

(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2017-504589

(P2017-504589A)

(43) 公表日 平成29年2月9日 (2017. 2. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 15/18 (2006. 01)	A 6 1 P 15/18	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015. 01)	A 6 1 K 35/76	4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/761 (2015. 01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

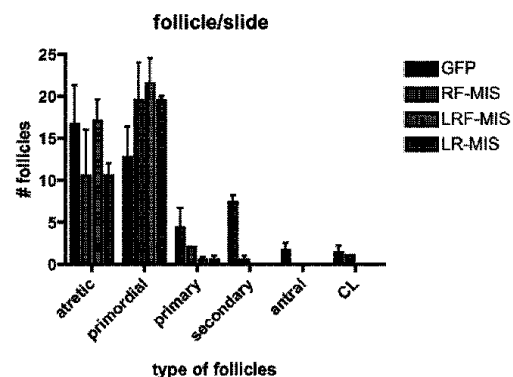
(21) 出願番号	特願2016-538687 (P2016-538687)	(71) 出願人	592017633
(86) (22) 出願日	平成26年12月11日 (2014. 12. 11)		ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ ション
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月21日 (2016. 7. 21)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ ストン フルーツ ストリート 5 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/069829		
(87) 国際公開番号	W02015/089321	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成27年6月18日 (2015. 6. 18)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/914, 671	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成25年12月11日 (2013. 12. 11)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 避妊および卵巣予備能の保存のためのミュー管抑制物質 (M I S) タンパク質の使用

(57) 【要約】

本発明の一態様は、ミュー管抑制物質 (MIS) を含む組成物を女性対象に投与することを含む、避妊方法を提供する。MISは、組換えMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターによって、対象において内因性に生産され得る。いくつかの実施形態において、避妊は永続的であり、1回の組成物の投与だけが必要である。本発明の他の態様は、MISまたは組換えMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む誘導可能なベクターを含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、卵巣予備能を保存する方法に関する。

FIG. 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ミュー管抑制物質 (MIS) タンパク質を含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、避妊方法。

【請求項 2】

MISタンパク質が、配列番号:3の26～560位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:3の26～560位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

MISタンパク質が、配列番号:4の25～559位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:4の25～559位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項1記載の方法。 10

【請求項 4】

MISタンパク質が、配列番号:5の25～567位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:5の25～567位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

MISタンパク質が、ベクターによって生産され、該ベクターが、プロモーターに作用可能に連結されたMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。 20

【請求項 6】

ベクターがウイルスベクターである、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

ウイルスベクターが、アデノウイルス (Adv) ベクター、AAVベクター、ボックスウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターからなる群より選択される、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

ポリヌクレオチドが、配列番号:1に対応するか、または配列番号:1の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドに対応する、請求項5～7のいずれか一項記載の方法。 30

【請求項 9】

ポリヌクレオチドが、配列番号:2に対応するか、または配列番号:2の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドに対応する、請求項5～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

組成物が薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

女性対象が動物である、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

動物がネコまたはイヌである、請求項11記載の方法。 40

【請求項 13】

女性対象がヒトである、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

投与が、1回の注入である、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

投与が、パルス投与に続く投与しない期間を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

投与が、皮下投与、または経皮パッチ、リング、バイオゲルもしくは注入を介した投与 50

である、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

MISタンパク質が、対象における濾胞形成の完全な停止のために十分に高い濃度で投与される、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、10%～50%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、請求項17記載の方法。

【請求項19】

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、50%～100%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、請求項17記載の方法。

10

【請求項20】

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、2～5倍高くまたは5倍を超えて高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、請求項17記載の方法。

【請求項21】

対象に投与されたMISが、1 μ g/ml～5 μ g/mlまで対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、請求項17記載の方法。

【請求項22】

ミュー管抑制物質(MIS)タンパク質を含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、女性対象における機能的卵巣予備能(FOR)の低下を妨げる方法。

【請求項23】

20

MISタンパク質が、配列番号:3の26～560位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:3の26～560位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項22記載の方法。

【請求項24】

MISタンパク質が、配列番号:4の25～559位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:4の25～559位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項22記載の方法。

【請求項25】

MISタンパク質が、配列番号:5の25～567位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:5の25～567位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項22記載の方法。

30

【請求項26】

MISタンパク質が、ベクターによって生産され、該ベクターが、プロモーターに作用可能に連結されたMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項22～25のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

プロモーターが誘導可能プロモーターである、請求項26記載の方法。

【請求項28】

ベクターがウイルスベクターである、請求項26記載の方法。

【請求項29】

40

ウイルスベクターが、アデノウイルス(Adv)ベクター、AAVベクター、ボックスウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターからなる群より選択される、請求項28記載の方法。

【請求項30】

ポリヌクレオチドが、配列番号:1に対応するか、または配列番号:1の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドに対応する、請求項26～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

ポリヌクレオチドが、配列番号:2に対応するか、または配列番号:2の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドに対応する、請求項26～29のい

50

れか一項記載の方法。

【請求項 3 2】

組成物が薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項22～31のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 3】

女性対象がヒトである、請求項22～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 4】

女性対象が動物である、請求項22～33のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 5】

投与が、1回の注入である、請求項22～34のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 3 6】

投与が、パルス投与に続く投与しない期間を含む、請求項22～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 7】

投与が、皮下投与、経口投与、経皮パッチ投与、腔内投与、リング、バイオゲルまたは注入を介した投与からなる群より選択される、請求項22～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 8】

MISタンパク質が、濾胞形成の完全な停止のために十分に高い濃度で投与される、請求項22～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 9】

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、10%～50%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、請求項38記載の方法。

20

【請求項 4 0】

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、50%～100%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、請求項38記載の方法。

【請求項 4 1】

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、2～5倍高くまたは5倍を超えて高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、請求項38記載の方法。

【請求項 4 2】

対象に投与されたMISが、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、請求項38記載の方法。

30

【請求項 4 3】

パルス投与が、組成物のパルス投与の合間に少なくとも3日の期間を含む、請求項36記載の方法。

【請求項 4 4】

パルス投与が、組成物のパルス投与の合間に少なくとも7日の期間を含む、請求項36記載の方法。

【請求項 4 5】

パルス投与が、組成物のパルス投与の合間に少なくとも7日～3週の期間を含む、請求項36記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ミューラー管抑制物質（MIS）タンパク質およびそのバリエーションを使用する、避妊および/または卵巣予備能の保存の方法に関する。いくつかの実施形態において、MISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションは、対象に投与される。いくつかの実施形態において、MISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションは、組換えMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションをコードするポリヌクレオチドを含むベクターによって、女性対象において内因性に生産される。

50

【 0 0 0 2 】

関連出願の相互参照

本願は、参照によりその内容がその全体において組み込まれる、2013年12月11日に出願された米国仮出願第61/914,671号の米国特許法第119条(e)下の恩典を主張する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

発明の背景

抗ミューラー管ホルモン (AMH) としても知られるミューラー管抑制物質 (MIS) は、糖タンパク質の大きなトランスフォーミング成長因子 - (TGF) 多重遺伝子族の140kDaジスルフィド結合ホモダイマー糖タンパク質メンバーである。この遺伝子族のタンパク質は、
10
全てが二量体の前駆体として生産され、切断および解離を要求する活性化のための転写後プロセッシングを行って生物活性C末端フラグメントを遊離する。同様に、MISの140キロダルトン (kDa) ジスルフィド結合ホモダイマーは、その活性化C末端フラグメントを生成するためにタンパク質分解で切断される。

【 0 0 0 4 】

MISは、胎児の睾丸において生産される生殖ホルモンであり、男性における女性第二性徴の構造の発達を阻害する。性分化前に胎児は二分化能を有し、男性における、女性のミューラー管 (すなわち、ファロピウス管、子宮、膣) と比較した男性のウォルフ管 (すなわち、前立腺、精管) の発達の選択は、一部分においてMISによって制御される。

【 0 0 0 5 】

ヒトMIS遺伝子は、染色体19に位置し、その発現は性的に二形性である。男性において、MIS発現は、胎児の睾丸において妊娠9週目に始まり、発現レベルが劇的に低下する思春期まで高レベルで続く。女性において、MISは、出生後にのみ顆粒膜細胞内で、成人男性と同様のレベルで前思春期から閉経期にまでわたって生産され、その後、発現は止まる。男性の胎児において、MISは、ミューラー管、ファロピウス管の前駆体、子宮、頸部、および膣の子宮上部 (upper third) の退行を引き起こす。
20

【 0 0 0 6 】

内因性に、MISは、顆粒膜細胞によって生産され、成長プール中の原始卵胞の動員の重要なゲートキーパーである。男性では、MISの過剰発現は、テストステロンレベルにおいて著しい低下を生じる、ライディッヒ細胞のステロイド産生を阻害する (Teixeira et al
30
, 1999)。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、避妊方法および女性の卵巣予備能を保護する方法に使用するための、野生型MISタンパク質と比較して増加した生物活性および効力を有するMISタンパク質およびMISタンパク質バリエーションの使用に関する。本発明は、ヒトMISタンパク質が、原始卵胞の初期段階で濾胞形成を停止するとの発見に基づく。特に、本発明者は、生殖能力のあるマウスモデルにおいて、例えば遺伝子治療を介したヒトMISタンパク質の投与は、濾胞成熟および卵母細胞の放出を妨げることができ、したがって排卵を阻害することができ、インビボのマウスモデルにおいて、ヒトMISタンパク質を投与されたマウスは、生殖することが
40
不可能であるか、または著しく減少した生殖割合を有することを実証した。したがって、本発明の一態様は、MISを含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、女性対象における避妊方法を提供する。したがって、本方法は、対象が妊娠することを妨げるため、および生殖を妨げるために使用され得る。

【 0 0 0 8 】

本明細書において、本発明者は、例えば遺伝子治療を介したMISタンパク質の投与が、マウスモデルにおいてインビボで、加齢に関連する原始卵胞の数の減少を妨げることができ、することも実証した。したがって、本発明の他の態様は、MISを含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、卵巣予備能を保存する方法、または女性の加齢に関連した卵胞の減少を妨げる方法を提供する。したがって、本発明は、卵巣予備能を保存することが必要な
50

対象、例えば、生涯のより後の時点まで生殖を遅らせることを望む対象、および／または生殖の年数を延長することを望む対象、ならびに早発卵巢老化（premature ovarian aging：POA）（これは潜在性の原発性卵巢機能不全としても知られる）を有するかもしれないそのリスクを有する対象において使用され得る。いくつかの実施形態において、MISタンパク質またはMISタンパク質をコードする核酸を投与する段階を含む方法は、卵巢予備能のさらなる減少を妨げるために、卵巢予備能の低下（diminished ovarian reserve：DOR）を有する対象に投与される。

【0009】

したがって、本発明の一態様は、ミュー管抑制物質（MIS）タンパク質を含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、避妊方法に関する。

10

【0010】

本発明の他の態様は、ミュー管抑制物質（MIS）タンパク質を含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、女性対象における機能的卵巢予備能（FOR）の低下を妨げる方法に関する。いくつかの実施形態において、女性対象における機能的卵巢予備能（FOR）の低下を妨げることは、対象における卵巢予備能を妨げる方法に関する。いくつかの実施形態において、そのような方法は、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを投与されなかった、年齢が一致する対象と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、もしくは少なくとも50%、または50%を超えて、天然の加齢に関連したFORの低下を阻害する。

【0011】

20

いくつかの実施形態において、MISタンパク質は、配列番号：3の26～560位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号：3の26～560位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、MISタンパク質は、配列番号：4の25～559位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号：4の25～559位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、MISタンパク質は、配列番号：5の25～567位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号：5の25～567位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、MISタンパク質は、ベクターによって生産され、ベクターは、プロモーターに作用可能に連結されたMISタンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、アデノウイルス（Adv）ベクター、AAVベクター、ポックスウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターを含む。いくつかの実施形態において、MISタンパク質は、配列番号：1に対応するポリヌクレオチド配列、または配列番号：1の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態において、MISタンパク質は、配列番号：2に対応するポリヌクレオチド配列、または配列番号：2の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる。

30

【0013】

いくつかの実施形態において、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

40

【0014】

本発明の全態様のいくつかの実施形態において、女性対象は、ネコまたはイヌなどの動物である。いくつかの実施形態において、女性対象は、ヒト女性である。

【0015】

投与は、当業者に共通に知られる任意の方法および経路によって実施され得、例えば、1回の注入（例えば、遺伝子治療の場合、例えば、永続的な避妊が望まれる場合）、またはパルス投与とそれに続く投与しない期間（例えば、一時的な避妊方法などにおいて濾胞形成の一時的な停止が望まれる場合、または対象の生涯のより後の期間で妊娠が望まれる場合）を含み得る。いくつかの実施形態において、パルス投与は、MISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションの投与の後、本明細書に開示された組成物のパルス投与の合間に

50

、無処置の、少なくとも3日の期間、または少なくとも7日の期間、約7日～3週の期間を含む。いくつかの実施形態において、投与は、皮下投与、または経皮パッチ、リング、バイオゲルもしくは注入を介した投与である。

【0016】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションは、対象における濾胞形成の完全な停止のために十分に高い濃度で投与される。いくつかの実施形態において、MISは、MISの投与無しと比較して、10%～50%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させるか、またはMISの投与無しと比較して、50%～100%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させるか、またはMISの投与無しと比較して、2～5倍高くもしくは5倍を超えて高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させるために十分な量で、対象に投与される。いくつかの実施形態において、MISは、1 μ g/ml～5 μ g/mlまで対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させるために十分な量で、対象に投与される。

10

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1A～図1Cは、マウスにおけるAAV9-MIS処置を示す。図1Aは、様々な力価のAAV9-LR-MISまたはGFPの単回感染の後の、ELISAによる血液MISタンパク質レベルを示す。図1B、60日間 3×10^{11} ウイルスで処置されたマウスにおける濾胞数。図1C、60日（同拡大率、インサート $10 \times$ ）での最大直径のMISおよびGFP卵巣の切片。より小さいLR-MIS卵巣における原始卵胞の存在量に注意。

20

【図2】様々なAAV9-MIS構築物の処置の後の、濾胞数/スライドの数を示す。AAV9-GFPで処置された対照マウスと比較した、ヒトMISバリエーションタンパク質を発現する以下の異なるAAV9-MISウイルス；AAV9-LR-MIS、AAV9-LRF-MIS、およびAAV9-RF-MISのうち1つで60日間 3×10^{11} pfuのウイルスで処置したマウスにおける濾胞数。AAV9-LR-MIS、AAV9-LRF-MIS、またはAAV9-RF-MISで処置されたマウスは、AAV9-GFPで処置されたマウスより、スライド当たりより多くの濾胞を有していた。これは、MISで処置されたマウスにおける保存を実証する。

【図3】様々なAAV9-MIS構築物での処置の後の、卵巣の寸法を示す画像セットである。卵巣切片は、AAV9-GFP対照または3つの修飾されたヒトMIS構築物：AAV9-LR-MIS、AAV9-LRF-MIS、およびAAV9-RF-MISで60日間処置された、3E11ウイルスで処置されたマウスにおいて最大直径で撮影された。全ての写真は同拡大率で撮影された。AAV9-LR-MIS、AAV9-LRF-MIS、またはAAV9-RF-MISで処置されたマウスは、対照AAV9-GFPで処置されたマウスと比較して、より小さな卵巣を有していた。これは、MISで処置されたマウスにおける濾胞形成の欠如を実証する。

30

【図4】異なる組換えMISタンパク質バリエーションを示す模式図である。フラッグ（flag）タグ（F）、修飾された切断部位（R）、およびアルブミンリーダー配列（L）を含む、RF、LRF、およびLR構築物の設計。

【図5】AAV9-MISの単回注入の後の、ELISAによるMISの血液レベルを示す。AAV9-RF-MIS、AAV9-LRF-MIS、およびAAV9-LR-MISの 3×10^{11} ウイルス粒子の注入は0日目に実施され、血液は、MIS ELISAを用いて60日間、毎週モニターされた。

40

【発明を実施するための形態】

【0018】

発明の詳細な説明

本発明は、避妊方法および女性の卵巣予備能を保護する方法に使用するための、野生型MISタンパク質と比較して増加した生物活性および効力を有するMISタンパク質およびMISタンパク質バリエーションの使用に関する。

【0019】

一態様において、本発明は、女性の避妊として、ミューラー管抑制物質（MIS）タンパク質または同タンパク質をコードする核酸を女性対象に投与する方法に関する。本発明は、ヒトMISタンパク質が、原始卵胞の初期段階で濾胞形成を停止するとの発見に基づく。濾

50

胞形成は、月経周期に入る前に、排卵前の大きな濾胞に発達する原始卵胞の動員を含む、卵胞の成熟である。濾胞形成が停止される場合、卵胞の成熟は停止され、妊娠の可能性を著しく減少させることができる。

【0020】

特に、本発明者は、例えば遺伝子治療を介したヒトMISTタンパク質の投与は、濾胞成熟および卵母細胞の放出を阻害することができ、したがって排卵を阻害することができることを実証した。重要なことに、本発明者は、ヒトMISTタンパク質をインビボで投与されたマウスは、生殖することが不可能であるか、または対照で処置されたマウスと比較して、著しく減少した生殖割合を有することを実証した。したがって、本発明の一態様は、MISを含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、女性対象における避妊方法を提供する。したがって、本方法は、対象の妊娠を妨げるため、および生殖を妨げるために使用される。避妊としての、または妊娠を妨げるためのMISの投与は、MISが典型的にはホルモン避妊薬により抑制されることを考慮すると、驚くべきことである (Kushnir et al., 「Ovarian Reserve screening before contraception?」、Reproductive Biomedicine Online、2014; 29; 527-529; Dolleman et al., 「Reproductive and lifestyle determinants of anti-mullerian hormone in a large population-based study」、J. Clin Endocrinol. Metabol., 2013, 98; 2106-2115)。

10

【0021】

本明細書において、本発明者はまた、例えば遺伝子治療を介した高レベルのMISTタンパク質の投与が、インビボでマウスモデルにおける加齢に関連した原始卵胞の数の減少を妨げることができることを実証した。重要なことに、MISは、原始卵胞の動員において役割を果たし、マウス卵巣において原始卵胞成長を阻害することが以前に報告されている一方 (Durlinger et al., Endocrinology、1999; 140; 5789-5796; Durlinger et al., Endocrinology、2002; 143(3); 1076-1084)、MISを慢性的に発現するトランスジェニックマウスにおいて異常な性的発達が生じたことが以前に示されたために (Behringer et al., Lett. Nature, 1990; 345; 167-170)、高レベルのMISが、卵胞の成熟を阻害することができたことは、驚くべきことである。さらに、MISは原始卵胞の動員を阻害することが報告されている一方、観察されたMIS阻害効果の大きさは、いつも幾分小さい。対照的に、本発明者は驚くべきことに、本明細書において、著しく高レベルのMISを用いて、濾胞形成が完全に停止されることを発見した。これは、MISのみが、原始卵胞の動員を調節するために十分であることを実証する。

20

30

【0022】

MISレベルは濾胞プールを反映しており (全ての成長中の濾胞がMISを分泌するため)、内因性MISは、十分な数の濾胞がすでに成長している場合に原始卵胞の過剰動員を避けるためのネガティブフィードバック調節因子であることから、血液中のMISレベルは、しばしばヒト女性における機能的卵巣予備能 (FOR) の評価において使用される。したがって、減少したMISレベルは、小さな卵巣予備能 (ほとんど原始卵胞が残されていない) および「加齢した」卵巣を示す、成長中の小さい濾胞プールを有する女性対象を示しており、異常に高レベルのMISは、女性対象に対して早発卵巣老化 (POA) のリスクの早期診断として使用され得 (Pigny et al., Serum anti-mullerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome、J. Clin Endocrinol. Metabol., 2006, 91; 941-945)、高レベルのMISは、異常な低い機能的卵巣予備能 (FOR) に関連する (Gleicher et al., FMR1 genotype with autoimmunity-associated polycystic ovary-like phenotype and decreased pregnancy chance、PLoS one、2010、5、e15303)。したがって、血液中の高レベルのMISは、早発卵巣老化 (POA) および低い機能的卵巣予備能 (FOR) を有する対象を同定することができると考えると、本発明者が、外因性MIS (例えば、タンパク質または遺伝子治療) の投与による高レベルのMISの維持が、思春期前の女性と同様に、原始卵胞の動員を阻止し、休止状態で卵巣を維持することができることを発見したことは、驚くべきことである。

40

【0023】

50

したがって、本発明の他の態様は、MISを含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、卵巢予備能を保存する方法、または女性の加齢に関連した卵胞の減少を妨げる方法、または機能的卵巢予備能（FOR）の加齢に関連した減少を妨げる方法を提供する。したがって、本発明は、卵巢予備能を保存することが必要な対象、例えば、生涯のより後の時点まで生殖を遅らせることを望む対象、および／または生殖の年数を延長することを望む対象、ならびに早発卵巢老化（POA）（これは潜在性の原発性卵巢機能不全としても知られる）を有するかもしれないもしくはそのリスクを有する対象において使用され得る。いくつかの実施形態において、MISタンパク質またはMISタンパク質をコードする核酸を投与する段階を含む方法は、卵巢予備能のさらなる減少を妨げるために、卵巢予備能の低下（DOR）を有する対象に投与される。

10

【0024】

MISタンパク質およびMISバリエーションタンパク質の投与を受容し得る対象

本発明の全態様において、本明細書に開示された方法および組成物による治療を受容し得る対象は、女性のヒトである。

【0025】

避妊剤としてのMIS

本明細書に述べたとおり、本発明の一態様は、避妊方法として、女性対象にMISタンパク質およびMISバリエーションタンパク質を投与することに関する。したがって、本明細書に開示された方法は、女性対象の妊娠を妨げるため、およびそれによる生殖を妨げるために使用され得る。本明細書に開示された、避妊剤としてまたは対象の妊娠を妨げるためにMISを使用する方法は、本明細書に開示されたMISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質（例えば、LR-MIS）または同タンパク質をコードする核酸を対象に投与する段階を含む。重要なことに、本発明者は、避妊剤としてのMISの使用を以前に報告したが（US特許第4,753,794号を参照、これは本明細書にその全体が組み入れられる）、LR-MIS、LRF-MISもしくはRF-MISなどのMISタンパク質バリエーションの使用、または避妊のためのMISタンパク質の1回の投与のための遺伝子治療は示されていないし、報告されていない。

20

【0026】

治療を受容し得る対象には、妊娠することを望まない任意の対象が含まれる。女性対象が、妊娠することを一時的に妨げることはまたは無防備な性行為もしくは性交時に妊娠することを永続的に妨げることを望むことにより、対象は、一時的に、またはより長期間もしくは永続的に、MISタンパク質もしくはMISタンパク質バリエーション（LR-MISなど）またはMISタンパク質をコードする核酸を投与され得る。適した対象には、任意の女性、例えば、約15～55歳、約15～25歳、約25～35歳、もしくは約35～55歳、または55歳を超える年齢範囲のヒト女性が含まれる。いくつかの実施形態において、例えば、非ヒト種の集団を制御することが重要である場合に、対象は非ヒト対象である。いくつかの実施形態において、対象は動物である。いくつかの実施形態において、動物は、ネコもしくはイヌ、または任意の野生動物である。いくつかの実施形態において、女性対象はヒトである。

30

【0027】

卵巢予備能の減少を妨げるMIS

当技術分野において、原始卵胞は、単層細胞に囲まれた卵母細胞からなり、卵母細胞は、生殖に関与する女性生殖細胞であることが知られている。生殖寿命を通して、原始卵胞の総数は、卵巢予備能とも呼ばれるが、動員と細胞死の結果として経時的に着実に減少する（McGee and Huseh, Endocrine Reviews 2000, 21 200-214）。そして、卵巢予備能の枯渇により、女性の不妊が生じる。理論に結びつけることを意図しないが、濾胞形成が停止または阻止された場合、原始卵胞は、動員を妨げられ、卵巢予備能の枯渇に寄与する1つの主要な因子を効果的に除去する。したがって、本発明の関連する態様は、MISを含む組成物または組換えMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む誘導可能なベクターを女性対象に投与する段階を含む、女性対象における卵巢予備能を保存する方法に関する。

40

【0028】

50

したがって、本明細書に述べたとおり、本発明の他の態様は、卵巢予備能を保存する方法または加齢に関連した卵胞の減少を妨げる方法において、MISタンパク質およびMISバリエーションタンパク質を女性対象に投与することに関する。本明細書に開示された、避妊剤としてまたは対象の妊娠を妨げるためにMISを使用する方法は、本明細書に開示されたMISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質（例えば、LR-MIS）または同タンパク質をコードする核酸を対象に投与する段階を含む。

【0029】

治療を受容し得る対象には、妊娠を遅らせること、生涯のより後の時点で妊娠すること、または生涯のより後の時点に出産可能な年を遅らせることを望む、任意の女性対象が含まれる。適した対象には、任意の女性、例えば、約25～30歳、約30～35歳、約35～40歳、もしくは約40～45歳、または45歳を超える年齢範囲のヒト女性が含まれる。

10

【0030】

このため、本発明の他の態様は、生涯のより後の時点まで生殖を遅らせることを望む対象、および/または生殖の年数を延長することを望む対象、ならびに早発卵巢老化（POA）（これは潜在性の原発性卵巢機能不全としても知られる）を有するかもしくはそのリスクを有する対象などの、例えば、卵巢予備能を保存することが必要な対象のために、卵巢予備能を保存する方法において、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を女性対象に投与することに関する。いくつかの実施形態において、MISタンパク質またはMISタンパク質をコードする核酸を投与する段階を含む方法は、卵巢予備能のさらなる減少を妨げるために、卵巢予備能の低下（DOR）を有する対象に投与される。

20

【0031】

治療を受容し得る対象は、加齢に関連した不妊を経験している者、早発卵巢老化（POA）（これは潜在性の原発性卵巢機能不全としても知られる）を有するかもしくはそのリスクを有する者、または早発卵巢機能不全（これは原発性卵巢機能不全としても知られる）を有する者である。いくつかの実施形態において、治療を受容し得る対象には、避妊後の無月経の症状、月経異常、または非MIS避妊の中止時の不妊を有する任意の女性ヒト対象が含まれる。

【0032】

いくつかの実施形態において、治療を受容し得る対象には、機能的卵巢予備能（FOR）評価後に、早発卵巢老化（POA）または卵巢予備能の低下（DOR）を有すると同定された、任意の女性ヒト対象が含まれる。そのような対象を同定するためのスクリーニングは、当技術分野において周知であり、卵胞刺激ホルモン（FSH）レベル、基底の黄体刺激ホルモン（LH）およびエストラジオール（ E_2 ）、ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）、FSH:LHレベル、インヒピンAおよびB、プロゲステロン（ P_4 ）および $P_4:E_2$ 割合、MISレベル、テストステロン、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、インスリン様増殖因子-1（IGF-1）およびIGF-1:IGF-1結合タンパク質の割合（IGF-1:IGFBP-1割合）、クエン酸クロミフェン負荷試験（CCCT）、ゴナドトロピン類似体刺激試験、外因性FSH卵巢予備能試験、卵巢生検、胞状濾胞の数、卵巢容積、卵巢間質血流のうち任意の1つまたは複数を測定することを含み、参照により全体が本明細書に組み入れられるJohnson et al. (Ovarian reserve tests for producing fertility outcomes for assisted reproductive technology; the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation Protocol for systematic review of ovarian reserve test accuracy, BJOG, 2006; 113; 1472-1480)に記載される。

30

40

【0033】

卵巢予備能を保存するための方法において治療を受容し得る他の対象には、女性を、卵巢手術、化学療法、放射線療法、脊髄移植、抗ウイルス治療、および他の医学的リスク因子などの医原性因子を含むがこれら限定されない、早発卵巢老化（POA）にさせる因子を有するか、またはそれを経験する可能性のある対象を含む。いくつかの実施形態において、対象は、化学療法、化学放射線療法、放射線療法、または他の癌治療を受けている。原始卵胞が動員されることを妨げることによって、化学療法薬物によって影響を受ける原始

50

卵胞のリスクが低下される。重要なことに、化学療法の間のMISタンパク質またはそのMISタンパク質バリエーションを含む組成物の同時治療は、薬物誘導性の早発卵巢機能不全を減少させるか、または妨げるための方法において使用され得る。細胞傷害性薬物、特に分裂細胞を選択的に損傷する化学療法は、しばしば成長中の濾胞に対して非常に毒性である。成長中の濾胞の損失は、原始卵胞の過剰動員を導く、ネガティブフィードバックの調節解除を引き起こす（すなわち、一時的に低いMISレベル）。その後、それらの濾胞は、化学療法剤および繰り返される化学療法サイクルの手順により、全ての原始卵胞が卵巢で枯渇するまで損傷を受ける。女性はある量の原始卵胞を持って生まれるので、化学療法または他の状況による早発卵巢機能不全は、不可逆的である。したがって、本発明は、MISによって提供されるネガティブフィードバックの調節解除を妨げるため、および/またはこのネガティブフィードバックを再建するために、MISタンパク質およびMISタンパク質バリエーションを、化学療法の間または後に癌患者に投与することを含む。

10

【0034】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示された方法、組成物、およびキットによる処置を受容し得る女性対象は、早発卵巢老化（POA）になりやすい女性対象である。

【0035】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示された卵巢予備能を保存するための方法を受容し得る対象には、子宮内膜症、多嚢胞性卵巢症候群（PCOS）、FMR1変異（例えば、参照により全体が本明細書に組み入れられるUS特許出願第2011/0020795号および第2014/0206756号に開示されるFMR1遺伝子におけるCGGリピートの測定）を有するかもしくは有する可能性がある対象、26個未満のGCC FMR1リピート（het-norm/low-subゲノムまたはhom/low/low-subゲノム）、BRAC1変異、ターナー症候群、自己免疫、甲状腺自己免疫（例えば、甲状腺機能亢進症または甲状腺機能低下症）、副腎自己免疫、任意の他の自己免疫、自己免疫多腺性症候群、自己免疫疾患の家族歴（例えば、第一度近親者または第二度近親者）、繰り返された妊娠喪失の履歴、または早期の母系/同胞閉経の履歴を有する対象の、任意の対象が含まれる。

20

【0036】

MISもしくはMISバリエーションタンパク質または同タンパク質をコードする核酸を含む組成物の投与は、早発卵巢老化（POA）を減速、停止、および/もしくは逆行させるための方法、ならびに/または不妊を治療するための方法において使用され得る。

30

【0037】

ミューラー管抑制物質（MIS）タンパク質およびMISタンパク質バリエーション

理論に結びつけることを意図しないが、ミューラー管抑制物質（MIS）は、糖タンパク質のTGF 多重遺伝子族の一員である。この遺伝子族のタンパク質は、全てが二量体の前駆体として生産され、切断および解離を要求する活性化のための転写後プロセッシングを行って、生物活性C末端フラグメントを遊離する。MISは、それぞれが57kDaのN末端ドメインおよび12.5kDaのカルボキシ末端（C末端）から構成される、同一の70kDaジスルフィド結合したモノマーからなる140kDaのダイマーである。これにより、MISは、2つの同一のモノマー（これにより、「ホモダイマー」と呼ばれる）を含み、それぞれのモノマーは、非共有結合で保持された2つのドメイン、N末端およびC末端ドメインを含む。精製されたC末端ドメインは、生物学的に活性な成分であり、活性のために切断が要求される。N末端ドメインは、インビボでタンパク質のフォールディングを助け、C末端ペプチドのそのレセプター、たとえばMISRIおよびMISRIIへのデリバリーを容易にする。MISの非切断変異体は生物学的に不活性である。

40

【0038】

カルボキシ末端の活性ドメインは、TGF 族メンバー、たとえばTGF-B 1、2、および3、インヒビン、アクチビン、および骨形成タンパク質、ならびに成長および分化因子（GDFs）のメンバーとアミノ酸相同性を有する。MISCALBOキシ末端ドメインの構造は、分子モデリング（Lorenzo, Donahoe, et al., 未公開）を用いて、TGF の三次元構造に対する相同性により明らかなように、その構造的安定性を導く、分子内および分子間ジスルフィド

50

架橋の両方に関連する7つのシステインにより支持される。

【0039】

他のTGF β 族メンバーと同様に、MISは、プラスミンにより切断されて、そのアミノ末端およびカルボキシ末端ドメインを形成する。このタンパク質分解過程は、その生理学的活性のために要求され、TGF β の配列において見出された二塩基切断部位に類似する位置の部位において起こる。得られた産物は、低pHにおいて解離する非共有結合複合体において密接に会合される。それゆえ、プラスミン処理および分子サイズ排除クロマトグラフィーを伴う技術的に複雑かつ時間を要求するプロトコルが、アミノ末端からのカルボキシ末端の分離を増化または完了させるために要求される。

【0040】

成熟MISタンパク質のプロセッシングは、リーダー配列（たとえば、配列番号：3のアミノ酸1~25）の切断および除去、N末端およびC末端ドメインを生産するための第1の部位におけるMISタンパク質の切断、ならびに生物活性ホモダイマーMISタンパク質を形成するための同一のモノマーへの鎖内および鎖間ジスルフィド結合により連結するジスルフィドである、これらドメインのモノマーへの形成を含む。

【0041】

MISは、プラスミンに対してセンシティブである2つの主要な切断部位を含み、組換えヒトMISタンパク質の精製は困難で複雑になる。第1の一塩基切断部位Q/Rが存在し、これはヒト野生型MISタンパク質のアミノ酸位置426~427（リーダー配列は切断されている）に位置する（RAQ/R切断部位は、配列番号：3のアミノ酸448~451に対応し、これは配列番号：3のリーダー配列1~25を含む野生型hMISタンパク質である）。MISの活性カルボキシ末端ドメインを遊離させるこの部位での切断は、コンセンサス・フリン切断部位に似ている。MISフラグメントのアミノ末端配列決定により同定された（「R/S」としても示される）第2の切断部位は、（本明細書の配列番号：3のアミノ酸254~255に対応する）野生型MISのアミノ酸末端ドメインの残基229~230に位置する。この部位は、R/Sを含むが、フリン切断のためのコンセンサスであるArg-X-(Arg/Lys)-Argには従わない。外因性プラスミンでの消化の後のアミノ末端MISからの精製されたカルボキシ末端の分離は、酸性条件下で分子サイズ排除クロマトグラフィーを以前は用いていた。この技術は、MIS消化を制御するために極めて注意を要する。なぜなら、プラスミン中でのMISの長いインキュベーションは、第1および第2の部位の両方の切断のため、カルボキシ末端MISドメインと22および34kDaの他のフラグメントとを作り出し、サイズ排除によって互いから分離するのは極めて困難だからである。カルボキシ末端ドメインを除いて、プラスミン消化後に形成されたすべてのフラグメントはグリコシル化されるので、MISのカルボキシ末端ドメインを精製するためにサイズクロマトグラフィーの代わりにコムギ胚芽レクチンアフィニティを用いることができる。プラスミン切断後、得られたフラグメントは、参照により全体が本明細書に組み込まれるLorenzo et al., J. Chromatography, (2001), 776; 89-98に開示されるように、アミノ末端およびカルボキシ末端ドメインを解離させるために、pH3.5でコムギ胚芽レクチンカラムにかけることができる。

【0042】

精製を容易にし、精製の間のMISフラグメントの生産を妨げるために、（例えば、カルボキシ末端MISドメインに加えて22および34kDaフラグメントの両方が、第1および第2部位の両方での切断により生産される）、本発明者は、ヒト野生型MISのアミノ酸426~427位における第1のRAQ/R切断部位（本明細書の配列番号：3のアミノ酸448~451位に対応する）をRAR/Rに改変した、修飾された組換えMISタンパク質（本明細書において「LR-MIS」と呼び、配列番号：4に対応する）を開発した。これは、参照により本明細書に全体が組み入れられるPCT出願PCT/US14/024010に開示され、本発明者は、本明細書の配列番号：3の450位のQをRに改変したことが、完全な生物活性を有するヒトMISタンパク質の高度に精製された切断調製物の生産を可能にしたことを以前に実証した。

【0043】

したがって、本発明の全ての態様において、本明細書に開示された方法、組成物、およ

10

20

30

40

50

びキットに使用するためのMISタンパク質は、少なくとも配列番号:3の26～560位を含む野生型MISであり得、または代替的に、修飾されたMISタンパク質、もしくは配列番号:3の残基448～451位の第1の切断部位がRAQ/RからRAR/Rに改変されたMISバリエーション（例えば、少なくとも配列番号:4のアミノ酸25～559位を含むMISバリエーションタンパク質）であり得る。

【0044】

上述のとおり、成熟野生型MISタンパク質は、配列番号:3の野生型MISタンパク質のアミノ酸残基1～25位に対応する、N末端リーダー配列を含むプロホルモンとして最初に生産される。リーダー配列は、成熟MISタンパク質にするために切断される。本発明の全態様において、本明細書に開示された方法、組成物、およびキットに使用するためのMISタンパク質または同タンパク質をコードする核酸配列は、配列番号:3のアミノ酸1～25位のMISリーダー配列が、例えば、ヒト血清アルブミンリーダー配列などの異なるリーダー配列に置換された、非内因性MISリーダー配列を有し得る。本発明の全態様において、本明細書に開示された方法、組成物、およびキットに使用するためのMISタンパク質または同タンパク質をコードする核酸配列は、ヒト野生型MISのアミノ酸426～427位の第1のRAQ/R切断部位（本明細書の配列番号:3のアミノ酸448～451位に対応する）がRAR/Rに改変され、内因性MISリーダー配列がアルブミンリーダー配列に置換された、配列番号:4に対応する修飾された組換えMISタンパク質（本明細書において「LR-MIS」と呼ぶ）である。

【0045】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示された方法、組成物、およびキットに使用するためのMISタンパク質または同タンパク質をコードする核酸配列は、少なくとも配列番号:4のアミノ酸25～559位（第1のRAQ/R切断部位がRAR/Rに改変されている）、および参照により全体が本明細書に組み入れられるPCT出願PCT/US14/024010に開示されたものなどの任意の適したN末端リーダー配列を含む、修飾された組換えMISタンパク質である。

【0046】

異なる非内因性リーダー配列はしばしば、宿主細胞における問題のポリペプチドの発現および/分泌を改善し、組換えタンパク質の生産のために有用である。一般に、遺伝子操作手順により要求されるタンパク質を生産するための効率的な方法は、それを細胞から分泌することを含み、その手順には、たとえば要求されるタンパク質（たとえば、MIS）およびプレプロペプチド（シグナルペプチド+プロペプチド）を含む融合タンパク質の宿主細胞での発現、次に、その宿主の酵素による細胞内での切断（例えば、プロセッシング）、続いて、細胞外への分泌、が含まれる。しかしながら、この方法に従って、融合タンパク質は、成熟タンパク質になるために宿主の酵素により2回、切断されなければならない、成熟タンパク質の収率の低下および残留した融合タンパク質を伴う成熟タンパク質のコンタミネーションを引き起こす。

【0047】

したがって、分泌されたタンパク質は、分泌経路に入るのを確実にするリーダー配列を含む前駆体形態において最初に細胞に発現される。シグナルペプチドとも呼ばれるこのようなリーダー配列は、その発現された産物を、小胞体（ER）の膜を横切って方向付ける。シグナルペプチドは、一般に、ERへのトランスロケーションの間、シグナルペプチダーゼにより切断される。分泌経路に入った後、タンパク質は、ゴルジ装置に輸送される。ゴルジから、タンパク質は、細胞空胞もしくは細胞膜のようなコンパートメントに導く異なる経路に従うことができ、またはそれは外部媒体に分泌されるように細胞の外に送られ得る（Pfeffer and Rothman (1987) Ann. Rev. Biochem. 56:829-852）。

【0048】

分泌されるタンパク質の工業生産のため、生産すべきタンパク質は、宿主細胞または宿主生物から効率的に分泌される必要がある。シグナルペプチドは、たとえば、生産すべきタンパク質のネイティブのシグナルペプチド、異種シグナルペプチド、またはネイティブおよび異種シグナルペプチドのハイブリッドであり得る。しかしながら、現在、知られているシグナルペプチドの使用にはいくつかの問題がある。非ヒト宿主細胞または生物からヒトタンパク質を生産する場合にしばしば発生する1つの問題は、ネイティブシグナルペ

10

20

30

40

50

プチドが、効率的なトランスロケーションおよび/またはシグナルペプチドの切断を確実にしないことである。これは、低いタンパク質分泌の速度、および/またはシグナルペプチドの不正確な切断によるN末端延長を示す成熟タンパク質の分泌を導く。これにより、シグナルペプチドの選択は、タンパク質の工業生産のために極めて重要なものである。

【0049】

タンパク質の分泌を方向付けるリーダー配列の付加において、前駆体形態は、成熟化の間に切断される補足的なリーダー配列を含み得る。プロペプチドと呼ばれるこれらの補足的リーダーペプチドは、通常、シグナルペプチドの次にある。実質的に、すべてのペプチドホルモン、多数の生物活性タンパク質（たとえば、成長因子、レセプター、および細胞接着分子、およびMIS等）、ならびに多くの細菌毒素、およびウイルスエンベローブ糖タンパク質は、成熟および生物学的に活性なタンパク質を生産するために翻訳後に切除されるプロペプチドを含む(Seidah and Chretien (1999) Brain Res. 848:45-62)。

【0050】

ペプチドは、さらに、プロタンパク質コンバーターと呼ばれる酵素により切断される。哺乳動物のプロタンパク質コンバーターは、たとえば、サブチリシンコンバーター、PCSK1、PCSK2、およびフリンを含む。フリンは、広範に発現され、トランス-ゴルジネットワークに位置する。フリンは、分泌経路コンパートメントにおいて多数のプロタンパク質基質を活性化する(Thomas (2002) Nat Rev Mol Cell Biol. 3:753-766)。より詳しくは、フリンは、細胞構造、エンドソーム、リソソーム、および分泌顆粒を含む、分泌経路タンパク質をそれらの最終的な目的地に仕分ける原因である後期ゴルジ構造であるトランスゴルジネットワークに局在化する。フリンが切断する部位は広範囲に研究されている。切断部位は、コンセンサス配列R-X-L/R-R（式中、Xはいずれかのアミノ酸を示し得る。(Nakayama (1997) Biochem. J 327:625-635)）のカルボキシ末端のアルギニンの後に位置する。切断効率は、Xがリジン、バリン、イソロイシン、またはアラニンである場合に増加する(Watanabe et al (1992) J Biol. Chem. 267:8270-8274)。

【0051】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、配列番号：3のアミノ酸残基1~25に対応するMISタンパク質の野生型リーダー配列に代わる、改変されたリーダー配列を含む。特定の実施形態において、配列番号：3のアミノ酸残基1~25のネイティブリーダー配列は、非MISリーダー配列、例えばこれらに限らないが、アルブミンリーダー配列またはその機能的フラグメントで置換される、特定の実施形態において、非MISリーダー配列は、ヒト血清アルブミン配列(HSA)、たとえば、配列番号：7（つまり配列番号1の核酸1~78）の核酸によりコードされる配列番号：6（つまり配列番号4のアミノ酸1~24）に対応するリーダー配列である。

【0052】

特定の実施形態において、HSA配列は、配列番号：6の機能的フラグメント、たとえば、配列番号：6の少なくとも23、少なくとも22、少なくとも21、少なくとも20、少なくとも19、少なくとも18、少なくとも17、少なくとも16、少なくとも15、少なくとも14、少なくとも13、少なくとも12、少なくとも11、少なくとも10、または10未満の連続または非連続アミノ酸である。HSAリーダー配列の改変型も本発明における使用に含まれ、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,759,802号に開示される。特定の実施形態において、HSAリーダー配列の機能的フラグメントは、参照により全体が本明細書に組み込まれる欧州特許EP2277889に開示される

MKWVTFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO: 8)

またはそのバリエーションである。HSAシグナル配列

(例えば、MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR, SEQ ID NO: 6)

のプレプロ領域は、フラグメント、たとえば、HSAシグナル配列のプレプロ領域

(例えば、MKWVTFISLLFLFSSAYS, SEQ ID NO: 9)

またはそのバリエーション、たとえば

MKWVSFISLLFLFSSAYS, (SEQ ID NO: 10)

10

20

30

40

50

を含む。

【 0 0 5 3 】

特定の実施形態において、リーダー配列は、配列番号：6のアミノ酸残基と、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%、同一である。

【 0 0 5 4 】

本明細書に用いるHSAリーダー配列は、組換えヒトMISTタンパク質の予期される収率の増加（より高い濃度およびより高い生産の両方）を引き起こすことが証明されている（PCT/US14/024101の図2および3を参照）。しかしながら、HSAリーダー配列の存在は、（配列番号：3の450/451の切断部位に対応する）第1の切断部位からの切断において、驚くべきかつ予期されない増加を引き起こした。この増加した収率および増加した切断は、驚くべきものであった。なぜなら、収率の増加（およびそれゆえ、細胞により生産されるより多くのタンパク質）に伴い、利用できる切断酵素の活性が飽和し拡大しすぎるにつれて、切断の減少が予測されるからである。しかしながら、そうではなく、実際に、タンパク質生産の増加に伴い、第1の切断部位からの切断が増加するというまさに反対の結果が起きた。

【 0 0 5 5 】

他のリーダー配列も、たとえば、配列番号：3のアミノ酸1～25を置換するために、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質における使用のために含まれる。このようなリーダー配列は当業者に公知であり、参照により全体が本明細書に組み込まれるUS 2007/0141666に開示されるような、組織型プラスミノーゲンアクティベータープロペプチドに融合したイムノグロブリニンシグナルペプチド(IgSP-tPA)を含むリーダー配列を含む。分泌されるタンパク質の生産のために多数の他のシグナルペプチドが用いられる。それらの一つはネズミイムノグロブリニンシグナルペプチド(IgSP, EMBL Accession No. M13331)である。IgSPは、1983にLoh et al.により最初に同定された(Cell. 33:85-93)。IgSPは、哺乳動物細胞においてすぐれた発現を引き起こすことが知られている。たとえば、欧州特許第0382762号は、IgSPとセイヨウワサビペルオキシダーゼとの間の融合ペプチドを構築することにより、セイヨウワサビペルオキシダーゼを生産する方法を開示する。

【 0 0 5 6 】

他のリーダー配列は、例えばこれらに限らないが、MPIF-1シグナル配列（たとえば、GenBank Accession number AAB51134のアミノ酸1～21）

MKVSVAALSCLMLVTALGSQA (SEQ ID NO: 11)

; スタニオカルシン (stanniocalcin) シグナル配列

(MLQNSAVLLLLVISASA, SEQ ID NO:12)

; インペルターゼシグナル配列

(例えば, MLLQAFLFLLAGFAAKISA, SEQ ID NO:13)

; 酵母接合因子アルファシグナル配列 (たとえば、K. ラクティス (K. lactis) キラートキシンリーダー配列); ハイブリッドシグナル配列

(例えば, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO:14)

; HSA/MF -1 ハイブリッドシグナル配列 (HSA/kex2としても知られる)

(例えば, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEDKR, SEQ ID NO:15)

; K. ラクティス キラー / MF -1 融合リーダー配列

(例えば, MNIFYIFLLSFVQGSLEDKR, SEQ ID NO:16)

; イムノグロブリンIgシグナル配列

(例えば, MGWSCILFLVATATGVHS, SEQ ID NO:17)

フィブリン B 前駆体シグナル配列

(例えば, MERAAPSRRVPLPLLLLGGGLALLAAGVDA, SEQ ID NO:18)

; クラスチリン前駆体シグナル配列

(例えば, MMKTLLLFVGLLLTWESGQVLG, SEQ ID NO: 19)

; およびインスリン様成長因子結合タンパク質 4 シグナル配列

10

20

30

40

50

(例えば, MLPLCLVAALLLAAGPGPSLG, SEQ ID NO:20)
を含む。

【 0 0 5 7 】

細菌系において組換えMISを生産することが要求される場合、リーダー配列は、米国出願US出願第2011/0020868号に開示されるような、細菌のリーダー配列を含み得る。組換えポリペプチドまたはタンパク質を発現するのに用いるためのいくつかの他の分泌シグナルが記載されている。たとえば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第5,914,254号、米国特許第4,963,495号、欧州特許第0 177 343号、米国特許第5,082,783号、PCT公開番号WO 89/10971号、米国特許第6,156,552号、米国特許第6,495,357; 6,509,181; 6,524,827; 6,528,298; 6,558,939; 6,608,018; 6,617,143号、米国特許第5,595,898; 5,698,435; および6,204,023号、米国特許第6,258,560号、PCT公開番号WO 01/21662, WO 02/068660、および米国出願公報第2003/0044906号、米国特許第5,641,671号、および欧州特許第 EP 0 121 352号である。

【 0 0 5 8 】

さらなる実施形態において、本明細書に開示された方法、組成物、およびキットに使用するためのMISタンパク質または同タンパク質をコードする核酸配列はまた、精製を助けるためのタグを含む。タグは、当技術分野において周知であり、参照により全体が本明細書に組み入れられるPCT出願PCT/US14/024010に開示される。タンパク質タグは、コムギ胚芽レクチンアフィニティーまたはサイズクロマトグラフィーカラムを用いる複雑な方法を必要とせず、C末端ドメインの精製を助けるために有用である。本発明者はまた、配列番号:5に対応する「LRF-MIS」バリエーションを生産するために、C末端ドメインのN末端にタグ（例えば、Flagタグ）を以前に追加した。任意のタンパク質タグが、本明細書における使用のために含まれ、参照により全体が本明細書に組み入れられるPCT/US14/024010に開示される。

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、少なくとも1つの内部標識または「タグ」を含む。特定の実施形態において、タグは、たとえば、c-myc、ポリヒスチジン、またはFLAGタグであり得る。特定の実施形態において、タグは、FLAGタグ、たとえば、配列番号:21のFLAGタグである。FLAGタグは、配列番号:22の核酸によりコードされ得る。

【 0 0 6 0 】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質上のタグは、切断部位からすぐ下流のカルボキシ末端において内部にある。それはC末端の最もフレキシブルな部分である、レセプターへの結合および特異性の決定に関連しないので、C末端の「フィンガーチップ」である(Papakostas et al, 2010, Lorenzo et al, 2002)。特定の実施形態において、この部位での標識化は、生物学的活性を保存する可能性が最も高い。特定の実施形態において、タグ、たとえばFLAGタグは、第1の切断部位の後に、たとえば、(慣用的なタンパク質命名法のアミノ酸残基425に対応する)配列番号:3のアミノ酸450の後に、位置する。特定の実施形態において、タグは、(MISタンパク質の通常のアミノ酸命名法下でアミノ酸残基427および428に対応する)配列番号:3のアミノ酸452と453との間に位置する。

【 0 0 6 1 】

別の実施形態において、タグまたは標識は、配列番号:3のアミノ酸450および560の間のいずれかの位置に位置する。特定の実施形態において、タグは、配列番号:3の位置450において改変アミノ酸の後2アミノ酸残基に挿入される。しかしながら、MISのC末端ドメインのN末端のタグの位置が好ましい。なぜなら、C末端ドメインのC末端の位置は、C末端ドメインを全体的に不活性にし、MISタンパク質の生物活性を大きく減少させるからである。

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態において、組換えMISタンパク質は、1より多いタグ、たとえば少なくとも

も2、少なくとも3、少なくとも4、または4を超えるタグを含む。特定の実施形態において、タグは、連続的（たとえば、次々に）である、特定の実施形態において、それらは、組換えヒトMISタンパク質において、分散（たとえば、断続的に）である。好ましくは、タグは、MISRIIへの結合および活性化において組換えMISタンパク質機能の生物活性を妨害または実質的に影響を与えない。特定の実施形態において、組換えMISタンパク質が1を超えるタグを含む場合、タグは、同じタグである。別の実施形態において、組換えMISタンパク質が1を超えるタグを含む場合、タグは、異なるタグであり、たとえば、組換えMISタンパク質は、FLAGタグおよびヒスチジンタグを含み得る。Flagタグの小さなサイズは、それが、C末端のフレキシブルな非結合N末端ドメインに含まれるのを許容する。したがって、特定の実施形態において、当業者に知られたいずれかのタグを、Flagタグの代わりに用いることができ、たとえば、約5～10アミノ酸、約10～15アミノ酸、約15～20アミノ酸、20～30アミノ酸、約30～50アミノ酸のタグである。特定の実施形態において、タグは、50アミノ酸を超える長さのタグは推奨されない。なぜなら、タグは、C末端ドメインのフレキシブルなN末端を立体的に妨害し、これにより組換えMISタンパク質の生物活性を阻害し得るからである。

10

20

30

40

50

【0063】

特定の実施形態において、タグで標識化、たとえばFLAGで標識した組換えヒトMISタンパク質、たとえば、本明細書に開示されるLRF組換えヒトMISタンパク質は、完全な生物活性を伴って、高度に精製された効率的に切断された調製物を生産するために、単一ステップにより溶出することができる。スケール・アップする場合、組換えヒトMISタンパク質のこの精製は、臨床適用に適するであろう。さらに、それは、臨床および実験の両方において、種々の結合アッセイに有用であろう。翻訳の間のMISの内部ラベリングは、タンパク質の精製後のラベリングより有効である。なぜなら、ヨウ素化またはビオチン化がMIS生物活性を大きく減少させるからである。驚くことに、本発明者らは、LRF組換えヒトMISタンパク質構成物が、野生型MISより生物活性が高いことを発見した。FLAGタグ配列の挿入は、いくつかの他の明確な利点を有する。第1に、その特有のアミノ酸ドメインは、（マウス脳ホスファターゼを除き）いずれの他の遺伝子にも存在しないので、抗FLAG抗体を極めて特異的にする。第2に3xFLAGペプチドでのタンパク質の溶出は、FLAG MISに特異的であり、アガロースビーズに非特異的に結合する他のタンパク質に特異的でない。

【0064】

いくつかの実施形態において、標識化組換えヒトMISタンパク質、たとえば、内部FLAGを有するMISは、MIS結合研究のためおよび薬物動態研究において追跡するために、前臨床および臨床的使用のためにスケール・アップのために用いることができる、MISの高度に純粋かつ生物学的に活性な内部標識形態を生産するための効率的な方法において有用である。

【0065】

上述のとおり、本明細書に開示された方法において有用なMISタンパク質は、野生型MIS、またはLR-MIS、LRF-MISなどのMISバリエーションであり得る。そのようなLR-MISおよびLRF-MISタンパク質バリエーションは、非天然タンパク質であり、組換え手段、例えば、本明細書に開示された核酸インビトロ発現システムからの発現によって、生産される。

【0066】

ヒト組換えMISタンパク質のバリエーションおよびホモログ

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法、組成物およびキットにおいて有用な組換えヒトMISタンパク質は、コアMISタンパク質配列、たとえば、配列番号：3のアミノ酸残基26～560内の修飾（配列番号：3のQからRへのアミノ酸残基450の修飾を含む）および/またはC末端ドメインの最初におけるタグの挿入を有し得る。このようなバリエーションは、野生型MISタンパク質と相同であると考えられる。

【0067】

本明細書に用いる場合、用語「ポリペプチド」は、アミノ酸のポリマーおよびその等価物をいい、その産物の特定の長さを指さない。これにより、ペプチド、オリゴペプチド、

およびタンパク質が、ポリペプチドの定義に含まれる。誘導体は、別の配列と比べて保存性アミノ酸置換を有するポリペプチドである。誘導体は、さらに、タンパク質の別の修飾、たとえば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化等の修飾を含む。

【0068】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、相同な組換えヒトMISタンパク質と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%類似している。本明細書に用いる場合、2つのポリペプチド配列の文脈における「類似性」または「類似性割合（パーセンテージ）」は、以下の配列比較アルゴリズムの一つを用いて、または視覚的検査により測定して、最大の一致のために比較および整列させた場合に、同じであるか、または同じであるアミノ酸残基もしくはその保存性置換の特定の割合を有する、2またはそれを超える配列またはサブ配列をいう。たとえば、第1の配列に含まれる数と等しい数のアミノ酸と比べた時に、または後述のような当該技術分野において知られているコンピュータ類似性プログラムにより整列されているポリペプチドのアラインメントと比べた時に、第1のアミノ酸配列が、第2のアミノ酸配列に対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、90%、または95%、同一であるか、保存的に置換されている場合、その第1のアミノ酸配列は第2のアミノ酸配列に類似すると考えることができる。

10

【0069】

配列番号：1のMISの相同体ならびに機能的誘導体および機能的フラグメントも本発明における使用に含まれ、たとえば、発現ライブラリーからのMISの発現により、同定することもできる(たとえば、Sambrook et al. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press); Ausubel et al., 前掲も参照)。変異した内因性遺伝子配列は、異種トランスジーンとすることができる。たとえば、自然発生ゲノム内で知られていないMISにおける変異をコードするトランスジーンは、ネズミおよび非ネズミ、たとえば、ヒト種に関して異種トランスジーンである。MISタンパク質、たとえば、米国特許第5,427,780, 5,359,033, および 5,661,126号(参照により全体が本明細書に組み込まれる)に開示されるもの。

20

【0070】

コアヒトMISタンパク質配列の一次構造におけるバリエーション(たとえば、(配列番号：3のQからRへのアミノ酸残基450の改変を含む)配列番号：3のアミノ酸26~560、および/またはC末端ドメインのN末端の始まりにおけるタグの挿入)、またはその機能的フラグメントもしくは相同体は、本発明における使用のために包含され、たとえば、欠失、付加、および置換を含む。置換は、保存性であっても、非保存性であってもよい。組換えヒトMISタンパク質とバリエーションとの間の差は、一般に、要求される特性を保存し、不要な特性を軽減もしくは除去し、および要求されるまたは新しい特性を付加する。たとえば、組換えヒトMISタンパク質のバリエーションは、野生型MISタンパク質と比べて優れた活性を有し得る。

30

【0071】

本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質のコアヒトMISタンパク質配列(たとえば、配列番号：3のアミノ酸残基26~560)は、タンパク質のアミノ酸配列を変更するよう直ちに操作することができる。MISタンパク質またはその機能的フラグメント、相同体、もしくはバリエーションをコードする遺伝子は、インビトロ変異誘発のための種々の公知の技術により、とりわけ、本明細書においてバリエーションまたはムテインとして言及される、自然発生ヒトタンパク質またはそのフラグメントのバリエーションを生産するため、操作することができ、本発明にしたがって用いることができる。

40

【0072】

組換えヒトMISタンパク質への他の改変

本発明に役立つ組換えヒトMISタンパク質は、たとえば、それらの親水性を増加させるように、それらのアミノ末端において改変することもできる。疎水性の増加は、親ペプチド-脂質コンジュゲートが組み込まれている脂質ベースの担体の表面上のペプチドの暴露を増強する。それらの親水性を増加させるようにペプチドへの結合に適した極性基は、公

50

知であり、たとえばこれらに限らないが、アセチル("Ac")、3-シクロヘキシルアラニル("Cha")、アセチル-セリン("Ac Ser")、アセチル-セリル-セリン("Ac-Ser-Ser-")、スクシニル("Suc")、スクシニル-セリン("Suc-Ser")、スクシニル-セリル-セリン("Suc-Ser-Ser")、メトキシスクシニル("MeO-Suc")、メトキシスクシニル-セリン("MeO-Suc-Ser")、メトキシスクシニル-セリル-セリン("MeO-Suc-Ser-Ser")、およびセリル-セリン("Ser-Ser-")基、ポリエチレングリコール("PEG")、ポリアクリルアミド、ポリアクリロモルフォリン、ポリビニルピロリドン、ポリヒドロキシ基、ならびにカルボキシ糖類、たとえば、ラクトビオニック(lactobionic)、N-アセチルノイラミン酸、およびシアル酸基を含む。これらの基のカルボキシ基は、アミド結合を介してペプチドのN末端に連結されよう。現在、好ましいN末端改変は、メトキシ-スクシニル修飾である。

10

【0073】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、1または複数の融合パートナーに融合させることができる。特定の実施形態において、融合パートナーの1つはFcタンパク質(たとえば、マウスFcまたはヒトFc)である。融合タンパク質は、さらに、第2の融合パートナー、たとえば精製または検出タグ、たとえば、直接的または間接的に検出可能なタンパク質(たとえば、緑色蛍光タンパク質、ヘマグルチニン、またはアルカリフォスファターゼ)、DNA結合ドメイン(たとえば、GAL4またはLexA)、遺伝子活性化ドメイン(たとえば、GAL4またはVP16)、精製タグ、または分泌シグナルペプチド(たとえば、プレプロトリプシンシグナルペプチド)を含み得る。

20

【0074】

一実施形態において、本明細書に開示される方法および組成物に役立つ組換えヒトMISタンパク質融合タンパク質は、ヒトFcタンパク質またはその機能的フラグメントを含み得る。したがって、一実施形態において、本明細書に開示される方法および組成物に役立つ組換えヒトMISタンパク質融合タンパク質は、第1の融合パートナーとしてヒトFc分子を含む。ここで、そのFcフラグメントは、配列番号:23またはその機能的バリエーションもしくは機能的誘導体であり得る。配列番号:23は以下の通りである:

LELVPRGSGDPIEGRGGGGGDPKSCDKPHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW

LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD

IAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYT

QKSLSLSPGK

30

【0075】

組換えヒトMISタンパク質およびベクターへのバリエーションおよび改変を用いて、組換えヒトMISタンパク質発現を増加または減少させ、および標的化するための手段を供することができる。たとえば、組換えヒトMISタンパク質は、癌細胞または卵巣細胞を標的にするために分子標的化分子に連結させ、それぞれ癌に特異的または卵巣に組織特異的な組換えヒトMISタンパク質を作成することができる。

40

【0076】

一実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、第2の融合パートナー、たとえば、バイオアベイラビリティを増強するために担体分子に融合される。このような担体は、当該技術分野において知られており、ポリ(アルキル)グリコール、たとえば、ポリエチレングリコール(PEG)を含む。血清アルブミンへの融合は、治療ペプチドの血清半減期を増加させることもできる。

【0077】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、第2の融合パートナー、たとえば、要求される位置に産物を標的化するポリペプチド、または、たとえば、必要に応じて精製を容易にするタグに融合させることもできる。特定の実施形態において、タグおよび

50

融合パートナーは、必要に応じて切断可能であるようにデザインすることができる。特に考慮される別の修飾は、ポリマーへの結合、たとえば共有結合である。一態様において、ポリマー、たとえばポリエチレングリコール (PEG) またはメトキシポリエチレングリコール (mPEG) は、それらが結合したタンパク質のインビボ半減期を増加させることができる。ポリペプチド剤のPEG化の方法は、当業者に公知であり、たとえば、いかにおおきなPEGポリマーを用いるかが考慮される。

【0078】

特定の実施形態において、組換えヒトMISTタンパク質またはその機能的フラグメントは、投薬、薬剤投与および効能に影響を与える、適切な循環半減期を達成するように改変される。生物学的治療薬の半減期を増加させる目的で多くのアプローチが行われている。60 kD未満の小さなタンパク質は、腎臓により迅速に除去され、それゆえ、それらの標的に到達しない。これは、効能に達するために高い投与量が必要とされることを意味する。循環におけるタンパク質の半減期を増加させるための本発明の方法に含まれる組換えヒトMISTタンパク質およびそのフラグメントへの改変は、PEG化；タンパク質、たとえばトランスフェリン (WO06096515A2)、アルブミン、成長ホルモン (US2003104578AA) とのコンジュゲーションまたは遺伝子融合；セルロースとのコンジュゲーション (Levy and Shoseyov, 2002)；Fcフラグメントとのコンジュゲーションまたは融合；グリコシル化および変異誘発アプローチ (Carter, 2006) を含み、これらは、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0079】

PEG化の場合、ポリエチレングリコール (PEG) は、組換えヒトMISTタンパク質またはフラグメントに結合され、それは、たとえば、血漿タンパク質、抗体、または抗体フラグメントであり得る。抗体のPEG化の効果に関する最初の研究は、1980年代に行われた。コンジュゲーションは、酵素によりまたは化学的に行うことができ、当該技術分野で十分に確立されている (Chapman, 2002; Veronese and Pasut, 2005)。PEG化に伴い、全体のサイズが増加し、腎臓ろ過の機会を減少させる。PEG化は、さらに、タンパク質分解デグラデーションから保護し、血液からのクリアランスを遅くする。さらに、PEG化は免疫原性を減少させ、可溶性を増加させることができることが報告されている。PEGの付加による薬物動態の改善は、いくつかの異なるメカニズムによる。それは、分子のサイズの増加、タンパク質分解からの保護、抗原性の減少、および細胞レセプターからの特定配列のマスキングである。抗体フラグメント (Fab) の場合、PEG化により血漿半減期の20倍増加が達成されている (Chapman, 2002)。

【0080】

今日までにいくつかの認可されたPEG化薬が存在し、たとえば、2000年に指定されたPEG-インターフェロン・アルファ2b (PEG-INTRON) および2002年に指定されたアルファ2a (Pegasys) である。CimziaまたはCertolizumab Pegolと呼ばれるTNFアルファに対するPEG化抗体フラグメントが、2007年にクローン病の治療のためにFDA認可の申請がされており、2008年4月22日に認可されている。PEG化の制限は、特に1000kDを超えるPEG鎖が必要とされる場合に、長い単分散種を合成する困難性である。多くの適用のために、10000kDを超える鎖長の多分散PEGが用いられ、異なる長さのPEG鎖を有するコンジュゲートの集団を生じ、これは、生産ごとに等価のバッチを確実にするために広範囲の分析を必要とする。PEG鎖の異なる長さは、異なる生物活性を生じ、それゆえ異なる薬物動態を生じ得る。PEG化の別の制限は、アルファ-インターフェロンPegasysで観察されているような、アフィニティーまたは活性の減少であり、それは、ネイティブタンパク質の抗ウイルス活性の7%だけであるが、血漿半減期の増加により改善した薬物動態を有する。

【0081】

特定の実施形態において、組換えヒトMISTタンパク質またはそのフラグメントは、長寿命のタンパク質、たとえば、67kDでありヒトで19日の血漿半減期を有するアルブミンと結合される (Dennis et al., 2002)。アルブミンは、血漿中で最も豊富なタンパク質で有り、血漿pH制御に関与するが、血漿中で物質の担体としても機能する。CD4の場合、血漿半減期の増加は、それをヒト血清アルブミンに融合した後に達成されている (Yeh et al., 1

10

20

30

40

50

992)。融合タンパク質の別の例は、インスリン、ヒト成長ホルモン、トランスフェリン、およびサイトカインである (Ali et al., 1999; Duttaroy et al., 2005; Melder et al., 2005; Osborn et al., 2002a; Osborn et al., 2002b; Sung et al., 2003、ならびに参照により全体が本明細書に組み込まれる、US2003104578A1, WO06096515A2, および WO07047504A2を参照)。

【0082】

血漿半減期およびタンパク質活性へのグリコシル化の効果は、広範囲に研究されている。組織プラスミノゲンアクティベーター (tPA) の場合、新しいグリコシル化部位の付加は、血漿クリアランスを減少させ、効力を改善した (Keyt et al., 1994)。いくつかのタンパク質およびイムノグロブリンについて糖鎖工学が成功して適用されている (Elliott et al., 2003; Raju and Scallion, 2007; Sinclair and Elliott, 2005; Umana et al., 1999)。さらに、グリコシル化は、イムノグロブリンの安定性に影響を与える (Mimura et al., 2000; Raju and Scallion, 2006)。

10

【0083】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質またはそのフラグメントは、IgGのFcフラグメントに融合させることができる (Ashkenazi and Chamow, 1997)。Fc融合アプローチは、たとえば、Regeneronにより開発されたTrap Technology(たとえばIL1 trap および VEGF trap)において利用されている。ペプチドの半減期を延長させるためのアルブミンの使用は、US2004001827A1に記載されている。アルブミンのポジティブな効果は、FabフラグメントおよびscFv-HSA融合タンパク質についても報告されている (Smith et al., 2001)。延長されたアルブミンの血清半減期は、FcRnにより媒介される再循環プロセスのためであることが証明されている (Anderson et al., 2006; Chaudhury et al., 2003; Smith et al., 2001)。

20

【0084】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国出願第2010/0209424号に開示されるような、ビオチン化Fcタンパク質にコンジュゲートされる。

【0085】

本明細書に用いる場合、用語「コンジュゲート」または「コンジュゲーション」は、1つの物質を形成するための2つまたはこれを超える物質の結合をいう。たとえば、本発明の方法は、別の物質、たとえば、組換えヒトMISタンパク質を安定にする第1の融合パートナーのような成分、たとえば、Ig担体粒子、たとえば、IgG1 Fcと連結した、組換えヒトMISタンパク質 (すなわち、配列番号: 2もしくは3またはそのフラグメント、誘導体もしくはバリエーション) のコンジュゲーションを供する。その結合は、リンカー、化学修飾、ペプチドリナー、化学リンカー、共有もしくは非共有結合、またはタンパク質融合により、または当業者に知られたいずれかの手段により、行うことができる。その連結は、永久的であっても可逆的であってもよい。特定の実施形態において、コンジュゲート中のそれぞれのリンカーおよびそれぞれのタンパク質の要求される特性を利用するために、いくつかのリンカーを含めることができる。フレキシブルなリンカーおよびコンジュゲートの可溶性を増加させるリンカーは、単独で、または本明細書に開示される他のリンカーとともに、考慮される。ペプチドリナーは、コンジュゲート中の1または複数のタンパク質へのリンカーをコードするDNAを発現することにより、連結させることができる。リンカーは、酸開裂、光切断、および熱感受性リンカーであり得る。コンジュゲーションのための方法は、当業者に公知であり、本発明における使用のために包含される。

30

40

【0086】

本発明によれば、組換えヒトMISタンパク質 (すなわち、配列番号: 4もしくは5、またはそのフラグメント、誘導体、もしくはバリエーション) は、当該技術分野において知られているように、いずれかの適切な手段により、第1の融合パートナーに連結させることができる (たとえば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第4,625,014, 5,057,301 および 5,514,363を参照)。たとえば、組換えヒトMISタンパク質は、直接的に

50

、または1もしくは複数のリンカーを介して、IgG1 Fcに共有結合させることができる。一実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質は、第1の融合パートナー（たとえば、Fc）に直接、コンジュゲートされ、別の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質は、リンカー、たとえば、輸送増強リンカーを介して、第1の融合パートナー（たとえば、IgG1 Fc）にコンジュゲートさせることができる。

【0087】

第1の融合パートナー（たとえば、Fc）との本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質のコンジュゲーションのための多種多様な方法が当該技術分野において知られている。このような方法は、たとえば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Hermanson (1996, Bioconjugate Techniques, Academic Press)、米国特許第U.S. 6,180,084、およびU.S. 6,264,914号に記載されており、たとえば、適用される免疫学において慣用的に用いられるような担体にハプテンを連結するのに用いる方法を含む(Harlow and Lane, 1988, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照)。特定の場 合、組換えヒトMISTタンパク質は、たとえば、それ

10

に利用したコンジュゲーション手順または化学基に依存して、コンジュゲーションにより効力または機能性を失い得ることが認められている。しかしながら、多種多様なコンジュゲーションのための方法を考えれば、当業者は、コンジュゲートすべき組換えヒトMISTタンパク質のような、物質の効力または機能性に影響を与えない、または最も影響の少ないコンジュゲーション法を見出すことができる。

20

【0088】

第1の融合パートナー（たとえば、Fc）との本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質のコンジュゲーションのための適切な方法は、たとえば、カルボジイミドコンジュゲーション(Bauminger and Wilchek, 1980, Meth. Enzymol. 70: 151-159)を含む。あるいは、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7269-7273 (1996)、および Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1794-1799 (1998)により記載されるように、成分を標的化剤に連結させることができる。用

30

いることができるコンジュゲーションのための別の方法は、たとえば、過ヨウ素酸ナトリウム酸化、ならびに次の適切な反応物の還元的アルキル化およびおよびグルタルアルデヒド架橋である。

【0089】

当業者は、第1の融合パートナー（たとえば、Fc）、たとえば、これらに限らないが、アミノカプロン酸セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)またはヘテロ二官能性架橋剤、たとえば、カルボニル反応性およびスルフヒドリル反応性架橋剤に本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質をコンジュゲートする多様な方法を用いることができる。ヘテロ二官能性架橋剤は、通常、ホモ二官能性架橋剤の使用にしばしば関連する重合化の程度を制限し得る、2または3ステップの過程においてタンパク質および他の高分子への2つの異なる機能標的に結合することができる2つの反応基を含む。このような多重ステップのプロトコルは、コンジュゲートのサイズおよび構成物のモル比の大きな制御を供し得る。

【0090】

用語「リンカー」は、2またはこれを超える物質、たとえば、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質を第1の融合パートナー（たとえば、Fc）と連結するいずれかの手段をいう。リンカーは、共有結合リンカーでも非共有結合リンカーでもよい。共有結合リンカーの例は、共有結合、または結合すべき1もしくは複数のタンパク質に共有結合したリンカー成分を含む。リンカーは、非共有結合リンカー、たとえば、金属中心、たとえば白金原子を介する有機金属結合でもよい。共有結合のために、多様な官能性を用いることができる。たとえば、アミド基、たとえば、カルボン酸誘導体、エーテル、エステル、たとえば、有機および無機エステル、ウレタン、尿素等である。結合を供するために、エフェクター分子および/またはプローブを、酸化、水酸化、置換、還元等により修飾して、結合のための部位を供することができる。本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク

40

50

質または第1の融合パートナー（たとえば、Fc）の機能を有意に減少させない修飾が好ましいと認められよう。

【0091】

標的化

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法および組成物に用いるための組換えヒトMISTタンパク質、またはその機能的フラグメントもしくは相同体は、標的化リガンドを介して癌または卵巣細胞に標的化（ターゲティング）することができる。標的化リガンドは、標的、たとえば、予め選択された細胞上の細胞表面マーカー、たとえば、細胞表面タンパク質、たとえばいずれの他の体組織上よりその予め選択された細胞標的上で大きい程度で存在するレセプターに高アフィニティーで特異的に結合する分子、たとえば、小分子、タンパク質またはそのフラグメントである。したがって、特定の実施形態において、本明細書に開示される方法および組成物に用いるための組換えヒトMISTタンパク質は、Fcに融合することができ、および/または任意に、標的化分子にも融合することができる。特定の実施形態において、標的化リガンドをコードする核酸分子は、組換えヒトMISTタンパク質、またはそのフラグメント、相同体、もしくはバリエーションをコードするヌクレオチドに融合することができる。標的化リガンドの別の例は、ヒトカドヘリンからのカドヘリンドメインの群である。組換えヒトMISTタンパク質に結合した標的化リガンド構成物は、予め選択された標的細胞に結合することができる、自然発生、組換え、または操作したリガンドまたはそのフラグメントを含む。

10

20

【0092】

標的化リガンドのさらなる例は、これらに限らないが、高アフィニティーで予め選択された表面タンパク質に特異的に結合する抗体およびその一部も含む。「高アフィニティー」は、当該技術分野において知られているアッセイ方法、たとえば、BiaCore分析により決定して、少なくともモル濃度（molar）の平衡解離定数を意味する。一実施形態において、標的化リガンドは、所定の組織特異的表面タンパク質または標的組織特異的レセプターに対して生じた抗体から単離された1または複数のイムノグロブリン結合ドメインも含み得る。本明細書に用いる用語「イムノグロブリン」または「抗体」は、本発明の場合は、組織特異的表面タンパク質、組織特異的レセプター、またはそれらの一部である、抗原に特異的に結合して認識する、イムノグロブリン遺伝子からのフレームワーク領域を含む、ヒトを含む哺乳動物のペプチドまたはそのフラグメントをいう。哺乳動物治療剤として意図した標的化融合ポリペプチドが使用されるであろうなら、イムノグロブリン結合領域は、対応する哺乳動物イムノグロブリンから得られるべきである。標的化融合ポリペプチドが非治療的使用、たとえば、診断およびELISAを意図するなら、イムノグロブリン結合領域は、ヒトまたは非ヒト、たとえばマウスのいずれかから得ることができる。ヒトイムノグロブリン遺伝子または遺伝子フラグメントは、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、およびミュー定常領域、ならびに無数のイムノグロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類することができる。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類することができ、これらは、イムノグロブリンのクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEをそれぞれ規定する。それぞれのIgGクラスにおいては、異なる異性体（たとえばIgG1、IgG2等）が存在する。典型的には、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性およびアフィニティーを決定するのに最も重要であろう。

30

40

【0093】

ヒトIgGの典型的なイムノグロブリン（抗体）構造単位は、テトラマーを含む。それぞれのテトラマーは、2つの同一のポリペプチド鎖の対から構成され、それぞれの対は、1つの軽鎖（約25kD）および1つの重鎖（約50~70kD）を有する。それぞれの鎖のN末端は、抗原認識のための主な原因である約100~110またはより多くのアミノ酸の可変領域を規定する。用語「可変軽鎖」（VL）および「可変重鎖」（VH）は、それぞれこれらの軽鎖および重鎖をいう。抗体は、完全なイムノグロブリンとして、または多様なペプチダーゼでの消化により生産されたいくつかの十分にキャラクタライズされたフラグメントとして存在

50

する。たとえば、ペプシンは、それ自体がジスルフィド結合によりVH-CHに連結した軽鎖であるFabのダイマーである、F(ab)'₂を生産するために、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋の下で抗体を消化する。F(ab)'₂は、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋を破壊するためにマイルドな条件下で還元し、それによりF(ab)'₂ダイマーをFab'モノマーに変換することができる。Fab'モノマーは、本質的に、ヒンジ領域の部分を伴うFabである。完全な抗体の消化に関して多様な抗体フラグメントが規定されるが、当業者は、このようなフラグメントを、化学的に、または組換えDNA技術を用いることにより、新たに合成することができることを認めるであろう。これにより、本明細書に用いるイムノグロブリンまたは抗体との用語は、完全な抗体の改変により生産された抗体フラグメント、または組換えDNA技術を用いて新しく合成されたもの（たとえば、一本鎖Fv (scFv)）、またはファージディスプレイライブラリーを用いて同定されたもの（たとえば、McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554を参照）も含む。さらに、本発明の融合ポリペプチドは、イムノグロブリンの重鎖 (VH) または軽鎖 (VL) の可変領域、ならびに組織特異的表面タンパク質およびその標的レセプター結合部分を含む。このような可変領域を生産する方法は、Reiter, et al. (1999) J. Mol. Biol. 290:685-698に記載されている。

10

20

30

40

50

【0094】

抗体を調製するための方法は、当該技術分野において知られている（たとえば、Kohler & Milstein (1975) Nature 256:495-497; Harlow & Lane (1988) Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NYを参照）。問題の抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子は、細胞からクローン化することができる。たとえば、モノクローナル抗体をコードする遺伝子は、ハイブリドーマからクローン化して、組換えモノクローナル抗体を生産するのに用いることができる。モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子ライブラリーも、ハイブリドーマまたは形質細胞から作ることができる。重鎖および軽鎖遺伝子産物のランダムな組み合わせは、異なる抗原特異性の抗体の大きなプールを作り出す。一本鎖抗体または組換え抗体の生産のための技術（米国特許第4,946,778号；米国特許第4,816,567号）は、融合ポリペプチドおよび本発明の方法に用いる抗体を生産するために、適合させることができる。また、トランスジェニックマウス、または他の生物、たとえば、他の哺乳動物は、ヒトまたはヒト化抗体を発現するために用いることができる。あるいは、ファージディスプレイ技術は、抗体、抗体フラグメント、たとえば、可変ドメイン、および所定の抗原に特異的に結合するヘテロマーのFabフラグメントを同定するのに用いることができる。

【0095】

好ましいイムノグロブリン（たとえば、抗体）のスクリーニングおよび選択は、当該技術分野において知られた多様な方法により行うことができる。組織特異的または標的レセプターに特異的なモノクローナル抗体の存在についての最初のスクリーニングは、たとえば、ELISAベースの方法またはファージディスプレイの使用を介して行うことができる。第2のスクリーンは、好ましくは、本発明の組織特異的融合ポリペプチドの構築に用いるために要求されるモノクローナル抗体を同定および選択するために行われる。第2のスクリーニングは、当該技術分野において知られたいずれかの適切な方法で行うことができる。「Biosensor Modification- Assisted Profiling」 ("BiaMAP") (米国特許出願公報2004/101920)と呼ばれる1つの方法は、要求される特徴を有するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマクローンの迅速な同定を可能にする。より詳しくは、モノクローナル抗体は、抗体-抗原相互作用の評価に基づいて異なるエピトープ関連群に分類される。

【0096】

組換えヒトMISタンパク質の生成

本明細書に開示される方法、組成物、およびキットにおいて有用な組換えヒトMISタンパク質、例えばLR-MISなどは、いずれかの適切な方法により得ることができる。たとえば、ポリペプチドは、慣用的な組換え核酸技術、たとえばDNAまたはRNA、好ましくはDNAを用いて生産することができる。組換えDNA技術を用いるポリペプチドの生産のための方法および材料に関するガイダンスおよび情報は、多数の論文および参考文献マニュアル

において見出すことができる。たとえば、Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press; Ausubel et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.; Innis et al. (eds.), 1990 PCR Protocols, Academic Pressを参照。

【0097】

あるいは、組換えヒトMISタンパク質、例えばLR-MISなど、またはその機能的フラグメントは、化学合成により、たとえば、ベンダーの説明にしたがって市販のペプチドシンセサイザを用いることにより、直接的に得ることができる。ポリペプチドの化学合成のための方法および材料は、当該技術分野において公知である。たとえば、Merrifield, 1963, "Solid Phase Synthesis," J. Am. Chem. Soc. 83:2149 -2154を参照。

10

【0098】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質、またはその機能的フラグメント、誘導体、もしくはバリエーションは、たとえば、本明細書に開示される慣用的な発現ベクターにおいて、またはカテーテルにより、またはエキスピボで、核酸で形質転換され対象に移植された細胞により、タンパク質をコードするDNA、たとえば、ヒトMISタンパク質、またはその相同体もしくは機能的フラグメントをコードする核酸の導入後に、細胞内で発現させることができる。

【0099】

遺伝子治療を介したヒト組換えMISタンパク質の送達

したがって、一態様において、本発明は、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質をコードする核酸を含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、女性対象における避妊方法、または妊娠を妨げる方法に関する。他の態様は、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質をコードする核酸を含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、女性対象における卵巣予備能を保存する方法に関する。

20

【0100】

いくつかの実施形態において、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質をコードする核酸を含む組成物は、例えば、非ヒト種の集団を制御することが望まれる場合に、ネコおよびイヌならびに任意の動物などの動物に処置するために、永続的避妊のための方法において投与される。

【0101】

したがって、いくつかの実施形態において、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質は、配列番号:3、配列番号:4、または配列番号:5の組換えMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、ベクターから発現される。いくつかの実施形態において、発現されたMISタンパク質は、対象において生産される野生型MISタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を含む、MISタンパク質を生産するために、配列番号:1のポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態において、MISタンパク質は、配列番号:3、配列番号:4、または配列番号:5のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質、またはそれらの機能的フラグメントを生産するポリヌクレオチドによってコードされる。

30

40

【0102】

いくつかの実施形態において、MISタンパク質を発現するベクターは、配列番号:1に対応するポリヌクレオチド配列、または配列番号:1の核酸配列と少なくとも95%配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む。

【0103】

いくつかの実施形態において、MISタンパク質を発現するベクターは、配列番号:2に対応するポリヌクレオチド配列、または配列番号:2の核酸配列と少なくとも95%配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む。

【0104】

50

組換えMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、様々なベクターは、本発明の方法に含まれ得る。例えば、多くのそのようなベクターが、参照により各々の内容の全体が組み入れられる2013年3月12日に出願されたUS 61/777,135、2013年9月20日に出願されたUS 61/880,451、および2013年9月24日に出願されたUS 61/881,719に開示された。

【0105】

いくつかの実施形態において、ベクターは発現ベクターである。真核生物細胞と適合可能な発現ベクター、好ましくは、脊椎動物細胞と適合可能なものは、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質、またはその機能的誘導体、あるいは機能的バリエーションまたは機能的フラグメントのための組換え構成物を作成するために用いることができる。真核生物細胞発現ベクターは、当該技術分野で公知であり、いくつかの商用ソースから利用できる。

10

【0106】

あるいは、特定の実施形態において、プラスミド発現ベクターを用いることができる。プラスミド発現ベクターは、これらに限らないが、以下のものを含む：pcDNA3.1、pETベクター (Novagen (登録商標))、pGEXベクター (GE Life Sciences)、および pMALベクター (New England labs. Inc.) (大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞、たとえば、BL21, BL21(DE3) および AD494(DE3)pLysS, Rosetta (DE3)、および Origami(DE3) におけるタンパク質発現のため) (Novagen (登録商標)); 強力CMV プロモーターベース pcDNA3.1 (Invitrogen (商標) Inc.) および pCIneoベクター (Promega) (哺乳動物細胞系、たとえばCHO, COS, HEK-293, Jurkat、および MCF-7における発現のため); 複製インコンピテント アデノウイルスベクター pAdeno X, pAd5F35, pLP-Adeno-X-CMV (Clontech (登録商標)), pAd/CMV/V5-DEST, pAd-DESTベクター (Invitrogen (商標) Inc.) (哺乳動物細胞におけるアデノウイルス媒介遺伝子転移および発現のため); pLNCX2, pLXSN、および pLAPSN レトロウイルス (哺乳動物細胞におけるレトロウイルス媒介遺伝子転移および発現のためのClontechからのRetro-X (商標) システムでの使用のためのレトロウイルスベクター); pLenti4/V5-DEST(商標), pLenti6/V5-DEST(商標)、および pLenti6.2/V5-GW/lacZ (INVITROGEN(商標) Inc.) (哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介遺伝子転移および発現のため); アデノ関連ウイルス発現ベクター、たとえば、pAAV-MCS、pAAV-IRES-hrGFP、およびpAAV-RCベクター (Stratagene(登録商標)) (哺乳動物細胞におけるアデノ関連ウイルス媒介遺伝子転移および発現のため); BACpak6 バキュロウイルス (Clontech (登録商標)) および pFastBac(商標) HT (Invitrogen (商標) Inc.) (スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodopera frugiperda*) 9 (Sf9) および Sf11 昆虫細胞系における発現のため); pMT/BiP/V5-His (Invitrogen (商標) Inc.) (ショウジョウバエ(*Drosophila*) Schneider S2 細胞における発現のため); Pichia 発現ベクター pPICZ, pPICZ, pFLD

20

30

および pFLD (Invitrogen (商標) Inc.) (ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*) における発現のため)、ベクター pMET および pMET (P.メタノリカ(*P. methanolica*) における発現のため); pYES2/GS および pYD1 (Invitrogen (商標) Inc.) ベクター (酵母サッカロマイセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*) における発現のため)。コナミドリムシ(*Chlamydomonas reinhardtii*) における大規模発現異種タンパク質における最近の進展が、Griesbeck C. et. al. 2006 Mol. Biotechnol. 34:213-33 and Fuhrmann M. 2004, Methods Mol Med. 94:191-5に記載される。外来性異種コーディング配列は、異種組換えにより、核、葉緑体、およびミトコンドリアのゲノムに挿入される。スペクチノマイシンまたはストレプトマイシンに対する耐性を与える最も多用途の葉緑体選択マーカーアミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ (aadA) を有する葉緑体発現ベクターp64は、葉緑体において外来タンパク質を発現するのに用いることができる。微粒子銃 (Biolistic) 遺伝子銃法は、ベクターを藻類に導入するのに用いられる。葉緑体への移入により、外来DNAは、遺伝子銃粒子から放出され、相同組換えにより葉緑体ゲノムに組み込まれる。

40

【0107】

いくつかの実施形態において、発現ベクターは、細菌 (例えば、大腸菌) またはバクテ

50

リオファージのためのpcDNA3.1、cDNA、またはゲノムベクターである。

【0108】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示された組換えヒトMISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質（例えば、LR-MIS）またはそれらの機能的フラグメントをコードする核酸は、例えばウイルスベクターなどのベクターとして適切に投与され得る。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターであり得る。他のウイルスベクターには、例えば、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、オルソポックス（ワクシニアおよび弱毒化ワクシニア）、アビポックスなどのポックスウイルス、レンチウイルス、マウスモロニー白血病ウイルスなどが含まれる。

10

【0109】

いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノ関連ウイルス（AAV）である。特に、本発明者は、本明細書において、AAV-MIS構築物を含むAAV9ベクターによるMISタンパク質の発現レベルが高く、60日間の実験の間、維持されたことを実証した（図1A）。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書に記載された方法は、単回注入の後に、対象における永続的な避妊を可能にすることができ、対象に投与された組成物は、閾値と同じまたはそれを超えるMIS発現を維持することができる。閾値レベルは対象における濾胞形成の完全な阻止を達成するために必要とされるMISの最低レベルである。閾値レベルは、対象または対象の種に依存し得ることに注意する。例えば動物への適用など、永続的な避妊が望まれる様々な実際の場面がある。

20

【0110】

最近、非病原性であるが、通常ヒトを含む哺乳類に感染するAAVが開発され、米国および欧州の臨床試験において遺伝子治療ベクターとして使用されている（Daya and Berns, Clinical Microbiology Reviews 2008, 21, 583-593）。いくつかの実施形態において、AAVはAAV9である。

【0111】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質をコードする核酸、またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）は、遺伝子療法による治療に有効に用いることができる。たとえば、全般的に、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,399,346号に参照。一般的な原理は、患者における標的細胞にそのポリヌクレオチドを導入することであり、そこで、それはタンパク質に転写される。

30

【0112】

細胞への移行は、当該技術分野で知られた適切な技術により、たとえば、適切なベクターの形態でポリヌクレオチドを供することにより、またはポリヌクレオチドをリポソームで被包することにより、容易にすることができる。

【0113】

遺伝子療法の要求される態様は、細胞内で複製し、要求される効果を増強および延長するような方法で、ポリヌクレオチドを供することである。これにより、ポリヌクレオチドは、適切なプロモーター、たとえば、対応する遺伝子の天然のプロモーター、肝臓、神経、骨、筋肉、皮膚、関節、もしくは軟骨細胞中で内因的に活性である異種プロモーター、または適切な剤により誘導することができる異種プロモーターに、作用可能に連結される。

40

【0114】

本発明に利用できるウイルスベクター系は、これらに限らないが、(a) アデノウイルスベクター；(b) レトロウイルスベクター；(c) アデノ関連ウイルスベクター；(d) 単純ヘルペスウイルスベクター；(e) SV 40 ベクター；(f) ポリオーマウイルスベクター；(g) パピローマウイルスベクター；(h) ピコルナウイルスベクター；(i) ポックスウイルスベクター、たとえば、オルソポックス、たとえばワクシニアウイルスベクターまたはアビポックス、たとえば、カナリア痘、または鶏痘、および (j) ヘルパー依存またはガトレス

50

(gutless) アデノウイルスを含む。好ましい実施形態において、ベクターは、アデノウイルスである。複製欠損ウイルスも遊離であり得る。

【0115】

ベクターは、細胞ゲノムに組み込んでもそうでなくてもよい。その構成物は、必要に応じて、トランスフェクションのためのウイルス配列を含み得る。あるいは、構成物は、エピソーム複製の可能なベクター、たとえば、EPVおよびEBVベクターに組み込まれ得る。

【0116】

本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質、またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）をコードする核酸の発現のための構成物、たとえば、DNA、MOD-RNA またはRNAaは、一般に、調節配列、たとえば、プロモーター、エンハンサー等に作用可能に連結させて、標的細胞中でのその構成物の発現を確実にすることができる。ベクターおよび他の構成物の他の詳細は以下にさらに詳細に記載される。

10

【0117】

いくつかの実施形態において、誘導可能なベクターは、細菌（例えば、大腸菌）またはバクテリオファージのためのpcDNA3.1、cDNA、またはゲノムベクターである。

【0118】

いくつかの実施形態において、誘導可能なベクターは、ウイルスベクターを含む。

【0119】

誘導可能なベクターを含む投与される組成物のいくつかの実施形態において、動員される原始卵胞の数を、MISの発現を阻害することによって、正常レベルに戻すことができる。遺伝子発現またはタンパク質合成を調節するための誘導可能なベクターの使用は、当技術分野において公知であり、例えば、WO1993/022431、US20110301228、US6500647、WO2005/053750、またはUS6784340を参照のこと。

20

【0120】

いくつかの実施形態において、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えば、LR-MISタンパク質）は、組換えMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結され、それによって、調節要素がMISの発現レベルを制御することができる、例えばプロモーター、エンハンサーなどの1つまたは複数の調節要素を含み得る。

【0121】

典型的な調節配列は、これらに限らないが、転写プロモーター、誘導可能プロモーター、および転写要素、転写を制御するための任意的な作動配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、転写および/または翻訳の終了を制御するための配列を含む。用語「調節要素」には、それらが作用可能に連結したタンパク質コーディング配列の転写を誘導または制御する核酸、たとえば、開始シグナル、エンハンサーおよびプロモーター、が含まれる。特定の例において、組換え遺伝子の転写は、発現を意図した細胞型において組換え遺伝子の発現を制御するプロモーター配列（または他の転写制御配列）の制御下にある。組換え遺伝子は、自然発生型のタンパク質の転写を制御するこれらの配列と同じまたはそれらから異なる転写制御配列の制御下にあり得ることも理解されよう。特定の例において、プロモーター配列は、特定遺伝子の転写を開始するために要求される、細胞の合成機構、または導入された合成機構により認識される。

30

40

【0122】

調節配列は、単一の調節配列、もしくは複数の調節配列、もしくは改変された調節配列、またはそれらのフラグメントであり得る。改変された調節配列は、その核酸が特定の手段、たとえば、これらに限らないが、変異、メチル化等により変更または改変されている、調節配列である。本明細書に開示される方法に有用な調節配列は、プロモーター依存性遺伝子発現を、細胞型特異的、組織特異的のために制御可能、または外部シグナルまたは剤（たとえば、エンハンサーまたはレプレッサー）により誘導可能にするのに十分であるプロモーター要素である。このような要素は、ネイティブ遺伝子の5'または3'領域内、またはイントロン内に位置し得る。

【0123】

50

本明細書に用いる場合、用語「組織特異的プロモーター」は、プロモーターとして機能する、すなわち、プロモーターに作用可能に連結した選択された核酸配列の発現を制御する、および、組織の特定の細胞、たとえば、卵巣起源の細胞において選択された核酸配列の発現に選択的に影響を与える、核酸配列を意味する。

【0124】

用語「構成的活性プロモーター」は、所定の細胞内で常に発現される遺伝子のプロモーターをいう。哺乳動物細胞に用いるための典型的なプロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) を含み、原核細胞に用いるためのものは、バクテリオファージT7およびT3プロモーター等を含む。

【0125】

用語「誘導可能プロモーター」は、所定のシグナル、たとえば、剤の追加または削減に応答して発現され得る遺伝子のプロモーターをいう。誘導可能なプロモーターの非限定的な例は、「tet-on」および「tet-off」プロモーター、または特定の組織型において制御されるプロモーターである。

【0126】

特定の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列、たとえば、DNA、MOD-RNA または RNAaを含むウイルスベクターを用いることができる。たとえば、レトロウイルスベクターを用いることができる (Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)を参照)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みのために必要な構成物を含む。組換えヒトMISTタンパク質をコードする核酸配列は、1または複数のベクターにクローン化され、それは、遺伝子の患者へのデリバリーを容易にする。レトロウイルスベクターについてのより詳細は、Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994)に見出すことができ、それは、幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、造血幹細胞にmdr1遺伝子を送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記載する。遺伝子療法におけるレトロウイルスベクターの使用を詳述する他の参考文献は、Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); and Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993)である。

【0127】

問題の遺伝子を有する組換えレトロウイルスベクターの生産は、典型的には、2段階で行われる。第1に、組換えヒトMISTタンパク質、またはその機能的誘導体、機能的バリアント、もしくは機能的フラグメントをコードする配列は、単独で、または-Fcと融合させて、(ウイルスの末端反復配列 (LTRs) により、または内部プロモーター/エンハンサーおよび関連するスプライシングシグナルにより、供され得る、プロモーターおよび/またはエンハンサー要素を含む)代謝レギュレーター、ウイルスRNAの感染性ビリオン (たとえば、パッケージングシグナル(Psi)、tRNA プライマー結合部位 (-PBS)、逆転写のために要求される3'調節配列 (+PBS)、およびウイルスLTRsへの効率的なパッケージングのために要求される配列)の効率的な発現のために必要な配列を含むレトロウイルスベクターに挿入することができる。LTRは、ウイルスゲノムRNA、逆転写酵素、およびインテグラーゼ機能の会合のために要求される配列、ならびに、ゲノムRNAの発現をウイルス粒子内にパッケージングさせることに関連する配列を含む。

【0128】

組換えレトロウイルスベクターの作成の後、ベクターDNAは、パッケージング細胞系に導入される。パッケージング細胞系は、要求される宿主範囲を有するウイルス粒子へのウイルスゲノムRNAのパッケージングのためにトランスにおいて要求されるウイルスタンパク質 (たとえば、ウイルス・コード・コア(gag)、ポリメラーゼ(pol)およびエンベロープ(env)タンパク質)を供する。宿主範囲は、部分的に、ウイルス粒子の表面上で発現されるエンベロープ遺伝子産物のタイプによって制御される。パッケージング細胞系は、エコトロピック、アンホトロピック、またはゼノトロピック (ecotropic, amphotropic or x

10

20

30

40

50

enotropic) エンベロープ遺伝子産物を発現し得る。あるいは、パッケージング細胞系は、ウイルスエンベロープ (env) タンパク質をコードする配列を欠如し得る。この場合、パッケージング細胞系は、ウイルスゲノムを、膜関連タンパク質 (たとえば、env タンパク質) を欠如する粒子にパッケージングすることができる。ウイルスの細胞への移入を許容する膜関連タンパク質を含むウイルス粒子を生産するために、レトロウイルス配列を含むパッケージング細胞系は、膜関連タンパク質 (たとえば、水疱性口内炎ウイルス (VSV) の G タンパク質) をコードする配列でトランスフェクトすることができる。トランスフェクトされたパッケージング細胞系は、次に、そのトランスフェクトされたパッケージング細胞系により発現された膜関連タンパク質を含むウイルス粒子を生産することができる。別のウイルスのエンベロープタンパク質によりキャプシド形成された 1 つのウイルス由来のウイルスゲノム RNA を含むこれらのウイルス粒子は、偽型ウイルス粒子と呼ばれる。

10

【 0 1 2 9 】

アデノウイルスは、遺伝子療法に用いることができる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、呼吸上皮に遺伝子を送達するための特に魅力あるビヒクルである。アデノウイルスは、自然に呼吸上皮に感染し、マイルドな疾患を引き起こす。アデノウイルスベースのデリバリーシステムのための他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分割細胞に感染することができる利点を有する。Koza rsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) は、アデノウイルスベースの遺伝子療法のレビューを供する。Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) は、アカゲザルの呼吸上皮に遺伝子を移送するためのアデノウイルスベクターの使用を証明している。別の好ましいウイルスベクターは、ボックスウイルス、たとえば、ワクシニアウイルス、たとえば、弱毒化ワクシニア、たとえば、Modified Virus Ankara (MVA) または NYVAC、アビボックス、たとえば、鶏痘またはカナリア痘である。遺伝子療法におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); PCT公開W094/12649; およびWang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995)に見出すことができる。別の実施形態において、レンチウイルスベクター、たとえば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許番号6,143,520; 5,665,557; および 5,981,276に記載されるHIVベースのベクターが用いられる。特定の実施形態において、ウイルスベクター、たとえば、アデノ関連ウイルス(AAV)ベクターが用いられる。典型的なAAVベクターは、Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許番号5,436,146; Gao et al., Gene Therapy 2005, 5, 285-297; Vandenberghe et al., Gene Therapy 2009, 16, 311-319; Gao et al., PNAS 2002, 99, 11854-11859; Gao et al., PNAS 2003, 100, 6081-6086; Gao et al., J. of Virology 2004, 78, 6381-6388; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th edition) ed. by M. Green and J. Sambrookに開示される。

20

30

【 0 1 3 0 】

特定の実施形態において、AAVベクターは、AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.10, AAV2.5である。特定の型のAAVベクターの選択は標的組織に依存し得ることに注意すべきである。特定の実施形態において、MISタンパク質、またはMISバリエーションタンパク質 (例えばLR-MIS) を発現するためのAAVベクターは、本明細書の実施例に記載したようなAAV9である。

40

【 0 1 3 1 】

特定の実施形態において、ウイルスベクターによりコードされる組換えヒトMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質 (例えばLR-MIS) が、対象において内因的に発現される場合、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質の発現レベルは、要求される期間、たとえば、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも1年、または少なくとも5年にわたって一定であり得る。特定の実施形態において、本明細書に開

50

示される組換えヒトMISTタンパク質の発現は、要求される期間にわたって、治療に有効なレベルで、またはそれを超えて、維持され得る。

【0132】

遺伝子療法への別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム毎回トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法により、組織培養において、遺伝子を細胞に移すことに関する。通常、転移の方法は、選択マーカーを細胞に移すことを含む。次に細胞は、取り上げられ、移された遺伝子を発現するこれらの細胞を単離するために、選択下に置かれる。次に、これらの細胞は患者に送達される。

【0133】

米国特許番号5,676,954（参照により全体が本明細書に組み込まれる）は、マウスへのカチオンリポソーム担体と複合体化した遺伝材料の注入に関して報告している。米国特許番号4,897,355, 4,946,787, 5,049,386, 5,459,127, 5,589,466, 5,693,622, 5,580,859, 5,703,055, および国際公開番号WO 94/9469（参照により全体が本明細書に組み込まれる）は、DNAを細胞および哺乳動物にトランスフェクトするのに用いるためのカチオン脂質を供する。米国特許番号5,589,466, 5,693,622, 5,580,859, 5,703,055, および国際公開番号 WO 94/9469（参照により全体が本明細書に組み込まれる）はDNA-カチオン脂質複合体を、哺乳動物に送達するための方法を供する。このようなカチオン脂質複合体またはナノ粒子も、タンパク質を送達するのに用いることができる。

【0134】

遺伝子または核酸配列は、いずれかの適切な方法により、標的細胞に導入することができる。たとえば、組換えヒトMISTタンパク質構成物は、トランスフェクション（たとえば、リン酸カルシウムまたはDEAE-デキストラン媒介トランスフェクション）、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション（たとえば、裸のDNAの直接の注入による）、微粒子銃（biolistics）、筋肉関連トランスジェーンを含むウイルスベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子転移、マイクロセル媒介遺伝子転移、核移植等により細胞に導入することができる。組換えヒトMISTタンパク質をコードする核酸は、エレクトロポレーション（たとえば、Wong and Neumann, Biochem. Biophys. Res. Commun. 107:584-87 (1982)を参照）および微粒子銃（biolistics）（たとえば、遺伝子銃；Johnston and Tang, Methods Cell Biol. 43 Pt A:353-65 (1994)；Fynan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11478-82 (1993)）により細胞に導入することができる。

【0135】

特定の実施形態において、組換えヒトMISTタンパク質をコードする遺伝子または核酸配列は、トランスフェクションまたはリポフェクションにより標的細胞に導入することができる。トランスフェクションまたはリポフェクションのための適切な剤は、たとえば、リン酸カルシウム、DEAEデキストリン、リポフェクチン、リポフェクタミン、DIMRIE C, Superfect, および Effectin (Qiagen), ユニフェクチン、マキシフェクチン、DOTMA, DOGS (Transfectam; ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン), DOPE (1,2-ジオレイル-sn-グレセロ-3-ホスホエタノールアミン), DOTAP (1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン), DDAB (ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド), DHDEAB (N,N-ジ-n-ヘキサデシル-N,N-ジヒドロキシエチルアンモニウムブロミド), HDEAB (N-n-ヘキサデシル-N,N-ジヒドロキシエチルアンモニウムブロミド), ポリブレン, ポリ(エチレンイミン) (PEI)等（たとえば Banerjee et al., Med. Chem. 42:4292-99 (1999)；Godbey et al., Gene Ther. 6:1380-88 (1999)；Kichler et al., Gene Ther. 5:855-60 (1998)；Birchall et al., J. Pharm. 183:195-207 (1999)を参照）を含む。

【0136】

タンパク質および/または核酸のような剤の治療デリバリーのための当該技術分野で知られた方法は、組換えヒトMISTタンパク質をコードするポリペプチドまたは核酸の対象へのデリバリーのために用いることができる。たとえば、細胞トランスフェクション、遺伝子療法、デリバリービヒクルまたは薬学的に許容される担体での直接の投与、本発明の標的化融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組換え細胞を供することによる間接的なデ

10

20

30

40

50

リバリーである。

【0137】

多様なデリバリーシステムが知られており、組換えヒトMISタンパク質のような治療用ポリペプチド、および/または本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質をコードする核酸を、直接、投与するのに用いることができる。たとえば、リボソームでの被包、マイクロ粒子、マイクロカプセル、その化合物を発現することがきる組換え細胞、およびレセプター媒介エンドサイトーシスである（たとえば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）。導入の方法は、腸または非経口であり得、これらに限らないが、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、肺、鼻内、眼内、硬膜内、および経口ルートを含む。剤は、いずれかの慣用的なルート、たとえば、注入またはボーラス注入により、上皮または皮膚粘膜ライニング（たとえば、口粘膜、直腸および腸粘膜等）を介する吸収により、投与することができ、他の生物学的に活性な剤とともに投与することができる。投与は、全身的であっても、局所的であってもよい。

10

【0138】

特定の実施形態において、治療の必要な領域に本発明の薬学的組成物を局所的に投与することが要求され得る。これは、たとえば、これらに限らないが、術中の局所的注入、局所的適用、たとえば、注入により、カテーテルにより、またはインプラントにより、行うことができる。インプラントは、シアラスティック（sialastic）膜、線維または、商用の皮膚代替物のような膜を含む、多孔質、非多孔質、またはゼラチン材料のものである。

20

【0139】

別の実施形態において、活性剤は、ベシクル、特に、リボソームにおいて送達することができる（Langer (1990) Science 249:1527-1533を参照）。さらに別の実施形態において、活性剤は、制御放出システムにおいて送達することができる。一実施形態において、ポンプを用いることができる（Langer (1990) 前掲を参照）。別の実施形態において、ポリマー材料を用いることができる（Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105を参照）。

【0140】

これにより、広範囲の種々の遺伝子転移/遺伝子療法ベクターおよび構成物が当該技術分野で知られている、これらのベクターは、本発明の方法に用いるために直ちに適合される。作用可能に連結した組換えヒトMISタンパク質をコードする核酸セグメントを、選択された発現/デリバリーベクターに挿入するための組換えDNA/分子生物学の技術を用いる適切な操作により、本明細書に開示される方法の実施のための多くの等価なベクターを作り出すことができる。

30

【0141】

クローン化遺伝子は、タンパク質のアミノ酸配列を変更するよう操作され得ることが当業者に認められよう。組換えヒトMISタンパク質のためのクローン化遺伝子は、インビトロ変異誘発のための種々の公知の技術により、とりわけ、本明細書に開示される方法および組成物にしたがって用いることができる組換えヒトMISタンパク質のムテイン、バリエーション、または変異体としても言及される、自然発生ヒトタンパク質のバリエーションを生産するために、操作することができる。

40

【0142】

本発明に役立つ組換えヒトMISタンパク質のムテインの一次構造のバリエーションは、たとえば、欠失、付加、および置換を含む。置換は、保存性または非保存性であり得る。天然タンパク質およびムテインの間の差は、一般に、要求される特性を保存し、不要な特性を軽減または除去し、そして要求されるまたは新しい特性を加える。

【0143】

Remington's Pharmaceutical sciences Ed. Germany, Merk Publishing, Easton, PA, 1995（参照により全体が本明細書に組み込まれる）は、薬学的組成物を調剤するのに用いる種々の担体、およびその調製のための知られた技術を開示する。薬学的に許容される担体として機能し得る材料の特定の例は、これらに限らないが、糖、たとえば、ラクトース、グルコース、およびスクロース、スターチ、たとえばコーンスターチおよびポテトス

50

ターチ、セルロース、およびその誘導体、たとえば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、およびセルロースアセテート、モルト、ゼラチン、タルク、賦形剤、たとえば、ココアバターおよび坐剤ワックス、オイル、たとえば、ピーナッツ油、綿実油、ヒマワリ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、およびダイズ油、グリコール、たとえば、プロピレングリコール、エステル、たとえば、オレイン酸エチル、ラウリル酸エチル、寒天、緩衝剤、たとえば、水酸化マグネシウム、および水酸化アルミニウム、水、等張性塩類溶液、リンガー液、エチルアルコール、およびリン酸緩衝液、ならびに他の非毒性適合可能潤滑剤、たとえば、ラウリル硫酸ナトリウムおよび硫酸マグネシウム、ならびに着色剤、解離剤、コーティング剤、甘味料、香料、芳香剤、防腐剤、および酸化防止剤を含み、調剤者の判断にしたがって、本組成物中に存在し得る。

10

【0144】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された組成物は、薬学的に許容される担体を含む。本明細書に記載された組成物を対象に投与するための様々な手段は、当業者に周知である。本発明の全実施形態のうちいくつかの実施形態において、組成物は、眼、経口、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、肺、皮膚、局所、および注入投与を含むが、これらに限定されない経路を介して投与される。投与は、局所的または全身的であり得る。好ましい実施形態において、投与は注入である。いくつかの実施形態において、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、またはそれを超える回数の投与を避妊コースの間に行うことができる。

20

【0145】

薬学的組成物の投与

MISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質（例えば、LR-MISタンパク質）、または同タンパク質をコードする核酸を含む、有効量または有効用量の組成物が、動員される原始卵胞の数を減少させるために投与される。例えば、有効量は、組成物を投与しない場合と比較して、動員される原始卵胞の数を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも99%減少させるための、MISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質（例えば、LR-MISタンパク質）、または同タンパク質をコードする核酸の量である。女性対象に投与されるMISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質（例えば、LR-MISタンパク質）、または同タンパク質をコードする核酸を含む組成物の量は、その量が、動員される原始卵胞の数を望ましい数に減少させるため、または動員される原始卵胞の割合を望ましい値まで減少させるために十分である場合に、有効であると考慮される。いくつかの実施形態において、投与される組成物の量は、避妊を達成するために十分である。

30

【0146】

いくつかの実施態様において、MISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質（例えば、LR-MISタンパク質）または同タンパク質をコードする核酸を含む組成物を、一度に、またはサブ用量、例えば2~4サブ用量に分割して投与することができ、および一定期間にわたって、例えばその日または他の適切なスケジュールを通じて適切な間隔で、投与することができる。いくつかの実施形態において、投与は慢性、例えば、週または月の期間にわたる毎日の1回もしくは複数回の用量および/または処置であり得る。投与および/または処置スケジュールの例は、1週間、2週間、3週間、4週間、1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間もしくは6ヶ月間、またはそれを超える期間にわたる、毎日、1日2回、1日3回もしくは1日4回、またはそれを超える回数の投与である。用量は、有害な副作用を引き起こす程度に大きなものであるべきではない。

40

【0147】

いくつかの実施形態において、MISは、配列番号:3に対応する天然型（すなわち、野生型）のヒトMISである。

【0148】

いくつかの実施形態において、MISは、組換えタンパク質またはそれらの機能的フラグ

50

メントもしくは誘導体もしくはバリエーションである。いくつかの実施形態において、MISは、組換えヒトMISタンパク質またはそれらの機能的フラグメントもしくは誘導体もしくはバリエーションである（例えば、配列番号:4または配列番号:5）。

【0149】

動員される原始卵胞の数を正常レベルに戻すために、MISを含む組成物を投与する実施形態において、MISを含む組成物の投与が終了する。用語「正常レベル」は、本明細書において、任意のMIS投与または非天然型のMISが存在しない場合での、動員される原始卵胞の数を示すために使用される。

【0150】

組換えヒトMISタンパク質、MISバリエーションタンパク質、またはその誘導体もしくは機能的フラグメントは、当該技術分野で知られた、または本明細書に記載されたいずれかの経路により、たとえば、経口、非経口（たとえば、静脈内または筋内）、腹腔内、直腸、皮膚、鼻、膈、吸入、皮膚（パッチ）、または眼により投与することができる。組換えヒトMISタンパク質またはその誘導体もしくは機能的フラグメントは、いずれかの投与量または投薬計画で投与することができる。

10

【0151】

本発明の治療方法に関して、組換えヒトMISタンパク質、あるいはこのような組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドの投与を、特定の投与の形態、投与量、または投与の頻度に限定することを意図しない。本発明は、全ての投与の形態、たとえば、筋内、静脈内、腹腔内、小胞内、動脈内、病巣内、皮下、または本明細書に開示される自己免疫疾患もしくは免疫関連疾患を治療するのに適した投与量を供するのに十分ないずれかの他の経路を考慮する。組換えヒトMISタンパク質の有効量、たとえば、治療有効量は、単一投与または複数投与で患者に投与することができる。多重投与量が投与される場合、その投与量は、たとえば、1時間、3時間、6時間、8時間、1日、2日、1週間、2週間、または1ヶ月だけ、互いから分離され得る。たとえば、組換えヒトMISタンパク質剤を含む組成物は、たとえば、2、3、4、5、6、7、8、10、15、20週間、またはこれを超える週の間、投与することができる。いずれかの特定の対象のために、個々の必要性およびその組成物の投与を管理または指導する人の専門家の判断にしたがって、特定の投薬計画は、経時的に調節すべきである。たとえば、より低い投与量が十分な治療活性を供しないなら、治療剤の投与量を増加することができる。

20

30

【0152】

本明細書に開示された組換えヒトMISタンパク質もしくはMISタンパク質バリエーション、または同タンパク質をコードする核酸を含む組成物の投与は、永続的または非永続的な手段によってもよいが、好ましくは、経口または静脈内の投与である。処置は、短時間、例えばパルスされるか、または患者の生涯を通じて永続的であってもよい。本明細書に開示された実施形態の全態様において、本明細書に開示された剤および組成物は、パルス投与によって投与される。いくつかの実施形態において、それらは対象に経口投与される。いくつかの実施形態において、対象は哺乳類、例えばヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、化学療法または癌治療を受けているか、または受けるであろう者である。

40

【0153】

いくつかの実施態様において、MISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションの量は、処置された対象におけるMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションの血液レベルが、年齢が一致する女性対象における内因性MISタンパク質の、約20%を超える、約30%を超える、約40%を超える、約50%を超える、約50~100%の間である、約2倍を超える、約3倍を超える、約4倍を超える、約5倍を超える、または5倍を超えるように、（パルスで、持続的処置として、または1回投与として（例えば、MISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションの遺伝子治療発現を介して））対象に投与され、これは、一般に対象における原始卵胞を停止するのに十分であり、したがって、本明細書に開示された避妊のため、または卵巣予備能を保存するための（例えば、機能的卵巣予備能（FOR）の低下を妨げるための）方法において使用するための、十分な量のMISタンパク質またはMISバリエーションタン

50

パク質である。

【0154】

いくつかの実施態様において、本明細書に開示されたMISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質、または同タンパク質をコードする核酸の投与は、例えば、卵胞形成の永続的な停止、例えばイヌおよびネコなどの動物の永続的な避妊が望まれる場合に、例えばベクター、例えばウイルスベクターまたは遺伝子治療を介した1回投与であり得る。

【0155】

代替的な実施形態において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質の投与は、例えば、FORの低下を一時的に避けるために濾胞形成を一時的に停止するため、または例えば、対象、例えば、生涯のより後の時点で妊娠することを望むヒト対象の一時的な避妊のために、パルス投与による。

10

【0156】

いくつかの実施態様において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物のパルス投与は、全パルス用量が、同組成物の持続的な投与から予測されるものよりも、しばしば低いことから、持続的な処置よりも有効である。各パルス用量を減少させることができ、処置コースにわたって投与される薬物の総量は、最小限になる。各パルス用量を減少させることができ、処置コースにわたって患者に投与される薬物の総量を最小限にすることができる。パルス治療により、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションのインビボレベルは、有効な持続的処置のために要求されるレベルよりも下がり得る。パルス投与は、増加した有効性を有する用量当たりおよび/または総処置レジメン当たりの、患者に投与される本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物の量を減少させ得る。パルス投与は、時間、労力、および費用を削減することができ、より低い有効用量は、患者によって経験され得る合併症の数および重症度を減らすことができる。そのため、パルスは、同組成物の持続的な投与よりも有効であり得る。

20

【0157】

治療の伝統的な形態において、反復投与は、体内で望まれるレベルの活性成分を維持するために設計される。非常にしばしば、発症する合併症は、有毒に近いまたは正常細胞に対して有害である、有効である用量レベルに起因し得る。対照的に、パルス治療により、薬物のインビボレベルは、有効な持続的処置のために要求されるレベルよりも下がる。したがって、パルスは、単に、望まれる期間の濾胞形成を停止するために十分に長い期間、対象の血液中に、治療的に十分に高濃度のMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを存在させるような、十分に大量なボーラス投与ではない。パルス投与は、増加した有効性を有する用量当たりまたは総処置レジメン当たりの、患者に投与されるMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物の量を実質的に減少させ得る。このことは、時間、労力、および費用を著しく削減することを示し、より重要なことに、より低い有効用量が、患者によって経験され得る合併症の数および重症度を実質的に減らす。

30

【0158】

ある実施形態において、パルス投与は、1つまたは複数のMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約4週間投与し、その後、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約1週間投与しないことを含む。いくつかの実施形態において、パルス投与は、少なくとも1つのMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約6週間投与し、その後、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約2週間投与しないことを含む。ある実施形態において、パルス投与は、少なくとも1つのMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約4週間投与し、その後、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約2週間投与しないことを含む。いくつかの実施形態において、パルス投与は、少なくとも1つのMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約2週間投与し、その後、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約2週間投与しないことを含む。いくつかの実施形態において、パルス投与は、少なくともMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約10日、約2週、約3週、約4週、約

40

50

5週、約6週、約7週、約8週、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約9ヶ月、約12ヶ月、または12ヶ月を超える期間投与するパルスを含む。特定の実施形態において、パルス投与は、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約10日、約2週、約3週、約4週、約5週、約6週、約7週、約8週、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約9ヶ月、約12ヶ月、または12ヶ月を超える、投与しない期間を含む。いくつかの実施形態において、投与は持続的である。ある実施態様において、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質の投与は、永続的避妊が必要とされるか、または望まれる場合に、対象の生涯の間である。

【0159】

本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を含む組成物の個々のパルスは、約2、4、6、8、10、12、14もしくは16時間などの数時間、または2、3、4、5、6もしくは7日などの数日間、または7日を超える、例えば、約7～14日、14日～3週、3～4週、4～6週もしくは6週を超える期間にわたって持続的に患者に送達され得る。例えば、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を含む組成物は、約10～20日または10～30日の期間にわたって投与され、その後、7日間処置無しであり得る。

【0160】

一実施形態において、開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物は、約2週、約3週、約4週もしくは約5週、または5週を超える期間、例えば、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月もしくは約7ヶ月、またはそれを超えて対象に投与され、適切な間隔の後で、その後、追加の期間、例えば、約2日、約3日、約4日もしくは約5日、または5日を超える期間、投与され得る。処置サイクルは、即時の連続で、またはサイクル間に処置無しの期間を置いて生じ得る。典型的には、対象が、（例えば、機能的卵巣予備能（FOR）の低下を妨げる方法において）卵巣予備能の保存のための本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を含む組成物を投与される場合、対象は、約3～4ヶ月の期間、約4～6ヶ月の期間、約6～8ヶ月の期間、約8～12ヶ月の期間、約12～24ヶ月の期間もしくは約24～36ヶ月の期間、または約36ヶ月を超える期間、組成物を投与され、その後、本明細書に記載したような、送達無しの期間を設けることができる。いくつかの実施形態において、対象が、避妊方法において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質を含む組成物を投与される場合、対象は、約3～4ヶ月の期間、約4～6ヶ月の期間、約6～8ヶ月の期間、約8～12ヶ月の期間、約12～24ヶ月の期間もしくは約24～36ヶ月の期間、または約36ヶ月を超える期間、または対象が妊娠しないことを望む期間、組成物を投与され、その後、送達無しの期間を設けることができる。

【0161】

いくつかの実施形態において、パルス治療が使用される場合、パルス間の間隔または送達無しの期間は、24時間を超え、好ましくは48時間を超え、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日もしくは10日、2週、3週もしくは4週、またはさらに長い期間であり得る。いくつかの実施形態において、パルス間の間隔は、例えば、本明細書の実施例に実証されるように、組成物の投与（例えば、パルス用量）後の対象における血液中のMISタンパク質レベルを測定すること、およびMIS mRNAまたはMISタンパク質レベルが、特定の予め定義された低い許容閾値に達する場合、パルス投与することによって、当業者によって決定され得る。そのような予め定義された低い許容閾値は、当業者によって決定され得、例えば、ほぼベースラインレベル、または年齢が一致する女性対象における外因性MISタンパク質レベルのベースラインレベルの約100%、約200%、約300%、約400%もしくは約500%であるか、または500%を超え得る。

【0162】

または、いくつかの実施形態において、パルス間の間隔は、組成物の活性成分が次のパルスの送達前に患者においてもはや検出可能ではない場合に、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物の他の用量を投与することによって計算され得る。あるいは、間隔はまた、組成物のインビボ半減期から計算され得る。

例えば、間隔はまた、組成物のインビボ半減期、または血液中のMISタンパク質もしくはMISバリエーションタンパク質のレベルから計算され得る。間隔は、インビボ半減期を超えるものとして、または組成物の半減期より2倍、3倍、4倍、5倍もしくは10倍を超えるものとして計算され得る。極めて急速な半減期寿命を有する組成物のために、間隔は、化学組成物の半減期の25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、および500倍であり得る。単回治療レジメンにおけるパルス数は、わずか2回であってもよいが、典型的には、約5～10回、10～20回、15～30回、またはそれを超える。いくつかの実施形態において、患者は、現行の治療に関連する問題および不都合無しに、本願発明の方法に従い、生涯の間、または対象が妊娠することを望まない所望の期間、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物を受容する。

10

【0163】

特定の実施形態において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物は、多くの任意の手段によって投与され得るが、好ましくは、患者に、注入（例えば、静脈内、皮下、または動脈内）、インフュージョン、または滴下として送達され、より好ましくは、経口摂取または腔内投与による。

【0164】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物の投与は、断続的であり得、例えば、2日に1回、3日毎、5日毎、1週に1回、1ヶ月に1回もしくは2回などであり得る。本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物の量、形態、および/または異なる形態の量は、投与の異なった時間に様々であり得る。

20

【0165】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物は、化学療法または放射線療法が対象に投与される前に、対象に投与され得る。代替的な実施形態において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物は、他の剤または治療レジメンと同時に、例えば、化学療法または放射線療法と同時に、対象に共に投与され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物は、1つまたは複数の追加の剤を含む薬学的組成物によって共に投与され得る。薬学的組成物は、パルス投与によって提供され得る。例えば、本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む組成物は、対象に投与され得、その後、間隔時間が経過した後、化学療法または放射線療法が行われ、投与のこの順序、同一または同様の時間間隔が、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10回、またはそれを超える回数、繰り返され得る。本明細書に開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む1つもしくは複数の薬学的組成物のパルス投与は、化学療法または放射線療法誘導性の早期卵巣機能不全を避けるために、予防的治療、例えば、化学療法および化学放射線療法を受けるであろう、有している、または現在受けている対象の予防的治療のために使用され得る。

30

【0166】

いくつかの実施形態において、対象は、例えば、ネコおよびイヌなどの動物対象のために、本発明の方法に従い、例えば、対象が永続的に妊娠しないことを望む場合に、生涯の間、開示されたMISタンパク質またはMISタンパク質バリエーションを含む1つもしくは複数の組成物を受容し得る。組成物は、多くの任意の手段によって投与され得、患者に、経口製剤または注入（例えば、静脈内、皮下、または動脈内）、インフュージョン、または滴下として送達され得る。インフュージョンまたは患者への送達他の形態により組成物をパルスするための様々な方法および装置は、参照により全体が本明細書に組み入れられるU.S. Pat. No. 4,747,825 ; U.S. Pat. No. 4,723,958 ; U.S. Pat. No. 4,948,592 ; U.S. Pat. No. 4,965,251 ; およびU.S. Pat. No. 5,403,590に開示される。

40

【0167】

主治医は、適切な量および投与計画を最終的には決定するであろうが、組換えヒトMIS

50

タンパク質またはその誘導体もしくは機能的フラグメントの有効量は、0.0001、0.01、0.01 0.1、1、5、10、25、50、100、500、または1,000 mg/kgの投与量で供することができる。有効な投与量は、インビトロまたは動物モデルのテストバイオアッセイまたはシステムから得られる投与量応答曲線から推定することができる。特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質の投与量は、約1pg/kg～10mg/kg(患者の体重)であるが、より低いまたはより高い投与量も投与することができる。

【0168】

特定の実施形態において、組換えヒトMISの投与量についての参照範囲は、米国における参照グループから評価され、Antimullerian Hormone (AMH), Serum from Mayo Medical Laboratories. Retrieved April 2012に記載される。特定の実施形態において、女性の対象は、以下の組換えヒトMISの投与量で投与することができる： 1 ~ 10 ng/mL (13~45歳の女性)、1 ng/mL未満(45歳を超える女性)。測定される人がビタミンD欠損である場合、MIS測定はより正確でなくなり得る。

10

【0169】

特定の患者または対象のための投与量は、慣用的な考慮すべき事項を用いて(たとえば、適切な慣用的な薬学的プロトコルにより)、当業者が決定することができる。医師は、たとえば、最初に相対的に低い投与量を処方し、次に、適切な応答が得られるまで投与量を増加させることができる。患者に投与される投与量は、適応に依存して、経時的に患者に有益な治療応答をもたらす、または、たとえば、症状もしくは他の適切な活性を削減するのに十分なものである。投与量は、特定の処方の効能、および本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的誘導体もしくはフラグメントの活性、安定性、もしくは血清半減期、ならびに、患者の状態、治療すべき自己免疫疾患、ならびに治療すべき患者の体重および表面領域により決定される。投与のサイズは、特定の対象において特定のベクター、製剤等の投与に伴ういずれかの不都合な副作用の存在、性質、および程度によっても決定される。組換えヒトMISタンパク質またはその機能的誘導体もしくは機能的フラグメントを含む治療用組成物は、任意で、当該技術分野において公知である方法にしたがって、効率的な組織代謝を確認するため、および投与量を評価するため、1または複数の適切なインビトロおよび/またはインビボの疾患の動物モデル、たとえば、実施例において本明細書に開示され。当業者に知られているミューラー管退行バイオアッセイにおいて、テストされる。特に、投与量は、関連アッセイにおいて、治療対非治療の活性、安定性、または他の適切な基準(たとえば、処理したvs処理していない細胞または動物モデルの比較)により、最初に決定され得る。製剤は、関連製剤のLD50、および/または、患者の大部分または全体的な健康に適用されるような、種々の濃度での組換えヒトMISタンパク質またはその機能的誘導体もしくは機能的フラグメントのいずれかの副作用の観察結果により決定された比率で投与される。投与は、単一でまたは分割した投与量で行うことができる。

20

30

【0170】

病気の治療または予防において投与されるべき組換えヒトMISタンパク質、MISバリエーションタンパク質(例えばLR-MIS)、あるいはその機能的誘導体または機能的フラグメント、またはそれをコードする核酸の有効量の決定において、医師は、MISタンパク質の循環血漿レベル、製剤毒性、および疾患の進行を評価する。選択される投与レベルは、多様な因子、たとえば、用いる本発明の特定の化合物またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与のルート、投与の時間、用いる特定の化合物の排出の速度、治療の持続時間、用いる特定の化合物と組み合わせる化合物および/または材料、年齢、性別、体重、状態、全般の健康、および治療する患者の以前の医療履歴等、ならびに医療の分野で公知の因子等に依存するであろう。

40

【0171】

特定の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質、またはMISバリエーションタンパク質(例えばLR-MIS)、またはそれをコードする核酸は、個々の患者の臨床条件、投与の部位および方法、投与のスケジュール、患者の年齢、性別、体重、およ

50

び医療実施者に知られた他の因子を考慮して、優れた医療実施にしたがった投与量で投与することができる。

【0172】

本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質、MISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーション、またはそれをコードする核酸を含む組成物の投薬計画は最適な要求される応答（たとえば、治療または予防応答）を供する様に調節することができる。たとえば、単一ボラスを投与することができ、いくつかに分割した投与量を経時的に投与することができ、または投与は、治療状況の緊急性により示されるように比例的に減少もしくは増加させることができる。投与の容易さおよび投与の均一性のため、投与単位形態において非経口的組成物を調剤することが特に有利である。

10

【0173】

さらに、薬学的組成物中の組換えヒトMISタンパク質、またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）の実際の投与量レベルは、対象に毒性でなく、特定の対象のための要求される治療応答、組成、および投与の態様を達成するために有効である活性成分の量を得るように、多様であり得る。本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む薬学的組成物は、「治療有効量」および/または「予防有効量」であり得る。一般に、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む組成物の適切な毎日の投与量は、本明細書に開示される増殖性障害または癌の症状の削減のような、治療効果を得るのに有効な最も低い投与量である、組換えヒトMISタンパク質の量であろう。このような有効量は、一般に、上述の因子に依存するであろう。

20

【0174】

必要に応じて、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む組成物の有効な毎日の投与量は、任意に単位投与形態で、その日を通じて適切な間隔で、別個に、2、3、4、5、6、またはこれを超えるサブ投与で投与することができる。

【0175】

対象に投与される投与レベルは、要求される期間、たとえば、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも1年、または少なくとも5年、または5年超に渡って一定であり得る。あるいは、対象に投与される投与レベルは、治療される状態の進行に依存して多様であり得、例えば、対象のFOR（functional ovarian reserve、機能的卵巣予備能）、またはPOAもしくはDOR（diminished ovarian reserve、減少した卵巣予備能）の重症度に依存する。

30

【0176】

投与量の値は、女性のFOR（functional ovarian reserve）、あるいは軽減すべきPORまたはDOR（diminished ovarian reserve）の重症度により、多様であり得る。いずれかの特定の対象のために、特定の投与計画は、個人の必要性、ならびに組成物の投与を管理および指導する人の専門家の判断にしたがって、経時的に調節されるべきであること、ならびに、本明細書に記載される投与範囲は典型例のみであり、本発明の範囲および実施を限定することを意図しないことがさらに理解されるべきである。

40

【0177】

化合物の効能および毒性は、細胞培養または実験動物において、標準的な薬学的手順、たとえばED50（投与が集団の50%で有効）およびLD50（投与が集団の50%で致死的）により決定することができる。治療効果に対する毒性の投与比率は、治療指数といい、それは、LD50/ED50の比率で表現することができる。大きな治療指数を示す薬学的組成物が好ましい。用いることができる適切な実験モデルは、実施例において本明細書に開示されるミューラー管退化バイオアッセイの使用、または当業者に広く知られているインビボ癌モデルであり得る。インビボ癌モデルは、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Frese et al.

50

, "Maximizing mouse cancer models" Nat Rev Cancer. 2007 Sep;7(9):645-58 および Santos et al., Genetically modified mouse models in cancer studies. Clin Transl Oncol. 2008 Dec;10(12):794-803, および "Cancer stem cells in mouse models of cancer", 6th Annual MDI Stem Cell Symposium, MDI Biological Lab, Salisbury Cove, ME, August 10-11, 2007"において議論されている。

【0178】

たとえば、治療有効量は、細胞培養アッセイにおいて、または動物モデル、通常は、マウス、ウサギ、イヌ、もしくはブタにおいて、最初に評価することができる。動物モデルは、投与の要求される濃度範囲およびルートを達成するためにも用いられる。次に、このような情報は、他の対象において投与のための有用な投与量およびルートを決めるのに用いることができる。一般に、治療有効量は、要求される治療効果に依存する、たとえば、組換えヒトMISTタンパク質の治療有効量は、生殖能に関するマウスモデルにおいて評価することができる。

10

【0179】

当業者である医師または獣医は、要求される薬学的組成物の有効量を直ちに決定し、処方することができる。たとえば、医師または獣医は、要求される治療効果を達成するために要求される量より低いレベルにおいて、薬学的組成物に用いる本発明の化合物の投与量を開示し、要求される効果が達成されるまで、投与量を次第に増加させることができる。ヒトは、本明細書で例示されるマウスまたは他の実験動物より一般に長く治療されることにも注意される。その治療は、疾患の過程および薬剤の有効性の長さに比例する長さを有する。投与量は、数日の期間にわたって、単一投与であっても多重投与であってもよいが、単一投与が好ましい。

20

【0180】

特定の実施形態において、組換えヒトMISTタンパク質（たとえば、タンパク質、または組換えヒトMISTタンパク質もしくはそのフラグメントをコードする核酸）は、いずれかの適切な投与のルート、たとえば、経口、鼻により、たとえば、噴霧、直腸、腔内、非経口的、嚢内、および局所的に、粉体、軟膏、またはドロップ、たとえば、口内および舌下により、治療のためのヒトおよび他の動物に投与することができる。

【0181】

要求される投与量での薬学的に許容される担体での調剤の後、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む薬学的組成物を対象に投与することができる。組換えヒトMISTタンパク質、またはMISTバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS蛋白質）、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーションを含む薬学的組成物は、いずれかの適切な手段を用いて、対象に投与することができる。一般に、投与の適切な手段は、これらに限らないが、局所、経口、非経口（たとえば、静脈内、皮下、または筋内）、直腸、嚢内、腔内、腹腔内、眼、または鼻のルートを含む。

30

【0182】

特定の実施形態において、組換えヒトMISTタンパク質を含む薬学的組成物を、治療の必要な領域に、投与することが要求され得る。これは、たとえば、これらに限らないが、手術中の局所注入により、局所的適用、たとえば、注入により、カテーテルにより、またはインプラントにより達成することができる。ここで、そのインプラントは、膜、たとえば、シラスティック（sialastic）膜、線維、または市販の皮膚代替物を含む、多孔質、非多孔質、またはゼラチンの材料、から作られ得る。特定の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質は、局所クリーム、パッチ、筋肉内注射等を用いて筋肉に適用することができる。

40

【0183】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示された組換えヒトMISTタンパク質は、例えば、当業者に知られ、参照により全体が本明細書に組み入れられるWoolfson et al., "Drug delivery by the intravaginal route", Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 2000 (17(5):509-599に開示されるような、ヒドロゲル、腔錠、ペッサリー/坐剤、微粒子

50

システム、および腔内リングなどを用いて、腔内に投与され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示された組換えヒトMISタンパク質は、参照により全体が本明細書に組み入れられるMaurya SK et al., 「Therapeutic potential of mucoadhesive drug delivery systems--an updated patent review」、Recent Pat Drug Deliv Formul. 2010 Nov;4(3):256-65; Balaglu et al., 「Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems」、J Pharm Pharm Sci. 2009;12(3):312-36; およびde Araujo Pereira, 「Vaginal mucoadhesive drug delivery systems」、Drug Dev Ind Pharm. 2012 Jun;38(6):643-52に開示されるような、腔粘膜付着性の薬物送達システム(DDS)を用いて、腔内に投与され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示された組換えヒトMISタンパク質は、Krutik et al., 「Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery」、Patil et al., Curr Drug Deliv 2008 Oct;5(4):312-8に開示されるような、粘膜付着性のマイクロスフェアを用いて、腔内に投与され得る。

10

20

30

40

50

【0184】

特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、対象に、経口的に(たとえば、カプセル、懸濁液、または錠剤において)、または非経口投与により投与することができる。経口投与のための慣用的な方法は、以下のいずれか1つにおいて組換えヒトMISタンパク質を投与することを含む: 錠剤、懸濁液、溶液、エマルション、カプセル、粉体、シロップ等が利用できる。組換えヒトMISタンパク質を経口的にまたは静脈内に送達し、生物学的活性を保持する周知の技術が好ましい。非経口投与は、たとえば、筋内、静脈内、関節内、動脈内、鞘内、皮下、または腹腔内投与を含み得る。組換えヒトMISタンパク質は、経口的、経皮的、局所的、吸入(気管支内、鼻内、口内吸入または鼻内ドロップ)により、または直腸で投与することもできる。投与は、示されるような局所的または全身的であり得る。剤、たとえば、組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸は、当業者に公知である方法により、ベクター、たとえば、ウイルスベクターを用いて送達することもできる。

【0185】

本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む組成物を非経口的に投与する場合、それは、一般に、単位投与量注入可能な形態(たとえば、溶液、懸濁液、エマルション)に調剤されよう。注入のために適した薬学的製剤は、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注入可能溶液または分散液への再構成のための滅菌粉末を含む。担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール(たとえば、グリコール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール)、それらの適切な混合物、および植物油を含む、溶媒または分散媒体であり得る。

【0186】

本明細書に用いる用語「投与単位」形態は、治療すべき哺乳動物対象のための単位の投薬量として適した物理的に別個の単位をいう。ここで、それぞれの単位は、要求される薬学的担体を関連して要求される治療効果を作り出すよう計算された所定量の活性化化合物を含む。本発明の投与単位形態のための詳細は、(a)本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションの特有の特徴、および達成すべき特定の治療または予防効果、ならびに、(b)組換えヒトMISタンパク質を個体における感受性の治療のための活性剤に合成する技術分野に固有の制限、により決定され、またはそれに直接、依存する。

【0187】

本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む薬学的に許容される組成物は、水性ビヒクル中に懸濁し、慣用的な皮下注射針を介して、または注入ポンプを用いて、導入することができる。

【0188】

薬学的組成物

特定の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはMISバ

リアントタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーションは、いずれかの適切な手段において、たとえば、滅菌注入可能溶液において調剤することができる。それは、たとえば、必要に応じて、種々の他の成分とともに要求される量の適切な溶媒中に組換えヒトMISタンパク質を組み込むことにより、調製することができる。

【0189】

本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーションを含む組成物の薬学的製剤は、いずれかの適合可能な担体、たとえば、多様なビヒクル、アジュバント、添加物、および希釈剤を含む注入可能製剤において患者に投与することができる。あるいは、本発明において利用される化合物は、徐放性皮下インプラント、または標的化デリバリーシステム、たとえば、モノクローナル抗体、誘導（vectored）デリバリー、イオン泳動、ポリマーマトリクス、リポソーム、およびマイクロスフィアの形態で非経口的に投与することができる。本発明に有用なデリバリー（送達）システムの例は、米国特番号：5,225,182；5,169,383；5,167,616；4,959,217；4,925,678；4,487,603；4,486,194；4,447,233；4,447,224；4,439,196 および 4,475,196に供されるものを含む。他のこのようなインプラント、デリバリーシステム、およびモジュールは当業者に公知である。

【0190】

適切な流動性は、たとえば、コーティング、たとえばレシチンの使用により、分散液の場合は要求されるサイズの維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。非水性ビヒクル、たとえば、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、大豆油、コーン油、ヒマワリ油、またはピーナッツ油、およびエステル、たとえば、ミリスチン酸イソプロピルも、化合物組成物のための溶媒システムとして用いることができる。さらに、組成物の安定性、滅菌性、および等張性を増強する種々の添加物、たとえば、抗微生物保存剤、酸化防止剤、キレート化剤、および緩衝液を添加することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌および抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、およびソルビン酸により確実にすることができる。多くの場合、等張剤、たとえば、糖、塩化ナトリウム等を含めることが要求されよう。注入可能な薬学的形態の延長された吸収は、吸収を遅らせる剤、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の使用によりもたらされ得る。しかしながら、本発明によれば、用いるいずれかのビヒクル、希釈剤、または添加物は、本化合物と適合可能でなければならないであろう。

【0191】

別の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーションを含む組成物は、脂質ベースの製剤を含み得る。周知の脂質ベースの薬剤デリバリーシステムのいずれも、本発明の実施に用いることができる。たとえば、多小胞体リポソーム、多重膜リポソーム、および単層リポソームは、すべて、被包された活性化合物の徐放比率を確立することができる限り、用いることができる。制御された放出の多小胞リポソーム薬デリバリーシステムを作成する方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、PCT出願公開WO 9703652, WO 9513796, およびWO 9423697に記載される。

【0192】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された方法において使用される組成物は、徐放性形態であり得る。様々な公知の制御または延長された放出用量形態、製剤、および装置が、本開示の塩および組成物と共に使用するために適合され得る。例には、各々が参照により本明細書に組み入れられるU.S. Pat. No. 3,845,770；U.S. Pat. No. 3,916,899；U.S. Pat. No. 3,536,809；U.S. Pat. No. 3,598,123；U.S. Pat. No. 4,008,719；U.S. Pat. No. 5,674,533；U.S. Pat. No. 5,059,595；U.S. Pat. No. 5,591,767；U.S. Pat. No. 5,120,548；U.S. Pat. No. 5,073,543；U.S. Pat. No. 5,639,476；U.S. Pat. No. 5,354,556；U.S. Pat. No. 5,733,566；およびU.S. Pat. No. 6,365,185 B1が含まれるが、これらに限定されない。これらの用量形態は、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセ

ルロース、他のポリマーマトリクス、ゲル、透過性膜、浸透圧システム（例えば、OROS（登録商標）など（Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA））、または様々な割合で所望の放出プロフィールを提供するそれらの組み合わせを用いて、1つまたは複数の活性成分の緩徐なまたは制御された放出を提供するために使用され得る。

【0193】

合成膜ベシクルの組成は、通常、リン脂質の組み合わせ、通常、ステロイド、特にコレステロールとの組み合わせである。他のリン脂質または他の脂質を用いることもできる。合成膜ベシクル生産に役立つ脂質の例は、ホスファチジルグレセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、およびガングリオシド、好ましい実施形態では、たとえば、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアシルホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、およびジオレイルホスファチジグリセロールを含む。

【0194】

組換えヒトMISTタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む脂質ベースのベシクルの調製において、変量、たとえば、活性化合物被包の効能、活性化合物の脂溶性、得られるベシクルの集団の均一性およびサイズ、活性化合物対脂質比、透過性、調製物の不安定性、ならびに製剤の薬学的許容性を考慮すべきである。

【0195】

別の実施形態において、組換えヒトMISTタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）は、ベシクル、特にリポソーム（Langer (1990) Science 249:1527-1533を参照）において送達することができる。さらに別の実施形態において、組換えヒトMISTタンパク質は、制御された放出システムで送達することができる。一実施形態において、ポンプを用いることができる（Langer (1990) 前掲を参照）。別の実施形態において、ポリマー材料を用いることができる（Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105を参照）。本発明の活性剤が組換えヒトMISTタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）をコードする核酸である別の実施形態において、その核酸は、それが、たとえば、レトロウイルスベクターの使用により（たとえば、米国特許No. 4,980,286を参照）、または直接の注入により、または微粒子照射の使用により（たとえば、遺伝子ガン、Biologic, Dupont）、または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト剤でのコーティングにより、またはそれを核に入ることが知られているホモボックス様ペプチドに連結させて投与すること等により（たとえば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868を参照）、細胞内になるように、適切な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築し、それを投与することにより、それにコードされたタンパク質の発現を促進するようにインビボで投与することができる。あるいは、核酸を細胞内に導入することができ、発現のために相同組換えによって宿主細胞のDNA中に取り込むことができる。

【0196】

導入の前に、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーションを含む組成物は、当該技術分野の多数の利用できる技術のいずれかにより、たとえば、ガンマ照射または電子ビーム滅菌で、滅菌することができる。

【0197】

本発明の別の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーションは、いずれかの他の治療剤と連動して（たとえば、組み合わせで）投与および/または調剤することができる。投与の目的のため、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションは、好ましくは、薬学的組成物として調剤される。本発明の薬学的組成物は、本発明の化合物、および薬学的に許容される担体を含み、ここで、その化合物は、問題の状態を治療するのに役立つ量で組成物中に存在する。適切な濃度および投与量は当業者が直ちに決定することができる。

【0198】

薬学的に許容される担体は、当業者に知られている。液体溶液として調剤された組成物のために、許容される担体は、塩類および滅菌水を含み、任意に、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、および他の添加物を含み得る。組成物は、錠剤、カプセル、粒子、または錠剤としても調剤することができ、それは、本発明の化合物に加えて、希釈剤、分散および表面活性剤、バインダー、および潤滑剤を含む。当業者は、適切な様式で、およびたとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1990に開示されるような許容される実施にしたがって、本発明の化合物をさらに調剤することができる。

【0199】

10

本発明の組成物は、いずれかの形態であり得る。これらの形態は、これらに限らないが、本発明の1または複数のレゾルビン(resolvin)および/またはプロテクチン(protectin)、またはそれらのアナログを含む、溶液、懸濁液、分散液、軟膏(口の軟膏を含む)、クリーム、ペースト、ゲル、粉末(歯磨き粉を含む)、練り歯磨き、ロゼンジ、軟膏剤、チューインガム、口スプレー、香錠、香粉(sachets)、マウスウォッシュ、エアロゾル、錠剤、カプセル、経皮パッチを含む。

【0200】

20

本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質(例えばLR-MIS)、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーションを含む組成物の調剤は、当業者に知られたいくつかの手段により調製することができる。特定の実施形態において、製剤は、たとえば、(i)複数の治療に有効な投与量を供するのに十分な量の本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質(例えばLR-MIS)、あるいはその機能的フラグメントまたはバリエーション、(ii)その製剤のそれぞれを安定化するのに有効な量の水の添加、(iii)エアロゾルカニスターからの複数の投与を噴霧するのに十分な量の噴霧剤、および(iv)いずれかの更なる任意成分、たとえば、共溶媒としてのエタノールを組み合わせ、化合物を分散させることにより、エアロゾル製剤としての投与のために調製することができる。それら成分は、慣用的なミキサーもしくはホモジェナイザーを用いて、振とうにより、または超音波エネルギーにより分散させることができる。バルク製剤は、バルブ-バルブ移動法、圧送注入を用いて、または慣用的なcold-fill法により、より小さな個々のエアロゾルバイアルに移すことができる。懸濁エアロゾル製剤に用いる安定化剤を噴霧剤中に可能化させることは要求されない。十分に可溶性ではないものは、適切な量で薬剤粒子上に被覆することができ、次にその被覆された粒子を、上述の通り製剤に組み込むことができる。

30

【0201】

特定の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質(例えばLR-MIS)を含む組成物は、薬学的に許容される担体とともに薬学的組成物として対象に投与することができる。特定の実施形態において、これらの薬学的組成物は、任意に、1または複数のさらなる治療剤をさらに含む。もちろん、このような治療剤は、当業者に知られており、当業者は容易に特定することができる。

【0202】

40

湿潤剤、乳化剤、および潤滑剤、たとえば、ラウリル硫酸ナトリウム、およびステアリン酸ナトリウム、ならびに、着色剤、解離剤、コーティング剤、甘味料、香料、芳香剤、防腐剤、および酸化防止剤も本組成物中に存在し得る。薬学的に許容される酸化防止剤の例は、水溶性酸化防止剤、たとえば、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等、油溶性酸化防止剤、たとえば、アスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロール等、ならびに金属キレート化剤、たとえば、クエン酸、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸等を含む。

【0203】

50

本発明の製剤は、静脈内、経口、鼻、局所、経皮、頬、舌下、直腸、膣、および/または非経口投与のために適したものを含む。その製剤は、便利には、単位投与形態で供することができ、医薬の当業者に公知のいずれかの方法により調整することができる。単一投与形態を生産するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、一般に、治療有効量を作り出す化合物の量であろう。一般に、百パーセントの中から、この量は約１パーセント～約９９パーセントの活性成分、好ましくは約５パーセント～約７０パーセント、最も好ましくは約１０パーセント～約３０パーセントの範囲であろう。

【 0 2 0 4 】

経口投与に適した本発明のMISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）の製剤は、カプセル、ピル、錠剤、ロゼンジ（味の付いたもの、通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガカントを用いる）、粉末、粒子、または水性もしくは非水性の液体の溶液もしくは懸濁液、水中油もしくは油中水の液体エマルジョン、エリキシルもしくはシロップ、または香錠（不活性のもの、たとえば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアを用いる）、および／またはマウスウォッシュ等の形態であり得、それぞれが、活性成分として本発明の化合物の所定量を含む。本発明の化合物は、ボーラス、舐剤、またはペーストとしても投与することができる。

【 0 2 0 5 】

経口投与のための本発明の固体投与形態（カプセル、錠剤、ピル、ドラジェー、粉末、粒子等）において、MISタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）は、1または複数の薬学的に許容される担体、たとえば、クエン酸ナトリウム、リン酸二カルシウム、および/または以下の成分と混合される：充填剤または増量剤、たとえば、スターチ、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および/またはケイ酸、バインダー、たとえば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、および/またはアカシア、保湿剤、たとえば、グリセロール、崩壊剤、たとえば、寒天、炭酸カルシウム、ポテトまたはタピオカスターチ、アルギン酸、特定のシリケート、および炭酸ナトリウム、溶液緩染剤、たとえば、パラフィン、吸収アクセラレーター、たとえば、四級アンモニウム化合物、湿潤剤、たとえば、セチルアルコール、およびグリセロールモノステアレート、吸収剤、たとえば、カオリンおよびベントナイト粘土、潤滑剤、たとえば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびそれらの混合物、ならびに着色剤。カプセル、錠剤、およびピルの場合、薬学的組成物は、環状剤も含み得る。類似するタイプの固体組成物は、ラクトースもしくはミルクのような賦形剤、ならびに高分子量ポリエチレングリコール等を用いて、軟質および硬質充填ゼラチンカプセルにおける充填剤として用いることもできる。

【 0 2 0 6 】

錠剤は、任意に１または複数の補助成分とともに、圧縮またはモールドイングにより作ることができる。圧縮錠剤は、バインダー（たとえば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性希釈剤、保存料、崩壊剤（たとえば、グリコール酸ナトリウムスターチ、または架橋カルボキシメチルセルロース）、表面活性または分散剤を用いて調製することができる。モールドイング錠剤は、適切な機械で、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状化合物を成形することにより、作ることができる。

【 0 2 0 7 】

本発明の薬学的組成物の錠剤および他の固体投与形態、たとえば、ドラジェー、カプセル、ピル、および粒子は、任意に、コーティングおよびシェル、たとえば、腸溶コーティングおよび薬学製剤技術において公知である他のコーティングを付与し、またはそれとともに調製することができる。それらは、たとえば、要求される放出プロフィールを供するために種々の割合のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、リポソーム、および/またはミクロスフィアを用いて、その中の活性成分の徐放または制御された放出を供するように調剤することもできる。それらは、たとえば、細菌保持フィルターを介するろ過により、または滅菌水に溶解することができる滅菌固体組成物の形態に

滅菌剤を組み込むことにより、または、いくつかの他の使用直前に滅菌注入可能な媒体により、滅菌することができる。これらの組成物は、任意に不透明化剤も含み得、それらが、単独でまたは好ましくは胃腸管の特定の部分において、任意に遅延様式で、活性成分の放出する組成物であり得る。用いることができる包埋組成物の例は、ポリマー物質およびワックスを含む。活性成分は、適切なら、1または複数の上述の賦形剤を含む、マイクロカプセル化形態でもあり得る。

【0208】

本発明の化合物の経口投与のための液体投与形態は、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシルを含む。

【0209】

活性成分に加えて、液体投与形態は、当該技術分野において一般に用いられる不活性な希釈剤、たとえば、水または溶媒、可溶化剤および乳化剤、たとえば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、オイル（特に、綿実油、ラッカセイ、コーン、胚芽、オリーブ、ひまし油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物を含み得る。不活性希釈剤の他に、経口組成物は、アジュバント、たとえば、湿潤剤、乳化および懸濁剤、甘味料、香味料、着色料、香料および保存剤も含み得る。

【0210】

懸濁液は、活性化合物に加えて、懸濁剤、たとえば、エトキシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天およびトラガカント、ならびにそれらの混合物を含み得る。

【0211】

特定の例において、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む組成物は、直腸または膣投与に適した製剤、たとえば、本発明の1または複数の化合物を、たとえば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤ワックス、またはサリチル酸塩を含み、室温で固体であるが、体温で液体であり、それにより活性化合物を放出する、1または複数の適切な非刺激性の賦形剤または担体と混合することにより、調製することができる、坐剤として、適した製剤であり得る。このような投与のための適切な担体および製剤は当該技術分野で知られている。

【0212】

本発明の組換えヒトMISタンパク質の局所的または経皮投与のため、たとえば、筋肉投与のための投与形態は、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、および吸入薬を含む。本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションは、滅菌条件下において、薬学的に許容される担体と、および要求され得るいずれかの保存剤、緩衝液、または推進薬と、混合することができる。

【0213】

軟膏、ペースト、クリーム、およびゲルは、本発明の活性化合物に加えて、賦形剤、たとえば、動物および植物油、ワックス、パラフィン、スターチ、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、および酸化亜鉛、ならびにこれらの混合物を含み得る。粉末およびスプレーは、本発明の化合物に加えて、賦形剤、たとえば、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物を含み得る。スプレーは、さらに、慣用的な推進剤、たとえば、クロロフルオロヒドロカーボン、および揮発性非置換炭化水素、たとえばブタンおよびプロパンを含み得る。

【0214】

経皮パッチは、体への、本発明の組換えヒトMISタンパク質の制御された送達を供する

10

20

30

40

50

さらなる利点を有する。このような投与形態は、適切な媒体中に化合物を溶解し、または分散させることにより、作ることができる。吸収エンハンサーは、皮膚を横切る化合物の流動を増加させるのに用いることもできる。このような流動の速度は、速度制御膜を供することにより、またはポリマーマトリクスもしくはゲルに活性化合物を分散させることにより、制御することができる。

【0215】

非経口投与に適した本発明の薬学的組成物は、1または複数の本発明の化合物を、1または複数の薬学的に許容される滅菌等張水性または非水性溶液、分散液、懸濁液、もしくはエマルジョン、または使用直前に滅菌注入可能溶液もしくは分散液に再構成することができる滅菌粉末と組み合わせて含む。それは、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、製剤を意図した受容者の血液と等張にする溶質、または懸濁もしくは増粘剤を含み得る。

10

【0216】

本発明の薬学的組成物中に用いることができる適切な水性および非水性担体の例は、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、ポリエチレングリコール等）、およびそれらの適切な混合物、植物油、たとえば、オリーブ油、ならびに注入可能有機エステル、たとえば、オレイン酸エチルを含む。適切な流動性は、たとえば、コーティング材料、たとえばレシチンの使用により、分散液の場合は要求される粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。

【0217】

これらの組成物は、アジュバント、たとえば、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤も含み得る。微生物の作用の阻止は、種々の抗細菌および抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等を含めることにより確実になり得る。等張剤、たとえば、糖、塩化ナトリウム等を組成物に含めることも要求され得る。さらに、注入可能薬学的形態の延長された吸収は、吸収を遅らせる剤、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含めることにより、もたらされ得る。

20

【0218】

特定の場合、薬剤の効果を延長させるために、皮下または筋内注入からの薬剤の吸収を遅くすることが要求される。これは、水溶性の乏しい結晶性または非結晶性材料の水性懸濁液の使用により達成することができる。薬剤の吸収の速度は、結晶サイズおよび結晶形態に依存し得る、その溶解の速度に依存する。あるいは、非経口投与の薬剤形態の遅延された吸収は、その薬剤を油ビヒクルに溶解および懸濁することにより、達成される。

30

【0219】

注入可能デポー（depot）形態は、生分解性ポリマー、たとえば、ポリラクチド - ポリグリコリドにおいて対象化合物のマイクロカプセル化マトリクスを形成することにより作られる。ポリマーに対する薬剤の比率、および用いる特定のポリマーの性質に依存して、薬剤放出の速度を調節することができる。他の生分解性ポリマーの例は、ポリ（オルトエステル）およびポリ（アンヒドリド）を含む。デポー注入可能製剤は、体組織と適合可能なりボソームまたはマイクロエマルジョンに薬剤を封入することによっても調製される。

【0220】

特定の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質またはMISバリアントタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントもしくはバリアントは、本明細書に記載され、または当業者に知られた1または複数の精製法により、単離され、および/または精製され、または実質的に精製され得る。一般に、その純度は、少なくとも90%、特に95%、しばしは99%を超える。特定の実施形態において、自然発生化合物は、より広い属の全般的記載から排除される。

40

【0221】

特定の実施形態において、本組成物は、少なくとも1つの組換えヒトMISTタンパク質またはMISバリアントタンパク質（例えばLR-MIS）を、薬学的に許容される担体を組み合わせて含む。薬学的に許容される担体として機能し得る材料の特定の例は、これらに限らないが、糖、たとえば、ラクトース、グルコース、およびスクロース、スターチ、たとえば

50

コーンスターチおよびポテトスターチ、セルロース、およびその誘導体、たとえば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、およびセルロースアセテート、粉末化トラガカント、モルト、ゼラチン、タルク、賦形剤、たとえば、ココアバターおよび坐剤ワックス、オイル、たとえば、ピーナッツ油、綿実油、ヒマワリ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、およびダイズ油、グリコール、たとえば、プロピレングリコール、ポリオール、たとえば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール、エステル、たとえば、オレイン酸エチル、ラウリル酸エチル、寒天、緩衝剤、たとえば、水酸化マグネシウム、および水酸化アルミニウム、アルギン酸、パイロジェンを含まない水、等張性塩類溶液、リンガー液、エチルアルコール、リン酸緩衝液、ならびに薬学的製剤に用いられる他の非毒性適合可能物質を含む。

10

【0222】

特定の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質またはMISバリアントタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントもしくはバリアントを含む組成物は、1または複数の酸性官能基を含み得、これにより、薬学的に許容される塩基とともに薬学的に許容される塩を形成することができる。本明細書に用いる用語「薬学的に許容される塩、エステル、アミド、およびプロドラッグ」は、本発明の化合物のこれらのカルボン酸塩、アミノ酸付加塩、エステル、アミド、およびプロドラッグをいう。それは、過度な毒性、刺激、アレルギー反応等なく、合理的な利益/リスク比と釣り合った、本発明の化合物の意図した使用に有効な、患者の組織と接触した使用に適した、健全な医療判断の範囲内にあるものである。用語「塩」は、本発明の化合物の相対的に非

20

【0223】

これらの塩は、その化合物の最終的な単離および精製の間、インサイチューで、または遊離塩形態の精製された化合物を、適切な有機もしくは無機酸と別個に反応させ、これにより形成された塩を単離することにより、調製することができる。これらは、アルカリ金属およびアルカリ土類金属、たとえば、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等に基づくカチオン、ならびに、非毒性アンモニウム、四級アンモニウム、およびアミンカチオン、たとえば、これらに限らないが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン等（たとえば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Berge S. M., et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977;66:1-19 を参照）を含み得る。

30

【0224】

用語「薬学的に許容されるエステル」は、本発明の化合物の、相対的に非毒性のエステル化された産物をいう。これらのエステルは、その化合物の最終的な単離および精製の間、インサイチューで、または遊離酸形態もしくはヒドロキシルの精製された化合物を、適切なエステル化剤と別個に反応させることにより、調製することができる。カルボン酸は、触媒の存在下でアルコールでの処理を介してエステルに変換することができる。その用語は、さらに、生理条件下で溶媒化され得る低級炭化水素基、たとえば、アルキルエステル、メチル、エチル、およびプロピルエステルを含むことを意図する。

40

【0225】

本明細書に用いる場合、「薬学的に許容される塩またはプロドラッグ」は、過度な毒性、刺激、アレルギー反応等なく、合理的な利益/リスク比と釣り合った、意図した使用に有効な、患者の組織と接触した使用に適した、健全な医療判断の範囲内にある、塩またはプロドラッグである。これらの化合物は、可能なら本発明のr化合物の、両性イオン形態を含む。

【0226】

用語「塩」は、本発明の化合物の相対的に非毒性の無機および有機酸付加塩をいう。これらの塩は、その化合物の最終的な単離および精製の間、インサイチューで、または遊離塩基形態の精製された化合物を、適切な有機もしくは無機酸と別個に反応させ、これによ

50

り形成された塩を単離することにより、調製することができる。これらは、アルカリ金属およびアルカリ土類金属、たとえば、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等に基づくカチオン、ならびに、非毒性アンモニウム、四級アンモニウム、およびアミンカチオン、たとえば、これらに限らないが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン等（たとえば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Berge S. M., et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977;66:1-19 を参照）を含み得る。

【0227】

用語「プロドラッグ」は、インビボで迅速に変換されて、活性な組換えヒトMISTタンパク質、たとえば、生物学的に活性名または機能的に活性なMISTタンパク質または機能的に活性なMISTタンパク質をコードする核酸（たとえば、mRNA, DNA, MOD-RNA）を生成する化合物または剤をいう。特定の実施形態において、組換えヒトMISTタンパク質プロドラッグは、たとえば、リーダー配列の切断、またはインスリンがプロタンパク質から活性インスリンタンパク質へ活性化されるのと同様に、生物活性MISTタンパク質の生産のためのN末端およびC末端ドメインを生じる第1の切断部位の切断を介して、血中での加水分解により活性化され得る。詳細な議論は、T. Higachi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in Bioreversible Carriers in: Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987（両方とも、参照により全体が本明細書に組み込まれる）に供される。本明細書に用いる場合、プロドラッグは、インビボ投与により、代謝され、またはその化合物の生物学的、薬学的、または治療的に活性な形態に変換される化合物である。プロドラッグは、副作用もしくは毒性を遮断するため、または組換えヒトMISTタンパク質の他の特徴もしくは特性を変えるために、組換えヒトMISTタンパク質の代謝安定性または輸送特性を変えるようデザインされ得る。

10

20

【0228】

インビボのMISの薬物動力的プロセスおよび薬剤代謝または翻訳後タンパク質プロセッシングの知識に基づいて、薬学的に活性な活性化化合物が同定されると、当業者は、一般的に、対象において生物活性MISTタンパク質のレベルを増加させるためにインビボで活性化され得る組換えヒトMISTタンパク質プロドラッグをデザインすることができる（たとえば、Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, N.Y., pages 388-392を参照）。適切なプロドラッグの選択および調製のための慣用的な手順は、たとえば、"Design of Prodrugs," ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985に記載される。プロドラッグの適切な例は、対応する酸のメチル、エチル、およびグリセロールエステルを含む。

30

【0229】

本明細書に議論されるように、特定の実施形態において、本明細書に開示される組換えヒトMISTタンパク質またはMISバリエーションタンパク質（例えばLR-MIS）、あるいはその機能的フラグメントもしくはバリエーションを含む組成物は、それらの組織特異性、および細胞、たとえば筋肉細胞への標的化を増加させるために、標的化剤にコンジュゲートまたは共有結合させることができる。標的化剤は、たとえば、これらに限らないが、「標的化」のセクションで議論されるような、抗体、サイトカイン、およびレセプターリガンドを含み得る。特定の実施形態において、標的化剤は、標的化されるべき細胞、たとえば、非筋肉細胞と比べて筋肉細胞上で過剰発現される。

40

【0230】

選択された投与のルートにかかわらず、適切な水和物形態で用いることができる本発明の化合物、および/または本発明の薬学的組成物は、当業者に知られた慣用的な方法により、薬学的に許容される投与形態に調剤される。

【0231】

定義

50

他に記載されない限り、または文脈から暗に意味されない限り、以下の用語および句は、以下に提供される意味を含む。他に特に記載されない限り、または文脈から明らかでない限り、以下の用語および句は、用語および句が属する技術分野で得られた意味を排除しない。本願発明の範囲は、特許請求の範囲によってのみ限定されるため、定義は、特定の実施形態の記載を補助するために提供され、本発明を限定することは意図されない。

【0232】

本明細書で使用されるように、用語「含むこと (comprising)」または「含む (comprises)」は、それが有用であるか否かにかかわらず、特定されていない要素を含むことに依然として開かれている、実施形態に有用である組成物、方法、およびそれらのそれぞれの成分に関して使用される。

10

【0233】

単数の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈にそうでないことが明確に示されていない限り、複数の指示物を含む。同様に、用語「または(or)」は、文脈がそうでないことが明確に示されていない限り、「および(and)」を含むことが意図される。

【0234】

実施例以外で、または他に示さない限り、本明細書に用いられる成分または反応条件の量を表現するすべての数字は、すべての場合において用語「約」により修飾されるものとして理解されるべきである。用語「約」は、パーセンテージとあわせて用いる場合、記載される値の平均 $\pm 5\%$ を意味し得る。例えば、約100は、95~105を意味する。

20

【0235】

本明細書に記載されたものと類似または同等の方法および材料は、この開示の実施および試験において使用され得るが、適した方法および材料は以下に記載される。用語「含む (comprises)」は「含む (includes)」を意味する。略語、「例えば (e.g.)」は、ラテン語の *exempli gratia* に由来し、本明細書では非制限的な例を示すために使用される。したがって、略語「例えば (e.g.)」は、用語「例えば (for example)」と同じ意味である。

【0236】

用語「ミューラー管抑制物質」および「MIS」は、本明細書において交換可能に用いられ、抗ミューラー (anti-Mullerian) ホルモンまたはAMHとしても知られ、MISと構造的に類似する化合物および材料をいう。「MIS」または「ミューラー管抑制物質」は、配列番号: 3のアミノ酸残基26~560と少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%、同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。本発明は、野生型MISと実質的に同じ、またはそれより大きい生物学的活性を有する組換えヒトMISの変異型を含むことを意図する。このような変異型MIS分子の例は、野生型MISのアミノ酸配列 (たとえば、配列番号: 1のアミノ酸残基26~560) において、欠失、挿入、または変換を有する。含まれる物質の別の形態は、たとえば、野生型MISおよび組換えヒトMISの塩、機能的誘導体、およびアグリコン形態である。さらに、ヒト組換えMISタンパク質は、組換えDNA技術を用いて、またはMISタンパク質の化学合成から得ることができる。参照目的のみのため、野生型ヒトMIS核酸は、RefSeq No: NM_000479に対応し、これは、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0237】

用語「ミューラー管抑制物質タイプIIレセプター」または「MISRII」は、本明細書において交換可能に用いられ、MISのためのII型レセプターをいう。用語「MISRII」は、MISRIIと実質的に相同であるすべてのMISレセプターおよびMISRIIの機能的誘導体を包含することを意図する。MISRIIは、別名、AMHR2としても知られる。参照目的のみのため、ヒトMISRIIの核酸配列は、NM_020547およびGenBank No: AF172932に対応し、これは、参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0238】

用語「野生型」は、それが通常はインビボで存在するので、タンパク質をコードする自然発生のポリヌクレオチド配列もしくはその一部、またはタンパク質配列もしくはその一部、それぞれをいう。したがって、本明細書に開示されるように、ヒトMISのプレプロタンパク質のための野生型アミノ酸配列は、配列番号：3に相当し、そのアミノ酸残基1～25はリーダー配列に相当する。MISのプロタンパク質は、後に本明細書に開示される切断により翻訳後にプロセッシングされ、生物活性MISホモダイマーを形成する、配列番号：3のアミノ酸残基26～560を含む（たとえば、1～25リーダー配列を欠如する）。

【0239】

本明細書に用いられる用語「可溶性MISポリペプチド」は、膜への機能的な結合を許容するアミノ酸の少なくとも一部、またはすべてを含まないMISポリペプチドをいう。

10

【0240】

「MISをコードするポリヌクレオチド」は、配列番号：3のアミノ酸残基26～560に対応するアミノ酸配列のいずれかと少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【0241】

用語「変異」は、生物の遺伝材料におけるいずれかの変化、特に、野生型ポリヌクレオチド配列における変化（すなわち、欠失、置換、付加、または変更）、または野生型タンパク質配列におけるいずれかの変化をいう。用語「バリエーション」は、「変異体」と交換可能に用いられる。遺伝材料における変化がタンパク質の機能の変化を生ずることがしばしば見込まれるが、用語「変異体」および「バリエーション」は、その変化がタンパク質の機能を変化させるか否か（たとえば、増加、減少、または新しい機能の付加）、または変化がタンパク質の機能に効果を有するか否か（たとえば、変異または変化がサイレントである）にかかわらず、野生型タンパク質の配列における変化をいう。用語「変異」は、本明細書において「多型」と交換可能に用いられる。

20

【0242】

用語「核酸」は、当該技術分野で公知である。本明細書に用いる「核酸」は、一般に、核酸塩基を含む、DNA、RNA、またはそれらの誘導体もしくは類似体の分子（すなわちストランド）をいう。核酸塩基は、たとえば、DNA（アデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」、またはシトシン「C」）またはRNA（A、G、ウラシル「U」、またはC）に見い出される自然発生のプリンまたはピリミジン塩基を含む。用語「核酸」は、それぞれ用語「核酸」の垂属として、用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」を包含する。用語「オリゴヌクレオチド」は、約3～約100の核酸塩基の長さの分子をいう。用語「ポリヌクレオチド」は、約100の核酸塩基の長さを超える、少なくとも1つの分子をいう。用語「核酸」は、ポリヌクレオチド、たとえば、デオキシリボヌクレオチド（DNA）、および適切な場合、リボヌクレオチド（RNA）も意味する。その用語は、等価物として、ヌクレオチドアナログから作られたRNAまたはDNAのいずれかのアナログ（類似体）、および記載される実施形態に適用できるので、一本鎖（センスまたはアンチセンス）および二本鎖ポリヌクレオチドも含むと理解すべきである。用語「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は、本明細書において、交換可能にも用いられる。

30

40

【0243】

本明細書に用いる場合、用語「遺伝子」は、エキソンおよび（任意で）イントロン配列の両方を含む、ポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームを含む核酸をいう。「遺伝子」は、遺伝子産物のコーディング配列、ならびに遺伝子産物の5'UTRおよび3'UTR領域、イントロン、およびプロモーターを含む、遺伝子産物の非コーディング領域をいう。これらの定義は、一般に、一本鎖分子を指すが、特定の実施形態においては、一本鎖分子と、部分的に、実質的に、または完全に、相補的であるさらなる鎖も包含するであろう。これにより、核酸は、二本鎖分子、または分子を含む特定の配列の1または複数

50

の相補鎖もしくは「補足物」を含む二本鎖分子を包含し得る。本明細書に用いる場合、一本鎖核酸は、接頭辞「ss」、二本鎖核酸は接頭辞「ds」、そして三本鎖核酸は接頭辞「is」として示し得る。用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の生産に関連するDNAのセグメントをいい、それは、コーディング領域の前および後の領域、ならびに個々のコーディングセグメント（エキソン）の間の介入配列（イントロン）を含む。プロモーターは、転写の開始および比率を制御する核酸配列の領域である。それは、核酸配列の特定の転写を開始するために、調節タンパク質および分子が結合し得る要素、たとえば、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子を含み得る。用語「エンハンサー」は、核酸配列の転写活性化に関連するシス作用調節配列をいう。エンハンサーは、いずれかの方向で機能し得、プロモーターの上流または下流であり得る。

10

【0244】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、交換可能に用いられ、アミノ酸残基のポリマーをいい、最小の長さに限定されない。ペプチド、オリゴペプチド、二量体、および多量体等も、ペプチド結合により連結された、直線的に配列されたアミノ酸から構成され、生物学的に、組換えにより、または合成的に生産されるか否か、自然発生または非自然発生アミノ酸から構成されるか否かにかかわらず、定義に含まれる。全長のタンパク質およびそのフラグメントの両方が定義に含まれる。その用語は、ポリペプチドの翻訳と同時のおよび翻訳後の改変、たとえば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、タンパク質分解切断（たとえば、フーリンまたはメタロプロテアーゼおよびプロホルモンコンバーターゼ（PC）による切断）等も含む。さらに、本発明の目的のため、「ポリペプチド」は、そのタンパク質が要求される活性を維持する限り、ネイティブ配列に対する改変、たとえば、欠失、付加、および置換（一般に、当業者に知られているように事実上保存性であるもの）を含むタンパク質を包含する。これらの改変は、たとえば部位特異的変異誘発により、意図的であり得、または、たとえばタンパク質を生産する宿主の変異により、もしくはPCR増幅もしくは他の組換えDNA法によるエラーを介して、偶発的であり得る。ポリペプチドまたはタンパク質は、ペプチド結合により連結された、直線的に配列されたアミノ酸から構成されるが、ペプチドと対照的に、十分に規定されたコンフォメーションを有する。タンパク質は、ポリペプチドと異なり、一般に、50またはそれを超えるアミノ酸の鎖からなる。本発明の目的のため、本明細書に用いる用語「ペプチド」は、典型的には、ペプチド結合により連結された、D-もしくはL-アミノ酸の一本鎖、またはD-もしくはL-アミノ酸の混合物から構成されるアミノ酸の配列をいう。一般に、ペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸残基を含み、約50未満のアミノ酸の長さである。

20

30

【0245】

合成非ネイティブアミノ酸、置換されたアミノ酸、または1もしくは複数のD-アミノ酸を含む、非天然アミノ酸のペプチド（またはプロテアーゼ認識配列を除く他の組成物の成分）の組み込みが、特定の状況において要求される。D-アミノ酸含有ペプチドは、L-アミノ酸含有形態と比べて、インビトロまたはインビボにおいて増加した安定性を示す。これにより、D-アミノ酸を組み込むペプチドの構築は、より大きなインビボまたは細胞内の安定性が要求または必要とされる場合に特に有用であり得る。より詳しくは、D-ペプチドは、内因性ペプチダーゼおよびプロテアーゼに対して耐性であり、それにより、このような特性が要求される場合に、結合した薬剤およびコンジュゲートの優れた経口、経上皮、および経皮デリバリー、膜-持続性複合体の改良されたバイオアベイラビリティ（さらなる議論について後述）、ならびに延長された血管内および間質寿命を供する。D-異性体ペプチドの使用は、結合した薬剤および他のカージオ分子の経皮および経口経上皮デリバリーを増強することもできる。さらに、D-ペプチドは、Tヘルパー細胞への主要組織適合複合体クラスII制限提示のために効率的に処理され得、それゆえ生物全体における液性免疫応答を誘導しにくい。それゆえ、ペプチドコンジュゲートは、たとえば、細胞浸透ペプチド配列のD-異性体型、切断部位のL-異性体型、および治療ペプチドのD-異性体型を用いて構築することができる。特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質は、D-またはL-アミノ酸残基から構成される。自然発生のL-アミノ酸の使用はいずれの分解産物も細胞

40

50

または生物に対して相対的に非毒性であるという利点を有するからである。

【0246】

本明細書に用いるペプチド、ポリペプチド、または分子の「フラグメント」との用語は、その分子のいずれかの近接するポリペプチドのサブセットをいう。本明細書に用いる用語「タンパク質フラグメント」は、配列番号3、4、または5のMISタンパク質から誘導される、合成および自然発生のアミノ酸配列の両方を含む。このタンパク質フラグメントは、組換えヒトMISタンパク質を断片化することにより得ることができ、あるいは自然発生アミノ酸の配列もしくはこの配列をコードする遺伝材料（DNAまたはRNA）の知識に基づいて合成することができる。したがって、分子の「フラグメント」は、その分子のいずれかのポリペプチドサブセットを指すことを意味する。特定の実施形態において、組換えヒトMISの機能的なフラグメントは、少なくともC末端ドメインと、少なくともN末端ドメインと、を含む。特定の実施形態において、機能的フラグメントは、組換えヒトMISタンパク質の、C末端の部分、および/またはN末端ドメインの部分（たとえば、フラグメント）を含む。本明細書に開示される配列番号：3、4、または5のMISタンパク質より大きい活性、または少なくともその活性を有し、可溶性である、組換えヒトMISタンパク質のフラグメントも、本発明における使用のために包含される。

10

【0247】

組換えヒトMISタンパク質のフラグメント、たとえば、本明細書に開示される方法に役立つ配列番号：3、4、または5の機能的フラグメントは、たとえば、実施例において本明細書に開示される卵胞成熟の障害を引き起こすために、インビボにおける配列番号：3、4、または5のポリペプチドの活性の少なくとも30%の活性を有する。別の言い方をすれば、組換えヒトMISタンパク質の機能的フラグメントは、MISR11に結合して活性化するか、または本明細書に開示される卵胞成熟の障害を引き起こすために、単独でまたは融合タンパク質として、配列番号：3、4、または5と同じ活性の少なくとも30%を引き起こし得る、配列番号：3、4、または5のいずれかのフラグメントである。本明細書に開示されるフラグメントは、可溶性（すなわち、膜に結合しない）であり得る。「フラグメント」は、少なくとも約6、少なくとも約9、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約250、少なくとも約300の核酸またはアミノ酸、またはこれらの間のいずれかの整数であり得る。典型的なフラグメントは、C末端トランケーション、N末端トランケーション、またはCおよびN末端の両方トランケーション（たとえば、N末端、C末端、または両方から削除される、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも8、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも75、少なくとも100、またはより多くのアミノ酸の欠失）を含む。当業者は、単純な欠失分析によりこのようなフラグメントを作り出すことができる。配列番号：3、4、または5のこのようなフラグメントは、たとえば、配列番号：3、4、または5のそれぞれのN末端および/またはC末端から削除された、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸、または10を超えるアミノ酸、たとえば、15、30、50、100、もしくは100を超えるアミノ酸であり得る。当業者は、配列番号：3、4、または5からNおよび/またはC末端アミノ酸を連続的に欠失させ、または組換えヒトMISタンパク質からN末端およびC末端アミノ酸を連続的に欠失させ、単独でまたは切断した時に、得られたペプチドフラグメントの機能を評価することにより、本明細書に開示される方法および組成物、または本明細書に開示される融合タンパク質に役立つ配列番号：3、4、または5の最小のペプチドフラグメントを容易に同定することができる。当業者は、複数のより小さなフラグメントで機能的フラグメントを形成することができる。これらは、ペプチドリinkerを架橋することにより結合させることができる。当業者は、野生型のコンフォメーションを維持するためにリンカーを直ちに選択することができる。いくつかの実施形態では、フラグメントは、少なくとも6、少なくとも約9、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約250、少なくとも約500の連続する核酸またはアミノ酸、またはこれらの間のいずれかの整数でなければならない。

20

30

40

50

【0248】

本明細書に用いる用語「誘導体」は、たとえば、これらに限定されないが、ユビキチン化、ラベリング、ペグ化（ポリエチレングリコールでの誘導化）、または他の分子の付加により化学的に改変されているペプチドを指す。分子は、それがその分子の通常の部分でない付加的な化学成分を含む場合、別の分子の誘導体でもある。このような成分は、その分子の可溶性、吸収性、生物学的半減期等を改良することができる。その成分は、あるいは、分子の毒性を減少させ、分子の要求されない副作用等を除去または低減することができる。このような効果を媒介することができる成分は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., MackPubl., Easton, PA (1990)に開示される。

10

【0249】

「誘導体」、「バリエント」、または「フラグメント」とあわせて用いる場合の用語「機能的」は、それがその機能的な誘導体、バリエント、またはフラグメントであるポリペプチドの生物学的活性に実質的に類似する生物学的活性（機能的または構造的のいずれか）を有するポリペプチドをいう。機能的誘導体という用語は、分子のフラグメント、アナログ、または化学的誘導体を含むことを意図する。この文脈における「実質的に類似」は、生物学的活性、たとえばMISR IIの活性化が、参照ポリペプチド、たとえば対応する野生型MISポリペプチドまたは組換えヒトMISタンパク質の少なくとも25%、少なくとも35%、または少なくとも50%の活性であり、好ましくは、少なくとも60%の活性、70%の活性、80%の活性、90%の活性、95%の活性、100%の活性、またはさらにこれを超える（すなわち、バリエントまたは誘導体が野生型より大きい活性を有する）、たとえば、110%の活性、120%の活性、またはこれを超える活性であることを意味する。言い換えると、この文脈における組換えヒトMISタンパク質の「実質的に類似」する機能的フラグメントは、対応する組換えヒトMISタンパク質の関連するまたは要求される生物学的活性の少なくとも25%、少なくとも35%、少なくとも50%が維持されることを意味する。本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質の機能的フラグメントまたはペプチドの例（たとえば、配列番号：3、4、または5）において、配列番号：3、4、または5の機能的フラグメントは、MISR IIを活性化するかまたは本明細書に開示される卵胞成熟を阻害するための活性を保持した配列番号：3、4、または5の一部を含むタンパク質またはペプチドであり得、配列番号：3、4、または5の前記フラグメントは、好ましくは、配列番号：3、4、または5に対応するMISタンパク質と比較して、少なくとも25%、少なくとも35%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、またはこれを超える（すなわち、バリエントまたは誘導体が配列番号：3のMISタンパク質または配列番号4、または5の組換えヒトMISタンパク質より大きい）活性、たとえば、少なくとも110%、少なくとも120%、またはこれを超える活性を有する。

20

30

【0250】

用語「機能的誘導体」および「模倣物」または「生物学的に活性なバリエント」または「生物学的に活性なフラグメント」は、交換可能に用いられ、その機能的誘導体である物質または分子（たとえば、組換えヒトMISタンパク質）の生物学的活性に実質的に類似する生物学的活性（機能的または構造的のいずれか）を有する化合物をいう。機能的誘導体との用語は、分子のフラグメント、バリエント、アナログ、または化学的誘導体を含むことを意図する。

40

【0251】

用語「機能的誘導体」は、分子の「フラグメント」、「バリエント」、「アナログ」、または「化学的誘導体」を含むことを意図する。分子は、両方の分子が実質的に類似する構造を有するなら、または両方の分子が類似する生物学的活性を有するなら、他方の分子と「実質的に類似」と呼ばれる。これにより、2つの分子が類似する活性を有するなら、それらはバリエントであると考えられる。なぜなら、この用語は、分子の一方の構造が他方に見いだされない場合でさえ、またはアミノ酸残基の配列が同一でない場合でさえ、本明細書において用いられるからである。組換えヒトMISタンパク質の「アナログ」は

50

、全体の分子またはそのフラグメントに機能において実質的に類似する分子を指すことを意味する。本明細書に用いる場合、分子は、それが分子の通常の部分でない更なる化学成分を含む場合に別の分子の「化学的誘導体」と呼ばれる。このような成分は、分子の可溶性、吸収性、生物学的半減期等を改良することができる。成分は、あるいは、分子の毒性を減少させ、分子の要求されない副作用等を除去または減衰させることができる。このような効果を媒介することができる成分は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., MackPubl., Easton, PA(1990)に開示される。

【0252】

組換えヒトMISTタンパク質の「バリエーション」は、全体の分子またはそのフラグメントのいずれかに構造および機能において実質的に類似する分子を指すことを意味する。したがって、本明細書に記載される用語「バリエーション」は、1または複数のアミノ酸または核酸の欠失、付加、置換、または側鎖修飾により自然発生ポリペプチドまたは核酸から異なるが、なお、自然発生分子の1または複数の特定の機能または生物学的活性を保持するペプチドまたは核酸をいう。アミノ酸置換は、アミノ酸が、異なる自然発生または非従来のアミノ酸残基で置換される変更を含む。このような置換は、ポリペプチドに含まれるアミノ酸残基が、極性、側鎖官能性、または大きさのいずれかに関して類似する特性の別の自然発生アミノ酸で置換される場合に「保存性」として分類することができる。本発明により包含される置換は、ペプチド中に存在するアミノ酸残基が、異なる特性を有するアミノ酸、たとえば、異なる基からの自然発生アミノ酸で置換される場合（たとえば、荷電または疎水性アミノ酸のアラニンでの置換）、または自然発生アミノ酸が非従来のアミノ酸で置換される場合に「非保存性」でもあり得る。特定の実施形態において、アミノ酸置換は保存性である。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを参照して用いる場合にバリエーションとの用語には、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドのそれぞれと比べて（たとえば、野生型ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと比べて）、一次、二次、または三次構造において変化し得るポリヌクレオチドまたはポリペプチドが含まれる。組換えヒトMISTタンパク質の「バリエーション」は、構造および機能において実質的に類似する、すなわち機能がMISRIIを活性化する能力である、分子をいう。

【0253】

たとえば、組換えヒトMISTタンパク質のバリエーションは、配列番号：3、4、または5において参照アミノ酸から異なる変異または改変を含み得る。特定の実施形態において、配列番号：3、4、または5のバリエーションは、本明細書に開示される配列番号：3、4、または5のフラグメントである。特定の実施形態において、バリエーションは、配列番号：3、4、または5の異なるアイソフォームであり得、異なる異性体アミノ酸を含み得る。バリエーションは、当該技術分野において公知である方法を用いて単離または生産された、自然発生、合成、組換え、または化学的に改変されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドであり得る。バリエーションは、後述のような保存性または非保存性アミノ酸変化を含み得る。ポリヌクレオチドの変化は、参照配列によりコードされるポリペプチドにおいて、アミノ酸置換、付加、欠失、融合、およびトランケーションを生じ得る。バリエーションは、バリエーションの基になるペプチド配列において通常、発生しないアミノ酸および他の分子の挿入および置換、たとえば、これに限られないが、ヒタンパク質において通常、発生しないオルニチンの挿入を含む、アミノ酸の挿入、欠失、または置換を含み得る。

【0254】

ポリペプチドを記述する場合の用語「保存性置換」は、ポリペプチドの活性を実質的に変化させないポリペプチドのアミノ酸組成の変化をいう。たとえば、保存性置換は、類似する化学特性を有する異なるアミノ酸残基にアミノ酸残基を置換することをいう。保存性アミノ酸置換は、イソロイシンもしくはバリンでのロイシンの置換、グルタミン酸でのアスパラギン酸の置換、またはセリンでのトレオニンの置換を含む。「保存性アミノ酸置換」は、1つのアミノ酸を、類似する構造的および/または化学特性を有する別のもので置換することにより行われる。たとえば、イソロイシンもしくはバリンでのロイシンの置換、グルタミン酸でのアスパラギン酸の置換、またはセリンでのトレオニンの置換である。

これにより、特定のアミノ酸配列の「保存性置換」は、ポリペプチド活性に重要でないこれらのアミノ酸の置換、または重要なアミノ酸の置換でさえペプチドの活性（すなわち、本明細書に開示されるような、T-reg細胞を削減し、および/または炎症性サイトカインを減少させるペプチドの能力）を減少させないような、類似する特性（たとえば、酸性、塩基性、正または負電荷、極性または非極性等）を有する別のアミノ酸でのアミノ酸の置換をいう。機能的に類似するアミノ酸を供する保存性アミノ酸の表は当該技術分野において公知である。たとえば、以下の6つの群それぞれが、互いについて保存性置換であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A), セリン (S), トレオニン (T); 2) アスパラギン酸 (D), グルタミン酸 (E); 3) アスパラギン (N), グルタミン (Q); 4) アルギニン (R), リジン (K); 5) イソロイシン (I), ロイシン (L), メチオニン (M), バリン (V); および 6) フェニルアラニン (F), チロシン (Y), トリプトファン (W) (Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984)も参照のこと)。特定の実施形態において、単一アミノ酸または少しの割合のアミノ酸を変化させ、付加し、または欠失する、個々の置換、欠失、または付加も、その変化がMISの活性（すなわち、本明細書に開示されるミューラー管退行バイオアッセイを用いて決定することができる、インビボでミューラー管退行を引き起こす組換えヒトMISタンパク質またはバリエーションの能力）を削減しないなら、「保存性置換」と考えることもできる。挿入または置換は、典型的には、約1～5の範囲のアミノ酸である。保存性アミノ酸の選択は、ペプチドにおいて置換すべきアミノ酸の位置に基づいて、たとえば、アミノ酸がペプチドの外側にあり、溶媒に暴露されるか、または内部にあり溶媒に暴露されないか、に基づいて行うことができる。

10

20

【0255】

別の実施形態において、当業者は、存在するアミノ酸の位置、すなわちその溶媒への暴露（すなわち、アミノ酸が溶媒に露出されるか、または溶媒に露出されない内部に位置したアミノ酸と比べてペプチドまたはポリペプチドの外部表面にあるか）に基づいて存在するアミノ酸を置換するであろうアミノ酸を選択することができる。このような保存性アミノ酸置換の選択は当該技術分野において公知であり、たとえば、Dordo et al, J. Mol Biol, 1999, 217, 721-739、およびTaylor et al, J. Theor. Biol. 119(1986);205-218、およびS. French and B. Robson, J. Mol. Evol. 19(1983)171に開示される。したがって、当業者は、タンパク質またはペプチドの外側のアミノ酸（すなわち、溶媒に暴露されたアミノ酸）に適した保存性アミノ酸置換を選択することができる。たとえば、これらに限らないが、以下の置換を用いることができる：YをFで、TをSまたはKで、PをAで、EをDまたはQで、NをDまたはGで、RをKで、GをNまたはAで、TをSまたはKで、DをNまたはEで、IをLまたはVで、FをYで、SをTまたはAで、RをKで、GをNまたはAで、KをRで、AをS、KまたはPでの置換。

30

【0256】

別の実施形態において、当業者は、タンパク質またはペプチドの内側のアミノ酸に適した保存性アミノ酸置換を選択することもできる。たとえば、タンパク質またはペプチドの内側のアミノ酸（すなわち、アミノ酸は溶媒に暴露されない）について適切な保存性置換を用いることができる。たとえば、これらに限らないが、以下の保存性置換を用いることができる：YをFで、TをAまたはSで、IをLまたはVで、WをYで、MをLで、NをDで、GをAで、TをAまたはSで、DをNで、IをLまたはVで、FをYまたはLで、SをAまたはTで、およびAをS、G、TまたはVでの置換。特定の実施形態において、非保存性アミノ酸置換もバリエーションの範囲に含まれる。組換えヒトMISタンパク質のバリエーション、たとえば、配列番号：3、4、または5のバリエーションは、配列番号：3、4、もしくは5の全体の分子、またはそのフラグメントのいずれかに、構造および機能において実質的に類似するいずれかの分子をいう。

40

【0257】

用語「相同性」、「同一性」、および「類似性」は、2つのペプチド間、または最適に整列された核酸分子間の配列類似性の程度をいう。相同性および同一性は、比較の目的のために整列させることができるそれぞれの配列において位置を比較することにより、それぞれ決定することができる。たとえば、それは、デフォルト位置で標準相同性ソフトウエ

50

ア、たとえばBLAST, version 2.2.14の使用に基づく。比較した配列における等価の位置が同じ塩基またはアミノ酸により占有される場合、分子はその位置において同一である。等価の位置が類似するアミノ酸（たとえば、立体構造および/または電気的性質が類似、たとえば、保存性アミノ酸置換）により占有される場合、分子はその位置で相同（類似）であるとして言及することができる。相同性/類似性または同一性のパーセンテージとしての表現は、それぞれ、比較した配列により共有される位置における類似するまたは同一のアミノ酸の数の関数を意味する。「無関係」または「非相同」である配列は、40%未満の同一性を有する。好ましくは、それは、本明細書に開示される配列と25%未満の同一性である。

【0258】

本明細書に用いる場合、用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列が比較窓上で同一（すなわち、ヌクレオチドごとに、または残基ごとに同一）であることを意味する。用語「配列同一性の割合（パーセンテージ）」は、比較の窓上の2つの最適に整列させた配列を比較し、同一の核酸塩基（たとえば、A, T, C, G, U, またはI）または残基が両方の配列にある位置の数を決定して、一致した位置の数を算出し、比較窓内（すなわち窓サイズ）の一致した位置の数を位置の総数で割り、そしてその結果を100倍して配列同一性の割合（パーセンテージ）を算出することにより計算される。

【0259】

本明細書に用いる用語「実質的同一」は、そのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列が、少なくとも18ヌクレオチド（6アミノ酸）位置の比較窓上で、頻繁には24~48ヌクレオチド（8~16アミノ酸）位置上で、参照配列と比べて、少なくとも85%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%~95%の配列同一性、より通常は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の特徴をいう。ここで、その配列同一性の割合は、比較窓上で参照配列の全体の20%またはそれ未満の欠失または付加を含み得る配列に対して、参照配列を比較することにより計算される。参照配列は、より大きな配列のサブセットであり得る。ポリペプチドを記述するのに用いる場合の用語「類似性」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列および保存性アミノ酸置換を第2のポリペプチドの配列と比較することにより決定される。

【0260】

本明細書に用いる場合、用語「相同」または「相同体（ホモログ）」は、交換可能に用いられ、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを記述するのに用いる場合、2つのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、または指定されたその配列が、たとえば整列用のデフォルトのパラメータのBLAST, version 2.2.14を用いて（本明細書を参照のこと）、任意に整列、比較させた場合に、ヌクレオチドの少なくとも70%、通常、ヌクレオチドの約75~99%、より好ましくはヌクレオチドの少なくとも約98~99%において、適切なヌクレオチド挿入もしくは欠失、またはアミノ酸挿入もしくは欠失を伴って、同一であることを示す。本明細書に用いる用語「ホモログ」または「相同」は、構造および/または機能に関する相同も意味する。配列相同性に関して、それらが少なくとも50%, 少なくとも60%, 少なくとも70%, 少なくとも80%, 少なくとも90%, 少なくとも95%, 少なくとも97%、または少なくとも99%、同一であるなら、配列は相同である。本発明の遺伝子またはペプチドの相同体の決定は、当業者が容易に行うことができる。

【0261】

用語「実質的に相同」は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、同一である配列をいう。相同な配列は、異なる種において同じ機能的遺伝子であり得る。本発明の遺伝子またはペプチドの相同体の決定は、当業者が容易に行うことができる。

【0262】

両分子が実質的に類似する構造を有する場合、または両分子が類似する生物学的活性を有する場合、たとえば、両分子がMISR11を活性化、または卵胞成熟を阻害することができる場合、分子は別の分子と「実質的に類似」と呼ばれる。これにより、2つの分子が

10

20

30

40

50

類似する活性を有するならば（すなわち、配列番号：3に対応するMISタンパク質または配列番号：4または5に対応する組換えヒトMISタンパク質が行う活性化と類似するMISR11を活性化が可能である組換えヒトMISタンパク質のバリエーション）、分子の一方の構造が他方に見出されなくても、またはアミノ酸残基の配列が同一でなくても、それらはバリエーションであると考えられ、本明細書に開示される使用のために包含される。これにより、2つの分子が類似する生物学的活性を有するならば、分子の一方の構造が他方に見出されなくても、またはアミノ酸残基の配列が同一でなくても、本明細書においてその用語は用いられるので、それらはバリエーションであると考えられる。または、組換えヒトMISタンパク質とより少ない類似性を有するが、これに匹敵する生物学的活性を有する核酸およびアミノ酸配列は、等価であると考えられる。ポリヌクレオチド配列の決定において、実質的に類似するアミノ酸配列をコードすることができるすべての対象ポリヌクレオチド配列は、コドン配列における差異にかかわらず、参照ポリヌクレオチド配列と実質的に類似すると考えられる。ヌクレオチド配列は、(a)ヌクレオチド配列が天然MIS核酸のコーディング領域にハイブリダイズする場合、(b)ヌクレオチド配列が、中程度のストリンジェント条件下で配列番号：1または2によりコードされる組換えヒトMISタンパクのヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができ、かつ、組換えヒトMISタンパク質に類似する生物学的活性を有する場合、または(c) (a)または(b)に定義されるヌクレオチド配列に対して、遺伝コードの結果として縮重したヌクレオチド配列である場合に、本明細書に開示される配列番号：1または2の特定の核酸配列に「実質的に類似」する。実質的に類似するタンパク質は、典型的には、ネイティブタンパク質の対応する配列に対して約80%を超える類似性を有するであろう。

10

20

【0263】

ペプチド配列の文脈で用いる用語「実質的に類似」は、ポリペプチドが、約10～20アミノ酸残基の比較窓上で、参照配列に対して少なくとも60%の配列同一性、または参照配列に対して70%、80%、もしくは85%の配列同一性、または最も好ましくは90%の同一性を有する配列を含むことを示す。アミノ酸配列の文脈において、「実質的に類似」は、アミノ酸の保存性置換をさらに含む。これにより、ポリペプチドは、たとえば、2つのペプチドが1または複数の保存性置換により異なる場合、第2のポリペプチドに実質的に類似する。

【0264】

一実施形態において、用語「ヒト相同体（ホモログ）」は、ヒトまたは動物、たとえばマウスまたはトランスジェニック動物のゲノムによりコードされるような組換えMISタンパク質遺伝子の配列の全長ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約55%の相同性を有するDNA配列をいう。一実施形態において、組換えヒトMISタンパク質に関連するとして同定されたタンパク質に対する用語「ヒト相同体」は、本発明のトランスジェニック動物のゲノムによりコードされるような組換えヒトMISタンパク質に関連するとして同定されたタンパク質の全長アミノ酸配列と40%の相同性を有するアミノ酸配列をいう。より好ましくは、少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約60%、より好ましくは、少なくとも約70%、より好ましくは、少なくとも約75%、より好ましくは、少なくとも約80%、より好ましくは、少なくとも約85%、より好ましくは、少なくとも約90%、より好ましくは、少なくとも約95%の相同性である。上述の通り、相同性は、少なくとも約50%～100%、および間のすべての区間（すなわち、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%等）である。本発明の遺伝子のヒト相同体の決定は、当業者が容易に行うことができる。

30

40

【0265】

ポリペプチドを記述する場合の用語「保存性置換」は、ポリペプチドの活性を実質的に変化させないポリペプチドのアミノ酸組成の変化をいう。これにより、特定のアミノ酸配列の「保存性置換」は、ポリペプチド活性に重要でないこれらのアミノ酸の置換、または重要なアミノ酸の置換でさえ活性を実質的に変化させないような、類似する特性（たとえば、酸性、塩基性、正または負電荷、極性または非極性等）を有する別のアミノ酸でのアミノ酸の置換をいう。機能的に類似するアミノ酸を供する保存性アミノ酸の表は当該技術分野において公知である。たとえば、以下の6つの群それぞれが、互いについて保存性置

50

換であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A), セリン (S), トレオニン (T); 2) アスパラギン酸 (D), グルタミン酸 (E); 3) アスパラギン (N), グルタミン (Q); 4) アルギニン (R), リジン (K); 5) イソロイシン (I), ロイシン (L), メチオニン (M), バリン (V); および 6) フェニルアラニン (F), チロシン (Y), トリプトファン (W) (Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984)も参照のこと)。さらに、コードされる配列において単一アミノ酸または少しの割合のアミノ酸を変化させ、付加し、または欠失する、個々の置換、欠失、または付加も、「保存性置換」である。

【0266】

本明細書に用いる場合、用語「非保存性」は、異なる化学特性を有する異なるアミノ酸残基でアミノ酸を置換することをいう。非保存性置換は、これらに限らないが、アスパラギン酸(D)のグリシン(G)での置換; アスパラギン(N)のリジン(K)での置換; またはアラニン(A)のアルギニン(R)での置換を含む。

【0267】

配列の比較のため、典型的には、1つの配列は、テスト配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、テストおよび参照配列は、コンピュータにインプットされ、必要に応じて、サブ配列コーディネートが指定され、そして、配列アルゴリズムプログラムが指定される。次に、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対するテスト配列の同一性の割合(パーセンテージ)を計算する。

【0268】

比較のための配列の最適な配置(アラインメント)は、たとえば、Smith and Watermanの局所相同性アルゴリズム(参照により本明細書に組み込まれるAdv. Appl. Math. 2:482 (1981))により、Needleman and Wunschの相同性アラインメントアルゴリズム(参照により本明細書に組み込まれるJ. Mol. Biol. 48:443-53 (1970))により、Pearson and Lipmanの類似性のためのサーチ方法(参照により本明細書に組み込まれるProc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48 (1988))により、これらのアルゴリズムのコンピュータでの実行(たとえば、Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.における、GAP, BESTFIT, FASTA, および TFASTA)により、または視覚的な検査(全般、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 4th ed., John Wiley and Sons, New York (1999)を参照)により、行うことができる。

【0269】

有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、配列同一性の割合を示すために、進行的な(progressive)対での(pairwise)アラインメントを用いて、関連配列の群からの多重配列アラインメントを作り出す。それは、アラインメントを作り出すために用いられるクラスタリング関係を示す系図または樹状図もプロットする。PILEUPは、Feng and Doolittleのプログレッシブアラインメント方法(参照により本明細書に組み込まれるJ. Mol. Evol. 25:351-60 (1987))の単純化を用いる。用いる方法は、Higgins and Sharpにより記載される方法(参照により本明細書に組み込まれるComput. Appl. Biosci. 5:151-53 (1989))に類似する。プログラムは、それぞれ5,000ヌクレオチドまたはアミノ酸の最大の長さで、300までの配列をアラインすることができ、多重アラインメント手順は、2つの最も類似する配列の対でのアラインメントで始まり、2つのアラインした配列のクラスターを作り出す。次に、このクラスターは、次の最も関連する配列またはアラインした配列のクラスターにアラインされる。配列の2つのクラスターは、2つの個々の配列の対でのアラインメントの単純な延長によりアラインされる。最終的なアラインメントは、一連の進行的な対でのアラインメントにより達成される。プログラムは、特定の配列およびそれらのアミノ酸またはヌクレオチドの配置を配列比較の領域のために指定することにより、およびプログラムパラメータを指定することにより、実行される。たとえば、参照配列は、以下のパラメータ: default gap weight (3.00), default gap length weight (0.10), および weighted end gapsを用いて、配列同一性関係のパーセンテージを決定す

10

20

30

40

50

るために、他のテスト配列と比較することができる。

【0270】

配列同一性および配列類似性の割合を決定するために適したアルゴリズムの別の例は、Altschul et al.によるBLASTアルゴリズム(参照により本明細書に組み込まれるJ. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)を参照)。(参照により本明細書に組み込まれるZhang et al., Nucleic Acid Res. 26:3986-90 (1998); Altschul et al., Nucleic Acid Res. 25:3389-402 (1997)も参照)。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationのインターネットウェブサイトで利用できる。このアルゴリズムは、データベース配列において同じ長さのワードでアラインした場合にいくつかの正の値の閾値スコアTと適合または満足する、クエリ配列において長さWの短いワードを同定することにより、高スコア配列対(HSPs)を最初に同定することに関連する。Tは、近隣ワードスコア閾値とも呼ばれる(Altschul et al. (1990), 前掲)。これらの最初の近隣ワードのヒットは、それらを含むより長いHSPsを見出すためにサーチを開始するための種として機能する。次に、ワードのヒットは、累積のアラインメントスコアが増加する限り、それぞれの配列に沿って両方向に広げられる。それぞれの方向におけるワード・ヒットの延長は次の場合に中断する:累積アラインメントスコアがその最大の達成した値から量Xだけ低下した場合;累積スコアが1または複数の負のスコアの残基アラインメントの蓄積により0またはそれより低くなった場合;またはいずれかの配列の端に到達した場合。BLASTアルゴリズムパラメータW,T,およびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTプログラムは、デフォルトとして、wordlength (W) of 11, the BLOSUM62 scoring matrix (参照により本明細書に組み込まれるHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-9 (1992)を参照) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4, および両鎖の比較を用いる。

10

20

【0271】

配列同一性の割合を計算することに加えて、BLASTアルゴリズムは、2つの配列の間の類似性の統計的分析も行う(たとえば、参照により本明細書に組み込まれるKarlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77 (1993)を参照)。BLASTアルゴリズムにより供される類似性の一基準は、最小合計確率(smallest sum probability(P(N)))であり、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間の適合が偶然に発生するであろう確率の目安を供する。たとえば、核酸は、テスト核酸の参照核酸との比較における最小合計確率が、約0.1未満、より典型的には約0.01未満、最も典型的には約0.001未満である場合に、参照配列に類似すると考えられる。

30

【0272】

用語「挿入」または「欠失」は、典型的には、約1~5アミノ酸の範囲にある。許容されるバリエーションは、組換えDNA技術を用いて配列中にヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を体系的に作り出しながら、ペプチドを合成して作り出すことにより、実験的に決定することができる。

【0273】

ペプチドを参照する場合の用語「置換」は、異なる物質、たとえば別のアミノ酸またはアミノ酸成分への、アミノ酸における変更をいう。置換は、保存性または非保存性置換であり得る。

40

【0274】

分子の「類似体(アナログ)」、たとえば組換えヒトMISTタンパク質、たとえば配列番号:4または5は、全体の分子またはそのフラグメントのいずれかと機能において類似する分子をいう。用語「類似体」は、対立遺伝子の、種の、および誘導されたバリエーションも含むことを意図する。アナログは、典型的には、しばしば保存性置換の観点により、1つまたは数個の位置において自然発生ペプチドから異なる。アナログは、典型的には、天然ペプチドと少なくとも80%または90%の配列同一性を示す。特定のアナログは、非天然アミノ酸またはNまたはC末端アミノ酸の修飾も含む。非天然アミノ酸の例は、たとえば、これらに限定されないが、アセジ置換化(acedisubstituted)アミノ酸、N-アルキルアミノ酸

50

、乳酸、4-ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン、 γ -N,N,N-トリメチルリジン、 γ -N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、 γ -N-メチルアルギニンである。フラグメントおよびアナログは、後述の通り、トランスジェニック動物モデルにおいて予防または治療効能についてスクリーニングすることができる。

【0275】

「共有結合」は、共有化学結合により、直接的または間接的に（たとえばリンカーを介して）連結することを意味する。

【0276】

本明細書に用いる用語「融合タンパク質」は、2つまたはこれを超えるタンパク質の組換えタンパク質をいう。融合タンパク質は、たとえば、すべての意図したタンパク質を有する単一のポリペプチドに細胞内で翻訳され得る単一のオープン読み枠を構成するように、1つのタンパク質をコードする核酸配列を別のタンパク質をコードする核酸に連結することにより、生産することができる。タンパク質の配置の順番は、多様である。非限定的例として、組換えヒトMIS融合タンパク質をコードする核酸配列は、第1の融合パートナー、たとえばIgG1 Fcフラグメントをコードする遺伝子の5'または3'末端のいずれかの端に枠内で融合した、組換えヒトMISタンパク質またはその機能的誘導体、フラグメント、もしくはバリエーションをコードするヌクレオチド配列から得られる。この方法において、遺伝子の発現に基づいて、組換えヒトMISタンパク質またはその機能的誘導体、フラグメント、もしくはバリエーションは機能的に発現され、IgG1 FcのN末端またはC末端に融合される。特定の実施形態において、組換えヒトMISタンパク質またはその機能的誘導体、フラグメント、もしくはバリエーションの機能性が、第1の融合パートナー、たとえばIgG1 Fcへの融合により、生物学的活性の点で実質的に影響されないように、ポリペプチドプロープの改変が行われる。

【0277】

「特異的に結合」または「特異的結合」は、要求されるポリペプチドを認識しそれに結合するが、試料、たとえば本発明のポリペプチドを自然に含む生物学的試料中の別の分子は実質的に認識・結合しない、化合物または抗体を意味する。

【0278】

「実質的に純粋」は、自然に伴う構成物から分離されている核酸または他の分子を意味する。典型的には、ポリペプチドは、自然に関連するタンパク質および自然発生有機分子を含まずに、少なくとも約60重量%、少なくとも約70重量%、少なくとも約80重量%、少なくとも約90重量%、少なくとも約95重量%、または少なくとも約99重量%である場合、実質的に純粋である。たとえば、実質的に純粋なポリペプチドは、天然ソースからの抽出により、そのタンパク質を通常、発現しない細胞における組換え核酸の発現により、または化学合成により、得ることができる。

【0279】

「タンパク質分解安定性の増強」は、同じ条件（たとえば、インビボまたはインビトロシステム、たとえば細胞または細胞溶解物内）下において対照配列と比較した、少なくとも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約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%のペプチド配列のタンパク質分解の比率または程度の減少を意味する。タンパク質分解安定性の増強を伴うペプチドは、いずれかの修飾、たとえば、特定部位においてタンパク質分解切断に関わる部位を削除または除去する、挿入、欠失、または点変異誘発を含み得る。タンパク質分解切断の部位は、周知の標的配列に基づいて、またはコンピュータソフトウェア（たとえば、Gasteiger et al., Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In John M. Walker, ed. The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005)に記載されるソフトウェア）を用いて、同定することができる。あるいは、タンパク質分解部位は、たとえば、細胞系または細胞ライゼートにおけ

る発現またはインキュベーションの後のタンパク質についてのウエスタンブロットにより、次の切断部位を決定するための同定されたフラグメントの配列決定により、実験的に決定することができる。

【0280】

核酸分子を記述するのに本明細書で用いる用語「組換え」は、その起源または操作の観点において自然に関連するポリヌクレオチドの全部または一部と関連しない、ゲノム、cDNA、ウイルス、半合成、および/または合成源を意味する。タンパク質またはポリペプチドに関して用いる組換え、この用語は、組換えポリヌクレオチドの発現により生産されたポリペプチドを意味する。宿主細胞に関して用いる組換え、この用語は、組換えポリヌクレオチドが導入されている宿主細胞を意味する。組換えは、その材料が異種材料（たとえば、細胞、核酸、タンパク質、またはベクター）の導入により改変されている材料（たとえば、細胞、核酸、タンパク質、またはベクター）をいうのにも本明細書において用いられる。

10

【0281】

用語「対象」および「個体」は、本明細書において交換可能に用いられ、本発明による薬学的組成物での、予防的治療を含む、治療が供される、動物、たとえばヒトをいう。本明細書に用いるように、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、霊長類、齧歯類、家畜、または狩猟動物などであるが、これらに限定されない脊椎動物である。霊長類は、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えばアカゲザルを含む。齧歯類は、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、およびハムスターを含む。家畜および狩猟動物は、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ科の種（例えば飼いネコ）、イヌ科の種（例えばイヌ、キツネ、オオカミ）、鳥類（例えばニワトリ、エミュー、ダチョウ）、魚類（例えばトラウト、キャットフィッシュ、サーモン）を含む。患者または対象には、上述の任意の小集団、例えば上記の全てを含むが、ヒト、霊長類、または齧歯類などの1つもしくは複数の群または種を除く。本明細書に記載された態様の特定の実施形態において、対象は、哺乳類であり、例えば霊長類、例えばヒトである。用語「患者」および「対象」は、本明細書において互換的に使用される。対象は男性または女性であり得る。さらに、対象は、幼児または子供であり得る。

20

【0282】

好ましくは、対象は哺乳類である。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、自己免疫疾患または炎症に関連する障害の動物モデルを示す対象として有利に使用され得る。加えて、本明細書に記載された方法および組成物は、家畜化された動物および/またはペットのために使用され得る。ヒト対象は、任意の年齢、性別、人種、または民族、例えば、コーカサス人（白人）、アジア人、アフリカ人、黒人、アフリカ系アメリカ人、アフリカ系ヨーロッパ人、ヒスパニック、中東人などであり得る。いくつかの実施形態において、対象は、臨床状況にある患者または他の対象であり得る。いくつかの実施形態において、対象はすでに治療を受けていてもよい。

30

【0283】

本明細書に使用されるように、用語「投与する」および「導入する」は、本明細書において互換的に使用され、所望の部位で組換えMISタンパク質を少なくとも部分的に局在させる方法または経路により、対象中に本明細書に開示された組換えMISタンパク質、または組換えMISタンパク質を発現する剤もしくはベクターを配置することを意味する。本発明の化合物は、対象における濾胞形成の阻止を生じる任意の適した経路によって投与され得る。

40

【0284】

本明細書に用いる用語「有効量」は、疾患または障害の少なくとも1または複数の症状を軽減するための、本明細書に開示される組換えヒトMISタンパク質の量をいい、要求される効果を供するための薬学的組成物の十分な量に関する。本明細書に用いる用語「治療的有效量」、たとえば、本明細書に開示される少なくとも1の組換えヒトMISタンパク質

50

を含む薬学的組成物の治療的有効量は、いずれかの医療的治療に適用可能な合理的な利益／リスク比率で、疾患を治療するための組成物の十分な量を意味する。それゆえ、用語「治療的有効量」は、癌または癌が媒介する状態に関連する症状または臨床的マーカーにおいて、治療的または予防的に有意な削減をもたらすのに十分である、本明細書に開示される組成物の量をいう。これにより、正確な「有効量」を特定することはできない。しかしながら、いずれかの所定の場合のために、適切な「有効量」は、慣用的な実験のみを用いて当業者により決定され得る。治療の効果は、当業者により判断され得、たとえば、効果は、受胎の動物モデルにおいて評価され得、妊娠の阻止、または卵胞における卵巣予備能（FOR）の減少の阻止をもたらす組成物または製剤の任意の処置または投与は、有効な処置を示す。

10

【0285】

症状の治療的または予防的に有意な削減は、対照のまたは治療していない対象と比べて、測定したパラメータにおいて、たとえば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約125%、少なくとも約150%またはこれを超える。測定されたまたは測定可能なパラメータは、疾患の臨床的に検出可能なマーカー、たとえば、生物学的マーカーのレベルの上昇または下降、ならびに、症状の臨床的に許容されるスケールに関連するパラメータまたは疾患もしくは障害のためのマーカーである。しかしながら、本明細書に開示される組成物または製剤の全体の毎日の用法は、健全な医療判断の範囲内で主治医である医師により決定されよう。要求される正確な量は、治療すべき疾患のタイプ等の要因により、種々である。

20

【0286】

用語「予防的有効量」は、要求される予防結果を達成するため、たとえば、女性の対象における妊娠を妨げるため、または卵巣予備能（FOR）の減少を妨げるために、必要な投与量および器官において、有効である組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションの量をいう。特定の実施形態において、予防的有効量は、治療的有効量より少ない（例えば、POAまたはDORを有するか、そのリスクがある対象の処置に関して）。避妊手段としてのMISまたはMISタンパク質バリエーションの投与量（例えば、予防有効量）は、卵巣予備能における減少を妨げる（例えば、卵巣予備能（FOR）における減少を妨げる）ための予防用の量よりも高い可能性がある。組換えヒトMISタンパク質またはその機能的フラグメントもしくはバリエーションの予防的有効量は、化合物のいずれかの毒性または有害な効果を有益な効果が上回る量でもある。

30

【0287】

本明細書に用いる場合、用語「妨げる（prevent）」、「妨げる（preventing）」および「防止（prevention）」は、疾患または障害、たとえばPOAまたはDOR（卵巣予備能の低下）の、1または複数の症状または測定可能なマーカーの兆候の回避または遅延をいう。症状またはマーカーの兆候の遅延は、疾患または障害を進展させる類似する可能性または感受性を有する、対照のまたは未処置の対象においてこのような症状またはマーカーが現れる時間に対する遅延である。用語「妨げる（prevent）」、「妨げる（preventing）」および「防止（prevention）」は、疾患の症状またはマーカーの回避または防止を含むだけでなく、疾患もしくは障害を進展させる類似する可能性または感受性を有する対照のもしくは個体におけるこれらの症状もしくはマーカーに対する、または疾患もしくは障害により影響を受ける集団の歴史的または統計的基準に基づいて生じやすい症状もしくはマーカーに対する、疾患の症状またはマーカーのいずれか1つの重症度または程度の削減も含む。「重症度の削減」は、対照または参照標準に対して、症状または測定可能な疾患マーカーも重症度または程度の少なくとも10%削減、たとえば、少なくとも15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%（すなわち、症状または測定可能なマーカーがない状態）の削減を意味する。

40

【0288】

「組成物」または「薬学的組成物」は、本明細書において交換可能に用いられ、賦形剤

50

、たとえば当該技術分野において慣用的であり、細胞への投与に適した薬学的に許容される担体を通常含む組成物をいう。細胞は、たとえば治療、診断、または予防目的のために、対象の部分であり得る。細胞は培養を行うこともでき、たとえば、潜在的な薬学的組成物をスクリーニングするためのアッセイの部分としての細胞であり得、細胞は、調査目的のためのトランスジェニック動物の部分でもあり得る。組成物は、本発明の代謝レギュレーターをコードするポリペプチドまたはポリヌクレオチドが細胞中または細胞培地中に存在する、細胞培養物でもあり得る。さらに、局所的（たとえば、口粘膜、呼吸器粘膜）および/または経口投与のための組成物は、当該技術分野で周知であり、本明細書に記載される、溶液、懸濁液、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤、含嗽液、または粉体を形成し得る。組成物は、安定化剤および保存剤を含み得る。担体、安定化剤、およびアジュバントの例は、University of the Sciences in Philadelphia (2005) Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons, 21st Ed.に開示される。

10

【0289】

「薬学的に」または「薬学的に許容される」は、哺乳類、適切な場合には特にヒトに投与した場合に、有害な、アレルギー性の、または他の有害反応を生じない、分子実体および組成物を意味する。薬学的に許容される担体または賦形剤は、非毒性固体、半固体、または液体フィラー、希釈剤、カプセル化材料、または任意の型の製剤補助剤を意味する。

【0290】

本明細書に用いる用語「薬学的に許容される担体」は、1つの器官、または体の部分から、別の器官または体の部分に対象の剤の活性を維持し、それを運び、または輸送することに関連する、薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクル、たとえば、液体または固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、またはカプセル化材料を意味する。本明細書に定義される場合の「薬学的に許容可能」であることに加えて、それぞれの担体は、製剤の他の成分と適合可能であるという意味で「許容可能」でなければならない。薬学的製剤は、1または複数の薬学的に許容される成分と組み合わせ、本発明の化合物を含む。担体は、固体、半固体、または液体希釈剤、クリーム、またはカプセルの形態であり得る。これらの薬学的調製物は、本発明のさらなる対象である。通常、活性化合物の量は、0.1~95重量%の調製物、好ましくは、非経口的使用のために調製物中0.2~20重量%、好ましくは経口投与のために調製物中1~50重量%である。本発明の方法の臨床的使用のため、本発明の標的化デリバリー組成物は、非経口投与、たとえば、静脈内、粘膜、たとえば、鼻内、腸内、たとえば経口、局所、たとえば経皮、眼、たとえば角膜乱切を介して、または他の投与の態様のための薬学的組成物または薬学的製剤に製剤化される。薬学的組成物は、1または複数の薬学的に許容される成分と組み合わせ、本発明の化合物を含む。担体は、固体、半固体、または液体希釈剤、クリーム、またはカプセルの形態であり得る。

20

30

【0291】

用語「ベクター」は、連結された別の核酸を輸送することができる核酸をいう。プラスミドは「ベクター」により包含される属の種である。用語「ベクター」は、典型的には、複製の起源、ならびに宿主細胞における複製および/または維持のための他の物質を含む核酸配列をいう。作用可能に連結された遺伝子および/または核酸配列の発現を指図することができるベクターは、「発現ベクター」として本明細書において言及される。一般に、有用性のある発現ベクターは、しばしば、そのベクター形態において、染色体に結合せず、典型的には、安定化もしくは一時的な発現のための物質またはコードされたDNAを含む、環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」の形態である。他の発現ベクターは、本明細書に開示される方法に用いることができ、たとえば、これらに限らないが、プラスミド、エピソーム、細菌の人工染色体、酵母の人工染色体、バクテリオファージ、またはウイルスベクターであり、このようなベクターは、宿主のゲノムに組み込まれ、特定の細胞内で自動的に複製することができる。ベクターは、DNAまたはRNAであり得る。等価な機能を供する当業者に知られた発現ベクターの他の形態も用いることができ、たとえば、自己複製染色体外ベクターまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターである。好ましいベクターは、自主的な複製および/または連結した核酸の発現を行うことができるも

40

50

のである。作用可能に連結した遺伝子の発現を指図することができるベクターは、本明細書において「発現ベクター」として言及される。発現ベクターは、DNAの安定または一時的な発現を引き起こし得る。本発明に用いるための典型的な発現ベクターはpcDNA3.1である。

【0292】

用語「ウイルスベクター」は、ウイルスとしての使用、または細胞への核酸構成物のキャリアとしてのウイルス関連ベクターをいう。構成物は、細胞への感染または形質導入のために、非複製性の欠損ウイルスゲノム、たとえば、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス(AAV)、または単純ヘルペスウイルス(HSV)、または他のもの、たとえば、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターに組み込み、パッケージングすることができる。ベクターは、細胞ゲノムに組み込んでもそうでなくてもよい。構成物は、必要に応じて、トランスフェクションのためのウイルス配列を含み得る。あるいは、構成物は、エピソームの複製を行うことができるベクター、たとえば、EPVおよびEBVベクターに組み込むことができる。

10

【0293】

用語「誘導可能なベクター」は、その遺伝子発現を制御することができるベクターを意味する。例えば、遺伝子発現のレベルは、増加され、減少され、または0まで低下され得る。いくつかの実施形態において、誘導可能なベクターは、遺伝子発現を制御するスイッチを含み得る。

20

【0294】

本明細書に用いる場合、交換可能に用いられる用語「プロモーター」、「プロモーター領域」、または「プロモーター要素」は、作用可能に連結された核酸配列の転写を制御する、核酸配列のセグメント、典型的にはこれらに限らないが、DNAもしくはRNAまたはそれらのアナログをいう。プロモーター領域は、RNAポリメラーゼ認識、結合、および転写開始のために十分である特定の配列を含む。プロモーター領域のこの部分は、プロモーターとして言及される。さらに、プロモーター領域は、RNAポリメラーゼの認識、結合、および転写開始を調節する配列を含む。これらの配列は、シス作用性であってもよく、トランス作用因子に対して応答性であってもよい。プロモーターは、制御の性質に依存して、構成的であってもよく、制御されてもよい。

30

【0295】

用語「調節配列」は、本明細書において「調節要素」と交換可能に用いられ、作用可能に連結された核酸配列の転写を調節し、これにより転写モジュレーターとして機能する、核酸のセグメント、典型的にはこれらに限らないが、DNAもしくはRNAまたはそれらのアナログをいう。調節配列は、作用可能に連結された遺伝子および/または核酸配列の発現を調節する。調節配列は、しばしば、転写結合ドメインである核酸配列であり、転写タンパク質および/または転写因子、リプレッサー、またはエンハンサーの核酸結合ドメインにより認識される、「調製因子」を含む。典型的には、調節配列は、これらに限らないが、転写プロモーター、誘導可能プロモーター、および転写因子、転写を制御するための任意的作動配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写および/または翻訳の終了を制御するための配列を含む。調節配列は、単一の調節配列または多重の調節配列、または改変された調節配列またはそのフラグメントであり得る。改変された調節配列は、核酸配列が特定の手段、たとえばこれらに限らないが、変異、メチル化等により、変化または改変されている調節配列である。

40

【0296】

本明細書に用いる用語「作用可能に連結」は、ヌクレオチドの調節配列、たとえば、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位、および他のシグナル配列との、核酸配列の機能的な関係をいう。たとえば、核酸配列、典型的にはDNAの、調節配列またはプロモーター領域への作用的連結は、DNAの転写が、そのDNAを特異的に認識し、結合し、および転写するRNAポリメラーゼにより、調節配列またはプロモーターから開始されるような、DNAと調節配列またはプロモーターとの間の物理的および機能的関係を指す。発現

50

および/またはインビトロ転写を最適化するために、発現される細胞型における核酸またはDNAの発現のための調節配列を改良することが必要であり得る。このような改良の要求または必要性は、経験的に決定することができる。エンハンサーは、それらが増強するコーディング配列に近接して位置する必要はない。さらに、第2のプロモーターにより転写される因子によりトランスで制御されるプロモーターから転写される遺伝子は、第2のプロモーターに作用可能に連結されることができる。このような場合、第1の遺伝子の転写は、第1のプロモーターに作用可能に連結されるといい、第2のプロモーターにも作用可能に連結されるという。

【0297】

用語「減少する」、「低下した」、「低下」、または「阻害する」はすべて、本明細書において、統計的に有意な量の減少を意味するために使用される。いくつかの実施形態において、用語「低下した」、「低下」、「減少する」、または「阻害する」は、参照レベルと比較して、少なくとも10%の減少、例えば、参照レベルと比較して、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%もしくは少なくとも約80%の減少、または約90~95%もしくは90~99%までの減少、または少なくとも10%~95%もしくは10~99%の任意の減少を意味し得る。

【0298】

用語「統計的に有意な」または「有意な」は、統計的な有意性を意味し、一般に、2標準偏差(2SD)またはそれ以上の差を意味する。

【0299】

細胞生物学および分子生物学における共通する用語の定義は、「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」、19th Edition、Merck Research Laboratoriesより出版、2006 (ISBN 0-911910-19-0); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd.より出版、1994 (ISBN 0-632-02182-9)に見出され得る。分子生物学における共通する用語の定義はまた、Benjamin Lewin、Genes X、Jones & Bartlett Publishingより出版、2009 (ISBN-10:0763766321); Kendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc.より出版、1995 (ISBN 1-56081-569-8); およびCurrent Protocols in Protein Sciences 2009、Wiley Intersciences、Coligan et al., eds.にも見出され得る。

【0300】

本発明は、本明細書に記載される、特定の方法、プロトコル、および試薬等に限られず、多様であり得ることが理解されるべきである。本明細書に用いられる用語は、特定の実施例を記述する目的のみのためであり、請求項によってのみ定義される、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0301】

本明細書および請求項において、文脈が明らかにそうでないと示さない限りは、単数形は複数の参照を含み、その逆でもある。実施例以外で、または他に示さない限り、本明細書に用いられる成分または反応条件の量を表現するすべての数字は、すべての場合において用語「約」により修飾されるものとして理解されるべきである。

【0302】

いくつかの実施形態において、本発明は以下に番号をふって記載した項目のいずれかで定義されうる:

[項1]

ミュー管抑制物質(MIS)タンパク質を含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、避妊方法;

[項2]

MISタンパク質が、配列番号:3の26~560位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:3の26~560位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、項1記載の方法;

[項3]

MISタンパク質が、配列番号:4の25～559位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:4の25～559位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、項1記載の方法；

[項 4]

MISタンパク質が、配列番号:5の25～567位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:5の25～567位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、項1記載の方法；

[項 5]

MISタンパク質が、ベクターによって生産され、該ベクターが、プロモーターに作用可能に連結されたMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、項1～4のいずれかに記載の方法；

[項 6]

ベクターがウイルスベクターである、項5記載の方法；

[項 7]

ウイルスベクターが、アデノウイルス(Adv)ベクター、AAVベクター、ボックスウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターからなる群より選択される、項6記載の方法；

[項 8]

ポリヌクレオチドが、配列番号:1に対応するか、または配列番号:1の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドに対応する、項5～7のいずれかに記載の方法；

[項 9]

ポリヌクレオチドが、配列番号:2に対応するか、または配列番号:2の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドに対応する、項5～7のいずれかに記載の方法；

[項 10]

組成物が薬学的に許容される担体をさらに含む、項1～9のいずれかに記載の方法；

[項 11]

女性対象が動物である、項1～10のいずれかに記載の方法；

[項 12]

動物がネコまたはイヌである、項11記載の方法；

[項 13]

女性対象がヒトである、項1～10のいずれかに記載の方法；

[項 14]

投与が、1回の注入である、項1～13のいずれかに記載の方法；

[項 15]

投与が、パルス投与に続く投与しない期間を含む、項1～13のいずれかに記載の方法；

[項 16]

投与が、皮下投与、または経皮パッチ、リング、バイオゲルもしくは注入を介した投与である、項1～13のいずれかに記載の方法；

[項 17]

MISタンパク質が、対象における濾胞形成の完全な停止のために十分に高い濃度で投与される、項1～13のいずれかに記載の方法；

[項 18]

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、10%～50%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、項17記載の方法；

[項 19]

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、50%～100%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、項17記載の方法；

[項 20]

10

20

30

40

50

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、2～5倍高くまたは5倍を超えて高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、項17記載の方法；

[項 2 1]

対象に投与されたMISが、1 μ g/ml～5 μ g/mlまで対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、項17記載の方法；

[項 2 2]

ミュー管抑制物質（MIS）タンパク質を含む組成物を女性対象に投与する段階を含む、女性対象における機能的卵巣予備能（FOR）の低下を妨げる方法；

[項 2 3]

MISタンパク質が、配列番号:3の26～560位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:3の26～560位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、項22記載の方法； 10

[項 2 4]

MISタンパク質が、配列番号:4の25～559位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:4の25～559位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、項22記載の方法；

[項 2 5]

MISタンパク質が、配列番号:5の25～567位のアミノ酸残基を含むか、または配列番号:5の25～567位のアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、項22記載の方法； 20

[項 2 6]

MISタンパク質が、ベクターによって生産され、該ベクターが、プロモーターに作用可能に連結されたMISタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、項22～25のいずれかに記載の方法；

[項 2 7]

プロモーターが誘導可能プロモーターである、項26記載の方法；

[項 2 8]

ベクターがウイルスベクターである、項26記載の方法；

[項 2 9]

ウイルスベクターが、アデノウイルス（Adv）ベクター、AAVベクター、ボックスウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターからなる群より選択される、項28記載の方法； 30

[項 3 0]

ポリヌクレオチドが、配列番号:1に対応するか、または配列番号:1の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドに対応する、項26～29のいずれかに記載の方法；

[項 3 1]

ポリヌクレオチドが、配列番号:2に対応するか、または配列番号:2の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドに対応する、項26～29のいずれかに記載の方法； 40

[項 3 2]

組成物が薬学的に許容される担体をさらに含む、項22～31のいずれかに記載の方法；

[項 3 3]

女性対象がヒトである、項22～32のいずれかに記載の方法；

[項 3 4]

女性対象が動物である、項22～33のいずれかに記載の方法；

[項 3 5]

投与が、1回の注入である、項22～34のいずれかに記載の方法；

[項 3 6]

投与が、パルス投与に続く投与しない期間を含む、項22～35のいずれかに記載の方法； 50

[項 3 7]

投与が、皮下投与、経口投与、経皮パッチ投与、腔内投与、リング、バイオゲルまたは注入を介した投与からなる群より選択される、項22～36のいずれかに記載の方法；

[項 3 8]

MISタンパク質が、濾胞形成の完全な停止のために十分に高い濃度で投与される、項22～37のいずれかに記載の方法；

[項 3 9]

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、10%～50%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、項38記載の方法；

[項 4 0]

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、50%～100%高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、項38記載の方法；

[項 4 1]

対象に投与されたMISが、MISの投与無しと比較して、2～5倍高くまたは5倍を超えて高く対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、項38記載の方法；

[項 4 2]

対象に投与されたMISが、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで対象の血液中のMISタンパク質の濃度を増加させる、項38記載の方法；

[項 4 3]

パルス投与が、組成物のパルス投与の合間に少なくとも3日の期間を含む、項36記載の方法；

[項 4 4]

パルス投与が、組成物のパルス投与の合間に少なくとも7日の期間を含む、項36記載の方法；

[項 4 5]

パルス投与が、組成物のパルス投与の合間に少なくとも7日～3週の期間を含む、項36記載の方法。

【 0 3 0 3 】

特定された全ての特許および他の刊行物は、例えば、本発明に関連して使用され得るそのような刊行物において記載された方法論を記載および開示する目的のために、参照により本明細書に特に組み入れられる。これらの刊行物は、単に本明細書の出願日前の開示のために提供される。この点で如何なるものも、発明者が先行発明または任意の他の理由の効力によってそのような開示に先行する権利を与えられないことの承認として構成されるべきではない。これらの書類の内容に関して日付けまたは説明に関して全ての陳述は、出願人に利用可能な情報に基づき、これらの書類の日付けまたは内容の正確さに関して如何なる許可も構成しない。

【 0 3 0 4 】

特に定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本発明の実施または試験において、任意の公知の方法、装置、および材料が使用され得るが、この点において方法、装置、および材料が本明細書に記載される。

【 0 3 0 5 】

好ましい実施形態は、本明細書に詳細に示され且つ記載されるが、様々な改変、追加、置換などを、本発明の精神から逸脱することなく行うことができ、したがって、それらは特許請求の範囲に定義される発明の範囲内であると考慮されることが、当業者に明らかである。さらに、まだ示されていない範囲まで、本明細書に記載および例示された様々な実施形態のいずれか一つが、本明細書に開示された他の実施形態のいずれかに示された特徴を含めるようにさらに改変され得ることが、当業者によって理解されるであろう。

【 実施例 】

【 0 3 0 6 】

10

20

30

40

50

以下の実施例は、詳述する目的のみのために供され、発明の範囲を限定することを意図しない。

【0307】

本発明の記載は、詳述および記載の目的のために供されているが、本発明を網羅およびその開示される形態に限定することを意図しない。本発明の範囲は、以下の請求項の範囲にのみ限定される。多くの改変およびバリエーションが当業者に明らかであろう。図に記載され、示される実施形態は、本発明の原理、実際の適用を最も良く説明するため、ならびに、考慮される特定の用途に適合するような種々の改変を加えて種々の実施形態について当業者が本発明を理解するために選択され、記載される。

【0308】

実施例1

マウスにおけるAAV9-MIS処置

最近、非病原性であるが、通常ヒトを含む哺乳類に感染するアデノ関連ウイルス (AAV) が開発され、欧州での臨床試験において遺伝子治療ベクターとして大きな成功を収めて使用されている。本試験では、本発明者は、MISタンパク質およびMISタンパク質バリエーション (例えば、LR-MIS、RF-MIS、LRF-MIS) (図4参照) を発現するAAV9が、単回用量として送達された場合、高レベルのMISの血液中への分泌が生じ (図5)、成功したことを実証する。MISの濃度は、 3×10^{11} ウイルス粒子が腹腔内投与された場合に $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であり、そのレベルは、極めて安定であり、実験の60日の間、如何なる減少もなく持続し (図1A)、発現は、マウスにおいて少なくとも6ヶ月持続し、または生理学的実験においてより

【0309】

腹腔内に注入された場合に、AAV-GFP対照感染から明らかなように、ウイルスは、体壁の筋肉および脾臓に著しい向性を有する。 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ の用量は、原始卵胞の正常量の観察から明らかなように、濾胞形成を完全に阻止するのに十分である、 $0.3 \sim 1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲でMISの生産を誘導することができ (図1A)、全ての他の段階の発達 (一次性、二次性、胞状性) の欠如を誘導することができる (図1B)。結果として生じたAAV-MISで処置された卵巣は、濾胞の成長が欠如している (図1C) が、毒性の証拠は示されず、原始卵胞を維持する (図1C、矢印を参照のこと) ために、対照で処置されたAAV-GFP卵巣よりも非常に小さい。同様の結果は、Flagタグ付けMIS構築物を送達するウイルスの単回注入の後に観察された (データは示さず)。

【0310】

実施例2

AAV9-LR-MIS、AAV9-LRF-MIS、またはAAV9-RF-MISで処置されたマウスは、対照AAV9-GFPで処置されたマウスよりも、スライド当たりより多くの濾胞を有し (図2)、より小さい卵巣を有していた (図3)。これは、MISで処置されたマウスにおける原始卵胞の保存および濾胞成熟の阻害を実証する。

【0311】

さらに、本発明者は、AAV9-LR-MISで処置されたマウスが、表1に示されるように、妊娠および生殖することができなかったことをインピボで実証する。特に、C57/BL6雌性マウスは、用量 3×10^{11} のAAV9-LR-MISまたはAAV9-GFP対照で成熟期 (6~8週) に処置され、サイクルを記録し、血液中のMISおよびステロイドレベルをモニターするために、1ヶ月間観察された。処置の1ヶ月後、雌性マウスを、3~4ヶ月齢の雄性的熟年ブリーダーとペアにした。ペアのマッチングに費やす累積時間、ならびに累積産仔数を記録した。AAV-GFPで処置された3ペアのマウスから、23仔が生まれ、一方、AAV9-LR-MISで処置された3ペアのマウスから、仔は生まれなかった (表1を参照のこと)。このことは、MISタンパク質が生殖を阻害することを実証する。

【0312】

表1は、AAV9-LRMISまたはAAV9-GFP対照で処置され、WT雄性マウスとペアをマッチングした状態に置かれた雌性マウスの、累積生殖アウトプットを示す。

	GFP 対照	MIS 雌
ペア	3	2
日	184	184
仔	23	0
仔/日/ペア	0.042	0.000

【 0 3 1 3 】

配列表：

配列番号：1 LR-核酸配列

ATGAAGTGGGTGAGCTTCATCAGCCTGCTGTTCTGTTTACGACGCGCTTACTCCCGCGGTGTGTTCCGCCGAGAGCAGAGGAGCCAGCTGTGGGCACCACTGGCCTCATCTTCCGAGAAGACTTGGACTGGCCTCCAGGCAGCCACAA
GAGCCTCTGTGCCTGGTGGCACTGGGCGGGGACAGCAATGGCAGCAGCTCCCCCTGCGGGTGGTGGGGGCTCTA
AGCGCCTATGAGCAGGCCTTCTGGGGGCGCTGCAGAGGGCCGCTGGGGCCCCGAGACCTGGCCACCTTCGGG
GTCTGCAACACCGGTGACAGGCAGGCTGCCTTGCCCTCTCTACGGCGGCTGGGGGCTGGCTGCGGGACCTGGG
GGGCAGCGCCTGGTGGTCTTACACCTGGAGGAAGTGACCTGGGAGCCAACACCTCGCTGAGGTTCAGGAGCCC
CCGCTGGAGGAGCTGGCCCCCAGAGCTGGCGCTGCTGGTGCTGTACCTGGGCTGGCCTGAGGTCACTGTG
ACGAGGGCTGGGCTGCCGGGTGCCAGAGCCTCTGCCCCCTCCGAGACACCCGCTACCTGGTGTAGCGGTGGAC
CGCCCTGCGGGGGCTGGCGCGGCTCCGGGCTGGCCTTGACCCTGCAGCCCCGCGGAGAGGACTCCCGGCTGAGT
ACCGCCCGGCTGCAGGCACTGCTGTTTCGGCGACGACACCGCTGCTTACACGGATGACCCCGGCCCTGCTCCTG
CTGCCGCGGTCCGAGCCCGCGCCGCTGCCTGCGCACGGCCAGCTGGACACCGTGCCCTTCCCGCCGCCAGGCCA
TCCGCGGAACCTCGAGGAGTCGCCACCCAGCGCAGACCCCTTCTGGAGACGCTCACGCGCCTGGTGCGGGCGCTG
CGGGTCCCCCGGCCCGGGCCTCCGCGCCGCGCCTGGCCCTGGATCCGGACGCGCTGGCCGGCTTCCCGCAGGGC
CTAGTCAACCTGTTCGACCCCGCGGCGCTGGAGCGCCTACTCGACGGCGAGGAGCCGCTGCTGCTGCTGCTGAGG
CCCCTGCGGCCACCAACCGGGGATCCTGCGCCCCCTGCACGACCCACGTCGGCGCCGTGGGCCACGGCCCTGGCG
CGCCGCGTGGCTGCTGAACTGCAAGCGGCGGCTGCCGAGCTGCGAAGCCTCCCGGGTCTGCCTCCGGCCACAGCC
CCGCTGCTGGCGCGCTGCTGCGCTCTGCCAGGTGGCCCCGGCGGCTCGGCGATCCCTGCGAGCGCTGCTG
CTCTGAAGGCGCTGCAGGGCCTGCGCGTGGAGTGGCGCGGGCGGGATCCGCGCGGGCCGGGTGCGGCACGGCGC
AGCGCGGGGGCCACCGCCGCCGACGGGCCGTGCGCGCTGCGCGAGCTCAGCGTAGACCTCCGCGCCGAGCGCTCC
GTACTCATCCCCGAGACCTACAGGCCAACAAATTGCCAGGGCGTGTGCGGCTGGCCTCAGTCCGACCGCAACCCG
CGCTACGGCAACCACTGGTGTCTGCTGCTGAAGATGCAGGCCCGTGGGGCCGCCCTGGCGCGCCACCTGCTGC
TGCCCCACCGCCTACGCGGGCAAGCTGCTCATCAGCCTGTTCGGAGAGCGCATCAGCGCGCACCACTGCCCCAAC
ATGGTGGCCACCGAGTGTGGCTGCCGGTGA

配列番号：2 LRF-核酸配列

ATGAAGTGGGTGAGCTTCATCAGCCTGCTGTTCTGTTTACGACGCGCTTACTCCCGCGGTGTGTTCCGCCGAGAGCAGAGGAGCCAGCTGTGGGCACCACTGGCCTCATCTTCCGAGAAGACTTGGACTGGCCTCCAGGCAGCCACAA
GAGCCTCTGTGCCTGGTGGCACTGGGCGGGGACAGCAATGGCAGCAGCTCCCCCTGCGGGTGGTGGGGGCTCTA
AGCGCCTATGAGCAGGCCTTCTGGGGGCGCTGCAGAGGGCCCGCTGGGGCCCCGAGACCTGGCCACCTTCGGG
GTCTGCAACACCGGTGACAGGCAGGCTGCCTTGCCCTCTCTACGGCGGCTGGGGGCTGGCTGCGGGACCTGGG
GGGCAGCGCCTGGTGGTCTTACACCTGGAGGAAGTGACCTGGGAGCCAACACCTCGCTGAGGTTCAGGAGCCC
CCGCTGGAGGAGCTGGCCCCCAGAGCTGGCGCTGCTGGTGCTGTACCTGGGCTGGCCCTGAGGTCACTGTG
ACGAGGGCTGGGCTGCCGGGTGCCAGAGCCTCTGCCCCCTCCGAGACACCCGCTACCTGGTGTAGCGGTGGAC
CGCCCTGCGGGGGCTGGCGCGGCTCCGGGCTGGCCTTGACCCTGCAGCCCCGCGGAGAGGACTCCCGGCTGAGT
ACCGCCCGGCTGCAGGCACTGCTGTTTCGGCGACGACACCGCTGCTTACACGGATGACCCCGGCCCTGCTCCTG
CTGCCGCGGTCCGAGCCCGCGCCGCTGCCTGCGCACGGCCAGCTGGACACCGTGCCCTTCCCGCCGCCAGGCCA
TCCGCGGAACCTCGAGGAGTCGCCACCCAGCGCAGACCCCTTCTGGAGACGCTCACGCGCCTGGTGCGGGCGCTG
CGGGTCCCCCGGCCCGGGCCTCCGCGCCGCGCCTGGCCCTGGATCCGGACGCGCTGGCCGGCTTCCCGCAGGGC
CTAGTCAACCTGTTCGACCCCGCGGCGCTGGAGCGCCTACTCGACGGCGAGGAGCCGCTGCTGCTGCTGCTGAGG
CCCCTGCGGCCACCAACCGGGGATCCTGCGCCCCCTGCACGACCCACGTCGGCGCCGTGGGGCACGGCCCTGGCG
CGCCGCGTGGCTGCTGAACTGCAAGCGGCGGCTGCCGAGCTGCGAAGCCTCCCGGGTCTGCCTCCGGCCACAGCC
CCGCTGCTGGCGCGCTGCTGCGCTCTGCCAGGTGGCCCCGGCGGCTCGGCGATCCCTGCGAGCGCTGCTG
CTCTGAAGGCGCTGCAGGGCCTGCGCGTGGAGTGGCGCGGGCGGGATCCGCGCGGGCCGGGTGCGGCACGGCGC
AGCGactacaaggatgaagacgacaagGCGGGGGCCACCGCCGCCGACGGGCCGTGCGCGCTGCGCGAGCTCAGC
GTAGACCTCCGCGCCGAGCGCTCCGTACTCATCCCCGAGACCTACCAGGCCAACAAATTGCCAGGGCGTGTGCGGC
TGGCCTCAGTCCGACCGCAACCCGCGCTACGGCAACCACGTGGTGTCTGCTGCTGAAGATGCAGGCCCGTGGGGCC
CCCTTGGCGCGCCACCTGCTGCGTGGCCACCGCCTACGCGGGCAAGCTGCTCATCAGCCTGTTCGGAGGAGCGC
ATCAGCGCACCACTGCGTGGCCACCGAGTGTGGCTGCCGGTGA

配列番号：3 MIS(560AA)-アミノ酸配列（下線はネイティブMISリーダー配列を示す）

10

20

30

40

50

mrdlpltsla lvlsalgall gtealraeep avgtsglifr edldwppgsp qeplclvalg
 gdsngssspl rvvgalsaye qaflgavqra rwgprdlaf gvcntgdrqa alpslrrlga
 wlrddpggqrl vvlhleewtw eptpslrfqe pppggagppe lallvlypgp gpevtvtrag
 lpgaqlscps rdtrylvlav drpagawrgs glaltlqprg edsrlstarl qallfgddhr
 cftrmtall llprsepap1 pahgqldivp fppprpsael eesppsadpf letltrlvra
 lrvpparasa prlaldpdal agfpqglvnl sdpaalerll dgeeplllll rptaattgdp
 aplhdptsap watalarrva aelqaaaael rslpglppat apillarllal cpggpgglgd
 plrallllka lqglrvewrg rdprgpggra rsagataadg pcalrelsvd lraersvlip
 etyqanncgg vcgwpqsdn prygnhvll lkmqvrgeal arppccvpta yagkllisls
 eerisahvp nmvatecgr

配列番号：4 LR(559AA)-太字の赤字はアルブミンリーダー配列を示し、緑色は改変切断部位を示す。

mkwvtfisl1 flfssaysrg vfrr raep avgtsglifr edldwppgsp qeplclvalg
 gdsngssspl rvvgalsaye qaflgavqra rwgprdlaf gvcntgdrqa alpslrrlga
 wlrddpggqrl vvlhleewtw eptpslrfqe pppggagppe lallvlypgp gpevtvtrag
 lpgaqlscps rdtrylvlav drpagawrgs glaltlqprg edsrlstarl qallfgddhr
 cftrmtall llprsepap1 pahgqldivp fppprpsael eesppsadpf letltrlvra
 lrvpparasa prlaldpdal agfpqglvnl sdpaalerll dgeeplllll rptaattgdp
 aplhdptsap watalarrva aelqaaaael rslpglppat apillarllal cpggpgglgd
 plrallllka lqglrvewrg rdprgpggra rsagataadg pcalrelsvd lraersvlip
 etyqanncgg vcgwpqsdn prygnhvll lkmqvrgeal arppccvpta yagkllisls
 eerisahvp nmvatecgr

10

配列番号：5 LRF(567AA)-ハイライトはFlagタグ (DYKDDDDK)

mkwvtfisl1 flfssaysrg vfrr raep avgtsglifr edldwppgsp qeplclvalg
 gdsngssspl rvvgalsaye qaflgavqra rwgprdlaf gvcntgdrqa alpslrrlga
 wlrddpggqrl vvlhleewtw eptpslrfqe pppggagppe lallvlypgp gpevtvtrag
 lpgaqlscps rdtrylvlav drpagawrgs glaltlqprg edsrlstarl qallfgddhr
 cftrmtall llprsepap1 pahgqldivp fppprpsael eesppsadpf letltrlvra
 lrvpparasa prlaldpdal agfpqglvnl sdpaalerll dgeeplllll rptaattgdp
 aplhdptsap watalarrva aelqaaaael rslpglppat apillarllal cpggpgglgd
 plrallllka lqglrvewrg rdprgpggra rsDYKDDDDK agataadg pcalrelsvd
 lraersvlip etyqanncgg vcgwpqsdn prygnhvll lkmqvrgeal arppccvpta
 yagkllisls eerisahvp nmvatecgr

20

配列番号：6 HSAリーダー配列 (アミノ酸)

mkwvtfisl1 flfssaysrg vfrr

配列番号：7 HSAリーダー配列 (核酸)

ATGAAGTGGGTGAGCTTCATCAGCCTGCTGTTCTGTTTCAGCAGCGCTTACTCCCGCGGTGTGTTCCGCCGAGAGCA

30

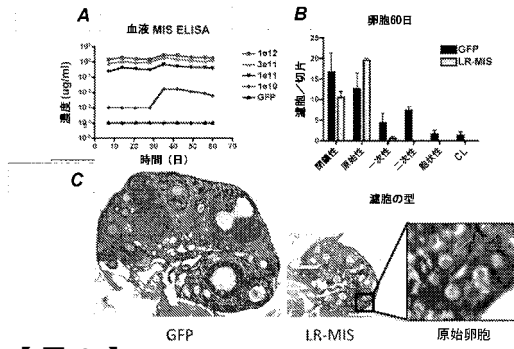
配列番号：2 1 Flagタグ (アミノ酸配列)

DYKDDDDK

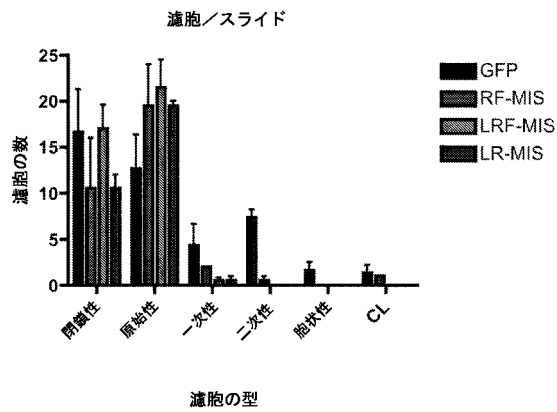
配列番号：2 2 Flagタグ (核酸配列)

gactacaaggatgacgacgacaag

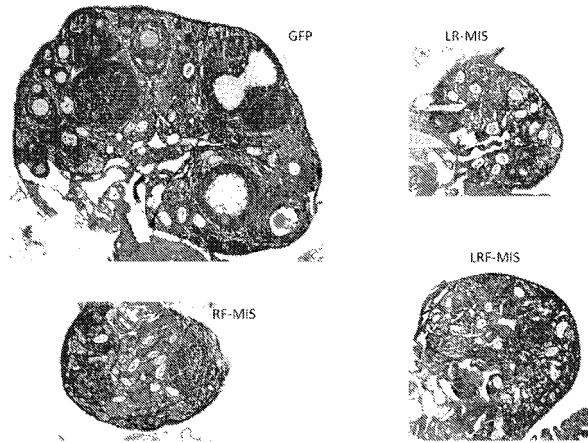
【 図 1 】



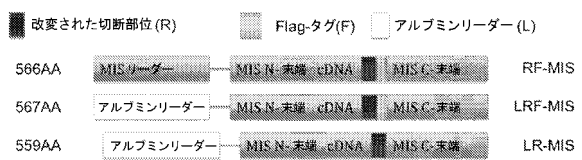
【 図 2 】



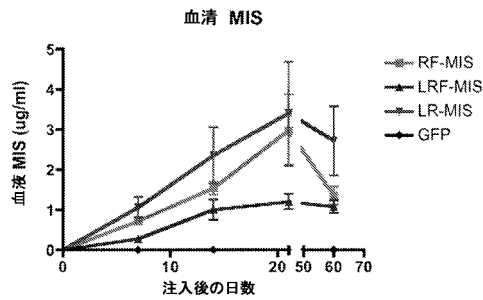
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【手続補正書】

【提出日】平成28年8月15日(2016.8.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017504589000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/69829
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/22, A61K 48/00, C12N 15/86 (2015.01) CPC - A61K 38/22, A61K 48/00, C12N 15/86 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 38/22, A61K 48/00, C12N 15/86 (2015.01) CPC - A61K 38/22, A61K 48/00, C12N 15/86 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12N 15/86, C12N 15/861, C12N 15/863 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Scholar Search terms: Mullerian inhibiting substance, Anti-Mullerian hormone, Mullerian inhibiting factor, Mullerian inhibiting hormone, MIS, contraceptive, contraception, functional ovarian reserve, ovarian reserve, vector, adenovirus, AAV, poxvirus, lentivirus, promoter, inducible		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 5,010,055 A (DONAHOE) 23 April 1991 (23.04.1991) col 3, ln 6-12	1 2, (5-7)/(1-2)
X — Y	US 2003/0124620 A1 (SEIFER et al.) 03 July 2003 (03.04.2003) abstract; para [0025]	22 23, (26-29)/(22-23)
Y	UniProtKB MIS_HUMAN [online]. [Retrieved on 23 June 2015]. Retrieved from the internet <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/P03971.txt?version=138 > (30 November 2010) Entire document	2, (5-7)/2, 23, (26-29)/23
Y	US 2004/0062750 A1 (DONAHOE et al.) 01 April 2004 (01.04.2004) para [0037], [0059], [0083], [0064], [0082], [0085]	(5-7)/(1-2), (26-29)/(22-23)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 June 2015 (23.06.2015)		Date of mailing of the international search report 27 JUL 2015
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. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT GSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/69829

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/59829

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.: 8-21 and 30-45
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 extra 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 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, 2, 5-7 (in part), 22, 23, 26-29 (in part), limited to a sequence with at least 95% identity to the amino acid sequence of amino acid residues 26-560 of 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 accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/69829

Continuation of Box No. 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. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-7 and 22-29, directed to methods of contraception or preventing a decline in the functional ovarian reserve (FOR) in a female subject. The methods of contraception or preventing a decline in FOR will be searched to the extent that the Mullerian Inhibiting Substance (MIS) protein sequence encompasses a sequence with at least 95% identity to the amino acid sequence of amino acid residues 26-560 of SEQ ID NO: 3. It is believed that claims 1, 2, 5-7 (in part), 22, 23, 26-29 (in part), encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass methods of contraception or preventing a decline in FOR wherein the MIS protein sequence encompasses a sequence with at least 95% identity to the amino acid sequence of amino acid residues 26-560 of SEQ ID NO: 3. Additional MIS protein sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected MIS protein sequences. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the '+' group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a MIS protein sequence encompassing a sequence with at least 95% identity to the amino acid sequence of amino acid residues 26-560 of SEQ ID NO: 4, i.e. claims 1, 3, 5-7 (in part), 22, 24, 26-29 (in part).

The inventions listed as Groups I+ 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:

Special Technical Features

The technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific Mullerian Inhibiting Substance (MIS) protein sequence recited therein. Each invention requires an MIS protein sequence not required by the other inventions.

Common Technical Features

The feature shared by Group I+ is the method of contraception of claim 1.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 5,010,055 A to (Donahoe). Donahoe discloses (claim 1) a method of contraception comprising administering to a female subject a composition comprising a Mullerian Inhibiting Substance (MIS) protein (col 3, in 6-9 "the invention provides a composition suitable for use as a contraceptive agent which comprises Mullerian Inhibiting Substance"; col 3, in 10-12 "Additionally, the invention relates to a method of contraception which comprises providing to a female an effective amount of the above composition"). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another feature shared by Group I+ is the method of preventing a decline in the functional ovarian reserve (FOR) in a female subject of claim 22.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2003/0124620 A1 to Seifer et al. (hereinafter 'Seifer'). Seifer discloses (claim 22) a method of preventing a decline in the functional ovarian reserve (FOR) in a female subject, comprising administering to the female subject a composition comprising a Mullerian Inhibiting Substance (MIS) protein (abstract "MIS can also be administered to women to stimulate follicle development and to prevent depletion of ovarian reserve"; para [0025] "Thus, stimulating the growth of follicles through the administration of MIS may rescue a certain percentage of follicles that would otherwise be destined to undergo apoptosis. The enhanced survival of these follicles will increase a woman's ovarian reserve"; para [0040] "As used herein, 'MIS' refers to Mullerian inhibiting substance"). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another feature shared by Group I+ is a Mullerian Inhibiting Substance (MIS) protein sequence.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by UniProtKB submission MIS_HUMAN (UniProtKB [online]). [Retrieved on 27 March 2014]. Retrieved from the internet <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/P03971.txt?version=138>> (hereinafter 'MIS_HUMAN'). MIS_HUMAN discloses the MIS protein sequence comprising amino acid residues 26-560 of SEQ ID NO: 3 (sequence of MIS_HUMAN exhibits 100% identity to SEQ ID NO: 3). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I+ therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or 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 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 15/18 1 7 1	
C 0 7 K 14/495 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
	C 0 7 K 14/495	

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

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(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 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ドナホー パトリシア ケイ .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ホイッティア ブレイス 8 1 6 エイチ

(72) 発明者 ペピン デイビッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル ローレル ストリート 2 2 # 1 2

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 DC50 MA27 MA31
MA52 MA63 MA66 NA14 ZA811 ZA861 ZC611
4C087 AA01 BC83
4H045 AA30 BA10 BA53 CA40 DA30 EA26 FA74

【要約の続き】

