

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-511789

(P2006-511789A)

(43) 公表日 平成18年4月6日(2006.4.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	2GO45
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 ZNAZ	4BO24
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4BO63
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	4CO86
A61K 31/405 (2006.01)	A61K 31/405	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-529521 (P2004-529521)	(71) 出願人	500137976
(86) (22) 出願日	平成15年8月15日 (2003.8.15)		アベンティス・ファーマスーティカルズ・
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月11日 (2005.4.11)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/025766		アメリカ合衆国ニュージャージー州088
(87) 国際公開番号	W02004/016223		07-0800.ブリッジウォーター.サ
(87) 国際公開日	平成16年2月26日 (2004.2.26)		マセット・コーポレイト・ブルヴァード
(31) 優先権主張番号	60/404,008		300
(32) 優先日	平成14年8月16日 (2002.8.16)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 高木 千嘉
(31) 優先権主張番号	0229244.9	(74) 代理人	100127926
(32) 優先日	平成14年12月16日 (2002.12.16)		弁理士 結田 純次
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミクロソームのプロスタグランジンE合成酵素または造血系プロスタグランジンD合成酵素の活性を低下させる能力に関して化合物または薬剤をアッセイする方法

(57) 【要約】

ミクロソームのプロスタグランジンE合成酵素または造血系プロスタグランジンD合成酵素によるそれぞれのプロスタグランジン生成物を産生する活性を、化合物または薬剤が低下させる能力を評価するために新規で有用な方法を、ここに提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素 (m P G E S) および造血系プロスタグランジン D 合成酵素 (h P G D S) からなるグループから選ばれるプロスタグランジン合成酵素が基質と反応しプロスタグランジン生成物を産生する活性を、化合物または薬剤が低下させるかどうかを測定するための方法であって、

(a) 該プロスタグランジン合成酵素と、基質、コファクターおよび化合物または薬剤とを、混合し；

(b) 工程 (a) の混合物と、該基質がプロスタグランジン生成物に自然変換することを防止する薬剤を含有する停止溶液とを、インキュベートし；

(c) 工程 (b) の混合物と、蛍光標識したプロスタグランジン生成物および該プロスタグランジン生成物を免疫原とした抗体を含有する検出試薬とを、インキュベートし；

(d) 工程 (c) の混合物および対照用混合物を、蛍光標識が励起できる波長を有する平面偏光で照射し、ついで工程 (c) の混合物および対照用混合物の蛍光偏光を測定し；そして

(e) 工程 (d) の測定値を比較する、
工程を含み、

ここで、混合物 (c) の蛍光偏光測定値が対照用混合物の蛍光偏光測定値より大きいという知見が、該化合物または薬剤が該プロスタグランジン合成酵素活性を低下させていることを示す、

上記方法。

【請求項 2】

プロスタグランジン合成酵素が、マイクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素 (m P G E S)、基質がプロスタグランジン H₂ (P G H₂)、コファクターがグルタチオン (G S H)、そしてプロスタグランジン生成物がプロスタグランジン E₂ (P G E₂) である請求項 1 の方法。

【請求項 3】

マイクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素が、配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでいるヒト m P G E S である、請求項 2 の方法。

【請求項 4】

プロスタグランジン合成酵素が、造血系プロスタグランジン D 合成酵素 (h P G D S)、基質がプロスタグランジン H₂ (P G H₂)、コファクターがグルタチオン (G S H)、そしてプロスタグランジン生成物がプロスタグランジン D₂ (P G D₂) である請求項 1 の方法。

【請求項 5】

造血系プロスタグランジン D 合成酵素が、ヒト造血系プロスタグランジン D 合成酵素であり、そして配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでいる、請求項 4 の方法。

【請求項 6】

停止溶液の薬剤が F e C l₂ である、請求項 1 の方法。

【請求項 7】

蛍光標識がフルオレセイン、フィコエリトリン (P E)、テキサスレッド (T R)、ローダミン、遊離のランタニド系列塩、キレート化ランタニド系列塩、B O D I P Y、A L E X A または C y D y e を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 8】

蛍光標識がテキサスレッド (T R) である、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

停止溶液の薬剤が F e C l₂ である、請求項 2 の方法。

【請求項 10】

インキュベートする工程 (b) の持続時間が少なくとも 30 秒間であり、そして、インキュベートする工程 (c) の持続時間が少なくとも 3 分間である、請求項 9 の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 11】

蛍光標識がフルオレセイン、フィコエリトリン (PE)、テキサスレッド (TR)、ローダミン、遊離のランタニド系列塩、キレート化ランタニド系列塩、BODIPY、ALEXA または CyDye を含む、請求項 10 の方法。

【請求項 12】

蛍光標識がテキサスレッド (TR) であり、そして、平面偏光励起光の波長が、 580 ± 20 nm である、請求項 11 の方法。

【請求項 13】

停止溶液の薬剤が $FeCl_2$ である、請求項 4 の方法。

【請求項 14】

蛍光標識がフルオレセイン、フィコエリトリン (PE)、テキサスレッド (TR)、ローダミン、遊離のランタニド系列塩、キレート化ランタニド系列塩、BODIPY、ALEXA または CyDye を含む、請求項 13 の方法。

【請求項 15】

蛍光標識がテキサスレッド (TR) であり、および、平面偏光励起光の波長が、 580 ± 20 nm である、請求項 14 の方法。

【請求項 16】

造血系プロスタグランジン D 合成酵素 (hPGDS) およびミクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES) からなるグループから選ばれるプロスタグランジン合成酵素が基質と反応しプロスタグランジン生成物を産生する活性を、化合物または薬剤が低下させるかどうかを測定するための方法であって、

(a) 該プロスタグランジン合成酵素と、基質、コファクターおよび化合物または薬剤とを、混合し；

(b) 工程 (a) の混合物と、未反応基質がプロスタグランジン生成物に自然変換することを防止する薬剤を含有する停止溶液とを、インキュベートし；

(c) 工程 (b) の混合物と、テキサスレッドで標識したプロスタグランジン生成物および該プロスタグランジン生成物を免疫原とした抗体を含有する検出試薬とを、インキュベートし；

(d) 工程 (c) の混合物および対照用混合物を、 580 ± 20 nm の波長の平面偏光で照射し、ついで工程 (c) の混合物および対照用混合物の蛍光偏光を 620 ± 20 nm で測定し；そして

(e) 工程 (d) の測定値を比較する、
工程を含み、

ここで、混合物 (c) の蛍光偏光測定の値が対照用混合物の蛍光偏光測定値より大きいという知見が、該化合物または薬剤が該プロスタグランジン合成酵素活性を低下させていることを示す、

上記方法。

【請求項 17】

プロスタグランジン合成酵素が、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むヒトのミクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES)、基質がプロスタグランジン H_2 (PGH₂)、コファクターがグルタチオン、プロスタグランジン生成物がプロスタグランジン E_2 (PGE₂) である、請求項 16 の方法。

【請求項 18】

停止溶液の薬剤が $FeCl_2$ である、請求項 17 の方法。

【請求項 19】

テキサスレッドで標識されたプロスタグランジン生成物が、該プロスタグランジン生成物および該テキサスレッドが結合しているリンカー分子を含む、請求項 18 の方法。

【請求項 20】

リンカー分子が、アミノ酪酸、アミノカプロン酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノカプリル酸、Fmoc-アミノカプロン酸、1個またはそれ以上の -アラニン、イソチ

10

20

30

40

50

オシアネート基、スクシンイミジルエステル、スルホナルハライドまたはカルボジイミドからなるグループから選ばれる、請求項 19 の方法。

【請求項 21】

リンカー分子がカルボジイミドである、請求項 20 の方法。

【請求項 22】

プロスタグランジン合成酵素が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むヒト造血系プロスタグランジン D 合成酵素 (hPGDS)、基質がプロスタグランジン H₂ (PGH₂)、コファクターがグルタチオン、プロスタグランジン生成物がプロスタグランジン D₂ (PGD₂) である、請求項 16 の方法。

【請求項 23】

停止溶液の薬剤が FeCl₂ である、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

テキサスレッドで標識されたプロスタグランジン生成物が、該プロスタグランジン生成物および該テキサスレッドが結合しているリンカー分子を含む、請求項 23 の方法。

【請求項 25】

リンカー分子が、アミノ酪酸、アミノカプロン酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノカプリル酸、Fmoc-アミノカプロン酸、1個またはそれ以上の -アラニン、イソチオシアネート基、スクシンイミジルエステル、スルホナルハライドまたはカルボジイミドからなるグループから選ばれる、請求項 24 の方法。

【請求項 26】

リンカー分子がカルボジイミドである、請求項 25 の方法。

【請求項 27】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むヒトのミクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素 (mPGE S) がその基質であるプロスタグランジン H₂ (PGH₂) と反応しプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を産生する活性を、化合物または薬剤が低下させるかどうかを測るための方法であって、

(a) mPGE S と、PGH₂、グルタチオンおよび化合物または薬剤とを、混合し；

(b) 工程 (a) の混合物と、FeCl₂ を含有する停止溶液とを、インキュベートし；

(c) 工程 (b) の混合物と、テキサスレッドで標識した PGE₂ および PGE₂ を免疫原とした抗体を含有する検出試薬とを、インキュベートし；

(d) 工程 (c) の混合物および対照用混合物を、580 ± 20 nm の波長の平面偏光で照射し、ついで工程 (c) の混合物および対照用混合物の蛍光偏光を測定し；そして

(e) 工程 (d) の測定値を比較する、

工程を含み、

ここで、工程 (c) の混合物の蛍光偏光測定の値が、対照用混合物の蛍光偏光測定値より大きいという知見が、該化合物または薬剤が mPGE S 活性を低下させていることを示す、

上記方法。

【請求項 28】

配列番号 4 のアミノ酸配列を含むヒト造血系プロスタグランジン D 合成酵素 (hPGDS) がその基質であるプロスタグランジン H₂ (PGH₂) と反応しプロスタグランジン D₂ (PGD₂) を産生する活性を、化合物または薬剤が低下させるかどうかを測定するための方法であって、

(a) hPGDS と、PGH₂、グルタチオンおよび化合物または薬剤とを、混合し；

(b) 工程 (a) の混合物と、FeCl₂ を含有する停止溶液とを、インキュベートし；

(c) 工程 (b) の混合物と、テキサスレッドで標識した PGD₂ および PGD₂ を免疫原とした抗体を含有する検出試薬とを、インキュベートし；

(d) 工程 (c) の混合物および対照用混合物を、580 ± 20 nm の波長の平面偏光

10

20

30

40

50

で照射し、ついで工程(c)の混合物および対照用混合物の蛍光偏光を測定し；そして
 (e)工程(d)の測定値を比較する、
 工程を含み、

ここで、工程(c)の混合物の蛍光偏光測定値が、対照用混合物の蛍光偏光測定値より大きいという知見が、該化合物または薬剤がhPGDS活性を低下させていることを示す、

上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化合物または薬剤が、プロスタグランジン合成酵素の活性を低下させる能力をアッセイするための新規で有用な方法に関する。特に、本発明はミクロソームのプロスタグランジンE合成酵素(mPGES)または造血系プロスタグランジンD合成酵素(hPGDS)の活性を、化合物または薬剤が低下させる能力をアッセイするための方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

プロスタグランジンは、痛み、発熱 および炎症において重要な役割を果たしているエイコサノイド(eicosanoids)の一つのクラスである。これらは、インビボでアラキドン酸から合成され、アラキドン酸の炭素鎖の一部を形成している炭素原子5員環を保持している。プロスタグランジンはホルモンではなく、局所、すなわち、それらが合成された場所に近いところで作用を及ぼす。

20

【0003】

2つのプロスタグランジン、 $PG E_2$ および $PG D_2$ は、特に発熱、痛みおよび炎症において重要な役割を果たしている。特に、抗原のチャレンジにより、気道のアレルギー性障害の主要なメディエーターである $PG D_2$ のマスト細胞からの産生が増加する。それは、特に、様々な症状の中で、気管支収縮、気管支過敏症、鼻詰まり、ならびに、好酸球および TH_2 細胞の浸潤を引き起こす。 $PG E_2$ は、痛みのメディエーターであり、痛覚過敏、発熱、血管拡張、および浮腫を誘発する役割を果たすことが示されてきた。

30

【0004】

インビボでの合成において、ホスホリパーゼA2はリン脂質をアラキドン酸(インビボではエステル形態で見出される)に変換する。続いて、プロスタグランジン・エンドペルオキシド合成酵素はアラキドン酸をプロスタグランジン G_2 ($PG G_2$)に変換する。プロスタグランジン・エンドペルオキシド合成酵素はまた $PG G_2$ のペルオキシド基の還元を触媒してプロスタグランジン H_2 ($PG H_2$)を産生し、これが $PG E_2$ および $PG D_2$ の前駆体である。 $PG E_2$ の産生の場合、コファクターのグルタチオン(GSH)の存在下でプロスタグランジンE合成酵素(PGES)が $PG H_2$ を $PG E_2$ に変換する。細胞質PGES(cPGES)およびミクロソームPGES(mPGES)という、少なくとも2個の $PG E_2$ 合成酵素が存在する。両方のPGESとも多くの組織で広く重複して発現している。mPGESは、リポ多糖類(LPS)、IL-1およびTNF- α のような炎症性刺激によって誘導することができ、他方、cPGESは構成的に発現している。さらに、mPGESはCOX-2活性と共役していることが示されている(Murakami等、J. Biol. Chem. 275巻:32783頁(2000年))。

40

【0005】

$PG D_2$ は、プロスタグランジンD合成酵素(PGDS)が $PG H_2$ を $PG D_2$ へ変換する結果として産生される。2つのタイプの $PG D_2$ 合成酵素が知られている。一つは主として中枢神経系で見られるリポカリン型PGDS(L-PGDS)であり、もう一つはもともと末梢組織で見られる造血系PGDS(hPGDS)である。L-PGDSはグルタチオン(GSH)非依存性であり、他方、hPGDSはGST活性を伴うGSH依存性である。さらに、L-PGDSとhPGDSとの間には構造上の類似性はほとんどない。

50

【0006】

P G D₂およびP G E₂は発熱、痛みおよび炎症において非常に重要な役割を果たすために、それらの産生を低下させるまたは阻害もできるような化合物のアッセイ方法を創出するために努力が続けられてきた。プロスタグランジン合成酵素活性を低下させまたは阻害する化合物または薬剤の能力を測定することを目的として、特に、H P L C、E L I S AまたはR I Aのような技術が、P G D₂およびP G E₂の産生を定量化するために用いられてきた。しかしながら、そうした技術は固有の限界を有している。例えば、そうした方法は種々の洗浄工程、精製工程および/または放射性物質の使用を必要としている。また、そうした方法は多くの時間を必要とし、そして、一日当たり数十(H P L C)から数百(E L I S AおよびR I A)個のデータポイントという処理能力(throughput)を有するだけである。したがって、そうした方法はハイスループットスクリーニングには適していない。

10

【0007】

蛍光偏光(fluorescence polarization)は、分子間の相互作用を研究するために用いられる技術である。この技術の背景にある原理は、評価される分子の大きさに依存している。特に、蛍光分子が平面偏光(plane polarized light)により照射された場合は、分子中で基底状態にある電子が励起状態まで励起される。約4~5ナノ秒後、これらの励起電子は基底状態まで減衰する。この減衰の間に分子は蛍光シグナルを放射する。蛍光偏光において、この蛍光放射は、分子が励起状態の間をとおして静止状態にあった場合のみ、同じ平面上で検出できる。もし、分子が励起状態の間、動いたり回転していたりすれば、その蛍光放射は、蛍光面の電子を励起させる偏光の蛍光放射とは異なった光平面にあることになる。その結果、蛍光放射は検出できない。分子が小さければそれだけその運動性および回転が大きくなることは、良く知られている。それゆえ、励起状態の間相対的に静止状態にある大きな分子より、小さな分子は実質的により小さなシグナルを発生するだろう。これが、蛍光偏光の基になっている分子の性質である。特に、リガンドの蛍光偏光アッセイにおいては、該リガンド、蛍光標識されたリガンドであるトレーサー、および、リガンドが結合する受容体が、溶液中に加えられる。このリガンドおよびトレーサーは受容体へ結合において互いに競合する。この溶液は次に平面偏光で照射され、次に、シグナルが検出される。もし溶液中にリガンドがそれほど多く存在しなければ、存在している受容体の大部分はトレーサーと結合するだろう。受容体は大きな分子(リガンドと比較すれば)なので、高度の蛍光偏光が得られる標識の蛍光から、シグナルが得られるだろう。対照的に、もし大量のリガンドが存在すれば、大部分の受容体はリガンドと結合するであろう。その結果、もし多少なりでも産生されれば、トレーサーのみから得られた蛍光偏光シグナルは、先に受容体に結合しているトレーサーによって得られたシグナルより、実質的に小さくなるであろう。それらのシグナルの間の差異から、当業者は、リガンドの存在の有無、およびその濃度を測定することができる。蛍光偏光はミリ偏光単位、すなわちm P、で測定される。

20

30

【0008】

それゆえに、蛍光偏光は、E L I S A、H P L CおよびR I Aのようなアッセイ方法より、ずっと簡単に効率的に実施することができる。さらに、それは、非常に短時間での大量の化合物または薬剤のハイスループットスクリーニングに、容易に適合させることができる。

40

【0009】

したがって、必要なことは、プロスタグランジン合成酵素活性を低下させまたは阻害する、化合物または薬剤の能力を評価する蛍光偏光法であり、とりわけ、薬剤または化合物が、m P G E SによるP G E₂産生活性を低下させまたは阻害するかどうかを評価するため、および、薬剤または化合物が、h P G D SのP G D₂産生活性を低下または阻害するかどうかを評価するための方法である。

【0010】

さらに必要なことは、プロスタグランジン合成酵素、特にm P G E Sまたはh P G D S

50

の活性を低下させまたは阻害する、化合物または薬剤の能力を評価するハイスルーブットシステムである。造血系プロスタグランジンD₂合成酵素(hPGDS)または誘導性ミクロソームプロスタグランジンE₂合成酵素(mPGES)の活性を低下またはさらに阻害する化合物は、例えば少し例を挙げれば、関節炎、喘息および鼻炎のような炎症およびアレルギー症状の治療に適用できるであろう。さらに、痛みおよび/または発熱もまたそうした化合物または薬剤で治療できるだろう。

【0011】

ここでのいかなる参考文献の引用も、そうした参考文献が本願の「公知技術」として利用できると認めたとのものと解釈されるべきではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明により、mPGESまたはhPGDSがそれぞれのプロスタグランジン生成物を産生する活性を低下させるかさらには阻害する、化合物または薬剤の能力を評価するために、放射性同位元素を使用せず、多くの洗浄工程を必要とせず、さらに、インビトロで、エキスピボ(ex vivo)で、細胞をベースにしたやり方で、または単離された方法で実施できる、新規で有用な方法に関する。さらに、本発明の方法は容易に高い処理能力のやり方で実施することができる。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、広義には化合物または薬剤が、プロスタグランジン合成酵素がその基質と反応してプロスタグランジン生成物を産生する活性を低下させるかどうか測定する方法に係り、該プロスタグランジン合成酵素はミクロソームプロスタグランジンE₂合成酵素(mPGES)および造血系プロスタグランジンD₂合成酵素(hPGDS)からなる群から選ばれる。本発明の方法は、酵素反応を起こすために、プロスタグランジン合成酵素とその基質、コファクターおよび化合物または薬剤を混合する工程を含んでいる。この混合物は、次に、未反応の基質からプロスタグランジン生成物への自然変換を阻害する薬剤を含有する停止溶液と、インキュベートする。この混合物を、次に、蛍光標識したプロスタグランジン生成物(すなわち、トレーサー)および該プロスタグランジン生成物を免疫原とした抗体を含有する検出試薬と、インキュベートする。続いて、該混合物と、化合物または薬剤は含有しないということ以外は全く同一に処理された対照用混合物とを、蛍光標識が蛍光を発する波長を有する平面偏光で照射する。該混合物および対照用混合物の蛍光偏光を測定し、次に比較する。対照用混合物の偏光測定値より大きな偏光測定値を有する混合物は、該化合物または薬剤がプロスタグランジン合成酵素活性を低下させたことを示している。その結果、そうした化合物または薬剤は、いくつかの例をあげれば、炎症、アレルギー、痛みおよび発熱、またはそれらの複合症に罹っている患者を治療するために、容易に適用できる。

【0014】

さらに、本発明は、上記の方法を、プロスタグランジン合成酵素が誘導性のミクロソームのプロスタグランジンE合成酵素(mPGES)、基質がプロスタグランジンH₂(PGH₂)、コファクターがグルタチオン(GSH)およびプロスタグランジン生成物がプロスタグランジンE₂(PGE₂)である方法に係る。本発明の方法で用いるmPGESは、ウシ、ヒツジ、ネズミ類、ウマ、イヌ、ヒト、ネコ等のものでありうる。特定の実施態様では、mPGESはヒトのものであり、図9Bおよび配列番号2のアミノ酸配列を有している。さらに、本発明の方法で用いられているmPGESは精製されたものである必要はない。

【0015】

本発明は、さらに、化合物または薬剤により、プロスタグランジン合成酵素がその基質と反応しここで記載されたプロスタグランジン生成物を産生する活性を低下させるかどうかを測定する方法において、プロスタグランジン合成酵素が造血系プロスタグランジンD

10

20

30

40

50

合成酵素 (hPGDS) であり、基質がプロスタグランジン H_2 (PGH_2)、コファクターが GSH およびプロスタグランジン生成物がプロスタグランジン D_2 (PGD_2) である方法にも係る。mPGES と全く同様に、本発明の方法に適用できる hPGDS は多くの材料から得ることができる。特定の実施態様では、hPGDS はヒト hPGDS であり、図 10B および配列番号 4 のアミノ酸配列を有している。さらに、本発明の方法で用いられている hPGES は精製されたものである必要はない。

【0016】

上記で説明したように、本発明の方法において、停止溶液は、未反応基質からプロスタグランジン生成物への自然変換を抑制する薬剤を含有している。特に、上記の2つのプロスタグランジン合成酵素の基質、 PGH_2 、はペルオキシド基を含んでいる。それらの作用機構を説明することを義務づけられるものでなくまた、いかなる説明にも拘束されることを全く意図するものではないが、mPGES および hPGDS の両者は、 PGH_2 のペルオキシド基の酸素結合の開裂を触媒し、 PGH_2 をそれぞれ PGE_2 および PGD_2 へと変換すると信じられている。しかしながら、また、 PGH_2 は PGE_2 または PGD_2 への自然変換をうける。この自然変換が、化合物または薬剤の mPGES または hPGDS 活性を低下させる能力のアッセイに干渉し、結果を変えてしまう。そのために、本発明の方法では、混合物を、 PGH_2 を PGE_2 または PGD_2 のいずれかへの自然変換を抑制する薬剤を含有する停止溶液と、インキュベートされる。特にそうした薬剤の例は約 20 mM 濃度の $FeCl_2$ である。しかし、当業者は、この同時変換を抑制する他の薬剤を容易に理解できるだろうし、そしてそれらは本発明の方法に包含される。さらに、このインキュベーションの時間は変更できるが、それは全ての残存する未反応 PGH_2 のプロスタグランジン生成物への変換を抑制するために十分な長さの時間でなければならない。

【0017】

さらに、本発明は、化合物または薬剤により、プロスタグランジン合成酵素、特に mPGES または hPGDS がその基質と反応しプロスタグランジン生成物を産生する能力を低下させるかどうか測定する方法において、停止溶液とのインキュベーションの後、混合物が蛍光標識されたプロスタグランジン生成物および該プロスタグランジン生成物を免疫原に使用した抗体を含有する検出試薬とインキュベートする、方法にも関する。多くの当業者に周知の蛍光標識が本発明の方法に適用できる。そうした蛍光標識の例には、フルオレセイン、フィコエリトリン (PE)、テキサスレッド (TR)、ローダミン、遊離のランタニド系列塩、キレート化ランタニド系列塩、CyDye (Amersham Biochem)、BODIPY (Molecular Probes) および ALEXA (Molecular Probes) が、若干の例として挙げられる。特定の実施態様では、蛍光標識はテキサスレッドである。さらに、蛍光標識は直接プロスタグランジン生成物に結合させることができ、または別法としてリンカー分子に結合してその後プロスタグランジン生成物に結合させることができる。ここで適用できる特定のリンカー分子には、それらには決して限定されるものではないが、アミノ酪酸、アミノカプロン酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノカプリル酸、Fmoc-アミノカプロン酸、1個またはそれ以上のアラニン、イソチオシアネート基、スクシンイミジルエステル、スルホナルハライドまたはカルボジイミドリンカーが、若干の例として挙げられる。本発明の特定の具体例では、プロスタグランジン生成物はカルボジイミドリンカーに結合され、次いで、テキサスレッドのような蛍光標識に結合される。

【0018】

さらに、本発明は、化合物または薬剤が、マイクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES) とそのプロスタグランジン H_2 (PGH_2) 基質とがプロスタグランジン E_2 (PGE_2) を産生する反応を低下または阻害するかどうかを測定するために、以下の

- (a) mPGES と、 PGH_2 、グルタチオン (GSH) および化合物または薬剤とを、少なくとも 30 秒間混合し；
- (b) 工程 (a) の混合物と、 $FeCl_2$ を含有する停止溶液とを、インキュベートし；

10

20

30

40

50

(c) 工程 (b) の混合物と、テキサスレッドで標識した $PG E_2$ および $PG E_2$ を免疫原とした抗体を含有する検出試薬とを、インキュベートし；

(d) 工程 (c) の混合物および対照用混合物を、 $580 \pm 20 \text{ nm}$ の波長の平面偏光で照射し、ついで工程 (c) の混合物および対照用混合物の蛍光偏光を測定し；そして

(e) 工程 (d) の測定値を比較する、
工程を含む方法に関する。

【0019】

アッセイする化合物または薬剤を含有する混合物の蛍光偏光測定値が、対照用混合物の蛍光偏光測定値より大きければ、それは該化合物または薬剤が $mPGES$ 活性を抑制していることを示す。特定の実施態様では、該 $mPGES$ は、図 9 B および配列番号 2 のアミノ酸配列を有するヒト $mPGES$ であり、カルボジイミドリンカーは $PG E_2$ とテキサスレッドに結合している。テキサスレッドが励起される波長は 580 nm である。しかしこの波長は 20 nm から 580 nm まで広げることができる。同様に、テキサスレッドの蛍光放射の波長は一般に 620 nm であると信じられている。しかしこの波長は $620 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ の範囲まで変更可能である。そうした励起波長および放射波長の変更範囲は本発明に包含される。さらに、先に説明したように、該 $mPGES$ は精製されたものである必要はない。

10

【0020】

さらに、本発明は、化合物または薬剤が、造血系プロスタグランジン D 合成酵素 ($hPGDS$) とそのプロスタグランジン H_2 (PGH_2) 基質がプロスタグランジン D_2 (PGD_2) を産生する反応を低下または阻害するかどうかを測定するために、

20

(a) $hPGDS$ と、 PGH_2 、 GSH および化合物または薬剤とを、少なくとも 30 秒間混合し；

(b) 工程 (a) の混合物と、 $FeCl_2$ を含有する停止溶液とを、インキュベートし；

(c) 工程 (b) の混合物と、テキサスレッドで標識した PGD_2 および PGD_2 を免疫原とした抗体を含有する検出試薬とを、インキュベートし；

(d) 工程 (c) の混合物および対照用混合物を、 $580 \pm 20 \text{ nm}$ の波長の平面偏光により照射し、そして工程 (c) の混合物および対照用混合物の蛍光偏光を測定し；そして

30

(e) 工程 (d) の測定値を比較する、
工程を含む方法に関する。

【0021】

アッセイする化合物または薬剤を含有する混合物の蛍光偏光測定値が、対照用混合物の蛍光偏光測定値より大きければ、それは該化合物または薬剤が $hPGDS$ 活性を抑制していることを示す。特定の実施態様では、該 $hPGDS$ は、図 10 B および配列番号 4 のアミノ酸配列を有するヒト $mPGES$ であり、テキサスレッドと PGD_2 はカルボジイミドリンカーを介して化学的に結合している。

【0022】

さらに、本発明は、化合物または薬剤が、プロスタグランジン合成酵素、特に $mPGES$ または $hPGDS$ がその基質と反応しプロスタグランジン生成物を産生する能力を低下させるかどうかを、ハイスループット方法で実施する方法に関する。

40

【0023】

したがって、化合物または薬剤が、プロスタグランジン合成酵素、例えば $mPGES$ または $hPGDS$ の活性を低下またはさらに阻害する能力を評価する方法を提供することが一つの局面である。その結果、本発明の方法により、当業者が、患者の痛み、炎症、発熱またはそれらの併合した症状を治療するために適用できる化合物または薬剤を同定することを可能にする。

【0024】

本発明の他の局面は、化合物または薬剤が $mPGES$ または $hPGDS$ の活性を低下さ

50

せるかまたは阻害する能力を評価するための方法を提供することであり、そのような方法は洗浄工程も放射性同位元素の使用も必要としない。

【0025】

本発明のさらに他の局面は、化合物または薬剤がm P G E Sまたはh P G D Sのようなプロスタグランジン合成酵素の活性を低下させるかまたは阻害する能力を評価するための方法を提供することであり、そのような方法はエキスピボ、インピトロ、細胞ベースまたは単離された方法で実施することができる。

【0026】

本発明のさらに他の局面は、化合物または薬剤がプロスタグランジン合成酵素の活性を低下させるかまたは阻害する能力を評価するための、ハイスループット方式で実施できる方法を提供することである。

10

【0027】

これらの、およびその他の、本発明の局面は、下記する図面および詳細な説明を参照してより良く理解できるだろう。

【0028】

図1は、基質P G H₂からP G E₂への酵素変換およびP G H₂からP G D₂またはP G E₂いずれかのプロスタグランジン生成物への自然変換との間の競合を示す模式的図面であり、用いる酵素はm P G E Sであり、自然変換の阻害はF e C l₂によるものである。

【0029】

図2は、プロスタグランジン合成酵素がm P G E Sであり、プロスタグランジン生成物がP G E₂である、本発明の方法の模式的図面である。

20

【0030】

図3は、基質P G H₂からP G D₂への酵素変換およびP G H₂からP G D₂またはP G E₂いずれかのプロスタグランジン生成物への自然変換との間の競合を示す模式的図面であり、用いる酵素はh P G D Sであり、自然変換の阻害はF e C l₂によるものである。

【0031】

図4は、プロスタグランジン合成酵素がh P G D Sであり、プロスタグランジン生成物がP G D₂である、本発明の方法の模式的図面である。

【0032】

図5は、化合物または薬剤がプロスタグランジン合成酵素活性を抑制または阻害するかどうかを測定するために、本発明の方法が使用できることを証明するために用いられる公知のm P G E S阻害剤である、M K - 8 8 6の化学構造を示す。

30

【0033】

図6は、プロスタグランジン合成酵素m P G E Sおよび公知の阻害剤M K - 8 8 6を用いた、本発明の方法の濃度反応曲線のグラフ図面である。I C 5 0 = 2 7 . 5 μ M。これらの結果は、当業者が、本発明の方法により化合物または薬剤がプロスタグランジン合成酵素、この場合はm P G E S活性を、低下できるかどうか測定できることを示している。

【0034】

図7は、H Q L 7 9の化学構造を示す。

【0035】

図8は、H Q L 7 9によるh P G D S活性の低下が本発明の方法により検出できることを表す棒グラフを示す。

40

【0036】

図9 Aおよび9 Bは、下記の実施例1で用いられるヒトm P G E Sの塩基配列およびアミノ酸配列を示す(それぞれ配列番号1および2)。

【0037】

図10 Aおよび10 Bは、ヒトH - P G D Sの塩基配列およびアミノ酸配列を示す(それぞれ配列番号3および4)。

【0038】

本発明は、蛍光偏光が、プロスタグランジン合成酵素、例えば、m P G E Sまたはh P

50

G D S が、プロスタグランジン、例えば、P G D₂またはP G E₂を産生する活性を低下させる化合物または薬剤の同定に用いることができるという、驚くべきまた予想もしていなかった発見を基にしている。そのためより広義では、本発明は、化合物または薬剤が、m P G E S および h P G D S からなる群から選ばれるプロスタグランジン合成酵素とその基質とが反応してプロスタグランジン生成物を産生する活性を低下させるかどうかを測定するために、以下の：

(a) 該プロスタグランジン合成酵素と、その基質、コファクターおよび化合物または薬剤とを、混合し；

(b) 工程 (a) の混合物と、基質からプロスタグランジン生成物への自然変換を抑制する薬剤を含有する停止溶液とを、インキュベートし；

(c) 工程 (b) の混合物と、蛍光標識したプロスタグランジン生成物および該プロスタグランジン生成物を免疫原とした抗体を含有する検出試薬とを、インキュベートし；

(d) 工程 (c) の混合物および対照用混合物を、該蛍光標識が発光する波長の直線偏光で照射し、ついで工程 (c) の混合物および対照用混合物の蛍光偏光を測定し；そして

(e) 工程 (d) の測定値を比較する、

工程を含む方法に関する。

【 0 0 3 9 】

ここで、工程 (d) の混合物の蛍光偏光測定値が対照用混合物の蛍光偏光測定値より大きければ、それは該化合物または薬剤が該プロスタグランジン合成酵素活性を低下させていることを示す。

【 0 0 4 0 】

本明細書および付属する請求項を通して用いられている多くの用語または成句は以下に定義される。すなわち：

ここで用いられている「化合物」または「薬剤」という用語は、現在知られているまたは今後発見される全ての組成物を意味する。ここで適用している化合物または薬剤の例には、有機化合物（例えば、人工のまたは天然由来の）、ペプチド（人工のまたは天然由来の）、炭水化物、核酸分子等を含む。

【 0 0 4 1 】

ここで用いられている「酵素」という用語は、特異的な化学反応を触媒するタンパク質またはRNAのような生体分子を意味する。これは触媒された反応の平衡には影響しない。むしろ、酵素は活性エネルギーを減少させて反応速度を促進する。

【 0 0 4 2 】

ここで用いられている「プロスタグランジン合成酵素」という用語は、プロスタグランジンH₂ (P G H₂) からプロスタグランジン生成物への変換を触媒する酵素を意味する。特に本発明での適用を有するプロスタグランジン合成酵素の例には、コファクターのグルタチオン (G S H) 存在下でプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンE₂ (P G E₂) へ変換する誘導性のミクロソームのプロスタグランジンE合成酵素 (m P G E S) が含まれる。他の例は、コファクターのG S H存在下でプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンD₂ (P G D₂) へ変換する造血系プロスタグランジンD合成酵素 (h P G D S) である。

【 0 0 4 3 】

ここで用いられている「基質」という用語は、酵素が生成物を産生するために作用する化合物を意味する。ここで適用される基質の例はP G H₂である。

【 0 0 4 4 】

ここで用いられている「コファクター」という用語は、酵素活性に必要な有機分子、無機分子、ペプチド、またはタンパク質を意味する。特に本発明の実施態様では、プロスタグランジン合成酵素はm P G E S または h P G D S であり、コファクターはグルタチオン (G S H) である。

【 0 0 4 5 】

ここで用いられている「プロスタグランジン生成物」という用語は、プロスタグランジ

10

20

30

40

50

ン合成酵素が該プロスタグランジン合成酵素の基質に作用する結果産生する生成物を意味する。すなわち、m P G E Sでは該プロスタグランジン生成物はP G E₂であり、h P G D Sでは該プロスタグランジン生成物はP G D₂である。

【0046】

ここで用いられている「蛍光標識」という用語は、特定の波長の光を照射されたとき蛍光を発し、問題とする化合物に直接結合するか、または代わりに、問題とする化合物に結合するリンカーに結合する物質を意味する。本発明で適用される蛍光標識の例は、それには限定されないが、フルオレセイン、フィコエリトリン(P E)、テキサスレッド(T R)、ローダミン、遊離のランタニド系列塩、キレート化ランタニド系列塩、B O D I P Y、A L E X A、C y D y e等が含まれる。特に本発明で適用される蛍光標識は、テキサスレッドである。

10

【0047】

ここで用いられている「リンカー」および「リンカー分子」という用語は、交換可能で用いられ、蛍光標識およびプロスタグランジン生成物が結合している化学成分を意味する。本発明で適用されるリンカー分子の特定の例には、アミノ酪酸、アミノカプロン酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノカプリル酸、F m o c-アミノカプロン酸、1個またはそれ以上の-アラニン、イソチオシアネート基、スクシンイミジルエステル、スルホナルハライドまたはカルボジイミドが、若干の例として挙げられる。本発明で適用される特定の例では、リンカーはカルボジイミド基である。

【0048】

ここで用いられている「対照用混合物」という用語は、アッセイする化合物または薬剤を含有している混合物と、同一の試薬、化合物、細胞等を等量含有しており、そしてアッセイすべき化合物または薬剤を含有していない他は、アッセイする化合物または薬剤を含有している混合物と同様の方法で処理された混合物を意味する。

20

【0049】

抗体

上記で説明したように、本発明の方法は、免疫原としてP G D₂またはP G E₂のようなプロスタグランジン生成物を有する、抗体を利用する。そうした抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはキメラ抗体であってもいい。当該分野で公知の種々の方法を、P G E₂またはP G D₂に対するポリクローナル抗体の製造のために用いることができる。抗体の製造のために、種々の動物をプロスタグランジン生成物の注射で免疫感作することができ、それには限定されないが、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等が用いられる。特定の実施態様では、P G E₂またはP G D₂は免疫原性担体、例えばウシ血清アルブミン(B S A)またはキイホールリンペットヘモシアニン(K L H)と共役させることもできる。宿主になる動物種によって、種々のアジュバントを、免疫反応を増強するために用いることができ、その例には、フロインドのアジュバント(完全または不完全)、水酸化アルミニウムのような鉱質ゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キイホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、B C G(カルメット-ゲランバシラス菌、bacille Calmette-Guerin)またはコリネバクテリウム・パルヴム(Corynebacterium parvum)が挙げられる。

30

40

【0050】

プロスタグランジン生成物に対するモノクローナル抗体を製造するためには、連続的な細胞株培養により抗体分子の製造を提供するどのような技術でも使用できる。そうした技術には、それに限定されないが、ケーラー&ミルシュタインが最初に開発したハイブリドーマ技術(Nature 256巻:495-497頁(1975年))、ならびにトリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor等、Immunology Today 4巻:72頁(1983年); Cote等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80巻:2026-2030頁(1983年))、および、ヒト型モノクローナル抗体を産生するE B Vハイブリドーマ技術(Cole等、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁(1985年))が含まれている。さらに、モノ

50

クロナール抗体は、PCT/US90/02545に記載された無菌動物利用技術で製造することもできる。プロスタグランジン生成物に特異的なマウス抗体分子からの遺伝子を、適切な生物学的活性のあるヒト抗体分子からの遺伝子と一緒に切り出してきて、「キメラ抗体」を製造するために開発された技術（Morrison等、J. Bacterial 159巻：870頁（1984年）； Neuberger等、Nature 312巻：604-608頁（1984年）； Takeda等、Nature 314巻：452-454頁（1985年））も用いることができる。

【0051】

条件

上記で説明したように、本発明の方法は、エキスピボ、インピボ、または、全ての試薬、酵素、基質等があらかじめ分離され、TRIS、TRIS-HCl、HEPESもしくはリン酸緩衝液のような緩衝溶液中に保持されているような、単離された形態で、または、細胞をベースとした方法で実施することができる。さらに、本発明の方法では、プロスタグランジン合成酵素は精製されている必要がない。

細胞をベースとしたアッセイ方法では、本発明の方法は、アッセイされる化合物または薬剤が細胞からのプロスタグランジン生成物の分泌を阻害または抑制できるかどうか測定するために使用され、他方、インピトロの方法では、化合物または薬剤を細胞内媒質中で評価できるように本発明の方法の実施の前に、細胞を溶解させることもできる。

【0052】

プロスタグランジン合成酵素活性を低下または阻害する化合物または薬剤の候補物質のためのライブラリーの探索

従来、有用な性質を有する新規な化学物質は、ある望ましい性質または活性を有する化合物（「リード化合物」とよばれる）を同定し、該リード化合物の誘導体を創製し、ついでそれらの誘導体化合物の性質および活性を評価することによって作成されてきた。しかし、最近の傾向は創薬の全ての局面で時間スケールを短縮することである。大きな数を迅速にかつ効率的に試験できる能力のために、従来のリード化合物同定方法がハイスループットスクリーニング（HTS）法へと置き換えられている。

【0053】

特定の実施態様では、ハイスループットスクリーニング法は、多数の可能性のある治療用化合物（候補化合物）を含有するコレクションを提供することを含んでいる。次に、そうした「歴史的に蓄積された化学物質のコレクション（historic chemical collections）」を本発明の方法でスクリーニングし、望ましい特徴のある活性を示すそうしたコレクション（特定の化学種またはサブクラス）のメンバーを同定する。こうして同定された化合物は、従来の「リード化合物」として用いることができ、またはそれ自体を可能性のあるもしくは実際の治療剤として用いることができる。

【0054】

コンビナトリアルケミカルライブラリー

コンビナトリアルケミカルライブラリー（combinatorial chemical libraries）は、新規なリード化合物の創製を助けるための好ましい手段である。コンビナトリアルケミカルライブラリーは、化学合成または生物的合成のいずれかにより、試薬類のような多数の化学「構築用ブロック（building blocks）」を結合させて作成された、多種多様な化合物のコレクションである。例えば、ポリペプチドライブラリーのような線形のコンビナトリアルケミカルライブラリーは、所与の化合物の長さ（すなわち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸の数）の範囲内で、あらゆる可能なやり方で、アミノ酸とよばれる一組の化学構築用ブロックを結合させることで、作成される。化学構築用ブロックをそうしたコンビナトリアルな方法で組み合わせることによって、数百万の化合物を合成することができる。例えば、一人のコメンテーターは、100個の交換可能な化学構築用ブロックを系統的にコンビナトリアル的に混合することによって、理論的には1億個の4量体化合物から100億個の5量体化合物が得られるという意見を述べている（Gallop等、Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies and Future Directions, J. Med. Chem. (1994年) 37巻

10

20

30

40

50

(9号): 1233-1251頁)。

【0055】

コンビナトリアルケミカルライブラリーの作成は、当該分野の当業者には周知である。そうしたコンビナトリアルケミカルライブラリーは、それに限定されないが、ペプチドライブラリー(例えば、US特許5,010,175; Furka (1991年) Int. J. Pept. Prot. Res., 37巻: 487-493頁; Houghton等、(1991年) Nature, 354巻: 84-88頁)を含んでいる。ペプチド合成が、本発明の使用のための、想定され意図される唯一のアプローチではない。他の、化学的に多様なライブラリーを創製するための化学方法もまた使用できる。そうした化学方法には、それに限定されないが、ペプトイド(peptoids)(PCT公開W0 91/19735、1991年12月26日)、コード化されたペプチド(PCT 公開W0 93/20242、1993年10月14日)、ランダムバイオオリゴマー(PCT公開W0 92/00091、1992年1月9日)、ベンゾジアゼピン(米国特許5,288,514)、ヒダントインのようなディバーソマー(diversomer)、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド(Hobbs等、(1993年) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90巻: 6909-6913頁)、ビニログスポリペプチド(vinylogous polypeptides)(Hagihara等、(1992年) J. Amer. Chem. Soc. 114巻: 6568頁)、ベータDグルコースの足場(scaffolding)を伴った非ペプチド性ペプチドミメティクス(nonpeptidal peptidomimetics)(Hirschmann等、(1992年) J. Amer. Chem. Soc. 114巻: 9217-9218頁)、小化合物ライブラリーの類似有機合成(analogous organic syntheses)(Chen等、(1994年) J. Amer. Chem. Soc. 116巻: 2661頁)、オリゴカルバメート(Cho等、(1993年) Science 261巻: 1303頁)、および/または、ペプチド性ホスホネート(Campbell等、(1994年) J. Org Chem. 59巻: 658頁が挙げられる。一般にはGordon等、(1994年) J. Med. Chem. 37巻: 1385頁、核酸ライブラリー、ペプチド核酸ライブラリー(例えば、US特許5,539,083参照)、抗体ライブラリー(例えば、Vaughn等、(1996年) Nature Biotechnology, 14巻(3号): 309-314頁)、およびPCT/US96/10287)、炭水化物ライブラリー(例えば、Liang等、(1996年) Science, 274巻: 1520-1522頁、および、US特許5,593,853参照)、および小有機分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピン、Baum (1993年) C & EN, 1月18日、33頁; イソプレノイド、US特許5,569,588; チアゾリジノンおよびメタチアザノン、US特許5,549,974; ピロリジン、US特許5,525,735および5,519,134; モルホリノ化合物、US特許5,506,337; ベンゾジアゼピン、US特許5,288,514、等)がある。

【0056】

コンビナトリアルライブラリーの作成のための器具は市販のものを利用できる(例えば、357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA参照)。

【0057】

溶液位相化学(solution phase chemistries)のために、多くの周知のロボットシステムもまた開発されてきた。これらのシステムは、武田薬品工業(大阪、日本)が開発した自動合成機器、および、化学者の行うマニュアルの合成手法を模倣したロボットアームを利用する多くのロボットシステム(Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, HewlettPackard, Palo Alto, Calif.)のような自動化されたワークステーションを含んでいる。上記の機器のいずれもが本発明の使用に適している。これらの機器をここで論じたように操作するために、改良の特性およびその実施法は(あるとして)、当該分野の当業者には明らかである。さらに、多くのコンビナトリアルライブラリーは、それ自体、購入して利用できる(例えば、ComGenex, Princeton, N. J.; Asinex, Moscow, Ru; Tripos, Inc., St. Louis, MO; Chem Star, Ltd, Moscow, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD等を参照のこと)。

【0058】

ケミカルライブラリーのハイスループットアッセイ法

蛍光偏光を用いる本発明の方法は、そのまま、容易にハイスループットスクリーニングに適用可能である。ハイスループットスクリーニングシステムは購入して利用すること

10

20

30

40

50

が可能である（例えば、Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA等を参照）。これらのシステムは、典型的には、全てのサンプルおよび試薬のピペット操作、液体の分配、時間の設定されたインキュベーション、およびアッセイに適合した測定機の上のマイクロプレートでの最後の読み取りまでの操作全体が自動化されている。これらの構成可能なシステムは、ハイスループットおよび迅速な立ち上がりならびに高度の柔軟性およびカスタム化を提供する。そうしたシステムの製造者は、種々のハイスループットのための詳細なプロトコルを提供する。例えば、Zymark Corp.は、遺伝子転写の変調、リガンドの結合およびそれに類したものを検出するためのスクリーニングシステムを記載した技術紀要を提供している。

10

【0059】

本発明の例示のために提供される以下の非限定的な実施例を参照することによって、本発明はより良く理解できる。以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様をより詳細に説明するために提供される。しかしながら、これらは決して本発明の広い範囲を制限するものと解釈するべきではない。

【0060】

実施例 1誘導性マイクロソームプロスタグランジン E 合成酵素 (mPGE S) の蛍光偏光アッセイ

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、炎症および痛みに関連する主要なメディエーターである。マイクロソームのプロスタグランジン E 合成酵素 (mPGE S) は、グルタチオンの存在下で、PGH₂ から PGE₂ への変換を触媒する。したがって、mPGE S 活性を低下または阻害する化合物は、若干の疾患または障害を挙げるとすると、炎症、痛み、発熱またはそれらの併合症、に関する有効な治療剤になる可能性がある。

20

【0061】

アッセイ方法が、誘導性マイクロソーム PGE₂ 合成酵素による PGH₂ から PGE₂ への変換を測定するために開発された。このアッセイ方法は蛍光偏光原理を基にして構成される。該酵素と、PGH₂、グルタチオン、および評価される化合物または薬剤とを、インキュベートする。短時間（少なくとも 30 秒）のインキュベーションの後、それがあった場合は PGD₂ または PGE₂ への自然変換が起こり、PGD₂ または PGE₂ への酵素変換の定量化を妨害する全ての残余の PGH₂ をクエンチするために、FeCl₂ およびクエン酸を含有する停止溶液を加える（図 1）。次に、PGE₂ の産生に逆比例する特異的なシグナルを生成するために、蛍光標識（テキサスレッド）トレーサー（PGE₂）および抗 PGE₂ 抗体を含有する検出溶液を加える（図 2）。該酵素反応から産生された PGE₂ は、該抗体に対して特異的に競合し、蛍光標識したトレーサーを放出する。PGE₂ 合成酵素活性の阻害は、FP 値の増加をもたらさるう。

30

【0062】

材料グルタチオン (GSH) :

Sigma から入手できる (カタログ番号 G-6529)

PGH₂ :

Cayman Chemicals, Inc. から入手できる (カタログ番号 17020)

PGE₂ モノクローナル抗体 :

Assay Designs, Inc. から入手できる (カタログ番号 915-057)

PGE₂ :

Cayman Chemicals, Inc. から入手できる (カタログ番号 14010)

40

【0063】

ヒト mPGE S 酵素の発現

ヒト mPGE S 酵素は、Jakobsson, P. 等 “Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal glutathione-dependent, inducible Enzyme, Constituting a Potential Novel Drug Target.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 巻: 7220-7225 頁 (1999

50

年6月)に記載された細菌の発現系および方法を用いて発現した。本実施例で使用した m P G E S は、精製されたものではなく、むしろ該 m P G E S を発現するために用いた細菌から得られた膜画分に含有されていた。本実施例で使用されているヒト m P G E S をコードする DNA 配列は、図 9 A および配列番号 1 に記載されている。本実施例で使用されているヒト m P G E S のアミノ酸配列は、図 9 B および配列番号 2 に記載されている。

【 0 0 6 4 】

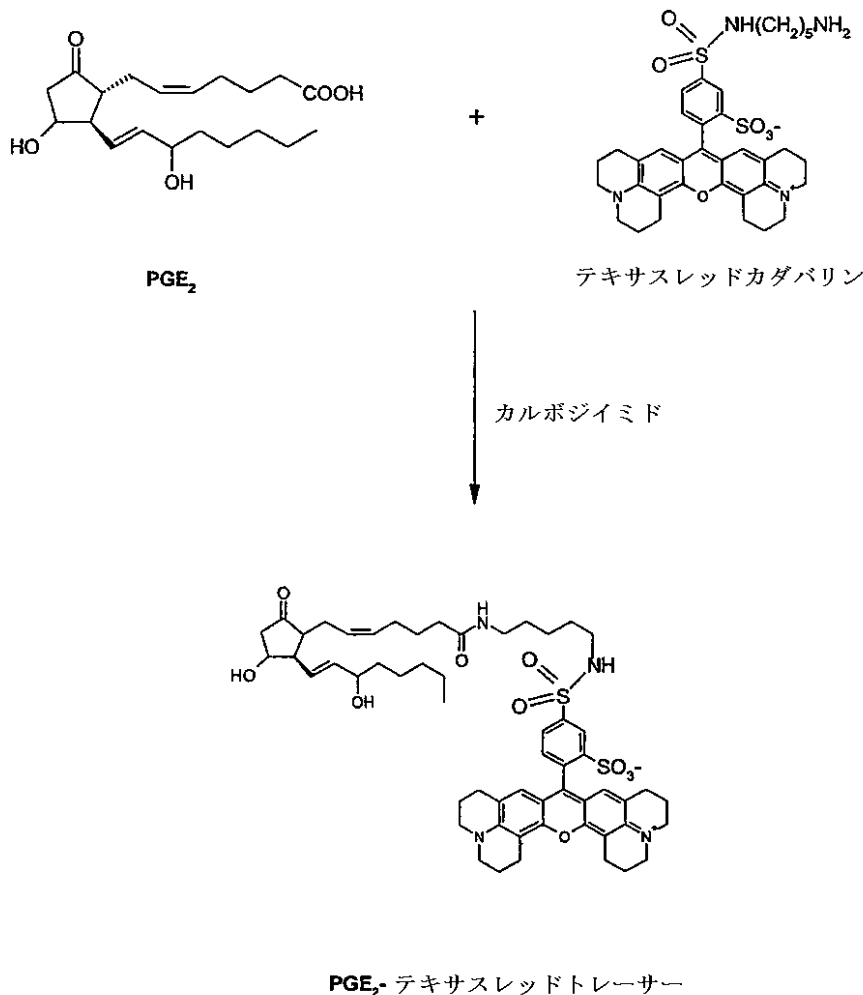
蛍光標識したプロスタグランジン生成物 P G E₂

上記で説明したように、多くの蛍光標識が本発明の方法で適用できる。特定の実施態様では、蛍光標識テキサスレッドはリンカーを介してプロスタグランジン E₂ (P G E₂) に結合している。この実施態様において、テキサスレッドで標識された P G E₂ はコンビニックス (Combinix) (San Mateo, CA) を用いて合成した。そうした成分 (moiety) の作成のための手順を以下に記載する：

10

【 化 1 】

PGE₂ トレーサー合成



20

30

40

【 0 0 6 5 】

この合成において、テキサスレッド カダバリン (Cadavarine) (Molecular Probes) を、プロスタグランジン E₂ (Cayman Chemicals) の乾燥塩化メチレン溶液に加えた。ジシクロヘキシルカルボジイミド (Sigma- Aldrich) を加え、窒素下、暗所で、24時間、攪拌しながら反応させた。逆相 H P L C クロマトグラフィーによる精製を、0.05% T F A をモディファイアーとして含んでいる水 / アセトニトリル勾配を用いて行った。この合成で用いたリンカーは変更することができる。

【 0 0 6 6 】

50

方法

最初に、酵素を含有する膜画分を、 K_2HPO_4 および KH_2PO_4 を含有する反応緩衝液で希釈し、リン酸緩衝化酵素溶液を作成した。アッセイすべき化合物または薬剤を次に酵素溶液に加えた。場合によっては、この溶液は次にインキュベートできる。この特定の実施例では、該溶液を約30分間インキュベートした。基質 PGH_2 のアセトン溶液およびコファクター GS を次に4で別々の容器に入れた。次に反応を開始させるために、該酵素溶液を PGH_2 を含む容器に入れた。この混合液を、約30秒間インキュベートした。次に、全ての残余の PGH_2 から PGE_2 への自然変換を阻止するために、20mMの $FeCl_2$ を含有する停止溶液を混合液の中に混ぜた。次に、抗- PGE_2 抗体および PGE_2 -テキサスレッドトレーサーを含有する検出溶液を該混合液に加え、混合液全体をインキュベートした。この特定の実施例では、インキュベーション時間は約120分だった。しかし、当業者は、この実施例に記載されたインキュベーション時間を如何ようにも変更して、なお有用な結果を得ることができる。化合物または薬剤を含まない他はこの混合液と同一の対照混合物を、同様に処理した；すなわち、同じ試薬、同じインキュベーション時間等で処理した。次に、該混合物全体および対照混合物を580nmの波長の平面偏光で照射し、該混合物全体および対照混合物の蛍光偏光を、励起波長580nm、および放射波長620nmにて、蛍光フィルターを用いて測定した。測定は、測定機器をFPモードにして行った。次に、これら2つの測定値を、化合物または薬剤を含有する混合液の蛍光偏光測定値が、対照混合液の蛍光測定値より大きいかどうか決定するために比較した。対照混合液の測定値より大きい混合液の測定値は、該化合物または薬剤がmPGE活性を抑制していることを示している。

10

20

【0067】

結果

上記のアッセイをmPGEの公知の阻害剤を用いて妥当性確認(validate)を行った。この阻害剤、MK-886は、Biomol Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA, カタログ番号EI-266)から購入可能であり、CAS番号は118414-82-7である。その構造式は図5に記載されている。この実験の結果は図6に記載されている。これらの結果は該mPGEアッセイの濃度反応曲線で示され、明らかに本方法が、化合物または薬剤のmPGE活性を抑制またはさらに阻害する能力をアッセイするために適用できることを示している。

30

【0068】

実施例II

造血系プロスタグランジンD合成酵素(hPGDS)の蛍光偏光アッセイ

抗原のチャレンジは、気道のアレルギー性障害における PGD_2 の産生を増加させる。 PGD_2 は、プロスタグランジンD合成酵素(hPGDS)による、 PGH_2 から PGD_2 への変換により産生され、D型プロスタグランジン受容体(DP)およびTh2細胞のケモカイン受容体(CRTH2)の両方に結合し、気管支収縮、血管拡張、および鼻粘膜拡張を増加させる。結果として発症する気管支過敏症、鼻つまり、ならびに好酸球およびTh2細胞の浸潤はアレルギー性反応をもたらす。その結果、hPGDS活性を低下または阻害する化合物または薬剤は、容易に治療薬として適用できる。

40

【0069】

hPGDS活性を測定する蛍光偏光(FP)アッセイもまた開発されてきた(図3および4)。このアッセイは蛍光偏光の原理に基礎をおいて構成されている。hPGDSを、 PGH_2 、グルタチオン、および評価される化合物または薬剤と混合した。短時間(約30秒)の後、 $FeCl_2$ (20mM)を含有する停止溶液を、 PGH_2 から PGD_2 への酵素変換の定量化を妨害する PGD_2 および PGE_2 の混合物へと自然に変換する全ての残余の PGH_2 をクエンチするために加えた(図3)。次に、蛍光標識(テキサスレッド)トレーサー(PGD_2)および抗- PGD_2 抗体を、 PGD_2 の生成に逆比例する特異的シグナルを産生させるために加えた(図4)。酵素反応により産生した PGD_2 は該抗体に対して特異的に競合し、蛍光標識トレーサーを遊離した。上記で論じた理由により、PGD

50

₂合成酵素活性の低下または阻害は、蛍光偏光 (F P) 値の増加をもたらす。

【 0 0 7 0 】

材料

h P G D S の発現

ヒト造血系 P G D₂合成酵素は、Kanaoka等 (Structure and Chromosomal Localization of Human and Mouse Genes for Hematopoietic Prostaglandin D Synthase. Eur. J. Biochem. 267巻: 3315-3322頁 (2000年)) に記載された方法に従って、細菌性発現系を用いて発現させた。該酵素をコードする塩基配列は、図 1 0 A および配列番号 3 に記載されている。コードしている塩基配列を増幅し、次に p T 7 - 7 に挿入し、それにより大腸菌 F L 2 1 (D E 3) 系の細胞を形質転換した。次に、形質転換細胞にヒト h P G D S 酵素の 10
産生させるために、最終濃度 0 . 6 m M のチオ - - D - ガラクトシダーゼを加えた。ヒト h P G D S を G S H - セファロース 4 B カラムクロマトグラフィーで精製した。本実施例で使用したヒト h P G D S のアミノ酸配列は、図 1 0 B および配列番号 4 に記載されている。

【 0 0 7 1 】

G S H :

Sigma から入手できる (カタログ番号 G-6529)

P G H₂ :

Cayman Chemicals, Inc. (Ann Arbor, Michigan) からカタログ番号 17020 として入手できる。 20

抗 P G D₂ 抗体 :

抗 P G D₂ モノクロナール抗体は、パスツール研究所からカタログ番号 0465328 として入手できる。

P G D₂ :

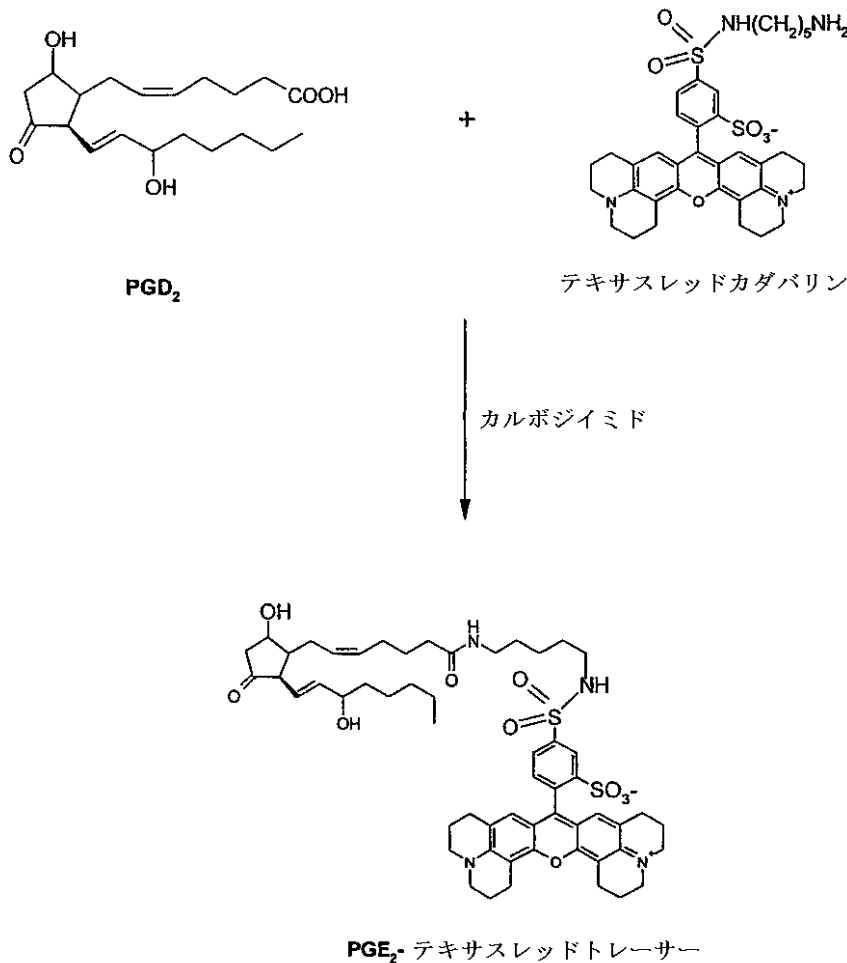
Cayman Chemicals, Inc. (Ann Arbor, Michigan) から入手できた (カタログ番号 12010) 。

【 0 0 7 2 】

蛍光標識したプロスタグランジン生成物 P G D₂ :

上記の実施例 1 のとおり、テキサスレッドを蛍光標識で用いた。テキサスレッドで標識したプロスタグランジン D₂ (P G D₂) は、Combinix (San Mateo, CA) によっても製造 30
されている。それらの成分を作成する手順を以下に記載する :

【化2】

PGD₂トレーサー合成

10

20

30

【0073】

この合成において、テキサスレッド カダバリン (Molecular Probes) を、プロスタグランジン D₂ (Cayman Chemicals) の乾燥塩化メチレン溶液に加えた。ジシクロヘキシルカルボジイミド (Sigma- Aldrich) を加え、窒素下、暗所で、24時間、攪拌しながら反応させた。逆相 HPLC クロマトグラフィー精製を、0.05% TFA をモディファイアーとして加えた水 / アセトニトリル勾配を用いて行った。この合成で用いたリンカーは変更することができる。

【0074】

方法

この方法は、使用した酵素が hPGDS およびプロスタグランジン生成物が PGD₂ である他は、実施例 I と同様に行った。上記で説明したように、最初に、酵素および GSH、K₂HPO₄ および KH₂PO₄ を含有する反応緩衝液で希釈し、酵素溶液を作成した。次に、アッセイする化合物または薬剤をこのリン酸緩衝化酵素溶液に加えた。場合によっては、この溶液は次にインキュベートできる。このインキュベーション時間は数分から1時間を超えるまで変更できる。この特定の実施例では、該酵素溶液は約30分間インキュベートした。

40

【0075】

基質 PGH₂ のアセトン溶液を4で別の容器に入れた。次に反応を開始させるために、該酵素溶液を PGH₂ を含む容器に加えた。この混合液を、約30秒間インキュベートした。次に、20mM の FeCl₂ およびクエン酸を含有する停止溶液を、全ての残余の

50

P G H₂からP G D₂またはP G E₂への自然変換を防止するために、混合液の中に混ぜた。次に、P G D₂を免疫原として有する抗体およびテキサスレッド標識P G D₂(トレーサー)を含有する検出溶液を、該混合液に加え、混合液全体をインキュベートした。この特定の実施例では、インキュベーション時間は約120分だった。しかし、この実施例に記載されたインキュベーション時間および他のインキュベーション時間は、試薬の濃度に応じて変更できる。

【0076】

対照混合物は、酵素を含有している混合物と同じように調製され、該対照混合物は酵素を含有している混合物と同様の方法；すなわち、同じインキュベーション時間等で処理された。しかし、該対照混合物は、評価する化合物または薬剤は含まない。次に、該混合物全体および対照混合物を580nmの波長(テキサスレッドが励起する波長)の平面偏光で照射し、該混合物および対照混合物の蛍光偏光を、励起波長580nmおよび放射波長620nmにて蛍光フィルターを用いて測定した。この蛍光偏光測定は、測定機器をFPモードにして行った。通常は、用いた波長は方法で用いた蛍光標識に依存するだろう。これら2つのFP測定値を、次に、化合物または薬剤を含有する混合液の蛍光偏光測定値が、対照混合液の蛍光測定値より大きいかどうか決定するために比較した。対照混合液の測定値より大きい混合液の測定値は、該化合物または薬剤がh P G D S活性を低下させていることを示している。

【0077】

結果

上記のアッセイをh P G D Sの公知の阻害剤であるH Q L 7 9を用いて妥当性確認(validate)を行った。H Q L 7 9は、W O 95/01350に記載されている。H Q L 7 9の構造式は図7に記載されている。この実験の結果は図8に記載されている。これらの結果は、明らかに本発明の方法により、H Q L 7 9がh P G D S活性を低下させることが検出されたことを示している。

【0078】

結論

実施例IおよびIIは、本発明の方法が簡便で、多数回の洗浄や放射性同位元素を必要とせず、化合物または薬剤が、プロスタグランジン合成酵素、特にh P G D Sまたはm P G E Sの活性を低下または阻害するかどうか測定するために、容易にハイスループット法に適用できることを、明白に証明している。

【0079】

本発明は、ここに記載された特定の実施態様に限定されない。実際、ここで記載されたものに加えてさらに種々の本発明の修正が可能なことは、上記の記載および以下の図から、当業者には明らかである。そうした修正は、付随する特許請求項の範囲に含まれるであろう。

【0080】

ここで引用された種々の文献の開示は、全体で、参照により組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】基質P G H₂からP G E₂への酵素変換およびP G H₂からP G D₂またはP G E₂いずれかのプロスタグランジン生成物への自然変換との間の競合を示す模式的図面であり、用いる酵素はm P G E Sであり、自然変換の阻害はF e C l₂によるものである。

【図2】プロスタグランジン合成酵素がm P G E Sであり、プロスタグランジン生成物がP G E₂である、本発明の方法の模式的図面である。

【図3】基質P G H₂からP G D₂への酵素変換およびP G H₂からP G D₂またはP G E₂いずれかのプロスタグランジン生成物への自然変換との間の競合を示す模式的図面であり、用いる酵素はh P G D Sであり、自然変換の阻害はF e C l₂によるものである。

【図4】プロスタグランジン合成酵素がh P G D Sであり、プロスタグランジン生成物がP G D₂である、本発明の方法の模式的図面である。

10

20

30

40

50

【図5】化合物または薬剤がプロスタグランジン合成酵素活性を抑制または阻害するかどうかを測定するために、本発明の方法が使用できることを証明するために用いられる公知のmPGEs阻害剤である、MK-886の化学構造を示す。

【図6】プロスタグランジン合成酵素mPGEsおよび公知の阻害剤MK-886を用いた、本発明の方法の濃度反応曲線のグラフ図面である。IC50 = 27.5 μM。これらの結果は、当業者が、本発明の方法により化合物または薬剤がプロスタグランジン合成酵素、この場合はmPGEs活性を、低下できるかどうか測定できることを示している。

【図7】HQL79の化学構造を示す。

【図8】HQL79によるhPGDS活性の低下が本発明の方法により検出できることを表す棒グラフを示す。

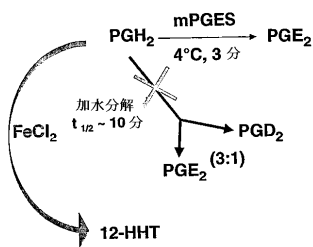
【図9A】実施例1で用いられるヒトmPGEsの塩基配列およびアミノ酸配列を示す(配列番号1)。

【図9B】実施例1で用いられるヒトmPGEsの塩基配列およびアミノ酸配列を示す(配列番号2)。

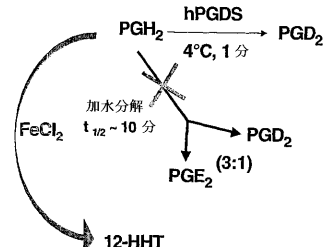
【図10A】ヒトH-PGDSの塩基配列およびアミノ酸配列を示す(配列番号3)。

【図10B】ヒトH-PGDSの塩基配列およびアミノ酸配列を示す(配列番号4)。

【図1】

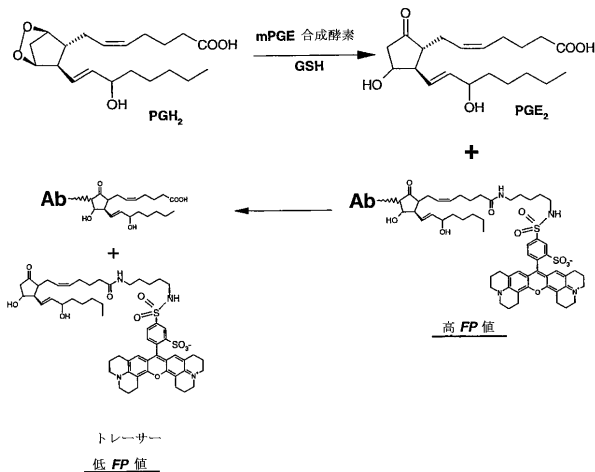


【図3】



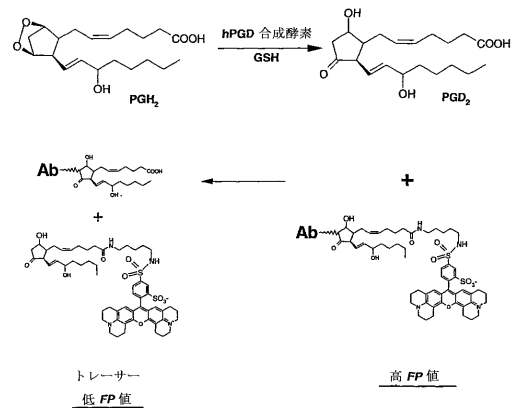
【図2】

FPをベースとした mPGE 合成酵素のアッセイ

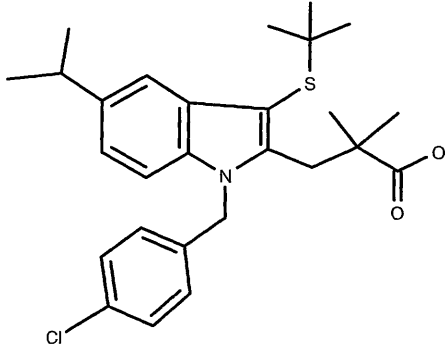


【図4】

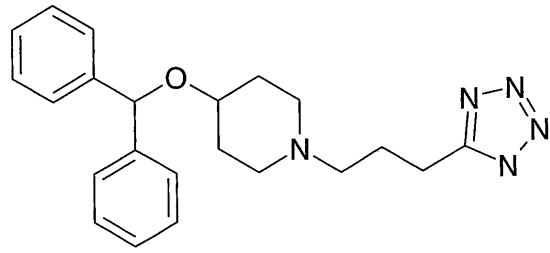
FPをベースとした hPGD 合成酵素のアッセイ



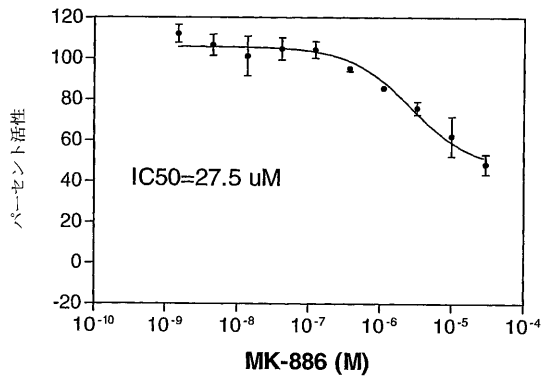
【 図 5 】



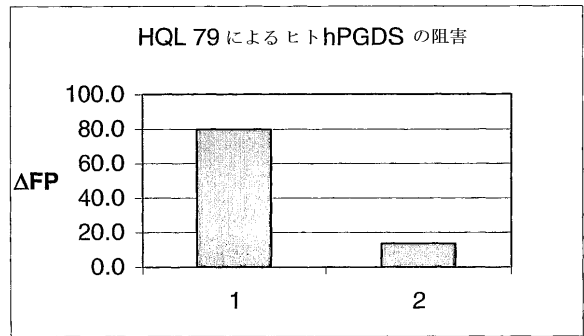
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 A 】

```
atgcctgccacagcctggtgatgagcagcccgccctccggcctctgctctgagcagcgtgctgctcatcaag
atgtacgtggtggccatcatcaccggccaagtgagcctgcggaagaaggccttggcaaccccgaggatgcccga
gacacggaggccccagatattgacgagcgcaccgccgctggaacgctgacctaggccccacggaaacgacatg
gagaccatcaccctcctttctggctctgctactccttctggctcctaaccttttgcgctggatgcaactcctggt
ctctcgtggccggtggtgacacaccggtggcctaccctggggaagctggggcaccatccgctcgtgacctaacc
cctggcccagctcccctggcctccatggctctgagatcctctgggaagcggcccgccacactgta
```

【 図 9 B 】

```
MPAHS LVMSSPALPFLLCSTLLVIKMYVVAITGQVRLRKKAF
ANPEDALRHGGPQYCRSDPDVERCLRHRNDMETIYPFLFLG
FVYSFLGPNPFVAMHFLVFLVGRVAHTVAYLGKLRAPIRSVT
YTLAQLPCASMALQILWEARHL
```

【 図 10 A 】

```
atgccaaactacaactcatttttaatatgaggggagagcagaaattattcgtacatattgctt
attggacatacagatgaagaccacagaatagaacaagctgactggcctgaaatcaatcaact
tccattggaaaaatcccatttggagttgatggactactctcaccagagcctgcaatagcaa
gatattgacaaaaacacagatttggctggaaacacagaaatggaacaatgcatggtgatgctatt
gtggacactcctggatgattcatgctatttctctggcagagaaaaagcaagatggaagagc
agatgtcaatgagctcactcagataatgcctcctcttatgcaagactggacacatattaggggg
gagagaatggctattgtaactctgtaactggcagactctactgggagattgcaaccacact
ttgctttaagcctgacctgttagacaaccatccaaggctggcttaccggaagaagtcacaagcca
ttcctgctgctgaactggataaaacgaaggcccaaaccaactctag
```

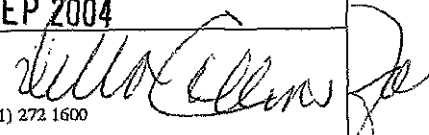
【 図 10 B 】

```
MPNYKLYFNMRGRAEIRYFAYLDIQYEDHRIEQADWPEIKSTLPFGKIPILEVDGLT
LHQSLAIARYLTKNTDLAGNTEMEQCHVDAIVDTLDDFMSCFPWAEEKQDVKEQMF
NELLTYNAPHLMQDLDTYLGGREWLIGNSVTWADFYWEICSTLLVFKPDLDDNHP
RLVTLRKKVQAIPAVANWIKRRPQTKL
```

【配列表】

2006511789000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/25766	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53; C12N 15/09, 9/88 US CL : 435/7.92, 69.2, 232, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.92, 69.2, 232, 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) STN & WEST. SEQ ID Nos. 2 & 4 are known sequences.			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
A	JAKOBSSON et al. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. Proc. Natl. Acad. Sci. June 1999, Vol. 96, pages 7220-7225. See the entire document, especially Figure 1 depicting microsomal PGE synthase or SEQ ID NO: 2.	1-28	
A	KANAOKA et al. Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase. Eur. J. Biochem. 2000, Vol. 267, pages 3315-3322. See the entire article, especially human PGDS [or SEQ ID NO: 4] disclosed in Figure 1.	1-28	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"I"	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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 21 June 2004 (21.06.2004)		Date of mailing of the international search report 08 SEP 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Tekchand Saidha  Telephone No. (571) 272 1600	

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 K	31/454	(2006.01)	A 6 1 K	31/454
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
C 1 2 Q	1/25	(2006.01)	C 1 2 Q	1/25
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

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

- (72) 発明者 ジューイン・リー
 アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 2 2 . フレミングトン . ヘイスティングスレーン 1 2
- (72) 発明者 ジュンジー・シーオン
 アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 6 9 . ラーリタン . ブルーバードウェイ 4
- (72) 発明者 ジェフリー・エス・サボール
 アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . パートランドドライブ 2 4
- (72) 発明者 ワイ・ヘンリー・マー
 アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . ブラドリーレーン 1 0 2

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA60 FA15 FB01 FB03 FB07 FB12
 4B024 AA11 BA07 CA02 HA15
 4B063 QA18 QQ79 QQ95 QR20 QR57 QR65 QS03 QS33 QX02
 4C086 AA10 BC14 BC62 GA07 ZA07 ZA08 ZB11 ZC20

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006511789A5	公开(公告)日	2006-09-14
申请号	JP2004529521	申请日	2003-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	安万特制药公司莱特每次		
申请(专利权)人(译)	每次Aventis制药公司的股份有限公司莱特		
[标]发明人	ジューインリー ジュンジーシーオン ジェフリーエスサポール ワイヘンリーマー		
发明人	ジューイン・リー ジュンジー・シーオン ジェフリー・エス・サポール ワイ・ヘンリー・マー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/536 A61K31/405 A61K31/454 A61P43/00 A61P29/00 C12Q1/25 C12N15/09		
CPC分类号	A61P29/00 C12Q1/533 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/50.ZNA.Z G01N33/15.Z G01N33/536.D A61K31/405 A61K31/454 A61P43/00. 111 A61P29/00 C12Q1/25 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA60 2G045/FA15 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 4B024 /AA11 4B024/BA07 4B024/CA02 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QQ95 4B063/QR20 4B063/QR57 4B063/QR65 4B063/QS03 4B063/QS33 4B063/QX02 4C086/AA10 4C086/BC14 4C086 /BC62 4C086/GA07 4C086/ZA07 4C086/ZA08 4C086/ZB11 4C086/ZC20		
优先权	60/404008 2002-08-16 US 2002029244 2002-12-16 GB		
其他公开文献	JP2006511789A		

摘要(译)

本文提供了新颖和有用的方法，用于评估化合物或试剂降低微粒体前列腺素E合酶或造血前列腺素D合酶的活性以产生其各自的前列腺素产物的能力。