

(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2014-520147

(P2014-520147A)

(43) 公表日 平成26年8月21日 (2014. 8. 21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 7 6
A 6 1 P 1/04 (2006. 01)	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/4184 (2006. 01)	A 6 1 K 31/4184	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/423 (2006. 01)	A 6 1 K 31/423	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-517091 (P2014-517091)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月19日 (2012. 6. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月27日 (2013. 12. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/043150
 (87) 国際公開番号 W02012/177640
 (87) 国際公開日 平成24年12月27日 (2012. 12. 27)
 (31) 優先権主張番号 61/499, 044
 (32) 優先日 平成23年6月20日 (2011. 6. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512312727
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
 ザ レランド スタンフォード ジュニ
 ア ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 - 1 1 0 6
 カリフォルニア州 パロ・アルト エル・
 カミノ・リアル 1 7 0 5
 (74) 代理人 100082072
 弁理士 清原 義博
 (72) 発明者 ディライモンド, トーマス
 アメリカ合衆国 9 4 5 6 3 カリフォル
 ニア州 オリンダ ハイランド・コート
 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患における組織トランスグルタミナーゼ活性化の調節

(57) 【要約】

組織トランスグルタミナーゼ (T G 2) の生理的な活性化を調節するための組成物と方法が提供され、該方法は、腸の炎症性疾患に関連する T G 2 の活性化を阻害する工程を含み、腸の炎症性疾患は、セリアック病、過敏性腸症候群、クローン病、ヘルペス状皮膚炎などを含んでもよい。本発明の他の実施形態では、腸組織の望ましくない傍細胞輸送、とりわけ、5 0 0 m w よりも大きな分子 (例えば、限定されないが、免疫原性のグルテンペプチドを含むペプチド) の傍細胞輸送を減少させるための方法が提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体における組織トランスグルタミナーゼ (T G 2) の活性化を低下させる方法であって、

前記方法は、 T G 2 活性を低下させるための有効量で T G 2 活性化または活性を遮断する薬剤を前記個体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

T G 2 活性は腸の T G 2 活性である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

個体は炎症性の腸疾患を抱えている、ことを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

炎症性の腸疾患は、セリアックスブルー、疱疹状皮膚炎、過敏性腸症候群、および、クローン病から選択される、ことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

薬剤は P I 3 キナーゼを阻害する、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

薬剤は L Y 2 9 4 0 0 2 である、ことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

薬剤はチオレドキシンを阻害する、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

薬剤は表 1 で説明される化合物から選択される、ことを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

薬剤は、 2 - (s e c - ブチルジスルファニル) - 5 - ニトロ - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール、 2 - (s e c - ブチルジスルファニル) ベンゾ [d] チアゾール、 2 - (s e c - ブチルジスルファニル) ベンゾ [d] オキサゾール、 2 - (シクロペンチルジスルファニル) - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール、および、 2 - (シクロヘキシルジスルファニル) - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾールからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

薬剤は T G 2 を阻害する、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

薬剤は表 3 および 4 で説明される化合物から選択される、ことを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

薬剤は、 (2 S , 4 S) - キノリン - 3 - イルメチル 2 - (((S) - 3 - プロモ - 4 , 5 - ジヒドロイソキサゾール - 5 - イル) メチルカルバモイル) - 4 - フルオロピロリジン - 1 - カルボン酸塩 ; (2 S , 4 S) - キノリン - 3 - イルメチル 2 - (((S) - 3 - プロモ - 4 , 5 - ジヒドロイソキサゾール - 5 - イル) メチルカルバモイル) - 4 - ヒドロキシピロリジン - 1 - カルボン酸塩 ; (2 S , 4 R) - キノリン - 3 - イルメチル 2 - (((S) - 3 - プロモ - 4 , 5 - ジヒドロイソキサゾール - 5 - イル) メチルカルバモイル) - 4 - (p r o p - 2 - y n y l o x y) ピロリジン - 1 - カルボン酸塩からなる群から選択される、ことを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

薬剤は、高い初回通過代謝を有している、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

薬剤は経口で投与され、腸内で活性である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

薬剤は、腸溶コーティングを含む製剤に含まれる、ことを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

50

【請求項 16】

P I 3 キナーゼの阻害剤を投与する工程を含む、望ましくない腸の傍細胞輸送を減らす方法。

【請求項 17】

望ましくない傍細胞輸送は、約 250 mw よりも大きな分子の輸送を含む、ことを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

薬剤は、高い初回通過代謝を有している、ことを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

薬剤は経口で投与され、腸内で活性である、ことを特徴とする請求項 18 に記載の方法

10

【請求項 20】

薬剤は、腸溶コーティングを含む製剤に含まれる、ことを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

T G 2 の活性化を調節する候補となる薬剤をスクリーニングする方法であって、
前記方法は、
前記薬剤のない状態およびある状態で、 - I F N の存在下において腸細胞の細胞モデルに接触する工程と、
前記モデルにおける T G 2 の活性を測定する工程を含み、
前記薬剤のある状態での T G 2 の活性の減少が、T G 2 活性化の阻害を示す、ことを特徴とする方法。

20

【請求項 22】

T G 2 の活性化の阻害のための有効量の化合物を含む医薬製剤であって、化合物は表 1 で説明される、ことを特徴とする医薬製剤。

【請求項 23】

薬剤は、2 - (s e c - ブチルジスルファニル) - 5 - ニトロ - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール、2 - (s e c - ブチルジスルファニル) ベンゾ [d] チアゾール、2 - (s e c - ブチルジスルファニル) ベンゾ [d] オキサゾール、2 - (シクロペンチルジスルファニル) - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール、および、2 - (シクロヘキシルジスルファニル) - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾールからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項 22 に記載の医薬製剤。

30

【請求項 24】

T G 2 の阻害のための有効量の化合物を含む医薬製剤であって、化合物は表 3 および 4 で説明され、化合物は化合物 (2) 以外のものである、ことを特徴とする医薬製剤。

【請求項 25】

薬剤は、(2 S , 4 S) - キノリン - 3 - イルメチル 2 - (((S) - 3 - プロモ - 4 , 5 - ジヒドロイソキサゾール - 5 - イル) メチルカルバモイル) - 4 - フルオロピロリジン - 1 - カルボン酸塩 ; (2 S , 4 S) - キノリン - 3 - イルメチル 2 - (((S) - 3 - プロモ - 4 , 5 - ジヒドロイソキサゾール - 5 - イル) メチルカルバモイル) - 4 - ヒドロキシピロリジン - 1 - カルボン酸塩 ; (2 S , 4 R) - キノリン - 3 - イルメチル 2 - (((S) - 3 - プロモ - 4 , 5 - ジヒドロイソキサゾール - 5 - イル) メチルカルバモイル) - 4 - (p r o p - 2 - y n y l o x y) ピロリジン - 1 - カルボン酸塩からなる群から選択される、ことを特徴とする請求項 24 に記載の医薬製剤。

40

【請求項 26】

表 1 で説明される治療用の化合物であって、該化合物は化合物 (1) 以外のものである、ことを特徴とする化合物。

【請求項 27】

薬剤は、2 - (s e c - ブチルジスルファニル) - 5 - ニトロ - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール、2 - (s e c - ブチルジスルファニル) ベンゾ [d] チアゾール、2 - (s

50

e c - ブチルジスルファニル) ベンゾ [d] オキサゾール、2 - (シクロペンチルジスルファニル) - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール、および、2 - (シクロヘキシルジスルファニル) - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾールからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項 26 に記載の治療用の化合物。

【請求項 28】

表 3 および 4 で説明される治療用の化合物であって、該化合物は化合物 (2) 以外のものである、ことを特徴とする化合物。

【請求項 29】

薬剤は、2 - (s e c - ブチルジスルファニル) - 5 - ニトロ - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール、2 - (s e c - ブチルジスルファニル) ベンゾ [d] チアゾール、2 - (s e c - ブチルジスルファニル) ベンゾ [d] オキサゾール、2 - (シクロペンチルジスルファニル) - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール、および、2 - (シクロヘキシルジスルファニル) - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾールからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項 28 に記載の治療用の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(政府の権利)

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた契約 D K 0 6 3 1 5 8 の下、政府の支援を受けて作られた。政府は本発明において一定の権利を有している。

【背景技術】

【0002】

セリアックスブルー (セリアック病 (c e l i a c d i s e a s e または c o e l i a c d i s e a s e) としても知られている) は、世界中のほとんどの人口の 0 . 5 - 1 % の頻度で生じる小腸の慢性炎症性疾患である。セリアックスブルーの環境要因は、小麦、ライ麦および大麦のような共通の穀類からの食物性グルテンである。グルテンの十二指腸消化により、 α -グリアジンからの免疫優勢 33 m e r などのタンパク質分解抵抗性の免疫毒性ペプチド断片が放出される。これらのペプチドは、粘膜の上皮性関門を超えて輸送され、内因性の酵素であるトランスグルタミナーゼ 2 (T G 2) によって特定のグルタミン残基で脱アミド化される。脱アミド化されたペプチドは、セリアックスブルー、ヒト白血球抗原 (H L A) D Q 2、セリアックスブルーと診断された事例の 90 % 以上で見られるクラス I I 主要組織適合複合体 (M H C) 分子の主要な遺伝的決定因子に高い親和性で結合する。残りの事例は H L A D Q 8 に関連付けられる。

【0003】

抗原提示細胞 (A P C) の表面で D Q 2 グルテン複合体に遭遇すると、グルテンに特有の D Q 2 制限 C D 4 + T 細胞は活性化し、I F N のような炎症誘発性サイトカインの分泌と、C D 8 + 上皮内リンパ球の動員を含む T h 1 反応を誘発して、最終的に粘膜の損傷を引き起こす。さらに、C D 4 + T 細胞は、グルテン特異抗体と T G 2 特異的な自己抗体の両方の産生を含む体液性免疫反応を助ける。

【0004】

多くの影響を受けた個体では、この分子論的病因は、栄養素吸収不良、消耗、および / または慢性下痢として現れ、グルテンに繰り返し曝すことによって引き起こされる慢性炎症は、小腸の T 細胞性リンパ腫の発生率の上昇に関連付けられる。炎症、抗体産生および臨床症状はグルテン依存であるため、グルテンを含まない食事を厳守することで寛解がもたらされ、一方で、グルテンの食事を再導入することで再発がもたらされる。しかしながら、ヒトの食物にはグルテンがあまねくそんざいするため、グルテンを含まない食事維持することは非常に難しい。その結果、食事を含まない治療は、セリアックスブルーの患者の健康および生活の質をかなり改善することができる。

【0005】

経口で投与されたグルテンに特異的なプロテアーゼ (すなわち、グルテナーゼ (g l u

10

20

30

40

50

t en a s e s)) は、セリアックスブルーを処置するための魅力的な戦略である。例えば、A L V 0 0 3 は、セリアックスブルーの患者で臨床治験を受ける2つの酵素の組み合わせによる経口治療である (I D # N C T 0 1 2 5 5 6 9 6) 。他の治療法も同様に評価されている。例えば、A T - 1 0 0 1 (I D # N C T 0 0 6 2 0 4 5 1) は、セリアックスブルーの患者で密着結合機能不全を逆転させると考えられるセリアック病の治験薬であり、それによって、上皮層を超えるグルテンの輸送を防ぐ。最近では、臨床治験は、免疫優勢方法で H L A - D Q 2 によって認識される一連のグルテンペプチドに基づいたプロトタイプワクチンである、N e x v a x 2 を用いて始められた (I D # N C T 0 0 8 7 9 7 4 9) 。

【 0 0 0 6 】

トランスグルタミナーゼは、選択的にタンパク質と架橋結合することによって、種々の生物学的機能で重要な役割を果たす酵素のファミリーに属している。トランスグルタミナーゼは、タンパク質間の - (- グルタミル) - リジン架橋結合の形成を触媒し、適切なタンパク質基質にポリアミンを組み込むこともある。この共有結合性のイソペプチド架橋結合は、安定しており、タンパク質分解に耐性があり、それによって、化学的、酵素的、機械的な破壊に対する組織の耐性を強化する。このファミリーのメンバーの中には、血漿トランスグルタミナーゼ、フィブリン塊を安定させる因子 X I I I a ; 扁平上皮の外表面上タンパク質を架橋結合する、ケラチノサイトトランスグルタミナーゼおよび表皮トランスグルタミナーゼ ; および、脳、肝臓、および腸のような器官の細胞外マトリックス中のフィブロネクチンと架橋結合する組織トランスグルタミナーゼがある。

【 0 0 0 7 】

トランスグルタミナーゼファミリーのカルシウム依存性メンバーであるトランスグルタミナーゼ 2 (組織トランスグルタミナーゼとしても知られている T G 2)) は、細胞外と細胞内の機能を有することが報告されている。細胞の外で、T G 2 は、フィブロネクチンと関連するタンパク質を架橋結合することによって、細胞外マトリックスを成形する際に重要な役割を果たす。T G 2 は、インテグリンとフィブロネクチンなどの他の重要なタンパク質を含む非共有結合複合体を形成することによって、細胞の接着と運動を促進する。細胞内の T G 2 は、G T P に結合すると酵素活性を失うが、ホスホリパーゼ C シグナル伝達カスケードにおける G タンパク質として機能する。ヒト T G 2 は構造的かつ機械論的に複雑なタンパク質である。その触媒機構は、システイン、ヒスチジンおよびアスパラギン酸塩の触媒三連構造に關与する、システインプロテアーゼによって使用される触媒機構に類似している。システインチオール基はタンパク質基質のグルタミン側鎖と反応することで、反応性のチオエステル中間体が形成され、そこからアシル基は別のアミン基質に移される。

【 0 0 0 8 】

トランスグルタミナーゼファミリーの複数のメンバーが疾患に関連しており、そのメンバーには組織トランスグルタミナーゼ (T G 2) と皮膚トランスグルタミナーゼ (T G 1 と T G 3) が含まれる。T G 2 は、血管壁中の細胞を含む多くの細胞にある細胞質酵素である。異常な T G 2 活性は、アルツハイマー病、パーキンソン病およびハンチントン病などの神経疾患で一定の役割を果たすと考えられている (例えば、K i m e t a l . (2 0 0 2) N e u r o c h e m . I n t . 4 0 : 8 5 - 1 0 3 ; K a r p u j e t a l . (2 0 0 2) N a t u r e M e d . 8 , 1 4 3 - 1 4 9 を参照) 。T G 2 が支配的な自己抗原であるセリアックスブルーでは、グルテンペプチドの部位特異的な脱アミド化によって抗原エピトープを露出させる際のその極めて重要な役割が十分に確立される。

【 0 0 0 9 】

多くの T G 2 阻害剤が過去 2 0 年間にわたって生物学的研究で使用されてきたが、これらの化合物 (例えば、モノダンシルカダベリン) の多くは、潜在的な阻害性モチーフに加えて一級アミンを包含しており、観察された効果が、過剰な競合するアミンによるものなのか、あるいは、T G 2 基質のターンオーバーの遮断によるものなのか、依然としてわか

10

20

30

40

50

っていない。少数の研究では、ヒトTG2を阻害する自殺阻害剤(L682777)が用いられた(Lorand et al. (1998) Exp Eye Res. 66: 531-6)。しかしながら、L682777は、因子XIIIIaの特異的阻害剤として設計されたものであるため、インビボのTG2生態の評価には適していない。最近では、モルモットおよびヒト(Hausch et al. (2003) Chem Biol 10, 225-231; Choi et al. (2005) Chem. Biol. 12, 469-475) TG2の機構に基づいた活性部位阻害剤が報告されている。

【0010】

セリアックスブルーの重篤かつ広く蔓延する性質と、食品からグルテンを取り除く難しさを考慮すれば、よりよい治療法は大きな関心を集めるものである。とりわけ、セリアックスブルーを抱えた個体が、病的な影響なくグルテンを含む食品を食べることを可能にするか、あるいは、再発を引き起こすことなく少量または中程度の量のそのような食品に少なくとも耐えることを可能にする治療方法に対するニーズがある。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

組織トランスグルタミナーゼ(TG2)の生理的活性化を調節するための組成物と方法が提供される。本発明の方法は腸の炎症性疾患に関連するTG2の活性化を阻害する工程を含んでおり、疾患は、セリアック病、過敏性腸症候群、クローン病、疱疹状皮膚炎などを含んでもよい。本発明の方法は、発症プロセスの間に、細胞外の活性化を含むTG2活性化に関与する分子経路で作用する阻害剤を提供する。調節のための標的タンパク質として、抗酸化タンパク質チオレドキシソと、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)ファミリーのアイソザイムが含まれる。これらのタンパク質の活性がTG2のインビボ活性化に必要であること、および、これらのタンパク質の1つまたは両方の活性の阻害が局所的な環境でTG2活性化を阻害し、その結果として食事のグルテンに対する疾患に特異的なT細胞の炎症反応における必要不可欠な工程が阻まれることが本明細書で示されている。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の幾つかの実施形態において、有効量のTG2活性化阻害剤が腸の炎症性疾患に苦しむ固体に投与され、ここで、個体における活性なTG2のレベル、とりわけ、活発な腸のTG2のレベルは減少する。本発明の幾つかの実施形態において、本明細書に記載の標的タンパク質の阻害剤は、小腸における標的の長期的な阻害に関連する適切な安全性特徴を提供する。特に、所望の阻害剤は、高い初回通過代謝を有しており、腸で活性である。阻害剤は経口で投与されてもよい。

30

【0013】

本発明の他の実施形態では、該方法は、腸組織中の望ましくない傍細胞輸送、とりわけ、500mwよりも大きな分子(例えば、限定されないが、免疫原性のグルテンペプチドを含むペプチド)の傍細胞輸送を減らすために提供される。調節のための標的タンパク質として、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)ファミリーのアイソザイムが含まれる。上記のような望ましくない傍細胞輸送は、様々な腸の疾患に関係していることもある。

40

【0014】

本発明の他の実施形態では、TG2活性化に作用する薬剤候補を特定するために、ハイスループットインビトロ細胞または無細胞アッセイを含むアッセイが提供される。本発明のアッセイでは、TG2は、IFNで処理した腸細胞によって活性化される。TG2活性のレベルは、当該技術で知られている方法によって、例えば、TG2基質の架橋結合を決定することによって、モニターすることができる。活性酵素のレベルは、例えば、適切な親和性アッセイなどによって決定されるように、総TG2濃度と比較されてもよい。候補となる薬剤は、系と接触させてもよく、TG2活性化に対する効果は、それが存在す

50

る場合には、活性化を測定するのに十分な時間、インキュベートした後に決定される。対照として、アッセイは、薬剤がない状態の活性と比較されてもよく、あるいは、TG2 活性化を阻害すると本明細書で示された薬剤、例えば、PI3キナーゼの阻害剤、チオレドキシンの阻害剤などがある状態での活性と比較されてもよい。TG2 活性の測定が上に記載された通りであるなら、無細胞アッセイは、チオレドキシンがある状態で、および、様々な酸化還元電位を有する緩衝液に晒すことで、TG2 の調製物を利用してもよい。候補となる薬剤は、限定されることなく、IFN の阻害剤、PI3キナーゼの阻害剤、チオレドキシンの阻害剤、TG2 の阻害剤などを含む。

【0015】

模式図1で例証されるように、本発明は、チオレドキシン、PI3K、または、TG2 の阻害剤であるリード化合物および治療薬を提供する。幾つかの実施形態では、リード化合物は、PX12(1)とそのアナログを含む、薬理的に有用なチオレドキシン阻害剤である。そのような化合物の例は、本明細書の表1と表2で説明されている。幾つかの実施形態において、リード化合物は、LY294002(2)とBEZ-235(8)およびそのアナログを含む、薬理的に有用なPI3K阻害剤である。幾つかの実施形態において、リード化合物は、ERW1041E(3)とそのアナログを含む、薬理的に有用なTG2阻害剤である。そのような化合物の例は、本明細書の表3、表4、および表5で説明されている。

【図面の簡単な説明】

【0016】

模式図1．チオレドキシン(PX12, 1)、PI3キナーゼ(LY294002, 2)、および、トランスグルタミナーゼ2(ERW1041E, 3)に対するリード化合物。

【0017】

模式図2．有望なPI3K阻害剤の他の例 - 化合物15e(4)、TGX-221(5)、AS-252424(6)、および、IC-87114(7)

【0018】

【図1】蛍光標識されたペプチドの流動とTG2 活性化を測定するために用いられるT84トランスロケーションアッセイ。(A) Transwellの模式図は、D8merペプチド対照と抗原グルテンペプチドである33merの輸送を例証している。 $D_p' = \text{IFN-}$ 条件下でのD8merの傍細胞の質量流束。 $D_p = \text{D8mer}$ の基底の傍細胞質量流束。 $P_T' = \text{IFN-}$ の条件下での33merの経細胞の質量流束。 $P_T = 33\text{mer}$ の基底細胞内質量流束。 $P_p' = 33\text{mer}$ のIFN- 条件の傍細胞質量流束。 $P_p = 33\text{mer}$ の基底傍細胞質量流束。33merの支配的な輸送が傍細胞経路を使用する場合、 $P_p' / P_p = D_p' / D_p$ である。蛍光標識したペプチド分子構造も例証される。(B) 平均+/-標準偏差として表される、48時間IFN- で処理されたT84単層全体のペプチドのモル流束。ペプチドのモル流束は、少なくとも200U/mLのIFN- で処理されたときに最大に達する。(C) 平均+/-標準偏差として表される、0U/mLのIFN(基底)条件に正常化された平均的なペプチドのモル流束。

【図2】定量的な酵素結合の免疫吸着型アッセイで測定されたT84単層のIFN- による処理に反応したTG2 活性化の投与量および時間依存性。T84単層は、25μMのERW1041Eを使用したTG2 阻害を用いて、または、用いずに、0-1000U/mLのIFN- で1~72時間で処理された。TG2 活性化は、ストレプトアビジンHRPによる標識を介してテトラメチルベンジジンのターンオーバーによって測定されるような、T84細胞中の天然タンパク質に架橋結合した5BPの量によって定量化された。5BPの取り込みはIFN- の曝露濃度に依存する。TG2 活性化は、1000U/mLのIFN- による処理で最も高く、TG2がERW1041Eを用いて遮断されたときに基底レベルに下がった。5BPの取り込みは、72時間のIFN- によるインキュベーション時間で最も高く、24時間未満のIFN- への曝露では比較的小さな5BP

10

20

30

40

50

の取り込みしか見られなかった。0 μ Mの5BPでインキュベートされた負の対照ウェルは、無視できる程度の信号を示した。データは平均 + / - 標準偏差として報告された。

【図3】様々な濃度のIFN- γ で処理されたT84モデルにおけるペプチド透過性とTG2活性化の減少への、PI3K阻害剤であるLY294002の用量依存性。(A) LY294002のインキュベーションにより、IFN- γ で48時間処理したT84細胞におけるCy5-33merとCy3-D8merの増加した透過性は減少する。10 μ Mでは、LY294002は、1000 U/mLのIFN- γ による処理で見られた最大のペプチドのモル流束を基底レベルまで減少させる。DMSOレベルは、培地において、0.1% (v/v) 未満で維持された。DMSO対照は、試験した任意のIFN- γ 処理のペプチドのモル流束に対してなんの影響も示さない。示されたデータは、平均 + / - 標準偏差によって表される、0 U/mLのIFN- γ 条件まで正常化される。(B) 定量的な酵素結合免疫吸着型アッセイで測定されたT84単層のIFN- γ による処理に反応したTG2活性化の用量および時間依存性。T84単層は、10 μ MのLY294002を使用したPI3K阻害を用いて、または、用いずに、0 - 1000 U/mLのIFN- γ で1 - 72時間、処理された。TG2活性化は、ストレプトアビジンHRP標識を介してテトラメチルベンジジンのターンオーバーによって測定されるような、T84細胞中の天然タンパク質に架橋結合した5BPの量によって定量化された。IFN- γ 曝露濃度に対する、5BPの取り込みの依存を例証する。TG2活性化は、1000 U/mLのIFN- γ で最も高く、PI3K活性がLY294002を用いて遮断されたときに基底レベルに下がった。5BPの取り込みは、72時間のIFN- γ のインキュベーション時間で最も高く、24時間未満のIFN- γ への曝露では比較的小さな5BPの取り込みしか見られなかった。0 μ Mの5BPでインキュベートされた負の対照ウェルは、無視できる程度の信号を示した。データは平均 + / - 標準偏差として報告された。

【図4】oxTG2における隣接するジスルフィド結合の酸化還元電位。(A) 様々な酸化還元電位を有する緩衝液に対する曝露へのTG2活性の時間依存性。酸化したTG2 (oxTG2) は、様々なGSH/GSSG比率を包含する緩衝液中で1時間、あらかじめインキュベートされ、10 mMの総[GSH] + [GSSG]濃度にさらす。その後、TG2活性は、室温で6時間、20 mMのZQG基質がある状態で、分光光度的にモニターされた。(B) 酸化還元電位に応じた定常的な酵素活性。比放射能は、4 - 5時間の勾配に基づいて計算され、5 mMのDTT処理の後に、TG2の活性に正常化された。(C) 酸化還元電位に応じて減少したTG2の定常状態の画分。減少したTG2の画分は、Cys370と371のアルキル化状態に基づいて決定された。

【図5】培養されたT84およびTHP-1細胞によるTrxの分泌。細胞内と細胞外のTrxレベルは、ウエスタンブロットおよびImageJ解析によって定量化された。(A) 1000 U/mLのIFN- γ で48時間処理した培養されたT84単層の頂端(上部)側と基底外(底)側のTrxの相対存在量。両方の場合で、Trx濃度は、IFN- γ を包含していないウェルに正常化される。側底の培地の容積が頂端側の培地の容積の2倍あるため、前者の容積へのTrx分泌の速度は、外側の容積よりも高くなると予想される。比較として、細胞内のTrxの濃度も示されている。すべての場合において、不変的な参考として、アクチン値が使用された。(B) IFN- γ で48時間処理した培養されたTHP-1単核球細胞の細胞外容量対細胞内容量におけるTrxの相対存在量。

【図6】WI-38繊維芽細胞とTHP-1細胞を含む共培養におけるTG2の活性化。2つの細胞株は、1000 U/mLのIFN- γ を含む、または、含まない8つのウェルグラスチャンバーで、48時間、共培養した。強程度のTG2活性(赤)の位置は、Alexa Fluor-555染色後の、1時間の0.5 mM 5BP取り込みによって視覚化され、細胞は位相差によって視覚化された。写真はすべて100倍の顕微鏡で撮られる。

【図7】定量的な酵素結合免疫吸着型アッセイで測定されたT84とWI-38の単層の組み換え型のヒトチオレドキシン処理に反応したTG2活性化の用量依存性。細胞の単層は、25 μ MのERW1041Eを用いるTG2阻害によってまたは該阻害を用いずに、

10

20

30

40

50

あるいは、 $0 - 50 \mu\text{M}$ のチオレドキシン阻害剤 $\text{PX} - 12$ を用いてまたは用いずに、 $0 - 10 \mu\text{M}$ のチオレドキシンで3時間で処理された。 $\text{TG}2$ 活性化は、ストレプトアビジン HRP 標識を介してテトラメチルベンジジンのターンオーバーによって測定されるような、培養された単層の細胞外マトリックス中の天然タンパクに架橋結合した 5BP の量によって定量化された。(A)と(B)は、 $\text{T}84$ と $\text{WI} - 38$ の細胞それぞれにおけるチオレドキシン曝露濃度への、 5BP 取り込みの依存を例証している。 $\text{TG}2$ 活性化は $10 \mu\text{M}$ のチオレドキシン処理で最も高く、 $\text{TG}2$ が $\text{ERW}1041\text{E}$ を用いて遮断されたときに基底レベルに下がった。(C)と(D)は、 $\text{TG}2$ を活性化するチオレドキシンの能力への 5BP 取り込みの依存を例証している。 $\text{TG}2$ 活性化は、 $0 \mu\text{M}$ の $\text{PX} - 12$ を用いる対照実験で最も高かった。 $\text{T}84$ と $\text{WI} - 38$ の培養物中の $3 \mu\text{M}$ のチオレドキシンの飽和濃度で 5BP の取り込みを半分まで減らすのに必要とされる $\text{PX} - 12$ の量は、それぞれ $11 \mu\text{M}$ と $5 \mu\text{M}$ の $\text{PX} - 12$ であった。 $0 \mu\text{M}$ の 5BP でインキュベートされた負の対照ウェルは、無視できる程度の信号を示した(データは示されない)。データは平均 \pm 標準偏差として報告された。

10

【図8】 $\text{IFN} - \gamma$ で処理された $\text{T}84$ 単層におけるペプチド浸透性と $\text{TG}2$ 活性に対する、 $\text{pan} - \text{PI}3\text{K}$ 阻害剤である $\text{BEZ}235$ の効果。(A) $\text{IFN} - \gamma$ で48時間処理した $\text{T}84$ 単層全体の $\text{Cy}3 - \text{D}8\text{mer}$ の浸透性、(B) 5BP の取り込みによって測定されるような $\text{TG}2$ 活性、(C) $\text{pan} - \text{PI}3\text{K}$ 阻害剤 $\text{BEZ} - 235$ (8)の構造。 $\text{BEZ}235$ を可溶性にするために使用される DMSO は、 $\text{T}84$ の浸透性に影響を与えなかった。 DMSO 値は、培地で 0.1% (v/v)未満に維持された。示されたデータは、平均 \pm 標準偏差によって表わされる 0U/mL の $\text{IFN} - \gamma$ の状態に正常化される。

20

【発明を実施するための形態】

【0019】

セリアックスブルーでは、炎症は、小腸に存在するとともに食事から有毒なグルテンペプチドを認識する、疾患特異的なT細胞が引き金となって起きる。この認識プロセスは、 $\text{TG}2$ によるグルテンペプチドの修飾によって促進される。そのため、 $\text{TG}2$ の腸内での阻害は、セリアックスブルーの非食事療法の有望な標的と一般には見なされている。正常な生理学的条件の下では、細胞外の $\text{TG}2$ は主に不活発な形態であり、グルテンペプチドが脱アミド化され得る前に、活性化されなければならない。 $\text{TG}2$ を小腸で活性化する機構は、以前は知られていなかった。本発明は、 $\text{TG}2$ 活性化のための経路と、活性化を調節する、チオレドキシンの存在などの因子の解明を提供する。

30

【0020】

$\text{TG}2$ 活性化経路についてのこの知識は、このような活性化を阻害する候補となる薬剤の設計と使用の可能性を開いた。そのような薬剤は、限定されないが、セリアックス病、過敏性腸症候群、クローン病、疱疹状皮膚炎などを含んでもよい腸の炎症性疾患を含んでいる疾病の処置において使用法を見出す。調節のための標的タンパク質としては、抗酸化タンパク質チオレドキシンとホスホイノシチド3-キナーゼ($\text{PI}3\text{K}$)ファミリーのアイソザイムが含まれている。これらのタンパク質の活性が $\text{TG}2$ のインビボの活性化に必要であること、および、これらのタンパク質の1つまたは両方の活性を遮断することで、局所的な環境で $\text{TG}2$ 活性化を阻害し、その結果として食事のグルテンに対する疾患に特異的なT細胞の炎症反応における必要不可欠な工程が阻まれることが本明細書で示されている。

40

【0021】

本発明の幾つかの実施形態において、 $\text{TG}2$ 活性化を阻む有効量の薬剤が、望ましくない $\text{TG}2$ 活性化に苦しむ個体に投与され、ここで、その投与量は、 $\text{TG}2$ 活性、特に腸の $\text{TG}2$ 活性の減少をもたらす。幾つかの実施形態では、個体は、炎症性の腸疾患であると診断されている。幾つかの実施形態では、炎症性の腸疾患は、セリアックスブルー、疱疹状皮膚炎、過敏性腸症候群、および、クローン病から選択される。いくつかの実施形態において、薬剤は $\text{PI}3$ キナーゼを阻害する。他の実施形態では、薬剤はチオレドキシンを

50

阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤は高い初回通過代謝を有している。幾つかの実施形態において、薬剤は経口で投与され、腸で活性である。幾つかの実施形態において、薬剤は、腸溶コーティングを含む製剤で提供される。

【0022】

本発明の他の実施形態では、方法は、腸組織における望ましくない傍細胞輸送、とりわけ、500mwよりも大きな分子（例えば、限定されないが、免疫原性のグルテンペプチドを含むペプチド）の傍細胞輸送を減らすために提供される。調節のための標的タンパク質としては、ホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）ファミリーのアイソザイムが含まれる。そのような望ましくない傍細胞輸送は、様々な腸疾患に関連付けられることもある。

10

【0023】

本発明の幾つかの実施形態において、腸の傍細胞輸送を阻害する有効量の薬剤が個体に投与され、その投与量は、約250mwよりも大きく、通常は約500mwよりも大きく、あるいは、1000mwよりも大きな分子の傍細胞輸送の減少をもたらす。幾つかの実施形態では、個体は、炎症性の腸疾患であると診断されている。幾つかの実施形態においては、炎症性の腸疾患は、セリアックスブルー、疱疹状皮膚炎、過敏性腸症候群、および、クローン病から選択される。いくつかの実施形態において、薬剤はPI3キナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤は高い初回通過代謝を有している。

幾つかの実施形態においては、薬剤は経口投与され、腸で活性である。

【0024】

20

本発明の治療方法は、当該技術で知られているような抗炎症剤の投与、TG2活性を直接阻害する薬剤の投与、グルテナーゼの投与などを含む当該技術で既知の療法と組み合わせられてもよい。

【0025】

本発明の幾つかの実施形態において、本明細書に記載の標的タンパク質の阻害剤は、小腸での標的の長期的な阻害に関連した適切な安全性特徴を提供する。とりわけ、所望の阻害剤は、高い初回通過代謝を有しており、腸で活性である。阻害剤は経口で投与されてもよい。

【0026】

30

（定義）

本明細書で使用されているように、「治療薬」または「治療レジメン」との用語は、疾患または疾病、とりわけ、本発明のための腸疾患状態の処置または予防で使用される薬剤を指す。対照となるのは、治療による処置方法、そのような治療法を用いる臨床試験、そのような治療法のためのスクリーニング検査、および、そのような治療を受ける患者のモニタリングである。

【0027】

幾つかの実施形態では、治療法は、個体、例えば、炎症性の腸疾患に苦しむ個体を、本発明の薬剤で処置することを含んでいる。患者は、処置されていない対照患者であってもよく、あるいは、対照となる臨床レジメン、例えば、グルテンの食事制限、PI3K阻害剤による処置に晒される患者は、新しく診断されるなどしてもよい。本明細書に使用されているように、「患者」または「個体」は、哺乳類、特にヒトを含む生物を記載している。

40

【0028】

疾病または疾患の「処置（treatingまたはtreatment）」は、次のものを含んでいる：（1）疾病の少なくとも1つの症状を防ぐこと、すなわち、疾患に晒されるまたは疾患にかかりやすいが、疾患の症状をまだ経験していないまたは見せていない哺乳動物において、臨床症状をあまり進行させないこと、（2）疾患を阻害すること、すなわち、疾患またはその症状の進行を阻むまたは抑えること、あるいは、（3）疾患を和らげること、すなわち、疾患またはその臨床症状を退行させること。

【0029】

50

「治療上有効な量」または「効果的な量」とは、ある疾患を処置するために哺乳類または他の被験体に投与されたときに、疾患のそのような処置を達成するのに十分な化合物の量を意味する。「治療上有効な量」は、化合物、疾患およびその重症度、ならびに、処置される被験体の年齢、体重などに依存して変化する。

【0030】

「薬物動態学」との用語は、正常な生理学的プロセスと治療薬との間の経時的な相互作用（すなわち、薬物に対する身体効果）の数学的な特性を指す。特定の生理学的プロセス（吸収、分布、代謝、および、排出）は、患者に所望の治療効果を提供する薬物の能力に影響する。薬物の薬物動態学についての知識は、薬物血流濃度を解釈するのに役立ち、薬理学的に有効な薬物投与量を決定するのに有用である。当該技術で知られているように、高い初回通過代謝は、局所的な領域で、かつ、短時間、薬物を有用にするが、全身性の活性は制限される。

10

【0031】

「～と組み合わせる」との用語は、本明細書で使用されるように、例えば、第1の化合物が、第2の化合物の投与の全経過中に投与される場合、第1の化合物が、第2の化合物の投与で重複する期間に投与される場合、例えば、第1の化合物の投与が第2の化合物の投与の前に始まり、第1の化合物の投与が、第2の化合物の投与が終わる前に終了する場合、第2の化合物の投与が、第1の化合物の投与の前に始まり、第2の化合物の投与が、第1の化合物の投与が終わる前に終了する場合、第1の化合物の投与が、第2の化合物の投与が始まる前に始まり、第2の化合物の投与が、第1の化合物の投与が終わる前に終了する場合、第2の化合物の投与が、第1の化合物の投与が始まる前に始まり、第1の化合物の投与が、第2の化合物の投与が終わる前に終了する場合、の使用について言及している。そういうものとして、「組み合わせる」とは、2つ以上の化合物の投与に関するレジメンにも言及することができる。「～と組み合わせる」とは、本明細書に使用されるように、同じまたは異なる製剤で、同じまたは異なる経路によって、および、同じまたは異なる剤形タイプで投与されてもよい、2つ以上の化合物の投与のことも指す。

20

【0032】

用語「単離した化合物」とは、化学剛性のあいだにともに自然に生じる他の化合物から十分に分離した、あるいは、他の化合物に対して十分に濃縮された、化合物を意味する。単離された化合物は、一般的に、少なくとも約80重量%純粋であり、あるいは、少なくとも約90重量%純粋であり、少なくとも約98重量%純粋であり、または、少なくとも約99重量%純粋である。本発明は、ジアステレオマーと、そのラセミ化合物の、および、分解した、鏡像異性的に純粋な形態とその薬学的に許容可能な塩を包含することを意味している。

30

【0033】

本明細書に使用されるように、用語「単位剤形」は、ヒトと動物の被験体の単一投与量として適切な物理的に別々の単位を指し、各々の単位は、薬学的に許容可能な希釈剤、担体、または、ビヒクルと連動して所望の効果を生むのに十分な量で計算された、あらかじめ定義された量の本発明の化合物を包含する。本発明の新しい単位剤形の仕様は、用いられる特定の化合物、達成される効果、および、宿主のそれぞれの化合物に関連した薬物動力学に依存する。

40

【0034】

用語「生理学的条件」は、生細胞に適合するその条件、例えば、生細胞に適合する温度、pH、塩分などの主に水性条件を包含することを意味している。

【0035】

「薬学的に許容可能な賦形剤」「薬学的に許容可能な希釈剤」、「薬学的に許容可能な担体」、および、「薬学的に許容可能なアジュバント」は、一般に安全で、無毒で、生理学的に望ましくなかったりそれ以外の点で望ましくなかったりすることのない医薬組成物を調製するのに役立つ賦形剤、希釈剤、担体、およびアジュバントを意味し、獣医学的用途やヒトの製薬学的用途にも許容可能な、賦形剤、希釈剤、担体、および、アジュバント

50

を含んでいる。明細書と請求項で使用されるような「薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤、担体、および、アジュバント」は、1つおよび2以上の双方の上記賦形剤、希釈剤、担体、および、アジュバントを含んでいる。

【0036】

本明細書で使用されているように、「医薬組成物」は、哺乳類（特にヒト）などの被験体への投与に適した組成物を包含することを意味している。一般に、「医薬組成物」は好ましくは無菌であり、被験体内で望ましくない反応を誘発することができる汚染物質を含まない（例えば、医薬組成物中の化合物は医薬品グレードである）。医薬組成物は、経口、頬側、直腸、非経口、腹腔内、皮内、気管内（*intracheal*）などの多くの異なる投与経路を介して、必要としている被験体または患者に投与するために設計され得る。

10

【0037】

本明細書で使用されているように、本発明の化合物の「薬学的に許容可能な誘導体」は、塩、エステル、エノールエーテル、エノールエステル、アセタール、ケタール、オルトエステル、ヘミアセタール、ヘミケタール、酸、塩基、溶媒和物、水和物、または、そのプロドラッグを含んでいる。上記のような誘導体は、そのような誘導体化のための既知の方法を用いて、当業者によって容易に調製されてもよい。生成される化合物は、実質的な毒性作用なく、動物またはヒトに投与されてもよく、薬学的に活性であるか、あるいは、プロドラッグであるかのいずれかである。

【0038】

化合物の「薬学的に許容可能な塩」は、薬学的に許容可能で、かつ、親化合物の望ましい薬理学的活性を有する塩を意味する。そのような塩類は、以下のものを含んでいる：（1）塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸が作られた、あるいは、酢酸、プロピオン酸、ヘキサ酸、シクロペンタンプロピオン酸、グリコール酸、ビルビン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、3-（4-ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-クロロベンゼンスルホン酸、2-ナフタリンスルホン酸、4-トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、グルコヘプトン酸、4,4'-メチレンビス-（3-ヒドロキシ-2-エン-1-カルボン酸）、3-フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、三級ブチル酢酸、ラウリル硫酸、グルコン酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフトエ酸、サリチル酸、ステアリン酸、ムコン酸などの有機酸から作られた、酸付加塩；または、（2）親化合物中に存在する酸性プロトンが、金属イオン、例えば、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、または、アルミニウムイオンと取り替えられるか、あるいは、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N-メチルグルカミンなどの有機塩基と協調するさいに形成される塩。

20

30

【0039】

本来酸性の本組成物に含まれる化合物は、薬学的に許容可能な塩基性の塩を形成するために、任意の数の無機塩基と有機塩基と反応してもよい。塩基は、例えば、NaOHとKOHなどの鉱物塩基を含んでもよいが、当業者は他の塩基も使用されてもよいことを認識するだろう。Ando et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., 700-720 (Alfonso R. Gennaro ed.), 2000.を参照のこと。

40

【0040】

加えて、本明細書に記載の化合物が酸付加塩として得られる場合、遊離塩基は、酸性塩の溶液を塩基性化することによって得ることができる。逆に、生成物が遊離塩基である場合、追加塩、とりわけ、薬学的に許容可能な追加塩は、適切な有機溶媒中に遊離塩基を溶解させること、および、塩基性の化合物から酸付加塩を調製するための従来の手順に従って酸で溶液を処理することによって生成されてもよい。当業者は、無毒な薬学的に許容可能な付加塩を調製するために用いられてもよい様々な合成方法論を認識する。

50

【0041】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載の化合物の薬学的に許容可能な付加塩は、例えば、水、メタノール、エタノール、ジメチルホルムアミドなどの様々な溶媒和物としても存在してもよい。そのような溶媒和物の混合物も調製されてもかまわない。そのような溶媒和物の源は、調製または結晶化の溶媒に固有な結晶化溶媒からものであるか、あるいは、そのような溶媒に対して偶発的なものであってもよい。

【0042】

本発明の化合物の「薬学的に許容可能な溶媒和物または水和物」は、薬学的に許容可能であるとともに親化合物の所望の薬理活性を有する溶媒和物または水和物の複合体を意味し、限定されないが、1つ以上の溶媒和物または水分子、あるいは、1から約100、または、1から約10、または、1から約2、3、4の溶媒和物または水分子と本発明の化合物との複合体を含む。

10

【0043】

用語「接触 (contact) (contacts) (contacting)」は、その通常の意味を有しており、2つ以上の実体 (例えば、2つのタンパク質、ポリヌクレオチドと細胞、細胞と候補となる薬剤、など) を組み合わせることを指している。接触は、インビトロ、インサイツ、または、インビボで生じ得ることがあり、「～に晒して (exposed to) (exposed to) (exposing to)」と同じ意味で使用される。

20

【0044】

本明細書で使用されているように、用語「減少する」、「低下する」、「阻害する」は、場合によっては、観察される活性が特定のアッセイの検出値以下に減らされ得ることが認識されるため、一緒に使用される。そのため、活性がアッセイの検出値以下に「減少する」か「低下するか」どうか、あるいは、完全に「阻害される」かどうかは、常に明らかでなくてもよい。

【0045】

本明細書で使用されているように「市販で入手可能な」化合物は、Acros Organics (ベルギー・ギール)、Aldrich Chemical (ウィスコンシン州ミルウォーキー。Sigma ChemicalとFlukaを含む)、Apin Chemicals Ltd. (英国ミルトンパーク)、Avocado Research (英国ランカシャー)、BDH Inc. (カナダ・トロント)、Bionet (英国コーンウォール)、Chemservice Inc. (ペンシルベニア州ウェストチェスター)、Crescent Chemical Co. (ニューヨーク州ホーボー)、Eastman Organic Chemicals, Eastman Kodak Company (ニューヨーク州ロチェスター)、Fisher Scientific Co. (ペンシルベニア州ピッツバーグ)、Fisons Chemicals (英国レスターシャー)、Frontier Scientific (ユタ州ローガン)、ICN Biomedicals, Inc. (カリフォルニア州コストメサ)、Key Organics (英国コーンウォール)、Lancaster Synthesis (ニューハンプシャー州ウィンダム)、Maybridge Chemical Co. Ltd. (英国コーンウォール)、Parish Chemical Co. (ユタ州オレム)、Pfaltz & Bauer, Inc. (コネチカット州ウォーターベリー)、Polyorganix (テキサス州ヒューストン)、Pierce Chemical Co. (イリノイ州ロックフォード)、Riedel de Haen AG (ドイツ・ハノーファー)、Spectrum Quality Product, Inc. (ニュージャージー州ニューブランズウィック)、TCI America (オレゴン州ポートランド)、Trans World Chemicals, Inc. (メリーランド州ロックビル)、Wako Chemicals USA, Inc. (バージニア州リッチモンド)、Molecular Probes (オレゴン州ユージーン)、Invitrogen (カリフォルニア州カールズバッド)、Applie

30

40

50

d Biosystems, Inc. (カリフォルニア州フォスターシティ)、Glen Research (バージニア州)、Biosearch Technologies (カリフォルニア州ノバト)、Anaspec (カリフォルニア州フレモント)、および、Berry & Associates (ミシガン州デクスター)を含む商業的供給源から得られてもよい。

【0046】

本明細書で使用されているように、合成工程を行なうための「適切な条件」は本明細書で明示的に提供されているか、あるいは、有機合成化学で使用される方法を対象とした公開公報への言及によって識別されてもよい。本発明の化合物の調製に役立つ反応物の合成を詳述する、上で説明された参考文献および論文は、本発明に応じて合成の工程を実行するのに適切な条件も提供する。

10

【0047】

本明細書で使用されているように、「当業者に既知の方法」は、様々な参考図書やデータベースを介して特定されてもよい。本発明の化合物の調製に役立つ反応物の合成を詳述するか、あるいは、調製について記載した記事への言及を提供する、適切な参考図書および論文は、例えば、"Synthetic Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York; S. R. Sandler et al., "Organic Functional Group Preparations", 2nd Ed., Academic Press, New York, 1983; H. O. House, "Modern Synthetic Reactions", 2nd Ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif. 1972; T. L. Gilchrist, "Heterocyclic Chemistry", 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1992; J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure", 4th Ed., Wiley Interscience, New York, 1992.を含んでいる。特定の反応物や類似した反応物は、米国化学会の化学情報検索サービス機関によって調製した既知の化学物質の索引によって特定されてもよく、これはほとんどの公共の図書館や大学の図書館で入手可能であり、オンラインデータベースを介しても入手可能である(ワシントンDCの米国化学会の詳細について触れることもある)。知られているが、カタログでは市販されていない化学物質は、カスタム化学合成専門会社(custom chemical synthesis houses)によって調製されてもよく、標準的な薬品卸売会社(例えば、上に列挙された会社)の多くは、カスタム合成サービスを提供している。

20

30

【0048】

「安定した化合物」および「安定した構造」は、有用な程度の純度で、反応混合物からの分離と、効果的な治療薬の中への製剤を生き残るのに十分なほど強健な化合物を示すことを意味している。

【0049】

「随意的」または「随意に」は、その後に記載される出来事の事象が生じても生じなくてもよいことと、この記載が、前記事象または出来事が生じる例と生じない例を含むことを意味している。例えば、「随意に置換されたアリール」とは、アリールが置換されても置換されなくてもよいこと、および、この記載が置換されたアリールラジカルと置換を有していないアリールラジカルの両方を含むことを意味している。用語「低級アルキル」は、約1~6つの炭素からの、直線の、分枝した、または、環状のアルキルを指すために、当該技術で知られているように本明細書では用いられる。1つ以上の置換基を包含している任意の基に関して、そのような基が、立体的に非実用的な、合成的に実現不可能な、および/または、本質的に不安定な任意の置換または置換パターンを導入するために意図されたものではないことが当業者によって理解されよう。

40

50

【 0 0 5 0 】

化合物、そのような化合物を含む医薬組成物、および、そのような化合物と医薬組成物を使用する方法について記載するとき、別段の指示がなければ、以下の用語は以下の意味を有している。以下に定義された部分は置換されなくても、様々な置換基で置換されてもよいこと、および、それぞれの定義は、その範囲内に置換されていない部分と置換された部分の両方を含むように意図されていることも理解されよう。

【 0 0 5 1 】

「アシル」は、 $-C(O)R$ 基を指し、ここで、Rは、本明細書で定義されるように、水素、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、または、ヘテロアリールである。代表的な例としては、限定されないが、ホルミル、アセチル、シクロヘキシルカルボニル、シクロヘキシルメチルカルボニル、ベンゾイル、ベンジルカルボニルなどが挙げられる。

10

【 0 0 5 2 】

「アシルアミノ」は、 $-NR'C(O)R$ 基を指し、ここで、本明細書で定義されるように、R'は、水素、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキルであり、および、Rは、水素、アルキル、アルコキシ、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアルキル、ヘテロアリール、または、ヘテロアリールアルキルである。代表的な例としては、限定されないが、ホルミルアミノ、アセチルアミノ、シクロヘキシルカルボニルアミノ、シクロヘキシルメチルカルボニルアミノ、ベンゾイルアミノ、ベンジルカルボニルアミノなどが挙げられる。

20

【 0 0 5 3 】

「アシルオキシ」は、基 $-OC(O)H$ 、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、あるいは、 $-OC(O)-$ シクロアルキルを指す。

【 0 0 5 4 】

「脂肪族」は、構成炭素原子の直線、分岐、または、環状配置と、芳香族不飽和の欠如を特徴とする、ヒドロカルビル有機化合物または基を指す。脂肪族化合物、限定されないが、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルキニル、および、アルキニレンを含んでいる。低級脂肪族基は、典型的には、1または2から6または12の炭素原子を有している。

30

【 0 0 5 5 】

「アルケニル」は、2から8の炭素原子までといった約11までの炭素原子を有する、および、2~6の炭素原子を含む、一価のオレフィン系不飽和ヒドロカルビル基を指し、それは直鎖または分枝鎖でもよく、オレフィン系不飽和の少なくとも1つの部位を有し、および、1~2の部位を含む。特定のアルケニル基としては、限定されないが、エテニル($-CH=CH_2$)、n-プロペニル($-CH_2CH=CH_2$)、イソプロペニル($-C(CH_3)=CH_2$)、ビニル、および、置換されたビニルなどが挙げられる。

【 0 0 5 6 】

「アルコキシ」は、基 $-O-$ アルキルを指す。特定のアルコキシ基としては、一例として、メトキシ、エトキシを含む、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、tert-ブトキシ、sec-ブトキシ、n-ペントキシ、n-ヘキソキシ、1,2-ジメチルブトキシなどが挙げられる。

40

【 0 0 5 7 】

「アルコキシカルボニル」は、ラジカル $-C(O)$ を $-$ アルコキシを指し、アルコキシは本明細書に定義される通りである。

【 0 0 5 8 】

「アルコキシカルボニルアミノ」は、基 $-NRC(O)OR'$ を指し、Rは水素、アルキル、アリール、または、シクロアルキルであり、および、R'はアルキルまたはシクロアルキルである。

【 0 0 5 9 】

50

「アルキル」は、とりわけ、約 12 または 18 までの炭素原子、より具体的には低級アルキルとして 1 から 8 の炭素原子、および、さらにより具体的には 1 から 6 の炭素原子を有する一価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指す。炭化水素鎖は直鎖でも分枝鎖でもかまわない。この用語は、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、*n*-ヘキシル、*n*-オクチルなどの基によって例証されている。用語「アルキル」は、本明細書に定義されるような「シクロアルキル」も含む。

【0060】

「アルキレン」は、特に約 12 または 18 までの炭素原子、より具体的には、直鎖でも分枝鎖でもあり得る 1 ~ 6 の炭素原子を有する、二価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指す。この用語は、メチレン (- CH₂ -)、エチレン (- CH₂CH₂ -)、プロピレン異性体 (例えば、- CH₂CH₂CH₂ - 、および、- CH (CH₃)CH₂ -) などによって例証される。

10

【0061】

「アルキニル」は、約 12 または 18 までの炭素原子、とりわけ、2 ~ 6 の炭素原子を有するアセチレン系不飽和ヒドロカルビル基を指し、該アセチレン系不飽和ヒドロカルビル基は、直鎖または分枝鎖であり得るアルキニル不飽和の少なくとも 1 つの部位、とりわけ、1 - 2 つの部位を有する。アルキニル基の特定の非限定的な例は、アセチレン、エチニル (- C ≡ CH)、プロパルギル (- CH₂C ≡ CH) などを含む。

【0062】

「アミノ」はラジカル - NH₂ を指す。

20

【0063】

「アミノカルボニル」は基 - C (O) NRR を指し、それぞれの R は、独立して、水素、アルキル、アリール、または、シクロアルキルであり、あるいは、R 基はアルキレン基を形成するために結合する。

【0064】

「アミノカルボニルアミノ」は、基 - NRC (O) NRR を指し、それぞれの R は、独立して、水素、アルキル、アリール、または、シクロアルキルであり、あるいは、2 つの R 基はアルキレン基を形成するために結合する。

【0065】

「アミノカルボニルオキシ」は、基 - OC (O) NRR を指し、それぞれの R は、独立して、水素、アルキル、アリール、または、シクロアルキルであり、あるいは、R 基はアルキレン基を形成するために結合する。

30

【0066】

「アラルキル」または「アリールアルキル」は、上に定義されるように 1 つ以上のアリール基で置換された、上に定義されるようなアルキル基を指す。

【0067】

「アリール」は、親芳香族環系の単一の炭素原子から 1 つの水素原子を取り除くことに由来する一価の芳香族炭化水素基を指す。典型的なアリール基としては、限定されないが、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、ベンゼン、クリセン、コロネン、フルオランテン、フルオレン、ヘキサセン、ヘキサフェン、ヘキサレン (hexalene)、*as*-インダセン、*s*-インダセン、インダン、インデン、ナフタリン、オクタセン (octacene)、オクタフェン (octaphe ne)、オクタレン (octalene)、オバレン、ペンタ - 2 , 4 - ジエン、ペンタセン、ペンタレン、ペンタフェン、ペリレン、フェナレン、フェナントレン、ピセン、プレイアデン、ピレン、ピラントレン、ルビセン、トリフェニレン、トリナフタレンなどに由来した基が挙げられる。場合によっては、アリール基は、6 ~ 14 の炭素原子を含んでいる。

40

【0068】

「アリールオキシ」は、- O - アリール基を指し、「アリール」は本明細書で定義された通りである。

50

【 0 0 6 9 】

「アジド」は、- N₃基を指す。

【 0 0 7 0 】

「カルボニル」は、- C (O) - 基、例えば、カルボキシ、アミド、エステル、ケトン、または、アシル置換基を指す。

【 0 0 7 1 】

「カルボキシル」は、- C (O) O H 基を指す。

【 0 0 7 2 】

「シアノ」は - C N 基を指す。

【 0 0 7 3 】

「シクロアルケニル」は、3 ~ 10 の炭素原子を有し、縮合したおよび架橋した環系を含む1つの環状の還または多くの縮合環を有し、および、オレフィン不飽和の少なくとも1つの部位、とりわけ、1 - 2 の部位を有する、環式のヒドロカルビル基を指す。そのようなシクロアルケニル基は、一例として、シクロヘキセニル、シクロペンテニル、シクロプロペニルなどの単環構造を含む。

10

【 0 0 7 4 】

「シクロアルキル」は、3 から約 10 の炭素原子を有し、および、縮合したおよび架橋した環系を含む1つの環状の還または多くの縮合環を有し、1 ~ 3 つのアルキル基で随意に置換され得る、環式のヒドロカルビル基を指す。そのようなシクロアルキル基としては、一例として、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロオクチル、1 - メチルシクロプロピル、2 - メチルシクロペンチル、2 - メチルシクロオクチルなどの単環構造、および、アダマンタニルなどの多くの環構造が挙げられる。

20

【 0 0 7 5 】

「ヘテロシクロアルキル」は、N、O、およびSから独立して選ばれる1つ以上のヘテロ原子を包含する、安定した複素環式非芳香族環および縮合環を指す。縮合複素環系は、炭素環を含んでもよく、1つの複素環だけを含む必要があることもある。複素環の例としては、限定されないが、ピペラジニル、ホモピペラジニル、ピペリジニル、および、モルフォリニルが挙げられる。

【 0 0 7 6 】

「ハロゲン」または「ハロ」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、および、ヨードを指す。

30

【 0 0 7 7 】

「ヘテロ」は、化合物、または、化合物上に存在する基を記載するために使用されるとき、化合物または基中の1以上の炭素原子が、例えば、窒素、酸素または、硫黄のヘテロ原子と取り替えられたことを意味する。ヘテロは、例えば、ヘテロ原子アルキル（例えば、ヘテロアルキル）、シクロアルキル（例えば、ヘテロシクロアルキル）、アリール（例えば、ヘテロアリール）、シクロアルケニル（例えば、ヘテロシクロアルケニル）、シクロヘテロアルケニル（例えば、ヘテロシクロヘテロアルケニル）などの上記のヒドロカルビル基のいずれかで、かつ、1 - 5、とりわけ、1 - 3 のヘテロ原子を有するものに適用されてもよい。ヘテロ原子は、炭素または水素以外の任意の他の原子であり、典型的には、限定されないが、窒素、酸素、硫黄、リン、ホウ素、塩素、臭素、またはヨードである。

40

【 0 0 7 8 】

「ヘテロアリール」は、親ヘテロ芳香族環系の単一の原子から1つの水素原子の除去によって派生した一価のヘテロ芳香族基を指す。典型的なヘテロアリール基としては、限定されないが、アクリジン、アルシンドール、カルバゾール、- カルボリン、クロマン、クロメン、シンノリン、フラン、イミダゾール、インダゾール、インドール、インドリン、インドリジン、イソベンゾフラン、イソクロメン、イソインドール、イソインドリン、イソキノリン、イソチアゾール、イソオキサゾール、ナフチリジン、オキサジアゾール、オキサゾール、ペリミジン、フェナントリジン、フェナントロリン、フェナジン、フタラジン、プテリジン、プリン、ピラン、ピラジン、ピラゾール、ピリダジン、ピリジン、ピ

50

リミジン、ピロール、ピロリジン、キナゾリン、キノリン、キノリジン、キノキサリン、テトラゾール、チアジアゾール、チアゾール、チオフエン、トリアゾール、キサンテンなどに由来する基が挙げられる。ヘテロアリール基は、5 - 20 員環ヘテロアリール、または、5 - 10 員環ヘテロアリールであり得る。特定のヘテロアリール基は、チオフエン、ピロール、ベンゾチオフエン、ベンゾフラン、インドール、ピリジン、キノリン、イミダゾール、オキサゾール、および、ピラジンに由来したものである。

【0079】

以下の環系は、用語「ヘテロアリール」で表示された複素環の（置換されようとも置換されまいとも）ラジカルの例である：チエニル、フリル、ピロリル、ピロリジニル、イミダゾリル、イソキサゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、テトラゾリル、チアトリアゾリル、オキサトリアゾリル、ピリジン、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、オキサジニル、トリアジニル、チアジアジニル、テトラゾロ、1, 5 - [b]ピリダジニルおよびプリニル、同様に、ベンゾ縮合誘導体、例えば、ベンゾオキサゾリル、ベンズチアゾリル、ベンズイミダゾリル、および、インドリル。

10

【0080】

上記の随意に置換されたヘテロアリール環のための置換基は、1 ~ 3 のハロ、トリハロメチル、アミノ、保護アミノ、アミノ塩、一置換アミノ、二置換アミノ、カルボキシ、保護カルボキシ、カルボン酸塩、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、ヒドロキシ基の塩、低級アルコキシ、低級アルキルチオ、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、置換（シクロアルキル）アルキル、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキル、および、（置換フェニル）アルキルを含む。ヘテロアリール基のための置換基は、以前定義された通りであるか、あるいは、トリハロメチルの場合では、トリフルオロメチル、トリクロロメチル、トリブロモメチル、または、トリヨードメチルであり得る。ヘテロアリール環のための上記の置換基と共に使用するように、「低級アルコキシ」は、C 1 - C 4 アルコキシ基を意味し、同様に、「低級アルキルチオ」は、C 1 - C 4 アルキルチオ基を意味する。

20

【0081】

「複素環」は、環の一部として、硫黄、酸素または窒素などの炭素に加えて、原子を包含している環構造を含む有機化合物を指している。それらは単純な芳香環または非芳香環のいずれかであってもよい。例としては、アゾール、モルホリン、ピペラジン、ピリジン、ピリミジン、および、ジオキサンが挙げられる。安定した化学的に実現可能な複素環におけるヘテロ原子の最大数は、それが芳香族であるか非芳香族であるかにかかわらず、環の大きさ、不飽和度、および、ヘテロ原子の原子価などの因子によって決定される。一般に、ヘテロ芳香族環が化学的に実現可能で安定している限り、複素環は1 ~ 4 のヘテロ原子を有していてもよい。

30

【0082】

「ヒドロキシル」は、- OH 基を指す。

【0083】

「立体異性体」は、所定の化合物に関するように、同じ分子式を有する別の化合物を指し、別の化合物を構築する原子は、それらが空間で配向する方法において異なるが、別の化合物の原子は、どの原子がどの他の原子と結合するかに関して、所定の化合物中の原子に似ている（例えば、鏡像異性体、ジアステレオマー、または、幾何異性体）。例えば、Morrisson and Boyd, Organic Chemistry, 1983, 4th ed., Allyn and Bacon, Inc., Boston, MA, p. 123 を参照。

40

【0084】

「置換された」は、1 つ以上の水素原子がそれぞれ独立して同じまたは異なる置換基と置き換えられる基を指す。「置換」基は特に、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アルコキシ、アルコキシカルボニル、アルコキシカルボニルアミノ、アミノ、アミノカルボニル、アミノカルボニルアミノ、アミノカルボニルオキシ、アリール、アリールオキシ、

50

アジド、カルボキシル、シアノ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ハロゲン、ヒドロキシル、ケト、ニトロ、チオアルコキシ、チオアリールオキシ、チオケト、チオール、アルキル - S (O) - 、アリール - S (O) - 、アルキル - S (O) ₂ - 、および、アリール - S (O) ₂ からなる基から選ばれた、1以上の置換基、例えば、1～5の置換基、とりわけ1～3の置換基を有する基について言及する。所望の置換基は、限定されないが、- X、- R₈ (R₈ が水素ではないという条件で)、- O - 、= O、- O R₈、- S R₈、- S - 、= S、- N R₈ R₉、= N R₈、- C X₃、C F₃、- C N、- O C N、- S C N、- N O、- N O₂、= N₂、- N₃、- S (O)₂ O - 、- S (O)₂ O H、- S (O)₂ R₈、O S (O₂) O - 、- O S (O)₂ R₈、- P (O) (O -)₂、- P (O) (O R₈) (O -)、- O P (O) (O R₈) (O R₉)、- C (O) R₈、C (S) R₈、- C (O) O R₈、- C (O) N R₈ R₉、- C (O) O - 、- C (S) O R₈、- N R₁₀ C (O) N R₈ R₉、 \vee N R₁₀ C (S) N R₈ R₉、- N R₁₁ C (N R₁₀) N R₈ R₉、および、- C (N R₁₀) N R₈ R₉を含んでもよく、それぞれの X は、独立してハロゲンであり、R₈ はアルキル、アルケニル、アルキニル、複素環、または、アリールである。

10

【0085】

「スルホニル」は、基 - S O₂ - を指す。スルホニルは、例えば、メチル - S O₂ - 、フェニル - S O₂ - 、および、アルキルアミノ - S O₂ - を含む。

【0086】

「スルフィニル」は、基 - S (O) - を指す。

20

【0087】

「チオアルコキシ」は、基 - S - アルキルを指す。

【0088】

「チオアリールオキシ」は、基 - S - アリールを指す。

【0089】

「チオケト」は、基 = S を指す。

【0090】

「チオール」は、基 - S H を指す。

【0091】

「チオ」は、基 - S - を指す。チオは、例えば、チオアルコキシ、チオアリールオキシ、チオケト、および、チオールを含んでいる。

30

【0092】

1つ以上の置換基を包含している本明細書に開示された基のいずれにも関して、そのような基が、立体的に実現困難な、および/または、合成的に実行可能な任意の置換または置換パターンを含まないことが、もちろん理解されよう。加えて、被験体の化合物は、これらの化合物の置換から発生する立体化学的異性体をすべて含んでいる。

【0093】

同じ分子式を有しているが、原子の結合の性質または配列、あるいは、空間における原子の配置の異なる化合物は、「異性体」と称される。空間におけるその原子の配置が異なる異性体は、「立体異性体」と称される。互いの鏡像ではない立体異性体は、「ジアステレオマー」と称され、互いの鏡像を重ね合わせることができないものは「鏡像異性体」と称される。化合物が不斉中心を有する場合、例えば、それが4つの異なる基に接合される場合、1対の鏡像異性体が可能である。鏡像異性体は、その不斉中心の絶対配置を特徴とすることができ、カーン (C a h n) とプレローグ (P r e l o g) の R および S - 配置の法則によって、あるいは、分子が偏光面を回転させて、右回りか左回り (すなわち、それぞれ、(+) または (-) の異性体) として指定される手法によって、特徴付けられ得る。キラル化合物は、個々の鏡像異性体、または、その混合物のいずれかとして、存在することができる。均等な割合の鏡像異性体を含む混合物は、「ラセミ混合物」と呼ばれる。

40

【0094】

50

本発明の化合物は、1つ以上の不斉中心を有してもよく、したがって、そのような化合物は、個体(R) - または(S) - 立体異性体として、あるいは、その混合物として、生成され得る。別段指示のない限り、明細書と請求項の特定の化合物の記載と命名は、鏡像異性体および混合物の両方、そのラセミ化合物、あるいは、それ以外のものを含むことを意図している。立体化学の測定と立体異性体の分離の方法は、当該技術では周知である(例えば、the discussion in Chapter 4 of "Advanced Organic Chemistry", 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992を参照)。

【0095】

PI3キナーゼ。ホスファチジルイノシトール3, 4, 5三リン酸塩[Ptclns(3, 4, 5)P₃]。[Ptclns(3, 4, 5)P₃]は、細胞増殖、細胞生存、および、代謝変化を制御する経路に - - しばしばプロテインキナーゼによって作用する。この脂質は、関連タンパク質のファミリーであるPI3キナーゼによって生成され得る(Vanhaesebroeck et al. (1997) TIBS 22:267; Toker and Cantley (1997) Nature 387:673676)。ホスファチジルイノシトール3 - キナーゼ(EC2.7.1.137)は、85 - kDと110 - kDのサブユニットからなる。85 - kDサブユニットは、PI3キナーゼ活性を欠き、アダプターとして作用して、活性化タンパク質チロシンキナーゼに110 - kDサブユニット(p110)を結合する。p110は、触媒活性のためにp85 - アルファを備えた複合体を必要とすることもある。ヒトPI(3)キナーゼのp110サブユニットの遺伝子配列とアミノ酸配列は、Genbank(受入番号Z29090、X83368)から得ることができる。[00103] 所望の薬剤は、PI(3)キナーゼの阻害剤、例えば、BEZ - 235、ウォルトマンニン、LY294002などを含み、本明細書の模式図2で示される化合物も含んでいる。ウォルトマンニンの生理学的に有効な値は、約10 ~ 1000 nMに及び、通常は約100 ~ 500 nM、最適には約200 nMである。LY294002生理学的に有効な値は、約1 ~ 500 μMに及び、通常は約25 ~ 100 μM、最適には約50 μMである。阻害剤は、標的組織でこれらの濃度を提供するのに十分な投与量で、インビボまたはインビトロで投与される。PI(3)キナーゼの他の阻害剤は、PI(3)キナーゼに特異的なアンチセンス試薬またはsiRNAを含んでいる。とりわけ対象となるのは、公に入手可能な配列を使用して、ヒトPI(3)キナーゼ配列、とりわけ、触媒p110サブユニットから得られるアンチセンス分子である。代替的に、抗体、抗体フラグメント、および、アナログ、または、他の遮断薬は、活性を低下させるべく、PI(3)キナーゼに結合するために使用される。

【0096】

チオレドキシンは、ジチオールジスルフィド活性部位を包含する、12 - kDオキシドレダクターゼ酵素である。それは広範に分布しており、植物や細菌から哺乳動物までの多くの生物に見られる。チオレドキシンのための多数のインビトロ基質は、リボヌクレアーゼ、コリオゴナドトロピン、凝固因子、グルココルチコイド受容体、および、インスリンを含んで特定されている。チオレドキシンは、CXXCモチーフにおける2つの隣接するシステインの存在によるアミノ酸配列の値を特徴とする。これらの2つのシステインは、他のタンパク質を還元するチオレドキシンの能力の鍵である。チオレドキシンのタンパク質は、チオレドキシンフォールドと称される特徴的な三次構造も有している。

【0097】

チオレドキシンは、NADPH依存性の反応において、フラボ酵素チオレドキシン還元酵素によって還元された状態で維持される。チオレドキシンは、ペルオキシダーゼとリボヌクレオチド還元酵素に対する電子供与体として作用する。関連するグルタレドキシンは、チオレドキシンの機能の多くを共有するが、特定の還元酵素よりもむしろグルタチオンによって還元される。

【0098】

アポトーシスを誘発するためにT r xまたはT r x Rのいずれかを標的とする多くの阻害剤が記載されてきた。例えば、スベロイルアニリドヒドロキサム酸(S A H A)は、T r xの内因性阻害剤をアップレギュレートすることによって機能する。他の化合物は、T r x Rのセレノシステイン含有活性部位を標的とする。これらは、金化合物、白金化合物、三酸化ヒ素、モテクサフィンガドリニウム、亜硝酸化合物、および、様々なフラボノイドを含んでいる。加えて、いくつかの化合物は、T r x RをR O S生成酵素に変換する。P X - 1 2は現在、チオレドキシン阻害剤として臨床試験で用いられている。

【 0 0 9 9 】

(組成物および使用方法)

T G 2、とりわけ腸のT G 2の活性を阻害するために使用されてもよい治療用の化合物が、本明細書で提供される。これらの化合物は、様々な経路による治療的投与のための様々な製剤に組み込むことができる。より具体的には、本明細書で開示された化合物は、適切で薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤および/またはアジュバントとの組み合わせによって、医薬組成物へ処方され得る。下記は発明の化合物の例である。

10

【 0 1 0 0 】

特定の実施形態では、被験体の化合物は、化合物の光学異性および/または立体異性に寄与する置換基を含んでいる。化合物の塩、溶媒和物、水和物、および、プロドラッグ形態も対象としている。

そのような形態はすべて、本発明に包含される。したがって、本明細書に記載の化合物は、その塩、溶媒和物、水和物、プロドラッグ、および、異性体の形態を含み、その薬学的に許容可能な塩、溶媒和物、水和物、プロドラッグ、および、異性体を含む。特定の実施形態では、化合物は薬学的に活性な誘導体へと代謝されてもよい。

20

【 0 1 0 1 】

所望の組成物は、チオレドキシン阻害剤P X 1 2 (1)とそのアナログを含み、以下の表 1 で説明される化合物を含んでいる。

【 0 1 0 2 】

【表 1】

表 1

#	構造	波長 (nm)	$\Delta\epsilon$ (M^{-1} cm^{-1})	Trx k_{inh}/K_i (μM^{-1} min^{-1})	DTT k (μM^{-1} min^{-1})	Trx/DTT
1		252	9400	0.16	0.0108	15
3		300	12064	0.19	0.0048	39
4		300	20630	-	0.054	-
5		300	22708	0.24	0.0032	74
6		300	1370	$\sim 2.8 \times 10^{-4}$	$\sim 2.8 \times 10^{-5}$	10
7		300	25200	0.38	0.0046	83
8		300	28620	0.33	0.0046	72
9		273	17194	0.87	0.0024	362
10		287	-6650	0.19	0.0022	85
11		320	22548	0.50	0.0013	385
12		294	19104	2.4	0.0061	392
13		343	8732	inactive	3.7×10^{-5}	N/A
14		310	5600	0.050	0.00074	68
15		325	15160	0.015	0.00017	88
16		372	3440	0.35	0.0020	175
17		314	16100	0.049	0.00060	82

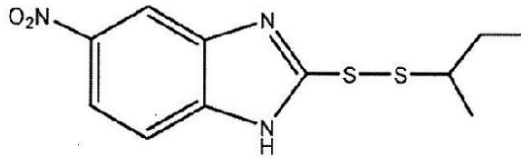
ヒトチオレドキシン阻害剤の物理的特徴と動力学パラメーター。下記の化合物は P X 1 2 (1) のアナログである。その効力は二分子パラメーター k_{inh}/K_i によって評価される。ヒトチオレドキシンのその選択性は、ジチオスレイトール (DTT) に対する、Trx へのその反応の比率によって評価される。

【0103】

とりわけ対象となるのは以下の化合物である：

【0104】

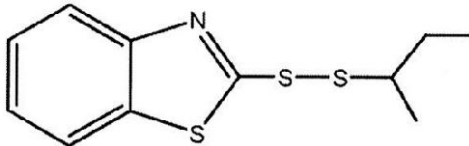
【化 1】



(9) 2-(*sec*-ブチルジスルファニル)-5-ニトロ-1*H*-ベンゾ [d] イミダゾール ;

【 0 1 0 5 】

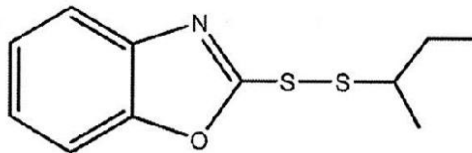
【化 2】



(11) 2-(*sec*-ブチルジスルファニル)ベンゾ [d] チアゾール ;

【 0 1 0 6 】

【化 3】



(12) 2-(*sec*-ブチルジスルファニル)ベンゾ [d] オキサゾール

【 0 1 0 7 】

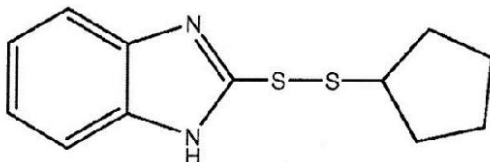
これらは特異性において 3 0 0 倍以上の改善を示している。

【 0 1 0 8 】

対象となる化合物は次のものを含んでいる。

【 0 1 0 9 】

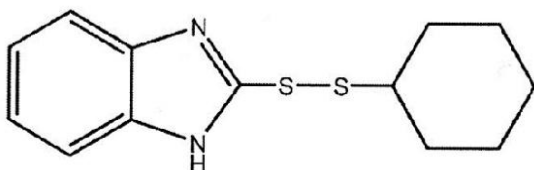
【化 4】



(5) 2-(シクロペンチルジスルファニル)-1*H*-ベンゾ [d] イミダゾール

【 0 1 1 0 】

【化 5】



(7) 2-(シクロヘキシルジスルファニル)-1*H*-ベンゾ [d] イミダゾール

【 0 1 1 1 】

これらも対象となっており、揮発性の 2 - ブタンチオール部分は、ペナルティを受ける

10

20

30

40

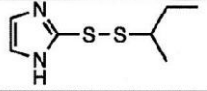
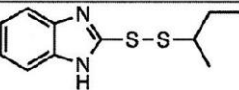
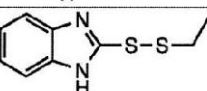
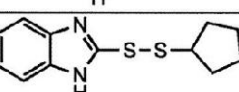
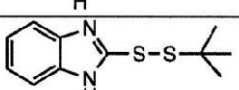
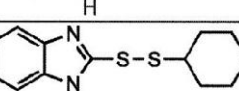
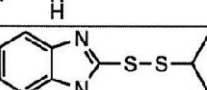
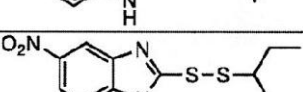
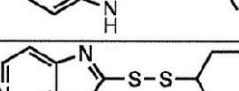
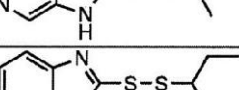
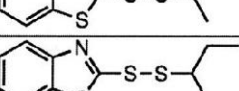
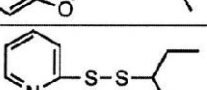
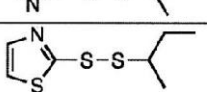
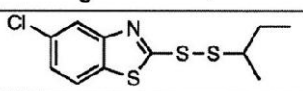
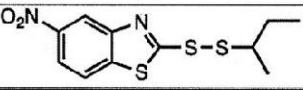
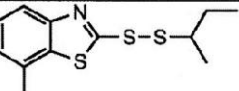
50

ことなく、揮発性でないチオール類と取り替えられる。2 - ブタンチオール脱離基は、以前のヒト臨床研究において P X - 1 2 の用量制限毒性の源であった。

【 0 1 1 2 】

【 表 2 】

表 2. ジスルフィド阻害剤の ^1H NMR (300 MHz, DMSO)

#	構造	^1H NMR	外見
1		δ 0.87, t, 3H; 1.29, d, 3H; 1.58, m, 2H; 3.04, m, 1H; 7.02, s, 1H; 7.29, s, 1H	白色粉末
3		δ 0.98, t, 3H; 1.32, d, 3H; 1.62, m, 2H; 2.99, m, 1H; 7.41, m, 1H; 7.67, m, 1H; 9.61, s, 1H	白色粉末
4		δ 1.37, t, 3H; 2.88, m, 2H; 7.42, m, 1H; 7.68, m, 1H; 9.78, s, 1H	白色粉末
5		δ 1.74, m, 4H; 2.01, m, 2H; 3.45, m, 1H; 7.42, s, 1H; 7.68, s, 1H; 9.68, s, 1H	白色粉末
6		δ 1.39, s, 9H; 7.50, m, 2H	白色粉末
7		δ 1.32, m, 6H; 1.78, m, 2H; 2.03, m, 2H; 3.00, m, 1H; 7.24, d, 2H; 7.51, s, 2H	白色粉末
8		δ 1.34, d, 6H; 3.25, m, 1H; 7.24, d, 2H; 7.51, s, 2H	白色粉末
9		δ 0.96, t, 3H; 1.33, d, 3H; 1.66, m, 2H; 3.06, m, 1H; 7.63, d, 1H; 8.18, d, 1H; 8.42, s, 1H	黄色固体
10		δ 0.97, t, 3H; 1.32, d, 3H; 1.62, m, 2H; 3.04, m, 1H; 7.29, t, 1H; 7.92, d, 1H; 8.32, s, 1H	暗粉末
11		δ 1.07, t, 3H; 1.38, d, 3H; 1.71, m, 2H; 3.10, m, 1H; 7.39, m, 2H; 7.85, m, 2H	淡黄色液体
12		δ 0.92, t, 3H; 1.29, d, 3H; 1.59, m, 2H; 3.18, m, 1H; 7.37, m, 2H; 7.71, m, 2H	暗液体
13		δ 0.95, t, 3H; 1.24, d, 3H; 1.57, m, 2H; 2.98, m, 1H; 7.25, m, 1H; 7.76, m, 2H; 8.46, m, 1H	黄色液体
14		δ 0.92, t, 3H; 1.31, d, 2H; 1.59, m, 2H; 3.11, m, 1H; 6.97, d, 1H; 7.26, d, 1H	淡黄色液体
15		δ 0.98, t, 3H; 1.35, d, 3H; 1.64, m, 2H; 3.23, m, 1H; 7.47, m, 1H; 7.94, d, 1H; 8.10, d, 1H	白色粉末
16		δ 0.99, t, 3H; 1.35, d, 3H; 1.68, m, 2H; 3.28, m, 1H; 8.01, d, 1H; 8.31, d, 1H; 9.12, s, 1H	黄色固体
17		δ 0.94, t, 3H; 1.29, d, 3H; 1.59, m, 2H; 2.90 s, 3H; 3.10, m, 1H; 7.27, s, 1H	明液体

10

20

30

40

【 0 1 1 3 】

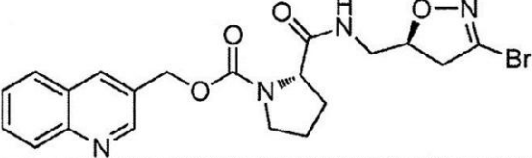
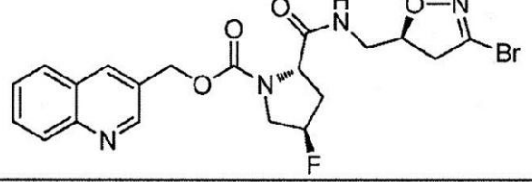
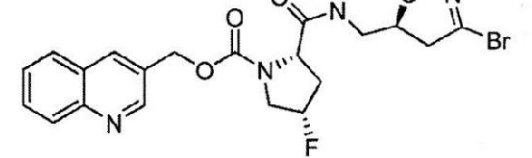
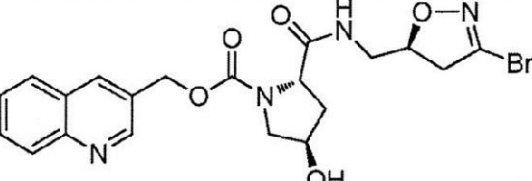
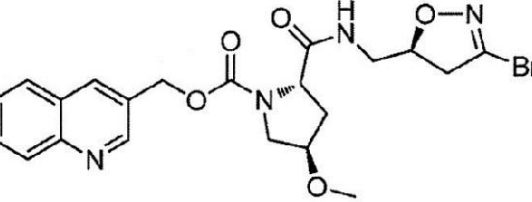
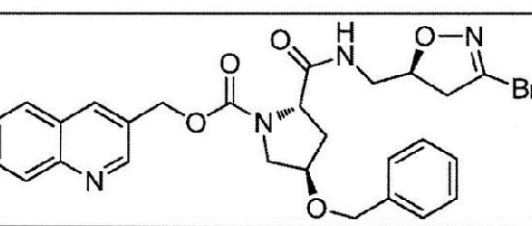
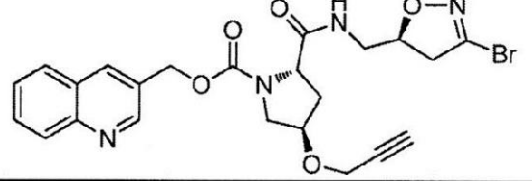
所望の組成物は、T G 2 阻害剤 E R W 1 0 4 1 E (2) とそのアナログを含み、以下の表 3 で説明される化合物を含む。

50

【 0 1 1 4 】

【 表 3 】

表 3

化合物	ID	K_{inh}/K_i [M ⁻¹ min ⁻¹]	
		TG2	TG1
	2	16989	13222
	18	7250	6694
	19	13436	6040
	20	12511	4387
	21	n/d	n/d
	22	7710	n/d
	23	8518	4340

ERW1041E (2) のアナログ。親化合物はヒトTG2に対して優れた活性を有しているが、ヒトの皮膚の構造と機能の維持にとって不可欠な酵素であるヒトトランスグルタミナーゼ1 (TG1) に対して同等の活性を示したため、それで満足だとはみなされていない。

【 0 1 1 5 】

所望の化合物は、限定されないが、以下を含んでいる：

10

20

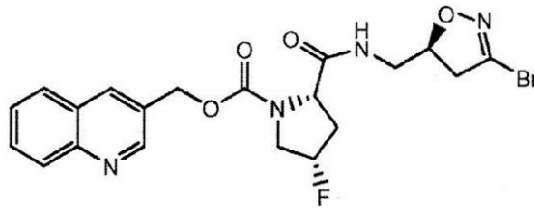
30

40

50

【 0 1 1 6 】

【 化 6 】



(19)

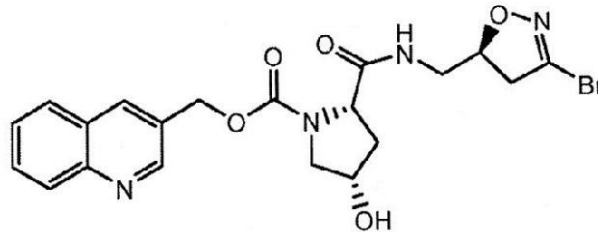
(2*S*,4*S*)-キノリン-3-イルメチル 2-(((*S*)-3-プロモ-4,5-ジヒドロイソキサゾール-5-イル)メチルカルバモイル)-4-フルオロピロリジン-1-カルボン酸塩

10

【 0 1 1 7 】

【 化 7 】

(20)



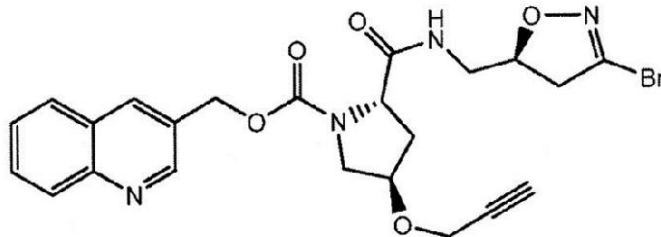
(2*S*,4*S*)-キノリン-3-イルメチル 2-(((*S*)-3-プロモ-4,5-ジヒドロイソキサゾール-5-イル)メチルカルバモイル)-4-ヒドロキシピロリジン-1-カルボン酸塩

20

【 0 1 1 8 】

【 化 8 】

(23)



(2*S*,4*R*)-キノリン-3-イルメチル 2-(((*S*)-3-プロモ-4,5-ジヒドロイソキサゾール-5-イル)メチルカルバモイル)-4-(prop-2-ynyloxy)ピロリジン-1-カルボン酸塩

30

【 0 1 1 9 】

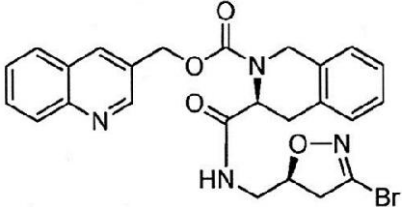
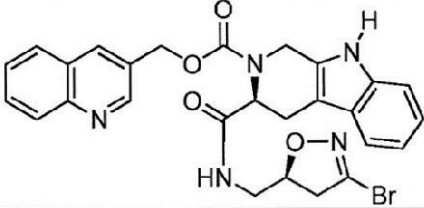
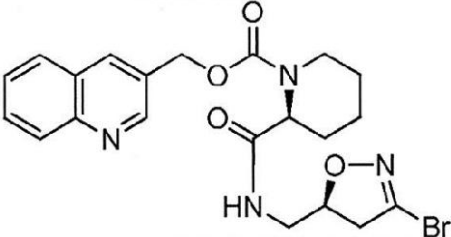
これらの化合物は、TG2 への特異性を著しく改善しており、したがって、治療的な用途に有望な手がかりである。これらの化合物の持続性は、直交性のアルキン基の存在によってとりわけ魅力的である。

40

【 0 1 2 0 】

【表 4】

表 4 : ERW1041E (2) の他の環に制約されたアナログ

化合物	ID	k_{inh}/K_i [M ⁻¹ min ⁻¹]	
		TG2	TG1
	24	7800	n/d
	25	20800	n/d
	26	8297	23092

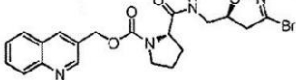
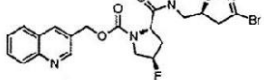
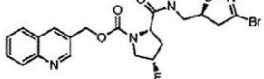
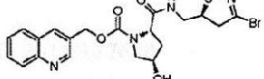
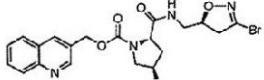
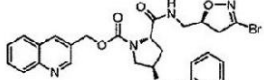
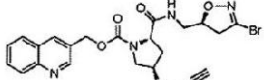
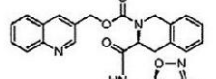
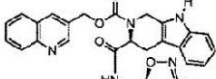
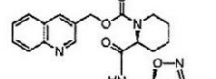
10

20

【 0 1 2 1 】

【表 5】

表 5. TG2 阻害剤の ^1H NMR

化合物	ID	
	2	Published (Watts, Siegel and Khosla – <i>J. Med. Chem.</i> 2006, 49, 7493-7501.)
	18	^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.86 (s, 1H); 8.08 (s, 1H); 8.06 (m, 1H); 7.76 (d, 1H); 7.65 (t, 1H); 7.49 (t, 1H); 7.16 (s, 1H); 5.40-5.10 (m, 3H); 4.70 (s, 1H); 4.40 (m, 1H); 4.00-3.80 (m, 1H); 3.70-2.90 (m, 5H); 2.50 (m, 1H); 2.30-2.10 (m, 1H).
	19	^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.84 (s, 1H); 8.14 (s, 1H); 8.06 (d, 1H); 7.80 (d, 1H); 7.70 (t, 1H); 7.43 (t, 1H); 6.78 (s, 1H); 5.40-5.20 (m, 3H); 4.75 (s, 1H); 4.50 (s, 1H); 3.80 (m, 1H); 3.70-3.30 (m, 3H); 3.20-3.00 (m, 2H); 2.60 (m, 1H); 2.40-2.20 (m, 1H).
	20	^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.87 (s, 1H); 8.11 (s, 1H); 8.08 (d, 1H); 7.79 (d, 1H); 7.69 (t, 1H); 7.53 (t, 1H); 7.04 (s, 1H); 5.30 (s, 1H); 5.23 (s, 1H); 4.76 (m, 1H); 4.45 (m, 2H); 3.75-3.60 (m, 3H); 3.38 (m, 1H); 3.20 (m, 1H); 3.02 (m, 1H); 2.35-2.15 (m, 2H).
	21	^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.92 (s, 1H); 8.16 (d, 1H); 8.08 (m, 1H); 7.83 (d, 1H); 7.72 (t, 1H); 7.56 (t, 1H); 6.84 (s, 1H); 5.30 (m, 2H); 4.8 (m, 1H); 4.35 (t, 1H); 4.00 (s, 1H); 3.8-3.4 (m, 3H); 3.30 (s, 3H); 3.25 (m, 1H); 3.05 (m, 1H); 2.25 (m, 1H); 2.00 (m, 1H).
	22	^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.93 (s, 1H); 8.15 (s, 1H); 8.12 (d, 1H); 7.82 (d, 1H); 7.74 (dt, 1H); 7.57 (dt, 1H); 7.4-7.2 (m, 5H); 5.34 (m, 2H); 4.79 (s, 2H); 4.46 (m, 2H); 4.2 (m, 1H); 3.69 (m, 1H); 3.58 (m, 1H); 3.49 (m, 1H); 3.22 (m, 1H); 3.05 (m, 1H); 2.31 (m, 1H); 1.94 (m, 1H).
	23	^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.89 (s, 1H); 8.1 (s, 1H); 8.06 (m, 1H); 7.80 (m, 1H); 7.68 (m, 1H); 7.52 (t, 1H); 6.90 (s, 1H); 5.30 (m, 2H); 4.75 (m, 1H); 4.30 (m, 1H); 4.10 (s, 3H); 3.8-3.5 (m, 2H); 3.40 (m, 1H); 3.20 (m, 1H); 3.00-2.60 (m, 2H); 2.40 (m, 1H); 2.25 (m, 1H).
	24	^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 8.91 (d, 1H); 8.17-8.41 (m, 2H); 7.90-8.05 (m, 2H); 7.72-7.80 (m, 1H); 7.58-7.66 (m, 1H); 7.10-7.25 (m, 4H); 5.20-5.41 (m, 2H); 4.38-4.77 (m, 4H); 2.93-3.30 (m, 5H); 2.60-2.75 (m, 1H).
	25	^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 10.81 (d, 1H); 8.97 (d, 1H); 8.32-8.44 (m, 2H); 7.97-8.07 (m, 2H); 7.78 (t, 1H); 7.64 (t, 1H); 7.37 (d, 1H); 7.28 (dd, 1H); 7.03 (t, 1H); 6.96 (t, 1H); 5.36-5.47 (m, 2H); 5.19 (t, 1H); 4.88 (t, 1H); 4.50-4.74 (m, 2H); 3.08-3.32 (m, 4H); 2.93-3.04 (m, 1H); 2.74-2.84 (m, 1H).
	26	^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.90 (s, 1H); 8.14 (d, 1H); 8.09 (d, 1H); 7.82 (d, 1H); 7.71 (t, 1H); 7.55 (t, 1H); 6.48 (s, 1H); 5.33 (s, 2H); 4.77 (m, 2H); 3.52 (m, 1H); 3.45 (t, 1H); 3.23 (m, 1H); 3.00-2.85 (m, 2H); 1.5-1.7 (m, 4H).

【0122】

TG2の活性化または活性を阻害する、および/または、腸の傍細胞輸送を阻害する薬剤は、望ましい結果を達成するのに有効な期間および投与量で、必要としている個体に投与される。本発明は、治療的な投与のために様々な製剤中の阻害剤を提供する。1つの態様では、薬剤は、適切な薬学的に許容可能な担体または希釈剤との組み合わせによって、医薬組成物へと処方され、および、錠剤、カプセル、粉末剤、顆粒剤、軟膏剤、溶液、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル剤、マイクロスフェア、および、エアロゾルなどの、固体、半固体、または、気体の形態の調製物へと処方される。そのため、経口投与が好ましい投与経路であるが、阻害剤の投与は様々な方法で達成される。製剤によっては、阻害剤は、移植部位で活性投与量を保持するように作用する移植片の使用などの製剤のおかげで局在化されるか、あるいは、さもなければ、関連する薬物動態学によって局在化される。

【0123】

医薬品の剤形では、阻害剤は、その薬学的に許容可能な塩の形態で投与される。いくつ

かの剤形では、阻害剤は単独で使用され、別の剤形では、阻害剤は、別の薬学的に活性な化合物と組み合わせて投与される。後者の実施形態では、別の活性化合物は、実施形態によっては、有毒なグルテンオリゴペプチドを開裂する、あるいは、さもなければ分解分解することができるグルテナーゼである。

【0124】

経口調製剤については、薬剤は、単独で投与されるか、あるいは、錠剤、粉末剤、顆粒剤、または、カプセルを作るための適切な添加剤と組み合わせて、例えば、ラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプン、または、ジャガイモデンプンなどの従来の添加剤と組み合わせて、結晶セルロース、セルロース誘導体、アラビアゴム、トウモロコシデンプンまたはゼラチンなどの結合剤と組み合わせて、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプンまたはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどの崩壊剤と組み合わせて、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤と組み合わせて、および、実施形態によっては、賦形剤、緩衝薬、湿潤剤、保存料、および、香味料と組み合わせて投与される。

【0125】

本発明の1つの実施形態では、経口調製剤は、活性薬剤が腸管に送達されるように、腸溶コーティングを含む。腸用製剤は、胃の強酸性内容物から活性成分を保護するためにしばしば使用される。そのような製剤は、酸性の環境下で不溶性で、かつ、塩基環境下で可溶性のポリマーの膜で、固体の剤形をコーティングすることによって作成される。典型的な膜は、酢酸フタル酸セルロース、ポリ酢酸ビニルフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、および、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、メタクリル酸塩共重合体、および、酢酸フタル酸セルロースである。

【0126】

他の腸用製剤は、胃腸の粘液および細胞内膜との強力な接着相互作用を示し、パリエル板のリンパ組を覆う粘膜の吸収上皮と濾胞関連上皮を横断することができる、生物学的に腐食しやすいポリマーで作られた人工のポリマーマイクロスフェアを含む。ポリマーは、長時間、腸上皮との接触を維持し、細胞を通して、実際には、細胞をとおおよび細胞間で、上皮に浸透する。例えば、Mathiowitz et al. (1997) Nature 386 (6623): 410 - 414を参照。Dorkooshらによって(2001) J Control Release 71(3): 307 - 18で記載されたように、薬物送達系は、非常に多孔性のヒドロゲル(SPH)とSPH化合物(SPHC)のコアを利用することもできる。別の実施形態では、阻害剤またはその製剤は、食物と混ぜ合わされるか、あるいは、グルテンを含む前処理した食品に対して使用される。

【0127】

製剤は一般に単位剤形で提供され、用語「単位剤形」とは、ヒト被験体の単一投与量として適切な物理的に別々の単位を指し、各々の単位は、薬学的に許容可能な希釈剤、担体、または、ビヒクルと連動して所望の効果を生むのに十分な量で計算された、あらかじめ決められた量の阻害剤を包含する。本発明の単位剤形の仕様は、用いられる特定の複合体、達成される効果、および、宿主のそれぞれの複合体に関連した薬物動力学に依存する。

【0128】

ビヒクル、アジュバント、担体または希釈剤などの薬学的に許容可能な賦形剤は、公に容易に入手可能である。さらに、pH調節および緩衝剤、等張化剤、安定剤、湿潤剤などの薬学的に許容可能な補助物質は、公に容易に入手可能である。

【0129】

処置される患者および疾病と投与経路に依存して、阻害剤は、一日当たり0.01 mg V/kg (体重) から500 mg、例えば、平均的な人で一日当たり約100 mgの投与量で投与される。投与量は、小児製剤用に適切に調節される。特定の阻害剤、患者の食事と食事のグルテン含有量、症状の重篤度、および、副作用に対する被験体の脆弱性に応じて、投与量が変動することを、当業者はすぐに認識するであろう。本発明の阻害剤のなかには他のものよりも有力なものもある。所定の阻害剤の好ましい投与量は、様々な手段に

よって当業者が容易に決定することができる。1つの好ましい手段は、所定の化合物の生理的な効能を測定することである。

【0130】

投与のための様々な方法が本発明を実施する際に使用される。1つの好ましい実施形態では、例えば、食事とともに経口投与が用いられる。治療用製剤の投与量は、疾患の性質、投与の頻度、投与の方法、患者からの薬剤の排除などに依存して、広範に変化し得る。初回投与量を多くして、その後、維持量を少なくすることができる。用量を週に一度または二週に一度の低頻度で投与することができ、あるいは、しばしば少量に分割して、毎日、食事と一緒に、二週に一度、投与されることで、有効量を維持することができる。

【0131】

(病状)

本発明の方法が対象とする疾病は、様々な腸疾患、特に慢性の炎症性疾患を含んでいる。本発明の幾つかの実施形態において、患者は、処置が企図される腸疾患を有していると診断される。対象となる腸疾患は、限定されないが、セリアックスブルー、ヘルペス性皮膚炎、過敏性腸症候群 (IBS)、および、クローン病を含む。

【0132】

セリアックスブルーは、グルテンに対する不耐性によって引き起こされた遺伝的に感受性が強い個体における免疫介在性の疾患であり、吸収不良を引き起こす粘膜の炎症を結果として生じる。症状は通常、下痢と腹部の不快感を含んでいる。発症は小児期が一般的だが、後年生じることもある。典型的な症状は存在しない。患者のなかには無症の人もおり、単に栄養不足の兆候を有するだけの人もいる。深刻なGI症状を呈する人もいる。

【0133】

セリアックスブルーは、食事にシリアルを導入した後の幼時期と小児期に現れる。子どもは、成長障害、感情鈍麻、食欲不振、顔面蒼白、全身の筋緊張低下、腹部膨張、および、筋肉の消耗を有している。便は柔らかく、かさばっていて、粘土色で、不快である。もっと年長の子どもは、貧血または発育不全を現わすこともある。成体では、倦怠、脱力感および食欲不振がもっとも一般的である。中程度や軽度の下痢はときおり見られる症状である。脂肪便は、中程度から重度 (一日当たり7~50gの脂肪)まで様々である。患者のなかには、痩せる必要が滅多にないほど体重が減少するものもいる。貧血、舌炎、口角炎およびアフタ性潰瘍は、これらの患者で通常見られる。

ビタミンDとカルシウムの欠乏 (例えば、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症)の徴候は一般的である。男性と女性の両方で受精率が低くなることもある。

【0134】

診断は、臨床的に、および、吸収不良を暗示する実験室での以上によって疑われるものであってもよい。家族内の発生率は貴重な手掛かりである。セリアックスブルーは、明白なGI出血のない鉄欠乏の患者では強く考慮されなければならない。確認は通常、十二指腸の第2の部分からの小腸生検を含んでいる。発見物は、絨毛の不足または欠乏 (絨毛萎縮)、上皮内の細胞の増加、および、陰窩の過形成を含んでいる。生検結果が非特異性であるかもしれないので、血清学的マーカーは診断を助けることができる。組み合わせた抗グリアジン抗体 (AGA) と抗筋肉内抗体 (EMA。腸の結合組織タンパク質に対する抗体) は、ほぼ100%の陽性および陰性の適中率を有している。これらのマーカーは、感染した患者の一親等血縁者、および、セリアックスブルーに関連して頻繁な頻度で生じる疾患を抱え患者を含む、セリアックスブルーの罹患率の高い集団を選別するために使用することができる。いずれの検査も陽性である場合、患者は診断に役立つ小腸生検を行なってもよい。両方が陰性の場合、セリアックスブルーの可能性は低い。他の研究所での異常はしばしば生じ、これを探すこともある。これらは、貧血 (小児の鉄欠乏性貧血および成人の葉酸欠乏性貧血); 低アルブミン、低カルシウム、低K、および、低ナトリウム; および、アルカリホスファターゼおよびPTの上昇を含んでいる。吸収不良検査はセリアックスブルーには特異的ではないが、しばしば行なわれる。この検査が行なわれると、共通する発見物は、10~40g/日の脂肪便と、異常なD-キシロースおよび (重篤な回腸

疾患では)テストを含んでいる。

【0135】

従来の処置は、グルテンを含まない食事(小麦、ライ麦または大麦を含有する食物を裂ける)である。グルテンは非常に広範に使用されているため、患者は、回避すべき食物の詳細なリストを必要とする。患者は、栄養士に意見を求め、セリアック病患者のサポートグループに加わるように激励される。グルテンを含まない食事に対する反応は通常迅速であり、症状は1~2か月で消散する。グルテンを含む少量の食物を摂取すると、寛解を防いだり、疾患を誘発したりすることもある。

【0136】

合併症は、難治性のスプルー、膠原性のスプルー、および、腸のリンパ腫の進行を含んでいる。腸のリンパ腫はセリアックスプルー患者の6~8%に影響し、通常患者の50歳代で見られる。他のGI悪性腫瘍(例えば、食道または中咽頭の癌、小腸腺癌)の発生率は増加する。グルテンを含まない食事へのアドヒアランスは、悪性の危険を著しく減らすことができる。

10

【0137】

疱疹状皮膚炎は、重篤な掻痒性の小水疱、丘疹、および、蕁麻疹のクラスターによって特徴付けられる慢性的な皮疹である。原因は自己免疫である。診断は、直接免疫蛍光法テストを用いる皮膚生検による。処置は通常ダブソンまたはスルファピリジンを用いる。

【0138】

この疾患は、通常30乃至40歳の患者30で見られ、黒人および東アジア人ではまれである。これは自己免疫性疾患である。セリアックスプルーは、疱疹状皮膚炎患者の75乃至90%と、患者の親類の数人で見られるが、ほとんどの場合、無症候性である。甲状腺疾患の発生率も増加する。症状がよく制御されているときでさえ、ヨウ化物はその疾患を悪化させることもある。用語「ヘルペス状」は、ヘルペスウィルスとの関係よりもむしろ病変のクラスター化した外観を指している。

20

【0139】

患者は、病変と、隣接する正常に思われる皮膚の皮膚生検を有することもある。皮膚の乳頭の先端におけるIgA沈着が通常見られ、診断には重要である。患者はセリアックスプルーと診断されなければならない。

【0140】

長期間(例えば、6-12か月)グルテンを含まない食事を厳格に遵守することで、一部の患者の疾患を制御し、薬物療法の必要をなくすまたは減らす。薬物が必要な場合、ダブソンが症状改善をもたらすこともある。それは、一日に一度50mgの経口で始められ、一日に二度、または一日に三度(あるいは、一日に一度100mgの投与量)に増やされ、これは、通常1~3日以内に、そう痒を含む症状を劇的に和らげ、そうでない場合、その投与量が継続される。まったく改善が生じない場合、投与量を毎週増やし、一日に四度、100mgに増やすことができる。ほとんどの患者は、一日当たり50~150mgを維持することができ、一週間あたり25mgほどの少量しか必要としない患者もいる。それほど有効でないが、スルファピリジンは、ダブソンを許容することができない患者のための代替案として使用されてもよい。最初の経口投与量は一日二度500mgで、疾患が制御されるまで、1-2週間ごとに、一日当たり1gだけ増やす。維持量は、一週間あたり二度500mgから、一日一度1000mgまで変動する。コルヒチンは別の処置の選択肢である。病変が消散するまで処置を継続する。

30

40

【0141】

クローン病(限局性腸炎;肉芽腫性回腸炎または回結腸炎)は通常、回腸末端部および遠位結腸に影響を及ぼすが、GI管の任意の一部で生じることもある、慢性的な貫壁の炎症性疾患である。症状は下痢と腹痛を含んでいる。膿瘍、内瘻および外瘻、および腸閉塞が生じることもある。腸外の症状(特に関節炎)が生じることもある。診断は結腸内視鏡検査とバリウム造影検査による。処置は、5-アミノサリチル酸、コルチコステロイド、免疫調節物質、抗サイトカイン、抗生物質、および、しばしば外科手術を用いる。

50

【 0 1 4 2 】

最も一般的な最初の症状は、腹痛、熱、食欲不振、および、体重の減少を伴う慢性的な下痢である。腹部には圧痛があり、腫瘤または膨満は触知できるかもしれない。肉眼の直腸出血は、単離した結腸の疾患以外では異常であり、それは潰瘍性大腸炎に類似して現れることもある。何人かの患者は、急性虫垂炎または腸閉塞を刺激する急性腹症を呈する。患者の約33%は、肛門周囲の疾患（とりわけ、亀裂および瘻孔）を有しており、それはしばしばもっとも顕著であるか、あるいは、最初の苦情でさえある。小児では、腸外の所見はしばしばGI症状を圧倒し、関節炎、原因不明熱、貧血または発育遅延が主な症状であることもあり、一方で、腹痛または下痢がないこともある。

【 0 1 4 3 】

再発性疾患では症状は変わる。疼痛はもっとも一般的であり、単純な再発と膿瘍形成の両方で生じる。重篤な突然の再発患者または膿瘍を抱えた患者は、顕著な圧痛、防御、反跳、および一般的な有毒性の外観を有する傾向がある。狭窄部分は、疝痛、膨満、便秘および嘔吐と共に、腸閉塞を引き起こすこともある。以前の外科手術からの癒着は、クローン病の突然の再発による閉塞に特有な熱、疼痛、および倦怠感の前駆症状なく、急に始まる腸閉塞を引き起こすこともある。腸膀胱瘻は、尿に気泡を生成することもある（気尿症）。皮膚の瘻孔の排出が生じることもある。腹膜腔への自由な穿孔は異常である。

【 0 1 4 4 】

クローン病は、炎症性または閉塞性の症状のある患者、あるいは、顕著なGI症状はないが、肛門周囲瘻または膿瘍、またはそうでなければ説明のできない関節炎、結節性紅斑、発熱、貧血または（子どもの）発育不全のある患者で疑われなければならない。クローン病の家族歴も疑いの指標を増やす。（初めての、または、再発した）急性腹症を示す患者は、水平かつ直立な腹部のX線と腹部CTスキャンを受けなければならない。これらの研究は、閉塞、膿瘍または瘻孔、および、急性腹症の他の可能な原因（例えば、虫垂炎）を証明する。超音波は、下腹部と骨盤の痛みを抱えた女性で、婦人科的病変をよりよく描写することもある。

【 0 1 4 5 】

最初の症状がそれほど急性でない場合、小腸フォロースルーと回腸末端のスポット写真を用いる上部消化管検査は、従来の結合組織よりも好ましい。しかしながら、大量の経口摂取した造影剤と高分解能CTを組み合わせるCT腸運動記録法の最新の技術は、中枢によつては選択の手順になりつつある。これらの撮像研究が腸ループの分離に伴って特徴的な狭窄または瘻孔を示す場合、これらは事実上診断である。発見物が疑わしい場合、CT高位浣腸法またはビデオカプセル（video capsule）小腸内視鏡は、表在性アフタ性潰瘍および線状潰瘍を示すかもしれない。症状が圧倒的に結腸で見られ（例えば、下痢）、不規則な回腸末端へのバリウムの逆流、小結節、凝り、壁肥厚、および、管腔の狭小化を示すこともある場合、バリウム注腸X線が使用されてもよい。同様のX線発見物を有する患者での鑑別診断は、盲腸の癌、回腸カルチノイド、リンパ肉腫、全身性血管炎、放射線腸炎、回盲部結核、および、アメーバ腫を含んでいる。

【 0 1 4 6 】

確立されたクローン病は、めったに直らないが、間欠性の悪化および寛解を特徴とする。患者のなかには、頻繁な衰弱性の痛みの周期を伴う重篤な疾患に苦しむ者もいる。しかしながら、賢明な薬物療法と、適切な場合には外科手術療法とで、ほとんどの患者はよく機能し、適合に成功する。疾患関連の死亡率は非常に低い。結腸と小腸の癌を含むGI癌は、過剰なクローン病関連の死亡率の主要な原因である。

【 0 1 4 7 】

過敏性腸症候群は、様々な程度の腹痛、便秘または下痢、および、腹部膨満を含む、再発性の上部および下部のGI症状からなる。診断は臨床的である。処置は一般に対症的であり、食事管理と、セロトニン受容体で活性な抗コリン薬および薬剤を含む薬物とからなる。

【 0 1 4 8 】

一貫した運動異常はない。患者のなかには、結腸の活性が長期間遅延している、異常な胃結腸反射を有するものもある。胃内容排出が減少するか、空腸の運動に支障が出ることもある。一部の患者は実証可能な異常変調を有しておらず、そのような患者のなかには、異常は症状とは関連がないこともある。小腸の通過は変動する。しばしば、近位の小腸は、食物または副交感神経興奮薬に過敏に反応するように思われる。S字結腸に関する管腔内圧研究は、機能性便秘が反応性亢進の膨起分割(haustral segmentation)(つまり、収縮の頻度および大きさの増加)とともに生じ得ることを示している。対照的に、下痢は運動機能の低下に関係している。したがって、強い収縮は、時として、通過を加速するまたは遅らせることがある。

【0149】

10

通常量の管腔内での膨張に対する過敏症と、通常量の腸内ガスの存在下での疼痛の認識の増加が存在する。疼痛は、腸の平滑筋の異常に強い収縮、または、膨張に対する腸の感受性の増加によって引き起こされるように思われる。ホルモンガストリンおよびコレシストキニンへの過敏症も存在するかもしれない。しかしながら、ホルモンの変動は症状と関連しない。高カロリー密度の食事は、筋電活性および胃の運動の大きさと頻度を増加させることもある。脂肪の摂取は、運動活性のピークを遅らせることもあり、それは過敏性腸症候群で悪化することもある。月経の最初の数日は、一時的なプロスタグランジンE₂の上昇をもたらすことがあり、恐らくプロスタグランジンの放出による、疼痛と下痢の増加をもたらしかねない。

【0150】

20

過敏性腸症候群の2つの主な臨床的なタイプが記載されている。便秘が優勢な過敏性腸症候群では、ほとんどの患者は、結腸の少なくとも1つの領域一帯に痛みを有しており、より正常な排便回数に代わって便秘の期間を有している。便はしばしば透明か白い粘液を含んでいる。疼痛は、発作で現れる仙痛、または、連続的な鈍痛のいずれかであり、排便によって取り除かれることもある。食事は一般に症状を引き起こす。膨満、鼓腸、吐き気、胃腸障害および胸やけが生じることもある。

【0151】

下痢が優勢な過敏性腸症候群は、上昇するとすぐに、あるいは、食事とりわけ早食いの直後に生じる、急な下痢を特徴とする。夜間下痢は異常である。疼痛、膨満、および、便秘逼迫は一般的であり、失禁が生じることもある。痛みのない下痢は一般的ではない。

30

【0152】

診断は、特徴的な腸のパターン、疼痛の時間と特徴、および、健康診断と日常的な診断テストを介する他の疾患プロセスの排除に基づく。「赤旗」が存在する場合(高齢、体重減少、直腸出血、嘔吐)、診断検査は一層集中的にならなければならない。柔軟な光ファイバー機器による直腸S状結腸鏡検査が行なわれなければならない。S状結腸鏡および空気吹送法の導入は、しばしば腸の攣縮と疼痛を引き起こす。過敏性腸症候群における粘膜と血管のパターンは正常に見えるのが一般的である。結腸内視鏡検査は、結腸のポリープと腫瘍を除外するために、排便習慣の変化を伴う40歳以上の患者、とりわけ、これまでに過敏性腸症候群の症状を呈していなかった患者に好ましい。慢性的な下痢の患者、とりわけ、年配の女性では、粘膜生検は潜在的な顕微鏡的大腸炎を除外することができる。

40

【0153】

傍細胞輸送。傍細胞輸送は上皮の細胞間の物質の移動を指す。それは、物質が細胞を通して移動し、頂端膜と側底膜の両方を通過する「経細胞輸送」とは対照的である。胃腸管のような管腔の器官の上皮層は、管腔の内容物と下層の組織コンパートメントの間で、調節された選択的に透過性の障壁を形成する。上皮細胞と内皮細胞全体の傍細胞の浸透性は、密着結合とも呼ばれる頂端の細胞間結合によって主に調節される。密着結合とその下部にある接着結合は、頂端の結合複合体を構成する。栄養素、内部シグナル伝達分子、および、サイトカインなどの刺激は、頂端のF-アクチン構築に影響を及ぼし、AJC構造と傍細胞の浸透性も調節する。

【0154】

50

(スクリーニング方法)

本発明の他の実施形態では、T G 2 活性化に作用する候補となる薬剤を特定するために、ハイスループットのインビトロの細胞または無細胞アッセイを含むアッセイが提供される。本発明のアッセイでは、T G 2 は、 α -I F N で処理された腸細胞によって活性化される。T G 2 活性のレベルは、当該技術で既知の方法によって、例えば、T G 2 基質の架橋結合を決定することによって、モニターすることができる。活性酵素のレベルは、例えば、適切な親和性アッセイなどによって決定されるように、総 T G 2 濃度と比較されてもよい。候補となる薬剤は、系と接触してもよく、T G 2 活性化に対する効果は、必要に応じて、活性化を測定するのに十分な時間、インキュベートした後に決定される。対照として、アッセイは、薬剤のない状態の活性と、または、T G 2 活性化を阻害すると本明細書で示された薬剤、例えば、P I 3 キナーゼの阻害剤、チオレドキシンなどの阻害剤などのある状態の活性と比較されてもよい。T G 2 活性の測定が上に記載された通りである場合、無細胞のアッセイは、チオレドキシンのある状態で、および、様々な酸化還元電位を備えた緩衝液に曝露した後の T G 2 の調製を利用してもよい。候補となる薬剤は、限定されないが、 α -I F N の阻害剤、P I 3 キナーゼの阻害剤、チオレドキシンの阻害剤、T G 2 の阻害剤などを含む。

10

【0155】

本明細書で使用されるような用語「薬剤」は、T G 2 活性化または傍細胞輸送を変える能力を備えた、任意の分子（例えば、タンパク質または医薬品）について記載している。一般に、様々な濃度への反応差を得るために、複数のアッセイ混合物が異なる剤濃度と並行して実行される。典型的には、これらの濃度の 1 つは、陰性対照として、すなわち、0 濃度または検出レベル以下で役立つ。

20

【0156】

候補となる薬剤は一般的に有機分子であり、好ましくは、50 以上かつ約 2,500 未満のダルトンの分子量を有する小さな有機化合物であるが、多くの化学物質分類を包含する。候補となる薬剤は、タンパク質との構造的な相互作用、とりわけ水素結合に必要な官能基を含み、典型的には、少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシル、または、カルボキシル、好ましくは少なくとも官能化学基の 2 つを含む。候補となる薬剤は、上記の官能基の 1 つ以上で置換された、周期的な炭素または複素環の構造、および / または、芳香族または多環芳香族の構造をしばしば含む。候補となる薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、その構造的なアナログまたは組み合わせを含む生体分子でも見られる。

30

【0157】

候補となる薬剤は、合成または天然の化合物のライブラリを含む多種多様な源から得られる。例えば、多くの手段は、無作為化したオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む、多種多様な有機化合物および生体分子の無作為な合成と対象とした合成に利用可能である。代替的には、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形をした天然化合物のライブラリは、利用可能であるか、あるいは、容易に生成される。さらに、天然または合成的に生成されたライブラリおよび化合物は、従来の化学的、物理的、および、生化学的手段によって容易に修飾され、組み合わせのライブラリを生成するために使用されてもよい。既知の薬物は、構造的なアナログを生産するために、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化 (a m i d i f i c a t i o n) などの対象としたまたは無作為な化学修飾にさらされてもよい。

40

【0158】

スクリーニングアッセイには、様々な他の試薬が含まれてもよい。これらは、最適なタンパク質タンパク結合を促進するとともに、および / または、非特異的な相互作用または背景相互作用を減少させるために用いられる、塩類、中性のタンパク質、例えば、アルブミン、洗浄剤などの試薬を含んでいる。プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤などのアッセイの効率を改善する試薬が使用されてもよい。必要な結合を提供する任意の順に、成分の混合物が加えられる。インキュベーションは、任意の適温で、一般的に 4

50

【 0 1 5 9 】

【 0 1 6 0 】

【 0 1 6 1 】

【 0 1 6 2 】

【 0 1 6 3 】

IFN- γ は、T84 単層の細胞外マトリックス中の TGF β 2 を活性化する：抗原グレンペプチドの傍細胞浸透性を増加させることに加えて、我々は、IFN- γ が、成熟した T84 単層の細胞外マトリックス中で TGF β 2 を活性化することができるかどうか測定しようと試みた。再び、これらの細胞の側底側は、48 時間、様々な用量の IFN- γ に晒された。その後、TGF β 2 である、5-ビオチンアミド (biotinamido) ペンチル

アミン (5 B P) の小分子基質が、細胞培養培地に簡潔に加えられた。このあいだに、触媒活性 T G 2 は、細胞外マトリックス中のフィブロネクチンなどのタンパク質に 5 B P を付けた。T 8 4 モデル系で I F N - が T G 2 を活性化する程度を定量化するために、酵素結合免疫吸着型アッセイ (E L I S A) が、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジンを使用して展開された。T 8 4 単層は、1 - 7 2 時間 I F N - に晒され、その後、4 時間、5 B P によるインキュベーションを行った。その後、培養物は P B S で洗われ、4 % (w / v) パラホルムアルデヒドで固定され、再度洗われ、5 % (w / v) B S A で遮断した。T 8 4 細胞は、この試験中で透過性にはならなかったため、結果として、ストレプトアビジンの認識は、細胞表面または細胞外マトリックスタンパク質に取り付けられるビオチンに限定的である。図 2 に示されるように、T G 2 活性は、I F N - に反応して着実に増加する。T G 2 阻害剤 E R W 1 0 4 1 E (3) による前処理は、5 B P の取り込みを完全に遮断し、生化学アッセイによって特定された候補薬剤の T G 2 阻害剤をスクリーニングするために、この細胞培養アッセイの有用性を立証する。

【 0 1 6 4 】

I F N - 媒介性の T G 2 活性化における P I 3 キナーゼの役割：キナーゼは、様々なヒトの疾患の処置における有望なクラスの薬物標的である。多くのキナーゼは、T 8 4 の腸上皮細胞株のバリア機能に影響を及ぼすと考えられている。実施例としては、アデノシン-リン酸で活性化したプロテインキナーゼ (A M P K) 、 r h o 関連プロテインキナーゼ (R O C K) 、セリントレオニンプロテインキナーゼ (A K T) 、ミオシン軽鎖キナーゼ (M L C K) 、プロテインキナーゼ C (P K C) 、および、ホスファチジルイノシチド (p h o s p h a t i d y l i n o s i t i d e) - 3 - キナーゼ (P I 3 K) が挙げられる (M c K a y e t a l . (2 0 0 7) J o u r n a l o f P h a r m a c o l o g y a n d E x p e r i m e n t a l T h e r a p e u t i c s 3 2 0 : 1 0 1 3 - 1 0 2 2 ; C h o u d h u r y (2 0 0 4) J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 2 7 9 : 2 7 3 9 9 - 2 7 4 0 9 ; a n d H w a n g e t a l . (2 0 0 4) B i o c h e m i c a l a n d B i o p h y s i c a l R e s e a r c h C o m m u n i c a t i o n s 3 1 8 : 6 9 1 - 6 9 7 を参照) 。

【 0 1 6 5 】

したがって、我々は、単一のキナーゼ阻害剤が I F N - に反応して T G 2 活性化を完全に逆にすることが可能かどうかを証明しようとした。図 3 に示されるように、P I 3 K 阻害剤 L Y 2 9 4 0 0 2 (2) は、T G 2 活性と同様に、経上皮ペプチドのモル流束の I F N - に誘発された増加を完全に否定する。I F N - に対する両方の反応は、セリアック病に関連する。それぞれが非食事療法の有望な標的と考えられてきたが、それらは、これまで、消費するグルテンとは無関係の結果だと見なされてきた。我々の発見物は、これらの 2 つの現象の間に機構的なつながりを確立する。それらはさらに、単一の薬物が食事のグルテンの両方の副作用を遮断することができるため、L Y 2 9 4 0 0 2 と、推論によって他の P I 3 K 阻害剤がセリアック病の治療にとって特に魅力的な薬剤であることも示唆している。模式図 2 は、化合物 1 5 e (4) [4 8] 、T G X - 2 2 1 (5) [4 9] 、A S - 2 5 2 4 2 4 (6) [5 0] 、および、I C - 8 7 1 1 4 (7) [5 1] を含む、潜在的に有望な P I 3 K 阻害剤の他の例を例証している。これらの化合物のいくつかは、重大な副作用を伴わずに高用量でヒトに既に投薬されてきた (H a y a k a w a e t a l . (2 0 0 6) B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y 1 4 : 6 8 4 7 - 6 8 5 8 ; J a c k s o n e t a l . (2 0 0 5) N a t u r e M e d i c i n e 1 1 : 5 0 7 - 5 1 4 ; P o m e l e t a l . (2 0 0 6) J o u r n a l o f M e d i c i n a l C h e m i s t r y 4 9 : 3 8 5 7 - 3 8 7 1 ; S a d h u e t a l . (2 0 0 3) J o u r n a l o f I m m u n o l o g y 1 7 0 : 2 6 4 7 - 2 6 5 4 を参照) 。

【 0 1 6 6 】

ヒト T G 2 の活性化における酸化還元電位の役割：細胞外の T G 2 活性が I F N - に

10

20

30

40

50

反応して誘発される正確な機構を理解するために、我々は、P I 3 Kシグナルカスケードが、カルシウム結合したT G 2を不活性化する隣接するジスルフィド結合の酸化還元状態を調節すると仮定した。カルシウムイオンとグアニンヌクレオチドは、哺乳類のT G 2活性の2つの周知のアロステリック制御因子である。カルシウムがある状態とグアニンヌクレオチドがない状態では、T G 2は、「開かれた」活性立体配座を採用する。逆に、カルシウムがなく、グアニンヌクレオチドがある状態では、T G 2は、「閉じられた」触媒不活性な立体配座だと仮定する。最近の研究では、第3のアロステリック制御因子が明らかになった。具体的には、タンパク質の開かれた立体配座における隣接するジスルフィド結合の形成は、可逆的にその酵素活性を阻害する。細胞外のT G 2の大部分がこの不活性な状態で存在するという仮定によって導かれて、我々は、このジスルフィド結合がI F N -

10

【0167】

我々はまず、ヒトT G 2における隣接するジスルフィド結合の酸化還元電位を測定しようとした。精製された活性なT G 2は、1時間、広範な電位範囲（-70 mVから-230 mV）にわたって、10 mM G S H / G S S G酸化還元緩衝液であらかじめ平衡化した。結果として生じるタンパク質の酵素活性が、同じ酸化還元緩衝液中で測定された。G S H / G S S G比率は、分析的なH P L Cで判断されるように、活性アッセイの間、変化しなかった。予想されたように、不活性化の動力学は比較的緩慢であるように思われたが（図4 A）、酸化還元電位が増加すると、T G 2は不活性化された。約4時間経った後にのみ、酵素活性が定常状態に到達したので、個々の反応進行曲線の傾斜は、4 - 5時間後のデータから計算され、D T Tで処理したT G 2の活性と比較された（図4 B）。T G 2の酸化還元電位 E_0 は、以下の二電子プロセスに関して、結果として生じるプロットをネルンストの式にあてはめることによって計算され、 -184 ± 4 mVであるとわかった。

20

【0168】

【数1】

$$E = E_0 - 29.6 \text{ mV} \times \log_{10} \frac{[\text{redTG2}]}{[\text{oxTG2}]}$$

30

【0169】

隣接するジスルフィド結合の E_0 を評価するために設計された代替的な直接実験では、組み換え型のヒトT G 2は、4時間、適切な酸化還元緩衝液であらかじめ平衡化し、その後、その遊離システイン残基のすべてが、ヨードアセトアミドによって共有結合で標識化された。変性タンパクはトリプシンで消化され、 C_{18} 液体クロマトグラフィーによって分離され、E S I質量分光法によって分析された。 C_{370} 、 C_{371} 、および、 C_{230} の相対的なアルキル化の定量分析から、T G 2の分画的な酸化状態が推測された。順番に、このデータは、 E_0 を計算するために、上記のような同じ二電子ネルンスト式にあてはめた。結果（ $E_0 = -198 \pm 5$ mV。図4 C）は、活性アッセイによって測定された酸化還元電位に十分一致していた。

40

【0170】

チオレドキシンによる酸化したT G 2のインビトロ活性化：ox T G 2における隣接するジスルフィド結合の異常に高い酸化還元電位は、T G 2が細胞外マトリックスでは主に不活性だったという初期の観察と完全に一致しており、酵素が細胞外マトリックスの酸化還元電位のわずかな減少の重大なセンサーかもしれないことを示唆した。しかしながら、熱力学的に好ましい状況下でさえ、ヒトT G 2におけるジスルフィド結合の形成/減少の速度は、比較的遅かった（例えば、図4 Aを参照）。したがって、我々は、細胞外マトリックス中の酸化したT G 2が、別の酸化還元活性タンパク質を巻き込む特定の分子認識事象を介して活性化されたと仮定した。

【0171】

50

理論上は、 -184 mV 未満の E_0 値を含む任意のジスルフィド結合還元剤は、酸化したTG2を活性化することができる。いくつかの理由で、我々はそのような候補としてチオレドキシンをターゲットとした。最初に、チオレドキシン(Trx)は、TG2[53]よりもはるかに小さな E_0 値(-230 mV)を有しており、したがって、反応に適切な推進力を提供すると予想される。次に、 Trx は哺乳動物で支配的なサイトゾルタンパク質であるが、それは、血漿などの細胞外液ではっきりと認識できる濃度($1 - 10\text{ nM}$)で見られる。最後だが大事なことは、 Trx の血漿レベルは、様々な疾患状態に反応して著しい増加 - 癌の処置のためのこの細胞外タンパク質の臨床的な標的化も動機づけた現象 - を経験することが知られている。

【0172】

我々の仮説を試験するために、酸化したTG2の Trx を媒介とした活性化の動力学を測定した。大腸菌とヒトからの Trx の還元体は、組み換え型の大腸菌の過剰発現によって、および、組み換え型の大腸菌からの精製によって調製された。ジチオスレイトール(DTT)は、参照の小分子還元剤として使用された。比較可能な条件下で、組み換え型のヒト Trx は、DTTよりも少なくとも100倍高く、大腸菌 Trx よりも少なくとも150倍高かった二次速度定数で、酸化したTG2を還元した。したがって、我々は、酸化したTG2の Trx 媒介性の還元のミカエリスメンテンのパラメータを測定することによって、ヒトの酸化TG2へのヒト Trx の特異性を定量化した。 Trx の特徴がはっきりした細胞外基質であるインスリンが対照として使用され、ヒトチオレドキシン還元酵素は、定常状態条件のターンオーバーを達成するために触媒として使用された。インスリン用の Trx と酸化TG2の k_{cat}/K_M は、それぞれ $3.6\text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{分}^{-1}$ 、および、 $1.6\text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{分}^{-1}$ であり、 K_M 値はそれぞれ $30\text{ }\mu\text{M}$ および $21\text{ }\mu\text{M}$ であった。これらのパラメータに基づいて、当業者は、細胞外マトリックス中の 2.5 nM ほども小さな Trx が、30分以内に局所酸化したTG2の10%を活性化することができるはずであると推測することができる。

【0173】

小分子PX-12(1, 1-メチルプロピル 2-イミダゾリル ジスルフィド)は、その活性部位システインを酸化することによって Trx を阻害する。酸化したTG2の Trx 媒介性の活性化のための我々のアッセイでは、PX-12は、 $100\text{ }\mu\text{M}$ のPX-12による完全な不活性化で、用量依存的な手法でTG2の活性化を阻んだ。高用量のPX-12が重大な副作用なくヒトに投与され、このことは、細胞外の Trx の阻害が安全な治療上の選択肢になるということを示唆している。

【0174】

インターフェロン- γ は、 Trx の分泌を引き起こし、細胞外のTG2を活性化する：IFN- γ が Trx の分泌を介して細胞外のTG2活性化を引き起こすかどうかを試験するために、我々は、2つの無関係なアッセイ系を使用した。最初に、T84単層が使用された。というのも、このサイトカインに反応してTG2を活性化するその能力が、既に定量的に特徴づけられていたためである(上記参照)。したがって、我々は、IFN- γ への曝露が、培養されたT84単層中の細胞外の Trx の値を変えたかどうか、評価しようとした。図5Aで示されるように、 Trx 分泌は、IFN- γ に晒したT84単層の頂端側と側底側の両方で著しく多かった。初期のレポート[61]が動機となって、我々は、WI-38繊維芽細胞との共培養において単球細胞株THP-1についても研究した。THP-1細胞における細胞外の Trx は、IFN- γ への曝露に反応して、約30倍増加した(図5B)。IFN- γ で前処理したTHP-1細胞が48時間、WI-38単層で同時にインキュベートされたとき、繊維芽細胞のサブセットのまわりでは強いTG2活性を検知することができる(図6)。IFN- γ による処理がない状態では、TG2活性は観察されなかった。我々の発見物は、細胞外のTG2が、IFN- γ に反応して分泌される Trx によって効率的に活性化され得ることを実証している。したがって、PX-12などの薬物候補による細胞外の Trx の薬理的な阻害が、セリアックスブルーの非食事療法用の有効な戦略であることが予想される。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 5 】

組み換え型のヒトチオレドキシンは、ヒトの腸の上皮細胞とヒトの線維芽細胞の両方で細胞外の T G 2 を活性化する：組み換え型のヒトチオレドキシンが細胞培養で T G 2 を直接活性化することができるかどうかを試験するために、我々は、本明細書に記載されたものに類似したアッセイにおいて T 8 4 と W I - 3 8 の単層を使用した。T 8 4 と W I - 3 8 の細胞は成熟した単層へと成長し、その単層の点で、T G 2 阻害剤、E R W 1 0 4 1 E、または、チオレドキシン阻害剤 P X - 1 2 などの小分子阻害剤および / または 5 B P とともに、様々な量のあらかじめ還元されたチオレドキシンが培養液に加えられた。その後、活性化した T G 2 によって、培養された単層の細胞外マトリックスへと取り込まれた 5 B P が定量化された。図 7 A - B は、T 8 4 と W I - 3 8 の単層の両方における 5 B P の取り込みの増加によって細胞外の T G 2 の活性に直接影響を及ぼす、組み換え型のヒトチオレドキシンの能力を実証している。さらに、選択的な T G 2 阻害剤 (E R W 1 0 4 1 E 。図 7 A - B) の追加は、チオレドキシンに誘発された 5 B P の取り込みを完全に否定する。最後に、既知のチオレドキシン阻害剤 P X - 1 2 の追加は、試験された両方の細胞株におけるチオレドキシンに対する反応での 5 B P の取り込み量を定量的に減らした (図 7 C - D) 。

10

【 0 1 7 6 】

本発明のこれらの方法と他の方法は、発明によって提供される方法を用いて実行され得る。

【 0 1 7 7 】

本明細書で言及されるすべての公開公報、特許、および、特許出願は、あたかも、それぞれの個々の公開公報、特許、または、特許出願が、具体的にかつ個別に参照によって組み込まれると意図されたかのように、参照によって本明細書に組み込まれる。

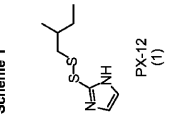
20

【 0 1 7 8 】

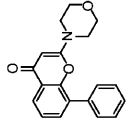
本発明は、本発明の実施のための好ましい方法を含むために、発明者によって発見または提案された特定の実施形態に関して記載されている。本開示を照らせば、本発明の意図した範囲から逸脱することなく、例証された特定の実施形態において、多くの修飾や変更を行なうことができることが、当業者に理解されよう。さらに、生物学上の機能的な同等性を考慮することによって、同じやり方または量で変更は現物または量の生物学的作用に影響を与えることなく、方法、構造、および化合物で変更を行うことができる。そのような修飾はすべて、添付の請求項の範囲内に含まれるように意図されている。

30

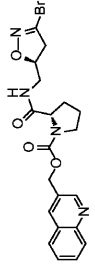
Scheme 1



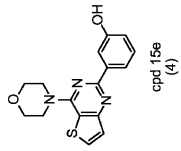
LY294002 (2)



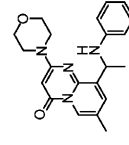
ERW1041E (3)



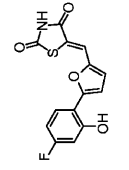
Scheme 2



TGX-221 (5)



AS-252424 (6)



IC-87114 (7)

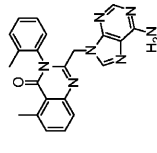


FIG.

【 図 6 】

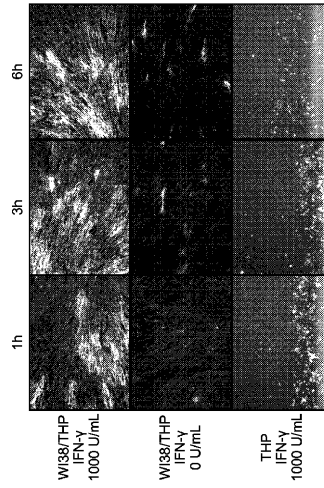
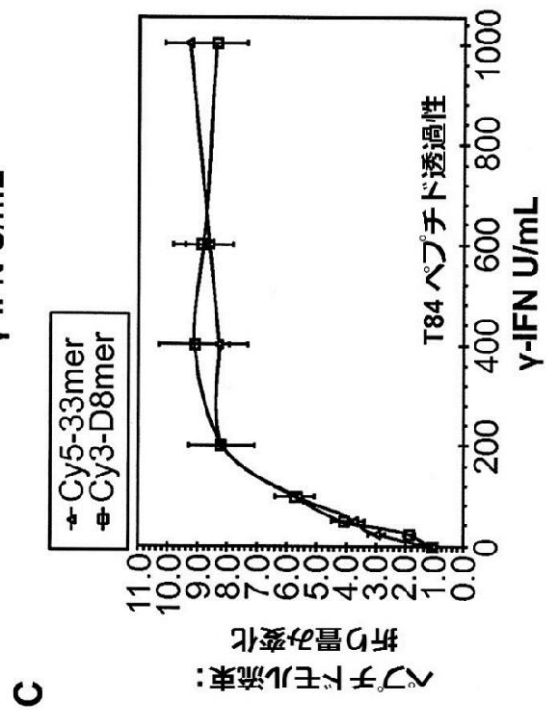
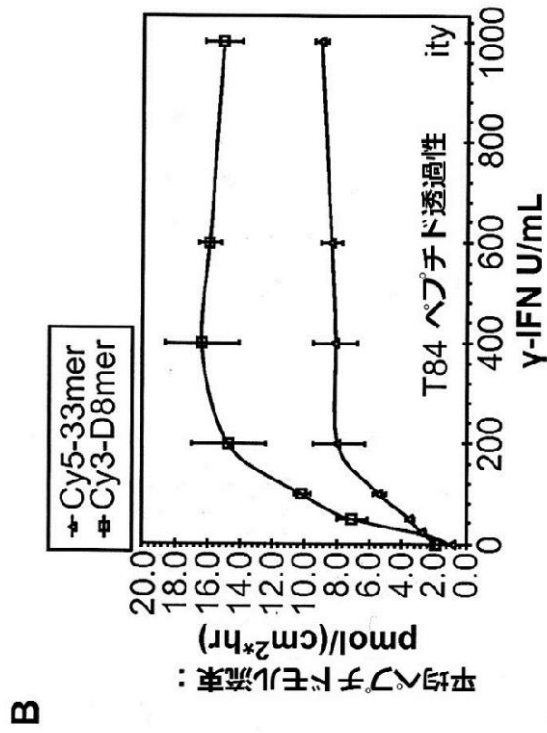
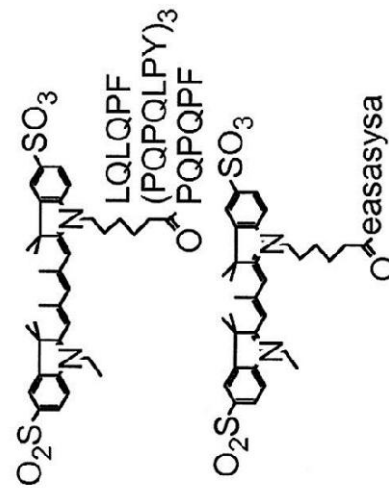
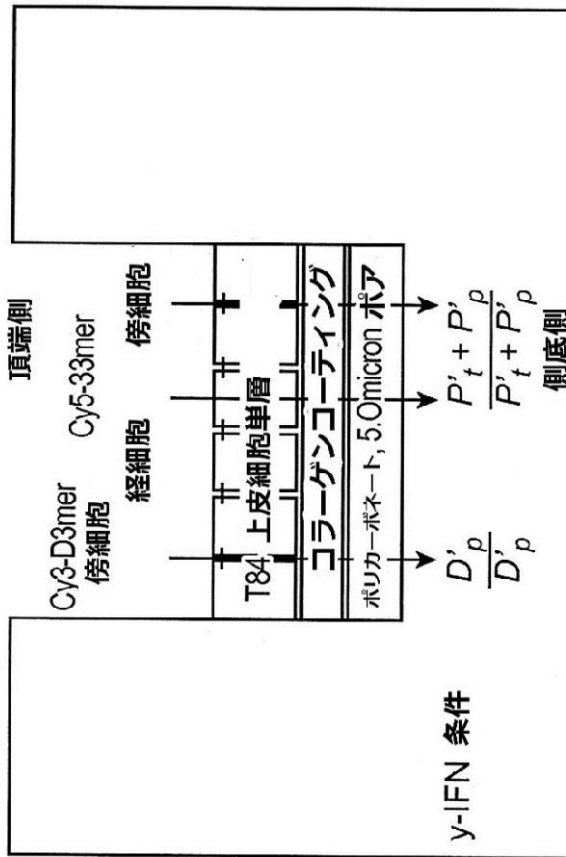
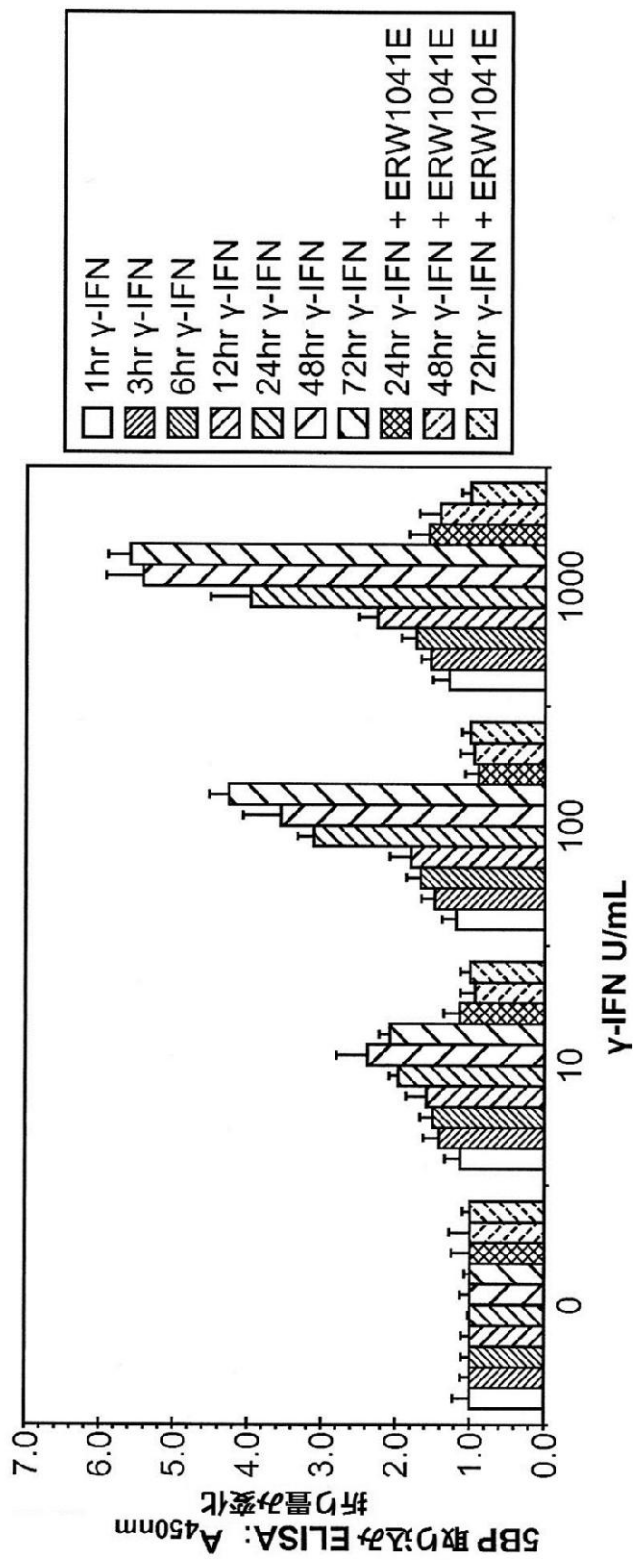


FIG. 6

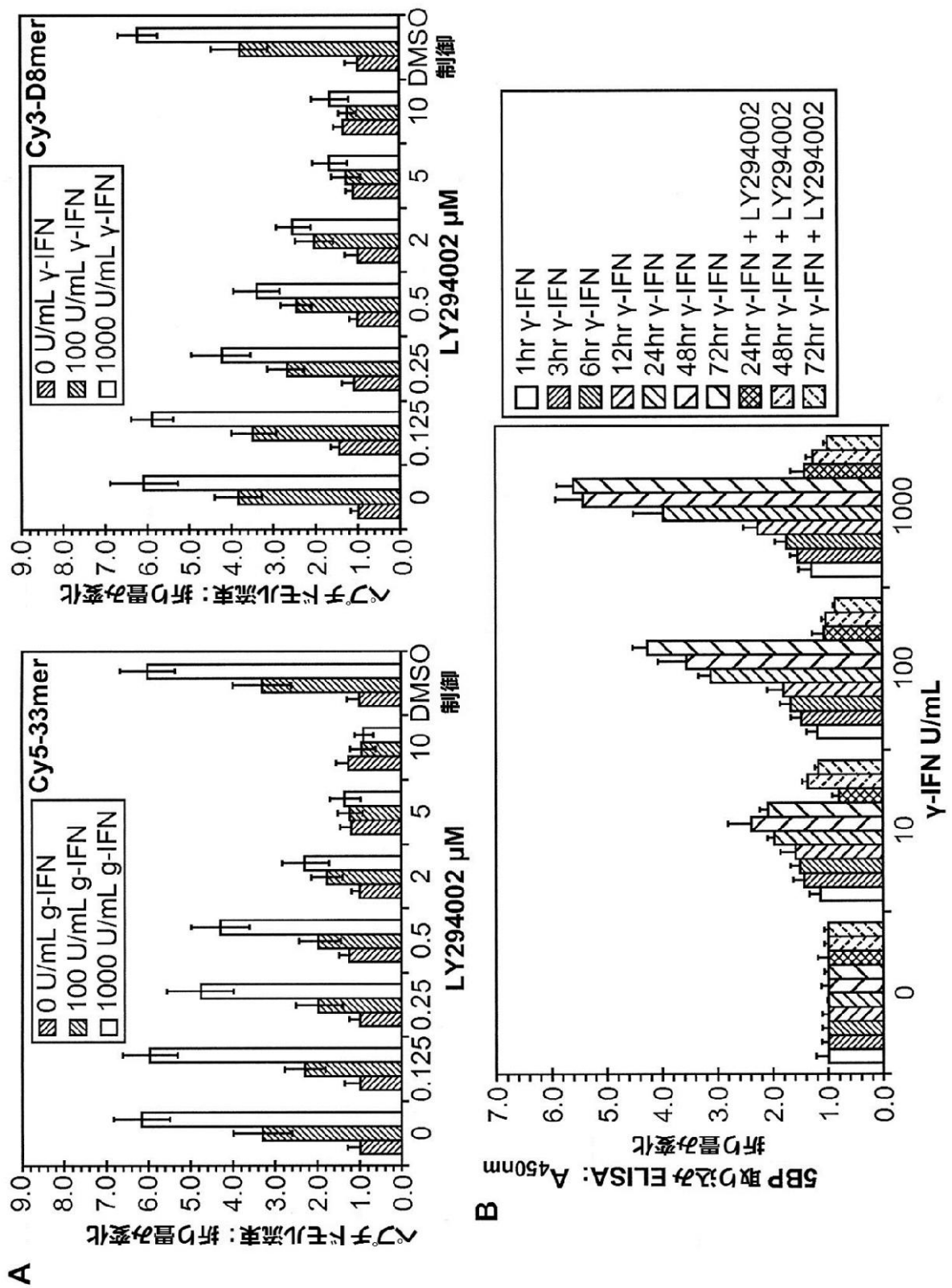
A トランスウェル



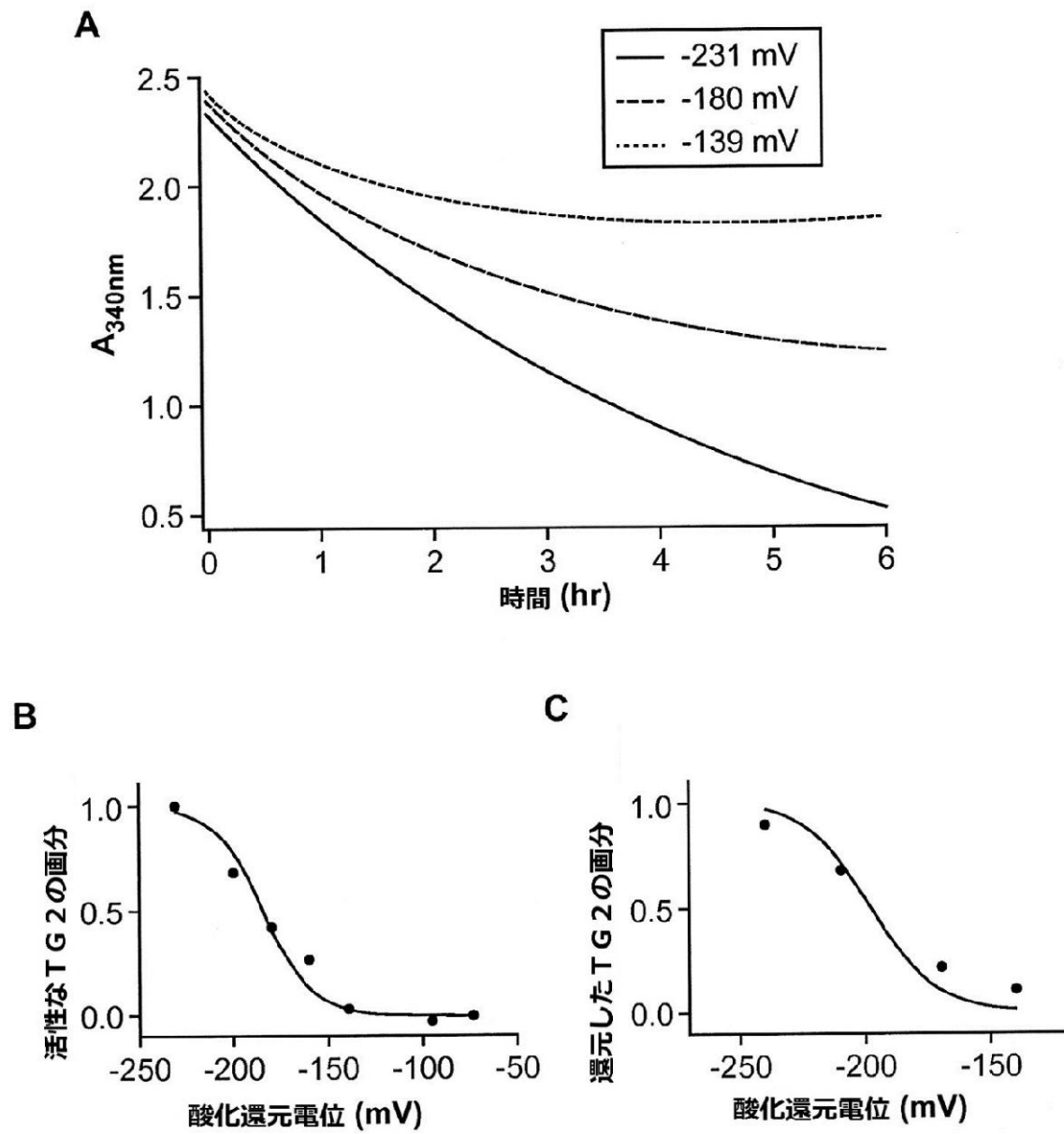
【図 2】



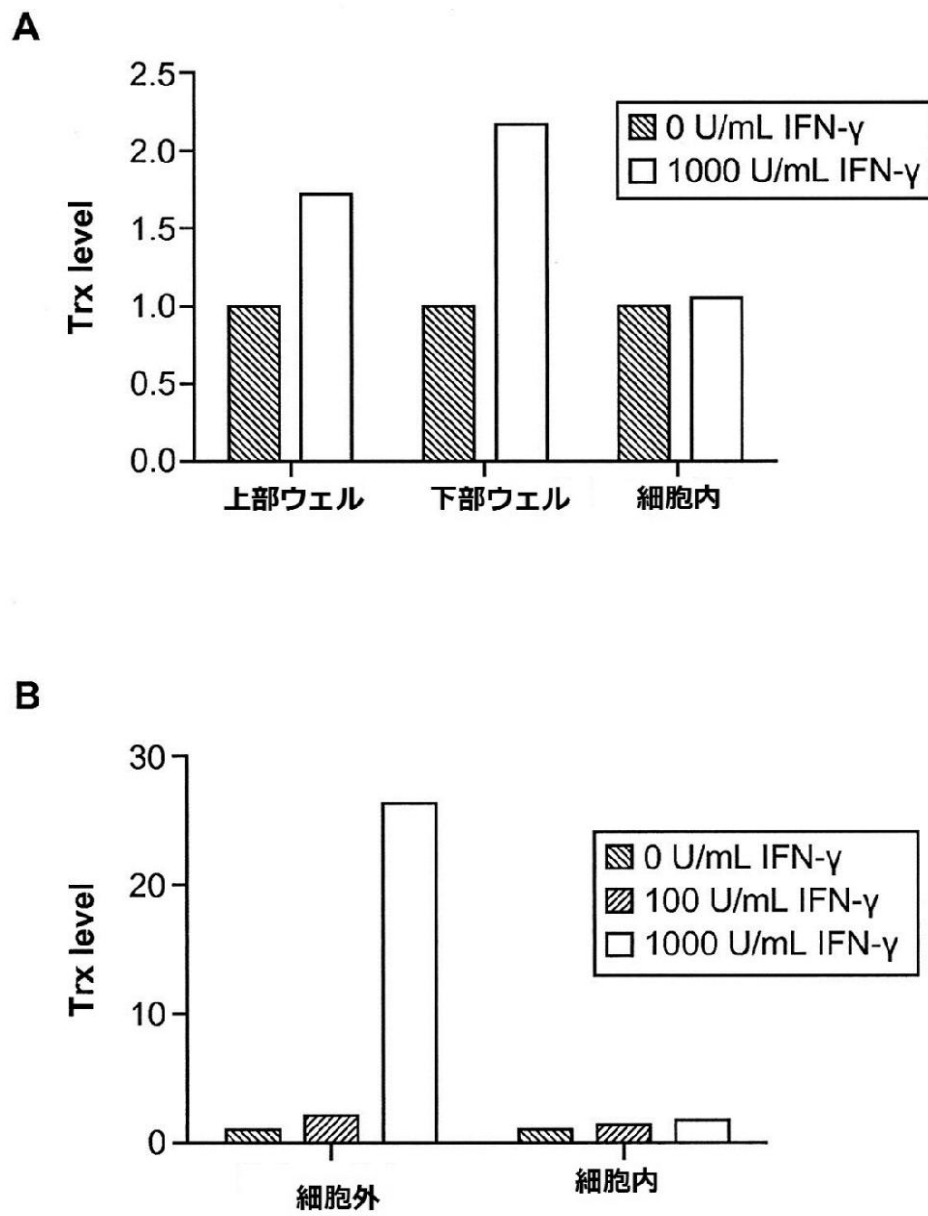
【図 3】



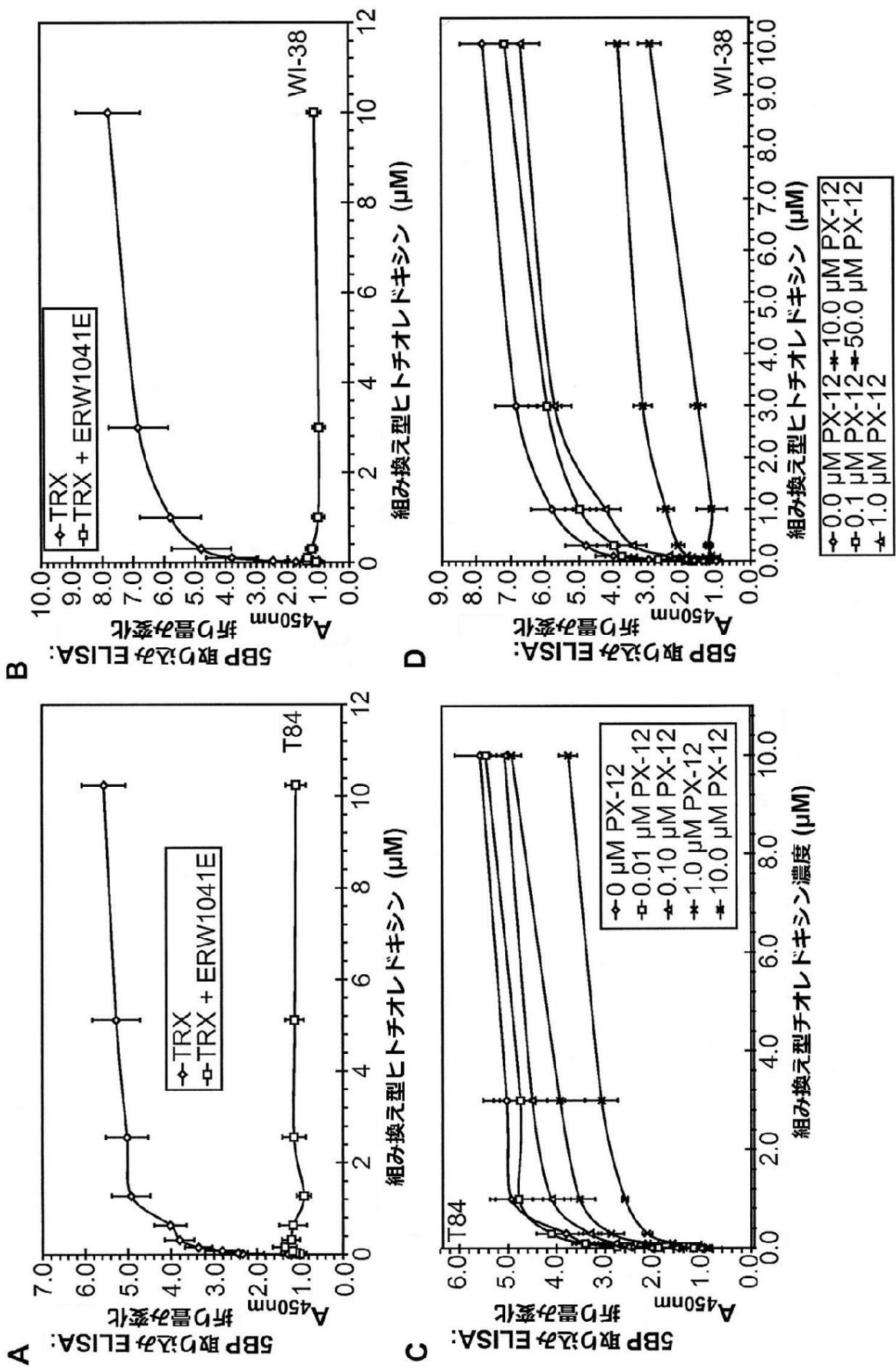
【 図 4 】



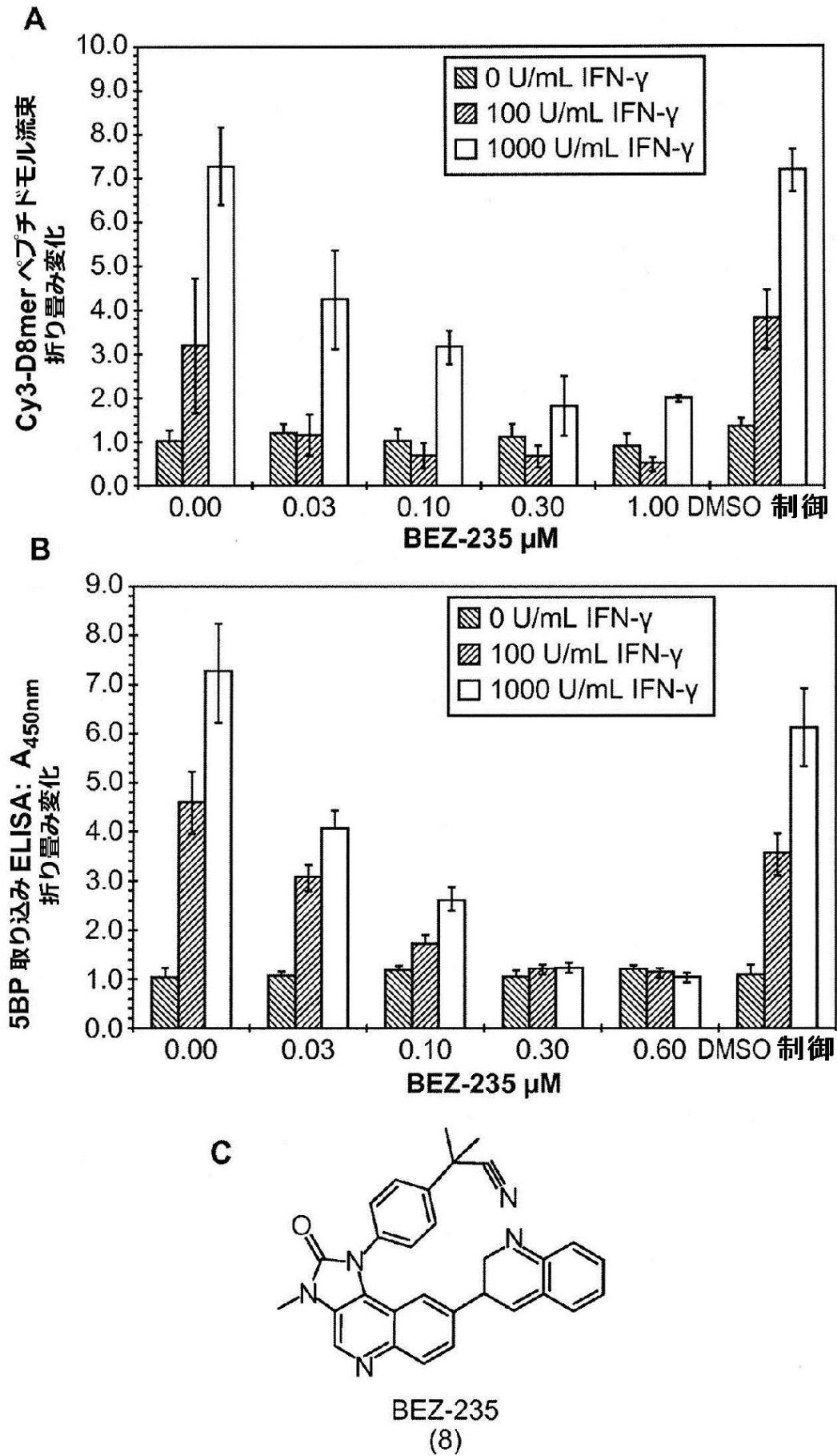
【 図 5 】



【図7】



【 図 8 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/43150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12Q 1/52; G01N 33/573; C12N 5/00 (2012.01)

USPC - 435/16

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)
USPC - 435/16Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 435/16, 435/7.4, 435/375; 514/19.3, 514/378 (words only)

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

*** Databases: WEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google, Google Scholar *** Search Terms Used: Leland Stanford, DiRaimondo, Jin, Klosek, Khosla, transglutaminase, TG-2, Tgase 2, thioredoxin, PX12, butyldisulfanyl, celiac sprue, dermatitis herpetiformis, irritable bowel, inhibitor, ERW1041E, LY294002

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2009/0042806 A1 (Khosla et al.) 12 February 2009 (12.02.2009), especially para [0008], [0022], [0051], [0061], [0068], [0113], [0119], [0190]; Table 3	1-4 and 10-15 7-9
Y	Antonyak et al., 'Phosphoinositide 3-Kinase Activity Is Required for Retinoic Acid-Induced Expression and Activation of the Tissue Transglutaminase,' (2002). The Journal of Biological Chemistry, Vol 277, No 17, Pg 14712-14716; abstract	5-6
Y	Blasko, 'Examination of transglutaminase activity of protein disulphide isomerase in <i>C. elegans</i> ,' University of Debrecen: PhD Thesis [online], December 2003 [retrieved on 27 October 2012]. Retrieved from the internet: <URL: http://ganymedes.lib.unideb.hu:8080/dea/bltstream/2437705/2/Blasko_Bernadett_tesis_angol.pdf >; pg 1-7, especially pg 3, para 1; pg 8, para 1 to pg 9, para 2	7-9
Y	US 2004/0116496 A1 (Kirkpatrick et al.) 17 June 2004 (17.06.2004), especially para [0019], [0036]	7-9
A, P	DiRaimondo et al., 'Interferon-gamma. Activates Transglutaminase 2 via a Phosphatidylinositol-3-Kinase-Dependent Pathway: Implications for Celiac Sprue Therapy', (January 2012). The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol 341, No 1, Pg 104-114; entire document	5-6
A, P	Jin et al., 'Activation of Extracellular Transglutaminase 2 by Thioredoxin', (September 2011). The Journal of Biological Chemistry, Vol 286, No 43, Pg 37866-37873; entire document	7-9

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

* 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

"g" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2012 (29.10.2012)

Date of mailing of the international search report

22 JAN 2013

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/43150

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:

- Please see extra sheet for continuation -

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 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.:
1-15

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

International application No.

PCT/US 12/43150

Continuation of:

Box NO III, Observations where unity of invention is lacking

Group I: claims 1-15, drawn to a method of reducing tissue transglutaminase (TG2) activation in an individual, the method comprising: administering to said individual an agent that blocks TG2 activation or activity in a dose effective to provide for a reduction in TG2 activity.

Group II: claims 16-20, drawn to a method of reducing undesirable enteric paracellular transport, the method comprising: administering an inhibitor of PI3 kinase.

Group III: claims 21-29, drawn to a method of screening for candidate agents that modulate the activation of TG2, the method comprising:

contacting a cellular model of enterocytes in the presence of gamma-IFN in the absence and presence of said agent;

determining the activity of TG2 in said model;

wherein a decrease in TG2 activity in the presence of said agent is indicative of TG2 activation inhibition.

The inventions listed as Groups I through III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group II do not share any inventive concept of Group I and III.

The inventions of Groups I do not include the inventive concept of a method of screening for candidate agents that modulate the activation of TG2, as required by Group II.

The inventions of Groups I and III share the technical feature of a method of modulating the activation of TG2. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2010/0160348 A1 (Matei). Matei discloses Claim 1, a method of reducing tissue transglutaminase (TG2) activation in an individual, the method comprising: administering to said individual an agent that blocks TG2 activation or activity in a dose effective to provide for a reduction in TG2 activity (para [0007]-[0008] and [0012]-[0017], a method of treating ovarian cancer comprising the step of administering to a human or animal patient in need thereof a therapeutically effective dose of at least one compound that alters the activity of TG2; para [0086] and Fig. 1. In order to determine the expression levels of TG2 in ovarian tumors, we used immunohistochemistry (IHC). Among 28 tumors, we identified intense cytoplasmic and membrane staining (2-3+ in more than 50% of tumor cells) in 24 specimens (85% of tumors). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I through III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

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 K 31/428 (2006.01)	A 6 1 K 31/428	
A 6 1 K 31/4709 (2006.01)	A 6 1 K 31/4709	
A 6 1 K 9/28 (2006.01)	A 6 1 K 9/28	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

(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, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, HR, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72) 発明者 ジン, シ
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア州 スタンフォード アプト. 1 0 5 コムストック・サークル 1 3

(72) 発明者 クロエック, コーネリアス
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア州 スタンフォード アプト. 1 0 9 ランニング・ファーム・レーン 1 3 7

(72) 発明者 コースラ, チャイタン
アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州 パロ・アルト ラ・パラ・アベニュー 7 4 0

F ターム (参考) 2G045 AA25

4C076 AA45 AA95 BB01 CC16 CC29

4C084 AA17 MA35 MA52 NA13 NA14 ZA682 ZC202

4C086 AA01 AA02 BC39 BC70 BC84 MA01 MA04 MA35 MA52 NA13

NA14 ZA68 ZC20