

發明專利說明書 200530538

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：93134232

※ 申請日期：93.11.10

※IPC 分類：

G01N 33/68
A61K 38/00

一、發明名稱：(中文/英文)

調節 C-REL-依賴型細胞激素產生之組成物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING C-REL-DEPENDENT
CYTOKINE PRODUCTION

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

幸託製藥公司

SYNTA PHARMACEUTICALS CORP.

代表人：(中文/英文) (容後補呈) / (容後補呈)

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國·麻州 02421·賴新頓·哈維爾大道 45 號

45 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421, U. S. A.

國籍：(中文/英文) 美國 / U. S. A.

三、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

1. (容後補呈) / LU, RONGZHEN

2. 巴生 詹姆士 / BARSOU, JAMES

3. (容後補呈) / WADA, YUMIKO

國籍：(中文/英文)

1. 中國大陸 / CHINESE

2. 美國 / U. S. A.

3. 日本國 / JAPAN

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003年11月10日；60/519,048（主張優先權）
2. 美國；2003年11月11日；60/519,040（主張優先權）

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

本申請案係主張分別於 2003 年 11 月 10 日及 2003 年 11 月 11 日所提出美國專利臨時申請案 No. 60/519,048 與 No. 60/519,040 之優先權，其申請書之全部內容在此合併作為參考文獻。

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關用於調節 c-Rel 依賴型細胞激素產生但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之組成物及方法。本發明亦有關藉由分析 c-Rel 之經改變的細胞內定位來篩選不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之 c-Rel 活性調節劑。

【先前技術】

已知細胞激素於自體免疫疾病及炎症疾患之發展中所扮演的角色。細胞激素如介白素-12(IL-12)會對炎性刺激產生急性反應(acute phase response)，提高巨噬細胞及其他細胞之抗菌作用，並且促進特定之淋巴細胞反應。IL-12 涉及多重-Th1 顯性之自體免疫疾病，該等自體免疫疾病包括，但不限於，多發性硬化症、重症肌無力、自體免疫性神經病變、基蘭巴爾症候群(Guillain-Barre' syndrome)、自體免疫性葡萄膜炎、自體免疫溶血性貧血、惡性貧血、自體免疫性血小板減少症、顳動脈炎(temporal arteritis)、抗磷脂症候群、血管炎、韋格納氏肉芽腫(Wegener's granulomatosis)、貝歇特氏病(Behcet's disease)、疱疹樣皮膚炎、天疱瘡、白斑、克隆氏症(Crohn's

disease)、潰瘍性結腸炎、原發性膽汁性肝硬化、自體免疫性肝炎、第 1 型或免疫媒介性糖尿病、葛雷夫氏症 (Grave's disease)、橋本氏甲狀腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、自體免疫性卵巢炎及睪丸炎、腎上腺之自體免疫性疾病、類風濕性關節炎、全身紅斑性狼瘡、硬皮症、多發性肌炎、皮膚炎、脊椎關節病變、僵直性脊椎炎、修格連氏症候群 (Sjogren's syndrome) 以及移植物對抗宿主疾病。

介白素-12 (IL-12) 為以雙硫鍵連結之雜二元體型 (heterodimeric) 細胞激素 (p70)，其係由兩個經獨立調節之次單元 p35 及 p40 所組成。IL-12 係於細菌、細菌產物如脂多醣 (lipopolysaccharide; LPS) 以及細胞內寄生物刺激期間，由吞噬細胞 (phagocytic cells) 及抗原呈現細胞 (antigen presenting cells) (尤其係巨噬細胞及樹突細胞) 所製造。IL-12 經充分證明之生物功能係誘導干擾素- γ 自 T 細胞及 NK 細胞表現，並分化朝向 Th1 T 淋巴細胞型。由 IL-12 誘導表現之 IFN- γ (干擾素- γ) 為一種強烈且具選擇性的增強子，可促進 IL-12 自單核球及巨噬細胞產生。此作用在以 LPS 或金黃色葡萄球菌 Cowan I 株 (*Staphylococcus aureus* Cowan I, SAC) 刺激前，使用 INF- γ 持續處理至少 8 小時後頗為顯著，而推測，尤其於慢性疾病中，INF- γ 係不間斷地產生，而 IL-12 之產生則由 INF- γ 所增加。推測於誘導 IL-12 產生之感染性或炎症性的刺激後，該強有力之回饋迴路會促使受 IL-12 所誘導之 INF-

γ 進一步提高 IL-12 之產生，而後導致發炎前細胞激素 (pro-inflammatory cytokine) 之過量生產。IL-23 細胞激素係為由 p19 次單元以及該與 IL-12 相同之 p40 次單元所組成的雜二元體。

LPS 會刺激巨噬細胞中之 p50/c-Rel 及 p50/p65 由細胞質轉位至細胞核。此等雜二元體均會結合至 p40 之啟動子的 NF κ B 位置。然而，卻僅 c-Rel 顯現出其在活體外或活體內於大量發炎前細胞激素刺激後，使 LPS 所誘導之訊息通過 Toll 樣受體 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 而導致 p40 產生之重要性。

對本發明而言，於此說明書之第 2 節或其他任何一節中，任何文獻之引用或認同均不應視為特徵，因為此等文獻係為可取得之先前技術。

【發明內容】

本發明提供用於鑑定可選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用之分子的方法，該方法係藉由下述方式進行：相較於未與候選分子接觸或與陰性對照組如磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 接觸之細胞，偵測該經定位至與一種或一種以上候選分子接觸之細胞 (例如，免疫細胞) 之核中的 c-Rel 分子之濃度改變，而不偵測 NF κ B 表現量及 / 或 I κ B 數量之任何改變，(例如，評估但不偵測無顯著改變之 NF κ B 及 / 或 I κ B 表現量)。於一具體實施例中，本發明提供用於鑑定可選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用之分子的方法，係包括下列步驟：(a) 使細胞 (例如，

免疫細胞如自然殺手細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或單核球)與一種或一種以上候選分子接觸；以及(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，若該細胞核中之 c-Rel 量相較於未與候選分子接觸或與陰性對照組如磷酸鹽緩衝液(phosphate buffered saline, PBS)接觸之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel-依賴型之轉錄作用。根據此具體實施例，該細胞可於接觸候選分子的同時再以 IFN- γ 及/或脂多醣(LPS)刺激之。較佳者，根據此具體實施例，該細胞係與候選分子接觸後，接著再以 IFN- γ 及/或脂多醣(LPS)刺激之。於特定具體實施例中，該與候選分子接觸之細胞係巨噬細胞、單核球或樹突細胞。

於另一具體實施例中，本發明提供用於鑑定可選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用之分子的方法，係包括下列指定順序之步驟：(a)接觸重組表現一種或一種以上候選分子之細胞(例如，免疫細胞如自然殺手細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或單核球)；以及(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，若該細胞核中之 c-Rel 數量相較於不表現一種或一種以上候選分子之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel-依賴型之轉錄作用。根據此具體實施例，該細胞可於誘導候選分子表現之前、同時或之後以 IFN- γ 及/或脂多醣(LPS)刺激之。於特定具

體實施例中，該表現候選分子之細胞係巨噬細胞、單核球或樹突細胞。

於此技藝中，任何已知之方法均可用於測量該定位至細胞核之 c-Rel 的濃度。例如，細胞中 c-Rel 之定位可藉由下述方法偵測：將該細胞與抗 c-Rel 之抗體或與該抗體之結合區，以及該抗體之經螢光標定結合對象於有利於免疫專一性結合之條件下接觸。或者，細胞中 c-Rel 之定位可藉由將該細胞與為 c-Rel 之具有螢光標定抗體或與該抗體之結合區在有利於免疫專一性結合之條件下接觸而偵測。細胞中 c-Rel 之定位亦可藉由將自細胞單離出之核蛋白以質譜儀定序而偵測。此外，細胞中 c-Rel 之定位復可藉由測量該 c-Rel-依賴型轉錄作用之量而偵測，例如，測量 p40 轉錄作用，或細胞之 p40 蛋白總濃度，或核之 p40 蛋白總濃度。

於此技藝中，任何已知之方法均可用於測量 NF κ B 之表現量，其包括，但不限於，藉由免疫專一性結合來測量 NF κ B 家族成員 p50、p65 以及 c-Rel 之濃度或測量其編碼 mRNA 之濃度。於特定具體實施例中，當例如使用完整細胞蛋白萃取物進行西方墨點分析法測量時，NF κ B 之表現係與 NF κ B 家族成員 p50、p65 以及 c-Rel 之表現相關。於此技藝中，任何已知之方法均可用於測量 I κ B 之數量，其包括，但不限於，例如使用完整細胞或細胞質蛋白萃取物進行西方墨點分析法測量，以測得細胞中 I κ B 蛋白或其編碼 mRNA 之總量，或例如測量該經處理之細胞內的 I κ B 蛋白

濃度，將之與未處理之細胞比較以測得 I κ B 之降解濃度。

於上下文中之 NF κ B 及/或 I κ B(包括 I κ B α 及 I κ B β)表現或/及數量，該用於本文之術語「顯著改變」係指 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之濃度改變大於 10%，較佳大於 20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或 95%。

任何依賴 c-Rel 轉錄作用之蛋白表現均可藉由改變 c-Rel-依賴型轉錄作用而改變。此等蛋白之實例包括，但不限於，IL-6、IL-10、IL-12、IL-15、IL-23、IFN- γ 、Bcl-xL、Mcl-1、Jagged-1、IRF-4 以及 c-myc。因此，一種或一種以上之此等蛋白的表現可經由根據本發明之方法所鑑定之可選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用之分子而改變。於較佳具體實施例中，IL-12 及/或 IL-23 之表現量係由根據本發明之方法所鑑定之可選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用之分子而改變。

本發明提供用於鑑定可選擇性改變 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子的方法，該方法係藉由下述方式進行：相較於未與候選分子接觸或與陰性對照組如磷酸鹽緩衝液(phosphate buffered saline, PBS)接觸之細胞，偵測該定位至與一種或一種以上候選分子接觸之細胞(例如，免疫細胞)之核中的 c-Rel 分子之濃度改變，而不偵測 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之任何改變，(例如，評估但不偵測無顯著改變之 NF κ B 及/或 I κ B 表現量)。依賴 c-Rel 以產生蛋白之細胞激素之實例包括，但不限於，IL-6、IL-10、IL-12、IL-15、IL-23 及 IFN- γ 。因此，一種或一種以上

之此等細胞激素的表現可藉由該根據本發明之方法所鑑定之可選擇性改變 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子而改變。於較佳具體實施例中，IL-12 及 / 或 IL-23 之表現量係由根據本發明之方法所鑑定之可選擇性改變 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子而改變。

於一具體實施例中，本發明提供用於鑑定細胞中可選擇性改變 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子的方法，其係包括下列指定順序之步驟：(a)使細胞(較佳者，係於 INF- γ 及 / 或 LPS 刺激後或於 INF- γ 及 / 或 LPS 刺激之同時)與一種或一種以上候選分子接觸；以及(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及 / 或 I κ B 數量的情況下，若該細胞核中之 c-Rel 數量相較於未與候選分子接觸或與陰性對照組如 PBS 接觸之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel-依賴型之細胞激素產生。根據此具體實施例，該與候選分子接觸之細胞較佳為巨噬細胞、單核球或樹突細胞。

於另一具體實施例中，本發明提供用於鑑定細胞中可選擇性改變 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子的方法，其係包括下列指定順序之步驟：(a)於細胞中重組表現一種或一種以上之候選分子；以及(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及 / 或 I κ B 數量的情況下，若該細胞核中之 c-Rel 數量相較於不表現一種或一種以上之候選分子的細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel-依賴型之細胞激素產

生。根據此具體實施例，該細胞可於誘導候選分子表現之前、同時或之後以 IFN- γ 及/或脂多醣(LPS)刺激之。於特定具體實施例中，該表現候選分子之細胞係巨噬細胞、單核球或樹突細胞。

於另一具體實施例中，本發明提供用於鑑定細胞中(於 INF- γ 及/或 LPS 刺激後或於 INF- γ 及/或 LPS 刺激之同時)可選擇性改變 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子的方法，其係包括下列指定順序之步驟：(a)將一種或一種以上之候選分子經顯微注射入細胞中；以及(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，若該細胞核中之 c-Rel 數量相較於未以一種或一種以上之候選分子顯微注射或以陰性對照組顯微注射之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel-依賴型之細胞激素產生。根據此具體實施例，該與候選分子接觸之細胞較佳為巨噬細胞、單核球或樹突細胞。

於一具體實施例中，根據本發明之方法所鑑定之可於細胞中選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用及/或 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子，並不會改變一種或一種以上之下列蛋白的表現量及/或活性：PU-1、Jak1、Jak2、STAT1、ERK、PKA、I κ B 及 p38 激酶。於另一具體實施例中，根據本發明之方法所鑑定之可於細胞中選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用及/或 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子，係降低細胞核中 ICSBP 之量。於特定具體實施例中，根據

本發明之方法所鑑定之可於細胞中選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用及/或 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子，係降低細胞核中干擾素共有序列結合蛋白(interferon consensus sequence binding protein, ICSBP)之量至少 10%，較佳者，至少 15%、至少 18%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%或至少 45%。

於另一具體實施例中，根據本發明之方法所鑑定之可於細胞中選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用及/或 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子，係會降低細胞核中 p50 之量。於另一具體實施例中，根據本發明之方法所鑑定之可於細胞中選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用及/或 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子，係會增加細胞核中 p65 之量。於特定具體實施例中，根據本發明之方法所鑑定之可於細胞中選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用及/或 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子，係增加細胞核中 p65 之量至少 35%，較佳為至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 59%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%或至少 85%。於另一具體實施例中，根據本發明之方法所鑑定之可於細胞中選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用及/或 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子，係降低 p35 之轉錄作用。又於另一具體實施例中，根據本發明之方法所鑑定之可於細胞中選擇性改變 c-Rel-依賴型轉錄作用及/或 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子，係導致下列兩種或兩種以上之影響：降低細胞核中 ICSBP 之量、降低細胞核中

p50 之量、增加細胞核中 p65 之量以及降低 p35 之轉錄作用。

本發明亦提供鑑定可於細胞中媒介 c-Rel-依賴型轉錄作用之選擇性抑制作用的藥物標的 (drug target) 之方法，其係包括下列指定順序之步驟：(a) 將一種或一種以上可降低細胞核中 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 表現量及 / 或 I κ B 數量之藥劑進行標定 (labeling)；(b) 使細胞與該一種或一種以上經標定之藥劑於可在該一種或一種以上之經標定藥劑及該藥物標的之間形成複合物之條件下接觸；(c) 單離該複合物；以及 (d) 由該複合物鑑定該藥物標的。於另一具體實施例中，本發明提供鑑定可於細胞中選擇性抑制 c-Rel-依賴型細胞激素產生之藥物標的之方法，其係包括下列指定順序之步驟：(a) 將一種或一種以上可降低細胞核中 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 表現量及 / 或 I κ B 數量之藥劑進行標定；(b) 使細胞與該一種或一種以上經標定之藥劑於可在該一種或一種以上之經標定藥劑及該藥物標的之間形成複合物之條件下接觸；(c) 單離該複合物；以及 (d) 由該複合物鑑定該藥物標的。接著可再使用該鑑定出之藥物標的來鑑定可改變細胞激素表現量 (尤其係 c-Rel-依賴型細胞激素量) 之化合物。

本發明亦有關用於鑑定可經由 c-Rel 細胞內定位之改變而改變其表現量或活性之分子的方法，亦即，包括將細胞與可改變 c-Rel 細胞內定位但卻不改變 NF κ B 表現量或 I κ B 數量之分子接觸，以改變 c-Rel 之細胞內定位，藉以

增加或降低細胞核中之 c-Rel，以及相較於未與該分子接觸或與陰性對照組如 PBS 接觸之細胞，鑑定與該分子接觸之細胞中其表現量或活性經改變之分子。

於本發明之一具體實施例中，係提供調節 c-Rel 活性之方法，其包括將表現 c-Rel 之細胞與可改變 c-Rel 細胞內定位之分子(尤其係降低細胞核之 c-Rel，但不顯著改變細胞中 NF κ B 表現量或 I κ B 數量者)接觸。於此具體實施例之一實施態樣中，該細胞中 c-Rel 蛋白之總量並未改變。於另一實施態樣中，該細胞中 c-Rel 蛋白之總量則已改變。於本發明之另一具體實施例中，係提供調節細胞中 c-Rel-依賴型細胞激素產生但不顯著改變細胞中 NF κ B 表現量或 I κ B 數量之方法，其包括將表現 c-Rel 之細胞與可改變 c-Rel 細胞內定位但不顯著改變細胞中 NF κ B 表現量或 I κ B 數量之分子接觸。於上述具體實施例之實施態樣中，該分子係藉由上述一種或一種以上之篩選分析法鑑定。於特定具體實施例中，該分子係藉由下述篩選方法鑑定，該方法包括：將細胞與一種或一種以上之候選分子接觸；以及偵測 c-Rel 分子於細胞中之定位，以便鑑定出彼等可造成細胞核中之 c-Rel 數量減少(其係相對於未與彼等分子接觸或與陰性對照組如 PBS 接觸之細胞中的 c-Rel 數量)但卻不會顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之分子。

於特定具體實施例中，本發明提供用以抑制細胞中 c-Rel-依賴型細胞激素產生但不顯著改變 NF κ B 表現量及

/或 I κ B 數量之方法，係包括將細胞與可降低細胞核中 c-Rel 數量但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之分子(例如，於上述篩選分析法所鑑定之分子)接觸。於該具體實施例之一實施態樣中，該方法係包括將細胞與可降低細胞核中 c-Rel 數量但不顯著改變細胞中 NF κ B 表現量之分子接觸，其中該 NF κ B 表現量係藉由例如細胞萃取物中 p50、p65 以及 c-Rel 之數量所估計。於另一實施態樣中，該方法係包括將細胞與可降低細胞核中 c-Rel 數量但不顯著改變細胞中 I κ B 數量之分子接觸，其中該 I κ B 數量係藉由例如細胞中 I κ B 之數量所估計。

本發明亦提供用於診斷或篩選存在下述疾病或不適、或具有發展該疾病或不適之傾向的方法，該疾病或不適係以患者體內具有異常之 c-Rel 細胞內定位但存在正常 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量為特徵，該特徵係藉由測量取自患者之樣本中 c-Rel 定位至細胞核的量而定，其中，相對於不具有該疾病或不適、或者不具有發展該疾病或不適之傾向的類似樣本，該 c-Rel 之細胞核定位量的減少或增加係顯示存在該疾病或不適、或者具有發展該疾病或不適之傾向。

本發明亦提供用於有需要之患者治療與 c-Rel-依賴型細胞激素產生有關之疾病或不適的方法，其係包括：投與有效量之分子至患者，以使表現 c-Rel 依賴型細胞激素之細胞的細胞核中之 c-Rel 量降低，但不顯著改變細胞中 NF κ B 之表現量及/或 I κ B 之數量。此等分子之非限制性

實例係包括彼等利用本文所述之分析法所鑑定之分子。較佳者，該患者係人。於此具體實施例之一實施態樣中，該疾病或不適係與 IL-12 產生有關之疾病。於另一具體實施例中，該疾病或不適係自體免疫疾病。

本發明亦提供於有需要患者增強用以抑制第一細胞激素產生之第一藥劑的活性之方法，其係包括：將第一藥劑與第二藥劑共同投與至患者，而該第二藥劑係於表現第一及/或第二細胞激素之細胞中抑制第二細胞激素產生但卻不顯著改變 NF κ B 之表現量及/或 I κ B 之數量者，其中，該第二細胞激素係 c-Rel 依賴型細胞激素。於此具體實施例之一實施態樣中，該第一及第二細胞激素係相同或相異者。較佳者，該患者係人。於某些實施態樣中，該第一藥劑係用於治療自體免疫/炎症性疾病，並不改變 c-Rel 之活性或細胞內定位。

本發明亦提供用於評估該降低細胞核中 c-Rel 量但卻不顯著改變細胞中 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之藥劑的生物效應之方法，該方法係包括使細胞與該藥劑接觸並觀察細胞中之任何表現型效應(phenotypic effects)。於另一具體實施例中，本發明係有關用於評估於患者降低細胞核中 c-Rel 量但不顯著改變細胞中 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之藥劑的生物效應之方法，該方法係包括將該藥劑投與至患者並觀察患者之任何表現型效應。該患者係哺乳動物，例如小鼠、大鼠、猴子、狗、豬、人等等。

本發明提供包含可降低細胞核中 c-Rel 量但卻不顯著

改變細胞中 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之分子的組成物。本發明復提供治療或預防與異常 c-Rel-依賴型細胞激素產生有關之疾病或不適(例如, 自體免疫疾病)的方法, 該方法係包括投與至需要此組合物之患者。於某些具體實施例中, 該分子不具有如下列文獻中所述之化合物: 美國專利案 No. 6,384,032; 於 2002 年 5 月 7 日所提出之美國專利申請案 No. 09/594,362; 於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/006,624(公開號 No. 20020082259); 於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/000,742(公開號 No. 20030139403); 於 2002 年 7 月 10 日所提出之美國專利申請案 No. 10/192,347(公開號 No. 20030114446); 於 2002 年 11 月 26 日所提出之美國專利申請案 No. 10/305,039; 國際專利 No. WO 00/78757; 國際專利 No. WO 03/04516; 於 2003 年 10 月 14 日所提出之國際專利申請案 PCT/US03/32546; 於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,791; 於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,787; 於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,788; Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號 (50586)61250, 名稱為「稠合雜環化合物」; Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號 (50586)61252, 名稱為「雜芳基腺化合物」; Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號

(50586)61253，名稱為「吡啶化合物」，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。

於某些具體實施例中，該分子不具有如下列文獻中所述之化合物：美國專利案 No. 6,384,032；於 2002 年 5 月 7 日所提出之美國專利申請案 No. 09/594,362；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/006,624(公開號 No. 20020082259)；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/000,742(公開號 No. 20030139403)；於 2002 年 7 月 10 日所提出之美國專利申請案 No. 10/192,347(公開號 No. 20030114446)；國際專利 No. WO 00/78757；國際專利 No. WO 03/04516，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。

於某些具體實施例中，該分子不具有如下列文獻中所述之化合物：美國專利案 No. 6,680,315；美國專利案 No. 6,693,097；美國專利案 No. 6,660,733；美國專利申請案 No. 10/655,672；美國專利申請案 No. 10/656,671；於 2002 年 11 月 26 日所提出之美國專利申請案 No. 10/305,039；於 2003 年 9 月 5 日所提出之美國專利申請案 No. 10/656,360；於 2003 年 10 月 14 日所提出之國際專利申請案 PCT/US03/32546；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,791；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,787；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,788；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申

請案代理人案號(50586)61250，名稱為「稠合雜環化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61252，名稱為「雜芳基脲化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61253，名稱為「吡啶化合物」，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。

於某些具體實施例中，該分子不具有如下列文獻中所述之化合物：美國專利案 No. 6,680,315；美國專利案 No. 6,384,032；於 2003 年 9 月 5 日所提出之美國專利申請案 No. 10/656,360；於 2002 年 5 月 7 日所提出之美國專利申請案 No. 09/594,362；美國專利申請案 No. 10/655,672；美國專利申請案 No. 10/656,671；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/006,624(公開號 No. 20020082259)；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/000,742(公開號 No. 20030139403)；於 2002 年 7 月 10 日所提出之美國專利申請案 No. 10/192,347(公開號 No. 20030114446)；國際專利 No. WO 00/78757；國際專利 No. WO 03/04516；於 2003 年 10 月 14 日所提出之國際專利申請案 PCT/US03/32546，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。

於某些具體實施例中，該分子並不具有如下列文獻中所述之化合物：於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,791；於 2003 年 11 月 10 日所提出

之美國專利臨時申請案 No. 60/518,787；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,788；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61250，名稱為「稠合雜環化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61252，名稱為「雜芳基脲化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61253，名稱為「吡啶化合物」，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。

於其他具體實施例中，該分子具有如下列文獻中所述之結構：美國專利案 No. 6,384,032；於 2002 年 5 月 7 日所提出之美國專利申請案 No. 09/594,362；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/006,624(公開號 No. 20020082259)；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/000,742(公開號 No. 20030139403)；於 2002 年 7 月 10 日所提出之美國專利申請案 No. 10/192,347(公開號 No. 20030114446)；於 2002 年 11 月 26 日所提出之美國專利申請案 No. 10/305,039；國際專利 No. WO 00/78757；國際專利 No. WO 03/04516；於 2003 年 10 月 14 日所提出之國際專利申請案 PCT/US03/32546；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,791；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,787；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美

國專利臨時申請案 No. 60/518,788；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號 (50586)61250，名稱為「稠合雜環化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號 (50586)61252，名稱為「雜芳基脲化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號 (50586)61253，名稱為「吡啶化合物」，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。於一實施態樣中，該分子係藉由任何於本文中所揭示之篩選方法所鑑定。於另一實施態樣中，該分子係經由此項技藝中習知之技術所純化。

於其他具體實施例中，該分子具有如下列文獻中所述之結構：美國專利案 No. 6,384,032；於 2002 年 5 月 7 日所提出之美國專利申請案 No. 09/594,362；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/006,624(公開號 No. 20020082259)；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/000,742(公開號 No. 20030139403)；於 2002 年 7 月 10 日所提出之美國專利申請案 No. 10/192,347(公開號 No. 20030114446)；國際專利 No. WO 00/78757；國際專利 No. WO 03/04516，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。於一實施態樣中，該分子係藉由任何於本文中所揭示之篩選方法所鑑定。於另一實施態樣中，該分子係經由此項技藝中習知之技術所純化。

於其他具體實施例中，該分子具有如下列文獻中所述之結構：美國專利案 No. 6,680,315；美國專利案 No.

6,693,097；美國專利案 No. 6,660,733；美國專利申請案 No. 10/655,672；美國專利申請案 No. 10/656,671；於 2002 年 11 月 26 日所提出之美國專利申請案 No. 10/305,039；於 2003 年 9 月 5 日所提出之美國專利申請案 No. 10/656,360；於 2003 年 10 月 14 日所提出之國際專利申請案 PCT/US03/32546；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,791；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,787；於 2003 年 9 月 5 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,788；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61250，名稱為「稠合雜環化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61252，名稱為「雜芳基脲化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61253，名稱為「吡啶化合物」，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。於一實施態樣中，該分子係藉由任何於本文中所揭示之篩選方法所鑑定。於另一實施態樣中，該分子係經由此項技藝中習知之技術所純化。

於其他具體實施例中，該分子具有如下列文獻中所述之結構：美國專利案 No. 6,680,315；美國專利案 No. 6,384,032；於 2003 年 9 月 5 日所提出之美國專利申請案 No. 10/656,360；於 2002 年 5 月 7 日所提出之美國專利申請案 No. 09/594,362；美國專利申請案 No. 10/655,672；

美國專利申請案 No. 10/656,671；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/006,624(公開號 No. 20020082259)；於 2001 年 11 月 30 日所提出之美國專利申請案 No. 10/000,742(公開號 No. 20030139403)；於 2002 年 7 月 10 日所提出之美國專利申請案 No. 10/192,347(公開號 No. 20030114446)；國際專利 No. WO 00/78757；國際專利 No. WO 03/04516；於 2003 年 10 月 14 日所提出之國際專利申請案 PCT/US03/32546，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。於一實施態樣中，該分子係藉由任何於本文中所揭示之篩選方法所鑑定。於另一實施態樣中，該分子係經由此項技藝中習知之技術所純化。

於其他具體實施例中，該分子具有如下列文獻中所述之結構：於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,791；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,787；於 2003 年 11 月 10 日所提出之美國專利臨時申請案 No. 60/518,788；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61250，名稱為「稠合雜環化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61252，名稱為「雜芳基脲化合物」；Mitsunori Ono 等人於 2004 年 11 月 10 日所提出之 PCT 申請案代理人案號(50586)61253，名稱為「吡啶化合物」，其中，各案之全部內容在此均合併作為參考文獻。於一實施態樣中，該分子係藉由任何於本文中所揭示之篩選方法所鑑定。於另

一實施態樣中，該分子係經由此項技藝中習知之技術所純化。

其他具體實施例

於其他具體實施例中，本發明係有關抑制細胞中 c-Rel-依賴型細胞激素產生但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變 I κ B 之降解量的方法，該方法係包括將該降低細胞核中 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變 I κ B 之降解量的分子與細胞接觸。於特定具體實施例中，該 c-Rel-依賴型細胞激素係 IL-12。於此具體實施例之某些實施態樣中，係會使 IL-12 之轉錄作用受到抑制，或者使細胞核中 p65 之量增加或使 c-Rel 轉位(translocation)至細胞核之作用受到抑制，或者不顯著改變 c-Rel 之表現。於其他實施態樣中，係使 IL-12/IL-23 p40 之表現受到抑制，或者使 IL-12/23 次單元 p40 啟動子之 NF κ B 成分受到抑制，或者使 IL-12/IL-23 次單元 p40 啟動子之 Est-2 成分的活化作用受到抑制。於其他實施態樣中，IL-12 次單元 p35 之表現受到抑制，及/或 IL-12 次單元 p35 啟動子之 NF κ B 成分受到抑制。又於其他實施態樣中，亦使細胞核中 ICSBP 之量降低，或者使 ICSBP 之表現受到抑制。於某些實施態樣中，該細胞係選自巨噬細胞、單核球及樹突細胞所構成之群組。

又於另一具體實施例中，該 c-Rel-依賴型細胞激素係 IL-23。於此具體實施例之某些實施態樣中，係使細胞核中 p65 之量增加，或者使 c-Rel 轉位至細胞核之作用受到抑

制，或者不顯著改變 c-Rel 之表現。又於其他實施態樣中，係使 IL-12/IL-23 次單元 p40 之表現受到抑制，或者使 IL-12/23 次單元 p40 啟動子之 NF κ B 成分受到抑制，或者使 IL-12/23 次單元 p40 啟動子之 Est-2 成分的活化作用受到抑制，或者使細胞核中 ICSBP 之量亦降低。又於其他實施態樣中，係使 ICSBP 之表現受到抑制。於某些實施態樣中，該細胞係選自巨噬細胞、單核球及樹突細胞所構成之群組。

於其他具體實施例中，本發明係有關鑑定可選擇性抑制 c-Rel 依賴型細胞激素產生之藥劑(亦稱候選分子或化合物)的方法，該方法係包括將試驗藥劑與細胞接觸之；偵測該細胞核中之 c-Rel 量；以及選擇彼等降低細胞核之 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變 I κ B 之降解量的藥劑。於此具體實施例之某些實施態樣中，該細胞核之 c-Rel 量係使用螢光酵素分析法(luciferase assay)之步驟偵測。該 c-Rel 依賴型細胞激素可為 IL-12 或 IL-23。

又於另一具體實施例中，本發明係提供標的探測(target discovery)之方法。於一實施態樣中，係提供鑑定可選擇性抑制 c-Rel 依賴型細胞激素產生之藥劑的方法，該方法包括將可降低細胞核中 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變 I κ B 之降解量的藥劑進行標定；使細胞與經標定之藥劑在可於該經標定之藥劑與該藥物標的之間形成複合物之條件下接觸；單離該

複合物；以及由該複合物鑑定藥物標的。於此具體實施例中，該 c-Rel 依賴型細胞激素係 IL-12 或 IL-23。

本發明亦有關於所需患者治療與 c-Rel-依賴型細胞激素產生相關之不適的方法，該方法係包括對病患投與有效量之可降低細胞(該細胞會產生細胞激素)核中 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不會顯著改變 I κ B 之降解量的藥劑。於一實施態樣中，該不適係選自下列所構成群組之自體免疫疾病：多發性硬化症、重症肌無力、自體免疫性神經病變、基蘭巴爾症候群、自體免疫性葡萄膜炎、自體免疫溶血性貧血、惡性貧血、自體免疫性血小板減少症、顛動脈炎、抗磷脂症候群、血管炎、韋格納氏肉芽腫、貝歇特氏病、乾癬、疱疹樣皮膚炎、天疱瘡、白斑、克隆氏症、潰瘍性結腸炎、原發性膽汁性肝硬化、自體免疫性肝炎、第 1 型糖尿病、免疫媒介性糖尿病、葛雷夫氏症、橋本氏甲狀腺炎、自體免疫性卵巢炎及睪丸炎、腎上腺之自體免疫性疾病、類風濕性關節炎、全身紅斑性狼瘡、硬皮症、多發性肌炎、皮膚炎、脊椎關節病變、僵直性脊椎炎、修格連氏症候群、移植物對抗宿主疾病。

於另一具體實施例中，本發明亦有關於治療患者體內與 c-Rel 依賴型細胞激素產生相關之不適的方法，該患者係經鑑定為需要此治療者。該患者可經由醫療專業人士鑑定或可自行診斷為需要此治療者。該方法係包括對患者投與有效量之可降低細胞(該細胞會產生細胞激素)核中 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變

I κ B 之降解量的藥劑。於一實施態樣中，該不適係選自下列所構成群組之自體免疫疾病：多發性硬化症、重症肌無力、自體免疫性神經病變、基蘭巴爾症候群、自體免疫性葡萄膜炎、自體免疫溶血性貧血、惡性貧血、自體免疫性血小板減少症、顛動脈炎、抗磷脂症候群、血管炎、韋格納氏肉芽腫、貝賽特氏病、乾癬、疱疹樣皮膚炎、天疱瘡、白斑、克隆氏症、潰瘍性結腸炎、原發性膽汁性肝硬化、自體免疫性肝炎、第 1 型糖尿病、免疫媒介性糖尿病、葛雷夫氏症、橋本氏甲狀腺炎、自體免疫性卵巢炎及睪丸炎、腎上腺之自體免疫性疾病、類風濕性關節炎、全身紅斑性狼瘡、硬皮症、多發性肌炎、皮炎、脊椎關節病變、僵直性脊椎炎、修格連氏症候群、移植物對抗宿主疾病。

於另一具體實施例中，根據本發明之篩選方法所鑑定之化合物係依據使用說明書標定之。該說明書可包括投與至需要此治療之患者的用法說明、使用劑量、劑型以及持續時間。患者可為哺乳動物，如人、靈長類動物、狗、馬、豬、牛或貓。

又於另一具體實施例中，本發明係有關於需要此治療之患者增強用以抑制第一細胞激素產生之第一藥劑的活性之方法，該方法係包括：將第一藥劑與會抑制第二細胞激素產生但卻不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變 I κ B 之降解量的第二藥劑共同投與至患者，其中，第二細胞激素之產生為 c-Rel-依賴型。於某些實施態樣中，該第一細胞激素與該第二細胞激素為相同者或該第一

細胞激素與該第二細胞激素為相異者。於其他實施態樣中，該第二細胞激素為 IL-12 或 IL-23。

又於另一具體實施例中，本發明係有關評估該降低細胞核中之 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變 I κ B 之降解量的藥劑之生物效應的方法，該方法係包括使細胞與該藥劑接觸並觀察細胞中之任何表現型效應。又於另一具體實施例中，本發明係有關評估該於患者會降低細胞核之 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變 I κ B 之降解量的藥劑之生物效應的方法，該方法係包括使細胞與該藥劑接觸並觀察患者之任何表現型效應。

又於另一具體實施例中，本發明係有關降低細胞核中之 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 轉錄因數之表現量以及不顯著改變 I κ B 之降解量的化合物，惟該化合物不具有於美國專利案 No. 6,384,032；PCT 案 WO 00/78757 中所述之結構。

【實施方式】

本發明在某種程度上係以發明人之發現為基礎，彼等發明人發現可在不顯著改變 NF κ B 表現量或 I κ B 數量之情況下，增加或減少 c-Rel 之活性，尤其係細胞核內之 c-Rel 量。

本發明係有關用於鑑定可於細胞中選擇性改變 c-Rel 依賴型轉錄作用之分子的方法，其係包括下列指定順序之步驟：(a)使細胞與一種或一種以上候選分子接觸；以及(b)

偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，若該細胞核中之 c-Rel 數量相較於未與一種或一種以上之候選分子接觸之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel-依賴型轉錄作用。於另一具體實施例中，本發明係有關用於鑑定細胞中可選擇性改變 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子的方法，其係包括下列指定順序之步驟：(a)使細胞與一種或一種以上候選分子接觸；以及(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，若該細胞核中之 c-Rel 數量相較於未與一種或一種以上之候選分子接觸之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel-依賴型之細胞激素產生。於另一具體實施例中，本發明係有關用於鑑定細胞中可選擇性改變 c-Rel-依賴型細胞激素產生之分子的方法，其係包括下列指定順序之步驟：(a)於細胞中重組表現一種或一種以上之候選分子；以及(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，若該細胞核中之 c-Rel 數量相較於未與一種或一種以上之候選分子接觸之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel-依賴型之細胞激素產生。於特定具體實施例中，該 c-Rel 依賴型細胞激素為 IL-12 或 IL-23。

本發明亦有關於所需患者增強用以抑制第一細胞激素產生之第一藥劑的活性之方法，該方法係包括：將第一藥

劑與抑制細胞中(該細胞會表現第一及/或第二細胞激素)第二細胞激素產生但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的第二藥劑共同投與至患者，其中，該第二細胞激素為 c-Rel-依賴型細胞激素。於此具體實施例之實施態樣中，該第一與第二細胞激素為相同或相異者。較佳者，該患者為人。

c-Rel/ κ B 細胞內定位之偵測

此項技藝中任何用以偵測 c-Rel 細胞內定位(亦即，定位至細胞核或細胞質)之已知方法均可用於本發明中。例如，但不限於，此類偵測方法之一係將細胞與對 c-Rel 具有專一性之抗體接觸，接著再偵測該抗體是否定位至細胞核。偵測 c-Rel 細胞內定位之特定方法係將經標定之抗-c-Rel 抗體(例如，以螢光染料標定之)及經標定之抗-DNA 抗體(例如，使用不同於抗-c-Rel 抗體之螢光染料)與所有細胞接觸，然後再以例如雷射掃描顯微鏡技術偵測細胞內含有經共同定位(co-localized)之兩標定物的細胞。

因此，本發明所包含之作為 c-Rel 原位(in situ)偵測的偵測方法係包括免疫螢光法或免疫電子顯微鏡術。原位偵測可藉由下述方式完成：將內生性表現或重組表現 c-Rel 分子之細胞與可結合 c-Rel 之經標定分子接觸，再偵測任何經定位至細胞核所發生的結合。或者，可組合使用未標定之分子與該分子之經標定結合對象。使用此分析法，不僅可測定該 c-Rel 分子之存在，亦可測定其細胞內定位(亦即，位於細胞核內)。或者，可使 c-Rel 與可偵測

部分(例如，基因標記(flag tag))一起表現。而後，再使用對該標記具有專一性之抗體偵測該重組之 c-Rel 分子。

典型之 c-Rel 免疫分析法係包括：於對 c-Rel 具有專一性的可偵測之經標定分子(例如，抗 c-Rel 之抗體)存在下培養樣本，該樣本為活體內或活體外培養細胞，接著再以此項技藝中任何已知之某些技術偵測該結合之分子。

於特定具體實施例中，可將生物樣本例如新鮮取得之細胞，與可固定細胞之固態支撐物或承載物如硝化纖維素、玻璃、聚苯乙烯或其他固體支撐物接觸或使樣本細胞固定於其上。接著可使用適當緩衝劑洗滌該支撐物，再以可偵測之經標定分子處理之。然後再使用該緩衝劑洗滌該固態支撐物第二次，以移除未結合之分子。接著可再經由習知方法偵測該結合於固體支撐物上之標定物量。

所使用抗 c-Rel 分子之抗體的結合活性可根據習知方法測定之。彼等於此技術領域中具有通常知識者可藉由使用例行實驗以決定各項測定之操作與最適分析條件。

抗 c-Rel 抗體可進行可偵測標定的方法之一係使該抗體與酵素連結，再使用於酵素免疫分析法(enzyme immunoassay, EIA)中(Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)", 1987, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD); Voller *et al.*, 1978, J. Clin. Pathol. 31: 507-520; Butler, 1981, Meth. Enzymol. 73: 482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme

Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL, ; Ishikawa *et al.*, (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo))。該結合於與 c-Rel 分子結合之抗體的酵素將與適當受質(較佳為呈色受質)反應之，於此方法係產生可經由例如分光光度法、螢光分析法或經由光學方法偵測之化學部分。

亦可使用螢光或化學冷光或生物發光化合物，或使用放射性部分或其他於此技藝中已知之標定物對抗體進行標定。

偵測及/或測量 c-Rel 之細胞核定位的另一方法係經由於此技藝中已知之任何方法單離核蛋白，並偵測於該核蛋白集合物(pool)中是否存在 c-Rel，較佳者係藉由質譜分析法鑑定於該核蛋白集合物中之蛋白。核蛋白之單離可經由此技藝中任何已知之方法完成。於核蛋白單離後，c-Rel 之偵測可藉由下述方法完成：例如以抗-c-Rel 抗體進行 c-Rel 免疫沈澱或使之與免疫親和性管柱上之抗 c-Rel 抗體結合或將之固定於平板上或槽中或經由西方墨點法顯現蛋白。於本發明之另一具體實施例中，c-Rel 定位至細胞核之作用可經由下述方法偵測及/或測量：於 SDS-PAGE 膠體上單離並離析核蛋白，自該膠體沖提所離析之蛋白，再將該沖提之蛋白進行質譜分析法以測定胺基酸序列。此質譜分析法可經由該項技藝中已知之質譜分析的任何適當方法進行之，例如於 Neubauer *et al.*, 1998, Nature Genetics 20:46-50; Neubauer *et al.*, 1997, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 94:385-390; 以及 Wilm et al., 1996, Nature 379:466-469 中所述之方法。僅作為例示使用而不用以限制者，該沖提之胜肽係溶於 5% 甲醇/5% 甲酸溶液中，並使用如 Wilm and Mann, 1996, Anal. Chem. 68:1-8 中所述之毛細管柱進行去鹽。接著將該胜肽以 50% 甲醇/5% 甲酸溶液(0.5 至 2 微升)經單一步驟直接稀釋於奈電噴灑離子源之噴灑針中。取得該胜肽之質譜。然後再於第一支四極棒(first quadrupole)中依次選擇胜肽。該質譜儀之第一部份係作為質量過濾器使用，以允許一種 m/z 值之胜肽離子種類於同一時間穿透。其後再於碰撞室中以氬氣進行碰撞誘導解離而使各胜肽分別斷裂成碎片。該所得之胜肽碎片係於第三支四極管中分離再偵測之。對於胰蛋白酶解性胜肽(tryptic peptides)而言，此方法通常會導致包含該羧基端之「巢狀」胜肽碎片。當兩鄰近片段間之質量差異與相對應胺基酸之殘基質量相符時，則可測定該胜肽自其羧基端至胺基端的部分序列。

細胞中 c-Rel 之定位可於活體外(例如，於細胞培養中單離)或活體內偵測及/或測量。該於細胞中偵測 c-Rel 細胞內定位之細胞可為任何細胞，例如會內生性地或重組地表現 c-Rel 或其片段或其同源基因之細胞。該細胞可為脊椎動物、昆蟲(例如，果蠅)、線蟲(*C. elegans*)、哺乳動物、牛、鼠、大鼠、鳥、魚、靈長類動物、人等等之細胞。該表現之 c-Rel 可為脊椎動物、昆蟲、線蟲(*C. elegans*)、哺乳動物、牛、鼠、大鼠、鳥、魚、靈長類動物、人等等

之 c-Rel。該細胞可為原生組織(primary tissue)之細胞、細胞株、或包含及表現 c-Rel 轉殖基因之動物細胞。例如，該基因轉殖動物可為果蠅(例如，黃果蠅(melanogaster))或線蟲(*C. elegans*)。於較佳具體實施例中，該轉殖基因係編碼人類 c-Rel。基因轉殖動物可由此項技藝中習知之標準方法產生。

於本發明之特定具體實施例中，係使用包含該 c-Rel 結合區(binding domain)(係針對 c-Rel)之抗體及片段以偵測上述方法之特定具體實施例中的 c-Rel。因此，c-Rel 蛋白、或其片段或相似物或衍生物，尤其係人類 c-Rel 蛋白或其片段，均可使用作為免疫原以產生抗-c-Rel 蛋白之抗體。此等抗體可為多株抗體、單株抗體、嵌合抗體、單鏈抗體、Fab(抗原結合)片段或來自 Fab 表現庫者。此類抗體之製造方法為該項技藝中所習知，且部分方法將於下文敘述之。

該對 c-Rel 具專一性之抗體可用於此技藝中已知者以及彼等於上文中討論之與本發明 c-Rel 蛋白的定位及/或定量相關的方法中，例如使此等蛋白成像、於適當生理樣本中測量其濃度、用於診斷方法中等等。此亦適用於 c-Rel 蛋白之衍生物、同源物或相似物。

NF κ B 之表現量或 I κ B 之數量亦可使用此技藝中已知之任何方法偵測，包括使用對 NF κ B 家族成員或其任何次單元(例如，p50、p65 或 c-Rel)或對 I κ B 具有專一性之抗體。例如使用對 I κ B 具專一性之抗體，例如經由教示於下

文實施例乙節中所例示之方法，則可測定 I κ B 之數量。NF κ B 之表現量可經由測量 p50、p65 或 c-Rel 的量而測定。

其他用於偵測 c-Rel 是否位於細胞核內之方法可包括測量蛋白或其編碼 mRNA 分子的存在，該測量係依 c-Rel 之轉錄活性以及其於表現量是否增加(細胞核中增加之 c-Rel)或減少(細胞核中減少之 c-Rel)而定。

抗體生產

此項技藝中已知之各種製程均可用於生產抗 c-Rel、NF κ B 家族成員或其任何次單元、或 I κ B 或該蛋白之片段、衍生物、同源物或相似物之抗體。本發明之抗體包括，但不限於，合成抗體、單株抗體、重組製造之抗體、胞內抗體(intrabodies)、多專一性抗體(包括雙專一性抗體)、人類抗體、擬人化抗體、嵌合抗體(chimeric antibody)、合成抗體、單鏈 Fvs (scFv)(包括雙專一性 scFvs)、單鏈抗體 Fab 片段、F(ab')片段、經雙硫鍵連結之 Fvs (sdFv) 及抗個體基因型(anti-Id, anti-idiotypic)抗體，以及上述任一者之抗原決定基(epitope)結合片段。尤其，本發明之抗體包括免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白分子之免疫活性蛋白，亦即該分子包含可免疫專一性地結合於抗原之抗原結合位(例如，抗體之一個或一個以上的互補決定區(CDRs))。

為生產抗體，可藉由注射例如天然 c-Rel 蛋白或其合成變化形式或其衍生物而使各種宿主動物免疫。此等宿主動物包括，但不限於，兔子、小鼠、大鼠等等。依據宿主

之種類可使用各種佐劑以增加免疫反應，該佐劑包括，但不限於，弗氏(Freund's)(完全與不完全)佐劑、礦物凝膠如氫氧化鋁、介面活性物質如溶血卵磷脂、共聚物多元醇(pluronic polyols)、聚陰離子(polyanions)、胜肽、油乳劑、二硝基酚以及潛在有益之人類佐劑如卡介苗(bacilli Calmette-Guerin, BCG)及短小棒狀桿菌(*Corynebacterium parvum*)。雖然下列事物係尤指於 c-Rel，但本文所述之任何方法亦同樣適用於 c-Rel、NF κ B 家族成員或其次單元、或 I κ B。

為了製備針對 c-Rel 或其衍生物、片段、同源物或相似物之單株抗體，可使用任何提供於經由培養持續性細胞株以製備單株抗體之技術。此等技術包括，但不受限於，起初由 Kohler 與 Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497) 發展之融合瘤技術、trioma 技術(Gustafsson *et al.*, 1991, *Hum. Antibodies Hybridomas* 2: 26-32)、人類 B 細胞融合瘤技術(Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4: 72)以及生產人類單株抗體之 EBV 融合瘤技術(Cole *et al.*, 1985, In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。於本發明之其他具體實施例中，可利用國際專利申請案 PCT/US90/02545 所述之新近技術於無菌(germ-free)動物中生產單株抗體。

根據本發明，可使用人類抗體且該人類抗體可經由使用人類融合瘤(Cote *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030)或經由於活體外將 EBV 病毒轉形至人

類 B 細胞 (Cote et al., 1985, In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96) 而獲得。事實上，根據本發明，可使用經下述方式處理發展出之「嵌合抗體」生產技術 (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454): 將該來自對 c-Rel 具有專一性之小鼠抗體分子的基因連同該來自具適當生物活性之人類抗體分子的基因進行剪接；此類抗體係包含於本發明之範疇中。

根據本發明，經敘述用於生產單鏈抗體之技術 (美國專利第 4,946,778 號案) 可適用於生產 c-Rel-專一性抗體。本發明之其他具體實施例係利用該經敘述用於構築 Fab 表現庫之技術 (Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281) 以快速且輕易地鑑定對 c-Rel 蛋白、其衍生物或相似物具有預期專一性之單株 Fab 片段。非人類抗體可藉由已知技術「擬人化」(例如，美國專利第 5,225,539 號案)。

包含 c-Rel 之個體基因型的抗體片段可經由該項技藝中已知之技術產生。例如，此等片段包括，但不限於，可經由抗體分子之胃蛋白酶分解作用而產生之 F(ab')₂ 片段；可經由還原 F(ab')₂ 片段之雙硫鍵橋 (disulfide bridge) 而產生之 Fab' 片段；經由使用木瓜酵素及還原劑處理抗體分子而產生之 Fab 片段；以及 Fv 片段。合成抗體，例如以化學合成方式產生之抗體，係使用於本發明中。

於抗體之生產中，可使用該項技藝中已知之技術篩選

欲得之抗體，例如 ELISA(酵素連結免疫吸附分析法)。為挑選對於 c-Rel 或其衍生物、同源物或相似物之特定功能區(domain)具有專一性之抗體，可分析所產生包含此功能區且結合於 c-Rel 蛋白或其衍生物、同源物或相似物之片段的融合瘤產物。

重組表現

用於本發明篩選方法之 c-Rel 及其衍生物或片段或同源物的重組生產方法為該項技藝中具有通常知識者所熟知。編碼 c-Rel、或其衍生物、片段以及同源物之核酸為該項技藝中已知。第 1 圖係提供已知之編碼該例示之人類 c-Rel 分子的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)。編碼 c-Rel 之核酸可由該項技藝中已知之任何方法獲得，例如使用可雜交至各序列之 3'及 5'端的合成引子進行 PCR 放大技術，及/或使用對於各序列具專一性之寡聚核苷酸自 cDNA 或染色體組基因庫進行選殖。

同源基因(例如，編碼除了人類以外之物種的 c-Rel 之核酸序列)或其他相關序列(例如，同物種同源基因)可經由使用該項技藝中習知之核酸雜交或選殖方法，與該作為探針之全部或部分的特定人類序列以低、中或高嚴格度雜交而獲得。

該述於第 1 圖之經編碼 c-Rel 蛋白(SEQ ID NO:2)可經由該項技藝中已知之蛋白純化及重組蛋白表現方法而獲得。為重組表現一種或一種以上之該蛋白，可將包含編碼該蛋白之全部或部分核苷酸序列的核酸插入適當表現載體

中，亦即，包含該經插入之編碼序列的轉錄作用及轉譯作用之必需單元的載體。必需之轉錄及轉譯訊號亦可由 c-Rel 基因及/或其側翼區 (flanking regions) 之天然啟動子所提供。

可利用各種宿主-載體系統以表現該蛋白編碼序列。此等系統包括，但不限於，以病毒(例如，牛痘病毒、腺病毒等等)感染之哺乳動物細胞系統；以病毒(例如，桿狀病毒)感染之昆蟲細胞系統；微生物如包含酵母菌載體之酵母菌；或以噬菌體、DNA、質體 DNA、或凝聚載體 (cosmid) DNA 轉形之細菌。載體之表現單元係依其強度及特性而有所不同。依據所利用之宿主-載體系統，可使用任一種適當之轉錄及轉譯作用單元。

於較佳具體實施例中，人類 c-Rel 係經由表現該人類 c-Rel 編碼序列而獲得。而於另一具體實施例中，則是以重組方式表現 c-Rel 之衍生物、片段或同源物。於一具體實施例中，該 c-Rel 蛋白係表現為嵌合或融合蛋白形式，其中，該相異於 c-Rel 序列之胺基酸序列係經由肽鍵連結至 c-Rel 序列。該用於偵測或單離所表現之嵌合或融合蛋白的相異胺基酸序列可為標籤序列如基因標記 (flag tag)。

此項技藝中任何可得之方法皆可使用於將 DNA 片段插入載體以構築包含由適當轉錄/轉譯控制訊號及蛋白編碼序列所構成之嵌合基因的表現載體。此等方法可包括活體外重組 DNA 及合成技術以及活體內重組技術 (基因重組)。

編碼 c-Rel、或其衍生物、片段或同源物之核酸序列的表現作用可由第二個核酸序列調節，以使經重組 DNA 分子轉形之宿主表現該基因或其片段。例如，該蛋白的表現可由該項技藝中已知之任何啟動子/增強子控制。於特定具體實施例中，該啟動子並非 c-Rel 基因之天然啟動子。於另一具體實施例中，該啟動子於免疫細胞內(例如，周邊血液單核細胞、樹突細胞或單核球或脾細胞)具有活性。可使用之啟動子包括但不限於 SV40 早期啟動子(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310)、包含於勞氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)之 3'長末端重複中的啟動子(Yamamoto *et al.*, 1980, Cell 22: 787-797)、皰疹胸腺嘧啶激酶啟動子(Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445)、金屬硫蛋白基因的調控序列(Brinster *et al.*, 1982, Nature 296:39-42); 原核生物表現載體如 β -內醯胺酶啟動子(Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731)或 tac 啟動子(DeBoer *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25; Gilbert *et al.*, 1980, Scientific American 242: 79-94); 包括胭脂鹼合成酶啟動子(Herrar-Estrella *et al.*, 1984, Nature 303: 209-213)或花椰菜嵌紋病毒 35S RNA 啟動子(Garder *et al.*, 1984, Nucleic Acids Res. 9: 2871)之植物表現載體，以及光合酵素核酮糖雙磷酸羧化酶之啟動子(Herrera-Estrella *et al.*, 1984, Nature 310: 115-120); 來自酵母菌及其他真菌之啟動子單元如

Gal4 啟動子 (Johnston *et al.*, 1987, *Microbiol. Rev.* 51 : 458-476)、醇脫氫酶啟動子 (Schibler *et al.*, 1987, *Annual Review Genetics* 21 : 237-257)、磷酸甘油激酶啟動子 (Struhl *et al.*, 1995, *Annual Review Genetics* 29 : 651-674 ; Guarente 1987, *Annual Review Genetics* 21 : 425-452)、鹼性磷酸酶啟動子 (Struhl *et al.*, 1995, *Annual Review Genetics* 29 : 651-674 ; Guarente 1987, *Annual Review Genetics* 21 : 425-452), 以及下列顯現組織特異性且已利用於轉殖動物中之動物轉錄控制區: 於胰臟腺泡細胞中具有活性之彈性蛋白酶 I 基因控制區 (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38 : 639-646 ; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50 : 399-409 ; MacDonald 1987, *Hepatology* 7 : 425-515); 於胰臟 β 細胞中具有活性之胰島素基因控制區 (Hanahan *et al.*, 1985, *Nature* 315 : 115-122)、於淋巴細胞中具有活性之免疫球蛋白基因控制區 (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38 : 647-658 ; Adams *et al.*, 1985, *Nature* 318 : 533-538 ; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell Biol.* 7 : 1436-1444)、於睪丸、乳房、淋巴及肥大細胞中具有活性之小鼠乳腺腫瘤病毒控制區 (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45 : 485-495)、於肝臟中具有活性之白蛋白基因控制區 (Pinckert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1 : 268-276)、於肝臟中具有活性之 α -胎兒蛋白基因控制區 (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell Biol.* 5 : 1639-1648 ; Hammer *et*

al., 1987, *Science* 235 : 53-58)、於肝臟中具有活性之 α -1 抗胰蛋白酶基因控制區 (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1 : 161-171)、於骨髓細胞中具有活性之 β 球蛋白基因控制區 (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315 : 338-340 ; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46 : 89-94)、於腦部之寡樹突神經膠質細胞中具有活性之髓鞘鹼性蛋白基因控制區 (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48 : 703-712)、於骨骼肌中具有活性之肌凝蛋白輕鏈-2 基因控制區 (Sani 1985, *Nature* 314 : 283-286) 及於下視丘之促性腺激素細胞中具有活性之促性腺激素釋放激素基因控制區 (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234 : 1372-1378)。

於特定具體實施例中，係使用包含下述特徵之載體：可連結至該編碼 c-Rel 或其片段、衍生物或同源物之核酸序列的啟動子、一個或一個以上之複製起點、且視需要包含一種或一種以上可篩選之標誌 (marker) (例如，抗生素抗性基因)。

於另一特定具體實施例中，係藉由將 c-Rel 基因次選殖入三個 pGEX 載體之各 *EcoRI* 限制酶切位以產生包含該 c-Rel 之編碼序列或其部分序列之表現載體 (麩胺基硫 S-轉移酶表現載體；Smith and Johnson, 1988, *Gene* 7 : 31-40)。此方法允許該產物於正確編碼股表現。

包含該重要序列之表現載體可經由三種一般方法鑑定：(a) 核酸雜交、(b) 「標誌」基因功能之存在或不存在，以及 (c) 所插入序列之表現。於第一方法中，c-Rel 序列可

藉由將之與探針(與該插入序列同源或互補之序列)進行核酸雜交而偵測。於第二方法中，該重組載體/宿主系統可以該經由將重要序列插入載體造成某些「標誌」功能(例如，對抗生素具抗性、於桿狀病毒形成包含體(occlusion body)等等)的存在或不存在為基礎而進行鑑定或篩選。例如，如果將 c-Rel 基因或其部分序列插入載體之標誌基因序列中，則包含該 c-Rel 片段之重組體將可藉由該標誌基因功能之不存在(例如， β -半乳糖苷酶活性之喪失)來鑑定。於第三方法中，重組表現載體可經由分析該由重組載體表現之 c-Rel 來鑑定。

一旦重組之 c-Rel 分子經鑑定與單離後，可使用該項技藝中已知之數種方法將之增殖。利用適當宿主系統及生長條件，可大量增殖並放大重組表現載體。如先前所述，該可使用之表現載體或衍生物包括，但不限於，人類或動物病毒如牛痘病毒或腺病毒；昆蟲病毒如桿狀病毒、酵母菌載體；噬菌體載體如 λ 噬菌體；以及質體或凝聚載體。

此外，可選擇會調節該插入序列之表現或以所欲之特定方式修飾或加工處理該經表現之蛋白的宿主細胞株。來自某些啟動子之表現可於某些誘導劑存在下提升；因此可控制該經基因改造 c-Rel 之表現。再者，不同的宿主細胞對於蛋白之轉譯及轉譯後的加工處理與修飾(例如，醣化、磷酸化等等)具有獨特且特定之機制。可選擇適當之細胞株或宿主系統以確保該外來蛋白達成所欲之修飾及加工處理。例如，於細菌系統中之表現可用於產生未醣化之核心

蛋白，而於哺乳動物細胞中之表現則可確保異源蛋白之「天然」醣化作用。而且，不同載體/宿主表現系統對於加工處理反應之影響程度亦不相同。

於其他特定具體實施例中，該 c-Rel 蛋白或其片段、同源物或衍生物可經表現為包含該經由肽鍵連結於不同蛋白之異源蛋白序列的蛋白、片段、同源物或衍生物之融合或嵌合蛋白產物。此等嵌合產物可藉由使用該項技藝中已知之方法將可編碼所欲胺基酸之適當核酸序列相互接合於適當編碼股中，並經由該項技藝中習知之方法表現該嵌合產物而產生。

用於鑑定調節劑之篩選方法

於本發明之一具體實施例中，係提供 c-Rel 活性之調節劑(例如，抑制劑、拮抗劑或促效劑)的鑑定方法，該方法係藉由偵測候選分子於不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之情況下對於 c-Rel 細胞內定位之改變的影響能力，故因此，或許亦可鑑定 c-Rel 於活化基因之轉錄作用的活性，其中 c-Rel 係藉由在該基因之啟動子及/或增強子中的 NF κ B 結合位形成序列專一性 DNA 結合複合物以參予轉錄起始複合物之產生。此類基因之說明實例為 c-Rel-依賴型細胞激素，例如 IL-12 及 IL-23，其次單元 p40 及 p35 分別於啟動子中包含 NF κ B 結合位。於本發明之此具體實施例的一實施態樣中，該用於鑑定 c-Rel 活性調節劑之方法包括：提供細胞與候選調節劑分子並偵測或測量該與細胞核共純化或共定位之 c-Rel 的量(在不顯著改變 NF κ B

表現量及/或 I κ B 數量之情況下)，其中，相較於未與候選分子接觸之細胞，該共純化或共定位至細胞核之 c-Rel 的存在或數量上之差異顯示該候選分子調節 c-Rel 活性。於本發明之篩選方法中所使用之例示細胞及細胞株包括，但不限於，巨噬細胞、樹突細胞、單核球、周邊血液單核細胞，其較佳係於與候選分子接觸之前先以 IFN- γ 及/或 LPS 刺激之。

本發明之特定實施態樣係有關鑑定抑制或促進 c-Rel 定位至細胞核之分子。於另一特定實施態樣，係有關鑑定抑制或促進 c-Rel 定位至細胞核但不影響細胞中所表現之 c-Rel 總量(不管是在轉錄或轉譯層次上)的分子。於較佳實施態樣中，該經鑑定之分子係藉由例如抑制 c-Rel 轉位至細胞核或增加細胞核中 c-Rel 之降解速度以降低細胞核中之 c-Rel 數量。於其他實施態樣中，細胞核之 c-Rel 數量或 c-Rel 轉位至細胞核之數量係受到抑制，但該 NF κ B 家族成員 p65 於細胞核之數量則增加。又於另一實施態樣中，於存在或不存在對 ICSBP mRNA 或蛋白的影響下，c-Rel 轉位至細胞核之作用係受到抑制且該 ICSBP 之數量亦降低。又於另一實施態樣中，當與細胞核中 c-Rel 數量未減少之細胞相比較時，c-Rel 轉位至細胞核之作用係降低且該 p40 之啟動子中的 Ets-2 結合功能區不再具有活化轉錄作用之能力。

可用於進行上述內容之方法為該項技藝中所習知者及/或彼等揭露於上文 5.1 節中之方法。用於本發明此具體實

施例之方法中的細胞可內生性地或重組地表現 c-Rel、或其片段、衍生物或相似物。c-Rel 之重組表現係藉由如 5.1.1 節中所揭露之方法或使用該項技藝中習知之步驟進行：將 c-Rel 編碼核酸序列送入表現載體中，接著再將該載體送入細胞中以表現 c-Rel，或者單純將 c-Rel 編碼核酸序列送入細胞中表現。於特定具體實施例中，c-Rel 係連同標誌表現以易於偵測，但該標誌並不影響 c-Rel 活性或細胞內定位。已有來自某些物種之編碼 c-Rel 核酸序列經選殖並定序，且其表現係為此項技藝中所習知。人類 c-Rel 核苷酸及胺基酸序列之說明實例係示於第 1 圖中 (SEQ ID NOS: 1 及 2)。表現可來自表現載體或染色體內。於特定具體實施例中，係使用標準人類細胞株，如人類樹突細胞株或人類單核球細胞株 THP-1、或人類周邊血液單核細胞進行篩選分析。於特定實施態樣中，當使用免疫細胞時，該免疫細胞係於與一種或一種以上候選分子接觸之前、同時或之後，與免疫活化化合物如脂多醣 (LPS) 或干擾素- γ (INF- γ) 接觸之。

於此項技藝中具有通常知識者所知之可將 c-Rel-編碼 DNA 插入載體之任何方法均可用於構築作為表現之表現載體，包括彼等於上文第 5.1 節中所揭露之方法。此外，可選擇會調節 c-Rel 表現或者會將該基因產物修飾或加工處理為所欲之特定形式的宿主細胞株。來自某些啟動子之表現可於某些誘導劑存在下提升；因此可控制 c-Rel 蛋白之表現。再者，不同的宿主細胞對於蛋白之轉譯及轉譯後

的加工處理與修飾(例如, 醱化、切割)具有獨特且特定之機制。可選擇適當之細胞株或宿主系統以確保所表現之 c-Rel 蛋白達成所欲之修飾及加工處理。例示之細胞株為彼等於下文實施例乙節中所揭露者。

於本發明之另一具體實施例係提供用於鑑定可媒介 c-Rel 活性選擇性抑制作用的藥物標的之方法。此例示方法之一係包括下列指定順序之步驟:(a)將一種或一種以上可降低細胞核中 c-Rel 量但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之藥劑進行標定;(b)使細胞與該一種或一種以上經標定之藥劑於可在該一種或一種以上之經標定藥劑及該藥物標的之間形成複合物之條件下接觸;(c)單離該複合物;以及(d)由該複合物鑑定該藥物標的。

候選分子

於此技藝中任何已知分子對於調節(提高或降低) c-Rel 活性之能力皆可藉由偵測 c-Rel 於細胞內定位(或其數量)上之變化而測試。經由實施例, 於定位上之變化可藉由下述方式偵測: 在暴露於候選分子之前及之後, 偵測該與細胞核一起純化之或定位至細胞核之 c-Rel 於數量上的變化。為了鑑定調節 c-Rel 之分子, 可直接將候選分子供應至表現 c-Rel 之細胞, 或者對於候選蛋白而言, 可藉由於下述條件下提供其編碼核酸而提供: 該核酸序列可於 c-Rel 表現細胞中經重組表現產生候選蛋白。

抑制 c-Rel 轉位至細胞核但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之較佳化合物係包括下列化合物:

化合物 1：N-(1H-吡啶-3-基亞甲基)-N'-[4-嗎啉-4-基-6-(2-吡啶-2-基-乙氧基)-[1,3,5]三吡啶-2-基]-聯胺；

化合物 2：N-(3-甲基-苯亞甲基)-N'-[6-嗎啉-4-基-2-(2-吡啶-2-基-乙氧基)-嘧啶-4-基]-聯胺；

化合物 3：N-(1H-吡啶-3-基亞甲基)-N'-[4-嗎啉-4-基-6-(2-嗎啉-4-基-乙氧基)-吡啶-2-基]-聯胺；

化合物 4：N-[3,5-二氟-2-嗎啉-4-基-6-(2-嗎啉-4-基-乙氧基)-吡啶-4-基]-N'-(3-甲基-苯亞甲基)-聯胺；

化合物 5：N-(3-甲基-苯亞甲基)-N'-[4-嗎啉-4-基-6-(2-嗎啉-4-基-乙氧基)-吡啶-2-基]-聯胺；

化合物 6：N-甲基-N'-(3-甲基-苯亞甲基)-N-[4-嗎啉-4-基-6-(2-嗎啉-4-基-乙氧基)-吡啶-2-基]-聯胺；

化合物 7：4-甲基-2-{[4-嗎啉-4-基-6-(2-嗎啉-4-基-乙氧基)-吡啶-2-基]亞胍基甲基}-苯胺；

化合物 8：N-(6,7-二甲氧基-2-嗎啉-4-基-喹啉-4-基)-N'-(3-甲基-苯亞甲基)-聯胺；

化合物 9：N-(7-氯-2-嗎啉-4-基-喹啉-4-基)-N'-(3-甲基-苯亞甲基)-聯胺；

化合物 10：N-[7-甲氧基-2-嗎啉-4-基-6-(2-苯氧基-乙氧基)-喹啉-4-基]-N'-(3-甲基-苯亞甲基)-聯胺；

化合物 11：N-[6-嗎啉-4-基-2-(2-吡啶-2-基-乙氧基)-嘧啶-4-基亞甲基]-N'-間-甲苯基-聯胺；

化合物 12：N-(3-氯-苯基)-N'-[6-嗎啉-4-基-2-(2-吡啶-2-基-乙氧基)-嘧啶-4-基亞甲基]-聯胺；

化合物 13：N-(3-甲氧基-苯基)-N'-[6-嗎啉-4-基-2-(2-吡啶-2-基-乙氧基)-嘧啶-4-基亞甲基]-聯胺；以及

化合物 14：N-(2,5-二甲基-苯基)-N'-[6-嗎啉-4-基-2-(2-吡啶-2-基-乙氧基)-嘧啶-4-基亞甲基]-聯胺。

本發明之此具體實施例係相當適用於篩選分子之化學庫(chemical libraries)，其中，該分子係經由改變該與細胞核一起純化或定位至細胞核之 c-Rel 數量而調節(例如，抑制、拮抗或促進)c-Rel 活性。該化學庫可為胜肽庫、模擬胜肽庫(peptidomimetic libraries)、化學合成庫、重組體例如噬菌體展示庫，以及於活體外以轉譯為基礎之文庫(translation-based libraries)、其他非胜肽合成有機庫(non-peptide synthetic organic libraries)等等。

使用本發明之方法所篩選之化學庫可包括各種型式之化合物。可根據本發明方法篩選之化學庫實例包括，但不限於，甘胺酸胺基取代之陽離子寡聚合物(一種胜肽衍生物，peptoids)；隨機生物寡聚合物；多樣體(diversomers)如乙內醯脲、苯二氮吡以及雙胜肽；類乙烯(vinylogous)多胜肽；非胜肽之模擬胜肽；寡胺基甲酸酯；肽基磷酸酯；胜肽核酸庫、抗體庫；碳水化合物庫；以及小分子庫(較佳者，小的有機分子庫)。於某些具體實施例中，該經篩選之化學庫中的化合物為核酸或胜肽分子。於非限制性實施例中，胜肽分子可存在噬菌體展示庫中。於其他具體實施例中，化合物之型式包括，但不限於，胜肽類似物包括該包含非天然存在之胺基酸(例如，D-胺基酸)的胜肽、胺基酸

之磷類似物如 γ -胺基磷酸、或具有非胜肽鍵之胺基酸、核酸類似物如硫代磷酸酯及 PNAs、荷爾蒙、抗原、合成或天然存在之藥物、鴉片劑、多巴胺、血清素、兒茶酚胺、凝血酶、乙醯膽鹼、前列腺素、有機分子、費洛蒙、腺苷、蔗糖、葡萄糖、乳糖以及半乳糖。多胜肽或蛋白庫亦可使用於本發明之分析中。

於較佳具體實施例中，該組合化學庫為小的有機分子庫，其包括但不限於，異戊二烯、噻唑啉酮、間噻吡啉酮 (metathiazanones)、吡咯啉、嗎啉基化合物以及苯二氮吡。於另一具體實施例中，該組合化學庫係包括甘胺酸胺基取代之陽離子寡聚合物；隨機生物寡聚合物；苯二氮吡；diversomers 如乙內醯脲、苯二氮吡以及雙胜肽；類乙烯多胜肽；非胜肽之模擬胜肽；寡胺基甲酸酯；肽基磷酸酯；胜肽核酸庫、抗體庫或碳水化合物庫。組合化學庫本身為商業上可購得者(參見，例如 ComGenex, Princeton, New Jersey; Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Missouri; ChemStar, Ltd, Moscow, Russia; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pennsylvania; Martek Biosciences, Columbia, Maryland; 等等)。

於較佳具體實施例中，該化學庫係先經過篩選，因此該化學庫之化合物可更易於細胞吸收。例如，化合物係依據特定參數如(但非受限於)大小、親脂性、親水性以及氫鍵進行篩選，其中該參數可提高化合物進入細胞之可能性。於另一具體實施例中，該化合物係以三維或四維電腦

計算程式分析。

可合成該根據本發明方法所使用之組合化合物庫。合成方法之主要重要性係有關小的有機分子化合物或化學庫之大量製造，其可對藥理學、生物學或其他活性進行篩選。該用於製造大量組合化學庫之合成方法係於溶液中或固態中進行，亦即於固體支持物上。固態合成法較易於實施多步驟反應且驅使反應以高產率完成，因為過量試劑可輕易地添加且於每個反應步驟後洗除。固態組合合成法亦可促進單離、純化及篩選。然而，較傳統之液態化學則比固態化學更能支援廣泛多種的有機反應。

本發明之組合化合物庫可使用揭露於美國專利第 6,190,619 號案(Kilcoin 等人)之設備合成，而該案之全部內容在此係合併作為參考文獻。美國專利第 6,190,619 號案揭露可支承多個反應容器之裝置，該多個反應容器係提供多樣不連續化合物或化合物之組合庫的平行合成。

於一具體實施例中，該組合化合物庫可於溶液中合成。該方法揭露於美國專利第 6,194,612 號案(Boger 等人)，而該案之全部內容係在此合併作為參考文獻，其特色為使用化合物作為組合庫之液態合成法的模板。該模板係設計為可允許反應產物以液/液或固/液萃取法輕易地由未反應之反應物中純化。該使用模板而經由組合合成法生產之化合物較佳為小的有機分子。該化學庫中之某些化合物可模擬非胜肽類或胜肽類之作用。相較於組合化合物庫之固態合成法，液態合成法並不需要使用專門程式以監測多

步驟固態合成法之個別步驟 (Egner *et al.*, 1995, *J. Org. Chem.* 60 : 2650 ; Anderson *et al.*, 1995, *J. Org. Chem.* 60 : 2652 ; Fitch *et al.*, 1994, *J. Org. Chem.* 59 : 7955 ; Look *et al.*, 1994, *J. Org. Chem.* 49 : 7588 ; Metzger *et al.*, 1993, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 32 : 894 ; Youngquist *et al.*, 1994, *Rapid Commun. Mass Spect.* 8 : 77 ; Chu *et al.*, 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117 : 5419 ; Brummel *et al.*, 1994, *Science* 264 : 399 ; 以及 Stevanovic *et al.*, 1993, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3 : 431)。

使用於本發明方法之組合化合物庫可於固體支持物上合成。於一具體實施例中，係使用分離之合成方法，於合成期間分離及混合固體支持物之程式，以於固體支持物上合成化合物庫 (參見例如 Lam *et al.*, 1997, *Chem. Rev.* 97 : 41-448 ; Ohlmeyer *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 10922-10926 及其所引用之參考文獻)。於最終化學庫中之各個固體支持物實質上均具有一種型式之化合物附著於其表面。於固體支持物上合成組合庫之其他方法 (其中，各支持物係附著一種產物) 將為彼等於此項技藝中具有通常知識者所知 (參見例如 Nefzi *et al.*, 1997, *Chem. Rev.* 97 : 449-472)。

於本文所使用「固體支持物」一詞並不受限於特定型式之固體支持物。多數支持物為可購得者且為該項技藝中具有通常知識者所知。固體支持物包括矽膠、樹脂、衍生塑膠膜、玻璃珠、棉、塑膠珠、聚苯乙烯珠、鋁膠以及多

醣。適當固體支持物可以所欲之最終用途以及於各種合成步驟之適用性為基礎而進行篩選。例如，對胜肽合成法而言，固體支持物可為樹脂如對-甲基二苯甲胺(pMBHA)樹脂 (Peptides International, Louisville, KY)、聚苯乙烯 (例如，得自 Bachem Inc., Peninsula Laboratories 等等之 PAM-樹脂) 包括氯甲基聚苯乙烯、羥甲基聚苯乙烯以及胺甲基聚苯乙烯、聚(二甲基丙烯醯胺)-接枝之苯乙烯共-二乙烯基-苯 (例如 POLYHIPE 樹脂，得自 Aminotech, Canada)、聚醯胺樹脂 (得自 Peninsula Laboratories)、與聚乙二醇接枝之聚苯乙烯樹脂 (例如 TENTAGEL 或 ARGOGEL, Bayer, Tübingen, Germany)、聚二甲基丙烯醯胺樹脂 (得自 Milligen/Biosearch, California) 或 Sepharose (Pharmacia, Sweden)。

於本發明之某些具體實施例中，化合物可經由連結物 (linker) 附著於固體支持物。連結物可為整體性的且為固體支持物的一部份，或者可為非整體性的，係合成於固體支持物上或者於合成後附著於固體支持物。連結物不僅可提供附著點使化合物附著至固體支持物，亦可依據連結物之性質於不同條件下使分子之不同基團自固體支持物切割。例如，連結物尤其可為親電性切割、親核性切割、光可切割、酵素切割、以金屬切割、於還原狀態下切割或於氧化狀態下切割。於較佳具體實施例中，該化合物係於化合物之高通量篩選前自固體支持物切割。

於本發明之某些具體實施例中，該化合物為小分子。

例示之化學庫為來自數個來源(ArQule, Tripos/PanLabs, ChemDesign, Pharmacopoeia)之商業上可購得者。於某些實例中，這些化學庫是使用組合策略(combinatorial strategies)所產生，該組合策略編碼位之化學庫各成員的特性於基板(成員化合物係附著於基材)，因此可直接且立即地鑑定作為有效調節劑之分子。因此，於許多組合方法中，該化合物位於平板的位置明確說明瞭化合物之組成。此外，於一實施例中，單一個平板位置可具有 1 至 20 個化學分子，該化學分子可藉由投與至含有交互作用關係的孔洞中篩選。因此，若偵測到調節作用，則可分析越來越小之集合的相互作用配對物之調節活性。經由此類方法可篩選許多候選分子。

許多適於使用之多樣性化學庫係為此項技藝中已知者，且可經使用於提供根據本發明所試驗之化合物。或者，可適用標準方法構築化學庫。化學(合成)庫、重組表現庫、或多核糖體基庫(polysome-based libraries)均為可使用之化學庫的例示型式。

該化學庫可為受限的或半硬式的(具有某些程度之結構限制)，或者線性的或非受限的。該化學庫可為 cDNA 或基因表現庫、隨機胜肽表現庫或化學合成之隨機胜肽表現庫、或非胜肽庫。將表現庫送入細胞內並進行分析，其中該庫之核酸係經表現以產生其所編碼之蛋白。

於一具體實施例中，該可使用於本發明之胜肽庫可為於活體外經化學合成之庫。此類化學庫之實例係由

Houghten *et al.*, 1991, *Nature* 354: 84-86 所提供，其敘述了自由六胜肽類之混合物，於該六胜肽中，各胜肽之第一個及第二個殘基係經個別且具體地定義；Lam *et al.*, 1991, *Nature* 354: 82-84 揭露了「一珠，一胜肽」之方法，該方法之固態分離合成系統生產了胜肽庫，其中，該集合物之各個珠體係已固定單一個隨機序列之胺基酸殘基；Medynski, 1994, *Bio/Technology* 12: 709-710 敘述了分離合成法及 T-bag 合成方法；以及 Gallop *et al.*, 1994, *J. Medicinal Chemistry* 37(9): 1233-1251。單由其他實施例，可根據下列文獻所敘述之方法製備組合化學庫以供使用：Ohlmeyer *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10922-10926; Erb *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422-11426; Houghten *et al.*, 1992, *Biotechniques* 13: 412; Jayawickreme *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1614-1618；或 Salmon *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11708-11712。PCT 公開號 WO 93/20242 以及 Brenner and Lerner, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5381-5383 敘述了「編碼之組合化學庫」，其包含各個化學聚合物庫成員之寡聚核苷酸識別符 (identifiers)。

於較佳具體實施例中，該經篩選之化學庫為生物表現庫，其係隨機胜肽噬菌體展示庫，其中，該隨機胜肽為限制性的（例如，以具有雙硫鍵之功效限制之）。

此外，亦可使用較普遍且結構上受限之有機多樣性（非

胜肽)庫。經由實施例，可使用苯二氮呋庫(參見例如 Bunin *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4708-4712)。

可使用之構形上受限的化學庫包括，但不限於，彼等包含不變之半胱胺酸殘基者(半胱胺酸於氧化環境中會藉由雙硫鍵交聯而形成胱胺酸)、經修飾之胜肽(例如，加入氟、金屬、同位素標記物、經磷酸化等等)、包含一個或一個以上非天然發生之胺基酸的胜肽、非胜肽結構以及包含顯著部分 γ -羧基麩胺酸之胜肽。

胜肽庫亦可使用例如胜肽衍生物(例如，包含一個以上非天然存在之胺基酸者)。此類之其中一實例為胜肽庫(Simon *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367-9371)。甘胺酸胺基取代的陽離子寡聚合物為具有天然存在之側鏈附接於骨架胺基氮上而非附接於 α 碳上之非天然胺基酸聚合物。因為甘胺酸胺基取代的陽離子寡聚合物不易經人類消化性酵素降解，所以更益於適用為藥物。可使用之化學庫的另一實例為敘述於 Ostresh *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11138-11142 者，該化學庫中胜肽之醯胺功能已經由預先甲基化產生化學轉換之組合庫。

可根據本發明篩選之胜肽庫成員並不受限於包含該 20 個天然存在之胺基酸。特定言之，化學合成庫與核糖體基庫可使用除了該 20 個天然存在之胺基酸以外的胺基酸(經由化學庫產生所使用之胺基酸前驅物集合物的內含

物)。於特定具體實施例中，該化學庫成員包括一個或一個以上非天然或非典型之胺基酸或環狀胜肽。非典型胺基酸包括但不限於：一般胺基酸之 D-異構物、 α -胺基異丁酸、4-胺基丁酸、Abu、2-胺基丁酸； γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-胺基己酸；Abi、2-胺基異丁酸；3-胺基丙酸；鳥胺酸；正白胺酸；正纈胺酸、羥脯胺酸、肌胺酸、瓜胺酸、氧化半胱胺酸、第三丁基甘胺酸；第三丁基丙胺酸、苯基甘胺酸、環己基丙胺酸、 β -丙胺酸、設計之胺基酸如 β -甲基胺基酸、 $C\alpha$ -甲基胺基酸、 $N\alpha$ -甲基胺基酸、氟-胺基酸以及一般胺基酸類似物。此外，該胺基酸可為 D(右旋性)或 L(左旋性)。

於特定具體實施例中，係篩選 c-Rel 之片段或相似物，特別是模擬胜肽，作為 c-Rel 細胞核定位或運輸之競爭性或非競爭性抑制劑的活性。

於本發明之另一具體實施例中，可使用組合化學鑑定 c-Rel 細胞核定位或運輸之調節劑。組合化學可創造含有數百個或數千個化合物之化學庫，且其中許多化合物可具有相似結構。雖然高通量篩選程式可篩選此等龐大化學庫之已知標靶的親和性，但卻仍發展出可完成具有較小維度但卻提供最大化學多樣性之化學庫的新方法。(參見例如 Matter, 1997, Journal of Medicinal Chemistry 40: 1219-1229)。

組合化學方法之一：親和性指紋分析法(affinity fingerprinting)，已先用於試驗小分子之不連續化學庫對

蛋白之鑑定板(defined panel)的結合親和性。經篩選得到之指紋係用於預測個別化學庫成員對於其他感興趣(於本發明, c-Rel)之蛋白或受體的親和性。將該指紋與由其他已知可與感興趣之蛋白反應的化合物所得之指紋相比較, 以預測該化學庫化合物是否可能具有相似反應。例如, 可試驗彼等具有與其他已知具有該活性之化合物相似指紋的配位子, 而不試驗龐大化學庫中每個配位子與 c-Rel 之交互作用。(參見例如 Kauvar *et al.*, 1995, *Chemistry and Biology* 2: 107-118; Kauvar, 1995, *Affinity fingerprinting, Pharmaceutical Manufacturing International*. 8: 25-28; 以及 Kauvar, *Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*, D. Kurtz. L. Stanker and J. H. Skerritt. Editors, 1995, AOAC: Washington, D.C., 305-312)。

Kay *et al.*, 1993, *Gene* 128: 59-65(Kay)揭露了構築胜肽庫之方法, 該胜肽庫係編碼完全隨機序列之胜肽, 且該序列係比任何先前傳統化學庫之序列更長。揭露於 Kay 之化學庫編碼出長度大於約 20 個胺基酸之完全合成的隨機胜肽。此類化學庫可利於經篩選以鑑定 c-Rel 調節劑。(亦參見 1996 年 3 月 12 日美國專利第 5,498,538 號案; 以及 1994 年 8 月 18 日 PCT 公開號 WO 94/18318 案)。

其他化學庫可包含抗體庫以及於細胞中表現胞內體之化學庫。

若化學庫包含化合物之陣列或微陣列(其中,各化合物皆具有位址或識別符),則化合物可例如藉由相互參照陽性樣品對原始化合物之列表(其係適用於個別之試驗分析)而去旋轉(deconvoluted)。

若該化學庫為胜肽或核酸庫,則化合物之序列可藉由直接將該胜肽或核酸定序而測定。此類方法為該項技藝中具有通常知識者所熟知。

各種類型之胜肽庫的綜合評論可參見於 Gallop *et al.*, J. Med. Chem. 37: 1233-1251。

於篩選分析法所鑑定之化合物

本發明復有關經由上述篩選分析法鑑定之化合物以及藉由使用此等分析法生產此類製劑之方法。該化合物可包括,但不限於,核酸、反義核酸、核醣核酸酵素、三螺旋鍊(triple helix)、抗體以及多胜肽分子與小的無機或有機分子。因此,於一具體實施例中,本發明包括經由包含上述篩選分析法之任一步驟之方法所得到之化合物。例如,該化合物係由包含下述步驟之方法所得到:將一種或一種以上之候選分子與細胞接觸;以及偵測 c-Rel 分子於細胞內之定位,其中,係在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下,該細胞核中之 c-Rel 量相較於未與一種或一種以上之候選分子接觸之細胞中的 c-Rel 量更為增加或減少者。

一旦試驗化合物經本發明篩選方法鑑定為具有適當活性時,則該試驗化合物可進行進一步之試驗,例如,於動

物模式中確認其於動物體內作為 c-Rel 活性或細胞內定位之調節劑的活性，或其潛在之副作用。亦可於以細胞為基礎之分析下或於動物分析下試驗該化合物對於已知可調節 c-Rel 活性或細胞內定位之分子的作用，以確認其預期之活性。亦可對於該經鑑定之化合物進行試驗以偵測其毒性或副作用（該毒性或副作用可能與此類化合物之投與有關）。或者，可將此處所述經鑑定之化合物用於動物模式中以測定此化合物之作用機制。

此等例示之用於評估可降低細胞核內 c-Rel 量但卻不顯著改變細胞中 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之製劑的生物效應之評估方法係包括下列步驟：將細胞與製劑接觸並觀察細胞中之任何表現型(phenotype)影響。另一例示之方法係包括：將該製劑投藥至試驗對象/動物，並觀察該試驗對象/動物體內之任何表現型影響。

本發明亦有關利用本文所述之處理方法使用經上述篩選分析法所鑑定之化合物。因此，如本文所述使用此等化合物於設計、調配配方、合成、製造及/或生產用於診斷、預後或治療之藥物或醫藥組成物，皆包含於本發明之範疇內。例如，於一具體實施例中，本發明包括藉由瞭解化合物（該化合物可經由上述篩選分析法得到）之結構及/或性質以合成或生產藥物或醫藥組成物之方法。例如，藥物或醫藥組成物可以上述篩選方法所得之化合物的結構及/或性質為基礎而合成。

此外，該經鑑定之化合物可於經調配使用於治療或預

防之方法前，先以該項技藝中已知之方法進行修飾以使該化合物更為合適，亦即增加其於試驗對象體內之半生期，或使該化合物更易於吸收至試驗對象之組織內。此等修飾方法包括，但不限於，聚乙二醇處理法(PEGylation)、多元聚合作用(multimerization)。此等修飾方法係藉由藥劑化學師進行以使該化合物更適於投藥。此外，該經鑑定之化合物可經修飾以穿越通過血腦障壁。

該顯現預期生物活性之化合物可使用作為發展或設計具有有效藥理活性之同類物(congener)或相似物之先導化合物。例如，一旦先導化合物經鑑定，則可使用分子模擬技術設計該化合物之可更為有效的變化體。分子模擬系統之實例為CHARM及QUANTA程式(Polygen Corporation, Waltham, MA)。CHARM執行能量之最小化及分子之動力學函數。QUANTA執行分子結構之構築、圖像模擬以及分析。QUANTA可提供分子間作用的相互構築、修飾、形像化及分析。可使用作為發展或設計具有有效藥理活性之同類物或相似物之先導化合物的例示化合物係敘述於美國專利第6,384,032號案；於2002年5月7日提出申請之美國專利第09/594,362號申請案；於2001年11月30日提出申請之美國專利第10/006,624號申請案(公開號20020082259)；於2001年11月30日提出申請之美國專利第10/000,742號申請案(公開號20030139403)；於2002年7月10日提出申請之美國專利第10/192,347號申請案(公開號20030114446)；於2002年11月26日提出申請之

美國專利第 10/305,039 號申請案；國際專利第 WO 00/78757 號案；國際專利第 WO 03/04516 號案；於 2003 年 10 月 14 日提出申請之國際專利申請案 PCT/US03/32546；於 2003 年 11 月 10 日提出申請之美國專利臨時申請案第 60/518,791 號案；於 2003 年 11 月 10 日提出申請之美國專利臨時申請案第 60/518,787 號案；於 2003 年 11 月 10 日提出申請之美國專利臨時申請案第 60/518,788 號案；於 2004 年 11 月 10 日提出申請之 PCT 申請案代理人案號(50586)61250，名稱為「稠合之雜環化合物(Fused Heterocyclic Compounds)」，Mitsunori Ono *et al.*，；於 2004 年 11 月 10 日提出申請之 PCT 申請案代理人案號(50586)61252，名稱為「雜芳基肼化合物(Heteroaryl Hydrazone Compounds)」，Mitsunori Ono *et al.*，；於 2004 年 11 月 10 日提出申請之 PCT 申請案代理人案號(50586)61253，名稱為「吡啶化合物(Pyridine Compounds)」，Mitsunori Ono *et al.*，，其中，各者之全部內容均在此合併作為參考文獻。

許多文章重新探討了藥物與特定蛋白間交互作用的電腦模擬，例如 Rotivinen *et al.*，1998, *Acta Pharmaceutical Fennica* 97: 159-166；Ripka, 1998, *New Scientist* 54-57；McKinaly & Rossmann, 1989, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 111-122；Perry & Davies, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp.189-193(Alan R. Liss, Inc. 1989)；Lewis & Dean, 1989, *Proc. R. Soc. Lond.* 236: 125-140

及 141-162 ; Askew *et al.*, 1989, J. Am. Chem. Soc. 111 : 1082-1090。其他篩選與透過圖像描述化學藥品之電腦程式可由下列公司購得，例如 BioDesign Inc. (Pasadena, California)、Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada) 以及 Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario)。雖然此等程式原先係設計於藥物對特定蛋白之專一性的應用，但其亦可適用於設計對任何特定區域具有專一性之藥物。或者，具有微少或無生物活性之先導化合物(於篩選中所確認者)亦可用於設計具有生物活性之化合物的類似物及同類物。

醫藥組成物及治療/預防性投與

本發明提供藉由投與有效量之本發明治療劑(亦即，經本發明篩選方法所鑑定之化合物)至試驗對象之治療(及預防)方法。於較佳實施態樣中，該治療劑本質上係經純化。該試驗對象較佳為動物，其包括但不限於下列動物：例如牛、豬、雞、貓、狗等等，且較佳為哺乳動物，以及最佳為人類。於特定具體實施例中，該試驗對象為非人類哺乳動物。

於特定具體實施例中，本發明提供治療具有異常 c-Rel 細胞內定位但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之疾病或不適之方法，該方法包括：將包含可降低 c-Rel 細胞核定位但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之分子以及醫藥上可接受之載劑的組成物投與至具有此類疾病或不適之試驗對象。於另一特定具體實施例中，

本發明提供治療與 IL-12 產生有關之疾病或不適之方法，該方法包括：將包含可降低 c-Rel 細胞核內定位但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之分子以及醫藥上可接受之載劑的組成物投與至具有此類疾病或不適之試驗對象。於另一特定具體實施例中，本發明提供治療與 c-Rel-依賴型細胞激素產生有關之疾病或不適之方法，該方法包括：將包含可降低 c-Rel 細胞核內定位但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之分子以及醫藥上可接受之載劑的組成物投與至具有此類疾病或不適之試驗對象。又於另一特定具體實施例中，本發明提供治療自體免疫疾病或不適之方法，該方法包括：將包含可降低 c-Rel 細胞核內定位但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之分子以及醫藥上可接受之載劑的組成物投與至具有此類疾病或不適之試驗對象。該可降低 c-Rel 細胞核內定位但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之分子，可為彼等經本文所述之篩選方法所鑑定者(例如彼等於詳細說明書中所描述者)。

本文所揭示之化合物及組成物係用於治療或預防任何與 IL-12 產生相關之不適，例如，炎症疾患、免疫疾病、神經性疾病以及骨質流失疾病。亦提供治療及預防之方法。

該術語「炎症疾患」包括任何由 IL-12 產生所造成、加劇或媒介之炎症疾病、不適或症狀。此類炎症疾患可包括但不限於：氣喘、成人呼吸困窘症候群、全身紅斑性狼瘡、發炎性腸道疾病(包括克隆氏症(Crohn's disease)以

及潰瘍性結腸炎)、多發性硬化症、胰島素依賴型糖尿病、自體免疫性關節炎(包括類風濕性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、乾癬性關節炎)、發炎症肺症候群、天疱瘡、特發性血小板低下性紫斑症、自體免疫性腦脊髓膜炎、重症肌無力、自體免疫性甲狀腺炎、皮膚炎(包括異位性皮膚炎及濕疹型皮膚炎)、乾癬、修格連氏症候群(包括修格連氏症候群之繼發性乾眼症)、簇型禿髮、節肢動物咬傷造成之過敏反應、口腔潰瘍、虹膜炎、結膜炎、角膜結膜炎、皮膚性紅斑狼瘡症、硬皮症、陰道炎、直腸炎、藥物疹(例如史蒂文斯-強生症候群(Stevens-Johnson syndrome))、癩瘋逆行反應(leprosy reversal reactions)、癩瘋結節性紅斑、自體免疫性葡萄膜炎、過敏性腦脊髓炎、再生不良性貧血、純粹性紅血球再生不良、血小板減少症、多發性軟骨炎、韋格納氏肉芽腫、慢性活動性肝炎、葛瑞夫茲氏眼病變(Graves' ophthalmopathy)、原發性膽道性肝硬化、後段葡萄膜炎以及間質性肺纖維化。

「炎症疾患」明確包含急性炎症疾患。急性炎症疾患之實例包括：移植物對抗宿主疾病、移植排斥反應、敗血性休克、內毒素血症、萊姆關節炎(Lyme arthritis)、感染性腦膜炎(例如，病毒性、細菌性、與萊姆症相關者)、氣喘之急性發作以及自體免疫疾病之急性發作。

「炎症疾患」明確包含慢性炎症疾患。慢性炎症疾患之非限制性實例包括：氣喘、德國麻疹關節炎以及慢性自體免疫性疾病如全身紅斑性狼瘡、乾癬、發炎症腸道疾病

(包括克隆氏症(Crohn's disease)以及潰瘍性結腸炎)、多發性硬化症、類風濕性關節炎。

該術語「自體免疫性疾病」包括任何由 IL-12 產生所造成、加劇或媒介之免疫性疾病、不適或症狀。此類免疫性疾病可包括但不限於：類風濕性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、全身型幼年型類風濕性關節炎、乾癱性關節炎、僵直性脊椎炎、胃潰瘍、血清陰性關節炎、骨關節炎、發炎性腸道疾病、潰瘍性結腸炎、全身紅斑性狼瘡、抗磷脂抗體症候群、虹膜睫狀體炎/葡萄膜炎/視神經炎、原因不明性肺纖維化、全身性血管炎/韋格納氏肉芽腫、類肉瘤病、睪丸炎/輸精管結紮回復步驟、過敏性/異位性疾病、氣喘、過敏性鼻炎、濕疹、過敏性接觸皮膚病、過敏性結膜炎、過敏性肺炎、器官移植、器官移植排斥反應、移植物對抗宿主疾病、全身性發炎反應症候群、敗血症、革蘭氏陽性敗血症、革蘭氏陰性敗血症、培養陰性敗血症(culture negative sepsis)、真菌引起之敗血症、嗜中性白血球減少造成的發燒、泌尿道感染敗血症、腦膜炎球菌血症、創傷/出血；出血、燒傷、遊離輻射暴露、急性胰臟炎、成人呼吸困窘症候群、類風濕性關節炎、酒精誘導性肝炎、慢性發炎性病變、類肉瘤病、克隆氏病變、鐮刀形紅血球貧血症、糖尿病、腎臟病變、異位性疾病、過敏性反應、過敏性鼻炎、花粉熱、常年性鼻炎、結膜炎、子宮內膜異位、氣喘、蕁麻疹、全身性過敏性、皮膚炎、惡性貧血、溶血性疾病、血小板減少症、任何器官或組織之移

植排斥反應、腎臟移植排斥反應、心臟移植排斥反應、肝臟移植排斥反應、胰臟移植排斥反應、肺臟移植排斥反應、骨髓移植(BMT)排斥反應、皮膚異體移植排斥反應、軟骨移植排斥反應、骨移植排斥反應、小腸移植排斥反應、胎兒胸腺移植排斥反應、副甲狀腺移植排斥反應、任何器官或組織之異種排斥反應、異體移植排斥反應、抗受體過敏反應、葛雷夫氏症、雷諾氏症、B型胰島素阻抗性糖尿病、氣喘、重症肌無力、抗體媒介之細胞毒性、第 III 型過敏反應、全身紅斑性狼瘡、POEMS 症候群(多發性神經病變、器官腫大、內分泌病變、單株免疫球蛋白增多症以及皮膚病變症)、多發性神經病變、器官腫大、內分泌病變、單株免疫球蛋白增多症以及皮膚病變症、抗磷脂抗體症候群、天疱瘡、硬皮病、混合性結締組織疾病、特發性艾迪生氏症、糖尿病、慢性活動性肝炎、原發性膽道性肝硬化、白斑、血管炎、MI 心臟切開手術後症候群、第 IV 型過敏反應、接觸性皮膚炎、過敏性肺炎、異體移植排斥反應、細胞內病原體所引起之肉芽腫、藥物敏感性、代謝性/特發性、威爾森氏症、血色素沈著症、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症、糖尿病視網膜病變、橋本氏甲狀腺炎、骨質疏鬆症、下視丘-腦下垂體-腎上腺軸向評估、甲狀腺炎、腦脊髓炎、惡病質、纖維囊腫、新生兒慢性肺部疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、家族性噬血症候群、皮膚病、乾癬、禿髮、腎病徵候群、腎炎、腎絲球腎炎、急性腎衰竭、血液透析、尿毒症、毒性、子癇前症、okt3 療法、抗 cd3 療法、細胞激

素療法、化學療法、放射線治療(例如，包括但不限於：虛弱無力、貧血、惡病質等等)、慢性水楊酸中毒等等。參見例如：默克手冊(Merck Manual)，第12至17版，Merk & Company, Rahway, N. J. (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells *et al.*, eds., 第2版, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000)，其全部內容係合併作為參考文獻。

該術語「神經性疾病」包括任何由 IL-12 產生所造成、加劇或媒介之神經性疾病、不適或症狀。此類神經性疾病可包括，但不限於：神經退化性疾病、多發性硬化症、偏頭痛、AIDS 癡呆複合症、髓鞘脫失性疾病如多發性硬化症及急性橫貫性脊髓炎；錐體外及小腦疾病如皮質脊髓損傷；基底核(basal ganglia)疾病或小腦疾病；運動機能亢進性疾病如亨丁頓舞蹈症及老年性舞蹈症；藥物誘發性運動異常如彼等由阻斷多巴胺受體之藥物所誘發者；運動不足症如帕金森氏症；進行性上核麻痺；小腦結構損傷；脊髓小腦退化症如脊髓性運動失調、弗利德來運動失調(Friedreich's ataxia)、小腦皮質退化、多發性系統退化症(Mencel 型、Dejerine-Thomas 型、Shi-Drager 型以及 Machado-Joseph 型)；系統性疾病(雷弗素姆氏病(Refsum's disease)、澱粉 β 脂蛋白症(abetalipoproteinemia)、毛細血管擴張性運動失調症(ataxia telangiectasia)以及粒線體複合系統疾病)；髓鞘脫失性疾病如多發性硬化症及急性橫貫性脊髓炎；以及

運動單元失調如神經性肌肉萎縮(前角細胞退化如肌萎縮性脊髓側索硬化症、嬰兒脊髓性肌肉萎縮症、幼年脊髓性肌肉萎縮症);阿茲海默症;中年唐氏症候群;泛發性路易體疾病;路易體型老年癡呆症;韋尼克-科爾薩科夫症候群(Wernicke Korsakoff syndrome);慢性酒精中毒;庫賈氏症(Creutzfeldt-Jakob Disease)、亞急性硬化性全腦炎、荷裏羅登-斯帕茲症(Hallerrorden-Spatz disease);以及拳擊性失智症等等。該方法可選擇性包含下述步驟:將有效量之組成物或包含至少一種TNF抗體或指定蛋白或變化體之醫藥組成物投與至需要此類調節、治療或醫療之細胞、組織、器官或病患。參見例如:Merck Manual, 16, Edition, Merk & Company, Rahway, N. J.(1992)。

該術語「骨質流失疾病」係包括任何由IL-12產生所造成、加劇或媒介之骨質流失疾病、不適或症狀,例如:牙周病、非惡性骨骼疾病(例如,骨質疏鬆症、骨骼之柏哲德氏症(Paget's disease)、成骨不全症、纖維性再生不良以及原發性副甲狀腺機能亢進症)、動情激素匱乏、發炎性骨質流失、骨惡性腫瘤、關節炎、骨石化症以及某些癌症相關疾病(例如,惡性高血鈣症(HCM)、多發性骨髓瘤之溶骨性骨骼病竈以及乳癌及其他轉移癌之溶骨性骨轉移)。

於此等定義相重疊之實例中,可將該疾病、症狀或不適視為上列任一類與IL-12產生相關之疾病的成員。與IL-12產生相關的特定疾病包括:類風濕性關節炎、敗血症、克隆氏症、多發性硬化症、氣喘或胰島素依賴型糖尿

病。

當該治療劑包括由上述分析法所鑑定之調節化合物時，則可使用於投藥配方或方法；附加之適當配方及投藥途徑可選自下文中所述者。此外，本發明之治療劑亦可與任何已知可治療本發明之疾病或不適之藥物組合投藥。

已知有各種投與系統可用於投與本發明之治療劑，例如：包覆於微脂粒、微粒子以及微膠囊中；利用可表現該治療劑之細胞；利用受體所媒介之胞飲作用（例如，Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432）；將治療劑核酸構築為反轉錄病毒或其他載體的一部份等等。送入之方法包括但不限於：皮內、肌肉內、腹腔內、靜脈內、皮下、鼻內、硬腦脊膜外以及口服途徑。化合物可經任何適當途徑投藥，例如：輸注、濃注、通過上皮或黏膜與皮膚外膜（例如，經口、直腸及小腸黏膜等等），且可與其他生物活性製劑共同投藥。投藥可為全身性或局部性。此外，可預期經由任何適當途徑將本發明醫藥組成物送入中樞神經系統，該途徑包括：腦室內及脊髓內注射；腦室內注射可藉由腦室內導管協助，例如附接於儲液槽如歐麻亞半球狀水容器（Ommaya reservoir）。肺部投藥亦可利用例如：使用吸入器或噴霧器，以及氣霧化試劑之配方。

於較佳具體實施例中，該治療劑係調配作為口服投藥。此類劑型包括錠劑（經包覆與未經包覆）、膠囊、硬明膠膠囊、軟明膠膠囊、口含錠、糖衣錠、分散劑、懸浮劑、溶液等等，包括該項技藝中習知之持續性釋放配方。參見

例如：Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 1985, Ansel, H. C., Lea and Febiger, Philadelphia, PA；Remington's Pharmaceutical Sciences, 1995, Mack Publ. Co., Easton, PA。因為錠劑與膠囊易於投藥，故其為較佳者並具有最有利之口服劑量單位型，而在此實例中係使用固體醫藥賦形劑。視需要，可使用標準水溶液或非水溶液技術包覆錠劑或片劑或膠囊。

於特定具體實施例中，可預期將本發明醫藥組成物局部投藥至需治療之區域。該局部投藥可藉由下述方法達成，例如(但非受限於)：於手術期間局部輸液、於手術後經由下列方式與癒傷敷料同時施用於局部，例如：經注射、經導管方式、經栓劑方式或經植入方式，而該植入物為多孔性、非多孔性或凝膠材料，包括膜類如矽橡膠膜類或纖維類。於一具體實施例中，可於惡性腫瘤或瘤性組織或癌前期組織之位置(或該位置前)經由直接注射投藥。

於另一具體實施例中，該治療劑可於小泡(vesicle)中運送，尤其係於微脂粒中(Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treat *et al.*, 1989, In: Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler, eds., Liss, New York, pp. 353-365; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; 通常參見上述出處)。

又於另一具體實施例中，該治療劑可經由控制釋放系統傳遞。於一具體實施例中，可使用泵(上述之 Langer,

Supra ; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 : 201-240 ; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88 : 507-516 ; Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321 : 574-579) 。於另一具體實施例中，可使用聚合材料(Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball, eds., Wiley, New York, 1984 ; Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 : 61 ; Levy *et al.*, 1985, Science 228 : 190-192 ; During *et al.*, 1989, Ann. Neural. 25 : 351-356 ; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71 : 858-836) 。又於另一具體實施例中，控制釋放系統可置於治療標的之鄰近處，亦即腦，因此僅需要全身劑量之小部份(例如，Goodson, 1984, In : Medical Applications of Controlled Release, supra, Vol. 2, pp. 115-138) 。其他控制釋放系統係詳述於 Langer 所著之回顧文章中(1990, Science 249 : 1527-1533) 。

本發明亦提供醫藥組成物。此組成物包括醫療有效劑量之治療劑以及醫藥上可接受之載劑。於特定具體實施例中，該術語「醫藥上可接受」係指經美國聯邦政府管理局或州政府批准或列於美國藥典或其他常見經認可之藥典中可使用於動物，且更特定言之為人類者。該術語「載劑」係指稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑，而治療劑係與此等載

劑共同投藥。此等醫藥載劑可為無菌液體如水或油，係包括彼等來自石油、動物、植物或合成來源者，包括但非受限於：花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等等。當該醫藥組成物為經口投藥時，水為較佳載劑。當該醫藥組成物為靜脈內投藥時，生理食鹽水及葡萄糖水溶液為較佳載劑。較佳係使用生理食鹽水溶液及葡萄糖溶液及甘油溶液作為可注射溶液之液體載劑。適當之醫藥賦形劑包括：澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、米、麵粉、白堊、矽凝膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等等。該組成物，視需要亦可含有較少量濕潤劑或乳化劑或 pH 緩衝劑。此等組成物可呈下列形式：溶液、懸浮液、乳狀液、錠劑、藥丸、膠囊、粉末、持續性釋放調配物等等。該組成物可經調配為具有傳統黏結劑及載劑如三酸甘油脂之栓劑。口服調配物可包含標準載劑如醫藥等級甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等等。適當醫藥載劑之範例係敘述於 E. W. Martin 所著之 “Remington’s Pharmaceutical Sciences” 中。此等組合物係包含醫療有效量之該治療劑（較佳者為經純化之形式）以及適量之載劑，以便於提供適於投藥至病患之形式。該配方應適合於投藥模式。

於較佳具體實施例中，該組合物係根據例行步驟調配為適於經靜脈內投藥至人類之醫藥組成物。典型地，靜脈內投藥之組成物為含於無菌等張緩衝劑水溶液中之溶液。

若需要，該組成物亦可包含助溶劑及局部麻醉劑如利多卡因(lidocaine)以減輕注射部位之疼痛。通常係將組成分分開施用或共同混合於單一劑型施用，例如，可為裝於標示有活性製劑量之密封容器如安瓿或藥袋中之乾燥凍乾粉末或無水濃縮物。若該組成物為經輸液投藥，則可調配於含有無菌之醫藥等級水或生理食鹽水之輸液瓶。若該組成物為經注射投藥，則可提供注射用無菌水或生理食鹽水之安瓿，以使組成分可於投藥前混合。

本發明之治療劑可調配為中性或鹽形式。醫藥上可接受之鹽係包括彼等與遊離羧基形成者，如彼等衍生自鹽酸、磷酸、醋酸、草酸、酒石酸等等者；彼等與遊離胺基形成者，如彼等衍生自異丙胺、三乙胺、2-乙基胺基乙醇、組胺酸、普卡因(procaine)等等者；以及彼等衍生自鈉、鉀、銨、鈣及氫氧化鐵等等者。

較佳醫藥組成物及劑型係包括本發明之治療劑或其醫藥上可接受之前藥、鹽、溶劑合物或籠合物(clathrate)，且可視需要與一種或一種以上附加之活性藥劑組合。

本發明治療劑之可有效治療特定疾病或症狀的量係依據該疾病或症狀之性質而定，且可經由標準臨床技術測定之。此外，可視需要使用活體外分析法以協助確認最佳劑量範圍。該使用於調配物之精確劑量亦依據投藥途徑以及該疾病或不適之嚴重程度而定，且應取決於行醫者之判斷及各病患之情況。然而，靜脈內投藥之適當劑量範圍通常為每公斤體重大約 1 至 50 毫克活性化合物。鼻內投藥之適

當劑量範圍通常為大約 0.1 mg/kg 體重至 50 mg/kg 體重。有效劑量可由得自活體外或動物模式試驗系統之劑量對反應曲線推算出。

栓劑通常含有範圍為 0.5 至 10 重量%之活性成分；口服配方較佳含有 10%至 95%之活性成分。

小分子之例示劑量係包括試驗對象或樣本每公斤體重中小分子之毫克或微克量(例如，大約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 、大約 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、或大約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大約 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$)。

就本發明所包含之抗體、蛋白、多胜肽、胜肽及融合蛋白而言，該投藥至病患之劑量典型為病患體重之 $0.0001 \text{ mg}/\text{kg}$ 至 $100 \text{ mg}/\text{kg}$ 。較佳者，該投藥至病患之劑量係界於病患體重之下述範圍之間： $0.0001 \text{ mg}/\text{kg}$ 與 $20 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $0.0001 \text{ mg}/\text{kg}$ 與 $10 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $0.0001 \text{ mg}/\text{kg}$ 與 $5 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 0.0001 與 $2 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $0.0001 \text{ mg}/\text{kg}$ 與 $1 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $0.0001 \text{ mg}/\text{kg}$ 與 $0.75 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $0.0001 \text{ mg}/\text{kg}$ 與 $0.5 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $0.0001 \text{ mg}/\text{kg}$ 至 $0.25 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 0.0001 至 $0.15 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 0.0001 至 $0.10 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 0.001 至 $0.5 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 0.01 至 $0.25 \text{ mg}/\text{kg}$ 或 0.01 至 $0.10 \text{ mg}/\text{kg}$ 。大致而言，由於對外來多胜肽之免疫反應，使人類抗體較來自其他物種之抗體於人體中具有較長半生期。因此，往往使用較低劑量之人類抗體以及較低之投藥頻率。再者，本發明抗體或其片段之投藥劑量及頻率可經由下述方式降低：藉由進行修飾作用如脂化作用以增加抗體之攝入及組織穿透力。

此外，於某些具體實施例中，由於 IL-12 之產生可於較低藥物濃度下受到抑制（其係抑制 IL-6 或 IFN- γ 產生所需），故適當之劑量為包括彼等可選擇性抑制 IL-12 產生但卻不抑制其他細胞激素者。

本發明治療劑亦可由該項技藝中具有通常知識者所熟知之控制釋放方法或傳輸裝置投藥，例如彼等揭露於美國專利第 3,845,770 號案；第 3,916,899 號案；第 3,536,809 號案；第 3,598,123 號案；以及第 4,008,719 號案、第 5,674,533 號案、第 5,059,595 號案、第 5,519,767 號案、第 5,120,548 號案、第 5,073,543 號案、第 5,639,476 號案、第 5,354,556 號案及 5,733,566 號案者。這些控制釋放組成物可用於提供本文所使用一種或一種以上活性成分之緩慢或經控制之釋放，該控制釋放組成物係例如，羥丙基甲基纖維素、其他聚合物基質、凝膠、滲透性膜、滲透系統、多層被覆、微粒子、微脂粒、微顆粒等等，或者可使用其組合以於改變調配比例時提供所預期之釋放態型。該項技藝中具有通常知識者可輕易選擇所知之適當控制釋放配方以用於本發明之醫藥組成物。

所有控制釋放醫藥產物均具有透過其非控制互補物以達成改善藥物治療之共同目標。理想上，該用於藥物治療之最佳設計控制釋放製劑係使用最小量之藥物物質以於最短時間治癒或控制病症。控制釋放調配物之優點可包括：延長藥物活性、降低劑量頻率及/或提高病患之配合。

大多數控制釋放調配物係設計為於起始時釋放可立即

產生所預期治療效果之製劑量，並逐漸地且持續地釋放其他量之治療劑以使適當程度之治療作用維持一段延長時間。為了維持體內治療劑之固定濃度，則該治療劑必須以可補足治療劑自身體代謝及排泄的量之速度自組成物釋放。該治療劑之控制釋放可由各種誘導物刺激之，例如：pH、溫度、酵素、水或其他生理條件或化合物。於本發明中協助活性成分控制釋放之此類控制釋放成分係包括但不限於：聚合物、聚合物基質、凝膠、滲透性膜、微脂粒、微粒體等等、或其組合。

本發明亦提供包括一種或一種以上之填滿一種或一種以上本發明醫藥組成物之組成分的容器之醫藥包或套組。視需要與此類容器相關之標示可為由管理醫藥或生物產品之製造、使用或販售的政府行政機構所規定之形式，該標示反應由政府行政機構批准可用於人類投藥之製造、使用或販售。

用於治療或預防需要此等治療之病患中與 IL-12 產生有關之疾病或不適、或彼等與 c-Rel 細胞內定位相關之疾病或不適、或自體免疫疾病或不適之方法，復可包括：將一種或一種以上有效量之其他治療劑投藥至經投與本發明化合物之病患。此類治療劑可包括其他治療劑如彼等習用於預防或治療與 IL-12 產生有關之疾病、或 c-Rel 細胞內定位異常或其症狀者。另一種治療劑可為類固醇或非類固醇抗發炎劑。可用之非類固醇抗發炎劑係包括但不限於：阿斯匹靈 (aspirin)、布洛芬 (ibuprofen)、雙氯芬酸

(diclofenac)、萘普生(naproxen)、苯惡洛芬
(benoxaprofen)、氟比洛芬(flurbiprofen)、非諾洛芬
(fenoprofen)、氟布芬(flubufen)、酮洛芬(ketoprofen)、
引朵洛芬(indoprofen)、皮若洛芬(piroprofen)、卡洛芬
(carprofen)、奧沙普嗪(oxaprozin)、普莫洛芬
(pramoprofen)、木若洛芬(muroprofen)、三惡洛芬
(trioxaprofen)、舒洛芬(suprofen)、胺洛芬
(aminoprofen)、噻洛芬酸(tiaprofenic acid)、氟洛芬
(fluprofen)、布氯酸(bucloxic acid)、引朵美辛
(indomethacin)、舒林酸(sulindac)、托美丁(tolmetin)、
佐美酸(zomepirac)、硫平酸(tiopinac)、齊多美辛
(zidometacin)、阿西美辛(acemetacin)、芬替酸
(fentiazac)、環氯節酸(clidanac)、罅平酸(oxpinac)、
甲芬那酸(mefenamic acid)、甲氯芬那酸(meclofenamic
acid)、氟芬那酸(flufenamic acid)、尼氟酸(niflumic
acid)、托芬那酸(tolfenamic acid)、二氟瑞柳
(diflurisal)、氟苯柳(flufenisal)、吡羅昔康
(piroxicam)、舒多昔康(sudoxicam)、伊索昔康
(isoxicam)；水楊酸衍生物包括阿斯匹靈、水楊酸鈉、三
水楊酸膽鹼鎂(choline magnesium trisalicylate)、雙水
楊酸酯(salsalate)(水楊酸水楊酸酯)、二氟尼柳
(diflunisal)、柳基柳酸、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)
及歐塞拉嗪(olsalazin)；對胺基酚衍生物包括乙醯胺基酚
(acetaminophen)及非那西汀(phenacetin)；引哚及節乙酸

類包括引朵美辛、舒林酸(sulindac)及依託度酸(etodolac)；雜芳基乙酸類包括托美丁(tolmetin)、雙氯芬酸(diclofenac)及酮咯酸(ketorolac)；鄰氨基苯甲酸類(fenamates)包括甲芬那酸(mefenamic acid)及甲氯芬那酸(medofenamic acid)；烯醇酸類(enolic acids)包括歐昔康(oxicams)(吡羅昔康(piroxicam)、替諾昔康(tenoxicam))及吡唑烷二酮類(苯丁唑酮(phenylbutazone)、氧苯賽松(oxyphenthartazone)；及烷酮類包括萘丁美酮(nabumetone)以及其醫藥上可接受之鹽及其混合物。NSAIDs之更詳盡說明請參見：*Paul A. Insel, Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents and Drugs Employed in the Treatment of Gout, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 617-57 (Perry B. Molinohoff and Raymond W. Ruddon eds., 9th ed 1996)以及 Glen R. Hanson, *Analgesic, Antipyretic and Anti-Inflammatory Drugs in Remington: The Science and Practice of Pharmacy Vol II* 1196-1221 (A. R. Gennaro ed. 19th ed. 1995)，其全部內容將於此合併作為參考文獻。

其他預防性及治療性製劑之實例包括但不限於：免疫調節劑、抗發炎劑(例如腎上腺皮質素、皮質類固醇(例如，倍氯米松(beclomethasone)、布地奈德(budesonide)、氟尼縮松(flunisolide)、氟替卡松(fluticasone)、曲安奈德(triamcinolone)、甲潑尼龍(methylprednisolone)、潑

尼松龍(prednisolone)、潑尼松(prednisone)、氫化可體松(hydrocortisone)、葡萄糖皮質素、類固醇、非類固醇抗發炎藥物(例如,阿斯匹靈、布洛芬、雙氯芬酸及 COX-2 抑制劑)、以及白三烯拮抗劑(例如,孟魯司特(montelukast)、甲基黃嘌呤(methyl xanthines)、紮魯司特(zafirlukast)及齊留通(zileuton))、 β 2-促效劑(例如,艾丁胺醇(albuterol)、必特洛(biterol)、菲諾特洛(fenoterol)、艾索賽瑞(isoetharie)、奧西那林(metaproterenol)、吡布特羅(pirbuterol)、沙丁胺醇(salbutamol)、特布他林福莫特羅(terbutalin formoterol)、沙美特羅(salmeterol)及沙丁胺醇特布他林(salbutamol terbutaline))、抗膽鹼藥劑(例如,異丙托溴銨(ipratropium bromide)及氧托溴銨(oxitrapium bromide))、柳氮磺吡啶(sulphasalazine)、青黴胺(penicillamine)、氨苯砒(dapsone)、抗組織胺、抗瘧劑(例如,羥基氯喹(hydroxychloroquine))、抗病毒劑以及抗生素(例如,放線菌素(dactinomycin)(以前的放線菌素(actinomycin))、平陽黴素(bleomycin)、紅黴素(erythromycin)、青黴素(penicillin)、普卡黴素(mithramycin)及安曲黴素(anthramycin, AMC))。

於組合治療之處理中,係使用習知方法將本發明化合物與其他藥劑共同投藥至哺乳動物(例如:人類,男性或女性)。該製劑可以單一劑型或以分開劑型投與。其他治療劑之有效量為該項技藝中具有通常知識者所熟知。然而,該

項技藝中具有通常知識者係有能力決定其他治療劑之最佳有效量範圍。於本發明之一具體實施例中，若將另一治療劑投藥至動物，則本發明治療劑之有效量係少於其於未投與其他治療劑時之有效量。於另一具體實施例中，該習知藥劑之有效量係少於其於未投與本發明化合物時之有效量。於此方法，可將任一藥劑中與高劑量有關的非預期副作用降至最低。其他潛在之優點(包括但不限於：改善攝取劑量及/或藥物成本)係為該項技藝中具有通常知識者所顯見。

於各具體實施例中，該製劑(例如，預防性或治療性製劑)係於下列時間間隔投藥：間隔少於5分鐘、間隔少於30分鐘、間隔1小時、間隔大約1小時、間隔大約1小時至大約2小時、間隔大約2小時至大約3小時、間隔大約3小時至大約4小時、間隔大約4小時至大約5小時、間隔大約5小時至大約6小時、間隔大約6小時至大約7小時、間隔大約7小時至大約8小時、間隔大約8小時至大約9小時、間隔大約9小時至大約10小時、間隔大約10小時至大約11小時、間隔大約11小時至大約12小時、間隔大約12小時至18小時、間隔18小時至24小時、間隔24小時至36小時、間隔36小時至48小時、間隔48小時至52小時、間隔52小時至60小時、間隔60小時至72小時、間隔72小時至84小時、間隔84小時至96小時、或間隔96小時至120小時。於較佳具體實施例中，係將兩種或兩種以上之治療劑投藥至相同就診病患。

於某些具體實施例中，係將一種或一種以上之本發明化合物以及一種或一種以上之其他治療劑(例如，預防性或治療性製劑)經週期性投藥。週期療法包括：先投與第一治療劑(例如，第一預防性或治療性製劑)一段時間，接著投與第二治療劑(例如，第二預防性或治療性製劑)一段時間，且視需要，再投與第三治療劑(例如，預防性或治療性製劑)一段時間等等，並重複此順序投藥，亦即，該週期係為了降低對其中一種治療劑之抗性的發展，以避免或降低其中一種治療劑之副作用及/或改善治療劑之功效。

於某些具體實施例中，可重複投與本發明之相同化合物，且該化合物之投與可間隔至少1天、2天、3天、5天、10天、15天、30天、45天、2個月、75天、3個月或至少6個月。於其他具體實施例中，除了本發明化合物外，亦可重複投與相同之治療劑(例如，預防性或治療性製劑)，且該製劑之投與可間隔至少1天、2天、3天、5天、10天、15天、30天、45天、2個月、75天、3個月或至少6個月。

於該項技藝中具有通常知識者所熟知之任何免疫調節劑皆可使用於共同投藥法以及本發明之組成物中。免疫調節劑可影響試驗對象體內一種或多種或所有類型之免疫反應。免疫反應類型包括但不限於：發炎反應、補體連鎖反應、白血球及淋巴細胞之分化、增殖、及/或受動器(effector)功能、單核球及/或嗜鹼細胞總數、以及免疫系統細胞間之細胞聯繫。於本發明之某些具體實施例中，免

疫調節劑係調節一種類型之免疫反應。於其他具體實施例中，免疫調節劑係調節一種以上類型之免疫反應。於較佳具體實施例中，將免疫調節劑投藥至試驗對象係抑制或降低試驗對象之一種或一種以上類型的免疫反應能力。於本發明之特定具體實施例中，該免疫調節劑係抑制或抑止試驗對象體內之免疫反應。根據本發明，免疫調節劑並非免疫專一地結合於 c-Rel 之抗體。於某些具體實施例中，免疫調節劑不為抗發炎劑。於某些具體實施例中，免疫調節劑不為抗血管生成劑。於某些具體實施例中，免疫調節劑不為整合素拮抗劑 (integrin antagonist)。於某些具體實施例中，免疫調節劑不為 TNF- α 拮抗劑。於某些具體實施例中，免疫調節劑為化學治療劑。於某些具體實施例中，免疫調節劑不為化學治療劑。

免疫調節劑之實例包括，但不限於：蛋白質製劑如細胞激素、模擬胜肽及抗體（例如，人類、擬人化、嵌合、單株、多株、Fvs、ScFvs、Fab 或 F(ab)₂ 片段或抗原決定位結合片段）、核酸分子（例如，反義核酸分子或三螺旋鍊）、小分子、有機化合物以及無機化合物。特定言之，免疫調節劑包括，但不限於：甲氨蝶呤 (methotrexate)、來氟米特 (leflunomide)、環磷醯胺、(cytoxan)、依木蘭 (immuran)、環孢靈 (cyclosporine A)、二甲胺四環素 (minocyclin)、硫唑嘌呤 (azathioprine)、抗生素（例如，FK506 他克莫司 (tacrolimus)、甲潑尼龍 (MP)、皮質類固醇、類固醇、黴酚酸酯嗎啉乙酯 (mycophenolate

mofetil)、雷帕黴素(rapamycin)(西羅莫司(sirosimus))、咪唑立賓(mizoribine)、脫氧司加林(deoxyspergualin)、布喹那(brequinar)、丙二腈醯胺類(例如,來氟那米特(lefunamide))、T細胞受體調節劑、細胞激素受體調節劑以及調節肥大細胞調節劑。

T細胞受體調節劑之實例包括,但不限於:抗T細胞受體抗體(例如:抗-CD4抗體(例如:cM-T412(Boeringer)、IDEC-CE9.1®(IDEC及SKB)、mAB4162W94、Orthoclone及OKTcdr4a(Janssen-Cilag))、抗-CD3抗體(例如:Nuvion(Product Design Labs)、OKT3(Johnson & Johnson)或利妥昔(Rituxan)(IDEC))、抗-CD5抗體(例如:抗-CD5蓖麻毒蛋白連結之免疫交聯物)、抗-CD7抗體(例如:CHH-380(Novartis))、抗-CD8抗體、抗-CD40配位子單株抗體(例如:IDEC-131(IDEC))、抗-CD52抗體(例如:CAMPATH 1H (Ilex))、抗-CD2抗體(例如:MEDI-507(MedImmune, Inc., 國際公開號 WO 02/098370 及 WO 02/069904))、抗-CD11a抗體(例如:灑耐琳(Xanelim)(Genentech))以及抗-B7抗體(例如:IDEC-114(IDEC))、CTLA4-免疫球蛋白以及LFA-3TIP (Biogen, 國際公開號 WO 93/08656 及美國專利第 6,162,432 號案)。

細胞激素受體調節劑之實例包括,但不限於:可溶性細胞激素受體(例如:TNF- α 受體之胞外功能區或其片段、IL-1 β 受體之胞外功能區或其片段以及IL-6受體之胞外功能區或其片段)、細胞激素或其片段(例如:介白素

IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-13、IL-15、IL-23、TNF- α 、TNF- β 、干擾素(IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 及GM-CSF)、抗-細胞激素受體抗體(例如：抗-IFN受體抗體、抗-IL-2受體抗體(例如：賽尼脈(Zenapax)(Protein Design Labs)、抗-IL-3受體抗體、抗-IL-4受體抗體、抗-IL-6受體抗體、抗-IL10受體抗體、抗-IL12受體抗體、抗-IL13受體抗體、抗-IL15受體抗體以及抗-IL23受體抗體)、抗細胞激素抗體。

於特定具體實施例中，細胞激素受體調節劑為IL-3、IL-4、IL-10、或其片段。於另一具體實施例中，細胞激素受體調節劑為TNF- α 受體之胞外功能區或其片段。於某些具體實施例中，細胞激素受體調節劑不為TNF- α 拮抗劑。

於一具體實施例中，細胞激素受體調節劑為肥大細胞調節劑。於另一具體實施例中，細胞激素受體調節劑不為肥大細胞調節劑。肥大細胞調節劑之實例包括，但不限於：幹細胞因數(c-kit受體配位子)抑制劑(例如：mAb 7H6、mAb 8H7a、pAb 1337、FK506、CsA、地塞米松(dexamethasone)及氟康昔諾耐得(fluconcinonide))、c-kit受體抑制劑(例如：STI571(過去已知為CGP 57148B))、肥大細胞蛋白酶抑制劑(例如：GW-45、GW-58、渥曼青黴素(wortmannin)、LY 294002、鈣磷酸蛋白C(calphostin C)、細胞鬆弛素D(cytochalasin D)、染料木素(genistein)、KT5926、史陶若普因(staurosporine)以及乳鐵蛋白)、鬆弛素("RLX")、IgE拮抗劑(例如：抗體 rhuMAb-E25 奧馬佐(omalizumab)、

HMK-12 及 6HD5、以及 mAB Hu-901)、IL-3 拮抗劑、IL-4 拮抗劑、IL-10 拮抗劑、以及 TGF- β 。

可選擇免疫調節劑以干擾 T 輔助細胞亞群 (TH1 或 TH2) 與 B 細胞間之交互作用，進而抑制中和抗體形成。影響或阻斷該由 TH (T 輔助) 細胞活化 B 細胞所需之交互作用並藉以阻斷中性抗體產生之抗體係使用為本發明方法中之免疫調節劑。例如，T 細胞所媒介之 B 細胞活化作用係需要透過某些交互作用而發生 (Durie et al., Immunol. Today, 15(9): 406-410(1994))，例如使 T 輔助細胞上之 CD40 配位子結合至 B 細胞上之 CD40，以及使 T 細胞上之 CD28 及/或 CTLA4 配位子結合至 B 細胞上之 B7 抗原。若無此兩種交互作用，則 B 細胞將無法受到活化以誘導中性抗體產生。

CD40 配位子 (CD40L)-CD40 交互作用為阻斷免疫反應所預期之處，因為其除了於 T 輔助細胞活化作用及功能上均具有廣泛活性外，其訊息傳遞路徑亦不冗餘 (absence of redundancy)。因此，於本發明之特定具體實施例中，係於投與本發明之一種或一種以上化合物以及免疫調節劑時，將 CD40L 與 CD40 之交互作用短暫阻斷。此阻斷作用可藉由使用製劑處理而達到，該製劑係會阻斷 TH 細胞上之 CD40 配位子並影響 T 輔助細胞上之 CD40 配位子與 B 細胞上之 CD40 抗原的正常結合。根據本發明方法，可選擇並使用抗 CD40 配位子之抗體 (anti-CD40L) (購自 Bristol-Myers Squibb Co; 參見例如於 1993 年 8 月 18 日公開之歐洲專利公告 555,880) 或可溶性 CD40 分子作為免疫調節劑。

可選擇免疫調節劑以抑制 TH1 細胞與毒殺性 T 淋巴細胞 (“CTL”) 間之交互作用，進而降低 CTL 所媒介之毒殺作用。可選擇免疫調節劑以改變 (例如，抑制或抑止) CD4+ 及 / 或 CD8+ T 細胞之增殖、分化、活性及 / 或功能。例如，可使用對 T 細胞具有專一性之抗體作為免疫調節劑以減少或改變 CD4+ 及 / 或 CD8+ T 細胞之增殖、分化、活性及 / 或功能。

於本發明之一具體實施例中，係根據本發明方法將可降低或減少 T 細胞 (較佳為記憶型 T 細胞) 之免疫調節劑投藥至可能患有或已患有下列病症之試驗對象：與 IL-9 多胜肽之異常表現及 / 或活性有關或以此為特徵之疾病或不適、與 c-Rel 之異常細胞內定位有關或以此為特徵之疾病或不適、自體免疫疾病、炎症疾病、增殖性疾病、或感染 (較佳者為呼吸道感染)。參見例如：美國專利第 4,658,019 號案。於本發明之另一具體實施例中，係根據本發明方法將可使 CD8+T 細胞去活化 (inactivate) 之免疫調節劑投藥至可能患有或已患有下列病症之試驗對象：與 c-Rel 之異常細胞內定位有關或以此為特徵之疾病或不適、自體免疫疾病、炎症疾病、增殖性疾病、或感染 (較佳為呼吸道感染)。於特定具體實施例中，係使用抗-CD8 抗體以降低或減少 CD8+T 細胞。

於另一具體實施例中，係根據本發明方法將可降低或抑制 CD4+ T 輔助細胞之 TH0、TH1、及 / 或 TH2 亞型之一種或一種以上生物活性 (例如，分化、增殖、及 / 或受動器功

能)的免疫調節劑投藥至可能患有或已患有下列病症之試驗對象：與 c-Rel 細胞內定位之異常表現有關或以 c-Rel 之異常細胞內定位為特徵之疾病或不適、自體免疫疾病、炎症疾病、增殖性疾病、或感染(較佳為呼吸道感染)。此類免疫調節劑之一實例為 IL-4。IL-4 於消耗 TH1 細胞功能下提高 TH2 細胞之抗原專一性活性(參見例如：Yokota et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83: 5894-5898; 以及美國專利第 5,017,691 號案)。影響 T 輔助細胞(尤其 TH1 及/或 TH2 細胞)之生物活性(例如：增殖、分化、及/或受動器功能)的免疫調節劑之其他實例包括但不限於：IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-15 及干擾素(IFN)- γ 。

於另一具體實施例中，係根據本發明方法將可避免抗原呈現之免疫調節劑(該免疫調節劑為細胞激素)投藥至可能患有或已患有下列病症之試驗對象：與 c-Rel 之異常細胞內定位有關或以此為特徵之疾病或不適、自體免疫疾病、炎症疾病、增殖性疾病、或感染(較佳為呼吸道感染)。於特定具體實施例中，用於本發明該方法之免疫調節劑為 IL-10。IL-10 亦會降低或抑制巨噬細胞作用，該作用係涉及細菌性排除作用(bacterial elimination)。

可選擇免疫調節劑以降低或抑制肥大細胞之活化作
用、去顆粒作用、增殖作用、及/或浸潤作用。於某些具體實施例中，該會影響肥大細胞與肥大細胞活化劑間之交互作用的免疫調節劑係包括，但不限於：幹細胞因數(c-kit

配位子)、IgE、IL-4、環境刺激物、及致病因數。於特定具體實施例中，該免疫調節劑會降低或抑制肥大細胞對環境刺激物之反應，該環境刺激物係如，但不限於：花粉、塵蟎、香煙煙霧、及/或寵物氣味。於另一具體實施例中，該免疫調節劑會降低或抑制肥大細胞對致病因數如：病毒、細菌以及真菌之反應。可降低或抑制肥大細胞之活化作用、去顆粒作用、增殖作用、及/或浸潤作用之肥大細胞調節劑包括，但不限於：幹細胞因數(c-kit受體配位子)抑制劑(例如：mAb 7H6、mAb 8H7a、及 pAb 1337)(參見 Mendiaz *et al.*, 1996, Eur J Biochem 293(3): 842-849)、FK506 及 CsA (Ito *et al.*, 1999, Arch Dermatol Res 291(5): 275-283)、地塞米松(dexamethasone)及氟康昔諾耐得(fluconcinonide)(參見 Finooto *et al.*, J Clin Invest 1997 99(7): 1721-1728))、c-kit受體抑制劑(例如：STI 571(過去已知為 CGP 57148B)(參見 Heinrich *et al.*, 2000 Blood 96(3): 925-932))、肥大細胞蛋白酶抑制劑(例如：GW-45 及 GW-58(參見 Temkin *et al.*, 2002 J Immunol 169(5): 2662-2669))、渥曼青黴素(wortmannin)、LY 294002、鈣磷酸蛋白 C(calphostin C)、細胞鬆弛素 D (cytochalasin D)(參見 Vosseller *et al.*, 1997, Mol Biol Cell 1997: 909-922)、染料木素(genistein)、KT5926、史陶若普因(staurosproine)(參見 Nagai *et al.*, 1995, Biochem Biophys Res Commun 208(2): 576-581)、以及乳鐵蛋白(參見 He *et al.*, 2003

Biochem Pharmacol 65(6) : 1007-1015))、鬆弛素(“RLX”) (參見 Bani *et al.*, 2002 Int Immunopharmacol 2(8) : 1195-1294)、IgE 拮抗劑(例如：抗體 rhuMAb-E25 奧馬佐 (omalizumab)(參見 Finn *et al.*, 2003 J Allergy Clin Immuno 111(2) : 278-284 ; Corren *et al.*, 2003 J Allergy Clin Immuno 111(1) : 87-90 ; Busse and Neaville, 2001 Curr Opin Allergy Clin Immuno 1(1) : 105-108 ; 以及 Tang and Powell, 2001, Eur J Pediatr 160(12) : 696-704)、HMK-12 及 6HD5(參見 Miyajima *et al.*, 2002 Int Arch Allergy Immuno 128(1) : 24-32)、以及 mAB Hu-901(參見 van Neerven *et al.*, 2001 Int Arch Allergy Immuno 124(1-3) : 400)、IL-3 拮抗劑、IL-4 拮抗劑、IL-10 拮抗劑、以及 TGF- β (參見 Metcalfe *et al.*, 1995, Exp Dermatol 4(4 Pt 2) : 227-230)。

於較佳具體實施例中，經利用作為免疫調節劑之蛋白、多胜肽或胜肽(包括抗體)係得自與該蛋白、多胜肽或胜肽接受者相同之物種，以便降低對彼等蛋白、多胜肽或胜肽產生免疫反應的可能性。於另一較佳具體實施例中，當試驗對象為人類時，該利用作為免疫調節劑之蛋白、多胜肽或胜肽係人類的或擬人化的。

根據本發明之一具體實施例，係於本發明之可改變 c-Rel 細胞內定位但不顯著改變 NF κ B 表現及/或 I κ B 數量之化合物投藥之前、之後或同時，將一種或一種以上之免疫調節劑投藥至可能患有或已患有下列病症之試驗對

象：與 c-Rel 之異常細胞內定位有關或以此為特徵之疾病或不適、自體免疫疾病、炎症疾病、增殖性疾病、或感染（較佳為呼吸道感染）。較佳者，當該項技藝中具有通常知識者認為需要時，可將一種或一種以上之免疫調節劑與本發明之可改變 c-Rel 細胞內定位但不顯著改變 NF κ B 表現及 / 或 I κ B 數量之化合物組合投藥至可能患有或已患有下列病症之試驗對象：與 c-Rel 之異常細胞內定位有關或以此為特徵之疾病或不適、自體免疫疾病、炎症疾病、增殖性疾病、或感染（較佳為呼吸道感染），以降低或抑制一種或一種以上類型之免疫反應。該項技藝中具有通常知識者所熟知之任何技術皆可使用於測量特定試驗對象體內之一種或一種以上類型的免疫反應，並藉此決定何時需要將免疫調節劑投藥至該試驗對象。於較佳具體實施例中，試驗對象體內之淋巴細胞平均絕對計數係維持在大約 500 cells/mm³，較佳為 600 cells/mm³、650 cells/mm³、700 cells/mm³、750 cells/mm³、800 cells/mm³、900 cells/mm³、1000 cells/mm³、1100 cells/mm³ 或 1200 cells/mm³。於另一較佳具體實施例中，若該試驗對象之淋巴細胞絕對計數為下列各值時，則不投與本發明化合物：500 cells/mm³ 或更低、550 cells/mm³ 或更低、600 cells/mm³ 或更低、650 cells/mm³ 或更低、700 cells/mm³ 或更低、750 cells/mm³ 或更低、或者 800 cells/mm³ 或更低。

於較佳具體實施例中，係將一種或一種以上之免疫調節劑與本發明化合物組合投藥，以便立即降低或抑制一種

或一種以上類型之免疫反應。此一種或一種以上類型之免疫系統的瞬時抑制作用或降低作用可持續數小時、數天、數週或數月。較佳者，該一種或一種以上類型之免疫反應的瞬時抑制作用或降低作用係持續幾小時(例如：2小時、4小時、6小時、8小時、12小時、14小時、16小時、18小時、24小時、36小時或48小時)、幾天(例如：3天、4天、5天、6天、7天或14天)、或幾週(例如：3週、4週、5週或6週)。

該項技藝中具有通常知識者所熟知之任何抗發炎劑(包括用於治療炎症疾病之治療劑)皆可使用於本發明之組成物及方法中。抗發炎劑之非限制性實例包括：非類固醇抗發炎藥物(NSAIDs)、類固醇抗發炎藥物、抗膽鹼藥物(例如：硫酸阿托平(atropine sulfate)、甲基硝酸阿托平(atropine methylnitrate)及異丙托溴銨(ipratropium bromide))、 β 2-促效劑(例如：艾丁胺醇(VENTOLIN™及PROVENTIL™)、必特洛(bitolterol)(TORNALATE™)、左旋丁胺醇(levulbuterol)(XOPONEX™)、奧西那林(metaproterenol)(ALUOPENT™)、吡布特羅(pirbuterol)(MAXAIR™)、特布他林(terbutlaine)(BRETHAIRE™及BRETHINE™)、艾丁胺醇(PROVENTIL™、REPETABS™及VOLMAX™)、福莫特羅(formoterol)(FORADIL AEROLIZER™)及沙美特羅(salmeterol)(SEREVENT™及SEREVENT DISKUS™)、及甲基黃嘌呤類(例如：茶鹼(UNIPHYL™、THEO-DUR™、SLO-BID™、及THEO-42™))。NSAIDs之實例包

括但不限於：阿斯匹靈、布洛芬、希樂葆(celecoxib)(CELEBREX™)、雙氯芬酸(VOLTAREN™)、依託度酸(LODINE™)、非諾洛芬(NALFON™)、引朵美辛(INDOCIN™)、克多炎(ketoralac)(TORADOL™)、奧沙普嗪(DAYPRO™)、舒林酸(CLINORIL™)、托美丁(TOLECTIN™)、羅菲可西保(rofecoxib)(VIOXX™)、萘普生(ALEVE™、NAPROSYN™)、酮洛芬(ACTRON™)以及萘丁美酮(RELAFEN™)。此類 NSAIDs 係藉由抑制環氧化酵素(例如：COX-1 及/或 COX-2)而作用。類固醇抗發炎劑藥物之實例包括但不限於：葡萄糖皮質素、地塞米松(DECADRON™)、皮質類固醇(例如：甲潑尼龍(MEDROL™))、可體松(cortisone)、氫化可體松、潑尼松(PREDNISONE™及 DELTASONE™)、潑尼龍(prednisolone)(PRELONE™及 PEDIAPRED™)、曲安西龍(triamcinolone)、柳氮磺胺吡啶(azulfidine)及類二十烷酸之抑制劑(例如：前列腺素、凝血脂素(thromboxane)及白三烯)。抗發炎治療劑及其劑量、投藥途徑與建議用法為該項技藝中已知者且業已揭露於此文獻中：*Physician's Desk Reference* (57th ed., 2003)。

對於關節炎、發炎造成之骨質流失以及其他具有發炎成分之疾病而言，使用於與本發明化合物或組成物組合治療之較佳習知治療劑包括(但不限於)：萘普生鈉(naproxen sodium)(Anaprox®及 Anaprox® DS, Roche)、氟比洛芬(Ansaid®; Pharmacia)、雙氯芬酸鈉(diclofenac sodium)+米索前列醇(misoprostil)(Arthrotec®; Searle)、伐地

昔布(valdecoxib)(Bextra®, Pharmacia)、雙氯芬酸鉀(Cataflam®及 Voltaren®, Novartis)、希樂葆(Celebrex®, Pharmacia)、舒林酸(Clinoril®, Merck)、奧沙普嗪(Daypro®, Pharmacia)、雙水楊酸酯(Disalcid®, 3M)、二氟尼柳(Dolobid®, Merck)、萘普生鈉(EC Naprosyn®, Roche)、吡羅昔康(Feldene®, Pfizer)、引朵美辛(Indocin® 及 Indocin SR®, Merck)、依託度酸(Lodine®及 Lodine XL®, Wyeh)、美洛昔康(meloxicam)(Mobic®, Boehringer Ingelheim)、布洛芬(Motrin®, Pharmacia)、萘普生(Naprelan®, Elan)、萘普生(Naprosyn®, Roche)、酮洛芬(Orudis®及 Oruvail®, Wyeth)、萘丁美酮(Relafen®, SmithKline)、托美丁鈉(tolmetin sodium)(Tolectin®, McNeil)、三水楊酸膽鹼鎂(Trilisate®, Purdue Fredrick)及羅菲可西保(Vioxx®, Merck)。

於任何情況下，若目標疾病之成分含有疼痛時，則該其他治療劑可為止痛劑。可用之止痛劑包括但不限於：非那西汀(phenacetin)、布他西丁(butacetin)、乙醯胺基酚、奈福泮(nefopam)、乙醯胺基醌(acetoamidoquinone)及其混合物。

對於治療骨質疏鬆、變形性骨炎(Paget's disease)以及其他與骨骼惡化相關之疾病而言，可用於與本發明化合物或組成物組合治療之較佳習知治療劑包括(但不限於)：雙膦酸鹽類(例如：依替膦酸鹽(etidronate))

(Didronel®， Procter & Gamble)、帕米膦酸鹽 (pamidronate)(Aredia®， Novartis)及阿倫膦酸鹽 (alendronate)(Fosamax®， Merk))、堤路膦酸鹽 (tiludronate)(Skelid®， Sanofi-Synthelabo, Inc.)、利塞膦酸鹽 (risedronate)(Actonel®， Procter & Gamble/Aventis)、抑鈣素 (Miacalcin®)、雌激素 (Climara®、Estrace®、Estraderm®、Estratab®、Ogen®、Ortho-Est®、Vivelle®、Premarin®及其他等)、雌激素及黃體素 (Activella™、FemHrt®、Premphase®、Prempro®及其他等)、副甲狀腺素 (parathyroid hormone)及其部份如特立帕肽 (teriparatide)(Forteo®， Eli Lilly and Co.)、選擇性雌激素受體調節劑 (SERMs)(如雷洛昔芬 (raloxifene) (Evista®))及目前於研究中之治療劑(如其他副甲狀腺素、氟化鈉、維他命 D 代謝物以及其他雙膦酸鹽與選擇性雌激素受體調節劑)。

任何副甲狀腺素 (PTH)皆可與本發明化合物組合使用。該副甲狀腺素一詞係指副甲狀腺素、其片段或代謝物以及其結構類似物，其可刺激骨骼形成並增加骨質密度。此外亦包括副甲狀腺素相關胜肽及活性片段以及副甲狀腺素相關胜肽之類似物(參見 PCT 公開號 WO 94/01460)。此類骨骼合成代謝功能活性係藉由彼等於該項技藝中具有通常知識者所知之標準分析法輕易測定。此等化合物之變化係揭露並參照如下。然而，其他副甲狀腺素則為該項技藝中具有通常知識者所知。例示之副甲狀腺素係揭露下列文

獻中。“Human Parathyroid Peptide Treatment of Vertebral Osteoporosis”, *Osteoporosis Int.*, 3, (Supp 1): 199-203. “PTH 1-34 Treatment of Osteoporosis with Added Hormone Replacement Therapy: Biochemical, Kinetic and Histological Responses” *Osteoporosis Int.* 1: 162-170.

任何生長激素或生長激素促泌素皆可與本發明化合物組合使用。該生長激素促泌素一詞係指可刺激生長激素釋放或可模仿生長激素作用(例如:增加骨骼形成以提高骨質密度)之化合物。此類作用係由該項技藝中具有通常知識者所熟知之於該項技藝中習用的標準分析法輕易測定。此等化合物之變化係揭露於下列所公開之 PCT 專利申請案: WO 95/14666; WO 95/13069; WO 94/19367; WO 94/13696; 及 WO 95/34311。然而,其他生長激素或生長激素促泌素則為該項技藝中具有通常知識者所知。特定言之,較佳生長激素促泌素為: N-[1(R)-[1,2-二氫-1-甲磺醯基螺[3H-吡啶-3,4'-六氫吡啶]-1'-基]羰基]-2-(苯基甲氧基)乙基]-2-胺基-2-甲基丙醯胺: MK-667。其他較佳生長激素促泌素包括: 2-胺基-N-(2-(3a-(R)-苯甲基-2-甲基-3-酮基-2,3,3a,4,6,7-六氫-吡啶並-[4,3-c]吡啶-5-基)-1-(R)-苯甲氧基甲基-2-酮基-乙基)-異丁醯胺或其 L-酒石酸鹽; 2-胺基-N-(1-(R)-苯甲氧基甲基-2-(3a-(R)-4-氟-苯甲基)-2-甲基-3-酮基-2,3,3a,4,6,7-六氫-吡啶並-[4,3-c]吡啶-5-基)-2-酮基-乙基)異丁醯胺; 2-胺基-N-(2-(3a-(R)-苯甲

基-3-酮基-2, 3, 3a, 4, 6, 7-六氫-吡啶並-[4, 3-c]吡啶-5-基)-1-(R)-苯甲氧基甲基-2-酮基-乙基)-異丁醯胺；及 2-胺基-N-(1-(2, 4-二氟-苯甲氧基甲基)-2-酮基-2(3-酮基-3a-吡啶-2-基甲基-2-(2, 2, 2-三氟-乙基)-2, 3, 3a, 4, 6, 7-六氫-吡啶並-[4, 3-c]吡啶-5-基)-乙基)-2-甲基-丙醯胺。

本發明之任何方法皆可包括：投與有效量之包括至少一種本發明化合物之組成物或醫藥組成物至需要此類調節、處理或治療之細胞、組織、器官、動物或病患。此方法可視需要進一步包括用於治療與 IL-12 產生相關之疾病的共同投藥法及組合療法，其中，該投藥復包括於本發明化合物投藥之前、同時及/或之後投與至少一種附加之選自下列各者之活性劑：TNF 拮抗劑(例如但不限於：TNF 抗體或片段、可溶性 TNF 受體或片段、其融合蛋白或小分子 TNF 拮抗劑)、抗類風濕藥物(例如：甲氨蝶呤(methotrexate)、金諾芬(auranofin)、硫代葡萄糖金(aurothioglucose)、硫唑嘌呤(azathioprine)、依那西普(etanercept)、硫代蘋果酸鈉金(gold sodium thiomalate)、硫酸羥氯醌(hydroxychloroquine sulfate)、來氟米特、柳氮磺胺吡啶)、肌肉鬆弛劑、麻醉劑(narcotic)、非類固醇抗發炎藥物(NSAID)、止痛劑、麻醉劑(anesthetic)、鎮靜劑、局部麻醉劑、神經肌肉阻斷劑、抗微生物劑(例如：胺基糖苷(amino glycoside)、抗真菌劑、抗寄生蟲劑、抗病毒劑、碳青黴烯(carbapenem)、頭孢菌素、氟喹諾酮

(fluoroquinolone)、大環內脂物(macrolide)、青黴素、磺醯胺、四環黴素、另一抗微生物劑)、抗牛皮癬劑、皮質類固醇、合成代謝類固醇、糖尿病相關製劑、礦物、營養劑、甲狀腺劑、維他命、鈣相關賀爾蒙、止瀉劑、止咳劑、止吐劑、抗潰瘍藥、輕瀉劑、抗凝血劑、紅血球生成素(erythropoietin)(例如：紅血球生成素 α)、非格司亭(filgrastim)(例如：G-CSF、Neupogen)、沙格司亭(sargramostim)(GM-CSF、Leukin)、免疫作用、免疫球蛋白、免疫抑制劑(例如：巴裏西單抗(basiliximab)、環孢靈、達克珠單抗(daclizumab))、生長激素、賀爾蒙替代藥物、雌激素受體調節劑、散腫劑、睫狀肌鬆弛劑、烷化劑、抗代謝劑、有絲分裂抑制劑、放射藥物、抗憂鬱藥物、抗燥症劑、抗精神病藥物、抗焦慮劑、安眠藥、刺激性藥物、多奈哌齊(donepezil)、塔克寧(tacrine)、氣喘藥物、 β 促效劑、吸入式類固醇、白三烯抑制劑、甲基黃嘌呤、咽達永樂(cromolyn)、腎上腺素或類似物、多馬斯 α (domase alfa)(Pulmozyme)、細胞激素或細胞激素拮抗劑。適當劑量為該項技藝中所熟知。參見例如：Wells et al., Pharmacotherapy Handbook, 2. sup. nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000), 其中各文獻之全部內容係於此合併作為參靠考文獻。

適用於本發明之組成物、組合療法、共同投藥法、設

計物及/或方法之 TNF 拮抗劑包括但不限於：抗-TNF 抗體（如 Remicade(英利昔單抗(Infliximab))或 Humira(艾達木單抗(adalimumab))）例如或其抗原結合片段，以及專一性結合於 TNF 之受體分子（例如 Enbrel(依那西普(Etanercept))）；阻止及/或抑制 TNF 合成、TNF 釋放或其於目標細胞上之作用的化合物，如：沙利竇邁(thalidomide)、替尼達普(tenidap)、磷酸二酯酶抑制劑（例如：己酮可可鹼(pentoxifylline)及洛利普南(rolipram))、A2b 腺苷受體促效劑及 A2b 腺苷受體增強劑；阻止或抑制 TNF 受體信號傳遞之化合物，如致裂原活化蛋白(MAP)激酶抑制劑；阻斷及/或抑制膜 TNF 裂解之化合物，如金屬蛋白酶抑制劑；阻斷及/或抑制 TNF 活性之化合物，如血管收縮素轉化酵素(ACE)抑制劑（例如：卡特普(captopril)）；以及阻斷及/或抑制 TNF 產生及/或合成之化合物，如 MAP 激酶抑制劑。

在此說明，「腫瘤壞死因子抗體」、「TNF 抗體」、「TNF 抗體」或片段等係於活體外、原位置及/或活體內減少、阻斷、抑制、廢除或影響 TNF 活性。例如，本發明之適當 TNF 人類抗體可結合 TNF α ，並包括抗-TNF 抗體、其抗原結合片段、以及其可專一性結合至 TNF α 之特定突變株或功能區。適當 TNF 抗體或片段亦可減少、阻斷、廢除、影響、妨礙及/或抑制 TNF RNA、DNA 或蛋白合成、TNF 釋放、TNF 受體信號傳遞、膜 TNF 裂解、TNF 活性、TNF 產生及/或合成。上述及其他可用之組合療法將為彼等於該項技藝中具有通

常知識者所瞭解及領會。此組合療法之潛在優點包括：可使用較少量之各單獨活性組成分以將毒性副作用降至最低、於效用上有所增進改善、促使投藥或使用之容易及/或降低化合物製劑或調配物之總消耗。本發明化合物之生物活性可藉由數種以細胞為基礎之分析法評估。此類分析法之一可經由使用來自人類周邊血液單核細胞(PBMC)或人類單核球細胞株(THP-1)實施。該細胞係以人類干擾素- γ (IFN- γ)及脂多醣之組合或以 IFN- γ 與金黃色葡萄球菌 Cowan I 株之組合於試驗化合物存在下刺激之。IL-12 產生之抑制程度可藉由例如使用三明治酵素結合免疫吸附(sandwich ELISA)分析法與抗-人類 IL-12 抗體測定 p70 之量而測量。接著可測定該試驗化合物之 IC₅₀。尤其，PBMC 或 THP-1 細胞係與該試驗化合物一起培養。細胞存活率(cell viability)係使用 MTS [3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑鎗]之生化還原作用(bioreduction)評估(Promega, Madison, WI)。

其他治療劑可包括骨骼抗-溶蝕劑，例如黃體素類(progestins)、多磷酸鹽類(polyphosphonates)、雙磷酸鹽(類)、雌激素促效劑/拮抗劑類(如 Premarin®)、雌激素/黃體素組合類、及雌激素衍生物類(如雌素酮(estrone)、雌三醇(estriol)或 17 α 、17 β -乙炔基雌二醇(estradiol))。例示之黃體素類為商業來源可購得者且係包括：阿孕苯奈德(algestone acetophenide)、四烯雌酮(altrenogest)、醋酸阿馬地酮(amadinone acetate)、醋

酸甲孕酮(anagestone acetate)、醋酸氯地孕酮
 (chlormadinone acetate)、烯孕醇(cingestol)、醋酸氯
 孕酮(clogestone acetate)、醋酸氯美孕酮(clomegestone
 acetate)、醋酸地馬孕酮(delmadinone acetate)、去氧孕
 烯(desogestrel)、地美炔酮(dimethisterone)、地屈孕酮
 (dydrogesterone)、艾昔孕酮(ethynerone)、(dthyndiol
 diacetate)、依託孕烯(etonogestrel)、醋酸氟孕酮
 (flurogestone acetate)、孕氯酮(gestaclone)、孕二烯
 酮(gestodene)、己酸孕諾酮(gestonorone caproate)、孕
 三烯酮(gestrinone)、鹵孕酮(haloprogesterone)、己酸
 羥孕酮(hydroxyprogesterone caproate)、左旋炔諾孕酮
 (levonorgestrel)、利奈孕酮(lynestrenol)、美屈孕酮
 (medrogestone)、醋酸甲羥孕酮(medroxyprogesterone
 acetate)、醋酸美侖孕酮(melengestrol acetate)、
 (methynodiol diacetate)、炔諾酮(norethindrone)、醋
 酸炔諾酮(norethindrone acetate)、異炔諾酮
 (norethynodrel)、諾孕酯(norgestimate)、諾孕美特
 (norgestomet)、炔諾孕酮(norgestrel)、苯丙酸奧索孕酮
 (oxogestone phenpropionate)、黃體激素
 (progesterone)、醋酸奎孕醇(quiringestanol acetate)、
 奎孕酮(quiringestrone)以及替孕醇(tigestol)。較佳黃體
 素類為甲羥孕酮、炔諾酮以及異炔諾酮。

例示之骨骼溶蝕作用(bone resorption)抑制多磷酸
 鹽類包括揭露於美國專利第 3,683,080 號案之多磷酸鹽類

型式。較佳多磷酸鹽類係成雙(geminal)之二-多磷酸鹽類(dipolyphosphonates)(亦稱為雙-磷酸鹽類(bis-phosphonates))。替魯磷酸二鈉(Tiludronate disodium)為特別佳之多磷酸鹽。伊班磷酸(Ibandronic acid)為特別佳之多磷酸鹽。阿侖磷酸鹽(Alendronate)為特別佳之多磷酸鹽。唑來磷酸(Zoledronic acid)為特別佳之多磷酸鹽。其他較佳之多磷酸鹽類為6-胺基-1-羥基-亞己基-二磷酸及1-羥基-3(甲基戊基胺基)-亞丙基-二磷酸。該多磷酸鹽類可以酸、或可溶性鹼金屬鹽或鹼土金屬鹽形式投藥。多磷酸鹽之可水解酯類亦同樣包括在內。特定實例包括乙烷-1-羥基-1,1-二磷酸、甲烷二磷酸(methane diphosphonic acid)、戊烷-1-羥基-1,1-二磷酸、甲烷二氯二磷酸、甲烷羥基二磷酸、乙烷-1-胺基-1,1-二磷酸、乙烷-2-胺基-1,1-二磷酸、丙烷-3-胺基-1-羥基-1,1-二磷酸、丙烷-N,N-二甲基-3-胺基-1-羥基-1,1-二磷酸、丙烷-3,3-二甲基-3-胺基-1-羥基-1,1-二磷酸、苯基胺基甲烷二磷酸、N,N-二甲基胺基甲烷二磷酸、N(2-羥乙基)胺基甲烷二磷酸、丁烷-4-胺基-1-羥基-1,1-二磷酸、戊烷-5-胺基-1-羥基-1,1-二磷酸、己烷-6-胺基-1-羥基-1,1-二磷酸以及其醫藥上可接受之酯類或鹽類。

尤其，本發明化合物可與哺乳動物雌激素促效劑/拮抗劑組合。任何雌激素促效劑/拮抗劑皆可用於此目的。該術語雌激素促效劑/拮抗劑係指會與雌激素受體結合、抑制骨代謝(bone turnover)及/或預防骨質流失之化合物。特定

言之，雌激素促效劑於本文係定義為可結合至哺乳動物組織中雌激素受體位置並模仿雌激素於一種或一種以上組織內之作用的化學化合物。雌激素拮抗劑於本文係定義為可結合至哺乳動物組織中雌激素受體位置；並阻斷雌激素於一種或一種以上組織內之作用的化學化合物。此類活性係藉由彼等該項技藝中習知之標準方法輕易測定，該標準方法包括雌激素受體結合分析法、標準之骨組織型態測定及密度測定儀(densitometer)方法、以及下列文獻所述之方法：E. F Eriksen *et al.*, Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, pp. 1-74(1994)；S. J. Grier *et al.*, The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry In Animals, *Inv. Radiol.* 31(1)：50-62(1996)；Wahner H. W. 及 Fogelman I., The Evaluation of Osteoporosis：Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice., Martin Dunitz Ltd., London, pp. 1-296 (1994)。此等化合物之變化係說明並參照如下。

較佳之雌激素促效劑/拮抗劑為屈洛昔芬 (droloxifene)：(酚, 3-(1-(4-(2-(二甲基胺基)乙氧基)苯基)-2-苯基-1-丁烯基)-, (E)-)及揭露於美國專利第 5,047,431 號案之相關化合物。另一較佳雌激素促效劑/拮抗劑為 3-(4-(1,2-二苯基-丁-1-烯基)-苯基)丙烯酸，其係揭露於 Wilson *et al.*, *Endocrinology* 138：3901-11 (1997)中。另一較佳雌激素促效劑/拮抗劑為泰莫昔芬 (tamoxifen)：(乙胺, 2-(4-(1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧

基)-N,N-二甲基,(Z)-2-,2-羥基-1,2,3-丙烷三羧酸酯(1:1))及揭露於美國專利第4,536,516號案之相關化合物。另一相關化合物為4-羥基泰莫昔芬,其係揭露於美國專利第4,623,660號案中。

較佳之雌激素促效劑/拮抗劑為雷諾昔酚

(raloxifene): (甲酮,(6-羥基-2-(4-羥基苯基)苯並[b]噻吩-3-基)(4-(2-(1-六氫吡啶基)乙氧基)苯基)氯化氫),其係揭露於美國專利第4,418,068號案中。另一較佳雌激素促效劑/拮抗劑為托瑞米芬(toremifene): (乙胺(ethanamine),2-(4-(4-氯-1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧基)-N,N-二甲基-,(Z)-,2-羥基-1,2,3-丙烷三羧酸酯(1:1)),其係揭露於美國專利第4,996,225號案中。另一較佳雌激素促效劑/拮抗劑為升克洛曼(centchroman): 1-(2-((4-(甲氧基-2,2-二甲基-3-苯基-色滿-4-基)-苯氧基)-乙基)-吡咯啶,其係揭露於美國專利第3,822,287號案中。左美洛昔芬(levormeloxifene)亦較佳。另一較佳雌激素促效劑/拮抗劑為艾多昔芬(idoxifene): (E)-1-(2-(4-(1-(4-碘-苯基)-2-苯基-丁-1-烯基)-乙基)-吡咯烷酮,其係揭露於美國專利第4,839,155號案中。另一較佳雌激素促效劑/拮抗劑為2-(4-甲氧基-苯基)-3-[4-(2-六氫吡啶-1-基-乙氧基)-苯氧基]-苯並[b]噻吩-6-醇,其係揭露於美國專利第5,488,058號案中。另一較佳雌激素促效劑/拮抗劑為6-(4-羥基-苯基)-5-(4-(2-六氫吡啶-1-基-乙氧基)-苯甲基)-萘-2-醇,其係揭露於美國專利第

5,484,795 號案中。另一較佳雌激素促效劑/拮抗劑為 (4-(2-(2-氮雜-雙環[2,2,1]庚-2-基)-乙氧基)-苯基)-(6-羥基-2-(4-羥基-苯基)-苯并[b]噻吩-3-基)-甲酮，其與其製備方法係揭露於歸屬於 Pfizer Inc. 之 PCT 公開號 WO 95/10513 中。其他較佳雌激素促效劑/拮抗劑係包括敘述於美國專利第 5,552,412 號案之化合物。本文所述之特別佳化合物為：順-6-(4-氟-苯基)-5-(4-(2-六氫吡啶-1-基-乙氧基)-苯基)-5,6,7,8-四氫-萘-2-醇；(-)-順-6-苯基-5-(4-(2-吡咯啶-1-基-乙氧基)-苯基)-5,6,7,8-四氫-萘-2-醇；順-6-苯基-5-(4-(2-吡咯啶-1-基-乙氧基)-苯基)-5,6,7,8-四氫-萘-2-醇；順-1-(6'-吡咯烷乙氧基-3'-吡啶基)-2-苯基-6-羥基-1,2,3,4-四氫萘；1-(4'-吡咯烷乙氧基苯基)-2-(4''-氟苯基)-6-羥基-1,2,3,4-四氫異喹啉；順-6-(4-羥基苯基)-5(4-(2-六氫吡啶-1-基-乙氧基)-苯基)-5,6,7,8-四氫-萘-2-醇；及 1-(4'-吡咯烷乙氧基苯基)-2-苯基-6-羥基-1,2,3,4-四氫異喹啉。其他雌激素促效劑/拮抗劑係揭露於美國專利第 4,133,814 號案中。美國專利第 4,133,814 號案揭露了 2-苯基-3-芳醯基-苯並噻吩以及 2-苯基-3-芳醯基苯並噻吩-1-氧化物之衍生物。

於該項技藝中具有通常知識者應瞭解，其他骨骼合成代謝劑(亦稱為骨質密度增加劑(bone mass augmenting agent))係可與本發明化合物結合使用。

骨質密度增加劑為可將骨質密度提高至骨折閾值(bone fracture threshold)以上之化合物，而該骨折閾值

係詳述於 World Health Organization Study World Health Organization, "Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report of a WHO Study Group. World Health Organization Technical Series 843"。任何前列腺素或前列腺素促效劑/拮抗劑皆可與本發明化合物組合使用。於該項技藝中具有通常知識者應瞭解，亦可使用 IGF-1、氟化鈉、副甲狀腺素(parathyroid hormone (PTH))、副甲狀腺素之活性片段、生長激素或生長激素促泌素(secretagogues)。下節係詳加敘述可與本發明化合物組合投藥之例示化合物。

前列腺素：該術語前列腺素係指為天然前列腺素 PGD₁、PGD₂、PGE₂、PGE₁ 及 PGF₂ 之類似物的化合物，該前列腺素係用於治療骨質疏鬆症及其他與過度蝕骨細胞骨骼溶蝕作用相關之疾病。此等化合物會結合至前列腺素受體。此結合係藉由該項技藝中具有通常知識者所知之標準分析法(例如：S. An *et al.*, Cloning and Expression of the EP₂ Subtype of Human Receptors for Prostaglandin E₂ Biochemical and Biophysical Research Communications, 197(1): 263-270 (1993))輕易測定。

前列腺素為與基礎化合物前列腺酸(prostanoic acid)相關之環脂族化合物。基礎前列腺素之碳原子編號係依序由羧基碳原子開始，通過環戊基環，而至鄰近側鏈上之末端碳原子。通常該鄰近側鏈為反式方向(trans

orientation)。若於環戊基部分之 C-9 處存在酮基，則表示前列腺素屬於 E 類型，儘管 PGE₂ 包含位於 C₁₃-C₁₄ 之反式不飽和雙鍵以及位於 C₅-C₆ 位置之順式雙鍵。

前列腺素之變化係敘述並參照如下。然而，其他前列腺素則為該項技藝中具有通常知識者所知。例示之前列腺素係揭露於美國專利第 4,171,331 號案及第 3,927,197 號案中。Norrdin *et al.*, The Role of Prostaglandins in Bone in Vivo, Prostaglandins Leukotriene Essential Fatty Acids 41: 139-150 (1990) 為骨骼合成代謝前列腺素之評論文章。任何前列腺素促效劑/拮抗劑皆可與本發明化合物組合使用。該術語前列腺素促效劑/拮抗劑係指可結合至前列腺素受體(例如: An S. *et al.*, Cloning and Expression of the EP₂ Subtype of Human Receptors for Prostaglandin E₂, Biochemical and Biophysical Research Communications 197(1): 263-70 (1993)) 並模仿前列腺素於活體內作用(例如: 刺激骨骼形成並增加骨質密度)之化合物。此等作用係藉由該項技藝中具有通常知識者所知之標準分析法輕易測定。Eriksen E. F. *et al.*, Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, 1994, pp. 1-74; S. J. Grier *et al.*, The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry In Animals, Inv. Radiol. 31(1): 50-62(1996); H. W. Wahner and I. Fogelman, The Evaluation of Osteoporosis: Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice, Martin Dunitz

Ltd. London, pp. 1-296 (1994)。數種此等化合物係敘述並參照如下。然而，其他前列腺素促效劑/拮抗劑則為該項技藝中具有通常知識者所知。例示之前列腺素促效劑—拮抗劑係揭露如下。美國專利第 3,932,389 號案揭露了有益於骨骼形成活性之 2-去羧基-2-(四唑-5-基)-11-去氧基-15-經取代- ω -五去甲基前列腺素類。美國專利第 4,018,892 號案揭露了有益於骨骼形成活性之 16-芳基-13,14-二氫-PGE₂ 對-聯苯基酯類。美國專利第 4,219,483 號案揭露了有益於骨骼形成活性之 2,3,6-經取代-4-吡喃酮類。美國專利第 4,132,847 號案揭露了有益於骨骼形成活性之 2,3,6-經取代-4-吡喃酮類。美國專利第 4,000,309 號案揭露了有益於骨骼形成活性之 16-芳基-13,14-二氫-PGE₂ 對-聯苯基酯類。美國專利第 3,982,016 號案揭露了有益於骨骼形成活性之 16-芳基-13,14-二氫-PGE₂ 對-聯苯基酯類。美國專利第 4,621,100 號案揭露了有益於骨骼形成活性之經取代環戊烷類。美國專利第 5,216,183 號案揭露了有益於骨骼形成活性之環戊酮類。

氟化鈉可與本發明化合物組合使用。該術語氟化鈉係指其所有形式(例如：緩釋型氟化鈉、持續釋放型氟化鈉)。持續釋放型氟化鈉係揭露於美國專利第 4,904,478 號案中。氟化鈉之活性係藉由該項技藝中具有通常知識者所知之生物方法輕易測定。

骨骼形成蛋白可與本發明化合物組合使用(例如參見：Ono *et al.*, Promotion of the Osteogenetic Activity

of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein by Prostaglandin E₁, Bone 19(6): 581-588(1996))。

動物模式

自體免疫疾病之動物模式可用於評估本發明治療劑或醫藥組成物之功效。自體免疫疾病如 1 型糖尿病、甲狀腺自體免疫性、全身紅斑性狼瘡及腎絲球腎炎之動物模式業已發展完成(Flanders *et al.*, 1999, Autoimmunity 29: 235-246; Krogh *et al.*, 1999, Biochimie 81: 511-515; Forster, 1999, Semin. Nephrol. 19: 12-24)。

下述系列之實施例係用於說明而非在限制本發明之範疇。

實施例

I. 測量 IL-12 p40 之濃度

實施北方墨點分析法以檢測 IL-12 p35 及 p40 之 mRNA 濃度。將人類 PBMC 及人類單核細胞株 THP-1 細胞於化合物 1 存在或不存在下以 IFN- γ /SAC 刺激之。使用 Ficoll-Paque(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)將人類 PBMC 經由離心單離出，並以補充有 10%胎牛血清(FCS)、100U/ml 青黴素及 100 μ g/ml 鏈黴素之 RPMI 培養基製備於具有 5×10^5 cells/well(細胞/孔)之 96 孔盤中。然後於存在不同濃度之化合物 2 或其他化合物下，將 IFN- γ (100U/ml)注入細胞，接著再注入 0.01%SAC 或 1 μ g/ml LPS。該試驗化合物係製備於 DMSO 中，且包括不含化合物之對照組在內，該 DMSO 於所有培養細胞中之終濃度係調整為 0.25%。18 小時

後取不含細胞之上清液進行細胞激素測量。該 THP-1 細胞係得自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)(Manassas, VA)，且係培養於補充有 10%FCS (ATCC, Manassas, VA)及 1%青黴素/鏈黴素 (Gibco-BRL, New York, N. Y.)之 RPMI 1640 (ATCC, Manassas, VA)中。將總 RNA 單離出並使用 IL-12 p35 及 p40 cDNA 探針進行北方墨點分析法。首先檢測於存在或不存在 $1 \mu\text{M}$ 化合物 1 下，經注入 IFN- γ 再注入 SAC 刺激之 hPBMC 與 THP-1 細胞培養中之 mRNA 累積的動力學。

於 hPBMC 中，在 SAC 添加 4 小時後均可偵測到 IL-12 p35 及 p40 mRNA，且於 SAC 添加 6 小時後達到高峰。於所有取樣時間中，p35 mRNA 之表現係完全受到化合物 1 抑制，反之 p40 次單元之 mRNA 表現則為顯著降低但不完全。在經 IFN- γ /SAC 刺激之 THP-1 細胞中，於不含化合物之對照組中 IL-12 p35 mRNA 係勉強可見，但於存在 $1 \mu\text{M}$ 化合物 1 下則偵測不到。相較之下，IL-12 p40 mRNA 於 SAC 添加後 4 小時即可立即偵測到並於添加後 6 小時達到高峰。此外，化合物 1 係顯著但不完全地降低 p40 資訊之表現。

於經 IFN- γ /SAC 刺激之 hPBMC 中進行化合物 1 對 IL-12 mRNA 之抑制作用的劑量反應研究。因為 IL-12 p35 及 p40 之 mRNA 量於 SAC 添加後 6 小時為最大，因此即選擇此時間點進行劑量反應研究。IFN- γ /SAC 對於 IL-12 p35 mRNA 累積之誘導作用係經由 3nM 化合物 1 (IC_{50} 低於 1nM) 完全逆轉。相較之下，IL-12 p40 mRNA 之累積則僅輕微受

到 1nM 化合物 1 抑制，儘管於 10nM 之最大值下仍為不完全抑制作用。相對於 p35 而言，p40 所顯見較微弱之抑制作用可能是由於 p35 啟動子之抑制作用較有效或僅可能是所產生之 p40 量遠超過 p35 以及其抑制作用可能需要更高濃度之藥物。

因此化合物 1 造成 p35 及 p40 之 mRNA 量均降低。接續之細胞核行進轉錄分析實驗(nuclear run-on experiments)顯示此作用係位於轉錄作用之起始階段。

II. 化合物 2 對於 IL-12 p35 及 p40 啟動子活性之影響

由北方墨點分析法之發現結果接著著手進行 p35 及 p40 啟動子活性之研究。將 DNA 構築體瞬時轉染至鼠科巨噬細胞株 RAW264.7，該 DNA 構築體中 p35 及 p40 啟動子係直接表現螢光酵素報導基因。該 RAW264.7 係得自美國菌種保存中心(Manassas, VA)，且係培養於補充有 10%FCS (ATCC, Manassas, VA)及 1%青黴素/鏈黴素(Gibco-BRL, New York, N. Y.)之 DEME (ATCC, Manassas, VA)中。

對於刺激作用之由 p35 及 p40 啟動子帶動之螢光酵素產生均是於存在或不存在化合物 1 及化合物 2 下測定。為構築該人類 IL-12 p35 及 p40 啟動子/螢光酵素報導構築體，係產生包含人類 IL-12 p35 及 p40 基因之數個序列結構區(motif)之 p35 (-1.5 kb 至 +3 bp)及 p40 (-1.3 kb 至 +56 bp)啟動子片段。該等片段係經由得自人類 PBMC 之基因體 DNA 以下述引子進行 PCR 而產生：IL-12 p35 1.5 kb-F：5'-GCAGCATTAGAAGGGGCCTTAGAGA-3' (SEQ ID NO:3)

以及 IL-12 p35 1.5 kb-R : 5'-TTTTATAATTGTCCCGAGGCGCG-3'(SEQ ID NO:4) ; IL-12 p40 1.3 kb-F : 5'-ACGGCGAGGAAAGTTAGCCCG-3'(SEQ ID NO : 5)以及 IL-12 p40 1.3 kb-R : 5'-TTGCTCTGGGCAGGACGGAG-3'(SEQ ID NO : 6) 。 p40 啟動子報導構築體之刪減(deletion)係使用下列引子進行 PCR 產生 : IL-12 p40 -250 bp 至 +56bp (p40/-250 bp) F : 5'-CACCCAAAAGTCATTTTCCTC-3'(SEQ ID NO : 7)以及 IL-12 p40 -250 bp 至 +56bp (p40/-250 bp) R : 5'-TGCTCTGGGCAGGACGGAG-3'(SEQ ID NO:8) ; IL-12 p40 -150 bp 至 +56bp (p40/-150 bp) F : 5'-AGAGTTGTTTTCAATGTTGCAAC-3'(SEQ ID NO : 9)以及 IL-12 p40 -150 bp 至 +56bp (p40/-150 bp) R : 5'-TGCTCTGGGCAGGACGGAG-3'(SEQ ID NO : 10) 。 所得之 PCR 產物係接合於 pGL3-Basic 載體 (Promega) 中螢光酵素基因之上游。所有構築體皆經由 DNA 定序確認。

將 RAW264.7 細胞瞬時轉染後，接著於存在或不存在不同濃度之化合物 1、化合物 2 或陰性對照組(結構上相關之不具活性的化合物)下，以鼠科重組 IFN- γ (100 ng/ml) 刺激該細胞 10 小時，再以 LPS(1 μ g/ml) 或 SAC(0.025%) 刺激 16 小時。轉染作用係使用 SuperFect Transfection Reagent(Qiagen) 以所述步驟完成。轉染 DNA 之總量(包括各未插入之對照組質體)係維持不變。

將細胞以載體 pCMV (BD Biosciences Clontech) 共轉染(co-transfect)，該載體中已活化之 CMV 啟動子係主導 β -半乳糖苷酶表現以用於偵測轉染效率。螢光酵素及 β -

半乳糖苷酶之活性係於根據螢光酵素分析系統(Promega)及螢光 β -gal 偵測系統(BD Biosciences Clontech)所製備之細胞萃取物中測定。接著再使用該 β -半乳糖苷酶值將螢光酵素活性標準化。含有 IL-12 p40 及 p35 啟動子構築體之 RAW264.7 細胞在經 IFN- γ /LPS 或 IFN- γ /SAC 刺激後，該螢光酵素活性係受到強烈誘導。此由 p40 及 p30 啟動子帶動之螢光酵素表現係於化合物 1 及化合物 2 存在下受到抑制，但卻不受該不具活性之陰性對照組化合物抑制。該結果示於第 2A 至 2B 圖。此結果顯示化合物 2 抑制 IL-12 轉錄作用之機制。化合物 2 係比化合物 1 更有效地抑制經 IFN- γ /LPS 刺激之由 p35 啟動子帶動的螢光酵素表現，而陰性對照組化合物則完全不抑制啟動子活性。化合物 1、化合物 2 及陰性對照組化合物於 THP-1 細胞中影響 IL-12 產生之 IC₅₀ 分別為 40 nM、10 nM、高於 1000 nM。此等結果與由 ELISA 所評估之影響 IL-12 蛋白產生之抑制活性相符，表示 p35 啟動子活性之抑制作用即為對 IL-12 之抑制活性的反應。ELISA 係藉由下述方法進行。人類 IL-12 p70 (雜二元體)係使用來自 Cell Sciences (Norwood, MA)之 ELI-PAIR 套組，根據廠商說明書進行分析。人類 IL-12 p40 係使用來自 Cell Sciences (Norwood, MA)之 ELISA 套組，根據廠商說明書進行分析。

用以檢測 IL-12 p35 及 p40 mRNA 量之北方墨點分析法係用於說明該作用之機制。化合物 1 造成 p35 及 p40 之 mRNA 量減少。細胞核行進轉錄分析實驗顯示此作用係位於轉錄

起始作用之階段。當該以 p35 及 p40 啟動子主導螢光酵素報導基因表現之 DNA 表現質體經轉染至細胞時，其係顯示螢光酵素之表現可由化合物 1 及化合物 2 抑制。此等結果證實化合物 2 抑制 IL-12 p35 及 p40 基因轉錄作用之機制。

接著開始著手分析參與此作用之 IL-12 轉錄啟動子單元(transcriptional promoter element)，並使用 p40 啟動子進行刪減分析。選擇此啟動子而非 p35 啟動子是因為 p40 啟動子之轉錄單元較為明確。為界限出該涉及 p40 基因轉錄活化作用之 IL-12 抑制劑反應單元，係構築三個不同啟動子並瞬時轉染至 RAW264.7 細胞中。如第 3A 至 3B 圖所示，該等由 NF- κ B 穿過 AP1 單元區所構成之啟動子係顯示減弱之啟動子活化作用，當該啟動子包含 p40 啟動子之 5'側翼區但卻具有大量之近側刪減時，其對於 IFN- γ /LPS 之刺激作用則顯現顯著降低之啟動子活性。只有該包含 Ets-2 與 PU-1、NF- κ B 及 AP1 單元之啟動子對於 IFN- γ /LPS 之刺激作用顯現出螢光酵素高活性，推測該 Ets-2 單元參與了 IL-12 p40 啟動子活性之調節作用。此由 IL-12 啟動子驅動之螢光酵素活性於化合物 1 存在下受到顯著抑制。由此等結果推測該對應於啟動子抑制作用之單元係位於 IL-12 p40 啟動子中自 TATA 盒至 -250 bp 之區域。

為更細部確認各個 p40 啟動子轉錄單元之角色，係生產許多此等單元之突變。此工作之目的在於評估突變之影響，該突變係於化合物 2 所媒介之抑制作用下減低但不消除 p40 啟動子活性。所有於 Ets-2 單元內之突變皆完全消

除了報導基因表現之誘導作用，因而更加突顯出此單元之重要性。於 NF- κ B 單元內之定點突變致使 p40 啟動子具有降低之但非明確可測量之由 IFN- γ /LPS 所媒介的誘導作用。定點突變係使用 GeneTailor 定點突變系統

(Invitrogen, Carlsbad, CA)，根據廠商說明書進行。該 IL-12 p40 突變株引子序列如下：IL-12 p40-Ets2 mut-F：5'-TATTCCCCACCCAAAAGTCACTTAGTTCATT-3'(SEQ ID NO: 11) 以及 IL-12 p40-Ets2 mut-R: 5'-TGACTTTTGGGTGGGGAATAAGG AAGGAGA-3'(SEQ ID NO: 12)；IL-12 p40-AP-1 mut-F：5'-TTGTTTTCAATGTTGCAACATTTCTAGTTTA-3'(SEQ ID NO: 13) 以及 IL-12 p40-AP-1 mut-R：5'-TGTTGCAACATTGAAAACAA CTCTCAAAC-3'(SEQ ID NO: 14)；IL-12 p40-NF κ B mut-F：5'-CAAACAAAAAAGGAACTTCTCAGAAGGTTTT-3'(SEQ ID NO: 15) 以及 IL-12 p40-NF κ B mut-R：5'-AGAAGTTCCTTTTTTGTGTTG TCTCTCTCTG-3'(SEQ ID NO: 16)；IL-12 p40-PU-1 mut-F：5'-ACAGAGAGAGACAAACAAAACACTTCTTGAAAT-3'(SEQ ID NO: 17) 以及 IL-12 p40-PU-1 mut-R：5'-TTTTGTTTGTCTCTCTCTGTG TGTGTATCA-3'(SEQ ID NO: 18)。

有趣地，由化合物 2 所媒介之表現的抑制作用在此突變構築體中降低了，因此暗示了 NF- κ B 所扮演的角色。由於已證明轉錄因數 NF- κ B 涉及 IL-12 p40 基因表現之調節作用，因此我們檢測了 STA-1856 是否改變 NF- κ B 與其位於 p40 啟動子上之同源位置(cognate site)的結合。由注入 IFN- γ 之 THP-1 細胞製備細胞核萃取物，其中該 THP-1

細胞係已使用或未使用 SAC 處理並於存在或不存在 $1 \mu\text{M}$ 化合物 1 或 10 nM ASA 下培養。細胞核萃取物之單離係藉由下述方法完成：首先將 THP-1 細胞懸浮於 20 倍體積之緩衝液 A 中，該緩衝液 A 包含 10 mM KCl 、 10 mM HEPES (pH 7.9)、 1 mM MgCl_2 、 1 mM 二硫代蘇糖醇 (DTT)、 0.1% 諾納德 P-40 (Nonidet P-40, NP-40) 以及 0.5 mM 苯甲基磺醯基氟化物 (PMSF)，接著再進行均質化並於 4°C 下以 $10,000 \text{ rpm}$ 離心 5 分鐘。然後再將細胞核沈澱物懸浮於緩衝液 C 中，該緩衝液 C 包含 400 mM NaCl 、 20 mM HEPES (pH 7.9)、 15 mM MgCl_2 、 0.2 mM EDTA 、 1 mM DTT 、 25% 甘油、 1 mM PMSF 與 $10 \mu\text{g}$ 亮抑酶肽 (leupeptin)、 $20 \mu\text{g}$ 胃蛋白酶抑制劑 (pepstatin) 以及每毫升 $10 \mu\text{g}$ 胰蛋白酶抑制劑 (antipain)，並於 4°C 下培養 30 分鐘，再以 $14,000 \text{ rpm}$ 離心 20 分鐘。將上清液以包含 100 mM NaCl 、 20 mM HEPES (pH 7.9)、 20% 甘油、 1 mM PMSF 以及 1 mM DTT 之緩衝液 D 透析。

將得自此步驟之萃取物用於凝膠位移分析法 (gel-shift assays)，該凝膠位移分析法係使用含有 NF- κ B 目標序列 (相當於來自 IL-12 p40 轉錄起始位置 -121 至 -102 之區域) 或突變之 NF- κ B 結合位的寡核酸。於經 IFN- γ /SAC 刺激之 THP-1 細胞中，該 NF- κ B 與包括其來自 p40 啟動子之同源序列的結合係受到強烈誘導。此交互作用係具有專一性，因為其會受過量之未標定探針競爭，但不受突變之寡核酸 (其中兩個鹼基對經取代) 競爭。化合物 1 對

於 NF- κ B 之結合並未顯現任何影響。相較之下，ASA 則顯著降低了此結合作用，儘管 IL-12 p70 蛋白之產生受 1 μ M 化合物 1 及 10mM ASA 抑制的百分比分別為 97%及 45%。結合化合物 2 對 I κ B 不具任何影響之結果，此等結果顯示化合物 1/化合物 2 對於 IL-12 產生之強烈抑制活性並非由於總 NF- κ B 結合活性之總量減少。故期望此後有可強有力阻斷 NF κ B 且具有比化合物 1/化合物 2 更廣大之細胞激素抑制作用的化合物。

為瞭解化合物 2 對於 NF- κ B 結合之作用，係使用以 ELISA 為基礎之轉錄因數-DNA 結合活性分析系統研究數個 NF- κ B 家族成員、p50、c-Rel 以及 p65。DNA-轉錄因數結合活性分析係使用 EZ-偵測轉錄因數套組 (EZ-detect transcription Factor kit)-NF- κ B p50 或 p65 (Pierce, Rockford, IL) 以及 BD Mercury TransFactor 套組-NF κ B (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)，根據廠商說明書進行。

於來自 THP-1 細胞 (該 THP-1 細胞係經 IFN- γ /LPS 刺激 3 小時) 之細胞核萃取物中，該 p50、c-Rel 以及 p65 之結合活性均顯著增加。而當化合物 2 (500 nM) 存在達 3 小時，則 c-Rel 之結合活性顯著降低且 p50 之結合活性輕微降低。於 p65 之實例中，對於 IFN- γ /LPS 之刺激，於化合物 2 存在下則觀察到結合活性之增加。此不具結合競爭之結果係由於 p50 及 c-Rel 的減少。

III. NF- κ B 蛋白轉位作用 (Translocation)

由 DNA-蛋白相互作用之研究顯示，對於化合物 2 之處理，c-Rel 與 p50（其係於 IL-12 形成功能性活化雜二元體）之結合活性為降低，而 p65 之結合活性則為增加。為瞭解此變化，係使用西方墨點分析法進行 NF- κ B 蛋白細胞內定位之研究。相對於未處理之細胞，在以化合物 2（500 nM）處理 3 小時之細胞中，發現 c-Rel 及 p65 於細胞核之內數量降低，而 p65 於細胞核內之數量則顯著增加。此發現與 DNA-蛋白相互作用之研究相符，顯示 p50/c-Rel 活性之減少以及 p65 結合活性之增加可能造成細胞核內 NF- κ B 蛋白之不平衡，並影響 p50/c-Rel 之結合活性。

IV. 化合物 2 對於 c-Rel 及 ICSBP 之影響（測量兩者於細胞核之量）

於經分析之轉錄因數中，ICSBP 及 c-Rel 兩個因數似乎會受到化合物 1/化合物 2 處理之影響。ICSBP 係間接地結合至 Est-2 位置。IL-12 之主要 NF κ B 轉錄活化子（trans-activator）為 c-Rel/p50 雜二元體。其他二元體（p65/p50 及 p50/p50）則皆缺乏活性或者具有抑制功能。因此，由於透過 NF- κ B 活化作用以及其與 ICSBP 之相互作用，使 c-Rel 參與了 IL-12 轉錄作用。西方墨點分析法以及 DNA 結合研究均顯示，於化合物 2 處理後細胞核之 c-Rel 降低。如第 4 圖所示，係以下述方法進行 THP-1 細胞核 c-Rel、p50 以及 p65 蛋白之西方墨點分析法：將 10%SDS 聚丙烯醯胺凝膠（Invitrogen）轉移至純硝化纖維膜（BioRed, Hercules, CA）。使該膜經 TBST 緩衝液之 5%牛

奶阻隔，接著再使用抗-c-Rel、抗-p65、抗-p50、抗-ICSBP 或抗-PU-1 抗體(所有抗體皆購自 Santa Cruz)於 1:500 之稀釋下，以室溫培養(incubated)1 小時或以 4°C 培養一夜。洗滌該膜並使用與辣根過氧化酶(Horseradish Peroxidase)結合之抗-兔 IgG 或抗-小鼠 IgG 抗體(Amersham, England)於 1:2000 之稀釋下，以室溫培養 1 小時。

以 IFN- γ 加上 LPS 以及 IFN- γ 加上 SAC 處理均可強烈增加細胞核 c-Rel、p65 以及 p50 之量。以化合物 2 處理則會顯著降低 c-Rel 量，且處理後之細胞核 c-Rel 量係相當於或低於未經刺激的量。相較之下，以化合物 2 處理後，細胞核 p65 蛋白的量則為增加，但卻保持在未經刺激的量之上。因此顯示以化合物 2 處理係造成細胞核 c-Rel/p50 (該主要 IL-12 活化 NF- κ B 二元體)之量的減少。

使用共轉染以 IL-12 啟動子-Luc 報導系統大量表現 ICSBP (其表現受化合物 2 降低)。該 ICSBP 大量表現構築體系使用下述引子由人類 PBMC 進行 PCR 產生: ICSBP-exp-F: 5'-CCGGAATTCAGGATGTGTGACCGGAATGG-3'(SEQ ID NO: 19)以及 CSBP-exp-R: 5'-ATATCTAGAATGGATGCAGGACGCAGAC-3'(SEQ ID NO: 20)，並將所得之 PCR 產物接合至 pCI 載體(Promega)。ICSBP 之大量表現增加了 p40 之表現並降低了化合物 2 之抑制作用。

V. 化合物 2 對 I κ B 之影響

I κ B 之降解作用為 NF- κ B 依賴型基因之訊息傳遞路

徑步驟之一。化合物 2 誘導 $I\kappa B\alpha$ 及 $I\kappa B\beta$ 降解之活性係於 THP-1 細胞中使用西方墨點及 FACS 分析法進行研究。對於 IFN- γ /LPS 或 IFN- γ /SAC 所媒介之誘導作用，THP-1 及 RAW267.4 細胞之細胞質中 $I\kappa B\alpha$ 及 $I\kappa B\beta$ 的量於 30 分鐘時顯著降低。然而，在使用或未使用化合物 2 (500 nM) 處理 30 分鐘及 2 小時之樣本間則未觀察到顯著差異。由化合物 2 處理前樣本亦可觀察到相似結果，該化合物 2 處理前樣本係於刺激前 30 分鐘加入化合物 2。此等結果顯示化合物 2 並不會誘導 $I\kappa B\alpha$ 及 $I\kappa B\beta$ 降解以使遊離之 NF- κ B 轉位至細胞核而可作為轉錄因數。

VI. 測量細胞核中 Ets-2 之量

轉錄因數 ICSBP 係經由結合於 PU-1 而間接結合至 Est-2 單元。將細胞核萃取物結合至 Ets-2 DNA 單元微粒子 (bead)，自遊離蛋白單離出該微粒子以分離結合物，並使用抗 ICSBP 或 PU-1 之抗體以西方墨點法分析該等蛋白。Ets-2 DNA 與微粒子之結合係以下述方法完成。包含 IL-12 p40 Ets-2 位置 (-292 至 -196) 之生物素化 DNA 片段係使用生物素化之引子經由 PCR 自 1.3kb 野生型人類 IL-12 p40 受體合成，該引子詳述於 The Journal of Immunology, 2000, vol 165, p. 271-279。以 Qiaquick Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) 純化 PCR 產物。於含有 10 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA、0.1 M NaCl 之緩衝液中，將 2 μ g 生物素化 DNA 結合至 100 μ l 經鏈黴抗生物素蛋白 (streptavidin) 結合之磁珠 (magnetic bead) (Dynabeads,

M280, Dynal, Lake Success, NY)。將結合至 $2\ \mu\text{g}$ DNA 之 $10\ \mu\text{l}$ 磁珠以 TGEDN 緩衝液 (120 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA、0.1 M NaCl、1 mM DTT、0.1% Triton X100、10% 甘油) 平衡，並與 $500\ \mu\text{g}$ THP-1 細胞核萃取物及 $20\ \mu\text{g}$ 鯡魚精子 DNA (Herring sperm DNA) (Gibco) 於 4°C 下培養 2 小時。於 TGEDN 緩衝液中洗滌磁珠，並以補充有 0.5% SDS 及 1M NaCl 之 $20\ \mu\text{l}$ 相同緩衝液將結合物質沖提出。將沖提之物質以 10% SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳分離並使用抗-ICSBP 或抗-PU-1 抗體以免疫轉漬分析法偵測之。

西方墨點分析法顯示，在經化合物 1 處理之 THP-1 細胞的細胞核萃取物中，ICSBP 蛋白量顯著降低，參見第 5 圖。相較之下，PU-1 的量則不受化合物 1 處理影響，參見第 6 圖。

特別有趣的發現是經化合物 2 處理之細胞的細胞核中 ICSBP 及 c-Rel 量均降低。由於這兩個轉錄因數會相互作用，因此預期這兩個因數數量之減少具有深遠的影響。化合物 2 選擇性地抑制基因表現，其中該基因係依賴轉錄活化作用之 ICSBP-c-Rel 相互作用。

雖然 c-Rel 參與單核球及巨噬細胞中 p35 及 p40 以及樹突細胞 (DCs) 中 p35 之表現，但是樹突細胞中 p40 之表現則為非 c-Rel 依賴型 (Grumont *et al.*, J. Exp. Med. 2001; 194: 1021-1031)。如果化合物 2 是透過 c-Rel 作用，則該藥物應抑制 PBMCs 產生之 p40 及 p70。然而，化合物應抑制 DCs 中 p70 之產生 (透過 p35 之抑制作用)，但應不

會抑制 DCs 中之 p40。此係根據下述方法藉由產生經單核球衍生之樹突細胞進行試驗。將 1×10^7 cells/ml 之人類 PBMC 懸浮於不含牛血清之 DMEM 中，並於 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下培養 2 小時。接著將非黏著細胞以 PBS 洗滌移除。然後使黏著細胞於含有 rhIL-4 (100 U/ml) 以及 rhGM-CSF (1000 U/ml) 之 RPMI-1640 培養基中培養 6 至 7 天。每隔一天添加一半體積之新鮮培養基及完全體積之新鮮細胞激素。接著於存在不同濃度之化合物 2 或其他化合物下，先將 IFN- γ (100 U/ml) 注入細胞，然後再將 0.01% SAC 或 $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 注入之。該試驗化合物係製備於 DMSO 中，且包括無化合物之對照組在內，該 DMSO 於所有培養細胞中之終濃度係調整為 0.25%。18 小時後取不含細胞之上清液進行細胞激素測量。

事實上，化合物 2 抑制人類 DCs 中 p70 之產生，但不抑制 p40 之產生(化合物 2 提高至 $10 \mu\text{M}$ 時無抑制作用)。此外，亦顯示於毒漿原蟲抗原(*Toxoplasma antigen*)(STAg) 刺激後之 IL-12 p40 生產抑制作用為非 c-Rel 依賴型。因此，若化合物 2 是透過 c-Rel 作用，則應不會於 STAg 刺激作用後觀察到 IL-12 p40 之有效抑制作用。初步結果顯示，相較於 IFN- γ /SAC 之刺激，以 STAg 誘導後化合物 2 所媒介之 p40 抑制作用的 IC_{50} 大約高出 1000 倍，然而，在以 SAC 及 STAg 刺激之情況下，地塞美松之 IC_{50} 均相同。這兩個結果進一步證實化合物 2 所媒介之 IL-12 產生的抑制作用係經過 c-Rel 路徑。

VII. 經化合物 2 處理之細胞中，NF- κ B 成員細胞核轉位作用之動力學

化合物 2 減弱了 c-Rel 及 p50 之細胞核轉位作用。接著係檢測於以化合物 2 處理之經 LPS 刺激的細胞中，NF- κ B 家族成員之細胞核轉位動力學。於存在或不存在 100 nM 化合物 2 之下，以 LPS 刺激 THP1 細胞，並經由處理後 5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、1 小時、3 小時及 6 小時所收集之免疫轉漬細胞核 (immunoblotting nuclear, n.p.) 萃取物測定 NF- κ B 家族成員之分佈。對於 LPS 之刺激作用，p50 早在刺激後 5 分鐘即轉位至細胞核並隨著時間累積 (第 7 圖，免疫轉漬及第 8 圖密度測定)。以化合物 2 處理經 LPS 刺激之細胞，於刺激後 5 分鐘至 1 小時對於 p50 進入細胞核之動力學均不具影響，且顯示細胞核部分之數量於 3 小時輕微降低。該檢測 p65 細胞核轉位作用之實驗係顯示於第 9 圖 (免疫轉漬) 以及第 10 圖 (密度測定)。於 LPS 刺激之細胞中，p65 早在刺激後 5 分鐘即轉位入細胞核並於刺激後 15 至 30 分鐘累積至最大量。以化合物 2 處理經 LPS 刺激之細胞，對於 p65 進入細胞核之動力學並不具影響。相對於未處理之細胞，於化合物 2 處理之細胞中，細胞核 p65 之數量於稍後之時間 (6 小時) 顯現輕微增加。

未預期與理論相結合，對於 LPS 之刺激作用，化合物 2 並不影響 p50 及 p65 細胞核轉位作用之動力。於稍後之時間，化合物 2 減弱了 p50 之細胞核轉位作用 (於 3 小時之時間點) 並增加了 p65 之細胞核轉位作用 (於 6 小時之時間

點)，顯示其對 NF- κ B 家族具選擇性之影響。

VIII. 化合物 2 對 p52 及 Rel-B 細胞核轉位作用之影響

Rel-B 及 p52 為 Rel 家族之兩成員，其係相互優先形成複合物。與 p50 及 p65 相似，p52 實質上係發現於所有細胞型中，而 c-Rel 及 Rel B 則僅於淋巴組織中偵測到。為測定化合物 2 對於 p52 及 Rel-B 細胞核轉位作用之影響，係於存在或不存在 100 nM 化合物 2 下以 IFNg+LPS 刺激 THP1 細胞，並於處理後 6 小時以免疫轉漬分析法測定 p52 及 Rel-B 之分佈。如第 11 圖所示，於化合物 2 存在下，細胞核 Rel-B 係輕微增加。於 p52 則無顯著影響。此結果顯示化合物 2 專一性地抑制 c-Rel 及 p50 之細胞核轉位作用，但對於其他 NF- κ B p52 及 Rel-B 之細胞核轉位作用則否。

細胞株及培養條件：

THP-1 細胞株係得自美國菌種保存中心(Manassas, VA)。該 THP-1 細胞係培養於補充有 10%FCS (ATCC, Manassas, VA)及 1%青黴素/鏈黴素(Gibco-BRL, New York, N. Y.)之 RPMI 1640 (ATCC, Manassas, VA)中。該細胞係於不同濃度化合物 2 存在下，先注入 IFNg (100 U/ml)接著再注入 1 μ g/ml LPS。化合物 2 係製備於 DMSO 中，且包括無化合物之對照組在內，該 DMSO 於所有培養細胞中之終濃度係調整為 0.25%。18 小時後取不含細胞之上清液進行細胞激素測量。

細胞核萃取物之單離：

將 THP-1 細胞懸浮於 20 倍體積之緩衝溶液 A 中，該緩衝液 A 包含 10 mM KCl、10 mM HEPES (pH 7.9)、1 mM MgCl₂、1 mM 二硫代蘇糖醇 (DTT)、0.1% 諾納德 p40 (NP-40) 以及 0.5 mM 苯甲基磺醯基氟化物 (PMSF)，接著再進行均質化並於 4°C 下以 10,000 rpm 離心 5 分鐘。然後再將細胞核沈澱物懸浮於緩衝液 C 中，該緩衝液 C 包含 400 mM NaCl、20 mM HEPES (pH 7.9)、15 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、1 mM DTT、25% 甘油、1 mM PMSF 與 10 μg 亮抑酶肽 (leupeptin)、20 μg 胃蛋白酶抑制劑 (pepstatin) 以及每毫升 10 μg 胰蛋白酶抑制劑 (antipain)，並於 4°C 下培養 30 分鐘，再以 14,000 rpm 離心 20 分鐘。將上清液以包含 100 mM NaCl、20 mM HEPES (pH 7.9)、20% 甘油、1 mM PMSF 以及 1 mM DTT 之緩衝液 D 透析。

西方墨點法：

將 10% SDS 聚丙烯醯胺凝膠 (Invitrogen) 轉移至純硝化纖維膜 (BioRad, Hercules, CA)。使該膜經 TBST 緩衝液之 5% 牛奶阻隔，接著再使用抗-c-Rel、抗-p65、抗-p50、抗-ICSBP 或抗-PU-1 抗體 (所有抗體皆購自 Santa Cruz) 於 1:500 之稀釋下，以室溫培養 (incubated) 1 小時或以 4°C 培養一夜。洗滌該膜並使用與辣根過氧化酶 (Horseradish Peroxidase) 結合之抗-兔 IgG 或抗-小鼠 IgG 抗體 (Amersham, England) 於 1:2000 之稀釋下，以室溫培養 1 小時。

預期化合物 3 至 14 於實施例 I 至 VIII 所述之步驟中

具有與化合物 1 及 2 相似之活性。

如該項技藝中具有通常知識者所顯見，本發明可於不悖離其精神及範疇下進行許多修飾及變化。本文中所述之特定具體實施例僅提供作為例示之用，且本發明僅受限於附加之各項申請專利範圍，此外其全部範疇係等同於申請專利範圍所主張之權利。此等修飾均包含於所附加申請專利範圍之範疇內。

本文引用之所有專利及非專利文獻之全部內容係於此合併作為參考文獻且各個經特定或單獨指示合併作為參考文獻之個別刊物或專利或專利說明書之全部內容皆屬本發明相同範疇。

本文所揭露之所有特徵、特定具體實施例以及特定取代者皆可以任何組合結合。本說明書中所揭露之各特徵、具體實施例或取代者皆可由任何可選擇之特徵、具體實施例或取代者取代以提供相同、相當或相似之目的。於化學化合物之實例中，特定值可以任何組合結合以得到穩定結構。此外，於一種類型之化學結構中，取代者之特定值（不管較佳與否）可以相同或相異類型之化學結構中的其他取代者之值（不管較佳與否）結合。因此，除非明確聲明，否則任何揭露之特徵、具體實施例或取代者僅為一系列相當或相似之特徵、具體實施例或取代者的範例。

【圖式簡單說明】

第 1A 至 1B 圖係顯示人類 c-Rel 之核苷酸及胺基酸序列（其係分別為 SEQ ID NOS：1 及 2）。

第 2A 及 2B 圖係顯示試驗分子抑制由 IFN- γ 及 IFN- γ /LPS 所誘導之 p40(第 2A 圖)及 p35(第 2B 圖)表現的能力。

第 3A 圖係顯示所使用之不同試驗啟動子的示意圖，以及第 3B 圖係顯示各種試驗啟動子對於 IFN- γ /LPS 之刺激的反應能力。

第 4 圖係顯示在受刺激與未受刺激之細胞中，THP-1 細胞核萃取物之西方墨點分析法，該分析係與 NF κ B 家族成員 c-Rel、p65 或 p50 之存在有關； α -微管蛋白為內部對照組(internal control)。

第 5 圖係顯示在受刺激與未受刺激之細胞中，THP-1 細胞核萃取物與抗-ICSBP 抗體之西方墨點分析法。

第 6 圖係顯示在受刺激與未受刺激之細胞中，THP-1 細胞核萃取物與抗-PU-1 抗體之西方墨點分析法。

第 7 圖為免疫墨點分析法，係顯示試驗分子對 NF- κ B p50 細胞核轉位作用之影響。

第 8 圖為密度測定結果之圖表，係顯示試驗分子對 p50 細胞核轉位作用之影響。

第 9 圖為免疫墨點分析法，係顯示試驗分子對 NF- κ B p65 細胞核轉位作用之影響。

第 10 圖為密度測定結果之圖表，係顯示試驗分子對 p65 細胞核轉位作用之影響。

第 11 圖免疫墨點分析法，係顯示試驗分子對 NF- κ B 成員之細胞核轉位作用的影響，包括 c rel。

五、中文發明摘要：

本發明係有關用於調節 c-Rel 依賴型細胞激素產生但不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之組成物及方法。本發明亦有關藉由分析 c-Rel 之經改變的細胞內定位 (subcellular localization) 來篩選不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之 c-Rel 活性調節劑。

六、英文發明摘要：

The present invention is directed to compositions and methods for modulating c-Rel -dependent cytokine production without materially altering the level of expression of NF κ B and/or the amount of I κ B. The present invention is also directed to screening for modulators of c-Rel activity as determined by assaying for altered subcellular localization of c-Rel but where the level of expression of NF κ B and/or the amount of I κ B is materially unaltered.

十、申請專利範圍：

1. 一種鑑定於細胞內改變 c-Rel 細胞內定位

(subcellular location)之分子之方法，係包括：

(a)使該細胞與一種或一種以上之候選分子接觸；
以及

(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，

其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量之情況下，當該 c-Rel 定位至細胞核的量相較於未與一種或一種以上之候選分子接觸之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel 之細胞內定位。

2. 一種鑑定於細胞內改變 c-Rel 細胞內定位之分子之方法，係包括：

(a)於該細胞中重組表現一種或一種以上之候選分子；以及

(b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，

其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，當該 c-Rel 定位至細胞核的量相較於在不表現一種或一種以上候選分子之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel 之細胞內定位。

3. 如申請專利範圍第 1 或第 2 項之方法，其中，步驟(b)係包括使細胞與抗 c-Rel 之抗體或該抗體之結合區以及該抗體之經螢光標定結合對象於有利於免疫專一性結合之條件下接觸。

4. 如申請專利範圍第 1 或第 2 項之方法，其中，步驟(b)係包括使細胞與經螢光標定之抗 c-Rel 之抗體或該抗體之結合區於有利於免疫專一性結合之條件下接觸。
5. 如申請專利範圍第 1 或第 2 項之方法，其中，步驟(b)係包括使用質譜儀將自細胞單離出之核蛋白定序。
6. 如申請專利範圍第 1 或第 2 項之方法，其中，該細胞為經培養之細胞。
7. 一種鑑定於細胞內改變 c-Rel 細胞內定位之分子之方法，係包括：
 - (a)將一種或一種以上之候選分子顯微注射入該細胞中；以及
 - (b)偵測該細胞中 c-Rel 分子之定位，其中，在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，當該 c-Rel 定位至細胞核的量相較於未以一種或一種以上候選分子顯微注射之細胞中所測得者更為增加或減少時，則顯示該候選分子改變 c-Rel 之細胞內定位。
8. 一種用於篩選調節 c-Rel 活性之分子之方法，係包括：
 - (a)使表現 c-Rel 之細胞與一種或一種以上之候選分子接觸；以及
 - (b)在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，偵測該細胞中 c-Rel 定位至細胞核的量，並相較於未與該候選分子接觸之細胞中所測得者，其中，於該候選分子存在下，當 c-Rel 定位至細胞核的

量較高或較低時，則顯示該候選分子調節 c-Rel 之活性。

9. 一種用於篩選直接或間接調節 c-Rel 活性之分子之方法，係包括：

(a)於表現 c-Rel 之細胞中重組表現一種或一種以上之候選分子；以及

(b)在不顯著改變 NF κ B 表現量及/或 I κ B 數量的情況下，偵測該細胞中 c-Rel 定位至細胞核的量，並相較於不表現該候選分子之細胞中所測得者，

其中，於該候選分子存在下，當 c-Rel 定位至細胞核的量較高或較低時，則顯示該候選分子調節 c-Rel 之活性。

10. 如申請專利範圍第 8 或第 9 項之方法，其中，該候選分子降低 c-Rel 定位至細胞核的量，因此該候選分子為 c-Rel 活性之候選抑制劑。

11. 如申請專利範圍第 8 或第 9 項之方法，其中，該候選分子增加 c-Rel 定位至細胞核的量，因此該候選分子為 c-Rel 活性之候選促效劑。

12. 如申請專利範圍第 8 或第 9 項之方法，其中，該候選分子係衍生自受限之隨機胜肽庫。

13. 如申請專利範圍第 8 或第 9 項之方法，其中，偵測 c-Rel 定位至細胞核之方法係包括：使該細胞與結合至 c-Rel 之分子以及結合至除了 c-Rel 以外之細胞核-專一性蛋白之分子於有利於結合之條件下接觸，並偵測該分子於

相同細胞內定位發生之任何結合。

14. 如申請專利範圍第 8 或第 9 項之方法，其中，步驟(b)係包括：使細胞與經螢光標定之抗 c-Rel 之抗體或該抗體之結合區於有利於免疫專一性結合之條件下接觸。
15. 一種化合物，係抑制 c-Rel 轉位至細胞核但不顯著改變 NF κ B 表現及 / 或 I κ B 數量。
16. 一種醫藥組成物，包括申請專利範圍第 15 項之化合物；以及醫藥上可接受之載劑或賦形劑。
17. 如申請專利範圍第 16 項之醫藥組成物，復包括生長激素或生長激素促泌素。
18. 如申請專利範圍第 16 項之醫藥組成物，復包括 TNF 拮抗劑。
19. 一種治療或改善與 IL-12 產生有關之疾病或不適之方法，係包括：將申請專利範圍第 17 項之組成物以足以治療或改善該疾病或不適之量投與至需要之對象。
20. 如申請專利範圍第 19 項之方法，復包括共同投與生長激素、生長激素促泌素、TNF 拮抗劑、抗發炎劑及 / 或免疫調節劑。
21. 一種治療或改善與 IL-12 產生有關之疾病或不適之方法，其中該治療或改善對象為經鑑定需要此治療或改善者，係包括：將申請專利範圍第 17 項之組成物以足以治療或改善該疾病或不適之量投與至需要之對象。
22. 一種套組，包括申請專利範圍第 15 項之化合物，該化合物係經標記為用於投與至經鑑定需要此化合物之對象。

cggaaaggtgt gagccycaaa cccagccyag gscgggaaga aggagggagcc ctczggg'g
 61 nccgggggac tgggggccc gccggcrag agccctcggc ctcazgaag actgactgc
 121 gccgcctccg gccaggaacc tgggagctgc ctgagggaag gtcggggag caggagccag
 181 gccctcgggt cgtataacc gatazagag ataatgaa accccaggca gaggggzag
 241 cglittagat acaaatgta agggcgalca gcagycagca lccagggga gcacagcaca
 301 gacaacaacc gaacataacc ctatccag ataatgaa ataatgaa aggaaagtg
 361 agaatlacat tagiacaana gaulgacca tataaacc accctatga itayrtgga
 421 aaagactgca gagacggca ctatgagca gaattggac aayaacgcag accitgtt
 481 ticraaati tgggtatcc atgtgtgag aazaagag laaagaagc taitatca
 541 agataaagg caggatcaa tccatcaat gtcctgaa acccctgaa tgalatgaa
 601 gatttgacc tcaatgtgt gagactgt titaagtt tctccctga tgaacatgt
 661 aattgacca ctctctcc lccgtgtc tgaaccaa tatalgaca ccgtgcaca
 721 aatctgcag aaitaaggt itgtgtga acaagaat gggaggtgt cagaggagga
 781 gatgaatal tctacttg gacaaagt cagaagatg acatagaat tglitgtg
 841 tgaacgat gggagcaaa aggcattt icacaagct atgtaccc tcaatgagc
 901 atgtttca aaactacc alatgcaa gctacacag acccctgac aglaaaag
 961 cagtgggga gactctga ccaggaagt agtgacta tggaitag atctgtcca
 1021 gatgaagag atactacgg caataagca aagaacaa agcaactt gctttccg
 1081 aaactgtcc aggatcagt agaacagg tttccctg tgaacagga tggcttga
 1141 cctctgaca caggatcc acccactg gccctccaa gtcgggat tazagta
 1201 tttctgaga gaccagacc tggctccc gttcaatt gagaggaag atactcaaa
 1261 aaagaacaa actgtttc tcaatgca gttgtgag aatgctac aggggttca
 1321 agtcaagcag aactctca tctctacc gggccatct caagtgtt gtaacat
 1381 gcccaatgg cactctgac tctcaagc tggctcag tggccacc ccccaccg
 1441 ccaggcaata caaccact gagtgttt caacagga cactcttc taatgca
 1501 agtaccac cactctgag aatccgtt gggatgatt taatgttc taatctgt
 1561 attaacaa atgccagca catagtgga atggagagc cctccatgc atagcagat
 1621 tatalgta tttctgac caactgtc tcaatgtt ctggaatal gatgcaacc
 1681 agcagigaca gcatgggga gactgata ccaagact tgaatgaa tllgaaac
 1741 cctctatga atcaggtt agaccaga gactgagac agtccatca gctgtct
 1801 tcaatgtgt cagcagcc caatcaat actactgt ttttcaaa alcagatga
 1861 itgagggat ctgactcag ttgtcagat aacagatga taatgagc gggccatca
 1921 accgacta acccaacc caatgttt gttcaagata gctgtatc aggtatgc
 1981 agtagcaaa atggcaat gactgctc tttcatat attttca agtatact
 2041 gcaagatta aactctta atcttgata ccaactat agatgagca tttgtat
 2101 gctaacagg gataaala ctatatt actgtatata taatctgac tgaatata
 2161 atactgatt tgaatata aaaaatt tcaagggaag aacatcaaa ctltggcat
 2221 agcgaataa aatgggag ctctcaaaa aagacact agagccagg cagcgggt
 2281 cacactga atctagac ttggggag caagcgggt gctacttg agaccag

第 1A 圖

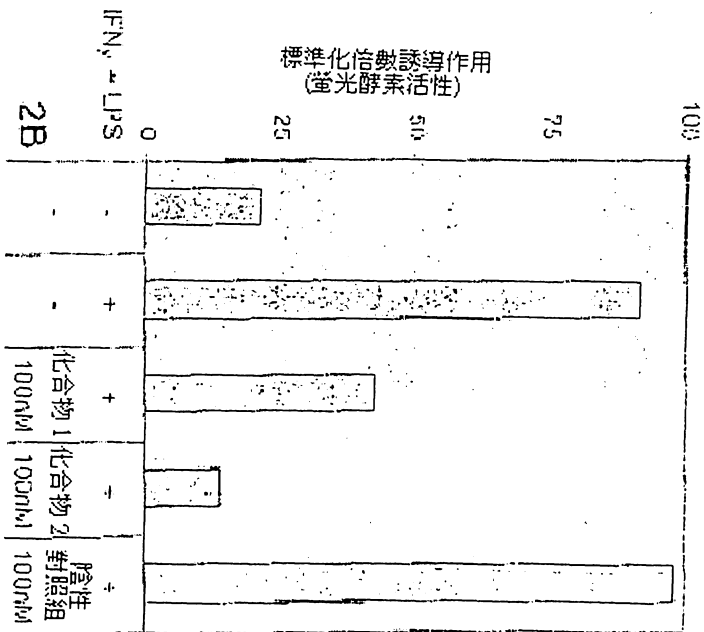
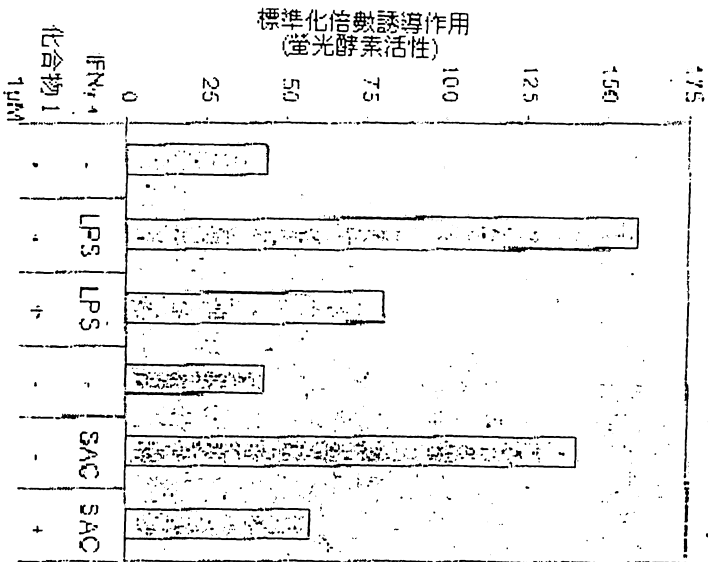
1 masqayrpyl eilepqrq mrtfkcqgr vagsiyeha zdaurtyptl qitnyyqkqk
 61 vritivkkné pyxqnhely gkderdgye atkgqertpl efgulgrcv kxkxkkaali
 121 erikagimoi nypekqindai edodinwrti cigvtilpdeh gniltalipw vanpilydnra
 181 pttaelirict vnkogayvrg gdeliflyedk vqkddiavrt vindweakgi tsqadvhrqv
 241 alvfktrpvc kattepvrc mqltrpedge vaesrdityl plekdvgnk akkqktc11e
 301 qkicqdvoc gtrhvqdgj allsqddpvc lanqaqitv nfpayvrgj lqsiqegryz
 361 kkepnitshd avvempcyv ssqesyyrs psptisqish hestapiss swavahpvc
 421 tagnimpls fectipans qqipflrip vgodlnana ciyennaddiv gmowassmpsa
 481 dlygidpam lansevmut tsqdamgctd nprlismole npscnvldp rdilvqlhcms
 541 kxmsagans nrtvsvqad vtegrdtscs dnmimwgr spstapnshg evqdsqyrsi
 601 gsmqneqisd epyerfgy

第 1B 圖

IL-12 p40 啟動子活性分析

IL-12 p40 (1.2k p40C-1)

IL-12 p35 (1.5k p35 C-10)



2A

2B

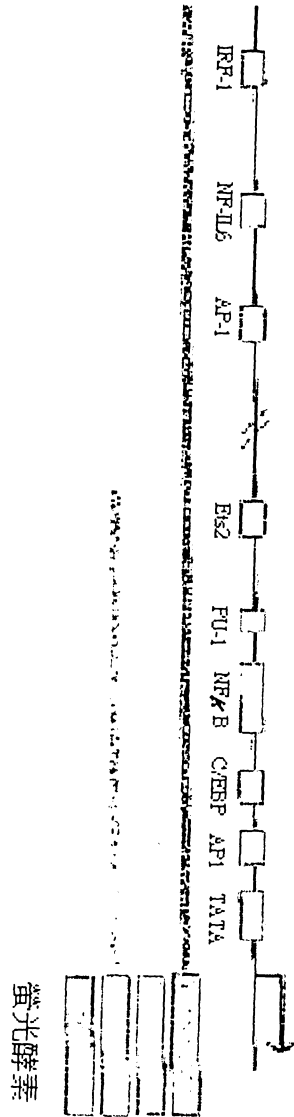
IC50 (by ELISA)
of IL-12p70 from THP-1
40nM 10nM > 1 μM

第 2A 至 2B 圖

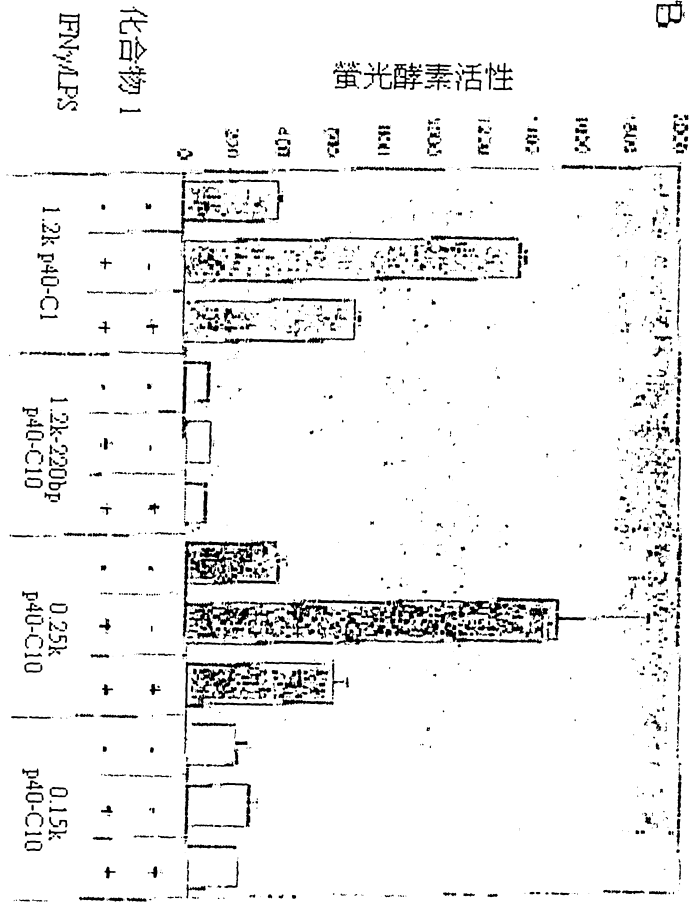
IL-12 p40 基因之啓動子刪減分析

3A IL12 p40 啓動子

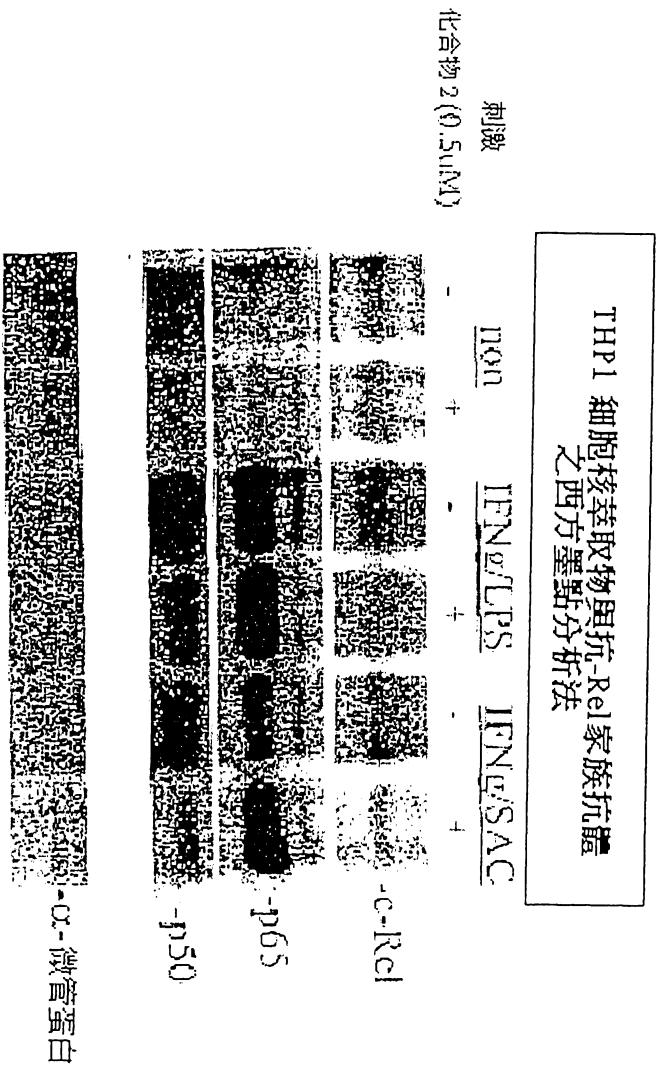
- 1.2k p40-C10
- 1.2k-220bp p40-C10
- 0.25k p40-C10
- 0.15k p40-C10



3B



第 3A 至 3B 圖



第 4 圖

THP1 細胞核萃取物與抗-ICSBP 抗體
之西方墨點分析法

來自Bis 2 DNA 結合分析法之物質

陽性對照組	結合	未結合	IFN γ /LPS 化合物 1
+	+	+	+
-	+	-	+



第 5 圖

THP1 細胞核萃取物與抗-PU-1 抗體
之西方墨點分析法

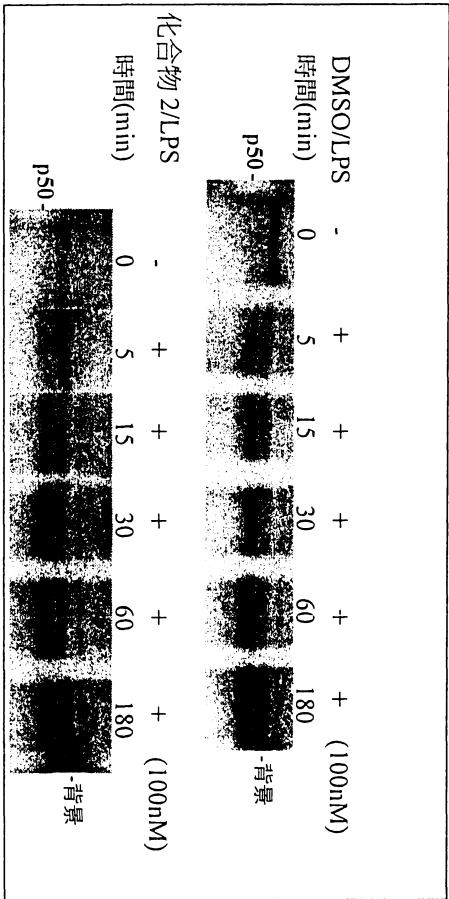
來自Bcr 2 DNA 結合分析法之物質

結合	+	-	未結合	+	-	IFN γ /PPS 化合物 1
	+	+	+	+	-	

PU-1-

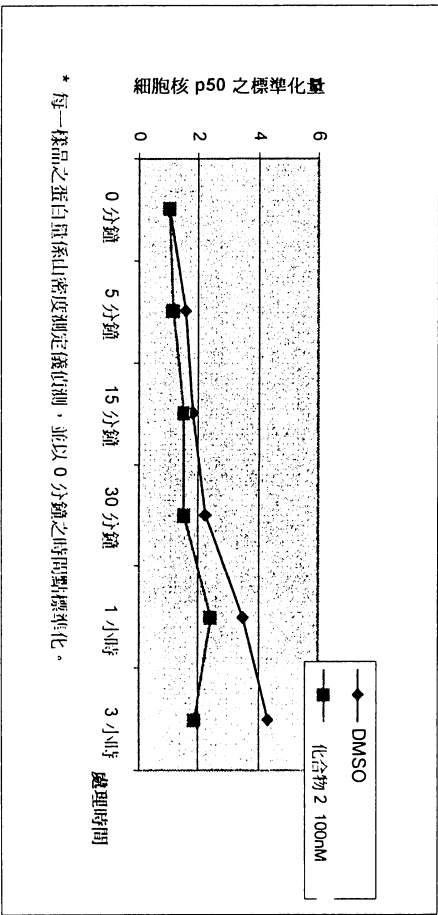


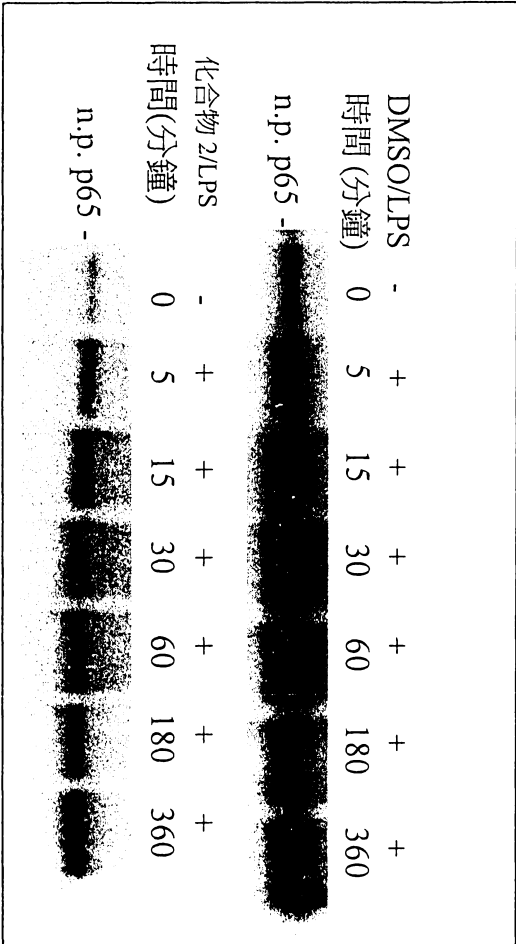
第 6 圖



第7圖

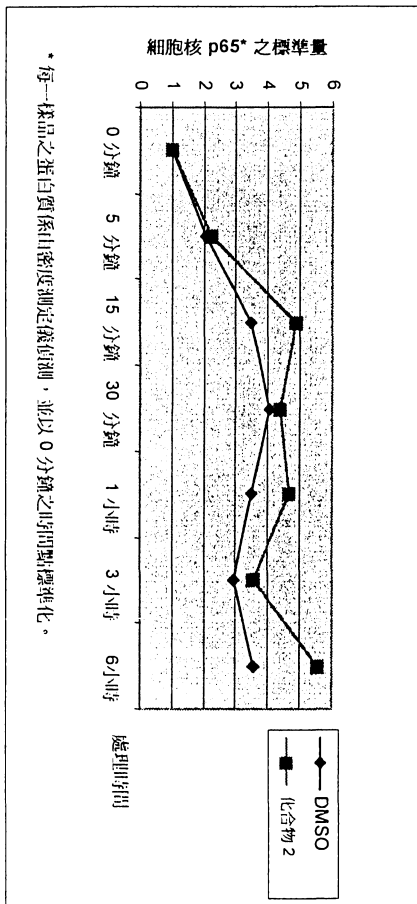
第 8 圖

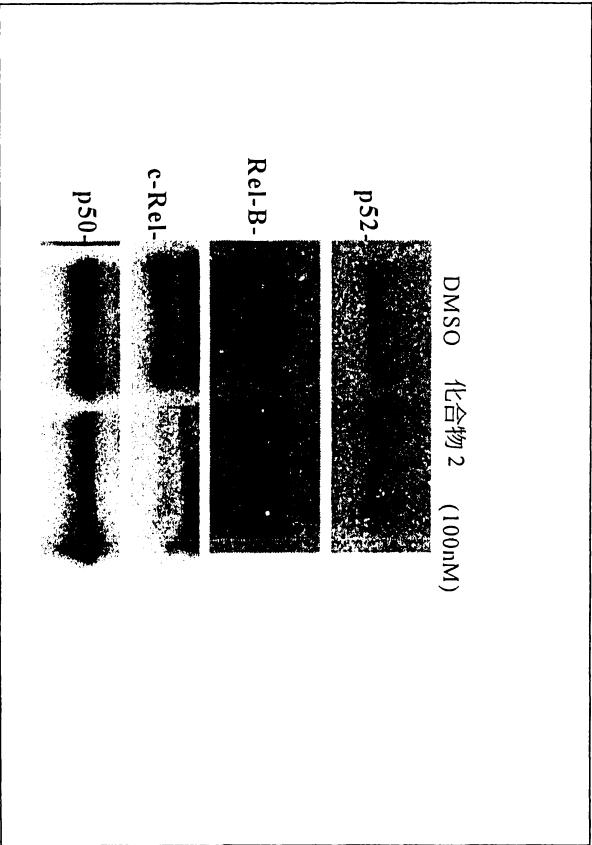




第 9 圖

第 10 圖





第 11 圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (7) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

該代表圖無元件符號及其所代表之意義。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

修正
補充
91年5月(自)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：43134232

※ 申請日期：

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

調節 C-REL-依賴型細胞激素產生之組成物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING C-REL-DEPENDENT
CYTOKINE PRODUCTION

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

幸託製藥公司

SYNTA PHARMACEUTICALS CORP.

代表人：(中文/英文) 瑞德 溫蒂 E / RIEDER, WENDY E.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國·麻州 02421·賴新頓·哈維爾大道 45 號

45 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421, U. S. A.

國 籍：(中文/英文) 美國 / U. S. A.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 呂容真 / LU, RONGZHEN

2. 巴生 詹姆士 / BARSOUM, JAMES

3. 和田裕美子 / WADA, YUMIKO

國 籍：(中文/英文)

1. 中國大陸 / CHINESE 2. 美國 / U. S. A.

3. 日本國 / JAPAN