

(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2004-510705

(P2004-510705A)

(43) 公表日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/18	A 6 1 K 31/18	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/341	A 6 1 K 31/341	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/365	A 6 1 K 31/365	
A 6 1 K 31/381	A 6 1 K 31/381	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 126 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-513457 (P2002-513457)	(71) 出願人	303033451
(86) (22) 出願日	平成13年7月20日 (2001.7.20)		ラウラス エイエス
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月17日 (2003.1.17)		ノールウェー エヌー 3 4 9 オスロ ガ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003284		ウスタダリー 2 1
(87) 国際公開番号	W02002/007721	(74) 代理人	100081994
(87) 国際公開日	平成14年1月31日 (2002.1.31)		弁理士 鈴木 俊一郎
(31) 優先権主張番号	0017908.5	(74) 代理人	100103218
(32) 優先日	平成12年7月20日 (2000.7.20)		弁理士 牧村 浩次
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)	(74) 代理人	100107043
(31) 優先権主張番号	0109648.6		弁理士 高畑 ちより
(32) 優先日	平成13年4月19日 (2001.4.19)	(74) 代理人	100110917
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		弁理士 鈴木 亨
		(72) 発明者	タスケン クジェティル
			ノールウェー エヌー 1 3 4 9 リッキン
			ベルガースレッタ 2 0
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 方法

## (57) 【要約】

本発明は、患者が C O X - 2 阻害剤またはその誘導体あるいは製薬的に許容しうるその塩、好ましくはジイソプロピルフルオロホスフェート、L - 7 4 5 3 3 7、ロフェコキシブ、N S 3 9 8、S C 5 8 1 2 5、エトドラク、メロキシカム、セレコキシブまたはニメスリドを投与されることを特徴とする免疫不全（たとえば H I V ）で特徴づけられる疾患の治療または予防の方法、それらの同一物を含む組成物および製品ならびに治療用医薬を製造する際のそれらの使用の方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

免疫不全で特徴づけられる疾患の治療用または予防用の医薬の調製において、COX-2 阻害剤またはその誘導体あるいは製薬的に許容しうるその塩の使用方法。

## 【請求項 2】

前記疾患が、ウイルスによって引き起こされる免疫不全疾患であることを特徴とする請求項 1 に記載の使用方法。

## 【請求項 3】

前記疾患が、全般の多様な免疫不全、あるいはレトロウイルス、なるべく HIV または関連するウイルスによる感染に起因するもの、あるいはその結果として生じる AIDS または関連する状態であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の使用方法。 10

## 【請求項 4】

前記医薬が、ヒトまたはヒトに添う動物または農業用動物に投与するためのものであることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の使用方法。

## 【請求項 5】

前記 COX-2 阻害剤が、IC<sub>50</sub> での WHMA アッセイによる COX-1 : COX-2 の選択性の比として > 5、好ましくは > 50 を有することを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の使用方法。

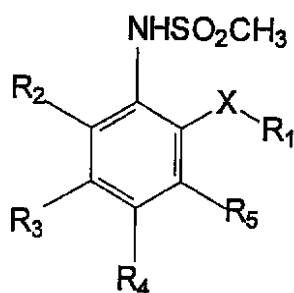
## 【請求項 6】

前記 COX-2 阻害剤が、メタンスルホンアミドエーテル、メタンスルホンアミドチオエーテルまたはジアリール複素環であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の使用方法。 20

## 【請求項 7】

前記 COX-2 阻害剤が、一般式 A の化合物またはその誘導体あるいは製薬的に許容しうるその塩であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれかに記載の使用方法；

## 【化 1】



A

30

ここで、

X は、酸素原子もしくは硫黄原子またはアルキル基、好ましくは -CH<sub>2</sub>- 基を表し、  
R<sub>1</sub> は、必要に応じて 1 以上の基または原子、好ましくは 1 以上のハロゲン原子で置換されていてもよいシクロアルキル基あるいはアリール基を表し、

R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> は、それぞれ独立に水素原子、ニトロ基、アシル基、または必要に応じて 1 以上の基もしくは原子で置換されていてもよいアルキル基、あるいは R<sub>2</sub> と R<sub>3</sub>、R<sub>3</sub> と R<sub>4</sub>、または R<sub>4</sub> と R<sub>5</sub> とが互いに炭素原子を介してシクロペンタノン基を形成してもよい。 40

## 【請求項 8】

X が酸素原子であることを特徴とする請求項 7 に記載の使用方法。

## 【請求項 9】

R<sub>1</sub> がアリール基、または 1 以上のフッ素原子で置換されたアリール基、あるいはシクロアルキル基であることを特徴とする請求項 7 または 8 に記載の使用方法。

## 【請求項 10】

R<sub>2</sub> および R<sub>3</sub> が水素原子であり、R<sub>4</sub> が -NO<sub>2</sub> 基または -COCH<sub>3</sub> 基であることを 50

特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の使用方法。

【請求項 11】

$R_2$  が水素原子であり、 $R_3$  と  $R_4$  とがシクロペンタノン基を形成していることを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の使用方法。

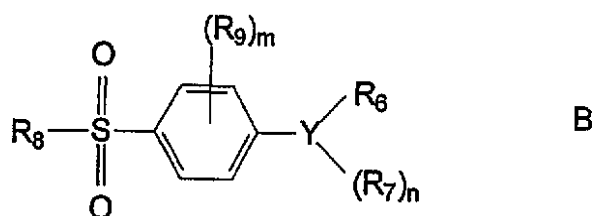
【請求項 12】

前記 COX - 2 阻害剤が、フロスリド ( f l o s u l i d e )、NS - 398、ニメスリド、FK' 3311、または L - 745 337であることを特徴とする請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の使用方法。

【請求項 13】

前記 COX - 2 阻害剤が、一般式 B の化合物またはその誘導体または製薬的に許容しうるその塩であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の使用方法；

【化 2】



ここで、

20

Y は、

環状基を、好ましくは、オキサゾリル、イソキサゾリル、チエニル、ジヒドロフリル、フリル、ピロリル、ピラゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、イソチアゾリル、シクロペンテニル、フェニルまたはピリジル基を表し、

n は、0 ~ 3 の整数であり、

m は、0 ~ 4 の整数であり、

$R_6$  は、環状ケト基 ( k e t o c y c l y l )、シクロアルキル基またはアリール基を表し、これらの基は、必要に応じて 1 以上の基または原子、好ましくは 1 以上のハロゲン原子で置換されていてもよく、

$R_7$  は、それぞれ独立に任意の官能基でもよい置換基を表し、好ましくは、水素原子またはハロゲン原子またはアルキル基であり、アルキル基は 1 以上の基または原子で置換されていてもよく、

30

$R_8$  は、アルキル基を表し、

$R_9$  は、ハロゲン原子を表し、

$R_{10}$  は、水素原子、または必要に応じて 1 以上の基または原子で置換されたアルキル基、好ましくはアシル基で置換されたアルキル基を表す。

【請求項 14】

$R_8$  が  $-NH_2$  または  $-CH_3$  であることを特徴とする請求項 13 に記載の使用方法。

【請求項 15】

Y がピラゾリル基、フリル基またはチエニル基であることを特徴とする請求項 13 または 14 に記載の使用方法。

40

【請求項 16】

$R_6$  が必要に応じて 1 以上のフッ素原子で置換されたアリール基であることを特徴とする請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載の使用方法。

【請求項 17】

n が 1 または 2 であることを特徴とする請求項 13 ~ 16 のいずれかに記載の使用方法。

【請求項 18】

$R_7$  が、臭素原子、アシル基、または置換されたアルキル基であることを特徴とする請求項 13 ~ 17 のいずれかに記載の使用方法。

【請求項 19】

50

前記C O X - 2 阻害剤が、セレコキシブ、ロフェコキシブ、D u P - 6 9 7、S C - 5 8 1 2 5、D F P、D F U、C G P 2 8 2 3 2 またはM F t r i c y c l i cであることを特徴とする請求項1 3 ~ 1 8のいずれかに記載の使用方法。

【請求項2 0】

前記C O X - 2 阻害剤が、非ステロイド系抗炎症剤(N S A I D)誘導体であることを特徴とする請求項1 ~ 6のいずれかに記載の使用方法。

【請求項2 1】

前記C O X - 2 阻害剤が、ジイソプロピルフルオロホスフェート、L - 7 4 5 3 3 7、ロフェコキシブ、N S 3 9 8、S C 5 8 1 2 5、エトドラク、メロキシカム、セレコキシブまたはニメスリドであることを特徴とする請求項1 ~ 2 0のいずれかに記載の使用方法。 10

【請求項2 2】

前記C O X - 2 阻害剤が、ロフェコキシブであることを特徴とする請求項2 1に記載の使用方法。

【請求項2 3】

前記C O X - 2 阻害剤が、セレコキシブであることを特徴とする請求項2 1に記載の使用方法。

【請求項2 4】

前記C O X - 2 阻害剤が、メロキシカムであることを特徴とする請求項2 1に記載の使用方法。 20

【請求項2 5】

請求項1 ~ 2 4のいずれかに記載のC O X - 2 阻害剤またはその誘導体または製薬的に許容しうるその塩、ならびに製薬的に許容しうる希釈剤、担体、または賦型剤を含有する医薬組成物。

【請求項2 6】

1以上の追加のC O X - 2 阻害剤、その誘導体、または製薬的に許容しうるその塩、および/または、1以上の追加の活性成分をさらに含有する請求項2 5に記載の医薬組成物。

【請求項2 7】

医薬として、好ましくは、請求項1 ~ 4のいずれかに記載された疾患の治療または予防のために使用される請求項2 5または2 6に記載の医薬組成物。 30

【請求項2 8】

請求項1 ~ 2 4のいずれかに記載のC O X - 2 阻害剤またはその誘導体あるいは製薬的に許容しうるその塩、ならびに1以上の追加のC O X - 2 阻害剤、その誘導体、または製薬的に許容しうるその塩、および/または1以上の追加の活性成分を含有し、請求項1 ~ 4のいずれかに記載された疾患の治療または予防において、同時または別個または逐次に使用される混合製剤である製品。

【請求項2 9】

請求項1 ~ 4のいずれかに記載された疾患の治療または予防のための医薬の調製における請求項2 5または2 6に記載の医薬組成物の使用方法。

【請求項3 0】

ヒトまたはヒト以外の動物に関し、前記動物に、請求項1 ~ 2 4のいずれかに記載のC O X - 2 阻害剤またはその誘導体または製薬的に許容しうる塩を投与するか、請求項2 5または2 6に記載の医薬組成物を投与することを特徴とする請求項1 ~ 4のいずれかに記載の疾患を治療する方法または予防の方法。 40

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、免疫不全およびウィルス感染の治療分野に属する。より詳しくは、本発明は、免疫不全およびウィルス性疾患、特にH I V感染およびA I D Sおよび関連する状態の治療のための免疫調節における、シクロオキシゲナーゼ- 2 (C O X - 2) 阻害剤またはその誘導体の使用に関する。 50

## 【0002】

プロスタグランジンは、炎症過程で重要な役割を担うため、プロスタグランジンの形成阻害は、抗炎症剤開発のための一般的な標的となっている。非ステロイド系抗炎症剤（NSAID類）は、アラキドン酸からのプロスタグランジン中間体の生合成に参与する酵素であるシクロオキシゲナーゼ（COX）を阻害する。臨床用途に使われるいくつかのNSAID類が存在し、たとえば、インドメタシン、ピロキシカム、テノキシカム、ジクロフェナク、メロキシカム、テニダップ（tenidap）、イソキシカム（isoxicam）、アセチルサリチル酸、ジフルニサル、スリンダク、イブプロフェン、ナプロキセンおよびケトプロフェンなどの薬剤が挙げられる。

## 【0003】

10

NSAID類は、今日、世界的に最も広く処方されている薬剤である。これらNSAID類は、臨床的に有効な薬剤であり、解熱性、抗炎症性、および抗血栓性作用を有する。この種の薬剤の主な適応症は、関節炎であり、たとえば、骨関節炎、リウマチ性関節炎、筋骨格の疼痛状態および一般的な疼痛状態が挙げられる。しかしながら、これらの薬剤には深刻な副作用がある。最も頻発する副作用は、胃腸の潰瘍化および出血、血小板凝集の阻害および他の薬剤との相互作用である。

## 【0004】

1990年代初めに、前記酵素の第2のCOXアイソフォーム（COX isoform）がクローニングされた。この新しいCOXアイソフォームは、現在、COX-2として知られている（Vaneら、1998年、Ann. Rev. Pharmacol. T

20

oxicol., 38, p97-120）。現在、よく知られた2つのCOXのアイソフォームがある。COX-1とCOX-2である（最近、COX-3の存在も推定されている）。COX-1は、たいていの組織内に存在し、ハウスキーパー酵素としてみなすことができる。たとえば、COX-1酵素の活性は、消化管の内壁を保護する。これに対し、COX-2は、通常は存在せず、炎症の際に増加する。NSAID類のいくつかの副作用は、COX-1酵素の阻害に関係している。NSAID類は、COX-1およびCOX-2の双方を阻害する（表1-3参照）。

## 【0005】

表1：モルモットのマクロファージモデルにおける種々のNSAID類のIC<sub>50</sub>値およびCOX-2/COX-1比（Engelhardtら、J. Inflammatory Res., 44, p422-43, 1995年からのIC<sub>50</sub>値）

30

## 【0006】

## 【表1】

NSAID類	COX-2 IC <sub>50</sub> (μmol/リットル)	COX-1 IC <sub>50</sub> (μmol/リットル)	COX-2 選択性 COX-1/COX-2
メロキシカム	0.0019	0.00577	3
ジクロフェナク	0.0019	0.000855	0.45
ピロキシカム	0.175	0.00527	0.030
テノキシカム	0.322	0.201	0.6
インドメタシン	0.00636	0.00021	0.03
テリダップ	47.8	0.393	0.008

40

## 【0007】

表2：COX-1（ウシ内皮細胞）およびCOX-2（刺激されたマクロファージ）に関して無傷細胞におけるNSAID類のIC<sub>50</sub>値（Takeito, J. National Cancer Institute, 90, p1529-1536, 1998年からのIC<sub>50</sub>値）

50

【 0 0 0 8 】

【 表 2 】

NSAID'類	COX-2 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}$ /リットル)	COX-1 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}$ /リットル)	COX-2 選択性 COX-1/COX-2
アスピリン	50	0.3	0.006
インドメタシン	0.6	0.01	0.02
トルフェナム酸	0.005	0.0003	0.06
イブプロフェン	15	1	0.07
アセトアミノフェン	20	2.7	0.1
サリチル酸ナトリウム	100	35	0.35
<b>BW 755C</b>	1.2	0.65	0.5
フルビプロフェン	0.025	0.02	0.8
カルプロフェン	3	3	1
ジクロフェナク	0.35	0.5	1.4
ナプロキセン	1.3	2.2	1.7
<b>BF 389</b>	0.03	0.15	5

10

20

【 0 0 0 9 】

表 3 : 組換えヒトPGH合成の阻害 (COX-1およびCOX-2) (Laneuvilleら、J. Pharm. Exp. Ther., 271, p927-34, 1994年からのIC<sub>50</sub>値)

【 0 0 1 0 】

【 表 3 】

NSAID'類	COX-2 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}$ /リットル)	COX-1 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}$ /リットル)	COX-2 選択性 COX-1/COX-2
インドメタシン	>1000	13.5	<0.01
スリンダク硫化物	50.7	1.3	0.03
ピロキシカム	>500	17.7	0.04
ジクロフェナク	20.5	2.7	0.13
フルビプロロフェン	3.2	0.5	0.16
メクロフェネメート	9.7	1.5	0.15
フェニルブタゾン	>100	16.0	<0.16
ナプロキセン	28.4	4.8	0.17
イブプロロフェン	12.5	4.0	0.3
ケトロラク・トロメタミン	60.5	31.5	0.5
<b>DHA (22:6)</b>	41	25.6	0.6
<b>6-MNA</b>	93.5	64.0	0.7
エトドラク	60	74.4	1.2
サリチル酸	>1000	>1000	~1

30

40

【 0 0 1 1 】

この10年間に、いくつかの新しい選択的なCOX-2阻害剤、いわゆる「選択的」CO 50

X - 2 阻害剤が確認された。これらのCOX - 2 阻害剤のいくつかは開発され、そのうちのいくつかは最近、市販にこぎつけた。このような新しいCOX - 2 阻害剤のあるものは、臨床的な用量でCOX - 1の阻害を示さない。これらのCOX - 2 阻害剤の利用に関する広範な臨床的研究および臨床での実施により、この新しいCOX - 2 阻害剤は、非選択的なNSAID類と比較して、安全性の点できわめて有利であることが示されている。COX - 2 阻害剤の概説については、たとえば、Goldenら, 1999年, Osteoarthritis. 25, p359 - 379、Mitchellら, 1999年, Brit. J. Pharmacol., 128, p1121 - 1132、Lipsky, 1999年, Am. J. Med., 106 (5B), p515 - 575、Takeito, 1998年, J. National Cancer Inst., 90, p1529 - 1537、Griswoldら 1996年, Med. Res. Rev., 16, p181 - 206 および Reitzら, 1995年, Ann. Rep. Med. Chem., 30, p179 - 188を参照されたい。

10

20

30

40

50

#### 【0012】

さらに、様々なCOX - 2 阻害剤に関する興味深い刊行物としては、たとえば、Lane, 1997年, J. Rheumatol., 24 (suppl. 49), p20 - 24、Mehlishら, 1998年, Clin. Pharmacol. Ther., 63, p1 - 8、Zhaoら, 1997年, Arthritis Rheum., 40 (suppl.), S88、Ehrichら, 1997年, Arthritis Rheum., 40 (suppl.), S93、Maziaszら, 1997年, Arthritis Rheum., 40 (suppl.), S195、Mengle-Gawら, 1997年, Arthritis Rheum., 40 (suppl.), S93、Morrison, 1999年, Clin. Ther., 21, p943 - 953、Chanら, 1995年, J. Pharmacol. Exp. Ther., 274, p1531 - 37、Riendeauら, 1997年, Br. J. Pharmacol., 121, p105 - 117、Blackら, 1999年, J. Med. Chem., 42, p1274 - 81、Cuorら, 1996年, J. Biol. Chem., 271, p19134 - 39、Geiss, 1999年, Scand. J. Rheumatol., 109 (suppl.), p31 - 37、Warnerら, 1999年, PNAS USA, 96, p7563 - 68、Bjarnsonら, 1997年, Scand. J. Gastroenterol., 32, p126 - 130、Dannebergら, 1999年, Semin. Oncol., 26, p499 - 504、Mitchellら, 1993年, PNAS USA, 90, p11693 - 97、Futakiら, 1994年, Prostaglandins, 47, p55 - 9、Futakiら, 1993年, J. Pharm. Pharmacol., 45, p753 - 5、Masferrerら, 1994年, PNAS USA, 91, p3228 - 32、Kleinら, 1994年, Biochem. Pharmacol., 48, p1605 - 10、Reitzら, 1994年, J. Med. Chem., 37, p3878 - 81、Seibertら, 1994年, PNAS USA, 91, p12013 - 17、Kleinら, 1996年, Biochem. Pharmacol., 51, p285 - 90、Nantalら, 1998年, 9th Intern. Conference Inflamm. Res. Assoc., Nov 1 - 5、Pennigら, 1997年, J. Med. Chem., 40, p1347 - 65 および Puigら, 2000年, J. Med. Chem., 43, p214 - 223が挙げられる。

#### 【0013】

COX - 2 阻害剤は、化学構造の観点から見て比較的多様な化合物の集団である。選択的にCOX - 2を阻害する化合物は、この10年間の多くの特許文献に記載されている。いくつかを挙げると、WO 94/26781, WO 94/20480, WO 94/13635, WO 95/00501, WO 94/27980, WO 94/15932

, WO 95/21817, WO 95/15316, WO 96/06840, WO 96/03388, WO 96/03387, WO 96/03392, WO 96/25405, WO 96/24584, WO 96/03385, WO 96/16934, WO 98/41516, WO 98/43966, WO 99/12930, EPO 673 366, WO 98/41511, WO 98/47871, WO 99/20110, WO 99/23087, WO 99/14194, WO 99/14195, WO 99/15513 および WO 99/15503 および米国特許明細書 5,380,738、5,344,991、5,393,790、5,434,178、5,474,995、5,475,018 および 5,510,368 が挙げられる。

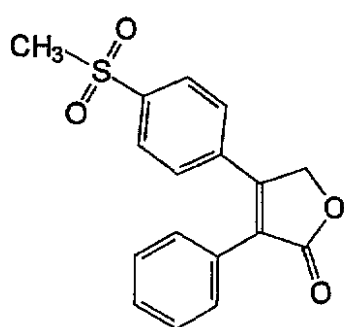
## 【0014】

10

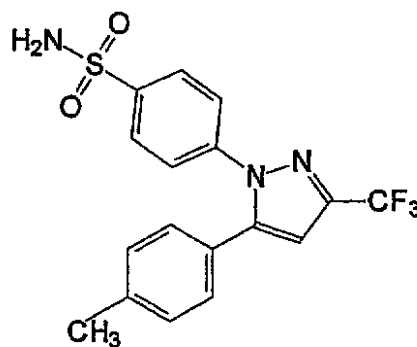
2つの化合物、ロフェコキシブ、すなわち(4-(4-メチルスルホニル)フェニル)-3-フェニル-2(5H)-フラノン)(I)が「Vioxx(R)」として、ならびにセレコキシブ、すなわち(4-(5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾール-1-イル)-ベンゼンスルホンアミド)(II)が「Celebra(R)」として、現在市販されている。

## 【0015】

## 【化3】



(I)



(II)

20

## 【0016】

30

ロフェコキシブ(rofecoxib)は、Merck Frosst Canada の WO 93/0500501、さらにMorrison, 1999年, Clin. Ther., 21, p943-953、Chanら, 1995年, J. Pharmacol. Exp. Ther., 274, p1531-37 および Nantelら, 1998年, 上掲に記載されている。

セレコキシブ(celecoxib)は、Geiss, 1999年, Scand. J. Rheumatol., 109 (suppl.), p31-37 および Penni ngら, 1997年, J. Med. Chem., 40, p1347-65に記載されている。セレコキシブは、COX-1と比較して、COX-2に対して375倍選択的であると述べられている。

40

## 【0017】

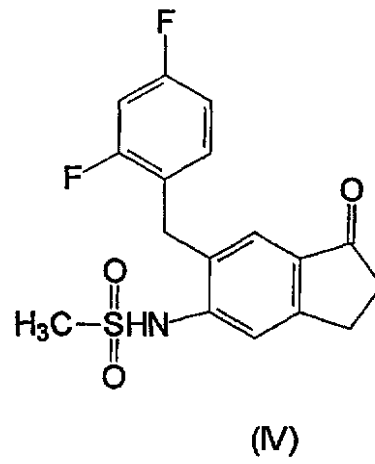
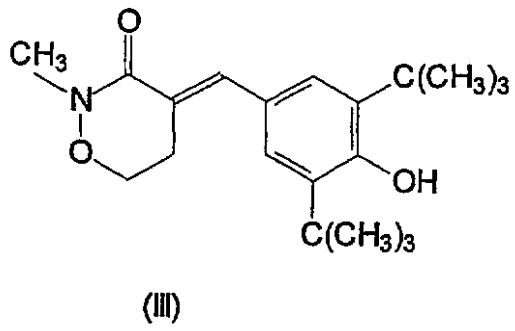
他のいくつかのCOX-2阻害剤は、生物学的なシステムにおいて評価されており、それらのあるものとは、BF 389 (III)、CGP 28232 (IV)、DFP、DFU (V)、DuP 697 (VI)、エトドラク(VII)、FK 3311 (VIII)、フロスリド(flosulide) (IX)、L-745,337 (X)、メロキシカム(「Mobic(R)」, US 4233299、4-ヒドロキシ-2-メチル-N-(5-メチル-2-チアゾリル)-1,1-ジオキシド-2H-1,2-ベンゾチアジン-3-カルボキサミド)(XI)、MF トリサイクリック (XII)、ニメスリド(XIII)、NS-398 (XIV) および SC-58125 (XV) である。

50

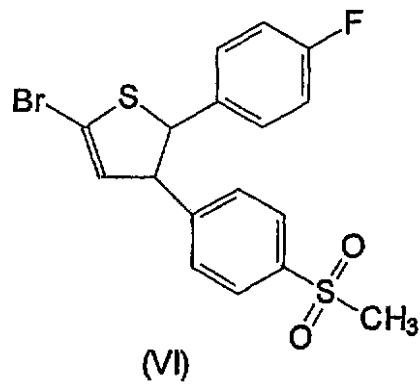
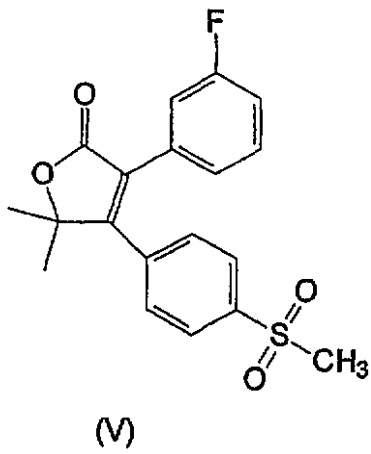


【 0 0 1 8 】

【 化 4 】



10

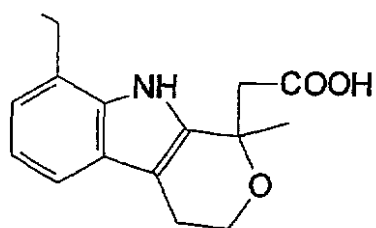


20

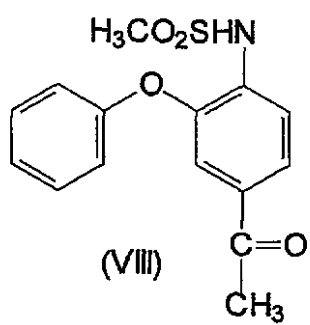
【 0 0 1 9 】

【 化 5 】

30

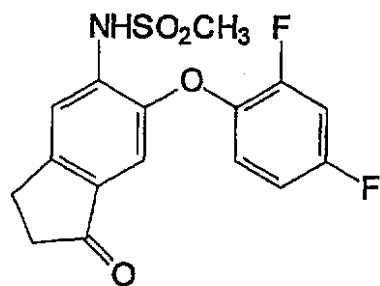


(VII)

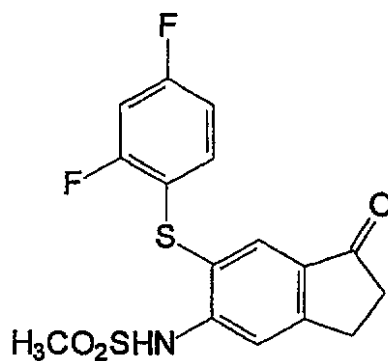


(VIII)

10

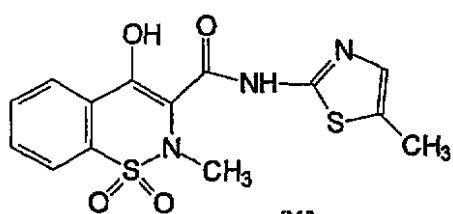


(IX)

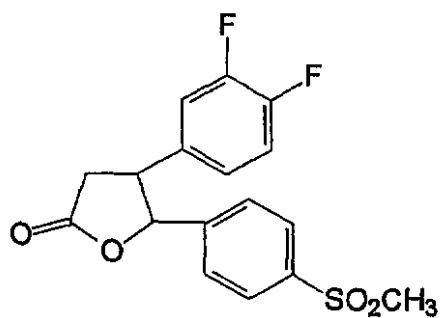


(X)

20

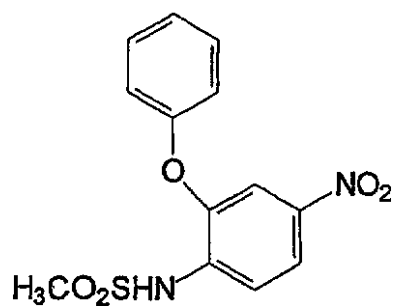


(XI)

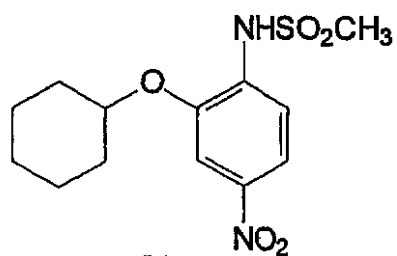


(XII)

30



(XIII)

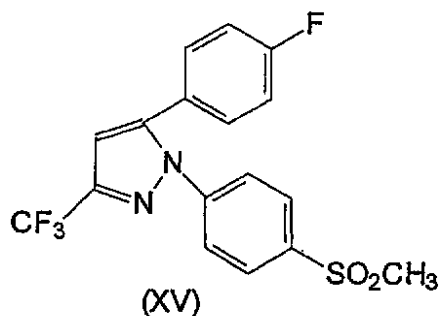


(XIV)

40

【 0 0 2 0 】

【 化 6 】



## 【 0 0 2 1 】

10

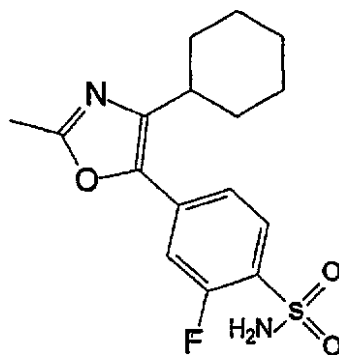
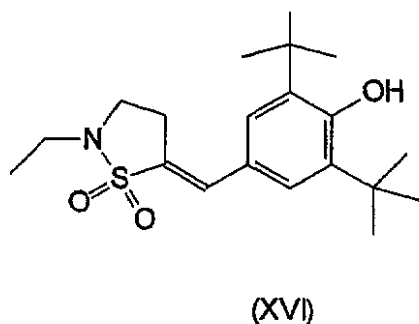
さらに、COX - 2 阻害剤として記載された化合物として、たとえば、S - 2 4 7 4 ( Shionogi, EP 5 9 5 5 4 6、5 ( E ) - ( 3 , 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシ ) ベンジリデン - 2 - エチル - 1 , 2 - イソチアゾリジン - 1 , 1 - ジオキシド ) ( XVI )、 JTE - 5 2 2 または RWK - 5 7 5 0 4 ( 4 - ( 4 - シクロヘキシル - 2 - メチル - 5 - オキサゾリル ) - 2 - フルオロベンゼンスルホンアミド ) ( XVII )、メシル酸ダブフェロン ( Darbufelone mesylate ) ( Pfizer, WO 9 4 / 0 3 4 4 8、2 - アミノ - 5 - ( ( 3 , 5 - ビス ( 1 , 1 - ジメチルエチル ) - 4 - ヒドロキシフェニル ) メチレン - 4 ( 5 H ) - チアゾロン ) のモノメタンスルホン酸塩 ) ( XVIII )、6 0 8 9 ( Kotobuki Pharmaceutical より ) ( XIX )、ヴァルデコキシブ ( Valdecoxib ) ( Pharmacia、4 - ( 5 - メチル - 3 - フェニル - 4 - イソキサゾリル ) - ベンゼンスルホンアミド ) ( XX )、パラコキシブナトリウム ( Paracoxib sodium ) ( Pharmacia、N - ( ( 4 - ( 5 - メチル - 3 - フェニル - 4 - イソキサゾリル ) - フェニル ) スルホニル - プロパンアミド ) のナトリウム塩 ) ( XXI )、4 - ( 2 - オキソ - 3 - フェニル - 2 , 3 - ジヒドロオキサゾル - 4 - イル ) - ベンゼンスルホンアミド ( Almirall - Prodespharma ) ( XXII ) および エトリコキシブ ( Etoricoxib ) ( MK - 6 3 3 , Merck and Co. ) が挙げられる。

20

## 【 0 0 2 2 】

## 【 化 7 】

30

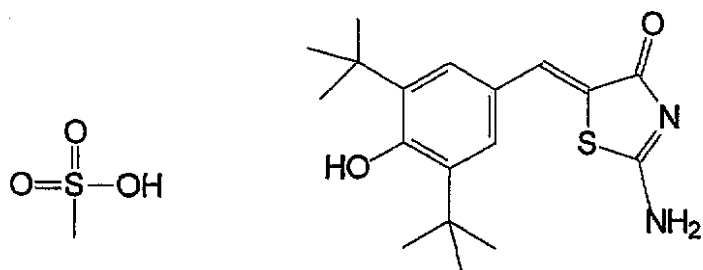


(XVII)

40

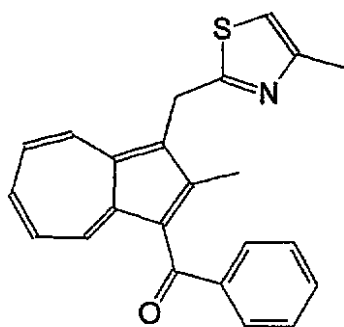
## 【 0 0 2 3 】

## 【 化 8 】

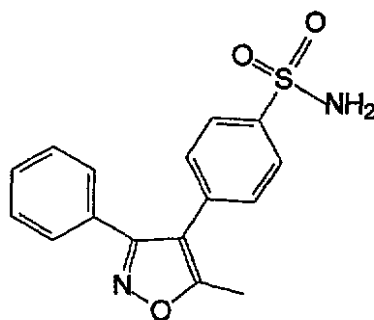


(XVIII)

10

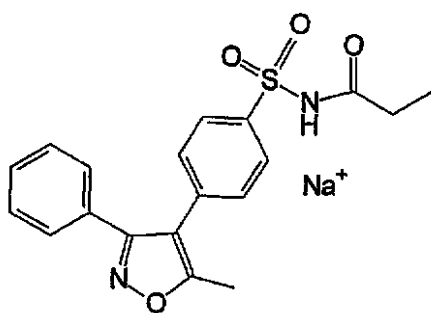


(XIX)

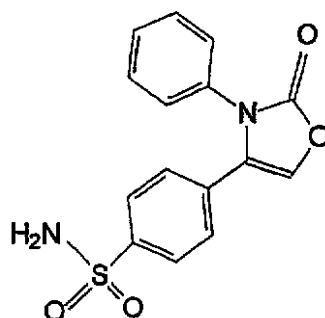


(XX)

20



(XXI)



(XXII)

30

40

## 【 0 0 2 4 】

上述の化合物は、後述する方法に用いるのに好ましいCOX-2阻害剤を形成する。COX-2阻害剤の適応症は、古典的なNSAID類、たとえば、インドメタシン、ジクロフェナクおよびナプロキセンで治療されてきた、関節炎、筋骨格の疼痛状態、および一般的な疼痛である。最近、COX-2阻害剤をガン治療、さらにはおそらくガン予防にも使用することが提案されている。さらに、COX-2阻害剤を、アルツハイマー病や他の痴呆に関連する脳活動に関して使用できる可能性がある。

## 【 0 0 2 5 】

50

COX-2 阻害剤の臨床的有用性の可能性は、たとえば、Nature, 367, p 215-216 (1994年)、Drug News and Perspectives, 7, P501-512 (1994年)、Annual Reports in Medicinal Chem., 30, p179-188 (1995年) および Oncogene, 18, p7908-7916 (1999年) に述べられている。

抗ウイルス治療におけるCOX-2 阻害剤の使用についての具体的な提案はなく、あるいはさらに具体的なHIV/AIDS 治療についての提案はなく、COX-2 阻害剤の抗HIV 作用についても試験されていない。さらに、ウイルスおよび非ウイルス起源の免疫不全症の治療において、免疫賦活性剤としてCOX-2 阻害剤（または非選択的なCOX 阻害剤）を使用することについての提案はない。

10

#### 【0026】

HIV 感染およびAIDS は、世界中で3300万人を超える人々がウイルスに感染している主要な健康問題である。感染者の多くは、アフリカ（サハラ以南（sub-Saharan））およびアジアの一部に住んでいる。今日、臨床用途のために日常的に用いられる抗AIDS 化合物には2つの種類がある。HIV 逆転写酵素阻害剤およびHIV プロテアーゼ阻害剤である。HIV 逆転写酵素阻害剤は、非ヌクレオシド系の逆転写酵素阻害剤（NNRTI）およびヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NRTI）に分けられる。

#### 【0027】

最も頻繁に使用されるNNRTI は、ネビラピン、デラビルジン、エファビレンツ、エミビリンおよびT180である。最も頻繁に使用されるNRTI としては、たとえば、ジドブジン、ジダノシン、スタブジンおよびザルシタピンが挙げられる。臨床的に有用なHIV プロテアーゼ阻害剤として、インクリナビル（incrinavir）、パリナビル（palinavir）およびサクイラビル（saquinavir）が挙げられる。

20

#### 【0028】

現代のHIV 感染およびAIDS の治療法は、いくつかの薬剤の組合せ、いわゆる逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤との混合剤に基づいている。これらの組合せは、HAART（高度に活性な抗レトロウイルス療法）と呼ばれ、極めて効果的であり、患者の血液中のウイルスを検出不能のレベルにまで減少させることができる。しかしながら、HAART は患者を治癒しない。ウイルスは依然として免疫細胞内に存在しており、その疾患がいつでも再発可能だからである。治療を中断することにより、ウイルス血症が頂点に達し、またAIDS への急速な進行が度々観察される。さらに、免疫不全およびHIV に特異的なT細胞機能不全が、HAART の間、持続する。この治療法は、生涯にわたる治療を必要とし、しかも極めて高価である。薬剤の費用だけでも、しばしば15,000 USドルを超える。加えて、この治療法に関係する他の問題がいくつか存在する。すなわち患者の服薬遵守の難しさ（複雑な薬剤投与計画）、耐性ウイルスの発生、理想的ではない薬物動態ならびに副作用、たとえば、骨髄の抑制および長期代謝効果の抑制などが挙げられる。

30

#### 【0029】

近年発行された、抗HIV 治療の総説については、下記を参照されたい：たとえば、Hillegroth, 1998年, Pharm. uns. Zeit., 1998年, 27, p22-25、Hillegroth, 1998年, Pharm. uns. Zeit., 7, p111-116、Stellbrink, 1997年, Dtsch. Arztebl., 94, p2497-2503、Rettler, 1998年, Int. J. STD AIDS, 9, p80-87、De-Clercq, 1998年, Antiviral Res., 38, p153-179、Gaiter, 1995年, TIBTECH, 13, p430-438 および Redshaw, "Emerging Drugs: The Prospects of Improved Medicines", Chapter 6, p127-154, 1997年が挙げられる。

40

#### 【0030】

要するに、HAARTのような複数薬剤の組合せ併用は、HIV 感染に苦しむ患者の予後

50

を著しく改善したが、H I Vの抗ウィルス治療における新規化合物、とりわけ免疫系を刺激する薬剤に対する医療上の必要性が存在している。本発明は、この必要性に焦点をあてるものである。

C O X - 2の発現は、通常は脳 / 脳活動、関節炎の滑膜、および損傷組織部位に限定されている。C O X - 2は、通常のリンパ節またはリンパ球内には見出されない。しかしながら今や驚くべきことに、免疫不全病M A I Dに感染したマウスのリンパ節細胞が、高レベルでC O X - 2を発現していることが見出されている。さらに、M A I D Sリンパ節からのB細胞ばかりでなく、正の選択をされたC D 4 + およびC D 8 + T細胞もまた、高レベルのC O X - 2を含んでいた(実施例2を参照のこと)。このC O X - 2が、免疫不全疾患の徴候を緩和すべく、標的にされているだろうということが見出された。具体的には、免疫刺激を作用させること、たとえば、抗原特異的な免疫応答を生起させることによって、T細胞機能不全を緩和するためである。

10

#### 【0031】

一方、理論により拘束されることを望まないが、C O X - 2活性は、P G E<sub>2</sub>産生を増加させると信じられている。このことにより、c A M Pのレベルを増加させ、次に、c A M PはP K Aシグナル経路を活性化し、結果的にリンパ球機能を減退させる。M A I D Sのマウスにインビボで実施した研究は、C O X - 2阻害剤がT細胞の免疫機能を改善することを説明している(実施例6参照)。

#### 【0032】

本発明は、免疫不全の治療または予防、特にH I VおよびA I D Sの治療または予防のための新規な方法を提供するものである。その方法は治療上有効な量のC O X - 2阻害剤またはその誘導体あるいは製薬的に許容されるその塩により、患者を治療することを含むものである。

20

したがって、本発明の最初の面は、ヒトまたはヒト以外の動物において上昇したC O X - 2活性によって特徴づけられる疾患、具体的には、(たとえば、C O X - 2発現の増加を通じて)免疫機能の減退により特徴づけられる疾患の治療方法または予防方法を提供することである。その方法は、前記動物に治療上有効な量のC O X - 2阻害剤またはその誘導体またはその製薬的に許容される塩を投与することを特徴としている。

#### 【0033】

本明細書において、増加したC O X - 2活性とは、より多くのC O X - 2分子の産生(たとえば、増大した発現)および/または、より活性な分子(たとえば、不活性型から活性型への転換あるいは活性型に対する阻害の除去)のいずれかを通して、上昇した活性のレベルを意味する。なるべくなら、前記疾患は、免疫機能の減退によって特徴づけられる。すなわち、免疫不全の状態、たとえば、リンパ球の機能不全を示す。なお、本明細書において、「免疫不全」とは、通常免疫応答に関わる細胞、とりわけB細胞およびT細胞の機能障害を意味する。したがって、本明細書に記載された化合物は、免疫刺激効果を達成して免疫応答を増強するように使用してもよい。このように、C O X - 2阻害剤は、免疫調節作用を有すると考えられる。好ましくは治療の対象となる状態として、ウィルスによって引き起こされる免疫不全の疾患が挙げられる。

30

#### 【0034】

かくして上記の方法は、これに限定されるものではないが、患者のH I VまたはA I D S関連疾患の治療に有用である。たとえば、一般の多様な免疫不全を有する患者の約50%は、H I V感染の場合と同様のT細胞機能障害を有しており、免疫刺激療法の恩恵を受け得るかもしれない。本発明によれば、いずれかのC O X - 2阻害剤をH I V / A I D S治療を必要とする患者に投与することができる。したがって、本発明による治療に好適な状態としては、たとえば、レトロウィルスによる感染、具体的にはH I Vによる感染(および他の動物における関連ウィルス、たとえばS I V、F I V、M A I D Sの感染)ならびにその結果として生じるA I D S、さらには一般の様々な免疫不全および前記状態に関連する状態の治療が挙げられる。

40

#### 【0035】

50

治療できる患者としては、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトおよびヒトに添う動物または農業用動物、たとえば、イヌ、ネコ、サル、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウサギ、ラットおよびマウスが挙げられる。

換言的に述べるならば、本発明は、上述したように増加したCOX-2活性によって特徴づけられる疾患を治療または予防するためのCOX-2阻害剤またはその誘導体またはその製薬的に許容しうる塩を提供するか、あるいは上述したように増加したCOX-2活性によって特徴づけられる疾患を治療または予防するための医薬を調製する際において、COX-2阻害剤またはその誘導体またはその製薬的に許容しうる塩の使用の方法を与える。なお、本明細書において、「治療」とは、前記疾患、たとえば感染の1つ以上の徴候を、好ましくは通常のレベルまで、軽減または緩和、あるいは免疫機能障害の減少または緩和を意味する。「予防」とは、絶対的な予防、すなわち、検出可能な感染性因子（たとえば、ウイルス）が存在しないこと、および/または特定の徴候（たとえば、COX-2活性）について正常レベルの保持、またはそうした徴候発症の程度の減少または軽減もしくはは時期調整（たとえば、遅延）を意味する。

10

#### 【0036】

シクロオキシゲナーゼ2酵素は、HIV/AIDS治療の新しい標的である。「COX-2阻害剤」という用語は、ある特定の濃度で投与した場合に、シクロオキシゲナーゼ1を有意に阻害することなく、シクロオキシゲナーゼ2酵素を阻害することができる化合物を意味する。その化合物は、好ましくはシクロオキシゲナーゼ2の阻害について、シクロオキシゲナーゼ1阻害と比較した場合、少なくとも10、より好ましくは少なくとも50、さらに好ましくは少なくとも100の選択性（たとえば、WHAM試験によって、COX-1:COX-2 IC<sub>50</sub>比として測定される、下記参照）を有する化合物が挙げられる（一つの特定化合物に対する選択性の比率は、生物学的なアッセイならびにそれが表現される方式によって変化する（好ましくは、COX-1:COX-2 IC<sub>50</sub>またはIC<sub>80</sub>の比として表現される）、表1~4を参照）。本明細書で述べる比は、1以上の適切な、公知のCOXアッセイ、好ましくは精製したヒト由来の酵素を使用して得られたデータを意味しており、たとえば、Engelhartら（1995年、上掲）によって測定されたIC<sub>50</sub>値の比を意味する。しかしながら、前記試験は、後述するようにWHAM試験が好ましい。

20

#### 【0037】

COX-1およびCOX-2の力価比に関する多数の分析が、単離精製された酵素から様々な種からの無傷の（intact）細胞および細胞モデルまでわたる広範囲のアッセイシステムを用いて行われてきた。しかしながら、現在では、最も広く受け容れられているモデルは、ヒト全血アッセイ（WBA）ならびにWilliam Harvey変異ヒト全血アッセイ（WHMA）修正版であり、好ましいアッセイである。これらのアッセイは、ヒトに使用する前記化合物に対し好適である試験のために、容易に入手できるヒト細胞を利用している。また、NSAID類の血漿タンパク質への結合をも考慮に入れている。さらに、選択性の評価は、IC<sub>50</sub>よりもむしろIC<sub>80</sub>で行うことが好ましい。COX-2およびCOX-1の阻害に関する両濃度曲線が平行ではなく、また多くの化合物は、80%阻害に近い阻害となる定常状態血漿濃度を与える用量で使用されるからである（W 40 arnerら，1999年，PNAS USA，96，p7563-7568）。

#### 【0038】

WBAアッセイでは、COX-1分析のために、血液を試験試薬で処理し、60分後にカルシウムイオノフォアで処置し、30分間インキュベートした後、血漿を回収する。COX-2分析については、血液をアスピリンで処理してCOX-1を阻害し、6時間後にリボ多糖と試験試薬で処理し、18時間インキュベートした後、血漿を回収する。引き続き、血漿中のトロンボキサンB2含量を、COX活性の尺度として、ラジオイムノアッセイで評価する。

#### 【0039】

WHMAアッセイでは、COX-1分析を上記のようにして実施する。COX-2分析に

30

40

50

ついては、インターロイキン 1 に 24 時間曝したヒト気道上皮細胞 (A549) の培養物から調節した培地で、血液を処理し、この培地と試験試薬で 60 分間インキュベートした後に、カルシウムイオノフォアを加えて、30 分後にジクロフェナクを添加して、プロスタノイド (prostanoid) 産生を停止させる。その後、血漿を回収し、COX-2 活性の尺度として、血漿中のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 含量をラジオイムノアッセイで分析する。COX-1 および COX-2 活性の評価に関して、インキュベートの回数は、この最後のアッセイと同様であるが、これにより活性をより比較できるものとし、また WHMA を好ましいアッセイとする。

#### 【0040】

このアッセイを使用して、IC<sub>80</sub>での COX-2 / WHMA - COX-1 に基づく選択性を表 4 に示す。ここで、0.2 および 0.02 は、それぞれ COX-2 についての 5 倍および 50 倍の選択性を表している。

表 4 : (Warner ら (上掲) からの WHMA 試験による IC<sub>80</sub> での COX-2 / COX-1 比)

#### 【0041】

##### 【表 4】

化合物	IC <sub>80</sub> での COX-2/WHMA-COX-1 比
ジイソプロピルフルオロホスフェート	<0.01
L-745337	<0.01
ロフェコキシブ	0.015
NS398	<0.05
SC58125	<0.01 (WBA アッセイ)
エトドラク	0.043
メロキシカム	0.091
セレコキシブ	0.11
ニメスリド	0.17

#### 【0042】

このため好ましい態様では、選択比 (selectivity ratio) は WHMA アッセイにより IC<sub>80</sub> で決定され、COX-2 : COX-1 選択比が 0.2 未満、好ましくは 0.05 未満、たとえば 0.02 未満、好ましくは 0.01 未満、具体的には < 0.005 の選択比を有する化合物が本発明の方法での使用にとりわけ好ましい。別の表現をすれば、上述したように、好ましい化合物は、2 より大、好ましくは 5 より大、特に好ましくは 50 もしくは 100 より大である COX-1 : COX-2 選択比 (IC<sub>80</sub> での WHMA アッセイによる) を有する。

#### 【0043】

ここでいう「阻害」とは、測定可能なシクロオキシゲナーゼ - 2 活性の減少を意味する。これは、転写、翻訳、翻訳後の修飾または COX-2 の活性に影響することにより達成されることができる。しかしながら好ましくは、阻害が酵素活性を阻害することにより達成され、すなわち既に存在する活性 COX-2 分子の活性部位への干渉である。

#### 【0044】

望ましくは、免疫不全またはウィルス感染、とりわけ HIV 感染および AIDS の治療のための COX-2 阻害剤が、約 0.5 μmol / リットル未満、より好ましくは約 0.2 μmol / リットル未満の COX-2 IC<sub>50</sub> を有する。



本発明で提供される方法は、免疫不全およびウィルス感染、とりわけHIVおよびAIDSを含むさまざまな症状の予防および治療における、COX-2阻害剤またはその誘導体の使用方法に関する。

【0045】

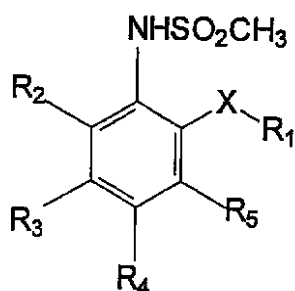
本発明のひとつの好ましい態様では、本発明に基づく治療のためのCOX-2阻害剤は、酸性スルホンアミド類(acidic sulfonamides)から選択される。

本発明のひとつの好ましい態様において、本発明で用いるCOX-2阻害剤は、メタンスルホンアミドエーテル類およびメタンスルホンアミドチオエーテル類を含む下記一般式Aで表される化合物、またはこれらの誘導体あるいはこれらの製薬的に許容しうる塩から選択される：

10

【0046】

【化9】



A

20

【0047】

ここで、

Xは、酸素原子または硫黄原子またはアルキル基、好ましくは-CH<sub>2</sub>-基を表し、  
R<sub>1</sub>は、必要に応じて1以上の基または原子、好ましくは1以上のフッ素などのハロゲン原子で置換されていてもよいシクロアルキル基あるいはアリール基を表し、  
R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>は、それぞれ独立に、水素原子、ニトロ基、アシル基、または必要に応じて1以上の基(たとえばアシル基)または原子で置換されていてもよいアルキル基、あるいはR<sub>2</sub>とR<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>とR<sub>4</sub>、または、R<sub>4</sub>とR<sub>5</sub>とが互いに炭素原子を介在させてシクロペンタノン基を形成してもよい。

30

【0048】

好ましくは該化合物中において、Xは酸素原子である。またさらに好ましい化合物では、R<sub>1</sub>は、アリール基、または1以上のフッ素原子で置換されたアリール基、またはシクロアルキル基である。

より好ましい化合物中においては、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>が水素原子であり、R<sub>4</sub>が-NO<sub>2</sub>基または-COCH<sub>3</sub>基である。代替りの好ましい化合物は、そのR<sub>2</sub>が水素原子であり、R<sub>3</sub>とR<sub>4</sub>と一緒にシクロペンタノン基を形成するものを含む。

【0049】

特に好ましくは、本発明で用いる式Aの化合物は、本明細書に記載の名称の化合物であるフロスリド(flosulide)、NS-398、ニメスリド、FK'3311およびL-745337である。

40

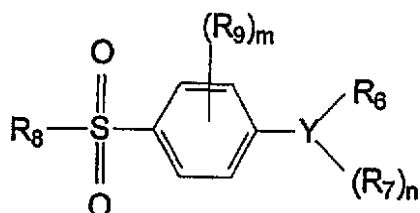
本発明の別の好ましい態様では、本発明に用いるCOX-2阻害剤は、ジアリール複素環から選択される。

【0050】

本発明でCOX-2阻害剤として用いることのできるジアリール複素環の仲間の一例には、下記一般式Bで示される化合物、またはそれらの誘導体もしくはそれらの製薬的に許容しうる塩が含まれる。

【0051】

【化10】



B

## 【 0 0 5 2 】

ここで、

Y は、環状基、好ましくはオキサゾリル、イソキサゾリル、チエニル、ジヒドロフリル、フリル、ピロリル、ピラゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、イソチアゾリル、シクロペンテニル、フェニルまたはピリジル基を表し、

n は、0 ~ 3 の整数であり、

m は、0 ~ 4 の整数であり、

R<sub>6</sub> は、環状ケト基 ( k e t o c y c l y l )、シクロアルキル基またはアリール基を表し、これらの基は、必要に応じて1以上の基または原子、好ましくはフッ素といった1以上のハロゲン原子で置換されていてもよく、

R<sub>7</sub> は、それぞれ独立に任意の官能基であり得る置換基を表し、好ましくは、水素原子またはハロゲン原子、より好ましくはフッ素または臭素であり、あるいはアルキル基 (好ましくは - C H<sub>3</sub>) であり、そのアルキル基は1以上の基または原子、好ましくは、たとえば - C F<sub>3</sub> などのように1以上のフッ素原子で置換されていてもよく

R<sub>8</sub> は、アルキル基、好ましくは - C H<sub>3</sub> または N H R<sub>10</sub>、好ましくは - N H<sub>2</sub> を表し、

R<sub>9</sub> は、ハロゲン原子、好ましくはフッ素を表し、

R<sub>10</sub> は、水素原子、または必要に応じて1以上の基または原子で置換されたアルキル基、好ましくはアシル基で置換されたアルキル基を表す。

## 【 0 0 5 3 】

この部類の化合物は、米国特許第 6 , 0 2 5 , 3 5 3 号における抗脈管形成剤として、請求されており、さらに、本発明による好ましい置換基および化合物の記載は、米国特許第 6 , 0 2 5 , 3 5 3 号明細書に記載のものと同一である。

このような化合物において、R<sub>8</sub> は - N H<sub>2</sub> または - C H<sub>3</sub> が望ましい。より好ましい化合物において、Y はピラゾリル基、フリル基またはチエニル基である。好ましくは、R<sub>6</sub> は必要に応じて1以上のフッ素原子で置換されたアリール基である。好ましくは、n は1または2である。R<sub>7</sub> は、臭素原子、アシル基または - C F<sub>3</sub> などの置換されたアルキル基であることが好ましい。

## 【 0 0 5 4 】

本発明で用いる、式 B の特に好ましい化合物は、本明細書に記載された、セレコキシブ、ロフェコキシブ、D u P - 6 9 7、S C - 5 8 1 2 5、D F P、D F U、C G P 2 8 2 3 2 および三環 M F ( M F t r i c y c l i c ) という化合物である。

本明細書で使用される用語「アルキル」は、特に他に言及のない限り、長鎖または短鎖、直鎖、分枝または環状の、必要に応じて水酸基、アルコキシ基、アシルオキシ基、ニトロ基、アルコキシカルボニルオキシ基、アミノ基、アリール基、オキソ基またはハロ基により、一置換または多置換されていてもよい脂肪族の飽和もしくは不飽和炭化水素基を含む。不飽和アルキル基は、一不飽和または多不飽和でもあってよく、アルケニル基およびアルキニル基の両方を含む。これらの基は 4 0 個まで、好ましくは 1 ~ 1 0 個の炭素原子を含むことができる。

## 【 0 0 5 5 】

本明細書で用いられる環式の環は、好ましくは C<sub>5</sub> - <sub>7</sub> であって、必要に応じて酸素、窒素および硫黄から選ばれる 1 以上のヘテロ原子を含有していてもよい。

本明細書で用いられる用語「アシル」は、カルボン酸基および炭酸基の両方を含み、よっ

10

20

30

40

50

て、たとえば、アルキルカルボニルオキシアルキルなどのアシルオキシ置換アルキル基が挙げられる。そうした基において、いずれのアルキレン部分も、好ましくは上記でアルキル基に対し定義した炭素原子数を含む。好ましいアリール基として、フェニル基および単環の5～7員複素環式芳香族、とりわけ必要に応じ置換されていてもよいフェニル基および単環5～7員複素環式芳香族基が挙げられる。

【0056】

代表的な置換アルキル基 $R_1$ として、アルコキシアルキル、ヒドロキシアルコキシアルキル、ポリヒドロキシアルキル、ヒドロキシポリアルキレンオキシアルキルなどの基、具体的には、アルコキシメチル、アルコキシエチルおよびアルコキシプロピル基、または、アシルオキシメチル、アシルオキシエチルおよびアシルオキシプロピル基、たとえばピバロイルオキシメチル(*pivaloyloxymethyl*)が挙げられる。

【0057】

本明細書で用いられる、「置換された基」としては、特に他に言及のない限り、水酸基、アルコキシ基、アシルオキシ基、ニトロ基、アルコキシカルボニルオキシ基、アミノ基、アリール基、オキソ基またはハロ基によって、一置換または多置換されたものであってもよい。

本発明の他の好ましい態様において、COX-2阻害剤は、古典的なNSAID類の修飾物、たとえばそれらのプロドラッグ類、エステル類または塩類から選択される。

【0058】

古典的なNSAID類の化学構造に基づいて、さらに新規な選択的COX-2阻害剤が調製されてきた。このような化合物は、オキセカム(よく知られたピロキシカムのCOX-2特異的アナログ)のひとつであるメロキシカム(*meloxicam*)、または、エトドラック(ジクロフェナックのCOX-2特異的アナログ)などの酢酸誘導体であってもよい。この部類におけるいくつかの最も好ましい化合物のあるものの例は、COX-2活性インドメタシン誘導体およびゾメピラックである。

【0059】

本発明に係る化合物のファミリーまたはサブファミリーに関するさらなる列挙は、COX-2阻害剤に関する特許および特許出願に見受けられ、たとえば、本明細書で先に掲げた特許文献中にある。これらの特許文献はまた、特定の化合物を例示および列挙しており、それらはまた本発明による最も好ましいCOX-2阻害剤でもある。

【0060】

特に好ましい化合物としては：

ジイソプロピルフルオロホスフェート、L-745337、ロフェコキシブ、NS 398、SC 58125、エトドラク、メロキシカム、セレコキシブまたはニメスリドである。

本発明に基づいて使用するCOX-2阻害剤の製造方法は、当該技術分野でよく知られた方法であり、上記の文献中に具体的に記載されている。

【0061】

本明細書で記載する疾患、たとえば、免疫不全およびウィルス感染、特にHIV/AIDSの治療および予防に用いる、本発明によるCOX-2阻害剤は、1個以上の不斉中心および/または1個以上の二重結合を有していてもよい。すなわち、本発明は、本明細書が開示する化合物の異性体およびラセミ体の使用にも及ぶ。これらすべての可能な異性体は、本発明の範囲に含まれる。COX-2阻害剤は、化合物の異性体混合物の形態、より好ましくは精製した異性体またはその製薬的に許容される塩の形態であってもよい。

【0062】

本発明による症状の治療、たとえば免疫不全およびウィルス感染の治療のためのCOX-2阻害剤の医薬組成物は、製薬的に許容される塩として製剤されてもよく、さらに当該技術分野でよく知られ、製薬上許容される担体もまた含んでもよい。

このように、本発明は、COX-2阻害剤またはその誘導体あるいはその製薬的に許容される塩ならびに製薬的に許容される希釈剤、担体または賦型剤を含有する医薬組成物にも

及ぶ。「製薬的に許容される」とは、成分が組成物中で他の原料成分と適合し、かつ、投与される者にとり生理的に許容しうるものであることを意味する。

【0063】

さらなる態様において本発明は、後述するように、このような組成物の使用、ならびにこのような組成物を用いた予防／治療の方法にもまた及ぶ。

C O X - 2 阻害剤が塩基性である場合には、塩は、製薬的に許容される非毒性の無機酸および有機酸を含む酸とから調製することができる。特に好ましい塩は、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、クエン酸塩および酒石酸塩である。

【0064】

C O X - 2 阻害剤が酸性である場合には、塩は、製薬的に許容される非毒性の無機塩基および有機塩基を含む塩基とから調製することができる。特に好ましい塩は、ナトリウム塩、カリウム塩およびマグネシウム塩である。

本明細書に記載の疾患、たとえば H I V / A I D S を含む免疫不全またはウイルス疾患などの、治療および予防のためには、C O X - 2 阻害剤は、経口的に、経直腸的（坐薬）に、局所的に、舌下剤として、吸入、あるいは注射または注入の形態で非経口的（たとえば、筋肉内、皮下、腹腔内または静脈内）に投与することができる。好ましい投与形態は、経口、経直腸および注射または注入による投与であろう。最も好ましい投与形態は、経口投与に適したものである。

【0065】

すべての投与形態において、C O X - 2 阻害剤は、通常、製薬的に許容される公知のキャリアー、助剤および担体を含む投薬単位の剤形で投与される。このようにして、活性成分は、錠剤、丸薬、散剤、トローチ剤、小袋剤、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳化剤、溶液剤、シロップ、煙霧剤（固体としてまたは液体媒体中で）、軟膏、軟質および硬質のゼラチンカプセル、坐剤、無菌注射剤、無菌包装粉剤およびその類似物を製造するために、必要に応じて配合調剤としての他の活性物質、1以上の通常の担体、希釈剤および／または賦形剤とともに一体化してもよい。生分解性ポリマー（ポリエステル、ポリ酸無水物（polyanhydrides）、ポリ乳酸またはポリグリコール酸など）もまた、固体インプラントに用いることができる。この組成物は、凍結乾燥、過冷法あるいはパーマザイム（Permazyme）を用いることにより安定化させることができる。

【0066】

適切な賦形剤、担体または希釈剤は、ラクトース、D型グルコース、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、デンプン類、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アグリネート、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水シロップ、水、水／エタノール、水／グリコール、水／ポリエチレン、グリコール、プロピレングリコール、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム、鉱油、または固い脂肪などの脂肪類、これらの適切な混合物である。この組成物は、必要に応じて、潤滑剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、甘味剤、香料、たとえば点鼻用（胆汁酸塩、レシチン、界面活性剤、脂肪酸、キレート化剤）などの吸着促進剤などを含んでもよい。本発明の組成物は、当業界で周知の方法を用いることにより、患者への投与後、活性成分を即時の放出、持続的または遅延的な放出するように製剤することができる。

【0067】

投与する活性成分は、医薬組成物での利用のために、適切に修飾されてもよい。たとえば、活性成分は、塩類または非電解質、酢酸塩、S D S、E D T A、クエン酸塩または酢酸緩衝液、マンニトール、グリシン、H A S またはポリソルビン酸塩などの適切な添加剤を用いることなどにより安定化されてもよい。

結合物は、改善した親油性を与え、細胞輸送を増加させ、溶解性の向上またはターゲティングを可能とするように形成されてもよい。これらの結合は、切断可能であってもよく、このため該結合物が薬剤前駆体（プロドラッグ）のように作用する。安定性はまた、たと

10

20

30

40

50

例えばZn、CaまたはFeとの適切な金属錯体を用いることにより与えることができる。

【0068】

この活性成分は、送達のため、または特定の細胞、器官または組織をターゲティングするために、適切な媒体中で処方してもよい。このため、該医薬組成物では、活性物質が吸収、吸着、取り込みまたは結合されてもよい、ミクロエマルジョン、リポソーム、ニオソームまたはナノ粒子の形態をとることができ、これらに生成物を効果的に不溶性の形態に変換することができる。

【0069】

これらの粒子は、循環時間を向上するため適切な表面分子（たとえば、血清成分、界面活性剤、ポリオキサミン908、PEGなど）、または、たとえば特定細胞に担われている選択的レセプターに対するリガンドなど、部位特異的ターゲティングのための部分を持つことができる。ドラッグデリバリーのための、またターゲティングのための適切な技術は、当該技術分野で知られているが、たとえば、ドラッグターゲティングに関する、Kreuter, 1994年, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 3, p253-256、Shen, 1997年, J. Drug Targeting, 5(1), p11-13、Mrsny, 1997年, J. Drug Targeting, 5(1), p5-9、Petit & Gombos, 1998年, TIBTECH, 16, p343-349、およびDuncan, 1997年, J. Drug Targeting, 5(1), p1-4、および、ペプチドおよび核酸分子デリバリーに関する、Simari & Nabel, 1996年, Semin. Intervent. Cardiol., 1, p77-83、Torchilin, 1998年, J. Microencapsulation, 15(1), p1-19、Klyashchitsky & Owen, 1998年, J. Drug Targeting, 5(6), p443-458、Kreuter, 1996年, J. Anat., 189, p503-505、Fasano, 1998, TIBTECH, 16, p152-157、Kataokaら, 1993, 24, p119-132、Anderson, 1998年, Nature, 392(suppl), p25-30、Langer, 1998年, Nature, 392(suppl), p5-10、Gregoriadis, 1995年, TIBTECH, 13, p527-536、Gregoriadisら, 1997年, FEBS Lett., 402, p107-110、Rolland, 1998年, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 15(2), p143-198、Hopeら, 1998年, Molec. Memb. Biol., 15, p1-14、およびSchermanら, 1998年, Curr. Opinion Biotech., 9(5), p480-485が挙げられる。特定部位指向ターゲティングの例としては、たとえば、ナノ粒子がHIV感染マクロファージ内に蓄積される、Schaeferら, 1992年, Pharm. Res., 9, p541-546を参照。明らかにこれらの方法は、本明細書に記載の本発明の方法における具体的な適用例を明確に有する。

【0070】

これらの誘導体化または結合された活性成分は、本発明により用いられる阻害分子の定義の範囲に収まることを意味する。

このため経口的に使用される該医薬組成物は、たとえば活性成分の他に錠剤、カプセル剤、溶液剤、懸濁剤またはその他経口投与用として周知の剤形を形成するための生理学的に許容しうる適切な剤を含む。このような組成物は、経口医薬組成物の製造方法として知られたいずれの方法によっても調製することができる。このような組成物は、1以上の生物活性物質および保存剤、不活性希釈剤、増粘剤、着色剤、甘味剤、造粒剤、崩壊剤、結合剤、浸透性活性剤、湿潤剤、懸濁剤、遅延剤形の調製用物質、油類および水よりなる群から選ばれる1以上の剤を含むことができる。

【0071】

たとえば、直腸投与用の坐剤または注射もしくは注入用の溶液剤といった、経口使用以外の医薬組成物は、よく知られている方法およびそうした剤形のための添加剤を用いて調製できる。注射および注入用のすべての製剤は、無菌製剤であるべきである。  
 このような組成物中の活性成分は、製剤重量の約 0.01% から約 99%、好ましくは約 0.1 から約 50%、たとえば 10% 含まれる。

#### 【0072】

本発明によれば、たとえば免疫不全およびウイルス感染などの疾患の治療のために、COX-2 阻害剤の一日あたりの用量水準は、0.005 mg から約 150 mg / kg 体重の範囲である。その投与量は、COX-2 阻害剤化合物の選択、臨床的状态（ウイルスの種類、感染の進行状況および患者の状態）、患者の年齢および体重、投与の経路、および、患者の治療過程の長さを含め、薬剤の総使用量に大きく依存する。より好ましい投与量は、通常、一日あたり 0.01 mg ~ 50 mg / kg 体重の間、より好ましくは、一日あたり 0.05 mg ~ 20 mg / kg 体重である。よってたとえば、一日あたりロフェコキシブ 25 mg またはセレコキシブ 200 mg が、経口投与でヒト成人 1 人に投与され得る。

10

#### 【0073】

投与単位は、通常、活性成分 1 mg から 500 mg の間である。

本発明の一つの見地によれば、たとえば免疫不全またはウイルス感染などの本明細書に記載された疾患を治療するために、一つの COX-2 阻害剤に、さらに 1 以上のその他の COX-2 阻害剤を併用することができる。

本発明の別の見地によれば、免疫不全、HIV 感染、または AIDS などの疾患の治療のために、COX-2 阻害剤は 1 以上のさらなる COX-2 阻害剤、または異なる作用様式の 1 以上のさらなる薬剤と併用することができる。このような組み合わせの例としては、COX-2 阻害剤と、1 以上の NNRTI との組み合わせ、または 1 以上の NRTI 類との組み合わせ、または 1 以上の HIV プロテアーゼ阻害剤との組み合わせ、または、1 以上の HAART と COX-2 阻害剤との組み合わせが挙げられる。

20

#### 【0074】

さらなる見地では本発明は、1 以上の COX-2 阻害剤と、特に長期の治療の間に活性成分の耐性を向上させる化合物とを組み合わせる方法および / または組成物を提供する。その典型的な化合物として、抗ヒスタミンおよびプロトンポンプ阻害剤が挙げられる。

よって本発明は、前記の COX-2 阻害剤を、1 以上の追加的な COX-2 阻害剤および / または 1 以上の追加的な活性成分とともに含む組成物にも及ぶ。本発明は、さらに前述のそのような組成物の使用ならびにそのような組成物を使用する方法にも及ぶ。本発明はまた上述した症状もしくは疾患の治療または予防において、同時または別個または逐次に使用される、混合製剤として上記の成分を含有する製品にも及ぶ。

30

#### 【0075】

##### 【実施例】

本発明は、以下の図を参照して以下の限定されない実施例でさらに詳述される。

#### 【0076】

##### 【実施例 1】

げっ歯類後天性免疫不全症候群 (MAIDS) のマウスは T 細胞機能障害を誘発する cAMP / PKA タイプ I を有する

40

MAIDS (げっ歯類の後天性免疫不全症候群)

多数の研究から MAIDS (Murine Acquired Immunodeficiency Syndrome) をヒトの HIV による可能な感染モデルとして考えられている。この症候群は、変異した Pr60<sup>gag</sup> ポリタンパク質をコード化する複製 - 欠陥のレトロウィルスを用いる感染後に、進行する (Chattopadhyay ら, 1991 年, J. Virol., 65, p4232 - 4241; Jolicœur, 1991 年, FASEB J., 5, p2398 - 2405)。本症候群は、脾臓およびリンパ節における進行性リンパ増殖および重症免疫不全と関係している。MAIDS の原因となる欠陥レトロウィルスは、主として B 細胞に感染する (Aziz, 1989 年

50

, Nature, 338, p505 - 508) が、CD4<sup>+</sup> T細胞は、有糸分裂誘発因子のインビトロ刺激に対して、深在性の機能障害およびアネルギー (anergy) を示す。感染マウスのCD4<sup>+</sup> T細胞 (CD8<sup>+</sup> T細胞ではなく) の大部分もまた、異常なThy-1のネガティブ表現型により特徴づけられる (Holmes ら, 1990年, Eur. J. Immunol., 20, p2783 - 2787; Moutschen ら, 1994年, Scand. J. Immunol., 39, p216 - 224 (MAIDS))。正常な感染していないマウスにおいては、CD4<sup>+</sup> Thy-1<sup>+</sup> T細胞は、胚中心 (該細胞はそこでは新しい抗原特異的な移出細胞に相当する) で選択的に認められる。

#### 【0077】

変異したPr60<sup>gag</sup> タンパク質がT細胞異常を誘発する機構は知られていない。感染細胞によって分泌される「溶性因子」が、距離を置いてT細胞の機能に影響を及ぼすことが主張されているが (Simard, J. Virol., 68, p1903 - 1912)、そのような媒介物 (mediator) の本性は決して解明されて来なかった。他の研究は、CD4<sup>+</sup> T細胞と抗原提示細胞との間の直接的で同種の相互作用がT細胞欠陥の誘発に対して必要であることを提案している (Green, 2001, J. Virol., 70, p2569 - 2575; de Leval, 1998年, J. Virol., 72, p5285 - 5290)。

#### 【0078】

アデニル酸シクラーゼ - cAMP - プロテインキナーゼA経路は、免疫応答の調節において重要な役割を果たす (Kammer, 1991年, Immunol. Today, 9, p222 - 229)。増加したcAMPの濃度は、抗CD3 mAbおよびインターロイキン-2といった種々の刺激に対するT細胞の増殖応答を阻害することが知られている。最近の報告は、JAK3チロシンキナーゼの下方制御が、cAMPによるT細胞増殖阻害の機構を表しているかもしれないということを提案している (Kolenko, 1999年, Blood, 93, p2308 - 2318)。ノルエピネフリンといった、cAMP誘導性の作用物質に暴露された、げっ歯類の胸腺細胞または胸腺腫細胞は、mRNAの不安定化を含むメカニズムによってThy-1発現を下方制御するため、環状AMPもまた膜タンパク質の下方制御を誘発できた (Wajeman-Chao, J. Immunol., 161, p4825 - 4833)。

#### 【0079】

プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、すなわちcAMPの強力な誘導物質は、主に単球、マクロファージおよび活性化されたT細胞によって分泌される。PGE<sub>2</sub>は、IL-2を阻害することとIL-4産生を促進することによって、T-ヘルパー・タイプ1細胞からT-ヘルパー・タイプ2細胞の方へと釣合いを移動させる (Betz および Fox, 1991年, J. Immunol., 146, p108 - 113; Meynard, 1997年, Blood, 89, p570 - 576)。それは、またB細胞の分化をIgE産生の方へと偏らせる (Fedyk および Phipps, 1996年, PNAS USA, 93, p10978 - 10983)。プロスタグランジン合成は、シクロオキシゲナーゼ-1および-2 (COX-1およびCOX-2) と特異的PGシクターゼとの逐次的な作用に由来する (Smith および DeWitt, 1996年, Adv. Immunol., 62, p167 - 215)。COX-1発現は、主として構成的かつ普遍的であるのに対し、COX-2はある細胞タイプ (マクロファージ、繊維芽細胞、平滑筋細胞) において、IL-1およびTNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインおよびNOによって誘導されるのみである。

#### 【0080】

MAIDSにおけるT細胞機能障害のもととなる機構は、まだ十分に理解されていない。CD4<sup>+</sup> T細胞は優先的に関わるが、CD8<sup>+</sup> T細胞の変化は、十分なCD4<sup>+</sup> T細胞支援の欠如によるのみであるといくつかの報告は示唆している。反対に、B細胞応答の阻害は固有のものであり、欠陥のあるCD4<sup>+</sup> リンパ球によってだけでは説明できない。

10

20

30

40

50

したがって、cAMPの選択的な増加がB細胞およびCD4<sup>+</sup> T細胞中にあり、しかもCD8<sup>+</sup> T細胞中にはないという本発明者の観察は、MAIDSに関係するアネルギープロセス(anergic process)へのcAMPの関与と矛盾しない。

#### 【0081】

発明者が知る限り、これは疾患モデルにおける、サブセット選択的なcAMPの増加についての最初の実証である。プロスタグランジンE<sub>2</sub>などの溶性因子が本当にcAMP誘導を招いたとすると、何がその作用のサブセット選択性を説明できるであろうか。かつての研究は、CD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> T細胞における様々なプロスタノイドレセプター(prostanoid receptor)の発現を比較して、両方のサブセットにおいて同じ発現パターンを結論づけた。通常のCD8<sup>+</sup> T細胞は、cAMPが誘導するPGE<sub>2</sub>の効果に対して十分に感受性がある。可能な説明はポストレセプターレベル(post receptor level)でできた。記憶/活性化されたT細胞は、無垢な(naive) T細胞よりもPGE<sub>2</sub>に対して感受性がある。MAIDSにおいて、MHCクラスII-依存性プロセスが関係しているところでは、CD4<sup>+</sup> T細胞は、活性化の特別の状態を獲得することができ、それにより該細胞は、任意の濃度のPGE<sub>2</sub>の効果をより受けやすくなった。プロスタノイド効果についてのポストレセプター変更は、対応する膜レセプターからプロテインGを分離するGレセプターキナーゼ(GRK)によって主に媒介される。リウマチ性関節炎などの炎症性状態は、GRKの下方制御により特徴づけられる。したがって、それは、カテコールアミンといった、cAMP誘発物質に対するリンパ球の増加した感受性によって特徴づけられる。感染マウスのCD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> T細胞におけるGRK活性のレベルは知られていない。

10

20

#### 実施例1および2で用いられた方法

##### マウスおよび細胞懸濁液

雄性C57BL/6マウスを発明者の施設で飼育した。4および5週齢において、マウスに0.25mlの無細胞ウィルス抽出液を2回腹腔内に注射した。週齢が一致した対照マウスには、0.25mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)を2回腹腔内に注射した。感染後の異なった時点で、マウスを炭酸ガス窒息により犠死させた。末梢リンパ節(鼠径部、腋窩および頸部)を、シリンジを用いて分離して単一細胞の懸濁液を得て、これをナイロンの細胞染色用具(cell stainer)に通し、RPMI1640完全培地で3回洗浄し、トリパンブルーの排除後にトーマ(Thoma)血球計算器上でカウントした。

30

#### 【0082】

##### ウィルス

ウィルス抽出液を、前述したようにRadLV-Rを2ヶ月前に注射したマウスのリンパ節から調製した。リンパ節を集めてPBS中ですりつぶし、1.5×10<sup>4</sup> gで30分間遠心分離した。上澄み液を再度30分間1.5×10<sup>4</sup> gで回転させた。この無細胞性のウィルス抽出液を液体窒素中で保管した。XCプラーク(plaque)アッセイを、ウィルス粒子を定量するために用いた。ウィルス標品は、10<sup>3</sup> 粒子形成単位(PFU)/mlの狭宿主性(ecotropic)ウィルスを含んでいた。

#### 【0083】

##### 抗体

以下のポリクローナル抗体をウエスタンブロット実験に用いた。第一：ポリクローナルウサギ抗COX-1またはウサギ抗COX-2抗体(Santa Cruz Biotechnology)。第二段階：を共役させたセイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ抗体をTransduction Laboratories(Transduction Laboratories, 英国)から購入した。フローサイトメトリーのために、用いたmoAbは以下の通りである。PE-共役CD4/L3T4(YTS.191.1)、FITC-共役CD45R/B220(RA3-6B2)、FITC-共役CD11b/Mac-1(M1/70)、FITC-共役CD161/NK-1.1(PK136)、FITC-共役CD8a(Ly-2)およびCD16/CD32(Fc III/

40

50



I I レセプター) ( 2 . 4 G 2 ) ( すべて P h a r m i n g e n から入手 : S a n D i e g o , カルフォルニア州 , 米国 ) 。 C D 3 m o A b ( 1 4 5 - 2 C 1 1 ) を発明者の研究室で精製した。コンカナバリン A ( C o n A ) を B o e h r i n g e r M a n n h e i m B i o c h e m i c a から、およびフィトヘマグルチニン - M ( P H A ) を D i f c o から購入した。

#### 【 0 0 8 4 】

フローサイトメトリーおよびセルソーティング ( 細胞選別 )

分析は、セルクエスト ( C e l l q u e s t ) ソフトウェア付きの F A C S t a r プラス ( F A C S t a r - p l u s ) フローセルソーター ( B e c t o n D i c k i n s o n ) を使用することによって行った。前方及び側方散乱を、生存リンパ球をゲート ( g a t e ) するために用いた。F I T C ( 緑 ) および P E ( 橙 ) の二色分析のために、488nm での青色励起光をアルゴンイオンレーザー ( A i r - t o - W a t e r c o o l e d m o d e l S p i n n a k e r 1 1 6 1 ; S p e c t r a P h y s i c s , M o u n t a i n V i e w , カリフォルニア州 ) により供給した。セルソーティングのために、 $60 \times 10^6$  個の細胞を、非特異的な相互作用を避けるために抗 F c R I I ( F c B l o c k ) とともにインキュベートした後に、蛍光色素 - 結合抗体を用いて氷上で 20 分間標識した。C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を、C D 8 <sup>+</sup> B 2 2 0 <sup>+</sup> C D 1 1 b <sup>+</sup> 細胞を枯渇させることによってネガティブに選択した。同様に、C D 8 <sup>+</sup> T 細胞を、C D 4 <sup>+</sup> B 2 2 0 <sup>+</sup> C D 1 1 b <sup>+</sup> 細胞を枯渇させることによって、および B 細胞を、C D 8 <sup>+</sup> C D 4 <sup>+</sup> C D 1 1 b <sup>+</sup> 細胞を枯渇させることによってネガティブに選択した。各ソーティングについて、選別された画分を、フローサイトメトリーによって再分析し、純度を評価したところ、常に 97% より高い純度であった。

#### 【 0 0 8 5 】

環状 A M P の定量

リンパ節の単一細胞の懸濁液を上述したように調製し、R P M I 1 6 4 0 を用いて 2 回洗浄し、 $1500 \times g$  で 3 分間遠心分離した。その後、細胞を超音波によって粉碎し、細胞内 c A M P を抽出溶液 ( 0 . 0 1 N H C l , 95% エタノール ) 中に容易に遊離させた。細胞溶解物を含む溶液を、 $13 \times 10^4 \times g$  で 15 分間遠心分離し、上澄み液を新しい試験管に移した。抽出物を 45 で S p e e d V a c 濃縮装置中で蒸発濃縮し、ペレットを - 20 で保管した。使用直前に、ペレットをアッセイ用緩衝液中に再懸濁し、c A M P レベルを、<sup>125</sup>I - 標識 c A M P アッセイシステム ( A m e r s h a m , 英国 ) を用いてラジオイムノアッセイ ( R I A ) により測定した。試験サンプル中の c A M P の濃度を、曲った直線形の検量線との比較によって求めた。正の対照および負の対照として、リンパ節細胞 (  $1 \times 10^6$  ) を、1mM の d ジブチリル - c A M P および 0 . 5 mM の D D A ( アデニル酸シクラーゼ阻害剤 ) を用いて 30 分間 37 で、加湿した 5% C O <sub>2</sub> 空気の培養器中で、それぞれインキュベートし、c A M P 濃度を測定した。

#### 【 0 0 8 6 】

細胞ホモジナイゼーションおよび免疫プロット

細胞 (  $50 \times 10^6$  ) を、250mM スクロース、1mM E D T A 、 0 . 1% トリトン X - 100 およびキモスタチン ( c h y m o s t a t i n ) 、ロイペプチン、ペプスタチン A およびアンチpain ( a n t i p a i n ) のプロテアーゼ阻害剤、各々 10 μ g / m l 、 10mM リン酸カリウムを含む緩衝液 ( p H 7 . 1 ) 中、氷上で超音波 ( 2 × 15 秒 ) によってホモジナイズし ( T a s k e n ら , 1993 年 , J . B i o l . C h e m . , 268 , p 21276 - 21283 ) 、 30 分間 ( 15 , 000 × g ) 遠心分離して不溶性物質を除去した。タンパク質濃度を B r a d f o r d アッセイ法 ( B i o R a d ) により求めた。免疫プロットのために、40 μ g のタンパク質を 10% S D S - P A G E により分離して P V D F 膜に移し、5% の非脂肪粉乳および 0 . 1% B S A ( B l o t t o ) を含む T B S / T w e e n 中の抗体とともにインキュベートした。一次抗体を H R P - 結合二次抗体 ( J a c k s o n L a b o r a t o r i e s / T r a n s d u c t i o n L a b o r a t o r i e s ) および E C L ( A m e r s h a m ) により検出した。

## 【0087】

P K A のホスホトランスフェラーゼ活性

P K A の触媒活性を、 $[ \gamma - ^3 ^2 P ] A T P$  (比活性  $0.25 Ci / mMol$ 、A m e r s h a m) を用いて、R . R o s k o s k i によって記載 (M e t h o d s E n z y m o l . , 1983年, 99, p36) されたアッセイ混合物中で、P K A - 特異的基質 (L e u - A r g - A r g - A l a - S e r - L e u - G l y) (K e m p r a , 1976年, P N A S U S A , 73, p1038 - 1042)、K e m p t i d e (P e n i n s u l a L a b o r a t o r i e s I N C .) をリン酸化することにより定量した。ホスホトランスフェラーゼ活性を、c A M P ( $5 \mu M$ ) および P K I ( $1 \mu M$ ) の存在下および非存在下の両方について測定し、P K I によって阻害されない低レベルの活性を差し引くことにより、P K A - 比活性を求めた。 10

## 【0088】

環状 A M P 結合の測定

可溶化された P K A 調節サブユニットの特異的  $[ ^3 H ] c A M P$  結合の定量化を、C o b b と C o r b i n によって記載 (M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 159, p202 - 208, 1988年) されたように、 $[ 2 , 8 - ^3 H ] c A M P$  ( $2.25 \mu M$ ; 比活性  $5 Ci / mMol$ ; D u P o n t - N e w E n g l a n d N u c l e a r) を含む混合物中で行った。R サブユニットのモル比を各調節サブユニットモノマー上の2つの c A M P 結合サイトに基づいて計算した。

## 【0089】

免疫細胞化学

対照および感染リンパ節のリンパ球を、冷アセトンで5分間固定し、それぞれ0.1%のサポニン P B S 中で5分間2回洗浄した。内因性ペルオキシターゼを、0.1%サポニン P B S 中の0.3%過酸化水素を用いて、15分間インキュベートすることによりブロッキングした。サポニン / P B S 中でリンスした後、スライドガラスをブロッキング緩衝液 (0.1%サポニン / P B S 中、1.5%の通常のヤギ血清) を用いて30分間室温でインキュベートし、次いで一次抗体溶液を用いて加湿室中、室温で60分間インキュベートした。Ca に対する抗体はサンタクルス (S a n t a C r u z) から入手し、0.1%のサポニンおよび0.5%の通常のヤギ血清を含む P B S 中に1:1000で希釈した。その後、スライドガラスを前述の通り洗浄し、ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体を用いてインキュベートした。その後これを A B C 複合体 (N o v a s t a i n S u p e r A B C K i t , N o v o c a s t r a) により検出した。ペルオキシターゼを、 $H_2O_2$  の存在下で褐色の沈殿を与えるジアミノベンジジン (d i a m i n o b e n z i d i n e) (D A B) (D a k o) を用いて、目に見えるようにした。スライドガラスを、ヘマトキシリン - エオシン (S i g m a) を用いて対比染色した。特異性は、P K A - C サブユニットに対する特異的ペプチドとともにサイトスピン (c y t o s p i n) をインキュベートすることにより検証した。 30

## 【0090】

免疫組織化学

免疫組織化学を、固定された4%のパラホルムアルデヒド中で処理された  $2 \mu m$  厚の組織切片および成形して埋め込まれた組織 (J B 4 - J B ポリサイエンス (J B P o l y s c i e n c e)) について実施した。切片をトリプシン (0.24%) 用いて1分間37で透過処理し、その後、T w e e n 20 (2%) を用いて30分間37で処理した。内因性ペルオキシターゼは、 $H_2O_2$  (1%) を用いて30分間、室温でインキュベートすることによりクエンチした。不特定部位 (a s p e c i f i c s i t e s) を通常のヤギ血清 (1.5%) を用いて37で1時間の間に飽和させた。その後、切片を、一晚4で一次ポリクロナルウサギ抗 C O X - 1 またはウサギ抗 C O X - 2 抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) を用いてインキュベートした後、ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体を用いて2時間インキュベートした。この後のものを A B C 複合体 (N o v a s t a i n S u p e r A B C K i t , N o v o c a s t r a) により検出した。 40 50

ペルオキシターゼを、 $H_2O_2$  の存在下で褐色沈殿を与えるジアミノベンジジン (d i a m i n o b e n z i d i n e) (D A B) (D a k o) を用いて、目に見えるようにした。切片を、ヘマトキシリン - エオシン (S i g m a) を用いて対比染色した。特異性を、一次抗体の代わりに通常のウサギ血清用いて切片をインキュベートすることにより分析した。

#### 【0091】

MAIDSマウスについての増殖アッセイ

増殖アッセイを100  $\mu$ l 容積の平坦底面96穴マイクロタイタープレート中で、1ml 当たり  $0.1 \times 10^6$  個のCD3<sup>+</sup> T細胞のインキュベーションにより行った。引き続き、活性化を、ヒツジ抗マウスIgG (D y n a l , c a t . n o . 110.02) を細胞 : ビーズ比として1 : 1でコートした単分散磁性ビーズを添加し、次いで、提示された実験について4  $\mu$ g / ml の最終希釈度で抗CD3 (クローン2C11) を添加することにより達成した。抗体の最適濃度を初期設定の段階で慎重に滴定し、いくつかの異なった抗体希釈度での並行実験を常に行った。増殖は、72時間細胞をインキュベーションすることにより分析したが、その間において、[<sup>3</sup>H] - チミジン (0.4  $\mu$ Ci) を最後の4時間において含有させ、細胞回収器 (c e l l h a r v e s t e r , S k a t r o n , S t e r l i n g , ヴァージニア州, 米国) を用いてガラス繊維フィルター上に捕集した。

10

#### 【0092】

取り込まれた前駆物質をシンチレーション分析器 (T r i - C a r b , P a c k a r d , M e r i d e n , コネティカット, 米国) でカウントした。cAMP類似化合物を使用した場合、その添加後30分してから、抗CD3抗体の添加により活性化した。8 - C P T - c A M P は S i g m a (S t . L o u i s , ミズーリ州) から入手し、SP - およびRP - 8 - B r - c A M P は B i o L o g L i f e S c i e n c e C o m p a n y (B r e m e n , ドイツ) から入手し、すべて4 ~ 10 mM の濃度までPBSに溶解し、濃度は、供給メーカーにより与えられる吸光係数を用いて計算した。インドメタシンを水に溶解し、50 ng / ml の濃度で用いた。

20

#### 【0093】

PGE<sub>2</sub> 定量

対照および感染マウス由来のリンパ節細胞について、48時間 - 培養の上澄み液500  $\mu$ l をピペットで1.5 ml のポリプロピレン製試験管に採取し、500  $\mu$ l の水 : エタノール (1 : 4) および10  $\mu$ l の氷冷酢酸を加えた。試験管を穏やかに混合し、5分間室温で放置した。この後、2500  $\times$  g で2分間遠心分離した。上澄み液を回収し、2カラム容積分の10%エタノールで詰めたAmprap C18ミニカラムに通した。その後、カラムを1容積分の $H_2O$ および1カラム容積分のヘキサンで洗浄した。その後、PGE<sub>2</sub> を2  $\times$  0.75 ml の酢酸エチルで溶出した。溶出画分を集め、窒素下で乾燥するまで蒸発させた。最終的に、各画分を100  $\mu$ l のアッセイ緩衝液に再び戻して、PGE<sub>2</sub> を、メーカーによって推奨されているAmersham EIAキットを用いてアッセイした。

30

#### 【0094】

統計解析

2群の個体の比較のために、Mann - Whitney のU検定 (両側の) を用いた。相関係数 (r) をスピアマン (S p e a r m a n) の順位検定により計算した。統計的解析および曲線適合 (c u r v e - f i t) 解析を、それぞれスタティスティカ (S t a t i s t i c a) (S t a t s o f t I n c . , T u l s a , O K) およびシグマプロット (S i g m a P l o t) (J a n d e l C o r p o r a t i o n , E r k r a t h , ドイツ) ソフトウェアパッケージを用いて行った。結果は中央値 (m e d i a n) および25位 - 75位の百分位数として与えられ、特にことわらない限り、p値は両側であり、0.05より小さい時には有意と見なされる。

40

実験

50

M A I D S 感染は、C D 4 + T 細胞において上昇した c A M P を誘導する -

M A I D S 発症の原因となる、R a d L V - R として知られたレトロウィルスの混合物を接種したマウスを、感染後異なった時点で犠死せしめ、リンパ節細胞を、フローサイトメーター / セルソーター装置を用いて、ネガティブな選択により純粋な B 細胞ならびに C D 4 + および C D 8 + T 細胞に選別した。細胞内の c A M P レベルを感染後の様々な細胞集団群で評価した。図 1 に見られるように、c A M P レベルは、感染して数週間後の C D 4 + T 細胞中において顕著に増大した ( 2 0 倍以上 )。後の段階でも B 細胞の c A M P レベルも増大したが、これに対し C D 8 + T 細胞では僅かな変化が観察されただけであった。さらに、C D 4 + T 細胞をポジティブなソーティングにより T h y - 1 . 2 + および T h y - 1 . 2 - 細胞に分離すると、T h y - 1 . 2 - 細胞では c A M P レベルの大きな変化があることが明らかになった ( 図 2、6 倍 )。両細胞集団群を非感染マウスから集めて来ると、この正常には「低」が多い集団群も、T h y - 1 . 2 + のそれらに匹敵するよりも高い c A M P 基底レベルを示した。

10

#### 【 0 0 9 5 】

界面活性剤で可溶化した抽出物の細胞核の後の ( p o s t n u c l e a r ) 上澄み液における P K A ホスホトランスフェラーゼ活性の分析により、c A M P 依存キナーゼ活性の全レベルは M A I D S リンパ節細胞において減少したが、c A M P が存在しない場合には活性の僅かな変化が観察されただけであることが明らかとなった ( 図 3 A )。これは、慢性的な活性化、および C サブユニットの分解または C の転移のいずれかをもたらす P K A の分離と矛盾しない。c A M P 結合の評価 ( 図 3 B ) は、P K A R サブユニットの全レベルの変化はないことを明らかにした。M A I D S および対照マウスのリンパ節細胞の免疫細胞化学は、細胞核における免疫反応性 P K A C サブユニットレベルの上昇を明らかにした ( 図 4 )。これも、M A I D S における c A M P - P K A 経路の活性化と矛盾しない。

20

#### 【 0 0 9 6 】

P K A タイプ I アンタゴニストは M A I D S T 細胞の T 細胞増殖を向上させる -

T C R / C D 3 - 誘導 T 細胞増殖の阻害に与える、上昇した c A M P および P K A の活性化の効果を調べるために、P K A タイプ I に対して十分なアンタゴニストとして作用する、硫黄置換した c A M P 類似化合物 ( R p - 8 B - B r - c A M P S ) を使用した ( G j e r t s e n , M e l l g r e n , ら 1 9 9 5 年 1 6 6 5 / i d )。図 5 A は、M A I D S 感染マウス由来の T 細胞において、T C R / C D 3 刺激による増殖が、非感染対照マウス T 細胞 ( 図 5 B ) のその 1 0 % 未満であることを示す。さらに、P K A タイプ I アンタゴニストの効果を M A I D S T 細胞で評価すると、より高い濃度では 4 倍を超えという T C R / C D 3 誘導性の増殖について、濃度依存性の増加が観察された ( 図 5 A )。しかしながら、対照 T 細胞の処理では刺激は観察されなかった ( 図 5 B )。1 1 匹の M A I D S 感染マウスを見ると、対照と比較して、すべて T 細胞増殖を著しく減少させており ( p < 0 . 0 0 1 )、1 1 匹のうち 1 0 匹のマウスで、P K A タイプ I アンタゴニストは T 細胞増殖を改善させた ( p < 0 . 0 1 ; 中央値 2 . 2 倍 , 表 5 )。c A M P アンタゴニストの刺激効果は使用した最も高濃度においても飽和していない ( 表 5 のすべてのマウスについて、図 5 A および同様のデータ ( 未表示 ) を得た )。このことは、化合物の溶解性、細胞に対する親和力または利用可能性が、観察された効果に対する制限因子であるかもしれないということを示す。したがって、より透過性でしかも強力である P K A タイプ I アンタゴニストが入手できるならば、M A I D S T 細胞の T C R / C D 3 誘導性増殖をさらに改善させるかもしれない。

30

40

#### 【 0 0 9 7 】

次に、T C R / C D 3 - 誘導の T 細胞増殖に与える、c A M P アゴニストの効果を、5 匹の M A I D S 感染マウスおよび 4 匹の対照で検討した。M A I D S 感染マウス由来の T 細胞は、外部から添加した 8 - C P T - c A M P により、細胞増殖阻害に対する感受性において明らかな変化を示した ( 図 5 C および表 5 )。さらに、M A I D S 感染マウス由来の T 細胞および対照 T 細胞の最大増殖速度を 1 0 0 % に正規化すると ( 図 5 C およびデータ

50

未表示)、左方にシフトした cAMP 阻害曲線に加えて、それらの曲線の傾きが著しく異なった(正常の T 細胞についての Hill 係数 2.2 (1.9 ~ 2.5) に対して、MAIDS マウス由来の T 細胞についての Hill 係数 0.6 (0.54 ~ 1.52)、表 5、 $p < 0.05$ )。

cAMP 類似化合物によって阻害への感受性が上昇したことは、外から加えた cAMP 類似化合物に対する A サイト親和性が後に上昇することとともに、PKA タイプ I の cAMP 結合サイト B を初回刺激 (prime) することにおいて、増加した内因性 cAMP からの寄与を示唆する。

#### 【0098】

曲線の傾きが、8-CPT-cAMP により、協同的な 2 - リガンドサイト結合 (2 - ligandsite binding) の状況から、見かけの非協同的な阻害曲線へシフトすることも、又、増加した内因性 cAMP による B サイトの占有を示している。

#### 【0099】

#### 【表 5】

マウス	抗 CD3 誘導増殖 (cpm)	Rp-8-Br-cAMPS による増殖の 増加 (倍増加)	8-CPT-cAMP による 増殖阻害 (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	8-CPT-cAMP による 増殖阻害 (Hill 係数)
1	9525	19	6	41
2	3312	24	22	54
3	9153	14	8	58
4	959	37	n.d.	n.d.
5	13791	10	52	156
6	6370	19	66	152
7	6357	22	n.d.	n.d.
8	9986	42	n.d.	n.d.
9	5696	40	n.d.	n.d.
10	16132	37	n.d.	n.d.
11	3740	37	n.d.	n.d.
MAIDS 中央値 (25 位-75 位 の百分位数)	6370* (3740 - 9986) n=11	2.2** (1.9-3.7) n=11	0.22 (0.08-0.52) n=5	0.58*** (0.54-1.52) n=5
対照 中央値 (25 位-75 位 の百分位数)	62281 (56539 - 82038) n=6	1.1 (1.0-1.3) n=6	0.40 (0.33-0.46) n=4	2.24 (1.93-2.47) n=4

MAIDS vs 対照; \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.05$

#### 【0100】

#### 【実施例 2】

環状 AMP が誘発した MAIDS の T 細胞機能不全は、COX 2 レベルの増加とともに CD11b - 陽性細胞による増大した PGE<sub>2</sub> 産生による

MAIDS における PGE<sub>2</sub> の増大した産生 -

混合リンパ節細胞集団群を MAIDS 感染マウスおよび対照マウスから分離し、インビトロで培養した。PGE<sub>2</sub> の分泌レベルを 48 時間培養後の培地上澄み液で評価すると、MAIDS 感染細胞が対照細胞の 7 ~ 8 倍も多い PGE<sub>2</sub> を分泌することが明らかとなった。

## 【0101】

M A I D S において P G E<sub>2</sub> 産生の障害は、T 細胞の増殖を回復させる -

次に、混合リンパ節細胞を抗 C D 3 抗体によって活性化し、T 細胞の増殖を誘導した。[<sup>3</sup> H] - チミジンの取り込みを 72 時間後に調べた。M A I D S 感染マウス由来の細胞の増殖もまた非感染細胞の T 細胞増殖の 10 ~ 20 % だけであった。しかしながら、混合培養においてインドメタシンを培地に添加して P G E<sub>2</sub> の産生を障害すると、これは、M A I D S 感染マウス (5 匹) 由来の細胞の増殖を、対照マウスに匹敵するレベルまで強力に増大させた (図 6)。10 匹の追加した M A I D S 感染マウスを見ると (表 6)、混合リンパ球培養の T 細胞の増殖に与えるインドメタシンの効果は、極めて有意であった ( $p < 0.01$ )。対照的に、インドメタシンで対照培養を処置しても、増殖を変えなかった。

10

## 【0102】

C O X - 2 が M A I D S 感染マウスのリンパ節において高レベルで発現する -

構成的に発現される C O X - 1 は、P G E<sub>2</sub> を産生するシクロオキシゲナーゼ活性の通常源である。しかしながら、C O X - 1 の増加が、P G E<sub>2</sub> の増大したレベルを説明し得るほどに M A I D S マウス中では見られなかった (データ未表示)。C O X - 2 の発現は、通常、脳 / 脳プロセス、関節炎滑液および組織の損傷部分に限定される。C O X - 2 は、たとえば、対照リンパ球について図 8 (上の図) に示されたように、リンパ節またはリンパ球では見出されない。驚くことに、M A I D S 感染マウス由来の粗リンパ節細胞は、高レベルに C O X - 2 を発現することが分かった (図 8、下の図)。さらに、M A I D S リンパ節から、B 細胞と同様、ポジティブに選択された C D 4 + および C D 8 + T 細胞は、高いレベルの C O X - 2 を含有していた。対照的にネガティブに選択された C D 11b - 細胞は、低レベルの C O X - 2 だけしか含有しなかった。

20

## 【0103】

M A I D S 感染マウスおよび対照マウス由来の C D 4 + および C D 8 + T 細胞ならびに B 細胞 (B 220 マーカー) をフローサイトメトリーにより調べると、C D 11b マーカーは、通常 T または B 細胞上には発現されないことが明らかであった。しかしながら、M A I D S 感染マウス由来の C D 4 + T 細胞と B 細胞との両方の正確な分画は、C D 11b 明 (bright) (標識 R 1 を “ゲート (gate)” する) であり、C D 8 + T 細胞のみならず C D 4 + T 細胞と B 細胞の追加プールは、C D 11b の暗 (dim) (標識 R 2 を “ゲート” する) であった。このことは、これらの細胞が有意ではあるが低レベルの C D 11b 発現を有することを示している。したがって、M A I D S 感染 C D 4 + および C D 8 + T 細胞の部分集団は、それぞれ C D 11b 明、および暗 (bright and dim) であるが、これに対し B 細胞の大部分は陽性であった。C D 11b + 細胞は C O X - 2 を発現し、C D 11b - 細胞は発現しないという事実とを考えると、これは、M A I D S 感染マウスに由来するリンパ節の B 細胞と T 細胞との両方が C O X - 2 を発現するということを示す。

30

## 【0104】

M A I D S 感染マウス由来の無処置のリンパ節を免疫組織化学により調べると、M A I D S (感染後 19 週) において、全体の構造は、対照マウスと比較すると胚中心の喪失でもって変更されていることが明らかである (図 10、c 対 a)。C O X - 2 について免疫染色したスライドガラスを高倍率で見れば、対照動物由来のリンパ節は、マクロファージに取り込まれた物質における、褐色 H R P 染色 (偽りの陽性「薄染色できる実体」、図 10 b) を示すだけであるのに対し、M A I D S におけるリンパ節細胞の大部分は、C O X - 2 に対して陽性に染色することは明らかである (図 10 d)。

40

## 【0105】

## 【表 6】

マウス	培地	インドメタシン n	抗 CD3	インドメタシン /抗 CD3
1	1304	1412	6245	9381
2	1082	1129	8019	47926
3	209	265	918	1345
4	236	335	8938	11579
5	4715	4317	6591	8545
6	1799	ND	2932	ND
7	3051	ND	7436	ND
8	1668	ND	3594	19624
9	839	2363	7885	31830
10	3413	7316	8777	42244
中央値 (25 位-75 位 の百分位数)	1486 (839- 3051)	1412 (335-4317) n=7	7013 (3594-8019) n=10	15601** (8963-37037) n=8

インドメタシン vs 対照:\*\* p<0.01

10

【0106】

20

【実施例3】

HIV患者は、インビボで非選択的なCOX阻害剤で治療されると、効果をかろうじて示すだけである

方法

HIV患者由来の末梢血CD3+ T細胞のネガティブな選択

末梢血CD3+ T細胞を、健常者ドナーからのバフィーコート(buffy coats)からネガティブ選択により精製した(Ulléval 大学病院血液センター、オスロ、ノルウェー)。随時、末梢血の単核細胞を密度勾配(Lymphoprep, Nycomed, オスロ、ノルウェー)遠心分離法により分離し、次いで、CD14およびCD19に対する抗体で直接コートした単分散の磁気ビーズと、CD56に対する抗体でコートしたラット抗マウスIgGビーズと磁石とを用いてネガティブ選択した。磁気ビーズはすべてDynal(オスロ、ノルウェー、それぞれcat. no. 111.12, 111.04, および110.11)から入手し、抗CD56抗体はPharminogen(San Diego, カルフォルニア州, cat. no. 31660.d)から入手した。すべての工程は4で実施した。細胞懸濁液をフローサイトメトリーにより分析し、90%を超える細胞がCD3+細胞からなることを示された。

30

【0107】

HIV患者のT細胞を用いた増殖アッセイ

増殖アッセイを100μl容積の平坦底面96穴マイクロタイタープレート中で0.75×10<sup>6</sup>個/mlのCD3+ T細胞のインキュベーションにより実施した。引き続き、活性化は、ヒツジ抗マウスIgG(Dynal, cat. no. 110.02)を細胞:ビーズを1:1の比率でコートした単分散磁性ビーズを添加することにより達成され、次いで、抗CD3(クローンSpvT<sub>3</sub>b)を、示された実験について最終希釈度1:125000で添加した。抗体の最適濃度を初期設定の段階で慎重に滴定し、いくつかの異なる抗体希釈度での並行実験を常に実施した。増殖は、細胞を72時間、インキュベートすることにより分析したが、その間の最後の16時間[<sup>3</sup>H]-チミジンを含むさせた。細胞を洗浄し、ガラスフィルター上に捕集し、次いで-シンチレーションカウンティングにより分析した。cAMP類似化合物を使用する場合には、抗CD3抗体の添加により活性化する30分前に加えた。8-CPT-cAMPはSigma(St. Louis, ミズーリ州)から入手した。

40

50

## 実験

進行中である第ⅠⅠ相の臨床試験は、非選択的なCOX阻害剤（インドメタシン）を用いる短期治療の免疫賦活効果を、HIV感染患者由来のT細胞上の代理パラメーター（surrogate parameters）に関してテストしている。認可された手順によると、患者は50mgのインドメタシンを1日に3回（全投与量150mg/日）2週間、0日、14日、28日（中止後2週間目）にサンプリングしながら、受けることになっていた。しかしながら、上腹部痛および消化不良などの有害事象、ならびに初期患者間の研究の中断により、この投与量を25mgのインドメタシンを1日に3回にカットしなければならなかった（全投与量75mg/日）。図11は、研究をこれまで完了した3人の患者（患者1～患者3）のT細胞免疫機能（活性化後の増殖として測定）を示す。

10

### 【0108】

上の図は開始時（0日）、インドメタシン治療の終了時（14日）、その2週間後（28日）におけるT細胞活性化後の増殖レベルを示す。見て分かるように、患者1および2は、インビボで投与された非選択的COXアンタゴニストによっては免疫機能を増加しなかった。しかしながら患者3におけるT細胞の応答は、約2.5倍に増加し、インドメタシン中止後2週間まで持続した。図11b、下図は、細胞培養においてPKA-I選択的cAMPアンタゴニスト、Rp-8-Br-cAMPとをインビトロでインキュベートした後のT細胞の増殖を示す。cAMP媒介によるT細胞機能不全の程度は、アンタゴニストによって得られた増殖の逆転から明らかである（上図と下図を比較。すべての時点で、増殖が入院患者1および3で約2倍増加、患者2では効果なし）。インドメタシンが納得できる効果を有しなかったことは図11から明らかであり、このことは有害事象による投与量の制限のみならず、COX-2選択性の欠如によるものかもしれない。

20

### 【0109】

#### 【実施例4】

HIV患者はインビボで非選択的COX阻害剤の投与した後、かるうじて効果を示す（実施例3の実験の続き）。

#### 方法

使用した方法は実施例3で記載した方法であった。

#### 実験

3剤の併用治療に加えて、インドメタシン25mgを1日に3回経口的に14日間受けた進行中の第ⅠⅠ相臨床試験（実施例3の続き）における7人の患者の結果を図12に示す。患者1～3は実施例3で述べた患者に相当する。インドメタシン投与に関わる問題は、上述（実施例3）したように、その投与量を1日3回25mgまでに制限される有害事象である。この許容される用量で、この非選択的COX阻害剤の効果は限界にある。治療の14日後、7人の患者のうち2人のみにおいて、T細胞免疫機能（T細胞活性化後の増殖として測定した）が明らかに上昇したが、1人の患者は免疫機能が減少し、4人の患者は僅かな変化であった。インドメタシンを中止して2週間後、7人の患者のうち5人は0日目と比べて免疫応答性が上昇した。しかしながら、2人の患者が2倍を超えるT細胞増殖の増加を示しただけであった。

30

### 【0110】

40

#### 【実施例5】

COX-2阻害剤はインビトロでMAIDS T細胞の免疫機能を向上させる

#### 方法

増殖アッセイで使用した方法は、実施例1に記載の方法であった。PGE<sub>2</sub>アッセイは実施例1に記載したとおりである。

#### 実験

#### 増殖アッセイ

混合リンパ節細胞を感染後17週目のMAIDSマウスから分離した。細胞を抗CD3抗体により活性化してT細胞の増殖を誘導し、免疫機能の尺度として、[<sup>3</sup>H]-チミジンの取り込みを72時間後に試験した。MAIDS感染マウス由来の細胞の増殖もまた、非

50



感染細胞のT細胞増殖の5～20%だけであった(MAIDSの細胞において、2000～12000 cpmに対して、非感染マウス由来の細胞における平均55000 cpm)。しかしながら、ロフェコキシブ(rofecoxib)(図13)またはセレコキシブ(celcoxib)(図14)を培養中に添加すると、これにより濃度依存的な様式で、MAIDS感染マウス由来の細胞増殖は2～3倍に増加した。これと対照的に、ロフェコキシブまたはセレコキシブを用いる非感染マウス由来の対照培養の処置は、その増殖を増加させなかった(COX-2阻害剤の存在下で、0.8～1.0倍の増加、すなわち増加しない。表示せず。)。MAIDSマウス由来のT細胞において、最大効果の半分(ED50)を示すロフェコキシブおよびセレコキシブの濃度は、ロフェコキシブについて約0.01 μM、セレコキシブについて約0.03 μMであった。マイクロモル濃度より下の濃度が効果的であるという事実は、明らかに、観察された免疫応答の増加がCOX-2の阻害を介しており、ロフェコキシブおよびセレコキシブのマイクロモル濃度においてのみ阻害されるCOX-1ではないことを示す(Warnerらの値, 1999年, PNAS USA, 96, p7563-7568)。したがって、阻害されたT細胞免疫機能のロフェコキシブおよびセレコキシブによる反転は、混合培養における減少したPGE<sub>2</sub>産生となり、それによってCOX-2の阻害を介してT細胞cAMPレベルの低下をもたらす。

10

#### 【0111】

PGE<sub>2</sub>産生

PGE<sub>2</sub>レベルに与えるCOX-2阻害剤ロフェコキシブおよびセレコキシブの効果も分析した。図15に見られるように、MAIDSマウス由来の粗リンパ節細胞は、健常マウス由来のリンパ節細胞よりも5～6倍のPGE<sub>2</sub>を分泌した(図6も参照)。さらに、感染マウスではLPSに応答したPGE<sub>2</sub>レベルは、非感染マウスでの約2倍と対照的に8～10倍に増加した。細胞をCOX-2阻害剤、ロフェコキシブおよびセレコキシブの存在下で培養すると、MAIDSリンパ節細胞のPGE<sub>2</sub>分泌は、非感染細胞と同様であった。インドメタシンの効果(図7の増殖との比較)を対照として含める。

20

#### 【0112】

#### 【実施例6】

COX-2阻害剤はインビボでMAIDS T細胞の免疫機能を向上させる

方法および実験

感染マウス(感染後17週目)を、経口的に(すなわち口から)1週間、ヒトへの使用に対して推奨される用量に相当する(ネズミでは7倍高いクリアランスを考慮して)ロフェコキシブの投与量で処置した。MAIDSマウスは通常、拡大されたリンパ節および脾臓とともに免疫増殖症候群を発生する。これによると、未治療の感染動物は、平均脾臓重量1.3 gおよび集めたリンパ節の平均重量1.7 gを有していた。対照的に、ロフェコキシブを7日間受けたMAIDSマウスは、平均脾臓重量0.8 gおよび集めたリンパ節の平均重量0.3 gを有していて、リンパ球増殖の反転を示した。

30

#### 【0113】

結果を図16に示す。T細胞免疫機能を、感染した治療および未治療のマウスに由来する粗リンパ節細胞で評価した場合、未治療の感染動物は、抗CD3誘導性増殖を2000～10000 cpmの範囲(平均7300 cpm)で有していたが、これに対して1週間ロフェコキシブを受けた感染マウスは、感染した未治療のマウスと比較して2.7～5.6倍に増加した、抗CD3に対するT細胞応答を有することは明らかであった。さらに、感染した未治療のマウスは、Rp-8Br-cAMPSの存在下で、抗CD3誘導性のT細胞増殖を増加させたが、この2～3倍の効果は、ロフェコキシブを用いて処置されたマウスでは失われた。このことは、インビボでロフェコキシブを用いる治療が、PGE<sub>2</sub>レベルを低下させ、T細胞機能のcAMP媒介による阻害を反転させたことを示した。

40

#### 【0114】

#### 【実施例7】

インビボでロフェコキシブまたはセレコキシブを用いたMAIDSマウスの治療は抗CD

50

### 3 に対する T 細胞応答および免疫応答を増加させる

#### 方法および実験

感染マウスを、ヒトへの使用に対して推奨される用量に相当する投与量で（ネズミでは 7 倍高いクリアランスを考慮して、それぞれ 3 および 20 mg / kg / 日）、ロフェコキシブおよびセレコキシブを用いて処置した。非経口的投与を、イントラリピッド中で処方される COX - 2 阻害剤を腹膜内に注射することにより実施した。結果を図 17 に示す。

#### 【0115】

T 細胞の免疫機能を、感染して 18 ~ 20 日後の治療および未治療の感染マウスに由来する粗リンパ節細胞で評価すると、未治療の感染動物は抗 CD 3 誘導性の増殖を 10000 c p m の範囲で有していたが、ロフェコキシブを 18 ~ 20 日間受けた感染マウスは、感染した未治療マウスと比較して、約 2 倍に増加した抗 CD 3 に対する T 細胞応答を有することが明らかであった。同様にセレコキシブは、注射された多くのマウス群由来の細胞において、免疫応答を、未治療の非感染マウスの約 3 倍を超えるまで向上させた。

10

#### 【0116】

#### 【実施例 8】

MAIDS マウスのメロキシカム (meloxicam) を用いたインビボ治療は T 細胞免疫機能を向上させる

#### 方法および実験

感染および健康マウスを 2 . 8 mg / kg / 日のメロキシカムを用いて治療した。このメロキシカムの投与量は、ネズミでは 7 倍高いクリアランスを考慮すると、ヒトへの使用に対して推奨される用量に相当する。非経口的投与は、水溶性メロキシカム注入化合物で満たされた浸透ポンプを皮下移植することにより実施された。T 細胞機能を評価し、その結果を図 18 に示す。

20

#### 【0117】

治療された感染マウスおよび対照の（PBS 処置された）感染マウスに由来する粗リンパ節細胞において、処置して 2 週間後に T 細胞免疫機能を評価すると、PBS 処置された感染動物は、抗 CD 3 誘導性の増殖を 500 c p m の範囲で有していたが、メロキシカムを 14 日間受けた感染マウスは、PBS のみを受けた感染マウスと比較して、抗 CD 3 に対する T 細胞の免疫応答が有意に増加していることが明らかであった（図 18 a、10 倍を超える； $p < 0 . 05$ ）。

30

#### 【0118】

メロキシカムによるインビボ阻害からの解除およびそれによる COX - 2 の再活性化を防止するために、3 日の T 細胞増殖インビトロアッセイ中、メロキシカムを細胞培養に再び添加したとき、メロキシカム治療群の免疫応答は、インビトロでメロキシカムを添加しないもの（ $p = 0 . 005$ ）よりも 2 倍高く、さらに PBS をインビボで受けた MAIDS マウスと比較しても、その効果は有意であった（図 18 b、 $p < 0 . 05$ ）。

#### 【0119】

対照的に、PBS をインビボで受け、メロキシカム治療を受けなかった MAIDS マウスのみが、PKA タイプ I 選択性 cAMP アンタゴニスト、Rp - 8 - Br - cAMP を、抗 CD 3 刺激混合リンパ節培養にインビトロで添加した場合に、上昇した免疫応答を示した（図 18 c）。メロキシカム治療した MAIDS マウスには cAMP アンタゴニストの効果がないという事実は、インビボのメロキシカム治療が MAIDS の cAMP 誘導の免疫不全を減少させまたは除去し、免疫機能を復原することを示すものである。

40

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、MAIDS 感染後において CD 8 + （A）、CD 4 + （B）および B （C）細胞におけるサイクリック AMP レベルを示す。単核細胞が、MAIDS で感染したマウスのリンパ節から種々の経過時間で分離され、FACS - セルソーターを用いるネガティブな選択（negative selection）により、CD 4 +、CD 8 + および B 細胞に単離された。細胞内の cAMP レベルは、超音波処理およびラジオイムノアッセイにより測定された。バーは、平均値 ± SD（ $n = 3$ 、個々のマウス）を示す。

50

【図2】図2は、CD4<sup>+</sup> 集団、Thy-1.2 陰性および陽性の集団におけるMAIDS cAMP レベルを示す。感染マウス3匹と週齢をマッチさせた対照マウス3匹とからのリンパ節細胞は、FACS - ソートされ、CD4<sup>+</sup>、Thy-1.2<sup>+</sup> (白のバー) およびCD4<sup>+</sup>、Thy-1.2<sup>-</sup> (濃いバー) の集団とし、細胞内cAMPレベルは図1と同様に測定した。バーは平均値 $\pm$ SD (n = 3)を示す。

【図3】図3は、MAIDSマウス対野生型マウスについてプロテインキナーゼA活性のレベルを示す。(A)マウス脾臓から精製したリンパ節細胞の界面活性剤で可溶化した抽出物におけるキナーゼ活性は、基質として5  $\mu$ M cAMPの存在(総活性、ハッチバー)または非存在(フリー活性、濃いバー)のKemptideを用いて、分析された。PKA特異的プロテインキナーゼ阻害剤(PKI, 1  $\mu$ M)により阻害されないホスト 10  
トランスフェラーゼ活性は、PKA特異的活性のみを示すために差し引かれた。感染マウス(MAIDS, n = 4)における活性は、野生型の同腹子のもとの比較で示される。(B) [<sup>3</sup>H - cAMP] 結合は、(A)と同じ抽出物中で測定し、Rモノマーのモル量を算出した。

【図4】図4は、MAIDSおよび野生型マウスの細胞におけるPKA C-サブユニットの免疫学的所在決定を示す。対照マウス(上パネル)およびMAIDS感染マウス(下の2個のパネル)からの単核細胞は、サイトスピン(400  $\times$  g)によりガラススライドに付着させ、固定してから、非PKA-Cポリクローナル抗体およびHRP-結合二次抗体(茶色染色)で免疫染色した。対比染色はヘマトキシリン(クロマチン上で青色染色) 20  
による。

【図5】図5は、MAIDSおよび野生型マウスのT細胞機能への、PKAタイプIIアンタゴニスト(抑制因子)、RP-8-プロモ-cAMP-ホスホロチオエート(phosphorothioate) (Rp-8-Br-cAMP S)の効果を示す。TCR/CD 刺激したT細胞増殖は、MAIDSマウス(A)および非感染の対照マウス(B)から分離したT細胞を用いて評価した。

MAIDSマウス(白丸、点線)および対照マウス(黒丸、実線)から分離したCD3<sup>+</sup> T細胞のTCR/CD3刺激した増殖に対するcAMP作動薬(8-CTP-cAMP)の濃度増加効果は、同じ実験(C)で個別に試験した。3つの測定の平均値 $\pm$ SDを示す。表4に取りまとめたデータ(n = 11)を示す。注: CではcAMP作動薬の非存在 30  
下で引き起こされたTCR/CD3増殖が、MAIDSおよび対照の両方のT細胞について100%正規化されたのに対して、AおよびBでは尺度が異なる。

【図6】図6は、インビトロでの、正常およびMAIDSリンパ節細胞によるPGE<sub>2</sub>の分泌を示す。感染後20週でのMAIDS感染マウス(濃いバー、n = 9)および、週齢をマッチさせた対照マウス(陰影バー、n = 4)からのソートしていないリンパ節細胞を、完全培地中で48時間培養し、その後ELISAにより上清中でのPGE<sub>2</sub>の分泌レベルを測定した。

【図7】図7は、正常およびMAIDS感染マウス中の、T細胞免疫機能に対する非選択的COX阻害剤の効果を示す。カラム1 - 対照マウス + 抗CD3、カラム2 - 対照マウス + 抗CD3 + インドメタシン、カラム3 - MAIDSマウス + 抗CD3、カラム4 - MAIDSマウス + 抗CD3 + インドメタシン。T細胞増殖応答は、ソートしていないリンパ 40  
節単核細胞の混合集団において、非選択的COX阻害剤であるインドメタシン(50 ng/ml)の非存在および存在下で、[<sup>3</sup>H] - チミジン取り込みにより評価した。T細胞活性化は、抗CD3 (mAb 2C11; 4 mg)の交差連結(cross-linkage)により達成される。バーは、対照(n = 3)およびMAIDS感染(n = 5)マウスによる平均値 $\pm$ SDを示し、表5に付加的データを示す。細胞は、72時間培養し、その間最後の4時間[<sup>3</sup>H] - チミジンを含んだ。

【図8】図8は、正常(A)およびMAIDS感染(B)マウスにおける、リンパ節リンパ球の異なるサブセットによるCOX-2の発現を示す。CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> TおよびB細胞は、それぞれCD4、CD8およびB220分子の発現に基づいて、ポジティブ 50  
選択(positive selection)によりFACSソートした。CD11b

- 細胞は、ネガティブ選択 (CD 11b 不存在に基づく) によりソートした。MAIDS 感染および正常マウスからの細胞は、次いで溶解させ、各サンプルからのタンパク質 10  $\mu$ g を COX-2 の発現の免疫プロット分析に供した。対照としてプロットは、アクチンに対する抗体と同時に反応させた。

【図 9】図 9 は、MAIDS および野生型リンパ節細胞中での CD 11b の発現を示す。MAIDS 感染および対照マウスからの、リンパ節リンパ球 (CD 4 +、CD 8 + T 細胞、および、B 220 + B 細胞) の異なるサブセットリンパ球による CD 11b の発現を示す (フローサイトメトリーによる)。R 1 : CD 11b 高、R 2 : CD 11b はっきりしない、R 3 : CD 11b -。

【図 10】図 10 は、MAIDS 感染マウスおよび野生型マウスのリンパ節における COX-2 の発現のレベルを示す。リンパ節は、凍結切片を作成し、COX-2 免疫組織化学染色 (茶色染色) に供した。(a) COX-2 について染色された胚中心を有する正常な対照リンパ節。(b) 高い倍率で拡大した正常なリンパ節。HRP-発色反応で陽性に染色される細胞は、取り込まれた物質を有する「染色できる実体」のマクロファージ (矢印) である。c. MAIDS 感染マウス (感染後 20 週) からのリンパ節。注: 変形した形態と構造 d. COX-2 について染色された MAIDS リンパ節の高倍率拡大。注: 細胞質が茶色に染色した細胞多数および多数の有糸分裂像。

【図 11】図 11 は、HIV 感染患者の T 細胞免疫機能への、非選択的 COX 阻害剤のインビボ投与の効果を示す。T 細胞増殖応答は、第 II 相の臨床試験に参加しており 3 剤併用治療に加えて、インドメタシン 25 mg を 1 日 3 回、14 日間経口的に摂取した患者 3 名 (pat. 1 から 3) について、CD 3 + T 細胞中における [ $^3$ H] - チミジン取り込みで評価した。上のパネルは、0 日、14 日 (2 週間の処置後) および 28 日 (中止して 2 週間後) における T 細胞免疫機能を、カラム 1、2 および 3 としてそれぞれ標識して示す。T 細胞活性化は、抗 CD 3 (mAb SpV T 3 b) の交差連結 (cross-linking) により達成される。A : T 細胞活性化後の基底増殖; B : Rp-8-Br-cAMP (1 mM) 存在下での増殖; 注: cAMP 仲介免疫欠損の程度は、上と下のパネルの比較から明らかである。バーは、3 回の測定 of 平均値  $\pm$  SD を示す。細胞は 72 時間培養し、その間、最後の 16 時間は [ $^3$ H] - チミジンを含ませた。

【図 12】図 12 は、図 11 と同様であるが 7 人の HIV 感染患者の、T 細胞増殖への、非選択的 COX 阻害剤インドメタシンのインビボ投与の効果を示し、患者 1 から 7 はそれぞれ、黒丸、白丸、黒三角、白三角、黒正方形、白正方形、および黒菱形により表示する。3 回測定の平均値がプロットされ、結合線は各患者の進展を示す。

【図 13】図 13 は、COX-2 特異的阻害剤であるロフェコキシブの、MAIDS 感染マウスにおける T 細胞免疫機能への効果を示す。T 細胞増殖応答は、ソートしていないリンパ節単核細胞の混合集団において、COX-2 選択的阻害剤であるロフェコキシブの非存在下および濃度が増加する (1.9 から 500 nM) 存在の条件下で、[ $^3$ H] - チミジン取り込みにより評価した。T 細胞活性化は、抗 CD 3 (mAb 2C11; 4  $\mu$ g/ml) の交差連結反応により達成される。3 回測定の平均値は、S 字型適合曲線とともに示される。細胞は、72 時間培養し、その間、最後の 4 時間は [ $^3$ H] - チミジンを含ませた。

【図 14】図 14 は、ロフェコキシブに係る図 13 の記載のように、COX-2 特異的阻害剤であるセレコキシブの、MAIDS 感染マウス中での T 細胞免疫機能への効果を示す。

【図 15】図 15 は、対照マウス (1) または MAIDS マウス (2) について、生体外での (ex vivo) リンパ節 (LN) 細胞による PGE<sub>2</sub> 分泌に対するロフェコキシブおよびセレコキシブの効果 (インドメタシンと比較した) を示す。ソートしていない LN 細胞を、完全培地中で、PGE<sub>2</sub> 誘導剤であるリポポリサッカライド (LPS; 4  $\mu$ g/ml)、非選択的シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシン (50 ng/ml) および COX-2 特異的阻害剤であるロフェコキシブ (0.125  $\mu$ M) およびセレコキシブ (0.125  $\mu$ M) の存在下または非存在下で培養した。48 時間後、上清におけ

10

20

30

40

50

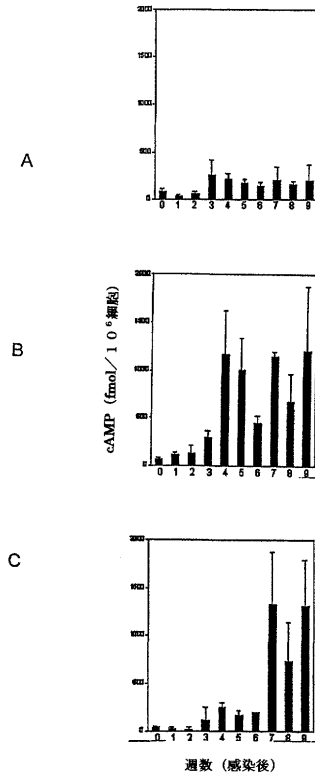
る  $\text{PGE}_2$  の濃度を  $\text{EIA}$  により測定した。感染マウス (20 週) 3 個体と、週齢をマッチさせた対照の 3 個体のプールとを分析した。平均  $\pm$  標準偏差を示す。

【図 16】図 16 は、ロフェコキシブを用いた  $\text{MAIDS}$  感染マウスのインビボ処置の、 $\text{T}$  細胞免疫機能に対する効果を示す。 $\text{MAIDS}$  マウスは、非処置のままであるか (非処置 1 から 3)、あるいはロフェコキシブを心室に挿入した管を経由して、経口で 7 日間投与して処置した ( $3 \text{ mg/kg/day}$ 、1 日 1 回投与、処置 1 および 2)。続いて  $\text{T}$  細胞増殖応答を、処置および非処置動物からの、ソートしていないリンパ節単核細胞の混合集団について、 $\text{Rp-8-Br-cAMP}$  の非存在下 (カラム A) および存在下 ( $0.5$  または  $1.0 \text{ mM}$ 、それぞれカラム B および C) で、 $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みによりインビトロで評価した。 $\text{T}$  細胞活性化は、全サンプルにおいて、抗  $\text{CD3}$  ( $\text{mAb } 2\text{C11}$  ;  $4 \mu\text{g/ml}$ ) の交差連結 ( $\text{cross-linking}$ ) により達成された。対照は、非感染マウスでの  $\text{T}$  細胞増殖を示す。3 回測定からの平均値を示す。細胞は、72 時間培養し、その間、最後の 4 時間は  $[^3\text{H}]$ -チミジンを含ませた。

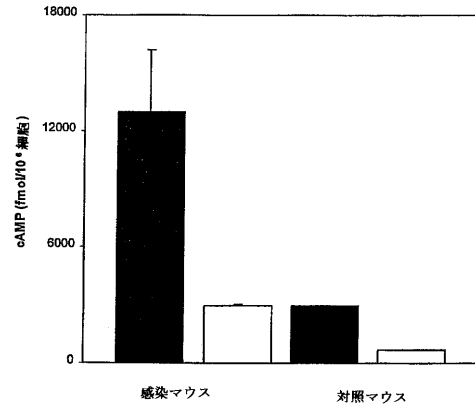
【図 17】図 17 は、ロフェコキシブまたはセレコキシブを用いた、 $\text{MAIDS}$  感染マウスのインビボ処置の  $\text{T}$  細胞免疫機能に対する効果を示す。 $\text{MAIDS}$  マウスには、媒体 (イントラリピッド) とともに注射した。すなわち、腹腔内注射 ( $3 \text{ mg/kg/day}$ 、1 日 1 回投与、 $n=6$ ) によりイントラリピッド中のロフェコキシブで、あるいは腹腔内注射 ( $20 \text{ mg/kg/day}$ 、1 日 1 回投与、 $n=5$ ) によりセレコキシブで、18 から 20 日間処置した。続いて、 $\text{T}$  細胞増殖応答を、 $\text{Rp-8-Br-cAMP}$  を用いないこと除き、他は図 16 について記載されたようにしてインビトロで評価した。対照は、非感染マウス中の  $\text{T}$  細胞増殖を示す。25 から 75 % パーセンタイル値 (囲まれた領域) およびメジアン (囲み中の線) とともに、3 回測定からの平均値を示す (黒丸)。バーはレンジを示す。

【図 18】図 18 は、メロキシカムを用いた、 $\text{MAIDS}$  感染マウスのインビボ処置の  $\text{T}$  細胞免疫機能に対する効果を示す。メロキシカム ( $70 \mu\text{g/動物/day}$  の放出速度) またはリン酸緩衝化生理的食塩水 ( $\text{PBS}$ ) を有する浸透ポンプ ( $\text{Alzet}$ 、 $100 \mu\text{l}$ ) を、 $\text{MAIDS}$  マウス (感染後 14 週) および健康なマウスに 14 日間皮下に埋め込んだ。a) 次いで、 $\text{T}$  細胞増殖応答は、図 17 に記載のようにインビトロで評価した。各グループにおける平均値  $\pm$  該平均の標準誤差 ( $\text{s.e.m.}$ ) を示す。 $\text{MAIDS}$  マウス (濃いバー) からの細胞の、抗  $\text{CD3}$  刺激した増殖へのメロキシカム処置の効果は、 $\text{PBS}$  を受けた  $\text{MAIDS}$  マウス (白バー) のものと比較すると有意性がある ( $p < 0.05$ )。b) インビボでメロキシカムまたは  $\text{PBS}$  で処置した a) のマウスのグループからの混合リンパ節培養物に、インビトロでメロキシカム ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ) を細胞培養中に再び添加し、抗  $\text{CD3}$  誘導  $\text{T}$  細胞増殖を a) のように評価し、そしてインビトロで再度添加したメロキシカムの効果 (白バー) をインビトロでの添加のない細胞の応答 (濃いバー) と比較した ( $p = 0.005$ )。c) a) においてメロキシカムまたは  $\text{PBS}$  でインビボ処置したマウスグループからの混合リンパ節細胞のインビトロ細胞培養物に  $\text{Rp-8-Br-cAMP}$  ( $0.5 \text{ mM}$ ) を添加し、抗  $\text{CD3}$  誘導  $\text{T}$  細胞増殖を a) のように評価した。そして、インビトロでの  $\text{Rp-8-Br-cAMP}$  の効果 (白バー) は、インビトロでの添加を受けていない細胞 (濃いバー) を超える倍数 ( $\text{fold}$ ) 誘導として表わされた。統計値は、2 グループの動物の比較では  $\text{Mann-Whitney U}$  検定により、また 2 つの異なる処置をした同一グループの比較では  $\text{Wilcoxon}$  ペアマッチ検定により分析した。

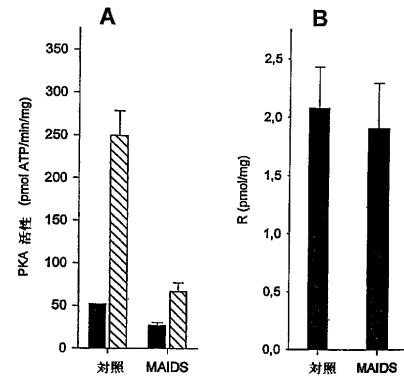
【図 1】



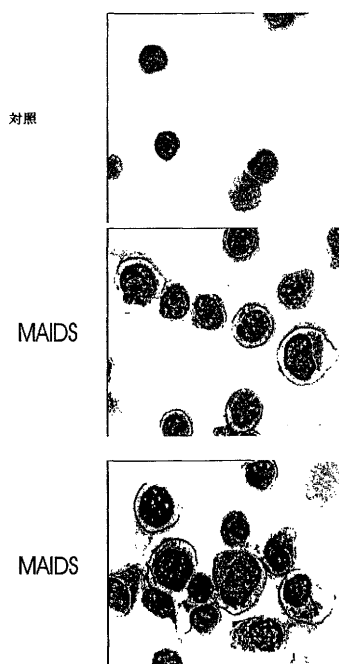
【図 2】



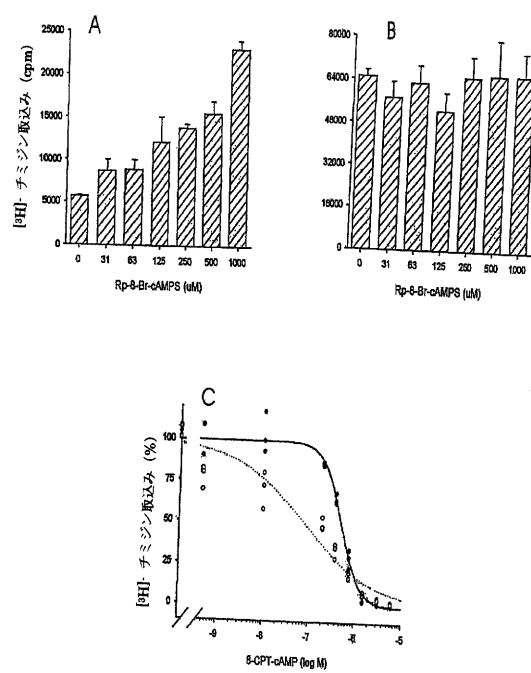
【図 3】



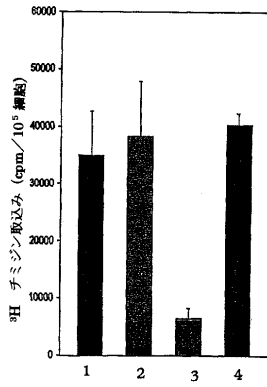
【図 4】



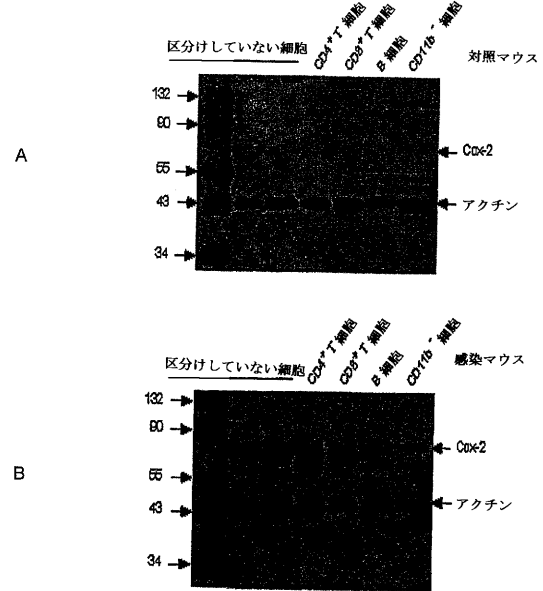
【図 5】



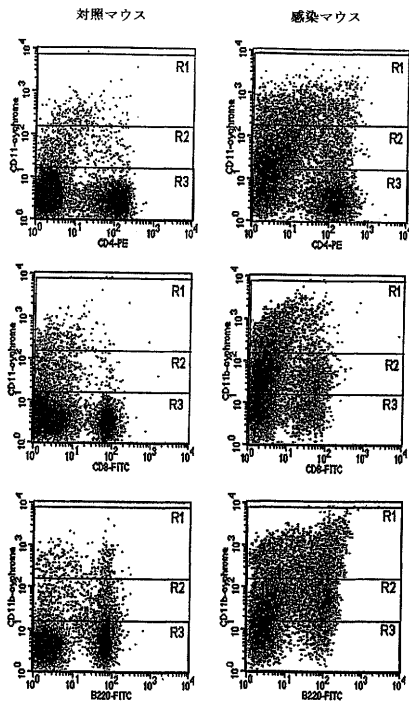
【図 7】



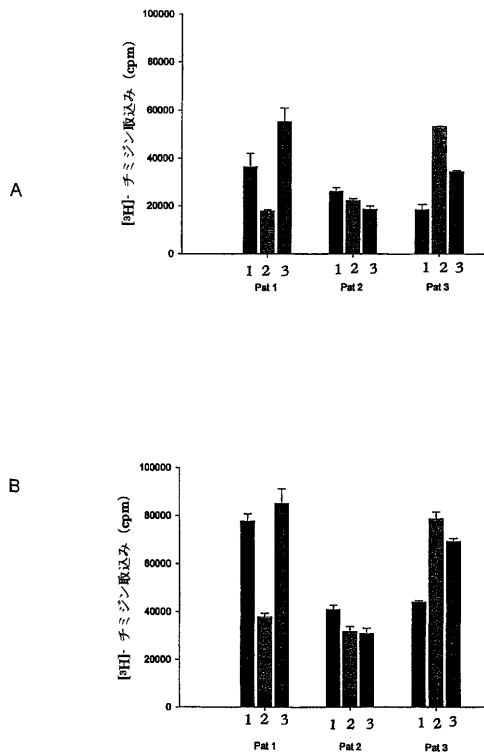
【図 8】



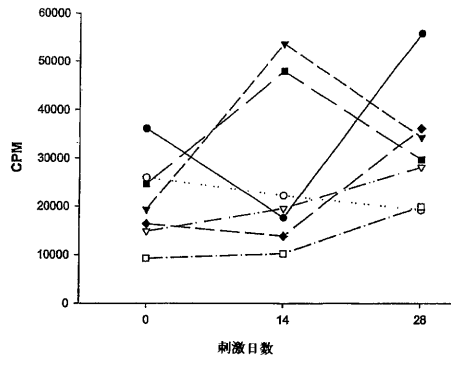
【図 9】



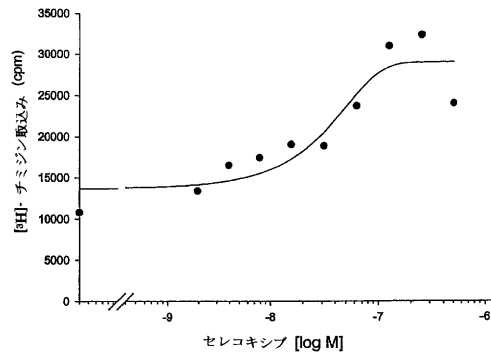
【図 11】



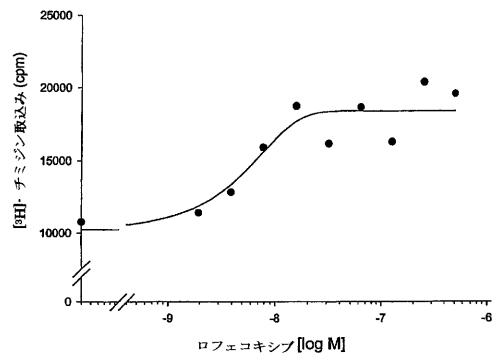
【図 1 2】



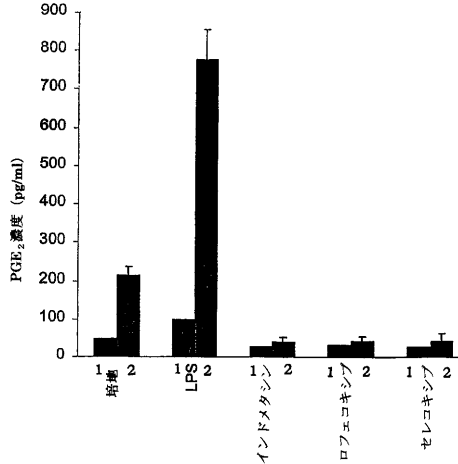
【図 1 4】



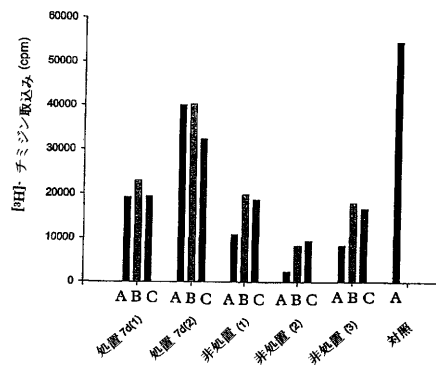
【図 1 3】



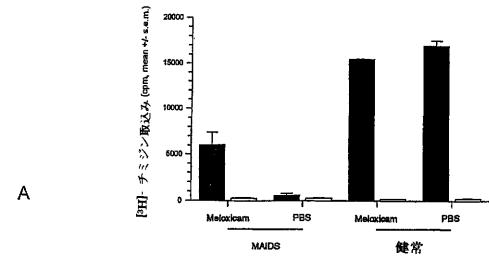
【図 1 5】



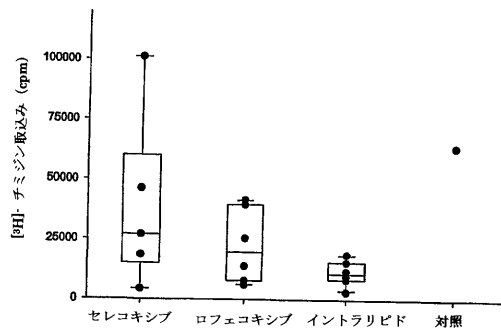
【図 1 6】



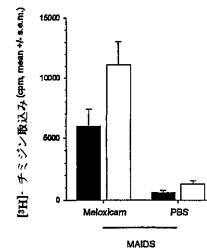
【図 1 8】



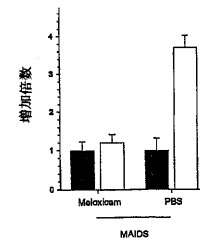
【図 1 7】



B



C





## 【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  
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/07721 A2(51) International Patent Classification: A61K 31/18,  
31/341, 31/381, 31/407, 31/415, 31/5415, 31/661, A61P  
31/12

(21) International Application Number: PCT/GB01/03284

(22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0017908.5 20 July 2000 (20.07.2000) GB  
0109648.6 19 April 2001 (19.04.2001) GB(71) Applicant (for all designated States except US): LAURAS  
AS [NO/NO]; Gaustadalleen 21, N-349 Oslo (NO).(71) Applicant (for GB only): JONES, Elizabeth, Louise  
[GB/GB]; Frank B. Dehn & Co., 179 Queen Victoria  
Street, London EC4V 4EL (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TASKÉN, Kjetil  
[NO/NO]; Bergersletta 20, N-1349 Rykkinn (NO).  
MOUTSCHEN, Michel [BE/BE]; Avenue du Bois  
Imperial de Rognac 60B, B-4121 Neupré (BE). RAH-  
MOUNI-PIETTE, Souad [BE/BE]; Rue des Sapins  
10, B-4100 Seraing (BE). AANDAHL, Einar, Martin  
[NO/NO]; Sidsel Sidsersvei 1c, N-2600 Lillehammer  
(NO). AUKRUST, Pål [NO/NO]; Abraham Pihls veg 5,N-2322 Ridabu (NO). FRÖLAND, Stig, S. [NO/NO];  
Hasselhaugveien 34, N-0851 Oslo (NO). JOHANS-  
SON, Christian, Carl [SE/NO]; Kirkeveien 57, Leil  
601, N-0368 Oslo (NO). HANSSON, Vidar [NO/NO];  
Ingerlien 14, Blommenholm, N-1339 Sandvika (NO).  
KLAVENESS, Jo [NO/NO]; Midtassen 5, N-1166 Oslo  
(NO).(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, 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, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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 reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/07721 A2

(54) Title: METHOD

(57) Abstract: The present invention provides a method of treating or preventing a disorder typified by an immunodeficiency (e.g. HIV), wherein the patient is administered a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof, preferably diisopropylfluorophosphate, L-745337, rofecoxib, NS 398, SC 58125, etodolac, meloxicam, celecoxib or nimesulide, and compositions and products containing the same or use of the same in preparing medicaments and for treatment.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

## METHOD

5 The invention is in the field of treatment of immunodeficiencies and viral infections. More specifically, the invention relates to the use of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors or derivatives thereof in immunomodulation for treatment of immunodeficiency and viral diseases; especially HIV  
10 infection and AIDS and related conditions.

Prostaglandins play an important role in the inflammation process and inhibition of formation of prostaglandins has been a popular target for development of anti-inflammatory drugs. Non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAID's) inhibit cyclooxygenase (COX) which is an enzyme involved in the biosynthesis of prostaglandin intermediates from arachidonic acid. There are several NSAID's in clinical use including drugs like indomethacin, piroxicam, tenoxicam,  
15 diclofenac, meloxicam, tenidap, isoxicam, acetylsalicylic acid, diflunisal, sulindac, ibuprofen, naproxen and ketoprofen.

NSAID's are today among the most widely prescribed drugs worldwide.

25 These NSAID's are clinically efficient drugs and they possess antipyretic, anti-inflammatory and antithrombotic effects. The main indications for this class of drugs are arthritis including osteoarthritis and rheumatoid arthritis, painful musculoskeletal conditions and general pain conditions. However, there are severe side-effects with these drugs. The most frequent side effects are gastrointestinal ulceration and bleeding, inhibition of platelet aggregation and interaction with other drugs.  
30

35 In the early 1990's a second COX isoform of the enzyme was cloned. This new COX isoform is now known as COX-2 (Vane et al, 1998, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.,

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 2 -

38, p97-120).

There are now two well known isoforms of COX, COX-1 and COX-2 (recently the existence of COX-3 has also been postulated). COX-1 is present in most tissues and can be regarded as the housekeeper enzyme. The activity of the COX-1 enzyme protects, for example, the lining in the gastrointestinal tract. COX-2, however, is not present normally but increases during inflammation. Several of the side effects of NSAID's are related to inhibition of COX-1 enzyme. NSAID's inhibit both COX-1 and COX-2 (see Tables 1-3):

**Table 1:** IC<sub>50</sub> values and COX-2/COX-1 ratios of different NSAID's in guinea pig macrophage model (IC<sub>50</sub> values from Engelhart et al. in J. Inflammatory Res., 44, p422-43, 1995)

NSAID'S	COX-2 IC <sub>50</sub> (μmol/litre)	COX-1 IC <sub>50</sub> (μmol/litre)	COX-2 selectivity COX-1/COX-2
Meloxicam	0.0019	0.00577	3
Diclofenac	0.0019	0.000855	0.45
Piroxicam	0.175	0.00527	0.030
Tenoxicam	0.322	0.201	0.6
Indomethacin	0.00636	0.00021	0.03
Teridep	47.8	0.393	0.008

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 3 -

Table 2: IC<sub>50</sub> values for NSAID's in intact cell on COX-1 (bovine endothelial cells) and COX-2 (stimulated macrophages) (IC<sub>50</sub> values from Taketo in J. National Cancer Institute, 90, p1529-1536, 1998)

NSAID'S	COX-2 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ mol/litre)	COX-1 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ mol/litre)	COX-2 selectivity COX-1/COX-2
Asprin	50	0.3	0.006
Indomethacin	0.6	0.01	0.02
Tolfenamic acid	0.005	0.0003	0.06
Ibuprofen	15	1	0.07
Acetaminophen	20	2.7	0.1
Sodium salicylate	100	35	0.35
BW 755C	1.2	0.65	0.5
Flubiprofen	0.025	0.02	0.8
Carprofen	3	3	1
Diclofenac	0.35	0.5	1.4
Naproxen	1.3	2.2	1.7
BF 389	0.03	0.15	5

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 4 -

Table 3: Inhibition of recombinant human PGH synthesis (COX-1 and COX-2) (IC<sub>50</sub> values from Laneuville et al. in J. Pharm. Exp. Ther., 271, p927-34, 1994)

NSAID'S	COX-2 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ mol/litre)	COX-1 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ mol/litre)	COX-2 selectivity COX-1/COX-2
Indomethacin	>1000	13.5	<0.01
Sulindac sulphide	50.7	1.3	0.03
Piroxicam	>500	17.7	0.04
Diclofenac	20.5	2.7	0.13
Flubiprofen	3.2	0.5	0.16
Meclofenamate	9.7	1.5	0.15
Phenylbutazone	>100	16.0	<0.16
Naproxen	28.4	4.8	0.17
Ibuprofen	12.5	4.0	0.3
Ketorolac tromethamine	60.5	31.5	0.5
DHA (22:6)	41	25.6	0.6
6-MNA	93.5	64.0	0.7
Etodolac	60	74.4	1.2
Salicylic acid	>1000	>1000	~1

During the last decade several new selective COX-2 inhibitors and so called "preferential" COX-2 inhibitors have been identified. Several of these COX-2 inhibitors have been developed and a few of these have recently reached the market. Some of these new COX-2 inhibitors do not show inhibition of COX-1 in clinical doses. Extensive clinical studies and clinical practise on use of these COX-2 inhibitors show that these new COX-2 inhibitors have great advantages with regard to safety compared to non-selective NSAID's. For reviews on COX-2 inhibitors see for example Golden et al., 1999, Osteoarthritis. 25, p359-379, Mitchel et al., 1999, Brit. J. Pharmacol., 128, p1121-1132, Lipsky, 1999, Am. J. Med., 106 (5B), p515-575, Taketo, 1998, J. National Cancer Inst., 90, p1529-1537, Griswold et al., 1996, Med. Res. Rev., 16, p181-206 and Reitz et al., 1995,

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 5 -

Ann. Rep. Med. Chem., 30, p179-188.

Further publications of interest on different COX-2 inhibitors include for example: Lane, 1997, J.

Rheumatol., 24 (suppl. 49), p20-24, Mehlish et al., 1998, Clin. Pharmacol. Ther., 63, p1-8, Zhao et al.,

5 1997, Arthritis Rheum., 40 (suppl.), S88, Ehrlich et al., 1997, Arthritis Rheum., 40 (suppl.), S93, Maziasz et al., 1997, Arthritis Rheum., 40 (suppl.), S195, Mengle-Gaw et al., 1997, Arthritis Rheum., 40 (suppl.), S93,

10 Morrison, 1999, Clin. Ther., 21, p943-953, Chan et al., 1995, J. Pharmacol. Exp. Ther., 274, p1531-37, Riendeau et al., 1997, Br. J. Pharmacol., 121, p105-117, Black et al., 1999, J. Med. Chem., 42, p1274-81, Cuo et al., 1996, J. Biol. Chem., 271, p19134-39, Geiss, 1999,

15 Scand. J. Rheumatol., 109 (suppl.), p31-37, Warner et al., 1999, PNAS USA, 96, p7563-68, Bjarnson et al., 1997, Scand. J. Gastroenterol., 32, p126-130, Danneberg et al., 1999, Semin. Oncol., 26, p499-504, Mitchell et al., 1993, PNAS USA, 90, p11693-97, Futaki et al., 1994,

20 Prostaglandins, 47, p55-9, Futaki et al., 1993, J. Pharm. Pharmacol., 45, p753-5, Masferrer et al., 1994, PNAS USA, 91, p3228-32, Klein et al., 1994, Biochem. Pharmacol., 48, p1605-10, Reitz et al., 1994, J. Med. Chem., 37, p3878-81, Seibert et al., 1994, PNAS USA, 91, 25 p12013-17, Klein et al., 1996, Biochem. Pharmacol., 51, p285-90, Nantal et al., 1998, 9th Intern. Conference Inflamm. Res. Assoc., Nov 1-5, Pennig et al., 1997, J. Med. Chem., 40, p1347-65 and Puig et al., 2000, J. Med. Chem., 43, p214-223.

30 COX-2 inhibitors are a relatively diverse group of compounds from a chemical structure point of view.

Compounds which selectively inhibit COX-2 are described in many patent documents of the last decade. Some of

35 these are WO 94/26781, WO 94/20480, WO 94/13635, WO 95/00501, WO 94/27980, WO 94/15932, WO 95/21817, WO 95/15316, WO 96/06840, WO 96/03388, WO 96/03387, WO 96/03392, WO 96/25405, WO 96/24584, WO 96/03385, WO

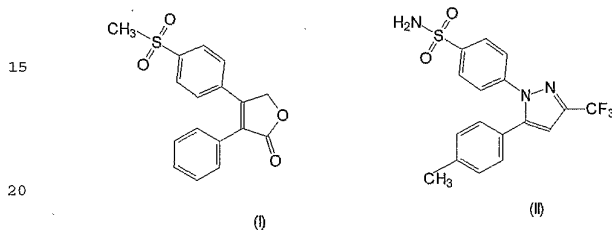
WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 6 -

96/16934, WO 98/41516, WO 98/43966, WO 99/12930, EPO 673  
366, WO 98/41511, WO 98/47871, WO 99/20110, WO 99/23087,  
WO 99/14194, WO 99/14195, WO 99/15513 and WO 99/15503  
and in US patents numbers 5,380,738, 5,344,991,  
5,393,790, 5,434,178, 5,474,995, 5,475,018 and  
5,510,368.

Two compounds are currently launched, rofecoxib (4-  
(4-methylsulfonyl)phenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone (I)  
in Vioxx® and celecoxib (4-(5-(4-methylphenyl)-3-  
(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl)-benzenesulfonamide)  
(II) in Celebra®:



Rofecoxib is described in WO 93/0500501 from Merck  
Frosst Canada and further in Morrison, 1999, Clin.  
Ther., 21, p943-953, Chan et al., 1995, J. Pharmacol.  
Exp. Ther., 274, p1531-37 and in Nantel et al., 1998,  
supra.

Celecoxib is described by Geiss, 1999, Scand. J.  
Rheumatol., 109 (suppl.), p31-37 and by Penning et al.,  
1997, J. Med. Chem., 40, p1347-65. Celecoxib is  
described to be 375-fold more selective for COX-2  
compared to COX-1.

Several other COX-2 inhibitors have been evaluated  
in biological systems and some of these are BF 389  
(III), CGP 28232 (IV), DFP, DFU (V), DuP 697 (VI),  
etodolac (VII), FK 3311 (VIII), flosulide (IX), L-

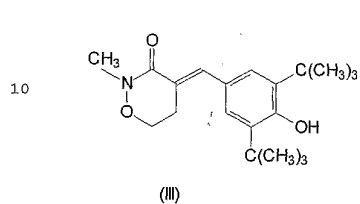
WO 02/07721

PCT/GB01/03284

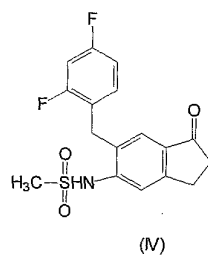
- 7 -

745,337 (X), meloxicam (Mobic®, US 4233299, 4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-2-thiazolyl)-1,1-dioxide-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide) (XI), MF tricyclic (XII), nimesulide (XIII), NS-398 (XIV) and SC-58125 (XV):

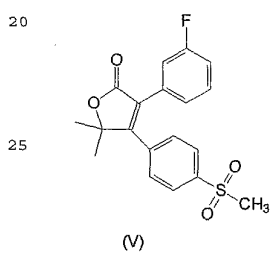
5



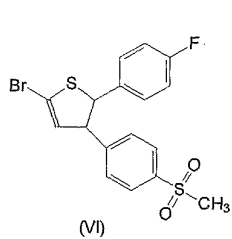
15



20



30



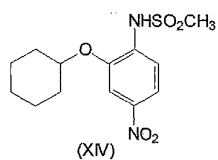
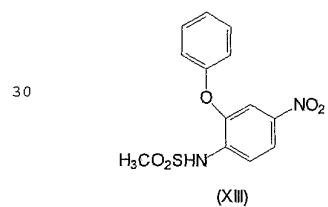
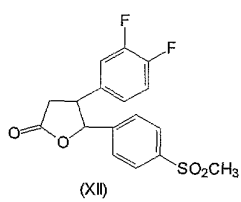
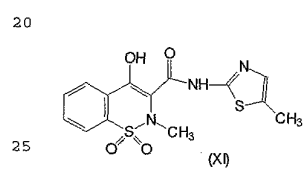
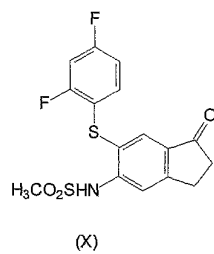
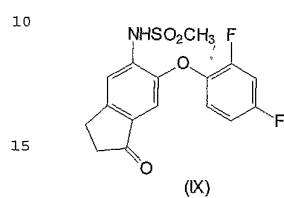
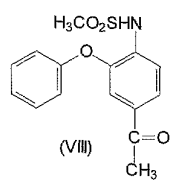
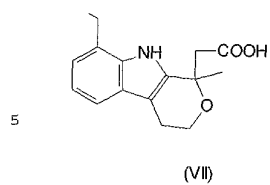
35



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

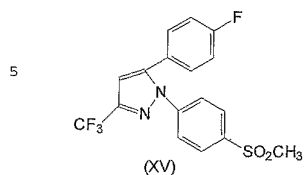
- 8 -



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 9 -

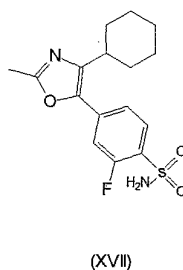
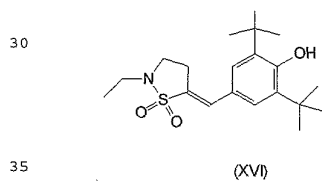


Further compounds described for COX-2 inhibition include S-2474 (from Shionogi, EP 595546, 5(E)-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy)benzylidene-2-ethyl-1,2-isothiazolidine-1,1-dioxide) (XVI), JTE-522 or RWK-57504 (4-(4-(4-cyclohexyl-2-methyl-5-oxazolyl)-2-fluorobenzenesulfonamide) (XVII), Darbufelone mesylate (Pfizer, WO 94/03448, monomethanesulfonate salt of 2-amino-5-((3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl)methylene-4(5H)-thiazolone) (XVIII), 6089 (from Kotobuki Pharmaceutical) (XIX), Valdecixib (Pharmacia, 4-(5-methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl)-benzenesulfonamide) (XX), Paracoxib sodium (Pharmacia, sodium salt of N-((4-(5-methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl)-phenyl)sulfonyl)-propanamide) (XXI), 4-(2-oxo-3-phenyl-2,3-dihydrooxazol-4-yl)-benzenesulfonamide (Almirall-Prodespharma) (XXII) and Etoricoxib (MK-633, Merck and Co.):

15

20

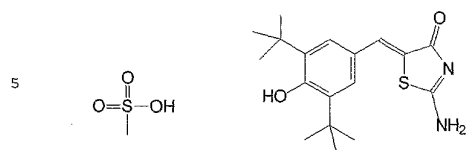
25



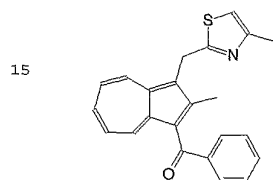
WO 02/07721

PCT/GB01/03284

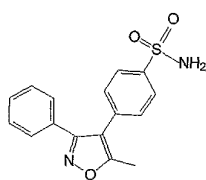
- 10 -



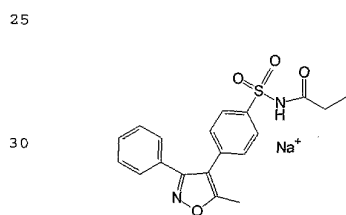
10 (XVII)



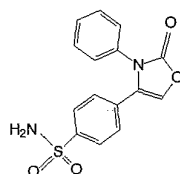
20 (XIX)



(XX)



30 (XXI)



35 (XXII)

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 11 -

The above described compounds form preferred COX-2 inhibitors for use in the methods described hereinafter.

The indications for COX-2 inhibitors are arthritis, musculoskeletal pain conditions and general pain which have been treated with classical NSAIDs such as indomethacin, diclofenac and naproxen. Recently, it has also been suggested to use COX-2 inhibitors in cancer therapy and maybe also cancer prevention. COX-2 inhibitors might also have potential for use in relation to Alzheimer disease and other dementia-associated brain processes.

The potentials of the clinical utility of COX-2 inhibitors are discussed in for example Nature, 367, p215-216 (1994), in Drug News and Perspectives, 7, p501-512 (1994), in Annual Reports in Medicinal Chem., 30, p179-188 (1995) and in Oncogene, 18, p7908-7916 (1999).

There are no specific suggestions for use of COX-2 inhibitors in antiviral therapy or more specifically in HIV/AIDS therapy, and no COX-2 inhibitors have been tested with regard to anti-HIV effects. Furthermore, there is no suggestion to use COX-2 inhibitors (or non-selective COX-inhibitors) as immunostimulatory agents in the treatment of immunodeficiency of viral and non-viral origin.

HIV infection and AIDS is a major health problem with more than 33 million people infected with the virus worldwide. Most of the infected people are located in Africa (sub-Sahara) and in parts of Asia. There are today two classes of anti-AIDS compounds in routine clinical use; inhibitors of HIV reverse transcriptase and inhibitors of HIV protease. HIV reverse transcriptase inhibitors can be divided into non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) and nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs).

The most frequently used NNRTI's are nevirapine, delavirdine, efavirenz, emivirine and T180. The most frequently used NRTI's include zidovudine, didanosine,

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 12 -

stavudine and zalcitabine. Clinically useful HIV protease inhibitors include inclinavir, palinavir and saquinavir.

5 The present treatment of HIV infection and AIDS is based on a combination of several drugs, a so-called cocktail of inhibitors of reverse transcriptase and protease inhibitors. These combinations, called HAART (highly active antiretroviral therapy), are quite effective and can reduce the virus back to undetectable levels in patient's blood. However, HAART is not a cure for the patient, because the virus is still present in the immune cells, and the disease can reappear at any time; upon discontinuation of therapy viremia peaks and rapid progression to AIDS is frequently observed. 10 Furthermore, the immunodeficiency and the HIV-specific T-cell dysfunction persists during HAART. This therapy requires life-long treatment and the treatment is very expensive. The cost of the drugs alone, often exceeds USD 15 000. There are, in addition, several other 15 problems associated with this therapy; difficulties with patient compliance (complicated drug regimes), development of resistant viruses, non-ideal pharmacokinetics and side effects such as, for example, suppression of bone-marrow and long-term metabolic effects. 20

For recently published reviews on anti-HIV therapy see for example: Hillegroth, 1998, Pharm. uns. Zeit., 1998, 27, p22-25, Hillegroth, 1998, Pharm. uns Zeit., 7, p111-116, Stellbrink, 1997, Dk Ärztebl., 94, p2497-2503, 25 Rettle et al., 1998, Int. J. STD AIDS, 9, p80-87, De-Clercq, 1998, Antiviral Res., 38, p153-179, Gait et al., 1995, TIBTECH, 13, p430-438 and Redshaw et al. in "Emerging Drugs: The Prospects of Improved Medicines", Chapter 6, p127-154, 1997. 30

35 In conclusion, although multidrug combinations like HAART has significantly improved the prognosis for patients suffering from HIV infection, there is a

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 13 -

medical need for new compounds in antiviral therapy of HIV; especially agents stimulating the immune system. The present invention addresses this need.

Expression of COX-2 is normally restricted to  
5 brain/brain processes, to arthritic synovia and sites of tissue injury. COX-2 is not found in normal lymph nodes or lymphocytes. It has now surprisingly been found however that in mice infected by the immunodeficiency disorder MAIDS, lymph node cells express high levels of  
10 COX-2. Furthermore, positively selected CD4+ and CD8+ T cells as well as B cells from MAIDS lymph nodes contained high levels of COX-2 (see Example 2). It has been found that this COX-2 may be targetted to alleviate symptoms of the immunodeficiency disorder, e.g. to  
15 alleviate T cell dysfunction by acting as an immunostimulant, e.g. by generating antigen-specific immune responses.

Whilst not wishing to be bound by theory, it is believed that COX-2 activity increases PGE<sub>2</sub> production  
20 which in turn increases the levels of cAMP which activates the PKA signalling pathway resulting in impaired lymphocyte function. Work conducted on mice with MAIDS *in vivo* illustrates that COX-2 inhibitors improve the immune functions of T cells (see Example 6).

25 The present invention provides a new method for treating or preventing immunodeficiency; especially for treatment of HIV and AIDS which comprises treating a subject with a therapeutically effective amount of a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically  
30 acceptable salt thereof.

Thus in a first aspect the present invention provides a method of treating or preventing a disorder typified by increased COX-2 activity, such as disorders  
35 typified by decreased immune function, in a human or non-human animal (e.g. through increased COX-2 expression) wherein said animal is administered a therapeutically effective amount of a COX-2 inhibitor or

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 14 -

derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof.

As used herein increased COX-2 activity refers to increased levels of activity either through the production of more COX-2 molecules (e.g. increased expression), and/or more active molecules (e.g. conversion from latent to active forms or removal of inhibition of the active form). Preferably said disorder is typified by decreased immune function, ie. is a condition of immunodeficiency e.g. exhibits lymphocyte dysfunctions. As used herein "immunodeficiency" refers to impaired function of cells involved in normal immune responses, particularly B and T cells. Thus compounds described herein may be used to achieve immunostimulatory effects to enhance immune responses. Thus COX-2 inhibitors are considered to have immunomodulatory effects. Preferably conditions which may be treated include virally-induced immunodeficiency disorders.

Thus, the method above would be useful for, but not limited to, the treatment of HIV or AIDS related disorders in a subject. For example, approximately 50% of patients with common variable immunodeficiency have a T-cell dysfunction similar to that of HIV infection and could benefit from immunostimulatory treatment. According to the present invention, any COX-2 inhibitor may be administered to a subject in need of HIV/AIDS therapy. Thus preferred conditions for treatment according to the invention include infection by retroviruses, particularly HIV (and infection by related viruses in other animals, e.g. SIV, FIV, MAIDS) and the resultant AIDS and treatment of common variable immunodeficiency and related conditions to the aforementioned conditions.

Subjects which may be treated are preferably mammalian, preferably humans and companion or agricultural animals such as dogs, cats, monkeys, horses, sheep, goats, cows, rabbits, rats and mice.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 15 -

Alternatively stated, the present invention provides a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof for treating or preventing a disorder typified by increased COX-2 activity as described above or the use of a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof in the preparation of a medicament for treating or preventing a disorder typified by increased COX-2 activity as described above. As used herein "treating" refers to the reduction or alleviation, preferably to normal levels, of one or more of the symptoms of said disorder, e.g. infectivity or a reduction or alleviation of immune dysfunction. "Preventing" refers to absolute prevention, i.e. absence of detectable infectious agent, e.g. virus and/or maintenance of normal levels with reference to a particular symptom (e.g. COX-2 activity) or reduction or alleviation of the extent or timing (e.g. delaying) of the onset of that symptom.

The enzyme cyclooxygenase 2 is a new target for HIV/AIDS therapy. The term "COX-2 inhibitor" denotes a compound able to inhibit the enzyme cyclooxygenase 2 without significant inhibition of cyclooxygenase 1 when administered at a particular concentration. Preferably, it includes compounds having a selectivity for cyclooxygenase-2 inhibition relative to cyclooxygenase-1 inhibition (e.g. as determined by the COX-1:COX-2  $IC_{50}$  ratio according to the WHMA test, see below) of at least 10, more preferably of at least 50, and even more preferably of at least 100. (The selectivity ratio for one specific compound will vary with the biological assay and the form in which it is expressed (preferably expressed as the ratio of COX-1:COX-2  $IC_{50}$  or  $IC_{80}$ ), see tables 1-4). The ratios described here refer to data obtained in one or more relevant, well known COX assays, preferably using purified human enzymes, e.g. ratio of  $IC_{50}$  values for example as determined by Engelhart et



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 16 -

al., 1995, supra. Preferably however, the test is the WHMA test as described below.

5 A number of analyses of relative potencies of COX-1 and COX-2 have been performed using a wide range of assay systems from isolated purified enzymes to intact cells and cell models from various species. However, at present, the most widely accepted model is the human whole blood assay (WBA) and a modified version William Harvey human modified whole blood assay (WHMA) which is 10 the preferred assay. These assays make use of readily available human cells for testing which is preferable for human use of the compounds. It also takes into account the binding of NSAIDs to plasma proteins. Furthermore, assessment of selectivity is preferably 15 made at  $IC_{80}$  rather than at  $IC_{50}$  as the concentration curves for inhibition of COX-2 and COX-1 are not parallel and since most compounds are used at doses giving steady-state plasma concentrations of closer to 80% inhibition (Warner et al., 1999, PNAS USA, 96, 20 p7563-7568)

In the WBA assay, for COX-1 analysis blood is treated with test agent followed 60 min later by calcium ionophore and incubated for 30 min after which plasma is collected. For COX-2 analysis, blood is treated with 25 aspirin to inhibit COX-1 and 6 hours later with lipopolysaccharide and test agent and incubated for 18 hours after which plasma is collected. Subsequently, the content of thromboxane B2 in plasma is assessed by radioimmunoassay as a measure of COX activity.

30 In the WHMA assay, COX-1 analysis is conducted as above. For COX-2 analysis, blood is treated with conditioned medium from cultures of human airway epithelium cells (A549) exposed to interleukin  $1\beta$  for 24 hours and incubated with this medium together with test 35 agent for 60 min after which calcium ionophore is added followed 30 min later by diclofenac to stop production of prostanoids. Subsequently, plasma is collected and

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 17 -

analysed for its content of prostaglandin E2 in plasma by radioimmunoassay as a measure of COX-2 activity. The times of incubation for assessment of COX-1 and COX-2 activities are similar in this last assay which makes activities more comparable and the WHMA the preferred assay.

Using this assay, selectivity based on COX-2/WHMA-COX-1 at  $IC_{50}$  is shown in Table 4 where 0.2 and 0.02 represents 5- and 50-fold selectivities for COX-2, respectively.

Table 4: (Ratio COX-2/COX-1 at  $IC_{50}$  according to the WHMA test taken from Warner, et al., supra) :

Compound	Ratio COX-2/WHMA-COX-1 at $IC_{50}$
Diisopropylfluorophosphate	<0.01
L-745337	<0.01
rofecoxib	0.015
NS398	<0.05
SC58125	<0.01 (WHA assay)
etodolac	0.043
meloxicam	0.091
celecoxib	0.11
nimesulide	0.17

In a preferred feature therefore the selectivity ratio is determined according to the WHMA assay at  $IC_{50}$  and compounds having a selectivity ratio of COX-2:COX-1 of less than 0.2, preferably less than 0.05, e.g. less than 0.02, preferably less than 0.01, e.g. <0.005 are particularly preferred for use in methods of the invention. Alternatively stated, preferred compounds have a COX-1:COX-2 selectivity ratio (according to the WHMA assay at  $IC_{50}$ ) of more than 2, preferably more than 5, especially preferably more than 50 or 100, as

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 18 -

mentioned previously.

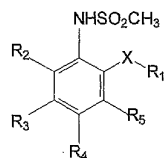
"Inhibition" as referred to herein refers to a reduction in measurable cyclooxygenase-2 activity. This may be achieved by affecting transcription, translation, post-translational modification or activity of COX-2. Preferably however inhibition is achieved by inhibiting the enzymatic activity, i.e. interfering with the active site of pre-existing active COX-2 molecules.

Preferably, COX-2 inhibitors for treatment of immunodeficiency or viral infection, especially HIV infections and AIDS, have a COX-2 IC<sub>50</sub> of less than about 0.5 μmol/litre, more preferably less than about 0.2 μmol/litre.

The method provided herein relates to the use of COX-2 inhibitors or derivatives thereof in the prevention and treatment of various conditions, including immuno-deficiencies and viral infections; especially HIV and AIDS.

In one preferred embodiment of the present invention, the COX-2 inhibitor for treatment according to the invention is selected from acidic sulfonamides.

In one preferred embodiment, COX-2 inhibitors for use in the invention are selected from the compounds according to the general formula A below including methansulphonamide ethers and thioethers:



A

wherein

X represents an oxygen or sulphur atom or alkyl group, preferably a -CH<sub>2</sub>- group;

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 19 -

R<sub>1</sub> represents a cycloalkyl or aryl group which may optionally be substituted by one or more groups or atoms, preferably by one or more halogen atoms, such as fluorine;

5 R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> independently represent a hydrogen atom, a nitro or acyl group or an alkyl group which may optionally be substituted by one or more groups (e.g. an acyl group) or atoms or alternatively R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub>  
10 or R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> together with the intervening carbon atoms form a cyclopentanone group;

or a derivative or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15 Preferably in such compounds X is an oxygen atom. In further preferred compounds R<sub>1</sub> is an aryl group or an aryl group substituted with one or more fluorine atoms, or a cycloalkyl group.

20 In further preferred compounds R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen atoms and R<sub>4</sub> is an -NO<sub>2</sub> or -COCH<sub>3</sub> group. Alternative preferred compounds comprise those in which R<sub>2</sub> is a hydrogen atom and R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> together form a cyclopentanone group.

25 Especially preferably compounds of formula A for use in the invention are compounds described herein denoted flosulide, NS-398, nimesulide, FK 3311 and L-745 337.

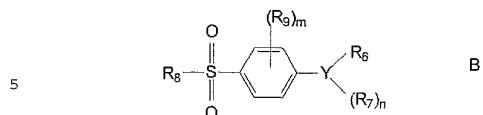
30 In another preferred embodiment of the present invention, the COX-2 inhibitor for use in the invention is selected from diaryl heterocycles.

One example of a family of diaryl heterocycles which may be used as COX-2 inhibitors for use in the invention comprises compounds of the general formula B  
35 below

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 20 -



wherein

- 10 Y represents a cyclic group, preferably selected from oxazolyl, isoxazolyl, thienyl, dihydrofuryl, furyl, pyrrolyl, pyrazolyl, thiazolyl, imidazolyl, isothiazolyl, cyclopentenyl, phenyl and pyridyl;
- 15 n is an integer from 0 to 3;
- m is an integer from 0 to 4;
- 20 R<sub>6</sub> represents a ketocyclyl, cycloalkyl or aryl group, which group may optionally be substituted by one or more groups or atoms, preferably by one or more halogen atoms, such as fluorine;
- 25 R<sub>7</sub> each independently represent a substituent which may be any functional group, preferably a hydrogen or halogen atom, preferably fluorine or bromine, or an alkyl group (preferably -CH<sub>3</sub>), which alkyl group may be substituted by one or more groups or atoms, preferably one or more fluorine atoms for example -CF<sub>3</sub>;
- 30 R<sub>8</sub> represents an alkyl group, preferably -CH<sub>3</sub> or NHR<sub>10</sub>, preferably -NH<sub>2</sub>;
- 35 R<sub>9</sub> represents a halogen atom, preferably fluorine; and
- R<sub>10</sub> represents a hydrogen atom or an alkyl group optionally substituted by one or more groups or atoms,

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 21 -

preferably by an acyl group;

or a derivative or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5

This class of compounds is claimed as anti-angiogenic agents in US 6,025,353 and a further description of preferred substituents and compounds according to the present invention are the same as in US

10

6,025,353. Preferably in such compounds  $R_5$  is  $-NH_2$  or  $-CH_3$ . In further preferred compounds Y is a pyrazolyl, furyl or thienyl group. Preferably  $R_6$  is an aryl group optionally substituted with one or more fluorine atoms. Preferably

15

n is 1 or 2. Preferably  $R_7$  is a bromine atom, an acyl group or a substituted alkyl group such as  $-CF_3$ . Especially preferred compounds of formula B for use in the invention are compounds described herein denoted celecoxib, rofecoxib, DuP-697, SC-58125, DFP, DFU, CGP

20

28232 and MF tricyclic.

As used herein, the term "alkyl" includes any long or short chain, straight-chained, branched or cyclic aliphatic saturated or unsaturated hydrocarbon group optionally mono or poly substituted by hydroxy, alkoxy, acyloxy, nitro, alkoxycarbonyloxy, amino, aryl, oxo or halo groups unless specifically stated otherwise. The unsaturated alkyl groups may be mono- or polyunsaturated and include both alkenyl and alkynyl groups. Such groups may contain up to 40, but preferably 1 to 10

25

carbon atoms.

30

As used herein cyclic rings are preferably  $C_{3-7}$  and optionally contain one or more heteroatoms selected from oxygen, nitrogen and sulphur.

The term "acyl" as used herein includes both carboxylate and carbonate groups, thus, for example, acyloxy substituted alkyl groups include for example

35

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 22 -

alkylcarbonyloxy alkyl. In such groups any alkylene moieties preferably have carbon atom contents defined for alkyl groups above. Preferred aryl groups include phenyl and monocyclic 5-7 membered heteroaromatics, especially phenyl and such groups may themselves optionally be substituted.

Representative substituted alkyl groups  $R_1$  include alkoxyalkyl, hydroxyalkoxyalkyl, polyhydroxyalkyl, hydroxy poly alkyleneoxyalkyl and the like such as alkoxyethyl, alkoxypropyl groups or acyloxyethyl, acyloxypropyl groups eg. pivaloyloxyethyl.

As used herein substituted groups may be mono or poly substituted by hydroxy, alkoxy, acyloxy, nitro, alkoxyalkoxy, amino, aryl, oxo or halo groups unless specifically stated otherwise.

In another preferred embodiment of the present invention, the COX-2 inhibitor is selected from modifications of classical NSAID's, for example the pro-drugs, esters or salts thereof.

With basis in the chemical structures of classical NSAIDs, more new selective COX-2 inhibitors have been prepared. Such a compound may be meloxicam which is an oxecam (the COX-2 specific analogue of the well known piroxicam), or acetic acid derivatives such as etodolac (COX-2 specific analogue of diclofenac). Other examples of some of the most preferred compounds in this class are COX-2 active indomethacin derivatives and zomepirac.

A further listing of families and subfamilies of compounds according to the present invention is found in patents and patent applications on COX-2 inhibitors; for example in the patent documents previously listed in this text. These patent documents also exemplify and list specific compounds that also are the most preferred COX-2 inhibitors according to the invention.

Particularly preferred compounds are however: diisopropylfluorophosphate, L-745337, rofecoxib, NS 398,

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 23 -

SC 58125, etodolac, meloxicam, celecoxib and nimesulide.

Methods for producing COX-2 inhibitors for use in accordance with the invention are well known to those in the art, particularly as described in the literature mentioned above.

A COX-2 inhibitor for use in treatment and prevention of disorders as described herein, e.g. immunodeficiencies and viral infections, especially HIV/AIDS, according to the present invention may contain one or more asymmetric centres and/or one or more double bonds i.e. the invention extends to use of isomers and racemates of the compounds disclosed herein. All such possible isomers are within the scope of the present invention. The COX-2 inhibitor can be in the form of an isomeric mixture of compounds or more preferably in the form of a purified isomer or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The pharmaceutical composition of COX-2 inhibitor(s) for treatment of conditions according to the invention, e.g. immunodeficiencies and viral infections can be formulated as pharmaceutically acceptable salts and can also contain pharmaceutically acceptable carriers well known in the art.

Thus, the present invention also extends to pharmaceutical compositions comprising a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or excipient. By "pharmaceutically acceptable" is meant that the ingredient must be compatible with other ingredients in the composition as well as physiologically acceptable to the recipient.

In further embodiments the present invention also extends to the use of such compositions and methods of prevention/ treatment using such compositions, as described hereinbefore.

If the COX-2 inhibitor is basic, salts can be prepared from pharmaceutically acceptable non-toxic



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 24 -

acids including inorganic and organic acids.

Particularly preferred salts are hydrochloric, hydrobromic, phosphoric, sulfuric, citric, maleic, citric and tartaric acid salts.

5        If the COX-2 inhibitor is acidic, salts can be prepared from pharmaceutically acceptable non-toxic bases including inorganic or organic bases. Particularly preferred salts are sodium, potassium and meglumine salts.

10        For the treatment and prevention of disorders as described herein, e.g. immunodeficiency or viral diseases including HIV/AIDS, the COX-2 inhibitors can be administered orally, rectally, topically, buccally, by inhalation or parenterally (e.g. intramuscularly, 15 subcutaneously, intraperitoneally or intravenously) in the form of an injection or infusion. The preferred administration forms will be administered orally, rectally and by injection or infusion. The most preferred administration form will be suitable for oral 20 administration.

      For all administration forms, the COX-2 inhibitor is administered in dosage unit formulations usually containing well known pharmaceutically acceptable carriers, adjuvants and vehicles. Thus, the active 25 ingredient may be incorporated, optionally together with other active substances as a combined preparation, with one or more conventional carriers, diluents and/or excipients, to produce conventional galenic preparations such as tablets, pills, powders, lozenges, sachets, 30 sachets, elixirs, suspensions, emulsions, solutions, syrups, aerosols (as a solid or in a liquid medium), ointments, soft and hard gelatin capsules, suppositories, sterile injectable solutions, sterile packaged powders, and the like. Biodegradable polymers 35 (such as polyesters, polyanhydrides, polylactic acid, or polyglycolic acid) may also be used for solid implants. The compositions may be stabilized by use of freeze-

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 25 -

drying, undercooling or Permazyme.

Suitable excipients, carriers or diluents are  
lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol,  
starches, gum acacia, calcium phosphate, aglinates,  
5 tragacanth, gelatin, calcium silicate, microcrystalline  
cellulose, polyvinylpyrrolidone, cellulose, water syrup,  
water, water/ethanol, water/glycol, water/polyethylene,  
glycol, propylene glycol, methyl cellulose,  
methylhydroxybenzoates, propyl hydroxybenzoates, talc,  
10 magnesium stearate, mineral oil or fatty substances such  
as hard fat or suitable mixtures thereof. The  
compositions may additionally include lubricating  
agents, wetting agents, emulsifying agents, suspending  
agents, preserving agents, sweetening agents, flavouring  
15 agents, adsorption enhancers, e.g. for nasal delivery  
(bile salts, lecithins, surfactants, fatty acids,  
chelators) and the like. The compositions of the  
invention may be formulated so as to provide quick,  
sustained or delayed release of the active ingredient  
20 after administration of the patient by employing  
procedures well known in the art.

The active ingredient for administration may be  
appropriately modified for use in a pharmaceutical  
composition. For example, the active ingredient may be  
25 stabilized for example by the use of appropriate  
additives such as salts or non-electrolytes, acetate,  
SDS, EDTA, citrate or acetate buffers, mannitol,  
glycine, HSA or polysorbate.

Conjugates may be formulated to provide improved  
30 lipophilicity, increase cellular transport, increase  
solubility or allow targeting. These conjugates may be  
cleavable such that the conjugate behaves as a pro-drug.  
Stability may also be conferred by use of appropriate  
metal complexes, e.g. with Zn, Ca or Fe.

35 The active ingredient may be formulated in an  
appropriate vehicle for delivery or for targeting  
particular cells, organs or tissues. Thus the

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 26 -

pharmaceutical compositions may take the form of microemulsions, liposomes, niosomes or nanoparticles with which the active ingredient may be absorbed, adsorbed, incorporated or bound. This can effectively  
5 convert the product to an insoluble form.

These particles may carry appropriate surface molecules to improve circulation time (e.g. serum components, surfactants, polyoxamine908, PEG etc.) or moieties for site-specific targeting, such as ligands to  
10 particular cell borne receptors. Appropriate techniques for drug delivery and for targeting are well known in the art, but see for example Kreuter, 1994, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 3, p253-256; Shen, 1997, J. Drug Targeting, 5(1), p11-13; Mreny, 1997, J. Drug Targeting,  
15 5(1), p5-9; Pettit & Gombotz, 1998, TIBTECH, 16, p343-349; and Duncan, 1997, J. Drug Targeting, 5(1), p1-4 regarding drug targeting and Simari & Nabel, 1996, Semin. Intervent. Cardiol., 1, p77-83; Torchilin, 1998, J. Microencapsulation, 15(1), p1-19; Klyashchitsky &  
20 Owen, 1998, J. Drug Targeting, 5(6), p443-458; Kreuter, 1996, J. Anat., 189, p503-505; Fasano, 1998, TIBTECH, 16, p152-157; Kataoka et al., 1993, 24, p119-132; Anderson, 1998, Nature, 392(suppl), p25-30; Langer, 1998, Nature, 392(suppl), p5-10; Gregoriadis, 1995,  
25 TIBTECH, 13, p527-536; Gregoriadis et al., 1997, FEBS Lett., 402, p107-110; Rolland, 1998, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 15(2), p143-198; Hope et al., 1998, Molec. Memb. Biol., 15, p1-14; and Scherman et al., 1998, Curr. Opinion Biotech., 9(5),  
30 p480-485 regarding peptide and nucleic acid molecule delivery. For an example of specific site directed targeting, see for example Schäfer et al., 1992, Pharm. Res., 9, p541-546 in which nanoparticles can be accumulated in HIV-infected macrophages. Clearly such  
35 methods have particular applications in the methods of the invention described herein.

Such derivatized or conjugated active ingredients

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 27 -

are intended to fall within the definition of inhibitory molecules which are used according to the invention.

Thus for example, the pharmaceutical composition for oral use contains the active ingredient(s) and suitable physiologically acceptable agents to form tablets, capsules, solutions, suspensions or other well known formulations for oral administration. Such compositions can be prepared according to any method known for the manufacture of oral pharmaceutical compositions. Such compositions can contain one or more biologically active agents and one or more agents selected from the group of preserving agents, inert diluents, viscosity increasing agents, colouring agents, sweetening agents, granulating agents, disintegrating agents, binding agents, osmotic active agents, wetting agents, suspending agents, materials for preparation of delay formulations, oils and water.

Pharmaceutical compositions for other than oral use, for example suppositories for rectal administration or solutions for injections or infusions can be prepared using well known methods and additives for such formulations. All formulations for injection and infusion should be sterile formulations.

The active ingredient in such compositions may comprise from about 0.01% to about 99% by weight of the formulation, preferably from about 0.1 to about 50%, for example 10%.

For treatment of disorders in accordance with the invention, e.g. immunodeficiencies and viral infections, with COX-2 inhibitors, the dose levels per day are in the range 0.005 mg to about 150 mg/kg of body weight. The dose depends strongly on the choice of the COX-2 inhibitor compound, the clinical situation (type of virus, status of the infection and condition of the patient), the patient's age and weight, route of administration and the total use of drugs by the patient including the length of the course of treatment. More

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 28 -

preferred doses will normally be between 0.01 mg and 50 mg/kg of body weight daily, and even more preferably 0.05 mg to 20 mg/kg of body weight daily. Thus for example, 25 mg of rofecoxib or 200 mg celecoxib may be administered daily by oral administration to an adult human.

Dosage units are generally between 1 mg and 500 mg of the active ingredient.

According to one aspect of the present invention, one COX-2 inhibitor can be combined with one or more other COX-2 inhibitors to treat disorders as described herein, e.g. an immunodeficiency or viral infection.

According to another aspect of the present invention, the COX-2 inhibitor can be combined with one or more further COX-2 inhibitors or one or more other drugs with different modes of action to treat the disorder, e.g. the immunodeficiency, HIV infection, or AIDS. Examples of such combinations could be COX-2 inhibitor in combination with one or more NNRTIs or in combination with one or more NRTIs or in combination with one or more HIV protease inhibitors or one or more HAART in combination with the COX-2 inhibitor.

In a further aspect the present invention provides methods and/or compositions which combine one or more COX-2 inhibitors with compounds that improve the tolerability of the active ingredient, especially during long term treatment. Typical compounds include antihistamine and proton pump inhibitors.

Thus the invention extends to a composition comprising a COX-2 inhibitor as described hereinbefore together with one or more additional COX-2 inhibitors and/or one or more additional active ingredients. The invention further extends to use of such compositions and methods of using such compositions as described hereinbefore. The invention further extends to a product comprising the components described above as a combined preparation for simultaneous, separate or

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 29 -

sequential use in treating or preventing conditions or disorders as described hereinbefore.

The invention is further described in the following non-limiting Examples with reference to the following Figures:

5 Figure 1 shows cyclic AMP levels following MAIDS infection in CD8+ (A), CD4+ (B) and B (C) cells. Mononuclear cells were isolated from lymph nodes of mice infected with MAIDS for various periods of time and separated into CD4+, CD8+ and B cells by negative selection using a FACS-cell sorter. Intracellular cAMP levels were assessed by sonication and radioimmunoassay. Bars represent mean  $\pm$  SD (n=3 individual mice);

10 Figure 2 shows MAIDS cAMP levels in CD4+, Thy-1.2 negative and positive populations. Lymph node cells from three infected and three age-matched control mice were FACS-sorted into CD4+, Thy-1.2+ (open bars) and CD4+, Thy-1.2- (solid bars) populations, and intracellular cAMP levels were assessed as in Figure 1. Bars represent mean  $\pm$  SD (n=3);

15 Figure 3 shows levels of protein kinase A activity in MAIDS vs wild type mice. (A) Kinase activities using Kemptide as substrate in the presence (total activity, hatched bars) or absence (free activity, solid bars) of 5  $\mu$ M cAMP was examined in detergent-solubilized extracts of lymph node cells purified from mouse spleens. Phosphotransferase activity not inhibited by the PKA-specific protein kinase inhibitor (PKI, 1  $\mu$ M) was subtracted to show only the PKA-specific activity.

20 Activities in infected mice (MAIDS; n=4) are shown relative to those of wild type littermates. (B) [ $^3$ H-cAMP] binding was measured in the same extracts as in (A), and molar amounts of R monomer were calculated;

25 Figure 4 shows immunolocalization of PKA C-subunit in cells of MAIDS and wild type mice. Mononuclear cells from control mice (upper panel) and mice infected with

30

35

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 30 -

MAIDS (two lower panels) were attached to glass slides by cytospin (400 x g), fixed and immunostained with anti-PKA-C polyclonal antibody and HRP-conjugated secondary antibody (brown stain). Counterstaining is by hematoxylin (blue stain on chromatin);

5 Figure 5 shows the effect of the PKA type I antagonist Rp-8-Bromo-cAMP-phosphorothioate (Rp-8-Br-cAMPS) on T cell function in MAIDS and wild type mice. TCR/CD3 stimulated T cell proliferation was assessed with

10 isolated T cells from MAIDS mice (A) and uninfected control mice (B). The effect of increasing concentrations of cAMP agonist (8-CPT-cAMP) on TCR/CD3 stimulated proliferation of CD3+ T cells isolated from

15 MAIDS (open circles, dotted line) and control mice (filled circles and solid line) was examined separately in the same experiments (C). Mean values of triplicate determinations  $\pm$  SD are shown. See Table 4 for summarised data (n=11). Note: Scaling differs in A and B, whereas in C the TCR/CD3 induced proliferation in the

20 absence of cAMP agonist is normalized to 100% for both MAIDS and control T cells;

Figure 6 shows secretion of PGE<sub>2</sub> by normal and MAIDS lymph node cells *in vitro*. Unsorted lymph node cells from MAIDS infected mice (solid bars, n=9) at 20 weeks

25 post infection and age-matched control mice (shaded bars, n=4) were cultured for 48 h in complete medium after which secreted levels of PGE<sub>2</sub> were measured in the supernatants by ELISA;

Figure 7 shows the effect of a non-selective COX inhibitor on T cell immune function in normal and MAIDS

30 infected mice. Column 1 - control mice + anti-CD3; column 2 - control mice + anti-CD3 + indomethacin; column 3 - MAIDS mice + anti-CD3; column 4 - MAIDS mice + anti-CD3 + indomethacin. T cell proliferative

35 responses were assessed in a mixed population of unsorted lymph node mononuclear cell by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation in the absence and presence of the non-

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 31 -

selective COX inhibitor indomethacin (50 ng/ml). T cell activation was accomplished by cross-ligation of anti-CD3 (mAb 2C11; 4 µg/ml). Bars show mean values ± SD from control (n=3) and MAIDS infected (n=5) mice, see Table 5 for additional data. Cells were cultured for 72 h during which [<sup>3</sup>H]-thymidine was included for the last 4 h;

Figure 8 shows expression of COX-2 by different subsets of lymph node lymphocytes in normal (A) and MAIDS infected (B) mice. CD4+ T, CD8+ T and B cells were FACS-sorted by positive selection on basis of expression of the CD4, CD8 and B220 molecules, respectively. CD11b- cells were sorted by negative selection (on the basis of absence of CD11b). Cells from MAIDS infected and normal mice were then lysed and 10 µg of protein from each sample were subjected to immunoblot analysis for the expression of COX-2. Blots were concomitantly reacted with antibodies to actin as control;

Figure 9 shows expression of CD11b in MAIDS and wild type lymph node cells. Expression of CD11b (by flow cytometry) by the different subsets of lymph node lymphocytes (CD4+, CD8+ T cells and B220+ B cells) from MAIDS infected and control mice is shown. R1: CD11b high; R2: CD11b dim and R3: CD11b-;

Figure 10 shows levels of expression of COX-2 in lymph nodes of MAIDS infected mice and wild type mice. Lymph nodes were freeze-sectioned and subjected to COX-2 immunohistochemical staining (brown stain). (a) Normal control lymph node with germinal center stained for COX-2. (b) Normal lymph node at higher magnification. Cells staining positive for HRP-colour reaction are "tingible body" macrophages with ingested material (arrows). c. Lymph node from MAIDS infected mouse (week 20 post infection). Note: altered morphology and architecture. d. Higher magnification of MAIDS lymph node stained for COX-2. Note: number of cells brown immunostaining in the cytoplasm and numerous mitotic



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 32 -

figures;

Figure 11 shows the effect of *in vivo* administration of a non-selective COX inhibitor on T cell immune function of HIV infected patients. T cell proliferative responses were assessed in CD3+ T cells as [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation from 3 patients (pat. 1 to 3) participating in a phase II clinical trial and receiving indomethacin 25 mg three times a day perorally for 14 days in addition to triple combination therapy. Upper panels shows T cell immune function at day 0, day 14 (after 2 weeks treatment) and at day 28 (2 weeks after discontinuation), labelled respectively as columns 1, 2 and 3. T cell activation was accomplished by cross-ligation of anti-CD3 (mAb SpVT3b). A: Basal proliferation after T cell activation; B: proliferation in presence of Rp-8-Br-cAMPS (1 mM); Note: degree of cAMP-mediated immunodeficiency is evident from comparing upper and lower panel. Bars show mean values  $\pm$  SD from triplicate determinations. Cells were cultured for 72 h during which [<sup>3</sup>H]-thymidine was included for the last 16 h;

Figure 12 shows the effect of *in vivo* administration of a non-selective COX inhibitor indomethacin on T cell proliferation of HIV infected patients as described in Figure 11 but for 7 patients, indicated for patients 1 to 7, respectively by filled circles, open circles, filled triangles, open triangles, filled squares, open square and filled diamonds. Mean values from triplicate determinations are plotted, connector lines show development of each patient;

Figure 13 shows the effect of rofecoxib, a COX-2 specific inhibitor, on T cell immune function in MAIDS infected mice. T cell proliferative responses were assessed in a mixed population of unsorted lymph node mononuclear cells by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation in the absence and presence of increasing concentrations (1.9 to 500 nM) of the COX-2 specific inhibitor, rofecoxib.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 33 -

T cell activation was accomplished by cross-ligation of anti-CD3 (mAb 2C11; 4  $\mu$ g/ml). Mean values from triplicate determinations are shown together with a sigmoid curve fit. Cells were cultured for 72 h during which [ $^3$ H]-thymidine was included for the last 4 h; Figure 14 shows the effect of celecoxib, a COX-2 specific inhibitor, on T cell immune function in MAIDS infected mice, as described in Figure 13 for rofecoxib; Figure 15 shows the effect of rofecoxib and celecoxib compared to indomethacin on the secretion of PGE<sub>2</sub> by lymph node (LN) cells ex vivo for control mice (1) or MAIDS mice (2). Unsorted LN cells were cultivated in complete medium in the presence or absence of the PGE<sub>2</sub> inducer, lipopolysaccharide (LPS; 4  $\mu$ g/ml); the nonspecific cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (50 ng/ml); and the COX-2 specific inhibitors rofecoxib (0.125  $\mu$ M) and celecoxib (0.125  $\mu$ M). After 48h, the concentration of PGE<sub>2</sub> was measured by EIA in the supernatants. 3 individual infected mice (week 20) and pool of 3 age-matched controls were analyzed. Means  $\pm$  standards deviations are shown; and Figure 16 shows the effect of in vivo treatment of MAIDS mice with rofecoxib on T cell immune function. MAIDS mice were left untreated (untreated 1 to 3) or treated with rofecoxib per os (3 mg/kg/day administered once daily, treated 1 and 2) for seven days administered via a tube inserted in the ventricle. Subsequently, T cell proliferative responses were assessed in vitro in a mixed population of unsorted lymph node mononuclear cells from treated and untreated animals by [ $^3$ H]-thymidine incorporation in the absence (columns A) and presence of Rp-8-Br-cAMPS (0.5 or 1.0 mM, columns B and C, respectively). T cell activation was accomplished in all samples by cross-ligation of anti-CD3 (mAb 2C11; 4  $\mu$ g/ml). Control represents T cell proliferation in uninfected mice. Mean values from triplicate determinations are shown. Cells were cultured for 72 h

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 34 -

during which [ $^3\text{H}$ ]-thymidine was included for the last 4 hours;

5 Figure 17 shows the effect of *in vivo* treatment of MAIDS mice with rofecoxib or celecoxib on T cell immune function. MAIDS mice were injected with vehicle (intralipid), treated with rofecoxib in intralipid by intraperitoneal injection (3 mg/kg/day administered once daily, n=6) or treated with celecoxib by intraperitoneal injection (20 mg/kg/day administered once daily, n=5) 10 for 18 to 20 days. Subsequently, T cell proliferative responses were assessed *in vitro* as described for Figure 16 but without Rp-Br-cAMPs. Control represents T cell proliferation in uninfected mice. Mean values from triplicate determinations are shown (black circles) 15 along with 25 to 75% percentile (boxed areas) and median (line in box). Bars represent range; and Figure 18 shows the effect of *in vivo* treatment of MAIDS mice with meloxicam on T cell immune function. Osmotic pumps (Alzet, 100  $\mu\text{l}$ ) with meloxicam (release rate of 70 20  $\mu\text{g}/\text{animal}/\text{day}$ ) or phosphate buffered saline (PBS) were implanted subcutaneously on MAIDS mice (14 weeks post infection) and healthy mice for 14 days. a), Subsequently, T cell proliferative responses were assessed *in vitro* as described for Figure 17. Mean 25 values  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m.) from each group are shown. The effect of meloxicam treatment on anti-CD3 stimulated proliferation of cells from MAIDS mice (solid bars) compared to that of MAIDS mice that received PBS (open bars) is significant ( $p<0.05$ ). b), 30 Mixed lymph node cultures from the groups of mice in a) treated *in vivo* with meloxicam or PBS were added back meloxicam (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in cell culture *in vitro*, anti-CD3 induced T cell proliferation was assessed as in a), and the effect of meloxicam added back *in vitro* (open bars) 35 was compared to the response of the cells with no *in vitro* addition (solid bars) ( $p=0.005$ ). c), Rp-8-Br-cAMPs (0.5 mM) was added to *in vitro* cell

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 35 -

cultures of mixed lymph node cultures from the groups of mice in a) treated *in vivo* with meloxicam or PBS, anti-CD3 induced T cell proliferation was assessed as in a), and the effect of Rp-8-Br-cAMPS *in vitro* (open bars) was expressed as fold induction above that of cells that received no *in vitro* addition (solid bars). Statistics were analysed by Mann-Whitney U test for comparison of two groups of animals and with Wilcoxon Matched Pairs Test for comparison of the same group with two different treatments.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 36 -

EXAMPLESEXAMPLE 1

5 Mice with murine acquired immunodeficiency syndrome  
(MAIDS) have a cAMP/PKA type I induced T cell  
dysfunction

MAIDS (Murine Acquired Immunodeficiency Syndrome). Numerous studies have considered MAIDS as a possible  
10 model for infection of humans by HIV. This syndrome develops following infection with a replication-defective retrovirus that encodes a variant Pr60<sup>gag</sup> polyprotein (Chattopadhyay et al., 1991, J. Virol., 65, p4232-4241; Jolicœur, 1991, FASEB J., 5, p2398-2405).  
15 The syndrome is associated with progressive lymphoproliferation in the spleen and lymph nodes and severe immune defects. Although the defective retrovirus responsible for MAIDS infects mostly B cells (Aziz, 1989, Nature, 338, p505-508), CD4<sup>+</sup> T cells display  
20 a profound dysfunction and anergy to mitogen stimulation in vitro. A large fraction of CD4<sup>+</sup> T cells (but not CD8<sup>+</sup> T cells) of infected mice are also characterized by an unusual Thy-1 negative phenotype (Holmes et al., 1990, Eur. J. Immunol., 20, p2783-2787; Moutschen et al.,  
25 1994, Scand. J. Immunol., 39, p216-224 (MAIDS)). In normal, uninfected mice, CD4<sup>+</sup> Thy-1<sup>-</sup> T cells are found selectively in the germinal centers where they correspond to recent antigen-specific emigrants.

30 The mechanism by which the variant Pr60<sup>gag</sup> protein induces T cell abnormalities is not known. Soluble factors secreted by infected cells have been claimed to influence the function of T cells (Simard, J. Virol., 68, p1903-1912) at a distance, but the nature of such  
35 mediators has never been elucidated. Other studies have suggested that direct, cognate interactions between CD4<sup>+</sup> T cells and antigen presenting cells are necessary for

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 37 -

the induction of T cell defects (Green, 2001, J. Virol., 70, p2569-2575; de Leval, 1998, J. Virol., 72, p5285-5290).

- 5 The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway plays an important role in the regulation of immune responses (Kammer, 1991, Immunol. Today, 9, p222-229). Increased concentration of cAMP is known to inhibit proliferative responses of T cells to various stimuli
- 10 such as anti-CD3 mAb and interleukin-2. A recent report has suggested that downregulation of the JAK3 tyrosine kinase might represent a mechanism by which cAMP inhibits T cell proliferation (Kolenko, 1999, Blood, 93, p2308-2318). Cyclic AMP could also induce the
- 15 downregulation of membrane proteins since murine thymocytes or thymoma cells exposed to cAMP inducing agents such as norepinephrine downregulate Thy-1 expression by a mechanism involving destabilization of mRNA (Wajeman-Chao, J. Immunol., 161, p4825-4833).
- 20 Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a potent inducer of cAMP, is mainly secreted by monocytes, macrophages and activated T cells. PGE<sub>2</sub> shifts the balance from T-helper type 1 cells toward T-helper type 2 cells by inhibiting IL-2 and enhancing IL-4 production (Betz and Fox, 1991, J.
- 25 Immunol., 146, p108-113; Meyaard, 1997, Blood, 89, p570-576). It also skews the differentiation of B cells toward IgE production (Fedyk and Phipps, 1996, PNAS USA, 93, p10978-10983). Prostaglandin synthesis results from
- 30 the sequential action of cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and COX-2) and specific PG synthases (Smith and DeWitt, 1996, Adv. Immunol., 62, p167-215). While COX-1 expression is largely constitutive and ubiquitous, COX-2 is only induced in certain cell types (macrophages,
- 35 fibroblasts, smooth muscle cells) by NO and inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- $\alpha$ .

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 38 -

The mechanisms responsible for T cell dysfunction in MAIDS are still poorly understood. CD4<sup>+</sup> T cells are preferentially involved whereas several reports have suggested that the alteration of CD8<sup>+</sup> T cells is only due to the lack of adequate CD4<sup>+</sup> T cell help. In contrast, the inhibition of B cell responses is intrinsic and cannot solely be explained by defective CD4<sup>+</sup> lymphocytes. The Inventors' observation of a selective increase of cAMP in B cells and CD4<sup>+</sup> T cells and not in CD8<sup>+</sup> T cells is therefore compatible with the involvement of cAMP in the anergic process associated with MAIDS.

To the Inventors' knowledge, this is the first demonstration of a subset selective increase of cAMP in a disease model. If a soluble factor such as prostaglandin E<sub>2</sub> is indeed responsible for cAMP induction, what could explain the subset selectivity of its action? Former studies had compared the expression of various prostanoid receptors on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and concluded a similar pattern of expression in both subsets. Normal CD8<sup>+</sup> T cells are fully susceptible to the cAMP inducing effects of PGE<sub>2</sub>. A possible explanation could take place at the post receptor level; memory/activated T cells are more responsive to PGE<sub>2</sub> than naïve T cells. In MAIDS, where MHC class II-dependent processes are involved, CD4<sup>+</sup> T cells could acquire a particular state of activation making them more susceptible to the effect of a given concentration of PGE<sub>2</sub>. Postreceptor modulation of prostanoid effects is principally mediated by G receptor kinases (GRK) which uncouple protein G from the corresponding membrane receptor. Inflammatory states such as rheumatoid arthritis are characterised by a downregulation of GRK and therefore by an increased lymphocyte sensitivity to cAMP inducing agents such as catecholamines. Levels of GRK activity in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from infected mice is unknown.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 39 -

Methods used in Examples 1 and 2Mice and cell suspension

- 5 Male C57BL/6 mice were bred in the Inventors' facility. Mice were injected twice i.p at the age of 4 and 5 weeks with 0.25 ml of the cell free viral extract. Age-matched control mice were injected twice i.p. with 0.25 ml phosphate buffered saline (PBS). At different times  
10 post-infection, mice were killed by CO<sub>2</sub> asphyxiation. Peripheral lymph nodes (inguinal, axillary and cervical) were dissociated with syringes to obtain single cell suspensions and passed through a nylon cell stainer, washed three times with RPMI 1640 complete medium and  
15 counted on Thoma cytometer after trypan blue exclusion.

Virus

- Viral extract was prepared from lymph nodes of mice injected 2 months earlier with RadLV-Rs as described  
20 previously. Lymph nodes were collected, ground in PBS and centrifuged at  $1.5 \times 10^4$  g for 30 min. The supernatant was spun again for 30 min at  $1.5 \times 10^4$  g. This acellular viral extract was stored in liquid nitrogen. XC plaque assay was used to quantify the  
25 viral particles. The viral preparation contained  $10^3$  particle forming units (PFU) ecotropic virus/ml.

Antibodies

- The following polyclonal antibodies were used for  
30 western blotting experiments; Primary: polyclonal rabbit anti-COX-1 or rabbit anti-COX-2 antibody. (Santa Cruz Biotechnology); Second-step: Horseradish Peroxidase Conjugated anti-rabbit was purchased from Transduction Laboratories (Transduction Laboratories, UK). For the  
35 flow cytometry, the moAbs used are as follows: PE-conjugated CD4/L3T4 (YTS.191.1), FITC-conjugated CD45R/B220 (RA3-6B2), FITC-conjugated CD11b/Mac-1



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 40 -

(M1/70), FITC-conjugated CD161/NK-1.1 (PK136), FITC-conjugated CD8a (Ly-2) and CD16/CD32 (FcγIII/II Receptor) (2.4G2), (all from Pharmingen: San Diego, CA, USA). CD3 mAb (145-2C11) was purified in the  
5 Inventors' laboratory. Concanavalin A (ConA) was purchased from Boehringer Mannheim Biochemica and phytohemagglutinin-M (PHA) from Difco.

*Flow cytometry and cell sorting*

10 Analysis were performed by using FACStar-plus flow cell sorter with the Cellquest software (Becton Dickinson). The forward and side scatters were used to gate viable lymphocytes. For two-colour analysis of FITC (green) and PE (orange), blue excitation at 488nm was provided  
15 by an argon ion laser (Air-to-Water cooled model Spinnaker 1161; Spectra Physics, Mountain View, CA). For cell sorting,  $60 \times 10^6$  cells were incubated with anti-FcγRII (Fc Block) to prevent non specific interactions, prior to labelling for 20 min on ice with  
20 the fluorochrome-conjugated antibodies.  $CD4^+$  T cells were negatively selected by depleting  $CD8^+ B220^+ CD11b^+$  cells. Similarly,  $CD8^+$  T cells were negatively selected by depleting  $CD4^+ B220^+ CD11b^+$  cells and B cells by depleting  $CD8^+ CD4^+ CD11b^+$  cells. For each sorting, the  
25 selected fraction was reanalyzed by flow cytometry to assess purity which was always higher than 97%.

*Cyclic AMP quantitation*

Single lymph node cell suspensions were prepared as  
30 described above, washed twice with RPMI 1640 and centrifuged at  $1500 \times g$  for 3 min. Cells were subsequently disrupted by sonication to facilitate the release of intracellular cAMP into the extraction solution (0.01N HCl, 95% ethanol). The solution  
35 containing the cell lysate was centrifuged at  $13 \times 10^4 \times g$  for 15 min, and the supernatant was removed to a fresh tube. The extract was evaporated in a Speed Vac

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 41 -

concentrator at 45°C, and the pellet was stored at -20°C. Just before use, the pellet was resuspended in the assay buffer and cAMP levels were measured by radioimmunoassay (RIA) using <sup>125</sup>I-labelled cAMP assay system (Amersham, England). The concentration of cAMP in test samples was determined by comparison with a curvi-linear standard curve. For positive and negative controls, lymph node cells (1 x 10<sup>6</sup>) were incubated respectively with 1 mM of dibutyryl-cAMP and 0.5mM of DDA (Adenylyl cyclase inhibitor) for 30 min at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> air incubator before measurement of cAMP concentration.

*Cell homogenization and immunoblotting*

Cells (50 x 10<sup>6</sup>) were homogenized by sonication (2 x 15 s) on ice in a buffer containing 10 mM potassium phosphate, pH 7.1, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100 and 10 µg/ml each of the protease inhibitors chymostatin, leupeptin, pepstatin A and antipain (Tasken et al, 1993, J. Biol. Chem., 268, p21276-21283), and centrifuged for 30 min (15,000 x g) to remove insoluble material. Protein concentrations were determined by Bradford assays (BioRad). For immunoblotting, 40 µg of protein was separated by 10% SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and incubated with antibodies in TBS/Tween with 5% non-fat dry milk and 0.1 % BSA (Blotto). Primary antibodies were detected by HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson Laboratories/Transduction Laboratories) and ECL (Amersham).

*Phosphotransferase activity of PKA*

Catalytic activity of PKA was assayed by phosphorylating a PKA-specific substrate (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) (Kemp et al, 1976, PNAS USA, 73, p1038-1042) Kemptide, Peninsula Laboratories INC.) using [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (specific activity 0.25 Ci/mMol, Amersham) in an assay mixture described by R. Roskoski (Methods Enzymol., 1983, 99,

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 42 -

p35). Phosphotransferase activity was measured both in the presence and absence of cAMP (5  $\mu$ M) and PKI (1  $\mu$ M), and the low levels of activity not inhibited by PKI was subtracted to determine PKA-specific activity.

5

*Cyclic AMP binding measurements*

Quantification of specific [ $^3$ H]cAMP binding of solubilized PKA regulatory subunits was performed as described by Cobb and Corbin (Methods in Enzymology, 159, p202-208, 1988) in a mixture containing [2,8- $^3$ H]cAMP (2.25  $\mu$ M; specific activity of 5 Ci/mMol; Du Pont-New England Nuclear). Molar ratios of R subunits were calculated based on two cAMP binding sites on each regulatory subunit monomer.

15

*Immunocytochemistry*

Control and infected lymph node lymphocytes were fixed with cold acetone for 5 min and washed twice for 5 min each in 0,1% of saponin in PBS. Endogenous peroxidase was blocked by incubation with 0,3% hydrogen peroxide in 0,1% saponin/PBS for 15 min. After rinsing in saponin/PBS, the slides were incubated for 30 min at RT with blocking buffer (1,5% normal goat serum in 0,1% saponin / PBS), followed by incubation for 60 min with primary antibody solution at RT in a humidified chamber. Antibody against Ca was from Santa Cruz and was diluted at 1:1000 in PBS containing 0,1% of saponin and 0,5% of normal goat serum. Slides were then washed as before and incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibody. This later was detected by ABC complex (Novastain Super ABC Kit, Novocastra). Peroxidase was revealed using diaminobenzidine (DAB) (Dako) which gives a brown precipitate in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Slides were counterstained with hematoxylin-eosin (Sigma). The specificity was tested by incubating the cytospin with specific peptide against the PKA-C $\alpha$  subunit.

35

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 43 -

*Immunohistochemistry*

Immunohistochemistry was performed on 2 $\mu$ m-thin histological sections done in 4% paraformaldehyde fixed and plastic embedded tissues (JB4-JBPolysciences).  
5 Sections were permeabilized with trypsin (0.24%) for 1 min at 37°C, and then with Tween 20 (2%) for 30 min at 37°C. Endogenous peroxidases were quenched by incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%) for 30 min at room temperature. Aspecific sites were saturated with normal goat serum  
10 (1.5%) during 1h at 37°C. Sections were then incubated overnight at 4°C with primary polyclonal rabbit anti-COX-1 or rabbit anti-COX-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology) and then for 2h with biotinylated goat anti-rabbit antibody. This latter was detected by ABC  
15 complex (Novostain Super ABC Kit, Novocastra). Peroxidase was revealed using diaminobenzidine (DAB) (Dako) which gives a brown precipitate in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sections were counterstained with haematoxylin-eosin (Sigma). The specificity was tested by incubating  
20 sections with normal rabbit serum instead of primary antibody.

*Proliferation assays for MAIDS mice*

Proliferation assays were performed by incubation of 0.1 X 10<sup>6</sup> CD3+ T cells/ml in a 100  $\mu$ l volume in flat-bottom  
25 96-well microtiter plates. Activation was achieved by subsequent addition of monodisperse magnetic beads coated with sheep anti-mouse IgG (Dynal, cat. no. 110.02) at a cell:bead ratio of 1:1 followed by addition  
30 of anti-CD3 (clone 2C11) at a final dilution of 4  $\mu$ g/ml for the experiments shown. The optimal concentration of antibody was titrated carefully in the initial setup and parallel experiments at several different dilutions of  
antibody was always performed. Proliferation was  
35 analyzed by incubating cells for 72 hours during which [<sup>3</sup>H]-thymidine (0.4  $\mu$ Ci) was included for the last 4 hours and collected with a cell harvester (Skatron,

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 44 -

Sterling, VA, USA) onto glass fiber filters. Incorporated precursor was counted in a scintillation analyzer (Tri-Carb, Packard, Meriden, CT, USA). cAMP analogs, when used, were added 30 min prior to  
5 activation by addition of anti-CD3 antibodies. 8-CPT-cAMP was from Sigma (St. Louis, MO) and Sp- and Rp-8-Br-cAMPS were from BioLog Life Science Company (Bremen, Germany) and were all dissolved to concentrations of 4 to 10 mM in PBS and concentrations calculated using the  
10 extinction coefficients given by the manufacturer. Indomethacin was dissolved in water and used at a concentration of 50 ng/ml.

*PGE<sub>2</sub> determination*

15 500  $\mu$ l of a 48h-culture supernatant of lymph node cells from control and infected mice were pipetted into 1.5 ml polypropylene tubes to which were added 500  $\mu$ l of water:ethanol (1:4) and 10  $\mu$ l of ice cold acetic acid. The tubes were gently mixed and left for 5 min at room  
20 temperature. This was followed by centrifugation at 2500 X g for 2min. The supernatants were collected and run through Amprep C18 minicolumns, which had been primed with 2 column volumes of 10% ethanol. The columns were then washed with 1 volume of H<sub>2</sub>O and 1  
25 column volume of hexane. PGE<sub>2</sub> was then eluted with 2 x 0.75 ml of ethyl acetate. The fractions were collected and evaporated under nitrogen to dryness. Finally, each fraction was reconstituted in 100 $\mu$ l of assay buffer and PGE<sub>2</sub> was assayed using Amersham BIA kit as recommended by  
30 the manufacturer.

*Statistical analyses*

For comparison of two groups of individuals, the Mann-Whitney U test (two-tailed) was used. Coefficients of  
35 correlation (r) were calculated by the Spearman-s rank test. Statistical and curve fit analyses were performed using Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK) and Sigma

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 45 -

Plot (Jandel Corporation, Erkrath, Germany) software packages, respectively. Results are given as medians and 25th to 75th percentiles if not otherwise stated, p-values are two-sided and considered significant when

5 <0.05.

#### Experimental

*MAIDS infection leads to elevated cAMP in CD4+ T cells -*

10 Mice inoculated with a mixture of retroviruses known as RadLV-Rs that causes development of MAIDS, were sacrificed at different time points after infection, and lymph node cells were sorted by negative selection using a flow cytometer/cell sorter into pure B cells and CD4+ and CD8+ T cells. Intracellular cAMP levels were

15 assessed in the different cell populations following infection. As can be seen from figure 1, cAMP levels were strongly increased (more than 20-fold) in CD4+ T cells after a few weeks of infection. At later stages, B-cell cAMP levels also increased whereas only minor

20 changes were observed in CD8+ T cells. Furthermore, when CD4+ T cells were separated into Thy-1.2+ and Thy-1.2- cells by positive sorting, it was evident that the major increase in cAMP levels was in Thy-1.2- cells (figure 2, 6-fold). This normally low-abundant

25 population also displayed higher basal levels of cAMP than compared to those of the Thy-1.2+ when both populations were harvested from uninfected mice.

Examination of PKA phosphotransferase activity in

30 postnuclear supernatants from detergent solubilized extracts revealed that the total levels of cAMP-dependent kinase activity was decreased in MAIDS lymph node cells whereas minor changes in the activity were observed in the absence of cAMP (Figure 3A). This is

35 consistent with a chronic activation and dissociation of PKA leading either to degradation of the C subunit or to translocation of C. Assessment of cAMP binding (Figure

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 46 -

3B) revealed no changes in total levels of PKA R subunits. Immunocytochemistry of lymph node cells from MAIDS- and control mice revealed increased levels of immunoreactive PKA C subunit in the nucleus (Figure 4).  
5 This is again consistent with an activation of the cAMP-PKA pathway in MAIDS.

*PKA type I antagonist improves T cell proliferation of MAIDS T cells -*

10 In order to examine the effect of elevated cAMP and activation of PKA on inhibition of TCR/CD3-induced T cell proliferation, we used a sulfur-substituted cAMP analog (Rp-8-Br-cAMPS) working as a full antagonist for PKA type I (Gjertsen, Mellgren, et al. 1995 1665 /id).  
15 Figure 5A shows that in T cells from MAIDS-infected mice, TCR/CD3-stimulated proliferation was less than 10% of that of T cells from uninfected control mice (figure 5B). Furthermore, when the effect of the PKA type I antagonist was assessed in MAIDS T cells, we observed a  
20 concentration-dependent increase in TCR/CD3-induced proliferation that was more than 4-fold at higher concentrations (Figure 5A), whereas no stimulation was observed by treatment of control T cells (Figure 5B).  
25 Looking at eleven MAIDS-infected mice, they all had severely impaired T cell proliferation compared to controls ( $p < 0.001$ ) and in 10 out of 11 mice, the PKA type I antagonist improved T cell proliferation ( $p < 0.01$ ; median 2.2-fold, Table 5). The stimulatory effect of the cAMP antagonist was not saturated even at the  
30 highest concentrations used (Figure 5A and similar data (not shown) were obtained for all mice in Table 5). This indicates that the solubility of the compound, affinity, or availability to cells may be a limiting factor for the effect observed. Thus, a more permeable  
35 and potent PKA type I antagonist, when available, may further improve TCR/CD3-induced proliferation of MAIDS T cells.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 47 -

Next, the effect of cAMP agonist on TCR/CD3-induced proliferation was investigated in five MAIDS-infected mice and four controls. T cells from MAIDS-infected mice revealed an apparent shift in sensitivity to inhibition of cell proliferation by exogenously added 8-CPT-cAMP (Figure 5C and Table 5). Moreover, when the maximal proliferation rates of T cells from MAIDS-infected mice and that of control T cells were normalized to 100% (Figure 5C and data not shown), it was evident that in addition to a left-shifted cAMP-inhibition curve, the slopes of the curves were significantly different (Hill coefficients of 0.6 (0.54 to 1.52) for T cells from MAIDS mice versus 2.2 (1.9-2.5) for normal T cells, Table 5,  $p < 0.05$ ). The increased sensitivity to inhibition by cAMP analog suggests a contribution from elevated endogenous cAMP in priming cAMP binding site B of PKA type I with subsequent increase in the affinity of the A site for the exogenously added cAMP analog. The shift in curve slope from a cooperative, two-ligand site binding situation to an apparent non-cooperative inhibition curve by 8-CPT-cAMP also indicates B-site occupancy by elevated endogenous cAMP.

25



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 48 -

Table 5.

	Mice	Anti-CD3-induced proliferation (cpm)	Increase in proliferation by Rp-8-Br- cAMPS (fold increase)	Inhibition of proliferation by 8-CPT-cAMP (IC <sub>50</sub> μM)	Inhibition of proliferation by 8- CPT-cAMP (Hill coefficient)
5					
10	1	9525	19	6	41
	2	3312	24	22	54
	3	9153	14	8	58
	4	959	37	n.d.	n.d.
15	5	13791	10	52	156
	6	6370	19	66	152
	7	6357	22	n.d.	n.d.
	8	9986	42	n.d.	n.d.
	9	5696	40	n.d.	n.d.
20	10	16132	37	n.d.	n.d.
	11	3740	37	n.d.	n.d.
	<b>MAIDS</b>	6370*	2,2**	0,22	0,58***
25	Median (25-75th percentiles)	(3740 - 9986) n=11	(1,9-3,7) n=11	(0,08-0,52) n=5	(0,54-1,52) n=5
	<b>Controls</b>	62281	1,1	0,40	2,24
30	Median (25-75th percentiles)	(56539 - 82038) n=6	(1,0-1,3) n=6	(0,33-0,46) n=4	(1,93-2,47) n=4

MAIDS vs. controls; \* denotes p&lt;0,001, \*\* denotes p&lt;0,01 and \*\*\* denotes p&lt;0,05

EXAMPLE 2

Cyclic AMP-induced T cell dysfunction of MAIDS is due to increased PGE<sub>2</sub> production by CD11b-positive cells with increased levels of COX-2

*Elevated production of PGE<sub>2</sub> in MAIDS -*

Mixed lymph node cell populations were isolated from MAIDS-infected and control mice and cultured *in vitro*.

Secreted levels of PGE<sub>2</sub> were assessed in media supernatants after 48 hours of culture and revealed that MAIDS infected cells secreted 7 to 8-fold more PGE<sub>2</sub> than control cells.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 49 -

*Inhibition of PGE<sub>2</sub> production restores the T cell proliferation in MAIDS -*

Next, mixed lymph node cells were activated by anti-CD3 antibodies to induce proliferation of T cells, and [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was examined after 72 hours. Proliferation of cells from MAIDS-infected mice was again only 10 to 20 % of the T cell proliferation of uninfected cells. However, when indomethacin was added to the cultures to inhibit production of PGE<sub>2</sub> in the mixed cultures, this strongly increased the proliferation of cells from five MAIDS-infected mice to levels comparable to that of control mice (Figure 6). Looking at 10 additional MAIDS-infected mice (Table 6), the effect of indomethacin on T cell proliferation of mixed lymphocyte cultures was very significant (p<0.01). In contrast, treatment of control cultures with indomethacin did not alter proliferation.

*COX-2 is expressed at high levels in lymph nodes of MAIDS infected mice -*

The constitutively expressed COX-1 is the normal source of cyclooxygenase activity that produces PGE<sub>2</sub>. However, no increase in COX-1 could be found in MAIDS mice that could account for the increased levels of PGE<sub>2</sub> (data not shown). Expression of COX-2 is normally restricted to brain/brain processes, to arthritic synovia and sites of tissue injury. COX-2 is not found in lymph nodes or lymphocytes as shown e.g. for control lymphocytes in Figure 8 (upper panel). Surprisingly, we found that crude lymph node cells from MAIDS infected mice express high levels of COX-2 (figure 8, lower panel). Furthermore, positively selected CD4+ and CD8+ T cells as well as B cells from MAIDS lymph nodes contained high levels of COX-2. In contrast, negatively selected CD11b- cells contained only low levels of COX-2.

From looking at CD4+ and CD8+ T cells and B cells (B220

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 50 -

marker) from MAIDS infected and control mice by flow cytometry, it was evident that the CD11b marker is not normally expressed on T or B cells. However, a distinct fraction of both CD4+ T cells and B cells from MAIDS infected mice were CD11b bright (gating labelled R1) and an additional pool of CD4+ T cells and B cells as well as CD8+ T cells were CD11b dim (gating labelled R2), indicating that they had significant but lower levels of CD11b expression. Thus, subpopulations of MAIDS-infected CD4+ and CD8+ T cells were CD11b bright and dim, respectively, whereas the majority of B cells were positive. Taken together with the fact that CD11b+ cells, and not CD11b- cells, expresses COX-2, this indicates that both B cells and T cells in lymph nodes from MAIDS-infected mice express COX-2.

From looking at intact lymph nodes from MAIDS-infected mice by immunohistochemistry, it is clear that the gross architecture is altered with loss of germinal centers in MAIDS (week 19 post infection) compared to control mice (Figure 10, c versus a). At higher magnification of slides immunostained for COX-2, it is evident that whereas lymph nodes from control animals only show brown HRP-staining in the ingested material in macrophages (falsely positive "tingible" bodies, Figure 10b), a large proportion of lymph node cells in MAIDS stain positive for COX-2 (Figure 10d).

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 51 -

Table 6.

	Mouse	Medium	Indomethacin n	Anti-CD3	Indomethacin / Anti-CD3
5	1	1304	1412	6245	9381
	2	1082	1129	8019	47926
	3	209	265	918	1345
	4	236	335	8938	11579
	5	4715	4317	6591	8545
10	6	1799	ND	2932	ND
	7	3051	ND	7436	ND
	8	1668	ND	3594	19624
	9	839	2363	7885	31830
15	10	3413	7316	8777	42244
	Median	1486	1412	7013	15601**
	(25-75th percentiles)	(839- 3051)	(335-4317) n=7	(3594-8019) n=10	(8963-37037) n=8

Indomethacin (Indo) vs. controls; \*\* denotes  $p < 0.01$ 

20

EXAMPLE 3HIV patients exhibit marginal effects when treated with  
non-selective COX inhibitor in vivo

25

Methods*Negative selection of peripheral blood CD3+ T cells from  
HIV patients*

30

Peripheral blood CD3+ T cells were purified by negative  
selection from buffycoats from normal healthy donors  
(Ullevaal University Hospital Blood Center, Oslo,  
Norway). Briefly, peripheral blood mononuclear cells  
were isolated by density gradient (Lymphoprep, NycoMed,  
Oslo, Norway) centrifugation followed by negative  
selection using monodisperse magnetic beads directly  
coated with antibodies to CD14 and CD19 and rat anti-  
mouse IgG beads coated with antibodies to CD56 and a  
magnet. Magnetic beads were all from Dynal (Oslo,  
Norway, cat. no. 111.12, 111.04, and 110.11,  
respectively) whereas anti-CD56 antibody was from

40

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 52 -

Pharmingen (San Diego, CA, cat. no. 31660.d). All steps were performed at 4 °C. Cell suspensions were analyzed by flow cytometry and shown to consist of more than 90 % CD3+ cells.

5

*Proliferation assays using HIV patient T cells*

Proliferation assays were performed by incubation of  $0.75 \times 10^6$  CD3+ T cells/ml in a 100  $\mu$ l volume in flat-bottom 96-well microtiter plates. Activation was achieved by subsequent addition of monodisperse magnetic beads coated with sheep anti-mouse IgG (Dynal, cat. no. 110.02) at a cell:bead ratio of 1:1 followed by addition of anti-CD3 (clone SpvT,b) at a final dilution of 1:125 000 for the experiments shown. The optimal concentration of antibody was titrated carefully in the initial setup and parallel experiments at several different dilutions of antibody were always performed. Proliferation was analyzed by incubating cells for 72 hours during which [<sup>3</sup>H]-thymidine was included for the last 16 hours. Cells were washed and harvested onto glass filters and subsequently analyzed by  $\beta$ -scintillation counting. cAMP analogs, when used, were added 30 min prior to activation by addition of anti-CD3 antibodies. 8-CPT-cAMP was from Sigma (St. Louis, MO).

25

Experimental

An on-going phase II clinical trial is testing the immunostimulatory effect of short-term treatment with a non-selective COX inhibitor (indomethacin) on surrogate parameters on T cells from HIV infected patients. According to approved protocol, patients were to receive 50 mg indomethacin 3 times a day (total dose of 150 mg/day) for 2 weeks with sampling at day 0, day 14 and day 28 (2 weeks after discontinuation). However, due to adverse events such as epigastric pain and dyspepsia, and discontinuation of the study among the initial patients, this dose had to be cut back to 25 mg

35

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 53 -

indomethacin 3 times a day (total dose of 75 mg/day). Figure 11 shows T cell immune function (measured as proliferation after activation) of the 3 patients (pat. 1 to pat 3) that have so far completed the study. The upper panel shows levels of proliferation after T cell activation at start (0 days), at completion of indomethacin treatment (14 days) and 2 weeks thereafter (28 days). As can be seen, patients 1 and 2 did not increase their immune function by a non-selective COX antagonist administered *in vivo*. However in patient 3, T cell responses increase approximately 2.5-fold and persisted up to 2 weeks after discontinuation of indomethacin. Figure 11b, bottom panel shows T cell proliferation after incubation with a PKA-I selective cAMP antagonist, Rp-8-Br-cAMPS *in vitro* in cell cultures. The degree of cAMP-mediated T cell dysfunction is evident from the reversal of proliferation obtained by the antagonist (compare upper and lower panels; approx. 2-fold increase in proliferation in patients 1 and 3 at all time points whereas no effect in patient 2). It is clear from Fig. 11 that indomethacin did not have a convincing effect, which may be attributed to the lack of COX-2 selectivity as well as to dose-limitations due to adverse events.

#### EXAMPLE 4

HIV patients show marginal effects after administration of non-selective Cox inhibitor *in vivo* (continuation of the experiments of Example 3)

#### Methods

The methods used were as described in Example 3.

#### Experimental

Results from 7 patients in an on-going phase II clinical trial (continuation of Example 3) that received indomethacin 25 mg three times a day perorally for 14

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 54 -

days in addition to triple combination therapy is shown in Figure 12. Patients 1-3 correspond to those described in Example 3. The problem with administration of indomethacin is adverse events as described above (Example 3) that limit the dose to 25 mg three times a day. At this permissive dose, the effects of this non-selective COX inhibitor are marginal. After 14 days of treatment only two of seven patients had clearly elevated T cell immune function measured as proliferation after T cell activation whereas one patient had decreased immune function and four patients had minor changes. Two weeks after discontinuation of indomethacin, five of seven patients had elevated immune responsiveness compared to day 0. However, only two patients had a more than two-fold increase in T cell proliferation.

#### EXAMPLE 5

Cox-2 inhibitors improve immune function of MAIDS T cells in vitro

#### Methods

The methods used in the proliferation assay were as described in Example 1. The PGE<sub>2</sub> assay was as described in Example 1.

#### Experimentals

##### Proliferation Assay

Mixed lymph node cells were isolated from MAIDS mice 17 weeks post-infection. Cells were activated by anti-CD3 antibodies to induce proliferation of T cells, and [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was examined after 72 hours as a measure of immune function. Proliferation of cells from MAIDS-infected mice was again only 5 to 20% of the T cell proliferation of uninfected cells (2000 to 12000 cpm in MAIDS cells vs. mean of 55000 cpm in cells from

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 55 -

uninfected mice). However, when rofecoxib (Figure 13) or celecoxib (Figure 14) were added to the cultures this increased the proliferation of cells from MAIDS-infected mice two- to three-fold in a concentration-dependent manner. In contrast, treatment of control cultures from uninfected mice with rofecoxib or celecoxib did not increase proliferation (0.8- to 1.0-fold increase in the presence of COX-2 inhibitors, i.e. no increase, not shown). In T cells from MAIDS mice, the concentration of rofecoxib and celecoxib that produced a half-maximal effect (ED50) was approximately 0.01  $\mu$ M for rofecoxib and 0.03  $\mu$ M for celecoxib. The fact that sub-micromolar concentrations are effective, clearly indicate that the observed increase in immune response is mediated via inhibition of COX-2, and not COX-1 which is inhibited only at micromolar concentrations of rofecoxib and celecoxib (values from Warner *et al.*, 1999, PNAS USA, 96, p7563-7568). Thus, reversal of inhibited T cell immune function by rofecoxib and celecoxib results in decreased PGE<sub>2</sub> production in the mixed cultures and thereby lowered T cell cAMP levels via inhibition of COX-2.

#### *PGE<sub>2</sub> production*

The effect of the COX-2 inhibitors rofecoxib and celecoxib on PGE<sub>2</sub> levels was also analysed. As can be seen from Figure 15, crude lymph node cells from MAIDS mice secreted 5 to 6-fold more PGE<sub>2</sub> than lymph node cells from healthy mice (see also Fig 6). Furthermore, PGE<sub>2</sub> levels in response to LPS increased 8-10 fold in infected compared to approximately 2-fold in uninfected mice. When cells were incubated in the presence of COX-2 inhibitors rofecoxib or celecoxib, the PGE<sub>2</sub> secretion of MAIDS lymph node cells was similar to that of uninfected cells. The effect of indomethacin (compare proliferation in Fig. 7) is included as control.



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 56 -

EXAMPLE 6Cox-2 inhibitor improves immune function of MAIDS T cells in vivo5 Methods and Experimental

10 Infected mice (17 weeks post-infection) were treated for one week per os (i.e. orally) with a dose of rofecoxib corresponding to the recommended dose for use in humans (and taking into account the 7-fold higher clearance in rodents). MAIDS mice normally develop an immunoproliferation syndrome with enlarged lymph nodes and spleen. In accordance with this, untreated infected animals had an average spleen weight of 1.3 g and an average weight of pooled lymph nodes of 1.7 g. In contrast MAIDS mice receiving rofecoxib for 7 days had 15 average spleen weights of 0.8 g and average weight of pooled lymph nodes of 0.3 g, indicating reversal of lymphoproliferation.

20 The results are shown in Figure 16. When T cell immune function was assessed in crude lymph node cells from infected treated and untreated mice, it was clear that whereas untreated infected animals had anti-CD3 induced proliferation in the range of 2000 to 10000 cpm (average 7300 cpm), infected mice that received rofecoxib for one week had T cell responses to anti-CD3 that were increased 2.7- to 5.6-fold compared to infected, untreated mice. Furthermore, whereas infected, untreated mice demonstrated increased anti-CD3 induced T 25 cell proliferation in the presence of Rp-8-Br-cAMPS, this 2- to 3-fold effect was lost in the mice treated with rofecoxib, indicating that the treatment with rofecoxib in vivo lowered PGE<sub>2</sub> levels and reversed cAMP-mediated inhibition of T cell function.

35

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 57 -

EXAMPLE 7In vivo treatment of MAIDS mice with rofecoxib or celecoxib increases T-cell responses to anti-CD3 and immune responses

5

Methods and Experimental

Infected mice were treated with rofecoxib and celecoxib corresponding to the recommended dose for use in humans (and taking into account the 7-fold higher clearance in rodents, 3 and 20 mg/kg/day, respectively). Parenteral administration was accomplished by intraperitoneally injecting Cox-2 inhibitors formulated in intralipid. The results are shown in Figure 17.

When T cell immune function was assessed in crude lymph node cells from infected treated and untreated mice after 18 to 20 days of infection, it was clear that whereas untreated infected animals had anti-CD3 induced proliferation in the range of 10000 cpm, infected mice that received rofecoxib for 18 to 20 days had T cell responses to anti-CD3 that were increased approximately two-fold compared to infected, untreated mice. Similarly, celecoxib improved immune responses in cells from the majority of the group of mice injected to approximately 3-fold over untreated, uninfected mice.

EXAMPLE 8In vivo treatment of MAIDS mice with meloxicam increases T-cell immune function

30

Methods and Experimental

Infected and healthy mice were treated with 2.8 mg/kg/day meloxicam, which corresponds to the recommended dose for use in humans when taking into account the 7-fold higher clearance in rodents. Parenteral administration was accomplished by

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 58 -

subcutaneous implantation of osmotic pumps filled with water-soluble meloxicam injection compound. T cell function was assessed and the results are shown in Figure 18.

5

When T cell immune function was assessed in crude lymph node cells from treated and control (PBS)-treated infected mice after 2 weeks of treatment, it was clear that whereas PBS-treated, infected animals had anti-CD3 induced proliferation in the range of 500 cpm, infected

10

mice that received meloxicam for 14 days had T cell immune responses to anti-CD3 that were significantly increased compared to infected mice that received only PBS (Fig. 18a, more than 10-fold;  $p < 0.05$ ).

15

When meloxicam was added back to the cell cultures during the 3-day *in vitro* T cell proliferation assay to prevent release from the *in vivo* inhibition by meloxicam and thereby reactivation of COX-2, the immune response in the meloxicam-treated group was two-fold higher than without addition of meloxicam *in vitro* ( $p = 0.005$ ) and compared to that of MAIDS mice that received PBS *in vivo* the effect was again significant (Fig. 18b,  $p < 0.05$ ).

20

25

In contrast, only MAIDS mice that received PBS *in vivo* and not meloxicam-treated mice demonstrated increased immune responses when the PKA type I-selective cAMP antagonist, Rp-8-Br-cAMPS, was added to the anti-CD3 stimulated mixed lymph node cultures *in vitro* (Fig. 18c). The fact that the effect of cAMP antagonist is absent in meloxicam-treated MAIDS mice indicates that *in vivo* meloxicam treatment reduces or removes the cAMP-induced immunodeficiency of MAIDS and restores immune function.

30

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 59 -

Claims:

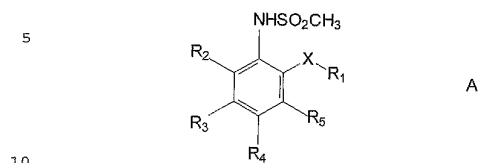
1. Use of a COX-2 inhibitor or derivative or  
pharmaceutically acceptable salt thereof in the  
5 preparation of a medicament for treating or preventing a  
disorder typified by an immunodeficiency.
2. The use as claimed in claim 1 wherein said disorder  
is a virally-induced immunodeficiency disorder.  
10
3. The use as claimed in claim 1 or 2 wherein said  
disorder is common variable immunodeficiency or results  
from infection by a retrovirus, preferably HIV or a  
related virus or is the resultant AIDS, or a related  
15 condition.
4. The use as claimed in any one of claims 1 to 3  
wherein said medicament is for administration to humans  
or companion or agricultural animals.  
20
5. The use as claimed in any one of claims 1 to 4  
wherein said COX-2 inhibitor has a COX-1:COX-2  
selectivity ratio of >5, preferably >50, according to  
the WHMA assay at IC<sub>50</sub>.  
25
6. The use as claimed in any one of claims 1 to 5  
wherein said COX-2 inhibitor is a methansulphonamide  
ether, a methansulphonamide thioether or a diaryl  
heterocycle.  
30
7. The use as claimed in any one of claims 1 to 6

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 60 -

wherein said COX-2 inhibitor is a compound of general formula A:



wherein

15 X represents an oxygen or sulphur atom or alkyl group, preferably a -CH<sub>2</sub>- group;

20 R<sub>1</sub> represents a cycloalkyl or aryl group which may optionally be substituted by one or more groups or atoms, preferably by one or more halogen atoms; and

25 R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> independently represent a hydrogen atom, a nitro or acyl group or an alkyl group which may optionally be substituted by one or more groups or atoms or alternatively R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> or R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> together with the intervening carbon atoms form a cyclopentanone group;

30 or a derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof.

8. The use as claimed in claim 7 wherein X is an oxygen atom.

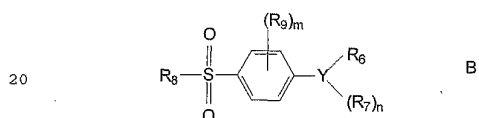
35 9. The use as claimed in claim 7 or 8 wherein R<sub>1</sub> is an aryl group or an aryl group substituted with one or more fluorine atoms, or a cycloalkyl group.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 61 -

10. The use as claimed in any one of claims 7 to 9 wherein  $R_2$  and  $R_3$  are hydrogen atoms and  $R_4$  is an  $-\text{NO}_2$  or  $-\text{COCH}_3$  group.
- 5 11. The use as claimed in any one of claims 7 to 10 wherein  $R_2$  is a hydrogen atom and  $R_3$  and  $R_4$  together form a cyclopentanone group.
- 10 12. The use as claimed in any one of claims 7 to 11 wherein said COX-2 inhibitor is flosulide, NS-398, nimesulide, FK 3311 or L-745 337.
- 15 13. The use as claimed in any one of claims 1 to 6 wherein said COX-2 inhibitor is a compound of general formula B;



- wherein
- 25 Y represents a cyclic group, preferably a oxazolyl, isoxazolyl, thienyl, dihydrofuryl, furyl, pyrrolyl, pyrazolyl, thiazolyl, imidazolyl, isothiazolyl, cyclopentenyl, phenyl or pyridyl group;
- 30 n is an integer from 0 to 3;
- m is an integer from 0 to 4;
- 35  $R_6$  represents a ketocyclyl, cycloalkyl or aryl group, which group may optionally be substituted by one or more groups or atoms, preferably by one or more halogen atoms;

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 62 -

- R<sub>7</sub> each independently represent a substituent which may be any functional group, preferably a hydrogen or halogen atom, or an alkyl group, which alkyl group may be substituted by one or more groups or atoms;
- 5 R<sub>8</sub> represents an alkyl group;
- R<sub>9</sub> represents a halogen atom; and
- 10 R<sub>10</sub> represents a hydrogen atom or an alkyl group optionally substituted by one or more groups or atoms, preferably by an acyl group;
- or a derivative or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
- 15 14. The use as claimed in claim 13 wherein R<sub>8</sub> is -NH<sub>2</sub> or -CH<sub>3</sub>.
- 20 15. The use as claimed in claim 13 or 14 wherein Y is a pyrazolyl, furyl or thienyl group.
16. The use as claimed in any one of claims 13 to 15 wherein R<sub>6</sub> is an aryl group optionally substituted with one or more fluorine atoms.
- 25 17. The use as claimed in any one of claims 13 to 16 wherein n is 1 or 2.
- 30 18. The use as claimed in any one of claims 13 to 17 wherein R<sub>7</sub> is a bromine atom, an acyl group or a substituted alkyl group.
- 35 19. The use as claimed in any one of claims 13 to 18 wherein said Cox-2 inhibitor is celecoxib, rofecoxib, DuP-697, SC-58125, DFP, DFU, CGP 28232 or MF tricyclic.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 63 -

20. The use as claimed in any one of claims 1 to 6 wherein said COX-2 inhibitor is a non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) derivative.
- 5 21. The use as claimed in any one of claims 1 to 20 wherein said COX-2 inhibitor is diisopropylfluorophosphate, L-745337, rofecoxib, NS 398, SC 58125, etodolac, meloxicam, celecoxib or nimesulide.
- 10 22. The use as claimed in claim 21 wherein said COX-2 inhibitor is rofecoxib.
23. The use as claimed in claim 21 wherein said COX-2 inhibitor is celecoxib.
- 15 24. The use as claimed in claim 21 wherein said COX-2 inhibitor is meloxicam.
- 20 25. A pharmaceutical composition comprising a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof as defined in any one of claims 1 to 24 and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or excipient.
- 25 26. A pharmaceutical composition as defined in claim 25 additionally comprising one or more additional COX-2 inhibitors, derivatives or pharmaceutically acceptable salts thereof and/or one or more additional active ingredients.
- 30 27. A pharmaceutical composition as defined in claim 25 or 26 for use as a medicament, preferably for treating or preventing a disorder as defined in any one of claims 1 to 4.
- 35 28. A product comprising a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof



WO 02/07721

PCT/GB01/03284

- 64 -

- as defined in any one of claims 1 to 24 and one or more additional COX-2 inhibitors, derivatives or pharmaceutically acceptable salts thereof and/or one or more additional active ingredients as a combined  
5 preparation for simultaneous, separate or sequential use in treating or preventing a disorder as defined in any one of claims 1 to 4.
29. Use of a pharmaceutical composition as defined in  
10 claim 25 or 26 in the preparation of a medicament for treating or preventing a disorder as defined in any one of claims 1 to 4.
30. A method of treating or preventing a disorder as  
15 defined in any one of claims 1 to 4 in a human or non-human animal wherein said animal is administered a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof as defined in any one of claims 1 to 24 or  
is administered a pharmaceutical composition as defined  
20 in claim 25 or 26.

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

1 / 13

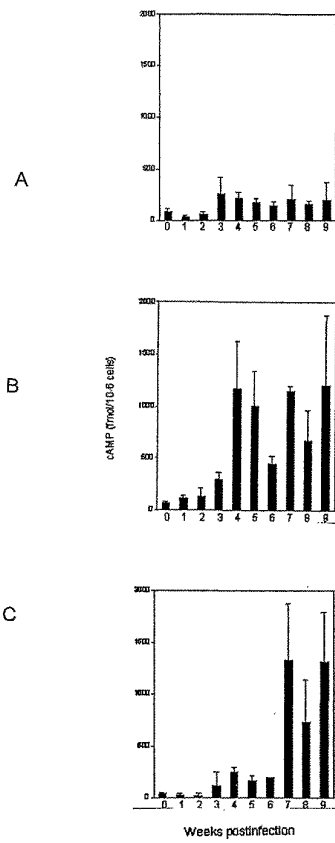


Figure 1

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

2 / 13

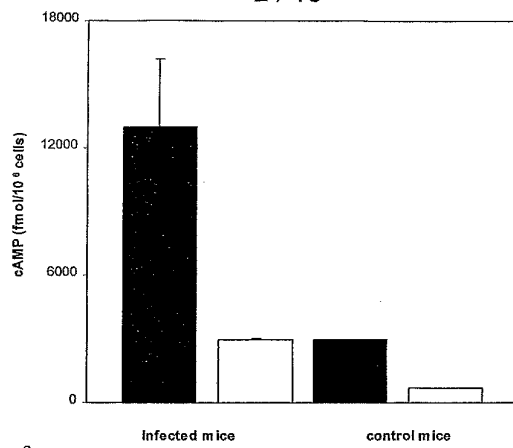


Figure 2

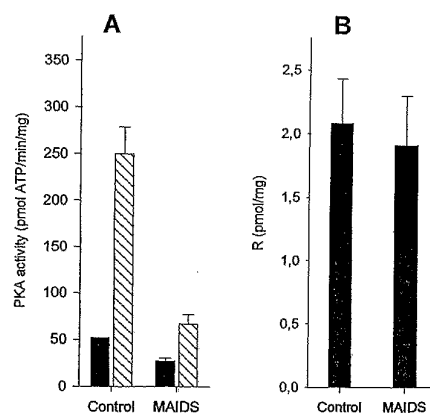
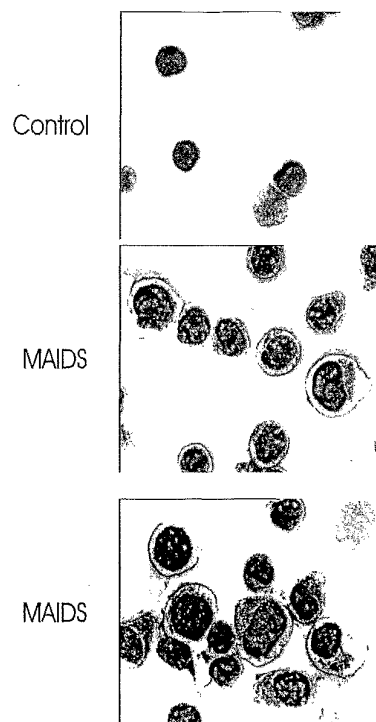


Figure 3

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

3 / 13

Figure 4

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

4 / 13

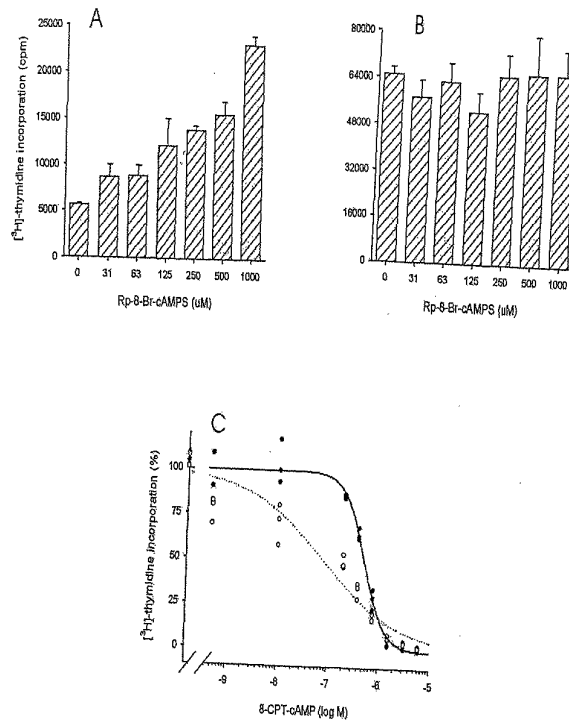


Figure 5

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

5 / 13

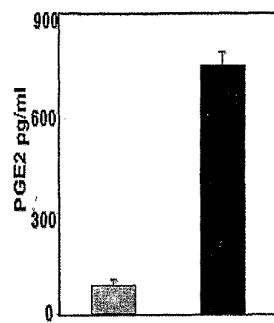


Figure 6

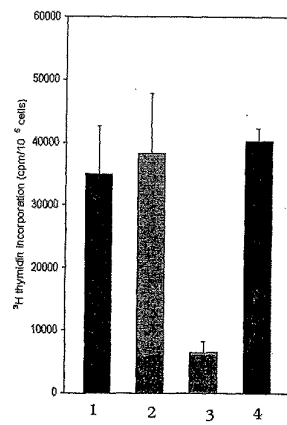


Figure 7

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

6 / 13

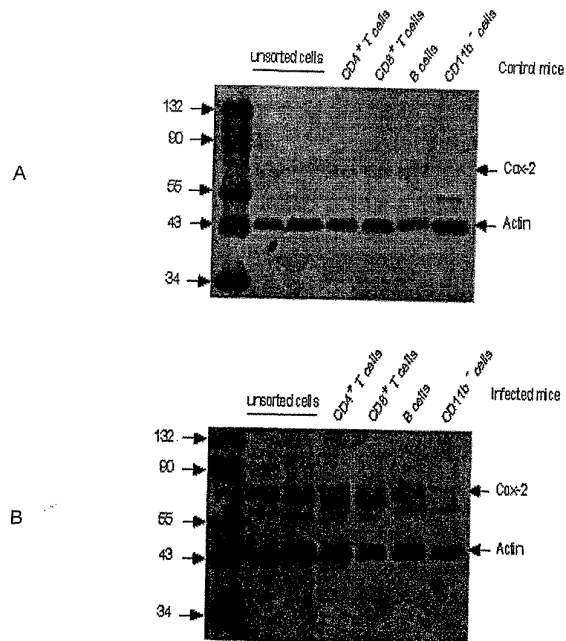


Figure 8

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

7 / 13

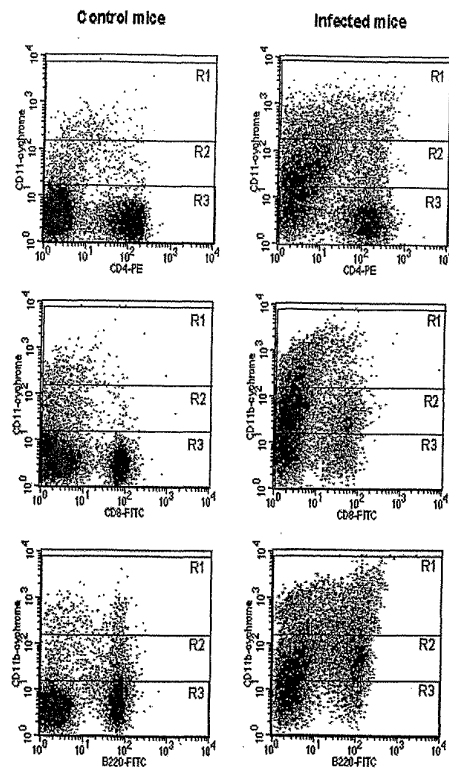


Figure 9



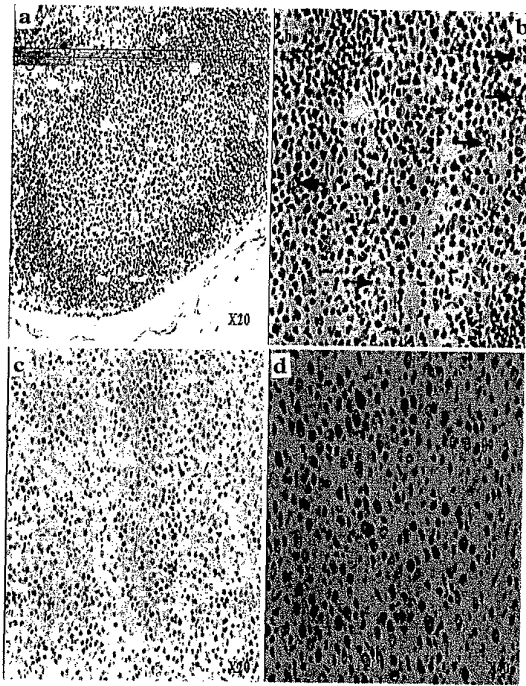


Figure 10

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

9/13

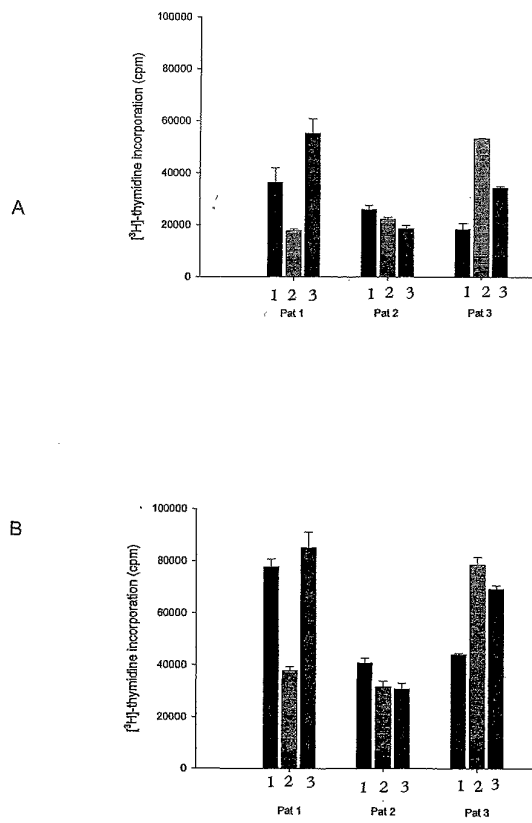


Figure 11

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

10 / 13

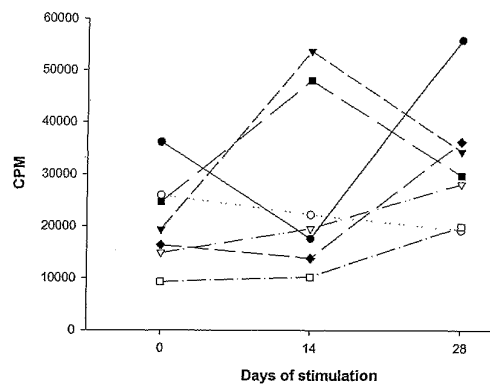


Figure 12

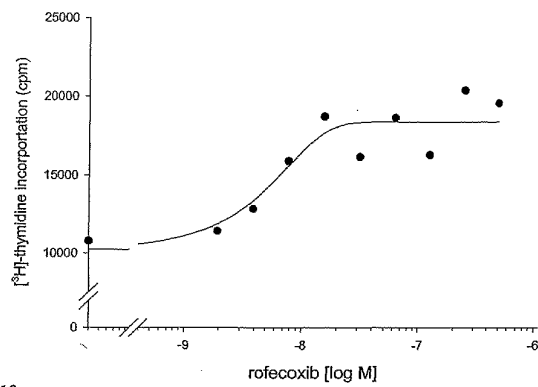


Figure 13

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

11 / 13

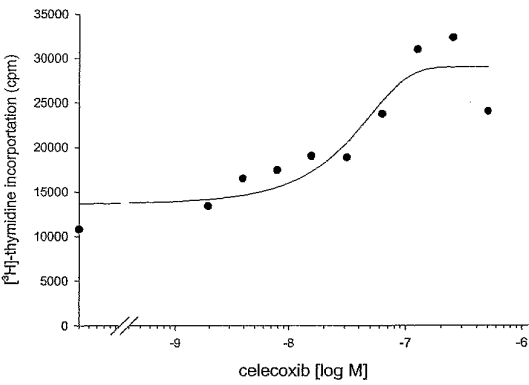


Figure 14

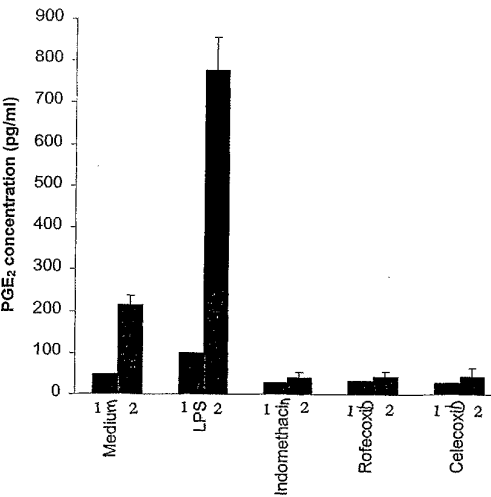


Figure 15

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

12 / 13

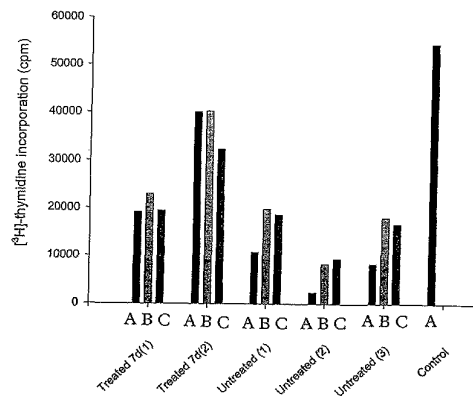


Figure 16

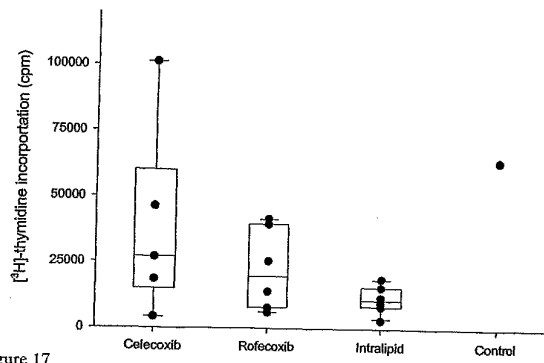


Figure 17

WO 02/07721

PCT/GB01/03284

13 / 13

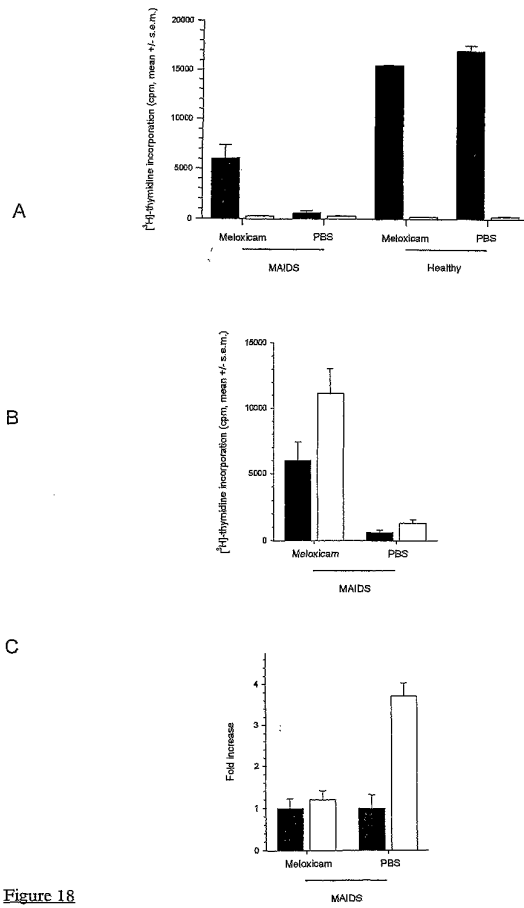


Figure 18

## 【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  
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/07721 A3(51) International Patent Classification: A61K 31/18.  
31/341, 31/381, 31/407, 31/415, 31/5415, 31/661, A61P  
31/12601, N-0368 Oslo (NO), HANSSON, Vidar [NO/NO];  
Ingerdén 14, Blommenholm, N-1339 Sandvika (NO).  
KLAVENESS, Jo [NO/NO]; Midtasen 5, N-1166 Oslo  
(NO).

(21) International Application Number: PCT/GB01/03284

(22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
0017908.5 20 July 2000 (20.07.2000) GB  
0109648.6 19 April 2001 (19.04.2001) GB(71) Applicant (for all designated States except US): LAURAS  
AS [NO/NO]; Gaustadallén 21, N-349 Oslo (NO).(71) Applicant (for GB only): JONES, Elizabeth, Louise  
[GB/GB]; Frank B. Deln & Co., 179 Queen Victoria  
Street, London EC4V 4EL, (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TASKÉN, Kjetil  
[NO/NO]; Bergersletta 20, N-1349 Rykkinn (NO).  
MOUTSCHEN, Michel [BE/BE]; Avenue du Bois  
Imperial de Rognac 60B, B-4121 Neupré (BE). RAH-  
MOUNI-PIETTE, Souad [BE/BE]; Rue des Sapins  
10, B-4100 Senning (BE). AANDAH, Einar, Martin  
[NO/NO]; Sidsel Sitteresvei 1c, N-2600 Lillehammer  
(NO). AUKRUST, Pål [NO/NO]; Abraham Pihls veg 5,  
N-2322 Riddabu (NO). FRØLAND, Stig, S. [NO/NO];  
Hasselhaugveien 34, N-0851 Oslo (NO). JOHANS-  
SON, Christian, Carl [SE/NO]; Kirkeveien 57, Leil(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, 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, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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:

— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments(88) Date of publication of the international search report:  
18 April 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/07721 A3

(54) Title: USE OF COX-2 INHIBITORS FOR PREVENTING IMMUNODEFICIENCY

(57) Abstract: The present invention provides a method for treating or preventing a disorder typified by an immunodeficiency (e.g. HIV), wherein the patient is administered a COX-2 inhibitor or derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof, preferably diisopropylfluorophosphate, L-745337, rofecoxi, NS 398, SC 58125, etodolac, meloxicam, celecoxib flunolide or nimesulide, and compositions and products containing the same or use of the same in preparing medicaments and for treatment.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/03284
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K31/18 A61K31/341 A61K31/381 A61K31/407 A61K31/415 A61K31/5415 A61K31/661 A61P31/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
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)		
WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 00 69255 A (ANTON PETER A ;ELLIOTT JULIE E (US); GIORGI JANIS V (US); POLES MI) 23 November 2000 (2000-11-23) abstract; claims 1-127 page 3, line 1 -page 6, line 31 page 15, line 24 -page 16, line 29 page 21, line 1 -page 24, line 25	1-30
X	CORASANITI, M. T. (1) ET AL: "Neurobiological mediators of gp120-induced apoptosis in the brain cortex of rat." JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, (JUNE, 2000) VOL. 6, NO. 3, PP. 258. PRINT. MEETING INFO.: NEUROSCIENCE OF HIV INFECTION 2000 EDINBURGH, SCOTLAND JUNE 22-24, 2000 , XP001058984 abstract	1-10, 12, 20, 21, 25-30
- / - -		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
31 January 2002		15/02/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5016 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  A. Jakobs

Form PCT/ISA(210) (second sheet) (July 1999)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/GB 01/03284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INIGUEZ M A ET AL: "INDUCTION OF CYCLOOXYGENASE-2 ON ACTIVATED T LYMPHOCYTES: REGULATION OF T CELL ACTIVATION BY CYCLOOXYGENASE-2 INHIBITORS" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 163, no. 1, 1999, pages 111-119, XP001050476 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-30
X	WO 97 29774 A (SEARLE & CO.; GREGORY SUSAN A (US); ISAKSON PETER C (US); ANDERSON) 21 August 1997 (1997-08-21) abstract page 8, line 2 -page 11, line 3 page 14, line 24 -page 20, line 5 page 47, line 11 -page 48, line 29; claims 1, 10-12, 18, 21, 22	1, 4-21, 24-30
X	RIOUX, NATHALIE ET AL: "Recovery from 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol-induced immunosuppression in A/J mice by treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs" J. NATL. CANCER INST. (1997), 89(12), 874-880, XP008000103 abstract	1-10, 12, 20, 21, 25-30
X	LIS, T. ET AL: "Inhibition of immune response by diisopropyl phosphorofluoridate" ARCH. TOXICOL., SUPPL. (1980), 4, 151-5, XP008000102 abstract page 151, paragraph 1 page 152, paragraph 7 -page 153, paragraph 1; figure 1	1-5, 19-21, 25-30
X	KAMOSHITA K. ET AL: "Calcium requirement and inhibitor spectrum for intracellular HIV type 1 gp160 processing in cultured HeLa cells and CD4+ lymphocytes: Similarity to those of viral envelope glycoprotein maturase." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1995) 117/6 (1244-1253), XP001053090 abstract page 1244, column 1, paragraph 1 -page 1245, column 1, paragraph 2; figures 4, 7; table 1 page 1251, column 1, paragraph 2 page 1252, column 1, paragraph 1	1-5, 19-21, 25-30
	---	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 01/03284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 20864 A (MEMO MAURIZIO ;PIZZI MARINA (IT); GRILLI MARIAGRAZIA (IT); SPANO P) 22 May 1998 (1998-05-22) claims 1-4; table 1 ---	1-18, 20, 21, 24-30
X, P	WO 01 41536 A (HAGEMAN MICHAEL J ;MIYAKE PATRICIA J (US); STEFANSKI KEVIN J (US);) 14 June 2001 (2001-06-14) abstract page 1, line 1-17 page 20, line 16 -page 23, line 32 ---	1-6, 13-21, 23, 25-30
X	WO 00 40243 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ;ADAMS JERRY L (US); BOEHM JEFFREY C (US);) 13 July 2000 (2000-07-13) abstract page 25, line 31 -page 28, line 9 ---	1-5, 25-30
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 27 March 1998 (1998-03-27) BAGETTA G ET AL: "HIV-1 gp120-induced apoptosis in the rat neocortex involves enhanced expression of cyclo-oxygenase type 2 (COX-2)." Database accession no. PREV199800215806 XP002188887 abstract & BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 244, no. 3, 27 March 1998 (1998-03-27), pages 819-824, ISSN: 0006-291X ---	1-5, 25-30
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1991 SCHROEDER H C ET AL: "AVAROL RESTORES THE ALTERED PROSTAGLANDIN AND LEUKOTRIENE METABOLISM IN MONOCYTES INFECTED WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1" Database accession no. PREV199293049901 XP002188888 abstract & VIRUS RESEARCH, vol. 21, no. 3, 1991, pages 213-224, ISSN: 0168-1702 --- -/-	1-5, 25-30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 01/03284

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1991 AMBRUS J JR ET AL: "IMPROVED IN-VITRO ANTIGEN-SPECIFIC ANTIBODY SYNTHESIS IN TWO PATIENTS WITH COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY TAKING AN ORAL CYCLOOXYGENASE AND LIPOXYGENASE INHIBITOR KETOPROFEN" Database accession no. PREV199293032818 XP002188889 abstract & JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 88, no. 5, 1991, pages 775-783, ISSN: 0091-6749 -----	1-5, 25-30
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1987 FOSTER S H ET AL: "CYCLOOXYGENASE INHIBITION AND IMPROVED OXYGENATION IN PATIENTS WITH PULMONARY COMPLICATIONS OF AIDS" Database accession no. PREV198784039647 XP002188890 abstract & NEW YORK STATE JOURNAL OF MEDICINE, vol. 87, no. 5, 1987, pages 280-282, ISSN: 0028-7628 -----	1-5, 25-30
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 WOLOSCHAK GAYLE E ET AL: "Salicylic acid inhibits ultraviolet-and cis-platinum-induced human immunodeficiency virus expression." Database accession no. PREV199598264040 XP002188891 abstract & CANCER RESEARCH, vol. 55, no. 8, 1995, pages 1696-1700, ISSN: 0008-5472 -----	1-5, 25-30
A	SPEIR, EDITH ET AL: "Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells" CIRC. RES. (1998), 83(2), 210-216 , XP008000109 the whole document -----	1-5, 25-30

International Application No. PCT/GB 01/03284

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1-6, 20, 25-30 relate to a product/compound/composition defined by reference to a desirable characteristic or property, namely COX-2inhibitors, NSAIDs

The claims cover all products/compounds/compositions having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products/compounds/compositions. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the products/compounds/compositions by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Present claims 1-30 relate to an large number of possible therapeutic applications as far as regarding the terms "disorder typified by an immunodeficiency, a virally-induced immunodeficiency disorder, a thereto related disorder that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search over the whole scope of the claims impossible.

Present claims 7-10, 13-18, 20, 25-30 relate to a large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the use of flosulide, ns-398 (N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulfonamide), nimesulide, fk-3311, L-745337, celecoxib, rofecoxib, DUP-697, SC-58125, dfu, diisopropylfluorophosphate (dfp), CGP-28232, etodolac and meloxicam in relation to HIV infection and/or the resultant AIDS.

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 01/03284

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0069255	A	23-11-2000	AU 5010800 A WO 0069255 A1	05-12-2000 23-11-2000
WO 9729774	A	21-08-1997	AU 1952597 A CA 2246336 A1 EP 0880363 A1 JP 2001506574 T WO 9729774 A1	02-09-1997 21-08-1997 02-12-1998 22-05-2001 21-08-1997
WO 9820864	A	22-05-1998	IT MI962356 A1 WO 9820864 A2	13-05-1998 22-05-1998
WO 0141536	A	14-06-2001	AU 1805901 A AU 1930301 A AU 1931001 A AU 1931101 A AU 2041201 A AU 2057101 A EP 1175214 A2 EP 1165072 A2 EP 1150959 A1 EP 1150960 A1 NO 20013855 A NO 20013858 A NO 20013859 A NO 20013868 A WO 0141536 A2 WO 0141761 A2 WO 0141762 A2 WO 0141760 A2 WO 0142221 A1 WO 0142222 A1	18-06-2001 18-06-2001 18-06-2001 18-06-2001 18-06-2001 18-06-2001 30-01-2002 02-01-2002 07-11-2001 07-11-2001 05-10-2001 08-10-2001 08-10-2001 03-10-2001 14-06-2001 14-06-2001 14-06-2001 14-06-2001 14-06-2001 14-06-2001
WO 0040243	A	13-07-2000	AU 2408300 A EP 1140083 A1 WO 0040243 A1	24-07-2000 10-10-2001 13-07-2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/407	A 6 1 K 31/407	
A 6 1 K 31/415	A 6 1 K 31/415	
A 6 1 K 31/5415	A 6 1 K 31/5415	
A 6 1 K 31/661	A 6 1 K 31/661	
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/12	1 7 1
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 マウトスチェン マイケル  
ベルギー ビー - 4 1 2 1 ネウブル アヴェニュー デュ ボイス インペリアル デュ ログ  
ナック 6 0 ビー
- (72)発明者 ラハマウニ - ピエッテ ソウアド  
ベルギー ビー - 4 1 0 0 セライング ルー デス サピンス 1 0
- (72)発明者 アンダール エイナー マーティン  
ノールウェー エヌ - 2 6 0 0 リレハマー シドセル シドサークスベイ 1 シー
- (72)発明者 アウクルスト パル  
ノールウェー エヌ - 2 3 2 2 リダブ アブラハム ピフルズ ベグ 5
- (72)発明者 フローランド スティグ エス.  
ノールウェー エヌ - 0 8 5 1 オスロ ハセルハウグファイエン 3 4
- (72)発明者 ジョハンソン クリスチャン カール  
ノールウェー エヌ - 0 3 6 8 オスロ レイル 6 0 1 キルケファイエン 5 7
- (72)発明者 ハンソン ビダー  
ノールウェー エヌ - 1 3 3 9 サンドバイカ ブルームメンホルム インガーライエン 1 4
- (72)発明者 クラベネス ジョー  
ノールウェー エヌ - 1 1 6 6 オスロ ミッドタセン 5

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA17 AA19 AA20 BA44 CA59 MA02 NA05 NA14 ZB072  
ZB112 ZB332 ZC202 ZC552 ZC612  
4C086 AA01 AA02 BA03 BB02 BC36 BC67 BC69 BC72 BC79 BC82  
BC87 CB22 DA34 GA10 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZB07  
ZB11 ZB33 ZC20 ZC55 ZC61  
4C206 AA01 AA02 AA03 JA11 KA01 MA01 MA02 MA04 MA13 MA14  
MA17 MA24 NA05 NA14 ZB07 ZB11 ZB33 ZC20 ZC55 ZC61