

(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2008-536808
(P2008-536808A)

(43) 公表日 平成20年9月11日(2008.9.11)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	Z N A 4 B 0 2 4
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1 4 B 0 6 3
A61K 31/57 (2006.01)	A 61 K 31/57	4 C 0 8 4
A61P 21/00 (2006.01)	A 61 P 21/00	4 C 0 8 6
A61P 25/02 (2006.01)	A 61 P 25/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-558176 (P2007-558176)	(71) 出願人	507297684 アルスジエン・インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成18年3月1日 (2006.3.1)		アメリカ合衆国ニュージャージイ州O 8 8
(85) 翻訳文提出日	平成19年10月4日 (2007.10.4)		5 2 モンマスジャヤンクション・スイート1
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/007253		2 3 ・デイアパークドライブ1 1
(87) 國際公開番号	W02006/096404	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(87) 國際公開日	平成18年9月14日 (2006.9.14)	(72) 発明者	スコット, シーン アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 3
(31) 優先権主張番号	60/658,630		2 サンフランシスコ・エルムハーストドライブ4 0
(32) 優先日	平成17年3月4日 (2005.3.4)	(72) 発明者	ベンジヤミン, ダニエル アメリカ合衆国ニュージャージイ州O 7 7
(33) 優先権主張国	米国(US)		2 6 イングリッシュタウン・プロデリンウェイ5 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロゲステロン受容体による神経変性疾患の調節

(57) 【要約】

神経変性障害を伴う被験体のプロゲステロン受容体を巻き込むホルモン経路の調節方法が提供される。プロゲステロン受容体活性は、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤がプロゲステロン受容体と相互作用しあつ神経変性疾患と関連するタンパク質の発現を変えるような、有効量のプロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤を被験体に投与することにより調節される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤がプロゲステロン受容体と相互作用しあつSODタンパク質をコードする遺伝子の転写を阻害するように、該剤を細胞に投与することを含んでなる、細胞中のSODタンパク質の産生の低下方法。

【請求項 2】

細胞が、脳中の細胞、脊髄中の細胞、髄膜組織中の細胞および筋中の細胞よりなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

細胞がALSを伴う被験体の神経細胞である、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 4】

SODタンパク質がSOD-1タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤がプロゲステロンおよびそのアナログである、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤がノルエチンドロンおよびそのアナログである、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤が、レボノルゲストレル、ノルゲストレル、デソゲストレル、3-ケトデソゲストレル、ノルエチンドロン、ゲストデン、酢酸ノルエチンドロン、ノルゲスチメート、オサテロン、酢酸シプロテロン、トリメゲストン、ジエノゲスト、ドロスピレノン、ノメゲストロール、若しくは(17-デアセチル)ノルゲスチメートおよびそれらのアナログよりなる群から選択される、請求項1に記載の方法。 20

【請求項 8】

遺伝子の転写の阻害がSODタンパク質の発現レベルをモニターすることを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

遺伝子の転写の阻害が、SODタンパク質をコードする核酸分子のレベルをモニターすることを含んでなる、請求項1に記載の方法。 30

【請求項 10】

核酸分子がリボ核酸若しくはデオキシ核酸よりなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

予防的に治療上有効な量のプロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤を被験体に投与することを含んでなり、該剤はプロゲステロン受容体と相互作用しあつSOD-1タンパク質をコードする遺伝子の転写を阻害する、被験体における筋萎縮性側索硬化症(ALS)の症状の発生の予防またはその症状若しくは進行の改善方法。

【請求項 12】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的予防上若しくは剤がプロゲステロンおよびそのアナログである、請求項11に記載の方法。 40

【請求項 13】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤がノルエチンドロンおよびそのアナログである、請求項11に記載の方法。

【請求項 14】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤が、レボノルゲストレル、ノルゲストレル、デソゲストレル、3-ケトデソゲストレル、ノルエチンドロン、ゲストデン、酢酸ノルエチンドロン、ノルゲスチメート、オサテロン、酢酸シプロテロン、トリメゲストン、ジエノゲスト、ドロスピレノン、ノメゲストロール、若しくは(17-デアセチル)ノルゲスチメート、およびそれらのアナログよりなる群から選択される、請求項11に記載の方 50

法。

【請求項 15】

被験体の生存の延長をモニターすることによりALSの改善をモニターすることをさらに含んでなる、請求項11に記載の方法。

【請求項 16】

ALSの改善をモニターする段階が、被験体の神経学的スコアをモニターすることを含んでなる、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

ALSの改善をモニターする段階が、SOD-1タンパク質の発現レベルをモニターすることを含んでなる、請求項15に記載の方法。 10

【請求項 18】

ALSの改善をモニターする段階が、SOD-1をコードする核酸分子のレベルをモニターすることを含んでなる、請求項15に記載の方法。

【請求項 19】

核酸分子がリボ核酸若しくはデオキシ核酸よりなる群から選択される、請求項18に記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2005年3月4日出願の米国仮出願第60/658,630号（その開示全体は引用することにより本明細書に組み込まれる）に対する優先権の利益を主張する。 20

【背景技術】

【0002】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は最も一般に診断される進行性運動ニューロン疾患である。該疾患は、大脳皮質、脳幹および脊髄の運動ニューロンの変性を特徴とする（非特許文献1；非特許文献2）。該疾患の原因は未知であり、そして、ALSは、発症の典型となる、非対称の四肢の衰弱および疲労感、上肢の局在化線維束性痙攣ならびに／若しくは脚の痙攣を患者が経験し始める場合にのみ診断されうる。ALSの少なくとも若干の発生に対する遺伝成分が存在する。 30

【0003】

ほぼ全例において、散発性ALSおよび常染色体優性の家族性ALS（FALS）は臨床上同様である（非特許文献3）。若干の、しかし全部ではないFALSの家系で、該疾患が染色体21q上の遺伝子欠損と結び付けられることが示された（非特許文献4）。

【0004】

とりわけ、染色体21q上に位置するSOD-1遺伝子中の突然変異が家族性の形態のALSと関連しているようである。SOD-1上の多様な突然変異の有害な影響は、もつともありそうには、SOD-1活性の喪失よりむしろ毒性機能の獲得により媒介される（非特許文献5；非特許文献6）。毒性は不明である一方、該タンパク質それ自身の排除が該毒性を改善することができることを示唆する証拠が存在する。 40

【0005】

神経変性疾患の経過を変え得る、若しくはこうした疾患を伴う患者の生存時間を延長し得る治療を開発することの必要性が存在する。とりわけ、ALS患者の脳および脊髄で産生されるSOD-1タンパク質を減少させる必要性が存在する。野性型若しくは変異体SOD-1タンパク質の形成を予防することは、疾患の進行を停止しかつALS症状の改善を見込むとみられる。

【非特許文献1】Principles of Internal Medicine、1991 McGraw-Hill, Inc.、ニューヨーク

【非特許文献2】Tandanaら(1985)Ann. Neurol.、18:271-280、419-431

10

20

30

40

50

【非特許文献3】Mulderら(1986)Neurology, 36:511-517

【非特許文献4】Siddiqueら(1991)New Engl. J. Med., 324:1381-1384

【非特許文献5】Al-ChalabiとLeigh、(2000)Curr. Opin. Neurol., 13, 397-405

【非特許文献6】Aliskiyら(2000)Hum. Gene Ther., 11, 2315-2329

【発明の開示】

【0006】

10

【発明の要約】

神経細胞内のプロゲステロン受容体の活性を調節することによる神経変性疾患の処置のための方法および組成物が開示される。プロゲステロン受容体は、プロゲステロンおよびそのアナログを高親和性で結合しあつ広範な遺伝子の発現を阻害若しくは活性化するよう にゲノムDNAに直接作用する、リガンド活性化転写因子である。プロゲステロン受容体は、神経細胞、例えば雄性および雌性双方の脊髄の神経細胞ならびにほぼ全部のこうした細胞中で見出され、そして従って神経変性疾患、例えばALSを処置するための有用な治療標的を構成する。

【0007】

本発明の方法および組成物は、例えば、プロゲステロン受容体を通じて作用してSOD-1 mRNAの転写若しくは転写物の安定性を阻害するプロゲステロン関連化合物、例えばノルエチンドロンを投与することにより、神経変性疾患に関連するタンパク質、例えばSOD-1の発現を減少若しくは阻害するために使用し得る。SOD-1 mRNAの減少はその場合SOD-1の低下されたタンパク質レベルにつながり、それは細胞中のその蓄積を減少させかつ疾患を改善する。変異体SOD-1の発現および蓄積は、家族性ALSの根底にある広く受け入れられた病態生理学的機構であり、そして散発性の形態の該疾患でもまたある役割を演じているとみられる。

20

【0008】

従って、一局面において、本発明は、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤を細胞に投与してその結果該剤がプロゲステロン受容体と相互作用しあつSODタンパク質をコードする遺伝子の転写を阻害することを含んでなる、細胞中のSODタンパク質の産生の低下方法に関する。細胞は、例えばALS(例えば家族性ALS)を伴う被験体中の神経細胞、若しくは脊髄、髄膜組織中のいずれかの細胞、または筋細胞であり得る。SODタンパク質はSOD-1タンパク質であり得る。細胞の例は、限定されるものでないが、ニューロン、介在ニューロン、神経膠細胞、小膠細胞、筋細胞、免疫応答に関与する細胞などを挙げることができる。

30

【0009】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤は、レボノルゲストレル、ノルゲストレル、デソゲストレル、3-ケトデソゲストレル、ノルエチンドロン、ゲストデン、酢酸ノルエチンドロン、ノルゲスチメート、オサテロン、酢酸シプロテロン、トリメゲストン、ジエノゲスト、ドロスピレノン、ノメゲストロール、若しくは(17-デアセチル)ノルゲスチメートおよびそれらのアナログよりなる群から選択し得る。一態様において、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤はプロゲステロンおよびそのアナログである。別の態様において、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤はノルエチンドロンおよびそのアナログである。

40

【0010】

遺伝子の転写の阻害はSODタンパク質、例えばSOD-1タンパク質の発現レベルを測定することによりモニターすることを含んでなる。あるいは、遺伝子の転写の阻害は、例えばリボ核酸若しくはデオキシ核酸レベルをモニターすることによる、SODタンパク質をコードする核酸分子のレベルをモニターすることを含んでなる。

50

【 0 0 1 1 】

別の局面において、本発明は、治療上有効な量のプロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤を被験体に投与することによる、被験体におけるALSの症状若しくは進行の予防、改善若しくは処置方法に関し、該剤はプロゲステロン受容体と相互作用しかつSOD-1タンパク質をコードする遺伝子の転写を阻害する。症状の改善は、被験体の生存の延長を測定すること、例えば被験体の神経学的スコアをモニターすることによりモニターし得る。あるいは、該改善は、SOD-1タンパク質の発現レベル若しくはSOD-1タンパク質をコードする核酸分子のレベルをモニターすることにより決定し得る。

【 0 0 1 2 】**[発明の詳細な記述]**

10

本発明の実務は、別の方法で示されない限り、当該技術分野の熟練内の微生物学、分子生物学および組換えDNA技術の慣習的方法を使用する。こうした技術は文献に完全に説明されている。(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(最新版); DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. I & II(D. Glover編); Oligonucleotide Synthesis(N. Gait編、最新版); Nucleic Acid Hybridization(B. HamesとS. Higgins編、最新版); Transcription and Translation(B. HamesとS. Higgins編、最新版); CRC Handbook of Parvoviruses, vol. I & II(P. Tijsseisen編); Fundamental Virology、第2版、Vol. I & II(B. N. FieldsとD. M. Knipe編)を参照されたい)。

20

【 0 0 1 3 】

本発明がより明瞭に理解されるように以下の用語を定義する。

【 0 0 1 4 】

30

「神経変性障害」若しくは「神経変性疾患」という用語は本明細書で互換性に使用され、そして、被験体若しくは被験体群における正常な神経学的機能の損傷若しくは非存在、または異常な神経学的機能の存在を指す。例えば、神経学的障害は疾患、傷害および/若しくは加齢の結果であり得る。本明細書で使用されるところの神経変性障害は、神経細胞若しくは神経細胞のある集団の形態および/若しくは機能異常を引き起こす神経変性もまた包含する。形態および機能異常の制限しない例は、神経細胞の物理的劣化および/若しくは死、神経細胞の異常な成長パターン、神経細胞間の物理的結合の異常、神経細胞による物質(1種若しくは複数)例えば神経伝達物質の過小若しくは過剰産生、それが通常産生する物質(1種若しくは複数)を産生することの神経細胞の失敗、物質例えば神経伝達物質の産生、および/または異常なパターン若しくは異常な時間での電気的衝撃の伝播を包含する。神経変性は被験体の脳のいかなる領域でも起こり得、そして、例えば筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多発性硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、プリオン関連疾患(CJD)、脊髄性筋萎縮症、脊髄性小脳性運動失調および脊髄傷害を包含する多くの障害で見られる。

【 0 0 1 5 】

40

「調節する」若しくは「調節すること」若しくは「調節される」という用語は本明細書で互換性に使用され、該調節が被験体若しくは被験体群で治療効果を生じるような、変化SOD-1活性若しくは発現、すなわちSOD-1活性若しくは発現の増大若しくは減少もまた指す。治療効果はALSの症状若しくは進行の軽減をもたらすものである。活性の変化は、例えばウエスタンプロット分析によるSOD-1タンパク質レベルの定量的若しくは定性的測定により測定し得る。定量的アッセイを使用して、ノルエチンドロンのようなプロゲステロン受容体調節剤の存在下でのSOD-1タンパク質レベルの上方制御若しくは下方制御を測定し得る。適するプロゲステロン受容体調節剤は、SOD-1発現を対照に比較して約5パーセントないし約50パーセント下方制御するものであり得る。発現の変化は、例えばRNA若しくはDNAの発現レベルを測定することによるSOD-1に

50

関連する核酸レベルの定量的若しくは定性的測定によってもまた測定し得る。

【0016】

被験体若しくは被験体群に対するプロゲステロン受容体調節の効果は、該被験体若しくは被験体群の生存を検査することによってもまた検討し得る。例えば、生存の変化、または神経変性疾患例えばALSの1種若しくはそれ以上の動物モデルでの生存の延長を測定することにより。生存の変化は、ALSマウスモデルに投与されるノルエチンドロンのようなプロゲステロン受容体調節剤の投与により得る。プロゲステロン受容体に対するプロゲステロン受容体の薬理学的調節剤の影響は、対照の剤を与えられたか若しくは剤を与えられないALSマウスの対照群に比較してのALSマウスの試験群の生存の日数の増大に基づき決定し得る。一態様において、プロゲステロン受容体調節剤は被験体若しくは被験体の集団（例えば雄性集団若しくは雌性集団）の生存に対する効果パーセントを最低2%ないし約100%増大させる。好ましくは、被験体若しくは被験体の集団の生存に対する効果パーセントは、最低5%ないし約50%、最低10%ないし約25%である。なおより好ましくは、被験体若しくは被験体の集団の生存に対する効果パーセントは、最低3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、32%、34%、36%、38%、40%、42%、44%、46%、48%および50%である。プロゲステロン受容体調節の影響は、例えば筋の動きの改善を評価することにより、または疾患の症状の緩和若しくは改善を検査することにより被験体若しくは被験体群の神経学的スコアを検査することによってもまた決定しうる。好ましい一態様において、被験体若しくは被験体群の神経学的スコアは、標準的統計学的解析手順を使用して決定される際に $p < 0.05$ と $p < 0.001$ の間の有意性水準を伴い、未処置の対照被験体のものと有意に異なる。
10

【0017】

該用語は、該調節が被験体若しくは被験体群で治療効果を生じるような、プロゲステロン受容体の活性、構造、またはプロゲステロン受容体若しくはプロゲステロン受容体のサブユニットの発現の変化、すなわちプロゲステロン受容体の活性若しくは発現の増大若しくは減少を指すのにもまた使用しうる。

【0018】

本明細書で使用されるところの「薬理学的剤」および「プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤」という用語は互換性に使用することを意図しており、そして、これらの用語は、被験体においてプロゲステロン受容体活性を調節するのに使用される化合物（1種若しくは複数）を指す。好ましくは、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤はプロゲステロン、例えばノルエチンドロンである。「薬理学的剤」若しくは「プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤」という用語は、プロゲステロンに類似の構造および機能をもつ他の化合物を包含することもまた意図している。
30

【0019】

本明細書で使用されるところの「阻害する」若しくは「阻害すること」という用語は、標的遺伝子若しくは標的タンパク質例えばSOD-1の発現の測定可能な減少を指す。該用語は標的タンパク質の活性の測定可能な低下もまた指す。好ましくは、発現の減少は最低約10%である。より好ましくは、発現の減少は約20%、30%、40%、50%、60%、80%、90%およびなおより好ましくは約100%である。
40

【0020】

本明細書で使用されるところの「SOD活性と関連する障害」若しくは「SOD活性と関連する疾患」という句は、SODタンパク質（例えばSOD-1、SOD-2、SOD-3など）の発現と関連するいかなる疾患状態も指す。とりわけ、本句は、SODタンパク質産生と関連する毒性機能の獲得を指す。SODタンパク質は野性型SODタンパク質若しくは変異体SODタンパク質であり得、そして、野性型SOD遺伝子若しくは最低1個の突然変異を伴うSOD遺伝子に由来し得る。

【0021】

本明細書で使用されるところの「被験体」という用語は、免疫応答が導き出されるいか
50

なる生存生物体も指す。被験体という用語は、限定されるものでないが、ヒト、チンパンジーならびに他の類人猿およびサル種のようなヒト以外の霊長類；畜牛、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマのような家畜；イヌおよびネコのような家畜哺乳類；マウス、ラットおよびモルモットなどのようなげっ歯類を包含する実験動物を挙げることができる。該用語は特定の齢若しくは性を示さない。従って、成体および新生被験体、ならびに胎児は、雄性であれ雌性であれ包含されることを意図している。

【0022】

I . 神経変性疾患

一局面において、本発明は、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤を投与することにより細胞中でのSODタンパク質の発現を変えることに関する。細胞は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のようなSODタンパク質を巻き込む神経変性疾患に関与する神経細胞であり得る。プロゲステロン受容体は、プロゲステロンおよびそのアナログを高親和性で結合しかつ広範な遺伝子の発現を阻害若しくは活性化するようにゲノムDNAに直接作用する、リガンド活性化転写因子である。プロゲステロン受容体は雄性および雌性双方で脊髄およびほぼ全部の細胞で見出され、そして従って神経変性疾患例えはALSの有用な治療標的を構成する。プロゲステロン受容体の機能の変化は、例えは、ALS、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病および多発性硬化症を包含する多くの神経変性状態の中心にあるとみられ、それらのそれぞれを下述する。

【0023】

ルー・ゲーリング病ともまた呼ばれる筋萎縮性側索硬化症(ALS)は大脳皮質、脳幹および脊髄の運動ニューロンを冒す致死的な神経変性疾患である。(Hirano、(1996)Neurology、47(4 Suppl. 2) : S63-6)。ALSの発症は人生の第四若しくは第五の10年に起こり(発症年齢の中央値は57歳である)、そして診断後2ないし5年以内に致死的である(Williamsら(1991)Mayo Clin. Proc.、66 : 54-82)。ALSはおよそ30,000人の米国人を冒しており、米国で毎年ほぼ8,000例の死亡が報告されている。ALS患者は累進的に全部の運動機能を喪失する(すなわち自分自身で歩行する、話す若しくは呼吸することが不可能)。

【0024】

ALSの基本的な特徴は、それらの制御下の筋を衰弱かつ消耗させて麻痺に至る脊髄運動ニューロンの喪失である。ALSは家族性(5~10%)および散発性双方の形態を有し、そして家族性の形態は7種の別個の遺伝子座に結び付けられている(Dengら(1995)Hum. Mol. Genet.、4 : 1113-16; Siddiqueら(1995)Clin. Neurosci.、3 : 338-47; Siddiqueら(1997)J. Neural Transm. Suppl.、49 : 219-33; Ben Hamidaら(1990)Brain、113 : 347-63; Yangら(2001)Nat. Genet. 29 : 160-65; Hadanoら(2001)Nat. Genet. 29 : 166-73)。家族性の症例の約15~20%がCu/Znスーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)をコードする遺伝子中の突然変異による(Siddiqueら(1991)N. Engl. J. Med.、324 : 1381-84; Rosenら(1993)Nature、362 : 59-62)。

【0025】

疾患の病因は不明であるとは言え、1つの理論は、ALSにおける神経細胞死が過剰な細胞外グルタミン酸による神経細胞の過剰興奮の結果であることである。グルタミン酸はグルタミン作動性ニューロンにより放出される神経伝達物質であり、そして神経膠細胞に取り込まれ、そこでそれは酵素、グルタミン合成酵素によりグルタミンに転化され、グルタミンはその後ニューロンに再進入し、そしてグルタミナーゼにより加水分解されてグルタミン酸を形成し、従って、該神経伝達物質プールを補給する。正常な脊髄および脳幹における細胞外グルタミン酸濃度は、ニューロンを支援するように部分的に機能する神経膠細胞が興奮性アミノ酸輸送体タイプ2(EAAT2)タンパク質を使用してグルタミン酸

10

20

30

40

50

を即座に吸収するため、細胞外液中で低マイクロモル濃度に保たれる。ALSを伴う患者での正常なEAAT2タンパク質の欠乏は、該疾患の病理学で重要であるとして同定された（例えば、Meyerら（1998）J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry、65：594-596；Aokiら（1998）Ann. Neurol.、43：645-653；Bristolら（1996）Ann. Neurol.、39：676-679を参照されたい）。EAAT2の低下されたレベルについての1つの説明は、EAAT2が異常にスプライスされることである（Linら（1998）Neuron、20：589-602）。異常なスプライシングは、EAAT2タンパク質のC末端領域に位置する45ないし107アミノ酸の欠失を伴うスプライスバリエントを生じる（Meyerら（1998）Neurosci. Lett.、241：68-70）。EAAT2の欠如若しくは不完全性により、細胞外グルタミン酸が蓄積して継続的にニューロンを興奮させる。グルタミン酸の蓄積は、ニューロンの継続的興奮が早期の細胞死につながるため、神経細胞に対する毒性効果を有する。

10

20

30

40

50

【0026】

ALSの病理学については多くが知られているとは言え、散発性の形態の病因論および家族性ALSにおける変異体SODタンパク質の原因特性についてはほとんど知られていない（Bruijnら（1996）Neuropathol. Appl. Neurobiol.、22：373-87；Bruijnら（1998）Science、281：1851-54）。グルタミン酸の毒性、低酸素状態、酸化的ストレス、タンパク質凝集、神経フィラメントおよびミトコンドリア機能不全を包含する多くのモデルが推測されている（Clevelandら（1995）Nature、378：342-43；Clevelandら Neurology、47(4 Suppl. 2)：S54-61、考察S61-2（1996）；Clevelandら（1999）Neuron、24：515-20；Clevelandら（2001）Nat. Rev. Neurosci.、2：806-19；Couillard-Despresら（1998）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、95：9626-30；Mitsumoto、（1997）Ann. Pharmacother.、31：779-81；Skeneら（2001）Nat. Genet.、28：107-8；Williamsonら（2000）Science、288：399）。

【0027】

現在、ALSの治療法は存在せず、該疾患を予防若しくはその経過を逆転するのに有効と判明した治療法も存在しない。数種の薬物が最近米国食品医薬品局（FDA）により承認された。今日まで、ALSを処置するための試みは、細胞保護効果を有する長鎖脂肪アルコール（米国特許第5,135,956号明細書を参照されたい）；若しくはピルビン酸の塩（米国特許第5,395,822号明細書を参照されたい）で神経変性を処置すること；およびグルタミン合成酵素を使用してグルタミン酸カスケードを阻害すること（米国特許第5,906,976号明細書を参照されたい）を伴う。例えば、グルタミン酸放出阻害剤RiluzoleTMは、ALSの処置のため米国で承認されており、そしてALSを伴う少なくとも若干の患者の寿命を延長するようである。しかしながら、いくつかの報告が、RiluzoleTM療法が生存時間を延長し得る場合であっても、それは患者の筋の強さの改善を提供すると思われないことを示している。従って、RiluzoleTMの効果は、該療法が患者の生活の質を改変しないために制限される（Borrás-Blaascoら（1998）Rev. Neurol.、27：1021-1027）。

【0028】

I I . SODおよびSOD突然変異

本発明は、プロゲステロン受容体調節剤およびそれらのアナログを用いてSOD-1タンパク質（例えば変異体SOD-1タンパク質）の発現を低下若しくは除外することにより細胞中の該タンパク質を減少させることに関する。SOD-1遺伝子は染色体21q22.1に位置を突き止められている。SOD-1配列はPCT公開第WO 94/19493号明細書に開示されているはSOD-1をコードするオリゴヌクレオチド配列であり

、そして、疾患を伴う患者を処置するための医薬品の製造における変異体および野性型いずれの形態のSOD-1をコードする遺伝子のアンチセンスDNAホモログの使用も一般に特許請求されている。ヒトSOD-1遺伝子の核酸配列はGenbank受託番号NM_000454に見出し得る。ヒトSOD-1のヌクレオチド配列は配列番号1にもまた提示する。対応するSOD-1タンパク質配列を配列番号2に提示する。

【0029】

I I I . 核内受容体によりSOD発現を阻害する化合物

一局面において、本発明はSOD、例えばSOD-1の遺伝子発現若しくはタンパク質産生を変えるプロゲステロン受容体調節剤を使用することに関する。プロゲステロン受容体は、プロゲステロンおよびそのアナログを高親和性で結合しかつ広範な遺伝子の発現を阻害若しくは活性化するようゲノムDNAに直接作用する、リガンド活性化転写因子である。プロゲステロン受容体遺伝子はPRAおよびPRBと命名された2種のタンパク質をコードする。双方のアイソフォームは、2種の代替プロモーターの転写および2個の異なるAUGコドンでの翻訳の開始の結果である。それらの生理学的役割はそれらの構造および機能特性により異なる。PRAおよびPRBは異なる遺伝子を活性化することができ、そして、それらの発現比は細胞の運命において重要である(Richerら(2002)J Biol Chem 277:5209-5218およびShyamalaら(2000)Proc Natl Acad Sci USA, 97:3044-3049)。

10

20

30

【0030】

プロゲステロン受容体は核内受容体スーパーファミリーに属する。核内受容体スーパーファミリーのメンバーのおよそ70メンバーが同定されている(MorassとGrone meyer 1998)。それらのいくつかのみがリガンド結合受容体である一方、他者は、特異的リガンドが未だ同定されていないか若しくはなお存在しないかもしれない、いわゆるオーファン受容体のサブファミリーに属する(O'malleyとConneely 1992)。プロゲステロン受容体は、標的遺伝子の調節領域の特定のエレメントと相互作用することにより直接、若しくは多様な成長因子シグナル伝達経路を活性化することにより間接的に遺伝子発現を調節し得る。

【0031】

核内受容体スーパーファミリーの構造の特徴は同様である。それぞれは4個の主要機能領域、すなわちN末端トランス活性化ドメイン(TAD)、中央DNA結合ドメイン(DBD)、C末端リガンド結合ドメイン(LBD)、ならびにDBDおよびLBDを結合するヒンジ領域を有する(Mangelsdorff 1995)。2種の自律トランス活性化機能、すなわちN末端で発する構成的に活性な活性化機能(AF-1)およびLBD中で生じるリガンド依存性活性化機能(AF-2)が、核内受容体の転写活性の原因である(GronemeyerとLaudet 1995)。

40

【0032】

核内受容体のDBDは、該サブファミリーの他メンバーに対する高程度のアミノ酸配列同一性を表す。結果、該4受容体は、核DNA中の同一でない場合は非常に類似のホルモン応答エレメント(HRE)を認識する。

50

【0033】

該分子のC末端に位置するLBDへのリガンド(例えばプロゲステロン若しくはエストロゲン)の結合から生じるコンホメーション変化は、リガンド応答を活性化する原因である。異なる核内受容体ファミリーのLBD間の20%くらい低い低配列同一性にもかかわらず、全部の核内受容体はこの領域で類似の折り畳み(fold)を共有する。それらは12個までのヘリックス、およびいわゆる-らせんサンドイッチ中に配置された1個の小さなシートより構成される。AF-1およびAF-2のトランス活性化機能は核内受容体のそれぞれTADおよびLBDに位置し、そして、それらの活性は、遺伝子転写のため活性の開始前部位を形成するための共活性化因子分子の動員に依存する(Onateら

50

1998、Bevanら 1999）。それらのLBDの欠失を伴う受容体は構成的に活性であり、AF-1がリガンド依存性であることを示唆する。強いAF-2は、レチン酸受容体(RAR)(Durandら 1994)、レチン酸-X受容体(RXR)(vom Baurら 1998)、ビタミンD受容体(Jimenezら 1999)、GR(Sheldonsら 1999)、PR(Onateら 1998)、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)(Nolteら 1998)、プロゲステロン受容体(ER)(Toraら 1989)、および甲状腺ホルモン受容体(THR)(Barettinoら 1994)のLBDで示されたが、しかしARではされなかった(Berrevoetsら 1998、Bevanら 1999)。

【0034】

核内受容体の転写活性は、リガンド選択性およびDNA結合能力を包含する核内受容体の多数の機能特性に影響する補助調節因子により影響される。核内受容体補助調節因子は、ヒストンの修飾により直接、若しくはクロマチン修飾複合体の動員により、ならびに基礎転写機械装置の動員において機能することにより間接的にのいずれかで、標的遺伝子のDNA修飾に参画する(HeinleinとChang 2002)。より良好に特徴付けられた補助調節因子のいくつかはp160ファミリーのメンバーすなわちARA70、ARA55、ARA54、ARA267-、Smad-3およびAIB1(Yehら 1999a)である。ARA55およびARA70双方はE17-Eストラジオール(E2)によるアンドロゲン受容体の活性化を可能にし、ARA70がE2にアンドロゲン活性を賦与するため最も有効な共活性化因子である(Miyamotoら 1998、Yehら 1998、Fujimotoら 1999)。さらに、ARA55およびSmad-3双方は、トランスフォーミング増殖因子-シグナル伝達経路とアンドロゲン/アンドロゲン受容体の作用の間のクロストークの架橋として機能することが示唆されている(Fujimotoら 1999、Kangら 2001)。

【0035】

(i) リガンド依存性の活性化

リガンド、例えばエストロゲン/プロゲステロンは標的細胞に拡散しそして核内受容体に結合する。リガンド結合が、受容体による標的遺伝子の調節に至る一連の事象を開始する。占有された受容体はそのLBDのアロステリックな変化を受け、そして、hsp90、hsp70およびhsp56のような熱ショックタンパク質から解離し(Royら 2001)、複合体形成、例えば二量体化し、そして、既に存在していない場合は核に移動される。核DNA中のホルモン応答エレメント(HRE)への結合に際して、受容体の二量体はp160ファミリーのような共活性化因子を動員して活性の開始前複合体を形成し、そして基礎転写機械装置と相互作用して標的遺伝子の転写を阻害若しくは誘発する。

【0036】

(ii) リガンド非依存性の活性化

核内受容体は細胞表面で発したシグナル伝達経路によってもまた活性化されうる。核内受容体は、他の転写因子と一緒に、可逆的リン酸化により調節される(Ortizら 1992)。キナーゼ媒介性シグナル伝達経路が核内受容体の活性に影響し得る(BurnssteinとCidlowski 1993)。ある種のコンセンサスリン酸化部位はDNA依存性タンパク質キナーゼ、プロテインキナーゼA、プロテインキナーゼC、マイトイエン活性化キナーゼおよびカゼインキナーゼIIの基質となり得る(Blockら 1996)。

【0037】

プロゲステロン受容体の天然のプロゲステロン受容体調節剤はプロゲステロンリガンドであるが、しかし、リガンドとしてもまたはたらく酢酸メドロキシプロゲステロン若しくはレボノルゲストレル、ノルエチンドロンのような合成化合物が作成された。一態様において、リガンドは、限定されるものでないが、Amen(プロゲスチン:メドロキシプロゲステロン)、Aygestin(プロゲスチン:ノルエチンドロン)、Crinone(プロゲスチン:プロゲステロン)、CombiPatch(エストロゲン/プロゲスチ

ンの組合せ：エストラジオール／酢酸ノルエチンドロン経皮系)、Curretab(プロゲスチン：メドロキシプロゲステロン)、Cycrin(プロゲスチン：メドロキシプロゲステロン)、Depo-Provera(プロゲスチン：メドロキシプロゲステロン)、Gesnterol 50(プロゲスチン：プロゲステロン)、Gesterol LA 250(プロゲスチン：ヒドロキシプロゲステロン)、Hy/Gestrone(プロゲスチン：ヒドロキシプロゲステロン)、Hylutin(プロゲスチン：ヒドロキシプロゲステロン)、Megace(プロゲスチン：メゲストロール)、Pro-Span(プロゲスチン：ヒドロキシプロゲステロン)、Prodrox(プロゲスチン：ヒドロキシプロゲステロン)、Prometrium(プロゲスチン：プロゲステロン)、Provera(プロゲスチン：メドロキシプロゲステロン)を挙げることができる。プロゲステロン関連化合物のさらなる例は、限定されるものでないが、第一世代のプロゲスチン、すなわちノルエチンドロン(例えばOrtho-Novum)およびノルエチノドレル(Enovid)；第二世代のプロゲスチン、すなわち酢酸ノルエチンドロン(例えばLoestrin)および酢酸エチノジオール(例えばDemulen)；第三世代のプロゲスチン、すなわちレボノルゲストレル(例えばTriphasil)、dl-ノルゲストレル(例えばOvral)；第四世代のプロゲスチン、すなわちデソゲストレル(例えばDesogen)、ゲストデン、ノルゲスチメート(例えばOrtho-Cyclen)、プレグナンプロゲスチン、酢酸クロルマジノン、酢酸メゲストロール、および酢酸メドロキシプロゲステロンを挙げができる。とりわけ、レボノルゲストレル、ノルゲストレル、デソゲストレル、3-ケトデソゲストレル、ノルエチンドロン、ゲストデン、酢酸ノルエチンドロン、ノルゲスチメート、オサテロン、酢酸シプロテロン、トリメゲストン、ジエノゲスト、ドロスピレノン、ノメゲストロール、若しくは(17-デアセチル)ノルゲスチメート。

【0038】

別の態様において、リガンドはエストロゲンおよびプロゲステロンの組合せのようなリガンドの組合せである。例は、限定されるものでないが、Premarin(エストロゲン：複合エストロゲン)、Premelle(エストロゲン／プロゲスチンの組合せ：複合エストロゲンおよびメドロキシプロゲステロン)、Premique(エストロゲン／プロゲスチンの組合せ：複合エストロゲンおよびメドロキシプロゲステロン)、Premphase(エストロゲン／プロゲスチンの組合せ：複合エストロゲンおよびメドロキシプロゲステロン)、Prempro(エストロゲン／プロゲスチンの組合せ：複合エストロゲンおよびメドロキシプロゲステロン)ならびにProvelle 28(エストロゲン／プロゲスチンの組合せ：複合エストロゲンおよびメドロキシプロゲステロン)を挙げができる。

【0039】

リガンドはプロゲステロン受容体に結合して受容体／リガンド複合体を創製する。本複合体は核DNA中に存在する特異的遺伝子プロモーターに結合する。DNAに一旦結合されれば、該複合体はその遺伝子によりコードされるmRNAおよびタンパク質の産生を調節する。従って、プロゲステロン受容体調節剤は、SOD-1機能と関連しない疾患に現在使用されているFDA承認の治療薬およびそれらの改変されたバリエントであり得る。プロゲステロン受容体調節剤は、SOD-1発現を変える新たに合成された化合物でもまたあり得る。プロゲステロン受容体調節剤は、プロゲステロン受容体と相互作用することが既知の既存の治療薬、例えばノルエチンドロンであり得る。

【0040】

活性化プロゲステロン受容体は、SRC-1、SRC-2およびSRC-3、CBP/p300ならびに他者のような共活性化因子若しくは補助抑制因子としてはたらき得る一連の重要な調節タンパク質を動員する。これらの補助調節タンパク質はヒストンアセチル化／脱アセチル化およびクロマチンリモデリングを調節することができ、また、付加的な効果を有しうる。プロゲステロン受容体複合体は特異的DNA配列、プロゲステロン応答エレメントを結合することができ、また、標的遺伝子の転写を開始することができる。プロ

10

20

30

40

50

ロゲステロン受容体がそれらの天然のリガンドにより活性化される古典的機構の完全な総説が別の場所に広範囲に記述されている (Giangrandeら (1999) R e c e n t P r o g H o r m R e s , 54 : 291 - 313) 。こうした複合体活性化配列は、プロゲステロンシグナル伝達経路の他の調節機構が組み込まれ得るいくつかの段階を提供する。

【 0041 】

プロゲステロン受容体活性化は、ヒトで基本的にリン酸化されているプロゲステロン受容体の4部位 (Ser 81, Ser 162, Ser 190 および Ser 400) を巻き込み、そしてホルモン処置に際して迅速な2倍増加を表す。他部位 (Ser 102, Ser 294 および Ser 345) はホルモン誘導可能であり、そして1~2時間の処置が最大のリン酸化に達するのに必要とされる。ホルモンに応答してのそれらの異なるキネティクスは、これらの2群のリン酸化部位が異なるシグナル伝達経路およびキナーゼの標的であり、そして別個の機能的構造的役割を供することを示唆する。リン酸化は転写活性の調節的オン-オフスイッチとしてはたらかないかもしれないが、しかしむしろ、增幅若しくは減衰いずれかの活性に対する機能を供しうる (Clemmら (2000) M o l E n d o c r i n o l ; 14 : 52 - 65) 。多様な成長因子、神経伝達物質およびポリペプチドホルモンとの、慣習的核 PR 経路を巻き込む数種のクロストーク機構が記述されている。大部分の研究は、プロゲスチンが成長因子および細胞表面のサイトカイン受容体を上方制御することを示す。それらは、例えば Stat5 のレベルを増大させることおよびその細胞内区画化を変えること、ならびにマイトジエン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) およびヤヌスキナーゼ活性を増強することにより数種の細胞内エフェクターを調節するように、細胞質レベルでもまた作用する (Langeら (1999) M o l E n d o c r i n o l 13 : 829 - 836) 。

10

20

30

【 0042 】

ステロイド受容体は相互とクロストークしうる。 (Migliaccioら (1998) E M B O J 17 : 2008 - 2018) 。Migliaccioらは、細胞のステロイド誘導性のS期進入に必要であるとみられる、細胞膜レベルでのPRB、ER およびSrcの間の相互作用を記述する。PRのゲノム以外の作用機序が、多様な系で記述されている (Mallerら (2001) P r o c N a t l A c a d S c i U S A ; 98 : 8 - 10) 。

【 0043 】

一局面において、本発明は、SOD-1発現を低下させるようにプロゲステロン受容体調節剤、例えばプロゲステロン若しくはノルエチンドロンでプロゲステロン受容体を標的とすることに関する。プロゲステロン、およびプロゲステロン受容体を活性化する関連化合物は、タンパク質およびmRNAレベルでSOD-1発現の強力な阻害剤であることが示されている。これらの化合物は、SOD-1を減少させるノルエチンドロンの効果がプロゲステロン受容体アンタゴニスト、ミフェブリストンにより阻害され得るため、プロゲステロン受容体を通じて作用すると考えられる。

【 0044 】

実施例の節は、SOD-1の発現がRNAのレベルで阻害されることを示し；ノルエチンドロン処置後のRNAの低下されたレベルは、これが転写若しくは転写物の安定性の低下により起こり得ることを示唆する。ミフェブリストンの拮抗作用により示されるノルエチンドロンのプロゲステロン受容体依存性の作用は、転写を阻害するための活性化されたプロゲステロン受容体の直接作用を強く示唆する。SOD-1 mRNAの減少は、その場合、SOD-1の低下されたタンパク質レベルにつながる。SOD-1タンパク質の低下されたレベルは細胞中でのその蓄積を低下させ、そして疾患を改善することが期待される。変異体SOD-1の発現および蓄積は家族性ALSの根底にある広く受け入れられた病態生理学的機構であり、そして散発性の形態の該疾患においてもまたある役割を演じているとみられる。プロゲステロン受容体は、雄性および雌性双方で脊髄 (Monksら、(2001) H o r m . B e h a v 40 : 490 - 496) およびほぼ全部の細胞で見

40

50

出され、そして従って全部の家族性およびおそらく散発性ALSで有用な治療標的を構成する。

【0045】

I V . プロゲステロン受容体調節剤を使用する神経変性障害の調節

ALSのような神経変性疾患におけるプロゲステロン受容体の役割、およびプロゲステロン受容体と関連する経路の調節は、ALS若しくは他の神経変性疾患における臨床研究の標的ではなかった。実施例の節に示されるデータは、プロゲステロン受容体がSOD-1の発現の減少においてある役割を演じていることを示す。

【0046】

ALSのSOD1 G93A(高コピー)マウスマルクは、23コピーのヒトG93A SOD突然変異を保有しかつ内因性プロモーターにより駆動される適するマウスである。該マウスの生存はコピー依存性である。高コピーG93Aは約128日の生存中央値を有する。変異体SODタンパク質の高分子量複合体は、ほぼ第30日に開始して、脊髄中で見られる。第60日に反応性星状細胞増加(GFAP反応性)が観察され;活性化された小膠細胞が第90日から後に観察される。Gurneyらによる研究は、第90日に、反応性星状細胞増加が統計学的有意性を喪失する一方で、小膠細胞活性化が有意に上昇され、そして疾患の最終段階までずっと上昇されることを継続することを示した(Gurneyら(1996)Ann.Neurol., 39: 147-5739を参照されたい)。

。

【0047】

このモデルで有効性を示した多くの薬物はヒト臨床試験に前進した。ALSの処置において唯一承認された薬物、リルゾールでの経験は、マウスマルクモデルが臨床的有効性の良好な予測体であることを示す。クレアチン、セレブレックス、補酵素Q10およびミノサイクリンのような他の薬物は、このモデルでの研究に基づき臨床評価中である。

【0048】

V . プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤の送達

本発明の薬理学的剤は、被験体への投与に適する製薬学的組成物に組み込み得る。典型的には、製薬学的組成物は、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤、例えばノルエチンドロン、および製薬学的に許容できる担体を含んでなる。本明細書で使用されるところの「製薬学的に許容できる担体」は、生理学的に適合性であるいざれかのおよび全部の溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを包含する。製薬学的に許容できる担体の例は、水、生理的食塩水、リン酸緩衝生理的食塩水、D-ブドウ糖、グリセロール、エタノールなどの1種若しくはそれ以上、ならびにそれらの組合せを包含する。多くの場合、等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールのような多価アルコール、若しくは塩化ナトリウムを組成物中に包含することが好ましいことができる。製薬学的に許容できる担体は、薬理学的剤の貯蔵寿命若しくは有効性を高める湿潤剤若しくは乳化剤、保存剤若しくは緩衝剤のような少量の補助物質をさらに含みうる。

【0049】

製薬学的組成物は多様な形態にありうる。これらは、例えば、液体溶液(例えば注入可能(injectable)および注入可能(infusible)溶液)、分散剤若しくは懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末、リポソームならびに坐剤のような液体、半固体および固体の投薬形態物を包含する。好ましい形態物は意図される投与様式および治療的応用に依存する。好ましい投与様式は非経口(例えば静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内)である。好ましい一態様において、薬理学的剤は腹腔内注入により投与される。

【0050】

典型的には、組成物は液体溶液若しくは懸濁剤いざれかとしての注入可能物として製造され;注入前の液体ベヒクル中の溶液若しくは懸濁液に適する固体の形態もまた製造し得る。該製剤はまた、乳化もし得るか、あるいは高められた補助効果のためリポソームまたはポリラクチド、ポリグリコリド若しくはポリマーのような微小粒子中に被包化もし得る

10

20

30

40

50

(例えば Langer、Science 249、1527(1990)およびHanes、Advanced Drug Delivery Reviews 28、97-119(1997)を参照されたい)。本発明の剤は、有効成分の持続若しくはパルス放出を可能にするような様式で処方し得るデポー注射剤若しくは植込物製剤の形態でもまた投与し得る。デポー注射剤若しくは植込物製剤は、例えば本発明の化合物の1種若しくはそれ以上を含み得るか、または異なる剤の組合せ(例えばピリメタミンおよびノルエチンドロン)を含み得る。

【0051】

10 製薬学的組成物は、典型的には製造および貯蔵条件下で無菌かつ安定でなければならぬ。組成物は、溶液、マイクロエマルション、分散剤、リポソーム、若しくは高薬物濃度に適する他の規則正しい構造として処方し得る。無菌の注入可能な溶液は、必要とされる量の有効成分(例えば薬理学的剤)を必要とされるとおり上で挙げられた成分の1種若しくは組合せと適切な溶媒中で組み込むこと、次いで濾過滅菌により製造し得る。

【0052】

一般に、分散剤は、上で挙げられたものからの基本的分散媒および必要とされる他成分を含有する無菌ベヒクルに有効成分を組み込むことにより製造する。無菌の注入可能な溶液の製造のための無菌の凍結乾燥粉末の場合、好ましい製造方法は、その以前に滅菌濾過した溶液からの有効成分およびいかなる付加的な所望の成分の粉末も生じる真空乾燥および噴霧乾燥である。溶液の適正な流動性は、例えばレシチンのようなコーティングの使用、分散剤の場合には必要とされる粒子径の維持、および界面活性剤の使用により維持し得る。注入可能な組成物の長時間吸収は、吸収を遅らせる剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に包含することによりもたらされ得る。

【0053】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤は、当該技術分野で既知の多様な方法により投与し得る。当業者により認識されるであろうとおり、投与経路および/若しくは様式は所望の結果に依存して変動することができる。ある態様において、有効成分は、植込物、経皮貼付剤および微小被包化送達系を包含する徐放製剤のような、迅速放出に対し化合物を保護することができる担体とともに製造しうる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸のような生物分解性の生物適合性ポリマーを使用し得る。こうした製剤の多くの製造方法が特許されているか、若しくは当業者に公知である。(例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J.R. Robinson編、Marcel Dekker, Inc.、ニューヨーク、1978; Kabanovらへの米国特許第6,333,051号、およびKabanovらへの同第6,387,406号明細書を参照されたい)。

【0054】

ある態様において、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤は、例えば不活性希釈剤若しくは吸収可能な可食性担体とともに経口投与しうる。化合物(および所望の場合は他成分)は、硬若しくは軟殻ゼラチンカプセルに封入しても、錠剤に圧縮しても、または被験体の食餌に直接組み込んでもまたよい。経口の治療的投与のため、化合物を賦形剤とともに取り込みかつ摂取可能な錠剤、顆側錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、カシェ剤などの形態で使用しうる。本発明の化合物を非経口投与以外により投与するために、化合物をその不活性化を予防する物質で被覆すること若しくはそれらと該化合物を共投与することが必要でありうる。

【0055】

ある態様において、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤は液体の形態で投与し得る。該薬理学的剤は、例えばメタノール、エタノールおよびイソプロパノールのような多様な溶媒に可溶性であるべきである。水および他の水性溶液中での薬理学的剤の溶解性を改良するための多様な方法が当該技術分野で既知である。例えば、Al-Razzakらへの米国特許第6,008,192号明細書は、化合物の投与を改良するための親水相

10

20

30

40

50

および界面活性剤若しくは界面活性剤の混合物を含んでなる親水性二相系（binary system）を教示する。

【0056】

補助的有効成分もまた組成物に組込み得る。ある態様において、プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤は、該薬理学的剤の薬物動態を改良するのに有用である1種若しくはそれ以上の付加的な治療薬と共に处方かつ／若しくは共投与し得る。本発明の薬理学的剤の薬物動態を改良するための多様な方法が当該技術分野で既知である。（例えば、Norbeckらへの米国特許第6,037,157号明細書を参照されたい）。

【0057】

薬理学的剤の薬物動態の他の改良方法は、例えば、Mastersへの米国特許第6,342,250号、Kabanovらへの同第6,333,051号、Straubらへの同第6,395,300号、Kabanovらへの同第6,387,406号、およびReedらへの同第6,299,900号明細書に開示されている。Mastersは薬理学的有効成分の除放のための薬物送達装置および方法を開示している。Mastersにより開示される薬物送達装置は、薄膜全体に均一に分散された、1種若しくはそれ以上の生物分解性ポリマー物質、1種若しくはそれ以上の生物適合性溶媒、および1種若しくはそれ以上の薬理学的有効成分を含んでなる薄膜である。米国特許第6,333,051号明細書において、Kabanovらは、最低1種の架橋ポリアミンポリマーフラグメント、最低1種の非イオン性の水溶性ポリマーフラグメント、および最低1種の適する生物学的剤（薬理学的剤を包含する）を有するコポリマー網状構造を開示する。この特許の教示によれば、ナノゲル網状構造と称されるこの網状構造は、副作用を減少させかつ治療作用を増大させることにより薬理学的剤の治療効果を改善する。別の特許すなわち米国特許第6,387,406号明細書で、Kabanovらは、多数の薬理学的剤の経口送達を改良するための別の組成物もまた開示している。

【0058】

薬理学的剤の送達および投与の他の改良方法は、膜を横断する、およびとりわけ血液脳関門を横断する薬理学的剤の能力の向上手段を包含する。一態様において、薬理学的剤を、血液脳関門を横断するその能力を向上させるように改変し得、また、代替の一態様において、薬理学的剤は、血液脳関門を横断する該薬理学的剤の能力を向上させる例えば抗真菌化合物のような付加的な剤と共に投与し得る。あるいは、脳の特定部位への薬理学的剤の正確な送達は、定位微小注入技術を使用して実施し得る。例えば、処置されている被験体を定位支持枠（MRI適合性）内に配置し得、そしてその後、高解像度MRIを使用して画像化して処置されるべき特定領域の三次元の位置決めを決定し得る。MRI画像をその後、適切な定位固定ソフトウェアを有するコンピュータに転送し得、そして多数の画像を使用して薬理学的剤の微小注入のための標的部位および軌道を決定する。該ソフトウェアが、該定位枠について正確に登録されている三次元座標に軌道を翻訳する。頭蓋内送達の場合には、頭蓋を露出させることができ、進入部位の上にバーホールをドリルで開けることができ、そして定位固定装置を使用して針の位置を決めかつ予め決められた深さでの植込を確実にことができる。薬理学的剤は、疾患若しくは障害と関連する脊髄、脳幹若しくは脳の細胞のような領域に送達し得る。例えば、標的領域は、脳髄質、橋、および中脳、小脳、間脳（例えば視床、視床下部）、終脳（例えば線条体、大脳皮質、または大脳皮質、後頭葉、側頭葉、頭頂葉若しくは前頭葉内）、あるいはそれらの組合せを包含し得る。

【0059】

プロゲステロン受容体を調節する薬理学的剤は、神経変性障害を処置するために単独で若しくは組合せで使用し得る。例えば、薬理学的剤は、例えば相乗効果を生じるための他の既存のプロゲステロン受容体調節物質とともに使用し得る。同様に、該薬理学的剤は、単独で、若しくは付加的な剤、例えば治療的組成物に有益な属性を与える剤、例えば該組成物の粘度を遂げる剤とともに使用し得る。該組成物は、例えば該組合せが、形成される組成物がその意図される機能を發揮し得るようである場合に、1種以上の付加的な剤、例

10

20

30

40

50

えば2若しくは3種の付加的な剤もまた包含し得る。いくつかの態様において、本発明は、例えは最低1種のピリメタミン化合物若しくはその機能的アナログ、またはエストラジオールのような最低1種のエストロゲン関連化合物と一緒に、ノルエチンドロンのような最低1種のプロゲステロン関連化合物を投与することを包含する。これらの化合物および投与の説明については、2006年3月1日出願の”Modulation of Neurodegenerative Diseases through the Progesterone Receptor(プロゲステロン受容体による神経変性疾患の調節)“および”Modulation of Neurodegenerative Diseases(神経変性疾患の調節)“と題された同時係属出願を参照されたい。

【0060】

10

本発明の化合物は、水性溶液としてのそれらの長期貯蔵および投薬を容易にするために製薬学的に許容できる酸の塩と複合体形成し得る。例えは、塩は製薬学的に許容できる担体(例えは水)の使用を伴い若しくは伴わずに製薬学的に許容できる酸(例えはHCl)由来であり得る。こうした塩は、例えは塩酸、臭化水素酸、酢酸、クエン酸、フマル酸、マレイン酸、ベンゼンスルホン酸およびアスコルビン酸を包含する無機若しくは有機いずれかの酸由来であり得る。担体および塩の組合せにより得られる製薬学的組成物は、一般に、所望の生物学的効果を導き出すのに必要な投薬量で使用することができる。これは、治療上有効な量、若しくは他の生物学的有効成分と組合せで使用される場合により少量でのその使用を包含する。

【0061】

20

本発明の製薬学的組成物は、本発明の薬理学的剤の「治療上有効な量」若しくは「予防上有効な量」を包含しうる。「治療上有効な量」は、所望の治療結果を達成するのに必要な投薬量でかつ時間の間有効な量を指す。薬理学的剤の治療上有効な量は、個体の疾患状態、齢、性および重量、ならびに個体で所望の応答を導き出す該薬理学的剤の能力のような因子により変動しうる。治療上有効な量は、薬理学的剤のいかなる毒性若しくは有害な効果も治療上有益な効果により超えられるものでもまたある。「予防上有効な量」は、所望の予防結果を達成するのに必要な投薬量でかつ時間の間有効な量を指す。典型的には、予防的用量は疾患の前若しくは早期段階に被験体で使用されるため、予防上有効な量は治療上有効な量より少ないことができる。

【0062】

30

投薬レジメンは至適の所望の応答(例えは治療若しくは予防応答)を提供するように調節しうる。例えは、単一ボーラスを投与することができるか、数回の分割用量を長時間に投与しうるか、または用量は治療状況の要件により示されるとおり比例して減少若しくは増大しうる。投与の容易さおよび投薬量の均一性のため非経口組成物を投薬単位形態物に処方することがとりわけ有利である。本明細書で使用されるところの投薬単位形態物は、処置されるべき哺乳動物被験体に対し单一投薬量として適する物理的に別個の単位を指し；各単位は、必要とされる製薬学的担体とともに所望の治療効果を生じるよう計算された予め決められた量の有効成分を含有する。本発明の投薬単位形態物の仕様は、(a)有効成分の独特の特徴および達成されるべき特定の治療若しくは予防効果、ならびに(b)個体での過敏症の処置のための有効成分のような調合の技術分野に固有の制限により支配され、かつ、それらに直接依存する。

【0063】

40

薬理学的剤(例えはプロゲステロン若しくはノルエチンドロン)の治療上若しくは予防上有効な量の例示的な制限しない範囲は、被験体若しくは被験体群に投与される0.5mg/日ないし約20mg/日、好ましくは約0.100mg/日ないし約15mg/日、より好ましくは約0.100mg/日ないし約12mg/日、および最も好ましくは約0.3mg/日ないし4mg/日の間である。好ましくは、治療上有効な量の薬理学的剤(例えはプロゲステロン若しくはノルエチンドロン)の投与は、1ナノモル(nM)ないし100ミリモル(mM)濃度の範囲の血流中の薬理学的剤の濃度をもたらす。例えは、約10nMないし約10mM、約1nMないし約1mM、約1nMないし約100マイク

50

口モル(μM)、約1μMないし約500μM、約1μMないし約200μM、若しくは約10μMないし約50μMの濃度範囲。投薬量の値は緩和されるべき状態の型および重症度とともに変動しうることが注目されるべきである。いずれかの特定の被験体について、特定の投薬レジメンを個々の必要性、および該組成物を投与する若しくはその投与を監督する人の専門的判断に従って長期間調節すべきであること、また、本明細書に示される投薬量範囲は例示のみでありかつ特許請求される組成物の範囲若しくは実務を制限することを意図していないことがさらに理解されるべきである。

【0064】

当業者は、上述の態様に基づき、本発明のさらなる特徴および利点を認識するであろう。従って、本発明は、付随する請求の範囲により示されるところを除き、具体的に示されかつ記述されたものにより制限されるべきでない。本明細書で引用される全部の刊行物および参考文献は、明らかに、そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる。

10

【実施例1】

【0065】

材料および方法：

(i) 細胞培養

ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞株(ATCC)はSOD-1タンパク質およびmRNAを発現することが見出され、そして、SOD-1発現を阻害する化合物を同定するためのモデル系として使用した。簡潔には、グルタミン4mM、認定ウシ胎児血清10%、ならびにペニシリン、ストレプトマイシンおよびナイスタチン(全部In vitroから)を補充した高グルコースを含むダルベッコの最小必須培地内で細胞を維持した。インキュベーション条件は5%のCO₂を伴う37度および99%相対湿度であった。培養物が90%コンフルエンスに達した場合にそれらを継代した。薬理学的実験のため、細胞を150μlの培地中3,500細胞/ウェルの密度で、無菌組織培養処理済み96ウェルプレートに接種した。

20

【0066】

(ii) 薬物：

全部の化合物は10mMのストック濃度で100%DMSOに溶解した。薬物はMicrosource Discovery若しくはSigma Aldrichから得た。

30

【0067】

(iii) 実験プロトコル：

接種および接着のための6時間後に、薬物を10μMの濃度で培地に添加した。薬物との72時間のインキュベーション後に、細胞障害性を評価し得たように倒立顕微鏡およびデジタルカメラを使用して、細胞を100倍で写真撮影した。写真文書化後に培地を除去し、そして細胞をリン酸緩衝生理的食塩水で1回洗浄し、およびその後、プロテアーゼインヒビターカクテルを含有する50μlの分子生物学等級水を添加した。10分のインキュベーション後に、プレートを-80度に置いて完全な溶解を誘導した。プレートをその後融解し、そして、25μlを、75μlのリン酸緩衝生理的食塩水を含有した、抗ヒトSOD-1抗体で被覆したマクスソープ(maxisorp)ELISAプレートに各ウェルから移した。二次抗体対(ポリクローナル抗SOD-1/HRP結合ヤギ抗ウサギ)をその後ウェルに添加し、そしてインキュベーションを室温で1時間実施した。インキュベーションの終了時にプレートを3回洗浄し(KPL Inc.からの洗浄緩衝液)、そしてSure Blue Reserve HRP基質を添加した。5~10分のインキュベーション後に反応(変動する程度まで青色に変わった)を停止試薬(KPL)の添加により停止した。プレートをその後穏やかに5秒間振とうし、そして450nmでの吸光度をTecanプレートリーダーで読み取った。各サンプルからの吸光度を、同一ELISAプレートでアッセイした精製組換えヒトSOD-1の標準曲線と比較し、そして、SOD-1免疫反応性(nmol/ml)を標準曲線との比較により推定した。

40

【0068】

50

(i v) プラッドフォードタンパク質アッセイ：

SOD-1アッセイで見出された減少分が単に薬物処理の細胞傷害効果の結果であったかどうかを決定するため、全タンパク質を各ウェルについて測定した。ELISAインキュベーションを進行中に、 $10\text{ }\mu\text{l}$ の残存するライセートを各ウェルから取り出しつつの空のプレートに入れ、そしてBioRadプラッドフォード試薬($100\text{ }\mu\text{l}$)をタンパク質に添加した。室温で15分インキュベーション後に、プレートを穏やかに5秒間振とうし、そして吸光度をTecan Sunriseプレートリーダーにて 595 nm で読取った。各ウェル中のタンパク質濃度は、同一プレートで実験したタンパク質標準との比較によりかのように決定した。

【0069】

10

(v) 定量的RT-PCR：

96ウェルプレート中の3500細胞/ウェルのHeLa細胞を上のとおりノルエチンドロンで72時間処理し、そしてその後細胞を溶解し、そしてGentra RNA抽出プロトコルおよび試薬を使用して全RNAを抽出した。精製したRNAをその後、オリゴDTでプライミングするSuperscript III MMLV転写酵素を使用する逆転写反応で鑄型として使用した。結果として生じるcDNAでPCR反応を実施して、ヒトSOD-1、ヒトTATAボックス結合タンパク質およびヒト-2ミクログロブリンに対応するcDNAを増幅した。PCR反応は別個のチューブ中で20、25および30サイクル実施し、そしてアンプリコンをその後、臭化エチジウムを含有する2%アガロースゲル上で泳動した。UV光源による刺激後に、臭化エチジウム染色バンドにより発射される蛍光をデジタルカメラを使用して記録した。デジタル化した画像はImageJ(NIH)を使用して解析し、そしてSOD-1のバンドを、サイクルの直線範囲(これらの条件下で25サイクル)の間で、対照に関する増大若しくは減少について、TATAボックス結合タンパク質および2ミクログロブリン(これらのハウスキーピング遺伝子は該薬物により影響されなかった)のバンドと比較した。

20

【0070】

(vi) GeneChip実験：

全細胞mRNAを、Qiagen RNAミニキット、次いでオリゴテックスmRNAミニキットを使用する処理を伴い若しくは伴わずにHeLa細胞から調製した。製造元の推奨に従い、T7-(dT)24プライマーを用いcDNA合成のためのSuperscript Choiceシステム(Invitrogen)を使用して、 $2\text{ }\mu\text{g}$ の全RNAから二本鎖cDNAを合成した。cDNAをフェーズロックゲル(PLG)フェノール/クロロホルム抽出により浄化し、そしてエタノール沈殿により濃縮した。供給元の推奨に従ってBioarray High Yield RNA転写物標識キット(Affymetrix)を使用するin vitro転写により、cDNAからビオチン標識cRNAを合成した。in vitro転写産物はRNeasyスピンカラム(Qiagen)を使用して浄化し、そして断片化緩衝液(40 mM トリス-酢酸、pH 8.1、 100 mM KOAc、 30 mM MgOAc)中で金属誘導加水分解により断片化した。断片化したcRNAをその後、ハイブリダイゼーション緩衝液(100 mM MES、 1 M NaCl、 20 mM EDTA、 0.01% Tween-20)中でAffymetrix GeneChipセットにかけた。GeneChip画像をAffymetrix Microarray Suite V5.0およびAffymetrix Data Mining Tool V3.0で解析した。全プローブ組のシグナル強度を150の標的値に對し概算した(scaled)。Detection Call、Change CallおよびSignal Log Ratioの結果を、絶対および比較双方の解析のための統計学的アルゴリズムにデフォルトのパラメータを適用することにより得た。

30

【0071】

40

(vii) ウエスタンプロッティング。

動物にペントバルビタールナトリウムを過剰投与した(250 mg/kg 、i.p.)。脊髄を解剖し、そして 20 mM トリス-HCl、pH 7.5、 2 mM DTT、 $0.$

50

1 mg のロイベプチニン、1 mM EDTA および 1 mM EGTA 中でホモジナイズした。ホモジエネートをその後 14,000 × g で遠心分離して破片をペレットにした。タンパク質濃度は BCA タンパク質アッセイ (Pierce、イリノイ州ロックフォード) を使用して測定した。各サンプルからのタンパク質 (25 µg) を 4 ~ 20 % ト里斯 - グリシンゲル (Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ) 上で泳動した。転写後、メンブレンを PBS で洗浄し、次いでプロッキング緩衝液 (0.2% I-block (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスター・シティ)、PBS および 0.1% Tween 20) 中で一夜インキュベートした。メンブレンをその後、4000 倍希釈のポリクローナルウサギ抗ウシ SOD1 (Sigma) 抗体でプローピングした。数回洗浄後、メンブレンをアルカリホスファターゼ結合二次抗体 (プロッキング緩衝液中 5000 倍) とインキュベートし、そして増強化学発光試薬 CDP Star (Wester Star キット; Troponix) を使用して免疫反応性シグナルを可視化した。露光後にフィルムを走査し、そしてその後、バンド密度の量について NIH Image にインポートした。

10

【実施例 2】

【0072】

プロゲステロン受容体に対する効果の試験

本実施例は、SOD-1 活性に対するプロゲステロン受容体薬物、例えばノルエチンドロンの *in vitro* 効果を検査する方法を記述する。ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株 (ATCC) を、グルタミン 4 mM、認定ウシ胎児血清 10%、ならびにペニシリソ、ストレプトマイシンおよびナイスタチン (全部 Invitrogen から) を補充した高グルコースを含むダルベッコの最小必須培地中で培養した。インキュベーション条件は 5% の CO₂ を伴う 37 および 99% 相対湿度であった。培養物が 90% コンフルエンスに達した場合にそれらを継代した。薬理学的実験のため、細胞を 150 µl の培地中 3,500 細胞 / ウェルの密度で、無菌組織培養処理済み 96 ウェルプレートに接種した。

20

【0073】

薬物との 72 時間インキュベーション後に細胞を写真撮影し、そして実施例 1 (iii) に記述されるとおり処理した。ライセートの全タンパク質を実施例 1 (iv) に記述されるところのプラッドフォードアッセイにより測定した。この試験の結果を図 1 に示す。これらの結果は、収集 72 時間前に HeLa 細胞の培地に添加したノルエチンドロンが SOD-1 タンパク質のレベルを有意に低下させた一方、全タンパク質レベルは影響されなかつことを示す。この低下は用量に関連しつつ 2 µM の IC₅₀ を伴い 3 µM までに最大であった。

30

【0074】

- シヌクレインは、パーキンソン病 (PD) およびレヴィー小体を伴う痴呆のようなレヴィー小体封入体を特徴とする神経変性障害に関与している。レヴィー小体様封入体は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を伴う患者の脊髄ニューロンでもまた観察され、そして、報告は、ALS 患者における可能な - シヌクレイン異常を示唆している。- シヌクレインはタンパク質シャペロン 14-3-3 に対する有意の物理的および機能的相同性を共有する遍在タンパク質であり、そして脳中でとりわけ豊富である (Ostrolova N. ら、*J. Neurosci.*、19: 5782 (1990))。増大する - シヌクレイン凝集率がレヴィー小体病における神経変性の機構に寄与するとみられる。トランスジェニック動物での研究もまた、- シヌクレインの凝集がニューロンに有害であることを示唆している。野性型ヒト - シヌクレインを発現するトランスジェニックマウスでドーパミン系の機能不全が発生したこと (Masliah, E. ら、*Science*、287: 1265-1269 (2000))、および - シヌクレインを過剰発現するショウジョウバエが、- シヌクレイン凝集物の発生と関連するドーパミン系の機能不全およびドーパミン作動性神経死を表したこと (Feany, M. B. ら、*Nature* 404: 394-8 (2000)) が報告された。証拠は、ドーパミンを含むニューロンが、

40

- シヌクレイン凝集物を発生しつつこれらの凝集物発生の際に変性することを示唆している。

50

いる。

【0075】

図3に示されるGenechip分析の結果は、ピリメタミン(ALG-2001)(3μM)およびノルエチンドロン(ALG-3001)(3μM)が、処置の4日後にHeLa細胞中のシヌクレインのmRNAを実質的に減少させたことを具体的に説明する。従って、本発明の化合物はレビー小体病における神経変性を遅らせ得る。これは、ALSおよびPDの進行の遅延若しくはそれらの影響の改善における本発明の化合物の役割を具体的に説明する。

【実施例3】

【0076】

in vivoでの化合物の効果の試験：SOD-93Aマウスモデル

実施例2に記述された、プロゲステロン受容体調節剤(例えばノルエチンドロン)およびそのアナログの効果を、ALSのSOD-93Aマウスモデルでin vivoで試験し、そしてSOD-1レベルの低下を測定した。RNA発現の阻害は、標準的RT-PCR技術を使用して化合物の誘導前および後のマウスからの単離した血液サンプルによりモニターした。SOD-1タンパク質の発現は、Sigmaからの抗SOD-1抗体を用いるウエスタンプロット技術を使用して測定した。

【0077】

14日間のノルエチンドロン(100mg/kg/日)の慢性投与は、図4に示されるおり、G93A雄性マウスにおいて脊髄SOD-1を有意に($p = 0.000351$ 、 $n = 5$ /群)減少させた。ノルエチンドロンは14日間経口投与した。脊髄を収集し、そして上述されたとおりELISAおよびウエスタンプロットにより分析した。対照群はベヒクル(生理的食塩水)のみを与えた。

【0078】

in vivo効果は、Renais sance Puritan Bennett肺活量計を使用して努力肺活量(FVC)を測定することにより被験体の呼吸をモニターすることによってもまた測定し得る。最大吸気力(maximum inspiratory force)(MIF)もまた、携帯型マノメータを使用して測定し得る。

【実施例4】

【0079】

神経学的評価

プロゲステロン受容体調節剤の効果は、4点尺度で記録した神経学的スコアによってもまた決定し得る。

0 = 後肢での正常反射(動物はその尾で持ち上げる場合にその後肢を広げができる)

1 = 異常反射(動物をその尾で持ち上げる場合の後肢の広げの欠如)

2 = 異常反射および麻痺の目に見える証拠

3 = 後肢の反射の欠如および完全麻痺

4 = 側臥にした場合にそれら自身を30秒で起こすことの不能、若しくは死亡して見出される。動物は生存の場合この段階で殺す。

【0080】

神経学的スコア、体重および生存に関する統計学的解析は、ANOVA、Kaplan Meier、t検定、Coxの比例ハザード回帰モデル対数ロジスティックおよびパラメトリック法、ならびに線形混合モデル法を利用することにより実施し得る。全部の統計学的解析は当該技術分野で既知の標準的手順を使用して実施した。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】ノルエチンドロンによるSOD-1タンパク質発現の減少を示すグラフである。

【図2】プロゲステロンアンタゴニスト、ミフェプリストン(RU-486)でのノルエチンドロンの効果の用量に関連した反転を示す棒グラフである。

10

20

30

40

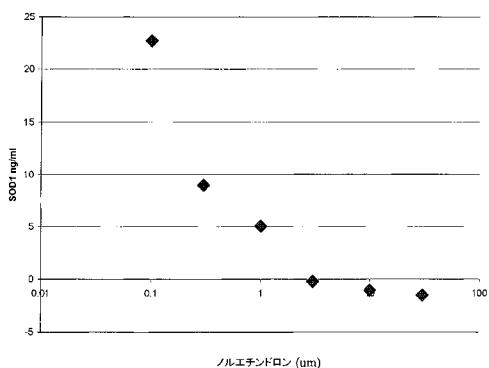
50

【図3】ピリメタミン（ALG-2001）およびノルエチンドロン（ALG-3001）での処理後のHeLa細胞中のシヌクレインのmRNAの低下した発現を示す棒グラフである。

【図4】G93Aマウスでの腹腔内（ip）ノルエチンドロン処置の14日後のマウス脊髄中の減少したSOD-1タンパク質を示す棒グラフである。

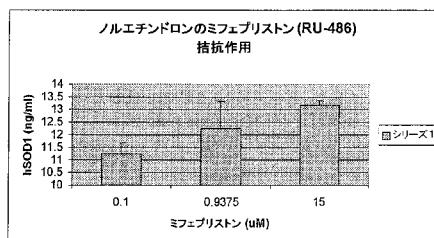
【図1】

FIGURE 1



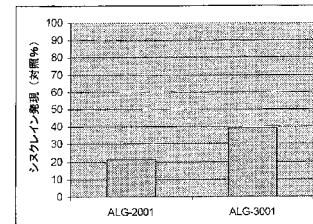
【図2】

FIGURE 2



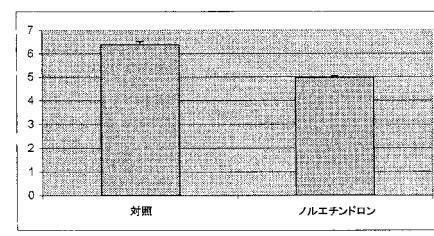
【図3】

FIGURE 3



【図4】

FIGURE 4



【配列表】

2008536808000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2006/007253						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/57 A61P25/28								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="padding: 2px;"> DENISELLE MARIA CLAUDIA GONZALEZ ET AL: "Progesterone treatment reduces NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in Wobbler mouse motoneuron disease" BRAIN RESEARCH, vol. 1014, no. 1-2, 16 July 2004 (2004-07-16), pages 71-79, XP002418010 ISSN: 0006-8993 the whole document -/-/ </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-19</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	<input checked="" type="checkbox"/>	DENISELLE MARIA CLAUDIA GONZALEZ ET AL: "Progesterone treatment reduces NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in Wobbler mouse motoneuron disease" BRAIN RESEARCH, vol. 1014, no. 1-2, 16 July 2004 (2004-07-16), pages 71-79, XP002418010 ISSN: 0006-8993 the whole document -/-/	1-19
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
<input checked="" type="checkbox"/>	DENISELLE MARIA CLAUDIA GONZALEZ ET AL: "Progesterone treatment reduces NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in Wobbler mouse motoneuron disease" BRAIN RESEARCH, vol. 1014, no. 1-2, 16 July 2004 (2004-07-16), pages 71-79, XP002418010 ISSN: 0006-8993 the whole document -/-/	1-19						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.						
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed								
Date of the actual completion of the International search 2 February 2007		Date of mailing of the International search report 23/02/2007						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hars, Jesko						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/007253

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GONZALEZ DENISELLE MARIA CLAUDIA ET AL: "Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease." NEUROBIOLOGY OF DISEASE, vol. 11, no. 3, December 2002 (2002-12), pages 457-468, XP002418011 ISSN: 0969-9961 the whole document	1-19
A	GONZALEZ DENISELLE MARIA CLAUDIA ET AL: "Cellular basis of steroid neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of motoneuron disease" CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY, vol. 21, no. 3, June 2001 (2001-06), pages 237-254, XP009078279 ISSN: 0272-4340 the whole document	1-19
P,X	SAAVEDRA M ET AL: "Progesterone and estradiol prevent the motor deficits induced by seed cycad in rats" BEHAVIORAL PHARMACOLOGY, vol. 16, no. Suppl. 1, September 2005 (2005-09), page S41, XP009078285 & 11TH BIENNIAL MEETING OF THE EUROPEAN-BEHAVIORAL-PHARMACOLOGY-SOCIETY; BARCELONA, SPAIN; SEPTEMBER 09 -12, 2005 ISSN: 0955-8810 the whole document	1-19
E	WO 2006/096405 A (ALSGEN LLC [US]; SCOTT SEAN [US]; BENJAMIN DANIEL [US]) 14 September 2006 (2006-09-14) the whole document	1-19
A	WO 2004/076675 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; ROTHSTEIN JEFFREY D [US]) 10 September 2004 (2004-09-10) the whole document	1-19
A	ROTHSTEIN JEFFREY D ET AL: "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression." NATURE 6 JAN 2005, vol. 433, no. 7021, 6 January 2005 (2005-01-06), pages 73-77, XP002418012 ISSN: 1476-4687 the whole document	1-19
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/007253

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SINGH MEHARVAN: "Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex" ENDOCRINE, vol. 14, no. 3, April 2001 (2001-04), pages 407-415, XP009078289 ISSN: 1355-008X the whole document	1-19
A	OKUNO TATSUSADA ET AL: "Induction of cyclooxygenase-2 in reactive glial cells by the CD40 pathway: relevance to amyotrophic lateral sclerosis" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 91, no. 2, October 2004 (2004-10), pages 404-412, XP002418174 ISSN: 0022-3042 the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/007253

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: — because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: — because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: — because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/007253

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - on paper
 - In electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in electronic form
 - furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/007253

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2006096405	A 14-09-2006	NONE		
WO 2004076675	A2 10-09-2004	AU 2004214938 A1		10-09-2004
		CA 2516619 A1		10-09-2004
		EP 1611238 A2		04-01-2006
		JP 2006524637 T		02-11-2006
		KR 20050115245 A		07-12-2005
		MX PA05009134 A		05-12-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA11 HA12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR55 QR62 QS34 QX04
 4C084 AA17 MA16 MA21 MA23 MA24 MA27 MA31 MA35 MA36 MA37
 MA41 MA44 MA52 MA55 MA66 NA14 ZA202 ZA942 ZC202
 4C086 AA01 AA02 DA10 GA16 MA01 MA04 NA14 ZA20 ZA94 ZC20