

(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2011-526143

(P2011-526143A)

(43) 公表日 **平成23年10月6日(2011.10.6)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 N	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 C 0 8 4
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-501132 (P2011-501132)
 (86) (22) 出願日 平成21年3月21日 (2009. 3. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年11月11日 (2010. 11. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/002091
 (87) 国際公開番号 W02009/118137
 (87) 国際公開日 平成21年10月1日 (2009. 10. 1)
 (31) 優先権主張番号 08290285.9
 (32) 優先日 平成20年3月26日 (2008. 3. 26)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 399050909
 サノフィーアベンティス
 フランス75013パリ、アヴニュ・ドゥ
 ・フランス 174番
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 マーティアス・ゲバオアー
 ドイツ連邦共和国65926フランクフル
 ト・アム・マイン、サノフィーアベンティ
 ス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー
 ・ハー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カテプシンCの使用

(57) 【要約】

本発明は、カテプシンCの使用に関する。本発明の他の態様は、薬剤のスクリーニング、疼痛感受性の診断及び疼痛処置の方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疼痛を変調させる化合物を識別するための、カテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体の使用。

【請求項 2】

疼痛を変調させる化合物を識別又は分析するための、カテプシンC又はその機能的フラグメントを異種的に発現する非ヒトトランスジェニック動物の使用。

【請求項 3】

亢進した疼痛感受性のモデルシステムとして、カテプシンC又はその機能的フラグメントを異種的に発現する非ヒトトランスジェニック動物の使用。

10

【請求項 4】

疼痛を変調させる化合物を識別又は分析するための、非ヒトカテプシンCノックアウト動物の使用。

【請求項 5】

低下した疼痛感受性のモデルシステムとして、非ヒトカテプシンCノックアウト動物の使用。

【請求項 6】

疼痛を変調させる化合物を識別するための、カテプシンC又はその機能的フラグメントを異種的に発現する細胞の使用。

【請求項 7】

亢進した疼痛感受性のモデルシステムとして、カテプシンC又はその機能的フラグメントを異種的に発現する細胞の使用。

20

【請求項 8】

疼痛を変調させる化合物を識別又は分析するための、カテプシンノックアウト細胞の使用。

【請求項 9】

低下した疼痛感受性のモデルシステムとして、カテプシンノックアウト細胞の使用。

【請求項 10】

疼痛を変調させる化合物を識別又は分析するための、カテプシンCプロモータ及び/又はエンハンサー又はその機能的フラグメントと発現的にリンクしたレポーター遺伝子を異種的に発現する細胞の使用。

30

【請求項 11】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

- a . 少なくとも2つの試料を用意すること；
 - b . カテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体を含む1つの試料を化合物と接触させること；
 - c . 化合物の存在下でカテプシンCの活性を測定すること；
 - d . 化合物の非存在下でカテプシンCの活性を測定すること；そして
 - e . c) によるカテプシンCの活性を d) によるカテプシンCの活性と比較すること；
- を含む方法。

40

【請求項 12】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

- a . カテプシンCタンパク質又はその機能的フラグメント若しくは誘導体を、試験化合物と接触させること；そして
 - b . その試験化合物が、カテプシンCタンパク質又はその機能的フラグメント若しくは誘導体の活性を変調させるかどうかを測定すること；
- を含む方法。

【請求項 13】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

- a . 検出可能な量又は活性のカテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体

50

を有する細胞を、試験化合物と接触させること；

b．その試験化合物が、細胞中に存在するカテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体の量又は活性を変調できるかどうかを測定すること；

を含む方法。

【請求項14】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a．カテプシンCタンパク質又はその機能的フラグメント若しくは誘導体をコードする核酸を、転写活性のあるシステム中で試験化合物と接触させ；そして

b．前述の化合物の存在下で、前述のシステム内に存在するカテプシンCタンパク質又はその機能的フラグメント若しくは誘導体をコードするmRNAの量を測定すること；そして

c．その試験化合物が、前述のシステム中に存在するカテプシンCタンパク質又は機能的フラグメント若しくは誘導体をコードするmRNAの量を変調させることができるかどうかを測定すること；

を含む方法。

【請求項15】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a．レポーター遺伝子又はその機能的フラグメントと作動的にカップリングしたカテプシンC遺伝子又はその機能的フラグメントのプロモータを含む核酸ベクターがトランスフェクトされた細胞を用意すること；

b．機能的カテプシンCプロモータと作動的にカップリングしていないレポーター遺伝子又はその機能的フラグメントを含む対照ベクターがトランスフェクトされた細胞を用意すること；

c．試験化合物の存在下で、a)及びb)による細胞のレポーター遺伝子活性を測定すること；

d．試験化合物の非存在下で、a)及びb)による細胞のレポーター遺伝子活性を測定すること；

を含む方法。

【請求項16】

疼痛を変調させる化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a．カテプシンCの活性を変調させる化合物を試験化合物として選択すること；そして

b．前述の試験化合物を疼痛感覚のある対象に投与し、疼痛が変調されるかどうかを測定すること；

を含む方法。

【請求項17】

対象の疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a．カテプシンCの生物学的活性を変調させる1つ又はそれ以上の変調化合物を識別するために、1つ又はそれ以上の試験化合物の存在下で、カテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体の生物学的活性をアッセイすること；そして

b．対象の疼痛、疼痛感覚又は疼痛感受性を減少させる能力について、1つ又はそれ以上の変調化合物を試験すること；

を含む方法。

【請求項18】

個体の疼痛限界を分析する方法が、前記個体の採取試料中のカテプシンCの量を、前記試料中に存在するカテプシンC mRNA及び/又はタンパク質の量と1つ又はそれ以上の参照試料のそれとが異なるかどうかに関して、1つ又はそれ以上の参照試料と比較して分析することを含む方法であって、前記個体におけるより多い量の存在が亢進した疼痛感受性を示し、より少ない量の存在が低下した疼痛感受性を示す方法。

【請求項19】

10

20

30

40

50

個体の疼痛の予防及び／又は処置のために薬剤の投与量を適合させる方法が、個体の採取試料中に存在するカテプシンC mRNA及び／又はタンパク質の量が1つ又はそれ以上の参照試料中のそれと異なるかどうかに関して試験することを含み、前記投与量が適合しているかどうか、個体の採取試料中のタンパク質及び／又はmRNAの量が1つ又はそれ以上の参照試料のそれと異なるかどうかに依存する方法であって、個体の採取試料中のより高いカテプシンC量がより高い投与量が必要であることを示し、個体の試料中のより低いカテプシンC量がより低い投与量が必要であることを示す方法。

【請求項20】

検査する個体の身体から採取した生物試料を分析することによって個体の亢進した疼痛感受性を診断するための、カテプシンC検出方法の使用。

10

【請求項21】

個体の疼痛感受性を診断するための検査キットであって、生体試料中のカテプシンCを検出するための少なくとも1つの方法を含むキット。

【請求項22】

疼痛に悩む対象の現在の疼痛を処置する方法であって、前記対象に治療的有効量の組成物を投与し、前記対象のカテプシンCの量又は活性を低下させることを含む方法。

【請求項23】

対象の疼痛感受性を低下させる方法であって、前記対象に治療的有効量の組成物を投与し、前記対象のカテプシンCの量又は活性を低下させる方法。

【請求項24】

ヒト以外の雌の対象から生まれる子供の疼痛感受性を変調させる方法であって、変調したカテプシンCの発現を付与する核酸を受精卵に移入し、カテプシンCの(変調した)発現特性に従った子供を選択することを含む方法。

20

【請求項25】

疼痛処置のための化合物であって、カテプシンCの活性及び／又は発現を低下させることができる化合物。

【請求項26】

請求項1～3、6、8及び10のいずれか1項に記載の使用又は請求項11～17のいずれか1項に記載の方法であって、変調が疼痛の軽減、根絶又は防止である使用又は方法。

30

【請求項27】

請求項1～3、6、8及び10のいずれか1項に記載の使用又は請求項11～17のいずれか1項に記載の方法であって、変調が増加である使用又は方法。

【請求項28】

請求項27記載の使用又は方法であって、化合物が疼痛の防止又は処置のための化合物である使用又は方法。

【請求項29】

請求項1～28のいずれか1項に記載の使用、検査キット又は方法であって、カテプシンCが哺乳動物、そして好ましくはヒトカテプシンCである、使用、検査キット又は方法。

40

【請求項30】

請求項1～29のいずれか1項に記載の使用、検査キット、方法又は化合物であって、疼痛が急性又は慢性疼痛、好ましくは慢性疼痛である、使用、検査キット、方法又は化合物。

【請求項31】

請求項1～30のいずれか1項に記載の使用、検査キット、方法又は化合物であって、疼痛が変形性関節症性、炎症性又は神経障害性の疼痛である、使用、検査キット、方法又は化合物。

【請求項32】

請求項1～3、6、8及び10のいずれか1項に記載の使用又は請求項11～17のい

50

いずれか 1 項に記載の方法であって、カテプシン C が分離したタンパク質又はポリヌクレオチドとして使用される、使用又は方法。

【請求項 3 3】

請求項 1 ~ 3、6、8 及び 10 のいずれか 1 項に記載の使用又は請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法であって、カテプシン C が、

a . 配列番号 2 に記載の配列を含む又は配列から成るポリペプチド又はその機能的なフラグメント；又は

b . 配列番号 1 に記載の配列を含む又は配列から成るポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；又は

c . 配列番号 1 から成るポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

である、使用又は方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 3、6、8 及び 10 のいずれか 1 項に記載の使用又は請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法であって、カテプシン C が、

a . 配列番号 1 に記載の配列を含む又は配列から成るポリヌクレオチド；又は

b . 配列番号 1 から成るポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチド；又は

c . 配列番号 2 に記載のカテプシン C 又はその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチド；

である、使用又は方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法であって、組み換えカテプシン C を発現する細胞を使用する方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法であって、カテプシン C 活性の測定がそのプロテアーゼ活性に関する方法。

【請求項 3 7】

請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用又は請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法であって、細胞が哺乳動物、好ましくは齧歯類の細胞である、使用又は方法。

【請求項 3 8】

請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用又は請求項 2 5 に記載の方法であって、非ヒト動物が哺乳類、好ましくは齧歯類、そしてより好ましくはマウスである、使用又は方法。

【請求項 3 9】

請求項 10 に記載の使用又は請求項 1 5 に記載の方法であって、レポーター遺伝子が

【請求項 4 0】

請求項 2 1 に記載の使用、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の方法又は請求項 2 2 に記載の検査キットであって、試料が哺乳類、そして好ましくはヒト試料である、使用、方法又は検査キット。

【請求項 4 1】

請求項 2 1 に記載の使用、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の方法又は請求項 2 2 に記載の検査キットであって、試料が組織学的試料、生検試料、細胞抽出物、1 つ又はそれ以上の細胞又は採取体液である、使用、方法又は検査キット。

【請求項 4 2】

請求項 2 1 に記載の使用又は請求項 2 2 に記載の検査キットであって、検出方法がカテプシン C DNA の検出方法である、使用又は検査キット。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の検査キットの使用であって、手段がプライマー又はプライマーセット、好適なプローブ又は配列特異的抗 DNA 抗体である使用。

10

20

30

40

50

【請求項 44】

請求項 14、19 又は 20 のいずれか 1 項に記載の方法であって、mRNA の量の変化が、好ましくはカテプシン C cDNA の増幅のための 1 つ又はそれ以上の好適なプライマーを用いて、又はカテプシン C cDNA 又は mRNA と標準的な条件でハイブリダイゼーションするのに好適な 1 つ又はそれ以上のプローブを用いて分析される方法。

【請求項 45】

請求項 44 に記載の方法であって、mRNA の量が、PCR、ノーザンブロット、アレイハイブリダイゼーション又はチップハイブリダイゼーションの方法によって分析される方法。

【請求項 46】

請求項 21 に記載の使用又は請求項 22 に記載の検査キットであって、検出方法が、生体試料に存在するカテプシン C mRNA 及び / 又はタンパク質を検出する方法である、使用又は検査キット。

10

【請求項 47】

請求項 46 に記載の検査キットの使用であって、カテプシン C タンパク質を検出する方法が抗体である使用。

【請求項 48】

請求項 14、19 又は 20 のいずれか 1 項に記載の方法であって、カテプシン C タンパク質量の変化が測定される方法。

【請求項 49】

請求項 48 に記載の方法であって、タンパク質が少なくとも 1 つの抗体を使用して検出される方法。

20

【請求項 50】

請求項 48 又は 49 に記載の使用、方法又は検査キットであって、検出が ELISA、ウェスタンブロット又はタンパク質チップの方法で行われる、使用、方法又は検査キット。

【請求項 51】

請求項 48 又は 49 に記載の使用、方法又は検査キットであって、検出が免疫組織学的又は免疫放射線化学的検出方法を使って行われる、使用、方法又は検査キット。

【請求項 52】

請求項 17 又は 18 に記載の方法であって、カテプシン C の量を低減させる方法。

30

【請求項 53】

請求項 52 に記載の方法であって、神経組織におけるカテプシン C の量を低減させる方法。

【請求項 54】

請求項 17 又は 18 に記載の方法であって、カテプシン C の活性を低下させる方法。

【請求項 55】

請求項 54 に記載の方法であって、低下したカテプシン C の活性がプロテアーゼ活性である方法。

【請求項 56】

請求項 54 に記載の方法であって、神経組織におけるカテプシン C の活性を低下させる方法。

40

【請求項 57】

請求項 19 に記載の方法であって、神経又はリンパ組織における発現が変調される方法。

【請求項 58】

請求項 22 又は 23 に記載の方法又は請求項 25 に記載の化合物であって、化合物がカテプシン C の可逆的なペプチドニトリル阻害剤、そして好ましくはカテプシン C のジペプチドアルファアミノアセトニトリル阻害剤である、方法又は化合物。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、カテプシンCの使用に関する。本発明の他の態様は、薬剤スクリーニングの方法、疼痛感受性診断の方法及び疼痛処置の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

西欧諸国では、慢性疼痛は、何百万という国民の保健福祉を損なう主要な未解決の健康問題である。慢性疼痛は、それを患う個人の幸せを厳しく苦しめ、そしてそれには、しばしば鬱病をもたらす自律神経症状が高い頻度で付随又は追隨する。慢性疼痛は、個人的な苦痛及び膨大な社会経済的コストをもたらす。既存の薬理的疼痛療法は、有効性及び安全性の両者に関して広範に満足させるものではない。

10

【0003】

最先端の疼痛処置に関する深刻な欠点を考慮に入れると、進行中の疼痛の処置のため、並びに慢性疼痛への進展の可能性に関する診断及び予測のための新規な選択肢に対する必要性がおおいにある。特に、急速に進展した疼痛の神経生物学の理解と欠点のない最先端の効果的な治療法の提供に対する満たされていない臨床ニーズとの間の巨大なギャップを考慮に入れると、取り組みは、新規な種類の鎮痛薬のための、新しいターゲットの発見に向けられる必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0004】

このように、新しい種類の疼痛変調剤を開発し提供するための新しい手段を提供することが、本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

この課題は、疼痛を変調させる化合物を識別するために、カテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体を使用することによって解決される。

【0006】

本発明は、カテプシンCの発現が神経障害性疼痛のマウスモデルにおける疼痛感受性と密接に相関することを初めて示す、発明者らの驚くべき所見に基づいている。

30

【0007】

疼痛は、国際疼痛研究会の定義によると、現実的若しくは潜在的組織損傷に伴う、又はその様な損傷に関して表現される不快な感覚的及び精神的な経験である。疼痛は、通常、組織の損傷又は潜在的損傷を検出し、そしてコード化することに特化された侵害性神経系の活性化の帰結である。疼痛は、従って、身体への現実的又は潜在的損傷を最小化するための反応を開始させる、身体の警報システムの一部である。疼痛は、病状の一次症状である可能性がある、又はしばしば生物学的に意味の無い病的状態の副次効果である可能性がある。

【0008】

疼痛は、急性又は慢性である可能性がある。急性の疼痛は、潜在的又は現実的な損傷を知らせる生理学的信号である。それは、組織損傷、感染、炎症又は他の急性の原因に付随して起こり、肉体的損傷又は故障の後にその人に警報を出す。急性疼痛が適切に処置されない場合、慢性疼痛を引き起こす可能性がある。

40

【0009】

慢性疼痛は、種々の原因、期間、強さ及び特異的症状を有する病的状態である。

【0010】

慢性疼痛は、侵害性起源の、炎症性の又は神経障害性のものである可能性がある。侵害受容性疼痛は、体性又は内臓性の疼痛感受性神経線維の進行している活性化に比例すると判断される。神経障害性疼痛は、末梢又は中枢神経組織のあらゆる種類の損傷に起因する疼痛であり；それは末梢神経系、中枢神経系(CNS)又は両者における異常な体性感覚

50

過程によって持続すると思われる(疼痛メカニズムの概要については、例えば、Scho lz and Woolf, 2002; Julius and Basbaum, 2001, Woolf and Mannion, 1999; Wood, J.D ., 2000; Woolf and Salter, 2000を参照)。

【0011】

慢性神経障害性疼痛は、患者によって違いがある。最近のデータは、個人の疼痛感受性が個人の苦しみの大きさのために重要な役割を演じている、即ち、疼痛、特に神経障害性疼痛に対する重要な遺伝的素因があることを示している。本発明は、慢性疼痛のげっ歯類モデルで疼痛感受性遺伝子(即ち、与えられた一定の程度の組織損傷の存在で感じる疼痛の大きさを決定する遺伝子)を特定することを目指した、本発明者らの広範な研究に基づく。本発明者らによって使用されたげっ歯類モデル及び実験設定は、異なる個体の中で、
a) 神経病変の性質及び均一性が正確に制御でき、b) 遺伝的及び環境的変動を最小限にできる、実験条件を可能にした。

10

【0012】

カテプシンC (CTSC; 代替りの名称: ジペプチジル(アミノ)ペプチダーゼI、D P P I ; (E C 3 . 4 . 1 4 . 1)) は、リソソームプロテアーゼである。

【0013】

カテプシンCの遺伝子座は、染色体11q14.1 - q14.3の上にある(Rao et al., 1997を参照)。カテプシンCのゲノム配列は、NCBIヌクレオチドデータベースのNW_925129(ヒトカテプシンCの配列、配列番号3、を含むゲノム配列)又はNW_001030863(マウスカテプシンCを含むゲノムDNA配列)の項目で公に利用可能である。

20

【0014】

カテプシンCをコードするポリヌクレオチドの配列は、以下のようないくつかの登録番号のNCBIヌクレオチドデータベースで公に利用可能である: NM_001814(ホモサピエンスカテプシンCの転写変異型1 mRNA)、BC113897(ホモサピエンスカテプシンC、転写変異型2、mRNAの完全なコード配列(cds))、BC109386(ホモサピエンスカテプシンC、mRNA、完全cds)、NM_009982(ハツカネズミカテプシンC mRNA)。熟練者は、NCBIデータベースからカテプシンCの更なるコード配列(他の動物種のカテプシンC; 存在するなら、カテプシンCの変異株又は種々のアイソフォーム)を検索する方法を知っている。以下において、カテプシンCコード配列に言及した場合、上記のmRNA又はコード配列のいずれかを意味することができる; 好ましくは参照番号NM_001814(ヒト)(配列番号1)又はNM_009982(マウス)を意味する。

30

【0015】

カテプシンCのタンパク質配列は、NCBIタンパク質データベース、例えば、以下の登録番号で公に利用可能である: ホモサピエンス(hs): 完全cds: CAA6067、AAL48191、AAL48192、AAL38195、AAH54028、AAQ08887、AAI00893、AAI00894、AAI00892、AAI00895、AAI09387、AAI10072、AAI13851; hsアイソフォームCRA_b: EAW59364; hsアイソフォームCRA_a: EAW59363; hsカテプシンCアイソフォームプレプロタンパク質: NP_001805; hsアイソフォームb前駆体: AAI13898又はNP_680475。ネズミ(ハツカネズミ)カテプシンC: AAH67063; プレプロタンパク質: NP_034112; アイソフォームCRA-b(ハツカネズミ): EDL06796; アイソフォームCRA-a(ハツカネズミ): EDL06795。更にまた、タンパク質配列は、UniProtKBデータベース(www.beta.uniprot.org)で、登録番号: P53634(HUMAN__CATC、ヒトカテプシンC、配列番号2)、又はP97821(CATC__MOUSE、マウスカテプシンC)で公に入手可能である。以下において、カテプシンCタンパク質又はアミノ酸配列に言及した場合、上記のタンパク質配列のいずれか; 好ましくは参照番号P53634(ヒト配列)又はP97821(マウス配列)を意味することができる。

40

50

【 0 0 1 6 】

N C B I は、国立のバイオテクノロジー情報センターである（郵便宛先：National Centre for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA; web-address : www.ncbi.nlm.nih.gov）。それ以上の配列（例えば、SwissProt又はE M B L登録番号を持つ配列）は、www.beta.uniprot.orgのUniProt KBデータベースで検索できる。

【 0 0 1 7 】

h s カテプシン C のクローニングは、Paris et al., 1995によって発表され、マウスカテプシン C のクローニングは、Pham et al., 1997によって発表されている。5' 隣接領域（プロモーター/エンハンサー）は、Rao et al., 1997（特に、10, 263ページの図4及び該ページの下の部分の詳細な文章；例えば、- 1127から始まり+1までの遺伝子配列を参照、この文献は参照することによって本明細書に組み込まれている）によって発表されている。カテプシン C は、肺、腎臓及び胎盤に高レベルに発現され、免疫系の細胞を含む様々な他の臓器では、より低い程度に発現されている（Rao et al., 1997）。

10

【 0 0 1 8 】

カテプシン C は、タンパク質基質のアミノ末端からジペプチドを除くことができるリソソームプロテアーゼである。カテプシン C は、免疫系の骨髄由来エフェクター細胞で発現される、顆粒セリンプロテアーゼの活性化に参与し；そして、Tリンパ球グランザイム A（G Z M A）、B（G Z M B）及びグランザイム C の処理及び活性化に参与し；更なる機能は、異なるリソソームカテプシンの処理、抑制性 N 末端ジペプチド残基の除去による、別のセリンプロテアーゼ（キモトリプシン様セリンプロテアーゼ）（例えば、上記グランザイム、カテプシン C 自身、好中球エラスターゼ、プロテイナーゼ 3、肥満細胞キマーゼ及びトリプターゼなど）の活性化である（Toomes et al., 1999、Pham and Ley 1999、Turk et al., 2000、Henningsson et al., 2003、McGuire et al., 1993、Adkison et al., 2002、Wolters et al., 2001、Pham et al., 2004、DeHaar et al., 2004、Sheth et al., 2003、Methot et al., 2007）。その機能は、一般に、プロテアーゼ活性、ペプチダーゼ活性、例えば、ジペプチジルペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ又はエンドペプチダーゼ活性；セリンプロテアーゼ（例えば、以下の1つ又はそれ以上のエラスターゼ、カテプシン G、並びにグランザイム A 及び B、ノイラミニダーゼ及び第 X I I I 因子）の活性化を含む。

20

30

【 0 0 1 9 】

カテプシン C は、200 k D の四量体タンパク質であり（Paris et al., 1995）、小さな単量体酵素である他のカテプシン（例えば、カテプシン B、H、L 及び S）とは対照的である。カテプシン C タンパク質は、プレプロ構造からタンパク質分解的に活性な酵素に処理される。成熟したカテプシン C の単量体の形態は重鎖、軽鎖及び活性酵素に関係するプロペプチドから成り（Wolters et al., 1998；Cigic et al., 2000）；その様な4つのカテプシン C 単量体が、タンパク質分解活性のある200 k D のカテプシン C 四量体を形成している。

【 0 0 2 0 】

カテプシン C ノックアウトマウス（D P P I - ノックアウトマウス）の創出は、Pham and Ley, 1999によって発表されている（材料と方法の項の8, 627ページから8, 629ページまで、特に8, 627ページの右欄の後半から8, 628ページの左欄の前半のD P P I 標的ベクターの構築及びD P P I - / - マウスの創出を参照；同様にPham and Ley, 1999が胎生幹細胞創出のために参照したHeusel et al., 1994；Mansour et al., 1988及びSoriano et al., 1991を参照）。

40

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 1 】

本発明による使用は、疼痛、特に神経障害性疼痛の防止及び/又は処置のための新規な物質の識別を可能にする。本発明による使用は、望ましい（即ち、疼痛感覚を低下させる）性質を備えた化合物の識別、並びに望ましくない（即ち、疼痛感覚を高める）性質を備

50

えた化合物の識別を含む。更にまた、本発明は、疾患又は病的状態の防止及び／又は処置に有用であることが既に確認された化合物のいずれにも、更なる特徴付けを可能にする。この場合、本発明は、例えば、不要な副作用（即ち、疼痛感覚増強）を有することが確認された活性化化合物を除外するために使用することができる。或る疾患に対する候補化合物の、例えば、カテプシンC（タンパク質及び／又は核酸、発現及び／又は機能など）に対する影響の概容を描くことができる。

【0022】

本発明の別の態様に使用される化合物／試験化合物／活性化化合物は、精製された、部分的に精製された、合成された又は生化学的若しくは分子生物学的な方法による製造の何れかの、いかなる生物学的若しくは化学的物質又は天然物抽出物であってもよい。

10

【0023】

本発明の別の態様の意味で、疼痛を変調させる活性があると考えられる化合物は、カテプシンCの機能の1つ又は細胞内のカテプシンC（タンパク質又は核酸）の量に対して、及びカテプシンCの発現、翻訳後修飾（例えば、N-グリコシル化又は処理（例えば、排除ドメイン、例えば、58又は61位の開裂））、モノマーのオリゴマー化、タンパク質の折りたたみ又は活性化に対して影響を及ぼす如何なる物質であってもよい。

【0024】

この目的を達成するためには、この物質はカテプシンC（例えば、上又は下にリストアップしたようなもの）のいかなる機能を変調させてもよい。カテプシンCタンパク質活性は、物質によって、例えば、カテプシンCポリペプチド／タンパク質又はそのフラグメントの直接的な相互作用及び干渉によって変調されてもよい。この物質は、また、カテプシンCの発現を、例えば、転写のレベル（開始、伸長、処理など）、転写安定性、翻訳について、変調させてもよい。更にそれは、翻訳後修飾、不活性形態から活性形態への処理（活性な単量体を形成する3つのポリペプチドへのプレプロ構造の開裂）及び／又は単量体から4量体へのオリゴマー化、並びにカテプシンCのタンパク質折りたたみなどを変調させてもよい。この物質は、直接的に又は間接的に（間接的な意味で、即ち、カテプシンCの機能／タンパク質活性／発現などに影響を与える天然のシグナル伝達カスケードに（プラス又はマイナスに）干渉することによって）上記の効果を発揮させてもよい。

20

【0025】

カテプシンCの機能には、上記に掲げたもの、例えば、プロテアーゼ活性；1つ又はそれ以上の上記に掲げたようなタンパク質基質のアミノ末端からジペプチドを除去する能力；1つ又はそれ以上の上記に掲げたようなタンパク質基質と特異的に相互作用する能力（タンパク質-タンパク質相互作用）；1つ又はそれ以上の上記に掲げたようなタンパク質基質を開裂及び／又は活性化する能力；上記に掲げたようなタンパク質基質を処理する能力が含まれる。

30

【0026】

カテプシンCの機能には、また、一般に、カテプシンCタンパク質又はその核酸又はフラグメントが（タンパク質、核酸、合成分子を含むがこれらに限定されない）他の分子と相互作用する能力、そして好ましくはタンパク質基質と相互作用しそして開裂させることができる能力が含まれる。

40

【0027】

酵素の基質とは、本件出願の用語の範囲で、酵素によって改変できるあらゆる分子であると理解される。本発明の範囲にある天然の基質は、それが天然の生理的又は病理学的状況で発生する形態に相当する（顆粒セリンプロテアーゼ、GZMA、GZMBのような）分子であり、それは、また、それぞれの酵素によって変更され得る分子である。

【0028】

疼痛の変調は、減少か増加の何れかであってもよい。

【0029】

相互に関連した本発明のグループの一態様によれば、カテプシンCのフラグメント又は誘導体を使用されてもよい。フラグメントは、タンパク質、ポリペプチド又はポリ核酸の

50

フラグメントであってもよい。

【0030】

タンパク質又はポリペプチドフラグメントは、1つ又はそれ以上の末端（N末端及び／又はC末端）を持つ、及び／又は、完全長カテプシンCと比較した場合、1つ、2つ又はそれ以上のアミノ酸の内部欠失を持つタンパク質またはポリペプチドであり；フラグメントは、例えば、

1．特にXaaがArg又はLysである、又はYaa若しくはZaaがProである場合以外の、N末端のジペプチドXaa-Yaa、アミノ酸鎖内のZaa-の欠失を有するカテプシンCフラグメント；

2．シグナルペプチド（アミノ酸鎖のアミノ酸1～24）が削除されたカテプシンCフラグメント、又はアミノ酸25～463から成るカテプシンCフラグメント；

3．配列番号2によるアミノ酸鎖の25～134番目を含む、又は25～134番目から成るカテプシンCフラグメント；

4．プロペプチドのアミノ酸135～230が削除された、カテプシンCフラグメント；

5．ジペプチジルペプチダーゼ1の重鎖（アミノ酸231～394）を含む又はから成る、カテプシンCフラグメント；

6．ジペプチジルペプチダーゼ1の軽鎖（アミノ酸395～463）を含む又はから成る、カテプシンCフラグメント；

7．ジペプチジルペプチダーゼ1の軽鎖（アミノ酸395～463）及び重鎖（アミノ酸231～394）を含む、カテプシンCフラグメント；

8．ジペプチジルペプチダーゼ1の軽鎖（アミノ酸395～463）及び重鎖（アミノ酸231～394）を含む、カテプシンCフラグメント；

を含む。

上記のフラグメントの位置は、配列番号2を参照し；上記フラグメントの好ましい例は、配列番号2によるタンパク質のフラグメントに関する。

【0031】

カテプシンCタンパク質の機能的フラグメントは、少なくとも1つ又はそれ以上の完全長のタンパク質の機能的特性、特に上記のような機能的特性、を有する、このタンパク質のあらゆるフラグメントである。

【0032】

ポリヌクレオチド酸のフラグメントは、1つ又はそれ以上の末端（5'-及び／又は3'-）を持つ、及び／又は、完全長のゲノム又はコード配列と比較した場合、1つ、2つ又はそれ以上のヌクレオチドの内部欠失を持つポリヌクレオチド酸又はオリゴヌクレオチドである。カテプシンC核酸の機能的フラグメントは、少なくとも1つ又はそれ以上の完全長ポリ核酸（mRNA、ゲノム又はコード配列）の機能的特性を有する、あらゆるフラグメントである。

【0033】

カテプシンCの誘導体という用語は、天然物の形態との比較、特に配列番号1又は配列番号2によるカテプシンCと比較して、カテプシンCのあらゆる種類の欠失ではない変更を含む。カテプシンCの機能的誘導体は、少なくとも1つ、そして好ましくは2つ以上の未改変タンパク質の機能的特性を有する、このタンパク質のあらゆる誘導体である。誘導体は、例えば、アミノ酸若しくはヌクレオチド配列の改変、又は、例えば、ポリペプチド又はポリヌクレオチドの安定化（核酸骨格のホスホルチオエート修飾又はアミノ酸間の結合の交換など）をもたらし、又はポリペプチド又はポリヌクレオチドの或る細胞への標的化を可能にする、又は細胞内への侵入若しくは細胞による取り込みを容易にする（細胞透過性ホスホペプチド、細胞透過性ペプチドベクターへのオルトカップリング、例えば、アンテナペディア/透過性、TAT及びシグナルペプチドを基本にした配列；又は特異的トランスポータ又はインポータ用のリガンドの部分への結合）など、化学的又は生物学的改変などの、あらゆる種類の他の変更を含む。

【0034】

10

20

30

40

50

本発明は、また、カテプシンCのフラグメントの機能的誘導体を含む。

【0035】

本発明の別の態様は、疼痛を変調させる化合物を識別又は分析するための、カテプシンC又はその機能的フラグメントを異種的に発現する、非ヒトトランスジェニック動物の使用に関する。

【0036】

非ヒト動物は、いかなる非ヒト動物であってもよい。好ましくは、ラット又はマウスのような齧歯類である。

【0037】

トランスジェニック動物は、そのゲノム内に意図的に移入された外来DNAを持つ動物である。動物ゲノムへの外来DNAの導入は、標準的な手順に従って行うことができる（例えば、Transgenic Animal Technology A Laboratory Handbook. C. A. Pinkert, editor; Academic Press Inc., San Diego, California, 1994 (ISBN: 0125571658) を参照）。

10

【0038】

異種発現という用語は、宿主生物の正常な遺伝子発現とは（定常状態のレベル、量、タイミング又は発現される遺伝子の組織分布に関して、又は発現される遺伝子の種類（即ち、その遺伝子は宿主内では通常全く発現されない）に関して）異なる発現を指す。異種発現は、構成的又は誘導性であってもよい。好適な誘導発現系は、業界によく知られている（例えば、テトラサイクリン誘導系など）。生物は、細胞又は非ヒト動物であればよい。

20

【0039】

別の態様によれば、本発明は、亢進した疼痛感受性のモデルシステムとして、カテプシンC又はその機能的フラグメントを異種性に発現する、非ヒトトランスジェニック動物の使用に関する。

【0040】

更に、本発明の別の態様は、疼痛を変調させる化合物を識別又は分析するための、非ヒトカテプシンCノックアウト動物の使用に関する。

【0041】

ノックアウト生物（動物又は細胞など）は、遺伝子の発現又は機能が部分的に又は完全に削除され、ゲノムの並びに機能的なノックアウト、誘導的並びに構成的なノックアウトを含む生物を指す。ノックアウト生物の創出は、ノックアウト生物を作り出すために使用することができる細胞又は動物と同様、業界によく知られている。カテプシンCノックアウトマウスの創出は、Pham and Ley, 1999に記載されている。

30

【0042】

本発明の更なる態様は、低下した疼痛感受性のモデルシステムとして、非ヒトカテプシンCノックアウト動物の使用に関する。

【0043】

疼痛を変調させる化合物を識別するための、カテプシンC又はその機能的フラグメントを異種的に発現する細胞の使用は、本発明の別の態様である。

【0044】

細胞は、例えば、核酸ベクターを移入させることができ、レポーター遺伝子を発現することができる細胞のような、いかなる原核生物又は真核生物の細胞であってもよい。これらは、基本的に初代細胞及び細胞培養由来細胞、例えば、多細胞生物及び組織由来の細胞（HeLa、CHO、COS、SF9又は3T3細胞など）若しくは酵母のような単細胞生物由来の細胞（例えば、サッカロミセス・ボンベ又はサッカロミセス・セレビシエ）のいずれかの細胞を含む真核培養細胞、又は原核培養細胞、好ましくはピチア属またはエシエリヒア・コリ（E. coli）を含む。組織由来の細胞及び試料は、血液採取、組織穿刺又は外科的手法のような周知の技術によって得ることができる。

40

【0045】

1つの実施態様によれば、改変前の状態と比較して低いカテプシンC活性を有する改変

50

細胞が使用される。このように、例えば、被験化合物が、低下した又は完全に廃絶したカテプシンC活性を亢進又は復活させることができるかどうかをテストすることができる。あるいは、疼痛感受性が低下した状況で、化合物がその機能を（例えば、疼痛変調又は別の病的状態若しくは疾患との関連における機能でも）実行できるかどうかを試験することができる。

【0046】

変化は、カテプシンC活性の低下、カテプシンC転写物の定常状態レベルの低下（即ち、カテプシンC転写又は転写物安定化の活性化による）又はカテプシンCタンパク質の定常状態レベルの低下（即ち、カテプシンCの翻訳又は翻訳後プロセシングの活性化による；カテプシンC翻訳後修飾の変調による、又は安定化の活性化による、又はその分解の阻害による）につながるいかなる種類の変化（安定的又は一過性、好ましくは安定的）でもよい。これは、例えば、カテプシンCのドミナントネガティブ変異体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、カテプシンCのRNAi構築物の利用によって、機能的又はゲノム性のカテプシンCノックアウト（それは、例えば、誘導性でもよい）の創出又は業界内に知られている他の好適な技術によって達成することができる。上記の技術の概要については、例えば、Current protocols in Molecular biology (2000) J.G. Seidman, Chapter 23, Supplement 52, John Wiley and Sons, Inc.; Gene Targeting: a practical approach (1995), Editor: A.L. Joyner, IRL Press; Genetic Manipulation of Receptor Expression and Function, 2000; Antisense Therapeutics, 1996; Scherr et al, 2003を参照されたい。

10

20

【0047】

1つの実施態様によれば、カテプシンCノックアウト細胞が用いられる。ノックアウト生成に好適な細胞株は業界内でよく知られており、例えば、Current protocols in Molecular Biology (2000) J.G. Seidman, Chapter 23, Supplement 52, John Wiley and Sons, Inc.; 又は Gene Targeting a practical approach. (1995) Ed. A.L. Joyner, IRL Press を参照されたい。カテプシンC (DPP I) ノックアウト細胞の生成は、同様に、Pham and Ley, 1999に記載されている (DPP Iネズミ胚幹細胞ノックアウトクローンの生成、8, 628ページ、左欄上半部を参照)。

【0048】

本発明の別の態様は、従って、疼痛を変調させる化合物を識別又は分析するための、カテプシンノックアウト細胞の使用に関する。

30

【0049】

更に、低下した疼痛感受性のモデルシステムとしてのカテプシンノックアウト細胞の使用は、本発明の相互に関連したグループの別の態様である。

【0050】

本発明の別の実施態様によれば、細胞は、参照細胞（例えば、未変化の状態にある同じ細胞）と比較してより高いカテプシンCの量を有することができる。カテプシンCの発現量は疼痛感受性に関係するため、この細胞システムは亢進した疼痛感受性の状態に類似した働きができる。

【0051】

本発明は、従ってまた、亢進した疼痛感受性のモデルシステムとして、カテプシンC又はその機能的フラグメントを異種的に発現する細胞の使用に関する。

40

【0052】

疼痛を変調させる化合物を識別又は分析するための、カテプシンCプロモータ及び/又はエンハンサー又はその機能的フラグメントと発現的に連結したレポーター遺伝子を異種的に発現する細胞の使用。

【0053】

本発明の上記の態様は、業界に一般に公知である典型的なレポーター遺伝子アッセイに基づく。この目的を達成するために、最適なプロモータは、プロモータが活性化されるとレポーター遺伝子が発現するように、選択された宿主細胞の種類に好適な発現ベクターの

50

最適なレポーター遺伝子上流に挿入される。その後、構築物は選りぬきの宿主細胞に導入される。形質転換又はトランスフェクションのための最適な方法、並びに細胞培養及びレポーター遺伝子発現の条件は、業界によく知られている（例えば、下に表示した標準的な文献を参照）。最適な条件は、ベクター、レポーター遺伝子及び市販の必要な試薬と同様、業界によく知られている。

【0054】

ベクターは、環状又は線状ポリヌクレオチド分子、例えば、DNAプラスミド、バクテリオファージ又はコスミドであり、その助けによってポリヌクレオチドフラグメント（例えば、他のベクターから切り出した又はPCRで増幅してクローニングベクターに挿入された）は、最適な細胞又は生物内で特異的に増幅される。発現ベクターは、宿主細胞又は生物に目的の遺伝子（例えば、レポーター遺伝子）の異種発現を可能にする。細胞又は生物の種類は目的に大きく依存し、その選択は熟練工の知識の内に在る。核酸増幅のために最適な生物は、例えば、大抵は、増殖速度の速い、例えば、細菌又は酵母のような単細胞生物である。最適な生物は、また、多細胞組織から分離し培養された、例えば、さまざまな生物から生成された細胞株のような細胞（例えば、*Spodoptera Frugiperda*由来のSF9細胞など）であればよい。最適なクローニングベクターは業界で知られており、例えば、Roche Diagnostics、New England Biolabs、Promega、Stratageneなど更に多くのさまざまなバイオテクノロジー業者から購入可能である。最適な細胞株は、例えば、American Type Culture Collection (ATCC) から購入可能である。

10

【0055】

タンパク質又はポリペプチドを異種発現させるためには、細胞は、核酸ベクターを移入させることができ、興味ある遺伝子、例えば、レポーター遺伝子を発現することができるいかなる原核細胞又は真核細胞であってもよい。これらには、基本的に初代細胞及び細胞培養由来細胞、好ましくは多細胞生物及び組織由来の細胞（HeLa、CHO、COS、SF9又は3T3細胞など）若しくは酵母のような単細胞生物由来の細胞（例えば、サッカロミセス・ポンベ（*S. pombe*）又はサッカロミセス・セレビスエ（*S. cerevisiae*））のいずれかの細胞を含む真核培養細胞、又は原核培養細胞、好ましくはピチア属またはエシェリヒア・コリ（*E. coli*）が含まれる。組織由来の細胞及び試料は、血液採取、組織穿刺又は外科的手法のような周知の技術によって得ることができる。

20

【0056】

本出願の文脈の中で、「トランスフェクション」という用語は、宿主細胞（原核細胞か真核細胞の何れか）に核酸ベクターを導入することを指し、従って、用語「形質転換」を含む。

30

【0057】

トランスフェクションは、安定的又は一過性のトランスフェクションであってもよい。

【0058】

カテプシンCプロモータは、カテプシンC遺伝子の一部であり、最適な発現ベクターで遺伝子産物のコード配列の上流に導入されると、興味ある遺伝子産物の発現を駆動させることができる。好ましくは、カテプシンCプロモータは、Rao et al., 1997の、1, 0263ページ、図4によって公開されたような配列の、ヌクレオチド-1127から+1番に従った配列を含む又は配列から成る。カテプシンCプロモータの機能的なフラグメントは、最適な発現ベクターの遺伝子産物のコード配列の上流に導入された場合、興味ある遺伝子産物の発現を駆動することができるカテプシンCプロモータのあらゆるフラグメントである。最適なフラグメントには、Rao et al., 1997の、1, 0263ページ、図4によって公開されたような、カテプシンCプロモータの機能的なフラグメントが含まれる。

40

【0059】

レポーター遺伝子は、遺伝子産物の簡単な定量を可能にするいかなる遺伝子でもよい。真核生物又は原核生物宿主用の膨大で多様なレポーター遺伝子、並びに検出方法及び必要な試薬は業界で知られており、市販されている。これらには、例えば、ラクタマーゼ（lacZ）、ルシフェラーゼ、グリーン又はブルーの蛍光タンパク質（GFP又はBFP

50

)、DsRed、HIS3、URA3、TRP1若しくはLEU2又はガラクトシダーゼの各遺伝子が含まれる。これらの遺伝子は、可視(色又は発光)反応(例えば、lacZ、ルシフェラーゼ)によって容易に検出できるタンパク質をコードする。これらは、可視(色又は発光)反応によって容易に検出できる遺伝子産物、又は発現された場合、アンピシリン又はカナマイシンのような抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子産物を含む。他のレポーター遺伝子産物は、例えば、栄養要求性遺伝子のように、発現細胞の成長をある条件下で可能にする。

【0060】

レポーター遺伝子の機能的フラグメントは、その遺伝子産物の簡単な定量を可能にする特定のレポーター遺伝子のあらゆるフラグメントである。

10

【0061】

レポーター遺伝子の機能的フラグメントは、その遺伝子産物の簡単な定量を可能にする特定のレポーター遺伝子のあらゆるフラグメントである。

【0062】

本出願の文脈の中で、用語の「トランスフェクション」は、宿主細胞(原核細胞か真核細胞の何れか)に核酸ベクターを導入することを指し、したがって用語「形質転換」を含む。

【0063】

トランスフェクションは、安定的又は一過性のトランスフェクションであってもよい。

【0064】

細胞は、核酸ベクターを移入させることができ、興味ある遺伝子、例えば、レポーター遺伝子を発現することができるいかなる原核細胞又は真核細胞であってもよい。これらには、基本的に初代細胞及び細胞培養由来細胞、好ましくは多細胞生物及び組織由来の細胞(HeLa、CHO、COS、SF9又は3T3細胞など)若しくは酵母のような単細胞生物由来の細胞(例えば、サッカロミセス・ポンベ又はサッカロミセス・セレビスエ)のいずれかの細胞を含む真核培養細胞、又は原核培養細胞、好ましくはピチア属またはエシェリヒア・コリ(E. coli)が含まれる。組織由来の細胞及び試料は、血液採取、組織穿刺又は外科的手法のような周知の技術によって得ることができる。

20

【0065】

上記の本発明の態様の文脈の中で、対照ベクターは、レポーター遺伝子又はその機能的フラグメントを含むあらゆる好適なベクターであり、かつ、(機能的な)カテプシンCプロモータによってレポーター遺伝子の発現が駆動されないベクターであってもよい。これは、例えば、レポーター遺伝子又はその機能的フラグメントが、機能的カテプシンCプロモータと作動的にカップリングしないことを意味する(即ち、完全にカテプシンCプロモータを欠いている、非機能的カテプシンCプロモータ若しくはプロモータフラグメントを含む、又は、そこではプロモータとレポーター遺伝子のカップリングが機能しない)。別の可能性は、レポーター遺伝子又はその機能的フラグメントが、カテプシンCプロモータ以外のプロモータ(例えば、SV40又は別の標準的なプロモータ)と作動的にカップリングすることである。機能的ベクター及び対照ベクターは、同様に、同じ細胞に移入することができるが、その場合レポーター遺伝子は異なる必要がある。

30

40

【0066】

上記の使用による化合物の識別は、例えば、以下に記載されるような又は業界に知られるアッセイによって行なうことができる。

【0067】

アッセイは、生物学的プロセスをモニターするあらゆる種類の分析的方法又はシステムである。好適には、生理学的代謝経路並びに病的状態の部分を代表する分子カスケード及びメカニズムが、細胞性又は生化学的(生体外)システムで再現されることである。潜在的な活性を持つ医薬化合物の薬理活性は、従って、これらのカスケード又はメカニズムを干渉又は変調させる能力によって測定することができる。

【0068】

50

薬剤スクリーニング、特に、新規医薬化合物のハイスループット・スクリーニングに使用するためには、アッセイは、再現性のあることが必要であり、好ましくは更にスケラブルで堅固であることである。本発明の範囲では、ハイスループット・スクリーニングは、本発明による方法が非常に小さなスケール、例えば、96、386又は1,536ウェルのプレートで数ミリリットルから数ナノリットル又は更に少ない範囲の非常に少量の試料で行われることを意味する。従って、非常に大量の試料が、短時間で分析できる。ハイスループット・スクリーニングには、たいてい1回の単一アッセイで、約500の異なる化合物のある能力のスクリーニングが含まれる。アッセイは、研究中の標的分子の活性を変調させる能力について、化学物質のハイスループット・スクリーニングに好適であることが好ましい。アッセイの種類は、例えば、用いる標的分子の種類（例えば、ポリペプチド又はポリヌクレオチド）及び「読み取り」、即ち、それによって標的分子の活性が測定されるパラメータに依存する（下記を参照）。

10

【0069】

異なる種類のそのようなアッセイは、一般に業界に知られており、商業的な供給業者から購入できる。

【0070】

いろいろな目的に好適なアッセイは、放射性同位体アッセイ又は蛍光アッセイ、例えば、標識されたメンバーと非標識メンバーの相互作用（例えば、標識タンパク質とそれらの非標識タンパク質リガンドとの相互作用）を測定するための蛍光偏光アッセイ（Panvera又はPackard BioScienceによって商業的に提供されるようなもの（HTRF; ALPHAScreen（商標）））を包含する。

20

【0071】

追加の例としては、細胞株が興味ある組み換えタンパク質を安定に（誘導性又はそうでない；染色体性又はエピソーム性に）又は一過的に発現する、細胞ベースのアッセイが挙げられる。これらのアッセイは、例えば、特定のプロモータ又はシグナル伝達カスケードのメンバーのシグナル伝達経路の制御が、その発現が前記特定のプロモータの制御下にあるレポーター酵素の活性に従って測定される、レポーター遺伝子アッセイを含む。このタイプのアッセイのためには、組み換え細胞株は、自体が研究対象である又は研究中のシグナル伝達カスケードによって規制される、明確なプロモータの制御下にレポーター遺伝子を含めて構築されなければならない。好適なレポーター酵素は、一般に業界に知られており、蛍ルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ（例えば、Packard reagentsから市販されている）、ガラクトシダーゼが含まれる。好適な細胞株は、アッセイの目的によって異なるが、普通はトランスフェクションが容易であり培養が容易な、例えば、HeLa、COS、CHO、NIH-3T3などの細胞株が含まれる。

30

【0072】

プロテアーゼ活性の測定については、代表的なプロテアーゼアッセイ形式が知られる。即ち、例えば、基質の1つの位置にレポータータグ（例えば、発光/蛍光又は他のシグナル発生タンパク質/ペプチド又は構成要素）の付いた、そして別の位置にクエンチャー（一構成要素（例えば、基質が無傷/未切断である限り、レポータータグのシグナル放出を抑制している別のペプチド））の付いた基質を用いる；基質は、好適な条件下でカテプシンCとインキュベートすることによって切断され、クエンチャーとレポータータグが分離するため、検出可能なシグナルの放出（例えば、発光）が起こる。

40

【0073】

他のタイプのアッセイ及び他のタイプの「読み取り」は、業界に周知されている。

【0074】

本発明によるアッセイは、以下に関する：

【0075】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a. 少なくとも2つの試料を用意すること；

b. カテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体を含む1つの試料を化合

50

物と接触させること；

c．化合物の存在下でカテプシンCの活性を測定すること；

d．化合物の非存在下でカテプシンCの活性を測定すること；そして

e．c)によるカテプシンCの活性をd)によるカテプシンCの活性と比較すること；

を含む方法。

【0076】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a．カテプシンCタンパク質又はその機能的フラグメント若しくは誘導体を、試験化合物と接触させること；そして

b．その試験化合物がカテプシンCタンパク質又はその機能的フラグメント若しくは誘導体の活性を変調させるかどうかを測定すること；

を含む方法。

10

【0077】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a．検出可能な量又は活性のカテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体を有する細胞を、試験化合物と接触させること；

b．その試験化合物が細胞中に存在するカテプシンC又はその機能的フラグメント若しくは誘導体の量又は活性を変調できるかどうかを測定すること；

を含む方法。

【0078】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a．カテプシンCタンパク質又はその機能的フラグメント若しくは誘導体をコードする核酸を、転写活性のあるシステム中で試験化合物と接触させること；そして

b．前述の化合物の存在下で、前述のシステム内に存在するカテプシンCタンパク質又はその機能的フラグメント若しくは誘導体をコードするmRNAの量を測定すること；そして

c．その試験化合物が、前述のシステム中に存在するカテプシンCタンパク質又は機能的フラグメント若しくは誘導体をコードするmRNAの量を変調させることができるかどうかを測定すること；

を含む方法。

20

30

【0079】

転写活性のあるシステムは、少なくとも転写単位の転写反応を行う能力があるあらゆる生化学的又は細胞性のシステムである。そのようなシステムは、業界でよく知られており、細胞並びに市販の生体外転写システム又はキット（例えば、細胞抽出物を基本とした）が含まれる。

【0080】

疼痛を変調及び/又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

a．レポーター遺伝子又はその機能的フラグメントと作動的にカップリングしたカテプシンC遺伝子又はその機能的フラグメントのプロモータを含む核酸ベクターがトランスフェクトされた細胞を用意すること；

b．機能的カテプシンCプロモータと作動的にカップリングしていないレポーター遺伝子又はその機能的フラグメントを含む対照ベクターがトランスフェクトされた細胞を用意すること；

c．試験化合物の存在下で、a)及びb)による細胞のレポーター遺伝子活性を測定すること；

d．試験化合物の非存在下で、a)及びb)による細胞のレポーター遺伝子活性を測定すること；

を含む方法。

40

【0081】

疼痛を変調させる化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程：

50

a . カテプシン C の活性を変調させる化合物を試験化合物として選択すること ; そして
b . 前述の試験化合物を疼痛感覚のある対象に投与し、疼痛が変調されるかどうかを測定すること ;
を含む方法。

【 0 0 8 2 】

対象の疼痛を変調及び / 又は防止する化合物を識別又は分析する方法であって、以下の工程 :

c . カテプシン C の生物学的活性を変調させる 1 つ又はそれ以上の変調化合物を識別するために、 1 つ又はそれ以上の試験化合物の存在下で、カテプシン C 又はその機能的フラグメント若しくは誘導体の生物学的活性をアッセイすること ; そして

d . 対象の疼痛、疼痛感覚又は疼痛感受性を減少させる能力について、 1 つ又はそれ以上の変調化合物を試験すること ;
を含む方法。

【 0 0 8 3 】

本発明の更なる態様は、医師の処置を個々の患者に適合 / 改善させるために、患者をグループに分類し医師を支援するための、以下のような、薬理ゲノム学的方法に関する。

【 0 0 8 4 】

個体の疼痛限界を分析する方法が、前記個体の採取試料中のカテプシン C の量を、前記試料中に存在するカテプシン C m R N A 及び / 又はタンパク質の量と 1 つ又はそれ以上の参照試料のそれとが異なるかどうかに関して、 1 つ又はそれ以上の参照試料と比較して分析することを含む方法であって、前記個体におけるより多い量の存在が亢進した疼痛感受性を示し、より少ない量の存在が低下した疼痛感受性を示す方法。

【 0 0 8 5 】

個体の疼痛の予防及び / 又は処置のために薬剤の投与量を適合させる方法が、個体の採取試料中に存在するカテプシン C m R N A 及び / 又はタンパク質の量が 1 つ又はそれ以上の参照試料中のそれと異なるかどうかに関して試験することを含み、前記投与量が適合しているかどうかは、個体の採取試料中のタンパク質及び / 又は m R N A の量が 1 つ又はそれ以上の参照試料のそれと異なるかどうかに依存する方法であって、個体の採取試料中のより高いカテプシン C 量がより高い投与量が必要であることを示し、個体の試料中のより低いカテプシン C 量がより低い投与量が必要であることを示す方法。

【 0 0 8 6 】

本明細書で用いられる「採取試料」という用語は、 1 種又はそれ以上の個々の生物 (ヒト又は非ヒト動物) の身体から採取した / 分離した生体試料を言う。生物材料及び生体試料は、例えば、細胞、組織又は器官の標本又は部分 (例えば、脳、血液、肝、脾臓、腎臓、心臓、血管など) を含み、もし脊椎動物に由来するなら好ましく、更にヒトを含む哺乳動物に由来するならより好ましい。含まれるのは、同様に、細胞培養由来の細胞、好ましくは多細胞生物及び組織由来の細胞 (H e L A 、 C H O 、 C O S 、 S F 9 又は 3 T 3 細胞など) 若しくは酵母のような単細胞生物由来の細胞 (例えば、サッカロミセス・ボンベ (S . pombe) 又はサッカロミセス・セレビスエ (S . cerevisiae)) のいずれかの細胞を含む真核培養細胞、又は原核培養細胞、好ましくはピチア属またはエシェリヒア・コリ (E . coli) である。組織由来の細胞及び試料は、血液採取、組織穿刺又は外科的手法のような周知の技術によって得ることができる。組換え分子の調製及び細胞又は組織からの天然由来の分子の精製、並びに細胞抽出物又は組織抽出物の調製は、当業者が周知している (例えば、更に下記にリストアップした標準的な文献を参照) 。

【 0 0 8 7 】

用語の「参照試料」は、既知の規定の疼痛表現型を持つ 1 つ又はそれ以上の個体から採られた生物試料、又は生体外生物試料 (例えば、生体外の細胞培養又は組織培養から生じる試料 (例えば、培養細胞)) であり、特定の性質 (例えば、そのカテプシン C の活性、量又は発現のレベル) が規定の疼痛表現型 (例えば、高い疼痛感受性又は低い疼痛感受性) に相当する試料を指す。

10

20

30

40

50

【0088】

更に本発明の別の態様は、検査する個体の身体から採取した生物試料を分析することによって、個体の亢進した疼痛感受性を測定するためのカテプシンC検出方法の使用に関する。

【0089】

カテプシンC検出の方法は、生物試料中に存在するカテプシンCポリペプチド/タンパク質又は核酸を特異的に検出することができるいかなる方法でもよい。

【0090】

カテプシンCタンパク質又はポリペプチドを特異的に検出する方法は、野生型カテプシンCタンパク質/ポリペプチドのいずれかを特異的に検出できるいかなる方法、及び同様に野生型カテプシンCポリペプチド/タンパク質と比較して、サイズ又はアミノ酸配列に関する1つ又はそれ以上の変異を隠匿しているカテプシンCタンパク質/ポリペプチドを特異的に検出できるいかなる方法でもよい。そのような方法の好ましい例は、カテプシンCタンパク質を特異的に検出することができる抗体、例えば、免疫組織学的又は免疫組織化学的技術（例えば、メンブラン、チップ、ELISAプレートなどの好適な担体に固定した組織学的組織切片、又はカテプシンにおけるカテプシンCタンパク質又はそのある種の変異の検出）に使用するための抗体である。カテプシンC抗体は、ヤギ抗ヒトカテプシンC、カタログ# AF1071、R&D Systems (Minneapolis, USA)、ヤギ抗マウスカテプシンC、カタログ# BAF1034、R&D Systems (Minneapolis, USA)などが、市販されている。

10

【0091】

カテプシンC核酸を検出する方法は、例えば、野生型か又は野生型カテプシンC核酸配列と比較して、その長さ又はその核酸配列に関する1つ又はそれ以上の変異を隠匿している場合の、どちらかのカテプシンC mRNA / cDNA 又はゲノムを検出する方法であればよい。その方法は、例えば、カテプシンC mRNA を特異的に検出及び/又は定量する方法であり、そして好ましくは、例えば、PCR配列決定（ヌクレオチド配列中の変異を検出するため）に使用するためのカテプシンC DNA を増幅することができる、又は、例えば、RT-PCR（カテプシンC mRNA の発現を検出及び/又は定量するため）に使用するカテプシンC cDNA を増幅することができる特異的なカテプシンC核酸プローブ又はプライマーセットを含む、又はそのものである方法であればよい。別の方法は、例えば、ノーザンブロット又はチップハイブリダイゼーション技術で使用するための、標準条件下でカテプシンC mRNA 又はcDNA と特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブであってもよい。

20

30

【0092】

野生型という用語は、自然に又は特定の生物の標準研究室保存に見られる遺伝子型又は表現型を指す。1つの好ましい実施態様によれば、カテプシンCの野生型配列は、配列番号1、2、3に記載された配列である。

【0093】

好適なプライマーの設計及び合成は、業界でよく知られている（上記を参照）。本発明の好ましい実施態様によれば、その手段は、ヒトカテプシンC核酸のようなカテプシンC核酸増幅用のプライマーセット、好ましくは配列番号4及び/又は5に記載した少なくとも1つのプライマーを含むプライマーセットである。

40

【0094】

更に好ましい本発明の実施態様によれば、その手段は、カテプシンC核酸の検出用のプローブであり、好ましくは、配列番号6に記載した配列を有するプローブである。好適なプローブの設計及び合成は、業界でよく知られている（同様に、下記の標準的な文献を参照）。

【0095】

更に別の好ましい本発明の実施態様によれば、その手段は、カテプシンCタンパク質又はポリペプチドを特異的に検出するための抗体である。好適な抗体又はその機能的フラグメントの調製もまた業界に周知されており、例えば、動物、例えば、ウサギを、必要に応

50

じて、例えば、フロイントアジュバント及び/又は水酸化アルミニウムゲルの存在下で、カテプシンCタンパク質又はそのフラグメントで免疫することによる（例えば、Diamond, B.A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine: 1344-1349 を参照）。免疫反応の結果として動物に生じるポリクローナル抗体は、次に、周知の方法で血液から分離され、そして、例えば、カラムクロマトグラフィーによって精製される。モノクローナル抗体は、例えば、Winter & Milstein の既知の方法（Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293-299）に従って調製することができる。モノクローナル抗体を産生する好適な手法は、業界にもよく知られている（下記の標準的な文献を参照）。本発明との関連において、抗体又は抗体フラグメントという用語は、また、抗体又は遺伝子組み換え的に調製され必要に応じて改変された、その抗原結合部分の、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、多機能性抗体、二重特異性又はオリゴ特異性抗体、一本鎖抗体及びF(a b)又はF(a b)₂などを含む（例えば、欧州特許公開第B1-0368684号、米国特許第4,816,567号、米国特許第4,816,397号、国際公開公報第88/01649号、国際公開公報第93/06213号又は国際公開公報第98/24884号を参照）。

10

【0096】

本発明の別の態様は、個体の疼痛感受性を測定するための診断キットに関し、その検査キットは、生体試料中のカテプシンCを検出するための少なくとも1つの方法を含む。

【0097】

本発明との関連において、検査キットは、本出願で確認される構成成分のあらゆる組み合わせであり、それは、機能的なユニットに組み合わせられ、空間的に共存し、そして更なる成分を含有できると理解される。

20

【0098】

本発明との関連において、検査キットは、少なくとも生体試料中のカテプシンC（例えば、量及び/又は変異）を検出する方法を含み、好適には、検出反応（例えば、抗体を用いたカテプシンCの免疫学的検出、カテプシンC活性をアッセイするための酵素反応など）を行うための好適な緩衝液及び/又は試薬、及び/又は個々の検出技術を実施するための試料調製法及び場合により取り扱いマニュアルを併せて含む。

【0099】

本発明の他の態様は、以下のような処置の方法に関する。

30

【0100】

疼痛に悩む対象の疼痛を処置する方法であって、前記対象に治療的有効量の組成物を投与し、前記対象のカテプシンCの量又は活性を低下させることを含む方法。これは、全体又は或る組織中、例えば、神経組織、リンパ組織又はマスト細胞、マクロファージ、好中球、T細胞（例えばCD8⁺T細胞）などのような、免疫システムの細胞中のカテプシンCの量又は活性であればよく、ここで、治療的有効量は、個体の疼痛感覚又は感受性を回復させるのに十分な量を含む。

【0101】

対象の疼痛感受性を低下させる方法であって、前記対象に治療的有効量の組成物を投与し、前記対象の（例えば、リンパ又は神経組織若しくは免疫システムの細胞中の）カテプシンCの量（例えば、発現、半減期）又は活性を低下させることを含む方法は、本発明の更に別の態様に関する。

40

【0102】

更に、本発明は、ヒト以外の雌の対象の子供の疼痛感受性を変調させる方法であって、変調したカテプシンCの発現を付与する核酸の受精卵への移入（例えば、電気穿孔）、その受精卵をヒト以外の里親への移入、及びカテプシンC発現特性（例えば、マウスのような野生型の対象と比較して低下した若しくは根絶したカテプシンC発現）に従った子供の選択を含む方法に関する。

【0103】

本発明の別の態様は、カテプシンCの活性及び/又は発現を低下させることができる疼

50

痛の処置のための化合物に関する。

【0104】

カテプシンCの阻害剤は、ペプチドニトリル阻害剤などが業界で知られている（例えば、Methot et al.2007、参照することによって本明細書に組み込まれる、を参照されたい。特に2,0839ページ、図1のGly-Phe-DMK、Gly4-(I)Phe-DMK、及び前記の図の化合物1*及び化合物2*のような、異なるカテプシンC阻害剤の構造を参照されたい）。

【0105】

薬剤の製造のためには、本発明のカテプシンC変調剤は、投与の種類によって、生理的緩衝液、例えば、塩化ナトリウム溶液、脱塩水などの好適な添加剤又は補助物質、プロテアーゼ阻害剤又はヌクレアーゼ阻害剤、好ましくはアプロチニン、 α -アミノカプロン酸又はペプスタチンA若しくはEDTAのような金属イオン封鎖剤などの安定化剤、白色ワセリン、低粘性パラフィン及び/又は黄色蠟などのゲル配合物を用いて製剤化することができる。

10

【0106】

好適な更なる添加剤は、例えば、Triton X 100又はデオキシコール酸ナトリウムのような界面活性剤、並びに、例えばポリエチレングリコール又はグリセリンのようなポリオール、例えば、ショ糖又はグルコースのような糖類、例えば、グリシン、特にタウリン又はベタインなどのアミノ酸のような双性イオン性化合物、及び/又は、例えば、ウシ又はヒト血清アルブミンのようなタンパク質である。界面活性剤、ポリオール及び/又は双性イオン性化合物は好ましい。

20

【0107】

生理的緩衝液は、好ましくは、約6.0~8.0のpH、特に約6.8~7.8のpH、とりわけ約7.4のpHを有し、約200~400ミリオスモル/リットル、好ましくは約290~310ミリオスモル/リットルのオスモル濃度を有する。薬剤のpHは、一般に好適な有機又は無機緩衝液を用いて、例えば、好ましくはリン酸緩衝液、トリス緩衝液（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）、HEPES緩衝液（[4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジノ]エタンスルホン酸）又はMOPS緩衝液（3-モルホリノ-1-プロパンスルホン酸）を用いて調整される。個別の緩衝液の選択は、一般に必要な緩衝液モル濃度に依存する。リン酸緩衝液は、例えば、注射及び注入溶液に好適である。

30

【0108】

薬剤は、従来の方法で、例えば、錠剤又はカプセルのような経口剤形を用いて、例えば、鼻腔又は口腔などの粘膜を介して、皮下に埋め込まれた貯蔵所の形態で、注射、注入又は本発明による薬剤を含むゲルによって投与することができる。上記のような特定の関節疾患を処置するために、薬剤を局所的及び局部的に、適切な場合、リポソーム複合体の形態で投与することは更に可能である。更に、処置は、薬剤の一時的に制御された放出を可能にする経皮吸収治療システム（TTS）によって行うことができる。TTSは、例えば、欧州特許第0944398A1号、欧州特許第0916336A1号、欧州特許第0889723A1号又は欧州特許第0852493A1号により知られている。

40

【0109】

注射液は、一般に、例えば、約1~約20mLの比較的少量の溶液又は懸濁液を身体に投与する場合だけに用いられる。注入液は、一般に、例えば、1リットル又はそれ以上の大量の溶液又は懸濁液を投与する場合に用いられる。注入液と対照的に、注射液の場合には僅か数ミリリットルが投与されるため、注射における血液又は組織液のpH及び浸透圧の小さな違いは、疼痛感覚に関してそれ自体が目立たない又は僅かな程度にしか目立たない。従って、本発明による製剤の使用前の希釈は、通常必要ない。しかし、比較的大量の投与の場合、本発明による製剤は、少なくとも大よそ等張溶液が得られる程度に投与の前に希釈されるべきである。等張溶液の一例は、0.9%強度の塩化ナトリウム溶液である。注入の場合、希釈は、例えば、無菌水を使用して行うことができ、更に投与は、例えば、いわゆるバイパスによって行うことができる。

50

【0110】

本発明の異なる態様の1つの好ましい実施態様によれば、カテプシンC、その誘導体又はフラグメントは、孤立分子として使用することができる。

【0111】

本発明との関連で、「孤立分子」という用語は、特に、カテプシンCについては、天然発生源から精製されるカテプシンCポリヌクレオチド又はポリペプチド、並びに精製された組換え分子を指す(ここで、用語の「精製された」は、完全精製と同様に部分精製も含む)。

【0112】

組換えポリペプチド又はポリヌクレオチド分子の調製、及び細胞又は組織からの天然分子の精製、並びに細胞抽出物又は組織抽出物の調製は、当業者が熟知している(例えば、更に下記の標準的な文献を参照)。

【0113】

これらには、公開されているゲノム又はコードポリヌクレオチド配列に基づいて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってポリヌクレオチドを目的の長さに増幅すること、そして次に、生成したポリヌクレオチドを宿主細胞にクローニングすることが含まれる(例えば、下記の標準的な文献を参照)。

【0114】

本発明との関連で、用語の「ポリペプチド」は、互いにペプチド結合によって結合したアミノ酸を含み、線形の様式で互いに結合してポリペプチド鎖を形成した少なくとも50残基のアミノ酸を含む分子を指す。この種類のより短い分子は、ペプチドと呼ばれる。用語の「タンパク質」は、少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む分子を指すが、互いに結び付いた又は結合した2つ以上のポリペプチド鎖を含む分子を言ってもよい。従って、「タンパク質」という用語は、「ポリペプチド」という用語を包含する。

【0115】

以下に、実施例によって本発明をより詳細に説明するが、それらによって限定されることを意味するものではない。

【実施例】

【0116】

材料及び方法

使用したマウス系統

5つの異なる近交系マウス系統: AKR/J (AKR)、CBA/J (CBA)、C3H/HeJ (C3H)、C57BL/6J (B6)及びC58/J (C58)を使用した。マウスは、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から入手した。これらのマウス系統について、それらは、幾つかの生体内疼痛指標に関して著しく異なることが示されている(Mogil et al 1999)。

【0117】

トータルRNAの分離

DRG(後根神経節)由来のトータルRNAは、PicoPure(商標)RNA Isolation Kit (Arcturus)を用いて、製造元の使用説明書に従って分離した。RNAの品質は、2100 Bioanalyzer及びRNA 6000 Nano LabChip(商標)Kit (Agilent)を用いて評価した。

【0118】

Affymetrix GeneChip(商標)Microarrays

ファーストストランドcDNA合成は、Baugh, L.R, Hill, A.A., Brown, E.L. and Hunter, C.P. (2001) Nucleic Acids Res. 29, e29に従って、100 pMのT7-(dT)₂₄オリゴマー(GGCCAGTGAAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGGCGG-dT₂₄:配列番号4)と共に、500 ngのトータルRNA及びSuperScript II逆転写酵素を用い、製造元の説明書の指示に従って行った。二本鎖cDNAを合成し、その後フェノール-クロロホルムを用い、続いてエタノール沈殿工程によって抽出した。生体外転写反応は、二本鎖cDNA試料を用い、BioArray High Yield RNA Transc

10

20

30

40

50

ription Labeling kit (Enzo) を使用して、製造元の使用説明書に従って行った。転写反応は、37 で16時間インキュベートした。cRNAは、RNA精製用のRNeasy (商標) Mini kit (Qiagen) のプロトコルを用いて精製し、分光光度計で定量した。ビオチン標識cRNAは、RNAフラグメント化緩衝液 (200 mMのトリス - 酢酸、500 mMのKAc、150 mMのMgOAc、pH 8.1) を用いてフラグメントにした。Mouse Genome 430 2.0 GeneChips (商標) (Affymetrix) のハイブリダイゼーション及び染色は、製造元の使用説明書に従って行った。マイクロアレイは、GeneChip (商標) 3000 Scannerを使用して読み取り、読み取ったデータは発現データ分析ソフトResolver v5.1 (Rosetta Biosoftware) を用いて取り込み、解析した。

【0119】

L5 脊髄神経切断及び擬似手術

麻酔下のマウスの左L5脊髄神経を露出させ、次に横突起を部分的に除去した。L4脊髄神経から分離した後、L5脊髄神経を切断した。擬似手術は、L5脊髄神経の切断手術と同じであるが、しかしL5脊髄神経は切断しなかった (DeLeo et al. 2000を参照)。

【0120】

足引っ込み限界 (paw withdrawal threshold) の測定

足引っ込み限界 (PWT) は、動的足底角膜炎知覚計 (dynamic plantar aesthesiometer) を用いて評価した (Szabo et al. 2005を参照)。金属網状の床のコンパートメントで馴化した後、刺激装置を動物の後ろ足の下に置き、電動のアクチュエータで駆動するまっすぐな金属の細い線を足底の表面に接触させ、動物が足を取りのけるまで (足引っ込み限界、PWT) 上向きに増加する力を与えた。PWTは、同側の、操作された側及び対側部位の後ろ足について評価した。各動物は、1つの測定のみを使用した。すべての動物実験では、意識のある動物による研究に対する倫理ガイドラインを遵守し、その手順は現地倫理委員会によって承認された。

【0121】

相関関係の解析

相関関係の解析については、「疼痛表現型」がC1 - S1としてそれぞれの神経切断動物 (Chungの動物) に対してC1 - S1として定義され、ここで、C1 = l_n (同側のPWT / 対側のPWT) であり、S1 = 平均_(同一系統内の全擬似動物) l_n (同側のPWT / 対側のPWT) である。強度発現データに基づいて、差転写調節の2つの単位を、各Chungの動物及び測定した各遺伝子に対して定義した。「生の強度測定」は、それぞれの遺伝子及び動物についての、Resolverの発現データ解析ソフト (v5.1) によって計算された強さの尺度として用いた。「ログ測定比」は、特定の遺伝子及びChungの動物について l_n (C2 / S2) として計算され、ここで、C2 = Chungの発現強度、そしてS2 = 平均_(同一系統内の全擬似動物) 擬似発現強度である。

【0122】

相関性を計算する前に、ノイズレベル以下で顕著なChung対擬似の規制無しに発現された遺伝子を排除するために、遺伝子のセットをフィルターにかけた。対象遺伝子は、少なくとも60%のChungの動物は絶対発現比 (absolute fold-change) が > 1.5 で制御されなければならないものとし、又は少なくとも20%のChungの動物は絶対発現比が > 2.0 で制御されなければならないものとした。また、関連遺伝子の発現は、それぞれの強度のp値が < 0.001 によって定義されるように、少なくとも5頭の動物で検出可能 (「存在する」) でなければならないものとした。

【0123】

疼痛表現型のスコアと転写制御の定義された単位の1つとの間の、各遺伝子についてのピアソンの相関係数は、Rソフトウェアパッケージ (<http://www.r-project.org/>) を使用して計算した。これらに基づいて、Storey et al. (2002) の方法に従い、統計学的有意性のp値及び対応する偽発見率 (FDR) を求めた。「ログ測定比」又は「強度測定」の下で $FDR < 0.05$ をもつ遺伝子は、有意に相関していると見なした。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 1 2 4 】

【図 1】カテプシン C - 相関性プロット L 5 D R G (L 5 診断別関連群) における、各マウスの神経障害性の疼痛表現型 (機械的疼痛過敏性、X 軸) 及び対応するカテプシン C の遺伝子制御 (ログ (Chung 対擬似対照) 比、Y 軸) を示す。マウスは、使用した系統によって色分けされる。ピアソンの相関性解析が行われ、疼痛表現型及びカテプシン C の遺伝子制御の 2 つのパラメータの、有意な正の相関性が明らかにされた。これは、個々のマウスについて、Chung の神経障害性マウスで L 5 D R G のカテプシン C 発現が高くなればなるほど、行動試験で示された機械的疼痛感覚過敏がより顕著になることを意味する。この有意な相関は、神経因性疼痛表現型を誘導するためのカテプシン C 遺伝子発現の因果関係を示す。

10

【図 2】カテプシン C - 強度データ A K R、C B A 及び C 5 7 の各マウス系統の、Chung 又は擬似手術後の、L 5 神経節におけるカテプシン C 発現の絶対値。

【図 3】Affymetrix probe set 1416381_at (Mouse Genome 430 2.0 マイクロアレイ) によって検出されたマウスカテプシン C m R N A のフラグメント (配列番号 7)

【図 4】NM__001814 によるカテプシン C c D N A 配列 (配列番号 1)

【図 5】Swiss-Prot H U M A N _ C A T C P 5 3 6 3 4 によるカテプシン C タンパク質の配列 (配列番号 2)

【図 6】配列番号 1 によるヒトカテプシン C c D N A 検出用のプライマーセット (配列番号 4 及び 5)

【図 7】マウスカテプシン C c D N A 検出用のプローブ (配列番号 6)

20

【 0 1 2 5 】

参考文献

DeLeo JA et al (2000) Transgenic expression of TNF by astrocytes increases mechanical allodynia in a mouse neuropathy model. *Neuroreport* 11:599-602.

Storey JD. (2002) A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 64: 479-498.

Szabo A et al. (2005) Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314:111-119.

Julius and Basbaum "Molecular mechanisms of nociception", *Nature*, volume 413, 13. September 2001, pp. 203-209;

30

Scholz and Woolf "Can we conquer pain", *Nature neuroscience supplement*, volume 5, November 2002, pp. 1062-1067;

Wood, J.D. "Pathobiology of Visceral Pain: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications II. genetic approaches to pain therapy", *American Journal of Physiological Gastrointestinal Liver Physiology*, 2000, volume 278, G507-G512;

Woolf and Mannion "Neuropathic pain: aetiology, symptoms mechanisms, and management", *The LANCET*, volume 353, June 5, 1999, pp. 1959-1964;

Woolf J. and Salter M.W. "Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain", *Science*, volume 288, June 9, 2000, pp. 1765-1768;

40

Cigic, B.; Dahl, S. W.; Pain, R. H. "The residual pro-part of cathepsin C fulfills the criteria required for an intramolecular chaperone in folding and stabilizing the human proenzyme". *Biochemistry* 39: 12382-12390, 2000

Paris, A.; Strukelj, B.; Pungercar, J.; Renko, M.; Dolenc, I.; Turk, V. : "Molecular cloning and sequence analysis of human preprocathepsin C". *FEBS Lett.* 369: 326-330, 1995

Pham, C. T. N.; Armstrong, R. J.; Zimonjic, D. B.; Popescu, N. C.; Payan, D. G.; Ley, T. J. "Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of murine dipeptidyl peptidase I" *J. Biol. Chem.* 272: 10695-10703, 1997.

Pham, C. T. N.; Ley, T. J. : "Dipeptidyl peptidase I is required for the proce

50

ssing and activation of granzymes A and B in vivo". Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 8627-8632, 1999.

Rao, N. V.; Rao, G. V.; Hoidal, J. R. : "Human dipeptidyl-peptidase I". J. Biol. Chem. 272: 10260-10265, 1997.

Toomes, C.; James, J.; Wood, A. J.; Wu, C. L.; McCormick, D.; Lench, N.; Hewitt, C.; Moynihan, L.; Roberts, E.; Woods, C. G.; Markham, A.; Wong, M.; and 10 others : "Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis". Nature Genet. 23: 421-424, 1999.

Wolters, P. J.; Raymond, W. W.; Blount, J. L.; Caughey, G. H. : "Regulated expression, processing, and secretion of dog mast cell dipeptidyl peptidase I." J. Biol. Chem. 273: 15514-15520, 1998 10

Heusel, J.W., Wesselschmidt, R., Shresta, S., Russel, J & Ley, T.J. "Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells", 1994, Cell 76, 977-987.

Manour, S., Thomas, K.R., and Capecchi, M.R., 1989, "disruption of the proto-oncogene Int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes", Nature 336, 348-352.

Soriano, PI, Montgomery, C., Geske, R., and Bradley, A., 1991, "Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice", Cell 65, 693-702. 20

Turk, B., Turk, D., and Turk, V., Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. Biochim Biophys Acta. 2000 Mar 7;1477(1-2):98-111.

McGuire, M., J., Lipsky, P.E., and Thiele, D. L. (1993) J. Biol. Chem., 268, 2458-2467, Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I.

Henningsson, F., wolters, P., Chapman, H.A., Caughey, G.H., and Peijler, G., (2003), Biol., Chem. 384, 1527-1531, Mast cell cathepsins C and S control levels of carboxypeptidase A and the chymase, mouse mast cell protease 5.

Adkison, A.M., Raptis, S.Z., Kelley, D.G., and Pham, C.T.N., (2002), J. Clin. Invest. 109, 363-371, Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. 30

Wolters, P.J., Pham, C.T.N., Muilenburg, D.J., ley, T.J., and Caughey, G.H., (2001) J. Biol. Chem., 276, 18551-18556, Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice.

Pham, C.T.N., Ivanovich, M.L., Raptis, S.Z., Zehnbaue, B., and Ley, T.J., (2004) J. Immunol., 173, 7277-7281, Papillon-Lefevre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans.

De Haar, S.F., Jansen, D.C., Schoenmaker, T., De Vree, H., Everts, V., and Beertsen, W. (2004) Hum. Mutat. 23, 524-524, Loss-of-function mutations in cathepsin C in two families with Papillon-Lefevre syndrome are associated with deficiency of serine proteinases in PMNs. 40

Sheth, P.D., Pedersen, NM., Walls, A.F., and McEuen, A.R. (2003) Biochem., Pharmacol., 66, 2251-2262, Inhibition of dipeptidyl peptidase I in the human mast cell line HMC-1: blocked activation of tryptase, but not of the predominant chymotryptic activity.

【 0 1 2 6 】

標準的な実験室手法のための文献

他に記載がなければ、標準的な実験室手法は以下の標準的な文献に従って行った又は行うことができる。

【 0 1 2 7 】

Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 545 pp;

Current Protocols in Molecular Biology; regularly updated, e.g. Volume 2000; Wiley & Sons, Inc; Editors: Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert Eg. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl.

Current Protocols in Human Genetics; regularly updated; Wiley & Sons, Inc; Editors: Nicholas C. Dracopoli, Honathan L. Haines, Bruce R. Korf, Cynthia C. Morton, Christine E. Seidman, J.G. Seigman, Douglas R. Smith.

Current Protocols in Protein Science; regularly updated; Wiley & Sons, Inc; Editors: John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield.

Molecular Biology of the Cell; third edition; Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.; Garland Publishing, Inc. New York & London, 1994;

Short Protocols in Molecular Biology, 5th edition, by Frederick M. Ausubel (Editor), Roger Brent (Editor), Robert E. Kingston (Editor), David D. Moore (Editor), J.G. Seidman (Editor), John A. Smith (Editor), Kevin Struhl (Editor), October 2002, John Wiley & Sons, Inc., New York "

Transgenic Animal Technology A Laboratory Handbook. C.A. Pinkert, editor; Academic Press Inc., San Diego, California, 1994 (ISBN: 0125571658)

Gene targeting: A Practical Approach, 2nd Ed., Joyner AL, ed. 2000. IRL Press at Oxford University Press, New York;

Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Nagy, A, Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R., 2003, Cold Spring Harbor Press, New York;

Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, 1985 (for physiologically tolerable salts (anorganic or organic), see esp. p. 1418)

【 0 1 2 8 】

実験室手法のための標準的な文献

他に記載がなければ、実験室手法は下に掲げた標準的な文献の標準的な方法に従って行った、又は行うことができる。

Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 545 pp or *Current Protocols in Molecular Biology*;

Current Protocols in Molecular Biology; regularly updated, e.g. Volume 2000; John Wiley & Sons, Inc; Editors: Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert Eg. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl.

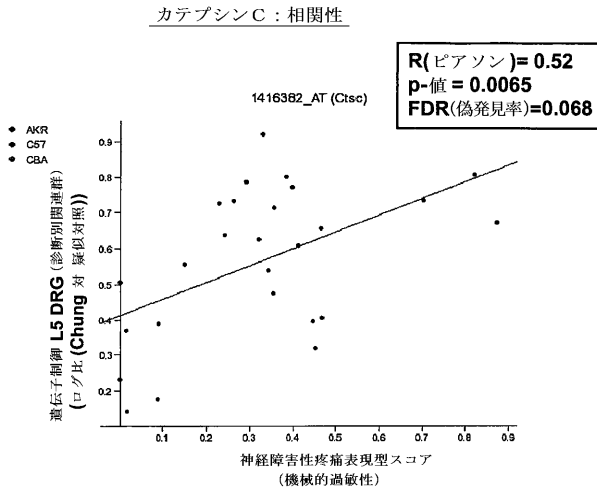
Current Protocols in Human Genetics; regularly updated, e.g. Volume 2003; John Wiley & Sons, Inc; Editors: Nicholas C. Dracopoli, Honathan L. Haines, Bruce R. Korf, Cynthia C. Morton, Christine E. Seidman, J.G. Seigman, Douglas R. Smith.

Current Protocols in Protein Science; regularly updated, e.g. Volume 2003; John Wiley & Sons, Inc; Editors: John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield.

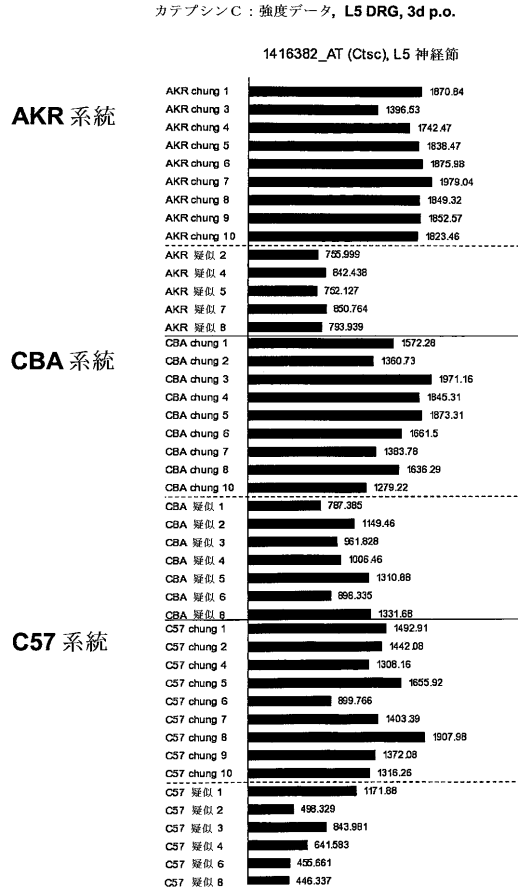
Molecular Biology of the Cell; third edition; Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.; Garland Publishing, Inc. New York & London, 1994;

Gene Targeting: a practical approach (1995), Editor: A.L. Joyner, IRL Press Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Edition 17, 1985.

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

マウスカテプシン cDNA フラグメント

```

gctgttttgcctgtgggctatggaagagatccagttactgggatagaatactggattata
aagaacagctggggctctaaactgggggagagtggtacttccgtatccgcagaggaact
gatgaatgtgcaattgagagtatagccgtggcgccnataccgatccctaaatattagga
catagctcccagtggtacatacaggctcttctcaactcacagagtgatttagtccactgct
gaagactttttcagagcaatatacagaagcttaccactaagcatctttaaagaatttgtc
tttgaacttaaaccatccttgattttttcttttaataatcttccccatcaactactgaa

```

配列番号 7

【 図 4 】

カテプシンC ヒト mRNA の配列

```

1  cgtagctatt  tcaaggcgcg  cgcctcgtgg  tggactcacc  gctagccgcg  agcgcctcgg
61  ttctctgtaa  ttcttcaacc  cttttctcag  ctccctgcag  catgggtgct  gggcctccct
121  tgctgctcgc  cgcctcctcg  ctgcttctct  ccggcgacgg  cgcctgctgc  tgcgacacac
181  ctgcccaactg  cacctatctt  gacctgctgg  gcaacctgggt  ctccaggtg  ggtccacagc
241  gttcccagcg  cgatgtcaac  tgctcgggta  tgggaccaca  agaaaaaaa  gtatgggtgt
301  accttcagaa  gctggataca  gcatatgatg  acctggcaaa  ttctggccat  ttccacatca
361  tttacaacca  aggctttgag  attgtgttga  atgactacaa  gtggttgoc  ttttttaagt
421  ataaagaaga  gggcagcaag  gtgaccactt  actgcaacga  gacaatgact  ggggtgggtg
481  atgatgtggt  gggcgggaac  tgggcttggt  tcaccggaaa  gaaggtggga  actgcctctg
541  agaattgtga  tgtcaacata  gcaacacctt  agaattctca  gaaaaagat  tctaataagg
601  tctacaagta  tgatcaaac  tttgtgaag  ctatcaatgc  cattcagaag  tcttggaactg
661  caactacata  catggaatat  gagacttcta  cctggggaga  tatgattagg  agaagtggtg
721  gccacagctg  aaaaatccca  agcccaaac  ctgcaccact  gactgctgaa  atacagcaaa
781  agattttgca  tttgccaaca  tcttgggact  ggagaaatgt  tcatggtatc  aattttgtca
841  gtctgtgtcg  aaaccaagca  tctctgtgca  gctgctactc  atttgcttct  atgggtatgc
901  tagaagcgag  aatccgtata  ctaaccaaca  attctcagac  cccaatccta  agcctcagg
961  aggtgtgtgc  ttgtagccag  tatgctcaag  gctgtgaagg  cggcttccca  tacctattg
1021  caggaagata  cgccaagat  tttgggtgg  tggaaagaag  ttgctcccc  tacacagcca
1081  ctgattctcc  atgcaaaatg  aagggaagact  gcttctgcta  ttaactcctc  tagtaccact
1141  atgtaggagg  tttctatgga  ggtgcgaatg  aagccctgat  gaagcttgag  ttggtccatc
1201  atgggcccac  ggcagttgct  ttggaagtat  atgatgactt  cctccactac  aaaaagggga
1261  tctaccacca  cactgggtcta  agagaccctt  tcaaccctt  tgagtgact  aatcatgctg
1321  ttctgcttgt  gggctatggc  actgactcag  cctctgggat  ggattactgg  atgttaaaa
1381  acagctgggg  caccgctgg  ggtgagaatg  gctactccg  gatccgcaga  ggaactgatg
1441  agtgtgcaat  tgagagcata  gcagtgccag  ccacaccaat  tcttaaatg  tagggatgac
1501  cttccagata  ttcataatga  tctgcatcag  ttgtaagggg  gaattggtat  atccacagac
1561  tgtagacttt  cagcagcaat  ctgagaagct  tacaataga  tttccatgaa  gatattgttc
1621  ttcagaatta  aaactgccct  taattttaa  ataccttca  atcggccact  ggcattttt
1681  ttctaagtat  tcaattaaat  ggaattttc  tggagatgg  tcagctatga  agtaaatag
1741  tttgcttaat  catttgtaat  tcaaacatgc  tatattttt  aaaaatgatg  tgaaaaacata
1801  gacttatttt  taaattgtac  caatcacaag  aaaaatgatg  caataattat  caaacctttt
1861  aaaaatgatg  ctcatatttt  taaaataaag  ttttaaaaa  aactgcaaaa  aaaaaaaaaa
1921  aaaa

```

配列番号 1

【 図 5 】

Swiss-prot P53634 によるカテプシンCヒトタンパク質の配列

MGAGPSILLLA ALLLLLSGDG AVRCDTPANC TYLDLLGTWV FQVGSSEGSQR DVNCSVMGPG

70 80 90 100 110 120
 EKIKVVVYLQK LDTAYDDLGN SGHFTIINYQ GFELVLDYK WFAFPKYKEE GSKVTTYCNE

130 140 150 160 170 180
 TMTGWVHDLV GRNWACFTGK KVGTAENYV VNTAHLKNSQ EKYSNRLYKY DHNFVKAINA

190 200 210 220 230 240
 IQKSWTATTY MEYETLTLGD MIRRSQGHSR KIPRPKPAPL TAEIQKILH LPTSWDWRNV

250 260 270 280 290 300
 HGINFVSPVR NQASCGSCYS FASMGMLEAR IRILTNSQPT PILSPQEVVS CSQYAQGCCEG

310 320 330 340 350 360
 GFPYLIAGKY AQDFGLVEEA CFPYTGTDSP CKMKEDCFRY YSSEYHYVGG FYGGCNEALM

370 380 390 400 410 420
 KLELVHHGPM AVAFEVYDDF LHYKGIYHH TGLRDPFNPV ELTNHAVLLV GYGTSASGM

430 440 450 460
 DYMIVKNSWG TGWGENGYFR IRRGTDECAI ESIIVAATPI PKL

配列番号 2

【 図 6 】

ヒトカテプシンC cDNA 検出用プライマー

順方向: 5'-gtccctgcagcatgggtgctggccctcc-3' (配列番号 4)

逆方向: 5'-gcataccctacaatttaggaattgggtggg-3' (配列番号 5)

【 図 7 】

マウスカテプシンC検出用プローブ

GCCCACTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGT

配列番号 6

【 配列表 】

2011526143000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/002091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C12Q1/37		
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) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/045476 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; WHITTAKER PAUL ANDREW [GB] 26 April 2007 (2007-04-26) claims 1-10	25
Y	WO 2004/077053 A (BIOFRONTERA PHARMACEUTICALS GM [DE]) 10 September 2004 (2004-09-10) abstract claims 1-6	1-58
Y	WO 03/020287 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; BUXTON FRANCIS PAUL [US];) 13 March 2003 (2003-03-13) abstract claims 1,2	1-58
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 July 2009		Date of mailing of the international search report 27/07/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jones, Laura

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/002091

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/106012 A (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 10 November 2005 (2005-11-10) page 39, line 9 - page 40, line 19	1-58
Y	WO 2005/113789 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; EILERS MARTIN [DE]) 1 December 2005 (2005-12-01) abstract claim 1	1-58
A	WO 2006/122237 A (UNIV FLORIDA [US]; WANG KEVIN KA-WANG [US]; HAYES RONALD L [US]; BAXTE) 16 November 2006 (2006-11-16) abstract	1-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/002091

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007045476	A	26-04-2007	EP 1941039 A2	09-07-2008
			JP 2009512428 T	26-03-2009
			US 2008260726 A1	23-10-2008
WO 2004077053	A	10-09-2004	AU 2003210347 A1	17-09-2004
WO 03020287	A	13-03-2003	EP 1423128 A2	02-06-2004
			JP 2005502679 T	27-01-2005
WO 2005106012	A	10-11-2005	EP 1745292 A2	24-01-2007
			EP 2017620 A2	21-01-2009
			US 2007286854 A1	13-12-2007
WO 2005113789	A	01-12-2005	EP 1595945 A1	16-11-2005
			EP 1751277 A2	14-02-2007
			US 2005266513 A1	01-12-2005
WO 2006122237	A	16-11-2006	US 2008311036 A1	18-12-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
A 6 1 P	25/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
		A 6 1 K	37/02	
		C 1 2 N	15/00	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, 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, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 マルティン・ミヒャエリス
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72)発明者 ダンピング・ディング - ブフェニツヒドルッフ
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72)発明者 アンケ・エム・シュルテ
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72)発明者 クリスティアン・メッツ - ヴァイドマン
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA13 DA14 DA20 FB01 FB02 FB03
4B024 AA11 CA04 CA09 CA12 DA02 EA04 HA12
4B063 QA18 QA19 QQ20 QQ79 QR32 QR55 QR62 QR77 QR80 QS05
QS34 QX02
4C084 AA17 BA44 CA62 NA14 ZA082 ZC422 ZC782

专利名称(译)	组织蛋白酶C的使用		
公开(公告)号	JP2011526143A	公开(公告)日	2011-10-06
申请号	JP2011501132	申请日	2009-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	赛诺菲		
申请(专利权)人(译)	赛诺菲 - 安万特		
[标]发明人	マーティアスゲバオアー マルティンミヒャエリス ダンピングディングプフェニツヒドルッフ アンケエムシュルテ クリスツィアンメッツヴァイドマン		
发明人	マーティアス・ゲバオアー マルティン・ミヒャエリス ダンピング・ディング・プフェニツヒドルッフ アンケ・エム・シュルテ クリスツィアン・メッツ・ヴァイドマン		
IPC分类号	C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/02 A61K45/00 A61P25/04 A61P19/02 A61P29/00 A61K38/00 C12N15/09		
CPC分类号	A61P19/02 A61P25/04 A61P29/00 C12Q1/37 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/6896 G01N2800/2842		
FI分类号	C12Q1/37 C12Q1/68.ZNA.A G01N33/48.N G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/68 G01N33/50.P G01N33/53.M G01N33/53.D C12Q1/02 A61K45/00 A61P25/04 A61P19/02 A61P29/00 A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ20 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/NA14 4C084/ZA082 4C084/ZC422 4C084/ZC782		
优先权	2008290285 2008-03-26 EP		
其他公开文献	JP5748652B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及组织蛋白酶C的用途。本发明的其他方面涉及筛选药物，诊断疼痛易感性和治疗疼痛的方法。

カテプシンC : 相関性

