

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5462623号
(P5462623)

(45) 発行日 平成26年4月2日 (2014.4.2)

(24) 登録日 平成26年1月24日 (2014.1.24)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15 Z N A
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
請求項の数 8 (全 42 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2009-510244 (P2009-510244)	(73) 特許権者	506401185
(86) (22) 出願日	平成19年5月16日 (2007.5.16)		ユニバーシティー オブ サスカチュワン
(65) 公表番号	特表2009-542192 (P2009-542192A)		カナダ国 サスカチュワン州 サスカトウ
(43) 公表日	平成21年12月3日 (2009.12.3)		ーン ジムナジウム プレイス 110
(86) 国際出願番号	PCT/CA2007/000848		アールピーオー ユニバーシティー ボッ
(87) 国際公開番号	W02007/131352		クス 5000
(87) 国際公開日	平成19年11月22日 (2007.11.22)	(74) 代理人	100080621
審査請求日	平成22年3月16日 (2010.3.16)		弁理士 矢野 寿一郎
(31) 優先権主張番号	60/800,406	(72) 発明者	ゴードン, ジョン アール.
(32) 優先日	平成18年5月16日 (2006.5.16)		カナダ国 エス7エヌ 4 ジェイ8 サス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		カチュワン, サスカトウーン, ジムナジ
			ウム プレイス 110, アールピーオー
			ーユニバーシティー ボックス 5000
		審査官	三原 健治
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E L R - C X C ケモカインの高親和性アンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID No. 13 に記載のアミノ酸配列からなる、単離または精製されたペプチド。

【請求項 2】

SEQ ID No. 13 に記載のアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列よりなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチドからなる形質転換細胞。

【請求項 4】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチドからなるように遺伝子工学によって作成されたウイルス性宿主。

【請求項 5】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチドからなるとともに、適当な宿主内において該ポリヌクレオチドの発現を制御する調節配列に作用的に連結される発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現ベクターからなる宿主細胞。

【請求項 7】

虚血・再灌流障害、内毒素血症誘導急性呼吸困難症候群、免疫複合体型糸球体腎炎、細菌性肺炎および乳腺炎からなるグループから選んだ C X C ケモカイン受容体媒介病状の治

療のための薬剤の製造方法であって、請求項 1 に記載のペプチドを利用した薬剤製造方法。

【請求項 8】

静脈配送、皮内配送あるいは皮下配送のために薬剤を配合する請求項 7 に記載の薬剤製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は CXC ケモカイン受容体アンタゴニストの分野に関する。

【背景技術】

10

【0002】

受容体信号グルタミン酸－ロイシン－アルギニン（ELR）モチーフ（例えば CXCL1 / GRO α 、CXCL8 / IL-8；M・バジョリニ（Baggiolini）、1998 年、ネイチャー 392 号 565～568 頁）を所有する CXC ケモカインは、多くの固化における病状の多くを媒介する炎症性細胞の流入において重要であり、該病状は虚血・再灌流障害（N・セキドウ他、1993 年、ネイチャー 365 号 654～657 頁；J・ヴィラード（Villard）他、1995 年、アメリカン・ジャーナル・オブ・リスペレトリー・アンド・クリティカル・ケア・メディスン 152 号 1549～1554 頁）、内毒素血症誘導急性呼吸困難症候群（ARDS；N・ムカイダ他、1998 年、インフレーション・リサーチ 47 号別冊 3：S151～157 頁）、関節炎、および免疫複合体型糸球体腎炎（A・ハラダ他、1996 年、インフレーション・リサーチ 2 号 482～489 頁）を含む。例えば、活性化された好中球からの不適当に放出された加水分解酵素および反応性酸素種は、病的処理を開始および／あるいは永続させる。一方、大半の細菌感染において、このケモカイン反応は防御の限界第一線を示す。しかし、ELR⁺CXC ケモカイン反応は、その CXCR1 および CXCR2 受容体を示す炎症細胞の活性化能力により、病状を悪化させる。例えば、実験の盲腸穿刺および結紮セプシスにおいて、MIP-2 の中和によってマウスの死亡率が 85% から 38% へ減少した（K・R・ウォリー（Wallley）他、1997 年、インフェクション・アンド・イミュニティ誌 65 号 3847～3851 頁）。また、循環する好中球を除去する実験的処理によって、肺性マンハイミオシス（mannheimiosis）の病状が改善される（R・スローカム（Slocombe）他、1985 年、アメリカン・ジャーナル・オブ・ヴェテリナリー・リサーチ誌 46 号 2253 頁）。気道での CXCL8 の発現は好中球の走化性誘導に不定に影響する（J・L・カズウェル（Caswell）他、1997 年、ヴェテリナリー・パソロジー誌 35 号 124～131 頁；J・L・カズウェル他、2001 年、カナディアン・ジャーナル・オブ・ヴェテリナリー・リサーチ誌 65 号 229～232 頁）。多くの固化におけるケモカイン反応の重大な重要性にもかかわらず、不都合な炎症細胞反応は損傷を与え、ELR⁺ケモカインを阻止可能な治療用具の発展が研究の優先度を有するようになっている（M・バジョリニおよび B・モザー（Moser）、1997 年、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン誌 186 号 1189～1191 頁）。

20

30

【0003】

40

'ELR'ケモカインはその CXCR1 および CXCR2 受容体によって、炎症細胞を走化性誘導および活性化する（バジョリニ、1998 年；S・K・アフジャ（Ahuja）および P・M・マーフィー、1996 年、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー誌 271 号 20545～20550 頁）。大半の哺乳類は CXCR1 および CXCR2 受容体および 'ELR'ケモカインのオーソログ（ortholog）（共通の先祖遺伝子から種分化した異なる種の遺伝子）を発現する。これらのホモログ（homologous）（遺伝子的または機能的に関連する）遺伝子の間の配列類似性は高く、保存されたアミノ酸置換を考慮してもより高い。マウスとラットは、CXCR1 遺伝子を持たず CXCL8 等価物が他の哺乳類より高度に発散しており、例外である。インターロイキン 8（CXCL8）は種特異ではなく、ある種由来の CXCL8 タンパク質は他の種において

50

も機能する（ロート（Rot）、1991年、サイトカイン3：21～27頁）。

【0004】

CXCR1はCXCL8およびCXCL6／果粒球走化性タンパク質-2（GCP-2）に対し特異的である。CXCR2は高い親和性でCXCL8に結合するが、それよりやや低い親和性でマクロファージ炎症性タンパク質-2（MIP-2）、CXCL1、CXCL5／ENA-78およびCXCL6にも結合する（例えばバジョリニおよびモーザー、1997年を参照）。ヒトCXCR1またはCXCR2を移入された細胞系におけるCXCL8シグナリングは、等力の走化性反応を誘導する（A・ワイツ（Wuyts）他、1998年、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー誌255号67～73頁；R・リチャードソン他、1998年、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー誌273号23830～23836頁）。好中球サイトゾル自由Ca⁺⁺変化およびCXCL8に応じた細胞脱顆粒もまたこれらの受容体に媒介され、ホスホリパーゼDの呼吸性突発および活性化は排他的にCXCR1に依存するともされている（S・A・ジョーンズ他、1996年、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ誌93号6682～6686頁）。一方、CXCR1のアンタゴニストではないCXCR2の非ペプチドアンタゴニストが、CXCL8媒介の好中球走化性を相殺するが細胞活性化にはしないことが報告されている（J・R・ホワイト他、1998年、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー誌273号10095～10098頁）。最後に、炎症反応においてケモカインがもっとも頻繁に過剰に発現するという豊富な証拠が存在する（例えばカズウェル他、1997年参照）。しかし当該領域における活性調査にもかかわらず、いずれかのELR-CXCケモカイン受容体に誘導される反炎症細胞活性の抑制に効果的な先行技術において、CXCケモカインアンタゴニストは知られていない。

【非特許文献1】Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. Nature. 392:565-568.

【非特許文献2】Sekido, N., N. Mukaida, A. Harada, I. Nakanishi, Y. Watanabe, and K. Matsushima. 1993. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. Nature. 365:654-657.

【非特許文献3】Villard, J., F. Dayer Pastore, J. Hamacher, J. D. Aubert, S. Schlegel Haeter, and L. P. Nicod. 1995. GRO alpha and interleukin-8 in Pneumocystis carinii or bacterial pneumonia and adult respiratory distress syndrome. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152:1549-1554.

【非特許文献4】Mukaida, N., T. Matsumoto, K. Yokoi, A. Harada, and K. Matsushima. 1998. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8). Inflamm. Res. 47 (suppl. 3):S151-157.

【非特許文献5】Harada, A., N. Mukaida, and K. Matsushima. 1996. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. Inflamm. Res. 2:482-489.

【非特許文献6】Walley, K. R., N. W. Lukacs, T. I. Standiford, R. M. Stricter, and S. L. Kunkel. 1997. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. *Infect. Immun.* 65:3847-3851.

【非特許文献7】Slocombe, R., J. Malark, R. Ingersoll, F. Derksen, and N. Robinson. 1985. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am. J. Vet. Res.* 46:2253.

10

【非特許文献8】Caswell, J. L., D. M. Middleton, S. D. Sorden, and J. R. Gordon. 1997. Expression of the neutrophil chemoattractant interleukin-8 in the lesions of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Pathol.* 35:124-131.

【非特許文献9】Caswell, J. L., D. M. Middleton, and J. R. Gordon. 2001. The importance of interleukin-8 as a neutrophil chemoattractant in the lungs of cattle with pneumonic pasteurellosis. *Canad. J. Vet. Res.* 65:229-232.

20

【非特許文献10】Baggiolini, M., and B. Moser. 1997. Blocking chemokine receptors. *J. Exp. Med.* 186:1189-1191.

【非特許文献11】Ahuja, S. K., and P. M. Murphy. 1996. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J. Biol. Chem.* 271:20545-20550.

30

【非特許文献12】Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1994. Both interleukin-8 receptors independently mediate chemotaxis. Jurkat cells transfected with IL-8R1 or IL-8R2 migrate in response to IL-8, GRO alpha and NAP1. *FEBS Lett.* 341:187-192.

40

【非特許文献13】Wuyts, A., P. Proost, I. P. Lenaerts, A. Ben Baruch, J. Van Damme, and J.M. Wang. 1998. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur. J. Biochem.* 255:

50

67-73.

【非特許文献14】Richardson, R., B. Pridgen, B. H-aribabu, H. Ali, and R. Snyder. 1998. Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. *J. Biol. Chem.* 273:23830-23836.

【非特許文献15】McColl, S. R., and I. Clark Lewis. 1999. Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists. *J. Immunol.* 163:2829-2835.

【非特許文献16】Jones, S. A., M. Wolf, S. Qin, C. R. Mackay, and M. Baggiolini. 1996. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:6682-6686.

【非特許文献17】White, J. R., J. M. Lee, P. R. Young, R. P. Hertzberg, A. J. Jurewicz, M. A. Chaikin, K. Widdowson, J. J. Foley, L. D. Martin, D. E. Griswold, and H. M. Sarau. 1998. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J. Biol. Chem.* 273:10095-10098.

【非特許文献18】Tateda, K., T. A. Moore, M. W. Newstead, W. C. Tsai, X. Zeng, J. C. Deng, G. Chen, R. Reddy, K. Yamaguchi, and T. J. Standiford. 2001. Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of *Legionella pneumonia*: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. *Infect. Immun.* 69:2017-2024.

【非特許文献19】Tsai, W. C., R. M. Stricter, B. Mehrad, M. W. Newstead, X. Zeng, and T. J. Standiford. 2000. CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. *Infect. Immun.* 68:4289-4296.

【非特許文献20】Goodman, R. B., R. M. Strieter, C. W. Frevert, C. J. Cummings, P. Tekamp Olson, S. L. Kunkel, A. Wall, and T. R. Martin. 1998. Quantitative comparison of C-X-C chemokines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages.

10

20

30

40

50

- Am. J. Physiol. 275:L87-95.
- 【非特許文献21】Nufer, O., M. Corbett, and A. Wall. 1999. Amino-terminal processing of chemokine ENA-78 regulates biological activity. *Biochem.* 38:636-642.
- 【非特許文献22】Wuyts, A., A. D'Haese, V. Cremers, P. Menten, J. P. Lenaerts, A. De Looft, H. Herenlans, P. Proost, and J. Van Damme. 1999. NH₂- and COOH-terminal truncations of murine granulocyte chemotactic protein-2 augment the in vitro and in vivo neutrophil chemotactic potency. *J. Leukoc. Biol.* 163:6155-6163. 10
- 【非特許文献23】Clark Lewis, I., B. Dewald, M. Loetscher, B. Moser, and M. Baggiolini. 1994. Structural requirements for interleukin-8 function identified by design of analogs and CXC chemokine hybrids. *J. Biol. Chem.* 269:16075-16081.
- 【非特許文献24】Li, F., and J. R. Gordon. 2001. IL-8 sub. (3-74) K11R is a high affinity agonist of the neutrophil CXCR1 and CXCR2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 286:595-600. 20
- 【非特許文献25】Moser, B., B. Dewald, L. Barella, C. Schumacher, M. Baggiolini, and I. Clark Lewis. 1993. Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modification. *J. Biol. Chem.* 268:7125-7128.
- 【非特許文献26】Caswell, J. L., D. M. Middleton, and J. R. Gordon. 1998. Production and functional characterization of recombinant bovine interleukin-8 as a neutrophil-activator and specific chemoattractant in vitro and in vivo. *Vet. Immunol. Immunopath.* 67:327-340. 30
- 【非特許文献27】Coligan, J., A. Kruisbeek, D. Margulies, E. Shevach, and W. Strober. 1994. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, New York. 40
- 【非特許文献28】Waller, K. P. 1997. Modulation of endotoxin-induced inflammation in the bovine teat using antagonists/inhibitors to leukotrienes, platelet activating factor and interleukin 1 beta. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57:239-251.
- 【非特許文献29】Cairns, C. M., J. R. Gordon, F. Li, M. E. Baca-Estrada, T. N. Moyana, and J. Xiang. 2001. Lymphotactin expression by engineered myeloma tumor cells dri 50

ves tumor regression. Mediation by CD4+ and CD8+ T cells and neutrophils expressing XCR1 receptors. J. Immunol. 167:57-65.

【非特許文献30】Gordon, J. R. 2000. TGFb and TNFa secretion by mast cells stimulated via the FceR1 activates fibroblasts for high level production of monocyte chemoattractant protein-1. Cell Immunol. 201:42-49. 10

【非特許文献31】Gordon, J. R., and S. J. Galli. 1994. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the FceRI. Role for mast cell-derived transforming growth factor-b and tumor necrosis factor-a. J. Exp. Med. 180:2027-2037.

【非特許文献32】Gordon, J. R. 2000- Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression during cutaneous allergic responses in mice is mast cell-dependent and largely mediates monocyte recruitment. J. Allergy Clin. Immunol. 106: 110-116. 20

【非特許文献33】Caswell, J. L. 1998. The role of interleukin-8 as a neutrophil chemoattractant in bovine bronchopneumonia. Ph.D. thesis, Department of Veterinary Pathology, University of Saskatchewan. 241 pg,

【非特許文献34】Hochreiter, W. W., R. B. Nadler, A. E. Koch, P. L. Campbell, M. Ludwig, W. Weidner, and A. J. Schaeffer. 2000. Evaluation of the cytokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide-78 as indicators of inflammation in prostatic secretions. Urology. 56: 1025-1029. 30

【非特許文献35】Persson, K., I. Larsson, and C. Hallen Sandgren. 1993. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. Vet. Immunol. Immunopathol. 37:99-112. 40

【非特許文献36】Gray, G. D., K. A. Knight, R. D. Nelson, and M. Herron, J. 1982. Chemotactic requirements of bovine leukocytes. Am. J. Vet. Res. 43:757-759.

【非特許文献37】Fernandez, H. N., P. M. Iienson, A. Otani, and T. E. Hugli. 1978. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5 50

a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. J. Immunol. 120: 109-115.

【非特許文献38】Riollet, C., P. Rainard, and B. Poutrel. 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clin. Diagn. Lab Immunol. 7: 161-167.

10

【非特許文献39】Shuster, D. E., M. E. Kehrl, Jr., P. Rainard, and M. Paape. 1997. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. Infect. Immun. 65: 3286-3292.

【非特許文献40】Bless, N. M., R. L. Warmer, V. A. Padgaonkar, A. B. Lentsch, B. J. Czernak, H. Schmal, H. P. Friedl, and P. A. Ward. 1999. Roles for C-X-C chemokines and C5a in lung injury after hindlimb ischemia-reperfusion. Am. J. Physiol. 276: L57-63.

20

【非特許文献41】Ember, J. A., S. D. Sanderson, T. E. Hugli, and E. L. Morgan. 1994. Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. Am. J. Pathol. 144: 393-403.

【非特許文献42】Fisher, C., G. Slotman, S. Opal, J. Pribble, R. Bone, G. Emmanuel, D. Nig, D. Bloedow, and M. Catalano. 1994. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. Crit. Care Med. 22: 11-21.

30

【非特許文献43】Verbon, A., P. E. Dekkers, T. ten Hove, C. E. Hack, I. Pribble, T. Turner, S. Souza, T. Axtelle, F. Hock, -S. -J. van Deventer, and T. van der Poll. 2001. IC14, an anti-CD 14 antibody, inhibits endotoxin-mediated symptoms and inflammatory responses in humans. J. Immunol. 166: 3599-3605.

40

【非特許文献44】Clark Lewis, I., K. S. Kim, K. Rajarathnam, J. H. Gong, B. Dewald, B. Moser, M. Baggiolini, and B. D. Sykes. 1995. Structure-activity relationships of chemokines. J. Leukoc. Biol. 57: 703-711.

50

【非特許文献45】Jones, S. A., B. Dewald, I. Clark Lewis, and M. Baggiolini. 1997. Chemokine antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2. *J. Biol. Chem.* 272:16166-16169.

【非特許文献46】Hang, L. B. Frendeus, G. Godaly, and C. Svanborg. 2000. Interleukin-8 receptor knockout mice have subepithelial neutrophil entrapment and renal scarring following acute pyelonephritis. *J. Infect. Dis.* 182: 1738-1748.

10

【非特許文献47】Saurer, L., P. Reber, J. Schaffner, M. W. Buchler, C. Buri, A. Kappeler, A. Wall, H. Friess, and C. Mueller. 2000. Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterol.* 118:356-367.

【非特許文献48】Szekanecz, Z., R. M. Strieter, S. L. Kunkel, and A. E. Koch. 1998. Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* 20:115-132.

20

【非特許文献49】MacDermott, R. P. 1999. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Immunol.* 19:266-272.

【非特許文献50】Damas, J. K., L. Gullestad, T. Ueland, N. O. Solum, S. Simonsen, S. S. Froland, and P. Aukrust. 2000. CXC-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure—possible role of platelets and monocytes. *Cardiovasc. Res.* 45 :428-436,

30

【非特許文献51】Morsey, M., Y. Popowich, I. Kowalski, G. Gerlach, D. Godson, M. Campos, and L. Babiuk. 1996. Molecular cloning and expression of bovine interleukin-8. *Microbial Pathogen.* 20:203-212.

【非特許文献52】Benson, M., I. L. Strannegard, G. Wennergren, and O. Strannegard. 1999. Interleukin-5 and interleukin-8 in relation to eosinophils and neutrophils in nasal fluids from school children with seasonal allergic rhinitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* 10:178-185.

40

【非特許文献53】Hauser, U., M. Wagenmann, C. Rudack, and C. Bachert. 1997. Specific immunotherapy suppresses IL-8-levels in nasal secretions: A possible explanation for the inhibition of eosinophil migration. *Allergol.* 20: 184-191.

50

【非特許文献54】Sehmi, R., O. Cromwell, A. J. Wardlaw, R. Moqbel, and A. B. Kay. 1993. Interleukin-8 is a chemoattractant for eosinophils purified from subjects with a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. Clin. Exp. Allergy 23:1027-1036.

【非特許文献55】Ulfman, L. H., D. P. Joosten, J. A. van der Linden, J. W. Lammers, J. J. Zwaginga, and L. Koenderman, 2001. IL-8 induces a transient arrest of rolling eosinophils on human endothelial cells. J. Immunol. 166:588-595.

【発明の開示】

【0005】

本発明の構成は、哺乳類細胞のCXCR1またはCXCR2受容体に結合可能な新たなELR-CXCケモカインアゴニストおよびアンタゴニストタンパク質を含む。これらは高親和性結合が可能なアゴニストおよびアンタゴニストを含み、ここで"高親和性"とは、アゴニストまたはアンタゴニストの受容体に対する親和性であって、生理的適性濃度において野生型ケモカインアゴニストを阻害するのに充分である親和性を示す。新たなアンタゴニストタンパク質はまた、野生型ウシおよび／またはヒトCXCL8タンパク質(SEQ ID No: 1および2のアミノ酸配列で示される)に略等しいものを含む(すなわち、CXCR1およびCXCR2結合機能を削除しないアミノ酸置換、付加および欠失を含む)とともに、Lys11のArg置換およびGly31のPro置換を有するクマ改良アミノ末端基アミノ酸残余を含む。このウシCXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/G31Pの相似物、すなわちCXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/G31P/P32G(SEQ ID No. 7)およびCXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/T12S/H13F/G31P(SEQ ID No. 8)も含まれる。

【0006】

本発明の他の構成は、これらのタンパク質に関連する新たなポリヌクレオチドおよびオリペプチドである。他の実施形態において、前記アミノ酸配列に由来するヌクレオチド配列が提供される。さらに本発明は、新たなポリヌクレオチドからなるベクター、および新たなポリヌクレオチドの調節配列制御発現と効果的に組み合わせられた該ポリヌクレオチドからなる発現ベクターを含む。同様に、親和性把持および新たなポリヌクレオチドからなる遺伝子融合、およびこのような遺伝子融合を含む合成ベクターおよび発現ベクターが本発明に含まれる。

【0007】

本発明はまた、新たなポリヌクレオチドを含むように遺伝子設計された宿主、および調節配列と効果的に組み合わせられた、新たなポリヌクレオチドすなわち調節配列が新たなポリヌクレオチドの発現を制御するような調節配列と効果的に組み合わせられた、新たなポリヌクレオチドを含むように遺伝子設計された宿主を含む。調節配列が遺伝子融合の発現を制御するような調節配列と組み合わせられたか、あるいはそのような調節配列が存在しない、遺伝子融合を含む宿主も含まれる。これらの宿主はウイルスまたは細胞でありうる。この細胞には制限なしでバクテリア、酵母菌、原生動物、茸、藻、植物細胞、動物細胞およびそれらに由来する高位の有機体が含まれる。

【0008】

本発明はさらに、哺乳類のCXCR1またはCXCR2受容体を含むCXCケモカイン媒介病状の治療における新たなポリヌクレオチドの利用からなる。同様に、CXCR1またはCXCR2受容体を含むELR-CXCケモカイン受容体媒介病状の治療方法であって、罹患した哺乳類への有効量の新たなポリヌクレオチドの1つの投薬を含む方法を、本

発明は含む。生物活性量の新たなポリヌクレオチドの1つからなる薬品組成も含まれる。

【0009】

新たなポリヌクレオチドの生産と精製の方法もまた本発明に含まれる。

【0010】

本発明の1つの側面において、以下の配列を有する、または該配列からなる、精製または単離されたペプチドが提供される。ここでXは任意のアミノ酸である。

【0011】

XELRCXCIRX XSXPFXPXI XXXXIXSPP HCNXXE
IIVK LXXGXEXCLX PXXWVQXXV XXFXKXXEXX XX
(SEQ ID No. 3)

10

本発明の別の実施形態においては、以下の配列からなる、精製または単離されたペプチドが提供される。ここで X_1 、 X_2 、 X_3 および X_4 は独立した0～10のアミノ酸残基であり、Xは任意のアミノ酸である。

【0012】

X_1 ELRCXCIRX XSXPFXPXI XXXXIXSPP HCNXX
EIIVK LXXGXEXCLX PXXWVQXXV XXFXKXXEXX $_2$ X $_3$ X $_4$

本発明の別の実施形態においては、以下の配列からなる、精製または単離されたペプチドが提供される。

X_1 ELRCX $_6$ CIRX $_{10}$ X_{11} SX $_{13}$ PFX $_{16}$ PKX $_{19}$ I X_{21} EX $_2$
 X_{24} X $_{25}$ IX $_{27}$ SPP
HCX $_{33}$ NX $_{35}$ EIIVK L X_{42} X $_{43}$ GX $_{45}$ EX $_{47}$ CLX $_{50}$ PX $_5$
 X_{53} X $_{54}$ WVQX $_{58}$ X $_{59}$ V
X $_{61}$ X $_{62}$ FX $_{64}$ KX $_{66}$ X $_{67}$ EX $_{69}$ X $_{70}$ X $_{71}$ X $_{72}$ (SEQ ID No.
. 4)

20

ここで、

X_1 は0～10のアミノ酸；

X_6 はQ、EまたはL；

X_{10} はTまたはI；

X_{11} はHまたはY；

X_{13} はTまたはK；

X_{16} はHまたはN；

X_{19} はFまたはYまたはL；

X_{21} はKまたはR；

X_{23} はLまたはM；

X_{24} はRまたはT；

X_{25} はVまたはA；

X_{27} はDまたはE；

X_{33} はVまたはAまたはE；

X_{35} はTまたはS；

X_{42} はSまたはVまたはTまたはF；

X_{43} はDまたはN；

X_{45} はRまたはAまたはNまたはKまたはD；

X_{47} はLまたはV；

X_{50} はDまたはN；

X_{52} はKまたはH；

X_{53} はEまたはQまたはT；

X_{54} はPまたはNまたはK；

X_{58} はRまたはKまたはI；

X_{59} はVまたはI；

30

40

50

X_{61} は E または Q ;
 X_{62} は K または I または V または A ;
 X_{64} は L または V ;
 X_{66} は R または K ;
 X_{67} は A または T ;
 X_{69} は S または N または K または G ;
 X_{70} は Q または S または K であるかあるいは削除 ;
 X_{71} は N または D であるかあるいは削除 ;
 X_{72} は P または A または S であるかあるいは削除である。

【 0 0 1 3 】

10

本発明の別の実施形態においては、実質的に以下の配列 1 乃至 2 に示すアミノ酸配列のいずれかからなる、精製または単離されたペプチドが提供される。

【 0 0 1 4 】

[配列 1]

【 化 1 】

GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P – SEQ ID No. 10);
 KELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVV
 EKFLKRAENS (hG31P (0) – SEQ ID No. 11);
 ELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVVE
 KFLKRAENS (hG31P (-1) – SEQ ID No. 12);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P (+2) – SEQ ID No. 13);
 GSMGSGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKEN
 WVQRVVEKFLKRAENS (hG31P (+6) – SEQ ID No. 14);
 GSTELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P K3T – SEQ ID No. 15);
 GSKELRCQCIRTHSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P Y13H – SEQ ID No. 16);
 GSKELRCQCIRTYSTPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P K15T (0) – SEQ ID No. 17);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCENTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P A35E(0) – SEQ ID No. 18);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANSEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P T37S (0) – SEQ ID No. 19);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLTDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P S44T (0) – SEQ ID No. 20);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGDELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P R47D (0) – SEQ ID No. 21);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKEKWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P N56K(0) – SEQ ID No. 22);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQK
 VVEKFLKRAENS (hG31P R60K (0) – SEQ ID No. 23);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR
 VVEVFLKRAENS (hG31P K64V (0) – SEQ ID No. 24);
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGREVCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (hG31P L49V – SEQ ID No. 25);

20

30

40

【 0 0 1 5 】

[配列 2]

【化 2】

GSKELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (bhG31P T3K – SEQ ID No. 26);
 GSTELRCQCIRTYSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (bhG31P H13Y – SEQ ID No. 27);
 GSTELRCQCIRTHSKPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (bhG31P T15K – SEQ ID No. 28);
 GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCANSEIIVKLTGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (bhG31P E35A – SEQ ID No. 29);
 GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENTEIIVKLTGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (bhG31P S37T – SEQ ID No. 30);
 GSMGGSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTGRELCLDPKEN
 WVQRVVEKFLKRAENS (bhG31P (+6) – SEQ ID No. 31);
 GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS (bhG31P (+2) – SEQ ID No. 32);
 TELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTGRELCLDPKENWVQRVV
 EKFLKRAENS (bhG31P (+0) – SEQ ID No. 33);
 ELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTGRELCLDPKENWVQRVVE
 KFLKRAENS (bhG31P (-1) – SEQ ID No. 34);
 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKEN
 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11R (+6) – SEQ ID No. 35);
 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCENTEIIVKLSDGRELCLDPKEN
 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P A35E(+6) – SEQ ID No. 36);
 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANSEIIVKLSDGRELCLDPKEN
 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P T37S (+6) – SEQ ID No. 37);
 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLTGRELCLDPKEN
 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P S44T (+6) – SEQ ID No. 38);
 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGDELCLDPKEN
 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P R47D (+6) – SEQ ID No. 39);
 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGREVCLDPKEN
 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P L49V – SEQ ID No. 40);
 GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTNGNEVCLNPKEKWVQK
 VVQVFVKRAEKQDP (Bovine 3-74 K11RG31P (+2)– SEQ ID No. 41).

10

20

30

【0 0 1 6】

本発明のさらなる側面により、以下のアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列からなる、単離されたポリヌクレオチド配列が提供される。ここで X_1 、 X_2 、 X_3 および X_4 は独立した 0 ~ 10 のアミノ酸残基であり、 X は任意のアミノ酸である。

X_1 E L R C X C I R X X S X P F X P K X I X E X X X I X S P P H C X N X E
 I I V K L X X G X E X C L X P X X X W V Q X X V X X F X K X X E X X X_2 X_3
 X_4

40

本発明のさらなる側面により、以下のアミノ酸配列をエンコードする、単離されたポリヌクレオチド配列が提供される。

X_1 E L R C X_6 C I R X_{10} X_{11} S X_{13} P F X_{16} P K X_{19} I X_{21} E X_2
 X_{24} X_{25} I X_{27} S P P
 H C X_{33} N X_{35} E I I V K L X_{42} X_{43} G X_{45} E X_{47} C L X_{50} P X_5
 X_{53} X_{54} W V Q X_{58} X_{59} V
 X_{61} X_{62} F X_{64} K X_{66} X_{67} E X_{69} X_{70} X_{71} X_{72} (S E Q I D N o .
 4)

ここで、

X_1 は 0 ~ 10 のアミノ酸；

50

X_6 は Q、E または L ;
 X_{10} は T または I ;
 X_{11} は H または Y ;
 X_{13} は T または K ;
 X_{16} は H または N ;
 X_{19} は F または Y または L ;
 X_{21} は K または R ;
 X_{23} は L または M ;
 X_{24} は R または T ;
 X_{25} は V または A ;
 X_{27} は D または E ;
 X_{33} は V または A または E ;
 X_{35} は T または S ;
 X_{42} は S または V または T または F ;
 X_{43} は D または N ;
 X_{45} は R または A または N または K または D ;
 X_{47} は L または V ;
 X_{50} は D または N ;
 X_{52} は K または H ;
 X_{53} は E または Q または T ;
 X_{54} は P または N または K ;
 X_{58} は R または K または I ;
 X_{59} は V または I ;
 X_{61} は E または Q ;
 X_{62} は K または I または V または A ;
 X_{64} は L または V ;
 X_{66} は R または K ;
 X_{67} は A または T ;
 X_{69} は S または N または K または G ;
 X_{70} は Q または S または K であるかあるいは削除 ;
 X_{71} は N または D であるかあるいは削除 ;
 X_{72} は P または A または S であるかあるいは削除である。

10

20

30

【0017】

本発明のさらなる側面により、実質的に SEQ ID No. 10～41 のいずれかのアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列からなる、単離されたポリヌクレオチド配列が提供される。

【0018】

本発明の他の側面においては、前記のポリヌクレオチドからなる形質転換細胞が提供される。該ポリヌクレオチドは非天然でありうる。

【0019】

本発明の他の側面においては、遺伝子工学によって前記のポリヌクレオチドからなるように作成されたウイルス性宿主が提供される。

40

【0020】

本発明のさらなる側面においては、前記のポリヌクレオチドからなる発現ベクターが提供される。該発現ベクターは適当な宿主内において該ポリヌクレオチドの発現を制御する調節配列に作用的に連結される。

【0021】

本発明のさらなる側面においては、前記の発現ベクターからなる宿主細胞が提供される。

【0022】

50

本発明の別の側面においては、E L R－C X C ケモカイン受容体媒介病状の治療のための薬剤の製造における前記のペプチドの利用が提供される。

【0023】

本発明の別の側面においては、治療を要する個体への有効量の前記ペプチドの投薬からなるE L R－C X C ケモカイン受容体媒介病状の治療方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下の略称を開示で用いる：A R D S（急性呼吸困難症候群）；B A L F（気管支肺胞洗浄液）；B H R（ボルトン－ハンター試薬）；C X C R 1、C X C R 2、C X C L 8 受容体A、Bそれぞれ；E L R（グルタミン酸－ロイシン－アルギニンモチーフ）；C X C L 1（生育依存腫瘍遺伝子アルファ）；C X C L 4（血小板第4因子）；C X C L 5（上皮移送好中球アクティベーター－78）；C X C L 6（果粒球走化性タンパク質－2）；C X C L 8（インターロイキン－8）；f M L P（フォルミルメチオニル－ロイシルプロリン細菌性トリペプチド）；I P T G（イソプロピルーチオ－D－ガラクトピロノシド）；M I P－2（マクロファージ炎症タンパク質－2）；P M S F（フッ化フェニルメチルスルホニル）；T M B（テトラメチルベンジジン）。

【0025】

ここで用いる'アゴニスト'は細胞を活性化する作用物質を指す。

【0026】

ここで用いる'アンタゴニスト'は、アゴニストの存在または非存在下において細胞の活性化を防止する作用物質を指す。

【0027】

ここで用いる用語'精製'は絶対的な純度を要求しないが、相対的な定義を意図する。例えば、出発原料または天然原料の、少なくとも1桁、好ましくは2または3桁への精製は、'精製'の定義内にあるものと明白に熟慮する

ここで用いる用語'単離'は、原料がその元の環境から除去されることを要する。

【0028】

ここで用いる用語'処置'は、疾患状態、疾患進行、疾患による他の異常の有害な効果を防止、養生、反転、希釈、軽減、最小化、抑制または停止することを指す。

【0029】

ここで用いる'有効量'は、所望の結果を得るのに十分な量である。当業者には認識されるように、そのような量はもちろん、処置される個体の年齢、体重および状態に依存する。

【0030】

ウシC X C L 8のアミノ末端切断をアミノ酸11におけるリジンのアルギニン置換（すなわちC X C L 8₍₃₋₇₄₎K11R）に組み合わせる場合、C X C R 1およびC X C R 2受容体親和性の劇的な増加が明白であり、C X C L 8₍₃₋₇₄₎K11Rは、多重配位子の双方の受容体への結合を競争的に阻害する（F・リーおよびJ・R・ゴードン、2001年、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ誌286号595～600頁、非特許文献に含まれる）。いくつかの受容体シグナリングC X C ケモカインのE L Rモチーフ（例えばヒトC X C L 8のアミノ酸4～6）へのさらなる切断によって、それらを緩い（C X C L 8₍₆₋₇₂₎）、並みの（C X C L 1₍₈₋₇₃₎）受容体アンタゴニストへと変形することができる（マッコールおよびクラーク・ルイス、1999年、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー誌268号7125～7128頁）。ここで開示するように、グリシン31のプロリン残基への二次アミノ酸置換のウシC X C L 8₍₃₋₇₄₎K11Rへの導入（すなわちC X C L 8₍₃₋₇₄₎K11R/G31P）により、このC X C L 8相似物はウシおよびヒトE L R－C X C ケモカイン反応の非常に親和性の高いアンタゴニストとなる。これは、細菌性またはエンドトキシン誘導の炎症病巣内で発現するヒトE L R－C X C ケモカインの配列全体を十分にアンタゴナイズするとともに、生体内エンドトキシン誘導炎症を遮断する。

【0031】

以下の考察の一部においては主にウシ好中球を扱うが、他の哺乳類（ヒトを含む）の炎症細胞もCXCR1およびCXCR2受容体を示し（例えば、M・ベンソン他、ピディアトリック・アレルギー・アンド・イミュノロジー誌10号178～185頁を参照）、そのためCXCL8（₃₋₇₄）K11R/G31Pによる阻害を受けることができる。よって、本発明は哺乳類ELR-CXCケモカイン媒介病状に広く適用することができる。

【0032】

当業者には理解されるように、ここで用いる命名、'3-74'は、天然CXCL8ペプチドの長さは74のアミノ酸であり（'74'）、最初の2つのアミノ酸を切断し、ペプチド配列が天然配列でのアミノ酸#3から始まることを指している。命名の一貫性のため、アミノ酸は野生型配列に基づく数によって示し、'G31P'は野生型配列のアミノ酸#31のグリシンのプロリンへの置換を指す。当業者には認識されるように、SEQ ID No. 1に関して、最初の2つのアミノ酸の除去によりプロリンは実際には29番目のアミノ酸である。

【0033】

本発明の別実施例においては、哺乳類炎症細胞においてCXCR1またはCXCR2受容体に結合可能なヒトELR-CXCケモカインアンタゴニストタンパク質が提供される。好ましい実施例において、これらのペプチドはSEQ ID No. 1の配列を有するペプチドと略同等である。これは、当業者には認識されるように、これらのペプチドは、少なくとも60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%が野生型CXCL8タンパク質（ここではSEQ ID No. 2のアミノ酸配列として示す）と一致するアミノ酸配列を有するとともに、最初の2つのアミノ酸の切断残基およびLys11のArg置換とGly31のPro置換を有する、ということと略等しい意味である。当業者には認識されるように、多くの実施例において、以下で述べるようにこれらのペプチドの長さはおよそ69、70または72のアミノ酸である。しかし、別の実施例においては、上で述べたペプチドは1、2、3、4、5、6またはそれ以上のアミノ酸の除去および／または挿入を含みうる。当業者には認識されるように、挿入または除去が許容されるペプチドの領域を、ペプチドの三次元構造から、または関連する生体の配列の比較によって予測することができる。

【0034】

例えば、ウシ、ヒト、アカゲザル、ヒツジ、イヌおよびブタを含む複数の種からの野生型CXCL8配列のペプチド整列を示す表1に関して、ブタ配列の1つは、野生型ウシ配列のアミノ酸60および61に対応する部分の間に挿入された追加のアミノ酸を含み、これによってこれは他の種の1つ以上のアミノ酸の挿入が許容されるらしいサイトであることが示される。同様に、ヒトおよびブタ配列において、2および3のアミノ酸が、ウシ配列に関連するC末端において除去され、これによって、少なくとも2～3のアミノ酸のC末端からの除去は他の種でも同様に許容されるらしいことが示唆される。当業者には認識されるように、これはまた、これらのペプチドのC末端でのアミノ酸の追加または置換が許容されるらしい、すなわちペプチドの所望の生物学的活性に有意な負の効果を持たない、ということを示す。

【0035】

ポリペプチドの構造においてペプチドの生物学的機能を実質的に変えることなくいくつかの変異および変化を加え、生物学的に同等のポリペプチドを得ることが可能であることが、当該技術において既知であることは注目すべきである。本発明の一つの側面において、前記のペプチドは、保存的アミノ酸置換による異なるペプチドを含みうる。本発明のペプチドはまた、保存的アミノ酸置換によって異なっている生物学的に同等のペプチドに拡張することができる。ここで用いる語"保存されるアミノ酸置換"は、1つのアミノ酸のペプチドにおける他の所定の位置との置換であって、関連する機能、この場合においてはエ

10

20

30

40

50

ピトーブの折り畳みの実質的な減少なしに可能な置換を指す。このような変化を為すにおいて、類似のアミノ酸残基の置換は、側鎖置換基の相対的類似、例えばその大きさ、電荷、疎水性、親水性等に基づいて可能であり、このような置換は、ペプチドの機能における該置換の効果について定期試験によって分析されうる。この実施例においては、機能とは C X C L 8 ケモカインアンタゴニスト活性を指す。

【0036】

いくつかの実施例においては、保存されるアミノ酸置換として、アミノ酸残基を近い親水値（例えば±2.0以内の値）を有する別のアミノ酸と置換することが可能であり、約-1.6のハイドロパシク（hydrophatic）インデックスを有するアミノ酸、Tyr（-1.3）やPro（-1.6）等を以下のアミノ酸残基に割り当てうる（非特許文献に含まれる米国特許4554101号に詳述される）：Arg（+3.0）；Lys（+3.0）；Asp（+3.0）；Glu（+3.0）；Ser（+0.3）；Asn（+0.2）；Gln（+0.2）；Gly（0）；Pro（-0.5）；Thr（-0.4）；Ala（-0.5）；His（-0.5）；Cys（-1.0）；Met（-1.3）；Val（-1.5）；Leu（-1.8）；Ile（-1.8）；Tyr（2.3）；Phe（-2.5）；and Trp（-3.4）。

10

【0037】

別の実施例においては、保存されるアミノ酸置換として、アミノ酸残基を近いハイドロパシクインデックス（例えば±2.0以内の値）を有する別のアミノ酸と置換することが可能である。このような実施例においては、以下のそれぞれのアミノ酸残基をその疎水性および電荷の特性に基づいて、ハイドロパシクインデックスに割り当てうる：Ile（+4.5）；Val（+4.2）；Leu（+3.8）；Phe（+2.8）；Cys（+2.5）；Met（+1.9）；Ala（+1.8）；Gly（-0.4）；Thr（-0.7）；Ser（-0.8）；Trp（-0.9）；Tyr（-1.3）；Pro（-1.6）；His（-3.2）；Glu（-3.5）；Gln（-3.5）；Asp（3.5）；Asn（-3.5）；Lys（-3.9）；and Arg（-4.5）。

20

【0038】

別の実施例においては、保存されるアミノ酸置換として、アミノ酸残基を同じクラスの別のアミノ酸と置換することが可能である。該アミノ酸は以下のように無極性、酸性、塩基性および中性に分けられる：無極性：Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Met；酸性：Asp, Glu；塩基性：Lys, Arg, His；中性：Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr。

30

【0039】

他の実施例においては、既知の任意のアミノ酸を所定の位置において置き換える置換がなされうる。いくつかの実施例においては、進化的な非保存または弱い保存のアミノ酸を、例えばサイズが近く疎水性の異なるアミノ酸または電荷が近くサイズが異なるアミノ酸と置換しうる。また、当業者に理解される他の類似の置換も可能である。

【0040】

よって、C X C L 8₍₃₋₇₄₎ K 1 1 R G 3 1 Pの相似物を構成することが可能であり、SEQ ID No. 6で示される配列の挿入、除去および置換によって所望の生物学的機能が保持される。SEQ ID No. 7~41において典型的な相似物が示されることも注目すべきである。

40

【0041】

好ましい実子例においては、C X C L 8₍₃₋₇₄₎ G 3 1 Pの略等しい相似物を、例えば表1に示される複数の種の関連する配列の比較を用いて調製する。当業者には認識されるように、高度に可変なアミノ酸位置の置換は、高度に保存されるアミノ酸よりも許容されうる。

【0042】

例えば、2つのN末端アミノ酸の消去、グリシン31のプロリンとの置換およびリジン11のアルギニンとの置換の後の、表1に示される配列の比較により、以下の配列が提供

50

される。

XELRCXCIRX XSXPFXPXI XEXXXIXSPP HCNXNEI
IVK LXXGXEXCLX PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX XX (SEQ ID No. 3)

ここでXは任意のアミノ酸である。いくつかの実子例においては、Xは天然アミノ酸である。

【0043】

本発明の別実子例においては、以下のアミノ酸配列を含む単離または精製されたペプチドが提供される。

X₁ELRCXCIRX XSXPFXPXI XEXXXIXSPP HCNXNEI 10
IIVK LXXGXEXCLX PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX₂X₃
X₄ (SEQ ID No. 42)

ここでX₁、X₂、X₃およびX₄は独立な0～10アミノ酸残基であり、Xは任意のアミノ酸である。すなわち、X₁は例えばランダムな6アミノ酸の長さであり、X₂、X₃およびX₄は全て0アミノ酸の長さ、つまり消去でありうる。別の実子例においては、X₁は変性の2アミノ酸、すなわちMS（ウシ）およびSA（ヒト）以外の任意の2アミノ酸であり、X₂はSまたはQ、X₃およびX₄は消去でありうる。

【0044】

あるいは、X₁は0～9アミノ酸、0～8アミノ酸、0～7アミノ酸、0～6アミノ酸、0～5アミノ酸、0～4アミノ酸、0～3アミノ酸、または0～2アミノ酸であるか、 20
もしくはX₁はGSK、GST、S、A、T、K、GSMGGSK、およびGSMGGSTからなるグループのいずれかであるか、またはX₁は消去でありうる。

【0045】

いくつかの実施例においては、前記ペプチドはSEQ ID No. 6、7、8または9のアミノ酸配列を持たないことが条件となることは注目すべきである。

【0046】

本発明の別実子例においては、以下のアミノ酸配列を含む単離または精製されたペプチドが提供される。

【0047】
X₁ELRC X₆CIRX₁₀ X₁₁SX₁₃PFX₁₆PKX₁₉I X₂₁E 30
X₂₃X₂₄X₂₅I X₂₇SPP
HCX₃₃NX₃₅E IIVK L X₄₂X₄₃GX₄₅EX₄₇CLX₅₀ PX₅
₂X₅₃X₅₄WVQX₅₈X₅₉V
X₆₁X₆₂FX₆₄KX₆₆X₆₇EX₆₉X₇₀X₇₁X₇₂ (SEQ ID No. 43)

ここで、X₁、X₇₀、X₇₁およびX₇₂は独立の0～10アミノ酸である。X₆、X₁₀、X₁₁、X₁₃、X₁₆、X₁₉、X₂₁、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₇、X₃₃、X₃₅、X₄₂、X₄₃、X₄₅、X₄₇、X₅₀、X₅₂、X₅₃、X₅₄、X₅₈、X₅₉、X₆₁、X₆₂、X₆₄、X₆₆、X₆₇、X₆₉は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、VおよびYからなるグループから 40
それぞれ独立に選ばれる。

【0048】

あるいは、X₁、X₇₀、X₇₁およびX₇₂は独立の0～9アミノ酸、0～8アミノ酸、0～7アミノ酸、0～6アミノ酸、0～5アミノ酸、0～4アミノ酸、0～3アミノ酸、または0～2アミノ酸であるか、もしくはX₁はGSK、GST、S、A、T、K、GSMGGSK、およびGSMGGSTからなるグループのいずれかであるか、またはX₁は消去でありうる。

【0049】

別の実子例においては、X₁は変性の2アミノ酸、すなわちMS（ウシ）およびSA（ヒト）以外の任意の2アミノ酸であり、X₇₀はSまたはQ、X₇₁およびX₇₂は消去 50

でありうる。

【0050】

いくつかの実施例においては、前記ペプチドはSEQ ID No. 6、7、8または9のアミノ酸配列を持たないことが条件となることは注目すべきである。

【0051】

本発明の別実子例においては、以下のアミノ酸配列を含む単離または精製されたペプチドが提供される。

X₁ E L R C X₆ C I R X₁₀ X₁₁ S X₁₃ P F X₁₆ P K X₁₉ I X₂₁ E X₂₃ X₂₄ X₂₅ I X₂₇ S P P
H C X₃₃ N X₃₅ E I I V K L X₄₂ X₄₃ G X₄₅ E X₄₇ C L X₅₀ P X₅₂ X₅₃ X₅₄ W V Q X₅₈ X₅₉ V
X₆₁ X₆₂ F X₆₄ K X₆₆ X₆₇ E X₆₉ X₇₀ X₇₁ X₇₂ (SEQ ID No. 4)

ここで、

X₁ は0～10のアミノ酸；

X₆ はQ、EまたはL；

X₁₀ はTまたはI；

X₁₁ はHまたはY；

X₁₃ はTまたはK；

X₁₆ はHまたはN；

X₁₉ はFまたはYまたはL；

X₂₁ はKまたはR；

X₂₃ はLまたはM；

X₂₄ はRまたはT；

X₂₅ はVまたはA；

X₂₇ はDまたはE；

X₃₃ はVまたはAまたはE；

X₃₅ はTまたはS；

X₄₂ はSまたはVまたはTまたはF；

X₄₃ はDまたはN；

X₄₅ はRまたはAまたはNまたはKまたはD；

X₄₇ はLまたはV；

X₅₀ はDまたはN；

X₅₂ はKまたはH；

X₅₃ はEまたはQまたはT；

X₅₄ はPまたはNまたはK；

X₅₈ はRまたはKまたはI；

X₅₉ はVまたはI；

X₆₁ はEまたはQ；

X₆₂ はKまたはIまたはVまたはA；

X₆₄ はLまたはV；

X₆₆ はRまたはK；

X₆₇ はAまたはT；

X₆₉ はSまたはNまたはKまたはG；

X₇₀ はQまたはSまたはKであるかあるいは削除；

X₇₁ はNまたはDであるかあるいは削除；

X₇₂ はPまたはAまたはSであるかあるいは削除である。

【0052】

あるいは、X₁ は0～9アミノ酸、0～8アミノ酸、0～7アミノ酸、0～6アミノ酸、0～5アミノ酸、0～4アミノ酸、0～3アミノ酸、または0～2アミノ酸であるか、

もしくは X_1 はGSK、GST、S、A、T、K、GSMGGSK、およびGSMGGSTからなるグループのいずれかであるか、または X_1 は消去でありうる。

【0053】

いくつかの実施例においては、前記ペプチドはSEQ ID No. 6、7、8または9のアミノ酸配列を持たないことが条件となることに注目すべきである。

【0054】

本発明の別実子例においては、以下のアミノ酸配列を含む単離または精製されたペプチドが提供される。

【0055】

X_1 ELRC X_6 CIR X_{10} X_{11} S X_{13} PF X_{16} PK X_{19} I X_{21} E 10
 X_{23} X_{24} X_{25} I X_{27} SP
 HC X_{33} N X_{35} EIIVK L X_{42} X_{43} G X_{45} E X_{47} CL X_{50} P X_5
 X_{53} X_{54} WVQ X_{58} X_{59} V
 X_{61} X_{62} F X_{64} K X_{66} X_{67} E X_{69} X_{70} X_{71} X_{72} (SEQ ID No.
 . 43)

ここで、

X_1 はGSK、GST、S、A、T、K、GSMGGSK、GSMGGST、あるいは削除；

X_{11} はHまたはY；

X_{13} はTまたはK； 20

X_{33} はAまたはE；

X_{35} はTまたはS；

X_{42} はSまたはT；

X_{43} はDまたはN；

X_{45} はRまたはNまたはD；

X_{47} はLまたはV；

X_{50} はDまたはN；

X_{54} はNまたはK；

X_{58} はRまたはK；

X_{61} はEまたはQ； 30

X_{62} はKまたはV；

X_{64} はLまたはV；

X_{69} はNまたはK；

X_{70} はQまたはSまたは消去；

X_{71} はDまたは消去；

X_{72} はPまたは消去である。

【0056】

いくつかの実施例においては、前記ペプチドはSEQ ID No. 6、7、8または9のアミノ酸配列を持たないことが条件となることは注目すべきである。

【0057】 40

別実子例においては、SEQ ID No. 6～41またはSEQ ID No. 10～41（前記配列1乃至2参照）のアミノ酸配列を実質的に含むかあるいは含む、単離または精製されたペプチドが提供される。

【0058】

当業者には認識されるように、上で定義したペプチドにおける'実質的に含む'とは、該ペプチドが例えばN末端および／またはC末端の除去であって、ペプチドの活性、すなわちELRCXCケモカインアゴニストまたはアンタゴニスト活性に著しく影響しない除去を含みうるということを指す。

【0059】

好ましい実施例においては、前記単離または精製されたペプチドはSEQ ID No 50

． 13 (h G 3 1 P + 2) または S E Q I D N o . 14 (h G 3 1 P + 6) に示されるものである。図 12、19 および 20 に示すとともに以下に述べるように、これらのペプチドは h G 3 1 P + 0 および h G 3 1 P - 1 と比較してより大きい反応活性を示すものである。

【0060】

前記のペプチドをエンコードするポリヌクレオチドは本発明の視野の範囲内であるとともに、当該技術分野において既知の手法を用いて構成しうる。当業者には認識されるように、このようなポリヌクレオチドからなるか、あるいは形質転換または移入された形質転換細胞または細胞系もまた、以下で述べるように本発明の視野の範囲内である。

【0061】

例えば、当該技術分野において既知の手法を用いて、ポリヌクレオチドまたは前記のポリヌクレオチドからなる発現ベクターからなるとともに、該ポリヌクレオチドの発現を制御する調節配列と効果的に連結されるウイルス性宿主を遺伝子工学によって構成しうる。

【0062】

さらに前記のペプチドを、C X C ケモカイン媒介病状の処置に用いる薬剤の製造に用いることもできる。いくつかの実施例においては、該薬剤は E L R - C X C ケモカイン媒介病状の処置に用いるものである。該 C X C ケモカイン媒介病状は、虚血・再灌流障害、内毒素血症誘導急性呼吸困難症候群、免疫複合体型糸球体腎炎、細菌性肺炎および乳腺炎からなるグループのいずれかでありうる。

【0063】

当業者には認識されるように、効果量の前記ペプチドのいずれかからなるこのような薬剤は、このような処置を必要とする個人の助けとなりうる。

【0064】

本発明の別実子例においては、結合サイトにおいて同じ三次元構造を有する化合物をアンタゴニストとして用いようと構想される。化学的構造の三次元解析を用いて、ケモカインとの結合サイトを含む活性サイトの構造を測定する。高処理量スクリーニングによる化学的誘導を用いて C X C R 2 の選択的アンタゴニストを生成するとともに化学的に最適化することがなされている（ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー誌 1998 年 273 号 10095 頁、非特許文献に含まれる）。同様の取り組みは C C R 3 アンタゴニストの生成にも用いられていた（ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー誌 2000 年 275 号 36626 頁、非特許文献に含まれる）。

【0065】

ウェルズ他（ジャーナル・オブ・ロイコサイト・バイオロジー誌 1996 年 59 号 53 頁、非特許文献に含まれる）において、核磁気共鳴分光（NMR）を用いて E L R および非 E L R の C X C ケモカインの双方を含む C X C R の配位子の三次元構造を詳述している。その NMR 情報により、ウェルズ他は多重ケモカインの受容体結合サイト内での多重置換を行い、実質的に配位子の受容体特性を変更することができた。

[原料と方法]

[試薬と補給]

以下の試薬を購入した。グルタチオンセファロース、発現ベクター p G E X - 2 T、セファデックス G - 25（アマシャム・ファーマシア・バイオテック、ケベック州バーダーフィー）ポルトン・ハンター試薬、タンパク質ビオチン化キット（ピアース・サイエンティフィック、イリノイ州ロックフォード）、シーケンシングベクター p ブルースクリプト I I K S、P f u ターボ（登録商標）DNA ポリメラーゼ（ストラトジーン、カリフォルニア州ラホーア）サイト指向突然変異誘発キット（クイックチェンジ（登録商標）、ベアリンガー・マンハイム、カナダ ケベック州ラヴァル）、アプロチニン、ベンゼン、カルシウムイオン透過担体 A 23187、クロラミン T、サイトカラシン B、ジメチルホルムアミド、エンドトキシン（大腸菌リポ多糖類、血清型 O 127 B8）、イソプロピルーチオール D - ガラクトピロノシド（I P T G）、ロイペプチン、p - ニトロフェニル D - グルクロニド、鉱油、シリコンオイル、テトラメチルベンジジン（T M B）、フッ化フェニ

10

20

30

40

50

ルメチルスルホニル (PMSF)、ホルボール-12, 13-ミリスチン酸アセテート (PMA)、トライトンX-100 (シグマ・ケミカル、オンタリオ州ミシソーガ) ディフ-クイック染色キット (アメリカン・サイエンティフィック・プロダクツ、イリノイ州マグロー)、ヒトCXCL1、CXCL5およびCXCL8 (R&Dシステムズ、ミネソタ州ミネアポリス)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 共役抗ウサギ免疫グロブリン (ザイメッド、カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)、DMEM、HBSS (ギブコ、ニューヨーク州グランドアイランド)、HRP-ストレプトアビジン (ベクター・ラボ、カリフォルニア州バーリングヘム)、ABTS酵素基質 (キアケゴー&ペリー・ラボ、メリーランド州ゲーサースバーグ)、ウシ血清アルブミン (BSA)、リンパ球分離薬剤 (ICNファーマスーティカルズ、イリノイ州オーロラ)。

10

[CXCL8. sub. (3-74) K11R相似物の生成]

高親和性CXCR1/CXCR2配位子CXCL8. sub. (3-74) K11RおよびそのT12S/H13F相似物を、リーおよびゴードン (2001年、前記) の方法に従って生成した。これらのタンパク質のGly31Pro (G31P)、Pro32Gly (P32G) およびG31P/P32G相似物を、適当な前方および後方オリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRによるサイト指向突然変異誘発で生成した (表1)。それぞれの反応の産物をDpnIにより消化し、ベクターpGEX-2T内へ連結し、HB101細胞へ移入し、それらの配列を商業的に確認した (プラント・バイオテクノロジー・インスティテュート、サスカトゥーン)。簡単には、プロテアーゼ阻害剤カクテル (2mM PMSF、2μg/ml アプロチニンおよび2μg/ml ロイペプチン) 存在下で組換え体細菌を溶解し、上澄み内の組換え体融合タンパク質を、カズウェル他の方法 (J・L・カズウェル、D・M・ミドルトンおよびJ・R・ゴードン、1998年、ヴェテリナリー・イミュノロジー・アンド・イミュノパソロジー誌67号327~340頁) に従って、グルタチオン-セファロースビーズを用いた親和クロマトグラフィーにより精製した。CXCL8 (3-74) K11R相似物をGST融合タンパク質からトロンピン消化によって開裂し、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) に対し透析し、市販エンドトキシン除去カラムを通過させ、それからポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) およびヤギ抗ウシCXCL8抗体 (M・モーセ (Morsey) 博士により提供された) を用いたウエスタンブロッティングによって特性を決定した。それぞれの精製された相似物は8kDaの分子量を持ち、ウエスタンブロッティングにおいて抗CXCL8抗体に特異的に認識され、PAGEゲルの濃度計解析による相対的純度は96%であった。

20

30

[組換え体タンパク質の標識]

後の相対的受容体親和性の分析のための、相似物の好中球および¹²⁵I-CXCL8への結合の初期測定に、¹²⁵I-CXCL8を用いた。CXCL8をビオチン化し、リーおよびゴードン (2001年、前記) に記載の市販キットを用いてビオチン置換のレベルを定量した。¹²⁵I-CXCL8を、1モルのCXCL8あたり2.15モルのビオチンで置換した。リーおよびゴードン (2001年、前記) に詳述されるようにして、CXCL8を¹²⁵Iによりボルトン-ハンター試薬 (BHR) 方法を用いて放射性同位元素で標識した。リーおよびゴードン (2001年、前記) に記載されるようにして、標識されたタンパク質を合体された¹²⁵I-BHRからセファデックスG50上のクロマトグラフィーによって分離し、標識されたCXCL8の特性を、その好中球への相対的親和性および結合平衡を得るのに必要な時間について決定した。

40

[CXCL8 (3-74) K11R相似物結合検定]

カズウェルの方法 (J・L・カズウェル他、1998年、ヴェテリナリー・イミュノロジー・アンド・イミュノパソロジー誌67号327~340頁) に従って、細胞 (85~93%好中球) を蓄牛の血液から精製した。予備実験において、トリパンブルー色素排除により、我々のいずれの相似物も好中球の生存に影響しないことを測定した。幅広い相似物測量的ため、HBSS/0.5%BSA内の好中球を相似物とともに4℃で2時間インキュベートし、冷DMEM中で洗浄し、それから¹²⁵I-CXCL8 (1000ng/ml) とともに4℃で2時間インキュベートした。洗浄した細胞をアルカリ性ホスファター

50

ゼ結合ストレプトアビジン（1：700希釈）とインキュベートしてからA B T S酵素基質とインキュベートすることで、細胞会合ビオチンを検出した。E L I S Aプレートリーダーを用いて試料のOD₄₀₅を定量した。薬剤で処置した好中球は十分なsup. biot CXCL8と慣例的に結合し、0.5～0.6のOD₄₀₅を生成した。

【0066】

CXCL8₍₃₋₇₄₎ K11R/G31Pの深さ方向の研究のため、¹²⁵I-CXCL8を非標識CXCL8またはCXCL8₍₃₋₇₄₎ K11R/G31Pとの結合抑制検定に用いた。予備実験において、好中球の¹²⁵I-CXCL8への結合平衡時間が45分であるとともに、20 pMの¹²⁵I-CXCL8がちょうど細胞の高親和性受容体を飽和させることを測定した。細胞をそれからシリコンオイル内の6%鉱油によって沈殿させ、細胞会合放射配位子のレベルをカウンターを用いて定量した。それぞれの検定において、試料のセット内での非標識配位子の200倍モル過多により、¹²⁵I-CXCL8の細胞への非特異的結合を評定した。この値を用いて特異的結合のパーセントを算出した（J・コリガン（Coligan）、A・クルスベーク（Kruisbeek）、D・マルグリース（Margulies）、E・シェバス（Shevach）およびW・ストロバー（Strober）、1994年、カレント・プロトコルス・イン・イミューノロジー、ジョン・ワイリー&サンズ、ニューヨーク）。

〔好中球－グルクロニダーゼ放出検定〕

好中球－グルクロニダーゼ検定は詳細に報告されている（リーおよびゴードン、2001年）。簡単には、サイトカラシンBで処置した好中球をCXCL8相似物とともに30分間インキュベートし、それからその分泌産物を酵素について熱量測定検定した。－グルクロニダーゼ放出は、0.2%（v/v）トライトンX-100で処置した細胞の溶解によって定量した全体細胞内容の存在として示された。ポジティブコントロール刺激薬PMA（50 ng/ml）およびA23187（1 μg/ml）による好中球免疫試験により、全体細胞－グルクロニダーゼ貯蔵の42+/-6%の放出が誘導された。

〔炎症病変からの試料〕

実験的エンドトキシン誘導乳腺炎の畜牛（n=4）の乳槽（K・P・ウォラー、1997年、ヴェテリナリー・イミューノロジー・アンド・イミューパソロジー誌57号239～251頁）と同様に、診断された臨床線維素膿性肺性マンハイミオシス（カズウェル他、1997年）によって蓄牛の肺（n=4）から気管支肺胞洗浄液（BALF）を得た。用量－反応先行試験において、5 μgのエンドトキシンが強い（最大70～80%）乳房好中球反応を誘導することが測定された。よって、報告される実験においては、5 μgのエンドトキシンまたは分散媒のみ（食塩水；体積3 ml）の、非泌乳ホルスタイン乳牛の乳槽への注入によって、乳腺炎が誘導されるとともに、15時間後、30 ml HBSSを加えた洗浄液により該槽の浸潤が回復された。BALFおよび乳槽洗浄液からの細胞を延伸分離によって沈殿させ、鑑別計数を行った。未処置およびCXCL8を削減した（下側）洗浄液を、そのケモカイン含有量についてE L I S A（CXCL8のみ）および走化性検定によって評定した。

〔好中球走化性検定〕

既知の方法（カズウェル他、1998年；C・M・ケアンズ他、2001年、ジャーナル・オブ・イミューノロジー誌167号57～65頁）に従って、複製改良ボイデン顕微走化性室において、ポリビニルピロリドンを含まない5 μm孔径ポリカーボネートフィルターを用いて、顕微走化性検定を行った。それぞれの試料について、20～30分で膜に移入された細胞の数を、40倍対物視野での少なくとも9回の直接計数によって計数し、その結果を細胞/40倍視野（+/-SEM）の平均値として示した。化学誘引物質は、ウシまたはヒトCXCL8、ヒトCXCL5およびCXCL1、肺性マンハイミオシスBALFおよび乳腺炎洗浄液（HBSS中で1：10～1：80に希釈）を含み、アンタゴニストはマウス抗ヒツジCXCL8抗体8M6（P・ウッド博士、オーストラリアCSIROによって寛大にも提供された）またはCXCL8₍₃₋₇₄₎ K11R相似物からなる。いくつかの分析において、試料を抗体（5 μg/ml）とともに氷上で60分間あらか

10

20

30

40

50

じめインキュベートした（J・R・ゴードン、2000年、セルラー・イミューノロジー誌201号42～49頁）。他の分析においては、8M6抗体およびタンパク質-A-SepharoseビーズによってCXCL8特異的免疫親和性マトリクスを生成し、これらを試料の過剰吸収に用いた（カズウェル他、1997年；J・R・ゴードンおよびS・J・ガリ（Galli）、1994年、ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン誌180号2027～2037頁）CXCL8削減の範囲を処置された試料のELISAによって確認した。組換え体アンタゴニストの分析のために、阻害剤を試験の直前に試料と直接混合した。

[CXCL8 ELISA]

ELISAのために、カズウェル他（1997年）に記載のように、MAb 8M6を捕捉抗体として用い、ウサギ抗ヒツジCXCL8抗血清（これもP・ウッド博士、CSIROより）を二次抗体として用いるとともに、HRP共役抗ウサギIgおよびTMBを検出システムとして用いた。それぞれの試料の連続希釈を三重反復で分析し、それぞれの分析は組換え体ウシCXCL8標準曲線を含んでいた。

[生体内でのCXCL8（3-74）K11R/G31Pのエンドトキシン反応の遮断]

一連の15時間の皮膚試験を用い、CXCL8（3-74）K11R/G31Pが生体内でエンドトキシン炎症誘導反応を遮断する能力を試験した。それぞれの試験において、2週齢の健康なホルスタイン乳牛を皮内について100μl食塩水中の1μgエンドトキシンによって免疫試験し、それから15時間後に局所麻酔（リドカイン）を用いて6mmのせん孔による生検材料を採取し、組織病理学的に処置した（ゴードンおよびガリ、1994年）。第一の（内部ポジティブコントロール）試験の後で、それぞれの動物の皮下、筋肉内、あるいは静脈に食塩水内のCXCL8（3-74）K11R/G31P（75μg/kg）を注入し、それからそれらを再び上記のようにエンドトキシンに対し免疫試験した。該動物を合計4回エンドトキシンによって免疫試験し、15時間反応サイト生検材料を処置後0、16、48および72時間後に採取した。該生検材料を通常の方法で処置し6mmパラフィン切片とし、ギエムザ溶液で染色し、400倍で盲目的方法において検査した（ゴードンおよびガリ、1994年；J・R・ゴードン、2000年、ジャーナル・オブ・アレルギー・アンド・クリニカル・イミューノロジー誌106号110～116頁）。40倍対物顕微鏡視野あたりの好中球の平均数を皮膚内の3つの異なる深度、乳頭（表面）、中間および網状（深い）真皮において定量した。

[統計的解析]

多群データをANOVAおよび事後のフィッシャー最小有意差法（PLSD）試験により解析し、2群比較はスチューデントt検定（両側）を用いて行った。結果を平均±SEMとして示した。

[結果]

[1. ウシG31P]

CXCL8（3-74）K11R/G31PはCXCL8の好中球への結合を競争的に阻害する。それぞれのCXCL8（3-74）K11R相似物の好中球上のCXCL8受容体への結合能力を測量し、その結果、配位子としてCXCL8と競争する。我々の初期測量において、^{b i o t}CXCL8結合阻害分析を行い、細胞を相似物（10ng/ml）とともに4℃で2時間インキュベートしてから^{b i o t}CXCL8（1μg/ml）へ暴露した。このレベルのCXCL8は、実験的肺性マンハイミオシスのヒツジの肺組織において発見されたものと近似している（J・L・カズウェル他、1998年。ウシの気管支肺炎においてインターロイキン8は好中球化学誘引物質の役割を果たす。サスカチュワン大学獣医病理学部博士号論文）。CXCL8（3-74）K11R/G31Pはこの分析（図1）におけるCXCL8結合の有効なアンタゴニストであり、10ng/mlのCXCL8（3-74）K11R/G31Pによって続いての^{b i o t}CXCL8の細胞への結合の95%が遮断された。この用量での試験の際、CXCL8（3-74）K11R/P32GはCXCL8の結合の48%しか遮断できず、未標識CXCL8自体は^{b i o t}CXCL8の結合の30%を競争的に遮断した。CXCL8（3-74）K11R/G

31PまたはCXCL8 (3-74) K11R/P32Gへの、Thr12およびHis13における追加のアミノ酸置換の導入は、相似物のアンタゴニスト活性を実質的に低下させる(図1)。このデータは、好中球をCXCL8 (3-74) K11R/G31Pとともに前もってインキュベートすることによって、それに続くCXCL8結合が強く減少調節されることを明確に示唆している。

【0067】

CXCL8 (3-74) K11R/G31PのCXCL8結合阻害能力をより微細にマッピングするために、次の実験群において、¹²⁵I-CXCL8および変動用量のCXCL8 (3-74) K11R/G31Pまたは未標識CXCL8へと、細胞を同時に暴露した。20pMの¹²⁵I-CXCL8の細胞への結合の阻害において、CXCL8 (3-74) K11R/G31Pは野生型CXCL8に対し約2桁大きく効果的であった(図1)。標識された配位子の結合の50%を阻害する濃度(IC₅₀)は、未標識CXCL8では120pMであり、CXCL8 (3-74) K11R/G31Pでは4pMであった。このデータによって、CXCL8 (3-74) K11R/G31PはCXCL8の好中球への結合の非常に有効な競争的阻害剤であることが示唆される。

【0068】

CXCL8 (3-74) K11R/G31Pは好中球アゴニスト活性を示さない。CXCL8 (3-74) K11R/G31Pは確かに好中球CXCL8受容体の高親和性配位子であるが、アゴニストまたはアンタゴニストとしても同等に作用するであろう。よって、我々の次の実験において、我々が生成したCXCL8 (3-74) K11R相似物の潜在的アゴニスト活性を、それらの細胞に対する化学誘引能力、または生体外での好中球顆粒加水分解酵素、グルクロニダーゼの放出誘導能力によって測定した(図2)。100ng/mlにおいて、CXCL8 (3-74) K11R/G31Pの化学誘引は弱く、1または100ng/mlのCXCL8 (p<0.001)によってそれぞれ13.9+/-4%または5.4+/-2%の反応を誘導した。100ng/mlにおいて、CXCL8 (3-74) K11R/P32G相似物は明確に実質的な(CXCL8反応の38.3+/-2%)反応を誘導したが、複合CXCL8 (3-74) K11R/G31P/P32G相似物は有効な化学誘引を示さなかった。グルクロニダーゼ放出の誘導能力の評価の際に、メディエータ放出を誘導するのにCXCL8と同等に効果的なCXCL8 (3-74) K11R相似物はなかった。実際に、これらのいずれも10ng/mlにおいては表面に出ない放出しか見られず、100ng/mlにおいてはCXCL8 (3-74) K11R/G31P/P32Gのみが有意な好中球反応を誘導した(図2)。CXCL8 (3-74) K11R/G31Pに注意を集中したことで、複合CXCL8競争的阻害および好中球アゴニストデータが得られた。

【0069】

CXCL8 (3-74) K11R/G31PはCXCR1およびCXCR2配位子の両方への好中球走化性反応を遮断する。不適当なELR⁺ケモカイン発現の最も病原となる効果は、炎症細胞の組織への誘引である。よって、次に大用量CXCL8への好中球の走化性反応に対するCXCL8 (3-74) K11R/G31Pの衝撃を評価した(図3)。我々のヒツジおよび畜牛での生体内観測(33)から予測されるように、1μg/ml (129nM)のCXCL8は非常に強い走化性誘導を示すが、非常に少ない用量のCXCL8 (3-74) K11R/G31Pによってこの反応は改善された。12.9pMのCXCL8 (3-74) K11R/G31Pの追加によって、細胞の走化性反応は33%減少した。この条件のCXCL8 (3-74) K11R/G31PにおいてIC₅₀は0.11nMであり、10nMのCXCL8 (3-74) K11R/G31PによってCXCL8反応は完全に遮断された。

【0070】

より微妙なウシCXCL8免疫試験の反応の遮断におけるCXCL8 (3-74) K11R/G31Pの効力の試験の際に、研究を拡張してCXCL8 (3-74) K11R/G31Pの、ヒトCXCL8およびヒトCXCR2特異配位子CXCL1およびCXCL

10

20

30

40

50

5への好中球反応の遮断能力を評価した。これらのそれぞれは、膵臓炎(W・W・ホシェーター(Hochreiter)他、2000年、ユーロロジー誌56号1025～1029頁)またはARDS(ヴィラード他、1995年)に罹患した組織において1～10 ng/mlで発現した。ウシ好中球は1 ng/mlのhCXCL1またはhCXCL5に反応するとともに、10 ng/mlのhCXCL8にも同様に反応した(図3)。よって、これらの用量を、これらの配位子の好中球反応へのCXCL8(3-74)K11R/G31Pの効果の試験に用いた。hCXCL1およびhCXCL5への好中球反応はそれぞれ0.26および0.06 nMのCXCL8(3-74)K11R/G31Pによって50%減少し、これらのhCXCL8への反応は0.04 nMのCXCL8(3-74)K11R/G31Pによって50%減少した(図3)。このデータにより、CXCL8(3-74)K11R/G31PによってケモカインのELR-CXC亜科の多くの動作をアンタゴナイズできることが示される。

10

【0071】

CXCL8(3-74)K11R/G31Pは、細菌性肺炎または乳腺炎病変において発現する好中球ケモカインの効果的な生体外アンタゴニストである。生体内の複合炎症環境において発現する好中球化学誘引物質の配列を我々のアンタゴニストによって遮断可能な範囲を試験しようとした。よって、ケモカインによる好中球活性化が病状の進行に重要に寄与する2つの疾患、乳腺炎および肺性マンハイミオシスを選択した。乳腺炎のエンドトキシンモデル(K・ペーション(Persson)他、1993年、ヴェテリナリー・イミュノロジー・アンド・イミュノパソロジー誌37号99～112頁)を用い、乳槽毎に5 μgのエンドトキシンを注入し15時間後にそれぞれの槽を洗浄した。好中球はエンドトキシンおよびコントロール槽からのそれぞれ82および6%の細胞からなり、細胞の残りはマクロファージからなっていた。希釈された(1:10)洗浄液は生体外での好中球走化性反応を強く誘導し、試料への抗CXCL8抗体の追加によってそれは薬剤コントロールに対し最大73+/-8%減少した(図4A)。一方、1 ng/mlのCXCL8(3-74)K11R/G31Pの試料への追加により、それらの走化性活性は97+/-3%減少した。

20

【0072】

好中球はまた、進行した肺性マンハイミオシスの蓄牛のBALFから回収した細胞の93+/-12%からなっていた。生体外での試験において、これらの試料もまた好中球への走化性が強く、抗CXCL8抗体の追加によってその好中球走化性活性は最大73+/-5%減少した(図4A)。これらのBALF試料を1または10 ng/mlのCXCL8(3-74)K11R/G31Pで処置することによって、好中球反応は薬剤コントロールに対しそれぞれ75+/-9または93+/-9%減少した。このデータにより、CXCL8(3-74)K11R/G31PによってCXCL8および非CXCL8化学誘引物質の動作を遮断できることが示される。

30

【0073】

別の戦略を用いてこれらの観測を確認するために、次に免疫親和性マトリクスを用いて細菌性肺炎BALF試料のCXCL8を削減し、それから試料の残余好中球走化性活性の遮断におけるCXCL8(3-74)K11R/G31Pの効力を評価した(図4B)。未処置の残余BALF試料は3,215+/-275 pg/mlのCXCL8を含み、免疫親和性で吸収されたBALFは24+/-17 pg/mlのCXCL8を含んでいた。この一連の実験において、CXCL8削減BALF試料への好中球反応は、未吸収サンプルへの反応の65.4+/-4%だった。CXCL8は、臨床の配列から得られた肺性マンハイミオシスのBALFにおける好中球走化性活性に、15%程度寄与できることが知られる(カズウェル他、2001年)。よって、CXCL8削減処置はCXCL8の除去において99%効果的であり、これらの試料内には実質的な量の走化性活性が残っていたとともに、1 ng/mlのCXCL8(3-74)K11R/G31Pの追加によってその蓄積効果は十分に排除された(図4B)。このデータによって、CXCL8(3-74)K11R/G31Pはこれらの試料において発現する非IL-8化学誘引物質をもアン

40

50

タゴナイズすることが明確に確認された。

【0074】

CXCL8₍₃₋₇₄₎ K11R/G31Pは、生体内でのエンドトキシン誘導好中球炎症の遮断に高度に効果的である。我々の最後の実験において、CXCL8₍₃₋₇₄₎ K11R/G31Pの蓄牛の皮膚におけるエンドトキシン誘導炎症反応の遮断能力、およびそれが効果的だった時間枠を評定した。動物を皮内において1 μgの細菌性エンドトキシンを加えて15時間前から免疫試験し（内部ポジティブコントロール反応）、あるいは異なる3種の時間の後で、静脈内、皮下または筋肉内にCXCL8₍₃₋₇₄₎ K11R/G31Pを注入した（75 μg/kg）。15時間のエンドトキシン反応サイトのパンチ生検を処置の15分前およびアンタゴニストのそれぞれの動物への注入の16、48および72時間後に採取し、浸潤した好中球の数をそれぞれの生検材料の乳頭（皮相）、中間および網状真皮において盲目的方法で定量した。アンタゴニスト処理の前に、強い好中球炎症反応がそれぞれの動物のエンドトキシン免疫試験サイトに存在した（図5）。生検材料内において、乳頭真皮での反応は全ての動物において穏やかであるとともに（データは図示しない）皮膚の深度が増すにつれて徐々に顕著となり、最大の炎症（好中球浸潤）は網状真皮の血管の周囲において観測された（図5A）。CXCL8₍₃₋₇₄₎ K11R/G31P処置の後で、それぞれの処置前の反応に対し、16時間の生検材料内において観測された炎症反応は88~93%抑制され、48時間の生検材料内では57%（静脈内）から97%（皮内）抑制された。72時間の処置後、静脈内に投薬されたアンタゴニストの効果は消えたが、皮内および皮下を処置された蓄牛のエンドトキシン反応はまだ60%抑制されていた。このデータによって、CXCL8₍₃₋₇₄₎ K11R/G31Pは生体内でのエンドトキシン誘導炎症反応の高度に効果的なアンタゴニストであり、その効果は2~3日持続するとともに、配送経路はこの新たなアンタゴニストの薬物動力学に著しく影響するということが明確に示される。

【0075】

G31Pはまた、ヒト好中球上のヒトELR-CXCケモカインCXCL8/IL-8およびCXCL5/ENA-78の走化性効果をアンタゴナイズすることを発見した。0.1~500 ng/mlのCXCL8（図6、左側のパネル）またはCXCL5/ENA-78（図6、右側のパネル）の走化性活性は、10 ng/mlの我々のアンタゴニストの走化性分析への追加によって実質的には完全に遮断された。同様に、G31PはCXCL8のCXCR1/CXCR2陽性好酸球への走化性効果を遮断した。我々および他者によって、アトピーまたはぜん息の被験者からの好酸球はELR-CXCケモカイン受容体を発現するとともに、CXCL8に反応することが発見されている（図7、左側のパネル）。穏やかなアトピーであるとともにぜん息ではないドナーの精製された末梢血液好酸球（純度99%）への100 ng/mlのCXCL8の走化性効果は、10 ng/mlのG31Pの走化性分析への追加によって完全に排除されたが、CCR3配位子CCL11/エオタキシンではそうではなかった（図7、中央のパネル）。好酸球増多症患者からの精製した好酸球に対する試験において（図7、右側のパネル）、G31Pはこれらの細胞のCXCL8/IL-8またはCXCL5/ENA-78への反応を中和した。

【0076】

このデータによって以下のことが明確に示される。ウシG31Pは、エンドトキシン免疫試験に反応して生体内で発現するウシELR-CXCケモカインの効果的なアンタゴニストであるとともに、好中球および好酸球のELR-CXCケモカイン受容体の、CXCR1/CXCR2の既知の配位子であるCXCL8およびCXCL5への反応を十分にアンタゴナイズするものである。

[2. ヒト化ウシG31P]

ウシG31Pのアミノ末端部分およびヒトCXCL8のカルボキシル末端部分からなるウシ-ヒトキメラタンパク質（bhG31P）（SEQ ID No. 10）を生成するとともに、これが生体内および生体外での強い好中球アンタゴニスト活性を有することを発見した。実際に、bhG31PはbG31Pまたはヒト形態のG31Pよりも強い活性

10

20

30

40

50

を有しうる。また、残存ウシアミノ酸をヒトアミノ酸と置換したb h G 3 1 Pの5つの別の形態 (SEQ ID No. 26~30) を生成し特性を決定した。これらは相似物のアンタゴニスト活性を増加させることはなく、いくつかの証拠からこれらはアンタゴニスト活性を減少させうることが示唆される。

【0077】

ヒトの薬剤の生成の1つの取り組みにおいて、我々はb G 3 1 Pのヒト化を企てた。さらに、C X C L 8の生物学的活性について、C X C L 8のアミノ末端'半分'はカルボキシル末端よりも重要である。C X C L 8のカルボキシル末端'半分'は10の分子の15のウシーヒト相違アミノ酸からなるため、最初に、h C X C L 8のカルボキシル末端（すなわち、エンコードアミノ酸45~72）のb G 3 1 Pのアミノ半分（すなわち、エンコードアミノ酸3~44）への大規模なライゲーションがその活性に影響するかどうかを検査した。本質的に、C X C L 8のアミノ半分は不可欠な受容体認識およびモチーフとその連合足場構造のシグナリングを行うと知られている。

【0078】

前記のようにして、キメラウシーヒトG 3 1 Pタンパク質、b C X C L 8 (3-44) K 1 1 R / G 3 1 P - h C X C L 8 (45-72) (b h G 3 1 P) (SEQ ID No. 10) を生成し、それからこのタンパク質のcDNAを残存ウシーヒト相違アミノ酸残基1つずつの置換のテンプレートとして用いた。

【0079】

エンテロキナーゼ (b h G 3 1 P⁺ およびb h G 3 1 P⁻ アイソフォームのみ) またはトロンビン (他の全ての相似物) 開裂のSOPを用い、それぞれの構造を発現および生成し、SDS-PAGEおよびウエスタンブロットティングによってこれらの特性を決定した (図8)。それぞれのアイソフォームは大きさが8 kDであり、b h G 3 1 P / T 1 5 K (SEQ ID No. 28) およびb h G 3 1 P / S 3 7 T (SEQ ID No. 30) アイソフォーム溶液は、あるいは試料内のタンパク質の高濃度、または二量化に関連するこれらのG 3 1 P相似物のこの部分の摂動の結果として形成された、低いレベルの相似物二量体として解釈可能であるものを含むと見られた。この領域の複数のアミノ酸はヒトC X C L 8の二量化に大きく影響することが既に報告されている。

【0080】

b h G 3 1 P (すなわち、b C X C L 8 (3-44) K 1 1 R / G 3 1 P - h C X C L 8 (45-72)) はb G 3 1 PのELR-CXCケモカインアンタゴニスト活性を保持し、ヒト好中球のヒトC X C L 8への走化性または活性酸素 (ROI) 放出反応を遮断した (図9)。

【0081】

このウシーヒトキメラタンパク質を、追加のヒト同等アミノ酸を相違残基 (すなわち、T 3 K (SEQ ID No. 26)、H 1 3 Y (SEQ ID No. 27)、T 1 5 K (SEQ ID No. 28)、E 3 5 A (SEQ ID No. 29) およびS 3 7 T (SEQ ID No. 30)) の代わりに導入することによってさらにヒト化した際に、これらの変更が50:50ウシーヒトキメラの活性に有意に影響しないことが発見された。走化性分析において評定されるように相似物のいずれをも好中球のアゴニストとせず、あるいは走化性阻害または活性酸素放出の阻害において評定されるようにアンタゴニスト活性の有意に減少しなかった (図10B)。

【0082】

アミノ末端配列を変更したb h G 3 1 P (すなわち、b h G 3 1 P⁺、b h G 3 1 P⁺、b h G 3 1 P⁺、b h G 3 1 P⁺、b h G 3 1 P⁺、b h G 3 1 P⁺) (それぞれSEQ ID Nos. 14、13、11および12) の活性の衝撃を評定し、それぞれの走化性阻害および活性酸素阻害分析を測定した (図11)。Lys 3の除去はb h G 3 1 Pの活性を減少させる傾向があるが、他の相似物のアンタゴニスト活性はおおよそ同等であった (図11)。当業者には認識されるように、このデータは、G 3 1 P活性を有意に妨害することなく可変長および可変アミノ酸組成のN末端追加が許容されうることを示すものである。N末端追加は0

10

20

30

40

50

～9のランダムアミノ酸、0～8のランダムアミノ酸、0～7のランダムアミノ酸、0～6のランダムアミノ酸、0～5のランダムアミノ酸、0～4のランダムアミノ酸、0～3のランダムアミノ酸、あるいは0～2のランダムアミノ酸である。

【0083】

また、このデータは、G31Pの多重ウシーヒトキメラ形態は有用な好中球アンタゴニストであることを示唆するものである。しかし、およそこれらのキメラの特性の決定を完了した際に、CXCL8誘導好中球反応の遮断においてCXCL8(3-72)K11R/G31Pのヒト形態はbG31Pと同等に効果的であるとともに、hG31Pは生体内での細菌性エンドトキシン誘導好中球炎症および病状の高度に効果的なアンタゴニストであると測定されたことは注目すべきである。

10

[3. ヒトG31P(hG31P)]

我々は宝生物工程(中国、大連)と契約し、全長のヒトCXCL8のcDNAを合成し、適合性の5'(BamH1)および3'(EcoR1)末端を用いてpGEX-2Tへとクローニングした。このpGEX-hCXCL8のcDNAをサイト指向突然変異誘発のテンプレートとして用い、pGEX-hCXCL8(3-72)K11R(hK11R)およびpGEX-hCXCL8(3-72)K11R/G31P(hG31P)を生成した。これらはGST融合タンパク質として発現され、標準的操作手順によるトロンビン開裂を用いて精製された。bhG31P(前記)とともに、組換え体G31P関連分子の、6(Gly-Ser-Met-Gly-Gly-Ser)または2(Gly-Ser)の外來アミノ酸が先行しそれぞれhG31P⁺₆(SEQ ID No. 14)またはhG31P⁺₂(SEQ ID No. 13)と称される2つの族、外來アミノ酸を持たない構成の族(G31P⁺₀)(SEQ ID No. 11)、さらにアミノ末端を除去した族(すなわちG31P⁻₁、G31P⁻₃またはG31P⁻₅)を生成した。ウシ同等アミノ酸をhG31P⁺₆のアミノ酸位置35(SEQ TD No. 36)、37(SEQ ID No. 37)、44(SEQ ID No. 38)、47(SEQ ID No. 39)および49(SEQ ID No. 40)へ導入した。それぞれのタンパク質をSDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングで発現、精製し特性を決定した。予測されたように、これらのそれぞれが抗CXCL8抗体に反応する～8kDのシングルバンドからなった。

20

[生物学的特性決定]

30

精製ヒト好中球による走化性分析を用いて、それぞれの構造のアゴニストおよびCXCL8アンタゴニスト活性を評定した(図12)。

[hCXCL8(3-72)K11R(hK11R)]

hK11RはCXCL8よりも有意に高い特異的活性を有し(好中球走化性分析)、天然ヒトケモカインよりはるかに強い好中球アゴニストを示す。よって、hK11Rは漸増好中球漸増/活性化を要する臨床状況において利用されうる。

[hCXCL8(3-72)K11R/G31P(hG31P)]

hK11R⁺₆でのG31P置換によってこの分子のアゴニスト活性は実質的に消去され、hG31P⁺₆はCXCL8誘導好中球走化性のアンタゴニストとして、少なくともbG31P⁺₆と同等に効果的である。

40

【0084】

hG31Pの様々なN末端構造は相似物の生物学的活性に影響した。hG31P⁺₆およびhG31P⁺₂はCXCL8走化性の優れたアンタゴニストであり、hG31P⁺₀およびhG31P⁺₂はbG31P⁺₆に比して有意に低い走化性アンタゴニスト活性を有していた。興味深いことに、ヒト好中球からのCXCL8誘導ROI放出の抑制能力を比較すると、相似物のアンタゴニスト活性への様々なN末端配列の影響は非常に低く、それぞれの相似物はだいに有意なROI放出アンタゴニスト活性を示した。ROI放出は好中球内のNADPHオキシダーゼ活性に依存し、NADPHオキシダーゼはCXCR1ではなくCXCR2に制御されることが報告されている。

【0085】

50

様々なN末端置換相似物の異なる有効性の原理は、あるいは立体障害によって、h G 3 1 P + ² または h G 3 1 P + ⁶ の余分の2または6の残基がE L Rモチーフ（すなわちG 3 1 P上の）のC X C R 1 / C X C R 2との相互作用の潜在性をさらに減少させることでありうる。

【0086】

C X C R 2の機能をアンタゴナイズするh G 3 1 Pの能力のさらなる記録のため、そのC X C L 5（E N A - 7 8）依存好中球走化性の抑制能力を評価した。C X C L 5はC X C R 1ではなくC X C R 2に特異的な配位子である。用量依存方式においてh G 3 1 P + ⁶はその走化性活性をアンタゴナイズした（図14）。

【0087】

h G 3 1 Pの様々なN末端相似物が有意なアゴニスト活性を有するかどうかを、P B Sのみに関連して好中球走化性分析において評価した。好中球の部分において他のN末端相似物への有意な反応は発見されなかった。

【0088】

次に、ヒトウシ相違アミノ酸のh G 3 1 P + ⁶でのさらなる置換がh G 3 1 Pのアンタゴニスト活性を増加させるかどうかを評価した。h G 3 1 P / A 3 5 E、h G 3 1 P A 4 9 V、h G 3 1 P R 4 7 D、h G 3 1 P / S 4 4 Tおよびh G 3 1 P / T 3 7 Sを生成および試験し、これらは全て無効なアゴニストであることを発見した。ウシ同等アミノ酸の位置35、37、44、47または49への導入はそれぞれこれらの相似物のアンタゴニスト活性を低下させた。R 4 7 DおよびS 4 4 T相似物はC X C L 8の活性を抑制というより増加させているように見られ、A 3 5 E、L 4 9 VおよびT 3 7 S相似物は有意な走化性抑制活性を示さなかった。

【0089】

細菌性の肺炎増悪を受けている嚢胞性繊維症（C F）患者の痰における好中球走化性活性をb G 3 1 Pによってアンタゴナイズできることを既に示した。よって、穏やか（n = 1）、中程度（n = 2）、激しい（n = 2）または進行した（n = ）C Fの患者、および未分類（n = 2、細菌性）、中程度（n = 2）または激しい（n = 2）気管支拡張症の患者からの痰における好中球走化性活性の、h G 3 1 Pによる遮断能力を試験した。ぜん息、C O P Dまたは一般的な静脈洞炎／気管支炎と診断された患者からの痰も、h G 3 1 P + ⁶の存在下または非存在下で試験した。コントロールのぜん息患者を除き、他の全ては様々な細菌種（例えばヘモフィルス属、シュードモナス属、ブドウ球菌属）の培養が陽性であった。それぞれの試料を先行試験において滴定し、走化性分析の最適な希釈度を決定した。G 3 1 Pは、進展したC F患者からの試料を除く全ての試料における好中球走化性活性の遮断に際立って効果的であった。これによって、進展したC F患者に見られる病状には別の病因が存在していることが示唆される。

[h G 3 1 Pは生体内の好中球炎症をアンタゴナイズする]

エンドトキシン誘導皮膚好中球性炎症および気道内毒素血症病状に対するb G 3 1 Pの遮断能力を既に示した。よって、次に気道内毒素血症のモデルにおけるh G 3 1 Pの活性を評価した。

[気道内毒素血症のマウスモデル]

マウスは小さい動物であり要するG 3 1 Pが実質的にモルモット（我々の標準モデル）より少ないため、最初にマウスでの好中球性炎症におけるh G 3 1 P + ⁶の保護効果を試験した。先行試験において、1 . 5 m g / k gのL P S用量によってB A L B / cマウスの適当な免疫試験用量が提供されることを決定し、これは5 μ g / k gのL P Sによって強い気道好中球増加症、発熱および肺胸膜出血性反応を誘導するモルモットとの明確な対比となる。単一マウス実験（n = 5 / グループ）において、マウスに食塩水あるいは1 0 0、2 5 0または5 0 0 μ g / k gのh G 3 1 P + ⁶ s . c . を投与し、それから1時間後にそれらを軽度イソフルランガス麻酔下でL P S（1 / 5 m g / k g）により鼻腔内で免疫試験した。1 6時間後、これらの動物をC O ₂を用いて安楽死させ、血液、気管支肺胞洗浄（B A L）液および肺組織を分析のために採取した。先の試験において1 5 0 μ

10

20

30

40

50

g/kgのbG31PのLPS腹膜炎モデルへの効果は小さかったが、hG31P⁺6は、気道全体白血球および好中球浸潤、肺柔組織好中球増加症、およびより小さく可変の範囲における気道での赤血球の出現の減少に非常に効果的であった（図17）。

〔気道内毒素血症のモルモットモデル〕

3つの実験において気道内毒素血症のモルモットモデルを用いた。その1つにおいて、その動物に最適用量のエンドトキシン（50 μg/kg）を投与し、2番目および3番目では標準LPS用量の5 μg/kgで、レベルを変動して配送されるG31Pを用いて免疫試験した。それぞれの実験において、該動物をG31Pと同時にLPSおよび処置したs.c.により鼻腔内で免疫試験した。15時間後にこれらの動物を犠牲にし、末梢血液（WBC較差）および肺反応（BAL WBC数、較差および好中球脱顆粒産物レベル、および組織好中球増加症）を前記のように評定した。

10

〔高（病的）用量LPS免疫試験実験〕

50 μg/kg以下の用量において、LPSはモルモットにおいて、気道への激しい出血を含む複数の肺損傷を引き起こすが、この用量において肺の好中球浸潤は+/-5 μg/kg LPSにおいて観測されるそれに比して鈍い。50 μg/kg LPS免疫試験であってもhG31P⁺6は気道での赤血球（RBC）の出現の減少において非常に効果的であることを発見した（図18）。G31処置によってBAL中の好中球平均数も減少した。

〔気道内毒素血症病状におけるhG31PおよびhbG31Pの効力〕

hG31P⁺0、hG31P⁻1、hG31P⁺2、hG31P⁺6、および生体外においてヒトCXCL8依存好中球漸増に対し非常に効果的であることを示したウーシヒトキメラbhG31P⁺6の相対的治療効力を比較した。再び、250 μg/kgのそれぞれのG31Pアイソフォームをモルモットのグループに配送し（s.c.；n=5）、それらを気道で5 μg/kg大腸菌LPSにより免疫試験し、それから15時間後にその動物を安楽死させ、その末梢血液好中球増加症、および気道好中球と赤血球のレベル、および2つの好中性顆粒マーカーであるラクトフェリン（好中球1⁰顆粒特異マーカー）およびミエロペルオキシダーゼ（好中球2⁰顆粒特異マーカー）のレベルを評定した。この250 μg/kgの用量において、試験されたG31Pアイソフォームのそれぞれは好中球の気道への浸潤（BAL好中球）を実質的に除去したとともに、BAL内でのRBC、ラクトフェリンおよびミエロペルオキシダーゼの発生を有意に減少させた（図19）。hG31P⁺2が他より大きい保護を与えたかのように見られたが、全てのパラメータを考慮に入れる場合は有意ではない。

20

30

〔毒理学試験〕

bG31P毒性の予備試験を行った。免疫増感を最適化するように設計された時間枠での3匹のモルモットへのbG31Pの配送（250 μg/kg）（すなわち、分子が免疫原だった場合）では、肝臓および腎臓酵素のパネルの血清レベルの通常からの観測可能な変動は生じなかった。動物の行動あるいは総合的な健康の変化は観測されなかった。さらに、これらの動物からの心臓、腎臓、肺、肝臓および胃の予備組織学的評定は、炎症浸潤、局所的細胞アポトシスまたは増殖、あるいは組織病理学的異常の徴候を示さなかった。我々は、解剖病理学者がこれらの組織を独立に評定できるように準備をしている。用いた分析は特別な感受性を持たないが、これらの動物の血清において識別できるレベルの抗bG31P抗体反応性を検出することができなかった。

40

【0090】

原核細胞（すなわち細菌）発現システムを用いるhG31PまたはbG31Pの生成に注目し、標品が細菌エンドトキシンによって有意に汚染されていることを発見した。商用エンドトキシン除去カラムを除外し薬剤のエンドトキシン負担を減少させた際に、エンドトキシン除去カラムの利用によってG31Pの容認できない高損失が生じることを発見した。生体内において、G31Pの治療用量において発見されるレベルのエンドトキシンによるモルモットの処置は、G31Pの治療活性を擬態しなかった。

〔効力研究〕

50

1つの実験において、 $hG31P^{+6}$ を $50\mu g/kg$ （すなわち、 $bG31P$ の最適な用量の20%）において用いた。 $5\mu g/kg$ のLPSでモルモットを免疫試験し、この低用量 $hG31P$ で処置した。 $hG31P^{+2}$ および $hG31P^{+6}$ は好中球炎症の減少において大きくない効力を保持するのみであったが、気道への赤血球移行の減少には効果的であることを発見した（この発見の意味は完全に明白ではないが、この薬剤がはたらく機構のさらなる複雑度の可能性を示唆するものである）。

【0091】

気道内毒素血症モデルを用いた生体内での別の取り組みにおいて、モルモットを、激しい肺出血を誘導することが知られているLPSの用量で免疫試験し、それらを $250\mu g/kg$ の $hG31P$ で処置した。この高められたLPSの用量において好中球は脈管構造から気道へと少ししか漸増しないことを、先の研究から我々は知っていた。

10

【0092】

1つの実験において、 $hG31P^{+6}$ を $50\mu g/kg$ （すなわち、 $bG31P$ の最適な用量の20%）において用いた。 $5\mu g/kg$ のLPSでモルモットを免疫試験し、この低用量 $hG31P$ で処置した。 $hG31P^{+2}$ および $hG31P^{+6}$ は好中球炎症の減少において大きくない効力を保持するのみであったが、気道への赤血球移行の減少には効果的であることを発見した（この発見の意味は完全に明白ではないが、この薬剤がはたらく機構のさらなる複雑度の可能性を示唆するものである）。

【0093】

気道内毒素血症モデルを用いた生体内での別の取り組みにおいて、モルモットを激しい肺出血を誘導することが知られている用量である $50\mu g/kg$ のLPSで免疫試験し、それらを $250\mu g/kg$ の $hG31P$ で処置した（図18参照）。この高められたLPSの用量において好中球は脈管構造から気道へと少ししか漸増しないことを、先の研究から我々は知っていた。しかし $hG31P$ は、食塩水で処置され高用量LPSで免疫試験した動物で観測されるように、RBCの気道への高いレベルの溢血の減少に有意な効果を有していたとともに（図18）、この免疫試験に関連して気道好中球反応および末梢血液好中球可動化を減少させる傾向があった（図18）。

20

[考察]

CXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/G31Pは多数のELR-CXCケモカインの高親和性アンタゴニストであることを、ここで我々は説明した。生体外においてこのアンタゴニストは、2つの粘膜区画（肺、乳腺）における穏やかなものから極度なまでの炎症病変において発現する、全ての好中球走化性活性を効果的に遮断したとともに、生体内においてエンドトキシン誘導炎症反応の97%までを遮断した。我々はCXCL8を肺炎および乳腺炎の試料における主要な化学誘引物質とみなしたが、細菌性肺炎試料の活性の35%が、同様にCXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/G31Pによって効果的にアンタゴナイズされるCXCL8ではない化学誘引物質によるものであることもまた説明した。げっ歯類（タテダ他、2001年；ツァイ他、2000年）、蓄牛（カズウェル他、1997年）およびヒト（ヴィラード他、1995年）における炎症反応の研究に基づき、これらの試料が、CXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/G31Pのアンタゴニスト効果を受ける多数のELR⁺CXCケモカイン（例えばCXCL5およびCXCL8）を含みうることは明らかである。

30

40

【0094】

【表 1】

```

HUMBT00706 : SAKELRCQCIKTYSKPFHFKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSGRELCLDPKENWVQR-VVEKFLKRAENS-- : 72
Rhesus      : SAKELRCECIKTYSKPFHFKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSGRELCLDPKEPWWQR-VVEKFVKRAENQNP : 74
Pig-tailed  : SAKELRCECIKTYSKPFHFKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSGRELCLDPKEPWWQR-VVEKFVKRAENQNP : 74
Red-crowne  : SAKELRCLCIKTYSKPFHFKFIKELRVIESGPHCVNTEIIVKLSGRELCLDPKEPWWQR-VVEKFLKRAESQNS : 74
Bovine.     : MSTELRCQCIKTHSTOFHOKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLTNGNEVCLNPKEKWWQK-VVQVFVKRAEKQDP : 74
SheepOAIL8  : MSTELRCQCIKTHSTPFHFKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLTNGKEVCLDPKEKWWQK-VVQAFVKRAEKQDP : 74
PigSSIL8_3  : VSAELRCQCINTHSTPFHFKFIKELREIESGPHCENSEIIVKLVNGKEVCLDPKEKWWQKVVQIFLKRTEK--- : 72
DOGIL8T_1   : VSSELRCQCIKTHSTPFHFKFIKELRVIDSGPHCENSEIIVKLVNGKEVCLDPKEKWWQK-VVQIFLKKAEKQDP : 74
CATCFU1030  : VSSELRCQCIKTHSTPFHFKFIKELRVIDSGPHCENSEIIVKLVNGNEVCLDPKEKWWQK-VVQIFLKKAEKQDP : 74
CATAF15859  : ISSELRCQCIKTHSTPFHFKFIKELTVIDSGPHCENSEIIVKLVNGKEVCLDPKQKWWQK-VVEIFLKKAEKQNA : 74
dolphinAB0  : MTSELRCQCINIHTSTPFHFKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLVNGKEVCLNPKEKWWQK-VVQIFLKKAEKKDP : 74
HORSEAY184  : ITAELRCQCIKTHSKPFHFKFIKELRAIESGPHCENSEIIVKLVNGAEVCLNPHTKWWQI-IVQAFVKRAEQNP : 74
          ELRC CIkt S PFhPK IkElrvi SGPHC N EIIVKL G E CL Pke WWQ Vv F K Ae

```

10

```

HUMAN (HUMBT00706)      %Exact 100
Rhesus                  %Exact 91
Pig-tailed              %Exact 91
Red-crowned             %Exact 90
Bovine.                 %Exact 71
SheepOAIL8_1           %Exact 74
PigSSIL8_3              %Exact 72
DOGIL8T_1               %Exact 70
CATCFU1030_1           %Exact 70
CATAF15859_2            %Exact 67
dolphinAB096002_1      %Exact 68
HORSEAY184956_3        %Exact 64

```

選択された哺乳類の CXCL8 の配列およびヒト CXCL8 との同定%

【0095】

【表 2】

20

キメラタンパク質の活性の結果 (%抑制)

	1st	2nd	3rd	4th	Mean
bG31P	56	72	51	53	58
hbG31P+7	11	36	66	46	39.75
hbG31P/S37T+7	-2	-104	73	82	12.25
hbG31P/T3K+7	-9	-35	34	-19	-7.25
hbG31P/T15K+7	16	-24	80	-38	8.5
hbG31P+6	70	20			45
hbG31P/S37T+6	-61	-82			-71.5
hbG31P/E35A+6	35	-132			-48.5
hbG31P/H13Y+6	52	-244			-96

30

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図 1】CXCL8₍₃₋₇₄₎K11R の G31P 相似物は、末梢血液好中球への CXCL8 結合の効力のある阻害剤である。ウシ末梢血液好中球（純度 87～93%）を（上側のパネル）CXCL8₍₃₋₇₄₎K11R 相似物（10 ng/ml）または媒質（med）のみに 4℃で 2 時間暴露し、それから洗浄しビオチン化 CXCL8（^{bio} CXCL8；1000 ng/ml または 129 nM）と共に同様にインキュベートした。CXCL8 のこれらのレベルは、肺パステラ症の動物の肺組織でのそれに近似する（非特許文献 8、9）。細胞に結合する ^{bio} CXCL8 のレベルは ELISA（酵素結合免疫収着検定）技術を用いて定量される。CXCL8₍₃₋₇₄₎K11R 内で描写されるアミノ酸には G31P、P32G、T12S/H13P/G31P および T12S/H13P/G31P/P32G が含まれていた。P32G 相似物ではない G31P 相似物は、細胞に結合する CXCL8 の高度に効果的なアンタゴニストであった。G31P および P32G の相似物とともに、T12S および H13P の追加の基質はそれらのアンタゴニスト活性を低下させた（下側のパネル）。変動濃度の CXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/G31P または未標識 CXCL8 および 20 pM の ¹²⁵I CXCL8 へ、好中球を同時に 4℃で 45 分暴露した。¹²⁵I-CXCL8 のレベルは細胞の高親和性 CXCL8 受容体をほぼ飽和させるように選択された（データは図示しない）。細胞関連 ¹²⁵I-CXCL8

40

50

L 8 のレベルはカウンターを用いて評定された。C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P が C X C L 8 より略高い好中球への親和性を有することが、データによって明瞭に示された。

【図 2】C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P は、好中球走化性誘導応答またはーグルクロニダーゼ放出のアゴニストではない。C X C L 8 および C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P の G 3 1 P、P 3 2 G、または組み合わせられた G 3 1 P / P 3 2 G 相似物について、その好中球アゴニスト活性を、新鮮に精製したウシ末梢血液好中球を用いて試験した。(上側のパネル)それぞれのタンパク質への走化性誘導反応を 30 分の顕微走化性検定によって試験し、その結果を平均 (+ / - S E M) 細胞数 / 40 倍対物顕微鏡視野で、手法の節で概略を述べるようにして示した。G 3 1 P および G 3 1 P / P 3 2 G の相似物はいずれもわずかに識別可能な走化性活性を示したが、P 3 2 G 相似物は 100 n g / m l において実質的な反応を誘導した。(下側のパネル)用量が変動されるそれぞれの相似物へ好中球を 30 分間暴露し、それから手法の節で概略を述べるようにして、色素産生基質 p - ニトロフェニルー D - グルクロニドを用いて細胞分泌物をーグルクロニダーゼについて検定する。ーグルクロニダーゼの全細胞貯蔵量を、トライトン X - 100 により溶解させた細胞の部分標本から定量する。個々の処理での酵素放出を、全細胞貯蔵量に対するパーセントで示す。全ての相似物は実質的なアゴニスト活性を持たないが、C X C L 8 自体が有意な酵素放出を誘導する。ホルボール - 12、13 - ミリスチン酸アセテートおよびカルシウムイオノフォア A 23187 によるポジティブコントロールにより、42 + / - 6 % の酵素放出が誘導された。

【図 3】C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R - G 3 1 P は E L R - C X C ケモカイン媒介好中球走化性誘導の高度に効果的なアンタゴニストである。C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P の、いくつかの E L R - C X C ケモカインへのウシ好中球の走化性誘導反応を遮断する能力を、20 分の顕微走化性検定を用いて測定した。(左側のパネル)細胞を同時に C X C L 8 (1 u g / m l) および濃度が変動される相似物へ暴露した。図 2 のように、C X C L 8 に反応した細胞の数を、走化性検定膜の直接計数によって評定した。C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R - G 3 1 P は、C X C L 8 への細胞の反応に対する高度に効果的な競争的阻害剤である。(中央のパネル)C X C L 1、C X C L 5 または C X C L 8 によるウシ好中球の走化性誘導の用量 - 反応曲線である。それぞれのケモカインは 1 ~ 10 n g / m l および 1 u g / m l において最大の二相活性パターンを示した。(右側の

パネル)C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P の、1 n g / m l のヒト C X C L 5 または C X C L 1 または 10 n g / m l のヒト C X C L 8 への細胞の反応を遮断する能力を、前記のようにして評定した。C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P はそれぞれの E L R - C X C ケモカインを効果的にアンタゴナイズし、完全な阻害は 3 ~ 20 n M の C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P によって得られた。

【図 4】C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R - G 3 1 P は、肺気道またはエンドトキシン誘導乳腺炎において発現する C X C L 8 および非 C X C L 8 化学誘引物質の活性を遮断する。好中球反応でのモノクローナル抗 I L 8 抗体 8 B 6 または C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R - G 3 1 P の、肺パスツレラ症の動物の肺またはエンドトキシン誘導乳腺炎の畜牛の乳槽において発現する化学誘引物質への効果を図 3 のように評定した。(A)希釈した (1 : 10) 肺炎の畜牛の肺葉の気管支肺胞洗浄液 (B A L F) (P N E U M O N I A) または乳腺炎の畜牛の乳槽洗浄液 (M A S T I T I S) を、そのまま (n o n e)、あるいは抗 C X C L 8 M A b 8 B 6 (5 u g / m l) または C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P (G 3 1 P ; 1 または 10 n g / m l) での処理後に試験し、その走化性活性を溶媒のみと比較した。双方のサンプルにおいて、M A b 8 B 6 抗体の独力でサンプルの走化性活性の 74 % を中和し、C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P によって反応が 93 ~ 97 % 減少した。(B)別の戦略を用いてこれらの結果を確認するために、次に病変 B A L 液を、その内容の C X C L 8 の 99 % より多くを除去したモノクローナル抗体 8 B 6 - 免疫親和性マトリクスによって吸収し、それから残余走化性活性および C X C L 8 (3 - 7 4) K 1 1 R / G 3 1 P の残余非 C X C L 8 走化性活性のアンタゴナイズ

10

20

30

40

50

能力を試験した。試料において全体および残余走化性活性の用量依存阻害が存在し、CXCL8および非CXCL8化学誘引物質がこれらの病変において発現していることが示される。

【図5】CXCL8₍₃₋₇₄₎K11R-G31Pは、エンドトキシン誘導炎症反応を生体内において除去することができる。2週齢のホルスタイン仔牛において、その好中球性炎症反応を皮内エンドトキシン(1 μg/site)免疫試験に対し、静脈内(i.v.)、皮下(subcutan.)、あるいは筋内(i.m.)へのCXCL8₍₃₋₇₄₎K11R-G31P注入の前および様々な期間の後に試験した。15時間のエンドトキシン反応サイト生検を処理の0、16、48および72時間後に採取し、好中球性反応の組織病状評定のために処理し、区画あたりの9つの40倍対物顕微鏡視野での好中球を計数して決定した。(左側のパネル)組織の顕微鏡写真は、処理前および処理後48時間の網状真皮の血管周囲のエンドトキシン免疫試験に対応する。処理後ではなく処理前の組織において、網状真皮の血管周囲に多数の好中球が蓄積された。(B)それぞれの経路によるCXCL8₍₃₋₇₄₎K11R-G31P配送の前(0h)および後(16、48、72h)でのエンドトキシン免疫試験への好中球反応の画像提示である。それぞれ**または**=p 0.01または0.001であり、内部制御処理前反応に関連する。

10

【図6】アトピー性でぜん息のドナーまたはアトピー性でぜん息ではないドナー(左側のパネル)あるいは過好酸球増加症の対象(右側のパネル)の血液から精製された好酸球を、その組換え型ヒトCXCL8、CXCL5またはCXCL11への反応について、示される用量の組換え型ウシCXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/G31P(G31P)の存在下または非存在下において評定した。低用量のG31Pにより、CXCR1およびCXCR2配位子へのこれらの細胞の反応を遮断することができたが、CCR3配位子CXCL11/イオタキシンへの好酸球の反応には効果が無かった。

20

【図7】健康なドナーの末梢血液からの好中球を、その組換え型ヒトCXCL8またはCXCL5への反応について、ウシCXCL8₍₃₋₇₄₎K11R/G31P(G31P; 10 ng/ml)の存在下または非存在下において試験した。G31Pは双方の配位子への好中球の反応を遮断した。

【図8】hbG31Pアイソフォームの物理的特性決定。

【図9】bG31PとhbG31Pとの比較(CXCL8アンタゴニズム)。

【図10】(A)hbG31P相似物は好中球アゴニストではない。(B)hbG31Pアンタゴニスト活性。

30

【図11】hbG31Pのアンタゴニスト活性におけるカルボキシル末端配列の効果。

【図12】アゴニストおよびCXCL8相似物一構成の活性。

【図13】bG31PとhG31P+6とのアンタゴニスト活性の比較

【図14】hG31Pは、CXCR2特異配位子であるENA78をアンタゴナイズする。

【図15】hG31Pは、CXCL8誘導ROI放出をアンタゴナイズする。

【図16】hG31Pは、気管支拡張症および脾臓繊維症の患者の痰の好中球走化性をアンタゴナイズする。

【図17】hG31Pは、内毒素血症マウスにおける肺の炎症を減少させる。

40

【図18】モルモットの病的気道内毒素血症におけるhG31Pの効果。

【図19】モルモットの病的気道内毒素血症における様々なhG31Pアイソフォーム(およびhbG31P)の効果。

【図20】モルモットの病的気道内毒素血症における様々なhG31Pアイソフォーム(およびhbG31P)の効果。

【図21】hbG31P変異体は、ヒトIL-8およびGROαに対し、ヒト好中球(PMN)細胞内Ca流入反応を遮断する。ヒトIL-8およびGROαに刺激されるhbG31Pおよびその変異体のヒト好中球(PMN)細胞内Ca流入の遮断活性[Ca]_iを評定した。100 ng/mlのbG31P、hbG31PおよびhbG31P変異体を、2 x 10⁵ PMNで染色した2 μMフッ化4AMと共にインキュベートし、それから10

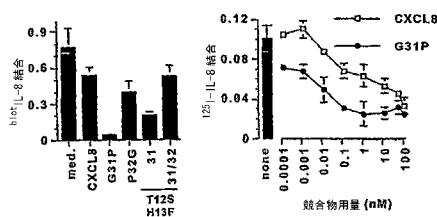
50

0 ng/ml の IL-8 または GRO α で刺激した。それから蛍光計で試料の蛍光を読んだ。データを [Ca]_i 測定の面積として示した。概して、hbG31P および bG31P と同様に hbG31P 変異体は、IL-8 および GRO α に刺激された PMN [Ca]_i において有効なアゴニスト活性を示した。

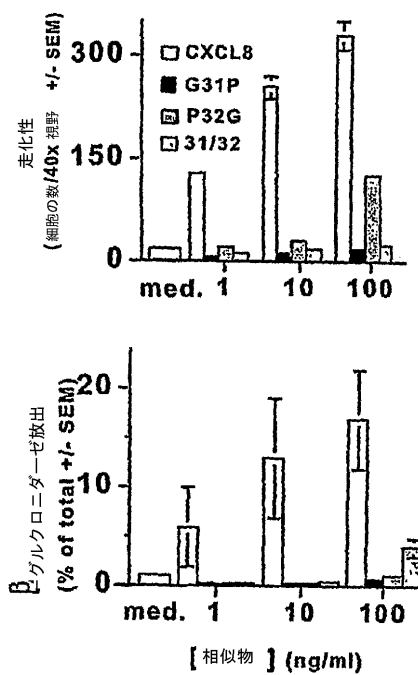
【図 2】 hbG31P 変異体は LPS に刺激された皮膚試験の炎症サイトへの PMN 移行の遮断に異なる効果を示した。hbG31P およびその変異体の、LPS 刺激炎症サイトへの PMN 移行の遮断におけるアンタゴニスト活性を評定した。顕微鏡の 40 倍視野における、0.5 μ g の LPS および 250 μ g/ml の bG31P、hbG31P またはその変異体で処理した皮下および皮内組織の PMN の遮断数の、炎症サイトを処理したのみの LPS での PMN の数に対するパーセンテージとして、データを示した。hbG31P が bG31P と等しい遮断能力を有することをデータは明瞭に示した。H13Y は T3K、E35A よりはるかに良いアンタゴニスト活性を示した。T15K はわずかな遮断効果を示した。一方、S37T はアンタゴニスト活性を示さなかった。

10

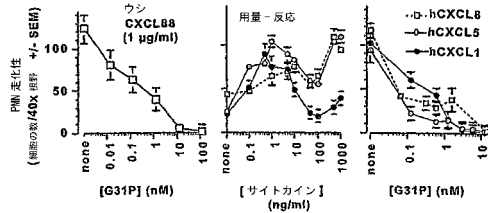
【図 1】



【図 2】

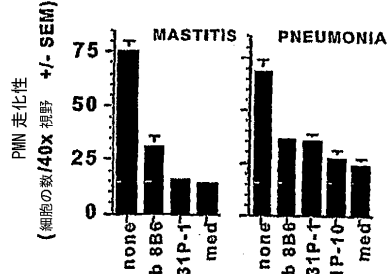


【図 3】

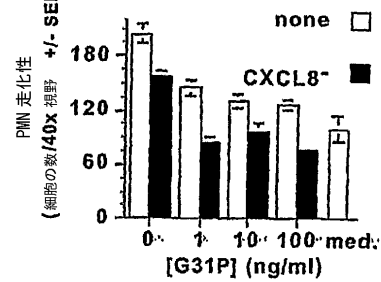


【図 4】

A

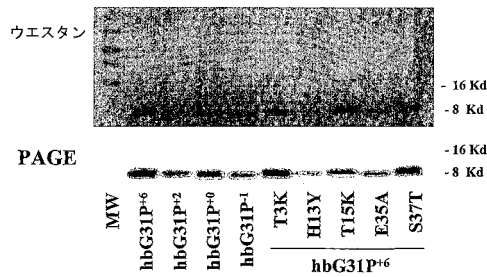


B



【図 8】

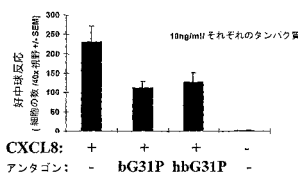
hbG31P アイソフォームの物理的特性決定



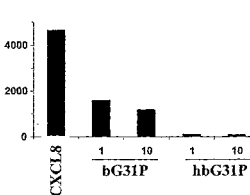
【図 9】

bG31P と hbG31P との比較 (CXCL8 アンタゴニズム)

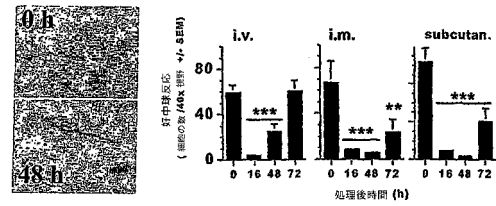
A - 走化性



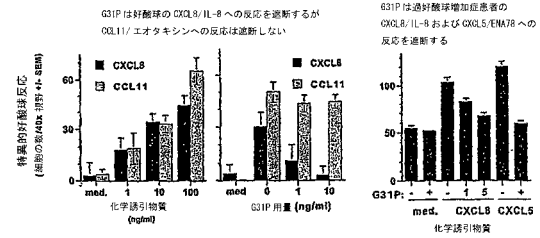
B - R01 放出



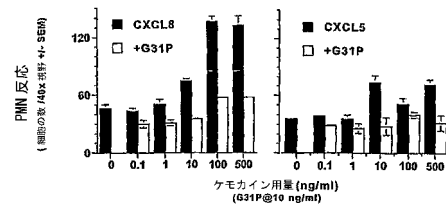
【図 5】



【図 6】

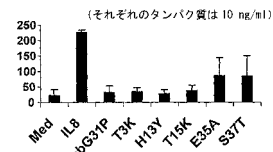


【図 7】

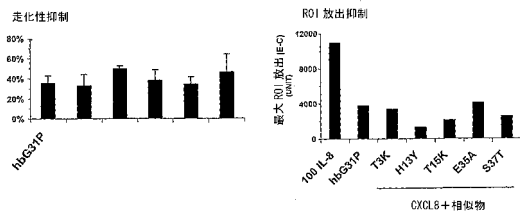


【図 10】

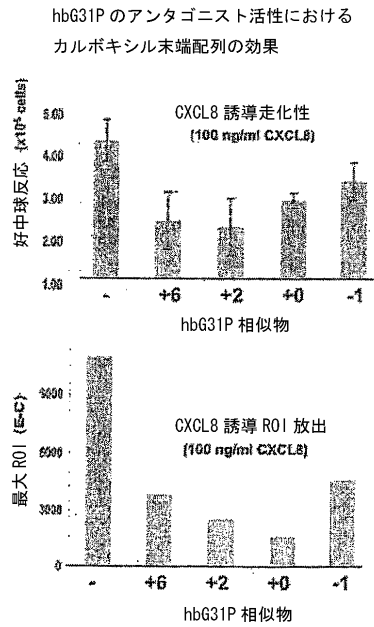
A hbG31P 相似物は好中球アゴニストではない



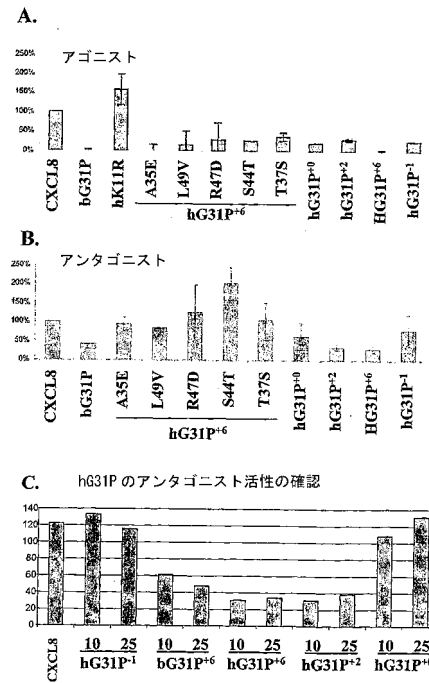
B hbG31P アンタゴニスト活性 (CXCL8 および hbG31P は 10 ng/ml)



【図 1 1】

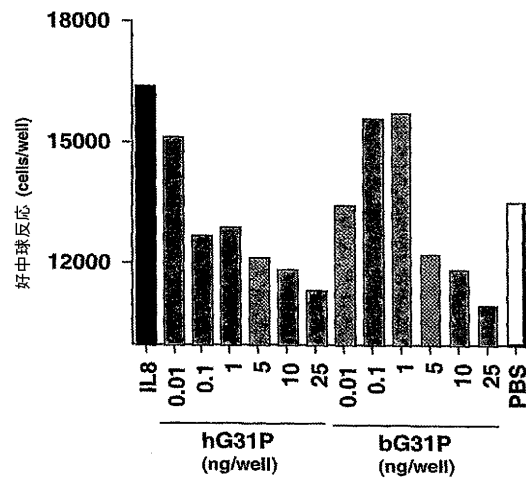


【図 1 2】



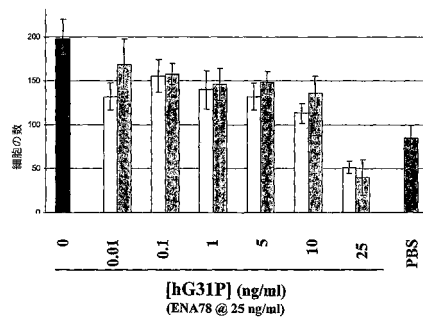
【図 1 3】

hG31P と hG31P⁶ とのアンタゴニスト活性の比較



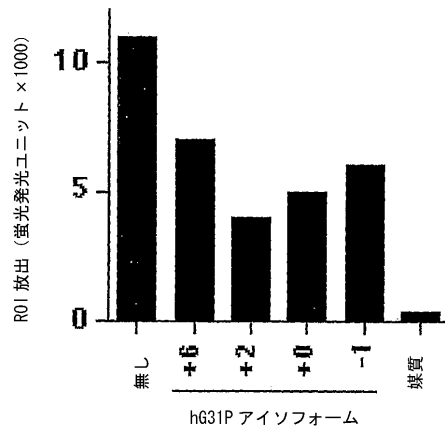
【図 1 4】

hG31P は CXCR2 特異配位子である ENA78 をアンタゴナイズする



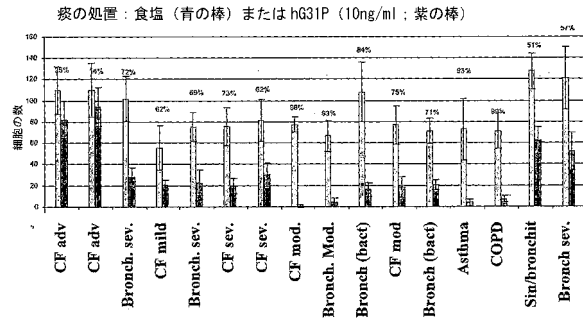
【図 15】

hG31P は CXCL8 誘導 ROI 放出を
アンタゴナイズする



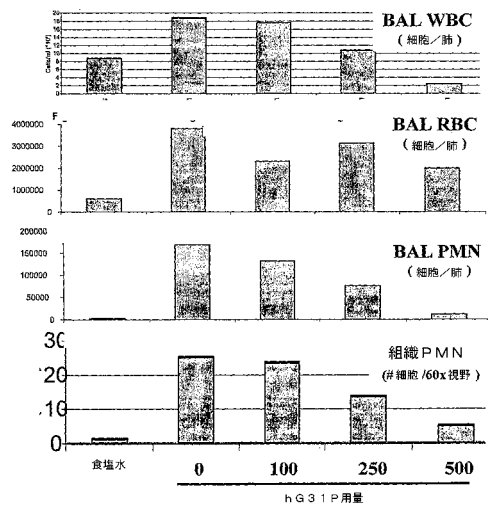
【図 16】

hG31P は気管支拡張症および肺繊維症の
患者の痰の好中球走化性をアンタゴナイズする



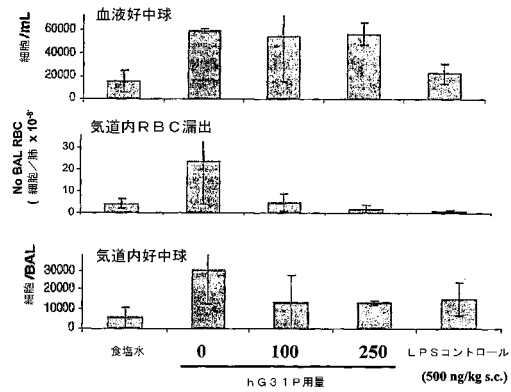
【図 17】

hG31P は内毒素血症マウスにおける肺の炎症を減少させる

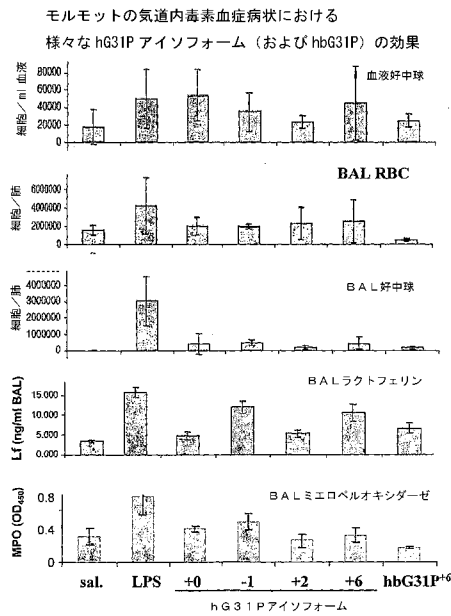


【図 18】

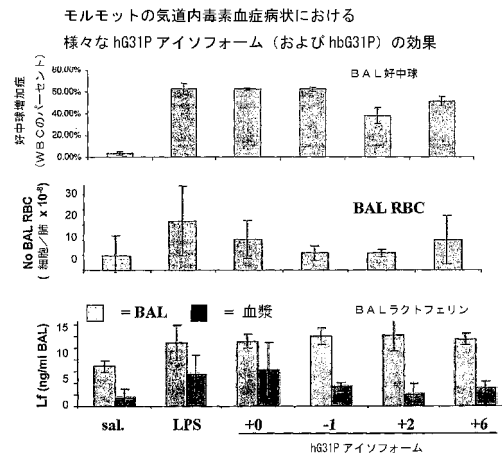
モルモットの病的気道内毒素血症における hG31P の効果



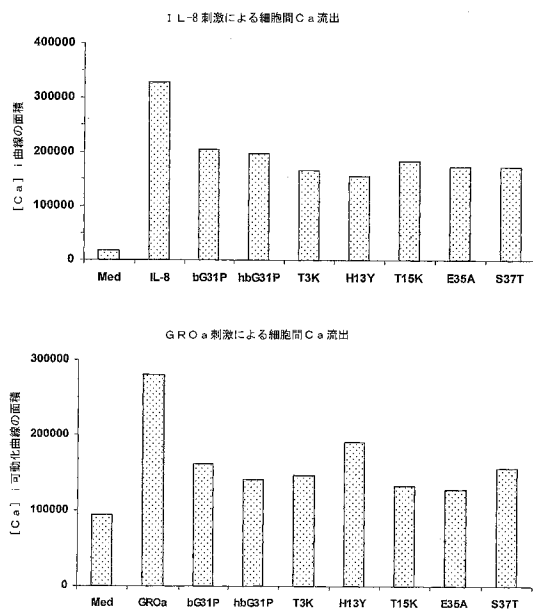
【図 19】



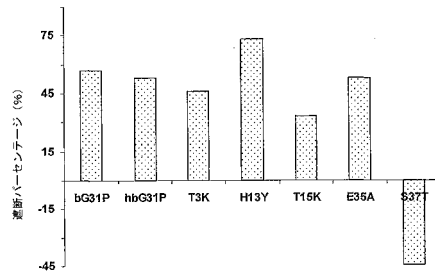
【図 20】



【図 21】



【図 22】



【配列表】

0005462623000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 43/00 1 1 1
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> 37/02
<i>A 6 1 P</i>	<i>9/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 9/10
<i>A 6 1 P</i>	<i>9/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 9/00
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 31/04
<i>A 6 1 P</i>	<i>11/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 11/00
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 37/02
<i>A 6 1 P</i>	<i>13/12</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 13/12
<i>A 6 1 P</i>	<i>15/14</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 15/14
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/54</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 14/54

- (56)参考文献 特表2004-534521 (JP, A)
 Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002年, 293, p.939-44
 J. Biol. Chem., 1994年, 269, p.16075-81
 Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001年, 286, p.595-600

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00-15/90
 C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (STN)
 P u b M e d