

(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2014-508150

(P2014-508150A)

(43) 公表日 平成26年4月3日(2014.4.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
<b>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 13/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-553969 (P2013-553969)	(71) 出願人	511019546
(86) (22) 出願日	平成24年2月21日 (2012.2.21)		フィブロスタチン ソシエダ リミターダ
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月30日 (2013.8.30)		FIBROSTATIN, SOCIEDA
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/052923		D LIMITADA
(87) 国際公開番号	W02012/113785		スペイン国 E-46005 バレンシア
(87) 国際公開日	平成24年8月30日 (2012.8.30)		セー/ コンデ デ アルテア 8-7
(31) 優先権主張番号	61/444, 872	(74) 代理人	100105957
(32) 優先日	平成23年2月21日 (2011.2.21)		弁理士 恩田 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100068755
(31) 優先権主張番号	61/469, 945		弁理士 恩田 博宣
(32) 優先日	平成23年3月31日 (2011.3.31)	(74) 代理人	100142907
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 本田 淳
(31) 優先権主張番号	61/473, 411		
(32) 優先日	平成23年4月8日 (2011.4.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 疾病を治療および診断する方法

## (57) 【要約】

本発明は、慢性腎疾患、免疫複合体仲介GN、関節リウマチ、および肺線維症の診断および/または治療の方法、およびそのような治療的使用のための化合物の同定方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

肺線維症（PF）を治療するために、77 kD GPBPのインヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、PFを治療する方法。

## 【請求項 2】

前記PFが非特発性PFである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

慢性腎疾患（CKD）を治療するために、77 kD GPBPのインヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、CKDを治療する方法。

## 【請求項 4】

免疫複合体仲介GNを治療するために、77 kD GPBPのインヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、免疫複合体仲介GNを治療する方法。

## 【請求項 5】

前記免疫複合体仲介GNが、IgA腎症、全身性エリテマトーデス（SLE）およびグッドパスチャー症候群からなる群から選択される自己免疫疾患と関連がある、請求項4に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記対象者がヒトである、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記77 kD GPBPインヒビターが、77 kD GPBPに結合する抗体である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記抗体が、77 kD GPBPアイソフォームに対する選択性を有する、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項7または8に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記GPBPインヒビターが、一般式X1-SHCIX2-X3（配列番号2）で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み、ここで：

X1は、配列ATTAGILATL（配列番号3）の0～10アミノ酸であり；

X2は、EまたはQであり；かつ

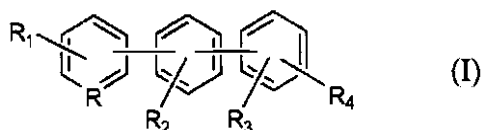
X3は、配列LMVKREDSWQ（配列番号4）の0～10アミノ酸である；

請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記GPBPインヒビターが式（I）：

## 【化 1】



の化合物、またはその薬学的に許容できる塩を含み、ここで：

Rは、NおよびCR<sub>5</sub>から選択され；

R<sub>5</sub>は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>アルキニル、ハロ（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル）、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、ハロ（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ）、アミノ、（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル）アミノ、ジ（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル）アミノ、ヒドロキシ（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル）、（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ）C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、アミノ（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル）、スルファニル（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル）、（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル）スルファニル（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル）、-（CH<sub>2</sub>）<sub>1-5</sub>-C（O）（C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ）、-（CH<sub>2</sub>）<sub>1-5</sub>-C（O）NH<sub>2</sub>、

10

20

30

40

50

(アリアル)  $C_2 \sim C_6$  アルキル、および (ヘテロアリアル)  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され；

$R_1$  は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、ヒドロキシ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、アミノ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、または ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) であり；

$R_2$  は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、ヒドロキシ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、ホルミル ( $C_0 \sim C_6$  アルキル)、アミノ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、( $C_1 \sim C_6$  アルキル) スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ 、(アリアル)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、または (ヘテロアリアル)  $C_1 \sim C_6$  アルキル であり；

$R_3$  は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、ヒドロキシ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、ホルミル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、アミノ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、( $C_1 \sim C_6$  アルキル) スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH(C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)N(C_1 \sim C_6$  アルキル) $_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、 $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、(アリアル)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、または (ヘテロアリアル)  $C_1 \sim C_6$  アルキル であり；かつ

$R_4$  は、ヒドロキシ、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、ベンジルオキシ、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH(C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)N(C_1 \sim C_6$  アルキル) $_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、 $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、 $-O(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-O(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、(アリアル)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、または (ヘテロアリアル)  $C_1 \sim C_6$  アルキル である；

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 1 2】

関節リウマチ (RA) または肺線維症 (PF) を診断する方法であって、

(a) RA または PF の危険性のある対象者由来の血漿試料を、77 kD GPBP への GPBP - 結合分子の選択的結合を促進する条件下で、77 kD GPBP に結合する GPBP - 結合分子と接触させること；

(b) 前記 GPBP - 結合分子と前記血漿試料中の前記 77 kD GPBP との間の複合体形成を検出すること；

(c) 前記 GPBP - 結合分子と前記血漿試料中の前記 77 kD GPBP との間で形成された複合体の量を、対照と比較すること；および

(d) 前記比較に基づいて、対象者を、RA または PF を有するとして診断すること、または RA もしくは PF を診断するための実体に前記比較を提供することを含む方法。

#### 【請求項 1 3】

前記 77 kD GPBP - 結合分子が、天然の 77 kD GPBP に結合する抗体を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

#### 【請求項 1 4】

前記抗体が、77 kD GPBP アイソフォームに対する選択性を有する、請求項 1 3 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 15】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記検出することが、ELISA、免疫蛍光検査法、およびクロマトグラフィからなる群から選択される技術の使用を含む、請求項 12 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記対象者が RA の危険性を有する、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象者が、1 つまたは複数の関節腫脹、1 つまたは複数の関節のこわばり、1 つまたは複数の関節のほてり、一般に 1 時間超持続する早朝の関節のこわばり、滑液過剰、滑膜における線維組織の発生、および関節運動範囲の障害からなる群から選択される 1 つまたは複数の症状に罹患している、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記対象者が PF の危険性のある、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象者が、慢性乾性咳、疲労、脱力、胸部不快、食欲不振、急速な体重減少、および労作と関係した呼吸困難からなる群から選択される 1 つまたは複数の症状に罹患している、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記対象者の C 反応性蛋白質 (CRP) 血漿値を測定すること、前記対象者の血漿中の CRP 量を対照と比較すること、および RA または PF の診断の補助のために前記 CRP 比較を使用することをさらに含む、請求項 12 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 22】

CKD または免疫複合体仲介 GN を診断する方法であって、

(a) CKD または免疫複合体仲介 GN の危険性のある対象者由来の血漿試料を、GPBP - 結合分子の 77 kD GPBP への選択的結合を促進する条件下で、77 kD GPBP に結合する GPBP - 結合分子と接触させること；

(b) (i) 前記 GPBP - 結合分子と前記血漿試料中の前記 77 kD GPBP との間の複合体形成を検出すること；および

30

(ii) 前記対象者の C 反応性蛋白質 (CRP) 血漿値を測定すること；

(c) (i) 前記 GPBP - 結合分子と前記血漿試料中の前記 77 kD GPBP との間で形成された複合体の量を対照と比較すること；および

(ii) 前記対象者の血漿中の CRP 量を対照と比較すること；および

(d) 前記比較に基づいて、前記対象者を、CKD または免疫複合体仲介 GN を有するとして診断すること、または CKD または免疫複合体仲介 GN の診断のための実体に前記比較を提供すること

を含む方法。

【請求項 23】

77 kD GPBP - 77 kD GPBP 基質結合複合体を、結合条件下で、1 つまたは複数のテスト化合物と接触させることを含み、ここで、77 kD GPBP 結合を前記結合複合体から外すテスト化合物は、CKD、免疫複合体仲介 GN、および PF の少なくとも一方を治療するための候補化合物である、CKD、免疫複合体仲介 GN、および PF の少なくとも一方を治療するための化合物を同定する方法。

40

【請求項 24】

77 kD GPBP - 基質を、結合条件下で

(a) 1 つまたは複数のテスト化合物；および

(b) 77 kD GPBP；

と接触させることを含み、ここで、前記 77 kD GPBP - 結合基質への結合に関して、77 kD GPBP に優る化合物は、CKD、免疫複合体仲介 GN、および PF の少な

50

くとも一方を治療するための候補化合物である、CKD、免疫複合体仲介GN、およびPFの少なくとも一方を治療するための化合物を同定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示の技術は、疾病を治療および診断する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

基底膜コラーゲンIVの3鎖の非コラーゲン(NC1)領域[3(IV)NC1]の立体配座は、ある程度、リン酸化によって決まる。グッドパスチャー抗原結合蛋白質(Goodpasture Antigen Binding Protein)(GPBP, 77kD GPBPまたはGPBP-1)(特許文献1;特許文献2)は、その超分子集合中に、3(IV)NC1領域の立体配座異性を触媒し、結果的に基底膜における多様な3(IV)NC1配座異性体の生成および安定化をもたらす、非従来型プロテインキナーゼである。GPBP値上昇は、非寛容化3(IV)NC1配座異性体の生成と関連づけられており、グッドパスチャー(「GP」)症候群を仲介する自己免疫応答を実行する。GP患者において、IV型コラーゲン3鎖の非コラーゲンC末端領域(NC1)(「グッドパスチャー抗原」または「GP抗原」)に対する自己抗体は、GP症候群の主要な2つの臨床兆候である、急速進行性糸球体腎炎(GN)およびしばしば肺出血を引き起こす。

10

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開第00/50607号

【特許文献2】国際公開第02/061430号

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】GPBP-1ブロッキングmAbの特性化を示す図。A:組換え型GPBP-1と3(IV)NC1との間の結合を、表示されたmAbの非存在下(対照)または存在下で、ELISAで測定した。値は、100%に設定した対照の、結合パーセンテージとして表現されている。GPBPに対する他のmAbは、3(IV)NC1へのGPBP-1結合を有意にブロックしなかった(表示せず)。B:NZWマウスは、10μg/g体重のビオチン化mAb N12またはmAb N26の単回腹腔内ブーストを受けた。注射後、表示された時に血液試料を採取し、表示されたmAbの血清抗体価をELISAで測定した。バーは、平均値±標準偏差(n=3)を示す。

30

【図2】GPBP-特異的抗体で処置したNZWマウスにおける、循環GPBP-1(cGPBP-1)値の低下を示す図。A:表示された抗体を用いた例示的な治療効果分析におけるcGPBP-1値の平均値(点、四角、または丸)を示す。二元配置ANOVA検定(\*P<0.05および\*\*P<0.01)を使用した、対照とmAb N12-ビオチン群との間の統計学的有意差は、第4週、第5週および第6週に到達した。B:Aで採取した各個の試料における血清cGPBP-1値(丸)、および各シリーズの平均値(線)を表す。クルスカール・ウォリス(Kruskal Wallis)/ダン(Dunn)検定(\*\*\*P<0.001)によれば、mAb N12-ビオチン処置群と他の2群との間で統計学的有意差が認められた。

40

【図3】GPBP-1ブロッキングmAbの投与は、NZWマウスにおけるGN進行を減ずることを示す図。組織化学的手順、免疫蛍光手順およびEM手順で分析した、表示されたマウス群[対照(n=6)、mAb N12(n=5)、mAb N26(n=5)]の例示的な糸球体切片を示す。ヘマトキシリン/エオシン(HE)染色およびマッソン3色(Masson's trichrome)(マッソン(Masson))染色を使用

50

して、糸球体構造、尿細管委縮および炎症性浸潤を同定した。従来の顕微鏡法を使用して I g G 沈着および I g M 沈着を可視化し、共焦点顕微鏡法を使用して C 3 c , G P B P - 1 および 3 ( I V ) の分布を可視化するために、標準間接免疫蛍光法を使用した。顕微鏡検査は、対照マウスでは、拡張した毛細管 G B M の上皮側に高電子密度物質を示しており ( 赤色矢印 )、G P B P ブロッキング m A b で処置したマウスでは、異常は認められない。原倍率  $\times 400$ 。共焦点スケールバー =  $35 \mu\text{m}$  および  $54 \mu\text{m}$  ( 最上および最下 )。電子顕微鏡法スケールバー =  $2 \mu\text{m}$  ( 最上 ) および  $1 \mu\text{m}$  ( 最下 )。

【図 4】G P B P - 1 の下方制御は、p r o - I L - 1 値を低下させ、I L - 1 分泌を遅らせることを示す図。A : 野生型および G P B P - 1 - 発現停止 ( p S i - G P B P - 1 ) R A W 264.7 細胞を、L P S で 8 時間プライミングし、細胞溶解物中の p r o - I L - 1 および G P B P - 1 を、特異的抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。B および C : 野生型および G P B P - 1 - 発現停止 ( p S i - G P B P - 1 ) R A W 264.7 細胞を  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  の L P S で一晩プライミングし、 $10 \mu\text{M}$  ドキソルピシンで、表示された時間、N L R P 3 を活性化した。培地上澄中の I L - 1 ( B ) および c G P B P - 1 ( C ) を、E L I S A で検出した。

【図 5】c G P B P - 1 値と C 反応性蛋白質 ( C R P ) 値とが、逆相関していることを示す図。蛋白尿患者の血清中の c G P B P - 1 および C R P を測定した。プロットは、表示された C R P 値を有する患者 3 群の平均 ( 棒 ) および個々の ( 丸 ) c G P B P - 1 値を示す。クルスカール・ウォーリス ( K r u s k a l W a l l i s ) / ダン ( D u n n ) 検定 ( \* \* \* P < 0.001 ) によれば、C R P <  $3 \mu\text{g} / \text{mL}$  の患者群と C R P >  $4 \mu\text{g} / \text{mL}$  の患者群との間に統計学的有意差が認められた。

【図 6】R A 患者が、循環 C R P 値と逆に調節される循環 G P B P - 1 値の上昇を示す図。A で、丸は、有意なレベルの抗 - 環状シトルリン化ペプチド ( 抗 C C P ) を有する患者 113 名 ( R A ) および健常なドナー 100 名 ( 対照 ) の個々の血清からの循環 G P B P - 1 値を表す。棒は、シリーズ内の平均値を示す。右側に、マン・ホイットニー ( M a n n - W h i t t n e y ) 分析の結果を示す。B で、各丸は有意なレベルの抗 C C P を有する R A 患者からの個々の血清で見られる、循環 C R P および G P B P - 1 のそれぞれの値を表す。

【図 7】コラーゲン誘発性関節炎 ( C I A ) を発症しているマウスにおける循環 G P B P - 1 値を示す図。点は、ウシ I I 型コラーゲンで免疫化する前 ( 免疫化前 )、または免疫化後表示された時刻の、表示されたマウスの個々の血清中の c G P B P - 1 値を表す。

【図 8】ドキソルピシンによる肺線維症 ( P F ) の誘発を示す図。薬物の気管内滴下注入後 12 日目の、対照マウスおよびドキソルピシン処置マウスにおける、肉眼的様相 ( 上方パネル ) およびヘマトキシリン / エオシンで染色した ( 真中のパネル ) またはマッソン 3 色で染色した ( 下方パネル ) 肺の例示的な組織学的所見 (  $\times 10$  )。

【図 9】ドキソルピシン誘発性 P F 発症中の G P B P - 1 の発現を示す図。A に、ドキソルピシンの気管内滴下注入後の表示された時点における c G P B P - 1 値を示す。結果を、個々のマウスの値として表す。棒は、各試験の平均値を表す。B に、薬物滴下注入後 12 日目の、対照およびドキソルピシン処置マウスの肺における G P B P - 1 m R N A 発現レベルを示す。結果を、各試料で並行して測定された、リボソーム 18 S サブユニット発現と比較して、G P B P - 1 発現の平均  $\pm$  S D 倍率変化として表す。C に、薬物滴下注入後 12 日目の、対照およびドキソルピシン処置マウスの肺切片における、ポリクローナル抗 G P B P - 1 抗体を使用した G P B P - 1 発現の免疫組織化学的試験 (  $\times 10$  )。

【図 10】ドキソルピシン誘発性 P F の発症におけるピナシジル処置の影響を示す図。非処置マウスまたは種々の用量のピナシジルで処置した動物由来の肺を、ドキソルピシン滴下注入後 12 日目に試験した。ヘマトキシリン / エオシン染色した肺切片 (  $\times 10$  ) を示す ( 左パネル )。加えて、各実験群の個々のマウスにおける組織学的病変の拡大を、冒された実質のパーセンテージとして表す ( 右パネル )。

【図 11】ドキソルピシン誘発性 P F 発症中の、コラーゲン I 発現の誘導における、ピナシジル処置またはミリセチン処置の影響を示す図。1 ( I ) コラーゲン m R N A の発現

10

20

30

40

50

を、RT-qPCRを使用して、ドキシソルピシン滴下注入後12日目に非処置マウス、ピナシジル処置マウスまたはミリセチン処置マウスで測定した。結果を、各試料で並行して測定されたりボソーム18Sサブユニット発現と比較して、1(I)コラーゲン発現の平均±SD倍率変化として表す。統計学的差は、以下の通りに表示する：ns：非有意、\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.01$ ，\*\*\* $p < 0.005$ 。

【図12】ドキシソルピシン誘発性PFに対するGPBP mAbの影響を示す図。1(I)コラーゲンmRNAおよび1(IV)コラーゲンmRNAの発現を、RT-qPCRを使用して、ドキシソルピシン滴下注入後12日目に、非処置、抗TGF- $\beta$ 1またはmAbN12処置マウスで測定した。結果を、各試料で並行して測定されたりボソーム18Sサブユニット発現と比較して、1(I)コラーゲン発現の平均±SD倍率変化として表す。統計学的差は、以下の通りに表示する：ns：非有意、\* $p < 0.05$ ，\*\*\* $p < 0.005$ 。

【発明を実施するための形態】

【0005】

第1態様で、本発明は、慢性腎疾患(CKD)を治療するために、77kD GPBPのインヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、CKDを治療する方法を提供する。

【0006】

第2態様で、本発明は、免疫複合体仲介系球体腎炎(GN)を治療するために、77kD GPBPのインヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、免疫複合体仲介GNを治療する方法を提供する。一実施態様において、免疫複合体仲介GNは、IgA腎症、全身性エリテマトーデス(SLE)およびグッドパスチャー症候群からなる群から選択される自己免疫疾患と関連している。

【0007】

第3態様で、本発明は、肺線維症(PF)を治療するために、77kD GPBPのインヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、PFを治療する方法を提供する。一実施態様において、PFは非特発性PFである。

【0008】

本発明の第1態様から第3態様までのそれぞれで、対象者は、好ましくはヒトである。各態様において、任意の適当な77kD GPBPインヒビターを使用することが可能である；一実施態様において、インヒビターは、77kD GPBPに結合する抗体、たとえばGPBPの77kDアイソフォームに選択性がある抗体等である。

【0009】

別の実施態様において、GPBPインヒビターは、一般式X1-SHCIX2-X3(配列番号2)で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み、ここで：

X1は、配列ATTAGILATL(配列番号3)の0~10アミノ酸であり；

X2は、EまたはQであり；かつ

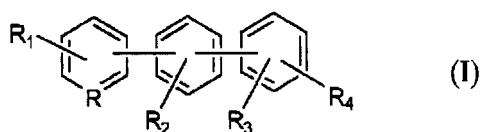
X3は、配列LMVKREDSWQ(配列番号4)の0~10アミノ酸である。

【0010】

別の実施態様において、インヒビターは式(I)：

【0011】

【化1】



【0012】

の化合物またはその薬学的に許容できる塩を含み、ここで：

Rは、NおよびCR<sub>5</sub>から選択され；

10

20

30

40

50

R<sub>5</sub> は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> アルケニル、C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキニル、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、アミノ、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)アミノ、ジ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)アミノ、ヒドロキシ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、アミノ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)スルファニル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)NH<sub>2</sub>、(アリーール)C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、および(ヘテロアリーール)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルからなる群から選択され；

R<sub>1</sub> は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、ヒドロキシ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、アミノ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、または(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)スルファニル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)であり；

R<sub>2</sub> は、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、ヒドロキシ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、ホルミル(C<sub>0</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、アミノ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)スルファニル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)NH<sub>2</sub>、(アリーール)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、または(ヘテロアリーール)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり；

R<sub>3</sub> は、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、ヒドロキシ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、ホルミル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、アミノ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)スルファニル(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)NH(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)N(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)<sub>2</sub>、-CH=CH-C(O)OH、-CH=CH-C(O)(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、(アリーール)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、または(ヘテロアリーール)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり；かつ

R<sub>4</sub> は、ヒドロキシ、ハロゲン、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、ベンジルオキシ、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)NH(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)N(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル)<sub>2</sub>、-CH=CH-C(O)OH、-CH=CH-C(O)(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)OH、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ)、(アリーール)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、または(ヘテロアリーール)C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである。

#### 【0013】

第4態様で、本発明は、

(a) RAまたはPFの危険性のある対象者由来の血漿試料を、GPBPへのGPBP-結合分子の選択的結合を促進する条件下で、77kD GPBPに結合するGPBP-結合分子と接触させること；

(b) GPBP-結合分子と血漿試料中の77kD GPBPとの間の複合体形成を検出すること；

(c) GPBP-結合分子と血漿試料中のGPBPとの間で形成された複合体の量を、対照と比較すること；および

(d) 比較に基づいて、対象者を、RAまたはPFを有するとして診断すること、またはRAもしくはPFを診断するための実体に比較を提供すること；

10

20

30

40

50

を含む、関節リウマチ（R A）または肺線維症（P F）を診断する方法を提供する。

【0014】

一実施態様において、77kD GPBP - 結合分子は、天然の77kD GPBP に結合する抗体、たとえばGPBPの77kDアイソフォームに選択性がある抗体等、を含む。

【0015】

別の実施態様において、検出は、ELISA、免疫蛍光検査法、およびクロマトグラフィからなる群から選択される技術の使用を含む。

対象者がR Aの危険性のある幾つかの実施態様において、対象者は、1つまたは複数の関節腫脹、1つまたは複数の関節のこわばり、1つまたは複数の関節のほてり、一般に1時間以上持続する早朝の関節のこわばり、滑液過剰、滑膜における線維組織の発生、および関節運動範囲の障害からなる群から選択される、1つまたは複数の症状に罹患している可能性がある。

10

【0016】

対象者がP Fの危険性のある幾つかの実施態様においては、対象者は、慢性乾性咳、疲労、脱力、胸部不快、食欲不振、急速な体重減少、および労作と関係した呼吸困難からなる群から選択される1つまたは複数の症状に罹患している可能性がある。

【0017】

この第4態様のあらゆる実施態様において、本方法は、対象者のC反応性蛋白質（CRP）血漿値を測定すること、対象者の血漿中のCRP量を対照と比較すること、およびR AまたはP Fの診断を助けるためにCRP比較を使用することを、さらに含んでもよい。

20

【0018】

別の実施態様において、本発明は、

(a) CKDまたは免疫複合体仲介GNの危険性のある対象者由来の血漿試料を、GPBP - 結合分子のGPBPへの選択的結合を促進する条件下で、77kD GPBP に結合するGPBP - 結合分子と接触させること；

(b) (i) GPBP - 結合分子と血漿試料中の77kD GPBPとの間の複合体形成を検出すること；および

(ii) 対象者のC反応性蛋白質（CRP）血漿値を測定すること；

(c) (i) GPBP - 結合分子と血漿試料中の77kD GPBPとの間で形成された複合体の量を対照と比較すること；および

30

(ii) 対象者の血漿中のCRP量を対照と比較すること；および

(d) 比較に基づいて、対象者を、CKDまたは免疫複合体仲介GNを有するとして診断すること、またはCKDまたは免疫複合体仲介GNの診断のための実体に比較を提供すること、

を含む、CKDまたは免疫複合体仲介GNを診断する方法を提供する。

【0019】

第5態様で、本発明は、77kD GPBP - 77kD GPBP - 基質結合複合体を、結合条件下で、1つまたは複数のテスト化合物と接触させることを含み、ここで、77kD GPBP結合を結合複合体から外す、それらのテスト化合物は、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはP Fを治療するための候補化合物である、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはP Fを治療するための化合物を同定する方法を提供する。

40

【0020】

第6態様で、本発明は、77kD GPBP - 基質を、結合条件下で

(a) 1つまたは複数のテスト化合物；および

(b) 77kD GPBP；

と接触させることを含む、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはP Fを治療するための化合物を同定する方法を提供し、

ここで、77kD GPBP - 結合基質への結合に関して、77kD GPBPに優る化合物は、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはP Fを治療するための候補化合

50

物である。

【0021】

全ての引用文献を、参照により全体として本明細書に援用する。本出願の範囲内で、特に指定のない限り、利用した技術は、幾つかの周知の参考文献、たとえば：分子クローニング (Molecular Cloning)：研究室マニュアル (A Laboratory Manual) (サムブルック (Sambrook) ら著、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、遺伝子発現テクノロジー (Gene Expression Technology) (酵素学における方法 (Methods in Enzymology)、185巻、D.ゴエデル (Goeddel) 編、1991年、アカデミック・プレス (Academic Press)、サンディエゴ、カリフォルニア)「蛋白質精製の手引き (Guide to Protein Purification)」、酵素学における方法 (Methods in Enzymology) (M. P. ドイツチャー (Deutscher) 編 (1990年) アカデミック・プレス社 (Academic Press, Inc.) ) ; PCRプロトコール (PCR Protocols)：方法および応用の手引き (A Guide to Methods and Applications) (イニス (Innis) ら著、1990年。アカデミック・プレス (Academic Press)、サンディエゴ (San Diego)、カリフォルニア)、動物細胞の培養 (Culture of Animal Cells)：基本的技術のマニュアル (A Manual of Basic Technique)、第2版 (R. I. フレッシュニー (Freshney) 著、1987年、リス社 (Liss, Inc)、ニューヨーク、ニューヨーク)、遺伝子トランスファーおよび発現プロトコール (Gene Transfer and Expression Protocols)、p. 109~128、E. J. マレイ (Murray) 編、ザ・ヒューマン・プレス社 (The Humana Press Inc)、クリフトン、ニュージャージー)、およびアンピオン (Ambion) 1998年カタログ (アンピオン (Ambion)、オースチン、テキサス) 等のいずれかに見られる。

【0022】

本明細書で使用されるとき、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上他の意味を明確に示す場合を除き、複数形の指示対象を含む。本明細書で使用されるとき「And」は、明示的に別段の定めをした場合を除き、「or」と互換的に使用される。

【0023】

本発明の種々の態様および実施態様の間で共通な全ての用語は、文脈上他の意味を明確に示す場合を除き、同じ意味を有する。

本出願で使用されるとき、用語「天然の蛋白質」は、翻訳後修飾 (PTM) を含む、細胞により自然に産生される蛋白質を意味し、非変性蛋白質、または (たとえば、実質的に精製され、たとえば、SDS-PAGEゲルで実行するために1つまたは複数の変性剤を受けた、自然に産生された蛋白質のような) 変性蛋白質を含む。

【0024】

本出願で使用されるとき、「実質的に精製されたポリペプチド」は、ポリペプチドがそのインビボ細胞環境から分離されていたことを意味する。単離されたポリペプチドが、たとえばポリアクリルアミド、アガロース、およびクロマトグラフィ試薬等の、ゲル剤が実質的にないことは、さらに好ましい。

【0025】

前後関係によって他の意味を明確に示す場合を除き、本発明の一態様のために開示される実施態様は、本発明の他の態様でも、また本発明の他の態様で開示される実施態様と組み合わせても、使用することができる。

【0026】

第1態様で、本発明は、慢性腎疾患 (CKD) を治療するために、77kD GPBPのインヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、CKDを治療

する方法を提供する。

【0027】

後続の実施例に示す通り、77kD GPBPのインヒビターは、腎臓における炎症性浸潤を減少させ、したがってCKDの治療に使用することができる。あらゆる炎症の最終段階は線維症であり、腎尿細管間質性線維症は、全ての腎疾患の最終共通路を代表し、組織の正常な構造を破壊して結果的にCKDを招く、線維性腫瘍の拡大につながる。

【0028】

対象者は、治療から恩恵を受ける可能性がある任意の対象者、たとえば哺乳動物等であってもよい。好ましい実施態様において、対象者はヒト対象者である。77kD GPBPのアミノ酸配列は、現在はGPBPまたはGPBP-1（配列番号1）とも呼ばれ、2003年6月17日に発行され、2000年8月31日に公開された、PCT公報国際公開第00/50607号に相当する、米国特許第6579969号明細書に開示された。その中、および国際公開第2010/009856号および米国特許第7935492号明細書に開示されている通り、ヒトGPBP mRNAは、選択的スプライシングを受けて、現在はCERTおよびGPBP-2とも呼ばれる、GPBP 26を生成し、非標準翻訳開始を受けて、現在はGPBP-3とも呼ばれる、91-kDa GPBPを生成する。異なるアイソフォームは異なる機能を有し、77kD GPBPは細胞外コンパートメントに達し、可溶性の免疫沈降形で存在することが証明されており、血液から分離することができる。

10

20

【0029】

本明細書で使用されるとき、「慢性腎疾患」は、基礎病理にかかわらず、数か月または数年という期間にわたる進行性の腎機能喪失である。一実施態様において、3カ月間、糸球体濾過率（GFR）が $< 60 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ である個体は、腎損傷の有無にかかわらず、CKDを有すると分類される。別の実施態様において、腎損傷を有する個体は、GFR値にかかわらず、CKDを有するとして分類される。腎損傷は、血液検査または尿検査あるいは画像診断における異常を含む、病理学的異常または損傷のマーカーと定義される。

【0030】

様々な実施態様において：

ステージ1：僅かな機能低下；正常なまたは比較的高いGFR（ $= 90 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ ）を有する腎損傷；

30

ステージ2：腎損傷を伴う、GFRの軽度低下（ $60 \sim 89 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ ）；

ステージ3：GFRの中等度低下（ $30 \sim 59 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ ）；および

ステージ4：GFRの重度低下（ $15 \sim 29 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ ）

等の、透析非依存性CKDを治療するために、本法を使用することができる。

【0031】

本明細書で使用するとき、CKDを「治療すること」は、（a）対象者の末期腎疾患（ESRD）への進行を遅らせること；（b）対象者におけるGFR低下を遅らせること；（c）対象者における腎疾患の進行を制限すること；および/または（d）CKD症状の重症度を低下させること；を意味する。

40

【0032】

本明細書で使用されるとき、「CKDの進行を制限すること」は、治療を受けていない患者と比較して、治療を受けている患者の腎機能低下を減少させるかまたは防止することを意味する。したがって、そのような治療は、患者における腎臓透析または腎臓移植の必要性を減少させる。

【0033】

腎疾患の進行は、以下：

（a）蛋白尿（すなわち：蛋白質の尿中への損失増加；多くの場合、アルブミン値の測定（すなわち「アルブミン尿」）によって評価される）；

50

(b) 糸球体クリアランス障害 (すなわち: 血液から物質を除去する腎機能; たとえば、クレアチンクリアランス (すなわち: 「クレアチンクリアランス障害」)、イヌリンクリアランス、または尿素クリアランスで測定できる);

(c) 血清クレアチニン値上昇; および/または

(d) 尿中形質転換増殖因子 (TGF- $\beta$ ) 値上昇を含む、様々な方法で測定できる。

【0034】

したがって、本発明の方法は、たとえば、本発明の方法で治療しようとしている対象者における、蛋白尿、アルブミン尿、血清クレアチニン値、および尿中TGF- $\beta$ 値の、1つまたは複数の上昇を制限するため、および/または糸球体クリアランスおよび/またはクレアチンクリアランスの障害を制限するために、使用することができる。

10

【0035】

第2態様で、本発明は、免疫複合体仲介GNを治療するために、77kD GPBPのインヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、免疫複合体仲介GNを治療する方法を提供する。対象者は、治療から恩恵を受ける可能性がある任意の対象者、たとえば哺乳動物等であってもよい。好ましい実施態様において、対象者はヒト対象者である。

【0036】

本明細書で使用されるとき、「GN」は、糸球体損傷を特徴とする腎疾患であり、「免疫複合体仲介GN」は、GNが免疫複合体の糸球体沈着により特徴づけられることを意味する。

20

【0037】

一実施態様において、免疫複合体仲介GNは、IgA腎症、全身性エリテマトーデス(SLE)およびグッドパスチャー症候群からなる群から選択される自己免疫疾患と関連がある。本明細書で使用されるとき、免疫複合体仲介GNを「治療すること」は、(a)糸球体損傷の進行を遅らせること; (b)糸球体免疫複合体沈着の進行を遅らせること; (c)糸球体炎症を減少させること; (d)糸球体免疫複合体沈着を減少させること; および/または(d)ESRDへの進行を遅らせること; を意味する。

【0038】

後続の実施例に示す通り、77kD GPBPのインヒビターは、糸球体基底膜コラーゲンをベースとする変化を修復し、免疫複合体の糸球体沈着を減少させ、免疫複合体仲介GNに付随する炎症を減弱させる。

30

【0039】

本発明の第1態様および第2態様の方法の好ましい実施態様において、77kD GPBPインヒビターは、1つまたは複数の他の治療法、たとえば治療しようとしている疾病の標準的ケア療法と同時投与が可能である。好ましい一実施態様において、そのような1つまたは複数の化合物は、薬学的に許容できる担体中の、アンギオテンシン変換酵素インヒビターおよびアンギオテンシン受容体ブロッカー、またはその薬学的に許容できる塩類からなる群から選択される。本発明で使用するためのアンギオテンシン変換酵素インヒビターの非限定的な例としては、ベナゼプリル、ベナゼプリラト、カプトプリル、デラプリル、フェンチアプリル、フォシノプリル、リベンザプリル、モエキシプリル、ペントプリル、ペリンドプリル、ピボプリル、キナプリル、キナプリラト、ラミプリル、スピラプリル、スピラプリラト、ゾフェノプリル、セロナプリル、エナラプリル、インドラプリル、リシノプリル、アラセピル、およびシラザプリル、またはその薬学的に許容できる塩類などが挙げられる。本発明で使用するためのアンギオテンシン受容体ブロッカーの非限定的な例としては、ロサルタン、カンデサルタン、イルベサルタン、オルメサルタン、バルサルタン、テルミサルタン、エプロサルタン、およびタソサルタンなどが挙げられる。

40

【0040】

別の実施態様において、インヒビターをベリムマブと併用することができる。

第3態様で、本発明は、肺線維症(PF)を治療するために、77kD GPBPのイ

50

ンヒビターの有効量を、必要としている対象者に投与することを含む、PFを治療する方法を提供する。対象者は、治療から恩恵を受ける可能性がある任意の対象者、たとえば哺乳動物等であってもよい。好ましい実施態様において、対象者はヒト対象者である。

【0041】

PFは、肺における、過剰な結合組織の形成または発生（線維症）である。肺線維症の症状としては、息切れ、慢性乾燥、空咳、疲労および脱力、胸部不快、および/または食欲不振および急速な体重減少などが挙げられるが、それらに限定されない。肺線維症は、労作と関係した進行性息切れ（呼吸困難）の病歴により示唆される。時には、聴診の際に、肺底で細かい吸気性クラックルが聞こえる場合がある。高解像度CATスキャンは通例、異常を示す。

10

【0042】

後続の実施例に示す通り、GPBPのインヒビターは、ヒトPF用の動物モデルである、ドキシソルピシン-誘発性PFの治療に有効であった。

本発明の方法で治療されるPFは、他の疾患（すなわち、自己免疫疾患（例：関節リウマチ-R A -、S L E、強皮症等）、ウイルス感染症または肺への他の顕微鏡的肺傷害（たとえばアスベスト、ケイ素、たばこの煙等への曝露）を含むがそれらに限定されない、「間質性肺疾患」）の副次効果であってもよく、あるいは特発性（すなわち「特発性肺線維症」）であってもよい。

【0043】

本明細書で使用されるとき、PFを「治療すること」は、(a)肺線維症の進行を遅らせること；および/または(b)PF症状を減少させること、を意味する。

20

本発明の第3態様の方法の好ましい実施態様において、77kD GPBPインヒビターは、1つまたは複数の他の治療法、たとえば治療しようとしている疾病の標準的ケア療法と同時投与が可能である。好ましい一実施態様において、そのような1つまたは複数の化合物は、コルチコステロイド類、免疫抑制薬（シクロホスファミド、アザチオプリン、およびメトトレキサートを含むがそれらに限定されない）、消炎剤、IFN-、ミコフェノール酸モフェチル、およびピルフェニドンからなる群から選択される。

【0044】

こうした態様のそれぞれで、本方法は適当な対象者、たとえば77kD GPBPを過剰発現していると認定されている者等、に対して実行することが可能である。たとえば、検量線のための基準としての77kD GPBPの正常値は、血漿中に10ng/ml未満である。様々な好ましい実施態様において、77kD GPBPの正常範囲は、血漿中に約1ng/ml~10ng/mlである。したがって、一実施態様において、血漿中に10mg/ml超の77kD GPBPを有すると認定された対象者が、本発明の方法に従って治療される。循環77kD GPBPの量を測定する方法は、当該技術分野で周知であり（国際公開第2010/009856号および米国特許第7935492号明細書を参照されたい）、例を後述する。

30

【0045】

治療方法を列挙した本発明のこうした態様のそれぞれで、77kD GPBPの任意の適当なインヒビターを使用することができる。一実施態様において、インヒビターは、77kD GPBPアンチセンスRNA、77kD GPBP siRNA、および77kD GPBP抗体からなる群から選択される。好ましい実施態様において、77kD GPBPのインヒビターは、77kD GPBP抗体か、またはその薬学的に許容できる塩類である。例示的な抗体は、たとえば、国際公開第2010/009856号および米国特許第7935492号明細書に開示されている。好ましい実施態様において、国際公開第2010/009856号および米国特許第7935492号明細書に開示されている抗体を含むがそれらに限定されない抗体は、天然の77kD GPBPを認識し、天然の77kD GPBPに対する抗体を産生するために当業者に教示を提供する。本明細書で使用されるとき、「天然の77kD GPBPに対する抗体」は、その抗体が天然の77kD GPBPに結合することを意味し、それらが他のGPBP種に結合しないことを必

40

50

要としない。一実施態様において、抗体は77kD GPBPに特異的である。任意の他の実施態様と併用できる、さらに好ましい実施態様において、抗体は、ヒト化モノクローナル抗体等の、モノクローナル抗体である。

【0046】

本明細書で使用されるとき、用語抗体は、本発明のポリペプチド類またはそのフラグメントと選択的に反応する、その抗体フラグメントを含むことを意図する。抗体は、従来の技術を使用して断片化することができ、また全抗体について上述したものと同様に、有用性についてフラグメントをスクリーニングすることができる。たとえば、 $F(ab')_2$ フラグメントは、抗体をペプシンで処理することにより生成することができる。結果として得られる $F(ab')_2$ フラグメントを処理してジスルフィド架橋を減らし、Fab'フラグメントを産生することができる。

10

【0047】

モノクローナル抗体フラグメントの例としては、(i)VL、VH、CLおよびCHI領域で本質的に構成される一価フラグメントである、Fabフラグメント；(ii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントである、 $F(ab)_2$ および $F(ab')_2$ フラグメント；(iii)VH領域およびCH1領域で本質的に構成されるFdフラグメント；(iv)抗体の単一アームのVL領域およびVH領域で本質的に構成される、Fvフラグメント；(v)VH領域で本質的に構成される、dAbフラグメント(ワード(Ward)ら著、(1989年)、ネイチャー(Nature)341:544-546)；および(vi)1つまたは複数の単離されたCDR、または機能的パラトープ、などが挙げられる。

20

【0048】

モノクローナル抗体は、動物由来の脾臓細胞を得ることによって産生することができる。(ケーラー(Kohler)およびミルスタイン(Milstein)著、ネイチャー(Nature)256、495~497(1975年)参照)。一実施例で、対象のモノクローナル抗体(mAb)は、同系繁殖マウスを77kD GPBP、またはその抗原断片で、免疫化することにより調製される。マウスは、免疫応答を誘発するのに十分な量および間隔で、IPルートまたはSCルートにより免疫化する。マウスは、0日に初回免疫化を受け、約3~約30週間、休息する。免疫化マウスに、1回または複数回の追加免疫を、静脈内(IV)経路で投与する。抗体陽性マウス由来のリンパ球は、当該技術分野で既知の標準手順によって、免疫化マウスから脾臓を摘除することにより得られる。ハイブリドーマ細胞は、安定したハイブリドーマの形成を可能にする条件下で、脾臓リンパ球を適当な融合パートナーと混合することによって産生される。抗体産生細胞と融合パートナー細胞を、濃度約30%~約50%のポリエチレングリコール中で融合させる。融合したハイブリドーマ細胞は、当該技術分野で既知の手順により、ヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリン添加ダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagles Medium)(DMEM)中での成長によって選択される。上澄液を成長陽性ウェルから採取し、固相イムノラジオアッセイ等のイムノアッセイ法で、抗体産生についてスクリーニングする。抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞を、マクファーソン(MacPherson)の軟寒天技術、軟寒天技術(Soft Agar Techniques)、組織培養方法および応用(Tissue Culture Methods and Applications)、クルーズ(Kruse)およびパターソン(Patterson)編、アカデミック・プレス(Academic Press)、1973年、等の技術で、クローン化する。

30

40

【0049】

「ヒト化抗体」は、非ヒト抗体由来の抗体、たとえばマウスモノクローナル抗体等を指す。あるいは、ヒト化抗体は、親の、非ヒト、抗体の抗原結合特性を保持するかまたは実質的に保持するが、ヒトに投与したとき、親の抗体に比べて低下した免疫原性を示す、キメラ抗体由来であってもよい。たとえば、キメラ抗体は、ヒト抗体フラグメントおよびマウス抗体フラグメント、通例、ヒト定常領域とマウス可変領域を含むことができる。ヒト

50

化抗体は、ヒトにおける免疫原性が非ヒトモノクローナル抗体より遥かに低いため、治療的抗体使用に好ましい。

【0050】

ヒト化抗体は、(1)非ヒトモノクローナル抗体由来の相補性決定領域を、ヒトフレームワークおよび定常領域上に移植(グラフト)すること(「ヒト化」)、および(2)非ヒトモノクローナル抗体可変領域を移植(トランスプラント)するが、それらを、表面残基の置換によってヒト様表面で「覆い隠すこと」(「ベニヤリング」)、を含むがそれらに限定されない、当該技術分野で既知の種々の方法を使用して調製できる。これらの方法は、たとえばジョーンズ(Jones)ら著、ネイチャー(Nature)321巻: P522~525(1986年);モリソン(Morrison)ら著、Proc. Natl. Acad. Sci., 米国、81巻: P6851~6855(1984年);モリソン(Morrison)およびオイ(Oi)著、Adv. Immunol., 44巻: P65~92(1988年);パーホイヤー(Verhoever)ら著、サイエンス(Science)239巻: P1534~1536(1988年);パドラン(Padlan)著、Molec. Immun., 28巻: P489~498(1991年);パドラン(Padlan)著、Molec. Immunol., 31(3)巻: P169~217(1994年);およびケットルボロー(Kettleborough)C.A.ら著、Protein Eng., 4(7)巻: P773~83(1991年)に開示されている。

10

【0051】

抗体応答を生じさせるために、本発明のポリペプチドは一般に、薬学的に許容できる非経口投与用担体と調合される。そのような許容できる補助剤としては、完全フロイント補助剤、不完全フロイント補助剤、ミョウバン沈降物、コリネバクテリウム パルヴム(Corynebacterium parvum)含有油中水乳剤およびtRNAなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドの濃縮ならびに媒体および他の成分の選択を含む、そのような組成物の製剤は、当該技術分野の技術の範囲内である。

20

【0052】

別の実施態様において、77kD GPBPインヒビターは、国際公開第2004/070025号および米国特許第7326768号明細書に開示されているペプチドインヒビターか、またはその薬学的に許容できる塩類である。一実施態様において、ペプチドインヒビターは、一般式X1-SHCIX2-X3(配列番号2)で示されるアミノ酸配列を含むかまたは同アミノ酸配列で構成される、ポリペプチドであり、ここで:

30

X1は、配列ATTAGILATL(配列番号3)の0~10アミノ酸であり;

X2はEまたはQであり;かつ

X3は、配列LMVKREDSWQ(配列番号4)の0~10アミノ酸である。

【0053】

好ましい実施態様において、ペプチドインヒビターは、SHCIE(配列番号5)、SHCIQ(配列番号6)、ILATLSHCIELMVKR(配列番号7)、およびILATLSHCIQLMVKR(配列番号8)からなる群から選択される配列を含むか、同配列で構成される。

【0054】

別の実施態様において、ペプチドインヒビターは、連続した少なくとも6つ(6、7、8、9、または全て)のアミノ酸EKTAGKPILF(配列番号9)を含むか、同アミノ酸で構成される。好ましい実施態様において、単離されたポリペプチドは、配列EKTAGKPILF(配列番号10)を含むか、同配列で構成される。

40

【0055】

ポリペプチドは、たとえば、ポリエチレングリコール(PEG)の付加または当該技術分野で既知の別の方法で、さらに誘導体化して、半減期を増加することができる。本発明のポリペプチドは、特別な性質を伝達するために、L-アミノ酸、D-アミノ酸(インピボで、L-アミノ酸特異的プロテアーゼ抵抗性である)、D-アミノ酸とL-アミノ酸の組合せ、および様々な「デザイナー」アミノ酸(たとえば、-メチルアミノ酸、C-

50

メチルアミノ酸、およびN - メチルアミノ酸等)を含んでもよい。合成アミノ酸は、リジンのためのオルニチン、およびロイシンまたはイソロイシンのためのノルロイシンを含む。

【0056】

加えて、本ポリペプチドは、新規な特性をもつポリペプチドを調製するために、ペプチド模倣結合、たとえばエステル結合等を、有することができる。たとえば、少ないペプチド結合を組み入れたポリペプチド、すなわち  $R_1 - CH_2 - NH - R_2$  を生じさせることが可能であり、ここで、 $R_1$  および  $R_2$  はアミノ酸残基またはアミノ酸配列である。少ないペプチド結合は、ジペプチドサブユニットとして導入することが可能である。そのようなポリペプチドは、プロテアーゼ活性に対して抵抗性があり、インビボで、長い半減期を有するであろう。

10

【0057】

用語「ポリペプチド」は、サブユニットアミノ酸、アミノ酸類縁体、またはペプチド模倣物の配列に言及するために、広義で使用される。サブユニットはペプチド結合で連結されるが、ポリペプチドは、必ずしもペプチド結合でポリペプチドに連結されないさらなる部分を含むことができる。たとえば、上述の通り、ポリペプチドは、芳香族環を含む非アミノ酸分子をさらに含むことができる。

【0058】

本明細書に記載のポリペプチドは、化学的に合成してもよく、または組換え的に発現させてもよい。上に開示した通り、組換え発現は、当該技術分野における標準方法を使用して遂行できる。そのような発現ベクターは、細菌またはウイルスの発現ベクターを含むことができ、またそのような宿主細胞は、原核細胞であっても真核細胞であってもよい。

20

【0059】

好ましくは、本発明の方法で使用するためのポリペプチドは、化学的に合成される。固相、液相、またはペプチド縮合技術、あるいはその任意の組合せの、周知の技術を使用して調製される合成ポリペプチドは、天然アミノ酸および非天然アミノ酸を含むことができる。ペプチド合成に使用されるアミノ酸は、標準的な脱保護、中和、カップリングおよび洗浄プロトコルを用いた標準的な Boc (N - アミノ保護 N - t - ブトキシカルボニル) アミノ酸樹脂であってもよく、または標準的な塩基に不安定な N - アミノ保護 9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) アミノ酸であってもよい。Fmoc N - アミノ保護アミノ酸も Boc N - アミノ保護アミノ酸も、シグマ・ケンブリッジ・リサーチ・バイオケミカル (Sigma Cambridge Research Biochemical)、または当業者によく知られている他の化学会社から入手することができる。加えて、本ポリペプチドは、当業者によく知られている他の N - 保護基を用いて合成することができる。

30

【0060】

固相ペプチド合成は、当業者によく知られている技術によって、またたとえば自動合成装置を使用するのであれば、遂行することが可能である。

ペプチド/抗体インヒビターは、薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物の状態で、一緒に投与することが可能である。医薬組成物は、ペプチドインヒビターに加えて (a) 凍結乾燥保護剤; (b) 界面活性剤; (c) 増量剤; (d) 浸透圧調整剤; (e) 安定剤; (f) 保存料および/または (g) パフファーを含んでもよい。幾つかの実施態様において、医薬組成物中のパフファーはトリス (Tris) パフファー、ヒスチジンパフファー、リン酸パフファー、クエン酸パフファーまたは酢酸パフファーである。医薬組成物は、凍結乾燥保護剤、たとえばスクロース、ソルビトールまたはトレハロースも含んでもよい。ある実施態様において、医薬組成物は、保存料、たとえば塩化ベンザルコニウム、ペンゼトニウム、クロロヘキシジン、フェノール、m - クレゾール、ベンジルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロロブタノール、o - クレゾール、p - クレゾール、クロロクレゾール、硝酸フェニル水銀、チメロサル、安息香酸、およびその様々な混合物を含む。他の実施態様において、医薬組成物は、グリシンのような、増量剤を含む

40

50

。さらに他の実施態様において、医薬組成物は、界面活性剤たとえば、ポリソルベート - 20、ポリソルベート - 40、ポリソルベート - 60、ポリソルベート - 65、ポリソルベート - 80、ポリソルベート - 85、ポロキサマ - 188、モノラウリン酸ソルビタン、モノパルミチン酸ソルビタン、モノステアリン酸ソルビタン、モノオレイン酸ソルビタン、トリラウリン酸ソルビタン、トリストアリン酸ソルビタン、トリオレイン酸ソルビタン、またはその組合せを含む。医薬組成物は、浸透圧調整剤、たとえば製剤をヒト血液と実質的に等張または等浸透圧にする化合物、も含んでもよい。例示的な浸透圧調整剤としては、スクロース、ソルビトール、グリシン、メチオニン、マンニトール、デキストロース、イノシトール、塩化ナトリウム、アルギニンおよび塩酸アルギニンなどが挙げられる。他の実施態様において、医薬組成物は、安定剤、たとえば、対象の蛋白質と組み合わせるとき、凍結乾燥状態または液状の、対象の蛋白質の化学的および/または物理的不安定性を実質的に防止するかまたは減少させる分子をさらに含む。例示的な安定剤としては、スクロース、ソルビトール、グリシン、イノシトール、塩化ナトリウム、メチオニン、アルギニン、および塩酸アルギニンなどが挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0061】

ペプチドインヒビター/抗体は、医薬組成物中の唯一の活性薬物であってもよく、または組成物は所期の使用に適した1つまたは複数の他の活性薬物をさらに含んでもよい。

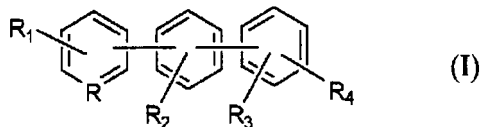
別の実施態様において、77kD GPBPインヒビターは、DAB-Am32、ピナシジル、およびミリセチン、ならびにその薬学的に許容できる塩類からなる群から選択され、それぞれが、本発明の方法で有効であることが、後続の実施例で証明される。

## 【0062】

さらなる実施態様において、77kD GPBPインヒビターは、国際公開第2011/054530号および米国特許第20110105545号明細書に開示されているものである。したがって、化合物は、式(I)の化合物、またはその薬学的に許容できる塩類：

## 【0063】

## 【化2】



## 【0064】

またはその薬学的に許容できる塩であってもよく、ここで：

Rは、NおよびCR<sub>5</sub>から選択され；

R<sub>5</sub>は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキニル、ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)、アミノ、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)アミノ、ジ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)アミノ、ヒドロキシ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アミノ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)スルファニル(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-C(O)NH<sub>2</sub>、(アリール)C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、および(ヘテロアリール)C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルからなる群から選択され；

R<sub>1</sub>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)、ヒドロキシ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アミノ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、または(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)スルファニル(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)であり；

R<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、

ハロ（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、ヒドロキシ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ） $C_1 \sim C_6$  アルキル、ホルミル（ $C_0 \sim C_6$  アルキル）、アミノ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、スルファニル（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）スルファニル（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ 、（アリーール） $C_1 \sim C_6$  アルキル、または（ヘテロアリーール） $C_1 \sim C_6$  アルキルであり；

$R_3$  は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、ヒドロキシ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ） $C_1 \sim C_6$  アルキル、ホルミル（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、アミノ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、スルファニル（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）スルファニル（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH(C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)N(C_1 \sim C_6$  アルキル) $_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、 $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、（アリーール） $C_1 \sim C_6$  アルキル、または（ヘテロアリーール） $C_1 \sim C_6$  アルキルであり；かつ

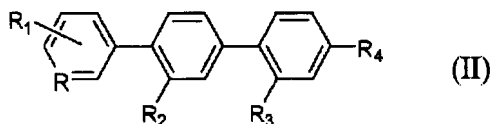
$R_4$  は、ヒドロキシ、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、ベンジルオキシ、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH(C_1 \sim C_6$  アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)N(C_1 \sim C_6$  アルキル) $_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、 $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、 $-O(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-O(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、（アリーール） $C_1 \sim C_6$  アルキル、または（ヘテロアリーール） $C_1 \sim C_6$  アルキルである。

【0065】

別の実施態様において、式（I）のインヒビター化合物は、式（II）のものであってもよい；

【0066】

【化3】



【0067】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式（I）または式（II）の化合物であり、ここで、

$R$  は、 $N$  および  $CR_5$  から選択され；

$R_5$  は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_2 \sim C_6$  アルケニル、 $C_2 \sim C_6$  アルキニル、ハロ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、アミノ、（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）アミノ、ジ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）アミノ、ヒドロキシ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ） $C_1 \sim C_6$  アルキル、アミノ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、スルファニル（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）スルファニル（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、および  $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$  からなる群から選択され；

$R_1$  は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ）、ヒドロキシ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）、（ $C_1 \sim C_6$  アルコキシ） $C_1 \sim C_6$  アルキル、アミノ（ $C_1 \sim C_6$  アルキル）

10

20

30

40

50

ル)、スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、または( $C_1 \sim C_6$ アルキル)スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)であり;

$R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、ホルミル( $C_0 \sim C_6$ アルキル)、アミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルキル)スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、または $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ であり;

$R_3$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、ホルミル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、アミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルキル)スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_{1-5}C(O)NH(C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)N(C_1 \sim C_6$ アルキル) $_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、または $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)であり;かつ、

$R_4$ は、ヒドロキシ、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、ベンジルオキシ、 $-(CH_2)_{1-5}C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、 $-(CH_2)_{1-5}C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH(C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)N(C_1 \sim C_6$ アルキル) $_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、 $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、 $-O(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、または $-O(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)である。

#### 【0068】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは式(I)または(II)の化合物であり、

ここで、

$R$ は、 $N$ および $CR_5$ から選択され;

$R_5$ は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、アミノ、( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ジ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、およびアミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)からなる群から選択され;

$R_1$ は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、またはハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)であり;

$R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、ホルミル( $C_0 \sim C_6$ アルキル)、アミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルキル)スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)であり;

$R_3$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_{1-5}C(O)NH(C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)N(C_1 \sim C_6$ アルキル) $_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、または $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)であり;かつ

$R_4$ は、ヒドロキシ、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、ベンジルオキシ、 $-(CH_2)_{1-5}C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、 $-(CH_2)_{1-5}C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH(C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)N(C_1 \sim C_6$ アルキル) $_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、または $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)である。

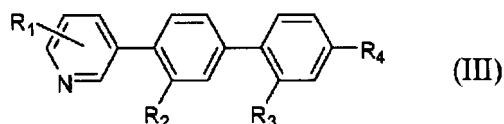
O)  $N(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})_2$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、 $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6 \text{ アルコキシ})$ 、 $-O(CH_2)_{1 \sim 5}-C(O)OH$ 、または $-O(CH_2)_{1 \sim 5}-C(O)(C_1 \sim C_6 \text{ アルコキシ})$ である。

【0069】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(II)の化合物であり、ここでRはNである。こうした化合物は、式(III)：

【0070】

【化4】



10

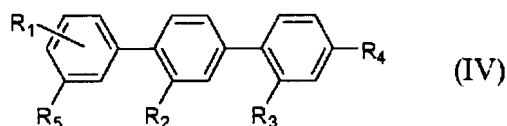
【0071】

で表すことができる。

さらに別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(II)の化合物であり、ここでRは $CR_5$ である。こうした化合物は、式(IV)：

【0072】

【化5】



20

【0073】

で表すことができる。

好ましい一実施態様において、インヒビターは、式(I)～(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_1$ は水素、ヒドロキシ、または $C_1 \sim C_6$ アルコキシである。

【0074】

好ましい一実施態様において、インヒビターは、(I)～(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_1$ は水素である。

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)～(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ホルミル( $C_0 \sim C_6$ アルキル)、アミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、またはスルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)である。

【0075】

さらに別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)～(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)またはホルミル( $C_0 \sim C_6$ アルキル)である。

40

【0076】

さらに別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)～(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、またはヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)であり得る。たとえば、ある実施態様において、 $R_2$ は、メチル、エチル、またはイソプロピル等の、 $C_1 \sim C_6$ アルキルであり得る。他の実施態様において、 $R_2$ は、フルオロメチル、ジフルオロメチル、またはトリフルオロメチル等の、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)であり得る。 $R_2$ は、ある実施態様において、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)であり得る。たとえば、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)は、ヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、または2-ヒ

50

ドロキシエチルであり得る。

【0077】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある好ましい実施態様において、 $R_2$ はメチルである。

【0078】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_3$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6 \text{アルコキシ})$ 、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、または $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6 \text{アルコキシ})$ である。

10

【0079】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_3$ は、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1-5}-C(O)(C_1 \sim C_6 \text{アルコキシ})$ 、または $-(CH_2)_{1-5}-C(O)NH_2$ である。

【0080】

さらに別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_3$ は、 $-(CH_2)_{1-2}-C(O)OH$ 、または $-(CH_2)_{1-2}-C(O)(C_1 \sim C_6 \text{アルコキシ})$ である。たとえば、ある実施態様において、 $R_3$ は、 $-(CH_2)_2-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_2-C(O)(OCH_3)$ 、 $-(CH_2)_2-C(O)(OCH_2CH_3)$ 、または $-(CH_2)_2-C(O)(OC(CH_3)_3)$ であり得る。他の実施態様において、 $R_3$ は、 $-(CH_2)_2-C(O)OH$ 、または $-(CH_2)_2-C(O)(OCH_2CH_3)$ であり得る。

20

【0081】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_3$ は、 $-(CH_2)_{1-2}-C(O)OH$ である。好ましくは、 $R_3$ は、 $-(CH_2)_2-C(O)OH$ である。

【0082】

好ましい一実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_4$ は、ヒドロキシ、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、またはベンジルオキシである。

30

【0083】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで、 $R_4$ は、ヒドロキシまたは $C_1 \sim C_6$ アルコキシ(たとえば、メトキシ)である。好ましくは、 $R_4$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシである。さらに好ましい実施態様において、 $R_4$ はメトキシである。

【0084】

好ましい一実施態様において、インヒビターは、式(I)、(II)、または(IV)に関して上述した化合物であり、ここで、 $R_5$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、またはハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)である。

40

【0085】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)、(II)、または(IV)に関して上述した化合物であり、ここで、 $R_5$ は、メチル等の、 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

【0086】

さらに別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)、(II)、または(IV)に関して上述した化合物であり、ここで、 $R_5$ は、トリフルオロメチル等の、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)である。

50

## 【0087】

ある好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)、(II)、または(IV)のいずれかの化合物であり、ここで：

R<sub>5</sub>は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>アルキニル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)、アミノ、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)アミノ、ジ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)アミノ、ヒドロキシ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、およびアミノ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)からなる群から選択され；

R<sub>1</sub>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、またはハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)であり；

R<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、ヒドロキシ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ホルミル(C<sub>0</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、アミノ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、または(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)チオ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)であり；

R<sub>3</sub>は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)NH(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)N(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-CH=CH-C(O)OH、-CH=CH-C(O)(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)であり；かつ

R<sub>4</sub>は、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)、またはベンジルオキシである。

## 【0088】

ある好ましい実施態様において、インヒビターは、式(III)のいずれかの化合物であり、ここで：

R<sub>1</sub>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、またはハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)であり；

R<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、ヒドロキシ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ホルミル(C<sub>0</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、アミノ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、または(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)チオ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)であり；

R<sub>3</sub>は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)NH(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)N(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-CH=CH-C(O)OH、-CH=CH-C(O)(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)であり；かつ

R<sub>4</sub>は、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)、またはベンジルオキシである。

## 【0089】

ある好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)、(II)、または(IV)のいずれかの化合物であり、ここで、R<sub>1</sub>は、水素であり；R<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、ヒドロキシ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、またはホルミル(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)であり；R<sub>3</sub>は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)、または-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>-C(O)NH<sub>2</sub>であり；R<sub>4</sub>は、ヒドロキシまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシであり；R<sub>5</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル)、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、またはハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ)である。

## 【0090】

ある好ましい実施態様において、インヒビターは、式(III)のいずれかの化合物であり、ここで、R<sub>1</sub>は、水素であり；R<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>ア

10

20

30

40

50

ルキル)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、またはホルミル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)であり;  $R_3$ は、 $-(CH_2)_{1 \sim 2}-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 2}-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、または $-(CH_2)_{1 \sim 2}-C(O)NH_2$ であり;  $R_4$ は、ヒドロキシまたは $C_1 \sim C_6$ アルコキシであり、 $R_5$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、またはハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)である。

## 【0091】

ある好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかの化合物であり、ここで:

$R$ は、存在するのであれば、 $N$ および $CR_5$ から選択され;

$R_5$ は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、アミノ、( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ジ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、およびアミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)からなる群から選択され;

$R_1$ は、水素であり;

$R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキルであり;

$R_3$ は、 $-(CH_2)_{1 \sim 2}-C(O)OH$ であり;かつ

$R_4$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシである。

## 【0092】

ある好ましい実施態様において、インヒビターは、式(I)~(IV)のいずれかの化合物であり、ここで:

$R$ は、存在するのであれば、 $N$ および $CR_5$ から選択され;

$R_5$ は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、アミノ、( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ジ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、およびアミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)からなる群から選択され;

$R_1$ は、水素であり;

$R_2$ はメチルであり;

$R_3$ は、 $-(CH_2)_2-C(O)OH$ であり;かつ

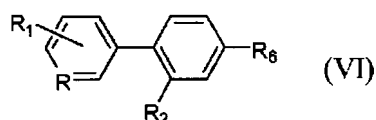
$R_4$ はメトキシである。

## 【0093】

好ましい一実施態様において、インヒビターは、式(V)または式(VI):

## 【0094】

## 【化6】



## 【0095】

の化合物である。

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(V)または(VI)の化合物であり、ここで:

$R$ は、 $N$ および $CR_5$ から選択され;

$R_5$ は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、アミノ、( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ジ(

$C_1 \sim C_6$  アルキル) アミノ、ヒドロキシ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、アミノ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)OH、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O) ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、および - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)NH<sub>2</sub> からなる群から選択され;

R<sub>1</sub> は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、  $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、  $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、ヒドロキシ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、アミノ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、または ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) であり;

R<sub>2</sub> は、  $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、  $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、ヒドロキシ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、ホルミル ( $C_0 \sim C_6$  アルキル)、アミノ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)OH、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O) ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)NH<sub>2</sub>、 - CH=CH - C(O)OH、または - CH=CH - C(O) ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ) であり; かつ

R<sub>6</sub> は、ヒドロキシ、ハロゲン、  $C_1 \sim C_6$  アルキル、  $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、ベンジルオキシ、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)OH、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O) ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)NH<sub>2</sub>、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)NH ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)N ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)<sub>2</sub>、 - CH=CH - C(O)OH、 - CH=CH - C(O) ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ) または - OS(O)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> である。

【0096】

別の好ましい実施態様において、開示内容は、式 (V) または (VI) の化合物を提供し、ここで:

R は、N および CR<sub>5</sub> から選択され;

R<sub>5</sub> は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、  $C_1 \sim C_6$  アルキル、  $C_2 \sim C_6$  アルケニル、  $C_2 \sim C_6$  アルキニル、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、  $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、アミノ、 ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) アミノ、ジ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) アミノ、ヒドロキシ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアミノ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) からなる群から選択され;

R<sub>1</sub> は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、  $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、  $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、またはハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ) であり;

R<sub>2</sub> は、  $C_1 \sim C_6$  アルキル、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、ヒドロキシ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)  $C_1 \sim C_6$  アルキル、ホルミル ( $C_0 \sim C_6$  アルキル)、アミノ ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 ( $C_1 \sim C_6$  アルキル) スルファニル ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 - CH=CH - C(O)OH、または - CH=CH - C(O) ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ) であり; かつ

R<sub>6</sub> は、ヒドロキシ、ハロゲン、  $C_1 \sim C_6$  アルキル、  $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、ハロ ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、ベンジルオキシ、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)OH、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O) ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)NH<sub>2</sub>、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)NH ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)、 - ( $CH_2$ )<sub>1-5</sub> - C(O)N ( $C_1 \sim C_6$  アルキル)<sub>2</sub>、 - CH=CH - C(O)OH、 - CH=CH - C(O) ( $C_1 \sim C_6$  アルコキシ)、または - OS(O)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> である。

【0097】

好ましい一実施態様において、インヒビターは、式 (V) ~ (VI) のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで R<sub>1</sub> は水素である。

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式 (V) ~ (VI) のいずれかに関

10

20

30

40

50

して上述した化合物であり、ここで $R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ホルミル( $C_0 \sim C_6$ アルキル)、アミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、スルファニル( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、または $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)である。

【0098】

さらに別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(V)~(VI)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで $R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ホルミル( $C_0 \sim C_6$ アルキル)、 $-CH=CH-C(O)OH$ 、または $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)である。さらに別の好ましい実施態様において、開示内容は、式(V)~(VI)のいずれかに関して上述した化合物を提供し、ここで $R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、または $-CH=CH-C(O)(C_1 \sim C_6$ アルコキシ)であり得る。たとえば、ある実施態様において、 $R_2$ は、メチル、エチル、またはイソプロピル等の、 $C_1 \sim C_6$ アルキルで有り得る。他の実施態様において、 $R_2$ は、フルオロメチル、ジフルオロメチル、またはトリフルオロメチル等の、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)で有り得る。 $R_2$ は、ある実施態様において、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)であり得る。たとえば、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)は、ヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、または2-ヒドロキシエチルで有り得る。

10

【0099】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(V)~(VI)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで $R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある好ましい実施態様において、 $R_2$ はメチルである。

20

【0100】

好ましい一実施態様において、インヒビターは、式(V)~(VI)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで $R_6$ は、ヒドロキシ、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、ベンジルオキシ、または $-OS(O)_2CF_3$ である。

【0101】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(V)~(VI)のいずれかに関して上述した化合物であり、ここで $R_6$ は、ヒドロキシまたは $C_1 \sim C_6$ アルコキシ(たとえば、メトキシ)である。好ましい一実施態様において、開示内容は、式(V)~(VI)に関して上述した化合物を提供し、ここで $R_5$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、またはハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)である。

30

【0102】

別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(V)~(VT)に関して上述した化合物であり、ここで $R_5$ は、メチル等の、 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

さらに別の好ましい実施態様において、インヒビターは、式(V)~(VI)に関して前述した化合物であり、ここで $R_5$ は、トリフルオロメチル等の、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)である。ある好ましい実施態様において、開示内容は、式(V)~(VI)のいずれかの化合物を提供し、ここで：

40

$R_5$ は、水素、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)、アミノ、( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ジ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、およびアミノ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)からなる群から選択され；

$R_1$ は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、またはハロ( $C_1 \sim C_6$ アルコキシ)であり；

$R_2$ は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_6$ アルキル)、ヒドロキシ( $C_1 \sim C_6$

50

アルキル)、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、ホルミル(C<sub>0</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、アミノ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、スルファニル(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)チオ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)または-CH=CH-C(O)(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)であり;かつ

R<sub>6</sub>は、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)、または-O-S(O)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>である。

#### 【0103】

ある好ましい実施態様において、インヒビターは、式(V)~(VI)のいずれかの化合物であり、ここで、R<sub>1</sub>は水素であり;R<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、ヒドロキシ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、ホルミル(C<sub>0</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、または-CH=CH-C(O)(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)であり;R<sub>6</sub>は、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、または-O-S(O)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>であり;R<sub>5</sub>は、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル)、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、またはハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ)である。GBPインヒビター化合物は、健全な医学的判断の範囲内であり、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、等なしに、患者の組織と接触した使用に適し、妥当な利益/リスク比に見合い、それらの所期の使用に有効である、本発明の化合物のカルボン酸塩、アミノ酸付加塩、エステル、アミド、プロドラッグ、ならびに可能であれば、本発明の化合物の両性イオン形を含むがそれらに限定されない、化合物の薬学的に許容できる塩類、エステル類、アミド類、およびプロドラッグを含む。用語「塩類」は、本発明の化合物の、比較的非毒性の、無機酸付加塩および有機酸付加塩を指す。こうした塩類は、化合物の最終分離および精製の間インサイチュで、または精製した化合物をその遊離塩基形で、適当な有機酸または無機酸と別々に反応させ、そのようにして形成された塩を分離することによって、調製することができる。例示的な塩類としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、バルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、ホウ酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩、等が挙げられる。これらは、アルカリ金属およびアルカリ土類金属をベースとするカチオン、たとえば、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、等、ならびにアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン、等を含むがそれらに限定されない、非毒性のアンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンカチオンを含んでもよい。(たとえば、ベルジュ(Berge)S.Mら著、「医薬品塩類(Pharmaceutical Salts)」、J.Pharm.Sci.、1977年;66巻:P1~19を参照されたい(参照により本明細書に援用する)。)

インヒビターの、薬学的に許容できる、非毒性のエステル類の例としては、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルエステル(ここで、アルキル基は直鎖または分岐鎖であり、置換されたまたは未置換である)、C<sub>5</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキルエステル、ならびにベンジルおよびトリフェニルメチル等のアリールアルキルエステルなどが挙げられる。C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキルエステル、たとえばメチル、エチル、2,2,2-トリクロロエチル、およびtert-ブチル等が、好ましい。本発明の化合物のエステル類は、従来の方法に従って調製することが可能である。

#### 【0104】

インヒビターの、薬学的に許容できる、非毒性のアミド類の例としては、アンモニア、一級C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルアミンおよび二級C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ジアルキルアミンから誘導されるアミドなどが挙げられ、ここで、アルキル基は直鎖状または分岐鎖状である。二級アミンの場合には、アミンは、窒素原子1個を含む、5員または6員のヘテロ環の形であってもよい。アンモニア、C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>アルキル一級アミンおよびC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>ジアルキル二級アミンから誘導されるアミド類が好ましい。本発明の化合物のアミド類は、従来の方法に従って調製することが可能である。

10

20

30

40

50

## 【0105】

用語「プロドラッグ」は、たとえば、血中で加水分解により、インビボで容易に変換されて上式の親化合物を生じる化合物を指す。プロドラッグの徹底的な議論は、T. ヒグチ (Higuchi) および V. ステラ (Stella) 著、「新規デリバリーシステムとしてのプロドラッグ (Pro-drugs as Novel Delivery Systems)」、A. C. S. シンポジウムシリーズ (A. C. S. Symposium Series) の第14巻、および薬物設計における生体可逆的担体 (Bioreversible Carriers in Drug Design)、エドワード (Edward) B. ロシュ (Roche) 編、アメリカン・ファーマシューティカル・アソシエーション・アンド・ペルガモン・プレス (American Pharmaceutical Association and Pergamon Press)、1987年に提供されており、その両者を参照により本明細書に援用する。

10

## 【0106】

本明細書で使用されるとき、用語「アルケニル」は、特別の定めのない限り、2~10個の炭素を含み、かつ少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む、直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。アルケニルの代表例としては、エテニル、2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、3-ブテニル、4-ペンテニル、5-ヘキセニル、2-ヘプテニル、2-メチル-1-ヘプテニル、3-デセニル、および3,7-ジメチルオクタ-2,6-ジエニル等が挙げられるが、それらに限定されない。

20

## 【0107】

本明細書で使用されるとき、用語「アルコキシ」は、酸素原子を介して親分子部分に付加された、本明細書で定義される、アルキル基を意味する。アルコキシの代表例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、2-プロポキシ、ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、およびヘキシルオキシ等が挙げられるが、それらに限定されない。

## 【0108】

本明細書で使用されるとき、用語「アルキル」は、特別の定めのない限り、1~10個の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。アルキルの代表例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソ-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、3-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、およびn-デシル等が挙げられるが、それらに限定されない。「アルキル」基が、他の2つの部分の間の結合基であるとき、そのときはアルキル基は直鎖であっても分岐鎖であってもよい；例としては  $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$  等が挙げられるが、それらに限定されない。

30

## 【0109】

用語「アルキレン」は、二価アルキル基を指す。「アルキレン鎖」は、ポリメチレン基、すなわち  $-(CH_2)_n-$  であり、ここでnは正の整数、好ましくは1~6、1~4、1~3、1~2、または2~3である。置換アルキレン鎖は、1つまたは複数のメチレン水素原子が置換基で置換されているポリメチレン基である。適当な置換基としては、置換脂肪族基について後述されるものなどがある。アルキレン鎖はまた、1つまたは複数の位置で、脂肪族基または置換脂肪族基で置換されていてもよい。

40

## 【0110】

本明細書で使用されるとき、用語「アルキニル」は、2~10個の炭素原子を含み、かつ少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む、直鎖または分岐鎖の炭化水素基を意味する。アルキニルの代表例としては、アセチレニル、1-プロピニル、2-プロピニル、3-ブチニル、2-ペンチニル、および1-ブチニル等が挙げられるが、それらに限定されない。

## 【0111】

本明細書で使用されるとき、用語「アリール」は、フェニル (すなわち、単環アリール

50

)か、または芳香族二環系の中に炭素原子のみを含む少なくとも1つのフェニル環または芳香族二環を含む二環系を意味する。二環アリールは、アズレニル、ナフチルであってもよく、あるいは単環シクロアルキル、単環シクロアルケニル、または単環ヘテロシクリルに縮合したフェニルであってもよい。二環アリールは、二環系のフェニル部分内に含まれる炭素原子、あるいはナフチル環またはアズレニル環が付いた炭素原子を介して、親分子部分に結合している。二環アリールの縮合した単環シクロアルキル部分または単環ヘテロシクリル部分は、1つまたは2つのオキソ基および/またはチア基で任意選択的に置換されている。二環アリールの代表例としては、アズレニル、ナフチル、ジヒドロインデン-1-イル、ジヒドロインデン-2-イル、ジヒドロインデン-3-イル、ジヒドロインデン-4-イル、2,3-ジヒドロインドール-4-イル、2,3-ジヒドロインドール-5-イル、2,3-ジヒドロインドール-6-イル、2,3-ジヒドロインドール-7-イル、インデン-1-イル、インデン-2-イル、インデン-3-イル、インデン-4-イル、ジヒドロナフタレン-2-イル、ジヒドロナフタレン-3-イル、ジヒドロナフタレン-4-イル、ジヒドロナフタレン-1-イル、5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-1-イル、5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-2-イル、2,3-ジヒドロベンゾフラン-4-イル、2,3-ジヒドロベンゾフラン-5-イル、2,3-ジヒドロベンゾフラン-6-イル、2,3-ジヒドロベンゾフラン-7-イル、ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-4-イル、ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル、2H-クロメン-2-オン-5-イル、2H-クロメン-2-オン-6-イル、2H-クロメン-2-オン-7-イル、2H-クロメン-2-オン-8-イル、イソインドリン-1,3-ジオン-4-イル、イソインドリン-1,3-ジオン-5-イル、インデン-1-オン-4-イル、インデン-1-オン-5-イル、インデン-1-オン-6-イル、インデン-1-オン-7-イル、2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキサジン-5-イル、2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキサジン-6-イル、2H-ベンゾ[b][1,4]オキサジン3(4H)-オン-5-イル、2H-ベンゾ[b][1,4]オキサジン3(4H)-オン-6-イル、2H-ベンゾ[b][1,4]オキサジン3(4H)-オン-7-イル、2H-ベンゾ[b][1,4]オキサジン3(4H)-オン-8-イル、ベンゾ[d]オキサジン-2(3H)-オン-5-イル、ベンゾ[d]オキサジン-2(3H)-オン-6-イル、ベンゾ[d]オキサジン-2(3H)-オン-7-イル、ベンゾ[d]オキサジン-2(3H)-オン-8-イル、キナゾリン-4(3H)-オン-5-イル、キナゾリン-4(3H)-オン-6-イル、キナゾリン-4(3H)-オン-7-イル、キナゾリン-4(3H)-オン-8-イル、キノキサリン-2(1H)-オン-5-イル、キノキサリン-2(1H)-オン-6-イル、キノキサリン-2(1H)-オン-7-イル、キノキサリン-2(1H)-オン-8-イル、ベンゾ[d]チアゾール-2(3H)-オン-4-イル、ベンゾ[d]チアゾール-2(3H)-オン-5-イル、ベンゾ[d]チアゾール-2(3H)-オン-6-イル、および、ベンゾ[d]チアゾール-2(3H)-オン-7-イルなどが挙げられるが、それらに限定されない。ある実施態様において、二環アリールは、(i)ナフチルか、または(ii)5員または6員の単環シクロアルキル、5員または6員の単環シクロアルケニル、あるいは5員または6員の単環ヘテロシクリルのいずれかに縮合したフェニル環であり、ここで縮合シクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクリル基は、独立にオキソまたはチアである、1つまたは2つの基で任意選択的に置換されている。

10

20

30

40

#### 【0112】

本明細書で使用されるとき、用語「ハロ」または「ハロゲン」は、-Cl、-Br、-Iまたは-Fを意味する。

用語「ハロアルキル」、「ハロアルケニル」および「ハロアルコキシ」は、場合によって、1つまたは複数のハロゲン原子で置換されている、アルキル、アルケニルまたはアルコキシ基を指す。

#### 【0113】

本明細書で使用されるとき、用語「ヘテロアリール」は、単環ヘテロアリールか、また

50

は少なくとも1つの芳香族複素環を含む二環系を意味する。単環ヘテロアリアルは、5員環または6員環であってもよい。5員環は、2つの二重結合と、1、2、3、または4つの窒素原子および任意選択的に1つの酸素原子またはイオウ原子で構成される。6員環は、3つの二重結合と、1、2、3または4つの窒素原子で構成される。5員または6員のヘテロアリアルは、ヘテロアリアル内に含まれるいずれかの炭素原子またはいずれかの窒素原子を介して、親分子部分に結合されている。単環ヘテロアリアルの代表例としては、フリル、イミダゾリル、イソキサゾリル、イソチアゾリル、オキサジアゾリル、オキサゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピロリル、テトラゾリル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリル、およびトリアジニルなどが挙げられるが、それらに限定されない。二環ヘテロアリアルは、フェニル、単環シクロアルキル、単環シクロアルケニル、単環ヘテロシクリル、または単環ヘテロアリアルに縮合した単環ヘテロアリアルで構成される。二環ヘテロアリアル基の縮合したシクロアルキル部分またはヘテロシクリル部分は、独立にオキソまたはチアである1つまたは2つの基で任意選択的に置換されている。二環ヘテロアリアルが縮合したシクロアルキル、シクロアルケニル、またはヘテロシクリル環を含む場合、そのときは二環ヘテロアリアル基は、二環系の単環ヘテロアリアル部分内に含まれるいずれかの炭素原子または窒素原子を介して親分子部分に結合されている。二環ヘテロアリアルが、ベンゾ環に縮合した単環ヘテロアリアルである場合、そのときは二環ヘテロアリアル基は、二環系内のいずれかの炭素原子または窒素原子を介して親分子部分に結合されている。二環ヘテロアリアルの代表例としては、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾキサジアゾリル、ベンゾキサチアジアゾリル、ベンゾチアゾリル、シンノリニル、5,6-ジヒドロキノリン-2-イル、5,6-ジヒドロイソキノリン-1-イル、フロピリジニル、インダゾリル、インドリル、イソキノリニル、ナフチリジニル、キノリニル、プリニル、5,6,7,8-テトラヒドロキノリン-2-イル、5,6,7,8-テトラヒドロキノリン-3-イル、5,6,7,8-テトラヒドロキノリン-4-イル、5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリン-1-イル、チエノピリジニル、4,5,6,7-テトラヒドロベンゾ[c][1,2,5]オキサジアゾリル、および6,7-ジヒドロベンゾ[c][1,2,5]オキサジアゾール-4(5H)-オニルなどが挙げられるが、それらに限定されない。ある実施態様において、縮合二環ヘテロアリアルは、フェニル環、5員または6員の単環シクロアルキル、5員または6員の単環シクロアルケニル、5員または6員の単環ヘテロシクリル、あるいは5員または6員の単環ヘテロアリアルのいずれかに縮合した5員または6員の単環ヘテロアリアル環であり、ここで縮合したシクロアルキル基、シクロアルケニル基、およびヘテロシクリル基は、独立にオキソまたはチアである1つまたは2つの基で任意選択的に置換されている。

10

20

30

40

#### 【0114】

G P B P インヒビターは通常、指示された投与経路に適した1つまたは複数の補助剤と併用される。インヒビターは、ラクトース、スクロース、澱粉粉末、アルカン酸のセルロースエステル、ステアリン酸、タルク、ステアリン酸マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸および硫酸のナトリウム塩およびカルシウム塩、アカシア、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリジン、および/またはポリビニルアルコールと混合して、従来の投与用に錠剤化またはカプセル化してもよい。あるいは、インヒビターは、食塩水、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、エタノール、コーンオイル、ピーナッツ油、綿実油、ゴマ油、トラガントガム、および/または様々なバッファーに溶解してもよい。他の補助剤および投与方法は、薬剤学の技術分野で周知である。担体または希釈剤は、時間遅延物質、たとえばモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルを単独でまたはワックスと一緒に、あるいは当該技術分野で周知の物質等、を含んでもよい。

#### 【0115】

インヒビターは、唯一の活性医薬品として投与することができ、あるいは本発明の方法を実行するのに有用な1つまたは複数の他の化合物と併用することもできる。併用として

50

投与するとき、治療薬は、同時にまたは異なるときに投与される別々の組成物として調合することもでき、あるいは治療薬を単一の組成物として投与することもできる。

【0116】

インヒビターは、固形（顆粒剤、散剤または坐薬を含む）で、または液体（たとえば、液剤、懸濁剤、乳剤）で、調合することが可能である。インヒビターは、種々の液剤で用いることができ、滅菌等の従来の製薬工程にかけることが可能であり、かつ/または従来の補助剤、たとえば保存料、安定剤、湿潤剤、乳化剤、バッファー等を含んでもよい。

【0117】

インヒビターは、従来の非毒性の薬学的に許容できる担体、補助剤および媒体を含む投与量単位製剤で、経口的、局所的、非経口的、吸入またはスプレーによって、あるいは直腸内に、投与することが可能である。本明細書で使用されるとき、用語非経口的は、経皮、皮下、血管内（たとえば、静脈内）、筋肉内、または髄腔内の注射または注入技術等を含む。インヒビターを含有する医薬組成物は、経口使用に適した形状、たとえば、錠剤、トローチ剤、薬用ドロップ、水性または油性懸濁剤、分散性散剤または顆粒剤、乳剤、硬カプセル剤または軟カプセル剤、シロップ剤またはエリキシル剤等であってもよい。

10

【0118】

経口使用向けの組成物は、医薬組成物の製造技術分野に知られている任意の方法に従って調製することが可能であり、そのような組成物は、口当たりがよい製剤を提供するために、甘味料、香味剤、着色剤および保存料からなる群から選択される1つまたは複数の化学物質を含んでもよい。錠剤は、錠剤の製造に適した非毒性の薬学的に許容できる賦形剤との混合物の中に、有効成分を含む。こうした賦形剤は、たとえば、不活性な希釈剤、たとえば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム等；造粒剤および崩壊剤、たとえば、コーンスターチ、またはアルギン酸；結合剤、たとえば澱粉、ゼラチンまたはアカシア、および滑沢剤、たとえばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクであってもよい。錠剤は、コーティングされていなくてもよく、既知の技術でコーティングされていてもよい。場合によっては、そのようなコーティングは、消化管内での分解や吸収を遅らせ、その結果、より長期間にわたって持続的な作用を提供するための既知の技術によって調製することが可能である。たとえば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の、時間遅延物質を使用することが可能である。

20

30

【0119】

経口使用のための製剤は、有効成分が不活性な固体希釈剤、たとえば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンと混合される硬ゼラチンカプセル剤として提供されることもあり、または有効成分が水媒質または油媒質、たとえばピーナッツ油、流動パラフィンまたはオリーブ油と混合される軟ゼラチンカプセル剤として提供されることもある。

【0120】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤との混合物の中に、活性物質を含む。そのような賦形剤は、懸濁化剤、たとえばナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロプロピル-メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガントガムおよびアカシアゴムであってもよく；分散剤または湿潤剤は、天然のリン脂質、たとえば、レシチン、または脂肪酸とアルキレンオキシドの縮合生成物、たとえばステアリン酸ポリオキシエチレン、長鎖脂肪族アルコールとエチレンオキシドの縮合生成物、たとえばヘプタデカエチレンオキシセタノール、または、脂肪酸とヘキシトールから誘導される部分エステルとエチレンオキシドの縮合生成物、たとえばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール、または脂肪酸とヘキシトール無水物から誘導される部分エステルとエチレンオキシドの縮合生成物、たとえばモノオレイン酸ポリエチレンソルビタンであってもよい。水性懸濁液は、1つまたは複数の保存料、たとえばエチル、またはn-プロピルp-ヒドロキシ安息香酸、1つまたは複数の着色剤、1つまたは複数の香味剤、および1つまたは複数の甘味料、たとえばスクロースまたはサッカリン等も含んでもよい。

40

50

## 【0121】

油性懸濁液は、植物油、たとえば落花生油、オリーブ油、ゴマ油またはヤシ油の中に、あるいは流動パラフィン等の鉱油の中に、インヒビターを懸濁させることによって調合することが可能である。油性懸濁液は、増粘剤、たとえば蜜蝋、固形パラフィンまたはセチルアルコールを含んでもよい。口当たりのよい経口製剤を提供するために、甘味料および香味剤を添加してもよい。こうした組成物は、アスコルビン酸等の酸化防止剤を添加することによって保存することが可能である。

## 【0122】

水の添加による水性懸濁液の製剤に適した分散性粉末および顆粒は、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤および1つまたは複数の保存料との混合物で、インヒビターを提供する。適当な分散剤または湿潤剤あるいは懸濁化剤は、すでに上述したもので例示されている。追加的な賦形剤、たとえば甘味料、香味剤および着色剤も存在してもよい。

10

## 【0123】

インヒビターは、水中油乳剤の形で投与することも可能である。油性相は、植物油または鉱油またはこれらの混合物であってもよい。適当な乳化剤は、天然ゴム、たとえばアカシアゴムやトラガントガム、天然のリン脂質、たとえば大豆、レシチン、および脂肪酸とヘキシトールから誘導されるエステルまたは部分エステル、無水物、たとえばモノオレイン酸ソルビタン塩、およびエチレンオキッドと前記部分エステルの縮合生成物、たとえばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンであってもよい。乳剤は、甘味料および香味剤も含んでもよい。

20

## 【0124】

シロップ剤およびエリキシル剤は、甘味料、たとえばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、グルコースまたはスクロースと調合することが可能である。そのような製剤は、粘滑薬、保存料、ならびに香味剤および着色剤も含んでもよい。インヒビター組成物は、無菌の注射用水性懸濁液または油性懸濁液の形であってもよい。この懸濁液は、既知の技術に従って、上述の適当な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して調合することが可能である。無菌の注射用製剤は、非毒性の親らしく許容できる希釈剤または溶媒、たとえば1,3-ピタンジオール中の溶液等、無菌の注射用溶液または懸濁液であってもよい。使用することが可能な許容できる媒体および溶媒としては、水、リンゲル液および塩化ナトリウム等張液などがある。加えて、無菌の不揮発性油は、溶媒または懸濁化剤として従来使用されている。このために、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含め、任意の無刺激性の不揮発性油を使用することが可能である。加えて、オレイン酸等の脂肪酸は、注射剤の製剤に用途がある。

30

## 【0125】

インヒビター含有組成物は、たとえば、薬物を直腸投与するための、坐薬の形で投与することも可能である。こうした組成物は、常温では固体であるが直腸温度では液体であり、したがって、直腸内で溶けて薬物を放出するであろう、適当な非刺激性の賦形剤と薬物を混合することによって調製することができる。そのような材料としては、カカオバターおよびポリエチレングリコールなどが挙げられる。

40

## 【0126】

本発明のインヒビター含有組成物は、無菌媒体中で、非経口的に投与することが可能である。薬物は、使用される媒体および濃度に応じて、媒体中に懸濁させたり溶解させたりすることができる。好都合なことに、局所麻酔薬、保存料および緩衝剤等の補助剤を媒体に溶解させることができる。

## 【0127】

およそ約0.01mg~約50mg/kg体重/日、より好ましくは0.1mg~約50mg/kg体重/日の、インヒビター投与量レベルが、上述の疾患の治療で有用である。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることが可能なインヒビターの量は、治療を受ける宿主および個々の投与方法によって異なるであろう。投与量単位形は一般に約1mg~約500mgのインヒビターを含有する。

50

## 【0128】

「薬学的に許容できる」は、健全な医学的判断の範囲内であり、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または妥当な利益/リスク比に見合う他の問題または合併症なしで人類および動物の組織との接触に適するか、さもなければヒトまたは家畜での使用に許容できるとして、米国食品医薬品局により承認済である、化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。

## 【0129】

第4態様で、本発明は、

(a) RAまたはPFの危険性のある対象者由来の血漿試料を、GPBP-結合分子のGPBPへの選択的結合を促進する条件下で、77kD GPBPに結合するGPBP-結合分子と接触させること；

10

(b) GPBP-結合分子と血漿試料中の77kD GPBPとの間の複合体形成を検出すること；

(c) GPBP-結合分子と血漿試料中の77kD GPBPとの間で形成された複合体の量を対照と比較すること；および

(d) 比較に基づいて、対象者を、RAまたはPFを有するとして診断すること、またはRAもしくはPFの診断のための実体に比較を提供すること；

を含む、関節リウマチ(RA)または肺線維症(PF)を診断する方法を提供する。

## 【0130】

RAの危険性のある対象者は、RAの何らかの症状または危険因子を有する対象者である。症状としては、特に早朝覚醒時または長期にわたる非活動後に、罹患関節が腫脹している、ほてっている、痛いおよび/またはこわばっている、関節の炎症；一般に1時間以上持続する早朝の関節のこわばり増加；腱テザリング；腱びらん；関節表面破壊；関節運動範囲障害；関節(手/指、足/つま先、頸椎、膝、および肩を含む)を冒す変形；および関節機能脳喪失、などが挙げられるが、それらに限定されない。

20

## 【0131】

PFは、肺における、過剰な結合組織の形成または発生(線維症)である。肺線維症の症状としては、進行性の息切れ(呼気作と関係した呼吸困難)等の息切れ、慢性乾燥、空咳、疲労および脱力、胸部不快、および/または食欲不振および急速な体重減少などが挙げられるが、それらに限定されない。時には、聴診の際に、肺底で細かい吸気性クラックルが聞こえる場合がある。解像度CATスキャンは通例、異常を示す。

30

## 【0132】

後続の実施例に示す通り、循環77kDの量は、RAおよびPFの前炎症期に増加し、ついで炎症性RAの特徴である腫脹した関節における痛みの発生、および炎症性PFの特徴である労作と関係した呼吸困難の発生と共に治まるため、77kD GPBPは、RAおよびPFの前炎症マーカーである。したがって、本方法を使用して、前炎症期にRAまたはPFを有する対象者を認定することができ、RAまたはPFに罹患している対象者の早期治療を可能にする。

## 【0133】

したがって、好ましい実施態様において、前炎症性RAの症状、たとえば1つまたは複数の関節腫脹、1つまたは複数の関節のこわばり、1つまたは複数の関節のほてり、一般に1時間以上持続する早朝の関節のこわばり増加、過剰な滑液、滑膜における線維組織の発生、および/または関節運動範囲の障害等を有する対象者におけるRAを診断するために、本方法を使用することができる。さらなる実施態様において、対象者は、1つまたは複数の関節腫脹の全てで痛みを経験している訳ではない。さらなる実施態様において、対象者は、1つまたは複数の関節の関節軟骨の破壊または強直を患わない。

40

## 【0134】

別の好ましい実施態様において、たとえば慢性乾燥、空咳；疲労および脱力；胸部不快；食欲不振および/または急速な体重減少；および/または労作と関係した呼吸困難等の、前炎症性PFの症状を有する対象者におけるPFを診断するために、本方法を使用する

50

ことができる。さらなる実施態様において、対象者は、安静時に呼吸困難を患っていない。

【0135】

今問題にしている方法は、疾病の決定的な診断を提供しないかもしれないが、本方法が、診断に役立つ陽性の徴候を提供するのであれば十分である。

この態様で使用されるとき、77kD GPBPの量は、完全な77kD GPBPだけのこともあり、血漿試料中の77kD GPBPと77kD GPBPフラグメントの量を含むこともある。

【0136】

対象者は、治療から恩恵を受ける可能性がある任意の対象者、たとえば哺乳動物等であってもよい。好ましい実施態様において、対象者はヒト対象者である。

関節リウマチ(RA)は、多くの組織および器官を冒す可能性があるが、主として(滑膜)関節を攻撃する、慢性の、全身性炎症性障害である。経過は、滑膜細胞の腫脹に続発する関節周囲の被囊の炎症反応、過剰な滑液、および滑膜における線維組織の発生をもたらす。疾病経過の病理は、多くの場合、関節軟骨の破壊および関節の強直に至る。RAは、肺、心膜、胸膜、強膜におけるびまん性の炎症、および皮下組織で最もよく見られる関節性病変も引き起こすことがある。

【0137】

世界人口の約1%が、RAに悩まされており、女性は男性より3倍多い。発症は、40~50歳が最も高頻度であるが、あらゆる年齢の人々が冒される可能性がある。RAは、障害を引き起こし、痛みを伴う疾患である可能性があり、もし適切に治療しなければ、機能および運動性の実質的喪失を招くことがある。症状、身体検査、X線、および臨床検査に基づいて行われる臨床診断ではあるが、米国リウマチ学会(American College of Rheumatology)(ACR)および欧州リウマチ学会(European League Against Rheumatism)(EULAR)は、診断ガイドラインを発行している。

【0138】

「GPBP-結合分子」は、1つまたは複数の他の生体分子、構造、細胞、組織等とは対照的に、77kD GPBPに選択的に結合するペプチドまたは核酸分子である。そのようなGPBP-結合分子の例示的な実施態様としては、抗体、アプタマーまたは基質などがあるが、それらに限定されない。本明細書で使用されるとき、「GPBP基質」は、77kD GPBP、またはGPBP-結合活性を保持するそのフラグメントに結合するGPBP生物活性の標的である。そのようなGPBP基質としては、I-20(配列番号18)、GPBP-相互作用蛋白質(GIP)(配列番号19~23)、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)およびその誘導体(配列番号24~27)、プリオン蛋白質(PrP)(配列番号28)、IV型コラーゲン3鎖NC1領域(3(IV)NC1)(配列番号29)、およびアルツハイマー病ペプチド(A<sub>I-42</sub>)(配列番号30)などが挙げられるが、それらに限定されない。こうした基質のGPBP結合を示す例示的な参考文献は、米国特許第6,579,969号明細書；米国特許第7,147,855号明細書；および米国特許第7,326,768号明細書にみられ、参照により全体として本明細書に援用する。

【0139】

「血漿試料」は、血液の液体成分である、血漿を意味し、たとえば、血球を除去するための全血の遠心分離によって調製される。本明細書で使用されるとき、血漿試料は、血液凝固因子が除去されている、血清試料も含む。

【0140】

血漿試料は、適当な対象者から、好ましくは、RAまたはPFに罹患している危険性のある、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、または家畜(ウシ、ヒツジ等)を含むがそれらに限定されない、哺乳動物、から得ることが可能である。最も好ましい実施態様において、血漿試料は、ヒト対象者から得る。本明細書に開示されている通り、発明者は、RAおよびPF

10

20

30

40

50

の動物モデルで、循環 77 kD GPBP 値の上昇を確認した。

【0141】

抗体は、上述の通り、ポリクローナルであれ、モノクローナルであれ、またはヒトモノクローナルであれ、いずれの選択的 GPBP 抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

【0142】

血漿試料中で、GPBP - 結合分子、たとえば抗体、アプタマー、または基質等の、77 kD GPBP への結合を促進するのに適した条件は、本明細書における教示および以下で提供する実施例に基づいて、当業者により決定され得る。たとえば、抗体 - 抗原結合は、多くの場合、疎水的相互作用（いわゆる疎水結合）に依存する；したがって、高い塩濃度、たとえばモル濃度範囲内、を使用して、非特異的結合を減少させ、特異的抗原 - 抗体結合を増加させることができる。選択性および特異性を増進するために、1つまたは複数の洗浄ステップを含む、さらなるステップが任意選択的に含まれてもよい。この洗浄ステップは、非結合の 77 kD GPBP および / または GPBP - 結合分子、または、非結合もしくは弱く結合した血清蛋白質；高濃度血清蛋白質の結合を減少させるための非特異的結合のインヒビター、77 kD GPBP を含むことが分かっている対照試料および / または 77 kD GPBP に結合しないことが分かっている陰性対照を、および / または 77 kD GPBP を持たないこと（ex : GPBP の欠失）が分かっている血漿試料の包含、を除去するためのものである。

【0143】

本方法は、ELISA、免疫蛍光検査法、およびクロマトグラフィ（たとえば、抗体を表面上で免疫化し、血漿蛋白質を標識して、抗体を血漿中の GPBP に結合させるのに適した条件下で、表面を流す、ラテラル・フロー・アッセイ）を含むがそれらに限定されない標準技術で、血漿試料中の 77 kD GPBP の存在についてテストすることができる。一実施態様において、フローサイトメトリーに連結された機能的ビーズ（ベクトン・ディッキンソン・テクノロジー（Becton Dickinson technology））が使用される；この技術は、体液または細胞 / 組織抽出物中の蛋白質レベルを測定するための新たな方法である。具体的には、蛍光マトリックスで作られたビーズを1つまたは複数の 77 kD GPBP 抗体で被覆し、血漿試料と混合し、さらにフィコエリトリン標識した検出用抗体と共にインキュベートする。最後に、マトリックス蛍光放射に従ってビーズを選択するフローサイトメトリープログラム、およびフィコエリトリン放出による分析物のレベル測定によって、ビーズを分析する。血球計算器で同時に検出して識別できる、最高 30 までの異なるタイプのビーズがある。この方法は、GPBP 抗体で被覆された特定のビーズタイプを、他の分析物用の結合ペプチド（すなわち自己抗体）で被覆された別個のビーズタイプと混合して同時に測定できるため、高感度および高性能を汎用性と結びつける。様々な分析物の測定は、GPBP 測定の可能性を高める可能性がある。一実施態様において、本技術は 77 kD GPBP アイソフォームの有無のみを決定することが可能である。あるいは、本技術は定量的である可能性があり、試料中の 77 kD GPBP の相対量に関する情報を提供する可能性がある。定量目的には、ELISA が好ましい。

【0144】

免疫複合体形成の検出は、標準検出技術で遂行できる。たとえば、免疫複合体の検出は、標識抗体または二次抗体を使用することによって遂行できる。標識の選択を含むそのような方法は、当業者に知られている。あるいは、抗体を検出可能な物質に結合する（couple）ことができる。用語「結合される（coupled）」は、検出可能な物質が抗体に物理的に連結されることを意味するために使用される。適当な検出可能な物質としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光体、発光体および放射性物質などがある。適当な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 - ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどがある。適当な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン / ビオチンおよびアビジン / ビオチンなどがある。適当な

10

20

30

40

50

蛍光体の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンなどがある。発光体の例としてはルミノールなどがある。適当な放射性物質としては<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>Sまたは<sup>3</sup>Hなどがある。

【0145】

本方法は、たとえば「正常」値の77kD GPBPを有することが分かっている血漿試料由来の対照、または血漿を入手した対象者由来の血漿で77kD GPBPの正常値が事前に測定された血漿試料由来の対照等の、対照と、テスト血漿試料で検出された77kD GPBP値の比較を含む。様々な実施態様において、対照は、組換え型77kD GPBPまたは参照値を使用した検量線を提供する。血漿試料中77kD GPBPの量と対照との比較で、対照と比較して血漿試料中の77kD GPBP上昇は、RAまたはPFの存在を示す。

10

【0146】

別の実施態様において、検量線用の基準値としての77kD GPBPの正常値は、血漿中に約1ng/ml~10ng/mlであるが、前炎症RA対象者は、正常値の少なくとも10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍およびそれ以上（すなわち300倍）、正常を超える。したがって、様々な実施態様において、RAの危険性のある対象者は、もし対象者の77kD GPBP血漿値が100ng/ml以上；200ng/ml以上；300ng/ml以上；400ng/ml以上；500ng/ml以上；600ng/ml以上；700ng/ml以上；800ng/ml以上；900ng/ml以上；1000ng/ml以上；2000ng/ml以上；または3000ng/ml以上であれば、RAを有すると診断される。

20

【0147】

前炎症PFモデルは、正常値の少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、またはそれ以上で、正常な77kD GPBP値を超える。したがって様々な実施態様において、PFの危険性のある対象者は、もし対象者の77kD GPBP血漿値が20ng/ml以上；30ng/ml以上；40ng/ml以上；50ng/ml以上；60ng/ml以上；70ng/ml以上；または80ng/ml以上であれば、PFを有すると診断される。

【0148】

さらなる実施態様において、77kD GPBP測定を、他の分析物の分析と組み合わせることにより、本方法は、RAまたはPFの鑑別診断または予後の実施を可能にする。非限定的な実施態様において、RAの危険性のある対象者で分析し得る他の分析物としては、リウマチ因子（RF）、抗CCP、抗変異シトルリン化ビメンチン（抗MCV）などがある。PFの危険性のある対象者で分析し得る他の分析物としては、形質転換増殖因子（TGF-）などがある。

30

【0149】

この第4の態様の全ての実施態様および実施態様の組合せの中の好ましい実施態様において、本方法は、対象者の血漿中のC反応性蛋白質（CRP）値を測定することをさらに含む。CRPは、炎症のマーカーである。後続の実施例に開示されている通り、血清中の77kD GPBP値とCRP値は、CKDおよびRAで逆相関している：77kD GPBP血漿値は、CKDおよびRAの前炎症段階で上昇しており、次いで炎症期に低下する。対照的に、CRP血漿値は、RAおよびCKDの炎症期に上昇するが、RAおよびCKDの前炎症期の間ずっと、ベースラインにとどまっている。したがって、一実施態様において、本方法は、血漿CRP値を測定すること、血漿CRPの量を対照と比較すること；および対象者がRAまたはPFを有するとして診断するのに役立つために、CRP比較を使用することを、さらに含む。

40

【0150】

別の実施態様において、本発明は、

(a) CKDまたは免疫複合体仲介GNの危険性のある対象者由来の血漿試料を、G

50

PBP - 結合分子のGPBPへの選択的結合を促進する条件下で、77kD GPBPに結合するGPBP - 結合分子と接触させること；

(b)(i) GPBP - 結合分子と血漿試料中の77kD GPBPとの間の複合体形成を検出すること；および

(ii) 対象者のC反応性蛋白質(CRP)血漿値を測定すること；

(c)(i) GPBP - 結合分子と血漿試料中のGPBPとの間で形成された複体の量を、対照と比較すること；および

(ii) 対象者の血漿中のCRP量を対照と比較すること；および

(d) 比較に基づいて、対象者を、CKDまたは免疫複合体仲介GNを有するとして診断すること、またはCKDまたは免疫複合体仲介GNの診断のための実体に比較を提供すること；

を含む、CKDまたは免疫複合体仲介GNを診断する方法を提供する。

#### 【0151】

こうした実施態様、またはその組合せの、いずれの方法も、対象者由来の血漿中の77kD GPBP値およびCRP値を、2つ以上の時点(すなわち：2、3、4、5、以上の時点)に測定すること、それぞれを対照と比較すること、および2つ以上の測定値の比較に基づいて、対象者がRA、PF、CKD、または免疫複合体仲介GNを有すると診断することをさらに含んでもよい。全ての実施態様において、77kD GPBP値と同じ血漿試料、または種々の試料から、CRP値を測定することが可能である。健康なヒト血漿中のCRPの正常濃度は通常、3 $\mu$ g/mL未満である。炎症の結果として、CRP値は少なくとも4 $\mu$ g/mL、たとえば軽度炎症では10 $\mu$ g/mL、活動性炎症では40 $\mu$ g~200 $\mu$ g/mL(またはそれより高い)等、である。

#### 【0152】

第5態様で、本発明は、77kD GPBP - 77kD GPBP - 基質結合複合体を、結合条件下で、1つまたは複数のテスト化合物と接触させることを含み、ここで、結合複合体から77kD GPBPを外すテスト化合物は、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはPFを治療するための候補化合物である、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはPFを治療するための化合物を同定する方法を提供する。

#### 【0153】

第6態様で、本発明は、77kD GPBP - 基質を、結合条件下で、

(a) 1つまたは複数のテスト化合物；および

(b) 77kD GPBP；

と接触させることを含む、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはPFを治療するための化合物を同定する方法を提供し、

ここで77kD GPBP基質への結合に関して、77kD GPBPに優る化合物は、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはPFを治療するための候補化合物である。

#### 【0154】

こうした第5および第6の実施態様において適当な77kD GPBP基質は、上に開示されている通りであり、I-20(配列番号18)、GPBP - 相互作用蛋白質(GIP)(配列番号19~23)、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)およびその誘導体(配列番号24~27)、プリオン蛋白質(PrP)(配列番号28)、IV型コラーゲン3鎖NC1領域(3(IV)NC1)(配列番号29)、およびアルツハイマー病ペプチド(A<sub>I-42</sub>)(配列番号30)などが挙げられるが、それらに限定されない。好ましい一実施態様において、77kD GPBP基質は、3(IV)NC1を含む。こうした基質のGPBP結合を示す例示的な参考文献は、米国特許第6,579,969号明細書；米国特許第7,147,855号明細書；および米国特許第7,326,768号明細書にみられ、参照により全体として本明細書に援用する。

#### 【0155】

後続の実施例に示す通り、77kD GPBP基質との結合複合体から77kD GP

10

20

30

40

50

B Pを外す化合物（たとえば抗体等）、または77 kD GPBP基質への結合について77 kD GPBPと競合する化合物は、CKD、免疫複合体仲介GN、および/またはPFを、治療するための候補化合物である。3(IV)NC1または他の77 kD GPBP基質へのテスト化合物の結合を評価するための適当な条件は、本明細書における教示に基づいて、当業者により決定され得る。一実施態様において、後続の実施例で使用される条件を使用することができる。非限定的な一実施態様において、結合相互作用を評価するために、マイクロウェルプレートに、適当なバッファー中の適量の3(IV)NC1で被覆することが可能である。次いで、非特異的結合を最小限に抑えるために、プレートをブロックすることが可能である。一実施態様において、次に、3(IV)NC1への結合を促進するのに適した条件下で、ある量の77 kD GPBP（たとえば天然の77 kD GPBP等）と共にプレートをインキュベートし（結合複合体を形成するため）、その後、適当な洗浄ステップ（非結合の77 kD GPBPを除去するため）および次いで、テスト化合物のいずれかがマイクロウェル中の77 kD GPMB - 3(IV)NC1結合複合体から77 kD GPBPを外せるかどうかを評価するために、1つまたは複数のテスト化合物との結合が続く。代替実施態様において、3(IV)NC1への結合に関して77 kD GPBPに優ることができるテスト化合物を同定するために、77 kD GPBPおよび1つまたは複数のテスト化合物を、同時に、結合条件下で接触させる。こうした実施態様において、結合事象の同定および分析を容易にするために、77 kD GPBPを検出可能に標識してもよく、かつ/またはより多いテスト化合物の1つを検出可能に標識してもよい。非限定的な、例示的な実施態様において、プレートを、PBS中1 μg/mLのポリ-His - 3(IV)NC1で被覆する。プレートは、4で16時間被覆し、PBS中3%のBSAで、室温にて1時間ブロックする。ブロック後、1 μg/mLのテスト化合物の存在下または非存在下で、プレートを、穏やかに振盪しながら、室温にて1~2時間、1 μg/mLのFLAG - 77 kD GPBPと共にインキュベートする。結合したFLAG - 77 kD GPBPを、1 μg/mL抗FLAG M2 - ペルオキシダーゼで検出する。

#### 【0156】

他の例示的な好適条件は上述の通りである。たとえば、テスト化合物が抗体であるとき、抗体-抗原結合は、多くの場合、疎水性相互作用（いわゆる疎水結合）に依存する；したがって、高い塩濃度、たとえばモル濃度範囲内、を使用して、非特異的結合を減少させ、特異的抗原-抗体結合を増加させることができる。任意選択的に、選択性および特異性を増進するために、非結合の77 kD GPBPおよび/またはテスト化合物；3(IV)NC1等の77 kD GPBP基質へのGPBP結合に関する競合物を含むことが分かっている対照試料および/または3(IV)NC1等の77 kD GPBP基質への77 kD GPBP結合に関して競合しないことが分かっている陰性対照を除去するための、1つまたは複数の洗浄ステップを含むがそれらに限定されない、さらなるステップが含まれてもよい。

#### 【0157】

本方法は、ELISA、免疫蛍光検査法、およびクロマトグラフィを含むがそれらに限定されない標準技術を使用することができる。定量目的には、ELISAが好ましい。結合事象の検出は、標準検出技術で遂行できる。たとえば、結合複合体の検出は、標識抗体または二次抗体を使用することによって遂行できる。標識の選択を含む、そのような方法は、当業者に知られている。あるいは、抗体を検出可能な物質に結合する(couple)ことができる。用語「結合される(coupled)」は、検出可能な物質が抗体に物理的に連結されることを意味するために使用される。適当な検出可能な物質としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光体、発光体および放射性物質などがある。適当な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどがある。適当な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどがある。適当な蛍光体の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、

ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンなどがある。発光体の例としてはルミノールなどがある。適当な放射性物質の例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ などがある。

【0158】

テスト化合物がポリペプチド配列を含むとき、そのようなポリペプチドは、化学的に合成してもよく、または組換え的に発現させてもよい。上に開示した通り、組換え発現は、当該技術分野における標準方法を使用して遂行できる。そのような発現ベクターは、細菌またはウイルスの発現ベクターを含むことができ、またそのような宿主細胞は、原核細胞であっても真核細胞であってもよい。固相、液相、またはペプチド縮合技術、あるいはその任意の組合せの、周知の技術を使用して調製される合成ポリペプチドは、天然アミノ酸および非天然アミノ酸を含むことができる。ペプチド合成に使用されるアミノ酸は、標準的な脱保護、中和、カップリングおよび洗浄プロトコルを用いた標準的なBoc(N-アミノ保護N-t-ブトキシカルボニル)アミノ酸樹脂であってもよく、または標準的な塩基に不安定なN-アミノ保護9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)アミノ酸であってもよい。Fmoc-N-アミノ保護アミノ酸もBoc-N-アミノ保護アミノ酸も、シグマ・ケンブリッジ・リサーチ・バイオケミカル(Sigma Cambridge Research Biochemical)、または当業者によく知られている他の化学会社から入手することができる。加えて、本ポリペプチドは、当業者によく知られている他のN-保護基を用いて合成することができる。固相ペプチド合成は、当業者によく知られている技術によって、またたとえば自動合成装置を使用するのであれば、遂行することが可能である。

10

20

【0159】

テスト化合物が抗体を含むとき、そのような抗体はポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。抗体は、ヒト抗体であっても、完全ヒト抗体であっても、またはマウス型の抗体であってもよい。そのような抗体は、たとえば、ハーロー(Harlow)およびレーン(Lane)著、抗体(Antibodies);研究室マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1988年)に記載されている、周知の方法で作ることができる。

30

【0160】

テスト化合物が核酸配列を含むとき、そのような核酸は、化学的に合成してもよく、または組換え的に発現させてもよい。組換え型発現技術は、当業者に周知である(たとえば、サムブルック(Sambrook)ら著、1989年、前出、参照)。核酸はDNAでもRNAでもよく、また一本鎖でも二本鎖でもよい。同様に、そのような核酸は、当該技術分野における標準技術を使用して、手動反応または自動化反応により、化学的にまたは酵素的に合成することができる。化学的に、またはインビトロ酵素的合成によって、合成されるのであれば、細胞内に導入する前に核酸を精製することが可能である。たとえば、核酸は、溶剤または樹脂を用いた抽出、沈殿、電気泳動、クロマトグラフィ、またはその組合せによって、混合物から精製することができる。あるいは、核酸は、試料処理による損失を避けるために、全く精製せずに、または最小限の精製で、使用することが可能である。

40

【0161】

テスト化合物が、ポリペプチド、抗体、または核酸以外の化合物を含むとき、そのような化合物は、有機化学合成を実行するための技術分野における種々の方法のいずれかによって作ることができる。

【0162】

(実施例)

実施例1. グッドパスチャー抗原結合蛋白質-1は、免疫複合体仲介GNの治療標的である。

50

## 【0163】

COL4A3BP (GPBP遺伝子)は、77-kD GPBPまたはGPBPとも呼ばれる、標準的なGPBP-1(1); CERTまたはGPBP 26とも呼ばれる、選択的mRNAエキソンスプライシングアイソフォームである、GPBP-2(2); および、選択的mRNA翻訳開始に起因し、91-kD GPBPとも呼ばれる変異型である、GPBP-3(3)を含む、少なくとも3つのポリペプチドを発現させる。GPBP-1は主として分泌され、IV型コラーゲンと相互に作用し(3); GPBP-2は主としてサイトゾルに局在し(3)、小胞体とゴルジ装置の間で、セラミドを輸送し(4)蛋白質分泌を誘導し(5); またGPBP-3は、細胞膜と関連しており、GPBP-1移出を促進する(3)。

10

## 【0164】

IV型コラーゲンは、3種の三重らせん分子[1. 1. 2(IV)、3. 4. 5(IV)および5. 5. 6(IV)]を形成する、6つの別個の鎖(1~6)で構成される(6)。腎系球体の主要な構造支持体は、末梢のラッピング(wrapping)膜組織化3. 4. 5(IV)ネットワーク(GBM)および中枢のメッシュ組織化1. 1. 2(IV)ネットワーク(メサンギウム基質)を含む。毛細血管壁にて、3. 4. 5(IV)ネットワーク(上皮)は、膜組織化1. 1. 2(IV)ネットワーク(内皮)と融合して、系球体濾過関門の主成分である、毛細管GBMの骨格を生じる。

20

## 【0165】

GPBP-1は、IV型コラーゲンをターゲットにし(1)、その系球体組織を制御する、非従来型Ser/Thrキナーゼである(7)。したがって、GPBP-1の発現増加は系球体濾過関門にて3. 4. 5(IV)ネットワークと1. 1. 2(IV)ネットワークの分離を引き起こし、1. 1. 2(IV)ネットワークの増大を誘導し、その結果として、毛細管虚脱(系球体硬化)を仲介する。狼瘡易発性のNZWマウスにおいて、自己抗体産生は、GPBP-1の系球体発現過剰と相関関係を示し、破壊された毛細管GBM上に免疫複合体沈着を形成する結果となる(7)。

30

## 【0166】

GPBP-1が、細胞外コンパートメントに分泌されており(3)、GPBP-1がヒト血漿(cGPBP-1)の構成成分であること、およびcGPBP-1値上昇は、免疫複合体仲介GNと関連していることを我々は証明した(国際公開第2010/009856号および米国特許第7935492号明細書)。ここで、我々はcGPBP-1が免疫複合体仲介GNの治療標的であることを明らかにする。

40

## 【0167】

## 結果

## cGPBP-1の同定およびその臨床的関連の評価

国際公開第2010/009856号および米国特許第7935492号明細書に記載の通り、cGPBP-1を単離するために、GPBP-特異的モノクローナル抗体(mAb)である固定化mAb N26を含むアフィニティカラムに、ヒト血漿を吸着させた。結合した物質を溶離して、約77kDaの多数派のポリペプチド、および、GPBP-特異的抗体と反応する、より低M<sub>r</sub>の少数派のポリペプチドを含むことを示し、GPBP-1および誘導生成物がヒト血漿の通常構成成分であることを確認した。cGPBP-1のM<sub>r</sub>は、使用した分子量標準によって74kDaと80kDaの間で変化した(表示せず)。

40

## 【0168】

cGPBP-1を測定するために、mAb N26を捕捉抗体として使用し、mAb N27-HRPを検出抗体として使用する(国際公開第2010/009856号および米国特許第7935492号明細書に記載されている通り、両者とも種々の非重複エピトープに結合する)、直接サンドイッチELISAを、我々は開発した。組換え型GPBP-1を用いて実施した検量線は、0.4~400ng/mLの間で直線関係を示した。こ

50

のプロトタイプを使用して、我々は、ヒトcGPBP-1の正常値は10ng/mL未満であると推定しており、年齢および性別による有意な変化は何も検出されなかった。

【0169】

cGPBP-1検出の臨床関連を探究するために、我々はその値を蛋白尿患者(>0.5g/日)で測定し、こうした患者はより高いcGPBP-1値を示すことが分かった。しかし、IgA腎症またはループス腎炎を経験している患者だけはcGPBP-1値上昇を示したが、普通の腎疾患(多発性嚢胞腎、PKD)またはGNを有する他の患者は、糸球体コラーゲン上の免疫複合体沈着に仲介されず、国際公開第2010/00985号および米国特許第7935492号明細書に記載されている通り、cGPBP-1値の統計学的に有意な上昇はなかったため、cGPBP-1値の差は、特定の臨床実体と対照を比較するとき、より意味深い。検出抗体がmAb e11-2(GPBP-1を認識するがGPBP-2を認識しないmAb)であるとき、同様の結論が得られた。

10

【0170】

cGPBP-1値上昇が有害な生体影響であるかどうかを評価するために、高値の組換え型cGPBP-1(200ng/mL)を有するA549ヒト細胞を培養し、mRNA発現プロファイル进行分析した。個々の遺伝子の発現に、統計学的に有意な変化は認められなかった；しかし、KEGG経路の機能分析は、組換え型cGPBP-1上昇が、map05322経路を活性化することを示し(ウェブサイト: genome.jp/dbget-bin/www\_bget?pathway:map05322)、それはSLEの発症と関連していた(テーブル1)。

20

【0171】

【表1】

テーブル1

KEGG経路: A549 + rcGPBP-1 対A549				
ID	サイズ	オッズ比対数	P. 調整後	名称
hsa05322	149	0.1444	0.0003	SLE
hsa05222	115	-0.1253	0.1576	小細胞肺癌
hsa05211	96	-0.1355	0.1576	腎細胞癌
hsa05200	366	-0.0843	0.1576	癌における経路
hsa04210	116	-0.1307	0.1576	アポトーシス
hsa04120	159	-0.1130	0.1576	ユビキチン仲介蛋白質分解
hsa00380	58	-0.1522	0.1576	トリプトファン代謝
hsa04510	235	-0.0969	0.1579	接着点
hsa04914	113	-0.1223	0.1771	プロゲステロン仲介卵母細胞成熟
hsa05218	97	-0.1196	0.3348	メラノーマ

30

40

50

## 【0172】

NZW高齡マウスにおける自己抗体とcGPBP-1の協調上昇

NZW高齡マウスは、GPBP-1の糸球体発現増加と関連した自己免疫応答(SLE)を発症することを以前に報告した(7)。GPBP-1の糸球体発現増加は、局所的mRNA発現増加に起因し得るが、GPBP-1の糸球体蓄積は、少なくともある程度、cGPBP-1の糸球体構造内捕捉に起因する可能性がある。その結果として、我々は、cGPBP-1値がNZWマウスにおけるSLEの自然進行を反映するかどうかを探究した。興味深いことに、cGPBP-1血漿値はNZW高齡マウスで上昇し、cGPBP-1値上昇と病理学的マーカーとの間の関係を明らかにする血漿自己抗体値と直接的に相関があったばかりでなく、cGPBP-1値の正常化または抑制は、GN進行を止めるための治療戦略となることが示唆された。

10

## 【0173】

NZWマウスにおけるIgG免疫複合体の顕著な沈着

NZWマウスは、糸球体におけるIgA免疫複合体の顕著な沈着を伴う、IgGおよびIgA自己抗体からなる狼瘡易発性の自己免疫応答を示すことを、我々は報告した(7)。しかし、本研究では、NZWマウスはIgGをベースとする狼瘡易発性の自己免疫応答を示し、循環IgA自己抗体は検出されなかった(データは図示せず)。自己免疫応答とNZWマウスにおけるGNとの間の関係をさらに調査するために、高齡マウス(>8カ月)の腎臓を組織化学的技術および免疫組織化学的技術により分析した。前述の通り(7)、我々は破壊されたGBMコラーゲンネットワークおよびGBMの上皮成分と拡張したメサンギウムまたは内皮GBM成分との間に蓄積した大量のGPBP-1(図3A)を認めた。組織学的分析は、多様な病理学的所見の存在も示した(図3B):糸球体間質の増殖(a)、硝子様血栓(b)、内皮下沈着(c)、マトリックス増殖(d)、ワイヤーループ沈着(e)、糸球体分葉(f)、内毛細血管増殖(g)、糸球体炎症性浸潤(h)、壊死、核崩壊および核濃縮(i)、偶発半月体(j)、尿細管間質性炎症性浸潤(k)および尿細管委縮(l)。我々は、主として糸球体の末梢に分布したIgGおよびC3cの大量の粒状沈着物、およびメサンギウムを優先的に占領するIgMの沈着物の存在も認めた。GBMの上皮成分に沿ったIgGおよびC3c沈着の局在を、共焦点顕微鏡法分析および電子顕微鏡法でさらに確認した(以下参照)。最後に、また既報の通り(7)、これらのマウスでGNの臨床兆候は何も検出できなかった。

20

30

## 【0174】

GPBP-1ブロッキング抗体の特性化

IV型コラーゲン[3(IV)NC1]へのGPBP-1結合を、ビオチン化mAb N12またはN26が阻止する能力を評価し、こうしたmAbは、インビボでcGPBP-1をブロックできる可能性があることが分かった(図1A)。

## 【0175】

血漿中のmAb動力学を調査するために、NZWマウスに単回腹腔内ブースト(250μg)を注射し、それらの循環値をモニターした(図1B)。両mAbは、注射の3日後に、ピークに達した(10μg/mL)。mAb N12-ビオチン値は8日目に半分低下し、14日目までにほぼ検出不可能であったが、mAb N26-ビオチン値は14日目で高い(6μg/mL)ままであり、mAb N26-ビオチンの血清クリアランスはmAb N12-ビオチンより低いことを示す。

40

## 【0176】

興味深いことに、我々は、抗体投与がマウスのcGPBP-1値を徐々に上昇させることを確認し(図示せず)、これは、抗体がcGPBP-1を標的としてリバウンド作用を誘発したことを示唆した。他の生物学的処置と関連した、血漿値に対するリバウンド作用が記述されている(8)。

## 【0177】

NZWマウスGNの抗GPBPmAb処置

GNを治療するためのmAbの有効性を評価するために、NZW高齡マウス(8~10

50

ヶ月齢) に対し、PBS (担体)、または、約  $1 \mu\text{g} / \text{g}$  体重のマウス IgG (対照) を含む PBS、mAb N12 - ビオチンを含む PBS、あるいは mAb N26 - ビオチンを含む PBS を注射したところ、1 回分の投与では、リバウンド作用を誘発しなかった (図 2)。初回注射後、cGPBP - 1 値は処置と関係なく低下し、研究開始時におけるマウスの処置によって引き起こされたある種のストレスが cGPBP - 1 値に影響したことが示唆された。しかし、処置の間じゅう低下したままであった mAb N12 - ビオチン処置マウス以外は、第 1 週の後に cGPBP - 1 値が上昇し、第 3 週にわたってほぼ元の値に戻り、第 4 週から第 6 週までの間に統計学的有意に達した (図 2A)。さらに、研究のタイムコースの間ずっと、mAb N12 - ビオチン投与マウスにおける cGPBP - 1 値の低下は、mAb N26 - ビオチン処置マウスより有効であった (図 2B)。

10

## 【0178】

処置の終わりに全てのマウスを屠殺し、腎病理を評価した (図 3)。対照マウス由来の腎臓は、NZW 免疫複合体仲介 GN に特有の異常を示した；しかし、GPBP - 特異的抗体処置マウスは、関連のある糸球体病変または尿細管病変を示さなかった (HE およびメイソン (Mason))。したがって、生物学的処置は GPBP - 1 の糸球体沈着を減少させ、GPBP の尿細管細胞内発現に影響をおよぼさず、免疫複合体 (IgG、IgM および C3c) の沈着を減少させた。後者は、対照マウスで毛細管 GBM の上皮側によく見られる高電子密度沈着が実質的に存在しないことによって、さらに裏付けられた。こうした全観察結果と一致して、GPBP - 特異的抗体処置マウスで、尿細管間質性炎症性浸潤が敏速に減少した (HE)。

20

## 【0179】

## 考察

SLE の最も重篤な兆候である、IgA 腎症およびループス腎炎を含む免疫複合体仲介 GN は、十分に解明されていない。こうした障害を治療するための現行の治療選択肢は限られており、十分に有効ではない。B - リンパ球刺激物質 (BLYS) に対する mAb であるベリムマブは、この 50 年の間に食品医薬品局により SLE 治療用に承認されてきた第 1 薬剤の代表である (9)。病因に関係なく、CKD は、広範囲の尿細管間質性線維症を呈し、あらゆるタイプの腎疾患に共通した最終的な病理学的病期である ESRD に向かう容赦ない進行を特徴とする。したがって、早期検出して CKD 進行を減ずるための、新しいバイオマーカーおよび治療標的が必要である。

30

## 【0180】

NZW 高齢マウスが、糸球体における顕著な IgA 沈着を伴う IgA および IgG 狼瘡易発性の自己抗体応答を示すことを、我々は前に報告した (7)。ここで、我々は、NZW マウスが、IgG の顕著な糸球体沈着を伴う狼瘡易発性の IgG 自己免疫応答を示すことを明らかにする。こうした結果から、NZW マウスの遺伝的背景は、SLE および免疫複合体仲介 GN の素因を与えるが、沈着した免疫複合体の構成は、概して、自己免疫応答の性質に依存することが示唆される。NZW マウスは遺伝的に同種であるため、自己免疫応答の差、したがって、沈着する免疫複合体の組成の差は、環境因子に依存すると予想される。これと一致して、我々の以前の研究は、標準的な動物施設で飼育された NZW マウスで実施したが、本研究では、NZW マウスを病原体フリー環境で維持した。この可能性を調査するために、商業的供給元から得られる若い NZW マウスを病原体フリー条件または非病原体フリー条件で維持して、NZW マウスは、病原体フリー条件で IgG を顕著に沈着し、非病原体フリー条件で IgA を顕著に沈着することをさらに確認した (未発表の観察結果)。しかし、我々の両研究で、GPBP - 1 - 依存性 GBM コラーゲン変化は、IgG 免疫複合体沈着の炎症促進条件に起因する可能性がある炎症性徴候を除き、類似していた。集合的に、NZW マウスにおける遺伝的背景は、狼瘡易発性の自己抗体産生および GPBP - 1 糸球体発現増加の両方を生じやすくすることを、証拠は示している；しかし、産生されて、破壊された GBM 上に沈着した自己抗体のタイプを決定する際には、環境因子が病理学的重症度を究極的に決定するであろう。したがって、NZW マウスは、病原体フリー環境または低制限環境で維持されたかどうかによって、それぞれ、「炎症性の

40

50

」ループス腎炎様（本実施例）または「非炎症性の」I g A腎症様（7）を示した。

【0181】

ブロッキング抗体は、投与されるとき、組織結合したGPBP-1およびcGPBP-1の両方を含む細胞外GPBP-1の活性を特異的に阻害すると予想される。したがって、本明細書における治療効果分析は、NZWマウスが発症した臨床的に無症状であるループス腎炎様における細胞外GPBP-1の病因的役割を決定するための独特のテストを示す。抗体治療は、GBMコラーゲンをベースとする変化を実質的に修復し、免疫複合体の糸球体沈着を減少させ、その結果として炎症を減ずることが、我々の結果から示唆される。cGPBP-1値を下げる能力について異なる能力を示すが、GBMコラーゲンへのGPBP-1結合について類似したブロッキング活性を示す2つの独立したmAbは、類似した方式でGN進行を減ずる。後者は、治療効果が、cGPBP-1値のクリアランスよりも、ブロッキングに依存することを示す。さらに、抗GPBP療法は明らかに、cGPBP-1値を下げる（図2）よりも、効率よく糸球体GPBP-1沈着を減少させ（図3）、糸球体GPBP-1がGBMコラーゲン解体に関与していることが示唆される。

10

【0182】

ブロッキング抗体は、GBMコラーゲンを結合するcGPBP-1の容量を低下させることにより、および組織結合したGPBP-1の放出を増強することにより、糸球体GPBP-1を下げると予想される。cGPBP-1値が、組織結合したGPBP-1値にいかんして影響するかはまだ決定されていないが、両GPBP-1源は影響を及ぼす可能性があり、より一般的な状況では、一次（優勢な局所産生）または二次（優勢な遠位産生）免疫複合体仲介GNの主な原因となる。

20

【0183】

GN進行に対する有益な影響とは対照的に、mAb処置は自己免疫応答の減少または減弱には有効ではない（未発表の観察結果）。循環GPBP-1の上昇と自己抗体とは関連している可能性があるが、病原性イベントと関係なく、個々のマウスにおけるそれらの正の相関関係（未発表の観察結果）からは、むしろcGPBP-1値の誘導は、共通した独特の発病カスケードにおける自己抗体産生の下流で生じることが示唆される。一貫して、GPBP-1発現上昇は、自己抗体産生の存在しない条件下で、免疫複合体GNを誘導した（7）。

【0184】

集合的に、データから、組織結合した自己抗体は、GPBP-1発現および分泌を誘導することが示唆される。GPBP-1は、周囲の細胞外コンパートメント内の組織に結合したままであるか、血漿に入るかのいずれかである。糸球体では、組織結合したGPBP-1は、cGPBP-1の局所的産生および捕捉に起因する。組織結合したGPBP-1の蓄積が、局所的産生増加（一次GN）に起因するか、または遠位産生増加およびその後の捕捉（二次GN）に起因するかを問わず、GBMコラーゲンは解体を受けて、追加的免疫複合体沈着形成を促進する。cGPBP-1上昇により仲介される、免疫複合体沈着物および狼瘡易発性の細胞性刺激は、SLEおよびGN進行を持続させる病因を上方制御する。抗GPBPブロッキング抗体は、GBMコラーゲン解体および免疫複合体沈着形成を減じ、病原性フィードバックを破壊する。我々のデータは、免疫複合体仲介GNにおけるcGPBP-1、病原因子および治療標的を同定する。

30

40

【0185】

実施例1のための参考文献

【0186】

## 【表 2】

1. Raya A, Revert F, Navarro S and Saus J. Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human Goodpasture antigen. *J Biol Chem* 1999; **274**: 12642-12649.
2. Raya A, Revert-Ros F, Martinez-Martinez P, Navarro S, Rosello E, Vieites B, Granero F, Forteza J and Saus J. Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the Goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 40392-40399. 10
3. Revert F, Ventura I, Martínez-Martínez P, Granero-Moltó F, Revert-Ros F, Macías J and Saus J. Goodpasture antigen-binding protein is a soluble exportable protein that interacts with type IV collagen. Identification of novel membrane-bound isoforms. *J Biol Chem* 2008; **283**: 30246-30255.
4. Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M and Nishijima M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 2003; **426**: 803-809. 20
5. Fugmann T, Hausser A, Schöffler P, Schmid S, Pfizenmaier K and Olayioye MA. Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol* 2007; **178**: 15-22.
6. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M and Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003; **348**: 2543-2556.
7. Revert F, Merino R, Monteagudo C, Macias J, Peydró A, Alcácer J, Muniesa P, Marquina R, Blanco M, Iglesias M, Revert-Ros F, Merino J and Saus J. Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane. *Am J Pathol* 2007; **171**: 1419-1430. 30
8. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT; Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure Investigators. Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure Investigators: Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 2003; **107**: 3133-3140. 40
9. Sanz I, Yasothan U and Kirkpatrick P. Belimumab. *Nat Rev Drug Discov* 2011; **10**: 335-336.

## 【 0 1 8 7 】

実施例 2 . c G P B P - 1 は、前炎症バイオマーカーおよび炎症促進性バイオマーカーである

G P B P - 1 は炎症促進性因子である。

## 【 0 1 8 8 】

抗GPBP-1抗体治療は、結果的に炎症性浸潤を減少させる(図3)という結果は、GPBP-1が炎症促進性因子の役割をするかどうかという調査に、我々を駆り立てた。

ヒト組換え型GPBP-1を発現する、または発現しない、A549細胞のトランスクリプトームの比較分析で、NLRP3の発現は、ヒト組換え型GPBP-1発現に応答して特異的に増加するが、他の関連NLRPファミリーメンバーの発現は不変のままであることが明らかにされた(テーブル2)。

【0189】

【表3】

テーブル2

遺伝子	統計値	倍率	p,調整後
NLRP2	-0.518610385	-0.069824178	0.783545114
<b>NLRP3</b>	<b>8.547879904</b>	<b>1.771963852</b>	<b>0.003351881</b>
NLRP4	1.574117626	0.388428279	0.322787609
NLRP5	1.216975198	0.691560834	0.445902128
NLRP6	-1.526104933	-0.819338257	0.336900082
NLRP7	-0.207647712	-0.016592656	0.932245268
NLRP8	-0.244957718	-0.187884448	0.915529983
NLRP9	0.473037136	0.039491996	0.805796945

10

【0190】

同様に、Neuro 2a細胞におけるGPBP-1の発現過剰は、IL-1およびインフラマソームの成分であるNLRP5aのmRNA発現上昇を誘導した。その全てから、GPBP-1がpro-IL-1発現およびインフラマソーム活性化を誘導することが示唆される。

【0191】

この関係を研究するために、我々はマクロファージRAW264.7およびLPSならびにドキソルピシンを使用して(1)、pro-IL-1発現およびIL-1放出を評価した。多くの異なる化学物質、たとえばアスベスト、ケイ酸塩、尿酸血漿またはドキソルピシン等は、インフラマソーム活性化剤である(2)が、それらは、Toll様受容体(TLR)のアゴニスト(すなわちLPS)に依存するマクロファージでのpro-IL-1(37kDa)の発現を誘導できない。マクロファージをLPSでプライミングするとき、pro-IL-1はサイトゾル中に蓄積し、インフラマソーム活性化剤は、pro-IL-1開裂およびIL-1(17kDa)の細胞外媒体への放出をもたらした(3)。

20

30

【0192】

我々のアッセイでは、RAW264.7マクロファージを1μg/mlのLPSで一晩プライミングし、NLRP3インフラマソームを10μMのドキソルピシンで活性化させた。培地中の、分泌したIL-1およびcGPBP-1を、指示された時間にELISAで測定し、細胞溶解物中のpro-IL-1およびGPBP-1のサイトゾル発現をウェスタンブロットで分析した(図4)。RAW264.7細胞におけるGPBP-1のサイレンシングは、pro-IL-1合成およびIL-1放出の減少を引き起こした(図4Aおよび図4B)。こうした細胞におけるcGPBP-1放出の時間パターンは、IL-1のそれと類似しており(図4Bおよび4C)、したがってGPBP-1抑制RAW264.7細胞は、cGPBP-1放出の顕著な減少を示し、これは、GPBP-1が、細胞により分泌される主要なGPBPアイソフォームであることを示す。

40

【0193】

我々のデータは、結果的にcGPBP-1とIL-1の両者の細胞外コンパートメントへの協調分泌をもたらすpro-IL-1発現およびインフラマソーム活性化を、GPBP-1が誘導することも示す。

【0194】

50

c G P B P - 1 は、蛋白尿患者における前炎症バイオマーカーである。

早期前炎症ステップにおける c G P B P - 1 の役割をさらに決定するために、我々は、蛋白尿患者の血清中の、全身性炎症 C 反応性蛋白質 ( C R P ) のバイオマーカーレベルを測定した。我々は、C R P 血清値と c G P B P - 1 血清値との間に逆相関があり ( 図 5 )、こうした患者では、c G P B P - 1 値が、C R P 値より早く上昇することを示し、したがって c G P B P - 1 は、蛋白尿患者における前炎症性バイオマーカーとして想定されるべきであることが分かった。

【 0 1 9 5 】

c G P B P - 1 は、R A の前炎症性バイオマーカーである。

上記結果の範囲を決定するために、我々は、自己免疫応答仲介 R A を経験している患者の c G P B P - 1 値を測定し、こうした患者は、対照個体に関して c G P B P - 1 値上昇を示すことが分かった ( 図 6 A )。興味深いことに、こうした患者で c G P B P - 1 値と C R P 値の両方を測定するとき、我々は類似した結論に達し、そこで蛋白尿を経験している患者を分析したとき、c G P B P - 1 値と C R P 値は対抗制御されていることが証明された ( 図 6 B )。

【 0 1 9 6 】

R A の病因に關与する免疫学的メカニズムの理解においてここ数十年に遂げた非常に大きい進歩は、主として実験的動物モデルの開発によってもたらされてきた。これらの中で、最も多く研究され、また頻繁に使用されたものはウシ I I 型コラーゲンで免疫化した後の自己免疫関節炎モデルである ( C I A )。C I A 発症は M H C によって制御され ( 4 )、その臨床的進展は性ホルモンによって左右され、オスマまたはテストステロンで雄性化されたメスで、より重症である ( 5 )。最近の結果から、T 細胞における組換え型ヒト B c l - 2 の発現は、C I A の発症を抑制することが裏付けられる。これはたぶん抗アポトーシス分子が、自己免疫応答を抑制する調節性 T 細胞の個体群拡大を可能にするためである ( 6 )。我々はこの実験モデルを使用して、C I A 発症における c G P B P - 1 値の制御について研究した。軽度の C I A を発症しているコラーゲン I I 型 - 免疫化非トランスジェニック ( t g ) メスマウスと、C I A を発症しなかった B c l - 2 - T g メスマウスの両者ともに、c G P B P - 1 値は、全自己免疫プロセスの間ずっと、不変のままである (  $p > 0.05$  )。対照的に、重度の C I A を発症しているマウス [ コラーゲン I I 型免疫化オスマウス、または抗 C D 2 5 モノクローナル抗体処置後に調節性 T 細胞が著減した非 - T g ( n o T g ) メスマウスおよび B c l - 2 - T g メスマウス ( 5、6 ) は、臨床的 C I A 発症に先立って、非常に高値の c G P B P - 1 を示す ( C I A 誘発後 4 週間 ; 全例で、 $p < 0.02$  ) が、いったん非常に重症の C I A が臨床的に明らかになるとその後は、こうした値は有意に低下しており、健康な非免疫化対照ではさらに低い値が認められた ( C I A 誘発後 8 週間 ; 全例で、 $p < 0.05$  ; 図 7 )。集合的に、我々のデータは、循環 G P B P - 1 が、R A 発病における早期のバイオマーカーであることを示す。

【 0 1 9 7 】

考察

I L - 1 は、主として血液単球で産生される、プロトタイプの多機能サイトカインであるが、マクロファージ、樹枝状細胞およびほぼ全タイプの種々の細胞によっても産生される ( 7 )。I L - 1 は、幾つかの炎症性障害の病因ならびに G N のヒトモデルおよび動物モデルに關与している ( 7、8、9、10 )。

【 0 1 9 8 】

インフラマソームを活性化する同一の炎症促進性刺激に対して、I L - 1 および c G P B P - 1 放出は協調している。L P S 刺激等の、炎症促進条件下で、p r o - I L - 1 および G P B P - 1 は、細胞内部に蓄積される。次いで、ドキシソルピシン仲介インフラマソーム活性化後、I L - 1 と c G P B P - 1 の両者が細胞外媒体に分泌される。

【 0 1 9 9 】

培養されたマクロファージ様マウス細胞株 R A W 2 6 4 . 7 で、G P B P - 1 の下方制御は、p r o - I L - 1 の産生を減少させ、I L - 1 の放出を遅らせて、炎症促進性

10

20

30

40

50

カスケードにおいて、G P B P - 1 発現および活性化は、p r o - I L 1 発現および活性化より早いステップであることを示す。健康な対照の血清中では、c G P B P - 1 濃度は10 n g / m l 未満であり、I g A 腎症患者およびループス腎炎患者の血清では有意に高いことを、我々は発見した(上記参照)。このことは、亜臨床的免疫複合体仲介G N を経験している高齢N Z W 腎臓の糸球体にG P B P - 1 が蓄積するという我々の以前の所見と一致している(11)。マクロファージR A W 2 6 4 . 7 は、炎症促進性刺激後、多量のc G P B P - 1 (> 20 n g / m l ) をI L - 1 とともに分泌し、c G P B P - 1 が自己分泌、傍分泌(糸球体におけるc G P B P - 1 )または内分泌炎症促進因子(血清中のc G P B P - 1 )の役割までも果たし得るという可能性を高める。さらに、G P B P - 2 は治療 - 炎症(12)の標的として以前提案されている。これは、G P B P - 2 の抑制は、I L - 1 に応答したP G E 2 合成のためのセラミドの利用可能性を制限すると予想され、G P B P - 1 およびG P B P - 2 が炎症促進性カスケードの一部であることが示唆されるためである。加えて、我々は、c G P B P - 1 値を、全身性炎症のマーカーである、C R P の値と比較した。こうした蛋白質の血清濃度は、蛋白尿またはR A を有する患者の血清で逆相関を示し、前炎症因子および炎症促進性因子として、c G P B P - 1 の二重の役割が示唆される。

10

【0200】

参考文献

【0201】

## 【表 4】

1. Sauter KA, Wood LJ, Wong J, Jordanov M and Magun BE. Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1 $\beta$  through activation of the NLRP3 inflammasome. *Cancer Biol Ther* 2011; **11**: 1008-1016.
2. Schroder K, Zhou R and Tschopp J. The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger? *Science* 2010; **327**: 296-300.
3. Perregaux D and Gabel CA. Interleukin-1 $\beta$  Maturation and Release in Response to ATP and Nigericin. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15195-15203. 10
4. Holmdahl R, Bockermann R, Bäcklund J and Yamada H. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice--a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res Rev* 2002; **1**, 135-147.
5. Jansson L and Holmdahl R. Oestrogen-induced suppression of collagen arthritis; 17 beta-oestradiol is therapeutically active in normal and castrated F1 hybrid mice of both sexes. *Clin Exp Immunol* 1992; **89**: 446-451.
6. González J, Tamayo E, Santiuste I, Marquina R, Buelta L, González-Gay MA, Izui S, López-Hoyos M, Merino J and Merino R. CD4+CD25+ T cell-dependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes. *J Immunol* 2007; **178**: 2778-2786. 20
7. Church LD, Cook GP and McDermott MF. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; **4**: 34-42.
8. Timoshanko JR, Kitching AR, Iwakura Y, Holdsworth SR and Tipping PG. Contributions of IL-1beta and IL-1alpha to crescentic GN in mice. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 910-918. 30
9. Goldbach-Mansky R and Kastner DL. Autoinflammation: the prominent role of IL-1 in monogenic autoinflammatory diseases and implications for common illnesses. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**: 1141-9; quiz 1150-1.
10. Aringer M and Smolen JS. Cytokine expression in lupus kidneys. *Lupus* 2005; **14**: 13-18.
11. Revert F, Merino R, Montegudo C, Macias J, Peydró A, Alcácer J, Muniesa P, Marquina R, Blanco M, Iglesias M, Revert-Ros F, Merino J and Saus J. Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane. *Am J Pathol* 2007; **171**: 1419-1430. 40
12. Lamour NF, Stahelin RV, Wijesinghe DS, Maceyka M, Wang E, Allegood JC, Merrill AH Jr, Cho W, Chalfant CE. Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis. *J Lipid Res.* 2007; **48**:1293-304.

実施例 3 . 肺線維症を治療するための薬物としての、グッドパスチャー抗原結合蛋白質 - 1 ( G P B P - 1 ) インヒビター

肺線維症 ( P F ) は、肺組織が損傷して癒痕化するときに起きる。P F は、未知の原因によって発症する ( 特発性 P F ) こともあり、または慢性の炎症プロセス、感染症、環境要因、電離放射線およびある種の薬品への曝露を含む、多くの条件に関連しているか、または誘発されることがある ( 1 )。この点については、癌で化学療法を受けている患者の約 5 ~ 10 % が、ある程度の P F を発症している可能性がある」と推定されてきた。したがって、プレオマイシンおよびドキシソルピシンは、ヒトを含む種々の動物種で P F を誘発することが明らかにされている ( 2 ~ 5 )。P F 患者の予後は悪く、この疾病を有する患者の大半は 5 年以内に死亡する。不幸なことに、P F 患者の転帰を改善することが証明されている薬品は無く ( 1 )、肺移植が、現在利用できる唯一の治療選択肢である。

10

【 0 2 0 3 】

G P B P - 1 は、細胞内外の、構造蛋白質の超分子構造形成を制御する ( 6、7 )。G P B P - 1 の発現は、T N F 等の炎症性刺激により制御され ( 8、9 )、また炎症は線維形成過程の開始および進行において重要な役割を果たすため、我々はここで、G P B P - 1 が異なるタイプのコラーゲン ( すなわち：コラーゲン I 型 ) の異常な蓄積で特徴づけられる疾病、たとえば P F 等の、病因に関与する重要分子である可能性がある」という仮説をたてた。本研究で我々は、プレツビック・ケミカル・ライブラリー ( P r e t s w i c k C h e m i c a l L i b r a r y ) から 2 つの化合物 ( インビトロで G P B P - 1 活性を変調する能力がある ) を特性化した。これらの化合物 ( ピナシジルおよびミリセチン ) の治療能力は、マウスにおけるドキシソルピシン誘発性 P F の実験モデルを使用して、インビボで評価されている。最後に、G P B P - 1 がドキシソルピシン誘発性 - P F における標的であることを確認するために、我々は G P B P - 1 に対する 2 つの異なるモノクローナル抗体、m A b 1 4 および m A b N 1 2 を使用して、マウスにおけるドキシソルピシン誘発性 - P F を治療した。

20

【 0 2 0 4 】

結果

ドキシソルピシンの気管内滴下注入は、P F を促進する。

C 5 7 B L / 6 オスマウスへの、ドキシソルピシン 7 5 μ g の気管内 ( i . t ) 滴下注入は、薬物投与後 1 2 日目に、出血性のように見える肺の激しい炎症によって肉眼的に特徴づけられる広汎性の変化を、肺構造に引き起こした ( 図 8 )。組織学的分析は、結果的に肺胞の閉塞をきたす血管周囲肉芽腫および間質マトリックス沈着の存在を含む、激しい炎症性の細胞浸潤を示す ( 図 8、H E )。間質マトリックス沈着物の膠原性は、肺のマッソン 3 色染色後に明白に示される ( 図 8 )。組織学的病変の発生と並行して、1 - コラーゲン I 遺伝子発現の増加が、ドキシソルピシン - 処置マウスの肺で R T - q P C R 分析により確認される ( 図 9 )。

30

【 0 2 0 5 】

ドキシソルピシン - 誘発性 P F を誘発中の、G P B P - 1 の発現増強

ドキシソルピシン誘発性 P F の発病における G P B P - 1 の潜在的関与を探究するために、我々はまず、ドキシソルピシン滴下注入後、異なる時点で、循環 G P B P - 1 値を E L I S A により測定した：G P B P - 1 の血清値はドキシソルピシン滴下注入後早期 ( 5 日目 ) に敏速に上昇し、その後低下して、炎症および線維症が臨床的に明らかになる 1 2 日目に最低値に達し ( 図 9 A、全例で、p < 0 . 0 5 )、その場合、発現レベルは対照と類似している ( 図 9 B )。最後に、特異的抗 G P B P - 1 ポリクローナル抗体を使用した免疫組織化学 ( 6 ) は、未処置マウスの肺における G P B P - 1 の発現が非常に低レベルであり、その発現が、気管支上皮に限定されることを示している ( 図 9 C )。対照的に、気管支上皮および実質の両方に位置するドキシソルピシン - 処置マウスの肺では、G P B P - 1 の発現増大が確認される。この最後の位置で、G P B P - 1 発現は、細胞外マトリックス沈着と関連してパッチパターンを採用する ( 図 9 C )。

40

【 0 2 0 6 】

50

G P B P - 1 の 2 つのインビトロ・インヒビターである、ピナシジルおよびミリセチンは、インビボで、ドキソルビシン誘発性 P F を改善する。

プレツビック・ケミカル・ライブラリー ( P r e t s w i c k C h e m i c a l L i b r a r y ) から 2 つの化学化合物、ピナシジルおよびミリセチンは、それらがインビトロで G P B P - 1 活性を妨げる能力に関して選択された ( 図示せず ) 。

#### 【 0 2 0 7 】

我々はここで、ドキソルビシン誘発性 P F を治療するためにピナシジルまたはミリセチンを使用する可能性を探究してきた。最初に、マウスにドキソルビシンを気管内滴下注入し、実験の最初から最後まで ( 0 ~ 1 2 日 ) 種々の用量のピナシジルで処置した。一日用量 0 . 0 8 m g / k g のピナシジルは、ドキソルビシン誘発性肺線維症の重症度を敏速に低下させ ( 図 1 0 ) 、また一貫して、肺の 1 ( I ) コラーゲン m R N A の有意な発現低下がピナシジル処置マウスで確認された ( 図 1 1 A ) 。より低用量のピナシジルは、結果的に 1 ( I ) コラーゲン m R N A ( 図 1 1 A ) の類似した発現低下をもたらした。意外なことに、ピナシジルの治療効果は、より高用量の薬物 ( 0 . 2 5 または 1 . 2 2 5 m g / k g / 日 ) を投与したとき失われた ( 図 1 1 A ) 。対照的に、マウスをミリセチンで処置したとき、テストした全ての用量で、ドキソルビシン誘発性線維症の効率的な減少が得られた ( 図 1 1 B ) 。

10

#### 【 0 2 0 8 】

G P B P - 1 に対する 2 つのモノクローナル抗体である、m A b 1 4 および m A b N 2 6 は、インビボで、ドキソルビシン誘発性 P F を改善する。

20

我々は、ドキソルビシン誘発性 P F を治療するために m A b 1 4 および m A b N 1 2 を使用する可能性を探究してきた。4 群のマウスに、ドキソルビシンを気管内注入し、気管内滴下注入後第 1 日から、既知の抗線維症療法である、形質転換増殖因子 ( T r a n s f o r m i n g G r o w t h F a c t o r ) に対するモノクローナル抗体 ( T G F ; 1 m g / 週を 3 回に分けて ) ( 1 0 ) 、または m A b - 1 4 ( 1 m g / 週を 3 回に分けて ) 、または m A b N 1 2 ( 2 5 μ g / 週、単回注入で ) で処置するか、または治療せずに放置した ( D o x o ) 。肺線維症に対する治療効果を評価するために、肺におけるコラーゲン I の 1 鎖の m R N A 発現 ( 2 ) およびコラーゲン I V の 1 鎖の m R N A 発現を R T - q P C R で測定した。ドキソルビシンは、1 ( I ) 発現と 1 ( I V ) 発現の両者を増加させる ( 線維症 ) 。G P B P - 1 に対する m A b は、1 ( I V ) の発現を有意に減少させず 1 ( I ) 発現に対して限定された効果があった T G F よりも良好に、1 ( I ) と 1 ( I V ) の両者の発現を減少させた ( \* P < 0 . 0 5 、 \* \* \* P < 0 . 0 0 1 ) 。 ( 図 1 2 )

30

#### 結論

ドキソルビシンの気管内滴下注入は P F を誘発した。

#### 【 0 2 0 9 】

1 ) ドキソルビシン誘発性 P F の発症中に、血清中の c G P B P - 1 値および肺における G P B P - 1 値の上昇が確認された。

2 ) G P B P - 1 に対する 2 つの m A b を含む 4 つの明らかに異なる G P B P - 1 インヒビターは、ドキソルビシン誘発性 P F を改善した。

40

#### 【 0 2 1 0 】

#### 参考文献

#### 【 0 2 1 1 】

## 【表 5】

1. Noth I and Martinez FJ. Recent advances in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2007; **132**: 637-650.
2. Sleijfer S. Bleomycin-induced pneumonitis. *Chest* 2001; **120**: 617-624.
3. Injac R and Strukelj B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol Cancer Res Treat* 2008; **7**: 497-516.
4. Meadors M, Floyd J and Perry MC. Pulmonary toxicity of chemotherapy *Semin Oncol* 2006; **33**: 98-105. 10
5. Öz E and Ýlhan MN. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. *Mol Cell Biochem* 2006; **286**: 11-15.
6. Revert F, Merino R, Monteagudo C, Macias J, Peydró A, Alcácer J, Muniesa P, Marquina R, Blanco M, Iglesias M, Revert-Ros F, Merino J and Saus J. Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane. *Am J Pathol* 2007; **171**: 1419-1430. 20
7. Revert-Ros F, López-Pascual E, Granero-Moltó F, Macías J, Breyer R, Zent R, Hudson BG, Saadeddin A, Revert F, Blasco R, Navarro C, Burks D, Saus J. Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) directs myofibril formation: identification of intracellular downstream effector 130-kDa GPBP-interacting protein (GIP130). *J Biol Chem.* 2011; **286**: 35030-35043.
8. Granero F, Revert F, Revert-Ros F, Lainez S, Martínez-Martínez P and Saus J. A human-specific TNF-responsive promoter for Goodpasture antigen-binding protein. *FEBS J* 2005; **272**: 5291-5305. 30
9. Miralem T, Gibbs PE, Revert F, Saus J and Maines MD. Human biliverdin reductase suppresses Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) kinase activity: the reductase regulates tumor necrosis factor- $\alpha$ -NF- $\kappa$ B-dependent GPBP expression. *J Biol Chem* 2010; **285**:12551-12558.
10. McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol.* 1999; **163**:5693-5699. 40

## 【 0 2 1 2 】

方法

動物実験

全ての手順を、実験における動物の使用に関する施設ガイドラインに準拠して実施した。

## 【 0 2 1 3 】

免疫複合体仲介系球体腎炎を治療するために、抗体を用いたインビボ研究（実施例 1）用に、NZWマウスおよびC57BL/6マウスを産生し、病原体フリー環境で維持した。インビボでmAbをモニターするために、8～10カ月齢のNZWマウスに10 $\mu$ g/

g 体重のビオチン - 標識 m A b N 1 2 ( n = 3 ) または N 2 6 ( n = 3 ) の単回ブーストを投与し、特定の時点で血清試料を採取した。治療効果分析用に、8 ~ 10 カ月齢の N Z W マウスは、1  $\mu$  g / g 体重の、m A b N 1 2 - ビオチン ( n = 5 )、m A b N 2 6 - ビオチン ( n = 5 )、マウス血清由来の I g G ( n = 3 )、または P B S ( n = 3 ) のいずれかの注射を 1 週間に 1 回受けた。処置を 8 週間継続し、注射の直前に血清試料を採取した。抗体または P B S を腹腔内に投与し、血清試料をマウス尾から得て分析測定に使用した。I g G - 処置マウスと P B S - 処置マウスとの間に差は認められず、統計分析用の対照として、両群を集合的に使用した。処置の終わりに、全てのマウスを屠殺し、標準的な組織学的技術で腎臓を分析した。3 カ月齢の N Z W マウス由来の血清および 8 ~ 10 月齢の C 5 7 B L / 6 マウス由来の血清を分析的研究で対照として使用した。

10

## 【0214】

ドキシソルピシンで P F を誘発するために ( 実施例 3 )、8 ~ 10 週齢の C 5 7 B L / 6 オスマウスをハーラン・イベリカ ( H a r l a n I b e r i c a ) ( バルセロナ、スペイン ) から購入した。ドキシソルピシン ( シグマ ( S i g m a ) ) を気管内 ( i . t . ) 滴下注入するために、ケタミン ( 5 0  $\mu$  g / g 体重 )、硫酸アトロピン ( 0 . 2  $\mu$  g / g ) およびジアゼパム ( 4  $\mu$  g / g ) の腹腔内 ( i . p . ) 注射でマウスを麻酔した。気管を、首の前面の皮膚切開によって定位し、鉗子で固定した。次いで、7 5  $\mu$  l のドキシソルピシン塩酸塩 ( 1 m g / m l ) を、3 0 G 針で気管内注射した。ついで、3 / 0 シルクで皮膚を縫合した。マウスに、固形飼料を不断給餌し、ドキシソルピシン気管内滴下注入後、種々の時点で、後眼窩叢から採血した。ピナシジルおよびミリセチンは、それらがインビトロ

20

口で G P B P の自己リン酸化活性を阻害する能力に基づいて、プレツビック・ケミカル・ライブラリー ( P r e t s w i c k C h e m i c a l L i b r a r y ) から選択された。ドキシソルピシンを気管内滴下注入されたマウスに、0 . 0 2 7、0 . 0 8、0 . 2 5 または 1 . 2 2 5 m g / k g のピナシジルか、0 . 1 1、0 . 3 4 または 0 . 9 5 m g / k g のミリセチンのいずれかを、毎日腹腔内 ( i . p . ) 注射した。ドキシソルピシン投与後 1 2 日目に、肺の遺伝子発現分析および病理解剖学的研究のためにマウスを屠殺した。

## 【0215】

## ヒト血清試料

ヒト血清試料を、対応する倫理委員会によって事前に認可された手順にしたがって、ホスピタル 1 2 デ・オクトブレ ( H o s p i t a l 1 2 d e O c t u b r e ) ( マドリード、スペイン ) およびワシントン大学ジョージ M オブライエン・腎臓疾患リサーチセンター ( W a s h i n g t o n U n i v e r s i t y G e o r g e M . O ' B r i e n C e n t e r f o r K i d n e y D i s e a s e R e s e a r c h ) ( セントルイス、米国 ) から入手した。P K D を除き、患者診断は、対応する腎生検の組織学的分析によって裏付けられた。

30

## 【0216】

## 抗体およびウェスタンブロット法

ピキア・パストリス ( P i c h i a p a s t o r i s ) ヒト組換え型 G P B P - 1 に対するモノクローナル抗体 N 1 2、N 2 6、および N 2 7 を生成したが、その産生は以前に報告されている ( 1、2 )。大腸菌 ( E . c o l i ) で発現されるキメラ蛋白質である G S T - e 2 6 に対するモノクローナル抗体 e 1 1 - 2 を生成した。G S T - e 2 6 は、G P B P - 1 のエキソン 1 1 によりコード化される蛋白質配列 ( G P B P - 2 には存在しない ) を含み、グルタチオン S - トランスフェラーゼ ( G S T ) に融合したキメラ蛋白質である。必要があれば、m A b N 1 2 および m A b N 2 6 を、スルホ - N H S - L C - ビオチン ( サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c )、ロックフォード、イリノイ ) でビオチン - 標識し、インビボ検定に使用した。免疫蛍光試験のために、アレキサ・フルア ( A l e x a ( 登録商標 )

40

F l u o r ) 5 4 6 ( インビトロジェン ( I n v i t r o g e n )、カールスバド、カリフォルニア ) で標識された m A b N 2 7 か、事前に特性化されたニワトリ抗 G P B P - p e p 1 ポリクローナル抗体のいずれかを使用して、G P B P - 1 を可視化した ( 3

50

）。セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP；EZ-リンク・プラス・活性化ペルオキシダーゼ（EZ-LINK Plus（登録商標）Activated Peroxidase）、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック（Thermo Fisher Scientific））で標識したモノクローナル抗体N27を、組換え型GPBP-1およびcGPBP-1の検出に使用した。

【0217】

SDS-PAGEおよびウェスタン・ブロッティングを、標準手順に従って、還元条件下で実施した。

市販の抗体

アレキサ・フルア（Alexa（登録商標）Fluor）647（インビトロジェン（Invitrogen）、カールスバド、カリフォルニア）で標識したヤギ抗IV型コラーゲン・ポリクローナル抗体（ケミコン（Chemicon）、テメキュラ、カリフォルニア）、およびビオチン標識抗3（IV）mAb3（ウィズラブ（Wieslab）AB、ルンド、スウェーデン）を、それぞれ系球体1.1.2（IV）ネットワークおよび3.4.5（IV）ネットワークの検出に使用した。組換え型cGPBP-1と3（IV）NCL領域の両者は、抗FLAG M2-ペルオキシダーゼ（ANTI-FLAG M2-Peroxidase）（シグマ・アルドリッチ（Sigma-Aldrich）、セントルイス、ミズーリ）で検出した。補体成分3c（C3c）、IgA、IgGおよびIgM沈着を、ウサギポリクローナル抗C3c-FITC（アブカム（Abcam））、およびヤギ抗マウスIgA-、IgG-またはIgM-FITC（シグマ・アルドリッチ（Sigma-Aldrich））で、それぞれ可視化した。ビオチン化抗体を、高感度ニュートラビジン-HRP（NeutrAvidin-HRP）（サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック（Thermo Fisher Scientific）、ロックフォード、イリノイ）、ストレプトアビジン（Streptavidin）-AF488（インビトロジェン（Invitrogen））またはエクストラビジン（Extravidin（登録商標））-TRITC（シグマ・アルドリッチ（Sigma-Aldrich））で検出した。使用した二次抗体は、ニワトリIgY-FITC（アブカム（Abcam））に対するヤギポリクローナル抗体、およびロバ抗マウスIgG-HRP（ジャクソン・イムノリサーチ・ヨーロッパ社（Jackson ImmunoResearch Europe Ltd）、サフォーク、英国）であった。

10

20

30

【0218】

細胞培養

A549細胞を、ダルベッコ変法イーグルF-12で増殖させ、HEK293およびRAW264.7を、ダルベッコ変法イーグル培地で培養した。全ての培地に10%ウシ胎仔血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した。

【0219】

プラスミド構築および細胞形質移入

pSilencer（登録商標）2.1-U6ハイグロベクター（アンピオン（Ambion））を、GPBP-1をサイレンシングするために特異的な低分子干渉mRNA（siRNA）の安定した発現に使用した。誘導された構築物はpSi-GPBP-1と名づけられ、cDNA標的配列は、既述の通り、GCCCTATAGTCGCTCTTCC（配列番号11）であった（4）。

40

【0220】

mAb e11-2抗体を得るために使用される、GST-e26の発現および精製用に、GPBP-1エキソン11のcDNAを、pGEX-5x-1ベクター（GEヘルスケア（Healthcare））におけるGSTのcDNAとのインフレームの下流にクローニングした。

【0221】

RAW264.7細胞の形質移入を、製造業者の推奨にしたがって、プロフェクション・哺乳類トランスフェクションシステム（ProFectin（登録商標）Mam

50

malian Transfection System) (プロメガ (Promega)) またはリポフェクタミン (Lipofectamine) 2000 (インビトロジェン (Invitrogen)) を使用した、リン酸カルシウム手順で実施した。個々のクローンにおける GPBP-1 の発現を、細胞抽出物のウェスタンブロット分析で決定した。GPBP-1 値低下を示すクローンを、機能的な研究で使用した。

#### 【0222】

##### 細胞処理

野生型 RAW264.7 細胞および GPBP-1 - 抑制 (サイレンシング) RAW264.7 細胞を、 $2 \times 10^6$  細胞/ウェルで、6 ウェル培養プレートにプレATINGし、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS (シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich)、大腸菌 (E. coli) 血清型 026:B6) で一晩 (16 時間) 刺激した。次いで、LPS-刺激マクロファージを  $10 \mu\text{M}$  ドキソルピシン (シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich)) に 2、4、および 6 時間、曝露した。ドキソルピシンと共にインキュベートした後、細胞溶解物中の pro-IL-1 および サイトゾル GPBP-1 の発現をウェスタンブロットで分析し、培地上澄中の成熟 IL-1 および cGPBP-1 を ELISA で定量した。

10

#### 【0223】

細胞溶解物を、溶解バッファー ( $25 \text{mM}$  Tris-HCl、 $\text{pH} 7.5$ 、 $150 \text{mM}$  NaCl、 $1\%$  Triton X-100、 $0.1\%$  SDS、 $1 \mu\text{M}$  ロイペプチン、 $1 \text{mM}$  PMSF) 中で細胞を解体し、氷上で 10 分間インキュベートすることによって得た。溶解物を、4 にて  $15,000 \times g$  で 10 分間遠心分離することによって清澄させ、ウェスタンブロットで分析した。

20

#### 【0224】

##### GPBP-1 および GST-e26 の組換え型発現および精製

ELISA で使用される組換え型 poly-His-GPBP-1 を、発現プラスミド pET-15b (メルク (Merck) KGaA、ダルムシュタット、ドイツ) のマルチプルクロニングサイトにインフレームでクロニングされた GPBP-1 cDNA で形質転換された大腸菌 (E. coli) から精製した。上記発現プラスミド pET-15b は、標準手順に従ったニッケル-キレート化アガロースカラム (クロンテック・ラボラトリーズ (Clontech Laboratories)、マウンテンビュー、カリフォルニア) を用いた精製を容易にするために 6 つのヒスチジンのタグを付加する。

30

#### 【0225】

組換え型 cGPBP-1 (rcGPBP-1) を、抗 FLAG M2 アフィニティ・ゲル (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel) (シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich)、セントルイス、ミズーリ) を使用して、FLAG-GPBP-1 を恒常的に分泌する HEK 293 細胞クローンの細胞培地から精製した。

#### 【0226】

GST-e26 発現を、pGEX-5x-1-e26 構築物を包懐する大腸菌 (E. coli) DH5 細胞において  $1 \text{mM}$  IPTG を用いて誘導し、精製を、製造業者の推奨に従って、GSH-アガロースアフィニティ樹脂 (シグマ (Sigma)) を用いて実施した。

40

#### 【0227】

poly-His-GPBP-1、rcGPBP-1 または GST-e26 の純度を、SDS-PAGE およびクマシー・ブルー染色で評価し、その完全性を、mAb N26、mAb N27 および mAb e11-2 を含む、GPBP-1 に対する mAb を使用したウェスタンブロットで評価した。

#### 【0228】

##### 病理学的研究

全てのマウスを、 $\text{CO}_2$  室で屠殺した。抗体を用いたインビボ実験 (実施例 1) 後、腎臓を  $10\%$  ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。電子ロータリーマイクローム (ミ

50

クローム (Microm)、ヴァルドルフ、ドイツ) で、2  $\mu$ m の切片を得て、従来のヘマトキシリン/エオシン (HE)、マッソン染色にかけた。

【0229】

PFアッセイでは、マウス肺を、4%リン酸塩緩衝ホルマリンで気管支内灌流し、次いで、この固定液中で24時間インキュベートし、最後にパラフィン包埋した。5  $\mu$ m の組織切片を、従来の方法に従ってHEまたはマッソン3色で染色した。免疫組織化学用に、パラフィン包埋した肺を抗GPBP-pep1抗体で染色し(3)、それを抗ニワトリ-HPRおよびDAB基質(ダコ・ダイアグノスティコス(Dako Diagnostics), S.A., パルセロナ、スペイン)で検出した。標本を、ヘマトキシリンで対比染色した。

10

【0230】

免疫蛍光法

腎臓をOCT(サクラ、東京、日本)に包埋し、凍結した。クライオスタット(マイクローム(Microm))を用いて6  $\mu$ m の切片を得て、既述の通り、従来の顕微鏡法分析および共焦点顕微鏡法分析用に染色した(3)。

【0231】

マイクロアレイ分析

ヒトA549細胞を、200 ng/mLのrcGPBP-1有り無しで、3時間培養した。次いで、細胞を溶解し、製造業者の推奨に従って、RNeasy(登録商標)プロテクトミニキット(キアゲン(Qiagen)、バレンシア、カリフォルニア)を用いて総RNAを抽出した。RNAを、ナノドロップ(登録商標)(NanoDrop)ND1000(ナノドロップ・テクノロジー(NanoDrop Technologies)、ウィルミントン、デラウェア)を用いて分光光度法で定量し、品質を、RNA6000ナノ・バイオアナライザー(Nano Bioanalyzer)(アジレント・テクノロジー(Agilent Technologies)、パロ・アルト、カリフォルニア)アッセイで確認した。簡単に記載すると、製造業者の説明書に従って、ロー・インプット・クイック・アンプ・ラベリング・キット・ワン・カラー(Low Input Quick(登録商標) Amp Labelling Kit One-Color)(アジレント(Agilent))を使用してシアニン3-CTP-標識cRNAを産生するために、150 ngの総RNAを使用した。「ワンカラー・マイクロアレイ・ベースド・ジーン・エクスペッション・アナリシス(One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis)」プロトコール・バージョン6.0(アジレント(Agilent))に従い、41000+ ヒト遺伝子および転写物を含むホール・ヒューマン・ゲノム・オリゴ・マイクロアレイ・キット(Whole Human Genome Oligo Microarray Kit(アジレント(Agilent))を用いて、1600 ngの標識cRNAをハイブリダイズさせた。製造業者の説明書に従って、アジレント・マイクロアレイ・スキャナ(Agilent Microarray Scanner)でアレイを走査し、アジレント(Agilent)プロトコールGE1\_107\_Sep09、グリッド・テンプレート014850\_D\_F\_20100430およびQCメトリック・セット(QC Metric Set)GE1\_QCMT\_Sep09に従い、アジレント・フィーチャー・エクストラクション・ソフトウェア(Agilent Feature Extraction Software)10.7.1を使用してデータを抽出した。分析は、ゲノミクス・コア・サービス・オブ・ザ・セントロ・デ・インヴェスティゲーション・プリンシペ・フェリペ(Genomics Core Service of the Centro de Investigacion Principe Felipe)(バレンシア、スペイン)で、アジレント・マイクロアレイ・スキャナ(Agilent Microarray Scanner)(アジレント・テクノロジー(Agilent Technologies)、パロ・アルト、カリフォルニア)を使用して、実施した。

20

30

40

【0232】

50

生データファイルは、供給元の方法論を使用してバックグラウンド補正し、強度信号シグナルは、変位値正規化アルゴリズムによって全アレイを標準化した。全比較の示差遺伝子発現評価は、リンマ調整 t 統計量を使用して実施した。ベンジャミニ・ホッホバーグ (Benjamini Hochberg) により提唱された多重検定のための従来の調整 (5) を使用して、調整 P 値を導いた。また、本研究で実施した比較のそれぞれについて、ロジスティック回帰モデルを使用し、前述同様に多重検定用に補正して、(5) 遺伝子セット分析を実施した。全ての分析は、バイオインフォマティクス・デパートメント・オブ・セントロ・デ・インヴェスティゲーション・プリンシペ・フェリペ (Bioinformatics Department of Centro de Investigacion Principe Felipe) の Babelomics (登録商標) (6) ウェブ・スイートを使用して実施した。アレイデータは、GEO に預託されている (受け入れ番号 GSE32181)。

10

### 【0233】

#### リアルタイム PCR 分析

実験的肺線維症のアッセイで、肺における GPBP およびコラーゲン I 型および IV 型 mRNA の発現を、リアルタイム定量 PCR (RT-qPCR) で分析した。製造業者の説明書に従い、RT-PCR キット (アマシャム・ファルマシア・バイオテック (Amersham Pharmacia Biotech)、ピスカタウェイ、ニュージャージー) を用いた cDNA 合成に、1  $\mu$ g の単離 RNA を使用した。RT-qPCR を、特異的プライマー SYBR・グリーン・PCR・マスター・ミックス (SYBR Green PCR Master Mix) (アプライド・バイオシステムズ、ライフ・テクノロジー社 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation)) を使用して、MX-3000P ストラタジーン・インストルメント (Stratagene instrument) (アジレント・テクノロジー社 (Agilent Technologies, Inc.))、サンタ・クララ、カリフォルニア) で実施した。使用したプライマーは: 1 (I) コラーゲン遺伝子には、5' プライマー 5' - TCCTGCTGGTGAGAAAGGAT - 3' (アミノ酸配列 12) および 3' プライマー 5' - CTGGAGTCCCATAAACGACCT - 3' (配列番号: 13); GPBP 遺伝子には、5' プライマー 5' - GCTGTTGAAGCTGCTCTTGACA - 3' (配列番号 14) および 3' プライマー 5' - CCTGGGAGCTGAATCTGTGAA - 3' (配列番号 15); 18S 遺伝子には、5' プライマー 5' - GTAACCCGTTGAACCCCAT - 3' (配列番号 16) および 3' プライマー 5' - GCGATGATGGCTAACCTACC - 3' (配列番号 17) であった。結果 (三重) は、リボソーム 18S サブユニット発現に正規化され、また各試料で並行して測定された。データを、対照試料と比較して、平均倍率変化として表す。

20

30

### 【0234】

#### cGPBP-1 の免疫精製

cGPBP-1 を、アフィニティークロマトグラフィでヒト血漿から抽出した。具体的には、血漿 (200 mL) を遠心分離で清澄させ、濾過し (0.45  $\mu$ m)、25 mM Tris pH 7.4、0.05% Tween 20 (TBST) を加えた 150 mM NaCl (Tris-緩衝食塩水、TBS) で 1:5 (v/v) 希釈した。1 mL のシアン酸プロミド-活性化-セファロース 4B (シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich)) に固定された 1 mg の mAb N26 を含むカラムに上澄を負荷した。結合した物質を 10 mL の TBST で洗浄し、イムノピュア・ジェントル・Ag/Ab 溶離バッファー (ImmunoPure (登録商標) Gentle Ag/Ab Elution Buffer) (サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック (Thermo Fisher Scientific)) で溶離し、TBS に対して徹底的に透析した。

40

### 【0235】

#### ELISA 手順

50

GPBP-1とIV型コラーゲンの3鎖の非コラーゲン1領域[3(IV)NC1]との相互作用を評価するために、PBS中、1 $\mu$ g/mLのpoly-His-GPBP-1でプレートを被覆した。ブロック後、プレートを、1 $\mu$ g/mLのmAb N12またはN26の存在下または非存在下で、1 $\mu$ g/mL FLAG-3(IV)NC1と共にインキュベートした。結合したFLAG-3(IV)NC1を、1 $\mu$ g/mL抗FLAG M2-ペルオキシダーゼで検出した。

【0236】

cGPBP-1の定量化またはビオチン化mAbの定量化を、それぞれ、PBS中、2 $\mu$ g/mLのmAb N26またはpoly-His-GPBP-1でプレートを被覆するサンドイッチELISAで実施した。プレートをブロックし、試料(1:10~1:20希釈)と共にインキュベートし、それぞれ、1 $\mu$ g/mLのmAb N27-HRPまたは高感度ニュートラビジン-HRP(High Sensitivity Neutr Avidin(登録商標)-HRP)を用いて検出を実施した。

10

【0237】

全ての場合で、プレートを、4で16時間被覆し、PBS中3%のBSAにて室温で1時間ブロックした。その後のインキュベーションを、穏やかに振盪しながら室温にて1~2時間行った。ステップ間にプレートを徹底的に洗浄し、蛍光性HRP基質(クオンタ・ブルー(Quanta Blue)、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック(Thermo Fisher Scientific))で展開した。蛍光強度をスペクトラマックス・ジェミニ XPS 蛍光マイクロプレート・リーダー(SpectraMax(登録商標) Gemini XPS Fluorescence Microplate Reader)(モレキュラー・デバイーズ(Molecular Devices)、サンベール、カリフォルニア)で測定し、ソフトマックス・プロ・データ獲得&解析ソフトウェア(SoftMax(登録商標) Pro Data Acquisition & Analysis software)(モレキュラー・デバイーズ(Molecular Devices))で解析したデータを獲得した。他に指示がない限りあらゆる希釈および洗浄は、TBSTで行った。

20

【0238】

抗-ss-DNA IgG抗体価およびCRP価を、製造業者の説明書に従い、それぞれアルファ・ダイグノスティック・インタナショナル(Alpha Diagnostic Intl.)(サンアントニオ、テキサス)およびメディテック(Meditec)(キール、ドイツ)からの市販キットを使用して、間接サンドイッチELISAで測定した。

30

【0239】

刺激されたRAW 264.7細胞による成熟IL-1 $\beta$ 産生を評価するために、製造業者の説明書に従い、マウスIL-1 $\beta$ 用ELISAレディー・セット・ゴー・キット(ELISA Ready-Set-Go Kit)(イーバイオサイエンス(eBioscience)、サンディエゴ、カリフォルニア)を使用して、細胞培地を分析した。

【0240】

電子顕微鏡法試験

40

腎臓を切除し、0.1Mリン酸ナトリウム pH7.4(PB)中に2%のパラホルムアルデヒドおよび2.5%のグルタルアルデヒドにおいて、4にて24時間浸漬することによって固定し、次いでPB洗浄した。ピプラトーム(ライカ(Leica)VT-1000;ライカ・マイクロシステムズ・ハイデルベルグ有限会社(Leica Microsystems Heidelberg GmbH)、マンハイム、ドイツ)を用いて200 $\mu$ mの切片を得て、PB中に2%の四酸化オスミウムで1.5時間固定し、氷温で洗浄し(3x5分)、氷温エタノール溶液の濃度を上昇させながら連続的に洗浄することにより脱水し(30%で5分、50%で5分、および70%で10分)、70%エタノール中に2%の酢酸ウラニルで、4にて2.5時間洗浄し、70%エタノール中で2x5分洗浄、96%エタノール中で2x5分および10分洗浄、100%エタノール中で2

50

× 7分洗淨、および乾燥 100%エタノール中で1回10分洗淨によりさらに脱水した。最後に、切片をプロピレンオキシドで2×10分洗淨し、アラルダイト(ダーキュパン(Durcupan)、シグマ・アルドリッチ(Sigma-Aldrich))に包埋した。1.5µmの準超薄切片および0.08µmの超薄切片をダイヤモンドナイフで切り、それぞれ1%トリジンブルーおよびクエン酸鉛(レイノルズ(Reynolds)溶液)で染色した。

#### 【0241】

##### 統計解析

プリズム4.0ソフトウェア(Prism 4.0 software)(グラフパド・ソフトウェア(GraphPad(登録商標)Software)、サンディエゴ、カリフォルニア)を、全ての計算に使用した。データを、シリーズ間の有意差を評価するために二元配置ANOVAまたはクルスカル・ウォーリス(Kruskal-Wallis)検定を用いて解析し、cGPP-1と抗-ssDNA自己抗体との間の相関の統計学的有意性を決定するためにスピアマン検定(Spearman's test)を用いて解析した。P値<0.05は有意であると考えられた。

10

#### 【0242】

##### 参考文献

#### 【0243】

##### 【表6】

1. Raya A, Revert F, Navarro S and Saus J. Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human Goodpasture antigen. *J Biol Chem* 1999; **274**: 12642-12649.
2. Raya A, Revert-Ros F, Martinez-Martinez P, Navarro S, Rosello E, Vieites B, Granero F, Forteza J and Saus J. Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the Goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 40392-40399.
3. Revert F, Merino R, Monteagudo C, Macias J, Peydró A, Alcácer J, Muniesa P, Marquina R, Blanco M, Iglesias M, Revert-Ros F, Merino J and Saus J. Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane. *Am J Pathol* 2007; **171**: 1419-1430.
4. Revert F, Ventura I, Martínez-Martínez P, Granero-Moltó F, Revert-Ros F, Macías J and Saus J. Goodpasture antigen-binding protein is a soluble exportable protein that interacts with type IV collagen. Identification of novel membrane-bound isoforms. *J Biol Chem* 2008; **283**: 30246-30255.
5. Benjamini Y and Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Statist Soc B* 1995; **57**: 289-300.
6. Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, Conesa A, Tàrraga J, Pascual-Montano A, Nogales-Cadenas R, Santoyo J, García F, Marbà M, Montaner D and Dopazo J. Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 2010; **38** (Web Server issue): W210-W213.

20

30

40

50

【 図 5 】

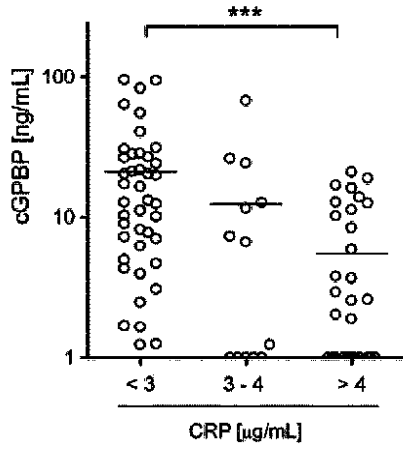
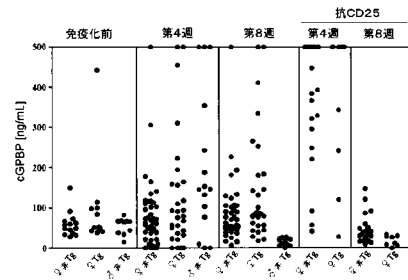
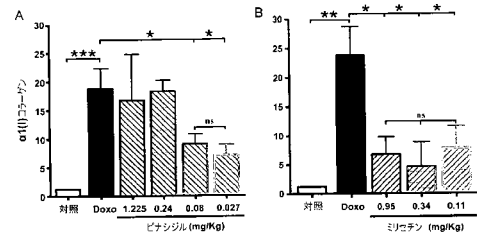


Figure 5

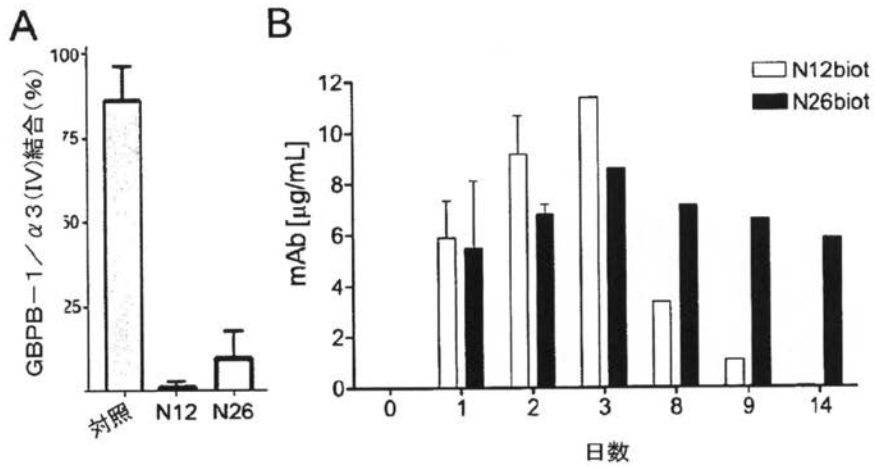
【 図 7 】



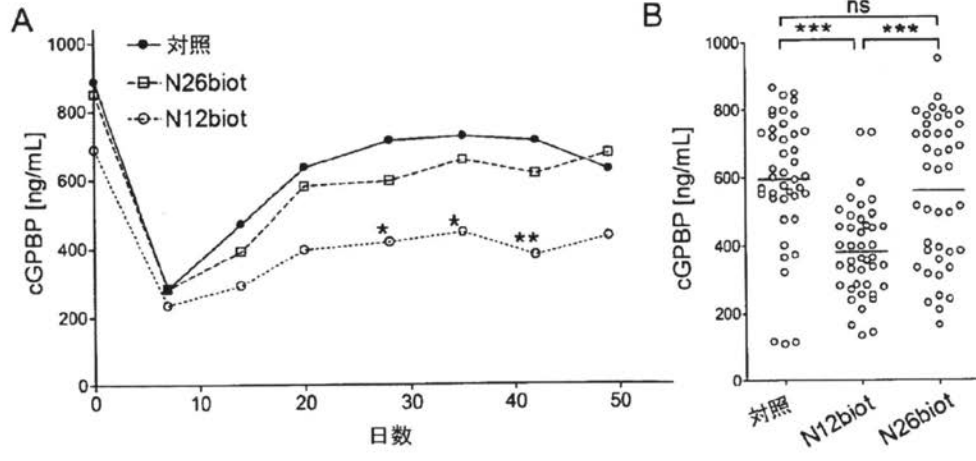
【 図 1 1 】



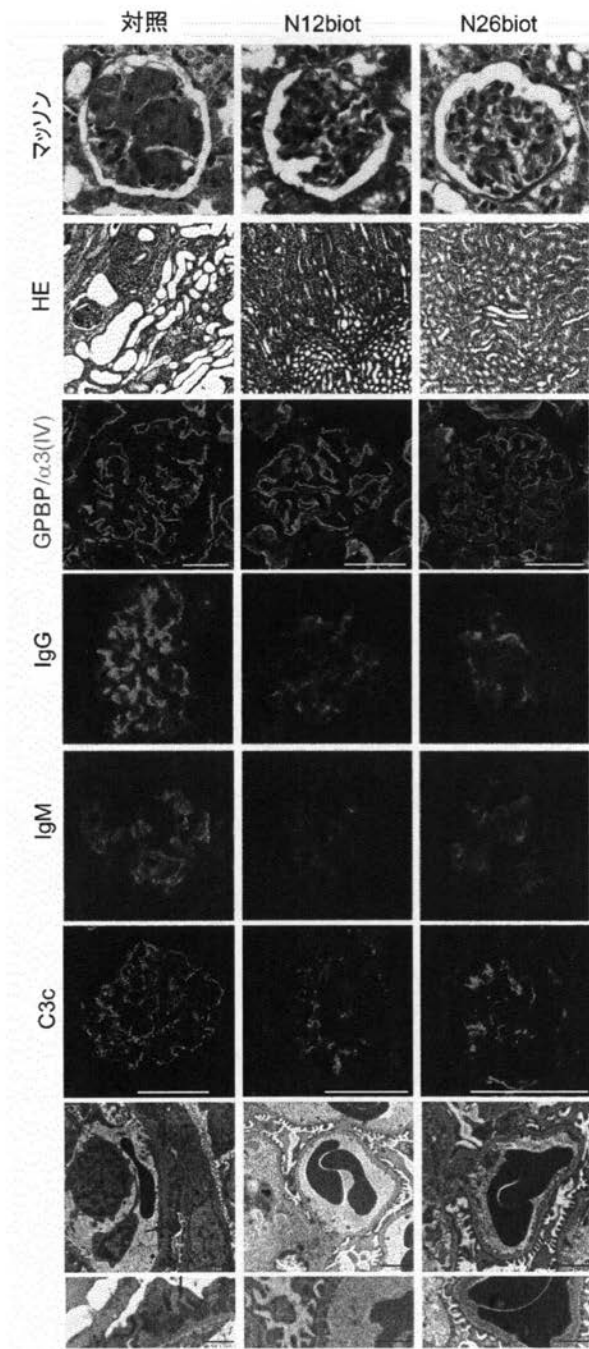
【 図 1 】



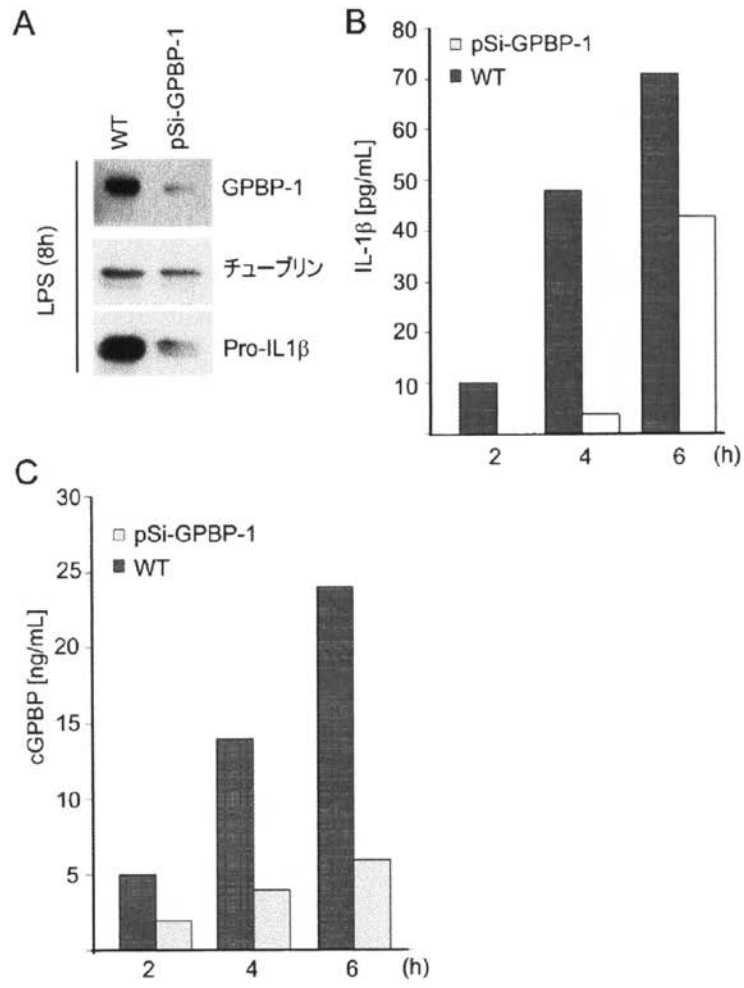
【 図 2 】



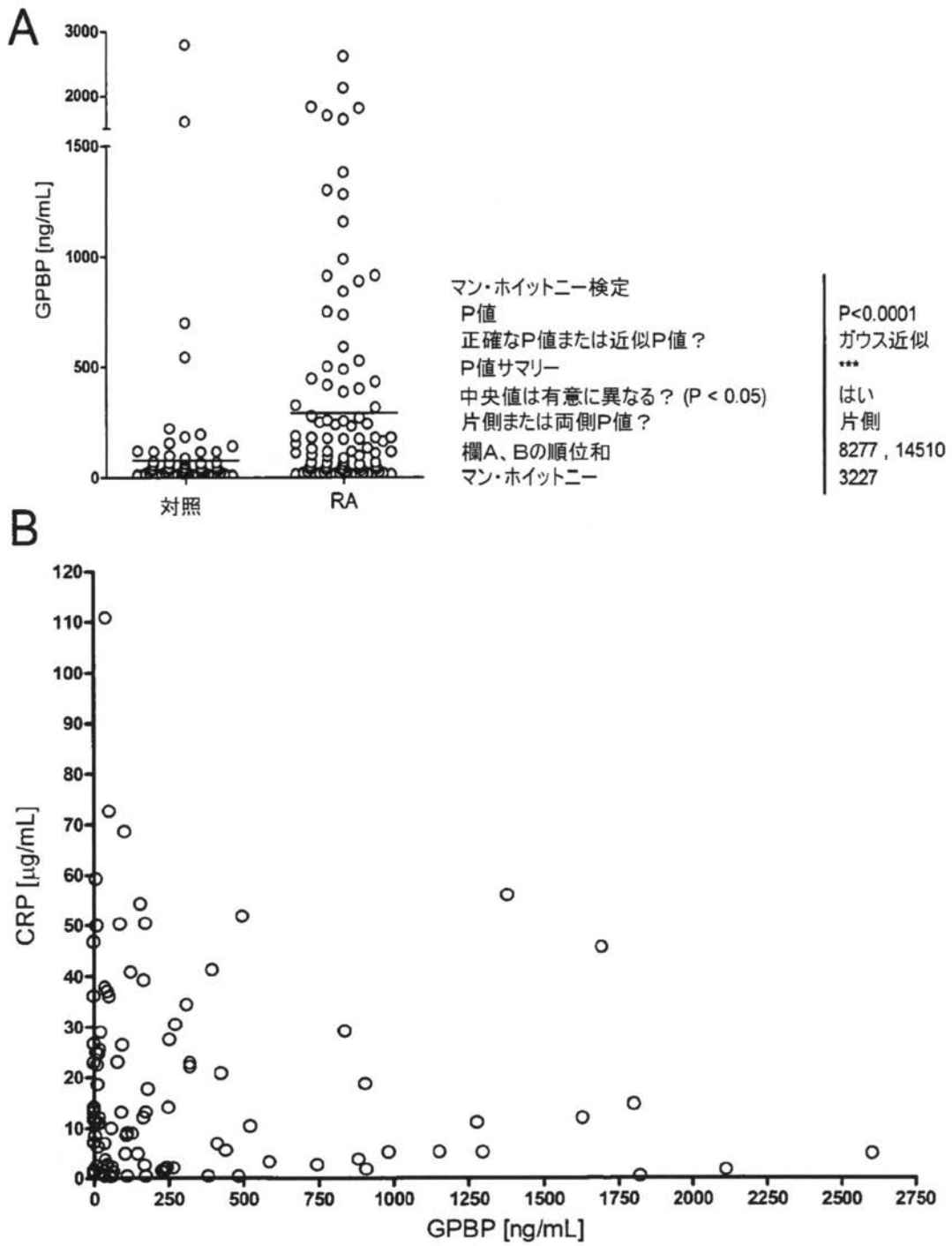
【 図 3 】



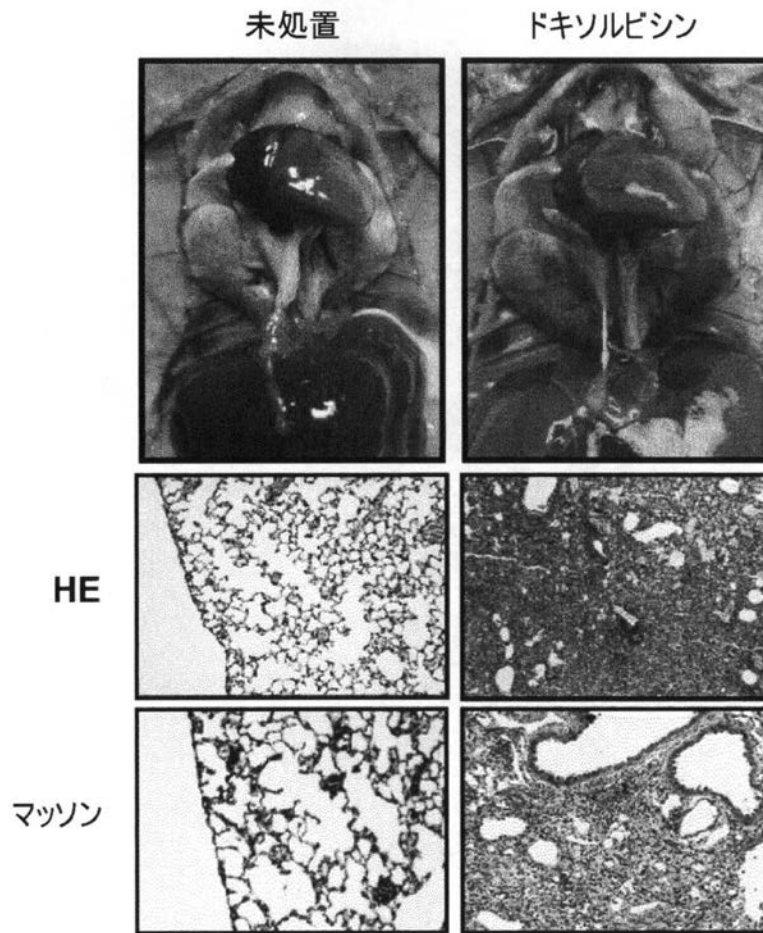
【 図 4 】



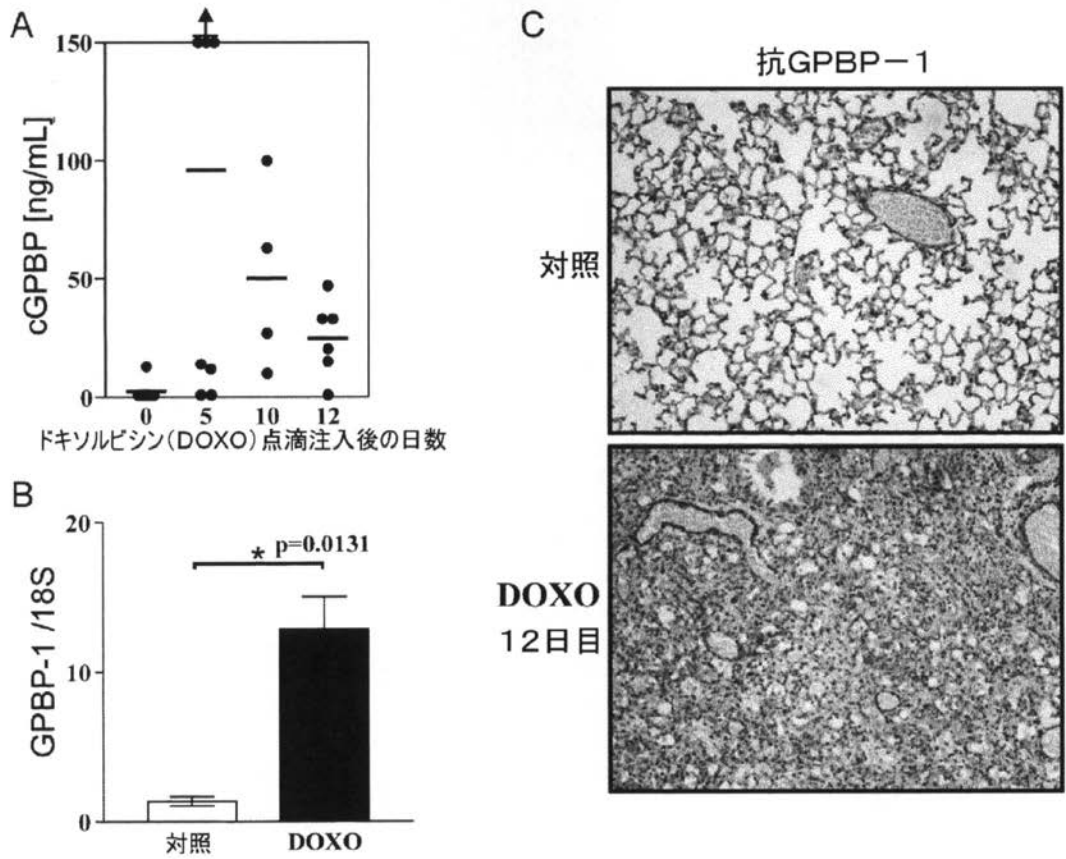
【 図 6 】



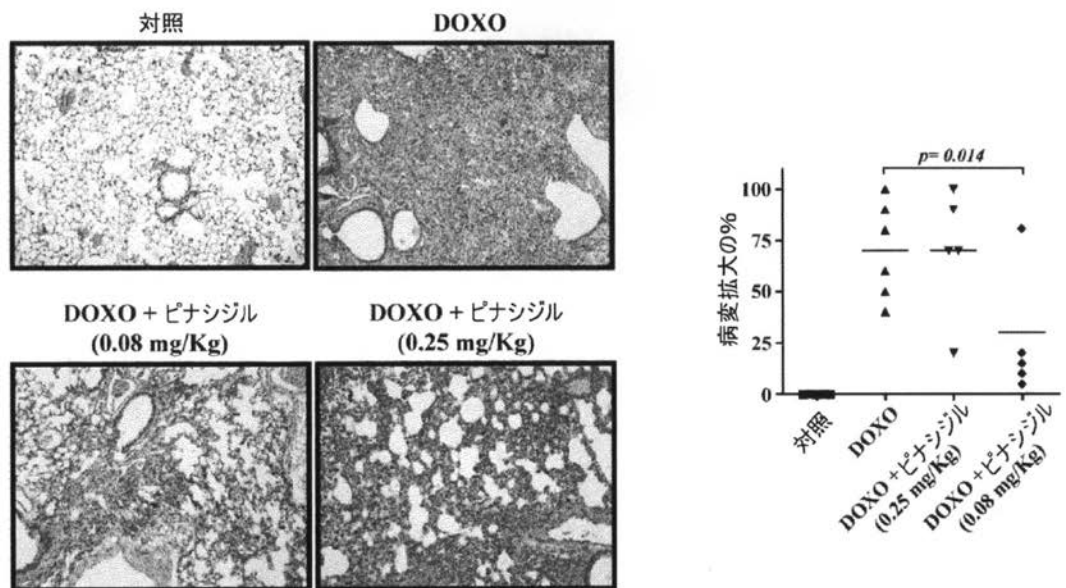
【 図 8 】



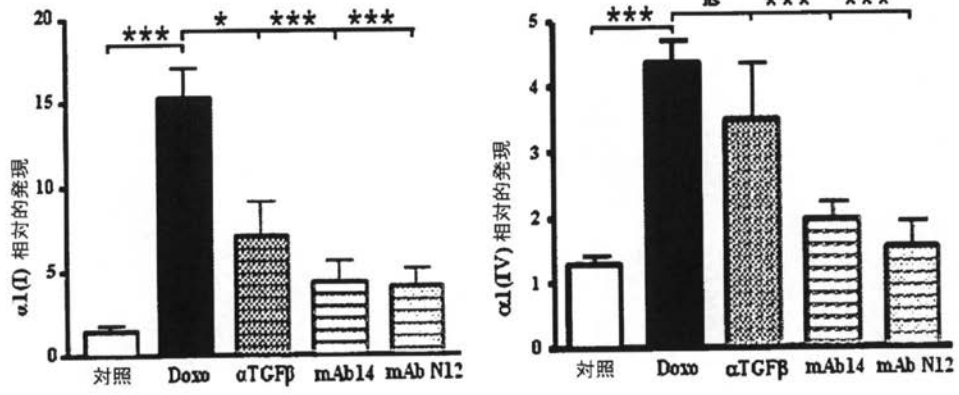
【 図 9 】



【 図 10 】



【图 1 2】



【配列表】

[201450815000001.app](#)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2012/052923**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/052923

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/070025 A2 (SAUS JUAN [ES]; REVERT FERNANDO [ES]; REVERT-ROS FRANCISCO [ES]) 19 August 2004 (2004-08-19) cited in the application page 5, line 26 - line 32 page 31, line 18 - page 35, line 23 page 55, line 1 - page 70, line 7 claims 22,25-35 -----	1-24
A	WO 2007/087689 A1 (CRC FOR ASTHMA AND AIRWAYS LTD [AU]; BOUSTANY SARAH [AU]; BURGESS JANE) 9 August 2007 (2007-08-09) the whole document, e.g. claims 1, 3-5, 15, 18, 25-27 -----	1,2, 6-21,23, 24
A	WO 2009/017833 A2 (ARRESTO BIOSCIENCES [US]; SMITH VICTORIA [US]; OGG SCOTT [US]; VAN VLA) 5 February 2009 (2009-02-05) the whole document, especially page 8, lines 5 -26, page 56, lines 5-30 -----	1-22
A	WO 2009/009019 A2 (PROMEDIOR INC [US]; SUROWY TERRY [US]; LI SHAWN [US]; LUPHER MARK L [U]) 15 January 2009 (2009-01-15) the whole document, especially page 53, lines 4 - 33; page 54, lines 27 - 33; claims 1-78 -----	12-22
X,P	WO 2011/054530 A1 (FIBROSTATIN S L [ES]; SAUS JUAN [ES]; FUSTERO SANTOS [ES]; SANZ-CERVER) 12 May 2011 (2011-05-12) cited in the application the whole document, especially pages 18-19, paragraph [0067] -----	4-6,11

International Application No. PCT/ EP2012/ 052923

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(completely); 6-21, 23, 24(partially)

A method for treating pulmonary fibrosis (PF) as recited in present claim 1 and related subject-matter.

---

2. claims: 3(completely); 6-11, 22-24(partially)

A method for treating chronic kidney disease (CKD) as recited in present claim 3 and related subject-matter.

---

3. claims: 4, 5(completely); 6-11, 22-24(partially)

A method for treating immune complex-mediated glomerulonephritis (GN) as recited in present claim 4 and related subject-matter.

---

4. claims: 12-21(partially)

A method for diagnosing rheumatoid arthritis as recited in present claim 12.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/052923

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2010009856	A2	28-01-2010	CN 102300583 A EP 2318039 A2 JP 2011528559 A US 2010021935 A1 WO 2010009856 A2	28-12-2011 11-05-2011 24-11-2011 28-01-2010 28-01-2010
WO 2004070025	A2	19-08-2004	NONE	
WO 2007087689	A1	09-08-2007	AU 2007211846 A1 EP 1988915 A1 US 2009221494 A1 WO 2007087689 A1	09-08-2007 12-11-2008 03-09-2009 09-08-2007
WO 2009017833	A2	05-02-2009	AU 2008282739 A1 AU 2008299784 A1 CA 2693208 A1 CA 2693310 A1 CN 101835490 A CN 101842114 A EP 2182981 A2 EP 2185198 A1 JP 2010535205 A JP 2010535219 A US 2009053224 A1 US 2009104201 A1 WO 2009017833 A2 WO 2009035791 A1	05-02-2009 19-03-2009 05-02-2009 19-03-2009 15-09-2010 22-09-2010 12-05-2010 19-05-2010 18-11-2010 18-11-2010 26-02-2009 23-04-2009 05-02-2009 19-03-2009
WO 2009009019	A2	15-01-2009	AU 2008275678 A1 CA 2692637 A1 EP 2176287 A2 JP 2010532872 A US 2009202520 A1 WO 2009009019 A2	15-01-2009 15-01-2009 21-04-2010 14-10-2010 13-08-2009 15-01-2009
WO 2011054530	A1	12-05-2011	US 2011105545 A1 WO 2011054530 A1	05-05-2011 12-05-2011

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 31/192 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/4406 (2006.01)	A 6 1 K 31/192	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/4406	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 30/88 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	G 0 1 N 30/88 J	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	
	C 0 7 K 7/06	

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

(72)発明者 サウス、ファン

スペイン国 E - 4 6 0 0 5 バレンシア セーノコンデ デ アルテア 8 - 7アー

(72)発明者 レベルト、フェルナンド

スペイン国 E - 4 6 1 1 3 バレンシア モンカダ セーノルイス ビバス 4 3 - 3アー

(72)発明者 ペレス、ラモン メリノ

スペイン国 E - 3 9 0 0 6 カンタブリア サンタンデール セーノフランシスコ パラスエロ  
ス 1 4 2

(72)発明者 ペレス、ヘスス メリノ

スペイン国 E - 3 9 7 9 3 カンタブリア ビリャベルデ デ ポントネス バリオ エル ソ  
ル ナンバー 2 6

(72)発明者 レベルト - ロス、フランシスコ

スペイン国 E - 4 6 0 0 8 バレンシア セーノドクトル サンキス シベラ 2 7 - 6アー

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA36

4C084 AA02 AA03 AA17 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 MA13 MA16

MA17 MA21 MA23 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55 MA60

MA63 MA66 NA14 ZA592 ZA812 ZB072 ZC202

4C085 AA13 AA14 AA19 BB31 BB41 BB43 BB44 CC02 CC22 CC23

EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG08 GG10

4C086 AA01 AA02 BC17 MA01 MA04 MA07 MA09 NA14 ZA59 ZA81

ZB07 ZC20

4C206 AA01 AA02 DA21 KA01 MA01 MA04 MA11 MA14 NA14 ZA59

ZA81 ZB07 ZC20

4H045 AA11 AA30 BA10 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15 BA17 BA50

CA40 DA50 DA75 DA76 EA20

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014508150A5</a>	公开(公告)日	2015-04-30
申请号	JP2013553969	申请日	2012-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	FIBROSTATIN SOC		
申请(专利权)人(译)	网络汀弟兄皇家社会LTDA		
[标]发明人	サウスファン レベルトフェルナンド ペレスラモンメリノ ペレスヘスメリノ レベルトロスフランシスコ		
发明人	サウス、ファン レベルト、フェルナンド ペレス、ラモン メリノ ペレス、ヘスス メリノ レベルト-ロス、フランシスコ		
IPC分类号	A61K45/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P37/02 A61K39/395 A61P43/00 A61K38/00 A61K31/192 A61K31/4406 G01N33/53 G01N33/68 G01N30/88 C07K16/28 C07K7/06		
CPC分类号	A61K31/352 A61K31/353 A61K31/4409 A61K38/16 A61K2039/505 A61P11/00 A61P13/12 C07K16/40 C12Y207/11009 C07K2317/76 G01N33/573 G01N33/6893 G01N2333/4737 G01N2333/912 G01N2800 /12		
FI分类号	A61K45/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 A61K37 /02 A61K31/192 A61K31/4406 G01N33/53.D G01N33/68 G01N30/88.J C07K16/28.ZNA C07K7/06		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084 /BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA17 4C084/MA21 4C084/MA23 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084 /MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZA812 4C084/ZB072 4C084 /ZC202 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085 /GG04 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC17 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA07 4C086/MA09 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZA81 4C086/ZB07 4C086/ZC20 4C206 /AA01 4C206/AA02 4C206/DA21 4C206/KA01 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/MA11 4C206/MA14 4C206/NA14 4C206/ZA59 4C206/ZA81 4C206/ZB07 4C206/ZC20 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA11 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA17 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	61/444872 2011-02-21 US 61/469945 2011-03-31 US 61/473411 2011-04-08 US		
其他公开文献	JP2014508150A JP5913379B2		
摘要(译)			

本发明提供了诊断和/或治疗慢性肾病，免疫复合物介导的GN，类风湿性关节炎和肺纤维化的方法，以及鉴定用于这种治疗用途的化合物的方法。