

(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2008-545396
(P2008-545396A)

(43) 公表日 平成20年12月18日(2008.12.18)

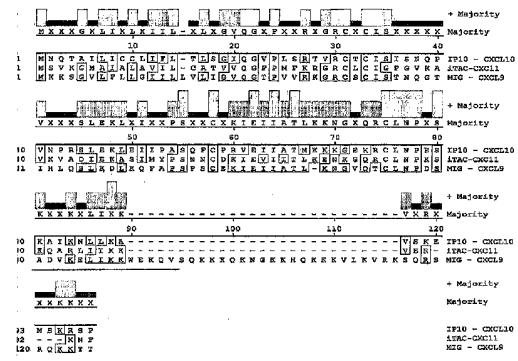
(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
C 12N 15/09	(2006.01)	C 12N	15/00	Z N A A
C 12N 1/15	(2006.01)	C 12N	1/15	4 B O 2 4
C 12N 1/19	(2006.01)	C 12N	1/19	4 B O 6 4
C 12N 1/21	(2006.01)	C 12N	1/21	4 B O 6 5
C 12N 5/10	(2006.01)	C 12N	5/00	A
				4 C O 8 4
				4 H O 4 5
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-512501 (P2008-512501)	(71) 出願人	502191619 インターミューン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 005 ブリスベン ベイショア ブルバ ード 3280
(86) (22) 出願日	平成18年5月17日 (2006.5.17)	(74) 代理人	230104019 弁護士 大野 聖二
(85) 翻訳文提出日	平成20年1月18日 (2008.1.18)	(74) 代理人	100106840 弁理士 森田 耕司
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/019233	(74) 代理人	100105991 弁理士 田中 玲子
(87) 國際公開番号	W02006/125077	(74) 代理人	100114465 弁理士 北野 健
(87) 國際公開日	平成18年11月23日 (2006.11.23)		
(31) 優先権主張番号	60/682,544		
(32) 優先日	平成17年5月18日 (2005.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】 非天然ケモカイン受容体リガンドおよびこれらの使用方法

(57) 【要約】

本発明は、非天然CXCRL3リガンドのようなiTACのN-ループ領域およびポリヌクレオチドを含む非天然CXCRL3リガンドを提供する。本発明は、さらに線維症疾患、血管新生障害、および癌の治療方法を提供する。本方法は、一般的には、本発明の非天然CXCRL3リガンドの有効量を、これを必要とする個人に投与することを含む。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

N - ループドメインが i T A C 由来である、非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 2】

N - ループドメインを除く該ポリペプチド受容体リガンドが、天然アミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 3】

N - ループドメインを除く該ポリペプチド受容体リガンドが、天然アミノ酸配列および非天然アミノ酸配列を有しており、該非天然アミノ酸配列は、少なくとも一つ以上の天然アミノ酸を、異なる C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンドの相同部位由来アミノ酸と置換することにより生じた、請求項 1 に記載の非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 4】

異なる C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンドの相同部位由来該アミノ酸が、コンセンサスアミノ酸残基である、請求項 3 に記載の非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 5】

配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 11 の配列およびこれらのバリエーションよりなる群から選ばれる配列であって、12 ~ 17 以外の部位が、i T A C、I P - 10 または M I G C X C R 3 ポリペプチドリガンドにおける相同部位由来アミノ酸に変化したものを含む、非天然 C X C R 3 ポリペプチドリガンド。

【請求項 6】

N - ループドメインが i T A C 由来である、非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 7】

N - ループドメインを除く該ポリペプチド受容体リガンドが、P F 4 の天然アミノ酸配列を有している、請求項 6 に記載の非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 8】

配列番号 13 を含むポリペプチド配列を有する、請求項 7 に記載の非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 9】

受容体リガンドが、リガンドの成熟型であり、N - 末端メチオニンを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 10】

受容体リガンドが、リガンドの成熟型であり、N - 末端メチオニンを含む、請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 11】

ポリペプチドの一つまたはそれ以上のアミノ酸が化学的に修飾されている、請求項 1 ~ 5 または 9 のいずれかに記載の非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 12】

ポリペプチドの一つまたはそれ以上のアミノ酸が化学的に修飾されている、請求項 6 ~ 8 または 10 のいずれかに記載の非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 13】

非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンドが、P E G 付加により修飾されている、請求項 11 に記載の非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 14】

非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンドが、P E G 付加により修飾され

10

20

30

40

50

ている、請求項 1 2 に記載の非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 1 5】

非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンドが、融合ポリペプチドである、請求項 1 ~ 5、9 または 1 1 に記載の非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 1 6】

非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンドが、融合ポリペプチドである、請求項 6 ~ 8、1 0 または 1 2 に記載の非天然 P F 4 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンドをエンコードする配列を含むポリヌクレオチド。 10

【請求項 1 8】

促進剤に対して操作可能に連結されている、請求項 1 7 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 1 9】

請求項 1 7 のポリヌクレオチドを含むウィルス発現ベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 7 または 1 8 のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 2 1】

請求項 1 8 の発現ベクターを含む宿主細胞。 20

【請求項 2 2】

請求項 2 1 の宿主細胞を非天然 C X C R 3 リガンドが有利に產生される条件下で培養すること、ならびに、培地内で発現させた非天然 C X C R 3 リガンドを単離することを含む、非天然 C X C R 3 リガンドを製造する方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の非天然 C X C R 3 リガンドに特異的に結合する抗体。 20

【請求項 2 4】

個人における線維症の治療または予防において有効な量の請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の非天然 C X C R 3 リガンドを、線維症を患う個人に投与することを含む、個人における線維症を治療する方法。 30

【請求項 2 5】

個人における線維症の治療または予防において有効な量の請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の非天然 C X C R 3 リガンドをコードするポリヌクレオチドを、線維症を患う個人に投与することを含む、個人における線維症を治療する方法。

【請求項 2 6】

非天然 C X C R 3 リガンドをコードするポリヌクレオチドが、ウィルスベクター内に提供されるものである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

線維症が肺線維症である、請求項 2 4 ~ 2 6 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 2 8】

肺線維症が特発性肺線維症である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

肺線維症が、既知の病因由来のものである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

線維症が、肝線維症、腎線維症、心線維症および強皮症から選択されるものである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の非天然 C X C R 3 リガンドの有効量を個人に投与することを含む、腫瘍を有する個人における腫瘍の成長を軽減する方法。 50

【請求項 3 2】

個人における線維症の治療または予防において有効な量の、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の非天然 C X C R 3 リガンドをエンコードするポリヌクレオチドを、線維症を患う個人に投与することを含む、個人における腫瘍の成長を軽減する方法。

【請求項 3 3】

非天然 C X C R 3 リガンドをエンコードするポリヌクレオチドが、ウィルスベクター内に提供される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

アルキル化剤、ニトロソ尿素、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、植物（ビンカ）アルカロイド、タキサンおよびステロイドホルモンから選択される、有効量の抗腫瘍剤を投与することをさらに含む、請求項 2 4 ~ 3 3 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 3 5】

個人がヒトである、請求項 2 4 ~ 3 4 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、ケモカイン受容体のためのリガンドの分野、ならびに線維性疾患、血管新生疾患、悪性腫瘍（がん）および細菌感染症の治療分野に関する。

20

【背景技術】**【0 0 0 2】**

ケモカインは、炎症時に産生され、ロイコサイトの動員を制御する小さなサイトカインのファミリーに属している。ケモカインは、好中球、単球、マクロファージ、好酸球、好塩基球、肥満細胞並びに T 細胞および B 細胞を含むリンパ球などの、ロイコサイトの走化性を選択的に誘導することができる。走化性の促進のみならず、ケモカインは細胞の形の変化、細胞内の遊離カルシウムイオンの濃度の一時的な上昇、顆粒エキソサイトーシス、インテグリンのアップレギュレーション、生物活性脂質（例えばロイコトリエン）の形成、ならびロイコサイト活性化に関連する呼吸バーストを誘導する。したがって、ケモカインは炎症反応において初期の役割を演じ、炎症性メディエータの放出、走化性、ならびに感染部位または炎症部位への管外遊出を引き起こす。

30

【0 0 0 3】

ケモカインとして 4 種のファミリーが特定され、その数および保護されたアミノ末端システインモチーフの配列に従ってグループ化されている。C C ケモカイン（ - ケモカイン）は、隣接するシステイン残基を含み、C X C ケモカイン（ - ケモカイン）は、単一追加残基により分離されるシステイン残基を含み、ならびに、C X 3 C ケモカインは、3 つの追加残基により分離されるシステイン残基を含んでいる。

【0 0 0 4】

C X C ケモカインは、C X C モチーフに隣接するさらなる G l u - L e u - A r g (すなわち E L R) トリペプチド配列の存在の有無に応じて、E L R および非 E L R ケモカインへと更に分けられる。E L R - C X C の例としては、インターロイキン - 8 (I L - 8) 、上皮由来好中球活性化タンパク質 (E N A) 、好中球活性化タンパク質 (N A P) および種々の成長関連タンパク質（例えば、G R O - 、 、 ）が含まれる。非 E L R C X C ケモカインには、インターフェロン - (I F N -) 誘導性 1 0 - k D a タンパク質 (I P - 1 0) 、 I F N - 誘導モノカイン (M I G) 、 I F N - 誘導性 T 細胞ケモアトラクタント (i T A C) 、ストロマ細胞由来因子 (S D F) および血小板因子 4 (P F 4) が含まれる。

40

【0 0 0 5】

I P - 1 0 、 M I G および i T A G は、活性化 T 細胞に対しては強力なケモアトラクタントであるが、非活動性 T 細胞、B 細胞およびナチュラルキラー (N K) 細胞に対してはそうではない。これらの発現は、T h 1 関連疾患において、I F N - が発現されている

50

ことに対応してアップレギュレートされているようである。IP-10、MIGおよびiTACの発現は、主に活性化内皮細胞およびIFN-活性化マクロファージに関連する。

【0006】

その他の細胞における非ELR CX3Cケモカインの発現もまた報告されている。特に、IP-10は単球、纖維芽細胞、星状膠細胞、ケラチン生成細胞、好中球および内皮細胞においてIFN-誘導化であり、例えば、潰瘍性大腸炎、アテローム動脈硬化症、サルコイドーシス、結核型らい、乾癬およびウイルス性髄膜炎に関連する発現を伴う(Sautiら、Qinら)。MIGは、末梢血単核細胞(PBMC)、纖維芽細胞、ケラチン生成細胞、内皮細胞、およびPMA-刺激型単球において、IFN-誘導される。MIG発現は、乾癬にも関連する。iTACは、活性化単球および星状膠細胞によって発現する。

10

【0007】

これらの非ELR CX3Cケモカインの発現は、活性化T細胞の上皮への動員における役割を演じるため、おそらくは、防御免疫の促進またはTh1型免疫応答の増幅のために現れるようである。

【0008】

CCおよびCX3Cケモカインは、7つの膜貫通Gタンパク質結合型受容体スーパーファミリーに属する受容体を通じて作用する。この、Gタンパク質結合型(蛇行型)受容体のファミリーは、7つの膜貫通領域を含む内在性膜タンパクの大群を含んでいる。GTPに結合可能であるとともに、例えば、細胞内メディエータの産生により結合化受容体からの情報伝達を調節可能であるヘテロ三量体調節タンパクである、Gタンパク質にこの受容体は結合している。

20

【0009】

CX3Cケモカイン受容体1~4(CXCR1~4)は、CX3Cケモカインに結合する。CXCR3(CD183)は、IP10、MIGおよびiTACに対する受容体である。CXCR3を介する情報伝達は、炎症に関連するエフェクターT細胞の走化性移動を誘導する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

30

【0010】

本発明の様態により、N-ループドメインがiTAC由来である、非天然CXCR3ポリペプチド受容体リガンドが提供される。特定の様態において、N-ループドメインを除く非天然CXCR3ポリペプチド受容体リガンドは、天然アミノ酸配列を有している。このような非天然リガンドには、例えば、IP-10またはMIGの天然配列であって、iTAC由来N-ループを有するものが含まれる。別の様態において、N-ループドメインを除くポリペプチド受容体リガンドは、天然および非天然双方のアミノ酸配列を有しているが、ここで、非天然アミノ酸配列は、多数において一致するコンセンサス残基を有する少なくとも一つの天然アミノ酸残基の相同部位での置換により生じたものである。

40

【0011】

最初に、複数のCXCR3受容体リガンドのポリペプチド配列、または他のCX3C受容体リガンドを、整列させることにより、相同部位が特定される(例えば、配列整列アルゴリズムを使用する)。次に、それぞれの配列決定部位に存在するアミノ酸残基は、それぞれの配列決定部位で比較され、以下に記載される基準に基づき、「同一」、「多数において一致」、あるいは「特異的」(すなわち、「非相同」)であると決定される。次いで、多数において一致する残基を、すべてあるいは一部の相同部位において置換する。

【0012】

本発明の特定の様態において、配列番号(SEQ ID NO:)3、配列番号6、配列番号9、配列番号10および配列番号11の配列を含み、配列番号3、6、9、10および11のバリエーションであって、12~17部位以外はiTAC、IP-10または

50

MIG CXCR3ポリペプチドリガンドにおける相同部位由来アミノ酸に変換されたものを含む、非天然CXCR3ポリペプチドリガンドを提供する。例えば、非天然CXCR3ポリペプチド受容体リガンドのN末端に関連するiTACのN-ループの部位は、1個、2個、3個あるいは4個のアミノ酸残基により改変されていてもよい。この場合、iTACのN-ループは本発明の非天然CXCR3受容体リガンドの8~13、9~14、10~15、11~16、13~18、14~19、15~20または16~21位に配置される。また、本発明の非天然CXCR3ポリペプチド受容体リガンドは、iTACのN-ループの側面に位置するiTACの天然ポリペプチド配列を含んでいてもよい。例えば、いくつかの態様において、iTACの天然N末端（すなわち、成熟ポリペプチドのアミノ酸残基1~11）は、非天然CXCR3ポリペプチドリガンド中に存在する。この例では、成熟IP-10またはMIGの非天然バージョンは、残基1~17として、天然iTACの配列表記残基1~17を含むことができるであろう。その他のバリエーションについては、以下の通り検討をおこなう。

10

【0013】

更に、その他の態様では、N-ループドメインがiTAC由来である、非天然PF4 CXCR3ポリペプチド受容体リガンドを提供する。ある態様において、N-ループを除くポリペプチド受容体リガンドは、PF4の天然アミノ酸配列を有している。特定の態様においては、配列番号13のものがその配列となる。本発明には、改変型PF4ポリペプチド配列を有する、非天然変位型PF4 CXCR3ポリペプチド受容体リガンドが含まれる。特定の態様において、改変型ポリペプチド配列は、保存アミノ酸置換を含んでいる。他の態様において、変異型ポリペプチド配列は、種々のCXCR3のアミノ酸残基、あるいは、種々のCXCR3リガンドのアミノ酸残基さえも含んでいる。

20

【0014】

本発明の非天然CXCR3ポリペプチド受容体リガンドは、翻訳時または翻訳後に、例えばグリコシル化、アミド化、プレニル化、ファルネシル化、アシル化、アセチル化、リン酸化、PEG付加などにより修飾されてもよい。

30

【0015】

本発明のいくつかの態様において、非天然CXCR3ポリペプチドリガンドは、シグナルペプチドを欠損した成熟形である。非天然CXCR3ポリペプチドリガンドは、N末端にメチオニンを含んでいてもよい。

【0016】

本発明の他の態様において、本発明の非天然CXCR3ポリペプチド受容体リガンドをコードするポリヌクレオチドが提供される。このようなポリヌクレオチドは、本発明の非天然CXCR3リガンドの成熟または前駆体型をエンコードしてもよく、あるいは、これらの一端であって生物学的活性を有するものをエンコードしてもよい。別の態様において、ポリヌクレオチドは、好適な促進剤に操作可能に連結した発現ベクター内に配される。関連する本発明の態様において、非天然CXCR3ポリペプチド受容体リガンドをコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞が提供される。

30

【0017】

更に他の態様では、本発明の非天然CXCR3リガンドを製造する方法であって、非天然CXCR3リガンドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞をCXCR3リガンドが有利に産生される条件下で培養すること、ならびに、培地中で発現させたCXCR3リガンドを単離することを含む方法が提供される。

40

【0018】

本発明の他の態様では、非天然CXCR3リガンドに特異的に結合する抗体が提供される。

【0019】

本発明はまた、本明細書に開示されるポリペプチドおよびポリヌクレオチドを使用して、疾病、疾患および/または病状を治療する方法をも提供する。

【0020】

50

例えば、本発明では、個人における線維症を治療する方法が提供される。この方法には、線維症を患う個人に対して、線維症の治療または予防に有効である量の非天然 CXCR3 受容体リガンドを投与することが含まれる。

【0021】

同様に、本発明では、非天然 CXCR3 リガンドをコードするポリヌクレオチドの有効量を投与することにより、個人における線維症を治療する方法が提供される。特定の様態において、非天然 CXCR3 リガンドをコードするポリヌクレオチドは、ウィルスベクターにおいて提供される。このベクターは、成熟 CXCR3 リガンドをコードするポリヌクレオチド、またはシグナルペプチドを有する前駆体型、あるいはこれらの所定のバリエーションを含むものであってもよい。

10

【0022】

線維症は、肺線維症であってもよい。特定の様態において、肺線維症は特発性肺線維症である。他の特定の様態において、肺線維症は既知の病因由来のものである。線維症は、肝線維症、腎線維症、心線維症および強皮症から選択されてもよい。

【0023】

本発明は、更に、非天然 CXCR3 リガンド、および / または非天然 CXCR3 リガンドをコードするポリヌクレオチドの有効量を個人に投与することにより、腫瘍を有する個人における腫瘍成長を軽減する方法を提供する。非天然 CXCR3 リガンドをコードするポリヌクレオチドは、ウィルスベクターにおいて提供されてもよい。

20

【0024】

本発明は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドとともに、有効量の抗腫瘍剤であって、アルキル剤、ニトロソ尿素、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、植物 (vinca) アルカロイド、タキサンおよびステロイドホルモンが含まれるがこれらに限定されないもの、を投与することが含まれる。

【0025】

本発明の方法は、ヒトにおける治療または予防、特に、本発明に関連する疾患、疾病または病状に悩まされるようになる恐れのある患者またはヒトに使用することができる。しかしながら、本発明は、家畜およびペットを含む動物の治療または予防にも使用することができる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本発明の好適な様態を記述する前に、以下の用語を定義する。定義されていない用語には、当該技術分野における通常の意味付けがなされるべきである。

【0027】

「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基（これらは用語を短縮して「アミノ酸」または「残基」と呼ばれる）のポリマーを指す。「ペプチド」、「オリゴペプチド」および「タンパク質」という用語は、ポリペプチドの定義の中に含まれる。「ポリペプチド」という用語は、翻訳時または翻訳後の修飾を必要とするものでもなければ、排除するものでもなく、グリコシル化、アミド化、プレニル化、ファルネシル化、アシル化、アセチル化、リン酸化、PEG 付加などが含まれるもの、これらに限定されない。ポリペプチドには、一つ以上のアミノ酸類似体（例えば、非天然に発現するアミノ酸）またはその他の官能基、例えば、ビオチン、エピトープ標識、蛍光および / またはクエンチング基など、を含んでもよい。

40

【0028】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、いずれかの長さのヌクレオチドの多量体型を指す。ポリヌクレオチドには、デオキシリボ核酸、リボ核酸および / またはこれらの類似体が含まれていてもよい。本明細書において使用される場合、ポリヌクレオチドには、直線状または環状の二本鎖または一本鎖分子が含まれ、これにはオリゴヌクレオチドプライマー、プラスミド、発現ベクター（ウィルス性の発現ベクターを含む）、コスミド、人為的クロモゾームおよび天然に発生のクロモゾームが含まれるが、これらに限定

50

されない。ポリヌクレオチドは、ペプチド（ビオチンなど）、蛍光および／またはクエエンチング基、エピトープ標識などを含む他の分子と接合してもよい。

【0029】

「整列部位」、「同一部位」、「相同部位」、「多数派コンセンサス残基」および「特異的」あるいは「非相同部位」は、次のように定義される。「整列部位」の用語は、配列整列（例えば、C X C R 3 ポリペプチドリガンドの配列）におけるいずれか一か所の部位を指す。ポリペプチド配列整列において、整列された部位とは、いずれか一ヶ所のアミノ酸残基の部位である。すべての整列された配列が、整列された部位において同一の残基を有する場合、整列された部位は、「同一部位」と称される。複数の整列されたポリペプチド配列が、整列された部位において同一のアミノ酸残基を有するが、一つまたはそれ以上の他の整列されたポリペプチド配列が、整列された部位において異なる残基を有する場合、整列された部位は、「相同部位」と称される。このような場合、整列されたポリペプチド配列中で最も頻度の高いアミノ酸残基を「多数派コンセンサス残基」と呼ぶ。複数の整列されたポリペプチド配列が、整列された部位において同一のアミノ酸残基を全く有していない場合、この部位のことを「特異的」あるいは「非相同」部位と呼ぶ（以下で議論される「相同部位におけるコンセンサスアミノ酸残基」の定義も併せて参照されたい）。

10

【0030】

本明細書で使用されているように、「保護アミノ酸置換」およびこれに関連する用語は、一個の残基を、極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および／または両親媒性の特性において類似する他の残基へと置換することを指す。「保護的なアミノ酸置換」には、(i) アスパラギン酸およびグルタミン酸、(ii) リジンおよびアルギニン、(iii) ロイシン、イソロイシンおよびバリン、(iv) グリシンおよびアラニン、(v) アスパラギンおよびグルタミン、(vi) セリンおよびスレオニン、ならびに(vii) フェニルアラニンおよびチロシンが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0031】

その他のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する「百分率による配列同一性」という用語は、二つの配列を比較したときにそれぞれ同一となる、塩基またはアミノ酸残基の百分率を意味する。百分率による配列同一性は、当該技術分野において既知である、多くの異なる方法で決定することが可能である。百分率による配列同一性を特定するために有用なプログラムには、BLAST、FASTAおよびSmith-Watermanが含まれる。

30

【0032】

「非天然C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド」、「非天然C X C R 3 リガンド」の用語、あるいは、特に文脈が記述の欠落をほのめかしているこれらのバリエーションは、iTAC、IP-10、MIGまたはPF4などの天然発生C X C R 3 ポリペプチドリガンドに関連するポリペプチドではあるが、天然発生（または、「天然」）C X C R 3 ポリペプチドリガンドとは異なるポリペプチド配列を代わりに有しているポリペプチドを指す。このような非天然C X C R 3 ポリペプチドリガンドは、ポリペプチド配列を含有するキメラでもよく、ドメインまたはその他の非連続の構造的および／または機能的領域を含み、一つまたはそれ以上の天然発生C X C R 3 ポリペプチドリガンド由来でもよい。非天然C X C R 3 リガンドは、アミノ酸の置換、付加または欠失を含んでいてもよい。置換には、保護的な置換および非保護置換が含まれる。本発明の非天然C X C R 3 リガンドのポリペプチド配列には、例えば、複数の天然C X C R 3 リガンドをアラインすることにより決定された、コンセンサスアミノ酸残基を含んでいてもよい。

40

【0033】

「相同部位における、多数派コンセンサスアミノ酸残基」、「コンセンサス相同アミノ酸残基」という用語、またはこれらのバリエーションは、ポリペプチド配列整列における相同部位において（上記参照）もっとも頻繁に出現するアミノ酸残基を指す。以下の3種の仮想ポリペプチド配列の整列は、「相同部位におけるコンセンサスアミノ酸残基」の意味を更に説明するものである。

50

部位 :	1	2	3	4	5	6
配列 A :	G l y	- G l y	- H i s	- A l a	- P h e	- S e r
配列 B :	A l a	- G l y	- T r p	- I l e	- C y s	- S e r
配列 C :	A l a	- L y s	- P h e	- V a l	- P h e	- S e r
コンセンサス	A l a	- G l y	- X a a	- X a a	- P h e	- S e r

【0034】

上記の整列には3種のポリペプチド配列A、BおよびCが含まれている。整列された部位1は、整列された配列AではG l y、整列された配列Bおよび、整列された配列CではA l aに対応する。複数の整列されたポリペプチド配列（すなわち、BおよびC）が部位1において同一の残基を含むため、整列された部位1は「相同」であるとみなされる。したがって、部位1での「多数派コンセンサス」アミノ酸はA l aである。整列された部位2はG l yおよびL y sによって占められている。ここでは、相同部位における、多数派コンセンサス残基はG l yであるが、複数の整列された配列における部位2にこれが存在しているからである。部位3および4の場合、いずれの單一アミノ酸残基も、複数の整列された配列において発現していない。したがって、これらの部位は「相同」ではなく、むしろ「特異的」あるいは「非相同」である。部位3または4を占めるコンセンサスアミノ酸配列は選択されず、そのかわりに、「コンセンサス」配列は、その配列中に本来存在するアミノ酸残基を含むことになるであろう。整列された部位5は、整列された配列AおよびCにおけるP h eに対応し、整列された配列BにおけるC y sに対応する。したがって、コンセンサス残基はP h eである。整列された部位6は、整列されたそれぞれのポリペプチド配列においてS e rに対応している。したがって、整列された部位6は「同一」部位である。

10

20

30

40

50

【0035】

「天然N-ループ」という用語は、C X C R 3受容体に対するケモカイン結合を仲介する、特徴的なC-X-Cモチーフに対して、C X C R 3ポリペプチド下流領域（すなわち、C末端付近）を指す。i T A Cの場合、天然N-ループは、成熟i T A Cケモカインの12～17位に位置する6個のアミノ酸残基（I l e - G l y - P r o - G l y - V a l - L y s；配列番号14）を含む。

【0036】

「成熟ケモカイン」という用語は、N末端シグナルペプチドを欠損したケモカインポリペプチドを指す。本明細書で使用されているように、「成熟ケモカイン」は、例えば、細胞または無細胞系における成熟ポリペプチドの発現を促進するために、N末端メチオニンを任意で含んでいてもよい。

【0037】

「前駆体C X Cケモカイン」という用語、あるいは適切なバリエーションは、C X Cケモカインの形状であってもよく、シグナルペプチドのポリペプチド配列および成熟ポリペプチドを有するものを指すものである。

【0038】

「宿主細胞」という用語は、本発明のいずれかの組み換えベクターまたは単離されたポリヌクレオチドの受容体となり得る、あるいはなったことのあるいずれかの細胞を含している。宿主細胞には、単一の宿主細胞の子孫も含まれるが、この子孫は、自然発生的、偶発的または意図的な突然変異および/または変化により、必ずしも元の親細胞と（形態において、または全D N A相補体において）完全に同一でなくてもよい。宿主細胞には、インビオまたはインビトロでまたは本発明の組み換えベクターまたはポリヌクレオチドを使用して形質転換または感染させた細胞が含まれる。本発明の組み換えベクターを含む宿主は、「組み換え宿主細胞」である。

【0039】

「D N A調節配列」および「調節エレメント」は、本明細書中では同一の意味で使用され、促進剤、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナルなどの転写および翻訳調節配列を指すが、宿主細胞におけるエンコードする配列

の発現および／またはエンコードされるポリペプチドの産生を提供および／または調節する。

【0040】

「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、外因性ポリヌクレオチドを細菌性細胞または真核細胞にそれぞれ導入することを指す。

【0041】

非天然C X C R 3リガンドをエンコードするポリヌクレオチド配列に関し、「プロモーターに操作可能に連結した」とは、プロモーターがその転写または発現に影響を及ぼすように配置したことを意味する。

【0042】

「構築物」という用語は、特定のヌクレオチド配列の発現を生成する、あるいはその他の組み換えポリヌクレオチド配列の構築に使用される組み換えポリヌクレオチドであって、通常は組み換えDNAを指す。

【0043】

抗体結合に関する文脈における「特異的に結合する」という用語は、他の類似するポリペプチドまたはこれらのフラグメントと比較した場合、特定のポリペプチドまたはそれらのフラグメントに対する、抗体の高い親和力および／または高い結合親和性を指す。ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、微弱ではあるが検出可能なレベル（例えば、目的のポリペプチドに対して示される結合性の10%またはそれ以下）で、異なるポリペプチドと結合できる可能性がある。このような微弱な結合またはバックグラウンド結合は、例えば、適切な対照を用いることにより、目的のポリペプチドに対する特異的抗体結合とは容易に区別することができる。一般的に、特異的抗体は、少なくとも 10^{-7} M、少なくとも 10^{-8} M、あるいは更に少なくとも 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} Mなどの結合和親性を有する特定のポリペプチドに結合する。 10^{-6} Mまたはそれ以下の結合和親性を有する抗体は、一般的に、現在使用されている従来の手法を使用した場合に検出可能なレベルで抗体に結合しないであろうということから有用であるとはいえない。

【0044】

本明細書で使用されるように、「治療」、「治療すること」などの用語は、所望の薬理学的および／または生理学的効果に作用することを指す。この効果は、疾病、疾患、病状またはこれらの症状を、完全にあるいは部分的に防ぐという見地から予防的なものであってもよく、および／または、疾病、疾患、病状またはこれらの症状を、部分的にあるいは完全に治療するという見地から治療的なものであってもよい。本明細書で使用されるように、「治療」には、(a)生存期間を増加させること、(b)疾患による死亡リスクを低減すること、(c)疾患にかかりやすい可能性があるが、疾患を有していると診断されてはいない被験者において、疾患が発症することを予防すること、(d)疾患を抑制すること、すなわち、その進行を阻止すること、ならびに(e)疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退化を引き起こすこと、を包含する。

【0045】

「個人」、「被験者」、「患者」といった用語は本明細書では同一の意味で使用され、哺乳類を指すものであり、ヒト、靈長類、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ウマおよびロバがその例として含まれる。

【0046】

「治療上有効な量」という用語は、意図している、あるいは所望の治療効果を奏するために有効となる治療剤の量または治療剤の投与率を指す。厳密には所望の治療効果は、治療を受ける状態、投与される剤形、ならびに当業者により理解されるその他の因子の多様性により変化するであろう。

【0047】

「線維性症状」、「線維症」および「線維性疾患」という用語は、抗線維活性を有する化合物の投与により治療することが可能な疾病、疾患、症状を指し、同一の意味で使用される。線維症には、特発性肺線維症（IPF）および既存の病因による肺線維症を含む肺

10

20

30

40

50

線維症、肝線維症、ならびに腎線維症が含まれるが、これらに限定されない。その他の典型的な線維性症状には、筋骨格系線維症、心線維症、術後癒着、強皮症、縫内障およびケロイドなどの皮膚損傷が含まれる。

【0048】

「癌」「新生物」および「腫瘍」という用語は、本明細書において同一の意味で使用されるものであり、相対的に独立した成長を示す細胞を指し、したがってこれらは細胞増殖の調節の著しい欠如によって特徴づけられる異常成長の表現型を示す。がん性細胞は良性または悪性である。

【0049】

「化学療法剤」または「化学療法の」（あるいは、化学療法剤を用いた治療の場合は「化学療法」）という用語は、非タンパク性の（すなわち、非ペプチド性の）化合物であって、がんの治療に有用なものを包含する。化学療法剤の例は、国際特許出願 WO 2005 / 016241 号に開示されており、参照により本明細書に援用される。

10

【0050】

「生物学的反応修飾物質」という用語は、いずれかのタンパク性（すなわち、ペプチド性）分子またはいずれかの非タンパク性（すなわち、非ペプチド性）分子であって、がんの治療に関する生物学的反応を構築、あるいは変更することができるものを指す。生物学的反応修飾物質の例は、国際特許出願 WO 2005 / 016241 号に開示されており、参照により本明細書に援用される。

20

【0051】

本明細書での使用において、「I型インターフェロン受容体アゴニスト」、「II型インターフェロン受容体アゴニスト」および「III型インターフェロン受容体アゴニスト」という用語は、それぞれ、天然由来、あるいは非天然由来ヒトI型、II型、III型インターフェロン受容体のリガンドを指すものであり、これらは受容体に結合し、受容体を通じてシグナル伝達を生じる。I型、II型、III型インターフェロン受容体アゴニストの例は、国際特許出願 WO 2005 / 016241 号に開示されており、参照によりこれは本明細書に援用される。

20

【0052】

本発明は、特定の態様において記載されているものの、本発明はこれらの特定の態様に限定されないこと、ならびに、これらの特定の態様を記載するために使用される専門用語が限定することを意図するものではないことが理解される。

30

【0053】

特に定義しない限り、本明細書において使用される、すべての技術的ならびに科学的用語は、これに関する技術分野に属する当業者により一般に理解される意味を有している。本明細書において言及されるすべての文献は、その文献が引用されることに関連する方法および/または物質を開示および記述するために参考することによりここに援用される。

30

【0054】

最後に、本明細書および添付される特許請求の範囲における使用されているように、単数形の「a」、「a n」および「t h e」は、文脈中でそうではないことが明らかである場合以外は、複数を指示する場合を包含することに留意しなければならない。したがって、例えば、参考例として「非天然 C X C R 3 リガンド」は複数のこのようないガンドを含むものであり、参考例として「製剤 (t h e f o r m u l a t i o n)」は、当業者により知られる一種またはそれ以上の製剤等の等価物が含まれる。

40

【0055】

本発明は、非天然 C X C R 3 ポリペプチド受容体リガンド、このようないガンドをエンコードするポリヌクレオチド、ならびに化合物、製剤、および、これらの使用方法を提供する。非天然 C X C R 3 リガンドの特段の特徴は、これらが C X C R 3 リガンドの天然 N - ループポリペプチド配列である i T A G を含んでいることである。i T A C の N - ループは、C X C R 3 受容体に対する、ケモカインの比較的高い親和性に関連している。

50

【0056】

天然 i T A G N - ループは、様々な天然または非天然 C X C R 3 リガンドの C X C R 3 受容体に対する特異性または親和性を改善し、こうした C X C R 3 リガンドのより強力なバージョンを生み出すであろう。このようにして、本発明は、高い親和性および / または特異性を有するバージョンの I P - 1 0 、 M I G 、 P F 4 、または、天然 i T A G N - ループを含むその他の C X C R 3 リガンドを提供する。また、本発明は、天然 i T A G N - ループを有する C X C R 3 受容体リガンドの高い親和性および / または特異性を有する変異体またはキメラ型を提供するが、これらのいくつかは本明細書に記載されている。こうした、高い親和性および / または特異的受容体リガンドは、血管新生の阻止、 T h - 1 仲介免疫応答の誘導、ならびに、 C X C R 3 リガンド発現に関連するすべての有益な効果の増強に有用である。

10

【0057】

i T A C N - ループ配列 (I l e - G l y - P r o - G l y - V a l - L y s ; 配列番号 1 4) は、天然発生 i T A C のポリペプチド配列内と実質的に同一の位置における非天然 C X C R 3 リガンド、すなわち、成熟 C X C R 3 リガンドポリペプチド配列の 1 2 ~ 1 7 位に位置している。これらの配置は、特徴的な C - X - C モチーフに対して下流 (C 末端) である。しかしながら、非天然 C X C R 3 ポリペプチドにおける i T A G N - ループの相対位置は、非天然 C X C R 3 リガンドの N - 末端により近接するか否かにおいて変化し得る。例えば、 i T A G N - ループは、本発明の非天然 C X C R 3 受容体リガンドのアミノ酸残基 8 ~ 1 3 、 9 ~ 1 4 、 1 0 ~ 1 5 、 1 1 ~ 1 6 、 1 3 ~ 1 8 、 1 4 ~ 1 9 、 1 5 ~ 2 0 または 1 6 ~ 2 1 位に配置され得るであろう。こうした再配置は、それより非天然 C X C R 3 リガンド内の i T A C の N - ループに隣接するアミノ酸残基が得られる、 C X C R 3 ポリペプチドの内因性 N - ループの位置と一致ことが望ましい可能性がある。

20

【0058】

i T A C の N - ループポリペプチド配列 I l e - G l y - P r o - G l y - V a l - L y s (配列番号 1 4) に加えて、本発明の非天然 C X C R 3 リガンドは、さらなる i T A G 由来アミノ酸残基を含有していてもよい。一つの実施例において、本発明の非天然 C X C R 3 リガンドは、ポリペプチド配列 P h e - P r o - M e t - P h e - L y s - A r g - G l y - A r g - C y s - L e u - C y s - I l e - G l y - P r o - G l y - V a l - L y s (配列番号 1 5) をはじめの 1 7 個のアミノ酸として含むが、これらはすべて天然 i T A C (すなわち、残基 1 ~ 1 7) であり、 1 2 ~ 1 7 位 (下線で表示) で N - ループを含んでいる。したがって、この配列は、 i T A C 以外の C X C R 3 リガンドに由来する、本発明の非天然 C X C R 3 リガンドの対応する N 末端 ~ N - ループ配列に取って代わるであろう。その他の態様において、リガンドの成熟型に対してメチオニン残基が 1 位に存在してもよい。

30

【0059】

本発明の非天然 C X C R 3 リガンドのその他の態様は、天然 i T A C N - ループを、 i T A C の N 末端隣接アミノ酸残基の一部のみ、例えば、残基 2 ~ 1 7 、 3 ~ 1 7 、 4 ~ 1 7 、 5 ~ 1 7 、 6 ~ 1 7 、 7 ~ 1 7 、 8 ~ 1 7 、 9 ~ 1 7 、 1 0 ~ 1 7 または 1 1 ~ 1 7 とともに含有している。本発明の非天然 C X C R 3 リガンドのその他の態様は、 N - ループに関する C 末端である i T A C アミノ酸残基を含んでいる。このような残基には、アミノ酸残基 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 および i T A C 内の N - ループに隣接する残基が含まれるが、これらに限定されない。 i T A C 由来 C 末端残基は、前述の i T A C 由来 N 末端残基に加えて、または代わりとして、非 i T A C である本発明の非天然 C X C R 3 リガンド中に存在し得る。

40

【0060】

i T A C N - ループの場合と同様に、隣接する N 末端または C 末端残基を伴う i T A C N - ループの相対位置は、非天然 C X C R 3 リガンドの N - 末端により近接するか否かにおいて変化し得る。もちろん、当業者であれば、本発明の非天然 C X C R 3 リガンド

50

が、成熟 i T A C リガンドの完全 N 末端ポリペプチド配列、すなわち残基 1 ~ 17 またはそれ以上、をどの位置に含んでいるかを理解するであろうが、N - ループの配置を非天然 C X C R 3 リガンドに関連してシフトすることは非現実的であるかもしれない。

【 0 0 6 1 】

文脈に規定されない限り、本明細書に記載されるいづれの非天然 C X C R 3 リガンドであっても、非 i T A C C X C R 3 リガンドの整列された部位における天然アミノ酸に対する代替として、i T A C N - ループ隣接型 N 末端および / または C 末端残基を含んでもよい。

【 0 0 6 2 】

非天然 C X C R 3 ポリペプチドリガンドは、更に、一つまたはそれ以上の C X C リガンド由来配列を含んでもよい。好ましくは、これらのリガンドは i T A C 、 M I G 、 I P - 10 または P F 4 などの非 E L R C X C R 3 リガンドであり、得られるポリペプチド配列は、i T A C を含む天然 C X C R 3 リガンドのポリペプチド配列と同一ではないとの条件を満たす。いくつかの場合、さらなるポリペプチド配列は複数の非 E L R C X C R 3 リガンドに由来するキメラ型である。キメラ型非天然 C X C R 3 リガンドは、国際特許出願 WO 2005 / 016241 号に開示されており、参照により本明細書に援用される。

10

【 0 0 6 3 】

本発明の非天然 C X C R 3 ポリペプチドリガンドは、代替的に、あるいは付隨的に、多数派コンセンサスアミノ酸残基を含んでいる。多数派コンセンサスアミノ酸残基は、例えば、 B L A S T 、 F A S T A または S m i t h - W a t e r m a n などの当該技術分野において既知のアルゴリズムを使用して、各対応付けられた部位におけるアミノ酸残基を比較して、複数の C X C R 3 リガンドを対応付けることにより特定される。

20

【 0 0 6 4 】

特定の態様において、非天然 C X C R 3 リガンドは、先の定義のように、コンセンサス残基を相同部位でのみ含有している。本発明のいくつかの態様において、相同部位にあるすべての残基が、コンセンサス残基により置換されている。その他の態様においては、相同残基のサブセットのみがコンセンサス残基と置換されており、他は置換されていない。後者の場合、コンセンサス残基により置換されない部位は (i T A C N - ループを除く) 、対応付けられた部位に存在するいかなるアミノ酸残基を含んでもよい。

30

【 0 0 6 5 】

本発明のいくつかの態様において、非天然 C X C R 3 リガンドにおける「特異的」な残基は、同一の天然 C X C R 3 リガンドに由来する。その他の態様において、特異的な残基は、複数の天然 C X C R 3 リガンドに由来する。特定の態様において、特異的な残基は I P - 10 、 M I G 、 i T A C またはこれらの組み合わせに由来する。更に別の態様において、特異的な残基は、本明細書において記載されるものに限定されないその他の C X C リガンドに由来する。すべての場合において、本発明の非天然 C X C R 3 リガンドは、天然 i T A C N - ループを含有している。

30

【 0 0 6 6 】

本発明は、更に、天然 i T A C N - ループ配列以外においてアミノ酸の置換、欠失および挿入を含む上述の非天然 C X C R 3 リガンドの変異体を提供するが、このような変異が、 C X C R 3 (C D 183) 受容体に結合するリガンドの能力を除去させることなく、炎症に関連するエフェクター T 細胞の走化性移動を誘導することを提供する。このような変異体は、上述および明細書全体に渡って定義したように、保護的な置換および / または保護的でない置換を含むものであってもよい。保護的な置換の例は、上述している。

40

【 0 0 6 7 】

非天然 C X C R 3 リガンド

本願のポリペプチドの例は、添付の図面および配列リストに示している。これらの配列は、 G e n B a n k で見られる天然ヒト I P - 10 、 M I G 、および i T A C のアミノ酸配列由来である。例えば、 I P - 10 は、受入番号 P 0 2 7 7 8 、 N P _ 0 0 1 5 5 6

50

および 1 3 1 2 3 5 6 A として G e n B a n k において見られる。これらの配列中、アミノ酸残基 1 ~ 2 1 はシグナル配列であり、一方、アミノ酸残基 2 2 ~ 9 8 は I P - 1 0 の成熟領域である。M I G は、受入番号 N P _ 0 0 2 4 0 7 および Q 0 7 3 2 5 として G e n B a n k において見られる。これらの配列中、アミノ酸残基 1 ~ 2 2 はシグナル配列であり、成熟 M I G はアミノ酸 2 3 ~ 1 2 5 である。i T A C は、受入番号 Q 1 4 6 2 5 および A A D 3 8 8 6 7 として G e n B a n k において見られる。これらの配列中、アミノ酸残基 1 ~ 2 1 はシグナル配列であり、成熟 i T A C はアミノ酸 2 2 ~ 9 4 である。なお本明細書に記載される配列は成熟 C X C ケモカインの配列であり、成熟ポリペプチドの第 1 アミノ酸残基は、1 位に指定される。

【 0 0 6 8 】

10

同一、多数派コンセンサス、および特異的な残基間における差異を示すために、I P - 1 0 、M I G および i T A C の L A Z E R G E N E 6 整列を図 1 に示す。全 3 種の C X C R 3 リガンドにおいて同一残基により占められているアミノ酸位置は、ミディアムグレーの陰影で示している。この同一残基は、「多数派」ポリペプチド配列中においても特定されるが、これは整列の上方に位置する。

【 0 0 6 9 】

相同部位における多数派コンセンサス残基は、ライトグレーの陰影で示しているが、最も頻繁に現れる（すなわち、コンセンサス）残基は「多数派」ポリペプチド配列中に示される。

【 0 0 7 0 】

20

相同部位における特異的な残基は、ダークグレーの陰影で示している。「X」（すなわち、「X a a」）は、多数派ポリペプチド配列中に現れるが、こうした残基は本発明の非天然 C X C R 3 ポリペプチドリガンドにおいてコンセンサス残基へと変化しないこと示している。その代りに、こうした残基は、いずれかの整列された配列内の整列された部位に存在するいずれかの残基から選択される。

【 0 0 7 1 】

以下の表は、同一 (I) 、相同 (H) 、および特異的 (U) アミノ酸残基部位の位置を、図 1 に示される i T A C 、 I P - 1 0 および M I G ポリペプチドの整列に基づきまとめたものである。また、この表は、ポリペプチドの前駆体フォーム中のこれらのアミノ酸残基部位と、ポリペプチドの成熟型中の対応部位とを関連付けている。9 0 ~ 1 1 6 位における整列内のギャップは表より除外された。

30

【 0 0 7 2 】

【表1】

図1における部位	成熟における対応する部位	I	H	U	図1における部位	成熟における対応する部位	I	H	U
23	1			X	62	40	X		
24	2	X			63	41		X	
25	3		X		64	42	X		
26	4		X		65	43		X	
27	5		X		66	44	X		
28	6			X	67	45		X	
29	7		X		68	46		X	
30	8	X			69	47		X	
31	9	X			70	48		X	
32	10			X	71	49		X	
33	11	X			72	50			X
34	12	X			73	51		X	
35	13		X		74	52		X	
36	14			X	75	53	X		
37	15			X	76	54	X		
38	16			X	77	55	X		
39	17			X	78	56	X		
40	18			X	79	57			X
41	19		X		80	58	X		
42	20			X	81	59		X	
43	21			X	82	60			X
44	22			X	83	61			X
45	23		X		84	62		X	
46	24		X		85	63			X
47	25		X		86	64		X	
48	26		X		87	65		X	
49	27		X		88	66	X		
50	28			X	89	67		X	
51	29		X		117	95		X	
52	30			X	118	96			X
53	31			X	119	97		X	
54	32		X		120	98			X
55	33	X			121	99			X
56	34			X	122	100			X
57	35			X	123	101		X	
58	36	X			124	102		X	
59	37			X	125	103			X
60	38		X		126	104			X
61	39		X						

10

20

30

【0073】

図2～図5は、本発明のいくつかのポリペプチドおよび先に記載したポリペプチド間の関係を示している。図2～図5に示す配列はすべて成熟型である（すなわち、これらはシグナルペプチドを欠いている）。

【0074】

図2は、iTACに関連または由来する3種のポリペプチドを示す。配列番号1は天然iTACである。天然iTAC N-ループには下線が付してある。配列番号2は「コンセンサスiTAC」であって、その中の天然iTACのアミノ酸残基は、iTAC、MIGおよびIP-10（図1を参照）における相同部位に存在する多数派コンセンサス残基と置換されている。コンセンサスiTACは、N-ループ領域においてアミノ酸置換を含んでいるが、ただし、天然iTAC N-ループの第2アミノ酸部位にあるGlyはコンセンサスSer残基（下線、イタリック体）により置換されている。配列番号3は、本発明の非天然CXCR3リガンドの一例である。配列番号3は、天然iTAC N-ループ（下線）を含むことを除き、配列番号2に類似している。

40

【0075】

図3は、IP-10に関連または由来する4種のポリペプチドを示している。配列番号

50

4は天然IP-10である。配列番号5は「コンセンサスIP-10」であって、その中の天然IP-10のアミノ酸残基は、iTAC、MIGおよびIP-10(図1参照)における相同部位に存在するコンセンサス残基と置換されている。配列番号6および10は、本発明の非天然CXC3リガンドの例である。配列番号6において、天然iTAC N-ループ(下線)はコンセンサスIP-10ポリペプチド配列中に挿入されている。配列番号10において、天然iTAC N-ループ(下線)は天然IP-10ポリペプチド配列中に挿入されている。

【0076】

図4は、MIGに関連または由来する4種のポリペプチドを示している。配列番号7は天然MIGである。配列番号8は「コンセンサスMIG」であって、その中の天然MIGのアミノ酸残基は、iTAC、MIGおよびIP-10(図1参照)中の相同部位に存在するコンセンサス残基と置換されている。配列番号9および11は、本発明の非天然CXC3リガンドの例である。配列番号9において、天然iTAC N-ループ(下線)はコンセンサスMIGポリペプチド配列中に挿入されている。配列番号11において、天然iTAC N-ループ(下線)は天然MIGポリペプチド配列中に挿入されている。

10

【0077】

図5は、PF4に関連または由来する2種のポリペプチドを示している。配列番号12は天然PF4であり、iTAC、MIGおよびIP-10に関連するCXC3リガンドであるが、これらのリガンドに対する構造上の類似性が低減したものである。配列番号13は、本発明の非天然CXC3リガンドの例であるが、この中において、天然iTAC N-ループ(下線)はPF4ポリペプチド配列中に挿入されている。

20

【0078】

上記のように、図2～図5は、シグナルペプチドを欠く成熟CXC3リガンドのポリペプチド配列を示している。シグナルペプチドは、タンパク質分解的に、翻訳時または翻訳後にシグナルペプチドを有する前駆体ペプチドから除去されるが、CXC3リガンドの成熟ポリペプチド配列は、N末端メチオニン残基を通常欠損している。しかしながら、本発明は、いずれかの非天然CXC3リガンドの成熟型を含んでおり、それは本開示により記載され実施可能であり、ならびに、さらに、N末端メチオニンを含んでいるが、これは、翻訳時または翻訳後の処理を必要とせずにリガンドの成熟型の発現を可能とするために加えられてもよい。

30

【0079】

ポリペプチドの修飾

いくつかの態様において、非天然CXC3ポリペプチドリガンドは一つまたはそれ以上の修飾を含む。一次アミノ酸配列を変化させるまたは変化させないことが可能な対象となる修飾には、ポリペプチドの化学的誘導体化、例えばアセチル化またはカルボキシル化；グリコシル化部位(糖鎖付加部位)を導入または除去するアミノ酸配列における変化；PEG付加(ポリエチレングリコール部分の付加)を起こしやすいタンパク質を作り出すようなアミノ酸配列における変化、などが含まれる。ある態様において、本発明は、一つまたはそれ以上の非天然発生グリコシル化および/またはPEG付加部位であって、この部位は低減された血清クリアランスを有するグリコシル-および/またはPEG-誘導化ポリペプチドが提供されるように設計されているもの、を有する非天然CXC3リガンド変異体の使用を意図している。したがって、本発明はPEG化非天然CXC3リガンドを含んでいる。同様に含まれるものは、グリコシル化、リン酸化、スルホン化/硫酸化、アミド化、アシル化、アセチル化、メチル化、水酸化、ADP-リボシル化、カルボキシル化、アデニル化、ユビキチン化、ファネシル化、プレニル化、金属添加、成熟、タンパク質分解切断、およびその他の既知であるが列挙していない、ポリペプチドに対する付加および/またはサブトラクション(削減)である。

40

【0080】

いくつかの態様において、非天然CXC3リガンドポリペプチドは、非天然CXC3リガンドポリペプチドと非相同ポリペプチド(例えば、融合パートナー)との融合ポリ

50

ペプチドである。好適な融合パートナーには、インビオにおいて増強された安定性の授与、単離および/または精製の促進、検出可能なシグナルの提供、多量化の提供するもの、あるいは、適切な翻訳時および/または翻訳後の処理の誘導(例えば、シグナルペプチド)を行なうペプチドおよびポリペプチドが含まれる。融合タンパク質は、細胞より融合タンパク質の分泌を提供するアミノ酸配列(例えば、米国特許第、712,113号参照)を含むもの、あるいはプロテアーゼ切断部位を提供するものであってもよい。融合パートナーおよび本発明の実施に有用なポリペプチドへの修飾の例は、国際特許出願 WO 2005/016241号にも開示されており、参照により本明細書に援用される。

【0081】

ポリヌクレオチド、ベクターおよび宿主細胞

本発明はさらに、本発明の非天然 CXCR3リガンドをエンコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドおよびこうしたポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。ポリヌクレオチドは、対象の発現ベクターおよび組み換えが行われた宿主細胞の作成に有用であり、これらは本発明の非天然 CXCR3リガンドの製造に有用である。

【0082】

したがって、対象の発明は非天然 CXCR3リガンドをエンコードするヌクレオチド配列を含む核酸、ならびにこのような核酸に対して実質的に核酸配列同一性を有する核酸(例えば、相同体)を提供する。多くの態様において、対象の核酸は、非天然 CXCR3リガンドをエンコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含み、これは、非天然 CXCR3リガンドをエンコードするヌクレオチド配列に(例えば、CXCR3をコードする配列を有する)またはそれらの相補的配列を有するヌクレオチド配列同一性の、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%または少なくとも約99%、あるいはそれ以上を有している。配列同一性を特定するアルゴリズムは、当該技術分野において知られており、そのいくつかは本明細書に記載している。

【0083】

同様に提供されるものは、厳密な状況下で上述の核酸にハイブリッドする核酸である。厳密なハイブリッド状態の例は、50以上ならびに0.1×SSC(15mM塩化ナトリウム、1.5mMクエン酸ナトリウム)における混成である。厳密なハイブリッド状態のその他の例は、溶液中:50%ホルムアミド、5×SSC(150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt溶液、10%硫酸デキストラン、および20μg/ml変性せん断精子DNAにおいて42で一晩のインキュベーションを行い、続いて0.1×SSC中、約65でフィルター洗浄をする。厳密なハイブリッド状態とは、少なくとも上記の代表的な状況下と少なくとも同程度の厳密であるようなハイブリッド状態である。その他の厳密なハイブリッド状態は、当該技術分野において知られており、こちらも本発明の特定の態様の核酸を特定するために採用してもよい。

【0084】

非天然 CXCR3ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド誘導体もまた、国際特許出願 WO 2005/016241号にも開示されており、参照により本明細書に援用される。

【0085】

本発明はまた、非天然 CXCR3ポリペプチドリガンドをエンコードするポリヌクレオチドを含むウィルスベクターを含んでいる。遺伝子輸送における使用のためのウィルスベクターには、レトロウィルスベクター(レンチウィルスベクターを含む)、アデノウィルスベクター、アデノ随伴ウィルスベクター、ヘルペスウィルスベクターおよびポックスウィルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。その他の多くのウィルスにおいて、細胞における対象の遺伝子を発現できることが既に証明されており、こうした組み換えウィルスベクターの構造は、本発明の一部を構成するものではない。

【0086】

10

20

30

40

50

ウィルスベクターを選択する基準には、患者間においても変化する可能性がある、ウィルスの細胞型特異性；所望の発現レベルおよび特定のウィルスベクターを使用することにより可能な発現レベル；特定のウィルスベクターが溶菌、アポトーシスまたはその他の様式による細胞死を引き起こす傾向；十分な量および質のウィルスベクター製造の容易性；特定のウィルスベクターに対する免疫応答の範囲、；ならびに、適切に折りたたまれ、翻訳後修飾され、そして活性ペプチドを製造するための特定のウィルスベクターの相対的能力；が含まれるが、これらに限定されない。ウィルスベクターならびに特定のウィルスベクターの有利な点および不利な点は当該技術分野でよく知られており、本発明の一部を構成するものではない。

【0087】

10

非天然 CXCR3 ポリペプチドリガンドの調製

対象非天然 CXCR3 リガンドは、化学合成法、標準的な組み換え技術による生成、およびこれらの組み合わせを含む、いずれかの既知の方法を用いて調製される。例えば、非天然 CXCR3 リガンドは、自動化固相 *t e r t* - ブチルオキシカルボニルおよびベンジル保護ストラテジーを用いて合成することができる。非天然 CXCR3 リガンドは、天然化学的連結反応により合成することができる、例えば、長さが約 15 ~ 約 40 個のアミノ酸であるフラグメント（例えば、長さが約 15 ~ 約 20 個、約 20 ~ 25 個、約 25 ~ 30 個、約 30 ~ 35 個、あるいは、約 35 ~ 40 個のアミノ酸であるフラグメント）は、化学合成の標準的な手法を用いて合成することができる、このフラグメントは、Dawsonら（1994年）Science 266巻：第 776 ~ 779 ページ、に記載の方法を用いて結紮される。合成されたポリペプチドの純度は、逆相 HPLC および等電点電気泳動法により評価することができる。リガンドの一次構造は、Edman シーケンス法により確認することができる。

20

【0088】

多くの態様において、非天然 CXCR3 リガンドをエンコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターは、従来の方法を用いて調製され、宿主細胞に導入される。この発現ベクターは宿主細胞中に非天然 CXCR3 リガンドの製造を提供する。

【0089】

30

したがって、本発明は、非天然 CXCR3 リガンドを製造する方法を提供するが、この方法には、宿主細胞により非天然 CXCR3 リガンドが好適に製造される条件下で、CXCR3 リガンドをエンコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含有する宿主細胞を培養すること、ならびに、培養物から（例えば、宿主細胞溶解物および / または培地から）非天然 CXCR3 リガンドを単離することが含まれる。この方法は、真核細胞または原核細胞を用いて行われる。

【0090】

ポリペプチドは、発現の目的により、従来の方法に従って原核生物または真核生物中で発現される。本発明の非天然 CXCR3 ポリペプチドを発現する方法は、国際特許出願 WO 2005 / 016241 号に開示されており、参照により本明細書に援用される。

【0091】

40

本発明は、非天然 CXCR3 リガンドを含有する組成物をも提供する。CXCR3 リガンドは多くの態様において純粋、例えば、少なくとも約 90 % の純度（非 - CXCR3 リガンドポリペプチドおよび / またはその他の巨大分子を含まない）、少なくとも 95 % の純度、少なくとも 98 % の純度または少なくとも 99 % の純度、あるいは、99 % を超える純度であろう。

【0092】

50

対象の CXCR3 リガンド組成物は、CXCR3 リガンドに加えて、一つまたはそれ以上のバッファー、塩、pH 調整剤、可溶化剤、キレート剤、洗剤、非イオン性洗剤、プロテアーゼ阻害剤、アジュバントなどを含有する。

【0093】

いくつかの態様において、対象の組成物は、対象の CXCR3 リガンドおよび医薬的に

許容可能な賦形剤を含む。医薬的に許容可能な賦形剤は、多岐にわたり当該技術分野において知られているため、本明細書において詳細を議論する必要はない。医薬的に許容可能な賦形剤は、例えば、A. Gennaro (2000年) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy"、第20版、Lippincott、Williams & Wilkins; Pharmaceutical Dosage forms and Drug Delivery Systems (1999年) H. C. Ansalら、第7版、Lippincott、Williams & Wilkins; および、Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000年) A. H. Kibbeら、第3版、American Pharmaceutical Association を含む、様々な文献に十分記載されている。

10

【0094】

抗体組成物

さらに提供されるものは、非天然CXCR3リガンドポリペプチドに特異的に結合する抗体である。好適な抗体は、非天然CXCR3リガンド全体またはその一部を含有するペプチドで宿主動物に免疫性を与えることにより得られる。好ましい宿主動物には、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ハムスターおよび抗体の製造に使用される他の動物が含まれる。当該技術分野においてよく知られる標準的な方法を用いて、この抗体を製造し、選別し、そして単離する。この抗体を、さらに精製または分画してもよい。

20

【0095】

さらに提供されるものは、対象の抗体を含む組成物である。対象の抗体組成物は、対象の抗体に加え、一つまたはそれ以上のバッファー、塩、pH調整剤、可溶化剤、キレート剤、洗剤、非イオン性洗剤、プロテアーゼ阻害剤などを含有する。

【0096】

抗体製造用の動物に免疫性を与えるために使用する免疫源には、本発明のいずれかの非天然CXCR3リガンドの前駆体または成熟型、あるいはこれらのフラグメントまたは誘導体が含まれていてもよい。典型的な免疫源にはタンパク質の全部または一部が含まれており、これらの残基は、天然標的タンパク質上に見られる翻訳後修飾、またはこうした修飾の部位を含む。免疫源は当該技術分野において知られている様々な方法、例えば、従来の組み換え方法を用いてクローニングした遺伝子の発現、非天然CXCR3リガンドポリペプチドの化学合成などにより製造される。

30

【0097】

本発明の好ましい態様において、免疫源は、少なくとも一部が天然CXCR3リガンドとは異なっている非天然CXCR3ポリペプチドリガンド配列の一部を含む。例えば、抗体源は、別のCXCR3リガンド由来フランкиング配列を伴うiTAC-N-ループ配列を含むこともあり得る。こうした免疫源は15、20、25個またはそれ以上の長さのアミノ酸残基であってもよいが、長さは本発明において特に重要ではない。

【0098】

本発明の抗体を調製する方法、および本発明に含まれる抗体の種類は、国際特許出願WO2005/016241号にさらに開示されており、参照により本明細書に援用される。免疫源は、ハプテンまたは担体へと融合あるいは付着される可能性があること、ならびに、ミョウバン、デキストラン、硫酸塩、巨大高分子アニオン、水と油のエマルジョン、例えばフロイントアジュバント、完全フロイントアジュバントなどのアジュバントと共に動物に投与される可能性があることが理解されるであろう。

40

【0099】

使用方法

CXCR3リガンドは、線維症に関連し、コラーゲン疾患、間質性肺炎、ヒト線維性肺疾患（例えば、閉塞性細気管支炎、特発性肺線維症、既存の病因に起因する肺線維症、肺疾患における腫瘍間質、肺を侵襲する全身性強皮症、ハーマンスキー-パドラック症候群、炭坑作業員塵肺症、アスベスト症、珪肺症、慢性肺高血圧症、AIDSに関連する肺高

50

10 血圧症、サルコイドーシスなど)、線維性血管障害、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、静脈瘤、心筋梗塞、脳梗塞、心筋線維症、筋骨格系線維症、手術後の癒着、ヒト腎臓病(例えば、腎炎症候群、アルポート症候群、HIVに関連するネフロパシー、多発性囊胞、ファブリー病、糖尿病性ネフロパシー、慢性糸球体腎炎、全身性ループスに関連する腎炎など)、皮膚ケロイド形成、全身性進行性硬化症(PSS)、原発性硬化性胆管炎(PSC)、肝線維症、肝硬変、腎線維症、肺線維症、囊胞性線維症、慢性の移植片対宿主拒絶反応、強皮症(局所性および全身性)、甲状腺眼症、糖尿病網膜症、線内障、ペイロニー病、陰茎線維症、膀胱鏡を使用する検査後の尿道狭窄症、手術後の内部付着、瘢痕、骨髄線維症、特発性腹膜後線維化症、既存の病因による腹膜線維症、薬剤誘発によるエルゴチン中毒、良性または悪性がんに伴う線維症、微生物感染に伴う線維症(例えば、ウィルス性、細菌性、寄生性、真菌性など)、アルツハイマー病、炎症性大腸炎に伴う線維症(クローン病および顕微鏡的大腸炎における狭窄形成を含む)、化学的または環境障害(例えば、がんの化学的療法、農薬、放射線(例えば、がんの放射線療法)など)に伴う線維症などを含むが、これらに限定されない。

【0100】

20 本発明は、線維症に感染している、あるいは線維症を発症する恐れのある個人における線維症を治療する方法を提供する。この方法には、通常、本発明の非天然CXC3リガンドの有効量を投与することが含まれる。この方法は、特発性肺線維症、既知の病因による肺線維症などの肺を侵襲するもの、肝線維症または肝硬変、心臓および腎性の線維症を含む、線維症の治療を提供する。病因は、毒性、代謝性、遺伝性および感染性の病因を含む、急性または慢性のいずれかの障害であり得る。関連するが、異なる非天然CXC3リガンドの使用は、国際特許出願WO2005/016241号に開示されており、参考により本明細書に援用される。

【0101】

30 いくつかの態様において、非天然CXC3リガンドの有効量とは、線維症を患っている個人に投与した場合に、治療前の個人における線維症の程度と比較して、あるいは、非天然CXC3リガンドによる治療を行なわない場合に患者が経験したであろう線維症の進行速度と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、または少なくとも50%、あるいはそれ以上で線維症を軽減、または線維症の進行速度を低減させるために有効な量である。

【0102】

40 いくつかの態様において、非天然CXC3リガンドの有効量とは、線維症を患っている個人に投与した場合に、治療前の個人における臓器機能の基礎レベルと比較して、あるいは、非天然CXC3リガンドによる治療を行なわない場合に個人が経験したであろう臓器機能における悪化速度と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、または少なくとも50%、あるいはそれ以上により、線維症に感染した臓器(例えば、肺、肝臓、腎臓など)の少なくとも一つの機能の悪化速度を増加または減少させるために有効な量である。

【0103】

任意の臓器における線維症の範囲を測定する方法、ならびに、いずれかの任意の臓器の機能を測定する方法は、当該技術分野において熟知されている。

【0104】

併用療法

いくつかの態様において、本発明は線維症の治療に対する併用療法を提供する。すなわち、本発明は線維症を治療する方法を提供するものであり、一般的には、第2治療剤を用いる併用療法において非天然CXC3リガンドを投与することを含む。好適な第2治療剤には、I型インターフェロン受容体アゴニスト、II型インターフェロン受容体アゴニスト、II型インターフェロン受容体アゴニスト、ピルフェニドンまたはピルフェニド

ン類似体、TNFアンタゴニスト、TGF-アンタゴニスト、エンドセリン受容体アンタゴニスト、ストレス活性化プロテインキナーゼ阻害剤などが含まれるが、これらに限定されない。本発明の組成物との使用に適する併用療法は、国際特許出願WO2005/016241号に開示されており、参照により本明細書に援用される。

【0105】

遺伝子治療

非天然CXCR3ポリペプチドリガンド投与の代替は、このようなリガンドをエンコードするポリヌクレオチドを標的となる組織または細胞（即ち、治療または予防されるべき特定の疾患に冒された細胞）に投与することである。多数のウイルスおよび非ウイルス発現は、当該技術分野において知られており、標的細胞および組織へ遺伝子を輸送するために使用されてきている。非ウイルスベクターには多様な発現ベクターが含まれるが、これらはトランスフェクション、形質導入、バリストイックデリバリーなどを介して個人の細胞に輸送されることが可能である。ウイルスベクターには、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスなどのレトロウイルス、ならびに、その他の遺伝子組み替えウイルスゲノムをベースとするベクターが含まれる。

【0106】

非天然CXCR3ポリペプチドリガンドの場合、このようなベクターは、シグナルペプチドを含んでいるポリペプチドの前駆体型、あるいはシグナルペプチドを欠損している成熟ポリペプチド型のいずれかを発現する。非天然CXCR3ポリペプチドリガンドの前駆体型の輸送は、適切な翻訳中および翻訳後の処理の発生を促進する傾向が強く、なぜならば、シグナルペプチドは、細胞中の正しい処理工程を通して新生ポリペプチド鎖を導くものと思われる。その後、シグナルペプチドは細胞性酵素により切断される。

【0107】

もう一方では、成熟型の非天然CXCR3ポリペプチドリガンドは、標的細胞に輸送される可能性がある。この場合、ポリペプチドの輸送に使用されるベクターは、成熟型の非天然CXCR3ポリペプチドリガンドのポリペプチド配列の前にN末端のMetを含むポリペプチドをエンコードするであろう。

【0108】

用量、剤型および投与経路

任意に一つまたはそれ以上の追加の治療薬との組み合わせの非天然CXCR3リガンドは、必要とする個人に製剤として投与される。多岐にわたる医薬的に許容可能な賦形剤は当該技術分野において知られているので、本明細書において議論する必要はない。医薬的に許容可能な添加物は様々な文献に十分に記載されており、例えば、A. Gennaro (2000年) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy"、第20版、Lippincott, Williams & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999年) H. C. Anselら、第7版、Lippincott, Williams & Wilkins; およびHandbook of Pharmaceutical Excipients (2000年) A. H. Kibbeら、第3版、Amer. Pharmaceutical Assoc. が含まれる。

【0109】

対象の方法において、活性薬剤は、所望の治療効果を生じることができるいずれかの都合のよい手段によって宿主に投与することが可能である。したがって、薬剤は、治療用の投与のために様々な剤型に組み込むことが可能である。特に、本発明の薬剤は、適切な医薬的に許容可能な担体または希釈剤と組み合わせることにより、医薬組成物として調剤することが可能であり、固体、半固体、液体または気体の形状、例えば、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、溶剤、座薬、注射剤、吸入剤およびエアゾールなどとして製剤に調剤できる。

10

20

30

40

50

【0110】

このように、薬剤の投与は、経口、口腔、直腸、非経口、腹腔内、皮内、静脈内、皮下、筋肉内、腫瘍内、経皮、気管内などの投与を含む様々な方法により実現することができる。非天然CXC₃リガンドの投与は、国際特許出願 WO 2005/016241号に開示されており、参照により本明細書に援用される。

【0111】

本発明は、それらの特定の態様を参照しながら記載されているものの、本発明の権利範囲および真の精神から逸脱することなしに、等価物に置き換えることが可能であること、そして、種々の変更を行なうことが可能であることは、当業者により理解されるべきである。さらに、特定の状況、素材、物質の組成、製造過程、製造工程または工程、本発明の対象、精神および権利範囲に適応させるために多くの修正が行われ得る。これらの修正はすべて、本明細書に添付される特許請求の範囲の権利範囲内にあることを意味する。

10

【実施例】

【0112】

実施例1：腫瘍形成用動物モデル

いくつかの態様において、非天然CXC₃リガンドは、腫瘍形成用のヒト以外の動物モデルにおける腫瘍の成長を阻害するために利用される。いずれの腫瘍形成用のヒト以外の動物モデルも使用に適している。モデルの事例は、米国特許 第6,491,906号において議論されている。このモデルは、腫瘍形成、自然転移および実験的肺コロニー形成の評価を提供する。ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）細胞系が使用される。無傷のNSCLC腫瘍または細胞系が使用され得る。腫瘍の成長は、腫瘍のサイズおよび質量で評価し、一方、自然転移および肺コロニー形成（実験的な転移）は、肺の組織病理学的分析により測定した。このシステムにおいて、非天然CXC₃リガンドは、腫瘍成長阻害活性に関する陽性対照として用いることができる。さらに、このシステムは非天然CXC₃リガンド活性のアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニングに使用することができる。

20

【0113】

ヒトNSCLC/SCIDマウスモデルは、4～6週齢の間のSCIDマウスの使用を特に必要とする。血清Igが1μg/ml未満である場合、SCIDマウスのみを使用するべきである。ヒトNSCLC/SCIDマウスキメラは、腫瘍移植の24時間前に尾静脈より20μlの抗アシアロGMI（aASGM1；Wako Chemicals, Dallas, Tex.）を受け取る。この治療では宿主由来NK細胞を除去する。

30

【0114】

無傷のヒトNSCLCを用いて、1mm³の試料（壞死を大幅に取り除き秤量したもの）を、SCIDマウスのコホート群の両側腹部領域の皮下に入れた。NSCLC細胞系（Calu-6、A549、Calu-1およびCalu-3）を用いて、セミコンフルーエントに成長した腫瘍細胞を採取し、SCIDのコホート群には、10⁶個の細胞および5×10⁵個の細胞を含む100μlのPBSを、それぞれ両側腹部領域および尾静脈に注入する。SCIDマウスの少なくとも一つ以上の群は治療群を形成し、対象非天然CXC₃リガンドを投与される。疾患の痕跡および腫瘍サイズの測定の双方をデジタルエンジニアカリパスにより、すべてのマウスを毎日観察する。

40

【0115】

16週間のあいだ、あるいは腫瘍サイズが3cmに到達するか、動物に発症が見られた場合には早期に、週単位で動物が犠牲となる。発症が見られる動物を犠牲とし、解剖を行い、その疾患が腫瘍の負担以外の理由によるものを試験から除外する。犠牲とする際に、皮下に位置する腫瘍を測定し、秤量する。次に、実験的肺腫瘍コロニー形成または自然転移を測定する。

【0116】

対象非天然CXC₃リガンドの投与は、SCIDマウス内の腫瘍の成長の対して顕著な軽減効果を発揮するであろう。したがって、非天然CXC₃リガンドにおける腫瘍成

50

長阻害活性は、抗がん化合物候補における腫瘍成長阻害活性との比較において陽性対照として使用することが可能である。これに代わり、このシステムを非天然CXC3リガンドの腫瘍成長阻害活性のアゴニストまたはアンタゴニスト候補の活性を評価するために使用することが可能である。

【0117】

実施例2：内皮細胞走化性の評価

対象非天然CXC3リガンドは、内皮細胞走化性活性に対する候補薬剤の評価にも使用することができる。内皮細胞走化性の評価は、48ウェルのプラインドウェル走化性チャンバー(N u c l e o p o r e C o r p . 、 M a r y l a n d)にて行う。 N u c l e o p o r e 走化性細胞膜(細孔は5ミクロン)を、これを3%の酢酸中で一晩、0.1%m g / m l ゼラチン中で2時間の間順次浸漬することにより調製する。細胞膜を滅菌水ですすぎ、滅菌エアーで乾燥させて、室温で1カ月以内貯蔵する。10%のF B S を含むD M E 中、ゼラチンで被覆したフラスコ内で保持したウシ副腎由来毛細血管内皮細胞(B C E)を標的細胞として使用する。使用の24時間前にB C E を0.1%のB S A を含むD M E 中で枯渇させる。1m l 当たり 1×10^6 細胞の濃度で0.1% B S A を含むD M E 中にけん濁した、25マイクロリットルの細胞を各底部ウェルに分注する。走化性細胞膜を底部ウェルの上に配置し、チャンバーを密封し、反転させて、2時間のあいだインキュベートを行って、細胞を細胞膜に接着させる。その後、チャンバーを再度反転させて50m l の試験培地を上部ウェルに分注し、さらに2時間のあいだ再インキュベートを行う。次に膜を固定化し、膜に結合した細胞を数え上げるためにD i f f - Q u i c k 染色キット(A m e r i c a n S c i e n t i c P r o d u c t s)で染色し、そして、膜を通過して反対面へと移動した細胞を数える。

10

20

30

【0118】

試験培地における対象非天然CXC3リガンドの存在は、チャンバー膜を通過する細胞の移動を誘発する。したがって、対象非天然CXC3リガンドを、このシステムにおける陽性対照として使用することができる。これに代わり、このシステムを非天然CXC3リガンドの走化性活性のアゴニストまたはアンタゴニスト候補を評価するために使用することが可能である。

【0119】

実施例3：インビボにおける血管形成の評価

さらに、非天然CXC3リガンドは、インビボの血管形成モデルにおける候補薬剤の抗血管形成活性の評価に使用することができる。ラットにおいて十分に特徴づけられた角膜マイクロポケットモデルが使用に好適である。例えば、試験サンプルの全タンパク質5m gを、等容積の滅菌H y d r o n キャスティング溶液と結合させて、5m l のアリコートを、ガラスベトリ皿の表面に接着させた1mmのテフロン棒の表面にピペットで乗せる。ペレットを層流フード中で空気乾燥させて(1時間)、ひと晩冷蔵する。移植の前にペレットを少量の加乳酸リングル液で再び水和させる。

40

【0120】

動物には、メトファンで麻酔をかけて、ペントバルビタールナトリウムを腹腔内に注入する。H y d r o n ペレットを、縁からおよそ1.5mmの外科的に作られた角膜内ポケットへと角膜内に移植する前に、0.1m l の2%リドカインによる球後注射を行なう。動物は、立体顕微鏡を用いて毎日診察する。移植の7日後に動物を再び麻酔にかけて、順次加乳酸リングル液、次にコロイド状炭素でかん流を行なう。角膜を採取し、平板化し、撮影する。

50

【0121】

移植片に向かうヘアピンループおよび毛細血管の芽における方向性を有する持続した内部成長が観察される場合のみ、陽性の新血管形成反応を記録する。成長が観察されない場合、あるいは、持続した成長が検出された証拠が何ら示されないヘアピンループまたは芽が偶発的にのみ観察される場合には、陰性反応を記録する。

【0122】

非天然 CXCR3 リガンドの存在は、試験サンプル中の血管形成剤の活性を阻害するであろう。したがって、非天然 CXCR3 リガンドは、このシステムにおける血管形成阻害剤候補の評価に対する陽性対照として使用することができる。これに代わり、このシステムを非天然 CXCR3 リガンドの血管形成活性のアゴニストまたはアンタゴニスト候補の活性を評価するために使用することが可能である。

【 0123 】

実施例 4：特発性肺線維症の治療方法

本発明は、特発性肺線維症 (IPF) の治療方法を提供する。この方法には、有効量の非天然 CXCR3 リガンドを IPF に感染する個人に投与することが概して含まれる。

【 0124 】

いくつかの態様において、IPF の診断は、外科生検により得られる肺組織の組織病理的評価における通常型間質性肺炎 (UIP) の発見により確認される。IPF の診断の基準は既知である。Ryuら (1998年) Mayo Clin. Proc. 73: 1085~1101。

【 0125 】

別の態様において、IPF の診断は、高分解能コンピュータートモグラフィー (HRCT) によってなされる確定的または推定的 IPF である。HRCT による診断において、以下の特徴の存在が認められる (1) 網状異常および / または基礎および抹消優位を伴う牽引性気管支拡張の存在 (2) 基礎および抹消優位を伴う蜂巣化の存在ならびに (3) 微小結節、気管支血管周囲型結節、硬化、孤立性 (非蜂巣化) のう胞、スリガラス様陰影 (あるいは、存在する場合には、網状陰影に比べて狭い範囲)、および縦隔リンパ節腫脹 (あるいは、存在する場合には、胸部 X 線撮影に写らない範囲) などの非定形的な特徴が存在しない。確定的 IPF の診断は、特徴 (1)、(2) および (3) を満たす場合に行われる。推定 IPF の診断は、特徴 (1) および (3) を満たす場合に行なわれる。

【 0126 】

「有効量」の非天然 CXCR3 リガンドとは、プラシーボ対照または無治療対照と比較した場合に、病気の進行を少なくとも 10%、20%、30%、40% または 50%、あるいはそれ以上で低減するために有効な用量である。

【 0127 】

病気の進行とは、以下の一つまたはそれ以上の発生である (1) 予測される FVC における 10% またはそれ以上の減少 (2) A-a 勾配の 5 mmHg またはそれ以上の増加 (3) 一回呼吸 DLc。における 15% またはそれ以上の減少。病気の進行が発生しているか否かは、4 ~ 14 週間の期間をあけた二つの継続的な時点で一つ以上のこれらのパラメーターを測定し、ベースラインと値を比較することにより決定される。

【 0128 】

いくつかの態様において、非天然 CXCR3 リガンドの「有効量」とは、無増悪生存期間、例えば、ベースライン (例えば、治療開始の 1 日前 ~ 28 日前までの期間) から、死亡までの時間を、あるいは、病気の進行をプラシーボ治療対照または無治療対照と比較した場合に、少なくとも 10%、20%、30%、40% または 50%、あるいはそれ以上で増加させるまでの時間を増加させるために有効な用量である。いくつかの態様において、非天然 CXCR3 リガンドの有効量とは、少なくとも一つ以上の肺機能のパラメーターを増加させるために有効な用量であり、例えば、非天然 CXCR3 リガンドの有効量は、少なくとも 10%、20%、30%、40% または 50%、あるいはそれ以上で少なくとも一つ以上の肺機能のパラメーターを増加させる。これらの態様のいくつかにおいて、肺機能のパラメーターが増加したか否かの判定は、ベースライン値を治療開始後のいずれかの時点、例えば、治療開始後約 4~8 週、または 2 つの時点の間、例えば、治療開始の約 4 ~ 約 14 週後の値と比較することにより行なわれる。

【 0129 】

いくつかの態様において、非天然 CXCR3 リガンドの有効量とは、4 ~ 14 週間離れた二つの継続的な時点におけるベースラインと比較した場合に、少なくとも 10%、20%

10

20

30

40

50

%、30%、40%または50%、あるいはそれ以上でFVCを増加させるために有効な用量である。

【0130】

これらの態様のいくつかにおいて、非天然CXC3リガンドの有効量とは、ベースラインと比較した場合に、少なくとも約5mmHg、少なくとも約7mmHg、少なくとも約10mmHg、少なくとも約12mmHg、少なくとも約15mmHgまたはそれ以上の肺胞：動脈勾配における減少を生じる用量である。

【0131】

これらの態様のいくつかにおいて、非天然CXC3リガンドの有効量とは、ベースラインと比較した場合に、少なくとも10%、20%、30%、40%または50%、あるいはそれ以上で一回呼吸DL_cを増加させる用量である。DL_cは、一酸化炭素に対する肺拡散容量であり、mL CO / mm Hg / 秒で表される。

10

【0132】

肺機能のパラメーターには、努力性肺活量(FVC)、努力呼気肺活量(FEV₁)、全肺気量、安静時の動脈酸素分圧、最大運動時の動脈酸素分圧が含まれるが、これらに限定されない。

【0133】

肺機能は、いずれかの既知の方法を用いて測定することが可能であり、肺活量測定法が含まれるが、これに限定されない。

【0134】

20

実施例5：肝線維症の治療方法

本発明は、臨床上の肝線維症の軽減、肝線維症を引き起こす可能性の軽減、ならびに肝線維症に関連するパラメーターの軽減を含む、肝線維症の治療方法を提供する。概して、この方法には、対象非天然CXC3リガンドの有効量の組み合わせをその必要のある個人に投与することが含まれる。多くの態様において、特に着目されるものは、ヒトの治療である。

【0135】

肝線維症は、門脈圧亢進症、進行性肝不全および肝細胞がんなどの肝硬変に関連する合併症の前兆である。従って、肝線維症の軽減は、こうした合併症の罹患率を減少させる。すなわち、本発明は、さらに、個人が肝硬変に関連する合併症を発現する可能性を軽減する方法を提供する。

30

【0136】

本発明は、一般的には、対象非天然CXC3リガンドの治療上有効量を投与することを含む。本明細書で使用されるように、対象非天然CXC3リガンドの「有効量」とは、肝線維症の軽減、または肝線維症の進行速度の低減に有効な量、および/または個人が肝線維症を発現する可能性の軽減に有効な量、および/または肝線維症に関連するパラメーターの軽減に有効な量、および/または肝硬変に関連する疾患の軽減に有効な量である。

【0137】

本発明はまた、個人における肝線維症の治療方法を提供し、個人における肝線維症の予防または治療に対して有効である、例えば、生存の可能性を増加させる、死亡リスクを軽減する、疾患による苦痛を改善する、あるいは個人における病気の進行を遅れさせるような量の対象非天然CXC3リガンドを個人に投与することを含む。

40

【0138】

対象非天然CXC3リガンドによる治療が、肝線維症の軽減に有効であるか否かは、肝線維症および肝機能測定用の十分に確立した数多くの技術により決定される。肝線維症が軽減するか否かは、肝生検サンプルを分析することにより判断される。肝生検の分析には、重症度および進行中の疾患活動性の測定として「グレード」で評価される壊死炎症(necroinflammation)、ならびに、長期にわたる疾患の進行を熟考することにより「段階」で評価される線維症および実質性または血管リモデリングの病変、の

50

二つの主な要素の評価が含まれる。例えば、Brunt (2000年) Hepatol. 31: 241~246；およびMETAVIR (1994年) Hepatology 20: 15~20を参照のこと。肝生検の分析に基づき、スコアが与えられる。線維症の程度および重症度の定量的評価を提供する、多くの標準化された評価システムが存在している。これらには、METAVIR、Knodell、Scheuer、LudwigおよびIshak評価システムが含まれる。

【0139】

METAVIR評価システムは、肝生検の種々な特性の分析に基づくものであり、肝生検には、線維症（門脈線維症、小葉中心性線維症および肝硬変）；壊死（ピースミールおよび小葉壊死、好酸性後退ならびに風船様変性）；炎症（門脈管炎症、門脈域リンパの会合ならびに門脈炎症の分散）；胆管の変化；ならびにKnodell指標（門脈周辺の壊死、小葉壊死、門脈炎症、線維症、および全般的な疾患活性のスコア）が含まれる。METAVIRシステムにおける各段階の定義は以下のとおりである：スコア0、線維症ではない；スコア：1、門脈管の放射状の拡大があるが、隔壁形成はない；スコア：2、わずかな隔壁形成を伴う門脈管の拡大；スコア：3、肝硬変を伴わない多数の隔壁；およびスコア：4、肝硬変。

10

【0140】

Knodellの評価システムは、肝炎活性指標とも呼ばれるが、これは、組織学的特徴の4つの分類：I. 門脈周辺および/または架橋壊死；II. 小葉内変性および巣状壊死；III. 門脈炎症；およびIV. 線維症、におけるスコアに基づいて試料を分類する。Knodellのステージングシステムにおいて、スコアは次のとおりである：スコア：0、線維症ではない；スコア：1、軽度の線維症（門脈の拡張）；スコア：2、中度の線維症；スコア：3、重度の線維症（架橋線維症）、およびスコア：4、肝硬変。スコアが高くなるほど肝組織の損傷は重度となる。Knodell (1981年) Hepatol. 1: 431。

20

【0141】

Scheuer評価システムにおけるスコアは以下のとおりである：スコア：0、線維症ではない；スコア：1、拡大、線維化した門脈管；スコア：2、門脈周辺あるいは門脈-門脈における隔壁、しかし構造上の損傷はなし；スコア：3、構造上の変形を伴う線維症、しかし明らかな肝硬変はみられない；およびスコア：4、推定的または断定的な肝硬変。Scheuer (1991年) J. Hepatol. 13: 372。

30

【0142】

Ishak評価システムは、Ishak (1995年) J. Hepatol. 22: 696-699に記載されている。ステージ0、線維症ではない；ステージ1、短い線維性の隔壁を伴う、あるいは伴わない、いくつかの門脈領域における線維化の拡大；ステージ2、短い線維性の隔壁を伴う、あるいは伴わない、ほとんどの門脈領域における線維化の拡大；ステージ3、時折、隔壁-隔壁(P-P)間の架橋を伴う、ほとんどの門脈領域における線維化の拡大；ステージ4、P-Pおよび隔壁-中央(P-C)間の顕著な架橋を伴う、門脈領域における纖維化の拡大；ステージ5、時折、結節（不完全な肝硬変）を伴う顕著な架橋(P-Pおよび/またはP-C)；ステージ6、推定的または断定的な肝硬変。血清ビリルビン濃度、血清アルブミン濃度、プロトロンビン時間、腹水の存在および重症度、ならびに脳症の存在および重症度の異常に基づくマルチコンポーネントポイントシステムを含むChild-Pugh評価システムを用いることにより、抗線維症治療の利点を測定および評価することも可能である。これらのパラメーターの存在および重症度に基づき、臨床疾患の重症度の増加によりA, BおよびCの3つの分類の一つに患者は分類される。

40

【0143】

いくつかの態様において、対象非天然CXCR3リガンドの治療上有効量は、治療前後の肝生検に基づいて線維症のステージにおける一単位またはそれ以上の変化に影響を及ぼす量である。特定の態様において、対象非天然CXCR3リガンドの治療上有効量は、M

50

E T A V I R 、 K n o d e l l 、 S c h e u e r 、 L u d w i g および I s h a k 評価システムにおける少なくとも一単位以上によって肝線維症を軽減する。

【 0 1 4 4 】

対象非天然 C X C R 3 リガンドを用いた治療の有効性を評価する目的で、肝機能の補助的、あるいは間接的指標も使用することができる。対象の治療方法の有効性を示すものとして、コラーゲンの特異的染色および / または肝線維症の血清マーカーに基づいた、肝線維症の定量的な度合いに関する形態学的にコンピューター化され半自動化された評価を測定することも可能である。肝機能の補助的な指標には、血清トランスアミナーゼ濃度、プロトロンビン時間、ビリルビン、血小板数、門脈圧、アルブミン濃度および C h i l d - P u g h スコアの評価が含まれるが、これらに限定されない。

10

【 0 1 4 5 】

その他の態様において、対象非天然 C X C R 3 リガンドの有効量とは、未治療の個人またはプラシーボ投与の個人の肝機能の指標と比べて肝機能の指標を少なくとも約 10 %、20 %、30 %、40 % または 50 %、あるいはそれ以上に増加させるために有効な量のことである。当業者は、標準的な測定方法を用いてこうした肝機能の指標を容易に測定することができ、こうした方法の多くは商業的に入手可能であり、臨床設定において定常的に使用されている。

【 0 1 4 6 】

肝線維症の血清マーカーもまた、対象の治療方法の有効性の指標として測定され得る。肝線維症の血清マーカーには、ヒアルロン酸塩、N - 末端コラーゲン I I I 型ペプチド、I V 型コラーゲンの 7 S ドメイン、C - 末端プロコラーゲン I 型ペプチドおよびラミニンが含まれるが、これらに限定されない。肝線維症のさらなる生化学的マーカーには、- 2 - マクログロブリン、ハプトグロビン、ガンマグロブリン、アポリポタンパク質 A およびガンマグルタミントラ_nsペプチダーゼが含まれる。

20

【 0 1 4 7 】

別の態様において、対象非天然 C X C R 3 リガンドの治療上有効量とは、未治療の個人またはプラシーボ投与の個人におけるマーカーのレベルと比べて、少なくとも約 10 %、20 %、30 %、40 % または 50 %、あるいはそれ以上で肝線維症のマーカーの血清レベルを減少させるために有効な量のことである。当業者は、標準的な測定方法を用いてこうした肝線維症の血清マーカーを容易に測定することが可能であり、こうした方法の多くは商業的に入手可能であり、臨床設定において定常的に使用されている。血清マーカーを測定する方法には、例えば、酵素免疫測定法 (E L I S A) 、ラジオイムノアッセイなど、特定の血清マーカーに特異的な抗体を使用する免疫学に基づいた方法が含まれる。

30

【 0 1 4 8 】

機能的な肝保存の定量試験もまた、対象非天然 C X C R 3 リガンドを用いた治療の有効性の評価に使用できる。これらには、インドシアニングリーンクリアランス (I C G) 、ガラクトース除去能試験 (G E C) 、アミノピリン呼気試験 (A B T) 、アンチピリンクリアランス、モノエチルグリシンキシリジン (M E G - X) クリアランスおよびカフェインクリアランスが含まれる。

40

【 0 1 4 9 】

本明細書で使用されるように「肝硬変に関連する合併症」とは、すなわち、非代償性肝臓疾患に続く、あるいは、肝線維症の進行に引き続いて結果として発症する疾患を指すものであり、腹水、静脈瘤出血、門脈圧亢進症、黄疸、進行性の肝不全、脳症、肝細胞がん、肝移植を必要とする肝不全、ならびに肝臓に関連する死亡の発生が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 5 0 】

別の態様において、対象非天然 C X C R 3 リガンドの治療上有効量とは、肝硬変に関連する疾患の発生率 (例えば、個人が発症すると思われる可能性) を、未治療の個人またはプラシーボ投与の個人と比べて、少なくとも約 10 %、20 %、30 %、40 % または 50 %、あるいはそれ以上で低下させるために有効な量である。

50

【0151】

対象非天然CXCR3リガンドを用いた併用療法が、肝硬変に関連する疾患の発生率の低減に有効であるか否かは、当業者によって容易に判断できる。

【0152】

肝線維症の軽減により肝機能が増大する。したがって、本発明は肝機能を増大する方法を提供するものであり、通常の対象非天然CXCR3リガンドの治療上有効量を投与することが含まれる。肝機能には、血清タンパク質（例えば、アルブミン、凝固因子、アルカリホスファターゼ、アミノトランスフェラーゼ（例えば、アラニン転移酵素、アスパラギン酸転移酵素）、5'-ヌクレオシダーゼ、-グルタミンイルトランスペプチダーゼなど）、ビリルビンの合成、コレステロールの合成、ならびに胆汁酸の合成などのタンパク質の合成；炭水化物代謝、アミノ酸およびアンモニア代謝、ホルモン代謝および脂質代謝を含むがこれらに限定されない肝代謝機能；外因性薬剤の解毒作用、内臓および門脈の血行動態を含む血行動態機能；などが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0153】

肝機能が増大したか否かは、当業者によって、十分に確立された肝機能の試験を用いて容易に確認することができる。したがって、アルブミン、アルカリホスファターゼ、アラニン転移酵素、アスパラギン酸転移酵素、ビリルビンなど、肝機能のマーカーの合成は、標準的な免疫学的および酵素学的なアッセイを用いて、血清中におけるこれらのマーカーのレベルを測定することにより評価できる。内臓循環および門脈血行動態は、標準的な方法を使用して門脈楔入圧および/または抵抗を測定することにより測定可能である。代謝機能は血清中におけるアンモニアのレベルを計測することによって測定可能である。

20

【0154】

肝臓により通常は分泌される血清タンパク質が正常な範囲内にあるか否かは、標準的な免疫学的および酵素学的なアッセイを用いて、こうしたタンパク質のレベルを測定することにより確定することが可能である。当業者は、こうした血清タンパク質の正常な範囲を知っている。以下は、非限定的な例である。アラニン転移酵素の正常な範囲は、1リットルの血清当たり約7～約56ユニットである。アスパラギン酸転移酵素の正常な範囲は、1リットルの血清当たり約5～約40ユニットである。ビリルビンは、標準的なアッセイを用いて測定される。正常なビリルビンのレベルは、一般的に約1.2mg/dL未満である。血清アルブミンのレベルは、標準的なアッセイを用いて測定される。血清アルブミンの正常なレベルは、約35～約55g/Lである。プロトロンビン時間の延長は、標準的なアッセイを用いて測定される。正常なプロトロンビン時間は、対照よりも4秒未満長い。

30

【0155】

別の態様において、対象非天然CXCR3リガンドの治療上有効量とは、肝機能を少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%、あるいはそれ以上で増加させるために有効な量のことである。例えば、対象非天然CXCR3リガンドの治療上有効量とは、肝機能の血清マーカーのレベルを少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%、あるいはそれ以上で低下させて正常範囲内とするために有効な量のことである。また、対象非天然CXCR3リガンドの治療上有効量とは、低下した肝機能の血清マーカーのレベルを、少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%、あるいはそれ以上で肝機能の血清マーカーのレベルを増加させて正常範囲内とするために有効な量のことである。

40

【0156】

実施例6：腎線維症の治療方法

腎線維症は、細胞外マトリックス（ECM）成分の過剰な蓄積により特徴づけられる。形質転換成長因子（TGF-）の過剰生産は、疾病を引き起こすECMの過剰蓄積により引き起こされる組織の線維化の土台となっているものと考えられている。TGF-の線維形成活性は、マトリックスタンパク質合成の同時刺激、マトリックス分解の抑制、ならびにECMアセンブリを促進する増強されたインテグリン発現の結果により生じる。

50

【0157】

本発明は、腎線維症の治療方法を提供する。この方法には、通常、腎線維症を有する個人に、対象非天然CXC3リガンドの有効量を投与することが含まれる。本明細書で使用されるように、対象非天然CXC3リガンドの「有効量」は、腎線維症の軽減に有効であり；および／または、個人が腎線維症を発症する可能性の軽減に有効である；および／または、腎線維症に関連するパラメーターの減少に有効である；および／または、腎臓の線維化に関連する疾患の軽減に有効な量のことである。

【0158】

一実施形態において、対象非天然CXC3リガンドの有効量とは、治療前の個人における腎線維症の重症度と比べて、あるいは、未治療の患者が経験したであろう腎線維症の進行速度と比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%あるいはそれ以上で、腎線維症を軽減させるため、あるいは、腎線維症の進行速度を低下させるために充分な量のことである。

10

【0159】

腎臓において線維症が軽減されたか否かは、いずれかの既知の方法を使用して決定することができる。例えば、ECMの蓄積の広がりおよび／または線維症の広がりに関する腎臓生検サンプルの組織化学的分析が実施される。その他の方法は当該技術分野において既知である。例えば、Masseroliら(1998年)Lab. Invest. 78:511～522、米国特許第6,214,542号を参照のこと。

20

【0160】

いくつかの態様において、対象非天然CXC3リガンドの有効量とは、治療前の個人における腎機能の基礎レベルと比較した場合に、腎機能を少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%、あるいはそれ以上で増加させるために有効な量のことである。

20

【0161】

いくつかの態様において、対象非天然CXC3リガンドの有効量とは、未治療の場合発生していたと考えられる腎機能の低下と比較した場合に、腎機能の低下を少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%、あるいはそれ以上で遅延させるために有効な量のことである。

30

【0162】

腎機能は既知のアッセイのいずれかを用いて測定でき、血漿クレアチニン値(正常値は、通常約0.6～約1.2mg/dLの範囲内である)；クレアチニンクリアランス(クレアチニンクリアランスの正常範囲は、男性では約97～137mL/分、ならびに、女性では約88～128mL/分)；糸球体ろ過速度(イヌリンクリアランスまたはその他の方法により得られるか、算出されるかのいずれかによる)；血中尿素窒素(正常範囲は、約7～約20mg/dL)；および尿中タンパク濃度が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0163】

その他の態様において、本発明は、対象非天然CXC3リガンドと第2治療剤との相乗的な組み合わせの投与を含む方法を提供する。本明細書において使用されるように、対象非天然CXC3リガンドと第2治療剤との「相乗的な組み合わせ」とは、(i)単剤療法と同一の用量を投与した場合における対象非天然CXC3リガンドの治療的ならびに予防的利益と、(ii)単剤療法と同一の用量を投与した場合における第2治療剤の治療的ならびに予防的利益とを、単なる付加的な組み合わせによって予測され得るであろう、あるいは期待され得るであろう治療の成果における付加的な改善に比べて、腎線維症の治療的または予防的な処置において、より有効な組み合わせになる用量である。

40

【0164】

本発明はまた、個人における腎線維症の治療方法も提供し、この方法には、例えば、個人において、血漿クレアチニン値が二倍に到達するまでの時間の増加、腎代償療法(例えば、透析または移植)が必要となる腎臓疾患の末期に到達するまでの時間の増加、延命の

50

可能性の増加、死亡リスクの減少、疾患による苦痛の改善または疾患の進行の遅延といった、個人における腎線維症の予防または治療に有効な量の対象非天然 CXCR3 リガンドを個人に投与することが含まれる。

【0165】

実施例7：がんの治療方法

本発明は、がんの治療方法を提供する。この方法には、通常、対象非天然 CXCR3 リガンドの有効量を、これらを必要とする個人に投与することが含まれる。

【0166】

この方法は、好適な対照と比較した場合、腫瘍負荷を少なくとも約 10%、20%、30%、40% または 50%、あるいはそれ以上で減少させるに有効である。したがって、これらの態様において、対象非天然 CXCR3 リガンドの「有効量」とは、好適な対照と比較した場合に、腫瘍負荷を少なくとも約 10%、20%、30%、40% または 50%、あるいはそれ以上で減少させるために有効な量のことである。実験用の動物系において、好適な対照とは、非天然 CXCR3 リガンドによる処理を受けていない遺伝的に同一の動物であってもよい。非実験系において、好適な対照は非天然 CXCR3 リガンドの投与前の腫瘍負荷の存在であってもよい。その他の好適な対照は、プラシーボ対照であってもよい。

10

【0167】

腫瘍負荷が減少したか否かは、いずれかの既知の手法を用いて判断されるものであり、固形の腫瘍瘤の測定、細胞学アッセイ法を用いた腫瘍細胞数の計算、蛍光活性化細胞選別装置（例えば、腫瘍関連抗原に特異的な抗体を用いた）による特定の腫瘍抗原を有する細胞数の特定、腫瘍のコンピューター断層撮影スキャン（CTスキャン）、磁気共鳴画像診断（MRI）および / または X 線画像による腫瘍サイズの推定および / または観察、例えば血液などの生検サンプル中の腫瘍に関連する抗原量の測定などが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0168】

この方法は、好適な対照と比較した場合に、腫瘍の成長の阻害全体を含めて、少なくとも約 10%、20%、30%、40% または 50%、あるいはそれ以上で腫瘍の成長速度を減少させるために有効である。したがって、これらの態様において、非天然 CXCR3 リガンドの「有効量」とは、好適な対照と比較した場合に、腫瘍の成長の阻害全体を含めて、少なくとも約 10%、20%、30%、40% または 50%、あるいはそれ以上で腫瘍の成長速度を減少させるために有効な量のことである。実験用の動物系において、好適な対照とは、非天然 CXCR3 リガンドによる処理を受けていない遺伝的に同一の動物であってもよい。非実験系においては、非天然 CXCR3 リガンドの投与前における腫瘍負荷の存在であってもよい。その他の好適な対照は、プラシーボ対照であってもよい。

30

【0169】

腫瘍の成長が阻害されているか否かは、いずれかの既知の方法を用いて決定でき、インビトロ増殖分析、³H - チミジン取り込みアッセイなどが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0170】

この方法は、上皮性悪性腫瘍、非上皮性悪性腫瘍、白血病およびリンパ腫を含む、多種多様ながんの治療に有効である。これらのがんの中で特定の類型のものは、国際特許出願 WO 2005 / 016241 号に開示されており、参照により本明細書に援用される。

【0171】

実施例8：血管新生疾患の治療方法

本発明は、血管新生疾患の治療方法を提供する。この方法には、通常、有効量の対象非天然 CXCR3 リガンドを、これらを必要とする個人に投与することが含まれる。

【0172】

対象の血管新生疾患の治療方法において、対象非天然 CXCR3 リガンドの「有効量」とは、血管新生抑制的（angiostatic）である量、例えば、非天然 CXCR3

50

リガンドによる治療を行なわない場合の血管新生のレベルと比べて、少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%、あるいはそれ以上で血管新生を減少させる量のことである。

【0173】

血管新生の評価には、多数の系が入手可能である。例えば、血管新生は、固体腫瘍成長に必要であることから、動物モデルにおける腫瘍成長の阻害は、血管新生の阻害の指標として使用することができる。皮膚または器官の創傷修復における、ならびに、血管新生は慢性炎症における、例えば、関節リュウマチ、アテローム性動脈硬化および特発性肺線維症（IPF）などの疾患における創傷治癒モデルに関し評価することも可能である。例えば、マーカー分子（例えば、CD3H、第VII因子またはPECAM-1）に対する染色を行った後に、組織切片中の血管を数えることにより、これを評価することも可能である。

10

【0174】

血管新生が減少したか否かは、当該技術分野において既知であるいずれかの方法を用いて判断することが可能であり、例えば、レラキシンに含浸させた移植片に対する新血管形成の刺激、角膜または前眼房における血管成長の刺激、インビトロにおける内皮細胞の増殖、移動または管形成の刺激、ニワトリ緑毛尿膜アッセイ、ハムスター頬袋アッセイ、ポリビニルアルコールスponジディスクアッセイが含まれるこのようなアッセイは当該技術分野において公知であり、数多くの文献に記載されており、例えば、Auernbachら（（1991年）Pharmac. Ther. 51：1～11）およびその中で引用されている文献が含まれる。

20

【0175】

血管新生の評価に幅広く使用されるシステムは、新血管形成に対する角膜マイクロポケットアッセイであり、ラットの角膜を使用して実施することが可能である。この生体内モデルは、臨床上の有用性において一般的に予測性のあるものとして広く受け入れられている。例えば、O'Reillyら（1994年）Cell 79：315～328、Liら（1991年）Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32（11）：2898～905、ならびに、Millerら（1994年）Am. J. Pathol. 145（3）：574～84を参照されたい。

30

【0176】

実施例9：

肺のヒト微小血管内皮細胞（HMVEC）、ヒト大動脈内皮細胞（HUEC）および安定的に形質転換されたヒトCXCR3を発現するマウスのプレB細胞を、血清および成長因子を追加した定義済みの培地の中で培養した。評価を行なう前に、細胞を一晩のあいだ血清飢餓状態として、ケモカインのパネルを用いて最大15分まで刺激を与えた。組み換えヒトIP-10、I-TAC、MIGおよびPF4（R&D Systems、カタログ番号266-IP/CF、672-IP/CF、392-MG/CFおよび795-P4/CF）；コンセンサスI-TACリガンド（配列番号2）；天然I-TAC-N-ループを有するコンセンサスI-TACリガンド（配列番号3）；コンセンサスIP-10リガンド（配列番号5）；天然I-TAC-N-ループを有するコンセンサスIP-10リガンド（配列番号6）；コンセンサスMIGリガンド（配列番号8）；天然I-TAC-N-ループを有するコンセンサスMIGリガンド（配列番号9）；ならびに、天然I-TAC-N-ループを有する天然PF4（配列番号13）。

40

【0177】

細胞溶解物を調製し、CXCR3受容体の活性化を示すためにSDS-PAGE後に免疫プロットを介してリン酸化ERK1/2を決定した。免疫プロットを介して非リン酸化ERK1/2もまた特定して、ローディングコントロールとして使用した。最終画像をスキャンし、デジタル化した帶強度およびリン酸化ERK1/2バンドをローディングコントロールに対して正常化した。その結果を対照値に対する誘導倍率として次表にまとめた。

50

【 0 1 7 8 】

【表 2】

	HMVEC	HUVEC	プレB細胞
対照	1.000	1.000	1.000
Rh-I-TAC, 2 分	0.205	1.646	2.244
Rh-I-TAC, 5 分	0.137	1.356	1.376
Rh-I-TAC, 15 分	3.077	1.310	1.223
c-I-TAC, 2 分	0.283	1.182	0.897
c-I-TAC, 5 分	0.132	1.325	1.333
c-I-TAC, 15 分	2.045	1.270	1.423
N-I-TAC, 2 分	0.275	1.269	2.164
N-I-TAC, 5 分	0.296	1.571	1.892
N-I-TAC, 15 分	4.771	1.385	0.337
Rh-IP10, 2 分	0.333	10.300	1.034
Rh-IP10, 5 分	0.070	10.831	0.921
Rh-IP10, 15 分	0.382	6.866	0.570
c-IP10, 2 分	0.098	4.109	0.674
c-IP10, 5 分	0.180	5.730	0.765
c-IP10, 15 分	3.935	5.598	0.722
N-IP10, 2 分	0.194	3.204	0.690
N-IP10, 5 分	0.341	6.559	1.040
N-IP10, 15 分	4.551	4.935	0.829
Rh-MIG, 2 分	1.564	5.347	0.795
Rh-MIG, 5 分	1.131	6.959	0.842
Rh-MIG, 15 分	1.313	5.765	1.756
c-MIG, 2 分	1.058	2.287	1.071
c-MIG, 5 分	1.344	3.342	1.918
c-MIG, 15 分	1.624	6.863	2.113
N-MIG, 2 分	1.163	2.294	0.986
N-MIG, 5 分	0.899	6.577	1.024
N-MIG, 15 分	2.327	6.950	2.178
Rh-PF4, 2 分	1.014	6.854	1.253
Rh-PF4, 5 分	0.895	9.627	1.328
Rh-PF4, 15 分	1.782	11.516	1.446
N-PF4, 2 分	0.915	4.134	1.575
N-PF4, 5 分	1.058	5.679	1.157
N-PF4, 15 分	3.278	9.832	0.931

10

20

30

40

【 0 1 7 9 】

当業者であれば、上記実施例は本発明を例証するために提供されたものであり、本発明の権利範囲を何ら制限するものではないことを理解するであろう。

【 0 1 8 0 】

本明細書中の特許および文献はすべて、本発明に関連する技術分野における通常の技術を有する者のレベルの指標である。各々の文献が、参照により援用されることが具体的かつ個別に示されたかのように、本明細書におけるすべての特許および文献は参照によりここに援用される。

【 0 1 8 1 】

本明細書において実例を用いて説明された本発明は、ここに特に記載されていない、いずれかの要素（単数または複数）、制限（単数または複数）なしに好適に実施してもよい。すなわち、例えば、「～を含む」、「～を実質的に含む」および「～よりなる」のいずれの用語であっても、いかなる場合でも他の二つに置き換えてよい。採用される用語および表現は、制限するためではなく、説明用語として使用されるものであり、これらの用

50

語および表現の使用において、記載、表示された特徴に対するいずれかの同等物またはこれらの一部を排除することを意図するものではないものの、本発明の権利範囲内における種々の変更は可能であるとは認識されている。したがって、本発明は好ましい態様および任意の特徴によって具体的に開示したものの、ここに開示したコンセプトのバリエーションならびに変更は、当業者により再構築することが可能であり、こうしたバリエーションおよび変更は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の権利範囲内であるとみなされるということを理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0182】

【図1】IP-10、MIGおよびiTACのポリペプチド整列を表している。整列された部位における全3種のCXCR3リガンドにおいて同一の残基は、ミディアムグレー色の陰影で表示している。多数派コンセンサス残基は、ライトグレー色の陰影で表示している。特異的（すなわち非相同）な残基は、ダークグレー色の陰影により表示している。「大部分」のポリペプチド配列は上述の整列された配列に表示されている。

【図2】iTACに関連または由来するポリペプチドを表している。配列は、本明細書中に表示されている。

【図3】IP-10に関連または由来するポリペプチドを表している。配列は、本明細書中に表示されている。

【図4】MIGに関連または由来するポリペプチドを表している。配列は、本明細書中に表示されている。

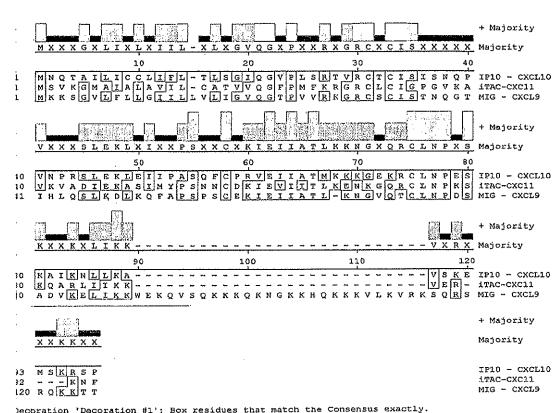
【図5】Pf4に関連または由来するポリペプチドを表している。配列は、本明細書中に表示されている。

10

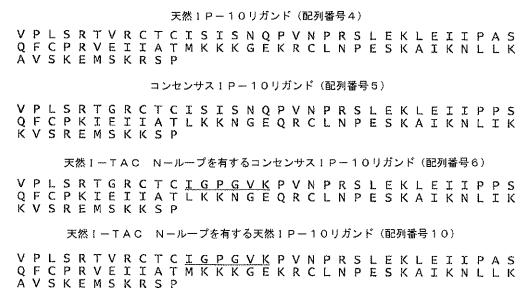
20

20

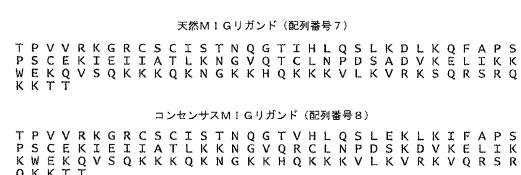
【図1】



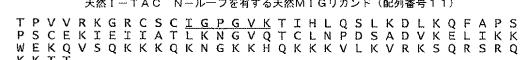
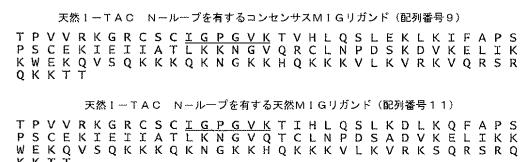
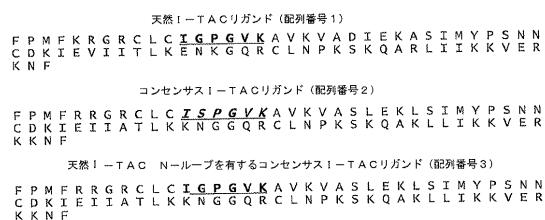
【図3】



【図4】



【図2】



【図5】

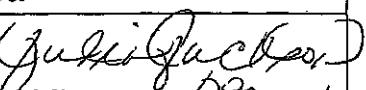
天然PF4 (配列番号12)

E A E E D G D L Q C L C V K T T S Q V R P R H I T S L E V I K A G
P H C P T A Q L I A T L K N G R K I C L D L Q A P L Y K K I I K K
L L E S

天然I-TAC Nループを有する天然PF4 (配列番号13)

E A E E D G D L Q C L C I G P G V K V R P R H I T S L E V I K A G
P H C P T A Q L I A T L K N G R K I C L D L Q A P L Y K K I I K K
L L E S

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/19233
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8): A61K 38/00(2006.01),45/00(2006.01) USPC: 530/300;424/85.1 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) U.S. : 530/300; 424/85.1		
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 practicable, search terms used) EAST, STN, SCORE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCCOLL et al. Expression of rat I-TAC/CXCL11/SCY11 during central nervous system inflammation: comparison with other CXCR3 ligands. Lab Investigation. 23 August 2004 (23.8.2004), Vol 84, pages 1418-1429, especially p 1419 and Figure 1. SEQ ID NO: 3 is free of the art, however MCCOLL et al., teach variants at Figure 1, including a variant where the mature form includes an N-terminal methionine (see muI-TAC).	1-5, and 9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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 09 May 2007 (09.05.2007)	Date of mailing of the international search report 25 MAY 2007	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer Cherie Woodward  Telephone No. 571-272-0500	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/19233

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

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

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-5 and 9 as drawn to SEQ ID NO: 3

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/19233

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

I-VI. Claims 1-5, and 9, drawn to a non-natural CXCR3 polypeptide receptor ligand wherein the N-loop domain is from ITAC, as drawn to SEQ ID NOs: 3, 6, 9, 10, 11, and 13.

VII. Claims 6-8, and 10, drawn to a non-natural PF4 CXCR3 polypeptide ligand.

Claims 11-35 are improper multiple dependent claims and have not been included in any of the groups.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

SEQ ID NOs: 3, 6, 9, 10, 11, and 13.

The inventions listed as Groups I-VII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: claim 1 is anticipated by MCCOLL et al., Expression of rat I-TAC/CXCL11/SCYA11 during central nervous system inflammation: comparison with other CXCR3 ligands. Laboratory Investigation. November 2004; 84(11):1418-1429. MCCOLL et al., teach synthesized rat ITAC/CXCL11 using automated FMOC-based solid-phase peptide synthesis (p. 1420, column 1, third paragraph). MCCOLL et al., teaches all of the limitations of claim 1. Thus, the groups lack the same or corresponding special technical feature.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: each of the claimed sequences have unique structural and/or functional characteristics. As such, they lack the same corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 19/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(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,LV,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,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,L R,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY ,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(72)発明者 プラット, ローレンス

アメリカ合衆国 9 4 1 2 1 カリフォルニア州 サンフランシスコ, ショア ビュー アベニュー
- 1 0

(72)発明者 セイワート, スコット

アメリカ合衆国 9 4 0 4 4 カリフォルニア州 パシフィカ, ロックアウェイ ビーチ 8 2 8

(72)発明者 タン, フア

アメリカ合衆国 9 4 0 1 5 カリフォルニア州 デイリー シティ, ウィルシャイア アベニュー
- 5 0

(72)発明者 フィリップス, ロデリック

アメリカ合衆国 9 4 1 2 2 カリフォルニア州 サンフランシスコ, テンス ストリート 1 3
7 9 # 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA01 DA03 EA02 GA11 HA01

4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA93X AB01 BA02 CA24 CA44

4C084 AA02 AA19 BA01 BA08 BA20 BA21 CA53 DA01 DA27 DA41

MA02 NA14 ZA36 ZA59 ZA75 ZA81 ZA96 ZB26 ZB35 ZC02

ZC75

4H045 AA10 AA30 CA40 DA01 DA50 EA22 EA28 FA74