

(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2006-515268

(P2006-515268A)

(43) 公表日 平成18年5月25日(2006.5.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/136 (2006.01)	A 6 1 K 31/136	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/42 (2006.01)	A 6 1 K 31/42	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 74 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-520026 (P2004-520026)	(71) 出願人	501401582
(86) (22) 出願日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		ザ ケネス エス. ウォーレン インステ
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月18日 (2005.2.18)		イテュート, インコーポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/021350		アメリカ合衆国 1 0 5 6 2 ニューヨー
(87) 国際公開番号	W02004/004656		ク州, オッシニン グ キッチャワ ン ロー
(87) 国際公開日	平成16年1月15日 (2004.1.15)		ド 7 1 2
(31) 優先権主張番号	10/188, 905	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成14年7月3日 (2002.7.3)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 応答性細胞、組織および器官の保護、回復および増強用の組織保護性サイトカイン

(57) 【要約】

組織保護性サイトカインを含む組成物の全身または局所投与による、炎症を示すかまたは関連する応答性細胞、組織、器官または体部分を保護するかまたは増強することにより、炎症を有する哺乳動物を治療する方法および組成物が提供される。本発明はまた、本発明の組織保護性サイトカインを含む組成物の投与および少なくとも1種の抗炎症または少なくとも1種の免疫調節薬の投与を含む併用治療も包含する。

Capillaries of the human brain express very high levels of EPO receptor, as determined by immunohistochemistry using specific anti-EPO receptor antibodies. This provides a mechanism whereby EPO is able to penetrate into the brain from the systemic circulation, in spite of the blood brain barrier.



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療上有効な量の組織保護性サイトカイン；少なくとも 1 種の抗炎症薬；および製薬上許容される担体を含む、医薬組成物

【請求項 2】

抗炎症薬がコルチコステロイド、グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド抗炎症薬、アゴニスト、抗コリン作用薬、メチルキサンチン、金注射、スルファサラジン、ペニシラミン、抗血管新生薬、ダブソン、ソラレン、抗マラリア薬、抗ウイルス薬、および抗生物質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

治療上有効な量の組織保護性サイトカイン；少なくとも 1 種の免疫調節薬；および製薬上許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 4】

免疫調節薬がメトトレキサート、レフルノミド、シクロホスファミド、サイトキサン、イムラン、シクロスポリン A、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質、メチルプレドニソロン、コルチコステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン、ミゾリビン、デオキシスベルガリン (deoxyspergualin)、ブレキナール (brequinar)、マロノニトリロアミンド (malononitroiloamindes)、T 細胞受容体調節因子、およびサイトカイン受容体調節因子からなる群から選択される、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

上記組織保護性サイトカインが、i)シアル酸部分を欠くエリスロポエチン；ii)N 結合糖鎖を欠くかまたは O 結合糖鎖を欠くエリスロポエチン；iii)少なくとも 1 種のグリコシダーゼによる処理によって天然エリスロポエチンの糖鎖含量が低下したエリスロポエチン；iv)少なくとも 1 以上の酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン；v)少なくとも 1 以上の化学的に還元される酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン；vi)少なくとも 1 以上の修飾されたアルギニン残基を含むエリスロポエチン；vii)少なくとも 1 以上の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子の N 末端アミノ基の修飾を含むエリスロポエチン；viii)少なくとも修飾されたチロシン残基を含むエリスロポエチン；ix)少なくとも修飾されたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含むエリスロポエチン；x)少なくとも修飾されたトリプトファン残基を含むエリスロポエチン；xi)少なくとも 1 つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン；xii)少なくともエリスロポエチン分子中の少なくとも 1 つのシスチン結合の開裂を含むエリスロポエチン；およびxiii)末端切断されたエリスロポエチンからなる群から選択される、請求項 1 または 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

応答性細胞、組織、および/または器官を含む哺乳動物における炎症を治療する方法であって、哺乳動物に、治療上有効な量の組織保護性サイトカインおよび製薬上許容される担体を含む医薬組成物を投与することを含む上記方法。

【請求項 7】

組織保護性サイトカインがヘマトクリットの増加、血管狭窄、血小板の活性化過剰、前凝固活性および血小板産生の増加からなる群から選択される少なくとも 1 つの活性を欠く、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

応答性細胞、組織、および/または器官を含む哺乳動物における炎症を治療する方法であって、それを必要とする哺乳動物に、予防上または治療上有効な量の組織保護性サイトカインおよび製薬上許容される担体を含む医薬組成物を投与すること、ならびに該哺乳動物に予防上または治療上有効な量の 1 種以上の抗炎症薬または免疫調節薬を投与することを含む上記方法。

【請求項 9】

抗炎症薬がコルチコステロイド、グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド抗炎症

10

20

30

40

50

薬、アゴニスト、抗コリン作用薬、メチルキサンチン、金注射、スルファサラジン、ペニシラミン、抗血管新生薬、ダブソン、ソラレン、抗マラリア薬、抗ウイルス薬、および抗生物質からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

免疫調節薬がタンパク質薬、ペプチド模倣物、抗体、核酸分子、小分子、有機化合物、無機化合物、メトトレキセート、レフルノミド、シクロホスファミド、サイトキサン、イムラン、シクロスポリン A、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質、メチルプレドニソロン (MP)、コルチコステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン、ミゾリビン、デオキシスベルガリン (deoxyspergualin)、ブレキナル (brequinar)、マロノニトリロアミンド (malononitriloamind)、T 細胞受容体調節因子、およびサイトカイン受容体調節因子からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。 10

【請求項 11】

上記組織保護性サイトカインが i) シアル酸部分を欠くエリスロポエチン； ii) N 結合糖鎖を欠くかまたは O 結合糖鎖を欠くエリスロポエチン； iii) 少なくとも 1 種のグリコシダーゼによる処理によって天然エリスロポエチンの糖鎖含量が低下したエリスロポエチン； iv) 少なくとも 1 以上の酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン； v) 少なくとも 1 以上の化学的に還元される酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン； vi) 少なくとも 1 以上の修飾されたアルギニン残基を含むエリスロポエチン； vii) 少なくとも 1 以上の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子の N 末端アミノ基の修飾を含むエリスロポエチン； viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を含むエリスロポエチン； ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含むエリスロポエチン； x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を含むエリスロポエチン； xi) 少なくとも 1 つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン； xii) 少なくともエリスロポエチン分子中の少なくとも 1 つのシスチン結合の開裂を含むエリスロポエチン； および xiii) 末端切断されたエリスロポエチンからなる群から選択される、請求項 6 または 8 に記載の方法。 20

【請求項 12】

上記組織保護性サイトカインがアシアロエリスロポエチンまたはフェニルグリオキサール-エリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 13】

組織保護性サイトカインが内皮細胞バリアを横断することができる、請求項 6 または 8 に記載の方法。 30

【請求項 14】

内皮細胞バリアが血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巢関門および血液胎盤関門からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

哺乳動物における応答性細胞、組織、および/または器官が、神経細胞、筋肉細胞、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管細胞、内皮細胞、精巣、卵巢、子宮内膜細胞、および幹細胞からなる群から選択される、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 16】

応答性哺乳動物細胞がさらに、光受容体細胞、神経節細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、ミュラー (Muller) 細胞、心筋細胞、ペースメーカー細胞、洞房結節細胞 (sinoatrial node cell、sinoatrial node cell、sinus node cell)、房室結節細胞、ヒス束 (bundle of His) 細胞、肝細胞 (hepatocyte cell)、星状細胞、クップファー (Kupfer) 細胞、メサングウム細胞、杯細胞、腸腺細胞、腸内分泌細胞、球状帯細胞、束状細胞、網状帯細胞、クロム親和性細胞、周皮細胞、ライディヒ (Leydig) 細胞、セルトーリ (Sertoli) 細胞、精子細胞、グラーフ卵胞 (Graffian follicle) 細胞、始原卵胞 (primordial follicle) 細胞、子宮内膜間質細胞、および子宮内膜細胞からなる群から選択される細胞を含む、請求項 6 または 8 に記載の方法。 40

【請求項 17】

上記組織保護性サイトカインがアシアロエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記 50

載の方法。

【請求項 18】

上記アシアロエリスロポエチンがヒトアシアロエリスロポエチンである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

上記組織保護性サイトカインが N 結合した糖鎖を持たないエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 20】

上記組織保護性サイトカインが O 結合した糖鎖を持たないエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

10

【請求項 21】

上記組織保護性サイトカインが少なくとも 1 種のグリコシダーゼにより処理されたエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 22】

上記組織保護性サイトカインが過ヨウ素酸で酸化されたエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 23】

上記過ヨウ素酸で酸化されたエリスロポエチンが水素化シアノほう素ナトリウムを用いて化学的に還元された、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

上記組織保護性サイトカインが 1 以上のアルギニン残基上に、R-グリオキサール部分（ここで、R はアリアルまたはアルキル部分である）を含むエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

20

【請求項 25】

上記エリスロポエチンがフェニルグリオキサール-エリスロポエチンである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

上記組織保護性サイトカインは、少なくとも 1 つのアルギニン残基が 2,3-ブタンジオンおよびシクロヘキサジオンからなる群から選択されるビシナルジケトンとの反応により修飾されているエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

30

【請求項 27】

上記組織保護性サイトカインは少なくとも 1 つのアルギニン残基を 3-デオキシグルコソールと反応させたエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 28】

上記組織保護性サイトカインは少なくとも 1 つのビオチン化リシンまたはビオチン化 N 末端アミノ基を含むエリスロポエチン分子である、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 29】

上記エリスロポエチン分子がビオチン化エリスロポエチンである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

上記組織保護性サイトカインがグルシトリルリシンエリスロポエチンまたはフルクトシルリシンエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

40

【請求項 31】

上記組織保護性サイトカインが少なくとも 1 つのカルバミル化リシン残基を有するエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 32】

上記カルバミル化エリスロポエチンが -N-カルバモイルエリスロポエチン；N- -カルバモイルエリスロポエチン； -N-カルバモイル,N- -カルバモイルエリスロポエチン； -N-カルバモイルアシアロエリスロポエチン；N- -カルバモイルアシアロエリスロポエチン； -N-カルバモイル,N- -カルバモイルアシアロエリスロポエチン； -N-カルバモイ

50

ルヒポシアロエリスロポエチン；N- -カルバモイルヒポシアロエリスロポエチン；および -N-カルバモイル,N- -カルバモイルヒポシアロエリスロポエチンからなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

上記組織保護性サイトカインは、少なくとも 1 つのリシン残基がアシル化エリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 3 4】

上記エリスロポエチンのリシン残基がアセチル化されている、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

上記アセチル化エリスロポエチンが -N-アセチルエリスロポエチン；N- -アセチルエリスロポエチン； -N-アセチル,N- -アセチルエリスロポエチン； -N-アセチルアシアロエリスロポエチン；N- -アセチルアシアロエリスロポエチン； -N-アセチル,N- -アセチルアシアロエリスロポエチン； -N-アセチルヒポシアロエリスロポエチン；N- -アセチルヒポシアロエリスロポエチン；および -N-アセチル,N- -アセチルヒポシアロエリスロポエチンからなる群から選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

上記組織保護性サイトカインがサクシニル化リシン残基を含むエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 3 7】

上記エリスロポエチンが -N-スクシニルエリスロポエチン；N- -スクシニルエリスロポエチン； -N-スクシニル,N- -スクシニルエリスロポエチン； -N-スクシニルアシアロエリスロポエチン；N- -スクシニルアシアロエリスロポエチン； -N-スクシニル,N- -スクシニルアシアロエリスロポエチン； -N-スクシニルヒポシアロエリスロポエチン；N- -スクシニルヒポシアロエリスロポエチン；および -N-スクシニル,N- -スクシニルヒポシアロエリスロポエチンからなる群から選択される請求項 3 6 に記載の方法。

20

【請求項 3 8】

上記組織保護性サイトカインが少なくとも 1 つの 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸塩により修飾されたリシン残基をもつエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 3 9】

上記塩が 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムである、請求項 3 8 に記載の方法。

30

【請求項 4 0】

上記組織保護性サイトカインは、少なくとも 1 つのチロシン残基がニトロ化および / またはヨウ素化されたエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

上記組織保護性サイトカインはアスパラギン酸および / またはグルタミン酸残基をカルボジイミドと反応させ、次いでアミンと反応させたエリスロポエチンである、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 4 2】

上記アミンがグリシンアミドである、請求項 4 1 に記載の方法。

40

【請求項 4 3】

炎症が病状または外傷からもたらされる、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 4 4】

外傷は血管炎、慢性気管支炎、膵炎、骨髄炎、関節リウマチ、糸球体腎炎、視覚神経炎、側頭動脈炎、脳炎、髄膜炎、横行性脊髄炎、皮膚筋炎、多発性筋炎、壊死性筋膜炎、肝炎、および壊死性全腸炎からなる群から選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

組織保護性サイトカインがグリア細胞により産生されるサイトカインから生じる炎症を抑制する、請求項 6 または 8 に記載の方法。

50

【請求項 4 6】

炎症がアポトーシスによりトリガーされる、請求項 6 または 8 に記載の方法。

【請求項 4 7】

応答性細胞、組織、および/または器官を含む哺乳動物における炎症を治療する医薬組成物を調製するための組織保護性サイトカインの使用。

【請求項 4 8】

組織保護性サイトカインがヘマトクリット増加、血管狭窄、血小板超活性化、前凝固活性および血小板産生増加からなる群から選択される少なくとも 1 つの活性を欠く、請求項 4 7 に記載の使用。

【請求項 4 9】

炎症が病状または外傷から生じる、請求項 4 7 に記載の使用。

【請求項 5 0】

外傷が癲癇発作障害 (seizure disorder)、多発性硬化症、卒中、低血圧、心停止、虚血、心筋梗塞、加齢に係る認知機能の喪失、放射障害、脳性麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー脳症 (Leigh disease)、AIDS 痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール症、気分障害、不安障害、注意欠陥障害、自閉症、クロイツフェルト ヤーコブ病、脳外傷、脊髄外傷、脳虚血、脊髄虚血、心肺バイパス、慢性心不全、黄斑変性症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、または網膜外傷により生じる、請求項 4 9 に記載の使用。

【請求項 5 1】

応答性細胞、組織、および/または器官を含む哺乳動物における炎症を治療する医薬組成物を調製するための組織保護性サイトカインの使用であって、医薬組成物が治療上有効な量の組織保護性サイトカイン；少なくとも 1 種の抗炎症薬または免疫調節薬；および製薬上許容される担体を含むことを特徴とする、上記の使用

【請求項 5 2】

上記組織保護性サイトカインが、i) シアル酸部分を欠くエリスロポエチン；ii) N 結合糖鎖を欠くかまたは O 結合糖鎖を欠くエリスロポエチン；iii) 少なくとも 1 種のグリコシダーゼによる処理によって天然エリスロポエチンの糖鎖含量が低下したエリスロポエチン；iv) 少なくとも 1 以上の酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン；v) 少なくとも 1 以上の化学的に還元される酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン；vi) 少なくとも 1 以上の修飾されたアルギニン残基を含むエリスロポエチン；vii) 少なくとも 1 以上の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子の N 末端アミノ基の修飾を含むエリスロポエチン；viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を含むエリスロポエチン；ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含むエリスロポエチン；x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を含むエリスロポエチン；xi) 少なくとも 1 つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン；xii) 少なくともエリスロポエチン分子中の少なくとも 1 つのシスチン結合の開裂を含むエリスロポエチン；および xiii) 末端切断されたエリスロポエチンである、請求項 4 7 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エリスロポエチンの化学修飾により作製された組織保護性サイトカイン、ならびに、エリスロポエチン応答性細胞と関連細胞、組織および器官を *in situ* はもとより *ex vivo* でも保護し、維持し、増強しまたは回復するため、および脈管構造の遠位のエリスロポエチン応答性細胞と関連細胞、組織および器官を保護しかつ増強する目的での内皮細胞バリアを横切る組織保護性サイトカインの送達のため、または関連分子を内皮細胞バリアを横切って運ぶための上記サイトカインの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

関係出願の相互参照

10

20

30

40

50

本出願は、本明細書にその全てが組み入れられる、2002年7月3日出願された米国特許出願第10/188,905号の優先権を主張する。

【0003】

発明の背景

長年にわたり、エリスロポエチンの唯一の明確な生理学的役割は赤血球の産生の制御であるとされていた。最近、いくつかの確証の流れは、エリスロポエチンがサイトカインスーパーファミリーの一員として、エリスロポエチン受容体（エリスロポエチン-R）との相互作用を通して媒介される他の重要な生理学的機能を果たすことを示唆する。これらの作用は、細胞分裂誘発、平滑筋および神経細胞中へのカルシウム流入の調節、赤血球の産生、血小板（platelet）の活性化過剰、血小板（thrombocyte）の産生、および中間代謝に対する影響を含む。エリスロポエチンは、低酸素細胞ミクロ環境を改善するとともに代謝ストレスにより起こるプログラム細胞死を調節する役割を果たす代償性応答を提供すると考えられる。頭蓋内に注入されたエリスロポエチンは低酸素ニューロン傷害に対してニューロンを防御することが研究で確立されているが、頭蓋内投与は、治療用として、特に正常な個体に対しては、非現実的で受け入れがたい投与経路である。さらに、先に行われたエリスロポエチンを与えた貧血患者の研究は、末梢投与したエリスロポエチンは脳内に輸送されないと結論している（Martiら、1997、Kidney Int. 51:416-8；Juulら、1999、Pediatr. Res. 46:543-547；Buemiら、2000、Nephrol. Dial. Transplant. 15:422-433）

10

分子の赤血球産生活性の改良を目指した活性をもつ様々なエリスロポエチンの修飾型が記載されていて、例えば米国特許第5,457,089号におよび米国特許第4,835,260号に記載のカルボキシ末端のアミノ酸が改変されたもの；例えば米国特許第5,856,298号に記載の1分子当たり様々な数のシアル酸残基をもつエリスロポエチンのイソ型；米国特許第4,703,008号に記載のポリペプチド；米国特許第5,767,078号に記載のアゴニスト；米国特許第5,773,569号および第5,830,851号に記載のエリスロポエチン受容体と結合するペプチド；ならびに米国特許第5,835,382号に記載の小分子模倣物が挙げられる。

20

【発明の開示】

【0004】

発明の概要

一態様においては、本発明は、応答性哺乳動物細胞とその関連細胞、組織および器官の機能または生存力を保護し、維持し、増強し、または回復する医薬組成物を調製するための、骨髓に対するエリスロポエチンの影響の1以上の態様を欠く組織保護性サイトカイン、すなわち化学修飾されたエリスロポエチンの使用に関する。1つの特別な態様においては、応答性哺乳動物細胞とその関連細胞、組織または器官は、密着内皮細胞バリアの存在によって脈管構造の遠位にある。他の特別な態様においては、該細胞、組織、器官または他の体の部分は、移植または再取付けを意図して哺乳動物体から単離されている。限定されない例として、応答性細胞または組織は、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣、脾臓、骨、皮膚または子宮内膜細胞または組織であってもよい。さらに、限定されるものでない応答性細胞の例は、光受容体（網膜杆体および網膜錐体）、神経節、双極、水平、無軸索、ミュラー（Mueller）、心筋、ペースメーカー、洞房結節（sinoatrial node、sinoatrial node、sinus node）、接合組織、房室結節、ヒス束（bundle of His）、肝細胞、星状、クップファー（Kupffer）、系球体間質、腎上皮、管状間質、杯（goblet）、腸腺（陰窩）、腸、内分泌、球状帯、束状、網状帯、クロム親和性、周皮細胞、ライディヒ（Leydig）、セルトーリ（Sertoli）、精子、グラーフ卵胞（Graffian follicle）、始原卵胞（primordial follicle）、ランゲルハンス島、細胞、細胞、細胞、F細胞、前骨芽、破骨、骨芽、子宮内膜間質、子宮内膜、幹および内皮細胞を含む。これらの応答性細胞の例は単に説明として挙げたものである。一態様においては、応答性細胞もしくはその関連細胞、組織または器官は、興奮性細胞、組織または器官でないか、あるいは興奮性細胞または組織を主に含むものでない。特別な実施形態においては、上記組織保護性サイトカインを使用する対象となる哺乳動物細胞、組織または器官は、少なくとも1つのその生存に有害な条件下で或る期間

30

40

50

を過ごしたかまたは過ごしうる哺乳動物細胞、組織または器官である。このような症状は、外傷性 *in situ* 低酸素血症もしくは代謝機能障害、外科的に誘導された低酸素血症もしくは代謝機能障害、または *in situ* での毒素曝露を含み；*in situ* での毒素曝露は化学療法または放射線療法に関連しうる。一実施形態においては、有害な症状は、ある特定の外科手術に使用される心肺バイパス（心肺機械）によりもたらされる。

【0005】

本明細書に記載の組織保護性サイトカインは、ヒトの主に神経学的もしくは精神医学的症候群を有する CNS もしくは末梢神経系の疾患はもとより、眼病、心臓血管病、心肺疾患、呼吸器疾患、腎臓、泌尿器および生殖疾患、胃腸疾患および内分泌および代謝異常、ならびに炎症の治療または予防処置のために有用である。

10

【0006】

本発明はまた、哺乳動物、好ましくはヒトに投与するための特定の組織保護性サイトカインを含む医薬組成物に関する。このような医薬組成物は、経口、鼻腔内、または非経口投与用に、または細胞、組織もしくは器官の生存力を *ex vivo* で維持するための灌流液の形態で製剤することができる。

【0007】

上記の目的および医薬組成物に有用な組織保護性サイトカインは、天然のエリスロポエチンと比較して、そして好ましくは天然ヒトエリスロポエチンと比較して、少なくとも1つの修飾により改変されたエリスロポエチンを含む。少なくとも1つの修飾はエリスロポエチン分子の少なくとも1つのアミノ酸の修飾、またはエリスロポエチン分子の少なくとも1つの糖鎖の修飾であってもよい。もちろん、本明細書に記載の目的に有用な組織保護性サイトカイン分子は、天然分子と比較して、複数の修飾、例えば分子のアミノ酸部分の複数の修飾、分子の糖鎖部分の複数の修飾、または分子のアミノ酸部分の少なくとも1つの修飾と分子の糖鎖部分の少なくとも1つの修飾を有してもよい。組織保護性サイトカイン分子は、応答性哺乳動物細胞の機能または生存力を保護し、維持し、増強または回復する能力を保持するが、該エリスロポエチン分子の上述の所望の特徴に無関係な1以上の特性は、天然の分子と比較して、不在であってもよい。好ましい実施形態においては、組織保護性サイトカインはエリスロポエチンの骨髓に対する影響、すなわち、ヘマトクリットの増加（赤血球新生）、血管狭窄（高血圧）、血圧の増加、血小板の活性化過剰、前凝固活性、および血小板産生の増加を欠く。さらに好ましくは、組織保護性サイトカインは赤血球新生作用を欠く；最も好ましくは組織保護性サイトカインはエリスロポエチンの骨髓に対する全ての効果を欠く。

20

30

【0008】

例として挙げれば、本発明の組織保護性サイトカインはアシアロエリスロポエチンであってもよい。他の例においては、本発明の組織保護性サイトカインは、天然のエリスロポエチンまたはアシアロエリスロポエチンのアミノ酸残基の1以上のアミノ基を修飾する1以上の試薬と反応させておいたエリスロポエチンまたはアシアロエリスロポエチンであってもよい。好ましい実施形態においては、組織保護性サイトカインは非赤血球新生性である。

【0009】

一実施形態においては、組織保護性サイトカインは、シアル酸部分を有しないエリスロポエチンである。好ましい実施形態においては、組織保護性サイトカインはアシアロエリスロポエチンであり、そして最も好ましくはヒトアシアロエリスロポエチンである。他の実施形態においては、組織保護性サイトカインは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13個のシアル酸部分を有する。このような部分的に脱シアル化されたエリスロポエチンを本明細書ではヒポシアロエリスロポエチン(hyposialoerythropoietin)と呼ぶ。これらは天然のエリスロポエチンの化学的または酵素的修飾により調製することができるし、またはエリスロポエチンにシアル酸を付加しないかもしくは部分的にしかシアル酸を付加しない系における発現により得ることができる。本発明のアシアロエリスロポエチンおよびヒポシアロエリスロポエチンは、該分子を調製する方法に関わりなく

40

50

包含される。

【0010】

他の好ましい実施形態においては、組織保護性サイトカインは少なくとも1以上の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基の修飾を含み、このような修飾はリシン アミノ基もしくはN末端アミノ基のアミノ基修飾剤との反応から得られる。修飾されたリシン残基または修飾されたN末端アミノ基をさらに化学的に還元してもよい。ある好ましい実施形態においては、エリスロポエチンを、1以上のリシン基においてまたはN末端においてビオチン化、カルバミル化、サクシニル化、アセチル化する。他の実施形態においては、リシンをアルデヒドまたは還元糖と反応させてイミンを生成させ、場合によっては、次いで該イミンを化学的還元により、例えば水素化シアノほう素ナトリウムを用いることにより安定化してN-アルキル化リシン残基、例えばグルシトリルリシンを生成させるか、または還元糖の場合には、該イミンをアマドリ (Amadori) またはヘインズ (Heyns) 転位により安定化して α -デオキシ α -アミノ糖、例えば α -デオキシ α -フルクトシルリシンを生成させることができる。他の好ましい実施形態においては、リシンまたはN末端アミノ基を、例えばシアナートイオンとの反応によってカルバミル化 (カルバモイル化) する、すなわちアルキルイソシアナート、アリールイソシアナートもしくはアリールイソチオシアナートとの反応によりそれぞれアルキルカルバミル化、アリールカルバミル化もしくはアリールチオカルバミル化するか、または反応性アルキルカルボン酸もしくはアリールカルボン酸誘導体により、例えば無水酢酸、無水コハク酸もしくは無水フタル酸との反応によりアシル化することができる。少なくとも1つのリシン基またはN末端アミノ基はまた、トリニトロベンゼンスルホン酸もしくは好ましくはその塩の1つとの反応によりトリニトロフェニル修飾してもよい。他の実施形態においては、リシン残基をグリオキザールとの反応、例えばグリオキザール、メチルグリオキザールまたは3-デオキシグルコソンとの反応により修飾して対応する α -カルボキシアルキル誘導体を生成させてもよい。

10

20

【0011】

他の実施形態においては、求電子試薬を用いてエリスロポエチンの少なくとも1つのチロシン残基を修飾することによって、例えば、限定されるものでないが、ニトロ化またはヨウ素化による修飾によってある芳香環位置を修飾し、組織保護性サイトカインを作製することができる。

30

【0012】

上記のように、本明細書に記載の目的に有用である組織保護薬は少なくとも1つの上記修飾を有しうが、1以上の上記修飾を有してもよい。分子のアミノ酸部分に1つの修飾および分子の糖鎖部分に任意の修飾をもつ組織保護性サイトカインを例に挙げると、組織保護性サイトカインは、カルバミルエリスロポエチン、カルバミルアシアロエリスロポエチン、カルバミルヒポシアロエリスロポエチン、アセチルエリスロポエチン、アセチルアシアロエリスロポエチン、アセチル低アシアロエリスロポエチン、サクシニルエリスロポエチン、サクシニルアシアロエリスロポエチン、サクシニルヒポシアロエリスロポエチン、ビオチニルエリスロポエチン、ビオチニルアシアロエリスロポエチン、ビオチニルヒポシアロエリスロポエチン、ヨードエリスロポエチン、ヨードアシアロエリスロポエチン、ヨードヒポシアロエリスロポエチン、N- α -カルボキシメチルエリスロポエチン、N- α -カルボキシメチルエリスロポエチン、N- α -カルボキシメチルヒポシアロエリスロポエチン、およびグルシトリルエリスロポエチン、グルシトリルアシアロエリスロポエチン、グルシトリルアシアロ低エリスロポエチンである。これらの化合物は本発明の修飾型エリスロポエチンの単なる例である。以上の些細な名称は単に天然のエリスロポエチン分子の修飾を表したものであり、本明細書に先に記載したように、アミノ基の修飾はリシン残基、またはN末端アミノ基の1以上の アミノ基の修飾物であってもよく、またはニトロもしくはヨード修飾型エリスロポエチンの場合には、1以上のチロシン残基の修飾であってもよい。以上の任意の組合わせが本発明に包含される。本発明はまた、1以上の上記組織保護性サイトカインを含有する医薬組成物を含む組成物も包含する。このような組成物のいず

40

50

れかは、天然のエリスロポエチンを含んでもよい。

【0013】

本発明の他の態様においては、応答性哺乳動物細胞とその関連細胞、組織ならびに器官の機能または生存力を保護し、維持し、増強しまたは回復する方法が、任意の1種以上の上記組織保護性サイトカインの有効量を投与することにより提供される。本方法の1つの特別な態様においては、応答性哺乳動物細胞とその関連細胞、組織または器官は、密着内皮細胞バリアによって脈管構造の遠位にある。他の特別な態様においては、細胞、組織、器官または他の体の部分は、移植または再結合を意図するものであって、哺乳動物体から単離されている。限定されない例として、応答性細胞または組織は神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣、脾臓、皮膚、骨または子宮内膜の細胞または組織であってもよい。これらの応答性細胞の例は単に説明として挙げたものである。特別な実施形態においては、応答性細胞もしくはその関連細胞、組織、もしくは器官は、興奮性細胞、組織、もしくは器官でなく、または興奮性細胞もしくは組織を主に含むものでない。他の特別な実施形態においては、上記組織保護性サイトカインを使用する対象となる哺乳動物細胞、組織または器官は、その生存に有害な少なくとも1つの症状のもとで消費してしまったかまたはある期間消費しうる哺乳動物細胞、組織または器官である。このような症状は、外傷性in situ低酸素血症もしくは代謝機能障害、外科的に誘導された低酸素血症もしくは代謝機能障害、またはin situでの毒素曝露を含み；後者は化学療法または放射線療法に随伴しうる。一実施形態においては、本発明は、心肺バイパス（心肺機械）によりもたらされる有害な症状を保護する。

10

20

【0014】

本発明の他の態様においては、以上の組織保護性サイトカインのいずれかを、応答性哺乳動物細胞とその関連細胞、組織ならびに器官を保護し、維持し、増強しまたは回復する目的で、細胞、組織ならびに器官のex vivo治療のための医薬組成物の調製で使用することができる。このようなex vivo治療は、例えば、自家移植または異個体間移植（xenotransplant））いずれかの移植のための細胞、組織または器官の保存に有用である。細胞、組織または器官がドナーまたはレシピエントの脈管構造に組み込まれていない間、細胞、組織または器官を組織保護性サイトカインを含む溶液中に浴するか、または灌流液を器官中に脈管構造もしくは他の手段を通して滴下注入し、細胞機能を維持することができる。灌流液の投与は、器官回収前のドナーに対してはもとより、回収した器官およびレシピエントに対して行ってもよい。さらに、任意の組織保護性サイトカインの上記の使用は、細胞、組織もしくは器官が、ある期間、個体の脈管構造から単離され、従って本質的にex vivoに存在するときいつでも有用であり、ここで用語「単離された」は、細胞、組織、器官もしくは体部分又はその脈管構造を拘束したり又は締めつけたりすること（特に心肺バイパス手術等の外科手術中に行われるもの等）、細胞、組織、器官又は体部分の脈管構造をバイパスすること、細胞、組織、器官又は体部分を哺乳動物の体から取り出すこと（異個体間移植の前又は自己移植の前及び自己移植中に行われるもの等）、あるいは細胞、組織、器官又は体部分の外傷性切断を指す。このように、本発明のこの態様は、組織保護性サイトカインによるin situおよびex vivo両方での灌流に関する。ex vivoで、エリスロポエチンを細胞、組織もしくは器官の保存溶液中に提供してもよい。いずれの態様に対しても、曝露は、連続灌流、拍動性灌流、注入、浴、注射、またはカテーテル処置の方法によって行うことができる。

30

40

【0015】

なおさらなる態様においては、本発明は、応答性細胞または組織を含む、哺乳動物体から単離された哺乳動物細胞、組織、器官もしくは体部分の生存力を保護、維持、増強もしくは回復する方法に関する。この方法は、上記生存力を保護し、維持し、増強し、もしくは回復するために有効である期間にわたって、少なくとも単離された哺乳動物細胞、組織、器官もしくは体部分を、上述の組織保護性サイトカインの量に曝露することを含む。限定されない例においては、用語「単離された」は、細胞、組織、器官もしくは体部分又はその脈管構造を拘束したり又は締めつけたりすること（特に心肺バイパス手術等の外科手

50

術中に行われるもの等)、細胞、組織、器官又は体部分の脈管構造をバイパスすること、細胞、組織、器官又は体部分を哺乳動物の体から取り出すこと(異個体間移植の前又は自己移植の前及び自己移植中に行われるもの等)、あるいは細胞、組織、器官又は体部分の外傷性切断を指す。このように、本発明のこの態様は、組織保護性サイトカインによる *in situ* および *ex vivo* 両方での灌流に関する。*ex vivo* で、エリスロポエチンを細胞、組織もしくは器官の保存溶液中に提供してもよい。いずれの態様に対しても、曝露は、連続灌流、拍動性灌流、注入、浴、注射、またはカテーテル処置の方法によって行うことができる。

【0016】

限定されない例として、上記 *ex vivo* 応答性細胞または組織は、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巢、卵巣、脾臓、皮膚、骨、骨髓、臍帯血または子宮内膜細胞または組織であってもまたは含んでもよい。これらの応答性細胞の例は、単に説明のためのものである。

10

【0017】

以上の方法および用途は好ましくはヒトに適用できるが、その上にいずれの哺乳動物にも、例えば、限定されるものでないが、ペット動物、家畜動物、牧畜動物および動物園動物にも有用である。上記医薬組成物の投与経路は、経口、静脈内、鼻腔内、局所、腔内、吸入または非経口投与を含み、非経口投与は静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、粘膜下または皮内を含む。*ex vivo* で使用する場合、灌流液または浴液が好ましい。これは脈管構造の単離部分を *in situ* で灌流することを含む。

20

【0018】

本発明のなお他の態様においては、機能障害の原因となる病気または症状の発症後に投与したときに、その機能障害の細胞、組織もしくは器官を回復させる医薬組成物を調製するうえで、任意の上記組織保護性サイトカインも有用である。限定されない例として、以前に脳に外傷を受けた動物において、組織保護性サイトカインを含む医薬組成物の投与は、外傷が収まった暫く後(例えば、3日、5日、1週間、1月間、またはそれ以後)に投与しても、認知機能を回復させる。

【0019】

なお他の実施形態においては、本発明は、機能障害の原因である病気または症状の発症後に投与したときに、機能障害の細胞、組織もしくは器官を回復するために上記組織保護性サイトカインを使用する方法を提供する。限定されない例として、以前に脳に外傷を受けた動物において、組織保護性サイトカインを含む医薬組成物を投与する方法は、外傷が収まった暫く後(例えば、3日、5日、1週間、1月間、またはそれ以後)に投与しても、認知機能を回復させる。このような方法に有用である組織保護性サイトカインは特定の上記の任意の修飾型エリスロポエチンを含む。

30

【0020】

本発明のなおさらなる態様においては、上記組織保護性サイトカインと結合した分子の組成物の投与により、哺乳動物における内皮細胞バリアを通過する分子の経細胞輸送(*transcytosis*)を容易にする方法を提供する。輸送される分子と組織保護性サイトカインの間の結合は、例えば、該分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合であってもよい。内皮細胞バリアは、血液脳関門、血液眼関門、血液精巢関門、血液卵巣関門および血液胎盤関門であってもよい。本発明の方法により輸送するのに好適な分子は、ホルモン、例えば成長ホルモン、神経成長因子(NGF)、脳由来の神経栄養因子(BDNF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、塩基性頸骨芽細胞成長因子(bFGF)、トランスフォーミング成長因子1(TGF-1)、トランスフォーミング成長因子2(TGF-2)、トランスフォーミング成長因子3(TGF-3)、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、およびインターロイキン6、AZT、腫瘍壊死因子に対する抗体、抗ウイルス薬、および免疫抑制薬、例えばシクロスポリンを含む。さらに、染料またはマーカーをエリスロポエチンまたは本発明の組織保護性サイトカインの1種と結合させて、脳および他のバリア機能に守られた器官内の細胞、組織、または器官を診断の目

40

50

的で可視化することができる。

【0021】

本発明のさらなる態様においては、哺乳動物における内皮細胞バリアを通過する分子の経細胞輸送を容易にするための組成物であって、上述の組織保護性サイトカインと結合した分子を含有する上記組成物を提供する。結合は、例えば、分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合であってもよい。内皮細胞バリアは、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門および血液胎盤関門であってもよい。本発明の方法により輸送するのに好適な分子は、ホルモン、例えば成長ホルモン、神経成長因子（NGF）、脳由来の神経栄養性因子（BDNF）、毛様体神経栄養性因子（CNTF）、塩基性頸骨芽細胞成長因子（bFGF）、トランスフォーミング成長因子 1（TGF 1）、トランスフォーミング成長因子 2（TGF 2）、トランスフォーミング成長因子 3（TGF 3）、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、およびインターロイキン6、AZT、腫瘍壊死因子に対する抗体、抗ウイルス薬、および免疫抑制薬、例えばシクロスポリンを含む。さらに、染料またはマーカーをエリスロポエチンまたは本発明の組織保護性サイトカインの1種と結合させて、脳および他のバリア機能に守られた器官内の細胞、組織、または器官を診断の目的で可視化することができる。

【0022】

本発明のさらなる態様においては、任意の上述の組織保護性サイトカインが、哺乳動物における内皮細胞バリアを通過する分子の経細胞輸送を容易にするための医薬組成物を調製するうえで有用である。結合は、例えば、分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合であってもよい。内皮細胞バリアは、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門および血液胎盤関門であってもよい。本発明の方法により輸送するのに好適な分子は、限定されるものでないが、数例を挙げれば、ホルモン、例えば成長ホルモン、抗生物質、抗ウイルス薬、染料、マーカー、および抗癌薬を含む。

【0023】

一実施形態においては、本発明の医薬組成物は、治療上有効な量の組織保護性サイトカイン、少なくとも1種の抗炎症薬、および製薬上許容される担体を含む。関係する実施形態においては、抗炎症薬はコルチコステロイド、グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド抗炎症薬、アゴニスト、抗コリン作用薬、メチルキサンチン、金注射、スルファサラジン、ペニシラミン、抗血管新生薬、ダブソン、ソラレン、抗マラリア薬、抗ウイルス薬、および抗生物質からなる群から選択される。

【0024】

一実施形態においては、本発明が提供する本発明の医薬組成物は、抗炎症薬または免疫調節薬が MSHまたは抗TNFでないという規定に従って、治療上有効な量の組織保護性サイトカイン、少なくとも1種の抗炎症薬および/または少なくとも1種の免疫調節薬、および製薬上許容される担体を含む。関係する実施形態においては、抗炎症薬または免疫調節薬は抗体でない。

【0025】

一実施形態においては、本発明が提供する本発明の医薬組成物は、本質的に、治療上有効な量の組織保護性サイトカインからなりかつ少なくとも1種の抗炎症薬および/または少なくとも1種の免疫調節薬、および製薬上許容される担体を含む。

【0026】

本発明は、治療上有効な量の組織保護性サイトカイン、少なくとも1種の免疫調節薬、および製薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。関係する実施形態においては、免疫調節薬は、メトトレキサート、レフルノミド、シクロホスファミド、サイトキサン、イムラン、シクロスポリンA、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質、メチルプレドニソロン、コルチコステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン、ミゾリピン、デオキシスベルガリン（deoxyspergualin）、ブレキナール（brequinar）、マロニトリロアミンド（malononitriloamides）、T細胞レセプター調節因子

、およびサイトカイン受容体調節因子からなる群から選択される。

【0027】

本発明はまた、上記組織保護性サイトカインが i) シアル酸部分を欠くエリスロポエチン； ii) N 結合糖鎖を欠くかまたは O 結合糖鎖を欠くエリスロポエチン； iii) 少なくとも 1 種のグリコシダーゼによる処理によって天然エリスロポエチンの糖鎖含量が低下したエリスロポエチン； iv) 少なくとも 1 以上の酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン； v) 少なくとも 1 以上の化学的に還元される酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン； vi) 少なくとも 1 以上の修飾されたアルギニン残基を含むエリスロポエチン； vii) 少なくとも 1 以上の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子の N 末端アミノ基の修飾を含むエリスロポエチン； viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を含むエリスロポエチン； ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含むエリスロポエチン； x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を含むエリスロポエチン； xi) 少なくとも 1 つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン； xii) 少なくともエリスロポエチン分子中の少なくとも 1 つのシスチン結合の開裂を含むエリスロポエチン； および xiii) 末端切断されたエリスロポエチンからなる群から選択されることを特徴とする、本明細書に上記記載した医薬組成物も提供する。

【0028】

一実施形態においては、応答性細胞、組織、および/または器官を含む哺乳動物における炎症を治療する方法は、治療上有効な量の組織保護性サイトカインおよび製薬上許容される担体を含む医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。関係する実施形態においては、組織保護性サイトカインは、ヘマトクリット増加、血管狭窄、血小板超活性化、前凝固活性および血小板産生増加からなる群から選択される少なくとも 1 つの活性を欠く。

【0029】

他の実施形態においては、応答性細胞、組織、および/または器官を含む哺乳動物における炎症を治療する方法は、予防または治療上有効な量の組織保護性サイトカインおよび製薬上許容される担体を含む医薬組成物をそれを必要とする哺乳動物に投与することおよび予防または治療上有効な量の 1 以上の抗炎症薬または免疫調節薬を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態においては、抗炎症薬は、コルチコステロイド、グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド抗炎症薬、アゴニスト、抗コリン作用薬、メチルキサンチン、金注射、スルファサラジン、ペニシラミン、抗血管新生薬、ダブソン、ソラレン抗マラリア薬、抗ウイルス薬、および抗生物質からなる群から選択される。

【0030】

一実施形態においては、本発明は、応答性細胞、組織、および器官を含む哺乳動物における炎症を治療する方法であって、抗炎症薬または免疫調節薬が MSH または抗 TNF でないという規定に従って、予防または治療上有効な量の組織保護性サイトカインおよび製薬上許容される担体を含む医薬組成物をそれを必要とする哺乳動物に投与することおよび予防または治療上有効な量の 1 以上の抗炎症薬または免疫調節薬を哺乳動物に投与することを含む上記方法を提供する。関係する実施形態においては、抗炎症薬または免疫調節薬は抗体でない。

【0031】

他の実施形態においては、免疫調節薬は、タンパク質薬、ペプチド模倣物、抗体、核酸分子、小分子、有機化合物、無機化合物、メトトレキセート、レフルノミド、シクロホスファミド、サイトキサン、イムラン、シクロスポリン A、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質、メチルプレドニソロン (MP)、コルチコステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン、ミゾリビン、デオキシスベルガリン (deoxyspergualin)、ブレキナール (brequinar)、マロノニトリロアミン (malononitriloamine)、T 細胞受容体調節因子、およびサイトカイン受容体調節因子からなる群から選択される。

【0032】

本発明は、上記組織保護性サイトカインが i) シアル酸部分を欠くエリスロポエチン； ii)

) N結合糖鎖を欠くかまたはO結合糖鎖を欠くエリスロポエチン；iii)少なくとも1種のグリコシダーゼによる処理によって天然エリスロポエチンの糖鎖含量が低下したエリスロポエチン；iv)少なくとも1以上の酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン；v)少なくとも1以上の化学的に還元される酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン；vi)少なくとも1以上の修飾されたアルギニン残基を含むエリスロポエチン；vii)少なくとも1以上の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基の修飾を含むエリスロポエチン；viii)少なくとも修飾されたチロシン残基を含むエリスロポエチン；ix)少なくとも修飾されたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含むエリスロポエチン；x)少なくとも修飾されたトリプトファン残基を含むエリスロポエチン；xi)少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン；xii)少なくともエリスロポエチン分子中の少なくとも1つのシスチン結合の開裂を含むエリスロポエチン；およびxiii)末端切断されたエリスロポエチンからなる群から選択されることを特徴とする本明細書に以上記載した方法を提供する。

10

【0033】

一実施形態においては、本明細書に以上記載した組成物および方法の組織保護性サイトカインは、アシアロエリスロポエチンまたはフェニルグリオキサール-エリスロポエチンである。他の実施形態においては、組織保護性サイトカインは内皮細胞バリアを横断することができる。内皮細胞バリアは、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門および血液胎盤関門からなる群から選択されてもよい。

【0034】

一実施形態においては、本発明の医薬組成物および方法の標的である哺乳動物における応答性細胞、組織、および/または器官は、神経細胞、筋肉細胞、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管細胞、内皮細胞、精巣、卵巣、子宮内膜細胞、および幹細胞からなる群から選択される。他の実施形態においては、応答性哺乳動物細胞はさらに、光受容体細胞、神経節細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、ミュラー（Muller）細胞、心筋細胞、ペースメーカー細胞、洞房結節（sinoatrial node、sinoatrial node、sinus node）、房室結節細胞、ヒス束（bundle of His）、肝細胞、星状、クップファー（Kupffer）細胞、メサングウム細胞、杯状細胞、腸腺細胞、腸内分泌細胞、球状帯細胞、束状細胞、網状帯細胞、クロム親和性細胞、周皮細胞、ライディヒ（Leydig）細胞、セルトーリ（Sertoli）細胞、精子細胞、グラーフ卵胞（Graffian follicle）細胞、始原卵胞（primordial follicle）細胞、子宮内膜間質細胞、および子宮内膜細胞からなる群から選択される細胞を含む。

20

30

【0035】

本発明はまた、上記組織保護性サイトカインがアシアロエリスロポエチンであることを特徴とする、本明細書に以上記載した哺乳動物における炎症を治療する医薬組成物および方法も提供する。好ましい実施形態においては、アシアロエリスロポエチンはヒトアシアロエリスロポエチンである。組織保護性サイトカインは好ましくはN結合糖鎖をもたないエリスロポエチンである。組織保護性サイトカインは好ましくはO結合糖鎖をもたないエリスロポエチンである。一実施形態においては、組織保護性サイトカインは、少なくとも1種のグリコシダーゼを用いて処理されたエリスロポエチンである。他の実施形態においては、組織保護性サイトカインは過ヨウ素酸で酸化されたエリスロポエチンである。過ヨウ素酸で酸化されたエリスロポエチンは好ましくは、水素化シアノほう素ナトリウムを用いて化学的に還元される。一実施形態においては、組織保護性サイトカインは、1以上のアルギニン残基上に、Rがアリールまたはアルキル部分であるR-グリオキサール部分を含むエリスロポエチンである。エリスロポエチンは好ましくはフェニルグリオキサール-エリスロポエチンである。他の実施形態においては、組織保護性サイトカインは、少なくとも1つのアルギニン残基が2,3-ブタンジオンおよびシクロヘキサジオンからなる群から選択されるピシナルジケトンとの反応により修飾されているエリスロポエチンである。なお他の実施形態においては、本発明の組織保護性サイトカインは少なくとも1つのアルギニン残基を3-デオキシグルコソンと反応させたエリスロポエチンである。さらに他の

40

50

実施形態においては、組織保護性サイトカインは少なくとも1つのビオチン化リシンまたはN末端アミノ基を含むエリスロポエチン分子である。エリスロポエチン分子はビオチン化エリスロポエチンであってもよい。

【0036】

本発明はまた、グルシトリルリシンエリスロポエチンまたはフルクトシルリシンエリスロポエチンである組織保護性サイトカインを含む、哺乳動物の炎症を治療するための医薬組成物および方法も提供する。

【0037】

一実施形態においては、本発明の医薬組成物および方法の組織保護性サイトカインは、少なくとも1つのカルバミル化リシン残基を有するエリスロポエチンである。他の実施形態においては、該カルバミル化エリスロポエチンは、
-N-カルバモイルエリスロポエチン；
N- -カルバモイルエリスロポエチン；
-N-カルバモイル,N- -カルバモイルエリスロポエチン；
-N-カルバモイルアシアロエリスロポエチン；
N- -カルバモイルアシアロエリスロポエチン；
-N-カルバモイル,N- -カルバモイルアシアロエリスロポエチン；
-N-カルバモイルヒポシアロエリスロポエチン；
N- -カルバモイルヒポシアロエリスロポエチン；
および -N-カルバモイル,N- -カルバモイルヒポシアロエリスロポエチンからなる群から選択される。

10

【0038】

一実施形態においては、本発明の医薬組成物および方法の組織保護性サイトカインは少なくとも1つのリシン残基がアシル化されているエリスロポエチンである。他の実施形態においては、上記エリスロポエチンのリシン残基はアセチル化されている。さらに他の実施形態においては、アセチル化エリスロポエチンは
-N-アセチルエリスロポエチン；
N- -アセチルエリスロポエチン；
-N-アセチル,N- -アセチルエリスロポエチン；
-N-アセチルアシアロエリスロポエチン；
N- -アセチルアシアロエリスロポエチン；
-N-アセチル,N- -アセチルアシアロエリスロポエチン；
-N-アセチルヒポシアロエリスロポエチン；
N- -アセチルヒポシアロエリスロポエチン；
および -N-アセチル,N- -アセチルヒポシアロエリスロポエチンからなる群から選択される。

20

【0039】

一実施形態においては、本発明の医薬組成物および方法の組織保護性サイトカインは、サクシニル化リシン残基を含むエリスロポエチンである。一実施形態においては、該エリスロポエチンは、
-N-スクシニルエリスロポエチン；
N- -スクシニルエリスロポエチン；
-N-スクシニル,N- -スクシニルエリスロポエチン；
-N-スクシニルアシアロエリスロポエチン；
N- -スクシニルアシアロエリスロポエチン；
-N-スクシニル,N- -スクシニルアシアロエリスロポエチン；
-N-スクシニルヒポシアロエリスロポエチン；
N- -スクシニルヒポシアロエリスロポエチン；
および -N-スクシニル,N- -スクシニルヒポシアロエリスロポエチンからなる群から選択される。

30

【0040】

一実施形態においては、本発明の医薬組成物および方法の組織保護性サイトカインは、少なくとも1つの2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸塩により修飾されたリシン残基をもつエリスロポエチンである。本発明の一態様においては、上記塩は2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムである。

40

【0041】

他の実施形態においては、本発明の医薬組成物および方法の組織保護性サイトカインは、少なくとも1つのチロシン残基がニトロ化および/またはヨウ素化されたエリスロポエチンである。

【0042】

さらに他の実施形態においては、本発明の医薬組成物および方法の組織保護性サイトカインは、アスパラギン酸および/またはグルタミン酸残基をカルボジイミドと反応させ、次いでアミンと反応させたエリスロポエチンである。本発明の一態様においては、アミンはグリシンアミドである。

50

【0043】

一実施形態においては、本明細書に以上記載した本発明の医薬組成物および方法の組織保護性サイトカインは、病状または外傷からもたらされる炎症を治療するために用いられる。一実施形態においては、外傷は血管炎、慢性気管支炎、脾炎、骨髄炎、関節リウマチ、糸球体腎炎、視覚神経炎、側頭動脈炎、脳炎、髄膜炎、横行性脊髄炎、皮膚筋炎、多発性筋炎、壊死性筋膜炎、肝炎、および壊死性全腸炎からなる群から選択される。

【0044】

一実施形態においては、本発明の医薬組成物および方法の組織保護性サイトカインは、グリア細胞により産生されるサイトカインが原因となる炎症を抑制する。他の実施形態においては、炎症はアポトーシスにより発症する。

10

【0045】

本発明の一態様によれば、組織保護性サイトカインは、応答性細胞、組織、および/または器官を含む哺乳動物における炎症を治療する医薬組成物を調製するために用いることができる。ある特定の態様によれば、組織保護性サイトカインは、ヘマトクリット増加、血管狭窄、血小板超活性化、前凝固活性および血小板産生増加からなる群から選択される少なくとも1つの活性を欠く。一実施形態においては、炎症は病状または外傷から生じる。

【0046】

他の実施形態においては、該外傷は、癲癇発作障害 (seizure disorder)、多発性硬化症、卒中、低血圧、心停止、虚血、心筋梗塞、加齢に関係する認知機能の喪失、放射障害、脳性麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー脳症 (Leigh disease)、AIDS痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール症、気分障害、不安障害、注意欠陥障害、自閉症、クロイツフェルト ヤーコブ病、脳外傷、脊髄外傷、脳虚血、脊髄虚血、心肺バイパス、慢性心不全、黄斑変性症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、または網膜外傷により生じる。

20

【0047】

本発明は、応答性細胞、組織、および/または器官を含む哺乳動物における炎症の治療用の医薬組成物を調製するための組織保護性サイトカインの使用であって、医薬組成物が治療上有効な量の組織保護性サイトカイン；少なくとも1種の抗炎症薬または免疫調節薬；および製薬上許容される担体を含むことを特徴とする、上記組織保護性サイトカインの使用を提供する。一実施形態においては、組織保護性サイトカインは、i)シアル酸部分を欠くエリスロポエチン；ii)N結合糖鎖を欠くかまたはO結合糖鎖を欠くエリスロポエチン；iii)少なくとも1種のグリコシダーゼによる処理によって天然エリスロポエチンの糖鎖含量が低下したエリスロポエチン；iv)少なくとも1以上の酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン；v)少なくとも1以上の化学的に還元される酸化された糖鎖を有するエリスロポエチン；vi)少なくとも1以上の修飾されたアルギニン残基を含むエリスロポエチン；vii)少なくとも1以上の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基の修飾を含むエリスロポエチン；viii)少なくとも修飾されたチロシン残基を含むエリスロポエチン；ix)少なくとも修飾されたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含むエリスロポエチン；x)少なくとも修飾されたトリプトファン残基を含むエリスロポエチン；xi)少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン；xii)少なくともエリスロポエチン分子中の少なくとも1つのシスチン結合の開裂を含むエリスロポエチン；およびxiii)末端切断されたエリスロポエチンである。

30

40

【0048】

本発明のこれらおよび他の態様は次の図面および詳細な説明を参照することにより、さらによく理解されるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

本発明の詳細な説明

本発明の方法は、様々な正常なおよび有害な条件のもとでの哺乳動物体内の細胞、組織

50

および器官の局所的または全身的な保護もしくは増強、または他の哺乳動物体へ移植することになっている上記細胞、組織および器官の保護を提供する。さらに、機能不全の回復または再生も提供される。以上記述したように、密着内皮細胞バリアを通過しかつ脈冠構造の遠位にある応答性細胞（ならびに他のタイプの細胞）に対してポジティブな効果を及ぼすエリスロポエチンの能力は、さもないとヒトを含む動物において重大な細胞および組織障害を起こしうる様々な症状および疾患を予防するだけでなく治療する可能性を提供しかつさらに伝統的に利益を上回るリスクのある今まで試みられなかった外科手術を成功させるものである。

【0050】

エリスロポエチンは、ヒトにおいて約34kDaの分子量を有する糖タンパク質ホルモンである。成体タンパク質は165個のアミノ酸を含み、グリコシル残基が分子量の約40%を含む。エリスロポエチンは購入することができ、例えば、PROCRITの登録商標でOrtho Biotech Inc. (Raritan, NJ) から、およびEPOGENの登録商標でAmgen Inc. (Thousand Oaks, CA) から市販されている。さらに、様々な宿主系を利用して組換えエリスロポエチンを発現しかつ産生させることができ、それらは、限定されるものでないが、細菌、酵母、昆虫、植物、およびヒトを含む哺乳動物の細胞系を含む。例えば、産物をグリコシル化またはシアル化しない細菌中で産生される組換えエリスロポエチンを利用して、非グリコシル化型のエリスロポエチンを産生させることができる。あるいは、組換えエリスロポエチンは、グリコシル化する他の系（ヒト細胞を含む）、例えば植物中で産生させることができる。本発明の実施に有用なエリスロポエチンの形態は、ヒトおよび他の哺乳動物エリスロポエチンの天然形態、合形成態および組換え形態の化学修飾物および/または発現系が介在するグリコシル化修飾物を包含する。

【0051】

「応答性細胞」は、エリスロポエチンへの曝露により、その機能または生存力が維持され、促進され、増強され、再生され、またはいずれか他の方法で利益を受けることができる哺乳動物細胞を意味する。このような細胞の限定されない例は、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巢、卵巣、脾臓、骨、皮膚または子宮内膜細胞を含む。特に、応答性細胞は、限定されるものでないが、神経細胞；網膜細胞；光受容体（網膜杆体および網膜錐体）、神経節、双極、水平、無軸索、ミュラー（Mueller）細胞；筋細胞；心細胞；心筋、ペースメーカー、洞房結節（sinoatrial node、sinoatrial node、sinus node）、接合組織細胞（房室結節（atrioventricular node）およびヒス束（bundle of His））；肺細胞；肝細胞（liver cell）；肝細胞（hepatocytes）、星状、およびクップファー（Kupffer）細胞；腎細胞；メサングウム、腎上皮、および管状間質細胞；小腸細胞；杯（goblet）、腸腺（陰窩）および腸内分泌細胞；副腎皮質細胞；球状帯、束状、および網状帯細胞；副腎髄質細胞；クロム親和性；毛細管細胞；周皮細胞；精巢細胞；ライディヒ（Leydig）、セルトーリ（Sertoli）、および精子細胞とそれらの前駆体；卵巣細胞；グラーフ卵胞（Graffian follicle）および始原卵胞（primordial follicle）細胞；子宮内膜細胞；子宮内膜間質および子宮内膜細胞；脾細胞；ランゲルハンス島、細胞、細胞、細胞、およびF細胞；皮膚細胞；骨細胞；前骨芽、破骨、骨芽細胞；ならびに以上に挙げた器官に存在する幹および内皮細胞を含む。さらに、このような応答性細胞およびエリスロポエチンによりそれらに提供される利益は、直接的に応答性でない他の細胞またはこのような応答性細胞を含有する組織もしくは器官でない他の細胞に対する保護または増強を、間接的に提供することまで拡大することができる。細胞、組織もしくは器官の一部として存在する応答性細胞の増強から間接的に利益を得るこれらの他の細胞もしくは組織もしくは器官は「関連した」細胞、組織および器官として存在する。このように、本明細書に記載したエリスロポエチンの利益は、組織もしくは器官中に存在する少数もしくは小比率の応答性細胞、例えば、このような組織中の興奮性もしくは神経組織、またはテストステロンを作る精巢のライディヒ（Leydig）細胞の存在の結果として提供される。一態様においては、応答性細胞もしくはその関連した細胞、組織、もしくは器官は、興奮性細胞、組織、もしくは器官でないか、または興奮性

10

20

30

40

50

細胞もしくは組織を主に含むものではない。

【0052】

最終的な利益のために誘導される意図的な有害条件（例えば高投与化学療法、放射線治療、*ex-vivo*移植体生存力の延長、および長時間の手術で誘導される虚血）の継続時間と程度は、本発明を利用することにより実施することができる。しかし、本発明は、限定されるものでないが、一態様として、標的応答性細胞が内皮細胞バリアまたは内皮の密着帯（tight junction）によって脈管構造の遠位にあることを特徴とする方法または組成物を含む。本発明は一般的に、エリスロポエチンへ曝露することにより利益を受けることができる応答性細胞および関連する細胞、組織および器官に関する。さらに、急の有害な出来事（外傷など）が起こった後に、エリスロポエチンへの曝露により細胞組織または器官機能不全を回復または再生させることができる。

10

【0053】

本発明は一般的に、細胞機能を維持し、促進し、増強し、再生し、またはいずれか他の方法で利益を与える、上記目的の医薬組成物を調製するためのエリスロポエチンの使用に関する。本発明はまた、哺乳動物に本明細書に記載のエリスロポエチンの有効量を投与することにより、細胞機能を維持し、増強し、促進し、または再生する方法にも関する。本発明はさらに、細胞、組織または器官をエリスロポエチンに曝露することにより、*ex vivo*で細胞機能を維持し、促進し、増強し、再生する方法に関する。本発明はまた、器官または組織保存に利用するためのエリスロポエチンを含む灌流液組成物にも関する。

【0054】

20

様々な本発明の方法が利用する医薬組成物は、特定の経路および曝露時間に、少なくとも哺乳動物体内のまたはそれから取り出した応答性細胞に対してポジティブな効果または利益を与えるために有効な量のエリスロポエチンを含む。意図する治療法の標的細胞、組織または器官が、エリスロポエチンの内皮細胞バリア通過を必要とする場合、医薬組成物は、内皮細胞バリアを通過した後に応答性細胞に所望の効果を及ぼすことができる濃度のエリスロポエチンを含む。エリスロポエチン受容体と相互作用しかつ受容体の活性を調節することができる分子、（本明細書ではエリスロポエチンまたはエリスロポエチン受容体活性調節因子と呼ぶ）は本発明の筋書きにおいて有用である。これらの分子は、上記の、例えば、天然、合成および組換え形態のエリスロポエチン分子であってもよいし、または、本明細書に記載のエリスロポエチン応答性細胞活性を調節することを除くと、エリスロ

30

【0055】

以上確認した組織保護属性に加えて、エリスロポエチンはさらに通常、骨髄に対する効果、すなわち、ヘマトクリットの増加（赤血球新生）、血管狭窄（高血圧）、血小板の活性化過剰、前凝固活性、および血小板産生の増加に関係がある。しかし、これらの骨髄に対する効果は以上考察した細胞、組織または器官機能不全を治療するためのエリスロポエチンの慢性および急性投与にリスクを課しうる。それ故に、本発明は一般的に、好ましくは、骨髄に対するエリスロポエチンの1以上の効果を欠く化学修飾されたエリスロポエチンからなる組織保護性サイトカインの利用に関する。さらに好ましくは、組織保護性サイトカインは赤血球新生を欠き；最も好ましくは組織保護性サイトカインは骨髄に対するエリスロポエチンの効果を全て欠くものである。他の実施形態においては、組織保護性サイトカインは上記効果のいずれか2つを欠くかまたは上記効果のいずれか3つを欠く。

40

【0056】

さらに、本明細書に記載の用途に所望される組織保護性サイトカインは、アルギニン、リシン、チロシン、トリプトファン、またはシステイン残基またはカルボキシル基のグアニジン化、アミジノ化、カルバミル化（カルバモイル化）、トリニトロフェニル化、アセチル化、サクシニル化、ニトロ化、または修飾、とりわけ、例えば、限定したタンパク質分解、アミノ基の除去、および/または分子生物学技術によるエリスロポエチンのアルギニン、リシン、チロシン、トリプトファン、またはシステイン残基の突然変異置換により、作製することができる。好ましくは、これらの化学修飾は、4つの認識された受容体領

50

域、すなわちVLQRY（配列番号1）、TKVNFYAW（配列番号2）、SGLRSLTTL（配列番号3）、またはSNFLRG（配列番号4）に影響を与える。さらに好ましくは、天然では基本的であるこれらの受容体領域を、これらの領域内で塩基性アミノ酸、アルギニンおよびリシンの化学修飾により修飾する。さらに、これらの受容体領域を囲む分子の範囲も同様に化学的に修飾し、分子の動力学または受容体結合特性に影響を与えてもよい。これにより、特定の器官と組織に対して十分なレベルの活性を維持するが、他のもの、例えば赤血球に対してはそうでない組織保護性サイトカインを産生する（例えば、Satakeら；1990, Biochim. Biophys. Acta 1038:125-9；本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）。以下に記載の限定されるものでない一例は、エリスロポエチンのアルギニン残基のグリオキサー

10

ール、例えばフェニルグリオキサーによる修飾である（Takahashi, 1977, J Biochem. 81:395-402、のプロトコルによる）。以下に見られるように、このような組織保護性サイトカイン分子はその神経栄養性効果を全て保持する。このような組織保護性サイトカイン分子は、本明細書に記載の様々な用途および組成物に全て受入れられる。

【0057】

エリスロポエチンおよびエリスロポエチン様分子の活性（単位：unit）、伝統的にげっ歯類モデルにおける赤血球産生の刺激におけるその効力に基づいて（およびエリスロポエチンの国際標準によって）定義される。通常のエリスロポエチン（分子量34,000）の1単位（U）はタンパク質約8ng（1mgは約125,000Uである）。しかし、赤血球産生に対する効果は、本明細書における所望の活性の二次的なものであり、本発明の組織保護性サイトカインの幾つかについては検出可能な特性である必要はないため、赤血球産生活性に基

20

いて活性を定義するのは適当ではない。従って、本明細書に使用される、エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインの活性単位は、神経または他の応答細胞系において、WHO国際標準エリスロポエチンによって誘発される活性と同じ活性を同じ系において誘発するのに必要なタンパク質の量として定義する。当業者であれば、本明細書中に示されるガイダンスに従って、非赤血球産生性エリスロポエチンまたは関係する組織保護性サイトカイン分子の単位を容易に決定することができるであろう。

【0058】

上述した組織保護性サイトカインに加えて、以下の考察は様々な本発明の組織保護性サイトカインについて広く行われる。

【0059】

本発明の組織保護性サイトカインは、アシアロエリスロポエチンと呼ばれる少なくともシアル酸部分を有しないエリスロポエチンからなってもよい。好ましくは、本発明の組織保護性サイトカインはヒトアシアロエリスロポエチンである。これは、シアリダーゼを用いて、例えばProZyme Inc.（San Leandro, California）からのシアリダーゼAの製造業者パッケージに記載されるように、エリスロポエチンを脱シアリル化（desialylate）することによって調製することができる。典型的には、PROZYME（登録商標）GLYCOPRO（登録商標）の配列決定等級（sequencing-grade）のシアリダーゼA（登録商標）（N-アセチルノイラミン酸グリコヒドラーゼ、EC 3.2.1.18）を用いて、複合糖鎖および糖タンパク質（エリスロポエチンなど）から全ての非還元末端シアル酸残基を切断する。これはまた、（内部残基と結合した）分枝シアル酸も切断する。シアリダーゼAはアルトロバクター属Arthrobacter ureafaciensのクローンから単離される。

40

【0060】

以上の操作の限定されない例においては、エリスロポエチンのシアリダーゼ（0.025U/mgEP0）による脱シアリル化処理を37℃で3時間行い、その後エリスロポエチンを脱塩して濃縮してもよい。AKTAPRIME（登録商標）系（Amersham Pharmacia Biotech）を用いてイオン交換カラムを通過させた後に、選択したバッファーを用いて溶出し、免疫電気泳動（PI~8.5および~7.9でIEFゲル上を移動）により同定したトップの2バンドだけを含む画分を選択した。この組織保護性サイトカインの調製物中に有意な量のシアル酸が検出されてはならない。

【0061】

10

20

30

40

50

代わりの実施形態においては、本発明の組織保護性サイトカインは、上記の方法によった部分的脱シアリル化による、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13個のシアリル酸残基を有するエリスロポエチンであってもよい。エリスロポエチンの部分的脱シアリル化から得られるこれらの組織保護性サイトカインは本明細書ではヒポシアロエリスロポエチンとも呼ばれて、例えば、1エリスロポエチン分子当たり2個だけのシアリル酸をもつ均一な組成物であってもよく、または、様々な異なるシアリル化度の不均一な混合物、例えば1エリスロポエチン当たり平均で約1～約4個のシアリル酸分子のような少数、または他の例では、1エリスロポエチン当たり平均で約10～約13個のシアリル酸のような多数を有する不均一な混合物であってもよい。このような混合物はアシアロエリスロポエチンまたはエリスロポエチンを含んでもよい。

10

【0062】

上述の用途のエリスロポエチンは、少なくとも1以上の修飾されたアルギニン残基を含んでもよい。例えば、修飾型エリスロポエチンは、1以上のアルギニン残基上にR-グリオキサル部分（ここで、Rはアリール、ヘテロアリール、低級アルキル、低級アルコキシ、またはシクロアルキル基、または-デオキシグリシトリル基であってもよい）を含むものであってもよい。本明細書に使用される用語の低級「アルキル」は、好ましくは1～6個の炭素原子を含有する、直鎖または分枝鎖の飽和脂肪族炭化水素基を意味する。このような代表的な基は、メチル、エチル、イソプロピル、イソブチル、ブチル、ペンチル、ヘキシルなどである。用語「アルコキシ」は、上に定義した分子の残部に酸素が結合した低級アルキル基を意味する。アルコキシの例は、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシなどを含む。用語「シクロアルキル」は、3～約8炭素をもつ環状アルキル基を意味し、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロヘキシルなどを含む。用語「アリール」はフェニルおよびナフチル基を意味する。用語「ヘテロアリール」は、酸素、窒素および硫黄からなる群から選択される1～3ヘテロ原子を含む4～10員環のヘテロ環基を意味する。例は、限定されるものでないが、イソキサゾリル、フェニルイソキサゾリル、フリル、ピリミジニル、キノリル、テトラヒドロキノリル、ピリジル、イミダゾリル、ピロリジニル、1,2,4-トリアゾリル、チアゾリル、チエニルなどを含む。R基は置換されたもの、例えば3-デオキシグルコソンの4-トリヒドロキシブチル基等であってもよい。R-グリオキサールの典型的な例は、グリオキサル、メチルグリオキサル、3-デオキシグルコソン、およびフェニルグリオキサルである。好ましいR-グリオキサル化合物は、メチルグリオキサルまたはフェニルグリオキサルである。このような修飾方法の例は、Werberら、1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11): 1169-70（フェニルグリオキサルを用いるもの）に記載されている。

20

30

【0063】

さらなる例においては、少なくとも1つのアルギニン残基は、好ましくは約50mmolハウ酸塩バッファー（pH 8～9）中において、ビシナルジケトン、例えば2,3-ブタンジオンまたはシクロヘキサジオンとの反応により修飾することができる。後者の2,3-ブタンジオンによる修飾の手法は、Riordan, 1973, *Biochemistry* 12 (20): 3915-3923に従って；そしてシクロヘキサジオンによる修飾の手法は、Patthyら、1975, *J. Biol. Chem* 250 (2): 565-9に従って行うことができる。

40

【0064】

本発明の組織保護性サイトカインは、少なくとも1以上の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基の修飾を含み、このような修飾はリシン残基のアミノ基修飾剤との反応から得られるものなどがある。例えば、エリスロポエチンまたは上記のアシアロエリスロポエチンまたはヒポシアロエリスロポエチンを、アセチル化、カルバミル化、サクシニル化、酸化および、とりわけ、その結果生じるカルボキシメチルリシン化によってアミノ基を修飾することができる。

【0065】

限定されない例においては、組織保護性サイトカインは、エリスロポエチン、または脱シアリル化されたエリスロポエチン、例えばアシアロエリスロポエチンを、再結晶したシ

50

アン酸カリウムを用いてホウ酸塩バッファー中でカルバミル化し、その後、透析を実施することにより作製することができる。

【0066】

同様に、上記のエリスロポエチンは、無水コハク酸との反応によりサクシニル化し、次いで透析して本発明の組織保護性サイトカインを作ることができる。

【0067】

さらに他の実施形態においては、組織保護性サイトカインは、エリスロポエチンを、無水酢酸とリン酸バッファー中で反応させ、エリスロポエチンをアセチル化して作製することができる。この反応は水に対する透析により停止することができる。この方法は、Satakeら, (1990). 「エリスロポエチンの化学修飾：グアニジン化による *in vitro* 活性の増加 (Chemical modification of erythropoietin: an increase in *in-vitro* activity by guanidination)」 *Biochimica et Biophysica Acta*. 1038:125-129に記載されている。

10

【0068】

他の実施形態においては、組織保護性サイトカインは、エリスロポエチンまたはアシアロエリスロポエチンから、グリオキシル酸および NaBH_3CN とのリン酸ナトリウムバッファー中の反応およびその後の透析により調製される N^6 -(カルボキシメチル)リシン (CML) アダクトである。Akhtarら, (1999) 「組換え α -クリスタリンの N^6 -(カルボキシメチル)リシンアダクトのコンフォメーションに関する研究 (Conformational study of N^6 -(carboxymethyl)lysine adducts of recombinant α -crystallins)」 *Current Eye Research*, 18: 270-276、を参照。

20

【0069】

他の実施形態においては、組織保護性サイトカインは、エリスロポエチンのリシン残基を、グリオキサル誘導体との反応、例えばグリオキサル、メチルグリオキサルおよび3-デオキシグルコソンとの反応により γ -カルボキシアルキル誘導体を作ることによって作製する。例としては、Glomb及びMonnier, 1995, *J. Biol. Chem.* 270(17): 10017-26に記載されるようなグリオキサルとの反応によりカルボキシメチルリシンを形成させるもの、又は、Degenhardtら, 1998, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44(7):1139-45に記載されるようなメチルグリオキサルとの反応により (1-カルボキシエチル)リシンを形成させるものが挙げられる。修飾したリシン残基をさらに化学的に還元してもよい。例えば、実施例2に記載される方法等に従ってリシン基によりエリスロポエチンをビオチン化してもよい。実施例2では、D-ビオチノイル- γ -アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルをエリスロポエチンと反応させた後、Wojchowski及びCaslake, 1989, *Blood* 74(3):952-8により記載されたようにセントリコン (Centricon) 10カラムでのゲル濾過により未反応ビオチンを除去した。この報文において、著者らはエリスロポエチンをビオチン化する3つの異なる方法を使用しており、本明細書中に記載された用途で用いるエリスロポエチンを調製するためには、これらの方法のどれでも用いることもできる。ビオチンは、(1) シアル酸成分、(2) カルボキシラート基又は(3) アミノ基に付加することができる。

30

【0070】

他の好ましい実施形態においては、リシンをアルデヒド又は還元糖と反応させてイミンを形成させ、このイミンを、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等を用いた還元により安定化させて、グルシトリルリシン等のN-アルキル化リシンを形成してもよいし、又は還元糖を用いる場合は該イミンをアマドリ転位又はヘインズ転位により安定化させて、 γ -デオキシ- γ -フルクトシルリシン等の γ -デオキシ- γ -アミノ糖を形成してもよい。例として、リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4) 中の0.5Mグルコースと一緒に60日間インキュベートすることによるフルクトシルリシン修飾型タンパク質の調製は、Makitaら, 1992, *J. Biol. Chem.* 267:5133-5138により記載されている。他の例において、リシン基を、シアナートイオンとの反応等によってカルバミル化してもよいし、アルキル-イソシアナート、アリール-イソシアナート、アルキル-イソチオシアナートもしくはアリール-イソチオシアナートとの反応によって、アルキル-カルバミル化、アリール-カルバミル化、アルキル

40

50

-カルバモイル化もしくはアリアル-カルバモイル化してもよく、またはリシン基を反応性アルキル-またはアリアルカルボン酸誘導体により、例えば、無水酢酸または無水コハク酸または無水フタル酸との反応によりアシル化してもよい。例としては、リシン基の4-スルホフェニルイソチオシアナートによるまたは無水酢酸による修飾が挙げられ、両方の例が、Gaoら, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91(25):12027-30に記載されている。リシン基はまた、トリニトロベンゼンスルホン酸または、好ましくはその塩との反応により修飾することもできる。このような方法は、以下の実施例2に記載されている。

【0071】

エリスロポエチンの少なくとも1つのチロシン残基は、求電子試薬によって、例えばニトロ化またはヨウ素化により芳香環位置において修飾して、組織保護性サイトカインを

10

【0072】

エリスロポエチンの少なくともアスパラギン酸またはグルタミン酸残基は、例えば、カルボジイミドとの反応とその後のアミン、例えば、限定されるものでないが、グリシンアミドとの反応により修飾することができる。

20

【0073】

他の例においては、エリスロポエチンのトリプトファン残基は、例えば、n-ブロモスクシンイミドまたはn-クロロスクシンイミドとの反応により、Josseら, Chem Biol Interact 1999 May 14; 119-120に記載の方法に従って修飾することができる。

【0074】

さらに他の例においては、組織保護性サイトカインは、天然エリスロポエチンの少なくとも1つのアミノ基を除去することにより調製することができ、このことは、ニンヒドリンとの反応およびその結果生じるカルボニル基の水素化ホウ素との反応による還元などにより達成することができる。

【0075】

なおさらなる例においては、ジチオトレイトール等の還元剤と反応させた後に、その結果生じるスルフヒドリルをヨードアセトアミド、ヨード酢酸又は他の求電子試薬と反応させてジスルフィド結合の再形成を防ぐことにより、エリスロポエチン分子中のシスチン結合のうちの少なくとも1つの開裂を少なくとも有する組織保護性サイトカインが提供される。上記記述したように、二者択一的にまたは組合わせて、実際の橋架けに参加するシステイン分子を改変するか、またはエリスロポエチンが少なくとも1つの天然分子中に存在するジスルフィド結合を形成できなくなる少なくとも1つの他のアミノ酸残基を改変することによって、ジスルフィド結合を無くすることができる。

30

【0076】

エリスロポエチンを特異的残基を標的とする限定した化学的タンパク質分解で処理し、例えばトリプトファン残基後に切断することにより、組織保護性サイトカインを調製することができる。そのようにして得られるエリスロポエチン断片は本明細書に包含される。

40

【0077】

上記のように、本明細書中に記載された目的のために有用な組織保護性サイトカインは、上記修飾のうちの少なくとも1つを有するものであってもよいが、上記修飾のうち2以上を有するものであってもよい。分子の糖鎖部分に1つの修飾およびアミノ酸部分に1つの修飾を有する組織保護性サイトカインの例として、組織保護性サイトカインはアシアロエリスロポエチンであってかつそのリシン残基がビオチン化もしくはカルバミル化されていてもよい。

【0078】

50

さらに、化学的に修飾したエリスロポエチンをさらにエリスロポエチンの少なくとも 1 つのアミノ酸を突然変異させることにより修飾することができる。このような突然変異は、置換、内部欠失を含む欠失、融合タンパク質を生じる付加を含む付加、またはアミノ酸配列内および/またはアミノ酸配列に隣接したアミノ酸残基の保存的置換を含んでもよいが、しかしその変化は機能的に等価のエリスロポエチンを産生するという意味で「サイレントな」変化をもたらす突然変異である。保存的アミノ酸置換は、関わる残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンを含み；極性中性アミノ酸は、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含み；正荷電（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リシン、およびヒスチジンを含み；そして負荷電（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。あるいは、非保存的アミノ酸変化、およびより大きい挿入および欠失を利用して機能的に改変されたエリスロポエチンを作製することができる。このような突然変異体を用いて所望の様にエリスロポエチン特性を改変することができる。例えば、一実施形態においては、本発明の実施に有用なエリスロポエチンを、受容体結合に影響を与えるエリスロポエチンの 4 つの機能性ドメイン：VLQRY（配列番号 1）および/またはTKVNFYAW（配列番号 2）および/またはSGLRSLTTL（配列番号 3）および/またはSNFLRG（配列番号 4）の中の 1 以上のアミノ酸において改変することができる。他の実施形態においては、分子の動態または受容体結合に影響を与える分子の周囲領域の中に突然変異を含有するエリスロポエチンを用いることができる。

10

20

【0079】

これらのさらなる修飾を利用して、組織保護効果を増強し、骨髄効果を抑制し、または組織保護性サイトカインの物理的特性、例えば電荷を改変することができる。

【0080】

本発明の組織保護性サイトカインを調製する方法の以上の例は、単に説明のためであって限定するものではなく、これらまたは他の方法を用いて本発明の化合物を調製してもよい。調製の方法が名称内に含まれる上記の名称、例えば「アセチル化」または「ビオチン化」は、本明細書では単に化合物が作られる方法を理解する手段として与えられたのであり、それに関わらず、本発明は上記反応の生成物である化合物に関する。当業者であれば、上記反応の生成物である化合物を容易に理解するであろう。ここまで、本発明の化合物を非公式または慣用の名称で参照して、本発明の修飾の範囲およびその修飾がエリスロポエチンまたは修飾型エリスロポエチン分子の 1 以上の部位で起こりうることを伝えてきた。限定されない例として挙げれば、次の具体的な化合物が本明細書に包含される化合物グループのメンバーである。

30

【0081】

1. カルバミル化エリスロポエチン：以下の化合物はエリスロポエチン分子の N 末端アミノ酸のカルバモイル部分（「 ---N-カルバモイル- 」）またはエリスロポエチンの 1 以上のリシル残基の アミノ基のカルバモイル部分（「 N- ---カルバモイル- 」）を表す。もちろん、 ---N- 修飾を伴うまたは伴わない複数の N- 修飾が存在してもよい。

40

【0082】

- i. $\text{---N-カルバモイルエリスロポエチン}$ ；
- ii. $\text{N- ---カルバモイルエリスロポエチン}$ ；
- iii. $\text{---N-カルバモイル, N- ---カルバモイルエリスロポエチン}$ ；
- iv. $\text{---N-カルバモイルアシアロエリスロポエチン}$ ；
- v. $\text{N- ---カルバモイルアシアロエリスロポエチン}$ ；
- vi. $\text{---N-カルバモイル, N- ---カルバモイルアシアロエリスロポエチン}$ ；
- vii. $\text{---N-カルバモイルヒポシアロエリスロポエチン}$ ；
- viii. $\text{N- ---カルバモイルヒポシアロエリスロポエチン}$ ；および
- ix. $\text{---N-カルバモイル, N- ---カルバモイルヒポシアロエリスロポエチン}$ 。

50

【 0 0 8 3 】

2. サクシニル化エリスロポエチン：以下の化合物はエリスロポエチン分子のN末端アミノ酸のサクシニル部分（「 -N-サクシニル-」）またはエリスロポエチンの1以上のリシル残基のアミノ基のサクシニル部分（「N- -サクシニル-」）を表す。もちろん、-N-修飾を伴うまたは伴わない複数のN- 修飾が存在してもよい。

【 0 0 8 4 】

- i. -N-サクシニルエリスロポエチン；
- ii. N- -サクシニルエリスロポエチン；
- iii. -N-サクシニル,N- -サクシニルエリスロポエチン；
- iv. -N-サクシニルアシアロエリスロポエチン；
- v. N- -サクシニルアシアロエリスロポエチン；
- vi. -N-サクシニル,N- -サクシニルアシアロエリスロポエチン；
- vii. -N-サクシニルヒポシアロエリスロポエチン；
- viii. N- -サクシニルヒポシアロエリスロポエチン；および
- ix. -N-サクシニル,N- -サクシニルヒポシアロエリスロポエチン。

10

【 0 0 8 5 】

3. アセチル化エリスロポエチン：以下の化合物はエリスロポエチン分子のN末端アミノ酸のアセチル部分（「 -N-アセチル-」）またはエリスロポエチンの1以上のリシル残基のアミノ基のアセチル部分（「N- -アセチル-」）を表す。もちろん、-N-修飾を伴うまたは伴わない複数のN- 修飾が存在してもよい。

20

【 0 0 8 6 】

- i. -N-アセチルエリスロポエチン；
- ii. N- -アセチルエリスロポエチン；
- iii. -N-アセチル,N- -アセチルエリスロポエチン；
- iv. -N-アセチルアシアロエリスロポエチン；
- v. N- -アセチルアシアロエリスロポエチン；
- vi. -N-アセチル,N- -アセチルアシアロエリスロポエチン；
- vii. -N-アセチルヒポシアロエリスロポエチン；
- viii. N- -アセチルヒポシアロエリスロポエチン；および
- ix. -N-アセチル,N- -アセチルヒポシアロエリスロポエチン。

30

【 0 0 8 7 】

4. ビオチン化エリスロポエチン：以下の化合物はエリスロポエチン分子のN末端アミノ酸のビオチニル部分（「 -N-ビオチニル-」）またはエリスロポエチンの1以上のリシル残基のアミノ基のビオチニル部分（「N- -ビオチニル-」）を表す。もちろん、-N-修飾を伴うまたは伴わない複数のN- 修飾が存在してもよい。

【 0 0 8 8 】

- i. -N-ビオチニルエリスロポエチン；
- ii. N- -ビオチニルエリスロポエチン；
- iii. -N-ビオチニル,N- -ビオチニルエリスロポエチン；
- iv. -N-ビオチニルアシアロエリスロポエチン；
- v. N- -ビオチニルアシアロエリスロポエチン；
- vi. -N-ビオチニル,N- -ビオチニルアシアロエリスロポエチン；
- vii. -N-ビオチニルヒポシアロエリスロポエチン；
- viii. N- -ビオチニルヒポシアロエリスロポエチン；および
- ix. -N-ビオチニル,N- -ビオチニルヒポシアロエリスロポエチン。

40

【 0 0 8 9 】

5. ヨウ素化エリスロポエチン：もちろん、当業者であれば、エリスロポエチン内の複数の異なるチロシン残基だけでなくチロシン残基の組合わせをヨウ素化してもよく、掲げたものは単に説明のためであることを理解するであろう。

【 0 0 9 0 】

50

- i ヨードエリスロポエチン；
- ii ヨードアジアロエリスロポエチン；および
- iii ヨードヒポシアロエリスロポエチン。

【0091】

6. カルボキシメチルリシル-エリスロポエチン：次の化合物は、エリスロポエチンのリシル残基の1以上のアミノ基上のカルボキシメチル部分（「N- -カルボキシメチル-」）を表す。もちろん、複数のN- 修飾が存在してもよい。

【0092】

- i N- -カルボキシメチルエリスロポエチン；
- ii N- -カルボキシメチルアジアロエリスロポエチン；および
- iii N- -カルボキシメチルヒポシアロエリスロポエチン。

10

【0093】

様々な宿主発現ベクター系を利用して、本発明のエリスロポエチン及びエリスロポエチン関連分子を作製することができる。このような宿主発現系は、目的のエリスロポエチンを作製した後に精製するために用いる媒介手段を代表するものであるが、適当な塩基コード配列で形質転換もしくはトランスフェクトしたときにin situで修飾型エリスロポエチン遺伝子産物を示し得る細胞でもある。これらとしては、以下に挙げる細菌、昆虫、植物、及び哺乳動物（ヒトを含む）宿主系が挙げられるがこれらに限定されない：例えば修飾型エリスロポエチン産物をコードする配列を含むバキュロウイルス等の組換えウイルス発現ベクターに感染させた昆虫細胞系；カリフラワーモザイクウイルスCaMVやタバコモザイクウイルスTMV等の組換えウイルス発現ベクターに感染させた植物細胞系、又はエリスロポエチン 関連分子をコードする配列を含むTiプラスミド等の組換えプラスミド発現ベク 20ターで形質転換した植物細胞系；あるいは、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えばメタロチオネインプロモーター等）もしくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えばアデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター等）を含む組換え発現構築物を宿している、ヒト細胞系を含む哺乳動物細胞系（例えばHT1080、COS、CHO、BHK、293、3T3）。

20

【0094】

さらに、挿入された配列の発現を調節する宿主細胞株、又は、望み通りの特定の仕様で遺伝子産物を修飾及びプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク 30質産物のこのような修飾（例えばグリコシル化）及びプロセッシング（例えば切断）は、タンパク質の機能にとって重要である。異なる宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後のプロセッシング及び修飾の特徴的且つ独特なメカニズムを有する。発現される外来タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを行うために、適当な細胞系又は宿主系を選択することができる。このために、一次転写産物の適切なプロセッシング、グリコシル化、及び遺伝子産物のリン酸化のための細胞内装置（cellular machinery）を有する真核宿主細胞を用いることができる。このような哺乳動物宿主細胞（ヒト宿主細胞を含む）としては、HT1080、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3及びWI38が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0095】

組換えタンパク質の長期的な高収率産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、エリスロポエチン関連分子の遺伝子産物を安定に発現する細胞系を遺伝子操作により作製することができる。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを用いるのではなく、適当な発現制御エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー、配列、転写終結因子、ポリ阿德ニル化部位等）により制御されるDNA及び選択マーカーを用いて宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作した細胞を濃縮培地中で1～2日間増殖させたあと、選択培地に移し替える。組換えプラスミド中の選択マーカーは、その選択 40に対する耐性を与え、細胞の染色体の中にプラスミドが安定に組み込まれてこれらの細胞がフォーカス（foci）を形成できるようにし、これらのフォーカスは、クローニングして細胞系へと拡大させることができる。この方法は、エリスロポエチン 関連分子の遺伝子 50

40

50

産物を発現する細胞系を遺伝子操作するために、都合よく使用することができる。このような遺伝子操作された細胞系は特に、エリスロポエチン関連分子の遺伝子産物の内因活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニング及び評価において有用である。

【0096】

あるいは、細胞系又は微生物内での内因性エリスロポエチン遺伝子の発現特性は、異種DNA調節エレメントを、挿入された調節エレメントが内因性エリスロポエチン遺伝子に機能的に影響し得る形で結合されるように、安定な細胞系もしくはクローニングされた微生物のゲノム中に挿入することにより、改変することができる。例えば、通常は「転写上サイレントな(transcriptionally silent)」内因性エリスロポエチン遺伝子(すなわち細胞系の中で通常、全く又は非常に低レベルでしか発現されないエリスロポエチン遺伝子)を、その細胞系又は微生物の中で通常は発現されない遺伝子産物の発現を促進することができる調節エレメントを挿入することによって、活性化することができる。あるいは、転写上サイレントな内因性エリスロポエチン遺伝子を、細胞型を問わず機能する無差別な調節エレメントを挿入することによって活性化することができる。

10

【0097】

当業者に周知である、及びフランス特許第2646438号(パスツール研究所)、米国特許第4,215,051号(Chappel)、米国特許第5,578,461号(Sherwinら)、国際特許出願第PCT/US92/09627号(W093/09222号)(Seldenら)、及び国際特許出願第PCT/US90/06436号(W091/06667号)(Skoultchira)(これらはそれぞれ本明細書中に参考として全て組み込まれる)に記載されている標的を定めた相同的組換え等の技法を用いて、異種調節エレメントを、該エレメントが内因性エリスロポエチン遺伝子に機能的に影響し得る形で結合されるように、安定な細胞系又はクローニングされた微生物の中に挿入することができる。

20

【0098】

本発明の1つの実施形態において、シアル酸残基が少ないか又はシアル酸残基を全く持たないエリスロポエチン関連分子を、哺乳動物細胞(ヒト細胞を含む)内で作製することができる。このような細胞は、シアル酸を付加する酵素(すなわち -ガラクトシド 2,3シアリルトランスフェラーゼ(2,3シアリルトランスフェラーゼ)及び -ガラクトシド 2,6シアリルトランスフェラーゼ(2,6シアリルトランスフェラーゼ)活性)に欠陥があるように又は該酵素を持たないように遺伝子操作される。1つの実施形態において、2,3シアリルトランスフェラーゼ遺伝子及び/もしくは 2,6シアリルトランスフェラーゼ遺伝子のいずれか又は両方が欠失した哺乳動物細胞を用いる。このような欠失は、当分野で周知である遺伝子ノックアウト技法を用いて構築することができる。他の実施形態において、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)欠失チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を、組換えエリスロポエチン関連分子を産生するための宿主細胞として使用する。CHO細胞は酵素 2,6シアリルトランスフェラーゼを発現しないので、これらの細胞内で産生される糖タンパク質のN結合型オリゴ糖への2,6結合中にシアル酸を付加しない。その結果、CHO細胞内で産生された組換えタンパク質は、ガラクトースへの2,6結合中にシアル酸を持たない(Sasakiら, (1987); Takeuchiら(前掲)、Mutsaersら, Eur. J. Biochem. 156, 651(1986); Takeuchiら, J. Chromatogr. 400, 207(1987)。一実施形態においては、アシアロ-エリスロポエチンを産生する宿主細胞を作るために、CHO細胞中の 2,3シアリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を欠失させる。1つの実施形態において、アシアロ-エリスロポエチンを産生する宿主細胞を作成するために、CHO細胞内の 2,3シアリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を欠失させる。このような2,3シアリルトランスフェラーゼノックアウトCHO細胞はシアリルトランスフェラーゼ活性を全く持たないため、アシアロ-エリスロポエチンの組換え発現及び産生に有用である。

30

40

【0099】

他の実施形態において、アシアロ糖タンパク質は、ゴルジ体内へのシアル酸の輸送を妨げることによって作製することができる(例えばEckhardtら, 1998, J. Biol. Chem. 273:20189-95)。当業者に周知である方法(例えばOelmannら, 2001, J. Biol. Chem. 276:26291-300)を用いて、ヌクレオチド糖CMP-シアル酸トランスポーターの突然変異誘発を起

50

こして、チャイニーズハムスター卵巣細胞の突然変異体を作製することができる。これらの細胞は、エリスロポエチン等の糖タンパク質にシアル酸残基を付加することができないので、アシアロエリスロポエチンのみを産生する。

【0100】

エリスロポエチンを産生するトランスフェクトされた哺乳動物細胞は、培養培地中に漏れ出した場合に効率良くシアロエリスロポエチンを分解する細胞質ゾルシアリダーゼも産生する（例えば、Gramerら、1995 Biotechnology 13:692-698）。当業者に周知である方法（例えばFerrariら、1994, Glycobiology 4:367-373に記載された情報から）を用いて、細胞系をトランスフェクトしたり、突然変異させたり、又は他の方法で、シアリダーゼを構成的に産生するようにさせることができる。このように、アシアロエリスロポエチンは、アシアロエリスロポエチンの製造中に作製することができる。

10

【0101】

本発明の組織保護性サイトカインは、分子のグリコシル化状態とは関係なく、エリスロポエチン中にアミノ酸残基の少なくとも1つの修飾を有する。上述のように、化学修飾は少なくとも、少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つのアミノ基、例えばリシン残基もしくはN末端アミノ基の修飾、または少なくとも1つのチロシン残基のヨウ素化であってもよい。

【0102】

本発明の組換え組織保護性サイトカインおよび化学修飾した組換え組織保護性サイトカインを製造した後、当業者は周知のアッセイを用いて、サイトカインの組織保護属性および骨髄に対する効果の不在性を確かめることができる。

20

【0103】

例えば、組換え組織保護性サイトカインの非赤血球新生効果は、TF-1アッセイを用いて確かめることができる。このアッセイにおいては、TF-1細胞を、GM-CSF 5ng/mlおよびFCS 10%を補充した不完全RPMI培地中で、1日間、37℃にてCO₂インキュベーター内で増殖する。次いで細胞を飢餓培地（5%FCS、GM-CSFなし）中で洗浄し、10⁶細胞/mlの密度で16時間懸濁させた。96ウエルプレートを次のように調製した：(1)湿度を維持するために、無菌水100μlを外側ウエルに加える；(2)培地（10%FCS、細胞またはGM-CSFなし）のみを5ウエルに加える；そして(3)25,000細胞/ウエルを、10%FCSおよび組換え組織保護性サイトカインを含有する培地を用いて残りのウエル（試験するサイトカイン1種類当たり5ウエル）に接種する。もし細胞が増殖すれば、組織保護性サイトカインは赤血球新生性でありうる。次いで、化合物のin vivo効果を、組換え組織保護性サイトカインによるヘマトクリットの増加をモニタリングするin vivoアッセイで試験しなければならない。ネガティブな結果（in vitroアッセイのTF-1アッセイにおける細胞の非増殖、またはin vivoアッセイでのヘマトクリットの非増加）は、組換え組織保護性サイトカインが非赤血球新生性であることを意味する。

30

【0104】

組換え組織保護性サイトカインの組織保護特性は、ラットにおけるP-19in vitroアッセイまたは水中毒in vivoアッセイを用いて実証することができるので、その両方を以下にさらに詳しく概説する。上記アッセイは単に例として提供するものであり、当業者に公知であるサイトカインの骨髄および組織保護に対する効果を確認する他の好適なアッセイは本発明によっても同様に考慮されている。

40

【0105】

本発明の一態様の実施において、組織保護性サイトカインを含む上記医薬組成物は、内皮細胞バリアを横切る移行を可能にしかつ応答性細胞に有利な効果をもたらすために十分なレベルの組織保護性サイトカインを脈管構造内に生じる任意の経路により、哺乳動物に投与することができる。組織又は器官を灌流するために使用する場合も、同様の結果が望ましい。組織保護性サイトカインをex-vivo灌流で使用する場合、組織保護性サイトカインは、上記の化学的に修飾されたエリスロポエチンのいずれであってもよい。細胞または組織が血管新生作用を有しないおよび/または投与が細胞もしくは組織を本発明の組成物

50

に浴する場合には、医薬組成物は、組織保護性サイトカイン応答性細胞に有益な有効量の組織保護性サイトカインを提供する。組織保護性サイトカインが移行する時に横切る内皮細胞バリアとしては、哺乳動物内に存在する密着帯、有孔接合部(perforated junction)、有窓接合部(fenestrated junction)、および他のタイプの内皮バリアが挙げられる。好適なバリアは、内皮細胞密着帯であるが、本発明はそれに限定するものではない。

【0106】

上記組織保護性サイトカインは一般に、主に神経症候または精神医学的症候を有する、中枢神経系または末梢神経系のヒト疾患、眼の疾患、心臓血管疾患、心肺疾患、呼吸器疾患、腎臓疾患、尿路疾患、生殖器系疾患、骨疾患、皮膚疾患、胃腸疾患、ならびに内分泌性および代謝性異常の治療的もしくは予防的処置において有用である。特に、このような症状および疾患としては、低酸素状態が挙げられ、該低酸素状態は、中枢神経系組織、抹消神経系組織、心臓組織または網膜組織(例えば脳、心臓、または網膜/眼等)内の興奮性組織などの興奮性組織に悪影響を及ぼす。従って本発明は、種々の症状および状況における低酸素状態により生じる興奮性組織への損傷を治療または予防するために用いることができる。このような条件と環境の限定されるものでない例を、本明細書の以下の表に掲げる。

10

【0107】

本発明に従って治療することができる神経組織の病理の保護の例において、このような病理には、神経組織への酸素供給量の低下により生じる病理が含まれる。神経組織への酸素の利用可能性を低下させるあらゆる条件(ストレス、障害、そして最終的には神経細胞死をもたらす)は、本発明の方法によって治療することができる。一般的に低酸素症および/または虚血症と呼ばれるこれらの症状は、限定されるものでないが、卒中、血管閉塞、出生前もしくは生後の酸素欠乏、窒息、気道内閉塞、溺水初期(near drowning)、一酸化炭素中毒、煙吸入、外傷(外科手術および放射線療法を含む)、仮死、癲癇、低血糖症、慢性閉塞性肺疾患、気腫、成人呼吸促進症候群、低血圧性ショック、敗血症性ショック、アナフィラキシーショック、インスリンショック、鎌状赤血球発症、心停止、律動異常、窒素性ナルコーシス、および心肺バイパス手術により引き起こされる神経性欠損等から生じるかまたはこれらを含む。

20

【0108】

一実施形態において、例えば腫瘍切除または動脈瘤の修復等の外科手術中に傷害または組織障害の危険から生じる傷害または組織障害を防ぐために、例えば特定の組織保護性サイトカイン組成物を投与することができる。低血糖症により引き起こされるまたは低血糖症から生じる他の病理であって、本明細書中に記載される方法によって治療可能なものとしては、インスリンの過剰投与(医原性高インスリン血症とも呼ばれる)、インスリンノーマ、成長ホルモン欠乏、低副腎皮質機能、薬物の過剰投与、およびある種の腫瘍が挙げられる。

30

【0109】

興奮性神経組織の障害により発生する他の病理としては、発作障害(癲癇、痙攣、または慢性発作障害等)が挙げられる。他の治療可能な症状および疾患としては、卒中、多発性硬化症、低血圧症、心停止、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳性小児麻痺、脳または脊髄の外傷、AIDS痴呆、加齢による認知機能の低下、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、発作障害、アルコール中毒症、網膜虚血、緑内障により生じる視神経の障害、およびニューロン減少などの疾患が挙げられる。

40

【0110】

本発明の特定の組成物および方法を利用して、病状または様々な外傷からもたらされる炎症、例えば物理的または化学的に誘導される炎症を治療することができる。このような外傷としては、血管炎、慢性気管支炎、膵炎、骨髄炎、関節リウマチ、糸球体腎炎、視神経炎、側頭動脈炎、脳炎、髄膜炎、横断脊髄炎、皮膚筋炎、多発性筋炎、壊死性筋膜炎、肝炎、および壊死性全腸炎が挙げられる。

【0111】

50

活性化星状細胞は、神経毒を産生することによりニューロンに対する細胞傷害作用を有しうることが実証されている。一酸化窒素、反応性酸素種、およびサイトカインが、脳虚血に反応してグリア細胞から放出される (Becker, K. J. 2001. 「虚血卒中における中枢神経系炎症反応のターゲティング (Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke)」 Curr Opin Neurol 14: 349-353; ならびに Mattson, M.P., Culmsee, C., および Yu, Z.F. 2000. 「卒中におけるアポトーシスおよび抗アポトーシス機構 (Apoptotic and Antiapoptotic mechanisms in stroke)」 Cell Tissue Res 301:173-187を参照)。諸研究はさらに、神経変性のモデルにおいて、グリア活性化とその結果起こる炎症性サイトカインの産生は1次神経損傷に依存することを実証している (Viviani, B., Corsini, E., Galli, C.L., Padovani, A., Ciusani, E., および Marinovich, M. 2000. 「瀕死の神経細胞はプロテアーゼ産物の放出を介してグリアを活性化 (Dying neural cells activate glia through the release of a protease product)」 Glia 32:84-90、ならびに Rabuffetti, M., Scioratti, C., Tarozzo, G., Clementi, E., Manfredi, A.A., および Beltramo, M. 2000. 「Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-クロロメチルケトンによるカスパーゼ-1-様活性の阻害は、アポトーシス低減および前炎症性サイトカインの減少を介して脳虚血における長時間持続する神経保護効果を有する (Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone includes long lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines)」 J Neurosci 20:4398-4404、を参照)。炎症とグリア活性化は、脳虚血、脳外傷および実験的アレルギー性脳脊髄炎を含む神経障害の色々な形態に共通するものであり、これらの障害において、エリスロポエチンは神経保護効果を与える。エリスロポエチンによるサイトカイン産生の阻害は、少なくとも部分的に、その保護効果に介在しう。しかし、腫瘍壊死因子産生を直接阻害する「古典的」抗炎症性サイトカイン、例えばIL-10およびIL-13と異なり、エリスロポエチンはニューロン死の存在においてのみ活性があると思われる。

10

20

30

40

50

【0112】

特定の理論に束縛されることも欲しないものの、この抗炎症性活性は仮説として、限定されるものでないが、複数の理論により説明できるとと思われる。第1に、エリスロポエチンはアポトーシスを阻止するので、アポトーシスによりトリガーされる炎症事象を阻止しう。さらにエリスロポエチンは、瀕死のニューロンからのグリア細胞を刺激するシグナルの放出を阻止するかまたは直接グリア細胞にその産物に対する反応を低下させるように作用しう。他の可能性は、エリスロポエチンが、炎症性カスケードのより近位の、アポトーシスと炎症の両方をトリガーするメンバー (例えば、カスパーゼ1、反応性酸素または窒素中間物) を標的とすることである。

【0113】

さらにエリスロポエチンは、他の抗炎症性化合物 (例えばデキサメタゾン) に典型的に随伴する反跳効果なしに、抗炎症性保護を与えられる。さらに、再び、特定の理論に束縛されることを欲しないものの、この抗炎症性保護はエリスロポエチンの多目的神経毒素 (例えば一酸化窒素 (NO)) に対する効果によるように思われる。活性化星状細胞およびミクログリアは様々な外傷に反応して神経毒性量のNOを産生するが、NOは体内で、本質的な生理学的機能の調節を含む多数の目的を果たす。このように、抗炎症薬の利用はNOまたは他の神経毒素を抑制することにより炎症を軽減するが、もし抗炎症薬の半減期が長すぎると、炎症に導いた外傷から生じた損傷を修復する上でのこれらの化学的役割を妨害しう。本発明の組織保護性サイトカインは、神経毒素、例えばNOの回復能力を妨げることなく、炎症を軽減することができると仮定される。

【0114】

本発明は、1種以上の組織保護性サイトカインおよび組織保護性サイトカイン以外の1種以上の予防もしくは治療薬 (すなわち、有効成分) を含む組成物、ならびに反応性哺乳動物細胞および哺乳動物におけるその関連細胞、組織および器官の炎症に関連する1以上の症候群を予防し、治療しまたは回復する方法であって上記哺乳動物に1種以上の上記組

成物を投与することを含む上記方法を提供する。本発明はまた、1種以上の組織保護性サイトカインを含む組成物、ならびに応答性哺乳動物細胞および哺乳動物におけるその関連細胞、組織および器官の炎症に関連する1以上の症候群を予防し、治療または回復する方法であって、上記哺乳動物に1種以上の上記組成物を投与することを含み、ここで該組成物を組織保護性サイトカイン以外の1種以上の予防もしくは治療薬と一緒に投与することを特徴とする上記方法も提供する。炎症は、傷害または疾患、例えば、限定されるものでないが、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、関節炎、またはアレルギー障害により引き起されるものであってよい。治療または予防薬は、限定されるものでないが、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、核酸分子、小分子、模倣薬、合成薬、無機分子、および有機分子を含む。炎症に関連する1以上の症候群の予防、治療または改善のために有用であることが公知の、または使われたことがあるまたは現在使われている薬剤を、本明細書に記載の本発明に従って組織保護性サイトカインと一緒に使うことができる。このような薬剤は、限定されるものでないが、発疹および腫脹用の皮膚薬（例えば、光線療法（すなわち、紫外線B照射）、光化学療法（例えば、PUVA）および局所薬、例えば緩和薬、サリチル酸、コールタール、局所ステロイド、局所コルチコステロイド、局所ビタミンD3類似体（例えば、カルシポトリエン）、タザロテン、および局所レチノイド）、抗炎症薬（例えば、コルチコステロイド（例えば、プレドニソンおよびヒドロコルチゾン）、グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド抗炎症薬（例えば、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナク、およびCOX-2阻害薬）、 α -アゴニスト、抗コリン薬およびメチルキサンチン）、免疫調節薬（例えば、小有機分子、T細胞受容体調節因子、サイトカイン受容体調節因子、T細胞欠乏薬（depleting agent）、サイトカインアンタゴニスト、モノカインアンタゴニスト、リンパ球阻害薬、または抗癌薬）、金注射、スルファサラジン、ペニシラミン、抗血管新生薬（例えば、アンギオスタチン、TNF-アンタゴニスト（例えば、抗TNF α 抗体）、およびエンドスタチン）、ダブソン、ソラレン（例えば、メトキサレンおよびトリオキサレン）、抗マラリア薬（例えば、ヒドロキシクロロキン）、抗ウイルス薬、および抗生物質（例えば、エリスロマイシンおよびペニシリン）を含む。

【0115】

当業者に周知である免疫調節薬を本発明の方法および組成物に使用することができる。免疫調節薬は、被験者において免疫応答の1以上のまたは全ての態様に影響を与えうる。免疫応答の態様は、限定されるものでないが、炎症性応答を含む。好ましい本発明の実施形態においては、免疫調節薬の被験者に対する投与は、被験者の免疫応答能力の1以上の態様を阻害または低下させる。本発明の特定の実施形態においては、免疫調節薬は被験者における炎症性応答を阻害または抑制する。一実施形態においては、本発明の組織保護性サイトカインを、1種以上の免疫調節薬と組合わせて投与し、炎症を治療、すなわち炎症の症候群を改善するかまたは予防する。

【0116】

免疫調節薬の例は、限定されるものでないが、タンパク質薬、例えばサイトカイン、ペプチド模倣物、および抗体（例えば、ヒト、ヒト化、キメラ、モノクローナル、ポリクローナル、Fv、ScFv、FabまたはF(ab)₂フラグメントまたはエピトープ結合フラグメント）、核酸分子（例えば、アンチセンス核酸分子および3重らせん体）、小分子、有機化合物、および無機化合物を含む。特に、免疫調節薬は、限定されるものでないが、メトトレキサート、レフルノミド、シクロホスファミド、サイトキサン、イムラン、シクロスポリンA、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質（例えば、FK506（タクロリムス））、メチルプレドニソロン（MP）、コルチコステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン（シロリムス）、ミゾリピン、デオキシスパーガリン、ブレキナール、マロノニトリロアミンド（malononitrioloamindes）（例えば、レフルナミド（leflunomide））、T細胞受容体調節因子、およびサイトカイン受容体調節因子を含む。T細胞受容体調節因子の例は、限定されるものでないが、抗T細胞受容体抗体（例えば、抗CD4抗体（例えば、cM-T412（Boeringer）、IDEC-CE9.1（登録商標）（IDECおよびSKB）、mAB 416

2W94、オルトクローン (Orthoclone) および OKTcdr4a (Janssen-Cilag)、抗 CD3 抗体、抗 CD5 抗体 (例えば、抗 CD5 リシン (ricin) 結合免疫コンジュゲート)、抗 CD7 抗体 (例えば、CHH-380 (Novartis))、抗 CD8 抗体、抗 CD40 リガンド モノクローナル抗体、抗 CD52 抗体 (例えば、CAMPATH 1H (Illex))、抗 CD2 モノクローナル抗体) および CTLA4-免疫グロブリンを含む。

【0117】

サイトカイン受容体調節因子の例は、限定されるものでないが、水溶性サイトカイン受容体 (例えば、TNF- α 受容体の細胞外ドメインまたはその断片、IL-1 受容体の細胞外ドメインまたはその断片、および IL-6 受容体の細胞外ドメインまたはその断片)、サイトカインまたはその断片 (例えば、インターロイキン (IL)-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、TNF- β 、TNF- γ 、インターフェロン (IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、および GM-CSF)、抗サイトカイン受容体抗体 (例えば、抗 IL-2 受容体抗体、抗 IL-4 受容体抗体、抗 IL-6 受容体抗体、抗 IL-10 受容体抗体、および抗 IL-12 受容体抗体)、抗サイトカイン抗体 (例えば、抗 IFN 受容体抗体、抗 TNF- α 抗体、抗 IL-1 抗体、抗 IL-6 抗体、および抗 IL-12 抗体) を含む。特定の実施形態においては、サイトカイン受容体調節因子は IL-4、IL-10、またはその断片である。他の実施形態においては、サイトカイン受容体調節因子は抗 IL-1 抗体、抗 IL-6 抗体、抗 IL-12 受容体抗体、抗 TNF- α 抗体である。他の実施形態においては、サイトカイン受容体調節因子は TNF- α 受容体の細胞外ドメインまたはその断片である。ある特定の実施形態においては、サイトカイン受容体調節因子は TNF- α アンタゴニストでない。

10

20

【0118】

好ましい実施形態においては、免疫調節薬として利用されるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド (抗体を含む) は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの受容者と同じ種から誘導し、これらのタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに対する免疫応答の可能性を低減させる。他の好ましい実施形態においては、被験者がヒトであるとき、免疫調節薬として利用されるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドはヒトまたはヒト化されたものである。

【0119】

本発明によれば、1 種以上の免疫調節薬は、炎症をもつ被験者に本発明の治療および / または予防薬とともに事前に、事後に、または同時に投与される。好ましくは、1 種以上の免疫調節薬は、炎症をもつ被験者に 1 以上の免疫応答の態様を低減または抑制するために必要に応じて投与される。当業者に周知である技術を利用して、特定の被験者の免疫応答の 1 以上の態様を測定し、かつそれによっていつ免疫調節薬を上記被験者に投与する必要があるかを決定することができる。

30

【0120】

好ましい実施形態においては、1 種以上の免疫調節薬を、炎症をもつ被験者に 1 以上の免疫応答の態様を一過的に低減または抑制するために投与する。このような一過的抑制または低減は数時間、数日間、数週間、または数ヶ月間持続しうる。好ましくは、免疫応答の 1 以上の態様の一過的抑制または低減は、数時間 (例えば、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、12 時間、14 時間、16 時間、18 時間、24 時間、36 時間、または 48 時間)、数日間 (例えば、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、14 日間)、または数週間 (例えば、3 週間、4 週間、5 週間または 6 週間) 持続する。1 以上の免疫応答の態様の一過的抑制または低減は、組織保護性サイトカインの予防および / または治療能力を増強する。

40

【0121】

本発明の一実施形態においては、T 細胞、好ましくは記憶 T 細胞 (memory T cell) を低減または枯渇させる免疫調節薬を、炎症をもつ被験者に本発明の方法に従って投与する。例えば、米国特許第 4,658,019 号を参照。本発明の他の実施形態においては、CD8⁺ T 細胞を不活化する免疫調節薬を、炎症をもつ被験者に本発明の方法に従って投与する。特定の実施形態においては、CD8⁺ T 細胞を低減または枯渇させるために抗 CD8 抗体を用いる。

【0122】

50

CD40リガンド (CD40L) -CD40相互作用が免疫応答を遮断するための望ましい点である、何故なら、Tヘルパー細胞活性化と機能の両方における広い活性だけでなくシグナル伝達経路における重複性が不在であるからである。このように、本発明の特定の実施形態においては、CD40LのCD40との相互作用を、1種以上の免疫調節薬を投与する時点で一過的に遮断する。この遮断は、TH細胞上のCD40リガンドを遮断する薬剤を用いて処理し、Tヘルパー細胞上のCD40リガンドのB細胞上のCD40抗原との正常な結合を妨害することにより実施することができる。CD40リガンドに対する抗体 (抗CD40L) (Bristol-Myers Squibb Co. が市販する; 例えば、1993年8月に公開された欧州特許出願555,880を参照) または水溶性CD40分子を本発明の方法により免疫調節薬として選択して使用してもよい。

【0123】

本発明に従って利用しうる免疫調節薬の他の例は、限定されるものでないが、コルチコステロイド、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル、シクロスポリンA、ヒドロコルチゾン、FK506、メトトレキサート、レフルノミド、およびシクロホスファミドを含む。シクロホスファミドの短いコースが、アデノウイルス・カプシドタンパク質に対するCD4⁺とCD8⁺T細胞の両方の活性化を成功裏に中断することが実証されている (Joossら, 1996, Hum. Gene Ther. 7: 1555-1566)。ヒドロコルチゾンまたはシクロスポリンA処理はサイトカインの誘導を低減するために成功裏に利用されていて、そのいくらかは細菌感染および炎症のクリアランスに関わりうる。

【0124】

免疫調節活性をもつタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドをコードする核酸分子、または免疫調節活性をもつタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドを、炎症をもつ被験者に本発明の方法に従って投与することができる。さらに、免疫調節活性をもつタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの誘導体、類似体、断片もしくは変異体をコードする核酸分子、または免疫調節活性をもつタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの誘導体、類似体、断片もしくは変異体を、炎症をもつ被験者に本発明の方法に従って投与することができる。好ましくは、このような誘導体、変異体および断片は、全長の野生型タンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドの免疫調節活性を保持するものである。

【0125】

免疫調節薬として利用しうるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載の周知の技術によって作ることができる。例えば、Ausubelら (編), 1999, 「分子生物学における簡単なプロトコル (Short Protocols in Molecular Biology)」, 第4版, John Wiley & Sons, NYの第16章を参照。この文献はタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを作る方法を記載し、本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。免疫調節薬として利用しうる抗体は、例えば、米国特許第6,245,527号ならびにHarlowおよびLane 抗体: 「研究室マニュアル (A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988、に記載の方法により作ることができる。この文献は本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。好ましくは、市販されかつ免疫調節薬として機能することが公知である薬剤を、本発明の組成物および方法に使用する。薬剤の免疫調節活性は、in vitroおよび/またはin vivoで当業者に周知の技術により決定することができ、それらの技術としては、例えば、特定のタンパク質、例えば同時刺激性分子およびサイトカインの発現に対するCTLアッセイ、増殖アッセイおよび、イムノアッセイ (例えば、ELISA) が挙げられる。

【0126】

本発明の特定の組成物および方法を用いて、網膜組織の症状および網膜組織への障害を治療することができる。このような障害としては、網膜虚血、黄斑変性、網膜剥離、色素性網膜炎、動脈硬化性網膜症、高血圧性網膜症、網膜動脈閉塞 (blockage)、網膜静脈閉塞、低血圧症、および糖尿病性網膜症が挙げられるがこれらに限定されない。

【0127】

他の実施形態において、本発明の方法と原理は、放射線による興奮性組織への障害から生じる損傷を保護または治療するために使用することができる。本発明の方法の他の用途

10

20

30

40

50

は、神経毒中毒症（例えばドウモイ酸（domoic acid）による貝中毒、神経ラシリズム（neuroleptism）およびガム（Guam）病など）、筋萎縮性側索硬化症、およびパーキンソン病の治療である。

【0128】

上記のように、本発明は、上記の組織保護性サイトカインの末梢投与により哺乳動物における興奮性組織の機能を増強する方法にも関する。この方法を用いた治療により、種々の疾患および症状を治療することができ、さらにこの方法は、何の症状も疾患もない場合に認知機能を増強するのに有用である。本発明のこれらの使用（ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方における学習および訓練の増強を含む）について、以下にさらに詳しく記載する。

10

【0129】

本発明のこの態様の方法によって治療することができる中枢神経系に關係する症状および疾患としては、気分障害、不安障害、うつ病、自閉症、注意欠陥過活動性障害、および認知機能障害が挙げられるが、これらに限定されない。これらの症状は神経機能の増強により利益を得る。本発明の教示に従って治療することができる他の障害には、睡眠障害（例えば睡眠時無呼吸および旅行に關係する障害等）、クモ膜下および動脈瘤出血、低血圧性ショック、振とう症傷害、敗血症性ショック、アナフィラキシーショック、および種々の脳炎および髄膜炎（例えば狼瘡等の結合組織に關係する脳炎）の続発症が含まれる。他の用途としては、神経毒による中毒（例えばドウモイ酸による貝中毒、神経ラシリズムおよびガム（Guam）病等）、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、塞栓性もしくは虚血性傷害の術後の処置、全脳放射線照射、鎌状赤血球発症、ならびに子癇の予防またはこれらからの保護が挙げられる。

20

【0130】

本発明の方法によって治療することができる更なる症状群としては、遺伝性もしくは後天性のミトコンドリア機能障害（神経の損傷および死を典型とする様々な神経疾患の原因となる）が挙げられる。例えば、リー病（亜急性壊死性脳障害）は、ニューロン脱落による視力低下の進行と脳障害および筋障害を特徴とする。これらの場合、不完全なミトコンドリア代謝により、興奮性細胞の代謝の燃料となる高エネルギー物質を十分供給することができない。エリスロポエチン受容体活性調節因子は、様々なミトコンドリア疾患において弱まった機能を最適にする。上記のように、低酸素状態は、興奮性組織に悪影響を及ぼす。興奮性組織としては、中枢神経系組織、末梢神経系組織、および心組織が挙げられるがこれらに限定されない。上記症状に加えて、本発明の方法は、一酸化炭素および煙の吸入などの吸入中毒、重度の喘息、成人呼吸促進症候群、ならびに窒息および溺水初期の治療において有用である。低酸素状態を引き起こすまたは何らかにより興奮性組織の障害を誘導する更なる症状としては、インスリンの不適切な投与において生じ得るまたはインスリン産生新生物（インスリノーマ）を有する低血糖症が挙げられる。

30

【0131】

興奮性組織の障害が原因であると考えられている様々な神経心理学的障害は、本発明の方法によって治療可能である。本発明による治療が提供される神経の障害が関与している慢性疾患には、中枢神経系および/または末梢神経系に關係する障害（加齢による認知機能の低下および老人性痴呆、慢性発作障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、結節硬化症、ウィルソン病、脳および進行性核上性麻痺、ガム（Guam）病、レーヴィ小体痴呆、プリオン疾患（例えばクロイツフェルト-ヤコブ病、ハンティングトン病、筋緊張性ジストロフィー、フリートライヒ運動失調および他の運動失調等の海綿状脳障害）、ジル・ド・ラ・ツレット症候群、癲癇等の発作障害および慢性発作障害、卒中、脳もしくは脊髄の外傷、AIDS痴呆、アルコール中毒症、自閉症、網膜虚血、緑内障、高血圧症や睡眠障害等の自律神経機能障害、ならびに神経精神障害（精神分裂病、分裂情動性障害、注意欠陥障害、気分変調性障害、大うつ病、躁病、強迫性障害、精神活性物質使用障害、不安、パニック障害、一極性および双極性情動障害を含むがこれらに限定されない）が含まれる。更なる神経精神障害および神経変性

40

50

障害としては、例えば、米国精神医学協会（American Psychiatric Association）の精神障害の診断および統計マニュアル（Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders, DSM）に記載されているものがあり、最新バージョンは、本明細書中に参考として全て組み込まれる。

【 0 1 3 2 】

他の実施形態において、エリスロポエチンを含む組換えキメラ毒素分子は、癌等の増殖性障害または亜急性硬化性汎脳炎等のウイルス性障害を治療するための、毒素の治療的送達のために用いることができる。

【 0 1 3 3 】

以下の表は、さらなる例示の、限定されるものでない、上記組織保護性サイトカインによる治療を受入れうる適応症を掲げる。 10

【 0 1 3 4 】

【表 1】

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状または疾患	タイプ
心臓	虚血	冠動脈疾患	急性、慢性 安定、不安定
		心筋梗塞	ドレスラー症候群
		アングナ	
		先天性心疾患	弁膜性、心筋症
		プリンズメタル型狭心症	
		心臓破裂	動脈瘤性 鼻中隔穿孔
		血管炎	
	不整脈	頻脈、徐脈型不整脈 上室性、心室性伝導異常	安定、不安定 頸動脈洞節過敏症
	うっ血性心不全	左心室、右心室、両心室	心筋症（特発性家族性、感染性、代謝性、沈着症、不全症、結合組織障害、浸潤及び肉芽腫、神経血管性）
		心筋炎	自己免疫、感染性、突発性
		肺性心	
	鈍傷及び穿通損傷 (penetrating trauma)		
	毒素	コカイン	
血管	高血圧症	原発性、続発性	
	潜函病		
	線維筋過形成		
	動脈瘤	解離性、破裂性、拡大性	
肺	閉塞	喘息 慢性気管支炎、気腫及び 気道閉塞	
	虚血性肺疾患	肺動脈塞栓症、 肺動脈血栓症、 脂肪塞栓症	
	環境肺疾患		
	虚血性肺疾患	肺動脈塞栓症 肺動脈血栓症	
	間質性肺疾患	特発性肺線維症	
	先天性	嚢胞性線維症	
	肺性心		
	外傷		
	肺炎および肺実質炎	感染性、寄生性、毒性、 外傷性、熱傷、吸引	
	サルコイドーシス		

10

20

30

40

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状または疾患	タイプ
膵臓	内分泌	真性糖尿病 I 型及び II 型	ベータ細胞の不全、機能障害、糖尿病性神経障害
		膵臓の他の内分泌細胞不全	
	外分泌	膵臓外分泌不全	膵炎
骨	オステオペニア	原発性、続発性	性機能低下症 不動化 閉経後の老化による 上皮小体機能亢進症 甲状腺機能亢進症 カルシウム、マグネシウム、リン及び／又はビタミン D 欠乏
	骨髓炎		
	無血管性壊死		
	外傷		
	パジェット病		
皮膚	脱毛症	限局性 全体性	原発性 続発性 男性型禿頭症
	白斑	限局性 広汎性	原発性 続発性
	糖尿病性潰瘍化		
	末梢血管疾患		
	火傷		
自己免疫障害	紅斑性狼瘡、シェーグレン、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、血管炎		
	ランゲルハンス組織球増殖症		
眼	視神経炎		
	鈍傷及び穿通損傷、感染症、サルコイド、鎌状赤血球 C 症、網膜剥離、側頭動脈炎		

10

20

30

40

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状または疾患	タイプ
	網膜虚血、 黄斑変性、 網膜剥離、 色素性網膜炎、 動脈硬化性網膜症、高血圧性網膜症、 網膜動脈遮断、 網膜静脈遮断、 低血圧、および 糖尿病性網膜症		
胚及び胎児障害	仮死		
	虚血		
CNS	慢性疲労症候群、 急性及び慢性の 低浸透及び高浸透症候群、AIDS 痴呆、 感電死		
	脳炎	狂犬病、疱疹	
	髄膜炎		
	硬膜下血腫		
	ニコチン嗜癖		
	薬物乱用及び禁断症状	コカイン、ヘロイン、クラック、マリファナ、 LSD、PCP、多重薬物乱用、エクスタシー、オピオイド、鎮静催眠薬、アンフェタミン、カフェイン	
	強迫性障害		
ENT	脊髄狭窄症、 横断脊髄炎、 ギラン-バレー症、 外傷、 神経根圧迫症、 腫瘍状圧迫症、 熱射痛		
	耳鳴		
	メニエール症候群		
	聴覚障害		
腎臓	外傷性損傷、 気圧障害		
	腎不全	急性、慢性	血管/虚血性、間質性疾患、 糖尿病性腎疾患、ネフローゼ症候群、感染症

10

20

30

40

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状または疾患	タイプ
	ヘーノボ・シェー ンライン紫斑 病		
横紋筋	自己免疫障害	重症筋無力症 皮膚筋炎 多発性筋炎	
	筋障害	遺伝性、代謝性、内分泌 性及び毒性	
	熱射痛		
	挫滅傷		
	横紋筋融解 (Rhabdomyolysis)		
	ミトコンドリア 疾患		
	感染症	壊死性筋膜炎	
性機能障害	中枢及び末梢	薬物投与に二次的な不能 症	
肝臓	肝炎	ウイルス性、細菌性、寄 生性	
	虚血性疾患		
	肝硬変症、脂肪 肝		
	浸潤性／代謝疾 患		
胃腸	虚血性腸疾患		
	炎症性腸疾患		
	壊死性腸炎		
器官移植	供与者及び受容 者の治療		
生殖道	不妊症	血管性 自己免疫 子宮異常 着床障害	
内分泌	腺の機能亢進及 び機能低下		

10

20

30

40

上記の通り、これらの疾患、障害または症状は、本発明の組織保護性サイトカインによって提供される利益の範囲の単なる例示である。従って本発明は一般的に、機械的な外傷またはヒト疾患の結果の治療的もしくは予防的処置を提供する。CNSおよび/または末梢神経系の疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が好ましい。精神医学的要素を有する疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が提供される。眼、心血管、心肺、呼吸器系、腎臓、尿道、生殖器、胃腸、内分泌性または代謝性の要素を持つものなど（ただしこれらに限定されない）の疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が

50

提供される。

【0135】

当業者は、本発明の医薬組成物が本発明の組織保護性サイトカインはもちろん、エリスロポエチンの混合物でも作られることを理解するであろう。

【0136】

一実施形態において、エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインのような医薬組成物は、標的細胞、組織または器官を保護または増強するために全身に投与することができる。このような投与は、非経口、吸入、または粘膜経由で行われる（例えば口内、鼻腔内、直腸内、腔内、舌下、粘膜下、または経皮投与等）。好ましくは、投与は、例えば静脈内もしくは腹腔内注射等による非経口経由であり、例えば動脈内、筋肉内、皮内および皮下投与が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0137】

灌流液の使用、器官内への注射または他の局所投与等による他の投与経路の場合、上記と同様のレベルの組織保護性サイトカインをもたらす医薬組成物が提供される。約15pM~30nMのレベルが好ましい。

【0138】

本発明の医薬組成物は、治療上有効な量の化合物および製薬上許容される担体を含み得る。特定の実施形態において、「製薬上許容される」という用語は、動物（特にヒト）への使用が、連邦政府または州政府の取締機関により認証されていること、または米国薬局方もしくは他の一般的に認識されている外国薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。このような医薬担体は、無菌液（例えば生理食塩水、または石油、動物、植物もしくは合成起源の油等（例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油等を含む））であってもよい。医薬組成物を静脈内投与する場合、生理食塩水が好ましい担体である。特に注射用溶液の場合は、生理食塩水、デキストロス水溶液およびグリセロール水溶液を液体担体として使用することもできる。好適な医薬賦形剤としては、澱粉、ブドウ糖、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、コムギ、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセリン、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水およびエタノール等が挙げられる。組成物は、所望であれば、少量の湿潤剤、乳化剤、またはpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、丸剤、カプセル、粉剤、および持続放出性製剤等であってもよい。この組成物は、伝統的な結合剤および担体（トリグリセリド等）と一緒に坐剤として製剤化することができる。本発明の化合物は、中性のものまたは塩として製剤化することができる。製薬上許容される塩としては、遊離アミノ基と共に形成されたもの（塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸および酒石酸等から誘導されたものなど）、ならびに遊離カルボキシル基と共に形成されたもの（ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等から誘導されたもの等）が挙げられる。好適な医薬担体の例は、E. W. Martinによる「レミントンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」に記載されている。このような組成物は、治療上有効な量の化合物（好ましくは精製した形態）を、患者への投与に適した剤形を提供するために適量の担体と一緒に含む。製剤は、投与方法に見合ったものでなければならない。

20

30

40

【0139】

経口投与用の医薬組成物は、カプセル剤もしくは錠剤として、粉剤もしくは顆粒剤として、（水性もしくは非水性液体中の）溶液、シロップもしくは懸濁剤として、食用泡沫もしくはホイップとして、または乳剤として提供されてもよい。錠剤もしくは硬ゼラチンカプセルは、乳糖、澱粉もしくはその誘導体、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、ステアリン酸もしくはその塩等を含んでもよい。軟ゼラチンカプセルは、植物油、ワックス、脂肪、半固体もしくは液体ポリオール等を含んでもよい。溶液およびシロップ剤は、水、ポリオールおよび糖類を含んでもよい。

50

【0140】

経口投与のための有効成分は、胃腸管内での該有効成分の分解および/または吸収を遅らせる物質でコーティングしたりこのような物質と混合したりしてもよい。例えばモノステアリン酸グリセリンまたはジステアリン酸グリセリン等を使用してもよい。このように、有効成分の持続性放出は、数時間にわたって達成してもよいし、必要であれば、有効成分は胃の中で分解されないように保護することができる。経口投与用の医薬組成物は、特定のpHまたは酵素条件によって胃腸内の特定の位置で有効成分の放出を促進するよう製剤化してもよい。

【0141】

経皮投与用の医薬組成物は、受容者の表皮に長時間密着させるための独立型のパッチとして提供されてもよい。局所投与用の医薬組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、粉末、溶液、パスタ剤、ゲル、スプレー、エアロゾルまたはオイルとして提供されてもよい。皮膚、口、眼または他の外部組織への局所投与用には、局所用の軟膏またはクリームを使用するのが好ましい。軟膏として製剤化する場合、有効成分を、パラフィン系もしくは水混和性の軟膏基剤と一緒に使用することができる。あるいは、有効成分を、水中油基剤または油中水基剤を用いてクリームとして製剤化することができる。眼への局所投与用の医薬組成物としては、点眼剤が挙げられる。これらの組成物中において、有効成分を、適当な担体の中（例えば水性溶剤の中）に溶解もしくは懸濁させることができる。口内への局所投与用の医薬組成物としては、トローチ剤、香錠および洗口剤が挙げられる。

【0142】

鼻腔内および肺投与用の医薬組成物は、粉末（好ましくは20～500ミクロンの粒径を有するもの）などの固体担体を含み得る。粉末は、鼻でかくようにして（すなわち鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻でさっと吸入することにより）投与することができる。あるいは、鼻腔内投与用の組成物は、液体担体を含み得る（例えば鼻内スプレーまたは点鼻剤等）。あるいは、深く吸入したりまたはマウスピースを介して咽頭口腔部に装置を据え付けることによって、肺への直接吸入を行ってもよい。これらの組成物は、有効成分の水溶性もしくは油性溶液を含み得る。吸入による投与用の組成物は、所定用量の有効成分を提供するように構築することができる専用デバイス（加圧エアロゾル、ネブライザー、または注入器を含むがこれらに限定されない）に入れて供給される。好ましい実施形態においては、本発明の医薬組成物は、鼻腔内に直接、または鼻腔もしくは咽頭口腔部を介して肺へと投与される。

【0143】

直腸投与用の医薬組成物は、坐剤または浣腸剤として提供することができる。腔内投与用の医薬組成物は、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、パスタ剤、泡沫剤またはスプレー製剤として提供することができる。

【0144】

非経口投与用の医薬組成物としては、水性および非水性の無菌注射用溶液もしくは懸濁液が挙げられ、これらは、酸化防止剤、バッファー、静菌薬、および投与を受ける受容者の血液と該組成物がほぼ等張となるようにする溶質を含み得る。このような組成物中に含まれ得る他の成分としては、例えば水、アルコール、ポリオール、グリセリンおよび植物油が挙げられる。非経口投与用組成物は、単位用量もしくは複数分の用量の容器（例えば密閉アンプルおよびバイアル）に入れて提供され、使用直前に無菌液体担体（例えば注射用無菌生理食塩溶液等）を加えるだけですむように、冷凍乾燥（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時調合注射用溶液および懸濁液は、無菌粉剤、顆粒剤および錠剤から調製することができる。一実施形態において、救急車、救急室、および戦場といった状況下での緊急時の使用のために、また、家庭内状況における自己投与のために（特に、例えば芝罘機の不注意な使用等による外傷性切断の可能性が生じ得る場合）、エリスロポエチンの注射用溶液を含む自己注射器が提供される。切断された身体部分の複数の部位にエリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインをできるだけ早く投与することによって、たとえ現場に医師が到着する前もしくは足指が切断された患者が運ばれて救急室に到着す

10

20

30

40

50

る前であっても、切断された足または足指の中の細胞および組織が再び取りつけた後に生き残る可能性を高くすることができる。

【0145】

好適な実施形態において、組成物を、ヒトへの静脈内投与用の医薬組成物と同様の常套手法に従って製剤化する。典型的には、静脈内投与用の組成物は、無菌等張水性バッファ中の溶液である。必要であれば、組成物は、可溶化剤および注射部位の痛みを和らげるリドカイン等の局部麻酔も含み得る。一般的に、これらの成分は別々にまたは単位剤形の中に一緒に混合して（例えば有効成分の量を示すアンプルやサッシェ（sachette）等の気密封止した容器に入れた凍結乾燥粉末または無水濃縮物として）供給される。組成物を注入により投与する場合、医薬品質の無菌水もしくは生理食塩水を含む注入ボトルを用いて投薬することができる。組成物を注射により投与する場合、投与前に成分を混合することができるよう、無菌食塩水の入ったアンプルを提供することができる。

10

【0146】

一般的に坐剤は有効成分を0.5～10重量%含み、経口投与用製剤は好ましくは有効成分を10%～95%含む。

【0147】

in situ灌流用の移植器官浴（transplanted organ bath）で使用するため、または器官を回収する前に器官ドナーの脈管に投与するための、灌流液組成物を提供することができる。このような医薬組成物は、個体への急性もしくは慢性の局部投与または全身投与には適さないレベルのエリスロポエチン、組織保護性サイトカイン、または形態のエリスロポエチンもしくは組織保護性サイトカインを含み得るが、死体、器官浴、器官灌流液、またはin situ灌流液において本明細書中で意図される機能を果たすものであり、その後、処理した器官または組織を正常な循環にさらすもしくは戻す前に、その中に含まれるエリスロポエチンのレベルを除去するかまたは低下させる。本発明のこの態様のためのエリスロポエチンは、限定されない例として、任意のエリスロポエチン、例えばヒトエリスロポエチンなどの天然型、または本明細書に以上記載した任意の組織保護性サイトカイン、例えばアシアロエリスロポエチンおよびフェニルグリオキサール-エリスロポエチンであってもよい。

20

【0148】

本発明は、1以上の炎症に関連する症候群を治療し、予防し、かつ改善するための医薬組成物を提供する。特定の実施形態においては、組成物は1種以上の組織保護性サイトカインを含む。他の実施形態においては、組成物は1種以上の組織保護性サイトカインおよび組織保護性サイトカイン以外の1種以上の予防もしくは治療薬を含み、上記予防もしくは治療薬は1以上の炎症に関連する症候群の予防、治療または改善に有用であるか、または使用されていたかまたは現在使用されていることが公知である。

30

【0149】

好ましい実施形態においては、本発明の組成物は医薬組成物である。このような組成物は予防または治療上有効な量の1種以上の予防もしくは治療薬（例えば、組織保護性サイトカインまたは他の予防もしくは治療薬）および製薬上許容される担体を含む。一実施形態においては、用語「治療上有効な量」は、該薬剤を単独で投与するときに必ずしも有効でないが、他の薬剤とともに同時投与すると有効である薬剤の量を含むことを意味する。

40

【0150】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の成分のうちの1種以上を充填した1以上の容器を含む医薬パックもしくはキットも提供する。場合により、このような容器に、医薬品もしくは生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定されたフォームで書かれた注意書き（この注意書きはヒト投与のための製造、使用または販売を規制する管轄機関による認可を反映する）を添えることができる。

【0151】

特に、本発明は、1種以上の本発明の予防もしくは治療薬、または医薬組成物をヘルメットにより気密封止した薬剤の量を表示した容器、例えばアンプルまたはサッシェ（sach

50

ette) に詰めて提供する。一実施形態においては、1種以上の本発明の予防または治療薬、または医薬組成物はヘルメットにより気密封止した容器に入れた無菌凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給し、例えば水または生理食塩水を用いて被験者へ投与するのに好適な濃度に再構築することができる。好ましくは、1種以上の本発明の予防もしくは治療薬、または医薬組成物を、ヘルメットにより気密封止した容器に入れた無菌凍結乾燥粉末として、少なくとも5mg、さらに好ましくは、少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、少なくとも75mg、または少なくとも100mgの単位用量にて供給する。凍結乾燥した本発明の予防もしくは治療薬、または医薬組成物は2 ~ 8 にてその元の容器中で保存しなければならないし、そして本発明の予防もしくは治療薬、または医薬組成物は、再構成した後、1週間以内に、好ましくは5日以内に、72時間以内に、48時間以内に、24時間以内に、12時間以内に、6時間以内に、5時間以内に、3時間以内に、1時間以内に投与しなければならない。代替の実施形態においては、1種以上の本発明の予防もしくは治療薬、または医薬組成物を、液状で、薬剤の量と濃度を表示したヘルメットにより気密封止した容器に入れて供給する。好ましくは、投与する組成物の液製剤をヘルメットにより気密封止した容器に入れて、少なくとも0.25mg/ml、さらに好ましくは少なくとも0.5mg/ml、少なくとも1mg/ml、少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも75mg/mLまたは少なくとも100mg/mlにて供給する。該液製剤は2 ~ 8 にてその元の容器に入れて保存しなければならない。

10

20

【0152】

該組成物は、必要であれば、有効成分を含有する1以上の単位投与剤形を含有するパックまたはディスペンサー装置に入れて提示することができる。パックは例えば金属またはプラスチックホイル、例えばブリスターパックであってもよい。パックまたはディスペンサー装置に投与の指示書を添付してもよい。

【0153】

一般的に、本発明の組成物の成分は、このような組成物の受容者と同じ種起源または種反応性である被験者から誘導される。従って、好ましい実施形態においては、ヒトまたはヒト化抗体はヒトの治療または予防用に投与される。

【0154】

他の実施形態においては、例えば、組織保護性サイトカインを制御型放出系で送達することができる。例えば、ポリペプチドを例えば、静脈内注入、移植可能な浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、または他の投与方式を用いて投与することができる。一実施形態においては、ポンプを利用することができる (Langer, 前掲; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwaldら, 1980, Surgery 88: 507; Saudekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照)。他の実施形態においては、化合物を小胞、特にリポソームに入れて送達することができる (Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treatら, in 「感染性疾患と癌の治療法に用いるリポソーム (Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer)」, Lopez-Berestein and Fidler (編), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); 国際特許出願公開番号第W0 91/04014号; 米国特許第4,704,355号; Lopez-Berestein, 同書, pp.317-327を参照; 全般的に同書を参照)。他の実施形態においては、ポリマー材料を利用することができる (「徐放の医学的応用 (Medical Applications of Controlled Release)」, Langer and Wise (編), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; 「徐放薬バイオアベイラビリティ、薬物設計と性能 (Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance)」, SmolenおよびBall (編), Wiley: New York (1984); RangerおよびPeppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61,1953を参照; また、Levyら, 1985, Science 228:190; Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71:105も参照)。

30

40

【0155】

さらに他の実施形態においては、制御型放出系を治療標的、すなわち標的細胞、組織ま

50

たは器官の近位に置いて、全身用量の一部分しか必要としないようにすることができる（例えば、Goodson, pp.115-138 in 「制御型放出の医学的応用（Medical Applications of Controlled Release）」, vol.2, 前掲, 1984を参照）。他の制御型放出系は、Langer（1990, Science 249:1527-1533）による総括で考察されている。

【0156】

他の実施形態においては、好適に製剤された組織保護性サイトカインを、鼻腔内、口内、直腸内、膣内、または舌下投与により投与することができる。

【0157】

特定の実施形態においては、本発明のエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを治療を必要とする領域に局所投与することが望ましい。これは、例えば、限定する訳ではないが、外科手術中の局所注入により、局所投与（例えば外科手術後の創傷包帯と組み合わせた投与）、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラントを用いて、行うことができる。インプラントは、多孔質、非多孔質、またはゼラチン状の材料（シラスチック膜等の膜または繊維を含む）からできている。

10

【0158】

好ましい有効用量の選択は、当業者に公知である幾つかの要因の考慮に基づいて専門家により決定される。このような要因としては、エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインの特定の形態、ならびに医薬化合物の規制認可を得る際に一般的に使用される一般開発手続き（usual development procedure）中に確立されうるその薬物動態パラメータ（例えばバイオアベイラビリティ、代謝、半減期等）が挙げられる。用量決定の際に考慮される更なる要因としては、治療される症状もしくは疾患、または正常な個体において得られるべき利益、患者の体重、投与経路（投与は急性もしくは慢性的なものであってもよい）、併用薬物の適用の有無、および投与される医薬成分の効力に影響を及ぼす周知の他の要因が挙げられる。このように正確な投薬量は、医師の判断および各患者の状況に従って（例えば個々の患者の体調および免疫状態等に応じて）、および標準的な臨床技法に従って決定されるべきである。

20

【0159】

本発明の他の態様において、移植用器官の灌流および保存のための灌流液または灌流溶液が提供され、該灌流溶液は、応答性細胞および関連する細胞、組織もしくは器官を保護するのに有効な量のエリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインを含む。移植には、器官（細胞、組織または他の身体部分を含む）をある供与者から回収して異なる受容者に移植する異個体間移植（xenotransplantation）、および、身体の一部から器官を取り出して他の部位に移植する自己移植（例えば腫瘍除去等のために器官を取り出し、ex vivoで切除、修復または処理した後に元の場所に戻すベンチ外科手術を含む）が含まれるがこれらに限定されない。一実施形態においては、灌流溶液は、約1～約25U/mlエリスロポエチン、5%ヒドロキシエチルデンプン（分子量約200,000～約300,000であり、エチレングリコール、エチレンクロロヒドリン、塩化ナトリウムおよびアセトンを実質的に含まない）、25mM KH_2PO_4 、3mMグルタチオン、5mMアデノシン、10mMグルコース、10mM HEPESバッファ、5mMグルコン酸マグネシウム、1.5mM CaCl_2 、105mMグルコン酸ナトリウム、200,000単位のペニシリン、40単位のインスリン、16mgのデキサメタゾン、12mgのフェノールレッドを含み、かつpHが7.4～7.5、重量モル浸透圧が約320mOsm/lであるウィスコンシン大学（the University of Wisconsin, UW）溶液（米国特許第4,798,824号）である。この溶液は、移植前に死体の腎臓および脾臓を維持するために用いられる。この溶液を用いると、死体の腎臓保存に推奨される制限時間30時間を超える長い時間保存することができる。この特定の灌流液は、有効量のエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを含ませることによって本発明の用途に適合させることができる多くのこのような溶液のうちの単なる例である。さらなる実施形態において、灌流溶液は、約1～約500ng/mlエリスロポエチンまたは40～約320ng/mlエリスロポエチンを含む。上記のように、本発明のこの態様において任意の形態のエリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインを使用することができる。

30

40

50

【0160】

本明細書中を通じて記載される目的のための組織保護性サイトカインの好ましい受容者はヒトであるとともに、本明細書中に記載される方法は、他の哺乳動物（特に飼養動物、家畜動物、ペットおよび動物園の動物）に同様に適用することができる。しかし、本発明はそれらの動物に限定されず、その利益はあらゆる哺乳動物に適用することができる。

【0161】

ex vivoの本発明のさらなる態様においては、エリスロポエチンおよび、上記のものに限定されことなく、任意の組織保護性サイトカインを利用することができる。

【0162】

本発明の他の態様においては、脈管構造から内皮細胞バリアにより単離されていない細胞、組織または器官の生存力を増強するための方法と組成物は、細胞、組織または器官を、エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインを含む医薬組成物に直接曝露するかまたはエリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインを含有する医薬組成物を組織または器官の脈管構造に投与するかまたは接触させることにより提供される。処理された組織または器官中の応答性細胞の活性増強は、作用したポジティブ効果に応答しうる。

【0163】

上記のように、本発明は、一部は、エリスロポエチン分子が、内皮細胞密着帯を有する器官（例えば脳、網膜、および精巣などを含む）の毛細血管内皮細胞の管腔表面から基底膜表面へ輸送され得るという発見に基づく。このように、バリアを通過する応答性細胞はエリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインの有益な効果に感受性のある標的であり、そして全てもしくは一部がその中に応答性細胞を含有しかつ依存する他の細胞型、組織または器官は本発明の方法の標的である。特定の理論に束縛されることを欲しないものの、エリスロポエチンの経細胞輸送の後、エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインは、例えば神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細血管内皮、精巣、卵巣もしくは子宮内膜等の応答性細胞上のエリスロポエチン受容体と相互作用することができる。そして受容体に結合することにより、応答性細胞もしくは組織中の遺伝子発現プログラムを活性化して、毒素、化学治療薬、放射線治療法、低酸素症等の障害から細胞、組織もしくは器官を保護するシグナル伝達カスケードを始動することができる。このように、損傷または低酸素性ストレスから応答性細胞を含有する組織を保護しかつこのような組織の機能を増強する方法について、本明細書で以下に詳細に説明する。

【0164】

本発明の一実施形態の実施にあたり、哺乳動物患者に、神経、肺、心臓、卵巣または精巣への障害等の副作用を一般的に有する癌治療のための全身化学療法（放射線治療を含む）を受けさせる。上記のようなエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを含む医薬組成物の投与は、化学療法および/または放射線療法を行う前または行っている間に、化学療法剤による障害から様々な組織および器官を保護するために（例えば精巣を保護するために）実施される。治療は、化学療法剤の循環レベルが哺乳動物の身体に危険を及ぼす可能性のあるレベル未満に下がるまで続けることができる。

【0165】

本発明の他の実施形態の実施にあたり、交通事故犠牲者から複数の受容者に移植するために様々な器官を回収するように計画し、これらの器官のうちの幾つかは長距離および長時間の輸送が必要であった。器官回収の前に、本明細書記載のエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを含む医薬組成物を犠牲者に注入した。出荷用の回収器官を、本明細書記載のエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを含む灌流液で灌流させ、エリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを含む浴の中に保存した。ある器官は、本発明のエリスロポエチンを含む灌流液を利用した拍動性灌流装置を用いて連続的に灌流した。in situでの輸送中、移植時、および器官の再灌流時の器官機能の劣化は最小限に食い止められた。

【0166】

本発明の他の実施形態において、心臓弁を修復するための外科手術で、一時的な心停止および動脈閉塞が必要であった。外科手術前に、患者に体重1kgあたり組織保護性サイトカイン、すなわちカルバミル化アシアロエリスロポエチン4 μg を注入した。このような治療は、特に再灌流後に、低酸素性虚血による細胞障害を防いだ。

【0167】

本発明の他の実施形態において、任意の外科手術（例えば心肺バイパス手術等）において、天然のエリスロポエチンまたは本発明の組織保護性サイトカインを用いることができる。一実施形態において、脳、心臓、および他の器官の機能を保護するために、上記エリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを含む医薬組成物の投与は、バイパス手術を行う前、行っている間、および/または行った後に行われる。

10

【0168】

天然のエリスロポエチンおよび/または本発明の組織保護性サイトカインをex vivo用途で、または応答性細胞、例えば神経組織、網膜組織、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣、または子宮内膜細胞または組織を治療するために使用する上記の例において、本発明は、脈管構造の遠位にある応答性細胞、組織または器官の保護または増強に適合させた投与単位剤形の医薬組成物であって、約1 pg~5 mg、500pg~5 mg、1 ng~5 mg、500ng~5 mg、1 μg ~5 mg、500 μg ~5 mg、または1 mg~5 mgの範囲の量の組織保護性サイトカイン、および製薬上許容される担体を含む上記医薬組成物を提供する。好ましい実施形態においては、組織保護性サイトカインの量は、約1 pg~1 mgの範囲にある。好ましい実施形態においては、該製剤は非赤血球産生性である

20

【0169】

本発明のさらなる態様において、組織保護性サイトカインの投与は、脳に外傷を負った動物の認知機能を回復させることが分かった。5日または30日遅れた後でも、エリスロポエチンの投与はなお、擬似処置手術を行った動物と比較して機能を回復させることができ、脳の活性を再生もしくは回復させるエリスロポエチンの能力を示している。このように、本発明は、脳の外傷または他の認知機能障害の治療（損傷後、例えば3日後、5日後、1週間後、1ヶ月後またはそれ以上の治療も含む）のための医薬組成物を調製するためのエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインの使用にも関する。本発明はまた、有効量のエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを投与することによる、損傷後の認知機能障害の治療方法にも関する。本発明のこの態様では、本明細書中に記載されるどのエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを使用してもよい。

30

【0170】

さらに、本発明のこの機能回復の態様は、治療がその機能障害の原因となる最初の傷害の後およびしばらくたった後に開始される場合の、細胞、組織もしくは器官の機能不全を回復させる医薬組成物の調製のための本明細書中に記載されるエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインのいずれかの使用に関する。さらに、本発明のエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインを用いた治療は、急性期および慢性期の疾患または症状の過程を通して行うことができる。

40

【0171】

本発明のエリスロポエチンが赤血球産生活性を有する場合、好ましい実施形態においては、エリスロポエチンを全身に1投与当たり、約1 μg ~約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、好ましくは約5~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、最も好ましくは約10~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量で投与することができる。この有効用量は、エリスロポエチンを投与した後に、エリスロポエチンの血清レベルを血清1mlあたり約10,000、15,000、または20,000m単位/ml（すなわち80、120、または160ng/ml）を超えるレベルとするために十分でなければならない。このような血清レベルは、投与後、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10時間経過後に達成されるものであってもよい。このような投与を必要により繰返してもよい。例えば、投与は、臨床的に必要である限り毎日繰返してもよいし、適当な間隔をもうけて（例えば1週間~12週間毎、

50

好ましくは1～3週間毎に)繰り返してもよい。一実施形態において、有効量のエリスロポエチンおよび製薬上許容される担体を1回分服用量のバイアルまたは他の容器の中にパッケージングすることができる。他の実施形態においては、本明細書に記載の活性を有するが、ヘモグロビン濃度またはヘマトクリットを増加しない組織保護性サイトカインを用いる。このような組織保護性サイトカインは、本発明の方法を長期的に提供する場合に好適である。他の実施形態においては、エリスロポエチンを、エリスロポエチンを最大限に刺激するために必要な用量を超える量で与える。上記のように、本発明の組織保護性サイトカインは必ずしも赤血球産生活性を有するものでなく、従って、造血単位で表示した上記用量は単に、赤血球生成作用を有するエリスロポエチンとしての例示であり;上記の投与に対する重量当量は、組織保護性サイトカインに対して適用可能であるものとして提供される。

10

【0172】

一実施形態においては、炎症に関連する1以上の症候群の治療、予防または改善に有効でありうる本発明の組成物の量は、標準の臨床技術により決定することができる。正確な製剤に利用すべき用量はまた、投与経路、および重症度にも依存しうるのであって、担当医師の判断とそれぞれの哺乳動物の環境により決定されなければならない。有効な用量は、*in vitro*または動物モデル試験系から誘導される用量-応答曲線から外挿してもよい。

【0173】

特定の実施形態においては、哺乳動物の炎症性障害に関連する1以上の症候群を予防、治療または改善するために投与される本発明の組成物または予防もしくは治療薬の投与量は、哺乳動物体重に対して、150 μ g/kg以下、好ましくは125 μ g/kg以下、100 μ g/kg以下、95 μ g/kg以下、90 μ g/kg以下、85 μ g/kg以下、80 μ g/kg以下、75 μ g/kg以下、70 μ g/kg以下、65 μ g/kg以下、60 μ g/kg以下、55 μ g/kg以下、50 μ g/kg以下、45 μ g/kg以下、40 μ g/kg以下、35 μ g/kg以下、30 μ g/kg以下、25 μ g/kg以下、20 μ g/kg以下、15 μ g/kg以下、10 μ g/kg以下、5 μ g/kg以下、2.5 μ g/kg以下、2 μ g/kg以下、1.5 μ g/kg以下、1 μ g/kg以下、0.5 μ g/kg以下、または0.5 μ g/kg以下である。他の実施形態においては、他の実施形態においては、哺乳動物の炎症性障害に関連する1以上の症候群を予防、治療または改善するために投与される本発明の組成物または予防もしくは治療薬の組成物の投与量は、単位用量として、0.1mg～20mg、0.1mg～15mg、0.1mg～12mg、0.1mg～10mg、0.1mg～8mg、0.1mg～7mg、0.1mg～5mg、0.1～2.5mg、0.25mg～20mg、0.25～15mg、0.25～12mg、0.25～10mg、0.25～8mg、0.25mg～7mg、0.25mg～5mg、0.5mg～2.5mg、1mg～20mg、1mg～15mg、1mg～12mg、1mg～10mg、1mg～8mg、1mg～7mg、1mg～5mg、または1mg～2.5mgである。

20

30

【0174】

さらに他の実施形態においては、被験者に1種以上の免疫調節薬の予防または治療上有効な量の用量の1以上が投与され、ここで、上記被験者に投与される上記薬の予防または治療上有効な量の用量は、上記被験者において近似的に500細胞/mm³～1500細胞/mm³未満、好ましくは1400細胞/mm³未満、1300細胞/mm³未満、1250細胞/mm³未満、1200細胞/mm³未満、1100細胞/mm³未満または1000細胞/mm³未満の平均絶対リンパ球数を達成するものである。

【0175】

本発明はさらに、上記エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインと結合した特定の分子を含む組成物を投与することによって哺乳動物の体内の内皮細胞バリアを通過する分子の輸送を容易にする方法に関する。上記のように、体内のある器官の中の内皮細胞同士の間密着帯は、ある特定の分子の侵入を防ぐバリアを生成する。バリア機能に守られた器官の中の種々の症状を治療するために、薬物の通過を促進する手段が望ましい。エリスロポエチンまたは本発明の組織保護性サイトカインは、血液脳関門および同様のバリアを通過する他の分子を送達するための担体として有用である。エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインと共にバリアを通過させたい分子を含む組成物を調製し、その組成物を末梢投与すると、バリアを通過する該組成物の経細胞輸送が得られる。バリアを通過させたい分子とエリスロポエチンとの結合は、不安定な共有結合であってもよく、この場

40

50

合は、バリアを通過した後に該分子がエリスロポエチンと結合した状態から解放される。該分子の所望の薬理学的活性がエリスロポエチンおよび/または組織保護性サイトカインとの結合により維持されるかまたは結合により影響を受けない場合、このような複合体を投与することができる。

【0176】

当業者であれば、分子をエリスロポエチンまたは本発明の組織保護性サイトカインおよび上記他の薬剤とを共有結合、非共有結合および他の手段により結合させる様々な手段を思いつくであろう。さらに、実験システムにおける組成物の効力の評価法を簡単に決定することもできるであろう。分子とエリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインとの結合は、様々な手段（不安定な、共有結合、架橋等を含む）によって行うことができる。ビオチンとアビジンとの相互作用を用いてもよい。上記のように、ハイブリッド分子を、例えば、所望の薬理活性をもつ分子のドメインおよびエリスロポエチン受容体活性調節を担うドメインの両方を含む融合またはキメラポリペプチドを、組換えもしくは合成手段によって調製してもよい。プロテアーゼ切断部位を分子内に含ませることができる。

10

【0177】

分子を多官能性分子（すなわち多官能性架橋剤）を介してエリスロポエチンと結合させることができる。本明細書中で使用される用語「多官能性分子」は、連続して2回以上反応することができる1つの官能基を有する分子（ホルムアルデヒド等）および2つ以上の反応性基を有する分子を包含する。本明細書中で使用される用語「反応性基」は、ある分子（例えば内皮細胞バリアを通過して送達しようとするペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸、特にホルモン、抗生物質、または抗癌剤）上の官能基と反応する架橋剤上の官能性基であって、反応すると架橋剤と分子との間に共有結合を形成する官能基を指す。用語「官能基」は、有機化学におけるその標準的な意味を持つ。使用することができる多官能性分子は、好ましくは成体適合性リンカーである（すなわち *in vivo* において非発癌性、非毒性であり、実質的に非免疫原性である）。当分野で公知であるものおよび本明細書中に記載されるもの等の多官能性架橋剤は、これらの生態適合性を決定するために動物モデルで簡単に試験することができる。多官能性分子は好ましくは二官能性である。本明細書中で使用される「二官能性分子」とは、2つの反応性基を有する分子を指す。二官能性分子は、ヘテロ二官能性であってもホモ二官能性であってもよい。ヘテロ二官能性架橋剤により、定方向コンジュゲーション（vectorial conjugation）が可能となる。架橋反応を水溶液（pH6~8に緩衝化した水溶液等）の中で生じさせるには多官能性分子が十分な水溶性を有すること、およびより効果的な生体内分布を得るためには得られるコンジュゲートが水溶性のままであることが特に好ましい。典型的には、多官能性分子はアミノもしくはスルフヒドリル官能基と共有結合する。しかし、他の官能基（例えばカルボン酸またはヒドロキシル基）に対して反応性である多官能性分子も本発明において想定している。

20

30

【0178】

ホモ二官能性分子は少なくとも2つの同種の反応性官能基を有する。ホモ二官能性分子上の反応性官能基は、例えばアルデヒド基および活性エステル基を含む。アルデヒド基を有するホモ二官能性分子としては、例えばグルタルアルデヒドおよびサブアラルデヒド（subaraldehyde）が挙げられる。架橋剤としてのグルタルアルデヒドの使用は、Poznanskyら、Science 223, 1304-1306 (1984)により開示された。少なくとも2つの活性エステルユニットを有するホモ二官能性分子としては、ジカルボン酸およびN-ヒドロキシスクシンイミドのエステルが挙げられる。このようなN-スクシンイミジルエステルの幾つかの例としては、スベリン酸ジスクシンイミジルおよびジチオ-ビス-（プロピオン酸スクシンイミジル）、ならびにこれらの可溶性ビス-スルホン酸およびビススルホン酸塩（これらのナトリウム塩およびカリウム塩等）が挙げられる。これらのホモ二官能性試薬は、Pierce（Rockford, Illinois）から入手可能である。

40

【0179】

ヘテロ二官能性分子は、少なくとも2つの異なる反応性基を有する。反応性基は、（例えばエリスロポエチン上およびその分子上に存在する）異なる官能基と反応する。ヘテロ

50

二官能性架橋剤上の反応性基と反応するこれら2つの異なる官能基は通常、アミノ基（例えばリシンのアミノ基等）、スルフヒドリル基（例えばシステインのチオール基等）、カルボン酸（例えばアスパラギン酸上のカルボキシラート等）、またはヒドロキシル基（例えばセリン上のヒドロキシル基等）である。

【0180】

もちろん、本発明の様々な組織保護性サイトカインおよびエリスロポエチンのいくつかは、ある特定の架橋剤と共に使用することができる適当な反応性基をもたなくてもよいが、当業者であれば、エリスロポエチンまたは本発明の組織保護性サイトカインの架橋に利用できる基に基づいて、架橋剤の選択を十分行うことができるであろう。

【0181】

ヘテロ二官能性分子の反応性基がアミノ基と共有結合を形成するとき、この共有結合は通常はアミドもしくはイミド結合である。アミノ基と共有結合を形成する反応性基は、例えば活性化されたカルボン酸基、ハロカルボニル基、またはエステル基であってもよい。好ましいハロカルボニル基は、クロロカルボニル基である。エステル基は好ましくは例えばN-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル基などの反応性エステル基である。

【0182】

他の官能基は、典型的には、チオール基、チオール基に変換されうる基、またはチオール基と共有結合を形成する基である。共有結合は、通常はチオエーテル結合またはジスルフィドである。チオール基と共有結合を形成する反応性基としては、例えば、チオール基または活性化されたジスルフィドと反応する二重結合が挙げられる。チオール基と反応する二重結合を含む反応性基はマレイミド基であるが、アクリロニトリルなどの他の反応性基も可能である。反応性ジスルフィド基としては、例えば2-ピリジルジチオ基または5,5'-ジチオ-ビス-(2-ニトロ安息香酸)基が挙げられる。反応性ジスルフィド結合を含むヘテロ二官能性試薬の幾つかの例としては、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジル-ジチオ)プロピオナート (Carlssonら, 1978, Biochem J., 173:723-737)、S-4-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチルベンジルチオ硫酸ナトリウム、および4-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル-(2-ピリジルジチオ)トルエンが挙げられる。N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナートが好ましい。チオール基と反応する二重結合を有する反応性基を含むヘテロ二官能性試薬の幾つかの例としては、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラートおよびスクシンイミジル m -マレイミドベンゾアートが挙げられる。

【0183】

他のヘテロ二官能性分子としては、スクシンイミジル3-(マレイミド)プロピオナート、スルホスクシンイミジル4-(p -マレイミド-フェニル)ブチラート、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル-シクロヘキサン)-1-カルボキシラート、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステルが挙げられる。スクシンイミジル m -マレイミドベンゾエートのスルホン酸ナトリウム塩が好ましい。上記ヘテロ二官能性試薬およびこれらのスルホン酸塩の多くは、Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USAから入手可能である。

【0184】

上記の可逆的にまたは不安定にコンジュゲートさせることの必要性は、当業者により簡単に決定することができる。コンジュゲートを、*in vitro*にてエリスロポエチンおよび所望の薬理活性の両方について試験してもよい。コンジュゲートがどちらの活性も維持している場合、次にその適合性について*in vivo*でテストする。コンジュゲートされた分子がその活性化のためにエリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインから分離する必要がある場合、エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインとの不安定な結合または可逆的結合が好ましいであろう。不安定性の特性はまた、*in vivo*試験の前に標準的な*in vitro*手法を用いて試験することもできる。

【0185】

これらならびに他の多官能試薬を作製しかつ使用する方法についてのさらなる情報は、

10

20

30

40

50

以下の出版物または当技術分野で利用しうる他の出版物から得ることができる。

【0186】

1. Carlsson, J.ら, 1978, Biochem. J. 173:723-737.
2. Cumber, J. A.ら, 1985, Methods in Enzymology 112:207-224.
3. Jue, R.ら, 1978, Biochem 17:5399-5405.
4. Sun, T. T.ら, 1974, Biochem. 13:2334-2340.
5. Blattler, W. A.ら, 1985, Biochem. 24 :1517-152.
6. Liu, F. T.ら, 1979, Biochem. 18:690-697.
7. Youle, R. J.およびNeville, D. M. Jr., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:5483- 5486. 10
8. Lerner, R. A.ら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3403-3407.
9. Jung, S. M.およびMoroi, M., 1983, Biochem. Biophys. Acta 761:162.
10. Caulfield, M. P.ら, 1984, Biochem. 81:7772-7776.
11. Staros, J. V., 1982, Biochem. 21:3950-3955.
12. Yoshitake, S.ら, 1979, Eur. J. Biochem. 101:395-399.
13. Yoshitake, S.ら, 1982, J. Biochem. 92:1413-1424.
14. Pilch, P. F.およびCzech, M. P., 1979, J. Biol. Chem. 254:3375-3381.
15. Novick, D.ら, 1987, J. Biol. Chem. 262:8483-8487.
16. Lomant, A. J.およびFairbanks, G., 1976, J. Mol. Biol. 104:243-261.
17. Hamada, H.およびTsuruo, T., 1987, Anal. Biochem. 160:483-488. 20
18. Hashida, S.ら, 1984, J. Applied Biochem. 6:56-63.

さらに、架橋方法は、MeansおよびFeeney, 1990, Bioconjugate Chem. 1:2-12が総括している。

【0187】

上記の方法および本発明の組成物が通過するバリアは、限定されるものでないが、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巢関門、および血液子宮関門を含む。

【0188】

内皮細胞バリアを横切って輸送させる候補分子としては、例えば成長ホルモン等のホルモン、神経栄養因子、抗生物質、抗ウイルスもしくは抗真菌剤、例えば脳および他のバリア機能に守られた器官からは通常除外されるもの、ペプチド放射性医薬品、アンチセンス薬、生物学的活性物質に対する抗体および抗ウイルス、医薬品、ならびに抗癌剤が挙げられる。このような分子の限定されない例としては、ホルモン、例えば成長ホルモン、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF)、トランスフォーミング増殖因子 1 (TGF 1)、トランスフォーミング増殖因子 2 (TGF 2)、トランスフォーミング増殖因子 3 (TGF 3)、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン6、AZT、腫瘍壊死因子に対する抗体、および免疫抑制剤、例えばシクロスポリンが挙げられる。さらに、染料またはマーカーをエリスロポエチンまたは本発明の組織保護性サイトカインの1種と結合させて、診断目的で、細胞、組織、または脳内器官および他のバリアをもつ器官を可視化することができる。一例として、脳内のプラークを可視化するために利用するマーカーを、エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインに結合して、患者内のアルツハイマー病の進行を確認することができる。 30 40

【0189】

本発明はまた、内皮細胞の密着帯バリアを介した経細胞輸送により輸送させようとする分子と上記エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインとを含む組成物にも関する。本発明はさらに、上記のようにバリアを介して分子を送達するための医薬組成物を調製するための、上記エリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインと該分子とのコンジュゲートの使用に関する。

【0190】

以下の実施例においては、様々な動物モデルならびに神経保護と経細胞輸送の in vitro 50

試験を提供し、本発明の組織保護性サイトカインの有効性を実証する。このようなモデルは、P-19細胞を利用して組織保護性サイトカインの神経保護効果を確認するin vitroモデル、およびマウスにおいて本発明の組織保護性サイトカインのin vivo神経保護効果を確認するin-vivo水中毒モデルを含む。経細胞輸送については、本発明のエリスロポエチンとコンジュゲートしたモデルタンパク質を、非経口投与後の脳中への輸送について評価する。in vitroモデルおよび動物モデルは、ヒトを含む哺乳動物種における本化合物の効能の予測となる。さらに実施例1は、ヒト脳が、エリスロポエチンと同様に組織保護性サイトカインの経細胞輸送に対する機構も提供する豊富なエリスロポエチン受容体を有することを実証する。

【実施例】

10

【0191】

本発明は、以下の限定するものでない実施例を参照することにより、さらによく理解することができる。以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態をさらに十分に説明する目的で提示する。しかしこの実施例は、本発明の広い範囲を限定するものと決して解釈してはならない。

【0192】

実施例1

ヒト脳内のエリスロポエチン受容体の分布

外科手術中に取出した正常ヒト脳（例えば、腫瘍切除物中の無腫瘍の自由縁を得る）を、5%アクロレインを含む0.1Mリン酸バッファー（pH 7.4）中で3時間、直接固定した。切片を振動ミクロトームを用いて40μm厚さにカットした。免疫組織化学染色を、自由に浮かぶ切片、およびエリスロポエチン受容体抗血清（Santa Cruz Biotechnologyから入手）の1:500希釈液を用いる間接的抗体ペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ法を用いて実施した。内因性ペルオキシダーゼ活性は、過酸化水素（3%メタノール溶液、30分間）を用いる組織切片の前処理によりクエンチした。組織対照も、一次抗体を省略しかつ適当なブロッキング用ペプチド（Santa Cruz Biotech.から入手）を用いて実施し、染色がエリスロポエチン（EP0）受容体に特異的であることを確認した。

20

【0193】

図1は、ヒト脳の毛細管が、特異的抗EP0受容体抗体を用いる免疫組織化学により測定すると、非常に高いレベルのEP0受容体を発現することを示す。この事実が、EP0が、血液脳関門にも関わらず、全身循環から脳中に貫入することができる機構を提供する。

30

【0194】

図2は、EP0受容体が、ヒト脳内の血液脳関門を形成する毛細管内および周囲に高密度で局在することを示す。

【0195】

10μm切片をパラフィンから切断し、包埋した切片を4%パラホルムアルデヒド中に浸漬して固定したことを除いて、図1および2に対するのと類似のプロトコルを実施して図3を得た。図3は、ヒト脳毛細管の管腔および反管腔表面に高密度のEP0受容体が存在し、循環から脳中へのEP0輸送に対する解剖学的根拠となることを示す。

【0196】

40

図4は、組織を電子顕微鏡用のウルトラミクロトームで切片化しかつ二次抗体をコロイド金粒子を用いて標識したことを除いて、図3と類似のプロトコルに従って得たものである。この図は、EP0受容体が、ヒト脳における内皮表面上（*）、細胞質小胞内（矢印）およびグリアのエンドフィート（glial endfeet）（+）に見出されることを示し、循環から脳中へのEP0輸送に対する解剖学的根拠を与える。

【0197】

実施例2

組織保護性サイトカイン

本明細書に記載される使用に望ましい組織保護性サイトカインは、エリスロポエチンの、本明細書に以上記載した方法の中でもとりわけ、アルギニンもしくはリシン残基または

50

カルボキシル基のグアニジン化、カルバミル化、アミジン化、トリニトロフェニル化、アセチル化、サクシニル化、ニトロ化、あるいは修飾によって得ることができる。これらの修飾は、その活性を特定の器官および組織に対してのみ維持するが、他の器官や組織（赤血球など）に対する活性を維持しない組織保護性サイトカインを生成する。エリスロポエチンを上記反応にかけると、一般的に、得られる分子はin vivoおよびin vitro赤血球産生活性を欠く（例えば、Satakeら；1990, Biochem. Biophys. Acta 1038:125-9）。組織保護性サイトカイン調製の数例を、以下に記載する。以下の例はエリスロポエチンを出発物質として用いるが、当業者であれば、エリスロポエチン誘導体、例えば脱シアリル化、グアニジン化、カルバミル化、アミジン化、トリニトロフェニル、アセチル化、サクシニル化、およびニトロ化されたエリスロポエチンも同様に利用しうることを理解するであろう。 10

【0198】

A. 脱シアリル化されたエリスロポエチンによる組織保護性サイトカインの生産

エリスロポエチンを以下の例示の方法により脱シアリル化することができる。シアリダーゼ（Streptococcus種6646Kから単離した）をSEIKAGAKU AMERICA（Code No. 120050）から得る。エリスロポエチンをシアリダーゼ（0.05U/mg EPO）により37℃にて3時間、脱シアリル化処理する。反応混合物を脱塩しかつUltrafree遠心濾過ユニットを用いて濃縮した。次いでサンプルをAKTApriMETM システムのイオン交換カラムに適用する。タンパク質を、選択したバッファーを用いて溶出する。有意な量のタンパク質を含有する溶出画分を次いでIEFゲル分析にかける。トップ2バンドだけを含有する画分（IEFゲル上でpI~8.5および~7.9にて移動する）をプールする。プールした画分のタンパク質含量を測定し、1/9容積の10 x 塩溶液（1M NaCl、0.2Mクエン酸ナトリウム、3mMクエン酸）を加えた。溶液のシアル酸含量を次いで測定した。有意なシアル酸含量を検出してはならない。 20

【0199】

図5~6に示すように、アシアロエリスロポエチンおよびフェニルグリオキサールエリスロポエチンは、in vitroで神経細胞に対して天然のエリスロポエチンと同じように有効であった。in vitro試験を、血清を除去するとアポトーシスを起こす神経様胚性癌細胞（P19）を用いて実施した。血清除去前24時間に、1~1000ng/mlのエリスロポエチンまたは修飾型エリスロポエチンを培養に加えた。翌日、培地を除去し、細胞を血清を含有しない新鮮な培地を用いて洗浄し、試験物質（無血清の）を含有する培地を培養に戻し、さらに48時間を経た。生存細胞数を測定するために、テトラゾリウム還元アッセイ（CellTiter 96；Promega, Inc.）を実施した。図5~6が示すように、アシアロエリスロポエチンは細胞死を防止する上でエリスロポエチン自身と等しい能力を有すると思われる。 30

【0200】

先に記載のように、中大脳動脈の領域に可逆性破壊を加えたラット局所虚血モデル（Brinesら、2000, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 97:10526-31）を用いて、in vivo神経保護活性の保持を確かめた。動脈閉塞の開始時に、アシアロエリスロポエチンまたはエリスロポエチン（5000 U（40μg）/kg体重、腹腔内に）またはピヒクルを成体雄Sprague-Dawleyラットに投与した。24時間後、動物を犠牲にして脳を取出して研究した。連続切片をカットし、テトラゾリウム塩を用いて染色し、脳の生存領域を確認した。図7に示すように、アシアロエリスロポエチンは、神経を1時間の虚血から保護する上で天然のエリスロポエチンと同様に有効であった。図8は、他の局所虚血モデルの結果を示し、ここではエリスロポエチンとアシアロエリスロポエチンを用いて比較しうる用量応答を実施した。250U（2μg）/kgの最低用量において、アシアロエリスロポエチンは保護を与えたが、未修飾型エリスロポエチンは与えなかった。 40

【0201】

B. エリスロポエチンのカルバミル化による組織保護性サイトカインの調製

天然のエリスロポエチンを用いて、Jin Zeng, (1991) 「カルバミル化およびグアニジン化によるメタロチオネインのリシン修飾（Lysine modification of metallothionein by carbamylation and guanidination）」 Methods in Enzymology 205: 433-437に記載の 50

以下の方法によって、それぞれのカルバミル化分子を調製することができる。最初に、シアン化カリウムを再結晶した。1 Mホウ酸塩バッファ（pH 8.8）を調製した。エリスロポエチン溶液を等容積のホウ酸塩バッファと混合した。シアン化カリウムを直接試験管に加えて最終濃度0.5Mの濃度とした。その溶液をよく混合し、37℃にて6時間インキュベートした。次いで溶液を蒸留水を用いて十分に透析した。生成物を透析チュービングから取出して新しいチューブ中に採集した。容積を測定し、そして1/9容積の10 x 塩溶液（1M NaCl、0.2Mクエン酸ナトリウム、3mMクエン酸）を溶液に加えた。タンパク質含量を測定し、生成物回収率を計算した。生成物をIEFゲルにより分析し、次いでTF-1細胞を用いて*in vitro*試験をした。

【0202】

10

C．エリスロポエチンのサクシニル化による組織保護性サイトカインの調製

天然のエリスロポエチンを用いて、Alcaldeら（2001）「好熱性偏性嫌気性細菌 *Thermoanaerobacter* sp. 501由来のシクロデキストリン・グリコシルトランスフェラーゼのサクシニル化は、デンプンをドナーとして用いるそのトランスフェラーゼ活性を増強する（*Succinylation of cyclodextrin glycosyltransferase from Thermoanaerobacter* sp. 501 enhances its transferase activity using starch as donor）」. *J. Biotechnology* 86:71-80に記載の以下の方法によって、それぞれのサクシニル化分子を調製することができる。0.5M NaHCO_3 （pH 8.0）中のエリスロポエチン（100 μg ）を、15モル過剰の無水コハク酸と15℃にて1時間インキュベートした。反応を蒸留水に対する透析により停止した。

【0203】

20

エリスロポエチンをサクシニル化する他の方法は、無水コハク酸を乾燥アセトン中に27 mg/mlにて溶解する。反応は、エッペンドルフチューブに入れた10mMリン酸ナトリウムバッファ（pH 8.0）中で実施する。エリスロポエチンと50倍モルの無水コハク酸をチューブに加える。溶液を十分攪拌し、チューブを4℃にて1時間回転する。反応を、透析カセット（Slide-A-Laze 7K、Pierce 66373）を用いて、10mMリン酸ナトリウムバッファに対する透析により停止する。生成物を透析カセットから取出して、新しいチューブ中に採集する。容積を測定し、1/9容積の10 x 塩溶液（1M NaCl、0.2Mクエン酸ナトリウム、3mMクエン酸）を加える。タンパク質含量を測定し、生成物回収率を計算する。生成物をIEFゲルにより分析し、次いでTF-1細胞を用いて*in vitro*試験をした。

【0204】

30

D．エリスロポエチンのアセチル化による組織保護性サイトカインの調製

天然のエリスロポエチンを用いて、Satakeら（1990）「エリスロポエチンの化学的修飾：グアニジン化による*in vitro*活性の増加（*Chemical modification of erythropoietin: an increase in in-vitro activity by guanidination*）」. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1038:125-129に記載の以下の方法によって、それぞれのアセチル化分子を調製することができる。

【0205】

反応は、エッペンドルフチューブに入れた80mMリン酸ナトリウムバッファ（pH 7.2）中で実施した。エリスロポエチンと等モルの無水酢酸をチューブに加えた。十分攪拌した後、溶液を氷上で1時間インキュベートした。反応は、透析カセット（Slide-A-Laze 7 K、Pierce 66373）を用いて、水に対する透析により停止した。生成物を透析カセットから取出して、新しいチューブ中に採集した。容積を測定した後、1/9容積の10 x 塩溶液（1M NaCl、0.2Mクエン酸ナトリウム、3mMクエン酸）を加えた。タンパク質含量を測定し、生成物回収率を計算した。生成物をIEFゲルにより分析し、次いでTF-1細胞を用いて*in vitro*試験をした。

40

【0206】

E．エリスロポエチンのリシンをカルボキシメチル化することによる組織保護性サイトカインの調製

天然のエリスロポエチンを用いて、Akhtarら，（1999）「組換え体 α -結晶のN⁻-(カルボキシメチル)リシンアダクトのコンフォメーションの研究（*Conformational study of N⁻-(*

50

carboxylmethyl)lysine adducts of recombinant α -crystallins)」 Current Eye Research, 18:270-276に記載の以下の方法によって、エリスロポエチンの1種以上のリシル残基が修飾されているそれぞれのN⁻-(カルボキシメチル)リシン(CML)修飾分子を調製することができる。

【0207】

リン酸ナトリウムバッファー(50mM、pH 7.5)中のグリオキシル酸(200mM)溶液およびNaBH₃CN(120mM)溶液を調製した。エッペンドルフチューブに入れたリン酸ナトリウムバッファーにエリスロポエチンを加えた。次いで溶液中のリシン当量(約8リシル残基/mol)を計算した。次に、3倍を超えるNaBH₃CNと5もしくは10倍を超えるグリオキシル酸をチューブに加えた。それぞれのチューブをボルテックス攪拌し、37℃で5時間インキュベートした。サンプルをリン酸バッファーに対して一夜4℃で透析した。それぞれの生成物の容積を透析後に測定した。タンパク質濃度を確認し、生成物回収率を計算した。生成物をIEFゲルにより分析し、次いでTF-1細胞を用いてin vitro試験をした。

10

【0208】

F. エリスロポエチンのヨウ素化による組織保護性サイトカインの調製

天然のエリスロポエチンを用いて、Pierce Chemical Company(Rockford, IL)により提供された指示書「IODO-GEN(登録商標)、プレコートされたヨウ素化チューブ(IODO-Gen Pre-Coated Iodination Tubes)」(製品#28601)に記載の以下の方法に従い、それぞれのヨウ素化分子を調製した。

【0209】

1. 最初に、0.1MのNaIを調製し、ヨウ素化をIODO-Gen(プレコートされたヨウ素化チューブ)(Pierce、28601)中で、リン酸ナトリウムバッファー(40mM、pH 7.4)0.1ml/チューブの全反応容積を用いて実施した。タンパク質基質(エリスロポエチン)をリン酸ナトリウムバッファーと混合し、次いでIODO-Gen(プレコートされたヨウ素化チューブ)へ移した。NaIを最終濃度1~2mMまで加えて、NaI/タンパク質のモル比を14~20にした。次いで溶液をよく混合し、室温で15分間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。反応混合物を取り出し、3.9mlのリン酸ナトリウムバッファー(すなわち、40倍希釈)を含有するチューブに加えて、反応を停止した。生成物は、予め湿らせたUltrafree遠心濾過器ユニットにより濃縮した。濃縮物の容積を測定し、そして1/9容積の10x塩溶液(1M NaCl、0.2Mクエン酸ナトリウム、3mMクエン酸)を加えた。タンパク質含量を測定し、生成物回収率を計算した。生成物をIEFゲルにより分析し、次いでTF-1細胞を用いてin vitro試験をした。

20

30

【0210】

2. エリスロポエチンをヨウ素化する他の方法は、1 mCiキャリアフリーNa¹²⁵Iを含有する100ul PBS(20mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.5)中の1個のヨードビーズ(Iodo Bead(Pierce、Rockford、IL))を5分間インキュベートする方法に関わる。次いで、100ul PBS中のエリスロポエチン(100ug)を混合物に加えた。10分間室温でのインキュベーションを経た後に、200ul溶液を反応溶液から取出す(ヨードビーズは後に残して)ことにより反応を停止した。次いで過剰のヨウ素を、セントリコン(Centricon)10カラム上のゲル濾過により取除いた。図9に示すように、この方法で生産したヨード-エリスロポエチンはP19細胞を血清除去から保護するのに有効である。

40

【0211】

3. エリスロポエチンはまた、クロラミンTを用いてヨウ素化することができる。100ul PBS中のエリスロポエチン(100ug)に500uCi Na¹²⁵Iを加え、次いで混合物を一緒にエッペンドルフチューブ中で混合する。次いで25ulクロラミンT(2mg/ml)を加え、混合物を1分間、室温でインキュベートした。次いで50ulのクロラミンT停止バッファー(2.4mg/mlメタ亜硫酸水素ナトリウム、10mg/mlチロシン、10%グリセロール、0.1%キシレンを含むPBS)を加えた。次いでヨードチロシンとヨウ素化エリスロポエチンをセントリコン(Centricon)10カラム上のゲル濾過により分離した。

【0212】

50

G. エリスロポエチンをビオチン化することによる組織保護性サイトカインの調製

1. Wojchowskiら, 「ビオチン化組換えヒトエリスロポエチン: 受容体リガンドとしての生物活性と効用 (Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand)」 Blood, 1989, 74 (3): 952-8において、著者らはエリスロポエチンをビオチン化するのに3つの異なる方法を用いている。ビオチンを(1)シアル酸部分、(2)カルボン酸基および(3)アミノ基に加える。著者らは、マウス脾細胞増殖アッセイを用いて、(1)ビオチンのシアル酸部分への付加はエリスロポエチンの生物学的活性を不活性化しないこと、(2)ビオチンのカルボン酸基への付加はエリスロポエチンの実質的な生物学的不活性化に導くこと、そして(3)ビオチンのアミノ基への付加はエリスロポエチンの完全な生物学的不活性化をもたらすことを実証した。これらの方法と修飾物は全て本明細書に包含される。図10は、血清飢餓P19アッセイにおけるビオチン化エリスロポエチンとアシアロエリスロポエチンの活性を示す。

【0213】

2. さらに、天然のエリスロポエチンを用いてそれぞれのビオチン化分子を、Pierce Chemical Company (Rockford, IL) により提供されたEZ-Link NHS-LC-ビオチン (製品#21336) に対する指示書に記載の以下の方法に従って調製することができる。

【0214】

反応直前に、DMSO中のEZ-Link NHS-LC-ビオチン (Pierce, 21336) を2 mg/mlにて溶解した。反応は、50mM炭酸水素ナトリウム (pH 8.3) を含有する全容積1mlのチューブ (17 x 100mm) 中で実施した。エリスロポエチンと<10%のEZ-Link NHS-LC-ビオチンを加えて、~20のビオチン/タンパク質モル比をもつ溶液を作った。溶液をよく混合し、氷上で2時間インキュベートした。溶液を脱塩し、かつUltrafree遠心濾過ユニットを用いて濃縮した。次いで生成物を新しいチューブ中に採集した。生成物の容積を測定し、1/9容積の10 x 塩溶液 (1M NaCl, 0.2Mクエン酸ナトリウム、3mMクエン酸) を生成物に加えた。生成物のタンパク質含量を測定し、生成物回収率を計算した。生成物をIEFゲルにより分析し、次いでTF-1細胞を用いてin vitro試験をした。

【0215】

3. エリスロポエチンの遊離アミノ基も、次の方法を用いてビオチン化することができる。最初に、0.2mg D-ビオチニル-e-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Boehringer Mannheim #1418165) を100ul DMSOに溶解した。次いでこの溶液を、ホイル (foil) で覆ったチューブ中にほぼ0.2mgエリスロポエチンを含有する400ul PBSと一緒にした。この溶液を4時間室温でインキュベートした後、未反応ビオチンをセントリコン (Centricon) 10カラム上のゲル濾過により分離した。

【0216】

組織保護性サイトカインに到達する目的で、これらの修飾のいくつかをエリスロポエチンもしくはエリスロポエチン誘導体に対して実施することを意図している。例えば、エリスロポエチンを、実施例2(A)の上に掲げた方法により脱シアル化しかつ実施例2(B)の上に掲げた方法によりカルバミル化してアシアロカルバモイルエリスロポエチンを作ることができる。

【0217】

実施例3

他の方法による組織保護性サイトカインの調製

1. トリニトロフェニル化: エリスロポエチン (100ug) を、Plappら (「修飾したアミノ基をもつウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼAの活性 (Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups)」 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845) に記載のとおり、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホナートを用いて修飾した。

【0218】

2. アルギニン修飾: エリスロポエチンを、Riordan (「カルボキシペプチダーゼAの機能性アルギニル残基 ブタンジオンによる修飾 (Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione)」 Riordan JF, Biochemistry 1973, 1

10

20

30

40

50

2 (20): 3915-3923) に記載のとおり、2,3-ブタンジオンを用いて修飾した。

【0219】

3. エリスロポエチンを、Patthyら (「リボヌクレアーゼ A とリゾチーム中の機能性アルギニン残基の同定 (Identification of functional arginine residuals in ribonuclease A and lysozyme)」 Patthy, L, Smith EL, J. Biol. Chem 1975 250 (2): 565-9) に記載のとおり、シクロヘキサノンを用いて修飾した。

【0220】

4. エリスロポエチンを、Werberら (「会報：カルボキシペプチダーゼ B：機能性アルギニル残基の修飾 (Proceedings: carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residuals)」 Werber, MM, Sokolovsky M Isr J Med Sci 1975 11(11): 1169-70) に記載のとおり、フェニルグリオキサールを用いて修飾した。フェニルグリオキサールで修飾したエリスロポエチンを、上記の神経様 P19 細胞アッセイを用いて試験した。図 11 に図解したように、この化学的に修飾したエリスロポエチンはその神経保護効果を完全に維持する。 10

【0221】

5. チロシン修飾：エリスロポエチン (100ug) を、Nestlerら, 「テトラニトロメタンを用いて修飾した高密度リポタンパク質によるラット卵巣細胞ステロイド産生の刺激 (Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane)」, Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd. J Biol Chem 1985 Jun 25;260(12):7316-21) が先に記載したとおり、テトラニトロメタンとともにインキュベートした。 20

【0222】

6. グルタミン酸 (およびアスパラギン酸) 修飾：カルボキシル基を修飾する目的で、エリスロポエチン (100ug) を、1M グリシンアミド中の 0.02M EDC とともに pH 4.5 で室温にて 60 分間、Carrawayら, 「キモトリプシンおよびキモトリプシノーゲン中のカルボキシル基修飾 (Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen)」 Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE Jr. J Mol Biol 1969 May 28;42(1):133-7 に記載のとおりインキュベートした。

【0223】

7. トリプトファン残基修飾：エリスロポエチン (100ug) を、20mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.5) 中の 20uM n-ブロモスクシンイミドとともに室温にて、Aliら, J Biol Chem. 1995 Mar 3;270(9):4570-4 に記載のとおり、インキュベートした。多数の酸化されたトリプトファン残基を、Korotchkina (Korotchkina, LGら, Protein Expr Purif. 1995 Feb;6(1):79-90) に記載の方法により確認した。 30

【0224】

8. アミノ基の除去：アミノ基を除去する目的で、エリスロポエチン (100ug) を 20mM ニンヒドリン (Pierce Chemical, Rockford, 11) を含有する PBS (pH 7.4) 中で、37 にて 2 時間、Kokkiniら (Kokkini, G.ら, 「ニンヒドリンによるヘモグロビンの修飾 (Modification of hemoglobin by ninhydrin)」 Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705) に記載のとおりインキュベートした。得られるアルデヒドの還元は、生成物を水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化リチウムアルミニウムと反応させることにより実施した。具体的には、エリスロポエチン (100ug) を PBS 中の 0.1M 水素化ホウ素ナトリウムとともに 30 分間、室温でインキュベートした。サンプルを氷上で 10 分間冷却することによって還元を終結し、それを PBS に対して 3 回、一夜透析した (Kokkini, G., Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705)。水素化リチウムアルミニウムを用いる還元は、エリスロポエチン (100ug) を PBS 中の 0.1M 水素化リチウムアルミニウムと 30 分間、室温でインキュベートすることにより実施した。サンプルを氷上で 10 分間冷却することにより還元を終結し、それを PBS に対して 3 回、一夜透析した。 40

【0225】

9. ジスルフィド還元と安定化：エリスロポエチン (100ug) を 500mM DTT と 15 分間、60 50

でインキュベートした。次いで、水中の20mMヨードアセトアミドをその混合物に加え、25分間、室温で暗所にてインキュベートした。

【0226】

10. 限定したタンパク質分解：エリスロポエチンを、特定残基を標的に定めた限定した化学的タンパク質分解にかけることができる。エリスロポエチンを、50%酢酸中の50倍過剰の2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-3-メチル-3'-プロモインドレニン（トリプトファン残基の後で特異的に切断する）と、48時間、暗所で室温にて、窒素圧下の栓をしたチューブ中で反応させた。トリプトファンを用いるクエンチングにより反応を終結し、そして脱塩した。

【0227】

上記のように、エリスロポエチンまたはアシアロエリスロポエチンを修飾し、さらに、エリスロポエチン分子の複数の修飾だけでなく、本発明の精神から逸脱することなく、さらなる修飾も実施することができる。以上のいずれの例も部分的に脱シアリル化されたエリスロポエチンを用いて実施することができ、これらは以下に記載のとおり調製することができる。例えば、任意の上述の修飾型エリスロポエチンを、1以上のアルギニン残基において、例えば、フェニルグリオキサールを用いることにより、Takahashi (1977, J. Biochem. 81:395-402) のプロトコルに従い修飾することができ、これは0.5～3時間の範囲の様々な長さの時間、室温で実施することができる。反応混合物を水に対して透析することにより反応を終結した。エリスロポエチンのこのような修飾型の用途は全て本発明に包含される。

【0228】

実施例 4

組織保護性サイトカインは神経保護効果を有する

本発明の組織保護性サイトカインの神経保護効果を、Manleyら, 2000, 「マウスにおけるアクアポリン4欠失は、急性水中毒後の脳浮腫および虚血卒中を軽減する (Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke)」, Nat Med 2000 Feb;6(2):159-63に記載の水中毒アッセイを用いて評価した。雌C3H/HENマウスを用いた。マウスに、その体重の20%の水中の400ng/kg体重DDAVP（デスモプレッシン）を腹腔内に（IP）与えた。マウスにエリスロポエチン（A）、または組織保護性サイトカイン：アシアロエリスロポエチン（B）、カルバミル化アシアロエリスロポエチン（C）、サクシニル化アシアロエリスロポエチン（D）、アセチル化アシアロエリスロポエチン（E）、ヨウ素化アシアロエリスロポエチン（F）、カルボキシメチル化アシアロエリスロポエチン（G）、カルバミル化エリスロポエチン（H）、アセチル化エリスロポエチン（I）、ヨウ素化エリスロポエチン（J）、またはN-カルボキシメチルエリスロポエチン（K）を投与した。マウスに、水の投与24時間前、および再び水投与時に、100 μg/kg用量のエリスロポエチンまたは組織保護性サイトカインを腹腔内に与えた。改変したManleyらからのスケールを用いてマウスを評価した。改変したスケールを以下に掲げる：

1. ケージ/テーブルを探索する

イエス 0

ノー 1

2. 対象物を視覚で追跡する

イエス 0

ノー 1

3. 頬ひげ運動

有り 0

無し 1

4. 脚-尾運動

正常 0

硬化 1

麻痺 2

5. 痛み解消 (つま先つねり)

イエス 0

ノー 1

6. 運動の座標

正常 0

異常 1

7. テーブル端での停止

イエス 0

ノー 1

可能な総スコア : 8

次の時点でマウスのスコアを付けた : 15、30、45、60、75、90、120、150、180分。プロットしたスコアは、生理食塩水だけを受けた動物のパーセントとしての全時間曲線下の面積である。図12は、対照マウスにより得たスコアのパーセントで表した、エリスロポエチンまたは本発明の組織保護性サイトカインの1種を受けたマウスのスコアを示す。本発明の組織保護性サイトカインを受けたマウスは、より低い神経学的障害を表し、従って修飾スケールでより良いスコアを有した。図12は、本発明の組織保護性サイトカインが神経組織を保護することを示す。

【0229】

実施例 5

エリスロポエチンは密着血液脳脊髄液関門を通過する

成体雄Sprague-Dawleyラットに麻酔をかけ、組換えヒトエリスロポエチンを腹膜内投与した。30分間隔で最長4時間、大槽から脳脊髄液のサンプルを取り、高感度の特異的酵素結合イムノアッセイを用いてエリスロポエチン濃度を測定した。図13に示すように、CSF内における基線エリスロポエチン濃度は8mU/mlである。数時間遅れて、CSF内で測定されるエリスロポエチンのレベルは上昇し始め、2.5時間以後は、基線濃度とは大きく異なる ($p < 0.01$ レベル)。約100mU/mlのピークレベルは、in vitroにおいて保護的な効果を発揮することが分かっている範囲内である (0.1~100mU/ml)。ピークに達する時間は約3.5時間頃であり、これは、ピーク血漿レベルのもの (1時間未満) よりかなり遅れている。この実験結果は、適当な濃度のエリスロポエチンの非経口ボーラス投与によって、有意なレベルのエリスロポエチンが密着細胞結合を通過することができることを示している。当業者は、類似の結果は本発明の組織保護性サイトカインにも予想されうること理解するであろう。

【0230】

実施例 6

移植用に準備された心臓の機能の維持

Wistar雄ラット (体重300~330g) に、エリスロポエチン (5000U/kg体重) またはビヒクルを与えた24時間後、ex vivo研究のために心臓を取り出す (Delcayreら, 1992, Amer. J. Physiol. 263: H1537-45のプロトコールに従って行う)。ペントバルビタール (0.3mL) を用いて動物を犠牲にし、静脈内にヘパリン投与 (0.2mL) を行う。まず心臓を15分間平衡化する。次に、拡張終期血圧が8mmHgとなる体積まで左心室のバルーンを膨張させる。一定量0.02mlの増分ずつバルーン体積を膨張させることにより、左心室の圧力-体積曲線を構築する。ゼロ体積は、左心室の拡張終期血圧がゼロになるポイントとして定義する。圧力-体積曲線が完成したら、左心室のバルーンからガスを抜いて拡張終期血圧をもとの8mmHgに設定し、冠状血流量をチェックした後、対照期間を15分間追跡する。次に、50mLのCelsior+分子を用いて心臓を停止させ、圧力60cm H₂O下で4 にて休息させる。次に心臓を取り出し、同溶液で満たしたプラスチック容器の中で4 にて5時間保存し、砕いた氷で囲む。

【0231】

保存終了後、心臓をランゲンドルフ装置に移す。バルーンカテーテルを左心室の中に再

10

20

30

40

50

び挿入し、虚血前期間と同じ体積になるまで再び膨らませる。心臓を37℃にて少なくとも2時間再灌流する。再灌流圧は、リフロー（re-flow）の15分間は50cm H₂Oに設定した後、次の2時間は100cmH₂Oに戻す。ペーシング（1分間あたり320拍）を再び始める。収縮指数および拡張期血圧の定容測定は、再灌流の25分、45分、60分および120分で3重テストを行う。この時間ポイントで、圧力-体積曲線の構築を行い、45mn再灌流中の冠状動脈流出液を回収して、クレアチンキナーゼの漏出を測定する。不対t-検定（unpaired t-test）を用いてこれら2つの処理グループを比較し、拡張終期血圧データを用いた1次回帰を用いてコンプライアンス曲線を設計する。図14に示すように、エリスロポエチンでの処理後には、発生した左心室圧の大きな改善、ならびに体積-圧力曲線の改善、拡張期の左心室圧の低下およびクレアチンキナーゼ漏出の減少が生じる。同様な結果は、本発明の組織保護性サイトカインによる処置にも予想されうる。

10

【0232】

実施例 7

エリスロポエチンは虚血傷害から心筋を保護する

24時間前に組換えヒトエリスロポエチン（5000U（40μg）/kg体重）を与えた成体雄ラットに麻酔をかけ、冠状動脈閉塞の準備をする。処置開始時に追加用量のエリスロポエチンを与え、左の主冠状動脈を30分間塞いだ後、解放する。処置後一週間、同量のエリスロポエチンを毎日与える。次に動物の心機能について調べる。図15が示すように、擬似注射（生理食塩水）を与えた動物は左心室の拡張終期血圧が大きく増加した。これは、心筋梗塞に付随した拡張した硬直心臓を示している。これとは対照的に、擬似手術を行った対照と比較して、エリスロポエチンを与えた動物では、心機能の減衰は見られなかった（差は有意であった：p<0.01レベル）。類似の結果は本発明の組織保護性サイトカインを用いる処置にも予想されうる。

20

【0233】

実施例 8

末梢投与したエリスロポエチンによる網膜虚血の保護

網膜細胞は、虚血ストレスの30分後にはその多くが死滅してしまうほど虚血に対して非常に敏感である。さらに、亜急性もしくは慢性の虚血は、糖尿病、緑内障、および黄斑変性等の多くの一般的なヒト疾患を伴う視力の悪化の原因である。現時点では、虚血から細胞を保護する効果的な治療法はない。血液と網膜との間には、大部分の巨大分子を排除する密着内皮バリアが存在する。末梢投与されたエリスロポエチンが、虚血に敏感な細胞を守るか否かをテストするために、Rosenbaumら（1997; Vis. Res. 37:3443-51）により記載される、急性可逆的緑内障ラットモデルを使用した。具体的には、成体雄ラットの前眼房に生理食塩水を注射して、全身動脈血圧を超える圧力にし、60分間維持した。動物に、生理食塩水または体重kgあたり5000U（40μg）のエリスロポエチンを腹腔内投与した24時間後に、虚血を誘導し、さらに3日間毎日投与を続けた。処置後1週間で、暗順応ラットに対して網膜電図記録を行った。図16～17は、食塩水のみで処置した動物（パネルC）（機能は僅かしか残っていなかった）とは対照的に、エリスロポエチンの投与は網膜電図（ERG）の良好な保持（パネルD）に関係があることを示している。図16は、エリスロポエチンで処置したグループと食塩水で処置したグループに対する網膜電図a波およびb波の振幅を比較するものであり、エリスロポエチンにより有意な保護が付与されたことを示す。同様な結果は、本発明の組織保護性サイトカインによる処置からも得ることが可能である。

30

40

【0234】

実施例 9

脳傷害から起こる認知機能の低下に対するエリスロポエチンの回復効果

脳に外傷を受けたマウスにおける低下した認知機能を回復させるエリスロポエチンの能力を実証する研究において、Brinesら（PNAS 2000, 97; 10295-10672）に記載されるように、雌Balb/cマウスに、脳に鈍傷を負わせ、5日後に、毎日1日あたり5000U（40μg）/kg体重のエリスロポエチンの腹腔内投与を開始した。損傷を負わせた12日後に、モーリス水迷路（Morris water maze）の中で認知機能について動物をテストした。一日あたり4回

50

試行を行った。処置動物および未処置動物はいずれもこのテストにおける行動が良くなかった（遊泳時間はおそらく90秒間のうち約80秒間）。図18は、エリスロポエチンで処置した動物の行動の方が良かったことを示している（この表現では負の値の方が良い）。外傷後30日までエリスロポエチン処置の開始を遅らせても（図19）、認知機能の回復が見られる。同様の結果は本発明の組織保護性サイトカインによる処置にも予想されうる。

【0235】

実施例 10

カニン酸モデル

カニン酸神経毒性モデルにおいて、Brinesら, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97; 10295-10672のプロトコールに従って、5000U (40 μ g) /kg体重の用量でアシアロエリスロポエチンを腹腔内投与した24時間後に、25mg/kgカニン酸を投与したところ、致死時間により示されるように（図20）、エリスロポエチンと同じくらい効果的であることが分かる。同様の結果は本発明の組織保護性サイトカインによる処置からも得ることができる。

10

【0236】

実施例 11

脊髄傷害モデル

1. エリスロポエチンおよび組織保護性サイトカインのラット脊髄圧迫試験

体重180~300gのWistarラット（雌）を本研究に用いた。動物を手術前12時間絶食し、不必要な苦しみを与えないように拘束し、そしてチオペンタルナトリウム（40mg/kg体重）の腹腔内注射により麻酔した。皮膚の浸潤（ブピバカイン0.25%）後に、完全単一レベル（T-3）椎弓切除（laminectomy）を、解剖顕微鏡下で2cmの切開を介して実施した。0.6ニュートン（65グラム）閉止力が脊椎に1分間作用する一時的動脈瘤クリップを硬膜外に適用することにより、外傷性脊椎損傷を誘導した。クリップ除去後、皮膚切開部を閉じ、動物を麻酔から完全に回復させてケージに戻した。ラットを、自発性排尿が再開するまで、少なくとも日に2回膀胱触診して継続的にモニターした。

20

【0237】

40動物を無作為に5グループに分割した。対照グループ（I）（n=8）は、切開部が閉じられた直後に通常の生理食塩水を（静脈内注射により）受けた。群（II；n=8）はr hEP0の16 μ g/kg体重を静脈内に受けた；グループ（III）は本発明のアシアロ組織保護性サイトカイン（アシアロエリスロポエチン）の16 μ g/kg体重を静脈内に受け、グループ（IV）はアシアロ組織保護性サイトカインの30 μ g/kg体重を静脈内に受け、そしてグループ（V）は本発明のアシアロ組織保護性サイトカイン（アシアロエリスロポエチン）の30 μ g/kg体重を静脈内に受けた；全て、動脈瘤クリップの除去直後に単一ボーラス静脈内注射として受けた。

30

【0238】

ラットの運動神経機能は、Bassoらの歩行運動評価スケールを用いて評価しうる。このスケールでは、動物を0（後肢運動が観察されない）~21（正常な歩調）の範囲のスコアに割付ける。ラットは、傷害後1、12、24、48、72時間および次いで1週に、各動物が受ける処置を知らされていない同じ試験者により、機能喪失について試験される。

40

【0239】

図21は、30日間にわたる脊椎外傷から回復するラットの歩行運動評価を実証するグラフである。グラフから見られるように、エリスロポエチン（グループII）または組織保護性サイトカイン（グループIII~V）を与えられたラットはより容易に傷害から回復し、対照ラットより優れた傷害からの全体的回復を実証した。同様の結果は本発明の組織保護性サイトカインによる治療処置にも予想されうる。

【0240】

2. エリスロポエチンと組織保護性サイトカインのウサギ脊椎虚血症試験

36匹のNew Zealand Whiteウサギ（8~12月齢、雄、体重1.5~2.5kg）を本研究に用いた。動物を12時間絶食し、不必要な苦しみを与えないように拘束した。麻酔誘導は、3%

50

ハロタンを含む100%酸素を介して行い、0.5~1.5%ハロタンを含む50%酸素と50%空気の混合物を用いて維持した。静脈内カテーテル(22ゲージ)を左耳静脈中に取付けた。乳酸リンゲル液を手術中、1時間当たり4 ml/kg体重(bw)の速度で注入した。手術前に、セファゾリン10mg/kg体重を、感染予防のために静脈内投与した。動物を右側臥位に置き、皮膚をポビドンヨウ素で拭き、ブピバカイン(0.25%)を浸潤させ、そして側面皮膚切開を脊椎に対して平行に第12肋骨レベルで実施した。皮膚および皮下胸腰筋膜の切開後、腰最長筋(longissimus lumborum muscle)および腰腸肋筋(iliocostalis lumborum muscle)を引っ込めた(retracted)。腹大動脈を左後腹膜アプローチ(left retroperitoneal approach)を経由して露出させ、左腎動脈の丁度下方に移動した。1片のPE-60チュービングを、左腎大動脈の直接遠位の大動脈の周りにループさせ、そして両端をより大きいゴムチューブの中に通した。PEチュービングを引張って、大動脈を傷付けずに20分間、閉塞した。大動脈閉塞の前に、ヘパリン(400IU)を静脈内ボラスとして投与した。閉塞の20分後に、チューブおよびカテーテルを取除き、切開部を閉じ、そして完全に回復するまで動物をモニターし、次いで神経学的機能を順次、評価した。

10

20

30

40

50

【0241】

36匹の動物を無作為に6グループに分割した。対照グループ(I)では、動物(n=6)は大動脈の開放直後に通常の生理食塩水を静脈内に受けた。グループ(II)はrhEP0の6.5 μg/kg体重を受けた；グループ(III)は組織保護性サイトカイン(カルバミル化エリスロポエチン)の6.5 μg/kg体重を受けた；グループ(IV)は他の組織保護性サイトカイン(アシアロエリスロポエチン)の6.5 μg/kg体重を受けた；グループ(V)はグループ(IV)と同じ組織保護性サイトカインであるが、その20 μg/kg体重を受けた；そしてグループ(VI)はさらに他の組織保護性サイトカイン(アシアロカルバミル化エリスロポエチン)の20 μg/kg体重を受けた；全て、再灌流直後に静脈内に受けた(n=6)。

【0242】

運動機能をDrummondおよびMooreの判定基準により、処置を知らされていない研究者により、再灌流後1、24および48時間後に評価した。それぞれの動物に次の通り0~4のスコアを割付けた：0 = 対麻痺、明らかな下肢運動機能がない；1 = 乏しい下肢運動機能、弱い抗重力運動のみ；2 = 中度の下肢機能、抗重力強度は良いが脚を体下に引く能力のない；3 = 優れた運動機能、脚を体下に引くおよび跳躍する能力をもつが正常でない；4 = 正常な運動機能。対麻痺の動物の膀胱は毎日2回手で排尿した。

【0243】

図22は、回復したウサギの運動機能をプロットしたグラフである。グラフは、たとえ2日だけの間にわたってでも、エリスロポエチンと本発明の組織保護性サイトカインはウサギをより完全に脊椎損傷から回復させることを実証する。同様な結果は本発明の組織保護性サイトカインによる治療処置にも予想されうる。

【0244】

実施例12

エリスロポエチンの抗炎症性効果

in vivo研究：

1. ラットの中大脳動脈閉塞(MCAO)研究

雄CrI:CD(SD)BRラット(体重250-280g)を、Charles River(Calco, Italy)から入手した。これらのラットに、Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M.およびCerami, A. 2000 「エリスロポエチンは血液脳関門を通過して実験的脳傷害を保護する[プロセス引用](Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury[In Process Citation])」 Proc Natl Acad Sci USA 97:10526-10531の教示に従い、手術を実施した。簡単に説明すると、ラットを抱水クロラル(400mg/kg体重、腹腔内)を用いて麻酔し、頸動脈を可視化し、そして右頸動脈を2つの縫合および切断により閉塞した。右眼窩に隣接しかつ吻合するバーホール(burr hole)によってMCA(中大脳動脈)の可視化が可能になり、これを鼻動脈の遠位で焼灼した。この固定されたMCA病変部を囲むペナンプ

ラ（境界域）を作るために、反対側頸動脈を、1時間、微細な鉗子で引張って閉塞し、次いで再開した。PBSまたはrhEPO（5,000U/kg-体重、腹腔内；先にこのモデルで保護を示した（1））をMCAO直後に投与した。示されているときは、先に記載（8）のように脳皮質ホモジネート中のTNFおよびIL-6を定量した。ホモジネート中のMCP-1は、市販のELISAキット（biosource、Camarillo、CA）を用いて測定した。

【0245】

MCAOの24時間後に、ラットを上記のとおり麻酔し、経心的に（transcardially）に100ml生理食塩水を用いて、次いでリン酸ナトリウム緩衝化4%パラホルムアルデヒド溶液250mlを用いて再灌流した。脳を速やかに取出して、リン酸ナトリウム緩衝化4%パラホルムアルデヒド溶液に2時間固定し、PBS中の20%スクロース溶液へ一夜移し、次いで30%スクロース溶液中にそれらが沈むまで置いて、次いで2-メチルブタン中で-45℃にて凍結させた。切片（30μm）をクリオスタット（HM 500 OM、Microm）により-20℃にて、脳を通る横断面でカットし、5切片毎に選択して異なる抗原またはヘマトキシリン-エオシン染色に対する組織化学研究に用いた。自由に浮遊する切片を、抗グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）マウスモノクローナル抗体（1:250、Boehringer Mannheim、Monza、Italy）とのおよび抗cd11b（MRC 0X-42）マウスモノクローナル抗体（1:50、Serotec、UK）との両方の免疫反応性について、Houserらが記載したプロトコルおよび製造業者のプロトコルにそれぞれ従って処理した。全ての切片を、生理食塩水中の光学顕微鏡観測のため、コートしたスライド上に搭載し、適格な等級のアルコールを通して脱水し、キシレン中に固定し、そしてDPXマウント（BDH、Poole、UK）を用いてカバースリップした。隣接切片をヘマトキシリン-エオシンを用いて、記載（10）のとおり染色した。

10

20

【0246】

図23は、ヘマトキシリンおよびエオシンにより染色した脳皮質層の冠状切片を示す。対照ラット（A）、PBSにより処置した虚血ラット（B）、rhEPO（5,000U/kg体重、MCAO直後に腹腔内投与）により処置した虚血ラット（C）。切片Bは炎症と一致する組織染色の著しい減少を示し、対照と比較してニューロン成分の減少を伴う。全身rhEPO投与は虚血障害を軽減して、細胞死または傷害を制限された範囲に局在させる。（拡大率2.5x、サイズバー = 800μm）。

【0247】

図24は、GFAP抗体により染色した梗塞の領域に隣接した前頭皮質の冠状切片である。対照ラット（A）、PBSにより処置した虚血ラット（B）、rhEPOにより処置した虚血ラット（C）。活性化星状細胞がGFAPポジティブ処理により可視化されている（パネルB）。代表的なrhEPO処置動物では活性化星状細胞の数ならびに染色強度の著しい減少があった（パネルC）。（拡大率10x、サイズバー = 200μm）。

30

【0248】

図25は、OX-42抗体により染色した脳皮質層の冠状切片を示す。PBSにより処置した虚血ラット（A）、rhEPOにより処置した虚血ラット（B）。虚血大脳半球において、両処置グループ共に細胞染色は特に梗塞組織周囲に顕著である。しかし生理食塩水処置グループではそれがより高密度でありかつ広がる。（拡大率20x、サイズバー = 100μm）。

【0249】

図26はOX-42抗体により染色した梗塞の領域に隣接した脳皮質層の冠状切片を示す。PBS（A）により処置した虚血ラットからの組織中には、rhEPOにより処置した虚血ラット（B）と比較して、より高密度の単核炎症性細胞が観察される。典型的な円形の浸潤白血球が潜在的に梗塞の体積を広げるのであろう。（拡大率10x、サイズバー = 200μm）。

40

【0250】

同様な結果が本発明の組織保護性サイトカインによる治療処置にも予想されうる。

【0251】

2. Lewisラットにおける急性実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）

雌Lewisラット（6～8週齢）をCharles River（Calco、Italy）から購入した。モルモットMBP（Sigma、St. Louis、MO）50μgを含有する水を、等容積の完全Freundアジュバン

50

ト (CFA、Sigma) で乳濁化し、熱殺菌したヒト結核菌 (*M. tuberculosis*) H37Ra (Difco、Detroit、MI) 7mg/mlを加え、最終容積100 μ の水乳濁化液として、ラットにこの水乳濁化液を両方の後足蹠中へ軽い麻酔のもとで注射することによりEAEを誘導した。ラットをEAEの徴候についてブラインド方式で試験し、次のスコアを付した：0、無疾患；1、弛緩性の尾部；2、運動失調；3、尿失禁を伴う完全な後肢麻痺。免疫感作3日後から開始して、ラットにr-Hu-EP0 (EP0etin alpha、Procrit、Ortho Biotech、Raritan、NJ) を腹腔内に1日1回、示された用量で、PBSに入れて与えた。臨床等級EP0はヒト血清アルブミンを含有したので、対照動物には常に同一量のヒト血清アルブミンを含有するPBSを与えた。5,000 U/kg体重のEP0の日投与は、ヘマトクリットを30%だけ増加した (データは示していない)。示されているときは、ラットに、3日から28日まで1日1回、PBSに溶解した1.3mg/kg体重のデキサメタゾン (DEX) リン酸ジナトリウム塩 (Sigma) (1mg/kg体重のDEXに対応する) を皮下注射 (s.c.) した。示されているときは、脳および脊髄ホモジネート中のTNFおよびIL-6を先に記載のように定量した [Agnello、2000 #10]。

【0252】

図27は臨床徴候に対する、MBPによる免疫感作後3日から18日までに与えた異なる用量のEP0の保護効果を示す。EP0は用量に依存する様式で、疾患の発症を遅れさせかつ疾患の重症度を軽減した。しかし、EP0は最大重症度までの時間を遅延させなかった。

【0253】

疾患が退行した後にEP0の処置を中断してラットを2ヶ月間モニターする実験において、再発は観察されなかった。これは投与の保留後に疾患の悪化を誘導するDEXと対照的であった (図28)。同様な結果は本発明の組織保護性サイトカインによる治療処置にも予想されうる。

【0254】

in vitro研究：

グリア細胞の一次培養を新生Sprague-Dawleyラット1～2日齢から調製した。大脳半球を髄膜から単離し、機械的に破壊した。細胞をトリプシン2.5%およびDNAアーゼ1%の溶液中に分散させ、100 μ mナイロンメッシュを通して濾過し、そしてEagle最小必須培地 (10%胎児ウシ血清、0.6%グルコース、ストレプトマイシン (0.1mg/ml) およびペニシリン (100 U/ml) を補充した) 中にプレーティングした (35mmディッシュ1枚当たり140,000細胞)。グリア培養を1週間当たり2回補給し、37℃にて5%CO₂の加湿インキュベーター中で増殖した。全実験は2～3週齢の97%星状細胞および3%ミクログリアからなるグリア細胞培養 (GFAPおよびマメ科植物Griffonia simplicifolia種イソレクチンB₄の免疫化学により評価して) について実施した。ニューロン培養は、18日ラット胎仔の海馬から確立した。脳を髄膜から取除いて切り離し、海馬を単離した。細胞を、15～20分間、37℃で2.5%トリプシン溶液中のインキュベーションにより分散させ、次いで摺り碎いた (tituration)。細胞懸濁液をグリア細胞用に使った培地中に希釈し、ポリオルニチンをコートしたカバースリップ上にカバースリップ1枚当たり160,000細胞の密度でプレーティングした。プレーティングの翌日にカバースリップを、シトシンアラビノシド5 μ Mを補充したニューロン維持培地中にグリア単層を含有するディッシュに移した (上記ニューロン維持培地は、Dulbecco改変Eagle培地とHam栄養分ミックスF12に、5 μ g/mlインスリン、100 μ g/mlトランスフェリン、100 μ g/mlブトレシン、30nM亜セレン酸Na、20nMプロゲステロンおよびペニシリン100U/mlを補充したものである)。カバースリップを反転して海馬ニューロンをグリア単層に直面させた。カバースリップに付着するパラフィンドットがカバースリップをグリア上方に支持するので、2種の細胞型はお互いに接触しないが水溶性物質は拡散できる狭いギャップを作った。これらの培養条件は、>98%均一性 (微小管関連タンパク質2およびGFAPの免疫化学により評価して) をもつ分化したニューロン培養の増殖を可能にした。次いで細胞を、rhEP0 (10U (80ng) /ml) の存在または不在のもとで1 μ Mトリメチルスズ (TMT) を用いて24時間処理し、その上清をTNFアッセイにを使って細胞生存力を以下に記載のように評価した。示されているときは、グリア細胞をLPSの存在のもとで、rhEP0とともにまたは無しで24時間培養し、培

養上清中のTNFを測定した。細胞生存力は3-(4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) アッセイにより測定した (Denizot, F., および Lang, R. 1986. 「細胞増殖および生存に対する迅速比色アッセイ: 感度と信頼性を改善するテトラゾリウム染色手法の改変 (Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability)」. J Immunol Methods 89:271-277)。簡単に説明すると、MTTテトラゾリウム塩を無血清培地に溶解して最終濃度0.75mg/mlとし、3時間37℃での処理が終わると細胞に加えた。次いで培地を取出して、ホルマザンを1N HCl: イソプロパノール (1:24) を用いて抽出した。560nmでの吸収をマイクロプレートリーダー上で読み取った。

【0255】

10

図29は、rhEP0が混合ニューロン-グリア培養中のニューロン死誘導性TNFの産生を阻止することを示す。パネルA: rhEP0 (10 U/ml) による処置ありまたはなしのTMT 1 μ Mにより誘導される神経細胞死の百分率。パネルB: rhEP0 (10 U/ml) ありまたはなしの、ニューロンの存在 (ハッチを施したバー) または不在 (黒塗りのバー) のもとでTMT 1 μ Mに曝したグリア細胞からのTNF- α の放出。同様な結果は、本発明の組織保護性サイトカインによる処置にも予想されうる。

【0256】

本発明の範囲は、本発明の個々の態様の単なる説明を意図するものである記載した特定の実施形態により限定されるものではなく、そして機能的に同等な方法および組成物は本発明の範囲内にある。実際、本明細書に示しかつ記載したものに加えて本発明の様々な修飾が、以上の説明と付随する図面から当業者には明らかになるであろう。このような修飾は添付した請求の範囲内に入ると意図している。

20

【0257】

本明細書に引用した全参考文献は、全ての目的に対して参照により本明細書にその全てが組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0258】

【図1】抗エリスロポエチン抗体により染色した薄い切片における、正常ヒト脳内のエリスロポエチン受容体の分布を示す。

【図2】図1のイメージの高倍率拡大である。

30

【図3】金標識した二次抗体を用いて、エリスロポエチン受容体の超顕微分布を示す。

【図4】図3と同様に調製した図であり、ヒト脳毛細管の管腔および反管腔表面の高密度エリスロポエチン受容体を示す。

【図5】エリスロポエチンとアシアロエリスロポエチンの、血清飢餓P19細胞の生存力に対するin vitro効力を比較する。

【図6】エリスロポエチンとアシアロエリスロポエチンの、血清飢餓P19細胞に対するin-vitro効力を比較する他の実験である。

【図7】エリスロポエチンとアシアロエリスロポエチンの、ラット限局性脳虚血モデルにおける保護を示す。

【図8】虚血卒中モデルの中大脳動脈閉塞における、ヒトエリスロポエチンとヒトアシアロエリスロポエチンの効力を比較する用量応答を示す。

40

【図9】P19アッセイにおけるヨウ化エリスロポエチンの活性を示す。

【図10】P19アッセイにおけるビオチン化エリスロポエチンおよびアシアロエリスロポエチンの効果を示す。

【図11】エリスロポエチンとフェニルグリオキサール修飾型エリスロポエチンの、血清飢餓P19細胞の生存力に対するin-vitro効力を比較する。

【図12】水中毒アッセイにおける組織保護性サイトカインの効果を示す。

【図13】非経口投与したエリスロポエチンの脳脊髄液中への移行を示す。

【図14】エリスロポエチンによる、移植用に準備した心臓の機能の維持を示す。

【図15】一時的血管閉塞後の、エリスロポエチンによる心筋の虚血障害からの保護を示

50

す。

【図 1 6】ラット緑内障モデルにおける、エリスロポエチン処置の効果を示す。

【図 1 7】ラット緑内障モデルにおける、エリスロポエチンによる、網膜機能の保存の程度を示す。

【図 1 8】外傷後 5 日から開始したエリスロポエチンの投与による脳外傷後の認知機能の回復を示す。

【図 1 9】外傷後 30 日から開始したエリスロポエチンの投与による脳外傷後の認知機能の回復を示す。

【図 2 0】大脳毒性のカイニン酸モデルにおける、ヒトアシアロエリスロポエチンの効力を示す。

10

【図 2 1】ラット脊椎損傷モデルにおける組織保護性サイトカインの効力を示す。

【図 2 2】ウサギ脊椎損傷モデル内の組織保護性サイトカインの効力を示す。

【図 2 3】ヘマトキシリンとエオシンにより染色した脳表層の冠状断面を示す。

【図 2 4】GFAP抗体により染色した、梗塞領域に隣接する前頭皮質の冠状断面を示す。

【図 2 5】OX-42抗体により染色した脳表層の冠状断面を示す。

【図 2 6】OX-42抗体により染色した、梗塞領域に隣接する脳表層の冠状断面を示す。

【図 2 7】EAEモデルにおける炎症に対するエリスロポエチンの効力を示す。

【図 2 8】EAEモデルにおける炎症に対するデキサメタゾンおよびエリスロポエチンの効果を比較する。

【図 2 9】エリスロポエチンがニューロン死に関連する炎症を抑制することを示す。

20

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Kenneth S. Warren Institute, Inc.
 <120> TISSUE PROTECTIVE CYTOKINES FOR THE PROTECTION, RESTORATION, AND
 ENHANCEMENT OF RESPONSIVE CELLS, TISSUES AND ORGANS
 <130> 10165-026-228
 <140>
 <141>
 <150> 10/188,905
 <151> 2002-07-03
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Functional Domains
 <400> 1
 Val Leu Gln Arg Tyr
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Functional Domains
 <400> 2
 Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Functional Domains
 <400> 3
 Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu
 1 5
 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Functional Domains
 <400> 4
 Ser Asn Phe Leu Arg Gly
 1 5

10

20

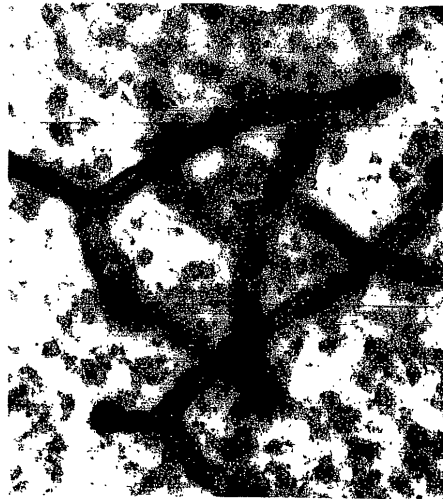
30

40

【図 1】



【図 2】



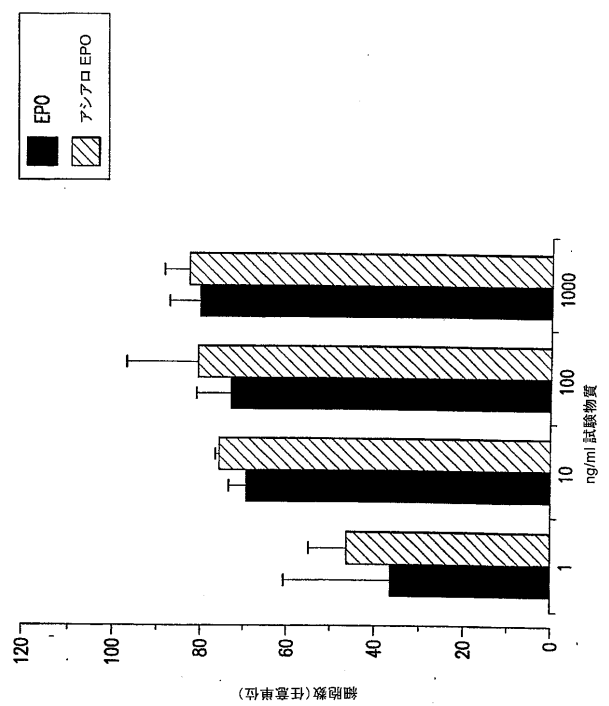
【図 3】



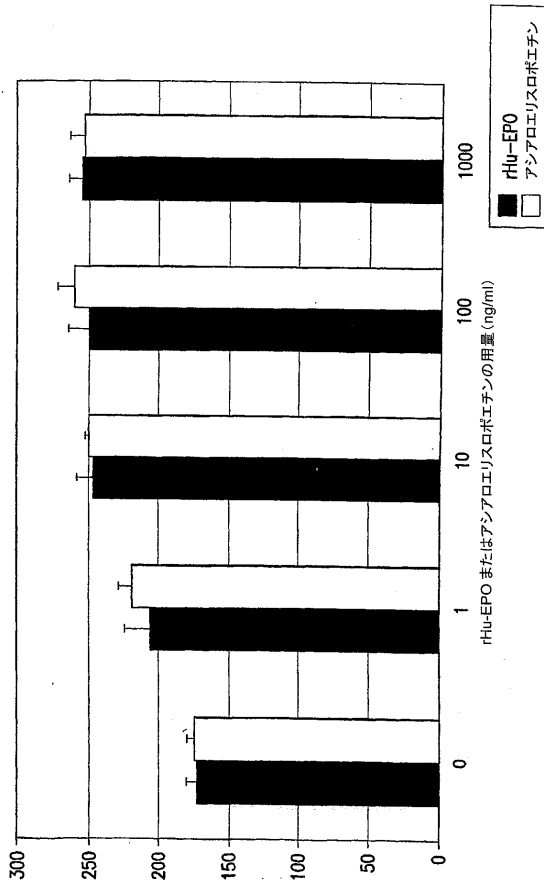
【図 4】



【図 5】

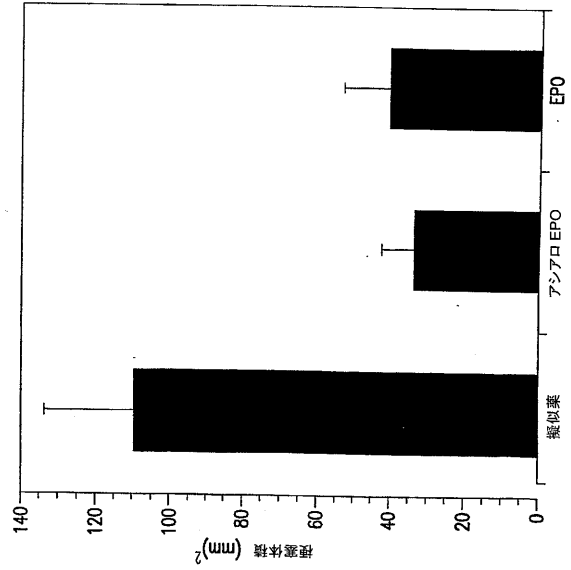


【図 6】

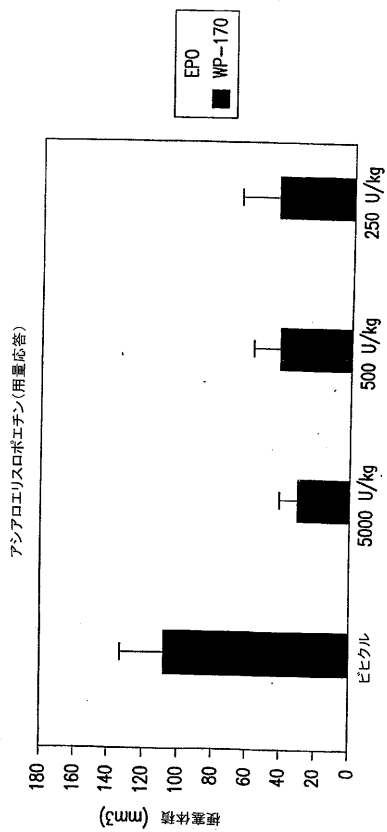


【図 7】

シアルエリスロポエチンはエリスロポエチンと同様に脾臓体積を減少させる。



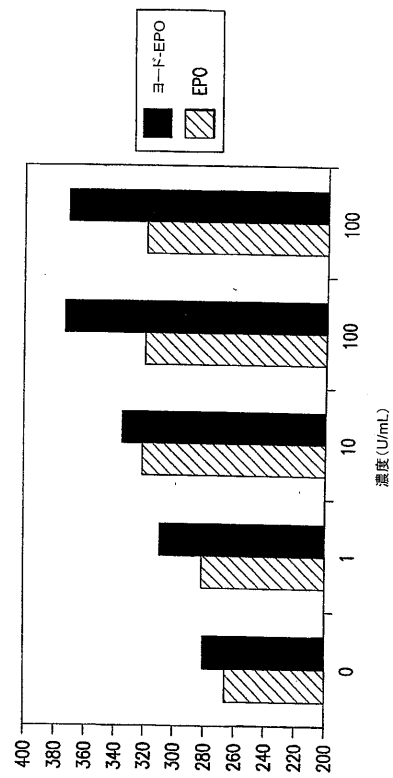
【図 8】



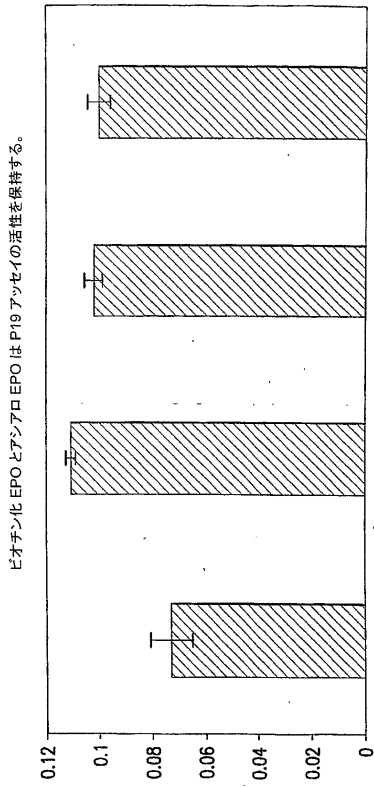
各グループのnは4以上である

【図 9】

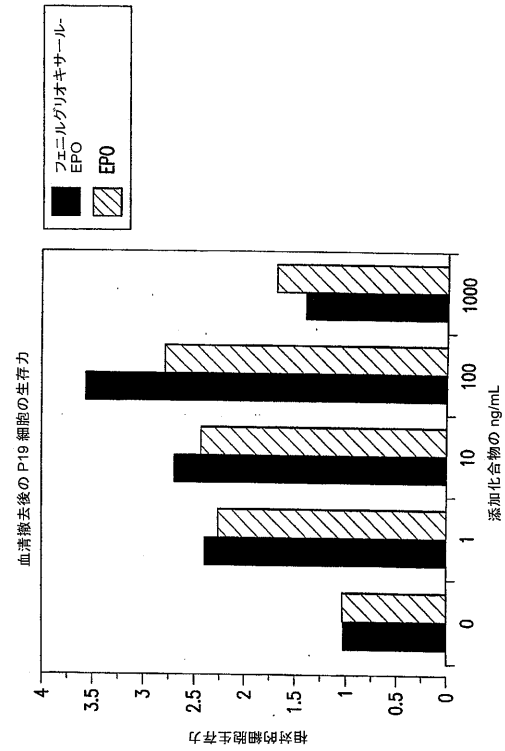
ヨード-EPOによる、血清銅値からの P19 細胞の保護



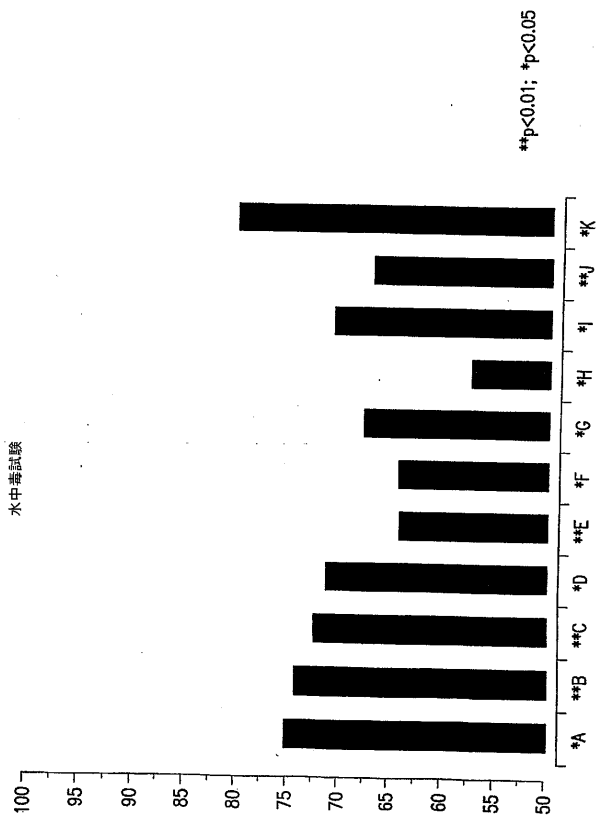
【図 10】



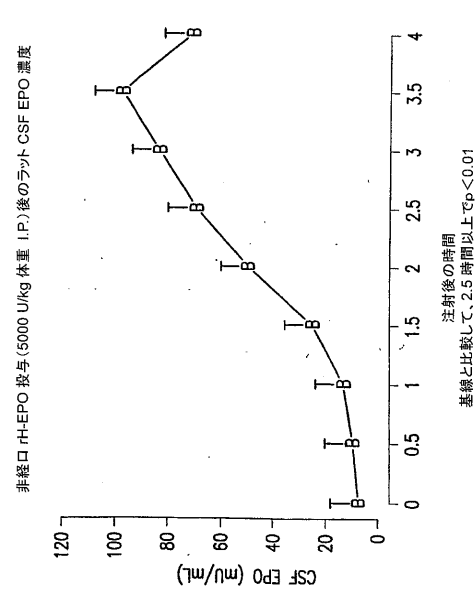
【図 11】



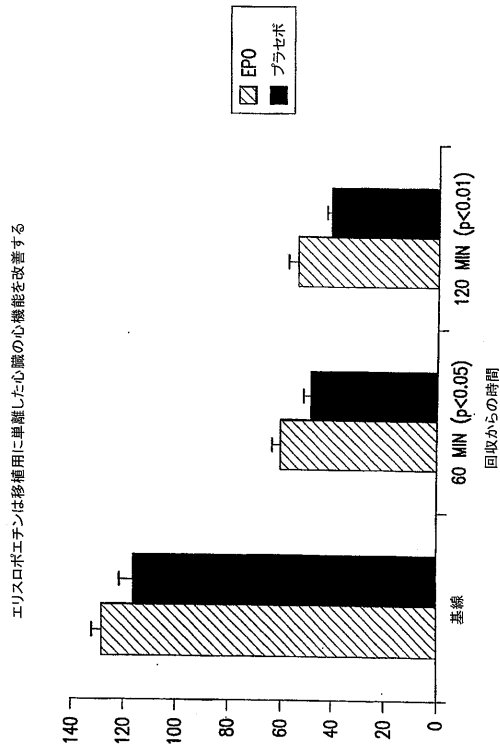
【図 12】



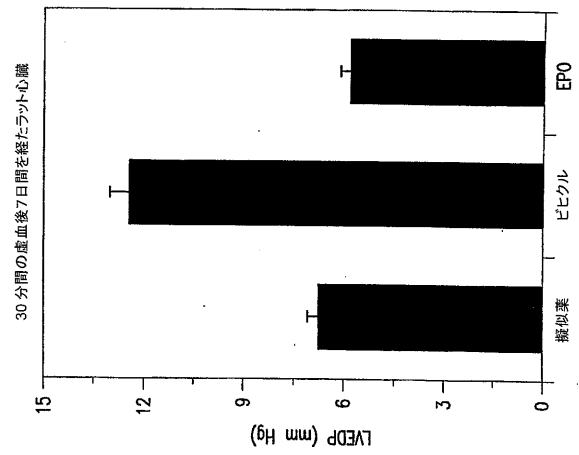
【図 13】



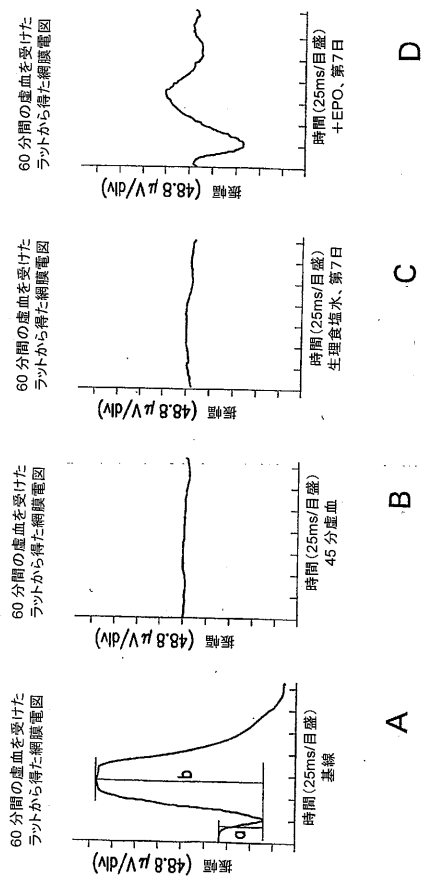
【図 14】



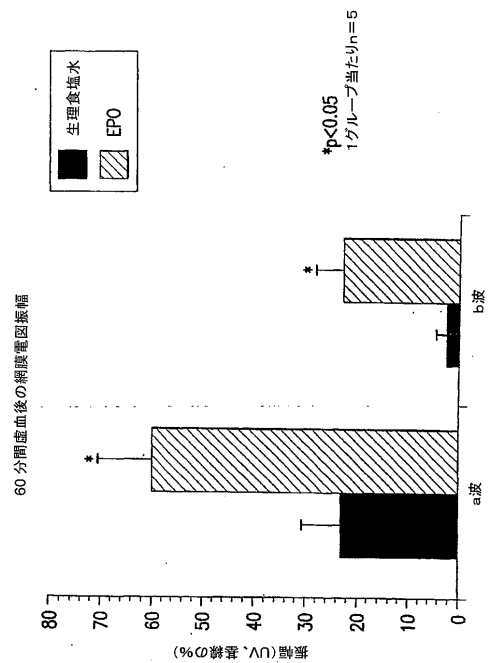
【図 15】



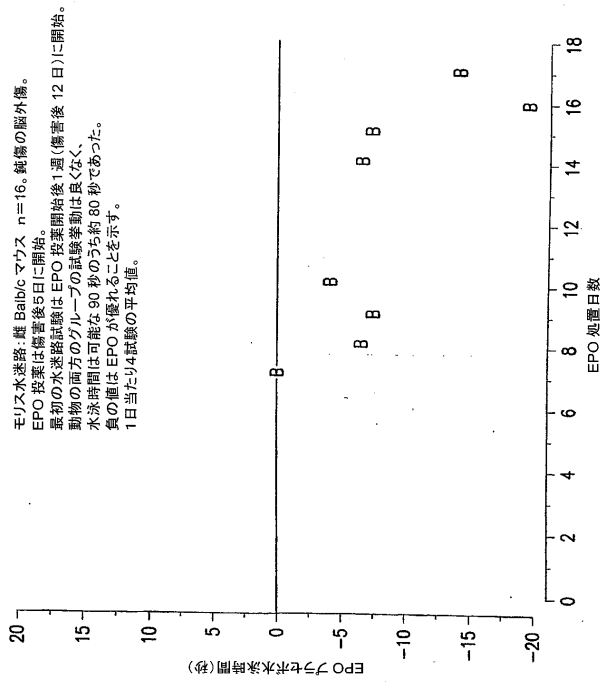
【図 16】



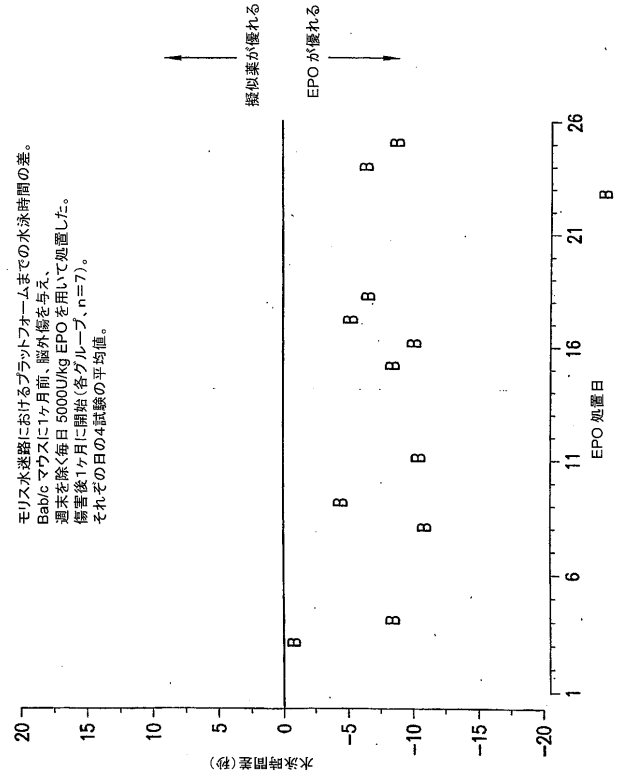
【図 17】



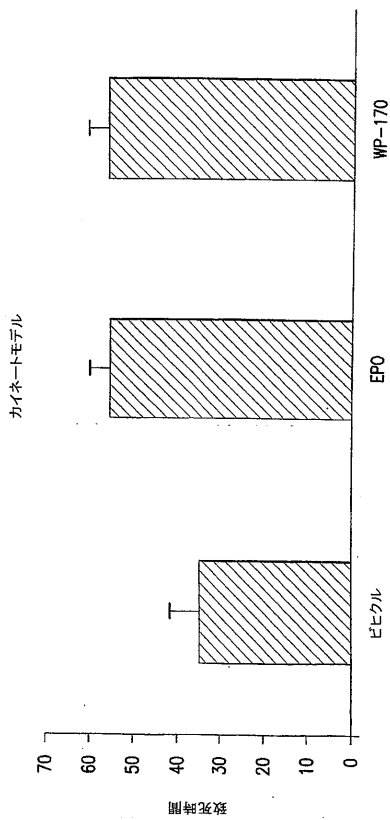
【図 18】



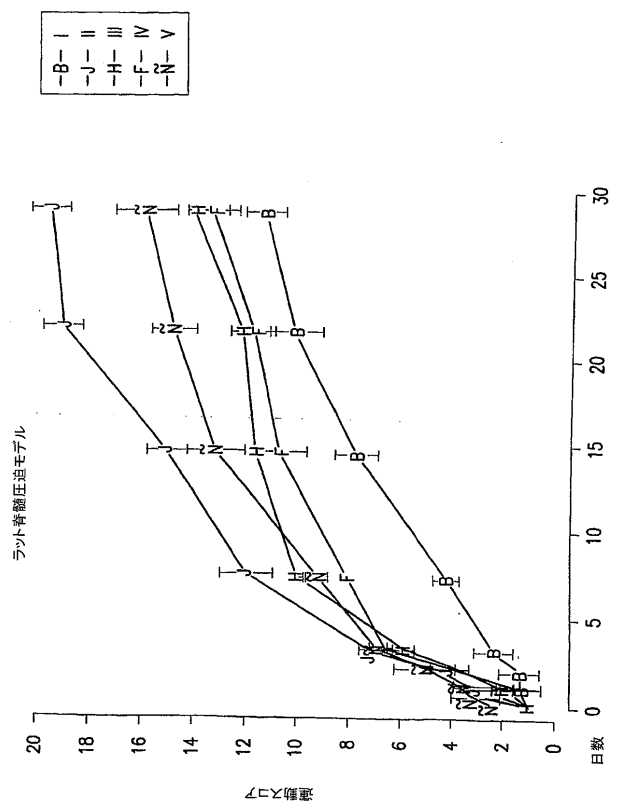
【図 19】



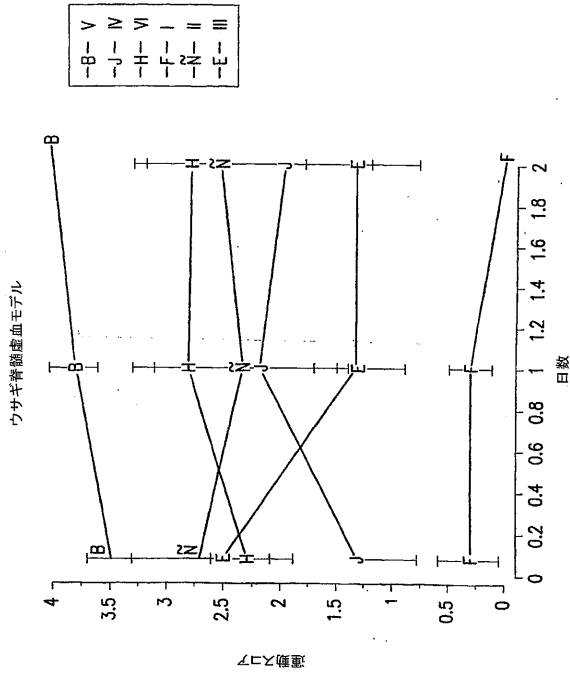
【図 20】



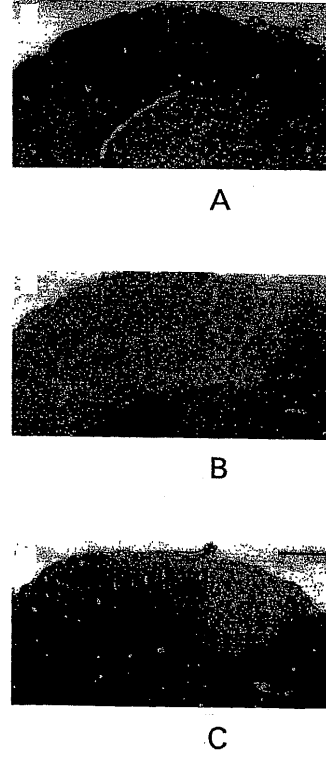
【図 21】



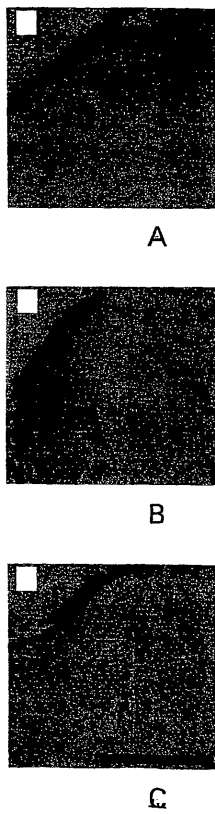
【図 2 2】



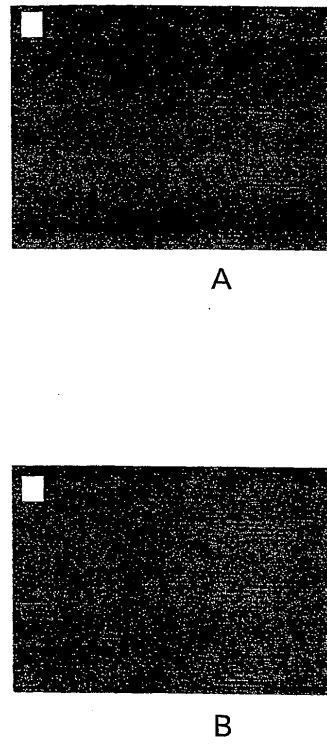
【図 2 3】



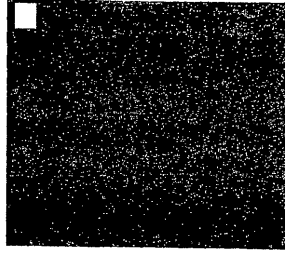
【図 2 4】



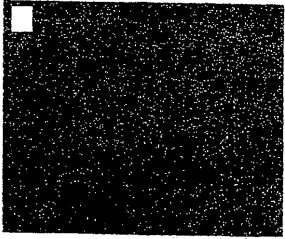
【図 2 5】



【図 26】

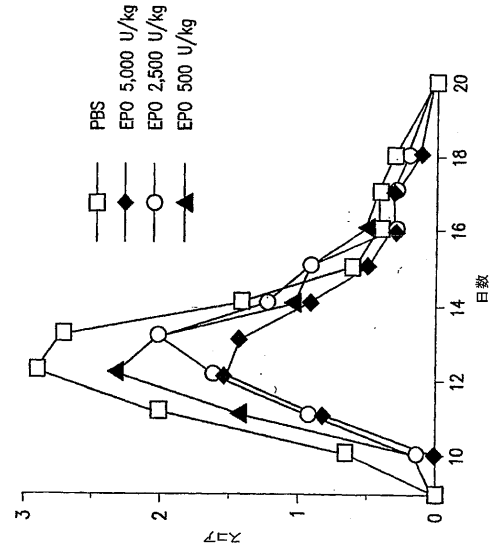


A

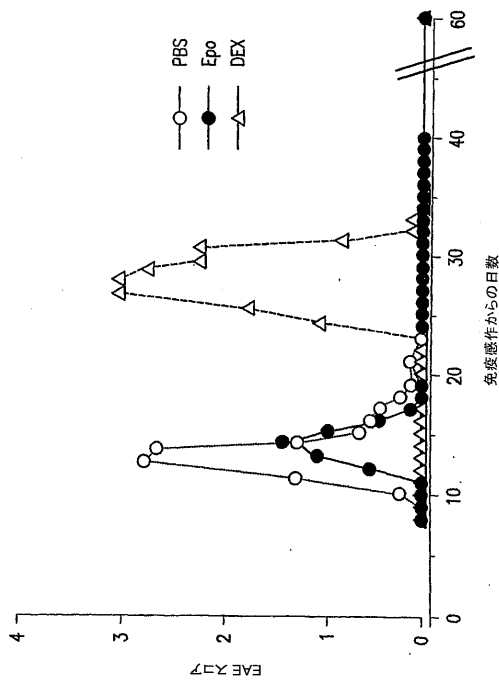


B

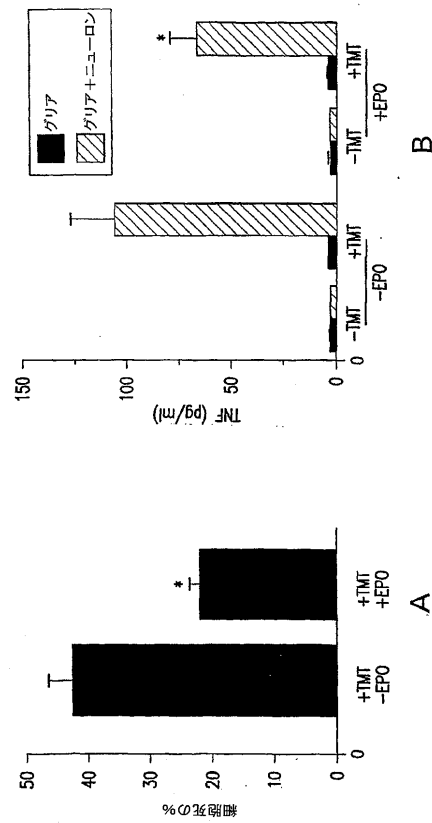
【図 27】



【図 28】



【図 29】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 K 31/52 (2006.01)	A 6 1 K 31/52	
A 6 1 K 31/56 (2006.01)	A 6 1 K 31/56	
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	
A 6 1 K 31/635 (2006.01)	A 6 1 K 31/635	
A 6 1 K 31/65 (2006.01)	A 6 1 K 31/65	
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 K 31/7056 (2006.01)	A 6 1 K 31/7056	
A 6 1 K 33/00 (2006.01)	A 6 1 K 33/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/22 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/32 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,HU,IE,IT,LU,MC,NL,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,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,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブラインズ, マイケル

アメリカ合衆国 0 6 5 2 5 コネティカット州, ウッドブリッジ, ウェパウォーグ ロード 1

(72)発明者 セラミ, アンソニー

アメリカ合衆国 1 0 5 2 0 ニューヨーク州, クロトン オン ハドソン, ブランブルブッシュ

ロード 49

(72)発明者 セラミ, カーラ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州, スリーピー ホーロー, ファーリントン アベニ
ュー 1 2 1

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA19 BA44 CA26 CA59 DA01 DA11 DB56 MA02
 MA13 MA16 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA34 MA35 MA37
 MA41 MA43 MA44 MA52 MA55 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66
 NA05 NA14 ZA012 ZA022 ZA052 ZA062 ZA152 ZA162 ZA332 ZA362
 ZA402 ZA512 ZA592 ZA662 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZB072
 ZB112 ZB152 ZB212 ZC352 ZC392

4C086 AA01 AA02 BC67 CB07 CB09 CB22 DA08 DA10 DA20 DA29
 DA31 DA35 HA01 MA02 MA04 MA07 NA05 NA14 ZA01 ZA02
 ZA05 ZA06 ZA15 ZA16 ZA33 ZA36 ZA40 ZA51 ZA59 ZA66
 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB21 ZC35
 ZC39

4C206 AA01 AA02 JA19 KA01 MA02 MA04 MA11 MA14 MA17 MA21
 MA23 MA24 NA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA05 ZA06 ZA15 ZA16
 ZA33 ZA36 ZA40 ZA51 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94
 ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB21 ZC35 ZC39