

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2005-516988****(P2005-516988A)**

(43) 公表日 平成17年6月9日(2005.6.9)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/06</b>	A 6 1 K 45/06	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 31/4015</b>	A 6 1 K 31/4015	4 C O 8 6
<b>A 6 1 K 31/7076</b>	A 6 1 K 31/7076	4 C O 8 7
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	
<b>A 6 1 K 35/12</b>	A 6 1 K 35/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-565420 (P2003-565420)	(71) 出願人	502228100
(86) (22) 出願日	平成15年2月7日(2003.2.7)		ユニバーシティ オブ マイアミ
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月9日(2004.8.9)		アメリカ合衆国 フロリダ 33136,
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/003513		マイアミ, セウエルビルディング,
(87) 国際公開番号	W02003/065994		エヌ. ダブリュー. 12 ティーエイチ
(87) 国際公開日	平成15年8月14日(2003.8.14)		アベニュー 1475
(31) 優先権主張番号	60/354,306	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成14年2月7日(2002.2.7)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シュヴァン細胞およびホスホジエステラーゼインヒビターに基づく治療

## (57) 【要約】

本明細書において、中枢神経系損傷後に機能を回復するための、ホスホジエステラーゼインヒビターおよび細胞移植と組み合わせた、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物の使用が、開示される。また、動物を、その動物の中枢神経系領域への損傷後に処置する方法が、本明細書において提供される。この方法は、a) サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼインヒビターをその動物に投与する工程；b) サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物をその動物に投与する工程；およびc) その動物の中枢神経系に対してネイティブである神経細胞の機能を提供または模倣する細胞を移植する工程；を包含し、その結果、運動機能および/または感覚機能がその動物において改善される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

動物を、該動物の中樞神経系領域への損傷後に処置する方法であって、該方法は、

a) サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼインヒビターを該動物に投与する工程；

b) サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物を該動物に投与する工程；および

c) 該動物の神経系に対してネイティブである神経細胞の機能を提供または模倣する細胞を移植する工程；

を包含し、その結果、運動機能および/または感覚機能が該動物において改善される、方法。 10

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ホスホジエステラーゼインヒビターが、前記サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物の前に投与される、方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ホスホジエステラーゼインヒビターが、前記サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物と同時に投与される、方法。

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ホスホジエステラーゼインヒビターが、全身投与される、方法。 20

## 【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ホスホジエステラーゼインヒビターが、前記損傷領域中に局所投与される、方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法であって、前記サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物が、前記損傷領域中に局所投与される、方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法であって、前記サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼインヒビターを投与する工程が、ロリプラム、3 - イソブチル - 1 - メチルキサンチン ( I B M X )、2 - ( 2 - プロピルオキシフェニル ) - 8 - アザプリン - 6 - オン ( ザプリナスト )、N - ( 3 , 5 - ジクロルピリド - 4 - イル ) - 3 - シクロペンチル - オキシ - 4 - メトキシ - ベンズアミド ( R P R - 7 3 4 0 1 )、8 - メトキシ - 5 - N - プロピル - 3 - メチル - 1 - エチル - イミダゾ [ 1 , 5 - a ] - ピリド [ 3 , 2 - e ] - ピラジノン ( D - 2 2 8 8 8 )、メチル - 2 - ( 4 - アミノフェニル ) - 1 , 2 - ジヒドロ - 1 - オキソ - 7 - ( 2 - ピリジニルメトキシ ) - 4 - ( 3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル ) - 3 - イソキノリンカルボキシレートスルフェート ( T - 1 0 3 2 )、4 - ( 3 - ブトキシ - 4 - メトキシベンジル ) - 2 - イミダゾリジノン ( R o - 2 0 - 1 7 2 4 )、4 - ( 3 - クロロフェニル ) - 1 , 7 - ジエチルピリド [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 ( 1 H ) - オン ( Y M 9 7 6 )、N - シクロヘキシル ' N - メチル - 4 - ( 1 , 2 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 6 - キノリルオキシ ) プチルアミド ( シロスタミド )、ジピリダモール、ミルリノン、アムリノン、オルプリノン、ペントキシフィリン、テオフィリン、シロスタゾール、シルデナフィル、およびニメスリドからなる群より選択される 1 つ以上の化合物を投与する工程を包含する、方法。 30 40

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の方法であって、前記サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼインヒビターを投与する工程が、サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼの m R N A と相補的でありかつ該 m R N A のプロセッシングを妨げるように設計された、アンチセンス配列またはアンチセンスベクターを投与する工程を包含する、方法。 50

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載の方法であって、前記サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼインヒビターを投与する工程が、ロリプラムを投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、前記ロリプラムの投与量が、1 日当たり 0.5 mg/kg と 200 mg/kg との間である、方法。

## 【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法であって、前記サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物を投与する工程が、db-cAMP、8-プロモ-アデノシン 3', 5'-モノホスフェート(8-Br-cAMP)、8-(4-クロロフェニルチオ)-cAMP、8-クロロ-アデノシン 3', 5'-モノホスフェート(8-Cl-cAMP)、ジオクタノイル-cAMP、Sp-cAMPS、Sp-8-プロモ-cAMPS、8-br-cGMP、ジブチリル-cGMP および 8-(4-クロロフェニルチオ)-cGMP からなる群より選択される 1 つ以上の化合物を投与する工程を包含する、方法。

10

## 【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法であって、前記サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物を投与する工程が、db-cAMP を投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、前記 db-cAMP の投与量が、1 日当たり 1 mg と 1000 mg との間である、方法。

20

## 【請求項 14】

請求項 1 に記載の方法であって、前記細胞を移植する工程が、シュヴァン細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経始原細胞、ニューロスフェア細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、神経膠制限前駆細胞、胚性幹細胞、骨髄間質細胞、および嗅神経被覆グリア細胞からなる群より選択される 1 つ以上の細胞型を移植する工程を包含する、方法。

## 【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法であって、前記細胞を移植する工程が、シュヴァン細胞を移植する工程を包含する、方法。

## 【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法であって、前記細胞を移植する工程が、シュヴァン細胞を注射する工程を包含する、方法。

30

## 【請求項 17】

請求項 15 に記載の方法であって、前記細胞を移植する工程が、シュヴァン細胞間架橋を移植する工程を包含する、方法。

## 【請求項 18】

請求項 1 に記載の方法であって、前記細胞を移植する工程が、自己移植片を移植する工程を包含する、方法。

## 【請求項 19】

請求項 1 に記載の方法であって、前記細胞を移植する工程が、同種異系移植片を移植する工程を包含する、方法。

40

## 【請求項 20】

請求項 1 に記載の方法であって、前記細胞を移植する工程が、同種移植片を移植する工程を包含する、方法。

## 【請求項 21】

請求項 1 に記載の方法であって、前記細胞を移植する工程が、異種移植片を移植する工程を包含する、方法。

## 【請求項 22】

請求項 1 に記載の方法であって、前記動物が哺乳動物である、方法。

## 【請求項 23】

50

請求項 2 2 に記載の方法であって、前記哺乳動物がヒトである、方法。

【請求項 2 4】

動物を、該動物の中樞神経系領域への損傷後に処置する方法であって、該方法は、

a) 中樞神経系損傷部位にシュヴァン細胞を移植する工程；

b) ロリプラムを該動物に投与する工程；および

c) ロリプラムを投与する工程の間に、該損傷領域にジブチリル - c A M P を投与する工程

を包含する、方法。

【請求項 2 5】

薬学的組成物であって、有効量のホスホジエステラーゼインヒビターと、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる化合物と、を含む、組成物。 10

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の組成物であって、神経機能を有する有効量の細胞をさらに含む、組成物。

【請求項 2 7】

中樞神経系損傷後に機能を回復するための、ホスホジエステラーゼインヒビターおよび細胞移植物と組み合わせた、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物の使用。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の使用であって、前記組成物が、d b - c A M P、8 - ブロモ - アデノシン 3' , 5' - モノホスフェート ( 8 - B r - c A M P )、8 - ( 4 - クロロフェニルチオ ) - c A M P、8 - クロロ - アデノシン 3' , 5' モノホスフェート ( 8 - C l - c A M P )、ジオクタノイル - c A M P、S p - c A M P S、S p - 8 - ブロモ - c A M P S、8 - b r - c G M P、ジブチリル - c G M P、および 8 - ( 4 - クロロフェニルチオ ) - c G M P からなる群より選択される化合物を含む、使用。 20

【請求項 2 9】

請求項 2 7 または請求項 2 8 に記載の使用であって、前記ホスホジエステラーゼインヒビターが、ロリプラム、3 - イソブチル - 1 - メチルキサンチン ( I B M X )、2 - ( 2 - プロピルオキシフェニル ) - 8 - アザプリン - 6 - オン ( ザプリナスト )、N - ( 3 , 5 - ジクロロピリド - 4 - イル ) - 3 - シクロペンチル - オキシ - 4 - メトキシ - ベンズアミド ( R P R - 7 3 4 0 1 )、8 - メトキシ - 5 - N - プロピル - 3 - メチル - 1 - エチル - イミダゾ [ 1 , 5 - a ] - ピリド [ 3 , 2 - e ] - ピラジノン ( D - 2 2 8 8 8 )、メチル - 2 - ( 4 - アミノフェニル ) - 1 , 2 - ジヒドロ - 1 - オキソ - 7 - ( 2 - ピリジニルメトキシ ) - 4 - ( 3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル ) - 3 - イソキノリンカルボキシレートスルフェート ( T - 1 0 3 2 )、4 - ( 3 - ブトキシ - 4 - メトキシベンジル ) - 2 - イミダゾリジノン ( R o - 2 0 - 1 7 2 4 )、4 - ( 3 - クロロフェニル ) - 1 , 7 - ジエチルピリド [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 ( 1 H ) - オン ( Y M 9 7 6 )、N - シクロヘキシル' N - メチル - 4 - ( 1 , 2 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 6 - キノリルオキシ ) ブチルアミド ( シロスタミド )、ジピリダモール、ミルリノン、アムリノン、オルプリノン、ペントキシフィリン、テオフィリン、シロスタゾール、シルデナフィル、およびニメスリドからなる群より選択される、使用。 30 40

【請求項 3 0】

請求項 2 7 または請求項 2 8 に記載の使用であって、前記ホスホジエステラーゼインヒビターが、サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼの m R N A と相補的であるように設計されたアンチセンス配列またはベクターであり、かつ該ホスホジエステラーゼインヒビターは、該 m R N A のプロセッシングを妨げる、使用。

【請求項 3 1】

請求項 2 7 ~ 2 9 のうちの 1 項に記載の使用であって、前記細胞移植物が、シュヴァン細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経始原細胞、ニューロスフェア細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、神経膠制限前駆細胞、胚性幹細胞、骨髄間質細胞、または嗅神経被覆グリア細胞 50

胞を含む、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、N I H助成金番号N I N D S 0 9 9 2 3およびP O I N S 3 8 6 6 5からの基金を部分的に用いて開発された。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0002】

(発明の背景)

(1. 技術分野)

本発明は、中枢神経系(C N S)損傷後に機能を回復するための、ホスホジエステラーゼインヒビターおよび細胞移植物と組み合わせた、サイクリックヌクレオチドシクラーゼおよびそのアクチベーターの使用に関する。 10

【背景技術】

【0003】

(2. 背景情報)

損傷または罹患している成体哺乳動物中枢神経系(C N S)における軸索再生の欠如は、永続的な機能損傷をもたらす。例えば、脊髄損傷単独が、米国において250,000人より多くにおいて発症している。末梢神経系(P N S)における損傷した軸索は首尾良く再成長して、脱神経標的との接触を再確立するが、C N Sにおける軸索再生は失敗し、永続的機能喪失をもたらす。C N S軸索の再生失敗は、失われた組織もしくは損傷組織の損傷部位もしくは損傷領域を取り囲む神経膠環境の非永続的性質に部分的に関連付けられている。 20

【0004】

シュヴァン細胞(S C)は、末梢神経系(Rodriguezら、2000)および中枢神経系の両方において、損傷および疾患の両方の後の脊髄(Xuら、1997)および脳(Brookら、2001; Collierら、1999)の両方において、再生を促進することが示されている。S C播種したガイダンスチャネルが、動物モデルにおいて離断した脊髄または神経中に移植された場合に、軸索再生が増強される。このことは、この技術または類似する技術は、さらに発展され洗練された場合に、機能を改善または回復し得ることを示す。1つの有望な研究領域は、栄養因子(trophic factor)および軸索成長を直接刺激するように細胞レベルで作用し得る他の因子または損傷部位に存在し得る阻害物質を妨げるように細胞レベルで作用し得る他の因子の添加であった。しかし、ここ数十年にわたる集中的研究にも関わらず、C N S損傷についての有効な処置は、つかみどころがないままである。従って、C N S損傷および関連する機能的損傷についての、新規な有効な処置の切実な必要性が存在するままである。 30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(要旨)

本発明は、損傷C N S中に配置した細胞移植物中への、およびその細胞移植物中からの、再生軸索の成長を促進する新規な治療ストラテジーを提供する。サイクリックヌクレオチドシクラーゼ(例えば、c A M P、c G M P、ジブチリル-c A M P)の細胞内レベルを上昇する組成物が、ホスホジエステラーゼインヒビター(例えば、ロリプラム)とともに動物(その動物の中枢神経系に対してネイティブである神経細胞の機能を提供または模倣する細胞が移植された動物)に投与された場合に、機能(一貫した足踏み、一貫した協調、および正確な足配置、ならびに非損傷動物と同様の様式で精密な運動作業を実施する能力)の顕著な改善が観察されることが、予期せず発見された。このような改善は、細胞移植物単独を、サイクリックヌクレオチドシクラーゼ上昇化合物とともに受けた動物においては観察されない。 40

【0006】

従って、本発明は、中枢神経系損傷後に動物に対して、運動機能および/または感覚機能を回復する方法を提供する。本明細書中に記載される方法において、動物の中枢神経系に対してネイティブである神経細胞の機能を提供または模倣する細胞を、中枢神経系損傷部位に移植し、サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼインヒビターと、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物との両方をその動物に投与する。この移植される細胞は、自己由来であっても、異種 (heterologously) 由来であっても、外因性 (xenologously) 由来であってもよい。

#### 【0007】

ホスホジエステラーゼ (PD) インヒビター (例えば、ロリプラム) は、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物の前にか、またはその組成物と同時に投与され得、好ましくは、機能のさらなる獲得の可能性がないと当業者により見なされるまで、連続的に送達される。このPDインヒビターは、全身にか、または損傷領域に、投与され得る。多くの場合、PDインヒビターを、損傷領域に、例えば、ミニポンプを使用して、局所投与して、その結果、より高濃度のそのインヒビターが損傷領域に送達されつつその動物に対するすべての全身副作用を最小にし得ることが、好ましい。好ましい実施形態において、そのPDインヒビターは、1日当たり0.5mg/kgと200mg/kgとの間の投与量で投与されたロリプラムである。個体環境について有効なロリプラム投与量または他のホスホジエステラーゼインヒビター投与量は、過度の実験を伴わずに、当業者によって決定され得る。

10

#### 【0008】

サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物は、サイクリックヌクレオチドシクラーゼアクチベーターまたは安定形態のcAMPもしくはcGMPのいずれかを包含し得る。サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物は、好ましくは、軸索通過がその損傷により影響される損傷領域または損傷ニューロンへと投与される。この組成物は、好ましくは、1回の投与当たり1mgと1000mgとの間の投与量で投与される、ジブチリル-cAMPを包含する。個体環境についての有効なdb-cAMP投与量または他のサイクリックヌクレオチドアクチベーター投与量は、過度の実験を伴わずに、当業者によって決定され得る。

20

#### 【0009】

動物の神経系に対してネイティブな神経細胞の機能を提供または模倣する細胞 (例えば、シュヴァン細胞) もまた、完全な離断ギャップ中への注射または移植のいずれかによって、損傷領域中に導入される。注射または移植されるべき細胞は、自己移植片 (autograft)、同種移植片 (homograft)、同種異系移植片 (allograft)、または異種移植片 (xenograft) であり得る。好ましくは、その細胞は、自己由来である。

30

#### 【0010】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、ヒトにおいて使用される。しかし、この方法は、一般的には、哺乳動物に適切であると考えられる。この方法は、ヒトと類似する中枢神経系の生化学的特徴/生理的特徴/解剖学的特徴、および特色を有する、非哺乳動物種のために有用であるはずである。

40

#### 【0011】

本発明はまた、ホスホジエステラーゼインヒビターと、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる化合物 (例えば、ロリプラムおよびdb-cAMP) とを含む、薬学的組成物、ならびにホスホジエステラーゼインヒビターと、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる化合物と、神経機能を有する細胞とを含む、組成物を包含する。

#### 【0012】

(発明の詳細な説明)

1つの局面において、本発明は、動物を、その動物の中枢神経系領域への損傷後に処置する方法を提供し、この方法は、

50

a) サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼインヒビターをその動物に投与する工程；

b) サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物をその動物に投与する工程；および

c) その動物の神経系に対してネイティブである神経細胞の機能を提供または模倣する細胞を移植する工程；

を包含し、その結果、運動機能および/または感覚機能がその動物において改善または回復される。

#### 【0013】

「機能の改善または回復」によって、BBB試験または当該分野で受容されている他の測定によって測定された場合に、運動機能または感覚機能の統計学的に有意な改善が意味される。他の試験（例えば、グリッドウォーキング（grid walking）分析およびフットプリント（foot print）分析）が存在するが、その容易さおよび実行に起因して、BBB試験が、後肢歩行運動の評価の最も一般的な様式となっている。しかし、本明細書中に記載される方法は、中枢神経系における他の多くの状況に適用可能であり、その中枢神経系において、神経線維の再成長が、失われた機能を改善するために役立ち、多数の試験が、これらの関係する機能的欠損の範囲を分析するために存在する。

#### 【0014】

サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇させる組成物は、サイクリックヌクレオチドシクラーゼアクチベーター、または細胞中に取り込まれ得る安定形態のcAMPもしくはcGMP、またはホスホジエステラーゼ抵抗性形態のサイクリックヌクレオチドシクラーゼ、またはサイクリックヌクレオチドシクラーゼ依存性プロテインキナーゼのホスホジエステラーゼ抵抗性アクチベーター（例えば、Genieserら、1992に記載されるような、1-D-リボフラノシルベンズイミダゾール3',5'-ホスフェート[cBIMP]のアナログ）のいずれかを包含し得る。本発明における使用のための適切なサイクリックヌクレオチドシクラーゼアクチベーターは、cAMPおよび/もしくはcGMPの細胞内レベルを上昇し得る任意の薬剤、例えば、ホルスコリン（forskolin）、7-デアセチル-7-[（モルホリノ）ブチリル]-ホルスコリンおよび6-[（ピペリジノ）-プロピオニル]-ホルスコリンを包含することが意図される。安定形態のcAMPおよび/またはcGMPとしては、ジブチリル-cAMP、8-プロモ-アデノシン3',5'-モノホスフェート（8-Br-cAMP）、8-(4-クロロフェニルチオ)-cAMP、8-クロロ-アデノシン3',5'-モノホスフェート（8-Cl-cAMP）、ジオクタノイル-cAMP、Sp-cAMP、Sp-8-プロモ-cAMP、8-br-cGMP、ジブチリル-cGMPおよび8-(4-クロロフェニルチオ)-cGMPが挙げられる。新規なアクチベーターは、当該分野で公知のスクリーニング技術を使用して、予測される化合物がアデニル酸シクラーゼまたはグアニル酸シクラーゼのいずれかを活性化する能力についてスクリーニングするインビトロアッセイを使用することによって、設計され得る。

#### 【0015】

適切なホスホジエステラーゼインヒビターは、当業者によって受容不能であると考えられる有害な作用を引き起こすことなく、哺乳動物に全身投与または局所投与され得る任意のサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼインヒビターを包含することが、意図される。そのような有害ないかなる影響も、本発明の処置の利益（すなわち、麻痺または脊髄に対する神経損傷の他の結果の後の、運動機能の改善または回復）に対して釣り合っていないなければならないことが、認識される。適切なホスホジエステラーゼインヒビターとしては、特に、4-(3-シクロペンチルオキシ-4-メトキシフェニル)-2-ピロリドン（ロリプラム）、3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）、2-(2-プロピルオキシフェニル)-8-アザプリン-6-オン（ザプリナスト（zaprinast））、N-(3,5-ジクロルピリド-4-イル)-3-シクロペンチル-オキシ-4-メトキシ-ベンズアミド（RPR-73401）、8-メトキシ-5-N-プロピル

10

20

30

40

50

- 3 - メチル - 1 - エチル - イミダゾ [ 1 , 5 - a ] - ピリド [ 3 , 2 - e ] - ピラジノ  
ン ( D - 2 2 8 8 8 ) 、 メチル - 2 - ( 4 - アミノフェニル ) - 1 , 2 - ジヒドロ - 1 -  
オキソ - 7 - ( 2 - ピリジニルメトキシ ) - 4 - ( 3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル )  
- 3 - イソキノリンカルボキシレートスルフェート ( T - 1 0 3 2 ) 、 4 - ( 3 - ブトキ  
シ - 4 - メトキシベンジル ) - 2 - イミダゾリジノン ( R o - 2 0 - 1 7 2 4 ) 、 4 - ( 3 - クロロフェニル ) - 1 , 7 - ジエチルピリド [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 ( 1 H )  
- オン ( Y M 9 7 6 ) 、 N - シクロヘキシル ' N - メチル - 4 - ( 1 , 2 - ジヒドロ - 2  
- オキソ - 6 - キノリルオキシ ) プチルアミド ( シロスタミド ( c i l o s t a m i d e ) ) 、 ジピリダモール ( d i p y r i d a m o l e ) 、 ミルリノン ( m i l l r i n o n e ) 、 アムリノン ( a m r i n o n e ) 、 オルプリノン ( o l p r i n o n e ) 、 ペントキ  
シフィリン ( p e n t o x i f y l l i n e ) 、 テオフィリン、シロスタゾール ( c i l o s t a z o l ) 、 シルデナフィル、およびニメスリド ( n i m e s u l i d e ) 、 なら  
びにサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼの m R N A と相補的でありかつその  
m R N A のプロセッシングを妨げるように設計された、アンチセンス配列またはアンチセン  
スベクターが挙げられる。新規な因子が、c A M P ホスホジエステラーゼまたは c G M P  
ホスホジエステラーゼのいずれかを阻害する能力について予期される化合物をスクリー  
ニングするためのインビトロアッセイを使用することによって、設計され得る。当業者は、  
適切なアンチセンスベクターを得る手段に精通している ( 例えば、M a u t i n o および  
M o r g a n , 2 0 0 2 ; P a c h o r i ら、2 0 0 2 ) 。

10

20

30

#### 【 0 0 1 6 】

適切な移植細胞は、C N S 損傷部位に投与されて、当業者により受容されないと考えら  
れる有害な影響を引き起こさずに哺乳動物内の失われた組織を置換し得る、神経系に対し  
てネイティブである細胞型の機能を提供もしくは模倣する、自己由来 ( a u t o l o g o  
u s l y ) 、または異種由来 ( h e t e r o l o g o u s l y ) または外因性由来 ( x e  
n o l g o u s l y ) の任意の細胞型を包含することが、意図される。そのようないかな  
る有害な影響も、この処置の利益 ( すなわち、麻痺または C N S に対する神経損傷の他の  
結果の後の、運動機能の改善または回復 ) に対して釣り合わなければならないことが、認  
識される。本明細書中で記載される方法における使用のために適切な細胞型としては、シ  
ュヴァン細胞、神経幹細胞、神経前駆 ( p r e c u r s o r ) 細胞、神経始原 ( p r o g  
e n i t o r ) 細胞、ニューロスフェア ( n e u r o s p h e r e ) 細胞、間葉幹細胞、  
造血幹細胞、神経膠限定 ( r e s t r i c t e d ) 前駆細胞、胚性幹細胞、骨髓間質細胞  
、および嗅神経被覆グリア ( o l f a c t o r y e n s h e a t h i n g g l i a )  
細胞が挙げられる。神経系に対して内因性である細胞の機能を模倣し得る新規な細胞型は  
、すべての体組織由来の幹細胞または幹細胞株のインビトロ分析を介して発見され得、そ  
して移植のために使用され得る。

#### 【 0 0 1 7 】

脊髄損傷は、脊髄の離断もしくは挫傷、または機能 ( 特に、運動機能 ) の測定可能な喪  
失を生じる他の任意の脊髄に対する機械的損傷を包含することが、意図される。脳損傷は  
、ニューロンおよび / もしくは軸索に対する損傷を生じ、そして機能の測定可能な喪失を  
生じる、脳に対する任意の機械的外傷または有害な生理的事象を包含することが、意図さ  
れる。中枢神経系 ( C N S ) 疾患は、ニューロンおよび / もしくは軸索の喪失もしくは破  
壊と、付随する測定可能な機能喪失を生じた、C N S の任意の異常な状態を包含するこ  
とが意図される。

40

#### 【 0 0 1 8 】

P D インヒビターおよびサイクリックヌクレオチドシクラーゼが影響を与える組成物は  
、全身投与され得るか、または損傷領域中に局所的に適用され得る。これは、挫傷もしく  
は離断もしくは細胞喪失もしくは軸索破壊の位置の 2 ~ 3 c m 以内を通常は意味するが、  
軸索輸送が不十分であるいくつかの場合には、その損傷部位からより大きな距離が必要で  
あり得る。この投与手順は、軸索成長を生じる再生プログラムの取り込みおよび活性化を  
容易にするために、損傷ニューロンの細胞体付近にその化合物を投与することを包含する

50



。治療ストラテジーを開発する目的の1つは、損傷後の可能な限りすぐに、損傷したヒトに容易にそれが投与されることである。これは、治療剤を投与すること（例えば、単純な皮下注射）が非常に容易な作業であるべきことを意味する。ロリプラムの利点は、これが、この様式で注射されうることである。しかし、CNSへの化合物の送達を促進するための多数の技術が、利用可能である。これらとしては、直接注射、または浸透圧ミニポンプにおける注入、移植した生体物質（例えば、コラーゲン、線維として、棒状態として、またはミクロスフェアとして）の内または表面に含めること、錠剤もしくはマイクロカプセルによって、または遺伝子形質転換した移植細胞においてアンチセンスベクターとしてかまたはサイクリックヌクレオチドシクラーゼのアクチベーターである遺伝子の形態で発現されることが、挙げられるがこれらに限定されない。

10

#### 【0019】

移植細胞は、下記に詳説されるように、注射または細胞間架橋の移植のいずれかによって、損傷に局所投与される。移植細胞は、脊髄の離断部位、挫傷部位、もしくは細胞喪失部位、または損傷脳もしくは罹患脳における創傷部位もしくは細胞喪失部位もしくは軸索損傷部位に位置する。この細胞は、好ましくは、移植片を受ける個体と遺伝的に類似するが、同種の別個体由来の細胞、またはいくつかの場合は、異なる種由来の細胞が、受容可能であり得る。移植のためにシュヴァン細胞を使用する利点の1つは、それが、移植を受けるヒトから調製され得ることである。すなわち、この細胞は、自己移植され得る。損傷したヒトから取り出した末梢神経片から、少数の細胞を2～3週間以内に多数の細胞へと増殖させる技術が、現在利用可能であり、これは、直径0.5インチの移植片の調製そしておそらく、直径1メートル長程度の大きさまでを可能にする。シュヴァン細胞を培養中で増殖させる間に、その細胞はまた、神経線維再成長を促進することが公知である特定の成長因子をより多量に生じるように遺伝子操作され得る（例えば、Blitsら、1999、Blitsら、2000を参照のこと）。数百万個のシュヴァン細胞が、非常に小容量（例えば、0.4  $\mu$ l）で、シリンジによって、哺乳動物脊髄中に注射され得る。多数のヒトシュヴァン細胞、およびラットシュヴァン細胞を生成するための技術を現在利用可能であることが、特に留意されるべきである。他の動物からのこのような細胞の生成は、慣用的であることが予期される。

20

#### 【0020】

ホスホジエステラーゼインヒビターは、好ましくは、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇する組成物および細胞移植の前に投与されるが、この組成物および細胞移植と同時に投与され得る。ホスホジエステラーゼインヒビターの投与は、サイクリックヌクレオチドシクラーゼの細胞内レベルを上昇する組成物の投与および細胞移植の間ならびにその後に、維持されなければならない。ホスホジエステラーゼインヒビターは、浸透圧ミニポンプ（例えば、DURECT Corporation、CuPERTINO, CAにより製造された浸透圧ミニポンプ）の使用によって、反復的全身注射によって、生体物質（個体内に移植され、この生体物質において、薬剤が、例えば、コラーゲン内に、線維として、棒状態として、またはミクロスフェアとして、包埋されているかまたはその上にコートされている）によって、または経口投与により反復投与されるべき錠剤またはマイクロカプセル中の処方物によって、長期間（例えば、数時間、数日間、数週間、またはより長期）にわたって連続的に投与され得る。ホスホジエステラーゼインヒビターはまた、ホスホジエステラーゼアンチセンスベクターの形態でか、または上記方法により投与され得るサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼのmRNAと相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドとして、形質転換移植細胞内に含まれ得る。

30

40

#### 【0021】

ホスホジエステラーゼインヒビターおよびサイクリックヌクレオチドシクラーゼアクチベーターまたは安定形態のcAMPもしくはcGMPの投与量は、当業者によって経験的に決定され得、そしてそれは、その特定のホスホジエステラーゼインヒビターおよびサイクリックヌクレオチドシクラーゼアクチベーターまたは安定形態のcAMPもしくはcGMP、その処方、投与経路、個体、損傷の型および重篤度、ならびにその症例の他の状況

50

などに依存する。一般に、 $1\text{ mg} \sim 1,000\text{ mg}$ のdb-cAMPもしくは別のサイクリックヌクレオチドシクラーゼアクチベーターまたは安定形態のcAMPもしくはcGMPが、細胞移植時またはその後に、創傷部位に送達される；ロリプラムまたは別のホスホジエステラーゼインヒビターが、細胞移植前、創傷後可能な限りすぐに、1日当たり $0.5\text{ mg/kg}$ と $200\text{ mg/kg}$ との間の速度で、サイクリックヌクレオチドシクラーゼアクチベーターまたは安定形態のcAMPもしくはcGMPの投与および細胞移植の時間と、さらなる機能獲得の可能性がないと当業者により見なされるまでのその後の回復の間の時間を含む期間の間、連続投与される。

#### 【0022】

本明細書中に記載される方法は、損傷の直後に処置が始まる場合に、最も良く機能することが、考えられる。損傷後のどの時間についても利益が予期され得るが、最大の機能回復は、迅速な介入の場合に予期される。

#### 【実施例】

#### 【0023】

##### (実施例1)

シュヴァン細胞を、(Morrissey, KleitmanおよびBunge (1991))により記載される方法に従って)成体ラット坐骨神経から培養して精製した。移植に使用したシュヴァン細胞の純度は、95%と98%の間であった。

#### 【0024】

シュヴァン細胞間架橋のために、細胞を、Xuら(1997)により記載されるように、マトリゲル/DMEM(30:70)中に懸濁し、 $120 \times 10^6$ 細胞/mlの密度で3~8mm長ポリマーガイダンスチャンネルへと引き込んだ。成体ラット(Fischerラット、Charles River Laboratories, 3~5ヶ月齢)への移植の間、離断脊髄の各断端を、このチャンネル中に1mm挿入した。時々、シュヴァン細胞ケーブルを、ガイダンスチャンネルなしで移植する。チャンネルを伴うかまたは伴わないいずれかの方法は、この手順を多数回実施し、その結果これを達成するために十分な経験を獲得した人物によって、容易に達成される。

#### 【0025】

成体ラットの脊髄を、T8索レベルの手術によって完全に離断し、その次の尾側セグメントを取り除いた。離断の時に、シュヴァン細胞間架橋を、損傷部位に移植し、50mM db-cAMPを、損傷の近位断端および遠位断端中に注射( $0.2\text{ }\mu\text{l}$ )または注入( $5\text{ }\mu\text{l}$ )し、ロリプラムを、 $0.07\text{ }\mu\text{mol/kg}$ /時間で2週間かけてミニポンプを介して皮下送達した。1つのコントロール群は、シュヴァン細胞間架橋を生理食塩水注入( $5\text{ }\mu\text{l}$ )もしくは生理食塩水注射( $0.2\text{ }\mu\text{l}$ )とともに、創傷の近位断端および遠位断端に受け、生理食塩水(等容量)もまた、ミニポンプにより送達された。他のコントロール群は、損傷の近位断端および遠位断端中に注入された $5\text{ }\mu\text{l}$ の1mM、5mMもしくは10mMのdb-cAMPを受けたか、損傷の近位断端および遠位断端中に注射された $0.2\text{ }\mu\text{l}$ の1mM、25mMもしくは50mMのdb-cAMPを受け、生理食塩水をミニポンプにより送達された。動物を、後肢歩行運動(運動回復の尺度)について、BBB試験を使用して週ベースで評価した。図1に示される結果は、シュヴァン細胞移植と、db-cAMPおよびロリプラムの注射との組み合わせが、胸郭索セグメント8で完全に脊髄離断されたラットにおいて、重量支持なくして足底配置を容易にすることを示す。これは、db-cAMP単独もしくはシュヴァン細胞移植単独または未処理動物を用いては観察されない。

#### 【0026】

図2は、シュヴァン細胞移植、注入されたdb-cAMPおよびロリプラムの組み合わせが、胸郭索セグメント8で完全に脊髄離断されたラットにおいて、重量支持なくして足底配置を容易にすることを示す。これは、db-cAMP単独もしくはシュヴァン細胞移植単独または未処理動物を用いては観察されない。

#### 【0027】

10

20

30

40

50

## (実施例2)

成体ラット (Fischer ラット、Charles River Laboratories, 3~5ヶ月齢) を、Gruner (1992) に記載される NYU 重量落下デバイス (NYU インパクト) を用いて、脊髄の胸郭レベルにおいて損傷させ、ロリプラム ( $0.07 \mu\text{mol/kg}$  / 時間) を2週間投与した。損傷の1日後または1週間後に、 $2 \times 10^6$  個のシュヴァン細胞を、損傷部位に注射し、そして db - cAMP ( $1 \text{ mM}$  もしくは  $50 \text{ mM} \times 0.2 \mu\text{L}$ ) を、損傷部位のすぐ上およびすぐ下に、中線のいずれかの側に注射した。動物を、BBB 試験 (Basso らに記載される) を使用して毎週試験した。微細移動性能についてのグリッドウォーク試験および平坦な表面上での条件移動後のフットプリント分析もまた、機能回復を試験するために使用した (Basso らに記載される)。図3~図7に示されるように、db - cAMP またはシュヴァン細胞のみを受けた動物と比較して、脊髄中へのシュヴァン細胞および db - cAMP の注射ならびにロリプラムの両方を受けた動物において、後肢移動 (一貫した足踏み、一貫した協調、および正確な足配置、ならびに非損傷動物と同程度に精密な運動作業を実施する能力) における顕著な改善が観察された。図3は、シュヴァン細胞移植、注射した db - cAMP およびロリプラムの組み合わせが、胸郭索セグメント8における中程度の挫傷損傷を有するラットにおいて、一貫した足踏み、一貫した協調、および正確な足配置 (db - cAMP 単独もしくはシュヴァン細胞移植単独、または未処理動物を用いては観察されない改善) を促進することを示す。

## 【0028】

図4は、種々の処理を受けた損傷ラットが、動物が通る不規則な間隔の10本の棒 ( $0.5 \text{ cm} \sim 4.5 \text{ cm}$  隔てられている) からなる1mグリッドウォーク装置において微細な運動技術を実施する能力を示す。動物がなした足踏みエラーの数を記録する (最大20、各棒の間の間隔当たり1本の肢当たり1)。より高いスコアは、その作業を実施する能力が低いことを示す。結果は、シュヴァン細胞移植と、注射した db - cAMP とロリプラムとの組み合わせが、胸郭索セグメント8での中程度の挫傷損傷を有するラットにおいて、微細運動作業を実施する能力を、非損傷動物とほぼ同じ程度まで回復することを示す。db - cAMP 単独またはシュヴァン細胞移植単独を有する動物は、この作業において多くのエラーを示した。

## 【0029】

図5、図6、および図7は、前肢および後肢の両方に (異なる色で) インクを付け、そのラットに、囲まれた平坦な道の上を1m歩かせ、その後、そのフットプリントを分析することによって試験した、種々の処理を受けた損傷ラットの歩行運動パターンを示す。連続する8つのステップからの記録したパラメーターは、動物のストライド幅 (その動物各々の側の連続する2つのプリントの中央パッド間で測定した)、支持面と接する部分 (base of support) (後肢の中央パッド間の距離を測定することにより測定した)、および後肢外側回転を包含した。正常な動物は、 $10 \text{ cm}$  と  $14 \text{ cm}$  との間のストライド幅を示す。これは、損傷の重篤度に従って、SCI 後に減少すると考えられる。支持面と接する部分 (base of support) は、動物の体幹安定性を示す。損傷動物は、倒れるのを回避することを支持する表面積を増加するために、大きな支持面と接する部分 (base of support) を有する。外側足回転は、一般的に、SCI 後に生じる。より大きな足回転角度が、損傷の重篤度に従って観察される。この図は、非損傷ラットの能力を示し、1) 重量落下 (NYU インパクト、 $12.5 \text{ mm}$  高) による中程度の挫傷損傷を受け、かつ1週間後に、生理食塩水注射とともに損傷部位に注射された  $2 \times 10^6$  個のシュヴァン細胞 (4つの注射部位、損傷部位に対して  $2 \sim 3 \text{ mm}$  吻側、損傷部位に対して  $2 \sim 3 \text{ mm}$  尾側、ならびに中線のいずれかの側) を受けた、コントロールラットと、2) 挫傷1週間後に  $1 \text{ mM}$  cAMP とともにシュヴァン細胞 (4つの注射部位、損傷部位に対して  $2 \sim 3 \text{ mm}$  吻側、損傷部位に対して  $2 \sim 3 \text{ mm}$  尾側、ならびに中線のいずれかの側) を受けたラットと、または3) 挫傷の1週間後に、 $50 \text{ mM}$  cAMP とともにシュヴァン細胞を受けたラットと、4) 挫傷の1日後に、 $50 \text{ mM}$  c

A M Pとともにシュヴァン細胞を受けたラットと、5)3と同様であるが損傷後の30分以内に開始してミニボンブによりロリプラム ( $0.07 \mu\text{mol/kg}$  / 時間を損傷後2週間) 受け、そして1週間後に、50 mM c A M Pとともにシュヴァン細胞を受けたラットとを、比較する。

【0030】

図5、図6、および図7は、シュヴァン細胞移植、注射したdb-c A M Pおよびロリプラムの組み合わせが、胸郭索セグメント8における中程度の挫傷損傷(重量落下、12.5、NYUデバイス)を有するラットにおいて、体幹不安定性を回復し、そして条件付け歩行運動の間に外側足回転を減少することを示す。db-c A M P単独有する動物も、シュヴァン細胞移植単独を有する動物も、同等の回復レベルを示さなかった。

10

【0031】

引用される参考文献は、簡便のために下記に列挙され、本明細書中に参考として援用される。

【0032】

(参考文献)

【0033】

【表1】

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats, J Neurotrauma 12: 1-21.

20

Blits B, Dijkhuizen PA, Carlstedt TP, Poldervaart H, Schiemanck S, Boer GJ,

Verhaagen J (1999) Adenoviral vector-mediated expression of a foreign gene in peripheral nerve tissue bridges implanted in the injured peripheral and central nervous system *Exp Neurol* 160:256-67.

Blits B, Dijkhuizen PA, Boer GJ, Verhaagen J (2000) Intercostal nerve implants transduced with an adenoviral vector encoding neurotrophin-3 promote regrowth of injured rat corticospinal tract fibers and improve hindlimb function *Exp Neurol* 164:25-37.

10

Brook GA, Lawrence JM, Raisman G (2001) Columns of Schwann cells extruded into the CNS induce in-growth of astrocytes to form organized new glial pathways, *Glia* 33:118-130.

Chen A, Xu XM, Kleitman, N, Bunge MB (1996) Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord.

20

Collier TJ, Sortwell CE, Daley BF (1999) Diminished viability, growth, and behavioral efficacy of fetal dopamine neuron grafts in aging rats with long-term dopamine depletion: an argument for neurotrophic supplementation, *J Neurosci* 19:5563-5573.

Genieser HG, Winkler E, Butt E, Zorn M, Schulz S, Iwizki F, Stormann R, Jastorff B, Doskeland SO, OGREID D, et al. Derivatives of 1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole 3',5'-phosphate that mimic the actions of adenosine 3',5'-phosphate (cAMP) and guanosine 3',5'-phosphate (cGMP). *Carbohydr Res* 1992 Oct 9;234:217-35.

30

Gruner JA (1992) A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* 9:123-126.

40

Guest, JD, Arundathi, R., Olson, L., Bunge, MB, Bunge, RP (1997) The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp Neurology* 148:502-521.

Mautino MR, Morgan RA (2002) Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by novel lentiviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope antisense RNA Hum Gene Ther 13:1027-37.

Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP (1991) Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. J Neurosci 11:2433-2442.

10

Negishi H, Dezawa M, Oshitari T, Adachi-Usami E (2001) Optic nerve regeneration within artificial Schwann cell graft in the adult rat. Brain Res Bull 55:409-419.

Pachori AS, Numan MT, Ferrario CM, Diz DM, Raizada MK, Katovich MJ (2002) Blood pressure-independent attenuation of cardiac hypertrophy by AT(1)R-AS gene therapy. Hypertension 39:969-75.

20

Rodriguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navarro X (2000) Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. Exp Neurol 161:571-584.

Xu, XM, Chen, A, Guenard, V, Kleitman, N, Bunge MB (1997) Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. J Neurocytology 26:1-16.

30

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0034】

【図1】図1は、脊髄の完全な離断の後にシュヴァン細胞間架橋を受けたラットのBBBスコアに対する、経時的なdb-cAMP注射およびロリプラムの影響を比較する。菱型（コントロール）：両方の脊髄断端中への生理食塩水注射；四角：両方の脊髄断端中に注射により投与された $0.2\mu\text{L} \times 1\text{mM}$  db-cAMP；三角： $0.2\mu\text{L} \times 25\text{mM}$  db-cAMP；交差： $0.2\mu\text{L} \times 50\text{mM}$  cAMP；丸： $0.2\mu\text{L} \times 1\text{mM}$  db-cAMPおよびミニポンプによるロリプラム投与（損傷後2週間の間に $0.07\mu\text{mol/kg/時間}$ ）。

【図2】図2は、脊髄の完全な離断の後にシュヴァン細胞間架橋を受けたラットのBBBスコアに対する、経時的なdb-cAMP洗浄およびロリプラムの影響を比較する。菱型（コントロール）：両方の脊髄断端中への生体物質（ゲル形態）による生理食塩水注入；四角：両方の脊髄断端中への注入により投与された $5\mu\text{L} \times 1\text{mM}$  cAMP；三角：両方の脊髄断端中への注入により投与された $5\mu\text{L} \times 5\text{mM}$  cAMP；交差：両方の脊髄断端中への注入により投与された $5\mu\text{L} \times 10\text{mM}$  cAMP；丸：両方の脊髄断端中への注入により投与された $5\mu\text{L} \times 1\text{mM}$  cAMPおよびミニポンプによるロリプラム投与（損傷後2週間の間に $0.07\mu\text{mol/kg/時間}$ ）。

【図3】図3は、重量落下（NYUインパクト、 $12.5\text{mm}$ 高）による脊髄への中程度の挫傷損傷を受けた後にシュヴァン細胞移植を受けたラットのBBBスコアに対する、経時的なdb-cAMP洗浄およびロリプラムの影響を比較する。各処理は、4つの注

50

射部位（損傷部位に対して2～3mm吻側、損傷部位に対して2～3mm尾側、ならびに中線のいずれかの側）を使用した。菱型： $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、損傷1週間後に、生理食塩水とともに損傷部位に注射した；四角： $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、損傷1週間後に、 $0.2 \mu\text{L} \times 1 \text{ mM}$  db-cAMP（4つの注射）とともに損傷部位に注射した；三角： $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、損傷1週間後に、 $0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMP（4つの注射）とともに損傷部位に注射した；交差： $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、損傷1日後に、 $0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  cAMP（4つの注射）とともに損傷部位に注射した；丸：動物に、損傷の30分以内に開始してミニポンプによりロリプラム（損傷後2週間の間 $0.07 \mu\text{mol} / \text{kg} / \text{時間}$ ）を与え、1週間後に、シュヴァン細胞を、 $0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMP（4つの注射）とともに与えた。

【図4】図4は、ロリプラムを伴うかまたは伴わない、db-cAMP投与+シュヴァン細胞移植後の、重量落下（NYUインパクト、 $12.5 \text{ mm}$ 高）による中程度の挫傷損傷の8週間後の、グリッドウォーキング（grid walking）分析における足踏みエラーを比較する。各処理は、4つの注射部位（損傷部位に対して2～3mm吻側、損傷部位に対して2～3mm尾側、ならびに中線のいずれかの側）を使用した。A．非損傷コントロール；B．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、生理食塩水とともに損傷部位に注射した；C．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ シュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 1 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；D．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；E．損傷1日後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；F．動物に、損傷の30分以内に開始してミニポンプによりロリプラム（損傷後2週間の間 $0.07 \mu\text{mol} / \text{kg} / \text{時間}$ ）を与え、1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMPとともに与えた。

【図5】図5は、ロリプラムを伴うかまたは伴わない、db-cAMP投与+シュヴァン細胞移植後の、重量落下による中程度の挫傷損傷の8週間後に行った、フットプリント分析におけるストライド幅を比較する。各処理は、4つの注射部位（損傷部位に対して2～3mm吻側、損傷部位に対して2～3mm尾側、ならびに中線のいずれかの側）を使用した。A．非損傷コントロール；B．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、生理食塩水とともに損傷部位に注射した；C．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 1 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；D．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；E．損傷1日後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；F．動物に、損傷の30分以内に開始してミニポンプによりロリプラム（損傷後2週間の間 $0.07 \mu\text{mol} / \text{kg} / \text{時間}$ ）を与え、1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMPとともに与えた。

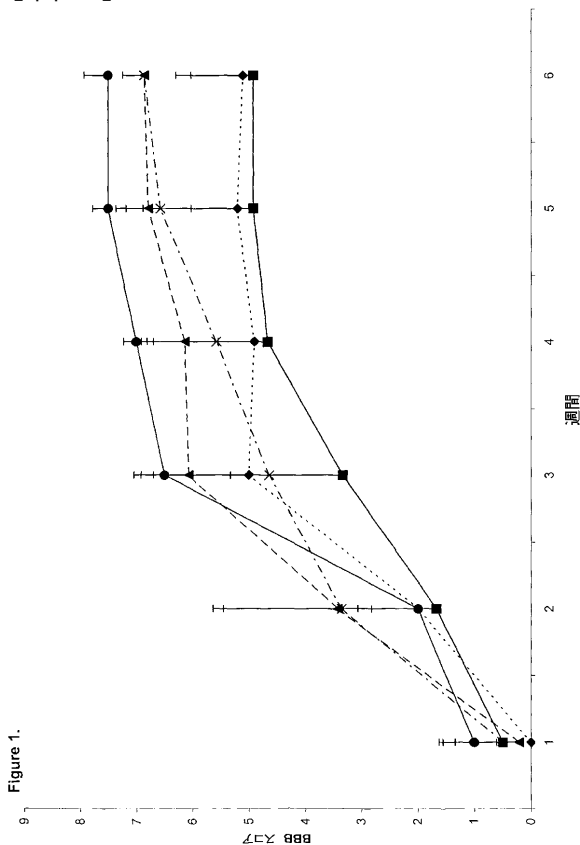
【図6】図6は、ロリプラムを伴うかまたは伴わない、db-cAMP投与+シュヴァン細胞移植後の、重量落下による中程度の挫傷損傷の8週間後に行った、フットプリント分析における支持面と接する部分（base of support）を比較する。各処理は、4つの注射部位（損傷部位に対して2～3mm吻側、損傷部位に対して2～3mm尾側、ならびに中線のいずれかの側）を使用した。A．非損傷コントロール；B．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、生理食塩水とともに損傷部位に注射した；C．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 1 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；D．損傷1週間後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；E．損傷1日後に、 $2 \times 10^6$ 個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db-cAMPとともに損傷部位に注射した；F．動物に、損傷の30分以内に開始してミニポンプによりロリプラム（損傷後2週間の間 $0.07 \mu\text{mol} / \text{kg} / \text{時間}$ ）を与え、1週間

後に、 $2 \times 10^6$  個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db - c A M P とともに与えた。

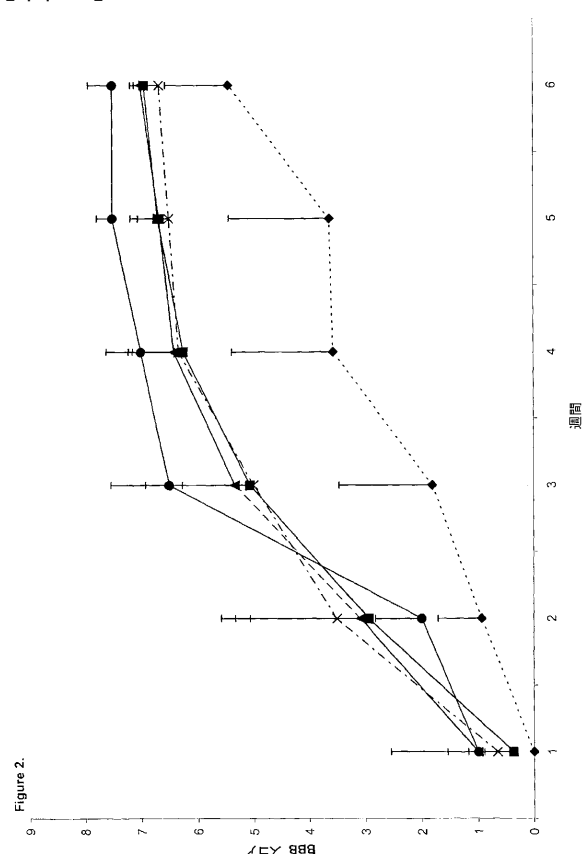
【図 7】図 7 は、ロリプラムを伴うかまたは伴わない、db - c A M P 投与 + シュヴァン細胞移植後の、重量落下による中程度の挫傷損傷の 8 週間後に行った、フットプリント分析における足外回転 (foot exo - rotation) の角度を比較する。各処理は、4 つの注射部位 (損傷部位に対して 2 ~ 3 mm 吻側、損傷部位に対して 2 ~ 3 mm 尾側、ならびに中線のいずれかの側) を使用した。A . 非損傷コントロール ; B . 損傷 1 週間後に、 $2 \times 10^6$  個のシュヴァン細胞を、生理食塩水とともに損傷部位に注射した ; ; C . 損傷 1 週間後に、 $2 \times 10^6$  個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 1 \text{ mM}$  db - c A M P とともに損傷部位に注射した ; D . 損傷 1 週間後に、 $2 \times 10^6$  個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db - c A M P とともに損傷部位に注射した ; E . 損傷 1 日後に、 $2 \times 10^6$  個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db - c A M P とともに損傷部位に注射した ; F . 動物に、損傷の 30 分以内に開始してミニポンプによりロリプラム (損傷後 2 週間の間  $0.07 \mu\text{mol} / \text{kg} / \text{時間}$ ) を与え、1 週間後に、 $2 \times 10^6$  個のシュヴァン細胞を、 $4 \times 0.2 \mu\text{L} \times 50 \text{ mM}$  db - c A M P とともに与えた。

10

【図 1】

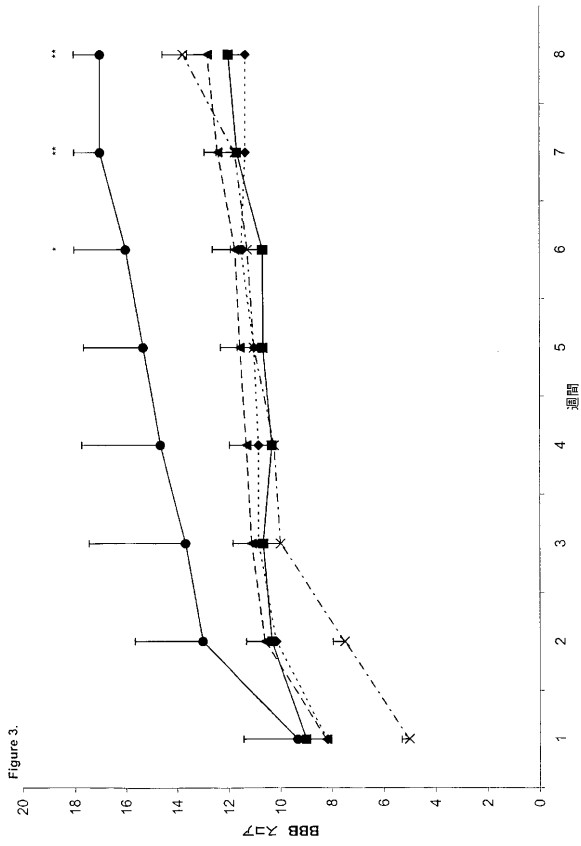


【図 2】

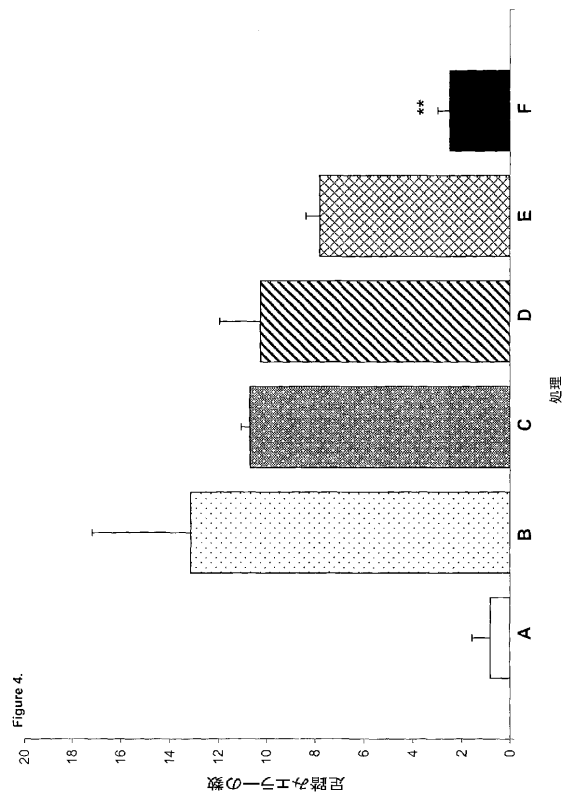




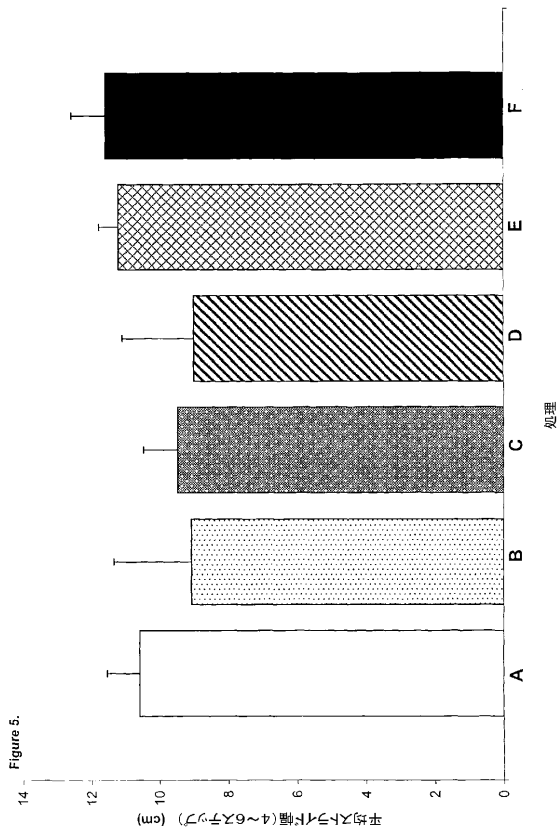
【 図 3 】



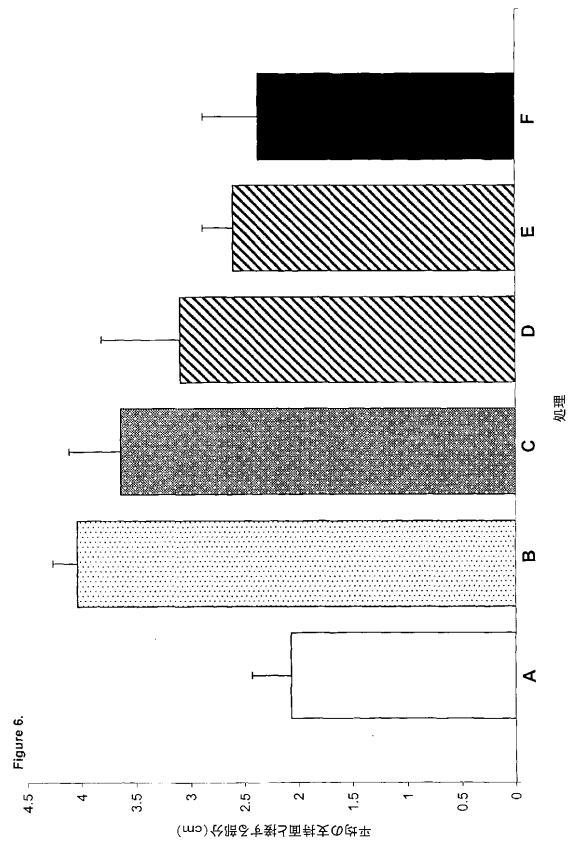
【 図 4 】



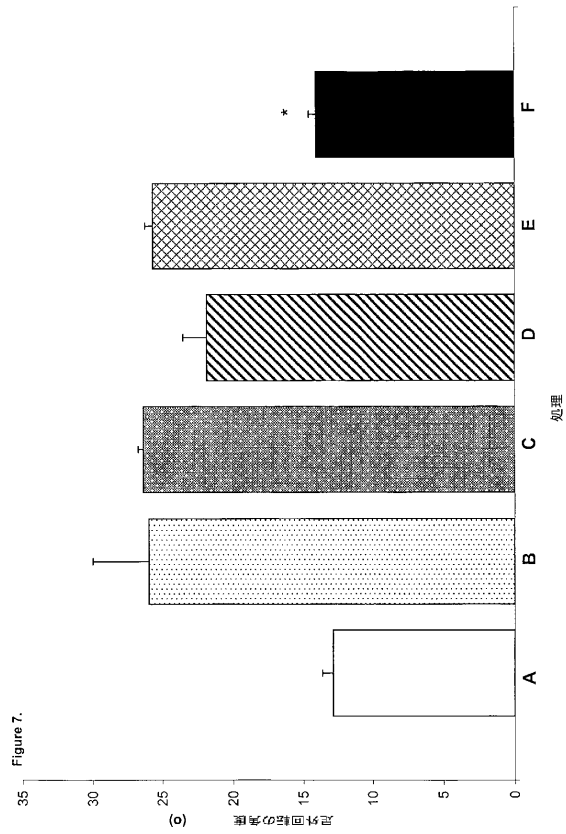
【 図 5 】



【 図 6 】



【図 7】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/03513										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 31/00, 35/30, 38/00, 48/00; C12N 5/02; C07H 21/04 US CL : 424/93.1; 435/325; 514/1, 2, 44; 536/24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.1; 435/325; 514/1, 2, 44; 536/24.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	US 6,524,854 B1 (MONIA ET AL.) 25 February 2003 (25.02.2003), entire document.	1, 8, 24, 30										
A	US 2003/0134821 A1 (SONG ET AL.) 17 July 2003 (17.07.2003), entire document.	1-30										
A	ROSEN ET AL. PDE-5 Inhibition and Sexual Response: Pharmacological Mechanisms and Clinical Outcomes. Annual Review of Sex Research, 2002, Vol. 13, pages 36-88, entire document.	1-30										
A	ROTELLA. Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. Nat. Rev. Drug. Discov. September 2002, Vol. 1, No. 9, pages 674-682, entire document.	1-30										
A	MANGANIELLO. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 5 and Sildenafil: Promises Realized. Molecular Pharmacology, June 2003, Vol. 63, No. 6, pages 1209-1211, entire document.	1-30										
X,P	US 6,512,004 B2 (SONG ET AL.) 28 January 2003 (28.01.2003), Figures 1-7 and Table I.	1-30										
X	US 6,268,352 B1 (SONG ET AL.) 31 July 2001 (31.07.2001), Figures 1-7 and Table I.	1-30										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"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)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"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)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"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 17 October 2003 (17.10.2003)		Date of mailing of the international search report 05 NOV 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Christopher Nichols, Ph.D.</i> Telephone No. 703-308-0196										

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/03513

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,885,834 A (EPSTEIN) 23 March 1999 (23.03.1999), Figures 1-14 and Columns 2-5.	1, 8, 24, 30
X	SINHA ET AL. A Further Study on the Regulation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity in Neuroblastoma Cells: Effect of Growth. In Vitro August 1977, Vol. 13, No. 8, pages 497-501, especially pages Figures 1-3.	1-7, 9-23, and 25-30
X	ZHU ET AL. The Antidepressant and Antiinflammatory Effects of Rolipram in the Central Nervous System. Winter 2001, Vol. 7, No. 4, pages 387-398, especially pages 391-393.	1-7, 9-23, and 25-30
X	LIU ET AL. Cilostazol (Pletal): A Dual Inhibitor of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Type 3 and Adenosine Uptake. Winter 2001, Vol. 19, No. 4, pages 369-386, especially pages 376-380.	1-7, 9-23, and 25-30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/03513

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

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

1. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim 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. ☒ Claim Nos.: 31  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/03513

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

WEST(USPT, PG Pubs, JPO, EPO, DERWENT); NCBI(PUBMED); STN(BIOSCIENCE)

cyclic nucleotide cyclase, rolipram, phosphodiesterase inhibitor, dibutyryl-cAMP, cBIMP, 8-Br-cAMP, 8-Cl-cAMP, Schwann cells, cell transplant therapy, stem cells, precursor cells, multipotent cells, pluripotent cells

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/30	A 6 1 K 35/30	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(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,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,MW,M X,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 パンジ, マリー パートレット  
アメリカ合衆国 フロリダ 3 3 1 3 4 , コーラル ゲイブルズ, テンディラ アベニュー  
9 1 9

(72)発明者 パース, ダミエン ダニエル  
アメリカ合衆国 フロリダ 3 3 1 4 3 , マイアミ, エスダブリュー 8 2 エヌディー スト  
リート 7 5 3 0 , アpartment ジー 2 0 1

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA13 AA24 BA35 BA44 CA28 CA56 MA02 MA66  
NA14 ZA022 ZA212 ZA222 ZB212 ZC202  
4C086 AA01 AA02 BC07 EA11 EA16 MA03 MA04 MA66 NA14 ZA02  
ZA21 ZA22 ZC20  
4C087 AA01 AA02 BB45 BB64 CA05 CA12 MA02 MA66 NA14 ZA02  
ZA21 ZA22 ZC20