

(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2005-534311

(P2005-534311A)

(43) 公表日 平成17年11月17日(2005.11.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/4174	A 6 1 K 31/4174	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-525342 (P2004-525342)	(71) 出願人	597011463
(86) (22) 出願日	平成15年7月28日 (2003. 7. 28)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月27日 (2005. 1. 27)		スイス国、4 0 5 6 バーゼル、リヒトシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/008313		ユトラーセ 3 5
(87) 国際公開番号	W02004/013629	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成16年2月12日 (2004. 2. 12)		弁理士 青山 稜
(31) 優先権主張番号	0217503. 2	(74) 代理人	100067035
(32) 優先日	平成14年7月29日 (2002. 7. 29)		弁理士 岩崎 光隆
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100064610
(31) 優先権主張番号	60/415, 124		弁理士 中嶋 正二
(32) 優先日	平成14年9月30日 (2002. 9. 30)	(74) 代理人	100072730
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】白血球関連炎症性疾患の処置に適する作用因子のスクリーニング

(57) 【要約】

本発明はヒト一過性受容器電位 6 遺伝子 (T R P C 6) がコードするポリペプチドの活性を変調する物質のアッセイ法に関する。該アッセイ法は、候補物質と当該ポリペプチドとを組合せ、次いで、該候補物質が当該ポリペプチドに及ぼす作用を測定することからなる。かかる物質は炎症性疾患、特に白血球と関連する疾患の処置用医薬の製造に使用することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト一過性受容器電位 6 遺伝子 (TRPC6) がコードするポリペプチドの活性を変調する白血球関連炎症性疾患処置の使用に適する物質の同定法であって、候補物質と当該ポリペプチドとを組合せ、次いで該候補物質が当該ポリペプチドに及ぼす作用を測定することを特徴とする方法。

【請求項 2】

該候補物質と、TRPC6 により安定に形質導入を受け、機能的 TRPC6 チャンネルを発現する細胞とを組合せ、TRPC6 - 介在 Na⁺ 流入を示すいずれかの膜脱分極を測定することからなる請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

アゴニストの刺激により TRPC6 チャンネルを活性化し得る内在性カルシウム - 可動性 G タンパク質 - カップル結合レセプターを該細胞により発現させ、TRPC6 チャンネルを刺激するための候補物質に続いてレセプターアゴニストを添加し、阻害測定を可能とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

ヒト TRPC6 イオンチャンネルを通過するカルシウムイオンの流入を阻害する化合物および医薬上許容される担体含有してなる医薬組成物。

【請求項 5】

該化合物が 1 - [b - [3 - (4 - メトキシフェニル) プロポキシ] - 4 - メトキシフ

20

ェネチル] - 1 H - イミダゾール・HCl である請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

ヒト TRPC6 遺伝子によりコードされるポリペプチドと免疫反応する抗体の使用、または当該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリオヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用であって、ヒト組織において白血球蓄積を阻害する医薬の製造に際しての使用。

【請求項 7】

ヒト TRPC6 遺伝子によりコードされるポリペプチドと免疫反応する抗体の使用、または当該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリオヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用であって

30

、白血球関連炎症性疾患処置用の医薬製造に際しての使用。

【請求項 8】

該疾患が、慢性閉塞性肺疾患、成人呼吸窮迫症候群、リウマチ様関節炎または炎症性腸疾患などの好中球関連疾患である請求項 7 記載の使用。

【請求項 9】

該疾患が、喘息およびアレルギー性鼻炎などの好酸球関連疾患である請求項 7 記載の使用。

【請求項 10】

白血球関連炎症性疾患の処置用医薬の製造における TRPC6 インヒビターの使用。

【請求項 11】

肺高血圧症の処置用医薬の製造における TRPC6 インヒビターの使用。

40

【請求項 12】

本明細書において実質的に実施例と関連して記載される、ヒト一過性受容器電位 6 遺伝子がコードするポリペプチドの活性を変調する白血球関連炎症性疾患の処置使用に適する物質の同定法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は一過性受容器電位 6 イオンチャンネル (TRPC6) の活性を変調する物質または作用因子の同定、およびかかる物質の炎症性疾患、特に呼吸器系炎症性疾患の処置においての使用に関する。

50

【0002】

炎症に際しては様々な細胞が組織内に引き寄せられる。これら細胞には種々の白血球、とりわけ中性好性顆粒球、好酸性顆粒球および単球などの炎症性食細胞が含まれる。好中球は慢性閉塞性肺疾患（COPD）、たとえば、慢性気管支炎およびその関連する肺気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）などの呼吸器疾患、クローン病および潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患、およびリウマチ様関節炎における炎症と組織破壊に関わる。好酸球は喘息およびアレルギー性鼻炎などの呼吸器疾患と関わっている。

【0003】

炎症症状において白血球が作用する重要な段階は、これらの細胞の組織への移行、たとえば、呼吸器炎症における気道への移行またはリウマチ様関節炎における関節への移行、細胞活性化とある範囲の炎症性メディエーター、ロイコトリエン、酸素ラジカル、プロテアーゼの放出などである。白血球の移行と活性化が必要であるというシグナルは、多くの場合、細胞質基質カルシウムレベルの増加に应答して、レセプターを介して伝達される。Ins(1,4,5)P3レセプターは細胞内貯蔵庫からカルシウムイオンを放出させることが知られているが、それらのイオンが通過する血漿膜のチャンネルについては余り知られていない。

10

【0004】

ショウジョウバエ（*Drosophila*）の一過性受容器電位または“trp”遺伝子は、Ca⁺⁺選択性貯蔵作用Ca⁺⁺取込み（SOC）をコードすることが知られているが、これはヒトの相同体（TRPC）および関連の遺伝子を見出すために使用されていた。このことが、イオンチャンネル、すなわち、TRPC1-6として機能するタンパク質ファミリーの発見につながった。

20

【0005】

ブレイ（Boulay）らはマウスのTRPC6をクローン化し、配列決定して、「GqクラスのGタンパク質にカップル結合したレセプターの活性化に対し、二次的にカルシウム取り込みに関与するショウジョウバエの一過性受容器電位（trp）の新規哺乳動物相同体のクローニングと発現」として報告した（*J. Biol. Chem.* Vol.272, 29672-29680（1997））。マウスTRPC6はジェンバンク（GenBank）から寄託番号NP_038866として入手し得る。

【0006】

古典的TRP6またはTRPC6としても知られるヒトTRPC6は寄託番号NP_004612としてジェンバンクから入手し得る。

30

【0007】

デスポジト（D'Esposito）らは、ヒトTRPC6遺伝子の配列について、「染色体11q21-->q22に対するヒト一過性受容器電位チャンネル6遺伝子TRPC6の同定と帰属（Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21-->q22）」として報告した（*Cytogenet. Cell Genet.* 83（1-2）, 46-47（1998））。

【0008】

ホフマン（Hofmann）らは、「ジアシルグリセロールによるヒトTRPC6およびTRPC3チャンネルの直接活性化（Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol）」（*Nature* Vol.397, 21 January 1999）において、もしCHO-K1細胞が異種として機能的TRPC6チャンネルを発現するなら（電気生理学的には証明されている）、CHO-K1細胞においてはヒスタミンが大きなCa⁺⁺流入を刺激することを示している。彼らはまたTRPC6チャンネル活性がNa⁺流入同様に測定し得ることも証明している。

40

【0009】

TRPC6は、炎症に際して組織に引き寄せられた細胞中に存在することが判明している。TRPC6 mRNAは分離した一次ヒト好中球に存在し、また喫煙者とCOPD患者から気管支肺胞洗浄により分離したヒト肺マクロファージにも存在することが示されてい

50

る。TRPC6 mRNAの発現はまた培養したヒトの気道平滑筋細胞および十分に分化したヒト気管支上皮細胞にも見出されている。TRPC6タンパク質はヒトT-リンパ球、培養したヒトの気道平滑筋細胞、十分に分化したヒト気管支上皮細胞、気管支気道平滑筋、気道上皮の上皮細胞、粘膜下腺および組織の白血球、すなわち、好中球、マクロファージおよびリンパ球において発現されることが示されている。

【0010】

かかる細胞へのカルシウムイオンの流入を阻害することにより、好中球または好酸球などの白血球の活性化を減弱させる物質が、喘息および慢性閉塞性肺疾患などの呼吸器疾患の処置に有用であることを本発明により提案する。したがって、本発明はかかる疾患の治療標的としてのTRPC6を提供し、またヒトTRPC6の遺伝子産物により形成されるチャンネル活性を刺激または阻害するモジュレーター、すなわち、ペプチド、ペプチド擬似物質、小分子またはその他の薬物などの候補化合物または作用因子を同定する“スクリーニングアッセイ”法を提供する。

10

【0011】

したがって、第一の側面において、本発明は、ヒト一過性受容器電位6遺伝子(TRPC6)がコードするポリペプチドの活性を変調する白血球関連炎症性疾患処置の使用に適する物質の同定法であって、候補物質と当該ポリペプチドとを組合せ、次いで該候補物質が当該ポリペプチドに及ぼす作用を測定することを特徴とする方法に関する。

【0012】

第二の側面において、本発明は、ヒトTRPC6イオンチャンネルを通過するカルシウムイオンの流入を阻害する化合物および医薬上許容される担体を含有してなる医薬組成物に関する。

20

【0013】

第三の側面において、本発明は、ヒトTRPC6遺伝子がコードするポリペプチドの使用、当該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリオヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用、または当該ポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドプローブと免疫反応する抗体の使用であって、ヒト組織において白血球蓄積を阻害する医薬の製造に際しての使用に関する。

【0014】

第四の側面において、本発明は、ヒトTRPC6遺伝子がコードするポリペプチドの使用、当該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリオヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用、または当該ポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドプローブと免疫反応する抗体の使用であって、白血球関連炎症性疾患の処置用医薬の製造における使用に関する。

30

【0015】

第五の側面において、本発明は、白血球関連炎症性疾患の処置用医薬の製造におけるTRPC6インヒビターの使用に関する。

【0016】

上記のように、第一の側面において、本発明は、ヒト一過性受容器電位6遺伝子がコードするポリペプチドの活性を変調する白血球関連炎症性疾患処置の使用に適する物質の本発明同定法に関する。広い意味で、本方法、またはアッセイ法は、候補物質と一過性受容器電位チャンネル6遺伝子がコードするポリペプチドとを組合せ、次いで該候補物質が当該ポリペプチドに及ぼす作用を測定することからなる。

40

【0017】

白血球関連炎症性疾患の処置使用に適した物質とは、その活性のエンハンサー(本明細書では“ヒトTRPC6アゴニスト”)またはインヒビター(本明細書では“ヒトTRPC6アンタゴニスト”)として役立つ。

【0018】

50

T R P C 6 遺伝子産物、すなわち、T R P C 6 イオンチャンネルを形成するポリペプチドは、たとえば、ヒトT R P C 6 チャンネルの活性に刺激的または阻害的作用を示す化合物を同定する細胞にもとづく方法またはスクリーニングアッセイ法により、あるいは適切なレポーター遺伝子アッセイ法により測定し得る。

【0019】

上記のスクリーニング法は、たとえば、その表面にT R P C 6 ポリペプチドを発現する細胞、たとえば、昆虫、哺乳動物もしくは酵母の細胞を調製し、次いで得られる細胞を候補物質とインキュベートして、T R P C 6 ポリペプチドの機能的活性が上昇しているか、阻害されているかを測定することにより実施し得る。

【0020】

T R P C 6 チャンネル活性化の適切な試験では、候補物質を、T R P C 6 の形質移入を安定に受け、機能的T R P C 6 チャンネルを発現する細胞と組合せ、膜脱分極を測定してT R P C 6 - 介在のN a + 流入を示す。

【0021】

T R P C 6 チャンネル阻害の適切な試験では、内在性Gタンパク質カップル結合カルシウム可動性レセプター、たとえば、T R P C 6 チャンネルを活性化し得るムスカリン様アセチルコリンレセプターを発現する細胞を用い、レセプターアゴニスト、たとえば、ムスカリン様アセチルコリンレセプターアゴニストを加えてT R P C 6 チャンネルを刺激する。該細胞はレセプターアゴニストの添加前に、候補物質で処理する。この処理は蛍光増大を生ずるはずであるが、その増大度は該候補化合物がT R P C 6 チャンネルを阻害する場合、減少する。蛍光の何らかの変化は適切な装置、たとえば、蛍光画像プレートリーダーにより測定し得る。

【0022】

かかる方法を使用し、1 - [b - [3 - (4 - メトキシフェニル) プロポキシ] - 4 - メトキシフェネチル] - 1 H - イミダゾール・H C l がヒトT R P C 6 イオンチャンネルの活性を阻害することを見出した。

【0023】

1 - [b - [3 - (4 - メトキシフェニル) プロポキシ] - 4 - メトキシフェネチル] - 1 H - イミダゾール・H C l は、レセプター介在カルシウム取込み (R M C E) を阻害することが開示されている (Merritt et al in Biochem. J. (1990) 271: 515-522) 。 また、井上らもマウスのT R P C 6 イオンチャンネルを遮断することを開示している (Inoue et al in Circ. Res. (2001) 88: 325-332) 。

【0024】

本発明はまたヒトT R P C 6 イオンチャンネルを通過するカルシウムイオンの流入を阻害する化合物、たとえば、1 - [b - [3 - (4 - メトキシフェニル) プロポキシ] - 4 - メトキシフェネチル] - 1 H - イミダゾール・H C l 、および医薬上許容される担体を含有してなる医薬組成物に関する。

【0025】

ヒト組織において白血球の蓄積を阻害する医薬を製造するために、ヒトT R P C 6 遺伝子がコードするポリペプチドと免疫反応する抗体 (本明細書では “ ヒトT R P C 6 抗体 ” という) 、または当該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリオヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチド (本明細書では “ ヒトT R P C 6 アンチセンスオリゴヌクレオチド ” という) を使用することができる。

【0026】

上記のヒトT R P C 6 抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドは、白血球関連炎症性疾患を処置するために使用することができる。

【0027】

ヒトT R P C 6 アゴニスト、ヒトT R P C 6 アンタゴニスト、ヒトT R P C 6 抗体およびヒトT R P C 6 アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書において “ 本発明の作用

10

20

30

40

50

因子”として相互に集合的に引用する。

【0028】

本発明を適用し得る好中球関連炎症性疾患は、好中球関連の炎症または閉塞性気道疾患、とりわけ慢性閉塞性肺疾患（COPD）、たとえば、慢性気管支炎および肺気腫、および成人（または急性）呼吸促進症候群（ARDS）、リウマチ様関節炎、およびクローン病および潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患である。また本発明を適用し得る好酸球関連炎症性疾患は、好酸球関連の炎症または閉塞性気道疾患、とりわけ喘息およびアレルギー性鼻炎である。

【0029】

末梢組織の中で、肺は胎盤とともに最高のレベルでTRPC6を発現する。TRPC6は肺の多くの常在性細胞、たとえば、上皮細胞および気道平滑筋細胞に存在するが、肺動脈の平滑筋にも存在する。TRPC6は血小板由来増殖因子（PDGF）により刺激を受けた場合、これらの平滑筋細胞で上方制御される。PDGFの増大は肺高血圧症および動脈平滑筋細胞の増殖と関連する。TRPC6の発現を、たとえば、アンチセンスにより阻害すると、PDGF-刺激を受けた動脈平滑筋細胞の増殖が抑制される。したがって、肺動脈の平滑筋TRPC6を阻害する医薬は肺高血圧症の処置に有用である。

10

【0030】

ヒトTRPC6ポリペプチドは適当な常套法により単離することができる。ヒトTRPC6遺伝子の配列は既知であるため、特異的プライマーを簡便な選択肢として使用してもよい。たとえば、前進プライマーとしての（SEQ01）5'-gcaaatgaaagcttttggaacc-3'および逆進プライマーとしての（SEQ02）5'-atcgtaacattatagactccat-3'は、300塩基対のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）産物を生成する。

20

【0031】

ヒトTRPC6ポリヌクレオチドはcDNA、ゲノムDNAまたはRNAであり、適当な常套法により取得し得る。たとえば、それを構成するヌクレオチドから化学合成により、たとえば、既知の手法と装置を用いる自動化固相合成により調製し得る。

【0032】

ヒトTRPC6抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。かかる抗体は常套の手法により調製し得る。精製抗原に対するポリクローナル抗体の産生方法は十分に確立されている（参考：Cooper and Paterson in Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. Eds., John Wiley and Sons Inc., Chapter 11）。ヒトTRPC6抗体はヒトTRPC6ポリペプチドの検出または発現レベルの定量に、あるいはヒトTRPC6ポリペプチドのリガンド/抗リガンド結合活性の阻害に使用し得る。

30

【0033】

ヒトTRPC6アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA、DNAのホスホロチオエートもしくはメチルホスホネート類似体などのDNA類似体、RNA、RNA類似体、またはペプチド核酸（PNA）でもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、たとえば、自動化固相法を用いる常套の方法で合成し得る。これは、それが望ましい場合、ヒトTRPC6遺伝子の発現を阻害するために使用し得る。あるいは、短鎖干渉RNA（siRNA）を標的遺伝子ロックダウンの特異的手段として使用することができる。RNA干渉は遺伝子の発現を阻害し、したがって遺伝子機能の探求に使用し得る。この技法についてはエルバシャーらが記載している（S.M. Elbashir et al in Methods 26（2002）199-213）。

40

【0034】

ヒトTRPC6ポリヌクレオチドプローブは上記ポリヌクレオチドまたはその相補体の少なくとも15個の連続したヌクレオチドからなる。該プローブはcDNA、ゲノムDNAまたはRNAであり、常套の方法で合成することができる。通常、それは15ないし50個のヌクレオチドからなる合成オリゴヌクレオチドであり、たとえば、発蛍光基で標識して検出可能なシグナルを生じさせることも可能である。ヒトTRPC6の最初の50個

50

程度のアミノ酸をコードするヌクレオチドは、この目的に使用し得る。ヒトTRPC6ポリヌクレオチドプローブはヒトTRPC6遺伝子の有無の検出、すなわち、遺伝的異常の検出に使用することができる。

【0035】

白血球関連炎症性疾患を阻害または逆転させる際の本発明作用因子の有効性は、該疾患のモデル、たとえば、ラットまたはマウスのリポ多糖誘発肺炎モデル、または文献 (Durie et al., Clin. Immunol. Immunopathol. (1994) 73: 11-18; and Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 9784-9788) 記載のモデルにて証明し得る。

【0036】

本発明の作用因子は適切な経路により、たとえば、経口により、たとえば、錠剤またはカプセル剤の形状で；非経口的に、たとえば、静脈内に；局所的に、たとえば、軟膏またはクリームとして；経皮的に、たとえば、パッチとして；吸入により；または経鼻的に投与し得る。

【0037】

本発明作用因子を含有する医薬組成物は、通常の希釈剤または添加剤ならびに製剤技術上既知の技法を用い、製造し得る。したがって、経口投与用剤は錠剤およびカプセル剤であり、吸引用の組成物はエアロゾルまたは他の噴霧可能製剤または乾燥粉末製剤を含み得る。

【0038】

該組成物がエアロゾル製剤からなる場合、該製剤は、好ましくは、たとえば、ヒドロフルオロ-アルカン(HFA)噴射剤、たとえば、HFA134aまたはHFA227またはその混合物、技術上既知の1種以上の補助溶媒、たとえば、エタノール(20重量%まで)、1種以上の界面活性剤、たとえば、オレイン酸またはトリオレイン酸ソルピタン、および1種以上の充填剤、たとえば、ラクトースを含む。

【0039】

該組成物が乾燥粉末製剤からなる場合、該有効成分は、好ましくは、粒径が10ミクロンまでのものであり、該製剤は希釈剤または担体、たとえば、ラクトース、および湿気による製品の性能劣化を防止する助剤となる化合物を含む。

【0040】

該組成物が噴霧製剤からなる場合、該製剤は、好ましくは、たとえば、溶解もしくは懸濁状態の有効成分を、水、補助溶媒としてのエタノールまたはプロピレングリコールおよび界面活性剤でもある安定剤を含む媒体を含有する。本発明は、(i)吸入可能な形状、たとえば、エアロゾルまたは他の噴霧可能な組成物または吸入可能な微粒子、たとえば、微小化形状の本発明作用因子；(ii)吸入可能な形状の本発明作用因子を含有してなる吸入可能な医薬；(iii)吸入装置と組み合わせた吸入可能な形状のかかる本発明作用因子を含有してなる医薬製品；および(iv)吸入可能な形状の本発明作用因子を含有する吸入装置；を包含する。

【0041】

本発明を実施するに際し採用する本発明作用因子の投与量は、勿論、たとえば、処置すべき特定の症状、所望の効果、および投与形態によって変動し得る。一般に、吸入投与の場合の適切な日用量は1μgないし10mg/kgの範囲であるが、経口投与の場合の適切な日用量は0.1mgないし1000mg/kgの範囲である。

【0042】

本発明を以下の実施例により説明する。

【実施例1】

【0043】

大量処理スクリーニングに適したアッセイ

候補化合物またはテスト化合物をスクリーニングするアッセイは、TRPC6を安定に形質導入した、機能的TRPC6チャンネルを発現する細胞、たとえば、哺乳動物細胞株HEK293(TRPC6チャンネルを活性化し得る内在性ムスカリン様アセチルコリン

レセプターを発現する)を用いて実施する。該アッセイは96穴FLIPR(登録商標)(Fluorescence Imaging Plate Reader; 蛍光画像プレートリーダー)(モレキュラー・デバイス・コーポレーション)上、モレキュラー・デバイス専売FLIPR(登録商標)膜電位アッセイキット(カタログ#R8034)を用いて実施し、TRPC6-介在Na⁺流入からの膜脱分極を測定する。このTRPC6-介在応答の特異性は、Na⁺が細胞外バッファーにおいて不透過性一価カチオンNMDG⁺と置換わっているならば、TRPC6発現細胞にはそれが観察されないこと、またNa⁺流入依存性膜の脱分極がTRPC6を形質移入していない対照の細胞で観察されないことを証明することにより示し得る。TRPC6発現細胞を96穴黒色壁平底マイクロプレートに塗布容量100 μ lで播種し、アッセイにとって周密となるまで増殖させる。アッセイ用細胞を調製するために、細胞培地を除き、ローディングバッファー100 μ lを各ウエルに添加する。ローディングバッファーは、pH7.4で、140mM-NaCl、0.15mM-CaCl₂、3.3mM-KH₂PO₄、1.2mM-MgCl₂、10mM-D-グルコースおよび20mM-HEPESからなり、0.03mM-BAPTA-AMを含むバッファー中、必要なアッセイ濃度まで希釈したFLIPR(登録商標)膜電位色素からなる。プレートはアッセイを開始する前に37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートする。TRPC6のインヒビターを検出するために、ムスカリン様アセチルコリンレセプターアゴニスト・カルバコール(TRPC6チャンネルを活性化する)で刺激する前または後に、各ウエルにテスト作用因子を加える。インヒビターの期待した効果は、カルバコール刺激による蛍光増大の減少となるはずである。TRPC6の活性化剤はテスト作用因子をカルバコールに置き換えることにより検出し得るが、この場合、活性化剤は蛍光増大を刺激する。

10

20

30

40

50

【実施例2】

【0044】

1-[b-[3-(4-メトキシフェニル)プロポキシ]-4-メトキシフェネチル]-1H-イミダゾール・HClの検出

1-[b-[3-(4-メトキシフェニル)プロポキシ]-4-メトキシフェネチル]-1H-イミダゾール・HClで10分間あらかじめ処理したTRPC6クローン14細胞を、実施例1に記載のアッセイ法にしたがってカルバコール(10 μ M)で刺激する。カルバコールを添加する前に(最小の応答、すなわち、Min)、また、カルバコール刺激による蛍光増大が最大に達したときに(最大応答、すなわち、Max)、蛍光を測定する。下記表1に認められるように、減少した蛍光応答が、化合物の存在しない対照応答に比べて、化合物処理細胞にて観察される。

【0045】

【表1】

表 1

1-[b-[3-(4-メトキシフェニル)プロポキシ]-4-メトキシフェネチル]-1H-イミダゾール・HClによるTRPC6イオンチャンネルの阻害

化合物濃度 (μ M)	平均蛍光応答 (Max-Min)/Minとして計算	S.E.M.
0 (すなわち、対照)	1.219	0.089
0.1	1.172	0.099
03	1.128	0.109
1.0	0.977	0.082
3.0	0.699	0.041
10.0	0.278	0.055
30.0	0.122	0.021

【0046】

データは(Max-Min)/Min応答として計算する。1-[b-[3-(4-メ

トキシフェニル)プロボキシ]-4-メトキシフェネチル]-1H-イミダゾール・HClの各濃度は、 $n = 10$ ウエルの平均 \pm SEM (平均値の標準誤差) である。 $n = 4$ の実験から計算された平均 IC_{50} 値は $4.9 \pm 0.8 \mu M$ (平均 \pm S.E.M.) である。

【0047】

この結果は実施例1に記載のアッセイ法が、1-[b-[3-(4-メトキシフェニル)プロボキシ]-4-メトキシフェネチル]-1H-イミダゾール・HClを検出していることを示している。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

10

<110> NOVARTIS AG

<120> ORGANIC COMPOUNDS

<130> 4-32594A PCT

<150> GB 0217503.2

<151> 2002-07-29

20

<150> US 60/415,124

<151> 2002-09-30

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

30

<400> 1

gcaaatgaaa gcttggacc

20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> primer

40

<400> 2

atcgtaacat tatagactcc at

22

【手続補正書】

【提出日】平成17年1月27日(2005.1.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2005534311000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 03/08313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/566 G01N33/68 A61K39/00 A61K48/00 A61K31/4174		
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) IPC 7 G01N		
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, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 25063 A (WELLESLEY CENTRAL HOSPITAL ; BERGER STUART ALAN (CA); GOMMERMAN JEN) 17 July 1997 (1997-07-17) page 5, line 9 - line 20 page 6, line 31,32; claim 62 ---	4, 5, 10
X	WO 02 48342 A (ALLEN KEITH D ; DELTAGEN INC (US)) 20 June 2002 (2002-06-20) page 26, line 17 - page 33, line 29; claim 18 ---	4
Y	BAERSCH, G. ET AL: "Differential effects of two calcium channel blockers on bronchial smooth muscle" ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG, vol. 45, no. 12, 1995, pages 1294-1297, XP008027738 abstract ---	1-3, 7, 9, 10, 12
Y	--- ---	1-3, 7, 9, 10, 12
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 February 2004		Date of mailing of the international search report 03/03/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC1/EP 03/08313

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	INOUE R. ET AL: "The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel" CIRCULATION RESEARCH, vol. 88, no. 3, 2001, pages 325-332, XP002220260 ISSN: 0009-7330 cited in the application table 2	1-12
X	CHUNG, S. ET AL: "Inhibition by SK&F 96365 of Ca ²⁺ current, IL-2 production and activation in T lymphocytes" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 113, no. 3, 1994, pages 861-868, XP008027740 page 861, column 2, paragraph 2	4,5
A	WO 00 04929 A (UNIV SOUTH ALABAMA) 3 February 2000 (2000-02-03) page 7, line 28 -page 8, line 3; claims 1-13	1-12
A	TIRUPPATHI C ET AL: "IMPAIRMENT OF STORE-OPERATED CA ²⁺ ENTRY IN TRPC4-/- MICE INTERFERES WITH INCREASE IN LUNG MICROVASCULAR PERMEABILITY" CIRCULATION RESEARCH, GRUNE AND STRATTON, BALTIMORE, US, vol. 91, no. 1, July 2002 (2002-07), pages 70-76, XP008010300 ISSN: 0009-7330 abstract	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/08313**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

2. Claims Nos.: 4, 10, 11 'partially!
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 03 08313

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 4, 10, 11 'partially!

Present claims 4, 10 and 11 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being a TRP6 inhibitor.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds being antisense TRP6, an antibody against TRP6 or
1-'b-'3-(4-methoxyphenyl)propoxy!-4-methoxyphenethyl!-1H-imidazole.HCl.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/08313

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
NO 9725063	A	17-07-1997	AT 245448 T 15-08-2003
			AU 732012 B2 12-04-2001
			AU 1362897 A 01-08-1997
			BR 9710942 A 24-10-2000
			CA 2242866 A1 17-07-1997
			WO 9725063 A1 17-07-1997
			CN 1213315 A ,B 07-04-1999
			DE 69723670 D1 28-08-2003
			EP 0873137 A1 28-10-1998
			JP 2000513708 T 17-10-2000
			PL 327921 A1 04-01-1999
			TR 9801359 T2 21-10-1998
			WO 0248342
AU 2022802 A 24-06-2002			
WO 0248342 A2 20-06-2002			
WO 0004929	A	03-02-2000	AU 5229199 A 14-02-2000
			WO 0004929 A1 03-02-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
// C 0 7 D 233/60	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/09	C 0 7 D 233/60	

(81) 指定国 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, HU, I
E, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, D
M, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NI, NO
, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SE, SG, SK, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ソー・ウェイ・リ

英国アールエイチ 1 2 ・ 5 エイビー、ウエスト・サセックス、ホーシャム、ウィンブルハースト・
ロード、ノバルティス・ホーシャム・リサーチ・センター

(72) 発明者 クリストファー・テレンス・ポル

英国アールエイチ 1 2 ・ 5 エイビー、ウエスト・サセックス、ホーシャム、ウィンブルハースト・
ロード、ノバルティス・ホーシャム・リサーチ・センター

(72) 発明者 ジョン・ウエストウィック

英国アールエイチ 1 2 ・ 5 エイビー、ウエスト・サセックス、ホーシャム、ウィンブルハースト・
ロード、ノバルティス・ホーシャム・リサーチ・センター

(72) 発明者 マーティン・ゴズリング

英国アールエイチ 1 2 ・ 5 エイビー、ウエスト・サセックス、ホーシャム、ウィンブルハースト・
ロード、ノバルティス・ホーシャム・リサーチ・センター

F ターム(参考) 2G045 CA11 CB01 FB03 GC15

4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA05 CA06 DA03 EA04 FA02 FA10

GA11 GA18 HA14

4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ79 QQ89 QR33 QR59 QR66 QR69 QR77

QR80 QS12 QS24 QS28 QS36 QX02

4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 MA52 MA59 NA14 ZA342 ZA422 ZA592

ZA682 ZA962 ZB112 ZB132 ZB152 ZB212 ZC502

4C085 AA13 BB11 CC03 EE01 GG08 GG10

4C086 AA01 AA02 BC38 EA16 MA01 MA04 MA52 MA59 NA14 ZA34

ZA42 ZA59 ZA68 ZA96 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZC50