

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年10月12日 (12.10.2006)

PCT

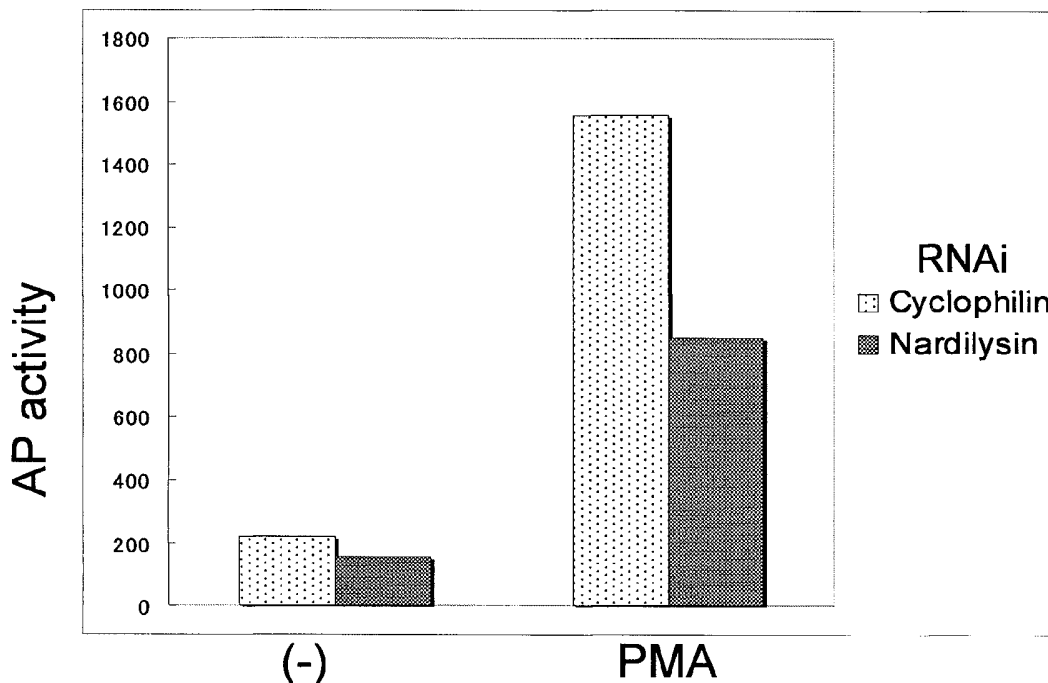
(10) 国際公開番号
WO 2006/106599 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/303687
- (22) 国際出願日: 2006年2月28日 (28.02.2006)
- (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2005-055495 2005年3月1日 (01.03.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP];
〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1
Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西英一郎 (NISHI,
Eiichiro) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田
近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内
Kyoto (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,

[続葉有]

(54) Title: PHARMACEUTICAL FOR PREVENTING AND/OR TREATING DISEASE CAUSED BY ABNORMAL ENHANCEMENT OF EXTRACELLULAR DOMAIN SHEDDING

(54) 発明の名称: 細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬



(57) Abstract: A pharmaceutical for preventing and/or treating a disease caused by the abnormal enhancement of extracellular domain shedding, containing a nardilysin inhibitor (such as a substance that inhibits the expression of nardilysin by RNAi) as an active ingredient.

[続葉有]



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).

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。

明 細 書

細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患の予防及び／又は治療のための医薬

技術分野

[0001] 本発明は細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患の予防及び／又は治療のための医薬に関し、具体的にはHB-EGF、TNF- α 、TGF- α 、又はアンフィレギュリン(Amphiregulin)等の膜結合型前駆体の細胞外ドメインシェディングを抑制するnardilysin阻害剤を含む医薬に関する。

背景技術

[0002] 細胞外ドメインシェディング(以下、本明細書において「シェディング」ということがある。)とは、膜近傍部における蛋白分解により、膜貫通型蛋白質の細胞外ドメインが不可逆的に切断される現象をいう。細胞外ドメインシェディングは、様々な刺激で誘導されることから、生体内では厳密な制御下におかれ、膜蛋白質の活性調節を介して重要な生理的役割を担うと考えられている。また、一部のサイトカイン(TNF- α 等)や、増殖因子(TGF- α , HB-EGF等)は、シェディングを受けて活性型となることが知られており、生体における炎症の惹起等にシェディングの異常亢進が深く関わっていると考えられている。

[0003] シェディングを司る切断酵素として、これまでに a disintegrin and metalloprotease (ADAM) ファミリー及びmatrix metalloproteinase (MMP)ファミリーに属する分子群が報告されている。その中で、TNF- α の切断酵素として同定されたTACE (TNF- α converting enzyme; ADAM17) (Nature, 385, 729, 1997; Nature, 385, 733, 1997)は、ノックアウトマウス由来の細胞を用いた検討からHB-EGFの膜結合型前駆体を含む広範な膜蛋白質のシェディングに関わっていることが報告されている(Chem. Rev., 102, 4627, 2002)。しかし、TACE等上記の切断酵素の生体におけるシェディングの誘導への関与のメカニズムについては詳しく解明されていない。

[0004] シェディングを受けて活性型となった増殖因子又はサイトカインの生物活性を標的とした治療法については、既に臨床的に適用されている。例えば、大腸癌の治療にE

GF受容体のリガンド(EGF, TGF- α , HB-EGF等)の同受容体への結合を阻害する抗体、肺癌の治療にEGF受容体のリン酸化阻害剤、及び慢性関節リウマチ、クローン病等の治療にTNF- α に対する抗体と可溶性TNF- α 受容体が用いられている。しかし、例えば我が国でいち早く肺癌の治療薬として承認されたEGF受容体のリン酸化阻害剤(商品名イレッサ)は、副作用(間質性肺炎)による死亡例が数多く報告されており、安全性に問題を残している。従って、副作用の少ない治療法としてシェディングの抑制による治療法の開発に期待が持たれている。

[0005] シェディングを標的とする治療法としては、低分子TACE阻害剤の開発が行われているが、現在まで、完成には至っていない。また、多岐にわたるMMP阻害剤の開発も行われており、これらのMMP阻害剤の中でTACEを含むADAM蛋白の活性を抑えるものも少なくない。しかし、悪性腫瘍に対するこれらのMMP阻害剤の臨床治験は、ほぼ全て関節炎様の副作用出現等の問題のため打ち切られており、その中には悪性腫瘍に対しては良好な結果を得られたものの副作用が出現したものが含まれている。

従って、炎症性サイトカイン又は増殖因子の膜結合型前駆体のシェディングを標的とする治療法の確立のために、シェディング誘導の経路上で、TACE又はMMP等に代わる効果的な標的の発見が求められている。

[0006] 一方、メタロエンドペプチダーゼであるnardilysinが精製同定されており、この蛋白質がEGFファミリーの増殖因子である可溶性HB-EGFに特異的に結合し可溶性HB-EGFによる細胞遊走を増強させることが報告されている(EMBO. J., 20, 3342, 2001)。しかし、現在までnardilysinが細胞外ドメインシェディングに関与しているとの報告はない。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らはnardilysinの生理活性を追求する過程で、nardilysinがHB-EGFの膜結

合型前駆体に結合することを新たに見出し、さらにnardilysinが、HB-EGFの膜結合型前駆体のシェディングを増強すること、TACEと会合すること、TACEの活性を増強すること、更にHB-EGF以外のTACEの基質蛋白質(TNF- α 等)の膜結合型前駆体のシェディングをも増強することを見出した。本発明はこれらの知見を基に完成されたものである。

[0009] すなわち本発明は、細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患の予防及び／又は治療のための医薬であつて、nardilysin阻害剤を有効成分として含む医薬を提供する。本発明の好ましい態様によれば、細胞外ドメインシェディングがTACEが関与する細胞外ドメインシェディング又は細胞外ドメインシェディングがHB-EGF、TNF- α 、TGF- α 、又はアンフィレギュリンの膜結合型前駆体の細胞外ドメインシェディングである上記医薬が提供される。

本発明のさらに好ましい態様によれば、細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患が炎症性疾患である上記のいずれかの医薬、nardilysin阻害剤がnardilysinの発現を阻害する物質を含む上記のいずれかの医薬、及び阻害がRNAiによる阻害である該医薬が提供される。

[0010] 本発明の別の観点からは、nardilysin阻害剤の予防及び／又は治療有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患を予防及び／又は治療する方法が提供される。

本発明のさらに別の観点からは、細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患の予防及び／又は治療のための医薬の製造のための、nardilysin阻害剤の使用が提供される。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]nardilysin及びTACEによるHB-EGFの膜結合型前駆体のシェディングを示すウェスタンブロットである。

[図2]TACE及び／又はnardilysin存在下でのHB-EGFの膜結合型前駆体の膜近傍切断部位ペプチド鎖の質量分析スペクトルである。

[図3]nardilysinによるTGF- α およびアンフィレギュリンの膜結合型前駆体のシェディングを示すウェスタンブロットである。

[図4]nardilysin及びTACEによるTNF- α の膜結合型前駆体のシェディングを示すELISA測定結果である。

[図5]シェディング誘導因子による、細胞表面におけるnardilysin発現の増加を示すウェスタンブロットである。

[図6]シェディング誘導因子による、nardilysin-TACE複合体形成の増加を示すウェスタンブロットである。

[図7]nardilysinに対するsiRNAによるHB-EGFの膜結合型前駆体のシェディングの抑制を示すグラフである。

[図8]抗nardilysinポリクローナル抗体による、HB-EGFシェディング誘導の抑制を示すグラフである。

[図9]nardilysin由来ペプチド鎖による、HB-EGFシェディング誘導の抑制を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患としては、膜結合型前駆体がシェディングを受けて活性型になるサイトカインや増殖因子等の増加が関与する疾患等が挙げられる。例えば、EGFファミリーのメンバーのひとつであるヘパリン結合性EGF様増殖因子(HB-EGF)は、肝臓癌、膵臓癌、乳癌等で発現が上昇していること、同分子を強発現させると正常細胞の癌化が誘導されること等が知られている(Growth Factors, 22, 253, 2004参照)。本明細書において「細胞外ドメインシェディングの異常亢進」との用語は、このように発現量が増加した膜結合型前駆体の存在により、細胞外ドメインシェディングが増加する状態を含む。なお、HB-EGFの膜結合型前駆体のシェディングの抑制によっては、心肥大が抑制されたとの報告もある(Nat. Med., 8, 35, 2002 参照)。

[0013] TACEが関与する細胞外ドメインシェディングとしては、増殖因子であるTNF- α 、TGF- α 、HB-EGF、アンフィレギュリン、NRG-a2C、及びフラクタルカイン(Fractalkine)の膜結合型前駆体:受容体として、R75 TNF-a RII、R55 TNF-a R、CD30、IL-6Ra、IL-1R II、GHR、ErbB4、及びNotch;接着分子としてL-セレクトリン;その他bAPP(b β -アミロイド前駆体)のシェディング等が挙げられる(Chem. Rev., 102, 4627, 2002)。従

って、TACEが関与する細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患としては、これらのシェディングの異常亢進が関与する、慢性間接リウマチ、クローン病等の炎症性疾患、肝臓癌、膵臓癌、乳癌等の腫瘍、動脈硬化、肥大型心筋症、アルツハイマー病等を挙げることができる。

[0014] nardilysin (N-arginine dibasic convertase; NRDC) はM16ファミリーに属するメタロプロテアーゼであり、そのプロテアーゼ活性の単離精製(J. Biol. Chem., 269, 2056, 1994)、遺伝子配列(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6078, 1994)が既に報告されている。また、本発明者らは上述のように可溶性HB-EGFとの結合活性等を報告している(EMBO. J., 20, 3342, 2001)。nardilysinと最もホモロジーの高い蛋白質は同じくM16ファミリーに属するインスリン分解酵素であるが、同ファミリー間で保存された酵素ドメイン内に高度酸性ドメインが挿入されていることが、nardilysinの大きな特徴である。nardilysinの発現は広範にわたるが、成体では精巣、骨格筋、心臓などで特に高い発現を認める。本発明者らは、精製した組み換えnardilysinを細胞に加えた実験及び発現ベクターを用いて細胞にnardilysinを発現させる実験の双方でnardilysinがHB-EGFの膜結合型前駆体のシェディングを亢進させることを見出し、また別の実験により酵素活性のないnardilysin変異体にもシェディングを亢進させる活性があることなどを確認した。

[0015] さらに、本発明者らは、後述の実施例で示すように、nardilysinはTACEのシェディングに対する効果を増強させることを見出した(例1)。その際、TACEに対する抗体を用いた免疫沈降法を用いた本発明者らの研究に基づくと、nardilysin、TACE、及びHB-EGFは複合体を形成しており、さらに精製蛋白質を用いたプルダウンアッセイによる本発明者らの研究に基づくと、nardilysin及びTACEは直接結合している。

[0016] さらに、後述の実施例における下記の結果：

- nardilysinの組み換え蛋白を加えると、TACEのペプチド切断活性が上昇する(例2)。
- nardilysinは、HB-EGFのみならずTACEのその他の基質(TGF- α 、アンフィレギュリン、TNF- α など)のシェディングも増強する(例3、4)。
- シェディング誘導因子により、nardilysinの細胞表面での発現が上昇する(例5)。

- シェディング誘導因子により、nardilysinとTACEの複合体形成が増加する(例6)。
- nardilysinの発現を抑制すると、HB-EGFのシェディングの誘導も抑制される(例7)。

から、ホルボールエステルや炎症性サイトカインなどのシェディング誘導因子によって細胞が活性化されると

- (1)細胞質から細胞表面へnardilysinが移動し、
- (2)細胞表面のnardilysin がTACEと結合することによって、
- (3)TACEが活性化され、
- (4)膜蛋白質の細胞外ドメインシェディングが増強されると考えられる。

同様にnardilysinはADAMファミリーに属するTACE以外の酵素等のシェディングに対する効果を増強させている可能性も考えられる。

[0017] 本発明で用いられるnardilysin阻害剤としては、nardilysinの発現を阻害する物質又はnardilysinに作用してnardilysinの活性及び機能を阻害する物質のほかに、nardilysin及びTACEの会合を阻害する物質、nardilysin及びシェディングを受ける膜結合型蛋白質の結合を阻害する物質又はnardilysin、TACE、及びシェディングを受ける膜結合型蛋白質の複合体の形成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。

nardilysin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。nardilysinに作用してnardilysin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。nardilysin及びTACEの会合を阻害する物質、nardilysin及びシェディングを受ける膜結合型蛋白質の結合を阻害する物質又はnardilysin、TACE、及びシェディングを受ける膜結合型蛋白質の複合体の形成を阻害する物質としては低分子化合物、抗体、又はペプチドを用いることができる。

[0018] 抗体としては、例えば、全長のnardilysin又は後述のnardilysinの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nardilysinとしては、例えば組み替えヒトnardilysin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、nardilysinの部分配列(例えば、配列表の配列番号2に

記載のアミノ酸配列の472番目から492番目までのアミノ酸配列)を有するペプチド等が挙げられる。

- [0019] RNAi (RNA interference: 遺伝子干渉)と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意味する。RNAiによりnardilysin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。
- [0020] siRNAとはshort interfering RNAの略称であり、約21～23塩基の長さ以下の二本鎖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、nardilysin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。
- [0021] siRNAの塩基配列と、nardilysin遺伝子の塩基配列との間で相同性のある領域は、nardilysin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、nardilysin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、nardilysin遺伝子の3'末端付近の配列でもよい。
- [0022] RNAiによりnardilysin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、nardilysin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。
- [0023] RNAiによりnardilysin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。

- [0024] RNAiによりnardilysin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、nardilysin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。
- [0025] RNAiによりnardilysin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。
- [0026] 本発明の医薬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、腔内投与、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。本発明の医薬は徐放剤の製剤形態であってもよい。本発明の医薬は、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、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、キ

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。

[0027] 経口用の固形製剤形態の本発明の医薬は、例えば、有効成分であるnardilysin阻害剤に賦形剤を加え、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医薬は、有効成分であるnardilysin阻害剤に矯味剤、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。

[0028] 本発明の薬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。

[0029] 有効成分がRNAiによりnardilysinの発現を阻害する物質である場合には、本発明の医薬は非ウイルスベクター又はウイルスベクターの形態であってもよい。このような投与形態については、当該分野において公知であり、例えば、別冊実験医学「遺伝子治療の基礎技術」羊土社、1996;別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997等を参照することができる。

非ウイルスベクター形態としては、リポソームを用いて核酸分子を導入する方法(リポソーム法、HVJ-リポソーム法、カチオニックリポソーム法、リポフェクション法、リポフェクトアミン法等)、マイクロインジェクション法、遺伝子銃(Gene Gun)でキャリア(金属粒子)とともに核酸分子を細胞に移入する方法等を利用した形態であればよい。発現ベクターとしては、例えば、pCAGGS、pBJ-CMV、pcDNA3.1、pZeoSV(Invitrogen社又はStratagene社から入手可能)等が挙げられる。

[0030] ウイルスベクター形態としては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルス

ベクターを利用することができる。無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス、SV40等のDNAウイルス又はRNAウイルスに、RNAiによりnardilysinの発現を阻害する物質を発現するDNAを導入し、細胞又は組織に組換えウイルスを感染させることによって細胞又は組織内に遺伝子を導入することができる。

RNAiによりnardilysinの発現を阻害する物質は、生体の器官や組織等に直接注入してもよい。

[0031] 本発明の医薬の投与量は、使用目的、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、性別、既往歴、又は有効成分であるRNAiによりnardilysinの発現を阻害す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。本発明の医薬の投与量は、有効成分がRNAiによりnardilysinの発現を阻害する物質である場合、例えば、有効成分量として、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。

[0032] 本発明の医薬の投与頻度は、例えば、一日一回～数ヶ月に1回であればよい。RNAiによりnardilysin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。

実施例

[0033] 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。なお、実施例においてnardilysinは、配列表の配列番号1のcDNAの283位(発現体のアミノ酸配列で配列表の配列番号2の50位のメチオニン)から開始するように発現ベクターを作製した。

(例1) nardilysin及びTACEによるHB-EGFの膜結合型前駆体のシェディング
COS7細胞に、C末端にV5タグを付加したnardilysin、TACE、及びN末端にHA(ヘマグルチニン)タグを付加したHB-EGFの膜結合型前駆体の発現ベクターを図1に示した組み合わせでトランスフェクションした。20時間後に培地をBSA (0.1%) 含有DMEM

に交換し、4時間後に培地、及び細胞溶解液を回収(細胞溶解バッファー; 10mM Tris (pH7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40、蛋白分解酵素阻害剤カクテル)した。回収した培地中に分泌された分泌型HB-EGFはヘパリンアガロースビーズにて部分精製後、SDS-PAGEにて展開し、ニトロセルロース膜に転写して、抗HAタグ抗体によるウェスタンブロットを行った。細胞溶解液も同様に抗V5タグ抗体、抗TACE抗体にてウェスタンブロットを行った。結果を図1に示す。図1中、上から細胞溶解液の抗V5抗体ブロット(nardilysin)、細胞溶解液の抗TACE抗体ブロット(TACE)、培地の抗HA抗体ブロット(HB-EGF)を示す。

図1に示された結果から、nardilysinとTACEを発現させた細胞の培地中に分泌された可溶性HB-EGFが、nardilysinのみ又はTACEのみを発現させた細胞の培地中に分泌された可溶性HB-EGFと比較して、顕著に増加していることがわかる。

[0034] (例2) nardilysin及びTACEによるHB-EGFの膜結合型前駆体の膜近傍切断部位に相当するペプチド鎖の切断

HB-EGFの膜結合型前駆体の膜近傍切断部位に相当する14アミノ酸からなるペプチド鎖(GLSLPVENRLTYD:配列表の配列番号3) (0.5 mM)を、反応バッファーのみ(25 mM Tris (pH 9), 2 μ M ZnCl₂) (図2上段; (-))、組み換えnardilysin (100 μ g/ml) (データは示さず)、組み換えTACE (25 μ g/ml) (図2中段; TACE)、組み換えnardilysin (100 μ g/ml) 及び組み換えTACE (25 μ g/ml) (図2下段; TACE+nardilysin)と8時間、37°Cで反応させた後、ペプチド鎖の切断を質量分析(MALDI-TOF)にて解析した。結果を図2に示す。

nardilysin単独では、反応バッファーのみの結果と同様の結果であり、有意なペプチドの切断は認められなかった。TACE単独では既に報告されている部位での切断を認め、切断によって生じた2種類のペプチド鎖(図2中矢印で表示)が検出された。TACEとnardilysinをともに加えたサンプルでは、TACEでの切断部位と同じ部位でのペプチドの切断が顕著に増加した。

[0035] (例3) TGF- α 及びアンフィレギュリンの膜結合型前駆体のnardilysin存在下でのシェディング

N末端にHAタグを付加したTGF- α 、アンフィレギュリンの発現ベクターをそれぞれ

COS7細胞にトランスフェクションして組み換えnardilysinとインキュベーションを行い、これらの膜結合型前駆体の細胞外ドメインシェディングにより生じた可溶性蛋白質を、TGF- α は抗HA抗体による免疫沈降で、アンフィレギュリンはヘパリンアガロースビーズにて部分精製後、例1と同様の方法で抗HAタグ抗体によるウェスタンブロットを行った。結果を図3に示す。図3からわかるように、1nM以上の組み換えnardilysinがこれらの膜結合型増殖因子のシェディングを明らかに誘導した。

[0036] (例4) nardilysin及びTACEによるTNF- α の膜結合型前駆体(pro TNF- α)のシェディング

COS7細胞に後述の発現ベクターをトランスフェクションし、20時間後に培地をBSA (0.1%) 含有DMEMに交換して、4時間後に培地を回収し、pro TNF- α の切断にて生じた培地中の可溶性TNF- α 濃度をELISAにて測定した。結果を図4に示す。図中、菱形で示すControlはpro TNF- α の発現ベクターのみ;四角で示すNRDcはpro TNF- α 及びnardilysinの発現ベクター;三角で示すTACEはpro TNF- α 及びTACEの発現ベクター;丸で示すTACE+NRDcはpro TNF- α 、nardilysin、及びTACEの発現ベクターをトランスフェクションしたCOS7細胞における結果である。

HB-EGFと同様に、nardilysinとTACEを共に発現させた細胞の培地中の可溶性TNF- α が、nardilysinのみ又はTACEのみを発現させた細胞の培地中の可溶性TNF- α と比較して、顕著に多かった。

[0037] (例5) ホルボールエステル(シェディング誘導因子)による、細胞表面におけるnardilysin発現の増加

RAW264.7(マウスマクロファージ系細胞株)をホルボールエステルなし(-)、あり(PMA)にて5分あるいは30分間刺激後、細胞表面をビオチン化し、細胞溶解液を回収した。同溶解液を抗nardilysin抗体で免疫沈降し、ストレプトアビジン(図5上段: avidin)、抗nardilysin抗体(図5下段: NRDc)でウェスタンブロットを行った。結果を図5に示す。ホルボールエステル刺激により、nardilysinの総量(図5下段)に著変はないが、細胞表面におけるnardilysinの発現(図5上段)が明らかに増加していることがわかる。

[0038] (例6) ホルボールエステルによる、nardilysin-TACE複合体形成の増加

nardilysinとTACEを一過性に発現させたHEK293T細胞(図6左パネル)、およびMK

N45細胞(胃癌細胞株:図6右パネル)を2時間ホルボールエステルなし(-)、あり(PMA)で刺激後、細胞溶解液を回収した。同溶解液を抗TACE抗体で免疫沈降し、抗nardilysin抗体(上段:NRDc)、抗TACE抗体(中段)でウェスタンブロットを行った。下段は、細胞溶解液の抗nardilysin抗体によるウェスタンブロットを示す。どちらの細胞においても、ホルボールエステル刺激にてnardilysin、TACEの総量は変化していないが、抗TACE抗体にて共沈するnardilysinの量、即ちnardilysin-TACE複合体の量が増加していることがわかる。

[0039] (例7)nardilysinの発現阻害によるHB-EGFの膜結合型前駆体のシェディングの抑制
アルカリフォスファターゼ(AP)のタグをN末端に付加したHB-EGF前駆体を安定に発現している293T細胞に、nardilysinに対するsiRNAのカクテル(Dharmacon, siGENOME SMARTpool)をトランスフェクションした。対照として、cyclophilinに対するsiRNAをトランスフェクションした293T細胞を同様に調製した。72時間後に培地をBSA(0.1%)含有DMEMに交換し、1時間、ホルボールエステル(PMA:100 nM)で刺激し、培地中のAP活性(HB-EGFのシェディングのレベルに比例する)を測定した。結果を図7に示す。図7からわかるように、無刺激の対照と比較して、PMAでAP活性は明らかに増加しているが、nardilysinに対するsiRNAをトランスフェクションした細胞はcyclophilinに対するsiRNAをトランスフェクションした細胞と比べて、増加の程度が低下した。同様の処理をした細胞でウェスタンブロットを行ったところ、siRNAによりnardilysinの蛋白の発現は30-40%低下したことが確認された。これらの結果から、nardilysinの発現抑制により、HB-EGFの膜結合型前駆体のシェディングを抑制できることが示された。

[0040] (例8)抗nardilysinポリクローナル抗体による、HB-EGFシェディング誘導の抑制
N末端にアルカリフォスファターゼ(AP)タグを付加したHB-EGFの膜結合型前駆体を安定発現させたHEK293T細胞を、コントロールマウスIgG(control IgG; 10 μ g/ml)あるいはマウス抗nardilysinポリクローナル抗体(anti-NRDc (poly); 10 μ g/ml)存在下に、ホルボールエステルなし(黒)、あり(白)で2時間刺激後、培地を回収しAP活性を測定した。AP活性は培地中に放出されたHB-EGF量、すなわち膜結合型前駆体のシェディングの量と対応する。結果を図8に示す。データは7回の独立した実験の平均値プラス標準誤差で表示している。

図8より、抗nardilysin抗体はホルボールエステルによるHB-EGFのシェディング誘導を有意に抑制していることがわかる。

[0041] (例9)nardilysin由来ペプチド鎖による、HB-EGFシェディング誘導の抑制

N末端にアルカリフォスファターゼ(AP)タグを付加したHB-EGFの膜結合型前駆体を安定発現させたHEK293T細胞の培地中に、ストレプトアビジンアガロースビーズ単独(-)、またはヒトnardilysinの部分配列(配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列の472番目から492番目までのアミノ酸配列)を有するペプチド鎖(peptide 41; SGSG SILSFLRKKCWALALFGNGE:配列表の配列番号4)のN末端をビオチン修飾したものを上記ビーズに結合させたものを加え、更にホルボールエステルなし(黒)、または、あり(白)で2時間刺激後、培地を回収しAP活性を測定した。結果を図9に示す。データは類似した結果を得た4回の独立した実験のうち、1回分を平均値プラス標準偏差(n=4)で表示している。ペプチド鎖(41)はホルボールエステルによるHB-EGFのシェディング誘導を有意に抑制している。なお、ペプチド鎖(41)は、ヒトnardilysin全長をカバーする92種類のペプチド鎖につき、スクリーニングを行い、最もHB-EGFのシェディング抑制効果の強かったもののひとつである。

産業上の利用可能性

[0042] 本発明により細胞外ドメインシェディングの異常亢進に起因する疾患の予防及び／又は治療のための医薬が提供される。本医薬は炎症性疾患等の予防及び／又は治療のための医薬として有用である。

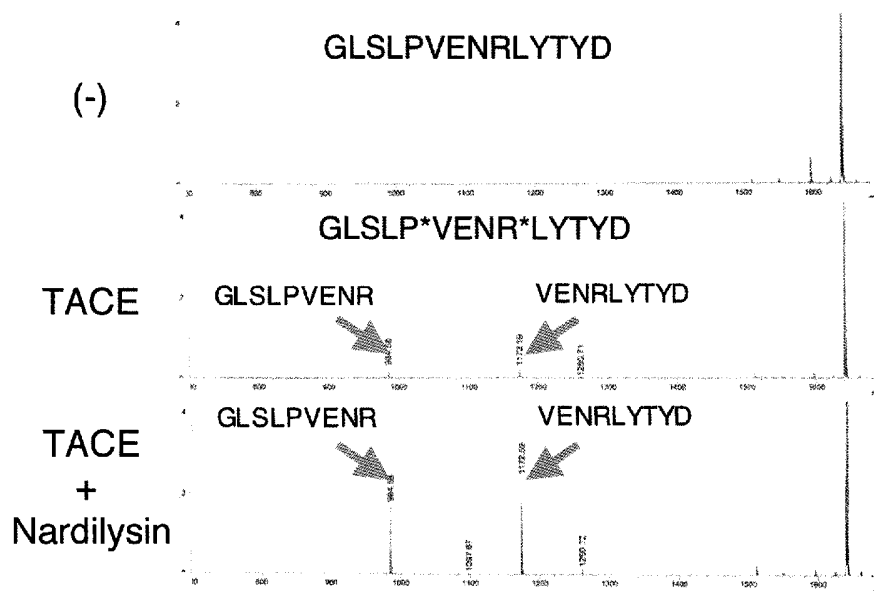
請求の範囲

- [1] 細胞外ドメインシエディングの異常亢進に起因する疾患の予防及び／又は治療のための医薬であって、nardilysin阻害剤を有効成分として含む医薬。
- [2] 細胞外ドメインシエディングが、TACEが関与する細胞外ドメインシエディングである請求項1に記載の医薬。
- [3] 細胞外ドメインシエディングが、HB-EGF、TNF- α 、TGF- α 、又はアンフィレギュリンの膜結合型前駆体の細胞外ドメインシエディングである請求項1又は2に記載の医薬。
- [4] 細胞外ドメインシエディングの異常亢進に起因する疾患が炎症性疾患である請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬。
- [5] nardilysin阻害剤がnardilysinの発現を阻害する物質を含む請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬。
- [6] 阻害がRNAiによる阻害である請求項5に記載の医薬。
- [7] nardilysin阻害剤が、全長のnardilysin又はnardilysinの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含む請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬。
- [8] nardilysin阻害剤が、nardilysinの部分配列を有するペプチドを含む請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬。

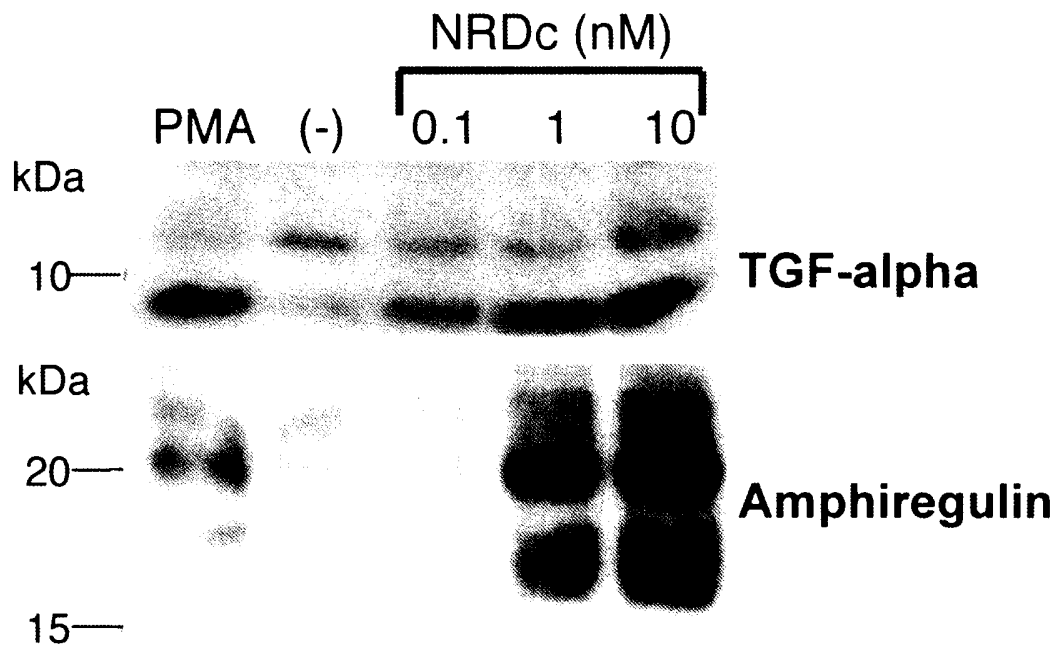
[図1]



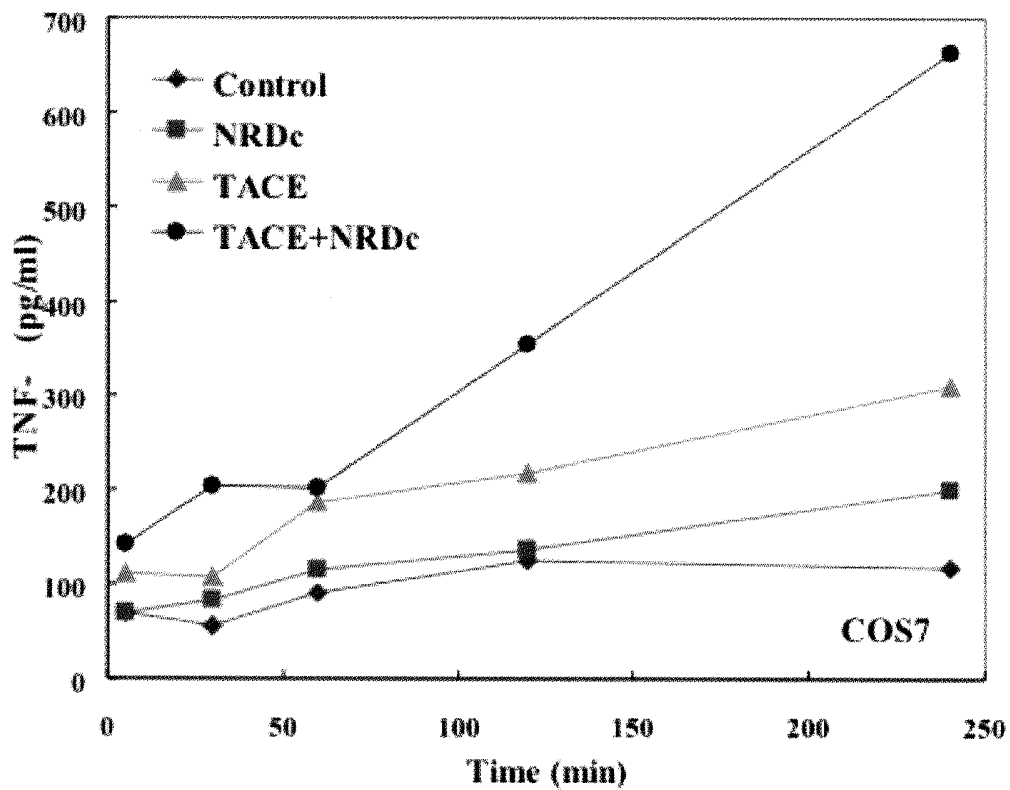
[図2]



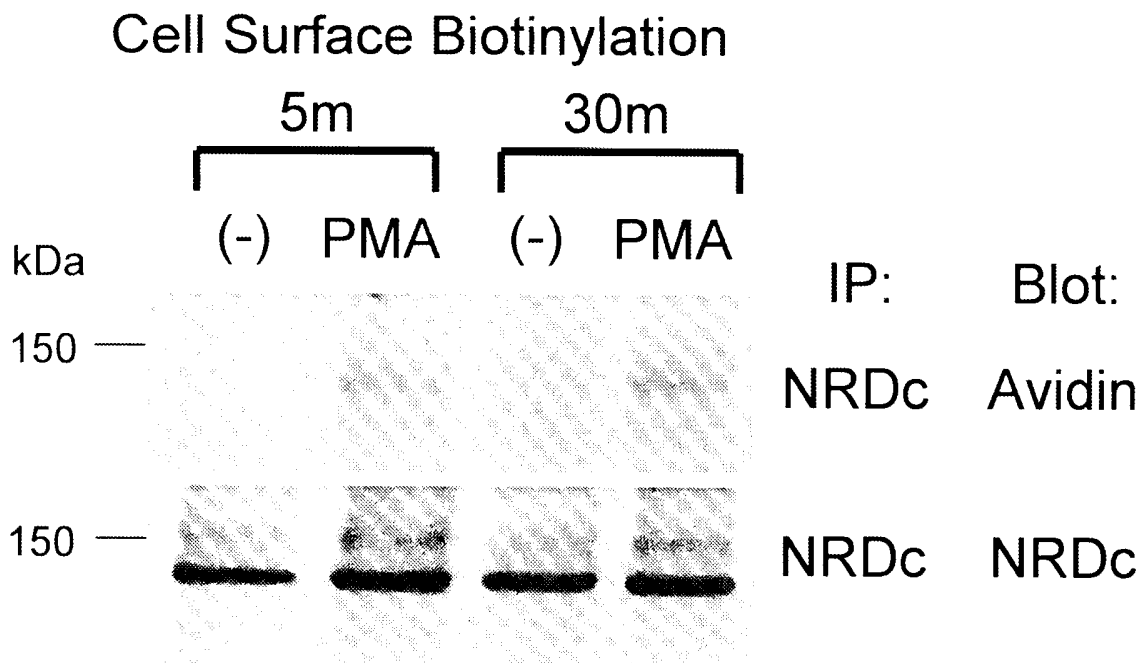
[図3]



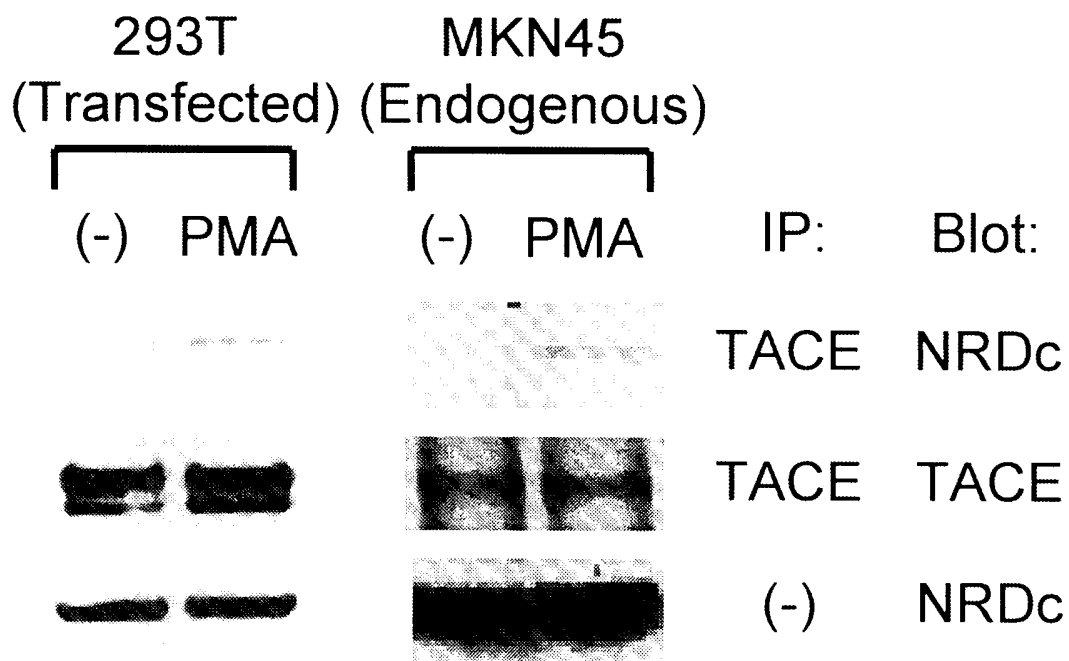
[図4]



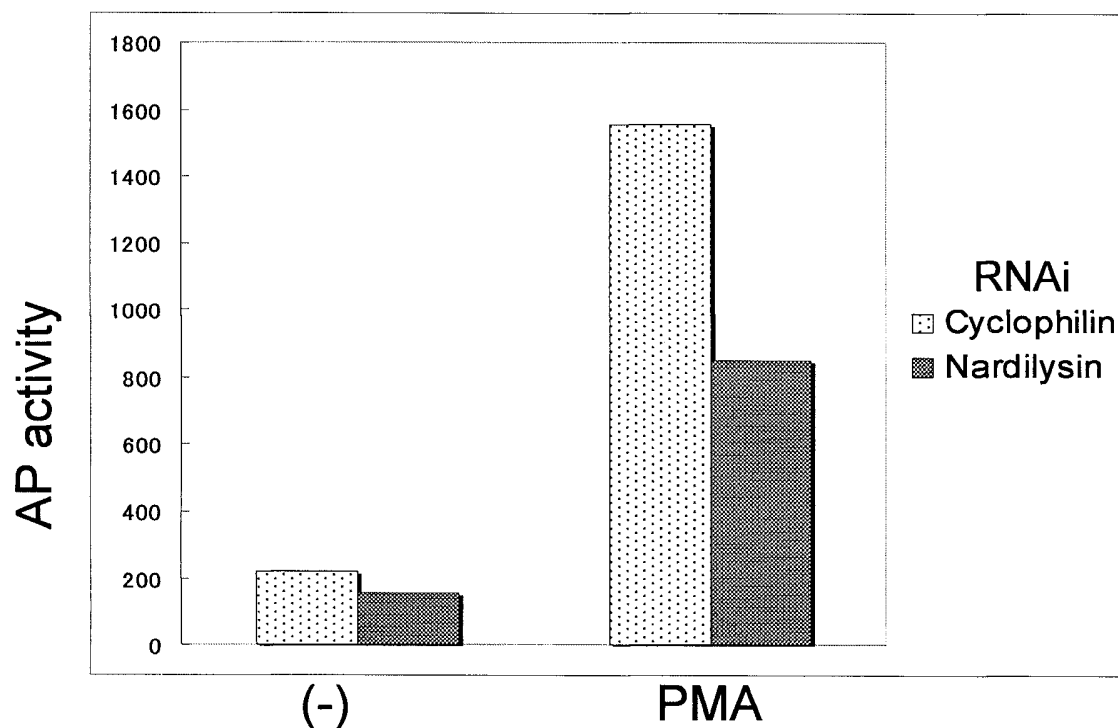
[図5]



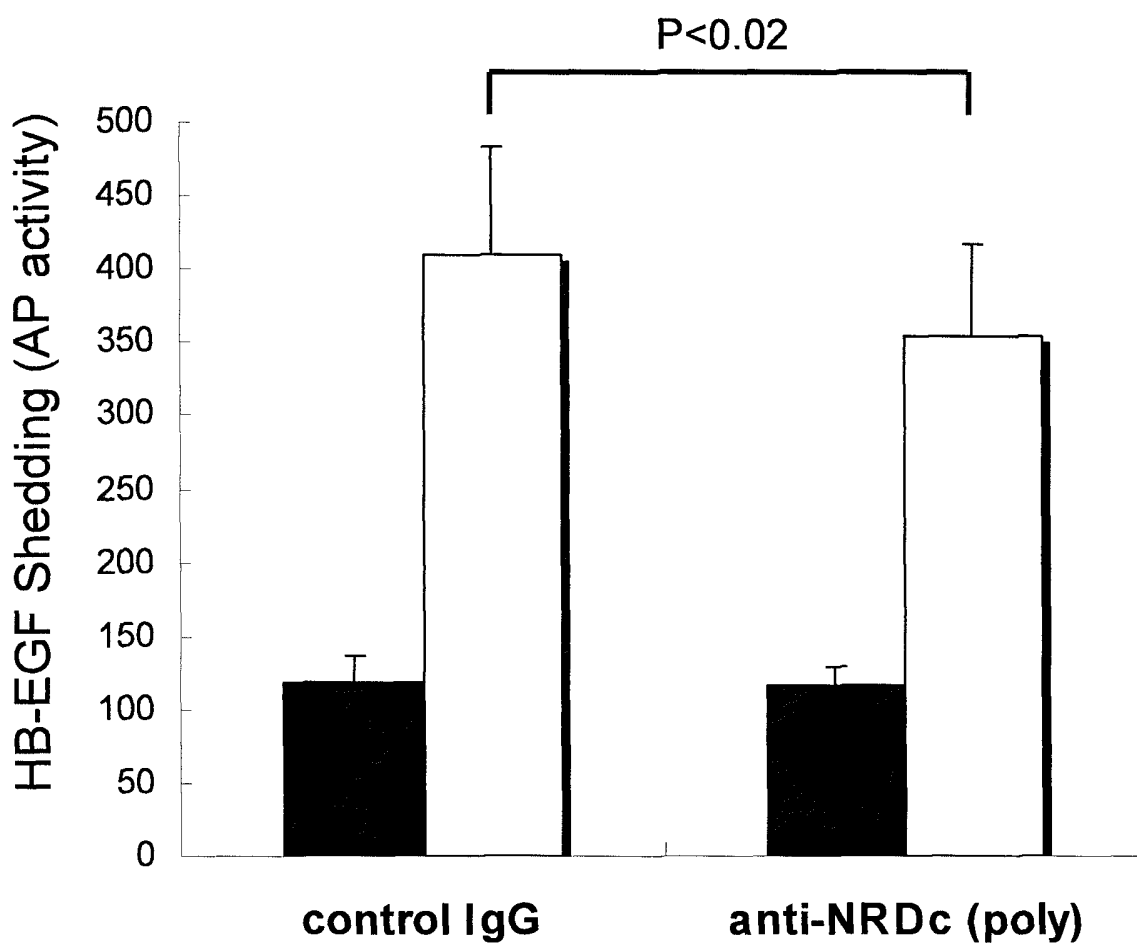
[図6]



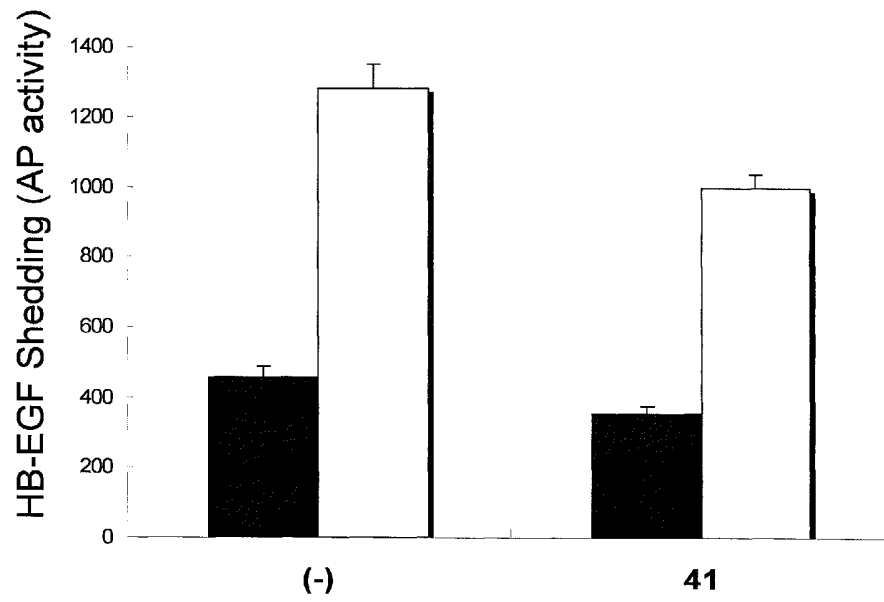
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01), **A61K38/00**(2006.01), **A61K39/395**(2006.01), **A61K48/00**(2006.01), **A61P9/00**(2006.01), **A61P9/10**(2006.01), **A61P19/02**(2006.01), **A61P25/28**(2006.01), **A61P29/00**(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **A61P43/00**(2006.01)

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)

A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P9/00, A61P9/10, A61P19/02, A61P25/28, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00

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), BIOTECHABS (STN), CA (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NISHI, E. <i>et al.</i> , The role of N-arginine dibasic convertase, a novel specific receptor for HB-EGF, in prostate cancer. Proceedings of the American Association for cancer Res., 2002, 43, pages 829 to 830, full text	1-3
Y		4-8
Y	NISHI, E. <i>et al.</i> , N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration. EMBO J., 2001, 20(13), pages 3342 to 3350, page 3345, left column, line 1 to page 3346, left column, line 3, Figs. 6, 7	4-8
A		1-3

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
14 April, 2006 (14.04.06)

Date of mailing of the international search report
25 April, 2006 (25.04.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303687

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	HOSPITAL, V. <i>et al.</i> , Nardilysin, a basic residues specific metallopeptidase that mediates cell migration and proliferation. <i>Protein and Peptide letters</i> , 2004, 11(5), pages 501 to 508, page 506, line 23 to page 506, line 3, Abstract	4-8 1-3
A	ONGUSAHA, P.P. <i>et al.</i> , HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. <i>Cancer Res.</i> , 2004. 64, pages 5283 to 5290, page 5288, left column, line 21 to right column, line 18, Fig. 6	1-8
A	ARRIBAS, J. <i>et al.</i> , Protein ectodomain shedding. <i>Chem.Rev.</i> , 2002, 102, pages 4627 to 4637, Table 1	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303687

(Extent of Search)

Claims 1-5 are directed to those containing as an active ingredient a compound defined by a desired property that the active ingredient is a nardilysin inhibitor or a substance that inhibits the expression of nardilysin, therefore, the above-mentioned claims can include wide and a variety of compounds.

However, according to the description, the compounds specifically used are only RNAi, polyclonal antibodies and peptides, and there is no description or suggestion of other compounds. Further, by the description of a nardilysin inhibitor and a substance that inhibits the expression of nardilysin, the scope of the compounds having such a property cannot be specified even by considering the technical knowledge at the time of application.

Such being the case, by the description, the person skilled in the art cannot fully understand what the inventions of claims 1-5 are. In addition, the inventions of such claims do not appear to be fully supported by the description (PCT Articles 5 and 6).

It is difficult to search all the claims completely because the claims 1-5 are those as described above. Accordingly, search was made only within the scope in which the active ingredient is any of RNAi, polyclonal antibodies and peptides specifically described.

<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), A61K38/00 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P9/00 (2006.01), A61P9/10 (2006.01), A61P19/02 (2006.01), A61P25/28 (2006.01), A61P29/00 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), A61P43/00 (2006.01)</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 38/00, A61K 39/395, A61K 45/00, A61K 48/00, A61P 9/00, A61P 9/10, A61P 19/02, A61P 25/28, A61P 29/00, A61P 35/00, A61P 43/00</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), BIOTECHABS (STN), CA (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)</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 Y</td> <td>NISHI, E., <i>et al.</i>, The role of N-arginine dibasic convertase, a novel specific receptor for HB-EGF, in prostate cancer. Proceedings of the American Association for cancer Res., 2002, 43, page 829 to 830, 全文</td> <td>1-3 4-8</td> </tr> <tr> <td>Y A</td> <td>NISHI, E., <i>et al.</i>, N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration. EMBO J., 2001, 20(13), page 3342 to 3350, 第3345頁左欄第1行-第3346頁左欄第3行, Fig.6, Fig.7</td> <td>4-8 1-3</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 Y	NISHI, E., <i>et al.</i> , The role of N-arginine dibasic convertase, a novel specific receptor for HB-EGF, in prostate cancer. Proceedings of the American Association for cancer Res., 2002, 43, page 829 to 830, 全文	1-3 4-8	Y A	NISHI, E., <i>et al.</i> , N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration. EMBO J., 2001, 20(13), page 3342 to 3350, 第3345頁左欄第1行-第3346頁左欄第3行, Fig.6, Fig.7	4-8 1-3	
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 Y	NISHI, E., <i>et al.</i> , The role of N-arginine dibasic convertase, a novel specific receptor for HB-EGF, in prostate cancer. Proceedings of the American Association for cancer Res., 2002, 43, page 829 to 830, 全文	1-3 4-8										
Y A	NISHI, E., <i>et al.</i> , N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration. EMBO J., 2001, 20(13), page 3342 to 3350, 第3345頁左欄第1行-第3346頁左欄第3行, Fig.6, Fig.7	4-8 1-3										
<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>14.04.2006</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>25.04.2006</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP)</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>川口 裕美子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>	<table border="1"> <tr> <td>4C</td> <td>3757</td> </tr> </table>	4C	3757								
4C	3757											

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
Y A	HOSPITAL, V., <i>et al.</i> , Nardilysin, a basic residues specific metallopeptidase that mediates cell migration and proliferation. <i>Protein and Peptide letters</i> , 2004, 11(5), page 501 to 508, 第 506 頁第 23 行－第 506 頁第 3 行, Abstract	4－8 1－3
A	ONGUSAHA, P.P., <i>et al.</i> , HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. <i>Cancer Res.</i> , 2004. 64, page 5283 to 5290, 第 5288 頁左欄第 21 行－右欄 18 行, Fig.6	1－8
A	ARRIBAS, J., <i>et al.</i> , Protein ectodomain shedding. <i>Chem. Rev.</i> , 2002, 102, page 4627 to 4637, Table 1	1－8

【調査の対象について】

請求の範囲1-5は、有効成分を **nardilysin** 阻害剤又は **nardilysin** の発現を阻害する物質という所望の性質により定義された化合物を有効成分とするものであるため、上記請求の範囲には広範且つ多彩な化合物が含有されうる。

しかしながら、明細書の記載によれば、具体的に用いられている化合物は、**RNAi**、ポリクローナル抗体及びペプチドのみであって、その他の化合物については何ら記載も示唆もされていない。また、**nardilysin** 阻害剤及び **nardilysin** の発現を阻害する物質という記載によっては、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できない。

してみれば、かかる記載によっては請求の範囲1-5に係る発明がいかなるものであるのかを当業者が十分に把握することができず、また、これらの請求の範囲に係る発明が明細書により十分な裏付けなされているものであるということができない（PCT5条及び6条）。

そして、請求の範囲1-5の記載が上記のようなものであって、すべての範囲について完全に調査することは困難であるから、有効成分を、具体的に記載された **RNAi**、ポリクローナル抗体及びペプチドとする範囲内についてのみ調査を行った。