

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4577992号
(P4577992)

(45) 発行日 平成22年11月10日(2010.11.10)

(24) 登録日 平成22年9月3日(2010.9.3)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/48 (2006.01) A 6 1 K 37/547
A 6 1 P 9/10 (2006.01) A 6 1 P 9/10

請求項の数 3 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2000-571953 (P2000-571953)	(73) 特許権者	591150410
(86) (22) 出願日	平成11年9月24日 (1999.9.24)		リユーベン・リサーチ・アンド・デベロッ プメント・ベー・ゼット・ウェー
(65) 公表番号	特表2002-525340 (P2002-525340A)		LEUVEN RESEARCH & D EVELOPMENT v z w
(43) 公表日	平成14年8月13日 (2002.8.13)		ベルギー、ベー・3000リユーベン、ベ ネデンストラート59番、グロート・ベ ヘインホーフ
(86) 国際出願番号	PCT/EP1999/007405		
(87) 国際公開番号	W02000/018436	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成12年4月6日 (2000.4.6)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成18年9月21日 (2006.9.21)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	98203280.7		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成10年9月29日 (1998.9.29)	(74) 代理人	100062144
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 青山 稔
(31) 優先権主張番号	99202004.0		
(32) 優先日	平成11年6月22日 (1999.6.22)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 虚血性卒中中の処置用の組成物を調製するための、 α_2 抗プラスミンをインビボで減少する化合物の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血栓溶解のメカニズムによらずに虚血性脳卒中後の脳梗塞サイズを減少するための、プラスミン、最初の4クリングルを欠くミニプラスミンまたは全ての5クリングルを欠くミクロプラスミンからなる群から選択される、 α_2 -抗プラスミン中和化合物を含む、組成物。

【請求項 2】

α_2 -抗プラスミン中和化合物が、 α_2 -抗プラスミン活性の全身体量を低下させる有効用量で投与される、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

該化合物がプラスミンであって、かつ該用量が6.7 mg/kgまでである、請求項2記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、焦点虚血性脳梗塞（虚血性卒中）を処置するための新しい手段に関する。

【0002】

焦点虚血性脳梗塞は、脳の特殊な領域への動脈血流が臨界レベル以下になったときに生じ、神経細胞が死ぬ。中枢神経系（CNS）疾患におけるニューロン変性、例えば、脳卒中、てんかん、アルツハイマー病などは、過剰の興奮性アミノ酸グルタメートにより刺激されると思われる(2)。CNSにグルタメート・アゴニストを注入すると、神経変性疾患に

みられるような海馬のニューロン細胞の死が実際に起きる(3)。

【0003】

エクサイトトキシン誘導ニューロン変性は、組織型プラスミノゲン・アクチベーター(t-P A)により仲介される(4)。この観察と同じく、t-P A欠損マウスはエクサイトトキシン誘導の海馬ニューロン変性に抵抗性があり、プラスミノゲン・アクチベーター阻害剤-1(P A I-1)がこの変性を防御する(4-6)。

【0004】

さらに、プラスミノゲン(P l g)の欠損、t-P Aのチモーゲン基質、 α_2 抗プラスミン(α_2 -A P)の注入は、エクサイトトキシン誘導の海馬ニューロン変性からマウスを保護する(5)。ラミニンのプラスミン仲介変性が、ニューロン細胞外マトリックスの相互作用を破壊して、海馬ニューロンの細胞死を敏感にするといわれている(7)。

10

【0005】

Wang らの最近の発表(8)によると、中位脳動脈の一時的な閉塞による焦点脳虚血後のニューロン損傷もマウスにおいてt-P A欠損により減少し、t-P A注入により悪化した。このことからすると、プラスミノゲン系は、脳虚血性梗塞の成立と血栓溶解療法における脳虚血性梗塞の進行との両方に関与するようである。最近の発表では、治りにくい焦点脳虚血に対するt-P Aの神経毒作用も、ストレプトキナーゼやスタフィロキナーゼなどの他の血栓溶解剤で生じる(9)。このように、治りにくい脳動脈閉塞の患者において、虚血性卒中のための血栓溶解療法は梗塞を進行することがある。これは、動脈の再疎通についての確立したすべての有益な効果を部分的に無くしてしまうだけでなく、ある種の患者にとっては非常に有害となりかねない。血栓溶解療法での脳動脈再疎通ができる患者とできない患者とを識別するのは不可能であるので、治りにくい焦点脳虚血に対する血栓溶解剤の神経毒作用に拮抗する具体的な総合的方策の開発が是認されるところである。

20

【0006】

よって、本発明の目的は、焦点虚血性卒中を処置するための新しい手段を提供することである。

【0007】

本発明に至った研究において、下記の事項が検討された。脳での焦点虚血における神経の損傷は、グルタメートなどのエクサイトトキシンの蓄積の結果として主に生じると推定されているが、皮質神経細胞の死についての病理におけるプラスミン仲介ラミニン変性あるいは代替メカニズムの役割は知られていない。焦点脳虚血性梗塞に対するプラスミノゲン(フィブリノーゲン分解性)系の個々の要素の関与を描写するために、本発明者は、マウスの左の中位脳動脈(M C A)の結紮によって生じた梗塞のサイズの定量を、P l g、そのアクチベーター組織型プラスミノゲン・アクチベーター(t-P A)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベーター(u-P A)、フィブリノーゲン分解性阻害剤P A I-1または α_2 -A Pをコードする遺伝子についての不活化を標的として行った。さらに、t-P AおよびP A I-1の遺伝子のアデノウイルス輸送の作用および脳梗塞に対するヒト α_2 -A Pの注入の作用を調べた。

30

【0008】

t-P A欠損が焦点脳虚血性梗塞を防ぐとの Strickland et al.の知見を完全に確認でき、またt-P A欠損が有意に大きい梗塞サイズをもたらしたが、P l g欠損がエクサイトトキシン誘発の神経細胞死を防ぐとの観察は確認できなかった。代わりに、焦点脳梗塞のサイズがP l g欠損のマウスで有意に大きく、逆に α_2 -A P欠損のマウスで有意に小さいことが分かった。

40

【0009】

全体として、これらのことからすると、プラスミノゲン系の要素は焦点脳虚血性梗塞のサイズに2つの異なるレベルで影響を及ぼす。すなわち、1) t-P A活性の減少(t-P A遺伝子の不活性化またはP A I-1遺伝子の輸送)が梗塞サイズを減少し、その増大(t-P A遺伝子の輸送またはP A I-1遺伝子の不活性化)が梗塞サイズを増加する。2) P l g活性の減少(P l g遺伝子の不活性化または α_2 -A Pの注入)が梗塞サイズ

50

を増加し、その増大 (α_2 -AP 遺伝子の不活性化または α_2 -AP の中性化) が梗塞サイズを減少する。この知見は、t-PA 仲介プラスミン生成が神経細胞死をもたらすであろう特別のリンク経路と相容れないで、反対方向に作用する 2 つの独立的 (t-PA 仲介および Plg 仲介) メカニズムを示唆する。

【0010】

α_2 -AP を体内で常に観察することは期待されなかったが、虚血性卒中の処置に最も関係する。第 1 に、梗塞サイズと遺伝子型とに相関があり、梗塞サイズを表すヘテロ接合体が野生型とホモ接合表現型の間にある。第 2 に、ヒト α_2 -AP ($h\alpha_2$ -AP) を α_2 -AP⁻¹ マウスに注射すると、用量依存性梗塞の展開が生じる。重要なことに、アフイノ特異的ポリクローナルウサギ抗 $h\alpha_2$ -AP 抗体は、MCA の閉塞 40 分後の静注で、脳虚血性梗塞サイズを有意に減少する。このことは、 α_2 -AP 阻害剤 (例えば、中和モノクローナル抗体または α_2 -AP を中和する化合物) を使用して焦点虚血性卒中に拮抗する経路の可能性を示唆している。これは、MCA 閉塞を持つマウスにプラスミンを注入することにより確認した。 α_2 -AP の中和により、梗塞のサイズが有意に減少した。ヒトの血漿中の α_2 -AP の濃度は 1 mM であり (12)、対応する全身体量は約 500 mg である。モノクローナル Fab 断片の等価量は約 400 mg であり、プラスミンの等価量は 500 mg であり、これは 1 回の治療投与として高いが過剰ではない。さらに、梗塞のサイズが α_2 -AP レベル (遺伝子用量効果すなわち用量応答から誘導) に比例することからして、血漿レベルの部分的な減少が顕著に有益の効果をもたらすのではないと思われる。

【0011】

上記の観点において、本発明は、焦点脳虚血性梗塞 (虚血性卒中) の処置のためにインビボで α_2 -AP 活性を減少する化合物の使用に関する。

【0012】

本発明使用の具体的な実施態様において、循環する α_2 -AP 濃度を減少する化合物をつくる。 α_2 -AP の低濃度は低活性をもたらす。別の実施態様において、循環する α_2 -AP の活性が直接的に減少する。

【0013】

α_2 -AP の濃度および活性の減少に適した化合物は、例えば、 α_2 -AP 中和抗体またはその誘導体である。好ましい抗体はモノクローナル抗体である。好ましい誘導体は Fab 断片や scFv 断片である。

【0014】

α_2 -AP を中和する化合物は、例えば、プラスミン、ミニプラスミン (最初の 4 クリングルを欠く)、ミクロプラスミン (全 5 クリングルを欠く) である。

【0015】

本発明を下記の実施例でさらに詳細に示す。これは発明の範囲を限定する意図ではない。実施例において下記の図面を参照する。

【0016】

図 1-3 は、マウス中位脳動脈 (MCA) の結紮後、焦点脳虚血性梗塞の容量 (mm³) を比較した棒グラフである。平均値と SEM (水平棒) を示し、コラム中の数字は実験回数である。

【0017】

図 1 は、焦点脳虚血性梗塞サイズに対するプラスミノーゲン系の要素 (横線における遺伝子型) の欠損効果を示す。WT: 野生型 (50% C57BL/6 / 50% S129、100% C57BL/6、100% S129 遺伝背景の蓄積値)。

【0018】

図 2 は、それぞれ t-PA または PAI-1 欠損マウスにおける焦点虚血性脳梗塞サイズに対する t-PA または PAI-1 遺伝子のアデノウイルス輸送効果を示す。

【0019】

図 3 は、焦点脳虚血性梗塞サイズに対する α_2 -AP の効果を示す。

A. 虚血性梗塞サイズに対する α_2 -AP の効果。

B. 虚血性梗塞サイズに対する α_2 -AP または α_2 -AP の注入、その後の抗 α_2 -AP の Fab 断片の注入の効果。

【0020】

実施例 1

ネズミの脳虚血性梗塞モデル

1. 説明

本試験で使用したマウスはすべて、K.U.Leuven の Gasthuisberg キャンパスの遺伝子組換え技術・遺伝子治療センターの無菌施設で生まれ飼育した。遺伝子の不活性化は、組織型プラスミノゲン・アクチベーター (t-PA) (13)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベーター (u-PA) (13)、プラスミノゲン・アクチベーター阻害剤-1 (PAI-1) (14、15)、プラスミノゲン (Plg) (16)、 α_2 抗プラスミン (α_2 -AP) (17) をコードする遺伝子を標的とする胚幹細胞における相同的組換えで行った。u-PA 受容体 (u-PAR) (18) をコードする不活性化遺伝子を有するマウスは、u-PA 欠損マウスで正常な結果が得られたため、含めなかった。

【0021】

2. 材料と方法

2. 1. 材料

ヒト α_2 -AP を、上記したような新鮮凍結血漿から調製した (19)。

ポリクローナル抗血清をウサギに、完全フロイド・アジュバントに懸濁した 200 mg 精製ヒト α_2 -AP を皮下注入し、ついで不完全フロイド・アジュバントに懸濁した抗原の 2 週間間隔の 2 回注入で作った。血清は耳静脈の穿刺を繰り返して得た。集めた血清をタンパク質 A セファロースのクロマトグラフィにかけた。0.1 M トリス HCl、pH 8.1 で調整し、0.1 M グリシン HCl、pH 2.8 で IgG を溶出して、血清 1 ml につき約 10 mg のタンパク質を得た。アフィノ特異的抗体を透析 IgG から、ヒト α_2 -AP (2.5 mg/ml 湿潤ゲル) で置換した CNBr 活性化セファロース・カラムのクロマトグラフィで得た。0.1 M グリシン HCl、pH 2.8 で溶出して、適用 mg につき約 0.1 mg の特異的 IgG を得た。

【0022】

Fab 断片をアフィノ特異的 IgG からパパイン消化で得た。すなわち、IgG を濃度 5 mg/ml に溶解し、1% (w/w) のパパインで、5 mM のシステイン、1 mM の EDTA、0.1 M のリン酸緩衝液の存在下に、pH 7.0 で 5 時間消化した。反応の停止のためにヨードアセトアミドを最終濃度 75 mM まで加えた。透析後、混合物を PBS で調整したタンパク質 A セファロースカラムで精製した。Fab 濃度を IgG 標準で校正した ELISA で決定した。SDS ゲル電気泳動は基本的に相同性の Fab 断片を表した (表示せず)。

【0023】

2. 2. アデノウイルス・ベクターの製造

組換えアデノウイルス AdCMV t-PA および AdCMV PAI-1 を、基本的に上記した 293 細胞における相同性組換えによりつくった (20)。AdCMV t-PA については、野生型ヒト t-PA をコードするプラスミド pSTE t-PA の XbaI 断片を XbaI 消化 pACCMV pLpA (21) 中に連結して、pACCMV t-PA を得た。アデノウイルス前駆体 pACCMV PAI-1 は、ヒト PAI-1 の全コード配列を含有する pPAI-1 RBR の 1.4 kb の EcoRI/BglIII 断片を、EcoRI/BamHI 消化 pACCMV pLpA 中に連結して作った。これらのプラスミドにおいて、t-PA および PAI-1 の cDNA は、サイトメガロウイルス即時型初期エンハンサー／プロモーターと SV40 t-抗原イントロン／ポリアデニル化信号との間に位置して、完全な転写単位を形成する。

【0024】

293 細胞 (22) の単層培養物を、10 mg の pACCMV t-PA または pACCM

10

20

30

40

50

VPAI-1 および 5 mg の pJM17 (20)、完全長アデノウイルス 5 d1309 ゲノムを含有するプラスミドで共トランスフェクトした。これらのプラスミド間の相溶性組換えは、アデノウイルス E1 領域がそれぞれ t-PA または PAI-1 形質転換遺伝子で置換された組換えウイルスゲノムを形成する。培養 293 細胞における組換えウイルスの複製は、293 細胞ゲノムに組み込まれた E1 コピーからのトランスに供給された E1A 遺伝子産物により支持される。

【0025】

トランスフェクト後に組換えウイルスを採取し、(23) 記載のように増幅した。組換えウイルスの同一性は、生産的感染の 293 細胞からつくったウイルス DNA についての制限分析およびサザンブロット法により決定した。組換えアデノウイルス AdRR5 は、E1 位置に組込まれた遺伝子を欠いており、同様の方法で pACRR5 および pJM17 からつくり、対照ウイルスとして使用できる (24, 25)。組換えウイルスを再接種してクロナル同一性を確認してから、さらに使用する。組換えアデノウイルスの大量生産を (23) 記載のように行った。精製ウイルスに 0.1 mg/ml の無菌ウシ血清アルブミン (BSA) を補充し、液体窒素で即時凍結して -80 °C で使用まで保存した。精製保存液中の感染ウイルス粒子の力価は、37 °C での 1 時間吸収で 293 細胞の単一層に対するプラーク検定法で決定した。精製ウイルス保存液は、ml につき 10^{10} プラーク形成ユニット (PFU) で通常得た。静脈ボラス注射によるアデノウイルス輸送後の t-PA および PAI-1 発現の反応速度および臓器分布は、別に示されている (26, 27)

【0026】

2. 3. ヒトプラスミンの調製

ヒトプラスミノゲンを、基本的に (28) 記載のように、新鮮な凍結ヒト血液バンク血漿から調製した。ヒト血漿 (6 リットル) に 1 ml 当たり 20 単位のアプロチニン (Trasylol, Bayer、ドイツ) を加え、15 分間 4 °C、4000 rpm で遠心分離した。リシン-セファロース (200 湿重量、置換レベルがセファロースゲル g 湿重量につき約 1 mg のリシン) を上澄み液に加え、混合物を 1 時間 4 °C で攪拌し、ゲルをブッフネルろうとに回収した。120 g のリシン-セファロースを濾液に加え、混合物を攪拌してゲルを上記のように回収した。合わせたゲルフракционを、10 単位/ml のアポチニン含有の 18 リットルの 0.2 M の K_2HPO_4 / KH_2PO_4 緩衝液、pH 7.5 で洗い、ついで 5 x 60 cm カラムに注ぎ、10 単位のアポチニン含有の 0.02 M の NaH_2PO_4 、0.1 M の NaCl 緩衝液、pH 7.5、4 °C で洗って、280 nm での洗液の吸収を 0.05 以下とした。カラムを 0.05 M の 6-アミノヘキサン酸を含有する緩衝液で溶出し、タンパク質含有のフラクションを集めた。6 リットルの血漿から 650 mg のタンパク質含有の約 145 ml の液を得た。これを Amicon PM10 フィルターで 2.5 倍に濃縮し、ウルトラゲル AcA44 の 5 x 90 cm カラム上で濾過したゲルを 0.02 M の NaH_2PO_4 、0.1 M の NaCl 緩衝液、pH 7.5 で、1 時間につき 60 ml の速度で洗った。約 590 mg のタンパク質を含有する主ピークを Amicon PM10 フィルター上で濃度 10 mg/ml に濃縮し、使用まで凍結した。

【0027】

ヒトプラスミンをプラスミノゲンから下記のように調製した。リシン-セファロース (20 g 湿ゲル) をヒトプラスミノゲン (200 mg) 溶液に加え、混合物を 3 時間 4 °C で攪拌し、ゲルをブッフネルろうと上で洗い、30 ml の 0.01 M の NaH_2PO_4 緩衝液、pH 7.4 に再懸濁した。ウロキナーゼ (500 µl の 50 µM 溶液、Saruplase (Gruenenthal, Aachen、ドイツ) より調製) およびプラスミン・セファロースを加え、混合物を 15 時間 4 °C で攪拌した。ゲルをブッフネルろうと上で 0.1 M の NaH_2PO_4 緩衝液、pH 7.4 で洗い、1.5 x 16 cm カラムに注ぎ、0.1 M の NaH_2PO_4 緩衝液、pH 7.4 で洗い、280 nm での洗液の吸収が 0.05 以下とした。0.05 M の 6-アミノヘキサン酸を含有する 0.1 M の NaH_2PO_4 緩衝液で溶出した。タンパク質含有のフラクションを集めて、グリセロールを最終濃度 10 % まで加え、集めて、10 % グリセロール含有の 0.1 M の NaH_2PO_4 に対して 4 °C で透析した。最終回収物は

、タンパク質濃度 4.0 mg/ml および活性プラスミン濃度 $25 \mu\text{M}$ を有する溶液 25 ml であった。

【0028】

2. 4. 血漿中の α_2 抗プラスミンの測定

ネズミ血漿中の α_2 抗プラスミンの測定を、プラスミンの迅速阻害 (29) に基づき色素遺伝子基質検定法により行った。簡単に言うと、 $10 \mu\text{l}$ マウス血漿 (0.01% ツイン 20 を含有する 0.05 M の NaH_2PO_4 緩衝液、 $\text{pH} 7.4$ に $1/10$ 希釈) を 37°C で $420 \mu\text{l}$ の 0.05 トリス HCl 、 0.01% ツイン 20 を含有する 0.1 M の NaCl 緩衝液、および $20 \mu\text{l}$ の $0.125 \mu\text{M}$ ヒトプラスミン (最終濃度 5 nM) と混合する。 10 秒インキュベートし、 $50 \mu\text{l}$ の 3 mM の S2403 (Chromogenics, Antwerp、ベルギー) を加え、吸収の変化を 405 nm で測定した。吸収の変化は、緩衝液で約 0.18 分^{-1} 、集めたネズミ血漿で 0.09 分^{-1} であった。

10

【0029】

2. 5. 動物実験

動物実験を、血栓症および止血についての米国生理学会および国際委員会の指針 (30) にしたがって行った。

【0030】

焦点脳虚血を、Welsh et al. (31) にしたがって MCA の完全な閉塞によりつくった。簡単に言うと、体重 20 から 30 g の雌雄マウスをケタミン (75 mg/ml 、Apharmo, Arnhem、オランダ) およびキシラジン (5 mg/ml 、Bayer, Leverkusen、ドイツ) の腹腔内注射により麻酔した。アトロピン (1 mg/kg 、Federa, Brussels、ベルギー) を筋肉内注射し、マウスを熱パッド上に置いて体温を保持した。U型の切開を左耳と左目の間に行った。側頭筋肉の上部および背側の部分を切り出し、頭骨を側頭筋肉の退縮によって露出した。小さい開口 ($1-2 \text{ mm}$ 直径) を手動ドリルで MCA 上の領域につくり、塩類液の過融解で熱損傷を防いだ。髄膜を鉗子で取り出し、 $10-0$ ナイロン糸 (Ethlon, Neuilly、フランス) 結紮して閉塞し、結紮点に末梢的に横断した。最後に、側頭筋肉および皮膚を背中から縫合した。

20

【0031】

AdCMVt-PA 、 AdCMVPAI-1 または AdRR5 を、 1.3×10^9 プラーク形成単位 (p.f.u.) の静脈内ボラスとして MCA の結紮 4 日前に与えた。ヒト $\alpha_2\text{-AP}$ ($\text{h}\alpha_2\text{-AP}$) を静脈内に 2 注射に分けて、それぞれ MCA 結紮の 1 分前および 30 分後に与えた。第 2 $\text{h}\alpha_2\text{-AP}$ 注射の 10 分後に Fab 断片をボラスとして静脈注射した。ヒトプラスミンをボラスとして静脈内に、 MCA 結紮の 15 分前および 15 分後に与えた。

30

【0032】

マウスを回収し、ケージに戻した。24 時間後に過剰量のネンブタール (500 mg/kg 、Abbott Laboratories, North Chicago、イリノイ) で殺し、断頭した。脳を取り出し、 1 mm の切片にするためにマトリックスに置いた。切片を 2% 塩化 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム (TTC) の溶液に浸し、30 分間 37°C でインキュベートして、 4% ホルマリンのリン酸緩衝液に入れた。この処理により、壊死性梗塞域は着色されない (白色) ので、着色 (レンガ赤) の生存能組織と明確に区別できる。切片を撮影しプラニメトリーにかけた。梗塞容量は、切片の非着色域掛ける厚さとして算出できる。

40

【0033】

データは、 n 回測定の平均 $\pm \text{SEM}$ で示す。差異の有意差検定には、Statview ソフトウェアを用いてフィッシャー PLSD 検定またはスチューデント t -検定による変動分析を使用した。

【0034】

実施例 2

プラスミノゲン系要素をコードする遺伝子の標的とされた不活化を有するマウスにおける脳虚血性梗塞

50

左MCAを結紮すると、(50%) S129と(50%) C57BL/6遺伝背景を有する野生型マウスで $7.6 \pm 1.1 \text{ mm}^3$ ($n=11$)、同系交配C57BL/6マウスで $9.3 \pm 2.7 \text{ mm}^3$ ($n=6$)、同系交配S129マウスで $6.4 \pm 1.3 \text{ mm}^3$ ($n=6$)の脳梗塞が生じた(背景について有意差なし、結果は表示しない)。

【0035】

t-PA遺伝子の不活性化は $2.6 \pm 0.80 \text{ mm}^3$ ($n=11$)への梗塞サイズの減少に関連し($p < 0.0001$ 対野生型)、一方、u-PA遺伝子の不活性化は梗塞サイズに効果がなかった($7.8 \pm 1.0 \text{ mm}^3$ 、 $n=8$ 、 $p=NS$ 対野生型)。

【0036】

PAI-1遺伝子の不活性化は $2.6 \pm 0.80 \text{ mm}^3$ ($n=11$)への梗塞サイズの有意の増加に関連した($16 \pm 0.52 \text{ mm}^3$ 、 $n=6$ 、 $p < 0.0001$ 対野生型)(図1)。不活性化Plg遺伝子を有するマウスにおいて、脳梗塞サイズが野生型マウスにおけるよりも有意に大きく($12 \pm 1.2 \text{ mm}^3$ 、 $n=9$ 、 $p=0.037$ 対野生型)、一方、 α_2 -AP遺伝子欠損マウスにおいては、逆に梗塞サイズが非常に減少した($2.2 \pm 1.1 \text{ mm}^3$ 、 $n=7$ 、 $p=0.0001$ 対野生型)(図1)。

【0037】

実施例3

t-PAおよびPAI-1の遺伝子輸送の脳梗塞サイズに対する効果

6匹のt-PA⁻¹-マウスにMCA結紮前4日間AdCMVt-PAの $1.3 \times 10^9 \text{ p.f.u.}$ 注入は脳梗塞サイズ $6.0 \pm 1.3 \text{ mm}^3$ に関連し、対照ウイルスAdRR5注入の5匹のt-PA⁻¹-マウスにおけるよりも有意に大きかった(1.8 ± 0.63 、 $p=0.028$)(図2A)。逆に、5匹のPAI-1⁻¹-マウスにAdCMVP-AI-1の $1.3 \times 10^9 \text{ p.f.u.}$ 注入は脳梗塞サイズ $10 \pm 1.4 \text{ mm}^3$ に関連し、対照ウイルスAdRR5注入の5匹のPAI-1⁻¹-マウスにおけるよりも有意に小さかった(1.3 ± 1.0 、 $p=0.019$)(図2B)

【0038】

実施例4

α_2 抗プラスミンの脳梗塞サイズに対する効果

脳梗塞サイズは α_2 -AP遺伝子の量に相関し、マウスで野生型が 11 ± 2.0 、ヘテロ接合欠損が 4.9 ± 2.0 、ホモ接合欠損が 2.2 ± 1.1 であった(図3A)。4匹の α_2 -AP⁻¹-マウス群でヒト α_2 -APの注入で梗塞サイズが増加し、全量1mgで $13 \pm 2.5 \text{ mm}^3$ ($n=4$)、全量0.2mgで $11 \pm 1.5 \text{ mm}^3$ ($n=6$)であった。マウスにおいてヒト α_2 -AP(0.2mgのヒト α_2 -AP)に対する1.7mgのアフィノ特異的Fabの注入は、脳梗塞サイズを $5.1 \pm 1.1 \text{ mm}^3$ に減少した($n=7$ 、 $p=0.0040$ 対0.2mgのヒト α_2 -AP)(図3B)。

【0039】

上記の実施例からして、 α_2 -AP活性の減少(α_2 -AP遺伝子発現の減少または阻害剤による循環 α_2 -APの減少)は、虚血性卒中にみられるような、焦点脳虚血性梗塞のサイズを減少する。

【0040】

実施例5

プラスミンの脳梗塞サイズに対する効果

体重約30gのマウスに50、100、150 μg のヒトプラスミンを注入すると、30秒後に採取した血液サンプルにおける α_2 -APレベルが出発点から67、40、31%減少した(2匹のマウスの平均、15%以下の変動)。3匹のマウスに200 μg のPliを注入すると、血漿 α_2 -APレベルが減少し、2時間後で 59 ± 4.8 、4時間後で 67 ± 4.4 、6時間後で 70 ± 2.5 であった。

【0041】

左中位脳動脈(MCA)の結紮は脳梗塞を誘導し、同系交配Balb/cマウスで $27 \pm 1.3 \text{ mm}^3$ ($n=10$)、同系交配C57BL/6マウスで $16 \pm 1.3 \text{ mm}^3$ ($n=1$)

10

20

30

40

50

2) であった。

【0042】

Balb/c マウスにおける 0.2 mg の Pl i の注入は梗塞サイズを $22 \pm 1.0 \text{ mm}^3$ に減少した ($n=9$) ($p=0.006$ 対塩類液)。同様の減少がMAC結紮の15分前と15分後に与えたときに観察された(表1)。C57BL/6 マウスにおける 0.2 mg の Pl i の注入は梗塞サイズを $10 \pm 1.2 \text{ mm}^3$ に減少した ($n=12$) ($p=0.004$ 対塩類液)。

【0043】

参考文献

1. Collen D; スタフィロキナーゼ：強力な独得のフィブリン選択性血栓溶解剤 Nature Medicine 1998; 4: 279-284. 10
2. Coyle JT, Puttfarcken P; 酸化ストレス、グルタメート、神経変性疾患 Science 1993; 262: 689-695.
3. Coyle JT, Molliver ME, Kuhar MJ; カイニン酸のインシトゥ注入：経路の軸索を分与する際のニューロン細胞体を選択的に損傷するための新方法 J Comp Neurol 1978; 180: 301-323.
4. Tsirka S, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S; エクサイトトキシン誘導ニューロンの変性および発作が組織プラスミノゲン・アクチベーターにより仲介される Nature 1995; 377: 340-344.
5. Tsirka S, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S; 細胞外タンパク質分解カスケードがマウスの海馬においてニューロン変性を促進する J Neurosci 1997; 17: 543-552. 20
- 【0044】
6. Tsirka S, Rogove AD, Strickland S; ニューロン細胞死および t-P A Nature 1996; 384: 123-124.
7. Chen ZL, Strickland S; 海馬におけるニューロン死がラミニンのプラスミン触媒変性により促進される Cell 1997; 91: 917-925.
8. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA; 組織プラスミノゲン・アクチベーター (t-P A) が野生型および t-P A 欠損型マウスにおいて焦点脳虚血後のニューロン損傷を増大する Nature Medicine 1998; 4: 228-231. 30
9. Nagai N, Vanlinthout I, Collen D; ハムスターのモデルにおける脳虚血性梗塞および肺血栓分解に対する組織型プラスミノゲン・アクチベーター、ストレプトキナーゼ、スタフィロキナーゼの作用の比較：提供
10. 国立神経疾患研究所、rt-P A 卒中研究班；急性虚血性卒中についての組織プラスミノゲン・アクチベーター N Eng J Med 1995; 333: 1581-1587.
- 【0045】
11. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Blumhki E, Haxter G, Mahagne MH, Hennerici M (ECASS研究班)；急性片側卒中についての組換え組織プラスミノゲン・アクチベーターでの静注血栓溶解 J Am Med Ass 1995; 274: 1017-1025. 40
12. Collen D, Wiman B; 抗プラスミンの交替、血漿の速作用プラスミン阻害剤 Blood 1979; 53: 313-324.
13. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord J, Collen D, Mulligan; マウスにおけるプラスミノゲン・アクチベーター遺伝子機能の喪失についての生理学的考え Nature 1994; 368: 419-424.
14. Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, Van Nuffelen A, Prendergast G, Cole M, Bronson R, Collen D, Mulligan; プラスミノゲン・アクチベーター阻害剤-1 遺伝子欠損マウス I. 相同性組換えによる生成および特性解明 J Clin Invest 1993; 92: 2746-2755.
15. Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, Ream B, Van den Oord JJ, De Mol M, Mu 50

lligan RC, Collen D; プラスミノーゲン・アクチベーター阻害剤-1 遺伝子欠損マウス
II 止血、血栓症、血栓溶解 J Clin Invest 1993; 92: 2756-2760。

【0046】

16. Poplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van Vlaenderen I, Moons L, Plow EF, Collen D; マウスにおける血栓症、生育、健康維持に対するプラスミノーゲン遺伝子の破壊効果 Circulation 1995; 92: 2585-2593。

17. Lijnen HR, Okada K, Matsuo O, Collen D, Dewerchin M; マウスにおける α_2 抗プラスミン遺伝子欠損が明白な出血なしにフィブリン分解の可能性増加に関連する Blood 1999; 93: 2274-2281。

18. Dewerchin M, Van Nuffelen A, Wallays G, Bouche A, Moons L, Carmeliet P, Mulligan RC, Collen D; ウロキナーゼ受容体欠損マウスの生成および特性解明 J Clin Invest 1996; 97: 870-878。

19. Lijnen HR, Holmes WE, Van Hoef B, Wiman B, Rodriguez H, Collen D; ヒト α_2 抗プラスミンのアミノ酸配列 Eur J Biochem 1987; 166: 565-574。

20. McGrory WJ, Bautista DS, Graham FL; 初期領域1変異の感染性ヒト・アデノウイルス型5へのレスキューのための簡単な技法 Virology 1988; 163: 614-617。

【0047】

21. Gomez-Foix AM, Coats WS, Baque S, Alam T, Gerard RD, Newgard CB; 筋グリコーゲン・ホスホリラーゼ遺伝子の肝細胞へのアデノウイルス仲介輸送はグリコーゲン代謝の調節を変える J Biol Chem 1992; 267: 25129-25134。

22. Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R; ヒトアデノウイルス型のDNAにより形質転換されたヒト細胞系の特徴 J Gen Virol 1977; 36: 59-74。

23. Gerard RD, Meidell RS; アデノウイルス・ベクター Hames Bd, Glover D (eds); DNAクローニング-実際的方法: 哺乳動物系 Oxford, UK, 1995, p 285-307。

24. Alcorn JL, Gao E, Chen Q, Smith ME, Gerard RD, Mendelson CR; ウサギ表面活性タンパク質A遺伝子の転写調節に関与する遺伝子要素 Mol Endocrinol 1993; 7: 1072-1085。

25. Kopfler WP, Willard M, Betz T, Willard JE, Gerard RD, Meidell RS; ヒト・アポリポタンパク質A-Iをコードする遺伝子の正常マウスへのアデノウイルス仲介輸送は循環の高密度リポタンパク質コレステロールを増加する Circulation 1994; 90: 1319-1327。

【0048】

26. Carmeliet P, Stassen JM, Van Vlaenderen I, Meidell RS, Collen D, Gerard RD; 組織型プラスミノーゲン・アクチベーターのアデノウイルス仲介輸送は組織型プラスミノーゲン・アクチベーター欠損およびプラスミノーゲン・アクチベーター阻害剤-1-過剰発現のマウスにおいて血栓崩壊を増大する Blood 1997; 90: 1527-1534。

27. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Janssens S, Lupu F, Collen D, Gerard RD; 動脈損傷治癒および新動脈内膜形成におけるプラスミノーゲン・アクチベーター阻害剤-1の阻害役割 Circulation 1997; 96: 3180-3191。

28. Deutsch DG, Mertz Et; アフィニティークロマトグラフィーによるヒト血漿からのプラスミノーゲン精製 Science 1970; 170: 1095-1096。

29. Edy J, De Cock F, Collen D; 正常および抗プラスミン除去のヒト血漿によるプラスミンの阻害 Thromb Res. 1976; 8: 513-518。

30. Giles AR; 生物医学研究における動物の使用についての指針 Thromb Haemost 1987; 58: 1078-1084。

【0049】

31. Welsh FA, Sakamoto T, McKee AE, Sims RE; マウス脳での虚血におけるラクトアシドーシスのピリジン・ヌクレオチド安定性に対する作用 J Neurochem 1987; 49: 846-851。

32. Bederson JB et al; ラットにおける実験的脳梗塞の検出および定量のための染料と

10

20

30

40

50

しての塩化 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム Stroke 1986; 17:472-476。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、焦点脳虚血性梗塞サイズに対するプラスミノゲン系の要素（横線における遺伝子型）の欠損効果を示す。

【図 2】 図 2 は、それぞれ t -PA または PAI-1 欠損マウスにおける焦点虚血性脳梗塞サイズに対する t -PA または PAI-1 遺伝子のアデノウイルス輸送効果を示す。

【図 3】 図 3 は、焦点脳虚血性梗塞サイズに対する α_2 -AP の効果を示す。

A. 虚血性梗塞サイズに対する α_2 -AP の効果。

B. 虚血性梗塞サイズに対する α_2 -AP または α_2 -AP の注入、その後の抗 α_2 -AP の Fab 断片の注入の効果。

10

【図 1】

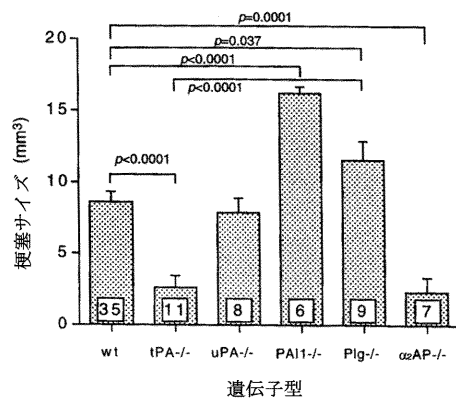


FIG. 1

【図 2】

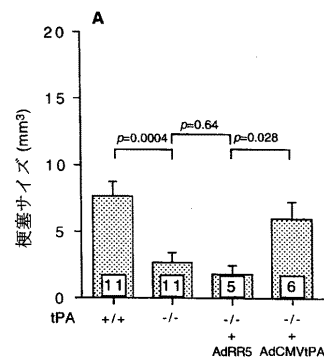


Fig. 2A

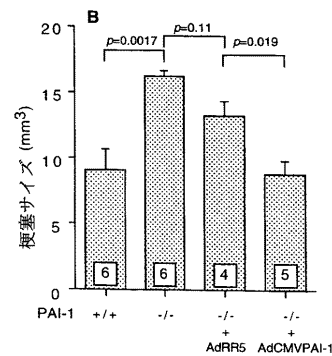
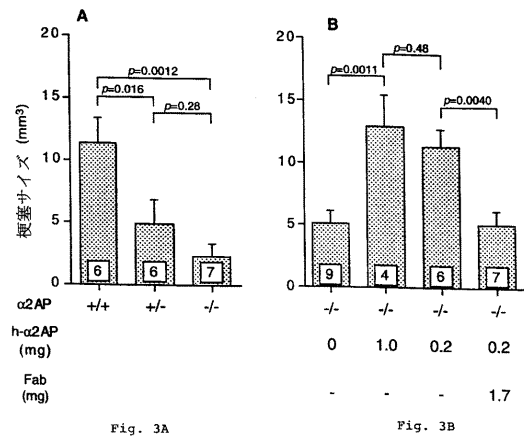


Fig. 2B

【図 3】



フロントページの続き

(74)代理人 100072730

弁理士 小島 一晃

(72)発明者 永井 信夫

静岡県浜松市半田町3776 E-317

(72)発明者 デジレ・ジョゼ・コラン

イギリス、エスダブリュー5・0エイチエヌ、ロンドン、コリンガム・ガーデンズ28番

審査官 田村 聖子

(56)参考文献 国際公開第98/012329 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00-38/58

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)