

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006 年 4 月 27 日 (27.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/043586 A1

(51) 国際特許分類:  
C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
G01N 33/15 (2006.01)

也 (SUGIYAMA, Tetsuya) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県  
つくば市和台 1 7 番地 2 小野薬品工業株式会社内  
Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/019187

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2005 年 10 月 19 日 (19.10.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2004-305003  
2004 年 10 月 20 日 (20.10.2004) JP

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 小野  
薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒5418526 大阪府大阪市中央区道修町  
二丁目 1 番 5 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 柴山 史朗  
(SHIBAYAMA, Shiro) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県  
つくば市和台 1 7 番地 2 小野薬品工業株式会社内  
Ibaraki (JP). 竹田 和彦 (TAKEDA, Kazuhiko) [JP/JP];  
〒3004247 茨城県つくば市和台 1 7 番地 2 小野薬品  
工業株式会社内 Ibaraki (JP). 渡邊 紀城 (WATANABE,  
Noriki) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 1 7 番  
地 2 小野薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 杉山 哲

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部  
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF MEASURING CELL MIGRATION ACTIVITY

(54) 発明の名称: 細胞遊走活性測定法

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a method of measuring cell migration corresponding to the function of a specific cell migration inducer *in vivo*; a method of evaluating a cell migration inhibitory compound by using the above method; and a method of producing the above compound. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] By using this method, cell migration corresponding to the function of a specific cell migration inducer can be measured *in vivo*. As a result, it becomes possible to evaluate the function of a cell migration inhibitory compound having a specificity or selectivity *in vivo*.

(57) 要約: [課題] 本発明は、*in vivo*において特定の細胞遊走誘導物質の作用に対応する細胞遊走を測定する方法ならびに当該方法を用いることによる細胞遊走抑制化合物の評価法および当該化合物の製造方法に関する。[解決手段] 本発明の方法を使用することにより、*in vivo*において特定の細胞遊走誘導物質の作用に対応した細胞遊走を測定することが可能となり、特異性あるいは選択性を有する細胞遊走抑制化合物の *in vivo*における作用評価が可能となった。

WO 2006/043586 A1

## 明 細 書

### 細胞遊走活性測定法

### 技術分野

- [0001] 本発明は、細胞遊走活性測定法に関する。さらに詳しく言えば、本発明は、*in vivo*において、特定の細胞遊走誘導物質に対応する細胞遊走活性を測定する方法ならびに当該方法を用いることによる細胞遊走抑制化合物の評価法および当該化合物の製造方法に関する。

### 背景技術

- [0002] 組織炎症部位では非常に多種類の細胞遊走誘導物質(ケモカインやサイトカイン等)が産生されている。さらに当該炎症の発症や増悪には、当該細胞遊走誘導物質により誘引される免疫担当細胞の関与が知られている。
- [0003] 当該免疫担当細胞の遊走を評価する方法として、従来用いられているair-pouch(空気のう)モデルは、LPSやカラゲニン等の炎症惹起剤を空気のう内に注入することにより炎症を惹起し、内在性の好中球やマクロファージ等を空気のう内に集積させるモデルとして知られている(非特許文献1、2、および3)。
- [0004] 非特許文献1:ガルシアーラマロ, イー(Garcia-Ramallo,E), ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology), 2002年, 169巻, 第11号, p.6467-6473。
- [0005] 非特許文献2:ナカムラ, エイチ(Nakamura,H), プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.), 2001年, 98巻, 第26号, p.15143-15148。
- [0006] 非特許文献3:マックコール, エスアール(McColl,SR), ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology), 1999年, 163巻, 第5号, p.2829-2835)。
- [0007] 一方、特定の細胞遊走誘導物質を優位に産生する細胞を空気のうに移入すること、当該細胞遊走誘導物質に誘引され得る細胞を任意に選択し、外部から必要数移入することによる空気のうモデルは、全く知られていない。

### 発明の開示

## 発明が解決しようとする課題

[0008] 細胞遊走を測定する方法として、従来用いられている空気のうちモデルは、LPSやカラゲニン等の炎症惹起剤を空気の中に入注することにより、炎症を惹起させるモデルである。当該方法において遊走されてくる細胞は、好中球やマクロファージが主であり、特定の細胞遊走誘導物質に一对一の対応関係にある細胞の遊走作用を測定することは困難であった。そこで、当該課題を解決することができる評価モデルの開発が望まれていた。

## 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、従来用いられている空気のうちモデルの課題を解決すべく、鋭意研究した結果、特定の細胞遊走誘導物質を優位に産生する細胞を空気の中に移入すること、当該細胞遊走誘導物質に誘引され得る細胞を任意に選択し、外部から必要数移入することにより、この課題を解決することを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は、

[1] (1) 哺乳動物の皮下に作製した空気の中に細胞遊走誘導物質を産生する細胞を移入する工程、(2) 哺乳動物の当該空気の中以外の部位に被測定細胞を移入する工程、(3) 当該空気の中の細胞を回収する工程、および(4) 工程(3)で回収された細胞のうち当該被測定細胞数を測定する工程からなる細胞遊走活性測定法、

[2] (1) 被験化合物またはその対照媒体を別々の哺乳動物に投与する工程、(2) 哺乳動物の皮下に作製した空気の中に細胞遊走誘導物質を産生する細胞を移入する工程、(3) 哺乳動物の当該空気の中以外の部位に被測定細胞を移入する工程、(4) 当該空気の中の細胞を回収する工程、(5) 工程(4)で回収された細胞のうち当該被測定細胞数を測定する工程、および(6) 対照媒体が投与された哺乳動物の空気の中の中の被測定細胞数に対する、被験化合物を投与した哺乳動物の空気の中の中の被測定細胞数を比較する工程からなる被験化合物の細胞遊走抑制活性の評価法、

[3] 前記[2]記載の細胞遊走活性の評価法を用いて細胞遊走抑制活性を有する物質を選択する工程、および、前記工程によって選択された物質を化学合成する工程を含むことを特徴とする細胞遊走抑制物質の製造方法、

[4] 細胞遊走誘導物質を産生する細胞が、細胞遊走誘導物質を産生するよう遺伝子

導入または遺伝子改変された細胞である前記[1]乃至[3]記載の方法、

[5]細胞遊走誘導物質が、ケモカインまたはサイトカインである前記[1]乃至[3]記載の方法、

[6]ケモカインが、I-309、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ P、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MRP-1、MCP-3、MCP-2、MIP-1 $\gamma$ 、エオタキシン、MCP-5、MCP-4、MCIF、MIP-1 $\delta$ 、NCC-4/LEC、TARC、MIP-4、MIP-3 $\beta$ 、MIP-3 $\alpha$ 、SLC、MDC、MIP-3、エオタキシン-2、TECK、エオタキシン-3、スキニンカイン、MEC、NAP-3、MIP-2 $\alpha$ 、MIP-2 $\beta$ 、Cinc2、CXCL4、CXCL4V1、ENA-78、CKA-3、PPBP、PPBPL1、IL-8、MIG、IP-10、I-TAC、SDF-1 $\alpha$ 、SDF-1 $\beta$ 、BCA-1、MIP-2 $\gamma$ 、ラングカイン、SR-PSOX、NAP-4、ニューロタクチン、ミドカイン、SCYC1、およびSCYC2から選択される1種以上である前記[5]記載の方法、

[7]ケモカインが、SDF-1 $\alpha$ 、SDF-1 $\beta$ 、TARC、またはMDCである前記[5]記載の方法、

[8]被測定細胞が、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、または顆粒球細胞である前記[1]乃至[3]記載の方法、

[9]T細胞が、CD4陽性T細胞またはCD8陽性T細胞である前記[8]記載の方法、

[10]T細胞が、Th1様分化細胞またはTh2様分化細胞である前記[8]記載の方法、

[11]ケモカインおよび／または被測定細胞がヒト由来であって、哺乳動物が免疫不全哺乳動物である前記[5]記載の方法、

[12]哺乳動物が、マウスである前記[1]乃至[3]記載の方法、および

[13]ケモカインおよび／または被測定細胞がヒト由来であって、哺乳動物がマウスである前記[5]記載の方法に関する。

[0011] 本明細書中、哺乳動物とは、例えば、マウス、ラット、モルモット、サル等が挙げられるが、好ましくはマウスである。当該マウスは、被測定細胞の由来となるマウスと同種のハプロタイプを有するマウスが好ましい。

- [0012] 本明細書中、被測定細胞が、ヒト由来である場合には、免疫不全哺乳動物であることが好ましい。免疫不全哺乳動物としてはマウス、ラット等が挙げられる。免疫不全マウスとしては、マウスヌードマウス、スキッドマウス、ALYマウス等が挙げられる。
- [0013] 本明細書中、哺乳動物の皮下に作製した空気のうは、本発明の方法を実施する数日前に哺乳動物の皮下にシリンジ等で空気を注入することによって作製することができる。当該哺乳動物の背部に作製するのが好ましい。
- [0014] 本明細書中、細胞遊走活性測定法においては、(1)の工程と(2)の工程の順序は任意であるが、(1)の工程および(2)の工程の順に行われるのが好ましく、ついで(3)および(4)の工程が行われる。(2)の工程は、(1)の工程を行ってから約1時間後に行うことが好ましく、さらに、9時間後に(3)の工程が行われるのが好ましい。
- [0015] 本明細書中、被験化合物の細胞遊走抑制活性の評価法においては、(1)の工程乃至(3)の工程の順序は任意であるが、(1)の工程乃至(3)の工程の順に行われるのが好ましく、ついで(4)乃至(6)の工程の順で行われる。(2)の工程は、(1)の工程を行ってから30分後に行うことが好ましく、以後の工程は上記方法に対応する工程の間隔で行われるのが好ましい。
- [0016] 当該評価法は、複数の個々の被験化合物の集団から、細胞遊走抑制化合物を選別する場合においても用いることができる。
- [0017] 本明細書中、本発明の評価方法で評価される被験化合物としては、化学合成化合物、ペプチド、非ペプチド性化合物、タンパク質、発酵生産物、細胞抽出物、植物抽出物、動物組織抽出物またはそれらの誘導体もしくは修飾体が挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。被験化合物として好ましくは、化学合成化合物である。
- [0018] 被験化合物は塩を形成していてもよく、生理学的に許容される塩が用いられる。被験化合物の塩としては、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、アミン塩、酸付加塩等が挙げられる。
- [0019] 塩は、水溶性のものが好ましい。適当な塩としては、アルカリ金属(カリウム、ナトリウム等)の塩、アルカリ土類金属(カルシウム、マグネシウム等)の塩、アンモニウム塩、薬学的に許容される有機アミン(テトラメチルアンモニウム、トリエチルアミン、メチルア

ミン、ジメチルアミン、シクロペンチルアミン、ベンジルアミン、フェネチルアミン、ピペリジン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、リジン、アルギニン、N-メチル-D-グルカミン等)の塩が挙げられる。

[0020] 酸付加塩は水溶性であることが好ましい。適当な酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩のような無機酸塩、または酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、グルクロン酸塩、グルコン酸塩のような有機酸塩が挙げられる。

[0021] 本明細書中、被験化合物の対照媒体とは、動物に経口又は非経口投与可能な溶媒であって、被験化合物を溶解あるいは懸濁させることができるものであればよい。経口投与の場合、蒸留水、生理食塩水、メチルセルロース(MC)水溶液、カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液、ショ糖脂肪酸エステル(DKエステル)水溶液等が挙げられる。

[0022] 本明細書中、細胞遊走誘導物質とは、本発明に係る被測定細胞の遊走を誘引しえる物質であって、空気のうに移入した細胞から一過的に、断続的に、継続的に、あるいは持続的に産生されるものである。当該細胞遊走誘導物質は、低分子化合物であっても、タンパク質であってもよい。タンパク質である場合には、いずれの哺乳動物由来のものであってもよく、内因性あるいは導入あるいは改変された遺伝子由来のタンパク質であってもよい。導入あるいは改変された遺伝子由来のタンパク質である場合には、同等の細胞遊走誘導活性を有する限り、他のタンパク質と融合された形態で発現されるものであってもよい。融合に適当な他のタンパク質としては、例えば、タンデムヒスチジン(6xHis)、免疫グロブリン定常部のFc断片、GST(グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)等が挙げられる。これらは、大量生産後の精製作業を有利にでき、また、融合タンパク質の溶解度を増加でき、さらに、立体配座を安定させる効果を期待することができる。

[0023] また、当該タンパク質としては、例えば、当該タンパク質のGenBankもしくはRefSeqに掲載される遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列、またはSwissProt、PIR、PRF、もしくはPDBに掲載されるタンパク質のアクセス番号に係るアミノ酸配列からなるもの

以外に、実質的に同等の活性を有する限り、その一部のアミノ酸(好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個)が欠失したもの、任意のアミノ酸と置換したもの、そのアミノ酸配列の数カ所(好ましくは1~10カ所、より好ましくは1~5カ所)に任意のアミノ酸が付加または挿入されたもの、およびそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するものも含まれる。ここで、アミノ酸の欠如、置換、付加、または挿入の位置は特に限定されない。

[0024] 実質的に同等の活性としては、例えば、シグナル情報伝達活性、受容体結合活性等が挙げられる。実質的に同等とは、それらの性質が実質的に(例えば、生理学的に、または薬理学的に)同等であることを示す。したがって、シグナル情報伝達活性または受容体結合活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.1~10倍、より好ましくは0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量等の量的要素は異なってもよい。

[0025] 当該タンパク質として好ましくは、ケモカインまたはサイトカインであり、さらに好ましくはケモカインである。

[0026] 当該ケモカインとしては、例えば、I-309(A37236, S24236, P50229)、MCP-1(P13500, Q62401, NP\_062078)、MIP-1 $\alpha$ (P10147, P10855, P50229)、MIP-1 $\alpha$ P(B35673, -, -)、MIP-1 $\beta$ (P13236, P14097, P50230)、RANTES(P13501, A46539, NP\_112378)、MRP-1(-, P27784, -)、MCP-3(A54678, Q62401, NP\_062078)、MCP-2(P80075, Q62401, -)、MIP-1 $\gamma$ (-, P51670, -)、エオタキシン(Eotaxin)(2208449A, P48298, NP\_062078)、MCP-5(P13500, NP\_035461, -)、MCP-4(Q99616, -, -)、MCIF(NP\_116741, -, -)、MIP-1 $\delta$ (NP\_116741, -, -)、NCC-4/LEC(NP\_004581, -, -)、TARC(Q92583, NP\_035462, NP\_476492)、MIP-4(P55774, -, -)、MIP-3 $\beta$ (Q99731, O70460, -)、MIP-3 $\alpha$ (P78556, O89093, P97884)、SLC(NP\_002980, NP\_075539, -)、MDC(O00626, O88430, -)、MIP-3(P55773, -, -)、エオタキシン-2(Eotaxin-2)(O00175, Q9JKC0, -)、TECK(O15444, NP\_033164, -)、エオタキシン-3(Eotaxin-3)(NP\_006063, -, -)、スキンカイン

(Skinkine) (NP\_\_006655, NP\_\_035466, -)、MEC(Q9NRJ3, Q9JIL2, NP\_\_446152)、NAP-3(P09341, P10889, S21467)、MIP-2 $\alpha$  (P19875, P10889, 2022188A)、MIP-2 $\beta$  (NP\_\_002081, -, -)、Cinc2(-, P10889, S46198)、CXCL4(P02776, NP\_\_064316, P06765)、CXCL4V1(P10720, -, -)、ENA-78(P80162, A57325, NP\_\_071550)、CKA-3(P80162, -, -)、PPBP(P02775, NP\_\_076274, 2022188A)、PPBPL1(XP\_\_116262, -, -)、IL-8(NP\_\_000575, -, -)、MIG(JN0470, A35766, P48973)、IP-10(1312356A, NP\_\_067249, P48973)、I-TAC(NP\_\_005400, Q9JHH5, P48973)、SDF-1 $\alpha$  (NP\_\_954637, I81182, NP\_\_071513)、SDF-1 $\beta$  (NP\_\_000600, I81182, NP\_\_071513)、BCA-1(NP\_\_006410, -, -)、MIP-2 $\gamma$  (JG0182, NP\_\_062514, -)、ラングカイン(Lungkine)(-, NP\_\_035469, -)、SR-PSOX(-, NP\_\_079673, -)、NAP-4(P19877, -, -)、ニューロタクチン(Neurotactin) (NP\_\_002987, O35188, O55145)、ミドカイン(Midkine) (P21741, A35305, NP\_\_110486)、SCYC1(P47992, P47993, P51672)、およびSCYC2(P47992, -, -)等が挙げられ、好ましくは、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、SDF-1 $\alpha$ 、SDF-1 $\beta$ 、TARC、SLC、MIG、IP-10、I-TAC、およびMDCであり、さらに好ましくは、SDF-1 $\alpha$ 、SDF-1 $\beta$ 、TARC、およびMDCである。

[0027] 上記ケモカインは、GenBankもしくはRefSeqに掲載される遺伝子から翻訳されるタンパク質、またはSwissProt、PIR、PRF、もしくはPDBに掲載されるタンパク質のアクセス番号に係るアミノ酸配列を有するタンパク質として定義される。上記ケモカインの一般的名称に続く括弧書き中の番号は、右からそれぞれヒト、マウス、およびラットの当該一般的名称で表わされるケモカインを定義するタンパク質のアミノ酸配列へのアクセス番号を示し、“-”はその動物種におけるケモカインの存在が確認されていないことを示している。

[0028] 本明細書中、ケモカインおよびサイトカインとしては、被測定細胞に対して遊走活性を有するものであればいずれのものであってもよい。

[0029] 本明細書中、細胞遊走誘導物質を産生する細胞とは、初代継代培養細胞、株化

細胞、またはそれらの遺伝子導入細胞もしくは遺伝子導入安定形質転換細胞の何れであつてもよい。ただし、1種または2種以上の細胞遊走誘導物質を優位に産生する細胞であるのが好ましい。さらに、当該1種または2種以上の細胞遊走誘導物質を優位に産生する細胞としては、細胞遊走誘導物質を優位に発現するように遺伝子改変された細胞が好ましい。細胞遊走誘導物質を優位に発現するように遺伝子改変された細胞とは、細胞遊走誘導物質の産生に関与するタンパク質をコードする遺伝子が導入された細胞または当該遺伝子が導入された安定形質転換細胞、および細胞遊走誘導物質がタンパク質であつて、当該タンパク質をコードする遺伝子が導入された細胞または当該遺伝子が導入された安定形質転換細胞を含む。

- [0030] 遺伝子改変によって動物細胞に細胞遊走誘導物質を産生させる際、遺伝子導入のために用いる発現ベクターのプロモーターとしては、動物細胞で機能するものであればいずれでもよい。該プロモーターとしては、例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオインプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター等が挙げられる。発現ベクターには、以上のほかに、エンハンサー、RNAスプライシングのシグナル、ポリA付加のシグナル、選択マーカー等を用いる。発現ベクターを構築する方法自体は公知であり、例えば、モレキュラー クローニング(Molecular Cloning)、アブラボラトリー マニュアル、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー(A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory), 1982年に記載されている。
- [0031] 形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 秀潤社, 1995年, p.263-267、ヴィロロジー(Virology), 1973年, 52巻, 456に記載の方法に従って形質転換することができる。
- [0032] 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地[サイエンス(Science), 122巻, 501 (1952)]、DMEM培地[ヴィロロジー(Virology), 1959年, 8巻, 396]、RPMI1640培地[ジャーナル・オブ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(J. Am. Med. Assoc.), 1967年, 199巻, 519]、199培地[プロシーディングス・オブ・ソサイエティ・オブ・エクソ・バイオロジカル・メディシン(Proc. Soc. Exo. Biol. Med.), 1950年, 73巻, 1]等が挙げられる。pHは

約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- [0033] 当該遺伝子の発現ベクターで形質転換された動物細胞を用いて当該蛋白質を安定に発現させる方法としては、細胞遊走誘導物質発現ベクターが導入細胞の染色体に組み込まれる方法と、導入細胞において当該遺伝子が染色体に組み込まれることなく安定に存在させる方法がある。前者の場合には、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子等の増幅系[ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー(J. Mol. Biol.), 1982年, 159巻, 601]を利用して当該蛋白質の生産量を増大させることができる。
- [0034] 形質転換された動物細胞(クローン)を選択する方法自体は公知であり、例えば、実験医学、臨時増刊号、1987年, 5巻, 11号に記載されている。具体的には、細胞遊走誘導物質遺伝子と共に選択マーカー遺伝子を指標にして形質転換株を選択する。この場合、選択マーカーを当該遺伝子と同一ベクターに乗せて細胞に導入しても良く、また選択マーカーを別のベクターに乗せ、これよりも多量の当該遺伝子をもつベクターとともに別のベクターに乗せ、細胞に導入(co-transformation)しても良い。これらの選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)[メトトレキセート(MTX)耐性]、チミジンキナーゼ、Ecogpt遺伝子(ミコフェノール酸耐性)、neo遺伝子(G418耐性)、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子(ハイグロマイシンB耐性)等が挙げられる。
- [0035] 細胞遊走誘導物質であるタンパク質をコードする遺伝子を導入された細胞または当該遺伝子が導入された安定形質転換細胞としては、当該タンパク質を発現あるいは過剰発現する発現ベクターが遺伝子導入され、一過的にあるいは安定的に当該タンパク質を発現し得る細胞である。当該発現ベクターは、公知のもの、市販されているもの、またはそれらを適切に加工したものを用いることができる。例えば、pFLAG-CMV-5a, b, c(シグマ アルドリッチ ジャパン)、pcDNA/V5-HisA, B, C, pEF6/V5-HisA, B, C(インビトロジェン)、およびpUC-SR $\alpha$ /FLAG等が挙げられ、好ましくはpUC-SR $\alpha$ /FLAGである。細胞への遺伝子導入は、公知の方法で行うことができるが、好ましくは市販されている遺伝子導入用試薬を用いた方

法に準じた方法で行うのが好ましい。特に好ましくは、リポフェクション法である。遺伝子導入される細胞としては、例えば、CHO細胞株、COS-7細胞株、WEHI-3細胞株、および293T細胞株が挙げられるが、好ましくは293T細胞株である。

[0036] 本明細書中、空気のように移入される細胞遊走誘導物質を産生する細胞数は、被測定細胞の遊走が測定可能な程度に十分量の細胞遊走誘導物質を産生する細胞数であれば足りる。例えば、当該哺乳動物としてマウスを使用する場合には、 $1 \times 10^7$  個／マウスを用いることが好ましい。ただし、当該細胞数は、使用する哺乳動物または細胞遊走誘導物質、または細胞遊走誘導物質を産生する細胞の種類により異なる。

[0037] 本明細書中、被測定細胞とは、本発明に係る細胞遊走誘導物質により遊走されえる細胞であって、移入される哺乳動物と同種のハプロタイプを有する細胞であればいずれのものでもよい。好ましくは、免疫担当細胞であるリンパ球(T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)、単球、樹上細胞、マクロファージ、または顆粒球細胞(例えば、好中球、好酸球、また好塩基球等)が挙げられる。さらに好ましくはT細胞であり、CD4陽性T細胞もしくはCD8陽性T細胞、特に好ましくはTh1様分化細胞またはTh2様分化細胞として濃縮された細胞である。

[0038] 本明細書中、被測定細胞の移入とは、被測定細胞を外部から必要数移入することであり、当該空気の中への細胞遊走が可能な部位であれば何れにおいて行ってもよく、好ましくは、哺乳動物の静脈、さらに好ましくは尾静脈に対して行うのがよい。

[0039] 移入される被測定細胞数は、空気の中への遊走細胞が測定可能な程度に十分量の数であればよく、例えば、当該哺乳動物としてマウスを使用し、被測定細胞としてTh1様分化細胞またはTh2様分化細胞を用いる場合には、 $2 \times 10^7$  個／マウスを用いるのが好ましい。ただし、当該細胞数は、使用する哺乳動物または細胞遊走誘導物質、または細胞遊走誘導物質を産生する細胞の種類により異なる。

[0040] 本明細書中、被測定細胞数の測定とは、空気の中に存在する被測定細胞数を測定することにより行う。当該測定にはFACSを用いるのが好ましい。FACSにおける被測定細胞の検出は、当該被測定細胞に特異的な抗原に対する抗体を用いて行うのが好ましい。当該被測定細胞が導入される哺乳動物に内在する遊走細胞と区別

するためである。例えば、被測定細胞上に発現しているアロ抗原に対する抗体を用いて検出することにより、当該内在性の遊走細胞の影響を排除することができる。アロ抗原とは、同種抗原のことを意味し、同種間で免疫反応を惹起する抗原のことである。

[0041] 本明細書中、細胞遊走抑制活性とは、空気のように移入された細胞から産生される細胞遊走誘導物質のみに起因する細胞遊走を抑制する活性を意味し、実施例4に記載された計算式に準じて計算される。

[0042] 本明細書中、細胞遊走抑制物質における細胞遊走抑制活性とは、本発明の細胞遊走抑制活性の評価法によって細胞遊走抑制活性が認められた化合物を意味する。具体的には、当該化合物を被験化合物として1乃至300mg/kg経口投与した場合に、被測定細胞の細胞遊走活性を約50%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上抑制する活性を意味する。さらに好ましくは、当該化合物を被験化合物として1乃至30mg/kg経口投与した場合に、被測定細胞の細胞遊走活性を約50%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上抑制する活性である。また、当該化合物を被験化合物として0.1乃至30mg/kg静脈投与した場合には、被測定細胞の細胞遊走活性を約50%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上抑制する活性を意味する。さらに好ましくは、当該化合物を被験化合物として0.1乃至3mg/kg経口投与した場合に、被測定細胞の細胞遊走活性を約50%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上抑制する活性である。同様に、当該化合物を被験化合物として0.1乃至30mg/kg腹腔内投与した場合には、被測定細胞の細胞遊走活性を約50%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上抑制する活性を意味する。さらに好ましくは、当該化合物を被験化合物として0.1乃至3mg/kg腹腔内投与した場合に、被測定細胞の細胞遊走活性を約50%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上抑制する活性である。

[0043] 本明細書中、細胞遊走誘導物質がケモカインであるMDCである場合、細胞遊走抑制物質としては、例えば、N-[5-ブロモ-3-(ピリジン-3-イルメトキシ)ピラジン-2-イル]-4-メチルベンゼンスルホンアミド、N-[5-ブロモ-3-({3-[

2-(ジメチルアミノ)エトキシ]-4-メトキシベンジル}オキシ)ピラジン-2-イル]-4-メチルベンゼンスルホンアミド、N-{3-[(3-アミノベンジル)オキシ]ピラジン-2-イル}-4-メチルベンゼンスルホンアミド、N-{3-[(3,4-ジメトキシベンジル)オキシ]-5-メチルピラジン-2-イル}-4-メチルベンゼンスルホンアミド、およびN-[3-({3-[2-(ジメチルアミド)エトキシ]-4-メトキシベンジル}オキシ)-5-メチルピラジン-2-イル]-4-メチルベンゼンスルホンアミド等が挙げられる。また、細胞遊走誘導物質がケモカインであるSDF-1 $\alpha$ または $\beta$ である場合には、細胞遊走抑制化合物として(3S)-N-(4-アゼパン-1-イルピリミジン-2-イル)-1'-(シクロヘキシルカルボニル)-1,4'-ビペリジン-3-アミンおよび1,4-シス-4-(3S)-3-[(4-アゼパン-1-イルピリミジン-2-イル)アミノ]ピペリジン-1-イルシクロヘキサノール等が挙げられる。

[0044] 本明細書中、細胞遊走抑制物質の製造方法とは、細胞遊走活性の評価法を用いて細胞遊走抑制活性を有する物質を選択する工程、および、前記工程によって選択された物質を化学合成する工程をその一連の製造過程に含む方法である。さらに、当該製造方法における工程のうち、選択された物質を合成する工程は、例えば、国際公開第2004/007472号パンフレットおよび国際公開第2004/052862号パンフレットに掲載された方法、またはそれらの実施例に記載された方法に準じて行うことができる。

[0045] 当該細胞遊走抑制物質は、それ自体単独で投与することもできるが、これらの有効成分の1種又は2種以上を含むこともでき、また、薬理的に許容される製剤用添加物等を用いて医薬品組成物として調製し、これを投与するのが好ましい。通常、全身的または局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与されるが、好ましくは、経口投与、および静脈内投与である。

[0046] 当該細胞遊走抑制物質は、公知の方法で塩に変換される。塩としては薬学的に許容される塩が好ましい。

[0047] 塩としては、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、アミン塩、酸付加塩等が挙げられる。

[0048] 塩は、水溶性のものが好ましい。適当な塩としては、アルカリ金属(カリウム、ナトリウム)

ム等)の塩、アルカリ土類金属(カルシウム、マグネシウム等)の塩、アンモニウム塩、薬学的に許容される有機アミン(テトラメチルアンモニウム、トリエチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、シクロペンチルアミン、ベンジルアミン、フェネチルアミン、ピペリジン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、リジン、アルギニン、N-メチル-D-グルカミン等)の塩が挙げられる。

[0049] 酸付加塩は水溶性であることが好ましい。適当な酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩のような無機酸塩、または酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、グルクロン酸塩、グルコン酸塩のような有機酸塩が挙げられる。

[0050] 投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、一回につき、100  $\mu$ gから100mgの範囲で、一日一回から数回経口投与されるかまたは、成人一人あたり、一回につき、10  $\mu$ gから100mgの範囲で、一日一回から数回非経口投与される。もちろん前記したように、投与量は種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

[0051] 経口投与のための固体組成物には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセルには、ソフトカプセルおよびハードカプセルが含まれる。

[0052] このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤(例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等)と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、潤滑剤(ステアリン酸マグネシウム等)、崩壊剤(繊維素グリコール酸カルシウム等)、安定化剤(ヒト血清アルブミン、ラクトース等)、溶解補助剤(アルギニン、アスパラギン酸等)を含有していてもよい。

[0053] 錠剤または丸剤は、必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の胃溶性あるいは腸溶性のフィルムで被膜してもよいし、また2以上の層で被膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収され

うる物質のカプセルも包含される。

- [0054] 経口投与のための液体組成物は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般に用いられる不活性な希釈剤(例えば、精製水、エタノール等)を含んでいてもよい。このような組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。
- [0055] 非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤と混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80(登録商標)等が挙げられる。
- [0056] このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等)、溶解補助剤(例えば、アルギニン、アスパラギン酸等)等の補助剤を含んでいてもよい。
- [0057] 非経口投与のための外用剤としては、例えば、軟膏剤、ゲル剤、クリーム剤、湿布剤、貼付剤、リニメント剤、噴霧剤、吸入剤、スプレー剤、エアゾル剤、点眼剤、および点鼻剤等が挙げられる。これらはひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、公知の方法または通常使用されている処方により製造される。
- [0058] 噴霧剤、吸入剤、およびスプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば、米国特許第2,868,691号および同第3,095,355号に詳しく記載されている。
- [0059] 非経口投与のための上記以外の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される直腸内投与のための坐剤および腔内投与のためのペッサリー等が含まれる。

## 発明の効果

- [0060] 本発明の方法を使用することにより、in vivoにおいて特定の細胞遊走誘導物質の作用に対応した細胞遊走を測定することが可能となり、特異性あるいは選択性を有する細胞遊走抑制化合物のin vivoにおける作用評価が可能となった。

## 図面の簡単な説明

- [0061] [図1](a) マウスMDC発現ベクター、(b) マウスSDF-1発現ベクター

[図2] 被験化合物の細胞遊走抑制活性の評価

## 発明を実施するための最良の形態

- [0062] 以下、実施例および生物学的実施例によって本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

### 実施例1: マウスMDCおよびマウスSDF-1cDNAの単離

マウスMDCcDNAは、配列番号1に示されるプライマー: 5'-AAAAAAAGATCTGCCACCATGGCTACCCTGCGTGTCCCACT-3' および配列番号2に示されるプライマー: 5'-AAAAAAGCGGCCGCGGACAGTTTATGGAGTAGCTTCT-3' を用いて、マウス脾臓cDNAライブラリーから既知のPCR法に準じた方法によって増幅し、単離した。同様に、マウスSDF-1cDNAも、配列番号3に示されるプライマー: 5'-GACTGCGGCCGCGCTTGTTTAAAGCTTTCTCCAGGTA-3' および配列番号4に示されるプライマー: 5'-AAAAGAGCTCGCCACCATGGACGCCAAGGTCGTGCGCCGTG-3' を用いて、マウス脾臓cDNAライブラリーから既知のPCR法に準じた方法によって増幅し、単離した。さらに、マウスTARCCcDNAも、配列番号5に示されるプライマー: 5'-AAAAAAAGATCTGCCACCATGAGGTCACCTCAGATGCTGCT-3' および配列番号6に示されるプライマー: 5'-AAAAAAGCGGCCGCGGGCCTTGGGTTTTTCACCAATCT-3' を用いて、マウス脾臓cDNAライブラリーから既知のPCR法に準じた方法によって増幅し、単離した。

- [0063] それぞれのPCR産物をアガロースゲル電気泳動によって分離および抽出した後、BglIIおよびNotIによる制限酵素処理を行った。同様に制限酵素処理を行った発現ベクターpUC-SR $\alpha$ /FLAGにライゲーションさせ、これを大腸菌DH5 $\alpha$ に遺伝

子導入した。得られたアンピシリン耐性コロニーを培養後、当該大腸菌から当該発現ベクターを抽出した。

実施例2: マウスMDC発現293T細胞およびマウスSDF-1発現293T細胞の作製  
 $3 \times 10^6$  / dishとなるように播種された293T細胞に対して、翌日にリポフェクション法により、マウスMDC発現ベクターマウスMDC / pUC-SR $\alpha$  / FLAGのトランスフェクションを行った。当該リポフェクション法は、インビトロジェンから購入したリポフェクタミン試薬およびPLUS試薬の使用説明書に記載された方法に準じて行った。翌日、当該細胞を回収した。マウスMDC / pUC-SR $\alpha$  / FLAGは、図1(a)に記載された構成を有する。

[0064] 同様の方法により、マウスSDF-1発現293T細胞を調製した。マウスSDF-1 / pUC-SR $\alpha$  / FLAGは、図1(b)に記載された構成を有する。

実施例3: 被測定細胞の調製(Th1およびTh2様分化細胞の調製)

Balb / cマウスの脾臓より常法に従い脾臓細胞を調製した。調製した脾臓細胞からマウスCD4サブセット エンリッチメントカラム(R&D)を用いてネガティブセレクション法により、マウスCD4陽性T細胞を精製した。この細胞を用いてマウスTh1様およびTh2様分化細胞を調製した。

[0065] すなわち、抗mTCR $\beta$ 抗体をコートした24ウェルプレートにウェル当たり $1.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞 / 2mLを播き、37 $^{\circ}$  CでCO $_2$ インキュベーター内で48時間培養した。このとき、Th1様分化細胞に分化誘導を行う場合には、20ng / mL mIL-12、2.5  $\mu$ g / mL抗mIL-4抗体、および1.0  $\mu$ g / mL 抗mCD28抗体を添加し、Th2様細胞に分化誘導を行う場合には、20ng / mL mIL-4、2.5  $\mu$ g / mL 抗mIL-12抗体、1.0  $\mu$ g / mL 抗mCD28抗体をそれぞれ添加した。

[0066] 刺激から48時間後に当該細胞を回収して、抗mTCR $\beta$ 抗体を除去した。その後2 ng / mL mIL-2存在下で72時間培養して、被測定細胞とした。

実施例4: 被験化合物の細胞遊走抑制活性の評価法

各被験化合物は、1%DKエステル(対照媒体)に懸濁させたものを調製した。被験化合物1、被験化合物2(30mg / kgおよび100mg / kg)または対照媒体を、それぞれ別の動物に経口投与し、30分後に、空気のう(予めマウス背部皮下に注射シリ

ンジにて作製)ヘマウスMDC発現293T細胞(もしくは293T細胞, mock-293T細胞)を $1 \times 10^7 / 500 \mu\text{L}$ /マウスで当該空気のう内へ移入した。さらに1時間後に $1 \times 10^7 / 500 \mu\text{L}$ /マウスの被測定細胞であるTh2様分化細胞を尾静脈内に移入した。

[0067] 24時間後にエーテル麻酔下で、2.5mLのPBS(−)で空気のう内を洗浄した。回収した洗浄液を70  $\mu\text{m}$ のセルストレーナーを通し、遠心後上清を回収した。得られた細胞は抗マウスCD16/32抗体によりFc受容体をブロック後、抗Ly1.2抗体及び抗マウスCD4抗体にて染色した。続いてFACSを用いてLy1.2陽性およびCD4陽性細胞を検出し、当該陽性細胞数を測定した。

[0068] 細胞遊走抑制活性は、各被験化合物投与でのマウスMDC発現293T細胞移入動物のLy1.2陽性およびCD4陽性細胞を(A)、対照媒体投与でのmock-293T細胞移入動物のLy1.2陽性およびCD4陽性細胞を(B)、対照媒体投与での293T細胞移入動物のLy1.2陽性およびCD4陽性細胞を(C)として、以下の式に従い算出した。

[0069] 細胞遊走抑制活性(%) =  $(1 - ((A) - (B) / (C) - (B))) \times 100$

本発明の細胞遊走抑制活性評価法は、図2に示すように、被験化合物1(N-[5-ブロモ-3-(ピリジン-3-イルメトキシ)ピラジン-2-イル]-4-メチルベンゼンスルホンアミド)および被験化合物2(N-[5-ブロモ-3-({3-[2-(ジメチルアミノ)エトキシ]-4-メトキシベンジル}オキシ)ピラジン-2-イル]-4-メチルベンゼンスルホンアミド)の細胞遊走抑制活性を評価することができた。

[0070] 同様の方法により、マウスSDF-1発現293T細胞と被測定細胞としてTh1様分化細胞を用いて、マウスSDF-1による細胞遊走に対する(3S)-N-(4-アゼパン-1-イルピリミジン-2-イル)-1'-(シクロヘキシルカルボニル)-1,4'-ビピペリジン-3-アミンおよび1,4-シス-4-(3S)-3-[(4-アゼパン-1-イルピリミジン-2-イル)アミノ]ピペリジン-1-イルシクロヘキサノールの抑制活性(それぞれ30mg/kg経口投与の場合、63%、58%抑制)を評価することができた。

#### 産業上の利用可能性

[0071] 本発明の細胞遊走活性測定法は、特異性あるいは選択性を有する細胞遊走抑制化合物のin vivoにおける作用評価を可能とし、当該化合物を有効成分とする医薬

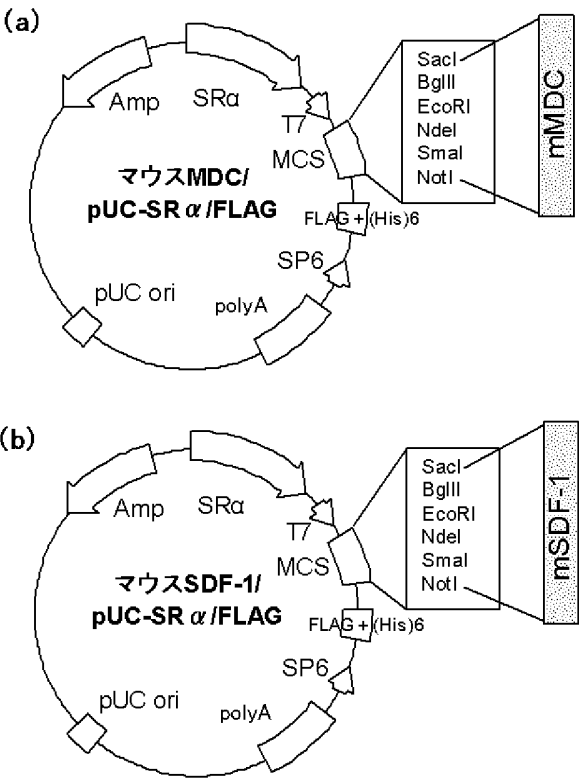
品の開発において使用することができる。

## 請求の範囲

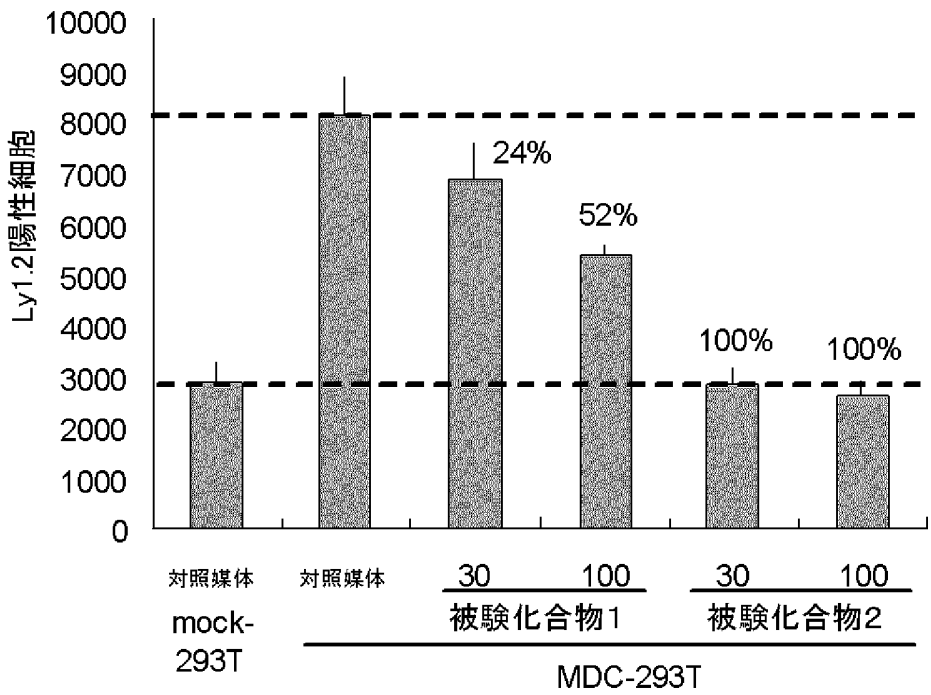
- [1] (1)哺乳動物の皮下に作製した空気の中に細胞遊走誘導物質を産生する細胞を移入する工程、(2)哺乳動物の当該空気のうち以外の部位に被測定細胞を移入する工程、(3)当該空気の中内の細胞を回収する工程、および(4)工程(3)で回収された細胞のうち当該被測定細胞数を測定する工程を含む細胞遊走活性測定法。
- [2] (1)被験化合物またはその対照媒体を別々の哺乳動物に投与する工程、(2)哺乳動物の皮下に作製した空気の中に細胞遊走誘導物質を産生する細胞を移入する工程、(3)哺乳動物の当該空気のうち以外の部位に被測定細胞を移入する工程、(4)当該空気の中内の細胞を回収する工程、(5)工程(4)で回収された細胞のうち当該被測定細胞数を測定する工程、および(6)対照媒体が投与された哺乳動物の空気の中中の被測定細胞数に対する、被験化合物を投与した哺乳動物の空気の中中の被測定細胞数を比較する工程を含む被験化合物の細胞遊走抑制活性評価法。
- [3] 請求の範囲2記載の細胞遊走活性の評価法を用いて細胞遊走抑制活性を有する物質を選択する工程、および、前記工程によって選択された物質を化学合成する工程を含むことを特徴とする細胞遊走抑制物質の製造方法。
- [4] 細胞遊走誘導物質を産生する細胞が、細胞遊走誘導物質を産生するよう遺伝子導入または遺伝子改変された細胞である請求の範囲1乃至3記載の方法。
- [5] 細胞遊走誘導物質が、ケモカインまたはサイトカインである請求の範囲1乃至3記載の方法。
- [6] ケモカインが、I-309、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ P、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MRP-1、MCP-3、MCP-2、MIP-1 $\gamma$ 、エオタキシン、MCP-5、MCP-4、MCIF、MIP-1 $\delta$ 、NCC-4/LEC、TARC、MIP-4、MIP-3b、MIP-3 $\alpha$ 、SLC、MDC、MIP-3、エオタキシン-2、TECK、エオタキシン-3、スキンカイン、MEC、NAP-3、MIP-2 $\alpha$ 、MIP-2 $\beta$ 、Cinc2、CXCL4、CXCL4V1、ENA-78、CKA-3、PPBP、PPBPL1、IL-8、MIG、IP-10、I-TAC、SDF-1 $\alpha$ 、SDF-1 $\beta$ 、BCA-1、MIP-2 $\gamma$ 、ラングカイン、SR-PSOX、NAP-4、ニューロタクチン、ミドカイン、SCYC1、およびSCYC2から選択される1種以上である請求の範囲5記載の方法。

- [7] ケモカインが、SDF-1 $\alpha$ 、SDF-1 $\beta$ 、TARC、またはMDCである請求の範囲5記載の方法。
- [8] 被測定細胞が、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、または顆粒球細胞である請求の範囲1乃至3記載の方法。
- [9] T細胞が、CD4陽性T細胞またはCD8陽性T細胞である請求の範囲8記載の方法。
- [10] T細胞が、Th1様分化細胞またはTh2様分化細胞である請求の範囲8記載の方法。
- [11] ケモカインおよび／または被測定細胞がヒト由来であって、哺乳動物が免疫不全哺乳動物である請求の範囲5記載の方法。
- [12] 哺乳動物が、免疫不全マウスである請求の範囲1乃至3記載の方法。
- [13] ケモカインおよび／または被測定細胞がヒト由来であって、哺乳動物がマウスである請求の範囲5記載の方法。

[図1]



[図2]



## SEQUENCE LISTING

<110> Ono Pharmaceutical Co., Ltd.  
<120> chemotactic regulator  
<130> ZZOP-17  
<150> 2004-305003  
<151> 2004-10-20  
<160> 6  
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence  
<400> 1  
aaaaaaagat ctgccaccat ggctaccctg cgtgtccac t 41

<210> 2  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence  
<400> 2  
aaaaaagcgg ccgcggacag tttatggagt agcttct 37

<210> 3  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence  
<400> 3  
gactgcggcc gccttgttta aagctttctc caggta 36

<210> 4  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence  
<400> 4  
aaaagagctc gccaccatgg acgccaaggt cgtcgccgtg 40

<210> 5  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence  
<400> 5  
aaaaaaagat ctgccaccat gaggtcactt cagatgctgc t 41

<210> 6  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence  
<400> 6  
aaaaaagcgg ccgcgggcct tgggttttc accaatct 38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019187

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12Q1/02** (2006.01), **G01L33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **C12N15/09** (2006.01), **G01N33/48** (2006.01)

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)

**C12Q1/02** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **C12N15/09** (2006.01), **G01N33/48** (2006.01)

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | MURAKAMI, Y. et al., Antiinflammatory effect of retrovirally transfected interleukin-10 on monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in murine air pouches., Arthritis Rheum., 2002, Vol.46, No.9, p.2504-13. | 1-13                  |
| A         | MCCOLL, S.R. et al., Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists., J.Immunol., 1999, Vol.163, No.5, p.2829-35.                                                                        | 1-13                  |
| A         | GARCIA-RAMALLO, E. et al., Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. J.Immunol., 2002, Vol.169, No.11, p.6467-73.                                       | 1-13                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

"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  
22 November, 2005 (22.11.05)

Date of mailing of the international search report  
13 December, 2005 (13.12.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/019187

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | YAMAMOTO, Y. et al., Inhibitory action of spinorphin, an endogenous regulator of enkephalin-degrading enzymes, on carrageenan-induced polymorphonuclear neutrophil accumulation in mouse air-pouches. Life Sci., 1998, Vol.62, No.19, p.1767-73. | 1-13                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **C12Q1/02** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **C12N15/09** (2006.01), **G01N33/48** (2006.01)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **C12Q1/02** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **C12N15/09** (2006.01), **G01N33/48** (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)  
PubMed

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| A               | MURAKAMI, Y. et al., Antiinflammatory effect of retrovirally transfected interleukin-10 on monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in murine air pouches., Arthritis Rheum., 2002, Vol.46, No.9, p.2504-13. | 1-13             |
| A               | MCCOLL, S. R., et al., Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists., J. Immunol., 1999, Vol.163, No.5, p.2829-35.                                                                     | 1-13             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 11. 2005

国際調査報告の発送日

13. 12. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3540

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                      |                  |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                    | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | GARCIA-RAMALLO, E., et al., Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation.<br>J. Immunol., 2002, Vol.169, No.11, p.6467-73.                                                   | 1-13             |
| A                     | YAMAMOTO, Y., et al., Inhibitory action of spinorphin, an endogenous regulator of enkephalin-degrading enzymes, on carrageenan-induced polymorphonuclear neutrophil accumulation in mouse air-pouches.<br>Life Sci., 1998, Vol.62, No.19, p.1767-73. | 1-13             |