(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2004-508553
(P2004-508553A)
(43)公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51)Int.Cl.[7]	F I	テーマコード（参考）
G01N 33/53	G01N 33/53 D	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 18 頁）

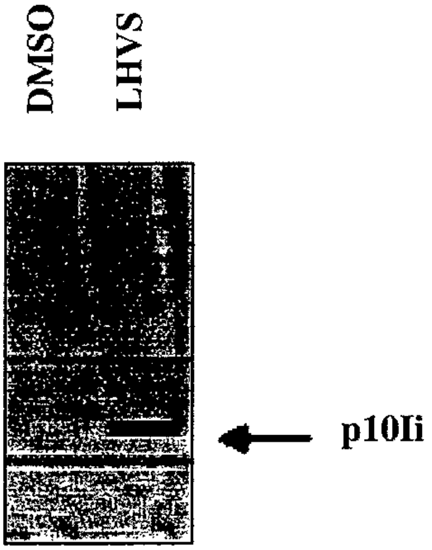
(21)出願番号	特願2002-524698(P2002-524698)	(71)出願人	598093026 オーソーマクニール・フアーマシユーチカル・インコーポレーテツド アメリカ合衆国ニユージヤージイ州０８８６９－０６０２ラリタン・ユーエスルートナンバー２０２
(86)(22)出願日	平成13年8月24日(2001.8.24)		
(85)翻訳文提出日	平成15年3月5日(2003.3.5)		
(86)国際出願番号	PCT/US2001/026373		
(87)国際公開番号	WO2002/021129		
(87)国際公開日	平成14年3月14日(2002.3.14)		
(31)優先権主張番号	60/230,484	(74)代理人	100060782 弁理士　小田島　平吉
(32)優先日	平成12年9月6日(2000.9.6)		
(33)優先権主張国	米国(US)	(72)発明者	サーモンド，ロビン アメリカ合衆国カリフオルニア州９２１１５サンデイエゴ・コンスタンスドライブ４６５４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カテプシンＳインヒビターの影響のモニタリング方法

(57)【要約】
本発明は、投薬された被験体の血液中のインバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物、とりわけｐ１０　Ｉｉフラグメントの蓄積を測定することによる、カテプシンＳインヒビターのインビボ投与の影響のモニタリング方法に関する。

Invariant Chain Degradation in PCBMs



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）治療される被験体の血液サンプルを採取すること；
ｂ）前記血液サンプル中のインバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物の蓄積を測定すること
を含んで成る、カテプシンＳインヒビターのインビボ投与の影響のモニタリング方法。
【請求項２】
ａ）治療される被験体の血液サンプルを採取すること；
ｂ）前記サンプルから白血球を精製すること；
ｃ）精製された白血球の全細胞ライセートを作成すること；
ｄ）適するアッセイ方法により、インバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物の存在についてライセートを分析すること
の段階を含んで成る、請求項１記載の方法。
【請求項３】
段階（ｄ）の適するアッセイ方法がウェスタンブロッティングもしくはＥＬＩＳＡである、請求項２記載の方法。
【請求項４】
インバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物がｐ１０Ｉｉフラグメントである、請求項１記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（関連出願の交差引用）
本出願は、２０００年９月６日出願の米国仮出願番号第６０／２３０，４８４号明細書の利益を主張する。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、投薬された被験体の血液中のインバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物、とりわけｐ１０　Ｉｉフラグメントの蓄積を測定することによる、カテプシンＳインヒビターのインビボ投与の影響のモニタリング方法に関する。
【０００３】
（発明の背景）
ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞による抗原提示ＭＨＣクラスＩＩ分子の認識は免疫学的応答の決定的に重要な構成要素である。クラスＩＩ分子は、他の膜貫通タンパク質と同様、合成後に小胞体に転位され、そこでそれらは第三のタンパク質、インバリアント鎖（Ｉｉ）と会合する。この分子は、小胞体からのクラスＩＩ－Ｉｉ複合体の退出（ｅｘｉｔ）を促進しかつクラスＩＩ分子を小胞体および分泌経路中の結合ペプチドおよびフォールディングされないタンパク質から保護する、クラスＩＩ特異的シャペロンとしてはたらくタイプＩＩの膜貫通タンパク質である。
【０００４】
Ｉｉの細胞質尾部中のターゲッティングモチーフは、該複合体を分泌経路からエンドソーム系に向ける。ＭＨＣクラスＩＩ分子が抗原を提示することができる前に、Ｉｉは除去されなければならない。これはＩｉを小ペプチドに解体する一連のプロテアーゼにより達成される。しかしながら、クラスＩＩ分子のペプチド結合溝を占有するクラスＩＩに会合されるインバリアント鎖ペプチド（ＣＬＩＰ）と呼ばれるＩｉフラグメントは、大部分の場合に自発的に遊離されない。ＣＬＩＰフラグメントは、細胞内輸送の間およびエンドソーム系中でのＩｉの分解後の双方に、クラスＩＩ結合ポケットを崩壊すること（ｃｏｌｌａｐｓｉｎｇ）から保護する置換ペプチドとしてはたらく。エンドサイトーシスされたタンパク質から生成される抗原ペプチドの結合は、空の、さらに開放の結合部位を必要とし、そして従ってＣＬＩＰは遊離されなければならない一方、該開放の結合部位は他のペプチドの結合を可能にするよう安定化される必要がある。ヒト白血球抗原ＤＭ（「ＨＬＡ－Ｄ

Ｍ」）は、これらの機能の双方を媒介し従って抗原ペプチドの結合を促進することが十分に報告されている。ペプチドを獲得した後に、クラスＩＩ分子は、ほとんど未知である経路を介して細胞表面に輸送される。

【０００５】

抗原の提示の封鎖は免疫応答の有望な一阻害方法である。これは、取り込み、タンパク質分解的プロセシングもしくはＭＨＣクラスＩＩ分子への結合を混乱させることによりなすことができる。取り込みを封鎖することは、多くの異なる細胞型がこの機能を必要とするために問題が多いかもしれない。特定の抗原のタンパク質分解的プロセシングの阻害は、異なるプロテアーゼが異なる抗原の切断に関与するかもしれないために有用であるかもしれないが、しかしながら、これらのプロテアーゼは特異的でなく、そして他の副作用につながるかもしれない。ＭＨＣクラスＩＩへの抗原への結合を特異的に封鎖するための一方法は、インバリアント鎖のタンパク質分解を阻害することである。これが除去されない場合には、ＭＨＣクラスＩＩ分子はペプチドを入れることができず、これゆえに、Ｉｉの分解を封鎖することは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞への抗原提示を減少させかつ正常な免疫応答を混乱させるとみられる。

【０００６】

カテプシンＳ（ＣａｔＳ）はリンパ組織中で発現されるシステインプロテアーゼである。それは、ＭＨＣクラスＩＩのペプチドを入れる必要条件であるインバリアント鎖のタンパク質分解において主要な役割を演じるとして同定されている（Ｒｉｅｓｅら（１９９６）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　４：３５７）。それはカテプシンＬおよびＫとの５０～６０％の同一性を有するが、しかし、それがアルカリ性のｐＨにわたる広範なｐＨの至適を有することにおいて異なる。阻害剤は、動物モデルにおいて抗原提示を調節することが示され、また、喘息モデルにおいて有効である（Ｒｉｅｓｅら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．（１９９８）１０１：２３５１）。カテプシンＳが欠乏したマウスは、専門の抗原提示細胞による外因性タンパク質を提示する損なわれた能力を有する（Ｎａｋａｇａｗａら、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（１９９９）１０：２０７；Ｓｈｉら、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（１９９９）１０：１９７）。

【０００７】

ヒトカテプシンＳのタンパク質分解活性を阻害する化合物は、限定されるものでないが、狼瘡、慢性関節リウマチおよび喘息を挙げることができる慢性自己免疫疾患の治療において有用性を見出し；また、組織移植に対する免疫応答の調節において潜在的有用性を有すると期待される。

【０００８】

カテプシンＳ活性、例えばＩｉ鎖のタンパク質分解を調節する作用物質を用いる自己免疫の調節方法、ならびに自己免疫障害を有する被験体の治療方法、免疫応答を調節するその能力についての治療の評価方法は、第ＷＯ　９９／５８１５３号明細書に記述される。

【０００９】

（発明の要約）

本発明は：

ａ）治療される被験体の血液サンプルを採取すること；

ｂ）前記血液サンプル中のインバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物の蓄積を測定すること

を含んで成る、カテプシンＳインヒビターのインビボ投与の影響のモニタリング方法もしくはそのためのアッセイに関する。

【００１０】

より具体的には、前記方法は、

ａ）治療される被験体の血液サンプルを採取すること；

ｂ）前記サンプルから白血球を精製すること；

ｃ）精製された白血球の全細胞ライセートを作成すること；

ｄ）適するアッセイ方法により、インバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物の存在につい

てライセートを分析すること
を含んで成る。
【００１１】
適するアッセイ方法は例えばウェスタンブロットアッセイもしくはＥＬＩＳＡアッセイ方法を含んで成る。インバリアント鎖（Ｉｉ）の特定の一中間分解産物はｐ１０Ｉｉである。さらなる一局面において、本発明は上の方法もしくはアッセイを実施するのに適する材料を含んで成る試験キットに関する。
【００１２】
（詳細な記述）
従って、本発明は、投薬された被験体の血液中のインバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物、とりわけｐ１０Ｉｉフラグメントの蓄積を測定することによる、カテプシンＳインヒビターのインビボ投与の影響のモニター方法を提供する。
【００１３】
本発明の前記アッセイは臨床試験の設定でとりわけ有用である。しかしながら、それは、限定されるものでないがサル、イヌ、ブタ、ウサギ、モルモットおよびげっ歯類を挙げることができる動物試験におけるインビボのカテプシンＳインヒビターの影響をモニターするのにもまた適用することができる。
【００１４】
臨床試験の設定におけるカテプシンＳインヒビターのインビボ投与の影響は、投薬された被験体の血液中のインバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物、すなわちｐ１０Ｉｉフラグメントの蓄積を測定することによりモニターすることができる。
【００１５】
簡潔には、時間のある期間の間、好ましくは１６～３０時間のカテプシンインヒビターの投与後に、血液を引き抜き、そして白血球を例えば赤血球の溶解もしくはフィコール（ＦＩＣＯＬＬ）勾配遠心分離のいずれかにより精製する。ＷＢＣの全細胞ライセートをその後作成し、そしてその後ウェスタンブロットアッセイもしくはＥＬＩＳＡアッセイのいずれかにより分析する。ウェスタンアッセイのためには、細胞ライセートを最初にＰＡＧＥゲル上で分離する。ニトロセルロースメンブレンに転写した後、Ｉｉ、およびｐ１０Ｉｉを包含するその中間分解産物をその後、Ｉｉに対するマウスｍＡｂ例えばＰｉｎ１．１、またはＩｉ全体もしくは一ペプチドフラグメントに対するウサギポリクローナル抗体を使用して検出することができる。ＥＬＩＳＡアッセイのためには、Ｐｉｎ１．１を包含するＩｉに対する一対の抗体、およびｐ１０ＩｉのＣ末端に対するウサギポリクローナル抗体を使用することができる。
【００１６】
前記アッセイは、限定されるものでないがサル、イヌ、ブタ、ウサギ、モルモットおよびげっ歯類を挙げることができる動物試験においてインビボのカテプシンＳインヒビターの影響をモニターするのにもまた適用することができる。
【００１７】
本発明の利点は、該方法が単純かつカテプシンインヒビター化合物のインビボの効力の測定においてより信頼できると考えられることである。
【００１８】
該方法は、実験的スクリーニングもしくは臨床の設定においてカテプシン阻害化合物の効力をアッセイするのに使用することができるのみでない。それは、カテプシンインヒビターで治療されている患者をモニターして、それらの治療の効力を確認しかつ必要な場合は投与を調節するのにもまた有用である。これは、処方医もしくは監督医が、所望のカテプシンＳ阻害薬物のレジメンをより正確かつ効果的に投与することを可能にすることができる。
【００１９】
実施例１
ヒト血液中のカテプシンＳ阻害のモニタリング

臨床試験の設定におけるカテプシンＳインヒビターのインビボ投与の影響は、投薬された被験体の血液中のインバリアント鎖（Ｉｉ）の中間分解産物、とりわけｐ１０Ｉｉフラグメントの蓄積を測定することによりモニターすることができる。簡潔には、時間のある期間の間、好ましくは１６～３０時間のカテプシンインヒビターの投与後に、血液を引き抜き、そして白血球を例えば赤血球の溶解もしくはフィコール（ＦＩＣＯＬＬ）勾配遠心分離のいずれかにより精製する。ＷＢＣの全細胞ライセートをその後作成し、そしてウェスタンブロットアッセイもしくはＥＬＩＳＡアッセイのいずれかにより分析する。ウェスタンアッセイのためには、細胞ライセートを最初にＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で分離する。ニトロセルロースメンブレンに転写した後、Ｉｉ、およびｐ１０Ｉｉを包含するその中間分解産物をその後、Ｉｉに対するマウスｍＡｂ例えばＰｉｎ１．１、もしくはｐ１０Ｉｉフラグメントのｃ末端に特異的なウサギポリクローナル抗体を使用して検出することができる。ＥＬＩＳＡアッセイのためには、Ｐｉｎ１．１を包含するＩｉに対する一対の抗体、およびｐ１０ＩｉのＣ末端に対するウサギポリクローナル抗体を使用することができる。同一のアッセイを、例えばサル、イヌ、ブタ、ウサギ、モルモットおよびげっ歯類での動物試験においてインビボでのカテプシンＳインヒビターの影響をモニターするのにもまた適用することができる。

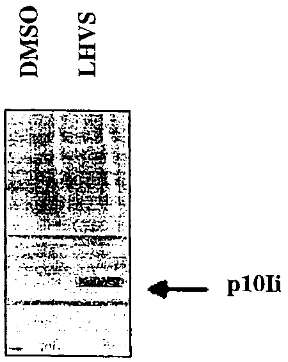
【００２０】

本実施例において、ヒト血液からの精製された末梢血単核細胞を、カテプシンＳインヒビターＬＨＶＳ（モルホリン尿素－ロイシン－ホモフェニルアラニン－ビニルスルホンフェニル、４－モルホリンカルボキサミド、Ｎ－［（１Ｓ）－３－メチル－１－［［［（１Ｓ，２Ｅ）－１－（２－フェニルエチル）－３－（フェニルスルホニル）－２－プロペニル］アミノ］カルボニル］ブチル］－（９Ｃｌ）ともまた称される）とともにインキュベートした。この化合物は米国特許第５，９７６，８５８号明細書、ならびにＰａｌｍｅｒら（１９９５）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３８：３１９３およびＲｉｅｓｅら（１９９６）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　４：３５７に記述されている。２４時間のインキュベーション後に、サンプルを標準的ＳＤＳ－ＰＡＧＥプロトコルを使用して泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写し、そしてｐ１０Ｉｉフラグメントを包含するインバリアント鎖を認識する抗体でプロービングした。ＬＨＶＳの存在下で、ｐ１０Ｉｉフラグメントは容易に見ることができる（図１）。これはカテプシンＳの阻害によるＩｉの分解における封鎖を表す。

【図１】

Figure 1

PCBMにおけるｲﾝﾊﾞﾘｱﾝﾄ鎖の分解



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/21129 A1

(51) International Patent Classification[7]: G01N 33/535, 33/545

(21) International Application Number: PCT/US01/26373

(22) International Filing Date: 24 August 2001 (24.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/230,484 6 September 2000 (06.09.2000) US

(71) Applicant: ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC. [US/US]; US Route 202, Raritan, NJ 08869 (US).

(72) Inventors: THURMOND, Robin; 4654 Constance Drive, San Diego, CA 92115 (US). SUN, Siquan; 13919 Amber Sky Lane, San Diego, CA 92129 (US). KARLSSON, Lars; 336 Fern Glen, La Jolla, CA 92037 (US).

(74) Agent: WALLEN, III, John W.; Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933-7003 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

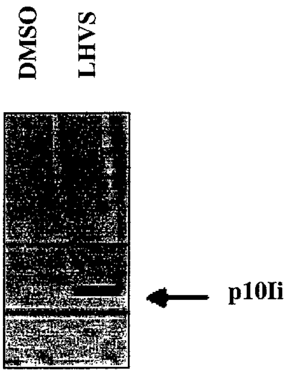
Published:
— *with international search report*

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD OF MONITORING THE EFFECT OF CATHEPSIN S INHIBITORS

(57) Abstract: The present invention relates to a method for monitoring the effect of in vivo administration of Cathepsin S inhibitors by measuring accumulation of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii), in particular the p10 Ii fragment, in blood of dosed patients.

Invariant Chain Degradation in PCBMs



WO 02/21129 A1

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

TITLE OF INVENTION

METHOD OF MONITORING THE EFFECT OF CATHEPSIN S INHIBITORS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This application claims the benefit of United States Provisional Application Serial No. 60/230,484, filed 6 September 2000.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a method for monitoring the effect of in vivo administration of Cathepsin S inhibitors by measuring accumulation of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii), in particular the p10 Ii fragment, in blood of dosed subjects.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The recognition of antigen-presenting MHC class II molecules by $CD4^+$ T cells is a crucial component of the immunological response. Class II molecules, like other transmembrane proteins, are translocated into the endoplasmic reticulum after synthesis, where they associate with a third protein, the invariant chain (Ii). This molecule is a type II transmembrane protein that serves as a class II-specific chaperone which promotes the exit of class II-Ii complexes from the endoplasmic reticulum and prevents class II molecules from binding peptides and unfolded proteins in the endoplasmic reticulum and in the secretory pathway.

A targeting motif in the cytoplasmic tail of Ii directs the complexes from the secretory pathway into the endosomal system. Before the MHC class II molecules can present antigen the Ii must be removed. This is accomplished by a series of proteases that break Ii down into small peptides. However, an Ii fragment, called class II-associated invariant chain peptide (CLIP), which occupies the peptide-binding groove of the class II molecule, is in most cases not spontaneously released. The CLIP fragment serves as a substitute peptide that protects the class II binding pocket from collapsing both during intracellular transport and after Ii degradation in the endosomal system. Binding of

antigenic peptides, generated from endocytosed proteins, requires an empty, yet open binding site, and therefore CLIP has to be released while the open binding site needs to be stabilized to allow the binding of other peptides. Human Leukocyte Antigen DM ('HLA-DM') has been well documented to mediate both of these functions, thus promoting the binding of antigenic peptides. After acquiring peptides, the class II molecules are transported to the cell surface via routes that are largely unknown.

Blocking the presentation of antigens is a promising way to inhibit the immune response. This could be done by disrupting the uptake, the proteolytic processing, or binding to MHC class II molecules. Blocking the uptake may be problematic since many different cell types require this function. Inhibition of the proteolytic processing of particular antigens may be of use since different proteases may be involved in cleaving different antigens, however these proteases are not specific and may lead to other side-effects. One way to specifically block the binding to the antigens to the MHC class II is to inhibit the proteolysis of the invariant chain. If this is not removed then the MHC class II molecules cannot be loaded with peptides, hence blocking Ii degradation would decrease antigen presentation to CD4+ T-cells and disrupt the normal immune response.

Cathepsin S (CatS) is a cysteine protease expressed in lymphatic tissues. It is has been identified as playing a major role in invariant chain proteolysis which is a prerequisite for peptide loading of MHC class II (Riese et al. (1996) Immunity 4:357). It has 50-60% identity to cathepsins L and K, but differs in that it has a broad pH optimum that extends to alkaline pH. Inhibitors have been shown in animal models to modulate antigen presentation and are effective in an asthma model (Riese et al., *J. Clin. Invest.* (1998) **101**:2351). Mice deficient in cathepsin S have an impaired ability to present exogenous proteins by professional antigen presenting cells (Nakagawa et al., *Immunity* (1999) **10**:207; Shi et al., *Immunity* (1999) **10**:197).

Compounds that inhibit the proteolytic activity of human cathepsin S are expected to find utility in the treatment of chronic autoimmune diseases including, but not limited to, lupus, rheumatoid arthritis, and asthma; and have potential utility in modulating the immune response to tissue transplantation.

Methods of modulating autoimmunity with an agent that modulates cathepsin S activity, e.g. proteolysis of the Ii chain, as well as methods of treating a subject having an autoimmune disorder, methods of evaluating a treatment for its ability to modulate an immune response are described in WO 99/58153.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention concerns a method of or an assay for monitoring the effect of in vivo administration of a cathepsin S inhibitor, said method or assay comprising:

(a) taking a blood sample of the subject treated;
(b) measuring the accumulation of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii) in said blood sample.

More in particular said method comprises:

(a) taking a blood sample of the subject treated;
(b) purifying the white blood cells from said sample;
(c) making whole cell lysates of the purified white blood cells;
(d) analyzing the lysates for presence of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii) by a suitable assay method.

Suitable assay methods comprise for example Western blot assay or ELISA assay methods. A particular intermediate degradation product of invariant chain (Ii) is p10Ii. In a further aspect, the invention concerns a test kit comprising materials suitable for conducting the above methods or assays.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Thus the present invention provides a method for monitoring the effect of in vivo administration of Cathepsin S inhibitors, by measuring accumulation of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii), i.e. the p10Ii fragment, in blood of dosed subjects.

The said assay of the present invention is particularly useful in a clinical trial setting. However it can also be applied to monitor the effect of Cathepsin S inhibitors in vivo in animal studies, which include but are not limited to monkey, dog, pig, rabbit, guinea pig, and rodents.

The effect of in vivo administration of Cathepsin S inhibitors, in a clinical trial setting, can be monitored by measuring accumulation of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii), i.e. the p10Ii fragment, in blood of dosed subjects.

Briefly, after administration of Cathepsin inhibitors for a certain period of time, preferably 16-30hr, blood is drawn and white blood cells are purified, e.g. either by lysis of red blood cells or by a FICOLL gradient centrifugation. Whole cell lysates of WBC are then made and then analyzed by either a Western blot assay or a ELISA assay. For Western assay, cell lysates are first resolved on PAGE gels. After transferring to nitrocellulose membrane, Ii and its intermediate degradation products, including the p10Ii, can then be detected using a mouse mAb against Ii , e.g. Pin1.1, or a rabbit polyclonal antibody against the entire Ii or a peptide fragment. For ELISA assay, a pair of antibodies against Ii, including Pin1.1 and a rabbit polyclonal antibody against C-terminal of p10Ii, can be used.

The said assay can also be applied to monitor effect of Cathepsin S inhibitors in vivo in animal studies, which include but not limit to monkey, dog, pig, rabbit, guinea pig and rodents.

The advantage of the invention is that the method is simple and considered more reliable in determining in vivo efficacy of Cathepsin inhibitor compounds.

The method can be used to assay the efficacy of Cathepsin inhibitory compounds not only in an experimental screening or clinical setting. It is also useful to monitor patients who have been treated with Cathepsin inhibitors to check efficacy of their treatment and to adjust dosing where necessary. This will allow the prescribing or supervising physician to more precisely and effectively dose the desired cathepsin S inhibitory drug regimen.

EXAMPLE 1.

MONITORING CATHEPSIN S INHIBITION IN HUMAN BLOOD

The effect of in vivo administration of Cathepsin S inhibitors, in a clinical trial setting, can be monitored by measuring accumulation of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii), i.e. the p10Ii fragment, in blood of dosed subjects. Briefly, after administration of Cathepsin inhibitors for a certain period of time, preferably 16-30hr, blood is drawn and white blood cells are purified, e.g. either by lysis of red blood cells or by a FICOLL gradient centrifugation. Whole cell lysates of WBC are then made and analyzed by either a Western blot assay or an ELISA assay. For Western assay, cell lysates are first resolved on SDS-PAGE gels. After transferring to nitrocellulose membrane, Ii and its intermediate degradation products, including the p10Ii, can then be detected using a mouse mAb against Ii , e.g. Pin1.1 or rabbit polyclonal antibodies specific for the C-terminal of the p10Ii fragment. For ELISA assay, a pair of antibodies against Ii, including Pin1.1 and a rabbit polyclonal antibody against C-terminal of p10Ii, can be used. The same assay can also be applied to monitor effect of Cathepsin S inhibitors in vivo in animal studies, for example in monkeys, dogs, pigs, rabbits, guinea pigs, and rodents.

In the present example purified peripheral blood mononuclear cells from human blood were incubated with the cathepsin S inhibitor, LHVS (morpholinurea-leucine-homo-phenylalanine-vinylsulfonephenyl, also referred to as 4-morpholinecarboxamide, N-[(1S)-3-methyl-1-[[[(1S,2E)-1-(2-phenylethyl)-3-(phenylsulfonyl)-2-propenyl]amino] carbonyl]butyl]- (9Cl)). This compound has been described in US patent no. 5,976,858 and in Palmer et al. (1995) J. Med. Chem. 38:3193 and Riese et al. (1996) Immunity 4:357. After incubation for 24 hours, the samples were run using standard SDS-PAGE protocols, transferred to nitrocellulose membranes and probed with an antibody which recognizes the invariant chain including the p10Ii fragment. In the presence of LHVS the p10Ii fragment can easily be seen (**Figure 1**). This represents a block in the degradation of Ii due to inhibition of cathepsin S.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of monitoring the effect of in vivo administration of a cathepsin S inhibitor, said method comprising:
   a) taking a blood sample of the subject treated;
   b) measuring the accumulation of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii) in said blood sample.

2. A method according to claim 1 comprising the steps of:
   a) taking a blood sample of the subject treated;
   b) purifying the white blood cells from said sample;
   c) making whole cell lysates of the purified white blood cells;
   d) analyzing the lysates for presence of an intermediate degradation product of invariant chain (Ii) by a suitable assay method.

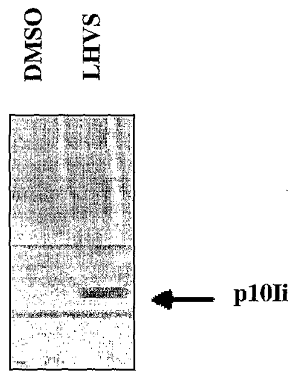
3. A method according to claim 2 wherein the suitable assay method in step (d) is Western blotting or ELISA.

4. A method according to claim 1 wherein the intermediate degradation product of invariant chain (Ii) is the p10Ii fragment.

Figures:

Figure 1

Invariant Chain Degradation in PCBMs



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/26373

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : G01N 33/535, 33/545
US CL : 435/7.24
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)
U.S. : 435/7.2, 7.21, 7.23, 7.71, 7.92, 173.4, 173.7, 173.9, 287.7, 964; 436/507, 508, 519, 172, 813; 424/9.2

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 practicable, search terms used)
MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 99/58153 A1 (BRIGHAM & WOMEN'S HOSPITAL) 18 November 1999 (18.11.1999), see entire document, especially pages 13-17.	1-3 ---------- 4
Y	WO 97/40066 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE of TECHNOLOGY) 30 October 1997 (30.10.1997), see entire document, especially pages 7-18.	1-4
A/P	US 6,245,904 B1 (MELMS et al.) 12 June 2001 (12.06.2001), see entire document.	1-4
A	US 5,919,639 A (HUMPHREYS et al.) 06 July 1999 (06.07.1999), see entire document.	1-4
Y	SHI G.P. et. al. Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. Journal of Experimental Medicine. April 2000, vol. 191, No. 7, pages 1177-1186, see abstract.	1-4
Y	Database Medline ACCN. No. 1999:170289. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. Immunity. NAKAGAWA et al.., see abstract, February 1999.	1-4

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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	Date of mailing of the international search report
16 November 2001 (16.11.2001)	12 FEB 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Gailene R. Gabel Janice Ford for Telephone No. (703) 308-0196

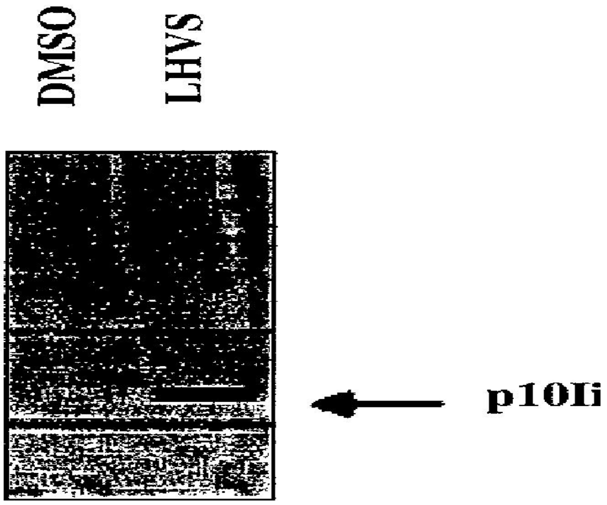
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 サン，シクアン
アメリカ合衆国カリフオルニア州９２１２９サンデイエゴ・アンバースカイレーン１３９１９
(72)発明者 カールソン，ラルス
アメリカ合衆国カリフオルニア州９２０３７ラジヨラ・フアーングレン３３６

专利名称(译)	监测组织蛋白酶S抑制剂影响的方法		
公开(公告)号	[JP2004508553A](JP2004508553A)	公开(公告)日	2004-03-18
申请号	JP2002524698	申请日	2001-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔药品公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔杉机俞蒂卡尔酒店股份有限公司每次的Rete		
[标]发明人	サーモンドロビン サンシクアン カールソンラルス		
发明人	サーモンド,ロビン サン,シクアン カールソン,ラルス		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/37 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/573 C12Q1/37 G01N2333/8139 G01N2333/96466 Y10S435/962 Y10S436/811 Y10S436/813 Y10S436/825 Y10T436/25125 Y10T436/25375		
FI分类号	G01N33/53.D		
优先权	60/230484 2000-09-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过测量给药受试者血液中恒定链（Ii），特别是p10 Ii片段的中间降解产物的积累来监测组织蛋白酶S抑制剂的体内施用效果的方法。