

(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2018-524577

(P2018-524577A)

(43) 公表日 **平成30年8月30日(2018.8.30)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z N A Z	4 C O 6 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C O 8 4
CO 7 D 471/04 (2006.01)	CO 7 D 471/04 1 O 8 Q	4 C O 8 6
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	CO 7 D 471/04 C S P	4 H O 4 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-565173 (P2017-565173)	(71) 出願人	514232085
(86) (22) 出願日	平成27年10月22日 (2015.10.22)		ユーシービー バイオファルマ エスピー
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月14日 (2018.2.14)		アールエル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/074490		ベルギー国 1070 ブリュッセル ア
(87) 国際公開番号	W02016/202411		レ デ ラ レシエルシエ 60
(87) 国際公開日	平成28年12月22日 (2016.12.22)	(74) 代理人	110000855
(31) 優先権主張番号	1510758.4		特許業務法人浅村特許事務所
(32) 優先日	平成27年6月18日 (2015.6.18)	(72) 発明者	オコンネル、ジェームス フィリップ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス国、パークシャー、スラウ、バス
			ロード 208、ユセベ セルテック、
			アイピーディー気付
		(72) 発明者	ポーター、ジョン ロバート
			イギリス国、パークシャー、スラウ、バス
			ロード 208、ユセベ セルテック、
			アイピーディー気付
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 作用機構

(57) 【要約】

本発明は、TNFシグナル伝達の分野にある。受容体を介するTNFトリマーのシグナル伝達を調節することができる化合物が同定された。したがって、そのような化合物を同定する方法が提供される。その化合物自体、治療において有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質に結合し、必要なTNFスーパーファミリー受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができる化合物を同定する方法であって、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数を決定するステップ、それによって、化合物が受容体を介するシグナル伝達を調節することができるかどうかを同定するステップを含む、上記方法。

【請求項 2】

対照と比較して、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数を決定するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

対照が、化合物の非存在下でTNFスーパーファミリーメンバーのトリマー及び必要な受容体を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

対照と比較したトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の減少が、化合物が受容体を介するシグナル伝達を調節することができることを同定する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

対照が、TNFスーパーファミリーメンバーのトリマー、必要な受容体、及び受容体を介するトリマーのシグナル伝達を調節することが公知の化合物を含む、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 6】

対照と比較したトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の同等の平均数、又は対照と比較したトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の減少が、化合物が受容体を介するシグナル伝達を調節することができることを同定する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数が、3:1~10:1(受容体:トリマー)のモル比で決定される、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

化合物が、トリマー-化合物複合体あたりに平均 3 個未満の受容体が結合すると決定される場合、受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができると同定される、請求項 1 から 7 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

化合物が、トリマー-化合物複合体あたりに平均 2 個の受容体が結合すると決定される場合、受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができると同定される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

化合物が、トリマー-化合物複合体あたりに平均 1 個の受容体が結合すると決定される場合、受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができると同定される、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 11】

トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の数が、

(a) イオン移動度質量分析; 及び/又は

(b) サイズ排除クロマトグラフィー; 及び/又は

(c) 凝集アッセイ; 及び/又は

(d) Förster 共鳴エネルギー移動; 及び/又は

(e) 結晶解析

によって決定される、請求項 1 から 10 までのいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

TNFスーパーファミリーメンバーがTNF であり、受容体がTNF-Rである、請求項 1 から 1 1 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質に結合し、必要な受容体を介するTNFスーパーファミリーメンバーのシグナル伝達を調節することができる化合物であって、対照と比較して、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の同等の平均数、又はトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の変化をもたらす、上記化合物。

【請求項 1 4】

化合物の非存在下でTNFスーパーファミリーメンバーのトリマーと必要な受容体とを含む対照と比較して、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の減少をもたらす、請求項 1 3 に記載の化合物。

【請求項 1 5】

TNFスーパーファミリーメンバーのトリマー、必要な受容体、及び受容体を介するトリマーのシグナル伝達を調節することが公知の化合物を含む対照と比較して、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の同等の平均数、又はトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の減少をもたらす、請求項 1 3 に記載の化合物。

【請求項 1 6】

トリマー-化合物複合体あたりに結合する平均 3 個未満の受容体をもたらす、請求項 1 3、1 4 又は 1 5 に記載の化合物。

【請求項 1 7】

トリマー-化合物複合体あたりに結合する平均 2 個の受容体をもたらす、請求項 1 6 に記載の化合物。

【請求項 1 8】

トリマー-化合物複合体あたりに結合する平均 1 個の受容体をもたらす、請求項 1 6 に記載の化合物。

【請求項 1 9】

結合した受容体の平均数が 3 : 1 ~ 1 0 : 1 (受容体 : トリマー) のモル比で決定される、請求項 1 3 から 1 8 までのいずれか一項に記載の化合物。

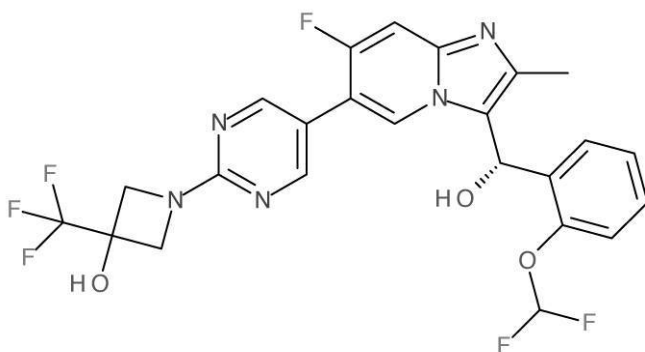
【請求項 2 0】

TNFスーパーファミリーメンバーがTNF であり、受容体がTNF-Rである、請求項 1 3 から 1 9 までのいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 2 1】

式 (5) の化合物、又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物。

【化 1】



(5)

【請求項 2 2】

TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質と、請求項 1 3 から 2 1

10

20

30

40

50

までのいずれか一項に記載の化合物とを含む複合体。

【請求項 2 3】

ヒト又は動物の身体の治療方法における使用のための、請求項 1 3 から 2 1 までのいずれか一項に記載の化合物又は請求項 2 2 に記載の複合体。

【請求項 2 4】

化合物が受容体を介してトリマーによって誘導されるシグナル伝達に拮抗する、自己免疫障害及び炎症障害；神経障害及び神経変性障害；疼痛障害及び侵害障害；並びに心血管障害の処置及び／又は防止における使用のための、請求項 2 3 に記載の化合物又は複合体。

【請求項 2 5】

関節リウマチ、クローン病、乾癬、全身性エリテマトーデス、アルツハイマー病、パーキンソン病及びてんかんの処置及び／又は防止における使用のための、請求項 2 4 に記載の化合物又は複合体。

【請求項 2 6】

請求項 1 3 から 2 1 までのいずれか一項に記載の化合物、又は請求項 2 2 に記載の複合体と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、TNF 受容体を介する TNF スーパーファミリーメンバーのトリマーのシグナル伝達を調節する化合物を同定するための方法に関する。特に、本発明は、新規低分子モジュレータの同定に関する。本発明はまた、そのような方法によって同定される化合物及び化合物とトリマーとの複合体にも関する。化合物及び複合体を、治療的に使用することができる。

【背景技術】

【0002】

腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーは、細胞生存及び細胞死を調節する主な機能を共有するタンパク質ファミリーである。TNF スーパーファミリーのメンバーは、「ジェリーロール」構造を形成する、逆平行鎖を含む 2 つの逆平行 β シートを包含する、共通のコアモチーフを共有する。TNF スーパーファミリーのメンバーにより共有される別の共通の特徴は、ホモ又はヘテロトリマー複合体の形成である。それは、特定の TNF スーパーファミリー受容体に結合し、活性化する TNF スーパーファミリーメンバーのこれらのトリマー形態である。

【0003】

TNF は、TNF スーパーファミリーの典型的なメンバーである。TNF 産生の調節異常は、有意に医学的に重要ないくつかの病状に関与してきた。例えば、TNF は、関節リウマチ、炎症性腸疾患 (クローン病を含む)、乾癬、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、疼痛、てんかん、骨粗鬆症、喘息、全身性エリテマトーデス (SLE) 及び多発性硬化症 (MS) に関与してきた。TNF スーパーファミリーの他のメンバーも、自己免疫疾患を含む病状に関与してきた。

【0004】

TNF スーパーファミリーメンバーの従来のアntagオニストは、大分子であり、TNF スーパーファミリーメンバーの、その受容体に対する結合を阻害することによって作用する。従来のアntagオニストの例としては、インフリキシマブ (Remicade (登録商標))、アダリムマブ (Humira (登録商標)) 及びセルトリズマブペゴール (Cimzia (登録商標)) などの抗 TNF 抗体、特に、モノクローナル抗体、又はエタネルセプト (Enbrel (登録商標)) などの可溶性 TNF 受容体融合タンパク質が挙げられる。

【発明の概要】

【0005】

10

20

30

40

50

受容体がTNFモノマーと比較して同等の濃度又は過剰の濃度で存在する場合（すなわち、少なくとも1：1（受容体：モノマー）；少なくとも3：1（受容体：トリマー）のモル（濃度）比）、TNFトリマーは、典型的には3個の受容体に結合する。本発明者らは、TNFシグナル伝達を調節する低分子実体（SME）を同定した。これらのSME化合物は、トリマー形態のTNFに結合すること、並びにトリマーのコンフォメーション変化を誘導すること、及び/又は安定化することによって作用する。化合物が結合したトリマーは、必要な受容体に対する変化した親和性、特に、第2及び第3の受容体に対する減少した親和性を有し、トリマー-化合物複合体あたりの結合する受容体数を減少させる。したがって、受容体を介する下流のシグナル伝達は減少する。したがって、これらの化合物を、TNFにより媒介される状態の処置において使用することができる。本発明者らはまた、この様式でTNFシグナル伝達を調節することができる化合物を同定することができる方法も開発した。

10

【0006】

本発明は、したがって、TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質に結合し、必要なTNFスーパーファミリー受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができる化合物を同定する方法であって、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数を決定することによって、化合物が受容体を介するシグナル伝達を調節することができるかどうかを同定することを含む、上記方法を提供する。

【0007】

本発明はまた、

20

- TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質に結合し、必要な受容体を介するTNFスーパーファミリーメンバーのシグナル伝達を調節することができる化合物であって、対照と比較して、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の同等の平均数、又はトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の変化をもたらす、上記化合物；

- 式(5)の化合物、又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物；

- TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質と、上記で定義された化合物とを含む複合体；

- ヒト又は動物の身体の治療方法における使用のための、上記で定義された化合物又は複合体；及び

30

- 上記で定義された化合物又は複合体と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物

も提供する。

【図面の簡単な説明】**【0008】**

【図1】化合物の非存在下においてTNF / TNF-R1シグナリングに関与する相互作用を示す。TNF トリマーは、最初の2個の受容体に93 pMの K_D で結合し、第3の受容体にほぼ1 μ Mの K_D で結合する。これらのトリマー及び受容体の複合体（3個の受容体が結合している）は、次いで、受容体の二量化を介してラフト構造を形成し、下流シグナリングを生じる。

40

【図2】化合物-安定化TNF トリマーと相互作用する2個の受容体二量体のみを有する結晶構造を示す。

【図3】TNF / TNF-R1シグナリングに対する2種類の化合物（A及びB）の効果を示す。両方の化合物が受容体二量体の形成に効果を及ぼさないが、変形したコンフォメーションを有するトリマーの形成を誘導及び/又は安定化する。第1の型の化合物（A）を有するトリマーは、第1及び第2の受容体に結合するが、第3の受容体に対しては親和性が減少している。したがって、トリマーは、2個の受容体のみと結合を形成する。第2の化合物（B）を有するトリマーは、第1の受容体に結合するが、第2及び第3の受容体に対しては親和性が減少している。それゆえ、トリマーは、1個の受容体のみと結合を形成する。トリマーあたりの受容体結合数の減少は、ラフト形成を妨害する。

50

【図4A】TNF受容体を介したTNFスーパーファミリーメンバーのトリマーのシグナリングを調節することができる、式(1)の化合物の構造を示す。

【図4B】TNF受容体を介したTNFスーパーファミリーメンバーのトリマーのシグナリングを調節することができる、式(2)の化合物の構造を示す。

【図4C】TNF受容体を介したTNFスーパーファミリーメンバーのトリマーのシグナリングを調節することができる、式(3)の化合物の構造を示す。

【図4D】TNF受容体を介したTNFスーパーファミリーメンバーのトリマーのシグナリングを調節することができる、式(4)の化合物の構造を示す。

【図4E】TNF受容体を介したTNFスーパーファミリーメンバーのトリマーのシグナリングを調節することができる、式(5)の化合物の構造を示す。

10

【図5】化合物(2)、TNF、及び(トリマー-化合物複合体に対して3.2倍過剰の)TNFR1を使用する、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)実験の結果を示す。低濃度の化合物(90 μ M)で、優勢ピークは、トリマー-化合物複合体あたり3個の受容体結合に相当する。このピークはわずかなショルダーを有し、トリマー-化合物複合体の一部が2個の受容体に結合していることを示す。化合物の濃度が増加し、TNFトリマーの濃度に対して過剰(690 μ M)で存在するとき、優勢ピークは、トリマー-化合物複合体あたり2個の受容体結合に相当する。しかしながら、ピークのわずかなショルダーは、一部のトリマーが3個全ての受容体に依然として結合していることを示す。図では、TNFのみを含む対照並びにTNF及びTNFR1を含む対照(化合物の非存在下での負の対照)の結果も示している。TNF及びTNFR1の負の対照では、トリマー-化合物複合体あたり3個の受容体が結合する。これは、TNFR1をTNFトリマーに対して3.2倍過剰でプレインキュベートすることにより達成される。さらなるデータを図6に示す。

20

【図6】図5に記載のSEC実験に対する対照を示す。TNFを様々な濃度のTNFR1(トリマーに対して1.2~5倍過剰の範囲の受容体)とインキュベートした。増大濃度のTNFR1を加えるとき、TNFを有する複合体の分子量は増加する(左にシフトする)。TNFトリマーの濃度に対して5倍過剰のTNFR1の添加は、3.2倍過剰で使用する場合を超えて複合体の分子量を増加させない。このことは、TNFが、3個のTNFR1対3個のTNFモノマー(トリマーあたり3個のTNFR1)のモル比で飽和することを示唆する。

30

【図7】化合物(5)、TNF、及び(トリマー-化合物複合体の濃度に対して3.5倍過剰の)TNFR1を使用する、SEC実験の結果を示す。結果は、対照についても示しており、第1の対照は、化合物の非存在下でのTNF及び受容体である。第2及び第3の対照も、化合物の非存在下でのTNF及び受容体であるが、第3の受容体結合部位、並びに第3及び第2の受容体結合部位で、相互作用を破壊するようにTNFが変異されている。TNF及び受容体である対照は、トリマーあたり3個の受容体結合を示すピークを示す。1個の受容体結合部位で変異を有する対照は、トリマーあたり2個の受容体結合に相当するピークを示し、2つの部位で変異を有する対照は、トリマーあたり1個の受容体結合に相当するピークを示す。化合物(5)の存在下で取得されるピークは、第2及び第3の対照の中間にあり、それゆえ、トリマー結合がそれぞれ2個の受容体と1個の受容体との混合であることを示す。

40

【図8A】図8Aは、化合物(1)の存在下におけるトリマー-化合物複合体あたり2個の受容体結合を明らかにする結晶解析実験の結果を示す。図8A~8Dは、同じ結晶構造の代替図である。

【図8B】図8Bは、化合物(1)の存在下におけるトリマー-化合物複合体あたり2個の受容体結合を明らかにする結晶解析実験の結果を示す。

【図8C】図8Cは、化合物(1)の存在下におけるトリマー-化合物複合体あたり2個の受容体結合を明らかにする結晶解析実験の結果を示す。

【図8D】図8Dは、化合物(1)の存在下におけるトリマー-化合物複合体あたり2個の受容体結合を明らかにする結晶解析実験の結果を示す。

50

【図 9】増大濃度の化合物(3)を用いた FRET 実験の結果を示す。ブロッキング抗体を用いて観察されるような完全阻害では、TNF への受容体の結合はなく、つまり FRET シグナルの完全阻害が生じる。この実験の場合、FRET シグナルは部分的に阻害されている。化合物の最高濃度で最大阻害は 29% であり、3 個の受容体のうち 1 個が、TNF トリマーへの結合から阻害されていることが示唆される。

【図 10】増大濃度の化合物(4)を用いた FRET 実験の結果を示す。再び、FRET シグナルは部分的に阻害されている。化合物の最高濃度で、最大阻害は 36% である。図 9 で記載される観察と同様に、3 個の受容体のうち 1 個が TNF トリマーへの結合から阻害されていることが示唆される。

【図 11】イオンモビリティ質量分析による受容体結合化学量論の解析を示す。対照(TNF 及び過剰の TNFR1 を含む)では、トリマー化合物複合体あたり平均して 3 個の受容体が結合していることが示される。対照的に、化合物(3)の存在下では、受容体化学量論が減少し、トリマー-化合物複合体あたり 2 個の受容体結合が優勢である。

【図 12】TNF 及び TNFR1 を用いた対照試料における解離定数の決定を示す。増大濃度の TNFR1 を TNF に加えるとき、様々な質量種が出現し、その後、最初に TNF に 1 個の TNFR1 が結合した種、続いて TNF に 2 個の TNFR1 が結合した種、最後に TNF に 3 個の TNFR1 が結合した種の出現が対応して消失する。

【図 13】TNF、TNFR1 及び化合物(3)を用いた試料における解離定数の決定を示す。この決定から、第 3 の受容体での TNFR1 と TNF との相互作用が顕著に劣ること(親和性が低いこと)(0.22 nM ~ 9.612 nM)が示される。

【発明を実施するための形態】

【0009】

配列表の説明

配列番号 1 及び 2 は、実施例で使用した配列を示す。

配列番号 3 は、C185__01974.0 の HCVR を示す。

配列番号 4 は、C185__01974.0 の LCVR を示す。

配列番号 5 は、C185__01974.0 の mIgG1 重鎖のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 は、C185__01974.0 の kappa 軽鎖のアミノ酸配列を示す。

配列番号 7 は、C185__01979.0 の HCVR を示す。

配列番号 8 は、C185__01979.0 の LCVR を示す。

配列番号 9 は、C185__01979.0 の mIgG1 重鎖のアミノ酸配列を示す。

配列番号 10 は、C185__01979.0 の kappa 軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【0010】

開示される方法及び生成物の異なる適用を、当業界における特定の必要性に応じて調整することができることが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は、本発明の特定の実施形態のみを記述するためのものであり、限定を意図するものではないことも理解されるべきである。

【0011】

さらに、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」及び「the」は、本文が明確に別途記述しない限り、複数の指示対象を含む。

【0012】

本明細書で引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は、上掲であっても、下掲であっても、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0013】

TNF スーパーファミリーメンバーのモジュレータを同定するための方法

本発明は、TNF スーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質に結合し、必要な TNF スーパーファミリー受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができる化合物を同定する方法(アッセイ)に関する。本発明の方法によって同定される化合物は、したがって、モジュレータとして公知でもある。

【0014】

10

20

30

40

50

以下にさらに記載されるように、本発明の方法によって同定される化合物は、一般的には、必要な受容体を介するTNFのシグナル伝達を防止する、又は減少させる（阻害する）。そのような化合物は、TNFシグナル伝達のアンタゴニストである。しかしながら、本発明の方法を使用して、必要な受容体を介するTNFのシグナル伝達を増加させる（増強する）アゴニスト化合物を同定することもできる。両方の場合、化合物は、TNFスーパーファミリーメンバーとその受容体との高親和性相互作用と競合する必要なく、TNFシグナル伝達を調節することができる。

【0015】

本発明の方法によって同定される化合物は、トリマー形態のTNFスーパーファミリーメンバーに結合する。化合物は、したがって、TNFスーパーファミリー受容体の天然のアゴニストに、すなわち、トリマー形態のTNFスーパーファミリーメンバーに結合するアロステリックなモジュレータである。TNFトリマーに結合することができる化合物をスクリーニングする方法は、以下でさらに考察される。

10

【0016】

現在公知の22種のTNFスーパーファミリーメンバーが存在し、それらは、TNF (TNFSF1A)、TNF (TNFSF1B)、CD40L (TNFSF5)、BAFF (TNFSF13B/BlyS)、APRIL (TNFSF13)、OX40L (TNFSF4)、RANKL (TNFSF11/TRANCE)、TWEAK (TNFSF12)、TRAIL (TNFSF10)、TL1A (TNFSF15)、LIGHT (TNFSF14)、リンホトキシン、リンホトキシン (TNFSF3)、4-1BBL (TNFSF9)、CD27L (TNFSF7)、CD30L (TNFSF8)、EDA (エクトジスプラシン)、EDA-A1 (エクトジスプラシンA1)、EDA-A2 (エクトジスプラシンA2)、FASL (TNFSF6)、NGF及びGITRL (TNFSF18)である。

20

【0017】

本発明の方法を使用して、22種の公知のTNFスーパーファミリーメンバーを含む、任意のTNFスーパーファミリーメンバーのシグナル伝達を調節する化合物を同定することができる。本発明の方法を使用して同定される化合物は、トリマー形態の1又は複数のTNFスーパーファミリーメンバーに特異的に結合することができる。本発明の方法によって同定される化合物は、ただ1つのTNFスーパーファミリーメンバーに特異的に結合することができるが、他の任意のTNFスーパーファミリーメンバーには結合しない。本発明の方法によって同定される化合物はまた、2つ、3つ、4つ、又は最大で全てのTNFスーパーファミリーメンバーに特異的に結合することもできる。

30

【0018】

特異的とは、化合物が、TNFスーパーファミリーの他のメンバーを含んでもよい、他の任意の分子との有意な交差反応性なしに、目的の分子又は複数の分子に、この場合、トリマー形態のTNFスーパーファミリーメンバーに結合することが理解される。交差反応性を、任意の好適な方法、例えば、表面プラズモン共鳴によって評価することができる。トリマー形態のTNFスーパーファミリーメンバーの化合物と、トリマー形態のその特定のTNFスーパーファミリーメンバー以外の分子との交差反応を、化合物がトリマー形態の目的のTNFスーパーファミリーメンバーに結合する強さの少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は100%の強さで他の分子に結合する場合、有意と考えることができる。トリマー形態のTNFスーパーファミリーメンバーに特異的である化合物は、それがトリマー形態のTNFスーパーファミリーメンバーに結合する強さの90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%又は20%未満で別の分子に結合することができる。好ましくは、化合物は、それがトリマー形態のTNFスーパーファミリーメンバーに結合する強さの20%未満、15%未満、10%未満又は5%未満、2%未満又は1%未満で他の分子に結合する。

40

50

【0019】

好ましくは、TNFスーパーファミリーメンバーは、TNF である。TNF は、可溶性 (TNF_s) と膜結合型 (TNF_m) の両方で存在する。本明細書でTNF を言う場合、これはTNF_s とTNF_m 型の両方を包含する。特に好ましくは、TNF は、TNF_s 型にある。

【0020】

現在公知の34種のTNF受容体が存在し、それらは、4-1BB (TNFRSF9 / CD137)、NGFR (TNFRSF16)、BAFFR (TNFRSF13C)、オステオプロテゲリン (TNFRSF11B)、BCMA (TNFRSF17)、OX40 (TNFRSF4)、CD27 (TNFRSF7)、RANK (TNFRSF11A)、CD30 (TNFRSF8)、RELT (TNFRSF19L)、CD40 (TNFRSF5)、TACI (TNFRSF13B)、DcR3 (TNFRSF6B)、TNFRH3 (TNFRSF26)、DcTRAILR1 (TNFRSF23)、DcTRAILR2 (TNFRSF22)、TNF-R1 (TNFRSF1A)、TNF-R2 (TNFRSF1B)、DR3 (TNFRSF25)、TRAILR1 (TNFRSF10A)、DR6 (TNFRSF21)、TRAILR2 (TNFRSF10B)、EDAR、TRAILR3 (TNFRSF10C)、Fas (TNFRSF6 / CD95)、TRAILR4 (TNFRSF10D)、GITR (TNFRSF18)、TROY (TNFRSF19)、HVEM (TNFRSF14)、TWEAKR (TNFRSF12A)、TRAMP (TNFRSF25)、リンホトキシンR (TNFRSF3) 及びXEDARである。

10

20

【0021】

必要な受容体は、特定のTNFスーパーファミリーメンバーと連動して作用する受容体である。特に、必要な受容体は、TNFスーパーファミリーメンバーによって活性化される受容体である。TNFスーパーファミリーのトリマーは受容体に結合し、受容体の活性化は下流のシグナル伝達をもたらす。TNFスーパーファミリーメンバーとその必要な受容体との組合せは、当業界で公知である。

【0022】

好ましくは、本発明の方法を使用して、TNF-R1 (TNFR1) 及びTNF-R2 (TNFR2) を介するシグナル伝達を調節する化合物を同定する。本明細書でTNF-Rを言う場合、これはTNF-R1とTNF-R2の細胞外ドメイン (ECD) などの、TNF-R1とTNF-R2の両方を包含する。より好ましくは、TNFスーパーファミリーメンバーはTNF であり、TNF受容体はTNF-R1又はTNF-R2である。さらにより好ましくは、TNFスーパーファミリーメンバーはTNF であり、TNF受容体はTNF-R1である。最も好ましくは、TNFスーパーファミリーメンバーはTNF_s であり、TNF受容体はTNF-R1である。

30

【0023】

本発明の方法を使用して、TNF-R1を介するTNFスーパーファミリーメンバーのシグナル伝達を特異的に調節することによって作用する化合物を同定することができる。特に、化合物は、TNF-R1を介するTNFスーパーファミリーメンバーのシグナル伝達を調節することによって作用することができるが、TNF-R2を介するTNFスーパーファミリーメンバーのシグナル伝達に対する効果はない。

40

【0024】

TNFスーパーファミリーメンバー及びその受容体を、精製するか、又は培養細胞、組織試料、体液若しくは培養培地中などの混合物中に提供することができる。

【0025】

本発明の方法では、必要な受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節する化合物が同定される。シグナル伝達の調節は、必要な受容体を介するシグナル伝達の増加 (増強) を指してもよい。シグナル伝達を増加させる化合物は、アゴニスト化合物である。しかしながら、本発明の方法を使用して同定される化合物は、一般的には、必要な受

50

容体を介するシグナル伝達を防止する、又は減少させる（阻害する）。そのような化合物は、アンタゴニストとして公知である。

【0026】

シグナル伝達のレベルを検出するために、TNFスーパーファミリー受容体シグナル伝達の下流の効果を測定するアッセイを実施することができる。例えば、L929マウス線維肉腫細胞殺傷アッセイを使用して、TNFによる細胞死の刺激を評価することができる。ヒト単球によるTNF誘導性IL-8産生の阻害を使用して、試験化合物がその受容体を介するTNFシグナル伝達を阻害するかどうかを評価することもできる。そのようなアッセイは、当業界で周知である。

【0027】

本発明の方法によって同定される化合物は、化合物-トリマー複合体の形態にあるTNFスーパーファミリーメンバーが受容体に結合する場合、TNF受容体を介するシグナル伝達を完全に、又は部分的に阻害することができる。化合物は、TNFスーパーファミリーメンバー受容体を介するシグナル伝達を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%減少させるように作用することができる。シグナル伝達のレベルの任意の変化を、アルカリホスファターゼ又はルシフェラーゼによるレポーター遺伝子活性、Cellomics Arrayscanなどの機械を使用するNF- κ B転座、下流エフェクターのリン酸化、シグナル伝達分子の動員、又は細胞死の測定を含む適切な技術によって測定することができる。

【0028】

本発明の方法によって同定される化合物は、化合物-トリマー複合体の形態にあるTNFスーパーファミリーメンバーが受容体に結合する場合、TNF受容体を介するシグナル伝達の下流の効果の少なくとも1つを調節することができる。そのような効果は、本明細書で考察され、TNFスーパーファミリー誘導性IL-8、IL17A/F、IL2及びVCAM産生、TNFスーパーファミリー誘導性NF- κ B活性化及び好中球動員を含む。TNFスーパーファミリーメンバーの下流の効果を測定するための標準的な技術が当業界で公知である。本発明の方法によって同定される化合物は、TNF受容体を介するシグナル伝達の下流の効果の少なくとも1、2、3、4、5、10又は最大で全部に調節することができる。

【0029】

本発明の方法によって同定される化合物の活性を、 IC_{50} 又は半数最大効果濃度（ EC_{50} ）値などの標準的な用語を使用して定量することができる。 IC_{50} 値は、特定の生物学的又は生化学的機能の50%の阻害に必要とされる化合物の濃度である。 EC_{50} 値は、その最大効果の50%に必要とされる化合物の濃度である。本発明の方法によって同定される化合物は、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、5nM、1nM、100pM以下の IC_{50} 又は EC_{50} 値を有してもよい。 IC_{50} 及び EC_{50} 値を、任意の適切な技術を使用して測定することができ、例えば、サイトカイン産生を、ELISAを使用して定量することができる。次いで、 IC_{50} 及び EC_{50} 値を、シグモイド型用量応答モデルとしても知られる標準的な4パラメータロジスティックモデルを使用して生成することができる。

【0030】

本発明では、化合物のライブラリーをスクリーニングして、TNFスーパーファミリーメンバーのモジュレータを同定することができる（すなわち、本明細書に開示される方法を使用する）。そのようなライブラリーは、典型的には、少なくとも260種の化合物を含む。好ましくは、そのようなライブラリーは、少なくとも300種、少なくとも500種又はさらには少なくとも1000種の化合物を含む。

【0031】

本発明の方法では、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数を決定して、TNFシグナル伝達を調節することができる化合物を同定する。全ての化合物の非存

10

20

30

40

50

在下で、受容体がTNFモノマーと比較して同等の、又は過剰の濃度で存在する場合（1：1（受容体：モノマー）より高い；3：1（受容体：トリマー）より高いモル比）、典型的には、TNFトリマーあたり3個の受容体が結合する。次いで、これらのトリマー及び受容体複合体は、受容体ダイマーの形成によってラフトを形成する。ラフトは、下流のシグナル伝達を担う。

【0032】

これは、TNFトリマーと受容体の相互作用、並びにTNF及びTNF-R1シグナル伝達に關与するラフトの形成を示す図1に例示される。図面に示されるように、TNFトリマーは、約93 pMの親和性（ K_D ）で第1及び第2の必要な受容体に結合する。次いで、トリマーは、約1 μ Mの K_D で第3及び最後の受容体に結合する。

10

【0033】

本発明の方法を使用して同定される化合物は、TNFトリマー内のコンフォメーション変化を誘導する、及び/又は安定化する。これらのトリマーは、受容体に対する、特に、親和性が減少している場合、第2及び第3の受容体に対する変化した親和性を有する。この減少した親和性は、トリマー-化合物複合体あたりに結合する受容体数の減少をもたらす。例えば、図2に示されるように、トリマー-化合物複合体あたり、2個のみの受容体ダイマーが結合することができる（通常の条件下で結合する3個の受容体の代わりに）。

【0034】

図3は、TNF / TNF-R1シグナル伝達に対する2つの型の化合物の効果を示す。両化合物とも、受容体ダイマーの形成に対する効果はないが、歪曲したコンフォメーションを有するトリマーの形成を誘導する、及び/又は安定化する。第1の型の化合物を有するトリマーは、第1及び第2の受容体に結合するが、第3の受容体に対する親和性が減少している。したがって、トリマーは、結合した2個のみの受容体と共に形成する。第2の化合物を有するトリマーは、第1の受容体に結合するが、第2及び第3の受容体に対する親和性が減少している。したがって、トリマーは、結合した1個のみの受容体と共に形成する。両方の型の化合物は、したがって、トリマーあたりに結合する受容体の数の減少のため、シグナル伝達ラフトの形成を阻害する。

20

【0035】

これを考慮して、本発明の方法は、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数を決定して、TNFシグナル伝達を調節する化合物を同定することを含む。用語「平均」は、トリマー/受容体の混合集団がほぼ確実に試料中に存在するという事実を反映する。例えば、いくつかの化合物が受容体3個に対するトリマーの親和性を減少させるとき、いくつかのトリマーは化合物の存在下で3個全部の受容体に依然として結合することができるが、大部分のトリマーは2個の受容体のみが結合している。

30

【0036】

用語「平均」とは、最頻値、すなわち、試料中に最も頻繁に存在するトリマー-化合物複合体あたりに結合する受容体の数を指してもよい。最頻値を、実験結果から視覚的に決定することができる。これは、以下の実施例のセクションに例示される。

【0037】

また、実験データを分解して、3、2、1又は0個の受容体が結合した試料中のトリマーの割合（パーセンテージ）の定量的測定を同定することもできる。そのような方法は、当業界で日常的である。例えば、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、それぞれ、異なる数の受容体が結合したトリマーに対応する、異なる溶出容量でピークを分解することができる。次いで、ピーク下面積を算出し、その面積を使用して、3、2、1又は0個の受容体に結合する試料中のトリマーの割合（パーセンテージ）を決定することができる。次いで、最頻平均は、最も高いパーセンテージで存在するトリマーあたりに結合する受容体の数を指す。

40

【0038】

用語「平均」は、平均値を指してもよい。

【0039】

50

最頻値と平均値の両方を例示するために、方法（以下に記載されるものなど）が試料中に存在するトリマーの5%に1個の受容体が結合することを同定する場合、75%は2個の受容体が結合しており、20%は3個の受容体が結合しており、最頻値はトリマーあたりに結合した2個の受容体である。平均値は、トリマーあたりに結合した2.15個の受容体である（ $(5 \times 1 + 75 \times 2 + 20 \times 3) / 100$ ）。

【0040】

平均値をこの方法で決定する場合、0~0.4の結果は、トリマーあたり平均で0個の受容体が結合したことを示すと取られ、0.5~1.4の結果は、トリマーあたり平均で1個の受容体が結合することを示すと取られ、1.5~2.4の結果は、トリマーあたり平均で2個の受容体が結合することを示すと取られ、2.5より高い結果は、トリマーあたり平均で3個の受容体が結合することを示すと取られる。

10

【0041】

本発明の方法では、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数は、典型的には、対照と比較して決定される。対照試料は、試験化合物を含む試料と同じ方法で処理される。特に、対照試料は、同じ試薬、トリマー及び受容体の濃度などの、試験化合物を含む試料と同じ実験条件にかけられる。さらに、対照に関するトリマーあたりに結合した受容体の平均数は、試験化合物に関するものと同じ実験方法を使用して決定される。

【0042】

トリマーあたりに結合した受容体の平均数は、通常、試験試料及び対照について同じ時間で決定される。換言すれば、実験は同時に実行される。しかしながら、対照におけるトリマーあたりに結合した受容体の平均数に関する値を、試験試料に対する実験を実行する前に決定してもよい。そのような値を、例えば、コンピュータ上に記録することができる。

20

【0043】

結果間の有効な比較を可能にするために、対照に関するトリマーあたりに結合した受容体の平均数は、試験試料に関するものと同じ方法で算出される（すなわち、上記で考察された最頻値又は平均値）。

【0044】

対照試料は、化合物の非存在下でTNFスーパーファミリーのトリマーと必要な受容体とを含んでもよい（陰性対照）。換言すれば、対照試料は、試験化合物が存在しないことを除いて、試験化合物試料と同一である。TNFスーパーファミリーメンバーのトリマーと必要な受容体は、上記で考察されたもののいずれかであってよいが、対照及び試験試料中で同じである（また、同じ濃度で存在する）。

30

【0045】

好ましくは、対照試料が化合物の非存在下でTNFスーパーファミリーメンバーのトリマーと必要な受容体とを含む場合、対照と比較した試験試料中でのトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の低下/減少は、化合物が受容体を介するシグナル伝達を調節することができることを同定する。換言すれば、対照試料と比較して試験化合物を含む試料中で、トリマーあたり、平均でより少数の受容体が結合すると同定される場合、試験化合物は受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができると同定される。

40

【0046】

例えば、対照がトリマーあたりに結合した受容体が平均3個であると決定される場合の最頻値を使用して算出される場合、試験化合物は、トリマー-化合物複合体あたり、平均でより2個以下の受容体が結合すると決定される場合、シグナル伝達を調節できると同定することができる。化合物の非存在下で、TNFスーパーファミリーメンバーのトリマーと、必要な受容体とを含む陰性対照は、トリマーあたり平均3個の受容体に結合することがわかると予想される（受容体が、TNFモノマーと比較して同等の濃度で、又は過剰で；少なくとも1:1（受容体：モノマー）又は3:1（受容体：トリマー）のモル比で存在する場合）。それにも拘わらず、対照がトリマーあたり平均2個の受容体が

50

結合すると同定される場合、試験化合物は、トリマー - 化合物複合体あたり、平均で 1 又は 0 個の受容体が結合すると決定される場合、シグナル伝達を調節することができると同定される。最後に、対照が、トリマーあたり平均で 1 個の受容体が結合したと同定される場合、試験化合物は、トリマー - 化合物複合体あたり、平均で 0 個の受容体が結合すると決定される場合、シグナル伝達を調節することができると同定される。

【 0 0 4 7 】

上記で算出されたように、平均として平均値を使用する場合、同じ理由が適用される。

【 0 0 4 8 】

陰性対照と比較した、トリマーあたりに結合した受容体の平均数の減少を、単純に 3、2、1 又は 0 個の受容体に結合する試料中でのトリマーのパーセンテージに基づいて算出することもできる。この場合、対照試料と、3、2、1 又は 0 個の受容体が結合した試験化合物を含有する試料との両方においてトリマーのパーセンテージを同定することがまず必要である。次いで、化合物の存在がある特定の数の受容体が結合するトリマーのパーセンテージの変化をもたらす場合、試験化合物は、シグナル伝達を調節することができると同定される。そのような算出は、典型的には、3 個の受容体が結合する試料中のトリマーのパーセンテージに基づくものであり、3 個の受容体が結合したトリマーのパーセンテージの減少は、シグナル伝達を調節するアンタゴニスト化合物を示す（2、1 又は 0 個の受容体に結合するトリマーのパーセンテージは、同時に増加しなければならない）。

10

【 0 0 4 9 】

例示するために、受容体とトリマーのみを含む（化合物を含まない）陰性対照において、90%のトリマーが3個の受容体に結合することを見出し、10%のトリマーが2個の受容体に結合することを見出すことができる。次いで、化合物が3個の受容体に結合する90%未満のトリマーをもたらす場合、試験化合物を、シグナル伝達を調節することができると同定することができる。より低いパーセンテージのトリマーが3個の受容体に結合している場合、2、1 又は 0 個の受容体に結合するトリマーのパーセンテージは増加しているはずである。したがって、トリマー - 化合物複合体あたりに結合する受容体の平均数は、対照と比較して減少する。

20

【 0 0 5 0 】

好ましくは、試験化合物は、試験化合物試料中で、3 個の受容体が結合したトリマーのパーセンテージが、陰性対照試料（化合物の非存在下で TNF スーパーファミリーメンバーと受容体とを含む）中で 3 個の受容体が結合したトリマーのパーセンテージと比較して少なくとも 10% 減少する（すなわち、少なくとも 10% 低い）、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% 減少する場合、シグナル伝達を調節することができると同定される。

30

【 0 0 5 1 】

或いは、対照は、TNF スーパーファミリーメンバーのトリマー、必要な受容体、及び受容体を介するシグナル伝達を調節することが公知の化合物（いわゆる「陽性対照」）を含んでもよい。受容体を介するシグナル伝達を調節することが公知の化合物は、トリマーあたりに結合した受容体の平均数を 2、1 又は 0 に減少させる（トリマーが全ての化合物の非存在下で 3 個の受容体に結合する条件下で）ことが公知の任意の化合物であってもよい。そのような化合物を、本明細書に記載の方法を使用して同定することができる。トリマーあたりの受容体の平均数を 2 に減少させることが公知の化合物の例は、化合物（1）～（4）であり、トリマーあたりの受容体の平均数を 1 近くまで減少させることが公知の化合物の例は、化合物（5）である。陽性対照は、これらの例示的化合物のいずれか 1 つを含んでもよい。

40

【 0 0 5 2 】

上記のように、陽性対照試料は、試験化合物を含む試料と同じ方法で処理され、対照試料と試験化合物試料の両方について同じ実験条件、方法及び計算が使用される。トリマー - 化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数は、通常、試験化合物試料と対照につい

50

て同時に決定されるが、試験化合物試料に対する実験を行う前に決定することもできる。

【0053】

好ましくは、陽性対照試料がTNFスーパーファミリーメンバーのトリマー、必要な受容体、及び受容体を介するシグナル伝達を調節することができることが公知の化合物を含む場合、対照と比較した試験試料中のトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の同等の平均数、又は対照と比較した試験試料中のトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の減少は、化合物が受容体を介するシグナル伝達を調節することができることを同定する。換言すれば、試験化合物は、平均で、同一又はより少ない数の受容体が、陽性対照と比較して試験化合物を含む試料中でトリマーあたりに結合すると同定される場合、受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節できると同定される。

10

【0054】

例えば、陽性対照が、トリマーあたりに結合した平均2個の受容体を有すると決定される場合に最頻値(上記)を使用して算出される場合、試験化合物は、トリマー-化合物複合体あたり、平均で2個以下の受容体(2個の受容体、1個の受容体又は0個の受容体)が結合すると決定される場合、シグナル伝達を調節できると同定される。同様に、対照がトリマーあたりに平均1個の受容体が結合すると同定される場合、試験化合物は、トリマー-化合物複合体あたり、平均で1又は0個の受容体が結合すると決定される場合、シグナル伝達を調節できると同定される。対照がトリマーあたりに平均0個の受容体が結合したと同定される場合、試験化合物は、これもトリマー-化合物複合体あたり平均で0個の受容体が結合すると決定される場合、シグナル伝達を調節できると同定される。

20

【0055】

平均として平均値を使用する場合も同じ理由が適用される。

【0056】

再度、陽性対照と比較した、トリマーあたりに結合した受容体の同等の平均数、又はトリマーあたりに結合した受容体の平均数の減少を、3、2、1又は0個の受容体に結合する試料中のトリマーの割合(パーセンテージ)を使用して算出することもできる。上記のように、対照試料と、3、2、1又は0個の受容体が結合した試験化合物を含有する試料の両方においてトリマーのパーセンテージを同定することがまず必要である。次いで、化合物の存在が、対照と比較して望ましい数の受容体が結合した(又はより少ない数の受容体が結合した)トリマーの同等のパーセンテージ、又は増加した/より高いパーセンテージをもたらす場合、試験化合物はシグナル伝達を調節できると同定される。そのような算出を、2個以下の受容体が結合した、1個以下の受容体が結合した、又は0個の受容体が結合した試料中のトリマーのパーセンテージに焦点を合わせることができる。

30

【0057】

例示するために、陽性対照試料において、化合物は、3個の受容体に結合する30%のトリマー及び2個の受容体に結合する70%のトリマーをもたらすことができる。次いで、化合物が2個以下(2、1又は0個)の受容体に結合する少なくとも70%のトリマーをもたらす場合、試験化合物を、シグナル伝達を調節できると同定することができる。

40

【0058】

本文脈における「同等のパーセンテージ」とは、典型的には、互いに10%以下、好ましくは、5%以下にある値を指す。例えば、2個の受容体に結合する70%のトリマーをもたらす試験化合物は、75%のトリマーが2個の受容体に結合する対照と同等のパーセンテージの、2個の受容体に結合するトリマーをもたらすと見ることができる。

【0059】

対照と直接比較することなく、トリマー-化合物複合体あたりに結合する受容体の数の決定に単純に基づき、化合物を、シグナル伝達を調節できると同定することもできる。

50

【0060】

このシナリオでは、平均3個未満の受容体がトリマー-化合物複合体あたりに結合すると決定される場合、化合物を、受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができると同定することができる。トリマー-化合物複合体あたりに結合する受容体の平均数は、上記のように平均値又は最頻値であってもよい。好ましくは、化合物がトリマーあたりに結合する平均2個の受容体をもたらす場合、化合物は、受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができると同定される。より好ましくは、化合物がトリマーあたりに結合する平均1個の受容体をもたらす場合、化合物は、受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができると同定される。また、化合物がトリマーあたりに結合する平均0個の受容体をもたらす場合、化合物を、受容体を介するトリマータンパク質のシグナル伝達を調節することができると同定することもできる。そのような化合物の例は、以下でより詳細に考察される。

10

【0061】

トリマー-化合物複合体あたりに結合する受容体の平均数は、典型的には、ほぼ同等の濃度(1:1のモル比)の受容体とTNFモノマーで決定される。1:1比の受容体:モノマーは、3:1比の受容体:トリマーに一致する。

【0062】

受容体の濃度は、モノマーの濃度と比較してわずかに過剰であってもよい。実験は、好ましくは、約10:1(受容体:トリマー)までのモル比で行われる。実験を、約3:1~10:1(受容体:トリマー)の範囲内の任意のモル比で行ってもよい。好ましくは、アッセイは、約3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1又は10:1(受容体:トリマー)の比で行われる。いくつかの場合、アッセイは、複数の濃度の受容体:トリマー、例えば、約3:1、6:1及び10:1で行われる。これらの滴定は、実施例のセクションにより詳細に例示される。

20

【0063】

典型的には、トリマー-化合物複合体あたりに結合する受容体の平均数を決定するための実験は、化合物が、化合物によるトリマーの完全な占有を確保する化合物の濃度で存在する場合に実行される。以下で考察されるように、化合物によるトリマーの占有を、質量分析を使用して決定することができる。化合物は、トリマーの濃度と比較して等しい濃度で存在してもよい(1:1の比の化合物:トリマー; 1:3の比の化合物:TNFモノマー)。しかしながら、化合物は、典型的にはTNFトリマーの濃度に対して過剰に存在する。例えば、化合物は、トリマーの濃度に対して1.5倍~500倍過剰に存在してもよい。好ましくは、化合物は、トリマーの濃度に対して5倍~100倍過剰、より好ましくは、トリマーの濃度に対して10倍~50倍過剰に存在する。化合物は、TNFトリマーの濃度に対して少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍又は少なくとも500倍過剰で存在してもよい。

30

【0064】

以下の実施例に示されるように、様々な濃度の化合物を用いて実験を行うことができる。

40

【0065】

トリマーあたりに結合する受容体の平均数を、任意の好適な技術を使用して、例えば、イオン移動度質量分析、サイズ排除クロマトグラフィー、凝集アッセイ、Forster共鳴エネルギー移動及び/又は結晶解析を使用して決定することができる。これらの技術を、単独で、又は好ましくは、組み合わせて使用して、トリマーあたりに結合する受容体の平均数を決定することができる。例えば、前記技術のいずれか2、3、4又は5つを一緒に使用してもよい。

【0066】

イオン移動度質量分析(IMSM-MS)は、イオン移動度分光分析と質量分析とを組み

50

合わせて、試験試料中の成分を同定するものである。IMS - MSを行うため、及び得られたデータを分解するための方法は、当業界で周知であり、以下の実施例のセクションにさらに例示される。

【0067】

例示的手順では、試験化合物を、室温で一晩、TNFと共にインキュベートする。自然の質量スペクトルを最初に記録して、化合物が、化合物の添加の前にTNFを100%占有することを確保する。換言すれば、自然の質量スペクトルは、化合物がトリマーに結合していることを確保する。化合物は、典型的には、上記のように、トリマーの濃度に対して過剰に存在する。次いで、必要なTNF受容体を添加し、インキュベートした後、試料のイオン移動度質量スペクトルを収集する。

10

【0068】

イオン移動度質量分析アッセイを、受容体：トリマーの任意の好適な比で、典型的には、3：1～10：1のおよその比、例えば、3：1、6：1及び/又は10：1（受容体：トリマー）で行う。多くの場合、イオン移動度質量分析アッセイを、試験試料についていくつかの濃度比で行う。

【0069】

また、イオン移動度質量分析を使用して、3個の受容体の、TNFトリマーへの結合に関する親和性データを提供することもできる。これは、以下の実施例のセクションに例示される。

【0070】

TNFトリマーあたりに平均で結合する受容体の数を決定するために使用することができる別の技術は、サイズ排除クロマトグラフィーである。サイズ排除クロマトグラフィー法は当業界で周知であり、そのサイズに基づいて溶液中の成分を分離することを含む。溶液中のより小さい成分は、よりゆっくりと溶出し、より大きい成分と比較してより大きい溶出容量を必要とする。

20

【0071】

3個の受容体に結合するTNFトリマーは、2個のみの受容体に結合するトリマーよりも大きいであろう。3個の受容体に結合するトリマーは、したがって、2個の受容体又は1個の受容体に結合するトリマーと比較して小さい容量で溶出される。したがって、異なる溶出容量でのピークを使用して、トリマーあたりに結合した受容体の平均数を同定することができる。これは、以下の実施例のセクションにより詳細に例示される。

30

【0072】

例示的なサイズ排除クロマトグラフィー手順では、TNFトリマーを、過剰の化合物と共にインキュベートする。化合物によるTNFトリマーの占有を、上記のような、IMS - MSによって決定することができる。次いで、試料を、受容体と共にインキュベートし、サイズ排除HPLCによって分析する。

【0073】

典型的には、サイズ排除クロマトグラフィー実験を、3：1～10：1のおよその比、例えば、3：1、6：1及び/又は10：1の受容体：トリマーで行う。好ましくは、化合物を、様々な濃度比で試験する。

40

【0074】

2個の受容体が結合した、又は1個の受容体が結合したトリマーに関する移動（ピーク）位置を確立するための対照を、以下の実施例のセクションに例示する。これらの対照は、第3、又は第2及び第3の受容体の結合が損傷したTNF突然変異体を含む。

【0075】

TNFトリマーあたりに結合する受容体の平均数を決定するのに使用することができる別の技術は、凝集アッセイである。

【0076】

トリマーあたりに結合した受容体の平均数を決定するための別の好適なアッセイは、Förster共鳴エネルギー移動（FRET）である。FRETを使用して、2個のフル

50

オロフォア（ドナー及びアクセプター）が互いにごく接近しているかどうかを決定することができる。

【0077】

本発明のアッセイでは、受容体を、例えば、ドナーフルオロフォアでタグ付けしてもよい。次いで、トリマーを、例えば、アクセプターフルオロフォア（おそらくリンカーを介して）でタグ付けする。典型的には、実験は、1：1の比の受容体：モノマーで行われるが、受容体の滴定を実施してもよい。同様に、実験を、様々な濃度で存在する試験化合物を用いて実施することができる。これは、以下の実施例に例示される。

【0078】

最後に、結晶解析を使用して、トリマーあたりに結合する受容体の平均数を決定することができる。結晶解析技術は当業界で周知である。

10

【0079】

本発明の方法は全て、化合物が受容体を介するシグナル伝達を調節することができることを同定する出力を提供することを含む。出力は、例えば、実験室ノートにおける記録情報であってもよい。また、出力は、コンピュータ上の記録情報であってもよい。

【0080】

化合物及び複合体

本発明はまた、TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質に結合し、必要な受容体を介するTNFスーパーファミリーメンバーのシグナル伝達を調節することができる化合物にも関する。化合物は、対照と比較して、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の対応する平均数、又は平均数の変化をもたらす。そのような化合物を、上記の方法によって同定することができる。

20

【0081】

TNFスーパーファミリーメンバー及び必要な受容体は、上記のもののいずれかであってもよい。

【0082】

化合物を、質量分析などの、当業界で公知の日常的な方法を使用して、TNFトリマーへの結合について容易にスクリーニングすることができる。また、質量分析を使用して、試料中のTNFトリマー自体の存在を同定することもできる。

【0083】

質量分析法としては、例えば、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析（MALDI MS）、表面増強レーザー脱離/イオン化質量分析（SELDI MS）、飛行時間質量分析（TOF MS）及び液体クロマトグラフィー質量分析（LC MS）が挙げられる。

30

【0084】

化合物は、その化学式又は構造に関して限定されない。化合物は、典型的には1000 Da以下、好ましくは750 Da以下、より好ましくは600 Da以下の分子量を有する低分子実体（SME）である。化合物は、TNFスーパーファミリーメンバーのトリマー内に存在する中心空間の内部（すなわち、トリマーのコア）に結合してもよい。トリマーのコア内での化合物の結合を、日常的な方法を使用して、例えば、結晶解析を使用して検出することができる。化合物は、ベンゾイミダゾール部分又はそのイソスターを含んでもよい。

40

【0085】

化合物は、少なくとも1つのTNFスーパーファミリーメンバーに結合し、必要な受容体を介するTNFスーパーファミリーメンバーのシグナル伝達を調節する。シグナル伝達の調節は、本発明の方法の文脈で上記されている。1：1のモル比の受容体：モノマーで、又は過剰の受容体の存在下で、TNFトリマーは通常、平均3個の受容体に結合する。本発明の化合物は、対照と比較して、トリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の同等の平均数、又はトリマー-化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の変化をもたらすことによってシグナル伝達を調節する。

50

【0086】

上記のように、対照は、化合物の非存在下でTNFスーパーファミリーメンバーのトリマー及び受容体を含んでもよい（陰性対照）。TNFスーパーファミリーメンバーのトリマー及び受容体は、試験化合物と対照の両方について同じであり、試験化合物試料及び対照は同じ実験条件（例えば、試薬の濃度）及び方法にかけられる。

【0087】

対照は、試験化合物を含む試料と同時に実行してもよい。或いは、対照は、試験化合物試料の前に実行してもよい。

【0088】

対照が化合物の非存在下でTNFスーパーファミリーメンバーのトリマー及び受容体を含む場合、アッセイを等しい（1：1）モル比のTNFモノマー：受容体で実行する場合、又は受容体がモノマーの濃度と比較して過剰に存在する場合、トリマーあたり平均3個の受容体が結合すると予想される。アンタゴニスト化合物は、そのような条件下でトリマーあたりに結合する受容体の平均数の減少をもたらす。トリマーあたりに結合する受容体の平均数の減少を決定する方法は、上記で考察されている。

10

【0089】

或いは、対照は、TNFスーパーファミリーメンバーのトリマー、必要な受容体、及び受容体を介するトリマーのシグナル伝達を調節することが公知の化合物を含んでもよい（陽性対照）。再度、TNFスーパーファミリーのトリマー及び受容体は、試験化合物と対照の両方について同じであり、試験化合物試料及び対照は、同じ実験条件（例えば、試薬の濃度）及び方法にかけられる。典型的には、対照は、試験化合物と同時に実行される。しかしながら、対照はまた、試験化合物試料の前に実行してもよい。

20

【0090】

対照がTNFスーパーファミリーメンバーのトリマー、必要な受容体、及び受容体を介するトリマーのシグナル伝達を調節することが公知の化合物を含む場合、化合物は、それが対照と比較してトリマー - 化合物複合体あたりに結合した受容体の同等の平均数、又は対照と比較してトリマー - 化合物複合体あたりに結合した受容体の平均数の減少をもたらす場合、シグナル伝達を調節することができると同定される。この方法で化合物を同定する方法は、上記されている。

【0091】

拮抗化合物は、トリマー - 化合物複合体あたりに結合する平均3個未満の受容体をもたらす（化合物の非存在下で、トリマー - 化合物複合体あたり平均で3個の受容体が結合する条件下で）。好ましくは、そのような条件下で、試験化合物は、トリマー - 化合物複合体あたりに結合する平均2個の受容体をもたらす。そのような化合物の例としては、化合物（1）～（4）が挙げられる。別の試験化合物がシグナル伝達を調節することができるかどうかを評価する場合、これらの化合物を陽性対照化合物として使用することができる。

30

【0092】

より好ましくは、試験化合物は、トリマー - 化合物複合体あたりに結合する平均1個の受容体をもたらす。そのような化合物の例としては、トリマーあたりに結合する単一の受容体に対するシフトをもたらす化合物（5）が挙げられる。再度、別の試験化合物がシグナル伝達を調節することができるかどうかを評価する場合、これらの化合物を陽性対照化合物として使用することができる。

40

【0093】

試験化合物はまた、トリマー - 化合物複合体あたりに結合する平均0個の受容体をもたらしてもよい。

【0094】

本発明はまた、TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質と、化合物とを含む複合体に関する。TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質と、化合物は、上記のものいずれかであってもよい。

50

【0095】

トリマー - 化合物複合体を同定するための抗体

本発明者らは、本発明の化合物と、トリマーTNFスーパーファミリーメンバーとを含む複合体に選択的に結合する抗体を開発した。これらの抗体を使用して、TNFを阻害することができるさらなる化合物を同定することができる。

【0096】

特に、本発明者らは、本発明の化合物との複合体にあるヒトTNF に対して生じるCA185__01974及びCA185__01979と呼ばれる2つの抗体を同定した。CA185__01974の重鎖可変領域(HCVR)は配列番号3に示され、CA185__01974の軽鎖可変領域(LCVR)は配列番号4に示される。完全長IgG1重鎖は配列番号5(1974HC mIgG1フル)に示され、完全長軽鎖(1974 LCカッパフル)は配列番号6に示される。

10

【0097】

CA185__01979のHCVRは配列番号7に示され、CA185__01979のLCVRは配列番号8に示される。CA185__01979の完全長IgG1重鎖は配列番号9(1979 HC mIgG1フル)に示され、完全長軽鎖は配列番号10(1979 LCカッパフル)に示される。

【0098】

当業者であれば、上記のHCVR/LCVR又は完全長配列対を含む抗体を、標準的な技術を使用して容易に生成することができる。

20

【0099】

TNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質に結合し、受容体を介するシグナル伝達を調節することができる化合物を決定するための本発明の方法は、したがって、配列番号3/4又は7/8のHCVR/LCVR対を有する抗体がトリマー - 化合物複合体に結合するかどうかを同定することを含んでもよい。同様に、方法は、配列番号5/6又は9/10の配列対を有する抗体がトリマー - 化合物複合体に結合するかどうかを同定することを含んでもよい。本明細書に記載の他のアッセイに加えて、抗体アッセイを使用してもよい。

【0100】

本発明の抗体を、例えば、標準的なELISA又はウェスタンブロッティングにより、化合物 - トリマー複合体に対する結合について試験することができる。抗体の結合選択性を、例えば、フローサイトメトリーにより、抗体の、標的タンパク質を発現する細胞に対する結合をモニタリングすることによって決定することもできる。したがって、本発明のスクリーニング方法は、ELISA若しくはウェスタンブロットを実行することにより、又はフローサイトメトリーにより、化合物 - トリマー複合体に結合することができる抗体を同定するステップを含んでもよい。

30

【0101】

本明細書に記載の抗体は、少なくとも1つの化合物 - トリマー複合体、すなわち、化合物 - トリマー複合体中のエピトープを選択的(又は特異的)に認識する。抗体、又は他の化合物は、それが選択的であるが、他のタンパク質には実質的に結合しない、又は低い親和性で結合するタンパク質に対して優先的に、又は高い親和性で結合する場合、タンパク質「に選択的に結合する」又は「を選択的に認識する」。

40

【0102】

本発明の例では、化合物 - トリマー複合体は、典型的には、1 nM未満の親和性で配列番号3/4若しくは7/8のHCVR/LCVR対(又は配列番号5/6若しくは9/10の配列対)を有する抗体に結合することができる。換言すれば、本発明の方法は、配列番号3/4若しくは7/8のHCVR/LCVR対(又は配列番号5/6若しくは9/10の配列対)を有する抗体が1 nM未満のKD-abでトリマー - 化合物複合体に結合することを同定することによって、化合物がTNFスーパーファミリーメンバーであるトリマータンパク質に結合し、受容体を介するシグナル伝達を調節することができることを決

50

定することを含んでもよい。いくつかの例では、KD - a bは、500 pM未満、又は200 pM未満であってもよい。親和性を、表面プラズモン共鳴によって決定することができる。TNFは、典型的には、ヒトTNFである。

【0103】

同様に、本発明の複合体は、化合物 - トリマー複合体が、配列番号3 / 4若しくは7 / 8のHCVR / LCVR対（又は配列番号5 / 6若しくは9 / 10の配列対）を有する抗体に結合する、トリマーTNFスーパーファミリーメンバーと化合物との複合体であってもよい。再度、TNFは、典型的にはヒトTNFであり、結合親和性は、典型的には1 nM未満（又は500 pM / 200 pM未満）である。結合親和性は、典型的には、表面プラズモン共鳴によって決定される。

【0104】

治療指標

TNFは、TNFスーパーファミリーの典型的なメンバーである。TNFは、免疫調節及び炎症応答を媒介する多面的なサイトカインである。in vivoでは、TNFは細菌、寄生虫及びウイルス感染に対する応答に関与することも知られている。特に、TNFは、関節リウマチ（RA）、炎症性腸疾患（クローン病を含む）、乾癬、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、疼痛、てんかん、骨粗鬆症、喘息、敗血症、発熱、全身性エリテマトーデス（SLE）及び多発性硬化症（MS）並びにがんにおいて役割を有することが知られている。TNFはまた、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、虚血性脳卒中、免疫複合体媒介性糸球体腎炎、ループス腎炎（LN）、抗好中球細胞質抗体（ANCA - ）関連糸球体腎炎、微小変化型疾患、糖尿病性腎症（DN）、急性腎傷害（AKI）、閉塞性尿路疾患、腎同種移植拒絶、シスプラチン誘導性AKI及び閉塞性尿路疾患における役割を有することが知られている。

【0105】

TNFスーパーファミリーの他のメンバーは、自己免疫疾患及び免疫不全に関与することが公知である。特に、TNFスーパーファミリーのメンバーは、RA、SLE、がん、MS、喘息、鼻炎、骨粗鬆症及び多発性ミエローマ（MM）に関与することが公知である。TL1Aは、臓器移植片拒絶において役割を果たすことが公知である。

【0106】

本発明の方法を使用して同定される化合物、又はTNF - トリマー化合物複合体を、ヒト又は動物の身体の治療方法において使用することができる。化合物又は複合体を使用して、従来のTNFスーパーファミリーメンバーモジュレーターによって処置、防止又は改善することができる任意の状態を処置、防止又は改善することができる。化合物又は複合体を、単独で、又は従来のTNFスーパーファミリーメンバーモジュレーターと組み合わせて使用することができる。

【0107】

原理的には、TNFスーパーファミリーメンバーによるTNF受容体を介する病的シグナル伝達から、又はTNFスーパーファミリーメンバーによるTNF受容体を介するシグナル伝達の欠陥から、部分的又は全体的に生じる任意の状態を、本発明に従って処置、防止又は改善することができる。TNFスーパーファミリーメンバーによるTNF受容体を介する病的シグナル伝達は、正常な生理学的レベルのシグナル伝達を超えるTNF受容体を介するシグナル伝達の増加、最初は正常であったが、正常な生理学的シグナルに反応して停止することができないTNF受容体を介するシグナル伝達及び正常の生理学的規模範囲内にあるが、非生理的手段によって開始するTNF受容体を介するシグナル伝達を含む。好ましい実施形態では、本発明は、TNFによって媒介又は影響される状態の処置、防止又は改善に関する。

【0108】

TNFと相互作用する化合物は、したがって、様々なヒトの病気の処置及び/又は防止において有益である。これらのものとしては、自己免疫障害及び炎症障害；神経障害及び神経変性障害；疼痛障害及び侵害障害；並びに心血管障害が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0109】

炎症障害及び自己免疫障害としては、全身性自己免疫障害、自己免疫性内分泌障害及び臓器特異的自己免疫障害が挙げられる。全身性自己免疫障害としては、全身性エリテマトーデス（SLE）、乾癬、血管炎、多発性筋炎、強皮症、多発性硬化症、強直性脊椎炎、関節リウマチ及びシェーグレン症候群が挙げられる。自己免疫性内分泌障害としては、甲状腺炎が挙げられる。臓器特異的自己免疫障害としては、アジソン病、溶血性貧血又は悪性貧血、糸球体腎炎（グッドパスチャー症候群を含む）、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、インスリン依存性糖尿病、若年性糖尿病、ブドウ膜炎、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む）、天疱瘡、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肺炎、自己免疫性心臓炎、重症筋無力症、自然不妊症、骨粗鬆症、喘息及び筋ジストロフィー（デュシェンヌ型筋ジストロフィーを含む）が挙げられる。

10

【0110】

神経障害及び神経変性障害としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、脳卒中、筋萎縮性側索硬化症、脊髄損傷、頭部外傷、発作及びてんかんが挙げられる。

【0111】

心血管障害としては、血栓症、心臓肥大、高血圧、心臓の不規則収縮（例えば、心不全中の）、及び性的障害（勃起障害及び女性性的機能障害を含む）が挙げられる。

【0112】

特に、化合物又は複合体を使用して、炎症障害、CNS障害、免疫障害及び自己免疫障害、疼痛、骨粗鬆症、発熱及び臓器移植拒絶を処置又は防止することができる。好ましい実施形態では、化合物又は複合体を使用して、関節リウマチ、炎症性腸疾患（クローン病を含む）、乾癬、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん、喘息、敗血症、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、喘息、鼻炎、がん及び骨粗鬆症を処置又は防止することができる。別の好ましい実施形態では、化合物又は複合体を使用して、関節リウマチ（RA）、非特異的炎症性関節炎、浸食性骨疾患、軟骨炎、軟骨変性及び/又は破壊、若年性炎症性関節炎、ステイル病（若年及び/又は成人開始型）、若年性特発性関節炎、若年性特発性関節炎（少関節炎型と多関節炎型の両方）、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎、不確定大腸炎、回腸嚢炎を含む）、乾癬、乾癬性関節症、強直性脊椎炎、シェーグレン病、アルツハイマー病（AD）、ベーチェット病、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、虚血性脳卒中、疼痛、てんかん、骨粗鬆症、骨減少症、慢性疾患の貧血、悪液質、糖尿病、脂質異常症、代謝症候群、喘息、慢性閉塞性気道（又は肺）疾患、敗血症、発熱、呼吸窮迫症候群、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症（MS）、免疫複合体媒介性糸球体腎炎、ループス腎炎（LN）、抗好中球細胞質抗体（ANCA-）関連糸球体腎炎、微小変化型疾患、糖尿病性腎症（DN）、急性腎傷害（AKI）、閉塞性尿路疾患、腎同種移植拒絶、シスプラチン誘導性AKI及び閉塞性尿路疾患、眼疾患（糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、未熟児網膜症、加齢黄斑変性、黄斑浮腫、増殖性及び/又は非増殖性網膜症、新血管形成を含む角膜血管新生、網膜静脈閉塞、様々な形態のブドウ膜炎及び角膜炎を含む）、甲状腺炎、様々な形態の肝線維症、様々な形態の肺線維症を含む線維化障害、全身硬化症、強皮症、がん並びにがん関連合併症（骨格合併症、悪液質及び貧血を含む）を処置又は防止することができる。

20

30

40

【0113】

医薬組成物、用量及び用量レジメン

本発明の方法を使用して同定される化合物及び化合物-トリマー複合体は、典型的には、薬学的に許容される担体と一緒に、医薬組成物中に製剤化される。

【0114】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生理的に適合する任意且つ全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを含む。担体は、例えば、注射又は輸注による、非経口、例えば、静脈内、筋肉内、

50

皮内、眼内、腹腔内、皮下、脊髄又は他の非経口投与経路にとって好適であってよい。或いは、担体は、局所、表皮又は粘膜投与経路などの非非経口(non-parenteral)投与にとって好適であってよい。好ましい実施形態では、担体は、経口投与にとって好適である。投与経路に応じて、モジュレータを、酸の作用及び化合物を不活化し得る他の自然条件から化合物を保護するための材料中でコーティングすることができる。

【0115】

本発明の医薬組成物は、1又は複数の薬学的に許容される塩を含んでもよい。「薬学的に許容される塩」とは、親化合物の望ましい生物活性を保持し、いかなる望ましくない毒性効果も与えない塩を指す。そのような塩の例としては、酸付加塩及び塩基付加塩が挙げられる。

10

【0116】

好ましい薬学的に許容される担体は、水性担体又は希釈剤を含む。本発明の医薬組成物中で用いることができる好適な水性担体の例としては、水、緩衝化水及び塩水が挙げられる。他の担体の例としては、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、及びその好適な混合物、オリーブ油などの植物油、並びにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。

【0117】

治療組成物は、典型的には、製造及び保存の条件下で無菌性であり、安定でなければならない。組成物を、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は高い薬物濃度にとって好適な他の規則的構造として製剤化することができる。

20

【0118】

本発明の医薬組成物は、さらなる活性成分を含んでもよい。

【0119】

また、化合物又は複合体と、使用のための指示書とを含むキットも本発明の範囲内にある。キットは、上記で考察されたさらなる治療剤又は予防剤などの、1又は複数のさらなる試薬をさらに含有してもよい。

【0120】

化合物及び化合物-トリマー複合体又はその製剤若しくは組成物を、予防的及び/又は治療的処置のために投与することができる。

30

【0121】

治療的適用では、化合物及び化合物-トリマー複合体を、状態又は1若しくは複数のその症状を治癒させる、軽減する、又は部分的に停止させるのに十分な量で、上記の障害又は状態に既に罹患している対象に投与する。そのような治療的処置は、疾患症状の重症度の低下、又は無症状期間の頻度若しくは持続時間の増大をもたらし得る。これを達成するのに十分な量を、「治療有効量」と定義する。

【0122】

予防的適用では、製剤を、状態又は1若しくは複数のその症状のその後の効果を防止する、又は減少させるのに十分な量で、上記の障害又は状態のリスクがある対象に投与する。これを達成するのに十分な量を、「予防有効量」と定義する。それぞれの目的のための有効量は、疾患又は傷害の重症度並びに対象の体重及び全身状態に依存する。

40

【0123】

投与のための対象は、ヒト又は非ヒト動物であってもよい。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物及び非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、は虫類などを含む。ヒトに対する投与が好ましい。

【0124】

化合物又は化合物-トリマー複合体を、当業界で公知の1又は複数の様々な方法を使用して、1又は複数の投与経路により投与することができる。当業者であれば理解できるよ

50

うに、投与の経路及び／又は様式は、所望の結果に応じて変化する。化合物又は本発明の化合物 - トリマー複合体のための投与経路の例としては、例えば、注射又は輸注による、静脈内、筋肉内、皮内、眼内、腹腔内、皮下、脊髄又は他の非経口投与経路が挙げられる。本明細書で使用される語句「非経口投与」は、通常は注射による、腸内投与及び局所投与以外の投与様式を意味する。或いは、本発明の方法によって同定される化合物又は本発明の化合物 - トリマー複合体を、局所、表皮又は粘膜投与経路などの、非非経口経路により投与することができる。好ましい実施形態では、本発明の方法によって同定される化合物又は本発明の化合物 - トリマー複合体は、経口投与のためのものである。

【0125】

化合物又は化合物 - トリマー複合体の好適な用量を、技術のある医師によって決定することができる。本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の用量レベルは、患者にとって毒性的であることなく、特定の患者のための望ましい治療応答、組成、及び投与様式を達成するのに有効である活性成分の量を得るために変化し得る。選択される用量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物の活性、投与経路、投与の時間、用いられる特定の化合物の排出速度、処置の持続時間、用いられる特定の組成物と共に使用される他の薬物、化合物及び／又は材料、年齢、性別、体重、状態、処置される患者の全身の健康及び以前の病歴、並びに医学界で周知の因子などの、様々な薬物動態学的因子に依存する。

10

【0126】

好適な用量は、例えば、処置される患者の約 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $1000 \text{mg}/\text{kg}$ 体重、典型的には、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ 体重の範囲であってもよい。例えば、好適な用量は、1日当たり約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 体重又は1日当たり約 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 体重であってもよい。

20

【0127】

用量レジメンを、最適な望ましい応答（例えば、治療応答）を提供するように調整することができる。例えば、治療状況の緊急性によって示されるように、単回用量を投与してもよく、数回に分割された用量を経時的に投与してもよく、又は用量を比例的に減少若しくは増加させてもよい。本明細書で使用される用量単位形態とは、処置される対象にとって単一用量として適する物理的に個別の単位を指す；それぞれの単位は、必要とされる薬学的担体と関連する所望の治療効果をもたらすように算出される活性化合物の所定量を含有する。

30

【0128】

投与は、単一又は複数の用量にあってもよい。複数用量を、同じか、又は異なる経路により、同じか、又は異なる位置に投与することができる。或いは、用量は、持続放出製剤によるものであってもよく、その場合、低頻度の投与が必要である。用量及び頻度は、患者におけるアンタゴニストの半減期及び望ましい処置の持続時間に応じて変化してもよい。

【0129】

上記のように、化合物又は化合物 - トリマー複合体を、1又は複数の他の治療剤と共に同時投与することができる。例えば、他の薬剤は、鎮痛剤、麻酔剤、免疫抑制剤又は抗炎症剤であってもよい。

40

【0130】

2つ以上の薬剤の組合せ投与を、いくつかの異なる方法で達成することができる。両方も単一の組成物中で一緒に投与するか、又はそれらを組合せ治療の一部として別々の組成物中で投与してもよい。例えば、一方を、他方の前、後に、又はそれと同時に投与してもよい。

【0131】

以下の例は、本発明を例証するものである。

【実施例】

【0132】

(例1(A)) - 式(1)、(2)、(3)及び(4)の化合物の合成

50

化合物(1)の合成は、WO2013/186229(例490)に開示されている。
 化合物(2)の合成は、WO2013/186229(例2)に開示されている。
 化合物(3)の合成は、WO2014/009295(例4)に開示されている。
 化合物(4)の合成は、WO2013/186229(例89)に開示されている。

【0133】

(例1(B)) - 式(5)の化合物の合成

命名法

化合物は、ACD/Name Batch(Network)バージョン12.0又はAccelrys Draw4.0を補助に用いて命名した。

【0134】

略語

DCM:ジクロロメタン
 DMF:N,N-ジメチルホルムアミド
 DMSO:ジメチルスルホキシド
 Et2O:ジエチルエーテル
 THF:テトラヒドロフラン
 r.t.:室温
 br.:ブロード
 EtOAc:酢酸エチル
 MeOH:メタノール
 SiO₂:シリカ
 h:時間
 RT:保持時間
 MeCN:アセトニトリル
 M:質量

10

ブライン:飽和塩化ナトリウム水溶液

HPLC:高速液体クロマトグラフィー

LCMS:液体クロマトグラフィー質量分析

ES+:エレクトロスプレーポジティブイオン化

TEA:トリエチルアミン

TLC:薄層クロマトグラフィー

20

【0135】

分析条件

全てのNMRは、300MHz又は400MHzのいずれかで取得した。

【0136】

空気又は水分に敏感な試薬が関与する全ての反応は、乾燥溶媒及びガラス器具を使用して、窒素雰囲気下で行った。

30

【0137】

全ての化合物のLCMSデータは、下記の方法を使用して決定した。

【0138】

方法1:

Waters Acquity-SQD、Waters Acquity UPLC BEH C18、2.1×50mm、1.7μmカラム

移動相A:10mMのギ酸アンモニウム+0.1%アンモニア

移動相B:95%MeCN+5%H₂O+0.1%アンモニア

勾配プログラム(流量1.0mL/分、カラム温度40):

時間	A%	B%
0.00	95	5
0.50	95	5
1.75	5	95
2.00	5	95
2.25	95	5

40

【0139】

異なる解析条件が使用される場合に、LCMSデータについて異なる保持時間(RT)が取得されうることは、当業者にとって明らかである。

【0140】

旋光度は、Optical Activity PolAR 2001旋光計を使用

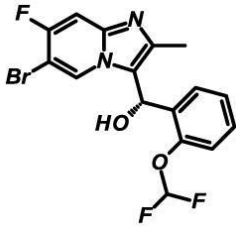
50

して測定した。

【0141】

中間体 1

【化1】



10

(6-ブロモ-7-フルオロ-2-メチルイミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル)
[2-(ジフルオロメトキシ)フェニル]-メタノール-エナンチオマー A

ラセミ体の標題化合物を、特許出願 W O 2 0 1 4 / 0 0 9 2 9 5 に記載の以下の手順に従って調製した。そのように調製したラセミ体混合物を、以下に詳述するキラルクロマトグラフィーにより、エナンチオマー成分に分離した：

【0142】

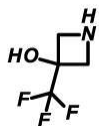
ラセミ体(6-ブロモ-7-フルオロ-2-メチルイミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル)[2-(ジフルオロメトキシ)フェニル]-メタノールを、Chiralpak ADでLC条件(100*500mm*mm、流量300mL/分、30、2-PrOH/ヘプタン 1/9、7.5g/Lの濃度で230mLの溶液を注入)下で精製することによって、標題化合物を単離した。第1の溶出エナンチオマー(RT27分)を収集し、画分を蒸発させてエナンチオマーAを得た。[] - 12.8°。第2の溶出エナンチオマー(RT50分)を収集し、画分を蒸発させてエナンチオマーBを得た。[] + 12.7°

20

【0143】

中間体 2

【化2】



30

【0144】

3-(トリフルオロメチル)アゼチジン-3-オール

氷/ブライン浴で約 - 5 に冷却した 1-boc-3-アゼチジノン(11.3g、58.4mmol)及び(トリフルオロメチル)トリメチルシラン(9.22g、64.3mmol)のTHF溶液(100mL)に、フッ化セシウム(9.77g、64.3mmol)を少しずつ加えた。得られた混合物を室温で攪拌して、4時間後、TLC解析により、出発物質の完全消費とより極性の小さな成分とが示された。反応を飽和塩化アンモニウム水溶液(100mL)の添加によりクエンチし、水相をEtOAc(3*100mL)で抽出した。有機相を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、揮発性物質を真空中で除去し、粗油状物を得た。そのように得られた油状物をDCM(100mL)に溶解し、トリフルオロ酢酸(40mL)を加えた。混合物を、周囲温度で4時間攪拌した。揮発物を真空中で除去し、残渣をトルエン(3*150mL)と共沸させて、標題化合物のトリフルオロ酢酸塩を褐色固体(15g)として得た。¹H NMR(400 MHz, d₆DMSO): / ppm 9.48 (s, 2 H), 7.95 (d, J 0.3 Hz, 1 H), 4.28 (d, J 13.1 Hz, 2 H), 4.06 (m, 2 H).

40

【0145】

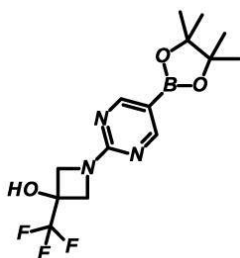
そのように得られた化合物を、次の反応で、さらに精製することなく使用した。

50

【 0 1 4 6 】

中間体 3

【 化 3 】



10

1 - [5 - (4 , 4 , 5 , 5 - テトラメチル - 1 , 3 , 2 - ジオキサボロラン - 2 - イル) ピリミジン - 2 - イル] - 3 - (トリフルオロメチル) アゼチジン - 3 - オール

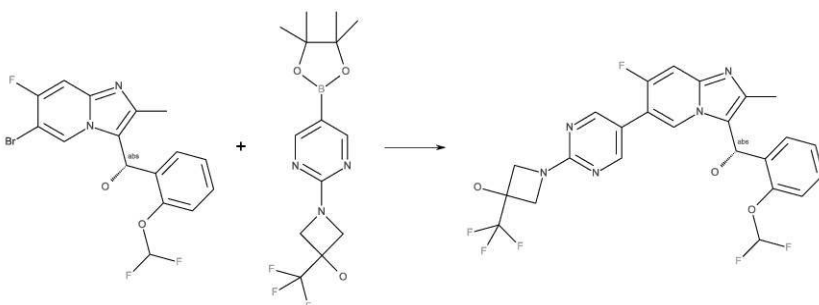
中間体 2 (1 2 g) のアセトニトリル (1 5 0 m L) 中溶液に、T E A (3 0 m L) 及び 2 - クロロ - 5 - (4 , 4 , 5 , 5 - テトラメチル - 1 , 3 , 2 - ジオキサボロラン - 2 - イル) ピリミジン (1 6 g) を加え、反応液を 6 5 ° で 1 8 時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、固体残渣を粉砕し、蒸留水で洗浄してベージュ色固体を得て、高真空下で乾燥させて標題化合物をベージュ色固体 (1 8 . 5 g) として得た。¹H NMR (300 MHz, d₆ DMSO): δ/ppm 8.53 (2H, s), 7.46 (1H, s), 4.33-4.31 (2H, m), 4.10-4.08 (2H, m), 1.29 (12H, s). LCMS (ES⁺) RT 1.14分, 346.0 (M+H)⁺.

20

【 0 1 4 7 】

化合物 (5)

【 化 4 】



30

1 - [5 - [3 - [(S) - [2 - (ジフルオロメトキシ) フェニル] - ヒドロキシ - メチル] - 7 - フルオロ - 2 - メチル - イミダゾ [1 , 2 - a] ピリジン - 6 - イル] ピリミジン - 2 - イル] - 3 - (トリフルオロメチル) アゼチジン - 3 - オール (エナンチオマー A)

中間体 1 (0 . 7 g , 2 m m o l) 、 中間体 3 (0 . 7 g , 2 m m o l) 、 1 , 1 ' - ビス (ジフェニルホスフィノ) フェロセン - パラジウム (I I) ジクロリドジクロロメタン錯体 (3 6 m g , 0 . 0 4 4 m m o l) 及び 2 M の炭酸ナトリウム (2 m L) のジオキササン (1 2 m L) 中混合物を脱気し、3 時間還流した。冷却した反応混合物を E t O A c で希釈し、ブラインで 2 回洗浄し、有機層を乾燥 (M g S O₄) し、真空中で濃縮した。残渣を、フラッシュカラムクロマトグラフィー (S i O₂ 、 0 ~ 9 0 % E t O A c / ヘプタン) に装填し、標題化合物をクリーム色固体 (5 0 0 m g , 5 0 %) として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : δ 8.51 (m , 3 H) , 7.95 (d d , J₁ 2.3 Hz, J₂ 6.7 Hz, 1 H) , 7.46 (m , 2 H) , 7.36 (m , 2 H) , 7.12 (m , 2 H) , 6.42 (d , J 4.4 Hz, 1 H) , 6.18 (d , J 4.4 Hz, 1 H) , 4.35 (m , 2 H) , 4.13 (d , J 10.2 Hz, 2 H) , 2.12 (s , 3 H) . LCMS (ES⁺) RT 1.34分, 540.0 (M+H)⁺. [α]_D + 39.7 ° .

40

【 0 1 4 8 】

50

(例2) - TNF / TNFR1 / 化合物複合体の解析的サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、様々な化合物の非存在下又は存在下における、TNF に結合するTNFR1受容体の数を決定した。化合物(2)は、下記プロトコル1に記載の条件下で試験した。化合物(5)は、プロトコル2に記載されるように試験した。

【0149】

プロトコル1

化合物(2)を、300 μMの融合TNF トリマーに、化合物の最終濃度範囲90 μM ~ 690 μMで、DMSO濃度は1.0%で一定に保ちながら、加えた。TNF 及び化合物の試料を、4 の温度で一晩インキュベートした。

10

【0150】

受容体を、最終濃度240 μM (トリマーに対して3.2倍過剰)で、上記のように調製した75 μMの化合物-トリマー複合体に加えた。DMSOの最終濃度は0.25%であった。混合物を22 で1時間インキュベートした。

【0151】

HPLCを使用する解析的サイズ排除の条件は以下の通りであった：注入体積：50 μl；TSK G3000SW LxI.D. 30 cm x 7.5 mmカラム、10 μmの粒径；10 mM HEPES、pH 7.5、150 mM NaClのバッファー。タンパク質について、トリマーヒトTNF の単一ポリペプチド鎖は、ヒトTNF 残基V77-L233、続けて、Ser-Gly-Serによって一緒に連結されたヒトTNF 残基D86-L233の2つのさらなるリピートで構成された(配列はUniProt P10375に基づく)。ヒトTNFR1 (V43-N184) (N54D、C182S)は、配列P19438 (UniProt)に基づいた。

20

【0152】

結果を図5に示す。図において、数字1~3は、TNF トリマーに結合する受容体の数を指す。この図に示されるように、増大濃度の化合物(2)の添加は、結合する受容体の数を、トリマーあたり平均3個からトリマーあたり平均2個へ減少させた。特に、低濃度の化合物(90 μM)では、トリマーあたり3個の受容体結合を示すピーク(トリマーあたり2個の受容体結合のわずかなショルダーを伴う)が観察される。過剰濃度の化合物(690 μM)では、優勢ピークは、トリマーあたり3個の受容体結合のピークに相当するわずかなショルダーを伴う、トリマーあたり2個の受容体結合に相当する。それゆえ、この濃度の化合物で、トリマー-化合物複合体の大部分は2個の受容体に結合している。

30

【0153】

TNF に結合する1、2及び3個の受容体の予測される移動を観察するための別個の実験では、様々な濃度のTNFR1 (TNF トリマーの濃度に対して1.2、2.2、3.2及び5倍過剰)をTNF に添加した。結果を図6に示す。この図に示されるように、受容体の濃度を増加させると、複合体の分子量が増加(左にシフト)し、トリマーあたりの受容体結合数が1から3へシフトすることが示唆される。TNFR1の濃度をさらに増加させても効果はないことから、最大で3個の受容体がTNF トリマーを占拠する。

40

【0154】

プロトコル2

化合物(5)を、20 μMのTNF トリマーに、最終濃度200 μM (トリマー：化合物の比1：10)で、DMSO濃度は2.0%で一定に保ちながら、加えた。TNF 及び化合物の試料を、4 の温度で一晩インキュベートした。受容体を最終濃度35 μMで、10 μMのトリマー-化合物複合体に加えた(トリマー-化合物複合体に対して3.5倍過剰の受容体)。DMSOの最終濃度は1.0%であった。混合物を22 で1時間インキュベートした。

【0155】

50

HPLCを使用する解析的サイズ排除の条件は、以下の通りであった：注入体積：50 μl；Superdex 200HR10/300、LxI.D. 30cm x 10mmカラム、13~15 μmの粒径；及び10mM HEPES、pH7.5、150mM NaClのバッファー。

【0156】

TNF は、ヒトTNF 残基V77-L233、続けて、Ser-Gly-Serによって一緒に連結されたヒトTNF 残基D86-L233の2つのさらなるリピートで構成される、トリマーヒトTNF の単一ポリペプチド鎖であった（配列はUniProt P10375に基づく）。ヒトTNFR1は、配列UniProt P19438に基づく（V43-N184）（N54D、C182S）であった。

10

【0157】

TNF に結合する1、2及び3個の受容体の予測される移動のためのマーカーを確立するために、1、2及び3個の受容体結合部位で相互作用を破壊するヒトTNF の点変異を、同じ最終濃度1.0%のDMSOを含むバッファー中の3.5x受容体（トリマーに対して3.5倍過剰の受容体）に加えた。

【0158】

図7は、化合物(5)トレースと、1、2及び3個の受容体に結合するように変異させたTNF を示す対照トレースとの重ね合わせを示す。化合物(2)と比較して、化合物(5)を含有するピークは、1個の受容体結合の近くへ移動している。

20

【0159】

(例3) - マウスTNF - TNFR1 - 化合物(1)の三元複合体を示す結晶解析

マウスTNF (VC6535、UniProt P06804)の可溶性形態を融合タンパク質として大腸菌(E. coli)で発現した。このタンパク質は、以下の最終配列を有する：

DKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNQLV
VPADGLYLVSQVLFKGGQGPCPDYVLLTHTVSRFAISYQEK
VNLLSAVKSPCKDTPEGAELKPWYEPILYLGGVFQLEKGD
QLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL (配列番号1)

30

【0160】

細胞を濃縮培地中37 で前培養し、0.1%のアラビノース添加で誘導し、25 で一晩、ベクターpEMB54で発現させた。このベクターは、切断可能なN末端His₆ Smt-タグを導入する。細胞を溶解し、Ni-NTAキレートクロマトグラフィーにより精製した。融合タンパク質を、イミダゾールを含有するバッファーを用いて溶出し、プロテアーゼの添加により切断した。最終切断TNF タンパク質を、減算型Niキレートクロマトグラフィー工程で精製して融合タグを除去し、さらに、サイズ排除クロマトグラフィーで精製して残余の不純物を除去した。最終TNF 産物を、20.5mg/mlに濃縮し、液体窒素中で急速凍結した。

【0161】

ヒトTNFR1 (VC5602、UniProt P19438)の細胞外ドメインを、バキュロウイルス感染昆虫細胞で分泌タンパク質として発現した。このタンパク質は、以下の最終配列を有する：

40

GSVCPQGKYIHPQDNSICCTKCHKGTLYLNDPCPGPGQD TD
CRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD
RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQE
KQNTVCTCHAGFFLRENECVSSSN (配列番号2)

【0162】

融合タンパク質プラスミドを、切断可能なN末端分泌シグナル及びHisタグ化融合タンパク質をコードするpEMB50発現ベクターにクローニングした。ウイルスを、バキュロウイルス発現系を使用して生成した。感染した昆虫細胞は、融合タンパク質を培地へ

50

分泌した。融合タンパク質をNi-NTAキレートクロマトグラフィーにより精製し、イミダゾール勾配を使用してNiカラムから溶出した。溶出したタンパク質をプロテアーゼで切断し、N末端His融合タグを除去した。続いて、切断TNFR1を減算型Niキレートクロマトグラフィー工程で精製し、サイズ排除クロマトグラフィーによりさらに精製した。最終TNFR産物を、8.8 mg/mlに濃縮し、液体窒素中で急速凍結した。

【0163】

精製マウスTNF (20.5 mg/ml、VC6535)を、6モル過剰の化合物(1)(DMSO中100 mM)と37 で3時間インキュベートし、その後、4 で一晩インキュベートした。翌日、ヒトTNFR1(8.8 mg/ml、VC5602)を、最終モル比が3個のTNF モノマー(1個のトリマーに相当):3個のTNFR1受容体となるように加えた。三元複合体(サイトカイン、リガンド、受容体)を1時間インキュベートしてから、10 mMのHEPES pH7.5、150 mMのNaClで予め平衡化したSuperdex 200サイズ排除カラム(23 ml)に負荷した。最終精製三元複合体を18.5 mg/mlに濃縮し、直ちに結晶化を試みた。

10

【0164】

三元複合体を、シッティングドロップ蒸気拡散法により、0.5 μlの複合体と、0.5 μlの800 mM酒石酸ナトリウムカリウム、0.5%PEG5000MME、100 mM Tris pH8.5を、100 μlの同じ結晶化溶液で混合することにより、結晶化した。結晶を、初期設定後ほぼ2カ月間、データ収集のために採取した。結晶を、パラフィン油に短時間浸漬し、液体窒素中で直接凍結し、2012年8月17日にArgonne Photon Source、beamline 21-IDFでデータ収集した。

20

【0165】

化合物(1)と複合体化したマウスTNF (VC6535)及びヒトTNFR(VC5602)の構造を、Phaserを使用し、複合体化ヒトTNF 構造に基づく導入モデルを用いて、分子置換により解明した。データをXDSで統合し、SCALAを使用して拡張した。初期構造決定及び精密化は、3.15 の分解能で単結晶からのデータを使用した。Coot (Emsley, P. and Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. Dec;60(Pt 12 Pt 1):2126-32. PMID: 15572765)及びRefmac (Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. May 1;53(Pt3):240-55. PMID: 15299926)を使用する反復マニュアルモデル構築を、R及びR_{free}がR=0.222、R_{free}=0.272に達するまで続けた。モデルの質を、Coot及びMolProbityを使用して検証した(Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall W.B., de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. 2003. Structure validation by Dalphi geometry: phi, psi and Cbeta deviation. Proteins. Feb 15;50(3):437-50. PMID: 12557186)。最終データ処理及び精密化統計を表1に列挙する。

30

【表 1】

表 1. データ収集及び精密化統計

データ収集	データセット 1	
結晶 ID	234879c07	
ビームライン	APS 21-IDF	
収集日	8/17/2012	
振動幅(°)	1.0	
フレーム	60	10
曝露(秒)	3	
距離(mm)	300	
波長(Å)	0.97872	
<hr/>		
データ処理	(外殻)	
空間群	$P4_12_12$	
単位格子(Å、°)	$a=b=133.577, c=141.445;$ $\alpha=\beta=\gamma=90$	
分解能(Å)	3.15	20
I/σ	8.3 (1.8)	
完全性(%)	99.9 (100)	
R _{pim}	0.095 (0.45)	
R _{merge} (%)	0.19 (0.90)	
反射(特有)	18,167 (1,314)	
多重度	4.8 (5.0)	
<hr/>		
精密化統計		
R _{work} /R _{free} 全体	22.2/27.2	
RMSD 結合(Å)	0.011	
RMSD 角度(°)	1.222	
<hr/>		
ラマチャンドラン外れ値(%)	0.9	
ラマチャンドラン有利値(%)	95.9	
Molprobitity スコア	1.91; 100 パーセンタイル* (N=2048, 3.15Å ± 0.25Å)	40
<hr/>		
査読:	デイビッド・フォックス(David Fox)	
*100 パーセンタイルが、匹敵する分解能の構造の中で最良であり、0 パーセンタイルは最低である。		

【0166】

結晶構造は、図 8 A ~ D に示されるように、トリマー - 化合物複合体あたり 2 個の受容体結合を示す。

【0167】

(例4) - TNF - TNFR1 TR - FRET

均一性時間分解蛍光共鳴エネルギー移動 (TR - FRET) アッセイを展開して、融合 TNF トリマーへの TNF 受容体 1 (TNFR1 細胞外ドメイン (ECD)) 結合の化合物媒介減少を測定した。

【0168】

テルビウム標識ストレプトアビジンは、ビオチン化融合 TNF トリマーとの複合体において、FRET ペアのドナー部分を形成した。Alexa Fluor 488 (AF488) コンジュゲート TNFR1 (ECD) を、FRET アクセプターとして使用した。

【表2】

表 2:FRET アッセイのためのタンパク質構築物及び標識

タンパク質構築物	標識
TNFR1(ECD)-6x リシン-ヒト 単鎖 Fc	アミン反応性 Alexa Fluor 488 5-TFP (Life technologies、A30005)
TNF α (融合トリマー)-AVI Tag	AVI Tag 上のビオチン分子 (Avidity、ビオチン-タンパク質リガーゼ、EC 6.3.4.15)
ストレプトアビジン	LanthaScreen アミン反応性テルビウムキレート (Life Technologies、PV3581)

10

20

20

【0169】

標識タンパク質をそれぞれ、バッファー溶液 (20 mM の Tris、150 mM の NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.2) 中 7.5 nM の最終アッセイ濃度 (TNF モノマー: 受容体の濃度比 1:1) に希釈した。3 倍希釈液を用いて化合物を 10 点滴定で試験した。最終アッセイにおける最大化合物濃度は 25 μ M であった。アッセイの最終 DMSO 濃度は 5 体積% であった。

【0170】

20 時間インキュベートした後、プレートを、LJL Analyst プレートリーダーを使用して読み取った。試料を 330 nm で励起し、蛍光読取りを、テルビウムドナー及び AF488 アクセプターの発光波長のそれぞれ 495 nm 及び 520 nm で行った。FRET 比は、アクセプター数をドナー数で割算し、10,000 を乗算することによって計算した。

30

【0171】

妨害分子の非存在下で、TNFR1 は、融合 TNF トリマーと複合体を形成し、FRET シグナルを生成する。妨害分子は、TNFR1 の結合を妨げ、続いて FRET シグナルを阻害する。

【0172】

FRET の阻害は完全又は部分的である場合があり、阻害によって、結合する TNFR1 (ECD) の減少があり、TNF - TNFR1 (ECD) 化学量論の減少が示される。抗体による完全阻害は、100% である。

40

【0173】

図 9 及び 10 は、化合物 (3) 及び化合物 (4) を用いて観察された部分的阻害を表す。化合物の最高濃度で、最大阻害は、それぞれ 29% 及び 36% である。この値は、可能性のある 3 個の受容体結合のうち 1 つの平均阻害 (33% と予測される) に相当する。

【0174】

(例5) - イオンモビリティ質量分析による TNF 受容体結合化学量論の解析

ヒト TNF を、使用前に脱塩し、20 mM 酢酸アンモニウム、pH 7.4 にバッファ

50

ー交換した。zebaスピンカラム(Thermo-Fisher、7kDa MWCO)と続くマイクロ透析(Thermo slide-alyzer mini透析ユニット、10kDa MWCO)との組み合わせにより、タンパク質の十分な脱塩とネイティブ質量分析による良好な分解能のシグナル生成を確実にした。TNF (20 μ M)を小分子TNF 阻害剤(化合物(3))、200 μ M、2%DMSOと1:1(v:v)で加えた。化合物を、20mM酢酸アンモニウム、pH7.4を使用して、10mMのDMSOストックから希釈した。TNF (20 μ M)をバッファー(20mM、酢酸アンモニウム、pH7.4、2%DMSO)と1:1(v:v)で加えて、DMSOのみの対照も調製した。両方の溶液を室温で一晩インキュベートし、その後、小分子含有試料を非共有結合性飛行時間型質量分析(Advion TriVersa NanoMateイオン源を備えたWaters LCT Premier)により解析し、TNF が十分に結合されたことを確認した。

10

【0175】

ヒトTNFR1(残基41~184、C182S、脱グリコシル化)を、ネイティブMS解析のために、zebaスピンカラム(Thermo-Fisher、7kDa MWCO)を使用する20mM酢酸アンモニウム、pH7.4へのバッファー交換により調製した。受容体を先に調製したTNF 試料のアリコートに1:1(v:v)で加え、5、10及び23 μ MのTNFRを含有する、実験あたり3つの試料を得た(それぞれの試料の最終TNF 濃度は5 μ Mであった)。試料を2時間インキュベートし、イオンモビリティ質量分析(Advion TriVersa NanoMateイオン源を備えたWaters Synapt G2 Q-TOF質量分析計)により解析した。

20

【0176】

1、2又は3個の受容体がTNF に結合するとき有意な質量差が得られることから、質量分析により、受容体化学量論を一意に決定することができる。しかしながら、使用する質量電荷比(m/z)スケールでの電荷状態の重複による問題があり、例えば、20電荷を有する解析物(MW20,000Da)から、16電荷を有する解析物(MW32,000)と同じm/z値2000が得られる。それゆえ「ドリフト時間」及び質量電荷比の両方の測定により追加で分離度が得られるイオンモビリティ質量分析が、これらの実験のために必要とされる。解析物のドリフト時間は、その質量、電荷、及びコンフォメーションに依存し、分析計内のガス充填モビリティセルを通過するために各解析物が要する時間の長さとして測定される。得られるm/z対ドリフト時間の二次元プロットにより、受容体化学量論の明確な割当てが可能になる。

30

【0177】

対照実験において、加えたモル過剰のTNFRがTNF の濃度の3倍より大きいとき、TNF トリマーあたり3個の受容体の結合が観察された。小分子TNF 阻害剤、例えば、化合物(3)の存在下で、受容体の化学量論は減少し、TNF トリマーあたりの2個の受容体結合が優勢となった(図11を参照されたい)。

【0178】

(例6) - TNF へのTNFR1親和性に対する化合物(3)の効果を測定する質量分析解析

40

化合物ストック:

2 μ lの10mM DMSOストック、プラス2 μ lのDMSOを、96 μ lの20mM酢酸アンモニウムバッファーに加え、100 μ lの200 μ M化合物(3)、4%DMSOを得た。

【0179】

タンパク質ストック:

TNFは、2xZebaカラムを使用して脱塩し、続いて20mM酢酸アンモニウムpH7.4内へ透析した。TNFRは、2xzebaカラムを使用して脱塩し、続いて20mM酢酸アンモニウムpH7.4内へ透析した。A280測定を行い、タンパク質試料の最終濃度を確認した。

50

【0180】

化合物をTNF (40 μ M)へ1:1 (v:v)で加え、室温で一晩インキュベートした(最終DMSO濃度=2%)。

【0181】

DMSOのみの対照試料も調製した。

【0182】

各試料について、5 μ LのTNFプラス化合物又はTNFプラスDMSOのみを、それぞれの指定された濃度で、5 μ LのTNFRに加えた。最終[TNF]は5 μ Mであった。

【0183】

試料を、解析前にTNFRと2時間インキュベートした。

【0184】

化合物(3)の存在下で、5000 nMのhTNF及び5000 nMのhTNFを含有する溶液を、1000、2000、4000、6000、8000、10000及び23000 nMの濃度範囲で、hTNFR1(残基41~184を含む細胞外ドメイン)で滴定した。

【0185】

イオンモビリティ質量スペクトル解析を、Advion Nanomate-Waters Synapt G2機器で実施した。以下の機器パラメータを利用した。

コーン=50 V

イオン源温度=20

トラップ/移動衝突エネルギー=オフ

トラップガスフロー=0.4 mL/分

ヘリウムセル=180 mL/分

IMS(N₂)=90 mL/分

トラップDCバイアス=40 V

モビリティトラッピング手動解除-利用不可

IMS波遅延=450 μ s

IMS波速度=750 m/s

IMS波高 40 V

バックグランド=6.21 mbar

トラップ 2.05 e-2 mbar

IMS 3.47 mbar

TOF 1.2 e-6 mbar

Quadプロファイル:

4000、5000、6000(ドウェル30、ランプ(ramp)30)

範囲 500~8000

【0186】

データは、driftscopeソフトウェアにおいてそれぞれの種の質量スペクトルを抽出することにより解析した。得られたスペクトルをスムージング(50/5)し、全ての電荷状態にわたるピーク高さを合計した。

【0187】

TNF種(受容体結合なし)、TNF+1R種(1個の受容体が結合)、TNF+2R種(2個の受容体が結合)及びTNF+3R種(3個の受容体が結合)に相当するピークのイオンカウントを測定した。正規化イオンカウントは、カウントしたイオンの合計数で割算したそれぞれの種のイオンの分率として計算した。これらの値を、平衡状態におけるそれぞれの種のモル分率と等価として使用した。2つの実験からのデータを下記表にまとめる。

10

20

30

40

【表 3】

表 3:

初期濃度		正規化イオンカウント			
hTNF α トリマー[nM]	hTNFR1 [nM]	TNF	TNF+1R	TNF+2R	TNF+3R
5000	1000	0.973	0.027	0.000	0.000
5000	2000	0.767	0.233	0.000	0.000
5000	4000	0.421	0.525	0.054	0.000
5000	6000	0.121	0.547	0.332	0.000
5000	8000	0.000	0.331	0.669	0.000
5000	10000	0.000	0.000	0.720	0.280
5000	23000	0.000	0.000	0.000	1.000

10

【表 4】

表 4:

初期濃度		正規化イオンカウント			
hTNF α トリマー[nM] + 化合物(3)	hTNFR1 [nM]	TNF	TNF+1R	TNF+2R	TNF+3R
5000	1000	0.869	0.131	0.000	0.000
5000	2000	0.789	0.211	0.000	0.000
5000	4000	0.396	0.558	0.046	0.000
5000	6000	0.113	0.665	0.222	0.000
5000	8000	0.034	0.490	0.476	0.000
5000	10000	0.000	0.050	0.950	0.000
5000	23000	0.000	0.000	0.713	0.287

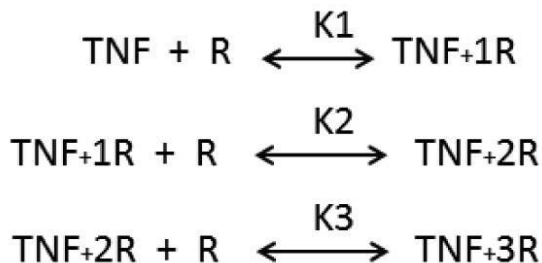
20

30

【0188】

これらのデータから平衡定数を誘導するために、平衡状態の系をトランスフォーメーションによって表した：

【数 1】



40

【0189】

ネイティブ質量分析データに最も良く一致する解離定数のセット K_1 、 K_2 及び K_3 を計算するために、TNF、TNF+1R、TNF+2R 及び TNF+3R 種についてこれらの種の測定されたモル分率に最も近いモル分率を生ずる K_1 、 K_2 、 K_3 の値を、関数の最小化によって得た：

50

【数 2】

誤差 ($K1$ 、 $K2$ 、 $K3$)

$$= \sum_{T0, Rmin}^{T0, Rmax} [(f_{TNF_{calc}} - f_{TNF_{obs}})^2 + (f_{TNF+1R_{calc}} - f_{TNF+1R_{obs}})^2 + (f_{TNF+2R_{calc}} - f_{TNF+2R_{obs}})^2 + (f_{TNF+3R_{calc}} - f_{TNF+3R_{obs}})^2]_{T0, R}^{1/2}$$

ここで $T0$ は、 TNF の初期量を表し、 $Rmin$ 、 R 、 $Rmax$ は、 $Rmin$ から開始して $Rmax$ で終了する、アッセイされる受容体 R の初期濃度を表す。分率 f_{obs} は、ネイティブ質量分析測定により平衡で観察される TNF 、 $TNF + 1R$ 、 $TNF + 2R$ 及び $TNF + 3R$ 種のモル分率 (例えば、 $f_{TNF_{obs}}$) である。 f_{calc} は、BioNetGen B N G L モデリングツール (Blinov, M. L., Faeder, J. R., Goldstein, B., and Hlavacek, W. S. (2004) BioNetGen: software for rule-based modeling of signal transduction based on the interactions of molecular domains. *Bioinformatics* 20, 3289-3291) を使用し、 $T0$ 、 $R0$ 並びに $K1$ 、 $K2$ 及び $K3$ の値を入力して、平衡方程式を解くことにより計算されるそれぞれの種についてのモル分率 (例えば、 $f_{TNF_{calc}}$) である。誤差関数は、SciPy / NumPy フレームワーク (<http://docs.scipy.org/doc/numpy/index.html>) に実装された `brute force` 最小化ユーティリティを使用して最小化した。全データ処理解析は、必要なときに BioNetGen ルーチンを呼び出す Python プログラミング言語 (<https://www.python.org/>) で実施した。

【0190】

データ解析後、3個の受容体結合事象に対応する3つの平衡定数 ($K1$ 、 $K2$ 及び $K3$) を、化合物 (3) あり及びなしで、 TNF と受容体との混合物について計算した。データは、平衡状態における全ての種のモル分率を「 Y 」軸にプロットし、 TNF の固定した初期濃度に加えた受容体の濃度を「 X 」軸にプロットすることにより視覚化した。記号は、ネイティブ質量分析実験で測定された種の観察されたモル分率を表し、トレースは、平衡定数 $K1$ 、 $K2$ 及び $K3$ から計算された予測濃度に相当する。これらのグラフを図 12 及び 13 に示す。

【表 5】

表 5:

試料	K1 [nM]	K2 [nM]	K3 [nM]
TNF + 受容体	0.01	0.02	0.22
TNF + 受容体 + 化合物(3)	0.04	0.19	9612

【0191】

(例 7) - Maら (2014) 及び Silvanら (2011) の化合物及び複合体は、本発明の化合物及び複合体と異なる特徴を有する

Ma et al. (2014) JBC 289:12457-12466, C87の12458頁に記載されているように、C87は、 TNF の外部表面との相互作用において、 $TNFR1$ のループ2 / ドメイン2由来の7アミノ酸ペプチドによって占められる空間に適応する分子を見つけることを試みるパーチャルスクリーニングを通じて発見された。MaらからのC87化合物、及び Silvan et al. (2011) ACS Chemical Biology 6:636-647からのBIO8898化合物を、本発明者によって試験した。

【0192】

知見の要約

Maらで記載されたC87についてのBiacore観察結果は再現することができな

った。

細胞におけるTNF特異的阻害の証拠は観察されなかった。

さらにC87は、ミリモルの親和性に感受性である質量分析で結合が観察されなかった。広範な結晶学的試みで、アポ-TNF（化合物なしのTNF）のみが製造された。

蛍光偏光（FP）アッセイにおいて、C87は、蛍光読出しを有する化合物の干渉レベルを超える有意な阻害を示さなかった。

TNFの熱融解温度の安定化を測定するThermofluorで、C87についての小さな安定化が示された。

要約すると、トリマーの中心にC87が結合している証拠は見つからなかった。圧倒的多数のデータが、TNFとの直接的相互作用がないことを示唆した。BIO8898もTNFに結合しないことが分かった。

10

【0193】

細胞-TNF誘導性HEK-NFκBレポーター遺伝子アッセイ

C87を、TNFと1時間プレインキュベートしてから、NFκBの制御下にSEAPで安定的にトランスフェクトしたHEK-293細胞に加えた。適切なカウンタースクリーンも、非TNF関連（オフターゲット）活性を検出するために試験した。アッセイを一晩インキュベートした後、阻害を、対照化合物による100%ブロッキングと比較して測定した。最大C87濃度は10,000nMであり、3倍段階希釈した。

【0194】

阻害効果は検出されず、オフターゲット活性に帰属させることはできなかった。

20

【0195】

Biacore

avi-タグリンカーを使用してTNFを固定化し、C87にチップを通過させた。一実験では、最高濃度の10μMからC87の用量応答を行った。結合は何ら観察されなかった。

【0196】

第2の実験では、チップを通過するC87の流量は減少した。小さなシフトが観察されたが、全体的な結合は無視できる程度であった。

【0197】

さらに記載のTNFへのC87の結合は、Y軸上のRU値に基づいた超化学量論である可能性が高かった。チップ上の標準TNF密度で、この値は、単純な1:1結合について、予測されるよりも30倍高い領域にあった。

30

【0198】

別の実験では、BIO8898を、Biacore4000機器のSPRにより、CD40Lの固定化可溶性形態及びTNFの可溶性形態に対して試験した。17μMの幾何平均IC50がCD40Lに対する結合について決定され、一方で、このアッセイにおいて、TNFに対する結合は100μMまでの濃度で検出されなかった。

【0199】

質量分析

400μMの濃度でC87のヒトTNF（20μM）への結合の証拠はなかった。より低い分子量（約473Da）種が、5%未満の占有率で結合しているようである。C87は、503Daの分子量を有する。400μMの濃度での占有率に基づいて、低分子量種の1mMを超える親和性が予測される。

40

【0200】

結晶学

全体的に、TNFとのC87の結晶化について、本出願に記載の化合物における通常的手段の試験条件を含め、多大な努力が注がれた。これには、様々リガンド濃度、様々なタンパク質濃度、及び様々な浸漬時間での多数の結晶化の試みの設定が含まれる。いくつかの結晶が観察され、解析によって、塩、つまり化合物を有しないTNFであることが分かった。

50

【 0 2 0 1 】

蛍光偏光 (F P)

C 8 7 を、蛍光化合物 (プローブ) に対するアッセイの前に 1 時間、 T N F と共にブレインキュベートした。蛍光化合物との直接的 (同じ部位で結合する) 又は間接的 (T N F を妨害する) のいずれかの競合が、 F P の減少により検出される。

【 0 2 0 2 】

阻害曲線の外挿により、約 1 0 0 μ M の I C 5 0 が得られた。しかしながら、最高濃度の阻害剤で蛍光消光が観察され、差し引くと、このアッセイで C 8 7 の阻害は無視できる程度となった。

【 0 2 0 3 】

T h e r m o f l u o r

T h e r m o f l u o r は、タンパク質を安定化又は妨害のいずれかをする化合物による T N F の融解温度 (T m) の変化を測定する。 3 . 8 での安定化効果が 5 0 0 μ M の濃度の C 8 7 で観察されることから、非特異的でありうる弱い結合の可能性が示唆される。

【 0 2 0 4 】

Sequence listing

SEQ ID NO: 1

DKPVAHVAVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNLVVPADGLYLVYSQVLFKGGQCPDYVLLTHTVSRFAISYQEK
VNLLSAVKSPCKDTPEGAELKPWYEP I YLGGVFQLEKGDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL

SEQ ID NO: 2

GSVCPQGKYIHPQDNSICCTKCHKGTLYNDCPPGQDQDTCRECEGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD
RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSSSN

SEQ ID NO: 3 (HCVR of 1974)

DVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSAYYMAWVRQAPTKGLEWVASINYDGANTFYRDSVKGRFTVSRDNARSSLY
LQMDSLRSEDATATYYCTTEAYGYNSNWFYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 4 (LCVR of 1974)

DIQMTQSPASLPASPEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPKGKSPQLLIYGATSLADGVPSRFSASRSGTQYSLKISRLQV
EDFGIFYCLQGQSTPYTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 5 (1974 HC mlgG1 full)

DVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSAYYMAWVRQAPTKGLEWVASINYDGANTFYRDSVKGRFTVSRDNARSSLY
LQMDSLRSEDATATYYCTTEAYGYNSNWFYWGQGLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTV
TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPVPSSTWVPSSTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI
FPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR
VNSAAFPAPIEKTSKTKGRPKAPQVYTPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMDDTDG
SYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 6 (1974 LC kappa full)

DIQMTQSPASLPASPEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPGKSPQLLIYGATSLADGVPSRFSASRSRGTQYSLKISRLQV
EDFGIFYCLQQQSTPYTFGAGTKLELKRDAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL
NSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCETHKSTSPIVKSFNRNEC

SEQ ID NO: 7 (HCVR of 1979)

10

EVHLLVESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITNSYWDWIRKFPNGKMEWMGYINYSGSTGYNPSLKSRSISISRDTSNNQFFL
QLNSITTEDTATYYCARGTYGYNAYHFDYWGRGVMVTVSS

SEQ ID NO: 8 (LCVR of 1979)

DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPGKSPHLLIYGTTSLADGVPSRFSGSRSGTQYSLKISGLQV
ADIGIYVCLQAYSTPFTFGSGTKLEIK

20

SEQ ID NO: 9 (1979 HC mlgG1 full)

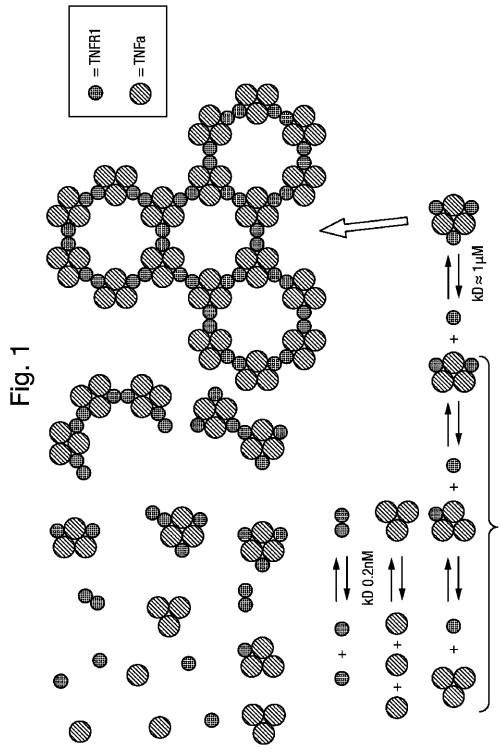
EVHLLVESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITNSYWDWIRKFPNGKMEWMGYINYSGSTGYNPSLKSRSISISRDTSNNQFFL
QLNSITTEDTATYYCARGTYGYNAYHFDYWGRGVMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT
WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI
FPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV
NSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGS
YFVYSKLVNQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

30

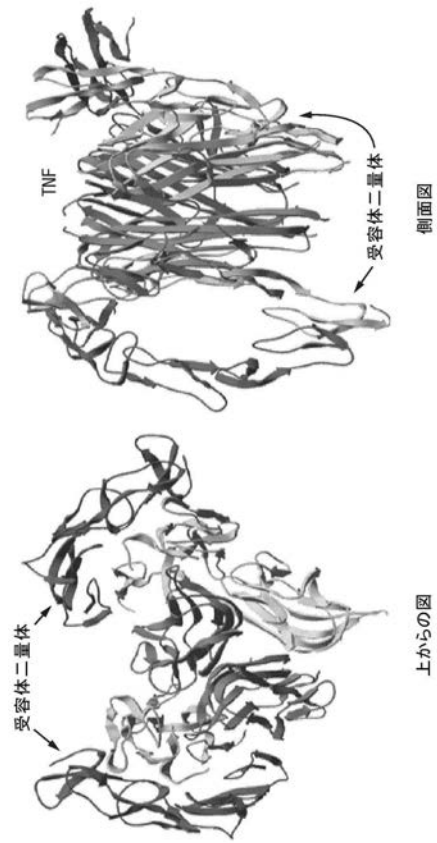
SEQ ID NO: 10 (1979 LC Kappa full)

DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPGKSPHLLIYGTTSLADGVPSRFSGSRSGTQYSLKISGLQV
ADIGIYVCLQAYSTPFTFGSGTKLEIKRDAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL
NSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCETHKSTSPIVKSFNRNEC

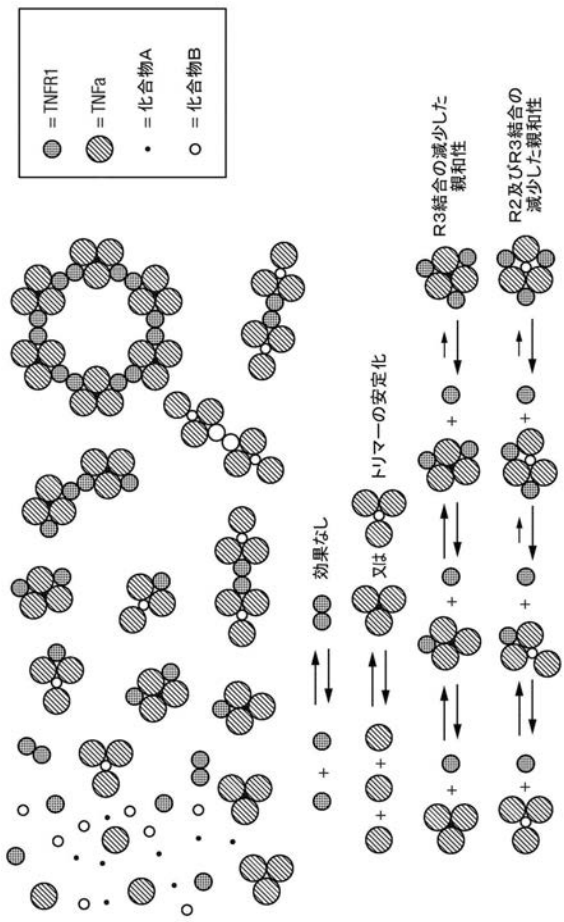
【 図 1 】



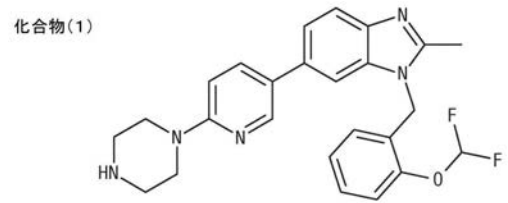
【 図 2 】



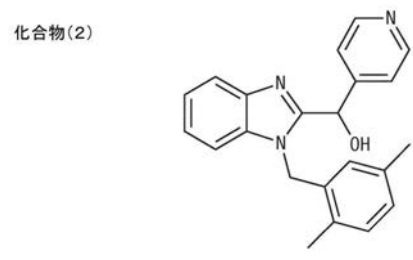
【 図 3 】



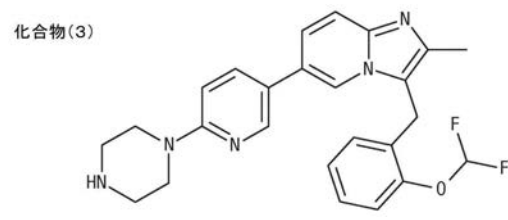
【 図 4 A 】



【 図 4 B 】

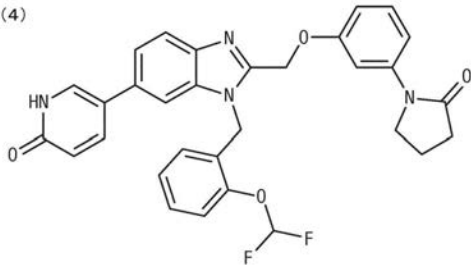


【 図 4 C 】



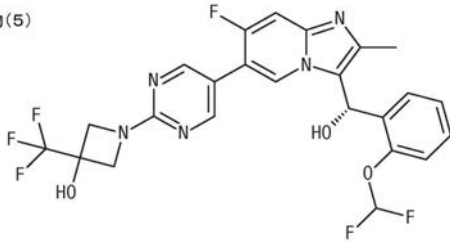
【 図 4 D 】

化合物(4)

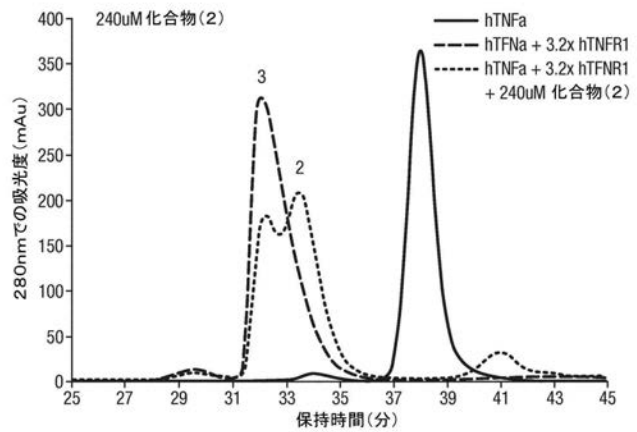
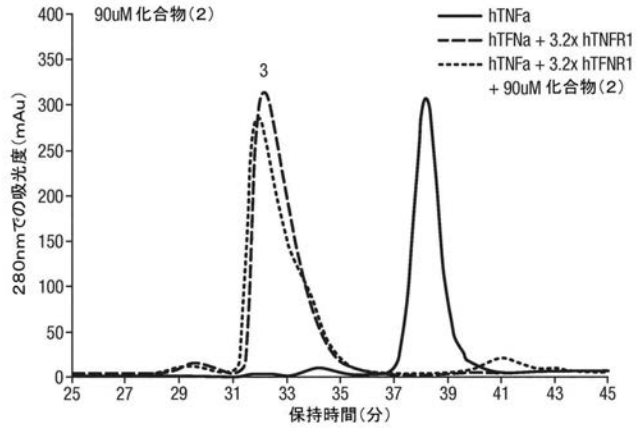


【 図 4 E 】

化合物(5)

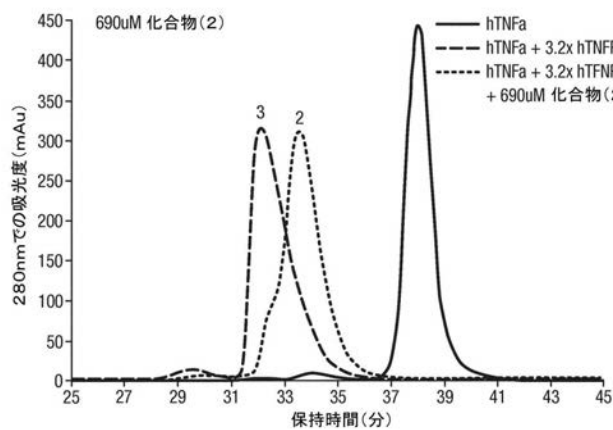
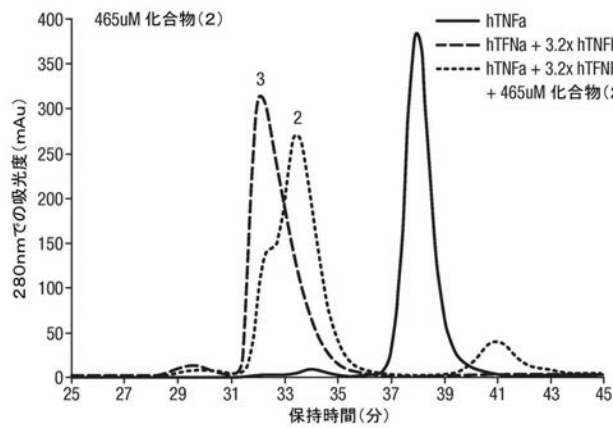


【 図 5 - 1 】

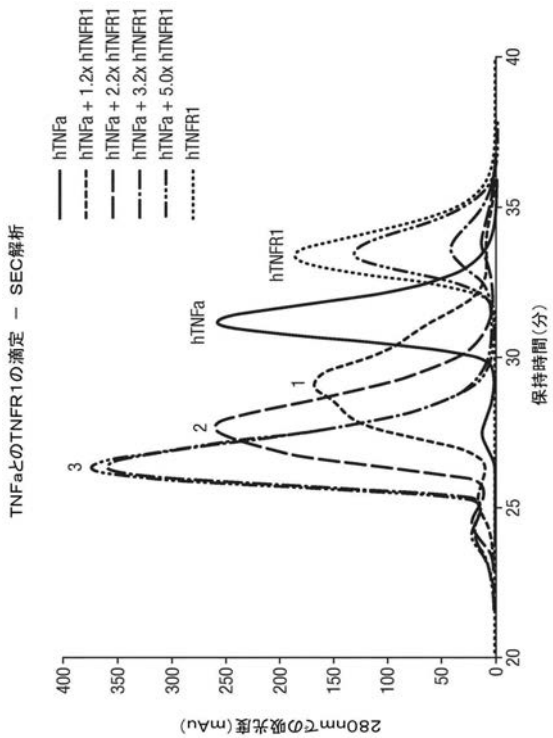


【 図 5 - 2 】

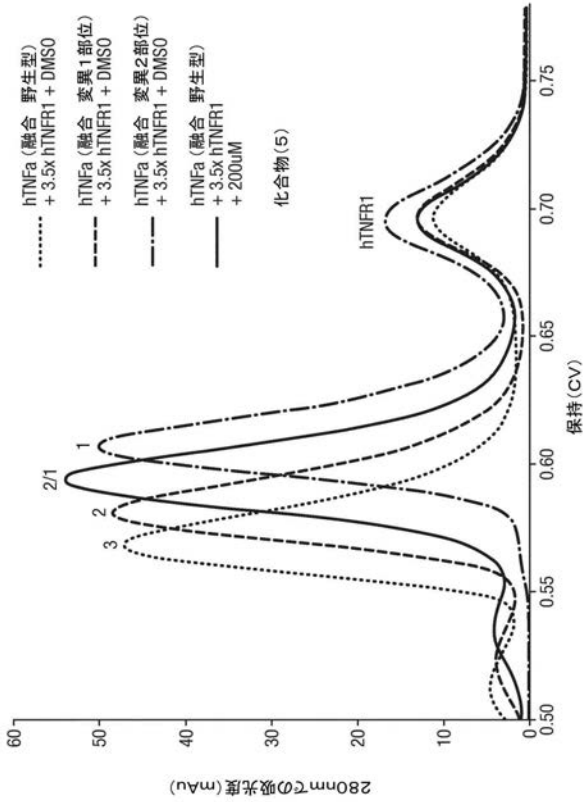
(続き)



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 A 】

Fig. 8A



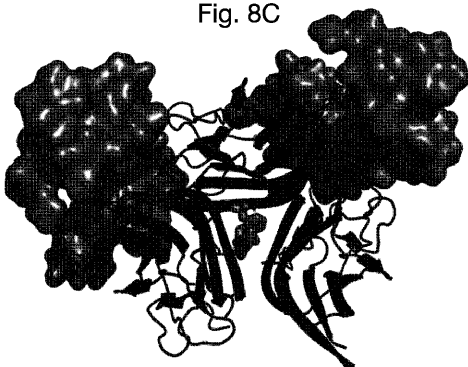
【 図 8 B 】

Fig. 8B



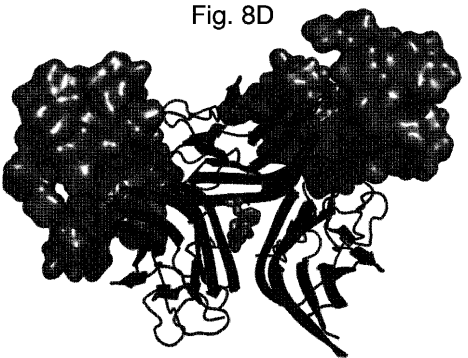
【 図 8 C 】

Fig. 8C

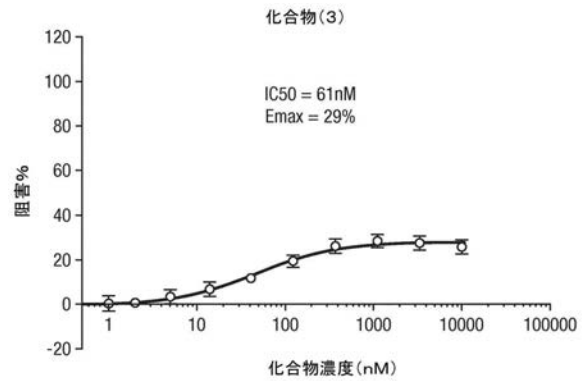


【 図 8 D 】

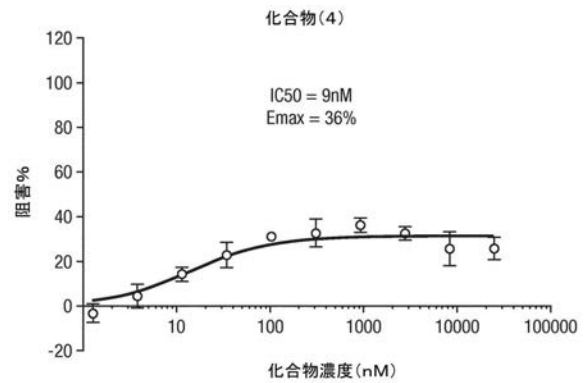
Fig. 8D



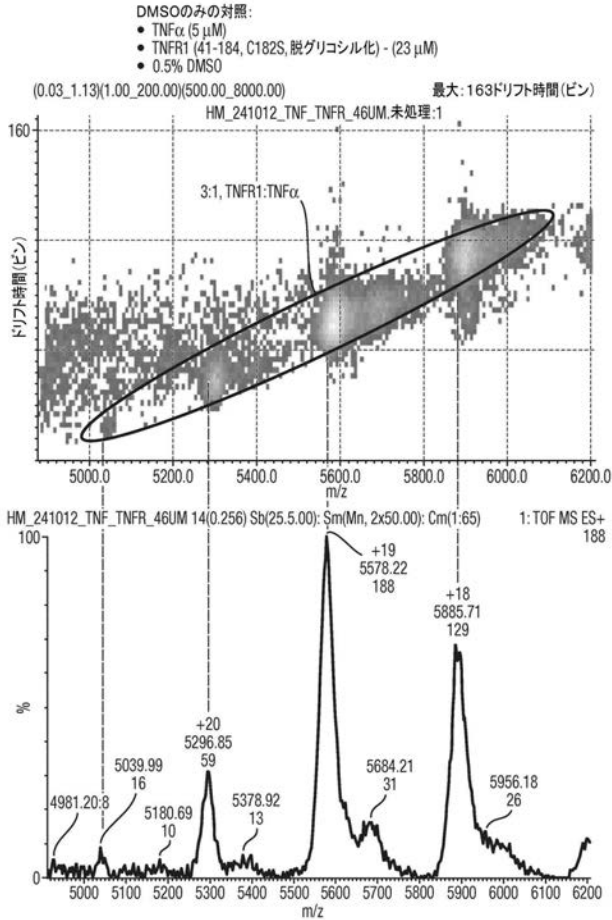
【 図 9 】



【 図 10 】

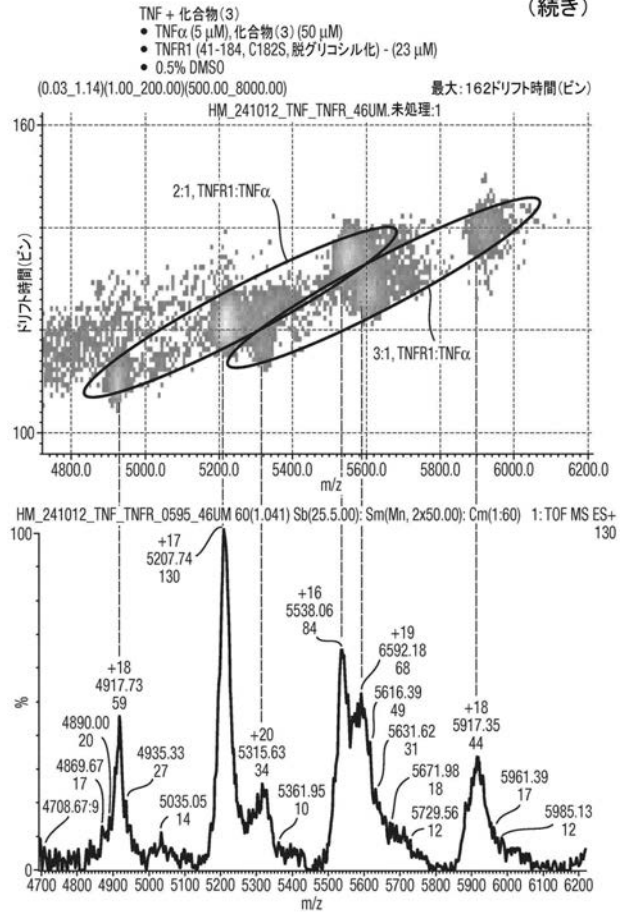


【 図 1 1 - 1 】

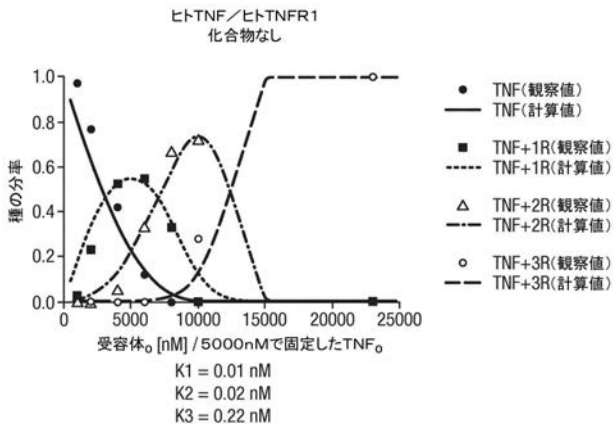


【 図 1 1 - 2 】

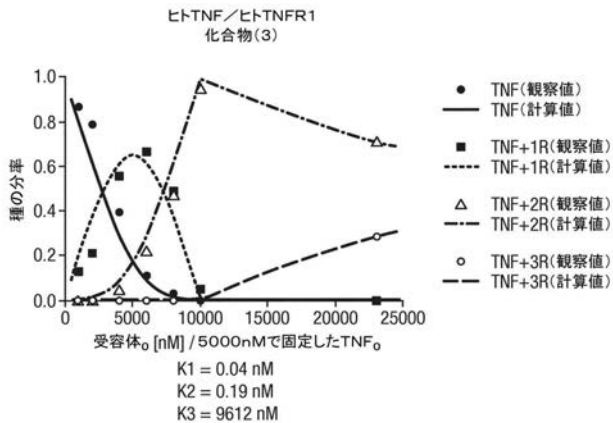
(続き)



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【配列表】

2018524577000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/074490

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/074490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. G01N33/68 C07D401/14 C07K14/525 C07D471/00 C07K14/705 ADD.		
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) G01N C07D 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAURA F. SILVIAN ET AL: "Small Molecule Inhibition of the TNF Family Cytokine CD40 Ligand through a Subunit Fracture Mechanism", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 6, no. 6, 17 June 2011 (2011-06-17), pages 636-647, XP055231751, US ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/cb2000346 cited in the application	1-20, 22-26
A	the whole document ----- -/--	21
<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 30 November 2015		Date of mailing of the international search report 11/01/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer R. von Eggelkraut-G.

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/074490

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLLY M HE ET AL: "Small-Molecule Inhibition of TNF-alpha", SCIENCE, vol. 310, no. 5750, 11 November 2005 (2005-11-11), pages 1022-1025, XP008147896, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US ISSN: 0036-8075	1-20, 22-26
A	the whole document -----	21
X	GANESAN L ET AL: "Exploratory computational assessment of possible binding modes for small molecule inhibitors of the CD40-CD154 co-stimulatory interaction", PHARMAZIE, vol. 67, no. 5, May 2012 (2012-05), pages 374-379, XP002751609, ISSN: 0031-7144, DOI: 10.1691/PH.2012.1696	1-20, 22-26
A	the whole document -----	21
X	ANDREAS HOFFMANN ET AL: "New Binding Mode to TNF-Alpha Revealed by Ubiquitin-Based Artificial Binding Protein", PLOS ONE, vol. 7, no. 2, E31298, 20 February 2012 (2012-02-20), pages 1-10, XP055231011, DOI: 10.1371/journal.pone.0031298	1-20, 22-26
A	the whole document -----	21
X	R. ALZANI ET AL: "Mechanism of suramin-induced deoligomerization of tumor necrosis factor .alpha.", BIOCHEMISTRY, vol. 34, no. 19, 1 May 1995 (1995-05-01), pages 6344-6350, XP055231745, US ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00019a012	1-20, 22-26
A	the whole document -----	21
X	WO 2014/009295 A1 (UCB PHARMA SA [BE]) 16 January 2014 (2014-01-16) cited in the application	13-20, 22-26
A	p. 1, line 1 - p. 103, line 14; Ex. 4, Ex. 326, claims 1-19 -----	21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/074490

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014009295 A1	16-01-2014	CA 2877550 A1	16-01-2014
		CN 104619709 A	13-05-2015
		EA 201500130 A1	30-07-2015
		EP 2872508 A1	20-05-2015
		JP 2015522051 A	03-08-2015
		US 2015203486 A1	23-07-2015
		WO 2014009295 A1	16-01-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 K 31/4439 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/496	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 31/4439	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 0 7 K 14/525 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
	C 0 7 K 14/705	
	C 0 7 K 14/525	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (72)発明者 ローソン、アレステア
イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、アイピーディ
ー気付
- (72)発明者 クロップリン、ボリス
イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、アイピーディ
ー気付
- (72)発明者 ラペッキ、スティーブン エドワード
イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、アイピーディ
ー気付
- (72)発明者 ノーマン、ティモシー ジョン
イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、アイピーディ
ー気付
- (72)発明者 マクミラン、デイヴィッド ジェームス
イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、アイピーディ
ー気付
- (72)発明者 ワレロウ、グラハム ジョン

イギリス国、パークシャー、スラウ、バスロード 208、ユセベセルテック、アイピーディ
ー気付

(72)発明者 ブルッキングス、ダニエル、クリストファー

イギリス国、パークシャー、スラウ、バスロード 208、ユセベセルテック、アイピーディ
ー気付

(72)発明者 アレクサンダー、リッキーター

イギリス国、パークシャー、スラウ、バスロード 208、ユセベセルテック、アイピーディ
ー気付

Fターム(参考) 4C065 AA03 BB06 CC01 DD02 EE02 HH06 JJ02 KK04 LL01 PP03
PP08 PP14 QQ04
4C084 AA01 AA02 AA03 BA08 BA22 BA23 BA32 MA02 NA05 NA14
ZA011 ZA021 ZA061 ZA081 ZA161 ZA361 ZA891 ZA961 ZB071 ZB081
ZB111 ZB151 ZC751
4C086 AA01 AA02 AA03 BC39 BC50 CB05 GA07 GA08 GA12 MA01
MA04 MA55 MA66 NA14 ZA01 ZA02 ZA06 ZA08 ZA16 ZA36
ZA89 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB15 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA50 CA40 DA14 DA51 EA50 FA74

專利名称(译)	作用机构		
公开(公告)号	JP2018524577A	公开(公告)日	2018-08-30
申请号	JP2017565173	申请日	2015-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	UCB制药生物藻厄尔萨尔瓦多		
申请(专利权)人(译)	UCB制药生物藻厄尔萨尔瓦多		
[标]发明人	オコンネルジェームスフィリップ ポータージョンロバート ローソンアレステア クロップリンボリス ラベッキスティーブンエドワード ノーマンティモシージョン マクミランデイヴィッドジェームス ワレロウグラハムジョン ブルッキングスダニエルクリストファー アレクサンダーリッキピーター		
发明人	オコンネル、ジェームス フィリップ ポーター、ジョン ロバート ローソン、アレステア クロップリン、ボリス ラベッキ、スティーブン エドワード ノーマン、ティモシー ジョン マクミラン、デイヴィッド ジェームス ワレロウ、グラハム ジョン ブルッキングス、ダニエル、クリストファー アレクサンダー、リッキピーター		
IPC分类号	G01N33/15 G01N33/53 C07D471/04 A61K31/506 A61P37/06 A61P29/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P9/00 A61P19/02 A61P1/04 A61P17/06 A61P37/02 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/08 A61K31 /496 A61K31/4439 A61P43/00 A61K38/16 C07K14/705 C07K14/525		
CPC分类号	C07D401/14 C07D471/00 C07D471/04 C07K14/525 C07K14/70575 C07K16/241 G01N33/6845 G01N2500/02 A61P35/00 A61P37/00 C07D213/72 C07D235/04 C07D239/26 C07K2317/24 C07K2317 /92 G01N2333/525 A61K47/6425 C07K2317/55 G01N33/6854 G01N33/6863		
FI分类号	G01N33/15.ZNA.Z G01N33/53.D C07D471/04.108.Q C07D471/04.CSP A61K31/506 A61P37/06 A61P29/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P9/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P1/04 A61P17/06 A61P37 /02 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/08 A61K31/496 A61K31/4439 A61P43/00.121 A61K38/16 C07K14 /705 C07K14/525		
F-TERM分类号	4C065/AA03 4C065/BB06 4C065/CC01 4C065/DD02 4C065/EE02 4C065/HH06 4C065/JJ02 4C065 /KK04 4C065/LL01 4C065/PP03 4C065/PP08 4C065/PP14 4C065/QQ04 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA32 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084 /NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA061 4C084/ZA081 4C084/ZA161 4C084/ZA361 4C084 /ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB151 4C084/ZC751 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/BC39 4C086/BC50 4C086/CB05 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/GA12 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA55 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086 /ZA02 4C086/ZA06 4C086/ZA08 4C086/ZA16 4C086/ZA36 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045 /CA40 4H045/DA14 4H045/DA51 4H045/EA50 4H045/FA74		

優先権 2015010758 2015-06-18 GB

其他公开文献 JP2018524577A5
JP6659030B2

外部链接 Espacenet

摘要(译)

本发明属于TNF信号传导领域。已经鉴定出能够调节通过受体的TNF三聚体信号传导的化合物。因此，提供了鉴定此类化合物的方法。该化合物本身可用于治疗。

(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2018-524577 (P2018-524577A) (43) 公表日 平成30年8月30日(2018.8.30)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z N A Z	4 C O 6 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C O 8 4
CO 7 D 471/04 (2006.01)	CO 7 D 471/04 I O 8 Q	4 C O 8 6
AG 1 K 31/506 (2006.01)	CO 7 D 471/04 C S P	4 H O 4 5
AG 1 P 37/06 (2006.01)	AG 1 K 31/506	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2017-565173 (P2017-565173)	(71) 出願人 514232085	
(86) (22) 出願日 平成27年10月22日 (2015.10.22)	ユーシービー バイオファルマ エスビー	
(85) 翻訳文提出日 平成30年2月14日 (2018.2.14)	アルエル	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/074490	ベルギー国 I O 7 O プリュッセル ア	
(87) 国際公開番号 W02016/202411	レ デ ラ レンエルシエ 6 O	
(87) 国際公開日 平成28年12月22日 (2016.12.22)	(74) 代理人 110000855	
(31) 優先権主張番号 1510758.4	特許業務法人遠村特許事務所	
(32) 優先日 平成27年6月18日 (2015.6.18)	オコンネル、ジェームス、フィリップ	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	イギリス国、パークシャー、スラウ、バス	
	ロード 2 O 8、ユセベ セルテック、	
	アイビーディー気付	
	(72) 発明者	
	ポーター、ジョン ロバート	
	イギリス国、パークシャー、スラウ、バス	
	ロード 2 O 8、ユセベ セルテック、	
	アイビーディー気付	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 作用機構		