

(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2009-532369

(P2009-532369A)

(43) 公表日 平成21年9月10日(2009.9.10)

(51) Int.Cl.

A61K 38/55 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

F 1

A 61 K 37/64
A 61 P 25/00
A 61 P 43/00 107
A 61 P 25/02
A 61 P 9/10

テーマコード(参考)

4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-503084 (P2009-503084)
(86) (22) 出願日 平成19年3月30日 (2007.3.30)
(85) 翻訳文提出日 平成20年11月27日 (2008.11.27)
(86) 國際出願番号 PCT/US2007/008270
(87) 國際公開番号 WO2007/117440
(87) 國際公開日 平成19年10月18日 (2007.10.18)
(31) 優先権主張番号 60/788,021
(32) 優先日 平成18年3月30日 (2006.3.30)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/787,927
(32) 優先日 平成18年3月31日 (2006.3.31)
(33) 優先権主張国 米国(US)

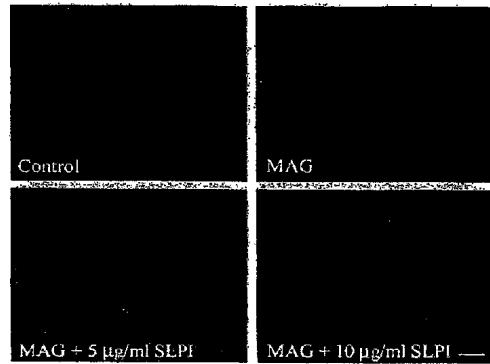
(71) 出願人 503161626
リサーチ ファウンデーション オブ シ
ティ ユニバーシティ オブ ニューヨー
ク
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1001
9, ニューヨーク, ウエスト 57テ
ィーエイチ ストリート 555
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分泌性白血球プロテアーゼインヒビターによる神経再生の刺激

(57) 【要約】

本発明は、ヒトなどの動物へのS L P Iの投与による、神経の生存、成長、および再生を刺激する方法を提供する。これらの方法を使用して、必要とする被験体の種々の神経学的容態(神経障害および変性疾患など)を治療することができる。本発明は、ニューロンをS L P Iと接触させ、それにより、軸索伸長を刺激する工程を含む、ニューロンの軸索伸長を刺激する方法を提供する。本発明はまた、ニューロンをS L P Iと接触させ、それにより、N F - Bまたはc - j u n活性を減少させる工程を含む、ニューロン中のN F - Bまたはc - j u n活性を減少させる方法を提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ニューロンを S L P I と接触させ、それにより、軸索伸長を刺激する工程を含む、ニューロンの軸索伸長を刺激する方法。

【請求項 2】

ニューロンを S L P I と接触させ、それにより、N F - B または c - j u n 活性を減少させる工程を含む、ニューロン中の N F - B または c - j u n 活性を減少させる方法。

【請求項 3】

ニューロンを S L P I と接触させ、それにより、阻害を減少させる工程を含む、ミエリンによってニューロンの軸索伸長の阻害を減少させる方法。 10

【請求項 4】

S L P I の投与後に前記ニューロンの成長をモニタリングする工程をさらに含む、請求項 1 または請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記接触工程が、前記ニューロンの細胞体を接触させることを含む、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記接触工程が、前記ニューロンの軸索を接触させることを含む、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ニューロンが損傷している、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ニューロンが脊髄中または末梢神経系中に存在する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ニューロンが運動ニューロンである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

S L P I を含む組成物を患者に投与する工程を含む、患者における神経成長または神経系の再生を刺激する方法。 30

【請求項 11】

S L P I を含む組成物を患者に投与する工程を含む、患者における障害または神経組織の損傷を治療する方法。

【請求項 12】

前記障害または損傷が、末梢神経の障害またはニューロパシー、頭蓋または脳の外傷、動脈瘤、脊髄損傷、または卒中に起因する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

S L P I を含む組成物を患者に投与する工程を含む、患者の疾患、疾病、または容態に関連する神経の変性または損傷を治療または防止する方法。

【請求項 14】

前記患者が、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリング病）、進行性核上麻痺、視神経炎、糖尿病性網膜症、黄斑変性、または緑内障を罹患している、請求項 10 ~ 請求項 13 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 15】

ニューロンに投与した場合の軸索成長の刺激に有用な薬物の製造のための S L P I を含む組成物の使用。

【請求項 16】

ニューロンに投与した場合のニューロン中の N F - B または c - j u n 活性の減少に有用な薬物の製造のための S L P I を含む組成物の使用。 50

【請求項 17】

ニューロンに投与した場合のニューロンの軸索伸長の阻害の減少に有用な薬物の製造のための S L P I を含む組成物の使用。

【請求項 18】

前記ニューロンの成長をモニタリングする、請求項 15 ~ 請求項 17 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 19】

前記薬物を、前記ニューロンの細胞体に投与する、請求項 15 ~ 請求項 17 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 20】

前記薬物を、前記ニューロンの軸索に投与する、請求項 15 ~ 請求項 17 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 21】

前記ニューロンが損傷している、請求項 15 ~ 請求項 17 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 22】

前記ニューロンが、末梢神経系の脊髄中に存在する、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

前記ニューロンが運動ニューロンである、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 24】

患者の神経系における神経の成長または再生の刺激に有用な薬物の製造のための S L P I を含む組成物の使用。

【請求項 25】

患者の障害または神経組織の損傷の治療に有用な薬物の製造のための S L P I を含む組成物の使用。

【請求項 26】

前記障害または損傷が、末梢神経の障害またはニューロパシー、頭蓋もしくは脳の外傷、動脈瘤、脊髄損傷、または卒中に起因する、請求項 25 に記載の使用。

【請求項 27】

患者の疾患、疾病、または容態に関連する神経の変性または損傷の治療または防止に有用な薬物の製造のための S L P I を含む組成物の使用。

【請求項 28】

前記患者が、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリッジ病）、進行性核上麻痺、視神経炎、糖尿病性網膜症、黄斑変性、または緑内障を罹患している、請求項 27 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

発明の技術分野

本発明は、動物（例えば、ヒト）における神経の生存、成長、および再生を刺激するための分泌性白血球プロテアーゼインヒビターの使用に関する。

【背景技術】**【0002】**

発明の背景

哺乳動物神経系は、軸索（神経）成長を助長 / 促進する分子が多数存在するという事実にもかかわらず、障害後に再生されない。この再生の欠如を担う要因には、少なくとも 3 つの以下の要因が存在する：グリア性瘢痕の形成、ミエリン中の再生インヒビターの存在、および成体軸索の固有の成長能力。障害に関与する状況では、グリア性瘢痕の形成には障害後いくらか時間がかかる。瘢痕形成前のこの「タイミングのいい機会」の間に軸索成

10

20

30

40

50

長を助長することが有利であろう。例えば、疾病、疾患、または容態に関連する神経の変性または損傷の治療または防止のために、瘢痕化と無関係に軸索成長を助長することができることも望ましいであろう。例えば、もはやインヒビターに応答しないように軸索のインヒビターを中和するか、軸索の成長能力を変化させることによってミエリン中に存在する再生インヒビターの機能を遮断することができる。

【0003】

今日まで、ミエリン中で以下の3つのインヒビターが同定されている：ミエリン関連糖タンパク質（「MAG」）（非特許文献1；非特許文献2；特許文献1，特許文献2，および特許文献3；および特許文献4）、Nogo（非特許文献3；非特許文献4）；およびオリゴデンドロサイト-ミエリン糖タンパク質（oligodendrocyte myelin glycoprotein）（「Omgp」）（非特許文献5）。これらの3つの全インヒビターは、Nogo-66受容体（「NgR」）に結合して、その阻害効果を発揮する（Wangら、上記非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8）。

10

【0004】

環状アデノシンーリン酸（「cAMP」）と呼ばれる環状ヌクレオチドレベルの上昇により、MAGの阻害効果が減少し、神経線維成長を有意に改善することができることが示されている（特許文献5）。

20

【特許文献1】米国特許第5,932,542号明細書

【特許文献2】米国特許第6,203,792号明細書

【特許文献3】米国特許第6,399,577号明細書

【特許文献4】国際公開第97/01352号パンフレット

【特許文献5】国際公開第01/85981号パンフレット

【非特許文献1】McKerracher et al., Neuron 13:805-11 (1994)

【非特許文献2】Mukhopadhyay et al., Neuron 13:757-67 (1994)

【非特許文献3】Chen et al., Nature 403:434-439 (2000)

【非特許文献4】Grandpre et al., Nature 403:439-444 (2000)

【非特許文献5】Wang et al., Nature 417:941-944 (2002)

30

【非特許文献6】Domeniconi et al., Neuron 35:283-290 (2002)

【非特許文献7】Fournier et al., Nature 409:341-346 (2001)

【非特許文献8】Liu et al., Science 297:1190-1193 (2002)

【発明の開示】

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の概要

本発明者らは、cAMPが分泌性白血球プロテアーゼインヒビター（「SLPI」）産生を大いに増加させ、SLPIが神経細胞成長のミエリンインヒビターの阻害的影響を克服してニューロン（例えば、軸索）の再生を促進するという驚くべき発見をした。本発明者らの発見の前に、SLPIは神経刺激機能を有することは知られていなかった。

【0006】

したがって、本発明は、神経の生存、成長、および再生を促進するための以下の段落に記載の方法を提供する。SLPIは抗炎症薬でもあるので、炎症に起因する二次ニューロ

50

ン障害の防御でも有用である。

【0007】

本発明は、ニューロンをSLPIと接触させ、それにより、軸索伸長を刺激する工程を含む、ニューロンの軸索伸長を刺激する方法を提供する。

【0008】

本発明はまた、ニューロンをSLPIと接触させ、それにより、NF-Bまたはc-jun活性を減少させる工程を含む、ニューロン中のNF-Bまたはc-jun活性を減少させる方法を提供する。

【0009】

ニューロンをSLPIと接触させ、それにより、阻害を減少させる工程を含む、ミエリンによってニューロンの軸索伸長の阻害を減少させる方法も提供する。 10

【0010】

上記の各実施形態では、接触工程が、ニューロンの細胞体またはニューロンの軸索をSLPIと接触させることを含むことができる。いくつかの実施形態では、ニューロンは損傷している。ニューロンは、中枢神経系（例えば、脊髄）または末梢神経系のニューロンであり得る。いくつかの実施形態では、ニューロンは運動ニューロンであり得る。

【0011】

本発明はまた、SLPIを含む組成物を患者に投与する工程を含む、患者における神經成長または神經系の再生を刺激する方法を提供する。SLPIを含む組成物を患者に投与する工程を含む、患者における障害または神經組織の損傷を治療する方法も提供する。本発明はまた、SLPIを含む組成物を患者に投与する工程を含む、患者の疾患、疾病、または容態に関連する神經の変性または損傷を治療または防止する方法を提供する。本発明の方法のいくつかの実施形態では、患者は、神經の疾患、疾病、または障害（脊髄損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、多系統萎縮症、進行性核上麻痺、動脈瘤、非虚血性の頭蓋または脳の外傷、末梢神經障害、ニューロパシー、脱髓疾患、ALS、シャルコー・マリー・トゥース病、または脊髄運動萎縮症（spinal motor atrophy）が含まれるが、これらに限定されない）を罹患している。 20

【0012】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図面から明らかであろう。 30

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

発明の詳細な説明

SLPIは、白血球セリンプロテアーゼ（好中球由来のエラスターーゼおよびカテプシンG、肥満細胞由来のチマーゼおよびトリプターゼ、ならびに膵腺房細胞由来のトリプシンおよびキモトリプシンなど）の強力なインヒビターである（Jin et al., Cell 88: 417-26 (1997) およびその参考文献；Grutter et al., The EMBO Journal 7: 345-51 (1988)）。SLPIは、先天性の宿主防御に関する複数の機能（抗炎症性、抗ウイルス性、抗真菌性、および抗細菌性が含まれる）を有する。さらに、マウスにおいて皮膚創傷治癒を促進することが見出されている（Ashcroft et al., Nature Med. 6: 1147-53 (2000)）。Wang et al., Mol. Pharma. 64: 833-40 (2003) も参照のこと。 40

【0014】

免疫系では、SLPIは、LPS応答を阻害するリポ多糖（LPS）誘導性IFN抑制性食細胞産物であることが示されている。SLPIは、アネキシンIIを介してヒトマクロファージの膜に結合する（Jin et al., (上記)、およびMa et al., J. of Exp. Med. 200: 1337-46 (2004)）。SLPIは、単球中のIL-8およびTNF-遺伝子のプロモーター領域中のNF-B結合部位に結合し、これらの遺伝子発現を阻害する（Taggart et al., J. Exp. 50

. Med. 202: 1659 - 68 (2005) および引用された参考文献）。SLPI の抗炎症機能がかかる遺伝子阻害から生じることが示唆された。

【0015】

最近の研究で、白血球（例えば、好中球およびマクロファージ）によって媒介される活性化プロテアーゼの急速な阻害および炎症反応のその抑制（虚血性脳障害に寄与する）により、SLPI が局所性卒中（focal stroke）で神経保護的役割を果たし得ることが示唆されている（Taggart et al., (上記)；Ilzcka et al., Cerebrovascular Disease 13: 38 - 42 (2002)）。血清 SLPI レベルの上昇は、ヒト卒中患者でも認められる（Ilzcka et al., (上記)）。しかし、存在するとすれば、SLPI が虚血部位でニューロン自体にどのような影響を及ぼすのか知られていない（Wang et al., (上記)）。

10

【0016】

ヒト SLPI は、耳下腺唾液、精漿、子宮頸管粘液、鼻粘液、および気管支粘膜中に見出される 11.7 kDa タンパク質である。ヒト上皮細胞では、SLPI は構成性に発現し、その発現は、超生理学的濃度（supraphysiological concentration）のホルボールエステル、TNF-α、および LPS ならびにエラスターとコルチコステロイドとの相乗的組み合わせによって増加する（Jin et al., (上記)）。SLPI は、カルボキシ末端ドメイン中のロイシン 72（ヒト型）に存在するプロテアーゼ阻害部位を有する 2 つのシステインリッチドメインから構成される。

20

【0017】

本発明者らは、SLPI がインビトロでの神経突起（軸索が含まれる）の成長を促進し、インビオで投与した場合にニューロンの成長能力を増大させることを発見した。この発見は、SLPI が中枢神経系障害および末梢神経系障害（脊髄損傷など）ならびに軸索変性によって特徴づけられる疾患の治療で有用であることを示す。SLPI は、神経再生または神経変性の進行の治療または遅延にも有用であり得る。本発明者らは、SLPI がニューロン中の遺伝子転写の調節によってその刺激効果を達成することができる見出した。

20

本発明で有用な SLPI

本発明の方法で使用される SLPI は、ヒト、ラット、およびマウスなどの哺乳動物由来の野生型 SLPI タンパク質またはその種々のホモログ、対立遺伝子変異型、およびイソ型であり得る。ヒト SLPI、ラット SLPI、およびマウス SLPI のアミノ酸配列は、Wang et al., (上記) に記載されている。全長ヒト SLPI 配列およびその X 線結晶構造については、Grutter et al., (上記) も参照のこと。

30

【0018】

アミノ酸配列の変動が少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、90%、95%、最も好ましくは 99% またはそれを超えた配列同一性を保持し、分子が生物活性（例えば、公知の任意の方法（例えば、第 35 段落および以下の実施例 2 に記載の神経突起伸長アッセイ）によってアッセイした場合の神経の成長および再生の調節）を保持する場合、SLPI のアミノ酸配列の軽微な変動（variations）も本発明の一部と見なされる。特に、保存的アミノ酸置換が意図される。保存的置換は、その側鎖に関連するアミノ酸ファミリー内で起こる置換である。遺伝学的に、コードされたアミノ酸は、一般に、以下のファミリーに分類される：（1）酸性 = アスパラギン酸、グルタミン酸；（2）塩基性 = リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性 = アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）無荷電性極性 = グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。より好ましいファミリーは、以下である：セリンおよびトレオニンは脂肪族ヒドロキシファミリーであり、アスパラギンおよびグルタミンはアミド含有ファミリーであり、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンは脂肪族ファミリーであり、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは芳香族ファミリーである。

40

50

。

【0019】

例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンとの単離置換、アスパラギン酸のグルタミン酸との単離置換、トレオニンのセリンとの単離置換、またはアミノ酸の構造的に関連するアミノ酸との類似の置換は、得られた分子の性質に大きな影響を及ぼさないであろうと予想することが妥当である。アミノ酸の変化によって機能的なペプチドまたはタンパク質が得られるかどうかを、例えば、本明細書中に詳述したアッセイを使用したペプチドまたはタンパク質誘導体の比活性のアッセイによって容易に決定することができる。

【0020】

しかし、本発明のSLPIは、野生型配列と高い相同意または配列同一性を示す必要はない。実際、ラット、マウス、およびヒトSLPIの相同意は高くない。ラットSLPIは、そのマウスおよびヒト対応物とそれぞれ約80%および60%のアミノ酸配列しか同一でない(Feuerstein, (上記))。しかし、これらのSLPIは、構造が非常に類似している(例えば、Jin et al, (上記)を参照のこと)。したがって、本発明で使用可能なSLPIタンパク質が公知の野生型配列と配列同一性が比較的低い(例えば、50%、60%、または70%)場合、これらのタンパク質は全体的なタンパク質の構造および機能(例えば、神経刺激機能、セリンプロテアーゼ阻害機能、およびNF-B阻害機能)に極めて重要な位置でアミノ酸残基を保存していることが好ましい。例えば、Wang et alの図2は、ラット、マウス、およびヒトSLPIにおける高度に保存されたシステイン残基およびプロリン残基を示す。Mulligan et al (Am. J. of Path. 156: 1033-39 (2000))は、本発明で有用なSLPI改変体の例をさらに示す。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明で使用可能なSLPIには、所望のSLPI機能を保存した全長SLPIのフラグメントも含まれる。例えば、Masuda et al. (British J. of Pharma. 115: 883-888 (1995))は、全長SLPIのC末端ドメインを含み、有意なレベルの全長分子のセリンプロテアーゼおよびNF-B阻害活性を有するSLPIタンパク質を記載している。

【0022】

本発明のSLPIには、機能的部分に連結したSLPIを含む融合タンパク質も含まれる。機能的部分を使用して、SLPIを所望のニューロン部位に仕向け、SLPIの機能(インビボ半減期が含まれる)を増強するか、SLPIの产生および精製を容易にすることができます。例えば、この部分は、遺伝子マーカー、酵素マーカー、化学的マーカー、免疫学的マーカー(エピトープタグ、myc、血球凝集素(HA)、GST、免疫グロブリン、-ガラクトシダーゼ、ビオチンtrpE、タンパク質A、-ラクタマーゼ、-アミラーゼ、マルトース結合タンパク質、アルコールデヒドロゲナーゼ、ポリヒスチジン(例えば、ポリペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシル末端での6つのヒスチジン)、lacz、緑色蛍光タンパク質(GFP)、酵母接合因子、GAL4転写活性化またはDNA結合ドメイン、ルシフェラーゼ、および血清タンパク質(オボアルブミン、アルブミン、およびIgGの定常ドメイン(例えば、Fc)など)など)であり得る。例えば、Godowski et al, 1988およびAusubel et al, (上記)を参照のこと。免疫グロブリンFc領域は、免疫グロブリン分子が成熟形質細胞から高レベルで分泌されるので、分泌融合タンパク質の作製に特に有用な融合パートナーであり、そしてFc領域は、他のタンパク質由来のドメインを許容し、小胞体および分泌経路を介してこれらを有效地に指向させる「代理母」として十分に適応するようである。

【0023】

融合タンパク質はまた、特定の酵素切断部位(第XIII因子、トリプシン、ペプシン、または当該分野で公知の任意の他の酵素などの酵素によって認識される部位など)も含むことができる。融合タンパク質を、典型的には、上記のいずれかの組換え核酸法によって作製するか、Merrifield, 1963(本明細書中で参考として援用される)

に記載の技術などの技術を使用して化学合成するか、化学的架橋によって產生する。タグ化融合タンパク質は、エピトープまたは酵素タグを介して容易に局在化、スクリーニング、および特異的結合することが可能である。いくつかのタグにより、目的のタンパク質をファージミド（所望のタンパク質標的に結合することができるパニング剤に有用な M 13 など）の表面に提示することが可能である。融合タンパク質の別の利点は、エピトープまたは酵素タグが精製を簡潔にすることができる。これらの融合タンパク質を、しばしば单一工程で、アフィニティクロマトグラフィによって精製することができる。例えば、*H i s*⁶ タグ化タンパク質を、*N i* アフィニティカラムで精製することができ、GST 融合タンパク質を、グルタチオンアフィニティカラムで精製することができる。同様に、*I g G* の *F c* ドメインを含む融合タンパク質を、プロテイン A またはプロテイン G カラムで精製することができ、*m y c* などのエピトープタグを含む融合タンパク質を、抗 *c - m y c* 抗体を含む免疫親和性カラムを使用して精製することができる。エピトープタグは、必須の遺伝子によりコードされるタンパク質から、精製後に切断することができる酵素切断部位によって、分離されると好ましい。融合タンパク質の第 2 の利点は、エピトープタグを使用して、スクリーニング標的の親和性結合によって融合タンパク質をプレートまたはカラムに結合させることである。

10

【0024】

本発明の S L P I タンパク質を、誘導体化、例えば、ペグ化、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、グリコシル化、またはユビキチン化することができる。いくつかの実施形態では、誘導体を、例えば、放射性同位体 (¹²⁵I, ³²P, ³⁵S, および ³H など) で標識した。他の実施形態では、誘導体を、標識したリガンドの特定の結合対メンバーとして役立ち得るフルオロフォア、化学発光剤、酵素、および抗リガンドで標識した。

20

【0025】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、S L P I タンパク質の代わりに S L P I タンパク質の三次元構造を模倣するペプチドのアナログおよび模倣物を使用する。かかるペプチド模倣物は、N F - B およびセリンプロテアーゼ阻害機能を S L P I と競合することができる。ペプチド模倣物は、種々の理由（化学的安定性がより高いこと、生物活性および薬理学的性質（半減期、吸収、効力、有効性など）が増強されること、特異性が変化する可能性があること（例えば、広範な生物活性）、抗原性の減少、および產生に関連する経済上の考慮が含まれる）で、天然に存在するペプチドより優れ得る。

30

【0026】

一般に、ペプチド模倣物は、パラダイムポリペプチド（すなわち、所望の生化学的性質または薬理学的活性を有するポリペプチド）に構造が類似しているが、当該分野で周知の方法によって - - C H₂ N H - - 、 - - C H₂ S - - 、 - - C H₂ - C H₂ - - 、 - - C H = C H - - (シスおよびトランス) 、 - - C O C H₂ - - 、 - C H (O H) C H₂ - 、および B C H₂ S O - からなる群から選択される結合と随意に置換された 1 つまたは複数のペプチド結合を有する。コンセンサス配列の 1 つまたは複数のアミノ酸の同系の D アミノ酸との系統的置換（例えば、L - リジンの D - リジンでの置換）を使用して、より安定なペプチドを生成することもできる。さらに、コンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列変化を含む制限されたペプチドを、当該分野で公知の方法 (R i z o and G i e r a s c h , Ann . Rev . Biochem . 61 : 387 (1992)) (例えば、ペプチドを環状化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基の付加) によって生成することができる。

40

【0027】

1 つの実施形態では、本発明の模倣物は、化学構造モチーフを天然分子に類似の所望の分子相互作用を容易にすることによってタンパク質二次構造のエレメントを模倣するペプチド含有分子である（例えば、Johnson et al . , (1993) Peptide Turn Mimetics, in Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto et al . , (editors) Chapman and Hall を参照のこと）。

50

【0028】

別の実施形態では、本発明のペプチドアナログは、「ペプチド模倣物（peptide mimetics）」または「ペプチド模倣物」とも呼ばれるテンプレートペプチドの性質に類似の性質を有する非ペプチド化合物であり、記載のように、コンピュータ化分子モデリングを用いて創り出すことができる（例えば、Fauchere, (1986) *Adv. Drug Res.* 15, 29-69; Weber & Freidinger, (1985) *Trends Neurosci.* 8, 392-396; Evans et al., (1987) *J. Med. Chem.* 30, 1229-1239（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【0029】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、SLPIタンパク質の代わりにSLPIタンパク質のアゴニストおよびSLPIタンパク質または遺伝子の正のレギュレーター（哺乳動物においてSLPI転写をアップレギュレートすることができるレギュレーターが含まれる）を使用する。

SLPIの使用方法

本発明は、神経系に影響を及ぼすことができる様式で本発明のSLPI分子を投与する工程を含む、神経組織またはニューロンに対する損傷を治療または防止する方法を提供する。神経系に影響を及ぼすことができる様式で本発明のSLPI分子を投与する工程を含む、神経組織またはニューロンへの神経の再生を促進する方法も提供する。好ましい実施形態では、その損傷は、末梢神経の障害またはニューロパシー、頭蓋または脳の外傷、動脈瘤、脊髄損傷、または卒中に起因する。

【0030】

本発明はまた、神経系に影響を及ぼすことができる様式でSLPI分子を投与する工程を含む、疾病、疾患、または病態に関連する神経の変性または損傷を治療または防止する方法を提供する。神経系に影響を及ぼすことができる様式で本発明のSLPI分子を投与する工程を含む、疾病、疾患、または病態に関連する神経組織またはニューロンへの神経の再生を促進する方法も提供する。好ましい実施形態では、疾病、疾患、または病態は、アポトーシスに関連する。別の好ましい実施形態では、疾病、疾患、または病態は、脱髓疾患に起因する。治療することができる疾患には、以下が含まれるが、これらに限定されない：アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、ハンチントン病、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリング病）、進行性核上麻痺、および脱髓疾患（多発性硬化症、单相性脱髓、脳脊髓炎、多病巣性白質脳症、汎脳炎、マルキアファーヴァ-ビニヤーミ病、脳橋ミエリン溶解（pontine myelinolysis）、副腎脳白質ジストロフィ、ペリツェーウス-メルツバッヒャー病（Pelizaeus-Maerzbacher disease）、海綿状変性、アレキサンダー病、キャナヴァン病、異染性白質ジストロフィ、クラッベ病、脊髄運動萎縮症（spinal motor atrophy）、シャルコー-マリー-トゥース病が含まれる）、および眼疾患（視神経炎、糖尿病性網膜症、黄斑変性、および緑内障など）。

【0031】

本発明はまた、神経系に影響を及ぼすことができる様式でSLPI分子に曝露したニューロンを投与する工程を含む、疾病、疾患、または病態に関連する神経の変性または損傷を治療または防止する方法を提供する。神経系に影響を及ぼすことができる様式でSLPI分子に曝露したニューロンを投与する工程を含む、疾病、疾患、または病態に関連する神経組織またはニューロンへの神経の再生を促進する方法も提供する。1つの実施形態では、ニューロンを、本発明のSLPI分子にエキソビオで（例えば、培養物中で）曝露する。

SLPIによって調節される標的化タンパク質によってニューロン再生を刺激する方法

本発明はまた、SLPIによってダウンレギュレートされるニューロン中のタンパク質の発現または活性を減少させ、それにより、SLPIの供給によりなされると等価なニューロン刺激を達成する方法を提供する。例えば、処置を必要とするニューロン部位へのS

L P I の供給の代わりに、(1)炎症誘発性サイトカイン(例えば、TNF - α および TNF - β)；(2)スーパーオキシドジムスターーゼ(Cu / Zn および Mn)などのストレス応答遺伝子；および(3)プロアポトーシス因子(Bax、カスパーゼ(例えば、カスパーゼ-11)、ならびにTRAF-1 および 2 など)などのアポトーシス関連タンパク質の発現または活性を減少させることができる。他の実施形態では、(1)成長因子受容体(例えば、EGFR)；(2)一定の酵素(BACE(部位アミロイド前駆体タンパク質切断酵素(阻害に必要な事象である p75 受容体の切断に関与することが最近示された酵素ファミリーのメンバー)など)；(3)タンパク質キナーゼ C；および(4)ミエリンタンパク質(例えば、ミエリン塩基性タンパク質)などの軸索成長のミエリン阻害に関連するタンパク質の発現または活性を減少させることができる。さらに他の実施形態では、-アミロイドおよびアポリポタンパク質 E などのアルツハイマー病に関連するタンパク質の発現または活性を減少させることができる。

有用な S L P I の同定

本発明で有用な S L P I を、神経突起伸長アッセイによって同定することができる。神経突起伸長アッセイを、例えば、精製ミエリンの存在下で培養ニューロンを使用して行うことができる。例えば、GrandPre et al. Nature 417: 547-551 (2002)、ミエリン調製物については、Norton and Poduslo, J. Neurochem. 21: 749-757 (1983) も参照のこと。あるいは、神経突起伸長アッセイを、成長許容基質(例えば、細胞表面神経阻害分子(MAG(例えば、Domeniconi et al., Neuron 35: 283-290 (2002)；国際公開第97/01352号パンフレットを参照のこと)；OMgp(例えば、Wang et al., Nature 417: 941-944 (2002)など)を発現するように操作されたトランスフェクトした細胞(例えば、COS 細胞または CHO 細胞)の単層または NgR または NgR 誘導体を発現する細胞(例えば、Domeniconi et al., Neuron 35: 283-290 (2002)；Liu et al., Science 297: 1190-1193 (2002)；Wang et al., Nature 417: 941-944 (2002)；GrandPre et al., Nature 417: 547-551 (2002)を参照のこと)に対して行うことができる。当該分野で公知のさらなる方法を使用して、神経突起伸長をアッセイすることもできる。

S L P I ポリペプチドの產生方法

本発明は、S L P I コード配列が発現調節配列に作動可能に連結された、S L P I ポリペプチドをコードする発現ベクターを提供する。広範な種々の宿主 / 発現ベクターの組み合わせを使用することができる。有用な発現ベクターは、例えば、染色体配列、非染色体配列、および合成核酸配列のセグメントを含むことができる。細菌および真核生物の宿主細胞(酵母細胞または哺乳動物細胞など)に有用な発現ベクターを使用することができる。例えば、種々のプラスミド、溶解性ウイルスベクター(例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、およびバキュロウイルス)、エピソームウイルスベクター(例えば、ウシバピローマウイルス)、およびレトロウイルスベクター(例えば、マウスレトロウイルス)を使用して、哺乳動物細胞中で発現させることができる。昆虫細胞に有用なベクターには、バキュロウイルスベクターおよび pVL941 が含まれる。(ウイルスベクターを使用した遺伝子送達についてのより詳細な考察については、以下を参照のこと)。

【0032】

さらに、広範な種々の発現調節配列のいずれかを、これらのベクター中で使用して、本発明のDNA配列を発現することができる。転写を調節する発現調節配列には、例えば、プロモーター、エンハンサー、および転写終結部位が含まれる。転写後事象を調節する真核細胞中の発現調節配列には、スプライス供与部位およびスプライス受容部位ならびに転写されたRNAの半減期を変化させる配列(例えば、ポリ(A)付加を指示する配列またはRNA結合タンパク質の結合部位)が含まれる。翻訳を調節する発現調節配列には、リボゾーム結合部位、特定の細胞区画に対してか特定の細胞区画内にポリペプチドの発現を

標的化させる配列、ならびに翻訳および／またはmRNA分解の速度または効率を変化させる5'および3'非翻訳領域中の配列が含まれる。

【0033】

原核細胞または真核細胞およびそのウイルスの遺伝子発現を調節する有用な発現調節配列の多くの例（構成性プロモーター、誘導性プロモーター、および組織特異的プロモーター、ならびに／またはエンハンサー配列が含まれる）が、公知である。原核生物宿主と共に使用するのに適切なプロモーターには、制御された - ラクタマーゼ、ラクトース、トリプトファン（trp）、および ファージプロモーター系、アルカリホスファターゼ、および lac プロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。細菌系で用いるプロモーターは、目的のポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結されたシャイン - ダルガーノ（S. D.）配列を含むことが好ましい。酵母宿主での使用に適切なプロモーターの例には、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素のプロモーターが含まれる。増殖条件によって調節される転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ならびにマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素のプロモーター領域である。

10

【0034】

哺乳動物宿主細胞中のベクターからの転写を、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス2または5など）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉種ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、およびシミアンウイルス40（SV40）などのウイルスゲノム、異種哺乳動物プロモーター（例えば、アクチンプロモーター、または免疫グロブリンプロモーター）、および熱ショックプロモーターから得たプロモーターによって調節することができる（かかるプロモーターが宿主細胞系と適合する場合）。他の有用な発現調節配列には、例えば、ウイルスLTR（モロニーマウス白血病ウイルスのLTR、SV40の初期および後期プロモーター、アデノウイルスまたはサイトメガロウイルスの最初期プロモーター、lac系、trp系、TACまたはTRC系、その発現がT7 RNAポリメラーゼによって管理されるT7プロモーター、ファージ1の主なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の調節領域、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター（例えば、Pho5）、酵母a接合因子のプロモーター、バキュロウイルス系の多角体プロモーター、原核細胞もしくは真核細胞またはそのウイルスの遺伝子発現を調節することが公知の他の配列、およびそれらの種々の組み合わせが含まれる。

20

30

【0035】

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写を、ベクターへのエンハンサー配列の挿入によって増加させることができる。エンハンサーは、プロモーター上で作動して転写を増加させるDNAのシス作動性エレメントであり、通常、約10～300bpである。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在公知である（グロビン、エラスター、アルブミン、 - フェトプロテイン、およびインスリン）。しかし、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例には、複製起点の終わりに近い部位上のSV40エンハンサー（bp100～270）、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター／エンハンサー、複製起点の終わりに近い部位上のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーを、目的のコード配列の5'側または3'側の位置でベクターにスプライシングすることができるが、プロモーターから5'側の部位に配置することが好ましい。

40

【0036】

好ましい実施形態では、プロモーターおよび／または調節配列を、特に神経系細胞（例えば、神経細胞または膠細胞）中で発現（好ましくは、調節された発現）するように特異的にデザインする。より好ましい実施形態では、プロモーターは、神経特異的プロモータ

50

ー（例えば、神経特異的エノラーゼプロモーター）である。他の神経特異的プロモーターが、当該分野で公知である（例えば、米国特許第6,066,726号および同第5,753,502号を参照のこと）。したがって、好ましい実施形態では、本発明の核酸は、軸索成長の見込みの減少によって特徴づけられる患者の障害、病態、または疾患の治療または防止に有用な少なくとも1つの転写調節配列に作動可能に連結する。

【0037】

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトの細胞、または他の多細胞生物由来の有核細胞）中で使用される発現ベクターは、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列も好ましくは含む。かかる配列は、一般に、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'（時折、3'）非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分中のポリアデニル化フラグメントとして転写されたヌクレオチドセグメントを含む。10

【0038】

好ましい核酸ベクターには、選択マーカー遺伝子、および任意選択的に増幅可能なマーカー遺伝子（例えば、DHFR）ならびに目的の遺伝子のコピー数を増幅させるための手段も含まれる。かかるマーカー遺伝子は、当該分野で周知である。核酸ベクターは、安定化配列（例えば、oriまたはARS様配列およびテロメア様配列）を含むこともできるか、あるいは、宿主細胞ゲノムへの好ましい定方向または非定方向の組み込みにデザインすることができる。20

【0039】

好ましい実施形態では、本発明の核酸配列を、目的のコードされた核酸配列を含む、タンパク質をコードするRNAを高レベルで発現可能な発現ベクターにインフレームで挿入する。核酸のクローニングおよび配列決定法は当業者に周知であり、種々の実験マニュアル（Sambrook et al., (上記)；およびAusubel et al., (上記)）に記載されている。生物学的、化学的、および免疫学的試薬の製造者からの製品情報からも有用な情報が得られる。20

【0040】

勿論、全てのベクターおよび発現調節配列が本発明の核酸配列を発現するように等しく十分に機能するわけではない。全ての宿主が同一の発現系を使用して等しく十分に機能するわけではない。しかし、当業者は、過度の実験を行うことなく、且つ本発明の範囲を逸脱することなく、これらのベクター、発現調節配列、および宿主を選択することができる。発現調節配列の選択では、種々の要因も考慮すべきである。これらには、例えば、配列の相対強度、その調節能力（例えば、調節可能な誘導性発現など）、および特に潜在的な二次構造に関する本発明の核酸配列との適合性が含まれる。発現ベクターのデザインは、形質転換すべき宿主細胞の選択および／または発現が望まれるタンパク質の型などの要因にも依存し得る。さらに、ベクターのコピー数およびベクターのコピー数を調節する能力、およびベクターによってコードされる任意の他のタンパク質（マーカーなど）の発現も考慮すべきである。30

【0041】

単細胞宿主（例えば、細菌、酵母、および培養した動物細胞または植物細胞）を、選択されたベクターとの適合性、本発明の核酸細胞によってコードされる産物の毒性、その分泌特性、ポリペプチドを正確に折り畳む能力、その発酵または培養の要件、および本発明の核酸細胞によってコードされる産物の精製しやすさを考慮することによって選択すべきである。40

【0042】

本発明のポリペプチドの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例には、ショウジョウバエS2およびスプドブテラSf9などの昆虫細胞ならびに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞およびCOS細胞が含まれるが、これらに限定されない。他の例には、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7、ATCC CRL-1650

51) ; ヒト胎児腎臓株 (293細胞または懸濁培養での増殖のために選択された293細胞) ; 機能的DHF遺伝子を欠くCHO細胞 (例えば、Ur1aubおよびChasin、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 77:4216(1980)) ; マウスセルトリ細胞 (例えば、TM4) ; ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75) ; ヒト肝臓細胞 (例えば、HepG2、BB8065) ; およびマウス乳腺腫瘍細胞 (例えば、MMT060562、ATCC CCL51) が含まれる。ヒト幹細胞 (例えば、米国特許第6,245,566号および同第6,090,622号を参照のこと) 、特に神経幹細胞および関連する送達系 (例えば、米国出願公開第20020164309号および同第20020064873号) を、本発明にしたがって使用することもできる。適切な宿主細胞の選択では、本発明の核酸を保有するベクターを考慮し、これは、当業者によってなされる範囲内である。

10

【0043】

宿主細胞への核酸の形質転換および他の導入方法 (例えば、抱合、プロトプラスト形質転換または融合、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染、およびプロトプラスト融合) を、当該分野で周知の種々の方法によって行うことができる (例えば、Ausubel, (上記) およびSambrook et al., (上記) を参照のこと)。使用する宿主細胞、ベクター、および形質転換法に応じて、ポリペプチドの一過性および安定な発現は構成性または誘導性であろう。当業者は、ポリペプチドが一過性または安定な様式で発現するかどうか、およびタンパク質が構成性または誘導性に発現するかどうかを決定することができる。

20

【0044】

組換えタンパク質のトランスフェクション、発現、および精製の詳細は十分に報告されており、当業者に理解されている。細菌細胞発現系中での外来遺伝子の組換え産生で使用される各工程の種々の技術的態様に関するさらなる詳細を、当該分野の多数のテキストおよび実験マニュアルで見出すことができる。例えば、Ausubel et al., (上記) 、およびSambrook et al., (上記) 、およびKieser et al., (上記) (本明細書中で参考として援用される) を参照のこと。

30

薬学的組成物および治療

本発明のSLPIを、薬学的組成物に処方し、取り組むべき特定の臨床的病態を処置するための治療有効用量にてインピボで投与する。1つまたは複数の本発明の薬学的組成物の投与は、神経系における神経の成長または再生の調節および促進、神経組織またはニューロンの障害または損傷の治療、および神経系の外傷、疾病、病態、または疾患に関連する神経変性の治療に有用である。かかる外傷、病態、疾患、疾病、または障害には、以下が含まれるが、これらに限定されない：頭蓋または脳の外傷、動脈瘤、卒中、脊髄損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、ハンチントン病、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症 (ルー・ゲーリング病) 、進行性核上麻痺、および脱髓疾患 (多発性硬化症、単相性脱髓、脳脊髓炎、多病巣性白質脳症、汎脳炎、マルキアファーヴァー - ビニャーミ病、脳橋ミエリン溶解、副腎白質ジストロフィ、ペリツェーウス - メルツバッヒャー病、海綿状変性、アレキサンダー病、キャナヴァン病、異染性白質ジストロフィ、クラッペ病、脊髄運動萎縮症、およびシャルコー - マリー - トゥース病が含まれる。)。

40

【0045】

本発明の組成物を、単独または1つまたは複数の治療薬または診断薬と組み合わせて投与することができる。例えば、本発明の組成物を、例えば、抗炎症薬、抗凝固薬、抗血栓剤、または組織プラスミノゲンアクチベーター (これらに限定されない) と共に投与することができる。

【0046】

治療すべき患者は、ヒトまたは脊椎動物であり得る。所与の適用のための好ましい薬学的処方物および治療に有効な投与計画の決定は、例えば、患者の病態および体重、所望の

50

治療範囲、および患者の治療許容度を考慮して、当業者によってなされる範囲内である。

【0047】

本発明のSLPI(単離型および精製型、その塩または薬学的に許容可能な誘導体が含まれる)を、ニューロンの障害または疾病の治療に使用される薬剤の従来より許容されている任意の投与様式を使用して投与することができる。1つの実施形態では、1つまたは複数の本発明のSLPI分子を発現するように操作された自己細胞、同種(alloologous)細胞、または異種細胞を、治療計画で使用することができる。かかる操作された細胞を使用して治療薬を合成し、独立して宿主に投与することができる。あるいは、操作された細胞から分泌または放出される本発明のSLPI分子を発現するDNAまたはRNAなどの外因性核酸で形質転換したか、トランسفェクトしたか、感染させた細胞を、例えば、かかる操作された細胞を治療を必要とする標的化された組織または細胞と連携した宿主の領域に移植することによって治療薬として直接使用することができる。

10

【0048】

本発明のポリペプチドが常に分泌タンパク質というわけではない場合、宿主細胞からのタンパク質の分泌に必要なシグナルペプチドを有するように操作することができる。かかるシグナルペプチドは、その長さ(約16~30アミノ酸)および疎水性によって特徴づけられ、そしてそれらは、アミノ酸配列レベルでは高度には保存されていない(例えば、Lodish et al., Molecular Cell Biology, 3d ed., Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York, 1995, Chapter 16を参照のこと)。真核細胞中での分泌のためのシグナル配列として機能するアミノ酸残基を、当業者に周知の多数の日常的な遺伝子操作方法のいずれかによって異種タンパク質のN末端に付けることができる。例えば、Farrell et al., Proteins, 41, pp. 144-53(2000)(<http://www.healthtech.com/2001/pex>も参照のこと); Borngraber et al., Protein Expr. Purif., 14, pp. 237-46(1998); Collins-Racie et al., Biotechnology, 13, pp. 982-987(1995); 米国特許第5,747,662号明細書; 国際公開第00/50616号パンフレット; 国際公開第99/53059号パンフレット; および国際公開第96/27016号パンフレット(それぞれその全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。本発明のポリペプチドの分泌形態を発現する宿主細胞は、神経系を浸す脳脊髄液(CSF)中のポリペプチドレベルを上昇させると予想される。あるいは、例えば、CSFへの直接注射によって本発明の分子を供給することが可能である。本発明の分子の他の形態を分泌するトランسفェクトした細胞を、類似の様式で、ニューロンの障害または変性部位に投与することができる。

20

【0049】

その後に本発明のSLPI分子を過剰発現する細胞へのウイルスまたは非ウイルス遺伝子送達を、当業者に周知の多数の技術のいずれかによってex vitroまたはインビボで行うことができる。多数のかかる送達方法は、ニューロンで作用することが示されている。例えば、米国出願公開第20020168760号(ニューロン細胞への遺伝子移入のためのレトロウイルスベクター);米国出願公開第20020168338号(中枢神経系へのDNA送達);Cherksey et al.の米国特許第6,210,664号(組換えレトロウイルス発現ベクターを含む中枢神経系への遺伝子移入方法);Kaplitt et al.の米国特許第6,180,613号(神経系細胞へのDNAのAAV媒介性送達);Hayes et al.の米国特許第6,096,716号(中枢神経系細胞のリポソーム媒介性トランسفェクション);Kochanek et al.の米国特許第5,981,225号(遺伝子移入ベクター、これを含む組換えアデノウイルス粒子、その產生方法、およびその使用方法);Gage et al.の米国特許第5,762,926号(中枢神経系の欠損、疾患、または損傷を治療するための遺伝子操作された細胞の移植方法);国際公開第008192号(遺伝子送達のためのヘルペ

30

40

50

スイルスペクター) ; およびCA2247912号(中枢神経系中の移植媒介性遺伝子送達のための遺伝子操作した初代乏突起膠細胞)(その全開示が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

【0050】

例えば、ニューロン細胞に、感染宿主細胞が高レベルで本発明の分子(例えば、ポリペプチド)を発現するウイルスペクターを感染させることができる。有用なウイルスペクターには、組換えレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、および単純ヘルペスウイルス-1、または損傷した軸索によって取り込まれ得る他の弱毒化ウイルス、組換え細菌プラスミドもしくは真核生物プラスミドが含まれるが、これらに限定されない。ウイルスペクターは、細胞を直接トランスフェクトすることができる。プラスミドDNAを、例えば、カチオン性リボソーム(リポフェクチン)または誘導体(例えば、抗体抱合体)、ポリリジン抱合体、グラマシジンS(gramacydin S)、人工ウイルスエンベロープまたは他のかかる細胞内キャリア、ならびに遺伝子構築物の直接注射、またはインピボで行ったリン酸カルシウム沈殿を用いて送達させることができる。特定の核酸送達系の選択は、意図する標的および投与経路(例えば、局所または全身)などの要因に依存するであろう。好ましい実施形態では、ベクター構築物を、発現産物が血液脳関門を通過することができるような方法で使用する。さらに、発現をインピボ調節することができるベクターは、細胞中での発現のインピトロ調整(本明細書などに記載のエキソビオアッセイ系での使用など)にも有用であると認識される。

10

20

30

40

【0051】

本発明で有用な1つの好ましいウイルス送達系は、アデノウイルス由来ベクターを使用する。アデノウイルスのゲノムを、目的の遺伝子産物をコードおよび発現するが、正常な溶解ウイルスの生活環を複製する能力に関して不活化されるように操作することができる。例えば、Berkner et al. Biotechniques 6:616(1988); Rosenfeld et al. Science 252:431-434(1991); およびRosenfeld et al. Cell 68:143-155(1992)を参照のこと。アデノウイルスAd株5d1324型またはアデノウイルスの他の型(例えば、Ad2、Ad3、Ad7など)由来の適切なアデノウイルスベクターは、当業者に周知である。組換えアデノウイルスは、これらが非分裂細胞に感染することができず、これらを使用して広範な細胞型に感染させることができるという点で、一定の状況で有利であり得る(Rosenfeld et al.(上記))。さらに、ウイルス粒子は比較的安定であり、精製および濃縮が可能であり、上記のように、感染範囲に影響を及ぼすように改変することができる。さらに、移入したアデノウイルスDNA(およびこれに含まれる外来DNA)を宿主細胞のゲノムに組み込まないがエピソームに保持されることにより、移入したDNAが宿主ゲノムに組み込まれるようになる(例えば、レトロウイルスDNA)状況における挿入変異誘発の結果として起こり得る潜在的に問題が回避される。さらに、アデノウイルスゲノムの外来DNAを保有する能力は、他の遺伝子送達ベクターと比較して大きい(8キロベースまで)(Berkner et al.(上記参照された); Haj-Ahmand and Graham J. Virology 57:267(1986))。現在使用されており、それにより、本発明で好ましい最も複製欠損のアデノウイルスペクターは、ウイルスE1およびE3遺伝子の全部または一部を欠失しているが、80%ものアデノウイルス遺伝子材料を保持する(例えば、Jones et al. Cell 16:683(1979); Berkner et al.,(上記); およびGraham et al. in Methods in Molecular Biology, E. J. Murray, Ed. (Humana, Clifton, NJ., 1991) vol. 7. pp. 109-127を参照のこと)。挿入した核酸配列の発現は、例えば、E1Aプロモーター、主要後期プロモーター(major late promoter)(MLP)および随伴するリーダー配列、E3プロモーター、または外因的に付加されたプロモーター配列の調節下にあり得る。

50

【0052】

本発明の核酸分子の送達に有用な別の好ましいウイルスベクター系は、アデノ随伴ウイルス（AAV）である。アデノ随伴ウイルスは、効率的な複製および産生生活環のためのヘルパーウイルスとしてアデノウイルスまたはヘルペスウイルスなどの別のウイルスを必要とする天然に存在する欠陥ウイルスである。（概説については、Muzychuk et al. Curr. Topics in Micro., and Immunol. 158 : 97 - 129 (1992) を参照のこと）。アデノ随伴ウイルスは、そのDNAを非分裂細胞に組み込み、高い頻度の安定な組み込みを示すことができる数少ないウイルスのうちの1つである（例えば、Flotte et al. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7 : 349 - 356 (1992) ; Samulski et al. J. Virol. 63 : 3822 - 3828 (1989) ; およびMcLaughlin et al. J. Virol. 62 : 1963 - 1973 (1989) を参考のこと）。AAVベクターを使用して、種々の核酸が異なる細胞型に移入されている（例えば、Hermonat et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 : 6466 - 6470 (1984) ; Tratschin et al. Mol. Cell. Biol. 4 : 2072 - 2081 (1985) ; Wondisford et al. Mol. Endocrinol. 2 : 3239 (1988) ; Tratschin et al. J. Virol. 51 : 611 - 619 (1984) ; およびFlotte et al. J. Biol. Chem. 268 : 3781 - 3790 (1993) を参考のこと）。

10

20

【0053】

本発明の核酸分子の送達に有用なさらに別の好ましいウイルスベクター系は、神経系において効率的な異種遺伝子の形質導入および発現を達成することを示した複製欠損単純ヘルペスウイルス-1(HSV-1)ベクターである(Dobson et al. Neuron. 5 : 353 (1990) ; Federoff et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 : 1636 (1992) ; Andersen et al. Hum. Gene Ther. 3 : 487 (1992) ; Huang et al. Exp. Neurol. 115 : 303 (1992) ; Fink et al. Hum. Gene Ther. 3 : 11 (1992) ; Breakerfield et al. in Gene Transfer and Therapy in the Nervous System. Heidelberg, FRG : Springer-Verlag pp 45 - 48 (1992) ; およびHo et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 : 3655 (1993))。HSV-2ベクターも記載されている(Linnik et al. Stroke. 26 : 1670 (1995) ; Lawrence et al. J. Neuroscience. 16 : 486 (1996) を参考のこと）。

30

40

【0054】

レトロウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、ヒトの遺伝子療法のための本発明の好ましいベクターである。これらのベクターは、遺伝子を細胞に効率的に送達し、導入された核酸を宿主の染色体DNAに安定に組み込む。複製欠損レトロウイルスを產生する特殊化した細胞株（「パッケージング細胞」）の開発は、遺伝子療法への適用に特に好ましい（例えば、Miller, A. D. Blood 76 : 271 (1990) を参考のこと）。レトロウイルスコード配列の一部(gag, pol, env)を、対象受容体の1つをコードする核酸に置換し、それにより、レトロウイルスを複製欠損にした組換えレトロウイルスを構築することができる。次いで、複製欠損レトロウイルスを、ビリオンにパッケージングし、これを使用して、標準的な技術によるヘルパーウイルスの使用によって標的細胞に感染することができる。組換えレトロウイルスの產生およびかかるウイルスでのインビトロまたはインビオでの細胞感染のプロトコールを、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10 - 9.14

50

および他の標準的な実験マニュアルに見出すことができる。レトロウイルスの代表例には、pLJ、pZIP、pWE、およびpEMが含まれ、これらは、当業者に周知である。狭宿主性および広宿主性レトロウイルス系の調製のためのパッケージングウイルス株の代表例には、psi.Crip、psi.Cre、psi2、およびpsi.Amが含まれる。レトロウイルスは、種々の遺伝子を多数の異なる細胞型にインピトロおよび/またはインビオで導入するために広範に使用されている。さらに、ウイルス粒子表面上のウイルスパッケージングタンパク質の改変によってレトロウイルスおよびレトロウイルスに基づくベクターの感染範囲を制限するのに有用である。(例えば、国際公開第93/25234号パンフレットおよび同第94/06920号パンフレット; Roux et al. PNAS 86:9079-9083(1989); Julian et al. J. Gen. Virol. 73:3251-3255(1992); およびGoud et al. Virology 163:251-254(1983)); Nedea et al. J. Biol. Chem. 266:14143-14146(1991)を参照のこと)。

【0055】

SLPIを、操作した細胞または本発明のかかる分子を放出または分泌するように操作した他の生体適合性材料の(例えば、脳脊髄液への)脊髄移植によって送達させることができる。随意に、本発明の1つまたは複数の分子を放出または分泌するトランスフェクトした細胞を、免疫隔離(immunoisolatory)カプセルまたはチャンバーにカプセル化し、当業者に公知の利用可能な方法を使用して脳または脊髄領域に移植する。例えば、米国特許第6,179,826号、同第6,083,523号；同第5,676,943号；同第5,653,975号；同第5,487,739号；同第4,298,002号；同第4,670,014；および同第5,487,739号；国際公開第89/04655号パンフレット；国際公開第92/19195号パンフレット；国際公開第93/00127号パンフレット；および引用文献(その全てが本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。あるいは、ポンプおよびチャンバー様デバイスを使用することができる。皮下投与のためにデザインされたポンプなどのポンプおよび/またはカテーテル様デバイスを、障害部位に皮下または髄腔内で移植または挿入して、SLPIを適時および所望の濃度で投与することができる。例えば、米国特許第4,578,057号およびその引用文献を参照のこと。埋め込みポンプについては、例えば、http://www.medtronic.comを参照のこと。それらは、それぞれ本明細書中で参考として援用される。

【0056】

本発明の分子が血液脳関門を通過することができる場合、障害部位から離れた位置に移植または挿入した、当業者によって選択され経験的に修正することができるポンプおよびカテーテル様デバイスを使用して、適時および所望の濃度で本発明の分子を投与することができる。本発明の分子が血液脳関門を通過しない場合、病变部位付近または病变部位から離れた位置にポンプおよびカテーテル様デバイスを使用して、本発明の分子を髄腔内に送達することができる。

【0057】

本発明のSLPIを、単独で投与するか、種々の手段によって軸索成長を好む環境を提供する1つまたは複数の薬剤と組み合わせて投与することができる。1つの実施形態では、SLPIを、本発明のベクターに組み込むか同時に投与することができる。別の実施形態では、SLPIを、局所または全身に注射することができ、本発明の分子または組成物と同時投与することが好ましい。さらに別の実施形態では、かかる薬剤を、米国特許第5,092,871号および同第4,955,892号に記載の神経ガイダンスチャネル(nerve guidance channel)と共に供給することができる。かかる薬剤クラスの例には、栄養因子(trophic factor)、受容体、細胞外基質タンパク質、内性因子が含まれる。例示的栄養因子には、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、NT-5、またはNT-6、CNTF、LIF、IGF-I、IGF-II、GD

10

20

30

40

50

N F、G P A、b F G F、T G F b、およびアポリボタンパク質 E が含まれるが、これらに限定されない。例示的受容体には、受容体の T r k ファミリーが含まれるが、これに限定されない。例示的細胞外基質タンパク質は、ラミニンである。例示的内性因子には、G A P - 4 3 およびアミロイド前駆体タンパク質 (a m e l o i d p r e c u r s o r p r o t e i n) (A P P) が含まれるが、これらに限定されない。例示的接着分子には、N C A M および L 1 が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 8 】

本発明の薬学的組成物は、種々の形態であってよく、好ましい投与様式にしたがって選択することができる。これらには、例えば、固体、半固体、および液体の投薬形態（錠剤、丸薬、粉末、液体の溶液または懸濁液、座剤、ならびに注射液および注入液など）が含まれる。好ましい形態は、意図する投与様式および治療への応用に依存する。投与様式には、経口投与、非経口投与、皮下投与、静脈内投与、病巣内投与、または局所投与が含まれ得る。

10

【 0 0 5 9 】

本発明の S L P I 分子を、例えば、取り込みまたは安定性を刺激する補因子を含むか含まない滅菌等張処方物に入れることができる。処方物は好ましくは液体であるか、凍結乾燥粉末であり得る。例えば、S L P I 分子を、5 . 0 m g / m l クエン酸一水和物、2 . 7 m g / m l クエン酸三ナトリウム、4 1 m g / m l マンニトール、1 m g / m l グリシン、および 1 m g / m l ポリソルベート 2 0 を含む処方緩衝液 (f o r m u l a t i o n b u f f e r) で希釈することができる。この溶液を、凍結乾燥し、冷蔵保存し、投与前に滅菌注射用蒸留水 (U S P) で再構成することができる。

20

【 0 0 6 0 】

組成物はまた、好ましくは、当該分野で周知の従来の薬学的に許容可能なキャリアを含む（例えば、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 1 6 t h E d i t i o n , 1 9 8 0 , M a c P u b l i s h i n g C o m p a n y を参照のこと）。かかる薬学的に許容可能なキャリアには、他の薬剤、キャリア、遺伝子キャリア、アジュバント、賦形剤など（ヒト血清アルブミンまたは血漿調製物など）を含むことができる。組成物は、好ましくは、単位用量形態であり、通常、1日に1回または複数回投与する。

30

【 0 0 6 1 】

本発明の薬学的組成物を、罹患組織または血流中、これらの付近、またはこれらと連絡してミクロスフィア、リポソーム、ナノ粒子、およびナノ粒子または微粒子の送達系または徐放性処方物を使用して投与することもできる。徐放性キャリアの適切な例には、座剤またはマイクロカプセルなどの成形物の形態の半透性ポリマー材料が含まれる。埋め込み可能であるかマイクロカプセルの徐放性材料には、ポリラクチド（米国特許第 3 , 7 7 3 , 3 1 9 号；欧州特許第 5 8 , 4 8 1 号）、L - グルタミン酸と エチル - L - グルタメートとのコポリマー (S i d m a n e t a l . , B i o p o l y m e r s 2 2 : 5 4 7 - 5 6 (1 9 8 5)) ；ポリ (2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート) 、またはエチレン酢酸ビニル (L a n g e r e t a l . , J . B i o m e d . M a t e r . R e s . 1 5 : 1 6 7 - 2 7 7 (1 9 8 1) ; L a n g e r , C h e m . T e c h . 1 2 : 9 8 - 1 0 5 (1 9 8 2)) が含まれる。

40

【 0 0 6 2 】

本発明の S L P I を含むリポソームを、周知の方法によって調製することができる（例えば、ドイツ特許第 3 , 2 1 8 , 1 2 1 号；E p s t e i n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 2 : 3 6 8 8 - 9 2 (1 9 8 5) ; H w a n g e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 7 7 : 4 0 3 0 - 3 4 (1 9 8 0) ；米国特許第 4 , 4 8 5 , 0 4 5 号および同第 4 , 5 4 4 , 5 4 5 号を参照のこと）。通常、リポソームは、脂質含有率が約 3 0 m o l . % コレステロールよりも高い小さな（約 2 0 0 ~ 8 0 0 ）の单層型のリポソームである。コレステロールの比率は、最適な S L P I 分子放出速度を調節するように選択される。

50

【0063】

本発明のS L P Iを、リポソームに付着することが可能であり、このリポソームは、随意に所望の治療部位への組成物の標的化または投与に役立てるための他の薬剤を含むことができる。任意の公知の架橋剤（標的送達用の毒素または化学療法薬を抗体にカップリングするために広範に使用されているヘテロ二官能性架橋剤など）によって付着することができる。炭水化物指向性架橋試薬4-(4-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド(M P B H)を使用して、リポソームに抱合することもできる(D u z g u n e s et al . , J . C e l l . B i o c h e m . A b s t . S u p p l 1 6 E 7 7 (1 9 9 2))。

【0064】

本発明のS L P Iを、ナノ粒子送達によって送達させることもできる。多数のナノ粒子送達方法が当該分野で公知であり、ナノカプセルが含まれるが、これに限定されない。

【0065】

以下の用語は、他で示されない限り、以下の意味を有すると理解するものとする。

【0066】

核酸配列の文脈での用語「配列同一率」または「同一な」は、最大に対応するように整列させた場合に同一な2つの配列中の残基をいう。配列同一性を比較する長さは、少なくとも9ヌクレオチド、通常、少なくとも約20ヌクレオチド、より通常には少なくとも約24ヌクレオチド、典型的には少なくとも約28ヌクレオチド、より典型的には少なくとも約32ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約36またはそれを超えるヌクレオチドであり得る。ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用することができる当該分野で公知の異なるアルゴリズムが多数存在する。例えば、ポリヌクレオチド配列を、W i s c o n s i n P a c k a g e V e r s i o n 1 0 . 0 , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p (G C G) , M a d i s o n , W i s c o n s i n 中のプログラムであるF A S T A、G a p、またはB e s t f i tを使用して比較することができる。F A S T Aにより、クエリー配列と検索配列との間の最も重複する領域のアラインメントおよび配列同一率が得られる(P e a r s o n , 1 9 9 0 , (本明細書中で参考として援用される))。例えば、核酸配列間の配列同一率を、そのデフォルトパラメーター(ワードサイズ6およびスコアリング行列のためのN O P A M因子)を使用するF A S T AまたはG C Gバージョン6.1(本明細書中で参考として援用される)で提供されるデフォルトパラメーターを使用するG a pを使用して決定することができる。

【0067】

核酸またはそのフラグメントをいう場合、用語「実質的な相同性」または「実質的な類似性」は、別の核酸(またはその相補鎖)と適切なヌクレオチド挿入物または欠失物を最適に整列させた場合、上記で考察した配列同一性の任意の周知のアルゴリズム(F A S T A、B L A S T、またはG a pなど)によって測定した場合、少なくとも約50%、より好ましくは60%のヌクレオチド塩基、通常少なくとも約70%、より通常には少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%のヌクレオチド塩基のヌクレオチド配列が同一である。

【0068】

あるいは、核酸またはそのフラグメントが、ストリンジェントなハイブリッド形成条件下で別の核酸、別の核酸の鎖、またはその相補鎖とハイブリッド形成する場合に実質的な相同または類似が現れる。核酸ハイブリッド形成実験の文脈での「ストリンジェントなハイブリッド形成条件」および「ストリンジェントな洗浄条件」は、多数の異なる物理的パラメーターに依存する。当業者に容易に認識されるように、核酸ハイブリッド形成は、塩濃度、温度、溶媒、ハイブリッド形成種の塩基組成、相補領域の長さ、およびハイブリッド形成核酸間のヌクレオチド塩基ミスマッチ数などの条件により影響を受ける。当業者は、ハイブリッド形成の特定のストリンジェンシーを達成するためにこれらのパラメーターを変動する方法を承知している。

10

20

30

40

50

【0069】

一般に、「ストリンジエントなハイブリッド形成」を、特定の条件下での特定のDNAハイブリッドの融点(T_m)より約25低い温度で行う。「ストリンジエントな洗浄」を、特定の条件下での特定のDNAハイブリッドの T_m よりも約5低い温度で行う。 T_m は、50%の標的配列が完全に適合したプローブとハイブリッド形成する温度である。Sambrook et al.,(上記),頁9.51(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。本明細書中に記載の目的のために、「高ストリンジエンシー条件」を、液相ハイブリッド形成について、 $6 \times SSC$ ($20 \times SSC$ は、3.0M NaClおよび0.3Mクエン酸ナトリウムを含む)、1%SDS中の65で8~12時間の水性ハイブリッド形成(すなわち、ホルムアミドなし)、その後の $0.2 \times SSC$ 、0.1%SDSでの65で20分間の2回の洗浄と定義する。65でのハイブリッド形成は、多数の要因(ハイブリッド形成する配列の長さおよび同一率が含まれる)に応じて異なる速度でおこることが当業者に認識される。

10

【0070】

用語「融合タンパク質」は、異種アミノ酸配列とカップリングしたポリペプチドまたはフラグメントを含むポリペプチドをいう。融合タンパク質は、2つまたはそれを超える異なるタンパク質由来の2つまたはそれを超える所望の機能的エレメントを含むように構築することができるので、融合タンパク質は有用である。融合タンパク質は、目的のポリペプチド由来の少なくとも10個の連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも20または30アミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも40、50、または60個のアミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも75、100、または125個のアミノ酸を含む。融合タンパク質を、異なるタンパク質またはペプチドをコードする核酸配列をインフレームでもつポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸配列の構築、およびその後の融合タンパク質の発現によって、組換え的に产生することができる。あるいは、融合タンパク質を、ポリペプチドまたはそのフラグメントの別のタンパク質への架橋によって化学的に产生することができる。

20

【0071】

用語「非ペプチドアナログ」は、基準ポリペプチドと類似の性質を有する化合物をいう。非ペプチド化合物を、「ペプチド模倣物(peptide mimetic)」または「ペプチド模倣物(peptidemimetic)」ということもできる。例えば、Jones,(1992)Amino Acid and Peptide Synthesis,Oxford University Press;Jung,(1997)Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries:A Handbook John Wiley;Bodanszky et al.,(1993)Peptide Chemistry-A Practical Textbook, Springer Verlag;"Synthetic Peptides:A Users Guide",G.A.Grant,Ed,W.H.Freeman and Co.,1992;Evans et al.J.Med.Chem.30:1229(1987);Fauchere,J.Adv.Drug Res.15:29(1986);Veber and Freidinger TINS p.392(1985);および上記の各引用文献(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。かかる化合物を、しばしば、コンピュータ化分子モデリングを使用して構築する。本発明の有用なペプチドと構造が類似するペプチド模倣物を使用して、等価な効果を得ることができ、したがって、本発明の一部と想定される。

30

【0072】

「ポリペプチド変異体」または「ムテイン」は、その配列が、未変性または野生型のタンパク質のアミノ酸配列と比較して、1つまたは複数のアミノ酸が挿入、重複、欠失、再構成、または置換しているポリペプチドをいう。ムテインは、ある位置の1つのアミノ酸が別のアミノ酸に変化した1つまたは複数のアミノ酸点置換、天然に存在するタンパク質配列中の1つまたは複数のアミノ酸がそれぞれ挿入または欠失された1つまたは複数の挿

40

50

入および／または欠失、および／またはアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかまたは両方のアミノ酸配列の短縮を有することができる。ムテインは、天然に存在するタンパク質と比較して同一であるが、好ましくは異なる生物活性を有し得る。例えば、ムテインは、セリンプロテアーゼ活性が増加または減少し得る。

【0073】

ムテインは、その野生型対応物と比較して全体で少なくとも70%の配列が相同である。野生型タンパク質と全体で80%、85%、または90%の配列が相同的なムテインがさらにより好ましい。さらにより好ましい実施形態では、ムテインは、全体で95%の配列同一性、さらにより好ましくは97%、さらにより好ましくは98%、さらにより好ましくは99%の配列が同一である。配列相同性を、任意の一般的な配列分析アルゴリズム(GapまたはBest fitなど)によって測定することができる。10

【0074】

好ましいアミノ酸置換は、(1)タンパク質分解に対する感受性が減少したアミノ酸置換、(2)酸化に対する感受性が減少したアミノ酸置換、(3)タンパク質複合体の形成に対する結合親和性が変化したアミノ酸置換、(4)結合親和性または酵素活性が変化したアミノ酸置換、および(5)かかるアナログの他の物理化学的性質または機能的性質を付与または改変するアミノ酸置換である。

【0075】

本明細書中で使用される場合、20個の従来のアミノ酸およびその略語は、慣例適用法に従う。Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)) (本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。20個の従来のアミノ酸、非天然アミノ酸(置換アミノ酸、二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、および他の従来にないアミノ酸など)の立体異性体(例えば、D-アミノ酸)も、本発明のポリペプチドに適切な成分であり得る。従来にないアミノ酸の例には、以下が含まれる: 4-ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、-N,N,N-トリメチルリジン、-N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、S-N-メチルアルギニン、および他の類似のアミノ酸およびイミノ酸(例えば、4-ヒドロキシプロリン)。本明細書中で使用されるポリペプチド表示法では、標準的用法および慣習に従って、左方向がアミノ末端方向であり、右方向がカルボキシ末端方法である。20

【0076】

タンパク質をコードする核酸配列が第2のタンパク質をコードする核酸配列に類似の配列を有する場合、タンパク質は、第2のタンパク質に対して「相同性」を有するか、「相同性」である。あるいは、2つのタンパク質が「類似の」アミノ酸配列を有する場合、タンパク質は第2のタンパク質に対して相同性を有す。(したがって、用語「相同タンパク質」は、2つのタンパク質が類似のアミノ酸配列を有することを意味すると定義される)。好ましい実施形態では、相同タンパク質は、野生型タンパク質に対して60%配列相同性を示すタンパク質であり、70%配列相同性がより好ましい。野生型タンパク質に対して80%、85%、または90%配列相同性を示す相同タンパク質がさらにより好ましい。さらにより好ましい実施形態では、相同タンパク質は、95%、97%、98%、または99%配列同一性を示す。本明細書中で使用される場合、アミノ酸配列の2つの領域の間の相同性(特に、予想される構造類似性に関して)は、機能の類似が示唆されると解釈される。30

【0077】

「相同性」をタンパク質またはペプチドに関して使用する場合、同一でない残基の位置がしばしば保存的アミノ酸置換によって異なると認識される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の化学的性質(例えば、電荷または疎水性)を有する側鎖(R基)を有する別のアミノ酸残基によって置換される置換である。一般に、保存的アミノ酸置換40

は、タンパク質の機能的性質が実質的に変化しない。2つまたはそれを超えるアミノ酸配列が保存的置換によって相互に異なる場合、配列同一率または相同性の程度を、置換の保存性が修正されるように上方に調整することができる。この調整手段は、当業者に周知である（例えば、Pearson et al., 1994（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【0078】

以下の6つの群は、それぞれ、相互に保存的置換されるアミノ酸を含む：

- 1) セリン (S)、トレオニン (T)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アラニン (A)、バ
リン (V)、および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

【0079】

配列同一率とも呼ばれるポリペプチドの配列相同性を、典型的には、配列分析ソフトウェアを使用して測定する。例えば、the Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group (GCG), University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705を参考のこと。タンパク質分析ソフトウェアは、種々の置換、欠失、および他の修飾（保存的アミノ酸置換が含まれる）に割り当てた相同性の測定を使用して類似の配列を適合させる。例えば、GCGは、密接に関連したポリペプチド（異なる動物種由来の相同ポリペプチドなど）の間または野生型タンパク質とそのムテインとの間の配列相同性または配列同一性を決定するためのデフォルトパラメーターと共に使用することができる「Gap」および「Best fit」などのプログラムを含む。例えば、GCGバージョン6.1を参考のこと。

【0080】

SLPI配列を異なる生物由来の多数の配列を含むデータベースと比較する場合の好ましいアルゴリズムは、コンピュータプログラムBLAST、特に、blastpまたはtblastnである（Altschul et al., 1997（本明細書中で参考として援用される））。BLASTpの好ましいパラメーターは以下である：

期待値：10（デフォルト）
 フィルタ：seg（デフォルト）
 ギャップオープンコスト（Cost to open a gap）：11（デフォルト）
 ギャップ伸長コスト（Cost to extend a gap）：1（デフォルト）
 最大アラインメント：100（デフォルト）
 ワードサイズ：11（デフォルト）
 表示数：100（デフォルト）
 ペナルティ行列：BLOWSUM62

相同性のために比較したポリペプチド配列の長さは、一般に、少なくとも約16アミノ酸残基、通常少なくとも約20残基、より通常には少なくとも約24残基、典型的には少なくとも約28残基、好ましくは約35残基長であろう。多数の異なる生物由来の配列を含むデータベースを検索する場合、アミノ酸配列を比較することが好ましい。アミノ酸配列を使用したデータベース検索は、当該分野で公知のblastp以外のアルゴリズムによって測定することができる。例えば、ポリペプチド配列を、FASTA (GCGバージ

10

20

30

40

50

ヨン 6 . 1 中のプログラム)を使用して比較することができる。F A S T Aにより、クエリー配列と検索配列との間の最良の重複領域のアラインメントおよび配列同一率が得られる(Pearson, 1990(本明細書中で参考として援用される))。例えば、アミノ酸配列間の配列同一率を、G C G バージョン 6 . 1(本明細書中で参考として援用される)で提供されているF A S T Aをデフォルトパラメーター(ワードサイズ2およびPAM 250スコアリング行列)で使用して決定することができる。

【0081】

本明細書中で使用される場合、句「治療有効量」は、選択された投与計画(例えば、選択された投薬レベルおよび治療期間)での治療後に被験体がニューロンの生存、成長、または再生において検出可能な改善を示すような本発明の分子の量を意味する。

10

【0082】

他で定義しない限り、本明細書中で使用した全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当該分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。例示的な方法および材料を以下に記載しているが、本明細書中に記載の方法および材料に類似するか等価な方法および材料も本発明の実施で使用することができ、これらは当業者に明らかである。本明細書中で言及した全ての刊行物および他の引用文献は、その全体が本明細書中で参考として援用される。矛盾する場合、本明細書(定義が含まれる)に従う。材料、方法、および実施例は、例示のみを目的とし、本発明を制限することを意図しない。

【0083】

当業者に公知の組換えDNAテクノロジーの一般的原理を記載する標準的な参考資料には、以下が含まれる: Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York(1998 and Supplements to 2001); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York(1989); Kaufman et al. Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, CRC Press, Boca Raton(1995); McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford(1991)。当業者に公知の免疫学の一般的原理を記載する標準的な参考資料には、以下が含まれる: Harlow and Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1999); およびRottitt et al., IMMUNOLOGY, 3d Ed., Mosby-Year Book Europe Limited, London(1993)。当業者に公知の医科生理学および薬理学の一般的原理を記載する標準的な参考資料には、以下が含まれる: Harrison's PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE, 14th Ed., (Anthony S. Fauci et al., editors), McGraw-Hill Companies, Inc., 1998。

20

30

40

【0084】

本明細書および段落を通して、用語「含む(comprise)」または「含む(comprises)」もしくは「含む(comprising)」などの変化形は、記載の整数または整数群を含むが、任意の他の整数または整数群を排除しないことを意味すると理解される。

【0085】

以下は、本発明の組成物および方法を説明する実施例である。これらの実施例は、本発明を制限すると解釈されるべきではない。実施例は、例示のみを目的とする。

【実施例】

50

【0086】

(実施例1)

小脳ニューロンを、本質的に、Doherty et al., Nature, 343, pp. 464-66 (1990); Neuron, 5, pp. 209-19 (1990); および Kleitman et al., Culturing Nerve Cells, pp. 337-78, MIT Press, Cambridge, MA / London, England (G. Bunker and K. Goslin, Eds.) (1991) に記載のように単離した。簡潔に述べれば、9日齢までの動物について、2匹の動物から小脳を取り出し、5mlの0.025%トリプシンを含むPBSに入れ、すり砕き、37でさらに10分間インキュベートした。10%ウシ胎児血清(FCS)を含む5ml DMEMの添加によってトリプシン処理を停止させ、細胞を、800rpmで6分間遠心分離した。細胞を、2%FCSを含む2mlのSATO中で単一細胞浮遊液(single cell suspension)に再懸濁した。

(実施例2)

本発明者らは、以前に、ニューロン中の環状AMP(cAMP)レベルとミエリンによる再生の阻害との間に正相関が存在することを確認していた(例えば、国際公開第01/85981号パンフレットを参照のこと)。内因性cAMPレベルは新生ニューロン中で高く、MAGおよびミエリンに対する外延的成長が認められたが、生後4日間でニューロンcAMPは急落し、これは、ミエリン阻害の開始と関係があった。より古いニューロンにおけるcAMPレベルがジブチリルcAMP(dbcAMP)での処置によって上昇した場合、阻害は逆転し、MAGおよびミエリンに対する神経線維成長が増強された。インビボでは、cAMPレベルを、末梢神経の傷害またはdbcAMP注射によって上昇させることができ、これにより、脊髄中の切離神経線維が再生した。

【0087】

cAMPの影響は、遺伝子転写を誘導する能力の結果であった。アップレギュレートされた遺伝子を同定するために、本発明者らは、dbcAMPまたは条件傷害(*conditional lesion*)のいずれかを受けたDRGニューロンに対してマイクロアレイ分析を行った。本発明者らは、両方の場合でSLPIの発現が非常に増加することを見出した。本発明者らは、培養において、ニューロンをSLPIで処置した場合にMAGおよびミエリンに対する神経線維の成長が有意に増加することおよびこの影響がdbcAMPを用いて認められた影響と等価であったことを示した。

【0088】

さらに、本発明者らは、成体動物に投与した場合にSLPIがニューロンの成長能力を増加したことを見出した。ポンプによってSLPIを脊髄に送達させた。ニューロンを取り出してMAGを発現する細胞上に培養した場合、成長が有意に増加した。これらのデータは、SLPIがCNS損傷後および軸索変性によって特徴づけられる疾患において再生を促進する可能性を有することを示した。

【0089】

図1Aおよび1Bは、SLPIがDRGニューロンのMAGによる阻害を逆転したことを示した。非処置DRGニューロンをMAG発現CHO細胞上に培養した場合、神経突起伸長が強く阻害された。しかし、ニューロンをSLPIで処置した場合、MAGに対する神経突起伸長は有意に増加し、5および10μg/ml SLPIが最も広範に成長させた。

【0090】

図2Aおよび2Bは、SLPIがミエリンに対する皮質ニューロンの神経突起伸長を増強させたことを示す。DRGニューロンと異なり、皮質ニューロンは、生後1日で、MAGおよびミエリンによって阻害された。ミエリンに対する神経突起伸長は、5および10μg/ml SLPIで有意に増加し、この影響は、ジブチリルAMP(dbcAMP)を用いて認められた影響に等価であった。

【0091】

10

20

30

30

40

50

図3Aおよび3Bは、SLPIのインビボ送達によって成体DRGニューロンのMAG阻害が克服されたことを示す。2および5 μ g/kg/時間の速度でのSLPIの髄腔内送達は、DRGニューロンのMAG阻害を遮断し、神経突起伸長を有意に増加する。これは、SLPIが生きた動物に投与した場合に有効であることを示した。

【0092】

要約すると、上記結果は、SLPIがMAGおよびミエリンの阻害効果を克服することができ、軸索成長を促進することを最初に示している。これらのニューロンの軸索が脊髄の運動機能を調節する神経路を形成するので、皮質神経突起成長がSLPIによって増強されることを示すデータは特に重要である。最も重要なのは、神経突起伸長は、成体ラットへのSLPIの髄腔内送達後に増加する。これらの実験により、インビボで投与した場合にSLPIが成熟ニューロン再生能力を増強することができ、それにより、SLPIが脊髄損傷および他のCNS外傷の治療のための実行可能な治療選択肢となるという証拠が得られた。

(実施例3)

上記のように、SLPIは、生きた動物に投与した場合に成長を促進し、且つ非毒性である。CNSニューロン中のSLPIの細胞内分布を調査するために、小脳顆粒ニューロン(cerebellar granule neuron)(CGN)を、組換えSLPIで1時間処置し、核内のタンパク質を、細胞質中のタンパク質から分離した。ウェスタンブロッティングを行って、核および細胞質画分中のSLPIを検出した。内因性SLPIが検出されないことを確実にするために、本発明者らは、これらの実験において、組換えSLPIに対して惹起した抗体を使用した。本発明者らは、SLPIが核に迅速に局在化することを見出した。SLPIは、SLPI処置CGNから単離した核画分のみに存在し、リン-CREBの存在により、SLPIが核に局在化することを確認した。

【0093】

要約すると、本発明者らは、SLPIがCGNの核に局在化することを最初に示した。したがって、理論に拘束されないが、SLPIは、ニューロン中で転写調節因子として作用し、細胞死(例えば、アボトーシス)およびミエリン阻害に関する遺伝子発現のダウンレギュレーションによって軸索再生およびニューロン生存を促進する可能性が高い。これらの影響は、脊髄損傷、卒中、および他のCNS外傷だけでなく、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、および多発性硬化症などの神経変性障害にも適用可能であろう。

(実施例4)

上記の実施例2に示すように、SLPIは、インビボで投与した場合に有効である。SLPIが障害後のミエリン阻害を克服し、軸索再生を助長することができることをさらに確認するために、成体ラットの脊柱の切離を実行することができる。次いで、SLPIを、成体ラットの脊柱切離後に髄腔内送達させる。適切な術後時点で、脊髄を、脊柱再生を証明するために組織学的に試験する。さらに、SLPIを、成体ラットの前根または坐骨神経の切離後に髄腔内送達させて、運動性軸索の再生を評価することができる。運動機能の回復を測定するために挙動分析を行った。

【0094】

坐骨神経および前根の障害後の運動性軸索再生の促進によって、本アプローチをALSに適用することができる。胚幹細胞由来運動ニューロンの移植と併せてSLPIを髄腔内投与して、前根流出部(exit zone)を介した運動性軸索の成長を助長する。胚または前成体ラットに対して類似の実験を行って、異なる発達段階でのSLPI処置の影響を決定することができる。

(実施例5)

TNF-発現およびp38分裂活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)のTNF-媒介活性化は、G93A変異スーパークリシドジムスター-1を発現するトランスジェニックマウス(広く使用されているALSモデル)における運動ニューロン欠損の発生および進行に関連した事象である(Elliott, Mol. Brain Res. 95:

172-78(2001); Tortarolo et al., Mol. Cell. Neurosci. 23: 180-92(2003); Yuasa et al., J. Biol. Chem. 273: 22681-92(1998)。SLPIがニューロンにおけるTNF-レベルおよびp38MAPK活性化を減少させるかどうかを決定するために、ELISAを使用して、SLPIにてインビトロで1時間処置したDRGニューロンおよびCGN中のTNF-レベルを測定することができる。SLPIを成体ラットに髄腔内送達させ、脊髄組織サンプルに対してELISA分析を行って、TNF-レベルがインビトロで減少するかを決定することができる。SLPIがp38MAPK活性を遮断する能力を、ニューロンのSLPIとのプレインキュベーションおよびその後のTNF-での処置によって試験することができる。p38MAPKのリン酸化を、ウェスタンブロッティングによって分析することができる。
10

(実施例6)

上記のように、SLPIはCGNの核に局在する。SLPIでの処置がニューロンにおける転写に影響を及ぼすことを確認するために、クロマチン免疫沈降(ChIP)実験を行って、SLPIによって調節される他の遺伝子を同定することができる。このアプローチにより、ALSモデルにおける運動ニューロン喪失を防止するための新規の分子標的を得ることができる。さらに、SLPIと相互作用するプロモーターを、SLPI処置ニューロンのChIP分析およびDNA配列決定によって同定することができる。細胞死およびミエリン阻害における役割に基づいて候補遺伝子を同定し、ChIP分析およびPCRをさらに行って、SLPIがそれらの発現をダウンリギュレートする能力を評価することができる。
20

(実施例7)

SLPIのインビオ投薬量および毒性を決定するために、SLPIを、後柱切離を行った成体ラットに髄腔内または皮下投与することができる。麻痺するが膀胱機能を保持し、動物の術後ケアが非常に容易である比較的簡潔な脊髄損傷モデルであるので、後柱傷害を選択する。後柱で認められた軸索再生は、SLPIの治療薬としての可能性の証明を提供する。

【0095】

SLPIの最適濃度を決定するための用量-応答実験を、以下のように行うことができる。P6 DRGおよび小脳ニューロンを、0、1、2、5、10、20、または50μg/ml SLPIで処置する。CHO細胞の単層およびCNSミエリン基質を、8ウェルチャンバースライドに調製する。ニューロンを、約10,000ニューロン/ウェルの密度で培養し、16~18時間インキュベートし、IIIチューブリンで免疫染色した。神経突起伸長を、以前に記載のように定量する(Mukhopadhyay et al., Neuron 13: 757-67(1994))。
30

【0096】

SLPIを、皮下注射または髄腔内ポンプによって成体ラットに投与する。同一手段によってコントロール群に生理食塩水を投与する。DRGニューロンを切り出し、コントロールおよびMAG発現CHO細胞の単層に移し、一晩培養する。神経突起伸長を上記のように定量する。
40

【0097】

後柱傷害を作製するために、Qiu et al., Neuron 34: 895-903(2002)に記載のように、8週齢雌ラットのT6-T7で後柱切離を行う。至適濃度のSLPIを、障害時に挿入した皮下注射または髄腔内ポンプによって送達させ、適切な期間で除去する。コントロールとして生理食塩水を投与する。術後24日に、軸索を、4mlの1%ビオチン化コレラ毒素Bサブユニット(CTB)の左坐骨神経への注射によって経神経節的に追跡する。4日後に動物を経噴門灌流によって屠殺し、胸髄を取り出し、後固定し、凍結防止を行う。脊髄を、長手方向に20μm切開し、IIIチューブリンについて免疫染色する。CTBを、フルオレセイン抱合ストレプトアビジンとのインキュベーションによって視覚化し、軸索再生を、IIIチューブリンおよびCTBの同
50

時局在化によって示す。

(実施例 8)

好中球は、脊髄損傷の初期段階で起こる二次ニューロン障害で主な役割を果たす (Taoka et al., *Neuroscience* 79: 1177-82 (1997); Carlson et al., *Exp. Neurol.* 151: 77-88 (1998))。多数の好中球が障害部位に浸潤し、エラスターーゼ(内皮細胞を特異的に標的化するSLPI基質)を放出する(Taoka et al., (上記))。SLPIが脊髄損傷後に好中球浸潤、出血、およびニューロンの壊死を防止することを確認するために、上記のように、ラットにおける後柱傷害を実施し、SLPIを動物に送達させることができる。同様に障害の挫傷モデルも使用することができる。障害後1、2、または5日目に動物を屠殺し、障害部位を含む脊髄領域を切開する。これらの切片を、ヘマトキシリソル(hemoltoxylin)およびエオシンで染色し、出血および壊死の証拠について試験する(Taoka et al., *Brain Res.* 799: 264-69 (1998))。好中球浸潤およびエラスターーゼ発現の範囲を、ミエロペルオキシダーゼおよびエラスターーゼの免疫染色によってそれぞれ決定する。最後に、IIIチューブリンについての免疫染色と併せたTUNEL染色を行い、ニューロン生存に及ぼすSLPIの影響を確認する。ニューロンの壊死数の減少により、SLPIが急性精髄損傷後の神経学的結果を非常に改善する可能性のある有効な神経防御薬であることを確認する。

(実施例 9)

本発明のSLPIを動物(ヒトが含まれる)に送達させるために、当業者に明らかな種々の方法(例えば、分子の神経系への標準的な送達技術および遺伝子移入技術)を使用することができる。神経系のニューロンおよび膠細胞へのウイルスまたは非ウイルス媒介遺伝子移入法は、当該分野で公知である(例えば、Basic Science and Gene Therapy (2000) Cid-Arregui, A. and A. Garcia-Carranca, editors. Natick, MA: Eaton Publishingを参照のこと)。SLPI分子を、所望の標的細胞に移入し、神経系細胞が浸漬した流動動物(例えば、CSF)中に発現産物が出現し、次いで、これらの流動動物を介して細胞に輸送することができる。異種遺伝子の調節のための公知且つ利用可能な転写調節配列および発現系を使用した本発明のポリヌクレオチドの誘導性発現および他の調節された発現は、本発明の範囲内であることが意図される。

【0098】

本発明の発現プラスミド(例えば、発現形態および分泌形態のSLPIをコードするもの)でトランスフェクトした哺乳動物細胞(例えば、CHO細胞またはCOS細胞)を培養し、培養物を分泌速度についてアッセイした。細胞を、修復を必要とする神経障害付近が罹患または障害した被験体の脊髄周囲の脳脊髄液に外科的に移植することができる。

【0099】

随意に、反復投与が実行された。細胞は、SLPIを分泌し、神経再生を刺激する。

(実施例 10)

SLPIがインビボで視神経中の軸索再生を促進する能力を調査した。成体雄Fischerラット(200~300g, Charles River Laboratories)を、イソフルレン(isoflurane)で麻酔し、定位固定フレームに配置した。以下のように視神経を破壊した。右視神経を露呈し、髄膜を除去した。次いで、眼から2mmの距離の神経を精細な鉗子で10秒間破壊した。特別なケアを行って眼動脈障害を回避した。切開部を閉じた後、動物の右眼に5μlの滅菌生理食塩水または10μgの組換えヒトSLPI(R&D Systems; 2μg/μlを含む5μlの滅菌生理食塩水)のいずれかを単回硝子体内注射によって右眼に投与した。2週間の術後生存後、動物を、4%パラホルムアルデヒドの経噴門灌流によって屠殺し、視神経を解剖した。神経を20ミクロン切開し、ゼラチンコーティングスライド上に解凍マウントした(the mounted)。切片を、5%ウサギ血清、2%BSA、および0.1%Tweenを含むTris緩衝化生理食塩水(TBS)で1000倍希釈したポリクローナルヒツ

10

20

30

40

50

ジ抗GAP-43抗体を使用して、GAP-43について免疫染色した。一晩のインキュベーション後、切片をTBSでリンスし、FITC抱合ウサギ抗ヒツジ二次抗体（ウサギ血清、BSA、およびTweenを含むTBSで500倍希釈）中にて室温で2時間インキュベートした。スライドにPermafluo rマウティング培地（Thermo）と共にカバーガラスをかけ、蛍光下で観察した。

【0100】

結果を、図5に示す。上のパネルは、視神経破壊後に生理食塩水を注射した動物の視神経を示す一方で、下のパネルは、SLPIを注射した動物由来の視神経を示す。GAP-43は、活動的に成長している軸索のみに存在するので、GAP-43陽性軸索の存在は、軸索の成長および再生を示す。生理食塩水処置神経ではGAP-43陽性軸索は認められないが（図5、上のパネル）、しかしSLPIで処置した神経中にはGAP-43陽性軸索が多数存在する（図5、下のパネル）。障害部位に多数の軸索が存在し、そのうちのいくつかは傷害部位を超えて伸長し（図5の下のパネルの左から右）、軸索の再生を示す。したがって、これらのデータは、SLPIを用いた障害を受けた視神経の治療が軸索の成長および再生を導くことを示し、さらに、SLPIがCNSおよび視神経における軸索再生の有効な促進手段であることを良好に示す。

10

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1A】図1Aおよび1Bは、それぞれ、SLPIがMAGによる脊髄後根神経節（「DRG」）ニューロンの阻害を逆転することを示す4つの写真および棒グラフのパネルである。生後6日のラット由来のDRGニューロンを、2、5、または $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ SLPIで処置し、コントロールまたはMAG発現チャイニーズハムスター卵巣（「CHO」）細胞の単層に培養し、16時間インキュベートした。ニューロンを、IIIチューブリンで染色し、METAMORPH画像分析ソフトウェアを使用して神経突起の長さを定量した。データを、 $\pm\text{SEM}$ で示す。

20

【図1B】図1Aおよび1Bは、それぞれ、SLPIがMAGによる脊髄後根神経節（「DRG」）ニューロンの阻害を逆転することを示す4つの写真および棒グラフのパネルである。生後6日のラット由来のDRGニューロンを、2、5、または $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ SLPIで処置し、コントロールまたはMAG発現チャイニーズハムスター卵巣（「CHO」）細胞の単層に培養し、16時間インキュベートした。ニューロンを、IIIチューブリンで染色し、METAMORPH画像分析ソフトウェアを使用して神経突起の長さを定量した。データを、 $\pm\text{SEM}$ で示す。

30

【図2A】図2Aおよび2Bは、それぞれ、SLPIがミエリンによる皮質ニューロンの神経突起伸長を増強することを示す4つの写真および棒グラフのパネルである。生後1日のラット由来の皮質ニューロンを、1mMジブチリルcAMP（dbcAMP）および5または $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ SLPIで処置し、中枢神経系ミエリン（ $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ウェル}$ ）でコーティングした8ウェルチャンバースライドに培養した。ニューロンを24時間インキュベートし、IIIチューブリンで免疫染色した。棒グラフは、平均神経突起の長さ $\pm\text{SEM}$ を示す。

40

【図2B】図2Aおよび2Bは、それぞれ、SLPIがミエリンによる皮質ニューロンの神経突起伸長を増強することを示す4つの写真および棒グラフのパネルである。生後1日のラット由来の皮質ニューロンを、1mMジブチリルcAMP（dbcAMP）および5または $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ SLPIで処置し、中枢神経系ミエリン（ $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ウェル}$ ）でコーティングした8ウェルチャンバースライドに培養した。ニューロンを24時間インキュベートし、IIIチューブリンで免疫染色した。棒グラフは、平均神経突起の長さ $\pm\text{SEM}$ を示す。

【図3A】図3Aおよび3Bは、それぞれSLPIのインピボ送達によって成体DRGニューロンのMAG阻害が克服されることを示す4つの写真および棒グラフのパネルである。1、2、または $5\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ のSLPIを脊髄に24時間注入した成体ラット由来のDRGニューロンを、コントロールまたはMAG発現CHO細胞上に培養した。ニュ

50

ーロンを 16 時間インキュベートし、I I I チュープリンで染色した。棒グラフは、平均神経突起の長さ \pm S E M を示す。

【図 3 B】図 3 A および 3 B は、それぞれ S L P I のインビオ送達によって成体 D R G ニューロンの M A G 阻害が克服されることを示す 4 つの写真および棒グラフのパネルである。1、2、または $5 \mu\text{g} / \text{kg}$ / 時間の S L P I を脊髄に 24 時間注入した成体ラット由来の D R G ニューロンを、コントロールまたは M A G 発現 C H O 細胞上に培養した。ニューロンを 16 時間インキュベートし、I I I チュープリンで染色した。棒グラフは、平均神経突起の長さ \pm S E M を示す。

【図 4】図 4 は、S L P I が小脳顆粒ニューロン (cerebellar granule neuron) ('C G N') の核に局在することを示すウェスタンプロット画像である。生後 5 日のラット由来の C G N を、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ S L P I と 1 時間インキュベートした。細胞質画分および核画分を、未処置 (-) および S L P I 処置 (+) ニューロンから単離し、S L P I についてのウェスタンプロットティングによって分析した。膜も剥ぎ取り、リン - C R E B (核内に見出される活性転写因子) について探索して核画分の純度を検証した。ポジティブコントロールとして組換え S L P I を使用した。

【図 5】図 5 は、視神経破壊後に生理食塩水を注射した動物 (上のパネル) または S L P I を注射した動物 (下のパネル) 由来の視神経の G A P - 4 3 染色を示す写真である。

10

【図 1 A】

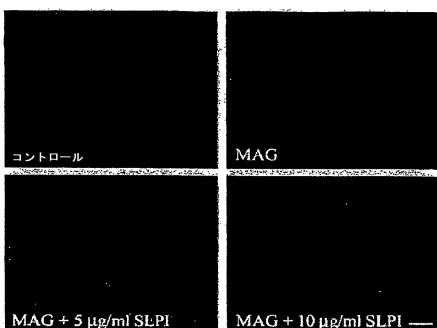


FIGURE 1A

【図 2 A】

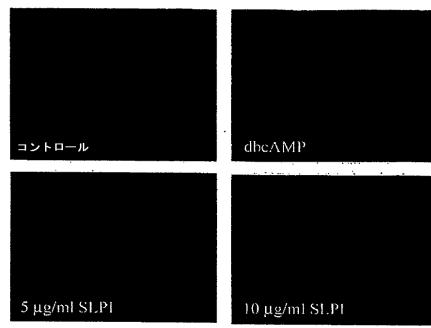


FIGURE 2A

【図 1 B】

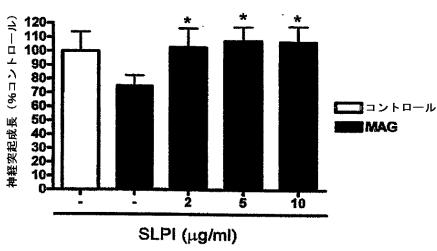


FIGURE 1B

【図 2 B】

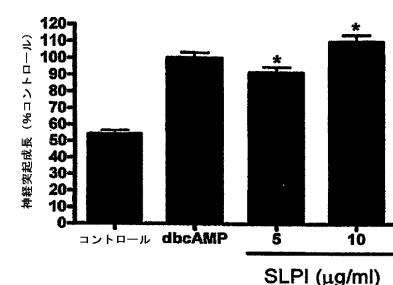


FIGURE 2B

【図3A】

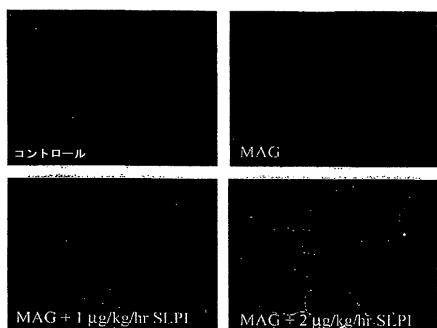


FIGURE 3A

【図3B】

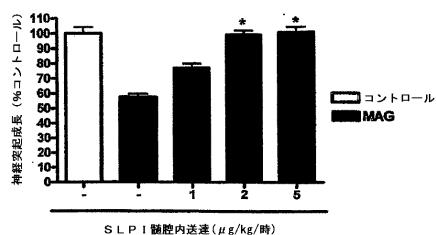


FIGURE 3B

【図4】



FIGURE 4

【図5】

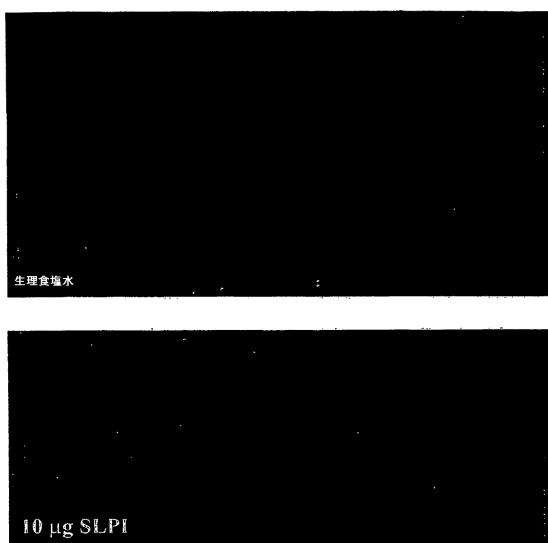


FIGURE 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2007/008270
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/57 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		
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/03719 A (AMGEN INC [US]) 18 January 2001 (2001-01-18) *cf. abstract, page 4, first para. and lines 30-35, bridging with page 5, line 12, page 32 to page 33, line 30, page 35, line 32 to page 36, first line, claims 1,15,30,31,40, 45 and 56*	1-28
X	WO 02/50287 A (ARRIVA PHARMACEUTICALS INC [US]; BARR PHILIP J [US]; GIBSON HELEN L [U] 27 June 2002 (2002-06-27) *cf. abstract, section [0003] on pages 1/2, page 5, section [0012], page 11, section [0027], page 23, section [0057], claims 1 and 2*	1-28
<input 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		
T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
10 January 2008	03/03/2008	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2140, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Stoltner, Anton	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/008270

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0103719	A	18-01-2001	AU	6078500 A	30-01-2001
WO 0250287	A	27-06-2002	AU CA EP JP	4166102 A 2430973 A1 1366175 A2 2004537970 T	01-07-2002 27-06-2002 03-12-2003 24-12-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(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,MT,NL,PL,PT,RO,SE,S1,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,BH,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,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フィルピン, マリー ティー.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10024, ニューヨーク, ウエスト 78ティーエイチ
ストリート 215

(72)発明者 ハニラ, サリー エス.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニューヨーク, イー. 77ティーエイチ ス
トリート 509, アパートメント 4エム

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 BA44 CA18 DC32 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA20
ZA33 ZB21 ZB22