

(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2005-525824

(P2005-525824A)

(43) 公表日 平成17年9月2日(2005.9.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 7/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/06	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-506507 (P2004-506507)
(86) (22) 出願日 平成15年5月16日 (2003.5.16)
(85) 翻訳文提出日 平成17年1月13日 (2005.1.13)
(86) 国際出願番号 PCT/EP2003/005175
(87) 国際公開番号 W02003/097852
(87) 国際公開日 平成15年11月27日 (2003.11.27)
(31) 優先権主張番号 60/381,544
(32) 優先日 平成14年5月17日 (2002.5.17)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 60/383,652
(32) 優先日 平成14年5月28日 (2002.5.28)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

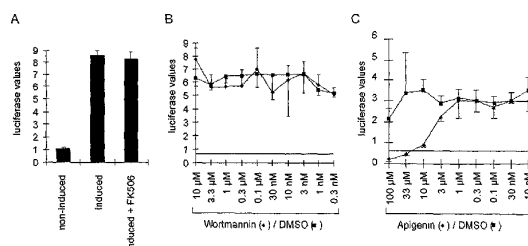
(71) 出願人 597011463
ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ
ュトラーセ 35
(74) 代理人 100062144
弁理士 青山 稔
(74) 代理人 100067035
弁理士 岩崎 光隆
(74) 代理人 100064610
弁理士 中嶋 正二
(74) 代理人 100072730
弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F c γ R I I I シグナル伝達の阻害剤を同定するためのアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、F c γ R I I I シグナル伝達を阻害する物質を同定するためのアッセイおよびその使用を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 互いに作動可能に結合している、誘導性特異的プロモーター、対応する 3' 調節遺伝子配列およびレポーター遺伝子を含む構築体によって、安定にトランスフェクトされている細胞系を提供すること、

b) 候補化合物を提供すること、

c) 刺激された細胞系を得るために十分な時間、a) の細胞系と免疫グロブリン G 複合体を接触させること、

d) b) の候補化合物を、a) の細胞系または c) の刺激された細胞系に免疫グロブリン G 複合体と同時にまたはすぐ後に添加すること、あるいは b) の候補化合物を添加しないこと、

e) レポーター遺伝子および / またはその産物の発現を、候補化合物の存在下および非存在下で検出すること、そして候補化合物の非存在下および存在下において、レポーター遺伝子および / またはその産物の発現量における差があるかどうかを決定すること、

f) 例えば医薬品として使用するために、e) で検出される該候補化合物から物質を選択すること、

を含む、FcγRIII シグナル伝達を阻害する物質を同定するためのアッセイ。

【請求項 2】

免疫グロブリン G (IgG) - 抗原複合体が IgG - F(ab')₂ 複合体であることを特徴とする、請求項 1 記載のアッセイ。

【請求項 3】

a) 互いに作動可能に結合している、誘導性特異的プロモーター、対応する 3' 調節遺伝子配列およびレポーター遺伝子配列を含む構築体によって、安定にトランスフェクトされている細胞系、

b) 免疫グロブリン G - 抗原複合体、および

c) 検出手段、

を含むキット。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 のいずれかに記載のアッセイによって同定される物質。

【請求項 5】

医薬物質として使用するための請求項 4 の物質。

【請求項 6】

自己免疫関連疾患またはアレルギー疾患を処置するための医薬製造のための、請求項 4 の物質の使用。

【請求項 7】

請求項 1 記載のアッセイによって同定される物質を、少なくとも 1 つの医薬賦形剤と組み合わせて含む、医薬組成物。

【請求項 8】

自己免疫関連疾患またはアレルギー疾患の処置方法であって、かかる処置を必要とする患者に、有効量の請求項 4 の物質または請求項 7 の医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 9】

自己免疫関連疾患が特発性血小板減少紫斑病、全身性エリテマトーデス、免疫性溶血性貧血またはリウマチ性関節炎であり、アレルギー疾患がアレルギー性喘息であることを特徴とする、請求項 8 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、安定にトランスフェクトされている細胞系を用いる FcγRIII シグナル伝達を阻害する物質を同定するためのアッセイおよびその使用に関する。

【0002】

補体-およびFcγR-ノックアウトマウスに関する最近のデータから、あるいくつかの自己免疫疾患、例えば狼瘡、糸球体腎炎の原因論の理解におけるパラダイムの変化がおきた。今までに多くの自己免疫疾患が、部分的または完全に補体システムに依存するものと見なされてきたが、これらの最近の知見が、FcγR類、特にFcγRIIIで開始される望ましくない誘発/シグナル伝達が、原因となって病因に関与しているという決定的な証拠を提供した。そのため、このシグナル伝達カスケードおよびその関係分子は、自己免疫疾患、例えば、狼瘡および糸球体腎炎および他の疾患の防止における薬理的アプローチのための新規標的を含む可能性がある。

【0003】

Fc受容体は、マクロファージ、マスト細胞、好中球およびナチュラルキラー細胞を包含する多様な細胞型で発現される。Fc受容体と抗体または抗体-抗原複合体とのクロスリンクによる誘発は、広範囲の細胞のエフェクター機能を媒介し、先天的および適応性の免疫系との間の関連を広く提供する。最近、このシステムの病理学上の重要性が、免疫グロブリン(IgG)がその同系の抗原と結合する場合に、Fc受容体欠損マウスが炎症応答をおこし得なかったという予想外の発見により示された(例えば、Ravetch, J.V. 1997, Fc receptors, Curr. Opin. Immunol. 9:121-125を参照されたい。)

著しく対照的に、補体成分が欠失した動物は、これらの実験的に誘導された抗体(細胞毒性)およびIgG-抗原複合体に対して正常な炎症応答を示し、多くの自己免疫疾患の病因についての古い免疫学的定理を否定する。

【0004】

病因性IgG抗体は、全身性エリテマトーデス、特発性血小板減少紫斑病、免疫性溶血性貧血、リウマチ性関節炎およびアレルギー性喘息を包含する自己免疫疾患において生じ、さらに(単独または別のファクターとの組合せで)このような疾患についての病因性誘発因子として考えられるものである。さらに、IgGFc受容体を欠損するマウスは、全身性狼瘡、糸球体腎炎、特発性血小板減少紫斑病、溶血性貧血およびアレルギー性喘息のモデルにおける各種疾患から保護されることが実験的に示された。現在、FcγRIII受容体は、特にこのような疾患プロセスにおいて重要な役割をはたすことが明確に確立されている。このような所見は、IVIg(静脈内免疫グロブリンG)で近年処置されているそれら全ての、難治性抗体媒介性自己免疫疾患の処置のための完全に新しいアプローチに対する根拠を形成する。IVIgの作用メカニズムの詳細な理解は、いまだに活発に研究中であるが、高用量のIVIgが、細胞性FcR類、とりわけFcγRIIIと相互作用し、それによって細胞の活性化を防止し得ることが考えられる。エフェクター応答に対して細胞毒性のある、免疫複合抗体を、カップリングする際のFcγRIII経路の特異性は、FcγRIIIシグナル伝達阻害剤が、低分子量化合物の全ての利点を有するIVIgに匹敵する類似した活性を持つということを強く示唆するものである。

【0005】

我々は、ここに驚くべきことに、IgG刺激(例えば、IgG複合体による刺激)による誘発後に、FcγRIIIシグナル伝達の阻害剤(特に、低分子量阻害剤)のハイスループット・スクリーニングに特に有用である安定に遺伝子的に修飾された細胞系を見出し、確認した。

【0006】

本発明は、1つの態様において、

a) 互いに作動可能に結合している、誘導性特異的プロモーター、対応する3'調節遺伝子配列およびレポーター遺伝子を含む構築体によって、安定にトランスフェクトされている細胞系を提供すること、

b) 候補化合物を提供すること、

c) 刺激された細胞系を得るために十分な時間、a)の細胞系と免疫グロブリンG複合体を接触させること、

d) b)の候補化合物を、a)の細胞系またはc)の刺激された細胞系に免疫グロブリンG複合体と同時またはすぐ後に添加すること、あるいはb)の候補化合物を添加しない

10

20

30

40

50

こと、

e) レポーター遺伝子および/またはその産物の発現を、候補化合物の存在下および非存在下で検出すること、そして候補化合物の非存在下および存在下において、レポーター遺伝子および/またはその産物の発現量における差があるかどうかを決定すること、

f) 例えば医薬品として使用するために、e) で検出される該候補化合物から物質を選択すること、

を含む、FcγRIIIシグナル伝達を阻害する物質を同定するためのアッセイを提供する。

【0007】

本発明のアッセイにおいて適切な細胞系は、FcγRIIIシグナル伝達経路が、免疫グロブリンG複合体を介して誘発され得る全ての細胞系を包含する。このように安定にトランスフェクトされている細胞系には、例えば、互いに作動可能に結合している、誘導性特異的プロモーター、対応する3'調節遺伝子配列およびレポーター遺伝子を用いて安定にトランスフェクトされているDC18マウス細胞系が含まれる。

10

【0008】

適切な誘導性特異的プロモーターには、FcγRIIIの誘発にポジティブに応答し、そして適切な検出し得る系、例えば、レポーター遺伝子に結合される全てのDNA調節配列が包含される。誘導性プロモーターは、例えば、hTNFαプロモーターであり、対応する3'調節遺伝子配列は、例えばhTNFα遺伝子からのものである。

適切なレポーター遺伝子は、その発現量が、例えば従来の方法によって検出できる遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子、分泌アルカリホスファターゼまたは蛍光タンパク質、例えばGFP(=緑色蛍光タンパク質)などを包含する。

20

【0009】

本発明のアッセイで使用される細胞系は、mRNAレベルでFcγRIIIを発現し、適切な物質(刺激物)、例えばIgG複合体で刺激される場合にTNF-α分泌で強く応答することを特徴とする。

【0010】

本発明の1つの実施態様において、候補化合物は、免疫グロブリンG複合体で刺激されるかまたはされない細胞系に添加されない。

【0011】

本発明の別の実施態様において、スクリーニングアッセイは実施され、そのなかで安定にトランスフェクトされている細胞系は、例えば、IgG-複合体で前もって刺激され、そして候補化合物は一定時間の後、例えばすぐ後に添加されて、その候補化合物がその阻害機能を誘起し得る。該候補化合物の存在および非存在下において、レポーター遺伝子および/またはその産物の発現は、先に記載したように検出され、その差違が決定されて、物質が選択され得る。

30

【0012】

適切な候補化合物は、Fc-受容体に対するその影響が決定され得る化合物(ライブラリー類)を包含する。化合物(ライブラリー)は、例えば、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、疑似体(mimetics)、小分子、例えば低分子量化合物(LMW)を包含する。

40

【0013】

本発明で使用される該細胞系が適切な物質、例えばIgG複合体で刺激された場合、TNF-α分泌で強く応答するか、または候補化合物がFcγRIIIシグナル伝達経路(=物質)に対する阻害作用を有する場合にTNF-α分泌の低下に強く応答するために、適切な物質は、本発明のアッセイにおいてこれらの細胞を使用して同定されうる。

【0014】

TNF-α分泌が低下した場合、より少量のレポーター遺伝子および/または遺伝子産物が発現される。候補化合物と接触されない刺激された細胞系におけるレポーター遺伝子の発現と比較して、ある濃度で候補化合物と接触された細胞系におけるレポーター遺伝子

50

の発現における特異的な発現低下は、該候補化合物が F c γ R I I I シグナル伝達を阻害すること、およびどのような程度に候補化合物が F c γ R I I I シグナル伝達を阻害するかを示す。

レポーター遺伝子および/またはその産物の発現量が検出される。「遺伝子産物」は、例えば、発現タンパク質、ポリペプチドまたはそれらのフラグメントである。

【0015】

該物質は、ステップ e) で検出/決定されるレポーター遺伝子および/またはその産物の発現に影響する(阻害する)化合物である。本発明のアッセイにより同定される物質は、明細書中で「本発明の物質」と定義される。

本発明の物質は、選択された候補化合物のうちの1つであり、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、擬体、小分子、例えば低分子量化合物(LMW)を包含し得る。

10

好ましくは、本発明の物質は、候補化合物の非存在における細胞系によって発現されるレポーター遺伝子の量と比較して、レポーター遺伝子の発現量を、例えば35%あるいはそれ以上低下し得る候補化合物である。

【0016】

該細胞系の刺激または誘発は、アッセイの感度(刺激されたもの対刺激されていないものの比)にとって重要であり得る。好ましい実施態様において、I g G - F (a b ')₂ 複合体、より好ましくは I g G 2 a - F (a b ')₂ 複合体は、刺激性免疫グロブリン G (I g G) - 抗原複合体として使用され得る。

20

【0017】

別のパラメーター、例えば、接触時間、刺激、必要な細胞数、使用される溶媒は、例えば、類似の従来の方法に準じて至適化され得る。

【0018】

別の態様において、本発明は、

a) 互いに作動可能に結合している、誘導性特異的プロモーター、対応する3'調節遺伝子配列およびレポーター遺伝子を含む構築体によって、安定にトランスフェクトされている細胞系

b) 免疫グロブリン G - 抗原複合体、および

c) 検出手段、

を含むキットを提供する。

30

【0019】

要素 a) および b) は、適切な溶媒および/または緩衝溶液中で提供されうる。適切な検出手段には、従来の手段、例えば、常套的なものとして蛍光分光分析または E L I S A 技術を包含する。

【0020】

別の態様において、本発明は、医薬物質として使用するために本発明のアッセイによって同定される F c γ R I I I シグナル伝達を阻害する物質を提供する。

【0021】

本発明の物質は、薬理的活性を示し、それ故自己免疫関連疾患に対する医薬としての有用性を示し、該疾患には、これらに限定しないが、I T P (=特発性血小板減少紫斑病)、全身性エリテマトーデス、免疫性溶血性貧血またはリウマチ性関節炎またはアレルギー疾患、例えばアレルギー性喘息、またはタイプ I アレルギーが包含される。

40

本発明の物質は、自己免疫関連疾患およびアレルギー疾患に対する治療上の活性を示し得る。

治療のための本発明の物質は、1以上の、好ましくは1つの本発明の物質、例えば2以上の本発明の物質の組合せ物を包含する。

【0022】

別の態様において、本発明は医薬物質として使用するための物質を提供する。

【0023】

50

別の態様において、本発明は、例えば、次のものに限定しないが、ITP (=特発性血小板減少紫斑病)、全身性エリテマトーデス、免疫性溶血性貧血またはリウマチ性関節炎またはアレルギー疾患、例えばアレルギー性喘息、またはタイプIアレルギーを包含する、自己免疫関連疾患処置のための医薬、例えば医薬組成物を製造するために本発明の物質の使用を提供する。

【0024】

別の態様において、本発明は、自己免疫関連疾患およびアレルギー疾患の処置方法を提供するものであって、その処置には有効量の本発明の化合物を、例えば医薬組成物の形態で、かかる処置を必要とする患者に投与することを包含する。

【0025】

10

処置には、治療および予防が包含される。

かかる処置のために、適当な用量は、もちろん、例えば、用いる本発明の物質の化学的性質および薬物動態データ、個々の宿主、投与様式および処置される症状の性質および重症度によって変化する。しかし、一般的に、比較的大型の哺乳動物、例えばヒトにおいて満足な結果を得るためには、指示される本発明の物質の一日用量は、約0.01g~約1.0g範囲であり、例えば、1日4回までの分割用量で投与されるのが便利である。

【0026】

本発明の物質は、従来のルート、例えば、経腸的に、例えば鼻、口内、直腸、経口投与を包含する；非経腸的に、例えば、静脈、筋肉内、皮下投与を包含する；または局所的、例えば、表皮(epicutaneous)、鼻腔内、気管内投与を包含するルートにより、例えば、被覆または非被覆錠剤、カプセル、注射用溶液または懸濁液の形態で、例えばアンプル、バイアルの形態で、クリーム、ゲル、ペースト、吸入粉末、泡沫、チンキ、リップスティック、滴剤、スプレーの形態で、または座薬の形態で投与され得る。

20

【0027】

本発明の物質は、薬学的に許容される塩の形態、例えば酸付加塩または金属塩；または遊離形態；所望により、溶媒和物の形態で投与され得る。塩の形態での本発明の物質、所望により溶媒和物の形態での本発明の物質は、遊離形態での本発明の物質と同程度の活性を示し得る。

【0028】

本発明の物質は、単独または1以上の他の医薬的に活性な物質を組み合わせ、本発明の医薬処置のために使用され得る。

30

組合せ物は、そのなかの2以上の医薬的に活性な物質が同じ製剤中に存在する固定された組合せ物；別々の製剤の形をした2以上の医薬的に活性な物質が、同じパッケージ内に、例えば同時投与のための指示書と共に販売されるキット；および医薬的に活性な物質が別々にパッケージされるが、同時または連続投与するための指示書と共に販売される自由な組合せ物、を包含する。

【0029】

別の態様において、本発明は、例えば適当な担体および/または希釈剤、例えば、増量剤、結合剤、崩壊剤、流動調節剤、滑沢剤、糖および甘味料、香料、保存剤、安定剤、湿潤剤および/または乳化剤、可溶化剤、浸透圧調節のための塩類および/または緩衝液を包含する、少なくとも1つの医薬賦形剤との組合せにおいて、本発明の物質を含む医薬組成物を提供する。

40

【0030】

別の態様において、本発明は、別の医薬的に活性な物質を含む本発明の医薬組成物を提供する。

【0031】

かかる組成物は、例えば、従来の方法に準じて、例えば、混合、造粒、被覆、可溶化または凍結乾燥工程によって製造され得る。単回用量形態は、例えば、約0.5mg~約1000mg、例えば、1mg~約500mgを含有しうる。

【0032】

50

(図面の説明)

図 1 : 各種免疫グロブリン複合体 (I g G アイソタイプを含む) による D C 1 8 C 1 0 細胞の刺激 ; n s t = 刺激されない。

図 2 : I g G 2 a 複合体で刺激される、安定にトランスフェクトされている D C 1 8 C 1 0 細胞についての経時動態。

図 3 : I g G 2 a 複合体で刺激された D C 1 8 C 1 0 細胞に対する、所定濃度 (x 軸) で各種阻害剤の適用。

図 4 : 適切な (robust) データ読取りに提供する細胞数 (x 軸で示される) のタイトレーション。

【 0 0 3 3 】

次の実施例において、全ての温度は摂氏で表示し、未補正である。

下記略語を用いた：

C s A = Cyclosporin A (シクロスポリン A) 。

D N P - B S A = dinitrophenyl-bovine serum albumin (ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) 。

F C S = fetal calf serum (ウシ胎児血清) 。

H E P E S = (N - (2 - Hydroxyethyl) piperazine - N - (2 - ethanesulfonic acid))
[N - (2 - ヒドロキシル) ピペラジン - N - (2 - エタンスルホン酸)] 。

m g M - C S F = mouse granulocyte monocyte-colony stimulating factor
(マウス顆粒球単球コロニー刺激因子) 。

P M A = phorbol-12-myristate-13-acetate

(ホルボール - 1 2 - ミリスレート - 1 3 - アセテート)

R P M I = the Roswell Park Memorial Institute の名前を取って命名した細胞培養培地。

T N P = trinitrophenyl (トリニトロフェニル) 。

【 0 0 3 4 】

実施例 1

トランスフェクト細胞系および細胞培養の製造：

D C 1 8 細胞系は、例えば、Elbe A. et al., J. Immunol. 153:2878-2889, 1994; Priesc hl E.E. et al., J. Immunol. 157:2645-2653, 1996 で特徴付けられる。

要約すると、細胞を、リンパ球 - M グラジエントを用いて、生存細胞を増やした後に皮膚および表皮細胞を含有するマウス胎児皮膚細胞懸濁液から単離 / 増殖させる。細胞を、R P M I 1640 を用いる 9 6 ウェルの丸底組織培養プレート中でウェルあたり 2×10^5 の密度で播種する。培地に、10% F C S、25 mM H E P E S、ゲンタマイシン ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)、2 mM L - グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ピルピン酸ナトリウム、 $50 \mu\text{M}$ β -メルカプトエタノールおよび抗生 - 抗菌性溶液を添加した。培養培地を、m G M - C S F ($100 \text{ U}/\text{ml}$) でさらに補充する。

【 0 0 3 5 】

D C 1 8 クローン - 遺伝子的に構築した細胞を次のように生成する：

h T N F α プロモーター - ルシフェラーゼ - h T N F α 3 ' 構築体を、安定な細胞系を生成するために使用する。細胞を、T N F α プロモーター - ルシフェラーゼ - T N F α 3 ' 末端構築体と共に至適条件 (200 V , $960 \mu\text{F}$) でエレクトロポレーションによってトランスフェクトし、エレクトロポレーション直後に培地 (10 ml) に播種し、次の日に Lymphoprep によって精製する。ウェルあたり 1×10^4 生存細胞を、96 ウェルマイクロタイタープレート中の各培地 ($100 \mu\text{l}$) + ゲネチシン (geneticin) (G 4 1 8) ($250 \mu\text{g}/\text{ml}$) に播種する。2 日後、新しい培地 ($100 \mu\text{l}$) を加えた。2 日ごとに、培養液 ($100 \mu\text{l}$) を取出し、新しい培養 ($100 \mu\text{l}$) に置き換える。安定な各クローンを、従来の細胞培養方法およびシングルセルクローニングによって選択する。これは、7 つの充分増殖した (outgrowing) クローンを生じ、そのうちの 4 つは、I g G 複合体での刺激に対応するルシフェラーゼ誘導によって、変動する程度 (6 ~ 10 倍の間

10

20

30

40

50

)で応答する。最良のレスポンスを、1ラウンドのさらに制限された希釈クローニング(シングルセルクローニング)に供し、これをDC18 クローン10(=DC18 C10)と名付けた。このクローンを、以後の全試験のために選択する。

【0036】

アッセイの刺激がIgGによるために、培養期間中における前刺激を防止するために細胞を低濃度のIgG培地中で培養することがきわめて重要である。

【0037】

実施例2

刺激条件およびデータ読取り:

IgGサブタイプは、Pharmingen/Becton Dickinsonから、DNP-BSAはCalbiochemから、およびウサギ抗マウスIgG(F(ab')₂)フラグメントはJackson Laboratoriesから提供される。

ウェルあたり(Optiplate, Packard)、50 μlの培地に1 × 10⁴細胞を播種する。候補化合物とのインキュベーションを45分間行った後、DNP-BSA(10 μg/ml)またはウサギ抗マウスIgG(F(ab')₂)フラグメント(30 μg/ml)のいずれかで複合体化した各種サブタイプのネズミIgG(5 μg/ml)により刺激する。刺激をその後4時間実施する。次いで、5倍濃縮したレポーター溶解緩衝液(Promega)(13 μl)を添加し、細胞を凍結(-80℃)-解凍サイクルによって溶解する。データ読取りのために、ルシフェラーゼの基質(Promega)(50 μl)を添加し、ルシフェラーゼ活性をMicroBetaJet(Wallac)で測定する。

【0038】

このクローンを用いる最初の実験は、全体的な再現性だけでなく、上清中のルシフェラーゼおよびTNFαの誘導された最高値に関して、IgG + F(ab')₂による複合体形成がIgG + 抗原(DNP-BSA)による複合体形成よりも優れているということを証明する。さらに、モノマーIgGは、TNFα誘導を刺激しないが、それはIgGに対する高親和性受容体、FcγRIの発現が検出できないことと一致する。そのため、更なる全ての試験において、IgG + F(ab')₂による刺激を行う。

【0039】

マウスおよびヒトにおけるFcγRIIIは、IgGアイソタイプの相異によって異なる相互作用をするので、全IgGに代えて、IgGアイソタイプの複合体、すなわちIgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3の複合体によるDC18 C10細胞の刺激を試験する。比較として、PMA刺激、さらにIgMおよびIgEによる刺激を並行して行う。図1に示すように、最良の刺激(IgGについて)がIgG2aによって達成され、これを誘発性免疫グロブリンとして次の全ての試験に使用する。

至適データ読取り条件を決定するために、刺激の時間動態を、6時間の範囲にわたって行う。図2に示し得るように、最大の刺激を6時間の時点で達成する。しかしながら、非刺激対刺激の比は、すでに4時間で10倍以上であったので、4時間という、より短い時間の刺激が、以後の全試験において、実行上の理由(薬物との前培養および測定を含むアッセイを1日以内に完了するため)により選択される。

【0040】

実施例3

プロトタイプ阻害剤についてのスクリーニング:

プロトタイプ阻害剤(ポジティブコントロール)を探索するのに、あるシグナル伝達経路を阻害すると知られるいくつかの候補化合物を検討する。CsA(Sandimmune; データは示していない)、FK506(図3A)またはWortmannin(PI3-キナーゼ阻害剤; 図3B)のいずれも、IC₅₀濃度でのデータ読取りを有意に阻害しなかった。全く対照的に、市販されているerk1,2/jnk1,2阻害剤であるアピゲニン(Apigenin)は、記載されているIC₅₀濃度(参照、図3C)で、IgG2a複合体誘発性ルシフェラーゼ誘導を阻害する。

ハイスループット・スクリーニングを至適化するために、適切な/有意なルシフェラーゼのデータ読取りを得るために必要とされる細胞数のタイトレーションを行った。図4が

10

20

30

40

50

らわかるように、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて、ウェルあたり 10^4 個のDC18 C10細胞が、適切かつ検出容易なデータ読取りのために十分である。

【0041】

実施例4

アッセイプロトコルの確立：

アッセイプロトコルを、次のように確立する。

1) 培養培地 ($45\mu\text{l}$) (Packard Optiplate) 中の 10^4 DC18 C10細胞 / ウェルを用い、化合物溶液 / 溶媒コントロール ($5\mu\text{l}$) を添加する。

2) 45分間、37℃、加湿したインキュベーター中で、5% CO_2 によりインキュベーションを行う。

3) 刺激を、マウス IgG2a抗-TNP ($5\mu\text{g/ml}$) + ウサギ抗-マウス Ig (Fab')₂フラグメント ($30\mu\text{g/ml}$) で行う。

4) 4時間、37℃、加湿したインキュベーター中で、5% CO_2 により、インキュベーションを行う。

5) 5倍濃縮した溶解緩衝液 (Promega) ($13\mu\text{l}$) を添加する。

6) 該混合物を、1時間、-80℃で凍結し、細胞を再び溶解させて、細胞を溶解する (凍結溶解サイクルによって溶解する)。

7) ルシフェラーゼ試薬 (Promega) ($50\mu\text{l}$) を溶解した細胞に添加し、5秒間後、Wallac MicroBetaJetにおいて、5秒の測定時間でルシフェラーゼ活性の測定を行う。

【0042】

ヒットの定義のためのカット・オフ点は、 $5\mu\text{M}$ の物質濃度で35%阻害に定めたが、異なるようにも (例えば60%阻害) 選択され得る。

細胞の取り扱いおよび測定を含めた全ての手順を、6~7時間の範囲で行うことができ、このアッセイはハイスループット・スクリーニングのための取り扱いを容易にし得る。

このアッセイプロトコルを用いて、我々は、高 / 低値、溶媒の感受性をチェックすることによってアッセイを検証し、多種類の物質について多くの試行を行った。

【図面の簡単な説明】

【0043】

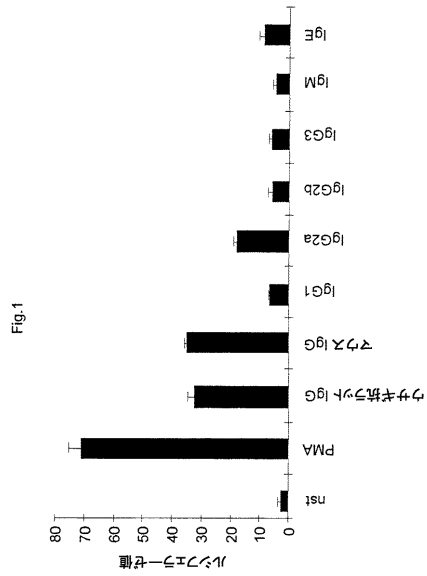
【図1】図1は、各種免疫グロブリン複合体 (IgGアイソタイプを含む) によるDC18 C10細胞の刺激を示す；n s t = 刺激されない。

【図2】図2は、IgG2a複合体で刺激される、安定にトランスフェクトされているDC18 C10細胞についての時間反応速度である。

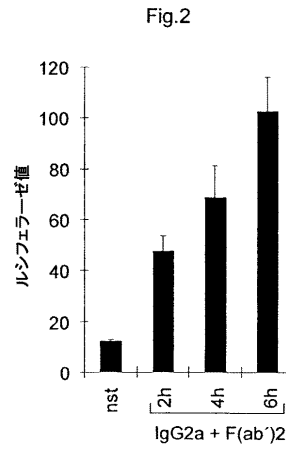
【図3】図3は、IgG2a複合体で刺激されたDC18 C10細胞に対する与えられた濃度 (x軸) における様々な阻害剤の適用を示す。

【図4】図4は、適切なデータ読取りのために提供される細胞数 (x軸で示される) のタイトレーションを示す。

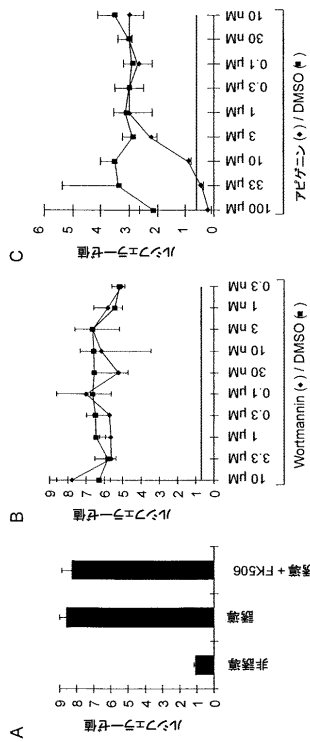
【 図 1 】



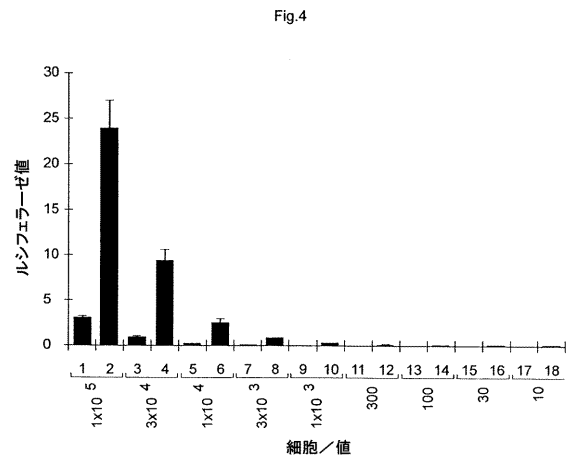
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatⁿal Search Report No.
PCT/EP 03/05175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 306 383 B1 (CRANDALL WILSON T) 23 October 2001 (2001-10-23) abstract column 2, line 9 - line 30; claim 10; example 2	4-9
A	US 2002/004210 A1 (KINET JEAN-PIERRE ET AL) 10 January 2002 (2002-01-10) abstract page 1, column 1, paragraph 4 -column 2, paragraph 7 page 7, column 1, paragraph 4 -page 8, column 2, paragraph 3 page 10, column 1, paragraph 4 -column 2, paragraph 2; claims 1-20 -/-	1-9
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 December 2003		Date of mailing of the international search report 16/12/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tilkorn, A-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/05175

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PRIESCHL E E ET AL: "Induction of the TNF-alpha promoter in the murine dendritic cell line 18 and the murine mast cell line CPII is differently regulated." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 15 SEP 1996, vol. 157, no. 6, 15 September 1996 (1996-09-15), pages 2645-2653, XP002263118 ISSN: 0022-1767 cited in the application abstract page 2645, column 2, paragraph 2 - paragraph 3 page 2646, column 1, paragraph 3 - paragraph 4 page 2646, column 2, paragraph 3 -page 2647, column 2, paragraph 1 page 2651, column 1, paragraph 3 -page 2653, column 1, paragraph 2	1-9
A	ABRAHAMS VIKKI M ET AL: "Induction of tumor necrosis factor alpha production by adhered human monocytes: A key role for Fc gamma receptor type IIIA in rheumatoid arthritis" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 43, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 608-616, XP001156411 ISSN: 0004-3591 the whole document	1-9
A	FR 2 655 269 A (RHONE POULENC SANTE ;UNIV PARIS CURIE (FR)) 7 June 1991 (1991-06-07) the whole document	1-9
P,A	WO 02 46433 A (SAUS JUAN) 13 June 2002 (2002-06-13) abstract page 3, line 7 - line 20 page 14, line 19 -page 15, line 33; claims 14-23	1-3
E	WO 03 041737 A (MOOTS ROBERT JOHN ;UNIV LIVERPOOL (GB); EDWARDS STEVEN WILLIAM (GB) 22 May 2003 (2003-05-22) abstract page 30, paragraph 2 - paragraph 4; claims 1-18; examples 2,3	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. application No.
PCT/EP 03/05175

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 8.9 (partially)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 4-9 (partially)
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 03 05175

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 8 and 9 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 8,9 (partially)

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 4-9 (partially)

Claim 4 is directed to an agent identified by the assay of claim 1. The claim contravenes the clarity requirements of Art 6 PCT because it does not contain any product features, which unambiguously define the agent. As claims 5-9 refer back to claim 4 the same arguments apply to said claims.

As the agent "Apigenin" is identified in the application using the method of claim 1 (Example 3), the search with respect to claims 4-9 has been restricted to said agent.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern plication No
PCT/EP 03/05175

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6306383	B1	23-10-2001	US 2002164389 A1	07-11-2002
US 2002004210	A1	10-01-2002	AU 5522098 A	03-07-1998
			EP 0948354 A1	13-10-1999
			US 2002182726 A1	05-12-2002
			WO 9825647 A1	18-06-1998
FR 2655269	A	07-06-1991	FR 2655269 A1	07-06-1991
			CA 2070166 A1	13-05-1991
			EP 0504234 A1	23-09-1992
			WO 9108301 A1	13-06-1991
			JP 5505303 T	12-08-1993
WO 0246433	A	13-06-2002	AU 1916402 A	18-06-2002
			AU 3575802 A	18-06-2002
			WO 0246378 A2	13-06-2002
			WO 0246433 A2	13-06-2002
			US 2003082745 A1	01-05-2003
			US 2003027165 A1	06-02-2003
WO 03041737	A	22-05-2003	WO 03041737 A1	22-05-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,I
E,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,D
M,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LT,LU,LV,MA,MK,MN,MX,NI,NO,NZ
,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SE,SG,SK,TJ,TM,TN,TR,TT,UA,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 トーマス・パウムルーカー

オーストリア、アー - 2 3 4 0 メートルング、グンボルツキルヒナー・シュトラッセ 2 6 / 3 番

(72)発明者 エヴァ・エリカ・プリーシュル

オーストリア、アー - 1 1 8 0 ヴィーン、ブレナーガッセ 1 8 / 8 番

F ターム(参考) 2G045 BB20 BB50 CB01 FB01 GC22
4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 DA02 EA04 FA02 GA11 HA11
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ13 QR48 QR69 QR77 QR80 QS24
QS28 QS36 QX02
4C084 AA01 AA02 AA17 NA14 ZA51 ZA55 ZA59 ZA81 ZA89 ZB05
ZB08 ZB13 ZB15 ZC42
4C085 AA13 CC03

专利名称(译)	鉴定鉴定FcγRIII信号传导的抑制剂		
公开(公告)号	JP2005525824A	公开(公告)日	2005-09-02
申请号	JP2004506507	申请日	2003-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	トーマス・バウムルーカー エヴァ・エリカ・プリーシュル		
发明人	トーマス・バウムルーカー エヴァ・エリカ・プリーシュル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C12N15/09 C12Q C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/567 G01N33/68		
CPC分类号	A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/02 A61P29/00 C12Q1/6897 G01N33/5023 G01N33/6854		
FI分类号	C12N15/00.A A61K39/395 A61K45/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.111 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50.Z A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/FB01 2G045/GC22 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA51 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZB05 4C084/ZB08 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZC42 4C085/AA13 4C085/CC03		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	60/381544 2002-05-17 US 60/383652 2002-05-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种测定法及其在鉴定抑制FcγRIII信号传导的试剂中的用途。

