

(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2006-510590

(P2006-510590A)

(43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	4 B 0 6 3
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-534688 (P2004-534688)	(71) 出願人	390033008 ジャンセン・ファーマシューチカ・ナーム ローゼ・フェンノートシャツプ JANSSEN PHARMACEUTI CA NAAMLOZE VENNOOT SCHAP
(86) (22) 出願日	平成15年9月5日(2003.9.5)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月1日(2005.3.1)	(72) 発明者	デサイ, プラニヤ・ジエイ アメリカ合衆国カリフォルニア州9207 8サンマルコス・リパークレストロード1 436
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/027943		
(87) 国際公開番号	W02004/021999		
(87) 国際公開日	平成16年3月18日(2004.3.18)		
(31) 優先権主張番号	60/408,736		
(32) 優先日	平成14年9月6日(2002.9.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー及び喘息の処置のためのヒスタミンH4受容体モジュレーターの使用

(57) 【要約】

マスト細胞又は好塩基性細胞化学走性に影響するヒスタミン受容体モジュレーターの同定のための方法ならびに喘息及び/又はアレルギー応答あるいは喘息又はアレルギー応答により調節されるか、影響されるか、又は引き起こされる疾患及び/又は状態の予防、処置、誘導又は他の所望の調節のためのそのようなヒスタミンH4受容体モジュレーターの使用を開示する。マスト細胞又は好塩基性細胞化学走性応答、例えば特定の部位への移動あるいはマスト細胞又は好塩基性細胞化学走性により調節されるか、影響されるか、又は引き起こされる疾患及び/又は状態の予防、処置、誘導又は他の所望の調節のためのヒスタミンH4受容体モジュレーターの使用も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 哺乳類ヒスタミン H 4 受容体活性の推定モジュレーター化合物を哺乳類ヒスタミン H 4 受容体及び既知のヒスタミン受容体 H 4 リガンドと合わせ；

b) タンパク質機能又はリガンドに結合するその能力へのモジュレーターの効果を測定する（ここで該効果は阻害、活性化、アンタゴニスト、アゴニスト及び逆アゴニスト活性より成る群から選ばれる調節である）

ことを含んでなる哺乳類ヒスタミン H 4 受容体活性を調節する化合物の同定の方法であって、該モジュレーター化合物がマスト細胞化学走性又は好塩基性細胞化学走性のモジュレーターである方法。

10

【請求項 2】

段階 b) で測定される効果が、受容体への結合に関する段階 a) のモジュレーターと既知のヒスタミン受容体 H 4 リガンドの間の競合による阻害である請求項 1 の方法。

【請求項 3】

段階 b) で測定される効果がヒスタミン H 4 受容体細胞内二次メッセンジャーの調節である請求項 1 の方法。

【請求項 4】

細胞内二次メッセンジャーが c A M P、カルシウム及びリポーター遺伝子産物より成る群から選ばれる請求項 3 の方法。

【請求項 5】

該化合物がマスト細胞化学走性のモジュレーターである請求項 1 の方法。

20

【請求項 6】

該化合物が好塩基性細胞化学走性のモジュレーターである請求項 1 の方法。

【請求項 7】

請求項 1 の方法を用いて同定される化合物であって、生体内もしくは試験管内における哺乳類ヒスタミン H 4 受容体機能の阻害剤ならびにマスト細胞化学走性又は好塩基性細胞化学走性の阻害剤である化合物。

【請求項 8】

請求項 1 の方法を用いて同定される化合物であって、哺乳類ヒスタミン H 4 受容体のアゴニスト、アンタゴニスト又は逆アゴニストである化合物。

30

【請求項 9】

請求項 1 の方法を用いて同定される化合物であって、哺乳類ヒスタミン H 4 受容体をコードする遺伝子の発現を調節する化合物。

【請求項 10】

哺乳類ヒスタミン H 4 受容体タンパク質と免疫学的に反応性の単一特異性抗体であって、マスト細胞化学走性又は好塩基性細胞化学走性を調節する抗体。

【請求項 11】

哺乳類ヒスタミン H 4 受容体タンパク質のヒスタミン結合又は活性化を妨げる請求項 10 の抗体。

【請求項 12】

請求項 1 の方法において活性な化合物及び製薬学的に許容され得る担体を含んでなり、ここで該化合物が喘息又はアレルギー応答のモジュレーターである製薬学的組成物。

40

【請求項 13】

請求項 12 の製薬学的組成物の投与を含んでなる、喘息又はアレルギー応答あるいは喘息又はアレルギー応答及びヒスタミン H 4 受容体により媒介される疾患もしくは状態を調節する処置の必要のある患者の処置の方法。

【請求項 14】

請求項 1 の方法において活性な化合物及び製薬学的に許容され得る担体を含んでなり、ここで該化合物がマスト細胞化学走性のモジュレーターである製薬学的組成物。

【請求項 15】

50

請求項 1 4 の製薬学的組成物の投与を含んでなる、喘息又はアレルギー応答あるいはマスト細胞化学走性及びヒスタミン H 4 受容体により媒介される疾患もしくは状態を調節する処置の必要のある患者の処置の方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 の方法において活性な化合物及び製薬学的に許容され得る担体を含んでなり、ここで該化合物が好塩基性細胞化学走性のモジュレーターである製薬学的組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 の製薬学的組成物の投与を含んでなる、喘息又はアレルギー応答あるいは好塩基性細胞化学走性及びヒスタミン H 4 受容体により媒介される疾患もしくは状態を調節する処置の必要のある患者の処置の方法。

10

【請求項 1 8】

哺乳類ヒスタミン H 4 受容体活性を調節する化合物及び製薬学的に許容され得る担体を含んでなり、該化合物が試験管内もしくは生体内におけるマスト細胞もしくは好塩基性細胞化学走性のモジュレーターである製薬学的組成物。

【請求項 1 9】

化合物がマスト細胞化学走性を阻害する請求項 1 8 の製薬学的組成物。

【請求項 2 0】

化合物が好塩基性細胞化学走性を阻害する請求項 1 8 の製薬学的組成物。

【請求項 2 1】

化合物が哺乳類ヒスタミン H 4 受容体のアゴニスト、アンタゴニスト又は逆アゴニストである請求項 1 8 の製薬学的組成物。

20

【請求項 2 2】

化合物が哺乳類ヒスタミン H 4 受容体をコードする遺伝子の発現を調節する請求項 1 8 の製薬学的組成物。

【請求項 2 3】

化合物がさらに試験管内もしくは生体内で好酸球の形の変化を調節する請求項 1 8 の製薬学的組成物。

【請求項 2 4】

哺乳類ヒスタミン H 4 受容体活性を調節する化合物及び製薬学的に許容され得る担体を含んでなる製薬学的組成物の投与を含んでなる、喘息又はアレルギー応答あるいはマスト細胞もしくは好塩基性細胞化学走性及びヒスタミン H 4 受容体により媒介される疾患もしくは状態を調節する処置の必要のある患者の処置の方法であって、該化合物が試験管内もしくは生体内におけるマスト細胞もしくは好塩基性細胞化学走性のモジュレーターである方法。

30

【請求項 2 5】

製薬学的組成物がマスト細胞化学走性を阻害する化合物を含む請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 6】

製薬学的組成物が好塩基性細胞化学走性を阻害する化合物を含む請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 7】

製薬学的組成物が哺乳類ヒスタミン H 4 受容体のアゴニスト、アンタゴニスト又は逆アゴニストである化合物を含む請求項 2 4 の方法。

40

【請求項 2 8】

製薬学的組成物が哺乳類ヒスタミン H 4 受容体をコードする遺伝子の発現を調節する化合物を含む請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 9】

製薬学的組成物が試験管内又は生体内で好酸球の形の変化を調節する化合物を含む請求項 2 4 の方法。

【請求項 3 0】

a) ヒスタミン H 4 受容体モジュレーターとして調べられている試験化合物の存在下もしくは不在下で、マスト細胞のヒスタミンに向かう動きを可能にする条件下でマスト細胞

50

をヒスタミンに近接して置き；

b) ヒスタミンに向かうマスト細胞の動きへのヒスタミンH4受容体モジュレーターの効果を測定する(ここでヒスタミンに向かうマスト細胞の動きの速度におけるか、あるいはヒスタミンに向かって動くマスト細胞の数における増加もしくは減少が、ヒスタミンへのマスト細胞のヒスタミンH4受容体-媒介化学走性を試験化合物が調節することの指標となる)

ことを含んでなる、ヒスタミンへのマスト細胞の哺乳類ヒスタミンH4受容体-媒介化学走性を調節する化合物の同定の方法。

【請求項31】

a) ヒスタミンH4受容体モジュレーターを用いる予備-処置の存在下もしくは不在下で、モジュレーターの不在下では哺乳類の気管においてあらかじめ決められた量の上皮-下マスト細胞蓄積を生ずるであろう管理下に、ヒスタミン又はアレルゲンを含んでなるエアゾールに哺乳類を暴露し；

b) ヒスタミンH4受容体モジュレーターの存在下及び不在下における哺乳類の気管中の上皮-下マスト細胞蓄積を比較し、モジュレーターの不在下と比較される時のモジュレーターの存在下における上皮-下マスト細胞蓄積の変化を、ヒスタミンH4受容体モジュレーターが、ヒスタミン又はアレルゲンへの暴露に应答した哺乳類の気管におけるマスト細胞の上皮-下蓄積を調節することの指標とする

ことを含んでなる、ヒスタミンH4受容体モジュレーターがヒスタミンもしくはアレルゲンへの暴露に应答した哺乳類気管におけるマスト細胞の上皮-下蓄積を調節するか否かの決定の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願へのクロスリファレンス

これは、2002年9月6日に申請された米国暫定出願公開第60/408,736号明細書の利益を主張し、それは引用することによりその記載事項全体が本明細書の内容となる。関連出願には、2002年3月8日に申請された米国特許出願公開第10/094,357号明細書、2002年9月6日に申請された米国暫定出願公開第60/408,569号明細書及び2002年9月6日に申請された米国暫定出願公開第60/408,579号明細書が含まれ、それらの開示は引用することによりそれらの全体が本明細書の内容となる。

発明の分野

本発明は、アレルギー応答、喘息あるいは喘息もしくはアレルギー応答により調節されるか、影響されるかもしくは引き起こされる疾患及び/又は状態の予防、処置、誘導あるいは他の望ましい調節のためのヒスタミンH4受容体モジュレーターの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ヒスタミンは、グアニンヌクレオチド結合タンパク質を介して細胞内経路に連結する細胞表面受容体を介して信号する多機能化学伝達物質である。この種類のヒスタミン結合細胞表面受容体は、Gタンパク質共役型受容体又はGPCRと呼ばれる受容体の広い群の一部である。現在、薬理的に定義され、且つH1、H2、H3及びH4類別(classifications)に分類されている4つのヒスタミン受容体のサブタイプがある(非特許文献1；非特許文献2)。H1ヒスタミン受容体はクローニングされており(非特許文献3)、アレルギー応答における平滑筋へのヒスタミンの効果を遮断するためのジフェンヒドラミン(diphenhydramine)のような薬剤の標的である。H2ヒスタミン受容体はクローニングされており(非特許文献4)、胃における酸分泌へのヒスタミンの効果を遮断するためのラニチジン(ranitidine)のような薬剤の標的である。1983年(非特許文献5)に存在すると仮定されたH3ヒスタミン受容体はク

ローニングされており（非特許文献6）、現在、中枢神経系薬剤の開発のための標的である。ヒトにおいては、未知の種類ヒスタミン受容体により媒介され得る多数の追加のヒスタミンの機能があり、例えばヒスタミンは喘息において役割を果たすことが知られているが、H1及びH2ヒスタミン受容体を標的とする現在の抗ヒスタミン薬は、喘息の処置において、もしあったとしても小さい利用性しか有していない（非特許文献7）。

【非特許文献1】Hill et al. 著, Pharmacol. Rev., 49 (3), 1997年, 253 - 278

【非特許文献2】Hough 著, Mol. Pharmacol., 59, 2001年, 415 - 419

【非特許文献3】Yamashita et al. 著, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88 (24), 1991年, 11515 - 11519 10

【非特許文献4】Gantz et al. 著, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88 (2), 1991年, 429 - 433

【非特許文献5】Arrang et al. 著, Nature (London), 302 (5911), 1983年, 832 - 837

【非特許文献6】Lovenberg et al. 著, Mol. Pharmacol., 55, 1999年, 1101 - 1107

【非特許文献7】Larsen et al. 著, Pharmacother., 21, 2001年, 28S - 33S

【発明の開示】 20

【0003】

発明の概略

本発明は、喘息及び/又はアレルギー応答ならびに喘息及び/又はアレルギー応答により媒介される疾患及び状態の処置及び/又は予防のためヒスタミンH4受容体モジュレーターの使用に関する。ヒスタミンH4受容体モジュレーターがH4受容体活性のアゴニストであるか、逆アゴニスト (inverse agonist) であるか、又はアンタゴニストであるかに依存して、ヒスタミンH4受容体のモジュレーターを、アレルギー応答の誘導ならびに阻害を含む哺乳類におけるアレルギー応答の調節のために用いることができる。白血球、好塩基性細胞、好酸球又はマスト細胞により媒介される喘息及びアレルギー応答は、ヒスタミンH4受容体のアンタゴニスト又は阻害剤を用いる処置により阻害される。 30

【0004】

1つの態様において本発明は、哺乳類ヒスタミンH4受容体活性の推定モジュレーター化合物を哺乳類ヒスタミンH4受容体及び既知のヒスタミン受容体H4リガンドと合わせ；H4受容体タンパク質機能又はリガンドに結合するその能力へのモジュレーターの効果を測定し、ここで効果は阻害、活性化、アンタゴニスト、アゴニスト又は逆アゴニスト活性であることを含んでなり、ここで該モジュレーター化合物がマスト細胞化学走性のモジュレーターである、哺乳類ヒスタミンH4受容体活性を調節する化合物の同定の方法を提供する。

【0005】 40

哺乳類ヒスタミンH4受容体タンパク質と免疫学的に反応性の単一特異性抗体も提供し、ここで該抗体はマスト細胞化学走性を調節する。

【0006】

他の側面において本発明は、哺乳類ヒスタミンH4受容体タンパク質活性の推定モジュレーター化合物を哺乳類ヒスタミンH4受容体タンパク質及び既知のヒスタミン受容体H4リガンドと合わせ；タンパク質機能又はリガンドに結合するその能力へのモジュレーターの効果を測定し、ここで該効果は阻害、活性化、アンタゴニスト、アゴニスト又は逆アゴニスト活性であることを含んでなり、ここで該モジュレーター化合物が好塩基性細胞化学走性のモジュレーターである、哺乳類ヒスタミンH4受容体タンパク質活性を調節する化合物の同定の方法を提供する。 50

【0007】

哺乳類ヒスタミンH4受容体タンパク質と免疫学的に反応性の単一特異性抗体も提供し、ここで該抗体は試験管内又は生体内で好塩基性細胞化学走性を調節する。

【0008】

本発明はそのいくつかの側面の1つにおいて、ヒスタミンH4受容体モジュレーターの存在下もしくは不在下で、マスト細胞がヒスタミンに向かって動くことを可能にする条件下でマスト細胞をヒスタミンに近接して置き；ヒスタミンに向かうマスト細胞の動きへのヒスタミンH4受容体モジュレーターの効果を測定し、ここでヒスタミンに向かうマスト細胞の動きの速度におけるか、あるいはヒスタミンに向かって動くマスト細胞の数における増加もしくは減少が、ヒスタミンへのマスト細胞のヒスタミンH4受容体-媒介化学走性を試験化合物が調節することの指標であることを含んでなる、ヒスタミンへのマスト細胞の哺乳類ヒスタミンH4受容体-媒介化学走性を調節する化合物の同定の方法を提供する。

10

【0009】

他の側面において本発明は、ヒスタミンH4受容体モジュレーターがヒスタミンもしくはアレルゲンへの暴露に应答した哺乳類気管におけるマスト細胞の上皮-下蓄積を調節するか否かの決定の方法を提供し、該方法はヒスタミンH4受容体モジュレーターを用いる予備-処置の存在下もしくは不在下で、モジュレーターの不在下では哺乳類の気管においてあらかじめ決められた量の上皮-下マスト細胞蓄積を生ずるであろう管理下に、ヒスタミン又はアレルゲンを含んでなるエアゾールに哺乳類を暴露し；ヒスタミンH4受容体モジュレーターの存在下及び不在下における哺乳類の気管中の上皮-下マスト細胞蓄積の量を比較し、モジュレーターの不在下と比較される時のモジュレーターの存在下におけるマスト細胞蓄積の変化は、ヒスタミンH4受容体モジュレーターが、ヒスタミン又はアレルゲンへの暴露に应答した哺乳類の気管におけるマスト細胞の上皮-下蓄積を調節することの指標であることを含んでなる。

20

【0010】

本発明の他の特徴及び利点は、下記の図、詳細な記述及び実施例を参照することにより理解されるであろう。

図面の簡単な記述

図1：ヒスタミンに应答したマウス骨髄-由来マスト細胞化学走性。

30

【0011】

図2：ヒスタミンに应答したマウス骨髄-由来マスト細胞の化学走性は、ヒスタミンH4受容体-特異的アンタゴニストにより遮断され得るが、H1、H2又はH3受容体アンタゴニストによっては遮断されない。

【0012】

図3：ヒスタミンに应答したマウス骨髄-由来マスト細胞の化学走性は、38nMのIC₅₀を有するヒスタミンH4受容体-特異的アンタゴニストにより遮断され得る。

【0013】

図4：マウス気管におけるマスト細胞の生体内ヒスタミン-誘導蓄積は、ヒスタミンH4受容体-特異的アンタゴニストにより妨げられ得る。

40

【0014】

図5：H4受容体アンタゴニスト、(5-クロロ-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノンを用いて処置されたマウスにおける、オポアルブミン-誘導肺炎症モデルからの気管支肺胞洗浄(BAL)液中の示差細胞カウント(differential cell count)。Studentの非対t-テストからのp-値は以下の通りに示される：*はp<0.05を示し、**はp<0.01を示し、***はp<0.001を示す。図5A：処置に関して用いられる記号は以下の通りである：

【0015】

【表 1】

PBS標準, □ ;
 OVA(オボアルブミン)標準, ▣ ;
 OVA+ビヒクル, ▤ ;
 OVA+50mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▥ ;
 OVA+20mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▦ ;
 OVA+5mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▧ 。

10

【0016】

図 5 B : 処置に関して用いられる記号は以下の通りである :

【0017】

【表 2】

PBS標準, □ ;
 OVA(オボアルブミン)標準, ▣ ;
 OVA+ビヒクル, ▤ ;
 OVA+5mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▥ ;
 OVA+2mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▦ ;
 OVA+0.5mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▧ 。

20

【0018】

図 6 : H4 受容体アンタゴニスト (5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンをを用いて処置されたマウスにおける、オボアルブミン - 誘導肺炎症モデルからの BAL 液中の示差細胞カウント。Student の非対 t - テストからの p - 値は以下の通りに示される : * は $p < 0.05$ を示し、** は $p < 0.01$ を示し、*** は $p < 0.001$ を示す。処置に関して用いられる記号は以下の通りである :

30

【0019】

【表 3】

PBS標準, —◆— ;
 OVA(オボアルブミン)標準, —■— ;
 OVA+ビヒクル, —▲— ;
 OVA+5mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, —✕— ;
 OVA+20mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, —✱— ;
 OVA+50mg/kgにおけるH4アンタゴニスト。

40

【0020】

図 7 : マウス (n = 8) 中のオボアルブミン - 誘導肺炎症モデルにおける気道高 - 反応性への H4 受容体アンタゴニスト、(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンの効果。Student の非対 t - テストからの p - 値は以下の通りに示される : * は $p < 0.05$ を示し、** は $p < 0.01$ を示し、*** は $p < 0.001$ を示す。処置に関して用いられる記号は以下の通りである :

50

【 0 0 2 1 】

【 表 4 】

PBS標準, □ ;

OVA標準, ▣ ;

OVA+20mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▤ ;

OVA+60mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▥ ;

OVA+100mg/kgにおけるH4アンタゴニスト, ▦ 。

10

【 0 0 2 2 】

本発明の詳細な記述及び好ましい態様

哺乳類ヒスタミンH4受容体をコードするDNA分子はクローニング及び特性化されており、且つGタンパク質共役型受容体の種類のメンバーに相当する(Liu et al. 著, (2001) Mol. Pharmacol., 59, 2001年, 420-426; Liu et al. 著, J. Pharmacol. Exp. Therapeut., 299(1), 2001年, 121-130)。組換え発現系を用い、これらのヒスタミンH4受容体をコードする機能性DNA分子がマウス、ラット、モルモット及びヒトから単離された。組換えタンパク質は、ヒトヒスタミンH4受容体のモジュレーターの同定を含むがこれに限られない多様な目的のために有用である。

20

【 0 0 2 3 】

マウス、ラット及びモルモットのヒスタミンH4受容体は、種々の哺乳類の種の間で観察される薬理的差の解決を含むがこれに限られない多様な用途を有し、それは特にモルモット、ラット及びネズミの種が通常、モジュレーターとして機能する新規な化学物質(chemical entities)の臨床前評価において用いられるからである。そのようなモジュレーターには例えばアゴニスト、アンタゴニスト及び逆アゴニストが含まれ得る。本明細書で開示されるアッセイで同定されるモジュレーターは、例えば治療薬、予防薬及び診断薬として有用である。そのような治療薬に関する適応症には、喘息、アレルギー、炎症、心臓血管及び脳血管障害、インスリン非依存性糖尿病、高血糖症、便秘症、不整脈、神経内分泌系の障害、ストレス及び痙攣ならびに酸分泌、潰瘍、気道収縮及び前立腺機能不全が含まれるが、これらに限られない。特定の態様において、H4受容体の発現、活性又は接近性(accessibility)を下方-調節する(down-regulate)モジュレーターは、アレルギー性鼻炎及び/又は喘息の処置のための治療薬として用いられる。本明細書で用いられる場合、「ヒトヒスタミンH4受容体」という用語は、ヒスタミンに関する特異的受容体として機能することができるH4サブクラスのタンパク質を指す。

30

【 0 0 2 4 】

アレルギー及び喘息は、最も普通の呼吸の問題の2つである。アレルギーは典型的にくしゃみ、水鼻(runny nose)、かゆい目又は涙目及び鼻のうっ血により特徴付けられる。より重症のアレルギーは、重要性が増す追加の症状を伴い得る。ほとんどの場合、アレルギーは環境的アレルゲンへの暴露、例えば花粉、ほこりダニ、カビ孢子又は動物のふけのような空気で運ばれるアレルゲンの吸入により引き金を引かれる。他のアレルゲンは食物又は飲料と一緒に摂取される。アレルギーと同様に、喘息はアレルゲンの吸入により引き起こされ得るが、それは非特異的刺激物及び運動のような他の因子によっても引き起こされ得る。それは、それが気道の炎症、気管支の高-反応性及び気道閉塞を特徴とする点でアレルギーと異なる。喘息の症状は、典型的にはぜん鳴、せき、胸苦しさ(chest tightness)及び息切れを含む。

40

【 0 0 2 5 】

IgE及びマスト細胞は、アレルギー及び喘息の両方において重要な役割を果たす。事

50

実、マスト細胞数の増加は慢性アレルギー性鼻炎及びアレルギーにおいて、ならびに抗原への暴露の後に見受けられる (Crimi et al. 著, Am. Rev. Resp. Dis., 144, 1991年, 1282; Kirby et al. 著, Am. Rev. Resp. Dis., 136, 1987年, 379; Slater et al. 著, J. Laryn. Otol., 110, 1996年, 929; Gauvreau et al. 著, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 161, 2000年, 1473; Amin et al. 著, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 162, 2000年, 2295; 及び Kassel et al. 著, Clin. Exp. Allergy, 31, 2001年, 1432)。多様な刺激がマスト細胞の活性化を引き起こし得、続いてそれらを特定の位置に移動させ (動員 (recruitment)) 及び/又は脱顆粒を受けさせ得る。これらの刺激は免疫学的 (例えば抗原又はアレルギー) あるいは非-免疫学的 (例えば化学的薬剤) 性質のものであり得る。活性化されたマスト細胞は複数の炎症媒介物、例えばヒスタミンを放出し、それは血管透過性の向上、気管支収縮、血管拡張及び炎症細胞の補充を含む急性期応答に含まれる。炎症細胞の流入は、今度は応答を助長し、且つ長期化させる追加の媒介物の放出に導く。両方の状態に伴う組織のリモデリングに導くのはこの慢性炎症プロセスである。最近、ヒスタミン受容体 H4 がクローニングされ、マスト細胞を含むがこれに限られない多様な細胞において発現されることが示された。

【0026】

他の重要な細胞型は好塩基性細胞であり、それは、通常環境と直接境を接する組織にあるマスト細胞と対照的に、血液中を循環しているのが見出された。炎症刺激に応答して、好塩基性細胞は炎症の部位に移動する。マスト細胞と同様に、それらは IgE 又は他の薬剤に応答し、ヒスタミンのような炎症媒介物を放出する。アレルギー性鼻炎及びアレルギーの両方の場合に、気道における好塩基性細胞の数の増加があり、それらは気道で後期応答における役割を果たすと考えられる (Kirby et al. 著, 同上, 1987年; Gauvreau et al. 著, 同上, 2000年; 及び Braunstahl et al. 著, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 164, 2001年, 858)。

【0027】

一般に、例えば抗ヒスタミン薬 (すべて H1 受容体アンタゴニスト) 及びうっ血除去薬によりアレルギーを抑制することができるが、まだ疾患-緩和薬に対する必要性がある。喘息の場合にも同じことが当てはまり、その場合には吸入される気管支拡張薬及びステロイドが主な治療薬である。注目すべきことは、ヒスタミン及びマスト細胞が両方の状態に関して重要であると考えられるが、現在利用できる H1 及び H2 受容体アンタゴニストはアレルギーの処置においてのみ有用であり、喘息においては、もしあっても小さい利益しか有していないことである。これは、喘息の場合、他のヒスタミン受容体、例えば H4 受容体が役割を果たすことを示唆している。

【0028】

多数の医学書が出版され、且つ関連する技術分野における熟練者に入手可能である。さらに、多数の科学的及び医学的研究出版物がアレルギー及び喘息の分野において出版されている。炎症を主題とする入手可能な出版教本の例には Barnes et al. 著, Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management, (Academic Press, London, 2002); Eric et al. 著, Bronchial Asthma: Principles of Diagnosis and Treatment, (Human a Press, 2001); Mygind 著, Allergic and Non-Allergic Rhinitis: Clinical Aspects, (W. B. Saunders Company, 1993); Grammer and Greenberger 著, Patterson's Allergic Diseases, (Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2

002); Cecil et al. 著, Textbook Of Medicine, 18th Ed. (W. B. Saunders Company, 1988); 及び Steadman's Medical Dictionary が含まれる。

【0029】

本発明は、ヒスタミンH4受容体が喘息及びアレルギー応答に含まれ、特に刺激の部位へのマスト細胞もしくは好塩基性細胞補充に含まれること、ならびにこの受容体に関するアンタゴニストが有効な抗-喘息及び/又は抗-アレルギー薬であることを示す。本発明は、現在好ましいある態様において、ヒスタミンH4受容体により直接もしくは間接的に媒介される喘息又はアレルギー応答を調節するための方法を提供する。本発明は、その側面の1つにおいて、ヒスタミンH4受容体のモジュレーターを用いる哺乳類の処置を介し、ヒスタミンH4受容体により媒介される喘息又はアレルギー応答を阻害するか、予防するか、改善するか、誘導するか、あるいは他のように影響を与えるための方法も提供する。本発明の方法において有用なヒスタミンH4受容体のモジュレーターには、ヒスタミンH4受容体に結合する抗体及び抗体フラグメント、ヒスタミンH4受容体をコードする遺伝子の発現を調節するRNAi、アンチセンス又は他の薬剤ならびにタンパク質、核酸もしくは他の有機分子を含むがこれらに限られないヒスタミンH4受容体の阻害剤、活性化剤、アンタゴニスト、アゴニスト及び逆アゴニストが含まれるが、これらに限られない。これらのモジュレーターは、必要のあるヒトへの投与のために有用であり、且つヒト以外の(non-human)哺乳類を含むがこれに限られないヒト以外の動物に投与する獣医学的目的のためにも有用である。

10

20

【0030】

哺乳類ヒスタミンH4受容体への単一特異性抗体は、G. Kohler及びC. Milstein (Nature, 256, 1975年, 495-497)の方法を用い、哺乳類ヒスタミンH4受容体に対して反応性の抗体を含有する哺乳類抗血清から精製され、哺乳類ヒスタミンH4受容体と反応性のモノクローナル抗体として調製される。本明細書で用いられる場合、単一特異性抗体は、哺乳類ヒスタミンH4受容体に関する均一な結合特性を有する単一の抗体種もしくは複数の抗体種として定義される。本明細書で用いられる場合、均一な結合は、特異的な抗原もしくはエピトープ、例えば上記のような哺乳類ヒスタミンH4受容体に関連するものに結合する抗体種的能力を指す。単一特異性ポリクローナル及びモノクローナル抗体の調製法は、当該技術分野において日常的過程である。

30

【0031】

単一特異性抗体の周知の調製法を用い、哺乳類ヒスタミンH4受容体ポリペプチドフラグメント又は全長新生哺乳類ヒスタミンH4受容体ポリペプチドあるいは個々の哺乳類ヒスタミンH4受容体エピトープに関して特異的な抗体を調製できることも、当該技術分野における熟練者に容易に明らかになる。特に、哺乳類ヒスタミンH4受容体の1つの種のみ的一部分又は完全に機能性のヒスタミンH4受容体に関して特異的な単一特異性抗体を生成させ得ることは、当該技術分野における熟練者に容易に明らかになる。ヒスタミンH4受容体に関して特異的な抗体が、受容体を活性化もしくは不活性化させるか、そのリガンドへの結合を妨げるか、その結合リガンドの放出を妨げるか、あるいはヒスタミンH4受容体に関連する正常なやり方で機能するのを妨げることを含むがこれらに限られない、受容体の機能的な活性における変化を起こさせ得ることも当該技術分野における通常の熟練者に容易に明らかになる。

40

【0032】

ヒトもしくは他の哺乳類のヒスタミンH4受容体コードDNA配列に相補的なヌクレオチド配列をアンチセンス治療のために合成することができる。これらのアンチセンス分子はDNA、DNAの安定な誘導體、例えばホスホロチオエートもしくはメチルホスホネート、RNA、RNAの安定な誘導體、例えば2'-O-アルキルRNA又は他のヒトヒスタミンH4受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドミメティックスであることができる。微量注入(microinjection)、リポソーム封入(liposome encapsulation)又はアンチセンス配列を保有するベクターからの発現により、

50

ヒトヒスタミンH4受容体アンチセンス分子を細胞中に導入することができる。ヒトヒスタミンH4受容体アンチセンス治療は、ヒトヒスタミンH4受容体活性を低下させるのが有益である疾患の処置のために特に有用であり得る。

【0033】

ヒトもしくは他の哺乳類のヒスタミンH4受容体遺伝子治療を、標的生物の細胞中にヒスタミンH4受容体を導入するために用いることができる。ヒスタミンH4受容体遺伝子をウイルスベクター中に連結することができ、それは受容宿主細胞の感染により、ヒトヒスタミンH4受容体DNAの転移を媒介する。適したウイルスベクターにはレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ-関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルスなどが含まれる。あるいはまた、リガンド-DNA複合体もしくはアデノウイルス-リガンド-DNA複合体を用いる受容体-媒介標的化DNA転移、リポフェクション膜融合 (lipofection membrane fusion) 又は直接微量注入を含む非-ウイルス法により、ヒトヒスタミンH4受容体DNAを遺伝子治療のために細胞中に転移させることができる。これらの方法及びそれらの変形は、生体外ならびに生体内ヒトヒスタミンH4受容体遺伝子治療に適している。ヒトヒスタミンH4受容体遺伝子治療は、ヒトヒスタミンH4受容体活性を高めるのが有益である疾患の処置に特に有用であり得る。

【0034】

ヒスタミンは、ほとんどすべての生理学的及び病態生理学的状況において、いくらかの能力で機能する生理活性アミン伝達物質である。ヒスタミンは中枢神経系において神経伝達物質及びニューロモジュレーター (neuromodulator) として働き、喘息及びアレルギー応答を媒介し、気道機能を調節し、胃における酸分布を制御し、心臓血管機能ならびに動脈及び静脈応答を調節し、且つまだ決定されていないプロセスに含まれるようである。これらの効果を媒介するヒスタミン受容体は、完全には特性化されていない。これらのプロセスにどのヒスタミン受容体が含まれるかを理解する1つの方法は、研究道具及び治療物質 (therapeutic entities) として受容体の化学的モジュレーター (例えばアゴニスト、アンタゴニスト及び逆アゴニスト) を開発することである。哺乳類ヒスタミンH4受容体を発現する組換え宿主細胞を用い、そのようなアゴニスト及びアンタゴニストを同定するためのスクリーニング法のための材料を得ることができる。従って本発明は、研究道具として有用であることが証明され得るか、又はヒスタミン受容体を直接もしくは間接的に含む障害、例えばアレルギー応答及び喘息の処置のための治療薬として用いられ得るヒスタミンH4受容体の新規なアゴニスト及びアンタゴニストの同定のための方法を提供する。ヒスタミンH4受容体の化合物相互作用又は調節を検出するためのアッセイには、直接リガンド結合アッセイ、競合的 (又は置き換え) リガンド結合アッセイあるいは例えばcAMPの生産又は好ましい態様におけるようにマスト細胞もしくは好塩基性細胞化学走性により、リガンドへの受容体の応答を測定する機能性アッセイが含まれるがこれらに限られない。この一般的な型のアッセイは当該技術分野における熟練者に周知であるが、それらは以前、本明細書に記載される組換え分子を得る前には可能でもなかったし、H4受容体を遮断する生理学的効果、例えば中でもマスト細胞化学走性の阻害を発明者等が発見する前には、それらが実際の利用性を有すると認識されてもいなかった。

【0035】

代表的な競合結合アッセイは以下の段階を含む：

1. ヒスタミンH4受容体をコードする核酸分子で哺乳類培養細胞を過的にトランスフェクションし、その後培養中で生育させる。
2. トランスフェクションされた細胞から、細胞の均質化及び例えば遠心による膜画分の分離により細胞膜を調製する。
3. 標準として、過剰のヒスタミンの存在下又は不在下で検出可能的に標識されたヒスタミン (例えばトリチウム化ヒスタミン) と一緒に細胞膜をインキュベーションする。
4. 試験試料として、種々の濃度の単数もしくは複数の調べられるべき化合物の存在下で

10

20

30

40

50

、上記の検出可能的に標識されたヒスタミンと一緒に細胞膜をインキュベーションする。
5. 既知の方法に従って K_i 値を計算する。

【0036】

本発明のある態様は、ヒスタミンへのマスト細胞又は好塩基性細胞の化学走性へのヒスタミンH4モジュレーターの効果を測定するための試験管内アッセイを提供する。マスト細胞に適用される場合、これらのアッセイのために、動物源（例えばマウス）から骨髄を得、マスト細胞の分化を促進する培地中で適した時間培養する。適した孔寸法の区分された（segmented）培養ウェルにフィブロネクチンをコーティングする。フィブロネクチンの除去の後、ヒスタミンを含有する培地を区分されたウェルの下の室に加える。上のウェルに種々の濃度の調べられるべき化合物をマスト細胞のアリコートと一緒に加える。上の室から下の室へのマスト細胞の移動を可能にする条件下でウェルをインキュベーションする。インキュベーションに続き、下の室中の細胞の数を、例えばフローサイトメトリーによりカウントする。

10

【0037】

さらに本発明は、別のそのいくつかの側面において、気管中のマスト細胞のヒスタミン-もしくはアレルゲン-誘導表皮-下蓄積へのヒスタミンH4モジュレーターの効果を評価するための生体内動物モデルを提供する。連続する数日（例えば2日）に短時間（例えば20分間）、試験動物（例えばマウス）を、食塩水（標準）又はヒスタミンを含んでなるエアゾールに暴露する。試験動物の場合、エアゾールでヒスタミンが与えられる（histamine aerosolized）マウスに、食塩水又は調べられるべき化合物を各エアゾールの前に予備-投薬する。処置の後、動物を犠牲にし、気管の切片を取り出し、切開する。免疫組織化学的又はトルイジンブルーを用いる選択的染色により、マスト細胞を定量的に検出する。マスト細胞を、気管切片内のそれらの位置に依存して、粘膜-下又は上皮-下としてさらに定量することができる。上皮-下空間中へのマスト細胞の移動は、アレルギー応答の指標である。

20

【0038】

本発明の好ましい方法は、例えばヒスタミンH4受容体のアゴニスト、アンタゴニスト又は逆アゴニストとして働く化学化合物を同定するために用いられる。実施例1にもっと詳細に記載される通り、H4受容体の候補化合物への結合を含むスクリーニングアッセイは、受容体に結合するいくつかの種類の化合物を同定した。これらの化合物の結合親和性は、ヒスタミンへのマスト細胞の化学走性を阻害する化合物の能力と正に関連した。代表的な化合物を生体内モデルにおいてさらに調べ、そこで化合物が気管の上皮-下空間中へのマスト細胞のヒスタミン-媒介移動を減少させるか、又は妨げることが示された。そのような移動は、アレルゲン暴露されると起こると考えられるものに類似している。

30

【0039】

従ってヒスタミンH4受容体のモジュレーターの同定の方法の他に、本発明の現在好ましい態様は、本明細書に記載される種々のスクリーニングアッセイにより同定されるH4受容体のモジュレーターを提供する。これらのモジュレーターは試験管内で組換えH4受容体に結合する。好ましい態様においてそれらは、本明細書で規定される条件下で、1 μ M未満、より好ましくは、好ましさが増す順にそれぞれ900 nM、800 nM、700 nMもしくは600 nM未満の受容体に関する K_i を有する。より好ましい態様において、それらは500 nM未満、さらにもっと好ましくは400 nM未満、さらにずっと好ましくは300 nM未満、そしてさらにもっと好ましくは200 nM未満の受容体に関する K_i を有する。特に好ましい態様において、 K_i は好ましさが増す順にそれぞれ100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM及び10 nM未満である。そのような化合物の K_i が試験管内においてヒスタミン-媒介マスト細胞化学走性を阻害する化合物の能力と正に関連することが示されたので、より大きな結合親和性を有する化合物を、アレルギー及び喘息を含むがこれらに限られないH4-媒介シグナル伝達に関連する病理学的状態の処置における治療薬として特に有利に用いることができることが、当該技術分野における熟練者により認識されるであろう。本発明に従うと、下記の実施例にもっと詳細に記

40

50

載する通り、いくつかの種類化合物が上記の必要な結合及び化学走性 - 調節の特徴を有することが示された。

【0040】

本発明は、そのいくつかの側面の1つにおいて、哺乳類ヒスタミンH4受容体をコードするDNA又はRNAの発現ならびに哺乳類ヒスタミンH4受容体タンパク質の機能を試験管内及び生体内で調節する化合物のスクリーニングのための方法も目的とする。これらの活性を調節する化合物は、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質又は非-タンパク質性有機分子であることができる。化合物は、哺乳類ヒスタミンH4受容体をコードするDNA又はRNAの発現あるいは哺乳類ヒスタミンH4受容体タンパク質の機能を向上させるかもしくは減衰させることにより調節することができる。哺乳類ヒスタミンH4受容体

10

【0041】

受容体結合又は本明細書に記載される他の機構を介する哺乳類ヒスタミンH4受容体活性のモジュレーターを含んでなる製薬学的に有用な組成物を既知の方法に従って、例えば

20

製薬学的に許容され得る担体の混合により、調製することができる。そのような担体及び調製法の例は、Remington's Pharmaceutical Sciencesに見出すことができる。有効な投与に適した製薬学的に許容され得る組成物の調製のために、そのような組成物はモジュレーター又は他の生物学的に活性な薬剤の有効量を含むであろう。

【0042】

本発明の治療用又は診断用組成物は、哺乳類ヒスタミンH4受容体 - 関連活性の調節が必要である障害の処置又は診断に十分な量で患者に投与される。有効量は、患者の状態、体重、性別及び年齢のような多様な因子に従って変わり得る。他の因子には投与の様式が含まれる。皮下、局所的、経口的、鼻内及び筋肉内のような多様な経路により製薬学的組成物を患者に与えることができる。

30

【0043】

「化学的誘導体」という用語は、通常は基本分子の一部ではない追加の化学的置換基もしくは部分を含む分子を記述する。そのような部分は、基本分子の溶解度、半減期、吸収などを向上させることができる。あるいはまた、該部分は基本分子の望ましくない副作用を減衰させることができるか、あるいは基本分子の毒性を低下させることができる。そのような部分の例は、Remington's Pharmaceutical Sciencesのような多様な教本に記載されている。

【0044】

本明細書に開示される方法に従って同定される化合物を、日常的な試験により規定される適した投薬量で単独で用い、可能な毒性を最小にしながら哺乳類ヒスタミンH4受容体もしくはその活性の最適障害を得ることができる。さらに、他の薬剤の共-投与又は逐次的投与は望ましいかも知れない。

40

【0045】

本発明は、別のいくつかの側面において、本発明の処置法における使用のための適した局所用、経口用、全身用及び非経口用製薬学的調剤も提供する。哺乳類ヒスタミンH4受容体の調節において用いるための活性成分として、本発明に従って同定される化合物又はモジュレーターを含む組成物を、投与のための通常のビヒクル中の多様な治療用投薬形態物において投与することができる。例えば化合物又はモジュレーターを錠剤、カプセル(それぞれ時機放出(timed release)及び徐放性調剤を含む)、丸

50

薬、粉剤、顆粒剤、エリキサー、チンキ剤、溶液、懸濁剤、シロップ及び乳剤のような経口的投薬形態物において、あるいは注入により投与することができる。同様に、それらを静脈内（ボラス及び輸液の両方）、腹腔内、皮下、閉塞（occlusion）を用いるかもしくは用いない局所的あるいは筋肉内形態で投与することもでき、すべて製薬学的技術分野における通常の熟練者に周知の形態物を用いる。有効だが無毒性の量の所望の化合物を、哺乳類ヒスタミンH4受容体 - 調節剤として用いることができる。

【0046】

製品の1日の投薬量は、1日当たり患者につき0.01~1,000mgの広い範囲に及んで変わることができる。経口的投与の場合、組成物は、処置されるべき患者への投薬量の症状的調整のために、好ましくは0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0及び50.0ミリグラムの活性成分を含有する刻み付きもしくは非 - 刻み付き錠剤の形態で与えられる。薬剤の有効量は通常1日当たり体重のkgにつき約0.0001mg~約100mgの投薬量レベルで供給される。範囲は、さらに特定のには1日当たり体重のkgにつき約0.001mg~10mgである。哺乳類ヒスタミンH4受容体モジュレーターは、組み合わせられる場合、所望の効果を達成するために調節される。他方、これらの種々の薬剤の投薬量を独立して最適化し、組み合わせ、いずれかの薬剤が単独で用いられる場合より病状が軽減する相乗的結果を達成することができる。

10

【0047】

処置の必要のある患者の気道に送達するために、組成物は好ましくはエアゾールとして調製され、それを鼻的に、又は当該技術分野で周知の通り吸入器により送達することができる。活性成分の量は、標準的方法に従ってこの送達の形態のために調節される。

20

【0048】

有利には、本発明の化合物又はモジュレーターを1日1回の投薬量において投与することができるか、あるいは1日の合計投薬量を1日2、3又は4回の分割された投薬量において投与することができる。さらに、経口的及び鼻内/吸入送達の他に、当該技術分野における通常の熟練者に周知の経皮パッチの形態を用い、経皮経路を介して本発明の化合物又はモジュレーターを投与することができる。経皮送達系の形態で投与するために、投薬量の投与はもちろん投薬管理を通じて断続的ではなくて継続的であろう。

30

【0049】

1種より多い活性薬剤を用いる組み合わせ処置のために、活性薬剤が分離された投薬調剤にある場合、活性薬剤を同時に投与することができるか、あるいはそれらをそれぞれ別々にずれた時期に投与することができる。

【0050】

本発明の化合物又はモジュレーターを用いる投薬管理は、患者の型、種、年齢、体重、性別及び医学的状态；処置されるべき状態の重度；投与の経路；患者の腎臓及び肝臓機能；ならびに用いられるそれらの特定の化合物を含む多様な因子に従って選ばれる。通常の熟練した医師又は獣医は、状態の進行を予防するか、それに対抗するか、又はそれを止めるのに必要な薬剤の有効量を容易に決定し、処方することができる。毒性なく有効性を生ずる範囲内の薬剤の濃度の達成における最適な精密さ（optimal precision）は、標的部位にとっての薬剤の利用性の速度論に基づく管理を必要とする。これには薬剤の分布、平衡及び消失の考慮が含まれる。

40

【0051】

本発明の好ましい方法において、活性薬剤成分又は成分（component or ingredient）は、1種もしくはそれより多い本明細書に記載される化合物又はモジュレーターを含むことができ、好ましくは目的とされる投与の形態、すなわち経口用錠剤、カプセル、エリキサー、シロップなどに関して適切に選ばれ、且つ通常の製薬学的習慣と一致する適した製薬学的希釈剤、賦形剤又は担体（本明細書で集合的に「担体」材料と呼ばれる）との混合物において投与され得る。

【0052】

50

例えば錠剤又はカプセルの形態における経口的投与の場合、単数種もしくは複数種の活性薬剤成分を経口用無毒性の製薬学的に許容され得る不活性担体、例えばエタノール、グリセロール、水などと合わせることができる。さらに、望ましいかもしくは必要な場合、適した結合剤、崩壊剤及び着色剤を混合物中に導入することもできる。適した結合剤にはデンプン、ゼラチン、天然の糖類、例えばグルコース又はベータ-ラクトース、コーン甘味料、天然及び合成ゴム、例えばアラビアゴム、トラガカント又はアルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ワックスなどが含まれるが、制限ではない。これらの投薬形態物中で用いられる滑沢剤にはオレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが含まれるが、制限ではない。崩壊剤にはデンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサントランゴムなどが含まれるが、制限ではない。

10

【0053】

液体形態物の場合、活性薬剤成分を、合成及び天然ゴム、例えばトラガカント、アラビアゴム、メチル-セルロースなどのような適切に風味付けられた懸濁化もしくは分散剤中で合わせることができる。用いられ得る他の分散剤にはグリセリンなどが含まれる。非経口的投与の場合、無菌の懸濁剤及び溶液が好ましい。一般に適した防腐剤を含有する等張調製物は、静脈内投与が望ましい場合に好ましい。

【0054】

活性薬剤成分を含有する局所用調製物を当該技術分野において周知の多様な担体材料、例えばアルコール、アロエベラゲル、アラントイン、グリセリン、ビタミンA及びE油、鉱油、PPG2プロピオン酸ミリスチルなどと混合し、例えばアルコール溶液、局所用クレンザー、クレンジングクリーム、皮膚用ゲル、皮膚ローション及びクリームもしくはゲル調剤中のシャンプーを形成することができる。

20

【0055】

本発明の化合物又はモジュレーターをリポソーム送達系、例えば小さい単層小胞、大きい単層小胞及び多層小胞の形態で投与することもできる。リポソームは、多様なリン脂質、例えばコレステロール、ステアリンアミン又はホスファチジルコリンから形成することができる。

【0056】

化合物分子をカップリングさせる個別の担体としてモノクローナル抗体を用いることにより、本発明の化合物を送達することもできる。本発明の化合物又はモジュレーターを、標的化可能な薬剤担体としての可溶性ポリマーとカップリングさせることもできる。そのようなポリマーにはポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピルメタクリル-アミドフェノール、ポリヒドロキシ-エチルアスパルタミドフェノール又はバルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリシンが含まれ得る。さらに、制御された薬剤の放出の達成に有用なある種の生分解性ポリマー、例えばポリ酢酸 (polylactic acid)、ポリε-ピロリドン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレート及びヒドロゲルの架橋されたもしくは両親媒性ブロックコポリマーに本発明の化合物又はモジュレーターをカップリングさせることができる。

30

40

【0057】

経口的投与のために、化合物又はモジュレーターをカプセル、錠剤又は大型丸剤形態で投与することができるか、あるいはまたそれらを動物の飼料と混合することができる。カプセル、錠剤及び大型丸剤は、適した担体ビヒクル、例えばデンプン、タルク、ステアリン酸マグネシウム又はリン酸二カルシウムと組み合わせられた活性成分を含む。これらの単位投薬形態物は、均一な混合物が得られるように、希釈剤、充填剤、崩壊剤及び/又は結合剤を含む適した微粉碎不活性成分と活性成分を緊密に混合することにより調製される。不活性成分は、化合物又はモジュレーターと反応せず、且つ処置されている動物に無毒性のものである。適した不活性成分にはデンプン、ラクトース、タルク、ステアリン酸マグネシウム、植物ゴム及び油などが含まれる。これらの調剤は、処置されるべき動物種の大

50

きさ及び型ならびに症状の型及び重度のような多数の因子に依存して広く変わり得る量の活性及び不活性成分を含有することができる。化合物を飼料材料と単に混合することにより、又は飼料の表面に化合物を適用することにより、活性成分を飼料への添加物として投与することもできる。あるいはまた活性成分を不活性担体と混合し、得られる組成物を次いで飼料と混合するか、又は動物に直接供給することができる。適した不活性担体にはコーン粉、柑橘類の粉、発酵残渣、あらひきダイズ (soy a g r i t s)、乾燥穀粒などが含まれる。活性成分は、最終的組成物が 0.001 ~ 5 重量%の活性成分を含有するように、微粉碎、攪拌、磨砕又はタンブリング (t u m b l i n g) によりこれらの不活性担体と緊密に混合される。

【0058】

あるいはまた、化合物又はモジュレーターを、不活性液体担体中に溶解された活性成分から成る調剤の注入を介して、非経口的に投与することができる。注入は筋肉内、管腔内、気管内又は皮下であることができる。注入可能な調剤は、適した不活性液体担体と混合された活性成分から成る。許容され得る液体担体には植物油、例えばピーナツ油、綿実油、ゴマ油などならびに有機溶媒、例えばソルケタール、グリセロールホルマルなどが含まれる。あるいはまた、水性非経口用調剤を用いることもできる。植物油は好ましい液体担体である。調剤は、最終的調剤が 0.005 ~ 10 重量%の活性成分を含有するように、活性成分を液体担体中に溶解するかもしくは懸濁させることにより調製される。

【0059】

化合物又はモジュレーターの局所的適用は、本化合物又はモジュレーターを水溶液もしくは水性懸濁液として含有する液体飲薬 (l i q u i d d r e n c h) 又はシャンプーの使用を介して可能である。これらの調剤は一般に懸濁化剤、例えばベントナイトを含有し、通常は消泡剤も含有するであろう。0.005 ~ 10 重量%の活性成分を含有する調剤が許容可能である。好ましい調剤は、0.01 ~ 5 重量%の本化合物又はモジュレーターを含有するものである。

【0060】

本発明の例示の目的で以下の実施例を提示するが、本発明はそれらに制限されない。

【実施例1】

【0061】

哺乳類発現ベクター中へのヒトヒスタミンH4受容体cDNAのクローニング
ヒトヒスタミンH4受容体cDNAs (集合的にpH4Rと呼ばれる)を哺乳類発現ベクターpCIneo中にクローニングした。ヒトヒスタミンH4受容体cDNAクローンをヒト視床cDNAライブラリから単離した。クローニングのために、EcoR1及びNot1部位を有する特異的プライマーを用いるPCRのための鋳型として全長cDNAを用いた。PCR産物をカラム(PromegaからのWizard PCR DNA精製キット)上で精製し、Not1及びEcoR1(NEB)で消化して付着末端を形成した。生成物を低融点アガロースゲル電気泳動により精製した。pCIneoベクターをEcoR1及びNot1酵素で消化し、続いて低融点アガロースゲル上で精製した。ヒトヒスタミンH4受容体cDNA挿入片への連結に線状ベクターを用いた。組換え体を単離し、ヒトヒスタミンH4受容体と称し、CaPO₄-DNA沈降による哺乳類細胞(SK-N-4MC細胞)のトランスフェクションに用いた。G418の存在下における生育により安定な細胞クローンを選択した。1種のG418耐性クローンが単離され、無損傷のヒトヒスタミンH4受容体遺伝子を含有することが示された。Konig et al. (Mol. Cell. Neurosci., 2(4), 1991年, 331-337)の方法に従ってヒスタミンに应答するアデニル酸シクラーゼの阻害を測定することにより、あるいはFlashplates(NEN)を用いるラジオイムノアッセイによってcAMP蓄積を直接測定することにより、ヒトヒスタミンH4受容体cDNAsを含有するクローンをpH4R発現に関して分析した。[³H]-ヒスタミン結合アッセイ(Clark et al. 著, Eur. J. Pharmacol., 210(1), 1992年, 31-35)を用いても発現を分析した。ヒトヒスタミンH4受容体をコードするDNAを含有

10

20

30

40

50

する組換えプラスミドを用い、哺乳類COS7又はCHO細胞あるいはHEK293又はL-細胞あるいはSK-N-MC細胞を形質転換した。

【0062】

安定して、又は過的にヒトヒスタミンH4受容体を発現する細胞を用い、ヒトヒスタミンH4受容体の発現及び $[^3\text{H}]$ -ヒスタミン結合活性に関して調べた。これらの細胞を用いて他の化合物を、ヒトヒスタミンH4受容体を調節、阻害もしくは活性化する、ならびに放射性ヒスタミン結合に関して競合するそれらの能力に関して同定し、且つ調べた。

【0063】

プロモーターに関して正の配向でヒトヒスタミンH4受容体cDNAを含有するカセットを、プロモーターの適した制限部位3'中に連結し、制限部位マッピング及び/又は配列決定により同定した。これらのcDNA発現ベクターを、エレクトロポレーション又は化学的方法(カチオン性リポソーム、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム)を含むがこれらに限られない標準的方法により、繊維芽細胞宿主細胞、例えばCOS-7(ATCC# CRL1651)及びCV-1tat[Sieckevitz et al. 著, Science, 238, 1987年, 1575-1578]、293, L(ATCC# CRL6362)、SK-N-MC(ATCC# HTB-10)中に導入した。トランスフェクションされた細胞及び細胞培養上澄み液を収穫し、本明細書に記載する通りにヒトヒスタミンH4受容体発現に関して分析した。

【0064】

哺乳類の一過的発現(transient expression)に用いられるベクターのすべてを、ヒトヒスタミンH4受容体を発現する安定な細胞系の確立に用いることができる。発現ベクター中にクローニングされた非改変ヒトヒスタミンH4受容体cDNA構築物は、ヒトヒスタミンH4受容体タンパク質を生産するように宿主細胞をプログラミングすると思われる。トランスフェクション宿主細胞にはCV-1-P[Sieckevitz et al. 著, 同上]、tk-L[Wigler et al. 著, Cell, 11(1), 1977年, 223-232]、NS/0及びdHFr-CHO[Randall J. Kaufman and Phillip A. Sharp 著, J. Mol. Biol. 159, 1982年, 601-621]が含まれるが、これらに限られない。

【0065】

ヒトヒスタミンH4受容体cDNAを、G418、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ;ハイグロマイシン、ハイグロマイシン-Bホスホトランスフェラーゼ;APRT、キサンチン-グアニンホスホリボシル-トランスフェラーゼを含むがこれらに限られない薬剤選択プラスミドと一緒に含有するベクターの共-トランスフェクションは、安定にトランスフェクションされた細胞の選択を可能にするであろう。ヒトヒスタミンH4受容体の量は、本明細書に記載されるアッセイにより定量される。

【0066】

ヒトヒスタミンH4受容体cDNA構築物を、可能な最高量のヒトヒスタミンH4受容体を合成する哺乳類細胞クローンの生産のために、増幅可能な薬剤-耐性マーカーを含有するベクター中にも連結した。細胞中へのこれらの構築物の導入に続き、プラスミドを含有するクローンを適した薬剤を用いて選択し、増加する用量の薬剤中における選択により、プラスミドの高いコピー数を有する過剰-発現クローンの単離が行なわれた。

【0067】

組換えヒトヒスタミンH4受容体の発現は、全長ヒトヒスタミンH4受容体cDNAの哺乳類宿主細胞中へのトランスフェクションにより達成された。

ヒトヒスタミンH4受容体の特性化

ヒトSK-N-MC細胞をpH4Rでトランスフェクションし、ネオマイシンの存在下で10日間選択した。個々のコロニーを採集し(picked)、6-ウェル皿中で生育させた。次いで細胞を96-ウェルプレート上に平板培養し、密集まで生育させた。細胞をイソブチルメチルキサンチン(1mM)と一緒に20分間インキュベーションした。ヒ

10

20

30

40

50

スタミン (100 pM ~ 100 μM) を用いて細胞を5分間刺激した。次いでフォルスコリン (3 μM) を用いて細胞を刺激し、37 °C で20分間インキュベーションした。細胞を0.1N HClで処理した。細胞を凍結し、解凍した。標準的 cAMP ラジオイムノアッセイキット (Flash plates, NEN) を用い、上澄み液のアリコートをしこれらのサイクリックAMP含有量に関して分析した。フォルスコリン処理はcAMPの細胞内濃度を向上させる。フォルスコリンに反応するcAMP含有量を減少させることによりヒスタミンに反応した細胞は、活性な機能性ヒトヒスタミンH4受容体を発現すると考えられた。本明細書に記載されるヒトヒスタミンH4受容体-コードDNA分子から発現される組換えヒトヒスタミンH4受容体は、ヒスタミンにより特異的に活性化されることが示された。

10

【実施例2】

【0068】

組換えヒトヒスタミンH4受容体についての結合アッセイ

SK-N-MC細胞又はCOS7細胞をpH4Rで過的にトランスフェクションし、150 cm² の組織培養皿中で生育させた。細胞を食塩溶液で洗浄し、細胞スクレーパー (cell scraper) でこすり取り、遠心 (1000 rpm, 5分) により集めた。高速で10秒間ポリトロン組織ホモジナイザーを用い、20mM Tris-HCl中で細胞ペレットを均質化することにより、細胞膜を調製した。ホモジネートを4 °C において1000 rpmで5分間遠心した。次いで上澄み液を集め、4 °C において20,000 x gで25分間遠心した。最終的ペレットを50mM Tris-HCl中に再懸濁させた。細胞膜を³H-ヒスタミン (5~70 nM) と一緒に、過剰のヒスタミン (1000 nM) の存在下又は不在下でインキュベーションした。インキュベーションは室温で45分間行なわれた。Whatman GF/Cフィルター上における迅速な濾過により膜を収穫し、氷-冷50mM Tris-HClで4回洗浄した。次いでフィルターを乾燥し、シンチラント (scintillant) と混合し、放射能に関してカウントした。ヒトヒスタミンH4受容体を発現するSK-N-MC又はCOS7細胞を用い、上記の混合物を種々の濃度の調べられるべき阻害剤又は化合物の存在下でインキュベーションすることにより、他の化合物の結合の親和性ならびに³H-リガンド結合に取って代わるそれらの能力を測定した。³H-ヒスタミンを用いる競合的結合研究のために、実験的に決定される5 nMのK_D値及び5 nMのリガンド濃度に基づき、Cheng及びPrusoff (Biochem. Pharmacol., 22, 1973年, 3099-3108) : $K_i = (IC_{50}) / (1 + ([L] / (K_D)))$ に従ってK_i値を算出した。

20

30

【0069】

競合的結合研究の結果を、3種類の化合物の範囲内の種々の化合物に関して表1に示し、それらは米国特許出願公開第10/094,357号明細書 (国際公開第02/072548号パンフレットも参照されたい)、米国暫定出願第60/408,569号明細書ならびに米国暫定出願第60/408,723号明細書に記載されている通りに製造することができ、これらの明細書の開示は引用することによりその記載事項が本明細書の内容となる。

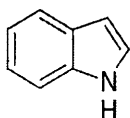
40

【0070】

1つの種類は頭部基 (head group)

【0071】

【化1】



【0072】

1H-インドールを含み、本明細書で「インドール」種と呼ばれる。

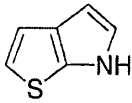
【0073】

50

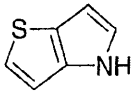
他の種類は以下の頭部基の1つを含み、本明細書で「二環式ピロール」種と呼ばれる：

【0074】

【化2】

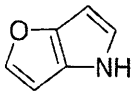


6H-チエノ[2,3-b]ピロール



4-チエノ[3,2-b]ピロール

10



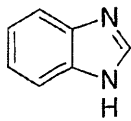
4H-フロ[3,2-b]ピロール

【0075】

第3の種類は頭部基

【0076】

【化3】



【0077】

1H-ベンゾイミダゾールを含み、本明細書で「ベンゾイミダゾール」種と呼ばれる。

表1

30

化合物	K_i (nM)
(5-クロロ-7-メチル-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	1
(2-クロロ-3-メチル-4H-チエノ[3,2-b]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	3
(5-クロロ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	5
(2,3-ジメチル-4H-チエノ[3,2-b]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	5
(2,3-ジクロロ-4H-チエノ[3,2-b]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	5.5
(7-メチル-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	6.6
(7-アミノ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	7
(5-プロモ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	8
(5,7-ジクロロ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	10
(5-クロロ-1H-インドール-2-イル)-ピペラジン-1-イル-メタノン	10

50

(2 , 3 - ジクロロ - 6 H - チエノ [2 , 3 - b] ピロール - 5 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 0	
(5 - メチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 1	
(4 , 5 - ジクロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 1	
(4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (5 - トリフルオロメチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - メタノン	1 1	
(5 - フルオロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 8	10
(5 , 7 - ジフルオロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 9	
(5 - アミノ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 9	
(5 - ヒドロキシ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 9	
(4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (3 - メチル - 4 H - チエノ [3 , 2 - b] ピロール - 5 - イル) - メタノン	2 1	
(7 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	2 3	20
(5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - [4 - (2 - ヒドロキシ - エチル) - ピペラジン - 1 - イル] - メタノン	2 5	
(2 - クロロ - 6 H - チエノ [2 , 3 - b] ピロール - 5 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	2 5	
(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	2 5	
(5 - フルオロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	2 6	
(5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (3 , 4 - ジメチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	2 7	30
(5 , 6 - ジフルオロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	2 8	
(5 , 7 - ジメチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	3 0	
(2 - クロロ - 3 - メチル - 4 H - チエノ [3 , 2 - b] ピロール - 5 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノン	3 0	
(4 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	3 1	
(1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	3 2	40
(6 - ヒドロキシ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	3 2 . 5	
(5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - ((R) - 3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	3 4	
(5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - ((S) - 3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	3 6	
(4 - プロモ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	4 0	
(2 - クロロ - 4 H - チエノ [3 , 2 - b] ピロール - 5 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	4 0	50

(5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	4 1	
(5 - フルオロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタ ノン	4 2	
(7 - アミノ - 1 H - インドール - 2 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノン	4 3	
(4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (5 - ニトロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - メタノン	4 6	
(7 - ヒドロキシ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イ ル) - メタノン	4 7	
(6 - クロロ - 5 - フルオロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	5 3	10
(7 - プロモ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	5 5	
(2 - クロロ - 6 H - チエノ [2 , 3 - b] ピロール - 5 - イル) - ピペラジン - 1 - イ ル - メタノン	5 6	
(3 - プロモ - 4 H - チエノ [3 , 2 - b] ピロール - 5 - イル) - (4 - メチル - ピペ ラジン - 1 - イル) - メタノン	5 6	
(3 - メチル - 4 H - チエノ [3 , 2 - b] ピロール - 5 - イル) - ピペラジン - 1 - イ ル - メタノン	8 0	
(4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (6 H - チエノ [2 , 3 - b] ピロール - 5 - イル) - メタノン	8 5	20
(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノ ン	8 7	
1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - カルボン酸 (8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - アミド	8 9	
(5 - プロモ - ベンゾフラン - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メ タノン	9 5	
(1 H - インドール - 2 - イル) - (3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 0 0	
(1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 1 7	30
(6 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 2 4	
(4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (4 H - チエノ [3 , 2 - b] ピロール - 5 - イル) - メタノン	1 2 5	
(1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタンチオ ン	1 3 2	
(4 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノ ン	1 3 5	
(2 , 3 - ジメチル - 4 H - フロ [3 , 2 - b] ピロール - 5 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 4 0	40
[5 - (3 - メトキシ - フェニル) - 1 H - インドール - 2 - イル] - (4 - メチル - ピ ペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 4 5	
(4 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	1 5 6	
(3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (3 - メチル - 4 H - チエノ [3 , 2 - b] ピ ロール - 5 - イル) - メタノン	1 6 1	
(2 - クロロ - 6 H - チエノ [2 , 3 - b] ピロール - 5 - イル) - (ヘキサヒドロ - ピ ロロ [1 , 2 - a] ピラジン - 2 - イル) - メタノン	1 7 6	
(6 - プロモ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル)		50

- メタノン	1 8 8
5 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - カルボン酸 (8 - メチル - 8 - アザ - ピシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - アミド	6 1 3
(3 - プロモ - 4 H - チエノ [3 , 2 - b] ピロール - 5 - イル) - (3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン	9 8 0

【実施例 3】

【0078】

哺乳類ヒスタミンH4受容体へのリガンド結合

ラット、マウス、モルモット及びヒトヒスタミンH4受容体に関する³H-ヒスタミンの親和性を、本明細書に記載される標準的方法を用いて決定した。適したヒスタミンH4受容体が安定にトランスフェクションされたSK-N-MC細胞からの膜につき、飽和結合を行なった。Scatchardプロット(結合/遊離対結合)の線形回帰の-1/傾斜からK_D値を誘導した。結果を表2に示す。

10

【0079】

【表5】

表2

種	³ H-ヒスタミンK _d (nM)
ラット	105
ネズミ	34
モルモット	20
ヒト	5

20

【0080】

数種の既知のヒスタミン受容体リガンドの相対的親和性を、30 nMの³H-ヒスタミンの競合的結合により決定した。Cheng及びPruscoff (K_i = IC₅₀ / (1 + [³H-ヒスタミン] / K_d))の方法に従って、各リガンドに関するK_i値を算出した。³H-ヒスタミンに関するK_D値は表2に示したものであった。結果を表3に示す。

30

【0081】

【表6】

表3

化合物	ヒト K _i (nM)	モルモットK _i (nM)	ラットK _i (nM)	ネズミ K _i (nM)
イメチト	1.3	30	6.8	6.6
ヒスタミン	5.9	27	70	41
クロベンプロピト	4.9	3.6	63	14
N-メチルヒスタミン	48	220	552	303
チオペラミド	52	83	28	22
R-α-メチルヒスタミン	144	486	698	382
ブリナミド	124	840	958	696
クロザピン	626	185	2200	2780

40

【実施例 4】

【0082】

ヒスタミンH4受容体アンタゴニストによる試験管内におけるヒスタミン-誘導マスト細胞化学走性の阻害

50

この実施例は、ヒスタミンH4受容体アンタゴニストが刺激に应答するマスト細胞の化学走性应答を遮断できるという発見を初めて示す。

方法

骨髓マスト細胞培養

BALB/c又はC57bl/6jマウスに由来する骨髓からマスト細胞を分化させた。マウスを95%CO₂下で窒息により犠牲にし、大腿骨を取り出した。大腿骨から骨髓を無菌的に単離した。10%FCS、0.1mM非-必須アミノ酸、50µg/mLペニシリン/ストレプトマイシン及び20%条件WEHI-3培地(conditional WEHI-3 medium)を含むRPMIから成る培地中で、37において5%CO₂を用い、細胞(5×10⁵個/mL)を培養した。条件WEHI-3培地は、10%FCS、4mML-グルタミン、1.5g/L炭酸ナトリウム、0.05µMベータ-メルカプトエタノール及び50µg/mLペニシリン/ストレプトマイシンを含むIscoves Dulbeccos培地中で培養されたWEHI-3細胞(ATCC)から調製された。濾過された上澄み液を条件WEHI-3培地として用いた。培養中で16時間の後、骨髓細胞を新しいフラスコに移した。培地を1週間に1回新しくした。4週間後、IgE受容体及びCD117(c-kit)発現に関してフローサイトメトリーにより細胞を調べた。マスト細胞を抗-DNP IgE(ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA)又はビヒクルと一緒に30分間インキュベーションし、続いてFITC標識抗-IgE(Pharmingen)又はFITC標識CD117(Pharmingen)と一緒に氷上で30分間インキュベーションした。培養されたマスト細胞は均一な集団から成り、それは>99% IgE受容体陽性且つ>99%CD117陽性であった。4~8週間の培養時間のマスト細胞を実験に用いた。

10

20

化学走性アッセイ

8µmの孔寸法のトランスウェル(Transwells)(Costar, Cambridge, MA)に、100ng/mLのヒトフィブロネクチン(Sigma)の100µLを室温で2時間コーティングした。フィブロネクチンの除去の後、ヒスタミン(1.25~20µMの範囲)の存在下で5%BSAを含む600µLのRPMIを下の室に加えた。種々のヒスタミン受容体アンタゴニストを調べるために、化合物の10µM溶液を上及び下の室に加えた。マスト細胞(2×10⁵個/ウェル)を上室に加えた。プレートを37で3時間インキュベーションした。トランスウェルを取り出し、下の室中の細胞の数を、フローサイトメーターを用いて60秒間カウントした。

30

結果

ヒスタミンはH4受容体を介して化学走性を媒介する。

【0083】

トランスウェルシステムを用い、ヒスタミンに向かうマスト細胞の化学走性能力を研究した。マスト細胞を上室に加え、ヒスタミンを下室に加えた。ヒスタミンは、下の室中の移動マスト細胞における用量-依存的増加を誘導した(図1)。

【0084】

特異的ヒスタミン受容体アンタゴニストを用い、どのヒスタミン受容体がヒスタミンに向かう化学走性を担うかを区別した。ヒスタミンH1、H2又はH3受容体に関して特異的なアンタゴニストは、ヒスタミン-誘導化学走性を変化させなかった(図2)。しかしながら、特異的ヒスタミンH4受容体アンタゴニストは、用量-依存的やり方でマスト細胞化学走性を阻害した(図2及び3)。

40

【0085】

下記の表4に示される結果は、化合物のK_iとマスト細胞化学走性を阻害するその能力の間の正の関連性を示し;すなわち一般に化合物がより有力な程、阻害が優れている。

【0086】

【表 7】

表4

化合物	K _i (nM)	% 阻害 10 μM	% 阻害 1 μM
(5-クロロ-7-メチル-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	1	97	100
(7-アミノ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	7		99
(5-クロロ-1H-インドール-2-イル)-ピペラジン-1-イル-メタノン	10		99
(5,7-ジフルオロ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	19		100
(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-(3-メチル-4H-チエノ[3,2-b]ピロール-5-イル)-メタノン	21		60
(2-クロロ-6H-チエノ[2,3-b]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	25	106	103
(5-クロロ-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	25	97	84
(5,6-ジフルオロ-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	28	97	72
(2-クロロ-4H-チエノ[3,2-b]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	40		92
(5-クロロ-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-ピペラジン-1-イル-メタノン	87	101	8
(2-クロロ-6H-チエノ[2,3-b]ピロール-5-イル)-(ヘキサヒドロ-ピロロ[1,2-a]ピラジン-2-イル)-メタノン	176	0	0
5-メチル-1H-ベンゾイミダゾール-2-カルボン酸(8-メチル-8-アザ-ビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル)-アミド	613	27	66
(3-ブromo-4H-チエノ[3,2-b]ピロール-5-イル)-(3-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン	980	0	0
インドール標準	>10K	0	0
二環式ピロール標準	>10k	0	0
ベンゾイミダゾール標準	>10k	0	0

10

20

【実施例 5】

30

【0087】

生体内におけるヒスタミンH₄受容体アンタゴニストによる
ヒスタミン-誘導マスト細胞化学走性の阻害

10匹の雌のBa1b/cマウス(8~12週)のグループを食塩水標準又は0.1Mヒスタミンのエアゾールに、連続する2日に20分間暴露した。エアゾールでヒスタミンが与えられるマウスに、各エアゾールから15分前に食塩水又は20mg/kgのH₄モジュレーター(5-クロロ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノンを、皮下経路(5ml/kg)を介して予備-投薬した。最終的なエアゾール投与から4時間後、ペントバルビトン過剰投薬を介してマウスを犠牲にし、気管の切片を取り出し、ホルマリン中で固定した。気管のパラフィン包埋及び縦切開を行い、トルイジンブルーを用いてマスト細胞を染色した。マスト細胞を、各気管切片内のそれらの位置に依存して、粘膜-下又は上皮-下として定量した。Student's非対称t-試験を用いて統計を行なった。結果(図4)は、ヒスタミンが上皮-下空間中へのマスト細胞の移動を誘導することを示す。そのような動きは、アレルゲン暴露されると起こると思われるものに類似している。この移動を特異的H₄受容体アンタゴニストにより妨げることができる。

40

【実施例 6】

【0088】

喘息及びアレルギー性鼻炎の動物モデルにおける
H₄受容体アンタゴニストによるマスト細胞化学走性の阻害

50

マスト細胞がアレルギー性炎症に应答して蓄積するという観察ならびにこの蓄積をH4受容体アンタゴニストにより妨害できるという観察を調べるために、この実施例において示される動物モデルを用いる。本発明の化合物をこのモデルにおいて調べ、アレルギー性鼻炎又は喘息のための処置薬としてのそれらの使用を示す。0日及び14日にオボアルブミン/ミョウバン(0.2 mLのAl(OH)₃中の10 µg; 2%)の腹腔内注入によりマウスを感作する。21日から23日まで、PBS又はオボアルブミンによりマウスに挑戦し、24日に、最後の挑戦から24時間後にマウスを犠牲にする。気管の切片を取り出し、ホルマリン中で固定する。気管のパラフィン包埋及び縦切開を行い、続いてトルイジンブルーでマスト細胞を染色する。あるいはまた、凍結切開のために気管をOCT中で凍結し、IgE染色によりマスト細胞を同定する。各気管切片内におけるマスト細胞の位置に依存して、それらを粘膜-下又は上皮-下として定量する。アレルゲンへの暴露は上皮-下マスト細胞の数を増加させ、この効果を遮断するH4受容体アンタゴニストの能力が測定される。

10

【実施例7】

【0089】

ヒスタミンH4受容体アンタゴニストによる好塩基性細胞化学走性の阻害

標準的方法(Tsang et al. 著, Immunological Methods, 233(1-2), 2000年, 13-20)を用い、ヒト血液から好塩基性細胞を単離する。室温で2時間、100 ng/mLのヒトフィブロネクチン(Sigma)の100 µLがコーティングされた8 µmの孔寸法のトランスウェル(Costar, Cambridge, MA)を用い、化学走性アッセイを行なうことができる。フィブロネクチンの除去の後、ヒスタミン(1.25~20 µMの範囲)の存在下で5% BSAを含む600 µLのRPMIを下の室に加える。種々のヒスタミン受容体アンタゴニストを調べるために、化合物の10 µM溶液を上及び下の室に加えることができる。好塩基性細胞を上のに加えることができる。プレートを37 °Cで3時間インキュベーションする。Transwellsを取り出し、下の室中の細胞の数を、フローサイトメーターを用いて60秒間カウントすることができるか、あるいはWrightの染色を用いる染色による定量することができる。

20

【実施例8】

【0090】

抗原への暴露後の患者における

マスト細胞及び好塩基性細胞集団における増加の測定

ネコのふけ又は草の花粉のような特定のアレルゲンにアレルギーを有する患者に、直接気管支投与又は他の方法を介し、適切な抗原で挑戦する。気管支粘膜及び鼻粘膜中のマスト細胞及び好塩基性細胞の数を、組織生検の後に標準的な免疫組織化学的染色法を用いて定量する。抗原の挑戦の後のマスト細胞及び好塩基性細胞の増加へのヒスタミンH4受容体モジュレーターの効果、抗原の挑戦の前に複数の異なる経路によりモジュレーターを投与することによって研究する。

30

【実施例9】

【0091】

患者における組織マスト細胞及び好塩基性細胞集団の測定

アレルギー性鼻炎及び/又は喘息を有する患者は、健康な被験者に比べて彼らの気道中のマスト細胞及び好塩基性細胞の両方が増加していることが既知である。気道中に存在するマスト細胞及び好塩基性細胞の集団へのヒスタミンH4受容体モジュレーターの効果、与えられた期間、複数の異なる経路によりモジュレーターを投与することによって調べる。処置の前、その間及びその後の気道中に見出されるマスト細胞及び好塩基性細胞の数の比較を行なうことができる。組織生検の後、標準的免疫組織-化学的染色法を用いて細胞を定量する。

40

【実施例10】

【0092】

50

ヒスタミンH4受容体アンタゴニストを用いる、
患者における喘息又はアレルギー応答の処置

アレルギー又は喘息の患者にヒスタミンH4受容体アンタゴニスト又はプラシーボを、与えられた期間与える。喘息の処置の経過中ずっと、患者の重度の得点、1秒間の努力呼吸肺活量(FEV1)及び気管支収縮薬に関する気管支高反応性(BHR)を測定する。ヒスタミンH4受容体アンタゴニストを用いる処置の後の喘息の重度の得点における減少、FEV1における増加及びBHRにおける低下はすべて、疾患への正の効果の指標である。さらに、ヒスタミンH4受容体アンタゴニストを用いて処置した時の炎症応答における低下を、可溶性インターロイキン2受容体(sIL-2R)、IL-4及び可溶性細胞内付着分子1(sICAM-1)の血清濃度；末梢血好酸球カウント；ならびに好酸球性カチオン性タンパク質(ECP)における変化により決定することができる。さらに、気管支生検を用い、炎症細胞集団、例えば好酸球、T細胞、マスト細胞、好塩基性細胞などにおける変化を定量することができる。

10

【実施例11】

【0093】

ヒスタミンH4受容体アンタゴニストを用いる、
患者におけるアレルギー応答の処置

アレルギー性鼻炎を有する患者にヒスタミンH4受容体アンタゴニスト又はプラシーボを、与えられた期間与える。昼間の鼻の症状の得点(うっ血、かゆみ及びくしゃみの平均)、目の症状、夜間の症状、個々の昼間の鼻の症状、全体的な評価(患者の及び医師の)ならびに生活の質の得点の比較により、有効性を測定する。さらに、アレルギー性結膜炎への効果を、眼の赤さ、かゆみ及び症状のない日数の測定を用いて定量することができる。

20

【実施例12】

【0094】

ヒスタミンH4受容体アンタゴニストによる
ヒスタミン-誘導好酸球形変化の阻害

この実施例は、ヒスタミンH4受容体アンタゴニストが、ヒスタミンへのヒト好酸球の形変化応答を遮断できることを示す。好酸球における形の変化は、付着、化学走性、脱顆粒及び食作用を含む数種の生物学的結果の1つもしくはそれより多くに導く初期の事象である。これらの下流の事象は、アレルギー性鼻炎及び喘息を含むアレルギー及び他の炎症/免疫応答を伴う。

30

方法

ヒト顆粒球をFicoll勾配によりヒト血液から単離した。5-10X Qiagen溶解バッファーを用い、室温で5~7分間赤血球を溶解した。顆粒球を収穫し、FACS緩衝液で1回洗浄した。反応緩衝液中でmL当たり 2×10^6 個の細胞の密度において細胞を再懸濁させた。特異的ヒスタミン受容体アンタゴニストによる阻害を調べるために、90 μ Lの細胞懸濁液($\sim 2 \times 10^5$ 個の細胞)を、種々の試験化合物の溶液の1つの10 μ Mと一緒にインキュベーションした。30分後、種々の濃度のヒスタミンの1つの11 μ Lを加えた。10分後、細胞を氷に移し、250 μ Lの氷-冷固定緩衝液(2%ホルムアルデヒド)を用いて1分間固定した。ゲート自己蛍光前進散乱アッセイ(gated autofluorescence forward scatter assay)(GAFS)(Byran et al. 著, Am. J. Crit. Care Med., 165, 2002年, 1602-1609)を用い、形の変化を定量した。

40

結果

下記の表中のデータは、ヒスタミンが好酸球における用量-依存的な形の変化を誘導することを示す。どのヒスタミン受容体が形の変化を担うのかを区別するために、ヒスタミン受容体(HR)アンタゴニストを用いた。ヒスタミンH1受容体に特異的なアンタゴニスト(ジフェンヒドラミン)又はH2受容体に特異的なアンタゴニスト(ラナチジン)は、ヒスタミン-誘導形変化を変更させなかった。しかしながら、二重(dual)H3/

50

H₄アンタゴニスト（チオペラミド（thiopramide））及び特異的ヒスタミンH₄受容体アンタゴニスト、（5-クロロ-1H-インドール-2-イル）-（4-メチル-ピペラジン-1-イル）-メタノン（K_i = 5 nM）は、それぞれ1.5及び0.27 μMのIC₅₀でヒスタミン-誘導好酸球形変化を阻害した。データを表5に示す。

【0095】

【表8】

表5

ヒスタミン (μM):	変化倍率				
	10	1	0.1	0.01	0
HRアンタゴニスト なし	1.34	1.31	1.21	1.01	1.00
10 μM H ₄ アンタゴニスト	1.09	1.05	1.05	1.01	1.00
10 μM チオペラミド	1.08	1.05	1.01	1.04	1.00
10 μM ジフェンヒドラミン	1.63	1.50	1.18	1.03	1.00
10 μM ラナチジン	1.64	1.49	1.21	1.04	1.00

10

20

【実施例13】

【0096】

H₄受容体アンタゴニストはヒトアレルギー性炎症のモデルにおける応答を調節する。この実施例は、H₄受容体アンタゴニストが動物において、ヒトアレルギー性炎症に関する通常の動物モデルであるオボアルブミン-誘導肺炎症へのアレルギー応答を調節することを示す。

30

方法

動物への感作及び挑戦

0日及び14日に、オボアルブミン/ミョウバンの腹腔内注入により、マウス（n = グループ当たり8）を感作した。21日から24日の毎日、PBS又はオボアルブミンを用いる20分間の挑戦の前に、ピヒクル又は（5-クロロ-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル）-（4-メチル-ピペラジン-1-イル）-メタノンをを用いてマウスを15分間予備処置した。

代表的H₄受容体アンタゴニストの投与

1つの実験において、（5-クロロ-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル）-（4-メチル-ピペラジン-1-イル）-メタノンを5、20又は50 mg/kgにおいて経口的に投与した。第2の実験において、（5-クロロ-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル）-（4-メチル-ピペラジン-1-イル）-メタノンを0.5、2又は5 mg/kgにおいて経口的に投与した。第3の実験において、（5-クロロ-1H-インドール-2-イル）-（4-メチル-ピペラジン-1-イル）-メタノンを20、60又は100 mg/kgにおいて皮下的に投与した。

40

細胞測定/データ収集

最後の挑戦から24時間後、マウスを犠牲にし、気管支肺胞洗浄（BAL）液中の細胞の合計数ならびに示差細胞カウントを決定した。

気道高-応答性監視

オボアルブミン-感作動物における気道高-応答性を、意識のあるマウスにおいて全身

50

プレチスモグラフィ (B u x c o) により監視した。マウス (n = グループ当たり 8) を細胞測定のために上記の通りに処置した。

結果

B A L 液の分析

オボアルブミンを用いる挑戦の後、B A L 液中の細胞の合計数における劇的な増加があり、それは主に好酸球の数の増加の故であった。図 5 に示す通り、合計細胞数及び好酸球の数の両方は、5 m g / k g 及びそれより多い (5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンのすべての用量において有意に減少した。好酸球の数における最大の減少は 5 0 % であった。好酸球における最大減少を与えた同じ用量は、リンパ球の数も有意に減少させた。調べられた最高の用量 (5 0 m g / k g) において、マクロファージの数における減少及び好中球の数における増加があった。マクロファージにおける減少は、第 2 の実験において 5 m g / k g の用量でも見られた。これらのデータは、(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンのような H 4 受容体アンタゴニストが抗 - 炎症性を有することを示す。

10

【 0 0 9 7 】

別の H 4 受容体アンタゴニスト、(5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンもこのモデルで調べた。図 6 は、B A L 液中の示差細胞カウントに関する結果を示す。合計細胞数及び好酸球の数の両方が 6 0 及び 1 0 0 m g / k g の (5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンにおいて有意に減少した。好酸球の数における最大減少は 5 0 % であった。好酸球における減少を与えた同じ用量において、リンパ球の数も有意に減少した。

20

気道高 - 応答性の分析

メタコリンへの気道高 - 応答性の応答を図 7 に示す。感作された動物の最後のオボアルブミン挑戦から 2 4 時間後、気管支収縮の指数である P e n h (増強休止期 (e n h a n c e d p a u s e)) により測定される通り、メタコリンへの気道の応答における劇的な向上があった。この高 - 応答性は、最初の 3 つの用量のいずれにおいても、(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンを用いる処置により低下した。これらのデータは、H 4 受容体アンタゴニストが気道炎症を妨げるのみでなく、アレルギー性気道高活性にも影響し、かくしてヒトにおけるアレルギー及び / 又は喘息の処置において有用であろうことを示す。

30

【 0 0 9 8 】

本発明の特徴及び利点は当該技術分野における通常の熟練者に明らかである。概略、詳細な記述、背景、実施例、図面及び請求項を含む本開示に基づき、当該技術分野における通常の熟練者は、種々の条件及び利用に修正及び応用を成し得るであろう。これらの他の態様も本発明の範囲内である。本明細書で引用された公開文献は、そのような引用によりそれらの全体が本明細書の内容となる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 9 】

【 図 1 】 ヒスタミンに応答したマウス骨髄 - 由来マスト細胞化学走性。

【 図 2 】 ヒスタミンに応答したマウス骨髄 - 由来マスト細胞の化学走性は、ヒスタミン H 4 受容体 - 特異的アンタゴニストにより遮断され得るが、H 1、H 2 又は H 3 受容体アンタゴニストによっては遮断されないことを示す図。

【 図 3 】 ヒスタミンに応答したマウス骨髄 - 由来マスト細胞の化学走性は、3 8 n M の I C ₅₀ を有するヒスタミン H 4 受容体 - 特異的アンタゴニストにより遮断され得ることを示す図。

【 図 4 】 マウス気管におけるマスト細胞の生体内ヒスタミン - 誘導蓄積は、ヒスタミン H 4 受容体 - 特異的アンタゴニストにより妨げられ得ることを示す図。

【 図 5 A 】 H 4 受容体アンタゴニスト、(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 -

40

50

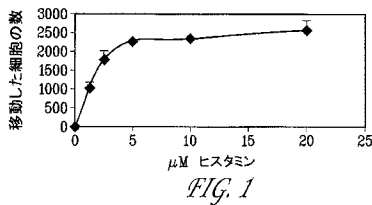
イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンを用いて処置されたマウスにおける、オボアルブミン - 誘導肺炎症モデルからの気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の示差細胞カウント。

【図 5 B】H4 受容体アンタゴニスト、(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンを用いて処置されたマウスにおける、オボアルブミン - 誘導肺炎症モデルからの気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の示差細胞カウント。

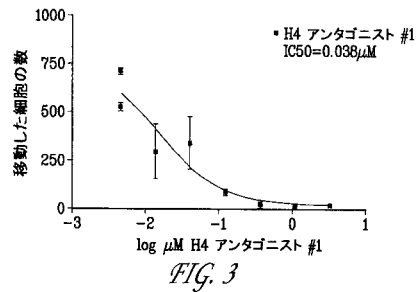
【図 6】H4 受容体アンタゴニスト (5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンを用いて処置されたマウスにおける、オボアルブミン - 誘導肺炎症モデルからの BAL 液中の示差細胞カウント。

【図 7】マウス中のオボアルブミン - 誘導肺炎症モデルにおける気道高 - 反応性への H4 受容体アンタゴニスト、(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノンの効果。

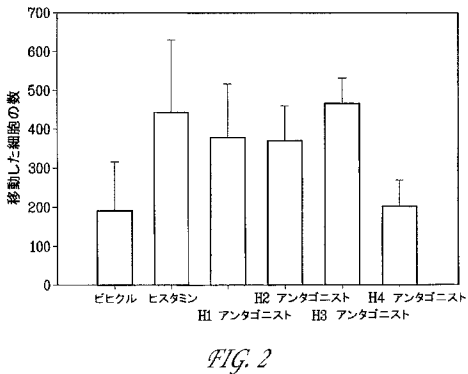
【 図 1 】



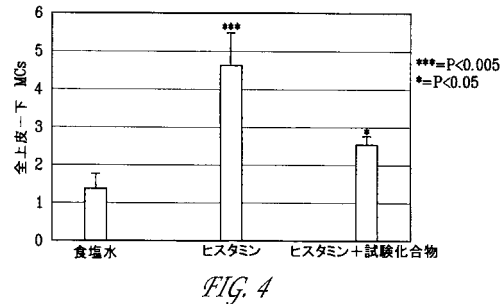
【 図 3 】



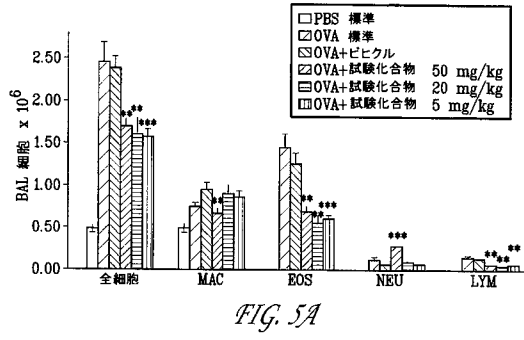
【 図 2 】



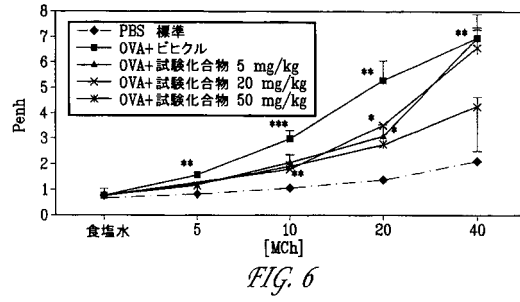
【 図 4 】



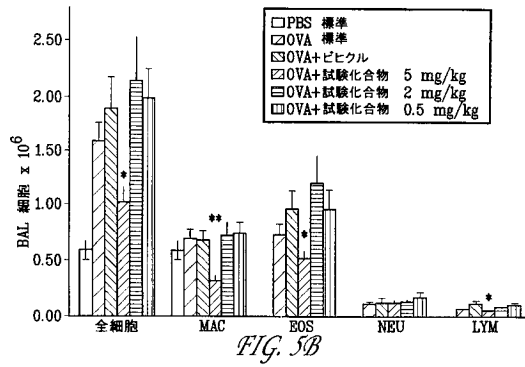
【 図 5 A 】



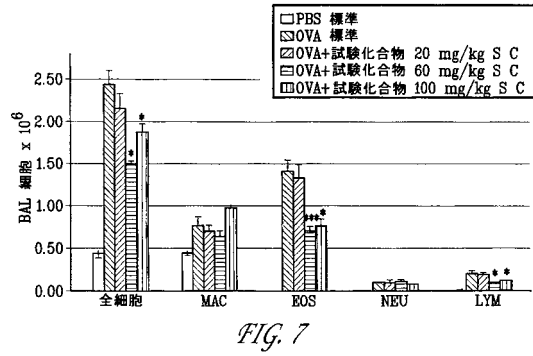
【 図 6 】



【 図 5 B 】



【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/27943
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 39/00, 47/00; C07K 16/00; G01N 33/53 US CL : 424/185.1, 278.1; 435/7.21; 530/388.1 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) U.S. : A61K 39/00, 47/00; C07K 16/00; G01N 33/53		
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/85786 A2 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION, 15 November 2001 (15.11.2001), see entire document.	1-31
Y	WO 01/92485 A1 (ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC., 06 December 2001 (06.12.2001), see entire document.	1-31
Y	WO 02/056871 A2 (PFIZER LIMITED) 25 July 2002 (25.07.2002), see entire document.	1-31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 15 March 2004 (15.03.2004)		Date of mailing of the international search report 28 JUL 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 872-9306		Authorized officer <i>Valerie Bell-Hansford</i> Marlene D. Bruno, Ph.D. Telephone No. (703) 571-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/27943

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST 2.1, STN (EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, SCISEARCH)

search terms: Inventors' names, histamine H4 receptor, identify, modulate, chemotaxis, second messenger, treat, asthma, allergy, agonist, antagonist, epithelial acculumulation, mast cells.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/27943

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim 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.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z

(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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ダンフォード, ポール・ジエイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サンディエゴ・ファーストアベニュー 4 1 5 3
- (72) 発明者 ホフストラ, クローディア・エル
オランダ・エヌエル - 3 9 9 2 シーケイ ホーテン・バルケニールスボーシユ 2 8
- (72) 発明者 カールソン, ラース
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 3 7 ラジヨラ・ファーンングレン 3 3 6
- (72) 発明者 リュング, ウエイ - ピング
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サンディエゴ・ブルベイカーコート 1 2 7 0 7
- (72) 発明者 リング, ピング
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 6 サンディエゴ・カルストンウェイ 1 0 7 4 1
- (72) 発明者 サーモンド, ロビン・エル
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 0 7 サンディエゴ・ギゾットストリート 1 4 6 5

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA36 FB03
4B063 QA18 QQ08 QQ13 QR77 QR80 QS05 QS38
4C084 AA17 NA14 ZB131
4C085 AA14 CC03 CC22 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 EA20

专利名称(译)	使用组胺H4受体调节剂治疗过敏和哮喘		
公开(公告)号	JP2006510590A	公开(公告)日	2006-03-30
申请号	JP2004534688	申请日	2003-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	Jiyansen杉机郁吃喀-Namuroze和非日元纸币施家伙翻牌		
[标]发明人	デサイプラニヤジエイ ダンフオードポールジエイ ホフストラクローディアエル カールソンラース リユングウエイピング リングピング サーモンドロビンエル		
发明人	デサイ,プラニヤ・ジエイ ダンフオード,ポール・ジエイ ホフストラ,クローディア・エル カールソン,ラース リユング,ウエイ・ピング リング,ピング サーモンド,ロビン・エル		
IPC分类号	A61K45/00 A61P37/08 A61P11/06 A61K39/395 C07K16/28 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 A61K A61K31/00 A61K39/00 A61K47/00 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K31/00 A61K39/0008 A61K2039/505 A61P11/06 C07K16/28 G01N33/5047 G01N33/6863		
FI分类号	A61K45/00 A61P37/08 A61P11/06 A61K39/395.U C07K16/28 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063 /QQ13 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS38 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB131 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/CC22 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /CA40 4H045/DA50 4H045/EA20		
优先权	60/408736 2002-09-06 US		
其他公开文献	JP2006510590A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于鉴定影响肥大细胞或嗜碱性粒细胞趋化性的组胺受体调节剂的方法，以及此类组胺H4受体调节剂在预防，治疗，诱导或其他所需的哮喘和/或过敏反应或疾病和/或调节中的用途。由哮喘或过敏反应调节，影响或引起的疾病。还公开了组胺H4受体调节剂在预防，治疗，诱导或其他所需的肥大细胞或嗜碱性粒细胞趋化反应的调节中的用途，例如迁移到特定部位，或被调节，影响或调节的疾病和/或状况。由肥大细胞或嗜碱性粒细胞趋化性引起。

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	4 B 0 6 3
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U 4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終	

(21) 出願番号	特願2004-534688 (P2004-534688)	(71) 出願人	390033008
(86) (22) 出願日	平成15年9月5日 (2003.9.5)		ジヤンセン・フアーマシューチカ・
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月1日 (2005.3.1)		ローゼ・フエンノトシヤツブ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/027943		JANSSEN PHARMACE
(87) 国際公開番号	W02004/021999		CA NAAMLOZE VENN
(87) 国際公開日	平成16年3月18日 (2004.3.18)		SCHAP
(31) 優先権主張番号	60/408, 736		ベルギー・ビー-2340-ビール
(32) 優先日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		ウルンホウトセベーク30
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100060782
			弁理士 小田島 平吉
		(72) 発明者	アサイ, ブラニヤ・ジエイ
			アメリカ合衆国カリフォルニア州9
			8サンマルコス・リパークレストロ
			436