

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年12月7日 (07.12.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/129784 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 21/04 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/04 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) A61P 27/14 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61P 5/14 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61P 7/10 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01) A61P 31/22 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) A61P 33/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61P 19/06 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

(KAISHO, Tsuneyasu) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 星野 克明 (HOSHINO, Katsuaki) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/311072

(22) 国際出願日: 2006年6月2日 (02.06.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-163647 2005年6月3日 (03.06.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 改正 恒康

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INTERFERON- α REGULATOR

(54) 発明の名称: インターフェロン- α 制御剤

(57) Abstract: The purpose is to elucidate the role of IKK α in TLR signaling to provide a regulator and a regulation method for interferon- α . An interferon- α production inhibitor including an IKK α inhibitor.

(57) 要約: 本発明の目的は、TLRシグナルにおけるIKK α の役割を解明し、インターフェロン- α の制御剤及び制御方法を提供することである。本発明によれば、IKK α の阻害剤を含む、インターフェロン- α 産生抑制剤が提供される。

WO 2006/129784 A1

明 細 書

インターフェロン- α 制御剤

技術分野

- [0001] 本発明は、インターフェロン- α の制御剤及び制御方法に関する。より詳細には、IKK α の阻害剤を用いたインターフェロン- α 産生の抑制剤又は抑制方法、並びにIKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質を用いたインターフェロン- α 産生の誘導剤又は誘導方法に関する。

背景技術

- [0002] Toll様受容体(Toll-like receptors; TLRs)は、樹状細胞(DC)等の抗原提示細胞上に発現しており、多様な微生物由来の分子構造の認識に関与している。TLRリガンドとしては、細菌及びウイルスに由来する脂質、タンパク質及び核酸成分が挙げられる。TLRの多くは、IL-6などの炎症性サイトカインの誘導、共刺激分子の発現などを含む、TLRに共通の樹状細胞活性化作用を有しているが、各TLRは各TLRに特有の機能を示す。
- [0003] TLR7及びTLR9はそれぞれ一本鎖RNA及び非メチル化CpG DNAを認識できる。これらの核酸を認識するTLRは、抗ウイルス免疫に必要なIFN- α 及びIFN- β 等のI型インターフェロン(IFN)を誘導できることを特徴とする(Wagner, H, Trends Immunol 25, 381-6 (2004))。TLR7及びTLR9は、細胞質内アダプター分子であるMyD88と会合する。MyD88は、樹状細胞がTLRリガンドに応答して、I型インターフェロンのみならず炎症性サイトカインを産生するのに必要である。転写因子IRF-7も、TLR-7/9により誘導されるI型インターフェロンの産生に重要である(Honda, K et al., Nature, 434, 772-7 (2005))。IRF7はMyD88と腫瘍壊死因子(TNF)受容体関連因子6(TRAF6)に会合して、IFN- α 遺伝子を誘導する(Kawai, T. et al., Nat Immunol 5, 1061-8 (2004);及びHonda, K. et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 15416-21 (2004))。さらに、IRAK-1が、IRF-7との会合を通じてこの分子中に含まれ、TLR7/9シグナル伝達によるIFN- α 産生に必要であることが分かっている(Uematsu, S. et a

1., J Exp Med 201, 915-23 (2005))。

[0004] 二本鎖RNA及びLPSをそれぞれ認識するTLR3及びTLR4は、IFN- β 遺伝子の誘導のためのシグナルを仲介できる。この誘導には、2つのIKKファミリーの因子TBK-1及びIKK ι /IKK ϵ が必要である(Hemmi, H. et al. J Exp Med 199, 1641-50 (2004);及びPerry, A.K., et al., J Exp Med 199, 1651-8 (2004))。これらのキナーゼはMyd88関連アダプター分子TRIFと会合し、TLR3/4誘導IFN- β 遺伝子発現に関与している(Yamamoto, M. et al. Science 301, 640-3 (2003);及びFitzgerald, K.A. et al. Nat Immunol 4, 491-6 (2003))。しかし、TLR9誘導IFN- α 産生は、TBK-1又はIKK ι /IKK ϵ 欠損マウスで損なわれないので、別のIFN- α 誘導経路の関与が示唆されている(Kawai, T. et al., Nat Immunol 5, 1061-8 (2004))。

[0005] IKK α 及びIKK β は、IKKファミリーの中で最初に同定された因子である(Hayden, M.S. et al., Genes Dev 18, 2195-224 (2004);及びBonizzi, G. et al., Trends Immunol 25, 280-8 (2004))。IKK β は、TLR誘導のみならずサイトカイン誘導のNF- κ B活性化の正規の経路に必須であり、炎症性サイトカインの産生を導く。IKK α はこの経路には必須ではないが、LT- α 、B細胞活性化因子(BAFF)、あるいはCD40の下流のNF- κ B活性化の正規でない経路に必須である。IKK α は、ケラチノサイトの分化のみならず、B細胞の成熟やパイエル板の形成にも必須である。しかしながら、TLRシグナルにおけるIKK α の役割は依然として不明であった。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、TLRシグナルにおけるIKK α の役割を解明し、インターフェロン- α の制御剤及び制御方法を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、IKK α 欠損マウスを分析して、IKK α がTLRにより誘導される作用にいかに関与するのかを調べた結果、TLR7,9刺激による樹状細胞からのIFN- α 産生誘導にIKK α が必要であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明によれば、IKK α の阻害剤を含む、インターフェロン- α 産生抑制剤が提供される。

好ましくは、IKK α の阻害剤は、IKK α の発現を阻害する物質、又はキナーゼ活性を欠損するIKK α 変異体である。

[0009] 本発明の別の側面によれば、細胞内のIKK α 活性を阻害することを含む、細胞からのインターフェロン- α の産生を抑制する方法が提供される。

[0010] 本発明のさらに別の側面によれば、IKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質を含む、インターフェロン- α 産生誘導剤が提供される。

[0011] 本発明のさらに別の側面によれば、細胞にIKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質を投与することを含む、細胞からのインターフェロン- α の産生を誘導する方法が提供される。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明は、IKK α の阻害剤を含むインターフェロン- α 産生抑制剤、並びにIKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質を含むインターフェロン- α 産生誘導剤に関するものである。本明細書中では、インターフェロン- α 産生抑制剤及びインターフェロン- α 産生誘導剤を総称して、インターフェロン- α 制御剤と称する場合がある。

[0013] IKK α は、キナーゼの1種であり、その遺伝子の塩基配列はすでに報告されている (Accession numberは、NM#007700; Connelly MA, Marcu KB. CHUK, a new member of the helix-loop-helix and leucine zipper families of interacting proteins, contains a serine-threonine kinase catalytic domain. Cell Mol Biol Res. 1995; 41: 537-49)。

[0014] 本発明で用いるIKK α の阻害剤としては、IKK α の発現を阻害する物質、キナーゼ活性を欠損するIKK α 変異体、又はIKK α に作用してIKK α の活性及び機能を阻害する物質等が含まれる。本明細書において、「阻害」との用語は、抑制又は低減との意味を含む。

[0015] IKK α の発現を阻害する物質としては、RNAi、アンチセンス法又はリボザイム法を利用した物質等が挙げられ、特に限定されないが、RNAiを利用したsiRNAsが好ましい。キナーゼ活性を欠損するIKK α 変異体の具体例としては、44番目のリジン残基

をアラニン残基に置換した変異体などが挙げられる。また、IKK α に作用してIKK α の活性及び機能を阻害する物質としては、低分子化合物及び抗体等が挙げられる。

[0016] 抗体としては、例えば、IKK α の全長又は部分配列を有するペプチドを免疫源として作製した抗体を用いることができる。全長のIKK α としては、例えば組み換えIKK α 等を用いることができる。抗体の作製は慣用の方法に従って行えばよい。抗体はモノクローナル抗体が好ましい。ペプチドとしては、例えば、IKK α の部分配列を有するペプチド等が挙げられる。

[0017] RNAi (RNA interference) は、細胞に導入された二本鎖RNAが、同じ配列を持つ遺伝子の発現を抑制する現象を言う。RNAiによりIKK α の発現を阻害する物質の具体例としては、下記に説明するようなsiRNA又はshRNA等が挙げられる。

[0018] siRNA とはshort interfering RNAの略称であり、約21～23塩基程度の長さの二本鎖RNAをいう。siRNAはRNAiを引き起こすことができる限り、どのような形態のものでもよく、例えば、化学合成もしくは生化学的合成、又は生物体内の合成で得られたsiRNA、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNA等であればよい。siRNA の配列と、IKK α のmRNAの部分配列とは100%一致することが好ましいが、必ずしも100%一致していなくてもよい。

[0019] siRNAの塩基配列と、IKK α 遺伝子の塩基配列との間で相同性のある領域は、IKK α 遺伝子の翻訳開始領域を含まないことが好ましい。相同性を有する配列は、IKK α 遺伝子の翻訳開始領域から20塩基離れていることが好ましく、70塩基離れていることがより好ましい。相同性を有する配列としては、例えば、IKK α 遺伝子の3'末端付近の配列でもよい。

[0020] RNAiによりIKK α の発現を阻害する物質としては、siRNA を生成する約40塩基以上のdsRNA等を用いてもよい。例えば、IKK α 遺伝子の核酸配列の一部に対して約70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは100%の相同性を有する配列を含む、二本鎖部分を含むRNA又はその改変体を使用することができる。相同性を有する配列部分は、通常は、少なくとも15ヌクレオチド以上であり、好ましくは約19ヌクレオチド以上であり、より好ましくは少なくとも20ヌクレオチド以上

であり、さらに好ましくは21ヌクレオチド以上である。

- [0021] RNAiによりIKK α の発現を阻害する物質としては、3'末端に突出部を有する短いヘアピン構造から成るshRNA (short hairpin RNA)を使用することもできる。shRNAとは、一本鎖RNAで部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約20塩基対以上の分子のことである。また、shRNAとしては3'突出末端を有するのが好ましい。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは10ヌクレオチド以上であり、より好ましくは20ヌクレオチド以上である。ここで、3'突出末端は、好ましくはDNAであり、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド以上のDNAであり、さらに好ましくは2~4ヌクレオチドのDNAである。
- [0022] RNAiによりIKK α の発現を阻害する物質は、人工的に化学合成してもよいし、センス鎖及びアンチセンス鎖のDNA配列を逆向きに連結したヘアピン構造のDNAをT7 RNAポリメラーゼによってインビトロでRNAを合成することによって作製してもよい。インビトロで合成する場合は、T7 RNAポリメラーゼ及びT7プロモーターを用いて、鋳型DNAからアンチセンス及びセンスのRNAを合成することができる。これらをインビトロでアニーリングした後、細胞に導入すると、RNAiが引き起こされ、IKK α の発現が抑制される。細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法、又は各種のトランスフェクション試薬(例えば、oligofectamine、Lipofectamine及びlipofection等)を用いた方法等により行うことができる。
- [0023] RNAiによりIKK α の発現を阻害する物質としては上述のsiRNA又はshRNAをコードする核酸配列を含む発現ベクターを用いてもよい。さらに該発現ベクターを含む細胞を用いてもよい。上記した発現ベクターや細胞の種類は特に限定されないが、既に医薬として用いられている発現ベクターや細胞が好ましい。
- [0024] 本発明では、IKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質をインターフェロン- α 産生誘導剤として用いることができる。IKK α の発現を増大させる物質としては、転写因子等のタンパク質や低分子化合物などが挙げられる。
- [0025] 本発明のインターフェロン- α 制御剤の投与経路は特に限定されず、経口投与又は非経口投与(例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膈内投与、患部への局所投与、皮膚投与等)のいずれの投与経路に

より投与してもよい。経口投与に適する製剤形態としては、固形又は液体の形態が挙げられ、非経口投与に適する製剤形態としては、注射剤、点滴剤、坐剤、外用剤、点眼剤、点鼻剤等の形態が挙げられる。本発明のインターフェロ α 制御剤は徐放剤の製剤形態であってもよい。本発明のインターフェロ α 制御剤は、その製剤形態により必要に応じて薬学的に許容可能な添加剤が加えられていてもよい。薬学的に許容可能な添加剤の具体例としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、保存剤、安定化剤、等張化剤、着色剤、矯味剤、希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィルター、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、キャリア、賦形剤及び／又は薬学的アジュバント等が挙げられる。

[0026] 経口用の固形製剤形態の本発明のインターフェロ α 制御剤は、例えば、有効成分であるIKK α の阻害剤、IKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質に賦形剤を加え、さらに必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、又は矯味剤などの製剤用添加物を加えた後、常法により錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤として調製することができる。経口用の液体製剤形態の本発明のインターフェロ α 制御剤は、有効成分であるIKK α の阻害剤、IKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質に矯味剤、安定化剤、又は保存剤など製剤用添加物の1種又は2種以上を加え、常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等として調製することができる。

[0027] 本発明のインターフェロ α 制御剤を液体製剤として処方するために使用される溶媒は、水性又は非水性のいずれでもよい。液体製剤は当該分野において周知の方法により調製することができる。例えば、注射剤は、生理食塩水、PBSのような緩衝液、滅菌水等の溶剤に溶解した後、フィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌容器(例えば、アンプル等)に充填することにより調製することができる。この注射剤には、必要に応じて、慣用の薬学的キャリアを含めてもよい。また、非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法を用いてもよい。本発明で用いることができるキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、又は血清アルブミンを含む生理食塩水等が挙げられる。

[0028] IKK α のsiRNAまたはsiRNA発現ベクターなど遺伝子送達の種類に関しては、適用される細胞内でIKK α のsiRNAをコードするRNAまたはsiRNA発現ベクターの発現を得る限り特に方法は限定されるものではなく、例えば、ウイルスベクター、リポソームを

用いた遺伝子導入を用いる事が可能である。ウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、シンリンセムリキウイルス等の動物ウイルスが挙げられる。

- [0029] RNAiによりIKK α の発現を阻害する物質は、細胞に直接注入してもよい。
- [0030] 本発明のインターフェロン- α 制御剤の投与量は、使用目的、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、性別、既往歴、又は有効成分として用いる物質の種類等を考慮して、当業者が決定することができる。本発明のインターフェロン- α 制御剤の投与量は、例えば、有効分量として、成人一人当たり、約0.1 ng～約100 mg/kg、好ましくは約1 ng～約10 mgであり、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターとして投与される場合は、通常、0.0001～100 mg、好ましくは0.001～10 mg、より好ましくは0.01～1 mgである。
- [0031] 本発明のインターフェロン- α 制御剤の投与頻度は、例えば、一日一回～数ヶ月に1回であればよい。RNAiによりIKK α の発現を阻害する物質を用いる場合は一般に投与後1～3日間効果が見られるので、毎日～3日に1回の頻度で投与することが好ましい。発現ベクターを用いる場合には1週間に1回程度の投与が適する場合もある。
- [0032] 本発明のインターフェロン- α 制御剤(インターフェロン- α 産生抑制剤、又はインターフェロン- α 産生誘導剤)については、インターフェロンの過剰産生が関与している疾患、又は体内においてインターフェロン産生を誘導することにより治療又は予防を期待することができる疾患の治療又は予防のために使用することができる。
- [0033] このような疾患の具体例としては、種々の炎症状態、膠原病、自己免疫疾患、種々の免疫疾患、特に関節および筋肉における炎症および疼痛(慢性関節リウマチ、リウマチ様脊椎炎、骨関節症、尿酸性関節炎等)、皮膚の炎症性状態(湿疹等)、眼の炎症性状(結膜炎等)、炎症を伴う肺の障害(喘息、気管支炎等)、炎症を伴う消化器の状態(アフタ性潰瘍、クローン病、萎縮性胃炎、いぼ状胃炎、潰瘍性大腸炎、脂肪便症、限局性回腸炎、過敏性腸症候群等)、歯肉炎、(手術または障害後の炎症、疼痛、腫脹)、炎症に関連した発熱、疼痛、その他の状態、移植による拒絶、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎、多発性軟骨炎、結節性動脈周囲炎、懐死性

血管炎、反応性脊椎関節症、強直性脊椎炎、炎症性慢性腎状態(糸球体腎炎、ループス腎炎、膜性腎炎等)、リウマチ熱、シェーグレン症候群、ベーチェット病、甲状腺炎、I型糖尿病、皮膚筋炎、慢性活動性肝炎、重症筋無力症、グレーブス病、多発性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性血液疾患(溶血性貧血、真性赤血球性貧血、特発性血小板減少症、再生不良性貧血等)、橋本病、ぶどう膜炎、接触皮膚炎、乾癬、川崎病、I型アレルギー反応が関与する疾患(アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、アレルギー性結膜炎、花粉症、湿疹、食物過敏症、アレルギー性鼻炎等)、ショック(敗血性ショック、アナフィラキシー性ショック、成人型呼吸窮迫症候群等)、サルコイドーシス、ウェゲナー肉芽腫症、ホジキン病、癌(肺癌、胃癌、結腸癌、肝癌等)が例示される。また、種々の微生物感染症、特に各種ウイルスによる急性(たとえばインフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、水疱性口内炎ウイルスなど)、慢性(たとえばB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなど)感染症、各種細菌感染症、各種真菌感染症、各種寄生虫感染症等も例示される。

[0034] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0035] 実施例1: TLR7,9刺激による骨髄由来in vitro樹状細胞からのIFN- α 産生誘導におけるIKK α の必要性

IKK α +/-マウス同士を交配させることにより、胎生13.5-15.5日の胎児を得た。この胎児の中から、IKK α +/+、-/-の遺伝形質を有するマウスをPCRにて選別したのち、胎児肝細胞を採取した。さらに、胎児肝細胞を放射線照射野生型C57BL6-CD45.1マウスに静注したのち6-10週後にIKK α +/-あるいはIKK α -/-骨髄キメラマウスとして使用した。

[0036] このキメラマウス骨髄細胞を 5×10^6 個/mlで、10%FCS, 100ng/ml human Flt3ligand (Peprotech)を含むRPMI1640培地で6~8日間培養することにより、Flt3L誘導骨髄樹状細胞(Flt3L BM DC)を調整した。このFlt3L BM DCを非刺激(med)あるいは100ng/ml Bacterial lipopeptide (BLP, Invivogen), 50 μ g/ml polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C), Amersham)(但し、図1cでは、lipofectamine 2000(Invitrogen)と混合した最

終濃度25 μ g/ml poly(I:C)を使用), 100ng/ml Salmonella Minnesota Re595由来LPS (Sigma), 100nM R848 (Invivogen), 合成DNA (1 μ M 1668:5'-tccatgacgttctctgatgct-3' (配列番号1), 3 μ M D19:5'-ggTGCATCGATGCAGggggG-3' (配列番号2)、小文字はphosphorothioate DNA, 大文字はphosphodiester DNA), Lipofectamine 2000 (Invitrogen)と混合した最終濃度20 μ g/ml polyuridylic acid (PolyU)により20-24時間刺激し、培養上清中のIL-12p40、TNF- α の量をGenzyme Techne社のELISAにて、IFN- α の量をPBL社のELISAにて測定を行った(図1a、b及びc)。

[0037] 野生型Flt3L誘導骨髄樹状細胞(Flt3L BM DC)は、細菌リポペプチド(BLP, TLR2リガンド)、ポリ(I:C) (TLR3リガンド)、LPS (TLR4リガンド)、R848 (TLR7リガンド)及びODN1668 (TLR9リガンド)に応答してIL-12p40を産生した。IKK α -/- Flt3L BM DCもIL-12p40を産生することによってこれらのTLRアゴニストに応答した。TLR7又はTLR9シグナル伝達によるIL-12p40の誘導量は僅かに減少したが、刺激後は有意に増加した(図1a)。TLR7又はTLR9シグナル伝達によるTNF- α の誘導量は野生型及びIKK α -/- Flt3L BM DCにおいて有意差はみられなかった(図1b)。また、D/A型CpG DNA(D19)は、野生型Flt3L BM DCにおけるIFN- α 産生を誘導できたが、この誘導は、IKK α -/- Flt3L BM DCでは大きく障害されていた(図1c)。Poly U誘導IFN- α 産生もIKK α -/- Flt3L BM DCでは大きく障害されていた(図1c)。一方、poly (I:C)刺激によるIFN- α 産生は正常であった(図1c)。

[0038] また、CD40とB220の発現をFACSにより解析を行った(図1d)。B220⁺(PDC)及びB220⁻(通常のDC)の2種類の樹状細胞の割合は正常であり、各々のDCのTLR7及びTLR9によるCD40の発現誘導は、IKK α +/+及びIKK α -/- Flt3L BM DCの間で有意な差を認めなかった(図1d)。

[0039] Flt3L BM DCにおけるIFN- α 、IFN- β 、IL-12p40遺伝子の発現を解析するため、Flt3L BM DCをLPS、D19またはPolyUにより刺激したのち、RNAを調製し、IFN- α 、IFN- β 、IL-12p40遺伝子をプローブとしてNorthern blot analysisを行った(図1e)。TLR7又はTLR9シグナル伝達によるIFN- α 遺伝子誘導は、IKK α -/- Flt3L BM DCでは大きく損なわれたが、IFN- β 及びIL-12p40遺伝子のTLR7又はTLR9誘導発現上昇は、野生型及びIKK α -/- Flt3L BM DCの間で同等であった(図1e)。この結果より、I

IKK α が、in vitro樹状細胞においてTLR7又はTLR9に仲介されたIFN- α 誘導に必須であることが示された。

[0040] 実施例2: TLR7,9刺激によるin vivo樹状細胞からのIFN- α 産生誘導におけるIKK α の必要性

キメラマウスの骨髄細胞におけるCD11c, B220の発現をFACSにて解析した(図2a)。その結果、IKK α $+/+$ 及びIKK α $-/-$ キメラは共に、CD11c $^+$ B220 $^+$ 細胞を骨髄細胞中に含んでいた。

[0041] また、骨髄細胞を 1×10^6 個/mlで、10%FCS を含むRPMI1640培地で非刺激、あるいは100nM R848, 1 μ M 1668, 3 μ M D19, Lipofectamine 2000 (Invitrogen)と混合した最終濃度25 μ g/ml polyUの刺激後20~24時間の培養上清中のIL-12p40の量をGenzyme Techne社のELISAにて、IFN- α の量をPBL社のELISAにて測定を行った(図2b)。TLR7又はTLR9誘導IFN- α 産生は、IKK α $-/-$ キメラ骨髄細胞において大きく減少していた。一方、IL-12p40誘導は軽度減少していた(図2b)。

[0042] また、キメラマウスの脾臓細胞から、磁気ビーズを用いたソーティング(MACS)によりCD11c陽性細胞を調製し、そのCD11c, B220の発現をFACSにて解析した(図2c)。CD11c陽性細胞におけるB220陽性細胞の数は、IKK α $+/+$ 及びIKK α $-/-$ キメラ脾臓細胞の間で同等であった(図2c)。

[0043] また、このCD11c陽性脾細胞を骨髄細胞と同様の条件で刺激し、IL-12p40, IFN- α の産生量をELISAにより測定した(図2d)。IKK α $-/-$ CD11c陽性脾細胞は、IKK α $+/+$ CD11c陽性脾細胞よりもIL-12p40の産生量が軽度減少していたが、IKK α $-/-$ CD11c陽性脾細胞からのTLR7/9で誘導されるIFN- α の産生は大きく低下していた(図2d)。

[0044] キメラマウスに1匹あたり50nmolのR848を静注し、静注後1,3,6時間に採血を行い、血清中のIFN- α 濃度をELISAにより測定した(図2e)。血清中のIFN- α 濃度のTLR7リガンド(R848)によって誘導される上昇は、PDCからの産生に依存しているが、IKK α $-/-$ キメラで大きく低下していた(図2e)。

[0045] 実施例3: MyD88依存性経路によるIFN- α プロモーター活性化におけるIKK α の機能

(1) プラスミドの調製

pUNO-MyD88, pUNO-TRAF6: Invivogenより購入した。

pUNO: pUNO-TRAF6をAgeI+NheIで切断し、インサートを除去後、self annealingを行い、コントロールベクターとして使用した。

pEF-BOS-FLAG-mIRF-7: プライマー5'-GGGTCGACATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGCTGAAGTGAGGGGGTCCAGCGA-3' (配列番号3)と5'-GGCCGGCCGCTCAAGGCCACTGACCCAGGTCCATGAG-3' (配列番号4)によるPCRにて、GM-CSFによって誘導されたマウス骨髄由来樹状細胞のcDNAライブラリーから、IRF7 cDNAを増幅し、プラスミドpEF-BOS (S. Mizushima, S. Nagata. *Nucleic Acid Res.* 18:5322,1990.)のSalI-NotI部位に挿入した。

[0046] pSR α -6myc-mIKK α : 徳島大学松本満先生より供与を受けた。野生型IKK α (IKK α -WT)の発現ベクターとして使用した。

pSR α -6myc-mIKK α (K44A): pSR α -6myc-mIKK α を基に、44番目のリジン残基をアラニン残基に変換するようにin vitro mutagenesisを行い、キナーゼ活性欠損IKK α (IKK α -KD)の発現ベクターとして使用した。

pSR α -6myc: pSR α -6myc-mIKK α からmIKK α をEcoRI+XhoIにより切断、末端を修復し、self annealingを行った。

[0047] pIFN- α 4-luc: IFN- α 4プロモーター領域をセンスプライマー 5'-CCCCCACA CT TACTTTTTT GACAGAA-3' (配列番号5)とアンチセンスプライマー 5'-TACAGG TTCTCTGAGAGCCTGCTGTGT-3' (配列番号6)にてC57BL6マウスDNAからPCRにて増幅を行った。このプロモーター領域をpGL3 (Promega)の XhoI-HindIII部位にサブクローニングすることによりpIFN- α 4-lucを作成した。

pELAM1-luc: Dr. D. T. Golenbockより供与。R.L. Delude et al. *J. Immunol.* 161:3001,1998.

pIFN- β -luc: Sato et al. *Immunity* 13:539, 2000.に従い、PCRでIFN- β プロモーター領域を増幅し、pGL3 (Promega)の XhoI-HindIII部位にサブクローニングすることによりpIFN- β -lucを作成した。

pRL-TK: Promegaより購入した。

[0048] (2) ルシフェラーゼアッセイ(図3a, b, f)

ヒト腎臓由来細胞株293Tを 2×10^5 個/mlの濃度で0.35ml/well, 24穴プレート上で10%FCSを含むDMEM培地で培養した。24時間後、pUNO、pUNO-MyD88(Invivogen), pUNO-TRAF6, pEF-BOS-Flag-mIRF-7, pSR α -6myc, pSR α -6myc-mIKK α , pSR α -6myc-mIKK α (K44A)を種々の組み合わせで、レポーター遺伝子pIFN- α 4-luc(図3a及びb), pELAM1-luc(図3f)あるいはpIFN- β -luc(図3f)、およびpRL-TK(Promega)と共に添加し、lipofectamine 2000(Invivogen)を用いて、遺伝子導入を行った。18-24時間後、細胞抽出物を調製し、Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega), 20/20thLuminometer (Turner Biosystem)を用いてluciferase活性を測定した。遺伝子導入効率を補正するために、得られたFirefly luciferase活性をRenilla luciferase活性で除することにより、相対活性値とした。最終的に実験データは空ベクターのみで遺伝子導入した相対活性値を1として、fold inductionで示した。

[0049] TLRアダプターMyD88だけの発現ではIFN- α プロモーターを活性化できないが、プロモーターのIRF-7誘導活性化を相乗的に増大することができる(図3a)。IKK α -KDの発現は、IRF-7のみによる活性化に影響しないが(図3a)、IRF-7共存下で認められるMyD88による相乗効果を阻害できた(図3a)。一方、IKK α -WTの発現は、MyD88、IRF-7の相乗効果をわずかながら増強した(図3a)。MyD88と同様、別のアダプター分子であるTRAF6も、IRF-7と相乗的にIFN- α プロモーターを活性化することができる(図3b)。IKK α -KDは、このTRAF6による誘導相乗効果も阻害できた。MyD88もNF- κ B又はIFN- β プロモーターを活性化できるが、この活性はIKK α -KDの発現では阻害されなかった(図3f)。従って、IKK α は、そのキナーゼ活性を介して、MyD88又はTRAF6と相乗してIFN- α プロモーターを活性化するIRF7の能力に関与していることが示された。

[0050] (3) IKK α とIRF7との会合(図3c, d, e)(3-1) 293T細胞におけるIKK α とIRF7の会合(図3c)

60mm dish1枚あたり 2×10^6 個の293Tを10%FCSを含むDMEM培地で一晚培養した。次に示されているプラスミドを全量5 μ gとして、lipofectamine 2000(Invivogen)を用いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入20時間後、細胞を回収し、溶解液(1% Nonid

et P-40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 20 μ g/ml aprotinin, 10mM NaF, 10mM β -glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4 , 及び20mM Tris-HCl, pH8.0)にて細胞抽出を行った。protein G-Sepharose4FF beadsと1時間混合した後、上清をさらに6 μ g/ml anti-Flag M2 mAb (Sigma-Aldrich) あるいは5 μ g/ml anti-Myc-tag clone PL14 mAb (MBL, Japan)を結合させたprotein G-Sepharose4FF beadsと4°Cで12時間混合を行った。ビーズを3回洗浄した後、Laemmli液にて100°C5分で溶出したものを10%SDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、PVDFメンブレンに転写した。次にメンブレンをビオチン標識anti-Flag M2 mAb (Sigma-Aldrich) あるいはビオチン標識anti-Myc-tag clone PL14 mAb (MBL, Japan)と室温で1時間混合した。TBS-Tバッファー (0.1%Tween20, 137mM NaCl, 2.6mM KCl, 25mM Tris-HCl, pH7.0)で洗浄後、さらにstreptavidin-HRP conjugate (Amersham bioscience) にて室温30分混合した。さらに洗浄後、ECL system (PerkinElmer Life sciences)を用いて、バンドの検出を行った。

[0051] その結果、IKK α はIRF-7と一緒に免疫沈降することが確認された(図3c)。MyD88又はTRAF6の共発現は、IRF7及びIKK α の相互作用を有意に増強できた(図3c)。

[0052] (3-2) Flt3L 誘導BM DCにおけるIKK α とIRF-7の会合(図3d)

野生型Flt3L BM DCを調製し、ウサギ抗IRF-7抗体(United States Biological)、そのコントロールとして正常ウサギ抗体IgG(Santa Cruz Biotechnology)、抗IKK α 抗体(M-280, Santa Cruz Biotechnology)を用いて、図3cと同様に、細胞抽出物の作成、免疫沈降およびWestern blotを行った。IRF-7のバンドの検出にはHRP標識ロバ抗ウサギIgG抗体(Amersham Bioscience)を用いた。

[0053] その結果、IKK α とIRF-7の会合が検出された(図3d)。

[0054] (3-3) GM-CSF誘導BMDCにおけるIKK α とIRF7の会合(図3e)

IKK α +/+あるいはIKK α -/-キメラマウスの骨髄細胞を 1×10^6 個/mlで、10%FCS, 10ng/ml GM-CSF (R&D)を含むRPMI1640培地で6~8日間培養することにより、GM-CSF誘導骨髄樹状細胞(GM-CSF BM DC)を調整した。さらに、レンチウイルスベクターpCSII-EF-FLAG-mIRF7-IRES2-Venusを用いて、GM-CSF BM DCにIRF7を強制発現させた。pCSII-EF-FLAG-mIRF7-IRES2-Venusは、理化学研究所三好浩之先生、宮脇敦史先生より供与されたレンチウイルスベクターpCSII-EF-MCS-IRES2-Venus

に、実施例3(1)で作成したIRF7 cDNAを挿入することにより作成した。このGM-CSF-DCを、Anti-FLAG M2 mAb、そのコントロールとしてanti-myc-tag clone PL14 mAb、抗IRF7抗体、及び抗IKK α 抗体(M-280, Santa Cruz Biotechnology)を用いて、図3cと同様に、細胞抽出物の作成、免疫沈降およびWestern blotを行った。

[0055] その結果、IRF7とIKK α の会合が検出された(図3e)。

[0056] 実施例4:IKK α によるGST-IRF7のリン酸化(図4)

(1) プラスミドの調製

pGST-IRF7: pEF-BOS-FLAG-mIRF-7の422-457番目の アミノ酸に相当する領域をPCRにて増幅し、pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences)にサブクローニングを行った。

pGST-I κ B α : マウスI κ B α の5-55番目のアミノ酸に相当する領域をPCRにて増幅し、pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences)にサブクローニングを行った。

[0057] (2)リン酸化アッセイ(図4)

pGEX-5X-1, pGST-IRF7およびpGST-I κ B α を大腸菌BL21に導入し、Glutathione sepharose 4B affinity chromatography (Amersham Biosciences)を用いて、GSTタンパク(コントロール)、GST融合IRF7およびGST融合pGST-I κ B α を精製し、基質として使用した。293T細胞にpSR α -6myc(コントロールベクター)、pSR α -6myc-mIKK α 、pSR α -6myc-mIKK α (K44A)を導入し、細胞抽出物を作成し、PL14を用いて免疫沈降を行った。この免疫沈降物と基質2 μ gを混合し、20mM HEPES-NaOH(pH7.6), 10mM MgCl₂, 2mM MnCl₂, 50mM NaCl, 0.1mM Na₃VO₄, 10mM β -glycerophosphate, 10mM PNPP, 1mM DTT, 10mM NaF, 50 μ M ATP, 370kBq[γ -³²P]ATPの存在下で37度30分反応させた(図4a)。反応後、10%SDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動、引き続きオートラジオグラフィーを行った。また、組み換えヒトIKK α (Lake Placid) 100ng (60units/mg protein)を用いて同様の反応を行った(図4b)。

[0058] その結果、IRF7は、IKK α によりリン酸化されることが分かった(図4a)。

産業上の利用可能性

[0059] 本発明により、インターフェロン- α の産生を制御することが可能になった。本発明のインターフェロン- α 制御剤は、インターフェロン- α の産生の抑制又は誘導によ

り治療や予防に有効となる各種疾患の治療や予防のために用いることができる。

図面の簡単な説明

[0060] [図1]図1は、TLR7,9刺激による骨髄由来in vitro樹状細胞からのIFN- α 産生誘導におけるIKK α の必要性を調べた実験結果である。

[図2]図2は、TLR7,9刺激によるin vivo樹状細胞からのIFN- α 産生誘導におけるIKK α の必要性を調べた実験結果である。

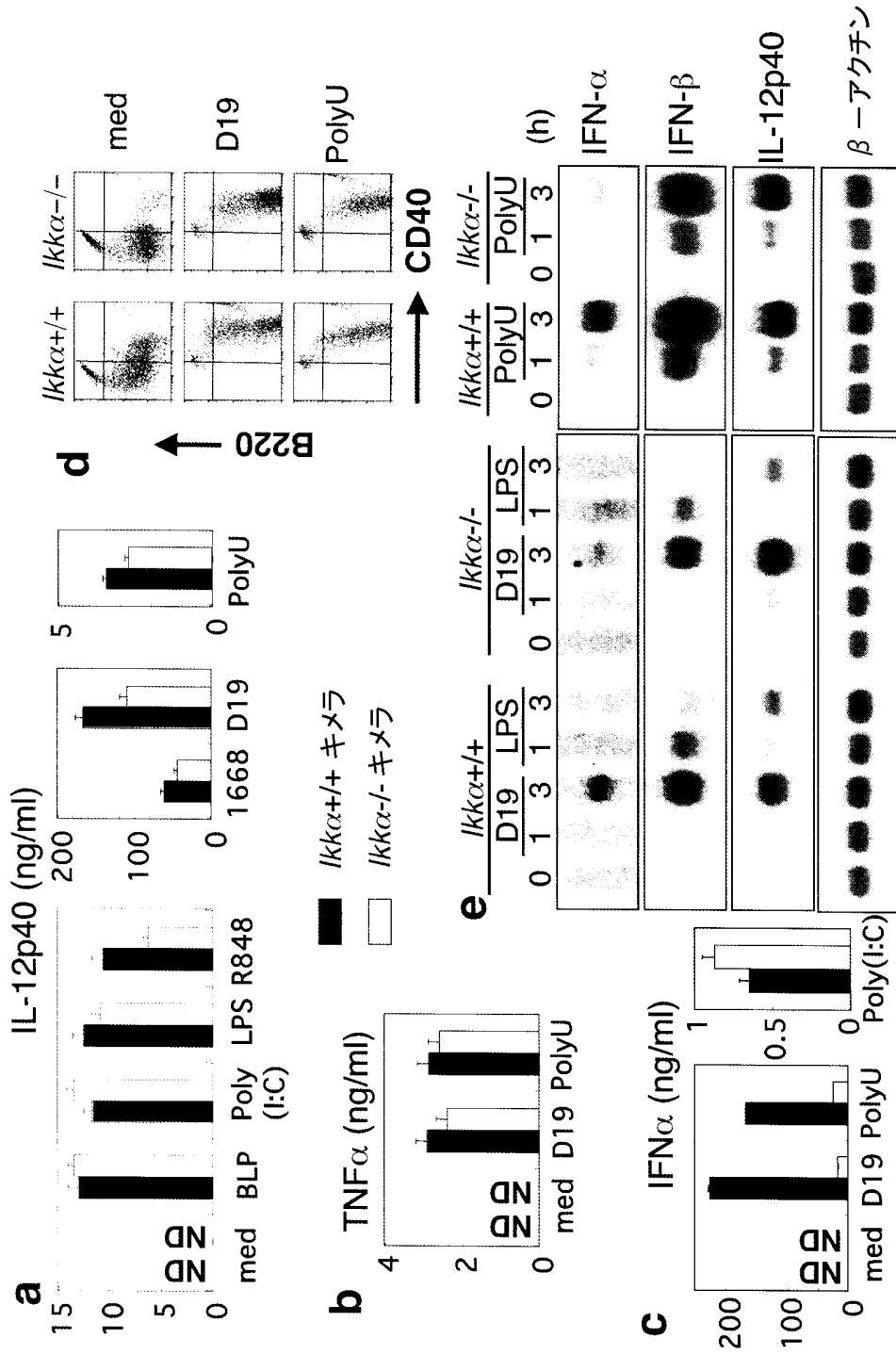
[図3]図3は、MyD88依存性経路によるIFN- α プロモーター活性化におけるIKK α の機能及びIKK α のIRF7との会合を調べた実験結果である。

[図4]図4は、IKK α によるGST-IRF7のリン酸化を示す実験結果である。

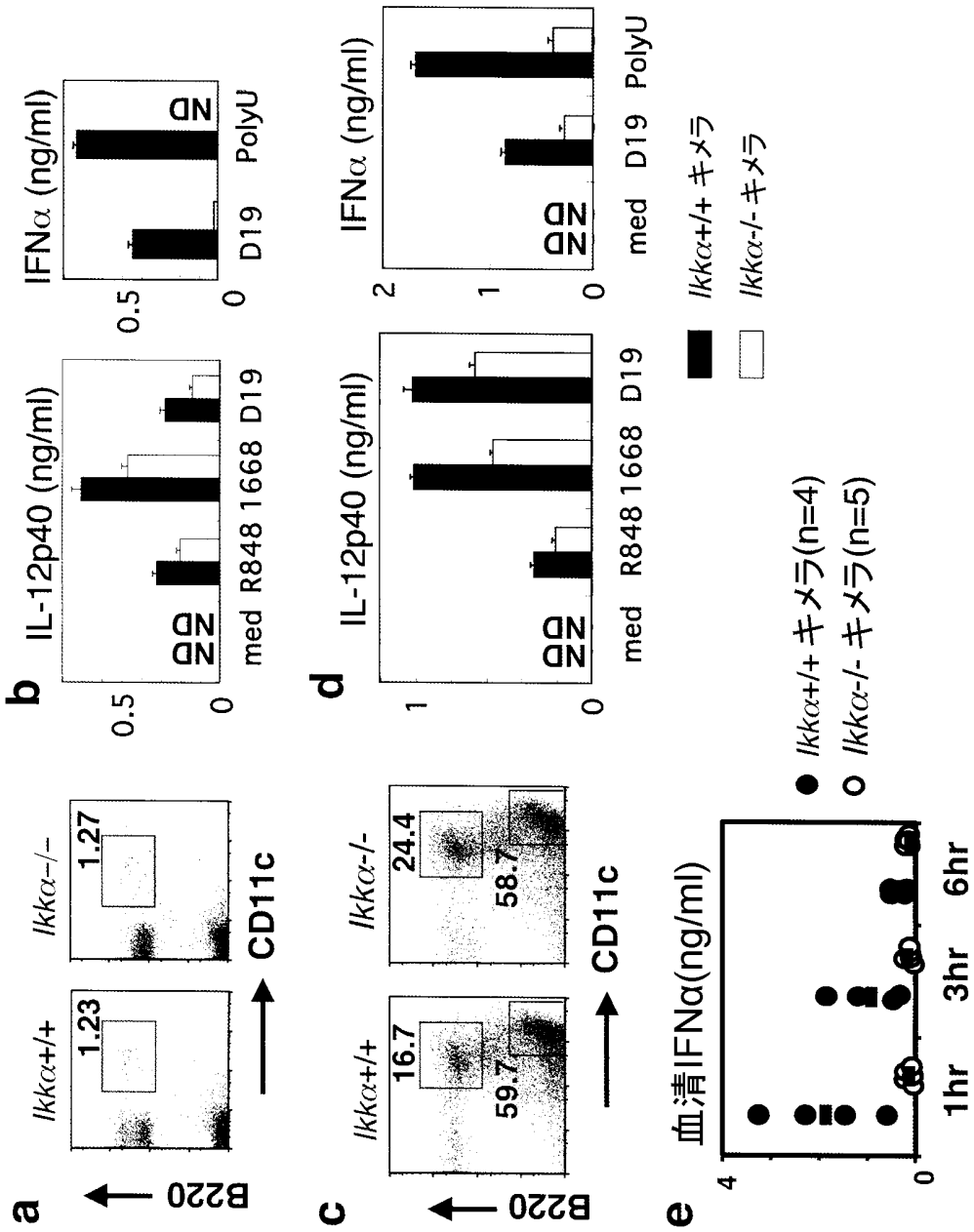
請求の範囲

- [1] IKK α の阻害剤を含む、インターフェロン- α 産生抑制剤。
- [2] IKK α の阻害剤が、IKK α の発現を阻害する物質、又はキナーゼ活性を欠損するIKK α 変異体である、請求項1に記載のインターフェロン- α 産生抑制剤。
- [3] 細胞内のIKK α 活性を阻害することを含む、細胞からのインターフェロン- α の産生を抑制する方法。
- [4] IKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質を含む、インターフェロン- α 産生誘導剤。
- [5] 細胞にIKK α 、又はIKK α の発現を増大させる物質を投与することを含む、細胞からのインターフェロン- α の産生を誘導する方法。

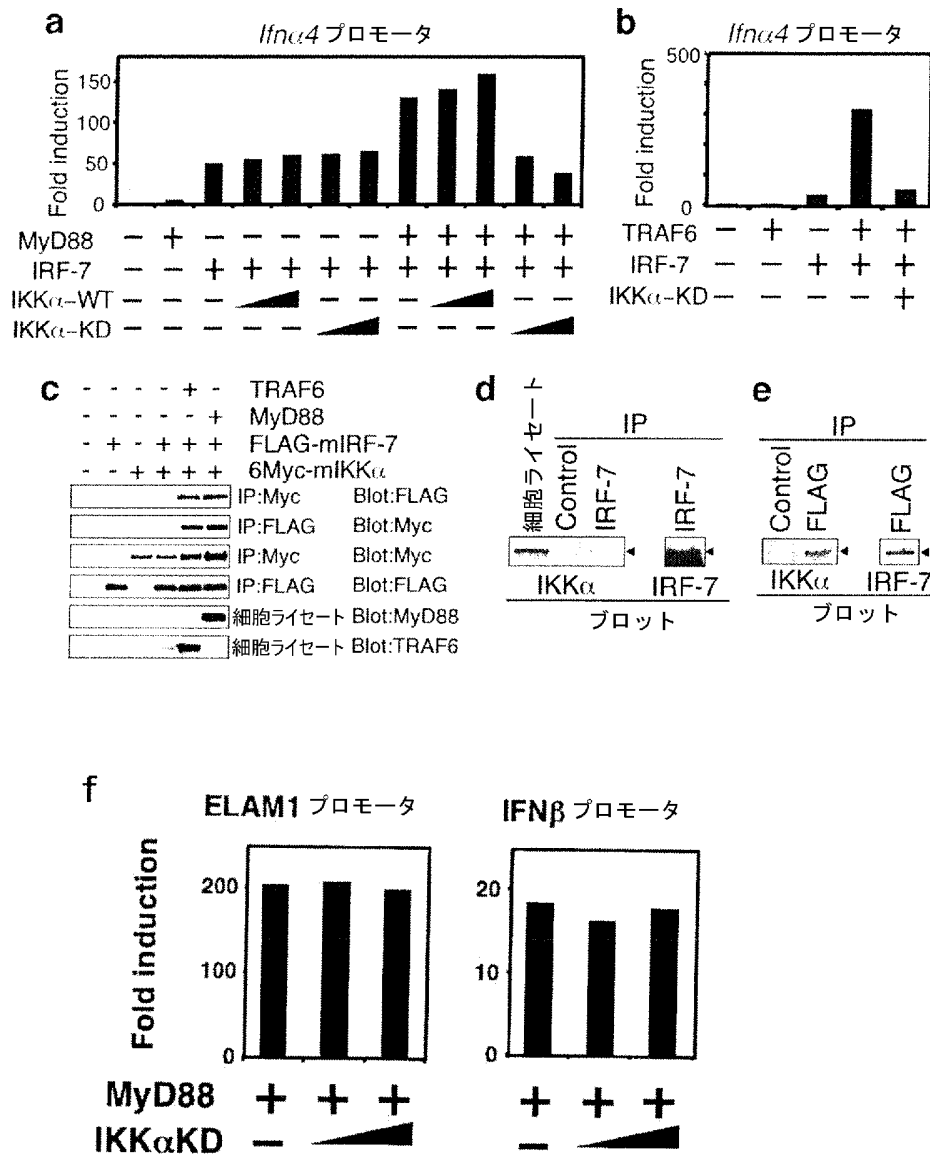
[図1]



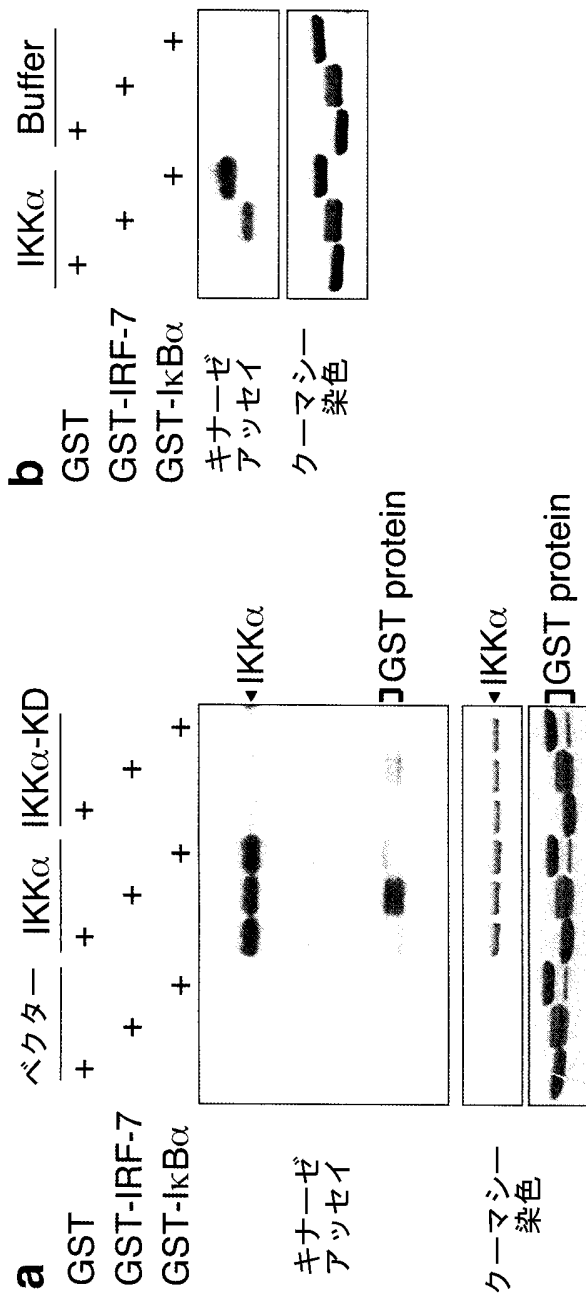
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311072

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/00 (2006.01), A61K31/7105 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P1/02 (2006.01), A61P1/04 (2006.01), A61P1/16 (2006.01), A61P3/10 (2006.01), A61P5/14 (2006.01), A61P7/06 (2006.01), A61P7/10 (2006.01), A61P9/00 (2006.01),		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/7105, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/02, A61P1/04, A61P1/16, A61P3/10, A61P5/14, A61P7/06, A61P7/10, A61P9/00, A61P11/02, A61P11/06, A61P13/12, A61P17/00, A61P17/04, A61P17/06, A61P19/02, A61P19/06, A61P19/08, A61P21/00,		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2000-253884 A (Toagosei Co., Ltd.), 19 September, 2000 (19.09.00), Particularly, Claims; page 3, right column, lines 20 to 43; page 6, right column, line 21 to page 10, right column, line 23 (Family: none)	1, 2 4
X A	WO 2003/103661 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS, INC.), 18 December, 2003 (18.12.03), Particularly, Claims; page 133, line 1 to page 138, line 25 & JP 2005-530816 A & EP 1513516 A1	1 2, 4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 06 July, 2006 (06.07.06)		Date of mailing of the international search report 18 July, 2006 (18.07.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311072

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/099781 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS, INC.), 04 December, 2003 (04.12.03), & JP 2005-527215 A & EP 1520043 A2	1, 2, 4
P, X	K, HOSHINO et al., IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9, Nature, Vol.440, No.7086, 13 April, 2006 (13.04.06), pages 949 to 953	1, 2, 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311072

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.: 3, 5

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 3 and 5 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

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:

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

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

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

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

Remark on Protest

the

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311072

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61P11/02(2006.01), **A61P11/06**(2006.01), **A61P13/12**(2006.01), **A61P17/00**
(2006.01), **A61P17/04**(2006.01), **A61P17/06**(2006.01), **A61P19/02**(2006.01),
A61P19/06(2006.01), **A61P19/08**(2006.01), **A61P21/00**(2006.01), **A61P21/04**
(2006.01), **A61P25/00**(2006.01), **A61P25/04**(2006.01), **A61P27/02**(2006.01),
A61P27/14(2006.01), **A61P29/00**(2006.01), **A61P31/04**(2006.01), **A61P31/10**
(2006.01), **A61P31/14**(2006.01), **A61P31/16**(2006.01), **A61P31/20**(2006.01),
A61P31/22(2006.01), **A61P33/00**(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **A61P37/00**
(2006.01), **A61P37/02**(2006.01), **A61P37/06**(2006.01), **A61P37/08**(2006.01),
A61P43/00(2006.01), **C12N5/00**(2006.01), **C12N15/09**(2006.01)

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

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

A61P21/04, A61P25/00, A61P25/04, A61P27/02, A61P27/14, A61P29/00,
A61P31/04, A61P31/10, A61P31/14, A61P31/16, A61P31/20, A61P31/22,
A61P33/00, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/02, A61P37/06, A61P37/08,
A61P43/00, C12N5/00, C12N15/09

Minimum documentation searched (classification system followed by
classification symbols)

<Subject of search>

Claims 1, 2 and 4 relate to an interferon- α production inhibitor or inducer comprising any substance having a desired property such as the ability to inhibit or increase the expression of an IKK α inhibitor or IKK α , and claims 1, 2 and 4 include all of the substances having the property. However, among the substances, those substances which are disclosed in the meaning within PCT Article 5 are only limited to a plasmid which can express wild-type IKK α or IKK α deficient in kinase activity and having a substitution of a lysine residue at position 44 by an alanine residue. Therefore, these claims are not regarded to be supported by the description in the meaning within PCT Article 6.

Thus, search was made on the relationship between IKK α and the interferon- α production, on an interferon- α production inducer comprising a plasmid capable of expressing wild-type IKK α as an active ingredient and on an interferon- α production inhibitor comprising a plasmid capable of expressing the IKK α deficient in kinase activity as an active ingredient.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K45/00 (2006.01), A61K31/7105 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P1/02 (2006.01), A61P1/04 (2006.01), A61P1/16 (2006.01), A61P3/10 (2006.01), A61P5/14 (2006.01), A61P7/06 (2006.01), A61P7/10 (2006.01), A61P9/00 (2006.01), A61P11/02 (2006.01), A61P11/06 (2006.01), 続きあり</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K 31/7105, A61K 45/00, A61K 48/00, A61P 1/02, A61P 1/04, A61P 1/16, A61P 3/10, A61P 5/14, A61P 7/06, A61P 7/10, A61P 9/00, A61P 11/02, A61P 11/06, A61P 13/12, A61P 17/00, A61P 17/04, A61P 17/06, A61P 19/02, A61P 19/06, A61P 19/08, A61P 21/00, A61P 21/04, A61P 25/00, A61P 25/04,</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2006年											
日本国実用新案登録公報	1996-2006年											
日本国登録実用新案公報	1994-2006年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS (STN), CApplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>JP 2000-253884 A (東亜合成株式会社) 2000.09.19, 特に、特許請求の範囲, 第3頁右欄第20-43行, 第6頁右欄第21行-第10頁右欄23行 (ファミリーなし)</td> <td>1, 2 4</td> </tr> <tr> <td>X A</td> <td>WO 2003/103661 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS, INC.) 2003.12.18, 特に、特許請求の範囲, 第133頁第1行-第138頁25行 & JP 2005-530816 A & EP 1513516 A1</td> <td>1 2, 4</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X A	JP 2000-253884 A (東亜合成株式会社) 2000.09.19, 特に、特許請求の範囲, 第3頁右欄第20-43行, 第6頁右欄第21行-第10頁右欄23行 (ファミリーなし)	1, 2 4	X A	WO 2003/103661 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS, INC.) 2003.12.18, 特に、特許請求の範囲, 第133頁第1行-第138頁25行 & JP 2005-530816 A & EP 1513516 A1	1 2, 4	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号										
X A	JP 2000-253884 A (東亜合成株式会社) 2000.09.19, 特に、特許請求の範囲, 第3頁右欄第20-43行, 第6頁右欄第21行-第10頁右欄23行 (ファミリーなし)	1, 2 4										
X A	WO 2003/103661 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS, INC.) 2003.12.18, 特に、特許請求の範囲, 第133頁第1行-第138頁25行 & JP 2005-530816 A & EP 1513516 A1	1 2, 4										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの											
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの											
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>06.07.2006</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>18.07.2006</p>											
<p>国際調査機関の名称及びびあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>清野 千秋</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>	<table border="1"> <tr> <td>4C</td> <td>3634</td> </tr> </table>	4C	3634								
4C	3634											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2003/099781 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS, INC.) 2003.12.04 & JP 2005-527215 A & EP 1520043 A2	1, 2, 4
P, X	K, HOSHINO et al., IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9, Nature, Vol. 440, No. 7086, 2006.04.13, p.949-953	1, 2, 4

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 3, 5 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 3, 5は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））の続き

Int.Cl. *A61P13/12* (2006.01), *A61P17/00* (2006.01), *A61P17/04* (2006.01), *A61P17/06* (2006.01),
A61P19/02 (2006.01), *A61P19/06* (2006.01), *A61P19/08* (2006.01), *A61P21/00* (2006.01), *A61P21/04* (2006.01),
A61P25/00 (2006.01), *A61P25/04* (2006.01), *A61P27/02* (2006.01), *A61P27/14* (2006.01), *A61P29/00* (2006.01),
A61P31/04 (2006.01), *A61P31/10* (2006.01), *A61P31/14* (2006.01), *A61P31/16* (2006.01), *A61P31/20* (2006.01),
A61P31/22 (2006.01), *A61P33/00* (2006.01), *A61P35/00* (2006.01), *A61P37/00* (2006.01), *A61P37/02* (2006.01),
A61P37/06 (2006.01), *A61P37/08* (2006.01), *A61P43/00* (2006.01), *C12N5/00* (2006.01), *C12N15/09* (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））の続き

Int.Cl. A61P 27/02, A61P 27/14, A61P 29/00, A61P 31/04, A61P 31/10, A61P 31/14,
A61P 31/16, A61P 31/20, A61P 31/22, A61P 33/00, A61P 35/00, A61P 37/00, A61P 37/02, A61P 37/06,
A61P 37/08, A61P 43/00, C12N 5/00, C12N 15/09

<調査の対象について>

請求の範囲 1, 2, 4 は、それぞれ、IKK α の阻害剤や IKK α の発現を阻害又は増大させる等、所望の特性を有するあらゆる物質を含有するインターフェロン α 産生抑制剤又は産生誘導剤に関するものである。そして、請求の範囲 1, 2, 4 は、各々そのような性質を有する物質を包含するものであるが、PCT 第 5 条の意味において開示されているのは、野生型 IKK α 又は 44 番目のリジン残基をアラニン残基に変換したキナーゼ活性欠損 IKK α を発現するプラスミドのみであり、PCT 第 6 条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

よって、調査は、IKK α とインターフェロン α 産生との関係について、及び、野生型 IKK α を発現するプラスミドを有効成分とするインターフェロン α 産生誘導剤及び上記キナーゼ活性欠損 IKK α を発現するプラスミドを有効成分とするインターフェロン α 産生抑制剤について行った。