

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5235881号  
(P5235881)

(45) 発行日 平成25年7月10日(2013.7.10)

(24) 登録日 平成25年4月5日(2013.4.5)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/395 Z N A D

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 39/395 N

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 11/00

A61K 45/00

請求項の数 18 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2009-523112 (P2009-523112)  
 (86) (22) 出願日 平成19年8月10日 (2007.8.10)  
 (65) 公表番号 特表2010-500291 (P2010-500291A)  
 (43) 公表日 平成22年1月7日 (2010.1.7)  
 (86) 國際出願番号 PCT/AU2007/001127  
 (87) 國際公開番号 WO2008/017126  
 (87) 國際公開日 平成20年2月14日 (2008.2.14)  
 審査請求日 平成22年8月9日 (2010.8.9)  
 (31) 優先権主張番号 2006904378  
 (32) 優先日 平成18年8月11日 (2006.8.11)  
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 500021413  
 シーエスエル、リミテッド  
 オーストラリア連邦ビクトリア州、パーク  
 ビル、ポブラー、ロード、45  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (74) 代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦  
 (74) 代理人 100130845  
 弁理士 渡邊 伸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肺疾患病態の処理

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下からなる群より選択されるG-CSFまたはG-CSFR阻害物質を含む薬学的組成物であつて、被験体に投与し、被験体における慢性閉塞性肺疾患 (COPD)またはその悪化型を処理するための薬学的組成物：

- a . G-CSFに対して特異的な抗体；および
- b . G-CSFRに対して特異的な抗体。

## 【請求項 2】

G-CSF抗体が、G-CSFに対して特異的な抗原結合断片である、請求項1記載の薬学的組成物。

10

## 【請求項 3】

G-CSFR抗体が、G-CSFRに対して特異的な抗原結合断片である、請求項1記載の薬学的組成物。

## 【請求項 4】

COPDの悪化型が急性悪化COPD (AECOPD) である、請求項1記載の薬学的組成物。

## 【請求項 5】

被験体がヒトである、請求項1記載の薬学的組成物。

## 【請求項 6】

抗炎症剤、気管支拡張剤、および抗生物質からなる一覧より選択される治療物質とともに用いられる、請求項1記載の薬学的組成物。

20

**【請求項 7】**

G-CSFまたはG-CSFRに対して特異的な抗体がモノクローナル抗体である、請求項1記載の薬学的組成物。

**【請求項 8】**

抗体がキメラ、ヒト、またはヒト化抗体である、請求項7記載の薬学的組成物。

**【請求項 9】**

抗体がヒト抗体である、請求項7記載の薬学的組成物。

**【請求項 10】**

被験体における慢性閉塞性肺疾患(COPD)またはその悪化型を処理するための薬剤の製造における、G-CSFまたはG-CSFRの活性を阻害する物質の使用であって、該物質が以下からなる群から選択される、前記使用：

- a . G-CSFに対して特異的な抗体；および
- b . G-CSFRに対して特異的な抗体。

**【請求項 11】**

G-CSF抗体が、G-CSFに対して特異的な抗原結合断片である、請求項10記載の使用。

**【請求項 12】**

G-CSFR抗体が、G-CSFRに対して特異的な抗原結合断片である、請求項10記載の使用。

**【請求項 13】**

COPDの悪化型が急性悪化COPD(AECOPD)である、請求項10記載の使用。

**【請求項 14】**

被験体がヒトである、請求項10記載の使用。

**【請求項 15】**

抗炎症剤、気管支拡張剤、および抗生物質からなる一覧より選択される治療物質の使用をさらに含む、請求項10記載の使用。

**【請求項 16】**

G-CSFまたはG-CSFRに対して特異的な抗体がモノクローナル抗体である、請求項10記載の使用。

**【請求項 17】**

抗体がキメラ、ヒト、またはヒト化抗体である、請求項16記載の使用。

**【請求項 18】**

抗体がヒト抗体である、請求項15記載の使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****分野**

本発明は、全般的に、好中球の浸潤を特徴とする、またはそれに関連する肺疾患およびそれから生じる合併症の効果を処理、予防、またはそうでなければ改善するための方法に関する。本発明はさらに、G-CSFまたはその受容体の活性を阻害する、G-CSFシグナル伝達を妨害する、および/またはG-CSFまたはその受容体の発現をダウンレギュレートする物質および物質を含む薬学的組成物を提供する。

**【背景技術】****【0002】****背景**

本明細書において提供される参考文献の関係書目の詳細を、本明細書の末尾に一覧表にして記載する。

**【0003】**

先行技術に対するいかなる言及も、この先行技術が、いずれの国においても共通の一般的知識の一部を形成すると認めておらず、そのように解釈すべきではなく、またはいかなる示唆も行っておらず、そのように解釈すべきではない。

**【0004】**

10

20

30

40

50

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、世界的な主な健康の負担であり、2020年までに世界における死因の第3位となるであろう (Lopez and Murray, *Nat Med* 4(11):1241-1243, 1998 (非特許文献1))。吸入した刺激物質、特に紙巻きタバコの煙に対する誇張された炎症反応が、進行性に気道が制限されるおそらく原因である。マクロファージおよび好中球が支配的であるこの炎症によって、酸化的ストレス、肺気腫、末梢気道線維症、および粘液過分泌が起こる。しかし、COPDは、強力なグルココルチコイドが含まれる現在の抗炎症処理に対する反応が不良であり、それらの薬剤はほとんどまたは全く利益を生じない。COPD肺にはまた、グラム陰性菌およびグラム陽性菌が生着するようになり、これが肺機能の減退を促進して、ウイルスおよび吸入された汚染物質と共に、再発性の消耗性の悪化の主な誘因となる。COPD患者は、ウイルスおよび細菌の双方によって引き起こされる再発性の急性の悪化 (AECOPD) に罹る。

#### 【0005】

組織学および気管支生検試験から、COPDを有する患者が好中球の増加を有することが示されている (Di Stefano et al, *Am J Respir Crit Care Med* 158(4):1277-1285, 1998; Retamales et al, *Am J Respir Crit Care Med* 164:469-473, 2001)。さらに、COPD患者のBALFおよび喀痰は、好中球の顕著な増加を有する (Pesci et al, *Eur Respir J* 12(2):380-386, 1998; Keatings et al, *Am J Respir Crit Care Med* 153(2):530-534, 1996)。気管支生検および誘導喀痰における好中球数は、COPD疾患の重症度 (Di Stefano et al, 1998、前記、Keatings et al, 1996、前記) および肺機能の減退速度 (Stanescu et al, *Thorax* 51(3):267-271, 1996) に相関する。好中球は、好中球エラスター、カテーテルGおよびプロテアーゼ-3と共にMMP-8およびMMP-9が含まれるセリンプロテアーゼを分泌し、これらは実験動物における肺胞の破壊および肺気腫の产生に寄与する (Stockley, *Am J Respir Crit Care Med* 160(5 Pt 2):S49-52, 1999; Barnes et al, *Eur Respir J* 22:672-688, 2003)。好中球は、IL-8が含まれる好中球走化性因子の指示下で呼吸器官に遊走する (Barnes et al、前記2003)。セリンプロテアーゼは、粘液過分泌の強力な刺激物質であり、慢性気管支炎において認められる粘液過分泌において重要な役割を有する可能性がある (Sommerhoff et al, *J Clin Invest* 85(3):682-289, 1990)。

#### 【0006】

炎症反応に関係している一つのサイトカインは、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) であり、これはCSF-3遺伝子によってコードされる。G-CSFは、顆粒球の产生を調節する造血増殖因子である (Nicola et al, *Nature* 314:625, 1985; Metcalf, *International Journal of Cancer* 25:225, 1980; Nicola et al, *Journal of Biological Chemistry* 258:9017, 1983)。G-CSFは、I型サイトカイン受容体スーパーファミリー (Demetri et al, *Blood* 78:2791-2808, 1991) のメンバーであるG-CSF受容体 (G-CSFR、CSFR-3遺伝子によってコードされる)との相互作用を通してその効果を媒介する。ヒトおよびマウスにおけるG-CSFの主な生物学的作用には、骨髄からの好中球の产生および放出の増加 (Souza et al, *Science* 232:61, 1986; Lord et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9499-9503, 1989)、骨髄からの造血前駆細胞の末梢血への動員 (Bungart et al, *British Journal of Haematology* 22:1156, 1990; de Haan et al, *Blood* 86:2986-2992, 1995; Roberts et al, *Blood* 89:2736-2744, 1997)、ならびに成熟好中球の分化およびエフェクター機能の調節 (Yong et al, *European Journal of Haematology* 49:251-259, 1992; Colotta et al, *Blood* 80:2012-2020, 1992; Rex et al, *Transfusion* 35:605-611, 1995; Gericke et al, *Journal of Leukocyte Biology* 57:455-461, 1995; Xu et al, *British Journal of Haematology* 93:558-568, 1996; Yong, *British Journal of Haematology* 94:40-47, 1996; Jacob et al, *Blood* 92:353-361, 1998) が含まれる。G-CSFは好中球減少症とを処理するためと共に、自己および同種異系幹細胞移植のために造血幹細胞 (HSC) を動員するために用いられる (Welte et al, *Blood* 88:1907-1929, 1996)。

#### 【0007】

COPD、AECOPDのようなその悪化型、および好中球の浸潤を特徴とするまたはそれ関連する他の肺疾患のような炎症病態の新しい処理を開発することが緊急に直ちに必要である。

10

20

30

40

50

## 【発明の概要】

## 【0008】

## 概要

本明細書を通して、本文がそれ以外を必要としている場合を除き、「含む」という用語、または「含む (comprises)」もしくは「含む (comprising)」のようなその変形は、記載の要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群が含まれるが、他の任意の要素もしくは整数または要素もしくは整数の群を除外しないことを暗示すると理解される。

## 【0009】

ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、配列同定子番号 (SEQ ID NO:) によって参照される。SEQ ID NO: は、配列同定子<400>1 (SEQ ID NO:1)、<400>2 (SEQ ID NO:2) 等に数字で対応する。配列同定子の概要を表1に提供する。配列の一覧を特許請求の範囲の後に提供する。

10

## 【0010】

本発明は、一般的に、好中球の浸潤を特徴とするまたは関連する肺疾患または病態の処理において、G-CSFの活性のアンタゴニスト、その受容体、および / またはG-CSFもしくはその受容体をコードする遺伝子の発現を阻害する物質を用いることに関する。特に、本発明は、慢性免疫媒介性炎症性肺疾患 (COPD)、急性悪化COPD (AECOPD) のようなその悪化型、ならびに慢性気管支炎、酸化的ストレス、肺気腫、粘液過分泌、不整脈、肺性心肺炎および肺癌のような、それから生じる合併症またはその症状発現の処理を企図する。

## 【0011】

20

本発明は、COPD、その悪化型 (たとえば、AECOPD)、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現に関連するG-CSFの役割の解明に部分的に基づいている。したがって、本発明に従って、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を全身性もしくは局所に阻害すること、および / またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現をダウンレギュレートすることは、好中球の浸潤を特徴とするまたはそれに関連する肺の病態を処理するために有用であると提唱される。

## 【0012】

「G-CSF」またはその完全な名称「顆粒球-コロニー刺激因子」という言及には、G-CSFの相同体および誘導体が含まれる。「相同体」または「誘導体」には、G-CSFの多形変種が含まれる。

30

## 【0013】

「G-CSFR」またはその完全な名称「顆粒球-コロニー刺激因子」という言及には、G-CSFRの相同体および誘導体が含まれる。「相同体」または「誘導体」には、G-CSFの多形変種が含まれる。

## 【0014】

したがって、本発明の一つの局面は、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害するために、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害するために有効な量の物質を被験体に投与する段階を含む、被験体における好中球の浸潤を特徴とするまたはそれに関連する肺の病態を処理するための方法を企図する。

## 【0015】

40

特定の態様において、以下からなる群より選択されるG-CSFまたはG-CSFR阻害物質を被験体に投与する段階を含む、被験体における好中球浸潤に関連する肺疾患を処理するための方法が提供される：

a . G-CSFに対して特異的な抗体；

b . G-CSFRに対して特異的な抗体；

c . 可溶性のG-CSFRまたはそのG-CSF結合部分；

d . ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:3において記載される配列を含む、G-CSFをコードする核酸分子を標的とする、長さが20~30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子；および

e . ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:7において記載される配列を含む、G-CSFRをコードす

50

る核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子。

【0016】

一般的に、物質は、肺の病態の症状を改善するために十分な時間および条件で投与される。

【0017】

特定の態様において、肺の病態は、COPD、またはそれから生じる一つもしくは複数の合併症、もしくはその症状発現である。

【0018】

より詳しくは、本発明は、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害するために、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害するために有効な量の物質を被験体に投与する段階を含む、被験体におけるCOPD、その悪化型、関連病態、またはそれによって生じる合併症もしくはその症状発現を処理するための方法に向けられる。

10

【0019】

投与は、全身または局所であってもよい。全身投与は特に有用である。「全身投与」という参照には、関節内、静脈内、腹腔内、および皮下注射、注入と共に、経口、直腸内、および鼻腔内経路による投与、または吸入による投与が含まれる。皮下注射または吸入による投与が特に好ましい。

【0020】

物質は、タンパク質様、非タンパク質様（たとえば、化学実体）、または核酸分子であってもよい。

20

【0021】

タンパク質様および非タンパク質様分子には、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質、小さい、中間、または大きい化学分子と共に、天然物スクリーニングまたは化学ライブラリのスクリーニングによって同定された分子が含まれる。天然物スクリーニングには、植物、微生物、土壤川床、珊瑚、水性環境および地球外環境からの抽出物または試料を、G-CSF活性またはG-CSFR遺伝子発現レベルに影響を及ぼす分子または分子群に関してスクリーニングすることが含まれる。これらの分子はまた、G-CSF/G-CSFR相互作用に影響を及ぼしてもよい。

【0022】

30

本発明はさらに、G-CSFおよび/またはG-CSFRおよび一つまたは複数の他の炎症標的のターゲティングのような併用療法を企図する。

【0023】

したがって、本発明のもう一つの局面は、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害する物質と、抗炎症剤、気管支拡張剤、または抗生物質のような少なくとも一つの他の治療物質とを投与する段階を含む、被験体におけるCOPD、AECOPDのようなその悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現のような、しかしこれらに限定されない、好中球の浸潤を特徴とするまたはそれに関連する肺の病態を処理するための方法に関する。

【0024】

40

一つの好ましい物質は、G-CSFまたはG-CSFRの活性を阻害する抗体である。他の有用な物質には、低分子阻害剤、可溶性G-CSF受容体、およびG-CSFまたはG-CSFR遺伝子発現を阻害する核酸分子が含まれる。抗体は、単特異的または二特異的が含まれる多重特異的であってもよい。

【0025】

よって、特に好ましい態様において、本発明は、G-CSFまたはG-CSFRの活性を阻害するために有効な量の抗体を被験体に投与する段階を含む、被験体におけるCOPD、その悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現を処理するための方法を企図する。

【0026】

50

G-CSF遺伝子もしくはmRNAまたはG-CSFR遺伝子もしくはmRNAに向けられるセンスもしくはアンチセンス分子が提供されるが、G-CSFまたはG-CSFRの遺伝子またはmRNAのリーダー配列、および選択されるイントロンまたはエキソンが含まれる、コードまたは非コード領域の任意の部分に対するセンスまたはアンチセンス分子が同様に提供される。よって、SEQ ID NO:2、3、6または7の一つまたは複数に対する、長さが20～30ヌクレオチドに基づくセンスおよびアンチセンス分子が企図される。

## 【0027】

好ましい被験体は哺乳動物であり、特にヒトである。

## 【0028】

本発明は、G-CSFまたはG-CSFRの活性または遺伝子発現のアンタゴニストを含む薬学的組成物を用いることに拡大される。一つの特に有用な組成物は、抗G-CSF抗体または抗G-CSFR抗体を含む。

10

## 【0029】

本発明はさらに、被験体におけるCOPD、その悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現を処理するための薬剤の製造においてG-CSFまたはG-CSFRに対する抗体を用いることを企図する。

## 【0030】

もう一つの局面は、被験体における好中球浸潤に関連する肺疾患を処理するための薬剤の製造における、以下からなる群より選択される、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害する物質の使用を提供する：

20

- a. G-CSFに対して特異的な抗体；
- b. G-CSFRに対して特異的な抗体；
- c. 可溶性のG-CSFRまたはそのG-CSF結合部分；
- d. ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:3において記載される配列を含む、G-CSFをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子；および
- e. ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:7において記載される配列を含む、G-CSFRをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子。

30

## [請求項101]

以下からなる群より選択されるG-CSFまたはG-CSFR阻害物質を被験体に投与する段階を含む、被験体における好中球浸潤に関連する肺疾患を処理するための方法：

- a. G-CSFに対して特異的な抗体；
- b. G-CSFRに対して特異的な抗体；
- c. 可溶性のG-CSFRまたはそのG-CSF結合部分；
- d. ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:3において記載される配列を含む、G-CSFをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子；および
- e. ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:7において記載される配列を含む、G-CSFRをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子。

40

## [請求項102]

G-CSF抗体が、G-CSFに対して特異的な抗原結合断片である、請求項101記載の方法。

## [請求項103]

G-CSFR抗体が、G-CSFRに対して特異的な抗原結合断片である、請求項101記載の方法。

## [請求項104]

肺疾患が、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、その悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現である、請求項101記載の方法。

## [請求項105]

肺疾患がCOPDであって、悪化型が急性悪化COPD(AECOPD)である、請求項104記載の方法。

50

## [請求項106]

合併症または症状発現が、肺気腫、気管支炎、肺炎、粘液過分泌、酸化的ストレス、肺性心、肺癌、急性呼吸窮迫症候群、または急性の肺損傷である、請求項104記載の方法。

## [請求項107]

被験体がヒトである、請求項101記載の方法。

## [請求項108]

抗炎症剤、気管支拡張剤、および抗生物質からなる一覧より選択される治療物質の投与をさらに含む、請求項101記載の方法。

## [請求項109]

G-CSFまたはG-CSFRに対して特異的な抗体がモノクローナル抗体である、請求項101記載の方法。

10

## [請求項110]

抗体がキメラ、ヒト、またはヒト化抗体である、請求項109記載の方法。

## [請求項111]

抗体がヒト抗体である、請求項109記載の方法。

## [請求項112]

被験体における好中球浸潤に関連する肺疾患を処理するための薬剤の製造における、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する物質またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害する物質の使用であって、該物質が以下からなる群から選択される、前記使用：

20

a. G-CSFに対して特異的な抗体；

b. G-CSFRに対して特異的な抗体；

c. 可溶性のG-CSFRまたはそのG-CSF結合部分；

d. ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:3において記載される配列を含む、G-CSFをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子；および

e. ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:7において記載される配列を含む、G-CSFRをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子。

## [請求項113]

G-CSF抗体が、G-CSFに対して特異的な抗原結合断片である、請求項112記載の方法。

30

## [請求項114]

G-CSFR抗体が、G-CSFRに対して特異的な抗原結合断片である、請求項112記載の方法。

## [請求項115]

肺の病態が、被験体におけるCOPD、その悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現である、請求項112記載の使用。

## [請求項116]

肺疾患が、COPDまたはAECOPDである、請求項115記載の使用。

## [請求項117]

合併症または症状発現が、肺気腫、気管支炎、肺炎、粘液過分泌、酸化的ストレス、肺性心、肺癌、急性呼吸窮迫症候群、または急性の肺損傷である、請求項115記載の使用。

40

## [請求項118]

被験体がヒトである、請求項112記載の使用。

## [請求項119]

抗炎症剤、気管支拡張剤、および抗生物質からなる一覧より選択される治療物質の投与をさらに含む、請求項112記載の使用。

## [請求項120]

G-CSFまたはG-CSFRに対して特異的な抗体がモノクローナル抗体である、請求項112記載の使用。

## [請求項121]

抗体がキメラ、ヒト、またはヒト化抗体である、請求項120記載の使用。

50

## [請求項122]

抗体がヒト抗体である、請求項119記載の使用。

## 【0031】

本明細書を通して用いられる配列同定子の要約を表1に提供する。

## 【0032】

(表1) 配列同定子の要約

SEQ ID NO:	説明
1	リーダー配列が含まれるヒトG-CSFアミノ酸配列
2	ヒトG-CSFコードおよび非コードヌクレオチド配列
3	成熟タンパク質をコードするヒトG-CSFヌクレオチド配列
4	ヒトG-CSF成熟タンパク質アミノ酸配列
5	リーダー配列が含まれるヒトG-CSFR3アミノ酸配列
6	ヒトG-CSF3Rコードおよび非コードヌクレオチド配列
7	成熟タンパク質をコードするヒトG-CSF3Rヌクレオチド配列
8	ヒトG-CSF3R成熟タンパク質アミノ酸配列

10

20

30

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0033】

【図1】アイソタイプ対照または250 μg/用量の抗G-CSF抗体（G-CSF抗体または抗GCSFとも呼ばれる）の腹腔内注射のいずれかをt = -3時間に処理し、t = 0時間にLPSの一つの用量に曝露して、24時間後に解剖したマウスを示すグラフ表示である。

【図2】図2a ~ dは、アイソタイプまたはG-CSF抗体による処理後のLPS-処理マウスのBALFにおける総生存細胞、マクロファージ、好中球、およびリンパ球のグラフ表示である。対照、LPS処理、およびLPS + G-CSF抗体処理動物のBALFにおける炎症細胞数を、標準的な白血球分画分析(differential cell analysis)によって決定した。データを1群あたり動物8匹の平均細胞数/ml BALF ± SEMとして表記する。P < 0.05 ( \* によって注釈する ) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

【図3】アイソタイプまたはG-CSF抗体による処理後のLPS処理マウスのBALFにおけるTNF のタンパク質レベルのグラフ表示である。対照、LPS処理およびLPS + G-CSF抗体処理動物のBALFにおけるTNF のタンパク質レベルをELISAによって決定した。データは1群あたり動物8匹の平均値 ± SEMとして表記する。P < 0.05 ( \* によって注釈する ) は統計学的に有意である。

【図4】図4a ~ cは、アイソタイプまたはG-CSF抗体による処理後のLPS-処理マウスのBALFにおけるMMP9レベルおよびプロテアーゼ活性のグラフ表示である。対照、LPS-処理およびLPS + G-CSF抗体処理動物のBALFにおけるMMP9のレベルをザイモグラフィーによって決定した。処理マウスのBALFにおけるプロテアーゼ活性を、ゼラチナーゼおよびセリンプロテアーゼアッセイによって決定した。データは、1群あたりマウス8匹のプールした試料(図3.3a) および1群あたり動物8匹の平均値 ± SEM (図3.3b & c) として表記する。P < 0.05 ( \* によって注釈する ) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

【図5】図5a ~ cは、アイソタイプまたはG-CSF抗体による処理後のLPS-処理マウスの全血における総生存細胞、マクロファージ、および好中球のグラフ表示である。対照、LPS-処理およびLPS + G-CSF抗体処理動物の全血における炎症細胞数を標準的な白血球分画分析によって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均細胞数 / ml BALF ± SEMとして表記する。P < 0.05 ( \* によって注釈する ) は統計学的に有意である。

【図6】通常の煙の吸入容積および紙巻きタバコの燃焼速度を模倣する一定時間ドローバ

50

ツク (draw-back) を用いて10秒間の50 ml一回換気量において生成された煙を示すグラフ表示である。

【図7】図7a～dは、アイソタイプまたはG-CSF抗体による処理後の偽処理または煙に曝露されたマウスのBALFにおける総生存細胞、マクロファージ、好中球、およびリンパ球のグラフ表示である。対照、煙曝露、および煙+G-CSF抗体処理動物のBALFにおける炎症細胞数を、標準的な白血球分画分析によって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均細胞数/ml BALF ± SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

【図8】アイソタイプまたはG-CSF抗体による処理後の偽処理または煙に曝露されたマウスのBALFにおけるTNF のタンパク質レベルのグラフ表示である。対照、煙曝露、および煙+G-CSF抗体処理動物のBALFにおけるTNF のタンパク質レベルをELISAによって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均値 ± SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意である。

【図9】図9a～cは、アイソタイプまたはG-CSF抗体による処理後の偽処理または煙に曝露されたマウスのBALFにおけるMMP9レベルおよびプロテアーゼ活性のグラフ表示である。対照、LPS-処理およびLPS+G-CSF抗体処理動物のBALFにおけるMMP9レベルをザイモグラフィーによって決定した。処理マウスのBALFにおけるプロテアーゼ活性をゼラチナーゼおよびセリンプロテアーゼアッセイによって決定した。データは、1群あたりマウス8匹のプールした試料として、および1群あたり動物8匹の平均値 ± SEMとして表記する。

【図10】図10a～cは、アイソタイプまたはG-CSF抗体による処理後の偽処理または煙に曝露されたマウスの全血における総生存細胞、マクロファージ、および好中球のグラフ表示である。対照、煙曝露、および煙+G-CSF抗体処理動物のBALFにおける炎症細胞数を、標準的な白血球分画分析によって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均細胞数/ml BALF ± SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

【図11】アイソタイプ対照またはG-CSF 250 µg/用量の腹腔内注射のいずれかによってt = d-1およびd2で処理した後、3日目または10日目に解剖したマウスを示すグラフ表示である。

【図12】図12a～dは、アイソタイプまたはG-CSFG-CSF抗体による処理後にインフルエンザ処理された煙曝露マウスのBALFにおける総生存細胞、マクロファージ、好中球、およびリンパ球のグラフ表示である(感染後3日目)。対照、インフルエンザ処理+煙曝露、およびインフルエンザ+煙+G-CSFG-CSF抗体処理動物のBALFにおける炎症細胞数を、標準的な白血球分画分析によって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均細胞数/ml BALF ± SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

【図13】図13a～dは、アイソタイプまたはG-CSFG-CSF抗体による処理後のインフルエンザ処理された煙曝露マウスのBALFにおける総生存細胞、マクロファージ、好中球、およびリンパ球のグラフ表示である(感染後10日目)。対照、インフルエンザ処理+煙曝露、およびインフルエンザ+煙+G-CSFG-CSF抗体処理動物のBALFにおける炎症細胞数を、標準的な白血球分画分析によって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均細胞数/ml BALF ± SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

【図14】図14aおよびbは、アイソタイプまたはG-CSFG-CSF抗体による処理後のインフルエンザ処理された煙曝露マウスのBALFにおけるTNF のタンパク質レベルのグラフ表示である(感染後3日目 & 10日目)。対照、インフルエンザ処理+煙曝露、およびインフルエンザ+煙+G-CSFG-CSF抗体処理動物のBALFにおけるTNF のタンパク質レベルを、ELISAによって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均値 ± SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

【図15】図15a～fは、アイソタイプまたはG-CSFG-CSF抗体による処理後のインフルエンザ処理された煙曝露マウスのBALFにおけるMMP9レベルおよびプロテアーゼ活性のグラフ

10

20

30

40

50

表示である（感染後3日目 & 10日目）。対照、インフルエンザ処理 + 煙曝露、およびインフルエンザ + 煙 + G-CSF-G-CSF抗体処理動物のBALFにおけるMMP9レベルを、ザイモグラフィーによって決定した。処理マウスのBALFにおけるプロテアーゼ活性をゼラチナーゼおよびセリンプロテアーゼ活性によって決定した。データは、1群あたりマウス8匹のプールした試料として、および1群あたり動物8匹の平均値  $\pm$  SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

【図16】図16a～cは、アイソタイプまたは G-CSF-G-CSF抗体による処理後のインフルエンザ処理された煙曝露マウスの全血における総生存細胞、マクロファージ、および好中球のグラフ表示である（感染後3日目）。対照、インフルエンザ処理 + 煙曝露、およびインフルエンザ + 煙 + G-CSF-G-CSF抗体処理動物のBALFにおける炎症細胞数を、標準的な白血球分画分析によって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均細胞数 / ml BALF  $\pm$  SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

10

【図17】図17a～cは、アイソタイプまたは G-CSF-G-CSF抗体による処理後のインフルエンザ処理された煙曝露マウスの全血における総生存細胞、マクロファージ、および好中球のグラフ表示である（感染後10日目）。対照、インフルエンザ処理 + 煙曝露、およびインフルエンザ + 煙 + G-CSF-G-CSF抗体処理動物のBALFにおける炎症細胞数を、標準的な白血球分画分析によって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均細胞数 / ml BALF  $\pm$  SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

20

【図18】対照、インフルエンザ処理 + 煙曝露、およびインフルエンザ + 煙 + G-CSF抗体処理動物の肺におけるウイルス力値のグラフ表示である。データは1群あたり動物8匹の平均値  $\pm$  SEMとして表記する。ns = 有意でない。

【図19】図19a～dは、アイソタイプまたは G-CSF抗体による処理後の偽処理または煙に曝露されたマウスのBALFにおける総生存細胞、マクロファージ、および好中球のグラフ表示である。対照、煙曝露、および煙 + G-CSF抗体処理動物のBALFにおける炎症細胞数を、標準的な白血球分画分析によって決定した。データは、1群あたり動物8匹の平均細胞数 / ml BALF  $\pm$  SEMとして表記する。P < 0.05 (\*によって注釈する) は統計学的に有意であり、ns = 有意ではない。

30

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0034】

##### 詳細な説明

本発明を詳細に記述する前に、特に明記していなければ、本発明は、成分の特異的製剤、製造法、用量、または診断計画等に限定されないと理解される。同様に、本明細書において用いられる用語は、特定の態様のみを記述する目的のためであり、制限的であると意図されないと理解される。

##### 【0035】

単数形「一つの」、「一つの (an)」、および「その」には、本文が明らかにそうでないことを明記している場合を除き、複数の局面が含まれる。このように、たとえば、「一つのサイトカイン」という言及には、一つのサイトカインと共に二つまたはそれより多いサイトカインが含まれ、「一つの抗体」という言及には、一つの抗体と共に二つまたはそれより多い抗体が含まれ、「本発明」という言及には、一つの発明または複数の発明が含まれる等である。

40

##### 【0036】

本発明を記述および請求するにあたって、以下に記述される定義に従って以下の用語を用いる。

##### 【0037】

「物質」、「化合物」、および「活性な」という用語は、所望の薬理学的および/または生理学的效果を誘導する物質を指すために本発明において互換的に用いられる可能性がある。この用語はまた、塩が含まれる、その薬学的に許容されて薬理学的に活性な型を含

50

む。所望の効果は、G-CSF活性もしくはシグナル伝達の阻害、またはG-CSFもしくはその受容体をコードする遺伝子の発現の阻害である。

【0038】

G-CSFまたはG-CSFRアンタゴニストを、抗炎症剤、気管支拡張剤、および／または抗生物質のようなもう一つの治療物質と共に用いることを伴う併用治療もまた、本発明によって企図される。

【0039】

一つの好ましい物質は、G-CSFまたはG-CSFRに対して特異的な抗体である。

【0040】

「抗体」および「複数の抗体」という用語には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびに完全長の抗体（たとえば、無傷のFc領域を有する）、たとえばFv、Fab、Fab'、およびF(ab')<sub>2</sub>断片が含まれる抗原結合断片、ならびに一本鎖抗体のような組み換え法を用いて産生された抗体由来ポリペプチドが含まれるがこれらに限定されるわけではない、モノクローナル抗体に由来する全ての様々な型が含まれる。本明細書において用いられる「抗体」および「複数の抗体」という用語はまた、たとえばトランスジェニック動物においてまたはファージディスプレイを通して産生されたヒト抗体と共に、キメラ抗体、ヒト化抗体、または靈長類化抗体を指す。抗体の断片または改変型の選択はまた、断片またはその改変型がその半減期に対して有する任意の効果を伴ってもよい。たとえば、一定の状況において、好中球減少症のような抗G-CSF処理の全身的な影響を回避するために、抗体は短い半減期を有することが有利である可能性がある。または、悪化が一般的または可能性がある場合、より長い半減期を有する抗体が有利である可能性がある。抗体の「半減期」は、本明細書において2日またはそれ未満であれば、短いと見なされる。抗体のより長い半減期は、2日を超える任意の半減期であり、7日より長い方がより好ましいかもしれない。

【0041】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において、実質的に相同な抗体の集団から得られる抗体を指すために用いられる。すなわち、集団を含む個々の抗体は、微量存在する可能性がある天然に存在する変異を除き、同一である。したがって、本明細書において用いられるように修飾語「モノクローナル」という用語は、抗体の実質的に相同な集団から得られた抗体の特徴を示し、抗体が特定の方法によって産生されたことを示すために用いられるのではない。たとえば、本発明に従うモノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature 256:495-499, 1975によって記述されるハイブリドーマ法によって作製されてもよく、または組み換えDNA法 (U.S. Patent No: 4,816,567において記述されるような) によって作製されてもよい。モノクローナル抗体はまた、Clackson et al, Nature 352:624-628, 1991またはMarks et al, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991によって記述される技術を用いてファージ抗体ライプラリから単離されてもよい。

【0042】

本明細書において用いられるように、「有効量」および「治療的有効量」という用語は、所望の治療または生理的効果または転帰を提供する、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害する物質の十分量を意味する。さらに、効果はCOPDまたはその悪化型（たとえば、AECOPD）、関連病態および／またはそれから生じる合併症またはその症状発現のような肺の病態の症状の改善であってもよい。望ましくない効果、たとえば副作用が時に、所望の治療効果と共に発現する可能性があり；よって医師は、適切な「有効量」である量を決定する場合に、可能性があるリスクに対して可能性がある利益のバランスをとる。必要な物質の正確な量は、被験体の種、年齢、および全身状態、投与様式等に応じて、被験体により変化するであろう。このように、正確な「有効量」を明記することは可能ではないかも知れない。しかし、任意の個々の症例における適切な「有効量」は、ルーチンの実験を用いて当業者によって決定される可能性がある。たとえば、G-CSF抗体がCOPDまたはその悪化型の効果を改善できるか否かを、動物モデル系において評価することができる。当業者は、被験体の体格、被

10

20

30

40

50

験体の症状の重症度、および選択された特定の組成物または投与経路のような要因に基づいて、必要な量を決定することができるであろう。

#### 【0043】

本発明の一つの態様が、G-CSFまたはその受容体に対する抗体を用いることに関連する限り、有効量には、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μg/kg体重、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 μg/kg体重、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20mg/kg体重のような、抗体の約10 μg/kg体重～20 mg/kg体重が含まれる。単剤療法または併用療法に関して類似の量が提供される。

#### 【0044】

「肺の病態または疾患」という言及には、煙、埃、フューム、粒子、細菌、真菌、酵母、またはウイルスのような、しかしこれらに限定されない外来異物または刺激物質によって刺激される可能性がある肺または肺動脈系における任意の過剰な、過度の、または持続的な炎症反応が含まれる。悪化型（たとえば、AECOPD）、酸化的ストレス、肺気腫、気管支炎、粘液過分泌、肺性心（右側の心不全または心臓肥大、および慢性肺疾患に関連する心不全）、不整脈、肺炎、および肺癌が含まれる、肺の病態の広範囲の合併症および症状発現が、本明細書において企図される。急性呼吸窮迫症候群および急性の肺損傷が含まれる合併症および症状発現。肺の病態は、慢性または急性、またはそのあいだの進行期であってもよい。慢性の病態の悪化のような再発性の急性型も同様に、本発明によって企図される。

#### 【0045】

本発明は、特に先に概要したように、COPD、その悪化型（たとえば、AECOPD）、その関連病態、ならびにその合併症および症状発現に向けられる。

#### 【0046】

「薬学的に許容される」担体および／または希釈剤は、生物学的にまたはそれ以外でも望ましい材料を含む薬学的媒体であり、すなわち材料を、選択された活性物質と共に被験体に投与しても、いかなるまたは実質的な副作用も引き起こさないであろう。担体には任意のおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張性を調節するために用いられる物質、バッファー、キレート剤、および吸収遅延剤等が含まれてもよい。

#### 【0047】

同様に、本明細書において提供される化合物の「薬理学的に許容される」塩は、生物学的にまたはそれ以外でも望ましい塩である。

#### 【0048】

本明細書において用いられるように「処理する」および「処理」という用語は、治療的処理を指し、予防的または防止的手段が含まれてもよい。たとえば、処理によって、肺疾患の症状の重症度および／または頻度の低減、炎症の症状および／または基礎となる原因の消失、炎症の症状および／またはその基礎となる原因の発生の予防、ならびに炎症後の損傷の改善、矯正、または改善が起こる可能性がある。よって、処理によって「治癒」は起こらず、むしろ症状の改善が起こる可能性がある。さらに、処理は、悪化事象が起こるまで開始されなくてもよい。この文脈において、「予防」という用語はまた、悪化事象が起こる可能性の予防または処理にも適用される。

#### 【0049】

本明細書において用いられるように、「処理する」および「処理」という用語はまた、好中球の浸潤を特徴とするまたはそれに関連する肺疾患に関連する一つまたは複数の症状または特徴の低減を指す。そのような症状または特徴には、好中球の浸潤の増加、BALFおよび喀痰における好中球の増加、肺機能の減退、好中球エラスター、カテーテシンG、およびプロテアーゼ-3と共にMMP-8およびMMP-9のような、しかしこれらに限定されないセリンプロテアーゼレベルの増加が含まれる。

#### 【0050】

同様に、キメラ抗体には、G-CSFまたはG-CSFRに対するラットまたはウサギ抗体の重鎖

10

20

30

40

50

および軽鎖可変領域と、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインとを含む、G-CSFまたはG-CSFRに対する抗体が含まれてもよい。

【0051】

「病態」および「疾患」という用語は、本明細書を通して互換的に用いられる。

【0052】

本明細書において用いられる「被験体」は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくは本発明の薬学的組成物および方法によって利益を得ることができるヒトを指す。現在記述の薬学的組成物および方法から利益を得ることができる動物のタイプに制限はない。ヒトまたは非ヒト動物によらず、被験体は、個体、患者、動物、宿主、またはレシピエントと共に被験体と呼ばれる可能性がある。本発明の化合物および方法は、ヒト医学および獣医学において応用を有する。

10

【0053】

好ましい哺乳動物はヒトおよび実験動物である。実験動物の例には、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、ネコ、およびイヌが含まれる。

【0054】

本発明の一つの特に有用な物質は、G-CSF受容体を通してG-CSFシグナル伝達を阻害するG-CSFまたはG-CSFRのいずれかに対する抗体である。G-CSFに対するそのような抗体は、抗G-CSF抗体またはG-CSFと呼ばれる可能性があり、G-CSFRに対する抗体は、抗G-CSFR抗体またはG-CSFRと呼ばれる可能性がある。

20

【0055】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体をいずれも容易に產生することができるが、モノクローナル抗体は、大量に生成することができ、非常に特異的であり、一つの抗原部位に対して向けられることから、モノクローナル抗体が特に好ましい。さらに、モノクローナル抗体調製物は均一であり、治療応用のための抗原結合断片および他の操作された抗体誘導体を生成するためにそれらは理想的となる。

【0056】

ポリクローナル抗体も同様に、比較的容易に調製されるが、ポリクローナル抗体調製物には典型的に、異なる抗原部位に対する異なる抗体が含まれることから、モノクローナル抗体ほど有用でなく、このように治療応用のための抗原結合断片および他の操作された抗体誘導体を生成するためには適していない。

30

【0057】

先に記述されたハイブリドーマ法は、モノクローナル抗体を產生するために、マウスのような動物において用いられる。しかし、動物に由来する抗体は免疫応答を引き起こす可能性があることから、一般的にヒトに投与するために適していない。以下に記述されるように、そのような抗体を、ヒトまたは望ましい非ヒト被験体に投与するために適するように改変してもよい。

【0058】

たとえば、G-CSF抗体はまた、当技術分野において周知の組み換え法（たとえば、大腸菌（*E. coli*）発現系において）を用いて產生してもよい。このアプローチにおいて、本発明のマウスモノクローナル抗体のようなモノクローナル抗体をコードするDNAをハイブリドーマ細胞株から単離して、標準的な技法を用いてシーケンシングしてもよく、任意で組み換えDNA技術によって操作してもよい。たとえば、DNAをもう一つの関心対象DNAに融合させてもよく、または一つもしくは複数の核酸残基を付加、欠失、または置換するために変更してもよい（変異誘発または他の従来の技術によるよう）。DNAをベクターに組み入れてもよく、それらを当技術分野において周知の方法を用いて適切な宿主細胞にトランスフェクトまたは形質転換する（U.S. Patent Nos: 4,399,216; 4,912,040; 4,740,461; および4,959,455において記述されるように）。ハイブリドーマ細胞株から単離されたDNAをまた、その発現によって產生された抗体の特徴を変化させるために改変してもよい。

40

【0059】

50

たとえば、選択されたマウス重鎖および軽鎖定常ドメインをコードするヌクレオチドを、U.S. Patent No. 4,816,567においておよびMorrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851, 1984によって記述されるように、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインをコードするヌクレオチドに置換することによって、マウス G-CSFモノクローナル抗体のキメラ型を产生してもよい。次に、キメラ抗体を、マウス骨髄腫細胞株のような、改変DNAをトランسفェクトされている適切な細胞株において产生してもよい。

#### 【0060】

このように、非マウス重鎖および軽鎖抗体定常ドメインに融合したマウス G-CSFモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含むキメラ G-CSF抗体は、本発明によって企図される抗体に含まれる。好ましくは、非マウス重鎖および軽鎖定常ドメインは、ヒト重鎖および軽鎖抗体定常ドメインである。同様に、キメラ抗体には、G-CSFまたはG-CSFRに対するラットまたはウサギ抗体の重鎖および軽鎖可変領域と、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインとを含むG-CSFまたはG-CSFRに対する抗体が含まれてもよい。

#### 【0061】

本発明において用いるための G-CSF抗体には、ヒト化抗体が含まれる。一般的に、ヒト化抗体は、相補性決定領域 (CDR) 残基が、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類のような非ヒト種 (ドナー抗体) からのCDR領域残基に置換されているヒト抗体 (レシピエント抗体) である。いくつかの場合において、ヒト抗体の一定のフレームワーク領域 (FR) 残基もまた、対応する非ヒト残基に置換されてもよく、またはヒト化抗体はレシピエント抗体もしくはドナー抗体において見いだされない残基を含んでもよい。これらの改変は、抗体の性能および親和性を増強するためになされる。一般的に、ヒト化抗体は、CDR領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のCDR領域に対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体配列のFRである、少なくとも一つ、典型的に二つの可変領域の実質的に全てを含むであろう。ヒト化抗体はまた任意で、典型的にヒト抗体の定常領域である、抗体の定常領域 (Fc) の少なくとも一部を含んでもよい (Jones et al, Nature 321:522-525, 1986; Reichmann et al, Nature 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992; Liu et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439, 1987; Larrick et al, Bio/Technology 7:934, 1989; Winter & Harris, TIPS 14:139, 1993; Carter et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 89:4285 1992)。同様に、靈長類化抗体を作製するために、マウスCDR領域を、当技術分野において公知の方法を用いて靈長類フレームワークに挿入することができる (たとえば、WO 93/02108およびWO 99/55369を参照されたい)。

#### 【0062】

または、ヒト化抗体は、「ベニヤリング (veneering)」プロセスによって作製してもよい。独自のヒトおよびマウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域の統計分析により、露出された残基の正確なパターンがヒトおよびマウス抗体において異なること、およびほとんどの個々の表面位置は、少数の異なる残基に対して強い選択性を有することが判明した (Padlan et al, Mol. Immunol. 28:489- 498, 1991およびPedersen et al, J. Mol. Biol. 235:959-973, 1994を参照されたい)。したがって、ヒト抗体において通常見いだされるものとは異なる、そのフレームワークにおける露出残基を置換することによって、非ヒトFvの免疫原性を低減させることが可能である。タンパク質の抗原性は、表面の到達可能性に相關する可能性があることから、マウス可変領域をヒト免疫系に対して「見えなくなる」ためには、表面残基の置換で十分である可能性がある。このヒト化技法は、抗体の表面のみが変更され、それを支える残基は乱されていないままであることから、「ベニヤリング」と呼ばれる。

#### 【0063】

さらに、WO 2004/006955は、非ヒト抗体の可変領域のCDR配列に関して模範的なCDR構造型を、ヒト抗体配列のライブラリ、たとえば生殖系列抗体遺伝子セグメントからの対応するCDRに関する模範的なCDR構造型と比較することによって、ヒト抗体遺伝子からの可変領域フレームワーク配列を選択することに基づいて、抗体をヒト化する方法を記述している。非ヒトCDRと類似の模範的CDR構造タイプを有するヒト抗体可変領域は、そこからヒトフ

10

20

30

40

50

レームワーク配列を選択すべきヒト抗体配列メンバーのサブセットを形成する。サブセットメンバーを、ヒトおよび非ヒトCDR配列間のアミノ酸類似性によってさらにランク付けてもよい。WO 2004/006955の方法において、最上位にランクされるヒト配列は、選択されたサブセットメンバーヒトフレームワークを用いて、ヒトCDR配列を非ヒトCDR相対物に機能的に置換するキメラ抗体を構築するためのフレームワーク配列を提供するように選択され、それによって非ヒトおよびヒト抗体のあいだでフレームワーク配列を比較する必要なく、高親和性および低免疫原性のヒト化抗体を提供する。

#### 【 0 0 6 4 】

所定の抗体のCDRは、たとえばKabat et al in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Department of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication No. 91-3242, 1991によって記述されるシステムを用いて容易に同定される可能性がある。

#### 【 0 0 6 5 】

好ましい態様において、本発明において用いられるための抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。G-CSFまたはその受容体に対するそのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系よりむしろヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックまたはトランスクロモソミックマウスを用いて生成することができる。これらのトランスジェニックおよびトランスクロモソミックマウスには、本明細書においてHuMAbマウスおよびKMマウスと呼ばれるマウスが含まれる。

#### 【 0 0 6 6 】

なおさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するもう一つのトランスジェニック動物系が当技術分野において利用可能であり、抗体を作製するために用いることができる。たとえば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と呼ばれる別のトランスジェニック系を用いることができ；そのようなマウスは、たとえばUS Patent Nos. 5,939,598 ; 6,075,181 ; 6,114,598 ; 6,150,584および6,162,963において記述されている。

#### 【 0 0 6 7 】

その上、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代わりのトランスクロモソミック動物系が当技術分野において利用可能であり、G-CSFまたはその受容体に対する抗体を作製するために用いることができる。たとえば、「TCマウス」と呼ばれるヒト重鎖トランスクロモソームとヒト軽鎖トランスクロモソームの双方を有するマウスを用いることができ；そのようなマウスは、Tomizuka et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722- 727, 2000において記述されている。

#### 【 0 0 6 8 】

ヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を用いても調製することができる。ヒト抗体を単離するためのそのようなファージディスプレイ法は、当技術分野において確立されている。たとえばUS Patent Nos. 5,223,409 ; 5,403,484 ; および5,571,698 ; US Patent Nos. 5,427,908および5,580,717 ; US Patent Nos. 5,969,108、6,172,197、およびUS Patent Nos. 5,885,793 ; 6,521,404 ; 6,544,731 ; 6,555,313 ; 6,582,915および6,593,081を参照されたい。

#### 【 0 0 6 9 】

ヒトモノクローナル抗体はまた、免疫によってヒト抗体反応が生成されうるように、その中にヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを用いて調製することができる。そのようなマウスは、たとえばUS Patent Nos. 5,476,996および5,698,767において記述されている。

#### 【 0 0 7 0 】

本発明の G-CSF抗体にはまた、Fv、Fab、Fab'、およびF(ab')<sub>2</sub>断片のような抗原結合断片が含まれる。従来、抗原結合断片は、完全な抗体のタンパク質分解消化によって生成された (Morimoto et al, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117, 1992 ; Brennan et al, Science 229:81, 1985)。組み換え型宿主細胞において抗体の

10

20

30

40

50

抗原結合断片を直接產生するために、多くの組み換え法が現在開発されている。

【0071】

たとえば、 $\text{Fab}'\text{-SH}$ 断片は、大腸菌から直接回収することができ、これを化学的にカッピングさせて $\text{F}(\text{ab}')_2$ 断片を形成することができる (Carter et al, Bio/Technology 10:163-167, 1992)。 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 断片はまた、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分子のアセンブリを促進するためにロイシンジッパーGCN4を用いて形成することもできる。Fv、Fab、または $\text{F}(\text{ab}')_2$ 断片はまた、組み換え型宿主細胞培養から直接単離することができる。一本鎖抗体の產生に関して、U. S. Patent No. 4,946,778; Bird, Science 242:423, 1988, Huston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988およびWard et al, Nature 334:544, 1989に記載される方法が含まれる多くの組み換え法が開発されている。一本鎖抗体は、一つのポリペプチド鎖 (scFv) を提供するために短いペプチドリンカーを通して重鎖 ( $\text{V}_\text{H}$ ) および軽鎖 ( $\text{V}_\text{L}$ ) 可変領域 (Fv領域) 断片を連結させることによって形成してもよい。scFvはまた、二つの可変領域のあいだのペプチドリンカーの長さに応じて二量体または三量体を形成してもよい (Kortt et al, Protein Engineering 10:423, 1997)。ファージディスプレイは、本発明の抗原結合断片を產生するためのもう一つの周知の組み換え法である。

【0072】

本発明の抗原結合断片を、所望の特性に関してスクリーニングしてもよい。本明細書において記述されるアッセイは、G-CSFまたはG-CSFRに結合して、G-CSFRを通してのG-CSFシグナル伝達に拮抗する抗原結合断片を同定する手段を提供する。

【0073】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株が当技術分野において周知であり、これにはAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。これらには、中でも、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NSO、SP2細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎 (BHK) 細胞、サル腎細胞 (COS) 、ヒト肝細胞癌細胞 (たとえば、Hep G2) 、A549細胞、3T3細胞、および他の多くの細胞株が含まれる。哺乳動物宿主細胞には、ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、およびハムスター細胞が含まれる。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有するか否かを決定することによって選択される。用いてもよい他の細胞株は、Sf9細胞のような昆虫細胞、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞、および真菌細胞である。重鎖またはその抗原結合部分、軽鎖および/またはその抗原結合部分をコードする組み換え型発現ベクターを哺乳動物細胞に導入する場合、抗体は、宿主細胞において抗体を発現させる、またはより好ましくは宿主細胞が生育する培養培地に抗体を分泌させるために十分な期間、宿主細胞を培養することによって產生される。

【0074】

抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて培養培地から回収することができる。さらに、宿主細胞株からの本発明の抗体の発現は、多数の公知の技術を用いて増強することができる。たとえば、グルタミンシンテターゼ遺伝子発現系 (GS系) は、一定の条件での発現を増強するための一般的なアプローチである。GS系は、European Patent Nos. 0 216 846、0 256 055および0 323 997、ならびに欧州特許出願第89303964.4号と結びつけて全体としてまたは部分的に考察される。

【0075】

異なる細胞株によってまたはトランスジェニック動物において発現された抗体は、互いに異なるグリコシル化パターンを有する可能性がある。しかし、慢性的な免疫媒介炎症性肺病態の処理において用いられるG-CSFまたはその受容体に対するそのような抗体は全て、抗体のグリコシル化パターンによらず、本発明の一部である。

【0076】

関心対象抗体とは異なるサブクラスまたはアイソタイプの抗体を誘導するための技術、すなわちサブクラススイッチングも公知である。このように、たとえばIgG1またはIgG4モノクローナル抗体がIgMモノクローナル抗体に由来してもよく、逆もまた同じである。そのような技術によって、所定の抗体 (親抗体) の抗原結合特性を保有するが、親抗体とは

異なる抗体アイソタイプまたはサブクラスに関連する生物特性を示す新規抗体が調製される。組み換えDNA技術を用いてもよい。特定の抗体ポリペプチドをコードするクローニングされたDNA、たとえば所望のアイソタイプの抗体の定常領域をコードするDNAを、そのような技法において用いてもよい。

【0077】

宿主細胞株におけるクローニングおよび発現のために利用できるベクターは、当技術分野において周知であり、これには、哺乳動物細胞株におけるクローニングおよび発現のためのベクター、細菌細胞株におけるクローニングおよび発現のためのベクター、ファージにおけるクローニングおよび発現のためのベクター、ならびに昆虫細胞株におけるクローニングおよび発現のためのベクターが含まれるがこれらに限定されるわけではない。抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて回収することができる。 10

【0078】

好ましい態様において、本発明の方法において用いるための抗体は、G-CSFRによってG-CSFシグナル伝達に拮抗するヒトまたはヒト化 G-CSF抗体である。

【0079】

好ましくは、ヒトまたはヒト化 G-CSF抗体は、単離型、均一型、または完全もしくは部分精製型である。

【0080】

より好ましくは、ヒトまたはヒト化 G-CSF抗体は、完全長のモノクローナル抗体または抗原結合断片である。 20

【0081】

先に示したように、抗体の抗原結合断片または変型の選択は、個々の半減期に対して断片または変型が有する効果によって影響を受ける可能性がある。

【0082】

有用な物質のもう一つの例は、G-CSF相互作用に関して天然に存在する膜結合型のG-CSFRと競合するG-CSFRの可溶性型である。当業者は、受容体の可溶性型を容易に調製することができ、たとえばUS 5,589,456およびHonjo et alを参照されたい。

【0083】

または、物質をG-CSFまたはG-CSFR遺伝子材料に対するその結合能についてスクリーニングすることができる。一つの態様において、G-CSFまたはG-CSFRをコードするcDNA、ゲノムDNA、mRNA転写物、またはESTもしくはSAGEタグのようなその一部を、ナノ粒子またはミクロスフェアのような固相支持体に固定する。固定された核酸分子に、可能性がある物質を接触させて、放射線、放出、原子の励起、質量および/または密度の変化によって結合を検出する。 30

【0084】

同定された後、物質を核酸分子から溶出させて、より詳細に特徴付けする。たとえば、G-CSF/G-CSFR遺伝子材料に結合する物質は、発現（転写および/または翻訳）を阻害する可能性がある。

【0085】

本発明はさらに、G-CSFまたはその受容体のアンタゴニストとしてG-CSFまたはG-CSFRの化学類似体を用いることを企図する。先に示したように、可溶性のG-CSF受容体もまた用いてもよい。 40

【0086】

本明細書において企図される化学類似体には、側鎖の変更、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質合成の際の非天然アミノ酸および/またはその誘導体の取り込み、クロスリンク剤の使用およびタンパク質様分子またはその類似体に対してコンフォメーション上の拘束を課す他の方法が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0087】

本発明によって企図される他の物質には、サイトカインまたはその受容体をコードする遺伝子のアンチセンスまたはセンス媒介機構による沈黙化を誘導するために有用であるRN 50

AまたはDNAのような核酸分子が含まれる。センス媒介遺伝子沈黙化はまた、共抑制とも呼ばれ、RNAiの誘導が含まれる広範囲の機構を伴う。したがって、転写および転写後遺伝子沈黙化は、本発明によって企図される。

【0088】

「核酸」、「ヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」という用語には、当業者によって容易に認識されるように、RNA、cDNA、ゲノムDNA、合成型および混合ポリマー、センスおよびアンチセンス鎖の双方が含まれ、これらは化学的もしくは生化学的に改変されてもよく、または非天然もしくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含有してもよい。そのような改変には、たとえば標識、メチル化、一つまたは複数の天然に存在するヌクレオチドと類似体との置換（モルフォリン環のような）、非荷電連結のようなヌクレオチド間改変（たとえば、メチルホスホネート、ホスホトリエスチル、ホスホアミデート、カルバメート等）、荷電連結（たとえば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）、懸垂部分（たとえば、ポリペプチド）、インターラーチャー（たとえば、アクリジン、ソラレン等）、キレート剤、アルキル化剤、および改変連結（たとえば、-アノマー核酸等）が含まれる。同様に、水素結合および他の化学相互作用を通して指定された配列に対するその結合能においてポリヌクレオチドを模倣する合成核酸も含まれる。そのような分子は当技術分野において公知であり、これにはたとえば、ペプチド連結が分子の骨格におけるホスフェート連結の代わりとなる分子が含まれる。

10

【0089】

アンチセンスポリヌクレオチド配列は、たとえばG-CSF遺伝子配列またはG-CSFR遺伝子配列の転写物を沈黙化するために有用である（Geng et al, Molecular Immunology 44:51 21-529, 2007を参照されたい）。さらに、G-CSF遺伝子座の全てまたは一部を含有するポリヌクレオチドベクターを、センスまたはアンチセンス方向のいずれかでプロモーターの制御下に置いて、細胞に導入してもよい。細胞内でのそのようなセンスまたはアンチセンス構築物の発現は、標的転写および/または翻訳と干渉する。さらに、共抑制（すなわちセンス-発現を用いる）およびRNAiまたはsiRNAを誘導する機構も同様に用いてよい。または、アンチセンスまたはセンス分子を直接投与してもよい。この後者の態様において、アンチセンスまたはセンス分子を組成物に製剤化した後、任意の数の手段によって標的細胞に投与してもよい。

20

【0090】

アンチセンスおよびセンス分子の変化は、モルフォリンヌクレオチド誘導体、およびホスホロジアミデート連結で構成されるオリゴヌクレオチドであるモルフォリノの使用を伴う（たとえば、Summerton and Weller, Antisense and Nucleic Acid Drug Development 7:187-195, 1997を参照されたい）。

30

【0091】

一つの態様において、本発明は、G-CSFまたはG-CSFRをコードする核酸分子の機能または効果の調節において用いるためのオリゴヌクレオチドおよび類似の種のような化合物を使用し、すなわちオリゴヌクレオチドは転写または転写後遺伝子沈黙化を誘導する。これは、標的核酸をコードする一つまたは複数の核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを提供することによって達成される。オリゴヌクレオチドは、細胞に直接提供されてもよく、または細胞内で生成されてもよい。本明細書において用いられるように、「標的核酸」および「G-CSFまたはG-CSFRをコードする核酸分子」という用語は、便宜上、コードされるDNA、そのようなDNAから転写されたRNA（プレmRNAおよびmRNA、またはその一部が含まれる）、および同様にそのようなRNAに由来するcDNAを含むために用いられている。本発明の化合物とその標的核酸とのハイブリダイゼーションは、一般的に「アンチセンス」と呼ばれる。その結果、本発明のいくつかの好ましい態様の実践において含まれると考えられる好ましい機構は、本明細書において「アンチセンス阻害」と呼ばれる。そのようなアンチセンス阻害は典型的に、少なくとも一つの鎖またはセグメントが切断、分解、またはそうでなければ操作不能にされるように、オリゴヌクレオチド鎖またはセグメントの水素結合に基づくハイブリダイゼーションに基づく。この点において、その

40

50

ようなアンチセンス阻害のために、特異的核酸分子およびその機能を標的とすることが現在好ましい。

【0092】

干渉されるDNAの機能には、複製および転写が含まれる。複製および転写は、たとえば内因性の細胞錠型、ベクター、プラスミド構築物またはそれ以外に由来しうる。干渉されるRNAの機能には、タンパク質翻訳部位へのRNAのトランスロケーション、RNA合成部位とは離れた細胞内の部位へのRNAのトランスロケーション、RNAからのタンパク質の翻訳、一つまたは複数のRNA種を生じるためのRNAのスプライシング、およびRNAに関係するまたはRNAによって促進される可能性があるRNAを伴う触媒活性または複合体形成のような機能が含まれる。

10

【0093】

本発明の文脈において、「ハイブリダイゼーション」は、オリゴマー化合物の相補鎖の塩基対形成を意味する。本発明において、対形成の好ましい機構は、オリゴマー化合物の鎖の相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基(ヌクレオベース)間のワトソン-クリック、フーグスティーン、または逆フーグスティーン水素結合であってもよい水素結合を伴う。たとえば、アデニンおよびチミンは水素結合の形成を通して対を形成する相補的ヌクレオベースである。ハイブリダイゼーションは、様々な状況で起こりうる。

【0094】

アンチセンス化合物は、標的核酸に対する化合物の結合が標的核酸の正常な機能を干渉して活性の喪失を引き起こす場合に特異的にハイブリダイズ可能であり、特異的結合が望ましい条件で非標的核酸配列に対するアンチセンス化合物の非特異的結合を回避するために十分な程度の相補性が存在する。

20

【0095】

本明細書において用いられるように「相補的な」は、オリゴマー化合物の二つのヌクレオベース間の正確な対形成能を指す。たとえば、オリゴヌクレオチド(オリゴマー化合物)の一定の位置でのヌクレオベースが、DNA、RNA、またはオリゴヌクレオチド分子である標的核酸の一定の位置でのヌクレオベースと水素結合することができる場合、オリゴヌクレオチドと標的核酸のあいだの水素結合の位置は相補的な位置であると見なされる。オリゴヌクレオチドとさらなるDNA、RNA、またはオリゴヌクレオチド分子は、各分子における相補的な位置の十分数が互いに水素結合することができるヌクレオベースで占有されている場合に、互いに相補的である。このように、「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」とは、オリゴヌクレオチドと標的核酸のあいだで安定かつ特異的な結合が起こるように、十分数のヌクレオベースに対して十分な程度の正確な対形成または相補性を示すために用いられる用語である。

30

【0096】

本発明に従って、化合物には、アンチセンスオリゴマー化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部誘導配列(external guide sequence(EGS))オリゴヌクレオチド、交互スプライサー、プライマー、プローブ、および標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズする他のオリゴマー化合物が含まれる。そのため、これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状、またはヘアピンオリゴマー化合物の形で導入されてもよく、内部または末端の隆起またはループのような構造要素を含有してもよい。系に導入された後、本発明の化合物は、標的核酸の改変を行うために一つまたは複数の酵素または構造タンパク質の作用を誘発してもよい。そのような酵素の一つの非制限的な例は、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼであるRNアーゼHである。「DNA様」である一本鎖アンチセンス化合物がRNアーゼHを誘発することは当技術分野において公知である。したがって、RNアーゼHの活性化によって、RNA標的の切断が起こり、それによって遺伝子発現のオリゴヌクレオチド媒介阻害効率は大きく増強される。RNアーゼIIIおよびリボヌクレアーゼL酵素ファミリーの役割のような類似の役割が、他のリボヌクレアーゼについても仮定されている。

40

【0097】

50

アンチセンス化合物の好ましい型は一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであるが、多くの種において、二本鎖RNA (dsRNA) 分子のような二本鎖構造を導入しても、遺伝子またはその関連する遺伝子産物の機能の強力かつ特異的アンチセンス媒介低減を誘導することが示されている。

【0098】

本発明の文脈において、「オリゴマー化合物」という用語は、複数の単量体単位を含むポリマーまたはオリゴマーを指す。本発明の文脈において、「オリゴヌクレオチド」という用語は、リボ核酸 (RNA) もしくはデオキシリボ核酸 (DNA) のオリゴマーもしくはポリマー、またはその模倣体、キメラ、類似体、および相同体を指す。この用語には、天然に存在するヌクレオベース、糖および共有ヌクレオシド (骨格) 連結で構成されるオリゴヌクレオチドと共に、類似のように機能する非天然部分を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。そのような改変または置換オリゴヌクレオチドは、たとえば細胞の取り込みの増強、標的核酸に対する親和性の増強、およびヌクレアーゼの存在下での安定性の増強のような望ましい特性のために、しばしば天然型に対して好ましい。オリゴヌクレオチドは、本発明の化合物の好ましい型であるが、本発明は、本明細書において記述されるような、オリゴヌクレオチド類似体および模倣体が含まれるがこれらに限定されるわけではない他のファミリーの化合物も同様に包含する。

【0099】

アンチセンス化合物の局所送達に関して、これらのオリゴヌクレオチドは、改変骨格または非天然のヌクレオシド間連結を含有してもよい。本明細書において定義されるように、改変骨格を有するオリゴヌクレオチドには、骨格においてリン原子を保持するオリゴヌクレオチドおよび骨格においてリン原子を有しないオリゴヌクレオチドが含まれる。本明細書の目的に関して、および時に当技術分野において参照されるように、そのヌクレオシド間骨格においてリン原子を有しない改変オリゴヌクレオチドもまた、オリゴヌクレオシドであると見なされうる。

【0100】

その中にリン原子を含有する好ましい改変オリゴヌクレオチド骨格には、たとえばホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、およびキラルホスホネートが含まれるメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートが含まれるホスホラミデート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、通常の3'-5'連結を有するセレノホスフェートおよびボラノホスフェート、これらの2'-5'連結類似体、ならびに一つまたは複数のヌクレオチド間連結が3'から3'、5'から5'、または2'から2'連結である逆極性を有する類似体が含まれる。逆極性を有する好ましいオリゴヌクレオチドは、最も3'-側のヌクレオチド間連結、すなわち塩基性であってもよい(ヌクレオベースが失われている、またはその代わりにヒドロキシル基を有する)一つの逆ヌクレオシド残基で一つの3'から3'連結を含む。様々な塩、混合塩、および遊離の酸型も同様に含まれる。

【0101】

本明細書において特に企図されるセンスおよびアンチセンスヌクレオチド配列には、長さが20~30ヌクレオチドの塩基が含まれる。「20~30」という言及には、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30個、または20~30ヌクレオベースの範囲外のその同等物が含まれる。「ヌクレオベース」および「ヌクレオチド」という用語は、互換的に用いられる可能性がある。特に有用なセンスおよびアンチセンス分子は、成熟タンパク質 (SEQ ID NO:4) をコードするG-CSF遺伝子もしくはmRNA (SEQ ID NO:2および3)、または成熟タンパク質 (SEQ ID NO:8) をコードするG-CSFR遺伝子もしくはmRNA (SEQ ID NO:6および7) に向けられる。

【0102】

G-CSF遺伝子もしくはmRNAに対するセンスもしくはアンチセンス分子、またはG-CSFR遺

10

20

30

40

50

伝子もしくはmRNAのセンスもしくはアンチセンス分子は、G-CSFまたはG-CSFRの遺伝子またはmRNAのリーダー配列および選択されたイントロンまたはエクストンが含まれるコードまたは非コード領域の任意の部分に対して企図される。よって、SEQ ID NO:2、3、6、または7の一つまたは複数に対して、長さが20～30ヌクレオチドに基づくセンスおよびアンチセンス分子が企図される。

【0103】

代わりの態様において、DNA「ワクチン」が含まれる遺伝子構築物は、アンチセンスまたはセンス分子哺乳動物を生成するために用いられる。さらに、先に記述された好ましい特色の多くが、センス核酸分子にとって適切である。

【0104】

本発明のこの局面は、従来の分子生物学および組み換えDNA技法によって実施された場合に得ることができる。技術は、当技術分野において周知であり、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. ; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II, D. N. Glover ed. 1985およびAusubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994のような様々な刊行物において記述されている。

【0105】

本発明の核酸は、天然の調節（発現制御）配列に隣接してもよく、またはプロモーター、配列内リボソーム進入部位（IRES）および他のリボソーム結合部位配列、エンハンサー、反応エレメント、サプレッサー、シグナル配列、ポリアデニル化配列、イントロン、5'および3'-非コード領域等が含まれる異種配列に会合してもよい。

【0106】

「プロモーター」または「プロモーター配列」は、細胞においてRNAポリメラーゼに結合して、コード配列の転写を開始することができるDNA調節領域である。プロモーター配列は一般的に、転写開始部位によってその3'末端で結合され、任意のレベルで転写を開始するために必要な塩基またはエレメントの最小数が含まれるように、5'方向において上流に伸長する。転写開始部位と共に、RNAポリメラーゼの結合の原因となるタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が、プロモーター配列内に認められてもよい。プロモーターは、エンハンサーおよびリプレッサー配列が含まれる他の発現制御配列、または本発明の核酸に機能的に会合してもよい。遺伝子発現を制御するために用いられてもよいプロモーターには、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターおよびSV40初期プロモーター領域が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0107】

コード配列は、配列が、コード配列のRNA、好ましくはmRNAへのRNAポリメラーゼ媒介転写を指示する場合に、細胞において転写および翻訳制御配列の「制御下である」、それらと「機能的に会合している」、または「操作可能に会合して」おり、次にこれは、トランス-RNAスプライシングしてもよく（イントロンを含有する場合）、任意でコード配列によってコードされるタンパク質に翻訳されてもよい。

【0108】

「発現する」および「発現」という用語は、遺伝子における情報、すなわちRNAまたはDNA配列の産物への変換を許容するまたは引き起こすこと；たとえばヌクレオチド配列の転写および翻訳に関する細胞機能を活性化することによってタンパク質を産生することを意味する。DNA配列は、細胞においてまたは細胞によって発現されて、RNA（mRNAまたは二本鎖低分子RNA、ヘアピンRNA、またはアンチセンスRNAのような）またはタンパク質（サイトカイン活性のアンタゴニストまたは抗サイトカイン抗体の一部のような）のような「発現産物」を形成する。発現産物そのものもまた、細胞によって「発現された」と言われてもよい。

【0109】

「ベクター」、「クローニングベクター」、および「発現ベクター」という用語は、宿

10

20

30

40

50

主を形質転換するために、および任意で導入された配列の発現および／または複製を促進するために、それによってDNAまたはRNA配列を宿主細胞に導入することができる媒体（プラスミドのような）を意味する。

【0110】

「トランスフェクション」または「形質転換」という用語は、細胞への核酸の導入を意味する。これらの用語は、サイトカイン交叉反応抗体またはその断片をコードする核酸の細胞への導入を指してもよい。導入されたDNAまたはRNAを受容する宿主細胞は「形質転換」されており、「形質転換体」または「クローン」である。宿主細胞に導入されるDNAまたはRNAは、宿主細胞と同じ属もしくは種の細胞、または異なる属もしくは種の細胞が含まれる、任意の起源に由来しうる。

10

【0111】

「宿主細胞」という用語は、細胞による物質の產生、たとえばタンパク質の発現または遺伝子の複製のために任意の方法で選択、改変、トランスフェクト、形質転換、生育、または使用もしくは操作される任意の生物の任意の細胞を意味する。

【0112】

「発現系」という用語は、ベクターによって運ばれ、宿主細胞に導入されるタンパク質または核酸を、適した条件で発現することができる宿主細胞および適合性のベクターを意味する。一般的な発現系には、大腸菌宿主細胞とプラスミドベクター、昆虫宿主細胞とバキュロウイルスベクター、および哺乳動物宿主細胞とベクターが含まれる。

20

【0113】

本発明に従って同定された物質（たとえば、抗体、G-CSFの非シグナル伝達変異体型のようなタンパク質、小さい化学分子、可溶性受容体等）は、薬学的組成物において簡便に供給される。

【0114】

注射での使用にとって適した組成物の剤形には、滅菌水溶液（水溶性の場合）、および滅菌注射用溶液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。これは、製造および保存条件で安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保存されなければならない。担体は、たとえば水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、その適した混合物、および植物油を含む溶媒または希釈媒体となりうる。たとえば界面活性剤を用いることによって、適当な流動性を維持することができる。微生物の作用に対する予防は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされうる。多くの場合において、等張性を調節する物質、たとえば糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収遅延剤、たとえばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物において用いることによってもたらされうる。

30

【0115】

滅菌注射用溶液は、活性化合物の必要量を適切な溶媒において、活性成分および任意で必要に応じて他の活性成分と共に組み入れた後に、濾過滅菌することまたは他の適切な滅菌手段によって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、適した調製法には、活性成分 + 任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥技術が含まれる。

40

【0116】

調節剤が適切に保護される場合、これはたとえば不活性希釈剤もしくは同化可能な食用担体と共に経口投与されてもよく、硬もしくは軟ゼラチンカプセルに封入されてもよく、錠剤に圧縮されてもよく、食事の食物と共に直接取り込まれてもよく、または乳汁によって投与されてもよい。経口治療的投与に関して、活性成分を賦形剤と共に組み入れてもよく、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウェーハ等の剤形で用いてもよい。そのような組成物および調製物は、調節剤の重量の少なくとも1%であるべきである。組成物および調製物の百分率は、当然変化しても

50

よく、簡便に単位重量の約5～約80%であってもよい。そのような治療的に有用な組成物における調節剤の量は、適した用量が得られる量である。本発明に従う好ましい組成物または調製物は、経口投与単位剤形が調節剤の約0.1μg～約200mgを含有するように調製される。代わりの用量には、約1μg～約1000mgおよび約10μg～約500mgが含まれる。これらの用量は、個体あたりまたはkg体重あたりであってもよい。投与は時間、日、週、月、または年毎であってもよい。

#### 【0117】

錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤、クリーム等はまた、本明細書において以降記載される成分を含有してもよい。ゴム、アカシア、コーンスターク、またはゼラチンのような結合剤；リン酸カルシウムのような賦形剤；コーンスターク、ジャガイモデンプン、アルギン酸等のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；および蔗糖、乳糖、もしくはサッカリンのような甘味料を加えてもよく、またはペパーミント油、冬緑油、もしくはサクランボ香料のような着香料を加えてもよい。単位投与剤形がカプセル剤の場合、上記のタイプの材料のほかに液体担体を含有してもよい。他の様々な材料がコーティングとして存在してもよく、または用量単位の物理的形状を改変するために存在してもよい。たとえば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤をシェラック、糖、またはその双方によってコーティングしてもよい。シロップ剤またはエリキシル剤は、活性化合物、甘味料としての蔗糖、保存剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、色素、およびサクランボまたはオレンジ香料のような着香料を含有してもよい。当然のこととして、いかなる単位投与剤形も調製するために用いられるいかなる材料も、薬学的に純粋であるべきであり、使用される量で実質的に非毒性であるべきである。さらに、活性化合物（群）を徐放性調製物および製剤に組み入れてもよい。

10

20

#### 【0118】

薬学的に許容される担体および／または希釈剤には、任意のおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等が含まれる。薬学的活性物質のためにそのような媒体および物質を用いることは、当技術分野において周知であり、任意の従来の培地または物質が調節剤と非適合性である場合を除き、治療的組成物におけるそのような使用が企図される。補助活性物質もまた、組成物に組み入れることができる。

#### 【0119】

30

先に示したように、投与はいかなる手段によって行ってもよい。肺の炎症病態の処理に関して、鼻腔内、静脈内、および肺内投与は特に有効である。

#### 【0120】

最適な所望の反応（たとえば、治療反応）を提供するために、投与養生法を調節してもよい。たとえば、1回ボーラス用量を投与してもよく、数回の分割用量を一定時間で投与してもよく、または投与は治療状況の緊急性に応じてそれに比例して低減もしくは増加させてもよい。投与の容易さおよび投与の均一性のために非経口組成物を投与単位剤形で製剤化することは特に有利である。

#### 【0121】

当業者である医師または獣医師は、必要な薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。たとえば、医師または獣医師は、所望の治療効果を達成するために必要な用量より低いレベルで薬学的組成物において用いられる用量で本発明のG-CSF抗体を開始して、所望の効果が達成されるまで用量を徐々に増加させることができるであろう。一般的に、本発明の組成物の適した1日量は、所望の効果を產生するために有効な最低用量である化合物の量であってもよい。そのような有効量は一般的に、先に記述された要因に依存するであろう。投与は、好ましくは標的（たとえば、肺）部位の近傍の注射によることが好ましい。望ましければ、薬学的組成物の有効な1日量を、1日を通して適当な間隔で個別に2、3、4、5、6回、またはそれより多い回数で投与してもよい。

40

#### 【0122】

治療応用の場合、本発明のG-CSF抗体は、肺内、鼻腔内、口腔内、または動脈内経路

50

によって、ボーラスとしてまたは一定時間にわたる持続的注入としてヒトに静脈内投与されてもよい用量が含まれる、先に考察した剤形のような薬学的に許容される投与剤形で哺乳動物、好ましくはヒトに投与される。

【 0 1 2 3 】

組成物はまた、調節剤がタンパク質様分子である場合に、ベクターが調節剤をコードすることができる核酸分子を有する、標的細胞にトランスフェクトすることができるベクターのような遺伝的分子を含んでもよい。ベクターはたとえば、ウイルスベクターであってもよい。この点において、一定の細胞を単離する段階、細胞を遺伝子操作する段階、および細胞を同じ被験体または遺伝的に関連するもしくは類似の被験体に戻す段階が含まれる、広範囲の遺伝子治療が本発明によって企図される。

10

【 0 1 2 4 】

よって、本発明のさらなる局面は、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害するために有効な量の物質を被験体に投与する段階を含む、被験体における好中球の浸潤を特徴とする、またはそれに関連する肺の病態を処理するための方法を企図する。

【 0 1 2 5 】

もう一つの局面は、以下からなる群より選択される、G-CSFまたはG-CSFR阻害物質を被験体に投与する段階を含む、被験体における好中球浸潤に関連する肺疾患を処理する方法を提供する：

- a . G-CSFに対して特異的な抗体；
- b . G-CSFRに対して特異的な抗体；
- c . 可溶性のG-CSFRまたはそのG-CSF結合部分；
- d . ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:3において記載される配列を含む、G-CSFをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子；および
- e . ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:7において記載される配列を含む、G-CSFRをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子。

20

【 0 1 2 6 】

もう一つの局面において、本発明は、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害するために有効な量の物質を被験体に投与する段階を含む、COPD、その悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現を処理するための方法に向けられる。

30

【 0 1 2 7 】

本発明のもう一つの局面は、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害する物質と、抗炎症剤、気管支拡張剤、または抗生物質のような少なくとも一つの他の治療物質とを投与する段階を含む、被験体におけるCOPD、AECOPDのようなその悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現のような、しかしこれらに限定されない、好中球の浸潤を特徴とするまたはそれに関連する肺の病態を処理するための方法に関する。

40

【 0 1 2 8 】

特に好ましい態様において、本発明は、G-CSFまたはG-CSFRの活性を阻害するために有効な量の抗体またはその抗原結合部分を被験体に投与する段階を含む、被験体におけるCOPD、その悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現を処理するための方法を企図する。

【 0 1 2 9 】

本発明はさらに、被験体における好中球の浸潤を特徴とするまたはそれに関連する肺の病態の処理における薬剤を製造するために、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害する物質を用いることを企図する。

50

## 【0130】

なおさらなる局面は、被験体における好中球の浸潤を特徴とするまたはそれに関連する肺の病態の処理するための薬剤を製造するために、以下からなる群より選択される、G-CSFもしくはG-CSFRの活性を阻害する、またはG-CSFもしくはG-CSFRをコードする遺伝子の発現を阻害する物質を用いることを企図する：

- a . G-CSFに対して特異的な抗体；
- b . G-CSFRに対して特異的な抗体；
- c . 可溶性のG-CSFRまたはそのG-CSF結合部分；
- d . ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:3において記載される配列を含む、G-CSFをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子；および
- e . ヌクレオチド配列がSEQ ID NO:7において記載される配列を含む、G-CSFRをコードする核酸分子を標的とする、長さが20～30ヌクレオベースのセンスまたはアンチセンス分子。

## 【0131】

好ましい態様において、本発明は、被験体におけるCOPD、その悪化型、関連病態、またはそれから生じる合併症もしくはその症状発現を処理するための薬剤を製造するために、G-CSFまたはG-CSFRに対する抗体を用いることに向けられる。

## 【0132】

G-CSFまたはその受容体の阻害を試験するために有用な動物モデル、またはG-CSF活性の拮抗に対する他のアプローチには、急性のLPS曝露、亜慢性の紙巻きタバコの煙に対する曝露、および煙に曝露されたマウスのインフルエンザ感染（悪化モデル）が含まれる。

## 【0133】

これらのモデルにおいて、好中球性の炎症、TNF 産生、および過剰なプロテアーゼ活性によって、COPD様炎症の重要な特色のいくつかの抑制における、G-CSF/ G-CSFR抗体の有効性、またはG-CSFレベルもしくはG-CSFシグナル伝達の低減を決定することができる。

## 【0134】

好中球は、COPD患者の気道に浸潤する主要な優勢な細胞タイプである (Beeh and Beier, Clin Exp Allergy 26(2):142-157, 2006 ; Stockley, Chest 121(5 Suppl):151S-155S, 2002)。好中球が反応性酸素種およびプロテアーゼを生成できることは、その宿主防御役割にとって重大である。しかし、免疫応答の全ての局面の場合のように、過剰活性は有害となりうる。

## 【0135】

COPD患者の気道に存在するサイトカイン環境は、好中球性の炎症の増強にとって理想的な環境を提供する (Barnes, N Engl J Med 343(4):269-280, 2000 ; Barnes, Cytokine Growth Factor Rev 14 (6):511-522, 2003)。健康な肺における好中球の生存は通常、非常に限られていることから、COPDにおける好中球の持続的な生存は重要な特色である。

## 【0136】

本発明に従って、試験アンタゴニストによるG-CSFの抑制は、LPS、紙巻きタバコの煙の曝露、およびインフルエンザ感染によって誘発されるBALFおよび血液中の好中球数に対して有意な影響を及ぼした。好中球は、COPD様炎症の重要なメディエータであることから、三つ全てのCOPDモデルにおいてG-CSFアンタゴニストによって好中球数の有意な低減が誘発されたことは、G-CSF活性の拮抗が有用な治療アプローチであることを示している。

## 【0137】

本発明をさらに、以下の非制限的な実施例によって説明する。実施例において、以下の方法を使用する。

## 【0138】

動物

特異的病原体を含まない、7週齢の体重～20 gの雄性Balb/cマウスをAnimal Resource C

10

20

30

40

50

entre Pty. Ltd. (Perth, Australia) から得た。動物を20 の12時間照明の無菌的な小動物用隔離室に収容して、Purinaマウス用固体飼料の標準的な滅菌飼料を与え、水を自由に与えた。

#### 【0139】

##### 紙巻きタバコの煙の曝露

マウスをクラスII生物安全キャビネットにおいて18リッターのPerspexチャンバー内に入れて、紙巻きタバコの煙に曝露した。午前8時、正午、および午後4時に紙巻きタバコ3本ずつを1時間間隔で1日3回送達することによって、1日あたり紙巻きタバコ9本から生成された紙巻きタバコの煙にマウスを4日間曝露した。予備実験において、1日あたり紙巻きタバコ3本、6本、および9本は非常によく認容されることが見いだされた。偽曝露マウスを18リッターのPerspexチャンバーに入れたが紙巻きタバコの煙を与えなかった。5日目、マウスを麻酔薬 (5.6 mgケタミン / 1.12 mgキシラジン、Parnell Laboratories, NSW, Australia) の過量の腹腔内投与 (i.p.) によって屠殺して、肺をPBSによって洗浄した。以下の組成の市販のフィルターフィルタード紙巻きタバコ (Philip Morris, Australia製) を用いた：タール16 mgまたはそれ未満、ニコチン1.2 mgまたはそれ未満、およびCO 15 mgまたはそれ未満。煙は、通常の喫煙時の吸入体積および紙巻きタバコの燃焼速度を模倣する一定時間ドローバック (draw-back) を用いて10秒間で50 mlの一回換気量において生成された。試験が確実に0.05の信頼水準で反応変数における差を検出するための統計力を有するように、処理あたり1群8匹のマウスを用いた。

#### 【0140】

##### 薬物投与

マウスに、明記された用量のPBS、アイソタイプ対照、または抗GSCF抗体 (1章において概要したとおり) を1日1回 (最初の煙の60分前)、腹腔内注射によって投与した。

#### 【0141】

##### ウイルス感染

紙巻きタバコの煙に曝露したマウス (先に記述したように) を、非致死的なマウス適合インフルエンザ株 [Mem71, H3N1] に、産生的複製および炎症を引き起こすが明白な疾患を引き起こさないことがわかっている用量 (正常なマウスにおいて) で感染させる。インフルエンザ感染後3日および10日目にマウスを解剖する。対照マウスには、ウイルスを生育させるために用いた非感染細胞調製物を投与する。

#### 【0142】

##### 気管支肺洗浄 (BAL)

BALは、完全に麻酔したマウスにおいて行った。簡単に説明すると、各マウスからの肺をインサイチューで400  $\mu$  lアリコートの後にPBS 300  $\mu$  lアリコート3回によって洗浄して、各動物から気管支肺洗浄液 (BALF) 約1 mlを回収した。煙の曝露は、回収容積に影響を及ぼさなかった。BALFにおける生存細胞の総数を、標準的なNeubauer血球計算盤において、蛍光体であるエチジウムプロマイドおよびアクリジンオレンジ (Molecular Probes, San Diego, USA) を用いて、Zeiss Axioscope蛍光顕微鏡を用いて決定した。Cytospin 3 (Shandon, UK) において、BALF 200  $\mu$  lを用いて350 rpmで10分間遠心してサイトスピノンを調製した。サイトスピノン調製物をDiffQuik (Dade Baxter, Australia) によって染色して、標準的な形態学的基準によって、細胞を単核球、上皮細胞、好酸球、好中球、およびマクロファージへと同定および識別した。スライドガラスあたり最少で細胞500個を計数した。

#### 【0143】

##### 酵素免疫測定法 (ELISA)

BALF試料におけるTNF 濃度をPharmingen OptEIA (商標) ELISAキット (Pharmingen) を用いて製造元の指示通りに測定した。吸光度を450 nmで読み取って (Victor 1420 Multilabel Counter, Wallac) 、標準曲線および試料の吸光度を誘導したMicroplate Manager (登録商標) (BioRad, USA) プログラムを用いて分析した。

#### 【0144】

10

20

30

40

50

### BALFにおけるプロテアーゼ発現および活性

ザイモグラフィーを用いて、プロテアーゼ発現を査定した。簡単に説明すると、各処理群における動物からのBALFをプールして、プールしたBALF試料500  $\mu$ lに対して50% v/vトリクロロ酢酸250  $\mu$ lを加え、4℃で終夜放置することによって濃縮した。翌日、試料を遠心して(4℃、13,000 rpmで10分間)、沈降物を80%ジエチルエーテル(20% v/vエタノールにおいて)300  $\mu$ lによって2回洗浄後、10分間空気乾燥させた。次に沈降物を1×非還元緩衝液50  $\mu$ lに浮遊させて、65℃で10分間加熱してSDS-PAGEミニゲルに20  $\mu$ lをローディングした。SDS-PAGEミニゲル(10% v/v)は、成型の前にゼラチン(2 mg/ml)を組み入れることによって調製した。BALF(20  $\mu$ l)を、非還元条件で200 Vの一定電圧でゲル内に泳動させた。色素の先端が底に達した際に、ゲルを取り外して2.5% v/v Triton X-100によって15分間2回洗浄してザイモグラフィー緩衝液(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、5 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM ZnCl<sub>2</sub>、および0.01% v/v NaN<sub>3</sub>)において37℃で終夜インキュベートした。ゲルをクーマシーブリリアントブルーR-250によって45分間染色した後、十分に脱色した。脱色した後、酵素活性域はクーマシーブルーバックグラウンドに対して透明に見えた。  
10

#### 【0145】

未希釈のBALFをまた、蛍光共役ゼラチン(Molecular Probes, USA)およびN-メトキシスクシニル-ala-ala-pro-val-p-ニトロアニリド(Sigma, USA)をそれぞれ用いて、真のゼラチナーゼおよび真のセリンプロテアーゼ活性に関して試験した。ゼラチン基質(10  $\mu$ g)を50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub>、0.01% v/v NaN<sub>3</sub>において希釈して、未希釈BALF 100  $\mu$ lと共に室温で16時間インキュベートした。消化された基質は、495 nm/515 nmで吸収/放射最大値を有した。N-メトキシスクシニル-ala-ala-pro-val-p-ニトロアニリド(50  $\mu$ g)を50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub>、0.01% NaN<sub>3</sub>において希釈して、未希釈BALF 100  $\mu$ lと共に室温で16時間インキュベートした。消化された基質は405 nmで最大吸収を有した。基質の蛍光強度をマイクロプレートリーダー(Victor II, Wallac)において測定して、活性の定量的差を検出した。  
20

#### 【0146】

### ウイルス定量

肺全体を各処理群あたりマウス4匹から摘出した。肺を維持培地において2×15秒パルスによってホモジナイズして、その後低速洗浄スピンを行った。肺ホモジネートの連続希釈液を、既に記述されるようにブラークアッセイにおいて用いて(Youill, J Virol Methods 120(1):23-31, 2004)、ウイルス力価をpfu/g肺として表記した。  
30

#### 【0147】

### 組織学

肺が一貫して形態学的に保存されていることを確保するために、マウスを腹腔内麻酔薬(5.6 mgケタミン/1.12 mgキシラジン)の過量によって屠殺した後、正確に200 mm H<sub>2</sub>O圧で4% v/vホルムアミドによって気管カニューレを通して還流固定した。1時間後、気管を結紮して肺を胸郭から摘出して4% v/vホルムアルデヒドにおいて少なくとも24時間液浸した。肺組織を固定してパラフィンロウにおいて処理した後、左葉を横断するように切片(厚さ3~4  $\mu$ m)を作製した。切片を、全般的組織病理学のためにヘマトキシリソ-エオジン(H&E)によって染色した。  
40

#### 【0148】

### 統計分析

データは正規分布していることから、それらを平均値±標準誤差(s.e.m.)として表記する群毎のデータとして表し；nはマウスの数を表す。総BALF細胞タイプおよび白血球分画の差は、適切であれば多数の比較のために一元配置分散分析(ANOVA)の後にDunnnett後検定によって決定した。いくつかの場合において、Student's unpaired t-testを用いて対の平均値のあいだに有意差があるか否かを決定した。統計分析は全て、Windows(バージョン3.03)用GraphPad Prism(商標)を用いて行った。全ての場合において、0.05未満の確率水準(\*P<0.05)は、統計学的有意性を示すと見なされた。  
50

#### 【0149】

## 実施例1

## 原理および試験設計

これは、点滴注入したリポ多糖類（LPS）が強い好中球性の炎症を誘発する急性肺炎症モデルである。本モデル系における抗GM-CSF抗体の詳細な速度論および使用がこれまでに公表されている（Bozinovski et al, J Biol Chem 277(45):42808-42814, 2002 ; Bozinovski et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286(4):L877-885, 2004）。以下に記述する条件において、このモデルにおける炎症は、グルココルチコステロイドであるデキサメタゾンに対して不応性である（Bozinovski et al, J Proteome Res 4(1):136-145, 2005）。

## 【0150】

10

## 実験計画

マウスをアイソタイプ対照または G-CSFの250 µg/用量のt = -3時間での腹腔内注射によって処理して、t = 0にLPSの一つの用量に曝露した後、24時間後に解剖した（図1）。

## (i) 群：対照 - 無処理

生理食塩液

LPS

LPS + アイソタイプ（ラット IgG1、GL113）

LPS + G-CSF（ラット G-CSF、MAB414）

生理食塩液 + アイソタイプ（ラット IgG1、GL113）

生理食塩液 + G-CSF（ラット G-CSF、MAB414）

20

## 【0151】

## (ii) エンドポイント： BAL液 - 総細胞数 / 白血球分画数

( total / differential cell counts )

- ELISA (TNF)

- ザイモグラフィー（プロテアーゼ誘導）

- プロテアーゼ活性

血液 - 血液塗末標本

- 総細胞数 / 白血球分画数

全肺 - 瞬間凍結して各群に関してプール

## 【0152】

30

データは、BAL液および血液細胞数のデータ、ELISA結果のグラフ、プロテアーゼ活性およびザイモグラフィーゲルのグラフである。凍結BAL液試料およびプールした肺試料も同様に保持されている。

## 【0153】

## (iii) マウス：雄性Balb/cマウス；6週齢；およそ20 g

8匹 / 群

ARC, Perthからマウス56匹を供給された

## 【0154】

## (iv) 薬物製剤：

試験化合物： G-CSF抗体（G-CSF）

40

特異性：マウスG-CSF (G-CSF生物活性を中和する)

Igクラス：ラットIgG1

起源：R&amp;D Systems

カタログ番号：MAB414

クローン：67604

エンドトキシンレベル：R&amp;Dによって供給されるように &lt; 0.1 EU/1 µg mAb

製剤：9.95 mg/mlでPBSにおける0.2 µM濾過滅菌溶液として供給される。エンドトキシンを含まない滅菌PBSによって1.0 mg/mlに希釀。5 mg (5 ml) アリコートで-20 °Cで保存。

用量；250 µg / 注射 / マウス、腹腔内注射

50

試験化合物：アイソタイプ対照抗体（アイソタイプ）

特異性：大腸菌 - ガラクトシダーゼ

Igクラス：ラットIgG1

起源：Walter and Eliza Hall Institute Monoclonal Antibody Lab

クローニング：GL113

エンドトキシンレベル：WEHIによって供給されるように < 0.1 EU/1 μg mAb

製剤：1.3 mg/mlでPBSにおける滅菌溶液として供給される。エンドトキシンを含まない滅菌PBSによって1.0 mg/mlに希釈。5 mg (5 ml) アリコートで-20°で保存。

用量：250 μg / 注射 / マウス、腹腔内注射

【0155】

10

LPS-処理マウスのBALFにおける炎症細胞数に及ぼす G-CSF抗体の効果

G-CSF抗体、アイソタイプ対照、またはPBS（生理食塩液）は、生理食塩液処理動物のBALFにおいて炎症細胞数を増加させなかった（図2a～d）。

【0156】

LPSは、BALFにおける総細胞数（図2a）、好中球（図2c）、およびリンパ球（図2d）を有意に増加させた。アイソタイプ対照は炎症細胞数に対して効果を有しなかった。

【0157】

対照的に、G-CSFは、LPS処理動物における総細胞数、好中球数およびリンパ球数の有意な減少を引き起こしたが、マクロファージ数の減少は引き起こさなかった（図2）。

【0158】

20

ELISAによって決定した場合のLPS処理マウスのBALFにおけるTNF のタンパク質レベルに及ぼす G-CSF抗体の効果

24時間の時点で生理食塩液またはLPS処理動物のBALFにおいて検出されたTNF は非常に少なかった（図3）。しかし、G-CSFはLPS処理マウスのBALFにおいてTNF レベルの顕著な増加を引き起こした。

【0159】

ザイモグラフィーおよびプロテアーゼアッセイによって決定した場合のLPS処理マウスのBALFにおけるプロテアーゼ発現および活性に及ぼす G-CSF抗体の効果

LPS処理は、マウスのBALFにおいてMMP9発現（図4a）およびプロテアーゼ活性（図4bおよびc）の顕著な増加を引き起こした。しかし、LPS誘発プロテアーゼ発現または活性に対して、アイソタイプ対照または G-CSFはいずれも効果を示さなかった。

30

【0160】

LPS処理マウスの血液中の炎症細胞数に及ぼす G-CSF抗体の効果

LPSは、処理マウスの血液中の総生存細胞、マクロファージ、および好中球数の有意な増加を引き起こした。G-CSFは、LPS処理動物の好中球数の有意な低減を引き起こしたが、総生存細胞またはマクロファージ数には影響を及ぼさなかった。いかなる動物の血液中にもリンパ球が検出されなかったことに注目されたい。

【0161】

実施例2

亜慢性的な煙

40

このモデルにおいて、マウスを煙（または偽処理）に1日3回（2本 / 曝露）、4日間曝露して、既に記述されるように（Chen et al, *Neuropharmacology* 30(4), 713-719 2005）5日目に分析した。

【0162】

実験設計

マウスを紙巻きタバコの煙に1日3回、4日間曝露した。マウスをt = d-1およびd2にアイソタイプ対照または250 μg/用量の G-CSFの腹腔内注射のいずれかによって処理した後、5日目に解剖した。煙の曝露の条件は既に記述されたとおりであった（Vlahos et al, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(5):L931-945, 2006）。簡単に説明すると、マウスに紙巻きタバコ3本からの煙を1時間与え、これを1日3回、4日間行った。以下の組成の

50



煙曝露マウスのBALFにおけるMMP9発現は有意に増加したが、これは G-CSFによって低減されたがアイソタイプ対照によっては低減されなかった（図9a）。

【0173】

対照的に、煙の曝露後ゼラチナーゼ（図9b）またはセリンプロテアーゼ活性（図9c）のいずれにも有意な増加を認めなかった。セリンプロテアーゼ活性に及ぼすアイソタイプ対照または G-CSFの効果は区別できなかったが、 G-CSFはゼラチナーゼ活性において有意な増加を引き起こすように思われた。

【0174】

煙曝露マウスの血液中の炎症細胞数に及ぼす G-CSF抗体の効果

煙の曝露は、偽処理動物と比較して血液中の好中球数の有意な増加を引き起こした。い 10 ずれの動物の血液中にもリンパ球が検出されなかったことに注意されたい。

【0175】

アイソタイプ対照は、煙を曝露された動物の血液中の総細胞数およびマクロファージ数の有意な低減を引き起こしたが、 G-CSF抗体は、煙を曝露した動物における総細胞、好中球、およびマクロファージ数の有意な低減を引き起こした。

【0176】

実施例3

煙およびインフルエンザ（悪化）試験

試験設計：

マウスを紙巻きタバコの煙に1日3回、4日間（-5日目～-2日目）曝露した。次に0日目にマウスをインフルエンザ（MDCK細胞由来Mem-71、インフルエンザA株）または希釀剤（非感染MDCK細胞調製物）に感染させた。マウスを、t=d-1およびd2にアイソタイプ対照または250 µg/用量の G-CSFの腹腔内注射のいずれかによって処理した後、3日目または10日目に解剖した。

20

【0177】

(i) 群：1. 対照 - 無処理（×2）

2. 希釀剤（×2）
3. 希釀剤+アイソタイプ（×2）
4. 希釀剤 + G-CSF（×2）
5. インフルエンザ（×2）
6. インフルエンザ + アイソタイプ（×2）
7. インフルエンザ + G-CSF（×2）

30

【0178】

(ii) エンドポイント：BAL液 - 総細胞数 / 白血球分画数

- ELISA (TNF)
- ザイモグラフィー（プロテアーゼ誘導）
- プロテアーゼ活性

血液 - 血液塗末標本

- 総細胞数 / 白血球分画数

全肺 - 肺のウイルス定量

- 組織学のためのPFA固定肺（1、5、6、7群のみ）
- 瞬間凍結して各群に関してプール

40

【0179】

データは、BAL液および血液細胞数のデータ、ELISA結果のグラフ、肺のウイルス力価、プロテアーゼ活性およびザイモグラフィーゲルのグラフである。定量的肺組織学結果および組織学スライドガラスは、双方の時点で対照およびインフルエンザ処理群について提供されている。凍結BAL液試料およびプールした肺試料も同様に保持されている。

【0180】

(iii) 必要なマウス：12匹 / 群（すなわち、BALに関して8匹および全肺におけるウイルス滴定のために4匹）

50

組織学のために1、5、6、7群に関してはさらに4匹／群  
マウス184匹（1.1章において記述されるとおり）

## 【0181】

(iv) 薬物製剤：

試験化合物：G-CSF抗体（先に記述したとおり）

試験化合物：アイソタイプ対照抗体（先に記述したとおり）

## 【0182】

インフルエンザ処理および煙曝露マウスのBALFにおける炎症細胞数に及ぼす G-CSF抗体の効果

感染後3日目に（図12）、紙巻きタバコの煙の曝露は、BALFにおける総細胞数（図12a）10、マクロファージ数（図12b）、およびリンパ球数（図12d）の顕著な増加を引き起こし、これは、煙曝露マウスのインフルエンザ感染によって好中球数（図12c）と共にさらに上昇した。

## 【0183】

アイソタイプ対照は、煙に曝露されたインフルエンザ処理マウスのBALFにおいて総細胞数、またはマクロファージ、好中球、およびリンパ球数に効果を有しなかった。

## 【0184】

しかし、G-CSFは、煙曝露およびインフルエンザ処理動物のBALFにおいて総細胞数、マクロファージおよび好中球数の有意な低減を引き起こし、リンパ球数の顕著な低減を引き起こした。20

## 【0185】

感染後10日目（図13）、紙巻きタバコの煙の曝露は、BALFにおける炎症細胞数の顕著な増加を引き起こさなかった。しかし、煙曝露マウスのインフルエンザ感染は、BALFにおける全ての炎症細胞の顕著な増加を引き起こし（図13a～d）、これはアイソタイプ対照によってわずかに増加したが、G-CSF抗体処理によって顕著に減少した。

## 【0186】

ELISAによって決定した、インフルエンザ処理および煙曝露マウスのBALFにおけるTNF のタンパク質レベルに及ぼす G-CSF抗体の効果

紙巻きタバコの煙の曝露は、3日目および10日目で（図14）BALFにおけるTNF レベルの顕著な増加を引き起こした。インフルエンザは、感染後3日目でBALFにおけるTNF の低減を引き起こしたが、これは G-CSFによってさらに低減された（図14a）。30

## 【0187】

感染後10日目、インフルエンザは、煙曝露マウスにおけるBALF TNF の小さい増加を引き起こし、これは G-CSF処理によってごくわずかに低減された（図14b）。

## 【0188】

アイソタイプ対照は、3日目および10日目の双方でTNF レベルのわずかな低減を引き起こしたが、これは G-CSF抗体処理ほど顕著ではなかった。

## 【0189】

ザイモグラフィーおよびプロテアーゼアッセイによって決定した、インフルエンザ処理および煙曝露マウスのBALFにおけるプロテアーゼ発現および活性に及ぼす G-CSF抗体の効果40

感染後3日目、紙巻きタバコの煙はMMP9発現（図15a）およびゼラチナーゼ活性（図15c）のわずかな増加を引き起こした。ゼラチナーゼ活性はインフルエンザ感染によってさらに上昇した。プロテアーゼレベルおよび活性におけるこの上昇は、G-CSF処理によって低減された。

## 【0190】

感染後10日目、紙巻きタバコの煙は、BALFにおけるMMP9レベルの低減を引き起こした（図15b）。インフルエンザ感染は、10日目に煙曝露マウスのBALFにおいてMMP9レベルおよびゼラチナーゼ活性を増加させ（図15c）、プロテアーゼレベルおよび活性におけるこの上昇は G-CSFによって低減された。50

【 0 1 9 1 】

3日目または10日目でのBALFにおけるセリンプロテアーゼ活性に対して、紙巻きタバコの煙の曝露またはインフルエンザ感染はいずれも効果を示さず（図15eおよびf）、したがって、G-CSFの区別できる効果は認められなかった。

【 0 1 9 2 】

## インフルエンザ処理および煙曝露マウスの血液中の炎症細胞数に及ぼす G-CSF抗体の効果

感染後3日目(図16)、紙巻きタバコの煙は、血液中の炎症細胞の顕著な増加を引き起こし、これはインフルエンザ曝露後有意に増加した(マクロファージ数はインフルエンザ感染後顕著に上昇した)。G-CSFは煙曝露およびインフルエンザ感染動物の血液中で好中球数の有意な低減を引き起こし(図16c)、血液中の総細胞数の顕著な低減を引き起こした。G-CSFは煙に曝露されたインフルエンザ感染マウスの血液中のマクロファージ数にほとんど効果を示さなかった。

【 0 1 9 3 】

感染後10日目(図17)、インフルエンザ感染は、煙曝露マウスの血液中の総細胞、マクロファージ、および好中球数の有意な増加を引き起こした。G-CSFは、煙曝露およびインフルエンザ感染マウスの血液中の好中球数の有意な低減、ならびにマクロファージおよび総細胞数の顕著な低減を引き起こした。

【 0 1 9 4 】

## インフルエンザ処理および煙曝露マウスの肺におけるウイルス力価に及ぼす G-CSF抗体の効果

G-CSFは、感染後3日目でアイソタイプ処理マウス（図18）と比較して煙曝露およびインフルエンザ感染マウスにおけるウイルス力価の顕著な低減を引き起こした。感染後10日目では処理群のいずれにおいてもウイルスは検出されなかった。

【 0 1 9 5 】

## 組織学分析によって決定した場合のインフルエンザ処理および煙曝露マウスの肺組織における炎症細胞動員に及ぼす G-CSF抗体の効果

試料を対照、インフルエンザ処理 + 煙曝露、インフルエンザ + 煙 + G-CSF抗体処理マウスのPFA固定した肺から採取して、パラフィン包埋して染色し、肺実質、血管系および気管支における構造変化および細胞変化を明らかにした。Zeiss顕微鏡において10倍および20倍で画像を得た。左の肺の気管支周囲領域の3日目および10日目の双方で得た画像は、煙およびインフルエンザが、血管と気管支とのあいだの領域の単核球、好中球、およびリンパ球による浸潤として認識される炎症の顕著な増強を引き起こすことを示した。肺実質の浸潤も同様に明白であった。アイソタイプ対照と比較すると、G-CSF抗体は全ての領域において炎症の程度を顕著に低減させた。

〔 0 1 9 6 〕

## 実施例4

### 亜慢性的な煙

このモデルにおいて、マウスを煙（紙巻きタバコ2本／曝露）に1日3回、4日間曝露（または偽処理）して、既に記述されるように（Chen et al, *Neuropsycho-pharmacology* 30(4):713-719, 2005）5日目に分析した。マウスを、 $t = d-1$  および  $d+2$  にアイソタイプ対照または抗GCSFの  $85 \mu\text{g}$   $\text{t}n$  もしくは  $250 \mu\text{g}$   $\text{ip}$  のいずれかによって処理した。

【 0 1 9 7 】

試驗設計

gまたはそれ未満、ニコチン1.2 mgまたはそれ未満、およびCO 15 mgまたはそれ未満。煙は、通常の喫煙時の吸入体積および紙巻きタバコの燃焼速度を模倣する一定時間ドローバックを用いて10秒間で50 mlの一回換気量において生成された。

【0198】

- (i) 群：1. 偽（処理、しかし煙に曝露していない）
- 2. 煙単独
- 3. 煙 + アイソタイプの経鼻注射（85 μg = 50 μl @ 1.7 mg/ml）（ラット IgG1、GL113）
- 4. 煙 + 抗-GCSFの経鼻注射（85 μg = 50 μl @ 1.7 mg/ml）（ラット抗GCSF、MAB414）
- 5. 煙 + アイソタイプの腹腔内注射（250 μg）（ラット IgG1、GL113）
- 6. 煙 + 抗GCSFの腹腔内注射（250 μg）（ラット抗GCSF、MAB414）

【0199】

(ii) エンドポイント： BAL液 - 総細胞数 / 白血球分画数

- ELISA (TNF)
- ザイモグラフィー（プロテアーゼ誘導）

血液 - 総細胞数 / 白血球分画数

全肺 - 瞬間凍結して各群に関してプール

【0200】

注意：以下のグラフが提供されている：BAL液および血液細胞数のグラフ、ELISA結果およびザイモグラフィーゲルのグラフ。凍結BAL液試料およびプールした肺試料は依頼人に輸送される。

【0201】

(iii) 必要なマウス：8匹 / 群

マウス48匹

【0202】

(iv) 薬物製剤：

試験化合物： G-CSF抗体

特異性：マウスG-CSF (G-CSF生物活性を中和する)

Igクラス：ラット IgG1

起源：R&D Systems

カタログ番号：MAB414

クローン：67604

エンドトキシンレベル：R&Dによって供給されるように < 0.1 EU/1 μg mAb

製剤：9.95 mg/mlでPBSにおける0.2 μM濾過滅菌溶液として供給される。エンドトキシンを含まない滅菌PBSによって1.0 mg/mlに希釈。-20°で保存される5 mg (5 ml) アリコートとして提供。

用量：250 μg / 注射 / マウス, i.p. または85 μg / 経鼻 / マウス, t.n

試験化合物：アイソタイプ対照抗体

特異性：大腸菌 - ガラクトシダーゼ

Igクラス：ラット IgG1

起源：Walter and Eliza Hall Institute Monoclonal Antibody Lab

クローン：GL113

エンドトキシンレベル：WEHIによって供給されるように < 0.1 EU/1 μg mAb。

製剤：1.3 mg/mlでPBSにおける滅菌溶液として供給される。エンドトキシンを含まない滅菌PBSによって1.0 mg/mlに希釈。5 mg (5 ml) アリコートとして提供；-20°で保存。

用量：250 μg / 注射 / マウス, i.p. または85 μg / 経鼻 / マウス, t.n

【0203】

煙曝露マウスのBALFにおける炎症細胞数に及ぼす G-CSF抗体の効果

4日間の煙の曝露は、偽処理群と比較してBALFにおける総生存細胞、マクロファージ、

10

20

30

40

50

好中球、およびリンパ球のわずかな増加を引き起こした(図19)。

【0204】

経鼻投与した G-CSF抗体は、経鼻投与したアイソタイプ群と比較してBALFにおける総生存細胞、マクロファージ、好中球、およびリンパ球において有意な低減を引き起こした。

【0205】

腹腔内注射によって投与された G-CSF抗体は、総生存細胞数および好中球の有意な低減を引き起こしたが、アイソタイプ(ip)群と比較してBALFにおけるマクロファージまたはリンパ球に対して効果を示さなかった。

【0206】

10

実施例5

様々なG-CSFアンタゴニストによるhG-CSF受容体発現Ba/F3細胞におけるG-CSF媒介増殖の阻害

Layton et al, 前記1997によって記述されるようにhG-CSFRを安定にトランスフェクトしたBaF3細胞を、5%FBSおよび0.5 ng/ml rhまたはmGCSF(それぞれ、R&D Systemsカタログ番号214-CSおよびカタログ番号414-CS)を添加したDMEM培地において20,000個/ウェルで96ウェルプレートにおいて培養した。G-CSFアンタゴニスト(R&D Systems MAB414、抗-hG-CSFR mAb711、およびhG-CSFR-Fc)を1 μMから始める3倍滴定用量で加えて、培養48時間後に細胞増殖をMTS還元によって測定した(Cory et al, Cancer Commun. 3:207-12, 1991; Riss and Moravec, 前記1993)。

20

【0207】

A. 抗G-CSF抗体の阻害:

市販のR&D Systems抗体MAB414は、10 pMのIC<sub>50</sub>でmG-CSF増殖を阻害することができた。

【0208】

B. 抗hG-CSFR抗体の阻害:

hG-CSF受容体に対するマウスモノクローナル抗体、mAb711(Layton et al, 前記1997)およびそのヒト化誘導体はそれぞれ、1.1 nMおよび1.5 nMのIC<sub>50</sub>でmG-CSF増殖を阻害することができた。

【0209】

mAb711の重鎖および軽鎖可変領域、ならびにヒトIgG1重鎖および軽鎖定常領域を含むキメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体mAb711と類似のIC<sub>50</sub>でG-CSF活性を阻害した。

30

【0210】

C. 可溶性hG-CSFR-Fcタンパク質による阻害:

可溶性のG-CSFR-Fcタンパク質(Honjo et al, Acta Cryst F61:788-790, 2005)は、22 pMのIC<sub>50</sub>でmG-CSF増殖を阻害することができた。

【0211】

これらの結果は、G-CSFの生物活性が、G-CSFに対する抗体、G-CSFRに対する抗体、および可溶性G-CSF受容体が含まれるがこれらに限定されるわけではない多様なアンタゴニストによって阻害される可能性があることを証明している。

【0212】

40

当業者は、本明細書において記述される本発明が、具体的に記述される変更および改変以外の変更および改変を受けやすいことを認識するであろう。本発明には、そのような全ての変更および改変が含まれると理解されるべきである。本発明にはまた、本明細書において個々にまたは集合的に参照または示される段階、特色、組成、および化合物の全て、ならびに任意の二つまたはそれより多い段階または特色の任意のおよび全ての組み合わせが含まれる。

【0213】

関係書目

Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.m  
1994

Barnes, *N Engl J Med* 343(4):269-280, 2000

Barnes *et al*, *Eur Respir J* 22:672-688, 2003

10

Barnes, *Cytokine Growth Factor Rev* 14(6):511-522, 2003

Beeh and Beier, *Clin Exp Allergy* 26(2):142-157, 2006

Bird, *Science* 242:423, 1988

Bozinovski *et al*, *J Biol Chem* 277(45):42808-42814, 2002

20

Bozinovski *et al*, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(4):L877-885, 2004

Bozinovski *et al*, *J Proteome Res* 4(1):136-145, 2005

Brennan *et al*, *Science* 229:81, 1985

30

Bungart *et al*, *British Journal of Haematology* 22:1156, 1990

Carter *et al*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89:4285 1992

Carter *et al*, *Bio/Technology* 10:163-167, 1992

Chen *et al*, *Neuropsychopharmacology* 30(4),713--719 2005

40

Clackson *et al*, *Nature* 352:624-628, 1991

Colotta *et al*, *Blood* 80:2012-2020, 1992

Cory *et al*, *Cancer Commun.* 3:207-212, 1991

de Haan *et al*, *Blood* 86:2986-2992, 1995

10

Demetri *et al*, *Blood* 78:2791-2808, 1991

Di Stefano *et al*, *Am J Respir Crit Care Med* 158(4):1277-1285, 1998

EP Patent No. 0 216 846

20

EP Patent No. 0 256 055

EP Patent No. 0 323 997

EP Patent Application No. 89303964.4

Geng *et al*, *Molecular Immunology* 44:5121-529, 2007

30

Gericke *et al*, *Journal of Leukocyte Biology* 57:455-461, 1995

Honjo *et al*, *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 61(Pt 8):788-90, 2005

Honjo *et al*, *Acta Cryst F* 61:788-790, 2005

Huston *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879, 1988

40

Jacob *et al*, *Blood* 92:353-361, 1998

Jones *et al*, *Nature* 321:522-525, 1986

Kabat *et al*. in *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Department of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication No. 91-3242, 1991

Keatings *et al*, *Am J Respir Crit Care Med* 153(2):530-534, 1996

10

Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-499, 1975

Kortt *et al*, *Protein Engineering* 10:423, 1997

Lerrick *et al*, *Bio/Technology* 7:934, 1989

Layton *et al*, *J. Biol. chem.* 272:29735-29741, 1997

20

Layton *et al*, *Growth Factors* 14:117-130, 1997

Liu *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439, 1987

Lopez and Murray, *Nat Med* 4(11):1241-1243, 1998

30

Lord *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9499-9503, 1989

Marks *et al*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991

Morimoto *et al*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117, 1992

Morrison *et al*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, 1984

40

Nicola *et al*, *Journal of Biological Chemistry* 258:9017, 1983

Nicola *et al*, *Nature* 314:625, 1985

Metcalf, *International Journal of Cancer* 25:225, 1980

Padlan *et al*, *Mol. Immunol.* 28:489- 498, 1991

Pedersen *et al*, *J. Mol. Biol.* 235:959-973, 1994

10

Pesci *et al*, *Eur Respir J.* 12(2):380-386, 1998

Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992

Reichmann *et al*, *Nature* 332:323-329, 1988

20

Retamales *et al*, *Am J Respir Crit Care Med* 164:469-473, 2001

Rex *et al*, *Transfusion* 35:605-611, 1995

Riss and Moravec, *Mol. Cell Biol.* 3(1):184a, 1993

Roberts *et al*, *Blood* 89:2736-2744, 1997

30

Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning: *A Practical Approach*, Volumes I and II, D. N. Glover ed. 1985

Sommerhoff *et al*, *J Clin Invest* 85(3):682-289, 1990

40

Souza *et al*, *Science* 232:61, 1986

Stanescu *et al*, *Thorax* 51(3):267-271, 1996

Stockley, *Am J Respir Crit Care Med* 160(5 Pt 2):S49-52, 1999

Stockley, *Chest* 121(5 Suppl):151S-155S, 2002

Summerton and Weller, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 7:187-195, 1997

10

Tomizuka *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727, 2000.

U.S. Patent No: 4,399,216

U.S. Patent No. 4,740,461

20

U.S. Patent No: 4,816,567

U.S. Patent No. 4,912,040

U.S. Patent No. 4,946,778

U.S. Patent No. 4,959,455

30

U.S. Patent No. 5,223,409

U.S. Patent No. 5,403,484

U.S. Patent No. 5,427,908

40

U.S. Patent No. 5,476,996

U.S. Patent No. 5,571,698

U.S. Patent No. 5,698,767

U.S. Patent No. 5,580,717

U.S. Patent No. 5,589,456

U.S. Patent No. 5,939,598

10

U.S. Patent No. 5,885,793

U.S. Patent No. 5,969,108

U.S. Patent No. 6,075,181

20

U.S. Patent No. 6,114,598

U.S. Patent No. 6,150,584

U.S. Patent No. 6,162,963

U.S. Patent No. 6,172,197

30

U.S. Patent No. 6,521,404

U.S. Patent No. 6,544,731

U.S. Patent No. 6,555,313

40

U.S. Patent No. 6,582,915

U.S. Patent No. 6,593,081

Vlahos *et al*, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(5):L931-945, 2006

Ward *et al*, *Nature* 334:544, 1989

Welte *et al*, *Blood* 88:1907-1929, 1996

10

Winter & Harris, *TIPS* 14:139, 1993

WO 1993/02108

WO 1999/55369

20

WO2004/006955

Xu *et al*, *British Journal of Haematology* 93:558-568, 1996

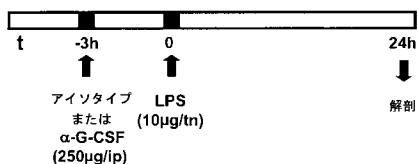
Yong *et al*, *European Journal of Haematology* 49:251-259, 1992

Yong, *British Journal of Haematology* 94:40-47, 1996

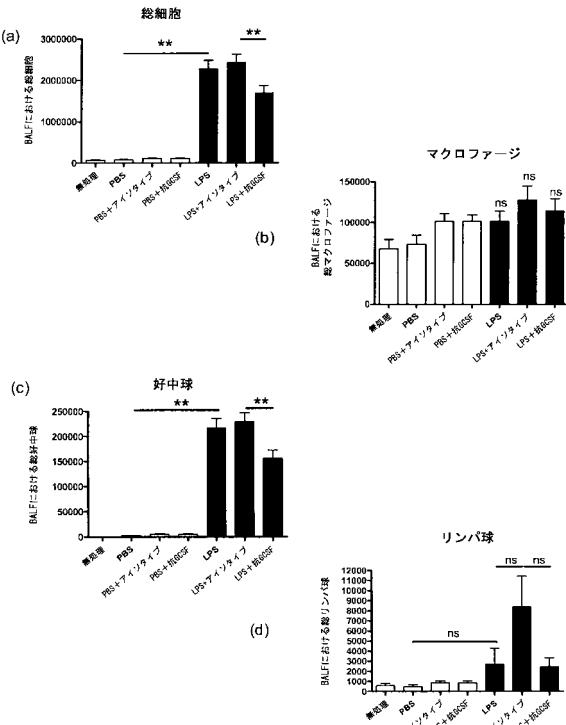
30

Youil, *J Virol Methods* 120(1):23-31, 2004

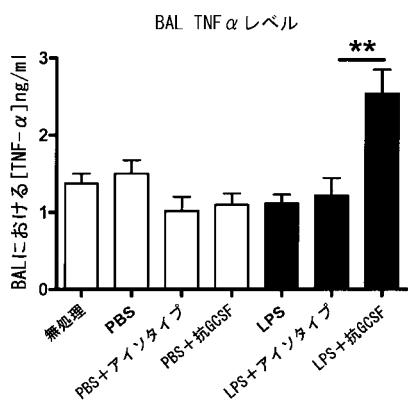
【図1】



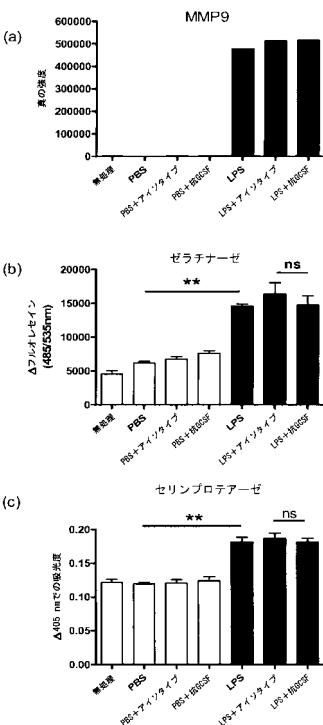
【図2】



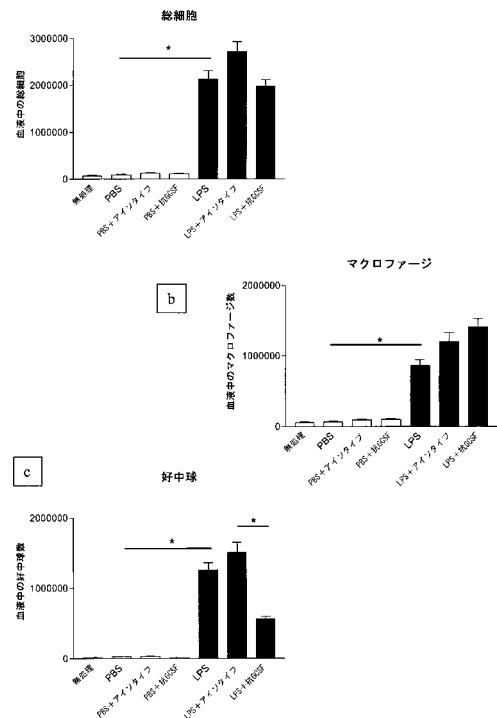
【図3】



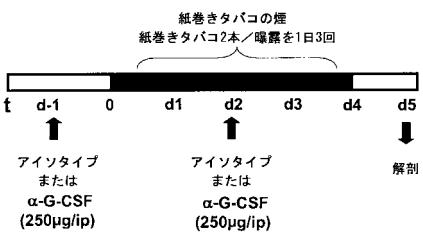
【図4】



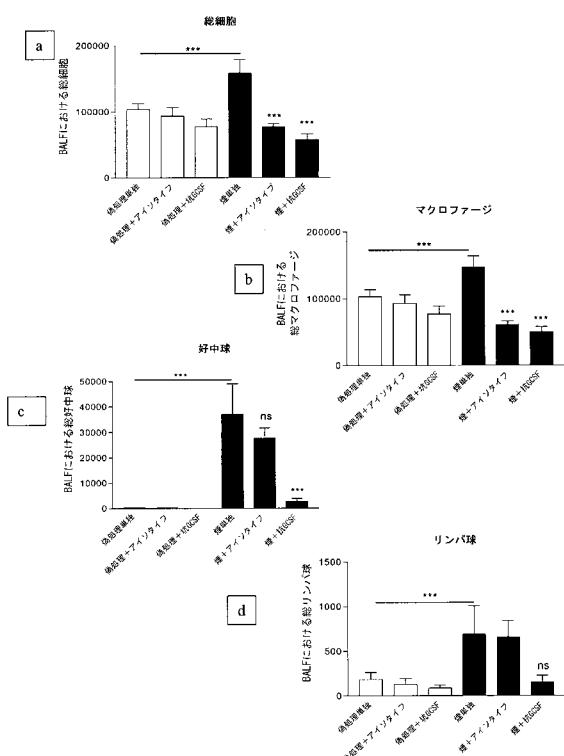
【図5】



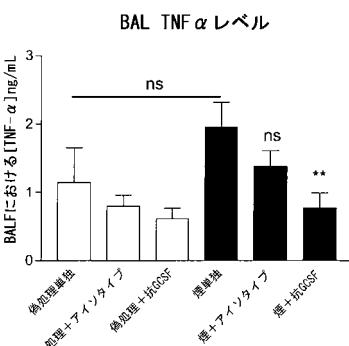
【図6】



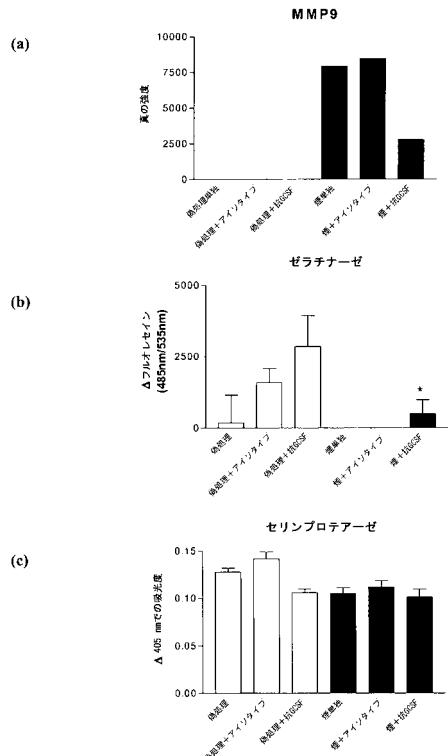
【図7】



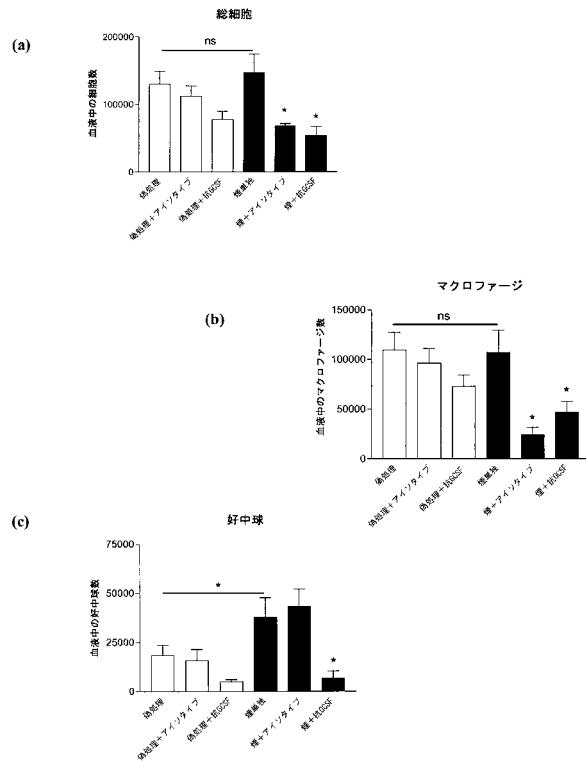
【図8】



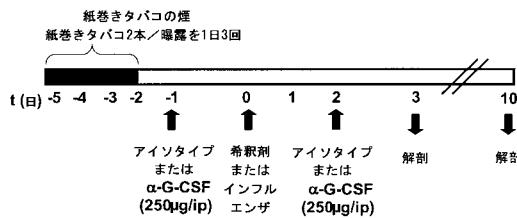
【図9】



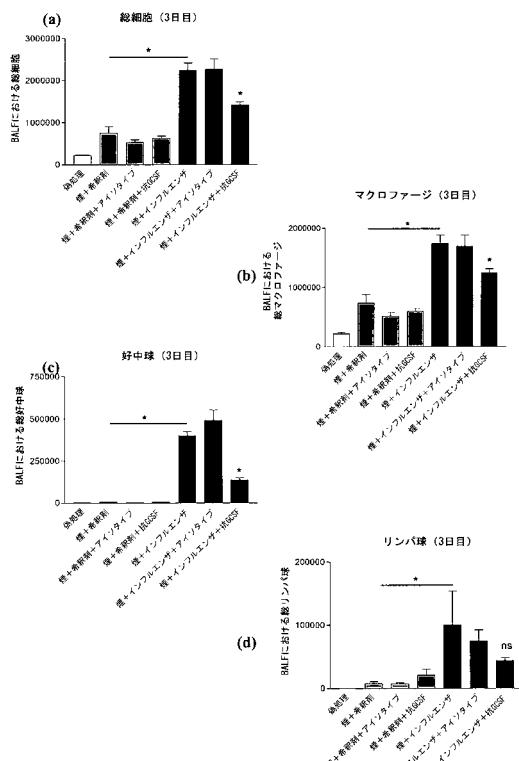
【図10】



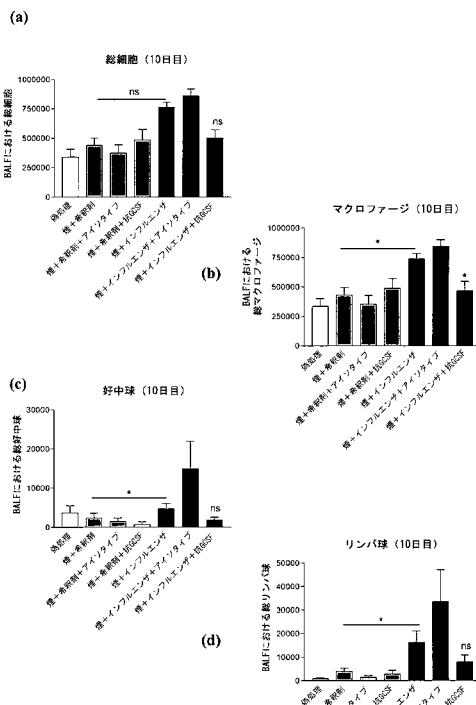
【図11】



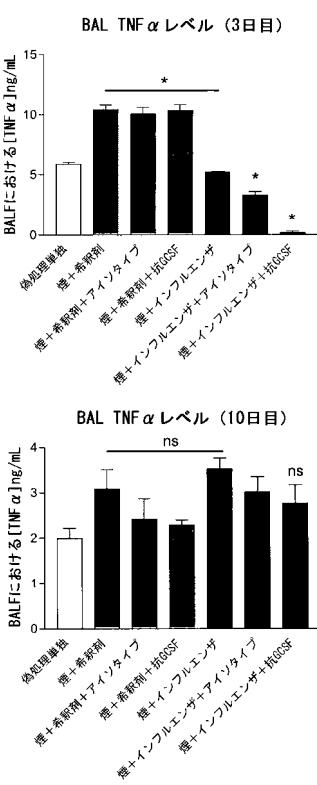
【図12】



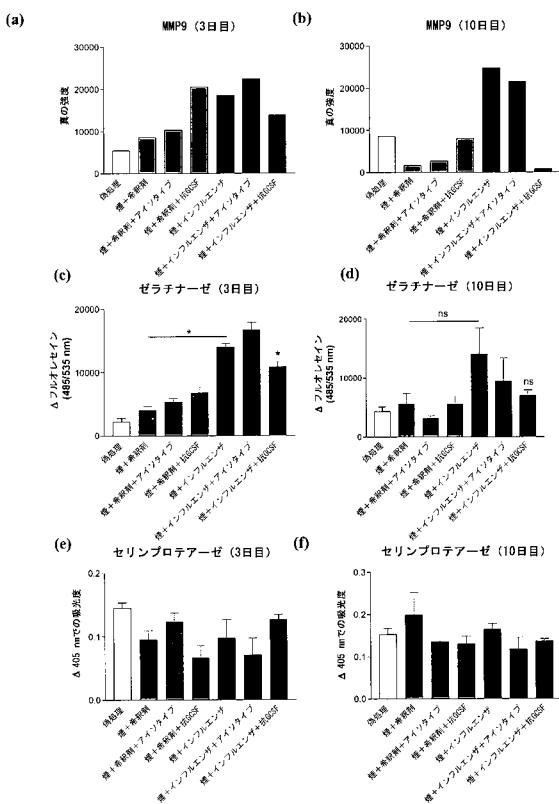
【図13】



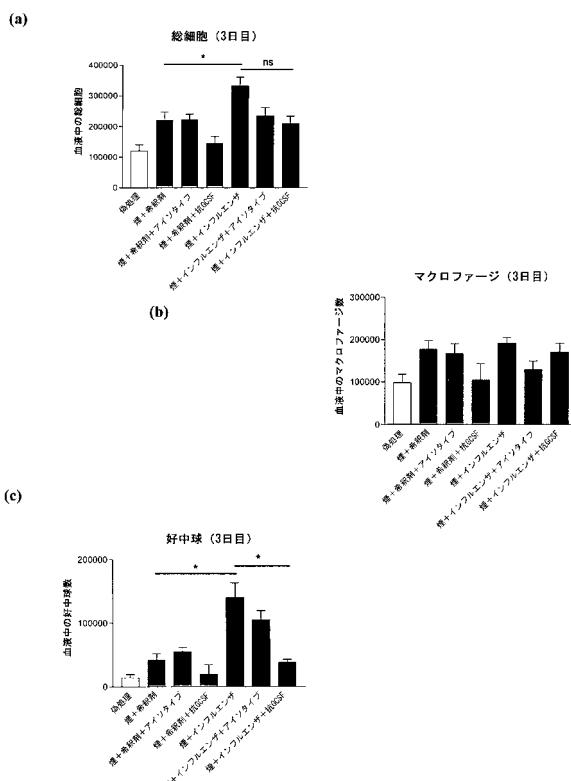
【図14】



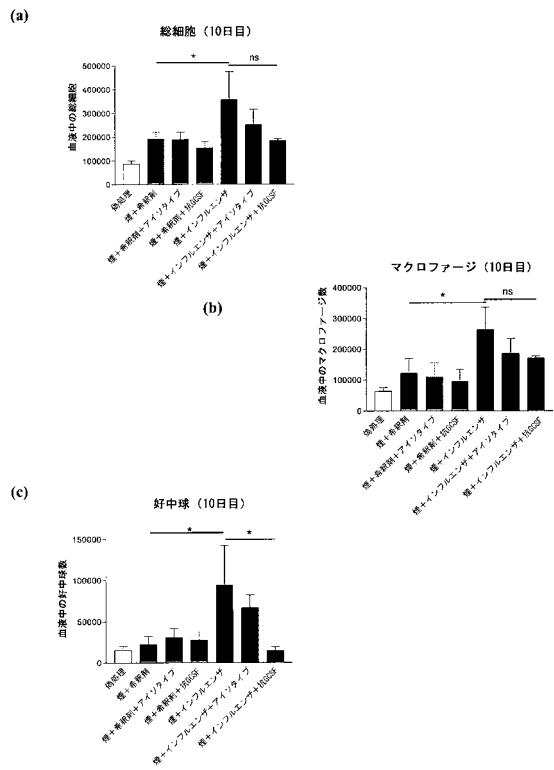
【図15】



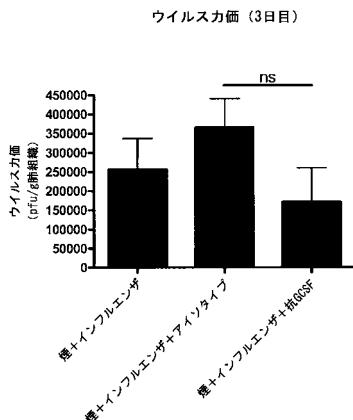
【図16】



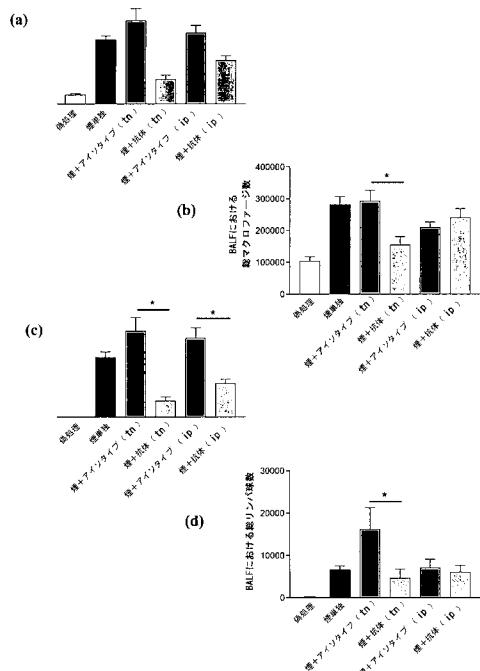
【図17】



【図18】



【図19】



【配列表】

0005235881000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 クランプ デヴィッド エリック

オーストラリア ピクトリア州 バルウィン ノース ドンカスター ロード 50

(72)発明者 ナッシュ アンドリュー ドナルド

オーストラリア ピクトリア州 キュー ピール ストリート 185

審査官 宮坂 隆

(56)参考文献 特表2005-536535 (JP, A)

国際公開第06/077501 (WO, A1)

日本臨牀, 1999年, Vol.57, pp.105-10

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 39/00 - 39/44

A 61 P 11/00 - 11/16

C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )

P u b M e d