

(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2008-507980

(P2008-507980A)

(43) 公表日 平成20年3月21日(2008.3.21)

| | | |
|-------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int. Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/25 (2006.01) | C 1 2 Q 1/25 | 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 | |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 | S |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2007-523838 (P2007-523838)
 (86) (22) 出願日 平成17年7月28日 (2005. 7. 28)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年3月7日 (2007. 3. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/026945
 (87) 国際公開番号 WO2006/015195
 (87) 国際公開日 平成18年2月9日 (2006. 2. 9)
 (31) 優先権主張番号 60/592, 501
 (32) 優先日 平成16年7月30日 (2004. 7. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500137976
 アベンティス・ファーマスーティカルズ・
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国ニュージャージー州088
 07. ブリッジウォーター. コーポレイト
 ドライブ55
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100105290
 弁理士 三輪 昭次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸

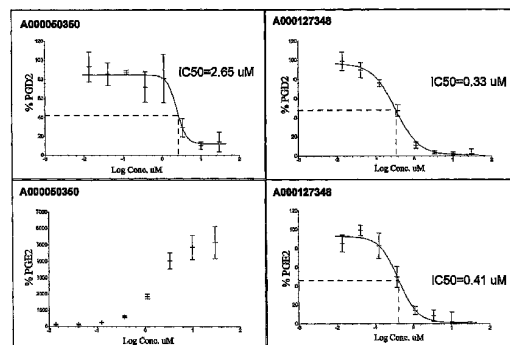
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造血管型プロスタグランジンD2合成酵素の効力、特異性および毒性を決定する方法

(57) 【要約】

本発明は、造血管型プロスタグランジンD2合成酵素 (hPGDS) の活性を減少させる、または阻害するそれらの能力に関して化合物および物質を分析するための、新規で有用な方法に関する。具体的には、本発明は、hPGDS阻害剤の効力、特異性および毒性を測定するための分析に関する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物細胞における h P G D S 阻害化合物の効力、特異性および毒性をスクリーニングする方法であって、次の段階：

- i) 該哺乳動物細胞と、アラキドン酸の放出を増加させる刺激分子とを接触させ、
 - ii) 該哺乳動物細胞を、化合物で処理し、
 - iii) 該哺乳動物細胞またはその上清における P G D 2 のレベルを測定し、
 - iv) 該哺乳動物細胞における P G D 2 のレベルと、該化合物で処理されていないコントロール哺乳動物細胞における P G D 2 のレベルとを比較して、該化合物の効力を決定し、
 - v) 該哺乳動物細胞における P G E 2 のレベルを測定し、
 - vi) 該哺乳動物細胞における P G D 2 のレベルと P G E 2 のレベルとを比較し、ここで、P G D 2 のレベルが P G E 2 のレベルより低いという結果は、化合物が h P G D S に特異的な阻害活性を有することを示すものとし、
 - vii) 化合物で処理された哺乳動物細胞の細胞毒性の量と、コントロール哺乳動物細胞の細胞毒性の量を測定し、処理された哺乳動物細胞における細胞毒性レベルと、コントロール哺乳動物細胞における細胞毒性レベルとを比較し、ここで、化合物で処理された細胞における細胞毒性の結果は、細胞増殖の阻害の指標であるものとする、
- を含む、上記方法。

10

【請求項 2】

哺乳動物細胞は、肥満細胞、抗原提示細胞、巨核球、および T H 2 リンパ球からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

哺乳動物細胞は、ラット好塩基球性白血病 (R B L) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

刺激分子は、カルシウムイオノフォア、イオノマイシン、ホルボールエステル、増殖因子、サイトカイン、発癌プロモーター、およびカルシウムチャンネル動員分子からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

カルシウムイオノフォアは、A 2 3 1 8 7 である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

カルシウムチャンネル動員分子は、B A Y K - 8 6 4 4 である、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 7】

刺激分子は、アラキドン酸である、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化合物および物質を、造血器型プロスタグランジン D 2 合成酵素 (h P G D S) の活性を減少させる、または阻害するそれらの能力に関して分析するための、新規で有用な方法に関する。具体的には、本発明は、h P G D S 阻害剤の効力、特異性および毒性を測定するための分析法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

プロスタグランジンは、多様な生物学的作用を有するエイコサノイドの一種である。プロスタグランジンは、心臓血管系、血小板凝集に対する薬理効果、胃腸系、腎臓機能および尿生成に作用する平滑筋に対する効果、中枢神経系、内分泌系に対する効果、代謝に対する効果を有し、炎症および免疫反応において重要な役割を果たすことが示されている。従って、プロスタグランジンは、広範な治療上の有用性を有する可能性を示す。プロスタグランジンはアラキドン酸から合成され、アラキドン酸の鎖の一部を形成していた炭素原子の 5 員環を有する。典型的には、プロスタグランジンは、局所的に、すなわちそれらの

50

合成部位の近傍で作用する。

【0003】

プロスタグランジンD₂ (PGD₂)は、気道アレルギー性疾患の主要な媒介物質である抗原の攻撃に応答して活性化された肥満細胞によって生産される主要なプロスタノイドである。特に、PGD₂は、とりわけ、気管支収縮、気管支過敏性、鼻充血、ならびに好酸球およびTH₂細胞の浸潤を引き起こす。また、抗原によって刺激された肥満細胞および好塩基球から放出されたPGD₂は、喘息における即時型過敏性、気道炎症、またはリモデリングを誘発すると考えられている。

【0004】

酵素プロスタグランジンD合成酵素 (PGDS)は、プロスタグランジンH₂ (PGH₂)の、PGD₂への変換を触媒する。2種のPGD₂合成酵素が既知である。第一は、主に中枢神経系で見出されるリポカリン型 (L-PGDS)であり、第二は、主に末梢組織で見出される造血管型PGDS (hPGDS)である。L-PGDSはグルタチオン (GSH)非依存性であるが、一方、hPGDSはGSH依存性である。その上、L-PGDSとhPGDSとの構造的な相同性はほとんどない。

10

【0005】

PGD₂は炎症において重要な役割を果たすため、それらの生産を阻害することが可能な化合物をスクリーニングするための分析を開発しようとする試みがなされてきた。特に、PGD₂合成阻害剤は、アレルギー性鼻炎、喘息の治療、さらに場合によっては慢性閉塞性肺疾患 (COPD)の治療に有用である可能性がある。また、その治療用途は、多発性硬化症、アルツハイマー病、および虚血再灌流傷害、脳腫瘍によって引き起こされる障害の治療ならびにプロスタグランジンで調節される生物学的プロセスにおける治療用途に拡大される可能性がある。

20

【0006】

化合物または物質の、PGD₂の生産を減少させる、阻害する、強化する、または調節する能力を決定するために、高圧液体クロマトグラフィー (HPLC)、酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA) (または酵素免疫検査法 (EIA)として知られている)、または、ラジオイムノアッセイ (RIA)のような技術を用いて、PGD₂の生産量を定量することができる。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

これまでに、効力、特異性および毒性の評価は、異なる実験パラダイムに分けられてきた。さらに特異性の測定は生化学分析において最も適しているが、多くの場合細胞中に存在する複雑な生物学的状態は模倣できなかつた。従って、同じ実験サンプルからのPGDSモジュレーターの効力、特異性および毒性を測定する細胞ベースの分析を設計することが望ましい。このような設計は、一般的に二次スクリーニングを必要とする工程を短縮し、さらに、インピボでの細胞状態により密接に関連した情報を提供することになる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、hPGDSモジュレーターに関し、効力、特異性および細胞毒性を同時に評価することができる、単一の細胞ベースの分析を確立する。hPGDSの活性を調節する化合物は、炎症の治療、および免疫応答の薬理的な処置のための新規の治療アプローチを提供する。このような分析の設計は、hPGD₂が発現されるあらゆる哺乳動物細胞系に使用するのに適しており、例えば肥満細胞、抗原提示細胞、巨核球、およびTh₂リンパ球である。本発明において、哺乳動物細胞は、アラキドン酸の放出を高める刺激分子で処理される。本発明で意図される分子は、カルシウムイオノフォア、例えばA₂₃₁₈₇、イオノマイシン、ホルボールエステル、増殖因子、サイトカイン、発癌プロモーター、またはカルシウムチャンネル動員分子、例えばBAY K-8644である。特定の一実施形態において、アラキドン酸は、細胞に直接添加してもよい。

40

50

【0009】

hPGDSを調節する化合物をスクリーニングするのに用いられる細胞を試験化合物および刺激分子で処理して、アラキドン酸の放出を誘導する。試験化合物の存在下で、PGD2の生産レベルを測定し、試験化合物で前処理していない場合のPGD2レベルと比較する。試験化合物の効力を測定することに加えて、本発明は、上記細胞ベースの分析系に一体化された、特異性および細胞毒性の測定を提供する。これは、PGE2に関する第二の計測値を評価することによって設計される。例えば、試験化合物がhPGDS活性を特異的に阻害する場合、その試験化合物は、PGE2に関するIC50より有意に低いPGD2に関するIC50を発生させることになる。それに対して、試験化合物が非特異的であるか、または、細胞毒性である場合、その試験化合物は、PGD2とPGE2とで類似したIC50値を発生させることになる。追加の細胞毒性試験を用いて、これらの値が、試験化合物の毒性によるものなのか、またはプロスタノイド合成の非特異的な阻害によるものなのかを決定することができる。

10

【0010】

本発明の上記の形態およびその他の形態、特徴および利点は、添付の図を共に参照しながら、以下の詳細な説明によりさらによく理解できると思われる。

【0011】

図面の簡単な説明

図1は、特異的なPGD2阻害剤と、非特異的なPGD2阻害剤とを区別するための細胞ベースの分析の結果を示す。化合物A000050350は、RBL細胞におけるPGD2生産を特異的に阻害するが、それに対して、化合物A000127348は、RBL細胞におけるPGD2生産とPGE2生産の両方を非特異的に阻害する。

20

図2は、細胞毒性の評価を示すグラフであり、これは、セルタイター96アクオス・ワン・ソリューション・セル・プロリフェレーション・アッセイ(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)を用いて、数種の濃度のPGDS試験化合物で処理したラット好塩基球形白血病(RBL)細胞の細胞増殖を測定することによってなされた。

【0012】

本発明は、造血器型PGD2合成酵素(hPGDS)を調節する化合物をスクリーニングするための細胞ベースの分析に関する。本分析は、生きた細胞中で試験化合物の効力、特異性および毒性を評価する。本発明は、多くの炎症性疾患を治療するための薬物として使用可能な阻害化合物の同定を可能にし、このような炎症性疾患としては、例えば、これらに限定されないが、喘息、アレルギー性鼻炎、COPD、多発性硬化症、アルツハイマー病、および虚血再灌流傷害により生じたその他の障害が挙げられる。

30

【0013】

本発明は、概して、単一の細胞ベースの分析中で、hPGDS活性を調節する試験化合物の効力、特異性および細胞毒性を測定するために用いられる細胞ベースの分析に関する。測定は、迅速に行うことができ、さらに、規模を大きくして多種の様々な化合物を同時に試験することができる。

【0014】

分析することができる化合物に関して格別な限定はない。例としては、小分子量化学分子、合成低分子化合物のライブラリー、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドライブラリー、細胞抽出物、および培養上清が挙げられる。

40

【0015】

本発明では、hPGDSを発現する哺乳動物細胞系であればどのような哺乳動物細胞系を用いてもよい。例えば、これらに限定されないが、肥満細胞、抗原提示細胞、巨核球、およびTh2リンパ球が挙げられる。加えて、ラット好塩基球形白血病(RBL)のような哺乳動物細胞系を用いてもよい。さらなる例としては、ヒトやマウスのような異なる種の一次肥満細胞、または異なる種のT細胞サブタイプが挙げられる。本発明では、hPGDSまたは改変hPGDSを、発現または過剰発現するように加工された細胞も包含され

50

るものとする。

【0016】

選択された哺乳動物細胞は、アラキドン酸の放出を高める刺激分子で処理される。本発明での使用に包含されるものとする分子は、カルシウムイオノフォア、例えばA23187、イオノマイシン、ホルボールエステル、増殖因子、サイトカイン、発癌プロモーター、およびカルシウムチャンネル動員分子、例えばBAY K-8644である。本発明のその他の特定の実施形態において、アラキドン酸は、選択された哺乳動物細胞に直接添加してもよい。

【0017】

本発明において効力を測定するために、細胞を試験化合物で処理し、続いて刺激分子を添加してアラキドン酸の放出を高める。刺激分子と様々な濃度の試験化合物で処理した細胞中のPGD2の生産レベルを測定する。これらのレベルと、刺激で処理したが試験化合物に暴露させていない細胞で生産されたPGD2のレベルとを比較する。

10

【0018】

本発明はまた、同じ細胞ベースの分析に、特異性および細胞毒性を測定する能力を提供する。これは、プロスタノイド生産の第二の計測値（例えば細胞上清中のPGE2のレベル）を評価することによって設計される。試験化合物がhPGDS活性を特異的に阻害する場合、その試験化合物は、PGE2に関するIC50より有意に低いPGD2に関するIC50を発生させることになる。それに対して、試験化合物が非特異的であるか、または細胞毒性である場合、その試験化合物は、PGD2とPGE2とで類似したIC50値を発生させることになる。非特異的な阻害が、試験化合物の毒性によるものなのかどうかを決定するために、追加の細胞毒性分析は、上述の細胞ベースの分析と同じサンプルを用いてその後に行ってもよいし、または上述の細胞ベースの分析と同じ条件を用いて別々に行ってもよい。細胞増殖の阻害の結果は、試験された化合物の標的外の活性の測定と考察される。

20

【0019】

本発明で使用可能な細胞毒性分析としては、これらに限定されないが、MTS、MTTおよびLDH分析のような分析が挙げられ、いずれも、例えばプロメガ(Promega)から市販されている。

【0020】

化合物のPGD2のレベルを調節する能力は、単に阻害化合物の存在下と非存在下で測定を行うだけでなく、それらの様々な濃度で測定を行うことによっても決定される。様々な化合物濃度で測定を行うことによっても、そのIC50のような特定の特徴を計算することが可能である。IC50は、化合物が50%阻害を引き起こす濃度と定義される。逆に言えば、本発明の分析は、閾値下の量の刺激分子を用いることによる、または刺激分子を用いないことによる、PGD2生産を刺激する化合物に関する分析に、容易に修正可能である。

30

【0021】

また当然ながら、本発明の分析はまた、単一点分析として行い、1種だけの濃度の試験化合物を用いて、PGD2およびPGE2生産に対する化合物の阻害を評価してもよい。単一点のスクリーニングとIC50決定はいずれも、ハイスループットスクリーニングに適している。ハイスループットスクリーニングシステムは、市販されている（例えば、ザイマーク社(Zymark Corp., ホプキントン, マサチューセッツ州); エアー・テクニカル・インダストリーズ(Air Technical Industries, メンター, オハイオ州); ベックマン・インスツルメンツ社(Beckman Instruments, Inc., フラトン, カリフォルニア州); プレシジョン・システムズ社(Precision Systems, Inc., ナティック, マサチューセッツ州)などを参照)。これらのシステムは、典型的には、全てのサンプルおよび試薬のピペティング、液体の分配、時間制御されたインキュベーション、および分析に適した最終的な検出器におけるサンプルの読み取りなどの全手順を自動化している。これらの設定可

40

50

能なシステムは、ハイスループットおよび迅速なスタートアップ、同様に、高度のフレキシビリティおよびカスタマイゼーションを提供する。このようなシステムの製造元は、様々なハイスループット分析のための詳細なプロトコールを提供する。

【0022】

P G D 2 および P G E 2 の濃度を測定する方法は当技術分野でよく知られている。例えば、高圧液体クロマトグラフィー (H P L C)、ガスクロマトグラフィーマスマスペクトロメトリー (G C - M S)、酵素結合免疫吸着検査法 (E L I S A) (また、酵素免疫検査法 (E I A) としても知られている)、ラジオイムノアッセイ (R I A s)、および蛍光偏光法 (F P) が挙げられる。また、シンチレーション近接分析も、P G D 2 および P G E 2 レベルの測定において有用であり得る。

10

【0023】

本発明は、本明細書で説明されている特定の実施形態による範囲に限定されない。実際に、本明細書で説明されているものに加えて、本発明の様々な改変が、当業者であれば前述の説明と添付の図から明白になると予想される。このような改変は、添付の請求項の範囲内にあるものとする。

【0024】

本明細書で引用された全ての参考文献は、それらの全体を参照により本明細書に組み入れられる。

【0025】

〔実施例〕

20

実施例 1 : カルシウムイオノフォアでの細胞処理ならびに試験化合物およびコントロール化合物とのインキュベート

この実施例において、R B L - 2 H 3 細胞 (アメリカン・ティッシュ・カルチャー・センター (A m e r i c a n T i s s u e C u l t u r e C e n t e r) から入手) を、トリプシン処理 (10 % ウシ胎仔血清、L - グルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシンが添加された調製 M E M 培地 (ギブコ (G i b c o) 11095 - 080) 中の 0.05 % トリプシン E D T A) して、単一細胞の懸濁液にした。96 ウェルプレート中に、R B L 細胞を 2×10^4 細胞 / ウェルで蒔いた。プレートを 37 °C で一晩インキュベートした。

30

【0026】

H B S S 緩衝液 (ギブコ / インビトロジェン (I n v i t r o g e n) 14025 - 092) を、基準化合物または試験化合物に含まれる D M S O の最高濃度に等しい D M S O (シグマ (S i g m a) D - 8779) で希釈した。使用前に、化合物プレートと基準コントロールを融解し、よく混合した。この実施例において、C O X - 1 阻害剤 S C 560 を基準として使い、ケイマン・ケミカル (C a y m a n C h e m i c a l) から購入した。

【0027】

試験化合物と基準 S C 560 の希釈液は、以下に示す E I A テンプレートに従って、コースター (C o s t a r) (3960、またはそれと同等のもの) 分析ブロックを用いて製造した。カラム 1 のウェル (ブランク、T A = 総活性、N S B = 非特異的な結合、および、B o = バックグラウンド)、ならびにカラム 2 および 3 は、細胞の処理には用いずに、E I A 分析のための標準を充填した。コントロール 1、2、5 および 6 は、カルシウムイオノフォアを含むが化合物を含まないポジティブコントロールである。コントロール 3、4、7 および 8 は、カルシウムイオノフォアまたは化合物を含まないネガティブコントロールである。

40

【0028】

【表 1】

| EIA コントロール | 標準 | 標準 | 化合物 1 | 化合物 2 | 化合物 3 | 化合物 4 | 化合物 5 | 化合物 6 | 化合物 7 | SC560 コントロール | コントロール |
|-----------------|---------------|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|-----------------|
| ブランク | 1000 pg/ml | 1000 pg/ml | 30 μ M | 30 μ M | 30 μ M | 30 μ M | 30 μ M | 30 μ M | 30 μ M | 濃度 1 | コントロール 5 +Ca |
| TA | 500 pg/ml | 500 pg/ml | 10 μ M | 10 μ M | 10 μ M | 10 μ M | 10 μ M | 10 μ M | 10 μ M | 濃度 2 | コントロール 6 +Ca |
| NSB | 250 pg/ml | 250 pg/ml | 3 μ M | 3 μ M | 3 μ M | 3 μ M | 3 μ M | 3 μ M | 3 μ M | 濃度 3 | コントロール 7 -Ca |
| Bo | 125 pg/ml | 125 pg/ml | 1 μ M | 1 μ M | 1 μ M | 1 μ M | 1 μ M | 1 μ M | 1 μ M | 濃度 4 | コントロール 8 -Ca |
| コントロール 1 +Ca | 62.5 pg/ml | 62.5 pg/ml | 300nM | 300nM | 300nM | 300nM | 300nM | 300nM | 300nM | 濃度 5 | |
| コントロール 2 +Ca | 31.3 pg/ml | 31.3 pg/ml | 100nM | 100nM | 100nM | 100nM | 100nM | 100nM | 100nM | 濃度 6 | |
| コントロール 3 -Ca | 15.6 pg/ml | 15.6 pg/ml | 30nM | 30nM | 30nM | 30nM | 30nM | 30nM | 30nM | 濃度 7 | |
| コントロール 4 -Ca | 7.8 pg/ml | 7.8 pg/ml | 10nM | 10nM | 10nM | 10nM | 10nM | 10nM | 10nM | 濃度 8 | |

10

【0029】

試験化合物を以下のように希釈した：HBSS（DMSO非含有）1mlを、分析ブロックのウェルA4～A10〔30 μ M〕に添加した。HBSS（0.3% DMSO含有）620 μ lを、ウェルB4～B10からH4～H10に添加した。化合物ストック3 μ l〔10 mM〕を、ウェルに30 μ Mで添加した。よく混合した。A列〔30 μ M〕からB列〔10 μ M〕の310 μ lを添加した。よく混合した。上述のようにして希釈を続け、以下の濃度〔30、10、3.3、1.1、0.37、0.12、0.04、および、0.014 μ M〕を作製した。

20

【0030】

基準SC560を以下のように希釈した：HBSS（DMSO非含有）1mlを、ウェルA11に添加した。HBSS（0.3% DMSO含有）620 μ lを、ウェルB11～H11に添加した。予め希釈したストック3 μ l〔1 mM, 100% DMSO中〕を、ウェルA11に添加した〔3 μ M〕。よく混合した。ウェルA11〔3 μ M〕からウェルB11〔1 μ M〕に310 μ lを添加した。よく混合した。希釈を続け、以下の濃度〔3 μ M、1 μ M、0.33 μ M、0.11 μ M、0.037 μ M、0.012 μ M、0.0041 μ M、および、0.0013 μ M〕を作製した。

30

【0031】

カルシウムイオノフォア（A23187シグマ番号C-7522）とメトキシム化試薬（methoximate reagent）（ケイマンのキット番号512011の説明に従って製造）を添加するための自動化した細胞の処理を、ザイマークのサイクロン・デッキ（SciClone Deck）を用いて設計した。

【0032】

以下に概略を説明するように、本発明の自動化（A）プロトコールは、多数の工程を手動（M）で行うことが必要である。

40

【0033】

（A）オーバーナイト培地（overnight media）を除去し、HBSS緩衝液200 μ lで1回洗浄した。細胞からHBSS緩衝液を除去し、プレートに従って、200 μ l/ウェルの希釈した化合物とコントロールで置換した。（M）カバーをして、細胞プレートを37 に戻した。15分間インキュベートした。細胞プレートのカバーをはずし、デッキに戻した。（A）ポジティブコントロールを含む200 μ lの細胞処理物のウェルに、20倍濃度10 μ lを添加した。ここで、ネガティブコントロールウェルには、カルシウムイオノフォアの添加がないことに留意。（M）空のチップボックスを除

50

去し、デッキ位置 B 2、B 3 および B 4 に 200 μ l チップで置き換えた。(M) カバーをして、細胞プレートを 37 $^{\circ}$ C に戻した。15 分間インキュベートした。(M) プレートを 1000 x rpm で 5 分間遠心分離した。細胞プレートのカバーをはずし、デッキに戻した。(A) 上清 25 μ l を回収し、PGD2-MOX EIA キット(ケイマン番号 512011、またはそれと同等のもの)に従って、MOX 試薬 25 μ l で(1:1 の比率)化学的にメトキシ化した。以下の実施例を参照。(M) MOX 分析プレートのカバーをして、60 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。(M) 追加の分析プレートを、PGE2 解析のために回収される上清用にデッキ位置 D 2、D 3 および D 4 に置いた(A) 残存する上清 175 μ l を回収して、PGE2 に関して評価した。メトキシ化された(PGD2 について)、およびメトキシ化されていない(PGE2 について)上清は、-80 $^{\circ}$ C で 3 ヶ月まで保存することができる。

10

【0034】

実施例 2 : プロスタグランジン D 2 レベルの定量化 : 酵素免疫検査法

この実施例において、PGD2 の濃度を、酵素免疫検査法(EIA)を用いて測定した。PGD2 を測定するための EIA は、商業的に入手可能である。例えば、PGD2 EIA キットは、ケイマン・ケミカルより入手可能である。

【0035】

この分析は、限られた数の PGD2-MOX 特異的ウサギ抗血清結合部位に関する、PGD2-メトキシ(methoxime)(MOX)と、PGD2-MOX-アセチルコリンエステラーゼ(AchE)結合体(PGD2-MOX トレーサー)との競合に基づく。PGD2-MOX トレーサーの濃度は一定に保たれるが、PGD2-MOX の濃度は変動するため、ウサギ抗血清に結合することができる PGD2-MOX トレーサーの量は、ウェル中の PGD2-MOX の濃度に反比例する。このウサギ抗血清-PGD2-MOX 複合体は、予めウェルに結合させたマウスモノクローナル抗ウサギ IgG に結合する。プレートを洗浄した後、エルマン試薬(AchE に対する基質を含む)をウェルに添加した。その酵素生成物は、412 nm で強く吸光する明瞭な黄色であった。この色の強度は、ウェルに結合した PGD2-MOX トレーサーの量に比例し、インキュベート中にウェル中に存在する遊離の PGD2-MOX の量に反比例する。

20

【0036】

EIA と洗浄緩衝液を、市販の説明書に従って作製した。サンプルを前述の実施例に従って製造した。プロスタグランジンレベルは変動する可能性があるため、上清を EIA 緩衝液で希釈して、標準曲線の直線範囲内のプロスタグランジンレベルを得た。全般的に使用する PGD2 の希釈率は、1:12.5 であった。

30

【0037】

製造元の説明書に従って、メチルオキシ化試薬、PGD2-MOX 発現 EIA 標準、PGD2-MOX AchE 発現 トレーサー、PGD2-MOX 発現抗血清、および PGD2-MOX 発現 EIA メトキシ化コントロールを調製した。製造元の説明書に従って分析を行い、412 nm の波長でプレートを読んだ。

【0038】

8 種の濃度の試験化合物で処理した細胞のプロスタグランジンレベルを決定した後、化合物濃度の対数スケールに対するプロスタグランジンレベルの片対数プロットを行うことによって、化合物の IC50 を得た。また、この分析は、1 種だけの化合物濃度を用いて PGD2 生産に対する化合物の阻害を評価する単一点分析として行ってもよい。

40

【0039】

実施例 3 : プロスタグランジン E 2 レベルの定量化

この実施例において、PGE2 濃度を、酵素免疫検査法(EIA)を用いて測定した。PGE2 を測定するための EIA は、商業的に入手可能である。例えば、PGE2 EIA キットは、アッセイ・デザインズ(Assay Designs)より入手可能である。PGE2 EIA は、PGE2 に特異的なマウスモノクローナル抗体を用いた。溶液中の遊離の PGE2 は、既知の量の PGE2 トレーサーと競合して、限られた量の抗 PGE2 抗

50

体と結合する。PGE₂トレーサーは、PGE₂とアセチルコリンエステラーゼとの結合体である。次に、ヤギ抗マウスIg抗体を用いて抗PGE₂抗体を固定した。次に、固定した抗体を、アセチルコリンエステラーゼの基質を含むエルマン試薬で展開させた。この反応によって生成した生成物は黄色を有し、412nmで強く吸光した。高濃度のPGE₂が存在する場合、PGE₂が、トレーサーに打ち勝つことになり、得られたサンプルは、412nmで弱い吸光度を有するものとなる。逆に、低い濃度のPGE₂が存在する場合、トレーサーが、PGE₂に打ち勝つことになり、得られたサンプルは、412nmで強い吸光度を有するものとなる。この分析を行う際、412nmでの吸光度を、既知の濃度のPGE₂の吸光度の標準と比較した。

この分析は、当業者によって、例えばザイマークのサイクロン・デッキを用いることによって自動化様式に容易に変換することもできる。

【0040】

実施例4：特異的な化合物と非特異的な化合物とを区別するための、PGD₂およびPGE₂の定量化

この実施例は、特異的な化合物と非特異的な化合物とを区別するために上記のPGD₂およびPGE₂細胞ベースの分析がどのようにして用いられるかを示す。図1で示されるように、化合物A00050350は、PGD₂阻害に関して2.65μMのIC₅₀値を生じるが、PGE₂の阻害では示さなかったことから、A00050350は、有力で特異的なPGD₂合成阻害剤であることを示唆した。それに対して、化合物A000127348は、PGD₂とPGE₂に関して類似のIC₅₀値(それぞれ0.33μMおよび0.41μM)を生じたことから、A000127348は、非特異的な化合物、または、細胞毒性の化合物であることを示唆した。それに続く細胞毒性試験により、化合物A000127348は、試験条件下で細胞増殖に影響を与えることが確認された。

【0041】

この実施例において、細胞ベースの分析の場合と同じ条件下で(ただしA23187を添加しなかったことを除く)、RBL細胞をPGDS化合物で45分間処理した。起り得る細胞毒性を、セルタイター96アクオス・ワン・ソリューション・セル・プロリフェレーション・アッセイ(MTS)(プロメガ, マディソン, ウィスコンシン州, カタログ番号G3582)で決定した。この分析を、製造元の説明書に従って行った。

【0042】

0.01μM~30μMの範囲の8種の濃度の各化合物の細胞毒性を決定した。試験濃度は、0.014μM、0.041μM、0.123μM、0.370μM、1.111μM、3.333μM、10μM、および30μMであった(図2を参照)。化合物A000127348、およびその他のPGDS化合物、A000123383は毒性であり、同じプロット中に示された多数の非毒性の試験化合物と区別された。ポジティブコントロールとして、ゲネチシンを用いた。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】特異的なPGD₂阻害剤と、非特異的なPGD₂阻害剤とを区別するための細胞ベースの分析の結果を示す。

【図2】細胞毒性の評価を示すグラフである。

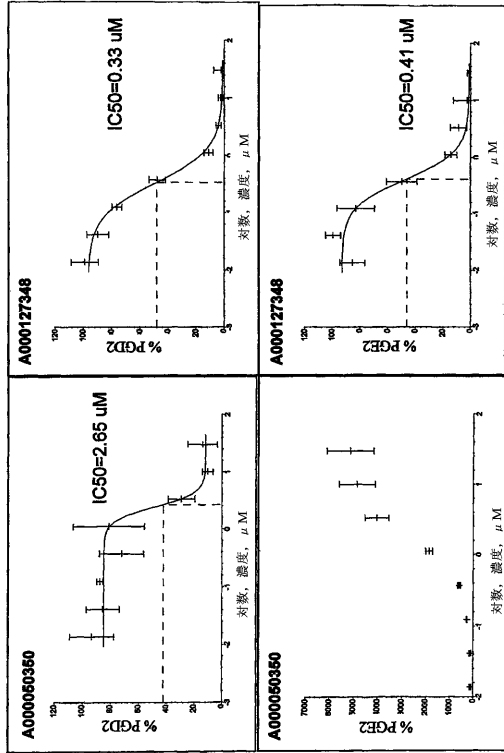
10

20

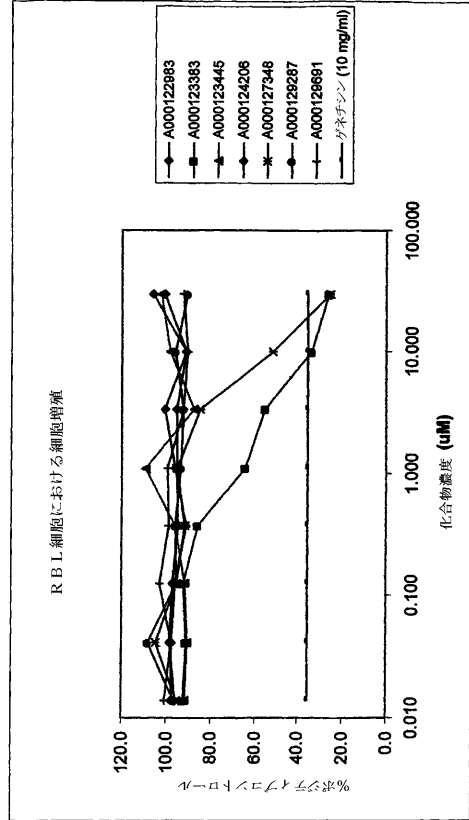
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2005/026945

| | | |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC 7 C12Q1/533 G01N33/573 G01N33/88 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC 7 C12Q G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | CA 2 503 674 A1 (INSTITUTE OF MEDICINAL MOLECULAR DESIGN, INC) 15 April 2004 (2004-04-15) Test example 8 | 1-7 |
| A | US 2004/082021 A1 (LI ZHUYIN ET AL) 29 April 2004 (2004-04-29) page 2, paragraph 14-18; example 2 | 1-7 |
| A | KANAOKA Y ET AL: "HEMATOPOIETIC PROSTAGLANDIN D SYNTHASE" PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES AND ESSENTIAL FATTY ACIDS, CHURCHILL LIVINGSTONE MEDICAL JOURNALS,, GB, vol. 69, no. 2/3, 2003, pages 163-167, XP009019772 ISSN: 0952-3278 page 165, left-hand column | 1-7 |
| -/-- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the International search | | Date of mailing of the International search report |
| 26 October 2005 | | 07/11/2005 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Hennard, C |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/026945

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | <p>CIPOLLONE F ET AL: "Balance between PGD synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans" ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY 2004 UNITED STATES, vol. 24, no. 7, 20 May 2004 (2004-05-20), pages 1259-1265, XP002351016 ISSN: 1079-5642 page 1261, last sentence - page 1262, first paragraph</p> | 1-7 |
| A | <p>MURAKAMI YOUSUKE ET AL: "Inhibition of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation by retrovirally transfected prostaglandin D synthase." ARTHRITIS AND RHEUMATISM. OCT 2003, vol. 48, no. 10, October 2003 (2003-10), pages 2931-2941, XP002351017 ISSN: 0004-3591 page 2933, left-hand column</p> | 1-7 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/026945

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| CA 2503674 | A1 | 15-04-2004 | |
| | | AU 2003268735 A1 | 23-04-2004 |
| | | GB 2410025 A | 20-07-2005 |
| | | WO 2004031180 A1 | 15-04-2004 |
| US 2004082021 | A1 | 29-04-2004 | NONE |

フロントページの続き

(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, LT, LU, LV, 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, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100106769

弁理士 新井 信輔

(74)代理人 100128543

弁理士 犬山 広樹

(72)発明者 ヤン・カウ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . ルイスドライブ 8

(72)発明者 ジェフリー・エス・サーボル

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . パートランドドライブ 2 4

(72)発明者 スティーヴン・エアーズ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 0 8 5 スウィーディズバラ . ロビンズランウエスト 1 9 9

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ61 QQ95 QR20 QR77 QS31

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 确定造血器官前列腺素D2合酶的效力，特异性和毒性的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2008507980A | 公开(公告)日 | 2008-03-21 |
| 申请号 | JP2007523838 | 申请日 | 2005-07-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 安万特制药公司莱特每次 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 每次Aventis制药公司的股份有限公司莱特 | | |
| [标]发明人 | ヤンカウ ジェフリー・エス・サーボル スティーヴン・エアーズ | | |
| 发明人 | ヤン・カウ ジェフリー・エス・サーボル スティーヴン・エアーズ | | |
| IPC分类号 | C12Q1/25 C12Q1/02 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/5094 G01N33/5008 G01N33/5014 G01N33/5047 G01N33/88 | | |
| FI分类号 | C12Q1/25 C12Q1/02 G01N33/53.S | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA18 4B063/QQ61 4B063/QQ95 4B063/QR20 4B063/QR77 4B063/QS31 | | |
| 优先权 | 60/592501 2004-07-30 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及测定化合物和试剂降低或抑制造血前列腺素D2合酶 (hPGDS) 活性的能力的新的和有用的方法。具体而言，本发明涉及用于测量hPGDS抑制剂的效力，特异性和毒性的测定法。[选型图]图1

