(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5174653号
(P5174653)
(45)発行日　平成25年4月3日(2013.4.3)　(24)登録日　平成25年1月11日(2013.1.11)

(51)Int.Cl.　　F I
A61K 38/00 (2006.01)　　A61K 37/02 ZNA
A61P 25/02 (2006.01)　　A61P 25/02
A61P 35/00 (2006.01)　　A61P 35/00

請求項の数 18　(全 28 頁)

(21)出願番号　特願2008-502205 (P2008-502205)
(86)(22)出願日　平成18年3月23日 (2006.3.23)
(65)公表番号　特表2008-535805 (P2008-535805A)
(43)公表日　平成20年9月4日 (2008.9.4)
(86)国際出願番号　PCT/CA2006/000438
(87)国際公開番号　WO2006/099739
(87)国際公開日　平成18年9月28日 (2006.9.28)
審査請求日　平成21年3月19日 (2009.3.19)
(31)優先権主張番号　60/664,908
(32)優先日　平成17年3月23日 (2005.3.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　507316435
ラモト　アト　テルーアビブ　ユニバーシティー　リミテッド
イスラエル　テル　アビブ　ピー．　オー．　ボックス　３９２
(73)特許権者　507316930
アロン　セラピューティクス　インコーポレイテッド
カナダ国　ブリティッシュコロンビア州　バンクーバー　チェストナット　ストリート　３１５－１６８１
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】末梢神経毒症状を処置するためのＡＤＮＦポリペプチドの使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
治療的有効量のADNFポリペプチドを含む、対象における末梢神経毒症状（peripheral neurotoxicity）を処置するための組成物であって、該ADNFポリペプチドが、
(a) 以下のアミノ酸配列: Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO: 1)からなるADNF Iポリペプチド;
(b) 以下のアミノ酸配列: Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEQ ID NO:2)からなるADNF IIIポリペプチド;ならびに、
(c) (a)記載のADNF Iポリペプチドおよび(b)記載のADNF IIIポリペプチドの混合物からなる群より選択されるメンバーであって、
該末梢神経毒症状が、1種類またはそれ以上の抗癌剤による処置の結果である、前記組成物。
【請求項２】
ADNFポリペプチドがSEQ ID NO：1のアミノ酸配列からなるADNF Iポリペプチドである、請求項1記載の組成物。
【請求項３】
ADNF Iポリペプチドが少なくとも1個のD-アミノ酸を含む、請求項2記載の組成物。
【請求項４】
ADNFポリペプチドがSEQ ID NO：2のアミノ酸配列からなるADNF IIIポリペプチドである、請求項1記載の組成物。

【請求項５】
ADNF IIIポリペプチドが少なくとも1個のD-アミノ酸を含む、請求項4記載の組成物。
【請求項６】
ADNFポリペプチドが(a)記載のADNF Iポリペプチドおよび(b)記載のADNF IIIポリペプチドの混合物である、請求項1記載の組成物。
【請求項７】
ADNF IポリペプチドおよびADNF IIIポリペプチドのいずれかまたは両方が少なくとも1個のD-アミノ酸を含む、請求項6記載の組成物。
【請求項８】
ADNFポリペプチドが、鼻腔内に、経口的に、静脈内に、または皮下に投与される、請求項1記載の組成物。
【請求項９】
末梢神経毒症状の処置のための医薬の製造におけるADNFポリペプチドの使用であって、該ADNFポリペプチドが、
(a) 以下のアミノ酸配列: Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO: 1) からなるADNF Iポリペプチド;
(b) 以下のアミノ酸配列: Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEQ ID NO:2) からなるADNF IIIポリペプチド;ならびに、
(c) (a)記載のADNF Iポリペプチドおよび(b)記載のADNF IIIポリペプチドの混合物からなる群より選択されるメンバーであって、
該末梢神経毒症状が、1種類またはそれ以上の抗癌剤による処置の結果である、前記使用。
【請求項１０】
前記1種類またはそれ以上の抗癌剤が、ビンカアルカロイド、白金剤、タキサン、サリドマイド、メトトレキサートおよびコルヒチンからなる群より選択される、請求項1記載の組成物。
【請求項１１】
前記1種類またはそれ以上の抗癌剤が、ビンカアルカロイドおよびタキサンからなる群より選択される、請求項1記載の組成物。
【請求項１２】
前記1種類またはそれ以上の抗癌剤が、ビンカアルカロイド、白金剤、タキサン、サリドマイド、メトトレキサートおよびコルヒチンからなる群より選択される、請求項9記載の使用。
【請求項１３】
前記1種類またはそれ以上の抗癌剤が、ビンカアルカロイドおよびタキサンからなる群より選択される、請求項9記載の使用。
【請求項１４】
ADNFポリペプチドと薬学的に許容される担体を含む、抗癌剤により引き起こされる末梢神経毒症状を処置するための組成物であって、該ADNFポリペプチドが、
(a) 以下のアミノ酸配列: Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO: 1)からなるADNF Iポリペプチド;
(b) 以下のアミノ酸配列: Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEQ ID NO:2)からなるADNF IIIポリペプチド;ならびに、
(c) (a)記載のADNF Iポリペプチドおよび(b)記載のADNF IIIポリペプチドの混合物からなる群より選択されるメンバーである、前記組成物。
【請求項１５】
抗癌剤がビンカアルカロイドである、請求項14記載の組成物。
【請求項１６】
神経変性疾患または末梢神経毒症状のための治療薬剤に対する応答を試験する方法であって、該治療薬剤がADNFポリペプチドであって、該ADNFポリペプチドが、

(a) 以下のアミノ酸配列: Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO: 1)からなるADNF Iポリペプチド;
(b) 以下のアミノ酸配列: Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEQ ID NO:2)からなるADNF IIIポリペプチド;ならびに、
(c) (a)記載のADNF Iポリペプチドおよび(b)記載のADNF IIIポリペプチドの混合物からなる群より選択されるメンバーであり、
該方法が以下の工程、
a) 1種類またはそれ以上の抗癌剤による処置の結果である潜在的な末梢神経毒症状を有する対象における嗅覚能を測定する工程;
b) 該ADNFポリペプチドが投与された対象における嗅覚能を測定する工程;
c) 工程a)からの嗅覚能と工程b)からの嗅覚能とを比較する工程
を含む、方法。

【請求項１７】

潜在的な末梢神経毒症状が、ビンカアルカロイド、白金剤、タキサン、サリドマイド、メトトレキサートおよびコルヒチンからなる群より選択される1種類またはそれ以上の抗癌剤による処置の結果である、請求項16記載の方法。

【請求項１８】

潜在的な末梢神経毒症状が、ビンカアルカロイドおよびタキサンからなる群より選択される1種類またはそれ以上の抗癌剤による処置の結果である、請求項16記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

発明の分野

本発明は、神経毒症状の処置におけるADNFポリペプチドの使用に関する。本発明はまた、医薬の製造、製剤方法、およびこれらの使用にも関する。ADNFポリペプチドには、ADNF IおよびADNF III(ADNPとも呼ばれる)ポリペプチド、アナログ、(以下に定義される)NAPおよびSAL等のサブ配列、およびD-アミノ酸型(全体がD-アミノ酸であるペプチド、またはD-アミノ酸およびL-アミノ酸が混合するペプチド)、ならびにそれらのそれぞれの活性コア部位を含むそれらの組み合わせが含まれる。

【０００２】

関連出願の相互参照

本出願は、2005年3月23日に出願された米国特許仮出願第60/664908号の恩典を主張するものであり、これは全ての目的のために、参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【０００３】

発明の背景

8-アミノ酸ペプチド(NAPVSIPQ = Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln ; SEQ ID NO:2)であるNAPは、新規のタンパク質である活性依存型神経保護タンパク質、すなわちADNPに由来する(米国特許第6613740号, Bassan et al., J. Neurochem. 72: 1283-1293 (1999); Zamostiano, et al., J. Biol. Chem. 276:708-714 (2001))。ADNP遺伝子内のNAP配列は、齧歯類およびヒトにおいて同一である(米国特許第6613740号, Zamostiano, et al., J. Biol. Chem. 276:708-714 (2001))。

【０００４】

細胞培養において、NAPは、フェムトモル濃度で中枢神経系(CNS)の細胞に神経保護活性を有することが示されている(Bassan et al., 1999; Offen et al., Brain Res. 854:257-262 (2000))。いくつかの動物モデルは、CNS疾患においてNAP活性も呈している。アルツハイマー病の病状の一部をシミュレートした動物モデルにおいて、NAPは保護的であった(Bassan et al., 1999; Gozes et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 293:1091-1098 (2000);さらに米国特許第6613740号を参照されたい)。通常の加齢ラットにおいて、NAPの鼻腔内投与はモリス水迷路における成績を向上させた(Gozes et al., J. Mol. Neurosci. 19: 1

75-178 (2002))。NAPは、アポトーシスを減少させることにより(Leker et al., Stroke 33:1085-1092 (2002))、および、マウスにおける閉鎖性頭部外傷により引き起こされた損傷を炎症を減少させることによって減少させることにより(Beni Adani et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 296:57-63 (2001); Romano et al., J. Mol. Neurosci. 18:37-45 (2002); Zaltzman et al., NeuroReport 14:481-484 (2003))、虚血性障害後の梗塞容量および運動機能欠損を減少させた。NAPは胎児期アルコール症候群のモデルにおいて保護的介入を提供することが示されており、胎児期における死亡および成長制限を減少させる(Spong et. al., J Pharmacol Exp Ther. 297:774-9 (2001))。さらに、マウスでは、長期間のNAPの経鼻投与が不安症の低減をもたらした(Alcalay et al., Neurosci Lett. 361(1-3): 128-31 (2004))。

【０００５】

9-アミノ酸ペプチド(SALLRSIPA = Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala；SEQ ID NO:1)であるSALは、ADNF-9としても知られており、ADNFの最も短い活性型として同定された(米国特許第6174862号参照)。SALは、インビトロアッセイおよびインビボ疾患モデルにおいて、各種損傷に対して中枢神経系の神経細胞を生存状態に維持することが示されている(例えば、Gozes et al., 2000, 下掲; Brenneman et al., 1998. J. Pharmacol. Exp. Ther. 285, 619-627)。D-SALは、安定かつ経口摂取可能であるSALの全てのD-アミノ酸誘導体であり(Brenneman, et al., J Pharmacol Exp Ther. 309: 1190-7 (2004))、驚くべきことに、試験した系においてSALと類似の生物学的活性（有効性および効力）を示す。

【０００６】

NAPおよびSALを含むADNFポリペプチド、ならびに中枢神経系の障害に対する神経保護におけるその使用は、PCT国際公開公報第1/92333号;1992年4月22日に出願された米国特許出願第07/871,973号、現在の米国特許第5,767,240号; 1994年10月17日に出願された米国特許出願第08/342,297号（国際公開公報第96/11948号として公開)、現在の米国特許第6,174,862号; 1997年2月7日に出願された米国特許出願第60/037,404号（国際公開公報第98/35042号として公開); 1998年11月11日に出願された米国特許出願第09/187,330号（国際公開公報第00/27875号として公開); 1999年3月12日に出願された米国特許出願第09/267,511号（国際公開公報第00/53217号として公開); US6613740、1999年8月18日に出願された米国特許出願第60/149,956号（国際公開公報第01/12654号として公開); 2000年5月31に出願された米国特許出願第60/208,944号; および、2001年2月8日に出願された米国特許出願第60/267,805号; 2004年3月11日に出願されたPCT/IL2004/000232（国際公開公報第2004/080957号として公開)を含む特許および特許出願の対象であり、それぞれは、参照によりそれらの全体が本明細書中に組み入れられる。

【発明の開示】

【０００７】

本開示は、末梢神経系の神経毒症状の処置における、例えば、NAP、SAL、D-NAP、およびD-SALを含むADNFポリペプチドの新規かつ驚くべき使用を提供する。

【０００８】

発明の概要

一局面において、本発明は、治療的有効量のADNFポリペプチドを、それを必要とする対象に投与する工程を含む、該対象における末梢神経毒症状（peripheral neurotoxicity）を処置する方法を提供する。

【０００９】

一態様において、ADNFポリペプチドは、

(a) 以下のアミノ酸配列: Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO:1)を有する活性コア部位を含むADNF Iポリペプチド、またはそのアナログ、

(b) 以下のアミノ酸配列: Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEQ ID NO:2)を有する活性コア部位を含むADNF IIIポリペプチド、またはそのアナログ、および

(c) ADNF Iポリペプチド部分(a)およびADNF IIIポリペプチド部分(b)、またはそれらのそれぞれのアナログの混合物

からなる群より選択されるメンバーである。

【００１０】

別の態様において、ADNFポリペプチドは、全長ADNF Iポリペプチド、全長ADNF IIIポリペプチド(ADNP)、ならびに、全長ADNF Iポリペプチドおよび全長ADNF IIIポリペプチドの混合物からなる群より選択されるメンバーである。

【００１１】

一態様において、ADNFポリペプチドは、組換えDNA法により調製される。別の態様において、ADNFポリペプチドの活性コア部位は、少なくとも1個のD-アミノ酸を含む。別の態様において、ADNFポリペプチドの活性コア部位は、全てのD-アミノ酸を含む。

【００１２】

一態様において、ADNF Iポリペプチドは、式(R1)x-Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala-(R2)y(SEQ ID NO:20)、またはそのアナログを有し、式中、

R1は、それぞれが天然のアミノ酸およびアミノ酸アナログからなる群より独立して選択される1～約40個のアミノ酸を含むアミノ酸配列であり;

R2は、それぞれが天然のアミノ酸およびアミノ酸アナログからなる群より独立して選択される1～約40個のアミノ酸を含むアミノ酸配列であり; かつ、

xおよびyは独立して選択され、0または1に等しい。

【００１３】

一態様において、ADNF Iポリペプチドは、

Val-Leu-Gly-Gly-Gly- Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO:3);

Val-Glu-Glu-Gly-Ile-Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO:4);

Leu-Gly-Gly-Gly- Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO:5);

Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO:6);

Gly-Gly-Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO:7);

Gly- Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO:8);

Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO:1); および

SALLRSIPAPAGASRLLLLTGEIDLP (SEQ ID NO:21)

からなる群より選択される。

【００１４】

一態様において、ADNF Iポリペプチドは、活性コア部位のN末端およびC末端のいずれかまたは両方に最大約20または40個のアミノ酸を含む。

【００１５】

別の態様において、ADNF IIIポリペプチドは、式$(R^1)_x$-Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln-$(R^2)_y$ (SEQ ID NO: 13)、またはそのアナログを有し、式中、

R^1は、それぞれが天然のアミノ酸およびアミノ酸アナログからなる群より独立して選択される1～約40個のアミノ酸を含むアミノ酸配列であり;

R^2は、それぞれが天然のアミノ酸およびアミノ酸アナログからなる群より独立して選択される1～約40個のアミノ酸を含むアミノ酸配列であり; かつ、

xおよびyは独立して選択され、0または1に等しい。

【００１６】

別の態様において、ADNF IIIポリペプチドは、

Gly-Gly-Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEQ ID NO:9);

Leu-Gly-Gly-Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln-Gln-Ser (SEQ ID NO:10);

Leu-Gly-Leu-Gly-Gly-Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln-Gln-Ser (SEQ ID NO:11);

Ser-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly-Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln-Gln-Ser (SEQ ID NO:12); および

Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEQ ID NO:2)

からなる群より選択されるメンバーである。

【００１７】

別の態様において、ADNF IIIポリペプチドは、活性コア部位のN末端およびC末端の少なくとも一方に最大約20個のアミノ酸を含む。

【００１８】

一態様において、ADNF Iポリペプチド部分(a)およびADNF IIIポリペプチド部分(b)が対象に投与される。

【００１９】

一態様において、ADNFポリペプチドは鼻腔内に投与される。別の態様において、ADNFポリペプチドは経口投与される。別の態様において、ADNFポリペプチドは静脈内または皮下に投与される。

【００２０】

一局面において、本発明は、末梢神経毒症状の処置のための医薬の製造におけるADNFポリペプチドの使用を提供する。

【００２１】

一態様において、末梢神経毒症状の症候は、運動機能障害、筋消耗、または嗅覚、視覚、聴覚、深部腱反射、振動感覚、皮膚感覚、歩行および平衡、筋力、起立性血圧、ならびに慢性または間欠性の痛みの感覚における変化の中から選択される変化によって測定される。

【００２２】

別の態様において、末梢神経毒症状は、1種類またはそれ以上の化学的薬剤による処置の結果である。別の態様において、末梢神経毒症状は、癌、多発性硬化症、痛風、関節炎、ベーチェット病、精神障害、免疫抑制、および感染症のための化学的薬剤から選択される化学的薬剤による処置の結果である。

【００２３】

別の態様において、1種類またはそれ以上の化学的薬剤は、ビンカアルカロイド(例えば、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、およびビンブラスチン)、白金剤(例えば、シスプラチン、カルボプラチン)、L-アスパラギナーゼ、およびタキサン類(例えば、タキソール、タキソテール)の中から選択される。抗癌剤のほかに、神経毒症状は、サリドマイド、メトトレキサート、コルヒチン、および抗感染症剤(限定するものではないが、ラミブジン、ザルシタビン、ジダノシン、およびスタブジンなどのヌクレオシドアナログを含む)により引き起こされ得る。

【００２４】

別の態様において、末梢神経毒症状は疾患過程の結果である。別の態様において、疾患過程は、糖尿病、ハンセン病、シャルコー・マリー・ツース病、遺伝性感覚自律神経性ニューロパチー(HSAN)、ギラン・バレー症候群、ウイルス性疾患(例えば、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、およびヒト免疫不全ウイルス (HIV))、細菌感染(カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）およびライム病を含む)、慢性アルコール依存症、ボツリヌス中毒症、ポリオ、尿毒症、慢性腎不全、およびアテローム性動脈硬化症の中から選択される。

【００２５】
別の局面において、本発明は、
(a) 抗癌剤を投与する工程; および
(b) 工程(a)の抗癌剤と、同時にまたは連続的に、薬学的に許容される担体中のADNFポリペプチドを投与する工程を含む、
癌または新生組織形成の処置方法を提供する。
【００２６】
別の局面において、本発明は、以下の工程、
(a) 神経変性疾患または潜在的な末梢神経毒症状を有する対象における嗅覚能を測定する工程;
(b) 治療薬剤を対象に投与する工程;
(c) 工程(b)の後で対象における嗅覚能を測定する工程;
(d) 工程(a)からの嗅覚能と工程(c)からの嗅覚能とを比較する工程を含む、
神経変性疾患または末梢神経毒症状のための治療薬剤に対する応答を試験する方法を提供する。
【００２７】
別の態様において、治療薬剤はADNFポリペプチドである。別の態様において、神経変性疾患はアルツハイマー病である。別の態様において、対象は、化学療法薬剤による処置と関連した、潜在的な末梢神経毒症状を有する。
【００２８】
別の局面において、本発明は、タウオパチーを罹患しているまたは罹患のおそれがある対象に対して、治療的有効量のADNFポリペプチドを投与する工程を含む、対象におけるタウオパチーの処置方法を提供する。
【００２９】
定義
「ADNFポリペプチド」という語句は、SALLRSIPA(SEQ ID NO:1)(「SAL」と呼ばれる)もしくはNAPVSIPQ(SEQ ID NO:2)(「NAP」と呼ばれる)からなるアミノ酸配列を含む活性コア部位、または、例えば、Hill et al, Brain Res. 603:222-233 (1993); Brenneman & Gozes, J. Clin. Invest. 97:2299-2307 (1996), Gozes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 427-432 (1996)に記載されているインビトロ皮質神経細胞培養アッセイを用いて測定される、神経栄養活性／神経保護活性を有するその保存的に修飾された変異体を有する、1つまたはそれ以上の活性依存性神経栄養因子(ADNF)を意味する。ADNFポリペプチドは、ADNF Iポリペプチド、ADNF IIIポリペプチド、それらの対立遺伝子、多型変異体、アナログ、種間ホモログ、それらの任意のサブ配列(例えば、SALLRSIPA(SEQ ID NO:1)もしくはNAPVSIPQ(SEQ ID NO:2))、または、例えば、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、中枢神経系由来の神経細胞に対して神経保護作用/神経栄養作用を示す脂肪親和性の変異体であり得る。「ADNFポリペプチド」は、ADNF IポリペプチドとADNF IIIポリペプチドの混合物をも意味し得る。
【００３０】
「ADNF I」という用語は、8.3 ± 0.25のpIを有し、約14,000ダルトンの分子量を有する、活性依存性神経栄養因子ポリペプチドを意味する。上記したように、ADNF Iポリペプチドは、Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala(SEQ ID NO:1) (「SALLRSIPA」または「SAL」または「ADNF-9」とも呼ばれる)からなるアミノ酸配列を含む活性部位を有する。Brenneman & Gozes, J. Clin. Invest. 97:2299-2307 (1996)、 Glazner et al., Anat. Embryol. ((Berl). 200:65-71 (1999)、Brenneman et al., J. Pharm. Exp. Ther., 285:619-27 (1998)、Gozes & Brenneman, J. Mol. Neurosci. 7:235-244 (1996)、および Gozes et al., Dev. Brain Res. 99:167-175 (1997)を参照されたい。特に明記しない限り、「SAL」は、Ser-Ala-Leuであるアミノ酸配列を有するペプチドではなく、Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala(SEQ ID NO:1)であるアミノ酸配列を有するペプチドを意味する。ADNF Iの全長アミノ酸配列は、国際公開公報第96/11948号中に見出すことができる。

【００３１】
活性依存性神経保護タンパク質(ADNP)とも呼ばれる、「ADNF IIIポリペプチド」または「ADNF III」という語句は、NAPVSIPQ(SEQ ID NO:2)(「NAP」と呼ばれる)からなるアミノ酸配列を含む活性コア部位、または、例えば、Hill et al., Brain Res. 603,222-233 (1993); Gozes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 427-432 (1996)に記載されているインビトロ皮質神経細胞培養アッセイを用いて測定される、神経栄養活性/神経保護活性を有するその保存的に修飾された変異体を有する、1つまたはそれ以上の活性依存性神経栄養因子(ADNF)を意味する。ADNFポリペプチドは、ADNF IIIポリペプチド、対立遺伝子もしくは多型の変異体、アナログ、種間ホモログ、または、例えば、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、中枢神経系由来の神経細胞に対して神経保護作用/神経栄養作用を示すそれらの任意のサブ配列(例えば、NAPVSIPQ；SEQ ID NO:2)であり得る。ADNF IIIポリペプチドは、約8アミノ酸からの範囲であることができ、例えば、8～20、8～50、10～100、または約1000もしくはそれ以上のアミノ酸を有し得る。

【００３２】
全長ヒトADNF IIIは、123,562.8 Da (1000より多いアミノ酸残基)の予想分子量および約6.97のpIを有する。上記したように、ADNF IIIポリペプチドは、Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln(SEQ ID NO:2) (「NAPVSIPQ」または「NAP」とも呼ばれる)からなるアミノ酸配列を含む活性部位を有する。Zamostiano et al., J. Biol. Chem. 276:708-714 (2001)およびBassan et al., J. Neurochem. 72:1283-1293 (1999)を参照されたい。特に明記しないかぎり、「NAP」は、Asn-Ala-Proからなるアミノ酸配列を有するペプチドではなく、Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln(SEQ ID NO:2)であるアミノ酸配列を有するペプチドを意味する。ADNF IIIの全長アミノ酸および核酸配列は、国際公開公報第98/35042号、国際公開公報第00/27875号、米国特許第6613740号中に見出すことができる。ヒト配列のアクセッション番号はNP_852107であり、下掲のZamostiano et al.も参照されたい。

【００３３】
「アミノ酸」という用語は、天然および合成のアミノ酸、ならびに、天然のアミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸擬似体を意味する。天然のアミノ酸は、遺伝子コードによりコードされるアミノ酸、ならびに、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリンなどの、後から修飾されたアミノ酸である。本出願の目的において、アミノ酸アナログは、天然のアミノ酸と同じ基本的化学構造を有する化合物、すなわち、水素、カルボキシ基、アミノ基、およびR基と結合している炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを意味する。かかるアナログは、修飾されたR基(例えば、ノルロイシン)または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然のアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。本出願の目的において、アミノ酸擬似体は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然のアミノ酸と類似の様式で機能する化合物を意味する。

【００３４】
アミノ酸には、参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報第01/12654号に開示されているような、化合物の経口摂取性およびその他の薬物と同様の特性を向上させ得る非天然のD-キラル性を有するものも含まれ得る。かかる態様においては、NAPまたはADNFポリペプチドの1つまたはそれ以上、および潜在的には全てのアミノ酸がD-キラル性を有し得る。ペプチドの治療的使用は、より長い半減期および作用時間を提供するために、D-アミノ酸を使用することにより、増強させることができる。しかしながら、多くの受容体はL-アミノ酸に対して強力な選択性を示す。しかし、天然のL-ペプチドと同等の活性を有するD-ペプチドの例、例えば、ポア形成抗菌ペプチド、βアミロイドペプチド(毒性の違い無し)、および、CXCR4受容体に対する内在性リガンドが報告されている。これに関して、NAPおよびADNFポリペプチドも、D-アミノ酸形態で活性を保持する(Brenneman et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 309(3): 1190-7 (2004), 下掲)。

【００３５】

アミノ酸は、それらの一般的に知られている3文字表記、または、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨されている1文字表記のいずれかによって参照することができる。同様に、ヌクレオチドは、それらの一般的に受け入れられている1文字コードによって参照することができる。

【００３６】

「保存的に修飾された変異体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾された変異体は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、または、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一の配列を意味する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたはそれ以上の選択された(または全ての)コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基によって置換されている配列を作製することにより達成することができる(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。遺伝子コードの縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUは全て、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置において、このコドンは、コードされるポリペプチドを変更することなく、記述される対応するコドンのいずれかと変更することができる。かかる核酸の変異は、「サイレント変異」であり、保存的に修飾された変異の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書中の全ての核酸配列は、その核酸の全ての可能なサイレント変異をも表す。当業者であれば、核酸中の各コドン(通常、メチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および、通常、トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く)が、機能的に同一の分子を得るように修飾され得ることを認識すると考えられる。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、それぞれ記述された配列中に潜在的に含まれる。

【００３７】

アミノ酸配列に関して、当業者であれば、コード配列中の単一のアミノ酸または低いパーセンテージでのアミノ酸を変更、付加、または欠失させる核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の配列への個々の置換、欠失、または付加は、この変更が化学的に類似するアミノ酸とのアミノ酸置換をもたらす場合、「保存的に修飾された変異体」であることを認識すると考えられる。機能的に類似するアミノ酸を示す保存的置換の表は当技術分野において周知である。かかる保存的に修飾された変異体は、本発明の多型変異体、種間ホモログ、および対立遺伝子に追加的なものであり、これらを除外するものではない。

【００３８】

以下のグループはそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む：

(1) アラニン(A)、グリシン(G);
(2) セリン(S)、スレオニン(T);
(3) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E);
(4) アスパラギン(N)、グルタミン(Q);
(5) システイン(C)、メチオニン(M);
(6) アルギニン(R)、リジン(K)、ヒスチジン(H);
(7) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、バリン(V); および
(8) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)（例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照されたい)。

【００３９】

当業者であれば、本明細書中に示された核酸配列およびポリペプチド配列の多くの保存的変異体が、機能的に同一の産物を生じることを理解すると考えられる。例えば、遺伝子コードの縮重のため、「サイレント置換」(すなわち、コードされるポリペプチドの変化を生じない核酸配列置換)は、アミノ酸をコードする全ての核酸配列の潜在的特性である。同様に、アミノ酸配列中の1個または数個のアミノ酸の「保存的アミノ酸置換」は、非

常に類似した特性を有する異なるアミノ酸と置換され（前記定義のセクションを参照されたい）、開示されているアミノ酸配列、または、アミノ酸をコードする開示されている核酸配列と非常に類似するものとして容易に同定される。それぞれ明記された核酸配列およびアミノ酸配列のかかる保存的に置換された変異体は本発明の特徴である。

【００４０】

「対象」という用語は、寿命の任意の段階における、任意の哺乳動物、特にヒトを意味する。

【００４１】

「接触」という用語は、以下の語句、すなわち：組み合わせて、添加して、混合して、通過させて、ともにインキュベートして、流れさせて等と互換的に、本明細書において使用される。さらに、本発明のADNF IIIポリペプチドまたはそれらをコードする核酸は、例えば、非経口、経口、局所、および吸入経路等の任意の従来の方法によって「投与」することができる。いくつかの態様においては、非経口経路および経鼻吸入経路が使用される。

【００４２】

本明細書中で使用する場合、「神経毒症状」は、化学物質または疾患過程に曝されたことによる神経系の細胞の構造または機能への有害作用として定義される。特に、神経毒物は、神経細胞への一般的な損傷(神経細胞障害)、軸索への傷害(軸索障害)、またはミエリン鞘の破壊(髄鞘障害)をもたらす形態的変化を引き起こし得る。特定の化学療法薬剤、農業用および工業用化学物質への曝露は、神経系を損傷し、神経学的および行動的障害を生じ得ることは十分に立証されている。神経毒症状の症候には、筋力低下、感覚および運動制御の喪失、振せん、認識力の変化、および自立神経系の機能障害が含まれる。神経毒性学的評価では、機能的試験と観察的試験の組み合わせを利用する。ヒトにおける神経毒症状は、最も一般的には、認識力、感覚、および運動機能を評価する神経学的試験により測定される。

【００４３】

「末梢神経毒症状」とは、末梢神経系(PNS)の神経毒症状を意味する。PNSには、脳または脊髄の中以外の全ての神経が含まれ、後根神経節(DRG)が含まれる。これらの神経は、感覚情報および運動インパルスを運搬する。PNS神経繊維に対する損傷はCNSと身体の残りの部分との情報伝達を妨害し得る。末梢神経毒症状は、文献中において、末梢神経障害と呼ばれる場合もあり、以下にさらに記載されるような、何百もの識別可能な症状を含み得る。「末梢神経障害」は、脳および脊髄の外部の神経が損傷されている広範な症状を包含し、挫滅外傷および切断も含み得る。

【００４４】

「中枢神経系」または「CNS」とは、脳および脊髄を意味する。

【００４５】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを意味するように、本明細書中では互換的に使用される。通常は、ペプチドは短いポリペプチドを意味する。これらの用語は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が、対応する天然のアミノ酸、ならびに、天然のアミノ酸ポリマーのアナログまたは擬似体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

【００４６】

本明細書中で使用する場合、「処置」には、疾患の進行もしくはさらなる症候の発生の防止のため、または、副作用もしくは疾患症候の回避または軽減のための処置など、予防的処置または病気予防法が含まれる。

【００４７】

本明細書中で使用する場合、「疾患」には、疾患の初期の症状もしくは障害もしくは症候、初期症状、または障害が含まれる。

【００４８】

「単離された」、「精製された」、または「生物学的に純粋な」という用語は、その天

然の状態で見いだされた場合に、それに通常は付随する成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を意味する。

【００４９】

「十分量」または「有効量」、または「治療的有効量」とは、関心対象の活性を示すか、あるいは、症候の主観的な軽減、または、医師もしくは資格を有するその他の観察者により認識される客観的に識別可能な改善をもたらす、ADNFポリペプチドの量のことである。治療的用途において、本発明のADNFポリペプチドは、疾患の症候を軽減または除去するために十分な量で患者に投与される。これを達成するために適切な量が「治療的有効量」と定義される。投与量の範囲は、使用されるADNFポリペプチド、投与経路、ならびに、以下にさらに示すような、および、カナダ特許第2202496号、米国特許第6174862号、および米国特許第6613740号の特許文献中に記載されるような、特定のADNFポリペプチドの効力によって変動する。

【００５０】

発現または活性の「インヒビター」、「アクチベーター」、および「モジュレーター」は、発現または活性に関するインビトロおよびインビボアッセイを使用して同定される、それぞれ、阻害する、活性化する、または調節する分子（例えば、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト、ならびに、それらのホモログおよび擬似体）を意味するように使用される。「モジュレーター」という用語には、インヒビターおよびアクチベーターが含まれる。インヒビターは、例えば、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの発現を抑制するか、または、結合して部分的もしくは全体的に刺激もしくは酵素活性をブロックするか、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性を、減少させる、抑制する、活性化を遅延させる、不活性化する、感受性を低下させる、または、ダウンレギュレートする物質（例えば、アンタゴニスト）である。アクチベーターは、例えば、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの発現を誘導するもしくは活性化するか、または、結合して、活性化もしくは酵素活性を刺激する、増大させる、開始する、活性化する、容易にする、促進する、感受性を増大させる、または、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性をアップレギュレートする物質（例えば、アゴニスト）である。モジュレーターには、天然および合成のリガンド、アンタゴニスト、アゴニスト、化学小分子等が含まれる。インヒビターおよびアクチベーターを同定するためのアッセイには、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの存在下または非存在下において、推定されるモジュレーター化合物を細胞に適用し、次いで、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性に及ぼす機能的影響を調べる工程が含まれる。潜在的なアクチベーター、インヒビター、またはモジュレーターによって処理された、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含むサンプルまたはアッセイを、その影響の程度を調べるために、インヒビター、アクチベーター、またはモジュレーターを含まない対照サンプルと比較する。対照サンプル(モジュレーターによって処理されていない)の相対活性値を100%とする。対照に対する本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性値が約80%、任意で50%または25～1%である場合に阻害は達成される。対照に対する本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性値が110%、任意で150%、任意で200～500%、または1000～3000%以上の場合に活性化は達成される。

【００５１】

発明の詳細な説明

本発明は、CNSに対して神経保護的であり、認識力の向上をもたらすことがこれまでに示されているADNFポリペプチドが、化学的薬剤または疾患過程により引き起こされる末梢神経毒症状の処置においてもう一つの選択肢として使用し得るという驚くべき知見を開示する。本発明は、NAPペプチドのインビボ投与が化学的薬剤により引き起こされた末梢神経毒症状を有意に減少させるという、実施例において示された知見により支持される。

【００５２】

ADNFポリペプチド: 組成および合成

一態様において、本発明のADNFポリペプチドは、以下のアミノ酸配列:$(R^1)_x$-Asn-Ala-P

ro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln-$(R^2)_y$ (SEQ ID NO: 13)およびその保存的に修飾された変異体を含む。この表記において、R^1は、アミノ末端(NH_2、すなわちN末端)側の位置付けを意味し、R^2は、カルボキシル末端(COOH、すなわちC末端)側の位置付けを表す。

【００５３】

上記式において、R^1は、それぞれが天然のアミノ酸およびアミノ酸アナログからなる群より独立して選択される1～約40個のアミノ酸を含むアミノ酸配列である。「独立して選択される」という用語は、アミノ酸配列R^1を構成するアミノ酸が同一であっても異なっていてもよい(例えば、アミノ酸配列中のアミノ酸の全てがスレオニン等であってもよい)ことを示すように、本明細書中において使用される。さらに、前記において説明したとおり、アミノ酸配列R^1を構成するアミノ酸は天然のアミノ酸、または天然のアミノ酸と類似の様式で機能する天然アミノ酸の既知のアナログ(すなわち、アミノ酸擬似体およびアナログ)のいずれかであってよい。アミノ酸配列R^1を形成するために使用され得る好適なアミノ酸には、限定するものではないが、下掲の表Iに示されるものが含まれる。指数「x」および「y」は独立して選択され、1または0と等しくあり得る。

【００５４】

R^1と同様に、上記式において、R^2は、それぞれが天然のアミノ酸およびアミノ酸アナログからなる群より独立して選択される1～約40個のアミノ酸を含むアミノ酸配列である。さらに、R^1と同様に、アミノ酸配列R^2を構成するアミノ酸は同一であっても異なっていてもよく、アミノ酸配列R^2を構成するアミノ酸は天然のアミノ酸、または天然のアミノ酸と類似の様式で機能する天然アミノ酸の既知のアナログ(すなわち、アミノ酸擬似体およびアナログ)のいずれかであってよい。アミノ酸配列R^2を形成するために使用され得る好適なアミノ酸には、限定するものではないが、下掲の表Iに示されるものが含まれる。

【００５５】

本明細書中で使用する場合、「NAP」または「NAPペプチド」は、式中xおよびyの両方が0に等しい、上記式を意味する。「NAP関連ペプチド」は、上記式で記載される、NAPのその他の任意の変異体を意味する。

【００５６】

R1およびR2は独立して選択される。R1およびR2が同じである場合には、それらは鎖長およびアミノ酸組成の両方に関して同一である。例えば、R1およびR2の両方がVal-Leu-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:14)であってもよい。R1およびR2が異なる場合には、それらは鎖長および／またはアミノ酸組成および／またはアミノ酸配列中のアミノ酸の順番に関して互いに異なり得る。例えば、R1がVal-Leu-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:14)であって、一方、R2がVal-Leu-Gly-Gly (SEQ ID NO:15)であってもよい。あるいは、R1がVal-Leu-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:14)であって、一方、R2がVal-Leu-Gly-Gly-Val (SEQ ID NO:16)であってもよい。あるいは、R1がVal-Leu-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:14)であって、一方、R2がGly-Val-Leu-Gly-Gly (SEQ ID NO:17)であってもよい。

【００５７】

上記式の範囲内において、特定のNAPおよびNAP関連ポリペプチド、すなわち、式中xおよびyの両方が0であるもの(すなわちNAP)が好ましい。同様に好ましいものは、式中xが1であり; R1がGly-Glyであり; かつ、yが0であるNAPおよびNAP関連ポリペプチドである。また、同様に好ましいものは、式中1であり; R1がLeu-Gly-Glyであり; yが1であり; かつ、R2が-Gln-SerであるNAPおよびNAP関連ポリペプチドである。また、同様に好ましいものは、式中xが1であり; R1がLeu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEQ ID NO:18)であり; yが1であり; かつ、R2が-Gln-SerであるNAPおよびNAP関連ポリペプチドである。また、同様に好ましいものは、式中xが1であり; R1がSer-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEQ ID NO:19)であり; yが1であり; かつ、R2が-Gln-SerであるNAPおよびNAP関連ポリペプチドである。生物学的活性を失うことなく、活性であるペプチドのN末端およびC末端の両方に、さらなるアミノ酸を付加することができる。

【００５８】

別の局面において、本発明は、前述のNAPおよびNAP関連ポリペプチドの一つを、所望の

治療活性を示すのに十分な量で、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤中に含む、薬学的組成物を提供する。一態様において、NAPまたはNAP関連ペプチドは、SEQ ID NO:2および9～12からなる群より選択されるアミノ酸配列、および保存的に修飾されたその変異体を有する。

【００５９】

別の態様において、ADNFポリペプチドは、以下のアミノ酸配列: (R1)x-Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala-(R2)y (SEQ ID NO:20)およびその保存的に修飾された変異体を含む。この表記において、R1は、アミノ末端(NH2、すなわちN末端)側の位置付けを意味し、R2は、カルボキシル末端(COOH、すなわちC末端)側の位置付けを表す。

【００６０】

上記式において、R^1は、それぞれが天然のアミノ酸およびアミノ酸アナログからなる群より独立して選択される1～約40個のアミノ酸を含むアミノ酸配列である。「独立して選択される」という用語は、アミノ酸配列R^1を構成するアミノ酸が同一であっても異なっていてもよい(例えば、アミノ酸配列中のアミノ酸の全てがスレオニン等であってもよい)ことを示すように、本明細書中においては使用される。さらに、前記において説明したとおり、アミノ酸配列R^1を構成するアミノ酸は天然のアミノ酸、または天然のアミノ酸と類似の様式で機能する天然アミノ酸の既知のアナログ(すなわち、アミノ酸擬似体およびアナログ)のいずれかであってよい。アミノ酸配列R^1を形成するために使用され得る好適なアミノ酸には、限定するものではないが、下掲の表Iに示されるものが含まれる。指数「x」および「y」は独立して選択され、1または0と等しくあり得る。

【００６１】

R^1と同様に、上記式において、R^2は、それぞれが天然のアミノ酸およびアミノ酸アナログからなる群より独立して選択される1～約40個のアミノ酸を含むアミノ酸配列である。さらに、R^1と同様に、アミノ酸配列R^2を構成するアミノ酸は同一であっても異なっていてもよく、アミノ酸配列R^2を構成するアミノ酸は天然のアミノ酸、または天然のアミノ酸と類似の様式で機能する天然アミノ酸の既知のアナログ(すなわち、アミノ酸擬似体およびアナログ)のいずれかであってよい。R^2を形成するために使用され得る好適なアミノ酸には、限定するものではないが、下掲の表Iに示されるものが含まれる。

【００６２】

本明細書中で使用する場合、「SAL」または「SALペプチド」は、式中xおよびyの両方が0に等しい、上記式を意味する。「SAL関連ペプチド」は、上記式で記載される、SALの任意のその他の変異体を意味する。

【００６３】

R^1およびR^2は独立して選択される。R^1 R^2が同じである場合には、それらは鎖長およびアミノ酸組成の両方に関して同一である。さらなるアミノ酸を、生物学的活性を失うことなく、活性ペプチドのN末端およびC末端の両方に付加することができる。

【００６４】

別の局面において、本発明は、前述のSALおよびSAL関連ポリペプチドの一つを、所望の治療活性に対して十分な量で、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤中に含む、薬学的組成物を提供する。一態様において、SALまたはSAL関連ペプチドは、SEQ ID NO:1および3～8からなる群より選択されるアミノ酸配列、および保存的に修飾されたその変異体を有する。さらなる態様において、SAL関連ペプチドは、

SALLRSIPAPAGASRLLLLTGEIDLP

(SEQ ID NO:21)を含む。配列

SALLRSIPAPAGASRLLLLTGEIDLP

(SEQ ID NO:21)は、コリベリン（Colivelin）としても知られており、SAL活性部位およびAGA-(C8R)HNG17と呼ばれるタンパク質ヒューマニンの誘導体の組み合わせである。コリベリンについては、Chiba et al., J. Neurosci. 25:10252-10261 (2005)に記載されており、当該文献は全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

【００６５】

好ましいADNFポリペプチドが、本明細書中にそのいくつかが開示されている、当業者に公知の適切なアッセイおよび動物モデルを使用することにより、末梢神経保護活性に対して容易に選択され得ることが、当業者には容易に明らかであると考えられる。

【００６６】

さらに、当業者であれば、それらの生物学的活性を減じることなく、様々な化学的修飾がペプチドに対して行われ得ることを認識すると考えられる。特定のアミノ酸とその他のアミノ酸との置換に加えて、特定のアミノ酸に対する広範な修飾、および、様々なポリマー、タンパク質、糖質、またはその他の有機質部分とのコンジュゲートも存在し得る。

【００６７】

本発明のペプチドは様々な周知の技法を介して調製することができる。比較的短いサイズのペプチドは、通常、従来技法にしたがって、固体支持体上または溶液中で合成される(例えば、Merrifield, Am. Chem. Soc. 85:2149-2154(1963)を参照されたい)。多様な自動合成装置および配列決定装置が市販されており、既知のプロトコールにしたがって使用することができる(例えば、Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis (2nd ed. 1984)を参照されたい)。配列中の残りのアミノ酸の逐次付加がその後に続く、配列のC末端アミノ酸を不溶性の支持体へ結合させる固相合成は、本発明のペプチドの化学合成のための好ましい方法である。固相合成のための技法については、Barany & Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.; Merrifield et al 1963; Stewart et al. 1984に記述されている。NAPおよび関連ペプチドは、標準的Fmocプロトコール(Wellings & Atherton, Methods Enzymol. 289:44-67 (1997))を用いて合成される。

【００６８】

ペプチドのためのその他の合成方法には、液相合成(例えば、Fischer and Zheleva J Pept Sci. 8(9):529-42 (2002)が含まれる。

【００６９】

前述の技法に加えて、ADNFペプチド、特に、本発明において使用するための全長タンパク質ADNF IおよびADNF IIIは、組換えDNA法により調製することができる。一般的に、これには、該タンパク質をコードする核酸配列を作製し、特定のプロモーターの制御下の発現カセット中に核酸を配置し、宿主細胞中で該タンパク質を発現させることが含まれる。当業者に既知の組換え操作される細胞には、限定するものではないが、細菌、酵母、植物、糸状菌、（特にバキュロウイルスベクターを使用している）昆虫、および哺乳動物の細胞が含まれる。

【００７０】

末梢神経毒症状を処置するためのADNFポリペプチドの使用

末梢神経毒症状は、様々な技法により、対象において同定および診断することができる。通常は、運動機能障害、筋消耗、または、嗅覚、視覚、聴覚における変化、または深部腱反射、振動感覚、皮膚感覚、歩行および平衡、筋力、起立性血圧、ならびに慢性もしくは間欠性の痛みにおける変化の中から選択される変化によって測定することができる。ヒトにおいて、これらの症候は、PNSおよびCNSの両方における毒性効果を示す場合もある。究極的には、神経毒症状から生じ得る、潜在的な何百もの末梢神経障害が存在する。PNS活性の範囲を反映した場合、症候は、感覚機能、運動機能、または自律機能を伴い得る。それらは、影響を受ける神経の種類、および、症候が発現している期間にしたがって分類することができる。

【００７１】

末梢神経毒症状は、化学療法薬剤(抗癌剤、抗菌剤等)および疾患過程によって引き起こされ得る。これらの2つの異なる領域については、以下に別々に記載する。

【００７２】

化学療法薬剤に関して、ビンカアルカロイド、スラミン、タキサン類、およびシスプラチン等の薬剤に曝露された患者は、末梢神経毒症状を発現し得ることは周知である。近年発表された神経学的知見は、腫瘍を罹患した患者におけるタキサン類およびシスプラチン

の投与が、用量および時間に依存して、神経欠損を引き起こすことを示している(Bedikian A. Y., et al. 1995. J. Clin. Oncol., 13: 2895-2899)。さらに、白金化合物およびタキサン類を併用した場合、患者は、より重篤な末梢神経障害を発現する。化学療法薬剤によって引き起こされる神経障害の病態生理学は依然として明らかでないが、様々な研究によって、タキサン類は、軸索輸送を妨害し、これにより、軸索末端の感覚-運動障害を引き起こし、一方、白金化合物は、脊髄神経節の神経細胞体に主としてはたらく感覚神経障害を引き起こすことが示されている。病理学的および電気生理学的研究によっても、後根神経節の神経細胞がシスプラチン処置後に選択的に損傷を受けていることが示されている。この末梢神経毒症状の発現が、より重篤な神経欠損を防ぐための医師の治療を妨げ得ることが報告されている(Amato A. A., Collins M. P. Semin. Neurol., 18: 125-142, 1998)。神経毒性効果のため、潜在的な神経保護物質の同定のために多くの労力が捧げられている。したがって、神経毒症状を防止し、および／または化学療法後の末梢神経支配を向上させ得るADNFポリペプチドが、臨床的に有用であろうという仮説を立てるのは合理的である。当業者は末梢神経毒症状を引き起こし得る化学療法薬剤に精通している。一般的には、かかる化学療法薬剤は、癌、多発性硬化症、痛風、関節炎、ベーチェット病、精神障害、家族性地中海熱、アミロドーシス、免疫抑制、および感染症の処置において使用される。代表的リストには、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、およびビンブラスチン)、白金剤(シスプラチン、カルボプラチン)、L-アスパラギナーゼ、およびタキサン類(タキソール、タキソテール)が含まれる。抗癌剤のほかに、神経毒症状は、サリドマイド、メトトレキサート、コルヒチン、および抗感染症剤（限定するものではないが、ラミブジン、ザルシタビン、ジダノシン、およびスタブジン等といったヌクレオシドアナログを含む)によって引き起こされ得る。

【００７３】

本発明の方法により、治療的有効量のADNFポリペプチドの投与は、上記に記載されるような化学療法薬剤を投与された対象における末梢神経毒症状を処置または予防するために有用であることが認識される。化学療法薬剤の投与に対して、ADNFポリペプチドの投与は、その前に、同時に、後に、または不規則に生じ得る。当業者は、神経毒症状の影響が現れる前に末梢神経保護を確立するように設計されている薬剤同士の好適な時間的関係を特定することができる。処置は、化学療法薬剤が中止されるまで、または、該薬剤から生じた神経毒症状が回復して、悪化が予想されなくなるまで、継続してもよい。

【００７４】

化学療法薬剤と非同時に（例えば、連続的に）投与される場合、ADNFポリペプチドは、通常、該薬剤とは別々に製剤化され得る。同時に投与される場合には、該薬剤と組み合わせた剤形でADNFポリペプチドを提供するのが有利であり得る。したがって、本発明によって、ADNFポリペプチドの用量が化学療法薬剤に関連する末梢神経毒症状を低減または除去するために有効な、化学療法薬剤とADNFポリペプチドとの製剤が認識される。当業者は、本開示および選択した化学療法薬剤の予想される神経毒性効果に基づいて、ADNFポリペプチドの適切な用量を選択することができる。

【００７５】

上述したように、特定の疾患過程も末梢神経毒症状を生じ得る。例えば、糖尿病/末梢神経障害の関連性は十分に確立している。糖尿病関連の典型的な神経障害症候には、足で最初に始まる感覚への影響が含まれる。関連する痛みまたはしびれてピリピリする感覚、燃えるようにヒリヒリする感覚、何かが這うような感覚、もしくはチクチク刺すような感覚は、足および下肢に典型的な「靴下型」分布を形成する。

【００７６】

末梢神経毒症状を生じ得るその他の疾患には、感染症を含む遺伝性または後天性の疾患が含まれる。かかる疾患には、ハンセン病、シャルコー・マリー・ツース病、遺伝性感覚自律神経性ニューロパチー(HSAN)等の遺伝性神経障害、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、およびヒト免疫不全ウイルス(HIV)等のウイルス性疾患に関連する合併症から生じ得るギラン・バレー症候群、または、カンピロバクター・ジェジュニおよ

びライム病を含む細菌感染が含まれる。末梢神経障害のその他の周知の原因には、慢性アルコール依存症、水痘-帯状疱疹ウイルス感染、ボツリヌス中毒症、およびポリオが含まれる。末梢神経障害は一次症候として発現し得、または、それはあまり顕著ではないかもしれない。尿毒症または慢性腎不全は、最終的に神経障害を発現するリスクを10～90%有し、肝不全と末梢神経障害との間の関連性も存在し得る。血管内での脂質の蓄積(アテローム性動脈硬化症)が、特定の末梢神経への血液の供給を妨げ得る。

【００７７】

化学療法薬剤の場合において認識されたように、疾患過程からの神経毒症状を処置または予防するためのADNFポリペプチドの使用は、かかる疾患を患う対象における、末梢神経毒症状を処置または予防するために十分な治療的有効量のADNFポリペプチドの投与を必要とする。この場合、末梢神経毒症状の開始に対して、ADNFポリペプチドの投与は、その前に、同時に、後に、または不規則に生じ得る。当業者は、疾患によって引き起こされる神経毒症状の影響が現れる前に末梢神経保護を確立するように設計されている薬剤同士の好適な時間的関係を特定することができる。処置は、元となる疾患が回復するまで、または、該疾患から生じた神経毒症状が回復して、悪化が予想されなくなるまで、継続してもよい。いくつかのケースでは、ADNFポリペプチドの投与が長期的であってもよい。

【００７８】

本発明に関係する疾患過程はその他の治療薬剤を用いて処置されることが多いので、かかる薬剤と組み合わせた剤形でADNFポリペプチドを提供することが有利であり得るということが本発明によって認識される。したがって、本発明によって、ADNFポリペプチドの用量が化学療法薬剤に関連する末梢神経毒症状を低減または除去するために有効な、治療薬剤とADNFポリペプチドとの製剤が認識される。当業者は、本開示および選択した治療薬剤の予想される神経毒性効果に基づいて、ADNFポリペプチドの適切な用量を選択することができる。

【００７９】

タウオパチーおよび関連疾患を処置するためのADNFポリペプチドの使用

タウオパチーとは、微小管関連タンパク質タウの、神経細胞質内およびグリア細胞質内における蓄積を意味する。この用語は比較的新しいが、時にはアミロイドβタンパク質の沈着が無い状態の、神経細胞およびグリア細胞両方におけるタウエピトープの広範な蓄積を証拠立てる神経変性疾患に関連する。タウオパチーは、現在、神経変性の主要な原因の一つであると考えられており、高齢者の約3分の1が、比較的少ないアミロイドβタンパク質(Aβ)とともに異常にリン酸化されたタウタンパク質の沈着を示している。神経原繊維変化形成(タウ凝集を含む)の過程において、これらの病変の主要なタンパク性成分は翻訳後修飾を受ける。タウの場合、これらには（チロシン残基も含まれるが）主としてセリン残基およびスレオニン残基のリン酸化が含まれる。さらに、タウは、ユビキチン化、ニトロ化、切断、プロリル異性化、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの結合、グリコシル化、糖化、および糖化最終産物(AGE)による修飾を受ける。ヒトのタウオパチーには、アルツハイマー病、および、第17染色体と関連したパーキンソニズムを示す前頭側頭認知症が含まれる(Chen et al. Curr Drug Targets. 5(6):503-15 (2004))。さらに、最近の研究によって、化学療法の結果として、神経変性のマーカーである脳脊髄液中タウが増加することが示されている(Van Gool et al. Leukemia. 14:2076-84 (2000); Lee et al., Biochem. Biophys Acta. 1739: 251-9 (2005))。

【００８０】

本発明は、治療的有効量のADNFポリペプチドを対象に投与する工程を含む、対象におけるタウオパチーの処置方法に関する。NAPペプチドによるタウオパチーの処置は本発明の具体的態様である。

【００８１】

本発明者らは、本開示に基づいて、NAP等のADNFポリペプチドが、ビンカアルカロイドであるビンクリスチン(実施例参照)による神経毒性損傷を効果的に防止すること、ならびに、いかなる特定の理論または作用機序にも拘束されることも望むことなく、NAPがチュ

ーブリンと相互作用して微小管形成を促進し、かつグリア細胞および神経細胞中の微小管構造を安定させることを示している、PCT国際公開公報第2004/080957号(Gozes et al.)およびDivinski et al. J Biol Chem. 279(27):28531-8. (2004)の教示とNAPの前記の効果とを組み合わせることができ、それによりNAPがタウオパチーの処置に有用であることを初めて確立することを認識している。ADNF-9(すなわちSAL)および全てD-アミノ酸のSAL(D-SALと呼ばれる, Brenneman et al. (2004), 下掲)ならびに全長ADNP(ADNF III)を含むADNFファミリーのその他のペプチドは、チューブリンと相互作用する(Furman et al., Neuron Glia Biology 1: 193-9 (2004)。

【００８２】

タウは微小管ネットワークを安定させかつ維持する重要な機能を果たし、その結果、それは神経細胞における軸索輸送にとって重要であることは十分認識されている。タウの過リン酸化から生じる病理学的神経原繊維変化の形成は、微小管の破壊および軸索輸送の障害を生じる(Ishihara et al. Neuron 24:751-62 (1999); Lee et al., Annu Rev Neurosci. 24:1121-59 (2001); Morfini et al. Neuromolecular Med. 2:89-99 (2002); Gozes. J Mol Neurosci. 19(3):337-8 (2002))。Divinski et al. J Biol Chem. 279(27):28531-8. (2004)は、亜鉛毒性への曝露が星状細胞および神経細胞において微小管の破壊を生じること、および、微小管ネットワークの再構成を促進することにより、NAPはこれらの細胞をこの毒性から保護することを示している。同じ実験において、チューブリンはNAP結合分子として同定された。さらに、NAPの存在下では、リン酸化タウに対する非リン酸化タウの比の増大(Gozes & Divinski, Journal of Alzheimer's Disease 6(6 Suppl.):S37-41 (2004))、ならびに、緩徐な軸索原形質輸送に依存した過程である神経突起伸長の増大(Lagreze et al., Invest Opthalmol Vis Sci. 46:933-8 (2005); Gozes. Neurochem Int .4: 101-20 (1982); Smith-Swintosky et al. J Mol Neurosci. 25:225-38 (2005)が生じる。したがって、微小管ネットワークのアセンブリおよび安定性を、チューブリンに結合することにより直接的にまたは様々な形態のタウのレベルの変化を通じて間接的に促進するようにNAPが機能することは可能である。適切な微小管アセンブリの促進はまた、ビンクリスチンおよび関連化合物がチューブリンのらせん状繊維および凝集されたらせん構造の形成を促進するので、ビンクリスチン処置の場合において重要である(Verdier-Pinard et al. Biochem Pharmacol. 58(6):959-71 (1999))。限定するものではないが、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、およびビンブラスチン)、タキサン類(タキソール、タキソテール)、ノコダゾール、ならびにコルヒチンを含む、任意のその他のチューブリン結合および修飾薬剤は、結果としてNAP処置の特定の神経保護効果により保護され得る、軸索細胞質輸送に影響を及ぼし得る(Gozes et al. J Mol Neurosci. 20(3):315-22, (2003))。

【００８３】

ADNFポリペプチド等の神経療法の有効性を調べるための嗅覚試験の使用

嗅覚減退(味覚および嗅覚の能力の低下)または無嗅覚症(味覚および嗅覚の能力の全損)を含む嗅覚障害は、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、多発性硬化症、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、およびその他)ならびに化学療法薬剤および疾患過程によって引き起こされる末梢神経毒症状と関連する。これらの全てのケースにおいて、嗅覚障害は、通常、進行性である。

【００８４】

本発明は、神経変性疾患または末梢神経毒症状を有する対象が、疾患を処置するために投与された治療薬剤に応答するか否かを、該対象の嗅覚を測定することにより同定する方法を提供する。治療に対する応答は、以下のいずれか、すなわち、治療薬剤による処置後の対象における嗅覚の能力もしくは質の向上によって、または、未処置の疾患を有する対象において予測され得る、嗅覚減退の程度もしくは嗅覚減退から無臭覚症への進行が、かかる処置後に少なくとも低下することによって示される。

【００８５】

この方法は神経変性疾患または末梢神経毒症状の処置のための任意の治療薬剤に対する

応答を調べるために使用することができるが、特に、本発明は、ADNFポリペプチドによる治療に対する応答を特定するための方法を提供する。

【００８６】

本方法は、神経変性疾患のための治療薬剤に対する応答の調査を含み、以下の工程：(a)神経変性疾患または潜在的な末梢神経毒症状を有する対象における嗅覚能を測定する工程;(b)対象に治療薬剤を投与する工程;(c)工程(b)の後で対象における嗅覚能を測定する工程;および(d)工程（a)からの嗅覚能と工程(c)からの嗅覚能とを比較する工程を含む。

【００８７】

工程(d)の比較結果に基づいて、対象および介護者は、治療薬剤による処置後の対象における嗅覚の能力もしくは質が向上するか、または、未処置の疾患を有する対象において予測され得る嗅覚減退の程度、もしくは嗅覚減退から無臭覚症への進行が、かかる処置後に少なくとも低下するかし、それによって、治療薬剤に対する応答を示すか否かを判定することができる。その結果、患者および介護者は、その治療薬剤による処置を継続すべきか中止すべきかを続いて決定することができる。

【００８８】

本方法は、特に、神経変性疾患または末梢神経毒症状の開始の結果として、喪失または低下する最初の感覚の一つが嗅覚であることから、治療薬剤に対する応答を評価するために多くの利点を提供する。

【００８９】

薬学的投与

本発明のADNFポリペプチドは、通常、薬学的製剤の形態で投与される。本発明における使用のための好適な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (17th ed. 1985)中に見られる。さらに、薬物送達の方法の概説については、Langer, Science 249: 1527-1533 (1990)を参照されたい。

【００９０】

そのようなものとして、本発明は、ADNFポリペプチドの量が治療効果を提供するために十分である、本明細書中に記載される1つまたはそれ以上のADNFポリペプチドを薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて含む、治療組成物または医薬を提供する。

【００９１】

本発明のADNFポリペプチドは、非経口投与、局所投与、経鼻投与、経口投与、経肺投与（例えば、吸入による）、または局部投与を含む、任意の有効な手段による投与が意図される薬学的組成物として具体化される。好ましくは、この薬学的組成物は、例えば、静脈内、皮下、皮内、筋肉内、または鼻腔内のように非経口的に投与される。

【００９２】

したがって、本発明は、許容される担体中、好ましくは水性担体中に溶解または懸濁した、上記したようなADNFポリペプチドの溶液を含む、非経口投与のための組成物を提供する。例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸等を含む様々な水性担体を使用することができる。これらの組成物は従来の周知の滅菌技法により滅菌してもよいし、または、それらは滅菌濾過してもよい。得られる水性溶液は使用のためにそのままの状態でまたは凍結乾燥した状態でパッケージしてもよく、凍結乾燥された調製物は投与前に滅菌溶液と混合される。この組成物は、pH調整剤および緩衝剤、等張化剤、湿潤剤等（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウラート、トリエタノールアミンオレアート等）を含む、おおよその生理学的条件のために必要とされる、薬学的に許容される補助物質を含んでもよい。

【００９３】

固体組成物のためには、例えば、薬学的グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム等を含む、従来の非毒性固体担体を使用することができる。経口投与のためには、薬学的に許容される非毒性の組成物は、上記した担体等の通

常使用される賦形剤のいずれかと、通常は、10～95%の活性成分、より好ましくは25%～75%の濃度の活性成分とを合わせることにより形成される。

【００９４】

エアロゾル投与のためには、ADNFポリペプチドが、好ましくは、微粉化された形態で界面活性剤および噴射剤と共に供給される。当然ながら、界面活性剤は、非毒性であって、好ましくは噴射剤に溶解性でなければならない。かかる薬剤の代表は、6～22個の炭素原子を含む脂肪酸のエステルまたは部分エステル（例えば、脂肪族多価アルコールまたはその環状無水物と共にあるカプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリック酸、およびオレイン酸）である。混合または天然のグリセリド類等の混合エステルを使用してもよい。望ましければ、例えば、鼻腔内送達のためのレシチンと同様に、担体も含有させることができる。例としては、1ミリリットルあたり7.5 mg NaCl、1.7 mg クエン酸一水和物、3 mg リン酸二ナトリウム二水和物、および0.2 mg 塩化ベンズアルコニウム溶液(50%)を含む溶液が含まれる(Gozes et al, J MoI Neurosci. 19 (1-2): 167-70 (2002))。したがって、本発明のADNFポリペプチドは、末梢神経毒症状の処置または予防のための医薬の製造において使用することができる。この医薬は、本発明において意図される任意の量の活性成分(例えば、ADNFポリペプチド)を含む、本発明において意図される任意の薬学的製剤を含むことができる。

【００９５】

治療的用途において、本発明のADNFポリペプチドは、末梢神経毒症状の症候を軽減または除去するために十分な量で患者に投与される。これを達成するために適切な量が「治療的有効量」と定義される。この用途のために有効な量は、例えば、使用される特定のNAPまたはADNFポリペプチド、予防される疾患または障害のタイプ、投与様式、患者の体重および一般的健康状態、ならびに、処方医の判断によって左右される。

【００９６】

例えば、1日あたり1回(例えば、夜に)鼻腔内投与される100 ng～10 mgの用量範囲に該当するポリペプチド量は治療的有効量であり得る。あるいは、用量は、この範囲外であっても、または、異なるスケジュールであってもよい。例えば、用量は、1回の投与あたり、0.0001 mg/kg～1000 mg/kgの範囲であることができ、好ましくは、約0.001 mg/kg、0.1 mg/kg、1 mg/kg、5 mg/kg、50 mg/kg、または500 mg/kgであり得る。一回分は、1時間毎、4、6または12時間毎、食事時、毎日、2、3、4、5、6、もしくは7日毎、毎週、2、3、4週間毎、毎月、または2、3もしくは4ヶ月毎、あるいはこれらの任意の組み合わせで投与することができる。投与期間は、処置する症状に応じて、単回（急性）投与であっても、または、数日間、数週間、数ヶ月間、もしくは、数年間の期間にわたってもよい。当業者は好適な用量を決定することができ、Gozes et al., 2000, Gozes et al., 2002), Bassan et al. 1999; Zemlyak et al., Regul. Pept. 96: 39-43 (2000); Brenneman et al., Biochem Soc. Trans. 28: 452-455 (2000); Erratum Biochem Soc. Trans. 28: 983; Wilkemeyer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 8543-8548 (2003))中に報告されている予備的データを頼りにしてもよい。好適な用量範囲は、本明細書中に示される実施例ならびに国際公開公報第9611948号に記載される。

【００９７】

本明細書中で使用する場合および添付された特許請求の範囲においては、単数形「a」、「and」、および「the」には、文脈がそうでないことを明らかに示していない限り、複数の指示対象も含まれることに留意しなければならない。したがって、例えば、「a cell」という言及には、複数のかかる細胞および当業者に公知であるその等価物等が含まれる。

【００９８】

本明細書中において論じた刊行物は、本出願の出願日前におけるそれらの開示のために提供されるにすぎない。本明細書中は、先行発明によって本発明がかかる刊行物に先行する資格を有しないことを認めることを何ら意図するものではない。さらに、提供された刊行物の日付は、独立して確認する必要があり得る実際に公開された日付とは異なる場合も

ある。引用は、参照により本明細書に組み入れられる。

【００９９】

実施例

実施例1: NAPの鼻腔内投与はラットにおいて、ビンカアルカロイドにより引き起こされる末梢神経毒症状を減少させる

本研究は、NAP処理が、ラットにおいて、ビンカアルカロイドであるビンクリスチンにより引き起こされる末梢神経毒症状を成功裏に減少させるかどうかを評価するために設計された。

【０１００】

方法

10匹からなる4群に分けたラット(200～300g)に、生理食塩水中に溶解させた硫酸ビンクリスチンを注入した。ストック濃度は2 mg/ml、pH4.5 ～ 5.2であった。薬物のアリコートを毎日生理食塩水で0.175 mg/mlの濃度となるように希釈し、0.175 mg/kgの量で腹腔内投与した。NAPを生理食塩水中0.1 mg/1.3 ml(0.9% NaCl)に調製し、25マイクログラム/kg(正確な計算は毎日の体重に基づいて行った)の投与を達成するために、約300gのラットに約0.1mlを皮下注射した。2.5マイクログラム/kgにするために、注射溶液を10倍に希釈し、再度0.1 mlをラット毎に注射した。処理は毎日(週5日間)、約3週間(20日間)、毎日の体重に基づいて計算した投与量で行った。NAPを、以下のスケジュールで示される投与および量で、ビンクリスチンと同時に投与した。

【０１０１】

4群を評価した:(1) 対照、生理食塩水(n=10)、(2) ビンクリスチン(i.p.) 0.175 mg/kg (n=10)、(3) ビンクリスチン(i.p.) 0.175 mg/kg + NAP (s.c.) 2.5マイクログラム/kg (n=10)、および(4) ビンクリスチン (i.p.) 0.175 mg/kg + NAP (s.c.) 25マイクログラム/kg (n=10)。

【０１０２】

処理の中断1週間後、ビンクリスチンの最後のブーストを腹腔内で毎日、3日間行い、25マイクログラム/kgでNAPを、鼻腔内で第4群のみに与えた。鼻腔内製剤は先の実験に従った(1 mLの滅菌水(U.S.P.)あたり、7.5mgの塩化ナトリウム、1.7mgのクエン酸一水和物、3.0mgのリン酸ナトリウム二水和物、0.2mgの塩化ベンザルコニウム溶液(50%)、Alcalayら、下掲)。行動実験のため、以下の試験手法を用いて、ベースラインの毒素の効果を最初の注射に続いて2～23日間評価した。

【０１０３】

(1) ロータロッド

ビンクリスチン処理した動物は、筋の神経支配および強さを評価するロータロッド試験において行動障害を示す(Boyle et al., J Pharmacol Exp Ther 279: 410-415 (1996))。ここで、ロータロッド試験を、ビンクリスチン注射の開始後3、8、15および23日目に実行した。

【０１０４】

ロータロッド試験において、回転するロッド上に齧歯動物を置く。回転のスピードを徐々に増加させ、齧歯動物が回転しているロッド上に留まる能力を記録する。ここで、スピードを30秒毎に200秒まで3rpmずつ3rpmから30rpmへ徐々に増加させる。落下することなくロータロッド上に留まっていた時間を記録した。正常な機能が損なわれた動物はロータロッドからより早く落下する。単回処理した各動物が留まっていた時間を全ての処理および試験日について、図1にみられるようにまとめた。統計分析によりビンクリスチン処理動物および対照動物の間の有意な差異が示され、ビンクリスチン動物において正常な機能が損なわれることを示した(P<0.01)。NAP (2.5マイクログラム/kg)による第3群の処理は、動作を対照値の同程度まで有意に向上させた。第4群におけるNAP (25マイクログラム/kg)処理された動物は、ビンクリスチン処理のみで処理された動物とは何ら有意な差異は示さず、対照とは有意に異なっていた。

【０１０５】

(2) 運動評価

運動試験を、ビンクリスチン注射の開始後6、9、13および24日目に行った。ラットを、ビンクリスチン注射後に運動障害スケールを用いて評価した (Bederson JB, et al., Stroke. 1986; 17: 472-476; Leker RR, et al., J Neurol Sci. 1999; 162: 114-119)。

【０１０６】

動物を、直径30 cmの円から20秒以内に出て行くことの失敗に基づいて調べた。

【０１０７】

図2は、運動評価の結果を示す。直径30 cmの円から20秒以内に脱出する能力は、対照動物と比較して、ビンクリスチン処理ラットに関して有意に減少した(P<0.001)。第4群におけるNAP (25マイクログラム/kg)を用いたさらなる処理は、動作を対照値の同程度まで有意に向上させた(P<0.01)。第3群においてNAP (2.5マイクログラム/kg)を用いて処理した動物は、ビンクリスチンのみで処理した動物と何ら有意な差異を示さなかった。

【０１０８】

(3) 嗅覚識別試験

処理は約3週間(20日間)の間毎日(週5日間)、毎日の体重において計算された投与量で行われた。上述のスケジュールの中で示された投与および量でビンクリスチンが腹腔内投与されるのと同時にNAPを皮下投与した。処理の中断1週間後、ビンクリスチンの最後のブーストを腹腔内で3日間毎日行い、25マイクログラム/kgでNAPを、鼻腔内で第4群のみに与えた。鼻腔内製剤は先の実験に従った(Alcalayら、下掲)。嗅覚識別試験を、最後のブースト期間中のNAP処理における3日間それぞれにおいて行った(Macknin et al., Brain Res. 1000, 174-78 (2004))。試験された匂いは、(1)脱イオン水(ddw)および(2)香り抽出物、すなわち、バニラ／アーモンドであった。

【０１０９】

全体の実験は、それぞれが2分間の3試行を包含する、3つの匂い(水および2種の香り抽出物)を含む。新しく浸された綿棒が、それぞれの香りに関する各試行の開始時に用いられた。

【０１１０】

試験30分前、対象を別々のケージに入れ、水に浸した綿棒をケージ内に吊るした状態で配置した。30分間、動物を綿棒およびケージに慣らした。その後、この綿棒を所望の香りに浸し、ケージの頂部から吊るした。

【０１１１】

動物の鼻が綿棒から約1 cmである時を開始とし、動物がその前足を綿棒の上に載せるかまたはそれを咬もうとする時を終了とするカウントによる、綿棒を嗅ぐ持続時間(秒)は、嗅覚反応を反映する。

【０１１２】

動物が匂いを識別できる場合、それは同じ香りの各試行に徐々に興味を示さなくなると考えられる - したがって、嗅ぐ時間は減少すると考えられる。しかし、匂いが新しいものに置き換えられる場合には、嗅ぐ時間は増加すると考えられる。

【０１１３】

個々の試験群と対照群との比較、または対になっていない群同士の比較を行うために、ｔ検定を用いた。

【０１１４】

図3～5は、新たな匂いに費やされる時間、すなわち、嗅覚能を示す。3つの連続する試験に渡る、それぞれの匂いに費やされた時間を記録した。図3は、対照群ラット(第1群)、図4は、ビンクリスチン処理ラット(第2群)、ならびに図5は、ビンクリスチンおよび25マイクログラム/kg NAP処理されたラット(第4群)に関する。第2群のビンクリスチン処理ラットは、新たな匂いについて何ら最初の関心を示さず、新たな匂いに対する関心の増加傾向は、対照およびビンクリスチン-NAP処理ラット中で観察された。これらの結果をさらに図6中で評価した。

【０１１５】

図6は、新たな匂いに交換した後の、特定の匂いに費やした時間の間の比較 - 匂い識別試験を示す。図は4つのポイントを示す：ポイント1 =水(ddw)、試行3; ポイント2 =匂い#1、試行#1; ポイント3 =匂い#1、試行3; ポイント4 =匂い#2、試行1。結果は、ビンクリスチン処理ラット(第2群)を、対照ラット(第1群)またはビンクリスチン+25マイクログラム/kg NAPラット(第4群) (P<0.05)のいずれかと比較した際、第3の匂いを嗅ぐためにかかる時間における有意な差異が示された。

【０１１６】

結果

末梢神経毒症状、特に筋の神経支配または強さ（例えばロータロッド試験）;運動能力(運動および円脱出);および行動能力/嗅覚能力を評価するこれら3つの独立な試験の結果は、NAPによる動物の処理が、ビンクリスチン処理によりもたらされる機能障害および末梢神経毒症状の兆候を有意に低減したことを示す。

【０１１７】

特に嗅覚能力試験の結果は、鼻腔内NAPが化学療法の結果として嗅覚能を失っている動物に対し便益を提供することを立証する。このことは、ADNFポリペプチドによる処置を受ける患者において嗅覚減退または無臭覚症の進行が停止する、低減する、または回復するか否かを測定することにより、神経変性疾患または末梢神経毒症状のいずれかに関して対象がADNFポリペプチド処理に対し応答するか否かを調べるために、嗅覚能の測定を使用することができるという知見を支持する。

【０１１８】

実施例2: NAPの投与は、化学療法薬剤により引き起こされる神経毒症状を減少させる

試験の目的:この無作為盲検試験の目的は、進行癌を有する男女において、化学療法薬剤ビンクリスチンにより引き起こされる神経毒症状の低減におけるNAPの有効性を調べることである。

【０１１９】

方法:

最初に、進行癌を有する21名の患者を無作為にA群およびB群に分ける。A群(11名の患者）において、NAPを、ビンクリスチン注入(1.4mg/m^2)前に15mg/45kg～70kgの投与量で投与する。B群(10名の患者)において、同様の化学療法プロトコールを、NAPの投与を行うことなく行う。化学療法開始前、および化学療法の6サイクル後に、全ての患者を、無作為化について知らない神経科医による臨床的神経検査および神経伝導検査に供するものとする。

【０１２０】

結果:

臨床的神経検査は、腱反射、表層感覚認知、および筋力、ならびに神経障害症候などの評価された神経毒症状指標である。神経伝導検査は神経伝導速度および7つの末梢神経における活動電位振幅を評価する。神経伝導パラメータ、腱反射、筋力、表層感覚認知の低下、さらに患者の症候も、グループBにおいて有意により重篤である。

【０１２１】

結論:

進行癌を有する男女において、NAPの同時投与が、化学療法薬剤ビンクリスチンにより引き起こされる神経毒症状を有意に低減することが見出されると考えられる。

【０１２２】

実施例3: オキサリプラチン(L-OHP)、FA/5-FUを用いた化学療法下での神経毒症状の副作用を低減するための、NAPを用いたまたは用いない無作為試験

研究の目的: L-OHP、FA、5-FUを用いた化学療法は、進行大腸癌(ACRC)において高い活性を有する。L-OHPを用いた化学療法において、投与量を制限する毒性症状の主たるものは末梢感覚神経障害である。この試験において患者(pts)は、NAPを用いて、または用いずにL-OHP、FA、5-FUを用いた化学療法を受けるものとする。問題は、NAPを適用した後に、神経毒症状の副作用の低減が見られるか否かである。

【０１２３】
材料および方法
本発明者らは、ACRCを有する27の患者を含める。L-OHPを85 mg/m^2 dl、FAを500mg/m^2 d1+d2、および5-FUを4000 mg/m^{2}用い、隔週スケジュールの48hに渡る連続的注入によって、治療群Aの化学療法を適用する。治療群Bにおいて、化学療法の同様のスケジュールにおける適用の前に、15mg/45kg～70 kgのNAPを、10分間に渡る静脈内投与によって与える。毒性検査、神経学的検査、および血球カウントを各サイクルの前に実行する。副作用を毎日記録するために、全患者は質問表を受け取る。NAP群は末梢神経毒症状における有意な低減を示す。NAP群において、グレードII/IIIの白血球減少は、対照群におけるものよりも低い頻度で生じる。

【０１２４】
結論
L-OHP、FA/5-FUを含む化学療法下での末梢神経毒症状等の副作用は、NAPによる補助療法下で低減すると考えられる。

【０１２５】
実施例4: タキソール神経毒症状およびNAPによる保護
本試験は、NAP処理が、ラットにおけるタキサン系タキソールにより引き起こされる末梢性経毒症状を成功的に低減させるか否かを評価するために設計された。

【０１２６】
方法
実験1
40匹のスプラーグドーリーラット(8週齢)を以下の処理を受ける4群に分けた: (a)10%のCremophor EL生理食塩水溶液; (b)累積投与量5.6mg/kgのタキソール; (c)累積投与量5.6mg/kgのタキソール+NAP 2.5μg/kg/日;または(d)累積投与量5.6mg/kgのタキソール+NAP 25μg/kg/日。タキソールを、10% Cremophor EL生理食塩水溶液の溶媒中に再構成した。

【０１２７】
タキソール処理を腹腔内(i.p.)に、非連続的な日において、各回250μlの量で4回投与した。NAPをタキソール注射の最初の日から連続8日間毎日投与した(週末の2日間の中断を含む)。

【０１２８】
ラットをロータロッド試験およびプランターテストにおいて試験した。ロータロッド試験は上述され、筋力を評価する。プランターテストは温熱性痛覚過敏を評価する。プランターテストのために、各ラットを、プラスチックの床面を有する透明なプラスチックチャンバ内に置き、短時間の間、新しい環境に慣れさせた(約2～5分間)。次いで動物に対し、赤外線(IR)熱源を用いて、後足の足底表面へと下方から照射を行った(7371 Plantar Test, Ugo Basile)。同側および反対側の後足の両方における、引っ込めるまでの待ち時間を調べた。赤外線の強度はIR55に設定し、IR供給源に対して曝す最大時間は18秒とした。統計的な差異をANOVAおよびｔ検定によって試験した。

【０１２９】
結果:
プランターテストにおいてのみ、群の間での統計的な有意な差異が観察され、結果を図7中に示す。3日目の最後のタキソール注射後、タキソール処理されたラットは温熱性痛覚過敏を呈し、それは2.5μg/kg/日のNAP注射によって改善された。25μg/kgのNAPはプランターテストには影響を与えなかった。タキソール処理により引き起こされる痛覚過敏は、4日後に減退した。ロータロッド試験は、この試験における群の間で統計的に有意な差異を示さなかった。

【０１３０】
実験2
15匹のスプラーグドーリーラット(7週齢)を以下の処理を受ける3群に無作為に分けた:(a)10%のCremophor EL生理食塩水溶液;(b)累積投与量9mg/kgのタキソール;または(c)累積

投与量9mg/kgのタキソール+ 2.5μg/kg/日のNAP。タキソールを、10% Cremophor EL生理食塩水溶液の溶媒中に再構成した。

【０１３１】

タキソールを、非連続的な日に2度投与した;各ラットに0.4～0.5mlのタキソール溶液を投与(i.p.)した。NAPをタキソール最初の注射の日から開始して連続5日間、0.1mlの量で投与した。

【０１３２】

最後のタキソール注射後1日後に、ラットを、上述のロータロッド試験およびプランターテストにおいて試験した。統計的有意性は、不対片側t検定を使用した場合にのみ観察された。

【０１３３】

結果

結果を図8 (プランターテスト)および図9 (ロータロッド試験)に示す。タキソール処理を行ったラットは、最後のタキソール注射の8日後に、有意な温熱性痛覚過敏を呈した。この痛覚過敏はNAP処理によって改善された。より高投与量のタキソールにおいて、最初のタキソール注射の5日後のロータロッド試験を用いて、神経筋機能における有意な効果を測定した。神経筋の効果はNAP処理によって改善された。

【０１３４】

結論：

NAPはインビボで、タキソールにより引き起こされる神経障害を防ぐ。

【０１３５】

上記の実施例は本発明の効果を例示するために示され、特許請求の範囲により意図される本発明の態様または範囲を限定することが意図されるものではない。本発明のその他の改変が当業者によって容易に明らかであり、添付の特許請求の範囲によって包含されると考えられる。本明細書中に引用されるあらゆる刊行物、データベース、Genbank配列、GO用語、特許、および特許出願は参照により本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【０１３６】

（図１）ロータロッド試験は、0.175 mg/kgのビンクリスチンを投与されたラット、および、ビンクリスチン+皮下経路でNAPを投与された類似のラットで行った。ロータロッド試験は、ビンクリスチンおよびNAPで処理された動物(n=10)の方が、ビンクリスチンのみで処理された動物(n=10)よりも良好に動作することを示す($^{**}p< 0.01$)。

（図２）運動評価：直径30 cmの円から20秒以内に脱出する能力。対照動物(n=10)と比較して、ビンクリスチン処理ラット(n=10)は有意に悪化した(P<0.001)。NAP(25マイクログラム/kg)を用いた処理(n=10)は、動作を対照値の同程度まで有意に向上させた(P<0.01)。

（図３、４、および図５）新たな匂いに費やされる時間：嗅覚能。3つの連続する試験に渡る、それぞれの匂いに費やされた時間を記録した。図3は、対照群ラット、図4は、ビンクリスチン処理ラット、ならびに図5は、ビンクリスチンおよび25マイクログラム/kg NAP処理されたラットに関する。ビンクリスチン処理されたラットは、新たな匂いについて何ら最初の関心を示さなかったのに対して、新たな匂いに対する関心の増加傾向は、対照およびビンクリスチン-NAP処理ラット中で観察された。

（図６）前の匂いを交換した後の、特定の匂いに費された時間の間の比較 - 匂い識別試験。図は4つのポイントを示す：ポイント1 =水(ddw)、試行3; ポイント2 =匂い#1、試行#1; ポイント3 =匂い#1、試行3; ポイント4 =匂い#2、試行1。結果は、対照とビンクリスチン処理ラットまたはビンクリスチン+25マイクログラム/kg NAPを用いてビンクリスチン処理されたラットとを比較した際に、第3の匂いを嗅ぐためにかかる時間において有意な差異が示された(P<0.05)。

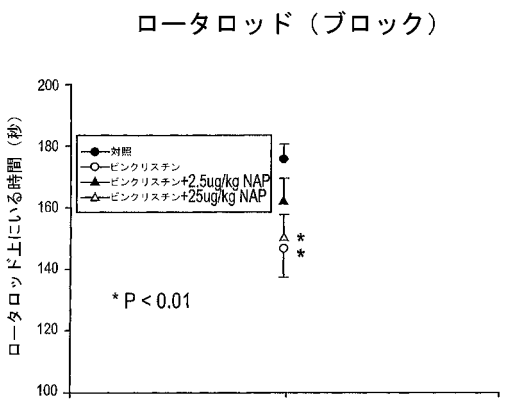
（図７）プランターテストを、総用量5.6 mg/kgのタキソールを投与されたラット、ならびに、タキソール+2.5 μg/kg/日のNAPを投与された類似のラットにおいて実施した

。プランターテストは、タキソールおよび2.5 μg/kg/日のNAPによって処理された動物(n=10)の方が、タキソールのみで処理された動物(n=10)よりも良好に動作することを示す(*p< 0.01)。

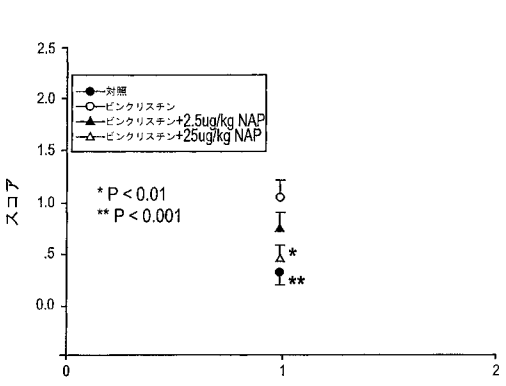
（図８）プランターテストを、総用量9 mg/kgのタキソールを投与されたラット、ならびに、タキソール+2.5 μg/kg/日のNAPを投与された類似のラットにおいて実施した。プランターテストは、タキソールおよび2.5 μg/kg/日のNAPによって処理された動物(n=10)の方が、タキソールのみで処理された動物(n=5)よりも良好に動作することを示す(*p< 0.04)。

（図９）ロータロッド試験を、総用量9 mg/kgのタキソールを投与されたラット、ならびにタキソール+2.5 μg/kg/日のNAPを投与された類似のラットにおいて実施した。ロータロッド試験は、タキソールおよび2.5 μg/kg/日のNAPによって処理された動物(n=5)の方が、タキソールのみで処理された動物(n=10)よりも良好に動作することを示す(*p< 0.04)。

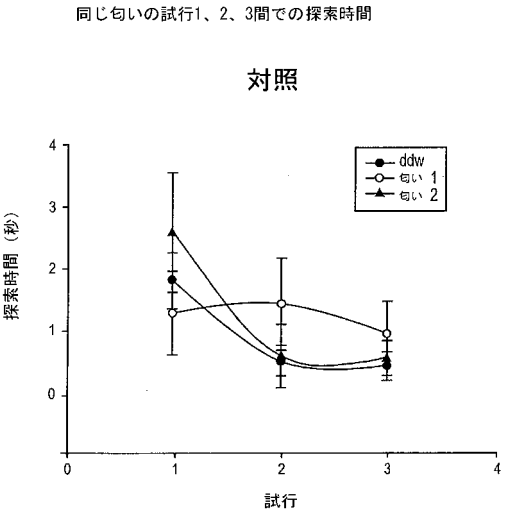
【図１】



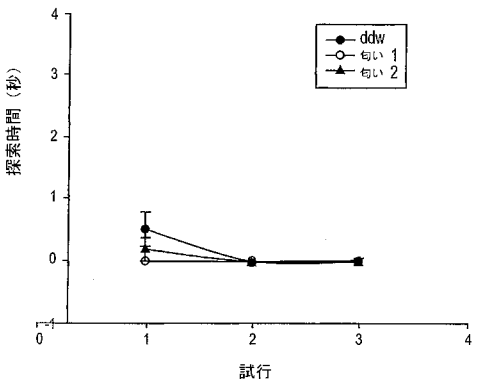
【図２】



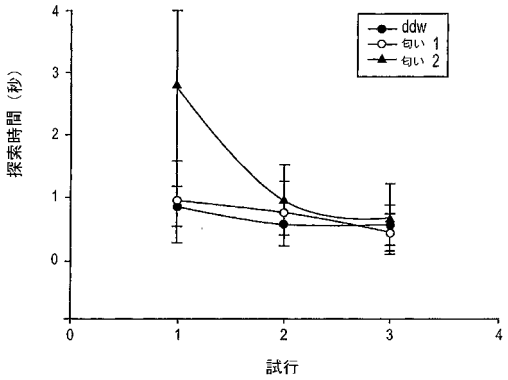
【図３】



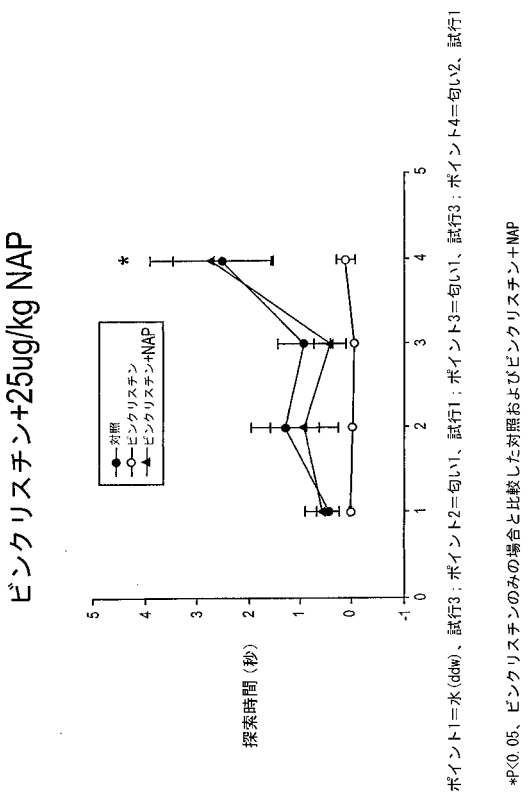
【図４】


ビンクリスチン
ddw
匂い 1
匂い 2
探索時間（秒）
試行

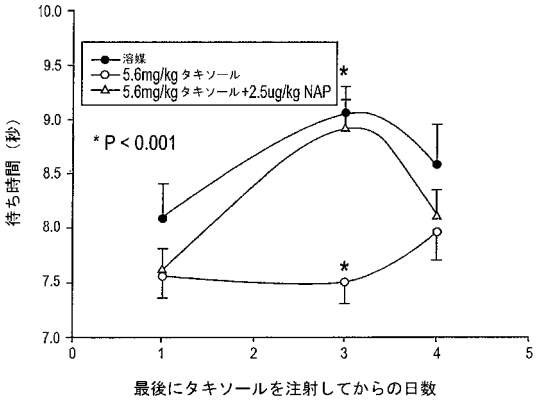
【図５】


ビンクリスチン+25ug/kg NAP
ddw
匂い 1
匂い 2
探索時間（秒）
試行

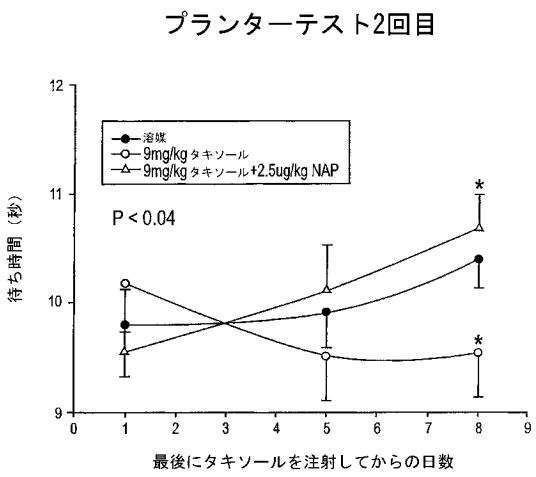
【図６】


ビンクリスチン+25ug/kg NAP
対照
ビンクリスチン
ビンクリスチン+NAP
探索時間（秒）
ポイント1＝水(ddw)、試行3．ポイント2＝匂い1、試行1．ポイント3＝匂い1、試行3．ポイント4＝匂い2、試行1
*P<0.05、ビンクリスチンのみの場合と比較した対照およびビンクリスチン+NAP

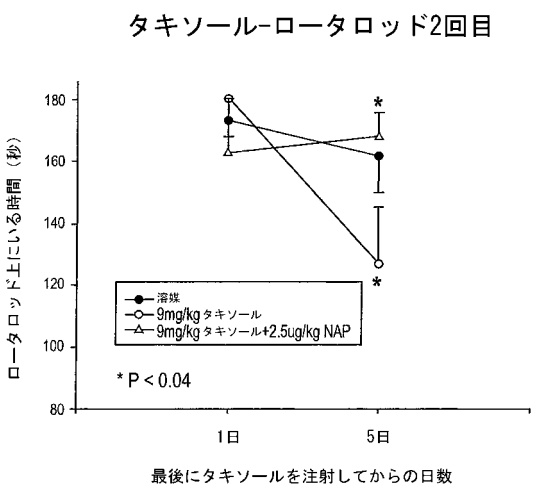
【図７】


タキソール-プランターテスト
溶媒
5.6mg/kg タキソール
5.6mg/kg タキソール+2.5ug/kg NAP
* P < 0.001
待ち時間（秒）
最後にタキソールを注射してからの日数

【図８】



【図９】



【配列表】

0005174653000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(72)発明者 ゴゼス イルアナ
イスラエル ラマット－ハシャロン ハーマル ストリート １４
(72)発明者 ミラー ジェイムズ
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ハンプトン プレイス １７－５６５０

審査官 安藤 公祐

(56)参考文献 国際公開第０１／０１２６５４（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２００３／０１６６５４４（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第００／０２７８７５（WO，Ａ１）
特表２００１－５２２２２８（ＪＰ，Ａ）
LAGREZE,W.A. et al, The peptides ADNF-9 and NAP increase survival and neurite outgrowth of rat retinal ganglion cells in vitro, Invest Ophthalmol Vis Sci, ２００５年, Vol.46, No.3, p.933-8
CHIBA,T. et al, Neuroprotective effect of activity-dependent neurotrophic factor against toxicity from familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 in vitro and in vivo, J Neurosci Res, ２００４年, Vol.78, No.4, p.542-52
GOZES,I. et al, Antiserum to activity-dependent neurotrophic factor produces neuronal cell death in CNS cultures: immunological and biological specificity, Brain Res Dev Brain Res, １９９７年, Vol.99, No.2, p.167-75