。米国特許第６，０２５，１４６号はまた、構造情報に基づく、Ｍ－ＣＳＦにおける候補アミノ酸置換の選択の方法を記載する。図１は、短縮された二量体Ｍ－ＣＳＦにおけるジスルフィド結合を示すトポロジー図である；図２は、毎１０番目の残基が標識され、そして非結晶学対称軸を点線で示した、Ｃ－α骨格の立体図である。図１に示されるようなＭ－ＣＳＦのこの形態の全体的なトポロジーは、逆平行の４つのαヘリックス性束のトポロジーであり、ここで、このヘリックスは、ほとんどの４ヘリックス束の最も普通に観察される、上－下－上－下結合性とは異なり、上－上－下－下と走る。長い交差結合が、ヘリックスＡをヘリックスＢと連結し、そして同様の結合がヘリックスＣとヘリックスＤとの間に見られる。ジスルフィド結合された二量体形態において、この束が末端－末端で連結され、極度に平らで伸長された構造（おおよその寸法が８５’×３５’×２５’）を形成する。それぞれのモノマーにおいて３つの分子内ジスルフィド結合（Ｃｙｓ７－Ｃｙｓ９０、Ｃｙｓ４８－Ｃｙｓ１３９、Ｃｙｓ１０２－Ｃｙｓ１４６）が存在し、そのすべてが分子の末端に存在する。１つの鎖間（ｉｎｔｅｒｃｈａｉｎ）ジスルフィド結合（Ｃｙｓ３１－－Ｃｙｓ３１）が、図２に示されるように、二量体を横切る非結晶学的な２回の対称軸（ｔｗｏ－ｆｏｌｄ ｓｙｍｍｅｔｒｙ ａｘｉｓ）を有する二量体の境界面に位置する。変異実験から、この形態のＭ－ＣＳＦにおける全てのシステイン残基が、完全な生物学的活性に必要であり得ることが示された。本明細書中で記載される構造は、その役割が、レセプター認識に関するよりも、主に構造的であることを示唆する。米国特許第６，０２５，１４６号は、配列中のアミノ酸残基のα炭素の位置によって示されるような、短縮された組換えＭ－ＣＳＦα二量体の三次元構造を提供する。

【００４５】

ヘリックスＡ、ヘリックスＣ、およびヘリックスＤにおける特定の残基が、レセプター結合相互作用の特異性に関与するようである。Ｍ－ＣＳＦβは、システイン１５７および／またはシステイン１５９に関与する鎖内（ｉｎｔｒａｃｈａｉｎ）ジスルフィド結合を有するので、Ｍ－ＣＳＦのＣ末端領域は、この構造の「後面」から伸びるようであり、Ｍ－ＣＳＦの膜結合形態についての長さの変わり得る「つなぎ縄」を提供する。従って、Ｍ－ＣＳＦの「前面」またはレセプター結合領域は、分子の反対側にあり、ヘリックスＡ、ヘリックスＣ、およびヘリックスＤの中または近くの、溶媒が接近可能な残基（それぞれ、天然のＭ－ＣＳＦの、約６～２６残基、７１～９０残基、および１１０～１３０残基を含む）からなる。レセプターとの側鎖相互作用を増加または減少させる位置指定突然変異誘発による、これらの領域内の溶媒接近可能な残基の変化が、Ｍ－ＣＳＦアゴニストまた

はアンタゴニストを産生し得る。トリペプチドであるｇｌｙ－ｘ－ｇｌｙにおける場合、接近可能なアミノ酸の表面積の規格化に基づいて、約０．２５を越え、好ましくは約０．４を越える溶媒接触表面積（ｓｏｌｖｅｎｔ　ａｃｃｅｓｓｉｂｌｅ　ｓｕｒｆａｃｅ　ａｒｅａ）を有する残基が、好ましい（Ｋａｂｓｃｈ，Ｗ．ら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ　２２：２５７７（１９８３））。好ましくは、単量体の相対的な配置を維持し、そしてタンパク質のフォールディングのプロセスへの妨害を避けるために、二量体の境界面のようなタンパク質の他の部分と相互作用しない、残基が選択される。

【００４６】

必要に応じてさらなる考慮が、ヒトＭ－ＣＳＦとマウスＭ－ＣＳＦとの間で保存されない残基を選択する。このマウスＭ－ＣＳＦはヒトＭ－ＣＳＦレセプターを認識しない。ＭＣＳＦ－Ｒ残基との水素結合および／または疎水相互作用を破壊するために、候補アミノ酸は好ましくは、非保存的アミノ酸との置換について選択される。例えば、１つ以上のヒスチジンを同じような大きさの非水素ドナーアミノ酸と変換することが、変化されたレセプター結合能力を有するＭ－ＣＳＦを作成し得る。置換に好ましいアミノ酸としては、Ｈ１５；Ｑ７９；Ｒ８６；Ｅ１１５；Ｅ４１；Ｋ９３；Ｄ９９；Ｌ５５；Ｓ１８；Ｑ２０；Ｉ７５；Ｖ７８；Ｌ８５；Ｄ６９；Ｎ７０；Ｈ９；Ｎ６３；およびＴ３４が挙げられるが、これらに限定されない。レセプターシグナル伝達に重要なＭ－ＣＳＦの残基は、Ｍ－ＣＳＦの非連続的な領域から構成されると考えられる。潜在的に投与されるＭ－ＣＳＦベースのタンパク質性薬物に対する抗体形成の可能性を最小化するために、可能な場合はいつでも、（天然の分子に似せるために）溶媒に接近可能な親のＭ－ＣＳＦ残基を保持することが望ましい。

【００４７】

Ｎ末端／Ａヘリックス領域におけるアミノ酸Ｈ１５およびＨ９の変異誘発は、有意により低い生物学的活性および有意により低いＭＣＳＦ－Ｒ結合能力を有するムテインを生じた。これらの結果は、減少した生物学的活性が、減少したレセプター結合親和性に起因することを示した；したがって、これらのヒスチジンアミノ酸が、Ｍ－ＣＳＦレセプター結合親和性に重要である接触を説明し、完全なレセプター結合能力が望ましい場合には、変えられないまま残されるべきである。例えばＹ６およびＳ１３および他のような、すぐ隣の溶媒に接近可能な残基はまた、Ｍ－ＣＳＦレセプターの接触残基を説明し得る。Ｍ－ＣＳＦの二重突然変異体（Ｑ２０Ａ、Ｖ７８Ｋ）が構築され、ヘリックスＡおよびヘリックスＣの中央部分にある溶媒に接近可能な残基の重要性を試験した。この二重ムテインは、やや低い（８～１０倍）生物学的活性、および対応してより低いレセプター結合活性を有した。残基Ｑ１７、Ｒ２１、Ｅ１１５、およびＥ１１９の変異誘発は、目的の領域における溶媒に接近可能なアミノ酸の側鎖性質を変化させたが、生物学的な特異的活性には影響せず、このことは、これらの残基が、アンタゴニスト活性を有するように設計されるムテインへの変化に必要ないことを示唆した。

【００４８】

１つの実施形態において、本発明は、レセプター結合に関与するヘリックスＡおよび／またはヘリックスＣおよび／またはヘリックスＤの残基（例えば、アミノ酸６～２６、アミノ酸７１～９０、および／またはアミノ酸１１０～１３０）が、非保存的に変異されたＭ－ＣＳＦムテインを企図する。好ましくは、これらのムテインは天然の配列とヘリックスＡ、ヘリックスＣ、またはヘリックスＤ内で、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、または９０％の類似性を保持する（すなわち、同一であるか、または類似した性質を有するアミノ酸）が、ポリペプチドの残りの部分における天然の配列とより高い類似性（例えば、少なくとも９５％、９８％、または９９％の類似性）を有する。さらに、レセプター結合部位の三次元構造（ｃｏｎｆｉｒｍａｔｉｏｎ）を支持する残基は、非保存的に変異され得る。

【００４９】

別の実施形態において、Ｍ－ＣＳＦムテインは、Ｍ－ＣＳＦの単量体形態である。Ｍ－ＣＳＦの二量体形態は、生物学的に活性な形態であり、そしてＭ－ＣＳＦの単量体形態は

、一般に活性でない。単量体のジスルフィド結合は、Ｃｙｓ３１－Ｃｙｓ３１鎖間連結を通して生じるようである。従って、Ｍ－ＣＳＦの単量体形態が、アンタゴニストとしての使用に適切であり得ることが企図される。このような形態としては、Ｃｙｓ３１および／または他のシステインのシステイン欠失および／またはシステイン置換（例えば、システインのアラニンへの置換）を含むムテイン、あるいはシステイン（特にＣｙｓ３１）が化学的に改変されてジスルフィド結合に利用可能でないムテインが挙げられる。

【００５０】

さらに別の実施形態において、Ｍ－ＣＳＦムテインは、レセプター結合に関与するヘリックスＡ、ヘリックスＣ、またはヘリックスＤ、あるいはそれらの部分の１つ以上を、単独で、または他のポリペプチドと融合して含み、正しい三次元構造におけるフラグメントの表示を可能にする。

【００５１】

任意の所望の保存的ムテインおよび／または非保存的ムテインを含むムテインは、組換え産生または化学合成を含む、当該分野で周知の技術を用いて、容易に調製される。

【００５２】

保存的な置換、特にリガンド－レセプター結合に直接関与する領域の外側の置換は、Ｍ－ＣＳＦムテイン（またはＭ－ＣＳＦＲムテイン）の結合性質を有意に変化させることは期待されない。物理学的性質ならびに二次タンパク質構造および三次タンパク質構造への寄与に従って、アミノ酸は分類され得る。保存的な置換は、１つのアミノ酸の、類似した性質を有する別のアミノ酸への置換として、当該分野で認識される。例示的な保存的置換がすぐ下の表２に述べられる（ＷＯ９７／０９４３３、第１０頁、１９９７年３月１３日に公開（ＰＣＴ／ＧＢ９６／０２１９７、９６年９月６日出願））。

【００５３】

（表２）

（保存的置換Ｉ）

【００５４】

【表２】

側鎖特徴	アミノ酸
脂肪族	
非極性	GAPILV
極性―非荷電性	CSTMNQ
極性―荷電性	DEKR
芳香族	HFWY
その他	NQDE

あるいは、保存的なアミノ酸は、すぐ下の表３に述べられるように、Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第２版；Ｗｏｒｔｈ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．ＮＹ：ＮＹ（１９７５）、ｐｐ．７１－７７）において記載されるように分類され得る。

【００５５】

（表３）

（保存的置換ＩＩ）

【００５６】

【表３－１】

側鎖

特徴	アミノ酸
非極性（疎水性）	
A. 脂肪族：	ALIVP
B. 芳香族：	FW
C. 硫黄含有：	M
D. 境界：	G

【００５７】

【表３－２】

非荷電性―極性	
A. ヒドロキシル：	STY
B. アミド：	NQ
C. スルフヒドリル：	C
D. 境界：	G
陽性に荷電（塩基性）：	KRH
陰性に荷電（酸性）：	DE

さらに別の代替として、例示的な保存的置換が、すぐ下の表４に記載される。

【００５８】

（表４）

（保存的置換ＩＩＩ）

【００５９】

【表４－１】

本来の残基	例示的な置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly

【００６０】

【表４－２】

Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

Ｍ－ＣＳＦをコードするＤＮＡ配列の利用可能性は、所望のポリペプチドを産生するための種々の発現系の使用を可能にする。発現ベクターの構築、および適切なＤＮＡ配列からの組換え産生が、当該分野で周知の方法によって実施される。これらの技術および種々の他の技術は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．（１９８９）、およびＫｒｉｅｇｌｅｒ，Ｍ．、Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９０）（本明細書中において両方が参考として援用される）に従って、一般に実施される。

【００６１】

Ｍ－ＣＳＦの一次配列への特定の改変は、周知の組換えＤＮＡ技術に従って、所望の構造（例えば、Ｍ－ＣＳＦのレセプター結合能力）を破壊することなく、ＤＮＡ配列によってコードされるアミノ酸を欠失、付加、または変更することでなされ得る。さらに、個々のアミノ酸は置換されても、酸化、還元、または他の改変によって改変されてもよく、そして、活性な結合部位および構造情報を保持するフラグメントを得るために、ポリペプチドが切断され得ることを、当業者は認める。このような置換および変更は、「成熟したＭ－ＣＳＦα（配列番号２）ポリペプチド、Ｍ－ＣＳＦβ（配列番号４）ポリペプチド、およびＭ－ＣＳＦγ（配列番号４）ポリペプチドと実質的に同じアミノ酸配列を有する」ポリペプチドの定義内に含まれるアミノ酸配列を有するポリペプチドを生じる。

【００６２】

ポリペプチドは、当該分野で公知である標準的な溶液相または固相のペプチド合成技術を用いて合成され得る。溶液相合成において、広範囲のカップリング法および保護基が用いられ得る（ＧｒｏｓｓおよびＭｅｉｅｎｈｏｆｅｒ編、「Ｔｈｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｂｉｏｌｏｇｙ」、第１巻～第４巻（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、１９７９）；ＢｏｄａｎｓｋｙおよびＢｏｄａｎｓｋｙ、「Ｔｈｅ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」、第２版（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ、１９９４）を参照のこと）。さらに、中間体の精製および線形のスケールアップが可能である。この溶液合成が、主鎖および側鎖の保護基、ならびに活性化方法、およびラセミ化を最小化するためのセグメントの選択の考慮を必要とすることを、当業者は認める。

【００６３】

固相のペプチド合成は一般に、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９、１９６３の方法に従って実施され得るが、これは、保護されたアミノ酸を用いた、樹脂支持体上の直線状ペプチド鎖の組み立てに関する。固相のペプチド合成は、代表的にはＢｏｃストラテジーまたはＦｍｏｃストラテジーのいずれかを利用する。Ｂｏｃストラテジーは、１％の架橋されたポリスチレン樹脂を用いる。α－アミノ官能基の標準的な保護基は、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル（Ｂｏｃ）基である。この基は、強酸の希釈溶液（例えば、２５％のトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ））によって除かれ得る。次にＢｏｃ－アミノ酸は、代表的にはジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）を用いてアミノアシル樹脂に連結される。この組み立ての完了に続いて、このペプチド－樹脂は、ベンジルエステル結合を切断し、そして遊離のペプチドを遊離させるために、無水ＨＦによって処理される。側鎖の官能基は、普通はベンジル誘導性のブロック基によって合成の間にブロックされ、これもまたＨＦによって切断される。次いで、この遊離のペプチドを適切な溶媒を用いて樹脂から抽出し、精製して、特徴付ける。新たに合成されたペプチドは、例えば、ゲル濾過、ＨＰＬＣ、分配クロマトグラフィー、および／またはイオン交換クロマトグラフィーによって精製され得、そして、例えば、質量分析またはアミノ酸配列分析によって特徴付けられ得る。Ｂｏｃストラテジーにおいて、Ｃ末端アミド化ペプチドは、ベンズヒドリルアミン樹脂またはメチルベンズヒドリルアミン樹脂を用いて取得され得るが、これらは、ＨＦによる切断に際してペプチドアミドを直接的に得る。９－フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）を用いる代わりのアプローチは、側鎖保護基およびペプチド－樹脂連結が、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ基の切断に用いられる二級アミンに対して完全に安定であり得る、異なる試薬を用いる。側鎖保護およびペプチド－樹脂連結は、穏やかなアシドリシス（ａｃｉｄｏｌｙｓｉｓ）によって切断される。塩基と繰り返し接触させることは、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ樹脂をＦｍｏｃ化学にとって不適切にし；そして樹脂に連結されるｐ－アルコキシベンジルエステルが一般に用いられる。脱保護および切断は、一般にＴＦＡを用いて達成される。Ｎ－末端のアセチル化は、最終のペプチドを、樹脂からの切断の前に無水酢酸で反応することで達成され得る。Ｃ－アミド化は、適切な樹脂（例えば、Ｂｏｃ技術を用いるメチルベンズヒドリルアミン樹脂）を用いて達成される。

【００６４】

一般に、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドをコードする遺伝子の改変は、種々の周知の技術（例えば、位置指定変異誘発（Ｇｉｌｌｍａｎおよびｓｍｉｔｈ、Ｇｅｎｅ　８：８１－９７（１９７９）、およびＲｏｂｅｒｔｓ，Ｓ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　３２８：７３１－７３４（１９８７）および米国特許第５，０３２，６７６号（これらの全ては、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）によって容易に達成される。ほとんどの改変は、所望の特徴についての適切なアッセイにおけるスクリーニングによって評価される。例えば、ポリペプチドのＭ－ＣＳＦレセプター結合特性における変化は、適切な参照ポリペプチドを用いる競合アッセイによって、または米国特許第４，８４７，２０１号（本明細書中で参考として援用される）に記載されるバイオアッセイによって検出され得る。

【００６５】

本発明の挿入改変体は、Ｍ－ＣＳＦの予定された部位に１つ以上のアミノ酸が導入される改変体である。例えば、挿入改変体は、異種タンパク質または異種ポリペプチドの、そのサブユニットのアミノ末端またはカルボキシル末端への融合であり得る。置換改変体は、少なくとも１つの残基が除かれ、そしてその部位に異なる残基が挿入される改変体である。非天然のアミノ酸（すなわち、天然のタンパク質には通常見出されないアミノ酸）および等配電子のアナログ（アミノ酸または他）もまた、本発明における使用に適切である。適切な置換の例は当該分野で周知である（例えば、Ｇｌｕ－＞Ａｓｐ、Ｓｅｒ－＞Ｃｙｓ、およびＣｙｓ－＞Ｓｅｒ、Ｈｉｓ－＞アラニン）。改変体の他のクラスは欠失改変体であり、これは、Ｍ－ＣＳＦからの１つ以上のアミノ酸残基の除去によって特徴付けられる。

【００６６】

本発明の他の改変体は、天然のタンパク質のアミノ酸を化学的に改変すること（例えば、ヒスチジン残基を改変するジエチルピロカルボネート処理）によって産生され得る。あるアミノ酸側鎖に特異的な、好ましい、または化学的な改変。特異性はまた、保護されるべき側鎖に関する抗体を用いる他の側鎖のブロックによっても達成され得る。化学的な改変としては、酸化、還元、アミド化、脱アミド化、または巨大な基（例えば、多糖またはポリエチレングリコール（例えば、米国特許第４，１７９，３３７号およびＷＯ９１／２１０２９号（両方が、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと））の置換のような反応が挙げられる。

【００６７】

例示的な改変としては、コハク酸または他のカルボン酸無水物を用いる反応による、リジン（ｌｙｓｉｎｙｌ）残基およびアミノ末端残基の改変が挙げられる。これらの薬剤による改変は、リジン残基の電荷を逆転させる効果を有する。アミノ含有残基を改変するための他の適切な試薬としては、イミドエステル（例えば、メチルピコリンイミデート）；ピリドキサルホスフェート；ピリドキサルクロロボロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；Ｏ－メチルイソウレア、２，４－ペンタンジオン；および、グリオキシレートによるトランスアミナーゼ触媒性反応、およびポリエチレングリコールまたは他の巨大な置換のＮ－ヒドロキシスクシンアミドエステルが挙げられる。

【００６８】

アルギニル残基は、フェニルグリオキサール、２，３－ブタンジオン、１，２－シクロヘキサンジオン、およびニンヒドリンを含む多数の試薬を用いる反応によって改変される。アルギニン残基の改変は、グアニンジン官能基の高いpK_aのために、アルカリ性条件において反応が行われる必要がある。さらに、これらの試薬は、リジン基およびアルギニンε－アミノ基と反応し得る。

【００６９】

チロシル残基もまた、Ｏ－アセチルチロシル分子種および３－ニトロ誘導体を形成するために用いられる、それぞれ芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンを用いる反応によって、チロシル残基にスペクトルの標識を導入する特別な目的で改変され得る。チロシル残基はまた、ラジオイムノアッセイにおける使用のための標識されたタンパク質を調製するために、^{125}Ｉまたは^{131}Ｉを用いてヨウ素化され得る。

【００７０】
カルボキシル側鎖（アスパルチルまたはグルタミル）は、カルボジイミド（Ｒ－－Ｎ．ｄｂｄ．Ｃ．ｄｂｄ．Ｎ－－Ｒ．ｓｕｐ．１）との反応によって選択的に改変され得、ここでＲおよび$Ｒ_{1}$は異なるアルキル基（例えば、１－シクロヘキシル－３－（２－モルホリニル－４－エチル）カルボジイミドまたは１－エチル－３－（４－アゾニアー４，４－ジメチルペンチル）カルボジイミド）である。さらに、アスパルチル残基およびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル残基およびグルタミニル残基に変換される。
【００７１】
反対に、グルタミニル残基およびアスパラギニル残基は、穏やかな酸性条件下において、それぞれ対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基に脱アミド化され得る。これらの残基のそれぞれの形態は、本発明の範囲内に含まれる。
【００７２】
他の改変としては、プロリンおよびリジンの水酸化、セリル（ｓｅｒｙｌ）残基またはトレオニル残基の水酸基のリン酸化、リジン側鎖、アルギニン側鎖、およびヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化（Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．、Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ｐｐ．７９－８６（１９８３））、Ｎ末端アミンのアセチル化、および任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。
【００７３】
システインのキャッピングもまた（ａｌｏｓ）、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドの改変のために使用され得る。例えば、スルフヒドリル基（システイン）は、ヨードアセトアミド（アルキルハライドまたはハロアセトアミド）またはマレイミド（Ｎ－エチルマレイミド（Ｎ－ｅｔｈｙｕｌｍａｅｉｍｉｄｅ）（ＮＥＭ）または７－ジエチルアミノ－３－（４’－マレイミジルフェニル）－４－メチルクマリン ＣＰＭ）との反応により選択的に改変され得る。異なるアルキル基がタンパク質に結合され、改変されたタンパク質の安定なチオエーテル形態を生じる。
【００７４】
Ｍ－ＣＳＦムテインの、天然のＭ－ＣＳＦタンパク質との類似度を決定するために、多数の方法が用いられ得る。例えば、整列（ａｌｉｇｎｍｅｎｔ）を最大化させるために、１００アミノ酸長に４つのギャップが導入され得る場合、比較される配列における同一のアミノ酸残基を整列する２つの配列のより小さいほうに含まれるアミノ酸残基の百分率として、相同性百分率が計算される（本明細書中で参考として援用される、Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、第５巻におけるＤａｙｈｏｆｆ、ｐ．１２４、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．（１９７２））。配列比較の目的のためのポリペプチドの配列整列もまた、種々の複数整列サーバーを用いて行われ得、これらのサーバーの多くは現在インターネット上で利用可能である（例えば、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ、ＭＡＰ、ＰＩＭＡ、Ｂｌｏｃｋ Ｍａｋｅｒ、ＭＳＡ、ＭＥＭＥ、およびＭａｔｃｈ－Ｂｏｘ）。好ましくは、ポリペプチド（および、ポリヌクレオチドも）の配列整列のために、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ（Ｈｉｇｇｉｎｓら、Ｇｅｎｅ（１９８８）７３：２３７－２４４；Ｈｉｇｇｉｎｓら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．（１９９６）２６６：３８３－４０２）が利用される。同様に、ＢＬＡＳＴＰプログラムがタンパク質データベースに対してアミノ酸照会配列を比較し、そしてＴＢＬＡＳＴＮは、全ての６つのリーディングフレーム（両方の鎖）において動的に翻訳されたヌクレオチド配列データベースに対してタンパク質照会配列を比較し、そして本発明において利用され得る。２つのアミノ酸配列が実質的に相同（すなわち、類似または同一）であるかどうかを決定することはまた、Ｐｅａｒｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４－２４４８（１９８８）に基づくＦＡＳＴＡ検索にも基づき得る。

【００７５】
特に、同一性および／または類似度を決定するための好ましい方法は、試験される配列間の最大の一致を与えるように設計される。同一性および類似度を決定する方法は、公共に利用可能なコンピュータープログラム（例えば、先に記載したようなプログラム）に分類される。２つの配列の間の同一性および類似度を決定するための好ましいコンピュータープログラム方法としては、ＧＡＰ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（１９８４）１２（１）：３８７；Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を含むＧＣＧプログラムパッケージ、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、およびＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．（１９９０）２１５：４０３－４１０）が挙げられるが、これらに限定されない。ＢＬＡＳＴ Ｘプログラムは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）および他の供給源から公共に利用可能である（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、ＢＬＡＳＴ Ｍａｎｕａｌ、ＮＣＢ ＮＬＭ ＮＩＨ Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ ２０８９４；Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９０）２１５：４０３－４１０）。周知のＳｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムもまた、同一性を決定するために利用され得る。ＧＡＰプログラムを用いてポリヌクレオチド配列を比較する際に、以下のデフォルトのパラメーターが好ましい：比較マトリックス：一致＝＋１０、不一致＝０、ギャップペナルティは５０、およびギャップ長ペナルティは３（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら、Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．（１９７０）４８：４４３－４５３）。

【００７６】
タンパク質の関連性はまた、そのコードする核酸の関連性を通して特徴付けられ得る。ポリヌクレオチド配列の同一性および／または類似度を決定する方法は、上記に記載される。さらに、中程度のストリンジェント条件または高いストリンジェント条件の下においてハイブリダイズする能力を試験することを通して、ポリヌクレオチド配列の類似度を決定する方法が、以下のように決定され得る。例示的な中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は以下の通りである：５０％ホルムアミド、１％ＳＤＳ、１ＭＮａＣｌ、１０％デキストラン硫酸を含むハイブリダイゼーション溶液中で４２℃でのハイブリダイゼーション、ならびに、０．１×ＳＳＣおよび１％ＳＤＳを含む洗浄溶液中で６０℃で３０分間の洗浄工程を２回。高いストリンジェント条件は、０．１×ＳＳＣおよび１％ＳＤＳを含む洗浄溶液中で６８℃での洗浄を包含する。相当するストリンジェンシーの条件は、当該分野（Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（１９９４）、ｐｐ．６．０．３～６．４．１０）で記載される種々の温度および緩衝液または塩濃度を通して達成され得ることが、当該分野で理解される。ハイブリダイゼーション条件における改変は、経験的に決定されても、プローブの長さ、およびグアノシン／シトシン（ＧＣ）塩基対合の割合に基づいて正確に計算されてもよい。ハイブリダイゼーション条件は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（編）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）、ｐｐ．９．４７～９．５１に記載されるように計算され得る。

【００７７】
（遺伝子治療）
適切な細胞への治療用タンパク質の送達は、当該分野で公知である任意の適切なアプローチを用いることによる、エキソビボ、インサイチュ、またはインビボの遺伝子治療を介して果たされ得、これらのアプローチとしては、物理的なＤＮＡ移送方法（例えばリポソームまたは化学的処理）の使用、またはウイルスベクター（例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはレトロウイルス）の使用が挙げられる。例えば、インビボでの治療のために、所望のタンパク質をコードする核酸が、単独あるいはベクター、リポソーム、または沈殿物との結合体のいずれかで、被験体に直接注射され得、そしていくつかの実

施形態において、タンパク質化合物の発現が望まれる部位に注射され得る。エキソビボでの処置のために、被験体の細胞が取り除かれ、核酸がこれらの細胞に導入され、そして改変された細胞が被験体に直接戻されるか、または、例えば患者に移植される多孔性の膜にカプセル化されるかのいずれかで被験体に戻される。例えば、米国特許第４，８９２，５３８号および同第５，２８３，１８７号を参照のこと。生細胞に核酸を導入するために利用可能な種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が、培養細胞にインビトロで移送されるか、または意図される宿主の細胞にインビボで移送されるかに依存して変化する。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸の移送に適切な技術としては、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、ＤＥＡＥ－デキストラン、およびリン酸カルシウム沈殿が上げられる。エキソビボでの核酸の送達に一般に用いられるベクターはレトロウイルスである。

【００７８】

他のインビボでの核酸移送の技術としては、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、Ｉ型単純ヘルペスウイルス、またはアデノ随伴ウイルス）のトランスフェクトおよび脂質ベースの系が挙げられる。この核酸およびトランスフェクト因子は、必要に応じて微粒子と合わせられる。例示的なトランスフェクト因子としては、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムとの共沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介性のトランスフェクト、四級アンモニウム両親媒性物質ＤＯＴＭＡ（（ジオレオイルオキシプロピル）トリメチルアンモニウムブロマイド、ＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎとしてＧＩＢＣＯ－ＢＲＬから市販））（Ｆｅｌｇｎｅｒら（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４，７４１３－７４１７；Ｍａｌｏｎｅら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６ ６０７７－６０８１）；ぶら下がったトリメチルアンモニウム頭部を有する脂肪親和性グルタミン酸ジエステル（Ｉｔｏら（１９９０）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １０２３、１２４－１３２）；代謝可能な親脂質（例えば、陽イオン性脂質ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン（ＤＯＧＳ、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ、Ｐｒｏｍｅｇａ）およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミルスペルミン（ＤＰＰＥＳ）（Ｊ．Ｐ．Ｂｅｈｒ（１９８６）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．２７、５８６１－５８６４；Ｊ．Ｐ．Ｂｅｈｒら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６、６９８２－６９８６）；代謝可能な四級アンモニウム塩（ＤＯＴＢ、Ｎ－（１－［２，３－ジオレオイルオキシ］プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムメチルサルフェート（ＤＯＴＡＰ）（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ）、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、ジオレオイルエステル、ＣｈｏＴＢ、ＣｈｏＳＣ、ＤＯＳＣ）（Ｌｅｖｅｎｔｉｓら（１９９０）Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｉｎｔｅｒ．２２、２３５－２４１）；３β［Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロール（ＤＣ－Ｃｈｏｌ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）／３β［Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロールＤＣ－Ｃｈｏｌの１対１混合（Ｇａｏら、（１９９１）Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １０６５、８－１４）、スペルミン、スペルミジン、リポポリアミン（Ｂｅｈｒら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ、１９９４、５：３８２－３８９）、脂肪親和性ポリリジン（ＬＰＬＬ）（Ｚｈｏｕら、（１９９１）Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ９３９、８－１８）、過剰なホスファチジルコリン／コレステロールを含む［［（１，１，３，３－テトラメチルブチル）クレ－ソキシ（ｃｒｅ－ｓｏｘｙ）］エトキシ］エチル］ジメチルベンジルアンモニウムヒドロキシド（ＤＥＢＤＡヒドロキシド）（Ｂａｌｌａｓら、（１９８８）Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ９３９、８－１８）、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド（ＣＴＡＢ）／ＤＯＰＥ混合物（Ｐｉｎｎａｄｕｗａｇｅら、（１９８９）Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ９８５、３３－３７）、ＤＯＰＥを含むグルタミン酸の脂肪親和性ジエステル（ＴＭＡＧ）、ＣＴＡＢ、ＤＥＢＤＡ、ジドデシルアンモニウムブロマイド（ＤＤＡＢ）、およびホスファチジルエタノールアミンとの混合におけるステアリルアミン（Ｒｏｓｅら、（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅ １０、５２０－５２５）、ＤＤＡＢ／ＤＯＰ

Ｅ（ＴｒａｎｓｆｅｃｔＡＣＥ、ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ）、およびオリゴガラクトースを有する脂質が挙げられる。移送の効率を増加させる、例示的なトランスフェクト亢進因子としては、例えば、ＤＥＡＥ－デキストラン、ポリブレン、リソソーム破壊ペプチド（Ｏｈｍｏｒｉ Ｎ Ｉら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ １９９７年6月２７日；２３５（３）：７２６－９）、コンドロイタン（ｃｈｏｎｄｒｏｉｔａｎ）ベースのプロテオグリカン、硫酸化プロテオグリカン、ポリエチレンイミン、ポリリジン（Ｐｏｌｌａｒｄ Ｈら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ、１９９８ ２７３（１３）：７５０７－１１）、インテグリン結合ペプチドＣＹＧＧＲＧＤＴＰ、直鎖デキストランノナサッカリド、グリセロール、オリゴヌクレオチドの３’末端ヌクレオシド間結合に結合したコレステリル基（Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ，Ｒ．Ｌ．１９８９ Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８６：（１７）：６５５３－６）、リゾホスファチド、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、および１－オレイルリゾホスファチジルコリンが挙げられる。

【００７９】

いくつかの状況において、核酸含有ベクターを標的細胞に配向させる因子と共に核酸を送達することが望ましくあり得る。このような「標的」分子としては、標的細胞の細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体、または標的細胞上のレセプターのリガンドが挙げられる。リポソームが利用される場合、エンドサイトーシスと関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が、標的のために、および／または取り込みを促進するために用いられ得る。このようなタンパク質の例としては、特定の細胞型に向性を有するキャプシドタンパク質およびそのフラグメント、循環における内部移行（ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ）を起こすタンパク質の抗体、および、細胞内局在を標的とし、細胞内半減期を増加させるタンパク質が挙げられる。他の実施形態において、レセプター媒介性エンドサイトーシスが用いられ得る。このような方法は、例えば、Ｗｕら、１９８７またはＷａｇｎｅｒら、１９９０に記載される。現在公知である遺伝子マーキングおよび遺伝子治療プロトコルの概観のためには、Ａｎｄｅｒｓｏｎ １９９２を参照のこと。また、ＷＯ９３／２５６７３およびその中に引用される参考文献も参照のこと。遺伝子治療技術の更なる概観のためには、Ｆｒｉｅｄｍａｎｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４：１２７５－１２８１（１９８９）；Ａｎｄｅｒｓｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ、ｖｏｌ．３９２の補遺、ｎｏ６６７９、ｐｐ．２５－３０（１９９８）；Ｖｅｒｍａ、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ：６８－８４（１９９０）；およびＭｉｌｌｅｒ、Ｎａｔｕｒｅ、３５７：４５５４６０（１９９２）を参照のこと。

【００８０】

（スクリーニング方法）

効果的な治療は、有意な毒性を欠く、効果的な因子を同定することに依存する。癌転移に関連する骨の減少を防ぐことまたは処置に有用な可能性のある化合物は、種々のアッセイを用いてスクリーニングされ得る。例えば、候補ムテインが、破骨細胞生成（ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔｏｇｅｎｅｓｉｓ）の誘導におけるＭ－ＣＳＦの中和能力を決定するために、培養細胞系内でまず特徴付けられ得る。このような系としては、マウスの頭蓋冠の骨芽細胞および脾臓細胞の共培養物（Ｓｕｄａら、Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ．Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．１３：６６ ８０、１９９２；ＭａｒｔｉｎおよびＵｄａｇａｗａ、Ｔｒｅｎｄｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．９：６－１２、１９９８）、マウスの間質細胞株（例えば、ＭＣ３Ｔ３－Ｇ２／ＰＡ６およびＳＴ２）およびマウス脾臓細胞の共培養物（Ｕｄａｇａｗａら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １２５：１８０５ １３、１９８９）、ならびにＳＴ２細胞および骨髄細胞、末梢血単核細胞、または肺胞マクロファージの共培養物（Ｕｄａｇａｗａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：７２６０ ４、１９９０；Ｓａｓａｋｉら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：４６２ ７、１９９８；Ｍａｎｃｉｎｏら、Ｊ．Ｓｕｒｇ．Ｒｅｓ．１００：１８－２４、２００１）が挙げられ得る。Ｍ－ＣＳＦムテインが全く無い場合、このような共培養物に形成される多核細胞が、破骨細胞の

主要な判定基準（例えば、酒石酸塩耐性酸ホスファターゼ（ＴＲＡＰ、破骨細胞のマーカー酵素）活性、カルシトニンレセプター、ｐ６０Ｃ－ＳＴＣ、ビトロネクチンレセプター、ならびに、骨および象牙質切片上の再吸収のくぼみの形成能力）を満たす。効果的なＭ－ＣＳＦムテインの存在は、このような多核細胞の形成を阻害する。

【００８１】

上記の共培養系に加えて、候補Ｍ－ＣＳＦムテインの破骨細胞生成阻害における能力は、間質細胞を含まないか、または骨芽細胞を含まない系においてアッセイされ得る。破骨細胞生成に必要なＭ－ＣＳＦは、共培養された転移性癌細胞（例えば、ＭＤＡ２３１）またはこれらの癌細胞に由来するならし培地（Ｍａｎｃｉｎｏら、Ｊ．Ｓｕｒｇ．Ｒｅｓ．０：１８－２４、２００１）、あるいは精製されたＭ－ＣＳＦの添加によって提供され得る。

【００８２】

癌転移に関連する骨の減少を防ぐか、または処置する上での所与のＭ－ＣＳＦムテインの効力がまた、当業者に知られた、動物の骨転移モデル系の任意のものにおいて試験され得る。このようなモデル系としては、骨の髄腔（Ｉｎｇａｌｌ、Ｐｒｏｃ．Ｓｏｃ．Ｅｘｐ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．１１７：８１９－２２、１９６４；Ｆａｌａｓｋｏ、Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．１６９：２０　７、１９８２）、ラットの腹大動脈（Ｐｏｗｌｅｓら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　２８：３１６　２１、１９７３）、マウス側方尾静脈、またはマウス左心室（Ａｕｇｕｅｌｌｏら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４８：６８７６　８１、１９８８）への腫瘍細胞の直接的な注射を包含する系が挙げられる。効果的なＭ－ＣＳＦムテインが存在しない場合、注射された腫瘍細胞から形成される骨溶解性骨転移が、Ｘ線写真（骨溶解性骨病変の領域）または組織化学（骨および軟組織）によって決定され得る。Ｓａｓａｋｉら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５：３５５１　７、１９９５；Ｙｏｎｅｄａら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９：２５０９　１７、１９９７。ＣｌｏｈｉｓｙおよびＲａｍｎａｒａｉｎｅ、Ｏｒｔｈｏｐ　Ｒｅｓ．１６：６６０　６、１９９８。Ｙｉｎら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０３：１９７　２０６、１９９９。効果的なＭ－ＣＳＦアンタゴニストが存在する場合、骨溶解性骨転移は防がれ得るか、または阻害され得て、より少ないおよび／またはより小さい転移を生じる。

【００８３】

本発明のＭ－ＣＳＦムテインはまた、癌転移を防ぐか、または処置する上で有用であり得る。癌転移を防ぐか、または処置する上での候補Ｍ－ＣＳＦムテインの有効性は、Ｆｉｌｄｅｒｍａｎら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　５２：３６６１６、１９９２に記載されるような、ヒトの羊膜基底膜侵襲モデルを用いてスクリーニングされ得る。さらに、種々の型の癌の転移についての動物モデル系の任意のものも用いられ得る。このようなモデル系としては、Ｗｅｎｇｅｒら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　１９：１６９　７３、２００２に記載されたモデル系；Ｙｉら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６２：９１７　２３、２００２に記載されたモデル系；Ｔｓｕｔｓｕｍｉら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔ　１６９：７７－８５、２００１に記載されたモデル系；Ｔｓｉｎｇｏｔｊｉｄｏｕら、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２１：９７１　８、２００１に記載されたモデル系；Ｗａｋａｂａｙａｓｈｉら、Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　５９：７５　８０、２０００に記載されたモデル系；ＣｕｌｐおよびＫｏｇｅｒｍａｎ、Ｆｒｏｎｔ　Ｂｉｏｓｃｉ．３：Ｄ６７２　８３、１９９８に記載されたモデル系；Ｒｕｎｇｅら、Ｉｎｖｅｓｔ　Ｒａｄｉｏｌ．３２：２１２　７に記載されたモデル系；Ｓｈｉｏｄａら、Ｊ．Ｓｕｒｇ．Ｏｎｃｏｌ．６４：１２２　６、１９９７に記載されたモデル系；Ｍａら、Ｉｎｖｅｓｔ　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ　Ｓｃｉ．３７：２２９３　３０１、１９９６に記載されたモデル系；Ｋｕｒｕｐｐｕら、Ｊ　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ　Ｈｅｐａｔｏｌ．１１：２６　３２、１９９６に記載されたモデル系が挙げられるが、これらに限定されない。効果的なＭ－ＣＳＦアンタゴニストが存在する場合、癌転移は防がれ得るか、または阻害され得て、より少ないおよび／またはより小さい転移を生じる。

【００８４】

特定のＭ－ＣＳＦムテインまたはＭ－ＣＳＦアンタゴニストの組み合わせの抗腫瘍活性が、適切な動物モデルを用いてインビボで評価され得る。例えば、ヒトリンパ腫細胞が免疫を損なわれた動物（例えば、ヌードマウスまたはＳＣＩＤマウス）に導入される、異種間リンパ腫癌モデル。効力は、腫瘍形成の阻害、腫瘍退行または転移などを測定するアッセイを用いて予測され得る。

【００８５】

インビトロアッセイの１つの変形において、本発明は、

（ａ）固定化されたＭ－ＣＳＦＲポリペプチドを候補Ｍ－ＣＳＦムテインと接触させる工程、および

（ｂ）候補Ｍ－ＣＳＦムテインの Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドへの結合を検出する工程

を包含する方法を提供する。別の実施形態において、候補Ｍ－ＣＳＦムテインが固定化され、そしてＭ－ＣＳＦＲポリペプチドの結合が検出される。固定化は、当該分野で周知の方法（例えば、支持体、ビーズ、またはクロマトグラフィー樹脂への共有結合、および非共有性の高親和性相互作用（例えば、抗体結合）、あるいは、固定化された化合物がビオチン部分を含む、ストレプトアビジン／ビオチン結合の使用）の任意のものを用いて達成される。結合の検出は、

（ｉ）固定化されていない化合物上の放射活性標識を用いて、

（ｉｉ）固定化されていない化合物上の蛍光標識を用いて、

（ｉｉｉ）固定化されていない化合物に対する免疫特異的な抗体を用いて、

（ｉｖ）固定化されていない化合物上の標識であって、固定化された化合物が結合される蛍光支持体を励起させる標識、および当該分野で周知でありかつ慣用的に実施される他の技術を用いて達成され得る。

【００８６】

Ｍ－ＣＳＦムテインを同定するための本発明の方法としては、上記に記載した方法の任意のものの変形が挙げられ、この変形は、候補Ｍ－ＣＳＦムテインが存在する場合に、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドとＭ－ＣＳＦＲポリペプチドとの間の結合が、候補Ｍ－ＣＳＦムテインが存在しない場合の結合と比べて変化する場合にＭ－ＣＳＦムテインが同定される技術を含む。Ｍ－ＣＳＦポリペプチドとＭ－ＣＳＦＲポリペプチドとの間の結合を増加させるＭ－ＣＳＦムテインは、エンハンサーまたは活性化因子として記載され、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドとＭ－ＣＳＦＲポリペプチドとの間の結合を減少させるＭ－ＣＳＦムテインは、インヒビターとして記載される。

【００８７】

本発明はまた、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドと相互作用するか、またはＭ－ＣＳＦポリペプチドのＭ－ＣＳＦＲポリペプチドとの生物学的活性を阻害する（すなわち、酵素活性、結合活性などを阻害する）化合物を同定するための、高スループットスクリーニング（ＨＴＳ）アッセイを包含する。ＨＴＳアッセイは、効率的な様式での大量の化合物のスクリーニングを可能にする。細胞ベースのＨＴＳ系は、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドとＭ－ＣＳＦＲポリペプチドとの間の相互作用を調査することが企図される。ＨＴＳアッセイは、所望の性質を有する「ヒット（ｈｉｔ）」または「リード化合物（ｌｅａｄ　ｃｏｍｐｏｕｎｄ）」を同定するために設計され、そこから所望の性質を改善するように改変が設計され得る。「ヒット」または「リード化合物」の化学的改変は、多くの場合、「ヒット」とＭ－ＣＳＦポリペプチド－Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドとの間の同定可能な構造／活性の関連に基づく。

【００８８】

本発明の別の局面は、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドと結合するＭ－ＣＳＦムテインを同定する方法に関し、この方法は、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドをＭ－ＣＳＦムテインと接触させる工程、およびＭ－ＣＳＦムテインがＭ－ＣＳＦＲポリペプチドと結合したかどうかを決定する工程を包含する。結合は当業者に周知の結合アッセイによって決定され得、これらの結合アッセイとしては、ゲルシフトアッセイ、ウェスタンブロット、放射標識競合アッセイ、ファージベースの発現クローニング、クロマトグラフィーによる共分画、共沈降

、架橋、相互作用トラップ（ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ　ｔｒａｐ）／ツーハイブリッド分析、サウスウェスタン分析、ＥＬＩＳＡなど（これらは、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９９）Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、ＮＹ（本明細書中にその全体が参考として援用される）に記載される）が挙げられるが、これらに限定されない。このような試験に利用されるＭ－ＣＳＦＲポリペプチドは、溶液中で遊離であるか、固体の支持体に結合されるか、細胞表面で生じるか、または細胞内に局在するか、あるいは細胞の一部分に付随するかのいずれかであり得る。例えば、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドと、試験されるＭ－ＣＳＦムテインとの間の複合体の形成を当業者は測定する。あるいは、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドとＭ－ＣＳＦＲポリペプチドとの間の複合体形成の、試験されるＭ－ＣＳＦムテインに起因する減少を、当業者は調べ得る。

【００８９】

本発明の別の局面は、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドの活性を調節する（例えば減少する）化合物を同定する方法に関し、この方法は、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドをＭ－ＣＳＦムテインと接触させる工程、およびＭ－ＣＳＦＲポリペプチドの活性をＭ－ＣＳＦムテインが改変するかどうかを決定する工程を包含する。試験Ｍ－ＣＳＦムテインの存在下での活性が、試験Ｍ－ＣＳＦムテインの非存在下での活性と比較される。試験Ｍ－ＣＳＦムテインを含有するサンプルの活性が、試験Ｍ－ＣＳＦムテインを欠くサンプルにおける活性よりも高い場合、その化合物は増加した活性を有する。同様に、試験Ｍ－ＣＳＦムテインを含有するサンプルの活性が、試験Ｍ－ＣＳＦムテインを欠くサンプルにおける活性よりも低い場合、その化合物は阻害された活性を有する。

【００９０】

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術の任意のものにおいて、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドおよび／またはＭ－ＣＳＦＲポリペプチドを用いることによるＭ－ＣＳＦムテインのスクリーニングのために、特に有用である。このような試験に利用されるＭ－ＣＳＦＲポリペプチドは、溶液中で遊離であるか、固体の支持体に結合されるか、細胞表面で生じるか、または細胞内に局在するか、あるいは細胞の一部分に付随するかのいずれかであり得る。例えば、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドと、試験されるＭ－ＣＳＦムテインとの間の複合体の形成を当業者は測定する。あるいは、Ｍ－ＣＳＦポリペプチドとＭ－ＣＳＦＲポリペプチドとの間の複合体形成の、試験されるＭ－ＣＳＦムテインに起因する減少を、当業者は調べ得る。

【００９１】

当業者に周知である種々の異種の系が、組換えポリペプチドの機能的な発現に利用可能である。このような系としては、細菌（Ｓｔｒｏｓｂｅｒｇら、Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９９２）１３：９５－９８）、酵母（Ｐａｕｓｃｈ、Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９７）１５：４８７－４９４）、いくつかの種類の昆虫細胞（Ｖａｎｄｅｎ　Ｂｒｏｅｃｋ、Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｃｙｔｏｌｏｇｙ（１９９６）１６４：１８９－２６８）、両生類の細胞（Ｊａｙａｗｉｃｋｒｅｍｅら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９７）８：６２９－６３４）、およびいくつかの哺乳動物の細胞株（ＣＨＯ、ＨＥＫ２９３、ＣＯＳなど；Ｇｅｒｈａｒｄｔら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ（１９９７）３３４：１－２３を参照のこと）が挙げられる。これらの例は、線虫から得られる細胞株（ＰＣＴ出願ＷＯ９８／３７１７７）を含む、他の可能性のある細胞発現系の使用を除外するものではない。

【００９２】

本発明の好ましい実施形態において、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法は、試験Ｍ－ＣＳＦムテインをＭ－ＣＳＦＲポリペプチドと接触させる工程、およびＭ－ＣＳＦムテインとＭ－ＣＳＦＲポリペプチドとの間の複合体の存在についてアッセイする工程を包含する。このようなアッセイにおいて、Ｍ－ＣＳＦムテインは代表的には標識される。適切なインキュベートの後、遊離のＭ－ＣＳＦムテイ

ンが、結合形態で存在するＭ－ＣＳＦムテインから分離され、そして遊離のまたは複合体化されていない標識の量が、特定のＭ－ＣＳＦムテインのＭ－ＣＳＦＲポリペプチドへ結合する能力の測定値である。

【００９３】

本発明の別の実施形態において、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドへの適切な結合親和性を有するＭ－ＣＳＦムテインについての高スループットスクリーニングが利用される。手短に言うと、大量の異なる試験Ｍ－ＣＳＦムテインが、固相の基材に固定化される。試験Ｍ－ＣＳＦムテインはＭ－ＣＳＦＲポリペプチドと接触され、そして洗浄される。次いで、結合したＭ－ＣＳＦＲポリペプチドは、当該分野で周知の方法によって検出される。本発明の精製されたＭ－ＣＳＦムテインはまた、前述の薬物スクリーニング技術における使用のために、プレート上に直接コーティングされ得る。さらに、中和されていない抗体が使用されて、Ｍ－ＣＳＦムテインを捕らえ得、そして固体の支持体に固定化し得る。

【００９４】

一般に、当業者に周知の方法によって適切な放射性同位体（^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、^{35}Ｓ、または^{32}Ｐが挙げられるが、これらに限定されない）で標識された基質分子、リガンド分子、アダプター分子、またはレセプター分子と併せられるＨＴＳ結合アッセイについて、発現されたＭ－ＣＳＦムテインが用いられ得る。あるいは、基質分子、リガンド分子、アダプター分子、またはレセプター分子は、周知の方法によって適切な蛍光誘導体で標識され得る（Ｂａｉｎｄｕｒら、Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ．Ｒｅｓ．（１９９４）３３：３７３－３９８；Ｒｏｇｅｒｓ、Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｏｄａｙ（１９９７）２：１５６－１６０）。固定化されたＭ－ＣＳＦムテインに特異的に結合される放射活性なリガンドは、いくつかの標準的な方法（結合していないリガンドから結合されたリガンドを分離するための、Ｍ－ＣＳＦムテイン－リガンド複合体の濾過（Ｗｉｌｌｉａｍｓ、Ｍｅｄ．Ｒｅｓ．Ｒｅｖ．（１９９１）１１、１４７－１８４；Ｓｗｅｅｔｍａｎら、Ｊ．Ｎａｔｕｒａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ（１９９３）５６、４４１－４５５）を含む）の１つにおけるＨＴＳアッセイにおいて検出され得る。別の方法としては、シンチレーション近似アッセイ（ｓｃｉｎｔｉｌｌａｔｉｏｎ ｐｒｏｘｉｍｉｔｙ ａｓｓａｙ）（ＳＰＡ）、またはこのような分離が不必要であるＦｌａｓｈＰｌａｔｅ形式（Ｎａｋａｙａｍａ、Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃ．Ｄｅｖ．（１９９８）１：８５－９１ Ｂｏｓｓｅら、Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ（１９９８）３：２８５－２９２）が挙げられる。蛍光リガンドの結合は種々の方法において検出され得、このような方法としては、蛍光エネルギー移動（ＦＲＥＴ）、結合したリガンドの直接的な蛍光分光定量（ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ）分析、または蛍光偏光（Ｒｏｇｅｒｓ、Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｏｄａｙ（１９９７）２、１５６－１６０；Ｈｉｌｌ、Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃ．Ｄｅｖ．（１９９８）１、９２－９７）が挙げられる。

【００９５】

本発明は、Ｍ－ＣＳＦＲへの基質、リガンド、アダプター、またはレセプターの結合のインヒビターのスクリーニングおよび同定のための多数のアッセイを企図する。１つの例において、Ｍ－ＣＳＦまたはＭ－ＣＳＦＲが固定化され、そして結合相手との相互作用が、候補Ｍ－ＣＳＦムテインの存在下および非存在下において評価される。別の例において、Ｍ－ＣＳＦとＭ－ＣＳＦＲとの間の相互作用が、候補Ｍ－ＣＳＦムテインの存在下および非存在下の両方において、溶液アッセイにて評価される。いずれのアッセイにおいても、インヒビターは、Ｍ－ＣＳＦとＭ－ＣＳＦＲとの間の結合を減少させるＭ－ＣＳＦムテインとして同定される。別に企図されるアッセイは、１９９５年８月３日に公開されたＰＣＴ公開番号ＷＯ９５／２０６５２に記載されるような、タンパク質／タンパク質相互作用のインヒビターが、形質転換された宿主細胞またはトランスフェクトされた宿主細胞における陽性のシグナルの検出によって同定される二因子ハイブリッドアッセイ（ｄｉｈｙｂｒｉｄ ａｓｓａｙ）の変形に関与する。

【００９６】

Ｍ－ＣＳＦＲの特異的なリガンドを同定するために他のアッセイが用いられ得、このようなアッセイとしては、試験Ｍ－ＣＳＦムテインの標的タンパク質への直接的な結合を測定することによってＭ－ＣＳＦＲのリガンドを同定するアッセイ、および、イオンスプレー質量分析／ＨＰＬＣ方法または他の物理的かつ分析的方法を有する親和性限外濾過を通して、標的タンパク質のリガンドを同定するアッセイが挙げられる。あるいは、このような結合相互作用は、Ｆｉｅｌｄｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３４０：２４５－２４６（１９８９）、およびＦｉｅｌｄｓら、Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、１０：２８６－２９２（１９９４）（この両方は本明細書中に参考として援用される）に記載される酵母ツーハイブリッド系を用いて間接的に評価される。ツーハイブリッド系は、２つのタンパク質またはポリペプチド間の相互作用を検出するための遺伝的アッセイである。これは、目的の公知のタンパク質に結合するタンパク質を同定するために、あるいは相互作用に決定的なドメインまたは残基を明確に叙述するために用いられ得る。この方法論の変形が、ＤＮＡ結合タンパク質をコードする遺伝子をクローン化するために、タンパク質に結合するペプチドを同定するために、および薬物のスクリーニングのために開発されてきた。ツーハイブリッド系は、相互作用するタンパク質の対が、転写活性化ドメインを、レポーター遺伝子の上流活性化配列（ＵＡＳ）に結合するＤＮＡ結合ドメインの極く近くに連れていく能力を活用し、一般的に酵母で実施される。このアッセイは、

（１）第一のタンパク質と融合されるＤＮＡ結合ドメイン、および

（２）第二のタンパク質と融合される活性化ドメイン

をコードする２つのハイブリッドな遺伝子の構築を必要とする。ＤＮＡ結合ドメインは、レポーター遺伝子のＵＡＳを第一のハイブリッドタンパク質の標的とする；しかし、ほとんどのタンパク質は活性化ドメインを欠いているので、このＤＮＡ結合ハイブリッドタンパク質は、レポーター遺伝子の転写を活性化しない。第二のハイブリッドタンパク質は活性化ドメインを含むが、ＵＡＳには結合しないので、それ自身ではレポーター遺伝子の発現を活性化し得ない。しかし、両方のハイブリッドタンパク質が存在する場合、第一のタンパク質と第二のタンパク質との非共有的な相互作用が、ＵＡＳに活性化ドメインを結合し、レポーター遺伝子の転写を活性化する。例えば、第一のタンパク質がＭ－ＣＳＦまたはＭ－ＣＳＦＲ、あるいは、もう一方のタンパク質または核酸に相互作用することが公知であるそれらのサブユニットまたはフラグメントである場合、このアッセイは、結合相互作用を妨害する因子を検出するために用いられ得る。異なる試験因子がこの系に加えられる場合、レポーター遺伝子の発現がモニターされる。阻害的因子の存在が、レポーターシグナルの欠失を生じる。

【００９７】

酵母ツーハイブリッドアッセイはまた、Ｍ－ＣＳＦＲに結合するタンパク質の同定に用いられ得る。Ｍ－ＣＳＦＲ、あるいはそのサブユニットまたはフラグメントに結合するＭ－ＣＳＦムテインを同定するためのアッセイにおいて、Ｍ－ＣＳＦＲ（あるいはサブユニットまたはフラグメント）およびＵＡＳ結合ドメインをコードする融合ポリヌクレオチド（すなわち第一のタンパク質）が用いられ得る。さらに、活性化ドメインと融合された、それぞれ異なる第二のタンパク質（すなわちＭ－ＣＳＦムテイン）をコードする多数のハイブリッド遺伝子が産生されて、そしてアッセイにおいてスクリーニングされる。代表的には、第二のタンパク質は、全ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ融合ライブラリーの１つ以上のメンバーによってコードされ、それぞれの第二のタンパク質のコードする領域は活性化ドメインと融合される。この系は、広範囲のタンパク質に適用可能であり、そして第二の結合タンパク質の正体または機能を知ることは必要ですらない。この系は高度に感受性であり、そして他の方法では明らかでない相互作用を検出し得る；一過的な相互作用すら、レポータータンパク質を生じるために繰り返し翻訳され得る安定なｍＲＮＡを産生するために転写を誘発させ得る。

【００９８】

標的タンパク質に結合する因子を検索するために、他のアッセイが用いられ得る。試験リガンドの標的タンパク質への直接的な結合を同定するための、１つのこのようなスクリ

ーニング方法は、米国特許第５，５８５，２７７号（本明細書中に参考として援用される）に記載される。この方法は、タンパク質が一般に折り畳まれた状態と折り畳まれない状態との混合物として存在し、そしてこの２つの状態の間で頻繁に交代するという原則に依存する。試験リガンドが標的タンパク質の折り畳まれた形態に結合する場合（すなわち、試験リガンドが標的タンパク質のリガンドである場合）、リガンドに結合された標的タンパク質分子は折り畳まれた状態であり続ける。従って、折り畳まれた標的タンパク質は、標的タンパク質に結合する試験リガンドの存在下で、リガンドが存在しない場合よりも、より多くの量で存在する。このリガンドの標的タンパク質への結合は、標的タンパク質の折り畳まれた状態と折り畳まれない状態とを区別する任意の方法によって決定され得る。標的タンパク質の機能は、行われるべきこのアッセイのために公知である必要は無い。実質的にいかなる因子も、この方法によって試験リガンドとして評価され得、このような因子としては、金属、ポリペプチド、タンパク質、脂質、多糖、ポリヌクレオチド、および小さな有機分子が挙げられるがこれらに限定されない。

【００９９】

本発明の他の実施形態は、本発明のＭ－ＣＳＦＲポリペプチドと結合し得る抗体の中和が、Ｍ－ＣＳＦＲポリペプチドとの結合について試験Ｍ－ＣＳＦムテインと特異的に競合する、競合的スクリーニングアッセイの使用を包含する。この様式において、Ｍ－ＣＳＦＲと１つ以上の抗原決定基を共有する任意のペプチドの存在を検出するために、抗体が用いられ得る。放射標識された競合結合研究は、Ａ．Ｈ．Ｌｉｎら、Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ（１９９７）第４１巻、ｎｏ．１０、ｐｐ．２１２７－２１３１に記載され、この開示は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

【０１００】

本発明の別の実施形態において、相互作用する制御タンパク質の同定、特徴づけ、および精製についての研究手段として、本発明のＭ－ＣＳＦムテインが利用される。適切な標識が、当該分野で公知である種々の方法によって本発明のＭ－ＣＳＦムテインに取り込まれ、そしてこのポリペプチドが相互作用する分子を捕らえるために用いられる。例えば、標識されたＭ－ＣＳＦムテインと共に分子がインキュベートされ、結合していないＭ－ＣＳＦムテインを除去するために洗浄され、そしてＭ－ＣＳＦムテイン複合体が定量される。異なる濃度のＭ－ＣＳＦムテインを用いて得られたデータが、タンパク質複合体を有するＭ－ＣＳＦムテインの数、親和性、および会合についての値を計算するために用いられる。

【０１０１】

標識されたＭ－ＣＳＦＲポリペプチドはまた、ポリペプチドが相互作用する分子の精製のための試薬として有用であり、これらの分子としては、Ｍ－ＣＳＦムテインが挙げられるがこれに限定されない。アフィニティ精製の１つの実施形態において、ポリペプチドは、クロマトグラフィーカラムに共有結合的に結合される。細胞およびその膜が抽出され、そして種々の細胞性の小成分（ｓｕｂｃｏｍｐｏｎｅｎｔ）がカラムを通過される。分子は、ポリペプチドへの親和性によってカラムに結合する。このポリペプチド複合体がカラムから回収され、分離されて、そして回収された分子がタンパク質配列決定に供される。次いで、捕らえられた分子を同定するために、または適切なｃＤＮＡライブラリーから対応する遺伝子をクローニングするために縮重されたオリゴヌクレオチドを設計するために、アミノ酸配列が使用される。

【０１０２】

利用可能なＭ－ＣＳＦまたはＭ－ＣＳＦＲの情報に基づいて、本発明のＭ－ＣＳＦムテインの推定三次構造を作り出すために、コンピューターモデリングが用いられ得る。従って、Ｍ－ＣＳＦまたはＭ－ＣＳＦＲの予測される構造に基づく新規なリガンドが設計され得る。

【０１０３】

本発明の別の局面は、他の動物におけるホモログを同定するための、本明細書中に開示

されたＭ－ＣＳＦまたはＭ－ＣＳＦＲのヌクレオチド配列の使用である。本明細書に開示されたヌクレオチド配列の任意のもの、またはそれらの任意の部分が、ホモログを同定するために、当業者に周知であるスクリーニング手順を用いて、例えば、データベースまたは核酸ライブラリー（例えば、ゲノムライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリー）をスクリーニングするためのプローブとして用いられ得る。従って、少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９５％、そして最も好ましくは少なくとも１００％の相同性をＭ－ＣＳＦ配列またはＭ－ＣＳＦＲ配列と有するホモログが同定され得る。

【０１０４】

（組み合わせ治療）

動物モデルにおいて効果的である１つ以上のＭ－ＣＳＦムテインが同定された場合、癌転移および／または癌転移に関連する骨の減少に対するなお改善された効力を提供するために、２つ以上のこのようなＭ－ＣＳＦアンタゴニストを混合することが、さらに有利であり得る。１つ以上のＭ－ＣＳＦアンタゴニストを含有する組成物が、癌転移および／または癌転移に関連する骨の減少に罹患するか、または罹患しやすいヒトまたは哺乳動物に投与され得る。

【０１０５】

Ｍ－ＣＳＦアンタゴニスト治療は癌の全てのステージにとって有用であり得るが、Ｍ－ＣＳＦムテイン治療は、進行した癌または転移性癌に特に適切であり得る。Ｍ－ＣＳＦムテイン治療方法を化学療法レジメンまたは放射性レジメンと組み合わせることは、化学療法的処置を受けていない患者にとって好ましくあり得、一方で、Ｍ－ＣＳＦムテイン治療による処置が、１つ以上の化学療法を受けた患者に示され得る。さらに、Ｍ－ＣＳＦムテイン治療はまた、特に化学療法薬剤の毒性をよく耐えない患者において、同時に行う化学療法の減少された投薬量の使用を可能とし得る。

【０１０６】

本発明の方法は、単一のＭ－ＣＳＦムテインの投与、および異なるＭ－ＣＳＦムテインの組み合わせまたは「カクテル」の投与を企図する。このような組み合わせにおけるＭ－ＣＳＦムテインは、相乗的な治療効果を示し得る。さらに、Ｍ－ＣＳＦムテインの投与は、他の治療因子および／または手順と併せられ得、このような他の治療因子および／または手順としては、種々の化学療法剤、アンドロゲンブロッカー、および免疫調節因子（例えば、ＩＬ－２、ＧＭ－ＣＳＦ）、ビスホスホネート（例えば、アレディア（Ａｒｅｄｉａ）；ゾメタ（Ｚｏｍｅｔａ）；クロドロネート）、手術、放射線、化学療法、ホルモン治療（例えば、タモキシフェン；抗アンドロゲン治療）、抗体治療（例えば、ＲＡＮＫＬ／ＲＡＮＫ中和化抗体；ＰＴＨｒＰ中和化抗体、抗Ｈｅｒ２抗体、ＶＥＧＦ中和化抗体）、治療的タンパク質治療（例えば、可溶性ＲＡＮＫＬレセプター；ＯＰＧ、ならびにＰＤＧＦインヒビターおよびＭＭＰインヒビター）、低分子薬物治療（例えば、Ｓｒｃ－キナーゼインヒビター）、増殖因子レセプターのキナーゼインヒビター；オリゴヌクレオチド治療（例えば、ＲＡＮＫＬまたはＲＡＮＫまたはＰＴＨｒＰのアンチセンス）、遺伝子治療（例えば、ＲＡＮＫＬインヒビターまたはＲＡＮＫインヒビター）、ペプチド治療（例えば、ＲＡＮＫＬのムテイン）、ならびに本明細書中に記載されるこれらのタンパク質、ペプチド、化合物、および低分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０７】

癌化学治療剤としては、限定はされないが、アルキル化因子（例えば、カルボプラチンおよびシスプラチン）；ナイトロジェンマスタードアルキル化因子；ニトロソ尿素アルキル化因子（例えば、カルムスチン（ＢＣＮＵ））；代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセート）；プリンアナログ代謝拮抗物質、メルカプトプリン；ピリミジンアナログ代謝拮抗物質（例えば、フルオロウラシル（５－ＦＵ）およびゲムシタビン）；ホルモン性抗新生物薬（例えば、ゴセレリン、ロイプロリド、およびタモキシフェン）；天然の抗新生物薬（例えば、アルデスロイキン、インターロイキン－２、ドセタキセル、エトポシド（ＶＰ

－１６）、インターフェロンα、パクリタキセル、およびトレチノイン（ＡＴＲＡ）；抗生物質性の天然の抗新生物薬（例えば、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、およびマイトマイシン）；およびビンカアルカロイドの天然の抗新生物薬（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン）；ヒドロキシウレア；アセグラトン、アドリアマイシン、イフォスファミド、エノシタビン、エピチオスタノール、アクラルビシン、アンシタビン、ニムスチン、プロカルバジン塩酸塩、カルボコン、カルボプラチン、カルモフール、クロモマイシンＡ３、抗腫瘍多糖、抗腫瘍血小板因子、シクロホスファミド、シゾフィラン、シタラビン、ダカルバジン、チオイノシン、チオテパ、テガフール、ネオカルジノスタチン、ＯＫ－４３２、ブレオマイシン、フルツロン（ｆｕｒｔｕｌｏｎ）、ブロクスウリジン、ブスルファン、ホンバン（ｈｏｎｖａｎ）、ペプロマイシン、ベスタチン（ウベニメクス）、インターフェロン－β、メピチオスタン、ミトブロニトール、メルファラン、ラミニンペプチド、レンチナン、Ｃｏｒｉｏｌｕｓ多色抽出物、テガフール／ウラシル、エストラムスチン（エストロゲン／メクロレタミン）が挙げられる。

【０１０８】

さらに、癌患者に対する治療として使用される付加的な薬剤としては、ＥＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、ガンシクロビル、抗生物質、ロイプロリド；メペリジン；ジドブジン（ＡＺＴ）；インターロイキン１～１８（変異体およびアナログを含む）；インターフェロンまたはサイトカイン（例えば、インターフェロンα、β、およびγ）ホルモン（例えば、黄体化ホルモン放出ホルモン（ＬＨＲＨ）およびアナログ、ならびに、性腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＧｎＲＨ））；増殖因子（例えば、トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、成長ホルモン放出因子（ＧＨＲＦ）、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子相同因子（ＦＧＦＨＦ）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、およびインスリン増殖因子（ＩＧＦ））；腫瘍壊死因子－αおよびβ（ＴＮＦ－αおよびβ）；浸潤阻害因子（ｉｎｖａｓｉｏｎ　ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ　ｆａｃｔｏｒ）－２（ＩＩＦ－２）；骨形成タンパク質１～７（ＢＭＰ１－７）；ソマトスタチン；サイモシン－α－１；γ－グロブリン；スーパーオキシドジスムターゼ（ＳＯＤ）；補体因子；抗血管新生因子；抗原性物質；およびプロドラッグが挙げられる。

【０１０９】

（投与および調製）

本発明は、化合物、この化合物を含有する薬学的処方物、この薬学的処方物を調製する方法、ならびに、この薬学的処方物および化合物を用いて患者を処置する方法を提供する。

【０１１０】

このような組成物は、例えば、顆粒、粉末、錠剤、カプセル、シロップ、坐薬、注射、乳濁液、エリキシル、懸濁液または溶液の形態であり得る。本組成物は、種々の投与経路（例えば、経口投与、経鼻投与、直腸投与、皮下注射、静脈注射、筋肉注射、または腹腔内注射による投与）のために処方され得る。以下の投薬形態は例示の目的で与えられ、そして本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

【０１１１】

経口投与、口腔内投与、舌下投与のために、粉末、懸濁液、顆粒、錠剤、丸薬、カプセル、ゲルキャップ（ｇｅｌｃａｐ）、およびキャプレット（ｃａｐｌｅｔ）が固体投薬形態として許容可能である。これらは、例えば、本発明の１つ以上の化合物またはそれらの薬学的に許容可能な塩もしくは互変体を、少なくとも１つの添加物（例えば、デンプンまたは他の添加物）と混合する工程によって調製され得る。適切な添加物は、ショ糖、乳糖、セルロース糖、マンニトール、マルチトール、デキストラン、デンプン、寒天、アルギン酸塩、キチン、キトサン、ペクチン、トラガカントガム、アラビアゴム、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、合成ポリマーまたは半合成ポリマー、あるいはグリセリドである。必要に応じて、経口投薬形態は投与を助けるために他の成分（例えば、不活

性な希釈剤、または潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム）、または保存剤（例えば、パラベンまたはソルビン酸）、または抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、トコフェロール、またはシステイン）、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝液、甘味料、香味料、または芳香剤）を含有し得る。錠剤および丸薬はさらに、当該分野で公知である適切なコーティング物質で処理され得る。

【０１１２】

経口投与のための液体投薬形態は、薬学的に受容可能な乳濁液、シロップ、エリキシル、懸濁液、および溶液の形態であり得、これらは不活性な希釈剤（例えば水）を含み得る。薬学的な処方物および医薬は、滅菌された液体（例えば、限定しないが、油、水、アルコール、およびこれらの組み合わせ）を用いて液体懸濁液または溶液として調製され得る。薬学的に適切な界面活性剤、懸濁因子、乳化因子が、経口投与または非経口投与のために添加され得る。

【０１１３】

上記に注記されるように、懸濁液は油を含み得る。このような油としては、ピーナッツ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油、およびオリーブ油が挙げられるが、これらに限定されない。懸濁液の調製物はまた、脂肪酸のエステル（例えば、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、脂肪酸グリセリド、およびアセチル化脂肪酸グリセリド）を含有し得る。懸濁液の処方物は、アルコール（例えば、限定しないが、エタノール、イソピルアルコール、ヘキサデシルアルコール、グリセロール、およびプロピレングリコール）を含有し得る。エーテル（例えば、限定しないが、ポリ（エチレングリコール））、石油炭化水素（例えば、鉱油およびペトロラタム）；および水がまた、懸濁液の処方物に用いられ得る。

【０１１４】

経鼻投与のために、薬学的な処方物および医薬は、適切な溶媒および必要に応じて他の化合物（例えば、限定しないが、安定剤、抗菌因子、抗酸化物質、ｐＨ調整剤、界面活性剤、バイオアベイラビリティー調節因子、およびそれらの組み合わせ）を含有するスプレーであってもエアロゾルであってもよい。エアロゾル処方物のための噴霧剤としては、圧縮空気、窒素、二酸化炭素、または炭化水素ベースの低沸点溶媒（ｌｏｗ　ｂｏｉｌｉｎｇ　ｓｏｌｖｅｎｔ）が挙げられ得る。

【０１１５】

注射可能な投薬形態としては一般に、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて調製され得る、水性の懸濁剤または油性の懸濁剤が挙げられる。注射可能な形態は溶液相にあっても懸濁液の形態にあってもよく、これらは溶媒または希釈剤を用いて調製される。受容可能な溶媒またはビヒクルとしては、滅菌水、リンガー溶液、または等張性の生理食塩溶液が挙げられる。あるいは、溶媒または懸濁剤として滅菌油が用いられ得る。好ましくは、この油または脂肪酸は不揮発性であり、これらとしては、天然の油または合成油、脂肪酸、モノグリセリド、ジグリセリド、あるいはトリグリセリドが挙げられる。

【０１１６】

注射のために、薬学的な処方物および／または医薬は、上記に記載されるような適切な溶液を用いた再構成に適切な粉末であり得る。これらの例としては、凍結乾燥粉末、回転乾燥（ｒｏｔａｒｙ　ｄｒｉｅｄ）粉末、または噴霧乾燥粉末、非結晶粉末、顆粒、沈殿、あるいは粒子が挙げられるが、これらに限定されない。注射のために、これらの処方物は必要に応じて、安定剤、ｐＨ調整剤、界面活性剤、バイオアベイラビリティー調節因子、およびこれらの組み合わせを含有し得る。

【０１１７】

直腸投与のために、薬学的な処方物および医薬は、坐薬、軟膏、浣腸、腸内、Ｓ状結腸内および／または直腸内で化合物を放出するための錠剤またはクリームの形態であり得る。直腸坐薬は、本発明の１つ以上の化合物、またはこの化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは互変体を、受容可能なビヒクル（例えば、通常の保存温度では固相で存在し、そして体内（例えば直腸内）で薬物を放出するのに適切な温度では液相で存在する、ココアバ

ターまたはポリエチレングリコール）と混合することによって調製される。油もまた、軟らかいゼラチン型および坐薬の処方物の調製に用いられ得る。水、生理食塩水、水性デキストロースおよび関連する糖溶液、ならびにグリセロールが、懸濁剤（例えば、ペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、またはカルボキシメチルセルロース）ならびに緩衝液および保存剤も含み得る懸濁処方物の調製において用いられ得る。

【０１１８】

上記に記載されるこれらの代表的な投薬形態の他に、薬学的に受容可能な賦形剤およびキャリア（ｃａｒｒｉｅｓ）が、一般に当業者に公知であり、従って本発明に含まれる。このような賦形剤およびキャリアは、例えば「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．、Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ（１９９１）（本明細書中に参考として援用される）にて記載される。

【０１１９】

本発明の処方物は、下記に記載されるように、短時間作用性であり、放出が早く、長時間作用性であり、そして徐放性であるように設計され得る。従って、薬学的な処方物はまた、放出が制御されるか、または放出が遅いように処方され得る。

【０１２０】

本発明はまた、例えば、ミセルもしくはリポソーム、または他のいくつかのカプセル化形態であり得るか、あるいは延長された貯蔵および／または送達の効果を提供するために、延長された放出形態で投与され得る。従って、薬学的な処方物および医薬はペレット剤またはシリンダー内に圧縮され得、そして蓄積注射として、またはステントのような移植物として筋肉内または皮下に移植され得る。このような移植物は、公知の不活性な物質（例えばシリコンおよび生分解性ポリマー）を用い得る。

【０１２１】

具体的な投薬量は、疾患の状態、被験体の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、および食餌、投薬間隔、投与経路、排出速度、および薬物の組み合わせに依存して調節され得る。効果的な量を含有する上記の投薬形態の任意のものは、十分に慣用的な実験の範囲内であり、従って、十分に本発明の範囲内である。

【０１２２】

本方法によって、Ｍ－ＣＳＦムテインを含有する組成物は、治療的処置のために、非経口的に投与されても、局所的に投与されても、経口的に投与されても、局在的に投与されてもよい。好ましくは、この組成物は経口的または非経口的に（すなわち、静脈内に、腹腔内に、皮内に、または筋肉内に）投与される。従って、本発明は、薬学的に受容可能なキャリア、好ましくは水性のキャリア内に１つ以上のＭ－ＣＳＦアンタゴニストを含む、投与のための組成物を用いる方法を提供する。種々の水性のキャリア（例えば、水、緩衝化された水、０．４％生理食塩水、０．３％グリシンなど）が用いられ得、そして、安定性を向上させるために、穏やかな化学的改変などを受けた、他のタンパク質（例えば、アルブミン、リポタンパク質、グロブリンなど）を含み得る。

【０１２３】

癌転移または癌転移に関連する骨の減少の治療に有用なＭ－ＣＳＦムテインは、多くの場合、他の天然に生じる免疫グロブリンまたは他の生物学的分子を実質的に含まずに調製される。好ましいＭ－ＣＳＦムテインはまた、癌転移および／または癌転移に関連する骨の減少に罹患する、または罹患しやすい哺乳動物に投与される場合、最小の毒性を示す。

【０１２４】

本発明の組成物は、通常の、周知である滅菌技術によって滅菌され得る。生じる溶液は使用のために包装されても、無菌的な条件下で濾過され、そして凍結乾燥されてもよく、凍結乾燥された調製物は、投与の前に滅菌された溶液と合わせられる。この組成物は、ほぼ生理学的な条件に要求されるような、薬学的に受容可能な補助的物質（例えば、ｐＨ調節および緩衝化因子、張度調節因子など（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および安定剤（例えば１２０％マルトー

スなど））））を含有し得る。

【０１２５】

本発明のＭ－ＣＳＦムテインはまた、リポソームを介して投与され得る。乳濁液、気泡、ミセル、不溶性単層、リン脂質分散、層状の層などを含むリポソームは、Ｍ－ＣＳＦムテインに特定の組織を目標とさせ、そして組成物の半減期を増加させるためのビヒクルとして役立ち得る。例えば、米国特許第４，８３７，０２８号および同第５，０１９，３６９号（これらの特許は本明細書中で参考として援用される）に記載されるように、リポソームを調製するために種々の方法が利用可能である。

【０１２６】

これらの組成物におけるＭ－ＣＳＦムテインの濃度は広く、すなわち約１０重量％未満、通常は少なくとも約２５重量％～７５重量％または９０重量％ほどに変化し得、そして選択された投与の特定の様式に合わせて、液体の体積、粘度などによって主に選択される。経口的に、局所的に、および非経口的に投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者にとって公知であるか明白であり、そして例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ、第１９版、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．、Ｅａｓｔｏｎ、ＰＡ（１９９５）（本明細書中で参考として援用される）に詳細に記載される。

【０１２７】

患者における癌転移および／または癌転移に関連する骨の減少を処置するための、本発明の組成物の有効量の決定は、当該分野で周知である標準の経験的な方法を通して達成され得る。例えば、Ｃｅｎｃｉら、Ｊ Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０５５：１２７９－８７、２０００に記載されるように、所与の投薬量のＭ－ＣＳＦムテインで処置される被験体に由来する血清のインビボでの中和活性が、インビトロにおけるマウスの単球（ＣＤ１１ｂ＋細胞、ＣＤ１１細胞のサブセット、これはＭ－ＣＳＦに対する高レベルのレセプターを発現する）の、Ｍ－ＣＳＦ誘導性の増殖および生存をブロックする、血清の能力を決定するアッセイを用いて評価され得る。

【０１２８】

本発明の組成物は、癌転移および／または癌転移に関連する骨の減少に既に罹患しているか、または罹患しやすい哺乳動物に、癌転移および／または癌転移に関連する骨の減少の発生を防ぐか、または少なくとも部分的に停止させるに十分な量で投与される。このことを達成するに適切な量は、「治療有効用量」として定義される。有効量のＭ－ＣＳＦムテインは変化し、そして疾患の重篤度ならびに処置される患者の体重および一般的な状態に依存するが、一般的には、体重１ｋｇあたり約１．０μｇ～約１００ｍｇの範囲であり、適用あたり約１０μｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの投薬量がより一般的に用いられる。投与は、疾患に対する反応および治療に対する患者の耐性に依存する必要性に応じて、毎日、毎週、またはより頻度が少ない。長期間にわたる投薬量の維持が必要であり得、そして投薬量は必要なように調節され得る。

【０１２９】

この組成物の単一の投与または複数の投与が、処置する医師によって選択される用量レベルおよびパターンをもって実施され得る。とにかく、この処方物は、癌転移および／または癌転移に関連する骨の減少の重篤度を効果的に防ぐか、または最小化させるに十分なＭ－ＣＳＦムテインの量を提供するべきである。本発明の組成物は、単独で投与されても、癌転移および／または癌転移に関連する骨の減少の処置のための当該分野で公知である他の治療と合わせた補助治療として投与されてもよい。

【０１３０】

本発明は以下の実施例によって例示されるが、これらの実施例は決して限定されることは意図されない。

【実施例】

【０１３１】

（実施例１）

この実施例は、高レベルのＭ－ＣＳＦを発現する、高度に転移性の乳癌細胞株を示す。マイクロアレイを用いて、高度に転移性の細胞株であるＭＤＡ２３１によるＭ－ＣＳＦ遺伝子の発現を、細胞株ＭＣＦ７およびＺＲ７５１のＭ－ＣＳＦ遺伝子の発現と比較した。ＭＤＡ２３１におけるＭ－ＣＳＦ発現のレベルをＭＣＦ７におけるＭ－ＣＳＦ発現のレベルと比較した場合６．９倍の増加があり、そしてＭＤＡ２３１におけるＭ－ＣＳＦ発現のレベルをＺＲ７５１におけるＭ－ＣＳＦ発現のレベルと比較した場合５．２倍の増加があった。

【０１３２】

（実施例２）

この実施例は、破骨細胞形成のインビトロアッセイにおいて、精製されたＭ－ＣＳＦが、転移性の細胞株であるＭＤＡ２３１に由来するならし培地（ＣＭ）と置換され得るが、細胞株ＭＣＦ７由来のＣＭとは置換し得ないことを示す（図３）。

【０１３３】

ならし培地（ＣＭ）の生成：ＭＤＡ２３１細胞またはＭＣＦ７細胞を、１×ＩＴＳ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ、Ｋｙ）、インスリン、ヒトトランスフェリン、および亜セレン酸を含む培養補充を含む５０％ＤＭＥＭ／５０％ＨＡＭｓ　Ｆ１２　８ｍｌ中に、１０ｃｍ皿あたり1×10^{6}細胞の密度でプレートした。５％CO_2中にて３７℃でのインキュベートを４８時間行った後、培地を収集し、１０分間１５００ＲＰＭで遠心分離して、あらゆる浮遊細胞を除いた。上清を収集し、０．２ｎＭフィルターを通して濾過し、ＣＭとして用いた。

【０１３４】

破骨細胞アッセイ：骨髄$CD34^{+}$細胞を１０％ＦＣＳ、１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐおよび１×ファンギゾン（ｆｕｎｇｉｚｏｎｅ）を含むαＭＥＭ　１００μｌ中に、９６ウェル毎に１５，０００細胞の密度でプレートした。翌日、それぞれのウェルから５０μｌの培地を除き、そして２５μｌのαＭＥＭ培地、および７５μｌのＣＭ、または１×ＩＴＳを含む５０％ＤＭＥＭ／５０％ＨＡＭｓＦ１２で置換した。それぞれのウェルに最終濃度１００ｎｇ／ｍｌでＲＡＮＫＬを添加し、そして適切なウェルに３０ｎｇ／ｍｌのＭ－ＣＳＦを添加した。細胞を５％CO_2中で３７℃にて１１日間インキュベートした。この間、６日後に再度新鮮なＲＡＮＫＬを添加した。１１日後、細胞を固定し、Ｓｉｇｍａからの Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　ａｃｉｄ　ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ　ｋｉｔを用いて、酒石酸塩耐性酸ホスファターゼについて染色した。

【０１３５】

結果：図３に示されるように、破骨細胞形成のインビトロアッセイにおいて、精製されたＭ－ＣＳＦは、転移性細胞株であるＭＤＡ２３１に由来するならし培地（ＣＭ）によって置換され得るが、細胞株ＭＣＦ７に由来するＣＭでは置換され得ない。

【０１３６】

（実施例３）

以下の実施例は、Ｍ－ＣＳＦムテインの設計および生成のための方法を提供する。

【０１３７】

米国特許第６，０２５，１４６号に記載されるＸ線結晶学的データは、Ｍ－ＣＳＦレセプター結合および生物学的活性に重要であるような、タンパク質内のアミノ酸の限定されたサブセットを同定し得る、Ｍ－ＣＳＦに関する構造的な情報を十分に提供し、従って、変化された生物学的活性を有するＭ－ＣＳＦムテイン（すなわちアゴニストまたはアンタゴニスト）を提供する究極的な目標を有する変異誘発のための、可能性のある候補を表す。この情報に基づき、いくつかの基準が用いられて、置換のための可能性のある標的アミノ酸のリストを作る。

【０１３８】

第一の基準は溶媒露出または溶媒の接触性であり、これらは、タンパク質の表面にあるアミン酸残基をいう。トリペプチドｇｌｙ－ｘ－ｇｌｙにおける場合、約０．２５を越える（好ましくは約０．４を越える）溶媒に接触可能な表面領域を有する残基が、アミノ酸

に接触可能な表面領域の中和に基づいて好ましい（Ｋａｂｓｃｈ，Ｗ．ら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ　２２：２５７７（１９８３））。単量体の相対的な配向を維持し、そしてタンパク質の折り畳みのプロセスへの妨害を避けるために、タンパク質の他の部分（例えば、二量体の境界面）と相互作用しない残基が選択される。候補アミノ酸物質の選択における特定の例において用いられるなお別の基準は、残基と、マウスＭ－ＣＳＦにおける対応する残基との関係である。別の重要な選択の基準は、Ｍ－ＣＳＦレセプター残基との可能性のある水素結合または疎水性相互作用の破壊を試みるように、置換が非保存的であることである。

【０１３９】

Ｍ－ＣＳＦムテインの調製は、基本的に米国特許第６，０２５，１４６号に記載されるように実施され得る。手短に言うと、Ｍ－ＣＳＦの成熟したＮ末端の領域ならびにヘリックスＡ、ヘリックスＣおよびヘリックスＤ領域に由来する、溶媒に接触可能な変更された残基を有する種々のＭ－ＣＳＦムテインが、当該分野で公知の技術を用いて構築される。例えば、Ｎ末端／Ａヘリックス領域における２つのヒスチジンが、Ｍ－ＣＳＦαの切断された形態（ｐＬＣＳＦ１５８Ａにコードされる）の位置指定変異誘発を通してアラニンに変換される。１：１００のジエチルピロカルボネート（ＤＥＰＣ）：ヒスチジンの割合でのＭ－ＣＳＦにおけるヒスチジンのＤＥＰＣ改変（Ｅｎｚｙｍｏｌ．におけるＭｅｔｈ．４７：４３１（１９７７）に記載される）が生物活性を有意に減少させた知見により、Ｍ－ＣＳＦレセプター相互作用における３つのＭ－ＣＳＦヒスチジン残基の１つの関与が関係される。

【０１４０】

プラスミドＤＮＡ　ｐＬＣＳＦ１５８Ａが、プラスミドｐＬＣＳＦ１５８Ａを保持するＥ．ｃｏｌｉ株ＨＷ２２（米国特許第４，９２９，７００号、実施例６、「Ｅ．ｃｏｌｉ　ｓｔｒａｉｎ　ＨＷ２２　ｔｒａｎｓｆｏｒｍｅｄ　ｗｉｔｈ　ｐＪＮ６５３　ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　ｔｈｅ　ａｓｐ．ｓｕｂ．５９　ＳＣＳＦ／Ｎ．ＤＥＬＴＡ．３Ｃ．ＤＥＬＴＡ．１５８　ｇｅｎｅ」）から調製される。この株は、５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＲ２培地（１％塩化ナトリウムを含み、グルコースを含まない２×Ｌｕｒｉａ　Ｂｒｏｔｈ、Ｊ．Ｂａｃｔ．、７４：４６１（１９５７））３５０ｍｌ中で、３０℃にて一晩振盪されて増殖される。製造業者の指示に従って、Ｑｉａｇｅｎ－ｔｉｐ　１００カラムを用いて、細胞からプラスミドＤＮＡを調製する。

【０１４１】

２０μｇのｐＬＣＳＦ１５８Ａ　ＤＮＡを、２００μｌの１×Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　ＮＥＢｕｆｆｅｒ　２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、Ｍａｓｓ．）中で、３７℃にて３時間２０分間、６６ユニットのＨｉｎｄＩＩＩおよび６６ユニットのＳｔｕＩを用いて消化する。ＤＮＡをフェノールおよびクロロホルムを用いて抽出し、次いでエタノール沈殿する。ＤＮＡを、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）から供給される、１×Ｄｅｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ　１００μｌ中にて、１ユニットの仔ウシ腸アルカリホスファターゼを用いて、３７℃にて３０分間処理する。さらなるユニットの仔ウシ腸アルカリホスファターゼが反応物に加え、そしてインキュベートを５０℃にて１時間続けた。次いで、生じるＤＮＡを、１％のＦＭＣ　Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ（Ｒｏｃｋｌａｎｄ、Ｍｅ．）のＳｅａ　ＫＥＭ．ＲＴＭ．ＧＴＧ．ＲＴＭ．アガロースゲル上で泳動する。このゲルから５．７ｋｂのｐＬＣＳＦ１５８Ａフラグメントを切り取り、そして、製造業者の指示に従って、Ｑｉａｇｅｎ（Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、Ｃａｌｉｆ．）のＱｉａｅｘビーズ上で精製する。

【０１４２】

次いで、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を行い、そして、例えばヒスチジン９およびヒスチジン１５（成熟したＮ末端から数えて）をアラニンに変化させた（Ｈ９Ａ、Ｈ１５Ａ　ＰＣＲフラグメントを生成する）、変異されたＭ－ＣＳＦ配列を含んだＰＣＲ産物を生成する。

【０１４３】
それぞれの反応物５μｌを、３％のアガロースゲル（トリス－ホウ酸緩衝液中に、１．５％のＦＭＣ Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ ＳｅａＫｅｍ．ＲＴＭ．ＧＴＧ．ＲＴＭ．アガロース、１．５％のＦＭＣ Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ ＮｕＳｅｉｖｅ．ＲＴＭ．ＧＴＧ．ＲＴＭ．アガロース）（ＦＭＣ Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｒｏｃｋｌａｎｄ、Ｍｅ．）上で泳動する。次いで、ゲルを臭化エチジウムで染色する。陽性の反応物をプールし、フェノールおよびクロロホルムを用いて抽出し、エタノールを用いて沈殿し、再懸濁し、そして最終体積が５００μｌの１×ＮＥＢｕｆｆｅｒ ２中で３７℃にて２時間、２５０ユニットのＳｔｕＩを用いて消化し、この反応物に５００ユニットのＨｉｎｄＩＩＩを添加し、１×ＮＥＢｕｆｆｅｒ ２中で体積を１ｍｌまで増加させ、そして消化を３７℃にてさらに２．５時間続けた。このＤＮＡを、３％アガロースゲル上で電気泳動する。消化された生産物をゲルから切り取り、製造業者の指示に従ってＱｉａｇｅｎ Ｑｉａｅｘビーズ上で精製する。

【０１４４】
次いで、ＰＣＲ産物を、ｐＬＣＳＦ１５８Ａベクター ＤＮＡに、挿入物対ベクターの比が約５：１にてライゲーションする。ライゲーションは、１×ライゲーション緩衝液（製造業者から供給される）の１ユニットのＢｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ Ｔ４ ＤＮＡリガーゼを用いて、２０μｌの体積で、１６℃にて一晩行う。

【０１４５】
それぞれの連結混合物の半分が、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｍａｎｉａｔｉｓら、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８２）に記載される塩化カルシウム手順と同様のプロトコルを用いて、能力のある（ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ）Ｅ．ｃｏｌｉ ＤＧ１１６（ＡＴＣＣ番号５３６０６）細胞への形質転換に用いられる。形質転換細胞に、３０℃にて選択無しで９０分間発現を許容し、この細胞を５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＲ２－４（１ｌ中に、トリプトン１０ｇ、酵母抽出物５ｇ、ＮａＣｌ ５ｇ、消泡剤Ａ ２滴、５０％グルコース４ｍｌ、および寒天１５ｇ）プレートにプレートする。このプレートを、室温にて７２時間インキュベートする。それぞれの形質転換体の１／４をプレートする。

【０１４６】
次いで形質転換体を培養し、そしてＭ－ＣＳＦムテイン配列を含むプラスミドの存在を確認するために配列決定する。

【０１４７】
Ｍ－ＣＳＦムテインは、基本的に米国特許第４，９２９，７００号、実施例５に記載されるように、発現され、精製され、二量体のタンパク質を形成するために再び折り畳まれ、そしてアッセイされ得るが、ＤＥＡＥ精製工程において変性剤に８Ｍの尿素を用いる。

【０１４８】
（実施例４）
本実施例は、Ｍ－ＣＳＦムテインの Ｍ－ＣＳＦＲに結合する能力について、Ｍ－ＣＳＦムテインを試験するための方法を提供する。

【０１４９】
インビボでのＭ－ＣＳＦの生物学的機能における重要な段階は、Ｍ－ＣＳＦレセプター（ｃ－ｆｍｓ遺伝子産物ともいわれる）との結合である。組換えヒト可溶性Ｍ－ＣＳＦレセプター（ｒｈｓＭ－ＣＳＦＲ）（配列番号８のアミノ酸２０～５１１を表す（Ｃｏｕｓｓｅｎｓ，Ｌら、Ｎａｔｕｒｅ、３２０：２７７（１９８６））を、Ｍ－ＣＳＦタンパク質のレセプター結合能力を試験するためのインビトロのアッセイ試薬として用いる。膜貫通レセプターの可溶性形態を生成するために、ヒトＭ－ＣＳＦレセプターの細胞外ドメインを、バキュロウイルス／昆虫細胞組換え発現系にて発現される。三次構造または四次構造に悪く影響することなく可溶性レセプターを精製するために、非変性クロマトグラフィー方法を選択する。組換えレセプターの精製のために、他の選択が存在する。レセプターに適切な抗体またはリガンドのいずれかが利用可能な場合、アフィニティクロマトグラ

フィーを利用し得る。あるいは、組換えレセプターのＣ末端に「タグ」（すなわち、ＫＴ３抗体認識配列）が付加され得て、アフィニティクロマトグラフィーにおける使用のための抗タグ抗体（すなわちＫＴ３）カラムによって精製され得る。ｒｈｓＭ－ＣＳＦＲがグリコシル化される発現系において、特異的な糖タンパク質を濃縮するためにレクチンクロマトグラフィーを用い得る。

【０１５０】

リガンド／レセプター相互作用およびリガンド誘導性レセプター二量体化を研究するために、ｒｈｓＭ－ＣＳＦＲを用い得る。リガンド／レセプター結合を検出するために用いるアッセイは、サイズ排除ＨＰＬＣの使用を、以下の改変：

用いるカラムはＳｕｐｅｒｏｓｅ６（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＬＫＢ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．）、そして移動層は０．５ｍｌ／分のＰＢＳ、そしてＭ－ＣＳＦ対ｒｈｓＭ－ＣＳＦＲの比は１：２

を伴って、基本的に欧州特許出願ＷＯ９２／２１０２９、Ｃ．Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍらに記載されるように用いる。この比において、Ｍ－ＣＳＦ／ｒｈｓＭ－ＣＳＦＲ複合体をクロマトグラフし、分子量１９０，００の水力学的半径が予測される。リガンド／レセプター結合またはレセプター二量体化を測定するために、他のアッセイ（例えば、化学的架橋およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ、または免疫沈降およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ）が利用され得る。レセプター二量体化を阻害するが、リガンド結合は阻害しない分子は、Ｍ－ＣＳＦの作用に拮抗する別の方法を提供する。

【０１５１】

（実施例５）

以下の実施例は、天然のＭ－ＣＳＦによるＭ－ＣＳＦＲの活性化を妨害するＭ－ＣＳＦムテインの能力についてＭ－ＣＳＦムテインを試験するための方法を提供する。

【０１５２】

天然のＭ－ＣＳＦと候補Ｍ－ＣＳＦムテインとの間のＭ－ＣＳＦＲとの結合の競合が、実施例４に記載される結合アッセイの改変により達成される。手短に言うと、上記に記載されるサイズ排除ＨＰＬＣ方法が、候補Ｍ－ＣＳＦムテインの存在下および非存在下で行われる。次いで、Ｍ－ＣＳＦＲ／Ｍ－ＣＳＦ相互作用を妨害する能力を有するＭ－ＣＳＦムテインが同定される。

【０１５３】

（実施例６）

本実施例は、インビトロ活性についてＭ－ＣＳＦムテインを試験するための方法を提供する。

【０１５４】

ヒトＭ－ＣＳＦまたはマウスＭ　ＮＦＳ　６０細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ登録番号ＣＲＬ－１８３８、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ、ＵＳＡにおけるＡＴＣＣから利用可能、Ｃａｓ－Ｂｒ－ＭｕＬＶ野生型マウスエコトロピックレトロウイルスによって誘導される骨髄性白血病から誘導、インターロイキン３およびＭ－ＣＳＦの両方に反応性であり、レトロウイルスの組み込みに起因する、切断されたｃ－ｍｙｂ癌原遺伝子を含む）の活性に対するＭ－ＣＳＦムテインの中和能力を測定するために、組換えヒトＣＳＦ－１（最終濃度１０ｎｇ／ｍｌ）を種々の濃度（１ｎｇ／ｍｌ～１ｍｇ／ｍｌ）の候補Ｍ－ＣＳＦムテインと共に、インキュベーター内にて、５％CO_2中で３７℃にて１時間プレインキュベートする。インキュベートに続き、この混合物を９６ウェルマイクロタイタープレート中のＭ　ＮＦＳ　６０培養物に添加する。１ウェル毎の全アッセイ体積は１００μｌであり、１０ｎｇ／ｍｌのｒｈＭ－ＣＳＦを含み、そして細胞密度は５，０００細胞／ウェルである。３７℃のCO_2インキュベーター中での７２時間の培養の後、細胞の増殖をＣｅＩＩＴｉｔｅｒ　Ｇｌｏ　Ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ）によってアッセイする。

【０１５５】

Ｍ－ＣＳＦムテインを含む混合物が、Ｍ－ＣＳＦによって誘導されるＭ　ＮＦＳ　６０

細胞の増殖を阻害することが予測される。

【０１５６】

（実施例７）

以下の実施例は、インビボの活性についてムテインを試験するための方法を提供する。

【０１５７】

実験の設計。骨溶解の処置のための治療薬剤としてのＭ－ＣＳＦムテインの効力を評価するために、高度に転移性であるヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－２３１（３×１０^{5}）を、雌のヌードマウスの脛骨骨髄洞（ｂｏｎｅ　ｍａｒｒｏｗ　ｃａｖｉｔｙ）に注射した。このマウスは４週齢～７週齢であり、平均重量が約２０ｇであった。このマウスを同定のために彫り、そして８週間の研究の開始に先立って少なくとも７日間の順化期間を経験させた。

【０１５８】

これらのマウスは、脛骨内注射の３０分前に、両方のわき腹に皮下的に、全用量１．５ｍｐｋ（マウスあたり０．０３ｍｇ）のブプレノルフィンを受けた。イソフルラン吸入によってマウスを麻酔し、そして７０％エタノールで右の後足を消毒した。１０μｌの生理食塩水に懸濁された腫瘍細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１－ｌｕｃ、３×１０^{5}）を、５０μｌまたは１００μｌのマイクロシリンジを用いて右の頚骨骨髄洞に注射した。

【０１５９】

投薬。Ｍ－ＣＳＦムテインによる処置は、腫瘍細胞の注射の翌日に始まる。投薬は、０．１ｍｇ／ｋｇ～５０ｍｇ／ｋｇの範囲である。最も高い投薬値の例である５０ｍｇ／ｋｇは、以下の通りである。投薬溶液が、１００μＬの注射されたＩＰが、２０ｇのマウスについて目的の用量（＝１０００μｇ）を送達するような、前もって希釈された濃度（＝１０ｍｇ／ｍｌ）で提供される。重量の調節のために、注射される体積は、相違する重量のｇ毎に５μｌずつ増加または減少される。例えば、２３ｇのマウスは１１５μｌを受け、一方で１８ｇのマウスは９０μｌを受ける。

【０１６０】

測定。骨溶解の重篤度を評価するために、それぞれのマウスは、腫瘍細胞の注射の翌日に撮られるベースラインのＦａｘｉｔｒｏｎ画像を受ける。さらに、研究の最後（８週）にＦａｘｉｔｒｏｎ画像を撮る。腫瘍細胞はルシフェラーゼを安定して発現するので、腫瘍の増殖をＸｅｎｏｇｅｎシステムを用いて同時に測定する。

【０１６１】

平均骨溶解スコア（ｏｓｔｅｏｌｙｓｉｓ　ｓｃｏｒｅ）が２．５以上である動物の数が、Ｍ－ＣＳＦムテイン処置を受けた群において最も低いことが企図される。骨溶解性の骨の損傷は０～４の尺度で評価し、０は骨の損傷が無いことと等値であり；１～２はいくらかの骨の損傷と等値であり、スコアが２．２５またはより高いものは重度の骨の損傷を示す。

【０１６２】

本明細書で言及される、そして／または、出願のデータシートに収載される、上記の米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および特許公開で無いものの全ては、本明細書中で、その全体が参考として援用される。

【０１６３】

前述から、本発明の特定の実施形態が例示の目的で本明細書中に記載されたが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、種々の改変がなされ得ることが理解される。従って、本発明は添付の特許請求の範囲により限定される場合を除いて、限定されない。

【図面の簡単な説明】

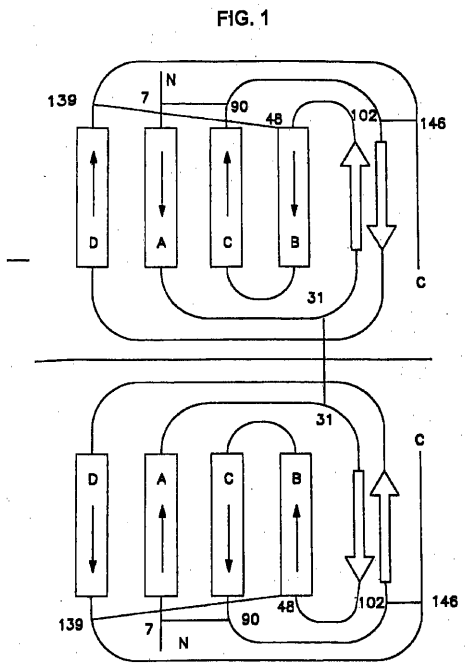
【０１６４】

【図１】図１は、短縮された二量体Ｍ－ＣＳＦにおけるジスルフィド結合を示すトポロジー図である。

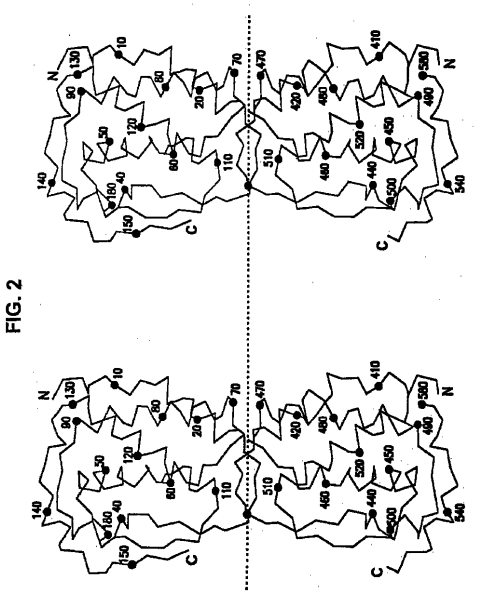
【図２】図２は、毎１０番目の残基を標識され、そして非結晶学対称軸を点線で示した、Ｃ－α骨格の立体図である。

【図３】図３は、精製Ｍ－ＣＳＦと、ＭＤＡ２３１細胞およびＭＣＦ７細胞由来のならし培地（ＣＭ）との間の、破骨細胞誘導活性の比較である。
【図４】図４は、Ｍ－ＣＳＦαのアミノ酸配列（配列番号２）である。
【図５】図５は、Ｍ－ＣＳＦβのアミノ酸配列（配列番号４）である。
【図６】図６は、Ｍ－ＣＳＦγのアミノ酸配列（配列番号６）である。

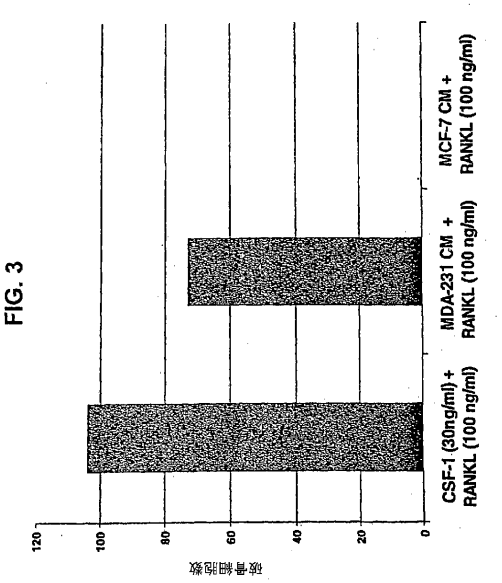
【図１】



【図２】



【図３】



【図４】

Fig. 4

```
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1               5                  10                  15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
            20                  25                  30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
        35                  40                  45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
    50                  55                  60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
                85                  90                  95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
            100                 105                 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
        115                 120                 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
    130                 135                 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
                165                 170                 175

Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
        195                 200                 205

Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
    210                 215                 220

Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
225                 230                 235                 240

Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
                245                 250                 255
```

【図５】

Fig. 5

```
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1               5                  10                  15
Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
            20                  25                  30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
        35                  40                  45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
    50                  55                  60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
                85                  90                  95
Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
            100                 105                 110
Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
        115                 120                 125
Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
    130                 135                 140
Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145                 150                 155                 160
Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
                165                 170                 175
Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
            180                 185                 190
Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
        195                 200                 205
Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
    210                 215                 220
Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225                 230                 235                 240
Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
                245                 250                 255
Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
            260                 265                 270
Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
        275                 280                 285
Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
    290                 295                 300
Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305                 310                 315                 320
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
                325                 330                 335
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
            340                 345                 350
Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
        355                 360                 365
Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
    370                 375                 380
Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
385                 390                 395                 400
Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
                405                 410                 415
Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
            420                 425                 430
Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
        435                 440                 445
Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
    450                 455                 460
Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
465                 470                 475                 480
His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
                485                 490                 495
Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
            500                 505                 510
Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
        515                 520                 525
Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
    530                 535                 540
Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
```

【図６】

Fig. 6

```
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1               5                  10                  15
Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
            20                  25                  30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
        35                  40                  45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
    50                  55                  60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
                85                  90                  95
Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
            100                 105                 110
Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
        115                 120                 125
Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
    130                 135                 140
Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145                 150                 155                 160
Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
                165                 170                 175
Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
            180                 185                 190
Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
        195                 200                 205
Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
    210                 215                 220
Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225                 230                 235                 240
Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
                245                 250                 255
Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
            260                 265                 270
Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
        275                 280                 285
Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
    290                 295                 300
Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305                 310                 315                 320
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
                325                 330                 335
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
            340                 345                 350
Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
        355                 360                 365
Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
    370                 375                 380
Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
385                 390                 395                 400
Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
                405                 410                 415
Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
            420                 425                 430
Gln Val Glu Leu Pro Val
```

【配列表】
2007524671000001.xml
【手続補正書】
【提出日】平成19年1月24日(2007.1.24)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2007524671000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/001630

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/19 A61P35/04 G01N33/50

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 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2004/045532 A (CHIRON CORPORATION) 3 June 2004 (2004-06-03) the whole document	1-64
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200171 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2001-613857 XP002347324 & JP 2001 233784 A (MORINAGA MILK IND CO LTD) 28 August 2001 (2001-08-28) abstract	1-64

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 September 2005	17/10/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Winger, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/001630

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98/39449 A (CHIRON CORPORATION; DWARKI, VAVARANI; MANNING, WILLIAM, C; KOTHS, KIRS) 11 September 1998 (1998-09-11)	1-64
X	page 36, line 22 - page 37, line 28; claim 1; example 5 page 47, line 17 - page 48, line 5	26,27, 43,49
Y	EP 0 955 056 A (CHIRON CORPORATION) 10 November 1999 (1999-11-10)	1-64
X	paragraphs '0028!, '0094! - paragraph '0114!	26,27, 43,49
Y	WO 90/01942 A (GENETICS INSTITUTE, INC) 8 March 1990 (1990-03-08) page 1, line 27 - page 2, line 9; examples 2-4	1-64
Y	EP 0 955 365 A (CHIRON CORPORATION; REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA; REGENTS O) 10 November 1999 (1999-11-10) cited in the application examples 9-12	1-64
Y	MIYAMOTO TAKESHI ET AL: "Differentiation and function of osteoclasts." THE KEIO JOURNAL OF MEDICINE. MAR 2003, vol. 52, no. 1, March 2003 (2003-03), pages 1-7, XP002347322 ISSN: 0022-9717 abstract; figure 5	1-64

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/001630

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-7, 12-25, 28 and 29 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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of 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

International Application No
PCT/US2005/001630

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004045532 A	03-06-2004	AU 2003291002 A1	15-06-2004
		CA 2505994 A1	03-06-2004
		EP 1572106 A2	14-09-2005
JP 2001233784 A	28-08-2001	NONE	
WO 9839449 A	11-09-1998	AU 6458898 A	22-09-1998
		EP 0973904 A1	26-01-2000
		JP 2001517079 T	02-10-2001
EP 0955056 A	10-11-1999	NONE	
WO 9001942 A	08-03-1990	AU 4219689 A	23-03-1990
EP 0955365 A	10-11-1999	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	A61P	43/00	111	
A61P	***19/08***	***(2006.01)***	A61P	43/00	121	
A61K	***45/00***	***(2006.01)***	A61P	19/08		
C12Q	***1/02***	***(2006.01)***	A61K	45/00	101	
G01N	***33/68***	***(2006.01)***	C12Q	1/02		
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	G01N	33/68		
			C12N	15/00	A	

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

(72)発明者 ジマーマン, デボラ リー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１１４, サンフランシスコ, １７ティーエイチ ストリート ３８４１
(72)発明者 ハロウィー, グレゴリー マーティン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４７０７, バークリー, スプルース ストリート １１０９
(72)発明者 リュー, チェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４８０３, リッチモンド, ブリストルコーン ロード ２２６６
(72)発明者 コーツ, カーストン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８－２９１７, エミリーヴィル, ホートン ストリート ４５６０
(72)発明者 キャバナー, ウィリアム マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５６３, オリンダ, オーチャード ロード ２２
(72)発明者 ロング, リー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６６２, エミリーヴィル, ピー．オー． ボックス ８０９７, カイロン コーポレイション

Fターム(参考) 2G045 AA40
4B024 AA01 AA11 BA30 CA04 CA05 CA06 CA09 DA02 DA06 EA02 EA04 FA02 FA10 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA14
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ20 QQ33 QR41 QR69 QR77 QS12 QS24 QS28 QS36 QX02
4C084 AA01 AA02 AA17 AA19 BA01 BA02 CA26 DA19 DA27 MA02 NA14 ZA961 ZB261 ZB271 ZC511 ZC751 ZC801
4C086 AA01 AA02 DA34 DA36 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA96 ZB26 ZB27 ZC02 ZC51 ZC75 ZC80