(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4454152号
(P4454152)

(45)発行日　平成22年4月21日(2010.4.21)　(24)登録日　平成22年2月12日(2010.2.12)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/00	(2006.01)	C12N	15/00	ZNA
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48	
A61K 31/711	(2006.01)	A61K	31/711	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	

請求項の数 43　(全 137 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-560919 (P2000-560919)
(86)(22)出願日　平成11年7月21日 (1999.7.21)
(65)公表番号　特表2002-521019 (P2002-521019A)
(43)公表日　平成14年7月16日 (2002.7.16)
(86)国際出願番号　PCT/CA1999/000659
(87)国際公開番号　WO2000/004926
(87)国際公開日　平成12年2月3日 (2000.2.3)
審査請求日　平成17年7月20日 (2005.7.20)
(31)優先権主張番号　09/120,523
(32)優先日　平成10年7月22日 (1998.7.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　508296532
オスプレイ・ファーマシューティカルズ・ユーエスエイ・インコーポレイテッド
ＯＳＰＲＥＹ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ　ＵＳＡ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国９４１５８カリフォルニア州サンフランシスコ、イリノイ・ストリート４０９番
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】二次的組織損傷ならびにその他の炎症症状および疾患を治療する方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下を含む、複合体：
サイトトキシック・エージェントまたはサイトトキシック・エージェントをコードする核酸分子であるターゲッテッド・エージェント、ここで、サイトトキシック・エージェントは細胞に取り込まれたときタンパク質合成を変化させ、細胞の増殖を阻害する、または細胞を死滅させる、および
ケモカインまたはその一部から選択されるケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント、ここで、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントは、GCP-2、GRO-α、GRO-β、GRP-γ、ENA-78、PBP、CTAP III、NAP-2、MIG、IP-10、SDF-1α、SDF-1β、SDF-2、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1α、MIP-1β、MIP-1γ、MIP-2、MIP-2α、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、MIP-5、MDC、HCC-1、ALP、ラングカイン、エオタキシン-1、エオタキシン-2、I-309、SCYA17、Tim-1、TARC、RANTES、DC-CK-1、リンホタクチン、Tim-1およびフラクタルカインおよびその一部からなる群から選択され、免疫エフェクター細胞上のケモカイン・レセプターに結合し、結合されたターゲッテッド・エージェントを前記レセプターを有する免疫エフェクター細胞に取り込ませ、免疫エフェクター細胞の移動、活性化、または増殖を阻害する。
【請求項２】
(ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント)$_n$、(L)$_q$および(ターゲッテッド・エージェント)$_m$の構成を含む、請求項１の複合体、ここで、

Lは、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとターゲッテッド・エージェントとを結合するリンカーである；
mおよびnは独立に選択され、少なくとも1である；
qは、得られた複合体がターゲッティングされるレセプターと結合し、取り込まれて、ターゲッテッド・エージェントを送達する限り0以上であってよい。
【請求項３】
ケモカイン・レセプターが活性化白血球上に発現している、請求項１または２の複合体。
【請求項４】
活性化白血球が、好塩基球、好中球、好酸球、およびそれらの２以上の組合せからなる群から選択される、請求項３の複合体。
【請求項５】
免疫エフェクター細胞が、白血球、単核食細胞(MNP)、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、Ｔリンパ球およびＢリンパ球からなる群から選択される、請求項１または２の複合体。
【請求項６】
ターゲッティングされるケモカイン・レセプターが、DARC、CXCR-1、CXCR-2、CXCR-3、CXCR-4、CXCR-5、CCR-1、CCR-2A、CCR-2B、CCR-3、CCR-4、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CCR-8、CCR-9、CX3CR-1、XCR-1およびCD97からなる群から選択される、請求項１－５のいずれかに記載の複合体。
【請求項７】
mおよびnが独立に選択され、1～6である、請求項２の複合体。
【請求項８】
qが0または1であり、nが1であり、かつ、mが1である、請求項７の複合体。
【請求項９】
免疫エフェクター細胞が、CXCR-4、CCR-2b、CCR-3、CCR-5、CCR-6、CCR-8、およびCX3CR-1からなる群から選択されるレセプターを発現し、かつ該細胞がHIVに感染している、請求項１－８のいずれかの複合体。
【請求項１０】
感染細胞が$CD4^+$リンパ球である、請求項９の複合体。
【請求項１１】
サイトトキシック・エージェントがリボソーム不活化タンパク質(RIP)である、請求項１－１０のいずれかの複合体。
【請求項１２】
RIPがI型RIPまたはその生物学上機能的な断片である、請求項１１の複合体。
【請求項１３】
I型RIPがジアンチン30、ジアンチン32、リクニン、サポリン-1、サポリン-2、サポリン-3、サポリン-4、サポリン-5、サポリン-6、サポリン-7、サポリン-8、サポリン-9、PAP、PAPII、PAP-R、PAP-S、PAP-C、マパルミン、ドデカンドリン、ブリオジン-L、ブリオジン、コリシン-1、コリシン-2、ルフィン-A、ルフィン-B、ルフィン-S、19K-PSI、15K-PSI、9K-PSI、α-キリロウイン、β-キリロウイン、ゲロニン、モモルジン、モモルジン-II、モモルジン-Ic、MAP-30、α-モモルカリン、β-モモルカリン、トリコサンチン、TAP-29、トリコキリン、オオムギRIP、トリチン、アマRIP、トウモロコシRIP、アスパリン-1、およびアスパリン-2からなる群から選択される、請求項１２の複合体。
【請求項１４】
RIPがII型RIP、その触媒サブユニット、またはその生物学上機能的なサブユニットもしくは断片である、請求項１１の複合体。
【請求項１５】
II型RIPが、ボルケンシン、リシン、ニグリン-b、CIP-29、アブリン、ビルクミン、モデクシン、エブリチン-α、エブリチン-β、エブリチン-γ、およびポレクチンからなる

群から選択される、請求項１４の複合体。
【請求項１６】
サイトトキシック・エージェントが、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、志賀毒素、志賀様毒素、その触媒サブユニット、およびその生物学上機能的な断片からなる群から選択される細菌毒である、請求項１－１０のいずれかの複合体。
【請求項１７】
サイトトキシック・エージェントがＤＮＡ切断剤である、請求項１－１０のいずれかの複合体。
【請求項１８】
ＤＮＡ切断剤が、アントラキノン-オリゴピロールカルボキシアミド、ベンズイミダゾール、ライナマイシン、ダインマイシンA、エネジイン、エンジインキノンイミン、2,2r-ビス(2-アミノエチル)-4-4'-ビチアゾール、エピリチシン-サレン銅複合体、およびその機能的類似体または誘導体からなる群から選択される、請求項１７の複合体。
【請求項１９】
サイトトキシック・エージェントが代謝拮抗物質である、請求項１－１０のいずれかの複合体。
【請求項２０】
代謝拮抗物質が、5-フルオロウラシル、メトトレキセート、メルファラン、ダウノマイシン、ドキソルビシン、ナイトロゲンマスタード、マイトマイシンc、およびその機能的類似体または誘導体からなる群から選択される、請求項１９の複合体。
【請求項２１】
ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとターゲッテッド・エージェントが共有結合またはイオン結合により直接結合している、請求項１－２０のいずれかの複合体。
【請求項２２】
ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとターゲッテッド・エージェントがリンカーにより結合している、請求項１－２０のいずれかの複合体。
【請求項２３】
リンカーが、ポリペプチドまたは化学リンカーである、請求項２２の複合体。
【請求項２４】
リンカーが、ヘテロ二機能性切断性架橋剤である化学リンカーである、請求項２３の複合体。
【請求項２５】
化学リンカーが、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)-アミノベンゾエート、スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)-アミノベンゾエート、4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-a-(2-ピリジルジチオ)-トルエン、スルホスクシンイミジル-6-[a-メチル-a-(ピリジルジチオール)-トルアミド]ヘキサノエート、N-スクシンイミジル-3-(-2-ピリジルジチオ)-プロプリオネート、スクシンイミジル6[3(-(-2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド]ヘキサノエート、スルホスクシンイミジル6[3(-(-2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート、3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオニルヒドラジド、エルマン試薬、ジクロロトリアジン酸、およびS-(2-チオピリジル)-L-システインからなる群から選択される、請求項２４の複合体。
【請求項２６】
リンカーが、ペプチドまたはアミノ酸である、請求項２２の複合体。
【請求項２７】
リンカーが、1～60のアミノ酸を含む、請求項２６の複合体。
【請求項２８】
リンカーが、ターゲッテッド・エージェントとケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとの間の立体障害を小さくするペプチド、細胞内酵素基質、複合体の可変性を高めるリンカー、複合体の可溶性を高めるリンカー、複合体の血清安定性を高め

るリンカー、光切断性リンカー、および酸切断性リンカーからなる群から選択される、請求項２７の複合体。

【請求項２９】

OPL98104 （配列番号61）、OPL98112 （配列番号62）、OPL98108 （配列番号63）、OPL98102 （配列番号52）、OPL98110 （配列番号53）、OPL98106 （配列番号54）、OPL98101 （配列番号55）、OPL98109 （配列番号56）、OPL98105 （配列番号57）、OPL98103 （配列番号58）、OPL98111 （配列番号59）、およびOPL98107 （配列番号60）からなる群から選択される、請求項１の複合体。

【請求項３０】

請求項１－２８のいずれかの複合体をコードするヌクレオチドの配列を含む核酸分子であって、該複合体がポリペプチドであるサイトトキシック・エージェントを含む、核酸分子。

【請求項３１】

請求項３０の核酸分子を含む、プラスミド。

【請求項３２】

請求項３１のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項３３】

以下を含む、複合体を製造する方法。

請求項３２の細胞を、該複合体を含む融合タンパク質が発現する条件下で培養する；および

該融合タンパク質を単離する。

【請求項３４】

DNAである、請求項３０の核酸分子。

【請求項３５】

請求項１－２９のいずれかの複合体または請求項３０の核酸分子を医薬上許容されるビヒクル中に含む、医薬組成物。

【請求項３６】

二次的組織損傷および関連病状を処置するため医薬の製造のための請求項３５の医薬組成物の使用であって、該組成物が二次的組織損傷誘発炎症細胞の増殖、移動または生理学的活性を阻害する、使用。

【請求項３７】

免疫エフェクター細胞の活性化、増殖または移動を阻害することにより炎症応答に関連する病状および／または免疫エフェクター細胞の活性化、増殖および移動に関連する二次的組織損傷を処置するための医薬の製造のための、請求項１－２８のいずれかの複合体の使用。

【請求項３８】

病状が二次的組織損傷を含む、請求項３６または３７の使用。

【請求項３９】

病状が、中枢神経系(CNS)損傷、CNS炎症性疾患、神経変性疾患、心疾患、炎症性眼疾患、炎症性腸疾患、炎症性関節疾患、炎症性腎疾患、炎症性肺疾患、炎症性鼻疾患、炎症性甲状腺疾患、およびサイトカインにより調節される癌からなる群から選択される、請求項３６または３７の使用。

【請求項４０】

CNS炎症性疾患および／または神経変性疾患が、卒中、非開放性頭部損傷、白質脳症、脈絡髄膜炎、髄膜炎、副腎白質萎縮症、AIDS性痴呆合併症、アルツハイマー病、ダウン症候群、慢性疲労症候群、脳炎、脳脊髄炎、海綿状脳症、多発性硬化症、パーキンソン病、および脊髄損傷／外傷(SCI)からなる群から選択される、請求項３９の使用。

【請求項４１】

以下である、請求項４０の使用：

疾患が、心疾患であり、アテローム性動脈硬化症である；

疾患が、炎症性眼疾患であり、増殖性糖尿病網膜症、増殖性硝子体網膜症、網膜炎、強膜炎、強膜虹彩炎、脈絡膜炎、およびブドウ膜炎からなる群から選択される；
疾患が、炎症性腸疾患であり、慢性大腸炎、クローン病、および潰瘍性大腸炎からなる群から選択される；
疾患が、炎症性関節疾患であり、若年性慢性関節リウマチ、変形性関節炎、慢性関節リウマチ、および脊椎関節炎からなる群から選択される；
疾患が、脊椎関節炎であり、強直性脊椎炎、ライター症候群、反応性関節炎、乾癬性関節炎、脊椎炎、未分化脊椎関節炎、およびベーチェット症候群からなる群から選択される；
疾患が、炎症性腎疾患であり、糸球体腎炎、IgA腎症、および狼瘡腎症からなる群から選択される；
疾患が、炎症性肺疾患であり、急性呼吸窮迫症候群、好酸球性肺疾患、慢性好酸球性肺炎、急性好酸球性肺炎、気管支収縮、気管支肺異形成症、気管支肺胞好酸球増加症、アレルギー性気管支肺、アスペルギルス症、肺炎、および繊維性肺疾患からなる群から選択される；
疾患が、炎症性鼻疾患であり、ポリープ症、副鼻腔炎、および鼻炎からなる群から選択される；
疾患が、甲状腺炎である；または、
疾患が、サイトカインにより調節される癌であり、神経膠腫、アテローム性癌腫、腺癌、肉芽腫、膠芽腫、肉芽腫症、リンパ腫、白血病、肺癌、黒色腫、骨髄腫、肉腫、類肉腫症、小神経膠腫、髄膜腫、星状細胞種、および乏突起神経膠腫からなる群から選択される。

【請求項４２】
炎症応答に関連する病状および免疫エフェクター細胞の活性化、増殖および移動に関連する二次的組織損傷を処置するための医薬の製造のための、請求項１－２８のいずれかの複合体の使用であって、動物において免疫エフェクター細胞の活性化、増殖または移動を阻害し、それにより該免疫エフェクター細胞の活性化、増殖または移動が阻害され、炎症応答が阻害される、使用。

【請求項４３】
組成物が、局所、関節内、槽内、眼球内、心室内、鞘内、静脈内、筋肉内、気管内、腹膜内、皮内、またはそれらの２種以上の組み合わせによる投与用に製造される、請求項４２の使用。

【発明の詳細な説明】

【０００１】
関連出願
国際出願のため、1998年7月22日にMcDONALD, John R.およびCOGGINS, Philip J.により出願された、「二次的組織損傷を治療する方法および組成物」と題された米国出願出願番号第09/120,523号の優先権の恩典を請求する。

【０００２】
米国出願のため、本願は米国出願出願番号第09/120,523の一部継続出願である。支障のない限り、米国出願出願番号第09/120,523号の主題は出典明示して本明細書の一部とされる。35 U.S.C. §120の下、優先権の恩典を請求する。

【０００３】
発明の分野
本発明は治療組成物および病状の治療におけるそれらの使用に関する。さらに詳しくは、限定されるものではないが、二次的組織損傷をはじめとする、炎症応答に関与する細胞の増殖、移動および生理学的活性に関連する病状を治療する化合物、組成物および方法が提供される。

【０００４】
発明の背景

ケモカイン
ケモカインは主として化学誘引物質および特異的な白血球細胞サブタイプのアクチベーターとして働く、40以上の小さな（約4ないし約14kDa）の誘導性・分泌型のプロ炎症性サイトカインのスーパーファミリーである。それとともに、ケモカインは全範囲の白血球サブタイプをターゲッティングし、各々個々は一部の範囲のみをターゲッティングする。ケモカインは塩基性ヘパリン結合タンパク質であり、ほとんどすべてのファミリーメンバー間で４個のシステインを共通に持っている。ケモカインには４つの主要なグループがあり、そのうち３つのグループが４個の保存されたシステインを含む。これらのグループは最初の２個のシステインの配列によって定義されている。最初の２個のシステインが単一のアミノ酸で分断されていれば、それはCXCファミリー（αとも呼ばれる）のメンバーであり；これらのシステインが隣接していれば、それらはCCファミリー（βとも呼ばれる）に分類される。それらが３個のアミノ酸によって分断されていれば、それらは第３のCX_3Cメンバーである。第４のグループのケモカインは、他のグループにおける１番目と３番目のシステインに相当する２個のシステインを含む。構造解析では、ほとんどのケモカインが単量体として機能し、可変性Ｎ末端の最初の35個のアミノ酸内のレセプター結合残基にこの２領域が必要であることが証明されている(Clark-Lewis et at. (1995) J Leukoc Biol 57.703-11(配列番号89-92); Beall et al. (1996) Biachem J 313, 633-40;およびSteitz et al. (1998) FEBS Lett 430, 158-64)。

【０００５】
ケモカインは接着分子と共同して炎症および組織損傷の特定部位に白血球のサブセットを補充する。一般に、ケモカインおよびケモカイン・レセプターの発現はオートクリン型またはパラクリン型で作用するケモカインを伴う疾患においてアップレギュレートされる(Glabinski et al., Int. J. Dev. Neurosci., 13: 153-65, 1995; Furie and Randolph, Am. J. Pathol., 146: 1287-301, 1995; Benveniste, E.N., J. Mol. Med., 75:165-73, 1997; Schall et al., Current Biol. 6: 865-73, 1994; Taub et al., Ther. Immunol., 1: 229-46, 1994; Baggliolini et al., Adv. Immunol., 55: 97-179, 1994;およびHaelens et al., Immunobiol., 195: 499-521,1996)。いくつかのサイトカインとケモカインは共同で働いて神経毒および細胞傷害因子の放出をはじめ、単核食細胞(NMP；単球)のほとんどの機能を調節する。

【０００６】
ひと度、単核食細胞(NMP)、特にCNSにおいて見られる独特なクラスの単核食細胞(NMP)である、活性型の小グリア細胞を浸潤することにより分泌されれば、ケモカインは、好中球、好酸球、好塩基球、Ｔリンパ球およびナチュラルキラー細胞をはじめとする他の数種の白血球細胞の化学誘引を担う。in vitroにおける研究では、リポ多糖(LPS)、IL-1、IFN-γおよびTNF-αをはじめとする種々の刺激物質が種々の中枢神経系(CNS)および他の細胞種からケモカインの発現および分泌を誘導することが示されている(Proost et al., J. Leukoc. Biol., 59: 67-74, 1996; Graves et al., Crit. Rev. Oral Biol. Med., 6: 109-18, 1995; Hayeshi et al., J. Neurommunol. 60: 143-50, 1995;およびHurwitz et al., J Neuroimmunol., 57: 193-8, 1995)。例えば、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、マクロファージ阻害タンパク質-1(MIP-1β)、およびRANTES(Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)などのケモカインの産生は星状細胞、小グリア細胞および白血球から誘導され得る(Proost et al., J Leukoc. Biol., 59: 67-74, 1996; Graves et al., Crit. Rev. Oral Biol. Med., 6: 109-18, 1995; Hayashi et al., J. Neuroimmunol. 60: 143-50, 1995;およびHurwitz et al., J Neuroimmunol., 57:193-8, 1995)。細胞培養研究において、これらのケモカインは小グリア細胞およびマクロファージの走化性および活性化を誘導することが示されている(Graves et al., Crit. Rev. Oral Biol. Med., 6:109-18, 1995; Hayashi et al., J. Neuroimmunol. 60:143-50, 1995;およびHurwitz et al., J Neuroimmunol., 57:193-8, 1995; Sun et al., J. Neurosci. Res., 48: 192-200, 1997;およびPeterson et al., J. Infect. Dis., 175: 478-81, 1997)。このようにケモカインは種々の白血球およびMNP細胞群からの反応性酸素種、分解性酵素、

ならびに炎症性で有毒なサイトカインの産生および放出を誘導するものと思われる(Glabinski et al., Int. J. Dev. Neurosci., 13: 153-65, 1995; Furie and Randolph, Am. J. Pathol., 146: 1287-301, 1995; Benveniste, E.N., J. Mol. Med., 75: 165-73, 1997; Schall et al., Current Biol., 6: 865-73, 1994; Taub et al., Ther. Immunol., 1: 229-46, 1994; Proost et al., J. Leukoc. Biol., 59: 67-74, 1996; Graves et al., Crit. Rev. Oral Biol Med., 6: 109-18, 1995; Hayashi et al., J. Neuroimmunol. 60: 143-50,1995; Hurwitz et al., J Neuroimmunol., 57: 193-8, 1995; Sun et al., J. Neurosci. Res., 48: 192-200, 1997; Peterson et al., J. Infect. Dis., 175: 478-81, 1997; Leonard et al., Immunol. Today, 11: 97-103, 1990およびFahey et al., J. Immunol., 148: 2764-9, 1992; Ali et al., Adv. Rheumatol., 81: 1-28, 1997)。

【０００７】

ケモカインメンバーのMCP-1、MIP-Ｉβ およびRANTESは、脳に対する機械的損傷後に星状細胞およびマクロファージで発現することが分かっている(Glabinski et al., Int. J. Dev. Neurosci., 13: 153-65, 1995;およびGhirnikar et al., J. Neurosci. Res., 46: 727-33, 1996)。これらの研究では、研究下にあるケモカインの発現を、反応性グリオーシスの兆候および損傷部位におけるMNPの出現と相関させた。ラットの限局性脳虚血後のMNPおよび星状細胞においてMCP-1およびMIP-ｌαの発現が検出されており(Kim et al., J. Neuroimmunol., 56: 127-34, 1995; Gourmala et al., J. Neuroimmunol., 74: 35-44, 1997; およびTakami et al., Neurosci. Lett., 277: 173-6, 1997)、多発性硬化症の動物モデルであるEAEにおける種々のケモカインの発現を研究した研究者もいる(Berman et ao., J. Immunol., 156: 3017-23, 1996;およびAdamus et al., J. Neurosci. Res., 50: 531-8, 1997)。また、MCP-1を過剰発現するトランスジェニックマウスはMNPおよび白血球のCNSへの著しい浸潤を示すことが示されている(Fuentes et al., J. Immunol., 155: 5769-76, 1995)。

【０００８】

多くのサイトカインおよびケモカインの発現レベルは無数の種の癌の進行中に上昇し、それを調節することが報告されている(Van Mier, Glia, 15: 264-88, 1995)。例えば、白血病のヒト・マスト細胞は、MCP-1、I-309、MIP-ｌα、MIP-1β、RANTESおよびIL-8をはじめとする複数のケモカインの供給源となるようである。ある研究では、正常成人組織は極めて低レベルのRANTESしか発現しないが、リンパ腫をはじめとする多種の癌でその発現が極めて増強されることを報告している(von Luettichau, et al., Cytokine, 8:89-98)。同様に、MCP-3の発現レベルも多くの腫瘍細胞系統で増強される(Murakami, et al., DNA Cell Biol. 16:173-83)。

【０００９】

サイトカイン(例えばIL-1、IL-6およびTNF-α)およびケモカイン(例えばIL-8、MCP-1、MIP-1α、MIP-1βおよびRANTES)は二次的組織損傷をはじめとする多くの症状および疾病の病因に関連付けられている。それらは慢性関節リウマチをはじめとする炎症性関節疾患の病因に関連づけられている(Rathanaswami et al., J. Biol. Chem. 268: 5834-9, 1993; Badolato and Oppenhiem, Semin. Arthritis Rheum., 2: 526-38, 1996; De Benedetti et al., Curr. Opin. Rheumatol., 9: 428-33, 1997; Viliger et al., J. Immunol., 149: 722-27, 1992; Hosaka et al., Clin. Exp Immunol., 97: 451-7, 1994; Kunkel et al., J. Leukoc. Biol., 59: 6-12, 1996)。反応性酸素種、タンパク質分解酵素および種々のサイトカインをはじめとするMNPからの炎症性メディエーターの放出は関節炎の状態において組織損傷の誘導と持続に関連する(Kunkel et al., J. Leukoc. Biol., 59: 6-12,1996; Badolato and Oppenhiem, Semin. Arthritis Rheum., 2: 526-38, 1996)。

【００１０】

ケモカイン・レセプター

ケモカインはＧタンパク質と結合した細胞表面レセプターを介してそれらの活性を媒介する。CXCケモカインが結合する５種のレセプター(CXCR1-5)とCCケモカインが結合する10種のレセプター(CCR-2AおよびCCR-2Bを含むCCR1-9)が同定されている。ダッフィ抗原レセプ

ターと呼ばれるあるメンバーはCCおよびCXCケモカインと結合する。

【００１１】

小グリア細胞などの炎症細胞は数種のケモカイン・レセプターを発現し、１つのレセプターに１を超えるケモカインが結合し得る。例えば、β-ケモカイン・レセプターCCR3(He et al., Nature, 385: 645-49. 1997)はMCP-3、MCP-4およびRANTESと結合するだけでなく、他の２種のCCケモカインエオタキシンおよびエオタキシン-2とも結合する(Jose et al., J. Exp. Med., 179: 881-7, 1994; Jose et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 205: 788-94, 1994; Ponath et al., J. Clin. Invest, 97: 604-12, 1996; Daugherty et al., J. Exp. Med. 183: 2349-54, 1996;およびForssman et al., J. Exp. Med., 185: 2171-6, 1997)。エオタキシンおよびエオタキシン-2はCCR3特異的である(Ponath et al., J. Clin. Invest, 97:
604-12, 1996; Daugherty et al., J. Exp. Med. 183: 2349-54, 1996;およびForssman et al., J. Exp. Med., 185: 2171-6, 1997)。

【００１２】

二番目の例はα-ケモカインCXCR4(フシン)HIV共同レセプターである。このレセプターに特異的に結合する３種のケモカイン(間質細胞由来因子SDF-1α、SDF-1βおよびSDF-2)が同定されており、これは炎症細胞の種々のサブセットに存在し、極めて効力のあるMNP細胞誘引物質である(Ueda et al., J. Biol. Chem., 272: 24966-70, 1997; Yi et al., J. Virol., 72: 772-7, 1998; Shirozu et al., Genomics, 28:495-500. 1995(配列番号93); Shirozu et al., Genomics, 37: 273-80, 1996; Bleul et al., J. Exp. Med, 184: 1101-9, 1996; Tanabe et al., J. Immunol. 159: 905-11, 1997;およびHamada et al., Gene, 176: 211-4, 1996)。

【００１３】

炎症性疾患、二次的組織損傷およびケモカイン

ケモカインは種々の生物学的活性を有する。それらは最初に白血球の移動と活性化を刺激する能力により単離された。それらは造血始原細胞の増殖の負の調節を行うことが分かっており、いくつかのCXCケモカインは血管形成を調節することができる。それらは成人性呼吸困難症候群、心筋梗塞、慢性関節リウマチおよびアテローム性動脈硬化症などの炎症性の組織破壊に関わる多くの疾病において役割を果たし得る。

【００１４】

炎症応答は組織損傷または外傷部位に蓄積して望ましくない外因性のもの（他微生物）または内因性のもの（例えば、癌細胞クローン）を体内から除去し、細胞残渣を除去し、さらに組織および創傷治癒にあずかる免疫防御細胞に媒介される。残念ながらこれらの修復（炎症）プロセスに関与する分子機構は、次ぎにいくつかの炎症性疾患の病因および病状の持続の一因となる二次的組織損傷を誘発し得る。ヒトにおけるほとんどの炎症性疾患において、二次的組織損傷に関与するこれらの分子機構、ならびに細胞および化学メディエーターは同一でないにしても類似のものである。一例として、中枢神経系(CNS)外傷および疾患における二次的組織損傷に関与するプロセスについて以下に概略を示す。

【００１５】

脊髄損傷(SCI)および全身性化中枢神経系(CNS)外傷に関する研究では、数時間内に見られる二次的組織損傷の明確な兆候が数週間進行することがあり、その後部分的に回復していく。虚血、浮腫、興奮性アミノ酸の増加、および反応性酸素種による組織の酸化傷害をはじめとする外傷後の脊髄における二次損傷の拡大には多くの因子が関与している。好中球およびマクロファージは活性化されると反応性酸素種を減少させるので、脊髄損傷後に起こる脂質の過酸化の一因となり得る。二次的組織損傷は細胞死、グリア細胞に搬痕をもたらすアストログリオーシス、新血管新生、脱髄、ならびに感覚および運動機能の喪失、すなわち麻痺として検出できる。二次損傷および部分的回復の経過は損傷部員の炎症程度に相関しており(Blight, A.R., J. Neurol. Sci. 103: 156-71, 1991; Dusart et al., Eur. J. Neurosci. 6: 712-14, 1994;およびGehrmann et al., Brain Res. Rev., 20: 269-87, 1995)、これらの結果の基礎にある分子機構は多発性硬化症(MS)、脳脊髄炎、アルツハ

イマー症(AD)、AIDS性痴呆合併症、海綿上脳脊髄炎および腺白質萎縮症に関連する損傷に介在するものと同様であると考えられる(Raine, C.S., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53: 328-37, 1994; Sobel, R.A., Neurol. Clin., 13: 1-21, 1995; Dickson et al., Glia 7: 75-83, 1993; Benveniste, E.N., Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis., 72: 71-88, 1994; Benveniste, E.N., J. Mol. Med., 75: 165-73, 1997; Sippy et al., J. Acquir. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 10: 511-21, 1995; Giulian et al., Neurochem. Int., 27: 119-37, 1995a; Christie et al., Am. J. Pathol., 148: 399-403, 1996; El Khoury et al., Nature 382: 716-19, 1996; Powers, J.M., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 54: 710-9, 1995;およびUhleisen et al., Neuropathol. App. Neurobiol., 21: 505-517,1995)。

【００１６】

一般に小グリア細胞はCNSの内在免疫エフェクター細胞であると受け取られている(Gehrmann et al., Brain Res. Rev., 20: 269-87, 1995; Giulian, D., J. Neurosci. Res., 18: 155-171, 1987;およびGiulian et al., J. Neurosci., 15: 7712-26, 1995b)。小グリア細胞および損傷後に活性化されるもう１つのクラスのMNPである浸潤性マクロファージは、いくつかのプロ炎症性サイトカインならびに神経傷害因子およびその他の細胞傷害因子の産生および分泌により、また細胞表面免疫分子のde novo発現により二次的細胞傷害をもたらす(Giulian et al., J. Neurosci., 9: 4416-29, 1989; Giulian et al., Ann. Neurol., 27: 33-42, 1990; Gehrmann et al., Brain Res. Rev., 20: 269-87, 1995; Sobel, R.A., Neurol. Clin., 13: 1-21, 1995; Dickson et al., Glia 7: 75-83, 1993; Benveniste, E.N., Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis., 72: 71-88, 1994; Sippy et al., J. Acquir. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 10: 511-21, 1995;およびGiulian et al., Neurochem. Int., 27: 119-37, 1995a)。

【００１７】

小グリア細胞はin vitroで大グリア細胞の増殖を促進するサイトカインであるインターロイキン1(IL-1)を産生、分泌する(Giulian et al., J. Neurosci., 8: 709-14, 1988)。研究では、IL-1の脳内浸潤が、損傷部位において小グリア細胞およびマクロファージの出現後にはじめて検出できるアストログリオーシスおよび新血管新生を刺激することができることが示されている(Giulian et al., J. Neurosci., 8: 2485-90, 1988;およびGiulian et al., J. Neurosci., 8: 709-14, 1988)。CNS外傷後１ないし２日目に小グリア細胞および血液に運ばれるマクロファージの最大数が認められるが、この期間はIL-1の産生ピークと関連していた(Giulian et al., J. Neurosci., 9: 4416-29, 1989)。これらの結果を考え合わせると、MNPがIL-1を介したアストログリオーシスの刺激を担っているということが示唆される。さらに、活性化された小グリア細胞は、CNSのいくつかの炎症性疾患いくつかの著しい役割を果たすことが分かっているサイトカインである腫瘍壊死因子α(TNF-α)を分泌する(Gehrmann et al., Brain Res. Rev., 20: 269-87, 1995)。TNF-αおよびIL-1は星状細胞にTNF-αおよび顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をはじめとする数種のサイトカインを産生される。星状細胞以外の反応性小グリア細胞もインターロイキン3(IL-3)を合成、分泌する。GM-CSF、IL-3およびインターロイキン-4(1L-4)はMNPの有効なマイトジェンである(Giulian et al., J. Neurosci., 12: 4707-17, 1988; Giulian et al., Dev. Neurosci., 16: 128-36, 1994; Gebicke-Haerter et al., J. Neuroimmunol. 50: 203-14, 1994; Lee et al., Glia 12: 309-18, 1994;およびSuzumura et al., J. Neuroimmunol., 53: 209-18, 1994)。生理学的には、正のフィードバック回路が確立され、それによりMNPが増殖してより多くの大グリア因子が産生され、これが損傷部位にグリア細胞の搬痕をもたらす。大グリア細胞の搬根は損傷部位で創傷を封じるが、最終的には周囲のニューロンの軸索の再生を妨げ得る

【００１８】

MNPはまた、興奮性アミノ酸N-メチル-D-アスパラギン酸レセプターを介してその作用を発揮すると考えられるいくつかの神経傷害物質を分泌する。これらの神経毒としては、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩およびキノリン酸が挙げられる。最初の２つの化合物は外

傷的脳損傷のモデルにおいて高濃度で認められ(Faden et al., Science 244: 798-800, 1989;およびRanter et al., Ann. Neurol., 27: 96-99, 1990)、キノリン酸は脊髄損傷挫傷のモデルにおいて認められる(Blight et al., Brain Res., 632: 314-16, 1993;およびPopovich et al., Brain Res., 633: 348-52, 1994)。別の神経傷害性NMDAレセプターリガンドは、ニューロンに特異的であるが大グリア細胞または乏突起膠細胞には作用しないと考えられると報告されている(Giulian et al., J. Neurosci., 13: 29-37, 1993;およびGiulian et al., J. Neurosci. Res., 36: 681-93, 1993)。さらに、神経傷害性アミン(Ntox)は、HIV-1陽性患者から単離された小グリア細胞および末梢MNPから産生されることが示されている(Giulian et al., J. Neurosci. 16: 3139-53, 1996。

【００１９】

活性化された小グリア細胞およびMNPはプラテイナーゼ、反応性酸素種、および窒素酸化物(NO)をはじめとするその他数種の有害な物質を放出する(Hartung et al., J. Neuroimmunol., 40: 197-210, 1992;Banati et al., Glia 7: 111-8, 1993;およびAli et al., Adv. Rheumatol., 81: 1-28, 1997)。プロテイナーゼは直接ミエリンを分解し、細胞外マトリックスタンパク質のタンパク質分解に関わっている(Hartung et al., J. Neuroimmunol., 40: 197-210, 1992;およびRomanic et al., Brain Pathol., 4: 145-46, 1994)。このようにMNP由来プロテアーゼ放出の増加は細胞外マトリックスおよびミエリンの崩壊に寄与し、それにより二次的組織損傷の領域を拡大するものと考えられる。また、反応性酸素中間体はインターフェロン-γ(IFN-γ)およびTNF-αに応答して小グリア細胞によって放出される。これらの酸素ラジカルは脂質の過酸化を担い、これが細胞膜の崩壊をもたらすが、この特異的標的がニューロン、乏突起膠細胞およびミエリン鞘自身である。ヒト小グリア細胞はIL-1、IFN-γおよびTNF-αを提供することにより星状細胞によるNOの産生を調節し得る(Chao et al., J. Leukoc. Biol. 1: 65-70, 1995)。

【００２０】

MNPはIL-1、TNF-α、IL-3、IL-4、GM-CSFおよびIFN-γをはじめとする数種のサイトカインを産生、分泌およびそれらに応答する。これらのサイトカインはMNPの大部分の機能、特にMNP上での細胞表面マーカーの発現を調節することができる。in vitroにおける研究では、TNF-αは乏突起膠細胞に直接細胞傷害性を示し、ミエリンの小グリア細胞を刺激することが証明されている(Zajicek et al., Brain 115: 1611-31, 1992;およびSoliven and Szuchet, Int. J. Dev. Neurosci., 13: 351-67, 1995)。さらに、TNF-αは実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)およびその他いくつかの脱髄疾患の病因に関与している(Selmaj et al., J. Neuroimmunol., 56: 135-41, 1995; Renno et al., J. Immunol., 154: 944-53, 1995; Redford et al., Brain, 118: 869-78, 1995; Probert. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11294-8, 1995;およびProbert et al., J. Leukoc. Biol., 59: 518-25, 1996).

【００２１】

GM-CSF、IL-3およびIL-4はMNPの効力あるマイトジェンであり(Giulian et al., J. Neurosci., 12: 4707-17, 1988c; Giulian et al., Dev. Neurosci., 16: 128-36, 1994; Gebicke-Haerter et al., J. Neuroimmunol., 50: 203-14, 1994; Lee et al., Glia 12: 309-18, 1994;およびSuzumura et al., J. Neuroimmunol., 53: 209-18, 1994)、ミエリンのより迅速な食作用を誘導すると考えられ(Giulian et al., J. Neurosci., 12: 4707-17, 1988９およびSmith, M.E., J. Neurosci. Res., 5: 480-487, 1993)、これが自己免疫炎症性疾患の病因の一因となる(Giulian et al., J. Neurosci., 12: 4707-17, 1988c; Giulian et al., Dev. Neurosci., 16: 128-36, 1994: Gebicke-Haerter et al., Neuroimmunol. 50: 203-14, 1994; Lee et al., Glia 12: 309-18, 1994; Suzumura et al., J. Neuroimmunol., 53: 209-18, 1994;およびSmith, M.E., J. Neurosci. Res., 5: 480-487, 1993)。例えば、AIDS患者ではMNP特異的なTNF-αレセプターのアップレギュレーションが証明されており(Dickson et al., Glia 7: 75-83, 1993;および Sippy et al., J. Acquir. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 10: 511-21, 1995)、顔面神経損傷の動物モデルではGM-CSFレセプターのアップレギュレーションが証明されている(Raivich et al., J. Ne

urosci. Res. 30: 682-6, 1991)。さらに、CNS外傷または疾患においては、新たに活性化された小グリア細胞および浸潤性マクロファージは低密度リポタンパク質(LDL)/マクロファージスカベンジャーレセプターの発現を増加させるが(Christie et al., Am. J. Pathol., 148: 399-403, 1996; Elkhoury et al., Nature 382: 716-19, 1996; Giulian, D., J. Neurosci. Res., 18: 155-171, 1987; Giulian et al., J. Neurosci., 73: 29-37, 1993a;およびBell et al., J. Neurocytol., 23: 605-13, 1994)、これがこれらの症状における高い食作用活性の理由であると思われる。

【００２２】

MNPおよび白血球はまた、種々の腫瘍、皮膚、眼、腎臓、肺をはじめとする数種の非CNS系炎症性疾患および炎症性関節疾患に関連する病態生理学（二次的組織損傷を含む）にも関与している。サイトカインおよびケモカインはこれらの応答を調節する際の手段となる(Furie and Randolph, Am. J. Pathol., 146: 1287-301, 1995; Baggiolini et al., Adv. Immunol. 55: 97-179, 1994; Schall et al., Current Biol., 6: 865-73, 1994; Howard et al., Trends Biotechnol., 14: 46-51, 1996; Strieter et al., J. Immunol., 156: 3583-86, 1997; Taub et al., Ther. Immunol., 1: 229-46, 1994; Driscoll et al., Environ. Health Perspect., 105: Suppl 5: 64: 1159-64, 1997)。

【００２３】

固形腫瘍疾患では、MNPは腫瘍の血管形成を誘導することが示されており(Leek et al., J. Leukoc. Biol., 56: 423-35, 1994; Sunderkotter et al., J. Leukoc. Biol., 55: 410-22, 1994)、種々の形態の固形腫瘍のリンパ細網浸潤物の主要な化合物であり、乳癌では細胞塊の50%近いことが分かっている(Lewis et al., J. Leukoc. Biol. 51: 747-51, 1995)。

【００２４】

小グリア細胞を含むMNPはまた、IL-2、IL-6、IFN-γ、IL-8およびMCP-1をはじめとするサイトカインおよびケモカインのレベルが高められるので(Abu el Asrar et al., Am. J. Ophthalmol., 123: 599-606, 1997; Aksunger et al., Ophthalmologica, 211: 223-5, 1997; Kernova et al., Eur. J. Ophthalmol., 7: 64-67, 1997)、増殖性硝子体網膜症をはじめとする眼疾患の病因にも関与している(Weller et al., Exp. Eye Res., 53: 275-81, 1991; Charteris et al., Ophthalmology, 100: 43-46, 1993)。上記の知見は脊髄損傷の病状をはじめいくつかの炎症病状が、二次的組織損傷を誘発する細胞種の増殖、移動または生理学的活性化に関連していることを証明するものである。

【００２５】

二次的組織損傷の治療およびその他の炎症病状

目下、二次的組織損傷およびその他関連病状ならびに炎症病状の治療は十分開発されていない。動物モデルでは、コルヒチン処理が損傷組織のMNPの数を減らし食作用および分泌機能の阻害の他、アストログリオーシスおよび新血管新生の阻害の助けとなることが示されている(Giulian et al., J. Neurosci., 9: 4416-29, 1989; Giulian et al., Ann. Neurol., 27: 33-42, 1990;およびGiulian et al., J. Naurosci., 13: 29-37, 1993)。しかしながらコルヒチンは選択性のある毒素ではないので、ヒトの治療のために実施可能な治療薬とはいえない。SCI治療および二次的組織損傷の予防に対する現行の薬理学的アプローチは、細胞レベルで起こる単一の生物学的事象、例えばMNDAアンタゴニストおよびフリーラジカルスカベンジャーを用いて興奮性アミノ酸または反応性酸素種の細胞傷害作用を阻害することに中心が置かれている(Faden et al., Trends Pharmacol Sci 13: 29-35, 1992;およびMclntosh, T.K., J. Neurotrauma, 10: 215-61, 1993)。いくつの薬剤では二次的組織損傷に対する絶大な作用が証明されている。現在SCIの二次損傷に向けて用いられている薬剤はステロイドメチルプレドニソロンおよびその合成21アミノステロイド（ラザロイド）誘導体（例えば、トリシラザド）であり、これらは酸素フリーラジカルスカベンジャーとして働く。しかしながらラザロイドの望ましくない副作用は、SCIのある動物モデルで見られたグリオーシスの誘発(Gonzalez-Deniselle et al., Cell Mol. Neurobiol., 16: 61-72, 1996)および創傷が脊髄へ侵入したヒトで見られるような運動および感

覚機能の喪失(Prendergast et al., J. Trauma, 37: 576-9, 1994)が含まれると考えられる。ステロイドはまた、ほとんどの炎症性疾患に対して選択される治療薬でもあるが、副作用を和らげることによりそれらの作用は著しく妨げられ、長期間のステロイド治療は実用的な臨床選択とはいえない。

【００２６】

従って、二次的組織損傷を含む炎症応答を誘発する細胞の増殖、移動および／または生理学的活性に関連する炎症病状を効果的治療する、また二次的組織損傷を治療するより包括的なアプローチの必要がある。

【００２７】

発明の概要

本明細書では、二次的組織損傷を誘発する細胞を含む、免疫エフェクター細胞の活性化、増殖および移動に関連する病状を治療する方法が提供される。詳しくは本明細書で提供される方法は、これらのターゲッティングされる免疫エフェクター細胞の活性化、増殖および移動を阻害する有効量の治療薬の投与によりこれらの病状を治療するためのものである。好ましくは治療薬はかかる細胞に直接的に毒性を持つ。ターゲッティングされる免疫エフェクター細胞としては、限定されるものではないが、樹状細胞、小グリア細胞、単球およびマクロファージなどの単核食細胞(MNP)；好塩基球、好中球および好酸球などの白血球；ならびにナチュラルキラー細胞、Ｔ細胞リンパ球およびＢ細胞などのリンパ球が挙げられる。

【００２８】

これらの方法で使用できる治療薬もまた提供される。これらの薬剤はケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントおよびターゲッテッド・エージェントを含有するリガンド-毒素複合体である。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントはケモカイン・レセプターを発現する細胞をターゲッティングする。かかる細胞には、二次的組織損傷を誘発する細胞をはじめ、免疫応答に関連する免疫エフェクター細胞が含まれる。ある実施態様では、リガンド-毒素キメラは、細胞毒と、ケモカインまたは１以上の二次的組織損傷誘発細胞に特異的なケモカインでないサイトカインのようなタンパク質性リガンド成分またはその生物学上機能的な断片を含む。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントを含む複合体もまた提供される。

【００２９】

１以上のターゲッテッド・エージェントと直接またはリンカーを介して結合した１以上のケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントを含む複合体もまた提供される。詳しくは、本明細書において提供される複合体は以下の構成要素：(ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント)$_n$、(L)$_q$および(ターゲッテッド・エージェント)$_m$を含み、ここではケモカインペプチドまたはケモカイン・レセプター特異的抗体、もしくはその有効な一部といった、少なくとも１つのケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントが、少なくとも１つのターゲッテッド・エージェントと直接または１以上のリンカー(L)を介して結合している。Lはリンカーを指す。得られる複合体がターゲッテッド・エージェントと相互作用して、結合されているターゲッテッド・エージェントの取り込みが達成される限り、複合体の要素間の好適な結合のいずれもが意図される。これらの複合体は、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントの他、ケモカインでないサイトカインを含んでもよい。かかるケモカインでないサイトカインは一般に、免疫エフェクター細胞、特にケモカイン種が結合する白血球集団と結合するものの中から選択される。

【００３０】

変数nおよびmは1以上の整数であり、かつ、qは0またはいずれかの整数である。変数n、qおよびmは、得られる複合体がターゲッテッド・エージェントと相互作用して、そのターゲッテッド・エージェントがそれに対してターゲッティングされていた細胞により取り込まれるように選択する。典型的にはnは1から3の間であり；結合されているターゲッティング・エージェントおよびターゲッテッド・エージェントの数および／またはリンカー官

能基にもよるが、qは0以上であり、qは一般に1から4であり；mは1以上、一般には1または2である。複合体中にターゲッテッド・エージェントが１以上存在する場合、これらのターゲッテッド・エージェントは同一であっても異なっていてもよい。同様に、複合体中にケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントが存在する場合、それらは同一であっても異なっていてもよい。

【００３１】

本明細書において提供される複合体は融合タンパク質として製造してもよく、化学的に結合していてもよいし、または融合タンパク質部分および化学的に結合した部分、またはそのいずれかの組み合わせを含んでもよい。本明細書の目的のためには、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントはいずれの薬剤であってもよいが、典型的には白血球上にあるものなどのケモカイン・レセプターと特異的に相互作用し、レセプターと相互作用した際に結合または会合した、ターゲッティングされる細胞に取り込ませようとする細胞傷害剤またはその他の治療製剤のようなターゲッテッド・エージェントを取り込ませるポリペプチドである。現在のところ好ましいケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとしては、限定されるものではないが、下記の表１に示されているものが挙げられる。本明細書において提供される複合体はケモカイン・レセプターの限定された分布と、炎症応答に関連する、特に二次的組織損傷およびある種の病状に関連する病理学的応答に関連する細胞へのそれらの局在化を利用するものである。本明細書において提供される複合体の利点は、炎症性疾患または炎症プロセスに関連する比較的小さな細胞集団に結合するターゲッティング・エージェントとしてケモカインまたはその他のかかる作用剤が選択されることである。かかる細胞集団におけるかかるレセプター分布および特異性によって、このような複合体を用い、有毒物質をはじめ結合した作用剤の、選択された細胞または組織への送達をターゲッティングして、細胞死をもたらしたり、ターゲッティングされる細胞の増殖を阻害したり、あるいはその生存を高めたり助けたりすることができる。上記は各成分が結合する順序または各成分が結合する様式を示すものではないと理解される。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントおよびターゲッテッド・エージェント（またはリンカーおよびターゲッテッド・エージェント）は、得られる複合体がケモカインが結合するレセプターと結合して、該レセプターを有する細胞においてターゲッテッド・エージェントを取り込ませる限り、いずれの順序で結合してもよいし、適当ないずれの結合によって結合してもよい。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントは典型的にはポリペプチドであり、そのＮ末端もしくはその付近、またはそのＣ末端もしくはその付近、または内部のいずれかの位置でターゲッテッド・エージェントまたはリンカーと結合していてよい。現在のところ、ターゲッテッド・エージェントがケモカインのアミノ末端またはその付近、約20、特には10アミノ酸内で直接またはリンカーを介して結合している複合体が好ましい。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントは１以上のターゲッテッド・エージェントと結合していてもよく、あるいは１以上のターゲッテッド・エージェントは１以上のケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントと結合していてよい。複数のターゲッティング・エージェントおよび／またはターゲッテッド・エージェントが結合する場合、それらは同一であっても異なっていてもよい。好ましくは、ケモカインがターゲッティング・エージェントである場合、ターゲッテッド・エージェントはケモカインのＣ末端と結合する。

【００３２】

複数のターゲッティング・エージェントおよび／またはターゲッテッド・エージェントを含む複合体が提供される。このように、１以上のターゲッテッド・エージェントと結合した複数、一般に少なくとも２つのケモカイン・ターゲッティング・エージェントを含む複合体も提供される。いくつかのケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントおよびターゲッテッド・エージェントを含むこれらの複合体は、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントをコードする核酸の複数のコピーを、単一のプロモーター領域の転写制御下で、好ましくはヘッド対ヘッドおよび／またはテール対テールの融合タンパク質として結合させることにより産生することができる。例えば（図１を参照

）、式：ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント-リンカー-毒素で示される、毒素がそのアミノ末端でケモカイン成分のカルボキシ末端と結合した融合タンパク質が提供される。また、例えば、毒素がそのカルボキシ末端でケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントのＣ末端と結合した融合タンパク質も提供される。２つのケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントは同一であっても、異なっていてもよい。これらの融合タンパク質は式：ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント-リンカー-毒素-ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントで示される。現在のところ１または２つのケモカイン・レセプター結合タンパク質が好ましい。第２のケモカイン・レセプター結合タンパク質を用いる場合、それはそのカルボキシ末端で毒素の空いている末端と結合させる。１または複数のケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントが１または複数のターゲッテッド・エージェントに結合したその他の要素の組み合わせも提供される。上記で示されたように、これらの複合体はケモカインでないサイトカインをさらに含んでもよい。

【００３３】

これらの複合体は化学結合により、または例えばリボソーム不活化タンパク質(RIP)などのターゲッテッド・エージェントをコードするDNAがリンカー領域により、またはリンカー領域なしにケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントをコードするDNAに結合した融合タンパク質の発現により製造することができる。これらの複合体はまた、化学結合、典型的には成分に存在する、もしくは成分に付加したシステイン残基間のジスルフィド結合により、あるいはアミド結合またはその他の好適な結合によって製造してもよい。イオンまたはその他の結合も考えられる。ターゲッテッド・エージェント-$(L)_q$-ケモカイン・レセプター結合部分-$(L)_q$-ケモカイン・レセプター結合部分の形の複合体が特に注目される。

【００３４】

ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントは、ケモカインが特異的に結合するレセプターに特異的に結合するいずれの作用剤であってもよい。これらの作用剤には、限定されるものではないが、ケモカイン、抗体、ならびにレセプターと相互作用して会合または結合したターゲッテッド・エージェントの取り込みを達成できる能力を保持するケモカインおよび抗体の断片が含まれる。これらの作用剤には、IL-4、CSFおよびケモカイン・レセプターとは特異的に結合しないのが典型であるその他のサイトカインなど、ケモカインでないサイトカインは含まれない。抗体がターゲッティング・エージェントである場合、抗体はケモカイン・レセプターに特異的なものの中から、好ましくはケモカインとケモカイン・レセプターとの結合に拮抗し、それにより結合した作用剤を取り込ませるだけでなく、ケモカインの結合を競合的に阻害するものの中から選択される。

【００３５】

ターゲッテッド・エージェントは、ある細胞集団または組織への送達のターゲッティングが望まれるいずれの作用剤であってもよい。これらの作用剤には、限定されるものではないが、細胞傷害剤、特にリボソーム不活化タンパク質(RIP)、ある種のRIPを含むDNAおよびRNAヌクレアーゼ、および大腸菌(E. coli)コリシンなどのバクテリオシン、ならびに他の毒素、または核酸、またはケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントが結合して、結合または会合しているターゲッテッド・エージェントを取り込ませるレセプターを発現する細胞により取り込ませようとするメトトレキセートなどの薬物、取り込まれた際に細胞内で代謝または遺伝子発現を変更する、タンパク質合成を調節または変更する、増殖を阻害するまたは細胞を死滅させるいずれかの分子が含まれる。その他のかかる作用剤としては、限定されるものではないが、光活性化ポルフィリン、および増殖阻害または細胞死をもたらすアンチセンス核酸；ならびにDNAとの相互作用または共同抑制またはその他のメカニズムを介して遺伝子発現を変更するアンチセンスRNA、DNAおよび末端切断型タンパク質が挙げられる。特定の実施態様では、細胞傷害剤は、例えばサポリン、リシン、志賀毒などのリボソーム不活化タンパク質(RIP)であるが、その他の細胞傷害剤も有利に使用できる。従ってターゲッテッド・エージェントは、ケモカイン・レセプター

・ターゲッティング・エージェントと相互作用する、典型的には結合するレセプターを発現し、かかる相互作用の際に結合または会合しているターゲッテッド・エージェント剤の取り込みが達成される、選択された細胞に取り込ませようとするいずれかの作用剤である。

【００３６】

ターゲッテッド・エージェントはまた、リンカーおよび／またはケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとの複合化により適したものとするため、またはそれらの細胞内活性を高めるために改変してもよい。かかる改変としては、限定されるものではないが、Ｎ末端またはＣ末端またはその付近におけるCys残基の導入、チオール基などの反応基を導入する誘導体化、およびターゲッテッド・エージェントを小胞体に向ける$(XaaAspGluLeu)_n$（配列番号68、ここでXaaはLysまたはArg、好ましくはLysであり、かつ、nは1ないし6、好ましくは1ないし3である）などの選別シグナルの、好ましくはカルボキシ末端における付加（例えば、Seetharam et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17376-17381;およびBuchner et al. (1992) Anal. Biochem. 205:263-270参照）。

【００３７】

リンカーはポリペプチドまたは非ペプチドであり、ターゲッテッド・エージェントとケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとが近接することによる立体障害を軽減または小さくし、かつ／またはターゲッティングされる成分の特異性、毒性、溶解性、血漿安定性および／または細胞内利用度などの複合体のその他の特性を増強または変更する、かつ／またはケモカイン・レセプター結合成分ポリペプチドとターゲッテッド・エージェントの間の結合の可変性を増す、または立体障害を小さくするように選択することができる。

【００３８】

融合タンパク質が意図される場合には、得られる核酸がケモカイン・レセプターを発現する細胞に結合してさらに取り込まれる融合タンパク質をコードし、かつ、取り込まれたタンパク質の全部または一部が好ましくは細胞質へ輸送されるようにリンカーを選択する。各リンカーの有利な特性を利用するためにいくつかのリンカーを結合させてもよい。このような例では、複合体のリンカー部分は50を超えるアミノ酸残基を含み得る。得られる融合タンパク質がケモカイン・レセプターと結合し、ターゲッテッド・エージェントを細胞質または核へ輸送する経路を介して結合したターゲッテッド・エージェントを取り込ませる限り、残基の数は重要ではない。

【００３９】

より好ましいリンカーとしては、融合タンパク質を組み込み、大腸菌などの宿主細胞で発現させることが可能なものがある。かかるリンカーとしては、カテプシンB基質、カテプシンD基質、トリプシン基質、トロンビン基質、サブチリシン基質、因子Xa基質およびエンテロキナーゼ基質などの酵素基質が挙げられ；溶解性、可変性、および／または細胞内切断性を高めるリンカーとしては$(gly_mser)_n$および$(ser_mgly)_n$（式中、mは1ないし6、好ましくは1ないし4、より好ましくは2ないし4であり、かつ、nは1ないし6、好ましくは1ないし4、より好ましくは2ないし4である）などのリンカーがある（例えば、複合体に用いられるリンカー例を示す国際PCT出願第WO 96/06641を参照）。いくつかの実施態様では、各リンカーの望ましい特性を利用するためにいくつかのリンカーを含んでよい。

【００４０】

ケモカインなど、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントが１以上のシステイン残基の欠失によるなどして改変された複合体もまた提供される。一般にケモカインのＮ末端付近の保存されたシステインが活性のために重要であり、その他のシステインは置換してもよい。かかる変更が望まれなければ、得られる改変型ケモカインの特異性を変えないように注意を払わねばならない。すべての場合において特定の改変は経験的に決定できる。

【００４１】

かかる複合体を含有する組成物は低い凝集性を示すはずである。ケモカイン・レセプター

をターゲッティングする部分および／またはターゲッテッド・エージェントが化学法によりリンカーまたはターゲッテッド・エージェントと結合している一方の末端またはその付近にシステイン(Cys)3が付加されることにより改変された複合体もまた提供される。

【００４２】

複合体の調製方法もまた提供される。これらの方法は化学結合法および複合体の組換え製造による方法を含む。化学法はターゲッテッド・エージェントを所望の結合剤で誘導体化し、次いでケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントと反応させることによるものである。誘導体化の化学法は、ケモカイン・レセプターをターゲッティングする成分タンパク質とDNAまたはRNAを結合させるのに、またターゲッテッド・エージェント-$(L)_q$-ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントの複合体を製造するのに特に有用である。化学法を実施すると、いずれかの手段、典型的には細菌または真核宿主でDNAを発現させることによって産生されるケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントがターゲッテッド・エージェントと仮泊的に結合する。ターゲッティング・エージェントまたはターゲッテッド・エージェントが化学結合を達成するのに好適な部分を含んでいなければ、これを誘導体化すればよい。例えば、志賀毒、ゲロニンなどの作用剤またはその他のかかる作用剤はN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SDP)などの結合剤との反応によるなどして誘導体化することができる。その他の実施態様では、志賀A鎖などのターゲッテッド・エージェントはシステイン残基をを含むようにＮ末端またはその付近で改変し、こうして得られた改変型作用剤はさらに誘導体化しなくてもケモカイン・レセプター結合成分タンパク質と反応できる。

【００４３】

複合体の生産の組換え法は、リンカーをコードする核酸と結合したケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントをコードする核酸、あるいはターゲッテッド・エージェントがタンパク質またはポリペプチドである場合には、ターゲッテッド・エージェントをコードする核酸と直接、またはリンカーをコードする核酸を介して結合したケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントをコードする核酸の発現によるものである。好適な宿主に導入され、核酸を発現した際、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントのポリペプチド、リンカーを有するケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント、またはターゲッティングされるポリペプチドまたはポリペプチド物質とリンカーを介してまたは直接結合したケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントが発現する。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・プロテイン、リンカーおよび結合された作用剤の組み合わせ、またはその一部のセットもしくは変異体は組換えDNA技術を用いてキメラとして製造される。融合タンパク質分子はケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント部分がその個々の細胞表面レセプターの認識のために利用され、かかる細胞表面レセプターを有する細胞に対して複合体をターゲッティングして、結合または会合されているいずれかのターゲッテッド・エージェントの取り込みを達成することができるように設計および製造される。組換え発現が用いられる場合、特に細菌宿主が用いられる場合、複合体の好ましい形態はケモカイン・ターゲッティング・エージェント-$(L)_q$-ターゲッテッド・エージェント（すなわち、リガンド-任意のリンカー-毒素）であり、ここでターゲッテッド・エージェントは、ケモカイン・レセプターターゲッティング・エージェントおよび／またはターゲッテッド・エージェントと結合した１以上のさらなるケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントを伴って、または伴わずに、１以上のリンカー部分を介して、または介さずに、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントのＣ末端と結合している。ある例示的な実施態様では、複数のケモカイン・ターゲッティング・エージェントおよび／またはターゲッテッド・エージェントを含む複合体は、N-リガンド-C-(任意のリンカー)-N-ターゲッテッド・エージェント-C-(任意のリンカー)-C-リガンド-N（ここで、NおよびCはそれぞれポリペプチドのアミノ末端およびカルボキシ末端を指し、リガンドはケモカイン・ターゲッティング・エージェントを指す）の形である。

【００４４】

本明細書で提供される、結果として得られる複合体は医薬組成物に、また治療法に使用できる。治療される好ましい疾患は病態生理学的炎症症状である。かかる症状においては、これらの複合体は結合されたケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントにより、選択されたケモカイン・レセプターを有する細胞へターゲッティングされる。細胞障害性部分がターゲッティングされれば、複合体の取り込みにより、増殖阻害または細胞死がもたらされる。かかる病態生理学的症状としては、例えば白血球関連二次的組織損傷、白血球関連固形腫瘍、ならびに白血球および細胞が関連するその他の望ましくない炎症応答が挙げられる。特に二次的組織損傷および関連の病状は、単核食細胞(MNP)、白血球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＴおよびＢリンパ球などの二次的組織損傷誘発細胞の増殖、移動または生理学的活性を阻害する、本明細書で提供される有効量の複合体を、それを必要とする患者に投与することによって治療できる。本明細書で提供される複合体はかかる細胞に直接の毒性があるように、かつ、かかる細胞上にあるターゲッティングされる結合したＧタンパク質、７つの膜貫通ドメイン、ロドプシン様レセプター、特に選択されたケモカイン・レセプターに特的であるように設計することができる。複合体はこれらのレセプターと結合し、標的細胞により取り込まれる。一度細胞内に入れば、治療薬は正常な細胞活性を妨げ、それによりかかる細胞の生物学的活性を抑制するか、または細胞死を引き起こす。かかる複合体を用いた治療方法が提供される。

【００４５】

治療は例えば生理学上許容される賦形剤中の治療上有効な量の複合体を投与することにより達成される。これらの複合体はまた、血管遺伝子またはTNFなどの治療薬の正しいコピーをコードする核酸を、ケモカイン・レセプターを有する細胞へ送達する遺伝子療法に使用してもよい。

【００４６】

典型的な複合体としては、ペプチドリンカーを介して細胞毒と結合したレセプター結合リガンド部分を含有する融合タンパク質がある。リガンドは毒素のカルボキシまたはアミノ末端のいずれに付着させてもよい。適当な細胞表面レセプターに結合すると、融合タンパク質は取り込まれ、毒素部分が酵素的に遊離して宿主細胞に死をもたらす。この融合タンパク質は細胞内ドメインに到達して細胞傷害性を発揮しなければならず、遊離毒素は細胞膜を通過できる機能を本来持たない。

【００４７】

本方法および本明細書で提供される複合体を用いた治療に適した病状としては、限定されるものではないが、CNS損傷、CNS炎症性疾患、神経変性疾患、心疾患、炎症性眼疾患、炎症性腸疾患、炎症性関節疾患、炎症性腎疾患、炎症性肺疾患、炎症性鼻疾患、炎症性甲状腺疾患、およびサイトカインにより調節される癌からなる群より選択される、CNS損傷、CNS炎症性疾患、神経変性疾患、炎症性眼疾患、炎症性腸疾患、炎症性関節疾患、炎症性腎疾患、炎症性肺疾患、炎症性鼻疾患、炎症性甲状腺疾患、およびサイトカインにより調節される癌が挙げられる。脊髄損傷および外傷の治療が特に注目される。

【００４８】

従って、本明細書で提供される方法の１つの態様では、使用される治療薬は、ケモカイン、インターロイキン、リンホカイン、モノカイン、コロニー刺激因子などのタンパク質性リガンド部分、またはDNA切断剤、代謝拮抗物質など、細胞と結合した意図されるレセプターを特異的に認識したレセプター結合タンパク質、またはタンパク質性細胞毒、例えば細菌、植物、昆虫、ヘビもしくはクモ毒を含むリガンド-毒素キメラである。これらのリガンド-毒素キメラは限定されるものではないが、局所、関節内、槽内、眼球内、心室内、鞘内、静脈内、筋肉内、気管内、腹膜内、または皮内を含む選択された送達経路のための処方される。

【００４９】

従って本明細書ではケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント-毒素複合体（ここではケモカイン-毒素複合体と呼ぶ）が提供され、リガンド部分が好ましくはケモカインまたはその生物学的に有効な断片であり、これが好ましくは細胞毒であるター

ゲッテッド・エージェントと結合されている。例えば複合体は、該複合体が選択されたレセプターと相互作用して、結合されているターゲッテッド・エージェントの取り込みを達成するように選択された大きさのポリペプチドリンカーによりタンパク質性細胞毒と結合したケモカインリガンドを有する融合タンパク質であり得る。かかるリンカーはペプチドである場合、典型的には約2ないし約6個のアミノ酸残基である。

【００５０】

また本明細書の方法にはケモカインでないサイトカインの複合体を使用してもよい。これらのケモカインでないサイトカインは、本明細書で治療が意図される二次的組織損傷などの望ましくない炎症応答に関連し、白血球などの細胞上に存在するレセプターと結合するものの中から選択される。

【００５１】

さらに、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントを含む複合体は炎症応答および／またはその潜在的疾患のその他の療法と併用して投与してもよい。例えば、本明細書で提供される、浸潤性腫瘍を白血球でターゲッティングする複合体は、腫瘍を治療するIL-4-毒素複合体などの複合体と併用投与してもよい。組み合わせ療法は同時に行ってもよいし、逐次または間欠的におこなってもよい。

【００５２】

本明細書で提供される方法および組成物には多くの利点があり、その中には細胞毒が、二次的組織損傷などの炎症性の病状に応答する細胞に対して特異的にターゲッティングされ、それにより関係のない細胞への傷害および毒性が最小となるという利点がある。これらの組成物は局所的かつ特異的に送達できるので、細胞毒の全身投与よりも、より高く、より有効な濃度の細胞毒を治療される領域に到達させることができる。

【００５３】

上記のように、本明細書で提供される複合体を使用して、ケモカイン・レセプターまたはケモカインが選択的に結合するレセプターを発現する細胞へその他の作用剤を送達し、結合されている作用剤の取り込みを達成または促進してもよい。

【００５４】

発明の詳細な説明

目次

A. 定義
B. 炎症応答
C. 複合体の成分
1. 概要
2. ケモカイン・レセプター・ターゲッティング部分
a. ケモカイン
b. ケモカインの選択
c. ケモカインでないサイトカイン
d. 抗体リガンド部分
3. ターゲッテッド・エージェント
a. 細胞毒部分
(1) DNA切断剤
(2) 代謝拮抗物質
(3) タンパク質細胞毒
(4) 細菌性細胞毒
(5) ポルフィリンおよびその他の光により活性化される毒素
b. ターゲッティング送達のための核酸
(1) アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん分子、ダンベル状オリゴヌクレオチド、DNA、細胞外タンパク質結合オリゴヌクレオチド、および小ヌクレオチド分子をはじめとするアンチセンスオリゴヌクレオチド
(2) リボザイム

(3) ターゲッティング送達のための治療産物をコードする核酸
(4) 核酸のタンパク質への結合
4. リンカー部分
a. ヘテロ二機能性架橋剤
b. 酸切断性、光切断性および感熱性リンカー
c. 他のリンカー
d. ペプチドリンカー
D. 複合体の調製
1. 融合タンパク質の製造
a. ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント・ペプチド、複合体、リンカー、融合タンパク質、およびペプチド・ターゲッテッド・エージェントをコードする構築物の発現のためのプラスミドならびに宿主細胞
b. リガンド-毒素キメラ融合タンパク質のクローニングおよび発現
c. ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント-毒素融合遺伝子例の構築および発現
2. 化学複合体の製造
E. 複合体を試験する動物モデル
F. 複合体含有組成物の処方および投与
G. 炎症応答および二次的組織損傷に関連する病状

【００５５】

A. 定義
特に断りのない限り、本明細書で用いられる技術用語および科学用語は本明細書に記載の主題が属する技術分野の熟練者に通常理解されているものと同様の意味を有する。本明細書で言及されるすべての特許、係属特許出願、公開出願およびその他の刊行物、ならびにGenBankおよびその他のデータベースからの配列は支障のない限り、出典明示によりそのまま本明細書の一部とされる。

【００５６】

本明細書において複合体とは、１以上のケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント（本明細書ではケモカイン・レセプター結合剤とも呼ばれる）とターゲッテッド・エージェントを含む、本明細書で提供される化合物を指す。これら複合体はまた本明細書においてケモカイン-毒素とも呼ばれ、組換え手段によって融合タンパク質として製造されるもの、化学的手段によって製造されるもの、および他の方法によって製造されるものを含み、それにより少なくとも１つのケモカイン・レセプター結合部分が直接または間接的にターゲッテッド・エージェントに結合され、それによりケモカイン・レセプターへの結合の際にターゲッテッド・エージェントがターゲッティングされる細胞に取り込まれる。従って、複合体とは少なくとも１つのケモカイン・レセプター・ターゲッティング部分および、直接またはリンカーを介して結合されている少なくとも１つのターゲッテッド・エージェントを含み、かつ、化学結合法によって、または核酸キメラ分子を発現させて融合タンパク質を産生させる組換え法によって製造される分子を指す。

【００５７】

本明細書においてケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとは、細胞上のケモカイン・レセプターと特異的に結合して結合または会合されていたターゲッテッド・エージェントの取り込みを達成する分子またはリガンドのいずれをも指す。ケモカイン・レセプター結合部分としては、限定されるものではないが、ケモカインがそれに対してターゲッティングされる細胞表面タンパク質と結合して、リガンド含有融合タンパク質の細胞への取り込みを促進することができるポリペプチドのいずれもが挙げられる。かかるリガンドとしては、増殖因子、抗体またはその断片、ホルモン、ケモカイン、ケモカイン・レセプターと特異的に結合して、結合されているいずれかのターゲッテッド・エージェントの取り込みを達成する抗体、およびこれを達成するケモカインまたは抗体の断片が挙げられる。レセプターに結合し、結合されているターゲッテッド・エージェントが取り

込まれるのに有効な抗体の断片または部分の同定は、例えば細胞傷害剤と結合した断片を試験し、本明細書で記載されているまたは当業者に公知のいずれかのアッセイを用いて細胞死を探すことにより、実験的に行うことができる。従って、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントには、限定されるものではないが本明細書に記載のクラス、ならびに全長ペプチドが特的に結合する細胞表面レセプターまたはタンパク質へ、結合されているターゲッテッド・エージェントを向け、レセプターまたはタンパク質が存在する細胞による取り込みが促進されるまたは可能とするに十分なその末端切断型および一部を含む、ケモカインと同定・表記されるペプチドのすべてが含まれる。

【００５８】

本明細書においてケモカインという場合、ケモカイン・レセプターと結合する化学誘引性（走化性）ケモカインを含めるものとし、天然源から単離されたタンパク質ならびに組換え手段または化学合成によるなど合成により製造されたものが含まれる。例えばケモカインとしては、限定されるものではないが、IL-8、IL-10、GCP-2、GRO-α、GRO-β、GRP-γ、ENA-78、PBP、CTAP III、NAP-2、LAPF-4、MIG、PF4、IP-10、SDF-1α、SDF-1β、SDF-2、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1α、MIP-1β、MIP-1γ、MIP-2、MIP-2α、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、MIP-5、MDC、HCC-1、ALP、ラングカイン、Tim-1、エオタキシン-1、エオタキシン-2、I-309、SCYA17、TARC、RANTES、DC-CK-1、リンホタクチン、ALP、ラングカインおよびフラクタルキン、ならびに当業者に公知なその他のものが挙げられる。

【００５９】

また、ケモカインには、ケモカイン・レセプター担持細胞に、結合されているターゲッテッド・エージェントをターゲッティングすることができるケモカイン突然変異タンパク質も含まれる。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントの突然変異タンパク質もまた複合体への使用が意図される。かかる突然変異タンパク質は下記の表に示されているものなど、保存的アミノ酸変異を有する。かかる突然変異タンパク質をコードする核酸は、縮重コドンの置換によって改変されない限り、少なくとも低ストリンジェンシー条件下で、一般には高ストリンジェンシー条件下で野生型タンパク質をコードするDNAとハイブリダイズする。突然変異タンパク質およびそれらのタンパク質の改変されたものには、限定されるものではないが、劣性対立遺伝子変異体または種変異体、および残基、特にシステイン残基の挿入または欠失が含まれる。好適な保存的アミノ酸置換は当業者に公知であり、通常、得られる分子の生物学的活性を変化させずになし得る。当業者ならば、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換は通常生物学的活性を実質的に変化させないことが分かっている(例えば、Watson et al., Mplecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224参照)。かかる置換は好ましくは以下に示されるものに従ってなされる。

【表１】

もとの残基	保存的置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser; 中性アミノ酸
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

【００６０】
その他の置換も許容され、経験的にあるいは公知の保存的置換に従って決定すればよい。かかるポリペプチドの改変はいずれも当業者に公知のいずれかの手段により達成され得る。

【００６１】
また、得られるタンパク質は単量体としてか、または二量体としてケモカイン・レセプター担持細胞に結合して、かかる結合の際に取り込まれるか、または結合されているターゲッテッド・エージェントを取り込ませる能力を有する限り、本明細書のように１以上のシステインをセリンで置換することによって作出された突然変異タンパク質、または他のアミノ酸欠失または置換を有するものも考えられる。典型的にはかかる突然変異タンパク質は上記の表に示されているもののような保存的アミノ酸変異を有する。かかる突然変異タンパク質をコードする核酸は、縮重コドンの置換によって改変されない限り、少なくとも低ストリンジェンシー条件、通常は高ストリンジェンシー条件下で、配列番号25～28で示されるものまたはそのエキソン（配列番号16～24）などのケモカインをコードするDNAとハイブリダイズする。

【００６２】
ケモカインの同定およびケモカイン活性、特に走化活性に関する種々のin vitroアッセイ

は当業者に公知である(例えば、好中球の走化性の確認に関してはWalz et al., (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:775;リンパ球の走化性のアッセイについてはLarsen et al. (1989) Science 243: 1461およびCarr et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:3652を参照、またケモカインの同定のための多くのアッセイを記載し、その手段を例示している国際PCT出願第WO99/33990も参照)。かかるアッセイを用いてケモカイン、改変型ケモカインおよびその有効な断片を同定することができる。本明細書で記載され、当業者に公知のる結合アッセイを使用してケモカイン・レセプターを特異的に認識する部分を同定してもよく、細胞傷害性アッセイを用いて結合または会合しているターゲッテッド・エージェントを取り込ませるものを同定することもできる。

【００６３】

強調すべきは、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントはCSF、TNF、IL-2、IL-3、IL-4およびケモカインの特性を持たないその他のものなどのケモカインでないサイトカインは含まないことである。

【００６４】

本明細書においてケモカインの一部とは、単独でまたは別の断片またはケモカイン単量体との二量体として、ケモカイン二量体が結合するレセプターと結合して、結合されているターゲッテッド・エージェントを取り込ませるに十分なケモカインの断片または切片を指す。

【００６５】

本明細書においてケモカインのアミノ酸残基とは、一方または両方のケモカイン単量体が残基の欠失により改変されているケモカイン二量体がケモカイン・レセプターに結合して、二量体が該アミノ酸を有する結合されているターゲッテッド・エージェントを取り込ませる実質的に同等の能力を有する限り、必須のものではない。

【００６６】

本明細書においてケモカインペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸とは、かかるペプチドをコードするとして本明細書で示されている核酸断片のいずれか、当業者に公知のかかる核酸断片のいずれか、ケモカイン・レセプターと結合してそれにより取り込まれ、上記核酸断片のいずれかをプローブとして用いてヒト細胞ライブラリーから単離し得るケモカインをコードする核酸断片のいずれか、または配列番号25～28で示されるものをはじめ、公知のケモカインペプチドのいずれかをコードする核酸断片のいずれか、および縮重コドンの置換により上記核酸断片のいずれかから産生され得るDNA断片のいずれかを指す。当業者にとっては、ケモカインペプチドのようなペプチドおよびかかるペプチドをコードするある核酸断片の完全なアミノ酸配列がひと度得られれば、縮重コドンを置換してかかるペプチドをコードする可能性のある核酸断片のいずれかを作製することが慣例である。かかるペプチドをコードする核酸をそのアミノ酸配列基づいて合成することも通常可能である。

【００６７】

本明細書においてケモカインにより媒介される病態生理学的状態とは、ケモカイン分裂促進刺激、増殖刺激および／または化学誘引活性に感受性のある細胞の増殖によって特徴付けられるまたは引き起こされる有害な状態を指す。

【００６８】

本明細書においてケモカイン・レセプターとは、天然に存在するケモカインタンパク質ファミリーのメンバーと特異的に相互作用し、かかるレセプターを担持する細胞へ輸送するレセプターを指す。これらには、限定されるものではないが、CXCケモカインが結合する５つのレセプター(CXCR1-5)およびCCケモカインが結合する９つのレセプター(CCR1-9)、ならびにいずれかのレセプターが特異的に結合して結合されているターゲッテッド・エージェントの取り込みを促進するその他のレセプターのいずれかが挙げられる。

【００６９】

本明細書においてターゲッテッド・エージェントとは、本明細書で定義されたようなターゲッティング部分との結合による取り込みを意図し、さらに取り込みの際になんらかの方

法で細胞の代謝、増殖活性、生存性またはその他の細胞の特性もしくは特徴を変更するまたはそれに作用するいずれかの作用剤である。ターゲッテッド・エージェントは細胞傷害剤をはじめとする治療薬であるのが好ましく、限定されるものではないが、タンパク質、ポリペプチド、有機分子、薬物、核酸およびその他のかかる分子が挙げられる。ケモカインまたはその一部に結合された蛍光部分のような標識は、本明細書で意図されるターゲッテッド・エージェントの定義の範囲内にあるとは考えない。

【００７０】

本明細書においてターゲッテッド・エージェントをターゲッティングするとは、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントに該作用剤を結合させることにより選択されたレセプターを発現する細胞に対してそれを向けることを意味する。レセプターと結合した際、ターゲッテッド・エージェントすなわちケモカイン・レセプター結合部分に結合されたターゲッテッド・エージェントが細胞により取り込まれる。

【００７１】

本明細書においてターゲッテッド・エージェントとは、本明細書で定義されたような標的部分との結合による取り込みを意図し、さらに取り込みの際になんらかの方法で細胞の代謝、増殖活性、生存性またはその他の細胞の特性もしくは特徴を変更するまたはそれに作用するいずれかの作用剤である。ターゲッテッド・エージェントとしては、タンパク質、ポリペプチド、有機分子、薬物、核酸およびその他のかかる分子が挙げられる。

【００７２】

本明細書においてケモカインは本明細書の目的のために上記の構造特性および生物学的特性を有するサイトカインファミリーであると認識されるが、リガンドとしての「サイトカイン」という場合にはケモカインでないサイトカインを指す。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントとはケモカイン、ケモカイン・レセプターと特異的に結合するサイトカイン、かかるレセプターに特異的な抗体、および該レセプター選択性を模倣して結合されている、いずれかのケモカインであるターゲッテッド・エージェントの取り込みを促進することができる他のいずれかの部分をいう。

【００７３】

本明細書において細胞傷害剤とは細胞の機能を阻害し得るターゲッテッド・エージェントをいう。該作用剤は増殖を阻害してもよいし、細胞に有害なものであってもよい。細胞により取り込まれた際に細胞の代謝を妨げるもしくは有害となるように変更する、またはいずれかの方法で細胞の成長もしくは増殖を阻害するいずれの作用剤も本用語の範囲内に包含され、限定されるものではないが、細胞に輸送された際にその有毒作用が媒介される、また細胞表面でその有毒作用が媒介される作用剤が挙げられる。種々の細胞傷害剤が使用でき、タンパク質合成を阻害するもの、および細胞の増殖または生存に不可欠な特定の遺伝子の発現を阻害するものが含まれる。また細胞傷害剤としては、細胞死をもたらすもの、および細胞成長、増殖および／または分化を阻害するものが含まれる。細胞傷害剤としては、限定されるものではないが、表および本明細書の配列表に示されているもの、ゲロニン、サポリン、リシン、アブリンおよびその他のリボゾーム不活化タンパク質(RIP)、水生由来サイトトキシン、シュードモナス外毒素、アンチセンス核酸などのDNA、RNAまたはタンパク質合成阻害剤、およびDNA切断分子などのその他の代謝阻害剤、ならびに光活性化ポルフィリンが挙げられ、それらは当技術分野で公知のものである。志賀毒、特に本明細書で提供される改変型志賀触媒サブユニットは本明細書において好ましい毒素であるが、その他の好適なRIPとしては、限定されるものではないが、志賀-A1、リシン、リシンA鎖、サポリン、大腸菌由来コリシン、志賀様毒素、トウモロコシRIP、ゲロニン、ジフテリア毒、ジフテリア毒A鎖、トリコサンチン、トリチン、アメリカヤカゴボウ抗ウイルス性タンパク質(PAP)、オシロイバナ抗ウイルス性タンパク質(MAP)、ジアンチン32および30、アブリン、モノルジン、ブリオジン、キュウリ種子から単離されたタンパク質生合成触媒阻害剤(例えば、WO93/24620参照)、これらの細胞毒および毒素の細胞傷害性として有効な断片、ならびに当業者に公知の他のものが挙げられる。RIPとはかかる細胞毒、ならびに転写、翻訳、生合成または分解経路、DNA合成およびその他のかかるプロセスをはじめ

とする細胞の代謝プロセスを阻害する、または細胞を死滅させるもしくは細胞増殖を阻害するその他の細胞傷害分子を広く含めるために本明細書において使用される。

【００７４】

本明細書においてリンカーとは、ケモカインポリペプチドとターゲッテッド・エージェントを結合するペプチドまたはその他の分子である。該作用剤がポリペプチドまたはペプチドである場合、リンカーはＮもしくはＣ末端またはその付近の内部残基、典型的にはケモカインおよび／またはターゲッテッド・エージェントのいずれかの末端のアミノ酸約20個内で結合し得る。本明細書において使用されるリンカーは単に複合体の成分を結合するため、細胞内利用度、血清安定性、複合体の特異性および溶解度を高める、または複合体の高い可変性を与える、もしくは立体障害を小さくするために働き得る。例えば、ターゲッテッド・エージェントの特異性および細胞内利用度は、正常細胞よりも腫瘍細胞で高レベルに存在するプロテアーゼなどのある種のプロテアーゼの基質であるリンカーを含むことで付与され得る。

【００７５】

本明細書においてマイトトキシンとは、ケモカインなどのマイトジェンにより特異的細胞をターゲッティングされる細胞傷害分子である。

【００７６】

本明細書において融合タンパク質とは、ケモカイン単量体とターゲッテッド・エージェント、またはケモカイン単量体とリンカーなど、少なくとも２つの成分を含むポリペプチドを指し、宿主細胞におけるDNAの発現により製造される。

【００７７】

本明細書において、志賀Ａサブユニットまたはケモカイン単量体などの細胞傷害剤の実質的にＮ末端またはＣ末端付近で達成される改変は、一般に末端から20残基、好ましくは10残基内で達成される。かかる改変は、ケモカイン・レセプターと反応するポリペプチドまたは該ポリペプチドの断片とターゲッテッド・エージェント部分との間の結合を促進して、所定のモル比、好ましくは１：１比のターゲッテッド・エージェントと、ケモカイン・レセプターと反応するポリペプチドまたは該ポリペプチドの断片を含む複合体を形成するためのシステインの付加など、残基の付加または欠失を含む。

【００７８】

本明細書において核酸とはターゲッテッド・エージェントとして意図されるRNAまたはDNAを指し、限定されるものではないが、治療タンパク質をコードするDNA、共同抑制に関するDNA断片、細胞傷害タンパク質をコードするDNA、アンチセンス核酸およびその他のかかる分子が挙げられる。核酸という場合、二重らせんDNA、一本鎖DNA、三重らせん、二重らせんまたは一本鎖RNAを含むいずれかの形態のRNA、アンチセンスRNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、一本鎖ヌクレオチド、およびその誘導体を含む。

【００７９】

本明細書において治療核酸とは、欠陥遺伝子の代替として働くことにより、またはホルモン、ケモカインでないサイトカインをはじめとするサイトカイン、および／または増殖因子などの治療産物をコードすることにより遺伝子治療を達成するのに使用される核酸を指す。治療核酸は遺伝子の全てまたは一部をコードしてもよいし、細胞中にすでに存在するDNAと組み換わり、それにより欠陥のある遺伝子部分に置き換わることにより機能するものであってもよい。それはまたタンパク質の一部をコードし、遺伝子産物の共同抑制によりその作用を発揮するものであってもよい。

【００８０】

本明細書においてアンチセンスとは、配列特異的核酸を利用して遺伝子転写または翻訳を改変する、いくつかの方法およびその方法で使用される核酸のいずれをもいう。この用語はまた、タンパク質およびレセプター上の部位と結合する核酸を提供する核酸および方法を含む。アンチセンスとしては、限定されるものではないが、下記に記載される以下の種類の核酸：アンチセンスmRNA、三重らせん分子の形成を意図したDNA、細胞外タンパク質結合オリゴヌクレオチド、および小ヌクレオチド分子が挙げられる。本明細書においてア

ンチセンスは以下の分子を包含する。

【００８１】

(a)アンチセンスmRNAおよびDNA

アンチセンス核酸とは、相補配列を有するmRNAと特異的に結合し、それによりmRNAの翻訳を妨げる一本鎖核酸構築物である(例えば、Altman et al.に対する米国特許第5,168,053号、Inouyeに対する米国特許第5,190,931号、Burchに対する米国特許第5,135,917号およびSmithに対する米国特許第5,087,617号参照)。

【００８２】

アンチセンス核酸はまた、RNA合成を特異的に阻害することが分かっているハンマーヘッド型またはダンベル型オリゴヌクレオチドなどの二本鎖環状オリゴヌクレオチドを含む(例えば、Clusel et al. (1993) Nucl. Acids Res. 21:3405-3411参照)。

【００８３】

(b)三重らせん分子

三重らせんとは、二重らせんDNAをターゲッティングし、主要な溝と結合することによってコ・ライナー(co-liner)三重らせんを形成し、それにより転写を阻害または変更する一本鎖DNAを指す(例えば、Hogan et al.に対する米国特許第5,176,996号参照)。選択されたDNA部位に強固かつ特異的に結合する三重らせんDNAが設計されている。

【００８４】

(e)リボザイム

リボザイムはRNAからなり、主としてRNA基質に作用する酵素である。本明細書においてリボザイムとは、メッセンジャーRNAを特異的に切断するRNA（またはRNA類似体）構築物（例えば、Cech et al.に対する米国特許第5,180,818号、同第5,116,742号および同第5,093,246号参照）を指し、特には切断に関するRNA分子をターゲッティングするように設計され、それにより何らかの方法で細胞増殖またはターゲッティングされたmRNAもしくはタンパク質の発現を阻害または妨害するたリボザイムを指す。

【００８５】

(d)細胞外タンパク質結合オリゴヌクレオチド

細胞外タンパク質結合オリゴヌクレオチドとは、タンパク質と特異的に結合するオリゴヌクレオチドを指す。

【００８６】

(e)小ヌクレオチド分子

小ヌクレオチド分子とは、レセプター部位をターゲッティングする核酸を指す。

【００８７】

本明細書において異種または外来核酸は互換的に用いられ、それが存在するゲノムの一部として天然には存在しない、または本来それが存在するものとは違うゲノム位置で見られるDNAまたはRNAを指す。異種核酸は一般にはそれが導入される細胞には内在せず、別の細胞に由来していたか、または合成により作出されたものである。一般に、必ずしも必要ではないが、かかる核酸はそれが発現される細胞によっては通常産生されないRNAまたはタンパク質をコードする。当業者がそれが発現される細胞に対して異種または外来であると認識する、またはみなすDNAまたはRNAはいずれも本明細書においては異種DNAとして包含される。異種DNAの例としては、限定されるものではないが、転写および翻訳調節配列、ならびに薬剤耐性を付与するタンパク質などの選択または追跡マーカータンパク質をコードするDNAが挙げられる。異種DNAはまた、転写、翻訳またはその他の調節可能な生化学プロセスに作用することにより内在性DNAの発現を媒介する、またはそれを変更するメディエーターをコードするDNAをコードし得る。

【００８８】

本明細書においてベクターまたはプラスミドとは、異種DNAの発現のため、またはクローン化された異種DNAの複製のために、異種DNAを細胞へ導入するのに使用される独立したエレメントを指す。かかるベクターおよびプラスミドの選択および使用は十分当業者のレベル内にある。

【００８９】
本明細書において発現とは、核酸がRNAへ転写され、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質へと翻訳されるプロセスを指す。核酸がゲノムDNAに由来する場合、発現は、適当な真核宿主細胞または生物が選択されれば、mRNAのスプライシングを含んでもよい。
【００９０】
本明細書において発現ベクターとしては、そのDNA断片の発現を達成し得るプロモーター領域などの調節配列と機能し得る形で結合されたDNA断片を発現し得るベクターが含まれる。従って、発現ベクターとは、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、または適当な宿主細胞へ導入した際にクローン化されたDNAが発現されるその他のベクターなどの組換えDNAまたはRNA構築物を指す。適当な発現ベクターは当業者に十分公知であり、真核細胞および／または原核細胞で複製可能なもの、ならびにエピソームで維持されるか、または宿主細胞のゲノムに組み込まれ得るものが含まれる。
【００９１】
本明細書において、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位、およびその他のシグナル配列などのヌクレオチドの調節およびエフェクター配列に対する異種DNAの機能し得る形の結合または機能し得る形の会合とは、かかるDNAとかかるヌクレオチド配列との間の機能的関係を指す。例えば、プロモーターに対する異種DNAの機能し得る形の結合とは、読み取り枠のDNAを特異的に認識し、それと結合し、転写するRNAポリメラーゼによりDNAの転写がプロモーターから開始されるようなDNAとプロモーターとの間の物理的および機能的関係を指す。
【００９２】
本明細書においてプロモーター領域とは、それが機能し得る形で結合されているDNAの転写を制御する遺伝子のDNA部分を指す。プロモーター領域部分としては、RNAポリメラーゼ認識、結合および転写開始に十分な特異的なDNA配列が含まれる。このプロモーター領域部分はプロモーターとも呼ばれる。さらに、プロモーター領域には、このRNAポリメラーゼの認識、結合および転写開始活性を調節する配列が含まれる。これらの配列はシス作用であってもよいし、またはトランス作用因子に応答するものであってもよい。調節の性質にもよるが、プロモーターは構成的であっても調節されるものであってもよい。本明細書における使用に関しては、誘導プロモーターが好ましい。これらのプロモーターは宿主により認識されるRNAポリメラーゼによって認識される。RNAポリメラーゼは宿主に内在していてもよいし、または遺伝子操作により、宿主の染色体の一部として、あるいは志賀Ａサブユニット含有ポリペプチドをコードするDNAを含有するプラスミドをはじめとするエピソームエレメントとして宿主に導入してもよい。本明細書における使用に関して最も好ましいプロモーターは、誘導しない限りサポリン含有タンパク質をコードするDNAが発現しないように厳格に調節される。
【００９３】
本明細書において転写終結領域は(a) 転写物においてポリアデニル化シグナルとポリアデニル化部位をコードするサブセグメントおよび、および／または(b)選択されたプロモーターを認識するポリメラーゼによる転写を終結させる転写終結シグナルを提供するサブセグメントのいずれかを有する。全転写ターミネーターはタンパク質をコードする遺伝子由来し、これはプロモーターの供給源である遺伝子と同一であっても異なっていてもよい。好ましい転写終結領域としては大腸菌で機能するものがある。転写ターミネーターは本明細書の発現系の任意の構成要素であるが、好ましい具体例では使用される。
【００９４】
本明細書においてポリペプチド「の発現に関してコードするヌクレオチド配列」とは、得られたmRNAの転写およびそれに次ぐ翻訳の際にポリペプチドを産生する配列を指す。これには例えばイントロンを含む配列が含まれ得る。
【００９５】
本明細書において「発現制御配列」とは、それが機能し得る形で連結されている核酸配列の発現を調節する核酸配列を指す。発現調節は、発現制御配列がその核酸配列の転写およ

び適当であれば翻訳を制御および調節する際に機能し得る形で核酸配列に連結される。従って発現制御配列は適当なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質コード遺伝子の前に開始コドン（すなわちATG）、イントロンのためのスプライシング配列、mRNAの適切な翻訳を可能にするタンパク質コード遺伝子の正しい読み取り枠の維持、および停止コドンを含み得る。さらに、陽性クローン（すなわち所望のポリペプチドを発現する宿主細胞）を選択するために、緑色または青色蛍光タンパク質などの蛍光表示ポリペプチドをコードするDNA配列を含んでもよい。

【００９６】

本明細書において「宿主細胞」とはベクターが増幅し、その核酸が発現され得る細胞である。この用語にはまた、患者宿主細胞のいずれの後代もが含まれる。複製の際に起こる突然変異が存在する可能性があるので、すべての後代は必ずしも親細胞と同一でないものと理解される。「宿主細胞」という場合ににはかかる後代も含まれる。

【００９７】

本明細書において分泌シグナルとは、宿主の細胞質から周辺質空間へ、または細胞外の増殖培地へ前駆タンパク質の分泌を指示する前駆タンパク質内のペプチド領域を指す。かかるシグナルは前駆タンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれにあってもよい。好ましい分泌シグナルはアミノ末端に結合しており、それが結合しているタンパク質とは異種のものであってもよい。典型的にはシグナル配列は細胞分泌経路を通っているうちに切断される。切断は不可欠ではないが、あるいは分泌されたタンパク質がその所望の活性をできるだけ長く保持するために必要である。

【００９８】

本明細書において核転座またはターゲッティング配列(NTS)とは、タンパク質の細胞核への転座に必要なタンパク質におけるアミノ酸配列である。既知のNTSと比較し、さらに要すれば候補配列を試験することにより、当業者ならばNTSとして機能するその他のアミノ酸配列を容易に確認することができるはずである。

【００９９】

本明細書において異種NTSとは、野生型ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に存在するNTSとは異なるNTSを指す。例えば、NTSは別のポリペプチドに由来してもよいし、合成してもよいし、あるいは同じポリペプチドの別の領域に由来してもよい。

【０１００】

本明細書においてトランスフェクションとは、宿主細胞によるDNAまたはRNAの取り込みを指す。形質転換とはDNAが染色体外エレメントとして、または宿主の染色体DNAの一部として複製できるような様式で行われるこのプロセスを指す。トランスフェクションおよび形質転換を達成する方法および手段は当業者に十分公知である(例えば、Wigler et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-1376; Cohen et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110参照)。

【０１０１】

本明細書において生物学的活性とは、化合物、組成物、その他混合物のin vivo投与の際に生じる化合物のin vivo活性または生理学的応答を指す。例えば生物学的活性はかかる化合物、組成物および混合物の治療作用および薬理活性を包含する。しかしながらかかる生物学的活性は所定のアッセイで測定される特定のin vitro活性に対して決定される。従って例えば本明細書においてケモカイン、その二量体、単量体もしくはその断片、またはケモカイン単量体もしくはその断片のその他の組み合わせの生物学的活性という場合、ケモカイン受容体を担持する細胞と結合して、結合されている作用剤を取り込ませる能力をいう。かかる活性は典型的にはin vitroにおいてケモカイン（二量体、単量体または断片）と、志賀Ａサブユニットなどの細胞傷害剤とを結合させ、白血球などのケモカイン受容体担持細胞とその複合体とを接触させ、さらに細胞の増殖または成長を評価することにより評価される。かかるin vitro活性はin vivo活性に外挿される。多くの動物モデルが参照され、また以下に記載される。

【０１０２】

本明細書において生物学的活性またはケモカインを含有する複合体などのケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントと志賀Ａサブユニットなどのターゲッテッド・エージェントとの複合体の生物学的活性とは、この場合、in vivoまたはin vitroいずれかのリボソームの不活性化によりタンパク質合成を酵素的に阻害する、または細胞による毒素含有ポリペプチドの取り込みの際に細胞を増殖を阻害するもしくは細胞を死滅させるかかるペプチドの能力を指す。かかる生物学的または細胞傷害活性は当業者に公知のいずれの方法によって評価してもよく、限定されるものではないが、タンパク質合成を測定するin vitroアッセイ、および細胞増殖またはタンパク質合成に対する試験化合物の作用を測定することによって細胞傷害性を評価するin vivoアッセイが挙げられる。しかしながらターゲッティングされた細胞において細胞傷害性を評価するアッセイが特に好ましい。

【０１０３】

本明細書において受容体と結合するとは、標準的なin vitroアッセイでアッセイした場合にかかる受容体を特異的に認識し、検出可能なように結合するリガンドの能力をいう。例えば本明細書のおいて結合は、十分記載されているリガンド-受容体結合アッセイ、走化性アッセイ、組織病理学的分析、フローサイトメトリーおよび共焦顕微鏡分析、ならびに当業者に公知であり、かつ／または本明細書において例示されたその他のアッセイを用いる、小グリア細胞、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球およびＴ細胞などの白血球細胞サブタイプ上のケモカイン受容体を認識するケモカイン複合体、ケモカイン単量体、またはその他の混合物の能力の測定値である。

【０１０４】

本明細書において実質的に純粋とは、かかる純度を評価するために当業者に用いられる薄層クロマトグラフィー(TLC)、ゲル電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)などの標準的な分析方法によって容易に検出可能な不純物を含まないことが明らかに示すに十分均一なこと、またはさらに精製しても、その物質の酵素活性および生物学的活性などの物理化学的特性を検出できるほどには変化させないといった十分純粋であることを意味する。実質的に化学的に純粋な化合物の製造するための化合物の精製方法は当業者に公知である。しかしながら、実質的に化学的に純粋な化合物は立体異性体の混合物であってもよい。このような場合、さらなる精製が化合物の特異的活性を高め得る。

【０１０５】

本明細書において単離された実質的に純粋なDNAとは、当業者に用いられる標準的な技術に従って精製されたDNA断片を指す(例えば、Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYおよびSambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY参照)。

【０１０６】

本明細書において明示されたストリンジェンシー条件の下でハイブリダイズするとは、２つの一本鎖DNA断片間で形成したハイブリッドの安定性についていうものであり、かかるハイブリッドが洗浄されるイオン強度および温度の条件をいい、次いで洗浄工程の条件より低い、または同等のストリンジェンシー条件下でアニーリングする。典型的には高い、中程度の、および低いストリンジェンシーは以下の条件またはそれらと同等の条件を含む：

1)高いストリンジェンシー：0.1×SSPEまたはSSC、0.1%SDS、65℃
2)中程度のストリンジェンシー：0.2×SSPEまたはSSC、0.1%SDS、50℃
3)低いストリンジェンシー：1.0×SSPEまたはSSC、0.1%SDS、50℃

同等の条件とは、得られるハイブリッドにおける誤対合のパーセンテージが実質的に同じように選択した条件をいう。ホルムアミド、フィコールおよびデンハート溶液などの成分の添加はハイブリダイゼーションが起こるべき温度および反応速度のようなパラメーターに作用する。従って42℃にて20%ホルムアミド5×SSC下でのハイブリダイゼーションは、上記に挙げた低いストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションと実質的に同等

の条件である。

【０１０７】

SSPE、SSCおよびデンハート溶液の配合ならびに脱イオン化ホルムアミドの調製は例えばSambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 8(Sambrook et al. vol. 3, p.B.13参照、また一般に用いられる実験室溶液について記載している多くのカタログを参照)に記載されている。SSPEはpH7.4リン酸緩衝0.18NaClである。

【０１０８】

本明細書において培養とは、それらの増殖が継続する培地での細胞の増殖およびそのあらゆる継代培養を意味する。継代培養とは、別の培養系（ソースカルチャー）の細胞から増殖させた細胞培養系、または対象となる継代培養系とソースカルチャーの間で行われた継代培養の回数に関わらず、ソースカルチャーの継代培養系のいずれもを指す。「培養する」とは、かかる培養物が増殖するプロセスをいう。

【０１０９】

本明細書において特定の疾病を治療するための化合物の有効量とは、その疾病に関連する徴候を緩和する、または何らかの方法で軽減するに十分な量をいう。かかる量は一回用量として投与してもよいし、またはそれが効果的となる投与計画に従って投与してもよい。この量はその疾病を治癒させ得るが、典型的にはその疾病の徴候を緩和するために投与される。徴候の望ましい緩和を達成するためには反復投与が要されることもある。

【０１１０】

本明細書において医薬上許容される複合体の塩、エステルまたはその他の誘導体には、かかる誘導体化に関して公知の方法を用いて当業者によって容易に調製され、かつ、実質的に有毒な作用なく動物もしくはヒトに投与され、医薬上有効であるか、またはプロドラッグとなる化合物を形成する塩、エステルまたは誘導体が含まれる。

【０１１１】

本明細書において治療とは、症状、疾患または疾病の徴候が緩和あるいは有益に変更されるいずれの方法をも意味する。治療はまた本明細書の組成物のいずれの医薬的使用をも包含する。

【０１１２】

本明細書において、ある医薬組成物の投与によるある疾患の徴候の緩和とは、永久であれ一時的であれ、持続的であれ一過性であれ、組成物の投与に帰すことができる、または関連させ得る軽減のいずれをも指す。

【０１１３】

本明細書においてプロドラッグは、in vivo投与時に生物学的、医薬的または治療的に有効な化合物形態へ代謝または変換される化合物である。プロドラッグを製造するには、医薬上有効な化合物を、その有効化合物が代謝のプロセスによって再生するように改変する。プロドラッグは、薬剤の代謝安定性または輸送の特徴を変更するよう、副作用または毒性をマスキングするよう、薬剤の香味を改良するよう、または薬剤のその他の特徴もしくは特性を変更するように設計してもよい。薬物動力学的プロセスおよびin vivoにおける薬物代謝に関する知見により、当業者であれば、ひと度医薬上有効な化合物が分かれば、その化合物のプロドラッグを設計することができる(例えば、Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392参照)。

【０１１４】

本明細書においてED_{50}とは、本明細書で提供される複合体とともに明記された時間インキュベーションした後に50%の細胞が死滅する濃度をいう。

【０１１５】

本明細書においてID_{50}とは、明記された時間の後に非処理細胞に比べて、複合体に曝された細胞の50%を減数するまたは排除するのに要する本明細書で提供される複合体の濃度をいう。

【０１１６】
本明細書において「サイトカイン」には、インターロイキン、ケモカイン、リンホカイン、モノカイン、コロニー刺激因子、ならびに受容体結合タンパク質およびその機能的断片が含まれる。本明細書の目的では、ケモカインでないサイトカインとは、他のサイトカインによっては一般に発揮されない化学誘引活性を有する、ケモカイン以外のすべてのサイトカインを指す。
【０１１７】
本明細書においてケモカインとは、主として特異的な白血球細胞サブタイプのの化学誘引物質およびアクチベーターとして働く、40以上の小さな（約4ないし約14kDa）の誘導性・分泌型のプロ炎症性ポリペプチドのスーパーファミリーのメンバーを指す。それとともに、ケモカインは全範囲の白血球サブタイプをターゲッティングし、各々は個々に一部の範囲のみをターゲッティングする。ケモカインは塩基性ヘパリン結合タンパク質であり、必ずしも必要ではないが典型的にはほとんどすべてのファミリーメンバー間で４つのシステインを共通に持っている。ケモカインには４つの主要なグループがあり、そのうち３つのグループが４個の保存されたシステインを含み、他のグループも同定できる。これらのグループは最初の２個のシステインの配列によって定義されている。最初の２個のシステインが単一のアミノ酸で分断されていれば、それはCXCファミリー（αとも呼ばれる）のメンバーであり；これらのシステインが隣接していれば、それらはCCファミリー（βとも呼ばれる）に分類される。それらが３個のアミノ酸によって分断されていれば、それらは第３のCX_3Cメンバーである。第４のグループのケモカインは、他のグループにおける１番目と３番目のシステインに相当する２個のシステインを含む。本明細書における目的では、ケモカインは、CC-、CXC-、CX3C-およびXC-受容体とは相互作用せず、白血球の化学誘引物質として主として機能せず、かつほとんどの細胞種の増殖、分化および機能に対して調節作用を発揮するGM-CSF、IL-1、IL-4などのサイトカインは含まない。いくつかのサイトカインはケモカイン受容体も発現する細胞上に存在する受容体と結合するので、IL-4複合体などある種のサイトカイン-ターゲッテッド・エージェント複合体は、炎症症状、特に本明細書で提供される二次的組織損傷に関連する炎症をターゲッティングする方法に使用され得る。
【０１１８】
本明細書においてケモカイン-毒素とは、ケモカインと毒素を含む複合体である。
【０１１９】
本明細書において「機能的断片」とは、所定の機能アッセイにより同定される生物学的機能または活性を有し、かつ、細胞または細胞機構における特定の才物学的、形態学的または表現型的変更に関連するポリペプチドを指す。
【０１２０】
本明細書において「酵素サブユニット」とは、N-グルコシダーゼまたはADP-リボシル化のいずれかを担うある毒素のサブユニットＡを指す(Pastan et al., Annu. Rev. Biochem. 61:331-54, 1992; Stirpe et al., Bio/Technology 10:405-12, 1992;およびSandvig and Van Deurs, Physiol. Rev. 76:949-66, 1996)。
【０１２１】
本明細書において「抗体」には、完全な分子、ならびにエピトープ決定基と結合できるFab、$F(ab')_2$、およびFvなどのその機能的断片が含まれる。これらの機能的抗体断片はそれらの個々の抗原または受容体と選択的に結合するある程度の能力を保持し、以下のように定義される。
(1)Fab、抗体分子の１価の抗原結合断片を含む断片は、完全な抗体を酵素パパインで消化して完全な軽鎖および１つの重鎖の一部を生じさせることにより製造できる；
(2)Fab'、完全な抗体をパパインで処理し、次いで還元して完全な軽鎖および重鎖の一部を生じさせることにより得ることができる抗体分子の断片；抗体分子につき２つのFab'断片が得られる；
(3)$(Fab')_2$、完全な抗体を酵素パパインで処理することにより、その後還元することなく

得ることができる抗体断片；$(Fab')_2$は２つの異なるジスルフィド結合によりともに保持される２つのFab'断片の二量体である；
(4)Fv、２鎖として発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝的に操作された断片として定義；および
(5)一本鎖抗体("SCA")、遺伝的に融合した一本鎖分子として好適なポリペプチドリンカーにより結合された、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝的に操作された分子。

【０１２２】
これらの断片を作製する方法は当技術分野で公知である(例えば、出典明示により本明細書の一部とされるHarlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988参照)。

【０１２３】
本明細書において「エピトープ」とは、抗体のパラトープが結合する抗原上の抗原決定基のいずれかを意味する。エピトープ決定基はアミノ酸または炭水化物側鎖などの分子の化学的に活性な表面基を含み、通常は特異的な三次元構造特性ならびに特異的な荷電特性を有する。

【０１２４】
本明細書においてペプチドおよび／またはポリペプチドとは、その単量体がアミノ結合によりともに結合したアミノ酸残基であり、ポリペプチドとも呼ばれる重合体を意味する。アミノ酸がα-アミノ酸である場合、Ｌ型光学異性体またはＤ型光学異性体のいずれかが使用でき、Ｌ型異性体が好ましい。さらに、β-アミノ酸、フェニルグリシンおよびホモアルギニンなどの非天然アミノ酸も含まれるものとする。一般に遺伝子コードされない偶発的(encountered)アミノ酸も本明細書で提供されるリガンド-トイイン(ligand-toiin)キメラに使用できるが、好ましいアミノ酸はコード可能なものである。

【０１２５】
本明細書において有効量とは、非験体における二次的組織損傷またはそれに関連する病状の症状を予防する、治癒する、緩和するまたは少なくとも部分的に抑えるのに必要な治療薬の量である。非験体はいずれの哺乳類であってもよく、好ましくはヒトである。

【０１２６】
B.炎症応答
炎症は、損傷または外傷の部位に対して免疫系防御細胞（白血球）の数種の基が活性化され補充されることによって始まる。前炎症白血球には、マクロファージ、単球、および小グリア細胞(ひとまとめにして単球食細胞、NMPとして知られている)、好中球、好酸球、およびＴリンパ球系統のサブタイプが含まれる。これらの細胞は、望ましくない外因性病因子（例えば、微生物）または内因性因子（例えば、癌細胞クローン）を身体から除去し、細胞残渣を除去し、さらに組織および創傷修復する働きをする。

【０１２７】
白血球は活性化され、その後、損傷した細胞が壊死することによって放出された可溶性因子に対する応答として広範囲の炎症性メディエーターを放出する。白血球由来メディエーターは治癒のプロセスに必須であるが、それらはまた、最終的に器官の機能不全をもたらし得る二次的組織損傷の原因でもあると思われる。白血球由来メディエーターの第１波には、サイトカインスーパーファミリーの多数のメンバーおよびケモカインスーパーファミリーの数種の強力な白血球化学誘引物質が含まれる。

【０１２８】
サイトカインおよびケモカインはそれら自身の産生を続け、自己分泌およびパラ分泌機構によって白血球から放出される。それらはまた、それらがターゲッティングする細胞から炎症性メディエーターの第２波の合成および放出を誘発する。この炎症媒体の第２波には、限定されるものではないが、神経毒、タンパク質分解酵素、陽イオン性タンパク質、アラキドン酸代謝物質、および反応性酸素種が含まれる。サイトカインおよびケモカインはまた、白血球、内皮細胞、およびグリア細胞上での細胞接着分子および細胞表面抗原の発

現を誘発するが、両事象は炎症応答に不可欠な構成要素である。

【０１２９】

脊髄およびCNS損傷

自動車事故のような脊髄損傷をもたらす不慮の事故は、通常、初期損傷または一次損傷という。外傷を負った脊髄は、損傷部位から細菌またはウイルスなどの外的侵入物を除去し、傷を覆い、さらに組織の修復を促進すべく設計されている正常な炎症応答を発動することによって速やかに応答する。この程度までは、脊髄の炎症応答は小さい切傷または擦傷に対する皮膚の応答に類似しており、両方の場合とも傷跡が永久に残ることもある。

【０１３０】

損傷に対する末梢応答は唯一の含まれる事象であると考えられるが、脊髄応答は「正常」が「不適当」になる点まで発展し、本質的に二次的損傷が起こる。要するに、脊髄の炎症応答は、神経の再生および修復を助けるには敵対する環境を損傷部位に作ってしまい、この領域の周辺を脊髄の非損傷領域を含むまで拡大し、実際には健康なニューロンおよび乏突起膠細胞ともに殺してしまう。従って、SCIは、初期損傷または不慮の損傷と、それに続く二次的組織損傷からなる二段階の過程である。

【０１３１】

本明細書に記載されているように、脊髄炎症の不適当な進行がSCIの典型的な結果である麻痺および二次的な医学的症状の程度に対する主な誘因である。臨床的見地からこのことは、炎症応答が開始されなかったとすれば、脊髄損傷患者は遥かによく機能したであろうことを意味している。脊髄炎症は進行性であるために、治療的介入が成功する見込みは厳しい。

【０１３２】

SCIおよび一般化したCNS外傷に関する研究により、明らかな二次的組織損傷の開始が数時間内に見られ、数週間進行し、その後に部分的回復期がくることが証明されている。二次的損傷は細胞死、大グリア細胞として検出可能であり、それはグリア細胞の搬痕、新生血管形成、脱髄、ならびに感覚および運動機能の喪失（すなわち、麻痺）をもたらす。二次的損傷および部分的回復の時間的進行は、損傷部位における炎症の程度とよく相関している。

【０１３３】

CNS炎症の初期の事象には、内在する小グリア細胞および浸潤するMNPの活性化および増殖が含まれる。小グリア細胞は異なるクラスのMNPおよびCNSの内在する免疫エフェクター細胞である。それは、細胞レベルで二次的損傷を引き起こすこれらの細胞の炎症活性である。さらに、MNP由来のサイトカインおよびケモカインは、単球、好中球およびＴリンパ球の活性化および損傷部位への補充、インテグリン、セレクチンおよび細胞間接着分子-1(I-CAM)をはじめとする細胞表面抗原および細胞付着分子、白血球サブタイプ、内皮細胞、および星状細胞のアップレギュレーションの結果として開始されるプロセスを助ける。好中球およびＴリンパ球は、それら自身のサイトカイン、ケモカイン、反応性酸素種、およびタンパク質分解酵素を炎症環境に放出することによって二次的損傷に寄与する。これらの炎症事象は、周囲の軸索の脱髄とともにニューロンおよび乏突起膠細胞（CNSのミエロン産生細胞）の局部的な死滅をもたらす。

【０１３４】

CNSの二次的損傷におけるサイトカインの役割

MNP、好中球およびTリンパ球、および星状細胞は、IL-1、TNF-α、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、BM-CSF、およびIFNをはじめとする数種のサイトカインを産生、分泌し、かつそれらに対して応答する。これらのサイトカインは、食作用活性、細胞表面抗原および細胞接着分子の発現、ならびに酸素ラジカルの生成を含む白血球のほとんどの機能を調節する。さらに、これらのサイトカインは直接グリア細胞に搬痕を残すプロセスと結び付けることができ、またはある場合には神経傷害性および細胞傷害性因子の放出の誘発を通じて結び付き得る。TNF-αは、EAEおよびその他の数種の脱髄疾患の病因に関係している。例えば、TNF-α、およびTNF-α受容体のMNP特異的なアップレギュレーションがAIDS患者の神経系で

実証されている。in vitroにおける研究によって、TNF-αは直接乏突起膠細胞に対して細胞傷害性があり、ミエリンの小グリア細胞食作用を刺激することが実証される。さらに、TNF-αは乏突起膠細胞始原細胞のIFN-γ誘導性細胞死の効力を増す。

【０１３５】

白血球および大グリア細胞のGM-CSFおよびIL-3はTリンパ球のIL-4とともにMNPの強力なマイトジェンおよびアクチベーターである。これらの因子は他のものとともに、最も可能性が高いのは先に議論したミエリンのさらに速い食作用によって炎症性自己免疫疾患の病因に寄与する。いくつかの興味深い研究において、トランスジェニックマウスをCNS中でIL-3、IL-6またはTNF-αのいずれかを低レベルで慢性的に産生するように設計されたが、それによってCNSの白質においてMNPの増殖および活性化がもたらされ、次いで主要な脱髄および運動疾患がもたらされた。

【０１３６】

CNSの二次的損傷におけるケモカインの役割

前述したようにケモカインは、主に白血球亜類型に作用する、小さい（およそ約6ないし約14kDa）、誘導性・分泌型の化学誘引物質サイトカインのスーパーファミリーである。このスーパーファミリーは一次配列における４つの保存されたシステイン残基の位置（または存在）を基にして４つのサブファミリーに区分される。CXC、すなわち「α」ファミリーのメンバーは最初の２つの保存されたシステインの間にアミノ酸介入を有しているが、CC、すなわち「β」ファミリーは有していない。C、すなわち「γ」ケモカインだけが２番目および４番目の保存されたシステイン残基を有する。４つ目の「δ」ファミリーも記載されている。このファミリーは１番目の２つの保存されたシステインの間に３つのアミノ酸介入を共有している（ゆえに、それらをCX3Cファミリーという）。CX3Cケモカインフラクタルキンは、可溶型および膜結合型で存在している点でその他のファミリーのメンバーとは異なる。

【０１３７】

ケモカインの受容体とそれらの標的細胞との結合は、複雑かつ絶えず発展している研究領域である。αケモカインファミリーは５つのCXC受容体(CXCR 1-5)の１つ以上と結合していることが示されたが、βケモカインファミリーはCC受容体(CC 1-9)の１つ以上と結合していることが示された。αおよびβケモカインの限定されない基から選択した例の受容体結合プロフィールが表１に示されている。適当な受容体が存在するが、あるケモカインの細胞特異性は独占的ではないにしても主として、MNP、もしくは好中球、または両者をターゲッティングするかどうかという問題がある。さらに、好酸球はβケモカインの著しいターゲットである。

【０１３８】

一般に、受容体サブタイプの標的細胞への結合親和性、特異性、および差別的分布は、炎症プロセスに対するあるケモカインの寄与を決定する。ある状況において決定されたあるケモカインの生物学的プロフィールは、別の状況、とりわけ外傷または疾病の際に標的細胞の割合および活性化状態が変化すれば当てはまらなくなる。従ってあるケモカインの生物学的プロフィールは、ケース・バイ・ケースで確立しなければならない。例えば、単球走化性タンパク質-3(MCP-3)の作用はMCP-1の作用に類似するが、前者はより広範囲の細胞と結合する。すでに複雑な状況に加え、ケモカインはまた、白血球の活性化および循環から炎症組織への輸送（溢出）に必要な勾配の維持を容易にすると考えられる様式で細胞表面のヘパリンおよびグリコサミノグリカンと結合する。

【０１３９】

ケモカインは自己分泌またはパラ分泌によって作用し、それらの受容体は疾病においてアップレギュレーションされる。in vitroにおける研究によって、リポ多糖類(LPS)、IL-1、IFN、およびTNF-αをはじめとする種々の刺激が種々のCNSおよび非CNS細胞種、例えば、MCP-1、マクロファージ炎症タンパク質-1β(MIP-1β)ならびに大グリア細胞、小グリア細胞、および白血球由来のRANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)からのケモカインの発現および分泌を誘発することが示された。ひと度放

出されればそれに付随して、ケモカインは損傷部位に化学誘引され、小グリア細胞、マクロファージ、好中球、およびＴリンパ球を活性化させる。ケモカインによって媒介される活性化は、適当な標的細胞から反応性酸素種、タンパク質分解酵素、およびサイトカインの合成および分泌が誘発され、その後分泌された作用剤に直接起因する二次的損傷が増加することを意味する。

【０１４０】

さらに特定の例を見てみると、CCケモカインMCP-1、MIP-1α、MIP-1β、およびRANTESは脳の機械的損傷後に大グリア細胞およびマクロファージによって発現されるが、それらの発現は損傷部位における反応性グリオーシスの開始およびMNPの出現に関連している。同様の例として、ラットにおける大脳病巣虚血後にMNPおよび大グリア細胞でMCP-1およびMIP-1αの発現が検出される。さらに複雑な例では、増殖調節癌遺伝子(GRO-α)を選択的かつ時間依存的にアップレギュレーションすることが実証された。ラットにおける脊髄挫傷後、最初の6ないし24時間以内に、インターフェロン-γ誘導性のタンパク質(IP10)、ならびにMCP-1および5が見られる。GRO-αの発現および好中球の化学誘引は初期の現象（6時間以内）であり、IP-10の発現およびＴ細胞の化学誘引は中期の現象（6-12時間）であり、最後にMCP-1および5の発現ならびにMNPの化学誘引は後期の現象（12-24時間）である。これに対し、MIP-1αおよびRANTESの発現は脊髄挫傷にほとんど影響しないようであり、それは細胞を浸潤および増殖させるとは言えないまでもこれらの２つのβケモカインに対する受容体は有していない。

【０１４１】

数人の研究者が実験上の自己免疫脳脊髄塩(EAE)においてケモカインを研究し、急性期の開始時に内皮細胞、MNP、大グリア細胞がMCP-1を発現することを示している。単球は24時間後に損傷部位に浸潤し、これに続いて脊髄中においてMCP-1が広範囲で発現する。MIP-1α、MIP-1β、RANTESおよびMCP-3の発現は、EAEの重篤度および状態に従い変動する。ケモカイン発現の時間的および空間的パターンは疾病の病因を左右し、MIP-1αおよびMCP-1がそれぞれ急性期および再発期EAEのNMPの浸潤を制御する。最後に、トランスジェニックマウスの過剰発現MCP-1は、MNPのCNSへの著しい浸潤性を示す。

【０１４２】

アポトーシスの二次的損傷への寄与

SCIを含むCNS外傷の初期段階において、著しく損傷を受けた細胞はほとんどすぐに死に始め、これが受動的な壊死のプロセスである。細胞の活性化の後、炎症性メディエーターが、次の後発性の長時間の細胞死を開始させ、これがしばしば「プログラムされた細胞死」、またはより頻繁にはアポトーシスと呼ばれる活性細胞の自殺プロセスということになる。アポトーシス作用はニューロンおよび乏突起膠細胞の双方に及び、それらの二次的損傷への寄与が進行する。ひと度誘発されれば、アポトーシスは長時間にわたって解剖学上最初の損傷部位とは異なる領域で起こり得る。また、アポトーシスの時間的および空間的パターンにより、免疫細胞が損傷部位またはその近傍でもはや検出されない際にも細胞死がなお認められるのがなぜなのかを説明することができる。

【０１４３】

アポトーシスは、SCI、AD、MS、外傷性の脳損傷および卒中、肝疾患、ならびに癌をはじめとする種々の炎症性および外傷性症状で見られる。例えば、ニューロンおよび乏突起膠細胞のアポトーシス（脱髄に関連）は、多数のCNS外傷およびSCIの動物モデルにおいて明らかである。CNS外傷の典型的な動物モデルのデータから、アポトーシスはかなり初期に（およそ数時間以内に）始まり、損傷後少なくとも１週間継続することが分かっている。少なくとも１つの公表された研究の中で、データからは２つの異なるアポトーシスの波が存在することが示唆されている。SCI後３時間ないし２ヶ月の間に死亡した患者由来のヒト脊髄を免疫組織化学的に試験した結果、93%の症例のニューロンおよび乏突起膠細胞にアポトーシスが見られた。動物および検死研究において、アポトーシスは損傷部位から離れたところで検出された。

【０１４４】

アポトーシスのメカニズムは、細胞内のシグナル伝達および遺伝子発現における変化を含む。細胞内エンドヌクレアーゼおよびタンパク質分解酵素（例えば、カスパーゼ）を活性化することによって、DNAの切断（ゲル電気泳動によって見られる特徴的な「DNAラダー」）、細胞内細胞骨格および細胞小器官の部分分解が起こり、最後には後発性の細胞死が起こる。CNSにおいて、アポトーシスは、サイトカイン、ケモカイン、反応性酸素種、NO、および興奮性アミノ酸をはじめとする白血球および大グリア細胞由来の炎症性メディエーターによって開始される。ここでも、このことはこれらのメディエーターの二次的組織損傷への寄与を強調するものである。

【０１４５】

アポトーシスおよび壊死の重要性および相対強度は、与えられたメディエーターによって異なると考えられ、例えば、NMDA受容体アゴニストおよびNOは両者のメカニズムを用いてニューロンを死滅させる。NMDAまたはNOによって媒介されるアポトーシスは、細胞内カスパーゼのカスケードの活性化を含む。NMDAおよびNOの活性化の結果である反応性酸素種もまたアポトーシスに関係していると思われるが、酸素ラジカルの形成および脂質の過酸化はカスパーゼの活性化より下流で起こるようである。これに対し、白血球由来のサイトカインは、アポトーシスの活性化または抑制のいずれかを行う。例えば、TNF-αは、少なくとも２つの異なる細胞内シグナル経路によって種々の細胞種においてアポトーシスを誘発する。II-1βはアポトーシスの活性化においてNOと相加作用的な役割を有するが、GM-CSFおよびIL-3はヒトおよびラットの白血球のアポトーシスを抑制する。GM-CSFはFAS、またはいわゆる「死んだ」受容体の活性化に従うヒト好中球のアポトーシスを抑制し、細胞は酸素ラジカルおよびタンパク質分解酵素を産生する能力を保持する。小グリア細胞に対する強力なマイトジェンであるIL-4は、de novoタンパク質合成の誘発を含むメカニズムによってヒト好中球におけるアポトーシスを抑制する。これらの例は、アポトーシスの抑制または活性化が、損傷部位での炎症性メディエーターの厳密な混合物に依存する二次的組織損傷をもたらすことを示唆している。

【０１４６】

中枢神経系における白血球により媒介される炎症、および非中枢神経系疾患ならびにその症状

疾病と臨床的症状は常に容易に区別できるとは限らない。例えば、プロボクサーはその職業柄、かなりの閉鎖性頭部外傷を受けており(症状)、その後の人生において、アルツハイマー病と非常に良く似た痴呆の一種(ボクサー痴呆)を発症する可能性がある。第１に攻撃的な炎症過程および二次的損傷に依存する神経系の外傷性損傷と、かなりの数の神経変性疾患の間の類似性は顕著である。実際、頭部外傷により引き起こされる炎症応答が患者をアルツハイマー病に罹患しやすくさせ、AIDS患者における脳の炎症が、アルツハイマー病の特徴であるアミロイド斑の形成を促進することが最近の報告により示されている。この観点から、本明細書で提供された複合体によりターゲッティングされる疾病は、共通の病因学および／または病理学を有する。

【０１４７】

中枢神経系の二次的損傷は、病態生理学的な炎症応答で観察される進行性の損傷における、事象の進行ならびにケモカインおよびケモカイン受容体を有する細胞の役割の典型的な例である。以下に記述され、また当業者に公知のように、限定されるものではないが肺炎疾患をはじめとする、癌、特に大量の浸潤性白血球が認められる固形腫瘍、血管形成、HIV感染症を含むウイルスおよび細菌性感染症、自己免疫疾患などの多くの疾患および炎症プロセスの病理において、免疫エフェクター細胞は重要な役割を果たす。

【０１４８】

C.　複合体の成分

1．要約

本明細書は炎症応答、特に白血球細胞種をはじめとする好中球、マクロファージ、好酸球および他のかかる細胞を含む免疫エフェクター細胞の活性化、増殖、および移動に関連する炎症応答に関する病理学的症状、ならびにこれらの炎症応答に関連する病態生理学的症

状の治療のための方法、化合物および組成物を提供する。
【０１４９】
以下に示すものが提供される：
(1)免疫エフェクター細胞により媒介される炎症応答に関連する病態生理学的症状の、これらの細胞をターゲッティングし、細胞傷害性薬剤を送達することによる治療法。この病態生理学的症状には、限定されるものではないが、これらの炎症応答に関連する、またはその結果として起こる二次的組織損傷も含まれる。治療のタイミング、治療期間および病状または疾患により、該方法はこれらの応答を阻害、回復または遮断する。
【０１５０】
ターゲッティングおよび送達は細胞表面に発現された受容体を介して行われる。かかる受容体には、サイトカイン、および特にケモカインの受容体も含まれる。このため、ケモカインの受容体が特異的にターゲッティングされる。また、これらの細胞上に発現される、ケモカインでないIL-4およびGM-CSFなどのサイトカインの受容体のような他の受容体もターゲッティングされる。本明細書で提供される該複合体((２)を参照)は、これらの方法における使用を意図している。IL-4と毒素を含む複合体のような当業者に公知の他の複合体も、特異的受容体を発現するこれらの細胞種のいずれかをターゲッティングするのに用いてよい。
【０１５１】
このように、本明細書で提供されるケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントを使用する方法、およびこれらの病態生理学的炎症応答に関与する細胞上に存在する受容体に結合するリガンドを包含する、公知の複合体を使用する方法を提供する。
【０１５２】
(2)ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント、およびターゲテッド・エージェントを包含する複合体も提供する。これらの複合体は上記方法における使用が意図されるが、ケモカインが相互作用する受容体発現細胞にいずれかの薬剤を送達し、結合された成分の取り込みに作用するかまたは促進するために使用してもよい。
【０１５３】
(3)前記の方法を、病態生理学的炎症症状に関連する疾患の治療のための当技術分野で認められた他の方法と組み合わせた治療の方法も提供する。
【０１５４】
2．ケモカイン・レセプター・ターゲッティング部分
いずれかのケモカインが選択的に結合する細胞の外被上に見られる受容体を選択的にターゲッティングする作用剤はいずれも、本明細書における使用が意図される。ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントは、炎症応答に関連する種々の免疫エフェクター細胞の活性化、移動、増殖を促進する40以上のポリペプチドを構成するケモカインファミリー(おおよそ約6ないし約14kDa)から選択されるのが好ましい。前述したように、このファミリーは４つの保存されたシステイン残基の位置または存在に基づいて、少なくとも４つのサブグループに分類される。CXCケモカイン(またはα)サブファミリーのメンバーは、最初の２つの保存されたシステインの間にアミノ酸介在を有し、一方CC(またはβ)サブファミリーのメンバーはそれを持たない。C(またはγ)ケモカインは１番目と３番目のシステイン残基を欠いている。一般に、αケモカインメンバーは好中球およびＴリンパ球に対し優先的に有効であり、βケモカインは単球、マクロファージ、およびＴリンパ球に対して有効である。さらに、αおよびβケモカインサブファミリーのいくつかのメンバーは、多くの炎症疾患の病態生理に関与すると考えられている、強力な抗原提示特性を呈する移動細胞である樹状細胞に対し有効である(Xu et al., J. Leukoc. Biol., 60:365-71, 1996; and Sozzani et al., J. Immunol., 159:1993-2000, 1997)。最近、フラクタリキンと称される４番目のヒトCX3C型ケモカインが報告されている(Bazan et al., Nature, 385:640-4, 1997; Imai etal., Cell, 91:521-30, 1997; Mackay, Curr. Biol. 7: R384-6, 1997)。他のケモカインとは異なり、フラクタリキンは膜に存在し、可溶性型である。この可溶性型は、単球およびＴ細胞に対する強力な化学誘引性物質である。このケモ

カインに対する細胞表面の受容体はCX3CR1と呼ばれる。異種由来のケモカインの化学的特性および生理学的作用には微妙な差異があるであろうことは注目すべきである(Baggiolini et al., Adv. Immunol:, 55: 97-179, 1994; and Haelens et al., Immunobiol., 195: 499-521, 1996)。

【０１５５】

ａ．ケモカイン

ケモカインは特異的な標的細胞受容体に結合することによりその作用を及ぼす(例えば、CXCR-1ないし5、およびCCR-1ないし9、XCR1ならびにCX3CR-1)。これらの受容体は、種々のケモカインリガンドと重複する複雑な様式で結合する(以下の表１参照)。受容体結合特異性および所与の受容体の細胞分布が、あるケモカインが影響を及ぼす炎症細胞種を決定する。例えば、MCP-3はMCP-1と類似の作用を有するが、より広い範囲の細胞サブタイプと結合する(Combadiere et al., J. Biol. Chem.,270: 29671-5, 1995; Franci et al., J. Immunol., 154: 6511-7, 1995; Weber et al., J. Immunol., 154: 4166-72, 1995; Gong et al., J.Biol. Chem., 271: 10521-27, 1996; and Proost et al., J. Leukoc. Biol., 59: 67-74, 1996)。さらに、ケモカインは細胞表面のヘパリンおよびグリコサミノグリカンに結合し、それは白血球の活性化と遊走に必要なケモカイン勾配の維持を容易にすると考えられている(Schall et al., Current Biol., 6: 865-73, 1994; and Tanaka et al., Immunology Today, 14: 111-15, 1993)。

【０１５６】

限定されるものではないが、本明細書で提供される複合体および方法に使用するケモカインの例には、ケモカインのα－、βおよびγ－サブグループが含まれる。より詳細には、現在、リガンド－毒素キメラ中のタンパク様リガンド成分としての使用が好ましいケモカインとしては、限定されるものではないが、当技術分野でIL-8として公知のα－ケモカインをはじめとする；顆粒球走化性タンパク質-2(GCP-2)；増殖－関連腫瘍因子－α(GRO-α)GRO－βおよびGRO－γ；上皮細胞由来好中球活性化ペプチド－78(ENA-78)；血小板塩基性タンパク質(PBP)；結合組織活性化ペプチドIII(CTAPIII)；好中球活性化ペプチド-2(NAP-2)；低親和性血小板因子-4(LAPF-4)；インターフェロン-γ誘導モノカイン(MIG)；血小板因子-4(PF4)；インターフェロン誘導タンパク質10(単球、Ｔ細胞および平滑筋細胞に対して強力な化学誘引性を有するIP-10)；間質細胞由来の因子SDF-1α、SDF-1βおよびSDF-2；単球走化タンパク質MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4およびMCP-5として当技術分野で公知のβ－ケモカイン；マクロファージ阻害タンパク質MIP-1α、 MIP-1β、 MIP-1γ、MIP-2、 MIP-2α、MIP-2β、MIP-3α、 MIP-3β、MIP-4およびMIP-5；マクロファージ由来ケモカイン(MDC)；ヒトケモカイン1(HCC-1)；RANTES；エオタキシン1；エオタキシン2；TARC；SCYA17およびI-309；樹状細胞ケモカイン-1(DC-CK-1)；γ-ケモカイン、リンホタクチン；可溶性型CX3Cケモカインフラクタリキン；当業者に公知の他のいずれかのケモカイン；ケモカイン受容体に結合するよう設計された合成または修飾タンパク質のいずれかが挙げられる。ケモカインは天然源から常法により単離してもよいし、またはケモカインをコードする核酸を用いて発現させてもよい。生物学的に有効なケモカインは大腸菌において組換えにより発現される(例、R&D Systems, Minneapolis, MNより商業的に入手可能)。

【０１５７】

二次的組織損傷－促進細胞上のケモカイン受容体は一般に、Ｇタンパク質が複合し、７つの膜貫通ドメインを有するロドプシン様受容体のスーパーファミリーに属している。リガンド－毒素キメラ中のケモカインは二次的組織損傷を促進するような炎症過程に関連する免疫エフェクター細胞上の少なくとも１つのケモカイン受容体と特異的に結合するのが好ましい。かかる受容体としては、限定されるものではないが、例えば当技術分野で公知の１以上のケモカインに対するDuffy抗原受容体(DARC)をはじめとする、CXCR-1、CXCR-2、CXCR-3、CXCR-4、CXCR-5、CCR-1、CCR-2A、CCR-2B、CCR-3、CCR-4、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CCR-8、CCR-9、CX3CR-1、CD97、XCR1および他のケモカイン受容体が挙げられる。

【０１５８】

以下の表１は、二次的組織損傷を含む病態生理学的炎症応答に関連する代表的なケモカイ

ン、それらが結合する受容体、および夫々により作用されるヒト細胞種を示したものである。

【表２】

表１

ケモカイン	受容体結合	作用される細胞種
CXC(α)ケモカイン		
IL-8	CXCR1 および２	N, T, E, B,および NK
GRO σ	CXCR2	N および B
GCP-2	CXCR1 および２	N および B
SDF-1 α	CXCR4	M,T, L および Dc
SDF-1 β	CXCR4	M,T, L および Dc
CC(β) ケモカイン		
MCP-1	CCR1*, 2-A, 2-B**, 4 および 5*	M,T, N および B
MCP-2	CCR1, 2B および３	M および T
MCP-3	CCR1, 2-A, 2-B および３	M, T, E, B NK, Dc および N
MCP-4	CCR2-B および３	M, E, B および Dc
MIP-1 α	CCR1, 2B, 3, 4 および５	M, T, E, B NK, Dc および N
MIP-1 β	CCR1*3, 5, 8	M, T, E, B および Dc
MIP-5	CCR1 および３	M, T, E*および Dc
エオタキシン	CCR3	Ｅ、Ｂおよび小グリア細胞
エオタキシン-2	CCR3	Ｅ、Ｂおよび小グリア細胞
RANTES	CCR1, 2B, 3, 4 および５	M, T, E, B, NK および Dc
I-309	CCR8	M

* 低親和性結合のみを示す。

** CC-R2AおよびBはスプライシングを受けた変異体であり、MCP-1および3に特異的に結合する。

Ｍ＝MNP系細胞（単球、マクロファージおよび小グリア細胞）。

Ｎ＝好中球

Ｔ＝Ｔリンパ球細胞サブタイプ

Ｌ＝白血球サブタイプ
Ｅ＝好酸球
Ｂ＝好塩基球
ＮＫ＝ナチュラルキラー細胞
Ｄｃ＝樹状細胞
【０１５９】
他のケモカインにはALPおよびラングキン（例えば、配列番号69および70をそれぞれ参照；また、Hromas et al.(1999)Biochem. Biophys. Res. Comm. 258:737-740)、ならびにラングキン（Rossi et al.(1999)J. Immunol. 162:5490-5497を参照)、Tim-1、ヒトCXCケモカイン（例えば、国際PCT出願第WO99/33990号、米国出願出願番号09/026,546に基づく；EMBLデータベースID　HS1301003、受託番号AA505654も参照)、国際PCT出願第WO99/32631号に記載のケモカインおよびケモカイン系統ペプチド、国際PCT出願第WO99/28473号に記載のLkn-1、ケモカインα-5、ケモカインα-6、ケモカインβ15およびその他が含まれる。
【０１６０】
表１のデータはヒトに関連するものである。ケモカイン受容体の特異性の間には種による差が存在するであろうし、ケモカインは異なる受容体に対して異なる親和性を有するであろう。従って、種特異的な複合体が製造され得る。ある種のメンバーの中では受容体における対立遺伝子の差異も存在するであろうし、要すれば対立遺伝子特異的な複合体を製造してもよい。さらに、異種がヒトケモカインの相同体を発現し得る。例えば、TCA-3はヒトI-309のネズミ相同体である(Goya et al., J. Immunol. 160:1975-81, 1998)。
【０１６１】
他のケモカインも公知であり、本明細書の記載に従ってかかるケモカインおよび特異的な受容体を同定し、要すれば産生してよく、また複合体を産生するために使用してよいことは理解されよう。得られた複合体を使用してよい疾病は、特異性および受容体が発現される細胞の母集団により決定してよく、また本明細書の例示、記載および／または参照を含む当業者に公知のin vitroおよびin vivoモデルを用いて経験的に決定してよい。
【０１６２】
ｂ．ケモカインの選択
複合体に使用するケモカインは、治療する疾病または疾患、ならびに治療のタイミングおよび期間により選択する。例えば、ケモトキシンが高度の受容体特異性を示す場合、小グリア細胞および／またはマクロファージが炎症を開始させる二次的組織損傷の初期の段階での使用が望まれるであろう。これらの細胞を非常に特異的な薬剤を用いて除去することにより、周辺、およびまだ良性の細胞の活性化の可能性を小さくする。疾病の中間期または後期において他の白血球サブグループが用いられる場合、より広範囲の細胞特異性が望ましいであろう。さらに、適当な範囲を有するケモトキシンは、多様なタイプのケモカイン受容体を発現する限られた白血球集団に対し、非常に強い打撃を与えるであろう。あるケモカインは、特定の病状に対し、他のケモカインよりもより強い影響力を示す。例えば、MCP-1の発現は急性EAEを調節する一方で、MIP-1αの発現はEAEの再発の重篤度と相関し、またAD脳標本の免疫組織化学的染色はMIP-1βがいくつかの他のケモカインよりも優勢に発現していることを示す。このように、例えば、それぞれMSおよびアルツハイマー病を治療するためには、ケモトキシンにとってMIP-1αおよびMIP-1βが選択されるべきリガンドであろう。IP-10およびRANTESのような、ヒトMSの症例においてアップレギュレーションされるCXCR3およびCCR5に特異的なリガンドは、MSの治療に使用されるであろう。最後に、エオタキシン1および2は、好酸球により優先的に発現されるCCR3βケモカイン受容体に高い特異性を示す。従って、エオタキシンケモトキシンは、種々の肺疾患、好酸球増加症－筋肉痛症候群、鼻アレルギー、ポリープ症を含む好酸球の疾患に使用されてよい。
【０１６３】
エオタキシンおよびSDF-1βは、限定され、かつ非常に特異的な受容体結合プロフィールを示すケモカインリガンドの例であり、利用可能な受容体の制限されたサブセットを介して、非常に特異的細胞種をターゲッティングするリガンドである。MCP-3およびMCP-1は、

幅広い細胞および受容体結合プロフィールを持つリガンドの例である。かかるケモカインリガンドは単一または幅広い範囲の臨床症状に関連する。受容体サブタイプを利用する幅広い範囲の細胞種をターゲッティングするリガンドは、すべての細胞上またはある種の細胞上のみに発現されてよい。これは、主としてある種の病状に特異的であるか、またはある範囲の病状に共通の細胞種の機能である。

【０１６４】

以下の表は、選択された疾病および症状の治療のためのいくつかの例示的なリガンドの要約である。

【表３】

表２　リガンドおよび治療される疾病の例

リガンド	疾患／症状
MCP-1 および 3, RANTES, IP-10, IL-8, GROα	アテローム性動脈硬化症および再狭窄
MCP-1 および 3, RANTES, SDF-1β	SCI、外傷性脳損傷、卒中、AD
MCP-3 および 4, RANTES, IP-10, Mig	多発性硬化症
エオタキシン, RANTES, MDC, SDF-1β	HIV
エオタキシン, MCP-1 および 4, MDC, IL-8, ENA-78	炎症性腸疾患
MCP-3 および 4, RANTES, IP-10, Mig, IL-8, ENA-78, GROα, I-TAC	炎症性関節疾患（例えば関節炎）
	炎症性肺疾患
MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, 2, 3, 4, RANTES, IP-10, IL-8, ENA-78	急性肺損傷および繊維症
エオタキシン, MCP-4, MDC	アレルギー性好塩基球関連疾患
MCP-1, IL-8	炎症性眼疾患
	癌
SDF-1β, IP-10, Mig, IL-8, ENA-78, GROα	神経膠腫
MCP-1, 3,および 4, RANTES, SDF-1β	乳房
MCP-1, IL-8, ENA-78	肺

イタリック体で示したリガンドはαまたはCXCケモカインファミリーメンバーであり、その他はβまたは他のケモカインファミリーメンバーである。

示されたリガンドは、示された疾病の治療に組み合わせて使用できる。

組み合わせ治療には、２つの異なるケモカインが毒素成分の夫々の末端に結合しているような、２以上の成分からなる分子を用いてもよい。その場合、これらの二重のケモカイン融合体はαおよびβケモカインファミリーからそれぞれ１つずつのリガンドを含むことが

好ましい。

【０１６５】

本明細書で提供される複合体への取り込みのための、ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント（リガンド）の典型的なアミノ酸配列を表３に示す。

【表４】

表３　リガンドの例示的アミノ酸配列

リガンド*	配列	配列番号
エオタキシン	GPASVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTK LAKDICADPKKKWVQDSMKYLDQKSPTPKP	13
GCP-2	GPVSAVLTELRCTCLRVTLRVNPKTIGKLQVFPAGPQCSKVE VVASLKNGKQVCLDPEAPFLKKVIQKILDSGNKKN	14
GM-CSF	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEV ISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHY KQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE	15
GRO-1α	ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIA TLKNGRKACLNPASPIVKKIIEKMLNSDKSN	16
I-309	KSMQVPFSRCCFSFAEQEIPLRAILCYRNTSSICSNEGLIFKLKR GKEACALDTVGWVQRHRKMLRHCPSKRK	17
IL-3	APMTQTTPLKTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDFNNLNGE DQDILMENNLRRPNLEAFNRAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPL ATAAPTRHPIHIKDGDWNEFRRKLTFYLKTLENAQAQQTTLSL AIF	18

【表５】

リガンド*	配列	配列番号
IL-8	AVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEII VKLSDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS	19
MCP-1	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIF KTIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT	20
MCP-2	QPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTK RGKEVCADPKERWVRDSMKHLDQIFQNLKP	21
MCP-3	QPVGINTSTTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSHCPREAVIFK TKLDKEICADPTQKWVQDFMKHLDKKTQTPKL	22
MCP-4	QPDALNVPSTCCFTFSSKKISLQRLKSYVITTSRCPQKAVIFRT KLGKEICADPKEKWVQNYMKHLGRKAHTLKT	23
MIP-1α	ASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIADYFETSSQCSKPGVIFL TKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA	24
IL- 4	HKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETF CRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLD RNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS	25
MIP-2α (GRO-β)	APLATELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIAT LKNGQKACLNPASPMVKKIIEKMLKNGKSN	26
MIP-2β (GRO-γ)	ASVVTELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVNVRSPGPHCAQTEVIA TLKNGKKACLNPASPMVQKIIEKILNKGSTN	27
PARC (MIP-4)	AQVGTNKELCCLVYTSWQIPQKFIVDYSETSPQCPKPGVILLT KRGRQICADPNKKWVQKYISDLKLNA	28
RANTES	SPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVT RKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS	29
MIP-1β	APMGSDPPTACCFSYTARKLPRNFVVDYYETSSLCSQPAVV FQTKRSKQVCADPSESWVQEYVYDLELN	30
RAP	YSREKNQPKPSPKRESGEEFRMEKLNQLWEKAQRLHLPPVRLAELH ADLKIQERDELAWKKLKLDGLDEDGEKEARLIRNLNVILAKYGLDGK KDARQVTSNSLSGTQEDGLDDPRLEKLWHKAKTSGKFSGEELDKL WREFLHHKEKVHEYNVLLETLSRTEEIHENVISPSDLSDIKGSVLHSR HTELKEKLRSINQGLDRLRRVSHQGYSTEAEFEEPRVIDLWDLAQSA NLTDKELEAFREELKHFEAKIEKHNHYQKQLEIAHEKLRHAESVGDG ERVSRSREKHALLEGRTKELGYTVKKHLQDLSGRISRARHNEL	31

【表６】

リガンド*	配列	配列番号
SDF-1	DGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVAR LKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRFKM	32
TARC	ARGTNVGRECCLEYFKGAIPLRKLKTWYQTSEDCSRDAIVFV TVQGRAICSDPNNKRVKNAVKYLQSLERS	33

ALP(Hromas et al.,(1999)Biochem.Biophys.Res.Comm.258:737-740を参照)、ラングキン(Rossi et al.,(1999)J.Immunol.152:5490-5497を参照)以外の、表中に示したすべての配列は、ヒトタンパク質の配列である。MCP-2のヌクレオチド配列は、配列番号67中に示されており、マウスALPおよびマウスラングキンのヌクレオチド配列は配列番号69および70にそれぞれ示されている。

【０１６６】

ｃ．ケモカインでないサイトカイン

ケモカイン受容体を発現する細胞種または二次的組織損傷に関与する細胞種に結合する、ケモカインでないサイトカインを包含する複合体も、本明細書により提供される方法に使用してよい。かかるケモカインでないサイトカインを包含する複合体は、腫瘍細胞をターゲッティングする癌治療のような他の治療に用いられてきた。本明細書では、腫瘍に浸潤する白血球のようなケモカイン受容体を有する細胞、および望ましくない炎症応答に関連する他の細胞に結合する能力を有するためにサイトカインが選択される。

【０１６７】

ケモカイン受容体を有する細胞上の受容体をターゲッティングするためのタンパク様リガンド成分として有用なケモカインでないサイトカイン、コロニー刺激因子(CSF)およびケモカインでないインターロイキン(IL)には、限定されるものではないが、二次的組織損傷誘発細胞のような炎症応答に関与する細胞上の、それぞれEMAP-II、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、およびIL-13ファミリーのサイトカイン受容体に結合する、上皮単核細胞活性化ポリペプチドII(EMAP-II)、顆粒球－マクロファージ-CSF(GM-CSF)、顆粒球-CSF(G-CSF)、マクロファージ-CSF(M-CSF)、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、およびIL-13が含まれる。

【０１６８】

炎症応答に関連する病態生理学的症状の治療または阻害のための、ターゲッティング・エージェントとして使用し得る他の受容体結合タンパク質であり、１以上の二次的組織損傷誘発細胞上のケモカインでない受容体と結合および／またはそれを活性化するタンパク質の例としては、限定されるものではないが、アシル化LDLスカベンジャー受容体1および2、ならびにLDL、超低密度リポタンパク質-1(VLDL-1)、VLDL-2、糖タンパク質330/メガリン、リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP)、α-2-マクログロブリン、sorLA-1に対する受容体が挙げられる。特に有用な受容体結合タンパク質は、まだ命名されていないが、分子量は約39,000ダルトンで、低密度リポタンパク質(LDL)－受容体ファミリーのメンバーのようなタンパク質に結合し、その活性を調節する。

【０１６９】

ｄ．抗体リガンド部分

ケモカイン・レセプター・ターゲッティング複合体中のタンパク質様リガンド部分はまた、特にケモカイン受容体およびケモカイン受容体を発現する細胞上に発現される受容体のような、炎症応答に関与する細胞上に発現された受容体に特異的な抗体、特にモノクローナル抗体、またはその機能的断片でもあり得る。モノクローナル抗体は、例えばDARC、CXCR-1、CXCR-2、CXCR-3、CXCR-4、CXC4-5、CCR-１、CCR-2A、CCR-2B、CCR-3、CCR-4、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CCR-8、CCR-9、XCR1、CX3CR-1、CD97などのケモカイン受容体および他のかかる受容体に特異的なモノクローナル抗体が好ましい。

【０１７０】
いくつかの例においては、該抗体は、ケモカインでないサイトカイン受容体EMAPII、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13に特異的であり得る。これらの抗体を包含する複合体は、ケモカイン受容体およびターゲッティングされたサイトカイン受容体を発現する細胞、またはケモカインでないかかる受容体を発現し、二次的組織損傷に関与する細胞をターゲッティングするために使用されよう。
【０１７１】
複合体に使用し得るモノクローナル抗体の例としては、限定されるものではないがMAC-1、MAC-3、ED-1、ED-2、ED-3、および以下の抗原CD5、14、15、19、22、34、35、54、および68；OX4、6、7、19、および42；Ber-H2、BR96、Fib75、EMB-11、HLA-DR、LN-1およびトウゴマアグルチニン-1に対するモノクローナル抗体が挙げられる。
【０１７２】
抗体断片は、抗体のタンパク質分解性加水分解、または該断片をコードするDNAの大腸菌における発現により製造できる。抗体断片は、常法に従って完全な抗体をペプシンまたはパパイン消化することにより得られる。例えば、ペプシンを用いて抗体を酵素的に切断し、$F(ab')_2$と呼ばれる5S断片を産生できる。この断片はさらにチオール還元剤、また所望によりジスルフィド結合の切断の結果得られたスルフヒドリル基に対する遮断基を用いて、１価の3.5S Fab'断片を生成できる。あるいは、ペプシンを用いる酵素的切断により２つの１価のFab'断片およびFc断片が直接生成される(例えば、米国特許第4,036,945号および同第4,331,647号ならびにそれに包含される、その特許が出典明示によりそのまま明細書の一部とされる参照；ならびにPorter, R.R., Biochm. J., 73:119-126, 1959を参照のこと)。無傷の抗体により認識される抗原に該断片が結合しさえすれば、H鎖の分離により１価のＬ－Ｈ鎖断片を形成し、さらに断片を切断する方法、または他の酵素的、化学的、もしくは遺伝学的技術など、抗体を切断する他の方法も用いてよい。
【０１７３】
Ｆｖ断片はV_HおよびV_L鎖の結合を包含する。Inbar et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62,1972に記載されているように、この結合は非共有結合であってよい。あるいは、その可変鎖は分子内のジスルフィド結合により連結でき、またはグルタルアルデヒドのような化学物質で架橋結合してもよい。このＦｖ断片はペプチドリンカーにより連結されたV_HおよびV_L鎖を包含するのが好ましい。これらの１本鎖抗原結合タンパク質(sFv)は、オリゴヌクレオチドにより結合されたV_HおよびV_LドメインをコードするDNA配列を含んでなる構造遺伝子を構築することにより製造する。この構造遺伝子を発現ベクター中に挿入し、次いでそれを大腸菌などの宿主細胞に導入する。この組換え宿主細胞は、２つのＶドメインを架橋結合させるリンカーペプチドを有するポリペプチド１本鎖を合成する。sFvsを製造する方法は、例えばWhitlow and Filpula, Methods, 2:97-105, 1991; Bird et al., Science242：423-426, 1988; Pack et al/., Bio/Technology 11:1271-77, 1993; and Ladner et al.,米国特許第4,946,778号に記載されており、これらは出典明示して本明細書の一部とされる。
【０１７４】
抗体断片の別の形態は、１本鎖相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。CDRペプチド(「最小認識単位」)は、注目される抗体のCDRをコードする遺伝子の構築により得ることができる。かかる遺伝子は、例えば抗原産生細胞のRNAから可変領域を合成するポリメラーゼ連鎖反応により製造する（例えば、Larrick et al., Methods, 2: 106-10, 1991; and Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837, 1989参照）。
【０１７５】
二次的組織損傷誘発細胞上のケモカイン受容体またはケモカインでないサイトカイン受容体に結合する抗体は、完全なポリペプチドまたは注目される小ペプチドを免疫抗原として含む生物学的機能断片を用いて製造できる。動物を免疫するために使用する該ポリペプチドまたはペプチド(例えば、翻訳されたcDNAまたは化学合成由来)は、所望により担体タンパク質と複合体を形成できる。一般的に使用される、ペプチドに化学的に結合された担体

としては、限定されるものではないが、スカシガイ・ヘモシアニン(KLH)、チログロブリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、および破傷風毒素が挙げられる。次いでこの結合されたペプチドを用いて動物を免疫する(例えば、マウス、ラット、またはウサギ）。

【０１７６】

モノクローナル抗体の製造法は従来のものであり、十分公知である（例えば、Kohler et al., Nature 256:495-7, 1975; and Harlow et al., in: Antibodies: a Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Pub., 1988を参照)。便宜には、モノクローナル抗体は、マウスに抗原を含む組成物を注射し、血清サンプルを採取して抗体産生の存在を確認し、脾臓を摘出してＢリンパ球を得、Ｂリンパ球を骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、そのハイブリドーマをクローニングして抗原に対する抗体を産生する陽性クローンを選択し、ハイブリドーマ培養液から抗体を単離することにより得られる。種々のよく確立された技術により、ハイブリドーマ培養液からモノクローナル抗体を単離および精製できる。かかる単離技術には、プロテインＡセファロースを用いるアフィニティークロマトグラフィーをはじめとする、サイズ排除クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられ、当業者に十分公知である(例えば、Pharmacia Monoclonal Antibody Purification Handbook(例、ネコ#18-1037-46)を参照）。

【０１７７】

また、抗体はヒトに近い霊長類抗体に由来するものであってもよい。ヒヒにおいて治療上有用な抗体を作製する一般的な技術は、例えばGoldenberg et al.,国際特許公開WO91/11465 (1991)およびLosman et al., Int. J. Cancer, 46:310-314, 1990に見出すことができ、これらは出典明示により本明細書の一部とする。あるいは、治療上有用な抗体は「ヒト化」モノクローナル抗体に由来するものであってもよい。ヒト化モノクローナル抗体はマウス相補性決定領域をマウス免疫グロブリンの可変重鎖および可変軽鎖からヒト可変ドメインに移し、さらにネズミ対応物の骨組領域においてヒト残基を置換することにより作製する。ヒト化モノクローナル抗体由来の抗体構成要素の使用によりネズミ不変領域の免役原性に関連する潜在的な問題が回避される。ネズミ免疫グロブリン可変ドメインをクローニングする一般的技術は、例えば、Orlandi et al., Proc Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833-7, 1989に記載されており、出典明示により本明細書の一部とされる。ヒト化モノクローナル抗体を作製する技術は、例えば、Jones et al., Nature 321:522-5, 1986;Riechmann et al., Nature 332:323-7, 1988;Verhoeyen et al., Science 239:1534-6, 1988; Carter et al., Proc Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285-9, 1992; Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437-62, 1992;およびSinger et al., J. Immunol. 150:2844-67, 1993に記載されており、これらは出典明示により本明細書の一部とされる。

【０１７８】

抗遺伝子型技術を用いてエピトープを模倣するモノクローナル抗体を作製することも可能である。例えば、最初のモノクローナル抗体に対して作製された抗遺伝子型モノクローナル抗体は超可変領域に結合ドメインを有するであろうが、これは最初のモノクローナル抗体により結合されたエピトープの像である。

【０１７９】

3.ターゲッテッド・エージェント

ターゲッテッド・エージェントにはターゲッティングされるケモカイン受容体を発現する選択された細胞種へのその送達が望まれる作用剤のいずれもが含まれる。これらの作用剤としては、志賀Ａ鎖、リシンおよびサポリンなどの細胞毒、限定されるものではないが、例えば抗菌物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、抗癌薬、抗マイコプラズマ薬をはじめとする実質的にすべてのクラスの薬物、核酸および本明細書において注目される細胞へのそのターゲッティング送達が望まれるいずれかの他の化合物が挙げられる。癌治療のための薬物としては、一般に、アルキル化剤、増殖阻害剤、チュービュリン結合剤および他のかかる薬物が挙げられる。その他の細胞毒性薬剤としては、例えば、ヌクレオシド類似体、アントラサイクリンファミリーの薬物、ビンカ薬物、マイトマイシンが挙げられる。そのように構築された薬物複合体は、対応する薬物が有効である通常の目的に関して有効であり、

かつ、薬物をそこでそれが特に役立つ細胞に輸送し、それによりその部位で有効濃度を高める能力により著しい効力を有する。

【０１８０】

a.細胞毒部分

該方法および組成物において使用するのに好適な細胞毒としては、DNA切断剤などの小分子、および、限定されるものではないが、細菌、真菌、植物、昆虫、ヘビおよびクモ毒をはじめとするタンパク質性細胞毒が挙げられる。

【０１８１】

本明細書において提供される複合体への組み込みが意図される典型的な細胞毒のアミノ酸配列が表４に示されている。

【表７】

表４　毒素の典型的アミノ酸配列

毒素	配列	配列番号
ブリオジン	DVSFRLSGATTTSYGVFIKNLREALPYERKVYNIPLLRSSISGR YTLLHLTNYADETISVAVDVTNVYIMGYLAGDVSYFFNEASA TEAAKFVFKDAKKKVTLPYSGNYERLQTAAGKIRENIPLGLPA LDSAITTLYYYTASSAASALLVLIQSTAESARYKFIEQQIGKRV DKTFLPSLATISLENNWSALSKQIQIASTNNGQFESPVVLIDGN NQRVSITNASARVVTSNIALLLNRNNIA	34
サポリン－６	VTSITLDLVNPTAGQYSSFVDKIRNNVKDPNLKYGGTDIAVIP PSKEKFLRINFQSSRGTVSLGLKRDNLYVVAYLAMDNTNVNR AYYFRSEITSAESTALFPEATTANQKALEYTEDYQSIEKNAQIT QGDQSRKELGLGIDLLSTSMEAVNKKARVVKDEARFLLIAIQ MTAEAARFRYIQNLVIKNFPNKFNSENKVIQFEVNWKKISTAI YGDAKNGVFNKDYDFGFGKVRQVKDLQMGLLMYLGKPKSS NEANSTVRHYGPLKPTLLIT	35

【表８】

毒素	配列	配列番号
抗ウイルス性タンパク質MAP	APTLETIASLDLNNPTTYLSFITNIRTKVADKTEQCTIQKISKTF TQRYSYIDLIVSSTQKITLAIDMADLYVLGYSDIANNKGRAFFF KDVTEAVANNFFPGATGTNRIKLTFTGSYGDLEKNGGLRKDN PLGIFRLENSIVNIYGKAGDVKKQAKFFLLAIQMVSEAARFKYI SDKIPSEKYEEVTVDEYMTALENNWAKLSTAVYNSKPSTTTA TKCQLATSPVTISPWIFKTVEEIKLVMGLLKSS	36
志賀毒素A－鎖	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSG TGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNN VFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQ INRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRF RQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDY HGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVARMASD EFPSMCPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS	37
志賀様毒素サブユニットA（ベロ毒素２）	MKCILFKWVLCLLLGFSSVSYSREFTIDFSTQQSYVSSLNSIRT EISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLDVYQARFDH LRLIIEQNNLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHISVPGVTTVSMT TDSSYTTLQRVAALERSGMQISRHSLVSSYLALMEFSGNTMT RDASRAVLRFVTVTAEALRFRQIQREFRQALSETAPVYTMTP GDVDLTLNWGRISNVLPEYRGEDGVRVGRISFNNISAILGTVA VILNCHHQGARSVRAVNEESQPECQITGDRPVIKINNTLWESN TAAAFLNRKSQFLYTTGK	38
トリコサンチン	DVSFRLSGATSSSYGVFISNLRKALPNERKLYDIPLLRSSLPGS QRYALIHLTNYADETISVAIDVTNVYIMGYRAGDTSYFFNEAS ATEAAKYVFKDAMRKVTLPYSGNYERLQTAAGKIRENIPLGL PALDSAITTLFYYNANSAASALMVLIQSTSEAARYKFIEQQIG KRVDKTFLPSLAIISLENSWSALSKQIQIASTNNGQFESPVVLI NAQNQRVTITNVDAGVVTSNIALLLNRNNMA	39

【０１８２】

(1)DNA切断剤

該方法を実施する際に用いられるリガンド－毒素キメラにおいて細胞毒として含有させるに好適なDNA切断剤の例としては、限定されるものではないが、アントラキノン－オリゴピロール－カルボキサミド、ベンズイミダゾール、ライナマイシン、ダインマイシンA、エネジイン、ならびにその生物学的に活性な類似体または誘導体（すなわち、実質的に同等な生物学的活性を有するもの）が挙げられる。公知の類似体および誘導体は、例えば、Islam. et al., J. Med. Chem. 34 2954-61, 1991; Skibo et al., J. Med. Chem. 37:78-92, 1994; Behroozi et al., Biochemistry 35:1568-74, 1996; Helissey et al., Anticancer Drug Res. 11:527-51, 1996; Unno et al., Chem. Pharm. Bull. 45:125-33, 1997; Unno et al., Bioorg. Med. Chem., 5:903-19, 1997; Unno et al., Bioorg. Med. Chem., 5:883-901, 1997; およびXu et al., Biochemistry 37:1890-7, 1998に開示されている。その他の例としては、限定されるものではないが、エンジインキノンイミン（米国特許第5,622,958号）、2,2r-ビス(2-アミノエチル)-4-4'-ビチアゾール(Lee et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 40:151-7,1996)、エピリチシン-サレン銅複合体(Routier et al., Bioconjug. Chem., 8:789-92, 1997)が挙げられる。

【０１８３】

(2)代謝拮抗物質

リガンド－毒素キメラにおいて細胞毒として含有させるに有用な代謝拮抗物質の例としては、限定されるものではないが、5-フルオロウラシル、メトトレキセート、メルファラン、ダウノマイシン、ドキソルビシン、ナイトロゲンマスタードおよびマイトマイシンcが挙げられる。

【０１８４】
(3)タンパク質細胞毒
該方法において用いられるリガンド－毒素キメラに組み込むのに有用なタンパク質性細胞毒の例としては、限定されるものではないが、I型およびII型リボソーム不活化タンパク質(RIP)が挙げられる。有用なI型植物RIPとしては、限定されるものではないが、ジアンチン30、ジアンチン32、リクニン、サポリン1-9、ヨウシュヤマゴボウ活性化タンパク質(PAP)、PAPII、PAP-R、PAP-S、PAP-C、マパルミン、ドデカンドリン、ブリオジン-L、ブリオジン、コロシン1および2、ルフィン-A、ルフィン-B、ルフィン-S、19K-タンパク質合成阻害タンパク質(PSI)、15K-PSI、9K-PSI、α-キリロウイン、β-キリロウイン、ゲロニン、モモルジン、モモルジン-II、モモルジン-Ic、MAP-30、α-モモルカリン、β-モモルカリン、トリコサンチン、TAP-29、トリコキリン、オオムギRIP、アマRIP、トリチン、トウモロコシRIP、アスパリン1および2が挙げられる(Stirpe et al., Bio/Technology 10:405-12, 1992)。有用なII型RIPとしては、限定されるものではないが、ボルケンシン、リシン、ニグリン-b、CIP-29、アブリン、モデクシン、エブリチン-α、エブリチン-β、エブリチン-γ、ビルクミン、ポレクチン、ならびにそれらの生物学的に活性な酵素サブユニットが挙げられる(Stripe et al., Bio/Technology 10:405-12, 1992; Pastan et al., Annu. Rev. Biochem. 61:331-54; Brinkmann and Pastan, Biochim. et Biophys. Acta 1198:27-45, 1994;およびSandvig and Van Deurs, Physiol. Rev. 76:949-66, 1996) 。
【０１８５】
(4)細菌毒素
細胞毒として有用な細菌毒素の例としては、限定されるものではないが、志賀毒素および志賀様毒素（すなわち、同様の活性または構造を有する毒素）、ならびにそれらの触媒サブユニットおよび生物学上機能的な断片が挙げられる。これらの細菌毒素にはまた、II型RIPもある(Sandvig and Van Deurs, Physiol. Rev. 76:949-66,1996; Armstrong, J. Infect. Dis., 171:1042-5, 1995; Kim et al., Microbiol. Immunol. 41:805-8, 1997およびSkinner et al., Microb. Pathog. 24:117-22,1998)。有用な細菌毒素のさらなる例としては、限定されるものではないが、シュードモナス外毒素およびジフテリア毒素が挙げられる(Pastan et al., Annu. Rev. Biochem. 61:331-54;およびBrinkmann and Pastan, Biochim. et Biophys. Acta 1198:27-45, 1994)。毒素酵素サブユニットの先端切断型および変異体も細胞毒成分として使用できる(Pastan et al., Annu. Rev. Biochem. 61:331-54; Brinkmann and Pastan, Biochim. et Biophys. Acta 1198:27-45,1994; Mesri et al., J. Biol. Chem. 268:4852-62, 1993; Skinner et al., Microb. Pathog. 24:117-22, 1998および米国特許第5,082,927号)。その他のターゲッテッド・エージェントとしては、限定されるものではないが、ＲＮアーゼ毒素の３４種を超える記載されたコリシンファミリーが挙げられ、これにはコリシンA、B、D、E1-9、クロアシンDF13および真菌ＲＮアーゼ、α-サルシンが含まれる(Ogawa et al. Science 283:2097-100, 1999; Smarda et al., Folia Microbiol Praha) 43:563-82, 1998; Wool et al., Trends Biochem. Sci., 17:266-69, 1992)。
【０１８６】
(5) ポルフィリンおよびその他の光により活性化される毒素
ポルフィリンは十分に公知の光活性化毒素であり、これはタンパク質に容易に架橋され得る（例えば、米国特許第5,257,970号;同第5,262,720号;同第5,238,940号;同第5,192,788号;同第5,171,749号;同第5,149,708号;同第5,202,317号;同第5,217,966号;同第5,053,423号;同第5,109,016号;同第5,087,636号;同第5,028,594号;同第5,093,349号;同第4,968,715号;同第4,920,143号および国際出願WO93/02192参照)。
【０１８７】
b.ターゲッティング送達のための核酸
本明細書において提供される複合体を用いて核酸を標的細胞に送達することもできる。該核酸としては細胞のゲノムを改変し、それにより遺伝子治療を達成することを意図したDNAならびにアンチセンス剤として用いるためのDNAおよびRNAが挙げられる。該核酸として

はアンチセンスRNA、DNA、リボザイムおよびアンチセンス剤として用いられることを意図されるその他のオリゴヌクレオチドが挙げられる。また、該核酸はウイルスパッケージング配列などのRNA輸送シグナルを含み得る(例えば、Sullenger et al., (1994) Science 262:1568-1569参照）。また、該核酸としては完全な遺伝子をコードするか、または遺伝子治療に用いられることを意図されるタンパク質をコードするDNA分子が挙げられる。

【０１８８】

細胞に送達され遺伝子治療を達成し得るDNA（またはRNA）としては、腫瘍壊死因子などの腫瘍特異的細胞毒分子、ウイルス抗原および細胞を抗癌剤に対して感受性にするその他のタンパク質をコードするDNA、ならびに欠陥遺伝子を置換するために、嚢胞性繊維症に関連する欠陥遺伝子(CFTR)(例えば、国際出願WO93/03709参照(これは米国出願出願番号第07/745,900号に基づくものである）;およびRiordan et al., (1989) Science 245:1066-1073参照）などの遺伝子をコードするDNAが挙げられる。本明細書において特に注目されるのは、例えば、SCIに関与するものなどの、CNSにおける細胞に送達され、損傷を受けた組織の再生を助けるCNS増殖因子を発現する遺伝子であろう。

【０１８９】

本明細書に記載のように用いるための核酸およびオリゴヌクレオチドは当業者に公知のいずれの方法によっても合成できる（例えば、WO93/01286(これは米国出願出願番号第07/723,454号に基づくものである);米国特許第5,218,088号;同第5,175,269号;同第5,109,124号参照)。アンチセンス剤として用いるためのオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの同定は十分に当技術分野の技術の範囲内にある。遺伝子治療のためにターゲッティングされる送達のための遺伝子をコードするDNAの選択もまた、十分に当業者の技術レベルの範囲内にある。例えば、かかるオリゴヌクレオチドの望ましい特性、すなわち、長さおよびその他の特徴は十分に公知である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは内生ヌクレオチド分解酵素による分解に耐えるよう設計され、限定されるものではないが、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルホン、スルフェート、ケチル、ホスホロジチオエート、ホスホラミデート、ホスフェートエステルおよびその他のかかる結合が挙げられる（例えば、Agrawal et al. (1987) Tetrehedron Lett. 28:3539-3542; Miller et al. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93:6657-6685; Stec et al. (1985) Tetrehedron Lett. 26:2191-2194; Moody et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:4769-4782; Letsinger et al. (1984) Tetrahedron 40:137-143; Eckstein (1985) Annu. Rev. Biochem. 54:367-402; Eckstein (1989) Trends Biol. Sci. 14:97-100; Stein (1989) In: Oligodeoxynucletides. Antisense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, ed, Macmillan Press, London, pp. 97-117; Jager et al. (1988) Biochemistry 27:7237-7246参照)。

【０１９０】

(1) アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん分子、ダンベル状オリゴヌクレオチド、DNA、細胞外タンパク質結合オリゴヌクレオチド、および小ヌクレオチド分子をはじめとするアンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスヌクレオチドとは相補的な配列を有するmRNAと特異的に結合し、それによりmRNAの翻訳を阻害するオリゴヌクレオチドである（例えば、Altman et al.に対する米国特許第5,168,053号、Inouyeに対する米国特許第5,190,931号、Burchに対する米国特許第5,135,917号、Smith and Clusel et al., (1993) Nucl. Acids Res. 21:3405-3411に対する米国特許第5,087,617号（これはダンベル状アンチセンスオリゴヌクレオチドを記載している）参照）。三重らせん分子とは、二重らせんDNAを標的とし、それにより転写を阻害する一本鎖DNAを指す（例えば、Hogan et al.に対する米国特許第5,176,996号（二重らせんDNA上の標的部位に結合する合成オリゴヌクレオチドを作製する方法を記載）参照）。

【０１９１】

(2)リボザイム

リボザイムとはメッセンジャーRNAを特異的に切断するRNA構築物である。RNA鎖の切断および／または連結に関与すると知られている、少なくとも５クラスのリボザイムがある。

リボザイムはいずれのRNA転写物もターゲッティングすることができ、かかる転写物を触媒的に切断し得る（例えば、米国特許第5,272,262号;同第5,144,019号;ならびにCech et al.に対する米国特許第5,168,053号、同第5,180,818号、同第5,116,742号および同第5,093,246号（リボザイムおよびその作製方法について記載）参照）。かかるリボソームはいずれもケモカイン受容体含有細胞への送達のためにケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントに結合され得る。

【０１９２】

該リボザイムは、真核ウイルスプロモーター、一般には後期プロモーターなどの真核生物のプロモーターに連結された、リボザイムをコードするDNAとしてターゲッティングされる細胞に送達され、その結果、核へ導入されるとリボザイムが直ちに転写される。かかる例においては、該構築物また、核転移配列を一般にはターゲッティング・エージェントの一部として、またはリンカーの一部として含み、核に核酸が結合される送達に好適な形態がそれに付与される。

【０１９３】

(3) ターゲッティング送達のための治療産物をコードする核酸

使用が意図される治療用産物をコードするDNAの中には、嚢胞性繊維症に関連する欠陥遺伝子(CFTR)（例えば、国際出願WO93/03709(これは米国出願出願番号第07/745,900号に基づくものである）;およびRiordan et al., (1989) Science 245:1066-1073を参照）などの欠陥遺伝子の正しいコピー、腫瘍壊死因子などの抗癌剤、志賀A1毒素またはサポリンなどのケモカイン受容体含有細胞に対する細胞傷害性薬剤をコードするDNAがある。該複合体はNTSを含むべきである。該複合体を、ターゲッティング・エージェントと結合されていたDNAが細胞質において切断され、さらにNTSがDNAに結合されたままのリンカーの部分に含まれるように設計すれば、取り込まれると、複合体が核に輸送される。核転移配列(NTS)は異種配列であってもよく、または選択されたケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント由来のものであってもよい。典型的な共通NTS配列はアミノ末端プロリンまたはグリシンとそれに続く７個ないし９個のアミノ酸の配列中の少なくとも３個の塩基残基を含む（例えば、Dang et al., (1989) J. Biol. Chem. 264:18019-18023, Dang et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4048-4058および表２（NTSの例および公知のNTSと相同性を共有するタンパク質領域を示す）参照）。

【０１９４】

(4)核酸のタンパク質への結合

本明細書における化学結合を達成するには、ターゲッティング・エージェントを酸に直接または１以上のリンカーにより結合する。核酸を5'末端、3'末端およびその他の位置でタンパク質のアミノおよびカルボキシル末端およびその他の部位に結合する法は当業者に公知である（概説に関しては、例えば、Goodchild, (1993) In: Perspectives in Bioconjugate Chemistry, Mears, Ed., American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 77-99を参照）。例えば、紫外線照射を用いて（Sperling et al., (1978) Nucleic Acids Res. 5:2755-2773; Fiser et al., (1975) FEBS Lett. 52:281-283）、二機能性化学物質を用いて(Baumert et al., (1978) Eur. J. Biochem. 89:353-359; およびOste et al., (1979) Mol. Gen. Genet. 168:81-86)、光化学架橋を用いて(Vanin et al., (1981) FEBS Lett. 124:89-92; Rinke et al., (1980) J. Mol. Biol. 137:301-314; Millon et al. (1980) Eur. J. Biochem. 110:485-454)タンパク質は核酸に結合される。

【０１９５】

特に、DNAを混合ジスルフィド形成によりα_2マクログロブリン(α_2M)などのタンパク質に結合させるには、試薬(N-アセチル-N'-(p-グリオキシリルベンゾリル)システタミンおよび2-イミノチオランがを用いられている(Cheng et al., (1983) Nucleic Acids Res. 11:659-669参照）。N-アセチル-N'-(p-グリオキシリルベンゾリル)システタミンは対合していないグアニン残基と特異的に反応し、還元すると遊離メルカプト基を生成する。2-イミノチオランはタンパク質と反応してメルカプト基を生成し、これはさらに分子間ジスルフィド交換反応により誘導体化DNAに結合される。いずれの結合を用いて複合体の取り込みの際に

ターゲッティングされる核酸を有効にしてもよい。従って、結合の切断が必要であり得ると予測されるが、プロモーターに連結されたリボザイムをコードするDNAまたは核へ送達するための治療薬をコードするDNAなどのいくつかの試薬に関してはかかる切断は必要でない場合があると考えられる。

【０１９６】

チオール結合はヘテロ二機能性試薬を用いて容易に形成できる。また、アミンはpH６のイミダゾールバッファー中で核酸と1-エチル-3'-[3-ジメチルアミノ-プロピル]カルボジイミド(EDC)またはN-エチル-N'(3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド-ヒドロクロリド(EDCI)などの水溶性カルボジイミドが反応して5'ホスホルイミダゾリドが生成することにより、水溶液中の非保護オリゴヌクレオチドまたは核酸の5'末端リン酸に結合される。5'ホスホルイミダゾリドをアミン含有分子およびエチレンジアミンと接触させると安定なホスホルアミデートが得られる（例えば、Chu et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:6513-6529;およびWO88/05077（米国が指定）参照）。詳しくは、DNA溶液をpH6でEDCで飽和させ、振盪しながら4℃で一晩インキュベートする。次いで、得られる溶液を例えば約3倍量の100mMクエン酸バッファーを加えることによりpH8.6に緩衝し、約5μgないし約20μgのケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントを加え、得られた混合物を4℃で約48時間振盪する。未反応タンパク質は例えば、0.1M炭酸アンモニウム溶液、pH7.0を溶出バッファーとして用いるSEPHADEX G75(Pharmacia)を用いてカラムクロマトグラフィーによって混合物から除去すればよい。単離された複合体は凍結乾燥して使用するまで保存できる。

【０１９７】

米国特許第5,237,016号により、その5'末端でブロモアセチル化されたヌクレオチドを作製し、得られたオリゴヌクレオチドをチオール基と反応させる方法が提供されている。その5'末端ブロモアセチル基で誘導体化されたオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,237,016号に記載のように5'-アミノヘキシル-ホスホルアミデートオリゴヌクレオチドをブロモ酢酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルと反応させることによって作製できる。米国特許第5,237,016号はまた、次いで選択された増殖因子上のチオール基と反応し得る、チオール誘導体化ヌクレオチドを作製する方法も記載している。便宜には、チオール誘導体化ヌクレオチドは5'-リン酸化ヌクレオチドを用いて二工程で作製する:(1)第一の反応工程中でのジイミドの存在下、リン酸基のイミダゾールとの反応およびイミダゾール脱離基のシスタミンでの置換、ならびにシスタミンリンカーとジチオスレイトールとのジスルフィド結合の還元（Chu et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:5671-5691（これは同様の手順を記載している）も参照）。5'-リン酸化出発オリゴヌクレオチドは当業者に公知の方法によって製造できる（例えば、Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 122参照）。

【０１９８】

アンチセンスオリゴマーまたはメチルリン酸化オリゴヌクレオチド(MP-オリゴマー）などの核酸はSPDPまたはSMPBと反応させることにより誘導体化すればよい。得られたMP-オリゴマーはHPLCにより精製し、さらにケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントに結合させればよい。該MP-オリゴマー（約0.1μM）を約40～50μlの1:1アセトニトリル／水に溶解し、これにリン酸バッファー（PH7.5、最終濃度0.1M）および約1mlリン酸緩衝生理食塩水中の1mgMP-オリゴマーを加える。反応を室温で約5～10時間進行させ、次いで、約15μLの0.1ヨードアセトアミドでクエンチする。該複合体はヘパリンセファロースHiトラップカラム（1ml、Pharmacia）で精製し、直線または段階勾配で溶出できる。該複合体は0.6M NaClで溶出するはずである。

【０１９９】

4.リンカー部分

本明細書に提供される複合体を製造するには、タンパク質性リガンドへのリンカー部分の結合が標的細胞、すなわち、標的細胞上の受容体へのタンパク質性リガンドの結合を実質的に阻害しない、またはリガンド－毒素の取り込み、もしくは代謝を実質的に阻害して細

胞毒の標的細胞に対する毒性を低下させない限り、２つの部分を結合する当技術分野で現在のところ公知のいずれかの方法によってリガンド毒素キメラにおいて細胞毒を直接的または間接的のいずれかでケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントに結合する。該結合は、限定されるものではないが、イオンおよび共有結合、ならびにそれによりターゲッテッド・エージェントが、複合体が標的細胞により取り込まれる、その他のいずれかの十分に安定な結合をはじめとするいずれの種類の結合であってもよい。

【０２００】

ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントは所望により１以上のリンカーによりターゲッテッド・エージェントに結合される。リンカー部分は所望の特性によって選択される。例えば、リンカー部分の長さを選択して、リガンドの標的受容体への結合により誘導されるコンホメーション変化のいずれをも含む、リガンド結合の速度論および特異性を最適化できる。リンカー部分は、タンパク質性リガンド部分と標的細胞受容体が自由に接触できるように十分な長さであり、十分に柔軟であるべきである。リンカーが短すぎる、または堅すぎる場合には、タンパク質性リガンド部分と細胞毒の間に立体障害が存在し得る。リンカー部分が長すぎる場合には、細胞毒が作製過程においてタンパク質分解され得、すなわち、その毒性作用を標的細胞に有効に送達しない可能性がある。これらの化学リンカーは、実施例１および２に記載のものなどの当技術分野で公知の多くのプロトコールを用いて精製リガンドに結合できる（Pierce Chemicals 「Solutions, Cross-linking of Proteins: Basic Concepts and Strategies」 Seminar #12, Rockford,IL参照）。

【０２０１】

典型的なリンカー

本明細書では当業者に公知のいずれのリンカーを用いてもよい。一般に、融合タンパク質である複合体においては、化学的に作製された複合体におけるリンカーとは異なるセットのリンカーが用いられる。化学的に結合された複合体に好適なのリンカーおよび結合としては、限定されるものではないが、アミンおよびチオール基などの遊離反応基間のジスルフィド結合、チオエーテル結合、立体障害ジスルフィド結合、および共有結合が挙げられる。これらの結合はヘテロ二機能性試薬を用いて作製し、ポリペプチドの片側または両側上に反応性チオール基を作製し、さらに片側のポリペプチド上のチオール基が反応性チオール基またはアミン基と反応し、もう片側でそれに反応性マレイミド基またはチオール基が結合され得る。その他のリンカーとしては、ビスマレイミデオキシプロパンなどの酸切断性リンカー、酸不安定性トランスフェリン複合体およびより酸性の細胞内区画において切断される、アジピン酸ジヒドラジド、UVまたは可視光に曝されると切断される架橋剤およびヒトIgG1の不変領域に由来するC_H1、C_H2、およびC_H3といった種々のドメインなどのリンカーが挙げられる（Batra et al. (1993) Molecular Immunol. 30:379-386参照）。いくつかの具体例では、各々のリンカーの所望の特性に関する利点をとるために数種のリンカーが含まれ得る。

【０２０２】

化学リンカーおよびペプチドリンカーは共有結合によってリンカーがケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント(TA)とターゲッテッド・エージェントに挿入される場合もある。以下に記載のヘテロ二機能性薬剤を用いてかかる共有結合を達成し得る。ペプチドリンカーはまた、リンカーおよびTA、リンカーおよびターゲッテッド・エージェント、またはリンカー、ターゲッテッド・エージェントおよびTAを融合タンパク質としてコードするDNAを発現することによって結合され得る。本明細書における使用には、柔軟なリンカーおよび複合体の可溶性を高めるリンカーが意図され、単独または他のリンカーをともなうのいずれかのものが考えられる。

【０２０３】

a.ヘテロ二機能性架橋剤

アミノ基とチオール基との間に共有結合を形成し、チオール基をタンパク質に導入するのに用いられる多数のヘテロ二機能性架橋剤は当業者には公知である（例えば、PIERCE CAT

ALOG、ImmunoTechnology Catalog & Handbook, 1992-1993（これはかかる試薬の製造および使用を記載し、かかる試薬の市販供給源を提供する）参照、また例えば、Cumber et al. (1992) Bioconjugate Chem. 3:397-401; Thorpe et al. (1987) Cancer Res. 47:5924-5931; Gordon et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:308-312; Walden et al. (1986) J. Mol. Cell Immunol. 2:191-197; Carlsson et al. (1978) Biochem. J. 173:723-737; Mahan et al. (1987) Anal. Biochem. 162:163-170; Wawryznaczak et al. (1992) Br. J. Cancer 66:361-366; Fattom et al. (1992) Infection & Immun. 60:584-589参照）。これらの試薬を用いてターゲッティング・エージェント、ケモカイン、およびターゲッテッド・エージェントの間に共有結合を形成してもよい。これらの試薬としては、限定されるものではないが、N-スクシンイミジル-3-(-2-ピリジルジチオ)-プロピオネート（SPDP;ジスルフィドリンカー）、スルホスクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート（スルホ-LC-SPDP）、スクシンイミジルオキシカルボニル-α-メチルベンジルチオスルフェート（SMBT、立体障害ジスルフェートリンカー）、スクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート（LC-SPDP）、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC）、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート（SPDB;立体障害ジスルフィド結合リンカー）、スルホスクシンイミジル2-(7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセトアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート（SAED）、スルホ-スクシンイミジル7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセテート（SAMCA）、スルホスクシンイミジル6-[α-メチル-α-(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート（スルホ-LC-SMPT）、1,4-ジ-[3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン（DPDPB）、4-スクシンイミジルオキシカルボニル-α-メチル-α-(2-ピリジルチオ)トルエン（SMPT、立体障害ジスルフェエートリンカー）、スルホスクシンイミジル6[α-メチル-α-(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート（スルホ-LC-SMPT）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ-MBS）、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート（SIAB;チオエーテルリンカー）、スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート（スルホ-SIAB）、スクシンイミジル4(p-マレイミドフェニル)ブチレート（SMPB）、スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート（スルホ-SMPB）、アジドベンゾイルヒドラジド(ABH）が挙げられる。

【０２０４】

その他のヘテロ二機能性切断性架橋剤としてはN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)-アミノベンゾエート、スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)-アミノベンゾエート、4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-a-(2-ピリジルジチオ)トルエン、スルホスクシンイミジル-6-[a-メチル-a-(ピリジルジチオール)-トルアミド]ヘキサノエート、N-スクシンイミジル-3-(-2-ピリジルジチオ)-プロプリオネート、スクシンイミジル6[3(-(-2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド]ヘキサノエート、スルホスクシンイミジル6[3(-(-2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド]ヘキサノエート、3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオニルヒドラジド、エルマン試薬、ジクロロトリアジン酸、S-(2-チオピリジル)-L-システインが挙げられる。さらなる典型的二機能性結合化合物は米国特許第5,349,066号、同第5,618,528号、同第4,569,789号、同第4,952,394号および同第5,137,877号に開示されている。

【０２０５】

b. 酸切断性、光切断性および感熱性リンカー

酸切断性リンカー、光切断性および感熱性リンカーも、特に、ターゲッテッド・エージェントを切断してそれがより容易に反応に利用されやすくすることが必要であり得る場合には使用してよい。酸切断性リンカーとしては、限定されるものではないが、ビスマレイミデオトキシプロパン、およびアジピン酸ジヒドラジドリンカー（例えば、Fattom et al., (1992) Infection & Immun. 60:584-589参照）およびトランスフェリンが細胞内トランスフェリン循環系に入るのを可能にするのに十分な部分を含む熱不安定性トランスフェリ

ン複合体（例えば、Wilhoner et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:4309-4314参照）が挙げられる。

【０２０６】

光切断性リンカーとは光に曝されると切断され（例えば、Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104-107参照（なお、このリンカーは出典明示により本明細書の一部とする））、それにより光に曝されるとターゲッテッド・エージェントを放出するリンカーである。光に曝されると切断される光切断性リンカーは公知である（例えば、Hazum et al. (1981) in Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 16th, Brunfeldt, K (Ed) pp, 105-110（これはニトロベンジル基のシステインの光切断性保護基としての使用を記載している）;Yen et al., (1989) Makromal. Chem 190:69-82（これはヒドロキシプロピルメタクリルアミド共重合体、グリシン共重合体、フルオレセイン共重合体およびメチルロダミン共重合体をはじめとする水溶性光切断性共重合体を記載している）;Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104-107（これは近UV光(350nm)に曝されても光分解に耐える架橋剤および試薬を記載している）;およびSenter et al. (1985) Photochem. Photobiol 42:231-237（これは光切断性結合を作製し、それにより光に曝されるとターゲッテッド・エージェントを放出する、塩化ニトロベンジルオキシカルボニル架橋剤を記載している） 参照）。かかるリンカーは特に、光ファイバーを用いる光に曝され得る、皮膚または目の症状の治療において用いられるであろう。複合体の投与後、目もしくは皮膚またはその他の身体部分を光に曝すことが可能であり、その結果、複合体からターゲッティングされる成分が放出される。かかる光切断性リンカーは、動物の身体からの迅速な除去を可能にするためにターゲッティング・エージェントを取り除くことが望ましい、診断プロトコールと関連して有用である。

【０２０７】

c.化学複合のためのその他のリンカー

その他のリンカーとしては、トリチルリンカー、特に、種々の酸またはアルカリ度で治療薬の放出を提供する複合体類を生成する誘導体化されたトリチル基が挙げられる。治療薬が放出されるpH範囲を予め選択する能力によって、このように付与される適応性により、治療薬の送達の必要性における組織間の公知の生理学的相違に基づくリンカーの選択が可能となる（例えば、米国特許第5,612,474号参照）。例えば、腫瘍組織の酸度は正常組織のものよりも低いと考えられている。

【０２０８】

d.ペプチドリンカー

リンカー部分はペプチドであってもよい。融合タンパク質およびまた化学結合性複合体においてペプチドリンカーを用いることができる。該ペプチドは典型的には約2ないし約60個のアミノ酸残基、例えば約5ないし約40個、または約10ないし約30個のアミノ酸残基を有する。選択される長さは、リンカーが含まれる使用目的などの因子によると考えられる。

【０２０９】

タンパク質性リガンドは１以上の標的細胞上の受容体と特異的に結合し、標的細胞により取り込まれる。標的細胞へのリガンド－毒素キメラの輸送を促進するためには、現在のところ、リガンド－毒素キメラの大きさが注目される標的細胞により取り込まれ得るものよりも大きくないということが好ましい。一般に、リガンド－毒素キメラの大きさはその構成要素による。リガンド毒素キメラが化学リンカーおよび化学毒素を含む（すなわち、タンパク質性のものではない）場合には、リガンド毒素の大きさは一般にリガンド－毒素キメラが融合タンパク質である場合よりも小さい。便宜には、ペプチド性リンカーは核酸によりコードされ、大腸菌などの宿主細胞において発現されると融合タンパク質に組み込まれ得る。

【０２１０】

ペプチドリンカーはケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントがタンパク質性である場合には有利である。例えば、リンカー部分は一本鎖抗体の研究において公

知のものなどの柔軟なスペーサーアミノ酸配列であり得る。かかる公知のリンカー部分の例としては、限定されるものではないが、GGGGS（配列番号1）、$(GGGGS)_n$（配列番号2）、GKSSGSGSESKS（配列番号3）、GSTSGSGKSSEGKG（配列番号4）、GSTSGSGKSSEGSGSTKG（配列番号5）、GSTSGSGKSSEGKG（配列番号6）、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号7）、EGKSSGSGSESKEF（配列番号8）、SRSSG（配列番号9）、SGSSC（配列番号10）が挙げられる。配列AMGRSGGGCAGNRVGSSLSCGGLNLQAM（配列番号11）を有するジフテリア毒素トリプシン感受性リンカーもまた有用である。

【０２１１】

あるいは、ペプチドリンカー部分はVMまたはAMであってもよく、または式：$AM(G_{2\ 10\ 4}S)_XAM$｛ここで、Xは１から11の整数である｝（配列番号12）により記載される構造を有してもよい。さらなる結合部分は、例えば、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:5879-5883, 1988; Whitlow, M., et al., Protein Engineering 6:989-995, 1993; Newton et al., Biochemistry 35:545-553, 1996; A. J. Cumber et al., Bioconj. Chem. 3:397-401, 1992; Ladurner et al., J. Mol. Biol. 273:330-337, 1997;および米国特許第4,894,443号に記載されている。

【０２１２】

その他のリンカーとしては、限定されるものではないが、カテプシンB基質、カテプシンD基質、トリプシン基質、トロンビン基質、サブチリシン基質、因子Xa基質、およびエンテロキナーゼ基質などの酵素基質、$(gly_mser)_n$および$(ser_mgly)_n$｛ここで、mは１ないし6、好ましくは1ないし4、より好ましくは2ないし4であり、かつ、nは１ないし30、好ましくは1ないし10、より好ましくは1ないし4である｝などのリンカーをはじめとする可溶性、柔軟性、および／または細胞内切断性を高めるリンカーが挙げられる（例えば、複合体に用いるための典型的なリンカーを提供する、国際PCT出願出願番号WO96/06641参照）。いくつかの具体例では、各々のリンカーの所望の特性に関する利点をとるために数種のリンカーが含まれ得る。

【０２１３】

D.複合体の調製

結合されたターゲテッド・エージェントを有する複合体は、化学結合もしくは組換えDNA技術のいずれか、または組換え発現と化学結合の併用により製造できる。本明細書の方法を、ケモカインおよび志賀A1またはサポリンに関して詳細に言及し、例を挙げて説明する。しかしながら、本明細書に記載されるように、任意のターゲッティング・エージェントとRIP、核酸または他のいずれかのターゲテッド・エージェントのような任意のターゲテッド・エージェントの、直接またはリンカーを介する複合体の製造および使用にも、同様の方法を用いてよいと理解される。このターゲッティング・エージェントおよびターゲテッド・エージェントは、任意の方向で結合されてよく、１以上のターゲッティング・エージェントおよび／またはターゲテッド・エージェントが複合体中に存在してもよい。

【０２１４】

1.融合タンパク質の製造

ケモカインリガンドおよび／またはキメラ融合タンパク質は、ケモカインおよび／または細胞毒素のアミノ酸配列が公知の場合は十分公知のタンパク合成法により製造でき、要すれば以下に記載される公知の方法で該配列をまず決定する。いくつかのリガンド遺伝子は現在商業的に入手可能である。商業的に入手できる遺伝子を得る利点は、それらが一般に大腸菌における発現のために最適化されていることである。問題のタンパク質、ペプチド、またはポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドは、DNA合成技術により製造できる。商業的に入手不可能な遺伝子をコードするDNAを得る方法、およびそれから遺伝子産物を発現させる方法は以下に記載され、本明細書の実施例１に示されている。

【０２１５】

このケモカインリガンド、タンパク質様リンカー部分およびタンパク質様細胞毒素を含むリガンド－毒素キメラはまた、図１に示された一般構造を有する融合タンパク質として製造できる。該融合タンパク質は、融合タンパク質の発現をコードする核酸配列と機能し得

る形で連結された発現制御配列を含む発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクトする、十分公知の方法により製造される(Molecular Cloning A Laboratory Manual, Sambrook et al., eds.,2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989)。

【０２１６】

以下の表５は、代表的なケモカイン・レセプター・ターゲッティング・リガンド複合体、およびケモカイン受容体を発現する細胞集団に結合する、ケモカインでないサイトカインを含む複合体の理論的なサイズとpIを示している。IL-4を含む複合体のようなケモカインでないサイトカインを有する複合体は、これまでに腫瘍細胞へのターゲッティング送達を行うために使用されてきたが、二次的組織損傷のような病理学的炎症症状の治療には用いられていない。

【表９】

表５　遊離ヒトリガンドおよびリガンド－サポリン６融合タンパク質の理論的分子量および等電点(ALA-METリンカーにより結合されたもの)

リガンド	遊離リガンド		リガンド-AM-サポリン-6	
	理論的pI	理論的分子量(ダルトン)	理論的pI	理論的分子量(ダルトン)
(A)				
MCP-1	9.39	8,685	9.44	37,371
MCP-2	9.49	8,914	9.47	37,600
MCP-3	9.74	8,956	9.56	37,642
MCP-4	9.98	8,599	9.64	37,285
MIP-1α	4.77	7,788	8.93	36,473
MIP-1β	4.77	7,819	8.91	36,505
RANTES	9.24	7,851	9.40	36,537
エオタキシン	9.92	8,365	9.63	37,051
(B)				
SDF-1α	9.97	8,698	9.63	37,384
IL-8	9.24	8,922	9.43	39,999
GROα	9.51	7,865	9.51	38,932
GCP-2	9.75	8,312	9.57	39,382

【表１０】

リガンド	遊離リガンド		リガンド-AM-サポリン-6	
	理論的pI	理論的分子量(ダルトン)	理論的pI	理論的分子量(ダルトン)
(C)				
RAP	6.88	37,772	8.86	66,457
(D)				
AM-Sap-6		9.40	28,704	
(E)				
IL-3	7.05	15,091	9.19	43,777
IL-4	9.26	14,963	9.39	43,649
GM-CSF	5.21	14,477	8.47	43,163

【０２１７】
凡例：(A)C-Cケモカイン；(B)CXCケモカイン；(C)LDL受容体に対する受容体結合タンパク質；(D)毒素+リンカー；(E)本明細書に記載の炎症応答に関連する細胞をターゲッティングするケモカインでないサイトカイン
【０２１８】
a．ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント・ペプチド、複合体、リンカー、融合タンパク質、およびペプチド・ターゲッテッド・エージェントをコードする構築物の発現のためのプラスミドならびに宿主細胞
発現ベクターの構築およびトランスフェクトされた細胞における遺伝子発現には、当技術分野に十分公知の分子クローニング技術が使用される(例えば、Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Sambrook et al., eds., 2nd Ed., Cold Spring Harbor, NY, (1989) and Current Protocols In Molecular Biology, Vols. 1 and 2, and Current Protocols In Molecular Biology, Vols. 1 and 2, Ausubel, et al., Eds., Current Protocols, 1987-1994; John Wiley and Sons, Inc., 1994-1999; Cloning Vectors - A Laboratory Manual, Vols I-IV, Pouwles, et al., Eds.,およびその増補, Elsebier, N.Y., 1995-1998参照)。かかる方法には、図２ないし５に示されたように、融合タンパク質コード配列、および適当な転写／翻訳制御シグナルを含む発現ベクターの構築が含まれる。これらの方法はまた、in vitro組換えDNA技術、合成技術およびin vivo組換え／遺伝的組換え法を含む(例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, Sambrook et al., eds., 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; and Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1 and 2, Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1 and 2, Ausubel, et al., Eds., Current Protocols, 1987-1994; John Wiley and Sons, Inc., 1994-1999; Cloning Vectors - A Laboratory Manual, Vols I - IV, Pouwels, et al., Eds.,およびその増補, Elsebier, N.Y.,1995-1998参照)。
【０２１９】
注目されるポリペプチドの発現をコードする配列を有する細胞のトランスフェクトに使用された核酸は、一般に該ポリペプチドの発現をコードするヌクレオチド配列に機能し得る形で連結された、発現制御配列を含む発現ベクターの形態であろう。この異種核酸が宿主において継続的に維持されるような安定した導入を得る方法は、当技術分野において公知

である。組換えDNAを用いる宿主細胞の形質転換は、当業者に十分公知の常法により行ってよい。宿主が大腸菌のような原核細胞の場合、対数増殖期の後に採取された細胞を、次いで当技術分野に十分公知の$CaCl_2$法で処理してDNA取り込みが可能なコンピテント細胞を作製できる。別法として、$MgCl_2$またはRbClも使用できる。形質転換は、宿主細胞のプロトプラストの形成後、またはエレクトロポレーションにより行うことができる。宿主としては原核宿主細胞を使用するのが好ましい。

【０２２０】

宿主が真核細胞である場合、DNAのトランスフェクション法には、リン酸カルシウムの共沈殿の形成およびマイクロインジェクション、エレクトロポレーションおよびリポソームに封入したプラスミドの挿入といった、従来の機械的方法が含まれる。他の方法としては、サルウイルス40(SV40)、ウシ・パピローマウイルス、または組換え自律型パルボウイルスベクターなどの真核ウイルスベクターを(米国特許第5,585,254号の記載に従って)使用し、一時的に真核細胞を感染または形質転換させ、タンパク質を発現させる(Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982)。真核細胞はまた、融合ポリペプチドをコードするDNA配列および、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子などの選択可能な表現型をコードする第２の異種DNA分子とともに同時にトランスフェクトできる。

【０２２１】

真核細胞の発現系は、発現された哺乳類タンパク質のさらなる翻訳後修飾を起こし得る。かかる細胞は、所望により一次転写の翻訳後プロセッシングのための細胞の仕組みを有している。かかる修飾には、限定されるものではないが、グリコシル化、リン酸化、ファルネシル化などが含まれる。かかる宿主細胞系としては、限定されるものではないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、Jurkat、HEK-293およびWI38が挙げられる。

【０２２２】

原核細胞または真核細胞のいずれかにより発現されたタンパク質の単離および精製技術は、例えば、分取クロマトグラフィー分離法およびモノクローナルもしくはポリクローナル抗体、もしくは抗原の使用を含む免疫学的分離法といった、いずれの常法によって行ってもよい。

【０２２３】

融合タンパク質コード配列を発現させるために、種々の宿主－発現ベクター系を使用してもよい。これには、限定されるものではないが、融合タンパク質コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌などの微生物；融合タンパク質コード配列を含む組換え酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母；融合タンパク質コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)を感染させた植物細胞系、もしくは組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)により形質転換された植物細胞系；融合タンパク質コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系；または融合タンパク質コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス)を感染させた動物細胞系、または安定した発現のために操作された形質転換動物細胞系が挙げられる。

【０２２４】

利用する宿主／ベクター系にもよるが、発現ベクター中に、構成および誘導プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどのいずれの数の好適な転写および翻訳エンハンサーエレメントを使用してもよい(例えば、Bitter et al., Methods in Enzymology 153:516-544, 1987参照)。例えば、細菌系でクローニングする場合、限定されるものではないが、バクテリオファージSのpL、plac、ptrp、ptac、tac、T7(ptrp-lacハイブリッドプロモーター)が使用され得る。哺乳類細胞系でクローニングする場合には、哺乳類細胞のゲノム由来(例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳類ウイルス由来(例えば、レトロウイルスの長い末端反復；アデノウイルス後期プロモーター；ワ

クシニアウイルス7.5Kプロモーター)由来のプロモーターを使用してもよい。組換えDNAまたは合成技術により作製したプロモーターも、挿入された融合タンパク質コード配列の転写のために用いてよい。

【０２２５】

細菌系において、所望される特性にもよるが多くの発現ベクターが有利に選択され得る。例えば、大量の融合タンパク質を産生する場合は、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物を直接発現するベクターが望ましい。融合タンパク質の回収を助けるには切断部位を含むよう操作されたものが好ましい。pET 11a、b、cまたはdをはじめ、商業的に入手可能ないくつかのベクター(Novagen, Madison, WI)を用いて優れた結果が得られている。

【０２２６】

大腸菌における形質転換のために特に好ましいプラスミドとしては、pET発現ベクター(米国特許第4,952,496号参照；NOVAGEN, Madison, WIから入手可能；Novagenから出版されたこの系について記載した文献を参照)が挙げられる。かかるプラスミドはT7 lacプロモーター、T7ターミネーター、誘導性大腸菌lacオペレーターおよびlacリプレッサー遺伝子を含むpET 11cおよび／またはpET 11a；T7プロモーター、T7ターミネーターおよび大腸菌ompT分泌シグナルを含むpET 12a-c；Hisカラムの精製で使用するためのHis-Tag^{TM}リーダー配列(配列番号40)およびカラム精製後の切断を行うトロンビン切断部位を含むpET 15b(NOVAGEN, Madison, WI)；T7-lacプロモーター領域およびT7ターミネーターを含む。

【０２２７】

ターゲテッド・エージェントにリンカーを介してあるいは介さずに結合されたケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントをコードする核酸、およびかかる構築物は、それぞれ細胞内または細胞質周辺での融合タンパク質発現のため、pETベクター、pET 11c、pET-11aおよびpET-15b発現ベクター(NOVAGEN, Madison, WI)に挿入できる。

【０２２８】

他のプラスミドとしてはは、pKKプラスミド、特にTACプロモーターを含むpKK 223-3(Pharmaciaより入手可能；Brosius et al.,(1984)Proc., Natl. Acad. Sci. 81:6929; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology; 米国特許第5,122,463号、同第5,173,403号、同第5,187,153号、同第5,204,254号、同第5,212,058号、同第5,212,286号、同第5,215,907号、同第5,220,013号、同第5,223,483号および同第5,229,279号)が含まれる。プラスミドpKKは、EcoRI付着末端を持つカナマイシン耐性カセット(Pharmaciaより購入；pUC4Kから得られる。例えば、Vieira et al., (1982) Gene 19:259-268;米国特許第4,719,179号参照)をアンピシリン耐性マーカー遺伝子中に挿入することにより修飾される。

【０２２９】

他の好ましいベクターには、pP$_L$－λ誘導的発現ベクターおよびtacプロモーターベクターpDR450(例えば、米国特許第5,281,525号、同第5,262,309号、同第5,240,831号、同第5,231,008号、同第5,227,469号、同第5,227,293号参照；Pharmacia P.L. Biochemicalsから入手可能；Mott, et al.(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:88;およびDe Boer et al. (1983)Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21を参照)；およびpBlueBacIIIを含むpBlueBacベクター(pJVETLおよびその誘導体；例えば米国特許第5,278,050号、同第5,244,805号、同第5,243,041号、同第5,242,687号、同第5,266,317号、同第4,745,051号および同第5,169,784号参照)のようなバキュロウイルスベクターが含まれる。

【０２３０】

他のプラスミドはpIN-IIIompA2のようなpIN-IIIompAプラスミド(Inouyeに対する米国特許第4,575,013号参照；また、Duffaud et al.(1987)Meth. Enz. 153:492-507参照)を含む。このpIN-IIIompAプラスミドは、大腸菌のリポタンパク質遺伝子由来の機能性断片とともに転写読み取り枠に連結された非相同DNAのための挿入部位を含む。このプラスミドはまた、所望のポリペプチドがそのアミノ末端のompAシグナルペプチドとともに発現され、それにより細胞質膜をわたる効率的な分泌を可能にする大腸菌のompAタンパク質シグナルペプチドDNA断片を含む。このプラスミドはさらに、所望のポリペプチドの転写発現のため

に適切な方向に配置された、大腸菌lac遺伝子プロモーター・オペレーターの特定のセグメントをコードするDNA、ならびにlacオペロンインデューサーの不在下でlacプロモーター・オペレーターと相互作用して転写を阻害する、結合されたリプレッサー分子をコードする別個の機能性大腸菌lacl遺伝子を含む。通常、いずれかのプロモーターからの転写がリプレッサー分子により阻害されるが、所望のポリペプチドの発現はリポタンパク質(lpp)プロモーターおよびlacプロモーター・オペレーターの制御下にある。このリプレッサーはインデューサー分子が双方のプロモーターから所望のポリペプチドの転写発現を誘導することにより選択的に不活性化される。

【０２３１】

リプレッサータンパク質は、構築物を含むプラスミド、またはリプレッサータンパク質をコードする遺伝子を含む第２のプラスミドによりコードされてもよい。このリプレッサータンパク質は、リプレッサータンパク質が結合するヌクレオチド配列を含むプロモーターの転写を抑制できる。そのプロモーターは、細胞の生理学的条件を変化させることにより抑制解除される。この変化は、例えばオペレーターもしくは調節タンパク質もしくはDNAの他の領域との相互作用を阻害する分子を増殖培地に加えることにより、または増殖培地の温度を変えることにより達成される。好ましいリプレッサータンパク質としては、限定されるものではないが、IPTG誘導に応答する大腸菌laclリプレッサー、温度感受性c1857リプレッサーが挙げられる。大腸菌laclリプレッサーが好ましい。

【０２３２】

ある具体例では、該構築体は転写ターミネーター配列も含む。このプロモーター領域および転写ターミネーターは同一または異なる遺伝子からそれぞれ独立に選択される。いくつかの具体例では、該DNA断片は細菌細胞、好ましくは大腸菌中で複製される。該DNA断片はまた、典型的には細菌の世代から世代へのDNA断片の維持を確実にする細菌の複製起点を含む。このようにして、細菌における複製により大量のDNA断片を産生できる。好ましい細菌の複製起点としては、限定されるものではないが、f1-oriおよびcol E1複製起点が挙げられる。

【０２３３】

昆虫宿主、pBlueBac(pJVETLおよびそれらの誘導体)ベクターのようなバキュロウイルスベクター、特にpBlueBacIII(例えば、米国特許第5,278,050号、同第5,244,805号、同第5,243,041号、同第5,242,687号、同第5,266,317号、同第4,745,051号および同第5,169,784号参照；INVITROGEN, San Diegoから入手可能)もポリペプチドの発現のために使用してよい。このpBlueBacIIIベクターは二重プロモーターベクターであり、このプラスミドは昆虫に認識され得るETLプロモーターの制御下にあるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)を含み、IPTGを用いて誘導できるので、青色／白色のスクリーニングにより組換え体の選択ができる。DNA構築物はバキュロウイルスベクターpBluebacIII(INVITROGEN, San Diego, CA)中に導入され、次いで昆虫細胞スポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)(sf９細胞；例えば、Luckow et al.(1988)Bio/technology 6:47-55および米国特許第4,745,051号参照)中に野生型ウイルスとともに、同時トランスフェクトされる。

【０２３４】

好ましい細菌宿主は機能し得る形でlacUVプロモーターのような誘導的プロモーターに連結されたT7 RNAポリメラーゼをコードするDNAの染色体コピーを含む(米国特許第4,952,496号参照)。かかる宿主としては、限定されるものではないが、溶原大腸菌株HMS174(DE3)pLysS、BL21(DE3)pLysS、HMS174(DE3)およびBL21(DE3)が挙げられる。菌株BL21(DE3)が好ましい。このpLys菌株は、T7 RNAポリメラーゼの天然の阻害剤であるT7ライソザイムレベルが低い。好ましい細菌宿主は、昆虫細胞スポドプテラ・フルギペルダである(sf9細胞；例えば、Luckow et al.(1988)Bio/technology 6:47-55および米国特許第4,745,051号参照）。

【０２３５】

融合タンパク質を発現するために使用できる代替の発現系としては昆虫系がある。かかる系の１つにおいては、オートグラファ・カリフォルニカ(Autographa californica)核多角

体病ウイルス(AcNPV)が異種遺伝子発現のためのベクターとして用いられる。このウイルスはスポドプテラ・フルギペルダ細胞において増殖する。該融合タンパク質コード配列をウイルスの非必須領域(例えば、多角体遺伝子)にクローン化してAcNPVプロモーター(例えば多角体プロモーター）の制御下に置いてよい。融合タンパク質コード配列の挿入の成功により、多角体遺伝子が不活性化され、非閉鎖型組換えウイルス(すなわち、多角体遺伝子によりコードされるタンパク質外被を欠いたウイルス)が産生される。次いでこれらの組換えウイルスを用いて、挿入された遺伝子が発現されるスポドプテラ・フルギペルダ細胞に感染させる(米国特許第4,215,051号参照)。

【０２３６】

本明細書で提供される構築物はまた、pBLUEBACIIIの名称で市販されているバキュロウイスルベクター中に挿入される(INVITROGEN, San Diego CA;INVITROGEN CATALOGを参照;Vialard et al.(1990)J. Virol. 64:37参照;また、米国特許第5,270,458号；同第5,243,041号；および米国特許出願第07/792,600号に基づく、公開国際PCT出願第WO93/10139号も参照）。このpBlueBacIIIベクターは二重プロモーターベクターであり、このプラスミドは昆虫により認識可能なETLプロモーターの制御下にあるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)を含み、IPTGを用いて誘導可能であるため、青色／白色スクリーニングにより組換え体の選択ができる。この構築物、または他の構築物をこのベクター中の多角体プロモーターの制御下に挿入する。青い吸蔵(occlusion)のないウイルスプラークを選択し、ウイルスプラークを精製して、適当な抗血清を用いるウエスタンブロットまたは適当なプローブを用いるサザンブロットなどの標準的ないずれかの方法でケモカイン-毒素をコードするDNAの存在に関してスクリーニングする。次いで選択された精製組換えウイルスを野生型バキュロウイルスとともに、$CaPO_4$トランスフェクションまたはリポソーム法によりスポドプテラ・フルギペルダ細胞(sf9細胞)中に同時トランスフェクトし、組織培養フラスコでまたは懸濁培養にて増殖させる。

【０２３７】

酵母において、構成または誘導プロモーターを含む多くのベクターが使用され得る。かかるベクターは十分公知である(概説に関しては、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, Vol.2, Ausubel et al., eds., Ch13, Current Protocols, 1987-1994;John Wiley and Sons, Inc., 1994-1999;およびBitter et al., Methods in Enzymol., 153:516-544, 1987; Rothstein In:DNA Cloning, Vol.II, Glover, D.M., ed., IRL Press, Wash., D.C., Ch3, 1986;およびBitter et al., Methods in Enzymol., 152:673-684, 1987;およびThe Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Strathern et al., eds., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II, 1982参照)。ADHもしくはLEU2などの酵母構成プロモーター、またはGALのような誘導プロモーターを使用してもよい(DNA Cloning, Vol. II, Glover, D.M., Ed., IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3, 1986)。あるいは、酵母染色体中への異種DNA配列の取り込みを促進するベクターを使用してもよい。ADHもしくはLEU2などの酵母構成プロモーター、またはGALのような誘導的プロモーターを使用してもよい(Rothstein In:DNA Cloning Vol.11, A Practical Approach,Ed. DM Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986, Cloning in Yeast, Ch.3)。

【０２３８】

植物発現ベクターを使用する場合、融合タンパク質コード配列の発現は多数のプロモーターにより行われてよい。例えば、CaMVの35S RNAおよび19S RNAプロモーターなどのウイルスプロモーター(Brisson et al., Nature 310：511-514, 1984)、またはTMVに対するコートタンパク質プロモーター(Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311, 1987)を使用してもよいし、あるいは、RUBISCOの小サブユニットなどの植物プロモーター(Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680, 1984; Broglie et al., Science 224:838-843, 1984);または例えばダイズhsp17.5-Eもしくはhsp17.3-Bなどの熱ショックプロモーターを使用してもよい(Gurley, et al., Mol. Cell. Biol. 6：559-565, 1986)。これらの構築物は、Tiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接的DNA形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを用いて植物細胞に導入できる。かかる技術の概説は

、例えばWeissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp421-463, 1988;およびPlant Molecular Biology, 2d Ed., Covey, S.N., ed., Ch.7-9, Blackie, London 1988を参照のこと。

【０２３９】

直接的発現のために組換えウイルスまたはウイルスエレメントを使用する哺乳類細胞系を操作してもよい。例えば、アデノウイルス発現ベクターを用いる場合、融合タンパク質コード配列を、例えば後期プロモーターおよび３部分リーダー配列などのアデノウイルス転写／翻訳制御複合体に連結してもよい。このキメラ遺伝子を、次いでin vitroまたはin vivo組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入する。ウイルスゲノムの非必須領域(例えば領域E1またはE3)への挿入の結果、感染された宿主中で生存可能かつ該融合タンパク質を発現できる組換えウイルスが作製される(例えば、Logan and Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3655-3659, 1984を参照)。あるいは、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーターを使用してもよい(例えば、Mackett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7415-7419, 1982;Mackett et al., J. Virol., 49:857-864, 1984; Panicali et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:4927-4931, 1982参照)。特に注目されるのは、染色体外エレメントとして複製能力を有するウシ・パピローマウイルスに基づくベクターである(Sarver, et al., Mol. Cell. Biol. 1:486-96, 1981)。このDNAがマウス細胞に入るとすぐに、該プラスミドが細胞１個あたり約100ないし200個のコピーを複製する。挿入されたcDNAの転写は、宿主の染色体へのプラスミド組み込みを必要としないため、高レベルの発現がおこる。プラスミド中にneo遺伝子のような選択可能なマーカーを含むことにより、これらのベクターを安定した発現のために使用できる。あるいは、宿主細胞中で該融合タンパク質遺伝子の発現を誘導および命令できるベクターとして使用するために、レトロウイルスゲノムを修飾することができる(Cone and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6349-6353,1984)。高レベルの発現はまた、限定されるものではないが、メタロチオネインIIAプロモーターおよび熱ショックプロモーターを含む誘導プロモーターを用いて達成してもよい。

【０２４０】

組換えタンパク質の長期にわたる、高収量の産生、安定な発現が好ましい。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを用いるよりもむしろ、適当な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)および選択マーカーにより、制御された融合タンパク質をコードするcDNAで宿主細胞を形質転換できる。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択のための耐性を付与し、細胞の染色体にプラスミドを安定に組み込ませ、増殖させて細胞増殖巣を形成させ、次いでそれをクローン化して細胞系統にまで発展させる。例えば、異種DNAの導入後、操作された細胞を１ないし２日間、豊富培地で増殖させて、次いで選択培地に切り替える。多くの選択系を使用してよく、限定されるものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., Cell, 11:223-32, 1977)、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska and Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026-30, 1962)、およびアデニンホスホ－リボシルトランスフェラーゼ(Lowry et al., Cell. 22:817-31, 1980)遺伝子をtk^-、$hgprt^-$または$aprt^-$細胞にそれぞれ使用できる。また、メトトレキセート耐性を付与するdhfr遺伝子(Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:3567-70, 1980; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8:1527-31, 1981)；マイコフェノール酸耐性を付与するgpt遺伝子(Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072-6, 1981)；アミノグリコシドG-418耐性を付与するneo遺伝子(Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1-14, 1981)；ヒグロマイシン耐性を付与するhygro遺伝子(Santerre et al., Gene, 30: 147-56,1984)の選択に基づいて抗代拮抗物質耐性も使用できる。最近、さらなる選択遺伝子について記載され、すなわちtrpBは細胞にトリプトファンの代わりにインドールを利用させる；hisDは細胞にヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用させる (Hartman and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8047-51, 1988);およびODC(オルニチンデカルボキシラーゼ)はオルニチンデカルボキシラーゼ阻害

剤、2-(ジフルオロメチル)-DLオルニチン、DFMOに対する耐性を付与する(McConlogue et al. J. Biol. Chem., 258:8384-8388)

【０２４１】

１つの具体例では、該融合タンパク質は組換えDNA技術により産生され、一本鎖ポリペプチドがケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント、ペプチドリンカー部分および細胞毒素部分のようなタンパク質性のターゲッティング・エージェントを含む。このケモカイン・レセプター・ターゲッティング部分は、ポリペプチド中の細胞毒素部分に対してアミノ末端側に置くことができる。かかる融合タンパク質は一般化された構造：(アミノ末端側)ケモカインリガンド部分－ペプチドリンカー部分－タンパク質性細胞毒素部分(カルボキシ末端側)を有し、図１に示されている。あるいは、該融合タンパク質中において、該ケモカイン部分は細胞毒素部分に対してカルボキシ末端側に置くことができる。本明細書においてまた意図されるのは、アミノおよび／またはカルボキシ末端に例えばポリヒスチジンタグのような余分のアミノ酸配列を含む融合タンパク質である。

【０２４２】

形質転換後、常法に従って大量のタンパク質を単離、精製できる。例えばHPLC、排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、または他の精製技術により精製して、発現宿主および所望のタンパク質(または融合タンパク質)から溶解産物を製造できる。精製されたタンパク質は一般に、約80％ないし約90％の純度であり、100％の純度まで引き上げることができる。純粋とは、他のタンパク質ならびに細胞残渣を含まないことを意味する。

【０２４３】

ｂ．リガンド－毒素キメラ融合タンパク質のクローニングおよび発現

cDNAライブラリーの構築

所望のタンパク質性リガンドを産生することが知られている細胞系統から全RNAを単離し、オリゴ(dT)-セルロース分画してRNAをポリA末端と結合させることにより精製した。ｃDNAの第一鎖の合成は逆転写酵素およびNotIのような好適な制限部位を有するプライマーを用いて行う。いくつかの逆転写酵素が利用可能であり、トリおよびネズミが最もよく使用される。次いでこのDNA-RNAハイブリッド分子を用いて、利用可能ないくつかの異なる方法の１つにより、二本鎖cDNAを生成する。DNAにリンカーを結合させ、次いで該DNAをアガロースゲル電気泳動によりサイズ分別する。このようにして得たDNAを好適なベクターを用いて直接クローニングするか、または最初にプロービングによりスクリーニングする。プロービングのためには、遺伝子の各末端の既知の遺伝子配列から２つのオリゴヌクレオチドを作製し、そのオリゴヌクレオチドをゲルのプロービングに用いる。両プローブとのハイブリダイゼーションを示すゲル領域を切り取り、DNAを精製する。この精製されたDNAをクローン化し、大腸菌を形質転換させるのに用いる。得られたコロニーを再度プロービングして陽性クローンを選択する。

【０２４４】

遺伝子産物の発現

次ぎに、遺伝子産物を発現させる。陽性クローンを得たところで、選択されたクローンが所望の配列を有していることを保証するために配列決定反応を行う。発現ベクターｐKK223-3において、遺伝子のATG開始コドンが直接的に制限部位により先行されているPCRオリゴヌクレオチドを作製する(Pharmacia, Piscataway, NJ)。遺伝子の3'末端の続いて２つの制限部位が存在する。第１の制限部位は、認識配列の前の10ないし20個の塩基を切断する酵素により認識され、引き続いて消化が起こり停止コドンが除去され、第２の遺伝子との融合が起こる。第２の認識部位は、発現ベクター中へ遺伝子をクローニングするのに用いられる。標準的な条件下でPCRを行って配列を延長し、得られたDNAをアガロースゲル上で分離して、正確なサイズのバンドを有するクローンを切り取り、発現ベクターへクローニングする。PCRはエラーを導入する可能性があるので、ここで全遺伝子を配列決定し、それが所望の正確な配列を有しているかどうか確かめる。クローンが正確な配列であれば、この方法で単離してベクターを大腸菌中にトランスフェクトし、イソプロピル-β-D-チ

オガラクトピラノシドで誘導される対数増殖中期まで４ないし６時間、クローンを増殖させる。

【０２４５】

発現されたタンパク質はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離して、単離のためにクマシーブルー染色する。この段階では、タンパク質は可溶性相に高収量で発現される。もし該タンパク質が不溶性であったり収量が非常に少ない場合は、リボソーム結合部位または増殖条件に対する種々の改良を行ってこの問題を解決する。

【０２４６】

5'末端のPCRプライマーは二重の制限部位を付加され、１つの部位は発現のための直接的なクローニングを容易にし、もう１つの部位は該オリゴヌクレオチドを発現ベクターにクローニング化し、融合タンパク質を産生することを除いては、リガンド遺伝子に融合される第２の核酸断片(例えば、タンパク質性リンカーをコードするポリヌクレオチド配列)は、配列番号１ないし12(国際PCT出願第96/06641号、複合体において使用するためのリンカー例を提供する)などの公知のアミノ酸配列から合成することで得られる。この第２のタンパク質はそれ自体により、または双方の遺伝子産物を含む融合タンパク質において発現される。第３の遺伝子(例えば、タンパク質性細胞毒をコードする遺伝子)は、前記の方法に従いって適当な細胞系統から得られ、その宿主細胞中へのトランスフェクションに先立って発現ベクターへ付加される。

c．ケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェント-毒素融合遺伝子例の構築および発現

【０２４７】

12のリガンド-毒素融合遺伝子（表６）が構築された。これらの遺伝子産物は３つの毒素の各々と遺伝子融合した４つのリガンドを含む。HISタグを付けた遺伝子はin vitroにおいて少量の各融合物が好都合に発現し、精製され、試験され得るように構築されたものである。HISタグはまた必要とされるべきタンパク質精製の代替経路を提供する。サポリン含有ケモカイン-毒素融合物は、それと他の毒素が比較され、特徴付けられるプロトタイプとなる。

【０２４８】

部分精製されたOPL898110はin vitroにおいて標的および非標的細胞に対して試験されてきた。相対的休止状態において標的細胞（ヒト一次末梢血単球およびヒトTHP-1細胞系統）はアポトーシス機構と一致して徐々に根絶されるが、活性型の標的細胞（ヒトTHP-1細胞系統およびヒト一次Ｔリンパ球）はより短い時間枠で根絶される。後者の作用はおそらく、少なくともある部分、細胞によりアップレギュレートされた代謝速度、好適なケモカイン受容体の発現、およびタンパク質の合成速度の上昇に対するOPL98110の阻害作用によるものであろう。代謝上活性な非標的細胞（プレ活性化ヒト胎児ニューロンおよびヒト神経膠腫細胞）は、標的細胞が明瞭な異常性または死を示さない濃度ではケモカイン-毒素によっては影響を受けない。組織培養で試験されるケモカイン-毒素融合タンパク質は白血球系の標的細胞を死滅させるが、非標的細胞には影響を及ぼさない。これらの結果はOPL98110が脊髄損傷の治療において有用であることを示唆するものである。

【０２４９】

このケモカイン-毒素タンパク質を使用すれば、二次的組織損傷を引き起こす細胞を根絶しつつ、正常なCNSの生存および機能に必要な活力のあるニューロン集団および星状細胞集団を使わずにすむ。

【０２５０】

上記のように、ペプチドリンカーを介して細胞毒と結合したケモカインを含有する一連のケモカイン-毒素融合タンパク質をコードする20の構築物例を構築した。これらの組成、コード名称、およびこれら融合タンパク質の選択される理論的特徴は表６に示されている。

【表１１】

表６　ケモカインー毒素および遊離毒素の組成、名称、理論的分子量および等電点

リガンド	リンカー	毒素部分	名称	分子量（ダルトン）	pI	配列番号
(A)複合体						
エオタキシン	AM	志賀-A1	OPL98104	35,603	9.63	61
	AM	志賀 HIS	OPL98112	35,943	9.63	62
	AM	サポリン	OPL98108	36,848	9.63	63
MCP-1	AM	志賀-A1	OPL98102	35,923	9.22	52
	AM	志賀 HIS	OPL98110	36,263	9.22	53
	AM	サポリン	OPL98106	37,168	9.44	54
MCP-3	AM	志賀-A1	OPL98101	36,194	9.49	55
	AM	志賀 HIS	OPL98109	36,535	9.49	56
	AM	サポリン	OPL98105	37,439	9.56	57
SDF-1β	AM	志賀-A1	OPL98103	35,944	9.62	58
	AM	志賀 HIS	OPL98111	36,263	9.62	59
	AM	サポリン	OPL98107	37,257	9.63	60
(B) 遊離毒素						
	--	志賀-A1	OPL981	27,053	8.13	64
1	--	志賀 HIS	OPL983	27,394	8.15	65
	--	サポリン	OPL982	28,501	9.40	66

【０２５１】

凡例(A)ケモカイン、リンカーおよび毒素部分からなるケモカイン-毒素複合体；(B)遊離毒素部分。「HIS6」は６個のカルボキシ末端ヒスチジン残基を示す。

【０２５２】

各ケモカイン-毒素の発現は明らかに検出されたが、実質的には粗細胞ペースト中の総タンパク質の0.1%未満と評価された。このような低レベルは、志賀毒およびサポリン毒をはじめとするリボソーム不活化タンパク質(RIP)がそれらを発現する細菌宿主細胞に対して毒性があるというこれまでに公表されている知見と全く一致するものである。さらに直接的には、志賀A1サブユニットは大腸菌リボソームに対してアッセイされた最も効力あるRIP毒である。発現されるタンパク質のレベルを向上させるためには、シグナルペプチドを機能し得る形で発現されるタンパク質に連結してそれを周縁質空間へ輸送する。あるいは

、また好ましくは、厳格に調節された発現ベクターへ融合タンパク質を導入し、最適化された培地および発酵手法を用いて増殖させる。

【０２５３】

本明細書で提供される融合タンパク質は厳格に調節されるpET11cベクター(T7プロモーター)を用いて発現されたが、発酵条件は定まったタンパク質生産用にはまだ最適化されていない。これに一致して、ケモカイン-毒素で形質転換した大腸菌はおよそ誘導４時間め、比較的低い細胞密度で死にはじめる。さらに最近のOPL98110およびOPL98106を用いた実験では、これらのケモカイン-毒素は発酵が進につれますます不溶性画分と会合することを示しており、このことはそれらが封入体と会合していることを示唆するものである。不溶性の封入体はタンパク質の単離および精製には実施上有利である。自動発酵槽ならびにより適切な増殖培地および条件の適用をはじめ、ケモカイン-毒素複合体をコードするタンパク質を含有する系統の発酵の最適化にはpET11c系が十分利用される。

【０２５４】

２．化学複合体の製造

本明細書において、化学的結合を達成するためには、ターゲッティング・エージェントは１種以上の選択されたリンカーにより結合されるか、またはターゲッテッド・エージェントに直接結合される。化学的結合は、ターゲッテッド・エージェントが核酸または非ペプチド性薬剤のようなペプチドまたはタンパク質ではない場合に用いられるべきである。選択した成分を化学的に結合するには、当業者に公知のいずれの手段を用いてもよい。いくつかの方法が実施例に記載されている。

【０２５５】

E.複合体を試験する動物モデル

本明細書において意図される炎症性疾病および症状を有する種々の動物モデルにおいて、本明細書に提供された複合体ならびに他の適応症に用いられるIL-2-、IL-4-、GM-CSF-、抗CD4-、および抗CD5-含有複合体などの利用できる複合体を用いて試験し、活性を確認し、かつ／または本明細書において意図される特定の疾病または症状の治療に好適なものが同定され得る。

【０２５６】

また、本明細書で提供されるケモカイン受容体をターゲッティングする複合体もまた、他の複合体が用いられている疾病のモデルで試験しても得る。例えば、抗腫瘍活性に関して同定するためのマウス異種移植片モデルがある（例えば、Beitz et al., (1992) Cancer Research 52:227-230; Houghton et al., (1982) Cancer Res. 42:535-539; Bogden et al., (1981) Cancer (Philadelphia) 48:10-20; Hoogenhout et al., (1983) Int. J. Radiat. Oncol., Biol. Phys. 9:871-879; Stastny et al., (1993) Cancer Res. 53:5740-5744参照)。

【０２５７】

哺乳類の治療のための候補を選択するための動物モデルは十分に公知であり、多数の認められたモデルがある。さらに、これらの病状における活性化免疫細胞の役割が証明されている。かかる疾病および症状の典型的なモデルとしては、限定されるものではないが、以下の考察におけるものが挙げられる。

【０２５８】

脊髄損傷(SCI)

ケモカイン受容体をターゲッティングする複合体を試験するために用いられるSCIの動物モデルを提供、使用する典型的な参照文献としては、限定されるものではないが、以下のものが挙げられる。

【０２５９】

Bennett et al., (1999) Spasticity in rats with sacral spinal cord injury [In Proces Citation] J. Neurotrauma 16:69-84 により、最小限に破壊され、膀胱、腸または後肢歩行運動機能は阻害していない、筋痙縮性のラットモデルが提供されている。S2仙骨レベルで脊髄を横切し、従って、尾の筋肉組織にのみ影響を及ぼした。脊髄を横切した後

、尾の筋肉は2週間動かなかった。この最初の期間に続き、尾において高血圧、反射亢進および間代が発現し、時間とともにより明白なものとなった。尾は容易に利用でき、操作しやすいので、これらの変化は覚醒しているラットにおいて評価された。力と筋電計記録を用いて測定したところ、尾の筋肉の伸展または皮膚刺激により筋肉痙攣が起こり、筋肉緊張状態において増加を示した。尾が拘束されていない場合には、自発的または反射誘導された屈筋および伸筋痙攣により尾を巻いた。痙攣の間の運動により尾の先端における間代が誘発されることが多かった。尾の毛および皮膚は軽度の接触に対し極めて反射亢進であり、接触すると即座に引っ込み、間代が尾の表面の反復接触に同調することもあった。脊髄切断の前後で分節性の尾の筋肉反射、例えばホフマン反射（H-反射）が測定され、横切の２週間後に有意に増加した。これらの結果は、仙骨脊髄ラットは脊髄損傷したヒトの手足の筋肉において認められるものと同様の特徴を有する、尾の筋肉における痙縮性の徴候を発現し、従って、この症状を研究するのに便宜な調製物を提供するということを示すものである。

【０２６０】

Taoka et al., (1998) Spinal cord injury in the rat, Prog Neurobiol 56:341-58により、ラットにおける外傷誘導性脊髄損傷の病理機構に関する概説から新規治療方法のさらなる開発までが提供されている。外傷により誘導された脊髄損傷は最初の身体の傷害および組織破壊をもたらす種々の病理化学現象を含む、続いて起こる進行性の損傷過程の結果であり、従って、後者の過程が薬理学的治療の標的となるはずである。最近、活性化好中球がラットにおける脊髄損傷の後者の過程に関与していることが示された。活性化好中球は好中球エラスターゼおよび酸素フリーラジカルなどの炎症性メディエーターを放出することにより内皮細胞を破壊する。活性化好中球の内皮細胞への付着もまた内皮細胞損傷において役割を果たしているのであろう。この内皮細胞損傷が次に微小循環系障害を誘導し、脊髄虚血をもたらす可能性がある。好中球活性化を阻害するいくつかの治療薬は脊髄損傷ラットモデルにおいて認められる運動障害を軽減する。メチルプレドニソロン(MPS)およびGM1ガングリオシドは急性脊髄損傷の治療に現在臨床利用できる、ただ２種のみの薬理学的作用剤であるが、このラットモデルにおいては好中球活性化を阻害しない。考え合わせると、これらの観察結果から、MPSまたはGM1ガングリオシドと併用される好中球活性化を阻害するその他の薬理学的作用剤がヒトにおける外傷性脊髄損傷の治療において共同効果を有し得るという可能性が持ち上がる。

【０２６１】

Carlson et al., (1988) Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury, Exp Neurol 151:77-88により、ラットのT10脊髄に対する挫傷損傷（10g重、50mm滴）の4、6、24および48時間後における好中球のおよびマクロファージ／小グリア細胞の頭側-尾側破壊を調べる研究が提供されている。好中球はミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性のアッセイを用いて測定したところ、主に壊死領域に局在し、24時にピークとなる経時変化を示した。MPO活性の最も鋭いピークは損傷の4mm頭側と尾側の間に局在していた。マクロファージ／小グリア細胞をED1およびOX-42に対する抗体で可視化した。24時間までには食細胞形態を有する多数の細胞が存在し、48時間までにはさらに多数となった。これらの細胞は主として灰白質および背側の珠柄白質内に局在していた。細胞数は外傷の6mm頭側から尾側にわたって徐々に低下した。OX-42染色もまた鈍いプロセスで、詳しくは外傷とははずれたレベルで反応性小グリア細胞を示した。マクロファージ／小グリア細胞数は各々のレベルで損傷を受けた組織量と有意に相関していた。

【０２６２】

Bartholdi et al. (1997) Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study, Eur J Neurosci 9:1422-38により、マウスの実験的脊髄損傷モデルにおける前炎症性および化学誘引物質サイトカインの発現パターンの研究が記載されている。in situハイブリダイゼーションにより、損傷後の最初の1時間内に前炎症性サイトカインTNFαおよびIL-1ならびにケモカインMIP-1αおよびMIP-1βの転写物はアップレギュレートされるとい

うことが示されている。この初期段階おいて、前炎症性サイトカインの発現は、おそらくCNSが常在するであろう外傷領域の周囲の細胞に限定されている。TNFαは極めて短い時間帯において発現されるが、IL-1は第２段階において多形核顆粒球の小セット中に検出され、これは約6時間で脊髄に移入する。ケモカインMIP-1αおよび-βのメッセージは約24時間で脊髄全体の灰白質に全身化されて発現され、損傷後4日で再び外傷部位の細胞浸潤物に限定される。このデータは常在CNS細胞、最もおそらくは小グリア細胞は末梢の炎症細胞ではなく、サイトカインおよびケモカインmRNAの主要な供給源であるということを示すものである。観察された所定のサイトカインパターンはCNSに外傷を受けた時の炎症現象は厳密に制御されているということを示す。前炎症性サイトカインおよびケモカインメッセージの極めて初期の発現は炎症細胞の補充の重要なエレメントを提供し得る。

【０２６３】

Blight et al. (1991) Morphometric analysis of blood vessels in chronic experimental spinal cord injury: hypervascularity and recovery of function, J Neurol Sci 106:158-74により、モルモットにおいて、それまでに記載された、一定の厚い部分への圧迫に基づく脊髄外傷モデルが提供されている。11個体の麻酔をかけた成体モルモットに下部胸髄の圧迫損傷を作出し、継続的な行動試験および2～3ヶ月での損傷の形態計測を用いて結果をモニターした。この報告書は外傷の中心を通る1ミクロンのプラスチック切片の光学顕微鏡解析に基づく脊髄の脈管質における変化を記載している。これらの外傷における平均血管密度は正常な、損傷を受けていない脊髄の同等の領域において認められるものの約2倍であり、また白質の超脈管質が外傷中心から頭部および尾部へ少なくとも4つの脊髄分節に拡張していた。毛細血管径分布は大きな値へ有意に変化し、大きな血管周囲空間がほとんどの毛細血管ならびに前および後毛細血管を取り囲んでいた。超脈管質の拡張は損傷の全般的な重篤度とは相関していなかったが、白質の400ミクロン外側における血管密度と損傷後1日から8週間に認められる、外傷下の二次的の神経学的機能損失との間には有意な正の相関があった。これらのデータは外傷の超血管新生は脊髄損傷における二次的の病理学的機構、おそらくは炎症性の応答と関連があるということを示すものであり、それは最初の機構損傷とは比較的無関係であるが、機能の損失および回復とはより密接に関係している。

【０２６４】

Blight et al. (1993) Increased level of the excitotoxin quinolinic acid in spinal cord following contusion injury, Brain Res 623:314-6により、炎症性食細胞の産生は脊髄外傷に続く二次的病理学の可能性ある誘因であるということが示されており、短時間圧迫損傷の5日後の成体モルモットの下部胸部脊髄における神経毒および活性化マクロファージの産物であるキノリン酸(QUIN)のレベルを定量する研究が提供されている。損傷部位(T13)では組織QUINレベルの上昇(>10倍）にインドールアミン-2,3ジオキシゲナーゼ活性の比例した増加(>2.5倍）およびL-キヌレニンの濃縮(>2.5倍）が付随した。これに対し、対照として比較試験された2つの非損傷領域、すなわち頸部脊髄(C2)および体知覚皮質においては有意な変化は生じなかった。

【０２６５】

Forbes et al. (1994) Inhibition of neutrophil adhesion does not prevent ischemic spinal cord injury, Ann Thorac Surg 58:1064-8により、動物モデルに頼り、対麻痺は一時的な大動脈閉塞後に脊髄の最初の虚血または再潅流期間の際の損傷の結果として生じ得るということが示されている。虚血／再潅流の動物モデルでは、再潅流損傷は好中球により部分的に調節され得るという証拠がある。ウサギにおける脊髄虚血／再潅流においてネズミモノクローナル抗体(MAb 60.3)をブロックする好中球付着の効力が評価された。脊髄虚血は腎臓下大動脈のバルーンカテーテル閉塞により達成された。神経学的評価は正常、部分神経学的欠損、または完全麻痺として分類された。体知覚により喚起される電位の電気生理学的モニタリングを用いて閉塞の最適時間が決定された。動物は2mg/kgの静脈注射Mab 60.3(n=8)または生理食塩水溶液(n=9)でランダムに処理され、研究者は処理を知らなかった。平均閉塞時間は群の間で異ならなかった（対照、32.7+/-3.6分に対しMAb、32.

4+/-6.0分）。5個体(55%)の生理食塩水処理および4個体(50%)のMAb 60.3処理動物が対麻痺となった。初期の不全対麻痺があった動物はすべて24時間以内に弛緩性麻痺に進行した。この研究は一時的な大動脈閉塞後の脊髄損傷は好中球のCD1/CD18糖タンパク質複合体と無関係であると結論づけている。この設定において損傷は虚血の間に生じ得、従って好中球または再潅流には依存するものではないと考えられる。

【０２６６】

Liu et al. (1997) Neuronal and glial apoprosis after traumatic spinalcord injury,J Neurosci 17:5395-406により、軽度ないし中程度の重篤度の外傷性傷害を受けたラットの脊髄が調べられている。軽い重量の液滴衝撃（6.5mm落下10gm重）後の数分内に、直接衝撃を受けた領域のニューロンは細胞質ニッスル小体の損失を示した。続く7日にわたって、この外傷領域が拡張し、空洞を生じた。末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)によりデオキシウリジントリホスフェート－ビオチンニック末端標識された（TUNEL)陽性ニューロンは損傷の4～24時間後に主に全外傷領域に限定されて示され、損傷後8時間で最大に存在した。TUNEL陽性グリアは4時間と14日の間の調べたすべての段階で存在し、損傷後24時間の外傷領域内に最大に存在した。損傷の7日後、外傷周辺の白質においてTUNEL陽性グリア細胞の第二波が示され、外傷中心から少なくとも数ミリメートル外側に拡張した。電子顕微鏡により、ならびにヘキスト33342色素での核染色によりおよび外傷部位から調製したＤＮＡの検査によりアポトーシスの誘発が確認された。さらに、12.5mm重の液滴傷害の直後に開始したシクロヘキシミドの反復腹膜内注入により4週間後に評価された脊髄損傷の組織学的証拠においておよび運動性機能不全において実質的な減少が起こった。このデータは活性タンパク質合成に依存するアポトーシスはニューロンおよびグリア細胞の死、ならびにラットの脊髄に対する軽度ないし中程度の重篤度の外傷性傷害により誘導される神経学的機能不全の一因であるという仮説を支持するものである。

【０２６７】

外傷性脳損傷および脳卒中

Ghirnikar et al. (1996) Chemokine expression in rat stab wound brain injury, J Neurosci Res 46:727-33により、成体哺乳類の中枢神経系(CNS)に対する外傷性損傷は反応性アストログリオーシスおよび損傷を受けた神経組織への造血細胞の移動をもたらすとの記載がある。ケモカイン、すなわち化学誘引物質サイトカインの種類は損傷後に生じる炎症性変化のメディエーターであると認められている。ラット脳の外傷においてMCP-1（マクロファージ走化性ペプチド-1）、すなわち、ケモカインのβファミリーのメンバーの発現が証明されている(Berman (1996) et al. J. Immunol 156:3017-3023)。機構損傷の刺傷創傷モデルを用いて、ラット脳における二種の異なるβケモカイン：RANTES（活性化を調節され、正常Ｔ細胞により発現され、かつ、分泌される）およびMIP-1β（マクロファージ炎症性タンパク質-1β）の発現が研究されている。刺傷創傷損傷は広範囲のグリオーシスおよび造血細胞の浸潤を特徴とした。免疫組織化学的染色により損傷を受けた脳においてRANTESおよびMIP-1βの存在が示された。RANTESおよびMIP-1βは双方とも壊死組織において広汎に発現され、損傷後(dpi)1日という初期に検出された。二重標識研究によりRANTESではなくMIP-1βが外傷部位付近の反応性星状細胞によって発現されるということが示された。さらに、MIP-1β染色は損傷部位のマクロファージでも検出された。ケモカインの最初の発現は損傷を受けたCNSにおける炎症性細胞の出現と密接に相関し、このことはRANTESおよびMIP-1βは外傷性脳損傷の炎症性現象において役割を果たす可能性があるということを示唆するものであった。この研究はまた、ラットCNSに対する外傷後の反応性星状細胞におけるMIP-1β発現を証明している。

【０２６８】

Want et al. (1998) Prolonged expression of interferon-inducible protein-10 in ischemic cortex after permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat, J Neurochem 71:1194-204により、焦点脳卒中におけるIP-10の役割が研究され、ラットにおける中央大脳動脈の閉塞後のIP-10ｍＲＮＡの側頭発現がノーザン解析という手段により

調べられている。焦点脳卒中後のIP-10ｍＲＮＡ発現は独特な二相のプロフィールを示し、中央大脳動脈の閉塞後、初期の3時間で著しく増加し（対照に対して4.9倍；p 0.01）、6時間でのピークレベル（14.5倍；p 0.001）となり、かつ、虚血損傷の10～15日後に二次波が誘導された（10および15日間でそれぞれ7.2および9.3倍増加；p 0.001）。in situハイブリダイゼーションによりIP-10ｍＲＮＡの誘導された発現が確認され、焦点脳卒中後のその場所的な分布が示された。免疫組織化学的研究により虚血領域のニューロン（3～12時間）および大グリア細胞（6時間ないし15日）においてIP-10ペプチドの発現が示された。C6グリア細胞に対するIP-10の用量依存的走化性作用およびラット小脳の顆粒ニューロンの付着の増加が証明された。このデータは虚血がIP-10を誘導し、これが焦点脳卒中後の長期にわたる白血球補充、星状細胞移動／活性化、およびニューロン付着／出芽において多面発現性の役割を果たすということを示すものである。

【０２６９】

Galasso et al. (1998) Excitotoxic brain injury stimulates expression of the chemokine receptor CCR5 in neonatal rats, Am J Pathol 153:1631-40により、出産後7日のラットにおいてCCR5発現に対するNMDAの海馬内注入の衝撃が評価されている。逆転写ポリメラーゼ鎖反応により傷害を引き起こした24時間後に海馬においてCCR5ｍＲＮＡ発現の増加が示され、またin situハイブリダイゼーション解析によりCCR5ｍＲＮＡは傷害を受けた海馬および近傍領域において発現されるということが証明された。ウエスタンブロット解析により傷害を引き起こした32時間後の海馬組織抽出物におけるCCR5タンパク質の増加が証明された。補足的免疫細胞化学研究により主なCCR5免疫反応性細胞として浸潤する小グリア細胞／単球および損傷を受けたニューロンが確認された。これらの結果は急性の興奮毒性損傷がCCR5発現を調節するということを証明するものである。

【０２７０】

Vannucci et al. (1999) Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage, J Neurosci Res 55:158-63では、未熟ラットモデルを用いて周産期低酸素症による虚血脳損傷の病原および治療技術が洞察されている。モデルは片側の共通の頚動脈の結紮とそれに続く全身の低酸素症を負っている。この傷害は頚動脈閉塞と同側の大脳半球に限定された永久の低酸素症による虚血脳損傷を引き起こす。このモデルを研究に用いて低酸素症による虚血脳損傷を防ぐかまたは最小限にとどめる治療方法を同定している。

【０２７１】

アルツハイマー病

Hauss-Wegrzyniak et al. (1998) Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease, Brain Res 780:294-303により、炎症性過程がアルツハイマー病(AD)に関連する変性変化および認識障害の病原において役割を果たすということが記載され、また若いラットの脳内に、慢性の、全体的な炎症を作出するための、グラム陰性細菌の細胞壁由来のリポ多糖類(LPS)の使用が記載されている。4週間の4番目の脳質へのLPSの長期注入（0.25マイクログラム／時間）により(1)脳全体に分布する、グリアの繊維性酸性タンパク質陽性活性化星状細胞およびOX-6陽性反応性小グリア細胞数の増加（なお、側頭葉、特に海馬内で最大に増加）、(2)基底前頭領域および海馬内でのインターロイキン-1β、腫瘍壊死因子-αおよびβアミロイド前駆体タンパク質ｍＲＮＡレベルの誘導、(3)海馬のCA3巨大ニューロンの変性、および(4)T迷路での自発的交互変化行動の減少により決定されるような、場所記憶における相当な損傷が引き起こされた。

【０２７２】

早期にADを発症する家族においてAβの産生に関与するヒト遺伝子の変異型を発現するよう遺伝子操作された齧歯類をはじめとする多数のその他のアルツハイマー病モデルが公知であり、かつ、当業者が利用できる。

【０２７３】

多発性硬化症

多発性硬化症(MS)は脱髄領域に局在することを特徴とする中枢神経系(CNS)の炎症性疾患

である。MSの病因論および病原は依然として大部分が未知であるが、一般に、ミエリン抗原に対する免疫応答が疾病過程の一因であると仮定されている。現象の正確な順序、ならびにミエリン分解をもたらす分子メディエーターはまだ同定されていない。

【０２７４】

Liu et al. (1998) TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination, Nat Med 4:78-83により、MS研究用の齧歯類モデル、実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)の使用が記載されている。

【０２７５】

関節炎および自己免疫疾患

Barnes et al. (1998) Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model,J Clin invest 101:2910-9により、佐剤誘導性関節炎(AIA)は慢性関節リウマチ、すなわち、Ｔリンパ球およびマクロファージ細胞浸潤物を特徴とする疾患の多数の動物モデルの１つであると記載されている。Barnes et al.はこの疾患モデルの発症をケモカイン発現に関して特徴づけており、全血および関節において、２種のケモカイン、RANTES、すなわち、Ｔリンパ球および単球化学誘引物質ならびにＫＣ、すなわち、好中球の化学誘引物質のレベルの上昇が認められたと示している。MIP-1α、別のＴリンパ球および単球化学誘引物質のレベルは、全血において疾患の経過を通じて変化せず、関節においてもわずかに上昇したに過ぎなかった。RANTESに対するポリクローナル抗体がAIAを誘導された動物において症状を大きく改善し、インドメタシン、非ステロイド性抗炎症剤での治療と同程度の効果があることが分かったので、RANTES発現は疾患において重要な役割を果たしている。MIP-1αまたはKCのいずれかに対するポリクローナル抗体は効果がなかった。

【０２７６】

Weinberg, A. D. (1998) Antibodies to OX-40 (CD134) can identify and eliminate autoreactive T cells: implications for human autoimmune disease,Mol Med Todey 4:76-83により、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、自己免疫ブドウ膜炎、糖尿病、炎症性腸疾患および移植片対宿主疾患においては自己抗原特異的CD4+Ｔ細胞が原因となる細胞種として関与しているということが記載され、また自己免疫組織破壊部位で自己反応Ｔ細胞を削除する有効な治療を開発するための、実験的に誘導した自己免疫疾患の使用が記載されている。

【０２７７】

Schrier et al. (1998) Role of chemokines and cytokines in a reactivation model of arthritis in rats induced by injection with streptococcal cell walls, J Lerkoc Biol 63:359-63により、関節炎の動物モデルにおけるケモカインの役割に関する研究が提供されている。連鎖球菌の細胞壁(SCW)抗原の関節内注入とそれに続く静脈内抗原投与の結果、Ｔ細胞媒介性単関節関節炎を患う雌のルイスラットが生じた。最初の研究により、静脈内SCW抗原に対するこの再活性化反応はインターロイキン-1(IL-1)および腫瘍壊死因子α(TNF-α)の存在に依存しており、かつ、腫脹の初期相は好中球依存性であるということが示された。好中球涸渇またはP-セレクチンもしくはマクロファージ炎症性タンパク質2に対する抗体での受動的免疫化により足関節浮腫の強烈度および好中球の流入が低下した。しかしながら、最初の2、3日後、関節炎反応は主に単核細胞によって媒介される。関節組織は単球走化性タンパク質-1(MCP-1)のｍＲＮＡのアップレギュレーションを示したが、これは抗IL-4によって部分的に阻害され、IL-4またはMCP-1に対する抗体でのラットの処理により足関節浮腫の発症および炎症の組織病理学的証拠が有意に抑制された。インターフェロン-γまたはIL-10に対する抗体は効果がなかった。抗MCP-1での処理もまた、[111]インジウム標識されたＴ細胞の足関節への流入を抑制した。これらのデータは雌のルイスラットにおけるSCW誘導性関節炎の後期の単核依存相はMCP-1をアップレギュレートするサイトカインを必要とし、それが次に単核細胞の関節への補充および管外遊出を促進し得るということを示唆するものである。

【０２７８】

Oppenheimer-Marks et al. (1998) interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model In vivo, J Clin Invest 101:1261-72により、内皮細胞(EC)のIL-15を産生する能力およびIL-15の、Ｔ細胞の内皮透過移動に影響を及ぼす能力が調べられている。ヒト臍帯静脈内皮細胞はIL-15ｍＲＮＡおよびタンパク質を発現する。内皮由来IL-15はＴ細胞の内皮透過移動を増強するが、これはIL-15に対する単球抗体をブロックすることによるこの過程の阻害により証明されている。インテグリン付着分子LFA-1(CD11a/CD18)の結合能を活性化することによって、IL-15により増強されたＴ細胞の内皮透過移動もまた、Ｔ細胞の運動性を高めた。さらに、IL-15は初期活性化分子CD69の発現を誘導した。in vivoでのＴ細胞の移動調節おけるIL-15の重要性はその、慢性関節リウマチ滑液分泌組織において選定され免疫不全SCIDマウスに導入されたヒトＴ細胞の蓄積を高める能力により実証されている。これらの結果は、ECはIL-15を産生し、これがＴ細胞を刺激して炎症組織に管外に遊出させるのに重大な役割を果たすということを証明している。

【０２７９】

Kasama et al. (1995) Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis, J Clin Invest 95:2868-76により、II型コラーゲン誘導性関節炎(CIA)の進展の間の、特定のケモカイン、マクロファージ炎症性タンパク質1α(MIP-1α)およびマクロファージ炎症性タンパク質2(MIP-2)およびインターロイキン10(IL-10)の発現および寄与が研究されている。まず、検出可能なレベルのMIP-1αおよびMIP-2の走化性サイトカインタンパク質が、最初のII型コラーゲン抗原投与後32日と36日の間で認められたが、IL-10の増加は36日と44日の間で認められた。MIP-1αまたはMIP-2のいずれかに対して向けられた抗体で受動的に免疫化されたCIAマウスは関節炎の発症における遅延および関節炎の重篤度の低下を示した。中和抗IL-10抗体を受けているCIAマウスは発症の加速および関節炎の重篤度の上昇を示した。興味深いことに、炎症を起こした関節において、抗IL-10処理によりMIP-1αおよびMIP-2の発現が高まり、ならびに、ミエロピルオキシダーゼ(MPO)活性および白血球浸潤が高まった。これらのデータは実験的関節炎の発症の際、MIP-1αおよびMIP-2は開始および維持において役割を果たし、他方、IL-10は調節的役割を果たすようであるということを示すものである。

【０２８０】

Keffer et al. (1991) Transgenic mice expressing human tunmour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis, Embo J 10:4025-31により、野生型および3'改変ヒト腫瘍壊死因子（hTNF-α、カケクチン）導入遺伝子を保持し、発現する形質転換マウス系統が提供され、形質転換マウスにおいて、正しい、内毒素反応性で、かつ、マクロファージ特異的hTNF遺伝子発現が確立され、ｈTNF遺伝子の3'領域がマクロファージ特異的転写に関与し得るという証拠が存在することが示されている。3'改変hTNF導入遺伝子を保持する形質転換マウスは調節されていない発現パターンを示し、慢性の炎症性多発性関節炎を発症する。Keffer et al.は予想通り関節炎を発症する形質転換マウスは遺伝的モデルとなり、それによりヒトにおけるこの疾患の病原および治療がさらに研究され得るとしている。

【０２８１】

Sakai et al. (1998) Potential withdrawal of rheumatoid synovium by the induction of apoptosis using a novel in vivo model of rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum 41:1251-7により、Fas媒介性アポトーシスが、慢性関節リウマチ(RA)の治療方法としての可能性を有するかどうかが、ヒトRA組織がSCIDマウスに移植されたRAモデルを用いて研究されている。関節の軟骨をはじめとする新鮮なリウマチ性滑液分泌組織をSCIDマウスの背中に皮下移植した。移植の6週間後、抗Fasモノクローナル抗体を腹膜内に注入した。移植された滑膜において抗Fasモノクローナル抗体により引き起こされた経時的アポトーシス性変化がニック末端標識組織化学によって評価された。注入の36時間後、移植された

滑液において広汎なアポトーシス性変化が認められた。注入の4週間後、リウマチ性滑液分泌組織が減少した。

【０２８２】

Smith et al. (1999) Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis, Arthritis Rheum 42:545-54により、骨関節症(OA)のイヌモデルが記載されている。OAは20個体の成体雑種犬において左の上方膝十字靭帯を横切することにより誘導され、このモデルを用いてOAを治療した。

【０２８３】

炎症性肺疾患

Kumagai et al. (1999) Inhibition of Matrix Metalloproteinases Prevents Allergen-Induced Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma,J Immunol 162:4212-4219により、アレルギー性喘息のネズミモデルを用いて、気管支喘息の病原におけるMMPの役割が研究されている。このモデルを用いて、白血球および好酸球の浸潤をともなう、OVA感作マウスにおけるAg吸入後の気管支肺胞洗浄液中のMMP-2およびMMP-9の放出の増加が報告されている。気管へのメタロプロテイナーゼ-2という組織阻害剤の投与により、白血球および好酸球の気管壁および管腔へのAg誘導性浸潤が阻害され、Ag誘導性気管応答性亢進が減少し、末梢血中の好酸球および白血球数が増加した。細胞の気管管腔への浸潤の阻害はまた、メタロプトテイナーゼ-1という組織阻害剤および合成基質メタロプロテイナーゼ阻害剤を用いても認められた。このデータはMMP、特にMMP-2およびMMP-9は、気管支喘息の病原的特徴である、炎症性細胞の浸潤および気管応答性亢進の誘導に関して決定的なものであるということを示すものである。

【０２８４】

Griffiths-Johnson et al. (1997) Animal models of asthma: role of chemokines, Methods Enzymol 288:241-66により、多数のケモカインが(1)炎症動物モデルに由来するin vitro細胞培養上清およびin vivo滲出物のバイオアッセイおよび(2)分子生物学技術の使用によって見出されているということが記載されている。いずれか１種のケモカインがいくつかの異なる細胞腫によって産生され、しばしば異なる標的細胞に対して作用を発揮し得ることが多い。喘息においては好酸球が重要なエフェクター細胞であるという、動物および臨床研究からの強力な証拠がある。Griffiths-Johnson et al.は肺への好酸球補充を阻害するための２種の標的、すなわち、好酸球生物学のいくつかの態様において重要であるIL-5およびその受容体、およびエオタキシンおよびその受容体であるCCR3を同定している。エオタキシン受容体は好酸球で多数発現されるがその他の白血球では発現されず、エオタキシンおよびMCP-4などのその他のケモカインに対する好酸球の主要な検出物であると考えられている。彼らは、エオタキシンおよびCCR3ノックアウトマウスが開発されており、その動物モデルが非常に価値のあるものであり続けるであろうとしている。

【０２８５】

Campbell et al. (1998) Temporal role of chemokines in a murine model of cockroach allergen-induced airway hyperreactivity and eosinophilia,J Immunol 161:7047-53により、ゴキブリアレルゲン誘導性気管疾患のネズミモデルが提供され、ヒトアトピー性喘息と類似の特異的な反応機構が評価されている。このモデルにおけるアレルギー性反応としてはアレルゲン特異的気管好酸球増加、および炎症と直接関連する相当に変化した気管生理機能が挙げられる。第一段階の間の重要な好酸球誘引物質であるMIP-1αおよび第二の再抗原投与段階の間のエオタキシンを用いて、これらの段階の間のCCケモカインの特異的な役割が同定されている。これらのモデルによりゴキブリアレルゲン抗原投与の両段階に関与するメディエーターの評価、ならびに特定の治療様相を試験することが可能となる。

【０２８６】

Piguet et al. (1989) Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis,J Exp Med 170:655-63およびSchrier et al. (19

83) The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation,Am Rev Respir Dis 127:614-617により、肺繊維症のマウスモデルが記載されている。

【０２８７】

Steinhauser et al. (1999) IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibactirial host defense, J Immunol 162:392-399により、敗血症と関連する免疫抑制機構を調べるための敗血症誘導性緑膿菌肺炎のネズミモデルが記載されている。CD-1マウスに盲腸の結紮および26規格針での穿刺(CLP)または擬似手術のいずれかとそれに続く緑膿菌または生理食塩水の気管内(i.t.)投与を施した。CLPとその24時間後の生理食塩水または緑膿菌のi.t.投与を施されたマウスの生存率はそれぞれ58%および10%であり、他方、擬似手術とそれに続く緑膿菌投与を施された動物は95%が生存した。CLP/緑膿菌群における死亡数の増加は肺の細菌排除が著しく損なわれこと、さらに緑膿菌菌血症の早期発症に起因した。擬似ではなくCLPを施したマウスへの細菌のi.t.投与により好酸球の強い肺内蓄積がもたらされた。さらに、敗血症マウスにおける緑膿菌抗原投与により、IL-12の減少傾向をともなう肺IL-10産生の増強への関連する変化がもたらされた。敗血症マウスにおいて、緑膿菌抗原投与の直前に与えられた、IL-10Absのi.t.ではないi.p.投与により、緑膿菌を投与された敗血症動物の生存率および肺からの細菌の排除の双方が相当改善された。最後に、CLPを施された動物から単離された肺胞マクロファージはex vivoで緑膿菌を取り込み死滅させる能力において著しい欠陥を示したが、この欠陥はin vivoでのIL-10の中和によって部分的に戻った。考え合わせると、これらの観察結果は敗血症反応は緑膿菌に対する肺の内在的な免疫を実質的に損ない、この作用は内生的に産生されたIL-10によって媒介されているということを示すものである。

【０２８８】

遺伝子治療後の炎症

Muruve et al. (1999)　アデノウイルス遺伝子治療はin vivoにおいて多重ケモカインの急速な誘導と急性好中球依存性肝臓傷害[In Process Citation]をもたらし、Hum Gene Ther 10:965-76は複製欠陥アデノウイルスに、感染組織の急性傷害および炎症を誘導する分子機構を研究し、ヒトの遺伝子治療への使用を制限している。この応答を特徴づけるため、種々のアデノウイルスベクターを静脈投与した後、DBA/2マウスにおけるケモカインの発現を評価した。adCMVbeta gal、adCMV-GFPおよびFG140を静脈投与すると、用量に依存してマウスの肝臓内に一貫したパターンのC-X-CおよびC-Cケモカインの発現が誘導された。10(10)PFUのadCMVbeta galを感染させた１時間後、肝臓のMIP-2 mRNAのレベルはベースラインの６０倍を上回る増加を示した。MCP-1およびIP-10 mRNAのレベルもまた種々のアデノウイルスベクターを感染させた後直ちに増加し、６時間でピークとなり、それぞれ25倍および100倍を超える発現が見られた。アデノウイルスベクターによるRANTESおよびMIP-1beta mRNAの初期誘導も起こったが、より低い程度であった。投与から16時間以内にソラレン不活性化アデノウイルス粒子が同一パターンのケモカイン遺伝子転写物を産生したので、ケモカインの誘導は独立にウイルス遺伝子の発現を行わせた。ケモカインの発現は予期した通り、感染した動物の肝臓内への好中球およびCD11b+細胞の流入と相関していた。高力価では、DBA/2マウスに対する全身投与の後、全てのアデノウイルスベクターが有意な肝臓の壊死およびアポトーシスを引き起こした。このアデノウイルス誘導性の肝傷害における好中球の役割を調査するため、動物を中和抗MIP-2抗体で前処理するかまたは好中球を涸渇させた。MIP-2の拮抗作用および好中球の減少の両方により血清ALT/ASTのレベルが減少し、アデノウイルス誘導性の肝傷害は組織学的に軽減され、初期の傷害は概ねケモカインの生産および好中球の補充によるものであると確認された。この結果は複製欠陥アデノウイルスベクターに対する初期の免疫応答を明らかにし、アデノウイルスを媒介とする炎症、およびケモカインまたは好中球の機能を妨げることによる組織の傷害を防御する戦略を示唆する。

【０２８９】

関節炎、他の炎症疾病および腫瘍増殖における役割を含む血管形成

血管形成および炎症に関与する細胞の補充は、腫瘍の増殖および発達に関連する。次の参照文献はこれらの関係を記載し、腫瘍の治療法、血管形成および炎症応答阻害剤を確認するための動物モデルは当業者に公知である。使用された複合体およびこれらの研究の中での標的細胞は、ここでの複合体および標的細胞と異なるものである。これらの参照文献は、腫瘍増殖阻害治療の研究のための動物モデルおよびそれに関連する細胞の有効性の証拠となるものである。

【０２９０】

腫瘍の増殖

Phillips et al. (1994) 増殖因子-αシュードモナス外毒素融合タンパク質(TGF-α-PE38）皮下治療および頭蓋内ヒト神経膠腫の形質転換、および胸腺欠損マウスの髄芽腫異種移植、Cancer Res 54:1008-15 は、TGF-α-シュードモナス外毒素組換え毒素、膠芽腫または髄芽腫皮下異種移植を有するヌードマウスを用いたTGF-α-PE38を用いる標的脳腫瘍の治療のため、多くの悪性神経膠腫および他の一次脳腫瘍において増幅または過剰発現されるが正常な脳内では低いかまたは検出できない上皮増殖因子受容体（EGFR）の特異的発現を開発した。異種移植モデルは、炎症応答治療のためのケモカイン受容体ターゲッティング複合体の研究および腫瘍発生に関係する細胞のターゲッティングに有効であろう。

【０２９１】

Debinski et al. (1994) 腫瘍細胞上に発現するインターロイキン-4受容体のキメラシュードモナス外毒素を用いる抗癌治療の標的としての使用、Int J Cancer 58:744-748は、ヒトIL4(hIL4)および強力な細菌毒素の２種の異なる変異体からなるキメラタンパク質、ヒト固形腫瘍異種移植モデルにおけるシュードモナス外毒素A(PE) の使用が報告されている。この２つのキメラ毒素はhIL4-PE4EおよびhIL4-PE38QQRと呼ばれ、hIL4R依存型および用量依存型の特異的な抗腫瘍活性を示す。

【０２９２】

Husain, S. R.; Behari, N.; Kreitman, R. J.; Pastan, I.; Puri, R. K. 1998, インターロイキン-4毒素治療による定着したヒト膠芽腫異種移植腫瘍の完全な退行、Cancer Res 58:3649-53は、ヌードマウスにおける膠芽腫側腫瘍の標的治療へのIL-4毒素複合体の使用を示している。Kreitman et al. (1998) in vivoでの腫瘍内組換え免疫毒素の蓄積：完全な応答に十分なのは細胞あたり1000分子未満、 Cancer Res 58:968-975もまたこのモデルの使用を説明している。

【０２９３】

血管形成

Folkman et al. (1987) 血管形成因子、Science 235:442-7は血管形成、ならびに、酸性および塩基性繊維芽細胞増殖因子、アンジオゲニン、および形質転換増殖因子αおよびβなどの因子の役割と、脈管系の増殖調節を理解する際のそれらの重要性を確立するものである。推定される標的に従って評価すると、因子は、血管内皮細胞に直接はたらいて移動または有糸分裂を刺激するグループ間接的にはたらいて宿主細胞(例えばマクロファージ)を動員して内皮増殖因子を放出するグループに分けられる。新血管新生がなされる腫瘍に因子が存在することに加えて、新血管新生が起こっていない多くの正常組織にも同じ血管形成のペプチドが見られる。これは血管形成因子の生理学的発現が厳格に調節されていることを示唆する。腫瘍により誘導される持続性血管形成のほかに、これまでには関係がないと思われていた種々の非腫瘍性疾患は毛細血管の病理学的成長に左右されるため、今では「血管形成疾患」とみなし得る。

【０２９４】

Leibovich et al. (1987) マクロファージ誘導性血管形成の腫瘍壊死α因子による媒介、Nature 329:630-632は、創傷修復、炎症および腫瘍増殖中の新しい血管成長の誘導においてマクロファージが重要であることを記載し、ラットの角膜における毛細血管形成およびひなの漿尿膜の発生を研究することによりしてこれを調べた。

【０２９５】

Koch et al. (1992) マクロファージ由来の血管形成メディエーターとしてのインターロ

イキン8、Science 258:1798-1801は、単球マクロファージにより産生された血管形成因子の、持続性血管形成を特徴とする慢性炎症性疾患の病因への関与を記載している。リンパ球および好中球に対して走化性のあるインターロイキン8（IL-8）の役割は、ラットの角膜に移植された時に潜在的に血管形成を示し、ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖および走化性を誘導する。このデータは、慢性関節リウマチ、腫瘍増殖、および創傷修復などの血管形成依存性疾患におけるマクロファージ由来のIL-8の役割を示す。

【０２９６】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)

Westmoreland et al. (1998) サル免疫不全ウイルス脳炎のマカークの脳内常在細胞および炎症細胞でのケモカイン受容体の発現、Am J Pathol 152:659-665は、脳内で浸潤する単球／マクロファージと神経性疾患の間に相関関係があることと、ケモカインおよびケモカイン受容体がHIV神経病の病因において役割を担っていることを記載し、SIV感染させたHIV脳炎のアカゲザルモデルにおける発現パターンを記載している。SIV脳炎のマカークザルの脳内における、ケモカインマクロファージ炎症性タンパク質(MIP)-1α、MIP-1β、RANTES、およびインターフェロン誘導タンパク質(IP)-10の発現上昇がは証明されており、この研究において対応するケモカイン受容体CCR3、CCR5、CXCR3、およびCXCR4の発現がこれら同じ組織の血管周囲の浸潤物で発現されることが分かった。さらにCCR3、CCR5、CXCR3、およびCXCR4は海馬状隆起神経および新皮質錐体神経の広範な副次集団に検出され、正常および脳炎のどちらの脳内膠細胞にも検出された。このデータおよび結果は多重ケモカインおよびその受容体がSIV脳炎の脳へ単球およびリンパ球を補充するのに寄与していることを示す。さらに、公知のHIV/SIV共通受容体の神経細胞での発現は、HIVまたはSIVが直接これらの細胞に働きかけ、正常な生理機能を妨害しAIDS痴呆複合体の病因に寄与していることを示唆する。

【０２９７】

Tyor et al. (1993) 重症複合免疫不全マウスのヒト免疫不全ウイルス脳炎モデル、Proc Natl Acad Sci USA 90:8658-62はその治療の開発の一助にHIV関連痴呆症候群の動物モデルを提供している。異種移植を受け拒絶反応を示さなかった重症複合免疫不全マウス(scidマウス)に、ヒト末梢血単核細胞およびHIVを大脳接種した。接種から１～４週間後、これらマウスの脳はヒトマクロファージ（HIV ｐ24抗原陽性のものもある）、偶発的な多核細胞、および免疫細胞化学染色による著しい神経膠症を有していた。ヒトマクロファージはまた腫瘍壊死因子型αに対してしばしば陽性であり、時にはインターロイキン１およびVLA-4に対しても陽性である。HIVに対するこれらの脳培養物は陽性であった。一般に、ヒトマクロファージは対照マウスの脳内にも顕著な神経膠症にも存在せず、大脳内にのみHIVを受けたマウスからHIVは回収されなかった。病理学的に、重症複合免疫不全マウスでのHIV脳炎モデルはヒトのHIV脳炎に類似し、このデータはHIV接種によるマクロファージの活性が脳内で蓄積および持続されて神経膠症を発症することを示唆する。このHIV脳炎モデルは病因への洞察およびこの疾患の治療を提供する。

【０２９８】

Toggas et al.(1994) トランスジェニックマウスにおけるHIV-1コートタンパク質gp120の発現による中枢神経系の損傷、Nature 367:188-193は脳内にgp120を発現するトランスジェニックマウスを提供し、これらのマウスをヒトに認められるニューロンおよびグリア細胞におけるgp120の役割の研究に用いた。トランスジェニックマウスの脳内に認められた変化はHIV-1感染したヒトの脳内の異常性と類似する。損傷の重篤度はgp120の脳レベルとの相互関係を明確に示した。これらの結果はin vivoにおいてgp120がHIV-1関連神経系の障害において主要な役割を担っているという証明となる。これはHIV脳相互作用にねらいを定めた治療戦略の評価および開発を容易にする。

【０２９９】

Wykrzykowska et al. (1998) サル免疫不全ウイルスに感染したアカゲザル胸腺前駆体の初期再生、J Exp Med 187:1767-1778は、AIDSのSIV／マカクモデルを用いて胸腺上にSIVの初期効果を調査している。

【０３００】
Krucker et al. (1998) ヒト免疫不全ウイルス１型コートタンパク質gp120を大脳に発現しているトランスジェニックマウスはCA1海馬状隆起における短期および長期の増強において分散型の変化を示す、Neuroscience 83:691-700は、ヒト免疫不全ウイルス1型に感染したヒト脳内と異常性が類似する、ニューロンおよびグリア細胞の変化を示す脳の星状細胞から、グリア原繊維酸性タンパク質により駆動されるgp120を構成的に発現するトランスジェニックマウスを研究している。
【０３０１】
Power et al. (1998) ネコ免疫不全ウイルスに感染した新生のネコにおける神経毒性はウイルス株特異的かつ全身免疫抑制に依存、J Virol 72:9109-15は、HIVの動物モデルおよび免疫抑制における役割を示している。ネコ免疫不全ウイルス(FIV)はレンチウイルスでネコの免疫抑制および神経性疾病の原因となる。種々のFIV株が神経性疾患を引き起こす程度を決定するため、FIV V1CSFおよびPetalumaをex vivoおよびin vivoにおいて比較した。両ウイルスをマクロファージに感染させ、そこで複製させ、同等レベルでグリア細胞培養を混合したが、V1CSFは神経毒性アッセイにおいてペタルーマ(Petaluma)よりも著しく多数の神経細胞死を誘導した。V1CSF感染動物は、ペタルーマ感染動物および非感染動物と比べて有意な神経発達の遅延を示した。前頭皮質に関する磁器共鳴分光測定研究は、他の群と比較して、V1CSF群中でアスパラギン酸N-アセチル／クレアチンの割合が有意に減少したことを明らかにした。。ペタルーマ感染動物へのシクロスポリンA処置は、神経発達の遅延および脳内のアスパラギン酸N-アセチル／クレアチンの割合の減少を引き起こした。非感染群およびペタルーマ感染群と比較して、V1CSF感染群でCD4(+)およびCD8(+)細胞数の減が認められた。これらの発見は神経発達の遅延およびニューロン傷害はFIV株特異的なものであるが、全身の免疫抑制もまたFIVに誘導される神経毒性の重要な決定要因であることを示す。
【０３０２】
F.複合体含有組成物の処方および投与
本明細書では、二次的組織損傷および関連病状を含む、病態生理学的炎症応答に関連する疾患の治療に用いる組成物が提供される。かかる組成物は上記のように、ケモカイン、またはその生物学上機能的な断片、および細胞毒を含んでなる治療上有効な量のリガンド毒素キメラを含む。
【０３０３】
有効な濃度の、１以上のケモカイン・レセプター・ターゲッティング・エージェントまたはその医薬上許容される誘導体を全身または局所投与に好適な医薬担体またはビヒクルと混合する。化合物には選択された疾患の治療に有効な量が含まれる。組成中の有効化合物の濃度は、有効化合物の吸収、不活化、排出速度、投与計画および投与量ならびに当業者に公知の他の因子による。
【０３０４】
複合物の投与、および本明細書で提供される方法に好適な医薬担体またはビヒクルには、特定の投与方法に公的であることが当業者に知られている担体のいずれもが含まれる。さらに、化合物は組成中、唯一の医薬上有効な成分として処方してもよいし、あるいは他の有効成分と組み合わせてもよい。
【０３０５】
投与する治療薬の量は体重1kgあたり約0.1pgないし約1ngの範囲内にある。治療薬は、限定されるものではないが、、マイクロスフェア、リポソーム、微粒子、ナノ粒子、およびコロイド状炭素などの徐放性ビヒクルにて投与可能である。典型的には、医薬上有効量は、有効成分約0.1ng/mlないし約50-100μg/mlの血清濃縮液となるべきである。医薬組成は、選択される複合体にもよるが、典型的には1日につき体重1kgあたり約0.01mgないし約100-2000mgの複合体を1回の投与量とすべきである。典型的には、静脈内または全身処置には0.05ないし0.5mg/kgの１日用量で十分であろう。局所適用では、1回の投与につき約1ngないし100μg、好ましくは約1μgないし約10μgとすべきである。投与量は、選択される

複合体、治療される適応症、およびおそらくは許容できる副作用に相関するものと理解される。用量は各疾患について認められているモデルを用い経験的に決定できる。

【０３０６】

有効成分は一度に投与してもよいし、あるいは一定の時間間隔投与される数回のより小さい用量に分割してもよい。正確な用量および治療期間は治療される組織に相関し、公知の試験プロトコールを用いるかまたはin vivoもしくはin vitroの試験データから推定して経験的に決定してもよいことが分かる。濃度および用量の数値は治療される個体の齢に応じても変わることに注意すべきである。さらに、いずれのい特定の患者に対しても特定の投与計画は、個々の必要性および投与する者または組成の投与を管理する者の専門的な判断に従って経時的に調節されるべきであり、また本明細書で示される濃度範囲は単に例示的なものであって、請求される組成の範囲または実施を限定すものではないものと理解される。

【０３０７】

化合物は微粉または他の好適な形態で懸濁させてもよいし、あるいはより可溶性の高い有効生成物を製造するため、またはプロドラッグを製造するために誘導体化してもよい。得られた混合物の形態は、意図する投与様式および選択した担体またはビヒクル中の化合物の溶解度をはじめとするいくつかの因子に依存する。有効な濃度は標的とされる症状の緩和に十分なものであり、経験的に決定できる。組成物を処方するには、標的とされる症状が軽減または緩和するような有効な濃度で、その重量分率の化合物を選択されたビヒクルに溶解、懸濁、分散させるか、あるいは混合する。。

【０３０８】

筋肉内、非経口的または関節内投与などの局所内部への投与には、化合物は好ましくは等張緩衝生理食塩水などの水性媒質中の懸濁溶液として処方するか、あるいは生体適合性支持体または、内部投与を意図した生体接着剤を配合する。

【０３０９】

得られた混合物は、溶液、懸濁液、エマルションなどであってもよく、また水性混合物、クリーム、ゲル、軟膏、エマルション、水溶液、エリキシル剤、ローション、懸濁液、チンキ、ペースト、泡沫、エアロゾル、灌注、噴霧、坐剤、包帯、または全身あるいは局所投与に好適な他の剤型として処方することもできる。

【０３１０】

本明細書で提供される化合物の投与に好適な医薬および美容用担体またはビヒクルは、特定の投与様式に適した当業者に公知のいずれの担体も含む。さらに、化合物は組成中唯一の医薬上有効な成分として処方されてもよいし、あるいは他の有効成分と組み合わせてもよい。有効化合物は、治療する個体に重大な有毒作用を起こさずに治療上有用な効果を発揮するに十分な量で担体中に含まれる。有効な濃度は、本明細書に記載した動物モデルをはじめ、in vitroおよびin vivo系を用いて化合物を試験することにより経験的に決定すればよい。

【０３１１】

局部適用に使用する水溶液または懸濁液には以下の成分：注射水、生理食塩水溶液、硬化油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶剤などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールおよびメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸および重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化物；エチレンヂアミン四酢酸(EDTA)などのキレート剤；アセテート、クエン酸およびリン酸などの緩衝液；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透圧調節剤のいずれかが含まれてよい。液体製剤はアンプル、使い捨てのシリンジ、または、ガラス、プラスチックもしくは他の好適な材料でできている複数用量のバイアルに封入してもよい。好適な担体としては生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水[PBS]を含んでよく、懸濁液および水溶液としてはグルコース、ポリエチレングリコール、およびポリプロピレングリコールおよびその混合物などの増粘剤および可溶化剤を含有してよい。リポソーム懸濁液も医薬上許容される担体として好適であり得る。これらは当業者に公知の方法に従って製造すればよい。

【０３１２】
この方法を用いる治療薬は、限定されるものではないが、例えば局所、関節内、大槽内、眼球内、脳室内、くも膜下腔内、静脈内、筋肉内、腹膜内、皮内、気管内、ならびにその２以上の組み合わせによるなど当業者に公知の経路のいずれかで投与できる。
【０３１３】
投与に最も適した経路は治療される病状、例えば炎症症状の位置によって変わる。投与様式としては、限定されるものではないが、局所、関節内、大槽内、眼球内、脳室内、くも膜下腔内、静脈内、筋肉内、気管内、腹膜内、皮内、およびその２以上の組み合わせによるものが挙げられる。例えば、SCIおよび他のCNS炎症状態の治療には、CNS液または脳内への投与（例えばくも膜下腔内、静脈内、または大槽内）をはじめとする局所投与は、治療薬の全身投与に伴う合併症の危険もなく治療薬を高濃度で投与し得るという利点がある。同様に、炎症性関節疾患の治療には、炎症を起こした関節へ治療薬を注射（例えば関節内に）することによる局所投与が好ましい。別の例として、炎症性の皮膚症状に関連する病状には、例えば、クリーム、ゲル、または軟膏として処方された治療薬の局所投与による治療が有利であり得る。炎症性肺症状に関連する病状の治療には、治療薬をエアロゾルで吸入する、または気管内投与する経路が好ましい。
【０３１４】
治療薬は有効な量が投与される。治療に用いる有効量は当然、投与経路と同じく疾患の重篤度および患者の体重や全身状態による。治療薬の局所濃度では、ある場合には、全身投与において安全性を持って達し得るよりも次の局所投与の方が高濃度であるとはいえ、治療薬の局所投与は典型的にはいずれの全身投与様式よりも少ない用量を要する。
【０３１５】
個々の患者は症状の重篤度において広範な変動を呈し、各治療薬は独特の治療特性をもつため、治療に対する患者の応答を決定し、それに従って用量を変えるのは従業者の役割である。In vitroで用いる用量は医薬組成のin situでの投与に有用な量への有効な指標を示すことができるであろうし、動物モデルはいくつかの場合において特定の疾患の治療に有効な用量を決定するのに用いられる。しかし一般に、局所投与に関しては治療薬の有効量は体重1kgあたり約0.1ピコグラム(pg)ないし約1ngの範囲内であろうと考えられている。有効な量に到達させる際の様々な考察が、例えば、et al., eds., goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990;および Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990およびニューロン特異的リガンド-毒素のくも膜下腔内注射を含むManthy et al., (Science, 278:275-79, 1997)の研究などに記載されている。これら参照文献はそのまま、出典明示により本明細書の一部とする。
【０３１６】
該複合体は、液体、半液体または固形形態で、例えば、経口、非経口、静脈内、皮内、皮下、または局所のいずれの適当な経路によっても投与可能で、各投与経路に好適な方法で処方される。好ましい投与方法は治療される適応症による。皮膚科学的または眼科学的適応症は、典型的には局所的に治療されるが、腫瘍およびSCIおよび他のかかる疾患の典型的な投与様式は全身的、皮内または筋肉内となろう。
【０３１７】
本明細書で提供される該組成物および方法の１つの具体例では、徐放性送達ビヒクル中の該治療薬は、例えばコロイド分散系中またはポリマー安定化結晶中に封入され、局所投与される。有用なコロイド分散系としては、ナノカプセルをはじめ、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油エマルション、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む脂質基剤系が挙げられる。コロイド系で現在好ましいのは、リポソームまたはマイクロスフェアである。リポソームは人工膜小胞であり、注射または移植の際に徐放性送達ビヒクルとして有用である。脂質－ポリマー複合体およびリポソームのいくつかの実施例が米国特許第5,631,018号に開示されており、出典明示して本明細書の一部とする。徐放性送達ビヒクルの他の例としては、生分解性のヒドロゲルマトリックス(米国特許第5,041,292号)、

樹状ポリマー複合体(米国特許第5,714,166号)および多小胞体リポソーム(Depofoam, Depotech, San Diego, CA)(米国特許第5,723,147号および第5,766,627号)が挙げられる。局所注射(例えば、皮下組織)のための、治療用薬剤の封入に好適なマイクロスフェアの１つとして、D. Fletcher, Anesth. Analg. 84:90-94, 1997に記載のポリ(D,L)ラクチドマイクロスフェアがある。

【０３１８】

外傷部位に効果的な治療用量を送達し、全身性毒性の頻度を低下させる他、局所投与はまたタンパク質分解ならびに抗原性および免疫原性応答を介する免疫学的介入のような分解過程に対する治療薬の曝露を少なくする。例えば、モノメトキシポリ(エチレングリコール)を用いる薬物送達も前記の欠点の可能性を小さくさせ得る。治療薬のペグ化(pegylation)は、タンパク質分解耐性を増大させ；血漿中での半減期を延長し、抗原性および免疫原性を低下させることが報告されている。PEGポリマー(サイズ範囲は約2,000ないし8,000 Da)を結合させる１つの方法が本明細書の実施例5に例示されている。ペグ化法に関する他の例としては、Lu and Felix, Int. J. Peptide Protein Res., 43:127-138, 1994; Lu and Felix, Peptide Res., 6:142-6, 1993; Felix et al., Int. J. Peptide Res., 46:253-64, 1995; Benhar et al., J. Biol.Chem.,269:13398-404, 1994;Brumeanu et al., J. Immunol., 154:3088-95, 1995に記載されている。

【０３１９】

本明細書で提供される組成物は、限定されるものではないが、不活性担体またはコロイド分散系のような送達を促進する１以上のアジュバントをさらに含む。かかる不活性担体の代表的かつ非限定的な例は、水、イソプロピルアルコール、ガス状フルオロカーボン、エチルアルコール、ポリビニルピロリドン、プロピレングリコール、ゲル生成材料、ステアリルアルコール、ステアリン酸、鯨ろう、モノオレイン酸ソルビタン、メチルセルロース、ならびにこれらのうち２以上の好適な組み合わせから選択できる。

【０３２０】

本明細書で提供される組成物はまた、好適な分散剤、湿潤剤または懸濁剤を用いて公知の方法に従って無菌注射懸濁液として処方できる。この無菌注射製剤はまた、例えば1-4,ブタンジオール溶液のような無毒の非経口投与が許容される希釈剤または溶媒中の無菌注射溶液または懸濁液であってよい。無菌の不揮発性油は、通常、溶媒または懸濁媒質として使用される、この目的のためにいずれの無菌不揮発性油を用いてもよく、限定されるものではないが、合成モノ－もしくはジグリセリド、脂肪酸(オレイン酸を含む)、ゴマ油、ココナツ油、ピーナッツ油、綿実油などの天然植物油、またはオレイン酸エチルのような合成脂質ビヒクルが挙げられる。バッファー、保存剤、抗酸化剤、および好適な成分を要すれば含むことができ、あるいは製剤を含んでもよい。

【０３２１】

経口投与用組成物には一般に、不活性希釈剤または可食担体が含まれ、また打錠してもよいし、またはゼラチンカプセルに封入してもよい。治療用経口投与のために、有効化合物または化合物群は賦形剤を配合し、錠剤、カプセル剤またはトローチ剤の形態で使用してよい。医薬上許容される結合剤およびアジュバント物質を組成物の一部として含んでもよい。

【０３２２】

錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは以下のいずれの成分、または類似の特性を有する化合物を含んでよい：微晶質セルロース、トラガントゴムおよびゼラチンなどの結合剤；デンプンおよび乳糖などの賦形剤、限定されるものではないが、アルギニン酸およびトウモロコシデンプンなどの崩壊剤；限定されるものではないが、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；限定されるものではないが、コロイド状二酸化シリコンなどのグリダント(glidant)；ショ糖またはサッカリンなどの甘味剤；ペパーミント、サリチル酸メチル、および果実フレーバーなどの香味剤。

【０３２３】

投与単位形がカプセルである場合、前記の種類の物質に加えて脂肪油などの液性担体を含

んでもよい。さらに、投与単位形は例えば、糖および他の腸溶剤被覆など該投与形の物理形態を改変する種々の他の物質を含むことができる。該複合体はまた、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、水剤、チューインガムなどの成分として投与できる。シロップ剤は、有効化合物に加えてショ糖などの甘味剤、およびある種の保存剤、色素、着色剤および香味剤を含有してもよい。

【０３２４】

該有効物質はまた、所望の作用を損なうことのない他の有効物質、または腫瘍治療のためのシスプラチンなどの所望の作用を補う物質と混合することができる。

【０３２５】

最後に、該化合物は包装材料、包装材料中の、本明細書で提供される１以上の複合体または組成物、該複合体が適用される適応症を指示するラベルを含む製品として包装してもよい。

【０３２６】

G. 炎症応答および二次的組織損傷に関連する病状

SCIおよび多くの他の病状は、種々のタイプの白血球の増殖、活性化および移動に関連する。これらの事象が組み合わさって、外傷部位または疾病部位において極めて攻撃的かつひどい状況を作り出す。その成功いかんに関わらず、治療のための現在のアプローチは前－炎症過程の単一成分に集中する傾向がある。例えば、多くの研究者は、増殖因子および神経親和性因子を産生する移植細胞または現存細胞のいずれかの生存もしくは再生が促進されることに望みをかけて、神経またはCNS組織を損傷した神経系に移植することに精力を集中してきた。他のアプローチは、NMDAアンタゴニストを用いて、興奮性アミノ酸の細胞傷害性作用を阻害し、かつ例えば、ステロイド、メチルプレドニソロンなどの抗酸化剤を用いて脂質過酸化を阻害することにより、イオンチャンネル型拮抗作用を介して二次的損傷に取り組もうと試みるものである。これらのアプローチのすべては、ほとんど利点がないか、あったとしても長期にわたる利点ではない。要するに、単独の生化学的メカニズムに集中すると、治療学的介入の効果を無効にしてしまうか、ある場合には実際に悪化させる可能性のある外傷応答(または疾病の過程)の代償性変化を起こす能力の全体としての正しい認識ができない。

【０３２７】

本明細書において、通常の炎症応答が開始されない場合に治療がより効果的になることが見出され、かつ、この炎症過程が長く継続すればするほど、改善および回復の見込みは著しく低下する。本明細書で提供される方法と組成物は、重要な白血球サブタイプ(および／または星状細胞)の活性を一時的に阻害または抑制し、炎症メカニズムおよび二次的損傷をあおる鍵となる源を除去するよう設計されている。

【０３２８】

本明細書により提供される該組成物および方法は、外傷または疾患に対して応答を指揮する細胞に治療薬を選択的、計画的かつ秘密裏に(surreptitipus)送達する。疾患のプロセス(例えば、癌)または炎症応答を開始、持続するために、関与する細胞は活性化され、種々のリガンドのための細胞表面受容体の発現がアップレギュレートされる。外傷および疾患に関与する受容体はしばしばアップレギュレートされるため、治療薬が正当な細胞に取り込まれる可能性が増大する。

【０３２９】

本明細書では、ほとんどの器官系を含む70以上の疾患および症状の細胞生物学が、急性SCIの細胞生物学と類似する様式で病態生理学的炎症応答に関与することが見出された。網羅するものではない、以下のリストおよび４つの臨床領域のより詳細な治療法は、より重要な類似性のいくつかを例示しようとするものである。脊髄損傷に加えて、例示の疾患および症状には、卒中をはじめとして、急性肺損傷および急性呼吸困難症候群(ARDS)、アルツハイマー病、ダウン症候群、炎症性関節疾患、HIV脳炎、増殖、血管新生(血管形成)、および脳、乳房、および肺癌を含むいくつかの型の癌の転移、多発性硬化症、海綿状脳症、敗血症、潰瘍性大腸炎およびクローン病、増殖性硝子体網膜症、およびブドウ膜炎が含

まれる。

【０３３０】

HIV感染症およびAIDSならびに他の病原体による感染症

CNA小グリア細胞の活性化および感染ならびにマクロファージの浸潤は、HIVにより誘発される疾病の病原論の１つの証明である。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、CD4受容体が特定のケモカイン・コ・レセプターに関与している時のみ細胞に入ることができる。CXCR4、CCR2b、CCR3、CCR5、CCR6、CCR8およびCX3CR1のすべてが、コ・レセプターとしての能力を持って作用し得る。例えば、マクロファージ刺激HIV-1系統は一般にCCR5コ・レセプターを使用するが、Ｔ細胞刺激系統は一般にCXCR4を使用する。さらに、二重刺激ウイルスはCXCR4およびCCR5小・レセプターを侵入に使用できるが、HIVウイルス系統の他のサブセットは種々の他のケモカイン・コ・レセプターを使用する。

【０３３１】

HIV脳炎(HIVE)の患者において、CXCR-4はMNPs、星状細胞およびコリン作動性神経細胞のサブ集団に発現するが、CCR5は主としてMNPで発現する。HIVE患者(子供および大人)の感染細胞の大多数はMNPであると思われ、CCR5の発現の増大は疾患の重篤度と相関していると考えられる点に注目すべきである。このことは、少なくともHIVEの後期の重篤な段階においてMNPに媒介される事象がより重要であることを示唆している。このCCR5受容体はまた、CNSの細菌感染後、および虚血性脳損傷のラットモデルにおいてアップレギュレートされる。

【０３３２】

サイトカイン(例えば、TNF-α)およびケモカイン(例えば、RANTES、MCP-1、MIP-1α、およびMIP-1β)の産生の増大は、HIV感染と関連している。HIV感染において増大したCNSケモカインは、末梢白血球の漸増と神経細胞および乏突起神経膠細胞に直接的な細胞傷害作用を持つサイトカイン放出(少なくともTNF-αの場合)を説明し、かつCNS損傷経験を正確に反映する。GM-CSF、マクロファージ－CSF、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-6、TNF-α、およびTNF-βを含むいくつかのサイトカインも、HIV複製を活性化および／または増大させることによりHIV疾患の病原論に寄与する。

【０３３３】

二次的損傷は、HIV-1陽性、無症状性の前-AIDS患者において起こる(An et al.(1997) Arch Anat Cytol Pathol 45, 94-105)。これらの研究者らは無症状性の患者のうち50%の脳においてHIV-1のDNAを検出し、ほぼ90％がアストログリオーシスを起こしていることを認めた。これらの患者はまた、免疫分子ならびにTNF-α、IL-1、IL-4およびIL-6を含むサイトカインのレベルが上昇している。ニューロンの損傷はアポトーシスを起こしたニューロンにより確認された。

【０３３４】

MNP由来の興奮性アミノ酸による直接的な神経毒性およびCCR5補受容体のアップレギュレーションもHIV感染の病理学に深く結びついている。誘導性酸化窒素シンターゼ活性の増大が、AIDS患者のHIVに感染した小グリア細胞で検出されている。これは、酸化窒素の生成が、神経系のHVI感染領域における損傷形成に寄与し得ることを示唆する。さらに、HIV脳症の病理学、ならびに発症前および発症後のAIDSのCNSに及ぼす影響は、SCIおよび他の炎症性疾患で認められる二次的組織損傷を模倣しているものと思われる。

【０３３５】

いくつかのケモカインおよびケモカイン受容体はまた、前微生物因子であり、感染性疾患を促進することが見出されている(Pease et al.(1998) Seminar in Immunol 10:169-178参照)。病原体はケモカイン系を利用する。例えば、細胞のケモカイン受容体は、HIVをはじめとする細胞内病原体の細胞侵入のために利用される。さらにウイルスは、ウイルスによりコードされたケモカイン受容体を利用して宿主細胞の増殖を促進する。病原体はまた、ケモカイン系を壊滅させる。ウイルスによりコードされたケモカインアンタゴニスト、およびウイルスによりコードされたケモカインスカベンジャーが知られている。本明細書により提供される複合体は、さまざまなメカニズムによりウイルスおよび細菌感染を防ぐ

ために使用されてよい。

【０３３６】

炎症性関節疾患および自己免疫疾患

慢性関節リウマチ(RA)は、慢性結合組織損傷および骨侵食を特徴とする炎症性自己免疫疾患である。この疾患の病原論には、滑膜空間への白血球の浸潤、その活性化、および最終的に作用された関節を変形させ、破壊する炎症メディエーターの放出が包含される。実際の関節炎応答は、おそらくMNPが前炎症性サイトカインおよびケモカインを放出する時に開始される。RA患者の関節組織中にTNFα、IL-1、IL-6、GM-CSFおよびケモカインIL-8が豊富に存在することが認められており、それらの最も可能性のある供給源は、MNPに加えて滑膜繊維芽細胞である。MNP、好中球、およびＴ細胞の組み合わせに滑膜繊維芽細胞および滑膜細胞が加わることにより、炎症のカスケードが始まる。

【０３３７】

IL-1およびTNFαは関節炎の関節中でのケモカインの産生にあずかると考えられている。ある研究においては、RA患者から単離したヒト滑膜繊維芽細胞において、これら２つのサイトカイン濃度の上昇がIL-8(Ｔ細胞の強力な化学誘引物質)、およびRANTES(好中球の強力な化学誘引物質)の発現を誘導した(Rathanaswami et al.(1993) J Biol Chem 268, 5834-9)。他の研究者らは、RAおよび骨関節炎の患者由来の炎症を起こした滑膜組織は高濃度のMCP-1を含有し、かつこれらの標本由来の培養滑膜細胞中において、TNFαおよびIL-1はこのケモカインのmRNA発現を著しく増大させた。MNP由来のケモカインおよび滑膜繊維芽細胞と滑膜細胞を刺激したサイトカインは、末梢の単球、好中球およびＴ細胞の補充および管外遊出を促進することにより、RAの病原論において重要な役割を担っている。他の疾患および症状に共通して、活性化された白血球は他の組織を損傷させる一連のメディエーターを放出する。より詳細には、白血球由来の反応性酸素種およびタンパク質分解酵素(例えば、基質メタロプロテイナーゼ、カテプシン、および好中球由来エラスターゼ)が炎症性関節疾患において組織損傷の開始および維持に関与する。

【０３３８】

肺疾患

肺の損傷の臨床症状は広い範囲にわたる。本明細書においては、それらを正しく肺の炎症性疾患(ILD)と称する。ILDは、典型的には特定の傷害の結果であり、例えば全身性細菌感染(例ｗば、敗血症)、外傷(例えば、虚血再還流傷害)、および抗原の吸入(例えば、タバコ煙のような毒素)が挙げられる。ILDはまた、アレルギー性肺胞炎、ARDS(急性または成人性呼吸困難症候群)、種々の型の喘息、気管支炎、コラーゲン血管疾患、肺類肉腫症、好酸球性肺疾患、肺炎、および肺繊維症が含まれる。要するに、これらの疾患および症状の病因論は、特に肺胞に存在するマクロファージの活性化に関与している。マクロファージの放出に引き続いて、好中球、好酸球およびＴ細胞が活性化され、損傷部位に補充されて、内皮および上皮細胞由来のサイトカインおよびケモカインに隣接する。関与する特定のサイトカインおよびケモカインには；GM-CSF、TNF-α、IL-1、IL-3、IL-5、IL-8、MCP-1、MCP-3、MIP-1α、RANTESおよびエオタキシンが含まれる。

【０３３９】

白血球は、プロテアーゼ、反応性酸素種、および生物学的活性脂質を含む二次的組織損傷の多くのメディエーターを放出して、また細胞表面抗原および細胞接着分子を発現することにより、前炎症性サイトカインおよびケモカインに応答する。さらに、特定の白血球集団はある種のILDにおいて、他のILDに対するよりもより重要な役割を果たすものと考えられる。好中球およびMNPは、ARDSなどの急性肺損傷および種々の肺繊維症における二次的損傷に対してより顕著に寄与するが、一方、Ｔ細胞と好酸球はアレルギー性喘息、繊維性肺胞炎、および類肉腫症などを含む好酸球性肺疾患の主犯である。

【０３４０】

癌

腫瘍細胞およびMNP産生増殖因子、サイトカインよびケモカインは腫瘍における血管形成と腫瘍微小環境への白血球補充を制御することが示されている。白血球が殺腫瘍性機能を

有するにもかかわらず、白血球浸潤および血管形成因子の過剰産生の結果、腫瘍細胞に栄養を与え、腫瘍の発達を促進する血管新生を引き起こす。白血球浸潤の定量実験から、例えばMNPは乳癌において、細胞塊の50%を占めることが示された。最近の研究では、MCP-1の過剰発現が白血球浸潤と卵巣腫瘍に関連するマクロファージおよびＴ細胞の数が多いことの原因であると結論付けている。実際、リンパ腫および神経膠腫を含む他の癌において他のケモカインおよびサイトカインの過剰発現が認められている。肺生体組織検査および細気管支肺胞洗浄サンプル中で増加している好中球数は細気管支肺胞癌と関連しており、強力な好中球の化学誘引物質であるIL-8の増加した濃度と相関している。

【０３４１】

サイトカインおよびケモカインの活性化に応答した細胞接着分子およびタンパク分解酵素のアップレギュレーションは、腫瘍転移に欠くことができない。白血球および上皮細胞のタンパク質分解酵素は、細胞外基質を破壊し、一次腫瘍からの細胞の分散に関与する。例えば、好中球エラスターゼは、非小細胞肺癌(NSCLC)から大動脈への細胞の直接的な浸潤に関連している。さらに、腫瘍細胞はそれら自体のタンパク分解酵素を産生することにより転移過程に寄与する。すべてのタイプの細胞上(例えば、腫瘍、内皮細胞および白血球細胞)における細胞接着分子(CAM)の発現は、転移に必須である。インテグリンCAMは、転移において重要な役割を果たすばかりでなく、腫瘍細胞の増殖および生存に関与し、種々のタンパク質分解酵素と共同して転移および血管形成を促進する。

【０３４２】

二次的組織損傷

二次的組織損傷に関連する病状は、本明細書で提供される方法および本明細書で提供される複合体、ならびに他の症状の治療のための、当業者に公知のケモカインでないサイトカインを用いて治療できる。これらの病状には、限定されるものではないが、CNS損傷をはじめとする、CNS炎症性疾患、神経変性疾患、心疾患、炎症性眼疾患、炎症性腸疾患、炎症性関節疾患、炎症性腎疾患、炎症性肺疾患、炎症性鼻疾患、炎症性甲状腺疾患、サイトカインにより調節される癌、および二次的組織損傷に関連する他の病状が挙げられる。

【０３４３】

本明細書記載の方法および本明細書で提供される複合体を使用して治療できるCNS炎症性疾患および／または神経変性疾患の例としては、限定されるものではないが、卒中、閉鎖性頭部損傷、白質脳症、脈絡髄膜炎、髄膜炎、副腎白質萎縮症、AIDS性痴呆合併症、アルツハイマー病、ダウン症候群、慢性疲労症候群、脳炎、脳脊髄炎、海綿状脳症、多発性硬化症、パーキンソン病、脊髄損傷／外傷(SCI)および外傷性脳損傷が挙げられる；本明細書で提供される方法を用いて治療できる心疾患には、限定されるものではないが、アテローム性動脈硬化症、新脈管内膜過形成、および再狭窄が含まれる；本明細書で提供される方法および複合体を用いて治療できる炎症性眼疾患には、限定されるものではないが、増殖性糖尿病網膜症、増殖性硝子体網膜症、網膜炎、強膜炎、強膜虹彩炎、脈絡膜炎およびブドウ膜炎が挙げられる。本明細書で提供される方法および複合体を用いて治療できる炎症性腸疾患の例としては、限定されるものではないが、慢性大腸炎、クローン病および潰瘍性大腸炎が挙げられる。本明細書で提供される方法および複合体を用いて治療できる炎症性関節疾患の例としては、限定されるものではないが、若年性慢性関節リウマチ、変形性関節炎、慢性関節リウマチ、ならびに強直性脊椎炎、ライター症候群、反応性関節炎、乾癬性関節炎、脊椎炎、未分化脊椎関節炎およびベーチェット症候群のような脊椎関節炎が挙げられる；本明細書で提供される方法および複合体を用いて治療できる炎症性腎疾患の例としては、限定されるものではないが、糸球体腎炎、狼瘡腎症およびIgA腎症が挙げられる；本明細書で提供される方法および複合体を用いて治療できる炎症性肺疾患の例としては、限定されるものではないが、好酸球性肺疾患、慢性好酸球性肺炎、繊維性肺疾患、急性好酸球性肺炎、および喘息、気管支肺異形成症、気管支肺胞好酸球増加症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、肺炎、急性呼吸困難症候群を含む気管支収縮、ならびに慢性閉塞性肺疾患(COPD)が挙げられる；本明細書で提供される方法および複合体を用いて治療できる炎症性鼻疾患の例としては、限定されるものではないが、ポリープ症、鼻炎

、副鼻腔炎が挙げられる；本明細書で提供される方法および複合体を用いて治療できる炎症性甲状腺疾患の例としては、限定されるものではないが、甲状腺炎が挙げられる；本明細書で提供される方法および複合体を用いて治療できるサイトカインにより制御される癌の例としては、限定されるものではないが、神経膠腫、アテローム性癌腫、腺癌、肉芽腫、膠芽腫、肉芽腫症、リンパ腫、白血病、黒色腫、肺癌、骨髄腫、肉腫、類肉腫症、小神経膠腫、髄膜腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、ホジキン病、ならびに乳房および前立腺癌が挙げられる。本明細書で提供される方法および複合体を用いる治療に感受性がある他の炎症性疾患としては、限定されるものではないが、脈管炎、自己免疫性糖尿病、インスリン依存性真性糖尿病、移植片対宿主病(GVHD)、乾癬、全身性狼瘡紅斑、敗血症、全身性炎症応答症候群(SIRS)、および火傷による外傷性炎症が挙げられる。

【０３４４】

前記のように、これらの疾患は多様ではあるが炎症応答に関して共通する特性を有する。患者に要すれば本明細書に記載の有効量の治療薬剤を投与することにより治療できる脊髄損傷または外傷は、考慮される疾患の例である。本明細書に記載の治療法は、白血球の増殖および移動に関与するこの応答の有害な結果に対抗するよう設計されている。この治療法は白血球の増殖および移動をなくす、または低下させ、それにより症状の軽減、有害な事象の低減をはかり、また、他の治療法の有効性を促進するといった他の有益な結果を導く。

【０３４５】

以下の実施例は単に例示を目的として示されるものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【０３４６】

実施例

実施例１

遺伝子の構築

開発過程を促進するために、遺伝子構築物、すなわち、融合タンパク質リガンド、毒素およびリンカー配列の置換を容易にするカセット構築物を設計した。この「カセット構築物」はOPL98101の全コード配列（表６参照、および配列番号55参照）を用いて適所に化学合成した。該遺伝子は融合タンパク質がメチオニン残基(Met)とそれに続く公開された成熟MCP-3の配列さらにアラニン(Ala)残基で開始するよう設計した。この配列にMet残基を続け（それによりAla-Metリンカーを形成する）、さらに志賀A1毒素サブユニットの残基23～268を続けた。

【０３４７】

異なるリガンドおよび毒素遺伝子での除去および置換を容易にするために、それぞれの3'および5'末端に近い各々の遺伝子配列に制限エンドヌクレアーゼ部位を組み込んだ（配列番号52～67参照）。さらに、成熟型のサポリン-6(OPL982)タンパク質をコードする、適当な内部制限部位を含む第２の毒素遺伝子を合成した。志賀毒も同様にサブクローニングした。ケモカイン－毒素融合物および遊離毒素遺伝子はフランクするXbaI(5')およびBamHI(3')制限部位を含んでいる。それらを独立にpGemex-1ベクター(Promega Inc)にクローニングした。得られた遊離サポリン毒素含有プラスミドはpOPL2（遊離サポリン毒素）とした。遊離サポリン毒素(pOPL2)のプラスミドマップは図２に示されている。リガンド－毒素融合物(MCP3-AM-SHIGA、表６ではOPL98101と示される）のプラスミドマップは図３に示されている（ここでは該プラスミドはpOPL1と示されている）。

【０３４８】

両遺伝子のATG開始コドンにはpET11c発現系（T7プロモーター、Novagen Inc.）へのサブクローニングのためのNdel部位を含めた。両ＤＮＡ構築物におけるコドン選択は設計段階中に大腸菌における発現に向けて最適化した。pGemex-1ベクターに由来する遺伝子を適当な制限酵素を用いてpET11c発現系にサブクローニングした。pET11cプラスミド中のケモカイン－毒素含有プラスミド例のプラスミドマップは図４(MCP-AM-SAP)および図５(MCP3-AM-SHIGA)に示されている。これらのような構築物の発現によりOPL98101およびOPL983など

のタンパク質が生じた（表６参照）。

【０３４９】

リガンドおよび毒素遺伝子のクローニング

本来の配列上に残ったすべて遺伝子および変異体は適当なオリゴヌクレオチドプライマー（表７参照）およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いてクローニングした。正鎖プライマーは遺伝子のpET11cへのサブクローニングのための制限部位を含めて設計した。逆鎖プライマーはリンカーおよび所望の毒素配列の一部と部分的に重複し、かつ、続くリガンドと毒素の除去および置換、ならびに発現ベクターへのサブクローニングに適当な制限部位をコードした。MCP-1はATCC65933プラスミドＤＮＡ(Rockville,MD)からクローニングし、他方、ヒトエオタキシンおよびSDF-1βはQuick-Cloneヒト肺ｃＤＮＡライブラリー(Clonetech, Palo Alto, CA)由来であった。先端切断型志賀A1遺伝子（成熟融合タンパク質においてC末端6残基ヒスチジンタグ配列を含むか含まない）はpOPL98101からクローニングした。PCR産物はアガロースゲルからQiagenゲル抽出キットを用いて単離し、TOPOクローニングキット(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてベクターｐCR2.1にクローニングした。それらの同一性を確認するために、完成した遺伝子をM13正および逆プライマーおよびABIプリズム310遺伝子解析装置を用いて配列決定した。

【表１２】

表７

プライマーの名称 向き （遺伝子）	配列（5’→3’）および翻訳
1 Eot フォワード (エオタキシン)	GGG TAA TAG CAT ATG GGG CCA GCT TCT GTC CCA ACC A NdeI G P A S V P T 配列番号 41
2 Eot リバース (エオタキシン)	CCC GAA TTC TTT CAT CGC TGG CTT TGG AGT TGG AGA TTT TTG GT EcoRI K M A P K P T P S K Q D 配列番号 42
1MCP-1 フォワード (MCP-1)	GGG TAA TAG CAT ATG CAG CCA GAT GCA ATC AAT GCC CCA NdeI Q P D A I N A P 配列番号 43
2 MCP-1 リバース (MCP-1)	CCC GAA TTC TTT CAT CGC AGT CTT CGG AGT TTG GGT TTC TT EcoRI K M A T K P T Q T Q K 配列番号 44
1 MCP-3 フォワード (MCP-3)	CAT ATG CAA CCG GTA GGC ATC AAC ACG *NdeI* Q P V G I N T 配列番号 45
2 MCP-3 リバース (MCP-3)	C ACT AGT AAC CAT CGC AAG CTT CGG GGT CTG AG *SpeI* V M A L K P T Q T 配列番号 46
1 SDF フォワード (SDF-1β)	GGG TAA TAG CAT ATG AAG CCC GTC AGC CTG AGC TAC AG NdeI K P V S L S Y R 配列番号 47
2 SDF リバース (SDF-1β)	CCC GAA TTC TTT CAT CGC CAT CTT GAA CCT CTT GTT TAA AGC TTT C EcoRI K M A M K F R K N L A K E 配列番号 48
1 SHIGA フォワード (志賀)	GGG TAA TAG CAT ATG AAA GAA TTC ACC CTG GAC TTT TCC NdeI K E F T L D F S 配列番号 49
2 SHIGA リバース	CCC GGA TCC ACT AGT A TTA AGC GTG GTG BamHI SpeI stop A H H 配列番号 50

【表１３】

プライマーの名称 向き （遺伝子）	配列（5’→3’）および翻訳
3 SHIGA リバース （志賀-His6）	CCC GGA TCC ACT AGT TTA ATG ATG ATG GTG GTG GTG GCA ATT GAG BamHI SpeI stop H H H H H H C N L AAT CAG I L 配列番号 51

【０３５０】
ケモカイン毒素複合体発現のスクリーニング
ケモカイン－毒素含有pET11C構築物（表６）を大腸菌BL21DE3pLysS(Stratagene)へ形質転換し、1%グルコースおよび100μg/mlカルベニシレン含有ルリアブロス(LB-car)で平板培養した。一晩インキュベートした後、単一コロニーを10mlのLB-carに播種し、OD_{600}値1.0まで増殖させ、1mMのIPTGで誘導した。誘導後１および２時間後にサンプルを採取し、遠心分離により細胞を濃縮し、SDSサンプルバッファーにOD13で再懸濁した。発現されたタンパク質をSDS-PAGEに付し、クマシー染色によって可視化し、他方、並行して行った１セットのゲルは適当な抗体(R&D systems, Minneapolis, MN) を用いてウエスタンおよび免疫ブロットした。これらのケモカイン－毒素はすべて（表６参照）明確に発現されていた。形質転換細胞のアリコート（OD_{600}が～0.85である15%グリセロール含有LBの1ml）を、その後の使用のために-70℃で凍結した。
【０３５１】
選択された融合タンパク質の精製
OPL98110のニッケルアフィニティークロマトグラフィーによる精製
少量の研究材料が迅速に発現し、かつ、精製されてin vitroバイオアッセイをはかどらせ、また、望まれるべき大スケール精製のためのさらなる方法を導くことができるよう、HISタグをつけたケモカイン－毒素遺伝子を構築した。ニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いて、少量の部分精製OPL98110（SDSゲルで～65%純度）が得られた。陽イオン交換およびニッケルアフィニティークロマトグラフィーの二段階工程により本質的に純粋なケモカイン－毒素が得られる。
【０３５２】
500mlのLBを含む振盪フラスコ中でpOPL98110で形質転換された細胞をOD_{600}値1.28まで増殖させ（37℃で7時間のインキュベーション）、1mMのIPTGで1.5時間誘導し（OD_{600}=2.53）、遠心分離によって回収した。ペレットの半量（すなわち、250mlの最初の培養物と同等なもの）を300mMのNaClおよび8Mの尿素を含有する6mlの10mMリン酸ナトリウム（pH7.4）中、氷上で超音波処理した。溶解物を微量遠心分離試験管中で13,000rpmで遠心分離し、得られた上清を4℃にて100,000gで1時間遠心分離した。最後の上清を、5mMのイミダゾールを含有するが尿素は含まない溶解バッファーで予め平衡化したニッケル－NTA樹脂(Qiagen)の1mlスラリー（50%v/v）と混合した。この混合物を4℃で5時間ゆっくりと回転させ、小カラムに注ぎ、300mMのNaClおよび60mMのイミダゾールを含有する4mlの10mMリン酸ナトリウム（pH7.4）で洗浄した。カラムを10mMリン酸ナトリウム（pH7.4）および0.5Mイミダゾールを含有する4×1mlのバッファーで溶出した。ウエスタンおよび免疫ブロッティングを併用するSDS-PAGEによってOPL98110陽性画分を同定した。プールしたところで、融合タンパク質の収率および純度はそれぞれ200μgおよび65%と推定された。
【０３５３】
Hisタグをつけていない融合タンパク質(OPL98101)の精製
OPL98101は、以下のように公開された方法 (McDonald et al. (1996) Protein ExprPurif 8, 97-108)を若干改変した変法を用いて精製した。OPL98101プラスミド含有細菌細胞（菌株BL21(CE3)pLysS)は一晩培養したもの（1:100希釈液）から、30℃にてインキュベータ

ー振盪機においてOD$_{600}$値0.7まで増殖させた。IPTG(Sigma Chemical, St. Louis, MO)を0.2mMの最終濃度まで加え、1.5時間増殖を続け、その時点で細胞を遠心分離した。37℃の代わりに30℃でBL21(CE3)pLysS細胞を増殖させることにより収率が向上する。細胞を30℃で増殖させる場合には、それらは誘導の前にOD$_{600}$値1.5まで増殖させる。誘導後、約2ないし2.5時間増殖を続け、その時点で細胞を遠心分離により回収する。

【０３５４】

発酵後、5倍容量の10mMのEGTA、10mMのEDTAおよび50mMのNaClを含有する10mMリン酸ナトリウム（pH7.4）中で細菌を超音波処理し、100,000gで遠心分離した。上清をS-セファロース-FFカラムの流入口に接続したQ-セファロース-FFカラム（同一のバッファー中で平衡化）に適用した。これらの条件下で、OPL98101は陰イオン交換樹脂を通って流れ、陽イオン交換樹脂に固着する。Qカラムをはずして S-セファロースカラムを10mMリン酸ナトリウム（1mMのEGTAおよび1mMのEDTA、pH7.4）中の直線勾配のNaCl（0.05～1.0M、10カラム容量）で溶出した。ケモカインー毒素を免疫ブロッティングによって検出し、適当にプールした画分をセファクリルS100カラムに適用した。

【０３５５】

タンパク質含有画分をゲル電気泳動およびゲルのクマシーブルー染色によって解析した。高度に濃縮されたケモカインー毒素が～28kDa酸性（pl 6.3）タンパク質と～1:1（融合タンパク質：混入物）の割合で同時精製された。クマシーブルー染色ゲルではその他のタンパク質バンドは検出されなかった。N末端配列決定によりOPL98101および大腸菌「ハウスキーピングタンパク質」であろう混入物の存在を確認した。疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)をはじめとする、それらを分離するためのさらなる試みは不成功に終わった。酸性混入物は精製の間塩基性融合タンパク質に強固に結合していたと考えられる。8M尿素などの変性剤の存在下で低pH（～5.0～5.8）で細胞を溶解することにより、２種のタンパク質のかかる強固な結合が解かれる。OPL98110（尿素の存在下で安定）を用いたその後の試験によりこの結論は支持されている。

【０３５６】

実施例２

選択されたケモカインー毒素融合タンパク質のin vitro生活性

in vitroタンパク質合成阻害(RIP)アッセイ

タンパク質合成の融合タンパク質および遊離リボソーム不活化毒素媒介性阻害は、ルシフェラーゼRNAの翻訳をアッセイする市販のウサギ網赤血球溶解物系(Promega, Madison, WI.)を用いて測定できる。便宜には、サンプルを20mMトリシン、pH7.8に連続希釈し、5μlの希釈タンパク質を5μlの反応混合液（50μg/mlのルシフェラーゼRNA、0.1mMのメチオニンを除くアミノ酸混合物）および15μlのウサギ網赤血球溶解物と合わせた。いくつかの陰性対照（バッファーおよび試薬ブランク）に加え、遊離サポリン（0.03～1nM）を陽性対照として用いた。サンプルを30℃で１時間インキュベートし、次いで、2.5μlの反応混合物をDynex96ウェルプレート(Dynex Technologies Inc. Chentilly, VA)に移し、予熱しておいた（30℃）LUMlstar＊照度計(BMG Lab Technologies, Durham, NC)を用いて分析した。

【０３５７】

タンパク質合成の阻害－RIPアッセイ

OPL98101の毒性活性は市販のin vitroタンパク質合成阻害アッセイを用いて測定した。30pMの濃度でサポリンは90%阻害性であったが、他方、推定された同一濃度のケモカインー毒素を含有するサンプルは同様の結果を得るのに500倍に希釈しなければならなかった。濃度推定が正しかったと仮定すると、この結果は志賀Aサブユニットはこのアッセイにおいてサポリンよりも強いという公開されたデータと一致する[Zollman,et al. (1994) Protein Expr Purif 5, 291-5; McDonald et al. (1996) Protein Expr Purif 8,97-108;およびChandler et al. (1998) Int J Cancer 78, 106-11参照]。

【０３５８】

組織培養プロトコール

一次培養
成人脳細胞培養のプロトコールは公知である（例えば、Yong et al. (1997) Culture of glial cells from human brain biopsies. In Protocols for Neural cell Culture(A. Richardson and S. Fedoroff, eds) Humana Press, St. Louis 157-172)参照）。要するに、手術によって切除した脳組織を1mm角に切断し、0.25%トリプシン中で37℃にて１時間インキュベートする。懸濁液を130μmのナイロンフィルターに通し、組織を単細胞に分離する。30%パーコール中で遠心分離した後（15,000rpm、25分）、上清は生存能力のあるニューロンを含み、他方ペレットは組織細片、ミエリンおよび赤血細胞からなっている。ニューロン細胞を回収し、コートしていない組織培養プラスチック上で平板培養する。培養物を37℃で24時間インキュベートすると、その時までに小グリア細胞はプラスチックに付着し、他方、乏突起神経膠細胞は溶液中に残存する。乏突起神経膠細胞をデカントし、遠心分離し、それらが付着するポリ-L-リジンで平板培養する。ニューロンおよび星状細胞はこの単離工程では生存しないが、得られる乏突起神経膠細胞および小グリア細胞の集団は95%以上純粋である。

【０３５９】
ニューロンおよび星状細胞は胎児脳試料から誘導する。脳組織を小角に切断し、0.25%トリプシンおよび100μg/mg DNAアーゼとともに37℃でインキュベートする（Oh et al. (1996) Glia 17, 237-53参照）。懸濁液を130μmのナイロンフィルターにとおし、濾液を回収し、洗浄し、細胞が付着するのを可能にするポリ-L-リジンでコートした組織培養プラスチックに播種する。ほとんどの胎児軸索束は有髄化していないので、パーコール遠心分離処置は必要でない。ニューロンの集団を精製するためには、混合培養物を有糸分裂的に活性な星状細胞を破壊する25μMのシトシンアラビノシド(Sigma, St. Louis)で処理する。星状細胞の集団を精製するには、混合培養物をニューロンを死滅させる0.25%トリプシンの存在下で継代する。成人の星状細胞も同様の方法で単離する。成人および胎児の星状細胞および胎児ニューロンの一次培養物を調製した。

【０３６０】
一般に、ニューロンの細胞培養には週に２回10%胎児ウシ血清、20μg/mlゲンタマイシンおよび0.1%デキストロース(Gibco, Grand Island, N. Y.)を添加した最小必須培地(MEM)を与える。

【０３６１】
ヒト末梢血白血球は公開された方法に従って回収する（例えば、Chabot et al.(1997) J Clin Invest 100, 604-12参照）。要するに、静脈血をフィコール-Hypaque(Pharmacia)上に重層し、2500rpmで30分遠心分離する。単核細胞画分を回収し、2回洗浄し、コートしていない組織培養培養基に播種する。2時間後、浮遊する細胞（ほとんどがＴリンパ球）を除去し、主に単球からなる付着集団を残す。これらの細胞は直ちに細胞傷害性実験に用いるか、または実験に先立って活性化する（3日、Ｔ細胞のための1mg/mlの抗CD3受容体結合または単球のための1mg/mlのリポ多糖類）。

【０３６２】
一般に、すべての造血細胞（一次細胞または下記の細胞系統）は10%胎児ウシ血清、20mg/mlゲンタマイシンおよび0.1%デキストロース(Gibco) を添加したRPMI培地で維持する。

【０３６３】
細胞系統
ヒト単核食細胞に由来する細胞系統は通常に培養する。化合物を試験するには、例えば、単球由来のU937およびTHP-1細胞および胎児脳由来の小グリア細胞様CHME系統（Dr. Tardieu, Fran ceにより得られた、Janabi et al. (1995) Neurosci Lett 195, 105-8も参照）が用いられている。星状細胞およびニューロンの系統のものをはじめとする多数の細胞系統はATCC(Rockville, MD)から容易に入手でき、出荷物に添付されている使用説明書を用いて首尾よく培養することができる。

【０３６４】
免疫組織化学

間接的免疫組織化学を通常に実施して富化培養物の純度を確認し、さらに拡張して、混合培養物中の異なる細胞種間を区別する。この工程を容易にするために用いることができる、種々の学究的および市販の細胞腫特異的抗体がある。例としては乏突起神経膠細胞を同定するための抗ガラクトセレブロシド(GalC)抗体、星状細胞のための抗グリア繊維性酸性タンパク質(GFAP)抗体、小グリア細胞のための抗Mac-1抗体、およびニューロンのための抗神経線維抗体(抗-NFL）が挙げられる。

【０３６５】

要するに、カバースリップ上の生存細胞を適当な固定剤（例えば、ガラクトセレブロシドのための4%パラホルムアルデヒド、および95%エタノール5%結晶性酢酸、v/v）で処理する。所定の濃度の一次抗体とそれに続く適当な二次抗体（典型的にはローダミンまたはフルオレセイン結合ヤギ抗ウサギまたは抗マウスIgG)を適用する。免疫蛍光を検出するために装備された顕微鏡を用いて染色された細胞を調べる。接着細胞培養物の解析は主に間接的免疫組織化学染色および標識、ならびに二重標識法による。各々の細胞種を十分に多数のランダムに選択した顕微鏡視野において計測し、データを適当な統計解析に付す。毒性の様式および／またはレベル、すなわち、アポトーシス対壊死および／または潜行性対著しい毒性によって、細胞死の程度を定性的に（0ないし4の毒性度、例えば、Noble et al. (1994) Brain Res 633,83-90参照）または定量的に（総集団のパーセンテージとしての死細胞数、例えば、Oh et al. (1997) Brain Res 757, 236-44参照）のいずれかで記録する。ほとんどの場合、データはチューキー－クラマー多重比較を用いる分散の片側解析(ANOVA)を用いて解析する。懸濁細胞は、典型的にはデータ収集を自動化されたフローサイトメーターおよび適当な統計解析（例えば、ベクトンディキンソンによる技術）を用いて解析する。

【０３６６】

細胞毒性アッセイ

便宜には、試験細胞に対照および試験物質（種々の濃度で）を含有する新鮮培地を供給し、指定期間（24～36時間）インキュベートする。次いで、他（Mosmann, T. (1983) J Immunol Methods 65, 55-63; Gieni et al. (1995) J Immunol Methods 187, 85-93）に詳細に記載されたように、細胞毒性を接着細胞の致命的な色素MTTを減少する能力として測定する。懸濁細胞培養における細胞毒性はコールター計数器を用いて測定し、これでは細胞の絶対数を試験条件あたりの生存細胞数の指標としてとる。最後に、総体的な細胞生存および形態は相転移顕微鏡および色素トリパンブルーの排除を用いて実験を通してモニターする(Yong et al.(1997) Culture of glial cells from human brain biopsies, In Protocols for Neural cell Culture (A. Richardson and S. Fedoroff, eds), Humana Press,St. Louis 157-172)。

【０３６７】

走化性アッセイ

各々の組換えケモカイン－毒素の走化性作用は、主に、リガンド成分の生物学的活性の試験として注目される。多数の走化性アッセイが当業者に公知である（例えば、Stuve et al. (1996) Ann Neurol 40, 853-63;およびStuve et al. (1997) J Neuroimmunol 80,38-46参照）。要するに、改良型ボイデンチャンバーの上部と下部の区画をフィブロネクチンでコートした3μMメンブレンで分離する。ケモカインが試験されるのに適当な、造血応答細胞をチャンバーの上の区画に入れ、他方、試験物質を下部に入れる。適当な時間の後、走化性刺激に応答して移動していた細胞数を記録する。移動するＴリンパ球はメンブレンからはなれて下のチャンバーに落ちるので、コールター計数器を用いて計数することができる。これに対し、移動するMNPはメンブレンの下面に保持され、従って、クマシーブルーでの染色および光学顕微鏡での解析の前に、上面を洗浄し、かつ下面を固定しなければならない。

【０３６８】

静止した標的細胞に対するOPL98110活性

注記、対照Aは組織培養培地である。対照Bはニッケルアフィニティー樹脂からのケモカイ

ン－毒素の溶出に先立って得た洗浄画分である。この画分は大腸菌タンパク質に極めて富んでいた。特に断りのない限り、すべての手順を３反復実施した。

【０３６９】

ヒト末梢血単球（健常提供者からの）およびTHP-1細胞（ヒト単球細胞系統）を1:10および1:50希釈の対照BおよびOPL98101で処理した。24時間後、細胞を位相差顕微鏡で調べ、代表的な視野の写真をとり計数した。OPL98110は両細胞種において著しい膜破壊および空胞化を引き起こした。処理細胞のほとんどは正常でないようであり、細胞細片量の増加によりいくつかはすでに死んでいるということが示された。低濃度のケモカイン－毒素（1:50）では、両細胞種の20～25％が影響を受けた。

【０３７０】

もう１つの実験では、THP-1細胞をOPL98110（1:10希釈）の存在および非存在下で48時間増殖させ、顕微鏡またはトリパンブルーを排除する能力のいずれかによって細胞活性を調べた。染料を排除する細胞は生存しており、他方、染色された細胞は死んでいる。THP-1細胞は本来非接着性であるので、より正確な計数を提供するために、計数に先立ってゆっくりとピペットで取ることにより対照および処理細胞を細胞細片と分離した。48時間後、58.8%±13%のOPL98110処理群と比較して、7.4±3%の対照細胞が死んでいた（すなわち、染色されていた）。これは51.4%の差である。96時間後に調べた対のウェルにより、対照細胞は増殖し、全く正常、かつ、健常のようであり続け、他方、ケモカイン－毒素処理培養物は多くの細胞細片を含んでいた（生存細胞の場合にはいずれもほんの少しである）ということが示された。

【０３７１】

これらの培養物を分け、さらに7日間インキュベートすることを可能にした。対照THP-1細胞は成長し、増殖し続けた。OPL98110処理培養物から分けられたウェルには生存細胞はなかった。これらの研究により処理細胞は病気になり、延長時間にわたって結局は死ぬということが証明されたが、このことはアポトーシス機構を示唆するものである。

【０３７２】

非標的細胞に対するOPL98110活性

OPL98110を非標的である、ヒト胎児一次ニューロンおよびヒトU251神経膠腫（星状細胞の腫瘍）細胞系統に対して試験した。ニューロンをTNF-αで活性化し、炎症をシミュレートした。神経膠腫細胞は積極的に増殖しており、その結果、活性化された。OPL98110（1:50希釈）に対する曝露の24時間後、細胞種のいずれかにおいても検出し得る作用はなかった。b-チュービュリンに関するニューロンの免疫組織化学染色およびアポトーシス(TUNEL)の検出により健常で完全な細胞と示された。

【０３７３】

移動する標的細胞に対するOPL98110活性

第１シリーズの実験では、白血球系統（ヒト末梢単球およびTHP-1細胞）の標的細胞をそれらの無活動の、静止した状態において試験した。上記で論じられるように、in vivoにおける焦点損傷または炎症時には、免疫細胞は種々の刺激（例えば、サイトカインおよびケモカイン）によって活性化され、その他のものの中でも、ケモカイン受容体の発現をアップレギュレートすること、および炎症部位に移動することによって応答する。標的細胞をサイトカイン、ケモカイン、ホルボールエステル、および細菌のリポ多糖類などの種々の外因性薬剤に曝すことによって、これらの特徴的なin vivo応答をin vitroで模倣し得るということが十分に確認されている。さらに明示すれば、ケモカインによって白血球のin vitro移動を誘導し、改良型ボイデン組織培養皿の上部と下部チャンバーを分離する3μmのフィルターを通って移動する細胞を計数することによって測定することができる。典型的には、試験ケモカインおよび細胞を短時間（例えば、2～3時間）インキュベートすることを用いて一時的化学誘引物質作用を観察する。所与の細胞が適当な受容体を有しても、すべてのケモカインがすべての細胞種に対して有効な化学誘引物質であるわけではない。

【０３７４】

THP-1細胞の場合には、MCP-3は化学誘引物質であるが、MCP-1（従って、OPL98110)はそうではない。MCP-3はTHP-1細胞を対照Aの185±8％まで下部チャンバーに誘引した。さらに、いずれのMCP-1応答性細胞も死んでしまう、OPL98110のまさしくその性質によって、所与のいずれかの化学誘引活性を定量することが困難となる。しかしながら、正常THP-1細胞は本来、いずれかの特定の外因性刺激がなくとも移動する（低細胞密度領域への接触が必要とされると思われることのすべてである）が、ケモカインによって誘導されたものよりもかなり遅い速度である。

【０３７５】

この知識をもって、本来的に移動する、および移動したTHP-1細胞（すなわち、改良型ボイデン組織培養皿の下部チャンバーに到達する細胞）に対するOPL98110の細胞傷害作用を試験するための長期間インキュベーションを行う実験を計画した。THP-1細胞を改良型ボイデンチャンバーの上部チャンバーに入れた。下部チャンバーはOPL98110の一連の希釈液を含有するか、しない培養培地を含んでいた。24時間後、上部および下部チャンバーの細胞をコールター計数器を用いて計数した。対照と試験間の上部チャンバーにおいて細胞数に差はなく、このことはすべての条件下で同数の細胞が移動したということを示唆するものである。対照と比較して、試験した細胞の下部チャンバーにおける細胞数はOPL98110の濃度が高まるにつれて減少した。移動したTHP-1細胞はOPL98110によって用量に依存して死に至った。

【０３７６】

改良型ボイデンチャンバー実験における「活性」細胞は、OPL98110に対して「静止した」（無活動の）組織培養モデルにおいて試験した細胞よりもより感受性があると考えられる。例えば、24時間後、OPL98110（1:50希釈液）で処理した約75～80％の静止THP-1細胞は顕微鏡下で観察した場合に健常であると思われた。ケモカイン－毒素の同一の希釈液を用いる移動アッセイにおける平均細胞生存率は50±15％（３反復の３実験の平均）であった。

【０３７７】

健常な志願者から単離した活性化（抗CD3+で）したヒトＴリンパ球を用いて同様の実験を実施した。OPL98110（1:50希釈液）は、同時に試験したTHP-1細胞の49+/-2％（p<0.001）と比較して、32+/-7％（p<0.05）のこれらの細胞を死に至らせた。

【０３７８】

実施例３

化学結合ケモカイン－毒素複合体の製造

第一級アミン基による二機能性架橋剤の結合

以下のように、二機能性架橋剤を用いてモノクローナル抗体(IgG)を第一級アミンを有する化合物に結合する。用いられる架橋剤としてはN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スルホスクシンイミジル6-エキサノエート(スルホ-LC-SPDP)、またはスルホスクシンイミジル6-［3'(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミンド］ヘキサノエート(Pierce Chemicals, Rockford, IL)がある。最初に毒素およびIgGを架橋剤で誘導体化する。

【０３７９】

1.0mlのBBS中の10mgの毒素に製造業者の使用説明書に従って製造した20nMの架橋剤の保存溶液を加え、混合物を室温で30分間攪拌する。結合されていない架橋剤を除去するために、サンプルをPBSで平衡化した5または10mlの脱塩カラムに適用し、1mlの画分を回収し、280nmでの吸光度をモニターし、ピーク画分を決定してプールする。回収したピーク画分を、例えば、微量透析を用いて1.0mlの最終容量まで濃縮する。

【０３８０】

次いで、30μlの架橋剤の保存溶液に25mgの抗体を加え、混合物を室温で30分間攪拌する。上記のようにピーク画分を回収し、酢酸塩バッファーで平衡化した脱塩カラムから濃縮する。濃縮液に500μlの酢酸塩バッファー中の12mgのジチオスレイトールを加え、混合物を室温で30分間攪拌する。

【０３８１】
混合物をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で平衡化した10mlの脱塩カラムに適用し、過剰の還元剤を除去する。1mlの画分を回収し、280nmでの各々の吸光度をモニターする。誘導体化した毒素に280nm吸光度ピークを有する第１の画分を加え、反応混合物を室温で18時間インキュベートし、次いで、セファデックス（登録商標）G-200カラム(1.5×45cm)(Pharmacia)に適用し、1ml画分を回収して280nmでの吸光度をモニターしながらPBSで平衡化する。複合体を含有する画分をプールする。
【０３８２】
実施例４
化学結合ケモカイン－毒素複合体の製造
メルカプト基による二機能性架橋剤の結合
メルカプト基での毒素へのモノクローナル抗体リガンドの結合は以下のように上記の架橋剤を用いて達成する。1.0mlのPBS中の5mgのリガンドに25μlの架橋剤の20mM保存溶液を加え、混合物を室温で30分間インキュベートする。過剰の架橋剤を除去するために、サンプルをPBS／エチレンジアミン四酢酸(EDTA)で平衡化した5ml脱塩カラムに適用し、1mlの画分を回収して280nmでの吸光度をモニターする。タンパク質を含有するピーク画分をプールし、1.0mlの最終容量まで濃縮する。タンパク質濃縮物に3mgのβ-ガラクトシダーゼを加え、反応混合物を室温で一晩インキュベートする。次いで、反応混合物をPBSで平衡化したセファデックス（登録商標）G-200カラム（1.5×45cm）(Pharmacia)に適用し、1mlの画分を回収する。280nmでの画分の吸光度をモニターし、カラムから出る最初の吸光ピークがタンパク質複合体を含んでいる。
【０３８３】
実施例５
化学結合ケモカイン－毒素複合体の製造
ケモカイン－毒素複合体のペグ化
精製ケモカイン－毒素複合体毒素のペグ化は、バッファーA（20mMリン酸ナトリウム、0.15MのNaCl、5mMのEDTA、pH7.0）中で毒素をメトキシ-PEG-マレイミド(MPEG-MAL)（分子量5000）(Sigma, St. Louis, MO)と1:10のモル率で混合することにより達成する。30分インキュベートした後、MPEG-MALの30倍モル過剰のCysを加えることにより反応をクエンチする。タンパク質を濃縮するために、反応混合物を好適なクロマトフラフィー樹脂に適用し、塩含有バッファー（中性ｐH）を用いてより濃縮された形で溶出する。例えば、反応混合物をバッファーB（10mMリン酸ナトリウム、1mMのEDTA、pH6.0）中の50mMのNaClで平衡化したS-セファロースカラム(Pharmacia)に適用する。タンパク質をバッファー中の１MのNaClでバッチ式に溶出する。濃縮されたタンパク質をゲル濾過カラムに充填し、バッファーC（50mMクエン酸ナトリウム、80mMのNaCl、0.1mMのEDTA、pH6.0）で溶出する。分子量差によって結合したPEG重合体を含むケモカイン－毒素複合体を非誘導体化ケモカイン－毒素複合体から分離する。
【０３８４】
当業者にとって改変は明らかであろうから、本発明は添付の請求項の範囲によってのみ限定されるものとする。
【図面の簡単な説明】
【図１】　本明細書で提供される融合タンパク質を示す模式図である。ここで、「リガンド」は表３に挙げられた種のアミノ酸配列の１つから選択されるタンパク質性のリガンドであり、「リンカー」はアミノ酸配列Ala-Metを有するタンパク質性のリンカー部分であるか、または本明細書で配列番号1～12として開示されているもののようなポリペプチド（複合体において用いられるリンカー例を提供している国際PCT出願第96/06641号も参照）から選択され、「毒素」はアミノ酸配列が表４に挙げられている細胞毒などのタンパク質性細胞毒である。
【図２】　実施例に記載されるようにpGEMEXベクター融合タンパク質中へクローン化されたサポリンをコードするpGEMEX-SAPで示されるプラスミド例のマップの模式図である。

【図３】　実施例に記載されるようにpGEMEXベクター中へクローン化された複合体MCP-3-AM-Shiga-A1のマップの模式図である。
【図４】　pET11cベクター中へクローン化された複合体MCP-1-AM-SAPのマップの模式図である（実施例および表６参照）。
【図５】　pET11cベクター中へクローン化された複合体MCP-3-AM-Shiga-A1のマップの模式図である（実施例および表６参照）。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> McDonald, John R.
Coggins, Philip

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING SECONDARY TISSUE DAMAGE AND OTHER INFLAMMATORY CONDITIONS AND DISORDERS

<130> 25020-601B

<140> Unassigned
<141> 1999-07-21

<160> 70

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> homo sapien

<400> 1
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> REPEAT
<222> (1)...(5)

<223> homo sapien

<400> 2
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> homo sapien

<400> 3
Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> homo sapien

<400> 4
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> homo sapien

<400> 5
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> homo sapien

<400> 6
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> homo sapien

<400> 7
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> homo sapien

<400> 8
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
1 5 10

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> homo sapien

<400> 9
Ser Arg Ser Ser Gly
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 10
Ser Gly Ser Ser Cys
1 5

<210> 11
<211> 28
<212> PRT
<213> diphtheria toxin trypsin sensitive linker

<400> 11
Ala Met Gly Arg Ser Gly Gly Gly Cys Ala Gly Asn Arg Val Gly Ser
1 5 10 15
Ser Leu Ser Cys Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ala Met
20 25

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapien

<220>
<221> REPEAT
<222> (3)...(3)
<223> repeat unit 2-4 times

<221> REPEAT
<222> (3)...(4)
<223> repeat family 1-11 times

<400> 12
Ala Met Gly Ser Ala Met
1 5

<210> 13
<211> 74
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 13
Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15
Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Gly
20 25 30
Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp
35 40 45
Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr
50 55 60
Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
65 70

<210> 14
<211> 77

<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 14
Gly Pro Val Ser Ala Val Leu Thr Glu Leu Arg Cys Thr Cys Leu Arg
1 5 10 15
Val Thr Leu Arg Val Asn Pro Lys Thr Ile Gly Lys Leu Gln Val Phe
20 25 30
Pro Ala Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys
35 40 45
Asn Gly Lys Gln Val Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys
50 55 60
Val Ile Gln Lys Ile Leu Asp Ser Gly Asn Lys Lys Asn
65 70 75

<210> 15
<211> 127
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 15
Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15
Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
20 25 30
Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45
Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60
Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80
Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95
Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110
Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

<210> 16
<211> 73
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 16
Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
1 5 10 15
Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser Pro Gly
20 25 30
Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg
35 40 45
Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile Ile Glu
50 55 60
Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
65 70

<210> 17
<211> 73
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 17
Lys Ser Met Gln Val Pro Phe Ser Arg Cys Cys Phe Ser Phe Ala Glu

```
 1               5                  10                  15
Gln Glu Ile Pro Leu Arg Ala Ile Leu Cys Tyr Arg Asn Thr Ser Ser
            20                  25                  30
Ile Cys Ser Asn Glu Gly Leu Ile Phe Lys Leu Lys Arg Gly Lys Glu
        35                  40                  45
Ala Cys Ala Leu Asp Thr Val Gly Trp Val Gln Arg His Arg Lys Met
    50                  55                  60
Leu Arg His Cys Pro Ser Lys Arg Lys
65                  70
```

<210> 18
<211> 133
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 18

```
Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp Val Asn Cys
 1               5                  10                  15
Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln Pro Pro Leu
            20                  25                  30
Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln Asp Ile Leu
        35                  40                  45
Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe Asn Arg Ala
    50                  55                  60
Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys Asn
65                  70                  75                  80
Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr Arg His Pro
                85                  90                  95
Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg Lys Leu Thr
            100                 105                 110
Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr Leu
        115                 120                 125
Ser Leu Ala Ile Phe
    130
```

<210> 19
<211> 77
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 19

```
Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys
 1               5                  10                  15
Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val
            20                  25                  30
Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu
        35                  40                  45
Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln
    50                  55                  60
Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser
65                  70                  75
```

<210> 20
<211> 76
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 20

```
Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
 1               5                  10                  15
Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
            20                  25                  30
Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
        35                  40                  45
```

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
50 55 60
Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
65 70 75

<210> 21
<211> 76
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 21
Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile
1 5 10 15
Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr
20 25 30
Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly
35 40 45
Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met
50 55 60
Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro
65 70 75

<210> 22
<211> 76
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 22
Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile
1 5 10 15
Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr
20 25 30
Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp
35 40 45
Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe Met
50 55 60
Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu
65 70 75

<210> 23
<211> 75
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 23
Gln Pro Asp Ala Leu Asn Val Pro Ser Thr Cys Cys Phe Thr Phe Ser
1 5 10 15
Ser Lys Lys Ile Ser Leu Gln Arg Leu Lys Ser Tyr Val Ile Thr Thr
20 25 30
Ser Arg Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Arg Thr Lys Leu Gly Lys
35 40 45
Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys Trp Val Gln Asn Tyr Met Lys
50 55 60
His Leu Gly Arg Lys Ala His Thr Leu Lys Thr
65 70 75

<210> 24
<211> 70
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 24
Ala Ser Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr

```
 1               5                  10                  15
 Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser
            20                  25                  30
 Ser Gln Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Ser Arg
        35                  40                  45
 Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser
    50                  55                  60
 Asp Leu Glu Leu Ser Ala
 65                  70
```

<210> 25
<211> 129
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 25

```
 His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
  1               5                  10                  15
 Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
            20                  25                  30
 Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
        35                  40                  45
 Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
    50                  55                  60
 Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
 65                  70                  75                  80
 Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
                85                  90                  95
 Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
            100                 105                 110
 Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
        115                 120                 125
 Ser
```

<210> 26
<211> 73
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 26

```
 Ala Pro Leu Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
  1               5                  10                  15
 Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys Ser Pro Gly
            20                  25                  30
 Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Gln
        35                  40                  45
 Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Lys Lys Ile Ile Glu
    50                  55                  60
 Lys Met Leu Lys Asn Gly Lys Ser Asn
 65                  70
```

<210> 27
<211> 73
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 27

```
 Ala Ser Val Val Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
  1               5                  10                  15
 Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Arg Ser Pro Gly
            20                  25                  30
 Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Lys
        35                  40                  45
```

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Gln Lys Ile Ile Glu
50 55 60
Lys Ile Leu Asn Lys Gly Ser Thr Asn
65 70

<210> 28
<211> 69
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 28
Ala Gln Val Gly Thr Asn Lys Glu Leu Cys Cys Leu Val Tyr Thr Ser
1 5 10 15
Trp Gln Ile Pro Gln Lys Phe Ile Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro
20 25 30
Gln Cys Pro Lys Pro Gly Val Ile Leu Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln
35 40 45
Ile Cys Ala Asp Pro Asn Lys Lys Trp Val Gln Lys Tyr Ile Ser Asp
50 55 60
Leu Lys Leu Asn Ala
65

<210> 29
<211> 68
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 29
Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala
1 5 10 15
Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly
20 25 30
Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln
35 40 45
Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser
50 55 60
Leu Glu Met Ser
65

<210> 30
<211> 69
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 30
Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr
1 5 10 15
Ala Arg Lys Leu Pro Arg Asn Phe Val Val Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser
20 25 30
Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val Phe Gln Thr Lys Arg Ser Lys
35 40 45
Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr
50 55 60
Asp Leu Glu Leu Asn
65

<210> 31
<211> 323
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 31
Tyr Ser Arg Glu Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser Pro Lys Arg Glu Ser

```
 1               5                  10                  15
Gly Glu Glu Phe Arg Met Glu Lys Leu Asn Gln Leu Trp Glu Lys Ala
            20                  25                  30
Gln Arg Leu His Leu Pro Pro Val Arg Leu Ala Glu Leu His Ala Asp
        35                  40                  45
Leu Lys Ile Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Trp Lys Lys Leu Lys Leu
    50                  55                  60
Asp Gly Leu Asp Glu Asp Gly Glu Lys Glu Ala Arg Leu Ile Arg Asn
65                  70                  75                  80
Leu Asn Val Ile Leu Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Gly Lys Lys Asp Ala
                85                  90                  95
Arg Gln Val Thr Ser Asn Ser Leu Ser Gly Thr Gln Glu Asp Gly Leu
            100                 105                 110
Asp Asp Pro Arg Leu Glu Lys Leu Trp His Lys Ala Lys Thr Ser Gly
        115                 120                 125
Lys Phe Ser Gly Glu Glu Leu Asp Lys Leu Trp Arg Glu Phe Leu His
    130                 135                 140
His Lys Glu Lys Val His Glu Tyr Asn Val Leu Leu Glu Thr Leu Ser
145                 150                 155                 160
Arg Thr Glu Glu Ile His Glu Asn Val Ile Ser Pro Ser Asp Leu Ser
                165                 170                 175
Asp Ile Lys Gly Ser Val Leu His Ser Arg His Thr Glu Leu Lys Glu
            180                 185                 190
Lys Leu Arg Ser Ile Asn Gln Gly Leu Asp Arg Leu Arg Arg Val Ser
        195                 200                 205
His Gln Gly Tyr Ser Thr Glu Ala Glu Phe Glu Glu Pro Arg Val Ile
    210                 215                 220
Asp Leu Trp Asp Leu Ala Gln Ser Ala Asn Leu Thr Asp Lys Glu Leu
225                 230                 235                 240
Glu Ala Phe Arg Glu Glu Leu Lys His Phe Glu Ala Lys Ile Glu Lys
                245                 250                 255
His Asn His Tyr Gln Lys Gln Leu Glu Ile Ala His Glu Lys Leu Arg
            260                 265                 270
His Ala Glu Ser Val Gly Asp Gly Glu Arg Val Ser Arg Ser Arg Glu
        275                 280                 285
Lys His Ala Leu Leu Glu Gly Arg Thr Lys Glu Leu Gly Tyr Thr Val
    290                 295                 300
Lys Lys His Leu Gln Asp Leu Ser Gly Arg Ile Ser Arg Ala Arg His
305                 310                 315                 320
Asn Glu Leu
```

<210> 32
<211> 74
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 32

```
 Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe
  1               5                  10                  15
 Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn
             20                  25                  30
 Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn
         35                  40                  45
 Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu
     50                  55                  60
 Glu Lys Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
 65                  70
```

<210> 33
<211> 71
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 33
Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Glu Tyr Phe Lys
1 5 10 15
Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Ser Glu
20 25 30
Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala
35 40 45
Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asn Lys Arg Val Lys Asn Ala Val Lys Tyr
50 55 60
Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser
65 70

<210> 34
<211> 247
<212> PRT
<213> Bryonia dioica

<400> 34
Asp Val Ser Phe Arg Leu Ser Gly Ala Thr Thr Thr Ser Tyr Gly Val
1 5 10 15
Phe Ile Lys Asn Leu Arg Glu Ala Leu Pro Tyr Glu Arg Lys Val Tyr
20 25 30
Asn Ile Pro Leu Leu Arg Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Arg Tyr Thr
35 40 45
Leu Leu His Leu Thr Asn Tyr Ala Asp Glu Thr Ile Ser Val Ala Val
50 55 60
Asp Val Thr Asn Val Tyr Ile Met Gly Tyr Leu Ala Gly Asp Val Ser
65 70 75 80
Tyr Phe Phe Asn Glu Ala Ser Ala Thr Glu Ala Ala Lys Phe Val Phe
85 90 95
Lys Asp Ala Lys Lys Lys Val Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr Glu
100 105 110
Arg Leu Gln Thr Ala Ala Gly Lys Ile Arg Glu Asn Ile Pro Leu Gly
115 120 125
Leu Pro Ala Leu Asp Ser Ala Ile Thr Thr Leu Tyr Tyr Tyr Thr Ala
130 135 140
Ser Ser Ala Ala Ser Ala Leu Leu Val Leu Ile Gln Ser Thr Ala Glu
145 150 155 160
Ser Ala Arg Tyr Lys Phe Ile Glu Gln Gln Ile Gly Lys Arg Val Asp
165 170 175
Lys Thr Phe Leu Pro Ser Leu Ala Thr Ile Ser Leu Glu Asn Asn Trp
180 185 190
Ser Ala Leu Ser Lys Gln Ile Gln Ile Ala Ser Thr Asn Asn Gly Gln
195 200 205
Phe Glu Ser Pro Val Val Leu Ile Asp Gly Asn Asn Gln Arg Val Ser
210 215 220
Ile Thr Asn Ala Ser Ala Arg Val Val Thr Ser Asn Ile Ala Leu Leu
225 230 235 240
Leu Asn Arg Asn Asn Ile Ala
245

<210> 35
<211> 275
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<400> 35
Val Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr
1 5 10 15
Ser Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu
20 25 30
Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Glu
35 40 45
Lys Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu

```
     50                  55                  60
 Gly Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp
 65                  70                  75                  80
 Asn Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr Ser
                 85                  90                  95
 Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys
            100                 105                 110
 Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln
        115                 120                 125
 Ile Thr Gln Gly Asp Gln Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp
    130                 135                 140
 Leu Leu Ser Thr Ser Met Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val
 145                 150                 155                 160
 Lys Asp Glu Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu
                 165                 170                 175
 Ala Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Ile Lys Asn Phe Pro
            180                 185                 190
 Asn Lys Phe Asn Ser Glu Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Asn Trp
        195                 200                 205
 Lys Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe
    210                 215                 220
 Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp
 225                 230                 235                 240
 Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys Ser Ser Asn
                 245                 250                 255
 Glu Ala Asn Ser Thr Val Arg His Tyr Gly Pro Leu Lys Pro Thr Leu
            260                 265                 270
 Leu Ile Thr
        275

<210> 36
<211> 250
<212> PRT
<213> Momordica charantia

<400> 36
 Ala Pro Thr Leu Glu Thr Ile Ala Ser Leu Asp Leu Asn Asn Pro Thr
  1               5                  10                  15
 Thr Tyr Leu Ser Phe Ile Thr Asn Ile Arg Thr Lys Val Ala Asp Lys
             20                  25                  30
 Thr Glu Gln Cys Thr Ile Gln Lys Ile Ser Lys Thr Phe Thr Gln Arg
         35                  40                  45
 Tyr Ser Tyr Ile Asp Leu Ile Val Ser Ser Thr Gln Lys Ile Thr Leu
     50                  55                  60
 Ala Ile Asp Met Ala Asp Leu Tyr Val Leu Gly Tyr Ser Asp Ile Ala
 65                  70                  75                  80
 Asn Asn Lys Gly Arg Ala Phe Phe Phe Lys Asp Val Thr Glu Ala Val
                 85                  90                  95
 Ala Asn Asn Phe Phe Pro Gly Ala Thr Gly Thr Asn Arg Ile Lys Leu
            100                 105                 110
 Thr Phe Thr Gly Ser Tyr Gly Asp Leu Glu Lys Asn Gly Gly Leu Arg
        115                 120                 125
 Lys Asp Asn Pro Leu Gly Ile Phe Arg Leu Glu Asn Ser Ile Val Asn
    130                 135                 140
 Ile Tyr Gly Lys Ala Gly Asp Val Lys Lys Gln Ala Lys Phe Phe Leu
 145                 150                 155                 160
 Leu Ala Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Ser
                 165                 170                 175
 Asp Lys Ile Pro Ser Glu Lys Tyr Glu Glu Val Thr Val Asp Glu Tyr
            180                 185                 190
 Met Thr Ala Leu Glu Asn Asn Trp Ala Lys Leu Ser Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205
 Asn Ser Lys Pro Ser Thr Thr Thr Ala Thr Lys Cys Gln Leu Ala Thr
    210                 215                 220
```

```
 Ser Pro Val Thr Ile Ser Pro Trp Ile Phe Lys Thr Val Glu Glu Ile
 225                 230                 235                 240
 Lys Leu Val Met Gly Leu Leu Lys Ser Ser
                 245                 250

<210> 37
<211> 293
<212> PRT
<213> Shigella dysenteriae

<400> 37
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
  1               5                  10                  15
 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
             20                  25                  30
 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn
         35                  40                  45
 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
     50                  55                  60
 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
 65                  70                  75                  80
 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                 85                  90                  95
 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
             100                 105                 110
 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
         115                 120                 125
 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
     130                 135                 140
 His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
 145                 150                 155                 160
 Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                 165                 170                 175
 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
             180                 185                 190
 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
         195                 200                 205
 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
     210                 215                 220
 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
 225                 230                 235                 240
 Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu
                 245                 250                 255
 Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His
             260                 265                 270
 Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg
         275                 280                 285
 Arg Thr Ile Ser Ser
     290

<210> 38
<211> 319
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 38
 Met Lys Cys Ile Leu Phe Lys Trp Val Leu Cys Leu Leu Leu Gly Phe
  1               5                  10                  15
 Ser Ser Val Ser Tyr Ser Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln
             20                  25                  30
 Gln Ser Tyr Val Ser Ser Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr
         35                  40                  45
 Pro Leu Glu His Ile Ser Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn
     50                  55                  60
```

```
His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp
65                  70                  75                  80
Val Tyr Gln Ala Arg Phe Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn
                85                  90                  95
Asn Leu Tyr Val Ala Gly Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr
            100                 105                 110
Arg Phe Ser Asp Phe Thr His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val
        115                 120                 125
Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Glu Arg Ser Gly Met Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser
145                 150                 155                 160
Tyr Leu Ala Leu Met Glu Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala
                165                 170                 175
Ser Arg Ala Val Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg
            180                 185                 190
Phe Arg Gln Ile Gln Arg Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala
        195                 200                 205
Pro Val Tyr Thr Met Thr Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp
    210                 215                 220
Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val
225                 230                 235                 240
Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr
                245                 250                 255
Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg
            260                 265                 270
Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Gln Ile Thr Gly Asp Arg
        275                 280                 285
Pro Val Ile Lys Ile Asn Asn Thr Leu Trp Glu Ser Asn Thr Ala Ala
    290                 295                 300
Ala Phe Leu Asn Arg Lys Ser Gln Phe Leu Tyr Thr Thr Gly Lys
305                 310                 315
```

<210> 39
<211> 247
<212> PRT
<213> Trichosanthews kirilowii

<400> 39

```
Asp Val Ser Phe Arg Leu Ser Gly Ala Thr Ser Ser Ser Tyr Gly Val
 1               5                  10                  15
Phe Ile Ser Asn Leu Arg Lys Ala Leu Pro Asn Glu Arg Lys Leu Tyr
            20                  25                  30
Asp Ile Pro Leu Leu Arg Ser Ser Leu Pro Gly Ser Gln Arg Tyr Ala
        35                  40                  45
Leu Ile His Leu Thr Asn Tyr Ala Asp Glu Thr Ile Ser Val Ala Ile
    50                  55                  60
Asp Val Thr Asn Val Tyr Ile Met Gly Tyr Arg Ala Gly Asp Thr Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Phe Phe Asn Glu Ala Ser Ala Thr Glu Ala Ala Lys Tyr Val Phe
                85                  90                  95
Lys Asp Ala Met Arg Lys Val Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr Glu
            100                 105                 110
Arg Leu Gln Thr Ala Ala Gly Lys Ile Arg Glu Asn Ile Pro Leu Gly
        115                 120                 125
Leu Pro Ala Leu Asp Ser Ala Ile Thr Thr Leu Phe Tyr Tyr Asn Ala
    130                 135                 140
Asn Ser Ala Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Ile Gln Ser Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160
Ala Ala Arg Tyr Lys Phe Ile Glu Gln Gln Ile Gly Lys Arg Val Asp
                165                 170                 175
Lys Thr Phe Leu Pro Ser Leu Ala Ile Ile Ser Leu Glu Asn Ser Trp
            180                 185                 190
Ser Ala Leu Ser Lys Gln Ile Gln Ile Ala Ser Thr Asn Asn Gly Gln
```

```
        195                 200                 205
 Phe Glu Ser Pro Val Val Leu Ile Asn Ala Gln Asn Gln Arg Val Thr
     210                 215                 220
 Ile Thr Asn Val Asp Ala Gly Val Val Thr Ser Asn Ile Ala Leu Leu
 225                 230                 235                 240
 Leu Asn Arg Asn Asn Met Ala
                 245
```

<210> 40
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien His-Tag leader sequence

<400> 40

```
aaggagatatacc atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc          43
              Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser
                1               5                  10

ggc ctg gtg ccg cgc ggc agc cat atg ctc gag gat ccg                    82
Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Leu Glu Asp Pro
         15                  20                  25
```

<210> 41
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien forward primer (Eotaxin)

<400> 41

```
gggtaatagc atatggggcc agcttctgtc ccaacca                              37
```

<210> 42
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien reverse primer (Eotaxin)

<400> 42

```
cccgaattct ttcatcgctg gctttggagt tggagatttt tggt                      44
```

<210> 43
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien forward primer (MCP-1)

<400> 43
gggtaatagc atatgcagcc agatgcaatc aatgcccca 39

<210> 44
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien reverse primer (MCP-1)

<400> 44

cccgaattct ttcatcgcag tcttcggagt ttgggtttct t 41

<210> 45
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien forward primer (MCP-3)

<400> 45
catatgcaac cggtaggcat caacacg 27

<210> 46
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien reverse primer (MCP-3)

<400> 46
cactagtaac catcgcaagc ttcggggtct gag 33

<210> 47
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien forward primer (SDF-1■)

<400> 47
gggtaatagc atatgaagcc cgtcagcctg agctacag 38

<210> 48
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo sapien reverse primer (SDF-1■)

<400> 48
cccgaattct ttcatcgcca tcttgaacct cttgtttaaa gctttc 46

<210> 49
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Shigella dysenteriae forward primer (Shiga)

<400> 49
gggtaatagc atatgaaaga attcaccctg gacttttcc 39

<210> 50
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Shigella dysenteriae reverse primer (Shiga)

<400> 50
cccggatcca ctagtattaa gcgtggtg 28

<210> 51
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Shigella dysenteriae reverse primer (Shiga-His6)

<400> 51
cccggatcca ctagtttaat gatgatggtg gtggtggcaa ttgag 45

<210> 52
<211> 978
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(978)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-toxin fusion protein MCP1-AM-truncated Shiga-A1 Subunit

<400> 52

```
atg cag cca gat gca atc aat gcc cca gtc acc tgc tgt tat aac ttc   48
Met Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe
  1               5                  10                  15

acc aat agg aag atc tca gtg cag agg ctc gcg agc tat aga aga atc   96
Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile
             20                  25                  30

acc agc agc aag tgt ccc aaa gaa gct gtg atc ttc aag acc att gtg   144
Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val
         35                  40                  45
```

```
gcc aag gag atc tgt gct gac ccc aag cag aag tgg gtt cag gat tcc   192
Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser
     50                  55                  60

atg gac cac ctg gac aag caa acc caa act ccg aag act gcg atg aaa   240
Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr Ala Met Lys
 65                  70                  75                  80

gaa ttc acc ctg gac ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat agc ctg   288
Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu
                85                  90                  95

aat gtg att cgt tcc gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att tcc agc   336
Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser
            100                 105                 110

ggt ggt act tcc ctc ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat aac ttg   384
Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu
        115                 120                 125

ttt gct gtt gat gtg cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt ttt aat   432
Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn
    130                 135                 140

aat ctg cgt ctg atc gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg ggt ttt   480
Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe
145                 150                 155                 160

gtg aac cgt acg aac aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc tcc cac   528
Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His
                165                 170                 175

gta acg ttt ccg ggc acc act gct gtt act ctg agc ggc gat tct tct   576
Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser
            180                 185                 190

tat act acg tta cag cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt atg caa   624
Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln
        195                 200                 205

atc aat cgc cat tct ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg agc cat   672
Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His
    210                 215                 220

tct ggc acc agc ctg acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg cgc ttc   720
Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe
225                 230                 235                 240

gtg acg gtc acc gcc gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa cgc ggc   768
Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly
                245                 250                 255

ttc cgc acc act tta gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg atg act   816
Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr
            260                 265                 270

gcc gaa gat gtc gat ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct tcc gtt   864
Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val
        275                 280                 285

ctg ccg gat tat cac ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt atc agc   912
Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
    290                 295                 300
```

```
ttt ggc tct att aat gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att ctc aat   960
Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn
305                 310                 315                 320

tgc cac cac cac gct taa                                       978
Cys His His His Ala
                325
```

<210> 53

<211> 984
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(984)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-toxin fusion protein MCP1-AM-truncated Shiga-A1 Subunit HIS6

<400> 53

```
atg cag cca gat gca atc aat gcc cca gtc acc tgc tgt tat aac ttc   48
Met Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe
  1               5                  10                  15

acc aat agg aag atc tca gtg cag agg ctc gcg agc tat aga aga atc   96
Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile
            20                  25                  30

acc agc agc aag tgt ccc aaa gaa gct gtg atc ttc aag acc att gtg   144
Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val
        35                  40                  45

gcc aag gag atc tgt gct gac ccc aag cag aag tgg gtt cag gat tcc   192
Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser
    50                  55                  60

atg gac cac ctg gac aag caa acc caa act ccg aag act gcg atg aaa   240
Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr Ala Met Lys
65                  70                  75                  80

gaa ttc acc ctg gac ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat agc ctg   288
Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu
                85                  90                  95

aat gtg att cgt tcc gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att tcc agc   336
Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser
            100                 105                 110

ggt ggt act tcc ctc ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat aac ttg   384
Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu
        115                 120                 125

ttt gct gtt gat gtg cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt ttt aat   432
Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn
    130                 135                 140

aat ctg cgt ctg atc gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg ggt ttt   480
Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe
```

```
145                 150                 155                 160

gtg aac cgt acg aac aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc tcc cac   528
Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His
                165                 170                 175

gta acg ttt ccg ggc acc act gct gtt act ctg agc ggc gat tct tct   576
Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser
            180                 185                 190

tat act acg tta cag cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt atg caa   624
Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln
        195                 200                 205

atc aat cgc cat tct ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg agc cat   672
Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His
    210                 215                 220

tct ggc acc agc ctg acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg cgc ttc   720
Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe
225                 230                 235                 240

gtg acg gtc acc gcc gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa cgc ggc   768
Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly
                245                 250                 255

ttc cgc acc act tta gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg atg act   816
Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr
            260                 265                 270

gcc gaa gat gtc gat ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct tcc gtt   864
Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val
        275                 280                 285

ctg ccg gat tat cac ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt atc agc   912
Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
    290                 295                 300

ttt ggc tct att aat gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att ctc aat   960
Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn
305                 310                 315                 320

tgc cac cac cac cat cat cat taa                                   984
Cys His His His His His His
                325
```

<210> 54
<211> 999
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(999)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-toxin fussion protein MCP1-AM-SAPORIN

<400> 54
atg cag cca gat gca atc aat gcc cca gtc acc tgc tgt tat aac ttc 48

```
Met Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe
  1               5                  10                  15

acc aat agg aag atc tca gtg cag agg ctc gcg agc tat aga aga atc   96
Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile
            20                  25                  30

acc agc agc aag tgt ccc aaa gaa gct gtg atc ttc aag acc att gtg   144
Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val
         35                  40                  45

gcc aag gag atc tgt gct gac ccc aag cag aag tgg gtt cag gat tcc   192
Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser
     50                  55                  60

atg gac cac ctg gac aag caa acc caa act ccg aag act gcg atg gtt   240
Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr Ala Met Val
 65                  70                  75                  80

act agt att acc ctg gac ctg gtc aat ccg acc gcc ggc caa tat agc   288
Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr Ser
                85                  90                  95

agc ttc gtg gat aag att cgt aac aac gta aaa gat ccg aat ctg aaa   336
Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu Lys
            100                 105                 110

tac ggt ggt act gat att gcg gtc atc ggt ccg ccg agc aaa gaa aag   384
Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Glu Lys
        115                 120                 125

ttc ctg cgc att aac ttt caa agc tcc cgt ggc act gtt tct ctg ggc   432
Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu Gly
    130                 135                 140

ctg aag cgc gat aac ctg tat gtt gtt gcc tat ctg gcg atg gat aat   480
Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp Asn
145                 150                 155                 160

acg aac gtg aac cgc gcc tac tac ttt cgt agc gag att acg agc gcg   528
Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr Ser Ala
                165                 170                 175

gaa tcc act gct ctg ttc ccg gag gcg acc act gca aac caa aaa gca   576
Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys Ala
            180                 185                 190

ctg gaa tat acg gaa gat tac cag tcc atc gag aag aac gcg cag atc   624
Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln Ile
        195                 200                 205

acc cag ggc gat caa tcc cgc aaa gaa ctg ggt ctg ggt att gat ctg   672
Thr Gln Gly Asp Gln Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp Leu
    210                 215                 220

ctg agc acg agc atg gaa gcg gtc aac aaa aaa gct cgc gtg gtt aaa   720
Leu Ser Thr Ser Met Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val Lys
225                 230                 235                 240

gac gaa gcc cgc ttc ctg ctg atc gcc att cag atg acg gca gaa gcc   768
Asp Glu Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu Ala
                245                 250                 255

gcc cgt ttc cgc tac att cag aac ctg gtc atc aaa aac ttc ccg aac   816
```

```
Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Ile Lys Asn Phe Pro Asn
            260                 265                 270

aag ttc aat tcc gag aat aaa gtc att cag ttc gag gtt aat tgg aaa   864
Lys Phe Asn Ser Glu Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Asn Trp Lys
        275                 280                 285

aaa att tcc acc gcc att tat ggt gac gcg aag aac ggt gtt ttc aat   912
Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe Asn
    290                 295                 300

aaa gat tat gat ttt ggt ttc ggt aag gta cgt cag gtg aaa gac ctg   960
Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp Leu
305                 310                 315                 320

caa atg ggt ctg ctg atg tac cta gga aaa ccg aag taa               999
Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
                325                 330

                325                 330

<210> 55
<211> 978
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(978)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-
toxin fusion protein MCP3-AM-truncated Shiga-A1 Subunit

<400> 55
atg caa ccg gta ggc atc aac acg tcg acc acg tgc tgt tat cgc ttt   48
Met Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe
  1               5                  10                  15

atc aac aag aaa atc ccg aaa caa cgc ctg gaa tcc tat cgt cgc acc   96
Ile Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr
             20                  25                  30

act agc agc cac tgt ccg cgc gaa gca gtc atc ttc aaa acc aag ctc   144
Thr Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu
         35                  40                  45

gat aag gaa atc tgt gca gac ccg act cag aaa tgg gtg caa gat ttt   192
Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe
     50                  55                  60

atg aaa cat ctg gat aag aaa act cag acc ccg aag ctt gcg atg aaa   240
Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu Ala Met Lys
 65                  70                  75                  80

gaa ttc acc ctg gac ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat agc ctg   288
Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu
                 85                  90                  95

aat gtg att cgt tcc gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att tcc agc   336
Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser
            100                 105                 110
```

```
ggt ggt act tcc ctc ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat aac ttg   384
Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu
        115                 120                 125

ttt gct gtt gat gtg cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt ttt aat   432
Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn
    130                 135                 140

aat ctg cgt ctg atc gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg ggt ttt   480
Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe
145                 150                 155                 160

gtg aac cgt acg aac aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc tcc cac   528
Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His
                165                 170                 175

gta acg ttt ccg ggc acc act gct gtt act ctg agc ggc gat tct tct   576
Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser
            180                 185                 190

tat act acg tta cag cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt atg caa   624
Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln
        195                 200                 205

atc aat cgc cat tct ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg agc cat   672
Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His
    210                 215                 220

tct ggc acc agc ctg acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg cgc ttc   720
Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe
225                 230                 235                 240

gtg acg gtc acc gcc gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa cgc ggc   768
Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly
                245                 250                 255

ttc cgc acc act tta gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg atg act   816
Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr
            260                 265                 270

gcc gaa gat gtc gat ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct tcc gtt   864
Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val
        275                 280                 285

ctg ccg gat tat cac ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt atc agc   912
Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
    290                 295                 300

ttt ggc tct att aat gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att ctc aat   960
Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn
305                 310                 315                 320

tgc cac cac cac gct taa                                          978
Cys His His His Ala
                325
```

<210> 56
<211> 984
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(984)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ce: Construct encoding chemokine-toxin fusion protein MCP3-AM-truncated Shiga-A1 subunit HIS6

<400> 56

```
atg caa ccg gta ggc atc aac acg tcg acc acg tgc tgt tat cgc ttt   48
Met Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe
  1               5                  10                  15

atc aac aag aaa atc ccg aaa caa cgc ctg gaa tcc tat cgt cgc acc   96
Ile Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr
             20                  25                  30

act agc agc cac tgt ccg cgc gaa gca gtc atc ttc aaa acc aag ctc   144
Thr Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu
         35                  40                  45

gat aag gaa atc tgt gca gac ccg act cag aaa tgg gtg caa gat ttt   192
Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe
     50                  55                  60

atg aaa cat ctg gat aag aaa act cag acc ccg aag ctt gcg atg aaa   240
Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu Ala Met Lys
 65                  70                  75                  80

gaa ttc acc ctg gac ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat agc ctg   288
Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu
                 85                  90                  95

aat gtg att cgt tcc gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att tcc agc   336
Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser
            100                 105                 110

ggt ggt act tcc ctc ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat aac ttg   384
Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu
        115                 120                 125

ttt gct gtt gat gtg cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt ttt aat   432
Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn
    130                 135                 140

aat ctg cgt ctg atc gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg ggt ttt   480
Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe
145                 150                 155                 160

gtg aac cgt acg aac aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc tcc cac   528
Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His
                165                 170                 175

gta acg ttt ccg ggc acc act gct gtt act ctg agc ggc gat tct tct   576
Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser
            180                 185                 190

tat act acg tta cag cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt atg caa   624
Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln
        195                 200                 205

atc aat cgc cat tct ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg agc cat   672
Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His
    210                 215                 220

tct ggc acc agc ctg acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg cgc ttc   720
```

```
Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe
225                 230                 235                 240

gtg acg gtc acc gcc gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa cgc ggc   768
Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly
                245                 250                 255

ttc cgc acc act tta gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg atg act   816
Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr
            260                 265                 270

gcc gaa gat gtc gat ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct tcc gtt   864
Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val
        275                 280                 285

ctg ccg gat tat cac ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt atc agc   912
Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
    290                 295                 300

ttt ggc tct att aat gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att ctc aat   960
Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn
305                 310                 315                 320

tgc cac cac cac cat cat cat taa                                   984
Cys His His His His His His
                325

<210> 57
<211> 999
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(999)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-
toxin Fusion Protein MCP3-AM-SAPORIN


<400> 57

atg caa ccg gta ggc atc aac acg tcc acc acg tgc tgt tat cgc ttt   48
Met Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe
  1               5                  10                  15

atc aac aag aaa atc ccg aaa caa cgc ctg gaa tcc tat cgt cgc acc   96
Ile Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr
             20                  25                  30

act agc agc cac tgt ccg cgc gaa gca gtc atc ttc aaa acc aag ctc   144
Thr Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu
         35                  40                  45

gat aag gaa atc tgt gca gac ccg act cag aaa tgg gtg caa gat ttt   192
Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe
     50                  55                  60

atg aaa cat ctg gat aag aaa act cag acc ccg aag ctt gcg atg gtt   240
Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu Ala Met Val
 65                  70                  75                  80
```

```
act agt att acc ctg gac ctg gtc aat ccg acc gcc ggc caa tat agc   288
Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr Ser
                 85                  90                  95

agc ttc gtg gat aag att cgt aac aac gta aaa gat ccg aat ctg aaa   336
Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu Lys
            100                 105                 110

tac ggt ggt act gat att gcg gtc atc ggt ccg ccg agc aaa gaa aag   384
Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Glu Lys
        115                 120                 125

ttc ctg cgc att aac ttt caa agc tcc cgt ggc act gtt tct ctg ggc   432
Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu Gly
    130                 135                 140

ctg aag cgc gat aac ctg tat gtt gtt gcc tat ctg gcg atg gat aat   480
Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp Asn
145                 150                 155                 160

acg aac gtg aac cgc gcc tac tac ttt cgt agc gag att acg agc gcg   528
Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr Ser Ala
                165                 170                 175

gaa tcc act gct ctg ttc ccg gag gcg acc act gca aac caa aaa gca   576
Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys Ala
            180                 185                 190

ctg gaa tat acg gaa gat tac cag tcc atc gag aag aac gcg cag atc   624
Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln Ile
        195                 200                 205

acc cag ggc gat caa tcc cgc aaa gaa ctg ggt ctg ggt att gat ctg   672
Thr Gln Gly Asp Gln Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp Leu
    210                 215                 220

ctg agc acg agc atg gaa gcg gtc aac aaa aaa gct cgc gtg gtt aaa   720
Leu Ser Thr Ser Met Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val Lys
225                 230                 235                 240

gac gaa gcc cgc ttc ctg ctg atc gcc att cag atg acg gca gaa gcc   768
Asp Glu Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu Ala
                245                 250                 255

gcc cgt ttc cgc tac att cag aac ctg gtc atc aaa aac ttc ccg aac   816
Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Ile Lys Asn Phe Pro Asn
            260                 265                 270

aag ttc aat tcc gag aat aaa gtc att cag ttc gag gtt aat tgg aaa   864
Lys Phe Asn Ser Glu Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Asn Trp Lys
        275                 280                 285

aaa att tcc acc gcc att tat ggt gac gcg aag aac ggt gtt ttc aat   912
Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe Asn
    290                 295                 300

aaa gat tat gat ttt ggt ttc ggt aag gta cgt cag gtg aaa gac ctg   960
Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp Leu
305                 310                 315                 320

caa atg ggt ctg ctg atg tac cta gga aaa ccg aag taa               999
Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
                325                 330
```

<210> 58
<211> 963
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-toxin fusion protein SDF1■-AM-truncated Shiga-A1 Subunit

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(963)

<400> 58

```
aag ccc gtc agc ctg agc tac aga tgc cca tgc cga ttc ttc gaa agc   48
Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
  1               5                  10                  15

cat gtt gcc aga gcc aac gtc aag cat ctc aaa att ctc aac act cca   96
His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
             20                  25                  30

aac tgt gcc ctt cag att gta gcc cgg ctg aag aac aac aac aga caa   144
Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
         35                  40                  45

gtg tgc att gac ccg aag cta aag tgg att cag gag tac ctg gag aaa   192
Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
     50                  55                  60

gct tta aac aag agg ttc aag atg gcg atg aaa gaa ttc acc ctg gac   240
Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met Ala Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp
 65                  70                  75                  80

ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat agc ctg aat gtg att cgt tcc   288
Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser
                 85                  90                  95

gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att tcc agc ggt ggt act tcc ctc   336
Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu
            100                 105                 110

ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat aac ttg ttt gct gtt gat gtg   384
Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val
        115                 120                 125

cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt ttt aat aat ctg cgt ctg atc   432
Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile
    130                 135                 140

gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg ggt ttt gtg aac cgt acg aac   480
Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn
145                 150                 155                 160

aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc tcc cac gta acg ttt ccg ggc   528
Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly
                165                 170                 175

acc act gct gtt act ctg agc ggc gat tct tct tat act acg tta cag   576
Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln
            180                 185                 190
```

```
cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt atg caa atc aat cgc cat tct   624
Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser
        195                 200                 205

ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg agc cat tct ggc acc agc ctg   672
Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu
    210                 215                 220

acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg cgc ttc gtg acg gtc acc gcc   720
Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala
225                 230                 235                 240

gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa cgc ggc ttc cgc acc act tta   768
Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu
                245                 250                 255

gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg atg act gcc gaa gat gtc gat   816
Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp
            260                 265                 270

ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct tcc gtt ctg ccg gat tat cac   864
Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His
        275                 280                 285

ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt atc agc ttt ggc tct att aat   912
Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn
    290                 295                 300

gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att ctc aat tgc cac cac cac gct   960
Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala
305                 310                 315                 320

taa                                                              963
```

<210> 59

<211> 969
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-toxin fusion protein SDF1■-AM-truncated Shiga-A1 Subunit HIS6

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(969)

<400> 59

```
aag ccc gtc agc ctg agc tac aga tgc cca tgc cga ttc ttc gaa agc   48
Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
  1               5                  10                  15

cat gtt gcc aga gcc aac gtc aag cat ctc aaa att ctc aac act cca   96
His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
             20                  25                  30

aac tgt gcc ctt cag att gta gcc cgg ctg aag aac aac aac aga caa   144
Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
         35                  40                  45
```

```
gtg tgc att gac ccg aag cta aag tgg att cag gag tac ctg gag aaa   192
Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
     50                  55                  60

gct tta aac aag agg ttc aag atg gcg atg aaa gaa ttc acc ctg gac   240
Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met Ala Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp
 65                  70                  75                  80

ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat agc ctg aat gtg att cgt tcc   288
Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser
                85                  90                  95

gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att tcc agc ggt ggt act tcc ctc   336
Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu
            100                 105                 110

ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat aac ttg ttt gct gtt gat gtg   384
Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val
        115                 120                 125

cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt ttt aat aat ctg cgt ctg atc   432
Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile
    130                 135                 140

gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg ggt ttt gtg aac cgt acg aac   480
Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn
145                 150                 155                 160

aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc tcc cac gta acg ttt ccg ggc   528
Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly
                165                 170                 175

acc act gct gtt act ctg agc ggc gat tct tct tat act acg tta cag   576
Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln
            180                 185                 190

cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt atg caa atc aat cgc cat tct   624
Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser
        195                 200                 205

ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg agc cat tct ggc acc agc ctg   672
Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu
    210                 215                 220

acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg cgc ttc gtg acg gtc acc gcc   720
Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala
225                 230                 235                 240

gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa cgc ggc ttc cgc acc act tta   768
Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu
                245                 250                 255

gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg atg act gcc gaa gat gtc gat   816
Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp
            260                 265                 270

ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct tcc gtt ctg ccg gat tat cac   864
Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His
        275                 280                 285

ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt atc agc ttt ggc tct att aat   912
Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn
    290                 295                 300
```

```
gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att ctc aat tgc cac cac cac cat   960
Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His His
305                 310                 315                 320

cat cat taa                                                       969
His His
```

<210> 60
<211> 984
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-toxin fusion protein SDF1■-AM-SAPORIN

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(984)

<400> 60

```
aag ccc gtc agc ctg agc tac aga tgc cca tgc cga ttc ttc gaa agc   48
Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
  1               5                  10                  15

cat gtt gcc aga gcc aac gtc aag cat ctc aaa att ctc aac act cca   96
His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
            20                  25                  30

aac tgt gcc ctt cag att gta gcc cgg ctg aag aac aac aac aga caa   144
Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
        35                  40                  45

gtg tgc att gac ccg aag cta aag tgg att cag gag tac ctg gag aaa   192
Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
    50                  55                  60

gct tta aac aag agg ttc aag atg gcg atg gtt act agt att acc ctg   240
Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met Ala Met Val Thr Ser Ile Thr Leu
65                  70                  75                  80

gac ctg gtc aat ccg acc gcc ggc caa tat agc agc ttc gtg gat aag   288
Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr Ser Ser Phe Val Asp Lys
                85                  90                  95

att cgt aac aac gta aaa gat ccg aat ctg aaa tac ggt ggt act gat   336
Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu Lys Tyr Gly Gly Thr Asp
            100                 105                 110

att gcg gtc atc ggt ccg ccg agc aaa gaa aag ttc ctg cgc att aac   384
Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Glu Lys Phe Leu Arg Ile Asn
        115                 120                 125

ttt caa agc tcc cgt ggc act gtt tct ctg ggc ctg aag cgc gat aac   432
Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu Gly Leu Lys Arg Asp Asn
    130                 135                 140

ctg tat gtt gtt gcc tat ctg gcg atg gat aat acg aac gtg aac cgc   480
Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp Asn Thr Asn Val Asn Arg
145                 150                 155                 160
```

```
gcc tac tac ttt cgt agc gag att acg agc gcg gaa tcc act gct ctg   528
Ala Tyr Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr Ser Ala Glu Ser Thr Ala Leu
                165                 170                 175

ttc ccg gag gcg acc act gca aac caa aaa gca ctg gaa tat acg gaa   576
Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys Ala Leu Glu Tyr Thr Glu
            180                 185                 190

gat tac cag tcc atc gag aag aac gcg cag atc acc cag ggc gat caa   624
Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln Ile Thr Gln Gly Asp Gln
        195                 200                 205

tcc cgc aaa gaa ctg ggt ctg ggt att gat ctg ctg agc acg agc atg   672
Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp Leu Leu Ser Thr Ser Met
    210                 215                 220

gaa gcg gtc aac aaa aaa gct cgc gtg gtt aaa gac gaa gcc cgc ttc   720
Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val Lys Asp Glu Ala Arg Phe
225                 230                 235                 240

ctg ctg atc gcc att cag atg acg gca gaa gcc gcc cgt ttc cgc tac   768
Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu Ala Ala Arg Phe Arg Tyr
                245                 250                 255

att cag aac ctg gtc atc aaa aac ttc ccg aac aag ttc aat tcc gag   816
Ile Gln Asn Leu Val Ile Lys Asn Phe Pro Asn Lys Phe Asn Ser Glu
            260                 265                 270

aat aaa gtc att cag ttc gag gtt aat tgg aaa aaa att tcc acc gcc   864
Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Asn Trp Lys Lys Ile Ser Thr Ala
        275                 280                 285

att tat ggt gac gcg aag aac ggt gtt ttc aat aaa gat tat gat ttt   912
Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe Asn Lys Asp Tyr Asp Phe
    290                 295                 300

ggt ttc ggt aag gta cgt cag gtg aaa gac ctg caa atg ggt ctg ctg   960
Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp Leu Gln Met Gly Leu Leu
305                 310                 315                 320

atg tac cta gga aaa ccg aag taa                                   984
Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
                325
```

<210> 61
<211> 972
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(972)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-toxin fusion protein EOTAXIN-AM-truncated Shiga-A1 Subunit

```
<400> 61
atg ggg cca gct tct gtc cca acc acc tgc tgc ttt aac ctg gcc aat   48
Met Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn
  1               5                  10                  15
```

```
agg aag ata ccc ctt cag cga cta gag agc tac agg aga atc acc agt   96
Arg Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser
            20                  25                  30

ggc aaa tgt ccc cag aaa gct gtg atc ttc aag acc aaa ctg gcc aag   144
Gly Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys
        35                  40                  45

gat atc tgt gcc gac ccc aag aag aag tgg gtg cag gat tcc atg aag   192
Asp Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys
    50                  55                  60

tat ctg gac caa aaa tct cca act cca aag cca gcg atg aaa gaa ttc   240
Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro Ala Met Lys Glu Phe
65                  70                  75                  80

acc ctg gac ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat agc ctg aat gtg   288
Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val
                85                  90                  95

att cgt tcc gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att tcc agc ggt ggt   336
Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly
            100                 105                 110

act tcc ctc ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat aac ttg ttt gct   384
Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu Phe Ala
        115                 120                 125

gtt gat gtg cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt ttt aat aat ctg   432
Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu
    130                 135                 140

cgt ctg atc gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg ggt ttt gtg aac   480
Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn
145                 150                 155                 160

cgt acg aac aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc tcc cac gta acg   528
Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr
                165                 170                 175

ttt ccg ggc acc act gct gtt act ctg agc ggc gat tct tct tat act   576
Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr
            180                 185                 190

acg tta cag cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt atg caa atc aat   624
Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn
        195                 200                 205

cgc cat tct ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg agc cat tct ggc   672
Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly
    210                 215                 220

acc agc ctg acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg cgc ttc gtg acg   720
Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr
225                 230                 235                 240

gtc acc gcc gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa cgc ggc ttc cgc   768
Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg
                245                 250                 255

acc act tta gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg atg act gcc gaa   816
Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu
            260                 265                 270
```

```
gat gtc gat ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct tcc gtt ctg ccg   864
Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro
        275                 280                 285

gat tat cac ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt atc agc ttt ggc   912
Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly
    290                 295                 300

tct att aat gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att ctc aat tgc cac   960
Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His
305                 310                 315                 320

cac cac gct taa                                               972
His His Ala
```

<210> 62
<211> 978
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(978)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-toxin fusion protein EOTAXIN-AM-truncated Shiga-A1 Subunit HIS6

<400> 62

```
atg ggg cca gct tct gtc cca acc acc tgc tgc ttt aac ctg gcc aat   48
Met Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn
  1               5                  10                  15

agg aag ata ccc ctt cag cga cta gag agc tac agg aga atc acc agt   96
Arg Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser
            20                  25                  30

ggc aaa tgt ccc cag aaa gct gtg atc ttc aag acc aaa ctg gcc aag   144
Gly Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys
        35                  40                  45

gat atc tgt gcc gac ccc aag aag aag tgg gtg cag gat tcc atg aag   192
Asp Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys
    50                  55                  60

tat ctg gac caa aaa tct cca act cca aag cca gcg atg aaa gaa ttc   240
Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro Ala Met Lys Glu Phe
65                  70                  75                  80

acc ctg gac ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat agc ctg aat gtg   288
Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val
                85                  90                  95

att cgt tcc gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att tcc agc ggt ggt   336
Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly
            100                 105                 110

act tcc ctc ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat aac ttg ttt gct   384
Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu Phe Ala
        115                 120                 125
```

```
gtt gat gtg cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt ttt aat aat ctg   432
Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu
    130                 135                 140

cgt ctg atc gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg ggt ttt gtg aac   480
Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn
145                 150                 155                 160

cgt acg aac aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc tcc cac gta acg   528
Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr
                165                 170                 175

ttt ccg ggc acc act gct gtt act ctg agc ggc gat tct tct tat act   576
Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr
            180                 185                 190

acg tta cag cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt atg caa atc aat   624
Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn
        195                 200                 205

cgc cat tct ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg agc cat tct ggc   672
Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly
    210                 215                 220

acc agc ctg acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg cgc ttc gtg acg   720
Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr
225                 230                 235                 240

gtc acc gcc gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa cgc ggc ttc cgc   768
Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg
                245                 250                 255

acc act tta gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg atg act gcc gaa   816
Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu
            260                 265                 270

gat gtc gat ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct tcc gtt ctg ccg   864
Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro
        275                 280                 285

gat tat cac ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt atc agc ttt ggc   912
Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly
    290                 295                 300

tct att aat gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att ctc aat tgc cac   960
Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His
305                 310                 315                 320

cac cac cat cat cat taa                                           978
His His His His His
                325
```

<210> 63
<211> 993
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(993)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding chemokine-

toxin fusion protein EOTAXIN-AM-SAPORIN

<400> 63

```
atg ggg cca gct tct gtc cca acc acc tgc tgc ttt aac ctg gcc aat   48
Met Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn
  1               5                  10                  15

agg aag ata ccc ctt cag cga cta gag agc tac agg aga atc acc agt   96
Arg Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser
            20                  25                  30

ggc aaa tgt ccc cag aaa gct gtg atc ttc aag acc aaa ctg gcc aag   144
Gly Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys
        35                  40                  45

gat atc tgt gcc gac ccc aag aag aag tgg gtg cag gat tcc atg aag   192
Asp Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys
    50                  55                  60

tat ctg gac caa aaa tct cca act cca aag cca gcg atg gtt act agt   240
Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro Ala Met Val Thr Ser
65                  70                  75                  80

att acc ctg gac ctg gtc aat ccg acc gcc ggc caa tat agc agc ttc   288
Ile Thr Leu Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr Ser Ser Phe
                85                  90                  95

gtg gat aag att cgt aac aac gta aaa gat ccg aat ctg aaa tac ggt   336
Val Asp Lys Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu Lys Tyr Gly
            100                 105                 110

ggt act gat att gcg gtc atc ggt ccg ccg agc aaa gaa aag ttc ctg   384
Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Glu Lys Phe Leu
        115                 120                 125

cgc att aac ttt caa agc tcc cgt ggc act gtt tct ctg ggc ctg aag   432
Arg Ile Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu Gly Leu Lys
    130                 135                 140

cgc gat aac ctg tat gtt gtt gcc tat ctg gcg atg gat aat acg aac   480
Arg Asp Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp Asn Thr Asn
145                 150                 155                 160

gtg aac cgc gcc tac tac ttt cgt agc gag att acg agc gcg gaa tcc   528
Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr Ser Ala Glu Ser
                165                 170                 175

act gct ctg ttc ccg gag gcg acc act gca aac caa aaa gca ctg gaa   576
Thr Ala Leu Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys Ala Leu Glu
            180                 185                 190

tat acg gaa gat tac cag tcc atc gag aag aac gcg cag atc acc cag   624
Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln Ile Thr Gln
        195                 200                 205

ggc gat caa tcc cgc aaa gaa ctg ggt ctg ggt att gat ctg ctg agc   672
Gly Asp Gln Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp Leu Leu Ser
    210                 215                 220

acg agc atg gaa gcg gtc aac aaa aaa gct cgc gtg gtt aaa gac gaa   720
Thr Ser Met Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val Lys Asp Glu
225                 230                 235                 240
```

```
gcc cgc ttc ctg ctg atc gcc att cag atg acg gca gaa gcc gcc cgt   768
Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu Ala Ala Arg
                245                 250                 255

ttc cgc tac att cag aac ctg gtc atc aaa aac ttc ccg aac aag ttc   816
Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Ile Lys Asn Phe Pro Asn Lys Phe
            260                 265                 270

aat tcc gag aat aaa gtc att cag ttc gag gtt aat tgg aaa aaa att   864
Asn Ser Glu Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Asn Trp Lys Lys Ile
        275                 280                 285

tcc acc gcc att tat ggt gac gcg aag aac ggt gtt ttc aat aaa gat   912
Ser Thr Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe Asn Lys Asp
    290                 295                 300

tat gat ttt ggt ttc ggt aag gta cgt cag gtg aaa gac ctg caa atg   960
Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp Leu Gln Met
305                 310                 315                 320

ggt ctg ctg atg tac cta gga aaa ccg aag taa                      993
Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
                325                 330

<210> 64
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding
Methionine-truncated Shiga-A1 Subunit fusion protien

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 64
atg aaa gaa ttc acc ctg gac ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat   48
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
  1               5                  10                  15

agc ctg aat gtg att cgt tcc gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att   96
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
            20                  25                  30

tcc agc ggt ggt act tcc ctc ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat   144
Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp
        35                  40                  45

aac ttg ttt gct gtt gat gtg cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt   192
Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg
    50                  55                  60

ttt aat aat ctg cgt ctg atc gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg   240
Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65                  70                  75                  80

ggt ttt gtg aac cgt acg aac aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc   288
Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
                85                  90                  95
```

```
tcc cac gta acg ttt ccg ggc acc act gct gtt act ctg agc ggc gat   336
Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp
            100                 105                 110

tct tct tat act acg tta cag cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt   384
Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
        115                 120                 125

atg caa atc aat cgc cat tct ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg   432
Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
    130                 135                 140

agc cat tct ggc acc agc ctg acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg   480
Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145                 150                 155                 160

cgc ttc gtg acg gtc acc gcc gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa   528
Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
                165                 170                 175

cgc ggc ttc cgc acc act tta gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg   576
Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val
            180                 185                 190

atg act gcc gaa gat gtc gat ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct   624
Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
        195                 200                 205

tcc gtt ctg ccg gat tat cac ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt   672
Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
    210                 215                 220

atc agc ttt ggc tct att aat gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att   720
Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225                 230                 235                 240

ctc aat tgc cac cac cac gct taa                                   744
Leu Asn Cys His His His Ala
                245
```

<210> 65
<211> 750
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding Methionine-truncated Shiga-A1 Subunit HIS6 fusion protein

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(750)

```
<400> 65
atg aaa gaa ttc acc ctg gac ttt tcc act gca aaa act tac gtc gat   48
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
  1               5                  10                  15

agc ctg aat gtg att cgt tcc gcg atc ggt acg ccg ctg caa acg att   96
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
             20                  25                  30

tcc agc ggt ggt act tcc ctc ctg atg att gat tcc ggt acg ggt gat   144
```

```
Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp
          35                  40                  45

aac ttg ttt gct gtt gat gtg cgc ggc att gac ccg gaa gaa ggc cgt   192
Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg
     50                  55                  60

ttt aat aat ctg cgt ctg atc gtc gaa cgc aac aac ctg tat gtg acg   240
Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
 65                  70                  75                  80

ggt ttt gtg aac cgt acg aac aac gtc ttc tat cgt ttc gct gat ttc   288
Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
                 85                  90                  95

tcc cac gta acg ttt ccg ggc acc act gct gtt act ctg agc ggc gat   336
Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp
            100                 105                 110

tct tct tat act acg tta cag cgt gtg gct ggt atc agc cgc act ggt   384
Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
        115                 120                 125

atg caa atc aat cgc cat tct ctg acg acc agc tat ctg gac tta atg   432
Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
    130                 135                 140

agc cat tct ggc acc agc ctg acc cag tct gtt gcc cgt gcg atg ctg   480
Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145                 150                 155                 160

cgc ttc gtg acg gtc acc gcc gaa gcc ctg cgt ttc cgt caa atc caa   528
Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
                165                 170                 175

cgc ggc ttc cgc acc act tta gac gat ctg tct ggc cgc agc tat gtg   576
Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val
            180                 185                 190

atg act gcc gaa gat gtc gat ctg acc ctg aac tgg ggt cgc ttg tct   624
Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
        195                 200                 205

tcc gtt ctg ccg gat tat cac ggt cag gat tct gtc cgt gtt ggc cgt   672
Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
    210                 215                 220

atc agc ttt ggc tct att aat gcc atc cta ggc tcc gtc gca ctg att   720
Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225                 230                 235                 240

ctc aat tgc cac cac cac cat cat cat taa                          750
Leu Asn Cys His His His His His His
                245                 250
```

<210> 66
<211> 765
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding

Methionine-Saporin fusion protein

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(765)

<400> 66

```
atg gtt act agt att acc ctg gac ctg gtc aat ccg acc gcc ggc caa   48
Met Val Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln
  1               5                  10                  15

tat agc agc ttc gtg gat aag att cgt aac aac gta aaa gat ccg aat   96
Tyr Ser Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn
            20                  25                  30

ctg aaa tac ggt ggt act gat att gcg gtc atc ggt ccg ccg agc aaa  144
Leu Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys
        35                  40                  45

gaa aag ttc ctg cgc att aac ttt caa agc tcc cgt ggc act gtt tct  192
Glu Lys Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser
    50                  55                  60

ctg ggc ctg aag cgc gat aac ctg tat gtt gtt gcc tat ctg gcg atg  240
Leu Gly Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met
65                  70                  75                  80

gat aat acg aac gtg aac cgc gcc tac tac ttt cgt agc gag att acg  288
Asp Asn Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr
                85                  90                  95

agc gcg gaa tcc act gct ctg ttc ccg gag gcg acc act gca aac caa  336
Ser Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln
            100                 105                 110

aaa gca ctg gaa tat acg gaa gat tac cag tcc atc gag aag aac gcg  384
Lys Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala
        115                 120                 125

cag atc acc cag ggc gat caa tcc cgc aaa gaa ctg ggt ctg ggt att  432
Gln Ile Thr Gln Gly Asp Gln Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile
    130                 135                 140

gat ctg ctg agc acg agc atg gaa gcg gtc aac aaa aaa gct cgc gtg  480
Asp Leu Leu Ser Thr Ser Met Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val
145                 150                 155                 160

gtt aaa gac gaa gcc cgc ttc ctg ctg atc gcc att cag atg acg gca  528
Val Lys Asp Glu Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala
                165                 170                 175

gaa gcc gcc cgt ttc cgc tac att cag aac ctg gtc atc aaa aac ttc  576
Glu Ala Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Ile Lys Asn Phe
            180                 185                 190

ccg aac aag ttc aat tcc gag aat aaa gtc att cag ttc gag gtt aat  624
Pro Asn Lys Phe Asn Ser Glu Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Asn
        195                 200                 205

tgg aaa aaa att tcc acc gcc att tat ggt gac gcg aag aac ggt gtt  672
Trp Lys Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val
    210                 215                 220
```

```
ttc aat aaa gat tat gat ttt ggt ttc ggt aag gta cgt cag gtg aaa   720
Phe Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys
225                 230                 235                 240

gac ctg caa atg ggt ctg ctg atg tac cta gga aaa ccg aag taa       765
Asp Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
                245                 250                 255


<210> 67
<211> 231
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(231)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Construct encoding
Methionine-MCP2 protein


<400> 67
atg caa ccg gta ggc atc aac acg tcg acc acg tgc tgt tat cgc ttt   48
Met Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe
  1               5                  10                  15

atc aac aag aaa atc ccg aaa caa cgc ctg gaa tcc tat cgt cgc acc   96
Ile Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr
            20                  25                  30

act agc agc cac tgt ccg cgc gaa gca gtc atc ttc aaa acc aag ctc   144
Thr Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu
        35                  40                  45

gat aag gaa atc tgt gca gac ccg act cag aaa tgg gtg caa gat ttt   192
Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe
    50                  55                  60

atg aaa cat ctg gat aag aaa act cag acc ccg aag ctt               231
Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu
65                  70                  75

<210> 68
<211> 4
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<220>
<223> Pseudomonas toxin carboxy-terminal endoplasmic reticulum retention
signal

<400> 68
Xaa Asp Glu Leu
  1

<210> 69
<211> 393
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
```

<223> Mouse chemokine ALP cDNA

<220>
<221> CDS
<222> (11)..(373)

<400> 69
ctgagtgagc atg atg gag ggg ctc tcc ccc gcc agc agc ctc ccg ctg 49
Met Met Glu Gly Leu Ser Pro Ala Ser Ser Leu Pro Leu
1 5 10

tta ctg ttg ctt ctg agc ccg gct cct gaa gca gcc ttg cct ctg ccc 97
Leu Leu Leu Leu Leu Ser Pro Ala Pro Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro
15 20 25

tcc agc act agc tgc tgt act cag ctc tat aga cag cca ctc cca agc 145
Ser Ser Thr Ser Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Gln Pro Leu Pro Ser
30 35 40 45

agg ctg ctg agg agg att gtc cac atg gaa ctg cag gag gcc gat ggg 193
Arg Leu Leu Arg Arg Ile Val His Met Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly
50 55 60

gac tgt cac ctc cag gct gtc gtg ctt cac ctg gct cgg cgc agt gtc 241
Asp Cys His Leu Gln Ala Val Val Leu His Leu Ala Arg Arg Ser Val
65 70 75

tgt gtt cat ccc cag aac cgc agc ctg gct cgg tgg tta gaa cgc caa 289
Cys Val His Pro Gln Asn Arg Ser Leu Ala Arg Trp Leu Glu Arg Gln
80 85 90

ggg aaa agg ctc caa ggg act gta ccc agt tta aat ctg gta cta caa 337
Gly Lys Arg Leu Gln Gly Thr Val Pro Ser Leu Asn Leu Val Leu Gln
95 100 105

aag aaa atg tac tca aac ccc caa cag caa aac taa taaagcaaca 383
Lys Lys Met Tyr Ser Asn Pro Gln Gln Gln Asn
110 115 120

ttagacgaca 393

<210> 70
<211> 912
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> Mouse Lungkine cDNA

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(504)

<300>
<308> AF082859/GenBank

<400> 70
atg gct gct caa ggc tgg tcc atg ctc ctg ctg gct gtc ctt aac cta 48
Met Ala Ala Gln Gly Trp Ser Met Leu Leu Leu Ala Val Leu Asn Leu
1 5 10 15

ggc atc ttc gtc cgt ccc tgt gac act caa gag cta cga tgt ctg tgt 96
Gly Ile Phe Val Arg Pro Cys Asp Thr Gln Glu Leu Arg Cys Leu Cys

```
            20                  25                  30

att cag gaa cac tct gaa ttc att cct ctc aaa ctc att aaa aat ata   144
Ile Gln Glu His Ser Glu Phe Ile Pro Leu Lys Leu Ile Lys Asn Ile
         35                  40                  45

atg gtg ata ttc gag acc att tac tgc aac aga aag gaa gtg ata gca   192
Met Val Ile Phe Glu Thr Ile Tyr Cys Asn Arg Lys Glu Val Ile Ala
     50                  55                  60

gtc cca aaa aat ggg agt atg att tgt ttg gat cct gat gct cca tgg   240
Val Pro Lys Asn Gly Ser Met Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Trp
 65                  70                  75                  80

gtg aag gct act gtt ggc cca att act aac agg ttc cta cct gag gac   288
Val Lys Ala Thr Val Gly Pro Ile Thr Asn Arg Phe Leu Pro Glu Asp
                 85                  90                  95

ctc aaa caa aag gaa ttt cca ccg gca atg aag ctt ctg tat agt gtt   336
Leu Lys Gln Lys Glu Phe Pro Pro Ala Met Lys Leu Leu Tyr Ser Val
            100                 105                 110

gag cat gaa aag cct cta tat ctt tca ttt ggg aga cct gag aac aag   384
Glu His Glu Lys Pro Leu Tyr Leu Ser Phe Gly Arg Pro Glu Asn Lys
        115                 120                 125

aga ata ttt ccc ttt cca att cgg gag acc tct aga cac ttt gct gat   432
Arg Ile Phe Pro Phe Pro Ile Arg Glu Thr Ser Arg His Phe Ala Asp
    130                 135                 140

tta gct cac aac agt gat agg aat ttt cta cgg gac tcc agt gaa gtc   480
Leu Ala His Asn Ser Asp Arg Asn Phe Leu Arg Asp Ser Ser Glu Val
145                 150                 155                 160

agc ttg aca ggc agt gat gcc taa aagccactca tgaggcaaag agtttcaagg  534
Ser Leu Thr Gly Ser Asp Ala
                165

aagctctcct cctggagttt tggcgttctc attcttatac tctattcccg cgttagtctg 594

gtgtatggat ctatgagctc tcttttaata ttttattata aatgttttat ttacttaact 654

tcctagtgaa tgttcacagg tgactgctcc cccatcccca tttcttgata ttacatataa 714

tggcatcata taccccttta ttgactgaca aactactcag attgcttaac attttgtgct 774

tcaaagtctt atcccactcc actatgggct gttacagagt gcatctcggt gtagagcaag 834

gctccttgtc ttcagtgccc cagggtgaaa tacttctttg aaaaattttc attcatcaga 894

raatctgaaa taaatatt                                              912
```

【図１Ａ】

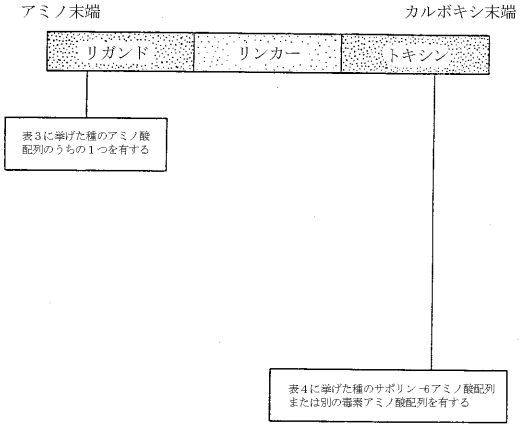


FIG. 1A

【図１Ｂ】

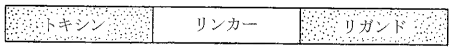


FIG. 1B

【図１Ｃ】



FIG. 1C

【図２】

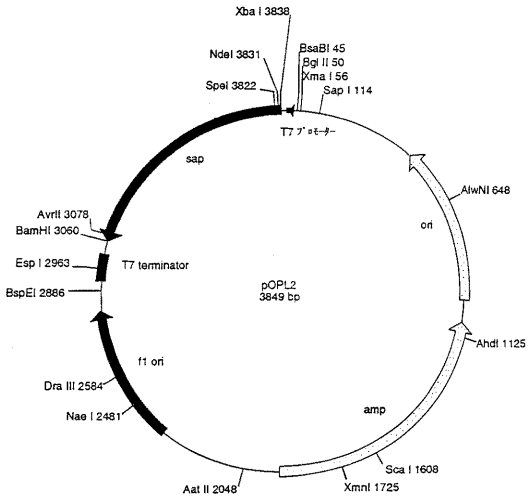


FIG. 2

【図３】

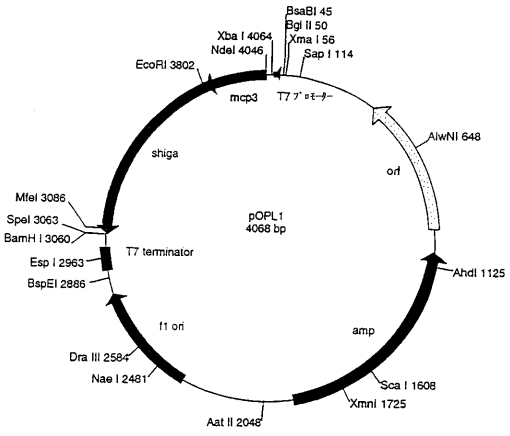


FIG. 3

【図４】

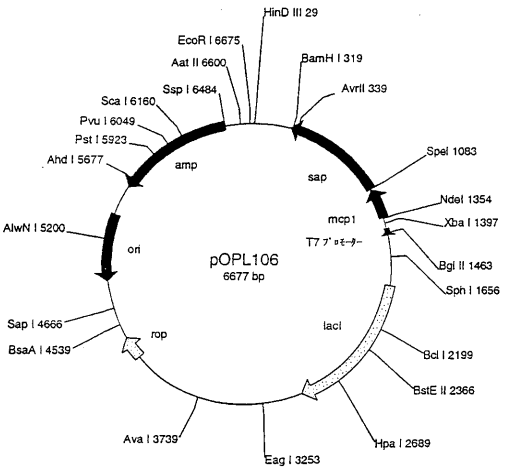


FIG. 4

【図５】

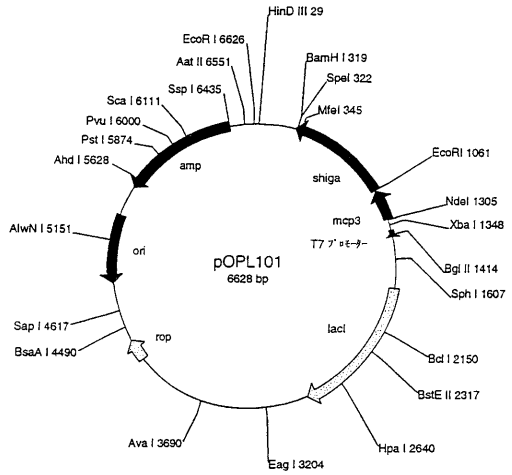

HinD III 29
EcoR I 6626
Aat II 6551
BamH I 319
Spe I 322
Ssp I 6435
Sca I 6111
Mfe I 345
Pvu I 6000
Pst I 5874
EcoRI 1061
Ahd I 5628
amp
shiga
NdeI 1305
mcp3
Xba I 1348
AlwN I 5151
ori
pOPL101
6628 bp
Bgl II 1414
Sph I 1607
Sap I 4617
rop
lacI
BsaA I 4490
Bcl I 2150
BstE II 2317
Ava I 3690
Eag I 3204
Hpa I 2640

FIG. 5

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P	29/00	
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15	
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/00	101
C12P 21/00	*(2006.01)*	C12P	21/00	C

(74)代理人 100127638
弁理士 志賀 美苗
(74)代理人 100138911
弁理士 櫻井 陽子
(74)代理人 100146259
弁理士 橋本 諭志
(72)発明者 ジョン・アール・マクドナルド
カナダ、ティ３イー・４ワイ９、アルバータ、カルガリー、ガバナー・ドライブ・サウスウエスト６０番
(72)発明者 フィリップ・ジェイ・コギンズ
カナダ、ティ２エス・２ジー８、アルバータ、カルガリー、５エイ・ストリート・サウスウエスト４２１１番

審査官 中野 あい

(56)参考文献 特表平０８－５０２０７５（ＪＰ，Ａ）
特表平０８－５１１７６５（ＪＰ，Ａ）
Cytokine, 1997年, vol. 9, no. 8, p. 587-596
J. Immunol., 1989年, vol. 143, no. 11, p. 3498-3502
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988年, vol. 85, no. 11, p. 3980-3984
NATO ASI Ser. A, 1992年, vol. 238, p. 19-29
IDrugs, 2001年, vol. 4, no. 4, p. 427-442 (abstractのみ), abstract

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed