

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-523275

(P2016-523275A)

(43) 公表日 平成28年8月8日 (2016. 8. 8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-522322 (P2016-522322)	(71) 出願人	513309199
(86) (22) 出願日	平成26年6月26日 (2014. 6. 26)		ザイジェン インフラメーション リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月25日 (2015. 11. 25)		キプロス共和国 3030 リマソール,
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/001737		アーチ. マカリオウ ザ サード 19
(87) 国際公開番号	W02014/206564		5, ネオクレウス ハウス
(87) 国際公開日	平成26年12月31日 (2014. 12. 31)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2013/001880		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成25年6月26日 (2013. 6. 26)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 多様な疾患を処置するための J N K 阻害剤分子の新規な用途

(57) 【要約】

本発明は、新規の J N K 阻害剤分子の使用および治療によりヒトまたは動物の身体を処置する方法におけるそれらの使用に関する。一局面において、本発明は、治療によりヒトまたは動物の身体を処置する方法における使用のための J N K 阻害剤を提供し、この J N K 阻害剤は、一般式：X 1 - X 2 - X 3 - R - X 4 - X 5 - X 6 - L - X 7 - L - X 8 (配列番号 1) に従う阻害性 (ポリ) ペプチド配列などを含む J N K 阻害剤を含み、式中、各 X 1 ~ X 8 は、本明細書で規定される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトまたは動物の身体の疾患の処置に使用するための J N K 阻害剤であって、前記 J N K 阻害剤は、以下：

a) 以下の一般式：

X 1 - X 2 - X 3 - R - X 4 - X 5 - X 6 - L - X 7 - L - X 8 (配列番号 1)

に従う阻害性 (ポリ) ペプチド配列を含む J N K 阻害剤であって、式中、

X 1 は、アミノ酸 R、P、Q、および r から選択されるアミノ酸であり、

X 2 は、アミノ酸 R、P、G、および r から選択されるアミノ酸であり、

X 3 は、アミノ酸 K、R、k、および r から選択されるアミノ酸であり、

X 4 は、アミノ酸 P および K から選択されるアミノ酸であり、

X 5 は、アミノ酸 T、a、s、q、k から選択されるアミノ酸であるか、または存在せず、

X 6 は、アミノ酸 T、D、および A から選択されるアミノ酸であり、

X 7 は、アミノ酸 N、n、r、および K から選択されるアミノ酸であり、かつ

X 8 は、F、f、および w から選択されるアミノ酸であり、

大文字で記されるアミノ酸残基が、L - アミノ酸を示すのに対し、小文字で記されるアミノ酸残基は、D アミノ酸残基を示し、

ただし、X 1、X 2、X 3、X 5、X 7 および X 8 からなる群より選択される前記アミノ酸のうちの少なくとも 1 つが、D - アミノ酸 (複数可) であることを条件とする、J N K 阻害剤；ならびに

b) a) で規定された配列番号 1 と少なくとも 80 % の配列同一性を共有する阻害性 (ポリ) ペプチド配列を含む J N K 阻害剤であって、ただし、配列番号 1 に関して、配列番号 1 と配列同一性を共有するこのような阻害性 (ポリ) ペプチド配列が、配列番号 1 の 4 位における L - アルギニン (R) 残基、ならびに配列番号 1 の 8 位および 10 位における 2 つの L - ロイシン (L) 残基を維持し、かつ配列番号 1 と少なくとも 80 % の配列同一性を共有する前記配列中の残りのアミノ酸のうちの少なくとも 1 つが D - アミノ酸であることを条件とする、J N K 阻害剤からなる群より選択される、J N K 阻害剤。

【請求項 2】

X 3、X 5、X 7、および X 8 からなる群より選択される前記アミノ酸のうちの少なくとも 1 つが、D - アミノ酸 (複数可) である、請求項 1 に記載の使用のための J N K 阻害剤。

【請求項 3】

配列番号 2 ~ 27 のうちのいずれか 1 つから選択される配列と少なくとも 80 % の配列同一性を共有する阻害性 (ポリ) ペプチド配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の使用のための J N K 阻害剤。

【請求項 4】

前記阻害性 (ポリ) ペプチド配列が、配列番号 2 ~ 27 のうちのいずれか 1 つから選択される、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用のための J N K 阻害剤。

【請求項 5】

配列番号 8 または配列番号 8 と少なくとも 80 % の配列同一性を共有する阻害性 (ポリ) ペプチド配列を含む、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用のための J N K 阻害剤。

【請求項 6】

輸送体配列を含む、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用のための J N K 阻害剤。

【請求項 7】

前記阻害性 (ポリ) ペプチド配列と前記輸送体配列とが重複する、請求項 6 に記載の使用のための J N K 阻害剤。

【請求項 8】

前記輸送体配列が、配列番号 28 ~ 30 のうちのいずれか 1 つに従う、D - アミノ酸と L - アミノ酸とが交互になった配列を含む、請求項 6 または 7 に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 9】

前記輸送体配列が、配列番号 31 ~ 170 のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 10】

前記輸送体配列が、配列番号 31 ~ 34、46、47、および 52 ~ 151 のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 6 から 9 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

10

【請求項 11】

前記輸送体配列が、前記阻害性（ポリ）ペプチド配列のちょうど N 末端またはちょうど C 末端に位置する、請求項 6 から 10 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 12】

a) 配列番号 171 ~ 190 のうちのいずれか 1 つに従う配列、または

b) 配列番号 171 ~ 190 のうちの少なくとも 1 つと少なくとも 50 % の配列同一性を共有する配列であって、配列番号 171 ~ 190 のうちの少なくとも 1 つと配列同一性を共有する前記配列が、以下：

20

i) 配列番号 1 に対応するその配列の連なりの中の 4 位において、前記 L - アルギニン（R）残基を維持し、

ii) 配列番号 1 に対応するその配列の連なりにおいて、前記 2 つの L - ロイシン（L）を維持し、かつ

iii) 配列番号 1 に対応するその配列の連なりの中の X1、X2、X3、X5、X7、もしくは X8 位において、少なくとも 1 つの D - アミノ酸を呈示することを条件とする、配列

を含む、請求項 6 から 11 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 13】

a) 配列番号 172 の配列、または

30

b) 配列番号 172 と 50 % の配列同一性を共有する配列であって、配列番号 172 と 50 % の配列同一性を共有する前記配列が、以下：

i) 配列番号 1 に対応するその配列の連なりの中の 4 位において、前記 L - アルギニン（R）残基を維持し、

ii) 配列番号 1 に対応するその配列の連なりにおいて、前記 2 つの L - ロイシン（L）を維持し、かつ

iii) 配列番号 1 に対応するその配列の連なりの中の X1、X2、X3、X5、X7、もしくは X8 位において、少なくとも 1 つの D - アミノ酸を呈示することを条件とする、配列

を含む、請求項 6 から 12 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

40

【請求項 14】

治療によりヒトまたは動物の身体を処置するための方法における使用のための JNK 阻害剤であって、

a) RPTTLNLF（配列番号 191）、KRPTTLNLF（配列番号 192）、RRPTTLNLF、および / または RPKRPTTLNLF（配列番号 193）からなる配列の群より選択される配列を含む阻害性（ポリ）ペプチド、ならびに

b) 配列番号 31 ~ 34 および 46 ~ 151 から選択される輸送体配列を含む、JNK 阻害剤。

【請求項 15】

治療によりヒトまたは動物の身体を処置するための方法における使用のための、配列番

50

号 194 または 195 の配列を含む JNK 阻害剤。

【請求項 16】

前記方法が、治療によりヒト身体を処置するための方法である、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 17】

静脈内投与、筋内投与、皮下投与、皮内投与、経皮投与、腸内投与、経口投与、直腸内投与、外用投与、経鼻投与、局所投与、鼻腔内投与、表皮投与、パッチ送達によって投与、滴下によって投与、硝子体内投与、結膜下投与、および / または鼓室内投与される、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 18】

前記使用が、糸球体腎炎一般、特に、膜増殖性糸球体腎炎、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、腎症一般、特に、膜性腎症または糖尿病性腎症、腎炎一般、特に、ループス腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、尿細管間質性腎炎、慢性腎炎または急性腎炎、ならびに微小変化型疾患および巣状分節状糸球体硬化症から特に選択される腎疾患および / または腎障害を処置するためのものである、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 19】

前記使用が、皮膚疾患、特に、炎症性皮膚疾患、より具体的には、湿疹、乾癬、皮膚炎、ざ瘡、口腔潰瘍、紅斑、扁平苔癬、サルコイドーシス、血管炎、および成年性線状 IgA 病からなる群から選択される皮膚疾患、特に、アトピー性皮膚炎または接触皮膚炎から選択される疾患および / または障害を処置するためのものである、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 20】

前記使用が、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、萎縮性側索硬化症、抗リン脂質症候群、アトピー性アレルギー、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性多内分泌症候群、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性蕁麻疹、パロー同心円性硬化症、水疱性類天疱瘡、キャスルマン病、瘢痕性類天疱瘡、寒冷凝集素疾患、補体成分 2 欠損関連疾患、クッシング症候群、ドゴー病、有痛脂肪症、好酸球性肺炎、後天性表皮水疱症、新生児の溶血性疾患、寒冷グロブリン血症、エバンス症候群、進行性骨化性線維異形成症、消化器性類天疱瘡、グッドパスチャー症候群、橋本脳炎、妊娠性類天疱瘡、ヒューズ - ストローヴィン症候群、低ガンマグロブリン血症、ランバート - イートン筋無力症候群、硬化性苔癬、限局性強皮症、急性痘瘡状苔癬状粧糠疹、重症筋無力症、ナルコレプシー、神経性筋緊張病、オブソクロノスミオクロノス症候群、傍腫瘍性小脳変性、発作性夜間ヘモグロビン尿症、バリ - ロンベルク症候群、悪性貧血、P O E M S 症候群、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、レイノー現象、むずむず脚症候群、後腹膜線維症、2 型自己免疫性多内分泌症候群、スティッフパーソン症候群、スザック症候群、熱性好中球性皮膚病、シドナム舞蹈病、血小板減少症、および白斑から選択される疾患および / または障害の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 21】

前記使用が、急性播種性脳脊髄炎、抗シンセターゼ症候群、自己免疫性肝炎、自己免疫性末梢神経障害、膵炎、特に、自己免疫性膵炎、ピッカーstaff 型脳炎、ブラウ症候群、セリアック病、シャーガス病、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、骨髄炎、特に、慢性再発性多発性骨髄炎、チャグ - ストラウス症候群、コーガン症候群、巨細胞性動脈炎、C R E S T 症候群、血管炎、特に、皮膚小血管性血管炎および蕁麻疹様血管炎、皮膚炎、特に、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、全身性強皮症、ドレスラー症候群、薬物誘導性ループス、円板状エリテマトーデス、腱付着部炎、好酸球性筋膜炎、胃腸炎、特に、好酸球性胃腸炎、結節性紅斑、特発性肺線維症、胃炎、グレーブス病、ギラン - バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ - シェーンライン紫斑病、汗腺膿瘍、特発性炎症性脱髄性疾患、筋炎、

10

20

30

40

50

特に、封入体筋炎、膀胱炎、川崎病、扁平苔癬、ルポイド肝炎、マジード症候群、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織疾患、脊髄炎、特に、神経脊髄炎、例えば、視神経脊髄炎、甲状腺炎、特に、オールド甲状腺炎、リウマチ、特に、回帰性リウマチ、パーソンージ-ターナー症候群、静脈周囲性脳脊髄炎、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、肝硬変、特に、原発性胆汁性肝硬変、胆管炎、特に、原発性硬化性胆管炎、進行性炎症性神経障害、ラスムッセン脳炎、軟骨炎、特に、多発性軟骨炎、例えば、再発性多発性軟骨炎、反応性関節炎（ライター病）、リウマチ熱、サルコイドーシス、シュニッツラー症候群、血清病、脊椎炎、特に、強直性脊椎炎、脊椎関節症、高安動脈炎、トロサ-ハント症候群、横断性脊髄炎、ならびに肉芽腫症、特に、ウェゲナー肉芽腫症から選択される炎症性疾患および／または炎症性障害の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

10

【請求項 22】

前記使用が、タウオパシーおよびアミロイドーシスおよびプリオン病から選択される疾患および／または障害の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 23】

前記使用が、ポリープの処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 24】

前記使用が、歯肉炎、骨壊死（例えば、顎骨の）、インプラント周囲炎、歯髄炎、および歯周炎から選択される疾患および／または障害の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

20

【請求項 25】

前記使用が、特に、肺線維症、心臓線維症、肝臓線維症、骨髄線維症、縦隔線維症、後腹膜線維症、皮膚線維症、腸線維症、関節線維症、および肩線維症から選択される線維性疾患および／または線維性障害の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 26】

前記使用が、多様な形態の認知症、例えば、前頭側頭型認知症およびレビー小体型認知症、統合失調症、脊髄小脳性運動失調、脊髄小脳萎縮、多系統萎縮症、運動ニューロン病、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、または遺伝性痙攣性対麻痺から選択される疾患および／または障害の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

30

【請求項 27】

前記使用が、角膜手術後の炎症、非感染性角膜炎、脈絡網膜の炎症、および交感性眼炎から選択される眼関連疾患および／または眼関連障害の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 28】

前記使用が、特に、心臓、腎臓、および皮膚（組織）、肺、脾臓、肝臓、血液細胞、骨髄、角膜、偶発的に切断された四肢（指、手、脚部、顔面、鼻など）、任意の種類の骨、心弁、血管、ならびに腸のセグメントの移植から選択される組織移植または臓器移植から生じる疾患および／または障害の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

40

【請求項 29】

前記使用が、乾癬の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 30】

前記使用が、ドライアイ疾患の処置のための使用である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための JNK 阻害剤。

【請求項 31】

50

前記使用が、眼の網膜を損傷する持続性炎症性疾患または急性炎症性疾患（網膜症）、特に、糖尿病網膜症、動脈性高血圧症誘導性高血圧性網膜症、放射線誘導性網膜症、太陽光誘導性日光性網膜症、外傷誘導性網膜症、例えば、ブルチャーの網膜症、未熟児網膜症（ROP）、および過粘稠度関連網膜症の処置のための使用である、請求項１から１７のいずれか一項に記載の使用のためのJNK阻害剤。

【請求項３２】

前記使用が、加齢性黄斑変性（AMD）、特に、加齢性黄斑変性の湿潤形態または乾燥形態の処置のための使用である、請求項１から１７のいずれか一項に記載の使用のためのJNK阻害剤。

【請求項３３】

前記使用が、特に、心臓移植時、腎臓移植時、または皮膚（組織）移植時の臓器移植、心臓移植時、腎臓移植時、または皮膚（組織）移植時の移植片拒絶の処置のための使用である、請求項１から１７のいずれか一項に記載の使用のためのJNK阻害剤。

【請求項３４】

前記使用が、関節症／関節炎、特に、反応性関節炎、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、および乾癬性関節炎の処置のための使用である、請求項１から１７のいずれか一項に記載の使用のためのJNK阻害剤。

【請求項３５】

前記使用が、糸球体腎炎を処置するためのものである、請求項１から１７のいずれか一項に記載の使用のためのJNK阻害剤。

【請求項３６】

配列番号１７２の配列からなる、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用のためのJNK阻害剤。

【請求項３７】

請求項１から１５のいずれかに記載のJNK阻害剤と薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項３８】

請求項１８から３５に記載の疾患／障害のうちのいずれかの処置に使用するための、請求項３７に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、酵素阻害の分野、特に、c-Junアミノ末端キナーゼ（JNK）の（ポリ）ペプチド阻害剤に関する。特に、本発明は、これらのJNK阻害剤を、多様な疾患の処置において用いることに関する。

【背景技術】

【０００２】

c-Junアミノ末端キナーゼ（JNK）とは、マイトジェン活性化タンパク質（MAP）キナーゼのストレス活性化群のメンバーである。これらのキナーゼは、細胞成長および細胞分化の制御に関与し、より一般には、環境からの刺激に対する細胞の応答に関与している。JNKシグナル伝達経路は、環境ストレスに応答して、かつ、いくつかのクラスの細胞表面受容体の仲介により活性化する。これらの受容体には、サイトカイン受容体、セルペンチン受容体、および受容体チロシンキナーゼが含まれる。哺乳動物細胞では、JNKが、発がん性形質転換および環境ストレスに対する適応応答の媒介などの生物学的過程に関与している。JNKはまた、免疫細胞の成熟および分化を含めた免疫反応の調節のほか、免疫系による破壊のために同定された細胞におけるプログラム細胞死の実行とも関連している。この固有の特性により、JNKシグナル伝達は、薬理的介入を開発するための有望な標的となっている。いくつかの神経障害のうちで、JNKシグナル伝達は特に、虚血性脳卒中およびパーキンソン病に関与しているが、また、下記でさらに言及される他の疾患にも関与している。さらに、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAP

10

20

30

40

50

K) p38アルファは、JNK - c - Jun経路をアンタゴナイズすることにより、細胞増殖を負に調節することも示された。したがって、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK) p38アルファは、正常細胞およびがん細胞の増殖の抑制において活性であると考えられ、がん疾患におけるJNKの関与もさらに裏付けている(例えば、Huira、Nature Genetics、39巻、6号、2007年6月を参照されたい)。また、c - Jun N末端キナーゼ(JNK)が、脊髄神経結紮(SNL)によりもたらされる神経障害性疼痛であって、SNLによりJNK、特に、JNK1の緩徐で持続性の活性化が誘導される疼痛に関与するのに対し、p38マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ活性化は、SNL後の脊髄ミクログリアにおいて見出されたが、21日間で基底レベル近傍まで降下したことも示された(Zhuangら、The Journal of Neuroscience、2006年3月29日、26巻(13号): 3551~3560頁)。2007年(Biochemica et Biophysica Acta、1341~1348頁)において、Johnsonらは、c - Junキナーゼ/ストレス活性化経路についての総説で、海馬ニューロンの興奮毒性、肝虚血症、再灌流、神経変性疾患、聴力損失、難聴、出生時神経管欠損症、がん、慢性炎症性疾患、肥満、糖尿病、特に、インスリン抵抗性糖尿病への関与など、JNKシグナル伝達の疾患への関与について論じ、選択的JNK阻害剤が、高度の特異性および毒性の欠如を伴う多様な疾患の処置に必要とされる可能性が高いことを提起した。

【0003】

したがって、JNKシグナル伝達経路の阻害または遮断は、JNKシグナル伝達と強く関連する障害に対抗するのに有望な手法である。しかしこれまでのところ、公知のJNKシグナル伝達経路阻害剤は少数であるに過ぎない。

【0004】

先行技術において既に公知のJNKシグナル伝達経路阻害剤には、例えば、上流のキナーゼ阻害剤(例えば、CEP - 1347)、例えば、タンパク質キナーゼのATP結合部位と競合することによりキナーゼ活性に直接影響を及ぼす低分子の化学的JNK阻害剤(SP600125およびAS601245)、およびJNKとその基質との間の相互作用に対するペプチド阻害剤(例えば、全てが参照により本明細書に組み込まれる、Kuanら、Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders、2005年2月、4巻、1号、63~67頁; WO2007/031280を参照されたい)が含まれる。WO2007/031280は、HIV - TATタンパク質の塩基性トラフィッキング配列に由来する、いわゆるTAT輸送体配列およびIB1のアミノ酸阻害性配列を含む、低分子の細胞透過性融合ペプチドについて開示している。

【0005】

WO2007/031280は、特に、2つの特定の配列であるL - TAT - IB1(GRKRRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD、本明細書における配列番号196)およびD - TAT - IB1(dqsrvpvpflnltpkrppprrrqrkrkg; 本明細書における配列番号197)(後者はL - TAT - IB1のレトロインベルソ配列である)について開示している。HIV TATに由来する輸送体配列に起因して、これらの融合ペプチドは、標的細胞へとより効率的に輸送され、標的細胞では、タンパク質分解がなされるまで有効性を保持する。

【0006】

JNKに対するATP非依存性のペプチド阻害剤は通例、より特異的な阻害剤であるので、JNKを阻害するとなると、第1選択となることが多い。しかし、WO2007/031280で開示されているペプチド阻害剤でもなお、全ての目的に最適というわけではない。例えば、Lアミノ酸だけからなる化合物L - TAT - IB1(本明細書における配列番号196)は、急速にタンパク質分解される。この問題を克服するために、WO2007/031280の発明者らはまた、Dアミノ酸を含むD - TAT - IB1(本明細書における配列番号197)も示唆した。より正確に述べると、D - TAT - IB1は、L

- T A T - I B 1 のレトロインベルソ配列を呈示する。D - アミノ酸の組込みは、立体化学の変化は、機能の喪失をもたらするという事実により困難となる。i) D - アミノ酸だけであるが、i i) 逆のペプチド配列にあるアミノ酸の使用は、1 つまたは複数の D - アミノ酸を元の配列へと組み込むより、元のペプチドの許容可能なコンフォメーション類似体をもたらす可能性が高いため、レトロインベルソ法を使用して、前記危険性を低減することができる。にもかかわらず、W O 2 0 0 7 / 0 3 1 2 8 0 の場合は、この手法が、L - T A T - I B 1 と比較して、阻害能の著明な減殺を結果としてもたらした (図 4 を参照されたい) 。加えて、レトロインベルソペプチドがタンパク質分解性消化に対してきわめて安定的である結果として、例えば、時間的制約のある実験における制御消化もほとんど不可能である。

10

【 0 0 0 7 】

当技術分野では、多様な疾患状態のための処置として、J N K 阻害剤が論じられ、提起され、調べられて成功してもいる。既に、1 9 9 7 年に、D i c k e n s らは、c - J u n アミノ末端キナーゼ阻害剤である J I P - 1 について記載し、J I P - 1 を、例えば、特に、B c r - A b l により引き起こされるプレ B 細胞の形質転換の文脈における慢性骨髄性白血病を処置する治療戦略のための候補化合物として提起した (S c i e n c e 、 1 9 9 7 年、2 7 7 巻 (5 3 2 6 号) : 6 9 3 ~ 6 9 6 頁) 。

【 0 0 0 8 】

2 0 0 1 年には、B o n n y および共同研究者らが、J N K の細胞透過性ペプチド阻害剤が、膵臓 細胞に対する、I L - 1 誘導性アポトーシスからの、長期にわたる保護を確認し、したがって、糖尿病の経過における自己免疫性破壊にあっても 細胞を温存しう

20

【 0 0 0 9 】

B o n n y ら (N e u r o s c i e n c e s 、 2 0 0 5 年、5 7 ~ 6 7 頁における総説) はまた、興奮毒性、ニューロンの細胞死、低酸素症、虚血症、外傷性脳損傷、てんかん、神経変性疾患、ニューロンおよび内耳感覚聴細胞のアポトーシスなどの文脈で、J N K 阻害剤である D - J N K I - 1 および他の J N K 阻害剤の阻害性作用についても論じた。

【 0 0 1 0 】

W O 9 8 / 4 9 1 8 8 では、パーキンソン病またはアルツハイマー病などの神経変性疾患 ; 脳卒中およびこれに付随する記憶喪失、関節炎などの自己免疫疾患 ; 炎症によって特徴付けられる他の状態 ; 白血病、例えば、慢性骨髄性白血病 (C M L) などの悪性疾患 ; 肝臓および腎臓などの臓器に対する酸化的損傷 ; 心疾患 ; ならびに移植片拒絶を処置するために、J I P - 1 に由来する、J N K シグナル伝達の阻害剤が提起されている。

30

【 0 0 1 1 】

B o r s e l l o ら (N a t M e d 、 2 0 0 3 年、(9 巻) 、 1 1 8 0 ~ 1 1 8 6 頁) は、c - J u n - N 末端キナーゼのペプチド阻害剤が、興奮毒性および脳虚血症に対して保護的であることを公表した。

【 0 0 1 2 】

A s s i らは、別の特定の J N K 阻害剤である S P 6 0 0 1 2 5 が、マウス急性大腸炎における腫瘍壊死因子 の産生および上皮細胞のアポトーシスを標的化することを公表した。著者らは、ヒト炎症性腸疾患の処置における J N K の阻害が役立つことを結論付けた (I m m u n o l o g y 、 2 0 0 6 年、1 1 8 巻 (1 号) : 1 1 2 ~ 1 2 1 頁) 。

40

【 0 0 1 3 】

K e n n e d y ら (C e l l C y c l e 、 2 0 0 3 年、2 巻 (3 号) 、 1 9 9 ~ 2 0 1 頁) では、J N K シグナル伝達の腫瘍の発症における役割が、より詳細に論じられている。

【 0 0 1 4 】

L e e Y o n g H e e ら (J B i o l C h e m 、 2 0 0 3 年、2 7 8 巻 (5 号) 、 2 8 9 6 ~ 2 9 0 2 頁) は、c - J u n N 末端キナーゼ (J N K) が、インスリンシグナル伝達カスケードのフィードバック阻害を媒介することを示し、J N K シグナル伝

50

達の阻害が、糖尿病患者におけるインスリン抵抗性を軽減するための良好な治療法であることを提起した。

【0015】

Milanoら (Am J Physiol Heart Circ Physiol、2007年、192巻(4号): H1828~H1835頁) は、c-JunのNH₂末端キナーゼのペプチド阻害剤が、心筋虚血症 - 再灌流傷害を軽減し、in vivoにおける梗塞サイズを低減することを発見した。前記研究の著者らは、細胞内トランスロケーションを媒介するヒト免疫不全ウイルスTATタンパク質の10アミノ酸のTAT配列へと連結された、腓島 - 脳1/JNK相互作用タンパク質1の最小限のJNK結合ドメインの20アミノ酸の配列を含有する、2つのドメインペプチドによるペプチド阻害剤であるD-JNKI-Iを用いた。著者らは、前記阻害剤の存在に起因するJNKの活性およびリン酸化の低減が、虚血症およびアポトーシスの段階にあるラットにおける心機能の温存に重要であることを結論付けた。

10

【0016】

さらなる研究グループは、JNKの低分子ペプチド阻害剤が、JNKシグナル伝達経路の阻害を介して、MPTP誘導黒質ドーパミン作動性傷害に対して保護的であることを公表している (Panら、Laboratory investigation、2010年、90巻、156~167頁)。著者らは、TATペプチドへと融合させたマウスJIP-1の残基153~163を含むペプチドが、JNKシグナル伝達経路の阻害を介して、MPTPによる傷害に対する神経保護をもたらし、パーキンソン病のための治療法をもたらすことを結論付けた。

20

【0017】

聴力損傷については、Pirvolaら (The Journal of Neuroscience、2000年、20巻(1号)、43~50頁) が、c-Jun-N末端キナーゼ活性化の阻害剤であるCEP-1347/KT7515による、聴覚、聴覚有毛細胞、およびニューロンのレスキューについて記載した。著者らは一般に、JNKシグナル伝達カスケードへの治療的介入が、内耳傷害を処置する機会をもたらしうることを示唆した。JNK阻害性ペプチドを投与することによる聴力損失の処置はまた、例えば、WO03/103698においても開示されている。

【0018】

特に、網膜疾患および加齢性黄斑変性については、Roduitら (Apoptosis、2008年、13巻(3号)、343~353頁) が、JNK阻害を治療法として用いることを同様に示唆した。例えば、WO2010/113753では、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病網膜症、中心性滲出性脈絡網膜症、網膜色素線条、網膜色素上皮剥離、多病巣性脈絡膜炎、新生血管黄斑症 (neovascular maculopathy)、未熟児網膜症、色素性網膜炎、レーバー病、網膜動脈閉塞症、網膜静脈閉塞症、中心性漿液性脈絡網膜症、網膜動脈瘤、網膜剥離、増殖性硝子体網膜症、スタルガルト病、脈絡膜硬化症、脈絡膜欠如 (chorioderemia)、卵黄状黄斑変性、小口病、白点眼底、点状網膜炎、ならびに脳回転状網膜脈絡膜萎縮を処置するための、JNK阻害に依拠する同様の考慮が開示されている。

30

40

【0019】

Zoukhriら (Journal of Neurochemistry、2006年、96巻、126~135頁) は、c-Jun NH₂末端キナーゼが、涙腺分泌のインターロイキン1誘導性阻害を媒介することを同定した。Zoukhriらは、JNKが、涙腺分泌のIL-1介在性阻害および後続するドライアイにおいて、枢要な役割を果たすことを結論付けた。

【0020】

ブドウ膜炎については、Touchardら (Invest Ophthalmol Vis Sci、2010年、51巻(9号)、4683~4693頁) が、D-JNKI1を、有効な処置として用いることを示唆した。

50

【0021】

IBD（炎症性腸疾患）については、Royら（World J Gastroenterol、2008年、14巻（2号）、200～202頁）は、IBDにおけるJNKシグナル伝達経路の役割を強調し、ペプチドによるJNK阻害剤を、前記疾患状態の処置に用いることを提起した。

【0022】

Beckhamら（J Virol、2007年7月、81巻（13号）：6984～6992頁）は、JNK阻害剤であるD-JNKI-1が、マウスをウイルス性脳炎から保護するのに有効であることを示し、このために、JNKの阻害をウイルス性脳炎のための有望で新規の処置戦略として示唆した。

10

【0023】

Palinら（Psychopharmacology（Berl）、2008年5月、197巻（4号）：629～635頁）は、同じJNK阻害剤であるD-JNKI-1を用い、D-JNKI-1による前処置（マウス1匹当たり10ng）が、中枢TNFアルファにより誘導される3つの疾病の徴候全てを著明に阻害するが、D-TATはそれほど阻害しないことを見出し、JNKの阻害を、サイトカイン誘導性疾病挙動のバックグラウンドにおいて発症する大うつ病性障害を処置するための手段として示唆した。

【0024】

WO2010/151638では、神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症のJNK阻害による処置が提起された。

20

【0025】

上記の導入セクションでは、選択された刊行物に基づいて、多様な疾患の処置におけるJNK阻害剤の有用性について強調している。したがって、当技術分野では、ヒト（および動物）疾患の処置における使用のためのJNK阻害剤が絶えず必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0026】

【特許文献1】国際公開第2007/031280号

【特許文献2】国際公開第98/49188号

【特許文献3】国際公開第03/103698号

30

【特許文献4】国際公開第2010/113753号

【特許文献5】国際公開第2010/151638号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0027】

したがって、本発明が解決しようとする課題は、特定の疾患を処置するためのJNKのさらなる（ペプチド）阻害剤を提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【0028】

JNK阻害剤

40

第1の態様では、本発明は、治療によりヒトまたは動物の身体を処置するための、方法における使用のための、特に、本明細書に開示された疾患/障害を処置するためのJNK阻害剤であって、以下の一般式：

X1 - X2 - X3 - R - X4 - X5 - X6 - L - X7 - L - X8（配列番号1）

[式中、X1は、アミノ酸R、P、Q、およびrから選択されるアミノ酸であり、

X2は、アミノ酸R、P、G、およびrから選択されるアミノ酸であり、

X3は、アミノ酸K、R、k、およびrから選択されるアミノ酸であり、

X4は、アミノ酸PおよびKから選択されるアミノ酸であり、

X5は、アミノ酸T、a、s、q、kから選択されるアミノ酸であるか、また

は存在せず、

50

X 6 は、アミノ酸 T、D、および A から選択されるアミノ酸であり、
 X 7 は、アミノ酸 N、n、r、および K から選択されるアミノ酸であり、
 X 8 は、F、f、および w から選択されるアミノ酸である]

に従う阻害性（ポリ）ペプチド配列であり、

X 1、X 2、X 3、X 5、X 7、および X 8 からなる群より選択されるアミノ酸のうちの少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、または 6 つが、D - アミノ酸であるという条件を伴う配列、好ましくは、X 3、X 5、X 7、および X 8 からなる群より選択されるアミノ酸のうちの少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、または 4 つが、D - アミノ酸であるという条件を伴う配列を含む JNK 阻害剤に関する。

10

【0029】

本発明者は、本発明の目的を、下記および付属の特許請求の範囲で示される対象物により解決する。

【0030】

以下では、付属の図面について、簡単な説明を施す。図面は、本発明をより詳細に例示することを意図する。しかし、図面は、いかなる形であれ、本発明の対象物を限定することを意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図 1 a】図 1 は、in vitro における AlphaScreen アッセイ (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay) により調査された、本発明に従ういくつかの JNK 阻害剤の阻害有効性を例示する図である。図 1 A は、配列番号 193、2、3、5、6、および 7 による JNK 1 の阻害を示す図である。

20

【図 1 b】図 1 は、in vitro における AlphaScreen アッセイ (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay) により調査された、本発明に従ういくつかの JNK 阻害剤の阻害有効性を例示する図である。図 1 B は、配列番号 193、2、3、5、6、および 7 による JNK 2 の阻害を示す図である。

【図 1 c】図 1 は、in vitro における AlphaScreen アッセイ (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay) により調査された、本発明に従ういくつかの JNK 阻害剤の阻害有効性を例示する図である。図 1 C は、配列番号 193、2、3、5、6、および 7 による JNK 3 の阻害を示す図である。

30

【図 2】図 2 は、本発明に従ういくつかの JNK 阻害剤（配列番号 193、2、3、5、6、および 7）の阻害有効性を例示する表である。nM 範囲の IC50 値、平均のそれぞれの標準誤差、および実施された実験回数（n）が示される。

【図 3 a】図 3 は、JNK 阻害性（ポリ）ペプチド配列と輸送体配列との融合タンパク質である、本発明に従ういくつかの JNK 阻害剤の阻害有効性を例示する図である。阻害有効性は、in vitro における AlphaScreen アッセイ (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay) により決定した。図 3 A は、配列番号 194、195、172、200、46、173、174、175、176、177、178、179、180、181、および 197 による JNK 1 の阻害を示す図である。

40

【図 3 b】図 3 は、JNK 阻害性（ポリ）ペプチド配列と輸送体配列との融合タンパク質である、本発明に従ういくつかの JNK 阻害剤の阻害有効性を例示する図である。阻害有効性は、in vitro における AlphaScreen アッセイ (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay) により決定した。図 3 B は、配列番号 194、195、172、200、46、173、174、175、176、177、178、179、180、18

50

1、および197によるJNK2の阻害を示す図である。

【図3c】図3は、JNK阻害性（ポリ）ペプチド配列と輸送体配列との融合タンパク質である、本発明に従ういくつかのJNK阻害剤の阻害有効性を例示する図である。阻害有効性は、*in vitro*におけるAlphaScreenアッセイ（Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay）により決定した。図3Cは、配列番号194、195、172、200、46、173、174、175、176、177、178、179、180、181、および197によるJNK3の阻害を示す図である。

【図3d】図3は、JNK阻害性（ポリ）ペプチド配列と輸送体配列との融合タンパク質である、本発明に従ういくつかのJNK阻害剤の阻害有効性を例示する図である。阻害有効性は、*in vitro*におけるAlphaScreenアッセイ（Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay）により決定した。図3Dは、配列番号194、195、172、200、46、182、183、184、185、186、187、188、189、190、および197によるJNK1の阻害を示す図である。

【図3e】図3は、JNK阻害性（ポリ）ペプチド配列と輸送体配列との融合タンパク質である、本発明に従ういくつかのJNK阻害剤の阻害有効性を例示する図である。阻害有効性は、*in vitro*におけるAlphaScreenアッセイ（Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay）により決定した。図3Eは、配列番号194、195、172、200、46、182、183、184、185、186、187、188、189、190、および197によるJNK2の阻害を示す図である。

【図3f】図3は、JNK阻害性（ポリ）ペプチド配列と輸送体配列との融合タンパク質である、本発明に従ういくつかのJNK阻害剤の阻害有効性を例示する図である。阻害有効性は、*in vitro*におけるAlphaScreenアッセイ（Amplified Luminescence Proximity Homogeneous - Screen Assay）により決定した。図3Fは、配列番号194、195、172、200、46、182、183、184、185、186、187、188、189、190、および197によるJNK3の阻害を示す図である。

【図4】図4は、JNK阻害性（ポリ）ペプチド配列と輸送体配列との融合タンパク質である、本発明に従ういくつかのJNK阻害剤の阻害有効性を例示する表である。nM範囲のIC50値、平均のそれぞれの標準誤差（SEM）、および実施された実験回数（n）を示す。

【図5】図5は、配列番号172、196、および197を伴うJNK阻害剤の、50%のヒト血清における安定性を示す図である。配列番号196を伴うJNK阻害剤は、6時間以内に、アミノ酸残基へと十全に分解された（A）。配列番号172を伴うJNK阻害剤が完全に分解されたのは、14日後であるに過ぎなかった（B）。配列番号197を伴うJNK阻害剤は、少なくとも30日後までは安定であった（B）。

【図6a】図6は、配列番号30に表示されるD-アミノ酸/L-アミノ酸パターンを伴う、TATに由来する輸送体構築物を用いる内部化実験を示す図である。解析された輸送体配列は、配列番号52～94に加えて、配列番号45、47、46、43、および99（図6a）および配列番号100～147（図6b）に対応する。見られる通り、コンセンサス配列rXXxrXXxr（配列番号31）を伴う全ての輸送体は、L-TAT輸送体（配列番号43）より高い内部化能を示した。HeLa細胞を、96ウェルプレート内で、10mMのそれぞれの輸送体と共に、24時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を、酸性緩衝液（0.2Mのグリシン、0.15MのNaCl、pH3.0）で2回にわたり洗浄し、PBSで2回にわたり洗浄した。細胞を、RIPA溶解緩衝液を添加することにより破壊した。次いで、各抽出物の蛍光強度（Fusion Alpha plateリーダー；PerkinElmer）を読み取った後でバックグラウンドを減算することにより、内部化したペプチドの相対量を決定した。

10

20

30

40

50

【図 6 b】図 6 は、配列番号 30 に表示される D - アミノ酸 / L - アミノ酸パターンを伴う、T A T に由来する輸送体構築物を用いる内部化実験を示す図である。解析された輸送体配列は、配列番号 52 ~ 94 に加えて、配列番号 45、47、46、43、および 99 (図 6 a) および配列番号 100 ~ 147 (図 6 b) に対応する。見られる通り、コンセンサス配列 r X X X r X X X r (配列番号 31) を伴う全ての輸送体は、L - T A T 輸送体 (配列番号 43) より高い内部化能を示した。H e l a 細胞を、96 ウェルプレート内で、10 mM のそれぞれの輸送体と共に、24 時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を、酸性緩衝液 (0.2 M のグリシン、0.15 M の NaCl、pH 3.0) で 2 回にわたり洗浄し、PBS で 2 回にわたり洗浄した。細胞を、R I P A 溶解緩衝液を添加することにより破壊した。次いで、各抽出物の蛍光強度 (F u s i o n A l p h a p l a t e リーダー; P e r k i n E l m e r) を読み取った後でバックグラウンドを減算することにより、内部化したペプチドの相対量を決定した。

10

【図 7】図 7 は、配列番号 172 の配列を伴う J N K 阻害剤が、T H P 1 を P M A により分化させたマクロファージにおいて、L P S に誘導されるサイトカインおよびケモカインの放出を遮断することを示す図である。図 7 A は、T N F の放出 (T H P 1 細胞を、3 ng / mL の L P S を伴う P M A で 6 時間にわたり処理する) を示す図であり、図 7 B は、T N F - の放出 (T H P 1 細胞を、10 ng / mL の L P S を伴う P M A で 6 時間にわたり処理する) を示す図であり、図 7 C は、I L 6 の放出 (T H P 1 細胞を、10 ng / mL の L P S を伴う P M A で 6 時間にわたり処理する) を示す図であり、図 7 D は、M C P 1 の放出 (T H P 1 細胞を、3 ng / mL の L P S を伴う P M A で 6 時間にわたり処理する) を示す図である。

20

【図 8】図 8 は、配列番号 172 による J N K 阻害剤が、T H P 1 を分化させたマクロファージにおいて、L P S に誘導される I L 6 の放出を、D - T A T - I B 1 (配列番号 197)、d T A T (配列番号 45)、および S P 600125 より大きな効力で遮断することを示す図である。L P S は、6 時間にわたり添加した (10 ng / mL)。

【図 9】図 9 は、配列番号 172 による J N K 阻害剤が、T H P 1 を分化させたマクロファージにおいて、L P S に誘導される T N F の放出を、D - T A T - I B 1 (配列番号 197)、d T A T (配列番号 45)、および S P 600125 より大きな効力で遮断することを示す図である。L P S は、6 時間にわたり添加した (10 ng / mL)。

【図 10】図 10 は、配列番号 172 による J N K 阻害剤が、P M A で分化させたマクロファージにおいて、L P S に誘導される I L - 6 の放出を、D - T A T - I B 1 (配列番号 197)、および L - T A T - I B 1 (配列番号 196) より大きな効力で遮断することを示す図である。L P S は、6 時間にわたり添加した。

30

【図 11】図 11 は、配列番号 172 による J N K 阻害剤が、P M A で分化させたマクロファージにおいて、L P S に誘導される T N F の放出を、D - T A T - I B 1 (配列番号 197)、および L - T A T - I B 1 (配列番号 196) より大きな効力で遮断することを示す図である。

【図 12】図 12 は、配列番号 172 による J N K 阻害剤が、初代ラット全血細胞において、L P S に誘導される T N F 放出を、3 ng / mL で遮断することを示す図である。L P S のレベル (ng / mL) が異なるときの、対照、1 μ M の配列番号 172、3 μ M の配列番号 172、および 10 μ M の配列番号 172 についての結果が示される。

40

【図 13】図 13 は、配列番号 172 による J N K 阻害剤が、P M A / イオノマイシンに応答する、初代ヒト T 細胞による I L - 2 の分泌を遮断することを示す図である。

【図 14】図 14 は、配列番号 172 による J N K 阻害剤が、C D 3 / C D 28 による刺激に応答する、初代ヒト T 細胞による I L - 2 の分泌を遮断することを示す図である。用いられた J N K 阻害剤は、それらの配列番号 172 および 197 により示される。

【図 15】図 15 は、初代ラットリンパ節の精製 T 細胞において、C D 3 / C D 28 により誘導される I L - 2 の放出に対する、配列番号 172 を伴う J N K 阻害剤による用量依存的な阻害を示す図である。対照ラットを屠殺し、リンパ節を採取した。さらに、T 細胞を精製し (磁気による陰性選択を用いて)、96 ウェルプレートへと、ウェル 1 つ当たり

50

200,000個の細胞で播種した。細胞を、抗ラットCD3抗体および抗ラットCD28抗体(2 µg/mL)で処理した。配列番号172を伴うJNK阻害剤を、培養物へと、CD3/CD28による処理の1時間前に添加し、IL-2の放出を、上清中で、処理の24時間後に評価した。

【図16】図16は、初代ラットリンパ節の精製T細胞において、CD3/CD28により誘導されるIL-2の放出に対する用量依存的な阻害：いくつかのJNK阻害剤、すなわち、配列番号172、197、およびSP600125の比較を示す図である。

【図17】図17は、PMA+イオノマイシンで刺激されたラット全血における、IL-2放出の用量依存的な阻害を示す図である。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、PMA+イオノマイシンによる刺激の1時間前に、3つの異なる濃度、すなわち、1、3、および10 µMで添加した。3つの用量(25/500 ng/mL、50/750 ng/mL、および50/1000 ng/mL)の活性化剤を4時間にわたり添加した。IL-2の放出を上清中で評価した。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、3つの被験活性化剤濃度のPMA-イオノマイシンに誘導されるIL-2の放出を、10 µMで効率的に低減した。

10

【図18】図18は、ヒト全血におけるJNKの阻害およびIL-6の放出を示す図である。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、全血の、LPS(0.02 ng/mL)による、4時間にわたる刺激の1時間前に、3つの異なる濃度、すなわち、1、3、および10 µMで添加した。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、LPSに誘導されるIL-6の放出を用量依存的な形で低減した。

20

【図19】図19は、ヒト全血におけるJNKの阻害およびIL-2の放出を示す図である。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、全血の、PMA+イオノマイシン(25/700 ng/mL、50/800 ng/mL、および50/1000 ng/mL)による、4時間にわたる刺激の1時間前に、3つの異なる濃度、すなわち、1、3、および10 µMで添加した。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、PMA+イオノマイシンに誘導されるIL-2の放出を用量依存的な形で低減した。

【図20】図20は、ヒト全血におけるJNKの阻害およびIFN- γ の放出を示す図である。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、全血の、PMA+イオノマイシン(25/700 ng/mL、50/800 ng/mL、および50/1000 ng/mL)による、4時間にわたる刺激の1時間前に、3つの異なる濃度、すなわち、1、3、および10 µMで添加した。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、PMA+イオノマイシンに誘導されるIFN- γ の放出を用量依存的な形で低減した。

30

【図21】図21は、ヒト全血におけるJNKの阻害およびTNF- α の放出を示す図である。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、全血の、PMA+イオノマイシン(25/700 ng/mL、50/800 ng/mL、および50/1000 ng/mL)による、4時間にわたる刺激の1時間前に、3つの異なる濃度、すなわち、1、3、および10 µMで添加した。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、PMA+イオノマイシンに誘導されるTNF- α の放出を用量依存的な形で低減した。

【図22】図22は、ヒト全血におけるJNKの阻害およびTNF- α の放出を示す図である。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、全血の、PHA-L(5 µg/mL)による、3日間にわたる刺激の1時間前に、3つの異なる濃度、すなわち、1、3、および10 µMで添加した。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、PHA-Lに誘導されるTNF- α の放出を用量依存的な形で低減した。

40

【図23】図23は、ヒト全血におけるJNKの阻害およびIL-2の放出を示す図である。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、全血の、PHA-L(5 µg/mL)による、3日間にわたる刺激の1時間前に、3つの異なる濃度、すなわち、1、3、および10 µMで添加した。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、PHA-Lに誘導されるIL-2の放出を用量依存的な形で低減した。

【図24】図24は、ヒト全血におけるJNKの阻害およびTNF- α の放出を示す図である。配列番号172を伴うJNK阻害剤は、全血の、CD3 \pm CD28抗体(2 µg/

50

mL) による、3 日間にわたる刺激の 1 時間前に、3 つの異なる濃度、すなわち、1、3、および 10 μ M で添加した。配列番号 172 を伴う JNK 阻害剤は、CD3 / CD28 に誘導される TNF- α の放出を用量依存的な形で低減した。

【図 25】図 25 は、CFA (完全フロイントアジュバント) により誘導される足部の腫脹の後における、配列番号 197 (10 μ g / kg) および配列番号 172 (10 μ g / kg) を伴う JNK 阻害剤の *in vivo* における抗炎症特性についての写真による例示を示す図である。足部の腫脹は、左後足において誘導し、右後足は処理しなかった。

【図 26】図 26 は、CFA (完全フロイントアジュバント) により誘導される足部の腫脹の後における、配列番号 197 (10 μ g / kg、n = 4) および配列番号 172 (10 μ g / kg、n = 3) を伴う JNK 阻害剤の *in vivo* における抗炎症特性についてのグラフ表示である。処理後において測定された左後足の外周が示される。

【図 27】図 27 は、CFA (完全フロイントアジュバント) により誘導される足部の腫脹の後における、配列番号 197 (10 μ g / kg) および配列番号 172 (10 μ g / kg) を伴う JNK 阻害剤の *in vivo* における抗炎症特性についてのグラフ表示である。CFA により誘導された足部の腫脹の 1 時間後において測定された、*in vivo* におけるサイトカインの放出が示される。

【図 28】図 28 は、静脈内投与 (内毒素誘導ブドウ膜炎モデル、EIU) 後のアルビノラットにおける、配列番号 172 に従う異なる量の JNK 阻害剤の投与についての臨床的評価を示す図である。左から右へ：ビヒクル；0.015 mg / kg (静脈内) の配列番号 172；0.18 mg / kg (静脈内) の配列番号 172；1.8 mg / kg (静脈内) の配列番号 172；2 mg / kg (静脈内) の配列番号 197；および 20 μ g のデキサメタゾン (結膜下注射により眼へと直接投与する) である。臨床スコア (平均および SEM) が示される。

【図 29】図 29 は、14 日間にわたり確立されたラット慢性 II 型コラーゲン関節炎 (RTTC / SOL - 1) における、毎日の静脈内投与後の、配列番号 172 による JNK 阻害剤の応答効果を示す図である。0 日目 ~ 14 日目における体重の変化が示される。左から右へ：正常対照 + ビヒクル (NaCl)；疾患対照 + ビヒクル (NaCl)；5 mg / kg (静脈内) の配列番号 172；1 mg / kg (静脈内) の配列番号 172；0.1 mg / kg (静脈内) の配列番号 172；0.01 mg / kg (静脈内) の配列番号 172；0.05 mg / kg (静脈内) のデキサメタゾンである。臨床スコア (平均および SEM) が示される。正常群 1 つ当たりの n = 4、処置群 1 つ当たりの n = 8；* 疾患対照 + ビヒクル (NaCl) に照らした一元 ANOVA による p = 0.05。

【図 30】図 30 は、14 日間にわたり確立されたラット慢性 II 型コラーゲン関節炎 (RTTC / SOL - 1) における、毎日の静脈内投与後の、配列番号 172 による JNK 阻害剤の応答効果を示す図である。時間経過に伴う足首直径 (インチ) が示される。正常群 1 つ当たりの n = 4、処置群 1 つ当たりの n = 8；* 疾患対照 + ビヒクル (NaCl) に照らした二元 RM ANOVA による p = 0.05。

【図 31】図 31 は、14 日間にわたり確立されたラット慢性 II 型コラーゲン関節炎 (RTTC / SOL - 1) における、毎日の静脈内投与後の、配列番号 172 による JNK 阻害剤の応答効果を示す図である。炎症、パンヌス、軟骨損傷、および骨吸収に関する足首の組織病理学スコアが例示される。処置群の n = 8。* 疾患対照 + ビヒクル (NaCl) に照らしたマン - ホイットニーの U 検定による p = 0.05。

【図 32】図 32 は、14 日間にわたり確立されたラット慢性 II 型コラーゲン関節炎 (RTTC / SOL - 1) における、毎日の静脈内投与後の、配列番号 172 による JNK 阻害剤の応答効果を示す図である。炎症、パンヌス、軟骨損傷、および骨吸収に関する膝の組織病理学スコアが例示される。処置群の n = 8。* 疾患対照 + ビヒクル (NaCl) に照らしたマン - ホイットニーの U 検定による p = 0.05。

【図 33】図 33 は、EIU を誘導した 24 時間後における細隙灯による臨床スコア付け、および EIU を誘導する前の異なる時点における、配列番号 172 に従う JNK 阻害剤 (静脈内で 1 mg / kg) の投与を示す図である。左から右へ：ビヒクル (0 時間)；E

10

20

30

40

50

I U 誘導の 4 週間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 2 週間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 1 週間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 4 8 時間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 2 4 時間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 0 時間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 0 時間前におけるデキサメタゾン (静脈内で 2 m g / k g) である。平均 \pm S E M 。 * ビヒクルと対比した $P < 0 . 0 5$ 、 * * ビヒクルと対比した $P < 0 . 0 1$ 。

【図 3 4】図 3 4 は、E I U を誘導した 2 4 時間後に定量化した、切片 1 つ当たりの P M N 細胞の数、および E I U を誘導する前の異なる時点における、配列番号 1 7 2 に従う J N K 阻害剤 (静脈内で 1 m g / k g) の投与を示す図である。左から右へ：ビヒクル (0 時間) ; E I U 誘導の 4 週間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 2 週間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 1 週間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 4 8 時間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 2 4 時間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 0 時間前における配列番号 1 7 2 ; E I U 誘導の 0 時間前におけるデキサメタゾン (静脈内で 2 m g / k g) である。平均 \pm S E M 。 * ビヒクルと対比した $P < 0 . 0 5$ 、 * * ビヒクルと対比した $P < 0 . 0 1$ 。

【図 3 5】図 3 5 は、スコポラミン誘導眼乾燥症候群を伴う動物について計算された、平均 T B U T A U C 値を示す図である。ビヒクル、3 つの異なる濃度の、配列番号 1 9 7 の配列を伴う a 1 1 - D - レトロインベルソ J N K 阻害剤 (ポリ) ペプチド、および 3 つの異なる濃度の、配列番号 1 7 2 の配列を伴う J N K 阻害剤 (ポリ) ペプチドで処置された動物についての結果、ならびにシクロスポリンで処置された動物についての結果が示される。

【図 3 6】図 3 6 は、スコポラミン誘導ドライアイを伴う動物について計算された平均 P R T T A U C (7 ~ 2 1 日目) を示す図である。ビヒクル、3 つの異なる濃度の、配列番号 1 9 7 の配列を伴う a 1 1 - D - レトロインベルソ J N K 阻害剤 (ポリ) ペプチド、および 3 つの異なる濃度の、配列番号 1 7 2 の配列を伴う J N K 阻害剤 (ポリ) ペプチドで処置された動物についての結果、ならびにシクロスポリンで処置された動物についての結果が示される。

【図 3 7】図 3 7 は、スコポラミン誘導眼乾燥症候群を伴う動物の、平均組織学的角膜病変スコアを示す図である。ビヒクル、3 つの異なる濃度の、配列番号 1 9 7 の配列を伴う a 1 1 - D - レトロインベルソ J N K 阻害剤 (ポリ) ペプチド、および 3 つの異なる濃度の、配列番号 1 7 2 の配列を伴う J N K 阻害剤 (ポリ) ペプチドで処置された動物についての結果、ならびにシクロスポリンで処置された動物についての結果が示される。

【図 3 8】図 3 8 は、A D R 投与後 8 、 1 4 、 2 9 、 4 1 、および 5 6 日目の、アドリアマイシン (A D R) 誘導性腎症モデルにおけるラットの、タンパク血 (p r o t i d e m i a) (A) および尿素レベル (B) により評価される腎機能を示す図である。群 1 (「 A D R 」) および群 2 (「 A D R + 配列番号 1 7 2 の J N K 阻害剤 」) は、0 日目に、A D R で処理して、腎症 (n e c r o p a t h y) を誘導したが、群 3 (「 N a C l 」) には、0 . 9 % の N a C l を施した。さらに、群 2 (「 A D R + 配列番号 1 7 2 の J N K 阻害剤 」) は、0 日目において、配列番号 1 7 2 の J N K 阻害剤で処置したが、群 1 および 3 には、ビヒクル (0 . 9 % の N a C l) を施した。

【図 3 9】図 3 9 は、過ヨウ素酸シッフ (P A S) で染色された、アドリアマイシン (A D R) 誘導性腎症モデルにおけるラットの腎切片を示す (元の倍率 : 4 0 倍) 。左欄に示された切片については、A D R 投与後 8 日目において、ラットを屠殺したが、左欄に示された切片については、ラットを 5 6 日目に屠殺した。A D R は、「 A D R 」群および「 A D R + X G 1 0 4 」群だけに投与し、一方「 N a C l 」群には、0 . 9 % の N a C l だけを施した。「 A D R + X G 1 0 4 」群は、0 日目において、配列番号 1 7 2 の J N K 阻害剤で処置したが (すなわち、「 X G 1 0 4 」とは、配列番号 1 7 2 の J N K 阻害剤を指す) 、他の群 (「 A D R 」および「 N a C l 」) には、ビヒクル (0 . 9 % の N a C l) を施した。

【図 4 0】図 4 0 は、0 日目において A D R およびビヒクルで処置された「 A D R 」群 (

上パネル)、ならびに0日目においてADRおよび配列番号172のJNK阻害剤で処置された「ADR + XG104」群(下パネル)について、ADR投与後8日目(左の4つのパネル)および56日目(右の4つのパネル)において、マッソントリクローム(青色)で評価された、ADR腎症における腎線維症を示す。元の倍率:10倍を、左パネルに、それぞれの日について示し、元の倍率:40倍を、右パネルに、それぞれの日について示す。

【図41】図41は、連続6日間にわたるイミキモド(iquimod)適用の後における、マウスのイミキモド誘導性乾癬モデルにおける耳の炎症についての群平均グレードを示す。「平均グレード」とは、顕微鏡による組織病理学エンドポイント(実施例14を参照されたい)を指す。3つの用量(0.02、0.2、および2mg/kg)の配列番号172のJNK阻害剤(それぞれ、「XG-104 0.02mg/kg」群、「XG-104 0.2mg/kg」群、および「XG-104 2mg/kg」群)を調べた。プレドニゾロンおよびデキサメタゾンは、陽性対照として用いられた。XG-104 0.2mg/kg群、プレドニゾロン群、およびデキサメタゾン群は、ビヒクル対照群との有意差を示した。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明に従うJNK阻害剤による阻害性(ポリ)ペプチド配列は、L-アミノ酸を含み、大半の実施形態では、D-アミノ酸を含む。別段に指定しない限り、本明細書では、L-アミノ酸残基を大文字で示す一方、Dアミノ酸残基は小文字で示す。グリシンは、大文字で示すこともでき、小文字で示すこともできる(D-グリシンもL-グリシンも存在しないので)。別段に指定しない限り、本明細書で開示されるアミノ酸配列は常に、N末端からC末端へと(左から右へと)示す。所与のアミノ酸配列は、C末端および/またはN末端において修飾(例えば、C末端におけるアセチル化および/またはN末端におけるアミド化もしくはシステアミン(cysteamide)による修飾)することもでき、修飾しないでおくこともできる。本明細書で開示されるアミノ酸配列のC末端および/またはN末端における、このような考えられるが任意選択の修飾を、明確さのために、とりわけ示すことはしない。

【0033】

本発明のJNK阻害剤は、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)の(ポリ)ペプチド阻害剤である。前記阻害剤は、例えば、JNK活性を遮断することにより、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)のキナーゼ活性を阻害する、すなわち、c-Jun、ATF2、および/またはElk-1などのJNK基質のリン酸化を防止するか、またはリン酸化の程度を低減する。当業者は、本明細書で用いられる「阻害剤」という用語が、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)分子および/またはキナーゼ活性を不可逆的に破壊する化合物を含まないことを理解するであろう。したがって、本発明の阻害剤のJNK阻害活性は、代表的には、JNKに対して競合的様式または非競合的様式で結合する化合物をいう。さらに、本明細書で用いられる「JNK活性の阻害」という用語は、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)のキナーゼ活性の阻害を指す。

【0034】

さらに、本明細書で用いられるJNK阻害剤は、アミノ酸ポリマーの少なくとも1つの機能的単位、すなわち、(ポリ)ペプチド配列を含む。さらに、この少なくとも1つの機能的なアミノ酸ポリマーは、JNK活性の阻害をもたらす。前記阻害性(ポリ)ペプチド配列のアミノ酸単量体は通例、ペプチド結合を介して互いと連結されているが、阻害活性(JNK活性の阻害)が、完全には失われていない、すなわち、結果として得られる化学的実体が、本明細書で機能的に規定されるJNK阻害剤としてやはり機能する条件で、前記ペプチド結合(複数可)または側鎖残基の(化学)修飾も許容されうる。「(ポリ)ペプチド」という用語は、(ポリ)ペプチド単位の長さを限定するとはみなさないものとする。本発明のJNK阻害剤の阻害性(ポリ)ペプチド配列は、500、490、480、470、460、450、440、430、420、410、400、390、380、

10

20

30

40

50

370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13アミノ酸未満、または12アミノ酸未満の長さであることが好ましい。阻害性（ポリ）ペプチド配列は、10アミノ酸残基以上を有することが好ましく、11アミノ酸残基以上を有することがより好ましい。

【0035】

10

さらに、本発明の「JNK阻害剤」は、JNK活性を阻害する、例えば、c-Jun基質（配列番号198）のヒトJNK媒介性リン酸化の阻害に関して、

a) ヒトJNK1の阻害に関して、3000nM未満、より好ましくは2000nM未満、なおより好ましくは1000nM未満、なおより好ましくは500nM未満、なおより好ましくは250nM未満、なおより好ましくは200nM未満、なおより好ましくは150nM未満、最も好ましくは100nM未満、

b) ヒトJNK2の阻害に関して、3000nM未満、より好ましくは2000nM未満、なおより好ましくは1000nM未満、なおより好ましくは500nM未満、なおより好ましくは250nM未満、なおより好ましくは200nM未満、なおより好ましくは150nM未満、最も好ましくは100nM未満、および/または

20

c) ヒトJNK3の阻害に関して、3000nM未満、より好ましくは2000nM未満、なおより好ましくは1000nM未満、なおより好ましくは500nM未満、なおより好ましくは250nM未満、なおより好ましくは200nM未満、なおより好ましくは150nM未満、最も好ましくは100nM未満

のIC50値を呈示する。

【0036】

一部の適用には、阻害剤が、上記の規定に従うヒトJNK2および/またはヒトJNK3は阻害するが、上記の規定に従うJNK1は阻害しないことが好ましい。

【0037】

当業者は、JNK活性が阻害されたのかどうかを、容易に評価することができる。当技術分野では、複数の方法が公知である。一例は、放射性キナーゼアッセイまたは非放射性キナーゼアッセイ（例えば、Alphaスクリーン試験；例えば、Guenatra、JBiomol Screen、2006年、11巻：1015～1026頁を参照されたい）である。

30

【0038】

したがって、本発明に従うJNK阻害剤は、例えば、配列番号2～27のうちのいずれかに従う阻害性（ポリ）ペプチド配列を含みうる（表1を参照されたい）。

【0039】

【表 1】

表1: 本発明に従うJNK阻害剤の阻害性(ポリ)ペプチド配列の例	
アミノ酸配列	配列番号
rPKRPTTLNLF	2
RPkRPTTLNLF	3
RPKRPaTLNLF	4
RPKRPTTLnLF	5
RPKRPTTLrLF	6
RPKRPTTLNLf	7
RPkRPaTLNLf	8
RPkRPTTLNLf	9
RPkRPTTLrLf	10
RRrRPTTLNLf	11
QRrRPTTLNLf	12
RPkRPTTLNLw	13
RPkRPTDLNLf	14
RRrRPTTLrLw	15
QRrRPTTLrLw	16
RRrRPTDLrLw	17
QRrRPTDLrLw	18
RRrRPaTLNLf	19
QRrRPaTLNLf	20
RrKRPaTLNLf	21
RPkRPsTLNLf	22
RPkRPqTLNLf	23
RPkRPkTLNLf	24
rGKRKALKLf	25
rGKRKALrLf	26
RRrRKALrLf	27

【0040】

本発明に従うJNK阻害剤はまた、配列番号1～27から選択される配列、特に、配列番号8との、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも55%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する阻害性(ポリ)ペプチド配列であって、配列番号1～27から選択されるそれぞれの配列に照らして、このような配列同一性を共

10

20

30

40

50

有する阻害性（ポリ）ペプチド配列が、

a) 4 位における L - アルギニン（R）残基を維持し、

b) 8 位および 10 位（配列番号 25 ~ 27 については、7 位および 9 位）における 2 つの L - ロイシン（L）残基を維持し、

c) 配列番号 1 の X 1、X 2、X 3、X 5、X 7、および X 8 からなる群より選択されるアミノ酸に対応するそれぞれの位置、ならびに配列番号 2 ~ 27 内のそれぞれの位置において、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの D - アミノ酸を呈示し、より好ましくは、配列番号 1 の X 3、X 5、X 7、および X 8 からなる群より選択されるアミノ酸に対応する位置、ならびに配列番号 2 ~ 27 内のそれぞれの位置において、1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つの D - アミノ酸を呈示し、

d) JNK 活性をやはり阻害する（すなわち、本明細書で規定される JNK 阻害剤である）

という条件を伴う配列を含む JNK 阻害剤（変異体）でもありうる。

【0041】

当然ながら、本明細書で開示される変異体（特に、配列番号 1 ~ 27 から選択される配列とある程度の配列同一性を共有する（上記の規定内で）阻害性（ポリ）ペプチド配列を含む JNK 阻害剤の変異体）は、それぞれの基準配列との、好ましくは 100 % 未満の配列同一性を共有する。

【0042】

前記規定を考慮して、明確さのために、表 1 では、配列番号 1 ~ 27 を含む JNK 阻害剤の変異体（上記の規定における a）および b）を参照されたい）において好ましくは変化させることのできない残基に下線を付す。

【0043】

同一でないアミノ酸は、保存的アミノ酸置換の結果であることが好ましい。

【0044】

本明細書で用いられる保存的アミノ酸置換では、群のメンバー間の置換が分子の生物学的活性を温存するように、十分に類似した物理化学的特性を有するアミノ酸残基を、群内に組み入れることができる（例えば、Grant ham, R. (1974 年)、Science、185 巻、862 ~ 864 頁を参照されたい）。特に、保存的アミノ酸置換は、アミノ酸が同じクラスのアミノ酸（例えば、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸、極性アミノ酸、脂肪族側鎖を伴うアミノ酸、正または負に帯電した側鎖を伴うアミノ酸、側鎖内に芳香族基を伴うアミノ酸、その側鎖が水素架橋をなすアミノ酸、例えば、ヒドロキシル官能基を有する側鎖などを伴うアミノ酸）に由来する置換であることが好ましい。本発明の場合には、保存的置換が、例えば、塩基性アミノ酸残基（Lys、Arg、His）の、別の塩基性アミノ酸残基（Lys、Arg、His）への置換、脂肪族アミノ酸残基（Gly、Ala、Val、Leu、Ile）の、別の脂肪族アミノ酸残基への置換、芳香族アミノ酸残基（Phe、Tyr、Trp）の、別の芳香族アミノ酸残基への置換、トレオニンのセリンによる置換またはロイシンのイソロイシンによる置換である。当業者には、さらなる保存的アミノ酸交換が公知であろう。異性体形態は、維持することが好ましいものとし、例えば、K は、R または H へと置換することが好ましいのに対し、k は、r および h へと置換することが好ましい。

【0045】

JNK 阻害剤の変異体についての上記の規定内で可能なさらなる置換は、例えば、

a) 配列番号 1 の X 1、X 2、X 3、X 4、X 5、X 6、X 7、および / もしくは X 8、または配列番号 2 ~ 27 から選択されるそれぞれの配列内の対応する位置のうちの 1 つ、2 つ以上を、A または a へと置換する場合、

b) 配列番号 1 の X 1 もしくは X 8、または配列番号 2 ~ 27 から選択されるそれぞれの配列内の対応する位置を欠失させる場合、

c) 配列番号 1 の X 5、または配列番号 2 ~ 27 から選択されるそれぞれの配列内の対応する位置が、E、Y、L、V、F、または K である場合、

10

20

30

40

50

d) 配列番号 1 の X 5、または配列番号 2 ~ 2 7 から選択されるそれぞれの配列内の対応する位置が、E、L、V、F、または K である場合、あるいは

e) 配列番号 1 の X 1、X 2、X 3、または配列番号 2 ~ 2 7 から選択されるそれぞれの配列内の対応する位置のうちの 1 つ、2 つ、または 3 つが、中性アミノ酸である場合である。

【0046】

本明細書で用いられる、「配列同一性%」という用語は、以下の通りに理解しなければならない。配列の間の最大の相関をもたらしように、比較されるこれらの 2 つの配列を配列決定する。これは、一方または両方の配列に「ギャップ」を挿入して、アライメントの程度を増大させることを包含しうる。次いで、比較される配列の各々の全長にわたり同一性%を決定する（いわゆる、グローバルアライメント）こともでき（これは、同じであるかまたは類似した長さの配列に特に適する）、規定された短い長さにわたり、同一性%を決定する（いわゆる、ローカルアライメント）こともできる（これは、長さが等しくない配列により適する）。上記の文脈では、クエリーアミノ酸配列に対して、少なくとも、例えば、95%の「配列同一性」を有するアミノ酸配列が、対象アミノ酸配列に、クエリーアミノ酸配列の各 100 アミノ酸当たり最大で 5 カ所のアミノ酸変化を組み入れうることを除き、対象アミノ酸の配列が、クエリー配列と同一であることを意味することを意図する。言い換えれば、クエリーアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一な配列を有するアミノ酸配列を得るには、対象配列内のアミノ酸残基のうちの最大で 5%（100 残基のうちの 5 残基）を、挿入することもでき、別のアミノ酸で置換することもでき、欠失させることもできる。配列同一性を決定する目的では、L - アミノ酸の D - アミノ酸への置換（および逆も成り立つ）が、そのまさに同じアミノ酸の D - （または L - ）異性体だけであっても、同一でない残基をもたらしと考えられる。

【0047】

当技術分野では、2 つ以上の配列の同一性および相同性を比較するための方法が周知である。例えば、数学的アルゴリズムを用いることにより、2 つの配列が同一である百分率を決定することができる。用いる数学的アルゴリズムの、好ましいがそれらに限定されない例は、Karlin ら（1993 年）、PNAS USA、90 巻：5873 ~ 5877 頁によるアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、インターネットのサイトである ncbi.nlm.nih.gov における、NCBI のホームページを介してアクセス可能な、BLAST ファミリーのプログラム、例えば、BLAST プログラムまたは NBLAST プログラム（また、Altschul ら、1990 年、J. Mol. Biol.、215 巻、403 ~ 410 頁；または Altschul ら（1997 年）、Nucleic Acids Res.、25 巻：3389 ~ 3402 頁も参照されたい）、および FASTA ファミリーのプログラム（Pearson（1990 年）、Methods Enzymol.、183 巻、63 ~ 98 頁；Pearson および Lipman（1988 年）、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、85 巻、2444 ~ 2448 頁）に組み込まれている。他の配列とある程度同一な配列は、これらのプログラムにより同定することができる。さらに、Wisconsin Sequence Analysis Package、version 9.1（Devereux ら、1984 年、Nucleic Acids Res.、12 巻、387 ~ 395 頁）において利用可能なプログラム、例えば、プログラムである BESTFIT および GAP を用いて、2 つのポリペプチド配列の間の同一性%を決定することができる。BESTFIT では、（Smith および Waterman（1981 年）、J. Mol. Biol.、147 巻、195 ~ 197 頁）による「局所相同性」アルゴリズムが用いられ、2 つの配列の間の最良で単一の類似性領域が見出される。

【0048】

当然ながら、本発明に従う JNK 阻害剤は、本明細書で規定される JNK 活性を阻害する能力が失われない限りにおいて、（上記で言及した阻害性（ポリ）ペプチド配列に加えて）、さらなる配列または配列要素、ドメイン、標識（例えば、蛍光標識または放射性標

10

20

30

40

50

識)、エピトープなどを含みうる。例えば、本発明に従うJNK阻害剤はまた、輸送体配列も含みうる。本明細書で用いられる「輸送体配列」とは、それが付着された分子の、生物学的膜を越えるトランスロケーションをもたらす(ポリ)ペプチド配列である。したがって、輸送体配列を含む、本発明に従うJNK阻害剤は、生物学的膜を越えてトランスロケーションすることが可能であると好ましい(例えば、結合体化されたカーゴ化合物)。したがって、本発明のこのようなJNK阻害剤は、細胞、細胞内のサブコンパートメント、および/または細胞核に入ることがいっそう容易でありうる。

【0049】

前記輸送体配列は、例えば、JNK阻害剤の阻害性(ポリ)ペプチド配列のN末端へと(例えば、直接)接合することもでき、C末端へと(例えば、直接)接合することもできる(好ましくは、共有結合によって)。輸送体配列と、阻害性(ポリ)ペプチド配列とはまた、間隔を置く、例えば、介在配列またはリンカー配列により隔てることもできる。特に、JNK阻害剤が、より複合的な分子である(例えば、いくつかのドメインを含む、多量体の結合体であるなどの)場合はまた、輸送体配列を、JNK阻害剤分子内の、阻害性(ポリ)ペプチド配列とは全く別の場所に位置させることも想定される。また、輸送体配列と、阻害性(ポリ)ペプチド配列とが重複しうることも想定される。しかしながら、JNK阻害部分のJNK阻害活性を維持する必要がある。下記では、このような重複する場合をさらに示す。

【0050】

本発明のJNK阻害剤と共に用いられる輸送体配列は、それらに限定せずに述べると、HIV TAT(HIV)に由来する輸送体配列、例えば、TATタンパク質(例えば、米国特許第5,804,604号、および同第5,674,980号において記載され、これらの参考文献の各々は、参照により本明細書に組み込まれる)、HSV(Herpes simplex)VP22(例えば、WO97/05265; ElliottおよびO'Hare、Cell、88巻:223~233頁(1997年)において記載されている)、非ウイルス性タンパク質(Jacksonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻:10691~10695頁(1992年))、アンテナペディアに由来する輸送体配列、特に、Drosophila属のアンテナペディア(例えば、Drosophila属のアンテナペディアの担体配列)に由来する輸送体配列、FGF、ラクトフェリンなどに由来する輸送体配列、または塩基性ペプチド、例えば、少なくとも5アミノ酸もしくは少なくとも10アミノ酸もしくは少なくとも15アミノ酸、例えば、5~15アミノ酸、好ましくは10~12アミノ酸の長さを有するペプチドに由来する輸送体配列などの、例えば、天然タンパク質から選択することもできる。そのような輸送体配列は、好ましくは、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは85%、なおもしくは90%の、例えば、アルギニン、リシン、および/もしくはヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を含むか、またはVP22に由来するか、PTD-4タンパク質またはPTD-4ペプチドに由来するか、RGD-K₁₆に由来するか、PEPT1/2またはPEPT1/2タンパク質もしくはPEPT1/2ペプチドに由来するか、SynB3またはSynB3タンパク質もしくはSynB3ペプチドに由来するか、PC阻害剤に由来するか、P21由来タンパク質またはP21由来ペプチドに由来するか、あるいはJNK Iタンパク質またはJNK Iペプチドに由来する、例えば、RRRRRRRRRR(R₉; 配列番号152)、RRRRRRRRRR(R₈; 配列番号153)、RRRRRRRRRR(R₇; 配列番号154)、RRRRRRRR(R₆; 配列番号155)、RRRRRR(R₅; 配列番号156)など、アルギニンに富むペプチド配列から選択することもできる。

【0051】

本発明のJNK阻害剤における使用のための輸送体配列の例は、それらに限定せずに述べると、特に、HIV-1 TATタンパク質に由来する塩基性輸送体配列である。HIV-1 TATタンパク質の塩基性輸送体配列には、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,804,604号、および同第5,674,980号にお

10

20

30

40

50

いて記載されるヒト免疫不全ウイルスHIV-1 TATタンパク質に由来する配列が含まれうることが好ましい。この文脈では、全長HIV-1 TATタンパク質が、HIV TAT遺伝子の2つのエクソンによりコードされる86アミノ酸残基を有する。TATのアミノ酸1~72が、エクソン1によりコードされるのに対し、アミノ酸73~86は、エクソン2によりコードされる。全長TATタンパク質は、2つのリシンおよび6つのアルギニンを含む塩基性領域（アミノ酸49~57）ならびに7つのシステイン残基を含むシステインに富む領域（アミノ酸22~37）によって特徴付けられる。塩基性領域（すなわち、アミノ酸49~57）は、核局在化に重要であると考えられた（Ruben, S.ら、J. Virol., 63巻：1~8頁（1989年）；Hauber, J.ら、J. Virol., 63巻：1181~1187頁（1989年））。システインに富む領域は、in vitroにおいて、金属により連結された二量体の形成を媒介し（Frankel, A. D.ら、Science, 240巻：70~73頁（1988年）；Frankel, A. D.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85巻：6297~6300頁（1988年））、トランス活性化因子としてのその活性に不可欠である（Garcia, J. A.ら、EMBO J., 7巻：3143頁（1988年）；Sadaie, M. R.ら、J. Virol., 63巻：1頁（1989年））。他の調節タンパク質における場合の通り、N末端領域は、細胞内プロテアーゼに対する保護に関与しうる（Bachmair, A.ら、Cell, 56巻：1019~1032頁（1989年））。本発明のJNK阻害剤における使用のための好ましいTAT輸送体配列は、TATの塩基性領域のアミノ酸配列（天然に存在するTATタンパク質のアミノ酸49~57）の存在；TATのシステインに富む領域のアミノ酸配列（天然に存在するTATタンパク質のアミノ酸22~36）の非存在；およびTATのエクソン2によりコードされるカルボキシ末端ドメイン（天然に存在するTATタンパク質のアミノ酸73~86）の非存在によって特徴付けられることが好ましい。本発明のJNK阻害剤中の輸送体配列は、TATの残基48~57もしくは49~57またはこれらの変異体を含むアミノ酸配列から選択されうることがより好ましい。

【0052】

所与の、本発明のJNK阻害剤中の輸送体配列はまた、例えば、プロテアーゼに対する安定性を改善するために、D-アミノ酸も呈示することが好ましい。特に、特定の序列で交互になったD-アミノ酸およびL-アミノ酸を呈示する輸送体配列が好ましい。交互になったD-アミノ酸およびL-アミノ酸のこのような序列（モチーフ）は、それらに限定せず述べると、配列番号28~30：

$d_1 L L L_x d_m L L L_y d_n$ （配列番号28）、
 $d L L L d (L L L d)_a$ （配列番号29）、および/または
 $d L L L d L L L d$ （配列番号30）

[式中、dは、D-アミノ酸であり、

Lは、L-アミノ酸であり、

aは、0~3、好ましくは0~2、より好ましくは0、1、2、または3、なおより好ましくは0、1、または2であり、最も好ましくは1であり、

l、m、およびnは、互いから独立に、1または2、好ましくは1であり、

xおよびyは、互いから独立に、0、1、または2、好ましくは1である]

のうちのいずれか1つのパターンに従いうる。

【0053】

D-アミノ酸およびL-アミノ酸の前記序列（モチーフ）は、輸送体配列を合成する場合、すなわち、アミノ酸配列（すなわち、側鎖残基の種類）は変化させずに保持する一方で、それぞれの異性体を交互に生起させる場合に関与性となる。例えば、HIV TATに由来する公知の輸送体配列は、RKKRRQRRR（配列番号43）である。配列番号30のD-アミノ酸/L-アミノ酸序列をこれに適用すれば、rKKRrQRRr（配列番号46）がもたらされるであろう。

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態では、本発明の J N K 阻害剤の輸送体配列が、 $r X X X r X X X r$ (配列番号 3 1) [式中、

r は、D - 鏡像異性体のアルギニンを表し、

X は、任意の L - アミノ酸 (グリシンを含めた) であり、

各 X は、個別に、かつ、配列番号 3 1 内の他の任意の X とは独立に選択することができる] に従う少なくとも 1 つの配列を含みうる。配列番号 3 1 内の前記 6 つの L - アミノ酸である X のうちの少なくとも 4 つは、K または R であることが好ましい。別の実施形態では、本発明に従う J N K 阻害剤が、輸送体配列 $r X_1 X_2 X_3 r X_4 X_5 X_6 r$ (配列番号 3 2) [式中、 X_1 は、K であり、 X_2 は、K であり、 X_3 は、R であり、 X_4 、 X_5 、および X_6 は、互いから独立に選択された任意の L - アミノ酸 (グリシンを含めた) である] を含む。同様に、本発明に従う J N K 阻害剤の輸送体配列は、配列 $r X_1 X_2 X_3 r X_4 X_5 X_6 r$ (配列番号 3 3) [式中、 X_4 は、Q であり、 X_5 は、R であり、 X_6 は、R であり、 X_1 、 X_2 、および X_3 は、互いから独立に選択された任意の L - アミノ酸 (グリシンを含めた) である] を含みうる。本発明の J N K 阻害剤はまた、配列 $r X_1 X_2 X_3 r X_4 X_5 X_6 r$ (配列番号 3 4) [式中、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つのアミノ酸残基 X は、{ X_1 は、K であり、 X_2 は、K であり、 X_3 は、R であり、 X_4 は、Q であり、 X_5 は、R であり、 X_6 は、R である } からなる群から選び出される一方で、上記の群より選択されない残りのアミノ酸残基 X は、任意の L - アミノ酸 (グリシンを含めた) であることが可能であり、互いから独立に選択される] も含みうる。この場合、 X_1 は、Y であることが好ましく、かつ / または X_4 は、K もしくは R であることが好ましい。

10

20

【 0 0 5 5 】

本発明の J N K 阻害剤分子における使用のための輸送体配列の例は、それらに限定せずに述べると、下記の表 2 に示される配列 (配列番号 3 1 ~ 1 7 0) から選択することもでき、任意の断片もしくは変異体またはそれらの化学修飾された誘導体から選択することもできる (生物学的膜を越えてトランスロケーションする機能を保持することが好ましい)。

【 0 0 5 6 】

【表 2 - 1】

表2: 本発明に従うJNK阻害剤における使用のための輸送体(ポリ)ペプチド配列の例			
配列名/ペプチド名	配列番号	AA	配列
r3 (generic)	31	9	rXXXrXXXr
r3 (generic;右半分)	32	9	rKKRrX ₄ X ₅ X ₆ r
r3 (generic;左半分)	33	9	rX ₁ X ₂ X ₃ rQRRr
r3 (generic;個体)	34	9	rX ₁ X ₂ X ₃ rX ₄ X ₅ X ₆ r
TAT (1-86)	35	86	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT ACTNCYCKKC CFHCQ VCFIT KALGISYGRK KRRQRRRPPQ GSQTHQVSLK K QPTSQSRGD PTGPKE
TAT (37-72)	36	36	CFITKALGIS YGRKKRRQRR RPPQGSQTHQ VLSKQ
TAT (37-58)	37	22	CFITKALGIS YGRKKRRQRR RP
TAT (38-58)GGC	38	24	FITKALGISY GRKKRRQRRR PGGC
TAT CGG(47-58)	39	15	CGGYGRKKRR QRRRP
TAT (47-58)GGC	40	15	YGRKKRRQRR RPPGC
TAT (1-72) Mut Cys/ Ala 72	41	56	MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT AFITKALGIS YGRKKR RQRR RPPQGSQTHQ VLSKQ
L-TAT (sla)	42	10	GRKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
L-TAT (slb)	43	9	RKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
L-TAT (slc)	44	11	YDRKKRRQRRR
D-TAT	45	9	rrqrkkrr
r ₃ -L-TAT	46	9	rKKRrQRRr
r ₃ -L-TATi	47	9	rRRQrRKKr
βA-r ₃ -L-TAT	48	9	βA-rKKRrQRRr (βA:ベータアラニン)
βA-r ₃ -L-TATi	49	9	βA-rRRQrRKKr (βA:ベータアラニン)
FITC-βA-r ₃ -L-TAT	50	9	FITC-βA-rKKRrQRRr (βA:ベータアラニン)
FITC-βA-r ₃ -L-TATi	51	9	FITC-βA-rRRQrRKKr (βA:ベータアラニン)
TAT(s2-1)	52	9	rAKRrQRRr
TAT(s2-2)	53	9	rKARrQRRr
TAT(s2-3)	54	9	rKKArQRRr
TAT(s2-4)	55	9	rKKRrARRr
TAT(s2-5)	56	9	rKKRrQARr
TAT(s2-6)	57	9	rKKRrQRAr
TAT(s2-7)	58	9	rDKRrQRRr
TAT(s2-8)	59	9	rKDRrQRRr
TAT(s2-9)	60	9	rKKDrQRRr
TAT(s2-10)	61	9	rKKRrDRRr

【表 2 - 2】

TAT(s2-11)	62	9	rKKRrQDRr
TAT(s2-12)	63	9	rKKRrQRDr
TAT(s2-13)	64	9	rEKRRRRr
TAT(s2-14)	65	9	rKERrQRRr
TAT(s2-15)	66	9	rKKErQRRr
TAT(s2-16)	67	9	rKKRrERRr
TAT(s2-17)	68	9	rKKRrQERr
TAT(s2-18)	69	9	rKKRrQREr
TAT(s2-19)	70	9	rFKRrQRRr
TAT(s2-20)	71	9	rKFRrQRRr
TAT(s2-21)	72	9	rKKFrQRRr
TAT(s2-22)	73	9	rKKRrFRr
TAT(s2-23)	74	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-24)	75	9	rKKRrQFRr
TAT(s2-25)	76	9	rRKRrQRRr
TAT(s2-26)	77	9	rKRRrQRRr
TAT(s2-27)	78	9	rKKKrrRRr
TAT(s2-28)	79	9	rKKRrRRRr
TAT(s2-29)	80	9	rKKRrQKRr
TAT(s2-30)	81	9	rKKRrQRKr
TAT(s2-31)	82	9	rHKRrQRRr
TAT(s2-32)	83	9	rKHRrQRRr
TAT(s2-33)	84	9	rKKHrQRRr
TAT(s2-34)	85	9	rKKRrHRRr
TAT(s2-35)	86	9	rKKRrQHRr
TAT(s2-36)	87	9	rKKRrQRHr
TAT(s2-37)	88	9	rIKRrQRRr
TAT(s2-38)	89	9	rKIRrQRRr
TAT(s2-39)	90	9	rKKIrQRRr
TAT(s2-40)	91	9	rKKRrIRRr
TAT(s2-41)	92	9	rKKRrQIRr
TAT(s2-42)	93	9	rKKRrQRIr
TAT(s2-43)	94	9	rLKRrQRRr
TAT(s2-44)	95	9	rKLrQRRr
TAT(s2-45)	96	9	rKKLrQRRr
TAT(s2-46)	97	9	rKKRrLRRr
TAT(s2-47)	98	9	rKKRrQLRr

【表 2 - 3】

TAT(s2-48)	99	9	rKKRrQRLr
TAT(s2-49)	100	9	rMKRrQRRr
TAT(s2-50)	101	9	rKMRrQRRr
TAT(s2-51)	102	9	rKKMrQRRr
TAT(s2-52)	103	9	rKKRrMRRr
TAT(s2-53)	104	9	rKKRrQMRr
TAT(s2-54)	105	9	rKKRrQRMr
TAT(s2-55)	106	9	rNKRrQRRr
TAT(s2-56)	107	9	rKNRrQRRr
TAT(s2-57)	108	9	rKKNrQRRr
TAT(s2-58)	109	9	rKKRrNRRr
TAT(s2-59)	110	9	rKKRrQNRr
TAT(s2-60)	111	9	rKKRrQRNr
TAT(s2-61)	112	9	rQKRrQRRr
TAT(s2-62)	113	9	rKQRrQRRr
TAT(s2-63)	114	9	rKKQrQRRr
TAT(s2-64)	115	9	rKKRrKRRr
TAT(s2-65)	116	9	rKKRrQQRr
TAT(s2-66)	117	9	rKKRrQRQr
TAT(s2-67)	118	9	rSKRrQRRr
TAT(s2-68)	119	9	rKSRrQRRr
TAT(s2-69)	120	9	rKKSrQRRr
TAT(s2-70)	121	9	rKKRrSRRr
TAT(s2-71)	122	9	rKKRrQSRr
TAT(s2-72)	123	9	rKKRrQRSr
TAT(s2-73)	124	9	rTKRrQRRr
TAT(s2-74)	125	9	rKTRrQRRr
TAT(s2-75)	126	9	rKKTrQRRr
TAT(s2-76)	127	9	rKKRrTRRr
TAT(s2-77)	128	9	rKKRrQTRr
TAT(s2-78)	129	9	rKKRrQRTTr
TAT(s2-79)	130	9	rVKRrQRRr
TAT(s2-80)	131	9	rKVRrQRRr
TAT(s2-81)	132	9	rKKVrQRRr
TAT(s2-82)	133	9	rKKRrVRRr
TAT(s2-83)	134	9	rKKRrQVRr
TAT(s2-84)	135	9	rKKRrQRVr

10

20

30

40

【表 2 - 4】

TAT(s2-85)	136	9	rWKRrQRRr
TAT(s2-86)	137	9	rKWRrQRRr
TAT(s2-87)	138	9	rKKWrQRRr
TAT(s2-88)	139	9	rKKRrWRRr
TAT(s2-89)	140	9	rKKRrQWRr
TAT(s2-90)	141	9	rKKRrQRWr
TAT(s2-91)	142	9	rYKRrQRRr
TAT(s2-92)	143	9	rKYRrQRRr
TAT(s2-93)	144	9	rKKYrQRRr
TAT(s2-94)	145	9	rKKRrYRRr
TAT(s2-95)	146	9	rKKRrQYRr
TAT(s2-96)	147	9	rKKRrQRYr
TAT(s2-97)	148	8	rKKRrQRr
TAT(s2-98)	149	9	rKKRrQRrK
TAT(s2-99)	150	9	rKKRrQRrR
r ₃ R ₆	151	9	rRRRrRRRr
L-R ₉	152	9	RRRRRRRRR
L-R ₈	153	8	RRRRRRRR
L-R ₇	154	7	RRRRRRR
L-R ₆	155	6	RRRRRR
L-R ₅	156	5	RRRRR
r ₉	157	9	rrrrrrrr
r ₅ R ₄ (D/L)	158	9	rRrRrRrRr
r ₅ R ₄ (DD/LL)	159	9	rrRRrrRRr
PTD-4	160	11	YARAAARQARA
PTD-4 (変異体1)	161	11	WARAAARQARA
PTD-4 (変異体2)	162	11	WARAQRAAARA
L-P1ペネトラチン	163	16	RQVKVWFQNRMRKWK
D-P1ペネトラチン	164	16	KKWKMRRNQFWVKVQR
JNKI, bestfit	165	17	WKRAAARKARAMSLNLF
JNKI, bestfit (変異体1)	166	17	WKRAAARAARAMSLNLF
MDCK細胞トランス サイトースドメイ ンの配列	167	9	RYRGDLGRR
YKGL	168	4	YKGL
P1	169	4	RRTK
P66	170	4	RRPK

10

20

30

40

上記で言及した通り、輸送体配列はまた、上記の表 2 の配列の断片または変異体からも選択することができる（このような断片または変異体が、好ましくは、生物学的膜を越えるトランスロケーションをもたらす機能を保持するという条件を伴う）。この特定の文脈では、これらの輸送体配列の変異体および／または断片が、表 2 で規定されるこのような輸送体配列と配列の全長にわたり、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、または少なくとも 85 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性を共有し、最も好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を共有するペプチド配列を含むことが好ましい。この特定の文脈では、表 2 で規定される輸送体配列の「断片」が、その切断型配列、すなわち、元の配列のアミノ酸配列と比較して N 末端において、C 末端において、かつ／または配列内において切断されたアミノ酸配列として理解されることが好ましい。

【0061】

さらに、上記で規定した輸送体配列またはその断片の「変異体」は、本明細書で規定される元の輸送体配列またはその断片と、1 つまたは複数の置換アミノ酸（または、必要な場合、挿入アミノ酸および／または欠失アミノ酸）など、1 つまたは複数の変異において異なる変異体のアミノ酸配列として理解することが好ましい。上記で規定したこのような輸送体配列の変異体は、それぞれの元の配列と比較して同じ生物学的機能または比活性を有する、すなわち、例えば、細胞または核への輸送をもたらすことが好ましい。この文脈では、上記で規定したこのような輸送体配列の変異体が、例えば、約 1 ～ 50 カ所、1 ～ 20 カ所、より好ましくは 1 ～ 10 カ所のアミノ酸変化を含むことが可能であり、最も好ましくは 1 ～ 5 カ所、4、3、2、または 1 カ所のアミノ酸変化を含みうる。上記で規定したこのような輸送体配列の変異体は、保存的アミノ酸置換を含みうることを好ましい。当技術分野では、保存的アミノ酸置換の概念が公知であり、JNK 阻害性（ポリ）ペプチド配列については上記で既に示されており、したがってここでも適用される。

【0062】

本発明の JNK 阻害剤中に組み込まれる輸送体配列の長さは変化しうる。一部の実施形態では、本発明に従う JNK 阻害剤の輸送体配列が、150 アミノ酸未満、140 アミノ酸未満、130 アミノ酸未満、120 アミノ酸未満、110 アミノ酸未満、100 アミノ酸未満、90 アミノ酸未満、80 アミノ酸未満、70 アミノ酸未満、60 アミノ酸未満、50 アミノ酸未満、40 アミノ酸未満、30 アミノ酸未満、20 アミノ酸未満、および／または 10 アミノ酸未満の長さであることが想定される。

【0063】

当業者は、特定の輸送体配列が、本発明に従う JNK 阻害剤の文脈において、やはり機能的であるのかどうかを容易に決定することができる。例えば、輸送体ドメインを含む JNK 阻害剤は、例えば、細胞内で容易に検出されうる、GFP などの蛍光タンパク質、放射性標識、酵素、フルオロフォア、エピトープなどの標識へと融合させることができる。次いで、輸送体配列を含む JNK 阻害剤および標識を、細胞へとトランスフェクトするか、または培養物上清へと添加して、生物物理的および生化学的な標準的方法（例えば、フローサイトメトリー、（免疫）蛍光顕微鏡法など）を用いることにより、細胞膜への透過をモニタリングすることができる。

【0064】

輸送体配列を含む、本発明に従う JNK 阻害剤の特定の例を、表 3 に示す。

【0065】

【表 3】

表3: 阻害性(ポリ)ペプチド配列および輸送体配列を含むJNK阻害剤の例		
アミノ酸配列	AA	配列番号
rKKRrQRRrRPkRPTTLNLf	20	171
rKKRrQRRrRPkRPaTLNLf	20	172
rKKRrQRRrRPkRPTTLrLf	20	173
rKKRrQRRrRPTTLNLf	17	174
rKKRrQRrRPTTLNLf	16	175
rKKRrQRRrRPkRPTTLNLw	20	176
rKKRrQRRrRPkRPTDLNLf	20	177
rKKRrQRRrRPTTLrLw	17	178
rKKRrQRrRPTTLrLw	16	179
rKKRrQRRrRPTDLrLw	17	180
rKKRrQRrRPTDLrLw	16	181
rKKRrQRRrRPaTLNLf	17	182
rKKRrQRrRPaTLNLf	16	183
rKKRrQRrKRPaTLNLf	17	184
rKKRrQRRrRPkRPsTLNLf	20	185
rKKRrQRRrRPkRPqTLNLf	20	186
rKKRrQRRrRPkRPaTLNLf	20	187
rKKRrQRRrGKRKALKLf	18	188
rKKRrQRRrGKRKALrLf	18	189
rKKRrQRRrRKALrLf	16	190

10

20

30

40

【0066】

上記で言及した通り、本発明の特定の実施形態では、輸送体配列と、阻害性(ポリ)ペプチド配列とが重複しうる。言い換えれば、輸送体配列のN末端が、阻害性(ポリ)ペプチド配列のC末端と重複する場合もあり、輸送体配列のC末端が、阻害性(ポリ)ペプチド配列のN末端と重複する場合もある。後者の実施形態が、特に好ましい。輸送体配列は、1つ、2つ、または3つのアミノ酸残基により、阻害性(ポリ)ペプチド配列と重複することが好ましい。このような状況では、所与の輸送体配列が、配列番号1またはそのそ

【0067】

配列番号174、175、178、179、180、181、182、183、184、188、189、および190は、本発明に従うJNK阻害剤の例であって、輸送体配列と、阻害性(ポリ)ペプチド配列とが重複する、例えば、

【0068】

【化1】

rKKRrQRRrRPTTLNLf(配列番号 174)

50

【 0 0 6 9 】

が、配列番号 4 6（下線を付す）および配列番号 1 1（イタリック体）と重複する良い例である。

【 0 0 7 0 】

本発明に従う J N K 阻害剤はまた、配列番号 1 7 1 ~ 1 9 0 に従う J N K 阻害剤のうちのいずれか 1 つの変異体である J N K 阻害剤からも選択することができる。このような変異体は、配列番号 1 7 1 ~ 1 9 0 の配列、特に、配列番号 1 7 2 との、少なくとも 5 0 %、より好ましくは少なくとも 5 5 %、より好ましくは少なくとも 6 0 %、より好ましくは少なくとも 6 5 %、より好ましくは少なくとも 7 0 %、より好ましくは少なくとも 7 5 %、より好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、より好ましくは少なくとも 9 0 %、最も好ましくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を共有し、

前記の配列番号 1 7 1 ~ 1 9 0 の配列内の阻害性（ポリ）ペプチド配列に照らして（基準の阻害性（ポリ）ペプチドについては、配列番号 1 の配列および配列番号 2 ~ 2 7 の特定の例を参照されたい）、配列同一性を共有するこのような配列が、

a) 阻害性（ポリ）ペプチド配列内の 4 位における L - アルギニン（R）残基を維持し、

b) 阻害性（ポリ）ペプチド配列内の 8 位および 1 0 位（配列番号 2 5 ~ 2 7 については、7 位および 9 位）における 2 つの L - ロイシン（L）残基を維持し、

c) 配列番号 1 の X 1、X 2、X 3、X 5、X 7、および / または X 8 からなる群より選択されるアミノ酸に対応するそれぞれの位置、ならびに配列番号 2 ~ 2 7 内のそれぞれの位置において、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、または 6 つの D - アミノ酸を呈示し、より好ましくは、配列番号 1 の X 3、X 5、X 7、および X 8 からなる群より選択されるアミノ酸に対応する位置、ならびに配列番号 2 ~ 2 7 内のそれぞれの位置において、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、または 4 つの D - アミノ酸を呈示し、

d) J N K 活性を阻害する（すなわち、本明細書で規定される J N K 阻害剤である）という条件を伴うことが好ましい。

【 0 0 7 1 】

前記規定を考慮して、明確さのために、表 3 では、配列番号 1 7 1 ~ 1 9 0 を含む J N K 阻害剤の変異体（上記の規定における a）および b）を参照されたい）において好ましくは変化させることのできない残基に下線を付す。

【 0 0 7 2 】

配列番号 1 7 1 ~ 1 9 0 を含む J N K 阻害剤の変異体における同一でないアミノ酸は、保存的アミノ酸置換の結果であることが好ましい（上記を参照されたい）。当然ながら、配列番号 1 7 1 ~ 1 9 0 を含む J N K 阻害剤の変異体についてはまた、上記で言及したさらなる可能な置換も想定される。同様に、本発明は、当然ながらまた、配列番号 1 7 1 ~ 1 9 0 に従う J N K 阻害剤のうちのいずれか 1 つの変異体であって、元の配列から逸脱するわけでもなく、もっぱら阻害性（ポリ）ペプチド配列内にあるわけでもないが、輸送体配列内に変異体残基を呈示する変異体も想定する。輸送体配列の変異体および断片については、本明細書におけるそれぞれの開示が適切である。

【 0 0 7 3 】

既に言及した通り、本発明に従う J N K 阻害剤の輸送体配列と J N K 阻害性（ポリ）ペプチド配列とを、必ずしも互いと直接連結する必要はない。それらはまた、例えば、介在または連結（ポリ）ペプチド配列により連結することもできる。阻害性（ポリ）ペプチド配列と、輸送体配列など、他の（機能的）配列とを隔てる好ましい介在配列または連結配列は、六量体、五量体、四量体、トリペプチド、またはジペプチドもしくは単一のアミノ酸残基など、1 0 アミノ酸未満の長さの短いペプチド配列からなる。特に好ましい介在配列は、全てが L - アミノ酸形態だけでもしくは D - アミノ酸形態だけであるジプロリン、ジグリシン、ジアルギニン、および / もしくはジリシン、または D - アミノ酸と L - アミノ酸とを混合したジプロリン、ジグリシン、ジアルギニン、および / もしくはジリシンの 1

つ、2つ以上のコピーである。あるいは、他の公知のペプチドスパーサー配列またはリンカー配列も同様に使用することができる。

【0074】

本発明に従う特に好ましいJNK阻害剤は、配列番号8（または配列番号8と、上記でさらに規定した範囲および限界を伴って、配列同一性を共有する配列）および輸送体配列を含む。輸送体配列は、配列番号31～170のうちのいずれか1つまたは本明細書で規定されるこれらの変異体から選択されることが好ましく、配列番号31～34および46～151のうちのいずれか1つから選択されることがなおより好ましい。本発明に従うJNK阻害剤の特に好ましい実施形態は、配列番号8および配列番号46（または上記で規定した範囲および限界内で、それらとのそれぞれの配列同一性を共有する配列）を含むJNK阻害剤である。好ましい例は、配列番号172の配列または、その、本明細書で規定される輸送体配列および/もしくは阻害性（ポリ）ペプチド配列において異なる、それぞれの変異体を含むJNK阻害剤である。

10

【0075】

さらなる態様では、本発明は、

a) RPTTLNLF（配列番号191）、KRPTTLNLF（配列番号192）、RRPTTLNLF、および/またはRPKRPTTLNLF（配列番号193）からなる配列の群に由来する配列を含む阻害性（ポリ）ペプチド、ならびに

b) 輸送体配列、好ましくは、表2において開示されている輸送体配列またはそれらの変異体/断片から選択される輸送体配列、なおより好ましくは、配列番号31～34および46～151またはそのそれぞれの変異体もしくは断片から選択される輸送体配列を含むJNK阻害剤に関する。

20

【0076】

輸送体配列と、阻害性（ポリ）ペプチド配列とは、重複しうる。本発明の前記実施形態に好ましい輸送体配列は特に、配列番号46の輸送体配列、好ましくは阻害性（ポリ）ペプチド配列のN末端へと（共有結合的に）連結される（例えば、直接）配列番号46の輸送体配列である。

【0077】

本発明のJNK阻害剤はまた、配列GRKKRRQRRRPPKRPTTLNLFPPQVPRSQD（配列番号194）、または配列GRKKRRQRRRPTTLNLFPPQVPRSQD（配列番号195）を含むかまたはこれからなるJNK阻害剤でもありうる。

30

【0078】

さらなる態様では、本発明は、rKKRrQRr（配列番号148）、rKKRrQRrK（配列番号149）、および/またはrKKRrQRrR（配列番号150）からなる配列の群より選択される輸送体配列を含む（ポリ）ペプチドに関する。

【0079】

本明細書で用いられる場合、本明細書に開示されるある配列または所定の配列番号を「含むこと」とは通例、（少なくとも）1コピーの前記配列が、例えば、JNK阻害剤分子内に存在することを含意する。例えば通例、1つの阻害性（ポリ）ペプチド配列で、十分なJNK活性の阻害を達成するのに十分である。しかし、結果として得られる分子が、JNK活性を阻害する全体的な能力を消失させない（すなわち、それぞれの分子が、やはり本明細書で規定されるJNK阻害剤である）限りにおいて、本発明にしたがって、それぞれの配列の2つ以上のコピー（例えば、異なるかもしくは同じ種類の阻害性（ポリ）ペプチド配列の2つ以上のコピー、および/または異なるかもしくは同じ種類の輸送体配列の2つ以上のコピー）を使用することも、本発明のポリ（ペプチド）について利用され得ることが想定される。

40

【0080】

本発明のJNK阻害剤は、当技術分野で周知の方法により、例えば、Fmoc（9-フルオレニルメチルオキシカルボニル）戦略を用いる固相ペプチド合成を介する化学合成に

50

より、すなわち、Fmoc脱保護とFmoc-アミノ酸カップリングとによるサイクルの逐次的ラウンドにより取得され得るかまたは生成され得る。このようなペプチド合成をもたらす市販のサービスは、多くの企業、例えば、PolyPeptide社(Strasbourg, France)により提供されている。

【0081】

本発明に従う使用のためのJNK阻害剤は場合によって、特に、阻害性(ポリペプチド)配列のアミノ酸残基においてさらに修飾することもできる。可能な修飾は、例えば、(i)放射性標識、すなわち、放射性リン酸化、または硫黄、水素、炭素、窒素などを伴う放射性標識；

(ii)着色染料(例えば、ジゴキシゲニンなど)；

(iii)蛍光基(例えば、フルオレセインなど)；

(iv)化学発光基；

(v)固相において固定化するための基(例えば、Hisタグ、ビオチン、ストレプトタグ、フラグタグ、抗体、エピトープなど)；

(vi)PEG化；

(vii)グリコシル化；

(viii)HES化；

(ix)プロテアーゼ切断部位(例えば、JNK阻害剤を制御放出するための)；

(x)ペプチド骨格の修飾(例えば、(CH₂-NH)結合)；

(xi)アミノ酸側鎖残基の保護；

(xii)N末端および/またはC末端の保護(例えば、N末端のアミド化またはC末端のアセチル化)；

(xiii)(i)~(xii)の下で言及した要素のうちの2つ以上の要素の組合せからなる群の項目(i)~(xiii)の1つ以上より選択することができる。

【0082】

(i)~(xi)および(i)~(xi)の下で言及した要素のうちの2つ以上の要素の組合せから選択される修飾が特に好ましい。この文脈におけるさらなる態様では、本発明は、(i)~(xi)から選択される修飾で修飾されるか、または(i)~(xi)の下で言及した要素のうちの2つ以上の組合せで修飾された、本明細書で開示されるJNK阻害剤、およびこのような修飾JNK阻害剤を含む医薬組成物(下記を参照されたい)についてのさらなる局面に関する。

【0083】

医薬組成物

本発明に従い規定されるJNK阻害剤は、本明細書で規定される疾患のうちのいずれかを防止または処置するのに適用しうる医薬組成物中に処方されることができる。本発明に従い用いられるこのような医薬組成物には、活性成分として、本明細書で規定されるJNK阻害剤、特に、本明細書で規定される、配列番号1に従う阻害性(ポリ)ペプチド配列を含むかまたはこれからなるJNK阻害剤を組み入れうることが典型的である。活性化化合物は、必要に応じて(リンカー配列を介するかまたはリンカー配列を含まずに)任意の適切な輸送体配列と(共有結合的に)結合体化された、配列番号2~27のうちのいずれか1つに従う、阻害性(ポリ)ペプチド配列を含むかまたはこれからなるJNK阻害剤であることが好ましい；または、輸送体配列を付着する場合は、配列番号171~190のうちのいずれか1つに従う配列のいずれかが選択され得る。

【0084】

本発明の発明者らは加えて、本明細書で規定されるJNK阻害剤が、特に、輸送体配列へと融合させる場合、本発明の疾患に関与する細胞への、特に顕著な取込み速度を呈示することも見出した。したがって、被験体に投与される医薬組成物中のJNK阻害剤の量は、(それに限定せずに述べると)その組成物中の低用量に基づいて使用されうる。したがって、投与される用量は、DTS-108など、当技術分野で公知のペプチド薬の場合(Florence Meyer-Losicら、Clin Cancer Res., 2

10

20

30

40

50

008年、2145～53頁)よりはるかに低量でありうる。それによって、例えば、潜在的な副反応の軽減および費用の低減は、本発明の(ポリ)ペプチド配列によって達成される。

【0085】

例えば、被験体に毎日投与される用量(体重1kg当たりの)は、最大で約10mmol/kg、好ましくは最大で約1mmol/kg、より好ましくは最大で約100μmol/kg、なおより好ましくは最大で約10μmol/kg、なおより好ましくは最大で約1μmol/kg、なおより好ましくは最大で約100nmol/kg、最も好ましくは最大で約50nmol/kgの範囲内にあることが好ましい。

【0086】

したがって、用量範囲(例えば、毎日投与される用量)は、約1pmol/kg～約1mmol/kg、約10pmol/kg～約0.1mmol/kg、約10pmol/kg～約0.01mmol/kg、約50pmol/kg～約1μmol/kg、約100pmol/kg～約500nmol/kg、約200pmol/kg～約300nmol/kg、約300pmol/kg～約100nmol/kg、約500pmol/kg～約50nmol/kg、約750pmol/kg～約30nmol/kg、約250pmol/kg～約5nmol/kg、約1nmol/kg～約10nmol/kg、または前記値のうちのいずれか2つの組合せでありうるということが好ましい。

【0087】

この文脈では、上記の医薬組成物を用いる場合の処置の処方、例えば、投与量などについての決定は、一般的な医療従事者および他の医師の責任の範囲内にあることが典型的であり、処置される障害、個別の患者の状態、送達部位、投与法、および医療従事者に公知の他の因子を考慮に入れることが典型的である。上記で言及した技法およびプロトコルの例は、REMYINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、16版、Osol, A. (編)、1980年において見出すことができる。したがって、本発明に従い用いられる医薬組成物の成分についての「安全かつ有効な量」とは、本明細書で規定される、JNKシグナル伝達と強く関連する疾患または障害の肯定的な変容を著明に誘導するのに十分なこれらの成分の各々または全ての量を意味する。しかし、同時に、「安全かつ有効な量」は、重篤な副作用を回避する、すなわち、利点と危険性との間の妥当な関係を可能とするのに十分小さい。これらの限界の決定は、妥当な治療的判断の範囲内にあることが典型的である。このような成分の「安全かつ有効な量」は、処置される特定の状態との関連で変化するであろうし、また、処置される患者の年齢および健康状態、状態の重症度、処置の持続期間、随伴する治療の性質、用いられる特定の薬学的に許容される担体の性質、ならびに主治医の知識および経験の範囲内にある類似した因子との関連でも変化するであろう。本発明に従う医薬組成物は、本発明に従い、ヒトのために用いることができ、また、獣医療目的のためにも用いることができる。

【0088】

本発明に従い用いられる医薬組成物は、JNK阻害剤のうちの1つまたは複数に加えて、(適合性の)薬学的に許容される担体、賦形剤、緩衝剤、安定化剤、または当業者に周知の他の材料をさらに含む。

【0089】

この文脈では、「(適合性の)薬学的に許容される担体」という表現が、組成物の液体基剤または非液体基剤を包含することが好ましい。「適合性の」という用語は、本明細書で用いられる医薬組成物の構成物質を、上記で規定した医薬活性成分および別の成分と、通例の使用条件下で組成物の医薬としての有効性を実質的に減殺する相互作用が起こらない形で混合することが可能なことを意味する。薬学的に許容される担体は、当然ながら、それらを、処置される患者への投与に適するものとするのに十分な程度に純度が高く、十分な程度に毒性が低くなければならない。

【0090】

本明細書で用いられる医薬組成物を、液体形態で提供する場合、薬学的に許容される担

10

20

30

40

50

体は、1つまたは複数の（適合性の）薬学的に許容される液体の担体を含むことが典型的である。組成物は、（適合性の）薬学的に許容される液体の担体として、例えば、発熱物質非含有水；等張性食塩水または、例えば、リン酸緩衝溶液、クエン酸緩衝溶液などの（水性）緩衝溶液；例えば、ラッカセイ油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、およびカカオに由来する油などの植物油；例えば、ポリプロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；アルギン酸などを含みうる。特に、本明細書で用いられる医薬組成物を注射するには、緩衝液、好ましくは水性緩衝液を用いることができる。

【0091】

本明細書で用いられる医薬組成物を固体形態で提供する場合、薬学的に許容される担体は、1つまたは複数の（適合性の）薬学的に許容される固体担体を含むことが典型的であろう。組成物は、（適合性の）薬学的に許容される固体担体として、例えば、1つまたは複数の適合性の固体または液体の充填剤または希釈剤を含む場合もあり、また、人への投与に適する封入化合物を用いる場合もある。このような（適合性の）薬学的に許容される固体担体のいくつかの例は、例えば、ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖；例えば、トウモロコシデンプンまたはパレイショデンプンなどのデンプン；セルロースおよび、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、酢酸セルロースなど、その誘導体；粉末化されたトラガント；麦芽；ゼラチン；獣脂；例えば、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウムなど、固体の流動促進剤；硫酸カルシウムなどである。

【0092】

（適合性の）薬学的に許容される担体または他の材料の正確な性質は、投与経路に依存しうる。したがって、（適合性の）薬学的に許容される担体の選び出しは、原則として、本発明に従い用いられる医薬組成物を投与する方式により決定することができる。本発明に従い用いられる医薬組成物は、例えば、全身投与することができる。投与経路には、例えば、静脈内経路、筋内経路、皮下経路、皮内経路、もしくは経皮経路などの非経口経路（例えば、注射を介する）、経口経路もしくは直腸内経路などの腸内経路、経鼻経路もしくは鼻腔内経路などの外用経路、または表皮経路もしくはパッチ送達などの他の経路が含まれる。また、滴下、硝子体内投与、および結膜下投与も（特に、眼関連疾患用に）想定される。例えば、耳関連疾患を処置する場合はいつでも、同様の投与を、鼓室内に施すことができる。

【0093】

用いられる医薬組成物の適量は、動物モデルを伴う日常的な実験により決定することができる。このようなモデルには、限定を含意することなく述べると、ウサギモデル、ヒツジモデル、マウスモデル、ラットモデル、イヌモデル、および非ヒト霊長動物モデルが含まれる。注射に好ましい単位用量形態には、滅菌水溶液、生理食塩水、またはそれらの混合物が含まれる。このような溶液のpHは、約7.4へと調整されるものとする。注射に適する担体には、ハイドロゲル、制御放出または遅延放出のためのデバイス、ポリ乳酸マトリックスおよびコラーゲンマトリックスが含まれる。外用適用に適する、薬学的に許容される担体には、ローション、クリーム、ゲルなどにおいて用いるのに適する、薬学的に許容される担体が含まれる。化合物を経口投与する場合は、錠剤、カプセルなどが、好ましい単位用量形態である。先行技術では、経口投与に用いる単位用量形態を調製するための、薬学的に許容される担体が周知である。それらの選び出しは、本発明の目的にはそれほど重要ではなく、当業者が困難を伴わずに行いうる、風味、費用、および保存可能性などの副次的検討事項に依存する。

【0094】

経口投与用の医薬組成物は、錠剤形態、カプセル形態、粉末形態、または液体形態でありうる。錠剤には、ゼラチンなど、上記で規定した固体担体が含まれる可能性があり、場合によって、アジュバントが含まれる可能性もある。液体の経口投与用の医薬組成物には一般に、水、石油、動物油または植物油、鉱油または合成油など、上記で規定した液体の

担体が含まれうる。生理食塩溶液、デキストロース、もしくは他の糖溶液、またはエチレングリコール、プロピレングリコール、もしくはポリエチレングリコールなどグリコールも含まれうる。

【0095】

静脈内注射、皮膚注射、もしくは皮下注射、または罹患部位における注射のために、有効成分は、発熱物質非含有であり、適切なpH、等張性、および安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形態にある。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸加リンゲル注射液などの等張性ビヒクルを用いて、適切な溶液を調製することが十分に可能である。防腐剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤、および/または他の添加剤も必要とされる場合含まれ得る。それがポリペプチドであれ、ペプチドであれ、核酸分子であれ、個体へと施される、本発明に従う、他の薬学的に有用な化合物であれ、投与は、「予防有効量」または「治療有効量」（場合に応じて）であることが好ましく、これは、個体への利益を示すのに十分である。投与される実際の量、ならびに投与速度および投与の時間経過は、処置されつつある状態の性質および重症度に依存する。

【0096】

本明細書で規定される疾患の処置は、上記で規定した医薬組成物の投与を包含することが典型的である。本発明のJNK阻害剤は、被験体におけるJNK活性を調節するであろう。「～を調節する」という用語は、例えば、さらなる輸送体配列を潜在的に含む、配列番号2～27の配列のうちのいずれかに従う阻害性（ポリ）ペプチド配列を含むかまたはこれからなる、少なくとも1つのJNK阻害剤を、細胞内の天然のc-jun結合部位、ATF2結合部位、およびNFAT4結合部位に対する競合的阻害剤として用いることによる、上記の疾患のうちのいずれかにおける、特に、c-jun、ATF2、またはNFAT4のリン酸化の抑制も包含する。「～を調節する」という用語はまた、それに限定することなく述べると、c-jun、ATF2、またはNFAT4、ならびに、例えば、c-jun、ATF2、およびc-fosから構成されるAP-1複合体など、それらの類縁のパートナーから構成される転写因子のヘテロマー複合体およびホモマー複合体の抑制も包含する。

【0097】

上記で開示した医薬組成物による被験体の処置は、（「治療有効」）量の、前記医薬組成物を、被験体に投与する（in vivoにおいて）ことにより達成しうるものが典型的であり、ここで、被験体は、例えば、ヒト被験体または動物であり得る。動物は、非ヒト哺乳動物、例えば、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、またはブタであることが好ましい。「治療的に有効な」という用語は、医薬組成物の活性成分が、本明細書で論じられる疾患および障害を改善するのに十分な量であることを意味する。

【0098】

疾患および障害

本発明は、上記で開示したJNK阻害剤またはそれを含む医薬組成物の、治療によりヒトまたは動物の身体、特に、ヒト身体を処置するための方法における特定の用途（または使用方法）に関する。上記で言及した通り、JNKシグナル伝達は、多種多様な疾患状態および障害に関与し、これらのうちの多くについて、前記シグナル伝達の障害が提起され、調べられて成功してもいる。本発明の発明者らは、本明細書で開示されるJNK阻害剤が、以下において開示されている疾患を処置するために有効なJNK阻害剤であることを見出した。

【0099】

本明細書で用いられる、治療によるヒトまたは動物の身体の処置とは、それぞれの被験体に対する任意の種類の治療的処置を指す。治療によるヒトまたは動物の身体の処置は、例えば、疾患または症状の発症の防止（予防）、すなわち、典型的には、患者において疾患が顕在化する前における防止（予防）を包含する。この用語はまた、所与の疾患の症状の処置「だけ」も包含する、すなわち、処置は、疾患および症状の根底をなす原因を必ず

しも治癒させることなく、疾患に関連する症状を軽減することにより、病因を改善する。当然ながら、この用語にはまた、疾患の根底をなす原因を治癒させることも包摂される。この用語はまた、それぞれの疾患の進行を遅延させるか、なおまたは停止させる処置も包摂する。

【0100】

一実施形態では、本発明に従うJNK阻害剤を、例えば、予見可能な障害の潜在的な発症の前に、例えば、予定される手術による介入または予定されるストレスの多い刺激への曝露の前に予防的に投与することもできる。手術による介入であれば、例えば、それぞれの創傷または近傍の組織の炎症の危険性を有しうるのであろう。放射線など、ストレスの多い刺激への曝露であれば、影響を受ける組織および細胞のアポトーシスをもたらしうるのであろう。このような状況では、本発明に従うJNK阻害剤は、例えば、最大で約4週間前に少なくとも1回投与することができる。JNK阻害剤は、例えば、少なくとも24時間、少なくとも48時間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、または4週間前に投与することができる。

10

【0101】

本明細書で開示されるJNK阻害剤により処置される疾患および障害は、急性の場合もあり、慢性の場合もある。

【0102】

本発明のJNK阻害剤は、一般に眼疾患、骨疾患、神経疾患、ニューロン疾患、神経変性疾患、皮膚疾患、免疫および/または自己免疫疾患、眼疾患、口腔疾患、炎症性疾患、代謝病、心血管疾患、増殖性疾患（特に、がんおよび腫瘍）、耳疾患、腸疾患、呼吸器系疾患（例えば、肺疾患）、感染性疾患、ならびに他の多様な疾患など、多様な臓器の疾患を処置するために使用され得る一方、本発明は、以下の疾患に特に言及する。

20

【0103】

本発明の分子で処置される疾患の中では、皮膚疾患、特に、炎症性皮膚疾患、より具体的には、湿疹、乾癬、皮膚炎、ざ瘡、口腔潰瘍、紅斑、扁平苔癬（Lichen plan）、サルコイドーシス、血管炎、および成年性線状IgA病からなる群から選択される皮膚疾患に言及すべきである。皮膚炎は、例えば、アトピー性皮膚炎または接触皮膚炎を包摂する。

【0104】

組織移植時または臓器移植時における（抗炎症）処置、特に、心臓、腎臓、および皮膚（組織）、肺、脾臓、肝臓、血液細胞（例えば、任意の種類の血液細胞、血小板、白血球、赤血球など）、骨髄、角膜、偶発的に切断された四肢（指、手、脚部、顔面、鼻など）、任意の種類の骨、心弁、血管、腸のセグメント、または腸自体の移植時における処置は、本発明の分子で処置可能である。このような処置は、例えば、臓器移植時/組織移植時において、移植片対宿主反応または宿主対移植片反応が生じる、いかなる場合にも適切であると考えられる。本発明の分子の使用はまた、移植手術を行ういかなる場合にも、特に、皮膚（または脾臓、肝臓、肺、心臓、腎臓）移植片対宿主反応または宿主対皮膚（または脾臓、肝臓、肺、心臓、腎臓）移植片反応が生じる場合にも使用することができる。

30

【0105】

神経変性疾患の中では、特に、慢性炎症と関連する神経変性疾患である、タウオパシーおよびアミロイドーシスおよびプリオン病は、本発明の分子で対処される。他のこのような神経変性疾患は、多様な形態の認知症、例えば、前頭側頭型認知症およびレビー小体型認知症、統合失調症および双極性障害、脊髄小脳性運動失調、脊髄小脳萎縮、多系統萎縮症、運動ニューロン病、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、または遺伝性痙攣性対麻痺を指す。適応の別の分野は、疼痛（例えば、疼痛の慢性形態または急性形態である、神経障害性疼痛、偶発性疼痛、突出痛、心因性疼痛、幻想痛）である。使用の別の分野は、膀胱疾患の処置、特に、膀胱機能の喪失（例えば、尿失禁、過活動膀胱、間質性膀胱炎、または膀胱がん）または口内炎を処置するための処置である。

40

【0106】

50

本発明の分子はまた、線維性疾患または線維症、特に、肺線維症、心臓線維症、肝臓線維症、骨髄線維症、縦隔線維症、後腹膜線維症、皮膚線維症、腸線維症、関節線維症、および肩線維症を処置するためにも使用することができる。

【0107】

口腔および顎/下顎の炎症性疾患は、本発明の分子で概ね処置可能であるが、歯肉炎、骨壊死（例えば、顎骨の）、インプラント周囲炎、歯髓炎、および歯周炎は、特に、治療を目的とするこれらの本発明の分子の使用に適する。

【0108】

加えて、ポリープは、本発明の分子を使用することにより、有効に処置可能である。

【0109】

また、腎臓の炎症性病態生理または非炎症性病態生理も、本発明の分子を使用することにより、有効に処置される。特に、疾患は、糸球体腎炎一般、特に、膜増殖性糸球体腎炎、メサングウム増殖性糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、腎症（nephrophathies）一般、特に、膜性腎症または糖尿病性腎症、腎炎一般、特に、ループス腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、尿細管間質性腎炎、慢性腎炎または急性腎炎、ならびに微小変化型疾患および巣状分節状糸球体硬化症からなる群から選択される。

【0110】

本発明の分子で有効に処置される疾患または障害の中では、大多数の疾患または障害は、炎症過程と関連しうるが、必ずしもこのような炎症過程と関連しない場合もある。以下の疾患または障害：アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis）、抗リン脂質症候群、アトピー性アレルギー、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性多内分泌症候群、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性蕁麻疹、バロー同心円性硬化症（Baló concentric sclerosis）、水疱性類天疱瘡、キャスルマン病、瘢痕性類天疱瘡、寒冷凝集素疾患、補体成分2欠損関連疾患、クッシング症候群、ドゴー病（Dagosa disease）、有痛脂肪症、好酸球性肺炎、後天性表皮水疱症、新生児の溶血性疾患、寒冷グロブリン血症、エバンス症候群、進行性骨化性線維異形成症（Fibrodysplasia ossificans progressive）、消化器性類天疱瘡、グッドパスチャー症候群、橋本脳炎、妊娠性類天疱瘡、ヒューズ-ストーヴィン症候群、低ガンマグロブリン血症、ランバート-イートン筋無力症候群、硬化性苔癬、限局性強皮症、急性痘瘡状苔癬状枇糠疹、重症筋無力症、ナルコレプシー、神経性筋緊張病、オブソクロヌスミオクロヌス症候群（Opsoclonus myoclonus syndrome）、傍腫瘍性小脳変性（Paraneoplastic cerebellar degeneration）、発作性夜間ヘモグロビン尿症、パリー-ロンベルク症候群、悪性貧血、POEMS症候群、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、レイノー現象、むずむず脚症候群、後腹膜線維症、2型自己免疫性多内分泌症候群、スティッフパーソン症候群（Stiff person syndrome）、スザック症候群、熱性好中球性皮膚病、シドナム舞蹈病、血小板減少症、および白斑は、この点で、本発明の分子を使用することにより処置可能な疾患または障害として具体的に開示される。

【0111】

本発明の分子を使用することにより、任意の種類の炎症性眼疾患を処置しうるが、以下の眼関連疾患：角膜手術後の炎症、非感染性角膜炎、脈絡網膜の炎症、および交感性眼炎を具体的に開示する。

【0112】

本発明の分子を使用することにより処置される、さらなるクラスの炎症関連疾患は、以下：急性播種性脳脊髄炎、抗シンセターゼ症候群（antisyntetase syndrome）、自己免疫性肝炎、自己免疫性末梢神経障害、腓炎、特に、自己免疫性腓炎、ピッカーstaff型脳炎、ブラウ症候群、セリアック病、シャーガス病、慢性炎症性

10

20

30

40

50

脱髄性多発性神経障害、骨髄炎、特に、慢性再発性多巣性骨髄炎、チャージ-ストラウス症候群、コガン症候群、巨細胞性動脈炎、CREST症候群、血管炎、特に、皮膚小血管性血管炎および蕁麻疹様血管炎、皮膚炎、特に、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、全身性強皮症、ドレスラー症候群、薬物誘導性ループス、円板状エリテマトーデス、腱付着部炎(enthesitis)、好酸球性筋膜炎、胃腸炎、特に、好酸球性胃腸炎、結節性紅斑、特発性肺線維症、胃炎、グレーブス病、ギラン-バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ-シェンライン紫斑病、汗腺膿瘍、特発性炎症性脱髄性疾患、筋炎、特に、封入体筋炎、膀胱炎、川崎病、扁平苔癬、ルポイド肝炎、マジード症候群、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織疾患、脊髄炎、特に、神経脊髄炎、例えば、視神経脊髄炎、甲状腺炎、特に、オールド甲状腺炎、リウマチ、特に、回帰性リウマチ、パーソネージ-ターナー症候群、静脈周囲性脳脊髄炎、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、肝硬変、特に、原発性胆汁性肝硬変、胆管炎、特に、原発性硬化性胆管炎、進行性炎症性神経障害、ラスムッセン脳炎、軟骨炎、特に、多発性軟骨炎、例えば、再発性多発性軟骨炎、反応性関節炎(ライター病)、リウマチ熱、サルコイドーシス、シュニッツラー症候群、血清病、脊椎炎、特に、強直性脊椎炎、脊椎関節症、高安動脈炎、トロサ-ハント症候群、横断性脊髄炎、ならびに肉芽腫症、特に、ウェゲナー肉芽腫症である。

10

【0113】

本発明の最も好ましい実施形態では、本発明の分子は、以下の疾患または障害：乾癬、ドライアイ疾患、眼の網膜を損傷する持続性炎症性疾患または急性炎症性疾患(網膜症)、特に、糖尿病網膜症または他の疾患により引き起こされる網膜症、加齢性黄斑変性(AMD)、特に、加齢性黄斑変性の湿潤形態または乾燥形態、未熟児網膜症(ROP)、口腔の持続性炎症性疾患または急性炎症性疾患、特に、インプラント周囲炎、歯髄炎、歯周炎、組織移植時または臓器移植時、特に、心臓移植時、腎臓移植時、または皮膚(組織)移植時における抗炎症性処置、心臓移植時、腎臓移植時、または皮膚(組織)移植時の移植片拒絶、炎症性脳疾患、特に、アルツハイマー病、代謝障害、糸球体腎炎、ならびに関節症/関節炎、特に、反応性関節炎、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、および乾癬性関節炎を処置するために使用することができる。

20

【0114】

進行性AMDの「乾燥」形態は、網膜下における網膜色素上皮層の萎縮であって、眼の中心部における光受容体(桿体および錐体)の喪失を介して、視力の低下を引き起こす萎縮から生じる。進行性AMDの血管新生性形態である「湿潤」形態は、脈絡毛細管板内の異常な血管成長(脈絡膜血管新生)であって、ブルッフ膜を通して、最終的に黄斑下における血液およびタンパク質の漏出をもたらす血管成長により、視力の低下を引き起こす。これらの血管に由来する出血、漏出、および瘢痕化は、処置されずに放置された場合、光受容体に対する不可逆的な損傷、および急速な視力の低下をいずれは引き起こす。本発明の分子は、AMDのいずれの形態を処置するのに適する。

30

【0115】

かつては水晶体後線維増殖症(RLF)として公知であった未熟児網膜症(ROP)は一般に、集中的な新生児ケアを受けた未熟児が罹患する眼の疾患である。ROPは、網膜血管の無秩序的な成長であって、瘢痕化および網膜剥離を結果としてもたらしうる成長により引き起こされると考えられている。ROPは、軽度の場合もあり、自発的に消散しうるが、重篤な症例では、失明をもたらす可能性もある。したがって、全ての早産児は、ROPの危険性があり、出生時体重が非常に軽いことは、さらなる危険因子である。酸素毒性および相対的な低酸素状態のいずれもが、ROPの発症に寄与しうる。本発明の分子は、ROPを処置するのに適する。

40

【0116】

さらに、本発明の分子は、網膜症の全ての形態、特に、真性糖尿病誘導性網膜症、動脈性高血圧症誘導性高血圧性網膜症、放射線誘導性網膜症(電離放射線への曝露による)、太陽光誘導性日光性網膜症(太陽光への曝露)、外傷誘導性網膜症(例えば、ブルチャーの網膜症)、および過粘稠度関連網膜症(hyperviscosity-related

50

d retinopathy) (パラタンパク血症を引き起こす障害において見られる)を処置するのに特に適する。

【0117】

本発明のJNK阻害剤はまた、代謝障害を処置するために、例えば、糖尿病(1型または2型、特に、1型)、ファブリー病、ゴーシェ病、低体温症、高体温症、低酸素症、脂質性組織球増殖症、リピドーシス、異染性大脳白質萎縮症、ムコ多糖症、ニーマン・ピック病、肥満、およびウォルマン病を処置するためにも使用することができる。より一般に、代謝障害は、遺伝性形態の場合もあり、炭水化物代謝の後天性障害、例えば、糖原病、アミノ酸代謝障害、例えば、フェニルケトン尿症、メーブルシロップ尿症、1型グルタル酸血症(glutaric acidemia type 1)、尿素回路障害(uUrea Cycle Disorder)もしくは尿素回路欠損症、例えば、カルバモイルリン酸シンターゼI欠損、有機酸代謝障害(有機酸尿症(organic acidurias))、例えば、アルカプトン尿症、脂肪酸酸化障害およびミトコンドリア代謝障害、例えば、中鎖アシル・コエンザイムAデヒドロゲナーゼ欠損症(MCADDと略記されることが多い)、ポルフィリン代謝障害、例えば、急性間欠性ポルフィリン症、プリン代謝障害もしくはピリミジン代謝障害、例えば、レッシュ・ナイハン症候群、ステロイド代謝障害、例えば、先天性リポイド副腎過形成(lipoid congenital adrenal hyperplasia)、もしくは先天性副腎過形成、ミトコンドリア機能障害、例えば、カーンズ・セイヤー症候群、ペルオキシソーム機能障害、例えば、ツェルウェーガー症候群、またはリソソーム蓄積症、例えば、ゴーシェ病もしくはニーマン・ピック病の場合もある。

10

20

【0118】

当業者は、上記で言及した疾患状態および障害が、上記で言及した疾患クラスの中の複数に属しうることを容易に認識するであろう。例えば、気管支癌腫は当然ながら、増殖性疾患であるだけでなく、また、肺疾患を含めた呼吸器系疾患の群にも属するであろう。したがって、上記で言及した個別の疾患の分類が、限定的なものであるとか、結論的なものであるとは考えられず、例示的な性質のものに過ぎないと考えられる。1つのクラスにおいて列挙された個別の疾患状態がまた実際には、本発明のJNK阻害剤を、疾患状態の別のクラスにおける処置として適用するのに適する例でもあることを除外するものではない。当業者は、異なる疾患状態および障害を、合致する分類へと割り当てることが容易に可能であろう。

30

【0119】

最後に、上記で言及した通り、本発明は、多様な疾患状態および障害を処置するための、本明細書で規定されるJNK阻害剤の使用を想定する。本発明は、本明細書で規定されるJNK阻害剤を、非ヒト動物を免疫化するために、例えば、モノクローナル抗体を作製するために用いることを想定するものではない。本明細書では、このような方法を、治療により動物の身体を処置するための方法とは考えない。

【0120】

本明細書で引用される全ての参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

40

【0121】

以下では、本発明の多様な実施形態および態様を例示する特定の例を提示する。しかし、本発明は、本明細書で記載される特定の実施形態により範囲を限定されないものとする。実際、当業者には、前出の記載、付属の図面、および下記の例から、本明細書で記載される改変に加えた本発明の多様な改変が容易に明らかとなろう。全てのこのような改変は、付属の特許請求の範囲内に収まる。

【0122】

実施例1：配列番号172によるJNK阻害剤の合成

例示的な例として、配列番号172を伴うJNK阻害剤の合成を下記に示す。当業者は、前記合成がまた、本発明に従う他の任意のJNK阻害剤の合成にも用いることができ、

50

容易に適合させうることを知るであろう。

【0123】

配列番号172を伴うJNK阻害剤は、Fmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)戦略を用いる固相ペプチド合成により作製した。ペプチドと樹脂との間のリンカーは、Rinkアミドリンカー(p-[Fmoc-2,3-ジメトキシベンジル]-フェノキシ酢酸)であった。ペプチドは、Fmoc脱保護とFmoc-アミノ酸カップリングとによる逐次的サイクルにより合成した。合成の終了時には、完成したペプチドを、トリフルオロ酢酸(TFA)により直接切断して、粗C末端アミドをもたらし、次いで、これを、分取逆相HPLCにより精製した。精製された画分は、均質なバッチ内にプールし、これをイオン交換クロマトグラフィーにより処理して、その酢酸塩を得た。次いで、ペプチドを凍結し乾燥させた。

10

【0124】

1.1 固相におけるペプチドの合成

言及される場合を除き、作製は、空気清浄環境内の室温(22 ± 7)で行った。合成のスケールは、精製ペプチド約1gの予測収量に対して、樹脂上の出発アミノ酸0.7 mmolであった。合成は、機械的攪拌および/または窒素バブリングを伴うガラス濾板を装備した30~50 mLの反応器内で手作業により実施した。

【0125】

1.2 樹脂の調製

p-メチルベンズヒドリルアミド樹脂(MBHA樹脂)をまず、窒素下でジクロロメタン/ジメチルホルムアミド/ジイソプロピルエチルアミン(diisopropylethylamine)により洗浄した。次いで、洗浄された樹脂を、PyBOB(ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)/ジイソプロピル-エチルアミン/1-ヒドロキシベンゾトリアゾール中で、Rinkアミドリンカー(p-[Fmoc-2,4-ジメトキシベンジル]-フェノキシ酢酸)へとカップリングして、Fmoc-Rinkアミド-MBHA樹脂をもたらしした。

20

【0126】

1.3 アミノ酸のカップリング

アミノ酸は、以下のサイクルを用いて樹脂へとカップリングした。

【0127】

Fmoc-Rinkアミド-MBHA樹脂を、35%(v/v)のピペリジン/ジメチルホルムアミド中で洗浄した後、ジメチルホルムアミド中で洗浄することにより脱保護した。脱保護反応は、約16分間を要した。ジメチルホルムアミド/ジクロロメタン(50/50)中のFmoc保護されたアミノ酸(例えば、2等量のアミノ酸およびHOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)を、樹脂へと添加した後、2等量のカップリング剤であるジイソプロピルカルボジイミド(DIC)を添加した。カップリング反応には、添加されるそれぞれのアミノ酸に応じて1時間~一晚を要した。容量は、ペプチド樹脂100 mg当たり0.5 mLのベースで計算し、各サイクル後に調整した。カップリングの後、樹脂を、DMFで3回にわたり洗浄した。カップリングの完全性は、一級アミンについてはニンヒドリン試験(またはカイザー試験1)により調べ、二級アミンについてはクロラニル(chloranil)試験2により調べた。場合によっては、クロラニル試験を、確実性対照として、ニンヒドリン試験と併合することもできる。万一、カップリング試験が不完全性反応を示した場合は、ジメチルホルムアミド/ジクロロメタンおよびジイソプロピルエチルアミン中により低度な過剰量(0.5~1等量)のアミノ酸、PYBOP、HOBtによりカップリングを繰り返した。樹脂の機能性を測定したところ、元の樹脂の負荷に応じて、概ね0.6~0.2 meq/gであった。最後のアミノ酸がカップリングされた後で、ペプチド樹脂を通例通りに脱保護し、次いで、DCMで5回にわたり洗浄してから、オープン内、真空下、30 で乾燥させた。ペプチド樹脂が乾燥した後で、固相合成の収率を、ペプチド樹脂の、初期の樹脂の負荷から計算された理論上の重量の増大と比較した重量増大の比として計算した。収率は、100%に近いとすることができる。

30

40

50

【 0 1 2 8 】

1 . 4 切断および脱保護

ペプチドを、また、T F A / K 試薬とも呼ばれる、トリフルオロ酢酸 / 1 , 2 - エタングジチオール (1 , 2 - e t h a n e d t h i o l) / チオアニソール / 水 / フェノール (v / v で 8 8 / 2 . 2 / 4 . 4 / 4 . 4 / 7) の混合物中、室温で4時間にわたり、樹脂から切断した。反応容量は、ペプチド樹脂 1 0 0 m g 当たり 1 m L であった。樹脂を試薬へと添加する間、混合物の温度を、3 0 を下回ったままであるように調節した。

【 0 1 2 9 】

1 . 5 ペプチドの樹脂からの抽出：

ペプチドは、ガラス濾板を介する濾過により樹脂から抽出した。R o t a v a p o r 上でその容量の 1 / 3 へと濃縮した後、低温の t - ブチルメチルエーテルによりペプチドを沈殿させ、濾過した。次いで、粗ペプチドを、真空下、3 0 で乾燥させた。

10

【 0 1 3 0 】

1 . 6 分取 H P L C による精製：

次いで、粗ペプチドを、逆相 H P L C により、9 5 % の純度まで精製した。精製画分を、R o t a v a p o r 上で濃縮し、凍結乾燥させた。

【 0 1 3 1 】

1 . 7 イオン交換クロマトグラフィー

濃縮して凍結乾燥させた配列番号 1 7 2 の配列を伴う精製ペプチドのプールを、水中に溶解させ、D o w e x アセテートによる 5 0 ~ 1 0 0 メッシュの樹脂上におけるイオン交換クロマトグラフィーで精製した。

20

【 0 1 3 2 】

合成に必要とされる出発試薬は、以下の通りであった。

【 0 1 3 3 】

【化 2】

	CAS登録番号	化学名	分子量
Fmoc-Rinkアミドリシンカー	145069-56-3	p-[Fmoc-2,4-ジメトキシベンジル]-フェノキシ酢酸	539.6
Fmoc-D-Ala-OH, H ₂ O	79990-15-1	N-アルファ-Fmoc-D-アラニン	311.3
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	154445-77-9	N-アルファ-Fmoc-N[2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル]-アルギニン	648.8
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	187618-60-6	N-アルファ-Fmoc-N[2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル]-D-アルギニン	648.8
Fmoc-Asn(Trt)-OH	132388-59-1	N-アルファ-Fmoc-N-γ-トリチル-アスパラギン	596.7
Fmoc-Gln(Trt)-OH	132327-80-1	N-アルファ-Fmoc-N-γ-トリチル-グルタミン	610.7
Fmoc-Leu-OH	35661-60-0	N-アルファ-Fmoc-ロイシン	353.4
Fmoc-Lys(Boc)-OH	71989-26-9	N-アルファ-Fmoc-N-Boc-リシン	468.5
Fmoc-D-Lys(Boc)-OH	143824-78-6	N-アルファ-Fmoc-N-Boc-D-リシン	468.5
Fmoc-D-Phe-OH	86123-10-6	N-アルファ-Fmoc-D-フェニルアラニン	387.4
Fmoc-Pro-OH	71989-31-6	N-アルファ-Fmoc-プロリン	337.4
Fmoc-Thr(tBu)-OH	71989-35-0	N-アルファ-Fmoc-O-t-ブチル-トレオニン	397.5

10

20

30

40

50

【0134】

本発明の他のJNK阻害剤も、同様の形で調製することができる。

【0135】

実施例2：本発明に従い選択されたJNK阻害剤の阻害有効性

以下では、本発明に従うJNK阻害剤の阻害有効性をどのようにして測定したのかについて記載する基準操作手順を示す。本方法は、*in vitro*の非放射性標準化アッセイにおいて、JNKによるc-Jun特異的基質のリン酸化を候補化合物が減殺する能力の測定を可能とする。さらに、選び出された化合物のJNKに対する阻害効果(IC₅₀)およびKiをいかにして決定するのも例示されるであろう。本方法は、候補化合物がJNK活性を阻害するのか否かを検証するのに適し、当業者は、当然ながら、下記の方法をその特定の目的および必要にいかにして適合させるのかを理解するであろう。

【0136】

2.1 材料

AlphaScreen 試薬およびプレート：

・最終濃度 5 nM の His - JNK 1 (参照番号 14 - 327、Upstate、100 μ l 中 10 μ g：濃度：2.2 μ M)

・最終濃度 5 nM の His - JNK 2 (参照番号 14 - 329、Upstate、100 μ l 中 10 μ g：濃度：2 μ M)

・最終濃度 5 nM の His - JNK 3 (参照番号 14 - 501、Upstate、100 μ l 中 10 μ g：濃度：1.88 μ M)

・最終濃度 10 nM の抗ホスホ - cJun (参照番号 06 - 828、Upstate、ロット番号 DAM1503356、濃度：44.5 μ M)

・最終濃度 30 nM のビオチン - cJun (29 ~ 67)：

配列：ビオチン - SNPKILKQSM T L N L A D P V G S L K P H L R A K N S D L L T S P D V G (配列番号 198)、ロット番号 100509 (分子量 4382.11、P 99.28%) (H₂O 中に溶解させる；濃度：10 mM)

・最終濃度 5 μ M の ATP (参照番号 AS001A、Invitrogen、ロット番号 50860B、濃度：100 mM)

・最終濃度 20 μ g / mL の SAD ビーズ (参照番号 6760617M、Perkin Elmer、ロット番号 540 - 460 - A、濃度：5 mg / mL)

・最終濃度 20 μ g / mL の AprotA ビーズ (参照番号 6760617M、Perkin Elmer、ロット番号 540 - 460 - A、濃度：5 mg / mL)

・384 ウェル白色プレートである Optiplate (参照番号 6007299、Perkin Elmer、ロット番号 654280 / 2008)

・ペプチド希釈用の 96 ウェルプレート (参照番号 82.1581、Sarstedt)

・TopSeals - A (参照番号 6005185、Perkin Elmer、ロット番号 65673)

・生物発光エネルギー移動の読取り

・生物発光エネルギー移動は、Fusion Alpha Plate リーダー (Perkin Elmer) 上で読み取った。

【0137】

ピペット：

・電子式 EDP3 ピペット 20 - 300 (参照番号 17007243；Rainin) を用いて、プレートを、酵素 (Enzyme) - 抗体ミックス、基質 - ATP ミックス、およびビーズで充填した

・PIPETMAN (登録商標) Ultra マルチチャネル 8 X 20 (参照番号 21040；Gibson) を用いて、プレートを、阻害性化合物で充填した。

【0138】

緩衝液および溶液

・キナーゼ緩衝液：pH 7.4 の 20 mM トリス塩基、10 mM の MgCl₂、1 mM の DTT、100 μ M の Na₃VO₄、0.01% の Tween、(1% の DMSO)

・停止緩衝液：pH 7.4 の 20 mM トリス塩基、200 mM の NaCl、80 mM の EDTA - K (NaOH の代わりに、KOH により pH 8)、0.3% の BSA

・JNK 希釈キナーゼ緩衝液：pH 7.4 の 50 mM トリス塩基、150 mM の NaCl、0.1 mM の EGTA、0.03% の Brij - 35、270 mM のスクロース、0.1% の β -メルカプトエタノール。

【0139】

2.2 方法

ペプチドの阻害効果を評価するため、標準的な AlphaScreen アッセイ (例えば、Guenat ら、J Biomol Screen、2006 年、11 巻：1015

10

20

30

40

50

～ 1026 頁を参照されたい)を実施した。異なる成分を調製し、その後、表示される通りに混合した。プレートは密封し、以下の通りにインキュベートした。

【0140】

5 μ l の JNK + 抗体

5 μ l の TP キナーゼ ± 阻害剤 30 分間にわたるブレインキュベーション

5 μ l の ビオチン - c Jun + ATP 24 で 60 分間にわたるインキュベーション

10 μ l の SAD ビーズ + Aprotin 暗所、24 で 60 分間にわたるインキュベーション。

【0141】

夾雑を回避するため、ミックスは、ピペットで、ウェルの異なるすみに添加した。プレートを各ミックスで充填した後、プレートをタッピングして(一方の面を固定して保ち、反対側の面でテーブルをタッピングして)、ミックスにウェルの壁面を流下させる。

10

【0142】

生物発光エネルギー移動は、Fusion Alpha Plateリーダー(Perkin Elmer)上で読み取った。

【0143】

全ての化合物は、JNKの各アイソフォームについて少なくとも3回の独立の実験により3連で調べるものとする。被験化合物の濃度は、場合によって、0、0.03 nM、0.1 nM、0.3 nM、1 nM、3 nM、10 nM、30 nM、100 nM、300 nM、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M、および100 μ Mであった。対照は、JNKを伴わないか、または基質(c-Jun)を伴わない試料であった。

20

【0144】

ミックスの調製

JNK 1、JNK 2、および JNK 3 5 nM

ビオチン - c Jun 30 nM

ATP 5 μ M; 抗ホスホ - c Jun (S63) 10 nM

Biotin SAD / Aprotin 20 μ g / mL。

【0145】

抗体 [最終] = 10 nM (抗ホスホ c Jun (S63))

検出部分: [ミックス] の 5 倍濃度 (25 μ l の最終容量中 5 μ l)

30

[原液] = 44.5 μ M (参照番号 06 - 828、Upstate、ロット番号 DAM 1503356)

10 nM キナーゼ緩衝液中 50 nM。

【0146】

JNK 1、JNK 2、および JNK 3 の [最終] = 5 nM

反応部分: [ミックス] の 3 倍濃度 (15 μ l の最終容量中 5 μ l)

[原液] = JNK 1 (参照番号 14 - 327、Upstate、ロット番号 D7KN022CU) について 2.2 μ M

JNK 2 (参照番号 14 - 329、Upstate、ロット番号 33221CU) について 2.0 μ M

40

JNK 3 (参照番号 14 - 501、Upstate、ロット番号 D7CN041CU) について 1.88 μ M

5 nM 抗体緩衝液中 15 nM。

【0147】

阻害剤:

反応部分: [ミックス] の 3 倍濃度 (15 μ l の最終容量中 5 μ l)

[原液] = 10 mM

100 μ M キナーゼ緩衝液中 300 μ M

30 μ M キナーゼ緩衝液中 90 μ M

10 μ M キナーゼ緩衝液中 30 μ M

50

．．．

0.03 nM キナーゼ緩衝液中 0.09 nM

および 0 nM キナーゼ緩衝液。

【0148】

2系列にわたる10倍の系列希釈を96ウェルプレート内で実施した。1系列目は300 μMで始めて0 nMまでとし、2系列目は90 μMで始めて0.03 nMまでとした。ペプチドは、384プレート内に8チャンネル型マルチピペット（参照番号F14401、Gillson、8X20）で添加する。

【0149】

ATPの[最終] = 5 μM

反応部分：[ミックス]の3倍濃度（15 μlの最終容量中5 μl）

[原液] = 100 mM（参照番号AS001A、Invitrogen、ロット番号50860B）

5 μM キナーゼ緩衝液中 15 μM。

【0150】

ビオチン-c-Jun[最終] = 30 nM

反応部分：[ミックス]の3倍濃度（15 μlの最終容量中5 μl）

[原液] = 10 mM

30 nM ATP緩衝液中 30 nM。

【0151】

SADビーズ/A ProtA[最終] = 20 μg/mL（感光性）

検出部分：[ミックス]の2.5倍濃度（25 μlの最終容量中10 μl）

[原液] = 5 mg/mL 20 μg/mL 停止緩衝液中 50 μg/mL

暗室（緑色光）内または暗所内のミックス。

【0152】

IC50曲線の解析：

解析は、S字型用量反応曲線（制限なし）についての以下の式：

$Y = \text{ボトム} + (\text{トップ} - \text{ボトム}) / (1 + 10^{-(\log EC_{50} - X)})$

を伴うGraphPad Prism4ソフトウェアにより実施した。

【0153】

外れ値データは、グラブス検定を用いて除外した。

【0154】

IC50の比較：

解析は、以下の検定を伴うGraphPad Prism4ソフトウェアにより実施した。一元ANOVA検定に続くテューキーの多重比較検定。P < 0.05を有意であると考えた。

【0155】

JNKに対するATPのKmおよびビオチン-c-Jun特異的ペプチドのKmは、AlphaScreen標準化アッセイにより決定した。

【0156】

KiとIC50 ($Ki = IC_{50} / (1 + ([\text{基質}] / \text{基質の} Km))$) との間の数学的関係を用いて、Ki値を計算することができる。

【0157】

実施例3：内部化実験および解析

3.1 取込み実験のための材料および方法

a) 細胞系：

この実験のために用いた細胞系は、HL-60（参照番号CCL-240、ATCC、ロット番号116523）であった。

【0158】

b) 培養培地およびプレート

2008年5月5日に、以下：

10%のFBS（参照番号A64906-0098、PAA、ロット番号A15-151）：2008年4月4日に、56で30分間にわたり非働化した

1mMのピルビン酸ナトリウム（参照番号S8636、Sigma、ロット番号56K2386）

ペニシリン（100単位/mL）/ストレプトマイシン（100μg/mL）（参照番号P4333、Sigma、ロット番号106K2321）

を補充した、RPMI（参照番号21875-091、Invitrogen、ロット番号8296）またはDMEM（参照番号41965、Invitrogen、ロット番号13481）。

10

【0159】

10倍濃度のPBS（参照番号70011、Invitrogen、ロット番号8277）：滅菌H₂Oで1倍濃度まで希釈した。

【0160】

トリプシン-0.05% EDTA（参照番号L-11660、PAA、ロット番号L66007-1194）。

【0161】

6ウェル培養プレート（参照番号140675、Nunc、ロット番号102613）

24ウェル培養プレート（参照番号142475、Nunc、ロット番号095849

20

）
96ウェル培養プレート（参照番号167008、Nunc、ロット番号083310）。

【0162】

タンパク質投与用の96ウェルプレート（参照番号82.1581、Sarstedt）。

【0163】

蛍光測定用96ウェルプレート（参照番号6005279、Perkin Elmer）。

【0164】

c) 溶液

30

ポリD-リシンコーティング溶液（Sigma：P9011；ロット番号095K5104）：1倍濃度のPBS中で25μg/mLの最終濃度に希釈した。

【0165】

酸性洗浄緩衝液：0.2Mのグリシン、0.15MのNaCl、pH3.0。

【0166】

Ripa溶解緩衝液：pH7.2の10mM NaH₂PO₄、150mMのNaCl、1%のTriton X-100、pH8.0の1mM EDTA、200μMのNa₃VO₂、0.1%のSDS、1倍濃度のプロテアーゼ阻害剤カクテル（参照番号11873580001、Roche、ロット番号13732700）。

【0167】

d) 顕微鏡法および蛍光プレートリーダー

40

倒立顕微鏡（Axiovert 40 CFL；Zeiss；20倍）を用いて、細胞を観察およびカウントした

蛍光は、Fusion Alpha Plateリーダー（Perkin Elmer）で読み取った。

【0168】

e) 方法

懸濁細胞について、FITCでマークしたペプチドの内部化を研究した。細胞を、ポリDL-リシンでコーティングしたディッシュへと、1mL当たりの細胞1×10⁶個の濃度で播種した。次いで、プレートを、37、5%のCO₂、および100%の相対湿度

50

で24時間にわたりインキュベートしてから、公知の濃度のペプチドを添加した。ペプチドを添加した後で、細胞を、37、5%のCO₂、および100%の相対湿度で30分間、1、6、または24時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞表面吸着ペプチド(Kameyamaら、(2007年)、Biopolymers、88巻、98~107頁を参照されたい)を除去するために、細胞を、酸性緩衝液(0.2Mのグリシン、0.15MのNaCl、pH3.0)で2回にわたり洗浄した。塩基性アミノ酸に富むペプチドは、細胞表面に強く吸着し、これは、内部化したペプチドの過大評価を結果としてもたすることが多いので、酸性緩衝液を用いた。したがって、酸性緩衝液を用いる細胞洗浄を使用して、細胞表面吸着ペプチドを除去した。Fab/細胞透過ペプチド結合体の細胞内への取込みを決定するときには、酸による洗浄を実行した後で、2回にわたりPBSによる洗浄を行った。細胞は、RIPA溶解緩衝液を添加することにより破壊した。次いで、内部化したペプチドの相対量は、バックグラウンドを減算し、タンパク質含量を正規化した後の蛍光により決定した。

10

【0169】

ステップは、この通りである：

1. 細胞の培養
2. 酸性洗浄および細胞抽出物
3. 蛍光プレートリーダーによるペプチド内部化の解析。

【0170】

f) 細胞の培養およびペプチドの処理

20

6ウェルの培養プレートを、3mLのポリD-Lys(Sigma; P9011; PBS中に25μg/mL)でコーティングし、24ウェルプレートを600μLのポリD-Lysでコーティングし、96ウェルプレートを125μLのポリD-Lysでコーティングし、37、5%のCO₂、および100%の相対湿度で4時間にわたりインキュベートする。

【0171】

4時間後、6ウェルプレート、24ウェルプレート、または96ウェルプレートのそれぞれについて、3.5mLのPBS、700μLまたは150μLのPBSで2回にわたり、ディッシュを洗浄した。

【0172】

30

細胞を、ディッシュ内の2.4mLの培地(RPMI)中に、懸濁細胞の場合、1mL当たりの細胞1,000,000個の播種密度で播種した。接種後、プレートを、37、5%のCO₂、および100%の相対湿度で24時間にわたりインキュベートしてから、ペプチドを添加した。接着細胞は、処理日に90~95%の密度であるものとし、DMEM中に播種した。

【0173】

【化3】

ウェル	培養物の表面積(cm ²)	培地	付着細胞数	懸濁細胞数
96ウェル	0.3	100 - 200 μl	8'000 - 30'000	100'000
24ウェル	2	500 - 1000 μl	100'000 - 200'000	500'000-1'000'000
35mm(P35)/6ウェル	10	2,4 ml	250'000 - 2'100'000	2'400'000
60mm (P60)	20	3,5 ml	15 * 10 ⁵	1'000'000/ml
10cm (P100)	60	10 ml	15-60 * 10 ⁵	

40

【0174】

細胞を、所望の濃度のFITCで標識されたペプチド(H₂O中10mMの濃度の原液

50

）で処理した。

【0175】

ペプチドの添加後、細胞を、37℃、5%のCO₂、および100%の相対湿度で、0～24時間（例えば、30分間、1、6、または24時間）にわたりインキュベートした。

【0176】

酸性洗浄および細胞抽出物：

抽出物は、氷上で冷却した。

【0177】

懸濁細胞（またはディッシュへと十分に付着する細胞）：

10

細胞を《15 mLのFalcon》内に移す。最大量の細胞を回収するために、ディッシュを1 mLのPBSで洗浄する

最大2400 rpmで2分間にわたり細胞を採取する

細胞を1 mLの低温のPBS中に懸濁させる

細胞をコーティングされた「エッペンドルフ管」（1 mLのポリD-Lysで4時間にわたりコーティングされ、1 mLのPBSで2回にわたり洗浄された）へと移す

1 mLの低温の酸性洗浄緩衝液で3回にわたり洗浄し、最大2400 rpmで2分間にわたり遠心分離する。「エッペンドルフ」内の細胞の広がりには注意する

1 mLの低温のPBSで2回にわたり洗浄して中和する

50 μlの溶解RIPA緩衝液を添加する

20

氷上でのかき混ぜを伴って30分間～1時間にわたりインキュベートする。

【0178】

接着細胞：

低温の酸性洗浄緩衝液3 mL、1 mL、または200 μl（6ウェルプレート、24ウェルプレート、または96ウェルプレートのそれぞれについて）で3回にわたり洗浄する。ディッシュから剥離する細胞に注意する

1 mLの低温のPBSで2回にわたり洗浄して（6ウェルプレート、24ウェルプレート、または96ウェルプレートのそれぞれについて）、中和する

50 μlの溶解RIPA緩衝液を添加する

氷上でのかき混ぜを伴って30分間～1時間にわたりインキュベートする

30

細胞を低温のスクレーパーでかきとる。24ウェルプレートおよび96ウェルプレートを、4℃、4000 rpmで15分間にわたり直接遠心分離して、細胞破砕物を除去した。次いで、上清（24ウェルプレートまたは96ウェルプレートのそれぞれについて100または50 mL）を、暗色の96ウェルプレートに直接移した。プレートを蛍光プレートリーダー（Fusion Alpha、Perkin Elmer）により読み取った溶解物をコーティングされた「エッペンドルフ」（1 mLのポリD-Lysで4時間にわたりコーティングされ、1 mLのPBSで2回にわたり洗浄された）に移す

次いで、溶解した細胞を、4℃、10000 gで30分間にわたり遠心分離して、細胞破砕物を除去した

上清を除去し、コーティングされた「エッペンドルフ管」（1 mLのポリD-Lysで4時間にわたりコーティングされ、1 mLのPBSで2回にわたり洗浄された）内、-80℃で保存する。

40

【0179】

蛍光プレートリーダーによるペプチド内部化の解析：

製造元の指示書に従い、各タンパク質抽出物の含量を、基準物質BCAアッセイ（キット型番23225、Pierce）により決定した。

【0180】

各試料10 μlずつを蛍光プレートリーダー（Fusion Alpha、Perkin Elmer）で読み取り、バックグラウンドを減算し、タンパク質濃度により正規化した後に、各試料の相対蛍光を決定する。

50

【 0 1 8 1 】

3 . 2 取込み実験

F I T C で 標 識 し た T A T に 由 来 す る 輸 送 体 構 築 物 の 、 H L - 6 0 細 胞 系 の 細 胞 へ の 、 時 間 依 存 的 な 内 部 化 (取 込 み) を 、 上 記 の 通 り に 、 配 列 番 号 5 2 ~ 9 6 、 4 3 、 お よ び 4 5 ~ 4 7 の 輸 送 体 ペ プ チ ド 配 列 を 用 い て 実 行 し た 。 こ れ ら の 配 列 を 、 下 記 の 表 4 に 列 挙 す る 。

【 0 1 8 2 】

【表 4 - 1】

表4: 取込み実験で調べた輸送体配列												
配列 番号	ペプチド番号 :図6での略称											
46	r3-L-TAT	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
52	1	H2N	dR	A	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
53	2	H2N	dR	K	A	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
54	3	H2N	dR	K	K	A	dR	Q	R	R	dR	CONH2
55	4	H2N	dR	K	K	R	dR	A	R	R	dR	CONH2
56	5	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	A	R	dR	CONH2
57	6	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	A	dR	CONH2
58	7	H2N	dR	D	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
59	8	H2N	dR	K	D	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
60	9	H2N	dR	K	K	D	dR	Q	R	R	dR	CONH2
61	10	H2N	dR	K	K	R	dR	D	R	R	dR	CONH2
62	11	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	D	R	dR	CONH2
63	12	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	D	dR	CONH2
64	13	H2N	dR	E	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
65	14	H2N	dR	K	E	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
66	15	H2N	dR	K	K	E	dR	Q	R	R	dR	CONH2
67	16	H2N	dR	K	K	R	dR	E	R	R	dR	CONH2
68	17	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	E	R	dR	CONH2
69	18	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	E	dR	CONH2
70	19	H2N	dR	F	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
71	20	H2N	dR	K	F	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
72	21	H2N	dR	K	K	F	dR	Q	R	R	dR	CONH2
73	22	H2N	dR	K	K	R	dR	F	R	R	dR	CONH2
74	23	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	F	R	dR	CONH2
75	24	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	F	dR	CONH2
76	25	H2N	dR	R	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
77	26	H2N	dR	K	R	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
78	27	H2N	dR	K	K	K	dR	Q	R	R	dR	CONH2
79	28	H2N	dR	K	K	R	dR	R	R	R	dR	CONH2
80	29	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	K	R	dR	CONH2
81	30	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	K	dR	CONH2
82	31	H2N	dR	H	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
83	32	H2N	dR	K	H	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
84	33	H2N	dR	K	K	H	dR	Q	R	R	dR	CONH2
85	34	H2N	dR	K	K	R	dR	H	R	R	dR	CONH2
86	35	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	H	R	dR	CONH2
87	36	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	H	dR	CONH2
88	37	H2N	dR	I	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
89	38	H2N	dR	K	I	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
90	39	H2N	dR	K	K	I	dR	Q	R	R	dR	CONH2
91	40	H2N	dR	K	K	R	dR	I	R	R	dR	CONH2
92	41	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	I	R	dR	CONH2
93	42	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	I	dR	CONH2
94	43	H2N	dR	L	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
45	44 (D-TAT)	H2N	dR	dR	dR	dQ	dR	dR	dK	dK	dR	CONH2
47	45 (r3-L-TATi)	H2N	dR	R	R	Q	dR	R	K	K	dR	CONH2
46	46 (r3-L-TAT)	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
43	47 (L-TAT)	H2N	R	K	K	R	R	Q	R	R	R	CONH2

【表 4 - 2】

99	48	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	L	dR	CONH2
100	49	H2N	dR	M	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
101	50	H2N	dR	K	M	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
102	51	H2N	dR	K	K	M	dR	Q	R	R	dR	CONH2
103	52	H2N	dR	K	K	R	dR	M	R	R	dR	CONH2
104	53	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	M	R	dR	CONH2
105	54	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	M	dR	CONH2
106	55	H2N	dR	N	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
107	56	H2N	dR	K	N	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
108	57	H2N	dR	K	K	N	dR	Q	R	R	dR	CONH2
109	58	H2N	dR	K	K	R	dR	N	R	R	dR	CONH2
110	59	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	N	R	dR	CONH2
111	60	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	N	dR	CONH2
112	61	H2N	dR	Q	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
113	62	H2N	dR	K	Q	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
114	63	H2N	dR	K	K	Q	dR	Q	R	R	dR	CONH2
115	64	H2N	dR	K	K	R	dR	K	R	R	dR	CONH2
116	65	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	Q	R	dR	CONH2
117	66	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	Q	dR	CONH2
118	67	H2N	dR	S	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
119	68	H2N	dR	K	S	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
120	69	H2N	dR	K	K	S	dR	Q	R	R	dR	CONH2
121	70	H2N	dR	K	K	R	dR	S	R	R	dR	CONH2
122	71	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	S	R	dR	CONH2
123	72	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	S	dR	CONH2
124	73	H2N	dR	T	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
125	74	H2N	dR	K	T	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
126	75	H2N	dR	K	K	T	dR	Q	R	R	dR	CONH2
127	76	H2N	dR	K	K	R	dR	T	R	R	dR	CONH2
128	77	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	T	R	dR	CONH2
129	78	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	T	dR	CONH2
130	79	H2N	dR	V	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
131	80	H2N	dR	K	V	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
132	81	H2N	dR	K	K	V	dR	Q	R	R	dR	CONH2
133	82	H2N	dR	K	K	R	dR	V	R	R	dR	CONH2
134	83	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	V	R	dR	CONH2
135	84	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	V	dR	CONH2
136	85	H2N	dR	W	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
137	86	H2N	dR	K	W	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
138	87	H2N	dR	K	K	W	dR	Q	R	R	dR	CONH2
139	88	H2N	dR	K	K	R	dR	W	R	R	dR	CONH2
140	89	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	W	R	dR	CONH2
141	90	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	W	dR	CONH2
142	91	H2N	dR	Y	K	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
143	92	H2N	dR	K	Y	R	dR	Q	R	R	dR	CONH2
144	93	H2N	dR	K	K	Y	dR	Q	R	R	dR	CONH2
145	94	H2N	dR	K	K	R	dR	Y	R	R	dR	CONH2
146	95	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	Y	R	dR	CONH2
147	96	H2N	dR	K	K	R	dR	Q	R	Y	dR	CONH2

10

20

30

40

【 0 1 8 4 】

上記の表において、Dアミノ酸は、それぞれのアミノ酸残基（例えば、dR = D - A r g）の前の小文字の「d」により示される。

【 0 1 8 5 】

50

少数の配列では、技術的な理由に起因して、第1の手法による合成に失敗した。これらの配列を、図6では1、2、3、4、5、6、7、8、43、52、53、54、55、56、57、85、86、87、88、89、および90と略記する。残り全ての配列は、内部化実験で用いた。

【0186】

結果を図6に示す。

【0187】

図6に見られる通り、24時間にわたるインキュベーションの後、コンセンサス配列 r X X X r X X X r (配列番号31)を伴う全ての輸送体は、L-TAT輸送体(配列番号43)より高い内部化能を示した。HeLa細胞を、96ウェルプレート内で24時間にわたり、10mMのr3-L-TATに由来する輸送体と共にインキュベートした。次いで、細胞を、酸性緩衝液(0.2Mのグリシン、0.15MのNaCl、pH3.0)で2回にわたり洗浄し、PBSで2回にわたり洗浄した。細胞を、RIPA溶解緩衝液を添加することにより破壊した。次いで、各抽出物の蛍光強度(Fusion Alpha plateリーダー; PerkinElmer)を読み取った後でバックグラウンドを減算することにより、内部化したペプチドの相対量を決定した。

【0188】

図6に見られる通り、1つの位置:2位におけるY(配列番号142に対応するペプチド番号91)が、最高の輸送体活性および輸送活性の動態の改善にきわめて重要であると考えられる。

【0189】

この実験の結果からの結論は、以下の通りである。

【0190】

・24時間にわたるインキュベーションの後、コンセンサス配列 r X X X r X X X r (配列番号31)を伴う全ての輸送体(可能な配列の選択については、表2を参照されたい)は、L-TAT輸送体(配列番号43)より高い内部化能を示した(図6)。これらの結果により、コンセンサス配列 r X X X r X X X r (配列番号31)の妥当性が十分に確認される。

【0191】

・1つの位置:2位におけるY(配列番号142に対応する配列91)が、最高の輸送体活性にきわめて重要である(図6)。

【0192】

したがって、表4において示される通り、特に、配列が9アミノ酸を呈示し、コンセンサス配列 r X X X r X X X r (配列番号31)を有する場合は、2位におけるYを呈示するこのようなTAT由来配列が好ましい。

【0193】

実施例4:サイトカイン放出およびケモカイン放出の測定

以下では、リガンドによりヒト細胞(血液、WBC、PBM C、精製初代リンパ球、細胞系、...)からの分泌を誘導した後における、いくつかのヒトサイトカインの放出量を、いかにして測定したのかについて説明する手順を示す。

【0194】

用いた技法は、抗体の2つの層(すなわち、捕捉抗体および検出抗体)の間の抗原量の測定を可能とする、サンドウィッチELISAである。少なくとも2つの抗体がサンドウィッチ内で作用するので、測定される抗原は、抗体への結合が可能な少なくとも2つの抗原部位を含有しなければならない。サンドウィッチELISA系では、捕捉抗体および検出抗体として、モノクローナル抗体を用いることもでき、ポリクローナル抗体を用いることもできる。モノクローナル抗体は、抗原のわずかな差異の微細な検出および定量化を可能とする、単一のエピトープを認識する。捕捉抗体としては、ポリクローナルを用いて、可能な限り多量の抗原をプルダウンすることが多い。サンドウィッチELISAの利点は、解析の前に試料を精製しなくともよく、アッセイがきわめて高感度(直接的ELISA

10

20

30

40

50

または間接的 E L I S A の、最大で 2 ～ 5 倍高感度) でありうることである。

【 0 1 9 5 】

本方法を用いて、*in vitro* / 細胞の培養物における、本発明の J N K 阻害剤の効果を決定することができる。非毒性用量では、化合物の有効性が、非処理試料と比較したサイトカインレベルの低下 (光学濃度 (4 5 0 n m における吸光度) の変化) により示され、E L I S A によりモニタリングされる。結果は、n g / m L 単位で表す。

【 0 1 9 6 】

4 . 1 材料

・ 9 6 ウェルプレート :

上清収集用の 9 6 ウェルプレート (参照番号 8 2 . 1 5 8 1 、 S a r s t e d t)

10

E L I S A 用の 9 6 ウェルプレート (F 9 6 M a x i S o r p 、参照番号 4 4 2 4 0 4 、 N u n c)

・ T o p S e a l - A : 9 6 ウェルマイクロプレートシール (参照番号 6 0 0 5 8 5 、 P e r k i n E l m e r) 。

・ E L I S A 試薬

E L I S A 用コーティング緩衝液 : 1 リットルの H ₂ O 中に p H 9 . 5 の 0 . 1 M 炭酸 N a (= 7 . 1 3 g の N a H C O ₃ (参照番号 7 1 6 2 7 、 F l u k a) + 1 . 5 9 g の N a ₂ C O ₃ (参照番号 7 1 3 4 5 、 F l u k a) とし、濃縮 N a O H により p H を 9 . 5 とした)

E L I S A 用洗浄緩衝液 : 1 倍濃度の P B S + 0 . 0 1 % の T w e e n 2 0 (1 倍濃度の P B S 1 リットルを調製し (1 0 倍濃度の P B S : 参照番号 7 0 0 1 1 、 G I B C O) 、磁気かき混ぜ機によりゆっくりと混合しながら、1 0 0 u l の T w e e n 2 0 (参照番号 P 1 3 7 9 、 S i g m a) を添加する) 。

20

【 0 1 9 7 】

アッセイ用希釈剤 : 1 倍濃度の P B S + 1 0 % の F B S (参照番号 A 1 5 - 1 5 1 、 P A A ; 5 6 で 3 0 分間にわたり非働化した) 。

【 0 1 9 8 】

D A K O T M B (参照番号 S 1 5 9 9 、 D A K O) : 市販の基質溶液

停止溶液 : 1 M の H ₃ P O ₄ (2 0 0 m L の場合 = 1 7 7 m L の H ₂ O + 2 3 m L の 8 5 % H ₃ P O ₄ (参照番号 3 4 5 2 4 5 、 A l d r i c h) 。

30

・ E L I S A キット (2 0 のプレートのための試薬)

I F N - : ヒト I F N - E L I S A セット、B D O p t E I A (商標) (参照番号 5 5 5 1 4 2 、 B D) 。

【 0 1 9 9 】

I L - 1 : ヒト I L - 1 E L I S A セット I I 、 B D O p t E I A (商標) (参照番号 5 5 7 9 5 3 、 B D)

I L - 1 0 : ヒト I L - 1 0 E L I S A セット I I 、 B D O p t E I A (商標) (参照番号 5 5 5 1 5 7 、 B D) 。

【 0 2 0 0 】

I L - 1 2 : ヒト I L - 1 2 (p 7 0) E L I S A セット、B D O p t E I A (商標) (参照番号 5 5 5 1 8 3 、 B D) 。

40

【 0 2 0 1 】

I L - 1 5 : ヒト I L - 1 5 E L I S A セット、B D O p t E I A (商標) (参照番号 5 5 9 2 6 8 、 B D) 。

【 0 2 0 2 】

I L - 2 : ヒト I L - 2 E L I S A セット、B D O p t E I A (商標) (参照番号 5 5 5 1 9 0 、 B D) 。

【 0 2 0 3 】

I L - 4 : ヒト I L - 4 E L I S A セット、B D O p t E I A (商標) (参照番号 5 5 5 1 9 4 、 B D) 。

50

【0204】

IL-5: ヒト IL-5 ELISA セット、BD OptEIA (商標) (参照番号 555202、BD)。

【0205】

IL-6: ヒト IL-6 ELISA セット I、BD OptEIA (商標) (参照番号 555220、BD)。

【0206】

IL-8: ヒト IL-8 ELISA セット、BD OptEIA (商標) (参照番号 555244、BD)。

【0207】

MCP-1: ヒト MCP-1 ELISA セット、BD OptEIA (商標) (参照番号 555179、BD)

TNF- α : ヒト TNF- α ELISA セット、BD OptEIA (商標) (参照番号 555212、BD)。

・吸光度の読取り: 吸光度は、Fusion Alpha Plateリーダー (Perkin Elmer) 上で読み取った。

・リピーティングピペット、デジタル式ピペット、またはマルチチャネルピペット。

【0208】

4.2 方法

試料の調製

試料は、培養ヒト細胞 (典型的には、全血、WBC、PBMC、精製 WBC 亜型、がん性細胞系) に由来する培養培地上清である。遠心分離 (400g で 5 分間にわたる) により任意の粒子状物質を除去し、速やかにアッセイするか、または試料を -20℃ で保存する。凍結-融解サイクルの反復を回避する。用いる 1 時間前に、試料を氷上で解凍し、遠心分離する。ステップ 11 では、アッセイ用希釈剤中で試料を、プレートへと直接希釈する (まずアッセイ用希釈剤を添加し、次いで、試料を添加し上下にピペティングする)。

【0209】

基準物質の調製

凍結乾燥させた基準物質を室温まで温めた後、材料の逸失を回避するために、バイアルを注意深く閉栓する。凍結乾燥させた基準物質を、提起された容量の脱イオン水で再構成して、基準物質原液を得る。希釈液を作製する前に、少なくとも 15 分間にわたり、基準物質を平衡化させる。静かにボルテックスして、混合する。再構成の後、基準物質原液を、ポリプロピレン製バイアルに、バイアル 1 本当たり 50 μ l ずつ速やかにアリコート分割し、最長 6 カ月間にわたり、-20℃ で凍結させる。必要な場合は、アリコート分割/凍結前の最長 8 時間にわたり、2~8℃ で保存する。再構成した基準物質を室温で放置しない。

【0210】

使用の直前に、試薬希釈剤中 2 倍の系列希釈を用いて 10 点の検量線を作成する。4000 pg/mL の高濃度の基準物質が推奨される。

【0211】

検出抗体ミックスの調製

ビオチン/SAV 試薬の 1 ステップインキュベーション。必要とされる容量の検出抗体を、アッセイ用希釈剤へと添加する。使用前の 15 分以内に、必要とされる量の酵素試薬を添加し、十分にボルテックスまたは混合する。推奨される希釈液については、ロットごとに指定された指示書/解析証明書を参照されたい。任意の残存する作業用検出抗体は、使用後に廃棄する。

【0212】

捕捉抗体によるコーティング

1. PVC 製マイクロタイタープレートのウェルを、コーティング緩衝液中で希釈した

10

20

30

40

50

ウェル1つ当たり100 μ lの捕捉抗体でコーティングする。推奨される抗体コーティング用希釈液については、ロットごとに指定された指示書/解析証明書を参照されたい。

【0213】

2. プレートを、プラスチック製粘着テープで覆い、4 で一晩にわたりインキュベートする。

【0214】

3. コーティング溶液を除去し、ウェルを150 μ lの洗浄緩衝液で満たすことにより、プレートを洗浄する。

【0215】

4. シンクの上でプレートを軽くふることにより、溶液または洗浄液を除去する。

10

【0216】

5. 合計3回の洗浄について、これらの過程を2回ずつ繰り返す。

【0217】

6. 最後の洗浄後、プレートをペーパータオル上で軽くたたくことにより、任意の残存する洗浄緩衝液を除去する。

ブロッキング

7. ウェル1つ当たり100 μ lの試薬希釈剤を添加することにより、コーティングしたウェル内の残りのタンパク質結合部位をブロッキングする。

【0218】

8. プレートを、プラスチック製粘着テープで覆い、室温で1時間にわたりインキュベートする。

20

【0219】

9. インキュベーションの間に、基準物質の調製を開始する。

【0220】

試料の添加

10. ステップ3における場合と同様に、150 μ lの洗浄緩衝液により、洗浄を1回行う。これで、プレートには、試料を添加する準備ができています。

【0221】

11. アッセイ用希釈剤中で適切に希釈した50 μ lの試料を各ウェルへと添加する。正確な定量結果のためには、未知の試料のシグナルを、検量線のシグナルに照らして常に比較する。精度を確保するためには、基準物質(3連)およびブランクを、各サイトカインについて試行しなければならない。

30

【0222】

12. プレートを、プラスチック製粘着テープで覆い、室温で2時間にわたりインキュベートする。

【0223】

検出抗体および二次抗体を伴うインキュベーション

13. ステップ3と同様に、プレートを、150 μ lの洗浄緩衝液で、4回にわたり洗浄する。

【0224】

14. 50 μ lの検出抗体ミックス(アッセイ用希釈剤中の検出抗体+ストレプトアビジン-HRP二次抗体)を、各ウェルへと、推奨される希釈率(ロットごとに指定された指示書/解析証明書を参照されたい)で添加する。

40

【0225】

15. プレートを、プラスチック製粘着テープで覆い、光保護下の室温で1時間にわたりインキュベートする。

【0226】

16. ステップ3における場合と同様に、プレートを、150 μ lの洗浄緩衝液で、6回にわたり洗浄する。

【0227】

50

17. 50 μ l の DAKO TMB 溶液を、各ウェルへと添加して、暗所、室温で密封せずに、15 ~ 20 分間にわたりインキュベートする。

【0228】

18. 50 μ l の停止溶液を、各ウェルへと添加する。プレートを静かにタッピングして、完全な混合を確保する。

【0229】

19. プレートを、プレートミキサー上、500 rpm で5分間にわたり混合する。

【0230】

20. 450 nm における光学濃度を読み取る (プログラム: Fusion Alpha Plateリーダー上の Cytokine __ELISA)。

10

【0231】

データ解析

各基準物質対照および各試料についての3連の読取りの平均。ゼロ基準の平均光学濃度 (O.D) を減じる。サイトカイン濃度の対数値を、O.D の対数値と対比してプロットする検量線を作成し、最良の近似直線を回帰分析により決定することができる。試料を希釈した場合は、検量線から読み取られる濃度に、希釈係数を乗じなければならない。検量線は、アッセイされる各試料セットについて創出するものとする。外れ値データは、グラフ検定を用いて除外した。次いで、SD の2倍の区間に入らないデータを棄却した。陽性対照が、既に観察されたデータを示す場合は、独立の実験を考慮する。独立の実験をブールする (N > 3)。

20

【0232】

データは、pg / mL 単位のサイトカイン放出または阻害剤による処理を伴わずに誘導される状態と比較した % を提示する。

【0233】

実施例 5 : THP 1 の分化 : サイトカインを放出させるための刺激

以下では、本発明の JNK 阻害剤、特に、配列番号 172 を伴う JNK 阻害剤が、刺激により誘導されたサイトカイン放出を低減する能力を調べるために、PMA により分化させて、LPS により6時間にわたり攻撃された、ヒト THP 1 細胞からのサイトカイン産生をどのようにして誘導したのかについて説明する手順を示す。サイトカイン放出を読み取るために、THP 1 細胞を、ex vivo において、異なるリガンドで刺激した。非毒性用量では、JNK 阻害剤の有効性が、非処理試料と比較したサイトカインレベルの低下により示され、ELISA によりモニタリングされる。化合物の毒性は、紫色を呈するトリアゾリウム (tretazolium) 塩 (MTS) のホルマゼンへの還元により評価する。

30

【0234】

手順 :

a . 材料

・細胞系 : THP - 1 (参照番号 TIB - 202、ATCC、ロット番号 57731475)

・培養培地、試薬およびプレート。

40

【0235】

以下 :

10 % の FBS (参照番号 A15 - 151、PAA) : 56 で30分間にわたり非働化した

10 mM の HEPES (参照番号 H0887、Sigma)

50 μ M の -メルカプトエタノール (参照番号 63690、Fluka : 14.3 M の原液) : 50 mM のアリコート 560 μ l を、-20 で貯蔵された PBS に添加する

1 mM のピルビン酸ナトリウム (参照番号 S8636、Sigma)

ペニシリン (100 単位 / mL) / ストレプトマイシン (100 μ g / mL) (参照番号 P4333、Sigma)

50

を補充した R P M I (参照番号 2 1 8 7 5 - 0 9 1、I n v i t r o g e n)。

【 0 2 3 6 】

次いで、R P M I 培地を、0 . 2 2 μ m のフィルター (参照番号 S C G P U 0 5 R E、M i l l i p o r e) で濾過する。

【 0 2 3 7 】

1 0 倍濃度の P B S (参照番号 7 0 0 1 1、I n v i t r o g e n) : 滅菌 H₂ O で 1 倍濃度まで希釈した

D M S O : 参照番号 4 1 4 4 4、F l u k a

P M A (ホルボール 1 2 - ミリスレート 1 3 - アセテート、参照番号 P 1 5 8 5、S i g m a、濃度 : 1 m M = - 2 0 の D M S O 中 6 1 6 . 8 μ g / m L)。R P M I 中に 1 0 0 n M の最終濃度で直接用いる (1 0 m L の培地中に 1 μ l)。

10

【 0 2 3 8 】

超高純度 L P S (リボ多糖、参照番号 t l r l - e k l p s、I n v i v o g e n、濃度 : 5 m g / m L) : L P S の原液 : 4 の P B S 中 3 μ g / m L。直接用いて、R P M I 培地中に 4 0 n g / m L である、4 倍濃度の濃縮溶液を調製する (プレート 1 枚当たり最小で 1 8 0 0 μ l ; プレート 5 枚で : 3 μ g / m L の L P S 1 2 5 μ l + 9 2 5 0 μ l の R P M I)。

【 0 2 3 9 】

9 6 ウェルプレート :

接着細胞培養用の 9 6 ウェルプレート (参照番号 1 6 7 0 0 8、N u n c)

20

上清収集用の 9 6 ウェルプレート (参照番号 8 2 . 1 5 8 1、S a r s t e d t)

E L I S A 用の 9 6 ウェルプレート (F 9 6 M a x i S o r p、参照番号 4 4 2 4 0 4、N u n c)

コーティング溶液 : ポリ D - リシン (参照番号 P 9 0 1 1、S i g m a) : 2 5 μ g / m L の 1 倍濃度の P B S 中での最終濃度に希釈した

・ E L I S A 試薬およびキット

E L I S A 用コーティング緩衝液 : 1 リットルの H₂ O 中に p H 9 . 5 の 0 . 1 M 炭酸 Na (= 7 . 1 3 g の N a H C O₃ (参照番号 7 1 6 2 7、F l u k a) + 1 . 5 9 g の N a₂ C O₃ (参照番号 7 1 3 4 5、F l u k a)、濃縮 N a O H により p H を 9 . 5 とした)

30

E L I S A 用洗浄緩衝液 : 1 倍濃度の P B S + 0 . 0 1 % の T w e e n 2 0 (参照番号 P 1 3 7 9、S i g m a、ロット番号 0 9 4 K 0 0 5 2) (= 1 倍濃度の P B S 1 リットルを調製し、磁気かき混ぜ機によりゆっくりと混合しながら、1 0 0 μ l の T w e e n 2 0 を添加する)。

【 0 2 4 0 】

アッセイ用希釈剤 : 1 倍濃度の P B S + 1 0 % の F B S (参照番号 A 1 5 - 1 5 1、P A A ; 5 6 で 3 0 分間にわたり非働化した)。

【 0 2 4 1 】

D A K O T M B (参照番号 S 1 5 9 9、D A K O) : 市販の基質溶液

停止溶液 : 1 M の H₃ P O₄ (2 0 0 m L の場合 = 1 7 7 m L の H₂ O + 2 3 m L の 8 5 % H₃ P O₄ (参照番号 3 4 5 2 4 5、A l d r i c h)。

40

【 0 2 4 2 】

T N F - : キット、ヒト T N F E L I S A セット、B D O p t E I A (参照番号 5 5 5 2 1 2、B D)。

・細胞傷害性の測定 : C e l l T i t e r 9 6 試薬 (参照番号 G 3 5 8 1、P r o m e g a)

・対照化合物 : S P 6 0 0 1 2 5 (参照番号 A L X - 2 7 0 - 3 3 9 - M 0 2 5、A l e x i s、濃度 : 2 0 m M の D M S O)

・吸光度の読取り : 吸光度は、F u s i o n A l p h a P l a t e リーダー (P e r k i n E l m e r) 上で読み取った。

50

・リピーティングピペット、デジタル式ピペット、またはマルチチャネルピペット。
・Top Seal - A : 96 ウェルマイクロプレートシール (参照番号 6 0 0 5 8 5 、 P e r k i n E l m e r) 。

【 0 2 4 3 】

b . 方法

ウェルのコーティング

プレートを、 $200\mu\text{l}$ のポリ D - リシン (1 倍濃度) でコーティングし、 37°C 、 5% の CO_2 、および 100% の相対湿度で 2 時間にわたりインキュベートした。

【 0 2 4 4 】

細胞の播種

2 時間後、ウェルを、1 倍濃度の P B S $200\mu\text{l}$ で 2 回にわたり洗浄した (速やかに用いるか、または使用まで 1 倍濃度の P B S $200\mu\text{l}$ と共に 37°C で放置するが、3 日間以内とする) 。

【 0 2 4 5 】

細胞をカウントした。所望数の細胞を採取し、 1mL 当たりの細胞 $1,000,000$ 個の希釈液を得るのに必要な量の培地中に再懸濁させた。 100nM の P M A を添加して、T H P 1 の、懸濁単球から付着マクロファージへの分化を誘導した。細胞を、ウェル内の $100\mu\text{l}$ の培地中に、ウェル 1 つ当たりの細胞 $100,000$ 個の播種密度で播種した。接種後、プレートを、 37°C 、 5% の CO_2 、および 100% の相対湿度で 3 日間にわたりインキュベートして、それらを分化させてから、被験薬を添加した。

【 0 2 4 6 】

細胞の処理

3 日後、接着細胞を顕微鏡で観察した。P M A を含有する培地を吸引し、P M A を伴わない $100\mu\text{l}$ の新鮮な R P M I 培地で置きかえた (1 倍濃度の P B S による洗浄ステップを伴わない) 。

【 0 2 4 7 】

被験薬を H_2O 中または D M S O 中 10mM の濃度で調製し、 -80°C で保存した。各日の使用前に、1 アリコート of J N K 阻害剤を解凍し、R P M I 培地中に 4 倍濃度の濃縮溶液 ($120\mu\text{M}$) に到達するように希釈し、次いで、R P M I 中に所望の濃度まで希釈した。S P 6 0 0 1 2 5 を、R P M I 培地中に 4 倍濃度の濃縮溶液 ($40\mu\text{M}$) に到達するように希釈し、次いで、 0.8% の D M S O を含有する R P M I 中に所望の濃度まで希釈した。

【 0 2 4 8 】

プレートを、 $50\mu\text{l}$ の培地または所望の最終薬物濃度 (J N K 化合物については、 0 、 100nM 、 1 、 3 、 10 、もしくは $30\mu\text{M}$ の最終濃度、または S P 6 0 0 1 2 5 陽性対照については、 0 、 10 、 100nM 、 1 、 3 、もしくは $10\mu\text{M}$ の最終濃度) の 4 倍濃度の溶液で処理した。薬物を添加した後、プレートを、 37°C 、 5% の CO_2 、および 100% の相対湿度でさらに 1 時間にわたりインキュベートした。

【 0 2 4 9 】

1 時間後、超高純度 L P S (3ng/mL の最終濃度) の 4 倍濃度の濃縮希釈液 $50\mu\text{l}$ を添加することにより、T N F の分泌を誘導した。

【 0 2 5 0 】

アッセイ

6 時間後、 $100\mu\text{l}$ の上清を、新たな 96 ウェルプレートへと移した。これらのプレートを密封し、サイトカインの分泌について E L I S A により解析するまで -20°C で保存した (例えば、実施例 4 を参照されたい) 。

【 0 2 5 1 】

化合物の細胞傷害効果を、M T S 吸光度により評価し (例えば、実施例 4 を参照されたい) 、倒立顕微鏡 (A x i o v e r t $40\times$ C F L ; Z e i s s ; $10\times$) を用いて細胞を観察した。

10

20

30

40

50

【0252】

データ解析

データの解析は、ELISA（実施例4を参照されたい）において示される通りに実施する。略述すると、ELISAでは以下の通りである。各基準物質対照および各試料についての3連の読取りの平均。ゼロ基準の平均光学濃度（O.D）を減じる。サイトカイン濃度の対数値を、O.Dの対数値と対比してプロットする検量線を作成し、最良の近似直線を回帰分析により決定することができる。試料を希釈した場合は、検量線から読み取られる濃度に、希釈係数を乗じなければならない。検量線は、アッセイされる各試料セットについて創出するものとする。外れ値データは、グラブス検定を用いて除外した。次いで、SDの2倍の区間に入らないデータを棄却した。陽性対照が、既に観察されたデータを示す場合は、独立の実験を考慮する。独立の実験をプールする（ $N > 3$ ）。

10

【0253】

細胞傷害効果の評価では以下の通りである：サイトカイン放出実験の解析を考慮した各独立の実験の各プレートでは、培地単独の吸光度の平均を、バックグラウンドと考え、これを減じて各吸光度値とした。各化合物により処理されない細胞の3連の平均を、100%の生存率と考えた。各化合物による3連の平均は、この100%により正規化した。外れ値データは、グラブス検定を用いて除外した。次いで、SDの2倍の区間に入らないデータを棄却した。独立の実験をプールする（ $N > 3$ ）。

【0254】

条件についての全ての統計学的比較は、Graph Pad Prism 4ソフトウェアにより実施した。以下の検定を伴う：一元ANOVA検定に続くテューキーの多重比較検定。P < 0.05を有意であると考えた。

20

【0255】

実施例6：配列番号172のJNK阻害剤および初代ラット細胞またはヒト全血細胞におけるTNFの放出

全血は、クエン酸ナトリウムを含有する、あらかじめラベル付けした真空チューブへと接続した静脈穿刺を用いて、麻酔をかけたラットまたはヒト健常ボランティアから収集する。チューブを、7～8回反転することによって穏やかに混合し、次いで、刺激するまで室温で保持する。配列番号172のJNK阻害剤は、PBS中6倍に濃縮して調製し、ウェル1つ当たり30 μ lのミックスを、96ウェルプレートへと添加する。全血をPBS中1：2で希釈し、希釈された血液120 μ lを、PBS単独または配列番号172のJNK阻害剤をあらかじめ添加してある各ウェルに添加する。全血を、37、85 rpm（Stuart Orbital インキュベータ；SI500）で60分間にわたりインキュベートする。活性化剤（LPS）は、調製された、ウェル1つ当たり30 μ lの6倍濃縮されたLPSである。60分間にわたるインキュベーションの後、LPSを、血液へと添加し、上下にピペティングすることにより血液を混合し、次いで、37で4時間にわたるかき混ぜ（85 rpm）下に置く。4時間にわたるインキュベーション後、プレートを、あらかじめ冷却した遠心分離機により、4、約770 gで15分間にわたり遠心分離する。最後に上清を収集し、サイトカインを測定するまで-20で保持する。次いで、標準的なElisaキット（例えば、R&D Systems製のDuoSet Elisa；またはBD Biosciences製のBD Opteia Set Elisa）を用いて、サイトカイン（IL-6、IL-2、IFN、およびTNF）を測定した。結果を、上清1 mL当たりの測定されたサイトカインpgとして表す。

30

40

【0256】

活性化剤／刺激剤としてのLPSの代わりにPMA＋イオノマイシンにより、同様の実験を行った。

【0257】

実施例7：本明細書で開示される特異的JNK阻害剤の半減期

配列番号196、197、および172の配列を伴うJNK阻害剤（0.1 mMの最終濃度）を、ヒト血清（1倍濃度のPBS中で10および50%）中で消化した。実験は、

50

Tugyiら(Proc Natl Acad Sci U S A、2005年、413～418頁)により記載される通りに実施した。残りのインタクトなペプチドは、UPLC-MSにより定量化した。配列番号196、197、および172について、同一の方法であるが2回の個別のアッセイにより安定性を評価した。配列番号196を伴うJNK阻害剤が、6時間以内に、アミノ酸残基へと十全に分解されたのに対し、配列番号172を伴うJNK阻害剤が完全に分解されたのは、14日後であるに過ぎなかった。配列番号197を伴うJNK阻害剤は、30日後においてもやはり安定であった。

【0258】

実施例8：配列番号172の配列を伴うJNK阻害剤による、ラット初代T細胞におけるCD3/CD28誘導IL-2放出の用量依存的な阻害

対照動物を屠殺し、リンパ節(LN)を採取し、完全RPMI培地中に保持した。LNを、5mLのピストンを用いて70 μ mのフィルター上の完全RPMIにより粉碎した。数滴の培地を添加して、ストレイナーを湿潤に保った。細胞を、450gおよび4で7分間にわたり遠心分離した。ペレットを5mLの新鮮な培地中に再懸濁させた。細胞に、再度、細胞ストレイナーを通過させた。1アリコートの細胞をカウントする一方で、4および1400rpmで10分間にわたり、細胞を再度遠心分離した。細胞を、MACS緩衝液(10⁷個の細胞当たり80 μ LのMACS緩衝液)中に再懸濁させた。細胞1千万個当たり10 μ Lの抗ラットMHCマイクロビーズを添加し、細胞を、4～8で15分間にわたりインキュベートした。細胞を、15mLのMACS緩衝液で洗浄し、4および700gで7分間にわたり遠心分離した。ペレットを、細胞10⁸個当たり500 μ LのMACS緩衝液中に再懸濁させた。動物1匹当たり1本のLSカラムを、MACS分離器の磁場に置いた。カラムは、3mLのMACS緩衝液でまずすすいだ。1本のチューブをカラムの下方の氷中に置き、細胞=T細胞を収集した(陰性選択であるので、溶出されるものを収集する)。細胞懸濁液を添加し、溶出物を氷上で収集した。カラムを、3mLのMACS緩衝液で3回にわたり洗浄した。溶出されるT細胞を、4および700gで7分間にわたり遠心分離した。再懸濁させた細胞をカウントし、100 μ Lの完全培地中にウェル1つ当たりの細胞200000個の密度で播種した。プレートは、実験の前日に、2 μ g/mLのCD3抗体であらかじめコーティングし、実験日に、プレートをPBSで3回にわたり洗浄した。細胞を、100 μ Lの(ポリ)ペプチドJNK阻害剤(配列番号172)で処理し、リガンドによる活性化の前に、1時間にわたり2倍に濃縮した。(ポリ)ペプチドJNK阻害剤(配列番号172)による前処置の1時間後、次いで、細胞を、2 μ g/mLの抗CD28抗体で24時間にわたり刺激した。刺激の24時間後、上清を収集し、解析するまで、-20で保存した。次いで、標準的なElisaキットを用いてサイトカインを測定した。結果を、上清1mL当たりの測定されたサイトカインpgとして表す。

【0259】

さらなる実験でも、上記で示したプロトコールと本質的に同じプロトコールを用いたが、配列番号172を伴う(ポリ)ペプチドJNK阻害剤に加えてまた、配列番号197の配列を伴うJNK阻害剤および薬物分子であるSP600125も調べ、これにより、これらの阻害剤の、CD3/CD28誘導IL-2放出の阻害に対する効果の比較を可能とした。

【0260】

実施例9：JNK阻害剤およびヒト全血におけるTNF/IL-2の放出：

クエン酸ナトリウムを含有する、あらかじめラベル付けした真空チューブへと接続した静脈穿刺を用いて、ヒト健常ボランティアに由来する全血を収集した。チューブを、7～8回反転することによって穏やかに混合し、次いで、刺激するまで室温で保持する。350 μ LのRPMI+P/Sを、1.2mLの96ウェルプレートへと添加した。配列番号172の10倍濃縮物を、RPMI+P/S中で調製した(ウェル1つ当たり50 μ L)。50 μ Lは、1.2mLの96ウェルプレートへと添加した。次いで、50 μ Lの全血を、培地単独またはJNK阻害剤をあらかじめ添加してある各ウェルに添加した。全血を

、37、5%のCO₂で、60分間にわたりインキュベートした。RPMI + P / S 中で希釈された、ウェル1つ当たり50 µl のリガンドを調製したところ、最終希釈率の10倍濃縮に対応した。60分間にわたるインキュベーションの後、リガンドを添加し、次いで、血液を上下にピペティングすることにより、ウェルを混合した。全血を37で3日間にわたりインキュベートした（毎日1回各ウェルを上下にピペティングすることにより、ウェルを混合した）。インキュベーションの終了時には、プレートを混合し、次いで、あらかじめ冷却した遠心分離機により、4、2500 rpmで15分間にわたり遠心分離した。次いで、標準的なEliisaキットを用いてサイトカインを測定した。結果を、上清1 mL当たりの測定されたサイトカイン pg として表す。

【0261】

同様の実験を、わずかな改変を伴って実行した。CD3 / CD8 刺激の場合、CD3 抗体を、PBS 中に2 µg / mL、4で一晩にわたりコーティングした。実験日において、PBSで3回にわたりウェルを洗浄し、使用まで、37でPBS中に放置した。CD28 抗体は、配列番号172の1時間後に、2 µg / mL の最終濃度で添加し、上清は、3日間にわたる刺激の後に収集した。

【0262】

実施例10：内毒素誘導ブドウ膜炎（EIU）のラットモデルにおける抗炎症性効力

配列番号172によるJNK阻害剤の抗炎症性効力を、静脈内投与後のアルビノラット（EIU / LPSモデル）において調べた。本研究の目的は、配列番号172の単回の静脈内注射（0.015、0.18、および1.80 mg / kg）の、内毒素誘導ブドウ膜炎アルビノラットモデルにおける炎症性応答に対する効果を決定し、これらの効果を、先行技術による配列番号197のJNK阻害剤（2 mg / kg）で得られる効果と比較することであった。さらなる対照としては、リン酸デキサメタゾンナトリウム（phosphate sodic dexamethasone）が用いられた。

【0263】

60匹の雄Lewisラットを、各群の動物10匹ずつの6つの群へと無作為に分けた。リポ多糖（LPS、1 mg / kg）の足蹠注射によりEIUを誘導した。NaCl（0.9%）、2 mg / kgの配列番号197、および3つの濃度（1.80 mg / kg、0.18 mg / kg、および0.015 mg / kg）の配列番号172を、静脈内注射により投与した。リン酸デキサメタゾンナトリウム（眼1つ当たり20 µg）を、両眼における結膜下注射により投与した。LPS注射の24時間後、臨床スコア付けにより炎症応答を評価した。

【0264】

臨床眼炎症の強度を、各眼について0～4のスケールでスコア付けした。

【0265】

グレード0 炎症なし

グレード1 虹彩および結膜における微弱な血管拡張

グレード2 虹彩および結膜における発赤を伴う中程度の血管拡張

グレード3 虹彩および結膜における発赤を伴う強度の血管拡張

グレード4 強度の炎症性反応

（+1）フィブリンの形成および瞳孔閉鎖。

【0266】

LPSによる誘導の24時間後、ビヒクルで処置されたラットの臨床スコアは、中央値を4（範囲：2～5）として、3.6 ± 0.2（平均 ± SEM、n = 20）であった。誘導および配列番号197（2 mg / kg）による静脈内処置の24時間後には、眼炎症の重症度の有意な軽減（p < 0.001）が検出され（平均スコア：2.2 ± 0.3、中央値：2）、ビヒクル群において観察されるスコアと比較した、EIUSコアの40%の低下に対応した。また、ほぼ同じ用量（1.80 mg / kg）の配列番号172による静脈内処置も、眼炎症の重症度を有意に軽減し、42%（平均スコア：2.1 ± 0.3、中央値：2、p = 0.001）の軽減であった。低用量（0.18および0.015 mg / k

10

20

30

40

50

g)でも、炎症は、それぞれ、33% (平均スコア: 2.4 ± 0.3 、中央値: 2) および36% (平均スコア: 2.3 ± 0.3 、中央値: 2) 軽減された。軽減は、 $p < 0.001$ により有意であった。

【0267】

また、陽性対照薬として用いたデキサメタゾン (眼1つ当たり $20 \mu\text{g}$) による結膜下処置も、臨床スコアを有意に低減し、79% (平均スコア: 0.8 ± 0.2 、中央値: 0.5、 $p < 0.001$) の低減であった。

【0268】

これらの実験条件下では、配列番号197の 2 mg/kg の単回の静脈内注射により、前房において観察される内毒素誘導炎症が部分的に防止されると明言することができる。これに対してまた、 0.015 、 0.18 、 1.80 mg/kg で静脈内注射された配列番号172も、前房における内毒素誘導炎症を軽減した。

【0269】

実施例11: 確立された慢性II型コラーゲン関節炎のラットモデルにおける14日後のJNK阻害剤を静脈内投与した後の用量反応効果

ラットコラーゲン関節炎とは、前臨床研究下もしくは臨床研究下にあるか、または関節炎における治療剤として現在用いられている多数の抗関節炎剤に対する前臨床試験のために広く用いられている、多発性関節炎の実験モデルである。このモデルの特徴は、頑健で容易に測定可能な多発性関節炎、パンヌス形成と関連する顕著な軟骨破壊、ならびに軽度～中程度の骨吸収および軟骨膜骨の増殖を、確実に発症および進行させることである。

【0270】

前記実験モデルでは、ラットにおいて確立されたII型コラーゲン関節炎において発生する炎症 (足部の腫脹)、軟骨の破壊、および骨吸収を阻害するために、14日間 (関節炎d1～14) にわたり毎日 (QD) 投与される、配列番号172によるJNK阻害剤の静脈内 (IV) における有効性を決定した。

【0271】

0および6日目において、動物 (関節炎について、1群当たり8匹) にイソフルランで麻酔をかけ、 2 mg/mL のウシII型コラーゲン (Elastin Products、Owensville、Missouri) を含有する $300 \mu\text{l}$ のフロイント不完全アジュバント (Difco、Detroit、MI) を、尾の基部および背部の2つの部位に注射した。研究の10日目 (関節炎d0) に関節炎が発症し、ラットを処置群へと無作為化した。各群への無作為化は、少なくとも一方の後足において足首関節の腫脹が明らかに確立された後で行った。

【0272】

確立されたII型コラーゲン関節炎を伴う雌のLewisラットを、関節炎の1～14日目において毎日 (QD)、静脈内 (IV) 経路を介して、ビヒクル (NaCl)、配列番号172 (0.01 、 0.1 、 1 、または 5 mg/kg)、または基準化合物であるデキサメタゾン (Dex、 0.05 mg/kg) で処置した。動物は、関節炎の14日目に屠殺した。有効性の評価は、動物の体重、キャリパーによる毎日の足首の測定、曲線下面積 (AUC) として表される足首の直径、終末後足重量、ならびに選択された群の足首および膝についての組織病理学的評価に基づいた。

【0273】

関節のスコア付け: 以下の基準に従い、炎症、パンヌス形成、および骨吸収について、コラーゲン関節炎性の足首および膝に0～5のスコアを施す。

【0274】

膝および/または足首の炎症

0 正常

0.5 最小限の限局性炎症

1 滑膜/関節周囲組織における炎症細胞の最小限の浸潤

2 軽度の浸潤

10

20

30

40

50

- 3 中程度の浮腫を伴う中程度の浸潤
- 4 顕著な浮腫を伴う顕著な浸潤
- 5 重度の浮腫を伴う重度の浸潤。

【0275】

足首のパンヌス

- 0 正常

0.5 軟骨および軟骨下骨におけるパンヌスの最小限の浸潤が、辺縁帯だけを侵し、少数の関節だけを侵している

1 軟骨および軟骨下骨におけるパンヌスの最小限の浸潤が、主に辺縁帯を侵している

2 軽度の浸潤（辺縁帯における脛骨または足根骨のうちの＜4分の1）

3 中程度の浸潤（辺縁帯における脛骨または小足根骨のうちの4分の1～3分の1が侵されている）

4 顕著な浸潤（辺縁帯における脛骨または足根骨のうちの2分の1～4分の3が侵されている）

5 重度の浸潤（辺縁帯における脛骨または足根骨のうちの＞4分の3が侵されており、全体的な構造が重度の変形を来している）。

10

【0276】

膝のパンヌス

- 0 正常

0.5 軟骨および軟骨下骨におけるパンヌスの最小限の浸潤が、辺縁帯だけを侵し、少数の関節だけを侵している

1 軟骨および軟骨下骨におけるパンヌスの最小限の浸潤であり、軟骨表面または軟骨下骨のうちの約1～10%が侵されている

2 軽度の浸潤（脛骨または大腿骨の表面領域または軟骨下領域のうちの最大で1/4にわたり広がる）であり、軟骨表面または軟骨下骨のうちの約11～25%が侵されている

3 中程度の浸潤（脛骨または大腿骨の表面領域または軟骨下領域のうちの＞1/4であるが、＜1/2にわたり広がる）であり、軟骨表面または軟骨下骨のうちの約26～50%が侵されている

4 顕著な浸潤（脛骨表面または大腿骨表面のうちの2分の1～4分の3にわたり広がる）であり、軟骨表面または軟骨下骨のうちの約51～75%が侵されている

5 重度の浸潤であり、軟骨表面または軟骨下骨のうちの約76～100%が侵されている。

20

30

【0277】

足首軟骨の損傷（小足根骨に重点を置く）

- 0 正常

0.5 トルイジンブルー染色の減殺は最小限であり、辺縁帯だけを侵し、少数の関節だけを侵している

1 最小限＝明らかな軟骨細胞の喪失またはコラーゲンの破壊を伴わない、トルイジンブルー染色の最小限～軽度の減失

2 軽度＝軽度の限局性（表在性）の軟骨細胞の喪失および／またはコラーゲンの破壊を伴う、軽度のトルイジンブルー染色の減失

3 中程度＝中程度の多巣性（中間帯までの深さ）の軟骨細胞の喪失および／またはコラーゲンの破壊を伴う、中程度のトルイジンブルー染色の減失であり、小足根骨が1/2～3/4の深さまで侵されているが、全層を喪失した領域は希少である

4 顕著＝顕著な多巣性（深部帯までの深さ）の軟骨細胞の喪失および／またはコラーゲンの破壊を伴う、顕著なトルイジンブルー染色の減失であり、1つまたは2つの小足根骨の表面において、軟骨の全層が喪失している

5 重度＝重度の多巣性（石灰化前線までの深さ）の軟骨細胞の喪失および／またはコラーゲンの破壊を伴う、重度のびまん性のトルイジンブルー染色の減失が、2つを超える

40

50

軟骨表面を侵している。

【 0 2 7 8 】

膝軟骨の損傷

0 正常

0 . 5 トルイジンブルー染色の減失は最小限であり、辺縁帯だけを侵している

1 最小限 = 明らかな軟骨細胞の喪失またはコラーゲンの破壊を伴わない、最小限 ~ 軽度のトルイジンブルー染色の減失

2 軽度 = 軽度の限局性 (表在性) の軟骨細胞の喪失および / またはコラーゲンの破壊を伴う、軽度のトルイジンブルー染色の減失であり、軟骨が 5 0 % の深さまで侵された小領域はほとんどない可能性がある

3 中程度 = 中程度の多巣性 ~ びまん性 (中間帯までの深さ) の軟骨細胞の喪失および / またはコラーゲンの破壊を伴う、中程度のトルイジンブルー染色の減失であり、全層を喪失した 1 つ ~ 2 つの小領域が、一表面の全幅員のうちの 4 分の 1 未満であり、かつ、全表面の全幅員のうちの 2 5 % 以下を侵している可能性がある

4 顕著 = 顕著な多巣性 ~ びまん性 (深部帯までの深さ) の軟骨細胞の喪失、ならびに / またはコラーゲンの破壊、もしくは 1 つの表面におけるほぼ完全な喪失および他の表面における部分的な喪失を伴う、顕著なトルイジンブルー染色の減失であり、完全な全体的喪失が、全表面のべ幅員で 5 0 % 未満である

5 重度 = 大腿骨および / または脛骨の両方において重度の多巣性 (石灰化前線までの深さ) の軟骨細胞の喪失および / またはコラーゲンの破壊を伴う、重度のびまん性のトルイジンブルー染色の減失であり、完全な全体的喪失が、全表面のべ幅員で 5 0 % を超える。

10

20

【 0 2 7 9 】

足首骨の吸収

0 正常

0 . 5 最小限の吸収が、辺縁帯だけを侵し、少数の関節だけを侵している

1 最小限 = 低倍率では容易に明らかとならない小さな吸収領域であり、破骨細胞は希少である

2 軽度 = 低倍率では容易に明らかとならないより多数の吸収領域であり、破骨細胞はより多数であり、辺縁帯における脛骨または足根骨のうちの < 4 分の 1 が吸収されている

3 中程度 = 皮質における全層欠損を伴わない骨髄小柱骨および皮質骨の明らかな吸収、一部の骨髄小柱の喪失、低倍率でも明らかな病変が見られ、破骨細胞はより多数であり、辺縁帯における脛骨または足根骨のうちの 4 分の 1 ~ 3 分の 1 が侵されている

4 顕著 = 残存する皮質表面のプロファイルの変形、顕著な骨髄骨の喪失、多数の破骨細胞を伴うことが多い皮質骨の全層欠損であり、辺縁帯における脛骨または足根骨のうちの 2 分の 1 ~ 4 分の 3 が侵されている

5 重度 = 残存する皮質表面のプロファイルの変形、顕著な骨髄骨の喪失、多数の破骨細胞を伴うことが多い皮質骨の全層欠損であり、辺縁帯における脛骨または足根骨のうちの > 4 分の 3 が侵されており、全体的な構造が重度の変形を来している。

30

40

【 0 2 8 0 】

膝骨の吸収

0 正常

0 . 5 最小限の吸収が、辺縁帯だけを侵している

1 最小限 = 低倍率では容易に明らかとならない小さな吸収領域であり、軟骨下骨の全関節幅員のうちの約 1 ~ 1 0 % が侵されている

2 軽度 = より多数の吸収領域、軟骨下骨の限定的な喪失が見られ、軟骨下骨の全関節幅員のうちの約 1 1 ~ 2 5 % が侵されている

3 中程度 = 軟骨下骨の明らかな吸収が見られ、軟骨下骨の全関節幅員のうちの約 2 6 ~ 5 0 % が侵されている

4 顕著 = 軟骨下骨の明らかな吸収が見られ、軟骨下骨の全関節幅員のうちの約 5 1 ~

50

75%が侵されている

5 重度 = 破壊に起因する関節全体の変形が見られ、軟骨下骨の全関節幅員のうちの約76~100%が侵されている。

【0281】

結果：

疾患対照群における疾患重症度は、1~5日目において増大し、4~5日目に1日当たりの増大が最大となった。次いで、増大の増分が小さくなり、7日目にピークに至った。この時点以降、急性腫脹はおおむね減殺され、キャリパーによる測定値も低下した。処置群も同様に、この全般的パターンに従った。

【0282】

10

全ての疾患群で、体重の減少が観察されたのに対し、正常対照群では、体重が増大した。5mg/kgの配列番号172で処置されたラットでは、ビヒクルで処置された疾患対照と比較して、体重の減少が有意に(25%、ANOVAによる $p < 0.05$)阻害された。スチューデントのt検定を用いて疾患対照と比較したところ、体重の減少の阻害はまた、1mg/kgの配列番号172で処置されたラット(21%、 $p < 0.05$)またはDexで処置されたラット(21%、 $p < 0.05$)についても有意であった。配列番号172による処置の結果は、このパラメータについて、用量応答的であった。

【0283】

5mg/kgの配列番号172で処置されたラット($p < 0.05$; 4~12日目)またはDexで処置されたラット($p < 0.05$; d3~14)については、毎日の足首直径の測定値が、正常に向けて、疾患対照と比較して有意に(二元RMANOVAによる $p < 0.05$)低減された。

20

【0284】

5mg/kgの配列番号172で処置されたラット(43%の低減)、1mg/kgの配列番号172で処置されたラット(27%)、またはDexで処置されたラット(97%)では、足首直径のAUCが、正常に向けて、疾患対照と比較して有意に(ANOVAによる $p < 0.05$)低減された。配列番号172による処置の結果は、このパラメータについて、用量応答的であった。

【0285】

5mg/kgの配列番号172で処置されたラット(26%の低減)またはDexで処置されたラット(114%)では、最終的な足重量が、正常に向けて、疾患対照と比較して有意に(ANOVAによる $p < 0.05$)低減された。配列番号172による処置の結果は、このパラメータについて、用量応答的であった。

30

【0286】

いずれの処置群におけるラットについても、相対肝臓重量は、疾患対照と比較して有意な(ANOVAによる)影響を受けなかった。

【0287】

Dexで処置されたラットでは、体重に照らした脾臓重量が、疾患対照と比較して有意に(ANOVAによる $p < 0.05$)低減された。Dexで処置されたラットの相対脾臓重量はまた、正常対照と比較しても有意に低減された。配列番号172で処置されたラットでは、相対脾臓重量が、有意な影響を受けなかった。

40

【0288】

Dexで処置されたラットでは、体重に照らした胸腺重量が、疾患対照と比較して有意に(ANOVAによる $p < 0.05$)低減された。Dexで処置されたラットの相対胸腺重量はまた、正常対照と比較しても有意に低減された。配列番号172で処置されたラットでは、相対胸腺重量が、有意な影響を受けなかった。

【0289】

5mg/kgの配列番号172で処置されたラットでは、全ての足首の組織病理学パラメータが、正常に向けて、疾患対照と比較して有意に(マン-ホイットニーのU検定による)低減された(合計スコアの25%の低減)。

50

【0290】

5 mg / k g の配列番号 172 で処置されたラットでは、全ての膝の組織病理学パラメータが、正常に向けて、疾患対照と比較して有意に（マン - ホイットニーの U 検定による）低減された（合計スコアの 73 % の低減）。

【0291】

本研究の結果は、配列番号 172（5 mg / k g）による毎日の静脈内処置が、ラットにおいて確立された I I 型コラーゲン関節炎と関連する、臨床パラメータおよび組織病理学パラメータに対して有意に有益な効果を及ぼすことを示した。配列番号 172（1 mg / k g）による処置は、足首直径の AUC を、結果として有意に低減した。足首直径に対する有益な効果は、疾患対照動物では 7 日目後に腫脹が低減されたにもかかわらず、12 日目まで観察された。配列番号 172 による処置の結果は、用量応答的であった。

10

【0292】

配列番号 172 による処置は、デキサメタゾンと異なり、臓器重量に対して有害作用を及ぼさなかった。

【0293】

実施例 12：マウスでのドライアイのスコポラミン誘導モデルにおける 3 つの用量による、配列番号 197 の a l l - D - レトロインベルソ J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドおよび配列番号 172 の J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドの効果

研究概念

本研究の目的は、2 つの異なる化合物である配列番号 197 の a l l - D - レトロインベルソ J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドおよび配列番号 172 の J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドの効果を、スコポラミン誘導ドライアイのマウスモデルにおける 3 つの用量レベルで評価することであった。

20

【0294】

配列番号 197 のペプチドおよび配列番号 172 のペプチドを、このドライアイのマウスモデルにおける有効性について調べた。ペプチドは、両方とも低用量、中程度用量、および高用量で調べた。配列番号 197 のペプチドの低用量レベル、中程度用量レベル、および高用量レベルについて、処方物試料中で測定された濃度は、それぞれ、0.06 %（w / v）、0.25 %（w / v）、および 0.6 %（w / v）であり、配列番号 172 のペプチドの低用量レベル、中程度用量レベル、および高用量レベルについて、処方物試料中で測定された濃度は、それぞれ、0.05 %（w / v）、0.2 %（w / v）、および 0.6 %（w / v）であった。陰性対照としてもまた用いられるビヒクルは、0.9 % の U S P グレード注射用塩化ナトリウムであった。

30

【0295】

本研究は、各群マウス 12 匹ずつの 8 群と、マウス 4 匹のさらなる群とを含む、合計 9 群の雌 C 5 7 B L / 6 マウスからなった。臭化水素酸スコポラミン（S i g m a - A l d r i c h C o r p . , S t . L o u i s , M O）注射（皮下（S C）、1日4回、1用量当たり 0.5 mg、0 ~ 21 日目）と、定常的な気流による乾燥環境へのマウスの曝露との組合せにより、両眼の短期ドライアイを誘導した。1 日目に開始して、群 1 ~ 8 のマウスを、1 日 3 回（T I D）ずつ 21 日間にわたり、ビヒクル（0.9 % の滅菌食塩水；陰性対照物品）、配列番号 197 のペプチド（0.06 %、0.25 %、および 0.6 %）、配列番号 172 のペプチド（0.05 %、0.2 %、および 0.6 %）、またはシクロスポリン（0.05 %；免疫系の活性を低減するのに用いられる免疫抑制薬としての陽性対照）の両眼（b i l a t e r a l o c u l a r（o c u l u s u t e r q u e；O U））外用（t o p i c a l）投与（1 用量当たり眼 1 つ当たり 5 μ l）により処置した。群 9 のマウスは、非誘導の（ドライアイを来さない）非処置対照として維持した。

40

【0296】

存命（処置）期間中は、臨床的観察を 1 日 1 回記録し、角膜フルオレセイン染色、涙液層破壊時間試験（T B U T）、およびフェノールレッド綿糸検査（P R T T）を伴う細隙灯検査（S L E）を毎週 3 回実施した。22 日目に剖検を実施し、眼、眼瞼、結膜、およ

50

び涙腺を、各動物の両眼から採取した。右眼 (right eyes (oculus dexter、OD)) に由来する組織を固定し、次いで、顕微鏡により評価した。左眼 (left eyes (oculus sinister; OS)) に由来する組織を、液体窒素中で瞬時凍結させ、その後の可能な解析のために - 80 で凍結保存した。

【 0 2 9 7 】

【 表 5 】

表5:実験デザイン

群	動物数 (雌)	0～21日目におけるドライ アイの誘導 (1日4回、SC)	1～21日目における処置(1日3 回、OU、眼1つ 当たり5μl)
1	12	スコポラミン (2.5mg/mLの 溶液200μl、 1用量 当たり 0. 5mg)	ビヒクル
2	12		配列番号197 (0.06%)
3	12		配列番号197 (0.25%)
4	12		配列番号197 (0.6%)
5	12		配列番号172 (0.05%)
6	12		配列番号172 (0.2%)
7	12		配列番号172 (0. 6%)
8	12		Restasis(登録商 標)* (0.05%)
9	4	ドライアイの 誘導を伴わな い	処置を伴わない

*シクロスポリン

【 0 2 9 8 】

方法

1 . 用量の調製

配列番号 1 9 7 の (ポリ) ペプチドは、 3 0 0 . 6 5 m g の乾燥粉末を含有する 1 . 5 m L の透明プラスチック製微量遠心用バイアルとして、Polypeptide Laboratories (France) から得た。

【 0 2 9 9 】

配列番号 1 7 2 の (ポリ) ペプチドは、 3 0 2 . 7 m g の乾燥粉末を含有する 1 . 5 m L の透明プラスチック製微量遠心用バイアルとして、Polypeptide Laboratories (France) から得た。

【 0 3 0 0 】

研究を開始する前に、配列番号 1 7 2 の (ポリ) ペプチドおよび配列番号 1 9 7 の (ポリ) ペプチドを、滅菌食塩水 (ビヒクル) 中で処方した。各濃度の投薬用溶液を、 0 . 2 μ m のフィルターを用いて滅菌し、複数のあらかじめラベル付けされたバイアルへとアリコート分割し、 - 2 0 で凍結させた。配列番号 1 9 7 のペプチドについて、処方物試料中で測定された濃度は、 0 . 0 6 % 、 0 . 2 5 % 、 および 0 . 6 % へと四捨五入される 0 . 0 5 8 % 、 0 . 2 5 % 、 および 0 . 6 2 4 % であった。配列番号 1 7 2 のペプチドについて、処方物試料中で測定された濃度は、 0 . 0 5 、 0 . 2 % 、 および 0 . 6 % へと四捨五入される 0 . 0 5 3 % 、 0 . 2 1 7 % 、 および 0 . 5 6 2 % であった。

【 0 3 0 1 】

投薬の各日において、 1 セットの投薬用溶液を融解させ、その日の用量投与のために用

いた。対照（ビヒクル；シクロスポリン）は、用量の準備ができた状態で用意され、用量の調製は不要であった。

【0302】

2．細隙灯検査（SLE）

研究への登録の前に、各動物には、SLEおよび外用適用されたフルオレセインを用いる間接的眼検査を施した。ドレイズスケール眼スコア付けを用いて、眼についての所見を記録した。SLEおよびドレイズスコア付けは、存命期間中毎週3回繰り返した。

【0303】

3．涙液層破壊時間（TBUT）試験およびその後の角膜検査

TBUT試験は、角膜へのフルオレセインの適用後における完全な瞬きと、涙液層における最初のランダムな乾燥スポットの出現との間の経過時間を秒単位で測定することにより、毎週3回実行した。TBUTを実施するために、0.1%の液体フルオレセインナトリウムを結膜嚢へと滴下し、眼瞼を指で3回にわたり閉止し、次いで、眼瞼を開放させたまま保持し、連続的なフルオレセイン含有涙液層が角膜を覆うことを明らかにし、涙液層が破壊される（乾燥スポットまたは乾燥ストリークが出現する）のに要する時間（秒単位の）を記録した。少なくとも90秒後、0.1%のフルオレセインのさらなる滴下を角膜へと再適用した後で、角膜上皮の損傷を、コバルトブルーフィルターを伴う細隙灯を用いてグレード付けし、次いで、ドレイズ眼スケールに従い、角膜をスコア付けした。

【0304】

4．フェノールレッド綿糸涙液試験（PRTT）

涙液の産生は、PRTT検査ストリップ（Zone-Quick；日本、名古屋、株式会社メニコン）を用いて、両眼において毎週3回測定した。1日の1回目の処置の前に、細隙灯生体顕微鏡法下で30秒間にわたり、糸を、各眼の結膜円蓋の外眼角へと適用した。涙液の糸に沿った移動（すなわち、湿潤した綿糸の長さ）を、ミリメートル単位の定規を用いて測定した。

【0305】

5．剖検および病理学的解析

22日目の剖検では、眼球、涙腺、眼瞼、および結膜を含めた、各動物に由来する両眼を摘出した。右眼および関連組織を、一晚にわたり改変ダビッドソン液中に浸漬することにより固定した後、10%の中性緩衝ホルマリン（NBF）へと移した。固定された右眼の組織を脱水し、パラフィン中に包埋し、3～5μmの厚さで切片化し、スライドにマウントした組織を、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色した。染色されたスライドガラスを、光学顕微鏡法により評価した。各右眼について少なくとも2つの切片レベルを組織病理学的に検討して、眼の全ての部分に対する詳細で完全な組織病理学的評価を実行した。角膜、結膜および角膜の上皮（杯細胞を含めた）のほか、涙腺に対して特別の注意を払った。これらの組織は、傷害について、0を正常とし、1を最小限の傷害とし、2を軽度の傷害とし、3を中等度の傷害とし、4を重度の傷害とする0～4のスケールに基づきスコア付けした。各角膜についてのスコアは、角膜上皮の厚さおよび角膜炎症に基づいた。結膜は、侵食および炎症のほか、杯細胞の存在または非存在についてスコア付けした。

【0306】

結果

1日4回のスコラミンのSC投与（1用量当たり0.5mg）により、雌C57BL/6マウスにおいて、眼を効果的に潤滑化および保護することが可能な、安定的な涙液層を維持する能力を低下させる、水性涙液産生容量の減少および涙液の生理化学的特性の変化によって特徴付けられる眼乾燥症候群を誘導した。

【0307】

1．涙液層破壊時間（TBUT）試験および角膜検査

ドライアイを誘導する前に、涙液層破壊時間試験（TBUT）を実施し、ドライアイの誘導後2、4、7、9、11、14、16、18、および21日目にもまた実施した。ス

10

20

30

40

50

コボラミンの投薬開始（ドライアイの誘導）後、全ての動物において、T B U T の平均値が減少し始めたが、群 6（中程度用量の配列番号 1 7 2）では、減少が緩徐であると考えられた。群 5、6、7（低用量、中程度用量、および高用量の配列番号 1 7 2 のペプチド）、および群 8（シクロスポリン）では、T B U T の平均の最低値が 7 日目に生じ、同様の値（それぞれ、 6.6 ± 0.4 、 6.7 ± 0.4 、 6.7 ± 0.3 、および 6.4 ± 0.4 秒間）に到達した。その後、これらの群の T B U T の平均は増大して、9 日目にピークに至った。群 6 および 7（配列番号 1 7 2 の中程度用量群および高用量群）における T B U T の平均が、群 8、シクロスポリン群（ 8.5 ± 0.3 秒間）より高い値（それぞれ、 10.0 ± 0.7 秒間および 9.9 ± 0.8 秒間）へと上昇したのに対し、低用量の配列番号 1 7 2 である群 5 の T B U T の平均のピーク（ 8.0 ± 0.4 秒間）は、群 8（シクロスポリン）の T B U T の平均のピークをわずかに下回った。群 3 および 4 の、中程度用量および高用量の配列番号 1 9 7 で処置された動物の T B U T の平均が、投薬の開始後に低下し続けて、9 日目には最低値に達したのに対し、低用量の群 2 では 9 日目に増大した。低用量、中程度用量、および高用量の配列番号 1 7 2 で処置された動物（それぞれ、群 2、3、および 4）の T B U T の平均は、ビヒクル群を上回ったが、低用量、中程度用量、および高用量の配列番号 1 7 2 で処置された動物の群の平均を概ね下回った。

10

【0308】

7 日目～21 日目における T B U T 値の曲線下面積（A U C）を用いて、多様な処置を、ビヒクル対照、中程度用量、低用量、および高用量（それぞれ、0.05%、0.2%、および 0.6%）の配列番号 1 7 2 のペプチドによる処置である群 5、6、および 7 のほか、シクロスポリン（0.05%）で処置された動物である群 8 と比較したところ、T B U T A U C の有意な（クルスカール-ワリスのノンパラメトリック A N O V A）増大が示された。配列番号 1 7 2 のペプチドは、T B U T の用量依存的な増大をもたらし、中程度用量と高用量とでは同様の効果をもたらすことが多いと考えられた。さらに、シクロスポリン処置群と、3 つの用量レベルの配列番号 1 7 2 で処置された群と、非誘導群（群 5、6、7、8、および 9）との間では、T B U T A U C に有意差が見られなかった。この知見は、配列番号 1 7 2 のペプチドの 3 つの用量全てとシクロスポリンとが、このドライアイモデルにおける T B U T 変化の根底をなす眼科的变化の改善または逆転においてほぼ同等に有効であったことを示唆する。

20

【0309】

低用量レベル、中程度用量レベル、および高用量レベルの配列番号 1 9 7 のペプチドで処置された群（群 2～4）は概ね、T B U T のわずかな用量依存的増大を示したが、この増大は、配列番号 1 7 2 またはシクロスポリンで処置された動物よりも約 2 日遅く始まった。

30

【0310】

【表 6】

表6: 計算された平均TBUT AUC値

群	TBUT AUC
群1	71.19
群2	88.54
群3	91.19
群4	89.98
群5	102.98
群6	119.08
群7	119.31
群8	116.1
群9	124.54

10

【0311】

2. フェノールレッド綿糸涙液試験 (PRTT)

20

ドライアイを誘導する前に、PRTT試験を実施し、2、4、7、9、11、14、16、18、および21日目にもまた実施した。0日目～4日目のPRTT値が、ドライアイを誘導された全てのマウスにおいて減少したことから、スコボラミンの投与および送風機により作り出される、気流を増大させた乾燥環境への曝露後における涙液産生の減少が示された。大半の群におけるPRTTの最低値は、ほぼ7日目に生じた。ビヒクル対照群(群1)では、PRTTが減少を続け、14日目に最低値に達した。全てのドライアイ群では、最低値の後で、増大が見られた。これらの所見は、スコボラミンによる処置の開始が、化合物による処置の開始より1日早ければ、眼乾燥症候群と関連する眼の生理学的変化を開始するのに十分であったことを示す。シクロスポリン処置群でもなお、約7日目までは他の群と同様のPRTTの減少を示し、次いで、11～14日目においてピークへと増大した後、わずかに減少した。最後のPRTT試験(21日目)では、シクロスポリン(群8)、ならびに群6および7の全てが、同様のPRTT値を示したことから、中程度用量および高用量の両方の配列番号172のペプチドによる処置が、このマウスドライアイモデルにおける涙液産生の増大において、シクロスポリンと同様の治療効果を有することが示唆される。

30

【0312】

低用量、中程度用量、および高用量の配列番号172のペプチドで処置された動物は、ビヒクルで処置された動物と比較して、著明により多くの涙液を産生した。したがって、配列番号172のペプチドは概ね、このモデルにおいてもTBUTと同様に、用量に関連する涙液産生の有意な増大をもたらした。

40

【0313】

低用量レベル、中程度用量レベル、および高用量レベル(0.06%、0.25%、および0.6%;それぞれ、群2、3、および4)の配列番号197のペプチドで処置された群は概ね、PRTTの用量依存的増大を示した。

【0314】

【表 7】

表7: 平均PRTT AUC値

群	PRTT AUC
群1	35.02
群2	39.96
群3	42.79
群4	43.17
群5	44.38
群6	44.85
群7	46.10
群8	49.44
群9	113.63

10

【 0 3 1 5 】

20

3. 組織病理学

本研究では、組織学的変化が概ね、角膜に限定された。角膜における所見は、角膜上皮表面の角質化の増大、角膜上皮の厚さの増大、角膜上皮の細胞充実度の増大、上皮細胞ターンオーバーの増大と符合する、上皮基底層の有糸分裂発生の微弱な増大からなった。これらの所見は、角膜の乾燥および角膜表面の刺激に対する生理学的適応応答を示す。本研究では、表面の潰瘍化、角膜間質の浮腫、および角膜への炎症性浸潤物が見られなかった。非処置群（正常マウス、スコポリンによる処置を伴わない）である群 9 における眼は、正常限界内にあった。眼瞼の何らかの最小限の非化膿性炎症が、全ての群にわたり散見されたが、結膜、網膜、涙腺、および眼の他の部分は、正常限界内にあった。杯細胞は、全ての群において、限界内にあると考えられた。杯細胞とは、涙液がより強力により付着性の涙液層を形成する一助となるムチンの主要な産生細胞である。

30

【 0 3 1 6 】

軽度～中程度の角膜変化が、非処置正常眼群（群 9）を除く全ての群において認められ、ビヒクル処置群である群 1、および低用量の配列番号 197 のペプチドである群 2 では、他の処置群と比較して僅かにより重度であった。これらの所見は、涙液産生増大の角膜に対する肯定的で有益な効果と符合した。

【 0 3 1 7 】

多様な処置群の組織学的スコアを、シクロスポリン群における組織学的スコアと比較して、他の任意の処置も、シクロスポリンと「同様のスコアの低減」をもたらすのかどうかを決定したところ、群 4、6、および 7 は、シクロスポリン群のスコアと著明には異ならないことが見出された。したがって、これらの 3 つの処置である中程度用量および高用量の配列番号 172 のペプチドならびに高用量の配列番号 197 のペプチドは、シクロスポリンに次いで、このマウスドライアイモデルと関連する角膜変化を軽減 / 改善するのに最も有効であった。

40

【 0 3 1 8 】

本発明の別の態様によれば、本発明の JNK 阻害剤配列であって、その移植の前に組織移植片または臓器移植片を（*in vitro*で）処置するための配列が提供される。通例、脳死ドナーに由来する移植片は、WIT には供されず、8～12 時間の CIT（調達病院から単離ラボへの輸送に必要とされる時間）にあることが典型的である。このような移植片は、宿主へと移植されるまで、それらの生存可能性および機能性を改善するために

50

、本発明による J N K 阻害剤で前処置され得ることが見出された。本発明のこの態様では、移植片は、腎臓、心臓、肺、脾臓、肝臓、血液細胞、骨髓、角膜、偶発的に切断された四肢、特に、指、手、脚部、顔面、鼻、骨、心弁、血管、または腸の移植片であることが典型的であり、好ましくは、腎臓、心臓、脾臓、または皮膚の移植片である。

【 0 3 1 9 】

実施例 1 3 : ラットにおける、J N K 阻害剤のアドリアマイシン誘導性腎症に対する効果

アドリアマイシンによる処理は、ラットおよびマウスにおける糸球体疾患を誘導し、ヒト巣状分節状糸球体硬化症 (F S G S : f o c a l s e g m e n t a l a n d g l o m e r u l a r s c l e r o s i s) を模倣する。このモデルでは、疾患経過中に
10
いて、重度のタンパク尿症に部分的に起因する、尿細管性炎症性病変および間質性炎症性病変が生じる。治療の非存在下では、腎疾患は、8 週間以内に、末期腎不全へと進行する。有足突起の傷害は、糸球体硬化症をもたらす順序の初期段階の 1 つである。本研究の目的は、J N K 阻害剤が、腎病変および腎不全の発症を防止しうるのであるかどうかを調査することであった。

【 0 3 2 0 】

方法

本研究では、雄 S p r a g u e - D a w l e y ラット (C h a r l e s R i v e r) 3 0 匹を使用した (1 0 匹ずつのラットによる 3 つの群へと分けた) 。腎症は、0 日目において、1 0 m g / k g のアドリアマイシンの単回静脈内注射により誘導した。0 日目に
20
、配列番号 1 7 2 の J N K 阻害剤 (2 m g / k g ; 0 . 9 % の N a C l 中) を、尾静脈に静脈内投与した。投与容量は、0 . 2 m l であった。

【 0 3 2 1 】

下記の表は、無作為割付けについてまとめる。

【 0 3 2 2 】

【表 8】

群番号	ADR (0日目)	処置 (0日目)	用量の容量/投 与	用量濃度	動物数
1	10 mg/kg	NaCl 0.9%	0.2 ml, IV	0	10
2	10 mg/kg	配列番号172のJNK 阻害剤2mg/kg 2 mg/kg	0.2 ml, IV	1 mg/ml	10
3	NaCl 0.9%	NaCl 0.9%	0.2 ml, IV	0	10

【 0 3 2 3 】

各日において、全ての動物の全般的挙動および外見を観察した。動物の健康をモニタリングした (瀕死の動物、異常で重要な体重の喪失、物質の無視できない非耐容性など・・) 。除外されるラットはなかった。
40

【 0 3 2 4 】

血液は、群 1 つ当たり 4 匹ずつのラットの尾静脈から、7、1 4、2 8、4 2、および 5 6 日目において回収した。A d v i a C h e m i s t r y 1 6 5 0 (B a y e r H e a l t h c a r e A G、L e v e r k u s e n、G e r m a n y) の適切なキットを使用して、血清中クレアチニン濃度、血中尿素、およびタンパク血を測定した。

【 0 3 2 5 】

群 1 つ当たり 2 匹ずつのラットを、7、1 4、2 8、4 2、および 5 6 日目の麻酔後に屠殺した。動物を屠殺した後、両方の腎臓を回収した。組織病理学的検討のために、固定された組織検体を、段階的なアルコール溶液中で脱水し、トルエン中で清浄化し、パラフィン中に包埋した。切片 (4 μ m) は、過ヨウ素酸シッフ (P A S) で染色し、マッソン
50

トリクローム染色を実施して、コラーゲン沈着を検出した。系球体硬化症および尿細管間質性硬化症を、顕微鏡下で定量化した。

【0326】

結果は、Microsoft Excel（登録商標）ソフトウェアを使用して、個々のデータ表および要約されたデータ表の形態で表した。数値による結果は、平均±平均の標準誤差（SEM）として表した。被験動物数が少ないため、統計学的解析は、実施しなかった。

【0327】

結果：

疾患の進行時における、配列番号172のJNK阻害剤の、腎機能に対する効果：

尿素およびクレアチニンの血清レベルを測定して、腎疾患の経過中における腎機能を研究した。クレアチニンは、熱量測定における投与量に干渉するため、腎機能の好適な指標である尿素だけを解析した。尿素の血清レベルは、非処理ラットでは、顕著に安定であった（5 mmol/lを下回った）が、ADRは、尿素レベルの進行性上昇を誘導し、これは、28日目から急激に、41日目に25 mmol/lまで上昇し、次いで、56日目に48 mmol/lまで上昇したことから、末期腎不全を反映する（図38B）。他方、配列番号172のJNK阻害剤で処置されたラットは、疾患の経過を通して、10 mmol/lを下回る尿素の血清レベルを示した（図38B）。これらの結果は、配列番号172のJNK阻害剤が、腎疾患および腎不全への進行を防止することを示唆する。

10

20

【0328】

組織病理学的所見（PASおよびマッソントリクローム染色）：

ADR誘導性の構造的変化は、光学顕微鏡下で評価した。食塩水で処置された対照ラットは、形態学的に正常な系球体および尿細管を示した。8日目において、光学顕微鏡による検討は、ADRネフローゼ群において、巣状分節状系球体硬化症およびタンパク質性円柱を伴ういくつかの領域を示した。これに対し、配列番号172のJNK阻害剤で処置されたラットでは、いくつかの尿細管は、タンパク質で満たされているが、系球体は、メサングウム細胞過形成が存在しないかまたは孤立する、正常なアーキテクチャーを示し、尿細管構造および間質は、病理学的変化を呈示しなかった（図39）。14日目までに、ADRで処理されたラットは、進行性系球体硬化症、ヒアリン沈着、尿細管拡張、および円柱形成を示した。この群では、29および41日目までに、系球体硬化症の程度は、劇的に悪化し、大半の系球体において、系球体係蹄とボーマン腔との間の明白な付着を伴う、びまん性となり、重度の尿細管萎縮および間質性線維症と関連した。56日目において、びまん性系球体硬化症は、全ての系球体において観察された（図40）。しかし、配列番号172のJNK阻害剤で処置されたラットは、8日目においても比較的正常な外見を呈し、56日目においても、ADRで処理されたラットと比較して、巣状分節状系球体硬化症および尿細管間質性線維症をほとんど発症しない。まとめると、これらの結果は、配列番号172のJNK阻害剤が、系球体線維症および尿細管間質性線維症の発症を防止することを強く示唆し、この群における腎機能の保存を説明しうる。

30

【0329】

本研究の結果は、配列番号172のJNK阻害剤が、ADRにより誘導された、系球体傷害および尿細管間質性傷害の進行を防止することの証拠を提示する。さらに、この分子は、腎機能を保存する。

40

【0330】

実施例14：マウスにおけるイミキモド誘導性乾癬に対する、JNK阻害剤の評価

TLR7およびTLR8のリガンドであるイミキモド（IMQ）は、強力な免疫応答修飾剤である。IMQは、強力な抗ウイルス効果および抗腫瘍効果について、多くの動物モデルにおいて裏付けられている。Van der Fitsら（The Journal of Immunology、2009年、182巻、5836～5845頁）は、BALB/cマウスにおけるIMQの局所適用は、乾癬を誘導し、これは、ヒト乾癬病変に酷似することを裏付けた。

50

【 0 3 3 1 】

方法

雌BALB/cAnNCr1マウス(Charles River、研究開始時に8～10週齢)を、以下の群(処置スケジュール)へと割り当てた。

【 0 3 3 2 】

【表9】

群	用量 (mg/kg)	用量 の容 量 (ml/kg)	調製物 濃度 (mg/ml)	投薬期間 (日数)	調製頻度	経路	動物数
ビヒクル	N/A	5	N/A	1、4、7日目	1、4、7日目	IV	8
配列番号172	0.02	5	0.004	1、4、7日目	1、4、7日目	IV	8
配列番号172	0.2	5	0.04	1、4、7日目	1、4、7日目	IV	8
配列番号172	2	5	0.4	1、4、7日目	1、4、7日目	IV	8
プレドニゾロン	10	10	1	7	毎日	PO	8
デキサメタゾン	0.5	5	0.1	1、4、7日目	1、4、7日目	IV	6

10

20

【 0 3 3 3 】

加えて、5匹の動物による群は、処置しなかった(「ナイーブ」群)。

【 0 3 3 4 】

IMQの局所適用により誘導された皮膚炎症が、乾癬に特徴的な構造的特徴を随伴するのかどうかを裏付けるために、IMQクリーム(5%のイミキモドクリーム約62.5mg)を、BALB/cマウスの背部の剃毛された皮膚および右耳に、連続6日間にわたり(2～7日目に)適用した。

【 0 3 3 5 】

この実験では、2つの陽性対照を利用した。第一に、10mg/kg(ビヒクル：純水中に1%のヒドロキシエチルセルロース、0.25%のポリソルベート80、および0.05%の消泡剤)のプレドニゾロンを、毎日経口投与した(「プレドニゾロン」群)。第二に、1、4、および7日目に、デキサメタゾンを、0.5mg/kg(ビヒクル：0.9%の滅菌NaCl)で、静脈内経路を介して投与した。

30

【 0 3 3 6 】

配列番号172のJNK阻害剤(「配列番号172」)は、0.9%のNaCl中に溶解させた。3つの異なる用量(上記の群分け表を参照されたい)を施すため、これを段階希釈した(1:10)。配列番号172のJNK阻害剤はたやすく溶け、溶液から析出しなかった。3つの異なる用量(0.02、0.2、および2mg/kg)の配列番号172のJNK阻害剤を、1、4、および7日目に、それぞれの群へと静脈内投与した。

40

【 0 3 3 7 】

8日目に、動物を屠殺し、組織(耳)を、10%の中性緩衝ホルマリン中で固定した。組織病理学のために、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色された切片(横切り)を調製し、全ての動物から回収された組織に対して、顕微鏡による評価を実施した。組織病理学のための方法およびこれについてのエンドポイントも、炎症、表皮過形成、表皮角質増殖症(角化不全症ではない)の重症度グレードについて観察および記録した、van der Fits(2009年)の論文において同様に記載されており、これにより、Vander Fitsら(The Journal of Immunology、2009年、182巻、5836～5845頁)からのそれぞれの方法論は、参照により本明細

50

書に組み込まれる。続発性炎症過程（全層表皮潰瘍）を伴う動物の皮膚または耳についての組織病理学のグレード付けスコアは除外した。スコアは、群ごとに平均し、標準偏差および統計学的有意性を計算した。図41のグラフは、群平均（+/-）標準偏差（SD）を示す。ホルマリンで固定され、パラフィン中に包埋された皮膚であって、マウス（BALB/c）の背部表面に由来する皮膚を、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染料で染色し、顕微鏡で評価した。上記の参考文献との重要な差違であって、本研究の観察をより詳細に記載する差違は、角質増殖症は、具体的に、正常角化性（核が保持されない）角質増殖症または角化不全性（核が保持された）角質増殖症と規定することができる。いずれもが、多様な解剖学的位置において、かつ、種に応じて、正常に生じうるが、いずれの状態も、特定の疾患状態において十分に規定される。van der Fits論文は、彼らのイミキモド（IMQ）誘導性乾癬モデルを、ヒト状態において見られる角化不全性角質増殖症と類似する、角化不全性角質増殖症を引き起こすものとして記載しており、これは、本研究の規定されたエンドポイントであった。しかし、Danilenkoら（Veterinary Pathology、2008年、45巻：563頁）は、多くの齧歯動物乾癬モデルが、正常角化性角質増殖症を有することを示した。実際、同じ病変が、場合によって、いずれの種類の角質増殖症も呈示する可能性があり、本研究における齧歯動物は主に、正常角化性角質増殖症を有し、まれに多巣性角化不全症を伴った。エンドポイントのグレード付けのために、より一般的な用語である「角質増殖症」を使用した。本文中には、いずれの種類（主に正常角化性）が見られたのかを記載する。van der Fits論文との別の差違は、van der Fitsらが、ヒト患者を、表皮の顆粒層内の顆粒化が減殺されているものとして記載している（そして、van der Fitsらの研究では、齧歯動物の皮膚も同様であると報告されている）のに対し、本研究およびDanilenkoによる総説では、乾癬の多くの齧歯動物モデルにより、この層内の顆粒化が増大（顆粒層肥厚）しているか、または層自体が過形成性であると呈示されていることである。

【0338】

顕微鏡による組織病理学のエンドポイントは、以下の通りにグレード付けした。

- 1 = MI = 最小限
- 2 = SL = 軽度
- 3 = MO = 中等度
- 4 = MA = 顕著
- 5 = SE = 重度。

【0339】

結果

配列番号172のJNK阻害剤の中程度用量群（統計学的に有意）および配列番号172のJNK阻害剤の高用量群は、耳の炎症を、ビヒクル-IMQ用量群と比較して減殺した（図41）。また、陽性対照群、すなわち、プレドニゾロン群およびデキサメタゾン群も、ビヒクル-IMQ用量群と比較した、耳の炎症の減殺を示した（いずれも統計学的に有意、図41）。一般に、真皮内に存在する炎症は、少数の好中球と混在した、リンパ球およびマクロファージからなった。それほど一般的ではない表皮内の炎症は主に、好中球性であり、角質層（正常角化層の）内およびマンロー微小膿瘍としての表皮内に存在した。ナイーブ群では、炎症は存在しなかった。

【0340】

耳の表皮過形成の最小限の減殺はまた、プレドニゾロン群およびデキサメタゾン群について観察される減殺をわずかに下回る、配列番号172のJNK阻害剤の中程度用量群についても観察された。配列番号172のJNK阻害剤の中程度用量群およびプレドニゾロン群における耳の表皮過形成は、ビヒクル-IMQ用量群を下回ったが、統計学的に有意ではなかった。いかなる明白な差違も、耳の表皮角質増殖症に関して、配列番号172のJNK阻害剤で処置された場合の用量反応関係としては呈示されなかったが、配列番号172のJNK阻害剤の低用量群、プレドニゾロン群、およびデキサメタゾン群は、平均グ

リードを、ビヒクル - I M Q 用量群と比較して最小限低下させた。ナীব群は、顕微鏡では正常であった。

【 0 3 4 1 】

実施例 1 5 : J N K 阻害剤の、腎虚血 / 再灌流病変に対する効果

本研究の目的は、配列番号 1 7 2 の J N K 阻害剤の、ラットにおける実験的腎虚血症に対する影響について調査することである。

【 0 3 4 2 】

この目的のために、雄 W i s t a r ラット (5 ~ 6 週齡、C h a r l e s R i v e r) 2 6 匹を、以下の群へと割り当てる。

【 0 3 4 3 】

【表 1 0 】

群番号	前処置 (クランピングの 1時間前)	処置 (クランピングの 1時間後)	用量の容量 /投与経路	濃度	腎虚血 時間 (分)	動物数
1	ヘパリン (5000 UI/kg)	NaCl 0.9%	2 ml/kg, IV	0		6
2	ヘパリン (5000 UI/kg)	配列番号172の JNK阻害剤 2000 µg/kg	2 ml/kg, IV	1 mg/ml	40	10
3	ヘパリン (5000 UI/kg)	NaCl 0.9%	2 ml/kg, IV	0	40	10

【 0 3 4 4 】

腎虚血症は、両方の腎茎 (r e n a l p e d i c l e) を、非外傷性クランプでクランピングすることにより誘導する (腎症の誘導) 。 1 単位用量の配列番号 1 7 2 の J N K 阻害剤 (2 0 0 0 µ g / k g) を、 0 日目の、両方の腎茎に非外傷性クランプを伴うクランピング時間の 1 時間後 (再灌流後) に、尾静脈へと静脈内 (I V) 投与する。投与容量は、 2 m l / k g とする。ヘパリン (5 0 0 0 U I / k g) を、クランピングの 1 時間前に、腹腔内投与する。

【 0 3 4 5 】

各日において、全ての動物の全般的挙動および外見を観察する。動物の健康が、研究の継続に適合しない場合 (瀕死の動物、異常で重要な体重の喪失、物質の無視できない非耐容性など . . .) は、動物を、研究責任者の責任下、倫理的に屠殺する。個々のラットを、代謝ケージ (T e c h n i p l a s t , F r a n c e) 内に収容する。尿は、 2 4 時間ごとに 7 2 時間まで回収する。血液試料は、尾静脈から、再灌流の前、次いで、再灌流の 2 4 および 7 2 時間後に得る。両方の時間の終点 (2 4 および 7 2 時間) に、群 1 つ当たりの 5 匹ずつのラット (群 1 については 3 匹) を屠殺する。動物を屠殺した後で、両方の腎臓を回収する。各時点 (再灌流の 2 4 および 7 2 時間後) において、群 1 つ当たりの 5 匹ずつのラット (群 1 については 3 匹) を使用する。腎機能进行评估するため、血清中クレアチニン濃度 (µ m o l / m l) または尿素濃度 (m m o l / m l) を、適切なキット (B a y e r H e a l t h c a r e A G , L e v e r k u s e n , G e r m a n y) で測定する。タンパク尿症およびアルブミン尿症进行评估するため、タンパク尿症およびアルブミン尿症について、A d v i a C h e m i s t r y 1 6 5 0 (B a y e r H e a l t h c a r e A G , L e v e r k u s e n , G e r m a n y) の適切なキットを使用してアッセイする。

【 0 3 4 6 】

再灌流の 2 4 および 7 2 時間後において、組織学的病変の評価を実施する。光学顕微鏡法のために、腎臓を、D u b o s q - B r a z i l 中で、 1 6 時間にわたりインキュベ

トし、脱水し、パラフィン内に包埋し、切片へと切り刻み、ヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）試薬または過ヨウ素酸シッフ（PAS）試薬で染色する。各染色について、3つの切片を解析する。

【0347】

免疫組織化学解析のために、腎臓試料を、Dubosq Brazil中で、16時間にわたり固定し、その後、脱水し、パラフィン内に包埋する。抗原回復は、スライドを、500Wのマイクロウェーブオーブン内で沸騰させた0.01Mのクエン酸緩衝液中に、15分間にわたり浸漬することにより実施する。内因性ペルオキシダーゼ活性は、メタノール中に0.3%のH₂O₂で、30分間にわたりブロッキングする。スライドを、アビジン-ビオチン溶液からなるブロッキング試薬と共に30分間にわたりインキュベートし、通常のブロッキング血清中で20分間にわたりインキュベートする。免疫検出のために、スライドを、抗体と共に、一晩にわたりインキュベートし、次いで、ビオチン化二次抗体と共にインキュベートする。アビジン-ビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体（Vectastain ABC Reagent、Vector Laboratories；Burlingame、CA）および免疫反応を視覚化するための色素原としての3,3'-ジアミノベンジジン（Sigma Biochemicals；St Louis、MO）を適用する。スライドは、ヘマトキシリンで対比染色する。一次抗体の非適用を、陰性対照と考える。

10

【0348】

10分間アセトン中で固定し、室温で30分間にわたり空気乾燥し、次いで、PBS中で3分間にわたりインキュベートし、PBS中に1%のBSAでブロックした腎臓組織の4mm厚のクライオスタット切片に対して、免疫蛍光による標識化を実行する。切片を、表示の抗体と共に、室温で1時間にわたりインキュベートし、PBS中で洗浄し、Texas Redを結合体化させた二次抗体と共にインキュベートする。切片は、免疫蛍光解析のために、蛍光顕微鏡法（Zeiss）で検討する。

20

【0349】

有足突起の損傷、炎症、および腎線維症に特異的な複数のマーカーの発現（RelA、TGF、TNFマッソントリクローム）を、免疫組織化学および免疫蛍光により評価する。腎臓内のTNF IL6、CXCL1（KC）、CXCL2（MIP-2）、およびMCP1についての定量的転写プロファイルを決定する。

30

【0350】

実施例16：JNK阻害剤の、ラット歯周炎モデルにおける炎症応答に対する阻害効果
本研究の目的は、配列番号172のJNK阻害剤の、ラットの歯周炎モデルにおいて誘導される炎症に対する影響について調査することである。

【0351】

本研究では、30匹のラットを使用する（10匹ずつのラットによる4つの群へと分ける）。実験的歯周炎は、0日目において、第一大臼歯（動物1匹当たり1本の第一大臼歯）の周囲に結紮を施すことにより誘導する。2または4mg/kgの単回用量を歯肉内（IGV）に投与する。

【0352】

下記の表は、無作為割付けをまとめる。

40

【0353】

【表 1 1】

群番号	結紮 (0日目)	処置	投与経路	動物数
1	-	-	IGV	10
2	あり	NaCl 0.9%	IGV	10
3	あり	配列番号172 2 または4mg/kg	IGV	10

【0354】

10

各日において、全ての動物の全般的挙動および外見を観察する。動物の健康が、研究の継続に適合しない場合（瀕死の動物、異常で重要な体重の喪失、物質の無視できない非耐容性など・・・）は、動物を、研究責任者の責任下、倫理的に屠殺する。歯周炎炎症の様態は、歯肉組織の肉眼的観察により解析する。プラーク指数および歯肉炎指数は、歯周臨床指数として測定する。

【0355】

20

約17日目において、動物を屠殺し、試料を回収する。炎症性細胞を評価するために、組織形態計測により、炎症性細胞の定量化を実施する。炎症性タンパク質レベルを評価するために、歯肉組織ホモジネートから炎症性タンパク質のレベル（p-JNK、TNF、IL-1、IL-10、MMP-8、MMP-9）を測定する。組織破壊を評価するために、放射線解析（マイクロCT）により、群1つ当たり3匹ずつの動物について、骨組織破壊を評価する。歯周複合体破壊は、組織学的解析により評価する。骨の微細構造を評価するために、骨の小柱測定値（厚さ、間隔）を、放射線解析（マイクロCT）により評価する。口腔内細菌を同定するため、歯周ポケット内の細菌集団を、9つの歯周病原体についてのDNAプローブ（リアルタイムPCR）により同定する。コラーゲンフレームワークについては、偏光顕微鏡法を使用して、総コラーゲン量の測定を実施する。コラーゲンI/コラーゲンIII比は、組織形態計測解析により評価する。

【図 14】

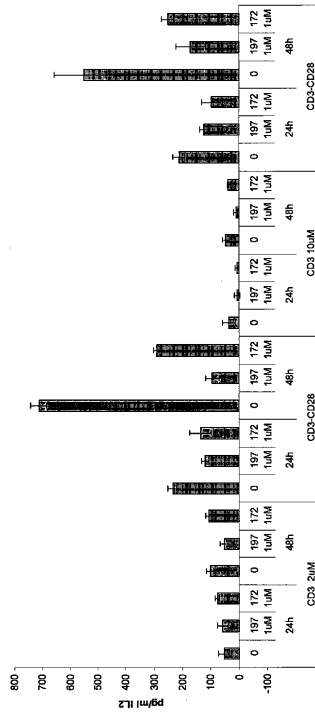


Fig. 14

【図 27】

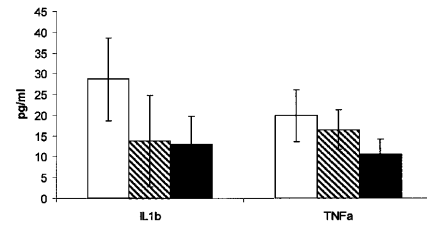


Fig. 27

【図 1 a】

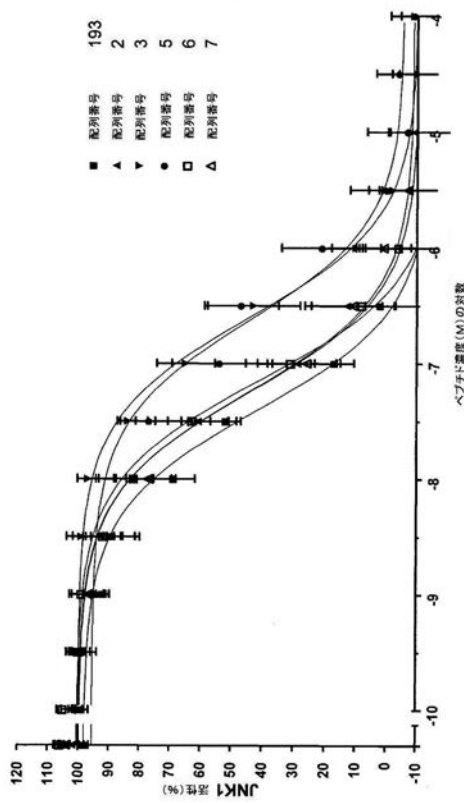


Fig. 1a

【図 1 b】

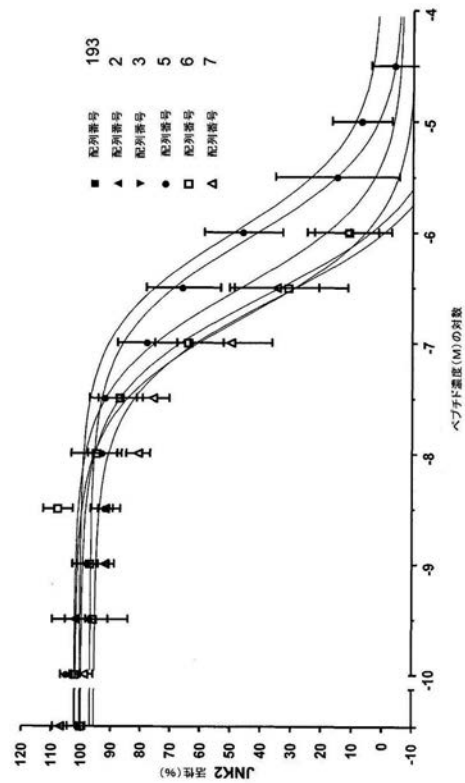


Fig. 1b

【 図 1 c 】

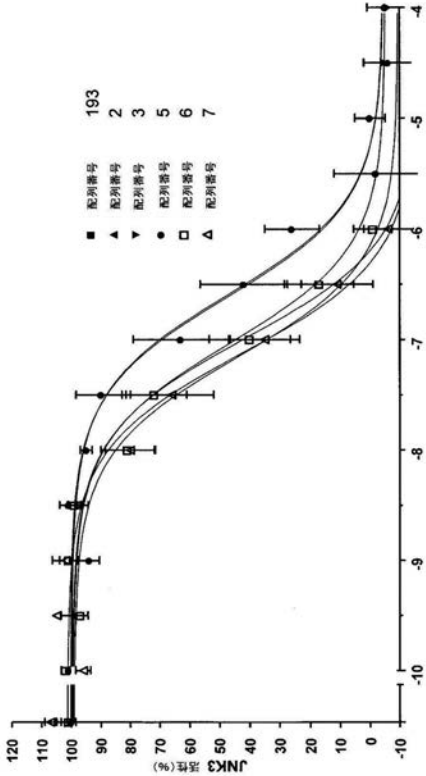


Fig. 1c

【 図 2 】

配列 番号	配列												hJNK1			hJNK2			hJNK3				
		NH2	R	P	K	R	P	T	T	L	N	L	F	CONH2	IC50	SEM	n	IC50	SEM	n	IC50	SEM	n
193		NH2	R	P	K	R	P	T	T	L	N	L	F	CONH2	38.52	0.57	2	183.85	50.45	2	67.68	13.92	2
2		NH2	r	P	K	R	P	T	T	L	N	L	F	CONH2	65.55	26.03	3	423.53	241.45	3	103.32	36.53	3
3		NH2	R	P	K	R	P	T	T	L	N	L	F	CONH2	311.63	99.86	4	1213.53	437.87	4	359.47	161.02	4
5		NH2	R	P	K	R	P	T	T	L	N	L	F	CONH2	347.55	174.17	4	1501.88	701.33	4	387.15	179.51	4
6		NH2	R	P	K	R	P	T	T	L	N	L	F	CONH2	90.50	29.63	4	358.75	105.28	4	119.50	39.82	4
7		NH2	R	P	K	R	P	T	T	L	N	L	F	CONH2	68.53	21.75	4	278.18	51.43	4	88.97	26.72	4

Fig. 2

【 図 3 a 】

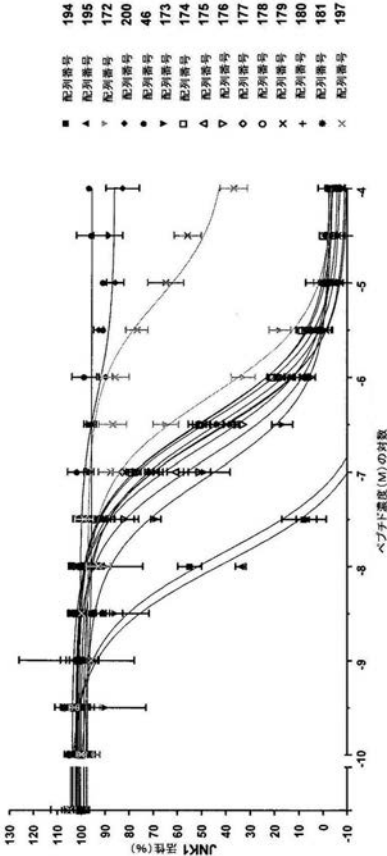


Fig. 3a

【 図 3 b 】

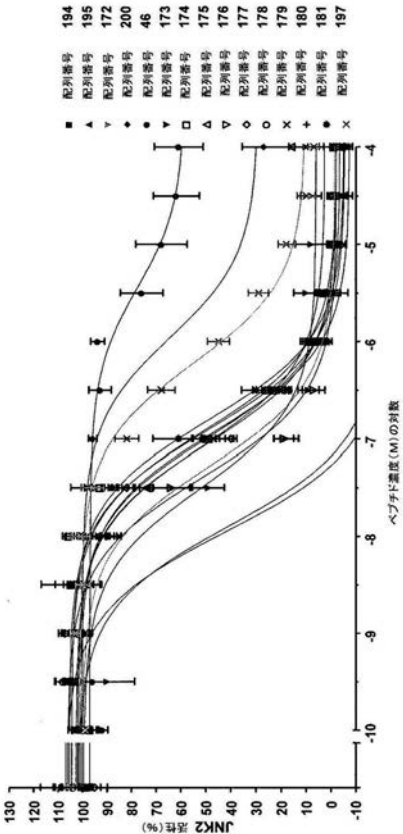


Fig. 3b

【図 3 c】

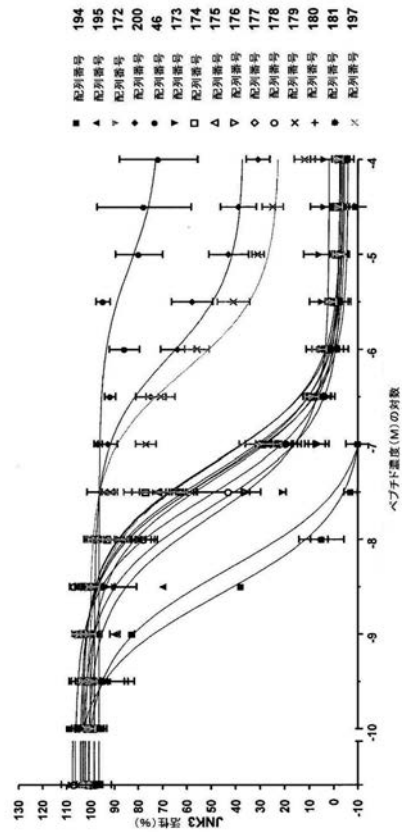


Fig. 3c

【図 3 d】

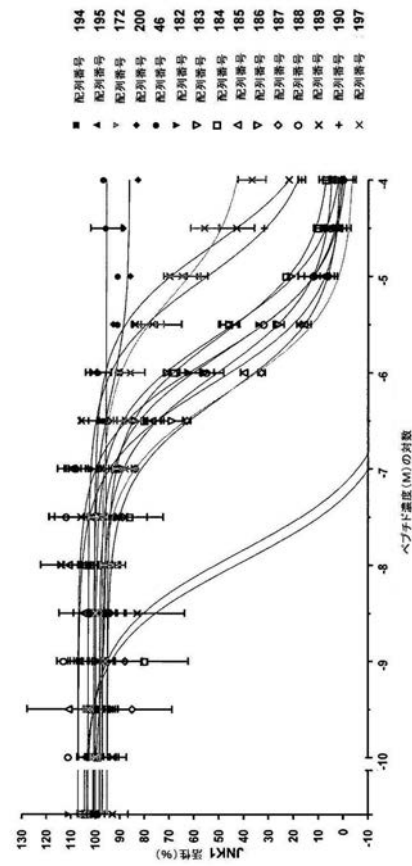


Fig. 3d

【図 3 e】

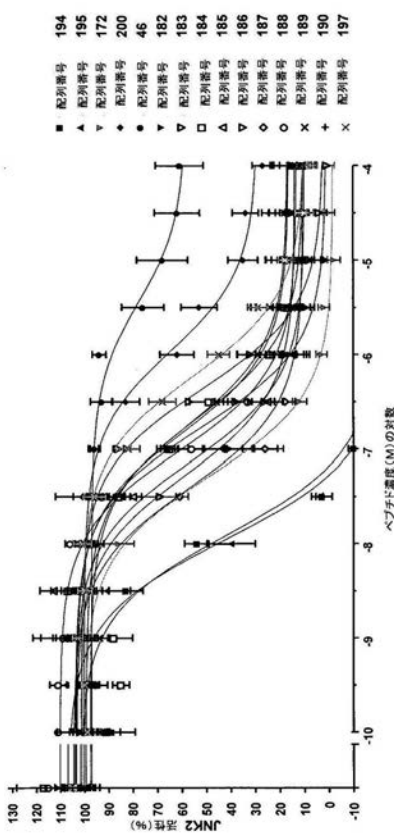


Fig. 3e

【図 3 f】

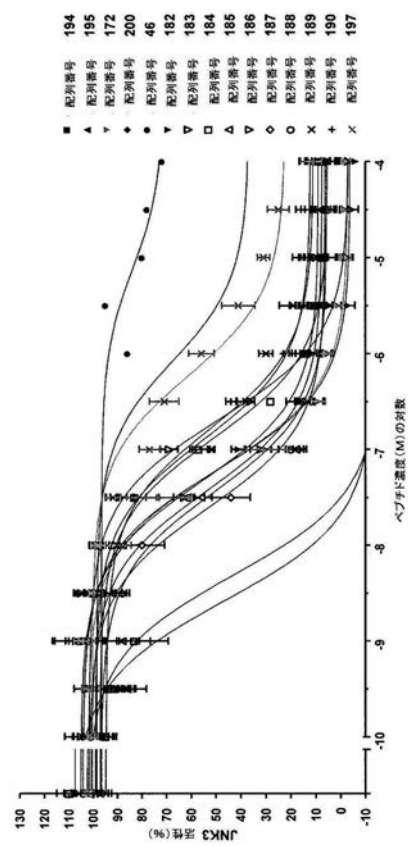


Fig. 3f

【図 4】

配列番号	配列	hJNK1			hJNK2			hJNK3		
		IC50	SEM	n	IC50	SEM	n	IC50	SEM	n
196	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	42.20	6.17	8	8.43	2.01	8	5.22	0.71	8
197	hJNK2: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	2438.00	10019.91	8	801.77	114.66	11	1264.24	255.51	11
198	hJNK3: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	13.86	0.86	2	12.70	0.46	2	2.59	0.08	2
199	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	10.77	1.83	2	11.26	0.56	2	4.92	0.27	2
200	hJNK2: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	722.40	174.58	7	54.66	13.94	7	102.32	47.81	7
201	hJNK3: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	NA	NA	6	3324.00	2469.99	6	3820.81	3190.08	6
202	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	NA	NA	3	5340.33	1803.08	3	830.66	523.73	3
203	hJNK2: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	88.36	4.02	2	30.03	0.16	2	18.78	2.03	2
204	hJNK3: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	333.70	36.46	3	120.13	4.53	3	60.12	6.04	3
205	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	165.30	18.10	3	82.30	9.26	3	60.60	6.01	3
206	hJNK2: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	131.17	12.28	3	40.33	4.60	3	22.38	1.00	3
207	hJNK3: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	315.10	34.02	3	87.20	7.12	3	45.38	6.70	3
208	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	328.33	12.26	3	108.60	42.64	3	30.41	5.81	3
209	hJNK2: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	284.47	22.35	3	122.11	20.73	3	45.68	3.79	3
210	hJNK3: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	265.20	34.65	3	117.65	10.58	3	46.89	8.21	3
211	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	283.70	9.79	3	160.22	40.13	3	47.58	5.77	3
212	hJNK2: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	167.90	34.60	2	168.40	20.80	2	59.36	2.35	2
213	hJNK3: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	268.00	484.00	2	407.30	25.00	2	199.20	3.90	2
214	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	2438.00	129.00	2	205.85	8.25	2	129.45	9.05	2
215	hJNK2: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	785.66	78.15	2	72.89	2.85	2	35.52	8.34	2
216	hJNK3: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	1021.30	100.70	2	52.59	2.73	2	44.24	4.80	2
217	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	584.45	40.45	2	37.88	5.47	2	25.41	8.05	2
218	hJNK2: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	1421.00	98.00	2	98.14	27.28	2	36.12	2.48	2
219	hJNK3: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	2270.00	590.00	2	175.60	1.30	2	127.72	31.88	2
220	hJNK1: GRKKRRRPPPPKRPPTTLNLFPGVPRSSQ	8989.50	2070.50	2	148.20	9.70	2	159.35	13.45	2

Fig. 4

【図 5】

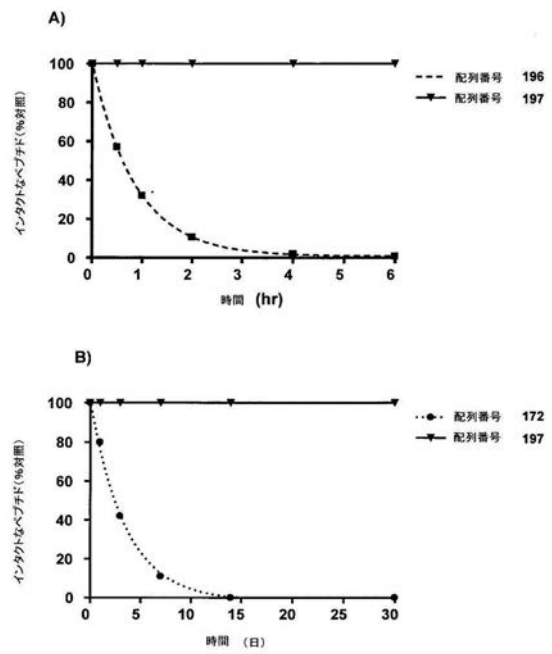


Fig. 5

【図 6 a】

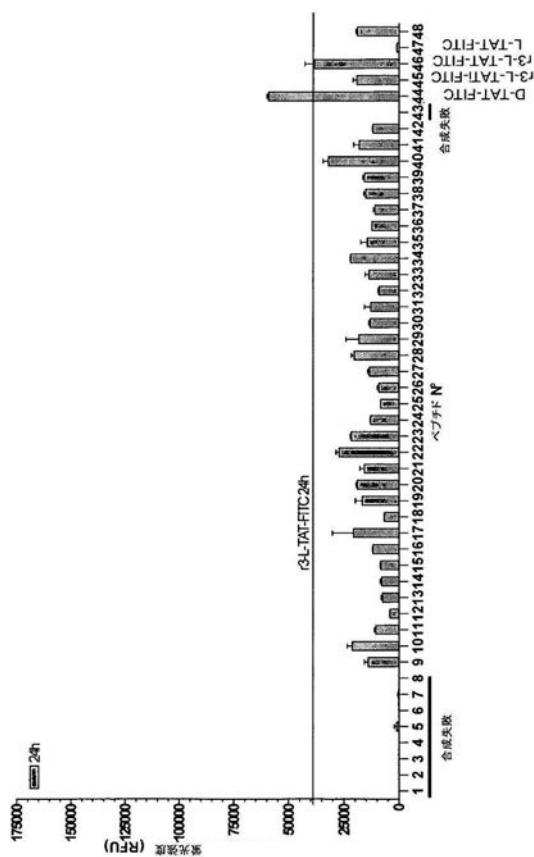


Fig. 6a

【図 6 b】

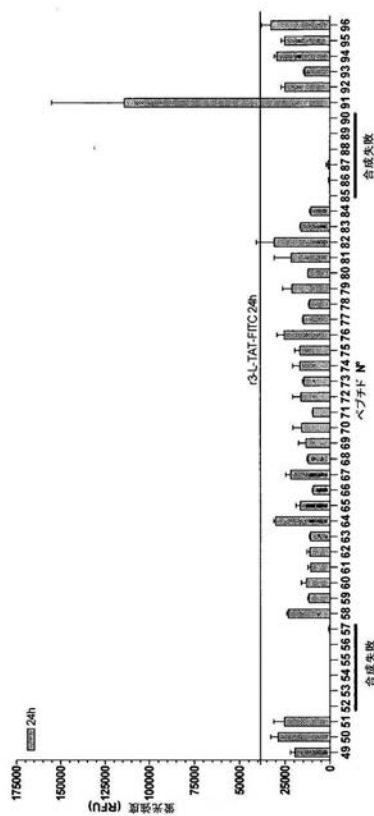


Fig. 6b

【 図 8 】

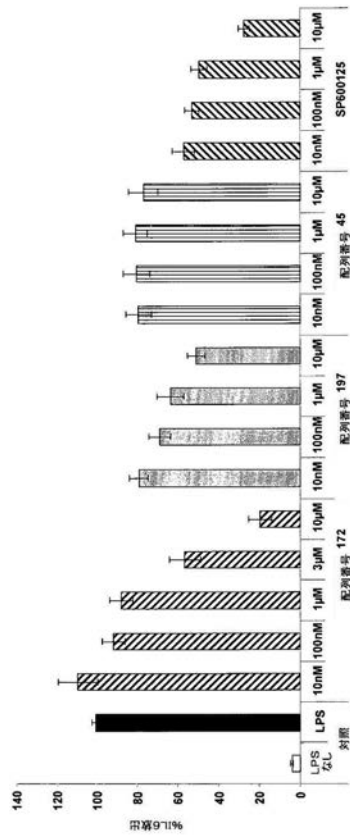


Fig. 8

【 ㄨ 1 0 】

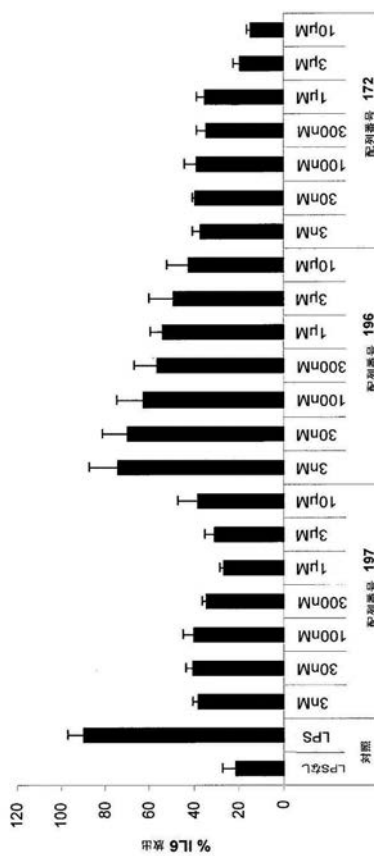


Fig. 10

【 図 1 1 】

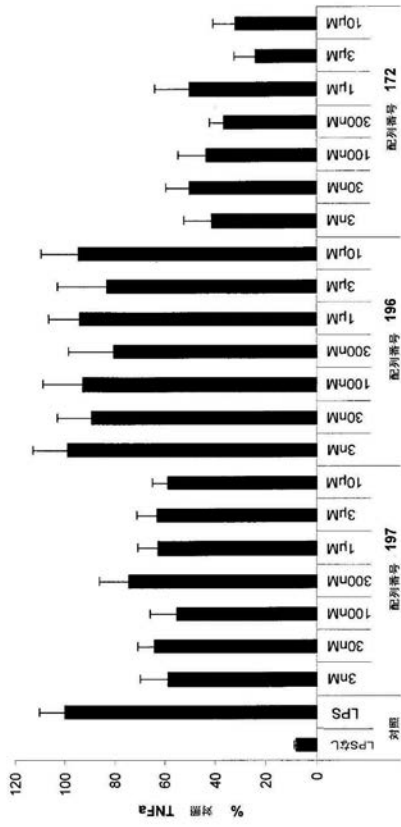


Fig. 11

【 図 1 3 】

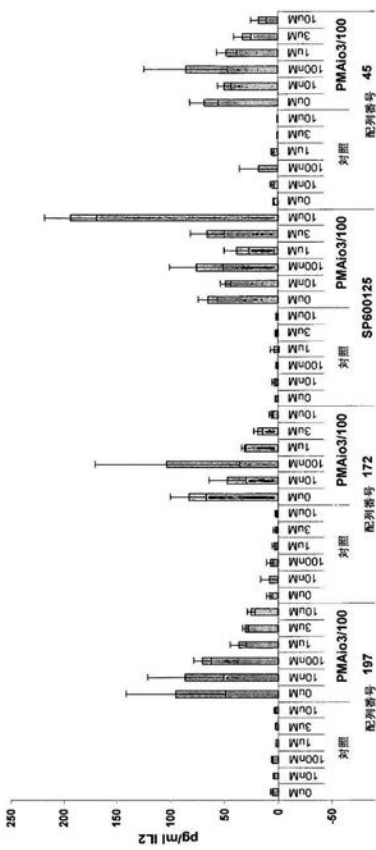


Fig. 13

【 図 1 2 】

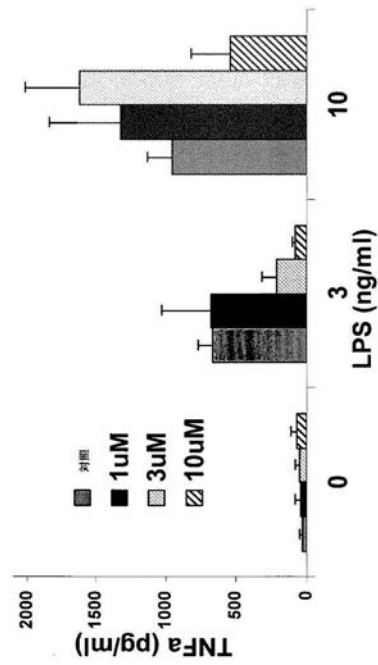


Fig. 12

【 図 1 5 】

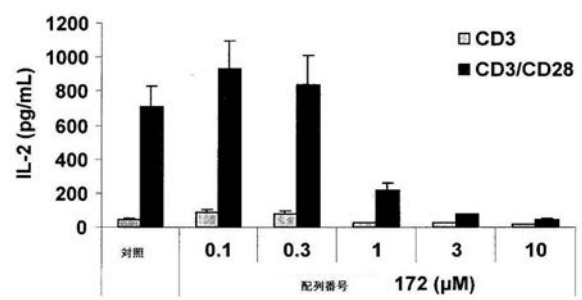


Fig. 15

【 図 1 6 】

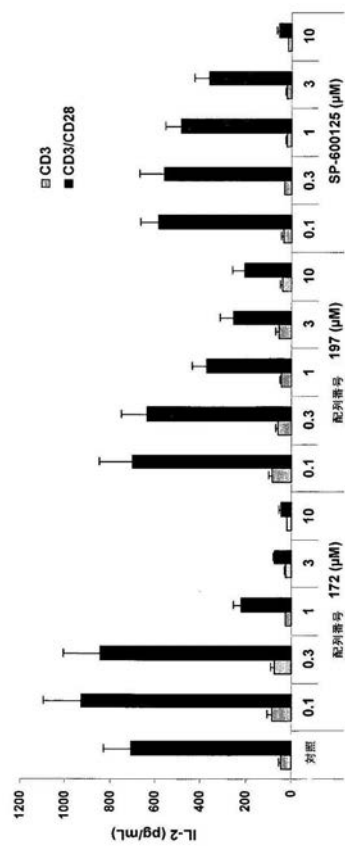


Fig. 16

【 図 1 8 】

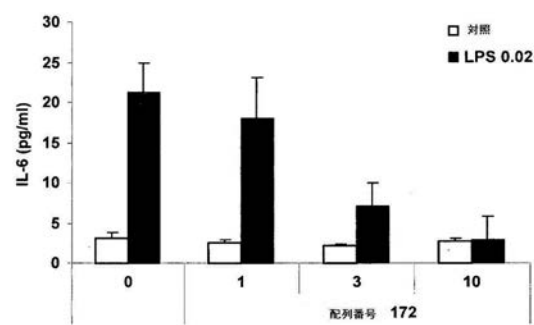


Fig. 18

【 図 1 7 】

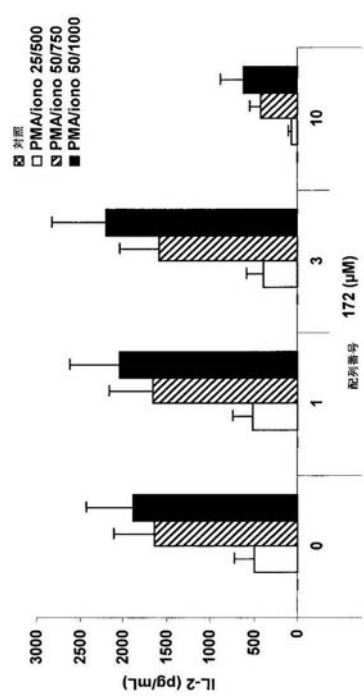


Fig. 17

【 図 1 9 】

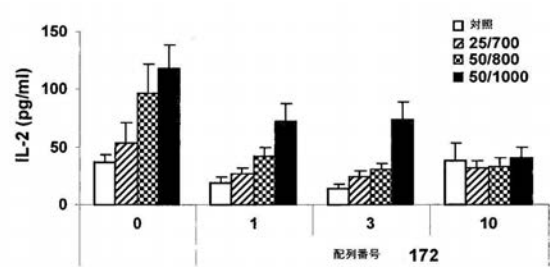


Fig. 19

【 図 2 0 】

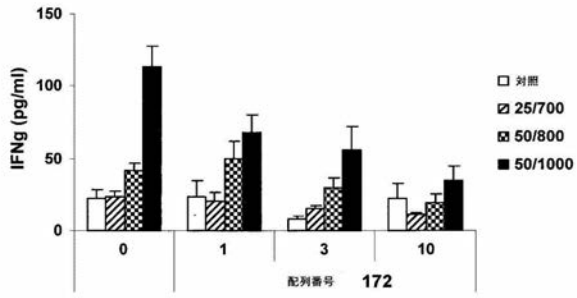


Fig. 20

【 図 2 1 】

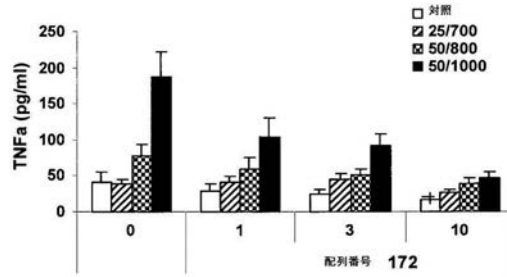


Fig. 21

【 図 2 2 】

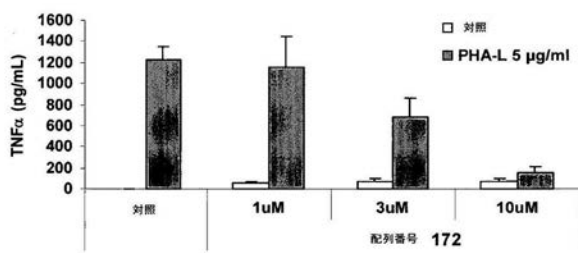


Fig. 22

【 図 2 3 】

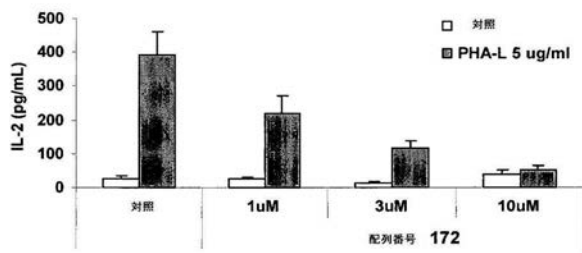


Fig. 23

【図 2 4】

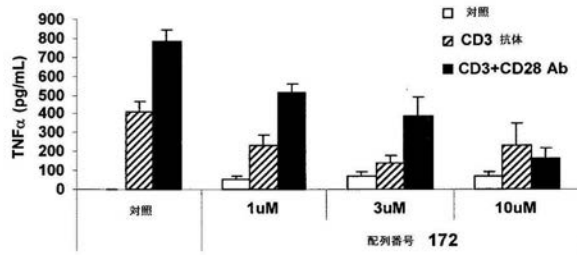


Fig. 24

【図 2 5】

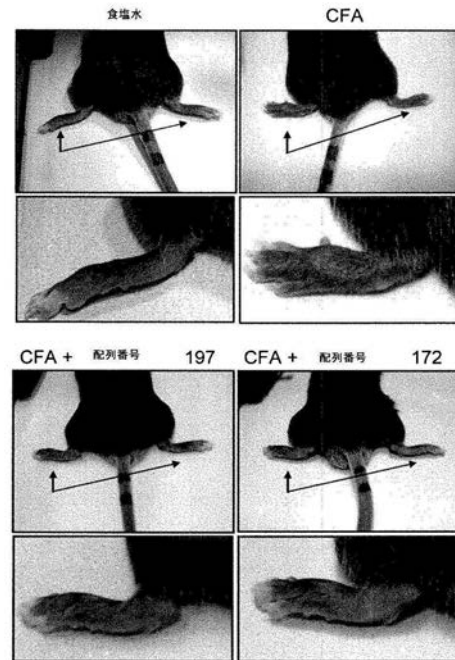


Fig. 25

【図 2 6】

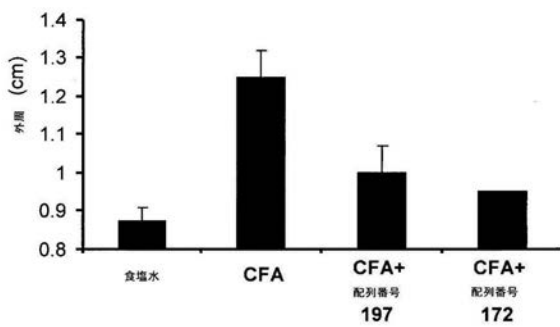


Fig. 26

【図 2 8】

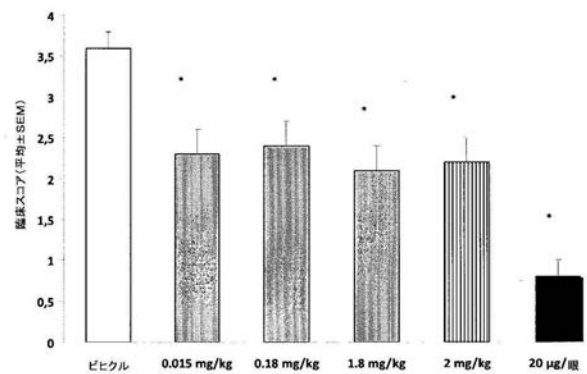


Fig. 28

【図 29】

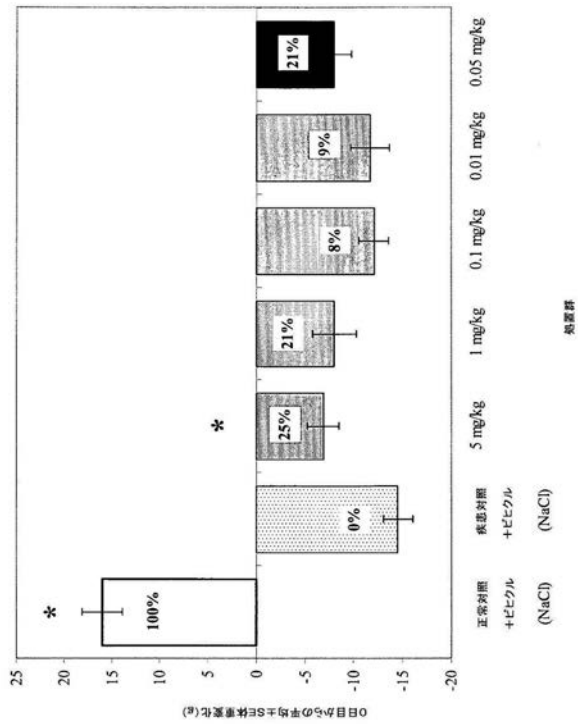


Fig. 29

【図 30】

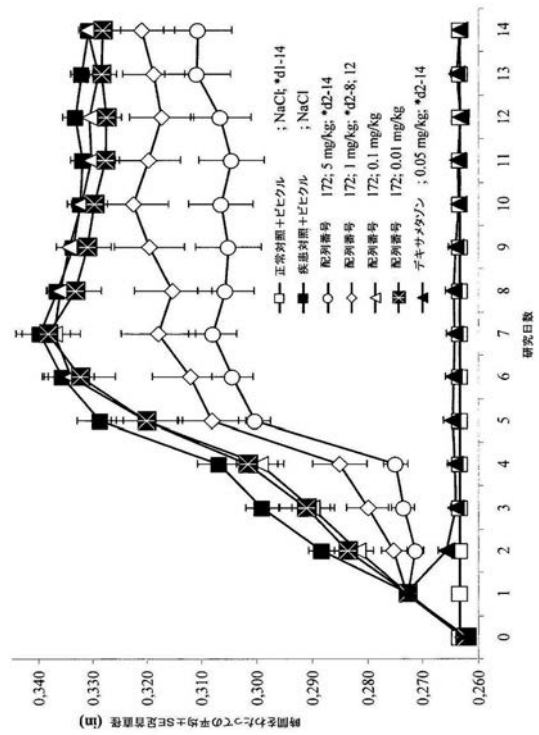


Fig. 30

【図 31】

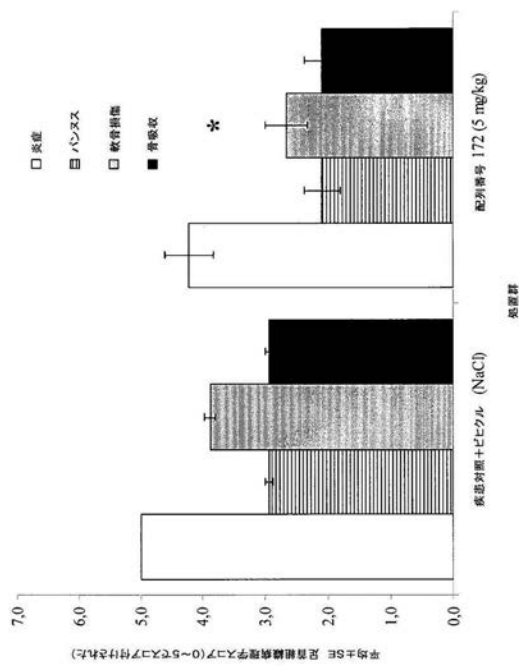


Fig. 31

【図 32】

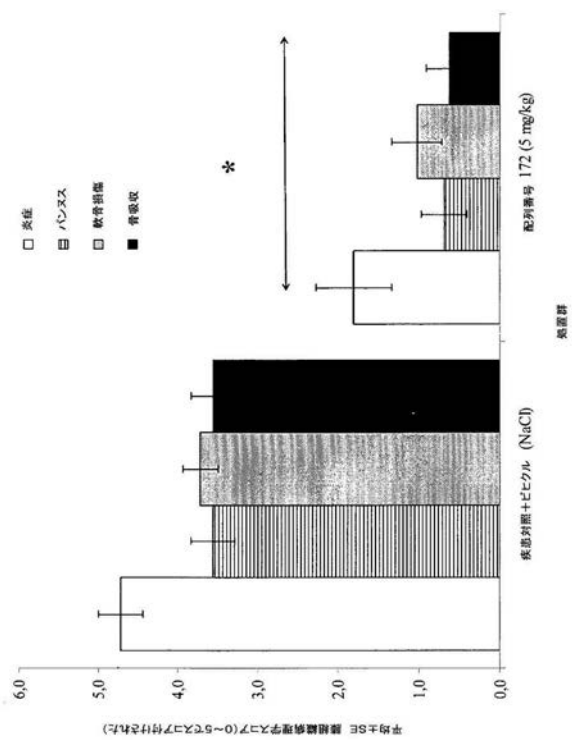


Fig. 32

【図 3 3】

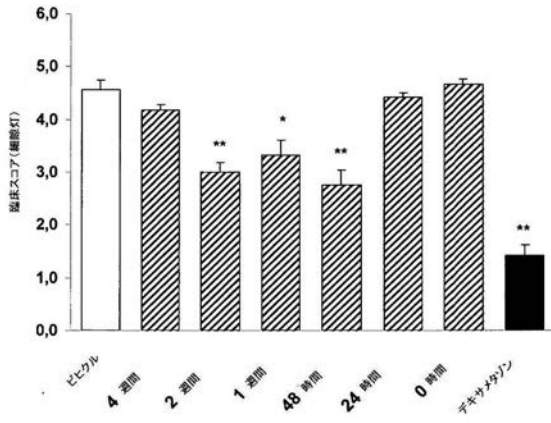


Fig. 33

【図 3 4】

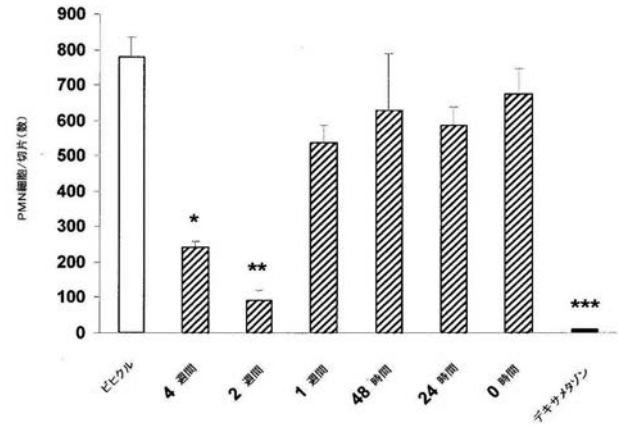


Fig. 34

【図 3 5】

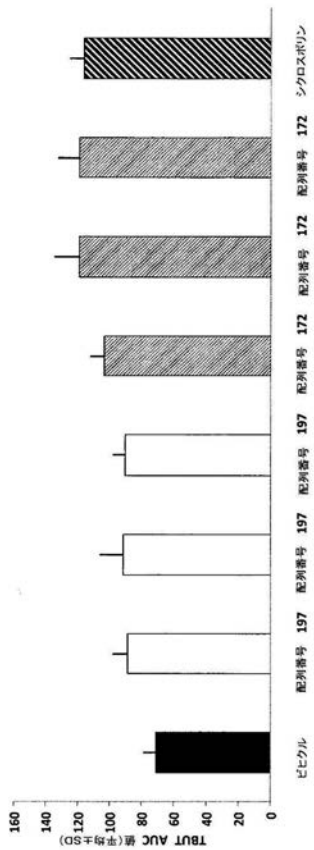


Fig. 35

【図 3 6】

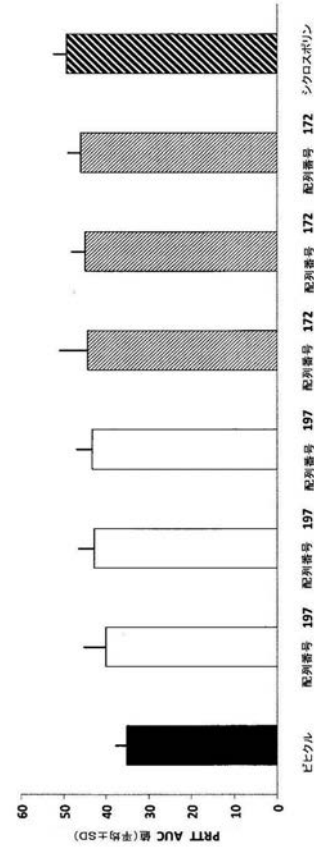


Fig. 36

【図 37】

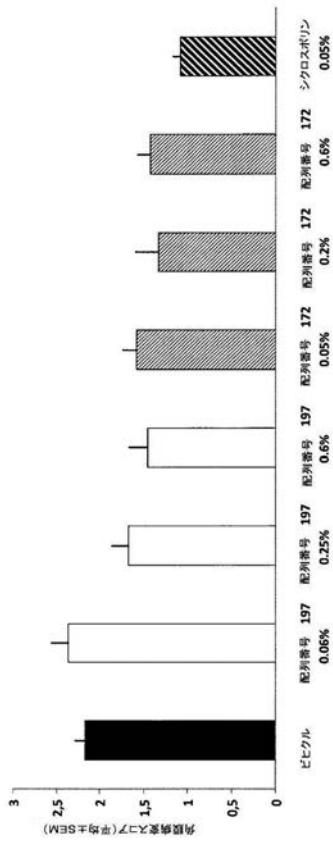
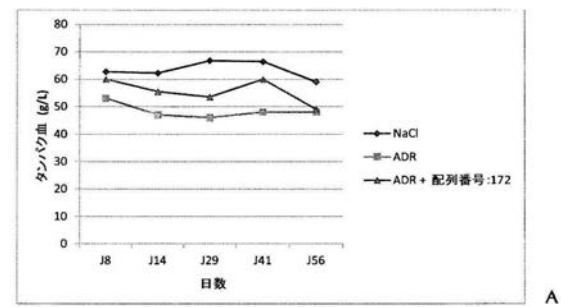
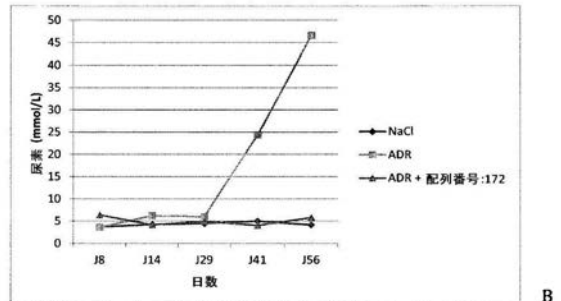


Fig. 37

【図 38】



A



B

Fig. 38

【図 39】

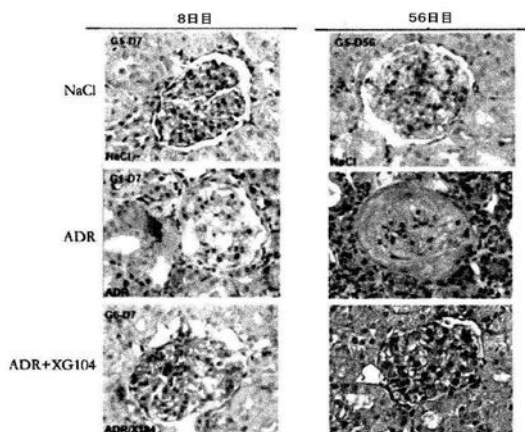


Fig. 39

【図 40】

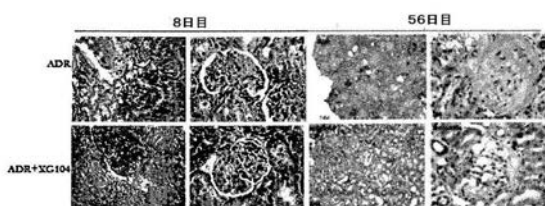


Fig. 40

【図 4 1】

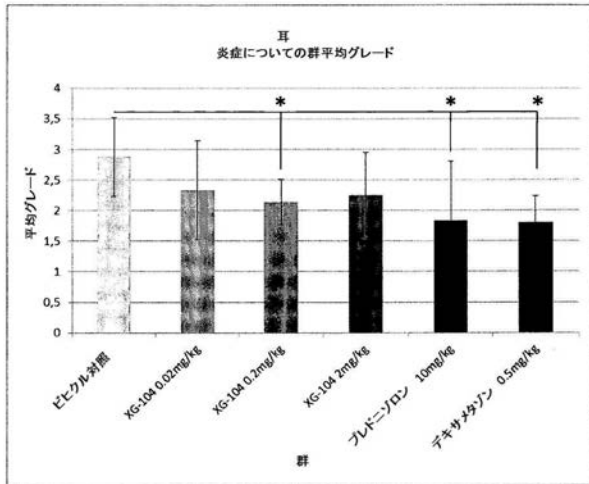


Fig. 41

【配列表】

2016523275000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/001737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/47 A61K38/03
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/143865 A1 (XIGEN SA [CH]; BONNY CHRISTOPHE [CH]) 3 December 2009 (2009-12-03) page 11; table 1; sequences 17,39,47 -----	1-13, 16-38
X	WO 2011/160653 A1 (XIGEN SA [CH]; BONNY CHRISTOPHE [CH]) 29 December 2011 (2011-12-29) the whole document	1-13, 16-38
Y	----- WO 2007/031280 A2 (XIGEN SA [CH]; BONNY CHRISTOPHE [CH]) 22 March 2007 (2007-03-22) cited in the application page 43 - page 44; claim 20 -----	1-13, 16-38
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 September 2014

Date of mailing of the international search report

09/12/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weinberg, Suzanna

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/001737

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2013/091670 A1 (XIGEN SA [CH]; COMBETTE JEAN-MARC [FR]; DELOCHE CATHERINE [CH]) 27 June 2013 (2013-06-27) the whole document	1-13, 16-38
X,P	WO 2013/091896 A1 (XIGEN INFLAMMATION LTD; COMBETTE JEAN-MARC [FR]; DELOCHE CATHERINE [CH]) 27 June 2013 (2013-06-27) the whole document	1-13, 16-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/001737**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-13(completely); 16-38(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/001737

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009143865 A1	03-12-2009	AR 070864 A1	12-05-2010
		AU 2009253346 A1	03-12-2009
		CA 2725545 A1	03-12-2009
		CN 102112149 A	29-06-2011
		CN 104147591 A	19-11-2014
		DK 2296684 T3	25-03-2013
		DK 2489361 T3	30-06-2014
		DK 2491942 T3	13-01-2014
		EP 2296684 A1	23-03-2011
		EP 2489361 A1	22-08-2012
		EP 2491942 A1	29-08-2012
		EP 2650007 A1	16-10-2013
		EP 2650008 A1	16-10-2013
		ES 2400988 T3	16-04-2013
		ES 2443347 T3	19-02-2014
		ES 2481915 T3	31-07-2014
		HK 1150305 A1	16-05-2013
		HK 1174839 A1	11-07-2014
		HK 1175102 A1	07-02-2014
		JP 5485265 B2	07-05-2014
		JP 2011524861 A	08-09-2011
		JP 2014111646 A	19-06-2014
		PT 2489361 E	29-05-2014
		PT 2491942 E	23-12-2013
		US 2011183888 A1	28-07-2011
		WO 2009143865 A1	03-12-2009
		WO 2009144037 A1	03-12-2009
WO 2011160653 A1	29-12-2011	AU 2011269329 B2	13-03-2014
		CA 2798100 A1	29-12-2011
		CN 103025754 A	03-04-2013
		JP 2013538787 A	17-10-2013
		KR 20130037218 A	15-04-2013
		RU 2013102345 A	27-07-2014
		SG 185495 A1	28-12-2012
		US 2013172530 A1	04-07-2013
		WO 2011160653 A1	29-12-2011
		WO 2011160827 A2	29-12-2011
WO 2007031280 A2	22-03-2007	AU 2006291541 A1	22-03-2007
		BR P10616824 A2	05-07-2011
		CA 2621337 A1	22-03-2007
		CN 101263157 A	10-09-2008
		DK 1928903 T3	20-08-2012
		EA 200800680 A1	30-12-2008
		EP 1928903 A2	11-06-2008
		EP 2418217 A1	15-02-2012
		ES 2388076 T3	08-10-2012
		HK 1118841 A1	08-03-2013
		HR P20120598 T1	31-08-2012
		JP 5386169 B2	15-01-2014
		JP 2009507502 A	26-02-2009
		JP 2012095657 A	24-05-2012
		KR 20080052586 A	11-06-2008
		PT 1928903 E	02-07-2012
		RS 52379 B	31-12-2012
		SI 1928903 T1	28-09-2012
		US 2009305968 A1	10-12-2009

International Application No. PCT/ EP2014/ 001737

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-13(completely); 16-38(partially)

An inhibitor of c-Jun amino terminal kinase (JNK), wherein the inhibitor is a polypeptide defined according to the general formula X1-X2-X3-R-X4-X5-X6-L-X7-L-X8 wherein at least one of the amino acids selected from X1, X2, X3, X5, X7 and X8 is/are a D-amino acid (SEQ ID NO.1), or a sequence sharing at least 80% identity to SEQ ID NO.1 wherein the L-Arg at position 4 and the two L-leu at positions 8 and 10 are maintained and that at least one of the remaining amino acids in the sequence sharing at least 80% identity is a D-amino acid, for use in therapy.

2. claims: 14, 16-38(all partially)

A JNK inhibitor comprising an inhibitory peptide comprising the sequence SEQ ID NO.191 and a transporter sequence selected from SEQ ID NOs 31-34 and 46-151 for use in a method of treatment.

3. claims: 14, 16-38(all partially)

A JNK inhibitor comprising an inhibitory peptide comprising the sequence SEQ ID NO.192 and a transporter sequence selected from SEQ ID NOs 31-34 and 46-151 for use in a method of treatment.

4. claims: 14, 16-38(all partially)

A JNK inhibitor comprising an inhibitory peptide comprising the sequence SEQ ID NO.193 and a transporter sequence selected from SEQ ID NOs 31-34 and 46-151 for use in a method of treatment.

5. claims: 15-38(partially)

A JNK inhibitor comprising the sequence SEQ ID NO.194 for use in a method of treatment.

6. claims: 15-38(partially)

A JNK inhibitor comprising the sequence SEQ ID NO.195 for use in a method of treatment.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/001737

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2014200187 A1	17-07-2014
		WO 2007031098 A1	22-03-2007
		WO 2007031280 A2	22-03-2007
		ZA 200800848 A	27-05-2009

WO 2013091670 A1	27-06-2013	AU 2012359164 A1	29-05-2014
		CA 2855226 A1	27-06-2013
		CN 104080469 A	01-10-2014
		KR 20140108308 A	05-09-2014
		WO 2013091670 A1	27-06-2013
		WO 2013091896 A1	27-06-2013

WO 2013091896 A1	27-06-2013	AU 2012359164 A1	29-05-2014
		CA 2855226 A1	27-06-2013
		CN 104080469 A	01-10-2014
		KR 20140108308 A	05-09-2014
		WO 2013091670 A1	27-06-2013
		WO 2013091896 A1	27-06-2013

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	3/08	(2006.01)	A 6 1 P	3/08	
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/00	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/02	
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/14	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	27/12	(2006.01)	A 6 1 P	27/12	
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
			C 0 7 K	14/47	Z N A
			C 0 7 K	19/00	

(81)指定国

AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T

M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R
S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H
R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG
, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 コンベット, ジャン - マルク

フランス国 エフ - 7 4 1 4 0 サン セルグ, ルート ドゥ テレ, 5 1 5

(72)発明者 デローシュ, カトゥリーヌ

スイス国 ツェーハー - 1 2 0 7 ジュネーブ, アベニュー ウィリアム - ファヴル, 2 2

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA09 BA18 BA19 BA20 BA23 DC32 MA52 MA55
MA56 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA02 ZA061 ZA08
ZA12 ZA15 ZA16 ZA22 ZA33 ZA34 ZA36 ZA42 ZA45 ZA59
ZA66 ZA67 ZA70 ZA75 ZA81 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96 ZA97
ZB08 ZB11 ZB15 ZB22 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZC20 ZC35
ZC41
4H045 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA41 CA40 DA55 EA20
FA33 GA23