

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 504420

(P2003 - 504420A)

(43)公表日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
35/76		45/00	4 C 0 8 4
45/00		48/00	4 C 0 8 7
48/00		A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12		33/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 54数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 510560(P2001 - 510560)

(86) (22)出願日 平成12年7月17日(2000.7.17)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月16日(2002.1.16)

(86)国際出願番号 PCT/GB00/02748

(87)国際公開番号 W001/005480

(87)国際公開日 平成13年1月25日(2001.1.25)

(31)優先権主張番号 9916703.3

(32)優先日 平成11年7月16日(1999.7.16)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 ケンブリッジ ユニバーシティ テクニカル サービスズ リミティド
イギリス国,ケンブリッジ シービー2 1テ
ィーエス,トリニティー レーン,ジ オー
ールド スクールズ

(71)出願人 エフスタショー, ステイシー
イギリス国,ケンブリッジ シービー2 1エ
ヌイー,ノーウィッチ ストリート 18

(71)出願人 アルカミ,アントニオ
イギリス国,ケンブリッジ シービー2 5エ
イチジェイ,リトル シェルフォード,ホー
クストン ロード 46

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウイルスタンパク質結合組成物及び方法

(57)【要約】

in vivoでのクモカイン又はクモカイン類似体に対する結合における使用のために、あるいはin vivoで対応する細胞表面受容体に対するクモカインの結合を阻止し、免疫調節作用を生み出し、又は細胞内への浸入を阻止するためにウイルス又はパラサイトに存在するクモカイン類似体と結合するために、MHV68によってコードされるM3タンパク質、又は前記M3タンパク質の相同体を含んで成る医薬組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫調節作用を生み出すための、ケモカイン又はケモカイン類似体に対する *in vivo*での結合、又は対応する細胞表面受容体に対する *in vivo*でのケモカインの結合の阻止における使用のための、ウイルスMHV68によってコードされるM3タンパク質、又は前記M3タンパク質の相同体を含んで成る医薬組成物。

【請求項2】 抗炎症作用を生み出す際の使用のための、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 ウイルス又はパラサイトの細胞への侵入を防ぐための、前記ウイルス又はパラサイトに存在するケモカイン類似体に対する結合における使用のための、ウイルスMHV68によってコードされるM3タンパク質又は前記M3タンパク質の相同体を含んで成る医薬組成物。

【請求項4】 追加の免疫抑制剤又は抗炎症物質を含んで成る、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】 ケモカイン、ケモカイン類似体、又はケモカイン受容体を *in vitro*で検出し、又は測定するための、M3タンパク質又はその相同体及び標識又は固定化反応物を含んで成る試験キット。

【請求項6】 標識されたM3タンパク質又はその相同体が検出可能な標識であることを特徴とする、請求項5に記載の試験キット。

【請求項7】 M3タンパク質又はその相同体が固体支持材上に固定化されている、請求項5に記載の試験キット。

【請求項8】 ケモカイン又はケモカイン類似体と結合し得る、M3タンパク質のポリペプチド相同体（M3タンパク質自身以外）を含んで成る組成物。

【請求項9】 M3タンパク質又はその相同体と別の物質とのカップリング産物、あるいは他の起源のポリペプチド配列と融合したM3ポリペプチド配列又はその相同体を含んで成る融合タンパク質を含んで成る、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】 前記M3タンパク質又はその相同体が検出可能な標識とカップリングする、請求項8又は9に記載の組成物。

【請求項11】 (a) M3の相同体、あるいは(b)他の起源のポリペプチド配列と融合した、M3タンパク質又はその相同体を含んで成る融合ポリペプチド、のうちのいずれかをコードする配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項12】 (a)又は(b)をコードする前記配列が、組織特異的又は構成的プロモーターと作用可能に会合している発現カセットを含んで成る、請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項13】 (a)又は(b)をコードする前記配列がウイルスベクター又は発現プラスミドの一部を形成する、請求項11又は12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項14】 抗炎症作用を生み出すための対象者に対する投与のための薬剤の製造における、ウイルスMHV68によってコードされるM3タンパク質、又は前記タンパク質の相同体、あるいは前記タンパク質又はタンパク質相同体を発現する発現ベクターの使用。

【請求項15】 ウイルス又はパラサイトの、細胞への侵入を防ぐために前記ウイルス又はパラサイトに存在するケモカイン類似体と結合するための、対象者に対する投与のための薬剤の製造における、ウイルスMHV68によってコードされるM3タンパク質、又は前記タンパク質の相同体、あるいは前記タンパク質又はタンパク質相同体を発現する発現ベクターの使用。

【請求項16】 ケモカイン又はケモカイン類似体を含んで成る物質を検出する方法であって、試験され得る前記物質をおそらく含んで成る試料と、ウイルスMHV68によってコードされるM3タンパク質、又は前記M3タンパク質の相同体を含んで成る試薬とを接触させて、それによって前記ケモカイン又はケモカイン類似体と結合させることを含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明の分野：

本発明は免疫系の成分及びその類似体にとっての結合パートナーとしてのウイルスタンパク質及びその類似体の使用、並びに関連組成物及び方法、例えば医薬組成物及び方法、並びに検出又はアッセイ用試薬及びキット及び方法。

【0002】

本発明の背景：

ヘルペスウイルスタンパク質の中で知られているものに、マウスガンマヘルペスウイルス68 (MHV68) のM3 遺伝子によってコードされるタンパク質がある (V van Berkel et al: J Virol 73 (5) (1999) pp4524 - 4529)。

【0003】

MHV68 のM3 タンパク質は、分泌タンパク質であることが報告されてきた。このタンパク質は、前記ウイルスによる感染に対する宿主の免疫応答を調節し得ることが示唆されてきた。

【0004】

本発明は、MHV68 のM3 タンパク質の、特定の結合特性の新規発見に起因している。

【0005】

本発明の要約及び説明：

本発明の観点に従い、M3 タンパク質及びその機能的相同体、例えば誘導体、及びフラグメントは、免疫系のケモカイン及びその類似体を結合させるために、そして対応する細胞表面受容体に対するケモカインの結合を阻止するために使用され得る。M3 は、例えば有用な免疫抑制剤として働くことができる。M3 タンパク質のこれらの結合作用の詳細を本明細書において下文に記載する。

【0006】

M3 タンパク質の相同体は、例えばM3 をコードしているヌクレオチド配列の突然変異及び突然変異した配列からの発現によって、そして/あるいは関連遺伝

子配列からの、例えばクロクルドゥラ・ルスラ (croclidura russula) 由来のヘルペスウイルスの使用によって得ることができる (Bowden, 1997, Cambridge University PhD thesis 及び Chastel et al, Acta Virologica 1994 38:309)。あるいは、それらは、例えばタンパク質の配列又はタンパク質をコードするヌクレオチド配列のいずれかを含むデータベースをスクリーニングすることにより、例えば相同性が Blast プログラムを用いて、例えば可能なアルゴリズムのいずれかを用いて決定され得る、Swissprot データベースをスクリーニングすることにより、M3 に対して相同な遺伝子配列を同定することによって得られ得る。全配列に及ぶ、許容される相同性レベルは、少なくとも約 20%、例えば約 30% である。M3 の機能的フラグメントと、他のタンパク質との相同性は、これよりも低いことがあり、例えば約 10% である。

【0007】

M3 の機能的相同体、例えば誘導体又はフラグメントは、例えば放射標識したケモカインを用いる、本明細書に記載の架橋アッセイの適当な等価物によって、以下で言及するケモカインのいずれか又は全てと結合するそれらの能力について調べられることがある。他の、例えば MHV 68 の関連タンパク質、例えば MHV 68 の M1 タンパク質も、有用なケモカイン結合特性を有することがある。このことは、例えば本明細書に記載の架橋アッセイ、又はそれらから容易に誘導可能な、適当な等価物によっても評価され得る。

【0008】

前記タンパク質は、前記タンパク質が発生する親ウイルスの宿主範囲に相当する動物種の起源又は特異性を有するケモカイン及びそれらの類似体、並びに / あるいはヒト起源及び / 又は特異性を有するケモカイン及びそれらの類似体と結合させるために使用され得る。

【0009】

M3 タンパク質は、C ケモカイン、CC ケモカイン、CXC ケモカイン又は CX3C ケモカイン、例えば以下の：ヒトリンホタクチン (C ケモカイン) ; RANTES, MIP-1-アルファ、MCP-1, MCP-4 (CC ケモカイン)

; IL-8、マウスKC、マウスMIP2、マウスLIX、ヒトGCP2、ヒトIP10(CXCケモカイン);及びフラクタルカイン(CX3Cケモカイン)と結合させるために使用され得る。

【0010】

本発明の観点に従い、M3タンパク質及びその相同体、例えば誘導体又はフラグメントは、*in vitro*で、例えば生物学的試料中で、又は*in vivo*で、前記ケモカインの、それらの受容体に対する結合を阻害するために使用され得る。

【0011】

この作用は、例えば診断及び測定目的のために、標識された反応物を用いて、特異的な結合試験において利用され得る。標識された反応物は、進行中の所望の目的のための構成に従い、M3タンパク質、又はケモカイン、又はケモカイン受容体のいずれかであってもよい。

【0012】

試験の構成、並びに対応する試薬の形態及び組成は、既知の特異的結合試験の構成の中から選択されることがあり：例えばELISA試験；Yalow及びBerson等の、独自のホルモン放射イムノアッセイの構成の類似型である。一般的に、当該試験の構成は、おそらく試料中に存在する、ケモカイン結合価を有する物質又はその受容体を検出し、又はアッセイするために、通常本明細書の上文に列記したケモカインから選択されるであろう、ケモカイン結合価を有する材料及び/又はケモカイン結合剤、並びにこの様なケモカインの、その受容体への結合を妨害し得る化合物の、標識及び/又は固定化型と、生物学的試料とを接触させることを含む。

【0013】

従って、本発明の観点は、前記試験を実施するための組成物にあり、例えばM3タンパク質又は相同体、例えば誘導体若しくはフラグメントの標識産物；これらのうちのいずれかの較正した試験用アリコート；本明細書で言及する様な特異的結合試験に参加するのに適した固相に対して結合するM3タンパク質又は相同体の産物；当該反応における結合パートナーのうちの1つの較正された試験用ア

リコート；並びに2又はそれ以上の前記試薬を伴う試験キットである。

【0014】

前記試験は、例えばケモカイン又はケモカイン受容体についてのアッセイであってもよい。その様な試験の例は、以下に詳細に記載した結合試験方法の変形を用いて改作され得る。

【0015】

結合作用は、M3タンパク質又はその相同体と結合し得るケモカインによって媒介される作用の阻害において利用されることもある。

【0016】

例えば、乾癬において、IL-8が皮膚における生理作用のメディエーターであることが知られている。本明細書に記載の結合作用は、診断方法において、所定の場合における、IL-8に対する皮膚作用の依存性の程度を評価するために、又はその様な作用の有用な阻害の程度を生み出すために、そのいずれかで使用され得る。

【0017】

その様な診断方法において、試験下の皮膚組織由来の試料材料は、ケモカイン、例えばIL-8の存在及び/又はレベルを評価するために上文で示した様な特異的結合アッセイにかけられ得る。

【0018】

阻害的処理方法において、タンパク質M3又はその類似体、例えば誘導体又はフラグメントは、組織におけるケモカインとその受容体との間の相互作用を調節するために、局所的に、又は全身的に、そのいずれかで皮膚組織に適用され得る。

【0019】

本発明の更なる観点に従い、医薬組成物は、適当な治療的（抗炎症的）量の抗炎症剤としての使用のための、M3タンパク質、又はその類似体、例えば上述した様な誘導体又はフラグメントを含んで成ることもある。

【0020】

本発明の更なる観点に従い、M3をコードしている遺伝子又はその相同体、例

例えば誘導体又はフラグメントは、適当なプロモーター、例えば強力な組織特異的又は構成的プロモーター例えばHCMV IEプロモーターの管理下で、遺伝子送達系において、例えば*in vivo*での遺伝子送達における使用のために挿入され得る。前記遺伝子送達系は、ウイルス又は非ウイルスベクター系であってもよい。その様なベクターは、標的のトランスフェクションされる細胞に対して、M3タンパク質又はその相同体、例えば誘導体又はフラグメントを産生する能力を賦与するために、例えば、標的細胞が、*in vivo*で処置の対象である宿主に存する場合の抗炎症目的として使用され得る。その様な抗炎症目的は、例えば、ケモカイン、例えば疾患、例えば炎症疾患、例えば乾癬又は関節リウマチを促進させ又はこれらと関連するケモカインによって媒介される作用を阻害するための使用を含み得る。抗炎症目的はまた、M3遺伝子を送達するもの同一のベクターか、又はその様な送達される遺伝子の別のものための別個の送達ベクターに由来する、ベクター送達系の因子に対するそして/あるいはベクター系による遺伝子送達後の標的細胞において発現する他の遺伝子産物に対する宿主免疫応答の低下を含む。

【0021】

中でも、本発明の範囲内のM3の誘導体は、M3のケモカイン結合特性を保持する、欠失又は置換によって修飾されるM3配列を有するポリペプチドである。例えば、任意の免疫原性アミノ酸モチーフ、例えばMHC分子と結合すると考えられているいずれかのものを欠失すること、又はその様なモチーフを、あまり免疫原性でないアミノ酸配列と置換することは有用だろう。免疫原性モチーフの例は、M-F Guercio et al., 1995, J. Immunol., 154, pp 685-693に記載されている。あるいは、宿主において免疫寛容を誘導し得る修飾は、M3配列に導入され得る。

【0022】

M3タンパク質、例えば精製組換えM3タンパク質は、処置され得る対象者に対する送達のための、適合性のある、本質的に常用の医薬賦形剤で調製され得る。

【0023】

M3タンパク質又はM3を発現するベクターは、例えば任意の適当な全身送達経路によって、*in vivo*の細胞に投与され得る。あるいは、投与は直接的な注射、例えば標的細胞又はその付近並びに/あるいは処置され得る対象者の炎症部位への静脈内注射によって標的とされ得る。有用に投与され得るM3タンパク質量は、およそ、少なくとも $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ （処置され得る対象者の体重）から推移する。処置がM3タンパク質を発現し得るベクター、例えばヘルペスウイルスの使用によって実施される場合、それは約 1×10^3 ~ 約 10^{13} pfuのウイルス、例えば約 1×10^3 ~ 約 1×10^8 pfuのウイルス量で、その様なベクターを送達することが有用なこともある。

【0024】

M3又はその相同体も、他の方法、例えば静脈内から、脱凝集したタンパク質形態で、例えば単一のサブユニットとして投与され得る。投与形態は、M3に対する宿主の免疫応答を制限するために選択され得る。例えば、M3タンパク質又はM3を発現するベクターは、別の免疫抑制剤（M3自身以外）又は抗炎症物質と一緒に、例えば副腎皮質コルステロイド、メトトレキサート又はOX40受容体の誘導体、例えばIgG分子の定常ドメインと融合したOX40由来の配列を含んで成る融合タンパク質、例えばWO95/12673に記載のもの（Stanford University and Becton Dickinson: W Godfrey et al）と一緒に送達され得る。

【0025】

天然及び/又は修飾型のM3タンパク質の免疫原性は、動物、例えばマウスへのM3タンパク質の注射、その後の、生じた免疫応答の測定、例えば標準的な既知の方法を用いる、抗体及びT細胞の両方を媒介する応答の測定によって評価され得る。

【0026】

本発明の更なる実験において、M3タンパク質及びその相同体、例えば誘導体又はフラグメントは、共有的又は非共有的に、他の物質とカップリングされ得る。適当なカップリングパートナーは、例えばポリエチレングリコール（PEG）である。他のカップリング産物は、融合タンパク質、例えばIg定常ドメイン配

列を組み込んでいる融合タンパク質であってもよい。M3相同体は、例えば融合タンパク質として産生することがあり、ここで、M3又は短くなったM3配列は、米国特許第5,428,130号(Genentech)に記載のものと類似の方法によって作製される、IgG分子の少なくとも1つの定常ドメインのN末端に対して、そのC末端で融合される。その様なカップリング産物は、所望な薬理動態特性、例えば*in vivo*での延長された半減期を有することがある。融合タンパク質はまた、その結合標的についてのM3部分の結合力の向上を示し、そして更に、Ig融合体の場合の様に、追加の有用なエフェクター機能を提供することがある。

【0027】

ある目的のために、カップリングパートナーは、既知の化学的カップリング方法によって、例えば一方のパートナーのビオチン化及びビオチンの結合パートナー、例えばアビジンによる他方の誘導体化によって、M3又はその相同体とカップリングされ得る。

【0028】

本発明のある態様において、機能的に活性な、短くなったM3タンパク質、すなわち短くなった配列を有するM3タンパク質相同体が、例えば*in vivo*で使用され得る。短くなったタンパク質は、天然M3と比較して増大した、組織、例えば炎症部位に侵入する能力を有することがある。

【0029】

本発明の更なる態様において、M3タンパク質及びその相同体、例えば誘導体又はフラグメントは、更なる方法で、例えば他のケモカイン結合タンパク質(又はその活性フラグメント若しくは誘導体を有するもの)と、例えばケモカイン結合タンパク質Serp1とM3の融合によって、有用に修飾され得る。その様に修飾されたタンパク質は、例えばM3の修飾型が、M3の非修飾型と比較して、あるクラスのケモカインに対して、より高い又はより低い親和性で結合し得る様に、ケモカインに対する変化した結合特異性を有することがある。

【0030】

天然M3と比較して、変化した結合特異性を有する様に修飾されたM3タンバ

ク質は、特定のタイプのケモカインの活性によって特徴づけられる、ある炎症性疾患又は病気を処置するために特に有用なことがあり、例えばIL-8は乾癬と関連している。

【0031】

前記のカップリングされ、短くされ、又は修飾されたM3タンパク質の結合活性は、通常、本明細書に記載の架橋アッセイの適当な等価物を用いて、例えば放射標識したケモカインを用いて調べられ得る。

【0032】

本発明は、ヌクレオチド配列（例えば、M3タンパク質及びその修飾型、例えば相同体、例えばフラグメント又は他のポリペプチドとのそれらの融合産物、例えば上述したものをコードしている、適当なプロモーターを組み込んでいるDNAカセット）及び適当なプラスミド又は他のベクター、例えばウイルスベクターに含まれる、前記発現カセットに及ぶ。

【0033】

本発明、並びにその態様の実施に適用可能な材料及び方法を更に例示するが、下文で更に詳細に説明する、以下の説明及び添付した図面によってその範囲を限定することは意図していない。

【0034】

図面、並びに材料及び方法に対する言及を以下に示す。

【0035】

本発明者は、本明細書に記載の様に、MHV68が広範な特異性を有する可溶性ケモカイン結合タンパク質をコードしていることを確認した。最初に、前記活性は、MHV68に感染した細胞培養上清において検出されてきた。MHV68ゲノムの解析は、独特なORFのM3が、約40kDaの分泌型タンパク質をコードすることが予測され得ることを示唆した。M3のORFは、M3のORFがケモカイン結合活性をコードするか否かを調べるために、MHV68ゲノムから欠失されてきた。M3のORFがウイルスゲノムに再インサートされた復帰変異体ウイルスも、ウイルスゲノムの他の場所での相互作用について調節するために構築された。野生型MHV68及びM3復帰変異体感染由来の上清は、架橋後の〔

125I] RANTESとの複合体を形成し、一方、M3欠失感染及びモック感染由来の上清は、複合体を産生しなかった(図1を参照のこと)。

【0036】

図1は、MHV68によって産生される可溶性ケモカイン結合活性を示す。レーン1~4について、感染していない(モック)、又はMHV68に感染した培養物からの培地を[125I] RANTESと一緒にインキュベートし、そしてクロスリンカーBS3で処理した。使用した培地の量は、 5×10^2 細胞に等しかった。モックバキュロウイルス又はバキュロウイルス/M3に感染した細胞由来のレーン5及び6の培地を[125I] IL-8と一緒にインキュベートし、そしてクロスリンカーBS3で処理した。SDS-PAGE解析のオートラジオグラフを、kDaの分子量で示す。RANTES(R)、IL-8及びリガンド受容体複合体の位置(四角の括弧)を記す。レーン1:MHV68の野生型、レーン2:MHV68 M3復帰変異体、レーン3:MHV68 M3欠失、レーン4:モック、レーン5:バキュロウイルスAcB15R、レーン6:バキュロウイルス/M3。

【0037】

[125I] IL-8(CXCケモカイン)、[125I] RANTES及び[125I] MIP-1(CCケモカイン)及び[125I] フラクタルカイン(CX3Cケモカイン)との結合アッセイは、MHV68に感染した細胞の上清を用いて、続くBS3との化学架橋により実施された。複合体は、試験したケモカインの3つのクラス全てを用いて検出された;モック感染は全く複合体を生まない(図1、そして他のデータは図で示さない)。全ての場合の複合体のサイズは約45kDaであり、これはMHV68ケモカイン結合タンパク質が、放射性標識したリガンドのサイズを引いた後、約40kDaのサイズであったことを示唆していた。結合は、CXC及びCCの代表的なメンバー並びに広範な結合特異性を示すケモカインのCX3Cサブファミリーの単一のメンバーで検出した。

【0038】

M3によってコードされるタンパク質がケモカインと結合することができることを更に証明するために、タンパク質としてM3のORFを発現する組換えバキ

ユロウイルスが構築された。この組換えバキュロウイルス/M3に感染した昆虫細胞由来の上清は、MHV68に感染した細胞の上清で観察されたものと類似のサイズの、[125I]IL-8との複合体(図1)を形成することが明らかとなった。従って、本発明者は、MHV68に感染した細胞の上清のケモカイン結合活性が、M3 ORFの産物に帰因すると結論づけた。

【0039】

M3 ORFの産物の結合特異性を決定するために、架橋実験が2000M以上の未標識ケモカイン競合物を用いて行われた。[125I]RANTESに対する結合は、全部で4つのサブファミリー(CXC, CC, C及びCX3C)由来のメンバー並びにヒト及びマウスケモカインの例を含めた、試験した全ての未標識ケモカイン競合物によってある程度競合した(図2)。バンドの異なる強度は、異なるケモカインについての、M3タンパク質の異なる親和性を示唆した。更なる実験は、IL-8及びMIP-1に対するM3の結合も、エクソダス-2(Exodus-2)(二次リンパ組織ケモカインSLCとしても知られている)並びに図2に列記されているケモカインと競合し得ることを示唆した。

【0040】

図2は、異なる種に由来する、2000倍の過剰な未標識ケモカインの非存在下(レーン2)又は存在下(レーン3~18)での、感染していない(モック)、及び感染した培養物に由来する培地に対する、0.4nMヒト[125I]RANTESとBS3との架橋による、MHV68 M3 ORFによってコードされる可溶性ケモカイン結合タンパク質の結合特異性を示す。培地の量は 5×10^2 の感染細胞に等しい。リカンド-受容体の複合体を示すSDS-PAGE解析のオートラジオグラフを示す。レーン1:モック感染細胞、レーン2:競合していないMHV68感染細胞、レーン3:ヒトRANTES、レーン4:マウスRANTES、レーン5:ヒトMIP-1、レーン6:マウスMIP-1、レーン7:ウイルスMIP-2、レーン8:MCP-1、レーン9:MCP-4、レーン10:マウスKC、レーン11:ヒトGRO、レーン12:ヒトIL-8、レーン13:マウスMIP-2、レーン14:マウスLIX、レーン15:ヒトGCP-2、レーン16:IP-10、レーン17:ヒトリンホタクチン、

レーン18：フラクタルカイン。

【0041】

更に、MHV68可溶性ケモカイン結合タンパク質、M3が、細胞表面受容体に対するケモカインの結合を阻止し得ることが示された。

【0042】

この様に、CCケモカインについてのM3の生物学的活性は、細胞の受容体に対する[125I]RANTESの結合を阻害する、MHV68感染細胞由来の上清の能力によって示された。U937細胞に対する[125I]RANTESの結合は、MHV68感染細胞の上清によって量依存型で阻害された(図3)。これらの結果は、M3のORFにコードされる可溶性タンパク質が、それらの高親和性の細胞受容体に対するCCケモカインの結合を阻止することを示唆した。このことは、RANTES及び他のCCケモカインとM3タンパク質との高親和性の相互作用と一致しており、そしてこのウイルスケモカイン結合タンパク質が、それらの細胞受容体との相互作用によって媒介される、ケモカインの生物学的活性の強力な阻害剤であることを強力に示唆した。

【0043】

図3は、細胞等価物として発現した、異なる量のMHV68感染細胞の上清の存在下での、U937細胞に対する[125I]RANTESの結合を例示する。一点をモック感染上清(20000個の細胞等価物)で示し、そして一点を100倍過剰な未標識RANTESについて表す。2回1組の試料に由来する平均を、競合物の非存在下で結合する総数のパーセンテージとして表す。

【0044】

図4a及び4bは、それぞれ、バキュロウイルスで産生する異なる量の組換えM3の存在下での、U937細胞に対する[125I]MIP-1アルファ及び[125I]IL-8の結合を例示する。M3及び未標識のMIP-1アルファ又はIL-8をそれぞれ発現しないバキュロウイルスに感染した細胞に由来する上清は、図3に関するコントロールとして示される。図4(a)及び(b)は、それぞれ、M3がU937細胞上で発現するそれらの天然受容体に対するMIP-1アルファ及びIL-8の結合を阻害することを示す。

【0045】

M3がU937細胞の高親和性ケモカイン受容体に対するケモカインの結合を阻止するという事実は、ケモカインについてのM3の親和性が、細胞のケモカイン受容体について報告されているものと同じ又はそれ以上であるという指標としてみなされる。

【0046】

本明細書に記載の細胞に対するケモカイン結合の阻害は、非常に少量のM3で達成することができ、これは更にケモカイン-受容体結合の強力な阻害剤であるという指標も与えている。

【0047】

M3による細胞に対するケモカイン結合の阻害は、試験される他のサイトカインよりも、ヒトIL-8の場合により強力であると思われる。このことは、あるケモカインに対するM3の結合の、ある程度の特異性を示唆し得る。

【0048】

図5は、M3がタンパク質のGAGモチーフと結合しないことを例示している。ヘパリン又はヘパリン硫酸(共にGAGモチーフを含む)とのプレインキュベーションは、M3に対するIL-8又はMIP-1アルファの結合作用を持たず、すなわち、ヘパリン及びヘパリン硫酸は、放射標識したIL-8又はMIP-1アルファと結合する、M3についての能力を妨害しない。

【0049】

図6は、50ng/mlのRANTESで刺激された末梢血単核細胞(PBMC)における、精製M3タンパク質の量の変化による、カルシウム流入の阻害を例示する。示したコントロールは、RANTES及びオボアルブミンで刺激されたPBMCである。結果は、M3が量依存型でヒトPBMCにおいてRANTES誘導型カルシウム流入を阻害することを示す。

【0050】

図7の部分(a)及び(b)は、それぞれ、精製M3タンパク質の量の変化による、50ng/mlのMCP-1に暴露される細胞におけるTHP-1の細胞遊走(部分(a))、及び50ng/mlのIL-8に暴露される細胞における好中球遊走

の阻害を例示する。示したコントロールは、ケモカイン又はM3単独と一緒にインキュベートされた細胞並びにケモカイン及び更にはVP22又はオボアルブミンであるコントロールタンパク質と一緒にインキュベートされた細胞である。結果は、M3が量依存型でMCP-1誘導型のTHP-1細胞の遊走及び好中球のIL-8遊走を阻害することを示す。

【0051】

図8は、マウスモデルにおける、*in vivo*での接触感受性炎症応答に対するM3の作用を例示する。応答の規模は、感作した動物において、マウスの耳の厚さの差異を、同一の動物の処置及び未処置の耳との比較によって測定することによって決定する。M3は、オキサゾロンで処置したマウスの耳の炎症を低下させることが示されている。図8に示す値は、コントロールと処置した耳との間の厚さの平均差異 \pm S.D.を表す。統計解析は、スチューデントT検定($p < 0.05$)を用いて、M3処置群(10及び100 μ g/注射)及びオボアルブミン(OVA)コントロール群との間で行われた。

【0052】

材料及び方法

ウイルス及び感染細胞の上清

ウイルスを増殖させ、そしてBHK21細胞上でアッセイした。上清は、細胞当たり5pfuで感染したBHK細胞から調製し；種菌を2時間後に除き、そして感染細胞にグラスゴー(Glasgow)改変イーグル培地(GMEM)を加えた。感染から2日後、上清を回収し、細胞片を遠心によって除去し、そしてHEPES緩衝液(pH7.5)を20mMの最終濃度で加えた。上清は、4, 5, 8-トリメチルソラレン及びUV光で不活性化した(Tsung et al., 1996)。

【0053】

試薬

放射ヨウ素標識した組換えヒトIL-8, RANTES及びMIP-1 (2000Ci/mmol)はAmersham(Little Chalfont, UK)から購入した。組換えRANTESはR & D Systems(Minn

e a p o l i s , M N) から購入した。組換えヒトマクロファージ炎症タンパク質 - 1 (M I P - 1)、ヒトヘルペスウイルス - 8 由来のウイルス M I P - 2、単球化学誘引タンパク質 (M C P) - 1 , M C P - 4、ヒトインターロイキン - 8 (I L - 8) , G R O - 、 I F N - 誘導性タンパク質 10 (I P - 10)、G C P 2、リンホタクチン、フラクタルカイン及びマウス R A N T E S、マウス M I P - 1、マウス K C、マウス M I P 2、及びマウスリポポリ多糖誘導型 C X C ケモカイン (L I X) は、P e p r o T e c h (R o c k y H i l l , N J) から購入した。

【0054】

結合アッセイ

結合培地は、20mM H E P E S (p H 7 . 4) 及び 0 . 1 % B S A を含む R P M I 1 6 4 0 とした。ビス (スルホスクシニミジル) スベリン酸 (B S 3) (50 μ M) を用いた、[1 2 5 I] ケモカイン (0 . 4 n M) に対する架橋実験は、記載通りに 25 μ l で行った (A l c a m i & S m i t h , 1 9 9 5 , U p t o n e t a l . , 1 9 9 2) 。試料は、12% のアクリルアミド S D S - P A G E ゲルによって解析した。U 9 3 7 細胞を用いる競合アッセイにおいて、上清は、100 μ l の 100 p M [1 2 5 I] ケモカインと一緒に、4 で 1 時間ブレインキュベートした。続いて、50 μ l の $2 . 5 \times 10^6$ U 9 3 7 細胞を加え、そして 4 で 2 時間インキュベートした。結合した [1 2 5 I] ケモカインは、記載通りにフタル酸油 (p h t h a l a t e o i l) 遠心によって決定した (A l c a m i & S m i t h , 1 9 9 2) 。

【0055】

組換えバキュロウイルスの構築

M H V 6 8 M 3 の O R F は、E c o R I 部位を挿入するオリゴヌクレオチド 5 - C G C G A A T T C A T G G C C T T C C T A T C C A C A T C G - 3 及び N o t I 部位を挿入する 5 - G G T G C G G C C G C A T G A T C C C C A A A A T A C T C C A G C - 3 を用いる P C R によって、感染細胞の D N A から増幅させた。1238 塩基対の産物は、E c o R I 及び N o t I で消化し、そしてその後、E c o R I , N o t I で消化した p B A C - 1 (N o v a g e n

)にライゲーションしてpBACM3を作製した。ORFは、記載通りに、組換えバキュロウイルスが産生される前に配列決定によって確認した(Alcami & Smith, 1995)。C末端の6ヒスチジンタグを含む組換えM3タンパク質は、組換えバキュロウイルスに感染したsf21昆虫細胞において産生した。ワクシニアウイルスの可溶性IL-1受容体を発現する組換えバキュロウイルスAcB15Rは既に説明されている(Alcami & Smith, 1992)。

【0056】

時として、ヒスチジンを含む組換えM3を精製することは、本質的に知られている方法で、最初に濾過膜によって前記タンパク質を含む上清を濃縮し、そして次にリン酸緩衝液(PBS)に対して濃縮液を透析し、そしてその後Nickel-NTAカラム(Qiagen)上で透析産物を精製することによって、簡便であることが明らかとなった。

【0057】

精製組換えタンパク質産物は、例えば以下の様に使用されてきた：

【0058】

M3がケモカインのGAG結合モチーフと結合するか否かの決定

結合アッセイは、放射標識したIL-8及びMIP-1アルファが、M3を含むMHV-68の上清の添加前に過剰量のヘパリン又はヘパリン硫酸と一緒にブレインキュベーションされることを除き、上述の様に実施された。

【0059】

カルシウム流入アッセイにおける使用のための末梢血単核細胞(PBMC)の調製

PBMCは、標準的な方法、例えばCurrent Protocols in Immunology, Vol.2, Ed. by R. Coico, Willey and Sons, U.S.A に記載のものを用いて、全血液から単離した。

【0060】

単離した細胞は、続いて1%ウシ胎児血清を含むハンス緩衝塩溶液(HBSS, Gibco, UK)中で洗浄され、次にカルシウム及びマグネシウム塩を欠

くHBSS中で再懸濁された(1×10^7 細胞/mlの濃度まで)。続いて、細胞をFluo-4AM(Molecular Probesから購入した、最終濃度4 μ Mのもの)及びプルロニック(pluronic)F-127標識(Molecular Probesから購入した、最終濃度0.02%のもの)と一緒に混合した。この後、細胞をインキュベートした(37 $^{\circ}$ Cで20分)。標識された細胞は、続いて1%ウシ胎児血清を含むHBSS中で希釈され(1/5)、そして37 $^{\circ}$ Cで40分間インキュベートされた。細胞をHEPES緩衝塩(1×10^6 細胞/ml)中で洗浄し、そして再懸濁し、そして37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。950 μ lの細胞懸濁液を続いてFACS管に移し、そしてカルシウム流入アッセイのために37 $^{\circ}$ Cで保持した。

【0061】

カルシウム流入アッセイ

RANTESタンパク質(Pepro Tech)及び精製M3タンパク質(上述の様に組換えバキュロウイルスにおいて産生される)を、緩衝液中での使用の前に希釈した。30 μ lのRANTES(2 μ g/ml)及びM3(10 μ g/ml \sim 0.16 μ g/mlに及んで変化する濃度)を両方一緒に混合し、そして室温で6分間インキュベートした。続いて50 μ lの混合物を950 μ lのPBMC(上述の様に得たもの)に加えた。コントロールはRANTES単独で刺激したPBMCとし、そして更にRANTES及びオボアルブミン(250ng/mlの最終濃度)の混合物で刺激した細胞とした。細胞のカルシウム流入は、FACS選別機(Becton Dickinson)及びセルクエストプログラム(Cell Quest Program)を用いて細胞の蛍光を決定することによって測定した。

【0062】

カルシウム流入の阻害(パーセンテージ)は次の様に決定した:

阻害(%) = $(\text{RANTESコントロールの蛍光} - \text{RANTES及びM3の蛍光}) / \text{RANTESコントロールの蛍光} \times 100$

【0063】

細胞遊走アッセイにおける使用のためのTHP-1細胞及び好中球の増殖

THP-1細胞 (European Culture Collection (EACC) から得られたもの) を、10%熱失活ウシ胎児血清 (Sigma)、ペニシリン (100国際単位/ml) 及びストレプトマイシン (100mg/ml) を含むRPMI-1640培地 (Sigma) 中で増殖した (5%二酸化炭素を含む、加湿された大気中で37℃)。細胞遊走アッセイの前に、細胞は1%ヒト血清アルブミンを含むHBSS中で洗浄し、1ml当たり 1×10^7 細胞の濃度で、組織培養のウェル中で再懸濁した。

【0064】

好中球は、標準的な方法、例えばCurrent Protocols in Immunology, Vol.2, Ed. by R. Coico, Willey and Sons, U.S.A に記載のものを用いて、全ヒト血液から単離した。

【0065】

細胞遊走アッセイ

75 μ lのMCP-1 (HBSS中で100ng/mlであり、そして1%ヒト血清アルブミンを含むもの) 及びM3 (1000ng/ml ~ 31ng/mlに及んで濃度が増加する) を共に混合し、そして37℃で15分間インキュベートした。インキュベーションの終わりに、29 μ lの混合物をトランスウェル遊走チャンバー (Chemo TX (商標)、Receptor Technologies, Oxon, UK) の下端のウェルに加え、そしてヒト単球 (ウェル当たり 2.5×10^5) を上端のウェルに加えた。ポリカーボネート膜 (5 μ (μ m) の孔径) が2つのウェルに分離した。前記チャンバーを続いて、5%二酸化炭素を含む加湿された大気中で、37℃で2時間インキュベートした。このインキュベーション期間の終わりに、膜内に存在した細胞を除去し、そしてEDTAと一緒に膜のインキュベーション、続く遠心によって下端のウェルに加えた。遊走した細胞の数は、血球計算器を用いて、下端のウェルにおいて計数することによって決定した。コントロールは下端のウェル中での緩衝液単独とし、そして更に下端のウェル中でのケモカイン単独とした。

【0066】

IL-8及びM3の存在下での好中球の遊走は、次のものを除き、THP-1

の遊走について上述した通りに決定した：IL-8は200 ng/mlの濃度で使用し、そして0.5%ウシ胎児アルブミンを含むRPMI中で希釈した。好中球は、ウェル当たり 5×10^4 細胞の濃度でチャンバーの上端のウェルに加えた。3 μ (μ m) の孔径を有する膜が本実験において使用され、そして当該チャンバーは1時間インキュベートされた。

【0067】

*in vivo*接触感受性アッセイ

マウスにおける接触感受性は、炎症の公知な動物モデルである。マウス（一群当たり6匹）は、既知の感作物質であるオキサゾロン（Sigma）に対して感作され、そして次の様な期間に及んで処置された：0日目に、25 μ lのオキサゾロン（アセトン（4割）及びオリーブ油（1割）中で3%の溶液）をマウスの腹部に塗り、後足のパッドにそれぞれ5 μ l塗った。5日目に、10 μ lの0.6%オキサゾロンをマウスの右耳に塗り、そしてコントロールとして10 μ lのアセトン/オリーブ油を左耳に塗った。1日前、0, 1, 4及び5日目に、マウスは100 μ lの精製M3タンパク質（0.1 μ g ~ 100 μ gのM3を含む）で腹腔内注射され、オボアルブミンをコントロールとして使用した。6日目に、耳の厚さがエンジニアカリパス（engineer caliper）を用いて測定された。炎症応答の測定は、マウスの右と左の耳の間で、耳の厚さに差異があった。

【0068】

本明細書の方法の項目で引用されている更なる参考文献は以下の通りである：

【表1】

Alcami, A. & Smith, G. L. (1992). A soluble receptor for interleukin-1 β encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71, 153-167.

Alcami, A. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia, cowpox and camelpox viruses encode interferon- γ receptors with novel broad species specificity. *J. Virol.* 69, 4633-4639.

Engeman, T.M., Gorbachev, A.V., Glague, R.P, Heeger, P.S., & Fairchild, R. (2000). Inhibition of functional T cell priming and contact hypersensitivity responses by treatment with anti-secondary lymphoid chemokine antibody during hamster sensitisation. *J. Immunol.* 164, 5207-5214.

Tsung, K., Yim, J. H., Marti, W., Buller, R. M. L. & Norton, J. A. (1996). Gene expression and cytopathic effect of vaccinia virus inactivated by psoralen and long-wave UV light. *J. Virol.* 70, 165-171.

Upton, C., Mossman, K. & McFadden, G. (1992). Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. *Science* 258, 1369-1372.

【0069】

本発明は更にウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルス、及びパラサイト、例えばプラスモジウム・ビバックス (*Plasmodium vivax*) と、それらが感染する標的細胞の表面上の接着タンパク質との間の相互作用に適用され得る。

【0070】

この適用は、ウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス、及びパラサイト、例えばプラスモジウム・ビバックスによる感受性細胞の感染を阻害する方法を含む。

【0071】

M3 タンパク質が溶液中でケモカインと結合し、そしてその結果ケモカインと細胞性ケモカイン受容体との相互作用を模倣するので、M3 タンパク質は更に HIV 又は P . ビバックス感染の過程と相互作用することが予測され得る。

【0072】

特に、M3タンパク質はHIV又はプラスモジウム・ピバックスの接着タンパク質と結合し、そしてその結果宿主細胞のケモカイン受容体に対するHIV又はP・ピバックスの結合及び/又はそれに続く細胞内への侵入を防ぎ得ると予測される。M3タンパク質は、この様にこれらの病原による標的細胞の感染を抑制し、又は防ぐために使用されることがあり、そしてこの様に、HIV又はP・ピバックス感染から個体を保護する際に、保護し、又は補助することがある。M3タンパク質はまた、HIV及びP・ピバックスとそれらの標的細胞との相互作用を研究するために使用され得る。

【0073】

ケモカイン受容体は、CD4と一緒にウイルスの侵入及び感染に必要とされる補助因子として働くことによって、HIVの伝染及び播種において必須の役割を果たすことが知られている(Faicu, 1996, Nature 384:529)。in vivoでのケモカイン受容体の重要性は、CCR5遺伝子の変異版についてホモ接合体である個体が、HIV感染にとって耐性があるという発見によって証明されている。ケモカイン受容体に対するケモカイン又は変異ケモカインアンタゴニストの結合が、HIV感染を阻止し得ることにより、HIV-ケモカイン受容体の相互作用の遮断の、HIVに対する予防的かつ治療的な戦略としての可能性を例示している。

【0074】

マラリアパラサイト(原虫)のプラスモジウム・ピバックスは、赤血球に侵入し、そして感染するために、未知の機能のケモカイン受容体(ダuffi抗原)を使用することが知られている(Horuk et al., 1993, Science 261:1182)。HIV感染と同様に、ダuffi抗原に対するケモカインの結合はP・ピバックスによる赤血球の感染を防ぎ、そして自身の赤血球上にダuffi抗原を欠いている個体は、P・ピバックスマラリアに対して耐性がある。この様に、M3及び相同体によるマラリアパラサイトとダuffi抗原との相互作用の遮断は、P・ピバックスのための薬剤の処置、研究、又は開発のいずれかのための、P・ピバックス感染と関連している使用が予測され得る。

【0075】

ケモカイン受容体とのウイルス又はパラサイトの相互作用の阻害剤は、例えばHIV混入材料による偶発的な注射の場合において、伝染後の感染を防ぎ、又は抑制するために使用され得る。M3タンパク質はまた、他の抗HIV治療と組合わせて使用され得る（いずれも100%有効でない）。

【0076】

M3の天然のリガンドはケモカインである。HIVのgp120がケモカインを模倣し、そしてケモカイン受容体と相互作用することが知られているので、M3はHIVのgp120と相互作用することが予測され、特にそれは本明細書に示される様にケモカインについての広範な特異性を有する様である。しかしながら、gp120についてのM3の親和性は、M3の天然のリガンドであるケモカインについてのものほど高くないと考えられる。

【0077】

それ故に、本発明の観点に従い、M3遺伝子に基づく*in vitro*でのDNA突然変異誘発は、HIVのgp120（又はP.ビバックスの接着タンパク質）とより結合する変異体が選択され得る、M3の修飾型を作製するために使用され得る。ポックスウイルスの35Kケモカイン結合タンパク質を除き、M3はケモカインと結合することが知られている唯一の可溶性タンパク質である。よって、M3タンパク質は、前記の結合剤/阻害剤を開発するための良好な出発点として使用され得る。

【0078】

この様に、M3タンパク質は、初期の段階でのHIV感染の阻止を容易にするために、細胞性ケモカイン受容体と相互作用するHIV gp120のドメインに対して、M3自身よりも高い親和性で結合し得る可溶性タンパク質を誘導する目的で、突然変異作業のための出発材料として使用され得る。M3タンパク質はまた、赤血球上のダuffy抗原に対するP.ビバックスの接着及び感染の開始を防ぐための物質を誘導する目的で、突然変異作業のための出発材料として使用され得る。

【0079】

記載した発明及び本明細書でなされた開示は、この開示の観点から当業者にと

って明らかな様に、そして容易に実施可能な様に、多くの修飾及び変更が可能であり；そして本開示は特許請求の範囲を含む本明細書の説明において言及され、そして/あるいは記載された様な特徴の改作、組合わせ及び副組合わせに及ぶ。本明細書で引用した全ての文書が、全ての目的のためにそれらの全体を引用によって本明細書に組み入れる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、可溶性ケモカインの結合活性がMHV68によって生じるという実験に由来する、SDS-PAGE解析のオートラジオグラフを分子量(kDa)で示す。

【図2】

図2は、MHV68M3ORFにコードされる可溶性ケモカイン結合タンパク質の結合特異性を示すための実験に由来する、別のSDS-PAGE解析の異なるオートラジオグラフを示す。

【図3】

図3は、細胞等価物として発現している、異なる量のMHV68感染細胞上清の存在下で(U937)細胞を試験するための、[125I]RANTESの結合を示すグラフである。

【図4(a)】

図4はMIP-1及びIL-8の、U937細胞に対する結合を示すグラフ(4(a)及び4(b))を含んで成る。

【図4(b)】

図4は、MIP-1及びIL-8の、U937細胞に対する結合を示すグラフ(4(a)及び4(b))を含んで成る。

【図5】

図5は、MIP-1アルファ及びIL-8に対するM3の結合に關与するSDS-PAGE解析実験のオートラジオグラフである。

【図6】

図6は、M3、培養細胞及びケモカインによる阻害実験の結果を示すグラフで

ある。

【図7(a)】

図7(a)は、M3、培養細胞及びケモカインによる阻害実験の結果を示すグラフである。

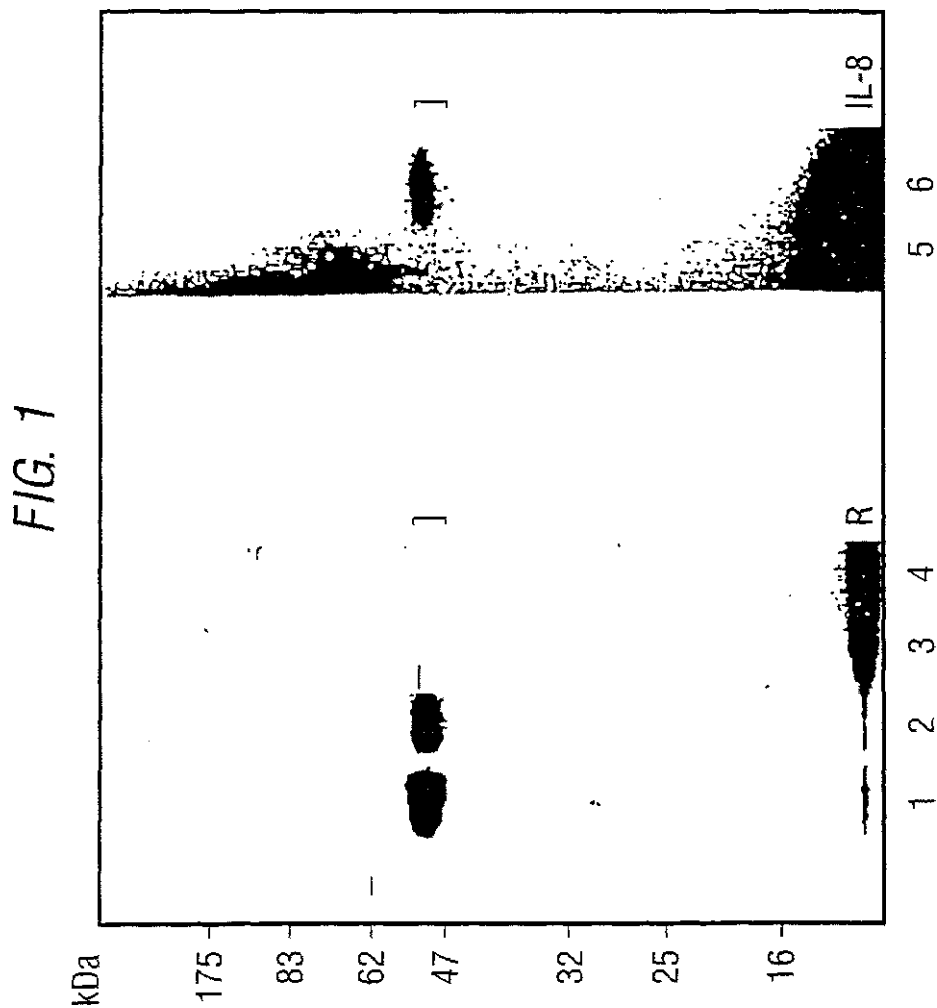
【図7(b)】

図7(b)は、M3、培養細胞及びケモカインによる阻害実験の結果を示すグラフである。

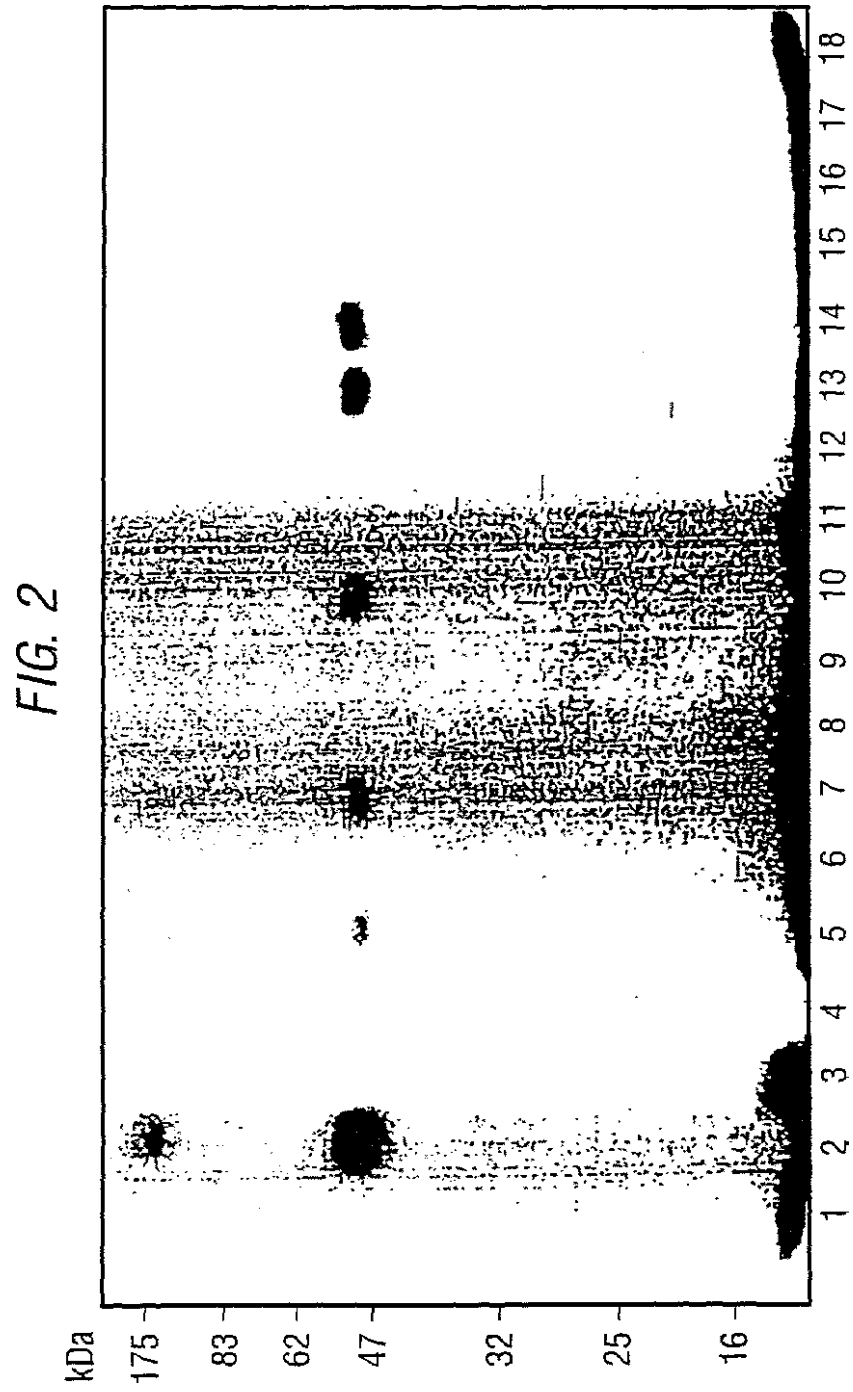
【図8】

図8は、マウスにおける炎症応答に対する作用についての、*in vivo*での実験結果を示すグラフである。

【図1】



【图2】



【图3】

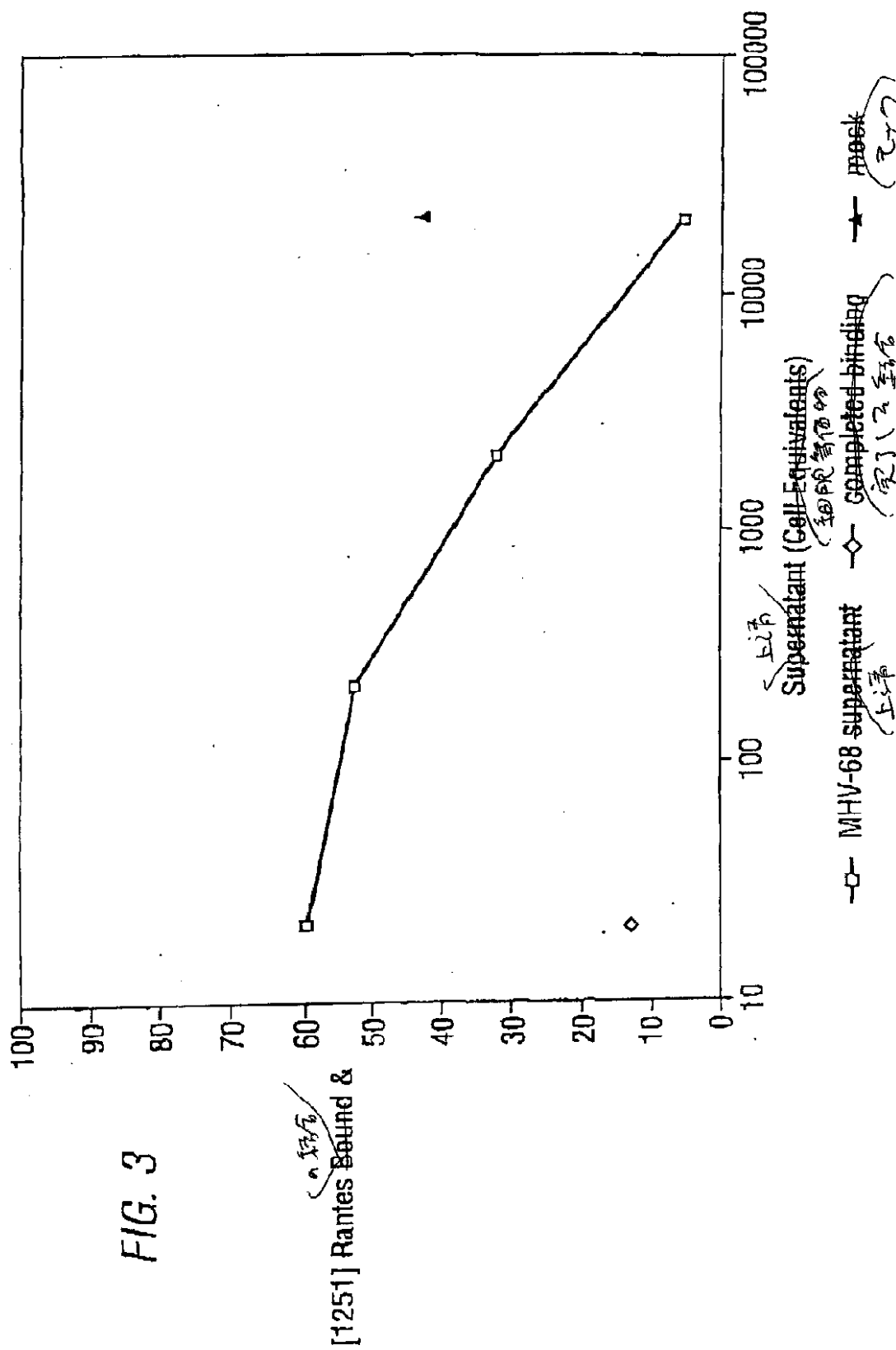


FIG. 3

[125I] Rantes Bound & Supernatant (Cell Equivalents)

Supernatant (Cell Equivalents)

—□— MHV-68 supernatant

—◇— completed binding

—▲— mask

上清

细胞等价物

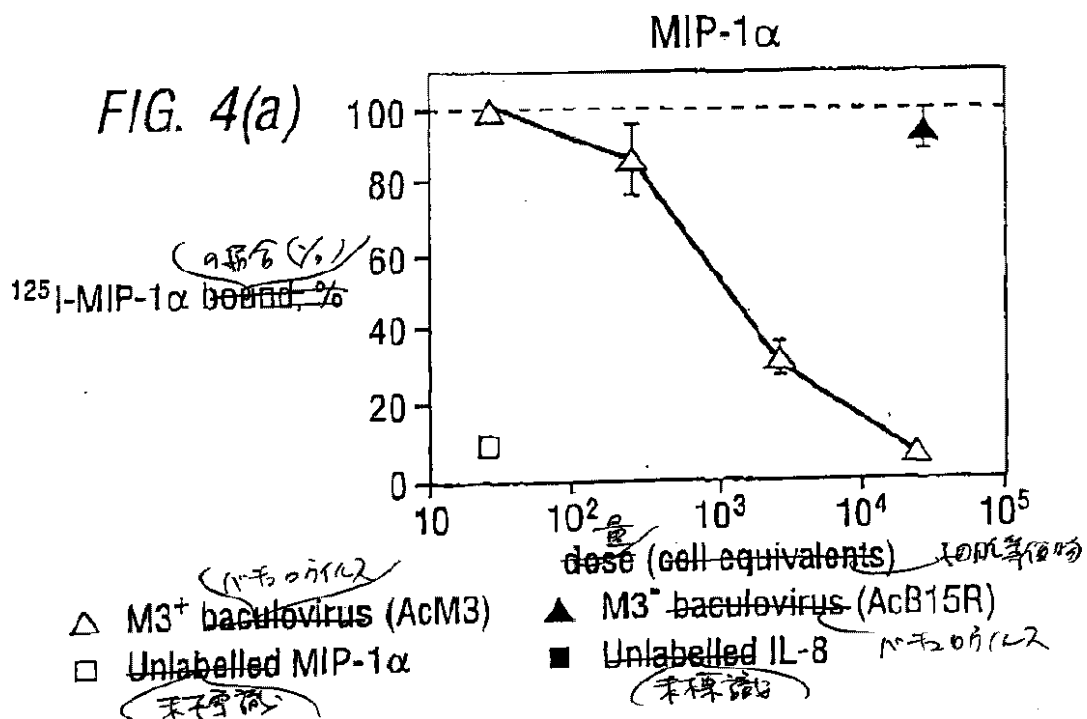
结合了Rantes

mask (已下)

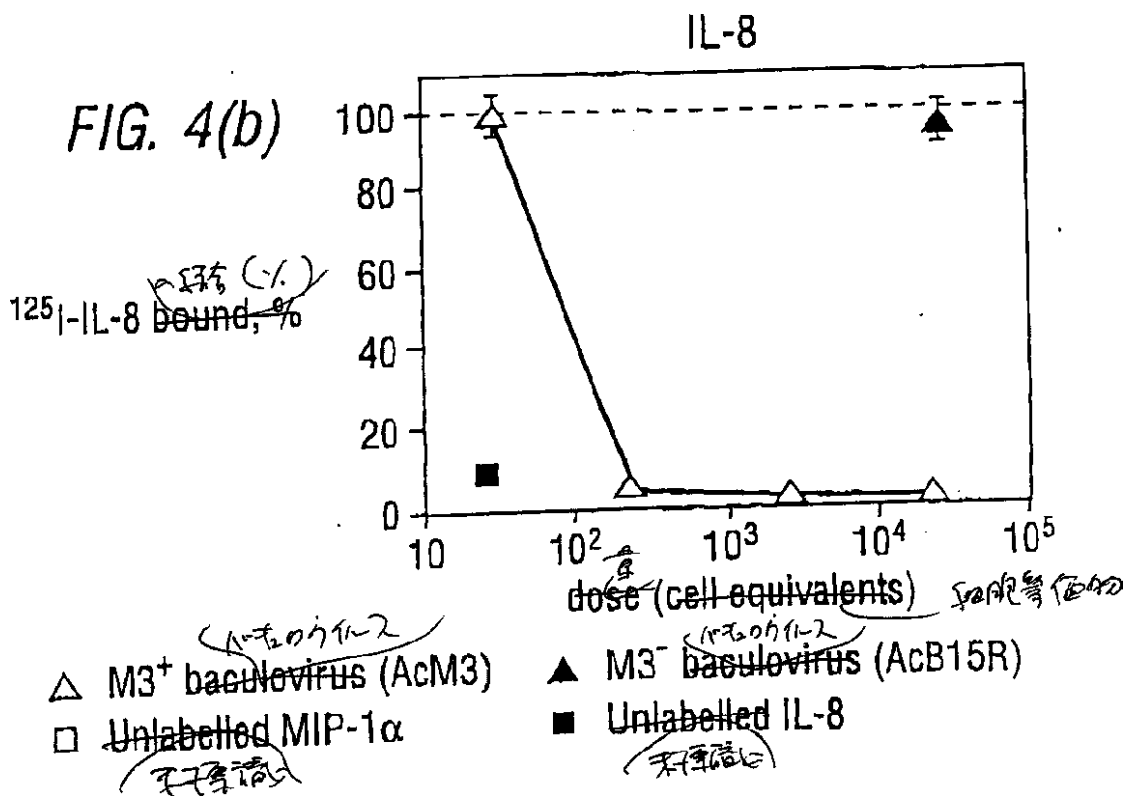
【図4(a)】

M3のU937細胞上に発現したMIP-1αの受容体の結合阻害 (a)
 MIP-1αとIL-8の結合阻害 (b)。

~~M3 inhibits binding of (a) MIP-1α and (b) IL-8 to their natural receptors expressed on U937 cells~~



【図4(b)】

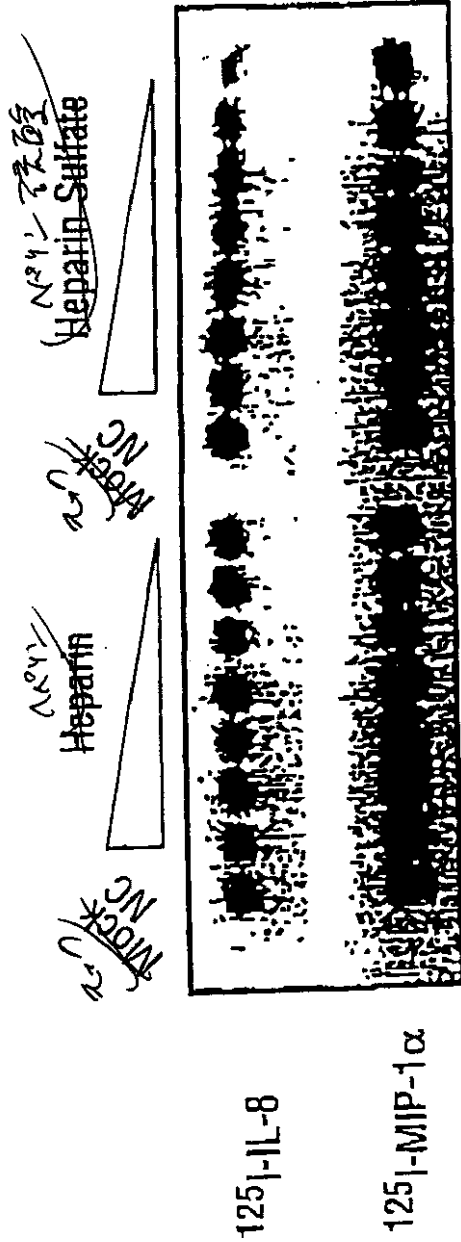


【图5】

^{125}I 及び ^{125}I 標識の放射線検出器 IL-8 及び MIP-1 α の結合能力を比較する。
 M) ^{125}I 標識の放射線検出器 (MIP)

FIG. 5

Heparin and heparin sulphate do not interfere with the capacity for M3 to bind to radio-labelled IL-8 or MIP-1 α

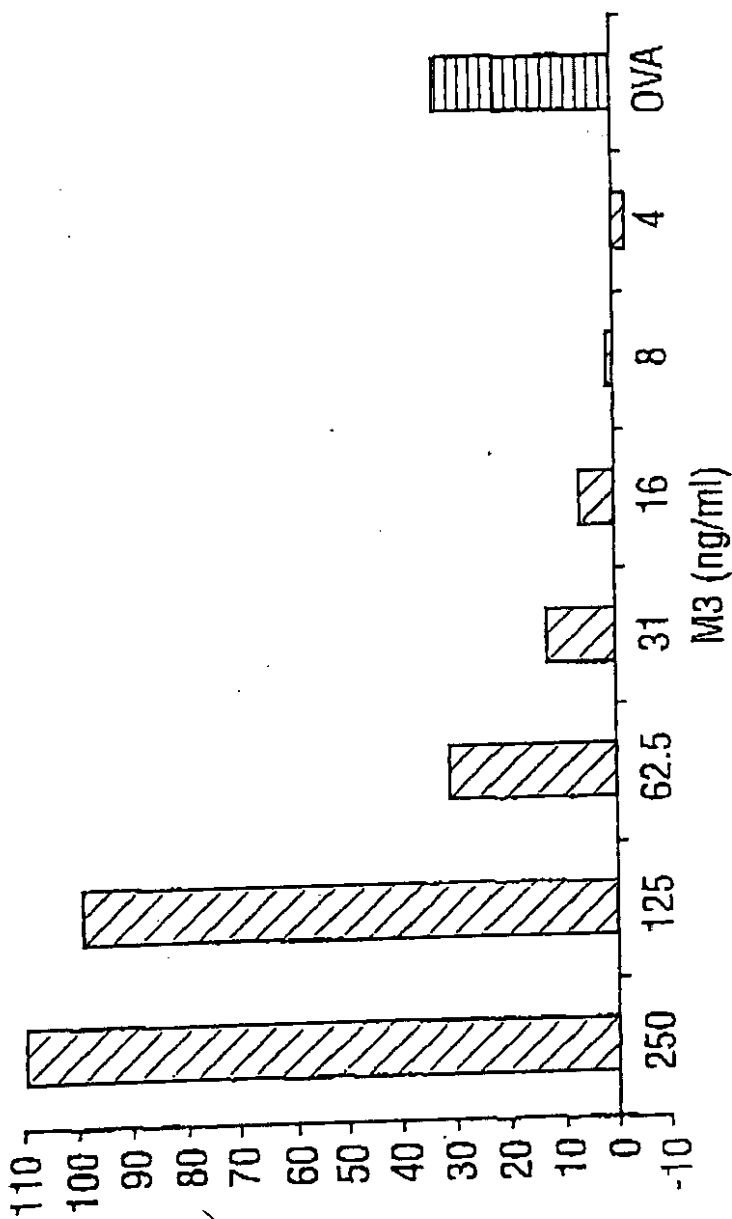


【图6】

M3は、量依性で、 Ca^{2+} PBMCにRANTES誘導型 Ca^{2+} 流量を阻害する。

FIG. 6

M3 inhibits RANTES-induced Ca^{2+} flux in human PBMCs in a dose dependant manner



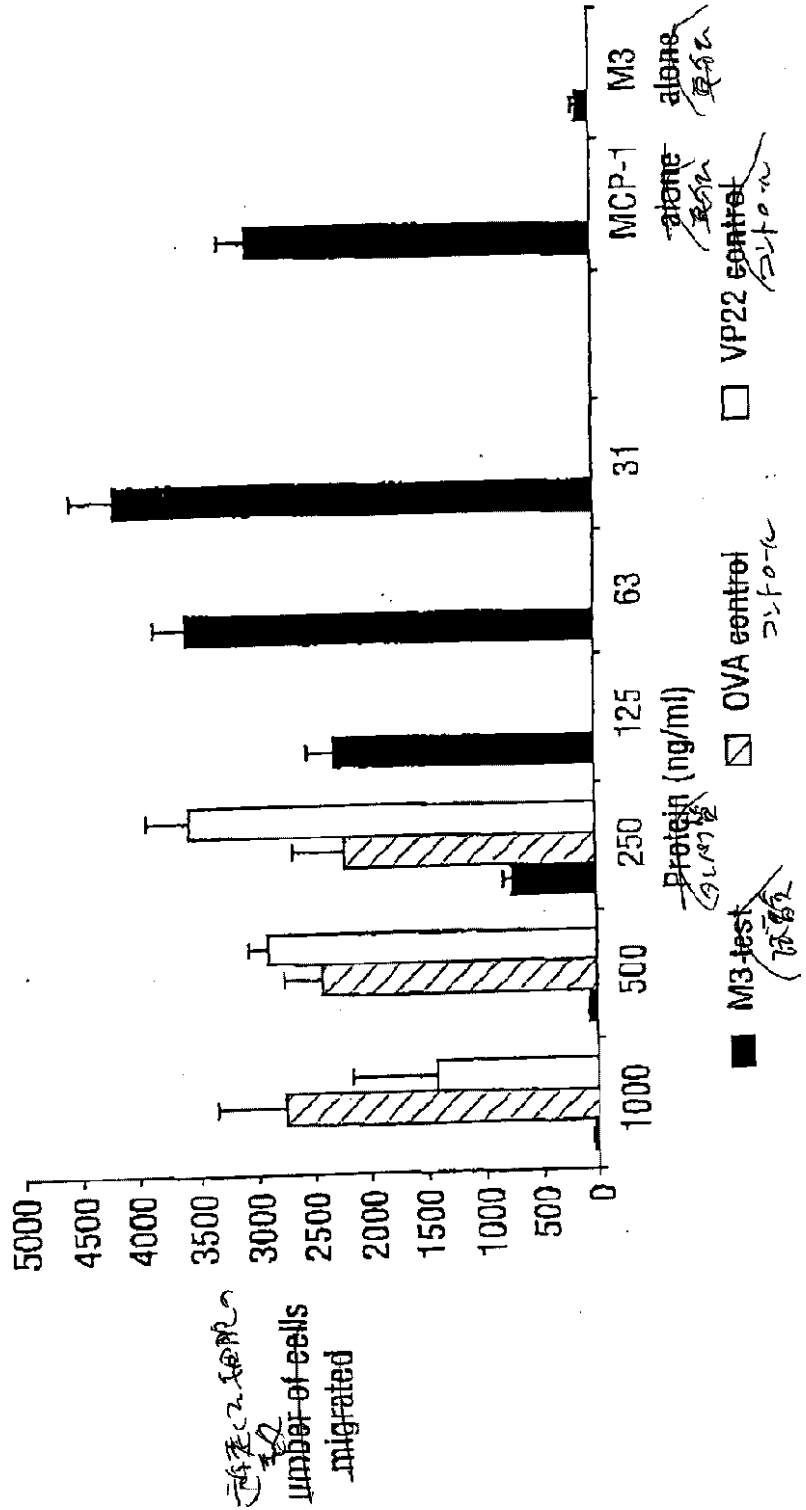
Ca^{2+} 流量を阻害(%)
% Inhibition of Ca^{2+} flux

【图7(a)】

M3 量依存型 (a) MCP-1 誘発型 THP-1 細胞を (b) IL-8 誘発型 THP-1 細胞を阻害した。

FIG. 7(a)

M3 inhibits (a) MCP-1 induced migration of THP-1 cells and (b) IL-8 induced migration of neutrophils in a dose dependant manner



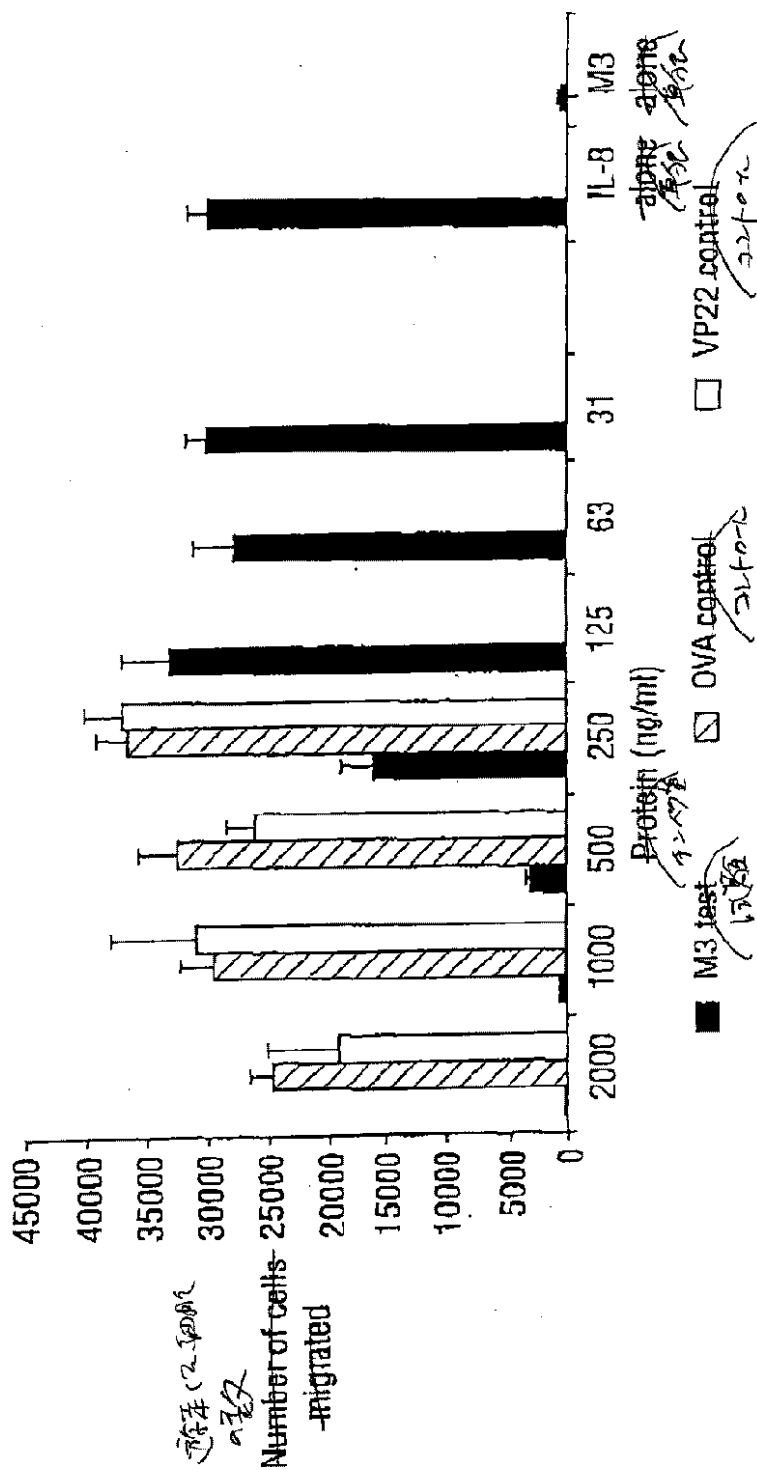
細胞の移動数
number of cells
migrated

【图7(b)】

M710、量依存型、(a) MCP-1 誘導型、THP-1細胞の遊走促進作用、IL-8 誘導型、
 細胞の遊走を阻害する。

FIG. 7(b)

M3 inhibits (a) MCP-1 induced migration of THP-1 cells and (b) IL-8
 induced migration of neutrophils in a dose-dependent manner.



遊走細胞の数

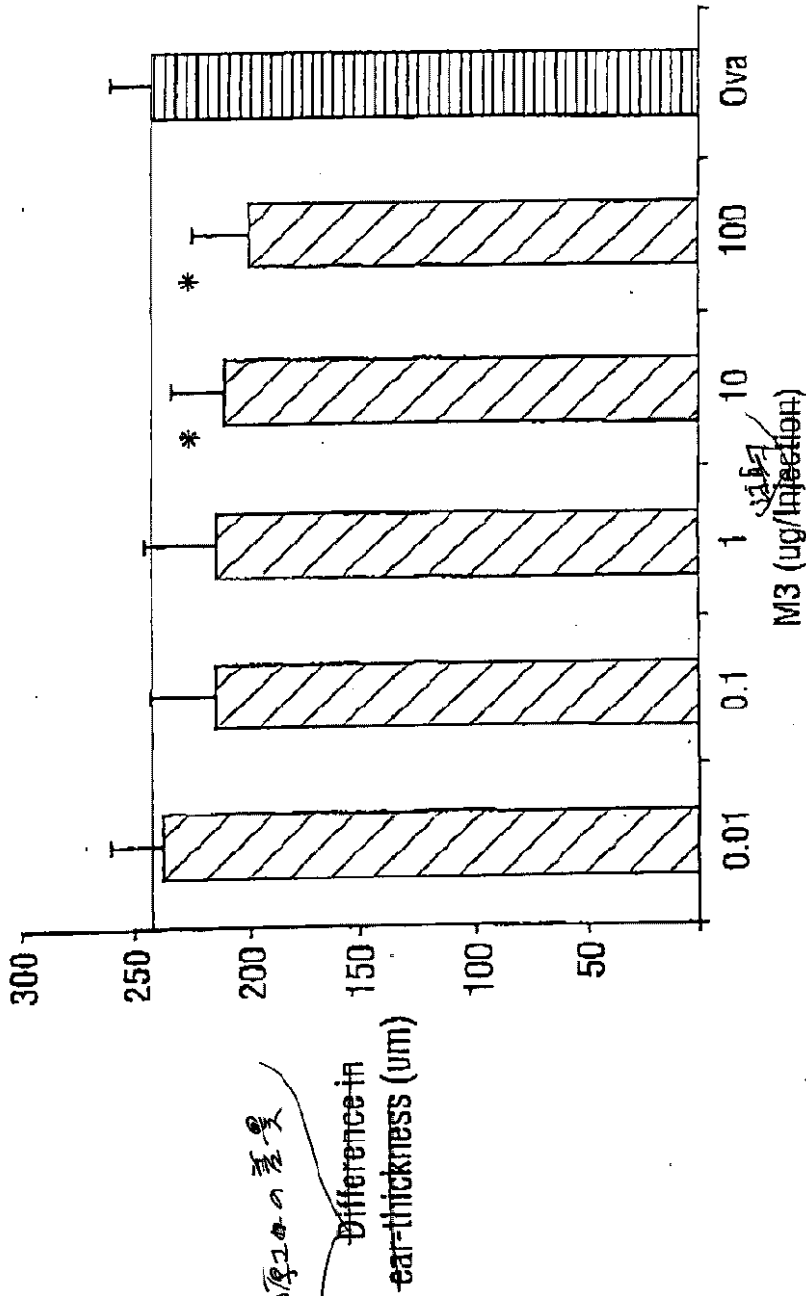
Protein (ng/ml)
 M3 test
 OVA control
 VP22 control

【図8】

2ヶ月間の接触感敏性炎症を抑制するM3の作用

FIG. 8

Effect of M3 on contact sensitivity inflammatory response in mice



耳の厚さの差異

Values represent mean difference in ear thickness between control and challenged ears \pm SD.
 Statistical analysis was performed between M3 treated groups (10 and 100 μ g/injection) and the ovalbumin (Ova) control group (100 μ g/injection) using Student's T-test ($*p < 0.05$).

値はコントロール群との平均差 \pm SD を示す。統計解析は、2ヶ月間の接触感敏性炎症を抑制するM3処置群 (10 μ g/注射) とオバアルブミン (Ova) コントロール群 (100 μ g/注射) との間で行った。 (* $p < 0.05$)

【**手続補正書**】

【**提出日**】平成14年2月7日(2002.2.7)

【**手続補正2**】

【**補正対象書類名**】図面

【**補正対象項目名**】図3

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【図3】

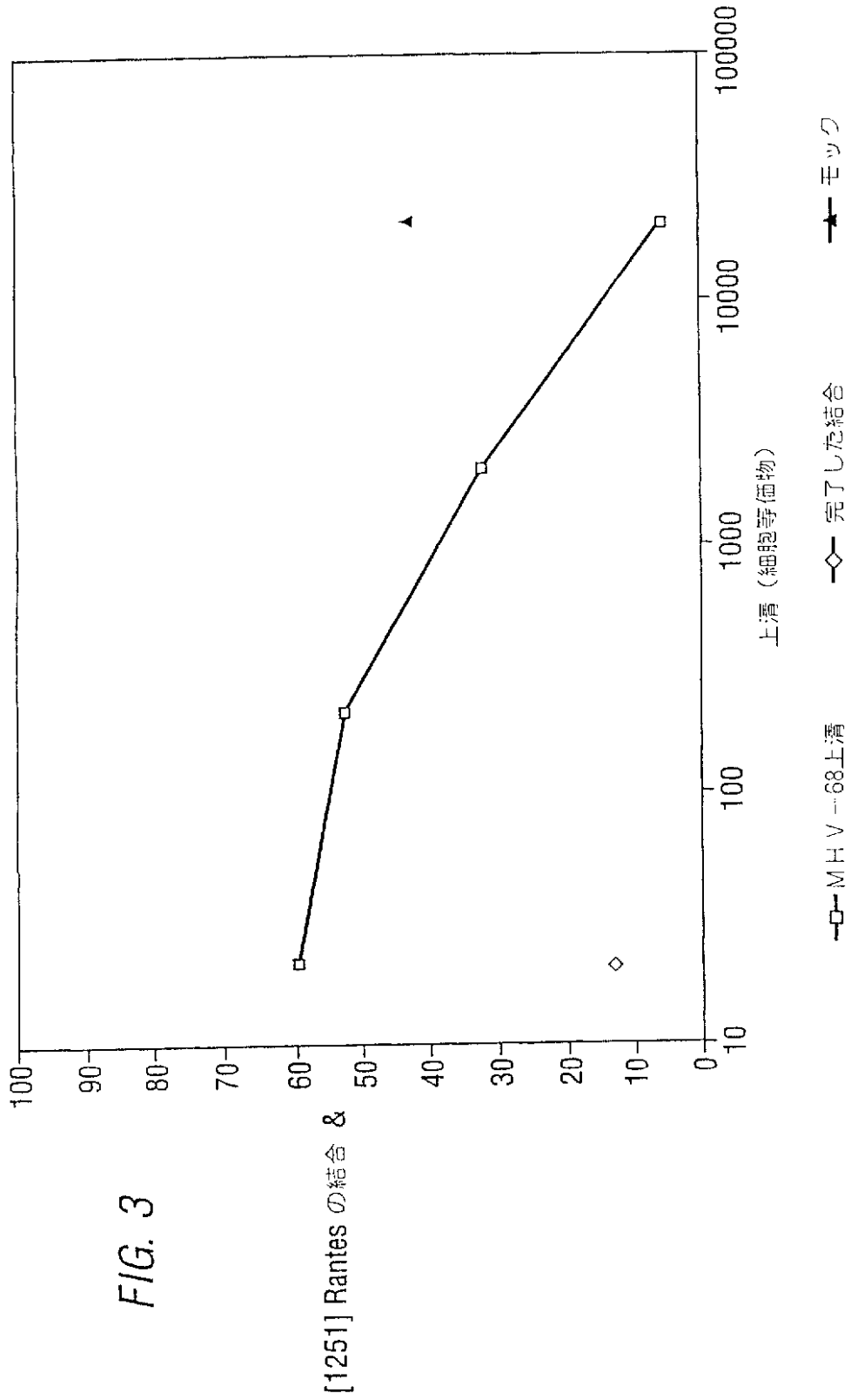


FIG. 3

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

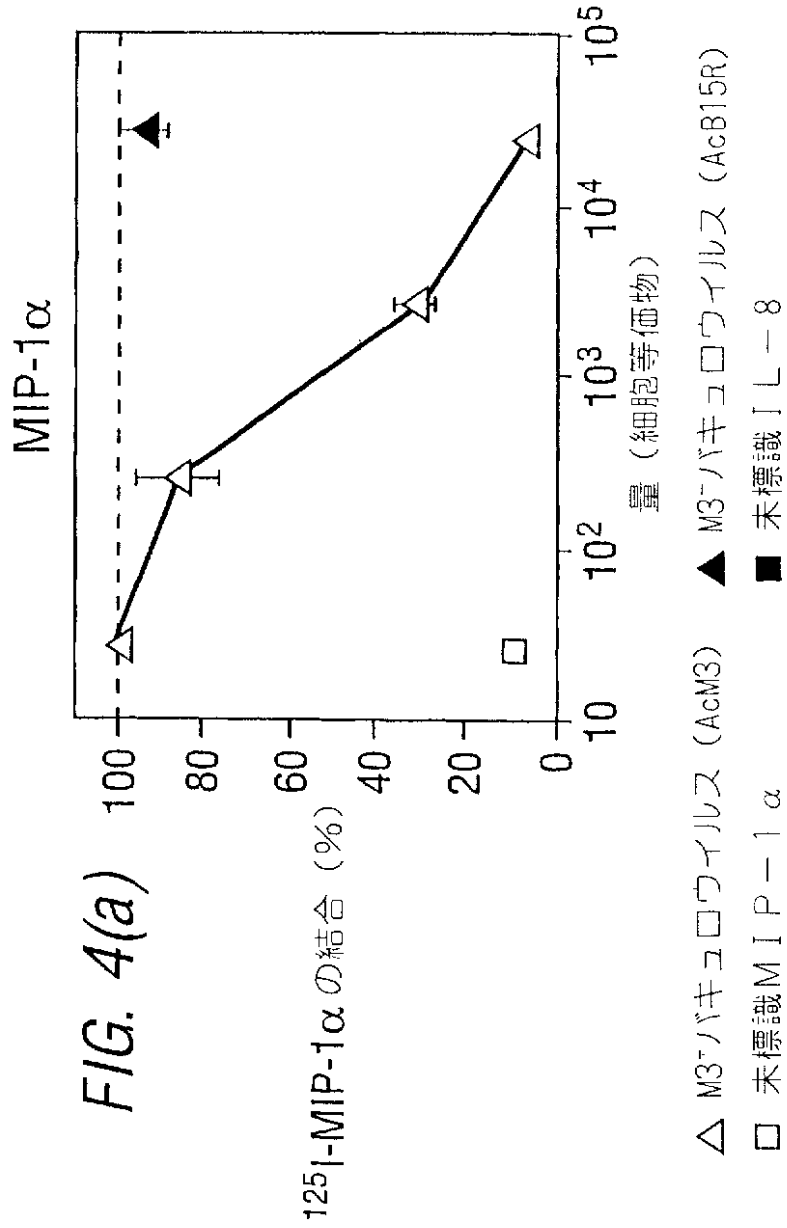
【補正対象項目名】図4(a)

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図4(a)】

M3はU937細胞上に発現している天然の受容体に対する
(a) MIP-1 α 及び(b) I α の結合を阻害する



【手続補正4】

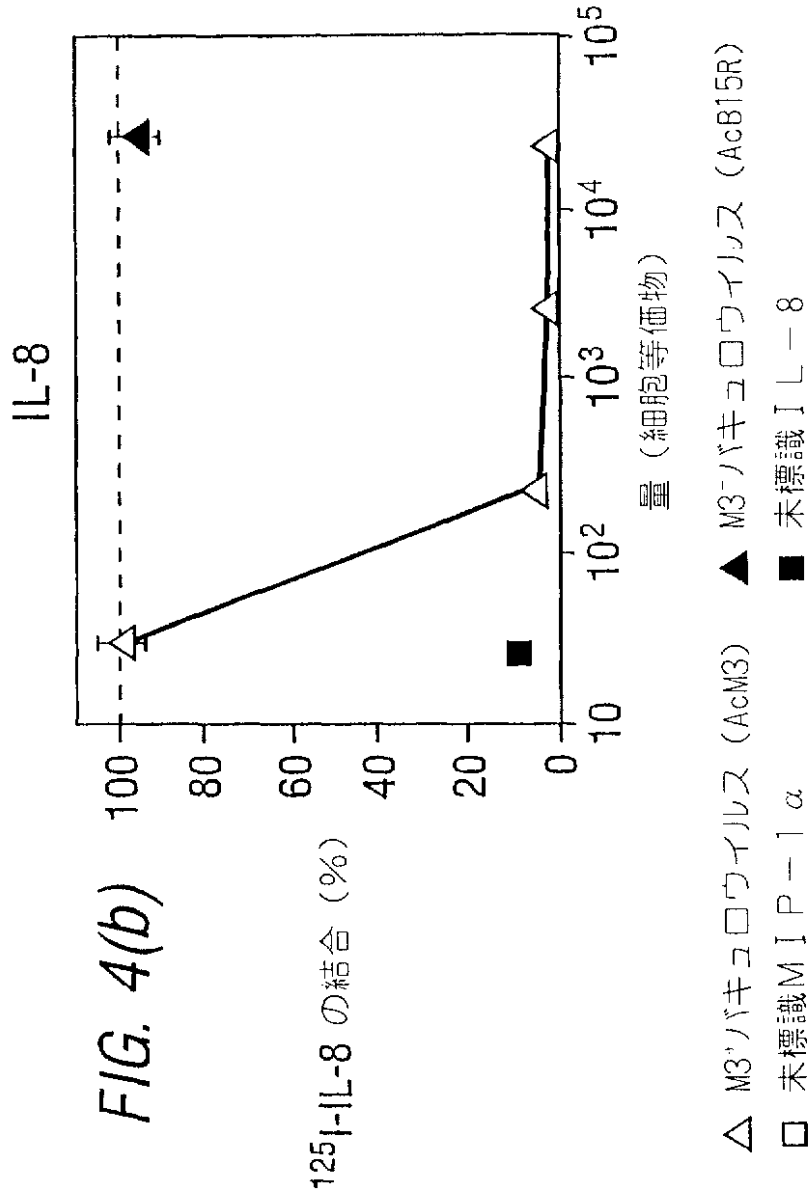
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4(b)

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図4(b)】



【手続補正5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図5

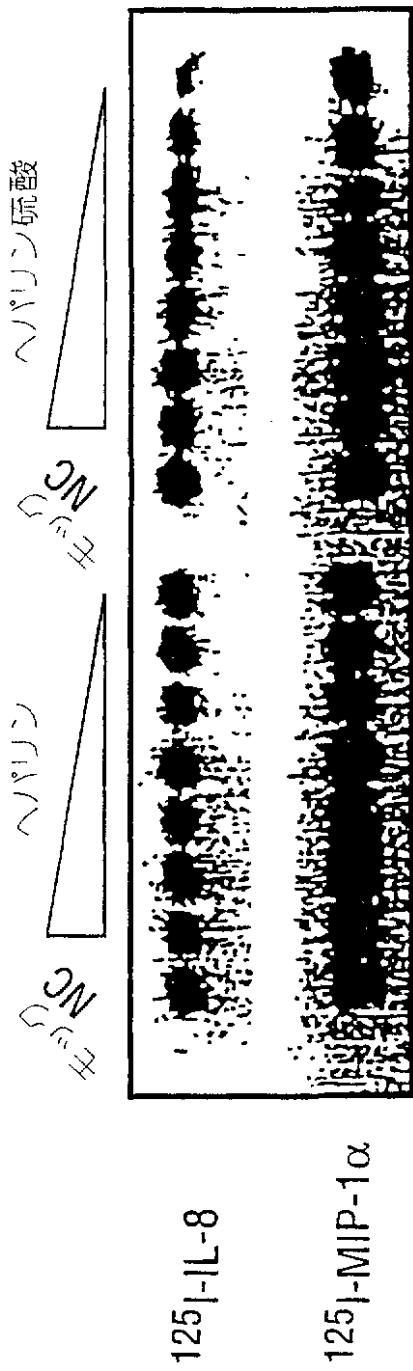
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図5】

FIG. 5

ヘパリン及びヘパリン硫酸は放射標識 I L-8 又は MIP-1α に対して結合する M3 の能力を妨害しない



125I-IL-8

125I-MIP-1α

【手続補正6】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図6

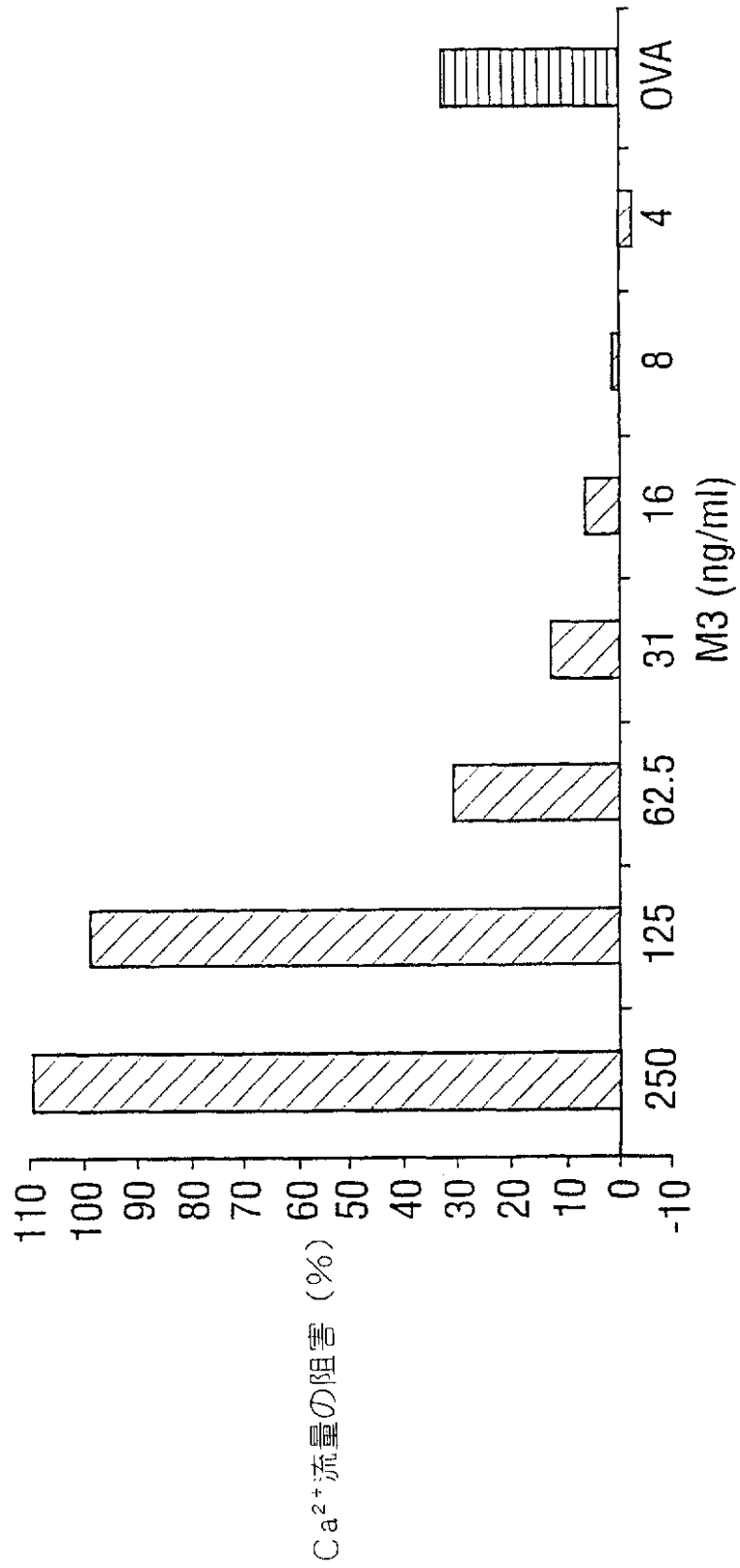
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図6】

FIG. 6

M3は、量依存型でヒトPBMCにおける
RANTES誘導型のCa²⁺流量を阻害する



【手続補正7】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図7(a)

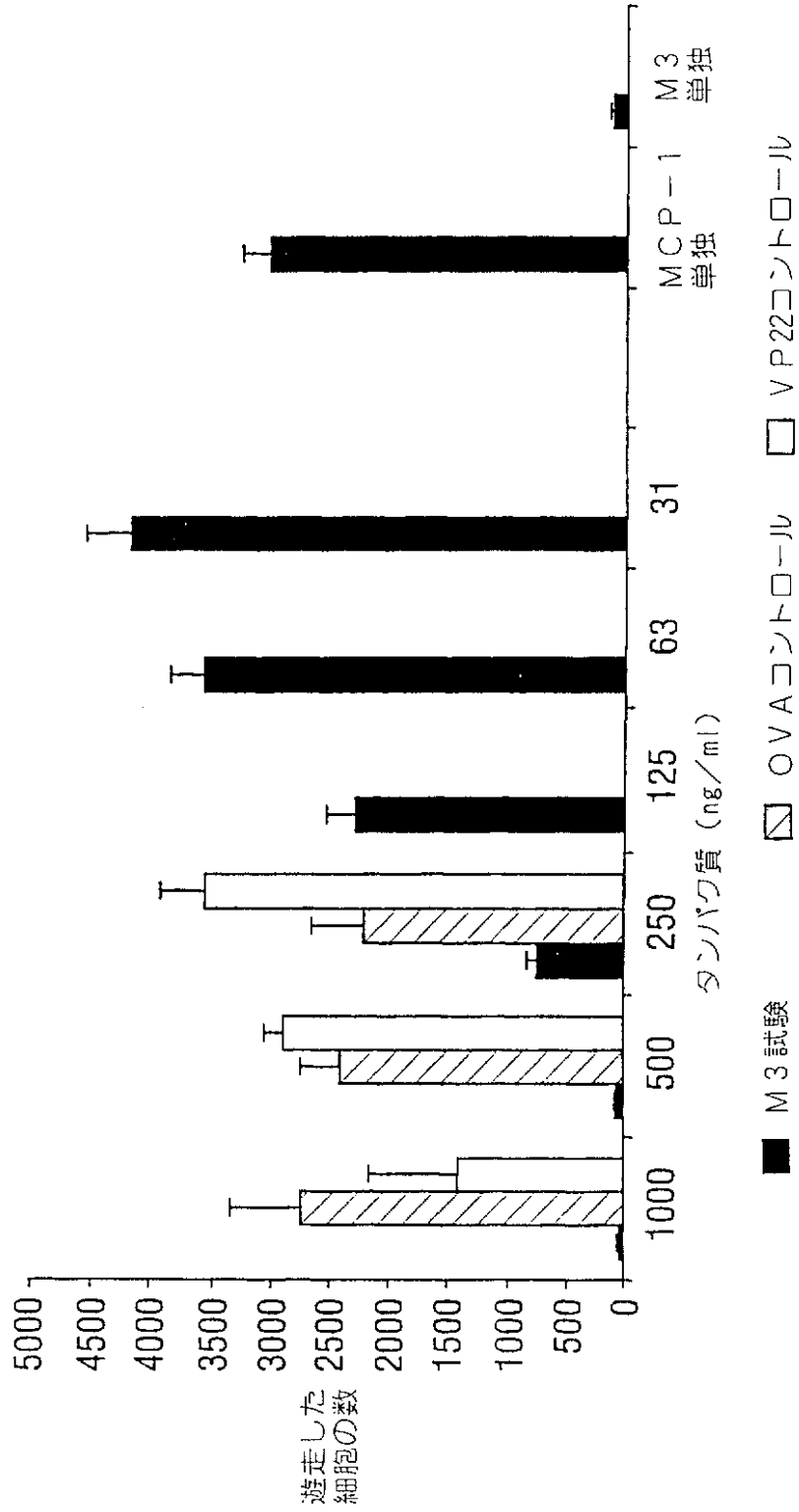
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図7(a)】

FIG. 7(a)

M3は、量依存型で(a)MCP-1誘導型のTHP-1細胞の遊走及び(b)IL-8誘導型の好中球の遊走を阻害する



【手続補正8】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図7 (b)

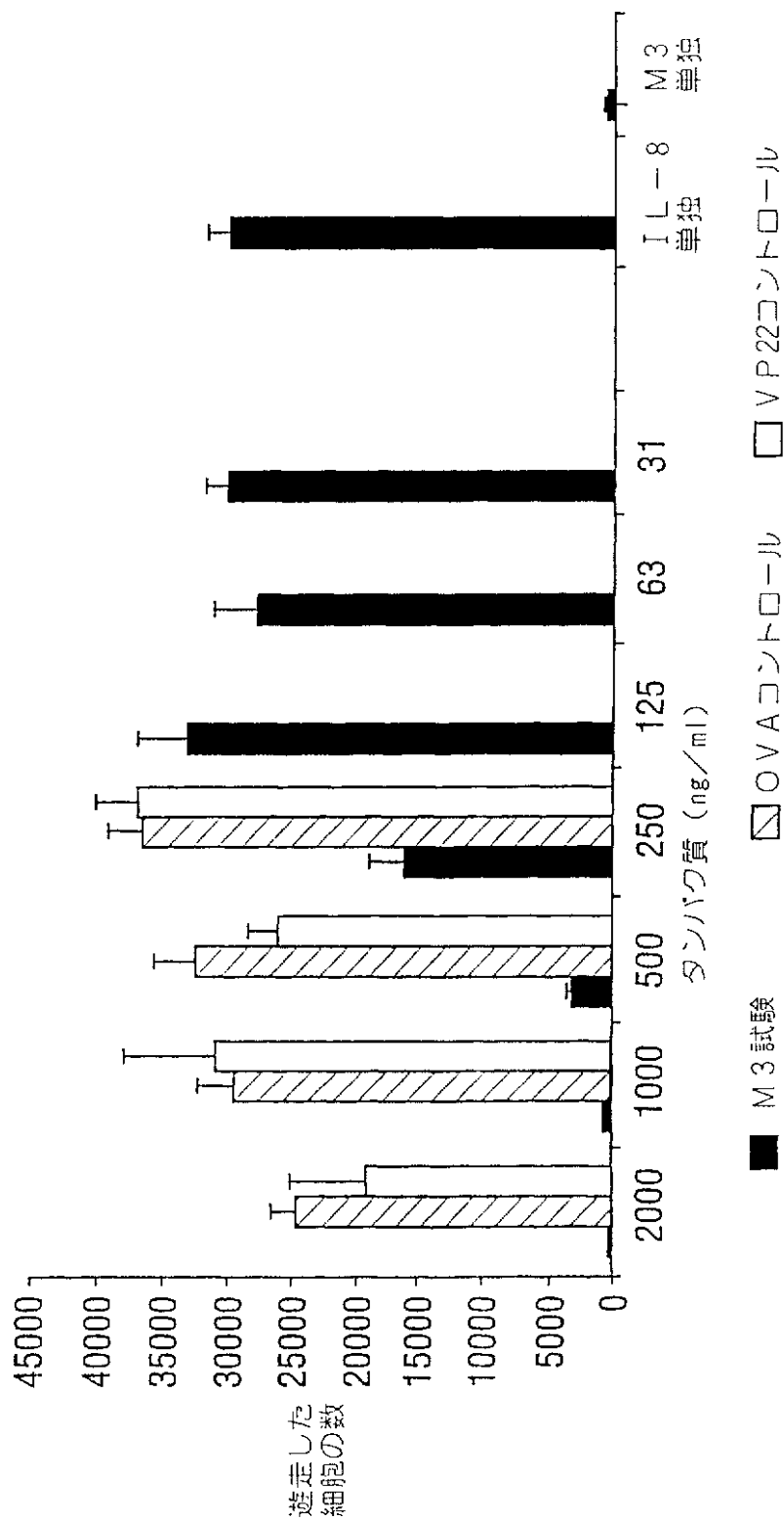
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図7(b)】

FIG. 7(b)

M3は、量依存型で(a)MCP-1誘導型のTHP-1細胞の遊走及び(b)IL-8誘導型の好中球の遊走を阻害する



【手続補正9】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図8

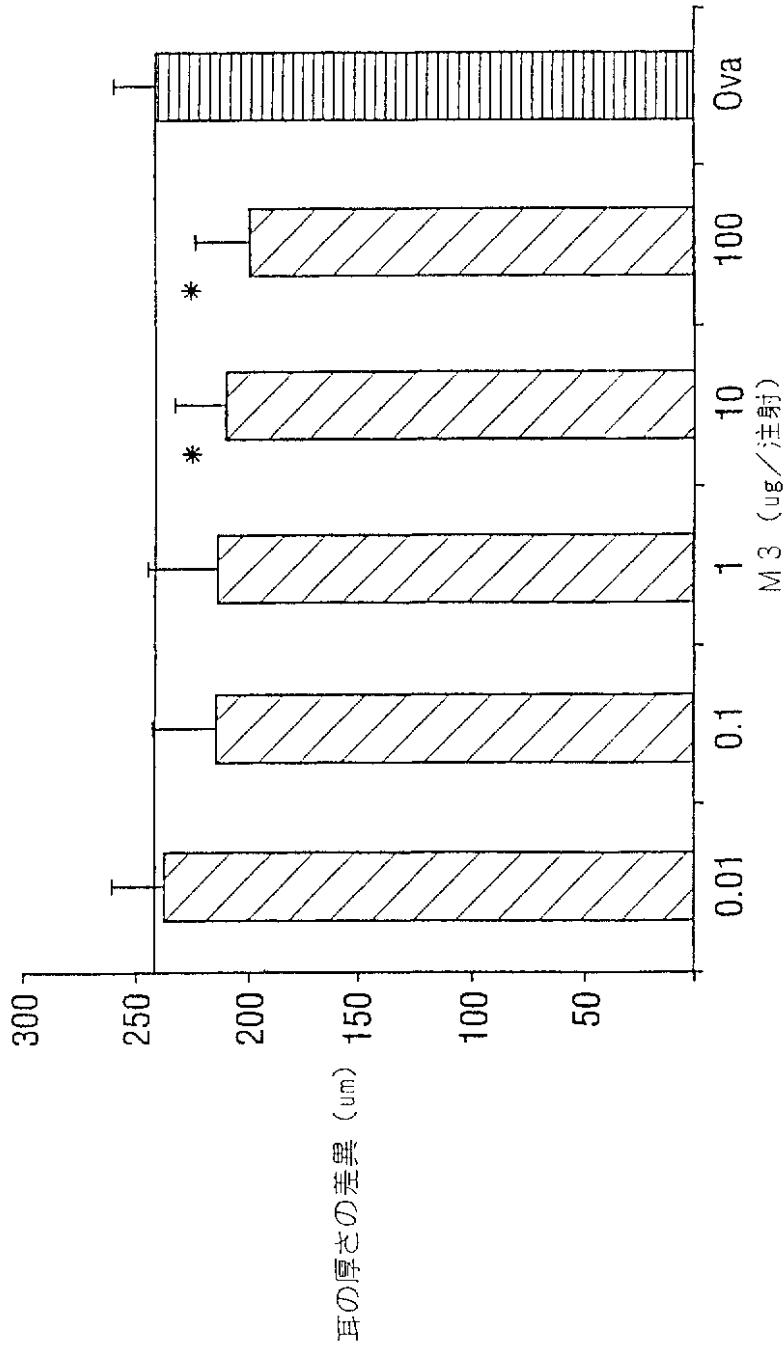
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図8】

FIG. 8

マウスにおける接触感受性炎症応答に対するM3の作用



値はコントロールと処置した耳との間の耳の厚さの平均差異±SDを表す。
 統計解析は、スチューデントT試験 (* $p > 0.05$) を用いて、M3処置群
 (10及び100 μ g/注射) とオボアルブミン (Ova) コントロール群
 (100 μ g/注射) との間で行われた。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int'l. Application No PCT/GB 00/02748
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/16 C07K19/00 C12N15/62 A61P31/12 A61P37/02 G01N33/68		
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) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, WPI Data, EPO-Internal, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAN BERKEL VICTOR ET AL: "Identification and initial characterization of the murine gammaherpesvirus 68 gene M3, encoding an abundantly secreted protein." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 4524-4529, XP002163166 ISSN: 0022-538X cited in the application	
A	W0 98 36766 A (ALCAMI JOSE ;ALCAMI ANTONIO (GB); ISIS INNOVATION (GB); SMITH GEOFF) 27 August 1998 (1998-08-27) the whole document --- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 March 2001		Date of mailing of the international search report 29/03/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3010		Authorized officer Niemann, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 00/02748

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 44054 A (LUCAS ALEXANDRA ;MCFADDEN GRANT (CA); UNIV ALBERTA (CA)) 27 November 1997 (1997-11-27) the whole document	
P,X	PARRY CHRISTOPHER M ET AL: "A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE., vol. 191, no. 3, 7 February 2000 (2000-02-07), pages 573-578, XP000982193 ISSN: 0022-1007 the whole document	1-16
T	LALANI A S A S ET AL: "Modulating chemokines: more lessons from viruses" IMMUNOLOGY TODAY,GB,ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 21, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 100-106, XP004187240 ISSN: 0167-5699 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 00/02748

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9836766 A	27-08-1998	AU 6302098 A	09-09-1998
		EP 0985046 A	15-03-2000
		WO 9837217 A	27-08-1998
WO 9744054 A	27-11-1997	AT 196091 T	15-09-2000
		AU 3136197 A	09-12-1997
		BR 9710028 A	10-08-1999
		CN 1226171 A	18-08-1999
		CZ 9803789 A	14-07-1999
		DE 69703040 D	12-10-2000
		EP 1034789 A	13-09-2000
		EP 0901379 A	17-03-1999
		ES 2152095 T	16-01-2001
		JP 2000511535 T	05-09-2000
		NO 985412 A	20-01-1999
		PL 330149 A	26-04-1999
		TR 9802392 T	22-02-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 33/00		A 6 1 P 37/02	
		G 0 1 N 33/53	S
C 1 2 N 15/09	Z N A		
G 0 1 N 33/53		A 6 1 K 37/02	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(81) 指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(71) 出願人	アルカミ, アントニオ イギリス国, ケンブリッジ シービー 2 5 エイチジェイ, リトル シェルフオー ド, ホークストン ロード 46		
(71) 出願人	パーリー, クリストファー マーク イギリス国, ケンブリッジ シービー 1 3 エスディー, ラングハム ロード 37		
(72) 発明者	エフスタショー, ステイシー イギリス国, ケンブリッジ シービー 2 1 エヌイー, ノーウィッチ ストリート 18		
(72) 発明者	アルカミ, アントニオ イギリス国, ケンブリッジ シービー 2 5 エイチジェイ, リトル シェルフオー ド, ホークストン ロード 46		
(72) 発明者	パーリー, クリストファー マーク イギリス国, ケンブリッジ シービー 1 3 エスディー, ラングハム ロード 37		
(72) 発明者	スミス, ピンセント ピーター イギリス国, ケンブリッジ シービー 4 1 エヌエス, チェスタートン, ヒッチ ス トリート 156		

(72)発明者 モンテイロ エ ロウロ マチャド デ
サイマス, ジョアオ ペドロ
ポルトガル国, ベー - 1250 リスボア, ア
ールノシー, ルア プロフェッサー ブラ
ンコ ロドリゲス, ナンバー 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 CA07 DA02
EA04 FA02 GA11
4C084 AA02 AA13 AA19 BA03 CA01
DC50 ZB07 ZB33 ZB37
4C087 AA01 AA02 BC83 CA16 CA47
ZB07 ZB33 ZB37

专利名称(译)	病毒蛋白结合组合物和方法		
公开(公告)号	JP2003504420A	公开(公告)日	2003-02-04
申请号	JP2001510560	申请日	2000-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	剑桥大学技术服务有限公司 F-明星秀斯泰西 阿尔卡米安东尼奥 珠光克里斯托弗·马克		
申请(专利权)人(译)	剑桥大学技术服务Rimitido F-明星秀, 斯泰西 Arukami, 安东尼奥 珠光, 克里斯托弗·马克		
[标]发明人	エフスタショーステイシー アルカミアントニオ パーリークリストファーマーク スミスピンセントピーター モンテイロエロウロマチャドデサイマスジョアオベドロ		
发明人	エフスタショー,ステイシー アルカミ,アントニオ パーリー,クリストファー マーク スミス,ピンセントピーター モンテイロ エロウロ マチャド デ サイマス,ジョアオ ベドロ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/76 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/12 A61P33/00 A61P37/02 C07K14/03 C12N15/09 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/005 A61K38/00 C12N2710/14143 C12N2710/16022 G01N33/6863 Y10S530/826		
FI分类号	A61K35/76 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/12 A61P33/00 A61P37/02 G01N33/53.S G01N33/566 A61K37/02 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA03 4C084/CA01 4C084/DC50 4C084/ZB07 4C084/ZB33 4C084/ZB37 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA16 4C087/CA47 4C087/ZB07 4C087/ZB33 4C087/ZB37		
优先权	1999016703 1999-07-16 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于在体内与蜘蛛或蜘蛛类似物结合,或在体内用于阻止蜘蛛与其相应的细胞表面受体结合,产生免疫调节作用或阻止细胞内进入包含由MHV68编码的M3蛋白或所述M3蛋白的同源物的药物组合物,用于与病毒或寄生虫中存在的蜘蛛因子类似物结合。

FIG. 1

