

(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2007-514414

(P2007-514414A)

(43) 公表日 平成19年6月7日(2007.6.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G O 5 4
A 6 1 K 38/27 (2006.01)	A 6 1 K 37/36	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/04 (2006.01)	A 6 1 K 37/43	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-539986 (P2006-539986)	(71) 出願人	504151848
(86) (22) 出願日	平成16年11月10日 (2004.11.10)		シンタ ファーマシューティカルズ コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成18年7月5日 (2006.7.5)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン ハートウェル アベニュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/038241		4 5
(87) 国際公開番号	W02005/046619	(74) 代理人	100106002
(87) 国際公開日	平成17年5月26日 (2005.5.26)		弁理士 正林 真之
(31) 優先権主張番号	60/519,048	(72) 発明者	ルー ロンゼン
(32) 優先日	平成15年11月10日 (2003.11.10)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 リンカーン サウス グレート ロード 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		5 8
(31) 優先権主張番号	60/519,040		
(32) 優先日	平成15年11月11日 (2003.11.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c - R e l 依存性サイトカイン産生を調節する組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、N F B の発現レベル及び/又は I B の量を実質的に変更することなく、c - R e l 依存性サイトカイン産生を調節する組成物及び方法を対象にする。本発明は、N F B の発現レベル及び/又は I B の量が実質的に変化せずに c - R e l の細胞内局在性が変化することをアッセイして判定される c - R e l 活性のモジュレーターのスクリーニングも対象にする。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞中で c - R e l の細胞内局在を変更する分子を識別する方法であって、
 (a) 前記細胞を 1 つ以上の候補分子に接触させることと、
 (b) 前記細胞中で c - R e l 分子の局在を検出することと、を含み、
 N F B の発現レベル及び / 又は I B の量を前記 1 つ以上の候補分子に接触されない細胞中の前記量に対して実質的に変更せずに、核に局在した c - R e l の量が増加又は減少することは、前記候補分子が c - R e l の細胞内局在を変更することを示す方法。

【請求項 2】

細胞中で c - R e l の細胞内局在を変更する分子を識別する方法であって、 10
 (a) 前記細胞中で 1 つ以上の候補分子を組み換え発現することと、
 (b) 前記細胞中で c - R e l 分子の局在を検出することと、を含み、
 N F B の発現レベル及び / 又は I B の量を前記 1 つ以上の候補分子が発現されない細胞中の前記量に対して実質的に変更せずに、核に局在した c - R e l 量が増加又は減少することは、前記候補分子が c - R e l の細胞内局在を変更することを示す方法。

【請求項 3】

ステップ (b) は、前記細胞を、 c - R e l の抗体又はこの抗体の結合領域、及び前記抗体の蛍光標識化された結合パートナーに、免疫特異的結合に導く条件で接触させることを含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (b) は、前記細胞を、 c - R e l の蛍光標識化された抗体又はこの抗体の結合領域に、免疫特異的結合に導く条件で接触させることを含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。 20

【請求項 5】

ステップ (b) は、前記細胞から単離された核タンパク質を、質量分析法によって配列決定することを含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞は、培養細胞である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞中で c - R e l の細胞内局在を変更する分子を識別する方法であって、 30
 (a) 1 つ以上の候補分子を前記細胞に微量注入することと、
 (b) 前記細胞中で c - R e l 分子の局在を検出することと、を含み、
 N F B の発現レベル及び / 又は I B の量を前記 1 つ以上の候補分子が微量注入されない細胞中の前記量に対して実質的に変更せずに、核に局在した c - R e l 量が増加又は減少することは、前記候補分子が c - R e l の細胞内局在を変更することを示す方法。

【請求項 8】

c - R e l 活性を直接又は間接的に調節する分子をスクリーニングする方法であって、
 (a) c - R e l を発現する細胞を、 1 つ以上の候補分子に接触させることと、
 (b) N F B の発現レベル及び / 又は I B の量を前記候補分子に接触されない細胞中の前記レベルに対して実質的に変更せずに、前記細胞中で核に局在した c - R e l のレベルを検出することと、を含み、 40
 前記候補分子の存在下で核に局在した c - R e l のレベルが高い又は低いことは、前記分子が c - R e l の活性を調節することを示す方法。

【請求項 9】

c - R e l 活性を直接又は間接的に調節する分子をスクリーニングする方法であって、
 (a) c - R e l を発現する細胞中で、 1 つ以上の候補分子を組み換え発現することと、
 (b) N F B の発現レベル及び / 又は I B の量を前記候補分子が発現されない細胞中の前記レベルに対して実質的に変更せずに、前記細胞中で核に局在した c - R e l のレベルを検出することと、を含み、 50

前記候補分子の存在下で核に局在した c - R e l のレベルが高い又は低いことは、前記分子が c - R e l の活性を調節することを示す方法。

【請求項 1 0】

前記候補分子は、核への c - R e l 局在の量を減少させ、それにより c - R e l 活性の候補阻害剤となる請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記候補分子は、核への c - R e l 局在の量を増加させ、それにより c - R e l 活性の候補アゴニストとなる請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記候補分子は、固定ランダムペプチドライブラリに由来する請求項 8 又は 9 に記載の方法。 10

【請求項 1 3】

前記核への c - R e l 局在は、前記細胞を、c - R e l に結合する分子、及び c - R e l 以外の核特異的タンパク質に結合する分子に、結合に導く条件で接触させることと、それが起こる、同じ細胞内部位への分子のいかなる結合も検出することを含む方法によって検出される請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ステップ (b) は、c - R e l の蛍光標識化された抗体又はこの抗体の結合領域と、細胞を、免疫特異的結合に導く条件で接触させることを含む請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 1 5】

核への c - R e l の移動を阻害するが、N F B の発現及び / 又は I B の量を実質的に変更しない化合物。 20

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の化合物、及び、薬理的に許容できるキャリア又は賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 1 7】

成長ホルモン又は成長ホルモン分泌促進物質を更に含む請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

T N F アンタゴニストを更に含む請求項 1 6 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 1 9】

I L - 1 2 産生に関連する疾患又は障害を治療又は回復する方法であって、請求項 1 7 に記載の組成物を、前記疾患又は障害を治療又は回復するのに十分な量で、必要とする患者に投与することを含む方法。

【請求項 2 0】

成長ホルモン、成長ホルモン分泌促進物質、T N F アンタゴニスト、抗炎症剤、及び / 又は免疫調節剤を同時投与することを更に含む請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

必要であると識別された患者において、I L - 1 2 産生に関連する疾患又は障害を治療又は回復する方法であって、請求項 1 7 に記載の組成物を、前記疾患又は障害を治療又は回復するのに十分な量で、必要とする患者に投与することを含む方法。 40

【請求項 2 2】

必要であると識別された患者に投与するために標識化された請求項 1 5 に記載の化合物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、全体が、ここに参考として組み込まれる、それぞれ 2 0 0 3 年 1 1 月 1 0 日及び 2 0 0 3 年 1 1 月 1 1 日に出願された米国仮特許出願第 6 0 / 5 1 9 0 4 8 号及び第 6 0 / 5 1 9 0 4 0 号の利益を主張する。

【0002】

本発明は、NF- κ Bの発現レベル及び/又はIL-1 β の量を実質的に変更することなく、c-Rel依存性サイトカイン産生を調節する組成物及び方法を対象にする。本発明は、NF- κ Bの発現レベル及び/又はIL-1 β の量が実質的に変更せずに、c-Relの細胞内局在が変化することをアッセイすることによって判定されるc-Rel活性の調節物質のスクリーニングも対象にする。

【背景技術】

【0003】

自己免疫疾患及び炎症性障害の発達におけるサイトカインの役割は、周知である。インターロイキン12(IL-12)のようなサイトカインは、炎症性刺激への急性位相応答を媒介し、マクロファージ及び他の細胞の殺菌性機能を強化し、且つ特異なリンパ球応答を促進する。IL-12は、多発性硬化症、重症筋無力症、自己免疫神経疾患、ギラン-バレー症候群、自己免疫ブドウ膜炎、自己免疫溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫血小板減少、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎、ヴェグナー肉芽腫症、ベーチェット病、乾癬、疱疹性皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、クローン病、潰瘍性大腸炎、間質性肺線維症、骨髄線維症、肝線維症、心筋炎、甲状腺炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫肝炎、1型又は免疫媒介真性糖尿病、グレーブス病、橋本甲状腺病、自己免疫卵巣炎及び睾丸炎、副腎の自己免疫疾患；リウマチ関節炎、全身性紅斑性狼瘡、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、シェーグレン症候群、及び移植片対宿主病を含むがそれらに限定されない多重Th1優性自己免疫疾患において、役割を果たす。

10

20

【0004】

インターロイキン-12(IL-12)は、2つの独立して調節されるサブユニットp35及びp40からなり、ジスルフィド結合されたヘテロ二量体サイトカイン(p70)である。IL-12は、細菌、細菌生成物、例えばリポ多糖(LPS)及び細胞内寄生生物の刺激で、食細胞及び抗体提示細胞、特にマクロファージ及び樹状細胞によって産生される。IL-12の十分に立証された生物学的機能は、T及びNK細胞からのインターフェロン- γ 発現の誘導、及びTh1Tリンパ球型への分化である。その発現が、IL-12によって誘導されるIFN- γ は、単球及びマクロファージからのIL-12産生の強かつ選択的なエンハンサーである。効果は、LPS又は黄色ブドウ球菌Cowan I(SAC)による刺激の前の少なくとも8時間のIFN- γ による広範囲な治療後に明白であり、特にIFN- γ の進行中の産生がある慢性疾患において、IL-12産生がIFN- γ によって増加することを示唆している。IL-12産生を引き起こす感染性又は炎症性刺激の後、強力なフィードバックループが、IL-12誘導IFN- γ に、IL-12産生を更に増加させることを促進し、結果として生じる炎症誘導性サイトカインの過剰産生につながることを推定される。サイトカインIL-23は、IL-12のp19サブユニット及び同じp40サブユニットからなるヘテロ二量体である。

30

【0005】

LPSは、マクロファージ中で、p50/c-Rel及びp50/p65のヘテロ二量体が細胞質から核まで移動するのを刺激する。これらヘテロ二量体の両方とも、p40のプロモーター中で、NF- κ B部位と結合する。しかしながら、c-Relのみが、インビトロ及びインビボで多数の炎症誘導性刺激に应答しp40産生に至らせるToll様レセプター-4(TLR4)を介したLPS誘導シグナル伝達に、重要であることが示された。

40

【0006】

本出願のセクション2又は他のいずれかのセクションの引用又は識別は、かかる参照が、本発明の先行技術として利用できるという自白として解釈されるべきでない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、候補分子に接触されない、又はリン酸緩衝食塩水(PBS)のような陰性対

50

照に接触される細胞に関して、NF- κ Bの発現及び/又はI κ Bの量のいかなる変更も検出することなく(例えば、NF- κ B及び/又はI κ Bの発現レベルを変更する物質を評価するが、検出せずに)、1つ以上の候補分子に接触される細胞(例えば免疫細胞)の核に局在したc-Rel分子レベルの変更を検出することによって、c-Rel依存性転写を選択的に変更する分子を識別する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

1つの実施態様において、本発明は、次のステップ:(a)1つ以上の候補分子と、細胞(例えばナチュラルキラー細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、又は単球細胞のような免疫細胞)を接触させることと、(b)細胞中のc-Rel分子の局在を検出することと、を記載した順序で含み、c-Rel依存性転写を選択的に変更する分子を識別する方法であって、1つ以上の候補分子と接触しない、又はPBSのような陰性対照と接触する細胞中の量に対してNF- κ Bの発現レベル及び/又はI κ Bの量を実質的に変更することなく、核内のc-Rel量が増加又は減少することは、候補分子がc-Rel依存性転写を変更することを示す方法を提供する。この実施態様によれば、IFN- γ 及び/又はリポ多糖(LPS)によって同時に刺激されながら、細胞が候補分子と接触することがある。好ましくは、この実施態様によれば、細胞は、IFN- γ 及び/又はリポ多糖(LPS)の刺激に続き候補分子と接触する。特定の実施態様において、候補分子と接触した細胞は、マクロファージ、単球、又は樹状細胞である。

10

【0009】

もう1つの実施態様において、本発明は、次のステップ:(a)1つ以上の候補分子を組換え発現する細胞(例えばナチュラルキラー細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、又は単球細胞のような免疫細胞)を接触させることと、(b)細胞中のc-Rel分子の局在を検出することと、を記載した順序で含み、c-Rel依存性転写を選択的に変更する分子を識別する方法であって、1つ以上の候補分子を発現しない細胞中の量に対してNF- κ Bの発現レベル及び/又はI κ Bの量を実質的に変更することなく、核内のc-Rel量が増加又は減少することは、候補分子がc-Rel依存性転写を変更することを示す方法を提供する。この実施態様によれば、細胞は、候補分子の発現誘導の前、同時、又は後に、IFN- γ 及び/又はリポ多糖(LPS)によって刺激され得る。特定の実施態様において、候補分子を発現する細胞は、マクロファージ、単球、又は樹状細胞である。

20

30

【0010】

当該技術分野において公知のいかなる方法も、細胞の核に局在したc-Relレベルを測定するために使用できる。例えば細胞中のc-Relの局在は、免疫特異性結合につながる条件で、細胞を、c-Relに対する抗体又は前記抗体の結合領域、及び前記抗体の蛍光標識結合パートナーと接触させることによって検出できる。あるいは、細胞中のc-Relの局在は、免疫特異性結合につながる条件で、細胞を、c-Relに対する蛍光標識抗体又は前記抗体の結合領域と接触させることによって検出できる。細胞中のc-Relの局在は、細胞から単離された核タンパク質を質量分析によって配列決定することによっても検出できる。更に、細胞中のc-Relの局在は、c-Rel依存性転写の量を測定すること、例えばp40転写、全細胞p40タンパク質レベル、又は全核p40タンパク質レベルを測定することによって検出できる。

40

【0011】

当該技術分野において公知のいかなる方法も、NF- κ Bの発現レベルを測定するために使用でき、免疫特異性結合によるNF- κ Bファミリーメンバーp50、p65及びc-Relのタンパク質レベルを測定すること、又はmRNAをコード化するレベルを測定することを含むが、それらに限定されない。特定の実施態様において、NF- κ Bの発現は、例えば全細胞タンパク質抽出物を使用するウェスタンブロットにおいて測定されるような、NF- κ Bファミリーメンバーp50、p65及びc-Relの発現を指す。当該技術分野において公知のいかなる方法も、I κ Bの量を測定するために使用でき、例えば全細胞又は細胞質タンパク質抽出物を使用するウェスタンブロットにおいて測定されるように、細

50

胞中のコード化 mRNA 又は I B タンパク質の総量を測定すること、又は例えば未処理細胞中のレベルと比較して、処理細胞中の I B タンパク質レベルを測定することにより、I B の分解レベルを測定することを含むが、それらに限定されない。

【0012】

NF B 及び / 又は I B (I B 及び I B を含む) の発現及び / 又は量において、ここで使用されるような用語「実質的に変更する」は、10%を超え、好ましくは20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、又は95%を超えるNF B の発現レベル及び / 又は I B の量の变化を意味する。

【0013】

発現が c - R e l 転写に依存するいかなるタンパク質も、c - R e l 依存性転写の変更の結果として変更できる。かかるタンパク質の例には、I L - 6、I L - 10、I L - 12、I L - 15、I L - 23、I F N - 、B c l - x L、M c l - 1、J a g g e d - 1、I R F - 4、及び c - m y c が含まれる。従って、1つ以上のかかるタンパク質の発現は、本発明の方法に従って c - R e l 依存性転写を選択的に変更すると識別される分子によって変更できる。好ましい実施態様において、I L - 12 及び / 又は I L - 23 の発現レベルは、本発明の方法に従って c - R e l 依存性転写を選択的に変更すると識別される分子によって変更される。

【0014】

本発明は、候補分子と接触しない、又はリン酸緩衝食塩水 (P B S) のような陰性対照と接触する細胞に関して、NF B の発現及び / 又は I B の量のいかなる変更も検出することなく (例えば、NF k B 及び / 又は I k B の発現レベルを変更する物質を評価するが、検出せずに)、1つ以上の候補分子と接触する細胞 (例えば免疫細胞) の核に局在した c - R e l 分子のレベル変更を検出することによって、c - R e l 依存性サイトカイン産生を選択的に変更する分子を識別する方法を提供する。産生タンパク質の c - R e l に依存するサイトカインの例には、I L - 6、I L - 10、I L - 12、I L - 15、I L - 23、及び I F N - が含まれるが、それらに限定されない。従って、1つ以上のかかるサイトカインの発現は、本発明の方法に従って c - R e l 依存性サイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子によって変更できる。好ましい実施態様において、I L - 12 及び / 又は I L - 23 の発現レベルは、本発明の方法に従って c - R e l 依存性サイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子によって変更される。

【0015】

1つの実施態様において、本発明は、次のステップ：(a) 1つ以上の候補分子と、細胞 (好ましくは、I F N - 及び / 又は L P S 刺激の後又は同時に) を接触させることと、(b) 細胞中の c - R e l 分子の局在を検出することと、を記載した順序で含み、細胞中の c - R e l 依存性サイトカイン産生を選択的に変更する分子を識別する方法であって、1つ以上の候補分子と接触しない、又は P B S のような陰性対照と接触する細胞中の量に対して NF B の発現レベル及び / 又は I B の量を実質的に変更することなく、核内の c - R e l 量が増加又は減少することは、候補分子が c - R e l 依存性サイトカイン産生を変更することを示す方法を提供する。この実施態様によれば、候補分子と接触する細胞は、好ましくは、マクロファージ、単球、又は樹状細胞である。

【0016】

もう1つの実施態様において、本発明は、次のステップ：(a) 1つ以上の候補分子を細胞中で組換えにより発現することと、(b) 細胞中の c - R e l 分子の局在を検出することと、を記載した順序で含み、細胞中の c - R e l 依存性サイトカイン産生を選択的に変更する分子を識別する方法であって、1つ以上の候補分子を発現しない細胞中の量に対して NF B の発現レベル及び / 又は I B の量を実質的に変更することなく、核内の c - R e l 量が増加又は減少することは、候補分子が c - R e l 依存性サイトカイン産生を変更することを示す方法を提供する。この実施態様によれば、細胞は、候補分子の発現誘導の前、同時、又は後に、I F N - 及び / 又はリポ多糖 (L P S) によって刺激され得る。特定の実施態様において、候補分子を発現する細胞は、マクロファージ、単球、又は

樹状細胞である。

【0017】

もう1つの実施態様において、本発明は、次のステップ：(a) 1つ以上の候補分子を、細胞に微量注入することと、(b) 細胞中のc-Rel分子の局在を検出することと、を記載した順序で含み、(IFN- γ 及び/又はLPS刺激の後又は同時に) 細胞中のc-Rel依存性サイトカイン産生を選択的に変更する分子を識別する方法であって、1つ以上の候補分子によって微量注入されない、又は陰性対照によって微量注入される細胞中の量に対してNF- κ Bの発現レベル及び/又はI κ Bの量を実質的に変更することなく、核内のc-Rel量が増加又は減少することは、候補分子がc-Rel依存性サイトカイン産生を変更することを示す方法を提供する。この実施態様によれば、候補分子と接触する細胞は、好ましくは、マクロファージ、単球、又は樹状細胞である。

10

【0018】

1つの実施態様において、本発明の方法に従って細胞中のc-Rel依存性転写及び/又はc-Relサイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子は、1つ以上の次のタンパク質：PU-1、Jak1、Jak2、STAT1、ERK、PKA、I κ B及びp38キナーゼの発現レベル及び/又は活性を変更しない。もう1つの実施態様において、本発明の方法に従って細胞中のc-Rel依存性転写及び/又はc-Relサイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子は、核内のICSBPのレベルを減少させる。特定の実施態様において、本発明の方法に従って細胞中のc-Rel依存性転写及び/又はc-Relサイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子は、少なくとも

20

【0019】

10%、好ましくは少なくとも15%、少なくとも18%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、又は少なくとも45%だけ細胞の核内のインターフェロンコンセンサ配列結合タンパク質(ICSBP)のレベルを減少させる。もう1つの実施態様において、本発明の方法に従って細胞中のc-Rel依存性転写及び/又はc-Relサイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子は、核内のp50のレベルを減少させる。もう1つの実施態様において、本発明の方法に従って細胞中のc-Rel依存性転写及び/又はc-Relサイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子は、核内のp65のレベルを増加する。特定の実施態様において、本発明の方法に従って細胞中のc-Rel依存性転写及び/又はc-Relサイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子は、少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、又は少なくとも85%だけ核内のp65のレベルを増加する。もう1つの実施態様において、本発明の方法に従って細胞中のc-Rel依存性転写及び/又はc-Relサイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子は、細胞中のp35転写を減少させる。更にもう1つの実施態様において、本発明の方法に従って細胞中のc-Rel依存性転写及び/又はc-Relサイトカイン産生を選択的に変更すると識別される分子は、次の効果：核内のICSBPレベルの減少、核内のp50のレベルの減少、核内のp65のレベルの増加、及びp35転写の減少の2つ以上をもたらす。

30

40

【0020】

本発明は、次のステップ：(a) NF- κ Bの発現レベル又はI κ Bの量を実質的に変更することなく、細胞の核内のc-Rel量を減少させる1つ以上の薬剤を標識化することと、(b) 1つ以上の標識化薬剤と薬物標的との間に複合体が形成される条件で、1つ以上の標識化薬剤に細胞を接触させることと、(c) 複合体を単離することと、(d) 複合体から薬物標的を識別することと、を記載した順序で含み、細胞中でc-Rel依存性転写の選択的阻害を媒介する薬物標的を識別する方法も提供する。もう1つの実施態様において、本発明は、次のステップ：(a) NF- κ Bの発現レベル又はI κ Bの量を実質的に変更することなく、細胞の核内のc-Relの量を減少させる1つ以上の薬剤を標識化す

50

ることと、(b) 1つ以上の標識化薬剤と薬物標的の間に複合体が形成される条件で、1つ以上の標識化薬剤に細胞を接触させることと、(c) 複合体を単離することと、(d) 複合体から薬物標的を識別することと、を記載した順序で含み、細胞中でc-Rel依存性サイトカイン産生を選択的に阻害する薬物標的を識別する方法を提供する。識別された薬物標的は、その場合サイトカイン発現レベル、特にc-Rel依存性サイトカインレベルを変更する化合物を識別するために使用できる。

【0021】

本発明は、c-Rel細胞内局在を変更するが、NF- κ Bの発現レベル又はI κ Bの量を変更しない分子と細胞を接触させることによってc-Relの細胞内局在を変更することと、発現又は活性が、分子と接触しないか又はPBSのような陰性対照と接触する細胞と比較して、分子と接触する細胞中で変更される分子を識別することと、を含み、発現又は活性が、c-Relの細胞内局在の変更、すなわち核内のc-Relの増加又は減少のために変更される分子を識別する方法も対象にする。

10

【0022】

本発明の1つの実施態様において、c-Relの細胞内局在、特にc-Relの核の減少を変更するがNF- κ Bの発現レベル又はI κ Bの量を実質的に変更しない分子にc-Relを発現する細胞を接触させることを含み、c-Relの活性を調節する方法が提供される。この実施態様の側面において、細胞中のc-Relタンパク質の全体的レベルは、変わらない。他の側面において、細胞中のc-Relタンパク質の全体的レベルは、変更される。本発明のもう1つの実施態様において、c-Relの細胞内局在を変更するが、NF- κ B発現のレベル又はI κ Bの量を実質的に変更しない分子にc-Relを発現する細胞を接触させることを含み、細胞中のNF- κ B発現のレベル又はI κ Bの量を実質的に変更することなく細胞中でc-Rel依存性サイトカイン産生を調節する方法が提供される。上記実施態様の側面において、上記の1つ以上のスクリーニングアッセイによって識別される。特定の実施態様において、1つ以上の候補分子に細胞を接触させることと、細胞中のc-Rel分子の局在を検出することと、を含むスクリーニング法によって、分子は識別され、これにより、NF- κ Bの発現レベル及び/又はI κ Bの量をそのように接触しない又はPBSのような陰性対照と接触する細胞中の前記量に対して実質的に変更することなく、核内のc-Relの量の減少を引き起こすこれらの分子が識別される。

20

【0023】

特定の実施態様において、本発明は、核内でc-Relの量を減少させるが、NF- κ Bの発現レベル及び/又はI κ Bの量を実質的に変更しない分子、例えば上記のスクリーニングアッセイで識別された分子と細胞を接触させることを含み、NF- κ Bの発現レベル及び/又はI κ Bの量を実質的に変更することなく、細胞中でc-Rel依存性サイトカイン産生を阻害する方法を提供する。実施態様の1つの側面において、方法は、核内でc-Relの量を減少させるが、例えば細胞抽出物中のp50、p65及びc-Relの量によって測定されるような細胞中のNF- κ B発現のレベルを実質的に変更しない分子、例えば上記のスクリーニングアッセイで識別された分子に細胞を接触させることを含む。もう1つの側面において、方法は、核内でc-Relの量を減少させるが、例えば細胞中のI κ Bの量によって測定されるような細胞中のI κ Bの量を実質的に変更しない分子に細胞を接触させることを含む。

30

40

【0024】

本発明は、被検者に由来する試料中の核へのc-Rel局在のレベルを測定することにより、被検者において正常なNF- κ Bの発現レベル及び/又はI κ Bの量を有するがc-Rel細胞内局在が異常であることで特徴付けられる疾患又は障害の存在又は疾患又は障害を発達させる素因を診断又はスクリーニングする方法を提供し、この方法において、疾患若しくは障害、又は疾患若しくは障害を発達させる素因を有さない類似試料中の局在レベルに対するc-Relの核局在レベルの減少又は増加は、疾患若しくは障害、又は疾患若しくは障害を発達させる素因の存在を示す。

【0025】

50

本発明は、c - R e l 依存性サイトカインを発現する細胞の核内のc - R e l 量を減少させるために有効であるが細胞中のN F Bの発現レベル及び/又はI Bの量を実質的に変更しない量で、分子を被検者に投与することを含み、必要とする被検者においてc - R e l 依存性サイトカイン産生に関連する疾患又は障害を治療する方法も提供する。かかる分子の非限定的な例には、ここに記載されるアッセイを利用して識別されたものが含まれる。好ましくは、被検者はヒトである。この実施態様の1つの側面において、疾患又は障害は、I L - 1 2 産生に関連する疾患である。もう1つの実施態様において、疾患又は障害は、自己免疫疾患である。

【0026】

本発明は、第1サイトカイン産生を阻害する第1薬剤を、第2サイトカイン産生を阻害する第2薬剤と共に、第1及び/又は第2サイトカインを発現する細胞中でN F Bの発現レベル及び/又はI Bの量を実質的に変更することなく、患者に投与することを含み、前記第2サイトカインはc - R e l 依存性サイトカインであり、必要とする被検者において第1薬剤の活性を強化する方法も提供する。この実施態様の1つの側面において、第1及び第2サイトカインは、同一又は異なる。好ましくは、被検者はヒトである。幾つかの側面において、第1薬剤は、c - R e l 活性又は細胞内局在を変更しない自己免疫/炎症性疾患の治療用である。

10

【0027】

本発明は、薬剤と細胞を接触させることと、細胞中のいかなる表現型効果も観察することと、を含み、細胞中でN F Bの発現レベル及び/又はI Bの量を実質的に変更することなく細胞の核内のc - R e l 量を減少させる薬剤の、生物学的効果を評価する方法も提供する。もう1つの実施態様において、本発明は、薬剤を被検者に投与することと、被検者におけるいかなる表現型効果も観察することと、を含み、N F Bの発現レベル及び/又はI Bの量を実質的に変更することなく細胞の核内のc - R e l 量を減少させる薬剤の、被検者における生物学的効果を評価する方法を対象とする。被検者は、哺乳動物、例えばマウス、ラット、サル、イヌ、ブタ、ヒト等である。

20

【0028】

本発明は、N F Bの発現レベル及び/又はI Bの量を実質的に変更することなく、細胞の核内のc - R e l 量を減少させる分子を含む組成物を提供する。本発明は、かかる組成物を必要とする被検者に投与することを含み、例えば自己免疫障害のような異常c - R e l 依存性サイトカイン産生に関連する疾患又は障害を治療又は予防する方法を更に提供する。幾つかの実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6384032号；2002年5月7日出願された米国特許出願第09/594362号；2001年11月30日出願された米国特許出願第10/006624号（公開第20020082259号）；2001年11月30日出願された米国特許出願第10/000742号（公開第20030139403号）；2002年7月10日出願された米国特許出願第10/192347号（公開第20030114446号）；2002年11月26日出願された米国特許出願第10/305039号；国際公開第W000/78757号；国際公開第W003/04516号；2003年10月14日出願された国際特許出願第PCT/US03/32546号；2003年11月10日出願された米国仮特許出願第60/518791号；2003年11月10日出願された米国仮特許出願第60/518787号；2003年11月10日出願された米国仮特許出願第60/518788号；発明の名称「Fused Heterocyclic Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61250；発明の名称「Heteroaryl Hydrazone Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61252；発明の名称「Pyridine Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61253に記載され

30

40

50

たような化合物を有さない。

【0029】

幾つかの実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6384032号；2002年5月7日に出願された米国特許出願第09/594362号；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/006624号（公開第20020082259号）；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/000742号（公開第20030139403号）；2002年7月10日に出願された米国特許出願第10/192347号（公開第20030114446号）；国際公開第WO00/78757号；国際公開第WO03/04516号に記載されたような化合物を有さない。

10

【0030】

幾つかの実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6680315号；米国特許第6693097号；米国特許第6660733号；米国特許出願第10/655672号；米国特許出願第10/656671号；2003年9月5日に出願された米国特許出願第10/656360号；2003年10月14日に出願された国際特許出願第PCT/US03/32546号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518791号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518787号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518788号；発明の名称「Fused Heterocyclic Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61250；発明の名称「Heteroaryl Hydrazone Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61252；発明の名称「Pyridine Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61253に記載されたような化合物を有さない。

20

【0031】

幾つかの実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6680315号；米国特許第6384032号；2003年9月5日に出願された米国特許出願第10/656360号；2002年5月7日に出願された米国特許出願第09/594362号；米国特許出願第10/655672号；米国特許出願第10/656671号；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/006624号（公開第20020082259号）；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/000742号（公開第20030139403号）；2002年7月10日に出願された米国特許出願第10/192347号（公開第20030114446号）；国際公開第WO00/78757号；国際公開第WO03/04516号；2003年10月14日に出願された国際特許出願第PCT/US03/32546号に記載されたような化合物を有さない。

30

【0032】

幾つかの実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518791号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518787号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518788号；発明の名称「Fused Heterocyclic Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61250；発明の名称「Heteroaryl Hydrazone Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61252；発明の名称「Pyridine Compounds」、Mitsunori Ono et al、200

40

50

4年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61253に記載されたような化合物を有さない。

【0033】

他の実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6384032号；2002年5月7日に出願された米国特許出願第09/594362号；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/006624号（公開第20020082259号）；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/000742号（公開第20030139403号）；2002年7月10日に出願された米国特許出願第10/192347号（公開第20030114446号）；2002年11月26日に出願された米国特許出願第10/305039号；国際公開第WO00/78757号；国際公開第WO03/04516号；2003年10月14日に出願された国際特許出願第PCT/US03/32546号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518791号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518787号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518788号；発明の名称「Fused Heterocyclic Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61250；発明の名称「Heteroaryl Hydrazone Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61252；発明の名称「Pyridine Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61253に記載されたような構造を有する。1つの側面において、分子は、ここに開示されたスクリーニング法のいずれによっても識別される。もう1つの側面において、分子は、当該技術分野で公知の技術によって精製される。

【0034】

他の実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6384032号；2002年5月7日に出願された米国特許出願第09/594362号；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/006624号（公開第20020082259号）；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/000742号（公開第20030139403号）；2002年7月10日に出願された米国特許出願第10/192347号（公開第20030114446号）；国際公開第WO00/78757号；国際公開第WO03/04516号に記載されたような構造を有する。1つの側面において、分子は、ここに開示されたスクリーニング法のいずれによっても識別される。もう1つの側面において、分子は、当該技術分野で公知の技術によって精製される。

【0035】

他の実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6680315号；米国特許第6693097号；米国特許第6660733号；米国特許出願第10/655672号；米国特許出願第10/656671号；2003年9月5日に出願された米国特許出願第10/656360号；2003年10月14日に出願された国際特許出願第PCT/US03/32546号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518791号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518787号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518788号；発明の名称「Fused Heterocyclic Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61250；発明の名称「Heteroaryl Hydrazone Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61252；発明の名称「Pyridine Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61253に記載されたような構造を有する。1つの側面において、分子は、ここに開示されたスクリーニング法のいずれによっても識別される。もう1つの側面において、分子は、当該技術分野で公知の技術によって精製される。

unds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61253に記載されたような構造を有する。1つの側面において、分子は、ここに開示されたスクリーニング法のいずれによっても識別される。もう1つの側面において、分子は、当該技術分野で公知の技術によっても精製される。

【0036】

他の実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6680315号；米国特許第6384032号；2003年9月5日に出願された米国特許出願第10/656360号；2002年5月7日に出願された米国特許出願第09/594362号；米国特許出願第10/655672号；米国特許出願第10/656671号；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/006624号(公開第20020082259号)；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/000742号(公開第20030139403号)；2002年7月10日に出願された米国特許出願第10/192347号(公開第20030114446号)；国際公開第WO00/78757号；国際公開第WO03/04516号；2003年10月14日に出願された国際特許出願第PCT/US03/32546号に記載されたような構造を有する。1つの側面において、分子は、ここに開示されたスクリーニング法のいずれによっても識別される。もう1つの側面において、分子は、当該技術分野で公知の技術によっても精製される。

10

【0037】

他の実施態様において、分子は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518791号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518787号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518788号；発明の名称「Fused Heterocyclic Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61250；発明の名称「Heteroaryl Hydrazone Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61252；発明の名称「Pyridine Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号(50586)61253に記載されたような構造を有する。1つの側面において、分子は、ここに開示されたスクリーニング法のいずれによっても識別される。もう1つの側面において、分子は、当該技術分野で公知の技術によっても精製される。

20

30

【0038】

他の実施態様

他の実施態様において、本発明は、NF- κ B転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく、且つI- κ B分解のレベルを実質的に変更することなく、細胞の核内のc-Rel量を減少させる分子を細胞に接触させることを含み、NF- κ B転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく且つI- κ B分解のレベルを実質的に変更することなく、細胞中のc-Rel依存性サイトカイン産生を阻害する方法を対象とする。特定の実施態様において、c-Rel依存性サイトカインは、IL-12である。この実施態様の幾つかの側面において、IL-12転写が阻害され、又は核内のp65の量が増加し、又は核へのc-Relの移動が阻害され、又はc-Rel発現が実質的に変更されない。他の側面において、IL-12/IL-23 p40発現が阻害され、又はIL-12/23サブユニットp40プロモーターのNF- κ B要素が阻害され、又はIL-12/IL-23サブユニットp40プロモーターのETS-2要素の活性化が阻害される。更に他の側面において、IL-12サブユニットp35発現が阻害され、且つ/又はIL-12サブユニットp35プロモーターのNF- κ B要素が阻害される。更に他の側面において、核内のICSBPの量が同様に減少し、又はICSBP発現が阻害される。幾つかの側面において、細

40

50

胞は、マクロファージ、単球細胞、又は樹状細胞からなる群から選択される。

【0039】

更にもう1つの特定の実施態様において、c - R e l 依存性サイトカインは、I L - 2 3 である。この実施態様の幾つかの側面において、核内の p 6 5 の量が増加し、又は核への c - R e l の移動が阻害され、又は c - R e l 発現が実質的に変更されない。更に他の側面において、I L - 1 2 / I L - 2 3 サブユニット p 4 0 発現が阻害され、又は I L - 1 2 / 2 3 サブユニット p 4 0 プロモーターの N F B 要素が阻害され、又は I L - 1 2 / 2 3 サブユニット p 4 0 プロモーターの E t s - 2 要素の活性化が阻害され、又は核内の I C S B P の量が同様に減少する。更に他の側面において、I C S B P 発現が阻害される。幾つかの側面において、細胞は、マクロファージ、単球細胞、又は樹状細胞からなる群から選択される。

【0040】

他の実施態様において、本発明は、テスト薬剤と細胞を接触させることと；細胞の核内の c - R e l 量を測定することと；N F B 転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく且つ I B 分解のレベルを実質的に変更することなく、細胞の核内の c - R e l 量を減少させる薬剤を選択することと、を含み、c - R e l 依存性サイトカイン産生を選択的に阻害する薬剤（あるいは、候補分子又は化合物と呼ばれる）を識別する方法を対象とする。この実施態様の幾つかの側面において、核内の c - R e l 量は、ルシフェラーゼアッセイを使用するステップによって測定される。c - R e l 依存性サイトカインは、I L - 1 2 又は I L - 2 3 であってよい。

【0041】

更にもう1つの実施態様において、本発明は、標的発見方法を提供する。1つの側面において、c - R e l 依存性サイトカイン産生を選択的に阻害する薬剤を識別する方法が、提供され、その方法は、N F B 転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく且つ I B 分解のレベルを実質的に変更することなく、細胞の核内の c - R e l 量を減少させる薬剤を標識化することと；標識化薬剤及び薬物標的の間で複合体を形成する条件で標識化薬剤と細胞を接触させることと；複合体を単離することと；複合体から薬物標的を識別することと、を含む。この実施態様において、c - R e l 依存性サイトカインは、I L - 1 2 又は I L - 2 3 である。

【0042】

本発明は、N F B 転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく且つ I B 分解のレベルを実質的に変更することなく、サイトカインを産生する細胞の核内の c - R e l 量を減少させる有効量の薬剤を患者に投与することを含み、必要とする患者において c - R e l 依存性サイトカイン産生に関連した障害を治療する方法も対象とする。1つの側面において、障害は、多発性硬化症、重症筋無力症、自己免疫神経疾患、ギラン - バレ症候群、自己免疫ブドウ膜炎、自己免疫溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫血小板減少、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎、ヴェゲナー肉芽腫症、ベーチェット病、乾癬、疱疹性皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、クローン病、潰瘍性大腸炎、間質性肺線維症、骨髄線維症、肝線維症、心筋炎、甲状腺炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫肝炎、1型又は免疫媒介真性糖尿病、グレーブス病、橋本甲状腺病、自己免疫卵巣炎及び睾丸炎、副腎の自己免疫疾患；リウマチ関節炎、全身性紅斑性狼瘡、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、シェーグレン症候群、及び移植片対宿主病からなる群から選択される自己免疫疾患である。

【0043】

もう1つの実施態様において、本発明は、必要であると識別された被検者において c - R e l 依存性サイトカイン産生に関連した障害を治療する方法も対象とする。被検者は、保健専門家によってそれが必要であると識別されるか、又は自己診断してもよい。方法は、N F B 転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく且つ I B 分解のレベルを実質的に変更することなく、サイトカインを産生する細胞の核内の c - R e l 量を減少させる有効量の薬剤を患者に投与することを含む。1つの側面において、障害は、多発性硬

化症、重症筋無力症、自己免疫神経疾患、ギラン - バレ症候群、自己免疫ブドウ膜炎、自己免疫溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫血小板減少、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎、ヴェゲナー肉芽腫症、ベーチェット病、乾癬、疱疹性皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、クローン病、潰瘍性大腸炎、間質性肺線維症、骨髄線維症、肝線維症、心筋炎、甲状腺炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫肝炎、1型又は免疫媒介真性糖尿病、グレーブス病、橋本甲状腺病、自己免疫卵巣炎及び睪丸炎、副腎の自己免疫疾患；リウマチ関節炎、全身性紅斑性狼瘡、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、シェーグレン症候群、及び移植片対宿主病からなる群から選択される自己免疫疾患である。

【0044】

もう1つの実施態様において、本発明によるスクリーニング法によって識別される化合物は、使用説明書に従って標識化される。説明書は、それが必要であると識別された被検者に投与するための指示、投与量、剤形、及び使用期間を含んでもよい。被検者は、ヒト、霊長類、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ又はネコのような哺乳動物であってもよい。

【0045】

更にもう1つの実施態様において、本発明は、必要とする患者において、第1サイトカイン産生を阻害する第1薬剤の活性を強化する方法を対象とし、この方法は、第1薬剤を、第2サイトカイン産生を阻害する第2薬剤と共に、NF- κ B転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく、且つIL-1 β 分解のレベルを実質的に変更することなく、患者に投与することを含み、第2サイトカイン産生がc-Rel依存性である。幾つかの側面において、第1サイトカイン及び第2サイトカインは同一であるか、又は第1サイトカイン及び第2サイトカインは異なる。他の側面において、第2サイトカインは、IL-1 β 又はIL-2 β である。

【0046】

更にもう1つの実施態様において、本発明は、薬剤と細胞を接触させることと、細胞中のいかなる表現型効果も観察することと、を含む、NF- κ B転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく且つIL-1 β 分解のレベルを実質的に変更することなく、細胞の核内のc-Rel量を減少させる薬剤の、生物学的効果を評価する方法を対象とする。更にもう1つの実施態様において、本発明は、薬剤と細胞を接触させることと、被検者におけるいかなる表現型効果も観察することと、を含み、NF- κ B転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく且つIL-1 β 分解のレベルを実質的に変更することなく、細胞の核内のc-Rel量を減少させる薬剤の被検者における生物学的効果を評価する方法を対象とする。

【0047】

更にもう1つの実施態様において、本発明は、NF- κ B転写因子発現のレベルを実質的に変更することなく且つIL-1 β 分解のレベルを実質的に変更することなく、細胞の核内のc-Rel量を減少させる化合物を、その化合物が米国特許第6384032号；国際公開第W000/78757号に記載された構造を有さないという条件で、対象とする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

本発明は、c-Relの活性、特に核内に存在するc-Relのレベルが、NF- κ Bの発現又はIL-1 β の量を実質的に変更することなく、増加又は減少できるという発明者の発見に部分的に基づく。

【0049】

本発明は、次のステップ：(a) 1つ以上の候補分子に細胞を接触させることと、(b) 細胞中のc-Rel分子の局在を検出することと、を記載した順序で含み、c-Rel依存性転写を選択的に変更する分子を識別する方法であって、1つ以上の候補分子と接触しない細胞中の量に対してNF- κ Bの発現レベル及び/又はIL-1 β の量を実質的に変更することなく、核内のc-Rel量が増加又は減少することは候補分子がc-Rel依存性転写を変更することを示す方法を対象とする。もう1つの実施態様において、本発明は、次のステップ：(a) 1つ以上の候補分子と細胞を接触させることと、(b) 細胞中のc

- R e l分子の局在を検出することと、を記載した順序で含み、細胞中でc - R e l依存性サイトカイン産生を選択的に変更する分子を識別する方法であって、1つ以上の候補分子と接触しない細胞中の量に対してNF Bの発現レベル及び/又はI Bの量を実質的に変更することなく、核内のc - R e l量が増加又は減少することは、候補分子がc - R e l依存性サイトカイン産生を変更することを示す方法を対象とする。もう1つの実施態様において、本発明は、次のステップ：(a) 1つ以上の候補分子を細胞中で組換えにより発現することと、(b) 細胞中のc - R e l分子の局在を検出することと、を記載した順序で含み、細胞中でc - R e l依存性サイトカイン産生を選択的に変更する分子を識別する方法であって、1つ以上の候補分子と接触しない細胞中の量に対してNF Bの発現レベル及び/又はI Bの量を実質的に変更することなく、核内のc - R e l量が増加又は減少することは、候補分子がc - R e l依存性サイトカイン産生を変更することを示す方法を対象とする。特定の実施態様において、c - R e l依存性サイトカインは、IL - 12又はIL - 23である。

10

20

30

40

50

【0050】

本発明は、第1サイトカイン産生を阻害する第1薬剤を、第2サイトカイン産生を阻害する第2薬剤と共に、第1及び/又は第2サイトカインを発現する細胞中でNF Bの発現レベル及び/又はI Bの量を実質的に変更することなく、患者に投与することを含み、前記第2サイトカインはc - R e l依存性サイトカインであり、必要とする被検者における第1薬剤の活性を強化する方法も対象とする。この実施態様の側面において、第1及び第2サイトカインは同一又は異なる。好ましくは、被検者はヒトである。

【0051】

C - R E L / K Bの細胞内局在の検出

c - R e lの細胞内局在、すなわち核又は細胞質への局在を検出する当該技術分野で公知のいかなる方法も、本発明において使用できる。例示的であり且つ限定的としてではなく、1つのかかる検出方法は、c - R e lに特異的な抗体と細胞を接触させ、且つ次に抗体が核に局在するか否かを検出することである。c - R e lの細胞内局在を検出する特定の方法は、標識化した、例えば蛍光色素で標識化した抗c - R e l抗体、及び標識化した、例えば抗c - R e l抗体と異なる蛍光色素で標識化した抗DNA抗体を、全細胞に接触させ、且つ次に例えばレーザー操作顕微鏡検査によって、細胞中で共局在した両方の標識を有する細胞を検出することである。

【0052】

従って、本発明により包含される検出方法には、c - R e l分子のインサイチュ検出用の免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡検査が含まれる。インサイチュ検出は、c - R e lに結合する標識化分子にc - R e l分子を内在的又は組換えで発現する細胞を接触させること、及び、発生し且つ核に局在したあらゆる結合を検出することによって達成できる。あるいは、未標識化分子は、分子の標識化結合パートナーと組み合わせて使用できる。かかるアッセイを使用すると、c - R e l分子の存在だけでなく、細胞内分布、すなわち核内の分布も判定することが可能である。あるいは、c - R e lは、フラグタグのような検出可能な部分によって発現できる。その場合、タグに特異的な抗体は、組換えc - R e l分子の検出を可能にする。

【0053】

c - R e lのイムノアッセイには、通常、c - R e lに特異的な検出可能な標識化分子、例えばc - R e lの抗体の存在下で、インピボ又はインピトロ培養で細胞のような試料をインキュベートすること、及び当該技術分野において公知の多数の技術のいずれかによって結合分子を検出することが含まれる。

【0054】

特定の実施態様において、生物学的試料、例えば新規に得られた細胞は、細胞を固定化することが可能なニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、又は他の固体担体のような固相担体又はキャリアと接触させ、且つそれらに固定化できる。担体は、次に適切な緩衝液によって洗浄でき、その次に検出可能な標識化分子による処理が続く。固相担体は、次

に緩衝液によって2度目に洗浄でき、非結合分子を除去する。固体担体上の結合標識の量は、次に従来の手段によって検出できる。

【0055】

c - Rel 分子への所与の抗体の結合活性は、周知の方法により判定できる。当業者は、定常の実験法を用いることにより、各判定のための操作上の、且つ最適なアッセイ条件を判定することができるであろう。

【0056】

c - Rel の抗体が検出可能に標識化される方法の1つは、それを、酵素及び酵素イムノアッセイ (EIA) に連結させることによる (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD); Voller et al., 1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520; Butler, 1981, Meth. Enzymol. 73:482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL; ; Ishikawa et al., (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo)。c - Rel 分子に結合された抗体に結合される酵素は、例えば分光光度、蛍光定量又は視覚的手段によって検出できる化学部分を産生するように適切な基質、好ましくは色素発生基質と反応する。

【0057】

蛍光若しくは化学発光若しくは生物発光化合物、又は放射性部分又は当該技術分野において公知の他の標識によって抗体を標識化することも可能である。

【0058】

c - Rel 核局在を検出及び/又は測定するもう1つの方法は、当該技術分野において公知のいずれかの方法によって核タンパク質を単離し、且つ核タンパク質のプール中のタンパク質を識別するために、c - Rel が核タンパク質のプール中に存在するか否かを好ましくは質量分析によって検出することである。核タンパク質の単離は、当該技術分野において公知のいずれかの方法によって達成できる。核タンパク質の単離後、c - Rel の検出が、例えば抗 c - Rel 抗体によって c - Rel を免疫沈降させること、又はイムノアフィニティーカラム上又はプレート上若しくはウェル中に固定化された抗 c - Rel 抗体に結合すること、又はウェスタンブロット法によってタンパク質を視覚化することによって達成できる。本発明のもう1つの実施態様において、核への c - Rel 局在は、SDS - PAGEゲル上に核タンパク質を単離及び分離すること、ゲルから分離されたタンパク質を溶出すること、及びアミノ酸配列を判定するために溶出されたタンパク質に質量分析を受けさせることによって検出及び/又は測定できる。かかる質量分析は、例えば Neubauer et al., 1998, Nature Genetics 20:46-50; Neubauer et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:385-390; 及び Wilm et al., 1996, Nature 379:466-469 に記載されたような、当該技術分野において公知のいずれかの適切な質量分析法によって実行できる。非限定例として、溶出したペプチドは、Wilm and Mann, 1996, Anal. Chem. 68:1-8 に記載されたように、5%メタノール/5%ギ酸溶液中で溶解され、且つ毛管カラムを使用して脱塩される。次に、ペプチドは、ナノエレクトロスプレーイオン源の噴霧針に直接、50%メタノール/5%ギ酸溶液(0.5-2 µl)中で1つのステップで希釈される。ペプチドの質量スペクトルが得られる。ペプチドは、次に第1四極子中で順々に選択される。質量分析計の第1部分は、一度に1つの m/z 値のペプチドイオン種の伝達を可能にするマスフィルターとして使用される。次に、各ペプチドは、衝突細胞中のアルゴンによる衝突誘導解離によって個別に断片化される。結果として生じたペプチド断片イオンは、第3四極子中で分離され、且つ検出される。トリプシンペプチドに関して、このことは、通常、カ

ルボキシ末端を含むペプチド断片の「入れ子集合」をもたらす。2つの隣接する断片間の質量差は、対応するアミノ酸残基の質量に対応するので、そのカルボキシからアミノ末端への部分配列が、判定できる。

【0059】

c - R e lの局在が検出及び/又は測定される細胞は、インビトロ（例えば細胞培養中に単離された）又はインビボであってもよい。c - R e lの細胞内局在が検出される細胞は、いかなる細胞、例えば内在的に又は組換えで発現するもの、又はその断片若しくは相同体であってもよい。細胞は、脊椎動物、昆虫（例えばショウジョウバエ）、線虫、哺乳動物、ウシ、マウス、ラット、トリ、魚、霊長類、ヒト等であってもよい。発現されるc - R e lは、脊椎動物、昆虫、線虫、哺乳動物、ウシ、マウス、ラット、トリ、魚、霊長類、ヒト等であってもよい。細胞は、一次組織、細胞系統、又はc - R e l導入遺伝子を含み且つ発現する動物の細胞であってもよい。例えば、形質転換動物は、ショウジョウバエ（例えばキイロショウジョウバエ）又は線虫であってもよい。好ましい実施態様において、導入遺伝子は、ヒトc - R e lをコード化する。形質転換動物は、当該技術分野において周知の標準的な方法によって作ることができる。

10

【0060】

本発明の特定の実施態様において、c - R e lに対して作られ、結合ドメインを含む抗体及び断片は、上記方法の特定の実施態様においてc - R e lを検出するために使用される。従って、c - R e lタンパク質、断片、又はその類似体若しくは誘導體、特にヒトc - R e lタンパク質又はその断片は、抗c - R e lタンパク質抗体を生成する免疫原として使用できる。かかる抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、F a b断片であるか、F a b発現ライブラリ由来であってもよい。かかる抗体の産生方法は、当該技術分野において周知であり、その幾つかは以下に記載する。

20

【0061】

c - R e lに特異的な抗体は、当該技術分野において周知の方法、本発明のc - R e lタンパク質の局在及び/又は数量化に関する、例えば適切な生理的試料におけるこれらタンパク質の撮像やレベル測定のための上記検討した方法、診断方法等で使用できる。これは、c - R e lタンパク質の誘導體、相同体又は類似体にも当てはまる。

【0062】

N F Bの発現レベル又はI Bの量は、N F Bファミリーメンバー及びそのいずれかのサブユニット、例えばp 5 0、p 6 5又はc - R e l、又はI Bに特異的な抗体の使用を含む、当該技術分野において公知のいずれかの方法を使用しても判定できる。例えば、I Bに特異的な抗体を使用して、I Bの量を、例えば以下の実施例で教示される例証的な方法によって判定できる。N F Bの発現レベルは、p 5 0、p 6 5又はc - R e lの量を測定することによって判定できる。

30

【0063】

c - R e lが核内に位置するか否かについての他の検出方法は、転写活性に関してc - R e lに依存するタンパク質又はそのコード化m R N A分子の存在、及び発現の増加（核内のc - R e l増加）又は減少（核内のc - R e l減少）があるか否かを測定することを含んでよい。

40

【0064】

抗体産生

当該技術分野において公知の種々の手順は、c - R e l、N F Bファミリーメンバー若しくはそのいずれかのサブユニット、又はI B、又はタンパク質の断片、誘導體、相同体若しくは類似体の抗体の産生に使用できる。本発明の抗体には、合成抗体、モノクローナル抗体、組換えにより産生された抗体、細胞内発現抗体（i n t r a b o d y）、多特異的抗体（二重特異的抗体を含む）、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、単鎖F v s（s c F v）（二重特異的s c F v sを含む）、単鎖抗体F a b断片、F（a b'）断片、ジスルフィド結合F v s（s d F v）、抗イデオタイプ（抗I d）抗体、及び上記いずれかのエピトープ結合断片が含まれるが、それらに限定されない。特に、本

50

発明の抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち抗原（例えば抗体の1つ以上の相補性決定領域（CDR））に免疫特異的に結合する抗原結合部位を有する分子が含まれる。

【0065】

抗体の産生に関して、種々の宿主動物は、例えば未変性 c - R e l タンパク質又は合成型、又は前述のものの誘導體による注射によって免疫化できる。かかる宿主動物には、ウサギ、マウス、ラット等が含まれるが、それらに限定されない。種々のアジュバントが、宿主種に応じて免疫応答を増加させるために使用でき、且つフロイント（完全及び不完全）、水酸化アルミニウムのような無機ゲル、リソレシチンのような界面活性物質、プルロン酸ポリオール（pluronic polyol）、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、ジニトロフェノール、及びカルメット-ゲラン桿菌（BCG）及びコリネバクテリウムバルブムのような潜在的に有用なヒトアジュバントを含んでよいが、それらに限定されない。以下の事項は、c - R e l に特に言及するが、ここに記載された方法のいずれも、c - R e l、NF Bファミリーメンバー若しくはそのいずれかのサブユニット、又はI Bに同様に適用される。

10

【0066】

c - R e l、又はその誘導體、相同体若しくは類似体に対して作られるモノクローナル抗体の調製に関して、培養中の連続継代細胞系統による抗体分子の産生を提供するいかなる技術も使用できる。かかる技術には、Kohler and Milstein (1975, Nature 256:495-497) によって当初開発されたハイブリドーマ技術、トリオーマ (trioma) 技術 (Gustafsson et al., 1991, Hum. Antibodies Hybridomas 2:26-32)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72)、及びヒトモノクローナル抗体を産生するEBVハイブリドーマ技術 (Cole et al., 1985, In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) が含まれるが、それらに限定されない。本発明の追加の実施態様において、モノクローナル抗体は、国際特許出願第PCT/US90/02545号に記載された最近の技術を利用して、無菌動物から産生できる。

20

【0067】

本発明によれば、ヒト抗体は使用でき、ヒトハイブリドーマを使用することによって (Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030) 又はインビトロでEBVウイルスによってヒトB細胞を形質転換することによって (Cole et al., 1985, In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 得られる。実際、本発明によれば、適切な生物活性のヒト抗体分子からの遺伝子と共に、c - R e l に特異的なマウス抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることによる「キメラ抗体」の産生のために開発された技術 (Morrisson et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) が使用でき。即ち、かかる抗体は、本発明の範囲内である。

30

40

【0068】

本発明によれば、単鎖抗体の産生に関して記載された技術 (米国特許第4946778号) は、c - R e l 特異的抗体を産生できるように適応させてよい。本発明の追加の実施態様は、c - R e l タンパク質、その誘導體又は類似体に所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速且つ容易な識別を可能にするために、Fab発現ライブラリ構築に関して記載された技術を利用する (Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281)。非ヒト抗体は、公知の方法 (例えば、米国特許第5

50

225539号)によって「ヒト化」できる。

【0069】

c - R e l のイデオタイプを含む抗体断片は、当該技術分野において公知の技術によって生成できる。例えば、かかる断片には、抗体分子のペプシン消化によって生成できる F (a b ') 2 断片； F (a b ') 2 断片のジスルフィド架橋を減少させることにより生成できる F a b ' 断片；パイン及び還元剤によって抗体分子を処理することにより生成できる F a b ' 断片；及び F v 断片が含まれるが、それらに限定されない。合成抗体、例えば化学合成によって生成された抗体は、本発明において有用である。

【0070】

抗体の産生において、所望の抗体のスクリーニングは、当該技術分野において公知の技術、例えば E L I S A (酵素結合免疫吸着検定法) によって達成できる。c - R e l、又はその誘導体、相同体若しくは類似体の特定のドメインに特異的な抗体を選択するために、かかるドメインを含む c - R e l タンパク質、又はその誘導体、相同体若しくは類似体の断片に結合する産生物の生成したハイブリドーマをアッセイできる。 10

【0071】

組換え発現

本発明のスクリーニング方法で使用する c - R e l、及びその誘導体又は断片又は相同体の組換え産生方法は、当業者にとって周知である。c - R e l、その誘導体、断片、及び相同体をコード化する核酸は、当該技術分野において公知である。例証的なヒト c - R e l 分子をコード化するヌクレオチド配列は、公知であり、図 1 に提供される (配列番号 1)。c - R e l をコード化する核酸は、当該技術分野において公知のいかなる方法によっても、例えば各配列の 3 ' 及び 5 ' 末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用する P C R 増幅によって、且つ / 又は各ヌクレオチド配列に特異的なオリゴヌクレオチドを使用する c D N A 又はゲノムライブラリからのクローニングによって得ることができる。 20

【0072】

相同体 (例えばヒト以外の種の c - R e l をコード化する核酸) 又は他の関連配列 (例えばパラログ) は、核酸ハイブリダイゼーション及びクローニングの分野において周知の方法を使用して、プローブとして特定のヒト配列の全部又は一部による、低度、中度又は高度にストリンジェントなハイブリダイゼーションによって得ることができる。 30

【0073】

図 1 に示され (配列番号 2)、コード化された c - R e l タンパク質は、タンパク質精製及び組換えタンパク質発現の分野において周知の方法によって得ることができる。1つ以上のタンパク質の組換え発現に関して、タンパク質をコード化するヌクレオチド配列の全部又は一部を含む核酸は、適切な発現ベクター、すなわち挿入されるタンパク質コード配列の転写及び翻訳に必要な要素を含むベクターに導入できる。必要な転写及び翻訳シグナルは、c - R e l 遺伝子及び / 又はその隣接領域の未変性プロモーターによっても供給できる。

【0074】

種々の宿主 - ベクター系が、タンパク質コード配列を発現するために利用できる。これらには、ウイルス (例えばワクシニアウイルス、アデノウイルス等) に感染した哺乳動物細胞系；ウイルス (例えばバキュロウイルス) に感染した昆虫細胞系；酵母含有酵母ベクターのような、微生物；又はバクテリオファージ、D N A、プラスミド D N A、又はコスミド D N A によって形質転換された細菌が含まれるが、それらに限定されない。ベクターの発現要素は、その強度及び特異性の点で異なる。利用される宿主 - ベクターに応じて、多数の適切な転写及び翻訳要素のいずれかが使用できる。 40

【0075】

好ましい実施態様において、ヒト c - R e l は、ヒト c - R e l コード配列を発現させることによって得られる。更にもう 1 つの実施態様において、c - R e l の誘導体、断片又は相同体は、組換えにより発現される。1 つの実施態様において、c - R e l タンパク 50

質は、c - R e l 配列と異なるアミノ酸配列が、c - R e l 配列にペプチド結合を介して結合される、キメラ又は融合タンパク質として発現される。異なるアミノ酸配列は、発現されたキメラ又は融合タンパク質の検出又は単離のための、フラッグタグのようなタグであってもよい。

【 0 0 7 6 】

当該技術分野において利用できるいかなる方法も、適切な転写 / 翻訳制御シグナル及びタンパク質コード配列からなるキメラ遺伝子を含む発現ベクターを構築するために、ベクターへのDNA断片の挿入のために使用できる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA及び合成技術及びインビボ組換え技術（遺伝子組換え）が含まれてよい。c - R e l、又はその誘導体、断片若しくは相同体をコード化する核酸配列の発現は、遺伝子又はその断片が、組換えDNA分子によって形質転換された宿主中で発現されるように、第2核酸配列によって調節できる。例えばタンパク質の発現は、当該技術分野において公知のいかなるプロモーター / エンハンサーによっても制御できる。特定の実施態様において、プロモーターは、c - R e l の遺伝子にネイティブではない。もう1つの特定の実施態様において、プロモーターは、免疫細胞、例えば末梢血単核細胞、樹状細胞、又は単球細胞、又は脾細胞において活性である。使用できるプロモーターには、SV40初期プロモーター（Bernois t and Chambon, 1981, Nature 290:304-310）、ラウス肉腫ウイルスの3'長い末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797）、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42）； - ラクタマーゼプロモーターのような原核発現ベクター（Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:37327-3731）又はtacプロモーター（DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25；Gilbert et al., 1980, Scientific American 242:79-94）；ノパリン合成酵素プロモーターを含む植物発現ベクター（Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 303:209-213）又はカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター（Gardner et al., 1981, Nucleic Acids Res. 9:2871）及び光合成酵素リブ्रोスニリン酸カルボキシラーゼ（Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120）；Gal4プロモーターのような、酵母及び他の菌類からのプロモーター要素（Johnston et al., 1987, Microbiol. Rev. 51:458-476）、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター（Schibler et al., 1987, Annual Review Genetics 21:237-257）、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター（Struhl et al., 1995, Annual Review Genetics 29:651-674-257；Guarente 1987, Annual Review Genetics 21:425-452）、アルカリホスファターゼプロモーター（Struhl et al., 1995, Annual Review Genetics 29:651-674-257；Guarente 1987, Annual Review Genetics 21:425-452）、及び組織特異性を示し、且つ形質転換動物に利用された次の動物転写制御領域：膵臓腺房細胞において活性であるエラスターゼI遺伝子制御領域（Swift et al., 1984, Cell 38:639-646；Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409；MacDonald 1987, Hepatology 7:425-515）；膵臓ベータ細胞で活性であるインスリン遺伝子制御領域（Hanahan et al., 1985, Nature 315:115-122）、リンパ球に

10

20

30

40

50

において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647-658; Adams et al., 1985, Nature 318: 533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444)、精巢細胞、乳腺細胞、リンパ球及びマスト細胞で活性であるマウス乳癌ウイルス制御領域 (Leder et al., 1986, Cell 45: 485-495)、肝臓で活性であるアルブミン制御領域 (Pinckert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268-276)、肝臓で活性であるアルファ-フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell Biol. 5: 1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53-58)、
 肝臓で活性であるアルファ-1抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171)、骨髄性細胞で活性であるベータグロブリン遺伝子制御領域 (Mogram et al., 1985, Nature 315: 338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89-94)、脳の乏突起膠細胞で活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703-712)、骨格筋で活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Sani 1985, Nature 314: 283-286)、視床下部の性腺刺激細胞で活性である性腺刺激抄出ホルモン遺伝子制御領域 (Mason 1986, Science 234: 1372-1378)が含まれるが、それらに限定されない。

10

20

【0077】

特定の実施態様において、c-Rel、又はその断片、誘導体若しくは相同体をコード化する核酸配列に作動可能に結合されたプロモーターと、1つ以上の複製起点と、任意で1つ以上の選択マーカー(例えば抗生物質耐性遺伝子)を含むベクターが使用される。

【0078】

もう1つの特定の実施態様において、c-Relのコード配列、又はその一部を含む発現ベクターは、3つのpGEXベクター(グルタチオンS-トランスフェラーゼ発現ベクター; Smith and Johnson, 1988, Gene 7: 31-40)の各々のEcoRI制限部位に遺伝子配列をサブクローニングすることによって作られる。このことは、正しいリーディングフレーム中の合成物の発現を可能にする。

30

【0079】

重要な配列を含む発現ベクターは、3つの一般的なアプローチ:(a)核酸ハイブリダイゼーション、(b)「マーカー」遺伝子機能の存在又は不存在、及び(c)挿入配列の発現、によって識別できる。第1のアプローチにおいて、c-Rel配列は、挿入配列に相同及び相補的な配列を含むプローブへの核酸ハイブリダイゼーションによって検出できる。第2のアプローチにおいて、組換えベクター/宿主系は、ベクター中への対象配列の挿入によって引き起こされるある種の「マーカー」機能(例えば抗体物質耐性、バキュロウイルス中の閉塞体(occlusion body)形成等)の存在又は不存在に基づいて識別及び選択できる。例えば、c-Rel遺伝子又はその一部が、ベクターのマーカー遺伝子配列中に挿入されると、c-Rel断片を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能(例えばベータ-ガラクトシダーゼ活性の損失)の不存在によって識別される。第3のアプローチにおいて、組換え発現ベクターは、組換えベクターによって発現されるc-Relをアッセイすることによって識別できる。

40

【0080】

一旦、組換えc-Rel分子が識別され単離されると、それらを増殖するために、当該技術分野において公知の幾つかの方法が使用できる。適切な宿主系及び成長条件を使用して、組換え発現ベクターは多量に増殖及び増幅できる。上記のように、使用できる発現ベクター又は誘導体には、ワクシニアウイルス又はアデノウイルスのようなヒト又は動物ウイルス;バキュロウイルスのような昆虫ウイルス、酵母ベクター;ラムダファージのようなバクテリオファージベクター;プラスミド及びコスミドベクターが含まれるが、それら

50

に限定されない。

【0081】

その上、所望の特定の方法で挿入配列の発現を調節し又は発現タンパク質を修飾又は処理する宿主細胞株が選択できる。幾つかのプロモーターからの発現は、幾つかの誘導物質の存在下で高めることができるため、遺伝子操作した c - R e l の発現を制御できる。更に、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳及び翻訳後処理及び修飾のための固有且つ特異的メカニズム（例えばグリコシル化、リン酸化等）を有する。適切な細胞系又は宿主系は、異種タンパク質の所望の修飾及び処理が確実に達成されるように選択できる。例えば、細菌系の発現は、非グリコシル化コアタンパク質を合成するために使用でき、他方で哺乳動物細胞中の発現は、非相同タンパク質の「未変性」グリコシル化を確実にする。更に、

10

【0082】

他の特定の実施態様において、c - R e l タンパク質又はその断片、相同体若しくは誘導体は、異なるタンパク質の非相同タンパク質配列にペプチド結合を介して接合したタンパク質、断片、相同体又は誘導体を含む融合又はキメラタンパク質合成物として発現できる。かかるキメラ合成物は、当該技術分野において公知の方法によって、適切なコードフレーム中で所望のアミノ酸を互いにコード化する適切な核酸配列をライゲーションすること、及び当該技術分野において公知の方法によって適切な宿主中でキメラ合成物を発現することによって作ることができる。

【0083】

モジュレーターを識別するスクリーニング方法

本発明の1つの実施態様において、NF B の発現レベル及び/又は I B の量、及びそれ故におそらく、c - R e l タンパク質が遺伝子のプロモーター及び/又はエンハンサー中の NF B 結合部位で配列特異的 DNA 結合複合体を形成することで転写開始複合体を作り出す役割を果たす遺伝子の転写を活性化する活性、を実質的に変更することなく、候補分子の（質的及び/又は量的に）c - R e l 細胞内局在を変更する能力を検出することによって、c - R e l 活性のモジュレーター、例えば阻害剤、アンタゴニスト又はアゴニストを識別する方法が提供される。かかる遺伝子の例証的な例は、c - R e l 依存性サイトカイン、例えばサブユニット p 4 0 及び p 3 5 の各々がそのプロモーター中に NF B 部位を含むものである I L - 1 2 及び I L - 2 3 である。本発明の実施態様の1つの側面において、c - R e l 活性のモジュレーターを識別する方法は、細胞に候補モジュレーター分子を提供することと、NF B の発現レベル又は I B の量を実質的に変更することなく核と同時精製又は共局在する c - R e l 量を検出又は測定することと、を含み、核に同時精製又は共局在する c - R e l の量又は存在の、候補分子に接触しない細胞と比較した差は、候補分子が c - R e l 活性を調節することを示す。本発明のスクリーニング方法に有用な代表的な細胞及び細胞系には、候補分子と接触する前に、好ましくは I F N - 及び/又は L P S によって刺激されるマクロファージ、樹状細胞、単球細胞、末梢血単核細胞が含まれるが、それらに限定されない。

20

30

【0084】

本発明の特定の側面は、核への c - R e l 局在を阻害又は促進する分子を識別することに関連する。もう1つの特定の側面において、細胞中に発現された c - R e l の転写レベル又は翻訳レベルでの全体量に影響を及ぼすことなく、核への c - R e l 局在を阻害又は促進する分子を識別することに関連する。好ましい側面において、例えば c - R e l の核への移動を阻害すること又は核内の c - R e l 分解率を増加させることによって、核内で c - R e l 量を減少させる分子が、識別される。他の側面において、核内の c - R e l 量又は核への c - R e l 移動は阻害されるが、NF B ファミリーメンバー p 6 5 は核内で増加する。更にもう1つの側面において、核への c - R e l 移動は阻害され、I C S B P m R N A 又はタンパク質のレベルに影響を及ぼして又は及ぼさずに I C S B P 量も減少する。更にもう1つの側面において、核への c - R e l 移動は減少し、p 4 0 のプロモーター中の E t s - 2 結合ドメインは、核内の c - R e l 量が減少しない細胞と比較して、

40

50

転写を活性化する能力をもちや有さない。

【0085】

上記事項を実行するために使用できる方法は、当該技術分野において公知であり、且つ／又は上記セクション5.1に開示された方法である。本発明のこの実施態様の方法において使用される細胞は、c-Rel又はその断片、誘導体若しくは類似体を内在的に又は組換えによって発現する。c-Relの組換え発現は、セクション5.1.1に記載されたように、又は当該技術分野において周知の手順を使用して、発現ベクターに核酸をコード化するc-Relを導入すること、及びその後c-Relを発現する細胞にベクターを導入すること、又は発現用細胞に核酸をコード化するc-Relを単に導入することによって実行される。特定の実施態様において、c-Relは、タグがc-Rel活性又は細胞内局在に影響がない場合には、検出を容易にするため、タグによって発現される。多数の種からc-Relをコード化する核酸は、クローニングされて配列決定され、その発現は、当該技術分野において周知である。ヒトc-Relヌクレオチド及びアミノ酸配列の例証的な例を図1に示す(配列番号1及び2)。発現は、発現ベクターによってもよく、染色体内であってもよい。特定の実施態様において、ヒト樹状細胞系統、又はヒト単球細胞系統THP-1のような標準ヒト細胞系統、又はヒト末梢血単核細胞は、スクリーニングアッセイにおいて用いられる。特定の側面において、免疫細胞が用いられるとき、免疫細胞は、1つ以上の候補分子と接触する前、同時又は後に、リポ多糖(LPS)又はインターフェロン-(IFN-)のような免疫活性化化合物に接触される。

10

【0086】

ベクターへのc-Relコード化DNA結合複合体の挿入のための、当業者に公知のいかなる方法も、上記セクション5.1に記載された方法を含み、c-Relを発現する発現ベクターを構築するために使用できる。その上、所望の特定のc-Relの発現を調節する又は遺伝子産物を修飾及び処理する宿主細胞株が選択できる。幾つかのプロモーターからの発現は、幾つかの誘導物質の存在下で高められるため、c-Relタンパク質の発現を制御できる。更に、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳及び翻訳後処理及び修飾のための固有且つ特異的メカニズム(例えばグリコシル化、開裂)を有する。適切な細胞系又は宿主系は、発現されるc-Relタンパク質の所望の修飾及び処理を確実にするように選択できる。例証的な細胞系統は、以下の実施例の部に記載されるものである。

20

30

【0087】

本発明のもう1つの実施態様において、c-Rel活性の選択的阻害を媒介する薬物標的を識別する方法が提供される。1つのかかる例証的方法是、次のステップ:(a)NF- κ Bの発現レベル又はI κ Bの量を実質的に変更することなく細胞の核内のc-Rel量を減少させる1つ以上の薬剤を標識化することと、(b)1つ以上の標識化薬剤と薬物標的との間に複合体が形成される条件で、1つ以上の標識化薬剤に細胞を接触させることと、(c)複合体を単離することと、(d)複合体から薬物標的を識別することと、を記載した順序で含む。

【0088】

候補分子

当該技術分野において公知のいかなる分子も、c-Rel(又はその量)の細胞内局在の変化によって検出されるような、c-Rel活性を調節する(増加又は減少させる)能力に関してテストできる。例として、局在の変化は、候補分子への曝露の前又は後に、核とともに精製する又は核に局在するc-Rel量の変化を検出することによって検出できる。c-Rel活性を調節する分子を識別するために、候補分子は、c-Relを発現する細胞に直接提供でき、又は、候補タンパク質の場合には、核酸がc-Rel発現細胞中で候補タンパク質を合成するために組換え発現される条件でそのコード化核酸を提供することによって提供できる。

40

【0089】

核へのc-Relの移動を阻害するが、NF- κ Bの発現及び／又はI κ Bの量を実質的

50

に変更しない好ましい化合物には、次の化合物が含まれる。

化合物 1 : N - (1 H - インドール - 3 - イルメチレン) - N ' - [4 - モルホリン - 4 - イル - 6 - (2 - ピリジン - 2 - イル - エトキシ) - [1 , 3 , 5] トリアジン - 2 - イル] - ヒドラジン ;

化合物 2 : N - (3 - メチル - ベンジリデン) - N ' - [6 - モルホリン - 4 - イル - 2 - (2 - ピリジン - 2 - イル - エトキシ) - ピリミジン - 4 - イル] - ヒドラジン ;

化合物 3 : N - (1 H - インドール - 3 - イルメチレン) - N ' - [4 - モルホリン - 4 - イル - 6 - (2 - モルホリン - 4 - イル - エトキシ) - ピリジン - 2 - イル] - ヒドラジン ;

化合物 4 : N - [3 , 5 - ジフルオロ - 2 - モルホリン - 4 - イル - 6 - (2 - モルホリン - 4 - イル - エトキシ) - ピリジン - 4 - イル] - N ' - (3 - メチル - ベンジリデン) - ヒドラジン ; 10

化合物 5 : N - (3 - メチル - ベンジリデン) - N ' - [4 - モルホリン - 4 - イル - 6 - (2 - モルホリン - 4 - イル - エトキシ) - ピリジン - 2 - イル] - ヒドラジン ;

化合物 6 : N - メチル - N ' - (3 - メチル - ベンジリデン) - N - [4 - モルホリン - 4 - イル - 6 - (2 - モルホリン - 4 - イル - エトキシ) - ピリジン - 2 - イル] - ヒドラジン ;

化合物 7 : 4 - メチル - 2 - { [4 - モルホリン - 4 - イル - 6 - (2 - モルホリン - 4 - イル - エトキシ) - ピリジン - 2 - イル] - ヒドラゾノメチル } - フェニルアミン ; 20

化合物 8 : N - (6 , 7 - ジメトキシ - 2 - モルホリン - 4 - イル - キノリン - 4 - イル) - N ' - (3 - メチル - ベンジリデン) - ヒドラジン ;

化合物 9 : N - 7 - クロロ - 2 - モルホリン - 4 - イル - キナゾリン - 4 - イル) - N ' - (3 - メチル - ベンジリデン) - ヒドラジン ;

化合物 10 : N - [7 - メトキシ - 2 - モルホリン - 4 - イル - 6 - (2 - フェノキシ - エトキシ) - キナゾリン - 4 - イル] - N ' - (3 - メチル - ベンジリデン) - ヒドラジン ;

化合物 11 : N - [6 - モルホリン - 4 - イル - 2 - (2 - ピリジン - 2 - イル - エトキシ) - ピリミジン - 4 - イルメチレン] - N ' - m - トリル - ヒドラジン ;

化合物 12 : N - (3 - クロロ - フェニル) - N ' - [6 - モルホリン - 4 - イル - 2 - (2 - ピリジン - 2 - イル - エトキシ) - ピリミジン - 4 - イルメチレン] - ヒドラジン ; 30

化合物 13 : N - (3 - メトキシ - フェニル) - N ' - [6 - モルホリン - 4 - イル - 2 - (2 - ピリジン - 2 - イル - エトキシ) - ピリミジン - 4 - イルメチレン] - ヒドラジン ; 及び

化合物 14 : N - (2 , 5 - ジメチル - フェニル) - N ' - [6 - モルホリン - 4 - イル - 2 - (2 - ピリジン - 2 - イル - エトキシ) - ピリミジン - 4 - イルメチレン] - ヒドラジン

【 0 0 9 0 】

本発明のこの実施態様は、化学ライブラリから、核とともに精製する又は核に局在する c - R e l 量を変更することによって、c - R e l 活性を調節、例えば阻害、拮抗又は作用 (a g o n i z e) する分子をスクリーニングすることに適している。化学ライブラリは、ペプチドライブラリ、ペプチド模倣薬ライブラリ、化学合成されたライブラリ、組換え、例えばファージ提示ライブラリ、及びインビトロ翻訳ベースライブラリ、他の非ペプチド合成有機ライブラリ等であってもよい。 40

【 0 0 9 1 】

本発明の方法を使用してスクリーニングされるライブラリは、種々のタイプの化合物を含むことができる。本発明の方法によってスクリーニングできるライブラリの例には、ペプトイド ; ランダムバイオオリゴマー (r a n d o m b i o o l i g o m e r s) ; ヒダントイン、ベンゾジアゼピン及びジペプチドのようなダイバーソマー (d i v e r s o 50

mers) ; ビニル性ポリペプチド ; 非ペプチド性 (nonpeptidial) ペプチド模倣薬 ; オリゴカルバミン酸塩 ; ホスホン酸ペプチジル ; ペプチド核酸ライブラリ ; 抗体ライブラリ ; 炭水化物ライブラリ ; 小分子ライブラリ (好ましくは、小有機分子ライブラリ) が含まれるが、それらに限定されない。幾つかの実施態様において、スクリーニングされるライブラリ中の化合物は、核酸又はペプチド分子である。非限定的な例において、ペプチド分子は、フェージ提示ライブラリ中に存在できる。他の実施態様において、化合物のタイプには、非天然発生アミノ酸、例えば D - アミノ酸、 α - アミノリン酸及び β - アミノリン酸のような、アミノ酸のリン系類似体、又は非ペプチド結合を有するアミノ酸、ホスホロチオエート及び PNA のような核酸類似体、ホルモン、抗原、合成又は天然発生薬物、アヘン剤、ドーパミン、セロトニン、カテコールアミン、トロンピン、アセチルコリン、プロスタグランジン、有機分子、フェロモン、アデノシン、ショ糖、ブドウ糖、ラクトース及びガラクトースからなるペプチドを含むペプチド類似体が含まれるが、それらに限定されない。ポリペプチド又はタンパク質のライブラリも、本発明のアッセイにおいて使用できる。

【0092】

好ましい実施態様において、組合せライブラリには、ベンゾジアゼピン、イソプレノイド、チアゾリジノン、メチアザノン、ピロリジン、モルホリノ合成物及びベンゾジアゼピンが含まれるが、それらに限定されない小有機分子ライブラリである。もう1つの実施態様において、コンビナトリアルライブラリには、ペプトイド ; ランダムバイオオリゴマー ; ベンゾジアゼピン ; ヒダントイン、ベンゾジアゼピン及びジペプチドのようなダイバーソマー ; ビニル性ポリペプチド ; 非ペプチド性ペプチド模倣薬 ; オリゴカルバミン酸塩 ; ホスホン酸ペプチジル ; ペプチド核酸ライブラリ ; 抗体ライブラリ ; 又は炭水化物ライブラリが含まれる。コンビナトリアルライブラリは、市場で入手可能である (例えば、ComGenex, Princeton, New Jersey ; Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Missouri ; ChemStar, Ltd, Moscow, Russia ; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pennsylvania ; Martek Biosciences, Columbia, Maryland ; 等参照)。

【0093】

好ましい実施態様において、ライブラリは、ライブラリの化合物が細胞取り込みにより受け入れられるように予め選択される。例えば、化合物は、化合物が細胞に入り込む可能性を高める、寸法、親油性、親水性、及び水素結合等の特定パラメータに基づいて選択される。もう1つの実施態様において、化合物は、三次元又は四次元コンピュータ計算プログラムによって分析される。

【0094】

本発明の方法により使用するコンビナトリアル化合物ライブラリは、合成できる。薬理的、生物学的、又は他の活性に関してスクリーニングできる小有機化合物の大きなコレクション又はライブラリの作成に向けられた合成方法には、大きな重要性がある。広大なコンビナトリアルライブラリを作り出すために適用される合成方法は、溶液中、又は固相中すなわち固体担体上で行われる。固相合成によれば、過剰な試薬を容易に添加して各反応ステップ後に洗い流すことができるので、多段階反応を実行すること及び反応を高収率で完了することが容易となる。固相組合せ合成は、同様に単離、精製及びスクリーニングを改良する傾向を有する。しかしながら、より伝統的な溶液相化学は、固相化学よりもより多種多様な有機反応を支持する。

【0095】

本発明のコンビナトリアル化合物ライブラリは、ここに全体を参考として組み込む、Kilcoinet al. の米国特許第 6190619 号に記載された装置を使用して合成できる。米国特許第 6190619 号は、複数の離散化合物の平行合成、又は化合物のコンビナトリアルライブラリのための複数の反応容器を保持することが可能な合成装置を開示する。

【0096】

1つの実施態様において、コンビナトリアル化合物ライブラリは、溶液中で合成できる。ここに全体を参考として組み込む、Boger et al. の米国特許第6194612号に記載された方法は、コンビナトリアルライブラリの溶液相合成の鑄型として有用な化合物を特徴とする。鑄型は、反応産物が、液-液又は固-液抽出を使用して、未反応反応物から容易に精製できるように設計されている。鑄型を使用してコンビナトリアル合成によって合成された化合物は、好ましくは小有機分子である。ライブラリ中の幾つかの化合物は、非ペプチド又はペプチドの効果を模倣する。コンビナトリアル化合物ライブラリの固相合成とは対照的に、液相合成は、多段階固相合成の個別のステップを観察する特定の手順の使用を必要としない (Egner et al., 1995, J. Org. Chem. 60: 2652; Anderson et al., 1995, J. Org. Chem. 60: 2650; Fitch et al., 1994, J. Org. Chem. 59: 7955; Look et al., 1994, J. Org. Chem. 49: 7588; Metzger et al., 1993, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 32: 894; Youngquist et al., 1994, Rapid Commun. Mass Spect. 8: 77; Chu et al., J. AM. Chem. Soc. 117: 5419; Brummel et al., 1994, Science 264: 399; 及び Stevanovic et al., 1993, Bioorg. Med. Chem. Lett. 3: 431)。

10

【0097】

本発明の方法に有用なコンビナトリアル化合物ライブラリは、固体担体上で合成できる。1つの実施態様において、スプリット合成方法、合成中に固体担体を分離及び混合するプロトコルは、固体担体上で化合物のライブラリを合成するために使用される (例えば、Lam et al., 1997, Chem. Rev. 97: 41-448; Ohlmyer et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10922-10926、及びそこに引用された参考文献を参照)。最終ライブラリ中の各固体担体は、その表面に付着した実質的に1タイプの化合物を有する。固体担体上にコンビナトリアルライブラリを合成する他の方法は、1つの産物が各担体に付着するものであり、当業者には知られている (例えば Nefzi et al., 1997, Chem. Rev. 97: 449-472を参照)。

20

30

【0098】

ここで使用されるように、用語「固体担体」は、特定のタイプの固体担体に限定されない。むしろ多数の担体が、利用可能であり、且つ当業者には知られている。固体担体には、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビード、木綿、プラスチックビード、ポリスチレンビード、アルミナゲル及び多糖が含まれる。適切な固体担体は、所望の最終用途及び種々の合成手順の適合性に基づいて選択できる。例えば、ペプチド合成に関して、固体担体は、p-メチルベンズヒドリルアミン (pMBHA) 樹脂のような樹脂 (Peptides International, Louisville, KY)、クロロメチルポリスチレン、ヒドロキシメチルポリスチレン及びアミノメチルポリスチレンを含むポリスチレン (例えば Bachem Inc., Peninsula Laboratories 等から得られる PAM-resin)、ポリ (ジメチルアクリルアミド) 移植スチレンコジビニルベンゼン (例えば, Aminotech, Canada から得られる POLYHIPE 樹脂)、ポリアミド樹脂 (Peninsula Laboratories から得られる)、ポリエチレングリコールによって移植されたポリスチレン樹脂 (TENTAGEL 又は ARGOGEL, Bayer, Tubingen, Germany)、ポリジメチルアクリルアミド樹脂 (Milligen/Biosearch, California から得られる)、又はセファロース (Pharmacia, Sweden) であってもよい。

40

【0099】

本発明の幾つかの実施態様において、化合物は、リンカーを介して固体担体に付着でき

50

る。リンカーは、一体である (integral) 又は固体担体の一部であってもよく、固体担体上に合成される又は合成後に固体担体に付着される非一体であってもよい。リンカーは、固体担体に化合物付着点を提供するだけでなく、リンカーの性質に応じて、様々な条件で様々な分子群が固体担体から開裂されることを可能にすることにも有用である。例えば、リンカーは、とりわけ、求電子開裂、求核開裂、光開裂 (photocleavable)、酵素開裂、金属による開裂、還元条件での開裂又は酸化条件での開裂ができる。好ましい実施態様において、化合物は、化合物のハイスループットスクリーニングの前に固体担体から開裂される。

【0100】

本発明の幾つかの実施態様において、化合物は、小分子である。

10

【0101】

代表的なライブラリは、幾つかの供給源から市場で入手可能である (ArQule, Tripos/PanLabs, Pharmacopoeia)。場合によっては、これらの化学ライブラリは、メンバー化合物が付着される基質上でライブラリの各メンバーの識別性をコード化し、これにより有効なモジュレーター分子の直接且つ即時の識別を可能にするコンビナトリアル戦略を使用して生成される。従って、多くのコンビナトリアルアプローチにおいて、化合物のプレート上の位置は化合物の組成を特定する。同様に、1つの実施例において、単一のプレート位置は、対象の相互作用を含むウェルへの投与によってスクリーニングできる1-20の化学物質を有することができる。従って、調節が検出された場合、相互作用対のますます小さいプールを調節活性に関してアッセイできる。かかる方法によって、多くの候補分子をスクリーニングできる。

20

【0102】

使用に適した多くの多様性ライブラリは、当該技術分野において公知であり、本発明によりテストする化合物を提供するために使用できる。あるいは、ライブラリは、標準的方法を使用して構築できる。化学(合成)ライブラリ、組換え発現ライブラリ、又はポリソームベースライブラリは、使用できるライブラリの代表的タイプである。

【0103】

ライブラリは、固定若しくは半硬質(ある程度の構造適合性を有する)、又は、線形若しくは非固定であってもよい。ライブラリは、cDNA又はゲノム発現ライブラリ、ランダムペプチド発現ライブラリ、又は化学合成ランダムペプチドライブラリ、又は非ペプチドライブラリである。発現ライブラリはアッセイが行われる細胞中に導入され、ライブラリの核酸がそのコード化されたタンパク質を合成するために発現される。

30

【0104】

1つの実施態様において、本発明において使用できるペプチドライブラリは、インビトロで化学合成されるライブラリであってもよい。かかるライブラリの例は、各ペプチドの第1及び第2残基が個別に且つ具体的に定義された遊離ヘキサペプチドの混合物を記載した Houghten et al., 1991, Nature 354: 84-86; 固コレクシヨンの各ビードがその上にアミノ酸残基の単一ランダム配列を固定化したペプチドライブラリを作製した「1つのビード、1つのペプチド」アプローチを記載している Lam et al., 1991, Nature 354: 82-84; スプリット合成及び T-バッグ(T-bag)合成方法を記載している Medynski, 1994, Bio/Technology 12: 709-710; 及び Gallop et al., 1994, J. Medicinal Chemistry 37(9): 1233-1251 に示される。単に他の例として、コンビナトリアルライブラリが、Ohlmeyer et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10922-10926; Erb et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-11426; Houghten et al., 1992, Biotechniques 13: 412; Jayawickreme et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1614-1618; 又は Salmon et al., 1993, Proc. Natl. A

40

50

cad. Sci. USA 90:11708-11712の方法に従って、使用するために調製できる。国際公開第WO93/20242号及びBrenner and Lerner, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383は、各化学ポリマライブラリメンバーにオリゴヌクレオチド識別子を含む「コード化コンビナトリアル化学ライブラリ」を記載している。

【0105】

好ましい実施態様において、スクリーニングされたライブラリは、(例えばジスルフィド結合を有することに基づき)ランダムペプチドが固定されるランダムペプチドフェージ提示ライブラリである生物学的発現ライブラリである。

【0106】

更に、より一般的な構造的に固定された有機多様性(例えば非ペプチド)ライブラリも使用できる。例として、ベンゾジアゼピンライブラリ(例えばBunin et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712)が、使用できる。

【0107】

使用できる立体配座的に固定されたライブラリには、酸化環境において、システインを形成するためにジスルフィド結合により架橋する不変システイン残基、修飾ペプチド(例えばフッ素、金属、同位体標識を組み込む、リン酸化される等)、1つ以上の非天然発生アミノ酸を含むペプチド、非ペプチド構造、及び有意な α -カルボキシグルタミン酸画分を含むペプチドを含むものが含まれるが、それらに限定されない。

【0108】

非ペプチド、例えばペプチド誘導体(例えば、1つ以上の非天然発生アミノ酸を含むもの)のライブラリも使用できる。これらの1つの例は、ペプチドライブラリである(Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371)。ペプトイドは、アルファ炭素に付着せず、バックボーンアミノ窒素に付着する天然発生側鎖を有する、非天然アミノ酸のポリマーである。ペプトイドは、ヒト消化酵素によって容易に分解しないので、好適に、薬物の使用により容易に適合可能である。化学変化したコンビナトリアルライブラリを生成するために、ペプチド中のアミド基が予めメチル化され、使用できるライブラリのもう1つの例は、Ostresh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142)に記載されている。

【0109】

本発明によってスクリーニングできるペプチドライブラリのメンバーは、20の天然発生アミノ酸を含むことに限られない。特に、化学合成されたライブラリとポリソームベースライブラリは、(ライブラリ作製において使用されるアミノ酸の前駆体プール中でそれらを含むことにより)20の天然発生アミノ酸に加えて、アミノ酸の使用を可能にする。特定の実施態様において、ライブラリメンバーには、1つ以上の非天然又は非古典的アミノ酸又は環状ペプチドが含まれる。非古典的アミノ酸には、共通アミノ酸、アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸のD-異性体； β -Abu、6-アミノヘキサン酸；Aib、2-アミノイソ酪酸；3-アミノプロピオン酸；オルニチン；ノルロイシン；ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキサアラニン、 γ -アラニン、デザイナアミノ酸、例えば β -メチルアミノ酸、C β -メチルアミノ酸、N β -メチルアミノ酸、フルオロアミノ酸及び一般的にアミノ酸類似体が含まれるが、それらに限定されない。更に、アミノ酸はD(右旋性)又はL(左旋性)であってもよい。

【0110】

特定の実施態様において、c-Relの断片及び/又は類似体、特にペプチド模倣薬は、c-Rel核局在又は輸送の競合的又は非競合的阻害剤としての活性に関してスクリーニングされる。

10

20

30

40

50

【0111】

本発明のもう1つの実施態様において、c-Rel核局在又は輸送のモジュレーターを識別するために、コンビナトリアル化学が使用できる。コンビナトリアル化学は、多くが構造的に類似していてもよい数十万の化合物を含むライブラリを作り出せる。ハイスループットスクリーニングプログラムは、公知の標的の親和力に関してこれらの広大なライブラリをスクリーニングすることが可能であるが、より小さな寸法であり最大の化学多様性を提供するライブラリを実現する新しいアプローチが開発された(例えば、Matter, 1997, Journal of Medicinal Chemistry 40: 1219-1229を参照)。

【0112】

コンビナトリアル化学の1つの方法、アフィニティーフィンガープリント法は、タンパク質の定義パネルの結合親和力に関して、小分子の離散ライブラリをテストするために、以前使用された。スクリーニングによって得られたフィンガープリントは、重要な他のタンパク質又はレセプター(本発明においてc-Rel)の個別のライブラリメンバーの親和力を予測するために使用される。フィンガープリントは、ライブラリ化合物が同じように反応するか否かを予測するために、対象のタンパク質と反応することが知られている他の化合物から得られたフィンガープリントと比較される。例えば、c-Relとの相互作用に関して大きなライブラリ中の全てのリガンドをテストするよりも、その活性を有することが知られている他の化合物に類似したフィンガープリントを有するリガンドをテストできる(例えば、Kauvar et al., 1995, Chemistry and Biology 2: 107-118; Kauvar, 1995, Affinity fingerprinting, Pharmaceutical Manufacturing International. 8: 25-28; 及びKauvar, Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, D. Kurtz, L. Stanker and J. H. Editors, 1995, AOAC: Washington, D. C., 305-312参照)。

【0113】

Kay et al., 1993, Gene 128: 59-65 (Kay)は、いかなる先行する従来ライブラリのそれよりも長い、完全にランダムな配列のペプチドをコード化するペプチドライブラリを構築する方法を開示している。Kayに開示されたライブラリは、長さが約20アミノ酸を超える完全合成ランダムペプチドをコード化する。かかるライブラリは、好適に、c-Relモジュレーターを識別するためにスクリーニングできる。(1996年3月12日の米国特許第5498538号; 及び1994年8月18日の国際公開第WO94/18318号も参照)。

【0114】

他のライブラリには、抗体ライブラリ及び細胞中で発現される細胞内発現抗体のライブラリが含まれてよい。

【0115】

各化合物がアドレス又は識別子を有する化合物のアレイ又はマイクロアレイをライブラリが含むならば、化合物は、例えば、個別のテストアッセイに適用された当初の化合物リストと陽性試料とを相互参照することによって解析できる。

【0116】

ライブラリがペプチド又は核酸ライブラリであるならば、化合物の配列は、ペプチド又は核酸の直接配列決定によって判定できる。かかる方法は、当業者に周知である。

【0117】

種々のタイプのペプチドライブラリの包括的な検討は、Gallop et al., 1994, J. Med. Chem. 37: 1233-1251に認められる。

【0118】

スクリーニングアッセイで識別される化合物

10

20

30

40

50

本発明は、上記スクリーニングアッセイによって識別される化合物及びこれらのアッセイの使用によってかかる薬剤を製造する工程を更に対象とする。化合物には、核酸、アンチセンス核酸、リボザイム、三重らせん体、抗体、及びポリペプチド分子、小無機又は有機分子が含まれるが、それらに限定されない。従って、1つの実施態様において、本発明は、前記スクリーニングアッセイのいずれかのステップを含む方法によって得られる化合物を含む。例えば、化合物は、1つ以上の候補分子と細胞を接触させることと；細胞中の c - R e l 分子の局在を検出することと、を含む方法によって得られ、1つ以上の候補分子に接触しない細胞中の量に対して、N F B の発現レベル及び / 又は I B の量を実質的に変更することなく核内の c - R e l 量が増加又は減少する。

【0119】

一旦テスト化合物が本発明のスクリーニング方法により適切な活性を有すると識別されると、テスト化合物は、例えば動物における c - R e l 活性又は細胞内局在のモジュレーターの活性を確認するため、又は潜在的副作用に関して、動物モデル中で更なるテストを受けることができる。テスト化合物は、その所望の活性を確認するために、細胞ベース又は動物アッセイの両方で、c - R e l 活性又は細胞内局在を調節する公知の化合物に対してもテストできる。識別された化合物は、かかる化合物の投与に関連し得る毒性又は副作用を判定するためにもテストできる。あるいは、ここに記載されたように識別された化合物は、かかる化合物の作用機序を判定するために動物モデル中で使用できる。

【0120】

細胞中で N F B の発現レベル及び / 又は I B の量を実質的に変更することなく、細胞の核内の c - R e l 量を減少させる薬剤の生物学的効果を評価するかかる代表的な評価方法は、薬剤と細胞を接触させることと、細胞中のあらゆる表現型効果を観察することと、を含む。もう1つの例証的な方法は、テスト被検者 / 動物に薬剤を投与することと、テスト被検者 / 動物におけるあらゆる表現型効果を観察することと、を含む。

【0121】

本発明は、ここに記載されたかかる化合物の処理方法の上記スクリーニングアッセイによって識別される化合物の使用にも関係する。従って、ここに記載されたような、診断、予後又は治療に使用するための薬物又は医薬組成物の設計、製剤、合成、製造及び / 又は製造にかかる化合物を使用することは、本発明の範囲内である。例えば、1つの実施態様において、本発明は、上記スクリーニングアッセイの1つによって得ることが可能な化合物の構造及び / 又は特性を参照することによって、薬物又は医薬組成物を合成又は製造する方法を含む。例えば、薬物又は医薬組成物は、上記に記載したスクリーニング方法によって得られる化合物の構造及び / 又は特性に基づき合成できる。

【0122】

更に、識別された化合物は、治療又は予防方法における使用のための製剤化前に、化合物をより安定にする、すなわち被検者における半減期を増加させる、又は化合物を被検者の組織に更に容易に吸収されるようにするために、当該技術分野において公知の方法を使用して修飾できる。かかる修飾には、PEG付加 (P E G y l a t i o n)、多量体化が含まれるが、それらに限定されない。かかる修飾は、化合物を投与により適するようにするために、薬化学者によって行われる。更に、識別される化合物は、血液脳関門を通過できるように修飾されてよい。

【0123】

所望の生物活性を示す化合物は、有用な薬理学的活性を有する同属種又は類似体の発達又は設計のためにリード化合物として使用できる。例えば、一旦リード化合物が識別されると、より有効であり得る化合物の変異体を設計するために分子モデリング技術が使用できる。分子モデリング系の例は、CHARM及びQUANTAプログラムである (P o l y g e n C o r p o r a t i o n , W a l t h a m , M A) 。 C H A R M は、エネルギー最小化及び分子動力学機能を実行する。QUANTAは、構築、図形モデリング及び分子構造の分析を実行する。QUANTAは、分子相互の行動の対話型構築、修飾、視覚化及び分析を可能にする。有用な薬理学的活性を有する同属種又は類似体の発達又は設計の

10

20

30

40

50

ためのリード化合物として使用できる代表的化合物は、各々、全体がここに参照として組み込まれる、米国特許第6384032号；2002年5月7日に出願された米国特許出願第09/594362号；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/006624号（公開第20020082259号）；2001年11月30日に出願された米国特許出願第10/000742号（公開第20030139403号）；2002年7月10日に出願された米国特許出願第10/192347号（公開第20030114446号）；2002年11月26日に出願された米国特許出願第10/305039号；国際公開第WO00/78757号；国際公開第WO03/04516号；2003年10月14日に出願された国際特許出願第PCT/US03/32546号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518791号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518787号；2003年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/518788号；発明の名称「Fused Heterocyclic Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号（50586）61250；発明の名称「Heteroaryl Hydrazone Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号（50586）61252；発明の名称「Pyridine Compounds」、Mitsunori Ono et al、2004年11月10日に出願された国際特許出願代理人事件整理番号（50586）61253に記載されている。

【0124】

Rotivinen et al., 1988, Acta Pharmaceutica Fennica 97:159-166; Ripka, 1998, New Scientist 54-57; McKinaly & Rossmann, 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:111-122; Pery & Davies, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis & Dean, 1989, Proc. R. Soc. Lond. 236:125-140及び141-162; Askew et al. 1989, J. AM. Chem. Soc. 111:1082-1090のような多数の論文は、特定のタンパク質と相互作用をする薬物のコンピュータモデリングを検討している。化学物質をスクリーニング及び図形的に描く他のコンピュータプログラムは、BioDesign, Inc. (Pasadena, California), Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada), 及びHypercube, Inc. (Cambridge, Ontario)のような会社から入手可能である。これらは、特定のタンパク質に特異的な薬物への応用のために主に設計されたが、いずれかの識別された領域に特異的な薬物の設計に適応させることができる。あるいは、スクリーニングにおいて確認される僅かな生物性を有する又は生物活性を有さないリード化合物も、生物活性を有する化合物の類似体及び同属種を設計するために使用できる。

【0125】

医薬組成物及び治療/予防投与

本発明は、本発明の治療物 (Therapeutic)、すなわち本発明のスクリーニング方法によって識別される化合物を、被検者に有効量投与することによる治療（及び予防）方法を提供する。好ましい側面において、治療物は実質的に精製されている。被検者は、好ましくはウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ等を含む動物であり、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくは、ヒトである。特定の実施態様において、非ヒト哺乳動物は被検者である。

【0126】

特定の実施態様において、本発明は、NF Bの発現レベル又はI Bの量が実質的に

変更せず c - R e l の細胞内局在が異常であることを特徴とする疾患又は障害を治療する方法であって、N F B の発現レベル又は I B の量を実質的に変更することなく c - R e l の核局在を減少させる分子を含む組成物及び薬理的に許容できるキャリアを、かかる疾患又は障害を有する被検者に投与することを含む方法を提供する。もう1つの特定の実施態様において、本発明は、I L - 1 2 産生関連疾患又は障害を治療する方法であって、N F B の発現レベル又は I B の量を実質的に変更することなく c - R e l の核局在を減少させる分子を含む組成物及び薬理的に許容できるキャリアを、かかる疾患又は障害を有する被検者に投与することを含む方法を提供する。もう1つの特定の実施態様において、本発明は、c - R e l 依存性サイトカイン産生に関連する疾患又は障害を治療する方法であって、N F B の発現レベル又は I B の量を実質的に変更することなく c - R e l の核局在を減少させる分子を含む組成物及び薬理的に許容できるキャリアを、かかる疾患又は障害を有する被検者に投与することを含む方法を提供する。更にもう1つの特定の実施態様において、本発明は、自己免疫疾患又は障害を治療する方法であって、N F B の発現レベル又は I B の量を実質的に変更することなく c - R e l の核局在を減少させる分子を含む組成物及び薬理的に許容できるキャリアを、かかる疾患又は障害を有する被検者に投与することを含む方法を提供する。前述の方法において N F B の発現レベル又は I B の量を実質的に変更することなく c - R e l の核局在を減少させる分子は、このスクリーニング方法によって識別されるもの（例えば詳細な説明において記載されたもの）であってもよい。

10

【0127】

20

ここに記載された化合物及び組成物は、いかなる I L - 1 2 産生関連障害、例えば炎症性障害、免疫疾患、神経系障害及び骨量減少疾患を治療及び予防するために有用である。治療及び予防方法も提供される。

【0128】

用語「炎症性障害」は、I L - 1 2 産生によって引き起こされ、悪化され又は媒介される、いかなる炎症性疾患、障害又は状態も含む。かかる炎症性障害には、喘息、成人呼吸促迫症候群、全身性紅斑性狼瘡、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む）、多発性硬化症、インスリン依存性真性糖尿病、自己免疫関節炎（リウマチ関節炎、若年性リウマチ関節炎、乾癬性関節炎を含む）、炎症性肺症候群、尋常性天疱瘡、突発性血小板減少性紫斑病、自己免疫髄膜炎、重症筋無力症、自己免疫甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎及び湿疹性皮膚炎を含む）、乾癬、シェーグレン症候群（シェーグレン症候群に続発する乾性角結膜炎を含む）、円形脱毛症、節足動物刺傷反応に起因するアレルギー応答、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、皮膚エリテマトーデス、強皮症、膣炎、直腸炎、（スティーヴェズ - ジョンソン症候群のような）薬疹、らい病反転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫ブドウ膜炎、アレルギー性脊髄炎、無形成貧血、赤芽球ろう、突発性血小板減少、多発性軟骨炎、ヴェゲナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、グレーブス眼症、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、及び間質性肺線維症が含まれるが、それらに限定されない。

30

【0129】

「炎症性障害」は、急性炎症性障害を明白に含む。急性炎症性障害には、移植片対宿主病、移植拒絶、敗血症性ショック、内毒血症、ライム関節炎、感染性髄膜炎（例えば、ウイルス、細菌、ライム病関連）、喘息の急性発症及び自己免疫疾患の急性発症が含まれる。

40

【0130】

「炎症性障害」は、慢性炎症性障害を明白に含む。慢性炎症性障害の非限定的な例には、喘息、風疹関節炎、及び全身性紅斑性狼瘡、乾癬、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患、多発性硬化症及びリウマチ関節炎のような慢性自己免疫疾患が含まれる。

【0131】

用語「免疫疾患」は、I L - 1 2 産生によって引き起こされ、悪化され又は媒介されるいかなる免疫疾患、障害又は状態も含む。かかる免疫疾患には、リウマチ関節炎、若年性

50

リウマチ関節炎、全身性発症若年性リウマチ関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、胃潰瘍、血清陰性関節炎、骨関節炎、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、全身性紅斑性狼瘡、抗リン脂質症候群、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、特発性肺線維症、全身性血管炎/ヴェゲナー肉芽腫症、サルコイドーシス、睪丸炎/精管切除反転法、アレルギー/アトピー性疾患、喘息、アレルギー鼻炎、湿疹、アレルギー接触性皮膚炎、アレルギー結膜炎、過敏性肺臓炎、移植体、臓器移植拒絶、移植片対宿主病、全身炎症反応症候群、敗血症候群、グラム陽性敗血症、グラム陰性敗血症、培養陰性敗血症、真菌性敗血症、好中球減少性発熱、尿路性敗血症、髄膜炎菌血症、外傷/出血、熱傷、電離放射線の曝露、急性膵炎、成人呼吸促迫症候群、リウマチ関節炎、アルコール誘導肝炎、慢性炎症性病変、サルコイドーシス、クローン病変、鎌状赤血球貧血、糖尿病、ネフローゼ、アトピー性疾患、過敏性反応、アレルギー性鼻炎、枯草熱、通年性鼻炎、結膜炎、子宮内膜症、喘息、じんま疹、全身アナフィラキシー、皮膚炎、悪性貧血、溶血性疾患、血小板減少、いずれかの臓器又は組織の移植片拒絶、腎臓移植拒絶、心臓移植拒絶、肝臓移植拒絶、膵臓移植拒絶、肺移植拒絶、骨髄移植(BMT)拒絶、皮膚同種移植片拒絶、軟骨移植拒絶、骨移植片拒絶、小腸移植拒絶、胎児胸腺インプラント拒絶、上皮小体移植拒絶、いずれかの臓器又は組織の異種移植片拒絶、同種移植片拒絶、抗レセプター過敏症反応、グレーブス病、レイノー病、B型インスリン抵抗性糖尿病、喘息、重症筋無力症、抗体媒介性細胞障害反応、III型過敏性反応、全身性紅斑性狼瘡、POEMS症候群(多発性神経症、巨臓器症、内分泌疾患、単クローン性高ガンマグロブリン血症、及び皮膚変化症候群)、多発性神経症、巨臓器症、内分泌疾患、単クローン性高ガンマグロブリン血症、皮膚変化症候群、抗リン脂質症候群、天疱瘡、強皮症、混合結合組織病、特発性アディソン病、真性糖尿病、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、白斑、血管炎、心筋梗塞後心臓切開症候群、IV型過敏症、接触皮膚炎、過敏症肺臓炎、同種移植片拒絶、細胞内生物に起因する肉芽腫、薬剤感受性、代謝性/特発性、ウィルソン病、ヘマクロマトーシス、-1-抗トリプシン欠乏、糖尿病網膜症、橋本甲状腺病、骨粗鬆症、視床下部-下垂体-副腎軸評価、原発性胆汁性肝硬変、甲状腺炎、脳脊髄炎、悪液質、嚢性線維症、新生児慢性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、家族性食血細胞リンパ組織球増多症、皮膚病変、乾癬、脱毛、ネフローゼ症候群、腎炎、糸球体腎炎、急性腎不全、血液透析、尿毒、毒性、子癇前症、okt3療法、抗cd3療法、サイトカイン療法、化学療法、放射線療法(例えば、無力症、貧血、悪液質等が含まれるが、それらに限定されない)、慢性サリチル酸中毒等が含まれるが、限定されない。例えば、各々、全体が参考として組み込まれる、the Merck Manual、12th-17th Editions、Merck & Company、Rahway、N.J.(1972、1977、1982、1987、1992、1999)、Pharmacotherapy Handbook、Wells et al. eds.、Second Edition、Appleton and Lange、Stamford、Conn.(1998、2000)を参照されたい。

【0132】

用語「神経系障害」は、IL-12産生によって引き起こされ、悪化され又は媒介されるいかなる神経系疾患、障害又は状態も含む。かかる神経系障害には、神経変性疾患、多発性硬化症、片頭痛、エイズ痴呆複合症候群、多発性硬化症及び急性横断脊髄炎のような脱髄疾患；皮質脊髄系の傷害のような錐体外路及び小脳障害；基底核の障害及び小脳障害；ハンチントン舞蹈病及び老年舞蹈病のような運動過剰性運動障害；CNSドーパミンレセプターを遮断する薬剤によって誘導されるような、薬剤誘導運動障害；パーキンソン病のような運動低下運動障害；進行性核上性麻痺；小脳の構造的病変；脊髄小脳変性、例えば脊髄性運動失調、フリードライヒ運動失調、小脳皮質変性、多系統変性(Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-Drager及びMachado-Joseph)；全身障害(レフスム病、無リポタンパク質血症、運動失調、末梢血管拡張、及びミトコンドリア多臓器障害)；脱髄性コア障害、例えば多発性硬化症、急性横断脊髄炎；及び運動単位の障害、例えば運動因性筋萎縮(前角細胞変性、例えば筋萎縮性側索硬

化症、小児性棘筋萎縮及び若年棘筋萎縮)；アルツハイマー病；中年におけるダウン症候群；広汎性レーヴィー体疾患；レーヴィー体型の老人性痴呆；ヴェルニッケ-コルサコフ症候群；慢性アルコール中毒；クロイツフェルト-ヤコブ病；亜急性硬化性全脳炎、ハレルフォルデン-スパッツ病(Hallerorden-Spatz disease)；及びボクサー痴呆等が含まれるが、これらに限定されない。かかる方法は、かかる調節、治療又は療法を必要とする細胞、組織、臓器、動物又は患者に、少なくとも1種のTNF抗体又は特定部分又は変異体を含む有効量の組成物又は医薬化合物を投与することを任意に含むことができる。例えばthe Merck Manual、16、Edition、Merck & Company、Rahway、N.J.(1992)を参照されたい。

10

【0133】

用語「骨量減少疾患」は、IL-12産生によって引き起こされ、悪化され又は媒介されるいかなる骨量減少疾患、障害又は状態、例えば歯周病、非悪性骨障害(例えば、骨粗鬆症、骨のバジェット病、骨形成不全、線維性異形成症、及び原発性上皮小体亢進)、エストロゲン欠乏、炎症性骨量減少、骨悪性疾患、関節炎、大理石骨病、及びある種の癌関連障害(例えば、悪性高カルシウム血症(HCM)、多発性骨髄腫の骨溶解性骨病変及び乳癌の骨溶解性骨転移、及び他の転移癌)も含む。

【0134】

これらの定義が重複する場合、疾患、状態又は障害は、IL-12産生関連障害の上記一覧に記載された分類のいずれかの構成要素であると考えてよい。特定のIL-12産生関連疾患には、リウマチ関節炎、敗血症、クローン病、多発性硬化症、乾癬、又はインスリン依存性真性糖尿病が含まれる。

20

【0135】

治療物が上記のアッセイによって識別される調節化合物を含むときに用いることができる製剤及び投与方法；追加の適切な製剤及び投与経路は、ここで以下に記載されたものから選択できる。その上、本発明の治療物は、同様に本発明の疾患又は障害を治療するためのいずれかの公知の薬物と併せて投与できる。

【0136】

種々の送達システムが、公知で、本発明の治療物を投与するために使用でき、例えばリポソーム、微粒子及びマイクロカプセル中のカプセル化、治療物を発現できる細胞の使用、レセプター媒介エンドサイトーシスの使用(例えばWu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432)；レトロウイルス又は他のベクターの一部としての治療核酸の構築等である。導入方法には、皮内、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外及び経口経路が含まれるが、それらに限定されない。化合物は、いかなる従来の経路、例えば注入、大量瞬時投与、上皮又は粘膜皮膚内層を通じた吸収(例えば、経口、直腸、腸粘膜等)によっても投与でき、他の生物学的に活性な薬剤と共に投与できる。投与は、全身又は局所であってもよい。更に、脳室内及び髄腔内注射を含むいずれかの適切な経路によって、中枢神経系に本発明の医薬組成物を導入することが望ましくなり得る。脳室内注射は、例えば、オマヤレザバーのようなレザバーに付着した脳室内カテーテルによって、容易に行うことができる。肺投与も、例えば吸入器又はネブライザーの使用、及びエアロゾル化剤による製剤によって行うことができる。

30

40

【0137】

好ましい実施態様において、治療物は、経口投与用に製剤される。これらの剤形には、当該技術分野において周知の持続放出製剤が含まれ、錠剤(コーティングされた、又はされていない)、カプレット、硬質ゼラチンカプセル、軟質ゼラチンカプセル、トローチ、糖剤、分散、懸濁液、溶液等が含まれる。例えば、Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 1985, Ansel, H. C., Lea and Febiger, Philadelphia, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences, 1995, Mack Publ. Co., Easton, PAを参照されたい。投与が容易であるために、錠

50

剤及びカプセルが好ましく、最も好適な経口剤単位形となり、その場合、固体医薬賦形剤が用いられる。必要に応じて、錠剤及びカプレット又はカプセルは、標準的な水性又は非水性技術によってコーティングできる。

【0138】

特定の実施態様において、本発明の医薬組成物を、治療の必要がある領域に局所的に投与することが望ましくなり得る。このことは、例えば、非限定で、手術中の局所注入、例えば手術後の創傷包帯と併せた、局所適用、注射、カテーテル、座薬、又はインプラントによって行うことができ、かかるインプラントは、唾液腺膜 (sialastic membrane) のような膜、又は繊維を含む多孔質、無孔質、又はゼラチン状材料を含む。1つの実施態様において、投与は、悪性腫瘍又は新生物形成若しくは新生物形成前組織の部位 (又は以前の部位) での直接注射によってもよい。

10

【0139】

もう1つの実施態様において、治療物は、小胞、特にリポソーム中で送達できる (Langer, 1990, Science 249: 1527 - 1533; Treat et al., 1989, In: Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler, eds., Liss, New York, pp. 353 - 365; Lopez-Berestein, 同書, pp. 317 - 327; 一般的に同書参照)。

【0140】

更にもう1つの実施態様において、治療物は、放出制御システムを介して送達できる。1つの実施態様において、ポンプが使用できる (Langer, 上掲; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 - 240; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507 - 516; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574 - 579)。もう1つの実施態様において、ポリマー材料が、使用できる (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Samolen and Ball, eds., Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; Levy et al., 1985, Science 228: 190 - 192; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351 - 356; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71: 858 - 863)。更にもう1つの実施態様において、放出制御システムは、治療標的、すなわち脳の近傍に置くことができ、これにより全身容量の一部のみが必要となる (例えば Goodson, 1984, In: Medical Applications of Controlled Release, 上掲, Vol. 2, pp. 115 - 138)。他の放出制御システムは、Langer (1990, Science 249: 1527 - 1533) による検討において論じられている。

20

30

40

【0141】

本発明は、医薬組成物も提供する。かかる組成物は、治療上有効量の治療物、及び薬理的に許容できるキャリアを含む。特定の実施態様において、用語「薬理的に許容できる」は、動物、且つ特にヒトへの用途で、連邦又は州政府の監督庁によって承認され、又は米国薬局方若しくは他の一般的に認められた薬局方に記載されていることを意味する。用語「キャリア」は、治療物が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤又はビヒクルを指す。かかる医薬キャリアは、石油、動物、植物又は合成由来の水及び油のような滅菌液であってよく、ラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等が含まれるが、それらに限定されない。医薬組成物が経口投与される時、水は好ましいキャリアであり得る。医薬組成

50

物が静脈内に投与される時、食塩水及び水性デキストロースは好ましいキャリアである。食塩液及び水性デキストロース及びグリセロール溶液は、注射可能な溶液のための液体キャリアとして、好ましく用いられる。適当な医薬賦形剤には、デンプン、ブドウ糖、乳糖、蔗糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が含まれる。所望の場合、組成物は、少量の湿潤剤又は乳化剤、又はpH緩衝剤も含んでよい。これらの組成物は、溶液、懸濁剤、エマルジョン、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、持続放出製剤等の形状をとってよい。組成物は、トリグリセリドのような従来の結合剤及びキャリアによって、座薬として製剤できる。経口製剤は、医薬品グレードのマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、セルロース、炭酸マグネシウム等のような標準的なキャリアを含むことができる。適切な医薬キャリアの例は、E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciences”に記載されている。かかる組成物は、患者に適切な投与のための形状を提供するように、適切な量のキャリアと共に、好ましくは精製された形状で治療上有効量の治療物を含む。製剤は、投与方法に適しているべきである。

10

【0142】

好ましい実施態様において、組成物は、ヒトへの静脈内投与に適した医薬組成物として、通常の手順により製剤される。通常、静脈内投与用の組成物は、滅菌等張緩衝剤中の溶液である。必要な場合、組成物は、注射部位での疼痛を緩和するために、可溶化剤及びリドカインのような局所麻酔薬を含むことができる。一般的に、成分は、別個に、又は単位剤形中で一緒に混合されて、例えば、活性薬剤の量を示すアンプル又はサシェット(sachette)のような気密密封された容器中の乾式凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、提供される。組成物が注入によって投与される場合、滅菌の医薬品グレードの水又は食塩水を含む注入ピンで投薬できる。組成物が注射によって投与される場合、成分が投与前に混合されるように、注射用の滅菌水又は食塩水のアンプルを提供してよい。

20

【0143】

本発明の治療物は、中性又は塩形状で製剤できる。薬理学的に許容できる塩には、遊離カルボキシル基、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等から誘導されるものによって形成される塩、遊離アミン基、例えばイソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等によって誘導されるもの及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムと水酸化第二鉄等によって誘導されるものによって形成される塩が含まれる。

30

【0144】

好ましい医薬組成物及び剤形は、本発明の治療物又はその薬理学的に許容できるプロドラッグ、塩、溶媒和化合物、又はクラスレートを、任意で、1つ以上の追加の活性薬物と組み合わせて含む。

【0145】

特定の障害又は状態の治療に有効な本発明の治療物の量は、障害又は状態の性質、及び標準的臨床技術によって決定できる。その上、最適な用量範囲を識別に役立つように、インビトロアッセイを任意に用いることができる。製剤で用いる正確な用量は、投与経路及び疾患又は障害の重症度によっても決まり、医師の判断及び各患者の状況により決定せねばならない。しかしながら、静脈内投与の適切な投与量範囲は、一般的に体重1キログラム当たり約1-50ミリグラムの活性化化合物である。鼻腔内投与の適切な投与量範囲は、一般的に体重1kg当たり約0.1mgから体重1kg当たり約50mgである。有効用量は、インビトロ又は動物モデルテストシステムから導かれた用量応答曲線から推定できる。

40

【0146】

座薬は、一般的に、0.5から10重量%の範囲の活性成分を含む。経口製剤は、好ましくは10%から95%の活性成分を含む。

50

【0147】

小分子の代表的用量は、被検者又は試料の重量1キログラム当たりミリグラム又はマイクログラムの量の小分子を含む(例えば、1キログラム当たり約1マイクログラムから1キログラム当たり約500ミリグラム、1キログラム当たり約100マイクログラムから1キログラム当たり約5ミリグラム、又は1キログラム当たり約1マイクログラムから1キログラム当たり約50マイクログラム)。

【0148】

本発明が包含する抗体、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び融合タンパク質に関して、患者に投与される投与量は、通常、患者の体重1kg当たり0.0001mgから100mgである。好ましくは、患者に投与される投与量は、患者の体重1kg当たり0.0001mg~20mg、0.0001mg~10mg、0.0001mg~5mg、0.0001mg~2mg、0.0001mg~1mg、0.0001mg~0.75mg、0.0001mg~0.5mg、0.0001mg~0.25mg、0.0001mg~0.15mg、0.0001mg~0.10mg、0.001mg~0.5mg、0.01mg~0.25mg、又は0.01mg~0.10mgである。一般的に、ヒト抗体は、異種ポリペプチドへの免疫応答のために、他種由来の抗体よりも人体中で長い半減期を有する。従って、ヒト抗体の低い投与量及び頻度の低い投与がしばしば可能である。更に、本発明の抗体又はその断片の投与量及び投与頻度は、例えば脂質化のような修飾により、抗体の取り込み及び組織浸透を強化することで、減少できる。

【0149】

更に、幾つかの実施態様において、IL-12産生は、IL-6又はIFN- γ 産生を阻害するために必要な濃度よりも、低い薬物濃度で阻害できるので、適切な投与量には、IL-12を選択的に阻害するが他のサイトカインを阻害しないものが含まれる。

【0150】

本発明の治療物は、米国特許第3845770; 3916899; 3536809; 3598123; 及び4008719、5674533、5059595、5591767、5120548、5073543、5639476、5354556及び5733566号に記載されたような、当業者に周知な放出制御手段又は送達装置によっても投与できる。これらの放出制御組成物は、種々の比率で所望の放出プロフィールを提供するために、そこに使用される1つ以上の活性成分、例えばヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過膜、浸透系、多層コーティング、微小粒子、リポソーム、小球体等、又はその組み合わせの減速又は制御された放出を提供するために使用できる。当業者に公知の適切な放出制御製剤は、本発明の医薬組成物による使用のために容易に選択できる。

【0151】

全ての放出制御医薬品は、薬剤療法を、制御されない医薬品によって実現されるものよりも改良するという共通の目標を有する。理想的には、医療において最適に設計された放出制御調剤は、最小限の時間で状態を治療又は制御するために使用される最小限の薬物物質により特徴づけられる。放出制御製剤の利点には、薬物の長時間の活性、投与頻度減少及び/又は患者のコンプライアンス増加が含まれる。

【0152】

大部分の放出制御製剤は、所望の治療効果を迅速に発揮する治療物量を最初に放出し、適切なレベルの治療効果を徐々に長時間にわたって維持するために、継続的に治療物の他の量を放出するように設計されている。体内で、この一定のレベルの治療物を維持するために、治療物は、代謝され、体から排出された治療物の量と同様の速度で組成物から放出されねばならない。治療物の放出制御は、種々の誘導物質、例えば、pH、温度、酵素、水又は他の生理学的条件若しくは化合物によって刺激され得る。本発明との関連でのかかる放出制御成分には、活性成分の放出制御を容易にする、ポリマー、ポリマーマトリックス、ゲル、透過膜、リポソーム、小球体等、又はその組み合わせが含まれるが、それらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0153】

本発明は、本発明の医薬組成物の1つ以上の成分で満たされた1つ以上の容器を備える医薬パック又はキットも提供する。任意に、医薬品又は生物学製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知であって、ヒト投与のための製造、使用又は販売の機関による承認を反映する通知を、かかる容器に記載してもよい。

【0154】

IL-12産生に関連する疾患若しくは障害、又は異常c-Rel細胞内局在、又は自己免疫疾患若しくは障害を、必要とされる患者において治療又は予防する方法は、本発明の化合物を投与される患者に、有効量の1つ以上の他の治療剤を投与することを更に含んでよい。かかる治療剤には、IL-12産生又は異常c-Rel細胞内局在に関連する障害又はその症候を予防又は治療するために従来使用されるような他の治療剤が含まれてよい。他の治療剤は、ステロイド又は非ステロイド性抗炎症剤であってもよい。有用な非ステロイド性抗炎症剤には、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナック、ナプロキセン、ベノキサプロフェン、フルルピプロフェン、フェノプロフェン、フルブフェン、ケトプロフェン、インドプロフェン、ピロプロフェン、カルプロフェン、オキサプロジン、プラモプロフェン、ムロプロフェン、トリオキサプロフェン、スプロフェン、アミノプロフェン、チアプロフェニン酸、フルプロフェン、ブクロクス酸、インドメタシン、スリンダック、トルメチン、ゾメピラック、チオピナック、ジドメタシン、アセメタシン、フェンチアザック、クリダナック、オキシピナック(oxpinac)、メフェナム酸、メクロフェナム酸、フルフェナム酸、ニフルミン酸、トルフェナム酸、ジフルリサル(diflurisal)、フルフェニサル、ピロキシカム、スドキシカム、イソキシカム;アスピリン、サリチル酸ナトリウム、三サリチル酸コリンマグネシウム、サルサレート、ジフルニサル、サリチルサリチル酸(salicylsalicylic acid)、スルファサラジン及びオルサラジンを含むサリチル酸誘導体;アセトアミノフェン及びフェナセチンを含むパラアミノフェノール誘導体;インドメタシン、スリンダック、及びエトドラックを含むインドール及びインデン酢酸;トルメチン、ジクロフェナック、及びケトロラックを含むヘテロアリアル酢酸;メフェナム酸、及びメクロフェナム酸を含むアントラニル酸(フェナメート);オキシカム(ピロキシカム、テノキシカム)、及びピラゾリジンジオン(フェニルブタゾン、オキシフェンタルタゾン(oxyphenhartzone))を含むエノール酸;及びナブメトンを含むアルカノン、並びにその薬理的に許容できる塩及びその混合物が含まれるが、それらに限定されない。NSAIDのより詳細な記載に関しては、全体が、参考として組み込まれる、Paul A. Insel, Analgesic - Antipyretic and Antiinflammatory Agents and Drugs Employed in the Treatment of Gout, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 617-57 (Perry B. Molinoff and Raymond W. Ruddo eds., 9th ed 1996)及びGlen R. Hanson, Analgesic, Antipyretic and Anti-Inflammatory Drugs in Remington: The Science and Practice of Pharmacy Vol II 1196-1221 (A. R. Genaro ed. 19th ed. 1995)を参照されたい。

【0155】

予防及び治療剤の他の例には、免疫調節剤、抗炎症剤(例えば、副腎コルチコイド、コルチコイドステロイド(例えば、ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド、フルチカゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン)グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド性抗炎症剤(例えばアスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナック、COX-2阻害剤)、及びロイコトリエンアンタゴニスト(例えばモンテルカスト、メチルキサンチン、ザフィルルカスト、及びジレウトン)、ベータ-2-アゴニスト(例えばアルブテロール、ピテロール、フェノテロ

10

20

30

40

50

ール、イソエタリン (i s o e t h a r i e)、メタプロテレノール、ピルブテロール、サルブタモール、テルブタリンホルモテロール、サルメテロール及びサルブタモールテルブタリン)、抗コリン作動薬 (例えば臭化イプラトロピウム、及び臭化オキシトロピウム)、スルファサラジン、ペニシラミン、ダブソン、抗ヒスタミン剤、抗マラリア性薬品 (例えばダクチノマイシン (以前はアクチノマイシン)、プレオマイシン、エリトロマイシン (e r y t h o m y c i n)、ペニシリン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン (A M C)) が含まれるが、それらに限定されない。

【 0 1 5 6 】

併用治療法において、本発明の化合物及び他の薬剤はいずれも、従来の方法によって哺乳動物 (例えばヒト、男性又は女性) に投与される。薬剤は、単一の剤形又は別個の剤形
10
で投与できる。他の治療剤の有効量は、当業者に周知である。しかしながら、他の治療剤の最適な有効量の範囲を決定することは、当業者が設計する範囲内にある。他の治療剤が、動物に投与される本発明の1つの実施態様において、本発明の化合物の有効量は、他の治療剤が投与されない場合のその有効量未満である。もう1つの実施態様において、従来の薬剤の有効量は、本発明の化合物が投与されない場合のその有効量未満である。このようにして、いずれかの薬剤の高い用量に関連する望ましくない副作用を最小限に抑制できる他の可能な利点 (投薬計画改善及び / 又は薬剤コスト減少を含む) は、当業者には明瞭であろう。

【 0 1 5 7 】

種々の実施態様において、治療 (例えば予防又は治療剤) は、5分未満離して、30分
20
未満離して、1時間離して、約1時間離して、約1時間から約2時間離して、約2時間から約3時間離して、約3時間から約4時間離して、約4時間から約5時間離して、約5時間から約6時間離して、約6時間から約7時間離して、約7時間から約8時間離して、約8時間から約9時間離して、約9時間から約10時間離して、約10時間から約11時間離して、約11時間から約12時間離して、約12時間から約18時間離して、約18時間から約24時間離して、約24時間から約36時間離して、約36時間から約48時間離して、約48時間から約52時間離して、約52時間から約60時間離して、約60時間から約72時間離して、約72時間から約84時間離して、約84時間から約96時間離して、又は約96時間から約120時間離して投与される。好ましい実施態様において、2つ以上の治療が、同じ患者の診察中に投与される。
30

【 0 1 5 8 】

幾つかの実施態様において、本発明の1つ以上の化合物及び1つ以上の他の治療 (例えば予防又は治療剤) は、循環的に投与される。循環治療は、一時期の第1治療 (例えば第1予防又は治療剤) の投与、それに続く一時期の第2治療 (例えば第2予防又は治療剤) の投与、任意で、それに続く一時期の第3治療 (例えば予防又は治療剤) の投与等と、且つ治療の1つへの耐性の発達を抑制し、治療の1つの副作用を回避又は低減し、且つ / 又は治療の効果を改良するために、この逐次投与すなわちサイクルを反復することを伴う。

【 0 1 5 9 】

幾つかの実施態様において、本発明の同じ化合物の投与は反復でき、少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2ヶ月、75日、3ヶ月又は少なくとも6ヶ月を隔てること
40
ができる。他の実施態様において、本発明の化合物以外の同じ治療 (例えば予防又は治療剤) の投与は、反復でき、少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2ヶ月、75日、3ヶ月又は少なくとも6ヶ月、隔てること
50

【 0 1 6 0 】

当業者に周知のいかなる免疫調節剤は、本発明の方法及び組成物の同時投与において使用できる。免疫調節剤は、被検者における免疫応答の1つ以上又は全ての側面に影響を及ぼすことができる。免疫応答の側面には、炎症性応答、補体カスケード、白血球及びリンパ球分化、増殖及び / 又はエフェクター機能、単球及び / 又は好塩基球数、及び免疫系の細胞間の細胞伝達が含まれるが、それらに限定されない。本発明の幾つかの実施態様にお

いて、免疫調節剤は、免疫応答の1つの側面を調節する。他の実施態様において、免疫調節剤は免疫応答の1つ以上の側面を調節する。本発明の好ましい実施態様において、被検者への免疫調節剤の投与は、被検者の免疫応答能力の1つ以上の側面を阻害又は減少させる。本発明の特定の実施態様において、免疫調節剤は被検者において免疫応答を阻害又は抑制する。本発明によれば、免疫調節剤はc - R e lに免疫特異的に結合する抗体ではない。幾つかの実施態様において、免疫調節剤は抗炎症剤ではない。幾つかの実施態様において、免疫調節剤は抗血管形成剤ではない。他の実施態様において、免疫調節剤はインテグリンアンタゴニストではない。他の実施態様において、免疫調節剤は、T N F - アンタゴニストではない。幾つかの実施態様において、免疫調節剤は、化学療法剤である。幾つかの実施態様において、免疫調節剤は化学療法剤ではない。

10

【0161】

免疫調節剤の例には、サイトカイン、ペプチド模倣薬、及び抗体（例えばヒト、ヒト化、キメラ、モノクローナル、ポリクローナル、F v s、s c F v s、F a b又はF (a b) 2断片、又はエピトープ結合断片）、核酸分子（例えばアンチセンス核酸分子及び三重らせん体）、小分子、有機化合物、及び無機化合物のようなタンパク質性製剤を含むが、それらに限定されない。特に免疫調節剤には、メトトレキセート、レフルノミド、シクロホスファミド、サイトキサン、イムラン、シクロスポリンA、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質（例えばFK506（タクロリムス））、メチルプレドニゾロン（MP）、コルチコステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン（シロリムス）、ミゾリピン、デオキシスベルグアリン、プレキナール、マロノニトリロアミン

20

【0162】

T細胞レセプターモジュレーターの例には、抗T細胞レセプター抗体（例えば、抗 - C D 4抗体（例えばc M - T 4 1 2 (B o e r i n g e r)、I D E C - C E 9 . 1 (登録商標) (I D E C 及びS K B)、m A B 4 1 6 2 W 9 4、O r t h o c l o n e 及びO K T c d r 4 a (J a n s s e n - C i l a g))、抗 - C D 3抗体（例えばN u v i o n (P r o d u c t D e s i g n L a b s)、O K T 3 (J o h n s o n & J o h n s o n)、又はR i t u x a n (I D E C))、抗 - C D 5抗体（例えば抗 - C D 5 リン結合免疫複合体）、抗 - C D 7抗体（例えばC H H - 3 8 0 (N o v a r t i s))、抗 - C D 8抗体、抗 - C D 4 0 リガンドモノクローナル抗体（例えばI D E C - 1 3 1 (I D E C))、抗 - C D 5 2抗体（例えばC A M P A T H 1 H (I l e x))、抗 - C D 2抗体（例えばM E D I - 5 0 7 I n c . (M e d I m m u n e I n c .、国際公開第W O 0 2 / 0 9 8 3 7 0 及びW O 0 2 / 0 6 9 9 0 4号）、抗 - C D 1 1 a抗体（例えばX a n e l i m (G e n e n t e c h))、及び抗B7抗体（例えばI D E C - 1 1 4) (I D E C))、C T L A 4 - 免疫グロブリン、及びL F A - 3 T I P (B i o g e n、国際公開第W O 9 3 / 0 8 6 5 6号及び米国特許第6162432号)が含まれるが、それらに限定されない。

30

40

【0163】

サイトカインレセプターモジュレーターの例には、可溶性サイトカインレセプター（例えばT N F - レセプター又はその断片の細胞外ドメイン、I L - 1 レセプター又はその断片の細胞外ドメイン、及びI L - 6レセプター又はその断片の細胞外ドメイン）、サイトカイン又はその断片（例えばインターロイキンI L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 1 0、I L - 1 1、I L - 1 3、I L - 1 5、I L - 2 3、T N F - 、T N F - 、インターフェロン (I F N) - 、I F N - 、I F N - 、及びG M - C S F)、抗サイトカインレセプター抗体（例えば抗I F Nレセプター抗体、抗I L - 2レセプター抗体（例えばZ a n a p a x (P r o t e i n D e s i g n L a b s))、抗I L - 3レセプター抗体、抗I L - 4レセプ

50

ター抗体、抗IL-6レセプター抗体、抗IL-10レセプター抗体、抗IL-12レセプター抗体、抗IL-13レセプター抗体、抗IL-15レセプター抗体、及び抗IL-23レセプター抗体)、抗サイトカイン抗体が含まれるが、それらに限定されない。

【0164】

特定の実施態様において、サイトカインレセプターモジュレーターは、IL-3、IL-4、IL-10、又はその断片である。もう1つの実施態様において、サイトカインレセプターモジュレーターは、TNF-レセプター又はその断片の細胞外ドメインである。幾つかの実施態様において、サイトカインレセプターモジュレーターは、TNF-アンタゴニストではない。

【0165】

1つの実施態様において、サイトカインレセプターモジュレーターは、マスト細胞モジュレーターである。代替的な実施態様において、サイトカインレセプターモジュレーターは、マスト細胞モジュレーターではない。マスト細胞モジュレーターの例には、幹細胞因子(c-キットレセプターリガンド)抑制剤(例えばmAb 7H6、mAb 8H7a、pAb 1337、FK506、CsA、デキサメタゾン(dexamethasone)、及びフルコンシノイド(flucanconide)、c-キットレセプター抑制剤(例えばSTI 571(以前、CGP 57148Bとして知られていた))、マスト細胞プロテアーゼ阻害剤(例えばGW-45、GW-58、ワートマニン、LY 294002、カルフォスチンC、サイトカラシンD、ゲニステイン、KT5926、スタウロスポリン及びラクトフェリン)、リラキシン("RLX")、IgEアンタゴニスト(例えば抗体rhumaB-E25オマリズマブ、HMK-12及び6HD5及びmAB Hu-901)、IL-3アンタゴニスト、IL-4アンタゴニスト、IL-10アンタゴニスト及びTGF-ベータが含まれるが、それらに限定されない。

【0166】

免疫調節剤は、中和抗体の形成を阻害するために、Tヘルパーサブセット(TH1又はTH2)とB細胞との間の相互作用を妨げるように選択されてよい。TH(Tヘルパー)細胞によるB細胞の活性化に必要な相互作用を妨げ又は遮断することで中和抗体の産生を遮断する抗体は、本発明の方法における免疫調節剤として有用である。例えば、T細胞によるB細胞の活性化は、B細胞上のCD40抗原へのTヘルパー細胞上のCD40リガンドの結合、及びB細胞上のB7抗原へのT細胞上のCD28及び/又はCTLA4リガンドの結合のような、幾つかの相互作用が起こることを必要とする(Durie et al., Immunol. Today, 15(9): 406-410(1994))。

【0167】

CD40リガンド(CD40L)-CD40の相互作用は、Tヘルパー細胞活性化及び機能の両方での広い活性、並びにシグナル伝達経路に重複性がないため、免疫応答を遮断するために望ましい点である。従って、本発明の特定の実施態様において、CD40LのCD40との相互作用は、本発明の1つ以上の化合物及び免疫調節剤の投与時に一過的に遮断される。このことは、TH細胞上でCD40リガンドを遮断し且つB細胞上のCD40抗原によるTヘルパー細胞上のCD40リガンドの正常な結合を妨げる薬剤によって処理することで達成できる。CD40リガンドの抗体(抗CD40L)(Bristol-Myers Squibb Coから入手可能;例えば、1993年8月18日に公開された欧州特許出願公開第555880号参照)又は可溶性CD40分子は、本発明の方法により選択でき、免疫調節剤として使用できる。

【0168】

免疫調節剤は、TH1細胞及び細胞毒性Tリンパ球("CTL")の間の相互作用を阻害して、CTL媒介死滅の発生を減少させるために選択できる。免疫調節剤は、CD4+及び/又はCD8+T細胞の増殖、分化、活性及び/又は機能を変更(例えば阻害又は抑制)するために選択できる。例えば、T細胞に特異的な抗体は、CD4+及び/又はCD8+T細胞の増殖、分化、活性及び/又は機能を枯渇させ又は変更するために、免疫調節剤として使用できる。

10

20

30

40

50

【0169】

本発明の1つの実施態様において、T細胞、好ましくは記憶T細胞を減少又は枯渇させる免疫調節剤は、本発明の方法によって、IL-9ポリペプチドの異常発現及び/又は活性に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、c-Relの異常な細胞内局在に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、増殖性疾患、又は感染（好ましくは呼吸器感染）の危険にある又は罹患した被検者に投与される。例えば、米国特許第4658019号を参照されたい。本発明のもう1つの実施態様において、CD8+T細胞を不活性化する免疫調節剤は、本発明の方法によって、c-Relの異常な細胞内局在に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、c-Relの異常な細胞内局在に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、増殖性疾患、又は感染（好ましくは呼吸器感染）の危険にある又は罹患した被検者に投与される。特定の実施態様において、抗CD8抗体は、CD8+細胞を減少又は枯渇させるために使用される。

10

【0170】

もう1つの実施態様において、CD4+Tヘルパー細胞のTH0、TH1及び/又はTH2サブセットの1つ以上の生物活性（例えば分化、増殖及び/又はエフェクター機能）を減少させ又は阻害する免疫調節剤は、本発明の方法によって、c-Relの異常な発現細胞内局在に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、c-Relの異常な細胞内局在に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、増殖性疾患、又は感染（好ましくは呼吸器感染）の危険にある又は罹患した被検者に投与される。かかる免疫調節剤の1つの例は、IL-4である。IL-4は、TH1細胞機能を犠牲にして、TH2細胞の抗原特異的活性を強化する（例えばYokota et al., 1986 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:5894-5898; 及び米国特許第5017691号参照）。Tヘルパー細胞（特にTH1及び/又はTH2細胞）の生物活性（例えば分化、増殖及び/又はエフェクター機能）に影響を及ぼす免疫調節剤の他の例には、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-15、及びインターフェロン（IFN）- が含まれるが、それらに限定されない。

20

【0171】

もう1つの実施態様において、本発明の方法によって、c-Relの異常な細胞内局在に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、増殖性疾患、又は感染（好ましくは呼吸器感染）の危険があり又は罹患した被検者に投与される免疫調節剤は、抗原提示を妨げるサイトカインである。特定の実施態様において、本発明の方法に使用される免疫調節剤は、IL-10である。IL-10も細菌除去を伴うマクロファージ作用を減少させ又は阻害する。

30

【0172】

免疫調節剤は、マスト細胞の活性化、脱顆粒、増殖、及び/又は浸潤の減少又は阻害のために選択できる。幾つかの実施態様において、免疫調節剤には、マスト細胞と、幹細胞因子（c-キットリガンド）、IgE、IL-4、環境刺激物及び病原菌等のマスト細胞活性化剤と、の間の相互作用を妨げる。特定の実施態様において、免疫調節剤は、花粉、チリダニ、タバコの煙及び/又はペットの鱗屑等の環境刺激物へのマスト細胞の応答を減少させ又は阻害する。もう1つの特定の実施態様において、免疫調節剤は、ウイルス、細菌及び菌類のような病原菌へのマスト細胞の応答を減少させ又は阻害する。マスト細胞の活性化、脱顆粒、増殖、及び/又は浸潤の減少又は阻害をするマスト細胞モジュレーター例には、幹細胞因子（c-キットレセプターリガンド）抑制剤（例えばmAb 7H6、mAb 8H7a、及びpAb 1337（Mendiaz et al., 1996, Eur J Biochem 293 (3): 842-849参照）、FK506、及びCsA（Ito et al., 1999 Arch Dermatol Res 291 (5): 275-283）、デキサメタゾン、及びフルコンシノニド（Fino et al., J Clin Invest 1997 99 (7): 1721-1728参照）、c-キットレセプター抑制剤（例えばSTI 571（以前、CGP

40

50

57148Bとして知られていた(Heinrich et al., 2000 Blood 96(3):925-932参照)、マスト細胞プロテアーゼ阻害剤(例えばGW-45、GW-58(Temkin et al., 2002 J Immunol 169(5):2662-2669参照)、ワートマニン、LY 294002、カルフォスチンC、及びサイトカラシンD(Vosseller et al., 1997, Mol Biol Cell 1997:909-922参照)、ゲニステイン、KT 5926、及びスタウロスポリン(Nagai et al., 1995, Biochem Biophys Res Commun 208(2):576-581参照)、ラクトフェリン(He et al., 2003 Biochem Pharmacol 65(6):1007-1015参照)、リラキシン("RLX")(Bani et al., 2002 Int Immunopharmacol 2(8):1195-1294参照)、)、IgEアンタゴニスト(例えば抗体rhumAb-E25オマリズマブ(Finn et al., 2003 J Allergy Clin Immunol 111(2):278-284; Corren et al., 2003 J Allergy Clin Immunol 111(1):87-90; Busse and Neaville, 2001 Curr Opin Allergy Clin Immunol 1(1):105-108; 及びTang and Powell, 2001, Eur J Pediatr 160(12):696-704参照)、HMK-12及び6HD5(Miyajima et al., 2002 Int Arch Allergy Immunol 128(1):24-32参照)、及びmAb Hu-901(van Neerven et al., 2001 Int Arch Allergy Immunol 124(1-3):400参照)、IL-3アンタゴニスト、IL-4アンタゴニスト、IL-10アンタゴニスト及びTGF-ベータ(Metcalf et al., 1995; Exp Dermatol 4(4 Pt 2):227-230参照)が含まれるが、それらに限定されない。

【0173】

好ましい実施態様において、免疫調節剤として利用されるタンパク質、ポリペプチド又はペプチド(抗体を含む)は、これらのタンパク質、ポリペプチド又はペプチドへの免疫応答の可能性を減少させるように、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの受容体として同種から誘導される。もう1つの好ましい実施態様において、被検者がヒトであるとき、免疫調節剤として利用されるタンパク質、ポリペプチド又はペプチドは、ヒト又はヒト化される。

【0174】

本発明の1つの実施態様によれば、1つ以上の免疫調節剤は、c-Relの細胞内局在を変更し且つNF Bの発現及び/又はI Bの量を実質的に変更しない本発明の化合物の前、後又は同時に、c-Relの異常な細胞内局在に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、増殖性疾患、又は感染(好ましくは呼吸器感染)の危険がある又は罹患した被検者に投与される。好ましくは、1つ以上の免疫調節剤は、c-Relの細胞内局在を変更し且つNF Bの発現及び/又はI Bの量を実質的に変更しない本発明の化合物と組み合わせて、当業者が必要であると考える免疫応答の1つ以上の局面を減少させ又は阻害するために、c-Relの異常細胞内局在に関連し又はそれを特徴とする疾患又は障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、増殖性疾患、又は感染(好ましくは呼吸器感染)の危険がある又は罹患した被検者に投与される。当業者に周知のいかなる技術も、特定の被検者における免疫応答の1つ以上の局面を測定し、これにより被検者に免疫調節剤をいつ投与することが必要であるかを判定するために使用できる。好ましい実施態様において、約500細胞/mm³、好ましくは600細胞/mm³、650細胞/mm³、700細胞/mm³、750細胞/mm³、800細胞/mm³、900細胞/mm³、1000細胞/mm³、1100細胞/mm³、又は1200細胞/mm³の平均絶対リンパ球数が、被検者において維持される。もう1つの好ましい実施態様において、被検者の絶対リンパ球数が、500細胞/mm³以下、550細胞/mm³以下、6

00細胞/mm³以下、650細胞/mm³以下、700細胞/mm³以下、750細胞/mm³以下、又は800細胞/mm³以下ならば、被検者は本発明の化合物を投与されない。

【0175】

好ましい実施態様において、1つ以上の免疫調節剤は、免疫応答の1つ以上の局面を一過的に減少させ又は阻害するように、本発明の化合物と組み合わせて投与される。免疫系の1つ以上の局面のかかる一過的な阻害又は減少は、数時間、数日、数週間、又は数ヶ月持続し得る。好ましくは、免疫応答の1つ以上の局面における一過的な阻害又は減少は、数時間（例えば2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、14時間、16時間、18時間、24時間、36時間、又は48時間）、数日（例えば3日、4日、5日、6日、7日、又は14日）、又は数週間（例えば3週間、4週間、5週間、又は6週間）持続する。

10

【0176】

当業者に周知な、炎症性障害の治療において有用な薬剤を含むあらゆる抗炎症剤は、本発明の組成物及び方法において使用できる。抗炎症剤の非限定的な例には、非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）、ステロイド性抗炎症剤、抗コリン作動薬（例えば臭化アトロピン、硝酸メチルアトロピン、臭化イプラトロピウム（ATROVENT（商標））、ベータ2-アゴニスト（例えばアルブテロール（VENTOLIN（商標）及びPROVENTIL（商標））、ピトルテロール（TORNALATEM（商標））、レバルブテロール（XOPONEXTM（商標））、メタプロテレノール（ALUPENT（商標））、ビルブテロール（MAXAIR（商標））、テルブタリン（BRETHAIRE（商標）及びBRETHINE（商標））、アルブテロール（PROVENTIL（商標））、REPEATABS（商標）、及びVOLMAX（商標））、ホルモテロール（FORADIL AEROLIZER（商標））、及びサルメテロール（SEREVENT（商標）及びSEREVENT DISKUS（商標））及びメチルキサンチン（例えばテオフィリン（UNIPHYL（商標）、THEO-DUR（商標）、SLO-BID（商標））、及びTEHO-42（商標））を含む。NSAIDの例には、アスピリン、イブプロフェン、セレコキシブ（CELEBREX（商標））、ジクロフェナック（VOLTAREN（商標））、エトドラック（LODINE（商標））、フェノプロフェン（NAFLON（商標））、インドメタシン（INDOCIN（商標））、ケトララック（ketorolac）（TORADOL（商標））、オキサプロジン（DAYPRO（商標））、ナブメントン（nabumenton）（RELAFEN（商標））、スリンダック（CLINORIL（商標））、トルメチン（TOLECTIN（商標））、ロフェコキシブ（VIOXX（商標））、ナプロキセン（ALEVE（商標）、NAPROSYN（商標））、ケトプロフェン（ACTRON（商標））、及びナブメントン（RELAFEN（商標））が含まれるが、それらに限定されない。かかるNSAIDは、シクロオキシゲナーゼ酵素（例えば、COX-1及び/又はCOX2）を阻害することによって機能する。ステロイド性抗炎症剤の例には、グルココルチコイド、デキサメタゾン（DECADRON（商標））、コルチコイドステロイド（例えば、メチルプレドニゾロン（MEDROL（商標））、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン（PREDNISON（商標）及びDELTA SONE（商標））、プレドニゾロン（PRELONE（商標）及びPEDIAPRED（商標））、トリアムシノロン、アザルフィジン、及びエイコサノイドの抑制剤（例えばプロスタグランジン、トロンボキサン、及びロイコトリエン）が含まれるが、それらに限定されない。抗炎症性治療及びその投与量、投与経路、及び推奨される使用法は、当該技術分野において公知であり、Physician's Desk Reference（57th ed. 2003）等の文献に記載されている。

20

30

40

【0177】

関節炎、炎症媒介骨量減少、及び炎症成分を有する他の障害に関して、本発明の化合物及び組成物の併用療法で使用する好ましい従来の治療薬には、ナプロキセンナトリウム（Anaprox（登録商標）及びAnaprox（登録商標）DS、Roche）、フル

50

ルビプロフェン (Ansaid (登録商標); Pharmacia)、ジクロフェナック
 ナトリウム+ミソプロスチル (misoprostil) (Arthrotec (登録商
 標)、Searle)、バルデコキシブ (Bextra (登録商標)、Pharmacia)、
 ジクロフェナックカリウム (Cataflam (登録商標) 及び Voltaren
 (登録商標)、Novartis)、セレコキシブ (Celebrex (登録商標)、P
 harmacia)、スリダック (Clinoril (登録商標)、Merck)、オ
 キサプロジン (Daypro (登録商標)、Pharmacia)、サルサレート (Di
 salcid (登録商標)、3M)、ジフルニサル (Dolobid (登録商標)、Me
 rck)、ナプロキセンナトリウム (EC Naprosyn (登録商標)、Roche
)、ピロキシカム (Feldene (登録商標)、Pfizer)、インドメタシン (I
 ndocin (登録商標) 及び Indocin SR (登録商標)、Merck)、エト
 ドラック (Lodine (登録商標) 及び Lodine XL (登録商標) Wyeth)
 、メロキシカム (Mobic (登録商標)、Boehringer Ingelheim
)、イブプロフェン (Motrin (登録商標)、Pharmacia)、ナプロキセン
 (Naprelan (登録商標)、Elan)、ナプロキセン (Naprosyn (登録
 商標)、Roche)、ケトプロフェン (Orudis (登録商標) 及び Oruvail
 (登録商標)、Wyeth)、ナブメトン (Relafen (登録商標)、SmithK
 line)、トルメチンナトリウム (Tolectin (登録商標)、McNeil)、
 三サリチル酸コリンマグネシウム (Trilisate (登録商標)、Purdue F
 redrick)、及びロフェコキシブ (Vioxx (登録商標)、Merck) が含ま
 れる (但し限定されない)。

10

20

【0178】

標的障害の中に疼痛がある全ての場合において、他の治療剤は鎮痛剤であってよい。有
 用な鎮痛剤には、フェナセチン、ブタセチン、アセトアミノフェン、ネフォパム、アセト
 アミドキノン、及びその混合物が含まれるが、それらに限定されない。

【0179】

骨粗鬆症、パジェット病及び骨老化に関連した他の障害に対して使用するために、本発
 明の化合物及び組成物と組み合わせて使用できる好ましい従来の薬剤には、二ホスホン酸
 塩、(例えばエチドロネート (Didronel (登録商標)、Procter & G
 amble)、パミドロネート (Aredia (登録商標)、Novartis) 及びア
 レンドロネート (Fosamax (登録商標) Merck)、チルドロネート (Ske
 lid (登録商標)、Sanofi-Synthelabo, Inc)、リセドロネート
 (Actonel (登録商標)、Procter & Gamble/Aventis)
 、カルシトニン (Miacalcin (登録商標))、エストロゲン (Climara (登
 録商標)、Estrace (登録商標)、Estraderm (登録商標)、Estr
 atab (登録商標)、Ogen (登録商標)、Ortho-Est (登録商標)、Vi
 velle (登録商標)、Premarin (登録商標) 他)、エストロゲン及びプロゲ
 スチン (Activella (商標)、FemHrt (登録商標)、Premphase
 (登録商標)、Prempo (登録商標) 他)、上皮小体ホルモン及びその部分、例え
 ば、テリパラチド (Forteo (登録商標)、Eli Lilly and Co.)
 、選択的エストロゲンレセプターモジュレーター (SERMs) (例えばラロキシフェン
 (Evista (登録商標)) 及び現在研究中の治療 (例えば他の上皮小体ホルモン、フ
 ッ化ナトリウム、ビタミンD代謝物、及び他の二ホスホン酸塩及び選択的エストロゲンレ
 セプターモジュレーター) が含まれる (但し限定されない)。

30

40

【0180】

あらゆる上皮小体ホルモン (PTH) は、本発明の化合物と組み合わせて使用できる。
 用語、上皮小体ホルモンは、骨形成を刺激し且つ骨量を増加できる上皮小体ホルモン、そ
 の断片又は代謝物、及びその構造類似体を指す。上皮小体ホルモン関連ペプチド、並びに
 上皮小体関連ペプチドの活性断片及び類似体も含まれる (国際公開第 WO 94 / 0146
 0号参照)。かかる骨同化機能活性は、標準アッセイ分野の当業者によって容易に判定さ

50

れる。種々のこれらの化合物は、以下に記載され参照される。しかしながら、他の上皮小体ホルモンも当業者に公知であろう。典型的な上皮小体ホルモンは、次の参考文献に開示されている。「Human Parathyroid Peptide Treatment of Vertebral Osteoporosis」、Osteoporosis Int.、3、(Supp 1):199-203。「PTH 1-34 Treatment of Osteoporosis with Added Hormone Replacement Therapy: Biochemical, Kinetic and Histological Responses」、Osteoporosis Int. 1:162-170

【0181】

あらゆる成長ホルモン又は成長ホルモン分泌促進物質は、本発明の化合物と組み合わせで使用できる。用語、成長ホルモン分泌促進物質は、成長ホルモンの放出を刺激し且つ成長ホルモンの作用（例えば、骨形成を増加させ、骨量増加をもたらす）を模倣する化合物を指す。かかる作用は、当業者に周知である標準アッセイの分野における当業者に容易に判定される。種々のこれらの化合物が、以下の国際公開に開示されている：WO95/14666；WO95/13069；WO94/19367；WO94/13696；及びWO95/34311。しかしながら、他の成長ホルモン又は成長ホルモン分泌促進物質も当業者に公知であろう。特に、好ましい成長ホルモン分泌促進物質は、N-[1(R)-[1,2-ジヒドロ-1-メタンスルホニルスピロ[3H-インドール-3,4'-ピペリジン]-1'-イル)カルボニル]-2-(フェニルメトキシ)エチル]-2-アミノ-2-メチルプロパンアミド：MK-667である。他の好ましい成長ホルモン分泌促進物質には、2-アミノ-N-(2-(3a-(R)-ベンジル-2-メチル-3-オキソ-2,3,3a,4,6,7-ヘキサヒドロ-ピラゾロ-[4,3-c]ピリジン-5-イル)-1-(R)-ベンジルオキシメチル-2-オキソ-エチル)-イソブチルアミド、又はそのL-酒石酸塩；2-アミノ-N-(1-(R)-ベンジルオキシメチル-2-(3a-(R)-(4-フルオロ-ベンジル)2-メチル-3-オキソ-2,3,3a,4,6,7-ヘキサヒドロ-ピラゾロ-[4,3-c]ピリジン-5-イル)-2-オキソ-エチル)-イソブチルアミド；2-アミノ-N-(2-(3a-(R)-ベンジル-3-オキソ-2,3,3a,4,6,7-ヘキサヒドロ-ピラゾロ-[4,3-c]ピリジン-5-イル)-1-(R)ベンジルオキシメチル-2-オキソ-エチル)-イソブチルアミド；及び2-アミノ-N-(1-(2,4-ジフルオロ-ベンジルオキシメチル)-2-オキソ-2-(3-オキソ-3a-ピリジン-2-イルメチル-2-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-2,3,3a,4,6,7-ヘキサヒドロ-ピラゾロ[4,3-c]ピリジン-5-イル)-エチル)-2-メチル-プロピオンアミドが含まれる。

【0182】

本発明のあらゆる方法は、本発明の少なくとも1種の化合物を含む有効量の組成物又は医薬組成物を、かかる調節、治療又は療法を必要とする細胞、組織、臓器、動物又は患者に投与することを含んでよい。かかる方法は、L-12産生に関連する障害を治療するための同時投与又は併用療法であって、投与が、TNFアンタゴニスト（例えば、TNF抗体又は断片、溶解性TNFレセプター又は断片、その融合タンパク質、又は小分子TNFアンタゴニストであるが、限定されない）抗リウマチ薬（例えば、メトトレキサート、オーラノフィン、アウロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、チオリンゴ酸金ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサルジン（sulfasalazine）、筋弛緩剤、麻薬、非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤（例えば、アミノグリコシド、抗真菌薬、駆虫剤、抗ウイルス剤、カルバペネム、セファロsporin、フルオロキノロン、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、他の抗菌剤）、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、糖尿病関連薬剤、無機、栄養、甲状腺剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、下痢止め薬、鎮咳薬、制吐剤、抗潰瘍剤、

10

20

30

40

50

緩下剤、抗凝固剤、エリトロポイエチン (erythropoietin) (例えば、エポエチンアルファ)、フィルグラスチム (例えば、G-CSF、Neupogen)、サルグラモスチム (GM-CSF、リユーカイン)、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制薬 (例えば、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ)、成長ホルモン、ホルモン置換剤、エストロゲンレセプターモジュレーター、散瞳薬、毛様体筋麻痺薬、アルキル化剤、代謝拮抗物質、有糸分裂阻害剤、放射性医薬品、抗うつ薬、抗躁薬、抗精神病薬、抗不安剤、催眠薬、交感神経興奮剤、覚醒剤、ドネベジル、タクリン、喘息薬剤、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリン又は類似体、ドルナーゼアルファ (パルモザイム)、サイトカイン又はサイトカインアゴニストから選択される少なくとも1種の活性薬剤を、本発明の化合物の前、同時、及び/又は後に投与することを更に含む方法を、任意で更に含んでよい。適切な投与量は、当該技術分野において周知である。例えば、各々、全体が本明細書中に参考として組み込まれる、Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition*, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000) を参照されたい。

10

【0183】

本発明の組成物、併用療法、同時投与、装置、及び/又は方法に適したTNFアンタゴニストには、抗TNF抗体 (例えば、レミケード (インフリキシマブ) 又はヒュミラ (アダリムマブ))、例えば、又はその抗原結合断片、及びTNFに特異的に結合するレセプター分子 (例えばエンブレル (エタネルセプト)) ; TNF合成、TNF放出、又は標的細胞へのその作用を予防及び/又は阻害する化合物、例えばサリドマイド、テニダップ、ホスホジエステラーゼ阻害剤 (例えばペントキシフィリン及びロリプラム)、A2bアデノシンレセプターアゴニスト及びA2bアデノシンレセプターエンハンサー ; TNFレセプターシグナル伝達を予防及び/又は阻害する化合物、例えば有糸分裂活性化タンパク質 (MAP) キナーゼ阻害剤 ; 膜TNF開裂を遮断及び/又は阻害する化合物、例えばメタロプロテイナーゼ阻害剤 ; TNF活性を遮断及び/又は阻害する化合物、例えばアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤 (例えばカプトプリル) ; 及びTNF産生及び/又は合成を遮断及び/又は阻害する化合物、例えばMAPキナーゼ阻害剤が含まれるが、それらに限定されない。

20

30

【0184】

明瞭にするために、「腫瘍壊死因子抗体」、「TNF抗体」、「TNF抗体」、又は断片等は、インビトロ、インサイチュ、及び/又は好ましくはインビボで、TNF活性を減少、遮断、阻害、抑止、又は干渉する。例えば、本発明の適切なTNFヒト抗体は、TNFaに結合でき且つ抗TNF抗体、その抗原結合断片、TNFaに特異的に結合する特定の突然変異体又はドメインを含む。適切なTNF抗体又は断片は、TNFRNA、DNA又はタンパク質合成、TNF放出、TNFレセプター信号伝達、膜TNF開裂、TNF活性、TNF産生及び/又は合成を減少、遮断、抑止、干渉、予防、又は阻害することもできる。

40

【0185】

前述及び他の有用な併用療法は、当業者が理解及び認識するであろう。かかる併用療法の潜在的な利点には、有害な副作用を最小限に抑えるために個別の活性成分の各々を少量で使用できること、有効性の相乗的な改善、投与又は使用の容易さの改善、及び/又は化合物調製又は製剤の全体的費用の減少が含まれる。本発明の化合物の生物活性は、多数の細胞に基づくアッセイによって評価できる。かかるアッセイの1つは、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 又はヒト単球細胞系統 (THP-1) からの細胞を使用して行うことができる。細胞は、テスト化合物の存在下でヒトインターフェロン- (INFN) とリポ多糖との組み合わせ、又はINFNと黄色ブドウ球菌 Cowan Iとの組み合わせによ

50

って刺激される。IL-12 産生の阻害レベルは、抗ヒト IL-12 抗体によるサンドイッチ ELISA アッセイを使用し、p70 の量を判定することによって測定できる。次に、テスト化合物の IC₅₀ が判定される。具体的には、PBMC 又は THP-1 細胞は、テスト化合物によってインキュベートされる。細胞生存度は、MTS [3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム] (Promega, Madison, WI) の生物還元 (bio reduction) を使用して評価された。

【0186】

他の治療剤には、骨抗吸収剤、例えばプロゲスチン、ポリホスホン酸塩、二ホスホン酸塩、エストロゲンアゴニスト/アンタゴニスト、(Premarin (登録商標) のような) エストロゲン、エストロゲン/プロゲスチンの組み合わせ、及び(エストロン、エストリオール、又は 17β, 17β-エチニルエストラジオールのような) エストロゲン誘導体が含まれてよい。典型的なプロゲスチンは、商業的供給源から入手可能であり、アルゲストンアセトフェニド、アルトレノジスト、酢酸アマジノン、酢酸アナゲストン、酢酸クロルマジノン、シングストール (cingestol)、酢酸クロゲストン、酢酸クロメゲストン、酢酸デルマジノン、デソゲストレル、ジメチステロン、ジドロゲステロン、エチネロン、二酢酸ジチノジオール (dthyndiol diacetate)、エトノゲストレル、酢酸フルゲストン、ゲスタクロン、ゲストデン、カブロン酸ゲストノロン、ゲストリノン、ハロプロゲステロン、ヒドロキシプロゲステロン、カブロン酸塩、レボノルゲストレル、リネストレノール、メドロゲストン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メレンゲストロール、二酢酸メチノジオール、ノルエチンドロン、酢酸ノルエチンドロン、ノルエチノドレル、ノルゲスチメート、ノルゲストメット、ノルゲストレル、オキソゲストンフェンプロピオネート、プロゲステロン、酢酸キングスタノール、キングストロン、及びチゲストール (tigestol) が含まれる。好ましいプロゲスチンは、メドロキシプロゲステロン、ノルエチンドロン、及びノルエチノドレルである。

【0187】

典型的な骨吸収阻害ポリホスホン酸塩には、米国特許第 3683080 号に開示された型のポリホスホン酸塩が含まれる。好ましいポリホスホン酸塩は、ジェミナルジポリホスホン酸塩 (二ホスホン酸塩とも呼ばれる) である。チルドロン酸二ナトリウムは、特に好ましいポリホスホン酸塩である。イバンドロン酸は、特に好ましいポリホスホン酸塩である。アレンドロン酸塩は、特に好ましいポリホスホン酸塩である。ゾレドロン酸は、特に好ましいポリホスホン酸塩である。他の好ましいポリホスホン酸塩には、6-アミノ-1-ヒドロキシ-ヘキシリデン-二ホスホン酸及び 1-ヒドロキシ-3-(メチルペンチルアミノ)-プロピリデン-二ホスホン酸が含まれる。ポリホスホン酸塩は、酸、又は溶解性アルカリ金属塩若しくはアルカリ土類金属塩の形状で投与できる。ポリホスホン酸塩の加水分解性エステルも、同様に含まれる。具体的な例には、エタン-1-ヒドロキシ 1,1-ジホスホン酸、メタンジホスホン酸、ペンタン-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸、メタンジクロロジホスホン酸、メタンヒドロキシジホスホン酸、エタン-1-アミノ-1,1-ジホスホン酸、エタン-2-アミノ-1,1-ジホスホン酸、プロパン-3-アミノ-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸、プロパン-N,N-ジメチル-3-アミノ-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸、プロパン-3,3-ジメチル-3-アミノ-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸、フェニルアミノメタンジホスホン酸、N,N-ジメチルアミノメタンジホスホン酸、N(2-ヒドロキシエチル)アミノメタンジホスホン酸、ブタン-4-アミノ-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸、ペンタン-5-アミノ-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸、ヘキサン-6-アミノ-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸及びその薬理的に許容できるエステル及び塩が含まれる。

【0188】

特に、本発明の化合物は、哺乳動物のエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストと組み合わせられる。いかなるエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストも、この目的で使用できる。用語、エストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、エストロゲンレセプターと結

10

20

30

40

50

合し、骨代謝回転を阻害し、且つ/又は骨量減少を阻害する化合物を指す。特に、エストロゲンアゴニストは、本明細書中で、哺乳動物組織中のエストロゲンレセプター部位に結合可能であり、且つ1つ以上の組織中でエストロゲンの作用を模倣可能な化合物と定義される。エストロゲンアンタゴニストは、本明細書中で、哺乳動物組織中のエストロゲンレセプター部位に結合可能であり、且つ1つ以上の組織中でエストロゲンの作用を遮断可能な化合物と定義される。かかる活性は、エストロゲンレセプター結合アッセイ、標準骨組織形態測定及び密度測定方法、及びE. F. Eriksen et al., Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, pp. 1-74 (1994); S. J. Grier et al., The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry In Animals, Inv. Radiol. 31(1): 50-62 (1996); Wahner H. W. and Fogelman I., The Evaluation of Osteoporosis: Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice., Martin Dunitz Ltd., London, pp. 1-296 (1994))を含む標準アッセイ分野の当業者に容易に判定される。種々のこれらの化合物を、下記に記載及び参照する。

【0189】

好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第5047431号に開示されたドロキシフェン：(フェノール, 3-(1-(4-(2-(ジメチルアミノ)エトキシ)フェニル)-2-フェニル-1-ブテニル)-, (E)-)及び関連する化合物である。もう1つの好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、Wilson et al., Endocrinology 138: 3911-11 (1997)に開示された3-(4-1, 2-ジフェニル-プト-1-エニル)-フェニル-アクリル酸である。もう1つの好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第4536516号に開示されたタモキシフェン：(エタンアミン, 2-(4-(1, 2-ジフェニル-1-ブテニル)フェノキシ)-N, N-ジメチル, (Z)-2-, 2-ヒドロキシ-1, 2, 3-プロパントリカルボキシレート(1:1))及び関連する化合物である。もう1つの関連する化合物は、米国特許第4623660号に開示された4-ヒドロキシタモキシフェンである。

【0190】

好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第4418068号に開示されたラロキシフェン：(メタノン, (6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)ベンゾ[b]チエン-3-イル)(4-(2-(1-ピペリジニル)エトキシ)フェニル)塩酸塩)である。もう1つの好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第4996225号に開示されたトレミフェン：(エタンアミン, 2-(4-(4-クロロ-1, 2-ジフェニル-1-ブテニル)フェノキシ)-N, N-ジメチル, (Z)-, 2-ヒドロキシ-1, 2, 3-プロパントリカルボキシレート(1:1))である。もう1つの好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第3822287号に開示されたセントクロマン(cenchrroman): 1-(2-(4-(4-(4-メトキシ-2, 2, ジメチル-3-フェニル-クロマン-4-イル)-フェノキシ)-エチル)-ピロリドン)である。レボルメロキシフェンも好ましい。もう1つの好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第4839155号に開示されたイドキシフェン：(E)-1-(2-(4-(1-(4-ヨード-フェニル)-2-フェニル-プト-1-エニル)-フェノキシ)-エチル)-ピロリドンである。もう1つの好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第5488058号に開示された2-(4-メトキシ-フェニル)-3-[4-(2-ピペリジン-1-イル-エトキシ)フェノキシ)-ベンゾ[b]チオフェン-6-オールである。もう1つの好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第5484795号に開示された6-(4-ヒドロキシ-フェニル)-5-(4-(2-ピペリジン-1-イル-エトキシ)-ベンジル)-ナフタレン-2-オールである。もう1つの好ましいエストロゲン

アゴニスト/アンタゴニストは、Pfizer Inc. に譲渡された国際公開第WO 95/10513号に、その製法と共に開示された(4-(2-(2-アザ-ビシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ)-フェニル)-(6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-フェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル)-メタノンである。他の好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストには、米国特許第5552412号に記載された化合物が含まれる。その中に記載された特に好ましい化合物には：シス-6-(4-フルオロ-フェニル)-5-(4-(2-ピペリジン-1-イル-エトキシ)-フェニル)-5,6,7,8-テトラヒドロ-ナフタレン-2-オール；(-)-シス-6-フェニル-5-(4-(2-ピロリジン-1-イル-エトキシ)-フェニル)-5,6,7,8-テトラヒドロ-ナフタレン-2-オール；シス-6-フェニル-5-(4-(2-ピロリジン-1-イル-エトキシ)-フェニル)-5,6,7,8-テトラヒドロ-ナフタレン-2-オール；シス-1-(6'-ピロリジノエトキシ-3'-ピリジル)-2-フェニル-6-ヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン；1-(4'-ピロリジノエトキシフェニル)-2-(4''フルオロフェニル)-6-ヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン；シス-6-(4-ヒドロキシフェニル)-5-(4-(2-ピペリジン-1-イル-エトキシ)-フェニル)-5,6,7,8-テトラヒドロ-ナフタレン-2-オール、及び1-(4'-ピロリジノールエトキシフェニル)-2-フェニル-6-ヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリンが含まれる。他のエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、米国特許第4133814号に記載されている。米国特許第4133814号は、2-フェニル-3-アロイル-ベンゾチオフェン及び2-フェニル-3-アロイルベンゾチオフェン-1-オキシドを開示する。

【0191】

当業者は、骨量増加剤とも呼ばれる他の骨同化剤が、本発明の化合物と併用できることを認めるであろう。骨量増加剤は、World Health Organization Study World Health Organization、「Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report of a WHO Study Group. World Health Organization Technical Series 843」に詳述された、骨折閾値を超えるレベルまで骨量を増加させる化合物である。あらゆるプロスタグランジン又はプロスタグランジンアゴニスト/アンタゴニストは、本発明の化合物と組み合わせて使用できる。当業者は、IGF-1、フッ化ナトリウム、上皮小体ホルモン(PTH)、上皮小体ホルモンの活性断片、成長ホルモン又は成長ホルモン分泌促進物質も使用できることを認めるであろう。以下の段落で、本発明の化合物と組み合わせて投与できる典型的な化合物を極めて詳細に記載する。

【0192】

プロスタグランジン：用語、プロスタグランジンは、骨粗鬆症及び過剰破骨細胞骨吸収に関連する他の障害の治療に有用な、天然プロスタグランジンPGD₁、PGD₂、PGE₂、PGE₁、及びPGF₂の類似体である化合物を指す。これらの化合物は、プロスタグランジンレセプターに結合する。かかる結合は、標準アッセイの分野の当業者によって容易に判定される(例えば、S. An et al., Cloning and Expression of the EP₂ Subtype of Human Receptors for Prostaglandin E₂ Biochemical and Biophysical Research Communications, 197(1):263-270(1993))。

【0193】

プロスタグランジンは、塩基性化合物プロスタイン酸に関係する脂環式化合物である。塩基性プロスタグランジンの炭素原子は、カルボン酸炭素原子からシクロペンチル環を通じて隣接側鎖の末端炭素原子へ順次番号が付けられる。通常、隣接側鎖はトランス配向に

ある。シクロペンチル部分のC - 9でのオキシ基の存在は、Eクラス内のプロスタグランジンを示し、他方でPGE₂は、C₁₃ - C₁₄にトランス不飽和二重結合を、C₅ - C₆位にシス二重結合を含む。

【0194】

種々のプロスタグランジンが、以下に記載され参照される。しかしながら、他のプロスタグランジンは、本発明の化合物と組み合わせて使用できる。用語プロスタグランジンアゴニスト/アンタゴニストは、プロスタグランジンレセプターに結合し(例えば、S. An et al., Cloning and Expression of the EP₂ Subtype of Human Receptors for Prostaglandin E₂ Biochemical and Biophysical Research Communications, 197(1):263-270(1993))、且つインビボでプロスタグランジンの作用を模倣する(例えば、骨形成を刺激し、且つ骨量を増加する)化合物を指す。かかる作用は、標準アッセイの分野の当業者によって容易に判定される。Eriksen E. F. et al., Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, 1994, pp. 1-74; S. J. Grier et al., The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry In Animals, Inv. Radiol. 31(1):50-62(1996); H. W. Wahner and I. Fogelman, The Evaluation of Osteoporosis: Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice, Martin Dunitz Ltd. London, pp. 1-296(1994)。多数のこれらの化合物が、以下に記載され参照される。しかしながら、他のプロスタグランジンアゴニスト/アンタゴニストも当業者に公知であろう。典型的なプロスタグランジンアゴニスト/アンタゴニストは、以下に開示されている。米国特許第3932389号は、骨形成活性に有用な2-デスカルボキシ(descarboxy)-2-(テトラゾール-5-イル)-11-デソキシ-15-置換-オメガ-ペンタノールプロスタグランジンを開示する。米国特許第4018892号は、骨形成活性に有用な16-アリール-13,14-ジヒドロ-PGE₂p-ビフェニルエステルを開示する。米国特許第4219483号は、骨形成活性に有用な2,3,6-置換-4-ピロンを開示する。米国特許第4132847号は、骨形成活性に有用な2,3,6-置換-4-ピロンを開示する。米国特許第4000309号は、骨形成活性に有用な16-アリール-13,14-ジヒドロ-PGE₂p-ビフェニルエステルを開示する。米国特許第3982016号は、骨形成活性に有用な16-アリール-13,14-ジヒドロ-PGE₂p-ビフェニルエステルを開示する。米国特許第4621100号は、骨形成活性に有用な置換シクロペンタンを開示する。米国特許第5216183号は、骨形成活性に有用なシクロペンタノンを開示する。

【0195】

フッ化ナトリウムは、本発明の化合物と組み合わせて使用できる。用語フッ化ナトリウムは、あらゆる形状のフッ化ナトリウムを指す(例えば、緩速放出フッ化ナトリウム、持続放出フッ化ナトリウム)。徐放フッ化ナトリウムは、米国特許第4904478号に開示されている。フッ化ナトリウムの活性は、生物学的プロトコルの分野の当業者によって容易に判定される。

【0196】

骨形成タンパク質は、本発明の化合物と組み合わせて使用できる(例えば、Ono e 50

t al., Promotion of the Osteogenetic Activity of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein by Prostaglandin E₁, Bone 19 (6): 581 - 588 (1996) 参照)。

【0197】

動物モデル

自己免疫障害用の動物モデルは、本発明の治療物又は医薬組成物を評価するために使用できる。1型糖尿病、甲状腺自己免疫病、全身性紅斑性狼瘡、及び糸状体腎炎のような自己免疫障害の動物モデルが開発された (Flanders et al., 1999, 29: 235 - 246; Krogh et al., 1999, Biochimie 81: 511 - 515; Foster, 1999, Semin. Nephrol. 19: 12 - 24)。

10

【0198】

次の一連の実施例は、例証として、本発明の範囲の限定ではなく示される。

【実施例】

【0199】

I. IL-12 p40 のレベル測定

IL-12 p35 及び p40 の mRNA レベルを検査するために、ノーザンブロット分析を行った。ヒト PBMC 及びヒト単球細胞系統 THP-1 細胞を、化合物 1 の存在下及び不存在下で IFN- γ /SAC によって刺激した。ヒト PBMC を、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を使用して遠心分離によって単離し、 5×10^5 細胞/ウェルの 96-ウェルプレート内で、10% ウシ胎児血清 (FCS)、100 U/ml ペニシリン及び 100 μ g/ml ストレプトマイシンを加え、RPMI 媒質中で調製した。次に、細胞を IFN- γ (100 U/ml) によって、次に 0.01% SAC 又は 1 μ g/ml LPS によって、異なる濃度の化合物 2 又は他の化合物の存在下で、準備刺激した。テスト化合物を DMSO 中で調製し、最終 DMSO 濃度を、無化合物対照を含む全ての培養において 0.25% に調節した。無細胞上清を、サイトカイン測定のために 18 時間後取り出した。THP-1 細胞を、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手し、10% FCS (ATCC, Manassas, VA) 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco-BRL, New York, N.Y.) を加えた RPMI 1640 (ATCC, Manassas, VA) 中で培養した。全 RNA を単離し、IL-12 p35 及び p40 cDNA プロブを使用して、ノーザンブロット分析を行った。1 μ M 化合物 1 の存在下又は不存在下で、IFN- γ によって準備刺激し、次に SAC の刺激を続けた hPBMC 及び THP-1 細胞の培養中の mRNA 蓄積の動態を最初に検査した。

20

30

【0200】

hPBMC 中での IL-12 p35 及び p40 の両方の mRNA は、SAC の添加後 4 時間までに検出でき、6 時間でピークに達した。p35 mRNA の発現は、全てのサンプリング時間で、化合物 1 によって完全に阻害された一方で、p40 サブユニットに関する mRNA の発現は、著しく減少したが不完全であった。IFN- γ /SAC により刺激された THP-1 細胞中で、IL-12 p35 mRNA は、無化合物対照で僅かに視認され、1 μ M 化合物 1 の存在下では検出不可能であった。対照的に、IL-12 p40 mRNA は、SAC の添加後 4 時間までに容易に検出でき、6 時間でピークに達した。この場合も、化合物 1 は、p40 メッセージの発現を著しく減少させたが、不完全であった。

40

【0201】

IFN- γ /SAC 刺激された hPBMC 中の IL-12 mRNA 発現に対する化合物 1 の阻害効果の用量応答研究を行った。IL-12 p35 及び p40 の両方の mRNA レベルが SAC の添加後 6 時間で最大だったので、この時点を用用量応答分析について選択した。IFN- γ /SAC による IL-12 p35 mRNA 蓄積の誘導は、1 nM 未満の I

50

C₅₀ で、3 nM 化合物 1 によって完全に逆転した。対照的に、IL-12 p40 mRNA 蓄積は、1 nM 化合物 1 によって僅かに阻害され、10 nM で最大であったが、依然として不完全な阻害であった。このような p35 に対する p40 の明らかに弱い阻害は、p35 プロモーターの阻害がより効果的であることに起因し、又は、単純に、p40 が p35 に対して非常に多く産生され、その阻害がより高濃度の薬物を必要とするものの帰結であるかもしれない。

【0202】

従って、化合物 1 は、p35 及び p40 の両方の mRNA レベルの減少を引き起こした。その後の核ランオン実験により、この効果が転写開始レベルにあることが示された。

【0203】

IL-12 p35 及び p40 プロモーター活性に対する化合物 2 の効果

ノーザンブロットの結果、p35 及び p40 プロモーター活性の研究に着手した。p35 及び p40 プロモーターがルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を指示する DNA コンストラクトを、マウスマクロファージ細胞系統 RAW264.7 に一時的にトランスフェクトした。RAW264.7 細胞系統を、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手し、10% FCS (ATCC, Manassas, VA) 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco-BRL, New York, N.Y.) を加えた DMEM (ATCC, Manassas, VA) 中で培養した。

【0204】

刺激にตอบสนองして p35 及び p40 の両方のプロモーターにドライブされるルシフェラーゼ合成を、化合物 1 及び化合物 2 の存在下及び不存在下で判定した。ヒト IL-12 p35 及び p40 プロモーター/ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを構築するために、ヒト IL-12 p35 及び p40 遺伝子の幾つかの配列モチーフを含む p35 (-1.5 kb から +3 bp) 及び p40 (-1.3 kb から +56 bp) プロモーター断片を生成した。断片は、次のようなプライマー：IL-12 p35 1.5 kb - F: 5' - G C A G C A T T A G A A G G G G C C T T A G A G A - 3' (配列番号 3)、及び IL-12 p35 1.5 kb - R: 5' - T T T T A T A A T T G T C C C G A G G C G C G - 3' (配列番号 4)；IL-12 p40 -1.3 kb - F: 5' - A C G G C G A G G A A A G T T A G C C C G - 3' (配列番号 5)、及び IL-12 p40 1.3 kb - R: 5' - T T G C T C T G G G C A G G A C G G A G - 3' (配列番号 6) を使用して、ヒト PBMc から得られたゲノム DNA から、PCR で生成した。p40 プロモーターレポーターコンストラクト中の欠失は、次のようなプライマー：IL-12 p40 -250 bp から +56 bp (p40 / -250 bp) F: 5' - C A C C C A A A A G T C A T T T C C T C - 3' (配列番号 7) 及び IL-12 p40 -250 bp から +56 bp (p40 / -250 bp) R: 5' - T G C T C T G G G C A G G A C G G A G - 3' (配列番号 8)；IL-12 p40 -150 bp から +56 bp (p40 / -150 bp) F: 5' - A G A G T T G T T T T C A A T G T T G C A A C - 3' (配列番号 9) 及び IL-12 p40 -150 bp から +56 bp (p40 / -150 bp) R: 5' - T G C T C T G G G C A G G A C G G A G - 3' (配列番号 10) によって、PCR で生成した。結果として生じた PCR 産物を、pGL3-Basic ベクター (Promega) 中でルシフェラーゼ遺伝子上流にライゲーションした。全てのコンストラクトを、DNA 配列決定によって確認した。

【0205】

RAW267.4 細胞に一過的トランスフェクトをし、次に、この細胞を、更に 16 時間、異なる濃度での化合物 1、化合物 2、又は陰性対照 (構造的に関連した不活性化化合物) の存在下又は不存在下で、マウス組換え IFN- γ (100 ng/ml) で 10 時間、その後 LPS (1 μ g/ml) 又は SAC (0.025%) で刺激した。トランスフェクションは、記載された手順により、Superfect Transfection Reagent (Qiagen) を使用して行った。トランスフェクト DNA の総量は、挿

10

20

30

40

50

入のない各対照プラスミドを添加することで、一定とした。

【0206】

細胞に、トランスフェクション効率を観察するための - ガラクトシダーゼ発現を構成的に活性なCMVプロモーターが指揮するベクターpCMV (BD Biosciences Clontech) を共トランスフェクトした。ルシフェラーゼ及び - ガラクトシダーゼ活性を、Luciferase assay system (Promega) 及びLuminescent - gal Detection system (BD Biosciences Clontech) により調製した細胞抽出物中で判定した。次に、ルシフェラーゼ活性を、 - ガラクトシダーゼ値を使用して規格化した。ルシフェラーゼ活性は、IFN- / LPS又はIFN- / SACによる刺激後における、RAW 264.7細胞中のIL-12 p40及びp35プロモーターコンストラクトの場合に、強く誘導された。このp40及びp35プロモータードライブのルシフェラーゼ発現は、化合物1及び化合物2の存在下で抑制されたが、不活性な陰性対照化合物の存在下では抑制されなかった。結果を図2A~2Bに示す。この結果は、化合物2がIL-12転写を阻害するメカニズムを裏付けている。IFN- / LPSによって刺激されたp35プロモータードライブのルシフェラーゼ発現は、化合物1よりも化合物2によって更に効果的に阻害された一方で、陰性対照化合物はプロモーター活性を全く抑制しなかった。THP-細胞中のIL-12産生に対する化合物1、化合物2、及び陰性対照化合物のIC₅₀は、それぞれ40nM、10nM、及び1000nM超であった。これらの結果は、ELISAによって評価されたIL-12タンパク質合成に対する阻害活性と一致し、p35プロモーター活性の阻害がIL-12に対する阻害活性を反映したものであることを表している。ELISAは、次の方法によって行った。ヒトIL-12 p70 (ヘテロ二量体) は、Cell Sciences (Norwood, MA) のELI-PAIRキットを製造業者の指示に基づいて使用し、アッセイした。ヒトIL-12 p40は、Cell Sciences (Norwood, MA) のELISAキットを製造業者の指示に基づいて使用して、アッセイした。

10

20

【0207】

IL-12 p35及びp40 mRNAレベルを検査するノーザンブロット解析を、作用のメカニズムを解明するために行った。化合物1は、p35及びp40 mRNAレベルの減少を引き起こした。核ランオン実験により、この効果が転写開始レベルにあることが示された。p35及びp40プロモーターがルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を指揮するDNA発現プラスミドが細胞にトランスフェクトされると、化合物1及び化合物2によってルシフェラーゼの発現を阻害できることが示された。これらの結果により、化合物2がp35及びp40遺伝子のIL-12転写を阻害するメカニズムが確認される。

30

【0208】

次に、この効果に関与するIL-12転写プロモーター要素の分析を始めた。p40プロモーターを使用して欠失分析を行った。p40プロモーターにおいて転写要素がより良く定義されていることから、p35プロモーターではなくp40プロモーターを選択した。p40遺伝子の転写活性化に関与するIL-12阻害剤応答配列を特定するために、3つの異なるプロモーターを構築し、RAW 264.7細胞中に一過的トランスフェクトした。図3A-3Bに示されるように、AP1要素領域を通してNF- Bからなるプロモーターは減少したプロモーター活性化を示す一方、p40プロモーターの5'隣接領域を含み且つ大きな近位欠失を有するプロモーターは、IFN- / LPSによる刺激に応答して、著しく減少したプロモーター活性を示した。PU-1、NF- B及びAP1要素と共にEts-2要素を備えるプロモーターのみがIFN- / LPS刺激に応答して高いルシフェラーゼ活性を示し、Ets-2要素がIL-12 p40プロモーター活性の調節に関与することが示唆された。このIL-12プロモータードライブのルシフェラーゼ活性は、化合物1の存在下で著しく抑制された。これらの結果は、プロモーター活性の抑制において応答する要素が、IL-12 p40プロモーターのTATAボックスから-250bpの領域に位置することを示唆している。

40

50

【0209】

個別の p40 プロモーター転写要素の役割をより詳細に評価するために、これらの多数の要素中に突然変異を生成した。この作業の目標は、化合物 2 による阻害を受けて、p40 プロモーター活性を減少させるが除去はしない突然変異の効果を評価することである。Ets-2 要素中の全ての突然変異はレポーター遺伝子発現の誘導を完全に除去し、これにより、この要素の重要性が強調された。NF- κ B 要素に部位特異的突然変異生成を行った結果、p40 プロモーターの IFN- γ /LPS による誘導が減少したが明らかに測定可能となった。部位特異的突然変異生成は、製造業者の指示に従って、Gene Tailor Site-directed Mutagenesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA) によって行った。IL-12 突然変異体配列は、次の通りである：IL-12 p40-Ets2 mut-F: 5'-TATTC C C C A C C C A A A A G T C A C T T A G T T C A T T - 3' (配列番号 11) 及び IL-12 p40-Ets2 mut-R: 5'-T G A C T T T T G G G T G G G G A A T A A G G A A G G A G A - 3' (配列番号 12); IL-12 P40-ap-1 mut-F: 5'-T T G T T T T C A A T G T T G C A A C A T T T C T A G T T T A - 3' (配列番号 13) 及び IL-12 p40-AP-1 mut-R: 5'-T G T T G C A A C A T T G A A A C A A C T C T C A A A A C - 3' (配列番号 14); IL-12 p40-NF κ B mut-F: 5'-C A A A C A A A A A A G G A A C T T C T C A G A A G G T T T T - 3' (配列番号 15) 及び IL-12 p40-NF κ B mut-R: 5'-A G A A G T T C C T T T T T T G T T T G T C T C T C T C T G - 3' (配列番号 16); IL-12 p40-PU-1 mut-F: 5'-A C A G A G A G A G A C A A A C A A A A C T T C T T G A A A T - 3' (配列番号 17) 及び IL-12 p40-PU-1 mut-R: 5'-T T T T G T T T G T C T C T C T C T G T G T G T G T A T C A - 3' (配列番号 18)。

【0210】

興味深いことに、化合物 2 による発現の抑制はこの突然変異体コンストラクト中で減少したことから、NF- κ B の役割が示唆された。転写因子 NF- κ B が IL-12 p40 遺伝子発現の調節に関与することが示されたので、STA-1856 が、p40 プロモーター上の同属部位への NF- κ B の結合を変更するか否かを検査した。SAC により又はよらずに処理し、1 μ M 化合物 1 又は 10 mM ASA の存在下又は不存在下でインキュベートし、IFN- γ 準備刺激した THP-1 細胞から、核抽出物を調製した。まず、THP-1 細胞を、10 mM KCl、10 mM HEPES (pH 7.9)、1 mM MgCl₂、1 mM ジチオトレイトール (DTT)、0.1% ノニデット p40 (NP-40)、及び 0.5 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を含む 20 容量の緩衝液 A 中に懸濁させ、次に、5 分間、4、10000 rpm で均質化及び遠心分離することによって、核抽出物の単離を行った。続いて、核ペレットを、400 mM NaCl、20 mM HEPES (pH 7.9)、15 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、1 mM DTT、25% グリセロール、1 mM PMSF、及び 1 ml 当たり 10 μ g ロイペチン、20 μ g ペプスタチン及び 10 μ g アンチパインを含む緩衝液 C 中で懸濁し、4 で 30 分間インキュベートし、20 分間 14000 rpm で遠心分離した。上清を、1 000 mM NaCl、20 mM HEPES (pH 7.9)、20% グリセロール、1 mM PMSF 及び 1 mM DTT を含む緩衝液 D に対して透析した。

【0211】

この工程から得られた抽出物を、突然変異された NF- κ B 結合部位又は IL-12 p40 の転写開始部位から -120 ~ -102 領域に対応する NF- κ B 標的配列を含むオリゴヌクレオチドを使用するゲルシフトアッセイにおいて、使用した。p40 プロモーターからの同属配列を含むプローブへの NF- κ B の結合は、IFN- γ /SAC 刺激 THP-1 細胞において強く誘導された。この相互作用は、過剰な非標識化プローブに競合するが、2 つの塩基対が置換される突然変異がされたオリゴヌクレオチドには競合しないので、特異的である。化合物 1 は、NF- κ B 結合に対していかなる影響も示さなかった。対照的に

、ASAは、1 μ M化合物1及び10 mM ASAに誘発されるIL-12 p70タンパク質合成の阻害率がそれぞれ97%及び45%だったという事実にも拘わらず、結合を著しく減少させた。I Bに対する化合物2の効果がなくなることと組み合わせると、これらの結果は、IL-12産生に対する化合物1/化合物2の強い阻害活性がNF B結合活性合計の総計的減少に起因しないことを示唆する。NF Bを強力に遮断する化合物が化合物1/化合物2よりも遙かに幅広いサイトカイン阻害プロフィールを有することから、このことは予期されるものであった。

【0212】

NF - B結合における化合物2の作用を理解するために、ELISAに基づく転写因子-DNA結合活性アッセイシステムを使用して、NF - Bファミリーメンバーであるp50、c-Rel及びp65を調査した。DNA転写因子結合活性アッセイは、製造業者の指示に従って、EZ-detect transcription Factor kit-p50又はp65 (Pierce, Rockford, IL)及びBD Mercury TransFactor Kits-NFkB (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を使用して行った。

10

【0213】

p50、c-Rel及びp65の結合活性は、IFN- / LPS刺激後3時間で、THP-1細胞の核抽出物中において著しく増加した。化合物2 (500 nM)の存在下、3時間でc-Relの結合活性は著しく減少し、p50は僅かに減少した。p65の場合、結合活性の増加は、IFN- / LPS刺激に应答して、化合物2の存在下で観察された。このことは、p50及びc-Relが減少したことにより結合競合がなくなった結果である。

20

【0214】

III. NF - Bタンパク質移動:

DNA-タンパク質相互作用研究により、IL-12中で機能活性ヘテロ二量体を形成するc-Rel及びp50の結合活性が減少し、p65の結合活性が化合物2処理に应答して増加することが示された。この変化を理解するために、ウェスタンブロット分析を使用してNF - Bタンパク質の細胞内局在を調査した。核内のc-Rel及びp50タンパク質の量が減少したことが認められ、p65の量が、未処理細胞と比較して、化合物2 (500 nM)で3時間処理された細胞において、著しく増加したことが認められた。この結果は、DNA-タンパク質相互作用研究と一致し、p50/c-Rel活性の低下及びp65結合活性の増加が、核内のNF - kBタンパク質の不均衡を誘発してp50/c-Relの結合活性に影響を及ぼすことができることを示唆するものである。

30

【0215】

IV. c-Rel及びICSBPに対する化合物2の効果 (核内での両方のレベルを測定する)

分析した転写因子のうち2つの因子ICSBP及びc-Relが、化合物1/化合物2処理により影響を受けたようである。ICSBPは、Ets-2部位に間接的に結合する。IL-12の第1のTF Bトランス活性化因子は、c-Rel/p50ヘテロ二量体である。他の二量体 (p65/p50及びp50/p50)は、活性に欠ける又は阻害機能を有する。従って、c-Relは、NF Bを介した活性化及びICSBPとの相互作用の双方の結果としてのIL-12転写において、役割を果たす。ウェスタンブロット分析及びDNA結合研究はいずれも、化合物2処理に続く核c-Relレベルの減少を示した。図4に示されるように、THP1核c-Rel、p50及びp65タンパク質のウェスタンブロットアッセイは、次の方法で行った; 10% SDSポリアクリルアミドゲル (Invitrogen)を、純粋なニトロセルロース膜 (BioRed, Hercules, CA)に移行した。膜を、TBS緩衝液中の5%ミルクでブロッキングし、次に、1:500希釈した抗c-Rel、抗p65、抗p50、抗ICSBP又は抗PU-1抗体により、室温で1時間又は4で一晩、インキュベートした (全ての抗体は、Santa Cruzから購入した)。膜を洗浄し、1:2000希釈した西洋わさびペルオキシ

40

50

ダーゼ抱合抗ウサギ IgG 又は抗マウス IgG (A m e r s h a m , E n g l a n d) によって、室温で 1 時間インキュベートした。

【 0 2 1 6 】

I F N - プラス L P S 及び I F N - プラス S A C 処理の両方とも、核 c - R e l 、 p 6 5 及び p 5 0 の量を強力に増加させた。化合物 2 処理は c - R e l のレベルを著しく減少させ、処理後の核 c - R e l レベルは非刺激レベル以下であった。対照的に、核 p 6 5 タンパク質は、化合物 2 処理後に増加した。p 5 0 レベルは、化合物 2 処理後に僅かに減少したが、非刺激レベルより高いままであった。従って、化合物 2 処理により、第 1 の I L - 1 2 活性化 N F B 二量体である核 c - R e l / p 5 0 の量の減少が誘発されることが示された。

10

【 0 2 1 7 】

I L - 1 2 プロモーター - ルシフェラーゼレポートシステムによる共トランスフェクションを使用して、化合物 2 によって発現が減少する I C S B P を過剰発現した。I C S B P の過剰発現コンストラクトは、次のようなプライマー : I C S B P - e x p - F : 5 ' - C C G G A A T T C A G G A T G T G T G A C C G G A A T G G - 3 ' (配列番号 1 9) 及び I C S B P - e x p - R : 5 ' - A T A T C T A G A A T G G A T G C A G G A C G C A G A C - 3 ' (配列番号 2 0) を使用して、ヒト P B M C の c D N A から P C R で生成し、結果として生じた P C R 産物を p C I ベクター (P r o m e g a) にライゲーションした。I C S B P 過剰発現は、p 4 0 の発現レベルを増加し、化合物 2 による阻害を減少させた。

20

【 0 2 1 8 】

V . I B に対する化合物 2 の影響

I B 分解は、N F B 依存性遺伝子のシグナル伝達経路におけるステップの 1 つである。ウェスタンブロット及び F A C S 分析を使用して、I B 及び I B の誘導性分解における化合物 2 の活性を T H P - 1 細胞において調査した。T H P - 1 及び R A W 2 6 4 . 7 細胞の細胞質中の I B 及び I B の量は、I F N - / L P S 又は I F N - / S A C による誘導に応答して 3 0 分で著しく減少した。しかしながら、化合物 2 (5 0 0 n M) により及びそれによらずに、3 0 分及び 2 時間処理した試料間に、有意な差は観察されなかった。同様の結果が、化合物 2 が刺激の 3 0 分前に添加された化合物 2 前処理試料から観察された。これらの結果により、転写因子として作用できる核に遊離 N F B が移動することを可能にする、I B 及び I B の分解を化合物 2 が誘導しないことが示された。

30

【 0 2 1 9 】

V I . 核内の E t s 2 のレベル測定

転写因子 I C S B P は、P U - 1 への結合を通じて、間接的に E t s - 2 要素に結合する。各抽出物を E t s - 2 D N A 要素ビーズに結合させ、このビーズを遊離タンパク質から結合物を分離するために単離し、I C S B P 又は P U - 1 の抗体を用いたウェスタンブロットでタンパク質を分析した。E t s - 2 D N A のビーズへの抱合は、次の方法によって行った。The J o u r n a l o f I m m u n o l o g y , 2 0 0 0 , v o l 1 6 5 p a g e s 2 7 1 - 2 7 9 に詳述されたように、ビオチン化プライマーを使用した P C R で、1 . 3 k b 野生型ヒト I L - 2 1 p 4 0 レポーターから、I L - 1 2 p 4 0 E t s - 2 部位 (- 2 9 2 から - 1 9 6) を包含するビオチン化 D N A 断片を合成した。P C R 産物を、Q i a q u i c k K i t (Q i a g e n , C h a t s w o r t h , C A) によって精製した。2 µ g のビオチン化 D N A を、1 0 m M T r i s - H C L 、 p H 8 . 0 、 0 . 1 m M E D T A 、 0 . 1 M N a C l を含む緩衝液中の 1 0 0 µ l のストレプトタビジン結合磁性ビーズ (D y n a b e a d s , M 2 8 0 , D y n a l , L a k e S u c c e s s , N Y) に抱合させた。2 µ g の D N A に抱合された 1 0 µ g のビーズは、T G E D N 緩衝液 (1 2 0 m M T r i s - H C L 、 p H 8 . 0 、 0 . 1 m M E D T A 、 0 . 1 M N a C l 、 1 m M D T T 、 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 、 1 0 % グリセロール) によって平衡化し、2 時間 4 で 5 0 0 µ g の T H P - 1 細胞核抽

40

50

出物及び20 µg ニシン精子DNA (Gibco) によってインキュベートした。ビーズをTGEDN緩衝液中で洗浄し、結合物質を0.5% SDS及び1M NaClを加えた20 µlのTGEDN緩衝液中に溶出させた。溶出物質を、10% SDS-PAGE中で分離し、抗ICSBP又は抗PU-1抗体を使用した免疫ブロット分析で検出した。

【0220】

ウェスタンブロット分析により、化合物1で処理されたTHP-1細胞の核抽出物中のICSBP量が著しく減少することが示された(図5参照)。対照的に、PU-1のレベルは、化合物処理によって影響を受けなかった(図6参照)。

【0221】

ICSBP及びc-Relのいずれもが化合物2処理された細胞の核内で減少したという検出事項は、特に重要である。これら2つの転写因子は相互に作用するので、両方の因子のレベル減少は、深刻な効果を有することが予想される。化合物2は、トランス活性化に関するICSBP-c-Rel相互作用に依存する遺伝子の発現を選択的に阻害する。

【0222】

c-Relは、単球及びマクロファージ中のp35及びp40の両方、並びに樹状細胞(DC)中でのp35の発現に関与するが、樹状細胞中のp40発現はc-Rel依存性である(Grumont et al, J. Exp. Med. 2001; 194: 1021-1031)。化合物2がc-Relを介して作用するならば、この薬物は、PBMCによるp40及びp70の両方の産生を阻害するはずであるが、DC中のp40を阻害しないはずである。このことは、次の方法で単球誘導樹状細胞を生成することによってテストされた。ヒトPBMCを無血清DMEM中に 1×10^7 細胞/mlで懸濁し、5% CO₂のもと、37°Cで2時間インキュベートした。次に、非接着細胞を、PBSによる洗浄によって除去した。接着細胞を、rhIL-4(100 U/ml)及びrhGM-CSF(1000 U/ml)を含むRPMI-1640培地中で、6-7日間培養した。半分量の新規な培地及び全量の新規なサイトカインを、1日おきに添加した。次に、細胞を、異なる濃度の化合物2又は他の化合物の存在下で、IFN- γ (100 U/ml)及びそれに続く0.01% SAC又は1 µg/ml LPSによって準備刺激した。テスト化合物を、DMSO中で調製し、最終DMSO濃度を、無化合物対照を含む全ての培養において0.25%に調節した。サイトカイン測定のために、無細胞上清を18時間後に採取した。

【0223】

化合物2は実際にヒトDC中のp70を阻害したが、p40産生は阻害しなかった(10 µM以下の化合物2では、阻害がなかった)。同様に、トキソプラズマ抗原(STAg)刺激に続くIL-12 p40産生の誘導は、c-Rel依存性であることが示された。従って、化合物2がc-Relを介して作用するのであれば、STAg刺激に続くIL-12 p40の強力な阻害が観察されるべきではない。予備的な結果は、化合物2のIC₅₀媒介p40阻害が、IFN- γ /SAC刺激に対しSTAgによって約1000倍高く、他方でデキサメタソンのIC₅₀は、SAC及びSTAg刺激の両方の場合で同じであった。これら2つの結果から、化合物2によるIL-12産生の阻害がc-Rel経路を介することが更に確認された。

【0224】

VII. 化合物2処理細胞中のNF- κ Bメンバーの核移動の動態

化合物2は、c-Rel及びp50の核移動を妨害する。化合物2によって処理されたLPS刺激細胞中でのNF- κ Bファミリーメンバーの核移動の動態を検査した。THP-1細胞を、100 nM化合物2の存在下又は不存在下、LPSで刺激し、処理後5分、15分、30分、1時間、3時間及び6時間に回収した核(n.p.)抽出物を免疫ブロットすることによって、NF- κ B c-Relファミリーメンバーの分布を判定した。LPS刺激にตอบสนองして、p50は早くも刺激5分後に核へ移動し、時間が経過するにつれ蓄積した(図7免疫ブロット及び図8デンストメトリー)。LPS刺激細胞の化合物2による処理は、刺激後5分から1時間で、p50の核流入の動態に対する影響を有さず、3時

10

20

30

40

50

間で核タンパク質レベルの小さい減少を示した。p 6 5 核移動を検査する実験を、図 9 (免疫プロット) 及び図 1 0 (デンストメトリー) に示す。L P S 刺激細胞において、p 6 5 は早くも刺激後 5 分で核へ移動し、刺激後 1 5 - 3 0 分で最大レベルに蓄積された。L P S 刺激細胞の化合物 2 による処理は、p 6 5 の核流入の動態に対する影響を有しない。後の時間 (6 時間) での核 p 6 5 のレベルは、化合物 2 処理細胞において、未処理細胞に対してわずかに増加した。

【 0 2 2 5 】

理論に拘束されることは望まないが、化合物 2 は、L P S 刺激にตอบสนองして p 5 0 及び p 6 5 核移動の動態に影響を及ぼすことはない。後の時間で、化合物 2 は、p 5 0 の核移動を低下させ (3 時間の時点) 、p 6 5 の核移動を強化し (6 時間の時点) 、N F - B ファミリーに対する選択的効果を示している。 10

【 0 2 2 6 】

V I I I . p 5 2 及び R e l - B の核移動に対する化合物 2 の効果

R e l B 及び p 5 2 は、優先的に互いに複合体を形成する R e l ファミリーの 2 つのメンバーである。p 5 0 及び p 6 5 と同様に、p 5 2 は実質的に全ての細胞型で検出された一方、c - R e l 及び R e l B はリンパ組織でのみ検出された。p 5 2 及び R e l - B 核移動に対する化合物 2 の影響を判定するために、1 0 0 n M の化合物 2 の存在下又は不存在下で I F N g + L P S によって T H P 1 細胞を刺激し、処理 6 時間後に核を免疫プロットすることで p 5 2 及び R e l - B の分布を判定した。図 1 1 に示されるように、核 R e l - B は化合物 2 の存在下で僅かに増加した。p 5 2 において、著しい差は認められ 20
なかつた。この結果により、化合物 2 が c - R e l 及び p 5 0 の核移動を特異的に阻害するが、他の N F - k B 及び R e l - B 核移動は阻害しないことが示唆される。

【 0 2 2 7 】

細胞系及び培養条件 :

T H P - 1 細胞は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (M a n a s s a s , V A) から入手した。T H P - 1 細胞を、1 0 % F C S (A T C C , M a n a s s a s , V A) 及び 1 % ペニシリン / ストレプトマイシン (G i b c o - B R L , N e w Y o r k , N . Y .) を加えた R P M I 1 6 4 0 (A T C C , M a n a s s a s , V A) 中で培養した。細胞を、I F N g (1 0 0 U / m l) 、続いて 1 μ g / m l L P S によって、異なる濃度の化合物 2 の存在下、準備刺激した。化合物 2 を 30
D M S O 中で調製し、無化合物対照を含む全ての培養において、最終 D M S O 濃度を 0 . 2 5 % に調節した。サイトカイン測定のために、無細胞上清を 1 8 時間後に採取した。

【 0 2 2 8 】

核抽出物の単離 :

T H P - 1 細胞を、1 0 m M K C l 、1 0 m M H E P E S (p H 7 . 9) 、1 m M M g C l 2 、1 m M ジチオトレイトール (D T T) 、0 . 1 % ノニデット p 4 0 (N P - 4 0) 、及び 0 . 5 m M フッ化フェニルメチルスルホニル (P M S F) を含む 2 0 容量の緩衝液 A 中に懸濁させ、5 分間、4 、1 0 0 0 0 r p m で均質化及び遠心分離した。次に、核ペレットを、4 0 0 m M N a C l 、2 0 m M H E P E S (p H 7 . 9) 、1 5 m M M g C l 2 、0 . 2 m M E D T A 、1 m M D T T 、2 5 % グリセロール、40
1 m M P M S F 及び 1 m l 当たり 1 0 μ g ロイペプチン、2 0 μ g ペプスタチン、及び 1 0 μ g アンチパインを含む緩衝液 C 中で懸濁し、4 で 3 0 分間インキュベートし、2 0 分間 1 4 0 0 0 r p m で遠心分離した。上清を、1 0 0 m M N a C l 、2 0 m M H E P E S (p H 7 . 9) 、2 0 % グリセロール、1 m M P M S F 及び 1 m M D T T を含む緩衝液 D に対して透析した。

【 0 2 2 9 】

ウェスタンプロット :

1 0 % S D S ポリアクリルアミドゲル (I n v i t r o g e n) を、純粋なニトロセルロース膜 (B i o R e d , H e r c u l e s , C A) に移行した。膜を、T B S T 緩衝液中の 5 % ミルクでブロッキングし、1 : 5 0 0 希釈した抗 c - R e l 、抗 p 6 5 、抗 p 5 50

0、抗ICSBP又は抗PU-1抗体によって、室温で1時間又は4で一晚、インキュベートした(全ての抗体は、Santa Cruzから購入した)。膜を洗浄し、1:2000希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ抱合抗ウサギIgG又は抗マウスIgG(Amersham, England)によって、室温で1時間インキュベートした。

【0230】

化合物3-14は、実施例IからVIIに記載された手順で、化合物1及び2と同様な活性を有することが予期される。

【0231】

当業者に明らかなように、本発明の多くの修正及び応用例はその精神及び範囲から逸脱することなくなされる。ここに記載された特定の実施態様は例としてのみ与えられ、本発明は、請求項の文言及びかかる請求項が権利を与えられる均等物の範囲全体によってのみ限定されるべきである。かかる修正は、請求項の範囲内に含まれることが意図される。

10

【0232】

ここで引用された全ての参考文献、特許及び非特許は、全体が参考として、各個別の公開又は特許又は特許出願は、あらゆる目的において、全体が参照として、特異的且つ個別に組み込まれることが示されるように、同じ範囲のあらゆる目的のためにここに組み込まれる。

【0233】

ここに開示された全ての特徴、特定の実施態様及び特定の置換基は、いかなる組み合わせで組み合わせられてもよい。明細書で開示された各特徴、実施態様又は置換基は、同じ、同等、又は類似した目的に役立つ代替的特徴、実施態様又は置換基によって置換されてよい。化合物の場合、特定の値は、安定した構造をもたらすあらゆる組み合わせで組み合わせられてよい。更に、1つのタイプの化学構造中の置換基の特定の値は(好ましい、又は好ましくないものであろうと)、同じ又は異なるタイプの化学構造において、他の置換基の値(好ましい、又は好ましくないものであろうと)と組み合わせられてよい。従って、別段の明確な記載がない限り、開示された各特徴、実施態様又は置換基は、包括的な一連の同等又は類似した特徴、実施態様又は置換基の例にすぎない。

20

【図面の簡単な説明】

【0234】

【図1a】ヒトc-Relのヌクレオチド及びアミノ酸配列を列挙する(配列番号1)。

30

【図1b】ヒトc-Relのヌクレオチド及びアミノ酸配列を列挙する(配列番号2)。

【図2A】IFN-及びIFN-/LPS誘導p40を示すグラフである。

【図2B】テスト分子のp35発現阻害能を示すグラフである。

【図3A】使用される様々なテストプロモーターの略図である。

【図3B】種々のテストプロモーターのIFN-/LPS刺激への応答能を示すグラフである。

【図4】NF-Bファミリーメンバーc-Rel、p65又はp50の存在に対する刺激を受けた及び刺激を受けない細胞における、THP-1核抽出物のウェスタンブロット分析である；-チューブリンは、内部対照である。

【図5】刺激を受けた及び刺激を受けない細胞における、抗ICSBP抗体を用いたTHP-1核抽出物のウェスタンブロット分析である。

40

【図6】刺激を受けた及び刺激を受けない細胞における、抗PU-1抗体を用いたTHP-1核抽出物のウェスタンブロット分析である。

【図7】テスト分子がNF-kB p50核移動に与える効果を示す免疫プロットである。

【図8】テスト分子がp50核移動に与える効果を示すデンストメトリーの結果を表すグラフである。

【図9】テスト分子がNF-kB p65核移動に与える効果を示す免疫プロットである。

【図10】テスト分子がp65核移動に与える効果を示すデンストメトリーの結果を表す

50

グラフである。

【図11】テスト分子が c r e lを含むNF - k Bメンバーの核移動に与える効果を示す免疫プロットを表す。

【図1a】

cggagaggtt gttgctgaaa tccagcctgag gaggagaga agggagagc cttcagagtg
 61 nctgggggag tggggggccc gggggctggg gcccctgg ccctggatgg actgagctgg
 121 gctggctggg gctgggggag tggggagctg ctg-gggagag gctggggggg cagagc-cag
 181 gctcctgggg agtggctccc gctggagag ctatgggac aaccagagga ggggggagtg
 241 cgttttgggt acaaaigtga agggagctga gctggagcga ctccagggga gctccagcaca
 301 gctaccaccc gactccccc tctctctgag ctctggactt atagagaga aggaagaatg
 361 agatfctat tggctacaa gctggaccaa tttttaccct accctctgca ttggctgga
 421 aaagatgca gggagggcct ctatggaga gattgggca agagcagag acccttggtt
 481 tcccaaat tggctctgg atgtggag agaaagag aaagaagc ttttttaca
 541 agataaag caggatcna tctctctat gctctggaaa accagctgca tgaatgaa
 601 gattggaaa tcaatgggt gctggaggtg tcaaggtt tctccctga tggactgg
 661 aattggaga ctgtctctc tctgttgc tggaccacaa ttatggaaa ctggctcga
 721 aatactgg agtaagat tggctgga acaagact gggagaggtt cagagggaga
 781 gatgaatt tctacttg tgcagagt cagaaagtg acatgaagt tctgtttg
 841 ttgagact gggagcaca aggatctt tccagagct atgacacg ctangagcc
 901 atgtttca aaacaccc atattgaaa gcttccag agaccctac agtaaaaag
 961 cagttggca gactctga ctgagaggt agtgaatca tggatctag ctatggca
 1021 gatgaatag atactacgg caataagta aggaacaaa agcaaacct gctttctag
 1081 aaattggcc aggtctggg agaaagagg ttggctgg ttgacagga tggcttgg
 1141 ctctggact cagggagct accacactg gctccctgaa g'ctggaggt ttggatga
 1201 ttctggaga gctggagac tggctctc ggtttatg g'agagagag atctctcaa
 1261 aaagacaa actgtttc tctgttga g'ctgtatg gattctac agggatca
 1321 agcagcag actctact tctccact aggcctat caatggatt gctccatct
 1381 gctctatgg caactctga tctttagc tggcttag tggccacc caccacagc
 1441 tcaagata caaccact gattggtt tcaagaga caactctc ttatggaa
 1501 ggtatccac caactctg actactgt gggatggt taatgttc taatgtg
 1561 aatcaaca atgctgga ctatggga atgagagt ctactctg ctatggat
 1621 taatgga ttctgctc caaaagct tttatgt ctggact gggagcaco
 1681 agcctgca gctggagag gctctat caagactt tggatgaa ttggaaac
 1741 cctctatga atctgtgt agcctaga gattggac atctctca gttctct
 1801 tctgtatgt agcagagc caatctat ctatgttt ttgttca atctgtgca
 1861 ttggagat ctgcttgg ttgagagt nacagctga taatgagt gggagctca
 1921 aacagctca ttccagag ctatggtt g'atgata g'atgatt agtatggc
 1981 agatgaaa atggacat g'ggtgctc ttccatgt ttctttcc agtatcct
 2041 gaaatgaa aactctta aactgtta caacctat agatcagca ttgtgatt
 2101 gctctctg g'atgata ctatctat actgataa taatctgac tggatgaa
 2161 atctgact tggagatc aaactctt ttctggag agcctgaaa atggatgt
 2221 agatgata ttatggag ctgtctaaa agctctctc agagcagag ctgagatgt
 2281 caaacctga atctagac ttggagag caagagggg g'atctctg agcagag

Figure 1a

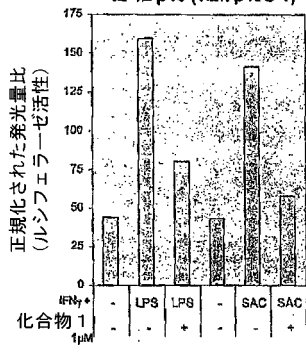
【図1b】

1 aatgagatgt atctggagag atgctgagc tctctctgaa tctctctgaa
 41 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 81 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 121 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 161 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 201 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 241 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 281 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 321 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 361 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 401 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 441 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 481 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 521 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa
 561 tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa

Figure 1b

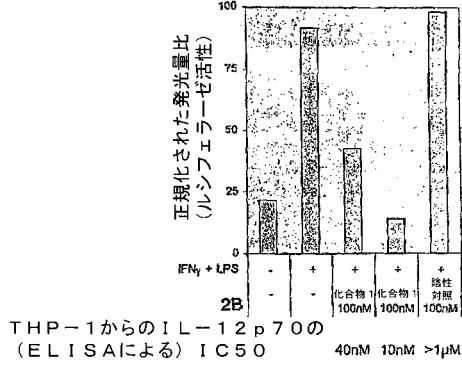
【 図 2 A 】

IL-12 p40プロモーター活性アッセイ
IL-12 p40 (1.2k p40C-1)

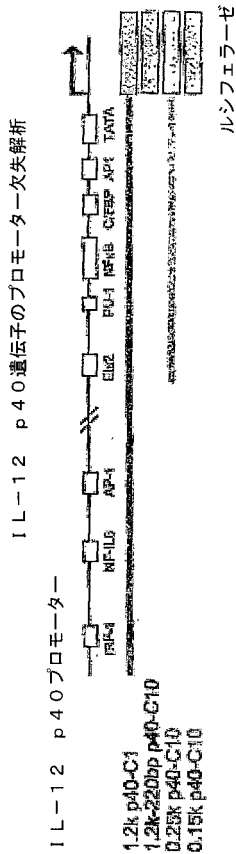


【 図 2 B 】

IL-12 p40プロモーター活性アッセイ
IL-12 p35 (1.5k p35 C-10)

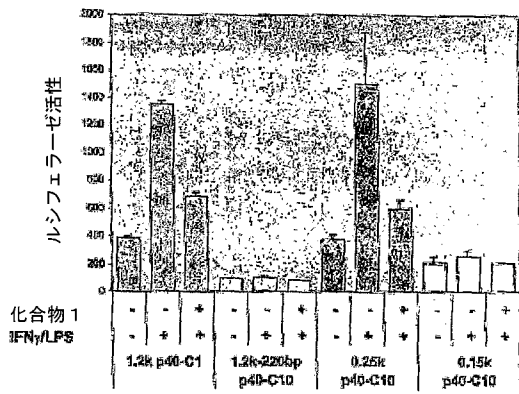


【 図 3 A 】

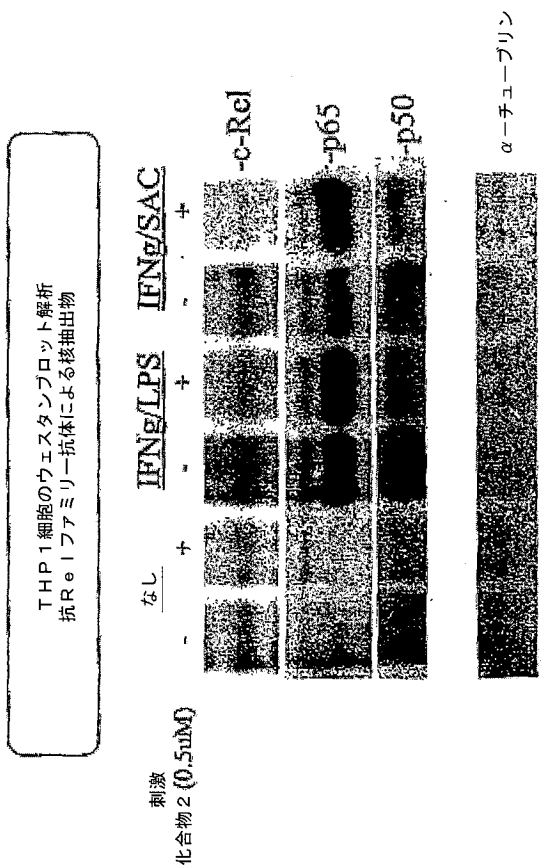


【 図 3 B 】

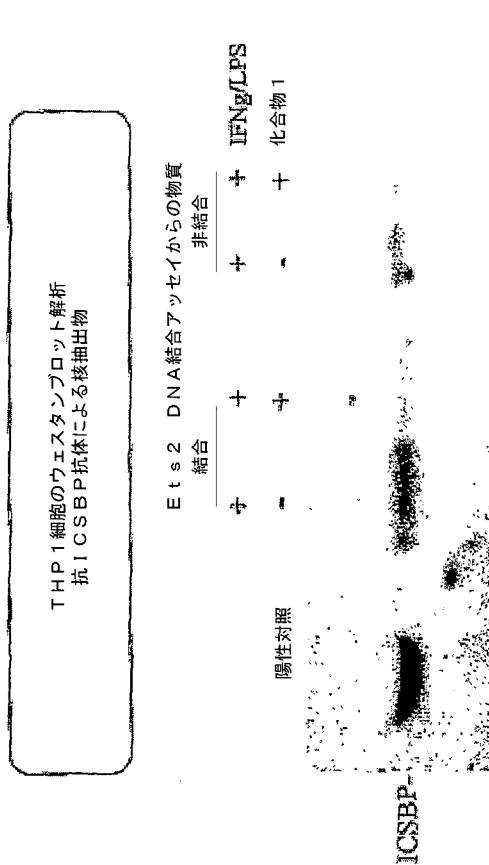
IL-12 p40遺伝子のプロモーター欠失解析



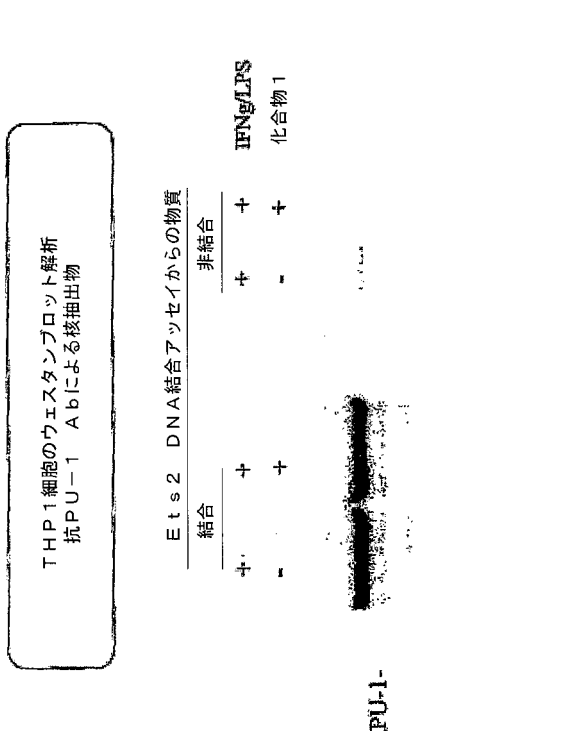
【 図 4 】



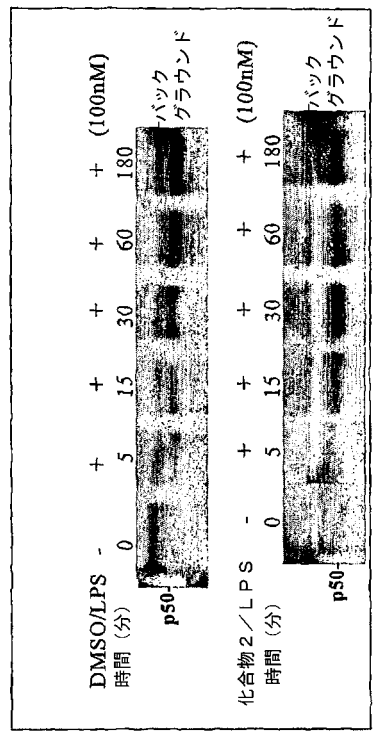
【 図 5 】



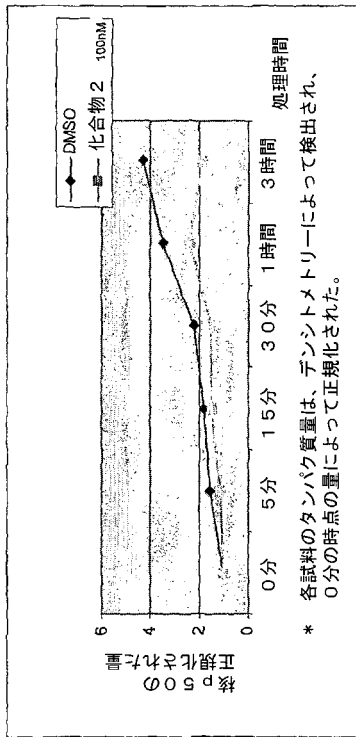
【 図 6 】



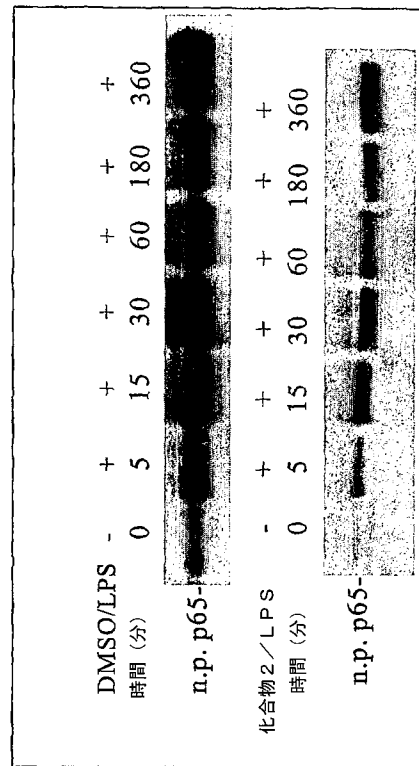
【 図 7 】



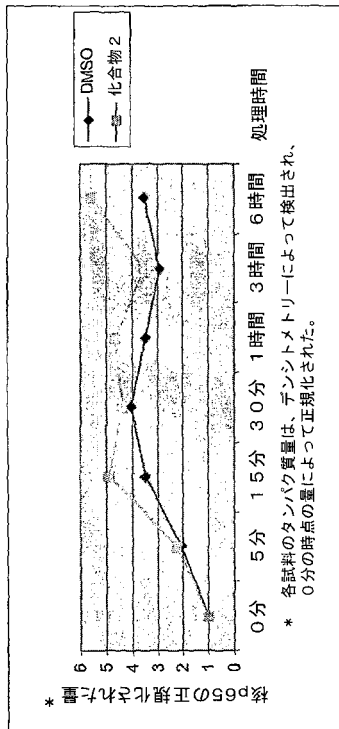
【 図 8 】



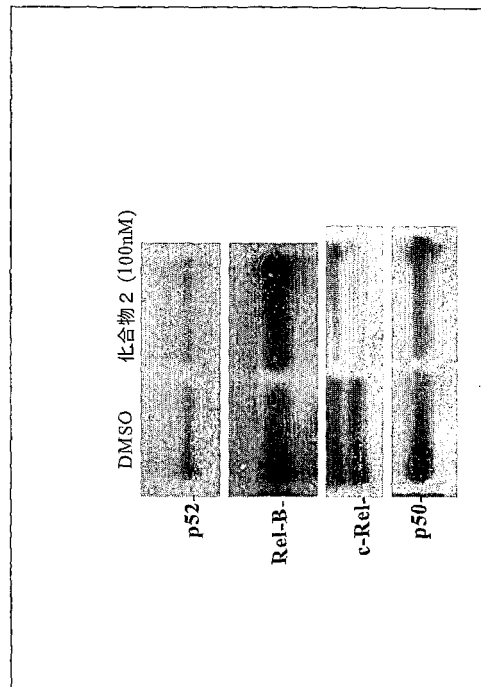
【 図 9 】



【 図 10 】



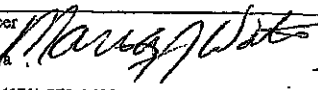
【 図 11 】



【配列表】

2007514414000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US04/38241
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53; C12N 15/85; A61K 48/00 US CL : 435/6, 7.1, 325; 514/2, 44 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. : 435/6, 7.1, 325; 514/2, 44 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) WEST, STN, MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, WPIDS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	HANSEN, S.K. et al. A novel complex between the p65 subunit of NK-kappaB and c-Rel binds to a DNA element involved in the phorbol ester induction of the human urokinase gene. The EMBO Journal, 1992, Vol. 11, No. 1, pages 205-213, see entire publication.	1,6,8,11,13,15,16 — 2-5,7,9,10,12,14,17-22
X — Y	JEON, Y.J. et al. Inhibition of NF-kappaB/Rel Nuclear Translocation by Dexamethasone: Mechanism for the Inhibition of iNOS Gene Expression, Biochemistry and Molecular Biology International, July 1998, Vol. 45, No. 3, pages 435-441, see entire publication.	1, 3,4,6,8,10,11,13-16, 7,12,17-22
X	US 2002/0045235 A1 (KARIN et al) 18 April 2002 (18.04.2002), see entire publication, especially p. 6, paragraph [0047]-p. 8, para [0063], p. 9, para [0072]-p. 12, para [0098], p. 14, para [0114].	1-22
X	US 5,597,898 A (GHOSH) 28 January 1997, (28.01.1997), see entire patent, especially col. 1, line 38-col. 2, line 15, col. col 9-col. 14, col. 23-col. 24, col. 29, line 45-col. 30, line 47.	1-22
<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 "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 10 October 2005 (10.10.2005)		Date of mailing of the international search report 10 NOV 2005
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 Mark L. Shibuya  Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US04/38241

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US04/38241

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1, 3-6, 8-14, drawn to methods of identifying or screening for a molecule that alters the subcellular location of c-Rel comprising contacting with one or more candidate molecules and detecting localization of c-Rel molecules in the cell.

Group II, claim(s) 2-6, 9-14, drawn to methods of identifying or screening for a molecule that alters the subcellular location of c-Rel comprising recombinantly expressing within the cell one or more candidate molecules and detecting localization of c-Rel molecules in the cell.

Group III, claim(s) 7, drawn to methods of identifying or screening for a molecule that alters the subcellular location of c-Rel comprising microinjecting one or more candidate molecules and detecting localization of c-Rel molecules in the cell.

Group III, claim(s) 15-18, drawn to a compound that inhibits translocation of c-Rel to the nucleus, but that does not materially alter expression of NF kappaB and/or amount of IkappaB, and pharmaceutical compositions thereof.

Group IV, claim(s) 19-21, drawn to methods of treating or ameliorating an IL-12 production-related disease or disorder comprising administering a pharmaceutical composition that inhibits translocation of c-Rel to the nucleus, as in claim 17.

Group V, claim(s) 22, drawn to a kit comprising a compound of claim 15 that is labeled for administration to a subject identified as in need thereof.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The technical feature linking Groups I-V appears to be that they all related to molecules that alter or inhibit the subcellular location of c-Rel.

However, Hansen, S.K. et al., The EMBO Journal, 1992, Vol. 11, No. 1, pages 205-213 and US 2002/0045235 A1 (KARIN et al) 18 April 2002 (18.04.2002), teach molecules that alter or inhibit the translocation of c-Rel to the nucleus.

Therefore, the technical feature linking the inventions of Groups I-V does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

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 29/00	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 15/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 15/02	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 25/32 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/32	
G 0 1 N 27/62 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 27/62	V
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 4 0 B 30/06 (2006.01)	G 0 1 N 21/78	C
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 4 0 B 30/06	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
	C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 バーソム ジェームズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン モアランド アヴェニュー 6

(72)発明者 和田 裕美子

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ビルリカ ユニット 184 レンジウェイ ロード 2
16

Fターム(参考) 2G041 CA01 FA13

2G054 AA08 AB04 BB08 CA23 CE02 EA03 GA04 GB10 JA02

4B024 AA01 BA80 CA01 CA12 DA02 EA04 GA11 HA08 HA12

4B063 QA18 QQ08 QQ36 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR48 QR50

QR55 QR62 QR72 QR77 QS16 QS25 QS28 QS33 QS34 QS36

QS39 QX01

4C084 AA17 AA20 DB14 DB22 MA02 NA05 NA14 ZA081 ZA121 ZA122

ZA161 ZA331 ZA341 ZA511 ZA551 ZA591 ZA671 ZA681 ZA751 ZA811

ZA891 ZA921 ZA941 ZA961 ZA962 ZA971 ZB022 ZB071 ZB072 ZB081

ZB111 ZB112 ZB131 ZB151 ZC351 ZC391

专利名称(译)	用于调节c-Rel依赖性细胞因子产生的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2007514414A	公开(公告)日	2007-06-07
申请号	JP2006539986	申请日	2004-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	辛塔制药公司		
申请(专利权)人(译)	振太医药有限公司		
[标]发明人	ルーロンゼン バーソムジェームズ 和田裕美子		
发明人	ルー ロンゼン バーソム ジェームズ 和田 裕美子		
IPC分类号	C12Q1/02 A61K45/00 A61K38/27 A61K38/04 A61K45/06 A61P29/00 A61P37/00 A61P25/00 A61P19/10 A61P11/06 A61P11/00 A61P1/04 A61P17/00 A61P3/10 A61P19/02 A61P7/00 A61P21/04 A61P17/06 A61P27/02 A61P17/14 A61P37/02 A61P15/02 A61P7/06 A61P19/00 A61P1/16 A61P37/06 A61P27/16 A61P17/02 A61P13/12 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/06 A61P25/28 A61P25/32 A61P1/02 G01N27/62 G01N33/53 G01N21/78 C40B30/06 C12Q1/68 C12N15/09 A61K G01N33/50 G01N33/567		
CPC分类号	A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/02 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/06 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/5035 G01N2333/54 G01N33/6872 G01N2333/4703 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A61K45/00 A61K37/36 A61K37/43 A61K45/06 A61P29/00 A61P37/00 A61P25/00 A61P19/10 A61P11/06 A61P11/00 A61P1/04 A61P17/00 A61P3/10 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P7/00 A61P21/04 A61P17/06 A61P27/02 A61P17/14 A61P37/02 A61P15/02 A61P7/06 A61P19/00 A61P1/16 A61P37/06 A61P27/16 A61P17/02 A61P13/12 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/06 A61P25/28 A61P25/32 A61P1/02 G01N27/62.V G01N33/53.D G01N21/78.C C40B30/06 C12Q1/68.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA13 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/BB08 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB10 2G054/JA02 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/DB14 4C084/DB22 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA081 4C084/ZA121 4C084/ZA122 4C084/ZA161 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZA511 4C084/ZA551 4C084/ZA591 4C084/ZA671 4C084/ZA681 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA921 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZA971 4C084/ZB022 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZC351 4C084/ZC391		
代理人(译)	Seihayashi正幸		
优先权	60/519048 2003-11-10 US 60/519040 2003-11-11 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明涉及在不实质上改变NFkB表达水平和/或kB量的情况下调节c-Rel依赖性细胞因子产生的组合物和方法。本发明还涉及通过测定改变的c-Rel的亚细胞定位而确定的c-Rel活性的调节剂的筛选，但是其中NFkappaB的表达水平和/IkappaB的量基本上没有改变。

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100