

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 98702

(P2002 - 98702A)

(43)公開日 平成14年4月5日(2002.4.5)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 11/06		A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
17/00		17/00	
19/02		19/02	

審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 30数) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001 - 206254(P2001 - 206254)	(71)出願人	397067152 ファイザー・プロダクツ・インク アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市 イースタン・ポイント・ロード
(22)出願日	平成13年7月6日(2001.7.6)	(72)発明者	バイヨン リー アメリカ合衆国 06340 コネチカット州 グロトン市 イースタン・ポイント・ロー ド (番地なし) ファイザー・グローバル ・リサーチ・アンド・デベロップメント内
(31)優先権主張番号	60/216796	(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(32)優先日	平成12年7月7日(2000.7.7)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	60/257393		
(32)優先日	平成12年12月22日(2000.12.22)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロスタグランジン D 2 により媒介される疾病状態の治療に有用な化合物の同定方法

(57)【要約】

【課題】 プロスタグランジン D 2 により媒介される疾病状態の治療に有用な化合物の同定方法、並びに C R T H 2 - P G D₂ 関連障害の診断方法及び診断キットを提供する。

【解決手段】 同定方法は、C R T H 2 のサンプルと P G D₂ とを接触させ、C R T H 2 に対する P G D₂ の結合を測定し；C R T H 2 の同種サンプルと、P G D₂ 及び適当な量の試験化合物の両方とを接触させ、C R T H 2 に対する P G D₂ の結合を測定し；そして前記結果を比較して、P G D₂ の結合が P G D₂ の存在により影響されているかを決定することを含む。診断方法は、患者サンプル中の C R T H 2 遺伝子発現又は P G D 2 依存性の C R T H 2 の活性のレベルを測定し、健康な個体の測定値と比較することを含む。診断キットは、P G D₂ 又はそのアナログ、及び C R T H 2 ポリペプチド、C R T H 2 ポリペプチドをコードする核酸、又は C R T H 2 を発現する細胞を容器中に含む。

ヒト好酸球並びにCRTH2及びDPトランスフェクタントにおける
[³H] PGD₂ 結合結果の比較

	CRTH2 トランスフェクタント IC50, μ M	ヒト好酸球 IC50, μ M	DPトランスフェクタント IC50, μ M
PGD2	0.015 (4)	0.025 (4)	0.022 (3)
PGF2 α	0.98 (1)	1.5 (1)	8.75 (1)
PGE2	1.6 (1)	3.3 (1)	6.76 (1)
BW-245C	>100 (3)	>100 (3)	0.01 (2-3)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a) CRTH2 のサンプルと PGD₂ とを接触させて、CRTH2 に対する PGD₂ の結合を測定し；(b) CRTH2 の同種サンプルと、PGD₂ 及び適当な量の試験化合物の両方とを接触させて、前記 CRTH2 に対する PGD₂ の結合を測定し；そして (c) 前記 (a) の結果と (b) の結果とを比較して、PGD₂ の結合が PGD₂ の存在により影響されているか否かを決定することを含む、CRTH2 レセプターに対する PGD₂ の結合を変化させる化合物の同定方法。

【請求項 2】 (a) CRTH2 のサンプルと PGD₂ とを接触させて、その結果生じる前記 CRTH2 の活性を測定する工程；(b) 適当な量の試験化合物の存在下で、CRTH2 の同種サンプルと PGD₂ とを接触させて、その結果生じる CRTH2 の活性を測定する工程；及び (c) 前記 (a) の結果と (b) の結果とを比較して、CRTH2 の PGD₂ 依存性活性が前記試験化合物の存在により影響されているか否かを決定する工程を含む、CRTH2 レセプターの活性（通常、CRTH2 レセプターに対する PGD₂ の結合に依存する）を変化させる化合物の同定方法。

【請求項 3】 試験化合物を、前記 CRTH2 の PGD₂ 依存性活性を妨害するアンタゴニストとして同定する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記試験化合物が、CRTH2 に特異的な抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】 前記試験化合物が、PGD₂ に特異的な抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】 試験化合物を、前記 CRTH2 の PGD₂ 依存性活性を向上するアゴニストとして同定する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】 CRTH2 の PGD₂ 依存性活性が、アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、自己免疫疾患、再灌流損傷、及び炎症性疾患からなる群から選択した疾病状態に関係する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】 前記炎症性疾患が、慢性関節リウマチ；変形性関節症；炎症性腸疾患；乾癬、湿疹、紅斑、かゆみ症、及びニキビから選択した皮膚の障害；発作；及び移植片拒絶反応からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 測定される CRTH2 活性が、PGD₂ に対して結合する能力である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】 前記 CRTH2 が、哺乳動物細胞の表面、哺乳動物細胞の膜断片の表面又は脂質小胞の表面に存在する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】 前記 CRTH2 が哺乳動物細胞の表面に存在し、そして前記 CRTH2 の PGD₂ 依存性活性が PGD₂ に対する前記細胞の走化性応答である、請求項 10 に記載の方法。

*【請求項 12】 前記 CRTH2 が哺乳動物細胞の表面に存在し、そして CRTH2 の PGD₂ 依存性活性が、(a) 細胞内 Ca²⁺ 濃度、(b) 反応性酸素種の放出、又は (c) アクチン重合への効果、に対する影響である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】 前記 CRTH2 を固体表面に固定する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 14】 前記固体表面がマイクロタイター皿である、請求項 13 に記載の方法。

10 【請求項 15】 患者サンプル中の (a) CRTH2 遺伝子発現、又は (b) PGD₂ 依存性の CRTH2 の活性のレベルを測定し、前記測定値を、臨床的に健康な個体から決定した測定値と比較することを含む、哺乳動物における CRTH2 - PGD₂ 関連障害の診断方法。

【請求項 16】 容器中に収容された、PGD₂ 又はそのアナログ、及び CRTH2 ポリペプチド、CRTH2 ポリペプチドをコードする核酸、又は CRTH2 を発現する細胞を含む、診断キット。

20 【請求項 17】 患者において CRTH2 - PGD₂ に関連する障害を検出又は治療するために使用するための指示書を更に含む、請求項 16 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、プロスタグランジン D₂ (PGD₂) により媒介される疾病状態の治療及び予防に有用な化合物の同定に関する。

【0002】プロスタグランジンは、局所活性ホルモン様化学的メディエータとして作用し、アラキドン酸の炭素原子数 20 の脂肪酸骨格から誘導される一群の化合物である。プロスタグランジンは、炭素原子数 20 のポリ不飽和脂肪酸から誘導され、エイコサノイドの或る主要な区分（化学的メディエータの大きなファミリー）を規定し、また、リボキシン、トロンボキサン、ヒドロペルオキシ脂肪酸、及びロイコトリエンも含まれる。

【0003】エイコサノイドの合成は、一般的に、局所的組織損傷、ホルモンによる刺激、又は細胞性活性化経路（例えば、免疫グロブリン IgE の細胞表面レセプターに対する結合）を介することによって刺激される。貯蔵され、予め形成された化学的メディエータと異なり、エイコサノイド脂質メディエータは、典型的に、活性化イベントの後でのみ細胞内に現れる。ついで、エイコサノイドは、特異的な細胞表面レセプターに結合することにより、多くの組織において多様な種々の効果を媒介する。プロスタグランジンは、多くの炎症性応答、並びに免疫系の機能を媒介することが知られている。アンタゴニスト化合物は、エイコサノイドレセプター結合の正常な作用を妨げるように作用するエイコサノイドの種々の群について開発されてきた。

*50 【0004】一般的に言えば、前記炎症性応答は、局所的損傷に対する応答を促進する保護的な機構である。例

えば、悪影響を受けている領域への組織液の漏洩は、抗体との接触を促進し、また、任意の有害薬剤と直接戦うように白血球を移動させる。残念ながら、炎症性応答は不適切なことがある。すなわち、炎症性応答は、長すぎる時間継続することがあるか、又は残念ながら身体にダメージを与える作用を有する炎症系成分による関与を含み、それによって、疾病状態に貢献するか、又は、疾病状態を規定することさえある。従って、炎症の進行を妨げることが医学的に適当である多くの状況が存在する。アレルギー及び喘息は、複雑で、典型的には慢性の炎症性疾患の主要な群の代表である。多くの炎症性疾患状態において典型的であるように、アレルギー疾病状態は、免疫系の異常な、あるいはそうでなければ望ましくない活性も含まれる。

【0005】本発明は、特に、アレルギー性疾患、例えば、アレルギー喘息、アトピー性皮膚炎、及びアレルギー性鼻炎の予防及び治療に有用な化合物の同定に関する。また、本発明は、全般的に、炎症性成分を含む疾病状態、例えば、以下に限定されるものではないが、炎症性障害、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、炎症性腸疾患；皮膚の障害、例えば、乾癬、湿疹、紅斑、かゆみ症、及びニキビ；発作、及び再灌流損傷により特徴づけられる任意の疾病、移植片拒絶反応、及び自己免疫疾患の予防及び治療に有用な化合物の同定に関する。

【0006】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】アレルギー性喘息及びアレルギー性鼻炎は、現在、人口の約10%が罹病している疾病であり、この数字は増加しつつあるように考えられている(Bush, R. K. a. G., Jhon W., Handbook of asthma and rhinitis, 第1版, 1997, Abingdon: Blackwell Science, 270)。現在、多くの群の薬剤、例えば、抗ヒスタミン剤、うっ血除去剤、 β 2アゴニスト、抗コリン作用剤、メチルキサンシネス(methylxanthines)、クロモリン、コルチコステロイド、及びロイコトリエンモジュレーターが、これらの疾病の治療に広く使用されている。しかしながら、一般的に、副作用及び低有効性から、これらの薬剤の有用性は限られている。従って、これらの疾病状態及び他の炎症性状態に寄与する炎症性及び免疫学的プロセスの鍵となる段階を妨害する薬剤学的に活性な化合物を同定することに対して、大きな医学的要求が存在する。

【0007】 PGD_2 は、血小板により生成されることが知られている。また、 PGD_2 は、マスト細胞、マクロファージ、並びに炎症性プロセス及び免疫系プロセスに関与する他の細胞によって生成される。 PGD_2 の機能として報告されているものとしては、血小板凝集の阻害、平滑筋の弛緩及び収縮、神経におけるシグナル伝達の変化、睡眠誘導、並びに炎症性応答を媒介する細胞の

走化性応答の促進を挙げることができる。マスト細胞は、長い間、免疫グロブリンタイプIgE依存性アレルギー性疾患、例えば、アレルギー性鼻炎及びアレルギー性喘息に関連づけられてきた。マスト細胞-誘導メディエータ、例えば、 PGD_2 、ロイコトリエン C_4 、ヒスタミン、プロテアーゼ、サイトカイン、及びケモカインが、即時過敏反応に関与することについては、明確な証拠がある〔例えば、Rossi and Olivieri, Chest, 112(2), pp. 523-529, 1997を参照されたい〕。

【0008】マスト細胞の他に、Th2タイプの免疫系ヘルパーT細胞も、アレルギー性応答の潜在的オーケストレーター(orchestrator)として認められている(Wills-Karp, 1999, Annual Review of Immunology 17: 255-81)。アトピー患者においては、疾病の重篤度は、Th2-生成サイトカインのレベルに相関し、そしてTh2細胞は、気管支肺胞洗浄及び気管支生検標本において同定されてきた〔Robinsonら, 1992, New England Journal of Medicine 326(5): 298-304; Walkerら, 1992, American Review of Respiratory Disease 146(1): 109-15〕。コルチコステロイドによる徴候の救済は、Th2サイトカインの減少と良好に相関する〔例えば、Wilkinsonら, 1991, International Archives of Allergy & Applied Immunology 94(1-4): 220-1を参照されたい〕。更に、IL-4ノックアウトマウスへTh2細胞を養子移植(adoptive transfer)することにより、Th2細胞が気道過敏の病原に関与する証拠が得られている〔Liら, 1996, Journal of Immunology 157(8): 3216-9; Brusselleら, 1995, American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 12(3): 254-9〕。

【0009】しかしながら、炎症状態に対するより特異的で効果的な治療方法を提供するためには、細胞レセプターについて関連する各化学的メディエータの特異性及び得られる下流シグナル伝達イベントの本質をより良く理解することが求められることになる。プロスタグランジンに対して多くのレセプター(例えば、DP、FP、及びEP)が同定されてきたが、DPレセプターだけが PGD_2 に対する特異性を有することが示されている。生物学的応答の複雑性を考慮すると、 PGD_2 に対する別の細胞レセプタータイプが存在する可能性が高いが、これに関連する最近の単離努力は失敗している〔Narumiyaら, 1999, Physiologic

al Reviews 79(4):1993-226}。

【0010】最近、PGD₂がヒトTh2細胞により生成されていることが決定された〔Tanakara, J. Immunol, 164(5)pp.2277-80, 2000〕。また、Th2細胞が或る特定のG-タンパク質共役型レセプター(これは、当初はヒトTh2セルラインからクローン化された)を発現することも決定された〔Nagataら, 1999, Journal of Immunology 162(3):1278-10 86; 及びUSP6040426を参照されたい〕。このレセプターは、CRTH2(chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on the cells: Th2細胞上で発現した化学誘引物質レセプターホモログ)と称されている。また、Gene Bank受託番号AB008535も参照されたい。

【0011】前記CRTH2レセプターは、多様な種々の組織、例えば、脳、肺、及びリンパ系器官からも、選択的に発現している〔Abeら, 1999, Gene 227(1):71-7〕。免疫系細胞からの発現に関して、CRTH2レセプターがTh2細胞(好酸球及び好塩基球)上に選択的に発現し、Th1細胞、B細胞、及びNK細胞上で発現しないことが報告されている〔Nagataら, 1999, FEBS Letters 459(2):195-9〕。更に、CRTH2と他のすべての公知の細胞表面タンパク質との間には、FMLPレセプターとの低い相同性(〜30%)を除いて、有意な配列相同性が存在しない。更に、CRTH2に対する天然リガンドは、報告されていない。本発明は、CRTH2に対する天然リガンドが、実際は、PGD₂であるという発見に基づくものであり、これらの相互作用が特異的抗炎症性医薬の開発において重要であることは、直ちに認識されるであろう。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、PGD₂関連障害、例えば、アレルギー、喘息、及び炎症の治療に有用な治療化合物のスクリーニング方法に関する。本発明は、部分的に、本明細書に記載の発見、すなわち、PGD₂がCRTH2に対する天然リガンドであること、及びアレルギー性及び炎症性応答におけるこの相互作用の役割に基づいている。本発明は、種々の態様において、PGD₂-CRTH2相互作用のモジュレータ(すなわち、アンタゴニスト及び/又はアゴニストである化合物)を同定する1次スクリーニングアッセイを提供する。これらの1次アッセイは、高スループットスクリーニングに適用することができる。

【0013】別の態様では、本発明は、前記モジュレータ(例えば、アゴニスト又はアンタゴニスト)の生物学的活性及び得られるそれらの有用性を更に特徴づける2 50

次アッセイを提供する。或る同定された化合物は、PGD₂が関与する障害及び状態、例えば、アレルギー、喘息、及び全般的に炎症性状態の治療及び予防に有用であろう。或る同定された化合物は、PGD₂とCRTH2との相互作用を向上させることが有利な障害又は状態の治療又は予防に有用であろう。

【0014】本発明は、(a)PGD₂の存在下又は不在下で、CRTH2と試験化合物とを接触させ;そして(b)その生物学的効果を決定することを含む、CRTH2-PGD₂-媒介プロセスを変化させる化合物の同定方法を提供する。典型的アッセイにおいては、PGD₂が通常は結合する部位と同じCRTH上の部位に、試験化合物が結合し、そして効果を有するが、当業者であれば、いつでも必ずしもそうなる必要がないことに気づくであろう、すなわち、本発明の方法論は、PGD₂結合部位と距離の離れたCRTH2上の部位において作用する化合物の同定にも用いることができる。

【0015】或る態様においては、同定される化合物は、PGD₂のCRTH2との相互作用又はその正常な結果を妨害するアンタゴニストである。更に別の態様においては、同定される化合物は、CRTH2上にPGD₂が結合する正常な効果を高いレベルで模倣するアゴニストである。典型的な態様では、測定されるCRTH2活性が、PGD₂と相互作用する能力である。本発明の更に別の態様においては、試験化合物は、CRTH2に特異的な抗体であるか、又はPGD₂により部分的にもたらされるエピトープに特異的な抗体である。

【0016】更に、本発明は、(a)CRTH2発現性細胞と試験化合物とを接触させ;そして(b)得られたCRTH2活性のレベル又は前記細胞内におけるCRTH2の発現のレベルを測定し、そして測定した前記の活性又は発現レベルが試験化合物の不在下で測定したものと異なっている場合には、CRTH2-PGD₂-媒介プロセスを変化させる化合物を同定することを含む、CRTH2-PGD₂-媒介プロセスを変化させる化合物の同定方法を提供する。或る態様では、測定されるCRTH2活性が、PGD₂と相互作用する能力である。別の態様では、測定されるCRTH2活性が、その細胞のPGD₂に対する走化性応答である。

【0017】別の態様では、本発明は、更に、(a)CRTH2を発現する第二細胞と、同定された化合物とを接触させ;そして(b)前記化合物が第二のCRTH2活性を変化させるか否かを決定することを含む。別の態様においては、測定される前記第一の又は第二のCRTH2活性のいずれかが、PGD₂と相互作用する能力である。更に別の態様においては、測定される前記第一の又は第二のCRTH2活性のいずれかが、その細胞のPGD₂に対する走化性応答である。別の態様においては、前記第二のCRTH2活性は、細胞内Ca²⁺濃度、反応性酸素種(species)の放出、又はアクチン

重合である。

【0018】本発明に包含される別の態様は、(a) 試験化合物の存在下で、C R T H 2 と P G D₂ (又はそのアナログ) とを接触させ；そして (b) C R T H 2 と結合する P G D₂ (又はそのアナログ) の量を測定し、そして (b) で測定した結合 P G D₂ の量が、試験化合物不在下で測定した結合 P G D₂ の量と異なる場合に、C R T H 2 に対する P G D₂ の結合を変化させる化合物を同定することを含む、C R T H 2 に対する P G D₂ の結合を変化させる化合物の同定方法である。或る態様においては、工程 (a) で接触させる C R T H 2 が、細胞表面上に存在する。別の態様では、前記 C R T H 2 が固体表面上に固定されている。別の態様では、前記固体表面が、マイクロタイター皿である。更に別の態様においては、前記細胞と P G D₂ 特異的抗体とを接触させることにより、P G D₂ の結合量を測定する。更に別の態様では、前記 P G D₂ を標識し、そして前記標識を検出することによって P G D₂ の結合量を測定する。この方法の或る態様では、P G D₂ を蛍光標識により標識する。

【0019】更に、本発明は、患者サンプルにおいて C R T H 2 遺伝子発現レベル又は C R T H 2 レセプターレベルのいずれかを測定し、そして測定されたレベルが、臨床的に正常な個体において見られるレベルと異なる場合に、C R T H 2 - P G D₂ 関連障害を検出することを含む、哺乳動物における C R T H 2 - P G D₂ 関連障害の検出方法を提供する。

【0020】また、本発明は、キットも包含する。提供されるキットは、容器中に収容された、(a) P G D₂ 若しくはそのアナログ、又は (b) C R T H 2 ポリペプチド、又は (c) C R T H 2 ポリペプチドをコードする核酸、又は例えば、(d) C R T H 2 を発現する細胞、並びに好ましくは、指示書及び他の試薬を含む。或る態様では、前記キットは、更に、患者における C R T H 2 - P G D₂ 関連障害の存在の検出に使用するための指示書を含む。

【0021】本明細書において、用語「P G D₂ 媒介」は、P G D₂ の発現、合成、及び/又は活性のレベルに、直接又は間接的に、依存及び/又は応答するプロセスを含む。前記プロセスとしては、以下に限定されるものでなく、アレルギープロセス、喘息プロセス、及び炎症プロセス、例えば、炎症性細胞の走化性、血小板凝集の阻害、平滑筋の弛緩及び収縮、並びに神経学的調節（例えば、睡眠、体温、及び痛み応答調節）を挙げることができる。

【0022】本明細書において、用語「C R T H 2 - P G D₂ - 関連障害」及び「C R T H 2 - P G D₂ - 関連状態」は、P G D₂ が関与するか、あるいは、患者内の P G D₂ の濃度によって有益に又は不利に作用することのある障害又は状態を意味する。前記障害及び状態は、例えば、正常で、悪影響を受けておらず、悪化していない

個体において見られるレベルと比較して、異常なレベルでの P G D₂ の発現、合成、及び/又は活性の結果として生じることがある。前記障害としては、以下に限定されるものでなく、アレルギー性障害、喘息性障害、及び炎症性障害、例えば、アレルギー性鼻炎、アレルギー性喘息、気管支収縮；及び神経学的障害、例えば、睡眠障害；並びに体温の調節又は痛み応答における障害を挙げることができる。

【0023】本発明の目的に関して、P G D₂ の「アナログ (analog)」とは、全体的に構造が P G D₂ に類似であり、少なくとも一つのアッセイの条件下において全体的に P G D₂ と同じ生物学的効果を有する化合物である。すなわち、或るアッセイにおいて有効な P G D₂ アゴニスト又は P G D₂ アンタゴニスト化合物の活性が測定されれば、そのアナログは、前記アッセイにおいて使用される限り、任意の P G D₂ 自体と置換することができる。

【0024】【発明の実施の形態】P G D₂ 関連障害、例えば、アレルギー性障害、喘息、及び炎症性応答障害の検出及び治療に有用な治療用化合物の同定のためのスクリーニングアッセイに関して以下に説明する。また、前記アッセイは、P G D₂ 自体と比較して、高い P G D₂ - C R T H 2 結合及び活性を示す化合物の検出にも適用することができる。前記スクリーニングアッセイには、第一に、高スループット・スクリーニングフォーマットに適用することができる 1 次スクリーニングアッセイ、及び第二に、1 次選別において同定されたリード化合物を更に特徴づけるために使用することができる 2 次スクリーニングアッセイが含まれる。更に、本明細書は、前記 P G D₂ 関連障害の治療において、同定された化合物を使用する診断及び治療方法も開示する。

【0025】本明細書に記載のスクリーニングアッセイは、例えば、P G D₂ の C R T H 2 との相互作用を変化させる、有機化合物、ペプチド、及びタンパク質（抗体を含む）の同定に使用することができる。前記の同定された化合物などは、P G D₂ による C R T H 2 の走化性誘発のアゴニスト又はアンタゴニストとして用いることができる。例えば、C R T H 2 活性に影響する化合物としては、以下に限定されるものでなく、C R T H 2 に結合し、このことにより、P G D₂ の結合を阻害する化合物、及び走化性誘発を妨害（アンタゴニスト）又は走化性誘発を向上（アゴニスト）する化合物を挙げることができる。また、本発明の方法論は、P G D₂ に結合し、そのことによって P G D₂ の C R T H 2 への結合を妨げるか又は向上させる化合物の検出（又は、活性の確認）にも有用である。

【0026】C R T H 2 遺伝子活性に影響する化合物（C R T H 2 遺伝子発現に影響することによる；例えば、転写に影響を与えるか又はスプライシングイベント

を妨害して、C R T H 2 の完全長又は切断された形態の発現を変化させることができるタンパク質又は小型有機分子などの分子を含む)も、本発明のスクリーニングにおいて同定することができる。更に、前記アッセイが、C R T H 2 シグナル変換を変化させる化合物(例えば、下流シグナリングイベントに影響を与える化合物、例えば、P G D₂により活性化されたシグナルの変換に関与することができるG-タンパク質活性の阻害剤又は増強剤又はC R T H 2 へ結合する別のリガンドも同定することができることに注意されたい。C R T H 2 の下流のシグナリングイベントに影響し、そしてアレルギー性又は炎症性応答におけるC R T H 2 の効果を変化させる化合物の同定又は使用も、本発明の範囲内に含まれる。
【0027】本明細書に記載の1次スクリーニングアッセイは、P G D₂-C R T H 2 相互作用を変化させる化合物、すなわち、C R T H 2 レセプターにおけるP G D₂の位置において(P G D₂と比較して反作用的に又は作用的に)作用する試験化合物、あるいはP G D₂と結合するか又はP G D₂を変化させ、それによりC R T H 2 レセプターにおいてP G D₂がどのように作用するかに影響を与える試験化合物を検出することを意図している。

【0028】以下に詳しく記載するように、前記アッセイは、高スループットスクリーニング方法に適用することができる機能的アッセイ(例えば、結合アッセイ)である。結合アッセイを用いて、P G D₂とC R T H 2 との間の相互作用を変化させる化合物を同定することができる。本発明の或る観点によると、前記選別は、C R T H 2 とP G D₂との間の正常な相互作用を妨害する化合物、例えば、他の天然プロスタグランジン若しくはそのアナログ、又は別の化合物を同定することを意図することができる。前記化合物は、アレルギー性応答、喘息、及び炎症性応答に対するリード化合物として有用となる。本発明の別の観点では、前記選別を、C R T H 2 とP G D₂の間の正常な相互作用を模倣するが、向上した効果を有する化合物(例えば、他のプロスタグランジン若しくはそのアナログ、又は他の化合物)を同定するように設計することができる。前記化合物は、C R T H 2 - P G D₂相互作用のアゴニストに対するリード化合物として有用であろう。

【0029】結合アッセイは、直接結合アッセイ又は競合結合アッセイとして実施することができる。直接結合アッセイにおいては、試験化合物を、C R T H 2 レセプター又はP G D₂リガンドに結合させることによって試験する。次いで、第二工程において、P G D₂-C R T H 2 相互作用を変化させる能力に関して試験化合物を試験する。一方、競合結合アッセイでは、C R T H 2 との結合に関してP G D₂と競合する試験化合物の能力を評価する。

【0030】直接結合アッセイでは、P G D₂及び/又

はC R T H 2 を、前記リガンド又はレセプターに前記試験化合物が結合可能な条件下で、試験化合物に接触させる。前記結合は、溶液中で又は固体表面上で実施することができる。好ましくは、前記試験化合物を、検出のために予め標識しておく。標識には、任意の検出可能な基、例えば、以下に限定されるものでなく、発光性、蛍光性、若しくは放射性の同位体又は前記のものを含む基、あるいは非同位体標識、例えば、酵素又は染料を用いることができる。結合を実施するのに十分な時間インキュベーションをした後に、その反応物を、過剰な又は非特異的に結合した試験化合物を除去する条件及び操作にさらす。典型的には、適当な緩衝液で洗浄することを挙げることができる。最後に、P G D₂-試験化合物複合体又はC R T H 2 -試験化合物複合体の存在を検出する。

【0031】競合結合アッセイでは、試験化合物を、P G D₂のC R T H 2 に対する結合を分裂させるか又は向上させるそれらの能力に関してアッセイする。標識したP G D₂を、C R T H 2 又はその断片若しくは誘導体と混合し、そして試験化合物を添加するか又は添加せずに、それらの間の相互作用が正常に発生する条件下におくことができる。C R T H 2 に結合する標識化P G D₂の量を、試験化合物の存在下又は不在下における結合量と比較することができる。

【0032】好ましい態様においては、複合体形成及び検出を促進するために、1又は複数の成分を固体表面上に固定して前記結合アッセイを実施する。種々の態様において、前記固体支持体は、以下に限定されるものでなく、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラス、ニトロセルロース、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド、及びアガロースであることができる。前記支持体の形状としては、ビーズ、膜、微細粒子、反応容器(例えば、マイクロタイタープレート)の内部表面、試験管、又は他の反応容器を挙げることができる。C R T H 2 又は他の成分の固定は、共有結合又は非共有結合を介して達成することができる。或る態様では、前記結合が間接的、すなわち、結合した抗体を介することができる。別の態様では、C R T H 2 及びネガティブコントロールを、エピトープ、例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(G S T)と組み合わせることにより、前記固体表面への結合を、市販の抗体、例えば抗G S T(Santa Cruz Biotechnology)によって媒介させることができる。

【0033】例えば、或る固体支持体に固定したC R T H 2 を用いて、親和性結合アッセイを実施することができる。典型的には、結合反応の固定成分(この場合、P G D₂又は試験化合物)を、標識して検出可能にする。種々の標識化方法が実施可能であり、例えば、発光性、発色性、蛍光性、又は放射性の同位体又は基の検出、あ

るいは非同位体標識、例えば、酵素又は染料の検出を用いることができる。或る好ましい態様では、試験化合物を発蛍光団、例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン (FITC: Sigma Chemicals, St. Louis から入手可能) で標識する。

【0034】次に、標識した試験化合物又はPGD₂及び試験化合物を、特異的結合が起こることが可能な条件下で、前記固体支持体と接触させる。前記結合反応を実施した後に、前記表面を洗浄することによって、結合していない試験化合物及び非特異的に結合した試験化合物を分離する。結合パートナーの前記固相への結合は、当業者に公知の種々の方法で実施することができ、例えば、以下に限定されるものでなく、化学的架橋、プラスチック表面への非特異的接着、固相へ結合した抗体との相互作用、結合パートナー（例えば、ビオチン）に結合したリガンドと固相に結合したリガンド-結合タンパク質（例えば、アビジン又はストレプトアビジン）との間の相互作用などを挙げることができる。最後に、前記固体表面に残っている標識を、当業者に公知の任意の方法により検出することができる。例えば、発蛍光団で標識した場合には、蛍光計を用いて複合体を検出することができる。

【0035】好ましい態様においては、結合アッセイを以下の通りに実施することができる：

(a) 一時的にCRTH2を発現する300-19細胞（後出）をペレット化し、そして室温でアッセイ緩衝液（Ca²⁺及びMg²⁺を含み、HEPES及び炭酸水素ナトリウムを補足したハンクスの平衡塩類溶液）で2回洗浄する。前記細胞を、2×10⁷細胞/mLの濃度で再懸濁する。96ウェルU底マイクロタイター皿を用いて、下記の通りに（体積150μLで）アッセイを準備する：

(b) ベヒクル50μL（アッセイ緩衝液中0.3% DMSO、合計ウェル）；又は最終アッセイ濃度が10μMになる30μM冷PGD₂50μL〔冷却したPGD₂の原液を、貯蔵濃度10mMでDMSO中に溶解し、そして-20℃で貯蔵し、次いで、使用に際して3:1000に希釈して最終貯蔵濃度30μMにした〕；細胞50μL（2×10⁷/mL；10⁶/ウェル）；6nM〔³H〕-PGD₂50μLを加えて、最終濃度を2nMとする〔Amersham；162Ci/mmol，メタノール：水：アセトニトリル（3:2:1）中0.1Ci/mL，617nMをアッセイ緩衝液1mL当たり10μLに希釈して濃度を6nMとした〕。

(c) 前記プレート室温で20分間放置することによりインキュベートし、その後で遠心分離（2800rpm，Sorval RT6000，5分間，4℃）する。その上清を捨てて、非特異的結合を減らす。冷却アッセイ緩衝液を用いて、ウェル1個の洗浄につき緩衝液150μLで6回洗浄することにより、前記プレート

(Packard Unifilter plate GF/C，予め少なくとも1時間3%PEI中に浸漬したもの)から集菌する。前記フィルタープレートを一晩乾燥させる。シンチレーション液50μLを加えた後に、前記プレートシンチレーション計数器中で計数（ウェル1個当たり1分間）する。好ましくは、CRTH2を発現するインタクト細胞の形態が、又はCRTH2を含む単離された細胞膜として、CRTH2を結合アッセイに加える。こうして、CRTH2への直接結合又はPGD₂-CRTH2複合体を変化させる試験化合物の能力を、培養物中のインタクト細胞又は動物モデル中で、試験化合物の存在下又は不在下で、アッセイすることができる。

【0036】標識したPGD₂は、CRTH2を発現する細胞又は前記細胞から得られる粗抽出物と混合することができる。また、前記試験化合物を加えることができる。CRTH2と相互作用する化合物の同定に、単離した膜を使用することができる。例えば、単離した膜を用いる典型的実験においては、細胞を遺伝子工学的に処理してCRTH2を発現させることができる。膜は、標準的技術によって回収し、そしてイン・ビトロ結合アッセイに用いることができる。標識したリガンド（例えば、¹²⁵Iで標識したPGD₂）を前記膜に結合させ、そして特異的活性についてアッセイし；そして過剰量の標識していない（冷却）リガンドの存在下で実施した結合アッセイと比較することによって特異的結合を決定する。あるいは、可溶性CRTH2を、組換え的に（recombinantly）発現させ、そして細胞に基づかないアッセイに利用してCRTH2に結合する化合物を同定する。組換え的に発現したCRTH2ポリペプチド又はCRTH2のECD1つ以上を含有する融合タンパク質を、前記の細胞に基づかないスクリーニングアッセイに用いることができる。あるいは、CRTH2のCD1つ以上に相当するペプチド又はCRTH2のCD1つ以上を含有する融合タンパク質を、前記の細胞に基づかないアッセイ系に用いて、前記CRTH2の細胞質部分に結合する化合物を同定することができる。前記化合物は、CRTH2のシグナル変換経路を変化させるのに有用でありえる。細胞に基づかないアッセイでは、当業者に公知の方法によって、前記の組換え的に発現したCRTH2を、固体基質、例えば、試験管、マイクロタイターウェル、又はカラムに結合させる（前出のAusubelらを参照されたい）。次に、前記試験化合物を、CRTH2に結合するそれらの能力に関してアッセイする。

【0037】あるいは、前記結合反応を、溶液中で実施することができる。このアッセイにおいては、標識した成分を放置して、溶液中のその結合パートナーと相互作用させる。標識した成分とその結合パートナーとの間の大きさの違いによって分離が可能な場合は、例えば、結

合していない標識成分は通過可能だが、その結合パートナー又はパートナーに結合した標識成分は通過することができない孔を有するウルトラフィルターを通して、結合反応の生成物を通過させることにより分離を達成することができる。また、分離は、前記標識成分の結合パートナーを溶液から捕獲することができる任意の試薬（例えば、前記結合パートナーに対する抗体、前記結合パートナーと結合する前にリガンドと相互作用することができるリガンド結合タンパク質など）を用いることによって達成することができる。

【0038】或る態様では、例えば、固相（例えば、プラスチックビーズ）に結合した精製 C R T H 2 又はその誘導体、アナログ、断片、若しくはドメインを含有するカラムに、連続的ファージディスプレイライブラリーからのファージを通過させることにより、ファージライブラリーをスクリーニングすることができる。洗浄緩衝液のストリンジェンシーを変化させることにより、C R T H 2 に対して高い親和性を有するペプチドを発現するファージを増加させることができる。前記カラムから単離されたファージは、クローニングすることができ、また、その短いペプチドの親和性は直接測定することができる。オリゴヌクレオチド 1 種以上に対する配列を、C R T H 2 に結合する更に高い親和性に関する試験と組み合わせることができる。どのアミノ酸配列が C R T H 2 に対して最も強力な結合をもたらすかを知る上で、コンピュータモデルを用いて、C R T H 2 と試験化合物との間の分子接触 (contact) を同定することができる。これにより、これらの連絡を模倣する非タンパク質化合物を設計することができよう。このような化合物は、前記ペプチドの活性と同じ活性を有することができ、そして製造するのに低コストで効果的であるという利点を有しつつ、治療上使用することができる。

【0039】この観点の本発明の別の特定の態様では、前記固体支持体が、マイクロタイター皿に結合している C R T H 2 含有膜である。試験化合物と、例えば、ライブラリーメンバーを発現する細胞とを、前記マイクロタイター皿中で、前記ライブラリーメンバーを発現することができる条件下で培養する。前記タンパク質（又は核酸若しくは誘導体）に結合するライブラリーメンバーを回収する。その方法は、Parmly & Smith, 1988, Gene 73:305-318; Fowlkesら, 1992, BioTechniques 13:422-427; PCT 公開 WO 94/18318; 及び本明細書で引用する他の参考文献中に、例として記載されている。

【0040】本発明の別の態様では、C R T H 2 又は P G D₂ と試験化合物との間の相互作用を、イン・ビトロでアッセイすることができる。既知の又は未知の分子について、結合を行わせる条件下で、C R T H 2 核酸、タンパク質、又は誘導体への特異的結合に関してアッセイ

し、続いて、C R T H 2 に特異的に結合する分子を同定する。前記の 2 種類の成分は、種々の方法で測定することができる。一つの方法は、前記成分の一方を容易に検出可能な標識で標識し、それを試験化合物と一緒に結合が起こりうる条件下におき、結合標識成分を非結合標識成分から分離する分離工程を実施し、次に結合成分の量を測定する。或る態様では、C R T H 2 を標識し、そして、結合が発生可能な条件を用いて、試験薬剤に加えることができる。前記試験薬剤の結合は、ポリアクリルアミドゲル分析を用いて前記試験薬剤の存在下又は不在下で形成された複合体を比較することによって決定することができる。

【0041】更に別の態様では、P G D₂ の C R T H 2 に対する結合を、動物モデル中のインタクト細胞内でアッセイすることができる。標識した P G D₂ を、試験化合物と共に及び試験化合物を伴わずに、動物に直接投与することができる。P G D₂ の取り込みを、試験化合物の存在下又は不在下で測定することができる。これらのアッセイに関して、試験化合物を添加しておいた宿主細胞を遺伝子工学的に処理して C R T H 2 及び / 又は P G D₂ を発現させることができる（これは、一時的、誘発的若しくは構成的、又は安定的であることができる）。本発明のスクリーニング方法の目的には、多様な種々の宿主細胞を用いることができ、例えば、以下に限定されるものでなく、組織培養細胞、哺乳動物細胞、酵母細胞、及び細菌を挙げることができる。どのタイプの細胞も、それぞれ長所を有する。本発明のアッセイを実施する上で、好ましいタイプの細胞としては、哺乳動物細胞、例えば、T 細胞又は C R T H 2 を発現する他の細胞、すなわち、脳、胸腺、筋肉、脾臓、皮膚、及び他の組織を挙げることができる。細菌及び酵母は、比較的容易に培養することができるが、哺乳類細胞と異なるタンパク質を処理する。

【0042】或る場合には、機能的 C R T H 2 リガンドが、C R T H 2 と一緒に、熱力学的に安定な複合体を形成せず、従って、安定な 2 量体複合体の形成が要求される 1 次アッセイによって検出できないことがある。しかしながら、前記リガンドは、複合体形成の動態学的測定により検出可能にすることができる。例えば、P G D₂ の C R T H 2 への結合及び D P への結合は、温度並びに Ca²⁺ 及び Mg²⁺ イオンの存在によって、別々に調節されていることが知られている。前記方法としては、例えば、レセプターへ結合するリガンドのオン・レート及びオフ・レートの動態学的測定を挙げることができる。従って、本発明の結合アッセイには、動態学的な研究及び測定も含まれる。

【0043】更に、或る場合には、G タンパク質共役型レセプターの応答が、リガンドへの長時間の露出により低下するか又は脱感受性化されることが観察されている。本発明の更に別の態様では、アッセイを利用して、

C R T H 2 レセプターの前記脱感受性化をブロックする化合物を同定することができ、前記化合物を用いて、C R T H 2 の活性を維持することができる。前記化合物は、P G D₂ 関連障害、例えば、アレルギー性及び炎症性応答障害、例えば喘息の治療に対する治療方法の一部として用いることができる。

【0044】本発明の或る態様において、例えば、熱力学的に安定な複合体の形成への依存性を低くしたアッセイは、シンチレーション近接アッセイ（USP 4568649に記載されている）である。精製した又は部分的に精製したC R T H 2 又はC R T H 2 膜を、シンチラント - 積載固相（例えば、ビーズ）の表面にコートし、そして前記固相を遮断剤、例えば、アルブミン又は血清で処理する。次に、放射能標識（例えば、³³P 標識）した試験化合物を、特異的結合の候補試験化合物が、前記固相上のC R T H 2 へ特異的に結合することが可能になる条件下で、C R T H 2 コートしたビーズと混合する。洗浄して過剰の又は非特異的な結合を除去した後で、標識した試験化合物とC R T H 2 との特異的結合が行われていた場合には、前記放射性標識をシンチラントに密接に近接させて光を放出させ、それをシンチレーション計数器で検出することができる。

【0045】別の態様では、親和性捕獲シンチレーション近接アッセイを使用して、結合を溶液中で実施することができる。このアッセイでは、C R T H 2 を精製し、そして親和性標識、例えばビオチンで標識する。次に、ビオチニル化したC R T H 2 を、溶液結合（solution binding）が発生可能な条件下で、放射能標識した試験化合物と混合する。C R T H 2 と試験化合物との複合体を含むビオチニル化C R T H 2 を、ストレプトアビジンでコートしたシンチラント - 積載ビーズ（Amershamから入手可能）上に捕獲し、そして前記のようにシンチレーション計数器中で計数する。

【0046】走化性アッセイも、1次アッセイとして使用することができる。C R T H 2 タイプのプロスタグランジンレセプターと誘引物質との間の相互作用の1つの生物学的効果は、走化性として知られる工程、すなわち、前記レセプターを発現している細胞の前記の特定の誘引物質への指向的移動の誘発である。本明細書に記載するように走化性アッセイを使用して、前記C R T H 2 レセプターと前記誘引物質P G D₂ との間の相互作用を妨害する化合物を選別することができる。前記走化性アッセイは、高スループットスクリーニング法に適用することができ、従って、1次アッセイとして用いて、C R T H 2 アンタゴニストを同定することができる。走化性による移動をアッセイするための多くの技術が開発されている（例えば、Leonardら、1995、"Measurement of α and β Chemokines", in Current Protocols in Immunology, 6.12.1

- 6.12.28, Coliganら編, John Wiley & Sons, Inc. 1995を参照されたい）。

【0047】或る態様では、例えば、マルチウエル・ボイデン（Boydén）走化性容器内の化学誘引物質勾配を用いて、C R T H 2 を発現する細胞の移動を誘発するP G D₂ の能力を変化させる能力について、化合物を試験することができる。この装置は、典型的には、U字型底部のウェル48個を有する容器を含み、これに、前記化学誘引物質又は化学誘引物質活性に関して試験する化合物を入れる。密閉ガasketで覆われたポリカーボネート膜によって、底部容器と48孔容器の蓋とを分離し、前記膜と前記容器の蓋とにより形成されたウェルに、細胞懸濁液を加える。

【0048】この方法の或る具体例では、C R T H 2 細胞のP G D₂ への誘引を妨げる試験化合物の能力に関して、前記試験化合物に対して競合アッセイを実施する。この方法では、前記ボイデン走化性容器の底部ウェル中に試験化合物を希釈して入れる。この希釈シリーズに、C R T H 2 細胞に対して走化性効果を有することが知られている濃度で、或る一定量のP G D₂ も加える。対照としての少なくともものアリコートは、P G D₂ のみを含む。C R T H 2 を発現している細胞を、10mM - HEPES及び1mg/mLウシ血清アルブミン（Sigma, St. Louis, ミズーリ州）を補足したRPMI 1640中に3~3.5×10⁶細胞/mLで再懸濁し、そして前記容器の上部ウェルに入れる。前記容器を、加湿CO₂ インキュベーター中で、37℃で90~120分間インキュベートする。インキュベーション時間が終了した後に、光学顕微鏡検査によって前記膜フィルターの下方表面上の移動細胞の数を計数する。P G D₂ の走化性活性に対する試験化合物の貢献は、P G D₂ のみを含むアリコートの走化性活性と、試験化合物及びP G D₂ を含むアリコートの走化性活性とを比較することによって測定する。P G D₂ 溶液へ試験化合物を添加した結果、前記膜の下方表面上で検出される細胞数が、P G D₂ のみを含む溶液を用いて検出される細胞数と比較して減少している場合には、C R T H 2 を発現している細胞の走化性活性のP G D₂ 誘発のアンタゴニストが同定される。反対に、P G D₂ 溶液へ試験化合物を添加した結果、前記膜の下方表面上で検出される細胞数が（P G D₂ のみを含む溶液を用いて検出される細胞数と比較して）減少している場合には、C R T H 2 を発現している細胞の走化性活性のP G D₂ 誘発のアゴニストが同定される。

【0049】本発明の方法は、多数の試験化合物の迅速なスクリーニングに対する高スループット様式で、常法どおりに実施することができる。特に、前記方法で用いられる細胞系は、当業者に公知の任意のマルチプルコピフォーマット（例えば、以下に限定されるものでな

く、マイクロタイタープレート、寒天板上のスポンティング、寒天ウェル、チップ上のスポンティングなど)で発現及びアッセイすることができる。同様に、標準的なマルチプル操作技術(例えば、以下に限定されるものではないが、ロボット操縦技術)も、細胞及び/又は試験化合物の多数配置に用いることができる。

【0050】PGD₂のCRTH2との相互作用を変化させる試験化合物の同定の後に、更に2次スクリーニングアッセイを用いて、PGD₂、CRTH2、及びPGD₂-CRTH2シグナリング経路の生物学的活性にお

ける試験化合物の効果について、試験化合物を更に特徴づけることができる。種々のアッセイを、2次選択として適用することができる。前記方法としては、例えば、以下に限定されるものでなく、結合アッセイ、走化性アッセイ、接着アッセイ、細胞内カルシウム移動アッセイ、酸素放出アッセイ、及びアクチン重合アッセイを挙げることができる。前記アッセイの実例を、以下に詳細に示す。

【0051】1次結合アッセイの代わりに又は1次結合アッセイに加えて、結合アッセイを2次アッセイとして実施することができる。或る態様では、1次選別として直接結合アッセイが用いられた場合に、2次選別として競合アッセイを用いることができる。別の態様では、機能的1次選別(例えば、高スループット走化性スクリーニングアッセイ)により同定された化合物に対して、結合アッセイを用いることができる。別の態様では、結合アッセイを用いる1次選別で同定された化合物を、第二タイプの結合アッセイを用いる2次選別において更に分析することができる。例えば、CRTH2親和性カラムアッセイを用いて同定された化合物を、その結合相互作用の動態学的分析によって2次選別において試験することができる。

【0052】走化性アッセイを、2次アッセイとして使用することができる。PGD₂のCRTH2に対する結合を妨害すること又はPGD₂のCRTH2に対する結合を向上することが1次スクリーニングアッセイにより同定された試験化合物は、走化性アッセイを用いて、生物学的活性について試験することができる。前記のように、ケモカインは、細胞タイプ特異的ケモカインレセプターとのそれらの相互作用を介して、細胞の指向的移動を誘発することができ、そしてこの走化性移動を試験するための技術が数多く開発されてきた(例えば、Leonardら、1995、"Measurement of α and β Chemokines", in Current Protocols in Immunology, 6.12.1-6.12.28, Coliganら編, John Wiley & Sons, Inc. 1995を参照されたい)。従って、或る態様では、例えば、マルチウェルボイデン走化性容器中のケモカイン勾配を用いて、或る化合物を、CRTH2を誘

現する細胞移動を誘発するPGD₂の能力を変化させる能力について試験することができる。

【0053】この方法の或る具体例では、1次選別で同定されたPGD₂/CRTH2アンタゴニスト又はアゴニスト試験化合物の希釈シリーズを、前記ボイデン走化性容器の底部ウェル中に入れる。この希釈シリーズに、或る一定量のPGD₂も加える。対照としての少なくとも1つのアリコートは、PGD₂のみを含む。この方法及びアッセイ条件は、前記1次スクリーニングアッセイに記載されているとおりであり、そして光学顕微鏡検査によって前記膜フィルターの下表面上の移動細胞の数を計数する。PGD₂の走化性活性に対する前記アンタゴニスト又はアゴニスト化合物の貢献は、PGD₂のみを含むアリコートの走化性活性と、試験化合物及びPGD₂を含むアリコートの走化性活性とを比較することによって測定する。PGD₂溶液へ試験化合物を添加した結果、前記膜の下表面上で検出される細胞数が、PGD₂のみを含む溶液を用いて検出される細胞数と比較して減少している場合には、CRTH2を発現している細胞の走化性活性のPGD₂誘発のアンタゴニストが同定される。反対に、PGD₂溶液へ試験化合物を添加した結果、前記膜の下表面上で検出される細胞数が(PGD₂のみを含む溶液を用いて検出される細胞数と比較して)減少している場合には、CRTH2を発現している細胞の走化性活性のPGD₂誘発のアゴニストが同定される。

【0054】他の2次アッセイは、反応性酸素種放出アッセイである。CRTH2細胞(例えば、好酸球)のPGD₂誘発活性化の一つの測定基準は、反応性酸素種の細胞内放出である。これは、ルシゲニン(lucigenin)依存化学発光を用いて反応性酸素種放出を測定する反応性酸素種放出アッセイ(又はROS)で試験することができる。この方法では、新鮮な単離好酸球を標準的方法によって調製し、そしてRPMI(10mM-HEPES; 1×Pen/Strep; 0.5%FBS)中2~4×10⁶細胞/mLの濃度で、室温で再懸濁する。使用する直前に、細胞懸濁液1mLを緩衝液9mLに加え、37℃で15分間予め加熱し、そして200mMルシゲニン0.5mLを加える。

【0055】DMSOを含む緩衝液(DMSO/2.5mL緩衝液; 1.5μL)中に試験化合物(10,000×DMSO原液として製造)を希釈し、そして25μL/ウェルの量で白色96ウェル培養プレートに加えて37℃インキュベーター中に放置する。単離した細胞(室温に維持)を、室温の緩衝液で2~4×10⁶細胞/mLに希釈し、そして水浴中で37℃で15分間インキュベートする。15分の時点で、前記細胞懸濁液の10mLに、200mMルシゲニン0.5mL[ビス-N-メチルアクリジニウム硝酸塩; Sigma, St. Louis, ミズーリ州]を加えて混合し、そして100

μL/ウェルの量で、予め加熱したマイクロタイタープレートに加える。前記プレートを5分間37℃に戻し、その時点で刺激物25μLを加える。前記プレートを、ルミノメーター中で8周期に亘って読みとる。試験化合物の発光は、PGD₂のみを含む対照サンプルと比較して、PGD₂の存在下で試験することができる。PGD₂の能力を妨害して、CRTH2細胞内において細胞内反応性酸素種放出をもたらす化合物は、CRTH2アンタゴニストに対する候補である。

【0056】別の2次スクリーニングアッセイは、カルシウム移動アッセイである。細胞内イオン化カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)の上昇は、走化性活性の初期の指標である。実際、後出のカルシウム流動研究において、低レベルのPGD₂でさえ、CRTH2を発現する細胞中で[Ca²⁺]_iの移動を増加させることが示されている。前記カルシウム流出アッセイを2次選別として用いて、PGD₂/CRTH2相互作用のモジュレータを更に特徴づけることができる。細胞内のカルシウムイオン濃度は、PGD₂の存在下で、及び/又は試験化合物の存在下及び不在下で、CRTH2を発現する細胞中で測定することができる。

【0057】カルシウム移動は、フローサイトメトリーによって、及び細胞内にトラップされる蛍光染料で標識することによって検出及び測定することができる。例えば、Indo-1という染料は、カルシウムが結合することにより発光スペクトルに変化が表れる。カルシウムが結合した染料により生成する蛍光の、結合していない染料により生成する蛍光に対する割合を用いて、細胞内カルシウム濃度を推定する。或る態様では、例えば、下記の方法を用いることができる。CRTH2を発現する細胞を収集し、そしてカルシウム流出アッセイを実施する前日に、新鮮な培地中に2×10⁵/mL以下で再懸濁する。細胞を37℃で20～30分を超えない時間インキュベートし、次いで、回転分離(spin down)し、そしてIndo-1 AMを含む新鮮なPTI緩衝液50mL〔ハンクス緩衝液、pH7.2～7.4；10mM-Hepes；1.6mM CaCl₂〕(37℃に予備加熱)中に、1mL当たり1千万の濃度で再懸濁する。細胞を励起させ、そして蛍光計(Photon Technology Corporation, International)を用いて蛍光を測定する。前記読み出しが安定化した後に、時間軸をリセットし、そして特定の時点(例えば20秒)でPGD₂を添加する。応答後、以下の試薬を以下の順序で、キュベット中に入れて、全カルシウムを放出及びキレートする：18% Triton X-100(20μL)、3M トリス(pH8.5, 20μL)、及び0.5M-EGTA(pH8.5, 20μL)。試験化合物の存在下及び不在下で、この実験を繰り返す。試験化合物の不在下では、PGD₂により、15nMのEC₅₀で、CRTH2

を発現する細胞中で[Ca²⁺]_iが増加する。従って、アゴニスト試験化合物の存在下では、EC₅₀がこの値よりも高くなることが予測されるのに対して、アゴニスト試験化合物の存在下では、EC₅₀が減少することが予測される。

【0058】更に別の2次スクリーニングアッセイは、アクチン重合アッセイである。PGD₂のCRTH2との相互作用の別の生物学的効果が、アクチン重合である。従って、アクチン重合アッセイは、本発明の1次スクリーニングアッセイで単離された化合物の活性を特徴づけるための2次選別として用いることができる。或る態様では、アクチン特異的蛍光標識であって、重合化アクチン繊維に結合するニトロベンゾオキサジアゾール(NBD)-ファラシジン(phalloidin)を用いて、アクチン重合をアッセイすることができる。或る具体的態様では、アッセイを以下の通りに実施することができる：細胞調製物を、10mM-HEPES、100/10Pen/Strep、及び0.5%FCSを加えたRPMI1640中に5～10×10⁶細胞/mLで再懸濁する。その細胞懸濁物を、96ウェルU字底ポリプロピレンマイクロタイタープレート中にアリコート(ウェル毎に100μL)する。適当な刺激物50μL(PGD₂若しくは試験化合物、又はPGD₂及び試験化合物の両方)を、8チャンネルピペットを用いて加え、続いて、正確に25秒後に、リソフォスファチジルコリン(0.5mg/mL)、ハンクスの平衡塩類溶液(100μL, 10×)、16%ホルムアルデヒド(800μL)、及びMEOH中の6.6μM-NBD-ファラシジン(100μL)を含む停止溶液50μLを加える。前記プレートを室温で15分間放置する。次に、前記プレートを1000rpmで5分間遠心分離し、上清を払い落とし、そして細胞ペレットを、2%FCS及び0.2%アジ化ナトリウムを加えたPBS250μL中に再懸濁する。次に、FACS特質装置(Caliber instrument)上で各サンプルを読み取る。前方散乱(forward scatter)/側方散乱(side scatter)データを用いて細胞をリンパ球領域にゲート(gate)する。応答は、ベヒクル処理細胞と刺激物処理細胞との間におけるFL-1蛍光の中間値の変化によって測定する。試験化合物は、PGD₂の存在下及び不在下でアッセイして、PGD₂のみを含むサンプルと比較することができる。CRTH2細胞のPGD₂誘発アクチン重合を減少する化合物は、CRTH2アンタゴニストの候補として同定される。

【0059】本明細書に記載のスクリーニングアッセイを使用して、有機化合物、又はペプチド若しくはタンパク質、例えば、PGD₂のCRTH2との相互作用を変化させるものを同定することができる。従って、本発明に従って選別することができる物質には、抗体及び断片

も含まれる。例えば、C R T H 2の細胞外ドメイン(E C D)に結合し、そして天然リガンドによって誘発される活性を阻害するペプチド模倣有機化合物(すなわち、アンタゴニスト)又は天然リガンドにより誘発される活性を模倣するペプチド模倣有機化合物(すなわち、アゴニスト)も選別することができる。更に、C R T H 2のE C D(又はその一部)が共有結合する有機化合物、ペプチド、抗体、又はそれらの断片も、前記天然C R T H 2リガンドと別の方法でP G D₂と結合し、従って、P G D₂を“中和”することができる。

【0060】スクリーニングに用いることができる化合物としては、以下に限定されるものでなく、ペプチド、例えば、可溶性ペプチド〔例えば、以下に限定されるものでなく、ランダムペプチドライブラリーのメンバー(例えば、Lamら, 1991, Nature 354: 82-84; Houghtenら, 1991, Nature 354: 84-86を参照されたい)〕、及びD-及び/又はL-配置アミノ酸から造られたコンビナトリアルケミストリー誘導分子ライブラリー、ホスホペプチド(例えば、以下に限定されるものでなく、ランダム又は部分的に分解した、誘導された[directed]ホスホペプチドライブラリー; 例えば、Songyangら, 1993, Cell 72: 767-778を参照)、抗体(例えば、以下に限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、又は一本鎖抗体、並びにそれらのF A b, F (a b ')₂及びF A b発現ライブラリーフラグメント、及びエピトープ結合性フラグメント)、並びに小型の有機又は無機分子を挙げることができる。

【0061】本発明の或る態様では、H S P R相互作用のモジュレータに関する選別に用いることができる試験化合物の源として、ペプチドライブラリーを用いることができる。多様性ライブラリー、例えば、ランダムの又はコンビナトリアルのペプチド又は非ペプチドのライブラリーを、前記H S Pレセプターに特異的に結合する分子に関して選別することができる。多くの使用可能なライブラリーが当業者に知られており、例えば、化学合成ライブラリー、組換えライブラリー(例えば、ファージディスプレイライブラリー)、及びイン・ビトロ翻訳系ライブラリーを挙げることができる。

【0062】化学合成ライブラリーは、例えば、以下の文献に記載されている: Fodorら, 1991, Science 251: 767-773; Houghtenら, 1991, Nature 354: 84-86; Lamら, 1991, Nature 354: 82-84; Medynski, 1994, Bio/Technology 12: 709-710; Gallopら, 1994, J. Medicinal Chemistry 37(9): 1233-1251; Ohlmeyerら, 50

1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10922-10926; Erbら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-11426; Houghtenら, 1992, Biotechniques 13: 412; Jayawickremeら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1614-1618; Salmonら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11708-11712; PCT公報WO93/20242; 並びにBrenner及びLerner, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5381-5383。

【0063】ファージディスプレイライブラリーは、例えば、以下の文献に記載されている: Scott & Smith, 1990, Science 249: 386-390; Devlinら, 1990, Science, 249: 404-406; Christianら, 1992, J. Mol. Biol. 227: 711-718; Lenstra, 1992, J. Immunol. Meth. 152: 149-157; Kayら, 1993, Gene 128: 59-65; 及び1994年8月18日付PCT公報WO94/18318。

【0064】非ペプチドのライブラリーの例としては、ベンゾジアゼピンライブラリー(例えば、buninら, 1994, proc. natl. acad. sci. USA 91: 4708-4712を参照されたい)を使用に供することができる。ペプチド(peptoid)ライブラリー(Simonら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367-9371)も用いることができる。ペプチド中のアミド官能基を過メチル化して化学的に変形されたコンビナトリアルライブラリーを生成している使用可能な他のライブラリーの例は、Ostreshら(1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11138-11142)により記載されている。

【0065】前記ライブラリーのスクリーニングは、多様な任意の公知方法によって実施することができる。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示した以下の参考文献を参照されたい: Parmley & Smith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol. 251: 215-218; Scott & Smith, 1990, Science 249: 386-390; Fowlkesら, 1992; BioTechniques 13: 422-427; Oldenburgら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5393-5397; Yuら, 1994, Cell 76: 933-945; Staudtら, 1988, Science 241, . 577-580; Bockら, 1992, Nature 355: 564-

566; Tuerkら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6988-6992; Ellingtonら, 1992, Nature 355: 850-852; USP 5096815, USP 5223409, 及び USP 5198346, all to Ladnerら; Rebar & Pabo, 1993, Science 263: 671-673; 及び PCT公報 WO94/18318。

【0066】本発明の別の態様では、標識した PGD₂ をイン・ビトロ翻訳システム、例えば、ウサギ網状赤血球ライセート (RRL) システムに加え、更に、イン・ビトロ初期 (priming) 反応を進行させることによって前記スクリーニングを実施することができる。イン・ビトロ翻訳系ライブラリーとしては、以下に限定されるものでなく、1991年4月18日付の PCT公報 WO91/05058; 及び Mattheakisら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9022-9026 に記載のものを挙げることができる。

【0067】本発明の方法で試験及び同定することができる化合物としては、以下に限定されるものでなく、任意の市販元、例えば、Aldrich (1001 West St. Paul Ave., Milwaukee, ウィスコンシン州 53233)、Sigma Chemical (P.O. Box 14508, St. Louis, ミズーリ州 63178)、Fluka Chemie AG (Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs, スイス連邦共和国 (Fluka Chemical Corp. 980 South 2nd Street, Ronkonkoma, ニューヨーク州 11779))、Eastman Chemical Company, Fine Chemicals (P.O. Box 431, Kingsport, テネシー州 37662)、Boehringer Mannheim GmbH (Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim)、Takasago (4 Volvo Drive, Rockleigh, ニュージャージー州 07647)、SST Corporation (635 Brighton Road, Clifton, ニュージャージー州 07012)、Ferro (111 West Irene Road, Zachary, ルイジアナ州 70791)、Riedel-deHaen Aktiengesellschaft (P.O. Box D-30918, Seelze, Germany)、PPG Industries Inc., Fine Chemicals (One PPG Place, 34階, Pittsburgh, ペンシルバニア州 15272) から得る化合物を挙げることができる。更に、あらゆる種類の天然生成物も本発明の方法を用いて選別すること

ができ、例えば、細菌、真菌、植物、又は動物の抽出物を挙げるができる。

【0068】更に、小型分子試験化合物を含む試験化合物の多様なライブラリーを用いることができる。ライブラリーは、例えば、Specs and BioSpecs B.V. (Rijswijk, The Netherlands)、Chembridge Corporation (San Diego, カリフォルニア州)、Contract Service Company (Dolgoprudny, Moscow Region, ロシア連邦共和国)、Comgenex USA Inc. (Princeton, ニュージャージー州)、Maybridge Chemicals Ltd. (Cornwall PL34 0HW, 英国)、及び Asinex (Moscow, ロシア連邦共和国) から購入することができる。

【0069】また、更に、当業者に公知のコンビナトリアルライブラリー法も利用することができ、例えば、以下に限定されるものでなく、生物学的ライブラリー；空間的なアドレスが可能な平行固相又は液相ライブラリー；脱コンボルーション (deconvolution) が必要な合成ライブラリー法；“1ビーズ1化合物 (one-bead one-compound)” ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を挙げることができる。前記生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるのに対し、他の4種のアプローチが、ペプチド、非ペプチドオリゴマー、又は低分子化合物のライブラリーに適用することができる (Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145)。試験化合物のコンビナトリアルライブラリー (低分子試験化合物を含む) を用いることができ、これは、例えば、Eichler & Houghten, 1995, Mol. Med. Today 1: 174-180; Dolle, 1997, Mol. Divers. 2: 223-236; 及び Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145-167 に記載のとおり生成することができる。

【0070】分子ライブラリーの合成法の例は、当業界内で、例えば、DeWittら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909; Erbら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422; Zuckermanら, 1994, J. Med. Chem. 37: 2678; Choら, 1993, Science 261: 1303; Carrellら, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carrellら, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; 及び Gallo

pら, 1994, J. Med. Chem. 37: 1233 中で見つけることができる。

【0071】化合物のライブラリーは、溶液中に（例えば、Houghten, 1992, Bio/Techniques 13: 412-421）、あるいはピーズ（Lam, 1991, Nature 354: 82-84）、チップ（Fodor, 1993, Nature 364: 555-556）、細菌（USP 5223409）、孢子（USP 5,571,698; 5,403,484; 及び 5,223,409）、プラスミド（Cu 10 lla, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869）、又はファージ（Scott and Smith, 1990, Science 249: 386-390; Devlin, 1990, Science 249: 404-406; Cwirlla, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382; 及び Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222: 301-310）上に存在させることができる。

【0072】前記ライブラリーのスクリーニングは、多 20 様な任意の公知方法によって実施することができる。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを記載した以下の参考文献を参照されたい：Parmley & Smith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol. 251: 215-218; Scott & Smith, 1990, Science 249: 386-390; Fowlkes, 1992; BioTechniques 13: 422-427; Oldenburg, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5393-5397; Yu, 199 30 4, Cell 76: 933-945; Staudt, 1988, Science 241, . 577-580; Bock, 1992, Nature 355: 564-566; Tuerk, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6988-6992; Ellington, 1992, Nature 355: 850-852; USP 5096815, USP 5223409, 及び USP 5198346, all to Ladner; Rebar & Pabo, 1993, Science 263: 671-673; 及び 40 PCT 公報 WO 94/18318。

【0073】前記試験化合物の中で、試験することができる化合物には、プロスタグランジン阻害剤として作用することが当業者に公知の小型有機分子も含まれる。PGD₂のCRTH2との相互作用を変化させる化合物の同定においては、その化合物を、アレルギー性又は炎症性応答を変更する能力に関する試験に対して更に調査することができる。例えば、特に、本発明の方法を経て同定された化合物を、PGD₂関連障害（例えば、アレルギー、喘息、及び炎症）を受けた動物モデル中で、イン 50

・ピボで更に試験することができる。

【0074】コンピュータモデリング及び検索技術によって、PGD₂のCRTH2との相互作用を変化させることができる化合物を同定するか、又は既に同定された化合物を改良することができる。同定されたこのような化合物又は組成物は、その活性部位又は領域を同定する。前記活性部位は、典型的には、リガンド結合部位であろう。前記活性部位は、当業者に公知の方法を用いて同定することができ、例えば、ペプチドのアミノ酸配列から、核酸のヌクレオチド配列から、又は関連する化合物又は組成物とその天然リガンドとの複合体の研究から同定することができる。後者の場合には、化学的方法又はX線結晶画像法（crystallographic method）を用いて、因子上のどの位置に複合体化したリガンドが発見されるかを発見することによって、活性部位を発見することができる。

【0075】次に、前記活性部位（典型的には結合部位）の三次元的幾何学構造を決定する。これは、公知の方法（例えば、完全な分子構造を決定することができるX線結晶画像化）によって実施することができる。一方、固相又は液相NMRを用いて、ある程度の分子内距離を決定することができる。他の任意の構造決定方法も、部分的な又は完全な幾何学構造を得るために用いることができる。幾何学的構造は、複合体化した（天然又は合成）リガンドを用いて測定することができ、これは、決定した活性部位構造の正確性を上げることができる。

【0076】正確さが不完全又は不十分な構造が決定された場合は、コンピュータに基づく数値的モデリングの方法を用いて構造を完全にするか又は精度を改良することができる。認められている任意のモデリング方法を用いることができ、例えば、特定のバイオポリマー（例えば、タンパク質又は核酸）に特異的なパラメーター化モデル、コンピュータによる分子動作の計算に基づく分子力学モデル、熱のアンサンブルに基づく統計学的力学モデル、又は組み合わせたモデルを挙げることができる。ほとんどのタイプのモデルに対して、標準的分子力場（構成する原子及び基の間の力を意味する）が必要であり、物理化学において知られている力場（force field）から選択することができる。不完全な又は正確さに欠けた実験的構造は、これらのモデリング法によって完全な又はより正確な構造をコンピュータによって計算する上の制約として役立てることができる。

【0077】最後に、実験的にモデリングによるか又は組み合わせにより、活性（結合）部位の構造が決定された後で、化合物を変化させる候補を、それらの分子構造に関する情報に沿って、化合物を含むデータベースを検索することによって同定することができる。前記検索は、決定した活性（結合）部位の構造と一致する構造を有し、そして前記活性部位を規定する基と相互作用をす

る化合物を探す。前記検索は、手動であることができるが、コンピュータを援用することが好ましい。この検索により発見される化合物は、有効なCRTH2を変化させる化合物である。

【0078】あるいは、これらの方法を、変化させる既知の化合物又はリガンドから、変化させるより向上した化合物を同定するために用いることができる。新しい構成 (composition) に適用した前記の実験的及びコンピュータによるモデリング方法を用いて、公知化合物の構成を修正させることができ、また、修正の構造的効果を決定することができる。次に、変更した構造を、前記化合物の活性 (結合) 部位の構造と比較して、改良された適合性又は相互作用が得られるか否かを決定する。この方法において、構成における体系的な変化 (例えば、側鎖の変化によるもの) は、迅速に評価して、特異性又は活性が向上した修正された変化させる化合物又はリガンドを得ることができる。

【0079】CRTH2又はPGD₂の活性 (結合) 部位並びに関連するプロスタグランジン及びそれらのアナログの同定に基づく変化させる化合物の同定に有用な更なる実験的及びコンピュータモデリング方法が、当業者に明らかになるであろう。分子モデリングシステムとしては、例えば、CHARMM及びQUANTAプログラム (Polygen Corporation, Waltham, マサチューセッツ州) を挙げることができる。CHARMMは、エネルギーの最小化及び分子力学機能を実施する。QUANTAは、作図 (construction)、グラフィックモデリング、及び分子構造の分析を実施する。QUANTAは、インタラクティブな作図、修正、ビジュアル化、及び分子相互の動作の分析をすることができる。

【0080】特定のタンパク質にインタラクティブな医薬のコンピュータモデリングに関する多くの技術文献が存在する。例えば、Rotivinenら (1988, *Acta Pharmaceutical Fennica* 97: 159-166); Ripka (1988, *New Scientist* 54-57); McKinally and Rossmann (1989, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 111-122); Perry and Davies, *OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design*, pp. 189-193, Alan R. Liss, Inc. 1989; Lewis and Dean (1989, *Proc. R. Soc. Lond.* 236: 125-140及び141-162); 及び、核酸成分に対するモデルレセプターに関して: Askewら (1989, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 1082-1090)。化学薬品を選別及び描画する他のプログラム

も、市販元、例えば、BioDesign, Inc. (Pasadena, カリフォルニア州)、Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, カナダ)、及びHypercube, Inc. (Cambridge, Ontario) から入手することができる。これらは、特定のタンパク質に特異的な医薬への適用を第一に意図しているが、それらは、一度同定されたDNA又はRNAの領域に特異的な医薬の設計に適用することができる。

【0081】CRTH2タンパク質、CRTH2の変異、一部欠失 (truncated)、若しくは欠失 (deleted) 型のポリペプチド及びペプチド断片、及び/又はCRTH2融合タンパク質は、特に限定されるものではないが、抗体の産生、診断アッセイにおける試薬として、PGD₂関連障害の調節に関連する他の細胞遺伝子産物の同定、PGD₂関連障害の治療における薬剤として使用可能な化合物のスクリーニング用アッセイにおける試薬として、種々の用途のために調製することができる。加えて、CRTH2及びPGD₂の相互作用から得られる情報に基づいて、CRTH2受容体分子への循環性 (circulating) PGD₂の正常な結合を阻害するCRTH2のペプチド断片が、インビボ治療用として得られる。

【0082】CRTH2ペプチド、ポリペプチド、及び融合タンパク質は、組換えDNA技術により調製することができる。例えば、蛇行した (serpentine) CRTH2のECDの4つのドメイン1又はそれ以上をコードするヌクレオチド配列を合成又はクローニングし、一緒に連結することにより、CRTH2の可溶性ECDをコードすることができる。4つのECD1又はそれ以上をコードするDNA配列は、直接的に、あるいは、ペプチドスペーサーをコードするリンカーオリゴヌクレオチドを介して、一緒に連結することができる。前記リンカーは、柔軟で、且つグリシンの割合が高いアミノ酸配列をコードし、そのため、連結されたドメインが、CRTH2リガンドと結合可能なコンフォメーションをとることができる。あるいは、ECD内の個々のドメインをコードするヌクレオチド配列を、CRTH2ペプチドを発現するのに用いることができる。

【0083】種々の宿主-発現ベクター系を利用して、CRTH2の適当な領域をコードするヌクレオチド配列を発現させ、前記ポリペプチドを産生することができる。得られるペプチド又はポリペプチドが可溶性誘導体 (例えば、ECDに相当するペプチド; TM及びCDが欠失した一部欠失体又は欠失体) である場合には、前記ペプチド又はポリペプチドは、培養培地から回収することができる。ポリペプチド又はタンパク質が分泌されない場合には、CRTH2産物は、宿主細胞それ自体から回収することができる。

【0084】宿主-発現ベクター系には、その場で (i

n s i t u ; すなわち、細胞膜に固定されて) C R T H 2 又は機能的等価物を発現するように作られた宿主細胞も含まれる。前記発現系からの C R T H 2 の精製又は濃縮は、当業者に周知の方法並びに適当な界面活性剤及び脂質ミセルを用いて達成することができる。しかし、C R T H 2 の構造的及び機能的特性を維持するだけでなく、生物学的活性を評価すること(例えば、薬剤スクリーニングアッセイ)が重要である場合には、前記作出宿主細胞それ自体を用いることができる。

【0085】本発明の目的のために用いることのできる 10 宿主-発現ベクター系には、特に限定されるものではないが、微生物、例えば、C R T H 2 ヌクレオチド配列を含む組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、若しくはコスミド DNA 発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、E. coli、B. subtilis); C R T H 2 ヌクレオチド配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、Saccharomyces、Pichia); C R T H 2 配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系; C R T H 2 ヌクレオチド配列を含む組換えウイルス発現ベクター[例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)、タバコモザイクウイルス(TMV)]を感染させたか、あるいは、組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Ti プラスミド)で形質転換された植物細胞系; 又は哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)若しくは哺乳動物ウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター)を含む 20 組換え発現構築物を担持する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3)が含まれる。

【0086】細菌系においては、発現させる C R T H 2 遺伝子産物の使用意図に基づいて、いくつかの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、C R T H 2 タンパク質の医薬組成物の調製用に、あるいは、C R T H 2 タンパク質に対する抗体の調製用に、前記タンパク質を大量に製造する必要がある場合には、例えば、容易に精製される融合タンパク質産物を高レベルで発現させるベクターが望ましい。このようなベクターには、特に 40 限定されるものではないが、大腸菌発現ベクター p U R 278 (Rutherford, 1983, EMBO J., 2:1791) (C R T H 2 のコード配列を、lacZ コード領域とインフレームで、ベクターに個別に連結し、融合タンパク質製造することができる); 及び p I N ベクター(Inouye 及び Inouye, 1985, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109; Van Heeke 及び Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 264:5503-5509)等が含まれる。また、グルタ

チオン S - トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するのに、p G E X ベクターを用いることができる。一般に、前記融合タンパク質は可溶性であり、溶解した細胞から、グルタチオン-アガロースゲルビーズに吸着させ、遊離グルタチオンの存在下で溶出することによって、容易に精製することができる。p G E X ベクターは、トロンピン又は X a 因子のプロテアーゼ切断部位を含むように設計されており、クローニングされた標的遺伝子産物は、GST 部分から切り離すことができる。

【0087】また、任意の融合タンパク質を、発現させる融合タンパク質に特異的な抗体を利用することにより、容易に精製することができる。例えば、Janknechtらにより記載された系を用いると、ヒトセルライン中で発現させた非変性融合タンパク質を、容易に精製することができる(Janknechtら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8972-8976)。この系では、目的遺伝子のオープンリーディングフレームが、ヒスチジン残基 6 個からなるアミノ末端タグに、翻訳可能に融合するように、前記遺伝子をワクシニア組換えプラスミドにサブクローニングする。組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞由来の抽出物を、Ni²⁺-ニトリロ酢酸-アガロースカラムにロードした後、イミダゾール含有バッファーにより、ヒスチジンタグ付加タンパク質を選択的に溶出する。

【0088】昆虫系においては、外来遺伝子を発現するためのベクターとして、AcNPV (Autographa californica 核多角体病ウイルス)が用いられる。前記ウイルスは、スポドプテラ(Spodoptera frugiperda)細胞中で増殖する。C R T H 2 コード配列を、ウイルスの非本質的領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に個別にクローニングし、AcNPV プロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下におくことができる。C R T H 2 遺伝子コード配列の挿入が成功すると、ポリヘドリン遺伝子の不活化と、非閉塞性組換えウイルス(すなわち、ポリヘドリン遺伝子によりコードされるタンパク質コートを欠失したウイルス)の産生とが生じる。続いて、前記組換えウイルスを用いて、挿入遺伝子を発現させる細胞に感染させる(例えば、Smithら, 1983, J. Virol., 46:584; Smith, 米国特許第 4,215,051 号明細書参照)。

【0089】哺乳動物宿主細胞においては、いくつかのウイルスベースの発現系を利用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合には、目的の C R T H 2 ヌクレオチド配列を、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体[例えば、後期プロモーター及び3部からなる(tripartite)リーダー配列]に連結させることができる。続いて、インビトロ又はインビ

ボ組換えにより、キメラ遺伝子をアデノウイルスゲノム中に挿入することができる。ウイルスゲノムを非本質的領域（例えば、E1又はE3領域）へ挿入することにより、感染宿主中でCRTH2遺伝子産物を発現可能で、発現しうる組換えウイルスが得られるであろう（例えば、Logan及びShenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3655-3659参照）。また、挿入したCRTH2ヌクレオチド配列の効率的翻訳のために、特異的な開始シグナルを必要とすることができる。これらのシグナルには、A 10 T G開始コドン及び隣接配列が含まれる。完全なCRTH2遺伝子又はcDNA（それ自身の開始コドン及び隣接配列を含む）を適当な発現ベクターに挿入する場合には、追加の翻訳制御シグナルを必要としないことができる。しかし、CRTH2Eコード配列の一部のみを挿入する場合には、外来性の翻訳制御シグナル（おそらく、A T G開始コドンを含む）が提供されることが必要である。更に、挿入物全体の翻訳を保証するためには、前記開始コドンは、目的のコード配列のリーディングフレームとインフレームであることが必要である。これらの外 20 来性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、種々の起源（天然物及び合成物の両方）であることができる。発現の効率は、適当な転写エンハンサー因子、転写ターミネーター等を含むことにより、向上させることができる（Bittnerら, 1987, Methods in Enzymol., 153:516-544参照）。

【0090】更には、所望の特定な方法で、遺伝子産物を修飾及びプロセシングしたり、あるいは、挿入した配列の発現を調節する宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物の前記修飾（例えば、グリコシル 30 化）及びプロセシング（例えば、切断）は、タンパク質の機能にとって重要であることができる。種々の宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセシング及び修飾に関して、特徴的且つ特定の機構を有する。発現させる外来タンパク質の正確な修飾及びプロセシングを保証するために、適当なセルライン又は宿主系を選択することができる。従って、一次転写産物の正確なプロセシング、グリコシル化、及び遺伝子産物のリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を用いることができる。前記哺乳動物宿主細胞には、特に限定されるもの 40 ではないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、及びW138の各セルラインが含まれる。

【0091】組換えタンパク質の長期間且つ高収率の製造のためには、安定（stable）発現が好ましい。例えば、先述のCRTH2配列を安定的に発現するセルラインを作出することができる。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを用いるよりもむしろ、選択マーカー、及び適当な発現制御因子（例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル 50

化部位など）により制御されるDNAで、宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAの導入の後、作出細胞を富化（enriched）培地で1～2日間増殖させ、続いて、選択培地に転換することができる。組換えプラスミド内の選択マーカーは、選択に対する耐性を与える。前記選択マーカーは、細胞の染色体中にプラスミドが安定的に組み込まれ、細胞が増殖してフォーカス（focus）を形成する（前記フォーカスは、次に、クローニングし、セルラインまで拡張可能である）のを可能にする。この方法は、CRTH2遺伝子産物を発現するセルラインを作出するのに、有利に使用することができる。前記作出セルラインは、CRTH2遺伝子産物の内在性活性に影響を与える化合物のスクリーニング及び評価において、特に有用であることができる。

【0092】特に限定されるものではないが、いくつかの選択系を用いることができる。例えば、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（Wiglerら, 1977, Cell, 11:223）、ヒボキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska及びSzybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026）、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowyら, 1980, Cell, 22:817）の各遺伝子を、それぞれ、tk⁻、hgprt⁻、又はaprt⁻の各細胞において使用することができる。また、以下の各遺伝子に関する選択に基づいて、抗代謝剤（antimetabolite）耐性を用いることもできる：メトトレキセートへの耐性を与えるdhfr（Wiglerら, 1980, Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567; O'Hareら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527）；ミコフェノール酸への耐性を与えるgpt（Mulligan及びBerg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072）；アミノグリコシドG-418への耐性を与えるneo（Colberre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol., 150:1）；及びハイグロマイシンへの耐性を与えるhygro（Santorreら, 1984, Gene, 30:147）。

【0093】CRTH2のエピトープ又はCRTH2の保存された変異体若しくはCRTH2のペプチド断片のエピトープの1又はそれ以上を特異的に認識する抗体も、本発明に含まれる。前記抗体には、特に限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）、ヒト化若しくはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、Fab発現ライブラリーにより製造される断片、抗イデオタイプ（anti-Id）抗体、及びこれらのいずれかのエピトープ結合断片が含まれる。

【0094】本発明の抗体は、例えば、生物学的試料中

のCRTH2の検出に用いることができ、従って、診断又は予後技術の一部として利用することができ、それによって、異常量のCRTH2に関して患者を検査することができる。CRTH2の変異型を特異的に認識する抗体は、診断又は予後技術の一部として、特に有用であることができる。前記抗体は、例えば、先述の化合物スクリーニング計画に関連して、CRTH2遺伝子産物の活性及び/又は発現における試験化合物の効果を評価するためにも、利用することができる。更に、前記抗体は、後述の遺伝子治療技術に関連して、例えば、正常及び/又は作出したCRTH2発現細胞の評価（患者に導入する前の評価）のために用いることができる。前記抗体は、更に、異常なCRTH2活性の阻害方法として用いることができる。従って、前記抗体は、PGD₂関連障害の治療方法の一部として利用可能である。

【0095】抗体を製造するために、CRTH2、CRTH2ペプチド[例えば、受容体の機能的ドメイン(例えば、ECD、TM、又はCD)に相当するペプチド]、一部欠失したCRTH2ポリペプチド[ドメイン(例えば、TM又はCD)1又はそれ以上が欠失したCRTH2]、CRTH2の機能的等価物、又はCRTH2の変異体を注射することにより、種々の宿主動物を免疫することができる。前記宿主動物には、特に限定されるものではないが、少し例を挙げれば、ウサギ、マウス、ハムスター、及びラットが含まれる。免疫応答を向上させるために、宿主の種に依存して、種々のアジュバンドを用いることができる。前記アジュバントには、特に限定されるものではないが、フロイント(完全及び不完全)、ミネラルゲル(例えば、水酸化アルミニウム)、界面活性物質(例えば、リゾレシチン)、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、KLH(keyhole limpet hemocyanin)、ジニトロフェノール、及び潜在的に使用可能なヒトアジュバント[BCG(bacille Calmette-Guerin)及びCorynebacterium parvum]が含まれる。ポリクローナル抗体は、免疫した動物の血清から得られる抗体分子の不均一な集団である。

【0096】特定抗原に対する抗体の均一な集団であるモノクローナル抗体は、継代セルラインの培養による抗体分子の製造に関して提供される任意の技術によって得ることができる。これらの技術には、特に限定されるものではないが、Kohler及びMilsteinのハイブリドーマ技術(1975, Nature, 256: 495-497及び米国特許第4,376,110号明細書)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら, 1983, Immunology Today, 4:72; Coleら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2026-2030)、及びEBVハイブリドーマ技術(Coleら, 50

1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)が含まれる。前記抗体は、任意の免疫グロブリンクラス(IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、及びそれらの任意のサブクラスを含む)であることができる。本発明のmAbを製造するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボで培養することができる。高力価のmAbの製造のためには、現在のところ、インビボが好適な製造方法である。

【0097】更に、「キメラ抗体」の製造のために開発された技術(Morrisonら, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neubergerら, 1984, Nature, 312:604-608; Takedaら, 1985, Nature, 314:452-454)を用いることができる。前記技術では、適当な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒に、適当な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることにより、キメラ抗体が製造される。キメラ抗体は、種々の部分が種々の動物種に由来する分子(例えば、マウスmAb由来の可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有する分子)である。

【0098】また、単鎖抗体の製造に関して記載の方法(米国特許第4,946,778号明細書; Bird, 1988, Science, 242:423-426; Hustonら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883; 及びWardら, 1989, Nature, 334:544-546)を、CRTH2遺伝子産物に対する単鎖抗体を製造するために、適合させることができる。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖及び軽鎖を、アミノ酸ブリッジを介して連結することにより形成され、その結果、単鎖ポリペプチドが得られる。

【0099】特定のエピトープを認識する抗体断片は、公知技術により製造することができる。例えば、前記断片には、特に限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化により製造することのできるF(ab')₂断片、及び前記F(ab')₂断片のジスルフィド結合を還元することにより製造することのできるFab断片が含まれる。また、Fab発現ライブラリーを構築し(Huseら, 1989, Science, 246:1275-1281)、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同定を行なうことができる。

【0100】CRTH2に対する抗体は、次に、当業者により周知の技術(例えば、Greenspan及びBona, 1993, FASEB J., 7(5):437-444; 及びNissinoff, 1991, J. Immunol., 147(8):2429-2438参

照)により、CRTH2に「よく似た(mimic)」抗イディオタイプ抗体を製造するのに利用することができる。例えば、CRTH2のECDに結合し、且つCRTH2へのメラノコルチンの結合を完全に阻害する抗体を、ECDに「よく似た」抗イディオタイプ(従って、メラノコルチンに結合し、メラノコルチンを中和する)の製造に用いることができる。前記中和性抗イディオタイプ、又はこの抗イディオタイプのFab断片は、治療的養生法において、天然のリガンドを中和し、PGD₂関連障害(例えば、アレルギー性障害及び喘息)を治療

10 するのに用いることができる。
【0101】また、CRTH2活性のアゴニストとして作用することのできる抗CRTH2抗体を製造することができる。前記抗体は、CRTH2に結合し、受容体のシグナル伝達活性を活性化するのである。更に、CRTH2活性のアンタゴニストとして作用する(すなわち、CRTH2受容体の活性化を阻害する)抗体は、PGD₂関連障害(例えば、アレルギー性障害、喘息、及び炎症性障害)の治療に、特に有用であろう。

【0102】可溶性のCRTH2のECD又は融合タンパク質(例えば、融合Ig分子)を発現する、遺伝子工学的に作出された細胞は、インビボに投与することが可能であり、そこで、可溶性分子の供給を担う「バイオリアクター」として機能することができる。前記可溶性CRTH2ポリペプチド及び融合タンパク質は、適当な濃度で発現された場合、CRTH2の天然リガンドを中和又は「掃討(mop up)」するはずである。従って、CRTH2活性の阻害剤として作用し、従って、PGD₂関連障害(例えば、アレルギー性障害、喘息、及び炎症性障害)を治療するのに用いることができる。

【0103】CRTH2は、或るT細胞、脳、胸腺、筋肉、脾臓、皮膚、及びおそらく他の細胞タイプに存在する細胞表面タンパク質であり、マスト細胞及びおそらく他の細胞タイプから放出されるPGD₂に応答するらしい(PGD₂関連障害に関連するシグナルにおける重要な初期段階)。このように、CRTH2は、アレルギー性及び炎症性応答における重要な初期段階であることができる。従って、CRTH2タンパク質、類似化合物、誘導体、及びその断片、並びに、核酸(及びそれに相補的な配列)及び抗CRTH2抗体は、前記PGD₂関連

40 障害の検出及び診断における用途を有する。
【0104】CRTH2及びCRTH2核酸を、慢性、急性、又は異常なアレルギー性及び炎症性応答(例えば、喘息)を引き起こすことのあるPGD₂関連障害の検出、予後、又は診断のアッセイに使用することができる。

【0105】本発明の分子は、アッセイ(例えば、イムノアッセイ)に用いたり、あるいは、CRTH2発現に影響を与える種々の症状、疾病、及び障害を検出、予後、診断、又はモニターするのに、あるいは、それらの

治療をモニターするのに用いることができる。特に、前記イムノアッセイは、免疫特異的な結合が可能な条件下で、患者由来の試料と抗CRTH2抗体とを接触させ、前記抗体により免疫特異的な結合量を検出又は測定することを含む方法により、実施される。特定の観点では、組織切片における前記抗体の結合は、異常なCRTH2局在化又はCRTH2の異常な(例えば、低いか、あるいは、存在しない)レベルの検出に用いることができる。特定の態様では、CRTH2に対する抗体は、CRTH2の存在に関する患者組織又は血清試料のアッセイ(CRTH2の異常レベルは、疾病症状の指標である)に使用することができる。「異常なレベル」とは、障害を有していない個体若しくは体の一部由来の類似試料における存在レベル(あるいは、それを代表する標準レベル)に対して、増加又は減少したレベルを意味する。

【0106】使用可能なイムノアッセイには、特に限定されるものではないが、少し例を挙げれば、例えば、ウエスタンブロット、免疫組織化学ラジオイムノアッセイ、ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫ラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、又はプロテインAイムノアッセイなどの技術を用いる競合及び非競合アッセイ系が含まれる。

【0107】CRTH2遺伝子並びに関連する核酸配列及び部分配列(相捕的配列を含む)は、ハイブリダイゼーションアッセイにも使用することができる。CRTH2核酸配列又はその部分配列(ヌクレオチド少なくとも約8個を含む)は、ハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。ハイブリダイゼーションアッセイは、先述のhspr発現及び/又は活性における異常な変化に関連する症状、障害、又は疾病状態の検出、予後、診断、又はモニターに用いることができる。特に、前記ハイブリダイゼーションアッセイは、ハイブリダイゼーションが可能な条件下で、核酸を含有する試料と、CRTH2DNA又はRNAとハイブリダイズ可能な核酸プローブとを接触させ、得られるハイブリダイゼーションを検出又は測定することを含む方法により、実施される。

【0108】具体的態様では、CRTH2タンパク質、CRTH2RNA、又はCRTH2機能的活性(例えば、PGD₂への結合、抗CRTH2抗体結合活性など)レベルの低下を検出することによるか、あるいはCRTH2のRNA、DNA、又はCRTH2タンパク質において、CRTH2の発現又は活性の低下を起こす突然変異(例えば、CRTH2核酸における転座、CRTH2遺伝子又はタンパク質における切断、野生型CRTH2

H2に対する核酸又はアミノ酸配列の変化)を検出することにより、感染又は悪化障害の間に免疫応答性の減少を伴う疾病及び障害を診断することができるか、又は疑われるそれらの存在を選別することができるか、又は前記障害が発病しやすい素質を検出することができる。前記疾病及び障害としては、以下に限定されるものでなく、アレルギー性及び喘息性障害(例えば、アレルギー性鼻炎、アレルギー性喘息、気管支収縮)、神経学的障害(例えば、睡眠障害、及び体温又は痛み応答の調整における障害)、及び炎症性障害(例えば、慢性関節リウマチ;変形性関節症;炎症性腸疾患;皮膚の障害、例えば、乾癬、湿疹、紅斑、かゆみ症、及びニキビ;発作;並びに再灌流損傷、移植片拒絶、及び自己免疫疾患によって特徴づけられる任意の障害)を挙げることができる。

【0109】例えば、CRTH2のレベルは、免疫アッセイによって検出することができ、CRTH2 RNAのレベルは、ハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、ノーザンブロット、インザイチューハイブリダイゼーション)によって検出することができ、そしてCRTH2 20 活性は、イン・ビボ又はイン・ビトロで結合活性を測定することによってアッセイすることができる。CRTH2核酸における転座、欠失、及び点変異は、サザンブロットティング、FISH、RFLP分析、SSCP、プライマー(好ましくは、CRTH2遺伝子の少なくとも大部分に及ぶ断片を生成するプライマー)を用いるPCR、CRTH2ゲノムDNA又は患者から得られたcDNAの配列などによって検出することができる。

【0110】好ましい態様では、患者サンプル中のCRTH2 mRNA又はタンパク質のレベルを、PGD₂関 30 連障害(例えば、アレルギー性障害、喘息、又は炎症性障害)を持たない対象由来の類似のサンプル中に存在するレベルと比較して検出又は測定することができる。減少したレベルは、その対象が、アレルギー性障害、喘息、又は炎症性障害を、発病するか又は発病しやすい素質を有することを現している。或る具体的態様では、患者サンプル中のhsrpのmRNA又はタンパク質のレベルを、前記障害を持たない対象由来の類似のサンプル中に存在するレベルとと比較して検出又は測定する。前記検出又は測定において、増加したレベルは、その対象 40 が、自己免疫障害を有するか又は自己免疫障害に罹病しやすい素質を有することを現している。

【0111】また、容器1個以上、抗CRTH2抗体、及び、場合により、前記抗体に対する標識化結合パートナーを含む、診断用途用のキットも提供する。あるいは、抗CRTH2抗体を(検出可能なマーカー、例えば、化学発光部分、酵素部分、蛍光部分、又は放射能部分で)標識することもできる。また、1又は複数個の容器中に、CRTH2 RNAとハイブリダイズ可能な核酸プローブを含むキットも提供する。或る具体的態様で 50

は、キットは、1個又は複数個の容器中に、CRTH2核酸の少なくとも一部に適当な反応条件下でプライマーによる増幅[例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(例えば、Innisら、1990、PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, カリフォルニア州を参照されたい)、リガーゼ連鎖反応(EP320, 308を参照されたい)Qβレプリカーゼの使用、環状プローブ反応、又は当業者に公知の他の方法による増幅]をすることが可能な一組のプライマー(例えば、それぞれ、ヌクレオチド数6~30個のもの)を含むことができる。キットは、場合により、容器中に、精製したPGD₂又はCRTH2核酸、タンパク質、それらの誘導体、アナログ、又は断片、あるいは標準又は対照として用いるためのものを更に含むことができる。

【0112】本発明は、PGD₂とCRTH2との相互作用を変化させるための、及びPGD₂関連障害(例えば、以下に限定されるものでなく、アレルギー、喘息、及び炎症)を治療するための方法及び組成物も包含する。正常CRTH2遺伝子生成物の機能が欠損するとPGD₂関連障害表現型が発生することがあるので、CRTH2遺伝子生成物活性の増加又はCRTH2経路の活性化(例えば、下流活性化)は、CRTH2遺伝子発現及び/又はCRTH2活性の不完全なレベルを示す個体において、正常PGD₂関連状態への進行を促進する。

【0113】あるいは、或るPGD₂関連障害の症状は、CRTH2遺伝子の発現及び/又はCRTH2遺伝子活性、及び/又はCRTH2経路のダウンレギュレーション活性のレベルを減少することによって(例えば、下流シグナリングイベントを標的とすることによって)改善することができる。別のアプローチを以下に記載する。或るCRTH2アンタゴニストは、喘息又は炎症などの状態の治療に用いることができる。CRTH2のアゴニストは、前記治療が必要な哺乳動物において、CRTH2活性を刺激するために用いることができる。

【0114】前記化合物の毒性及び治療効果は、細胞培養物又は実験動物における標準的製剤学的手順、例えば、LD₅₀(母集団の50%が致死する投与量)及びED₅₀(母集団の50%において治療上有効な投与量)によって決定することができる。毒性と治療効果との間の投与量率(dose ratio)は、治療指数であり、これは、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を用いることができることもあるが、影響を被っていない細胞に対する潜在的損傷を最小化するように、影響を被っている組織の部位に前記化合物を狙うデリバリーシステムを設計することに注意し、そのことによって副作用を減らすことが好ましい。

【0115】前記細胞培養アッセイ及び動物実験から得たデータは、製剤化する上で、ヒトにおいて使用するた

めの投与量の範囲に用いることができる。前記化合物の投与量は、好ましくは、僅かな毒性又は無毒で、前記 ED_{50} を含む循環性濃度の範囲内である。前記投与量は、この範囲内で、使用する投与形態及び利用する投与経路に応じて変化することができる。本発明の方法で使用する全ての化合物について、治療有効量は、細胞培養アッセイから最初に確立することができる。投与量は、動物モデル中で、細胞培養で決定した IC_{50} (すなわち、症状の最大の半分の阻害を達成する試験化合物の濃度) を含む循環性血しょう濃度範囲を達成するように製剤化

【0116】本発明に従って使用するための医薬組成物は、生理学的に許容することができる担体又は賦形剤 1 種以上を用いて、従来の方法で形成することができる。従って、前記化合物及びそれらの生理学的に許容することのできる塩及び溶媒化合物を、(口経路又は鼻経路の) 吸入又はガス注入、あるいは経口、頬、非経口、又は直腸投与によって投与する目的で製剤化することができ

【0117】経口投与用に、前記医薬組成物を、例えば、薬剤学的に許容することのできる賦形剤、例えば、結合剤 (例えば、予めゼラチン化したトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、又はヒドロキシプロピルメチルセルロース) ; 充填剤 (例えば、ラクトース、微晶性セルロース、又はリン酸水素カルシウム) ; 潤滑剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム)、タルク、又はシリカ) ; 崩壊剤 (例えば、ポテトデンプン又はナトリウムデンプングリコレート) ; 又は浸潤剤 (例えば、ラウリル硫酸ナトリウム) を用いて、従来の方法によって製造された錠剤又はカプセルの形態にすることができる。前記錠剤は、当業者に周知の方法でコートすることができる。経口投与用の液体調製物は、例えば、溶液、シロップ、又は懸濁液の形態にすることができるか、あるいはそれらを、使用前に水又は他の適当なベヒクルと構成する乾燥生成物とすることができる。前記液体調製物は、薬剤学的に許容することのできる添加剤、例えば、懸濁剤 (例えば、ソルビトール、シロップ、セルロース誘導体、又は水素化食用脂肪) ; 乳化剤 (例えば、レシチン又はアラビアゴム) ; 非水性ベヒクル (例えば、アーモンド油、油状エステル、エチルアルコール、又は精留した植物油) ; 及び防腐剤 (例えば、メチル若しくはプロピル - p - ヒドロキシベンゾエート又はソルビン酸) を用いて、従来の方法によって調整することができる。可能であれば、前記調製物は、緩衝液塩、香料、着色料、及び甘味料も含んでいることができる。

【0118】経口投与用の調製物は、前記活性化合物の放出を制御するように、適当に製剤化することができ

る。頬投与用に、前記組成物は、従来の方法で製剤化された錠剤又はロゼンジの形態にすることができる。吸入による投与用に、本発明に従って使用する化合物を、適当な推進剤 (例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、又は他の適当なガスをを用いて、圧縮パック又はネブライザからのエーロゾルスプレー供給という形態で便利に配達する。圧縮エーロゾルの場合には、計測された量を配達するためのバルブを備えることにより、単位投与量を決定することができる。吸入器又は注入器中で使用するための (例えばゼラチンの) カプセル又はカートリッジを、前記化合物と適当な粉末ベース (例えば、ラクトース又はデンプン) との粉末混合物を含んで製剤化することができる。

【0119】前記化合物は、注射による (例えば、ボーラス注射又は継続的注入による) 非経口投与用に製剤化することもできる。注射用調製物は、防腐剤を加えて、単位投与形態で、例えば、アンプル又はマルチ投与容器中に存在させることができる。前記組成物は、油性又は水性ベヒクル中で、例えば、懸濁液、溶液、又は乳液の形態であることができ、また、製剤化剤 (formulatory agent)、例えば、懸濁剤、安定化剤、及び / 又は分散剤を含むことができる。あるいは、前記活性成分は、使用前に適当なベヒクル、例えば、無菌のピロジェン不含水で構成する粉末形態であることができる。

【0120】前記化合物は、直腸組成物、例えば、座剤又は保留浣腸剤 (例えば、従来の座剤基剤、例えば、ココアバター又は他のグリセリドを含む) に製剤化することができる。前記化合物は、前記の製剤に加えて、蓄積 (depot) 調製物として製剤化することもできる。このような長期活性製剤は、移植 (例えば、皮下移植又は筋肉内移植) 又は筋肉内注入により投与することができる。従って、前記化合物は、例えば、適当な重合体の又は疎水性の材料 (例えば、許容することのできるオイル中のエマルジョンとして)、又はイオン交換樹脂を用いて製剤化するか、あるいは、弱可溶性誘導体、例えば、弱可溶性塩として製剤化することができる。

【0121】前記組成物は、所望により、パック又は投薬器 (これは、活性成分を含む単位投与形態を含むことができる) 中に存在させることができる。前記パックは、例えば、金属又はプラスチックホイル、例えば、プリスターパックを挙げることができる。前記パック又は投薬器は、投与に対する指示書を伴うことができる。

【0122】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例 1】本実施例に記載のインビボ及びインビトロアッセイは、CRTH2 に対するキーの内在性リガンド

としてPGD₂を同定する、PGD₂/CRTH2相互作用を特徴付けるものである。CRTH2を発現する300-19細胞(トランスフォームされたプレ-Bリンパ球)を用いて、多数のマスト細胞及び非マスト細胞由来のメディエーターを[Ca²⁺]_i可動性(mobilization)アッセイにおいてスクリーニングした(300-19細胞は、M. G. Rethら、Nature、317(6035)、353-365頁、1985年に開示されている)。本明細書に記載の実験について、CRTH2は、アンピシリン及びネオマイシン耐性マーカーを含み、CMVプロモーターにより駆動されるプラスミド「p3.1プロラックフラッグ(prolactin flag)」から発現させた。プロラックシグナルペプチドが、遺伝子挿入物の膜発現を可能にする。また、発現された分子の好都合な検出を可能とするN末端のFlagペプチドタグを有する。好ましいCRTH2の発現量は、約40,000分子/細胞表面である。

【0123】カルシウム流出(flux)の研究は、PGD₂がCRTH2安定セルラインの[Ca²⁺]_i可動性を15nMのEC₅₀で増加させることを示した。それに比して、PGJ₂はこの試験において200nMのEC₅₀を有しているのに対し、他のプロスタグランジン及びそれらの類似化合物[PGE₂、PGF₂α、BW-245C、及びトロンボキササン擬似物(mimetics)]及びロイコトレン(leukotrenes)は不活性である(300nMを越えるEC₅₀を有する)ことが見出された。

【0124】PGD₂に対するCRTH2の結合親和性を直接測定するために、以下の結合アッセイを用いた。トランスフェクションされた300-19細胞及び親の300-19細胞を、室温においてアッセイバッファで2回洗浄し、2×10⁷細胞/mLの濃度に再懸濁した。96ウェルのU字底ポリプロピレンプレート[Costar、Corning Inc.; 米国マサチューセッツ州アクトン(Acton)]を用いて、アッセイを次のように組み立てた: ビヒクル(アッセイバッファ中0.3%DMSO、全部のウェル)又は30mM冷PGD₂(NSウェル)50μL; 細胞(ウェル当たり10⁶細胞として2×10⁷細胞/mL)50μL; 6nM [³H]-PGD₂50μL。プレートを、遠心処理(2800rpm、Sorval RT6000、5分間、4)前、室温で20分間のインキュベーションに付した。プレートを、Packard Filtermate Cell Harvester(ウェル当たり6×150μLのバッファ洗浄)を用いて、冷アッセイバッファにより集めた(Packard UnifilterプレートGF/C、予め少なくとも1時間3%PEI中に浸漬)。フィルタープレートを一晚乾燥した。シンチレーション流体(Packard Microscint 0)50μLを添加した後、プレートをP

ackard Topcountシンチレーションカウンターで計数した(ウェル当たり1分間)。この結合のIC₅₀値は18nMであると測定された。ラベルされたPGD₂及びラベルされていない「コールドの(cold)」PGD₂の溶液を以下のように調製した: アッセイバッファ-1mL当たり[³H]-PGD₂(Amersham lot#TRK734、162Ci/mmol、メタノール:水:アセトニトリル(3:2:1)中0.1Ci/mL、617nM)10μLを用いて、6nMの濃度の[³H]-PGD₂の溶液(2nMの最終濃度に対して50μL/ウェル)を調製し; コールドPGD₂(Biomol#PG-005、lot#P4653)を10mMのストックとしてDMSO中に溶かした(-20で保存)。この10mMストックを3:1000に希釈し、30mMの最終濃度を得た(10mMの最終濃度に対して50μL/ウェル)。アッセイバッファ: HEPES及び炭酸水素ナトリウムを補充したハanks液(Hank's balanced saline): 10×のハanks液(Ca²⁺、Mg²⁺を含む)100mL; 1MのHEPES10mL/L; 7.5%炭酸水素ナトリウム4.7mL/L。

【0125】図1は、[³H]-PGD₂結合のスキッチャードプロット分析を示している。このデータは、リガンドが、均一集団受容体を有するトランスフェクタントに、K_d=18.1nMで結合したことを示した。受容体濃度は、79,554部位/細胞であると計算された。

【0126】CRTH2に結合し、且つCRTH2を発現する細胞におけるPGD₂反応を刺激するPGD₂の能力を、他のプロスタグランジン及びプロスタグランジン類似化合物の能力と比較した。最初に、プロスタグランジン及び類似化合物を、競合結合研究を用いて、CRTH2への結合に対しPGD₂と競合するそれらの能力について試験した。これらの研究は、試験したプロスタグランジン及び類似化合物の間のアゴニスト能力について次のランクを示した: PGD₂>>PGJ₂>PGF₂=PGE₂>>BW245C。次いで、相対的なカルシウム放出アッセイを実施した。図2は、トランスフェクタントにおける[Ca²⁺]_i可動性へのPGD₂、PGJ₂、PGF₂、PGE₂、及びBW245Cの効果を示している。[Ca²⁺]_i可動性の順序は、図2に示したように、それらの結合親和性の順序に類似している(すなわち、PGD₂>PGF₂a>>BW245C)。

【0127】図2に示すように、ヒト好酸球の[³H]-PGD₂結合部位及び好酸球の機能的応答へのプロスタグランジン及び類似化合物の効果は、同じ順序の能力を有している(すなわち、PGD₂>PGF₂a>>BW245C)。このアゴニストの能力のランク順序は、如何なる公知のプロスタノイド受容体のものとも有意に異なっており、CRTH2とのそれらの相互作用と一致

している(表1参照)。

【0128】ヒトCRTH2と、他のプロスタグランジン受容体、DP、EP1-4、TP、FP、及びIPとのアミノ酸配列アラインメントは、出版物を元にして決定することができる。CRTH2は、DP、EP1-4、TP、FP、及びIP各受容体と30%未満の配列相同性を示す。

【0129】ヒトTリンパ球のPGD₂、マウスMD C、及びマウスmSDFに対する走化性反応もアッセイした。走化性は、48-ウェルBoydenチャンパー [Neuropore、米国メリーランド州キャビンジョン(Cabin John)]、及び3.0μmポリカーボネートフィルターを用いて測定した。細胞を10mMのHEPES及び1mg/mLのウシ血清アルブミン(Sigma、米国ミズーリ州セントルイス)を補*

*充したRPMI1640中に再懸濁(3~3.5x10⁶細胞/mL)させ、チャンパーの上方のウェルに入れた。試験すべき化合物は、下方のウェルに入れた。このチャンパーを、給湿したCO₂インキュベーター中で37において90~120分間インキュベートした。インキュベーション時間の終わりに、フィルター上の移動細胞の数[高倍率範囲(high power field)当たりで発現される]を顕微鏡で計数した。図4及び図5に示すように、抗-CD3刺激T細胞(図4)及び抗-CD3及び抗-CD28-刺激T細胞(図5)は、いずれもPGD₂に特異的に応答する。図6において、ヒト好塩基球のPGD₂及びC5aに対する走化性応答を示している。

【0130】

《表1》

PGD₂及び他のプロスタグランジンの、単離されたヒト好酸球におけるL3H

IPGD₂結合及び機能的応答への効果

リガンド PGD₂結合 ROS⁺放出 走化性 アクチン-重合体^{*} [C A²⁺]_i可動性

	IC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	E
C ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)			
PGD ₂	0.025(4)	0.002(6)	0.003(1)	
	0.004(4)	0.03(4)		
PGJ2	OT	0.075(1)	>0.1(1)	
	1.8(1)	0.13(2)		
PGF2α	1.5(1)	>1(3)	>0.1(1)	
	1.9(1)	>1(1)		
BW-245C	>100(3)	>1(1)	>	
	1(1)??	>1(1)??	>1(1)	
Pa,11b-PGF2	OT	>0.1(2)	>0.1	
	(1)	>1(2)	OT	
PGE1	OT	>0.1(1)	>0.1(1)	

【0131】本発明の実施例(図1)としてスクリーニングを行うことに関して、PGD₂のCRTH2への特異的な結合は、40より室温の方が高い800に留意された1(2)共役型受容体として、CRTH2はGタンパク質を介しそれとは対照的に、PGD₂のDP受容体への特異的反0.1(1)細胞質媒介事象に共役する。興味深いことに、百日咳反応は、室温より40の方が高い。低濃度のリグネシウ40毒素は、PGD₂で媒介される好酸球走化性を阻害し、このことは、CRTH2がおそらくGiと結合していることを示唆した。研究により、CRTH2が、セカンドに阻害することにも留意され活性酸素種、D₂のアクチン重合体、セリン/チロシンリン酸化、カルシウムを利用H2受容体との反応を高めることに関して、5mMのカ

ルシウムイオン又はそのカルシウムイオンは結合可能濃度【0132】は好酸球に答へ、すなわちH2は広範な組織分であり、一般には、1~50mMであり、好ましくは5布を有しており、それは脳、胸腺、筋肉、脾臓、皮膚、及び他の組織で受容体の結合で、CRTH2は、異なる組織において異なる効果を有する可能性がある。す

【0132】 A

【実施例2】以下の実験を繰り返すことによりH2をH2で媒介される炎症反応におけるCRTH2の遺伝子産物及び活性を50活性化し、別の組織では、同一又は別の遺伝子産物又はことができると推定される。

活性をダウンレギュレートする（その特定の細胞型において活性化されるシグナル伝達経路に依存して）可能性がある。

【0134】モルモットの眼に局所的に与えられたPGD₂は、6時間後の攻撃(challenge)の時に、眼圧低下及び微小血管漏れとそれに続く結膜炎(好酸球浸潤、粘液分泌)を引き起こす(Woodwardら、1990年、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 31:38-146)。眼圧低下反応は、BW-245Cによって擬似されたが、一

方、微小血管漏れとそれに続く結膜炎は、BW-245Cでは無反応であった。このことは、炎症性応答が別の受容体、おそらくCRTH2によって媒介されることを示した。

【0135】脈管(vascular)透過性におけるCRTH2で媒介される増加は、細胞性の炎症のキ要素であることができ、この作用は、走化性因子に対するインビボの走化性応答を大いに促進することができる。イヌにおいて、気管注入(instillation)は、1~4時間後の攻撃においてそれらの気管の管腔に好酸球蓄積を引き起こし(Emeryら、1989年、Journal of Applied Physiology 67(3):959-62)、IV注入(infusion)は、循環性好酸球の顕著かつ迅速な減少を引き起こす。これらの全研究において、後PGD₂攻撃で好中球応答に変化はなく、観察は、好中球におけるCRTH2発現の欠如、及びラジオリガンド受容体結合アッセイが精製されたヒト好中球中に2nM[³H]-PGD₂に対する特異的な結合部位を同定できなかった事実と一致する。

【0136】単離されたヒト好酸球に関するインビトロ研究は、[Ca²⁺]_i可動性の活性化、ROS放出、アクチン重合反応、及び走化性が、これらの研究におけるアゴニスト能力のランク順序がCRTH2トランスフェクタントに関する[³H]-PGD₂結合研究からインビトロで得られたものと比較して似ている(実施例1参照)ことから、ほぼ確実にCRTH2を介して媒介されることを証明した。しかしながら、PGD₂による好酸球活性化は、明らかにFP又はTP受容体を介して媒介されるものではない。なぜならば、PGF₂ct又は公

知のトロンボキサン擬似物U46619は、これらのアッセイにおいて何らの活性も示さないからである。好酸球の他に、ヒトの活性化されたT-リンパ球及び好塩基球も、走化性アッセイにおいて、PGD₂に対して応答性があり、他のプロスタノイド又はBW-245Cには応答性がない(図6及び図7参照)。

【0137】ヒト活性化T細胞はPGD₂に

応答すること、及びPGD₂に対する応答にはCD3及びCD28によるT細胞の活性化が必要であることが示された。この反応がTh2細胞にのみ限定されているか否かはまだ

わからない。CRTH2はヒトにおけるTh2に特異的な受容体であることがもともと報告されているが、マウスの研究では、Th2細胞及びTh1細胞のいずれもがCRTH2を発現し、PGD₂に

応答することが示された。これらの研究は、CRTH2発現のパターンに一定の種差がある可能性を示唆している。

【0138】PGD₂は、アレルギー、喘息、及び炎症に関係した他の多くの生物学的効果を有している。例えば、吸入されたPGD₂は、喘息患者に気管支収縮を引き起こさせ、その効果は、PGF₂ct及びヒスタミンより、それぞれ3.5倍及び30倍強力である(Hardyら、1984年、New England Journal of Medicine 311(4):209-13)。この効果は、中枢の気道よりむしろ末梢の気道に優先的である(Wassermanら、1977年、Prostaglandins 13(2):255-69)。吸入されたPGD₂も咳を引き起こし、喘息患者におけるメタコリン及びヒスタミン気道の過剰反応性を強める。ヒトの皮膚に皮内的に投与されたPGD₂は、2時間までの間に強い紅斑形成を引き起こし(Soterら、1983年、Journal of Investigative Dermatology 80(2):115-9)、これは細静脈の透過性の増加を反映している。PGD₂によるアトピー性及び非アトピー性の被験者の鼻内攻撃は、投与量に依存した鼻開存性の減少、及びアレルギー症状(とりわけ、鼻のうっ血、咳、及びのどの痛み)の増大を引き起こし、このようにアレルギー性鼻炎に関連した症状及び病態生理学に擬似する(Soterら、1983年、Journal of Investigative Dermatology 80(2):115-9)。C57/BLマウスにおいて、抗原-及び化合物48/80-誘導された皮膚のかゆみは、PGD₂アンタゴニストにより遮断される。しかしながら、これらの応答の完全な薬理学的特徴付けが欠如しているため、どのプロスタノイド受容体が関与しているか明らかでない。インビボ及びインビトロ研究により、PGD₂による気管支収縮応答は、部分的に、気道平滑筋TP受容体の直接的活性化による(Beasleyら、1989年、Journal of Applied Physiology 66(4):1685-93)か、あるいは、気道副交感神経からのアセチルコリンの前結合的(prejunctional)放出の間接的刺激による(Tamaokiら、1987年、Journal of Applied Physiology 63(4):1396-400)ことがあり得ることが示唆されている。前者は、PGD₂が低い親和性(K_i=75µM)でTP受容体に結合するので、ありそうもないことと思われ;後者は、どのプロスタノイド受容体が関与しているかについての情報を提供していない。

【0139】モジュレーター、すなわち、PGD₂及びCRTH2の相互作用のアンタゴニスト及びアゴニストも、肺性疾患の治療において重要であることができる。PGD₂は、アレルギー、喘息、及び炎症におけるキーとなる媒介物質として機能することができ、マスト細胞によって生産される最も豊富な媒介物質の一つ[ヒスタミン及びペプチドロイコトリエン(peptidoleukotrienes)の他に]であり、そしてアトピー性の喘息患者のBAL及びアレルギー性鼻炎からの鼻洗浄から回収される(Knaniら、1992年、J 10
ournal of Allergy & Clinical Immunology 90(6 Pt 1): 880-9)。さらに、アレルギー性鼻炎及び喘息を持った患者は、商品名ZYRTEC及びSIGULAIRのもとに販売されている薬剤を用いた場合でさえ、鼻のうっ血及び肺性の機能不全の効果的な軽減を得られず、このことは、ヒスタミン及びロイコトレン以外の媒介物質(一種又はそれ以上)が関与していることを示している。抗原誘導され、マスト細胞由来のPGD₂の早期の放出は、アレルギー性の症状に寄与すること、並びに、20
肺中に好酸球、リンパ球、及び好塩基球を補充することにより炎症性の応答を開始することに役割を担うことができる。BAL、及び尿中のPGD₂及びその代謝産物の量も、12時間後の抗原攻撃の後、有意に高められると思われる。従って、PGD₂も、より多量の炎症性の細胞を引き付けることによって、免疫性の反応を維持し及び潜在的に増強することに関与していることができる。

【0140】さらに、速度論的(kinetic)研究により、抗IgEがPGD₂の早期(2~30分間)及び後期(4~6時間)の生産を引き起こし、そのとき前者はCOX-1により制御され及び後者は誘導性COX-2により調節されることが示された(Reddyら、1999年、Biochemical & Biophysical Research Communications 265(1): 205-10)。事実、最近になって、ヒトTh2細胞及び活性化された肺胞マクロファージは、COX-2依存性経路によりPGD₂を合成することが示された(Tamaokiら、1987年、Journal of Applied Physiology 63(4): 1396-400; Mac Dermotら、1984年、Prostaglandins 27(2): 163-79)。免疫組織化学的研究は、喘息患者における、COX-1でなくCOX-2の気管支上皮及び粘膜下組織の細胞性発現の有意な増加を示している(Sousaら、1997年、Thorax 52(11): 940-5)。PGD₂生産の速度(kinetics)は、抗原攻撃された喘息患者に見られる早期相及び後期相の応答により一時的に修正されるので、マスト細胞、Th2細胞、及び活性化された 50

肺胞マクロファージが、後期相においてPGD₂の量を高騰させるのに寄与する細胞種であると考えられる。

【0141】

【実施例3】図3は、PGD₂に近い類似化合物についてのカルシウム流出アッセイ(再度、300-19CRTH2トランスフェクタントを用いて)の結果を示している。

【0142】

【実施例4】《PGD₂アゴニスト及びアンタゴニストのCRTH2への結合を測定するための追加のアッセイ》PGD₂アゴニスト及びアンタゴニスト化合物の結合も、CRTH2-発現L1.2細胞から調製した膜を用いて測定した。膜調製物を作成するために、細胞ペレット10gを冷50mM-TrisHCl(pH7.7)20mL中に再懸濁させ、Polytron組織ホモジナイザーを用いて氷上で3回(各10秒間)ホモジナイズする。次いで、この懸濁液を同じバッファーで80mLまで希釈し、40,000xgで30分間遠心分離する。上澄みを廃棄した後、ペレットを、前記の再懸濁、ホモジナイズ、及び遠心分離を繰り返すことにより、冷80mM-TrisHCl(pH7.7)で一回洗浄する。最後に、ペレットを冷50mM-TrisHCl(pH7.7)20mL中に再懸濁させ、アリコートし、-80℃で保存する。アッセイの当日に、膜を氷上で解凍し、25μLを、96ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルに入れる。次いで、0.5M-MgCl₂5μL及びPVT-WGAシンチレーションプロキシミティー(proximity)アッセイ(SPA)ビーズ(Amersham)10μLを各ウェルに入れ、十分に混合する。次いで、試験すべき化合物5μLを添加し、続いて30nM³H-PGD₂(1:17希釈されたNENから200Ci/mmol)5μLを添加して、結合反応を開始する。次いで、プレートを密閉し、室温で少なくとも1時間インキュベートした後、Wallac MicrobetaTriluxシンチレーションカウンターで計数する。非特異的な結合を、100μMのラベルされていないPGD₂を含有するウェルで測定する。活性な化合物は、CRTH2への結合に対して³H-PGD₂と競合することができ、結合したcpmの数の減少により確認される。

【0143】

【実施例5】《CRTH2における化合物の機能的活性(アゴニスト対アンタゴニスト)を測定するための追加のアッセイ》化合物の機能的活性は、CRTH2を発現するL1.2細胞中でPGD₂により誘導された一時的なCa²⁺流出を遮断することができる能力により測定した。Ca²⁺流出は、FLIPRカルシウムアッセイキット(Calcium Assay Kit)(Molecular Devices)を用いることによりFLIPRで測定する。最初に、リージェントバッファー

(Reagent Buffer) の 1X 溶液を、キットからのコンポーネント (Component) B を 1:10 に希釈し、NaOH で pH を 7.4 に調整することにより調製する。次に、 Ca^{2+} センシングダイ (Sensing Dye) を、キットからのコンポーネント A の 1 ビン (vial) を 1X リージェントバッファ-10 mL 中に溶かすことにより調製する。アッセイの当日に、1X リージェントバッファ-20 mL を、ダルベッコの修正イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Media) (DME 10 M) 20 mL、250 mM プロベネシド 400 μL 、及び Ca^{2+} センシングダイ溶液 1 mL と混合して、アッセイバッファ (Assay Buffer) を調製する。次いで、細胞を 1000 $\times g$ で 5 分間遠心分離することによりペレット化し、約 90% の冷培地を吸引により除去する。次いで、細胞をアッセイバッファ中に 3×10^3 細胞 / μL の濃度に再懸濁し、この懸濁液 60 μL を 384 - ウェルプレートの各ウェルに入れる。この細胞プレートを 5% CO_2 中に 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートし、次いで、試験すべき化合物 5 μL を添加する。次いで、この細胞プレートを、1.4 μM PGD₂ を含有するプレートと共に FLIPR 中に入れる。FLIPR は、自動的に細胞プレートに PGD₂ (最終濃度は 100 nM である) 5 μL を添加し、2 分間にわたって直後の Ca^{2+} 流出を測定する。この Ca^{2+} 流出の生産を阻害することができる化合物はアンタゴニストである。

【0144】

【実施例 6】PGD 環に基づいて、図 9 及び図 10 に示した化合物を、CRTH2 受容体に対する選択性 (DP 30 と比較して) について試験した。アッセイにおいて、各 D 環化合物の ^3H -PGD₂ の結合と競合する能力を、CRTH2 及び DP 受容体の両方で測定し、IC₅₀ 値 (μM) を測定した。対照として、 ^3H -PGD₂ と競合するコールド PGD₂ を用いて、CRTH2 で 0.0107 の IC₅₀ 値を測定し (8 回の実験値)、そして DP 受容体で 0.0234 の値を測定した (7 回の実験値)。実施例 1 の結合アッセイ手順を用いた。好ましくは、DP での IC₅₀ に対する CRTH2 での IC₅₀ の比は、約 20 より小さく、さらに好ましくは約 200 より小さい。40

【0145】化合物 13, 14 - ジヒドロ - 15 - ケト PGD₂; 15 (R) 15 - メチル PGD₂; 及び 15 - デオキシ - デルタ 12, 14, PGD₂ は、とりわけ CRTH2 に対して選択的であった。図 9 及び図 10 に示した化合物は、別のアッセイにおいて PGD₂ アゴニストであることが決定された。

【0146】

【実施例 7】PGF 環に基づいて、図 11 に示した化合物を同様に試験し、CRTH2 受容体に選択的 (DP と比較して) であることが示された。図 11 に示した化合* 50

*物 は、別のアッセイにおいて PGD₂ アゴニストであることが決定された。

【0147】

【実施例 8】PGJ 環に基づいて、図 12 に示した化合物を同様に、CRTH2 受容体に対する選択性 (DP と比較して) について試験した。図 12 に示した化合物は、別のアッセイにおいて PGD₂ アゴニストであることが決定された。

【0148】

【実施例 9】図 13 ~ 図 16 に示した、4 種の化合物 (a) ~ (d) は同様に、CRTH2 受容体に対する選択性 (DP と比較して) について試験した。これらの化合物は、別のアッセイ (実施例 5 参照) において PGD₂ アンタゴニストであることが決定された。

【0149】本実施例の化合物の合成に関して、最初の化合物である図 13 の化合物 (a) は、化学文献 (Sindelar, K. *ら*; Collect. Czech. Chem. Commun., 40, 3530-3544 頁、1975 年) に報告されており、その合成は容易である。図 14 のステロイド化合物のメチルエステル (b) は、調製されている (I. G. Reshetov *ら*, Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci. (英訳)、39; 3.2; 607-609 頁、1990 年; 及び Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.; RU; 3; 687-690 頁、1990 年を参照されたい)。図 15 の化合物 (c) は、C. Menciur *ら*, J. Med. Chem.; 42 (4)、638-648 頁、1999 年に記載と類似の経路を介して合成することができる。図 16 の化合物 (d) は、B. L. Mylari *ら*, J. Med. Chem.; 34; 108-122 頁、1991 年に記載のように合成する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】CRTH2 でトランスフェクトした細胞への [^3H] - PGD₂ 結合のスクッチャードプロット分析の結果を示すグラフである。

【図 2】ヒト好酸球の [^3H] - PGD₂ 結合部位におけるプロスタグランジン及びアナログの効果を示す表である。

【図 3】PGD₂ 誘導体の構造を示す説明図である。

【図 4】ヒト T リンパ球における PGD₂、mMDC、及び mSDF の走化性応答の結果を示すグラフである。

【図 5】ヒト T リンパ球における PGD₂、mMDC、及び mSDF の走化性応答の結果を示すグラフである。

【図 6】PGD₂ 及び C5a に対するヒト好塩基球の走化性応答の結果を示すグラフである。

【図 7】PGD₂ アンタゴニスト IAa-11 及び BW-A868C の構造式を示す説明図である。

【図 8】プロスタグランジン及びアナログの構造を示す説明図である。

【図9】PGD環に基づくPGD₂アゴニストの構造を示す説明図である。

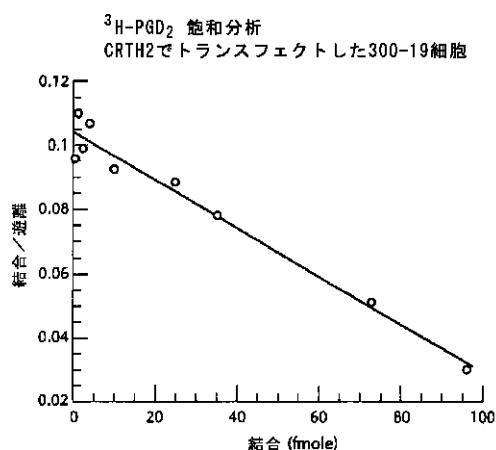
【図10】PGD環に基づくPGD₂アゴニストの構造を示す説明図である。

【図11】PGF環に基づくPGD₂アゴニストの構造を示す説明図である。

【図12】PGJ環に基づくPGD₂アゴニストの構造を示す説明図である。

*

【図1】



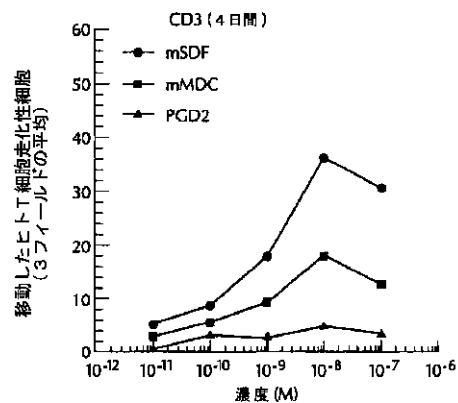
【図2】

ヒト好酸球並びにCRTH2及びDPトランスフェクタントにおける
[³H] PGD₂ 結合結果の比較

	CRTH2 トランスフェクタント IC ₅₀ , μM	ヒト好酸球 IC ₅₀ , μM	DPトランスフェクタント IC ₅₀ , μM
PGD ₂	0.015 (4)	0.025 (4)	0.022 (3)
PGF ₂ α	0.98 (1)	1.5 (1)	8.75 (1)
PGE ₂	1.6 (1)	3.3 (1)	6.76 (1)
BW-245C	>100 (3)	>100 (3)	0.01 (2-3)

【図4】

ヒトCD4 T細胞は、PBMCから単離した後、抗CD3
及び/又は抗CD28で4日間刺激した。走化性アッセイは、
PGD₂、マウスMDC、及びマウスSDFを用いて実施した。

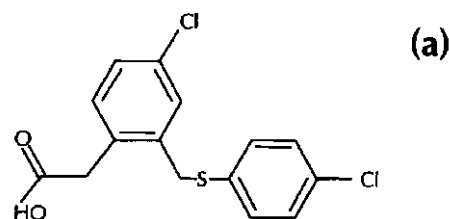


【図3】

構造	化学名	Ca流量アッセイにおけるIC ₅₀
	13,14-ジヒドロ-15 keto-PGD ₂	26 nM
	16,16-ジメチル- PGD ₂	16 nM
	15(S)-15-メチル- PGD ₂	16 nM

同様の条件下。PGD₂ それぞれは約15.2nMでテスト。

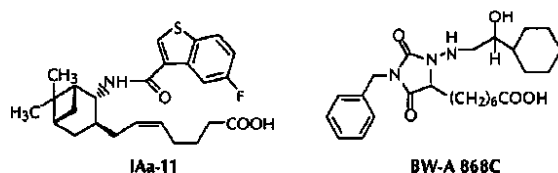
【図13】



[4-クロロ-2-(4-クロロ-フェニルスルファニル)-フェニル]-酢酸
CRTH2 IC₅₀ の DP IC₅₀ に対する比は 1:40 未満である。

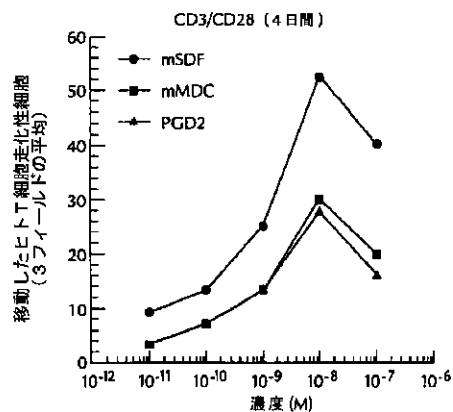
【図7】

PGD₂ アントゴニスト2種の構造



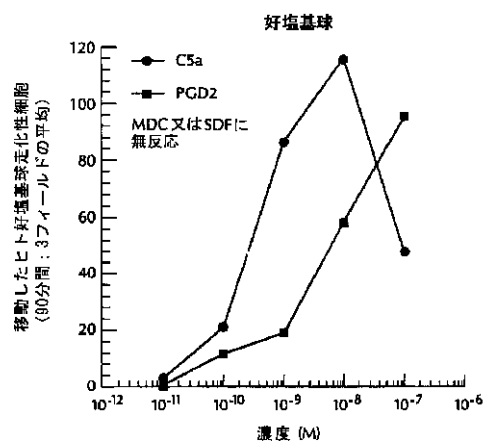
【図5】

ヒトCD4 T細胞は、PBM Cから単離した後、抗CD3及び/又は抗CD28で4日間刺激した。走化性アッセイは、PGD2、マウスMDC、及びマウスSDFを用いて実施した。

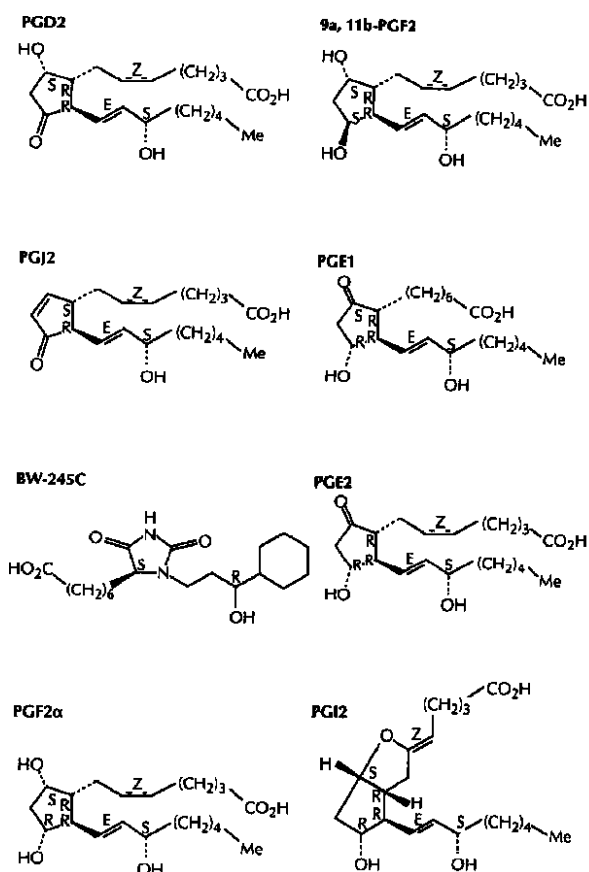


【図6】

PGD2及びCSaに対するヒト好塩基球の走化性応答

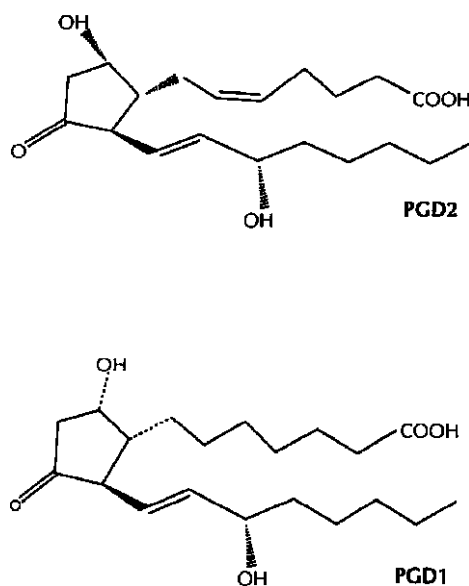


【図8】

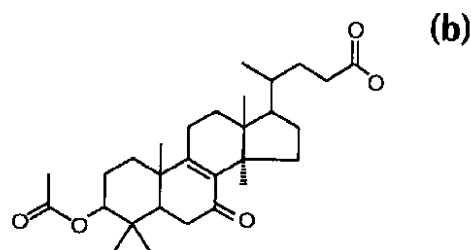


【図9】

PGD 環

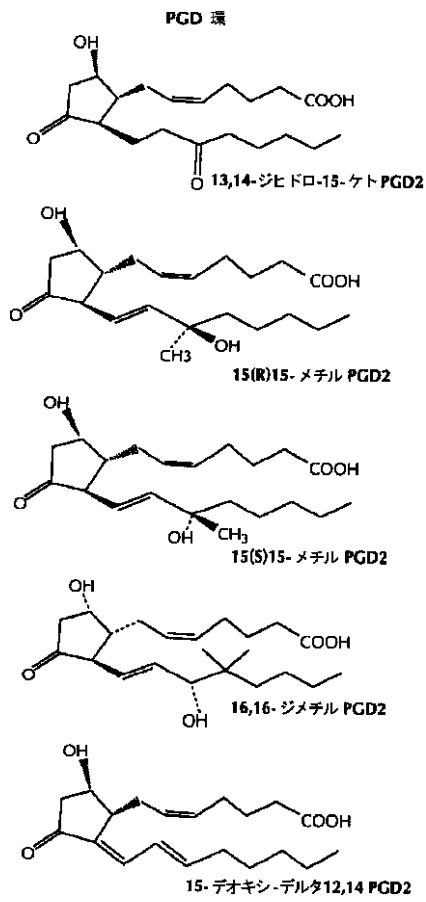


【図14】

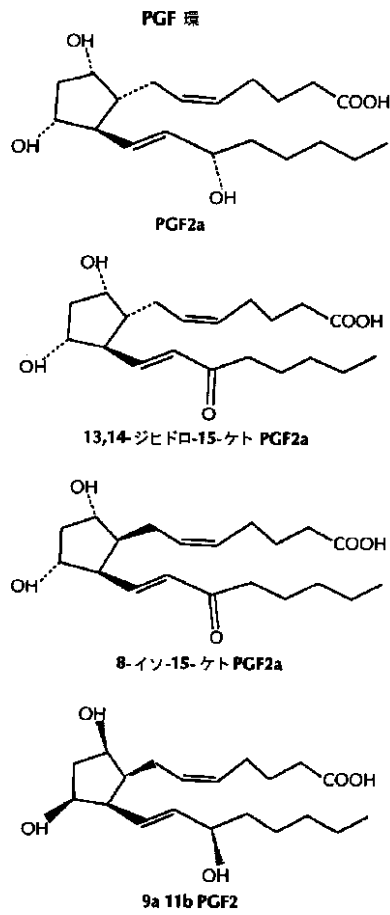


4-(3-アセトキシ-4,4,10,13,14-ペンタメチル-7-オキソ-2,3,4,5,6,7,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-17-イル)-ペンタン酸、CRTH2 IC₅₀のDP IC₅₀に対する比は1:30未満である。

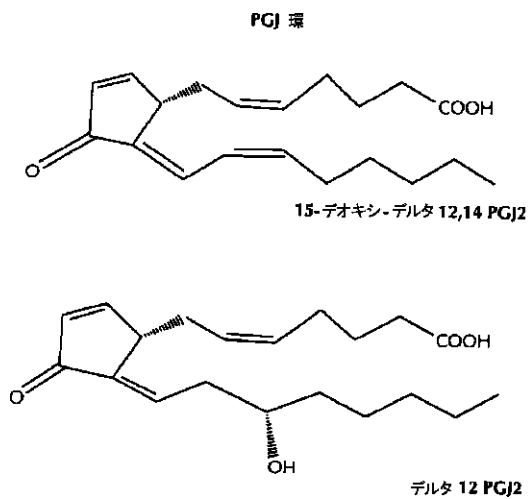
【図10】



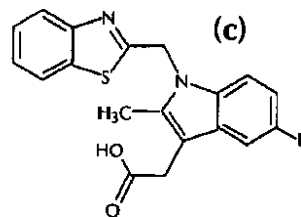
【図11】



【図12】

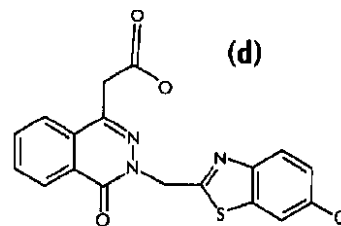


【図15】



(1-ベンゾチアゾール-2-イルメチル-5-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-3-イル)-酢酸
CRTH2 IC_{50} の DP IC_{50} に対する比は1:40未満である。

【図16】



[3-(6-ヒドロキシ-ベンゾチアゾール-2-イルメチル)-4-オキシ-3,4-ジヒドロ-フタラジン-1-イル]-酢酸
CRTH2 IC_{50} の DP IC_{50} に対する比は1:20未満である。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷		識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)	
A 6 1 P	29/00	1 0 1	A 6 1 P	29/00	1 0 1
	37/08			37/08	
C 1 2 Q	1/02		C 1 2 Q	1/02	
	1/68			1/68	Z
G 0 1 N	33/15		G 0 1 N	33/15	Z
	33/50			33/50	Z
	33/53			33/53	D
	33/531			33/531	A
	33/88			33/88	
	37/00	1 0 3		37/00	1 0 3
(72)発明者	カルディーブ シン ネオテ		(72)発明者	ジョン ビン チェン	
	アメリカ合衆国 06340 コネチカット州			アメリカ合衆国 06340 コネチカット州	
	グロトン市 イースタン・ポイント・ロ			グロトン市 イースタン・ポイント・ロ	
	ード (番地なし) ファイザー・グロー			ード (番地なし) ファイザー・グロー	
	バル・リサーチ・アンド・デベロップメン			バル・リサーチ・アンド・デベロップメン	
	ト内			ト内	
(72)発明者	ロナルド ポール グレイデュー		(72)発明者	ポール ハロルド バウアー	
	アメリカ合衆国 06340 コネチカット州			アメリカ合衆国 02476 マサチューセッ	
	グロトン市 イースタン・ポイント・ロ			ツ州 アーリントン市 ハイランド・アベ	
	ード (番地なし) ファイザー・グロー			ニュー 179	
	バル・リサーチ・アンド・デベロップメン		(72)発明者	ジャンスー ツァン	
	ト内			アメリカ合衆国 02131 マサチューセッ	
				ツ州 ロスリンデル市 グレンクリフ・ロ	
				ード 71	
			F ターム(参考)	2G045 AA25 CA11 CB01 DA59 DA80	
				DB07 FB03 FB08 JA20	
				4B063 QA05 QA19 QQ21 QQ43 QQ53	
				QQ79 QQ89 QQ96 QR08 QR41	
				QR42 QR48 QR77 QR80 QS16	
				QS25 QS31 QX02 QX07 QX10	
				4C084 AA17 ZA59 ZA89 ZA96 ZB13	
				ZB15 ZC78	

专利名称(译)	鉴定可用于治疗由前列腺素D2介导的疾病状态的化合物的方法		
公开(公告)号	JP2002098702A	公开(公告)日	2002-04-05
申请号	JP2001206254	申请日	2001-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	バイヨンリー カルディープシンネオテ ロナルドポールグレイデュー ジョンビンチェン ポールハロルドパウアー ジャンスーツァン		
发明人	バイヨン リー カルディープ シン ネオテ ロナルド ポール グレイデュー ジョン ビン チェン ポール ハロルド パウアー ジャンスー ツァン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/192 A61K31/343 A61K31/381 A61K31/4166 A61K31/428 A61K31/5575 A61K31/575 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P11/08 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/10 A61P19/02 A61P25/04 A61P25/20 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/564 G01N33/566 G01N33/88 G01N37/00		
CPC分类号	A61P11/06 A61P11/08 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/10 A61P19/02 A61P25/04 A61P25/20 A61P29/00 G01N33/566 G01N33/88 G01N2500/02		
FI分类号	G01N33/566 A61K45/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/08 C12Q1/02 C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/88 G01N37/00.103		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA11 2G045/CB01 2G045/DA59 2G045/DA80 2G045/DB07 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/JA20 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ21 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS31 4B063/QX02 4B063/QX07 4B063/QX10 4C084/AA17 4C084/ZA59 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZC78		
代理人(译)	小林 浩		
优先权	60/216796 2000-07-07 US 60/257393 2000-12-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种鉴定可用于治疗由前列腺素D2介导的疾病状态的化合物的方法，一种与CRTH2-PGD2相关的疾病的诊断方法以及一种诊断试剂盒。 解决方案：鉴定方法包括使CRTH2样品与PGD2接触并测量PGD2与CRTH2的结合； CRTH2，PGD2的同源样品和适量的测试化合物。 通过将两者接触并测量PGD2与CRTH2的结合来确定PGD2的结合是否受到PGD2的存在的影
响；并比较结果。 包括。 该诊断方法包括测量患者样品中CRTH2基因表达水平或CRTH2依赖PGD2的活性，并将其与健康个体的测量值进行比较。 诊断试剂盒在容器中包含PGD2或其类似物，以及CRTH2多肽，编码CRTH2多肽的核酸或表达CRTH2的细胞。

	CRTH2 トランスフェクタント IC50, μ M	ヒト好酸球 IC50, μ M	DPトランスフェクタント IC50, μ M
PGD2	0.015 (4)	0.025 (4)	0.022 (3)
PGF2 α	0.98 (1)	1.5 (1)	8.75 (1)
PGE2	1.6 (1)	3.3 (1)	6.76 (1)
BW-245C	>100 (3)	>100 (3)	0.01 (2-3)