(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-507441
(P2004-507441A)
(43)公表日　平成16年3月11日(2004.3.11)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C07K 14/705	C07K	14/705		2G045
C12N 5/06	C12Q	1/02		4B063
C12Q 1/02	G01N	33/15	Z	4B065
G01N 33/15	G01N	33/50	Z	4H045
G01N 33/50	C12N	5/00	ZNAE	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 83 頁）

(21)出願番号　特願2001-531867(P2001-531867)
(86)(22)出願日　平成12年10月12日(2000.10.12)
(85)翻訳文提出日　平成14年4月15日(2002.4.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2000/028183
(87)国際公開番号　WO2001/029069
(87)国際公開日　平成13年4月26日(2001.4.26)
(31)優先権主張番号　60/159,677
(32)優先日　平成11年10月15日(1999.10.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　502134786
ヒスタテツク・エル・エル・シー
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４１２３、サン・フランシスコ、ロムバード・ストリート・１９０６
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100105131
弁理士　井上　満
(74)代理人　100113332
弁理士　一入　章夫
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真
(74)代理人　100117053
弁理士　相馬　貴昌

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質とＮ－ホルミルペプチド受容体との複合体

(57)【要約】
ヒト末梢血単核細胞または多核白血球、または固定した組織細胞の炎症誘発応答の阻害方法を記載する。前記細胞を炎症誘発物質と接触させて炎症誘発応答を刺激する。次いで、前記細胞をＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質と接触させて、それによってＧ蛋白質によって媒介される炎症誘発応答シグナル伝達経路を阻害する。Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質が炎症誘発物質によって刺激されたヒト末梢血単核細胞または多核白血球の細胞表面受容体に結合した受容体複合体について記載する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
炎症誘発物質と接触したとき、ヒト末梢血単核細胞または多核白血球、または固定組織細胞の炎症誘発応答を阻害する方法であって、前記細胞をＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質と接触させ、それによってＧ蛋白質によって媒介される炎症応答シグナル伝達経路を阻害することを含む方法。
【請求項２】
前記ヒト末梢血単核細胞がリンパ球および単球、または顆粒球から選択された多核白血球から選択される請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ヒト末梢血単核細胞または多核白血球が好酸球、好塩基球、および活性化したＴ細胞から選択される請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記固定組織細胞が肥満細胞、樹状細胞、星状細胞またはマクロファージから選択される請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記炎症誘発物質がサイトカイン、ケモタキシンおよびマイトジェンから選択された請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記炎症誘発物質がｆＭＬＰ、活性化した補体断片、ロイコトリエンＢ４、血小板活性化因子、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３およびＴＮＦαから選択された請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質がｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕペプチドである請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質がｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅである請求項１に記載の方法。
【請求項９】
炎症誘発物質と接触したとき、ヒト末梢血単核細胞若しくは多核白血球または固定組織細胞の炎症誘発応答を阻害する方法であって、細胞表面受容体とＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質との複合体を形成し、それによって炎症誘発応答を阻害することを含む方法。
【請求項１０】
前記細胞表面受容体がホルミルペプチド受容体である請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記炎症誘発応答が下流受容体を阻害することを含み、該下流受容体がイムノグロブリン、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３およびＴＮＦαから成る群から選択されたサイトカイン、またはＣ５ａ、ＦＭＬＰ、ＰＡＦ、ＬＴＢ４から成る群から選択されたケモカインから選択された物質の受容体である請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
前記ヒト末梢血単核細胞がリンパ球および単球または好酸球および好塩基球から選択された多核白血球から選択される請求項９に記載の方法。
【請求項１３】
前記ヒト末梢血単核細胞または多核白血球が好酸球、好塩基球、および活性化したＴ細胞から選択される請求項９に記載の方法。
【請求項１４】
前記固定組織細胞が肥満細胞、樹状細胞、星状細胞またはマクロファージから選択される請求項９に記載の方法。
【請求項１５】

前記炎症誘発物質がサイトカイン、ケモカイン、ケモタキシンおよびマイトジェンから選択される請求項９に記載の方法。
【請求項１６】
前記炎症誘発物質がｆＭＬＰ、活性化した補体断片、ロイコトリエンＢ４、血小板活性化因子、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３およびＴＮＦαから選択される請求項９に記載の方法。
【請求項１７】
前記Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質がｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕペプチドである請求項９に記載の方法。
【請求項１８】
前記Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質がｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅである請求項９に記載の方法。
【請求項１９】
Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質および炎症誘発物質によって刺激されたヒト末梢血単核細胞若しくは多核白血球、または固定した組織細胞の細胞表面受容体を含む受容体複合体。
【請求項２０】
前記ヒト末梢血細胞がリンパ球および単球から選択された単核細胞または好酸球および好塩基球から選択された多核白血球である請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記固定組織細胞が肥満細胞、樹状細胞、星状細胞およびマクロファージから選択された請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
前記Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質がｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕペプチドである請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】
前記Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質がｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅである請求項１９に記載の方法。
【請求項２４】
前記炎症誘発物質がサイトカイン、ケモカイン、ケモタキシンおよびマイトジェンから選択される請求項１９に記載の方法。
【請求項２５】
前記炎症誘発物質がｆＭＬＰ、活性化した補体断片、ロイコトリエンＢ４、血小板活性化因子またはＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３およびＴＮＦαから選択される請求項１９に記載の方法。
【請求項２６】
Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質の同定方法であって、
ａ）活性化Ｔリンパ球、肥満細胞、好酸球および好塩基球から成る群から選択された炎症誘発媒介細胞を、サイトカイン、ケモカイン、ケモタキシン、およびマイトジェンから成る群から選択された公知の炎症誘発媒介物と接触させて炎症誘発応答を惹起する段階、
ｂ）段階ａ）にＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質の候補物質を添加する段階、および
ｃ）（ｉ）前記候補アンタゴニストおよび前記炎症誘発媒介物と同時に接触した炎症誘発細胞と（ｉｉ）前記炎症誘発媒介物とのみ接触した炎症誘発細胞とを比較して調節Ｇ蛋白質キナーゼの増減を検出する段階を含む前記方法。
【請求項２７】
前記炎症誘発媒介物質がｆＭＬＰ、活性化した補体断片、ロイコトリエンＢ４、および血小板活性化因子、またはＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３およびＴＮＦαから選択される請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】

活性化Ｔリンパ球、肥満細胞、好酸球および好塩基球から成る群から選択された炎症誘発媒介細胞の表面上の受容体と結合したＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質を含む細胞表面受容体複合体であって、それによって炎症誘発物質に対する炎症誘発細胞応答の阻害を提供する複合体。

【請求項２９】

Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質の同定方法であって、前記方法が、

活性化Ｔリンパ球、肥満細胞、好酸球および好塩基球から成る群から選択された炎症誘発媒介細胞を、三量体Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質候補と接触させる段階、および

Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質候補と接触していない細胞と比較してＰＬＣγ、Ｐｐ６０　Ｓｒｃ、およびＥＲＫ－１の量変化がなく、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）およびＰＩ３（８３Ｋｄ）の量が増加しており、Ｒｅｆ、Ｒａｓ、Ｇ蛋白質αキナーゼおよびＧ蛋白質βキナーゼの量が減少している前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配を決定する段階を含む方法。

【請求項３０】

ヒト末梢血単核細胞または多核白血球の細胞表面受容体および

Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質を含む細胞表面受容体複合体であって、

前記細胞表面受容体複合体を表さない細胞と比較して、前記細胞における蛋白質キナーゼの分配がＰＬＣγ、Ｐｐ６０　Ｓｒｃ、およびＥＲＫ－１の量に変化がなく、ＰＩ３（１１３Ｋｄ）およびＰＩ３（８３Ｋｄ）の量が増加しており、Ｒａｆ、Ｒａｓ、Ｇ蛋白質αキナーゼおよびＧ蛋白質βキナーゼの量が減少しているようになっている細胞表面受容体複合体。

【請求項３１】

前記細胞表面受容体がＦＰＲ受容体である請求項３０に記載の細胞表面受容体複合体。

【請求項３２】

前記ヒト末梢血単核細胞または多核白血球のＩＬ－４による刺激によって、前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配が、前記受容体複合体を表さない刺激された細胞と比較して、ＰＬＣγ、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）およびＰＩ３（８３Ｋｄ）の量が増加しており、ＲａｓおよびＧ蛋白質γキナーゼの量が減少している請求項３０に記載の細胞表面受容体複合体。

【請求項３３】

前記ヒト末梢血単核細胞または前記多核白血球の炎症誘発物質、ＩＬ－１３による刺激によって、前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配が、前記受容体複合体を表さない刺激された細胞と比較して、ＰＬＣγ、ＰＩ３（１１３Ｋｄ）およびＰＩ３（８３Ｋｄ）の量が増加しており、Ｒａｆ、Ｒａｓ、Ｐｐ６０　Ｓｒｃ、Ｇ蛋白質αキナーゼおよびＧ蛋白質βキナーゼの量が減少している請求項３０に記載の細胞表面受容体複合体。

【請求項３４】

前記ヒト末梢血単核細胞または前記多核白血球の炎症誘発物質、Ｃ５ａによる刺激によって、前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配が、前記受容体複合体を表さない刺激された細胞と比較して、ＰＩ３（８３Ｋｄ）およびＲａｆの量が増加しており、ＰＬＣγ、ＰＩ３（１１３Ｋｄ）、Ｇ蛋白質αキナーゼおよびＧ蛋白質βキナーゼの量が減少している請求項３０に記載の細胞表面受容体複合体。

【請求項３５】

前記ヒト末梢血単核細胞または前記多核白血球の炎症誘発物質、ＴＮＦαによる刺激によって、前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配が、前記受容体複合体を表さない刺激された細胞と比較して、Ｒａｆ、ＥＲＫ－１、Ｒａｓ、Ｇ蛋白質αキナーゼ、Ｇ蛋白質βキナーゼおよびＧ蛋白質γキナーゼの量が増加しており、ＰＬＣγ、ＰＩ３（１１３Ｋｄ）、およびＰｐ６０　Ｓｒｃキナーゼの量が減少している請求項３０に記載の細胞表面受容体複合体。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

発明の分野
本発明は、末梢血細胞の表面上に見られるＮ－ホルミルペプチド受容体に関しており、特にこのような受容体とＧ蛋白質シグナル伝達経路を変更するか、または中断する薬剤、特にある種のＮ－ホルミルペプチドとの複合体、および炎症誘発物質による共同刺激によってシグナル伝達を変更する方法に関している。
【０００２】
発明の背景
人体は、細菌が産生するＮ－ホルミルメチオニンペプチドを食細胞、特に好中球および単球の化学誘因物質として使用した防御機構を発達させるように進化してきた。Ｎ－ホルミルペプチドの中でも、ｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ（ＦＭＬＰ）は、好中球を活性化し、好中球からのリソソーム酵素の放出を促進する能力が最も高いことが確認された（Ｓｈｏｗｅｌｌ他、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１４３：１１５４～１１６９、１９７６）。その後、合成したテトラペプチド、特にｆ－Ｍｅｔ－Ｉｌｅ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕおよびｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅはまた、好中球応答を誘発することが示された（Ｒｏｔ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉｅ．ＵＳＡ　８４：７９６７～７９７１、１９８７）。これらのペプチドの能力は、当初は（１）Ｎ末端のホルミル基、（２）メチオニン側鎖、および（３）ロイシンおよびフェニルアラニン側鎖によるものとされた。
【０００３】
Ｎ－ホルミルペプチド受容体（ＦＰＲ）ｃＤＮＡのクローニングに続いてＦＰＲ蛋白質の１次構造が明らかにされたことによって、Ｎ－ホルミルペプチドの作用機構が躍進的に理解された（Ｂｏｕｌａｙ他、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２９：１１１２３～１１１３３、１９９０；Ｂｏｕｌａｙ他、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１６８：１１０３～１１０９、１９９０）。ＦＰＲは好中球および単球上で最初に発見されたが、その後ヒト脳、肝細胞、樹状細胞、および星状細胞でも発現していることが示された（Ｌａｃｙ他、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ．６１：７１～７８、１９９５；Ｓｏｚｚａｎｉ他、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５５：３２９２～３２９５、１９９５）。その後、さらに２種のＦＰＲ遺伝子、ＦＰＲ２（ＦＰＲＬ１およびＦＰＲＨ１としても知られる）（Ｂｏａ他、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　１３：４３７～４４０、１９９２；Ｍｕｒｐｈｙ他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：７６３７～７６４３、１９９２；Ｙｅ他、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１８４：５８２～５８９、１９９２）およびＦＰＲＬ２（Ｂａｏ他、前述）が単離された。ＦＰＲＬ１は、３５１個のアミノ酸から成り、ＦＰＲと７０％が同一であるが、ＦＭＬＰに対する親和性が最初のＦＰＲの４００倍であることが発見された（K_d＝１ｎＭ）。ＦＰＲＬ２はＦＰＲと５６％同一で、ＦＰＲＬ１とは８３％同一である。しかし、単球と好中球の両者に発現するＦＰＲＬ１とは異なり、ＦＰＲＬ２は単球では発見されたが好中球では発見されなかった（Ｄｕｒｓｔｉｎ他、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２１０：１７４～１７９、１９９４）。
【０００４】
ＦＰＲには、原形質膜に広がり、細胞外空間または細胞内空間のいずれかに暴露した親水性配列が結合した７個の疎水性ドメインが含まれている（Ｍｕｒｐｈｙ、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：５９３～６３３、１９９４）。第１および第３の細胞内ループは比較的小さくて、それぞれ５個および１６個のアミノ酸から成る。カルボキシ末端は細胞内空間にさらされており、一方Ｎ末端は細胞外空間にさらされている。細胞内配列にはさらに、Ｇ蛋白質結合ドメイン（以下に論じる様な受容体の機能に必須なドメイン）およびリン酸化を行うドメインが含まれる。
【０００５】
ＦＭＬＰ結合ドメインは、ＦＰＲの第１および第３の細胞外ドメインに位置するようである（Ｑｕｅｈｅｎｂｅｒｇｅｒ他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１８１６７～１８１７５、１９９３）。さらに、ＦＭＬＰ結合に対する結合状態が高親和性と低親和性で交互するといったＦＰＲ状態の相互変換性が指摘されている（Ｋｅｒｍｏｄｅ他、Ｂｉｏｃ

ｈｅｍ．Ｊ．２７６：７１５～７２３、１９９１）。Ｇ蛋白質は、このような相互交換状態を調節するものと考えられる。Ｇ蛋白質の関与なしで、ＦＰＲだけでは親和性の状態は低く、一方ＦＰＲがＧ蛋白質に結合すると高い親和性の状態が示される。様々なペプチドに認められる様々な効果を説明するために、さらにＧ蛋白質結合ＦＰＲを３種の異なる状態にモデル分けした。状態Ｉは、ＦＰＲはＧ蛋白質とは関与せず、親和性の低い状態であるが、Ｇ蛋白質と結合することによって親和性の高い状態、状態ＩＩに変換することができる。状態ＩＩＩは受容体がリガンドと結合しながら、Ｇ蛋白質のG_{α}サブユニットを遊離する親和性の高い中間的な状態である。状態ＩＶは一時的に親和性の低い状態で、残存するＧ蛋白質サブユニット（G_{β}およびG_{γ}）が受容体から分離する。Ｇ蛋白質G_{α}サブユニットの分離によって、Ｇ蛋白質のエフェクター機能が引き起こされ、細胞活性化が生じる。同様のモデルがＳｋｌａｒ他（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：８４８３～８４８６、１９８９）によっても提案された。

【０００６】

前記モデルでは、ペプチドの効果は状態ＩＩＩでの滞留時間によって決定される（Ｋｅｒｍｏｄｅ他、前述）。著者等は、ｆＭｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－ＰｈｅおよびｆＭｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－ＮＨＢｚｌなどの最も効果の高いホルミルペプチドが状態ＩＩＩを一時的に安定化して維持すると直ちに脱顆粒応答の引き金となるが、この状態ＩＩＩの期間では走化応答のシグナルが持続して、最大限の移動が可能になることを提案した。効果の低いホルミルペプチドによっては、高親和性の状態ＩＩＩから低親和性の状態ＩＶへの変換が迅速に媒介される。状態ＩＩＩでの初期脱顆粒応答は影響を受けないが、走化性シグナリング能は最小限になり、したがって細胞移動は制限される。したがって、一般に、高い効果のリガンドは高い親和性状態のＦＰＲと結合することによって走化性応答をもたらし、低い効果のリガンドは親和性の低いＦＰＲと結合することによって脱顆粒応答をもたらすと言うことができる。

【０００７】

アゴニスト活性およびアンタゴニスト活性はまた、このモデルを使用して定義することができる。アゴニストは活性化した受容体の状態ＩＩＩを安定化して、安定化の程度はその効果によって変わる。一方、アンタゴニストは受容体に結合するが、活性化した状態ＩＩＩを不安定にし、受容体を不活性化する。このようなモデルはＦＰＲに限定されるものではない。

【０００８】

さらに、脱顆粒はリガンドが受容体に結合したときに起こると言われており、同一または異なる受容体は同一または異なるリガンドによるその後の刺激に対して耐性になる。このような脱感作状態が通常の細胞活性化過程で受容体が占有された後に生じると、状態ＩＩＩの不安定化が起こり、または受容体占有前に生じると状態ＩＩＩは達成されない。無反応性状態または受容体不活性が１刺激物によって誘導され、複数のリガンドが結合していない受容体にも影響が及ぼされる場合、この状態を異種脱感作と呼ぶ。

【０００９】

最もよく研究されているＮ－ホルミルペプチドはｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ（ＦＭＬＰまたはｆＭＬＰ）である。しかし、より能力のあるペプチド、特にｆＭｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ、ｆＭｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－ＮＨＢｚｌ（ｆＭｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅベンジルアミド）、およびＮｌｅ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ（Ｎ－ホルミル－Ｌ－ノルロイシル－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ）（Ｋｅｒｍｏｄｅ他、前述）は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいてウサギの好中球上に受容体があることが特徴である。これらは、最大の移動度（２０～３５μｍの程度）および脱顆粒（10^{-10}から10^{-11}の程度のED_{50}）を示す。ごく最近の研究では、ホルミル化されていないペプチドもまたＦＰＲに結合することが可能で、好中球機能の効果的な活性化剤として作用できることが指摘された。たとえば、Ｍｅｔ－Ｍｅｔ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕは効果的なペンタペプチドで、ＦＭＬＰに匹敵する活性を有する（Ｃｈｅｎ他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：２３３９８～２３４０１、１９９５）。ペンタペプチドをＮ－ホルミル型へ変換するとその効果は１００～５０

０倍に増大し、厳密に言えば生物学的活性はＮ－ホルミル化によって決定されないようであるが、Ｎ－ホルミル化がまだペプチドの効果に重要な役割を果たしていることが示された。

【００１０】

その他の変更をペプチドに与えることによって、ペプチドの中には効果的なＦＰＲのアゴニストに変換できるものがあることが示された（Ｄｅｒｉａｎ他、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３５：１２６５～１２６９、１９９６；Ｈｉｇｇｉｎｓ他、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３９：１０１３～１０１７、１９９６）。このような変更には、アミノ末端基のウレア置換およびカルバメート修飾が含まれる。さらに、スーパーオキシドアニオン放出および好中球の血管内皮への付着によって測定すると、ＭＬＦペプチドのアミノ酸組成を変更することによって、ＦＰＲのアゴニストがアンタゴニストに変換することも示された。

【００１１】

好中球のＦＰＲを介したＮ－ホルミルペプチドによって刺激される走化性はよく研究されている。Ｎ－ホルミルペプチドによって刺激される前であっても、好中球は一時的に内皮細胞に発現したＰ－セレクチンに結合する。炎症部位で発生するＮ－ホルミルペプチドによって媒介される好中球の活性化によって、この部位に好中球の蓄積が引き起こされる。Ｎ－ホルミルペプチドは好中球上のＬ－セレクチンを促進させ、好中球を内皮上でローリングさせ、続いて好中球の表面上でインテグリンを促進させる。インテグリンは、細胞－細胞および細胞－細胞外マトリックス相互反応を媒介し、ラミニン、フィブロネクチン、ビクトロネクチン、並びにＩＣＡＭ（細胞内細胞接着分子）および内皮上に認められるＶＣＡＭ（血管細胞接着分子）と結合する。インテグリンとＩＣＡＭおよびＶＣＡＭが結合すると、細胞骨格との相互反応によって好中球の内部にシグナルが伝達される。次いで、好中球はＬ－セレクチンを発現し、内皮に沿って広がり始める。次いで、内皮細胞上でＥ－セレクチンおよびＩＣＡＭ－１が促進されると、好中球が内皮を横断して移動する（Ｌｕｓｃｉｎｓｋａｓ他、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４６：１６１７～１６２５、１９９１）。内皮バリアを突破すると、好中球はＮ－ホルミルペプチドの濃度勾配を感知して炎症部位に向かって移動する。高いペプチド濃度を含む最終目的地に到達すると、好中球は好細菌作用を一気に解き放つ。

【００１２】

刺激された好中球は迅速にレスピラトリーバーストオキシダーゼを活性化し、スーパーオキシドラジカルO_2^-の発生を触媒する。スーパーオキシドラジカルは他の分子と反応して、過酸化水素および次亜塩素酸を生じ、この両者は反応性の高い物質で、したがって効果的に微生物機能を妨害する。脱顆粒はまた、外来微生物の破壊に効果的な手段である。しかし、脱顆粒はまた、宿主の組織に損傷を与える。食作用は、外来微生物を排除する好中球の別の機構である。これらの機能の多くは、第２メッセンジャーとしてホスホリパーゼを使用したＧ蛋白質によって誘発され、３種類のホスホリパーゼが特徴付けられている。

【００１３】

ホスホリパーゼＣ、$PLC_{\beta 2}$は２個の第２メッセンジャー、１，４，５－イノシトール三リン酸（IP_3）およびジアシルグリセロール（ＤＧ）を発生する。ＦＰＲ活性化中に発生したＧ蛋白質のβ_γサブユニットは、$PLC_{\beta 2}$を活性化する。IP_3はある種のカルシウムチャンネルに結合して、細胞内貯蔵所からのカルシウムの放出を促進し、化学誘引物質による刺激の最中に観察される細胞質ゾル中のカルシウム濃度の増加をもたらす。カルシウムの放出と相まって、ＤＧは蛋白質キナーゼ（ＰＫＣ）を活性化する。最近、Ｇ蛋白質活性化ＰＬＣキナーゼが、Ca^{2+}増加に関連したラットの腹膜細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける肥満細胞脱顆粒の主要な経路であるとして文献で報告された（Ｂｅａｖｅｎ他、Ｊ．ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１６０：５１３６～５１４４、１９９８）。

【００１４】

ホスホリパーゼA_2（PLA_2）は、原形質膜の内面のリン脂質からアラキドン酸を生じさせる。アラキドン酸は、ロイコトリエンおよびプロスタグランジンなどの炎症伝達物質

の前駆体を形成する。PLA_2はマイトジェン活性化蛋白質（ＭＡＰ）キナーゼによるリン酸化で活性化される。

【００１５】

第３のホスホリパーゼはホスホリパーゼＤ（ＰＬＤ）で、ホスファチジルコリンからホスファチジン酸およびコリンを生成する。ホスファチジン酸はＰＫＣを活性化するＤＧを産生する役割に加えて、レスピラトリーバーストオキシダーゼの活性化に関与することが可能である。しかし、ＰＬＤの活性化にはカルシウムが必要で、ＦＭＬＰはカルシウム喪失細胞ではＰＬＤを刺激することができない（Ｋｅｓｓｅｌｓ他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６：２３１５２～２３１５６、１９９１）。さらに、Ｇ蛋白質ＡｒｆおよびＧ蛋白質ＲｈｏはＰＬＤ活性を調節するようである（Ｂｒｏｗｎ他、Ｃｅｌｌ　７５：１１３７～１１４４、１９９３；Ｃｏｃｋｃｒｏｆｔ他、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６３：５２３～５２６、１９９４；Ｓｉｎｇｅｒ他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：１４９４４～１４９５０、１９９５）。

【００１６】

蛋白質リン酸化は、ＦＭＬＰによって開始するシグナル伝達で中心的な役割を果たす。ＦＭＬＰ刺激の結果、３種の主要なキナーゼが蛋白質のリン酸化に関与する。

【００１７】

前述のように、ＰＫＣはＰＬＣによって産生されたＤＧによって活性化される。ＰＫＣはセリンおよびトレオニン残基をリン酸化するように作用する。ＰＫＣは、６個の異なるアイソフォームから成り、そのうち３種（α、βおよびγ型）は細胞内カルシウムに感受性で、３種（δ、εおよびζ型）は非感受性である。好中球には、α、βおよびζ型が含まれるが、γ型は含まれない。カルシウム依存性およびＤＧ依存性ＰＫＣ（ＰＫＣ－β）は、細胞質ゾルから膜に移動することによってＦＭＬＰおよびホルボールエステル刺激に応答する。次いで、レスピラトリーバーストオキシダーゼ系に関与するものなどのいくつかの細胞質ゾル蛋白質をリン酸化する。ＦＭＬＰはまた、カルシウム依存性、ＤＧ依存性およびホスファチジルセリン依存性ＰＫＣ型を活性化することができるが、その機能は明らかではない。

【００１８】

ＭＡＰキナーゼ（ＭＡＰＫ）はＲａｓおよびＲａｆの活性によるＧタンパク質のβ_γサブユニットによって活性化される。最近の文献で、高強度のＲａｓシグナリングがアポトーシス（Ｂａｒ－Ｓａｇｉ他、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１９（９）：５８９２～９０１、１９９９）並びに内皮細胞接着の促進（Ｆｉｎｋｅｌ他、．．．．．．．．）と関連があることが示唆された。Ｒａｆは、細胞の生存、増殖および分化を含めた増殖シグナルにおいて中心的な役割を担うことが今や明らかになった（Ｒａｐｐ他、．．．．．．．）。このキナーゼの経路はまた、Ｃ５ａおよびＩＬ－８によって誘発される（Ｂｕｈｌ他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：１９８２８～１９８３２、１９９５；Ｋｎａｌｌ他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：２８３２～２８３８、１９９６）。ＭＡＰキナーゼはいくつかの調節蛋白質、たとえば細胞外シグナル調節キナーゼ（ＥＲＫ）－１のチロシンリン酸化を誘導する。最近の文献で、ＭＡＰＫ経路はサイトカインの産生に深く関わっていることが示唆されている。しかし、ＴＨ－１およびＴＨ－２サイトカイン両者、並びにその他の炎症誘発分子、たとえばＣ５ａ、ＩＬ－８およびＦＭＬＰの活性化は、Ｇ蛋白質３量体のシグナル伝達に左右される。

【００１９】

ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）は、ＦＭＬＰによる刺激時に観察されるＰＩ三リン酸（PIP_3）の形成に重要である。PIP_3濃度の上昇は、明らかにレスピラトリーバーストオキシダーゼ系の活性化および好中球のアクチン重合化に関与しており、細胞骨格の変化および細胞移動の調節に重要であると考えられる。最近の文献で（Ｒａｎｋｉｎ他、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８８（９）：１６２１～３２、１９９８）、ＰＩ３キナーゼ濃度が上昇するとまた、Ｇ蛋白質のシグナリングに基づくＩＬ－５の活性化に基づいて、好酸球の脱顆粒が促進される可能性があることが報告された。さらに、Ｓ

ａｇｉ－Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇ他、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１９９８．２８：３４６８～３４７８は、Ｇ蛋白質シグナリングは、ＰＫＣおよびＰＩ３キナーゼの中間経路を使用して、ＩｇＥによるＦＣεＲ受容体を活性化することが可能で、ヒスタミンおよびアレルギー性気道過敏に関与するその他の炎症誘発性サイトカインを放出させることを示唆した。Ｕｃｋｕｎ他、Ｊ．ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇ．Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、Ｖｏｌ．２７４、Ｎｏ．３８、Ｓｅｐ．、１９９９、ｐｐ．２７０２８～２７０３８は、ＩｇＥ／ＦＣεＲ１の架橋結合を介して、肥満細胞の脱顆粒を導くＪＡＫ３キナーゼ経路におけるＧ蛋白質シグナリングを報告している。Ｂｅａｖｅｎ他、Ｊ．ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、１９９８、１６０：５１３６～５１４４は、Ｇ蛋白質シグナリングはまた、ＰＫＣを活性化させ、Ca^{2+}の取り込みをもたらして、肥満細胞の分泌および脱顆粒を導くことを報告している。したがって、Ｇ蛋白質は、ＩｇＥ抗原攻撃によるＦＣεＲ１の下流標的の活性化に必須である可能性があり、Ｇ蛋白質シグナリングを妨害する対応能力は、ＦＣεＲ受容体活性化の下流阻害の重要な基盤となることが可能である。

【００２０】

ウサギ好中球ＦＰＲのいくつかのアンタゴニストが同定されているが、分子がアンタゴニストであることを明確にする特性はまだ明らかになっていない。ＦＭＬＰのある種のブトキシカルボニル類縁体は、走化性ペプチド誘導細胞活性化と競合阻害することが示され、中でもＢｏｃＰＬＰＬＰが最も効果が高いことが発見された（Ｓｃｈｉｆｆｍａｎ他、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．１１７：１、１９８０；Ｆｒｅｅｒ他、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１９：２４０４、１９８０；Ｋａｎａｈｏ他、Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　Ｂｉｏｌ．４７：４２０、１９９０）。サイクロスポリンＨ、環状ウンデカペプチドおよびサイクロスポリンＡはまた、ホルミルペプチド受容体のアンタゴニストとしての活性を有することが示された（Ｗｅｎｚｅｌ－Ｓｅｉｆｅｒｔ他、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：４５９１～４５９９、１９９３）。天然に生じるホルミルペプチド受容体アンタゴニストもまた同定されており、レトロウイルス由来ヘキサペプチドがある（Ｏｏｓｔｅｎｄｏｒｐ他、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４９：１０１０、１９９２）。しかし、これらのアンタゴニストはいずれも高親和性ではホルミルペプチド受容体に結合せず、したがって研究手段または抗炎症剤として実際的には使用されない。

【００２１】

興味深いことに、Ｎ－ホルミル－メチオニル－ロイシル－フェニルアラニンによって肥満細胞の脱顆粒が阻害されることがＩｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ、Ｖｏｌ．５、Ｎｏ．１、ｐｐ．１３～１６（１９８１）で報告された。そこでは、２種の構造的に異なる走化性ペプチド、すなわちペプスタチンおよびＮ－ホルミル－メチオニル－ロイシル－フェニルアラニンが、４０／８０、好ラットＩｇＥ血清、またはウシ肺から単離された高分子アニオン透過性因子を皮下注射することによって生じたラット皮膚の血管透過性の増加を阻害することが報告された。これらのペプチドは直接肥満細胞に作用するようであることが報告された。ＦＰＲは肥満細胞上で発現することは報告されていないので、このような阻害の機構は明らかではない。

【００２２】

ＦＰＲの機能および機構に関して回答されていない疑問がたくさんあることは明らかである。さらに、ＦＰＲが非白血球細胞、たとえば脳細胞および樹状細胞で発現していることが発見されたことによって、ＦＰＲがその他の細胞種においてさらに解明されるべき新規の機能を遂行している可能性がある。したがって、細胞の炎症誘発応答を阻害する他の薬剤が、細胞の炎症誘発応答を研究する方法と共に必要とされている。

【００２３】

発明の概要

ここでは、ヒト末梢血単核細胞または多核白血球、または固定組織細胞を、炎症誘発物質（ｐｒｏ－ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　ａｇｅｎｔ）でこのような細胞を刺激した後にＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質で処理すると、通常の炎症誘発応答、特に炎症誘発物質、たとえばＣ５ａ、ＦＭＬＰ、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、Ｉ

Ｌ－１３およびＴＮＦαまたはＦＣε受容体によって誘導される下流の炎症誘発応答（ｐｒｏ－ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　ｒｅｓｐｏｎｓｅ）が阻害されることが発見された。Ｇ蛋白質の細胞産生が変化すると、Ｇ蛋白質によって媒介される炎症応答シグナル伝達経路が阻害される。特に有用なＧ蛋白質キナーゼ伝達経路変更剤は、式ｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ　Ｘを有するＮ－ホルミル－メチオニル－ロイシル（「ｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ」）ペプチドであって、式中、ＸはＴｙｒ、Ｔｙｒ－Ｐｈｅ、Ｐｈｅ－ＰｈｅおよびＰｈｅ－Ｔｙｒから成る群から選択されたペプチド、最も好ましくはｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅである。

【００２４】

ヒト末梢血単核細胞または多核白血球または固定した組織細胞は、リンパ球および顆粒球、好ましくは好酸球、好塩基球、および活性化したＴ細胞、および肥満細胞であることが可能である。

【００２５】

本発明の好ましい実施形態では、Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路修飾剤は、炎症誘発物質が存在するとＧ蛋白質サブユニットγのリン酸化を阻害する、これらの細胞に存在する細胞表面受容体、好ましくはホルミルペプチド受容体（「ＦＰＲ」）との複合体を形成する。さらに、Ｇ蛋白質の下流リン酸化を阻害またはブロックすることによって、３量体Ｇ蛋白質成分に依存した様々な経路が細胞の炎症誘発物質に対する応答をブロックまたは抑制する。

【００２６】

本発明の好ましい実施形態では、ある濃度のＦＣε受容体（ＦＣεＲ）では、ＩｇＥが存在すると、このＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質がＩｇＥによるＦＣεＲの活性化を阻害する。

【００２７】

本発明では、ヒト末梢血単核細胞または多核白血球または固定組織細胞の刺激に使用する炎症誘発物質は、サイトカイン、ケモタキシン、またはマイトジェンであることが好ましい。特に好ましい炎症誘発物質は、ＦＭＬＰなどのＮ－ホルミルペプチド、活性化した補体断片（Ｃ５ａ）、ロイコトリエンＢ４（ＬＴＢ４）、血小板活性化因子（ＰＡＦ）、およびＴＮＦα、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３などのサイトカイン、および抗原を架橋結合したＩｇＥ、ＩｇＧまたはＩｇＡである。

【００２８】

本発明の他の実施形態では、ヒト末梢血単核細胞または多核白血球細胞の炎症誘発応答を阻害する方法が提供され、この方法には細胞をＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質とを接触させること、およびこの薬剤を細胞の受容体に結合させることが含まれる。炎症誘発媒介細胞は、リンパ球または顆粒球であることが可能である。この細胞はまず前述のような炎症誘発物質によって刺激されていることが好ましい。

【００２９】

本発明の好ましい実施形態では、リガンド結合受容体は、ホルミルペプチド受容体である。ＦＣεＲ受容体のＧ蛋白質活性化の下流をブロックすることによって同様の治療上の利益がもたらされる。

【００３０】

本発明はさらに、Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質の同定方法を提供し、この方法には、

ａ）活性化Ｔリンパ球、肥満細胞、好酸球および好塩基球から成る群から選択された炎症誘発媒介細胞を、サイトカイン、ケモタキシン、およびマイトジェンから成る群から選択された公知の炎症誘発媒介物と接触させて炎症誘発応答を惹起する段階、

ｂ）段階ａ）にＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質候補を添加する段階、および

ｃ）Ｇ蛋白質キナーゼの量の減少またはＧ蛋白質キナーゼの失活を検出して、（ｉ）同時に前記候補薬剤および前記炎症誘発媒介物と接触した炎症誘発細胞を（ｉｉ）前記炎症誘発媒介物とのみ接触した炎症誘発細胞と比較して分離する段階が含まれる。

【００３１】
好ましいＧ蛋白質キナーゼはＧ蛋白質γキナーゼである。
【００３２】
本発明の他の実施形態では、Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質と複合した受容体は、炎症誘発媒介細胞とＧ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質とを接触させ、それによって炎症誘発応答を阻害することによって、活性化Ｔリンパ球、肥満細胞、好酸球および好塩基球から成る群から選択された炎症誘発媒介細胞の表面上に表れる。
【００３３】
本発明のさらに他の実施形態では、Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質の同定方法には、
活性化Ｔリンパ球、肥満細胞、好酸球および好塩基球から成る群から選択された炎症誘発媒介細胞を、Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質候補物質と接触させる段階、および
前記細胞によって産生した蛋白質キナーゼの分配であって、Ｇ蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質候補と接触していない細胞とを比較すると、ＰＬＣγ、Ｐｐ６０　Ｓｒｃ、およびＥＲＫ－１の量変化がなく、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）およびＰＩ３（８３Ｋｄ）の量が増加しており、Ｒａｆ、Ｒａｓ、Ｇ蛋白質αキナーゼおよびＧ蛋白質βキナーゼの量が減少している分配を決定する段階が含まれる。
【００３４】
したがって、本発明はまた細胞表面受容体およびＧ蛋白質シグナル伝達経路変更物質を含むヒト末梢血単核細胞または多核白血球細胞の新規受容体複合体であって、前記受容体複合体を表していない細胞と比較して、細胞における蛋白質キナーゼの分配が、ＰＬＣγ、Ｐｐ６０　Ｓｒｃ、およびＥＲＫ－１の量変化がなく、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）およびＰＩ３（８３Ｋｄ）の量が増加しており、Ｒａｆ、Ｒａｓ、Ｇ蛋白質αキナーゼおよびＧ蛋白質βキナーゼの量が減少しているようになっている新規複合体を提供する。細胞表面受容体は、ＦＰＲ受容体であることが好ましい。ＦＣεＲ受容体のＧ蛋白質活性化の２次ブロックもまた好ましい。
【００３５】
Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質と複合した細胞表面受容体を有するヒト末梢血単核細胞または多核白血球のＩＬ－４による刺激によって、前記受容体複合体を表していない刺激された細胞と比較して、ＰＬＣγ、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）およびＰＩ３（８３Ｋｄ）の量が増加しており、ＲａｓおよびＧ蛋白質γキナーゼの量が減少している前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配がもたらされる。
【００３６】
Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質と複合した細胞表面受容体を有するヒト末梢血単核細胞または多核白血球のＩＬ－６による刺激によって、前記受容体複合体を表していない刺激された細胞と比較して、ＰＬＣγ、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）、Ｒａｆ、Ｐｐ６０　Ｓｒｃ、ＥＲＫ－１およびＧ蛋白質αキナーゼの量が増加しており、ＰＩ３（８３Ｋｄ）、Ｇ蛋白質βキナーゼおよびＧ蛋白質γキナーゼの量が減少している前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配がもたらされる。
【００３７】
Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質と複合した細胞表面受容体を有するヒト末梢血単核細胞または多核白血球のＩＬ－１０による刺激によって、前記受容体複合体を表していない刺激された細胞と比較して、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）、ＥＲＫ－１およびＧ蛋白質γの量が増加しており、ＰＬＣγ、ＰＩ３（８３Ｋｄ）、Ｒａｓおよびキナーゼの量が減少している前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配がもたらされる。
【００３８】
Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質と複合した細胞表面受容体を有するヒト末梢血単核細胞または多核白血球の炎症誘発物質、ＩＬ－１３による刺激によって、前記受容体複合体を表していない刺激された細胞と比較して、ＰＬＣγ、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）、ＰＩ３（

８３Ｋｄ）、ＥＲＫ－１およびＲａｆの量が増加しており、Ｒａｓ、Ｐｐ６０　Ｓｒｃ、Ｇ蛋白質αキナーゼ、Ｇ蛋白質βキナーゼおよびＧ蛋白質γキナーゼの量が減少している前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配がもたらされる。

【００３９】

Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質と複合した細胞表面受容体を有するヒト末梢血単核細胞または多核白血球の炎症誘発物質、Ｃ５ａによる刺激によって、前記受容体複合体を表していない刺激された細胞と比較して、Ｐｐ６０　ＳｒｃおよびＲａｆが増加しており、PLC_{γ}、ＰＩ３（１０２Ｋｄ）、Ｇ蛋白質αキナーゼ、Ｇ蛋白質βキナーゼおよびＧ蛋白質γキナーゼの量が減少している前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配がもたらされる。

【００４０】

Ｇ蛋白質シグナル伝達経路変更物質と複合した細胞表面受容体を有するヒト末梢血単核細胞または多核白血球の炎症誘発物質、ＴＮＦαによる刺激によって、前記受容体複合体を表していない刺激された細胞と比較して、Ｒａｆ、Ｒａｓ、およびＰｐ６０　Ｓｒｃが増加しており、PLC_{γ}、ＰＩ３（８３Ｋｄ）、Ｇ蛋白質αキナーゼ、Ｇ蛋白質βキナーゼおよびＧ蛋白質γキナーゼの量が減少している前記細胞によって産生された蛋白質キナーゼの分配がもたらされる。

【００４１】

図面の簡単な説明

図１は、ヒト末梢血有核細胞に対するＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘ（ｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ）の結合を示すグラフである。

【００４２】

図２Ａ～図２Ｃは、活性化リンパ球に対するＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘ結合の点プロットである。図２Ａは、１００ｎＭＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘを添加して、培養２４時間後の６μｇのコンカナバリンＡ（ＣｏｎＡ）で刺激化されたリンパ球を示す。図２Ｂは、ＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘなしで、培養１２０時間後の６μｇＣｏｎＡで刺激化されたリンパ球を示す。図２Ｃは、１００ｎＭＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘを添加して、培養１２０時間後の６μｇＣｏｎＡで刺激化されたリンパ球を示す。

【００４３】

図３Ａ～図３Ｂは、図２Ａ～図２Ｃのリンパ球のＤＮＡ含量ヒストグラムである。図３Ａは、図２Ａの細胞のヒストグラムである。図３Ｂは、図２Ｂと図２Ｃの細胞のヒストグラムである。

【００４４】

図４は、全ヒト好中球ライゼートから回収された^{35}Ｓ－メチオニン標識化蛋白質と種々の樹脂とのオートラジオグラフである。

【００４５】

図５Ａ～図５Ｂは、媒体（０．３％ＤＭＳＯ）で処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図５Ａは、正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図５Ｂは、媒体（ＤＭＳＯ）のみで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。

【００４６】

図６Ａ～図６Ｂは、ＨＫ－Ｘで処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図６Ａは、ＨＫ－Ｘ処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図６Ｂは、ＨＫ－Ｘのみで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。

【００４７】

図７Ａ～図７Ｂは、ＩＬ－８で処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図７ＡはＩＬ－８処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図７Ｂは、ＩＬ－８のみで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。

【００４８】
図８Ａ～図８Ｂは、ＨＫ－ＸおよびＩＬ－Ａで処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図８Ａは、ＨＫ－ＸおよびＩＬ－Ａ処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図８Ｂは、ＨＫ－ＸおよびＩＬ－８で処理したで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。
【００４９】
図９Ａ～図９Ｂは、末梢血から新たに採取した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図９Ａは、新たに採取した細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図９Ｂは、新たに採取した細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。
【００５０】
発明の詳細な説明
本発明によれば、Ｇ－蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質は、炎症誘発物質または分子により刺激されたヒト末梢血細胞のある種の炎症誘発性反応を不活化することが見出された。
【００５１】
本発明による好ましいＧ－蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質は、リンパ球、特に活性化Ｔ細胞、好酸球、好塩基球などの顆粒細胞、肥満細胞などの固定組織細胞などの炎症誘発性媒介細胞上に見られるレセプターに結合することができる。
【００５２】
Ｇ－蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質がそのレセプターに結合すると、炎症誘発性反応が阻害される。本発明の好ましい実施形態により、Ｇ蛋白質のサブユニット、α、β、γが修飾され、これらのサブユニットのリン酸化もまた阻害される。薬剤－レセプター複合体により阻害され得る炎症誘発性反応は、レセプターを保持している細胞の分泌、脱顆粒、移動および他の炎症誘発性分子の合成および分泌である。
【００５３】
本発明のＧ－蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質は、炎症誘発性分子によって前もって刺激されたレセプターを不活化することができ、刺激されていない細胞には作用を及ぼさないことが好ましい。細胞刺激に有用な炎症誘発性物質の例としては、ＩＬ－８、Ｎ－ホルミルペプチド類、活性化補体断片（Ｃ５ａ）、ロイコトリエンＢ４（ＬＴＢ４）および血小板活性化因子（ＰＡＦ）がある。本発明の薬剤－レセプター複合体は、同一の炎症誘発性剤による、または異なった炎症誘発性剤によるさらなる刺激からレセプターを脱感作することもできることが好ましい。
【００５４】
レセプター保持細胞に及ぼすＧ－蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質－レセプター複合体に認められる作用を、Ｇ－蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質の同定に用いることができる。このような薬剤のスクリーニングは、炎症誘発性媒介細胞を知られた炎症誘発性媒介物質と接触させることによって、炎症誘発性反応を誘導し、その後、候補となる薬剤を加え、候補となる薬剤と炎症誘発性分子とに同時に接触させた炎症誘発性細胞内のＧ蛋白質キナーゼ量の減少を、炎症誘発性分子のみと接触させた炎症誘発性媒介細胞内のその量と比較して検出することにより実施することができる。
【００５５】
特に有用なＧ－蛋白質キナーゼシグナル伝達経路変更物質は、ｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅである。他の有用な薬剤は、上記手順の１つを用いて、慣例的な試験により同定することができる。
【００５６】
本明細書で用いられている炎症誘発性反応は、炎症誘発性媒介細胞の分泌または脱顆粒およびロイコトリエン類、ヒスタミン類および他のサイトカインの放出を含む。このような反応はまた、リンパ球、好酸球、好塩基球、肥満細胞および好中球の走化性吸着、移動お

よび凝集結果としての好酸球、好塩基球および肥満細胞の炎症組織への湿潤を含む。炎症部位の血管透過性とＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＡの産生亢進、およびそれら各々のＦＣレセプターもまた、炎症誘発性反応に関与し得る。

【００５７】

このように炎症誘発性反応の阻害は、本発明によるペプチドーレセプター結合に引き続いての炎症誘発性媒介細胞による脱顆粒化およびロイコトリエン、ヒスタミンおよびその他のサイトカイン類放出の減少、または好ましい実施形態においては完全な停止を含む。炎症誘発性媒介細胞の湿潤および移動もまた、大きく減少または完全に阻害され得る。炎症部位における血管透過性およびＩｇＥ濃度もまた減少し得る。

【００５８】

本明細書に説明された本発明をさらに十分に理解できるように、以下に実施例を挙げる。これらの実施例は説明の目的のためであって、いかなる様式においても本発明を限定するように解釈すべきでないことを理解する必要がある。

【００５９】

実施例１：末梢血有核細胞に対する標識ＨＫ－Ｘの結合

末梢血有核細胞上のＨＫ－Ｘ（「ｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ」）のＫｄおよびＢｍａｘ（飽和結合）を測定した。密度勾配遠心分離により調製した種々のフラクション（単球、リンパ球、顆粒球）の１００μｌ溶液中２×１０^{5}細胞を０．１％アジ化ナトリウムを含有する１％ＢＳＡ－ＰＢＳ中で予め洗浄した。ＦＩＴＣ標識したＨＫ－Ｘ（１％ＢＳＡ－ＰＢＳ溶液中）の下記のモル濃度１００μｌを表１によるチューブの各セットに加えた。

【００６０】

【表１】

表１

チューブ番号	FITC標識HK-Xのモル濃度
1	9.06×10^{-12}
2	2.71×10^{-11}
3	5.43×10^{-11}
4	7.25×10^{-11}
5	9.06×10^{-11}
6	2.71×10^{-10}
7	5.43×10^{-10}
8	7.25×10^{-10}
9	9.06×10^{-10}

【００６１】

チューブを混合し、３０秒間混和させた。次にチューブを４～８℃で３０分間保持した。次に１００μｌのＣａｌ－Ｌｙｓｅを加え、５分間温置または５００μｌの１％ホルムアルデヒドを加えた。Ｃａｌ－Ｌｙｓｅを加えた場合は、１ｍｌの水を加えてさらに５分間温置した。次に細胞をフローサイトメーター（Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｅｐｉｃｓ　Ｅｌｉｔｅ）上で分析した。結合結果を図１に示す。Ｂｍａｘは４７．６６、Ｋｄ＝１．６７４×１０$^{-10}$Ｍと決定した。したがって、これらの結果は、単球、リンパ球、顆粒球などの末梢血有核細胞に対してＨＫ－Ｘが結合していることを示している。

【００６２】
同様な方法によって、Ｈ－ＫＸは、は、好中球に対する知られた結合と同様、活性化Ｔ細胞、肥満細胞、好酸球、好塩基球に対して結合していることも確認された。
【００６３】
実施例２：活性化レセプターに対するＨＫ－Ｘの結合
末梢血リンパ球は、培養２４時間後、または１２０時間後にマイトジェンのコンカナバリンＡ（ＣｏＡ）によって刺激した。次に細胞を１００ｎＭ　ＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘに曝露したか、または曝露しなかった。また、細胞を細胞サイクル期決定のため、ＤＡＰＩで染色した。次に細胞をフローサイトメトリーにより分析した。
【００６４】
図２Ａ～図２Ｃは、ＣｏｎＡにより活性化したリンパ球と、ＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘの結合部位の発現との関係を示している。この４つの４分画区分は以下の特徴を表している：
左上の４分画区分は、ＤＮＡ含量が１ｎより高く、図１のプロフィルを用いて確立されたバックグラウンド濃度よりもＦＩＴＣ　ＨＫ－Ｘ結合濃度が上昇している細胞を表している；
右上の４分画区分は、ＤＮＡ含量が１ｎより高く、バックグラウンドより大きなＦＩＴＣ－リガンド結合を有した細胞を表している；
右下の４分画区分は、ＤＮＡ含量が１ｎよりも低いが、ＦＩＴＣ－リガンド結合はバックグラウンドより上である細胞を含んでいる；および
左下の４分画区分は、ＤＮＡ含量が１ｎでＦＩＴＣ－リガンドがバックグラウンド濃度である細胞を含んでいる。
【００６５】
図２Ｂと図２Ｃの検討から明らかなように、植物レクチンまたはマイトジェンに対する曝露は、細胞を刺激して細胞サイクルに入らせ、ＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘに対する結合部位を発現する。より長い１２０時間の培養時間によって、細胞の大部分が細胞サイクルに入ることが可能となった（図２Ａと比較して）。内在性蛍光バックグラウンド濃度の最も正確な測定は、ＣｏｎＡと共に培養し、ＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘで染色しなかった細胞（図２Ｂを参照）を用いて閾（四分画）を設定することにより得られた。
【００６６】
統計解析により、点プロットの検討により供された四分画の観察結果が確証された。図２Ｃの細胞のおよそ２５％がＤＮＡ含量１ｎ以上を含有し、ＦＩＴＣ－リガンド結合は、バックグラウンド濃度以上であった。これは図２Ａおよび２Ｂそれぞれの右上画分にある細胞数と著しく対照的である。
【００６７】
細胞サイクルの種々の期における細胞分配のさらに本格的な検討は、Ｐｈｏｅｎｉｘ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ社（アリゾナ州フェニックス）によるソフトウェアパッケージ「Ｍｕｌｔｉ　Ｃｙｃｌｅ」を用いて得られた。このソフトウェアは、ＤＮＡヒストグラムを巻き戻し、成分の適合度と有意性を統計的に解析する。
【００６８】
図３Ａは、図２Ａに含まれる同一のサンプルを示し、図３Ｂは、図２Ｂと図２Ｃに含まれる同一のサンプルを示す。二倍体（ＤＮＡ含量＞１ｎ）である細胞のパーセンテージの検討から明らかなように、フラクションは、図２Ａの２．２％から図２Ｂと図２Ｃの２９％へと上昇した。
【００６９】
このように、ヒト末梢血リンパ球のマイトジェンによる刺激は、それらのＤＮＡ複製を開始させ、この過程と同時にＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘに対する結合部位の発現を開始させると思われる。ＤＮＡ含量が１ｎである細胞、すなわち細胞サイクルがＧ０／Ｇ１期にある細胞フラクションのみがリガンドに対する結合部位の発現増加を示す。これと対照的に、二倍体ＤＮＡの含量（＞１ｎ）を有する全ての細胞は、リガンドに対する結合部位を含有する。

【００７０】
実施例３：ＨＫ－Ｘレセプターの同定および特性化
ＨＫ－Ｘおよび他のＮ－ホルミルペプチドに結合するレセプターを、マウス腹膜肥満細胞、ヒト多核白血球および単核細胞個体群より単離し特性化した。さらに、ＰＫＣ、ＰＩ３の増加、およびＣａ$^{2+}$移動の下流での結果としてのＦＣεＲレセプターのＧ蛋白活性化により、ＦＣεレセプターはＧ蛋白質を妨げる下流エフェクターのレセプターとなる。
【００７１】
ＨＫ－Ｘに結合する細胞としては、ＨＫ－Ｘへの曝露後に変化した生物学的反応性により、また蛍光または放射能標識ＨＫ－Ｘ結合により立証されたように、肥満細胞、好塩基球、好酸球が挙げられる。ＨＫ－Ｘに対するレセプター類は同定されていない。それに対し、好中球はその表面にホルミルペプチドレセプターを発現する。しかし、血液のリンパ球および単球とＨＫ－Ｘとの結合は、好中球の場合よりも少ないようである。
【００７２】
材料および方法の詳細：
１．細胞の単離－麻酔ラットの腹腔内へ３５ｍｌのタイロード液の注入によりラットの腹膜肥満細胞を単離した。その後、過剰麻酔剤の注入によりラットを殺処理した。腹膜細胞を採取し、１５ｍｌ遠心管に入れた。細胞を室温で１０分間、２５０×ｇでの遠心分離によりペレット化した。
【００７３】
ヒト末梢血の単核細胞および多核白血球を、正常ドナーから得た末梢血より単離した。血液はヘパリン中で採取した。Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上、室温、５００×ｇで遠心分離により種々の細胞種を単離した。各フラクションを採取し、別々にプールし、抗生物質を加えたＲＰＭＩ１６４０中で１回洗浄した。
【００７４】
２．^{35}Ｓ－メチオニンによる細胞の代謝的標識　－　細胞を、１０μＣｉの^{35}Ｓ－メチオニンを含有するメチオニンの少ないＲＰＭＩ１６４０培地の１ｍｌにつき１×１０^{7}に調整し、５％CO_2存在下、３７℃で一晩保持した。
【００７５】
３．細胞の採取および粗製膜の調製－細胞をＰＢＳ中で３回洗浄し、続いて０．３％ＮＰ４０とプロテイナーゼ阻害剤反応混液を含有するｐＨ７．２のＨｅｐｅｓ緩衝液中、音波処理によりライゼートした。その結果生じた細胞調製液を６００×ｇで１０分間遠心分離し、さらに分析するために上澄み液を採取した。
【００７６】
４．種々の細胞蛋白質のセファロースおよびサファロースＨＫ－Ｘクロマトグラフィ分離－セファロース未置換樹脂またはセファロースＨＫ－Ｘ樹脂のカラムに細胞調製液を通過させ、ＡとＢの２つの部分に分けた。
【００７７】
アリコートＡは、ＨＫ－Ｘ置換セファロースカラムを通過した。カラムを洗浄し、次にＨＫ－Ｘ（５ｍｇ／ｍｌ）、次いで０．１Ｍグリシンを含有する緩衝液ｐＨ２．５で溶出した。
【００７８】
アリコートＢは、溶解性ＨＫ－Ｘの存在下、ＨＫ－Ｘ置換カラムに結合させ、蛋白質を溶出した。各フラクションを濃縮し、凍結乾燥した。
【００７９】
本ステップで試みられた方法は、ＨＫ－Ｘをセファロース樹脂に結合してＨＫ－Ｘ置換樹脂を作製することを含む。ＨＫ－Ｘ置換樹脂に曝露する前に、標識された細胞蛋白質混合物を、ＨＫ－Ｘに置換されていない樹脂上を通して、天然樹脂と反応させ、いかなる蛋白質種をも除去した。したがって、レセプター蛋白質を含む細胞蛋白質を、適切なイオン環境下、ＨＫ－Ｘ置換樹脂を通すと、他の蛋白質の中でレセプター蛋白質（ＨＫ－Ｘレセプターに関する）が、ＨＫ－Ｘと堅固に結合した。樹脂を、中性ｐＨでリン酸緩衝液のよう

な緩和剤と共に洗浄して、いかなる低親和性結合蛋白質をも除去した。引き続いて、樹脂を、過剰量の遊離ＨＫ－Ｘに曝露し、樹脂に結合したレセプター蛋白質を競合的に溶出した。これらの各ステップで遊離された放射活性蛋白質を濃縮して、次のステップに詳述する１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステムにより分析した。

【００８０】

５．１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ－２５０ｃｐｍから２０００ｃｐｍの放射活性を含む放射活性細胞調製物の２５μＬをゲルの各レーンに塗布した。着色標準品の良好な分解能が得られるまで、このゲルを３０ｍＡ、９０Ｖで作動させた。標準品は、ホスホリラーゼｂ（分子量＝９４，０００）；ウシ血清アルブミン（分子量＝６８，０００）；オボアルブミン（分子量＝４３，０００）；炭酸脱水酵素（分子量＝３０，０００）；および大豆トリプシン阻害剤（分子量＝２１，０００）である。

【００８１】

６．分解放射活性蛋白質の推定分子量－相対移動度は、標準品、およびゲル上に見られる各々区別される分子量種に対して計算した。標準品の分子量の対数プロットを各標準品の相対移動度に対してプロットした。このデータをＰＲＩＳＭソフトウェアに入力し、未知蛋白質の分子量を標準カーブプログラムから予測した。これらの結果を、文献（Ｇｏｅｔｚｌ他、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ２０：５７１７－５７２２、１９８１）に公表されたＦＰＲレセプター蛋白質と比較した。

【００８２】

図４は代表的な実験の結果を示す。細胞ライゼートに存在する全ての蛋白質がＡレーンに示される。Ｂレーンでは、ＨＫ－Ｘの置換なしのセファロースカラムからの非結合物質が、全細胞ライゼートと同様の蛋白質バンド分配パターンを示す。Ｃレーンは溶出前の物質を含む。Ｄレーンはブランクレーンである。Ｅレーンでは、カラムを１ｍｇのＨＫ－Ｘ（競合品）の存在下で溶出すると３本の蛋白質バンドを見ることができる。分子量は、それぞれ～９４，０００、～６８，０００および～４０，０００Ｄｏｌｔｏｎと推定される。この実験条件は、結合の特異性を確証した。

【００８３】

本実験条件で溶出されたバンドのＧｏｅｔｚｌ他によって報告されたものに対する相対存在率の比較により、興味深い相違が明らかにされた（表２を参照）。レセプター類の標準化比率の検討により、ＦＭＬＰカラム（Ｇｏｅｔｚｌ）およびＨＫ－Ｘカラム（本実施例）から回収された３種の分配における本質的な相違が明らかにされる。６８Ｋｄ種は、ＦＭＬＰ親和性カラムからＧｏｅｔｚｌ他により回収された優性種であったが、一方、４０Ｋｄ種はＨＫ－Ｘ親和性カラムから回収された優性種であった。

【００８４】

【表２】

表２

FMLP-セファロースからのホルミルレセプターの報告された回収と HK-X-セファロースから回収されたものとの相違

分子量	メチオニンを含む全残基数	FMLPによる全レセプター数の比率	HK-Xによる全レセプター数の比率	レセプター蛋白質の標準化比率	
				FMLP	HK-X
94,000	14	15	26	1.07	1.8
68,000	11	80	28	7.27	2.54
40,000	4	5	41	1.25	10.25

【００８５】

１ｍｇのＨＫ－Ｘの添加によりラット腹膜肥満細胞から溶出された３種の分子種があることが、図４におけるラジオオートグラフから明白である。これらの蛋白質の計算された分子量は、Ｇｏｅｔｚｌ他によって報告された分子サイズと一致する。ＨＫ－Ｘとの競合後回収された蛋白質、またはラット腹膜肥満細胞および好中球からの酸の分子量は、ヒト好中球に関してＧｏｅｔｚｌにより報告されたものと同じであった。

【００８６】

４０Ｋｄ分子におけるメチオニンの全平均残基数は５．１個であるが、１分子につきそれぞれ１１個および１４個の残基を含む６８，０００および９４，０００種のいずれよりも強いラジオグラフ画像を有する。本実施例において、回収された各蛋白質種の相対存在率は、^{35}Ｓ－メチオニンにより生合成的放射標識により決定された。親和性クロマトグラフィから回収された相対比率は、オートラジオグラフからの曲線下面積の積分により決定された。Ｇｏｅｔｚｌは、化学的方法による蛋白質の決定により各蛋白質の相対存在率を測定した。したがって、２つの研究において回収された蛋白質分配をより正確に比較するために、分配値を、各々の種の相対存在率をメチオニン残基数で割ることにより標準化した。この比率は、方法論における差による値の潜在的変化を修正する。この修正比率により、Ｇｏｅｔｚｌにより報告された値と本実施例において得られた値との間の結合および／または回収プロフィルの大きな差が明らかにされた。１つの可能性は、界面活性剤で解離されたレセプター複合体が、ＨＫ－Ｘ置換セファロースのものと異なる選択的な様式でＦＭＬＰ置換セファロースに結合することである。

【００８７】

要約すると、本実施例におけるＨＫ－Ｘは、蛋白質をｉｎ　ｖｉｔｒｏで^{35}Ｓ－メチオニンにより蛋白質標識後回収された細胞ライゼートにおける結合蛋白質を選択的に回収するために使用された。ＦＭＬＰレセプター複合体と会合したペプチドのサイズに関する以前の報告と一致する３種の分子量種が単離された。

【００８８】

また、ＨＫ－Ｘは、ヒト多形核白血球および単核細胞、特に活性化Ｔ細胞、肥満細胞、好酸球および好塩基球のレセプターに結合することが、本実施例に使用される方法により示された。

【００８９】

実施例４：シグナル伝達および作用メカニズム

白血球は、大多数の化学誘引物質および他の炎症誘発媒介物質に応答する。幾つかの媒介物質は、化学走化性、酵素系の活性化および病理学上重要な媒介物質の遊離を引き起こす。典型的なＮ－ホルミルペプチド類（原型体－ＦＭＬＰ）、活性化補体断片（Ｃ５ａ）、ロイコトリエンＢ４（ＬＴＢ４）、血小板活性化因子（ＰＡＦ）および幾つかの走化性サイトカイン類（ＩＬ－８など）は、よく認識された走化性および炎症誘発物質である。これらの物質は、Ｇ蛋白結合レセプター類（ＧＰＣＲ）に結合し、引き続いて蛋白質キナーゼ系により媒介された複数のシグナル伝達の発生となる。最初の事象の結果生じるカスケードは、複雑且つ相互に関連付けられており、さらにすべての有核細胞の挙動全体に関与している。プログラム化細胞死（アポトーシス）、免疫応答の発生、自己認識Ｔ細胞の除去および細胞外マトリクス合成の制御は、シグナル伝達経路作用におけるわずかに少数の例である。

【００９０】

蛋白質キナーゼ類は、リン酸塩基をリン酸塩ドナーから蛋白質内に位置付けされたアクセプターアミノ酸上に移動する能力により同定された。通常は、ＡＴＰのγリン酸塩がドナーである。蛋白質内の３種の主要アクセプターアミノ酸残基は、チロシン、セリンおよびスレオニンである。１９９９年時点で、１１５種以上の蛋白質キナーゼが同定されており、文献に記載されている。

【００９１】

ＦＭＬＰによる刺激に応答する細胞挙動は、文献（Ｐｒｏｓｎｉｔｚ他、Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．７４：７３－１０２，１９９７）に記述されている。貪食細胞に結合す

るＦＭＬＰは、細胞外機能に関連するリン酸化を刺激する。ＦＭＬＰおよび他の化学誘引物質は、ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（Ｐ１３Ｋ）を刺激し、次々に蛋白質キナーゼ類（ＰＫＣ）を活性化する。好中球において、ＦＭＬＰ結合は、マイトジェン活性化蛋白質キナーゼ類（ＭＡＰキナーゼ類）と称されるキナーゼ類一般ファミリーに属する細胞外の調節化されたキナーゼ、（ＥＲＫ－１）のリン酸化を開始する。ＭＡＰキナーゼファミリーのうちのメンバーには、Ｒａｆ－１およびＲａｓがある。

【００９２】

ＭＡＰキナーゼファミリーのメンバーは通常、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により１種ずつ分解できる程度に分子量が異なる。さらに、ホスホチロシン蛋白質は、ホスホチンエピトープのみを認識するモノクローナル抗体による細胞内蛋白質の全質量から検出できる（Ｒｏｓｓ他、Ｎａｔｕｒｅ（ロンドン））２９４：６５４，１９８１；Ｆｒａｃｋｌｅｔｏｎ他、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．３：１３４３，１９８３）。

【００９３】

ヒト末梢血単核細胞および多核白血球に対するＨＫ－Ｘの付加により媒介された蛋白質キナーゼ類における変化を、ＨＫ－Ｘの作用メカニズムを解明するために分析した。ＨＫ－Ｘを単独でおよび知られた走化性および炎症誘発性物質であるＦＭＬＰまたはＩＬ－８と共に付加させた。

【００９４】

物質および方法の詳細：

１．細胞の単離－ヒトの末梢血単核細胞および多形核白血球を、正常ドナーから得られた末梢血から単離した。種々の細胞種を、室温で６０分間５００－ｘ９でＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上の遠心分離により単離した。各フラクションを回収し、別々にプールし、抗生物質を有するＲＰＭＩ１６４０中で１回洗浄した。

【００９５】

２．細胞の培養と処理－培地１ｍｌにつき10^7細胞を、細胞をリン酸化蛋白質プール内に定常状態に到達させるために、刺激剤の付加前に、３７℃で３０分間保持した。次に以下の刺激物を細胞の各々のｍｌに加えた。

【００９６】

Ａ．１００μＬの媒体（培地中０．３％ＤＭＳＯ溶液）。

【００９７】

Ｂ．１００μＬのＨＫ－は、２０μｇのＨＫ－Ｘを含んだ。

【００９８】

Ｃ．１００μＬのＦＭＬＰは、０．１μｇのＦＭＬＰを含んだ。

【００９９】

Ｄ．１００μＬのＩＬ－８は、０．１μｇのＩＬ－８（組換え型ヒトＩＬ－８）

Ｅ．１００μＬのＨＫ－Ｘは、２０μｇのＨＫ－Ｘを含み、プラス１００μＬのＦＭＬＰは０．１μｇのＦＭＬＰを含んだ。

【０１００】

Ｆ．１００μＬのＨＫ－Ｘは、２０μｇのＨＫ－Ｘ含み、プラス１００μＬのＩＬ－８は０．１μｇのＩＬ－８を含んだ。

【０１０１】

Ｇ．いかなる刺激剤もない細胞培養培地。

【０１０２】

細胞を５％CO_2中３７℃でさらに３０分間温置した。

【０１０３】

３．細胞の回収およびＳＤＳ－ＰＡＧ分析－細胞を室温で５分間２５０×ｇでペレットにした。上澄液を除き、２５μＬの２ＸＳＤＳ－ＰＡＧＥ出発緩衝液を加えた。ペレットを１５分間沸騰させて、１０，０００×ｇで５分間遠心分離する。小サンプルを、１２％アクリルアミドゲル上のゲルの電気泳動用に除いた。

【０１０４】

４．リン蛋白質の免疫ブロット検出－一蛋白質を１３Ｖで３０分間ナイロン膜に移し、続いて１％ＢＳＡにより１２時間ブロックした。０．３％ＢＳＡ中ＨＲＰにより共役した抗体を６０分間加えた。膜を洗浄し、固定し、写真撮影した。

【０１０５】

５．データ解析－写真は専門的実験室にて撮られ、ネガコピーを、極めて高いコントラストの低粒子フィルムを用いて各ゲルから作製した。次の写真を６００ｄｐｉでスキャンし、デンシトメトリー分析は、画像プロプラス（Ｉｍａｇｅ　Ｐｒｏ　Ｐｌｕｓ）ソフトウェア、ＳＰＳＳを用いて実施した。分子量を各バンドごとに計算した。

【０１０６】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥの各レーンに塗布した細胞蛋白質量を標準化するために、同数の細胞を各処理に用いて、ほぼ同容量のサンプルを各レーンに塗布した。図５から図９を通して、モノクローナル抗ホスホチロシン抗体により検出されたリン蛋白質の化学発光パターンを示す。化学発光画像のネガは、バンドの高解像度およびそれらの対応する化学発光強度を得るために、専門写真家により作製された。例えば、図５Ａでは、媒体に３０分間曝された細胞に存在する蛋白キナーゼは、ゲルのデンシトメトリー分析におけるピークにより示されるように９種の異なる蛋白種を明らかにした。明瞭にするために、デンシトメトリー分析にピークを矢印で示し、ゲル中の対応する分子種もまた、同じ矢印で示されている。（ゲル由来のものは、より大きな分子量種が位置付けされるゲルの右側にある）。

【０１０７】

図６において、ＨＫ－Ｘに対する蛋白キナーゼ応答が示される。およそ８３Ｋｄの分子量種における明らかな増加が検出され、それは他の処理において観察されなかった。著しい相違が、細胞の２０μｇ　ＨＫ－Ｘおよび０．１μｇ　ＩＬ－８、並びに２０μｇ　１ＨＫ－Ｘおよび０．１μｇ　ＦＭＬＰとの同時処理後に見られた（データは示していない）。より小さな分子量種は大きく減少して現れた（ゲルの左の大部分）。この減少は、ピーク面積により定量的に反映される。デンシトメトリーの追跡におけるこの面積を水平の２重頭矢により示す。蛋白キナーゼ含有量および新鮮な単核細胞の分配を図９に示す。これらの細胞のキナーゼ分配は、媒体処理細胞（図５）およびＨＫ－Ｘ処理細胞（図６）のものと著しく類似する。ＦＭＬＰ刺激単独およびＨＫ－ＸプラスＦＭＬＰ刺激に対するキナーゼ応答パターンは示していない。しかしながら、これらの各パターンは、それぞれＩＬ－８単独およびＨＫ－ＸプラスＩＬ－８により観察されたものと実質的に一致した。

【０１０８】

末梢血多核白血球に係る蛋白キナーゼのパターンと分配は、単核細胞のものと本質的に同一であった。２種の細胞種間の主要な相違は、単核細胞が多核白血球よりも代謝的に活性であることであった。

【０１０９】

デンシトメトリー分析法を用いて、各分子量種のピーク下面積を計算した。このように、各キナーゼの定量評価を全キナーゼ含有量のパーセントとし計算した。さらに、知られたキナーゼ類の分子量を、本実験における相対移動（Ｒｆ）計算から計算されたものと比較した。このようにして、本試験におけるキナーゼ類が同定できた。

【０１１０】

表３は、ＨＫ－Ｘに対する曝露後のヒト末梢血細胞からの蛋白キナーゼ類の分配における定量的変化を示す。

【０１１１】

【表３】

表３

蛋白キナーゼ	分子量	HK-Xによる変化%
PLCγ	150 Kd	NC
PI3	102 Kd	+57
PI3	83 Kd	+55
Raf	65～68 Kd	-42
Pp60 Src	62 Kd	NC
G蛋白α	56 Kd	-49
ERK-1	44～49 Kd	NC
G蛋白β	33～35 Kd	-25
Ras	21 Kd	-32
G蛋白γ	9 Kd	NC

【０１１２】
表４は、以前の定量データを確認し拡張した種々の実験におけるＧ蛋白質γキナーゼ定量を示す。各処理に同一細胞を用い、また回収された細胞内蛋白質のおよそ同一量を各レーンに塗布することを試みたが、キナーゼ類の全量は観察された面積に見られるように異なっていた。
【０１１３】
【表４】

表４

HK-XおよびIL-8およびFMLPに曝露後の末梢血細胞からの蛋白キナーゼの要約

蛋白キナーゼ	分子量(kD)	媒体	HK-X単独	FMLP単独	IL-8単独	HK-X+FMLP	HK-X+IL-8	新鮮な正常細胞
G蛋白γ	9	10	11.4	10.1	14.8	2.7	3.4	11.9
全面積		164,413	246,023	189,169	170,985	98,097	128,937	176,442

【０１１４】
表５は、（１）ＨＫ－Ｘおよび（２）ｆＭＬＰまたはＩＬ－８に対する共刺激曝露と比較してＨＫ－Ｘに対する曝露後のヒト末梢血細胞からの蛋白キナーゼ分配における変化を示す他の実験結果を示す。
【０１１５】
表６および表７は、１）ＨＫ－Ｘおよび（２）Ｃａ５、ＴＮＦα、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１０またはＩＬ－１３に対する共刺激曝露と比較してＨＫ－Ｘに対する曝露後のヒト末梢血細胞からの蛋白キナーゼ分配における変化を示したさらなる実験結果を示す。
【０１１６】
【表５】

表5

末梢血細胞におけるチロシン蛋白キナーゼ類の同定および分配の要約

---分配パーセント---

蛋白キナーゼ	分子量	媒体	HK-X 単独	HK-X + fMLP	HK-X + IL-8	新鮮な正常細胞
PI 3 キナーゼ	102 Kd	5	4	5.1	4	3
PI 3 キナーゼ	83 Kd	5.2	7.7	11	10.4	4.9
Raf	65~68 Kd	7	7.8	9.5	8.9	5
Ras	21 Kd	18	12.7	5.7	11.3	18.9
Pp60 Src	62 Kd	6.3	5	6.6	8.8	8.7
ERK-1	44~49 Kd	6.6	6.9	4.8	8.6	8.5
G蛋白α	56 Kd	6.9	6.3	7.8	8.2	12.3
G蛋白β	33~35 Kd	6.6	7	4.4	5.3	8.3
G蛋白γ	9 Kd	10	11.4	2.7	3.4	11.9

【０１１７】

【表６】

表６

末梢血細胞におけるチロシン蛋白キナーゼ類の同定および分配の要約

蛋白質キナーゼ	分子量	C5a Plus HK-X	TNFα プラス HK-X	IL-4 プラスHK-X	HK-X
		----------分配パーセント----------			
PLCγ	150 Kd	2.2	2.4	7.7	4.2
PI3キナーゼ	102 Kd	2.7	3.1	6.0	3
PI3キナーゼ	83 Kd	6.9	5.5	7.7	6.8
Raf	65~68 Kd	6.4	5.7	3.1	3
Ras	21 Kd	16.5	20.9	9.9	16.4
Pp60 Src	62 Kd	5.8	7.4	4.5	5.1
ERK-1	44~49 Kd	6.5	5.9	6.4	6.0
G蛋白α	56 Kd	5.5	6.3	7.9	7.5
G蛋白β	33~35 Kd	6.2	6.2	8.0	8.2
G蛋白γ	9 Kd	8.0	7.4	5.8	9.4

【０１１８】

【表７】

表7

末梢血細胞におけるチロシン蛋白キナーゼ類の固定および分配の要約

		分配パーセント			
蛋白キナーゼ	分子量	IL-6 プラス HK-X	IL-10 プラス HK-x	IL-13 プラス HK-X	媒体
PLCγ	150 Kd	5.0	3.8	11.2	5.8
PI3キナーゼ	102 Kd	3.5	3.4	13.3	4.0
PI3キナーゼ	83 Kd	4.3	5.7	7.2	7.6
Raf	65~68 Kd	6.7	2.6	5.7	3.6
Ras	21 Kd	17.6	15.8	9.8	13.3
Pp60 Src	62 Kd	6.7	4.7	4.4	4.8
ERK-1	44~49 Kd	8.9	8.8	6.9	5.7
G蛋白α	56 Kd	8.7	8.1	4.9	7.9
G蛋白β	33~35 Kd	6.6	8.5	5.2	7.2
G蛋白γ	9 Kd	4.4	11.1	3.4	6.7

【０１１９】

多くの重要な事象が、ホルミルペプチドに係るレセプターを保持する細胞の刺激中に起こる。これらは以下のことを含む：

Ａ．ＦＭＬＰまたは他の類縁物質を結合する際、ＦＰＲは、ＬＴＢ４およびＣ５ａレセプターなどの他の化学誘引物質レセプター類に共通するＧ蛋白プールと相互作用する（Ｊａｃｏｂｓ他、Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．５７：６７９－６８６，１９９５；ＭｃＬｅｉｓｈ他、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍ．３６：３８４－３９０）。

【０１２０】
Ｂ．ＦＭＬＰまたは他の化学誘引物質による刺激後、細胞は、同一または他の化学誘引物質に対し、さらなるまたは引き続く応答に対して御しにくくなる。この御しにくい状態すなわちレセプターの不活化が、１種の刺激剤により誘導され、複数の未結合レセプターに影響をあたえる場合、この状態は異種の脱感作である。脱感作のこの形態は、ＦＣεＲレセプターとのように、下流活性化キナーゼによる未結合レセプター類のリン酸化から生じ得ると推測されている。
【０１２１】
Ｃ．ＩＬ－８、Ｃ５ａおよびＦＭＬＰは、各々他のレセプターを脱感作した。これらの研究は、ＰＡＦおよびＬＴＢ４レセプター類などに拡張された。この過程が開始され得るメカニズムは、ＰＫＣによるレセプターリン酸化に関与していると思われる。しかしながら、ＦＰＲは、ＰＫＣによりリン酸化できる細胞内ドメインを含まないが、他のキナーゼが原因となっているようである。
【０１２２】
Ｄ．下流ＦＰＲ応答の脱感作は、ＦＰＲリン酸化の欠いた状態に生じる。
【０１２３】
ＨＫ－Ｘ単独処理は、キナーゼ類を特異的にダウンレギュレーションをしない。ＨＫ－ＸおよびＩＬ－８による、またはＨＫ－ＸおよびＦＭＬＰによる単核細胞の同時刺激後、選択的かつ有意にＧ蛋白γキナーゼは減少した。これらの観察は、次のＨＫ－Ｘの作用メカニズムを示唆するが、それを以下に説明する。
【０１２４】
ＨＫ－ＸおよびＩＬ－８およびＦＭＬＰなどの潜在的な炎症誘発性分子は、共に存在できる。トリマーＧ蛋白複合体の中の１種のダウンレギュレーションがある。特異的に、Ｇ蛋白γリン酸化は定常状態下で減少した。したがって、ＩＬ－８またはＦＭＬＰ存在下、ＨＫ－Ｘは、Ｇ蛋白γサブユニットのリン酸化を直接または間接的に阻害するレセプターの脱感作を開始すると思われる。
【０１２５】
本明細書に提示されたデータおよび以前に報告のデータから引き出すことができる多くの結論があるがそれらは以下のことである。
【０１２６】
１．ＨＫ－Ｘは、特異的炎症誘発性レセプター類により媒介される炎症誘発性刺激に対応できる細胞特異性を明示する。
【０１２７】
２．ＨＫ－Ｘが炎症事象中、系に維持される場合、ＨＫ－Ｘは、潜在的な応答細胞の脱感作を維持するはずである。
【０１２８】
３．本報告書に記載されるｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養系を用いると、他の細胞標的および他の炎症誘発性媒介物質を、ＨＫ－Ｘの作用に対する感受性に関してスクリーンできる。したがって、簡便なアッセイが、潜在的治療の有効性に関して迅速にスクリーンするために、および治療予測性を確立するために使用できる。
【０１２９】
ある程度、ＨＫ－Ｘは、炎症誘発性媒介物レセプターの脱感作を介して治療有効性を実現すると思われる。この事象から下流で、炎症細胞の不活化がＧ蛋白γサブユニットのリン酸化阻害を介して直接または間接的に媒介され維持される。
【０１３０】
本発明を、その好ましい実施形態を含んで詳細に記載した。しかしながら、当業者は、請求項に記載された本発明の意図と範囲内で変更または改善し得ることを理解されるであろう。
【図面の簡単な説明】
【図１】ヒト末梢血有核細胞に対するＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘ（ｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈ

ｅ－Ｐｈｅ）の結合を示すグラフである。
【図２Ａ】活性化リンパ球に対するＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘ結合の点プロットである。図２Ａは、１００ｎＭＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘを添加して、培養２４時間後の６μｇのコンカナバリンＡ（ＣｏｎＡ）で刺激化されたリンパ球を示す。図２Ｂは、ＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘなしで、培養１２０時間後の６μｇＣｏｎＡで刺激化されたリンパ球を示す。図２Ｃは、１００ｎＭＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘを添加して、培養１２０時間後の６μｇＣｏｎＡで刺激化されたリンパ球を示す。
【図２Ｂ】活性化リンパ球に対するＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘ結合の点プロットである。図２Ａは、１００ｎＭＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘを添加して、培養２４時間後の６μｇのコンカナバリンＡ（ＣｏｎＡ）で刺激化されたリンパ球を示す。図２Ｂは、ＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘなしで、培養１２０時間後の６μｇＣｏｎＡで刺激化されたリンパ球を示す。図２Ｃは、１００ｎＭＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘを添加して、培養１２０時間後の６μｇＣｏｎＡで刺激化されたリンパ球を示す。
【図２Ｃ】活性化リンパ球に対するＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘ結合の点プロットである。図２Ａは、１００ｎＭＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘを添加して、培養２４時間後の６μｇのコンカナバリンＡ（ＣｏｎＡ）で刺激化されたリンパ球を示す。図２Ｂは、ＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘなしで、培養１２０時間後の６μｇＣｏｎＡで刺激化されたリンパ球を示す。図２Ｃは、１００ｎＭＦＩＴＣ標識ＨＫ－Ｘを添加して、培養１２０時間後の６μｇＣｏｎＡで刺激化されたリンパ球を示す。
【図３Ａ】図２Ａ～図２Ｃのリンパ球のＤＮＡ含量ヒストグラムである。図３Ａは、図２Ａの細胞のヒストグラムである。図３Ｂは、図２Ｂと図２Ｃの細胞のヒストグラムである。
【図３Ｂ】図２Ａ～図２Ｃのリンパ球のＤＮＡ含量ヒストグラムである。図３Ａは、図２Ａの細胞のヒストグラムである。図３Ｂは、図２Ｂと図２Ｃの細胞のヒストグラムである。
【図４】全ヒト好中球ライゼートから回収された^{35}Ｓ－メチオニン標識化蛋白質と種々の樹脂とのオートラジオグラフである。
【図５Ａ】媒体で（０．３％ＤＭＳＯ）で処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図５Ａは、正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図５Ｂは、媒体（ＤＭＳＯ）のみで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。
【図５Ｂ】媒体で（０．３％ＤＭＳＯ）で処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図５Ａは、正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図５Ｂは、媒体（ＤＭＳＯ）のみで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。
【図６Ａ】ＨＫ－Ｘで処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図６Ａは、ＨＫ－Ｘ処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図６Ｂは、ＨＫ－Ｘのみで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。
【図６Ｂ】ＨＫ－Ｘで処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図６Ａは、ＨＫ－Ｘ処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図６Ｂは、ＨＫ－Ｘのみで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。
【図７Ａ】ＩＬ－８で処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図７ＡはＩＬ－８処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図７Ｂは、ＩＬ－８のみで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。
【図７Ｂ】ＩＬ－８で処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図７ＡはＩＬ－８処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図７Ｂは、ＩＬ－８のみで処理した正常細胞

のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。
【図８Ａ】ＨＫ－ＸおよびＩＬ－Ａで処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図８Ａは、ＨＫ－ＸおよびＩＬ－Ａ処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図８Ｂは、ＨＫ－ＸおよびＩＬ－８で処理したで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。
【図８Ｂ】ＨＫ－ＸおよびＩＬ－Ａで処理した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図８Ａは、ＨＫ－ＸおよびＩＬ－Ａ処理細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図８Ｂは、ＨＫ－ＸおよびＩＬ－８で処理したで処理した正常細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥの写真である。
【図９Ａ】末梢血から新たに採取した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図９Ａは、新たに採取した細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図９Ｂは、新たに採取した細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。
【図９Ｂ】末梢血から新たに採取した単核細胞内のリン酸化蛋白質の存在を、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体によって検出したものを示す。図９Ａは、新たに採取した細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメトリーであり、図９Ｂは、新たに採取した細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。

【図１】

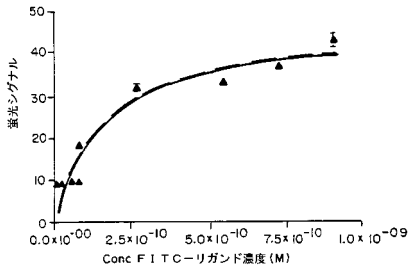


FIG.1

【図２Ａ】

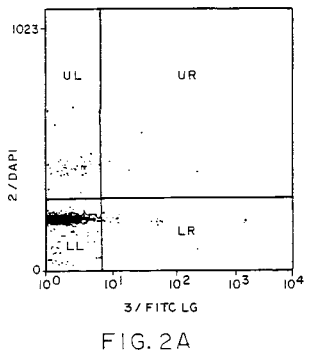


FIG.2A

【図２Ｂ】

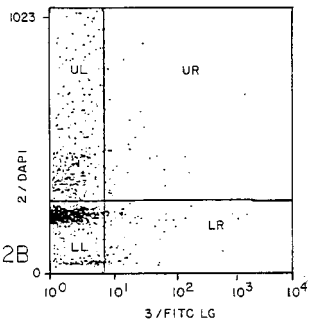


FIG.2B

【図２Ｃ】

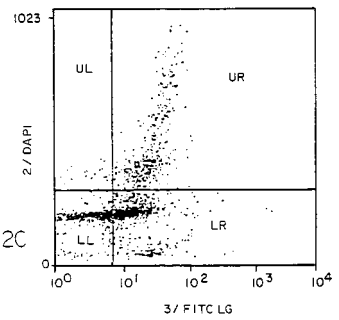


FIG.2C

【図３Ａ】

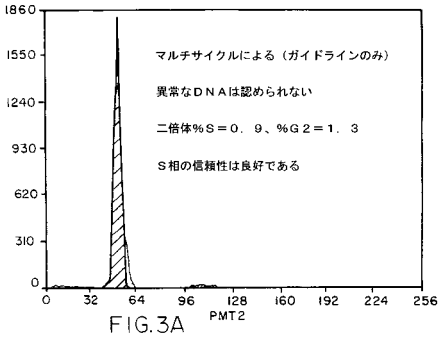


FIG.3A

【図３Ｂ】

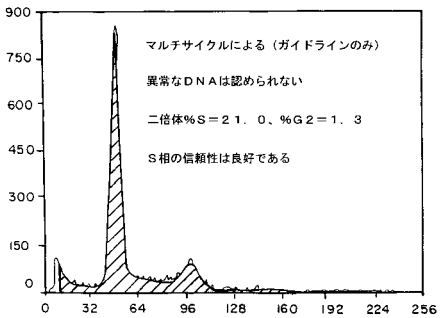


FIG.3B

【図４】

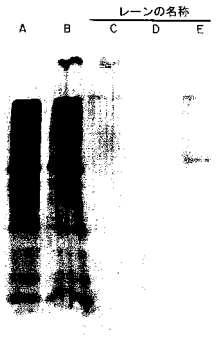


FIG.4

【図５Ａ】

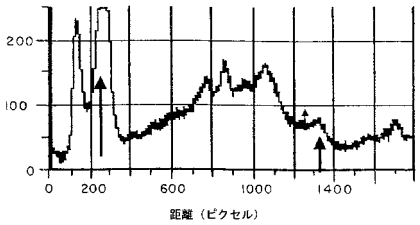


FIG. 5A

【図５Ｂ】



FIG. 5B

【図６Ａ】

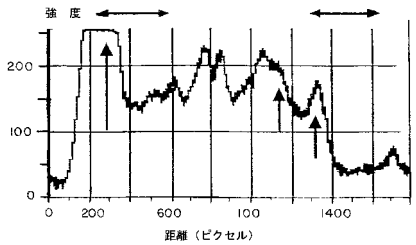


FIG.6A

【図６Ｂ】

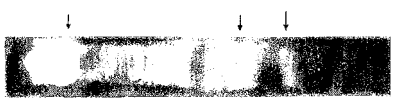


FIG 6B

【図７Ａ】

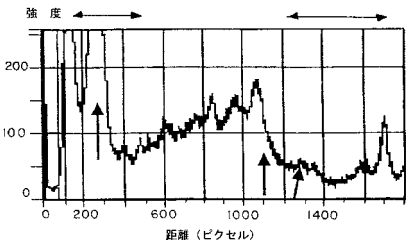


FIG. 7A

【図７Ｂ】

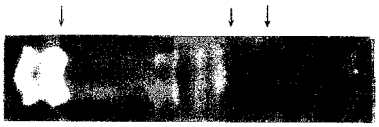


FIG. 7B

【図８Ａ】

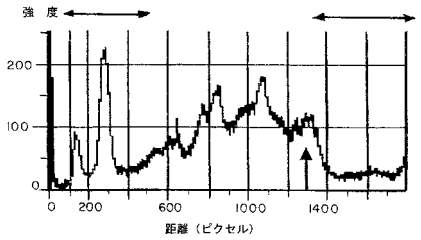


FIG. 8A

【図８Ｂ】



FIG. 8B

【図９Ａ】

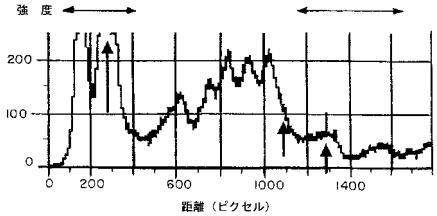


FIG. 9A

【図９Ｂ】



FIG. 9B

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
26 April 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/29069 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/00, G01N 33/53

(21) International Application Number: PCT/US00/28183

(22) International Filing Date: 12 October 2000 (12.10.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/159,677 15 October 1999 (15.10.1999) US

(71) Applicant: **HISTATEK, LLC** [US/US]; 37 St. Germain Avenue, San Francisco, CA 94114 (US).

(72) Inventors: **CLAGETT, James, A.**; 5615 139th Avenue, S.E., Snohomish, WA 98290 (US). **PALMER, Craig**; 37 St. Germain Avenue, San Francisco, CA 94114 (US).

(74) Agents: **NEUNER, George, W.** et al.; Dike, Bronstein, Roberts & Cushman, Intellectual Property Practice Group, Edwards & Angell, LLP, 130 Water Street, Boston, MA 02109 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *With international search report.*
— *Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/29069 A1

(54) Title: N-FORMYL PEPTIDE RECEPTOR COMPLEX WITH A G-PROTEIN KINASE SIGNAL PATHWAY MODIFICATION AGENT

(57) Abstract: A method of inhibiting a pro-inflammatory response of a human peripheral blood mononuclear cell or polymorphonuclear cell, or fixed tissue cell is described. The cell is contacted with a pro-inflammatory agent to stimulate a pro-inflammatory response. Then, the cell is contacted with a G protein kinase signal pathway modification agent, thereby inhibiting inflammatory response signal transduction pathways mediated by G protein. A receptor complex is described wherein a G protein kinase signal pathway modification agent binds to a cell surface receptor of a human peripheral blood mononuclear cell or polymorphonuclear cell that has been stimulated by a pro-inflammatory agent.

N-FORMYL PEPTIDE RECEPTOR COMPLEX WITH G-PROTEIN KINASE SIGNAL PATHWAY MODIFICATION AGENT

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to N-formyl peptide receptors, which are found on the surfaces of peripheral blood cells, and particularly to complexes of such receptors with agents that alter or disrupt the G-protein signal pathways, particularly certain N-formyl peptides, and to methods for altering signal transduction due to co-stimulation by pro-inflammatory agents.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The human body has evolved to develop defense mechanisms to bacterial infections by using bacterially-generated N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for phagocytes, in particular, neutrophils and monocytes. Of the N-formyl peptides, f-Met-Leu-Phe (FMLP) was identified as the most potent in its ability to recruit phagocytes and to stimulate release of lysosomal enzymes by neutrophils (Showell et al., *J. Exp. Med.* 143:1154-1169, 1976). Synthetic tetrapeptides, particularly f-Met-Ile-Phe-Leu and f-Met-Leu-Phe-Ile, have also subsequently been shown to evoke neutrophil responses (Rot et al., *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 84:7967-7971, 1987). The potency of these peptides were initially ascribed to: (1) a formyl group at the N-terminus, (2) a methionine side chain, and (3) leucine and phenylalanine side chains.

Cloning of the N-formyl peptide receptor (FRP) cDNA followed by the delineation of the primary structure of the FPR protein provided a major breakthrough in understanding the mechanism of action of N-formyl peptides (Boulay et al., *Biochemistry* 29: 11123-11133, 1990; Boulay et al., *Biochem.*

*Biophys. Res. Commun.*168: 1103-1109, 1990). FPR was initially found on neutrophils and monocytes but have subsequently been shown to be expressed in the human brain, hepatocytes, dendritic cells, and astrocytes (Lacy et al., *J. Neuroimmunol.* 61: 71-78, 1995; Sozzani et al., *J. Immunol.* 155: 3292-3295, 1995). Two other FPR genes were later isolated, FPR2 (also known as FPRL1 and FPRH1) (Bao et al., *Genomics* 13: 437-440, 1992; Murphy et al., *J. Biol. Chem.* 267: 7637-7643, 1992; Ye et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 582-589, 1992) and FPRL2 (Bao et al., *supra*). FPRL1 consists of 351 amino acids and shares 70% identity with FPR but was found to have a 400-fold lower affinity to FMLP (K_d=1nM) than the original FPR. FPRL2 shares 56% identity with FPR and 83% identity with FPRL1. However, unlike FPRL1, which is expressed in both monocytes and neutrophils, FPRL2 was found to be expressed in monocytes but not in neutrophils (Durstin et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 174-179, 1994).

The FPR contains seven hydrophobic domains spanning the plasma membrane, connected by hydrophilic sequences exposed to either the extracellular space or the intracellular space (Murphy, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 593-633, 1994). The first and third intracellular loops are relatively small, consisting of 5 and 16 amino acids, respectively. The carboxy terminal is exposed to the intracellular space, while the N-terminal is exposed to the extracellular space. The intracellular sequences further contain a G-protein-coupling domain (a domain essential for function of the receptor as discussed below) and a potential phosphorylation domain.

The FMLP binding domain appears to be located in the first and third extracellular domains of FPR (Quehenberger et al., *J. Biol. Chem.* 268: 18167-18175, 1993). In addition, there have been suggestions of interconvertible states of FPR, alternating between high-affinity binding and low-affinity binding states for FMLP binding (Kermode et al., *Biochem. J.* 276: 715-723, 1991). The G-protein is thought to regulate such interconvertible states. FPR alone, without association with the G-protein, represents a low-affinity state, whereas FPR bound to the G-protein exhibits a high affinity binding state. The model

further dissects the G-protein-bound FPR into three different states that account for the different potencies observed by different peptides. State I represents the low affinity binding state in which FPR is not associated with the G-protein but can be converted to the high affinity state of State II upon binding to the G-protein. State III is a high affinity intermediate step in which the receptor binds the ligand, while releasing the G_α subunit of the G-protein. State IV is a transient, low affinity state, in which the remaining G-protein subunits (G_β and G_γ) disassociate from the receptor. The disassociation of the G-protein subunit G_α leads to the effector functions of the G-protein, causing cellular activation. A similar model was proposed by Sklar et al. (*J. Biol. Chem.* 264: 8483-8486, 1989).

According to the above model, potency of a peptide is determined by the residence time at State III (Kermode et al., *supra*). The authors propose that most potent formyl peptides such as fMet-Leu-Phe-Phe and fMet-Leu-Phe-NHBzl temporarily stabilize and maintain State III, which triggers an immediate degranulation response but the duration at State III allows for a sustained signal for chemotactic responses, allowing maximal migration. Less potent formyl peptides mediate a rapid conversion from the high affinity State III to the low affinity State IV. Although the initial degranulation response at State III is unaffected, the chemotactic signaling ability is minimized and thus cellular migration is limited. Therefore, in general, a highly potent ligand can be said to effect chemotactic responses by binding to the high affinity state of FPR, while a less potent ligand effects the degranulation response by binding to the low affinity state of FPR.

Agonist activity and antagonistic activity can also be defined using this model. An agonist stabilizes the activated receptor State III and the degree of stabilization is reflected in its potency. An antagonist, on the other hand, binds to the receptor but destabilizes the activated State III and inactivates the receptor. Such a model is not limited to FPR.

Furthermore, desensitization is said to occur when a ligand binds to the receptor and the same or different receptor becomes refractory to subsequent stimulation by the same or different ligand. This desensitized state can form after receptor occupancy in the normal course of cell activation, resulting in destabilization of State III, or prior to receptor occupancy, in which State III is never achieved. When the refractory state or receptor inactivation is induced by one stimulant and affects multiple nonliganded receptors, this situation is called heterologous desensitization.

The most well-studied N-formyl peptide is f-Met-Leu-Phe (FMLP or fMLP). However, more potent peptides have been characterized with receptors on rabbit neutrophils *in vitro*, in particular, fMet-Leu-Phe-Phe, fMet-Leu-Phe-NHBzl (fMet-Leu-Phe benzylamide), and fNle-Leu-Phe-Tyr (N-formyl-L-norleucyl-Leu-Phe-Tyr) (Kermode et al., *supra*). These show both maximal migration (on the order of 20-35 μm) and degranulation (on the order of ED_{50} of 10^{-10} to 10^{-11}). More recent studies suggest that nonformylated peptides may also bind to FPR and can act as potent activators of neutrophil function. For example, Met-Met-Trp-Leu-Leu is a potent pentapeptide and is comparable in activity to FMLP (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 270: 23398-23401, 1995). Conversion of the pentapeptide to an N-formylated form boosted its potency 100-500 fold, demonstrating that N-formylation still plays a significant role in the potency of a peptide, although bioactivity does not appear to be strictly determined by N-formylation.

Other modifications to peptides have shown that some peptides can be converted to potent agonists for FPR (Derian et al., *Biochemistry* 35: 1265-1269, 1996; Higgins et al., *J. Med. Chem.* 39: 1013-1017, 1996). Such modifications include urea substitution of the amino terminal group and carbamate modifications. Furthermore, alteration of amino acid composition of the MLF peptide has been shown to also convert agonists to antagonists of FPR, as determined by superoxide anion release and neutrophil adhesion to vascular endothelium.

Chemotaxis stimulated by N-formyl peptides via FPR in neutrophils has been well- studied. Even prior to stimulation by N-formyl peptides, neutrophils transiently bind to P-selectin expressed on endothelial cells. Activation of neutrophils mediated by N-formyl peptides generated at the site of inflammation lead to neutrophil accumulation at this site. N-formyl peptides upregulate L-selectin on neutrophils and direct rolling of neutrophils along the endothelium, followed by upregulation of integrins on the surface of neutrophils. Integrins mediate cell-cell and cell-extracellular matrix interactions and bind to laminin, fibronectin, victronectin, as well as to ICAM (intracellular cell adhesion molecule) and VCAM (vascular cell adhesion molecule) found on the endothelium. Upon binding of the integrins to ICAM and VCAM, a signal is transduced to the interior of the neutrophil through interactions with the cytoskeleton. Neutrophils then shed L-selectin and begin to spread along the endothelium. Upregulation of E-selectin and ICAM-1 on the surface of endothelial cells then mediate the migration of neutrophils across the endothelium (Luscinskas et al., *J. Immunol.* 146: 1617-1625, 1991). Upon crossing the endothelial barrier, neutrophils migrate toward the site of inflammation by sensing a concentration gradient of the N-formyl peptide. Upon reaching their destination, which contains a high concentration of the peptide, neutrophils unleash their anti-microbial actions.

Stimulated neutrophils rapidly activate respiratory burst oxidase, which catalyzes the generation of the superoxide radical O_2^-. The superoxide radical reacts with other molecules to produce hydrogen peroxides and hypochlorous acid, both of which are highly reactive agents and are therefore effective in interfering with microbial functions. Degranulation is also an effective means for destroying foreign microbes. However, degranulation can also damage host tissue. Phagocytosis is another mechanism by which neutrophils eliminate foreign microbes. Many of these functions are stimulated via the G-protein, using phospholipases as second messengers, three of which have been characterized.

The phospholipase C, $PLC_{\beta 2}$, generates two second messengers, 1,4,5-ionsitol triphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DG). The $\beta\gamma$ subunits of the G-protein generated during activation of the FPR activate $PLC_{\beta 2}$. IP_3 binds to certain calcium channels to stimulate the release of calcium from intracellular storage, resulting in an increase in the cytosolic concentration of calcium that is observed during stimulation by chemoattractants. DG, in concert with released calcium, activates protein kinase C (PKC). G-protein activated PLC kinase has recently been reported in the literature (Beaven, et al, *J.of Immunology* 160:5136-5144, 1998) as a major pathway for mast cell degranulation in rat peritoneal cells in vitro, associated with Ca^{2+} increases.

Phospholipase A_2 (PLA_2) generates arachidonic acid from the phospholipids of the inner face of the plasma membrane. Arachidonic acid provides the precursors for the inflammatory mediators such as leukotrienes and prostaglandins. PLA_2 is activated upon phosphorylation by the mitogen-activated protein (MAP) kinase.

The third phospholipase is phospholipase D (PLD), which generates phosphatidic acid and choline from phosphatidylcholine. Phosphatidic acid may be involved in activation of respiratory burst oxidase in addition to playing a role in the production of DG, which activates PKC. However, activation of PLD requires calcium, and FMLP cannot stimulate PLD in calcium-depleted cells (Kessels et al., *J. Biol. Chem.* 266: 23152-23156, 1991). In addition, it appears that the G-protein Arf and G-protein Rho regulate PLD activity (Brown et al., *Cell* 75: 1137-1144, 1993; Cockcroft et al., *Science* 263: 523-526, 1994; Singer et al., *J. Biol. Chem.* 270: 14944-14950, 1995).

Protein phosphorylation plays a central role in signal transduction initiated by FMLP. Three major protein kinases are involved in the phosphorylation of proteins as a result of FMLP stimulation.

As discussed above, PKC is activated by DG, which is generated by PLC. PKC act to phosphorylate serine and threonine residues. PKC consists of six

different isoforms, three of which are sensitive to intracellular calcium (α, β, and γ forms) and three that are not (δ, ε, and ζ forms). Neutrophils contain the α, β, and ζ forms but not the γ form. The calcium-dependent and DG-dependent PKC (PKC-β) responds to FMLP and phorbol ester stimulation by translocating from the cytosol to the membrane. It then phosphorylates a number of cytosolic proteins, such as those involved in the respiratory burst oxidase system. FMLP can also activate the calcium-independent, DG-dependent and phosphatidyl serine-dependent PKC form but their function is unclear.

The MAP kinase (MAPK) reportedly is activated by the βγ subunits of the G-proteins by the activities of Ras and Raf. Recent literature suggests the involvement of high-intensity Ras signaling in inducing apoptosis (Bar-Sagi, et al, *J. Mol. Cell Biol.* 19(9):5892-901, 1999) as well as in promoting endothelial cell adherence (Finkel, et al, ...). Raf is now posited with a central role in growth signals, including cell survival, growth and differentiation (Rapp, et al, ...). This kinase pathway is also stimulated by C5a and IL-8 (Buhl et al., *J. Biol. Chem.* 270: 19828-19832, 1995; Knall et al., *J. Biol. Chem.* 271: 2832-2838, 1996). MAP kinase induces tyrosine phosphorylation of several regulatory proteins, such as the extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1. Recent literature suggests that MAPK pathways are responsible for cytokine production; however, the activation of both TH-1 and TH-2 cytokines, as well as other pro-inflammatory molecules, such as C5a, IL-8 and FMLP, is dependent upon the trimeric G-protein signal transduction.

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is responsible for the formation of PI triphosphate (PIP_3) that is observed upon stimulation by FMLP. Elevated PIP_3 levels apparently contribute to the activation of the respiratory burst oxidase system and to actin polymerization in neutrophils, which is considered important in regulating cytoskeletal changes and cell migration. Recent literature (Rankin, et al, *J. Exp. Med.* 188(9):1621-32, 1998) has reported that elevated PI3 kinase levels also can promote degranulation of eosinophils, based upon G-protein signaling based activation of IL-5. Further, Sagi-Eisenberg, et

al, *Eur.J.Immunol*, 1998.28: 3468-3478 suggest that G-protein signaling, using the intermediate pathways of PKC and PI3 kinases, may activate the FCεR receptor by IgE for the release of histamines and other pro-inflammatory cytokines involved in allergic airway hypersensitivity. Uckun, et al, *J.of Biolog. Chemistry*, Vol.274, No.38, Sep., 1999, pp.27028-27038 reports G-protein signaling in the JAK3 kinase pathway, through IgE/FCεR1 cross-linking, as leading to mast cell degranulation. Beaven, et al, *J. of Immunology*, 1998, 160: 5136-5144 report that G-protein signaling, through the activation of PKC and resulting uptake in Ca2+, also leads to secretion and degranulation of mast cells. Thus, G-protein may be essential for the down-stream activation of the FCεR1 upon IgE antigen challenge, and the corresponding ability to interfere with G-protein signaling, can be an important basis for down-stream inhibition of the activation of the FCεR receptor.

Several antagonists of rabbit neutrophil FPR have been identified but features that make certain molecules antagonists are still unclear. Certain butoxycarbonyl analogs of FMLP have been shown to competitively inhibit chemotactic peptide-induced cell activation, of which BocPLPLP was found to be the most potent (Schiffman et al., *FEBS Lett.* 117: 1, 1980; Freer et al., *Biochemistry* 19: 2404, 1980; Kanaho et al., *J. Leukocyte Biol.* 47: 420, 1990). Cyclosporin H, a cyclic undecapeptide and an analogue of cyclosporin A, has also been shown to possess antagonist activity to the formyl peptide receptor (Wenzel-Seifert et al., *J. Immunol.* 150: 4591-4599, 1993). A naturally occurring formyl peptide receptor antagonist has also been identified, a retrovirus-derived hexapeptide (Oostendorp et al., *J. Immunol.* 149: 1010, 1992). However, none of these antagonists bind to the formyl peptide receptors with high affinity and are therefore not of practical use as investigative tools or as anti-inflammatory drugs.

Interestingly, inhibition of mast cell degranulation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine was reported in *Inflammation*, Vol. 5, No. 1, pp. 13-16 (1981). There, it was reported that two structurally different chemotactic peptides, i.e., pepstatin and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, inhibit

the increase in vascular permeability in rat skin produced by intradermal injection of 40/80, anti-rat IgE serum, or macromolecular anionic permeability factor isolated from calf lung. It was reported that these peptides appear to act directly on the mast cells. The mechanism of such inhibition is unclear because FPR has not been reported to be expressed on mast cells.

Clearly, there are many unanswered questions regarding the function and mechanism of action of FPR. Furthermore, the finding that FPR is expressed in nonleukocytic cells, such as in the brain and dendritic cells, suggests that FPR may perform novel functions in other cell types that have yet to be elucidated. Thus, additional agents for inhibiting pro-inflammatory response of cells are needed as well as methods for studying the pro-inflammatory response of cells.

SUMMARY OF THE INVENTION

It has now been discovered that treatment of human peripheral blood mononuclear cells or polymorphonuclear cells, or fixed tissue cells with a G-protein kinase signal pathway modification agent after stimulation of such cells with a pro-inflammatory agent inhibits the conventional pro-inflammatory response, particularly down-stream pro-inflammatory responses induced by pro-inflammatory agents such as, for example, C5a, FMLP, IL-4, IL-6, IL-8, Il-10, IL-13 and TNFα or by the FCε receptor. The alteration of the cellular production of G-protein inhibits inflammatory response signal transduction pathways mediated by G protein. Particularly useful G -protein kinase signal pathway modification agents are N-formyl-methionyl-leucyl ("f-Met-Leu") peptides having the formula f-Met-Leu X where X is selected from the group consisting of Tyr, Tyr-Phe, Phe-Phe and Phe-Tyr, most preferably f-Met-Leu-Phe-Phe.

The human peripheral blood mononuclear or polymorphonuclear cells or fixed tissue cells can be lymphocytes and granulocytes, preferably, eosinophils, basophils, and activated T-cells, and mast cells.

The G-protein kinase signal pathway modification agent forms a complex with a cell surface receptor, preferably the formyl peptide receptor ("FPR"), that is present on these cells that, in the presence of pro-inflammatory agents, inhibits phosphorylation of the G-protein subunit γ in preferred embodiments of the present invention. Further, by inhibiting or blocking the down-stream phosphorylation of the G-protein, various pathways dependent upon the trimeric G-protein components block or down-regulate the response of the cell to the pro-inflammatory agents.

In a preferred embodiment of the invention, at the level of the FCε receptor (FCεR), this G-protein kinase signal pathway modification agent, in the presence of IgE, inhibits the activation of the FCεR by IgE.

In accord with the present invention, the pro-inflammatory agents used to stimulate the human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells, or fixed tissue cells preferably are cytokines, chemotaxins, or mitogens. Especially preferred pro-inflammatory agents are N-formyl peptides such as FMLP, activated complement fragment (C5a), leukotriene B4 (LTB4), platelet activating factor (PAF), and cytokines such as TNFα, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-13, plus antigen cross-linked IgE, IgG or IgA.

In another embodiment of the present invention, a method for inhibiting a pro-inflammatory response of a human peripheral blood mononuclear or polymorphonuclear cell is provided, the method comprising contacting the cell with a G- protein kinase signal pathway modification agent, and binding of the agent to a receptor on the cell. The pro-inflammatory mediating cell can be a lymphocyte or a granulocyte. Preferably, the cell is first stimulated by a pro-inflammatory agent such as set forth above.

In a preferred embodiment of the invention, the ligand-bound receptor is a formyl peptide receptor. The down-stream blocking of G-protein activation of the FCεR receptor provides a similar therapeutic benefit.

The present invention further provides a method for identifying a G protein kinase signal pathway modification agent, the method comprising the steps of:

a) contacting a pro-inflammatory mediating cell selected from the group consisting of activated T-lymphocyte, mast cell, eosinophil and basophil with a known pro-inflammatory mediator selected from the group consisting of a cytokine, chemotaxin, and mitogen and eliciting a pro-inflammatory response;

b) adding to step a) a candidate G- protein signal pathway modification agent; and

c) detecting a decrease in amount of a G protein kinase or failure of the G protein kinase to disassociate in (i) a pro-inflammatory cell simultaneously contacted with said candidate agent and said pro-inflammatory mediator compared to (ii) a pro-inflammatory cell contacted with said pro-inflammatory mediator alone.

A preferred G protein kinase is the G protein γ kinase.

In another embodiment of the present invention, a receptor complexed with a G-protein kinase signal pathway modification agent is provided on the surface of a pro-inflammatory mediating cell selected from the group consisting of activated T-lymphocyte, mast cell, eosinophil and basophil by contacting the pro-inflammatory mediating cell with the G-protein kinase signal pathway modification agent, thereby inhibiting a pro-inflammatory response.

In a further embodiment of the invention, a method for identifying a G protein kinase signal pathway modification agent comprises the steps of:

contacting a pro-inflammatory mediating cell selected from the group consisting of activated T-lymphocyte, mast cell, eosinophil and basophil with a candidate G- protein signal pathway modification agent; and

determining the distribution of protein kinases produced by said cell,

wherein compared to cells not contacted by the candidate G- protein signal pathway modification agent there is no change in the amount of PLC_{γ},

Pp60 Src, and ERK-1, there is an increase in the amount of PI3 (102 Kd) and PI3 (83 Kd), and there is a decrease in the amount of Raf, Ras, G-protein α and G-protein β kinases.

Thus, the present invention also provides a new receptor complex of a human peripheral blood mononuclear cell or a polymorphonuclear cell comprising a cell surface receptor and a G- protein signal pathway modification agent wherein, compared to cells not exhibiting said receptor complex, the distribution of protein kinases in the cells is such that there is no change in the amount of PLC_{γ}, Pp60 Src, and ERK-1, there is an increase in the amount of PI3 (102 Kd) and PI3 (83 Kd), and there is a decrease in the amount of Raf, Ras, G-protein α and G-protein β kinases. Preferably, the cell surface receptor is a FPR receptor. Secondary blocking of G-protein activation of the FCεR receptor is also preferred.

Stimulation by IL-4 of a human peripheral blood mononuclear cell or a polymorphonuclear cell having a cell surface receptor complexed with a G-protein signal pathway modification agent provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of PLC_{γ}, PI3 (102 Kd) and PI3 (83 Kd), and a decrease in the amount of Ras and G-protein γ kinases.

Stimulation by IL-6 of a human peripheral blood mononuclear cell or a polymorphonuclear cell having a cell surface receptor complexed with a G-protein signal pathway modification agent provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of PLC_{γ}, PI3 (102 Kd), Raf, Pp60 Src, ERK-1 and G-protein α, and a decrease in the amount of PI3 (83 Kd), G-protein β and G-protein γ kinases.

Stimulation by IL-10 of a human peripheral blood mononuclear cell or a polymorphonuclear cell having a cell surface receptor complexed with a G-

protein signal pathway modification agent provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of PI3 (102 Kd), ERK-1 and G-protein γ, and a decrease in the amount of PLC_{γ}, PI3 (83 Kd), Ras and kinases.

Stimulation by the pro-inflammatory agent, IL-13, of a human peripheral blood mononuclear cell or a polymorphonuclear cell having a cell surface receptor complexed with a G- protein signal pathway modification agent provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of PLC_{γ}, PI3 (102 Kd), PI3 (83 Kd), ERK-1 and Raf, and a decrease in the amount of Ras, Pp60 Src, G-protein α, G-protein β and G-protein γ kinases.

Stimulation by the pro-inflammatory agent, C5a, of a human peripheral blood mononuclear cell or a polymorphonuclear cell having a cell surface receptor complexed with a G- protein signal pathway modification agent provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of Pp60 Src and Raf, and a decrease in the amount of PLC_{γ}, PI3 (102 Kd), G-protein α, G-protein β and G-protein γ kinases.

Stimulation by the pro-inflammatory agent, TNFα, of a human peripheral blood mononuclear cell or a polymorphonuclear cell having a cell surface receptor complexed with a G- protein signal pathway modification agent provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of Raf, Ras, and Pp60 Src, and a decrease in the amount of PLC_{γ}, PI3 (83 Kd) G-protein α, G-protein β and G-protein γ kinases.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

FIG. 1 is a graph showing binding of FITC-labeled HK-X (f-Met-Leu-Phe-Phe) to human peripheral blood nucleated cells.

FIG. 2A- FIG. 2C are dot plots of FITC-labeled HK-X binding to activated lymphocytes. FIG. 2A shows lymphocytes stimulated with 6 μg Concanavalin A (ConA) at 24 hours after placed in culture in addition with 100nM FITC-labeled HK-X; FIG. 2B shows lymphocytes stimulated with 6 μg ConA at 120 hours after placed in culture but with no FITC-labeled HK-X; and FIG. 2C shows lymphocytes stimulated with 6 μg ConA at 120 hours after placed in culture in addition with 100nM FITC-labeled HK-X.

FIG. 3A- FIG. 3B are histograms of the DNA content of lymphocytes from FIG. 2 A-C. FIG. 3A is a histogram of cells from FIG. 2A and FIG. 3B is a histogram of cells from FIG. 2B and FIG. 2C.

FIG. 4 is an autoradiograph of ^{35}S-methionyl labeled proteins recovered from whole human neutrophil cell lysates and various resins.

FIG. 5A- FIG. 5B show the presence of phosphorylated proteins in mononuclear cells treated with vehicle (0.3% DMSO) as detected by monoclonal antibodies to phosphotyrosine. FIG. 5A is a densitometry of SDS-PAGE of normal cells and FIG. 5B is a photograph of the SDS-PAGE gel of normal cells treated with vehicle (DMSO) only.

FIG. 6A- FIG. 6B show the presence of phosphorylated proteins in mononuclear cells treated with HK-X as detected by monoclonal antibodies to phosphotyrosine. FIG. 6A is a densitometry of SDS-PAGE of HK-X treated cells and FIG. 6B is a photograph of the SDS-PAGE of normal cells treated with HK-X only.

FIG. 7A- FIG. 7B show the presence of phosphorylated proteins in mononuclear cells treated with IL-8 as detected by monoclonal antibodies to

phosphotyrosine. FIG. 7A is a densitometry of SDS-PAGE of IL-8 treated cells and FIG. 7B is a photograph of the SDS-PAGE of normal cells treated with IL-8 only.

FIG. 8A- FIG. 8B show the presence of phosphorylated proteins in mononuclear cells treated with HK-X and IL-8 as detected by monoclonal antibodies to phosphotyrosine. FIG. 8A is a densitometry of SDS-PAGE of HK-X and IL-8 treated cells and FIG. 8B is a photograph of the SDS-PAGE of normal cells treated with HK-X and IL-8.

FIG. 9A- FIG. 9B show the presence of phosphorylated proteins in mononuclear cells freshly collected from peripheral blood as detected by monoclonal antibodies to phosphotyrosine. FIG. 9A is a densitometry of SDS-PAGE of freshly collected cells and FIG. 9B is a photograph of the SDS-PAGE gel of freshly collected cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In accord with the present invention, G-protein kinase signal pathway modification agents have been found to inactivate certain pro-inflammatory responses of human peripheral blood cells that have been stimulated by pro-inflammatory agents or molecules.

Preferred G-protein kinase signal pathway modification agents, in accord with the present invention, can bind to receptors found on pro-inflammatory mediating cells such as lymphocytes, particularly activated T-cells, granulocytes such as eosinophils, basophils, and fixed tissue cells such as mast cells.

Upon binding of the G protein kinase signal pathway modification agent to its receptor, pro-inflammatory responses are inhibited. In accord with the preferred embodiments of the present invention, the G-protein subunits α, β, and γ are modified and also phosphorylation of these subunits is inhibited.

Pro-inflammatory responses that can be inhibited by the agent-receptor complex are secretion, degranulation and migration of the receptor-bearing cell, as well as synthesis and secretion of other pro-inflammatory molecules.

Preferably, the G protein kinase signal pathway modification agents of the present invention can inactivate the receptor previously stimulated by a pro-inflammatory molecule but have no effect on non-stimulated cells. Examples of pro-inflammatory agents useful for stimulating the cells are IL-8, N-formyl peptides, activated complement fragment (C5a), leukotriene B4 (LTB4) and platelet activating factor (PAF). Preferably, the agent-receptor complex of the present invention also can desensitize the receptor from further stimulation by the same pro-inflammatory agent or by a different pro-inflammatory agent.

The observed effect of the G protein kinase signal pathway modification agent-receptor complex on the receptor-bearing cell can be used to identify G protein kinase signal pathway modification agents. Screening for such agents can be carried out by contacting a pro-inflammatory mediating cell with a known pro-inflammatory mediator to elicit a pro-inflammatory response, followed by the addition of a candidate agent and by detecting a decrease in the amount of a G protein kinase in a pro-inflammatory cell contacted simultaneously with the candidate agent and the pro-inflammatory molecule compared to that amount in a pro-inflammatory mediating cell contacted with the pro-inflammatory molecule alone.

A particualrly useful G protein kinase signal pathway modification agent is f-Met-Leu-Phe-Phe. Other useful agents can be identified by routine testing using one of the above procedures.

As used herein, pro-inflammatory responses include secretion or degranulation of pro-inflammatory mediating cells and release of leukotrienes, histamines, and other cytokines. Such responses also include infiltration of eosinophils, basophils and mast cells into inflammatory tissues as a result of chemotactic adhesion, migration and aggregation of lymphocytes, eosinophils,

basophils, mast cells, and neutrophils. Vascular permeability at the site of inflammation and increased production of IgE, IgG and IgA, and their respective FC receptors, also can be associated with pro-inflammatory responses.

Inhibition of pro-inflammatory responses can thus include decrease of degranulation and release of leukotrienes, histamines and other cytokines by pro-inflammatory mediating cells, or complete cessation in preferred embodiments, following peptide-receptor binding according to the present invention. Infiltration and migration of pro-inflammatory mediating cells can also be greatly reduced, or completely inhibited. Vascular permeability at the site of inflammation and IgE levels also can be reduced.

In order that the invention described herein may be more fully understood, the following examples are set forth. It should be understood that these examples are for illustrative purposes only and are not to be construed as limiting this invention in any manner.

EXAMPLE 1: Binding of Labeled HK-X to Peripheral Blood Nucleated Cells

The Kd and Bmax (saturation binding) of HK-X ("f-Met-Leu-Phe-Phe") on peripheral blood nucleated cells were determined. 2 x 10^5 cells in 100 µl of solution from various fractions (monocytes, lymphocytes, granulocytes) prepared by density centrifugation was previously washed in 1% BSA-PBS solution containing 0.1% sodium azide. 100 µl of the following molar concentrations of FITC-labeled HK-X (in 1% BSA-PBS solution) was added to each set of tubes according to Table 1:

TABLE 1

Tube #	FITC-labeled HK-X Molar Concentration
1	9.06×10^{-12}
2	2.71×10^{-11}
3	5.43×10^{-11}
4	7.25×10^{-11}
5	9.06×10^{-11}
6	2.71×10^{-10}
7	5.43×10^{-10}
8	7.25×10^{-10}
9	9.06×10^{-10}

The tubes were mixed and vortexed for 30 seconds. The tubes were then held at 4-8°C for 30 minutes. 100 µl of Cal-Lyse was then added, incubated for 5 minutes, or 500 µl of 1% formaldehyde was added. If Cal-Lyse was added, 1 ml of water was added and incubated for a further 5 min. Cells were then analyzed on a flow cytometer (Coulter Epics Elite). Binding results are shown in FIG. 1. Bmax was determined to be 47.66 and Kd=1.674 x 10^{-10}M. Thus, these results show that HK-X binds to peripheral blood nucleated cells such as monocytes, lymphocytes, and granulocytes.

It was also determined by similar methodology that H-KX binds to activated T-cells, mast cells, eosinophils, and basophils, as well as the known binding to neutrophils.

EXAMPLE 2: HK-X Binds to Activated Receptors

Peripheral blood lymphocytes were stimulated with the mitogen Concanavalin A (ConA) at 24 hours or at 120 hours after being placed in culture. The cells were then either exposed to the 100nM FITC-labeled HK-X or were not exposed. Cells were also stained with DAPI for cell cycle determination. Cells were then analyzed by flow cytometry.

FIGs. 2A-2C show the relationship between activated lymphocytes by ConA and the appearance of binding sites for FITC-labeled HK-X. The four quadrants reveal the following characteristics:

the upper left quadrants denote cells with greater than 1n content of DNA and increased levels of FITC HK-X binding above background levels [established by using the profile in FIG. 1;

the upper right quadrants denote cells that contain greater than 1n DNA content and have FITC-ligand binding greater than background;

the lower right quandrants contain cells that have 1n DNA content but have bound FITC-ligand above background levels; and

the lower left quadrants contain cells with 1n DNA content and background levels of FITC-ligand.

As is apparent from examination of FIGs. 2B and 2C, exposure to the plant lectin or mitogen stimulates cells to enter into the cell cycle and express binding sites to the FITC-labeled HK-X. The longer culture period of 120 hours allowed a greater portion of the cells to enter the cell cycle (compared to FIG. 2A). The most accurate determination of background levels of endogenous fluorescence was obtained by setting the thresholds (quadrants) using cells cultured with ConA but not stained with the FITC-labeled HK-X (see FIG. 2B).

The statistical analysis confirms the qualitative observations furnished by examination of the dot plots. Approximately 25% of the cells in FIG. 2C contained greater than 1n DNA content and were above the background levels of FITC-ligand binding. This is in marked contrast to the numbers of cells in the upper right quadrant in FIGs. 2A and 2B, respectively.

A more formal examination of the distribution of cells in various phases of the cell cycle was obtained by using a software package "MultiCycle" by Phoenix Software, Phoenix, AZ. This software deconvolutes the DNA histogram and statistically analyses the components for degree of fit and significance.

FIG. 3A shows the same samples contained in Fig. 2A and FIG. 3B shows those contained in Figs. 2B and 2C. As is apparent from examination of the percentage of cells which are diploid (>1n DNA content) the fractions increased from 2.2% in FIG. 2A to 29% in FIGs. 2B and 2C.

Thus, it appears that stimulation of human peripheral blood lymphocytes with mitogen initiates duplication of their DNA and, simultaneously with this process, expression of binding sites for the FITC-labeled HK-X. Only a fraction of the cells with DNA content of 1n, or in G0/G1 phase of the cell cycle, show increased expression of binding sites for the ligand. By contrast, all cells with diploid DNA content (>1n) contain binding sites for the ligand.

EXAMPLE 3: Identification and Characterization of HK-X Receptors

Receptors that bind HK-X and other N-formyl peptides were isolated and characterized from murine peritoneal mast cells, human polymorphonuclear and mononuclear cell populations. Further, G-protein activation of the FCεR receptor as a down-stream consequence of increases in PKC, PI3 and mobilization of Ca^{2+}, make the FCε receptor a down-stream effector receptor of G-protein interference.

Cells that bind HK-X include mast cells, basophils and eosinophils as evidenced by changed biological reactivity after exposure to HK-X and by binding of a fluorescent or radioactive labelled HK-X. Receptors for HK-X have not been identified. In contrast, neutrophils express formyl peptide receptors on their surface. However, blood lymphocytes and monocytes appear to bind less HK-X than neutrophils.

DETAILED MATERIALS AND METHODS:

1. ISOLATION OF CELLS --- Rat peritoneal mast cells were isolated by infusion of 35 ml of Tyrode's Solution into the peritoneal cavity of anesthetized rats. The rats were then sacrificed by injection of an overdose of anesthetic. The peritoneal cells were harvested, placed into 15 ml centrifuge tubes. The cells were pelleted by centrifugation at 250-x g for 10 min at room temperature.

Human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells were isolated from peripheral blood obtained from normal donors. The blood was collected in heparin. The various cell types were isolated by centrifugation over Ficoll-Hypaque at 500-x g for 60 min at room temperature. Each fraction was harvested, pooled separately and washed 1x in RPMI 1640 with antibiotics.

2. METABOLIC LABELING OF CELLS WITH ^{35}S-METHIONINE ---Cells were adjusted to 1 x 10^7 per ml of methionine-less RPMI 1640 media containing 10 μCi of ^{35}S-methionine and held overnight at 37 °C in the presence of 5 % CO_2.

3. HARVESTING OF CELLS AND PREPARATION OF CRUDE MEMBRANES ---Cells were washed 3X in PBS and subsequently lysed by sonication in Hepes buffer, pH 7.2 containing 0.3% NP40 and proteinase inhibitor cocktail. The resulting cellular preparation was centrifuged at 600 x g for 10 min and the supernatant collected for further analyses.

4. SEPHAROSE and SEPAROSE HK-X CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF VARIOUS CELLULAR PROTEINS --- The cellular preparation was passed through a column of Sepharose unsubstituted resin or to Sepharose HK-X resin and divided into two portions, A and B.

Aliquot A: was passed over HK-X substituted Sepharose column. Columns washed and then eluted with buffer containing HK-X (5 mg/ml), and then with 0.1 M glycine, pH 2.5.

Aliquot B was bound to a HK-X substituted column in the presence of soluble HK-X and the proteins eluted. Each fraction was concentrated and lyophilized.

The approach undertaken in this step involved binding of HK-X to a Sepharose resin to make a HK-X substituted resin. Prior to exposure to HK-X substituted resin, the labeled cellular protein mixture was passed over a resin not substituted with HK-X to remove any protein species reacting with the native resin. Thus, when the cellular proteins including the receptor proteins were passed through the HK-X substituted resin under proper ionic environments, the receptor proteins (for the HK-X receptor) among the other proteins bound tightly with the HK-X. The resin was washed with a gentle agent, such as phosphate buffer at neutral pH, to remove any low affinity binding proteins. Subsequently, the resin was exposed to an excess amount of free HK-X to competitively elute receptor proteins bound to the resin. The radioactive proteins released at each of these steps was concentrated and analyzed on a 12% SDS-PAGE system as detailed in the following step.

5. 12% SDS-PAGE --- 25 uL of the radioactive cellular preparation containing 250 cpm to 2000 cpm radioactivity was applied to each lane of the gel. The gel was run at 90 V at 30 mA until good resolution of colored standards was obtained. The standards were phosphorlyase b (MW = 94,000); bovine serum albumin (MW= 68,000); ovalbumin (MW= 43,000); carbonic anhydrase (MW= 30,000); and soybean trypsin inhibitor (MW= 21,000).

6. ESTIMATION OF MOLECULAR WEIGHT OF RESOLVED RADIOACTIVE PROTEINS --- The relative mobilities were calculated for the standards and for each distinct molecular weight species visualized on the gel. A plot of log molecular weight of the standards was plotted against relative mobility for each standard. The data were entered in PRISM software and the molecular weights of the unknown proteins were predicted from a Standard Curve Program. The results were compared to FPR receptor proteins published in the literature (Goetzl et al., *Biochemistry* 20:5717-5722, 1981).

FIG. 4 shows the result of a representative experiment. All proteins present in the cell lysate are shown in Lane A. In Lane B, the unbound material from the Sepharose column without HK-X substitution shows a pattern of protein band distribution similar to the entire cell lysate. Lane C contains the pre-elution material. Lane D is a blank lane. In Lane E, three protein bands are visible when the column was eluted in the presence of 1 mg of HK-X (competitor). The molecular weights are estimated to be ~94,000, ~68,000 and ~40,000 Daltons, respectively. This experimental condition established the specificity of the binding.

Comparison of the relative abundance of the bands eluted in this experiment to that reported by Goetzl et al. revealed interesting differences (see Table 2). Examination of the normalized proportions of receptors reveals a substantial difference in the distribution of the three species recovered from FMLP column (Goetzl) and from HK-X column (this Example). The 68 Kd species was the dominant species recovered by Goetzl et al. from the FMLP affinity column whereas the 40 Kd species was the predominant species recovered from HK-X affinity column.

TABLE 2

Differences in the Reported Recovery of Formyl Receptors from FMLP-Sepharose from that Recovered from HK-X-Sepharose

Molecular Weight	# of total residues containing methionine	Proportion of total receptor population by FMLP	Proportion of total receptor population by HK-X	Normalized proportions of receptor proteins	
				FMLP	HK-X
94,000	14	15	26	1.07	1.8
68,000	11	80	28	7.27	2.54
40,000	4	5	41	1.25	10.25

It is clear from the radioautograph in FIG. 4 that there are three molecular species eluted from rat peritoneal mast cells by the addition of 1 mg of HK-X. The calculated molecular weights of these proteins agree with the molecular sizes reported by Goetzl et al. The molecular weights of proteins recovered after competition with HK-X or acid from rat peritoneal mast cells and neutrophils were the same as those reported by Goetzl for human neutrophils.

Although the total mean number of residues of methionine in the 40 Kd molecule is 5.1, it has a more intense radiographic image than either the 68,000 and 94,000 species which contain 11 and 14 residues per molecule, respectively. In this Example, the relative abundance of each of the protein species recovered was determined by biosynthetic radiolabeling with ^{35}S-methionine. The relative proportions recovered from affinity chromatography were determined by integration of the areas under the curves from the autoradiographs. Goetzl measured the relative abundance of each protein species by determination of protein by chemical methods. Therefore, to more accurately compare the distribution of the proteins recovered in the two studies, the distribution values were normalized by dividing the relative abundance of each species by its number of methionine residues. This ratio

corrects for potential variations in the values due to differences in methodologies. The corrected ratios revealed a vastly different binding and/or recovery profile between the values reported by Goetzl and the values obtained in this Example. One possibility is that the detergent disassociated receptor complex binds to FMLP-substituted Sepharose in a selective manner different from that of HK-X substituted Sepharose.

In summary, in this Example, HK-X was used to selectively recover the binding proteins in a cell lysate recovered after protein labeling with ^{35}S-methionine in vitro. Three molecular weight species were isolated which agree with previously reports on the size of peptides associated with the FMLP receptor complex.

It also has been demonstrated by the techniques used in this Example that HK-X binds to receptors on human polymorphonuclear and mononuclear cells, particularly activated T-cells, mast cells, eosinophils, and basophils.

EXAMPLE 4: Signal Transduction and Mechanism of Action

Leukocytes respond to a large number of chemoattractants and other proinflammatory mediators. Some mediators cause chemotaxis, activation of enzyme systems and release of pathologically significant mediators. The typical N-formyl peptides (the archetypal one -- FMLP), activated complement fragment (C5a), leukotriene B4 (LTB4), platelet activating factor (PAF), and some chemotactic cytokines (such as IL-8) are well-recognized chemotactic and pro-inflammatory agents. These agents bind to G-protein-coupled receptors (GPCRs) with subsequent generation of multiple signal transduction mediated by protein kinase systems. The cascades resulting for the initial events are complex and interrelated, yet are responsible for the entire behavior of all nucleated cells. Programmed cell death (apoptosis), generation of immune responses, removal of self-recognizing T cells, and control of synthesis of

extracellular matrices are just a few examples of the action of signal transduction pathways.

Protein kinases were identified by their capacity to transfer a phosphate group from a phosphate donor onto an acceptor amino acid located within a protein. Usually the γ phosphate of ATP is the donor. The three major acceptor amino residues within proteins are tyrosine, serine and threonine. As of 1999, over 115 protein kinases have been identified and described in the literature.

The behavior of cells in response to stimulation with FMLP is well described in the literature (Prosnitz et al., *Pharmacol. Ther.* 74: 73-102, 1997). FMLP binding to phagocytes stimulates phosphorylation, which correlates with cellular functions. FMLP and other chemoattractants stimulate phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) which in turn activates protein kinase (PKC). In neutrophils, FMLP binding initiates phosphorylation of an extracellular regulated kinase, (ERK-1) which belongs to a general family of kinases termed mitogen-activated protein kinases (MAP kinases). Some of the members of the MAP kinase family are: Raf-1 and Ras.

Members of the protein kinase families usually differ in molecular weight to such an extent that they can resolved one from another by SDS-PAGE technology. Further, phosphotyrosine proteins can be detected from the entire mass of intracellular proteins by monoclonal antibodies which recognize only the phosphotyrosine epitope (Ross et al., *Nature (London)* 294: 654, 1981; Frackleton et al., *Mol. Cell Biol.* 3: 1343, 1983).

Changes in protein kinases mediated by the addition of HK-X to human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells were analyzed in order to elucidate the mechanism of action of the HK-X. HK-X was added alone and with the addition of FMLP or IL-8, which are known chemotactic and pro-inflammatory agents.

DETAILED MATERIALS AND METHODS:

1. ISOLATION OF CELLS --- Human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells were isolated from peripheral blood obtained from normal donors. The blood was collected in heparin. The various cell types were isolated by centrifugation over Ficoll-Hypaque at 500-x 9 for 60 min at room temperature. Each fraction was harvested, pooled separately and washed 1x in RPMI 1640 with antibiotics.

2. CULTURE AND TREATMENT OF CELLS --- 10^7 cells per ml of media were held at 37°C for 30 min prior to the addition of stimulants in order to allow cells to reach a steady state within the phosphorylated protein pools. Then the following stimulants were added to each ml of cells:

A. 100 uL of vehicle (0.3% DMSO solution in media) .
B. 100 uL of HK-X contained 20 ug HK-X .
C. 100 uL of FMLP contained 0.1 ug FMLP .
D. 100 uL of IL-8 contained 0.1 ug IL-8 (recombinant human IL-8).
E. 100 uL of HK-X contained 20 ug HK-X plus 100 uL of FMLP contained 0.1 ug FMLP.
F. 100 uL of HK-X contained 20 ug HK-X plus 100 uL of IL-8 contained 0.1 ug IL-8.
G. cell culture media without any stimulants.

Cells were incubated for an additional 30 min at 37°C in 5% CO_2.

3. HARVESTING OF CELLS AND SDS-PAGE ANALYSIS --- Cells were pelleted at 250 x g for 5 min at room temperature. The supernatant was removed and 25 uL of 2X SDS-PAGE starting buffer added. The pellets were boiled for 15 min and centrifuges at 10,000 x g for 5 min. Small samples were removed for gel electrophoresis on 12% acrylamide gels.

4. IMMUNOBLOT DETECTION OF PHOSPHOPROTEINS --- The proteins were transferred onto nylon membrane at 13 V for 30 min and subsequently blocked with 1% BSA for 12 hr. The antibody conjugated with

HRP in 0.3% BSA was added for 60 min. Membranes were washed, fixed and photographed.

5. DATA ANALYSIS ---- The photographs were taken to a professional laboratory and a negative copy was made of each gel using very high contrast and low grain film. The subsequent photographs were scanned at 600 dpi and densitometric analysis performed using Image Pro Plus software, SPSS. Molecular weights were calculated for each band.

In order to standardize the amount of cellular protein applied to each lane of the SDS-PAGE, the same number of cells were used for each treatment and approximately the same volume of sample applied to each lane. In FIGs. 5 through 9, the chemiluminescence patterns of phosphoproteins detected by monoclonal anti-phosphotyrosine antibody are shown. A negative of the chemiluminescence images was made by a professional photographer in order to obtain the highest degree of resolution of the bands and their corresponding intensity of chemiluminescence. For example, in FIG. 5A, the protein kinases present in cells exposed to vehicle for 30 minutes revealed 9 distinct protein species as shown by peaks in a densitometry analysis of the gel. For the sake of clarity, peaks in the densitometry analysis are marked by arrows and the corresponding molecular species in the gel are also marked by the same arrows. (The origin of the gel is on the right side of the gel where the larger molecular weight species are located).

In FIG. 6, the protein kinase responses of cells to HK-X are depicted. An apparent increase in a molecular weight species of approximately 83 Kd was detected which was not observed in other treatments. Striking differences were seen after the simultaneous treatment of cells with 20 ug HK-X and 0.1 ug IL-8 and 20 ug HK-X and 0.1 ug FMLP (data not shown). The smaller molecular weight species appeared greatly reduced (left most portion of gel). This reduction is reflected quantitatively by the area of the peaks. This area in the densitometric tracing is shown by the horizontal double-headed arrow. The protein kinase content and distribution of fresh mononuclear cells is shown in

FIG. 9. The distribution of kinases of these cells is strikingly similar to that of vehicle treated cells (FIG. 5) and HK-X treated cells (FIG. 6). The kinase response patterns to FMLP stimulation alone and to HK-X plus FMLP stimulation is not shown. However, the patterns of each of these were substantially identical to that observed with IL-8 alone and HK-X plus IL-8, respectively.

The pattern and distribution of protein kinases for peripheral blood polymorphonuclear cells was essentially the same as that for the mononuclear cells. The primary difference between the two cell types was that mononuclear cells were more metabolically active than the polymorphonuclear cells.

Using the densitometric analytical approach, the area under the peaks for each molecular weight species was calculated. Thus, the quantitative assessment of each kinase as a percent of the total kinase content was calculated. In addition the molecular weight of known kinases was compared to that calculated from the relative migration (Rf) calculation in this experiment. Thus, the kinases in this study could be identified.

Table 3 shows the quantitative change in the distribution of protein kinases from human peripheral blood cells after exposure to HK-X.

TABLE 3

Protein Kinase	Molecular Weight	% Change with HK-X
PLCγ	150 Kd	NC
PI3	102 Kd	+57
PI3	83 Kd	+55
Raf	65-68 Kd	-42
Pp60 Src	62 Kd	NC
G-protein α	56 Kd	-49
ERK-1	44-49 Kd	NC
G-protein β	33-35 Kd	-25
Ras	21 Kd	-32
G-protein γ	9 Kd	NC

Table 4 shows the quantitative amount of G protein γ kinase for various experiments, which confirmed and extended the previous qualitative data. Although it was attempted to use the same number of cells were used for each treatment and approximately the same amount of intracellular protein recovered was applied to each lane, the total amount of kinases differed as seen by the areas observed.

TABLE 4

Summary of Protein Kinase from Peripheral Blood Cells After Exposure to HK-X and IL-8 and FMLP

Protein Kinase	MW (kD)	Vehicle	HK-X Alone	FMLP Alone	IL-8 Alone	HK-X + FMLP	HK-X + IL-8	Fresh Normal Cells
G-protein γ	9	10	11.4	10.1	14.8	2.7	3.4	11.9
Total areas		164,413	246,023	189,169	170,985	98,097	128,937	176,442

Table 5 illustrates the results of another experiment that shows the change in the distribution of protein kinases from human peripheral blood cells after exposure to HK-X compared to costimulatory exposure to (1) HK-X and (2) fMLP or IL-8.

Tables 6and 7 illustrate the results of a further experiment that shows the change in the distribution of protein kinases from human peripheral blood cells after exposure to HK-X compared to costimulatory exposure to (1) HK-X and (2) Ca5, TNFα, IL-4, IL-6, IL-10 or IL-13.

Table 5.

Summary of Tyrosine Protein Kinases Identification and Distribution in Peripheral Blood Cells

		PERCENT DISTRIBUTION				
Protein Kinase	*Molecular Weight*	*Vehicle*	*HK-X Alone*	*HK-X + fMLP*	*HK-X + IL-8*	*Fresh Normal Cells*
PI 3 Kinase	102 kd	5	4	5.1	4	3
PI 3 Kinase	83 Kd	5.2	7.7	11	10.4	4.9
Raf	65-68 Kd	7	7.8	9.5	8.9	5
Ras	21 Kd	18	12.7	5.7	11.3	18.9
Pp60 Src	62 Kd	6.3	5	6.6	8.8	8.7
ERK-1	44-49 Kd	6.6	6.9	4.8	8.6	8.5
G-Protein α	56 Kd	6.9	6.3	7.8	8.2	12.3
G-Protein β	33-35 Kd	6.6	7	4.4	5.3	9.3
G-Protein γ	9 Kd	10	11.4	2.7	3.4	11.9

Table 6.

Summary of Tyrosine Protein Kinases Identification and Distribution in Peripheral Blood Cells

Protein Kinase	Molecular Weight	PERCENT DISTRIBUTION					
		C5a Plus HK-X		TNFα Plus HK-X		IL-4 Plus HK-X	
PLCγ	150 Kd	2.2		2.4		7.7	4.2
PI 3 Kinase	102 kd	2.7		3.1		6.0	3
PI 3 Kinase	83 Kd	6.9		5.5		7.7	6.8
Raf	65-68 Kd	6.4		5.7		3.1	3
Ras	21 Kd	16.5		20.9		9.9	16.4
Pp60 Src	62 Kd	5.8		7.4		4.5	5.1
ERK-1	44-49 Kd	6.5		5.9		6.4	6.0
G-Protein α	56 Kd	5.5		6.3		7.9	7.5
G-Protein β	33-35 Kd	6.2		6.2		8.0	8.2
G-Protein γ	9 Kd	8.0		7.4		5.8	9.4

Table 7.

Summary of Tyrosine Protein Kinases Identification and Distribution in Peripheral Blood Cells

		PERCENT DISTRIBUTION			
Protein Kinase	*Molecular Weight*	*IL-6 Plus HK-X*	*IL-10 Plus HK-x*	*IL-13 Plus HK-X*	*Vehicle*
PLCγ	150 Kd	5.0	3.8	11.2	5.8
PI 3 Kinase	102 kd	3.5	3.4	13.3	4.0
PI 3 Kinase	83 Kd	4.3	5.7	7.2	7.6
Raf	65-68 Kd	6.7	2.6	5.7	3.6
Ras	21 Kd	17.6	15.8	9.8	13.3
Pp60 Src	62 Kd	6.7	4.7	4.4	4.8
ERK-1	44-49 Kd	8.9	8.8	6.9	5.7
G-Protein α	56 Kd	8.7	8.1	4.9	7.9
G-Protein β	33-35 Kd	6.6	8.5	5.2	7.2
G-Protein γ	9 Kd	4.4	11.1	3.4	6.7

A number of important events transpire during stimulation of cells bearing receptors for formyl peptides. These include:

A. Upon binding FMLP or other analogues, the FPR interacts with the G-protein pool that is common to other chemoattractant receptors such as the LTB4 and C5a receptors (Jacobs et al., *J. Leukoc. Biol.* 57: 679-686, 1995; McLeish et al., *Mol. Pharm.* 36: 384-390).

B. Following stimulation with FMLP or other chemoattractants, cells become refractory to further or subsequent responsiveness to the same or other chemoattractants. When the refractory state or receptor inactivation is induced by one stimulant and affects multiple unliganded receptors, this situation is heterologous desensitization. It has been speculated that this form of desensitization may result from the phosphorylation of the unliganded receptors by downstream-activated kinases, as with the FCεR receptor.

C. IL-8, C5a, and FMLP desensitized each other's receptors. These studies were extended to include PAF and LTB4 receptors. The mechanisms by which this process may be initiated may involve receptor phosphorylation by PKC. However, the FPR does not contain intracellular domains capable of being phosphorylated by PKC, but another kinase appears to be responsible.

D. Desensitization of downstream FPR responses occurs in the absence of FPR phosphorylation.

HK-X treatment alone did not specifically down-regulate kinases. G-protein γ kinase was selectively and significantly decreased after simultaneous stimulation of mononuclear cells with HK-X and IL-8 or with HK-X and FMLP. These observations suggest the following mechanism of action of HK-X, which is described below.

HK-X and potential pro-inflammatory molecules, such as IL-8 and FMLP can be present together. There is a down-regulation of one of the trimeric G-protein complexes. Specifically, G-protein γ phosphorylation was decreased under the steady state conditions. Therefore, HK-X in the presence of IL-8 or FMLP appears to initiate a receptor desensitization that either directly or indirectly inhibits phosphorylation of G-protein γ subunit.

There are a number of corollaries, which can be drawn from the data presented here and in previous reports. They are:

1. HK-X demonstrates specificity for cells capable of responding to pro-inflammatory stimuli mediated by specific pro-inflammatory receptors.
2. If HK-X is maintained in the system during inflammatory events, HK-X should maintain desensitization of the potentially responding cells.
3. Using an in vitro culture system as described in this report, other cell targets and other pro-inflammatory mediators can be screened for their sensitivity to the action of HK-X. Thus, a simple assay can be used to rapidly screen for potential therapeutic efficacy and to establish therapeutic predictability.

In part, HK-X appears to mediate its therapeutic efficacy through desensitization of pro-inflammatory mediator receptors. Downstream from this event, the inactivation of the inflammatory cell is mediated and maintained by either directly or indirectly through inhibition of phosphorylation of G-protein γ subunit.

The present invention has been described in detail including the preferred embodiments thereof. However, it will be appreciated that those skilled in the art may make modifications and improvements within the spirit and scope of the invention as set forth in the claims.

What is claimed is:

1. A method of inhibiting a pro-inflammatory response of a human peripheral blood mononuclear cell or polymorphonuclear cell, or a fixed tissue cell when contacted with a pro-inflammatory agent, said method comprising contacting said cell with a G protein kinase signal pathway modification agent, thereby inhibiting inflammatory response signal transduction pathways mediated by G protein.

2. The method of claim 1, wherein the human peripheral blood mononuclear cell is selected from lymphocytes and monocytes or a polymorphonuclear cell selected from granulocytes.

3. The method of claim 1, wherein the human peripheral blood mononuclear cell or polymorphonuclear cell is selected from eosinophils, basophils, and activated T-cells.

4. The method of claim 1, wherein the fixed tissue cell is selected from mast cells, dendritic cells, astrocytes or macrophages.

5. The method of claim 1, wherein the pro-inflammatory agent is selected from cytokines, chemotaxins, and mitogens.

6. The method of claim 1, wherein the pro-inflammatory agent is selected from fMLP, activated complement fragment, leukotriene B4, platelet activating factor, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 and TNFα.

7. The method of claim 1, wherein the G protein kinase signal pathway modification agent is a f-Met-Leu peptide.

8. The method of claim 1, wherein the G protein kinase signal pathway modification agent is f-Met-Leu-Phe-Phe.

9. A method of inhibiting a pro-inflammatory response of a human peripheral blood mononuclear cell or polymorphonuclear cell, or a fixed tissue cell when contacted with a pro-inflammatory agent, said method comprising forming a complex of a cell surface receptor with a G protein kinase signal pathway modification agent, thereby inhibiting a pro-inflammatory response.

10. The method of claim 9, wherein the cell surface receptor is a formyl peptide receptor.

11. The method of claim 9, wherein the pro-flammatory response includes inhibiting a down-stream receptor, wherein the downstream receptor is a FC receptor that is a receptor for an agent selected from an immunoglobulin, a cytokine selected from the group consisting of IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 and TNFα, or a chemokine selected from the group consisting of C5a, FMLP, PAF, LTB4.

12. The method of claim 9, wherein the human peripheral blood mononuclear cell is selected from lymphocytes and monocytes or a polymorphonuclear cell selected from eosinophils and basophils.

13. The method of claim 9, wherein the human peripheral blood mononuclear cell or polymorphonuclear cell is selected from, eosinophils, basophils, and activated T-cells.

14. The method of claim 9, wherein the fixed tissue cell is selected from mast cells, dendritic cells, astrocytes and macrophages.

15. The method of claim 9, wherein the pro-inflammatory agent is selected from cytokines, chemokines, chemotaxins, and mitogens.

16. The method of claim 9, wherein the pro-inflammatory agent is selected from fMLP, activated complement fragment, leukotriene B4, and platelet activating factor, or IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 and TNFα.

17. The method of claim 9, wherein the G protein kinase signal pathway modification agent is a f-Met-Leu peptide.

18. The method of claim 9, wherein the G protein kinase signal pathway modification agent is f-Met-Leu-Phe-Phe.

19. A receptor complex comprising a G protein kinase signal pathway modification agent and a cell surface receptor of a human peripheral blood mononuclear cell or polymorphonuclear cell, or a fixed tissue cell that has been stimulated by a pro-inflammatory agent.

20. The receptor complex of claim19, wherein the human peripheral blood cell is a mononuclear cell selected from lymphocytes and monocytes or a polymorphonuclear cell selected from eosinophils and basophils.

21. The receptor complex of claim 19, wherein the fixed tissue cell is selected from mast cells, dendritic cells, astrocytes and macrophages.

22. The receptor complex of claim 19, wherein the G protein kinase signal pathway modification agent is a f-Met-Leu peptide.

23. The receptor complex of claim19, wherein the G protein kinase signal pathway modification agent is f-Met-Leu-Phe-Phe.

24. The receptor complex of claim 19, wherein the pro-inflammatory agent is selected from cytokines, cheomokines, chemotaxins, and mitogens.

25. The receptor complex of claim 19, wherein the pro-inflammatory agent is selected from fMLP, activated complement fragment, leukotriene B4, and platelet activating factor or IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 and TNFα.

26. A method for identifying a G protein kinase signal pathway modification agent, the method comprising the steps of:

a) contacting a pro-inflammatory mediating cell selected from the group consisting of activated T-lymphocyte, mast cell, eosinophil and basophil with a known pro-inflammatory mediator selected from the group consisting of a cytokine, chemokine, chemotaxin, and mitogen and eliciting a pro-inflammatory response;

b) adding to step a) a candidate G protein kinase signal pathway modification agent; and

c) detecting a decrease or increase in amount of a regulating G protein kinase in (i) a pro-inflammatory mediating cell simultaneously contacted with said candidate antagonist and said pro-inflammatory mediator compared to (ii) a pro-inflammatory mediating cell contacted with said pro-inflammatory mediator alone.

27. The method of claim 26, wherein the pro-inflammatory mediator is selected from fMLP, activated complement fragment, leukotriene B4, and platelet activating factor, or IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 and TNFα.

28. A cell surface receptor complex comprising a G-protein kinase signal pathway modification agent binding with a receptor on the surface of a pro-inflammatory mediating cell selected from the group consisting of activated T-lymphocyte, mast cell, eosinophil and basophil, whereby inhibition of a pro-inflammatory cell response to a pro-inflammatory agent is provided.

29. A method for identifying a G protein kinase signal pathway modification agent, said method comprising the steps of:

contacting a pro-inflammatory mediating cell selected from the group consisting of activated T-lymphocyte, mast cell, eosinophil and basophil with a candidate trimeric G- protein signal pathway modification agent; and

determining the distribution of protein kinases produced by said cell,

wherein compared to cells not contacted by the candidate trimeric G-protein signal pathway modification agent there is no change in the amount of

PLC_γ, Pp60 Src, and ERK-1, there is an increase in the amount of PI3 (102 Kd) and PI3 (83 Kd), and there is a decrease in the amount of Ref, Ras, G-protein α and G-protein β kinases.

30. A cell surface receptor complex comprising:

a cell surface receptor of a human peripheral blood mononuclear cell or a polymorphonuclear cell and

a G- protein signal pathway modification agent,

wherein, compared to cells not exhibiting said cell surface receptor complex, the distribution of protein kinases in the cells is such that there is no change in the amount of PLC_γ, Pp60 Src, and ERK-1, there is an increase in the amount of PI3 (113 Kd) and PI3 (83 Kd), and there is a decrease in the amount of Raf, Ras, G-protein α and G-protein β kinases.

31. The cell surface receptor complex of claim 30, wherein the cell surface receptor is a FPR receptor.

32. The cell surface receptor complex of claim 30, wherein stimulation by IL-4 of the human peripheral blood mononuclear cell or the polymorphonuclear cell provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of PLC_γ, PI3 (102 Kd) and PI3 (83 Kd), and a decrease in the amount of Ras and G-protein γ kinases.

33. The cell surface receptor complex of claim 30, wherein stimulation by the pro-inflammatory agent, IL-13, of the human peripheral blood mononuclear cell or the polymorphonuclear cell provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of PLC_γ, PI3 (113 Kd) and PI3 (83 Kd), and a decrease in the amount of Raf, Ras, Pp60 Src, G-protein α and G-protein β kinases.

34. The cell surface receptor complex of claim 30, wherein stimulation by the pro-inflammatory agent, C5a, of the human peripheral blood mononuclear cell or the polymorphonuclear cell provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of PI3 (83 Kd) and Raf, and a decrease in the amount of PLC_{γ}, PI3 (113 Kd), G-protein α and G-protein β kinases.

35. The cell surface receptor complex of claim 30, wherein stimulation by the pro-inflammatory agent, TNFα, of the human peripheral blood mononuclear cell or the polymorphonuclear cell provides a distribution of protein kinases produced by said cell wherein, compared to stimulated cells not exhibiting said receptor complex, there is an increase in the amount of Raf, ERK-1, Ras, G-protein α, G-protein β and G-protein γ, and a decrease in the amount of PLC_{γ}, PI3 (113 Kd) and Pp60 Src kinases.

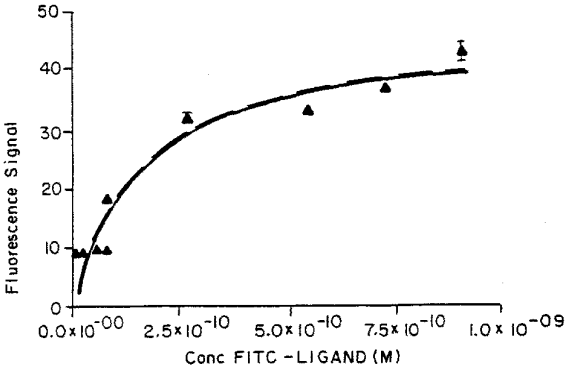

50
40
30
20
10
0
Fluorescence Signal
0.0x10-00
2.5x10-10
5.0x10-10
7.5x10-10
1.0x10-09
Conc FITC-LIGAND (M)

FIG. 1

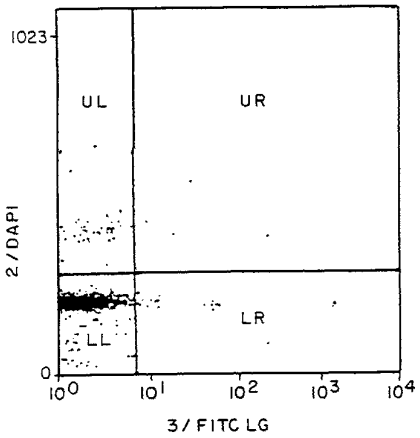

1023
0
UL
UR
LR
LL
2/DAPI
100
101
102
103
104
3/FITC LG

FIG. 2A

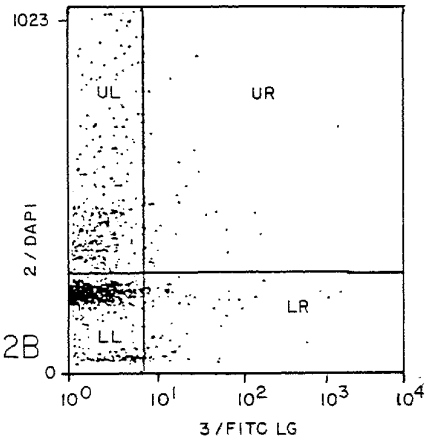

1023
UL
UR
LR
LL
0
2 / DAPI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
3 / FITC LG

FIG. 2B

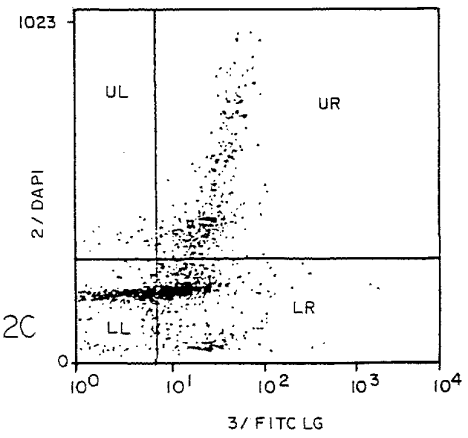

1023
UL
UR
LR
LL
0
2 / DAPI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
3 / FITC LG

FIG. 2C

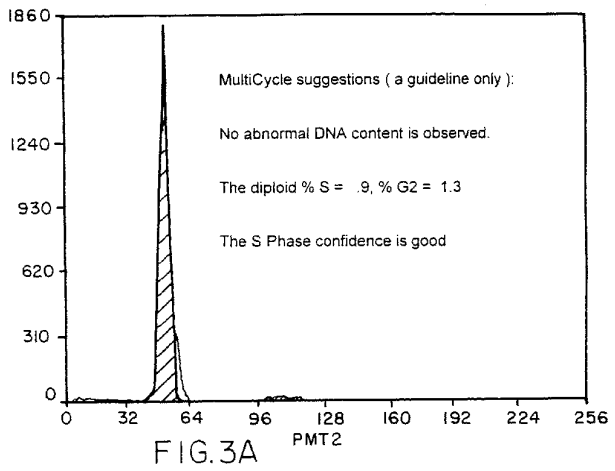

1860
1550
1240
930
620
310
0
MultiCycle suggestions (a guideline only):
No abnormal DNA content is observed.
The diploid % S = .9, % G2 = 1.3
The S Phase confidence is good
0 32 64 96 128 160 192 224 256
PMT2

FIG. 3A

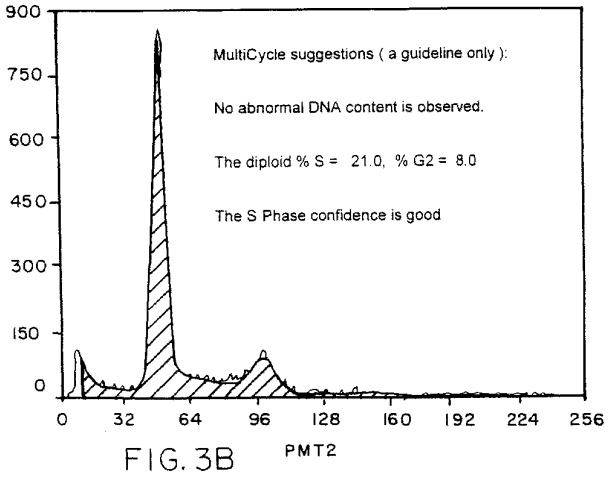

900
750
600
450
300
150
0
MultiCycle suggestions (a guideline only):
No abnormal DNA content is observed.
The diploid % S = 21.0, % G2 = 8.0
The S Phase confidence is good
0 32 64 96 128 160 192 224 256
PMT2

FIG. 3B

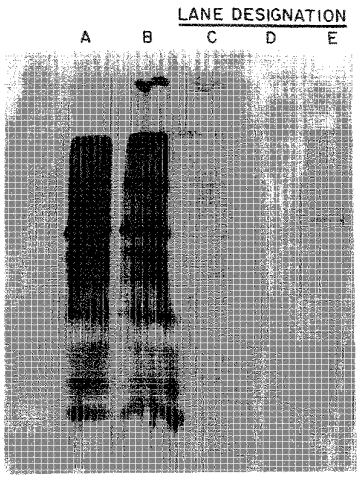


FIG. 4

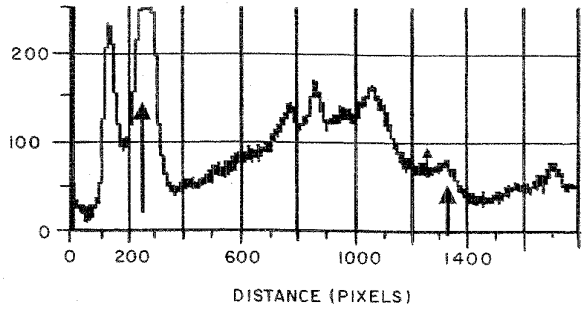


FIG. 5A

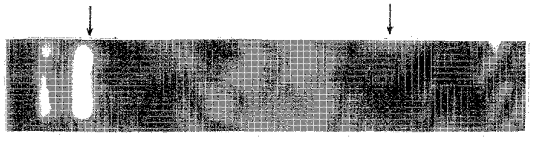


FIG. 5B

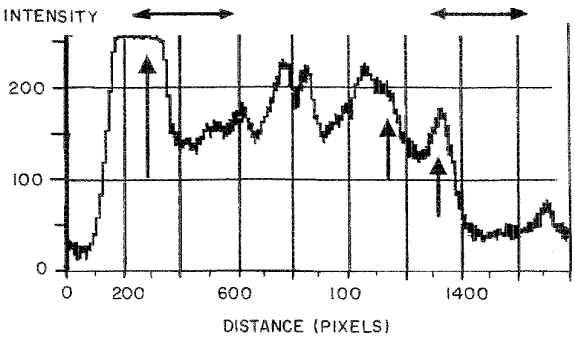


FIG. 6A

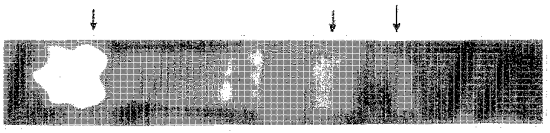


FIG 6B

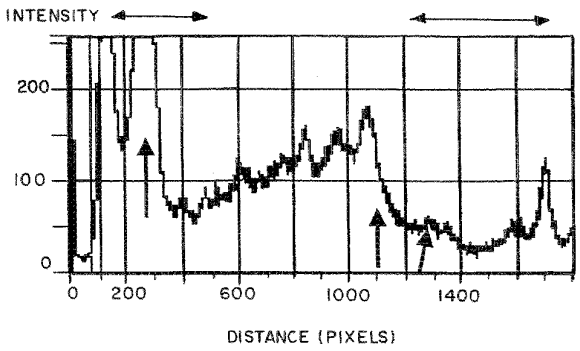


FIG. 7A

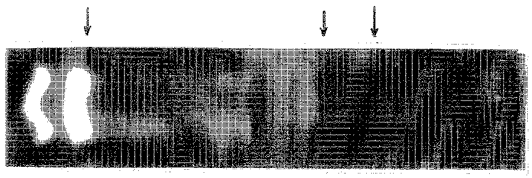


FIG. 7B

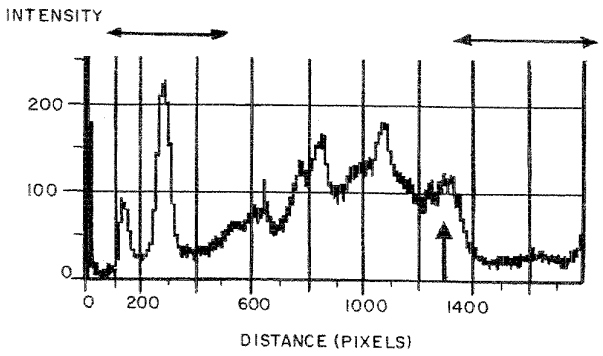


FIG. 8A

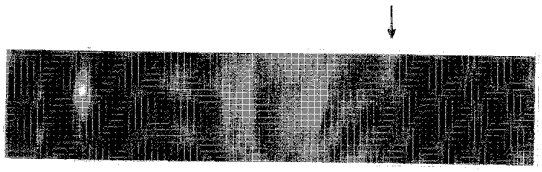


FIG. 8B

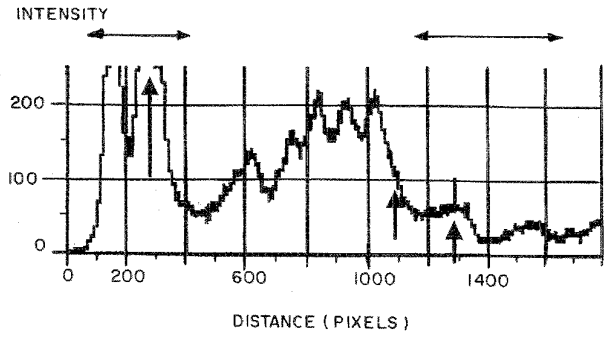


FIG. 9A

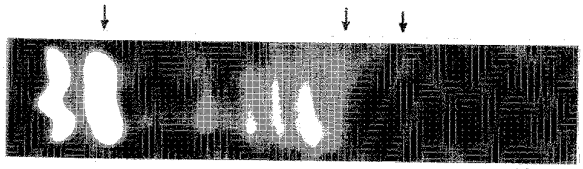


FIG. 9B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/28183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :C07K 14/00; G01N 33/53
US CL :435/7.1, 7.8; 530/350, 351
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/7.1, 7.8; 530/350, 351

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST MEDLINE BIOSIS EMBASE CAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BEVILACQUA, M. et al. Nimesulide decreases superoxide production by inhibiting phosphodiesterase type IV. European Journal of Pharmacology. 1994, Vol. 283, No. 3, pages 415-423, see entire document.	1-35
Y	SMITH, R.J. et al. NPC 15669-modulated human polymorphonuclear neutrophil functional responsiveness: effects on receptor-coupled signal transduction. British Journal of Pharmacology. 1995, Vol. 114, No. 8, pages 1694-1702, see entire document.	1-35

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 FEBRUARY 2001	30 MAR 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer JOSEPH F. MURPHY Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/28185

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SIMON, J.C. et al. Phorbol myristate acetate-activated keratinocytes stimulate proliferation of resting peripheral blood mononuclear lymphocytes via a MHC-independent, but protein kinase C-and intercellular adhesion molecule 1-dependent, mechanism. Journal of Immunology. 15 January 1991, Vol. 146, No. 2, pages 476-484, see entire document.	1-35
Y	BERETA, J. et al. Inhibition of basil and tumor necrosis factor-enhanced binding of murine tumor cells to murine endothelium by transforming growth factor-β^1. Journal of Immunology. 01 May 1992, Vol. 148, No. 9, pages 2932-2940, see entire document.	1-35

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 クラゲツト，ジエームズ・エイ
アメリカ合衆国、ワシントン・９８２９０、スノホミツシユ、サウス・イースト、ワンハンドレツドアンドサーテイナインス・アベニユー・５６１５
(72)発明者 パーマー，クレイグ
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４１１４、サン・フランシスコ、サン・ジエルマン・アベニユー・３７

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB10 BB20 CA11 DA12 DA13 DA20 DA36 FA37 FB01 FB05 FB06 FB07 FB12 GC15
4B063 QA05 QQ21 QQ27 QQ41 QQ61 QQ89 QR48 QR77 QS16 QS36 QX01
4B065 AA94X AC20 BA30 CA44 CA46
4H045 AA10 AA30 BA10 BA11 BA13 BA40 BA42 CA40 DA50 EA22 EA50