

(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2006-527741

(P2006-527741A)

(43) 公表日 平成18年12月7日(2006.12.7)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 A 6 1 P 29/00 C 1 2 N 9/64	A 6 1 K 37/02 A 6 1 P 29/00 C 1 2 N 9/64	Z N A Z Z
(2006.01) (2006.01) (2006.01)		4 B 0 5 0 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2006-516231 (P2006-516231)	(71) 出願人	503348847 シーティーティー キャンサー ターゲッ ティング テクノロジーズ オイ C T T Cancer Targetin g Technologies Oy フィンランド国、エフアイエヌ-0079 O ヘルシンキ、ヴィーキンカーリ 4 シー
(86) (22) 出願日	平成16年6月21日 (2004.6.21)	(74) 代理人	100116838 弁理士 渡邊 潤三
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月1日 (2006.2.1)	(72) 発明者	ステファニダキス、ミカエル フィンランド国、エフアイ-00710 ヘルシンキ、ウォルキヴェンティエ 1 ビー シー 64
(86) 國際出願番号	PCT/FI2004/000376		
(87) 國際公開番号	W02004/110478		
(87) 國際公開日	平成16年12月23日 (2004.12.23)		
(31) 優先権主張番号	20030923		
(32) 優先日	平成15年6月19日 (2003.6.19)		
(33) 優先権主張國	フィンランド(FI)		
(31) 優先権主張番号	20040616		
(32) 優先日	平成16年4月29日 (2004.4.29)		
(33) 優先権主張國	フィンランド(FI)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞遊走の阻害剤

(57) 【要約】

本発明は、 M_1 インテグリンのエドメインに結合することにより M_1 インテグリンと p r o M M P - 9との間の複合体形成を阻害し、好中球遊走を阻止することが見出されたペプチド化合物に関する。上記ペプチド化合物は、ヘキサペプチド配列 H F D D D E を含む。上記ペプチド化合物は、炎症性病態の予防及び治療において有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヘキサペプチド配列 H F D D D E を有する化合物。

【請求項 2】

請求項 1 の化合物を有効成分として含有する医薬。

【請求項 3】

請求項 1 の化合物を有効成分として含有する、好中球遊走の阻害剤。

【請求項 4】

請求項 1 の化合物を有効成分として含有する、炎症性病態の予防及び治療のための医薬。
10

【請求項 5】

請求項 1 の化合物と薬学的に許容される担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項 6】

請求項 1 の化合物を有効成分として含有する、好中球遊走に起因する病態の予防用及び治療用医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 の化合物を有効成分として含有する、炎症性病態の予防用及び治療用医薬組成物。

【請求項 8】

好中球遊走に起因する病態の治療処置または予防処置のための方法であって、ヘキサペプチド配列 H F D D D E を有する化合物を、処置を必要とする哺乳類に対し、好中球遊走を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。
20

【請求項 9】

炎症性病態の治療処置または予防処置のための方法であって、ヘキサペプチド配列 H F D D D E を有する化合物を、処置を必要とする哺乳類に対し、好中球遊走を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、_MインテグリンのIドメインに結合することにより_Mインテグリンとp r o M M P - 9との複合体形成を阻害し、こうして好中球遊走を阻止するペプチド化合物に関する。上記ペプチド化合物は、炎症性病態の治療において有用である。
30

【背景技術】**【0002】**

多形核好中球(P M N)は血液白血球の大部分を占め、侵入微生物に対する食作用と殺菌作用により急性炎症に中心的に関与する。好中球は、アズール親和性顆粒、特殊顆粒、ゼラチナーゼ顆粒、分泌小胞という4つの顆粒コンパートメントを含み、アズール親和性顆粒はミエロペルオキシダーゼ(M P O)を、特殊顆粒はラクトフェリン(L F)を、ゼラチナーゼ顆粒はゼラチナーゼを、分泌小胞は潜在性アルカリホスファターゼを、それぞれ、高濃度に含有することが特徴である。エラスターーゼ(参考文献1)、コラゲナーゼ(参考文献2)、M M P - 9などのタンパク質分解酵素はこれらの顆粒中に局在しており、タンパク質分解酵素は、白血球が骨髄を抜け出して体循環に進入し、炎症部位に集合するために重要な役割を果たす(参考文献3)。
40

【0003】

M M P - 9は組織再構成(tissue remodeling)、組織修復及び創傷治癒に関与し、慢性関節リウマチ(参考文献4)や多発性硬化症(参考文献5)などの炎症性疾患のマークターである。P M N(多形核好中球)は骨髄での成熟の最終段階にM M P - 9を産生し、M M P - 9は潜在的形態(p r o M M P - 9)としてゼラチナーゼ顆粒に貯蔵される。細胞が刺激を受けると、細胞内顆粒が急速に移動し、原形質膜と融合する。プロテインキナーゼC経路のような特定のシグナル伝達カスケードを開始させる細胞外刺激に応答して、酵
50

素前駆体 proMMP-9 が誘導・分泌される（参考文献 6、7）。MMP-9 はまた、ヒト白血球を補体 C5a アナフィラトキシン（参考文献 8）や腫瘍壞死因子-_M（TNF-_M）（参考文献 9）などの可溶性アゴニストで処理したときにも放出される。細胞外基質への細胞接着もまた proMMP-9 やその他の MMP 類を分泌させることが知られる刺激である（参考文献 10、11）。MMP-9 の選択的な発現は、PMN における _M² インテグリンのリガンドとの結合（参考文献 10）や T リンパ腫細胞における _L² インテグリンのリガンドとの結合の結果として誘導される（参考文献 12）。

【0004】

その結果、下記の 3 つの異なる形態の proMMP-9 が細胞外空間に放出されることがザイモグラフィーで検出される：92 kDa のモノマー、200 kDa のホモダイマー、及び好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）（輸送タンパク質のリポカリンファミリー中の 25 kDa のもの）に MMP-9 が結合した 120 kDa の複合体。proMMP-9 の活性化は、プロティナーゼにより細胞外から行なうことができ、また、水銀化合物または反応性酸素種を用いて化学的に行なうこともできる（参考文献 13、14）。活性化されると、分泌された MMP-9 は、細胞外空間に存在する組織性メタロプロテアーゼインヒビター（TIMP）と _L²-マクログロブリンにより阻害され得る。しかし、TIMP は好中球表面の MMP-9 は弱く阻害するだけである（参考文献 15）。従って、細胞表面への局在化は、MMP 活性調節の次の段階を構成する。

【0005】

最近、本発明者らは、白血病細胞をホルボールエステルで活性化すると、proMMP-2 ゼラチナーゼと proMMP-9 ゼラチナーゼが白血病細胞表面に _L² インテグリンや _M² インテグリンとの複合体として現れることを示した（参考文献 16、F120030923）。_L² インテグリン類（CD11/CD18）は大半の白血球機能に重要な役割をもつ（参考文献 17、18）。以下の 4 種類のインテグリンが知られている：白血球に多い _L² 型、顆粒球に多い _M² 型、そして単核白血球とマクロファージに多い _X² 型と _D² 型。これらインテグリンの細胞性リガンドは、免疫グロブリンスープーファミリーに属する細胞間接着分子（ICAMs）-1～5 である。白血球インテグリンが完全な機能を発揮するためには活性化されることが必要である（参考文献 17）。T リンパ球は最も詳細に研究されており、活性化は T 細胞受容体を介して起こる（参考文献 17、19）のであり、プロテインキナーゼ C が関与する可能性がある（参考文献 20）。顆粒球では、_M² インテグリンは細胞内の特殊顆粒に存在することが知られており、活性化により細胞表面に移動する（参考文献 21）。移動のメカニズムや、関与する細胞成分はよく分かっていない。

【0006】

本発明者らは、MMP 触媒ドメインに存在すると考えられる proMMP-9 の主要なインテグリン認識配列のマッピングを行なった（参考文献 16）。この配列はインテグリン _M² の I ドメインにバイオパニングで見出されたファージディスプレイペプチドにより模倣されたものであり、最も活性の高いペプチドは ADGACILWMDDGWCGAAAG (DDGW) であった。本願では、本発明者らは、PMN での proMMP-9 / _M² 複合体の発生と PMN 遊走における役割について研究した。本発明者らは、proMMP-9 と _M² との複合体が細胞のゼラチナーゼ顆粒中すでに形成されており、また、細胞活性化にともなうゼラチナーゼ顆粒の放出とともに上記複合体が細胞表面に移動することを見出した。さらに、MMP-9 の触媒ドメインに由来するわずか 6 アミノ酸の長さのペプチドでも、proMMP-9 の _M² インテグリンへの結合と競合することができた。ヘキサペプチドと DDGW のいずれもが、in vitro と in vivo の両方で PMN の遊走を弱めたが、これは、MMP-9 インテグリン複合体が PMN の運動性に関与することを示唆する。

【0007】

発明の概要

組換え MMP-9 ドメインでの実験により、インテグリンと相互作用する部位が MMP

10

20

30

40

50

- 9 の触媒ドメイン上に存在するという本発明者らの知見がさらに裏付けられた。本発明者らは、わずか 6 残基の長さの、活性な ID ドメイン結合性ペプチドを開発した。このペプチド H F D D D E は M M P - 9 触媒ドメインの直鎖状配列に対応し、*proMMP-9* の M_2 インテグリンへの結合または *proMMP-9* の精製した M_2 インテグリン ID ドメインへの結合と効率的に競合する。このペプチドのアミノ酸配列を乱すと活性を示さないので、負に帶電したアミノ酸の順序が活性に不可欠であることを示す。ファージディスプレイに由来するペプチド D D G W と同様に、H F D D D E は細胞結合型 *proMMP-9* を脱離させ、*in vitro* と *in vivo* の両方で好中球の遊走を阻害した。これらの結果は、*proMMP-9* と M_2 インテグリンとの複合体が好中球の運動性に重要であることを示唆するが、このペプチドが *proMMP-9* 以外の M_2 インテグリンリガンドにも影響する可能性は排除できない。しかし、D D G W と H F D D D E が、(休止した好中球ではなく) 活性化好中球のトランスウェルでの遊走と内皮貫通遊走 (transwell and transendothelial migration) を阻害したことは、これらのペプチドの作用の特異性を示すものである。C T T、抗 M M P - 9 抗体及び抗インテグリン抗体を用いて、本発明者らは、上記ペプチドが *proMMP-9* と M_2 インテグリンの両方を必要とする好中球遊走を阻害することを示した。同様に、T H P - 1 細胞系列を用いて、本発明者らは、*proMMP-9* が、 M_2 インテグリンが指揮する好中球遊走に少なくとも *in vitro* 条件下で関与することを知見した。

【 0 0 0 8 】

発明の詳細な説明

本発明者らは最近、*pro*マトリックスメタロプロティナーゼ、特に *proMMP-9* が、白血球 M_2 インテグリンに対する強力なリガンドであることを示した。本願では、好中球の主要な M M P とインテグリンである *proMMP-9* と M_2 インテグリンを研究した。休止した好中球では、*proMMP-9* / M_2 インテグリン複合体は細胞内顆粒中に検出されるが、細胞が活性化された後は、細胞表面に移動することが免疫沈降法と二重免疫蛍光法で示される。複合体形成のさらなる証拠としては、好中球及び M_2 をトランスフェクトした L 細胞は、固定化した *proMMP-9* またはその組換え触媒ドメインに対する結合（即ち、 M_2 インテグリン依存性の結合）を示したが、一方、野生型の L 細胞と白血球接着不全症 (LAD) 細胞は、そのような結合を示さなかった、ということが挙げられる。 M_2 インテグリンの ID ドメインに結合して *proMMP-9* との複合体形成を阻害するペプチドは、*in vitro* の内皮貫通アッセイ (transendothelial assay) と *in vivo* のチオグリコレート誘発腹膜炎で好中球遊走を阻害した。これらの結果は、*proMMP-9* / M_2 複合体の移動が、好中球遊走を導く細胞表面機構の一部であることを示唆する。

【 0 0 0 9 】

この研究において本発明者らは、P M N (多形核好中球) は細胞内顆粒中に *proMMP-9* / M_2 複合体を形成し、この複合体は、細胞がホルボールエステルまたは炎症性メディエイターにより活性化されたときに細胞表面に移動する、ということを示す証拠を提示する。*proMMP-9* は M_2 インテグリンと同じ細胞内顆粒中に局在することは知られているが、*proMMP-9* と M_2 インテグリンとが細胞内で会合することは従来知られていない。*proMMP-9* が M_2 インテグリン ID ドメインに直接結合できるということは、アクセサリー分子が介在する可能性は排除できないが、内在性 *proMMP-9* と M_2 インテグリンとの相互作用が直接的に行なわれることを示唆するものである。これまで、内在性好中球エラスター、プロティナーゼ 3 とカテプシン G は全て M_2 インテグリンに結合することが報告されている。従って、 M_2 インテグリンは一部のプロティナーゼに特異的なキャリア機能を有する可能性がある。本発明者らは、I C A M - 1 またはフィブリノーゲンは *proMMP-9* の結合と競合しないこと、及び、*proMMP-9* / M_2 複合体に対する D D G W ペプチド阻害剤は I C A M - 1、フィブリノーゲンまたは L L G - C 4 - G S T への白血球の一次接着を阻害できないが、それでも細胞遊走を阻害する、ということを見出した。これらの結果は、 M_2 に結合した *proMMP-9*

10

20

30

40

50

P - 9 は白血球の一次接着には必須ではないが、細胞浸潤の他の段階に必須であり、おそらくインテグリンによる基質タンパク質への結合を解除する際に必須であるものと考えられる。

【 0 0 1 0 】

T H P - 1 白血病細胞の代謝ラベルにより、本発明者らは [^{35}S] - メチオニンパルス後 2 時間以内に、インテグリン鎖が最初に明確に視認できる状態になった時に、インテグリン抗体が proMMP - 9 と共に沈することを示した。これらの結果は、proMMP - 9 とインテグリンの会合はインテグリンの形成後の早期に起こる現象であり、また、免疫沈降物はエンドサイトーシスまたはリサイクル中のインテグリンではないということを示す。このことは、活性化されていない PMN において proMMP - 9 と M_2 の大幅な細胞内共局在化を示す二重免疫蛍光法による研究結果と一致するものである。PMA により誘発された脱顆粒に続き、染色の拡散が観察され、共局在化が細胞表面に移動した。また、細胞表面画分からの共沈が最も強く生じた。これらの結果は、あらかじめ形成された proMMP - 9 / M_2 複合体の細胞内プールから細胞表面への移動が活性化後にすばやく起きることを示している。この考え方のほうが、「分泌された MMP が細胞表面のインテグリンに結合する」という考え方よりも、MMP / インテグリン複合体形成のメカニズムの説明として確度が高い。まず第一に、インテグリンは細胞内で結合した proMMP - 9 を、細胞外の MMP 阻害剤やインテグリンリガンドから競合されることなく適切な場所に移動することができる。第二に、 M_2 の I ドメインは活性化 MMP - 9 には結合しないので、インテグリンは、proMMP - 9 活性化のタイミングと活性化触媒の放出を調節できる。10 20

【 0 0 1 1 】

白血球 M_2 インテグリンは白血球の移動性に関与する。 M_2 または L のノックアウトマウスによる研究も、炎症性刺激に応答して M_2 インテグリンが白血球接着活性、遊走活性及び貪食活性を仲介することの重要性を示す。I 型白血球接着不全症 (LAD - 1) の患者から採取した白血球は、proMMP - 9 を発現するのに、 M_2 インテグリンサブユニットに欠陥があるので適切な遊走ができず、これは、proMMP - 9 のみでは細胞遊走能は付与されないことを示す。本発明者らは、LAD - 1 細胞は先導端 (leading edge) に MMP - 9 の免疫反応性を発現するが、固定化した proMMP - 9 には接着しないことを見出した。野生型 L 細胞について非常に似た結果が得られており、野生型 L 細胞は固定化した proMMP - 9 には接着できないが、 M_2 をトランスフェクトすると、proMMP - 9 に接着できるようになる。PMN による実験では、proMMP - 9 は、細胞内の「不活性」インテグリン及び PMA、C5a または TNF などの刺激で活性化された細胞外のインテグリンの両方と会合することが示される。LAD - 1 細胞において M_2 インテグリンの不存在下に (pro)MMP - 9 がどのようにして細胞表面に配置されるのかは不明である。MMP - 9 については他に数多くの結合タンパク質が公知文献に報告されている。30

【 0 0 1 2 】

細胞遊走アッセイにより、細胞運動性の 2 つの方式が明らかになった。即ち、 M_2 インテグリン依存性で、DDGW やその他のペプチドで阻害されるものと、 M_2 インテグリン非依存性で、ペプチドで阻害されないものである。従って、好中球遊走における proMMP - 9 の役割について文献の議論が分かれているのは驚くにあたらない。実験モデルと動物種により、好中球遊走におけるプロテアーゼの機能を支持する研究もあるし、支持しない研究もある。刺激の違いにより異なる遊走方式を示す細胞の能力により、このような矛盾の多くに説明がつく。 M_2 インテグリンと MMP に非依存性の白血球遊走は、in vitro 条件下に 3 次元のコラーゲン中で観察される白血球のアーベバ様の動き（これは MMP 阻害剤に非感受性である）に対応する可能性がある。40

【 0 0 1 3 】

MMP - 9 完全欠損マウスにおいても、チオグリコレートで誘導された腹膜炎で好中球遊走が見られ、また、TNF - α で処理した内皮細胞の間を好中球が in vitro でトラン

10

20

30

40

50

マイグレーションする。しかし、MMP類の機能はオーバーラップすることが知られており、MMP-9以外のMMP類がMMP-9欠損を補うことができる。本発明者らはこれまでに、^{p r o}MMP-2と^M₂インテグリンとの複合体を見出したが、本研究では、好中球MMP-8もまた精製したインテグリンエドメインに結合できることを示す。HFDDE配列は分泌型MMP類に高度に保存されており、多くのMMP類に由来するそのようなペプチドはpepspot膜アッセイで^MIエドメインに結合できる（参考文献16、FI20030923）。MMP-9ノックアウトマウスではどのMMP-インテグリン複合体が機能するのかはまだ不明である。さらに、他のプロティナーゼ（例えばエラスターーゼやウロキナーゼ）への^M₂インテグリンの結合能が好中球の浸潤に影響するであろうと考えられる。

10

【0014】

DDGWとHFDDEはマウス腹膜炎モデルの*in vivo*で高い活性を示したが、いずれのペプチドも別な種類の^M₂インテグリンリガンドを阻害する潜在能力も有するため、上記の活性がどの程度まで^{p r o}MMP-9の阻害に起因するのかは不明である。^M₂インテグリンリガンドの中にはDDGW様配列を有するものがあり、そのようなリガンドにはMMPの他に少なくとも補体iC3bとトロンボスpongin-1が含まれる。本発明者らの得た結果から、特定の^M₂インテグリンが指揮する好中球の運動機構の一部を、^{p r o}MMP-9と^M₂との複合体が構成している可能性が示唆される。

【0015】

従って本発明は、新規なペプチド化合物に関し、さらに詳しくは、ヘキサペプチド配列HFDDEを有するペプチド化合物に関する。上記ペプチド化合物は、好中球遊走を阻害するための医薬として用いることができる。そのような阻害活性は*in vitro*と*in vivo*の実験の両方で示された。従って、上記ペプチド化合物は炎症性病態の予防と治療において有用である。

20

【0016】

従って、本発明はヘキサペプチド配列HFDDEを有する化合物に関し、特に、好中球遊走の阻害に用いることを特徴とする化合物と炎症性病態の予防及び治療に用いることを特徴とする化合物に関する。

【0017】

本発明はまた、本発明の化合物を有効成分として含有する、好中球遊走に起因する病態の治療用医薬組成物に関する。

30

【0018】

本発明の他の1つの態様においては、有効成分としての本発明の化合物と薬学的に許容される担体とを含んでなる医薬組成物が開示される。

【0019】

本発明のさらなる1つの態様においては、好中球遊走に起因する病態の治療処置または予防処置のための方法であって、本発明の化合物を、処置を必要とする哺乳類に対し、好中球遊走を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法が開示される。本発明の具体的な態様としては、炎症性病態の予防または治療のための方法が挙げられる。

【0020】

40

本願で使用する略語

HMEC	ヒト微小血管内皮細胞
PMN	多形核好中球
CTT	CTTHWGFTLCペプチド
CTTW A	CTTHAGFTLCペプチド
L LG - C 4	CPCFL LGCCペプチド
DDGW	ADGACILWMDDGWC GAA Gペプチド
HSA	ヒト血清アルブミン
KKGW	ADGACILWMKK GWC GAA Gペプチド
LF	ラクトフェリン

50

M P O	ミエロペルオキシダーゼ
N G A L	好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン
G P A	グリコールホリンA
T A T - 2	腫瘍関連トリプシノーゲン-2

【0021】

なお本明細書中、発明の背景技術を説明するため、また、特に本発明の実施態様に関する詳細を補うために言及又は使用する各種刊行物及びその他の文献は、言及したことにより本明細書中に組み込まれたものとする。以下、実施例によって本発明をさらに詳しく説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0022】

好中球調製物及び細胞系

多形核好中球(P M N)を、クエン酸デキストロース中で抗凝固処理された末梢血から単離した。赤血球を2%デキストランT-500を用いて遠心分離で沈殿させ、得られた白血球を多く含有する上清をペレット化し、生理食塩水に再懸濁し、リンホプレップ(Lymphoprep)(ノルウェー国、オスロ、Nyegaard製)を用いて、400gで30分間遠心分離し、多形核細胞を血小板及び单核球から分離した(参考文献22)。P M Nの純度は95%より高く、典型的に好酸球の比率は2%より低い。細胞生存率を、MTT(3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド)アッセイを製造者(Roche)の説明書に従って用いて測定した。

20

【0023】

S. Mustjoki(ヘルシンキ大学、ハートマンインスティテュート)より寄贈されたヒト微小血管内皮細胞(H M E C - 1)(参考文献23)を、R P M I 1 6 4 0 中で、2mMグルタミン、100 I U / m l ペニシリン、100 μ g / m l ストレプトマイシンを含有する10%F B Sの存在下で生育した。ヒト单球性T H P - 1細胞を公知の方法(参考文献24、25)で維持した。I型白血球接着不全症(L A D - 1)細胞、野生型及び_M2-トランスフェクト型L 9 2 9マウス線維芽細胞はDr. Jean-Pierre Cartron(フランス国、パリ、INSERM)からの寄贈である。これらの細胞を、公知の方法(参考文献26)で維持し、_M2の発現を蛍光活性化細胞分類法(F A C S、カルフォルニア州、サンホセ、Becton Dickinson)によって試験した。

30

【0024】

抗体とその他の試薬

モノクローナル抗体M E M 1 7 0とモノクローナル抗体O K M 1 0は、_Mインテグリンサブユニットに対する抗体である(参考文献25)。抗M M P - 9モノクローナル抗体(G E - 2 1 3)はLab Vision(カルフォルニア州、フリーモン)から入手し、抗M M P - 9ポリクローナル抗体はSanta Cruz Biotechnology(カリフォルニア州、サンタクラーズ)から入手した。公知のアフィニティ精製した抗M M P - 9抗体(参考文献3)も用いた。対照モノクローナル抗体として、マウスIgG(オーストラリア国、ホーソン、Silenius製)及び抗グリコホリンA(G P A)(A T C C)を用いた。抗トリプシノーゲン-2(T A T - 2)抗体をウサギポリクローナル抗体の対照とした(参考文献27)。ペルオキシダーゼ結合抗G S Tモノクローナル抗体はSanta Cruz Biotechnologyから入手した。マウス_Mインテグリンに対するラット抗体(M C A 7 4)及びF I T C結合抗ラット抗体(F a b')₂はSerotec(英国、オックスフォード)より購入した。ペプチドであるC T T、W A C T T、L L G - C 4、D D G W及びK K G Wは公知である(参考文献16、28)。H F D D D Eペプチド及びD F E D H DペプチドはNeosystem(フランス国、ストラスブール)に特別注文した。p r o M M P - 8はCalbiochemから、p r o M M P - 9はRocheから購入した。フルオロリン酸ジイソプロピルはAldrich Chemical Company Inc.(ドイツ国、シュタインハイム)から入手した。ヒトC a 5はCalbiochem(カリフォルニア州、ラ・ホーヤ、Biosciences, Inc.)から、組換えT N F - はSigma-Aldrich(ミズーリ州、セントルイス)から購入した。

40

50

【0025】

細胞画分 (subcellular fraction)

P M N を、 3×10^7 個 / m l でクレブズ - リンガーリン酸塩 (Krebs-Ringer phosphat e) (130 mM NaCl、5 mM KCl、1.27 mM MgSO₄、0.95 mM CaCl₂、5 mM グルコース、10 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH 7.4)) に懸濁した。P M N を酢酸ミリスチン酸ホルボール (phorbol myristate acetate) (PMA; 2 µg / m l) と一緒に、またはなしで + 37 °C で 15 分間インキュベートし、その後 25 mMol / L フルオロリン酸ジイソプロピルと共に氷上で 5 分間インキュベートし、上清 (S 0) を採取した。顆粒画分 (granule fractions) を公知の方法 (参考文献 29) で精製した。端的に言うと、P M N を、ナイトロジェン キャビテーション法 (nitrogen cavitation) で破碎し、細胞残渣を遠心分離で除去した。得られた上清 (postnuclear supernatant) (S 1) に、パーコール (Percoll) を用いて 3 層の密度勾配 (1.050 / 1.090 / 1.120 g / m l) を形成し、+ 4 °C で 30 分間遠心した。画分 1 ~ 6、7 ~ 12、13 ~ 18、及び 19 ~ 24 (各 1 m l) を採取し、4 つの異なるグループとしてプールした。最後の画分 (25 ~ 30) に、透明な細胞質ゾル (S 2) が存在した。分取したものについて、個々の区分 (括弧内に示す) に対応するマーカータンパク質の存在を試験した: M P O (バンド / アズール親和性)、L F (1 バンド / 特殊)、ゼラチナーゼ (2 バンド / ゼラチナーゼ)、アルブミン (バンド / 分泌小胞及び原形質膜) (参考文献 21)。タンパク質レベルをサンドイッチ E L I S A アッセイで測定した。

10

20

30

40

【0026】

ゼラチンザイモグラフィー、免疫沈降及び免疫プロット法

顆粒画分を 1% (v / v) Triton-X-100 のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (PBS) で、氷冷しながら溶解し、溶解産物を + 4 °C で 10 分間遠心分離することにより不純物を除去した。溶解産物を、0.2% ゼラチンを含有する 8% SDS-PAGE リニアリアルアミドゲルを用いたゼラチンザイモグラフィーで分析した (参考文献 27)。免疫沈降を行う前に、溶解産物をプロテイン G - セファロースと共に、+ 4 °C で 30 分間インキュベートすることにより予備清掃 (preclear) した。遠心分離後、得られた上清を、抗 MMP-9 ポリクローナル抗体または抗 ^Mモノクローナル抗体 (OKM-10) を用いて免疫沈降に付した。プロテイン G - セファロースと共に + 4 °C で 1 時間インキュベートした後、免疫複合体をペレット化し、Triton X-100 溶解緩衝液で 3 回洗浄し、PBS で 1 回洗浄した。2-メルカプトエタノールを含有する Laemmli サンプル緩衝液で可溶化し、試料を 4 ~ 15% 勾配 SDS-PAGE ゲル (カリフォルニア州、ハイキュリーズ、Bio-Rad laboratories) で電気泳動させ、半乾燥電気泳動 (semidry electrophoresis) を 15 V で 30 分行うことによってニトロセルロース膜に移した (ドイツ国、ダッセル、Schleicher & Schuell)。上記の膜を 5% 粉ミルクと 0.05% Tween 20 を含有する PBS 溶液に + 4 °C で一晩浸漬することによって、非特異的結合をブロッキングした。上記の膜を ^Mモノクローナル抗体 (MEM170) (10 µg / m l) と共に室温で 2 時間インキュベートした後、西洋ワサビ結合ウサギ抗マウス IgG (1 : 1000 希釀液; デンマーク国、コペンハーゲン、DAKO A/S) と共に 25 °C で 30 分間インキュベートした。数回洗浄した後、高感度化学発光システム (Enhanced Chemiluminescence system) (Amersham Pharmacia Biotech 製) を、製造者の説明書に従って用いて、プロットを展開した。結合した抗体を膜から除去し、抗 MMP-9 ポリクローナル抗体でリプローブした。適切な二次抗体を用いた。免疫検出の後は毎回、膜を TBS 中に + 4 °C で保存した。

【0027】

インテグリンエドメインと MMP-9 組換えタンパク質の発現と精製

G S T - ^MI ドメイン融合タンパク質及び G S T - ^LI ドメイン融合タンパク質を、公知の方法で発現させ、精製した (参考文献 30)。トロンビン (Sigma 製) を用いて G S T を ^MI ドメインから切り離し、F P L C システム (Pharmacia 製) を用いたモノ S

50

H R 5 / 5 カラムによるイオン交換クロマトグラフィで I ドメインを精製した。 M M P - 9 及び F n I I ドメインの精製については別の場で発表する（参考文献 33）。組換えタンパク質の純度は S D S - P A G E で確認した。

【 0 0 2 8 】

M M P - 9 ドメインと _MI ドメインの相互作用

I C A M - 1、フィブリノゲン、p r o M M P - 8、p r o M M P - 9 または組換えドメイン（0.5 μg の P B S 溶液 / ウェル）をプラスチック製 96 ウェルプレートに + 4 °C で 16 時間被覆し、ウェルを、3% ウシ血清アルブミン（B S A）の P B S 溶液を用いて室温で 2 時間ブロッキングに付した。G S T - _MI ドメインの結合を、実質的に第一優先権出願に記載の通り測定した。逆方向のアッセイ（reverse assay）においては、G S T - _MI ドメインで被覆し、p r o M M P - 9 の結合を G E - 2 1 3 抗体を用いて測定した。実験を行う前に、競合ペプチドを _MI ドメインと共に 20 分間プレインキュベートした。

【 0 0 2 9 】

代謝放射性同位元素標識法 (metabolic radiolabelling) 及び免疫沈降

非活性化、または 50 nM の P M A により活性化させた T H P - 1 細胞（ 1×10^7 個）を [³⁵S] - メチオニンを用いて生合成的に標識した（biosynthetic labeling）（参考文献 31）。細胞を、メチオニンを含有せず、透析した、加熱不活性化 10% ウシ胎仔血清を含有する培地に懸濁し、+ 37 °C で 10 分間、50 μCi / ml の [³⁵S] - メチオニンでパルス標識（pulsed-labelling）した。細胞を素早く洗浄し、10% F C S を含有する完全培地で + 37 °C で、後述の所定時間インキュベートした。細胞をペレット化し、冷却した P B S を 2 ml ずつ 3 回（30 分後、2 時間後及び 4 時間後）添加することにより標識付けを停止させた。洗浄の後、細胞を 1% Triton X - 100、10 μg / ml アプロチニン、10 μg / ml ロイペプチド及び 1 mM フッ化フェニルメチルスルフォニルの P B S 溶液で溶解し、超遠心分離法で不純物を除去し、プロテイン G - セファロースで予備清掃した。溶解産物を、アフィニティ精製したウサギ抗 M M P - 9 抗体と _Mモノクローナル抗体（O K M - 1 0 ）（3 μg / ml）で免疫沈降した。ヒト I g G₁を対照抗体とした。プロテイン G - セファロースと共に + 4 °C で 1 時間インキュベートした後、免疫複合体をペレット化して洗浄し、7.5% S D S - P A G E ゲル上で泳動させた。ゲルをエンハンサー（Amplify、Amersham Biosciences 製）で処理し、ろ紙上で乾燥させ、Kodak X-Omat AR フィルムに - 70 °C で 1 週間曝露した。

【 0 0 3 0 】

免疫蛍光染色

P M N 及び L A D - 1 細胞を、20 nM P M A で + 37 °C で 15 分間処理するか、或いは未処理のままで、ポリ - L - リシンで被覆したカバーガラスに付着させ、2.5% パラフォルムアルデヒド中で、0.1% Triton X - 100 の存在下または非存在下で、+ 25 °C で 10 分間固定化し、数回洗浄した。上記細胞を 20% (v / v) ウサギ血清及び 3% B S A の P B S 溶液を用いて、室温で 30 分間ブロッキングした。細胞をウサギ抗 M M P - 9 ポリクローナル抗体及びマウス抗 _M 抗体（M E M 1 7 0 ）（1 : 250 で希釈）と共にインキュベートした。P B S で洗浄した後、二次抗体であるローダミン（T R I T C）結合抗ウサギ抗体または F I T C 結合抗マウス抗体（F a b'）₂（DAKO 製）を 1 : 500 に希釈したものと 30 分間インキュベートした。得られた試料をカバーガラスに載せ、+ 4 °C の暗所で保存した。_M₂ 及び M M P - 9 の細胞内分布を、蛍光顕微鏡法により、63 倍の油浸対物レンズ及びライカ T C S S P 2 スキャンユニットを備えた共焦点顕微鏡（ライカ マルチバンド共焦点イメージングスペクトロフォトメーター（Leica multi band confocal imagine spectrophotometer）を用いて調べた。

【 0 0 3 1 】

細胞接着

M M P - 9 タンパク質（200 nM P B S 溶液）を + 4 °C で 16 時間かけて被覆したマイクロタイターウェルを、3% B S A の P B S 溶液で、室温で 1 時間ブロッキングし

た。 M_2 インテグリン L - 細胞トランスフェクタント及びPMN (1×10^5 個 / ウェル) を 2 mM MgCl₂ と 0.1% BSA を添加した RPMI 培地に懸濁し、PMA (20 nM) で 20 分間活性化、或いは C5a (50 nM) または TNF- α (10 nM) で +37℃ で 4 時間活性化した。野生型 L926 細胞及び LAD-1 細胞を対照として用いた。細胞を、所定の抗体 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) またはペプチド ($50 \mu\text{M}$) で、+37℃ で 30 分間処理し、無血清倍地で 2 回洗浄し、マイクロタイヤーウェル中で、+37℃ で 30 分間インキュベートした。ウェルを PBS で洗浄し、接着細胞の数をフォスファターゼアッセイで定量した(参考文献 25)。

【0032】

細胞遊走

PMN には孔サイズが $3 \mu\text{m}$ の、THP-1 細胞には $8 \mu\text{m}$ の Costar 製 24 - トランスウェル遊走チェンバー (24-transwell migration chambers) を用いて細胞遊走を行った。 M_2 インテグリンに指揮される遊走を研究するため、チェンバーの膜の両面を LLG-C4-GST インテグリンリガンド ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) または対照として GST で被覆し、 10% 血清含有培地でプロッキングした(参考文献 16)。内皮貫通遊走を研究するために、コンフルエントな HMEC (4×10^5 個 / ウェル) をゼラチンで被覆した膜の上側で 5 日間生育した。3 日後に培地を交換した。PBS で HMEC 層を 2 回洗浄した後、C5a (50 nM)、TNF- α ($10 \text{ ng}/\text{ml}$)、または培地のみを下室に添加して化学走性活性化を +37℃ で 4 時間行った。その後、培養物を再度 2 回洗浄して全ての試薬を除去した。PMN または THP-1 細胞を、研究したペプチド阻害剤または抗体と 1 時間ブレインキュベートしてから、上室へ移動した ($100 \mu\text{l}$ RPMI / 0.1% BSA または 10% FCS 含有完全培地中に 1×10^5 個)。PMN を LLG-C4-GST 被覆膜を通して 2 時間、HMEC 単分子層を通して 30 分間遊走させた。THP-1 細胞を 16 時間遊走させた。遊走しなかった細胞を上部表面から綿棒で除去し、フィルターを通過した細胞をクリスタルバイオレットで染色して数えた。

【0033】

マウス炎症モデル

31 ~ 32 週齢の Balb/c マウスの腹腔内に、 3% (w/v) チオグリコレートの無菌生理食塩水を注射した(参考文献 32)。ペプチド ($100 \mu\text{l}$ 中に $5 \sim 500 \mu\text{g}$) を尾静脈に注射した。3 時間後に動物を安樂死させ、腹膜細胞を、 10 ml の無菌 PBS を腹膜壁より注射することによって採取した。洗浄液中に存在する赤血球細胞を低張溶解法 (hypotonic lysis) により除去した。細胞を遠心分離機にかけ、 1 ml の無菌 0.25% BSA / クレブズ - リンガー溶液に再懸濁した。上清も採取しゼラチンザイモグラフィーで分析した。 0.1% クリスタルバイオレットで染色し、 100 倍の対物レンズを備えた光学顕微鏡を用いて好中球の数を決定した。免疫蛍光染色をするために、細胞をポリ-L-リシン被覆カバーガラスに結合させ、 2.5% パラホルムアルデヒドの PBS 溶液を用いて +4℃ で 30 分間固定化し、数回洗浄した。Fc レセプターを 20% のウサギ血清及び 3% BSA の PBS 溶液の存在下でプロッキングした。その後細胞を抗 MP-9 ポリクローナル抗体及び M_1 モノクローナル抗体 (MCAT4) と 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄した後、二次抗体であるローダミン (TRITC) 結合抗ウサギ抗体または FITC 結合抗ラット抗体 (Fab')₂ とさらに 30 分間インキュベートした。試料を共焦点顕微鏡で調べた。動物実験はヘルシンキ大学倫理委員会の承認を得た。

【0034】

統計分析

得られた結果を F - 検定 (F-test) (分散分析 (ANOVA)) で分析し、グループ間で有意差が出た場合には、続いて、ダンカンの多重範囲検定 (Duncan's Multiple Range test) に付した。用いたプログラムはウィンドウズ用 SPSS の 8.0 版である。

【0035】

ゼラチナーゼの細胞からの脱離に対するペプチドの効果

T H P - 1 細胞 (50,000 個 / 100 μ l) を無血清 R P M I 培地で、200 μ M の本発明のペプチドの存在下または非存在下で 16 時間、所定の方法でインキュベートした。T H P - 1 細胞からの上清とマウス腹腔内液をゼラチンザイモグラフィーで分析した。ゼラチン分解活性を濃度計でスキャニングして定量した。

【 0 0 3 6 】

結果

p r o M M P - 9 / M₂ 複合体の細胞内での形成

休止状態の P M N を M₂ 抗体と M M P - 9 抗体で染色することにより、T r i t o n X - 100 による透過処理後に強い細胞内共局在化が示された（図 1 の A）。透過処理をしていない細胞では、そのような共局在化は見られず、もし M M P - 9 が細胞表面に存在したとしてもごくわずかであった（図 1 の B）。細胞内顆粒のエクソサイトーシスを引き起こす P M A 処理を行った後、細胞内の染色が減少し、M₂ インテグリンと M M P - 9 が細胞表面に共局在した（図 1 の C - D）。エクソサイトーシスを C 5 a で引き起こした場合も同様の結果が得られた（データは示さない）。二重免疫蛍光染色の対照として、

M₂ を欠く B 細胞由来の L A D - 1 細胞系（図 1 の E）を用いた。P M A 刺激の後、L A D - 1 細胞が p r o M M P - 9 を分泌したことがザイモグラフィー分析で検出され、分泌された p r o M M P - 9 は細胞表面に発現したが分布は好中球の場合とは異なり、M M P - 9 は細胞の先導端に局在した。

【 0 0 3 7 】

p r o M M P - 9 と M₂ の細胞内共局在化は、P M N 顆粒において、細胞表面への移動の前に p r o M M P - 9 / M₂ インテグリン複合体が形成されることを示唆した。P M A で処理した細胞及び未処理の細胞由来のアズール親和性画分（1 バンド）、特殊画分（1 バンド）、ゼラチナーゼ画分（2 バンド）、及び原形質膜を含む分泌小胞画分（1 バンド）を、3 段階の非連続的 Percoll 勾配で精製した。各画分の純度は、顆粒特異的マーカーで測定した。M P O をアズール親和性顆粒のマーカー；L F 及び N G A L を特殊顆粒のマーカー；M M P - 9 をゼラチナーゼ顆粒のマーカー；ヒト血清アルブミン（H S A）を分泌小胞のマーカー；そしてヒト白血球抗原（H L A）を原形質膜のマーカーとして用いた（図 2）。P M A が顆粒マーカーの大部分を細胞外環境に放出させたが、M P O はアズール親和性顆粒から部分的に放出されただけであった。N G A L は特殊顆粒から上清（S 0）に 75 % 放出され、L F は 90 % 放出された。同様に、ゼラチナーゼ顆粒中では M M P - 9 の含有量は 90 % 減少し、S 0 上清中では増加した。H S A は 85 % が分泌小胞から放出され、S 0 上清中で多量に検出された。原形質膜のマーカーである H L A は、比較的一定であった。細胞を活性化すると、H S A、N G A L、L F 及び M M P - 9 のレベルは上清（postnuclear supernatant）（S 1）中で大幅に減少した。細胞質ゾル画分（S 2）はこれらのマーカーを有さなかったが、これは細胞分画（subcellular fractionation）によって完全な顆粒（intact granule）を単離したことを見ている。

【 0 0 3 8 】

顆粒画分の免疫プロット分析により、p r o M M P - 9 が、細胞画分において、M₂ インテグリンと類似の分布を示すことが示された（図 3 の A）。休止状態の P M N において、p r o M M P - 9 と M₂ の大部分が 2 バンドに見られ、1 バンド及び 1 バンドにおいてはより少なかった。免疫蛍光分析の結果と一致して、P M A は 2 バンド含有量の減少を引き起こした。ゼラチンザイモグラフィーによる画分の分析により、同様に、P M A が細胞内 p r o M M P - 9 単量体及び二量体、ならびにその N G A L との複合体の量を減少させたことが示された（図 3 の B）。酵素前駆体 p r o M M P - 9 は、分泌小胞及び原形質膜を示す 1 バンド、及び細胞外環境（extracellular milieu）（S 0）において見られた。

【 0 0 3 9 】

非活性化 P M N において、M₂ インテグリン抗体である O K M - 10 は、1 バンド、2 バンド及び 1 バンドから 165 k D a の M₂ 鎌を免疫沈降させた。92 k D a の p r o M M P - 9 は 2 バンドから共沈した（図 3 の C）。細胞を P M A で刺激すると、

10

20

30

40

50

鎖は 1 バンド及び バンドから免疫沈降したが、 2 バンドからはそれ以上免疫沈降しなかった。上記インテグリン抗体は、 proMMP - 9 のみを バンドから共沈させた。可溶性 M I ドメインを加えることにより、共沈が阻止された。

【 0 0 4 0 】

proMMP - 9 と M 2 インテグリンとの内因性の複合体の生合成を、このような研究に適した THP - 1 白血病細胞系を用いて調べた。上記の複合体を [³⁵S] - メチオニンでパルス標識した細胞から免疫沈降によって 2 時間及び 4 時間の時点での上記複合体を検出した（図 3 の D、レーン 5 及び 8）。OKM10 抗体は M 鎖と proMMP - 9 を共沈した。 M 鎖は、抗 MMP - 9 抗体との免疫沈降物中に弱く検出されただけであり（レーン 4 及び 7）、これはリガンドと結合していない proMMP - 9 が過剰量存在するためであると考えられる。対照抗体は、 M 1 2 も proMMP - 9 も共沈しなかった（レーン 3、6 及び 9）。

【 0 0 4 1 】

proMMP - 9 / M 2 インテグリン複合体のペプチド阻害剤は好中球遊走を阻害する

本発明者らの以前の研究において、pepspot 分析により、proMMP - 9 がインテグリンと相互作用する部位は proMMP - 9 の触媒ドメインに存在する 20 個のアミノ酸配列 (Q G D A H F D D D E L W S L G K G V V V) であることが示された（第一優先権書類を参照されたい）。pepspot システムによる更なるスクリーニングにより、この配列をヘキサペプチド H F D D D E にまで短縮しても充分なインテグリン結合活性が達成されることが分かった（データは示さない）。そのような短い配列が proMMP - 9 の生物活性部位であることを確認するために、まず、細菌で発現させた MMP - 9 の組換えドメインを作成した（図 4 の A）。MMP - 9 は pro ドメイン (Pro) と触媒ドメインからなるが、ヘモペキシンドメインを欠いている。I I 型フィブロネクチン繰返し配列 (F n I I) は重要な基質結合領域なので、これも別の組換えタンパク質として作成した。pro 触媒ドメイン構築体 MMP - 9 は、野生型 proMMP - 9 とほぼ同じ効率で M の I ドメインと結合した（図 4 の B）。F n I I タンパク質は活性をほとんど欠いていた。固相 pepsot 分析で同定された H F D D D E ペプチドをペプチド合成で製造すると高い活性を示し、proMMP - 9 の M I ドメインへの結合を阻害し、その際、20 μM で I C₅₀ を達成した（図 4 の C）。結合された proMMP - 9 の決定は、F n I I ドメインにあるエピトープを認識する G E - 213 抗体を用いて行なった（データは示さない）。配列を乱したスクランブルペプチド D F E D H D (同じ負に帯電したアミノ酸を有する) は活性を示さなかった。H F D D D E は、ファージディスプレイで発見した上述の M I ドメイン結合性ペプチドである D D G W と同様に活性であった。D D G W の対照用ペプチドである K K G W は効果を示さなかった。MMP ファミリーのペプチドには H F D D D E 配列が高度に保存されているので、本発明者らは、 M I ドメインの、ヒト好中球コラゲナーゼである MMP - 8 への結合についても調べた。I ドメインは、proMMP - 9 に対するのと同様に、proMMP - 8 に対して、D D G W で阻害可能な結合を示した（図 4 の D）。I C A M - 1 とフィブリノゲンはいずれの proMMP とも競合せず、このことは、I ドメインにおいては、基質タンパク質と proMMP に対する結合部位が異なることを示唆する。

【 0 0 4 2 】

インテグリンが活性化された後、PMN は proMMP - 9 への接着能力を示した。PMA で刺激した PMN は、proMMP - 9 に対するのとほとんど同じ強度で、マイクロタイターウェルに塗布した MMP - 9 に結合した（図 5 の A）。PMN を C 5 a または TNF - で刺激すると同様の結果が得られ、PMN の接着が 3 倍となった（図 5 の B）。F n I I ドメインは PMN の接着を支持しなかった。PMN の接着は H F D D D E (50 μM)、D D G W (50 μM)、可溶性 M I ドメイン、M E M 1 7 0 抗体により阻害され（図 5 の C）、 M 2 インテグリンが指揮する結合であることを示した。対照ペプチド (D F E D H D、K K G W) 及び無関係なモノクロナール抗体（抗 G P A 抗体）は効果を

10

20

30

40

50

示さなかった。CTTペプチドはMMP-9の触媒ドメインに結合したが、MMP阻害活性を欠くW_A CTT対照ペプチドは結合せず(未公開の結果)、また、CTTペプチドはPMNの接着を阻害した。MMP-9抗体は部分的に阻害した。

【0043】

本発明者らはまた、トランスフェクトにより_M₂を発現したL細胞(_M₂-transfected L cells)についても調べてみた。_M₂発現L細胞トランスフェクタントは、PMNと同様に、proMMP-9とMMP-9に結合し、そして、IDメインリガンドとMMP-9阻害剤は結合を弱めた(図5のD)。トランスフェクトした細胞はまた、FnIDIドメインに弱い接着を示したが、調べたペプチドと抗体はこの結合を阻害しなかった。野生型のL細胞とLAD-1のいずれもproMMP-9やそのドメインには結合しなかった。

【0044】

PMNのin vitroでの遊走をトランスウェルフィルターассеイで研究した。人工的な₂インテグリンリガンドLLG-C4-GSTで被覆することにより、細胞遊走が₂インテグリンに依存するようになる(参考文献16, 25)。PMAで活性化したPMNのLLG-C4-GST層中の遊走は、GST層中における遊走の5倍であった(図6のA)。HFDDE(200 μM)は、PMAで刺激された細胞の遊走を阻害したが、不活性化細胞の基礎的遊走は阻害しなかった。DDGW、CTT、MEM170(20 μg/ml)及び抗MMP-9ポリクロナール抗体(20 μg/ml)は類似の活性を示し、PMAで活性化した細胞の遊走のみに影響を与えた。対照ペプチドと対照抗体(抗TAT-2)は効果を示さなかった。内皮貫通遊走assay(transendothelial migration assay)からも同様の結果が得られた(図6のB)。C5aまたはTNF-αによる化学走性によりPMNのトランスマイグレーション(transmigration)が5~10倍に増加し、また、それをDDGW、HFDDE及びCTTが阻害したが、対照ペプチドは阻害しなかった。同様に、_M抗体とMMP-9抗体は阻害したが、対照抗体(抗GPA抗体)は阻害しなかった。本発明者らはまた、LLG-C4-GSTで被覆したトランスウェルフィルターを通過するTHP-1白血病細胞の遊走に対して各種ペプチドが与える影響を調べた。結果はPMNの場合におけるのと同じであった。HFDDE、DDGW及びCTTはTHP-1の遊走を阻害したが、対照ペプチドは阻害しなかった(図6のC)。

【0045】

DDGWペプチドに関する以前の研究により、DDGWペプチドがTHP-1細胞からproMMP-9を脱離させることができることが示されている(FI2003/0923)。本発明者らはまた、HFDDEペプチドもproMMP-9を脱離させることができるが、DDGWペプチドを用いた場合ほど有効性が高くなないことを見出した(図6のD)。配列を乱したスクランブルペプチドはproMMP-9の脱離を誘導しなかった。16時間のインキュベーションの間、各種ペプチドはproMMP-2の分泌に影響しなかった。

【0046】

好中球のin vivoでの遊走を調べるために、本発明者らはチオグリコレートで誘発したマウス腹膜炎モデルを用いた。チオグリコレートで刺激してから3時間以内に腹腔に浸潤した細胞の大部分は、クリスタルバイオレット染色によりPMNであると判定された。この炎症モデルにおいては、DDGWペプチドとHFDDEペプチドは強いin vivo活性を示した(図7のA)。DDGWペプチドまたはHFDDEペプチドを尻尾へ静脈注射することでPMNの腹腔内蓄積を阻害した。対照として用いたKKGWペプチドとDFEDHDペプチドは効果を示さなかった。DDGWペプチドとHFDDEペプチドの効果は濃度依存性であり、DDGWペプチドの投与量50 μg/マウスとHFDDEペプチドの投与量500 μg/マウスで、90%までの阻害を達成できた。DDGWペプチドは、5 μg/マウスの投与量(0.1 mg/マウス組織1 kgの有効量に相当する)でさえも活性を示した。チオグリコレートで刺激した後、PBSを用いた対照と比較して約20倍のPMNが腹腔内に存在していた。採取した炎症性PMNは、proMMP-9/_M

10

20

30

40

50

²複合体の存在について二重免疫蛍光法で染色した(図7のB)。PBS注射の後に採取した細胞は上記複合体を欠いており、インテグリンを発現していたが、細胞表面MMP-9を有さなかった(図7のC)。採取した腹腔液の上清をザイモグラフィーで分析したことろ、PBSの場合と比較して、チオグリコレートがゼラチナーゼレベルの上昇を誘導したことが示された(図7のD)。DDGWペプチドとHFDDD Eペプチドは、細胞遊走の阻害にともない、ゼラチナーゼレベルの上昇を防止したが、スクランブルペプチドはそのような活性を示さなかった。

【0047】

参考文献

1. Dewald, B., R. Rindlerludwig, U. Bretz, and M. Baggiolini. 1975. Subcellular-localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 141:709. 10
2. Murphy, G., U. Bretz, M. Baggiolini, and J. J. Reynolds. 1980. The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leukocytes. Biochem. J. 192:517.
3. Kjeldsen, L., O. W. Bjerrum, J. Askaa, and N. Borregaard. 1992. Subcellular-localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. Biochem. J. 287:603.
4. Opdenakker, G., P. E. van den Steen, and J. van Damme. 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. Trends Immunol. 22:571. 20
5. Gijbels, K., S. Masure, H. Carton, and G. Opdenakker. 1992. Gelatinase in the cerebrospinal-fluid of patients with multiple-sclerosis and other inflammatory neurological disorders. J. Neuroimmunol. 41:29.
6. Xie, B., A. Laouar, and E. Huberman. 1998. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation - The signaling role of protein kinase C-beta. J. Biol. Chem. 273:11576.
7. Liu, J. F., M. Crepin, J. M. Liu, D. Barritault, and D. Ledoux. 2002. FG F-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293:1174. 30
8. Takafuji, S., A. Ishida, Y. Miyakuni, and T. Nakagawa. 2003. Matrix metalloproteinase-9 release from human leukocytes. J. Invest. Allerg. Clin. Immunol. 13:50.
9. Robinson, S. C., K. A. Scott, and F. R. Balkwill. 2002. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. Eur. J. Immunol. 32:404.
10. Wize, J., I. Sopata, A. Smerdel, and S. Maslinski. 1998. Ligation of selectin L and integrin CD11b/CD18 (Mac-1) induces release of gelatinase B (MMP-9) from human neutrophils. Inflamm. Res. 47:325.
11. Galt, S. W., S. Lindemann, D. Medd, L. L. Allen, L. W. Kraiss, E. S. Harris, S. M. Prescott, T. M. McIntyre, A. S. Weyrich, and G. A. Zimmerman. 2001. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. Circ. Res. 89:509. 40
12. Aoudjit, F., E. F. Potworowski, and Y. St-Pierre. 1998. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma endothelial cell contact: Implication of ICAM-1. J. Immunol. 160:2967.
13. Mazzieri, R., L. Masiero, L. Zanetta, S. Monea, M. Onisto, S. Garbisa, and P. Mignatti. 1997. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: A regulatory mechanism with cell-bound reactants. 50

EMBO J. 16:2319.

14. Ramos-DeSimone, N., E. Hahn-Dantona, J. Sipley, H. Nagase, D. L. French, and J. P. Quigley. 1999. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. J. Biol. Chem. 274:13066.
15. Owen, C. A., Z. M. Hu, B. Barrick, and S. D. Shapiro. 2003. Inducible expression of TIMP-resistant matrix metalloproteinase-9 on the cell surface of neutrophils. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 29:283.
16. Stefanidakis, M., M. Bjorklund, E. Ihanus, C. G. Gahmberg, and E. Koivunen. 2003. Identification of a negatively charged peptide motif within the catalytic domain of progelatinases that mediates binding to leukocyte b2 integrins. J. Biol. Chem. 278:34674. 10
17. Dustin, M. L., and T. A. Springer. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. Nature 341:619.
18. Gahmberg, C. G. 1997. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. Curr. Opin. Cell Biol. 9:643.
19. Springer, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune-system. Nature 346:425.
20. Fagerholm, S., T. J. Hilden, and C. G. Gahmberg. 2002. Lck tyrosine kinase is important for activation of the CD11a/CD18-integrins in human T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 32:1670. 20
21. Sengelov, H., P. Follin, L. Kjeldsen, K. Lollike, C. Dahlgren, and N. Børregaard. 1995. Mobilization of granules and secretory vesicles during in-vivo exudation of human neutrophils. J. Immunol. 154:4157.
22. Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 97:77.
23. Mustjoki, S., R. Alitalo, E. Elonen, O. Carpen, C. G. Gahmberg, and A. Vaheri. 2001. Intercellular adhesion molecule-1 in extravasation of normal mononuclear and leukaemia cells. Br. J. Haematol. 113:989. 30
24. Koivunen, E., W. Arap, H. Valtanen, A. Rainisalo, O. P. Medina, P. Heikkila, C. Kantor, C. G. Gahmberg, T. Salo, Y. T. Konttinen, T. Sorsa, E. Ruoslahti, and R. Pasqualini. 1999. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. Nat. Biotechnol. 17:768.
25. Koivunen, E., T. M. Ranta, A. Annila, S. Taube, A. Uppala, M. Jokinen, G. van Willigen, E. Ihanus, and C. G. Gahmberg. 2001. Inhibition of beta(2) integrin-mediated leukocyte cell adhesion by leucine-leucine-glycine motif-containing peptides. J. Cell Biol. 153:905.
26. Hermand, P., M. Huet, I. Callebaut, P. Gane, E. Ihanus, C. G. Gahmberg, J. P. Cartron, and P. Bailly. 2000. Binding sites of leukocyte beta(2) integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. J. Biol. Chem. 275:26002. 40
27. Sorsa, T., T. Salo, E. Koivunen, J. Tyynela, Y. T. Konttinen, U. Bergmann, A. Tuuttila, E. Niemi, O. Teronen, P. Heikkila, H. Tschesche, J. Leinonen, S. Osman, and U. H. Stenman. 1997. Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. J. Biol. Chem. 272:21067.
28. Bjorklund, M., H. Valtanen, H. Savilahti, and E. Koivunen. 2003. Use of intein-directed peptide biosynthesis to improve serum stability and bioactivity of a gelatinase inhibitory peptide. Comb. Chem. High Throughput Screen. 6:29. 50

29. Kjeldsen, L., H. Sengelov, and N. Borregaard. 1999. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients. *J. Immunol. Methods* 23:131.
30. Ihanus, E., L. Uotila, A. Toivanen, M. Stefanidakis, P. Bailly, J. P. Cartron, and C. G. Gahmberg. 2003. Characterization of ICAM-4 binding to the I domains of the CD11a/CD18 and CD11b/CD18 leukocyte integrins. *Eur. J. Biochem.* 270:1710.
31. Jokinen, M., C. G. Gahmberg, and L. C. Andersson. 1979. Biosynthesis of the major human red-cell sialoglycoprotein, glycophorin-A, in a continuous cell line. *Nature* 279:604.
32. Ajuebor, M. N., A. M. Das, L. Virag, R. J. Flower, C. Szabo, and M. Perretti. 1999. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: Evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J. Immunol.* 162:1685.
33. Submitted manuscript: Mikael Bjorklund, Pia Heikkila and Erkki Koivunen. Title: Peptide inhibition of catalytic and noncatalytic activities of matrix metalloproteinase-9 blocks tumor cell migration and invasion.

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】ヒト好中球とLAD-1細胞における M_2 及び $proMMP-9$ の二重免疫蛍光染色。健康な提供者から得た新鮮単離PMN(A、B、C及びD)とLAD-1細胞(E)をMMP-9及び M_2 インテグリンについて二重染色した(実施例を参照されたい)。簡単に説明すると、刺激していないPMN(A及びB)またはPMAで刺激したPMN(C及びD)をポリ-L-リシンで被覆したカバーガラスに載せ、固定し、そして透過処理したもの(A及びC)と透過処理しないもの(B及びD)を用意した。抗 M_2 抗体及び抗MMP-9抗体で細胞を処理し、次いでFITC標識二次抗体またはTRITC標識二次抗体で染色した。LAD-1細胞は透過処理せず、固定と染色は同様に行つた(E)。蛍光性は共焦点顕微鏡を使って検出した(A、B、C、D及びE)。バーはAが4.5 μm 、Bが3.4 μm 、Cが7.0 μm 、Dが4.8 μm そしてEが5.8 μm である。実験を少なくとも3回繰返し、同様の結果が得られた。

【図2】ナイトロジエンキャビテーション法(nitrogen cavitation)によって破碎した好中球の細胞画分を、パーコール密度勾配遠心にかけた結果を示す。細胞破碎前、単離した好中球を、休止状態に保つか刺激した。パーコールで密度勾配を形成して遠心分離を行い、得られた各画分をS0、S1、S2及びS3という群に分けた。S0はPMA刺激前またはPMA刺激後の上清であり、S1は得られた上清(postnuclear supernatant)であり、S2は細胞質ゾル物質である。プールした画分をMPO(A)、NGAL(B)、LF(C)、MMP-9(D)、HSA(E)及びHLA(F)についてELISAでアッセイを行なった。実験を少なくとも3回繰返し、同様の結果が得られた。

【図3】好中性顆粒における M_2 及びMMP-9の細胞内局在性。(A)各顆粒のプール(1バンド、2バンド、3バンド及び4バンド)から等量の総タンパク質をSDS-PAGEで分離し、抗MMP-9ポリクローナル抗体及び抗 M_2 抗体MEM170を用い、免疫プロット法により分析した。(B)各プールのゼラチナーゼ活性をゼラチンザイモグラフィーにより検出した。ゼラチン分解活性を有するバンドの位置と分子量(kDa)を矢印で示す。(C)各プールから単離した可溶化した膜タンパク質を抗 M_2 抗体OKM10で免疫沈降し、抗MMP-9ポリクローナル抗体または抗 M_2 抗体MEM170を用いたウェスタンプロット法で検出した。(D)THP-1細胞を [^{35}S] - メチオニンで10分間パルスラベルし、4時間チェイスした。細胞溶解物は抗MMP-9抗体、抗 M_2 抗体または対照抗体(ヒトIgG抗体)と共に3時間インキュベートした。免疫沈降物は24時間後にフルオログラフィーにより視覚化した。 $proMMP-9$ と M_2 サブユニットの位置を示す。

10

20

30

40

50

【図4】組換えMMP-9ドメインへの_MIドメインの結合。(A) MMP-9、及びE. coliを用いて製造したMMP-9の組換え体を模式的に示す。(B) proMMP-9、その組換え体またはBSAをマイクロタイターウェルに80 μg / ウェルとなるように被覆し、可溶性GST-_MIドメインを図に記載の濃度で結合させた。結合は抗GSTモノクローナル抗体で測定した。測定結果を、3つのウェルからの測定値の平均値±標準偏差で示す((C)、(D)についても同様)。(C)図に記載の濃度の各種ペプチドの存在下における、固定化したGST-_MIドメインへのproMMP-9の結合。結合は、抗MMP-9抗体GE-213を用いて測定した。(D)固定化したproMMP-8、proMMP-9、ICAM-1及びフィブリノーゲンへのGST-_MIドメインの結合を、50 μMのICAM-1、DDGWまたはKKGWを競合ペプチドとして用いて調べた。対照ウェルには、GST-_MIドメインの代わりにGSTを加えた。実験を3回繰返し、同様の結果が得られた。

【図5】_M-2インテグリン発現細胞による、組換えMMP-9ドメインの認識。ここで用いた細胞は以下の通りである: PMN (A、B、C)、_M-2発現L細胞トランスフェクタント(D)、非トランスフェクタント(D)及びLAD-1細胞(D)。proMMP-9またはそのドメインに対する結合実験の前に、PMNは休止状態、或いはPMA(A、C)かC5aかTNF(B)で刺激された状態にした。細胞は、図に記載の各種ペプチド(50 μM)、抗体(20 μg / ml)または_MIドメインで前処理した。結合しなかった細胞は洗浄除去し、接着した細胞の数をフォスファターゼアッセイによって定量した。実験を3回繰返し、同様の結果が得られた。

【図6】ゼラチナーゼと_M-2インテグリンに対する阻害剤による、*in vitro*におけるPMNとTHP-1の細胞遊走の阻害。図に記載のペプチド(200 μM)または抗体(20 μg / ml)の存在下または非存在下、LLG-C4-GSTまたはGSTで被覆した表面(A)またはHMEC単分子層(B)上に、PMN(100 μl中に1×10⁵個)を塗布した。PMNを20 nMのPMAで刺激するか(A)、HMECで処理して50 μMのC5aまたは10 ng / mlのTNFで刺激するか、或いは未処理のままで用いた(B)。THP-1細胞(100 μl中に5×10⁴個)に50 nMのPMAで刺激を与え、各種ペプチド(200 μM)と共に被覆表面上に塗布した(C)。トランスウェルフィルターを貫通して遊走した細胞を染色し、顕微鏡を使って染色された細胞数を数えた。実験は全て、最低2回繰り返し行った。(D)ホルボールエステルで活性化したTHP-1細胞(100 μl中に5×10⁴個)を、図に記載のペプチドの存在下または非存在下、+37°で16時間インキュベートした。ならし培地をゼラチンザイモグラフィーで分析した。

【図7】炎症を起こした組織への好中球遊走の阻害。(A)マウスにチオグリコレートまたはPBSを腹膜注射によって投与し、図に記載の分量の各ペプチドを静脈注射した。3時間経過後、腹膜内白血球を採取し、細胞数を数えた。得られた結果を、1群2~4匹からなる群の平均値±標準偏差で示す。アスタリスク(*)は統計的に有意な差(p < 0.001)を示す。実験は最低3回繰り返し行った。チオグリコレート(B)またはPBS(C)を投与したマウスの組織に浸潤した好中球を、「図面の簡単な説明」の図3の説明に記載の方法で抗MMP-9抗体及び抗_M抗体で染色した。蛍光性は共焦点顕微鏡を使って調べた。バーは(B)が9.1 μm、(C)が4.8 μmである。(D)マウス腹腔から(A)に記載の方法で採取した上清液のゼラチン分解活性。レーン1~4:チオグリコレートを投与したマウスから採取した試料。レーン5:PBSを投与したマウスから採取した試料。DDGW、HFDDDE及びDFEDHDをマウス1匹当たり各々0.1 mg、0.2 mg及び0.2 mgの投与量で静脈注射した。矢印はproMMP-9二量体、proMMP-9とproMMP-2を示す。実験を3回繰り返し、同様の結果が得られた。

【配列表フリーテキスト】

【0049】

配列番号1 インテグリンIドメイン結合テトラペプチド

10

20

30

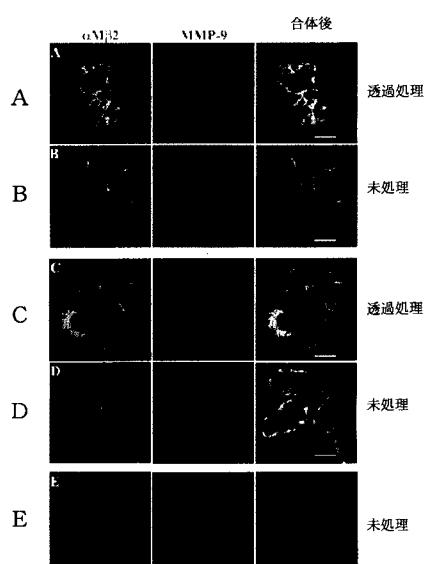
40

50

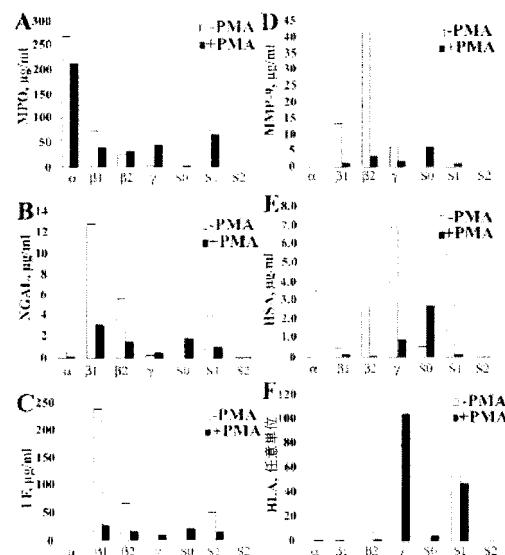
配列番号 2	インテグリン I ドメイン結合ヘキサペプチド
配列番号 3	環状 C T T ペプチド
配列番号 4	C T T ペプチドの A 1 a 置換体
配列番号 5	L L G - C 4 ペプチド
配列番号 6	D D G W 全長配列
配列番号 7	D D G W の対照ペプチド
配列番号 8	K K G W 全長ペプチド
配列番号 9	H F D D D E ペプチドに対する、スクランブル（配列並べ替え）による
对照ペプチド	
配列番号 10	インテグリンと相互作用する部位

10

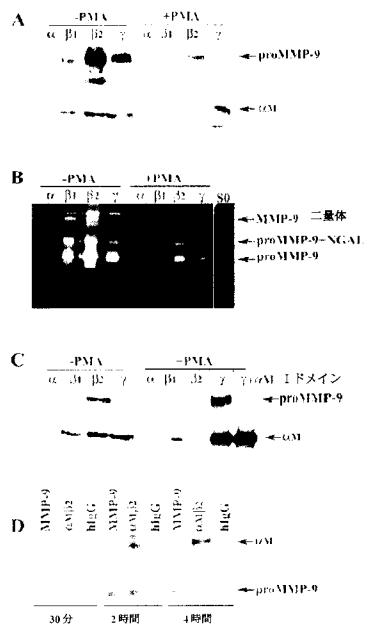
【図1】



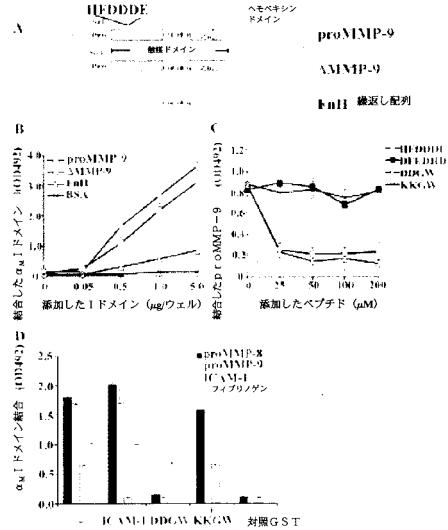
【図2】



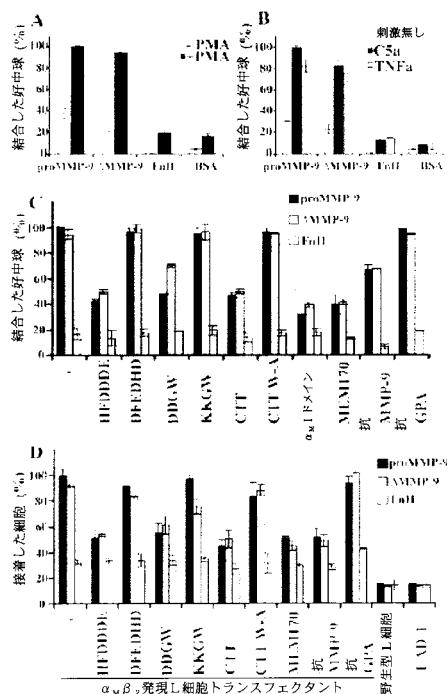
【図3】



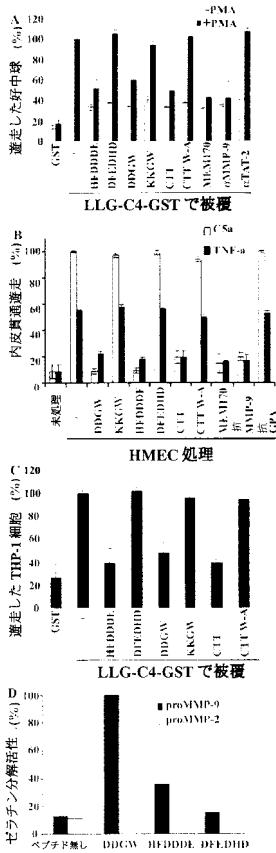
【 図 4 】



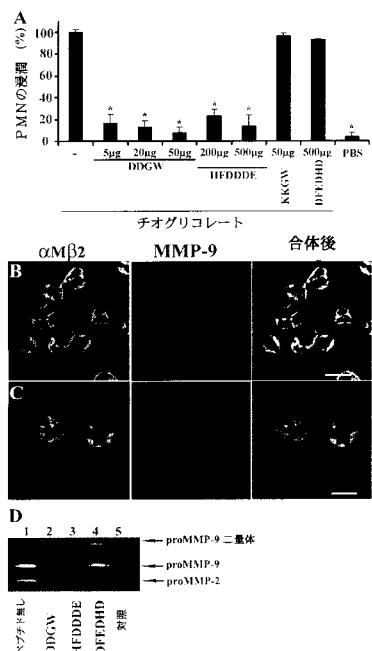
【 図 5 】



【 四 6 】



【図7】



【配列表】

2006527741000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年8月19日(2005.8.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヘキサペプチド H F D D D E を有効成分として含有する医薬。

【請求項2】

ヘキサペプチド H F D D D E を有効成分として含有する、炎症性病態の予防または治療のための医薬。

【請求項3】

有効成分としてのヘキサペプチド H F D D D E と少なくとも1種の薬学的に許容される担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項4】

ヘキサペプチド H F D D D E を有効成分として含有する、炎症性病態の予防用または治療用医薬組成物。

【請求項5】

好中球遊走に起因する病態の治療処置または予防処置のための方法であって、ヘキサペプチド H F D D D E を、処置を必要とする哺乳類に対し、好中球遊走を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

【請求項 6】

炎症性病態の治療処置または予防処置のための方法であって、ヘキサペプチド H F D D D E を、処置を必要とする哺乳類に対し、好中球遊走を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

【請求項 7】

炎症性病態の治療処置または予防処置のための方法であって、ヘキサペプチド H F D D D E を有効成分として含有する医薬組成物を、処置を必要とする哺乳類に対し、好中球遊走を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI 2004/000376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: A61K 38/48, A61K 38/02, C12N 9/50 // A61P 29/00 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)		
IPC7: A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SE,DK,FI,NO classes as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI DATA, EPO-INTERNAL, PAJ, CA REG, CAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	STN International, File CAPLUS, CAPLUS accession no. 140:3792, Duke University, "Genes expressed in atherosclerotic tissue and their use in diagnosis and pharmacogenetics", & WO,A2,2003091391,20031106 --	1-9
X	US 20030109021 A1 (WU ET AL), 12 June 2003 (12.06.2003), see page 24, paragraph 0236, SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, figure 2A, aa pos. 259-264, paragraphs 0770, 0053, 0675 and 0149 --	1-9
A	WO 9957315 A2 (ISIS INNOVATION LIMITED), 11 November 1999 (11.11.1999), see the abstract --	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 November 2004	19 -11- 2004	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer YVONNE SIÖSTEEN/BS Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 2004/000376

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STN International, File REGISTRY, see RN 156560-96-2, 26 July 1994 --	1-9
A	WO 0104157 A2 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA), 18 January 2001 (18.01.2001), page 21, line 29 - line 32; page 6, line 12; page 7, line 17 - line 19 -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2004/000376

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **8, 9**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see extra sheet

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI2004/000376

Box II.1

Claims 8,9 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/diagnostic methods practised on the human or animal body/Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/FI 2004/000376

US 20030109021 A1 12/06/2003 NONE

WO	9957315	A2	11/11/1999	AU	3938599 A	23/11/1999
				CA	2327538 A	11/11/1999
				EP	1075547 A	14/02/2001
				GB	9809764 D	00/00/0000

WO	0104157	A2	18/01/2001	AU	6344700 A	30/01/2001
				CA	2379373 A	18/01/2001
				CN	1379685 T	13/11/2002
				EP	1203025 A	08/05/2002
				JP	2003508352 T	04/03/2003

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

ウインドウズ

(72)発明者 コイヴネン , エルッキ

フィンランド国、エフアイ - 0 0 9 8 0 ヘルシンキ、ロッキサーレンティエ 5 シー 3 1 9

F ターム(参考) 4B050 CC04 CC05 DD11 EE01 LL01 LL03 LL05 LL10

4C084 AA02 BA01 BA08 BA17 BA23 DA01 NA14 ZB111 ZB112 ZC021

ZC022