

(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2005-500510

(P2005-500510A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/4745	A 6 1 K 31/4745	4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 C O 6 5
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-548435 (P2002-548435)	(71) 出願人	599056437
(86) (22) 出願日	平成13年12月6日 (2001.12.6)		スリーエム イノベイティブ プロパティ
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月5日 (2003.6.5)		ズ カンパニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/046698		アメリカ合衆国, ミネソタ 55144-
(87) 国際公開番号	W02002/046749		1000, セント ポール, スリーエム
(87) 国際公開日	平成14年6月13日 (2002.6.13)		センター
(31) 優先権主張番号	60/254, 229	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成12年12月8日 (2000.12.8)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100111903
			弁理士 永坂 友康
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 インターフェロン α を選択的に誘導する化合物を同定するための選別法

(57) 【要約】

I F N - の産生を選択的に誘導する化合物の選別方法、および I F N - の産生を選択的に誘導する小分子を使用して患者の病気を回復させる方法が開示されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

p D C 2 細胞からの I F N - の産生を選択的に誘導する化合物の同定方法であって、
- 炎症性サイトカイン産生細胞と p D C 2 細胞の両方を含む細胞集団を取得することと、
- 前記細胞集団を試験化合物に接触させることと、
- 前記試験化合物に接触させた前記細胞集団中に存在する I F N - の量を測定することと、
- 前記試験化合物に接触させた前記細胞集団中に存在する炎症性サイトカインの量を測定することと、
- 前記試験化合物との接触後に I F N - が、前記細胞集団中に存在する炎症性サイトカインの量よりも少なくとも 3 倍の量だけ前記細胞集団中に存在する場合に、前記試験化合物を I F N - の選択誘導物質として同定することを含む、化合物の同定方法。

10

【請求項 2】

I F N - の量と炎症性サイトカインの量を、E L I S A または生物検定法を用いて培養上清から測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

I F N - の量と炎症性サイトカインの量を、ドットプロット法、ウエスタンプロット法、ノーザンプロット法、R P A、および R T - P C R からなる群より選ばれた方法を用いて、前記集団中の細胞から測定する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記炎症性サイトカインが T N F - または I L - 1 2 である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞集団が全血中のものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞集団が末梢血単核細胞を含んでいる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞集団が、少なくとも 5 % の p D C 細胞を含有している末梢血単核細胞の分画を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞集団を、約 0 . 0 0 5 ~ 5 μ M の範囲の濃度の前記試験化合物に接触させる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記細胞集団を、約 1 2 ~ 3 6 時間の間、前記試験化合物を加えて培養する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記細胞集団が C D 1 4 + 細胞型を含んでいる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記炎症性サイトカインが T N F - であり、前記 C D 1 4 + 細胞によって産生される T N F - の量は、前記試験化合物が 1 μ M の濃度で前記細胞集団と接触したときには検出不可能である、請求項 1 0 に記載の方法。

40

【請求項 1 2】

p D C 2 細胞からの I F N - の産生を選択的に誘導する化合物の同定方法であって、
- 炎症性サイトカイン産生細胞と p D C 2 細胞の両方を含む細胞集団を取得することと、
- 前記細胞集団を試験化合物に接触させることと、
- 前記集団中に存在する p D C 2 細胞を同定し、I F N - が p D C 2 細胞によって産生されることをフローサイトメトリーで判別することと、
- 前記細胞集団中での炎症性サイトカインの産生をフローサイトメトリーで判別することと、

50

- p D C 2 細胞以外の前記集団中に存在するすべての細胞で産生される炎症性サイトカインがわずかなレベルである場合に、前記試験化合物を I F N - の選択誘導物質として同定することを含む、化合物の同定方法。

【請求項 1 3】

p D C 2 細胞の同定が、p D C 2 細胞の表面上に H L A - D R および C D 1 2 3 細胞表面マーカーが存在するかどうかで行われる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記炎症性サイトカインが、T N F - 、I L - 1 2、および/または I L - 1 である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記細胞集団が全血中のものである請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記細胞集団が末梢血単核細胞を含んでいる請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記細胞集団が末梢血単核細胞の分画を含んでいる請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記細胞集団を、約 0 . 0 0 5 ~ 5 μ M の範囲の濃度の前記試験化合物に接触させる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細胞集団を、約 2 ~ 2 4 時間の間、前記化合物で培養する、請求項 1 2 に記載の方法 20

【請求項 2 0】

I F N - に反応する患者の病気に影響を及ぼす方法であって、

- 炎症性サイトカイン産生細胞と p D C 2 細胞の両方を含む細胞集団を取得することと、
- 前記細胞集団を試験化合物に接触させることと、
- 前記試験化合物に接触させた前記細胞集団中に存在する I F N - の量を測定することと、
- 前記試験化合物に接触させた前記細胞集団中に存在する炎症性サイトカインの量を測定することと、
- 前記試験化合物との接触後に I F N - が、前記細胞集団中に存在する炎症性サイトカインの量よりも少なくとも 3 倍の量だけ前記細胞集団中に存在する場合に、前記試験化合物を I F N - の選択誘導物質として同定することと、
- 前記同定済み選択化合物を患者に投与して患者の病気に影響を及ぼすことからなるステップを含む、病気に影響を及ぼす方法。

【請求項 2 1】

I F N - の量と炎症性サイトカインの量を、E L I S A または生物検定法を用いて培養上清から測定する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

I F N - の量と炎症性サイトカインの量を、ドットプロット法、ウエスタンプロット法、ノーザンプロット法、R P A、および R T - P C R からなる群より選ばれた方法を用いて、前記集団中の細胞から測定する、請求項 2 0 に記載の方法。 40

【請求項 2 3】

前記炎症性サイトカインが T N F - および/または I L - 1 を含んでいる、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記細胞集団が全血中のものである請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記細胞集団が末梢血単核細胞を含んでいる請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 6】

10

30

40

50

前記細胞集団が末梢血単核細胞の分画を含んでいる請求項 20 に記載の方法。

【請求項 27】

前記細胞集団を、約 0.005 ~ 5 μ M の範囲の濃度の前記試験化合物と接触させる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 28】

前記細胞集団を、約 12 ~ 36 時間の間、前記試験化合物を加えて培養する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 29】

前記細胞集団が CD14+ 細胞型または DC1 細胞型を含んでいる請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 30】

前記炎症性サイトカインが TNF- α であり、前記 CD14+ または DC1 細胞によって産生される TNF- α の量は、前記試験化合物が約 1 μ M の濃度で前記細胞と接触しているときには検出不可能である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記病気が、黒色腫、骨髄性白血病、非ホジキンリンパ腫、腎細胞癌、カポジ肉腫、多発性硬化症、好酸球増加症候群、筋増殖性疾患、特発性骨髄線維症、B 型肝炎と慢性 C 型肝炎、天然痘、インフルエンザ、パラインフルエンザ、アデノウイルス、コロナウイルス、およびライノウイルスからなる群より選ばれる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 32】

前記病気が、皮膚壊死性脈管炎、混合性クリオグロブリン血症、晩発性皮膚ポルフィリン症、扁平苔癬、アダマンティアディス-ベーチェット症候群、多形性紅斑、結節性紅斑、マラコプラキア、じんま疹、およびそう痒症からなる群より選ばれる、請求項 31 に記載の方法。

20

【請求項 33】

前記選択化合物が、標的部分によって所望の細胞型へ届けられる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 34】

pDC2 細胞を含んでいる細胞集団から IFN- γ の産生を選択的に誘導する方法であって、前記細胞集団を、pDC2 細胞による IFN- γ の産生を選択的に誘導する免疫応答変更因子化合物と接触させることを含む、選択的に誘導する方法。

30

【請求項 35】

前記化合物が化合物 I である請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記化合物が化合物 II である請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

前記化合物が化合物 III である請求項 34 に記載の方法。

【請求項 38】

前記化合物が化合物 IV である請求項 34 に記載の方法。

【請求項 39】

前記化合物が化合物 V である請求項 34 に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記化合物が化合物 VI である請求項 34 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、免疫学の分野、特に免疫応答のモジュレーションに関するものである。本発明は、IFN- γ の選択的誘導用の化合物の選別方法、IFN- γ の選択的誘導用の化合物、および IFN- γ に反応する患者の病気を回復させるための IFN- γ の選択的誘導方法を提供する。

50

【0002】

背景

インターフェロン - (I F N -) は種々の病気を治療するのに使用できる。たとえば、I F N - は、肝炎、多発性硬化症、C型肝炎に関連した種々の皮膚疾患、リンパ腫、および黒色腫などの病気を治療するのに使用できる。最近、ウィルス感染に反応する血液中の1次インターフェロン産生細胞は、プラズマ細胞様の樹状細胞 (p D C) であることが明らかにされた。この細胞は、必要なものであり、イミダゾキノリンと呼ばれる化合物種に反応する、血液中の主要な I F N - 産生細胞である。このような化合物は、たとえば、米国特許第4,689,338号、同第5,389,640号、同第5,268,376号、同第4,929,624号、同第5,266,575号、同第5,352,784号、同第5,494,916号、同第5,482,936号、同第5,346,905号、同第5,395,937号、同第5,238,944号、同第5,525,612号、同第5,175,296号、同第5,693,811号、同第5,741,908号、同第5,939,090号、同第6,110,929号、同第4,988,815号、同第5,376,076号、ならびにPCT公報WO 99/29693、WO 00/76505、WO 00/76518、およびWO 00/76519に開示されている。これらの出願はすべて、ここでの参照により開示に含まれるものとする。

【0003】

しかし、I F N - 産生などの免疫応答（または免疫応答を誘導する化合物）は、腫瘍壊死因子 - (T N F -) や I L - 1 などの炎症性サイトカインの産生を上方制御することもある。T N F - や I L - 1 などの炎症性サイトカインの上方制御によって、組織破壊などの有害作用が生じることがよくある。数多くの臨床状況においては、炎症性サイトカインの産生を制限しながら、なおかつ I F N - の産生を誘導することが望ましい場合がある。したがって、炎症性サイトカインの産生を著しく増大させることなく I F N - の産生を誘導するような化合物を作り出すこと、またそれらの化合物を選別する方法を編み出すことが必要である。

【0004】

発明の概要

本発明は、I F N - の産生を刺激するが、それでも血流中に存在する細胞から著しいレベルの炎症性サイトカイン (T N F - など) を付随的に産生させないような化合物を同定するための方法を提供するものである。この方法は、p D C 2細胞を含んでいる細胞集団に対してそのような潜在能力のある化合物を選別することを伴う。p D C 2細胞は、細胞集団における I F N - の産生の大部分を担っているものである。この基準に合った化合物を「選択化合物」と呼ぶことにする。本発明では、本発明の選択化合物を用いて、I F N - の誘導に反応する患者の病気に影響を及ぼすための方法も提供する。

【0005】

発明の詳細な説明

本発明は、p D C 2細胞からの I F N - の産生を選択的に誘導する化合物の同定方法を提供する。実施態様によっては、本発明は、著しい量の炎症性サイトカイン (T N F - 、I L - 1、I L - 6、I L - 8、I L - 12、M C P - 1 など) を産生させることなく、未分離の全血または末梢血単核細胞 (P B M C) などの細胞集団中で I F N - を選択的に誘導することが可能である。本発明はまた、I F N - の選択的誘導用の好ましい化合物、I F N - に反応する患者の病気に影響を及ぼす化合物および影響を及ぼす方法も提供する。著しいレベルの炎症性サイトカインを発現させずに I F N - の発現を選択的に誘導するような化合物を投与するなら、炎症性サイトカインによる潜在的に望ましくない副作用が生じる可能性を少なくし、所期の治療効果または予防効果を有利にもたすことができる。

【0006】

本明細書では、「p D C 2細胞」は「前駆樹状細胞 - 2型」を意味する。この細胞は、白血球系譜マーカーがなく、C D 4、M H C クラス I I 分子、および C D 1 2 3 を発現し、

またインターロイキン - 3 (C D 4 0 リガンドがあってもなくてもよい) で培養した場合に 2 型樹状細胞に分化する形質細胞様細胞型である。p D C 2 細胞は、表面マーカーである C D 1 2 3 + 、H L A - D R + 、C D 4 + の存在により、また白血球系譜特定マーカーおよび C D 1 1 C - の非存在により同定できる。「p D C 2 細胞」という用語には、これらの前駆細胞や分化した 2 型樹状細胞 (D C 2) が含まれる。

【 0 0 0 7 】

「末梢血単核細胞」(P B M C) という用語は、血液中に通常存在する細胞のことを指し、T リンパ球、B リンパ球、N K 細胞、単球 (マクロファージなど)、および樹状細胞を包含する。

【 0 0 0 8 】

「炎症性サイトカイン産生細胞」という用語は、P B M C 集合内の炎症性サイトカインの大部分を産生する単一細胞型または細胞型の組合わせを包含する。そのような細胞の例としては、単球、マクロファージ、および樹状細胞 (C D 1 1 c +) が挙げられる。ただし、C D 1 1 c - である (D C 1) 樹状細胞は、ここで用いられている用語としての「炎症性サイトカイン産生細胞」とは見なさない。

【 0 0 0 9 】

「発現」、「発現された」、「発現する」などの用語は、遺伝子から、タンパク質およびタンパク質をコードするメッセンジャー R N A (m R N A) を産生することを指す。

【 0 0 1 0 】

「炎症性サイトカイン」は、炎症反応を誘導するサイトカインを指す。本発明によれば、炎症性サイトカインの例としては、腫瘍壊死因子 - (T N F -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、I L - 6、I L - 8、および I L - 1 2 がある。本明細書における「炎症性サイトカイン」という用語には、インターフェロン (I F N -) は含まれない。

【 0 0 1 1 】

「p D C 2 濃縮細胞」という用語は、細胞 (たとえば、P B M C または全血細胞) の標本で、p D C 2 細胞の割合が 5 % 以上、好ましくは 2 0 % 以上、さらに好ましくは 8 0 % ~ 9 5 % のものを指す。

【 0 0 1 2 】

本明細書における「選択化合物」は、著しいレベルの炎症性サイトカインを付随的に産生させずに、p D C 2 細胞を含んでいる P B M C などの造血細胞集団中で I F N - の発現を優先的に誘導するような化合物を指す。ここで用いられている「著しいレベル」とは、ある特定の使用での前記化合物の有用性を低減させるほどの炎症性サイトカインによる望ましくない作用を引き起こすような、炎症性サイトカインのレベルを指す。たとえば、産生された T N F - と産生された I F N - の比率が約 1 : 3 より大きい場合、これは、炎症性サイトカインの産生が著しいレベルであると見なされる。

【 0 0 1 3 】

選別方法

一実施態様では、本発明は I F N - の産生を選択的に誘導する化合物を同定する方法を提供し、この方法は、前記化合物を選別することを含み、前記化合物が、T N F - を含む炎症性サイトカインの産生を著しく誘導することなく細胞集団中での I F N - の産生を誘導するかどうかを判別するものである。本発明による化合物の選別に適した細胞集団は、炎症性サイトカインを産生する細胞および p D C 2 細胞を含む。したがって、好適な細胞集団の例としては、全血細胞、P B M C の完全集団または部分集団、p D C 2 細胞分画を多く含んだ P B M C 細胞、あるいは p D C 2 または D C 2 細胞を含んだ任意の造血集団がある。

【 0 0 1 4 】

典型的な実施態様では、本発明の選択化合物は、主に p D C 2 細胞から I F N - の発現を誘導する。好ましくは、I F N - の産生を誘導する選択化合物は、細胞集団中の p D C 2 細胞または他の細胞から高レベルの炎症性サイトカインを誘導しない。一般に、本発

10

20

30

40

50

明の選択化合物を、p D C 2 細胞と炎症性サイトカイン産生細胞とを含む細胞集団に与えた場合、I F N - は、T N F - の量より少なくとも3倍の量だけ、典型的には約100倍、実施態様によっては約1000倍以上、細胞集団中に存在する。

【0015】

p D C 2 細胞を含む細胞集団は、任意の適切な方法によって取得または調製できる。たとえば、適切な細胞集団を調製するための血球試料は、たいていの哺乳類から取得できる。細胞試料は、濃縮または精製手順を実施して、細胞集団中における所望の細胞型(p D C 2 細胞など)の割合を増やした細胞集団であってもよい。これらの手順は、ポジティブ選択またはネガティブ選択のいずれかに基づいたものにすることができる。ポジティブ選択の例としては、所望の細胞型をその細胞型の特異抗体で標識し、結合性がその細胞型上の抗体の存在に依存するカラムにその細胞型を結合させてから、細胞集団中の他の細胞から分離するというプロセスがある。ネガティブ選択の例としては、不要な細胞をその細胞に対して作られた抗体で標識し、結合性がその抗体の存在に依存するカラムにその細胞を結合させてから、所望の細胞型から分離するというプロセスがある。そのようなカラムとしては、たとえば、免疫親和性カラムまたはマグネットビーズ(m a g n e t i c b e a d)ベースのカラム(D z i o n e k A、F u c h s A、S c h m i d t P、C r e m e r S、Z y s k M、M i l t e n y i S、B u c k D W、S c h m i t z J : B D C A - 2、B D C A - 3、およびB D C A - 4 : ヒト末梢血中の樹状細胞の異なったサブセット用の3種類のマーカー)(J o u r n a l o f I m m u n o l o g y (「免疫学ジャーナル」) 165(11): 6037、2000)があるが、これらに限定されるわけではない。

10

20

【0016】

細胞は、フローサイトメーター(f l o w c y t o m e t e r)を使用した分別により、ポジティブまたはネガティブ選択で濃縮することもできる。この手順によれば、細胞は、細胞型を区別するフルオロフォア結合抗体で標識し、細胞表面上にフルオロフォア結合抗体が存在するかどうかに基づいて各集団に分別することができる。所望の細胞型の細胞集団を濃縮するその他の技法としては、たとえば、アンモニウム溶解(a m m o n i u m l y s i s)、補体細胞溶解(c o m p l e m e n t c e l l l y s i s)、密度勾配分離、パニング、粘着性減退(a d h e r e n c e d e p l e t i o n)、およびチャージフロー分離(c h a r g e - f l o w s e p a r a t i o n)がある。所望の細胞の濃縮または純度を達成するために、これらの技法を単独で、または組み合わせて実施できることは理解されるであろう。

30

【0017】

本発明の一実施態様では、p D C 2 を含んでいる細胞集団を、I F N - の発現を選択的に誘導するのに十分な量の選別する化合物と接触させる。細胞集団を化合物と接触させる際の培養条件および培地の組成は、任意の適切な設備を使用して作り出すことができる。発現を誘導するのに使用する化合物の特定量はさまざまであるが、刺激は一般には用量に敏感に応じる。選択化合物の典型的な用量範囲は、約0.005~約5 μ Mである。しかし、サイトカイン発現のもっと強力な刺激物質である化合物は、もっと低い用量範囲でもI F N - の産生または炎症性サイトカインの発現を生じさせることがある。化合物は、細胞や培地と生理学的に適合性のある適切な担体中の細胞に加えることができる。

40

【0018】

細胞集団は、化合物がI F N - の発現を選択的に誘導できるくらい十分な時間、化合物と接触させる。種々のサイトカインの発現の速度論については当技術分野において知られている。ただし、サイトカイン発現の判別方法が、化合物によって細胞集団が刺激される時間に影響を与えることもある。たとえば、産生される細胞内サイトカインm R N A の量を核酸プローブで評価してサイトカイン発現を判別する場合は、培地に分泌された細胞外サイトカインタンパク質の量でサイトカイン発現を判別する場合と比べて、一般にもっと短い時間内に細胞が刺激されることがある。細胞内m R N A または細胞内タンパク質の発現は、たいていの場合、細胞集団を化合物と接触させてから約2~6時間後に判別できる

50

。しかし、I F N - および T N F - の細胞内発現は、典型的には刺激してから 6 ~ 24 時間後に判別される。細胞外タンパク質の発現は、細胞集団を化合物に接触させてから約 6 ~ 48 時間後に、典型的には約 12 ~ 36 時間後に判別できる。

【0019】

本発明では、ある時間にわたって化合物と接触させた細胞集団から発現するサイトカインの特定量または相対量を測定することもできる。例を挙げれば、サイトカインの測定は、細胞中で産生されるサイトカインの量を、たとえば免疫検出により、多色フローサイトメトリー (multi-color flow cytometry) を利用して評価することで行うことができる。一実施態様では、I F N - や T N F - などのサイトカインに対する抗体は、細胞内免疫検出に適した公知の技法を用いて調製された細胞集団に侵入するのに使用できる。これらの抗体は、フルオロフォア (たとえば、F I T C、フィコエリトリン、および C y 3) や他の蛍光ラベルなどの化合物と結合させることができ、そうすることで、それらの抗体の蛍光検出が可能となり、細胞中のサイトカインの相対量が分かる。

10

【0020】

フローサイトメーターを使用すると、抗 I F N - または抗 T N F - フルオロフォア結合抗体で染色された細胞集団中の蛍光を測定できる。任意選択で、細胞集団は、特定表面タンパク質に対するフルオロフォア結合抗体で染色することもでき、このフルオロフォア結合抗体により細胞集団中の異なる細胞型 (たとえば p D C 2 細胞) の区別が可能である。所望の細胞型の同定およびその細胞型中で発現するサイトカインの相対量 (p D C 2 細胞中で産生される I F N - の量など) の測定は、多色フローサイトメトリーを使用して行うことができる。

20

【0021】

免疫検出によるサイトカイン誘導の測定は、細胞外に存在するサイトカインの量、あるいは細胞集団から培地へ分泌されたサイトカインの量を分析することによっても行うことができる。たとえば、分泌された I F N - および T N F - の測定は、E L I S A または生物検定法などの技法を使用しても行うことができる。ある時間にわたって化合物で刺激された後に細胞集団から分泌された、培養上清中に存在するサイトカインは、マイクロタイターのプレート表面などのプラスチック表面に固定化することができる。抗 I F N - 抗体または抗 T N F - 抗体などの抗体を使用すると、プラスチック表面に固定化されたそれらのサイトカインの存在を検出できる。それらの抗体は、アルカリ性ホスファターゼまたはペルオキシダーゼ分子などの既知の検出部分と結合させることができる。それらの分子は、検出試薬と一緒に使用して、サイトカインの存在や相対量を示すことができるものである。各サイトカイン標準物質を同時に用いれば、培地中に分泌されたサイトカインの合計量を測定できる。

30

【0022】

免疫検出または生物検定法によるサイトカインの測定は、細胞溶解産物中に存在するサイトカインの量を評価することによっても行うことができる。本発明によれば、刺激された細胞は、既知の方法 (たとえば、洗浄剤溶解 (detergent lysis)) によって溶解または可溶化させることができ、サイトカインを含んでいる溶解産物を担体表面 (たとえば、ニトロセルロース膜) に移すことができる。任意選択で、移す前に電気泳動法を実施して、溶解産物の成分を分離することができる。適切な 2 次および検出試薬を使用して、ウエスタンブロット法またはドットブロット法を実施すれば、細胞溶解産物中のサイトカイン (たとえば、I F N - または T N F -) の存在や量を判別することができる。細胞溶解産物からタンパク質を検出する技法は、当技術分野では一般に知られており、たとえば、「Current Protocols in Protein Science (タンパク質科学の最新プロトコル)」(Coligan ら編、1996、John Wiley & Sons、New York、NY) に記載されている。

40

【0023】

サイトカイン発現の細胞内検出方法としては、特定のサイトカインをコードする m R N A

50

の量の検出もある。この方法によれば、サイトカインの量は、標的サイトカイン mRNA (つまり、mRNA の一部) の相補的核酸プローブを使用し、上記のフローサイトメトリーおよび免疫検出と組み合わせて測定することができる。核酸プローブは、フルオロフォア (FITC または Cy3 など) と結合させることができる。あるいは、特定の化合物で刺激された細胞を採取および溶解させて、サイトカイン mRNA を含む溶解産物を得ることができる。たとえば、ノーザン分析などの方法を実施できる。一実施態様によれば、ノーザン分析には、電気泳動法による RNA の分離、RNA を固体の担体に移すこと (膜分析など)、標的サイトカイン mRNA の相補的核酸による探索、および検出部分への結合が含まれていてよい。好適な検出部分としては、放射能標識、フルオロフォア、発光性化合物、または比色化合物 (colorimetric compound) がある。リボヌクレアーゼ保護試験法 (RNAase protection assay) (RPA) や RT-PCR など他の方法を用いて、細胞試料内のサイトカイン mRNA (IFN- または TNF- の mRNA など) の存在および量を判別することもできる。そのような試験法は知られており、たとえば、「Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学の最新プロトコル)」(Ausubel ら編、1990、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience: John Wiley, New York) に開示されている。この文献は、ここでの参照によりその全体が開示に含まれるものとする。

10

【0024】

患者の病気に影響を及ぼす方法

20

別の実施態様では、本発明は、選択化合物を患者に投与することにより、IFN- に反応する患者の病気に影響を及ぼす方法を提供する。患者はヒトであっても動物であってもよい。選択化合物は、患者の pDC2 細胞からの IFN- の発現を増大させることにより、患者の IFN- の増大をもたらす。すでに論じたように、選択化合物は、好ましくは、炎症性サイトカインの発現の著しい増大をもたらさない。

【0025】

IFN- のレベルを増大させることにより影響を及ぼすことのできる病気の例としては、黒色腫、骨髄性白血病、非ホジキンリンパ腫、腎細胞癌、カポジ肉腫、多発性硬化症、好酸球増加症候群、アデノウイルス、ライノウイルス、痘瘡 (特に、大痘瘡)、インフルエンザ、コロナウイルス、HIV、パラインフルエンザ、筋増殖性 (myoproliferative) 疾患 (真性多血症や特発性骨髄線維症など)、B 型肝炎、慢性 C 型肝炎、ならびに、皮膚壊死性脈管炎 (cutaneous necrotizing vasculitis) などの皮膚性疾患、混合性クリオグロブリン血症、晩発性皮膚ポルフィリン症、扁平苔癬、アダマンティアディス-ベーチェット症候群 (Adamantia dis-Behcet syndrome)、多形性紅斑、結節性紅斑、マラコプラキア、じんま疹そう痒症、基底細胞癌、性器いぼ、光線性角化症、およびその他の種類のヒト乳頭腫ウイルス感染 (表皮異形成ペルシフォルミス (epidermoplasia verruciformis)、尋常性ゆうぜい、足底いぼ、および子宮頸部異形成を含む) があるが、これらに限定されるわけではない。

30

【0026】

選択化合物

選択化合物としては、炎症性サイトカインを著しく発現させることなく主に pDC2 細胞からの IFN- の発現を増大させる、ある特定のイミダゾキノリンアミン、イミダゾキノリンスルホンアミド、およびイミダゾキノリン尿素が挙げられる。

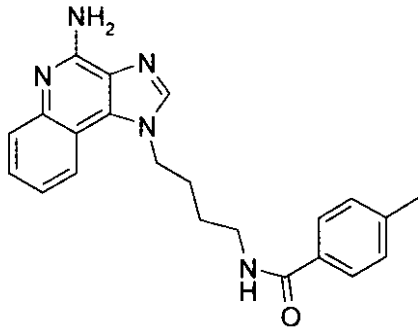
40

【0027】

本発明の方法を使用して選択性があるとして選別された化合物の例としては、次のものがある。

【化 1】

化合物 I :



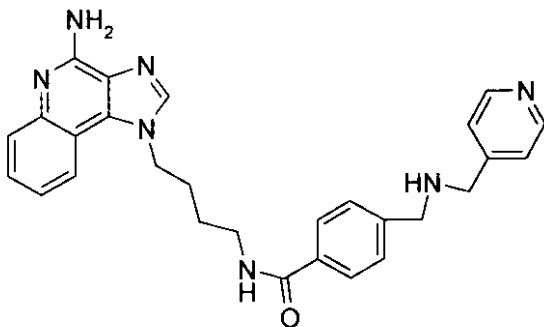
10

N-〔4-（4-アミノ-1H-イミダゾ〔4，5-c〕キノリン-1-イル）ブチル〕-4-メチルベンズアミド；

【化 2】

20

化合物 II :

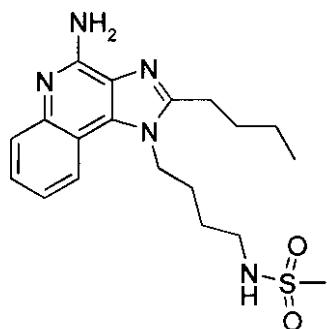


30

N-〔4-（4-アミノ-1H-イミダゾ〔4，5-c〕キノリン-1-イル）ブチル〕-4-〔〔（ピリジン-4-イルメチル）アミノ〕メチル〕ベンズアミド；

【化 3】

化合物 I I I :



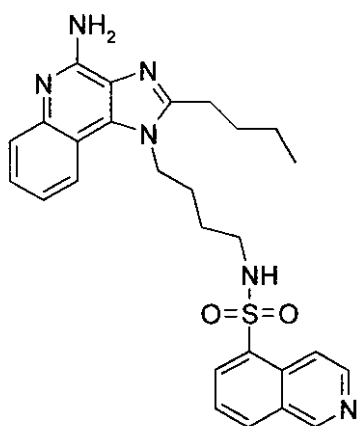
10

N- [4- (4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチル] メタンスルホンアミド ;

【化 4】

20

化合物 I V :



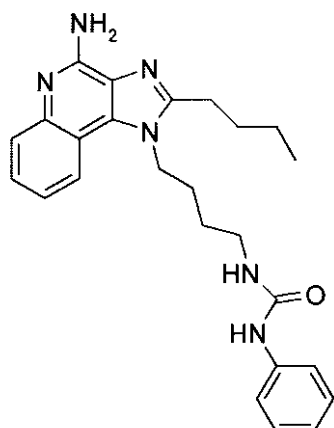
30

N- [4- (4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチル] イソキノリン-5-スルホンアミド ;

40

【化 5】

化合物Ⅴ：



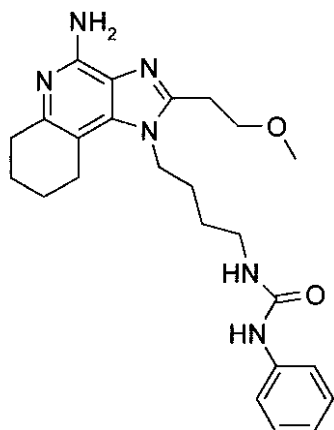
10

N-〔4-（4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ〔4，5-c〕キノリン-1-イル）ブチル〕-N'-フェニル尿素

20

【化6】

化合物ⅤⅠ：



30

N-〔4-〔4-アミノ-2-（2-メトキシエチル）-6，7，8，9-テトラヒドロ-1H-イミダゾ〔4，5-c〕キノリン-1-イル〕ブチル〕-N'-フェニル尿素

40

【0028】

上記の化合物およびその調製方法は、WO 0076505、WO 0076518、およびWO 0076519に詳しく記載されており、その内容を参照により本明細書に引用したものとする。

【0029】

これらの化合物は、標的部分へ化合物が結合する対象となる細胞型へ特別に送達されるよ

50

うにすることもできる。イミダゾキノリンをベースにした化合物などの化合物と結合させるのに役立つ標的部分としては、影響を受ける細胞（特に p D C 2 細胞）に特異的である抗体、サイトカイン、およびレセプターリガンドがある。p D C 2 細胞の標的部分としては、たとえば、抗 B D C A - 2、抗 B D C A - 4、抗 C D 4 抗体、抗 C D 1 2 3 抗体、または抗 H L A - D R 抗体を挙げることができる。

【0030】

本発明の選択化合物が、安定した無毒性の酸性塩または塩基性塩を形成できるほど十分に塩基性または酸性である場合には、化合物を塩として投与するのが適切であろう。薬学的に許容される塩の例としては、生理学的に許容される陰イオンを生じる酸によって形成される有機酸付加塩、たとえば、トシラート、メタンスルホン酸塩、アセテート、シトレート、マロネート、酒石酸塩、スクシネート、安息香酸塩、アスコルビン酸塩、 α -ケトグルタル酸塩、および β -グリセロリン酸塩がある。塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、重炭酸塩、および炭酸塩を含め、好適な無機酸塩を形成してもよい。薬学的に許容される塩は、当技術分野で知られている標準的な手順、たとえば、十分に塩基性である化合物（アミンなど）と生理学的に許容される陰イオンを生じる好適な酸とを反応させることにより得ることができる。カルボン酸のアルカリ金属（たとえば、ナトリウム、カリウム、またはリチウム）塩またはアルカリ土類金属（たとえば、カルシウム）塩も作ることができる。

10

【0031】

本発明のいくつかの実施態様の具体的な説明によって本発明をさらに説明するために、以下に実施例を示す。ただし、これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものではない。

20

【0032】

実施例

以下の実施例では、p D C 2 細胞からのサイトカイン産生を選択的に誘導する I R M 化合物の選別方法について記載する。

【0033】

培地

検討したこれらの実施例では、完全 R P M I (c R P M I) 培地を使用した。10% 熱失活 (F C S) (H y c l o n e , L o g a n , U T)、1 m M ピルビン酸ナトリウム、0.1 m M 非必須アミノ酸、1 m M L - グルタミンおよび 50 μ g / m l 硫酸ゲンタマイシン (L i f e T e c h n o l o g i e s , G a i t h e r s b u r g , M D) を補充した 25 m M H E P E S (L i f e T e c h n o l o g i e s) と R P M I 1640 とを混合して、c R P M I を調製した。

30

【0034】

種々の細胞型の産生、精製、または濃縮

P B M C は、インフォームド・コンセントを得た後に健康な志願者から、H i s t o p a q u e H y b r i M a x - 1077 密度勾配 (S i g m a) を使用して分離した。C D 14 + 細胞は、製造業者の指示に従い、M i n i M A C S システム (M i l t e n y i B i o t e c h , A u b o r n , C A) に関連して C D 14 + マイクロビーズを用いて、ポジティブ選択で精製した。フローサイトメトリーで評価した純度は 90% を超えていた。

40

【0035】

p D C 2 細胞は、製造業者の指示に従い、M i n i M A C S システム (M i l t e n y i B i o t e c h , A u b o r n , C A) に関連して C D 3 - 、C D 11 c - 、C D 14 - 、および C D 56 - マイクロビーズを用いて、ネガティブ選択で濃縮した。その後、ネガティブ選択で濃縮した p D C 2 細胞は、抗 C D 123、H L A - D R、および C D 4 抗体 (B e c t o n D i c k i n s o n) を使用して、固体数が 5% 以上 (フローサイトメトリーで判定) になるまで濃縮した。

【0036】

I R M 化合物による細胞刺激

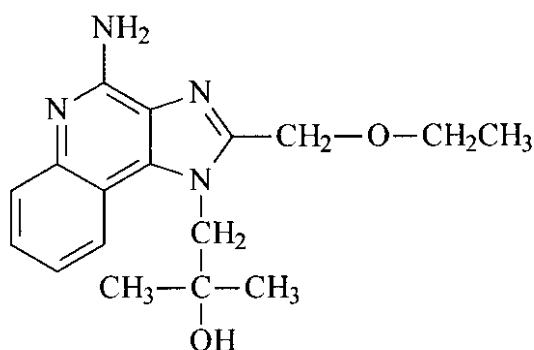
P B M C、単球 (C D 14 +)、p D C 2 濃縮、または D C 1 (C D 11 c + 血中 D C)

50

細胞を、 10^6 細胞 / μl の濃度で補足 RPMI 中に再懸濁した。その後、 $100 \mu\text{l}$ の細胞 (10^5 個の細胞) を、96 ウェル V 型プレート (V-bottom plate) (ヌンク) の個々のウェルに加えた。選択化合物または非選択化合物の濃度を変化させた補足 RPMI を含んだ溶液を調製した。具体的には、以下に示す非選択化合物レシキモド (resiquimod) および選択化合物 I ~ VI を補足 RPMI で 2.2、0.66、0.22、0.066、および $0.022 \mu\text{M}$ に希釈した。 $100 \mu\text{l}$ の化合物希釈溶液を細胞に加えて、化合物の最終濃度をそれぞれ 1.1、0.33、0.11、0.033、および $0.011 \mu\text{M}$ とした。DC1 細胞の刺激については、非選択化合物のレシキモドを希釈して 64、32、16、8、4、および $2 \mu\text{M}$ にした。 $100 \mu\text{l}$ の化合物希釈溶液を細胞に加えて、最終濃度を 32、16、8、4、2、および $1 \mu\text{M}$ とした。細胞は、5% CO_2 / 95% 空気の雰囲気下において 37 で培養した。

10

【化 7】



20

(レシキモド)

【0037】

細胞表面および細胞内フローサイトメトリー

30

細胞表面マーカー発現の評価は、次のモノクローナル抗体を使用してフローサイトメトリー分析 (flow cytometric analysis) で行った: PE 結合 CD14、クローン M P 9、PE 結合および FITC 結合 HLA-DR、クローン L 243、PE 結合および FITC 結合 1 / 2 a アイソタイプコントロール、クローン X 40 および X 39 (すべてベクトンディキンソン (Becton Dickinson) (カリフォルニア州、マウンテンビュー (Mountain View, CA)) からのもの)。細胞 (5×10^5) を、4 で 15 分間、精製 IgD (ベクトンディキンソン (Becton Dickinson)) を使用して培養して非特定結合をブロックし、その後、10% FCS および 0.1% アジ化ナトリウムを含んだ PBS 中で、4 で 30 分間、細胞を抗体で染色した。PBS で洗浄した後、細胞を FACSscan フローサイトメーターおよび Cell Quest ソフトウェア (ベクトンディキンソン (Becton Dickinson)) で分析した。

40

【0038】

サイトカインの分析

サイトカインのレベルは ELISA で測定した。ヒトの TNF- α および IL-12 (p40 / p70) キットは、ジェンザイム (Genzyme) (マサチューセッツ州ケンブリッジ (Cambridge, MA)) から購入した。ヒト IL-6 キットは、バイオソースインターナショナル (Biosource International) (カリフォルニア州、カマリロ (Camarillo, CA)) から入手した。ELISA はすべて製造業者の付属書に従って行った。IFN のレベルは生物検定法 (40) で測定した。

50

I F N - および I F N - の特異抗体を使用して、タイプ I のどの I F N が細胞上清中に存在するかを判別した。E L I S A の結果はすべて p g / m l で示し、I F N の結果は U / m l で示してある。

【 0 0 3 9 】

細胞内フローサイトメトリーによるサイトカインのプロファイルの特徴付け

p D C 2 含有細胞集団を 0 . 0 0 5 ~ 5 μ M の濃度範囲の種々の選択化合物および非選択化合物で 1 2 時間にわたって刺激した。またこれは、タンパク質の分泌を防ぐために B r e f e l d i n A (C a l b i o c h e m) の存在下で行った。p D C 2 含有細胞集団を P B S で洗浄し、4 % パラホルムアルデヒド (M e r c k) で固定してから、0 . 1 % サポニン / P B S (S i g m a) で透過化処理を施した。m A b s H L A - D R + - P e r C P と C D 1 2 3 - P E (B e c t o n D i c k i n s o n) を使用し、さらに T N F - F I T C 、 I L - 1 2 - F I T C および I F N - - F I T C (C h r o m a p r o b e) のうちのいずれかを使用して、細胞を染色した。P B S で洗浄した後、F A C S c a n フローサイトメーターおよび C e l l Q u e s t ソフトウェア (B e c t o n D i c k i n s o n) を使用して、三色フローサイトメトリー (t h r e e c o l o r f l o w c y t o m e t r y) で細胞を分析した。

10

【 0 0 4 0 】

表 1 のデータは、非選択化合物であるレシキモドで刺激した種々の細胞集団の細胞培養上清から測定した、サイトカイン I F N - および T N F - の発現についての生物検定法および E L I S A の結果を示している。

20

【 0 0 4 1 】

表 2 のデータは、選択化合物 I I で刺激した種々の細胞集団の細胞培養上清から測定した、サイトカイン I F N - および T N F - の発現についての生物検定法および E L I S A の結果を示している。他の選択化合物 I および I I I ~ V I の刺激で産生されたサイトカイン発現レベルも同様であった。

【 0 0 4 2 】

【 表 1 】

表 1

非選択化合物「レシキモド」で刺激した種々の細胞型でのサイトカイン
発現

PBMC				
レシキモド [μm]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 個 の細胞	pg TNF/10,000 個 の細胞
1.1	4985	1617	5.0	1.6
0.33	3788	8	3.8	0.0
0.11	1263	0	1.3	0.0
0.033	3788	0	3.8	0.0
0.011	5	0	0.0	0.0

10

CD14+細胞				
レシキモド [μm]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 個 の細胞	pg TNF/10,000 個 の細胞
1.1	140	2187	1.4	21.9
0.33	36	13	0.4	0.1
0.11	21	0	0.2	0.0

20

PDC2 濃縮細胞				
レシキモド [μm]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 個 の細胞	pg TNF/10,000 個 の細胞
1.1	3788	1175	37.9	11.8
0.33	3788	895	37.9	9.0
0.11	1662	1293	16.6	12.4
0.033	2676	196	28.8	2.0
0.011	1662	14	16.6	0.1

30

DC11c+血中 DC (DC1)				
レシキモド [μm]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 個 の細胞	pg TNF/10,000 個 の細胞
32	4	2066	0.0	20.7
16	4	2671	0.0	26.7
8	4	3580	0.0	35.8
4	5	3828	0.0	38.3
2	5	4688	0.0	46.9
1	5	4364	0.0	43.6

40

【 0 0 4 3 】

【 表 2 】

表 2

選択化合物 I I で刺激した種々の細胞型でのサイトカイン発現

PBMC				
化合物 I I	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 個 の細胞	pg TNF/10,000 個 の細胞
1.1	4985	0	5.0	0.0
0.33	4985	54	5.0	0.1
0.11	3788	0	3.8	0.0
0.033	1	0	0.0	0.0
0.011	1	0	0.0	0.0

10

CD14+細胞				
レシキモド [μm]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 個 の細胞	pg TNF/10,000 個 の細胞
1.1	27	0	0.3	0.0
0.33	52	0	0.6	0.0
0.11	16	0	0.2	0.0

20

PDC2 濃縮細胞				
レシキモド [μm]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 個 の細胞	pg TNF/10,000 個 の細胞
1.1	6561	807	65.6	8.1
0.33	6561	691	65.6	6.9
0.11	6561	405	65.6	4.1
0.033	4985	54	49.9	0.5
0.011	140	1	1.4	0.0

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/46749 A2(51) International Patent Classification: **G01N 33/50**,
33/68

(21) International Application Number: PCT/US01/46698

(22) International Filing Date: 6 December 2001 (06.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/254,229 8 December 2000 (08.12.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY** [US/US]; 3M Center, Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **TOMAI, Mark, A.** [US/US]; 8067 Enclave Bay, Woodbury, MN 55125 (US). **VASILAKOS, John, P.** [US/US]; 1760 Interlachen Bay, Woodbury, MN 55125 (US).(74) Agents: **HOWARD, MarySusan** et al.; Office of Intellectual Property Counsel, Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/46749 A2

(54) Title: SCREENING METHOD FOR IDENTIFYING COMPOUNDS THAT SELECTIVELY INDUCE INTERFERON AL-
PHA(57) Abstract: Methods for screening for compounds that selectively induce IFN- γ production and methods for ameliorating conditions in a patient using a small molecule that selectively induces the production of IFN- γ are disclosed.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

**SCREENING METHOD FOR IDENTIFYING COMPOUNDS THAT
SELECTIVELY INDUCE INTERFERON ALPHA**

5 **Field of the Invention**

The present invention is directed to the field of immunology and specifically to modulation of the immune response. The invention provides methods of screening compounds for selective induction of IFN- α and compounds and methods for selective induction of IFN- α to ameliorate conditions in patients which are responsive to IFN- α .

10

Background

Interferon- α (IFN- α) can be used to treat a variety of conditions. For example, IFN- α can be used to treat conditions such as hepatitis, multiple sclerosis, various dermatological disorders associated with hepatitis C, lymphoma and melanoma. Recently, it was shown that the primary interferon-producing cell in the blood in response to viral infections is the plasmacytoid dendritic cell (pDC). These cells are required for and are the principal IFN-producing cells in the blood in response to the class of compounds known as the imidazoquinolines. Such compounds are disclosed in, for example, U.S. Patent No. 4,689,338; 5,389,640; 5,268,376; 4,929,624; 5,266,575; 5,352,784; 5,494,916; 15 5,482,936; 5,346,905; 5,395,937; 5,238,944; 5,525,612; 5,175,296; 5,693,811; 5,741,908; 20 5,939,090; 6,110,929; 4,988,815; 5,376,076; and PCT Publications WO 99/29693; WO 00/76505; WO 00/76518; and WO 00/76519. All these applications are incorporated herein by reference.

However, immune responses, or compounds that induce immune responses, such of the production of IFN- α can also upregulate the production of inflammatory cytokines 25 such as Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and IL-1. Upregulation of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 can often have detrimental effects, such as tissue destruction. In many clinical situations it may be desirable to limit the production of inflammatory cytokines while still inducing the production of IFN- α . Accordingly, there is 30 a need to develop compounds and methods to screen for compounds that induce IFN- α production without significantly increasing the production of inflammatory cytokines.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

Summary of the Invention

The present invention provides a method for identifying compounds that stimulate the production of IFN- α without concomitant production of significant levels of inflammatory cytokines, such as TNF- α , from cells present in the bloodstream. The method involves screening potential compounds on a population of cells that contain pDC2 cells, which are responsible for the majority of the production of the IFN- α in the population. Compounds that meet this criteria are designated as "selective compounds". The invention also provides a method for using a selective compound of the invention to affect a condition in a patient responsive to induction of IFN- α .

10

Detailed Description of the Invention

The present invention provides methods of identifying compounds that selectively induce production of IFN- α from pDC2 cells. In some embodiments, the invention provides for selective induction of IFN- α in a population of cells, such as unseparated whole blood or peripheral blood mononuclear cells (PBMC), without concomitant production of significant amounts of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, etc. The invention also provides preferred compounds for selective induction of IFN- α as well as compounds and methods for affecting a condition in a patient that is responsive to IFN- α . Administration of a compound that selectively induces IFN- α expression without expression of significant levels of inflammatory cytokines advantageously provides for targeted therapeutic or prophylactic effect with reduced likelihood of potentially undesired side effects from inflammatory cytokines.

As used herein, "pDC2 cell" means "precursor dendritic cell-type 2", which is a plasmacytoid cell type that lacks leukocyte lineage markers, expresses CD4, MHC class II molecules, and CD123, and differentiates into type 2 dendritic cells when cultured with interleukin-3 with or without CD40 ligand. pDC2 cells can be identified by the presence of surface markers CD123+, HLA-DR+, CD4+, and the absence of leukocyte lineage specific markers and CD11C-. The term "pDC2 cell" is inclusive of these precursor cells and the differentiated type 2 dendritic cells (DC2).

30

The term "peripheral blood mononuclear cells" (PBMC) refers to cells that are typically found in blood and include T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, monocytes such as macrophages, and dendritic cells.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

The term "inflammatory cytokine producing cells" includes a single cell type or combination of cell types that produce a major portion of the inflammatory cytokines within a population of PBMCs. Examples of such cells include monocytes, macrophages and dendritic cells that are CD11c⁺; (DC1) dendritic cells that are CD11c⁻ are not considered to be "inflammatory cytokine producing cells" as that term is used herein.

The term "expression", "expressed", "expressing", etc. refers to the production of a protein, and the messenger RNA (mRNA) that encodes the protein, from a gene.

An "inflammatory cytokine" refers to cytokines that induce an inflammatory response. Examples of inflammatory cytokines according to the invention include tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, and IL-12. As used herein, the term "inflammatory cytokine" does not include interferon α (IFN- α).

The term "pDC2-enriched cells" refers to a preparation of cells, for example PBMC, or whole blood cells, where the percentage of pDC2 cells is 5% or greater, preferably 20% or greater, more preferably 80% to 95%.

As used herein a "selective compound" refers to a compound that preferentially induces expression of IFN- α in a population of hematopoietic cells such as PBMCs containing pDC2 cells without concomitant production of significant levels of inflammatory cytokines. As used in this context, the term "significant levels" refers to levels of inflammatory cytokines that cause an undesired effect by the inflammatory cytokines sufficient to reduce the utility of the compound for a particular application. For example, if the ratio of TNF- α produced to IFN- α produced is greater than about 1:3, this would be considered production of significant levels of an inflammatory cytokine.

Method of Screening

In one embodiment, the invention provides a method of identifying a compound that selectively induces production of IFN- α that includes screening the compound to determine whether the compound induces IFN- α production in a population of cells without significant induction of production of inflammatory cytokines, including TNF- α . A population of cells suitable for screening a compound according to the invention includes cells that produce inflammatory cytokines and pDC2 cells. Thus, examples of suitable cell populations include whole blood cells, complete or partial populations of

WO 02/46749

PCT/US01/46698

PBMCs, PBMC cells enriched with pDC2 cell fraction, or any hematopoietic population containing pDC2 or DC2 cells.

In a typical embodiment, a selective compound of the invention induces expression of IFN- α predominantly from pDC2 cells. Preferably, a selective compound that induces IFN- α production does not induce high levels of inflammatory cytokines from pDC2 cells or other cells in the population of cells. In general, when a selective compound of the invention is administered to a population of cells including pDC2 cells and inflammatory cytokine producing cells, IFN- α is present in the population of cells in an amount at least three times greater than the amount of TNF- α , typically about 100 times greater, and in some embodiments about 1000 times greater or more.

A population of cells containing pDC2 cells can be obtained or prepared using any suitable method. For example, a blood cell sample for preparing a suitable population of cells can be obtained from most mammals. A cell sample may also be a population of cells subjected to enrichment or purification procedures to increase the percentage of a desired cell type, such as pDC2 cells, in the population of cells. These procedures can be based on either positive selection or negative selection. An example of positive selection is the process where a desired cell type is labeled with an antibody specific for that cell type, bound to a column where the binding is dependent on the presence of the antibody on that cell type, and then separated from other cells in the population. An example of negative selection is the process where undesired cells are labeled with antibodies directed against those cells, bound to a column where the binding is dependent on the presence of the antibodies, and then separated from the desired cell type. Such columns include, but are not limited to, for example, immunoaffinity-based columns or magnetic bead-based columns such as Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J: BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology* 165(11):6037, 2000.

Cells can also be enriched by positive or negative selection by sorting using a flow cytometer. According to this procedure, cells can be labeled with fluorophore-coupled antibodies to discriminate cell types and separated into populations based on the presence of the fluorophore-coupled antibodies on the cell surface. Other techniques for enriching cell populations for a desired cell type include, for example, ammonium lysis, complement cell lysis, density gradient separation, panning, adherence depletion, and charge-flow

WO 02/46749

PCT/US01/46698

separation. It will be appreciated that these techniques may be performed alone, or in combination, to achieve the desired cell enrichment or purity.

In one embodiment of the invention, the population of cells containing pDC2 cells is contacted with a compound to be screened in an amount sufficient to assess the ability of the compound to selectively induce IFN- α expression. The culture conditions and composition of the media in which the population of cells are contacted with the compound can be performed using any suitable system. The specific amount of compound used to induce expression can vary, but stimulation typically is dose responsive. A typical dosage range for selective compounds is from about 0.005 to about 5 μ M. However, compounds that are more potent stimulators of cytokine expression may display IFN- α production or inflammatory cytokine expression in a lower dosage range. Compounds can be applied to the cells in a suitable carrier that is physiologically compatible with the cells and the culture media.

The cell population is contacted with the compounds for a period of time sufficient to assess the ability of the compound to selectively induce IFN- α expression. The kinetics of expression of various cytokines is known in the art. However, the method of determining cytokine expression can also influence the time that the cell population is stimulated with a compound. For example, if cytokine expression is determined using a nucleic acid probe to assess the amount of intracellular cytokine mRNA produced, cells may generally be stimulated for a shorter period of time than when cytokine expression is determined by the amount of extracellular cytokine protein secreted into the media. Expression of intracellular mRNA or intracellular protein can in many cases be determined at about 2 to 6 hours after contacting the cell population with the compound. However, intracellular expression of IFN- α and TNF- α are typically determined from 6 to 24 hours after stimulation. Expression of extracellular protein can be determined at about 6 to 48 hours after contacting the cell population with the compound, typically about 12 to 36 hours.

The invention also provides for measurement of specific amounts or relative amounts of cytokines expressed from a cell population that has been contacted with a compound for a period of time. Thus, measurement of cytokines can be determined by assessing the amount of cytokine produced in the cell, for example, by immunodetection, utilizing multi-color flow cytometry. In one embodiment, antibodies against cytokines,

WO 02/46749

PCT/US01/46698

such as IFN- α and TNF- α , can be used to penetrate a population of cells prepared using known techniques suitable for intracellular immunodetection. These antibodies can be coupled to compounds such as fluorophores, for example FITC, phycoerythrin and Cy3, or other fluorescent labels, which allow for the fluorescence detection of these antibodies and thus the relative amount of cytokine in the cells.

A flow cytometer can be used to measure the fluorescence in the cell population that has been stained with anti-IFN- α or anti-TNF- α fluorophore coupled antibodies. Optionally, a cell population can also be stained with fluorophore-coupled antibodies against specific surface proteins that allow for the discrimination of distinct cell types, for example, pDC2 cells, in the cell population. Identification of a desired cell type and the relative amount of cytokine expressed in that cell type, such as, the amount of IFN- α produced in pDC2 cells can be determined using multi-color flow cytometry.

Measurement of cytokine induction by immunodetection can also be determined by analyzing the amount of cytokine present extracellularly, or the amount of cytokine that has been secreted from the cell population into the culture media. Measurements of secreted IFN- α and TNF- α , for example, can be made using techniques such as ELISA or bioassay. Cytokines present in culture supernatants that were secreted from the cell population after stimulation with a compound for a period of time can be immobilized on plastic surfaces, such as microtiter plate surfaces. Antibodies, such as anti-IFN- α or anti-TNF- α antibodies, can be used to detect the presence of these cytokines immobilized on the plastic surface. These antibodies can be coupled to known detection moieties such as alkaline phosphatase or peroxidase molecules that can be used with a detection reagent to indicate the presence and relative amount of the cytokine. Cytokine standards can be run in parallel to determine the total amount of cytokine secreted into the media.

Measurement of cytokines by immunodetection or bioassay can also be determined by assessing the amount of cytokine present in cellular lysates. According to the invention, stimulated cells can be lysed or solubilized by known methods, for example, detergent lysis, and the lysates, which contain the cytokines, can be transferred to a support surface, for example a nitrocellulose membrane. Optionally, electrophoresis can be performed prior to transfer, to separate the constituents of the lysate. Western or dot blotting can be performed, utilizing appropriate secondary and detection reagents, to determine the presence and the amount of a cytokine, for example, IFN- α or TNF- α , in the

WO 02/46749

PCT/US01/46698

cell lysate. Techniques for protein detection from cell lysates are commonly known in the art and can be found, for example, in Current Protocols in Protein Science (Ed.: Coligan et al., 1996, John Wiley & Sons, New York, NY).

5 Methods for intracellular detection of cytokine expression also include detection of the amount of mRNA encoding a particular cytokine. According to this method, the amount of cytokine can be determined using a nucleic acid probe complimentary to the target cytokine mRNA, or a portion of the mRNA, in combination with flow cytometry and immunodetection, as described above. The nucleic acid probe can be coupled to a fluorophore, such as FITC or Cy3. Alternatively, cells stimulated with a particular
10 compound can be harvested and lysed to generate lysates containing cytokine mRNA. Methods such as Northern analysis, for example, can be performed. According to one embodiment, Northern analysis can involve separating RNA by electrophoresis, transferring the RNA to a solid support, such as a membrane analysis, probing with a nucleic acid complimentary to the target cytokine mRNA and coupling to a detection
15 moiety. Suitable detection moieties include a radiolabel, a fluorophore, a luminescent-generating compound, or a colorimetric compound. Other methods such as RNase protection assay (RPA) and RT-PCR can be used to determine the presence and amount of a cytokine mRNA, such as IFN- α or TNF- α mRNA, in a cellular sample. Methods for such assays are known and disclosed in, for example, Current Protocols in Molecular
20 Biology (Ed.: Ausubel et al., 1990, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience: John Wiley, New York), which is incorporated herein by reference in its entirety.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

Methods for Affecting a Condition in a Patient

In another embodiment, the invention provides a method for affecting a condition of a patient responsive to IFN- α by administering a selective compound to the patient.

- 5 The patient can be a human or animal. The selective compound provides an increase of IFN- α in a patient by increasing the expression of IFN- α from the patient's pDC2 cells. As discussed, the selective compounds preferably do not cause a significant increase in the expression of inflammatory cytokines.

- 10 Non-limiting examples of conditions which can be affected by increasing the level of IFN- α include melanoma, myeloid leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, renal cell carcinoma, Kaposi's sarcoma, multiple sclerosis, hypereosinophilic syndrome, adenovirus, rhinovirus, variola (particularly variola major), influenza, coronavirus, HIV, para-influenza, myeloproliferative disorders such as polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis, hepatitis B, chronic hepatitis C, and dermatological diseases such as
- 15 cutaneous necrotising vasculitis, mixed cryoglobulinemia, porphyria cutanea tarda, lichen planus, Adamantiadis-Behcet syndrom, erythema multiforme and nodosum, malacoplakia, urticaria pruritus, basal cell carcinoma, genital warts, actinic keratosis and other types of human papilloma virus infection including epidermoplasia verucciformis, common and plantar warts, and cervical dysplasia.

20

Selective Compounds

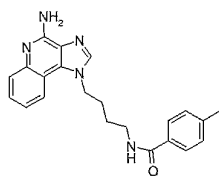
Selective compounds include certain imidazoquinoline amines, imidazoquinoline sulfonamides, and imidazoquinoline ureas that increase the expression of IFN- α primarily from the pDC2 cells without significant expression of inflammatory cytokines.

- 25 Examples of compounds that have been identified as selective using the method of the invention include:

Compound I:

WO 02/46749

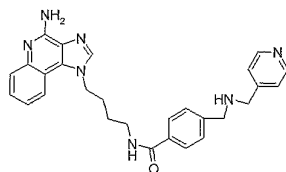
PCT/US01/46698



N-[4-(4-amino-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-yl)butyl]-4-methylbenzamide;

5

Compound II:

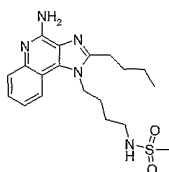


10

N-[4-(4-amino-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-yl)butyl]-4-[(pyridin-4-ylmethyl)amino]methylbenzamide;

15

Compound III:



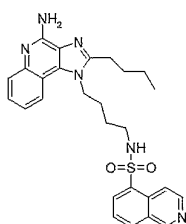
20

N-[4-(4-amino-2-butyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-yl)butyl]methanesulfonamide;

WO 02/46749

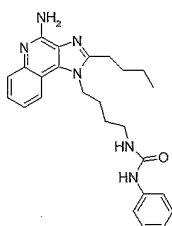
PCT/US01/46698

Compound IV:



5
N-[4-(4-amino-2-butyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-yl)butyl]isoquinoline-5-sulfonamide;

Compound V:

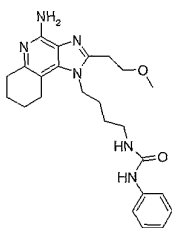


10
N-[4-(4-amino-2-butyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-yl)butyl]-*N'*-phenylurea
15

WO 02/46749

PCT/US01/46698

and Compound VI:



N-{4-[4-amino-2-(2-methoxyethyl)-6,7,8,9-tetrahydro-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-yl]butyl}-*N'*-phenylurea

These compounds and methods of preparing them are described in more detail in WO 0076505; WO 0076518; and WO 0076519, the disclosures of which are incorporated by reference herein.

The compounds can also be targeted for specific delivery to a cell type to be treated by conjugation of the compound to a targeting moiety. Targeting moieties useful for conjugation to a compound such as an imidazoquinoline-based compound include antibodies, cytokines, and receptor ligands that are specific to the cell, in particular, pDC2 cells, to be affected. Targeting moieties for pDC2 cells can include, for example, anti-BDCA-2, anti-BDCA-4, anti-CD4 antibodies, anti-CD123 antibodies, or anti-HLA-DR antibodies.

If the selective compound of the invention is sufficiently basic or acidic to form stable nontoxic acid or base salts, administration of the compound as a salt may be appropriate. Examples of pharmaceutically acceptable salts are organic acid addition salts formed with acids which form a physiologically acceptable anion, for example, tosylate, methanesulfonate, acetate, citrate, malonate, tartarate, succinate, benzoate, ascorbate, α -ketoglutarate, and α -glycerophosphate. Suitable inorganic salts may also be formed, including hydrochloride, sulfate, nitrate, bicarbonate, and carbonate salts. Pharmaceutically acceptable salts may be obtained using standard procedures known in

WO 02/46749

PCT/US01/46698

the art, for example by reacting a sufficiently basic compound such as an amine with a suitable acid affording a physiologically acceptable anion. Alkali metal (for example, sodium, potassium or lithium) or alkaline earth metal (for example calcium) salts of carboxylic acids can also be made.

- 5 The following examples are provided to further explain the invention through specific description of some embodiments of the invention. The Examples, however, are not intended to limit the scope of the invention.

Example

- 10 The following Example sets forth methods for screening IRM compounds which selectively induce cytokine production from pDC2 cells.

Culture Medium

- Complete RPMI (cRPMI) medium was used for the studies of these Examples.
15 cRPMI was prepared by mixing RPMI 1640 with 25 mM HEPES (Life Technologies, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% heat inactivated (FCS) (Hyclone, Logan, UT), 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine and 50 µg/ml gentamicin sulphate (Life Technologies).

- 20 **Generation, Purification or Enrichment of Various Cell Types**

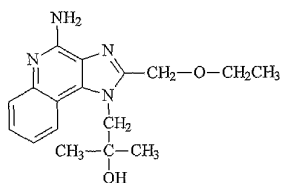
- PBMCs were isolated with Histopaque HybriMax -1077 density gradient (Sigma) from healthy human volunteers after obtaining informed consent.
CD14⁺ cells were purified by positive selection using CD14⁺ microbeads in conjunction with the MiniMACS system (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) by following the
25 manufacturer's instructions. Purity, as assessed by flow cytometry, was greater than 90%.
pDC2 cells were enriched by negative selection using CD3-, CD11c- CD14-, and CD56-microbeads in conjunction with the MiniMACS system (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) by following the manufacturer's instructions. The negatively enriched pDC2 cells were then enriched in the population to 5% or greater as judged by flow cytometry using
30 anti-CD123, HLA-DR, and CD4 antibodies (Becton Dickinson).

Cell Stimulation with IRM Compounds

WO 02/46749

PCT/US01/46698

PBMC, monocytes (CD14+), pDC2-enriched, or DC1 (CD11c+ blood DC) cells were resuspended in supplemented RPMI at a concentration of 10^6 cells/ μ l. 100 μ l of cells (10^5 cells) were then added to individual wells of a 96 well V-bottom plates (Nunc). Solutions containing supplemented RPMI with various concentrations of selective or non-selective compounds were prepared. Specifically, a non-selective compound resiquimod, shown below, and selective compounds I-VI were diluted to 2.2, 0.66, 0.22, 0.066, and 0.022 μ M in supplemented RPMI. 100 μ l of the compound dilutions were added to cells so that the final concentration of compound was 1.1, 0.33, 0.11, 0.033, and 0.011 μ M, respectively. For stimulation of DC1 cells, the non-selective compound resiquimod was diluted to 64, 32, 16, 8, 4, and 2 μ M. 100 μ l of the compound dilutions were added to cells so that the final concentration was 32, 16, 8, 4, 2, and 1 μ M. Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air.



(Resiquimod)

Cell Surface and Intracellular Flow Cytometry

Evaluation of cell surface marker expression was performed by flow cytometric analysis using the following monoclonal antibodies: PE-conjugated CD14, clone M ϕ P9, PE- and FITC-conjugated HLA-DR, clone L243, PE- and FITC-conjugated γ 1/ γ 2a isotype control, clones X40 and X39 (all from Becton Dickinson, Mountain View, CA). Cells (5×10^5) were incubated for 15 minutes incubation at 4°C with purified IgD (Becton Dickinson) to block non-specific binding, and then the cells were stained for 30 minutes with the antibodies at 4°C in PBS containing 10% FCS and 0.1% sodium azide. After

WO 02/46749

PCT/US01/46698

washing in PBS, the cells were analyzed using a FACScan flow cytometer and Cell Quest software (Becton Dickinson).

Cytokine Analysis

5 Cytokine levels were measured by ELISA. Human TNF- α and IL-12 (p40/p70) kits were purchased from Genzyme (Cambridge, MA). Human IL-6 kits were obtained from Biosource International (Camarillo, CA). All ELISA were run according to manufacturer's specifications. IFN levels were measured by bioassay (40). IFN- α and IFN- β specific antibodies were used to determine which type I IFN was present in the
10 cellular supernatants. Results for all ELISAs are presented in pg/ml, whereas IFN results are presented in U/ml.

Characterization of the Cytokine Profile by Intracellular Flow Cytometry

pDC2-containing cell populations were stimulated for 12 hours with various
15 selective and nonselective compounds at concentrations ranging from 0.005 to 5 μ M in the presence of Brefeldin A (Calbiochem) to prevent protein secretion. The pDC2-containing cell populations were then washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (Merck), and permeabilized with 0.1% saponin/PBS (Sigma). The cells were stained by using mAbs HLA-DR+PerCP, CD123-PE (Becton Dickinson), and either TNF-FITC, IL-12-FITC or
20 IFN- α -FITC (Chromaprobe). After washing in PBS, the cells were analyzed by three color flow cytometry using a FACScan flow cytometer and Cell Quest software (Becton Dickinson).

The data in Table 1 represents results of bioassay and ELISA of expression of cytokines IFN- α and TNF- α as measured from cell culture supernatants from various cell
25 populations stimulated with the non-selective compound resiquimod.

The data in Table 2 represents results of bioassay and ELISA of expression of cytokines IFN- α and TNF- α as measured from cell culture supernatants from various cell populations stimulated with the selective Compound II. Stimulation with other selective
30 Compounds I and III-VI produced similar cytokine expression levels.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

TABLE 1

CYTOKINE EXPRESSION IN VARIOUS CELL TYPES STIMULATED WITH NON-SELECTIVE COMPOUND "RESIQUIMOD"

PBMC				
Resiquimod [μ m]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 cells	pg TNF/10,000 cells
1.1	4985	1617	5.0	1.6
0.33	3788	8	3.8	0.0
0.11	1263	0	1.3	0.0
0.033	3788	0	3.8	0.0
0.011	5	0	0.0	0.0

5

CD14 + cells				
Resiquimod [μ m]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 cells	pg TNF/10,000 cells
1.1	140	2187	1.4	21.9
0.33	36	13	0.4	0.1
0.11	21	0	0.2	0.0

PDC2-enriched cells				
Resiquimod [μ m]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 cells	pg TNF/10,000 cells
1.1	3788	1175	37.9	11.8
0.33	3788	895	37.9	9.0
0.11	1662	1293	16.6	12.4
0.033	2676	196	28.8	2.0
0.011	1662	14	16.6	0.1

DC11c+blood DC (DC1)				
Resiquimod [μ m]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 cells	pg TNF/10,000 cells
32	4	2066	0.0	20.7
16	4	2671	0.0	26.7
8	4	3580	0.0	35.8
4	5	3828	0.0	38.3
2	5	4688	0.0	46.9
1	5	4364	0.0	43.6

WO 02/46749

PCT/US01/46698

TABLE 2
CYTOKINE EXPRESSION IN VARIOUS CELL TYPES STIMULATED WITH
SELECTIVE COMPOUND II

PBMC				
Compound II	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 cells	pg TNF/10,000 cells
1.1	4985	0	5.0	0.0
0.33	4985	54	5.0	0.1
0.11	3788	0	3.8	0.0
0.033	1	0	0.0	0.0
0.011	1	0	0.0	0.0

5

CD14 + cells				
Resiquimod [μ m]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 cells	pg TNF/10,000 cells
1.1	27	0	0.3	0.0
0.33	52	0	0.6	0.0
0.11	16	0	0.2	0.0

PDC2-enriched cells				
Resiquimod [μ m]	IFN [U/ml]	TNF [pg/ml]	U IFN/10,000 cells	pg TNF/10,000 cells
1.1	6561	807	65.6	8.1
0.33	6561	691	65.6	6.9
0.11	6561	405	65.6	4.1
0.033	4985	54	49.9	0.5
0.011	140	1	1.4	0.0

10

WO 02/46749

PCT/US01/46698

WE CLAIM:

1. A method for identifying a compound that selectively induces production of IFN- α from pDC2 cells, the method comprising:
 - 5 - obtaining a population of cells that includes both inflammatory cytokine producing cells and pDC2 cells;
 - contacting the population of cells with a test compound;
 - determining the amount of IFN- α present in the population of cells contacted with the test compound;
 - 10 - determining the amount of inflammatory cytokine(s) present in the population of cells contacted with the test compound; and
 - identifying the test compound as a selective inducer of IFN- α if IFN- α is present in the population of cells after contact with the test compound in an amount at least three times greater than the amount of inflammatory cytokine(s) present in the population of cells.
2. The method of claim 1 wherein the amount of IFN- α and inflammatory cytokine(s) is determined from culture supernatants using ELISA or bioassay.
- 20 3. The method of claim 1 wherein the amount of IFN- α and inflammatory cytokine(s) is determined from cells in the population using a method selected from the group consisting of dot blotting, Western blotting, Northern blotting, RPA and RT-PCR.
4. The method of claim 1 wherein the inflammatory cytokine is TNF- α or IL-12.
- 25 5. The method of claim 1, wherein the population of cells is in whole blood.
6. The method of claim 1, wherein the population of cells comprises peripheral blood mononuclear cells.
- 30 7. The method of claim 1, wherein the population of cells comprises a fraction of peripheral blood mononuclear cells containing at least 5% pDC cells.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

8. The method of claim 1 wherein the population of cells is contacted with the test compound at concentrations ranging from about 0.005 to 5 μ M.
9. The method of claim 1 wherein the population of cells is cultured with the test compound for a period ranging from about 12 to 36 hours.
10. The method of claim 1 wherein the population of cells comprises a CD14+ cell type.
11. The method of claim 10 wherein the inflammatory cytokine is TNF- α and the amount of TNF- α produced by the CD14+ cells is undetectable when the test compound contacts the population of cells at a concentration of 1 μ M.
12. A method for identifying a compound that selectively induces production of IFN- α from pDC2 cells, the method comprising:
 - obtaining a population of cells that includes both inflammatory cytokine producing cells and pDC2 cells;
 - contacting the population of cells with a test compound;
 - identifying pDC2 cells present in the population and determining that IFN- α is produced by the pDC2 cells by flow cytometry;
 - determining the production of inflammatory cytokine(s) in the population of cells by flow cytometry; and
 - identifying the test compound as a selective inducer of IFN- α if all cells present in the population other than pDC2 cells produce insignificant levels of inflammatory cytokine(s).
13. The method of claim 12 wherein the pDC2 cells are identified by the presence of HLA-DR and CD123 cell surface markers on a surface of the pDC2 cells.
14. The method of claim 12 wherein the inflammatory cytokine is TNF- α , IL-12 and/or IL-1.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

15. The method of claim 12, wherein the population of cells is in whole blood.
16. The method of claim 12, wherein the population of cells comprises peripheral blood mononuclear cells.
- 5 17. The method of claim 12, wherein the population of cells comprises a fraction of peripheral blood mononuclear cells.
18. The method of claim 12 wherein the population of cells is contacted with the test compound at concentrations ranging from about 0.005 to 5 μ M.
- 10 19. The method of claim 12 wherein the population of cells is cultured with the compound for a period ranging from about 2 to 24 hours.
- 15 20. A method of affecting a condition of a patient responsive to IFN- α , the method comprising a step of:
 - obtaining a population of cells that includes both inflammatory cytokine producing cells and pDC2 cells;
 - contacting the population of cells with a test compound;
 - 20 - determining the amount of IFN- α present in the population of cells contacted with the test compound;
 - determining the amount of inflammatory cytokine(s) present in the population of cells contacted with the test compound;
 - 25 - identifying the test compound as a selective inducer of IFN- α if IFN- α is present in the population of cells after contact with the test compound in an amount at least three times greater than the amount of the inflammatory cytokine(s) present in the population of cells; and
 - administering the identified selective compound to the patient to affect the condition.
- 30 21. The method of claim 20 wherein the amount of IFN- α and inflammatory cytokines is determined from culture supernatants using ELISA or bioassay.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

22. The method of claim 20 wherein the amount of IFN- α and inflammatory cytokines is determined from cells in the population using a method selected from the group consisting of dot blotting, Western blotting, Northern blotting, RPA and RT-PCR.
- 5 23. The method of claim 20 wherein the inflammatory cytokines include TNF- α and/or IL-1.
24. The method of claim 20, wherein the population of cells is in whole blood.
- 10 25. The method of claim 20, wherein the population of cells comprises peripheral blood mononuclear cells.
- 15 26. The method of claim 20, wherein the population of cells comprises a fraction of peripheral blood mononuclear cells.
27. The method of claim 20 wherein the population of cells is contacted with the test compound at concentrations ranging from about 0.005 to 5 μ M.
- 20 28. The method of claim 20 wherein the population of cells are cultured with the test compound for a period ranging from about 12 to 36 hours.
29. The method of claim 20 wherein the population of cells comprises a CD14 + or DC1 cell type.
- 25 30. The method of claim 29 wherein the inflammatory cytokine is TNF- α and the amount of TNF- α produced by the CD14 + or DC1 cells is undetectable when the test compound is in contact with the cells at a concentration of about 1 μ M.
- 30 31. The method of claim 20 wherein the condition is selected from the group consisting of melanoma, myeloid leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, renal cell carcinoma, Kaposi's sarcoma, multiple sclerosis, hypereosinophilic syndrome, myoproliferative disorders, idiopathic myelofibrosis, hepatitis B, and chronic hepatitis C, variola, influenza, parainfluenza, adenovirus, coronavirus, and
- 35 rhinovirus.

WO 02/46749

PCT/US01/46698

32. The method of claim 31 wherein the condition is selected from the group consisting of cutaneous necrotising vasculitis, mixed cryoglobulinemia, porphyria cutanea tarda, lichen planus, Adamantiadis-Bechet syndrome, erythema multiforme and nodosum, malacoplakia, urticaria and pruritus.
33. The method of claim 20 wherein the selective compound is delivered to a desired cell type by a targeting moiety.
34. A method for selectively inducing IFN- α production from a population of cells that includes pDC2 cells, the method comprising contacting the population of cells with an immune response modifier compound that selectively induces IFN- α production by pDC2 cells.
35. The method of claim 34 wherein the compound is Compound I.
36. The method of claim 34 wherein the compound is Compound II.
37. The method of claim 34 wherein the compound is Compound III.
38. The method of claim 34 wherein the compound is Compound IV.
39. The method of claim 34 wherein the compound is Compound V.
40. The method of claim 34 wherein the compound is Compound VI.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/046749 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/50, 33/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/46698
- (22) International Filing Date: 6 December 2001 (06.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/254,229 8 December 2000 (08.12.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): 3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY [US/US]; 3M Center, Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): TOMAI, Mark, A. [US/US]; 8067 Inclave Bay, Woodbury, MN 55125 (US); VASILAKOS, John, P. [US/US]; 1760 Interlachen Bay, Woodbury, MN 55125 (US).
- (74) Agents: HOWARD, MarySusan et al.; Office of Intellectual Property Counsel, Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 28 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/046749 A3

(54) Title: SCREENING METHOD FOR IDENTIFYING COMPOUNDS THAT SELECTIVELY INDUCE INTERFERON ALPHA

(57) Abstract: Methods for screening for compounds that selectively induce IFN- α production and methods for ameliorating conditions in a patient using a small molecule that selectively induces the production of IFN- α are disclosed.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/46698
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50 G01N33/68		
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 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	No relevant documents disclosed	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt 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 ** 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 *B* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 March 2003		Date of mailing of the international search report 08/05/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Döpfer, K-P

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 9/00	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/04	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 19/04	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/16	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 7
C 1 2 N 5/06	A 6 1 P 43/00	1 1 7
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	P
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 0 7 D 471/04	C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 P 21/02	C 0 7 D 471/04	1 0 5 C
(C 1 2 Q 1/02	C 1 2 P 21/02	F
C 1 2 R 1:91)	C 1 2 Q 1/02	
	C 1 2 R 1:91	

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

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 トマイ, マーク エー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 2 5, ウッドベリー, エンクレイブ ベイ 8 0 6 7

(72)発明者 バシラコス, ジョン ピー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 2 5, ウッドベリー, インターレイチェン ベイ 1 7 6 0

F ターム(参考) 4B063 QA18 QQ20 QQ79 QR72 QR77 QS24 QS28

4B064 AG08 CA10 CD12 DA01

4B065 AA90X AC14 BB12 CA24 CA44 CA46

4C065 AA04 AA05 AA18 BB06 CC09 DD03 EE02 HH01 JJ07 KK09

LL01 PP03 PP12

4C084 AA17 NA14 ZA15 ZA36 ZA51 ZA75 ZA89 ZA94 ZA96 ZB02

ZB09 ZB11 ZB22 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZC02

4C086	AA01	AA02	CB05	MA01	MA04	NA14	ZA15	ZA36	ZA51	ZA75
	ZA89	ZA94	ZA96	ZB02	ZB09	ZB11	ZB22	ZB26	ZB27	ZB33
	ZB35	ZC02								

专利名称(译)	用于鉴定选择性诱导干扰素-α的化合物的分选方法		
公开(公告)号	JP2005500510A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2002548435	申请日	2001-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	明尼苏达州采矿制造公司		
申请(专利权)人(译)	3M创新公司		
[标]发明人	トマイマークエー バシラコスジョンピー		
发明人	トマイ,マーク エー. バシラコス,ジョン ピー.		
IPC分类号	A61K31/4745 A61K45/00 A61P1/16 A61P7/00 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P19/04 A61P19/08 A61P21/00 A61P25/28 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 A61P43/00 C07D471/04 C12N5/06 C12P21/02 C12Q1/02 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P1/16 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P19/04 A61P19/08 A61P21/00 A61P25/28 G01N33/5047 G01N33/6863 G01N33/6866 G01N2333/525 G01N2333/54 G01N2333/56 G01N2500/20		
FI分类号	G01N33/50.Z A61K31/4745 A61K45/00 A61P1/16 A61P7/00 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P19/04 A61P19/08 A61P21/00 A61P25/28 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 A61P43/00.107 A61P43/00.117 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.P G01N33/566 C12N5/00.E C07D471/04.105.C C12P21/02.F C12R1/91		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ79 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS28 4B064/AG08 4B064/CA10 4B064/CD12 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AC14 4B065/BB12 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C065/AA04 4C065/AA05 4C065/AA18 4C065/BB06 4C065/CC09 4C065/DD03 4C065/EE02 4C065/HH01 4C065/JJ07 4C065/KK09 4C065/LL01 4C065/PP03 4C065/PP12 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA15 4C084/ZA36 4C084/ZA51 4C084/ZA75 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB09 4C084/ZB11 4C084/ZB22 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZC02 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB05 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA15 4C086/ZA36 4C086/ZA51 4C086/ZA75 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB02 4C086/ZB09 4C086/ZB11 4C086/ZB22 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZC02		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 西山雅也		
优先权	60/254229 2000-12-08 US		
其他公开文献	JP2005500510A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于筛选选择性诱导IFN-α60产生的化合物的方法和使用选择性诱导IFN-α产生的小分子改善患者状况的方法。

