

(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2015-514771

(P2015-514771A)

(43) 公表日 平成27年5月21日 (2015.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 7/06 (2006.01)</b>	C 0 7 K 7/06 Z N A	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/10	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	
<b>A 6 1 P 27/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 27/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-507143 (P2015-507143)	(71) 出願人	505463308 ブラウン ユニバーシティ アメリカ合衆国 ロードアイランド 02 912, プロビデンス, ジョージ ストリ ート 47, ボックス 1949
(86) (22) 出願日	平成25年4月17日 (2013.4.17)	(71) 出願人	514261971 ウェイン ステート ユニバーシティー アメリカ合衆国 ミシガン 48201, デトロイト, イー. キャンフィールド 540
(85) 翻訳文提出日	平成26年11月11日 (2014.11.11)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/036938	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02013/158739		
(87) 国際公開日	平成25年10月24日 (2013.10.24)		
(31) 優先権主張番号	61/625, 349		
(32) 優先日	平成24年4月17日 (2012.4.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 神経保護性組成物および使用方法

## (57) 【要約】

5 ~ 9 個のアルギニンのポリアルギニンペプチドを含み、さらに 1 個または 1 個より多くの末端システインを含む、脳の損傷を処置するための治療用組成物。上記組成物は治療有効投薬量で、予防的に、損傷後できるだけ早くニューロン損傷の処置において投与される。具体的には、以下の組成物に言及する。5 ~ 9 個のアルギニンを有するポリアルギニン：RRRRR は R ( 5 ) とも称する。同様に、R ( 6 )、R ( 7 )、R ( 8 ) および R ( 9 )。1 - アミノ酸および d - アミノ酸の両方が想定される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

5 ～ 9 個のアルギニンを含むポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 2】

さらに 1 個または 1 個より多くの末端システインを含む、請求項 1 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 3】

少なくとも 2 個の末端システインを含み、前記少なくとも 2 個のシステインがジスルフィド結合によって連結されている、請求項 2 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 4】

C - s - s - C R R R R R R R ( 式中、C はシステインであり、C - s - s - C は 2 個のシステイン間のジスルフィド結合であり、R はアルギニンである ) を含む、請求項 2 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 5】

前記 2 個のシステインが N 末端で連結されている、請求項 4 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 6】

C R R R R R R R を含む、請求項 2 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 7】

R R R R R R R を含む、請求項 1 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 7】

少なくとも 1 個のアルギニンが d - アルギニンである、請求項 1 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 8】

少なくとも 1 個または 1 個より多くの前記末端システインが d - システインである、請求項 2 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 9】

さらに、2 個までの末端中性アミノ酸を含む、請求項 1 に記載のポリアルギニンペプチド。

## 【請求項 10】

5 ～ 9 個のアルギニンのポリアルギニンペプチドを治療有効用量で投与することを含む、実際の、または予期されるニューロン損傷を処置する治療方法。

## 【請求項 11】

請求項 9 に記載の前記ポリアルギニンペプチドが、さらに 1 個または 1 個より多くの末端システインを含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記ポリアルギニンペプチドが C - s - s - C R R R R R R R である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

投与が静脈内である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

投与が約 0 . 0 1 m g / k g ～ 約 2 0 m g / k g である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

被験体に、5 ～ 9 個のアルギニンを含み、さらに 1 個または 1 個より多くの末端システインを含むポリアルギニンペプチドを治療有効投薬量で投与することを含む、被験体の少なくとも片方の目を緑内障関連視力損傷から保護する方法。

## 【請求項 16】

前記投与が前記少なくとも片方の目に対する点眼の形態である、請求項 15 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

政府の権利の記載

本発明は、米国立神経疾患研究所のNIH助成金番号：R21-NS031176および米国立眼病研究所のNIH助成金番号：R01-EY014430による政府支援を伴ってなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

## 【0002】

発明の分野

本明細書に開示したポリアルギニンおよびポリアルギニン/システイン組成物により、神経系傷害、具体的にいうと、脳卒中、外傷性脳損傷、および脊髄損傷（集合的に、「ニューロン損傷」）に対する治療選択肢がもたらされる。具体的に言及すると、本発明の組成物は、脳卒中、外傷性脳損傷（TBI）および緑内障の結果としての網膜の損傷と関連する病理学的代謝的カスケードを緩和または回避する。また、黄斑変性の処置も注目される。

10

## 【背景技術】

## 【0003】

発明の背景

脳卒中、または脳血管障害（CVA）は、脳への血液供給障害による急速な脳機能の低下である。これは、閉塞（血栓症、動脈塞栓症）によって引き起こされる虚血（血流欠乏）、または出血によるものであり得る（広く、「神経系傷害」と称される）。その結果、多くの場合、経時的に悪化し、脳の損傷は永久的な機能不全/損傷状態になる。典型的には、障害された脳領域は、機能が低下するか、または完全に失われる。詳細な例としては、これは、身体の片側の四肢の1つ以上を動かすことができないか、もしくは動かしにくい、または理解もしくは系統立てた話ができないか、もしくは困難を有する、または片方の視野が見えない状態として発現される。脳卒中の場合、初期傷害後の副次的ニューロン損傷は、患者が衰え、最終的に死亡する大きな要因である。この衰えは、初期の脳卒中（stroke）の数週間後から数ヶ月後に現れるが、有効な治療的介入がなければ、患者の身体的および精神的健康状態はゆっくりだが衰え続けることになる。

20

## 【0004】

TBIの場合、損傷の進行は、典型的には脳卒中よりも遅い。しかしながら、最近の報告により、TBIは、より重度の症例では転帰は同等に破壊的であることが立証されている。現在の報告により、TBIを有する人の約40%が身体的および精神的の両方において能力の継続的な衰えを発現していることがわかっている。これは、認知症の有意に高い発症率を表し、場合によっては悪化性の死亡要因となる。

30

## 【0005】

ニューロン損傷（脳卒中またはTBIのいずれかを含む）の障害を有する患者の治療的処置および転帰の改善における重要な考慮事項は、最初の時点で原発傷害によって直接障害を受けなかった周囲ニューロンの副次的損傷を阻止することである。文献により、副次的ニューロン損傷は、さまざまな脳傷害、例えば、くも膜下出血、脳卒中および外傷性脳損傷の後に起こり、代謝的カスケードが関与していることが報告されている。特筆される代謝的態様としては、長期副次的虚血、脳低酸素症、低血圧症、脳水腫、脳への血流の変化；および頭蓋内圧亢進が挙げられる。他の副次的傷害としては、高炭酸ガス症、アシドーシス、髄膜炎、および脳膿瘍が挙げられる。また、神経伝達物質、特にグルタメートの放出の改変により、そのニューロン内でフリーラジカル生成および酸化ストレスが引き起こされる（これは神経変性に至る）ことによって興奮毒性ニューロン細胞死が引き起こされ得る。

40

## 【0006】

以下の参考文献が特筆される。その教示は参照によりその全体が組み込まれる：

1. The Behavioral and Cognitive Neurology of Stroke

50

Olivier Godefroy 編 (Cambridge University Press, 第2版, 2013);

2. Stroke Rehabilitation: A Function - Based Approach, 第3版、Glen Gilled 編、(Mosby, 2010);

3. Stroke Part III: Investigation and management, 第94巻: Handbook of Clinical Neurology (シリーズ編集者: Aminoff, Boller および Swaab, Marc Fisher 編 (Elsevier 2009);

4. Traumatic Brain Injury: Methods for Clinical and Forensic Neuropsychiatric Assessment, 第2版, Robert P. Granacher Jr. (CRC Press 2007);

5. Sports Neuropsychology: Assessment and Management of Traumatic Brain Injury, Ruben J. Echemendia PhD 編 (The Guilford Press, 2006);

6. Brain Injury Medicine: Principles and Practice, 第2版 Nathan D. Zasler MD 編 (Demos Medical; 2012); ならびに

7. Blockade of PARP activity attenuates poly(ADP-ribosyl)ation but offers only partial neuroprotection against NMDA-induced cell death in the rat retina. (Goebel および Winkler, J Neuro Chem, 98:1732-1745, 2006) (NMDA-induced chemical stroke in vivo rat retinal neurotoxicity model)。

【0007】

グラスゴー・コーマ・スケールに言及しておく。グラスゴー・コーマ・スケールは、命令に従う、ならびに目および四肢を動かす、という対象者の能力を確認することにより脳の損傷の初期重症度を評価するために使用される15点試験である。この能力は数値でスコア化される。スコアが高いほど損傷が軽いことを意味する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】The Behavioral and Cognitive Neurology of Stroke Olivier Godefroy 編 (Cambridge University Press, 第2版, 2013)

【非特許文献2】Stroke Rehabilitation: A Function - Based Approach, 第3版、Glen Gilled 編、(Mosby, 2010)

【非特許文献3】Stroke Part III: Investigation and management, 第94巻: Handbook of Clinical Neurology (シリーズ編集者: Aminoff, Boller および Swaab, Marc Fisher 編 (Elsevier 2009)

【非特許文献4】Traumatic Brain Injury: Methods for Clinical and Forensic Neuropsychiatric Assessment, 第2版, Robert P. Granacher Jr. (CRC Press 2007)

【非特許文献5】Sports Neuropsychology: Assessment

10

20

30

40

50

t and Management of Traumatic Brain Injury, Ruben J. Echemendia PhD 編 (The Guilford Press, 2006)

【非特許文献6】Brain Injury Medicine: Principles and Practice, 第2版 Nathan D. Zasler MD 編 (Demos Medical; 2012)

【非特許文献7】Blockade of PARP activity attenuates poly(ADP-ribosylation) but offers only partial neuroprotection against NMDA-induced cell death in the rat retina. (GoebelおよびWinkler, J Neuro Chem, 98:1732-1745, 2006) (NMDA-induced chemical stroke in vivo rat retinal neurotoxicity model)

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概要

本発明の組成物は5～9個のアルギニンのポリアルギニンペプチドを含む。d-アルギニンおよびL-アルギニンの両方が想定される。該組成物は、さらに1個の末端システインを含み得る。末端システインは、N末端システインまたはC末端システインのいずれかであり得る。また、選択肢としては第2のシステインの付加（該システインは該ペプチドの末端システインに、ジスルフィド結合によって連結される）、および/またはR(5+n)ペプチドの両端の末端システインの配置（ジスルフィド結合によるさらに2個のシステインの付加を伴う、または伴わない）も挙げられる。

20

【0010】

具体的には、以下の組成物に言及する。

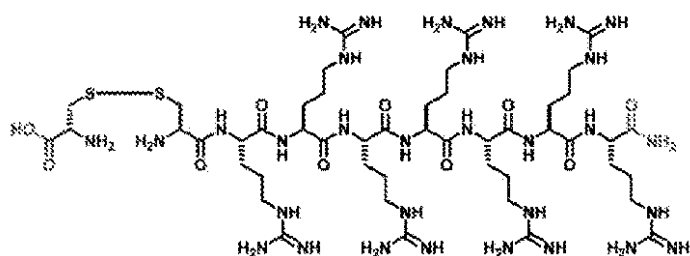
【0011】

5～9個のアルギニンを有するポリアルギニン：RRRRRRはR(5)とも称する。同様に、R(6)、R(7)、R(8)およびR(9)。L-アミノ酸およびd-アミノ酸の両方が想定される。

30

【0012】

【化1】



C-s-s-C-R(7)-アミド

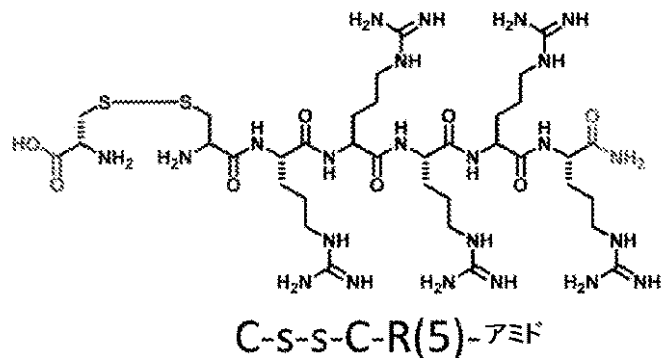
40

【0013】

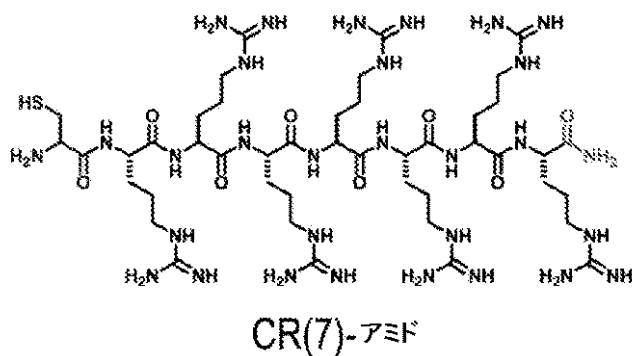
一例として、この組成物は「C-s-s-C-R-R-R-R-R-R-R」と表示する場合もあり得る。この表記法により、該組成物に存在するジスルフィド結合を慣用的なペプチド結合と区別する。以下に示す組成物も必要な変更を加えて同様に表示される。

【0014】

## 【化 2】



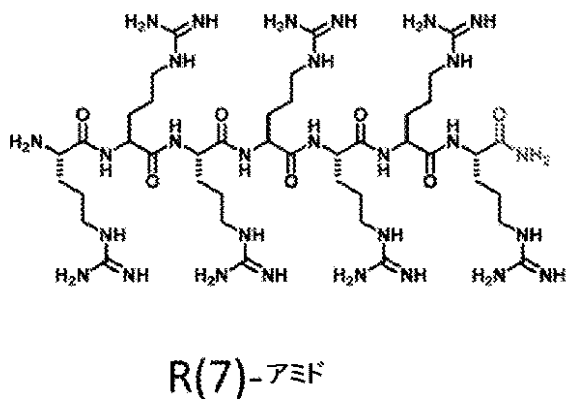
10



20

## 【 0 0 1 5 】

## 【化 3】



30

## 【 0 0 1 6 】

本発明は、5～9個のアルギニンを含むポリアルギニンペプチドを含む。一部の実施形態では、このペプチドは、さらに、1個または1個より多くの末端システインを含む。一部の 경우에는、ジスルフィド結合によって連結された少なくとも2個の末端システインが存在している。具体的なポリアルギニンペプチドは、C-s-s-CRRRRRRRR（式中、Cはシステインであり、C-s-s-Cは2個のシステイン間のジスルフィド結合であり、Rはアルギニンである）を含む（of comprises）。任意選択で、このペプチドの2個のシステインはN末端で連結されている。

40

## 【 0 0 1 7 】

他の実施形態では、該ポリアルギニンペプチドはCRRRRRRRRを含むか、またはRRRRRRRRを含む。

## 【 0 0 1 8 】

記載のペプチドは、少なくとも1個のd-アルギニンおよびさらに、d-システインで

50

ある少なくとも1個または1個より多くの末端システインを含むものであってもよい。

【0019】

該ポリアルギニンペプチドのまたさらなる実施形態は、2個までの末端中性アミノ酸を含む。

【0020】

さらに、本発明は、5～9個のアルギニンのポリアルギニンペプチドを治療有効用量で投与する工程を含む、実際の、または予期されるニューロン損傷を処置する治療方法に関する。任意選択で、該方法は、さらに1個または1個より多くの末端システインを含むかかるペプチドを投与することをさらに含む。一実施形態において、該ポリアルギニンペプチドはC-s-s-CRRRRRRRRである。静脈内(i.v.)を含むすべての投与方法が想定される。静脈内処置投薬法のための有用な範囲は約0.01mg/kg～約20mg/kgである。

10

【0021】

またさらに、本発明は、前記被験体に治療有効投薬量の本明細書に記載の組成物を投与することを含む、被験体の少なくとも片方の目を緑内障関連視力損傷から保護する方法に関する。具体的には、5～9個のアルギニンを含み、さらに1個または1個より多くの末端システインを含むポリアルギニンペプチドに言及する。投与は、任意の通常の形態、例えば、経口および点眼薬によるものであり得る。20μlの点眼に対して約0.1～約10μgの用量が特筆される。

【発明を実施するための形態】

20

【0022】

発明の詳細な説明

なんら特定の理論に拘束されないが、本発明の組成物は、ミトコンドリアを機能性細胞小器官として保持する機能を果たし、これが、本明細書に開示した広範に観察される神経保護に影響を及ぼしていると考えられる。

【0023】

C-R-R-R-R-R-R-R(Cはシステインであり、Rはアルギニンである；「CR(7)」と称される組成物)による神経保護(neuorprotection)は、該ペプチドをL-アミノ酸またはD-アミノ酸のいずれかを有するように作製した場合に有効である。投薬もまた、実質的にL-非依存性またはD-非依存性である。

30

【0024】

なんら特定の理論に拘束されないが、該ポリアルギニン組成物の強い正電荷に言及する。例えば、該ペプチド全体の全電荷は7つのアルギニン残基により+7である。注目すべきことに、末端システインの存在下または非存在下でアルギニンをリシン(同じく正電荷)に置換すると神経保護はもたらされなかった。

【0025】

さらに、少なくとも5個または5個より多くのアルギニンを有するペプチドに1個または2個の中性アミノ酸をフランキングさせてもよく、それでもなお治療活性である。かかる場合において、システインは、存在させる場合はアルギニン末端に結合させる。一例として、C-R-R-R-R-R-R-AまたはC-R-R-R-R-R-R-A-A(Aは、中性であるアラニンである)。

40

【0026】

投薬は、被験体がニューロン損傷；例えば、脳卒中様徴候または外傷性脳損傷を呈した後、できるだけ早く開始するのがよい。投薬は、R7(すなわち、7アルギニンペプチド)組成物について記載しているが、本明細書に開示したすべての組成物に対しても同様である。広くは、約1,000μg/kg～約1μg/kgの治療有効な脳室内投薬量が特筆される。静脈内投与では、約20mg/kg～約0.01mg/kgの治療有効投薬量が特筆される。経口、髄腔内、および実際にはあらゆる投与形態が想定される。

【0027】

脳室内(intraventricular)注射では、特に有用な(だが、限定されな

50

い) 投薬量範囲は

R ( 7 ) - C C :

上端 : 5 0 0  $\mu$  g / k g

下端 : 5  $\mu$  g / k g

R ( 7 ) - C

上端 : 4 5 0  $\mu$  g / k g

下端 : 4 . 5  $\mu$  g / k g

R ( 7 )

上端 : 4 0 0  $\mu$  g / k g

下端 : 4 . 0  $\mu$  g / k g

10

である。

【 0 0 2 8 】

静脈内注射による投薬では、単位を m g / k g / 時とし、血液脳関門を通過後、 2 0 % が依然として活性であると仮定する。

【 0 0 2 9 】

R ( 7 ) - C C ( N 末端 ) :

上端 : 5 m g / k g

下端 : 0 . 0 5 m g / k g

R ( 7 ) - C ( N 末端 )

上端 : 4 . 5 m g / k g

下端 : 0 . 0 4 5 m g / k g

20

R ( 7 )

上端 : 4 m g / k g

下端 : 0 . 0 4 0 m g / k g 。

【 0 0 3 0 】

投薬は、初期ニューロン損傷後、できるだけ早く始めることが想定される。投薬は、傷害後、毎日、約 1 0、2 0 もしくは 3 0 日間またはそれより長くあり得る。1 日おきの投薬、または該組成物の循環血中レベルに基づいた変動レジメンも想定される。

【 0 0 3 1 】

初期損傷後、1 ~ 1 0 時間にわたる静脈内輸注が想定されるが、輸注は、傷害後、毎日、約 1 0、2 0 もしくは 3 0 日間またはそれより長く有用に投与され得る。

30

【 0 0 3 2 】

組成物の合成 :

開示したアルギニン組成物は、周知のさまざまな合成手法によって調製され得る。一実施形態において、標準的な f m o c 系プロトコルを使用した ( M e r r i f i e l d ら , J . A m C h e m . S o c . ( 1 9 6 3 ) 8 5 , 2 1 4 9 - 2 1 5 5 ) 。これおよびここに挙げられたすべての参考文献の教示は参照によりその全体が組み込まれる。

【 0 0 3 3 】

アルギニンおよびシステインのキラルな性質に言及する。l - 系組成物および d - 系組成物 (例えば、d - R、d - C、l - R、l - C) はどちらも神経保護性であった。末端システイン (1 つまたは複数) がペプチド結合によって N 末端または C 末端のいずれか / 両方に結合していることが想定され、露出した S H 基の反応性を低減させるために、第 2 のシステインへのジスルフィド結合 (本明細書では C - s - s - C と表示する) によって保護される選択肢を有する。

40

【 0 0 3 4 】

試験モデルでは、網膜を N M D A 誘発性化学的脳卒中から保護した。注目すべきことに、d - アミノ酸ペプチドは、ほとんどのプロテアーゼによる消化に対して抵抗性であり、一部の実施形態では、インビボで長期の半減期が示される。本発明の組成物は、さまざまな臨床状況 (そのほとんどは、ミトコンドリア損傷に代表される神経系傷害または細胞傷害を特徴とする) で有用である。なんら特定の理論に拘束されないが、未処置のミトコン

50



ドリア損傷は、フリーラジカル種の生成をもたらすと考えられる。本発明組成物は、NMDA 傷害後の網膜内の酸化ストレスを、ミトコンドリア由来フリーラジカル生成を低減させることにより回避または抑制するようである。なんら特定の理論に拘束されないが、かかる活性は、本発明の組成物によりもたらされる神経保護において有意であると考えられる。

#### 【0035】

具体的には、脳卒中および外傷性脳損傷（例えば、閉鎖性頭部外傷、例えば、脳震盪を伴うスポーツ、事故による損傷、爆風損傷（戦闘またはその他）などのニューロン損傷に言及する。一実施形態において、フットボール選手およびボクサーは、試合、練習またはひと勝負の前に予防的に投薬される。さらに、投薬は、予定された試合またはひと勝負の最初の接触直後であってもよい。投薬は、実際に（検出される）症状の呈示に関係なく神経系傷害または初期損傷であるという仮定に基づいてなされる。

10

#### 【0036】

本発明の薬理活性組成物は、ガレン製薬学（Galenic pharmacy）の慣用的な方法に従って加工され、被験体、例えば、ヒトを含む哺乳動物に対する投与のための医薬剤が作製され得る。本明細書に開示した治療用組成物は、水性液剤に有用に調製される。特に等張性生理食塩水で作製されるものでない。他の投薬形態も想定される。特に適しているのは注射用滅菌液剤である。アンプルは簡便な投薬単位である。

#### 【0037】

また、この新規組成物を凍結乾燥させ、得られた凍結乾燥物を、例えば、注射の製剤品の調製に使用することが可能である。所与の受容者に対する投薬量は、慣用的な考慮事項を用いて、例えば、主題組成物と公知薬剤の活性の違いの慣行的な比較によって（例えば、適切な慣用的な薬理学的プロトコルにより）決定され得る。

20

#### 【0038】

インビボ条件下での脳組織内への取込みに注目されたい。蛍光タグ化 R (7) および C - s - s - C R (7) をラットの目の硝子体眼房内に注射し、網膜ニューロン内への特異的取込みについて、注射後、多数の時点で解析した。どちらの化合物でも、注射後、30 分以内に網膜内への取込みが示され、網膜の神経節および内顆粒層の両方に存在する網膜ニューロンおよびグリア細胞で有意な蓄積が示された。より後の時点（注射の 2 ~ 4 時間後）では、優先的蓄積を伴う網膜の内側半分内のニューロンの大部分の細胞質内に蓄積された標識ペプチドの蓄積は、神経節細胞およびアマクリン細胞の両方の核をとりまく小さな膜結合細胞小器官ならびに存在する神経節細胞軸索に局在する。二重標識試験により、これらの標識された点の大部分はミトコンドリア特異的マーカーと共局在していることが示され、R (7) ペプチドがミトコンドリアを標的化していることが強く示唆される。

30

#### 【0039】

蛍光タグ化 R (7) および C - s - s - C - R (7) の髄腔内および脳室内注射に取り組む試験を行なった。蛍光タグ化 C R (7) の髄腔内注射および脳室内 (intraventricular) 注射はどちらも、該ペプチドが軟膜 (pia matter) のグリア関門を容易に通過し、脊髄内および脳内の多数のニューロン集団に蓄積されることを示す。優先的蓄積は、海馬および大脳皮質内部に存在するニューロン内にみとめられた。このアプローチは、脳卒中または該組織に対する外傷性損傷の両方を予防するための速やかな送達の実行可能な選択肢である。

40

#### 【0040】

データにより、本発明の化合物、具体的にいうと R (7)、C R (7) および C - s - s - C R (7) は、強い NMDA 傷害から神経組織（網膜）を保護することが立証される。神経化学的誘発脳卒中のモデルであるインビボラット網膜毒性モデルを用いて試験を行なった (Goebel, D. J. および Winkler, B., J. Neurochem. 98: 1732 - 1745, 2006)。R (7)、C R (7) および C - s - s - C R (7) は、該化合物を、グルタメート受容体アゴニスト N - メチル - D - アスパラギン酸 (NMDA) を用いた化学的誘発脳卒中の誘発と同時に投与すると、短期間ニューロン

50

細胞死シグナル伝達を阻止することが実証されている。上記の3種類の化合物はすべて、傷害後8時間まで、すべてのNMDA受容性ニューロンの原形質膜選択性のNMDA誘発性低下を阻止したが、NMDA単独で処置した網膜では、傷害の2～4時間後、有意なニューロンの惨状が示された。また、短期間(NMDA傷害後2～4時間)生化学試験でも、R(7)、CR(7)およびC-s-s-CR(7)は、網膜におけるNMDA誘発性カスパーゼ活性化、ポリ(ADP)リボシル化およびミトコンドリア誘発性酸化ストレス(すべて、本発明者らの系における早期シグナル伝達ニューロン細胞死の特質である)を十分に阻止することが示される。

#### 【0041】

CR(7)およびC-s-s-CR(7)はどちらも、傷害後、14～21日目においてNMDA誘発性網膜神経節細胞死からの長期間保護が実証されたが、どちらのペプチドも、未処置または擬似的処置した対照網膜で得られた結果と有意に異ならない保護がもたらされた。だが、R(7)では十分な短期間保護がもたらされる。R(7)は、単回投薬の使用で網膜神経節細胞死からの長期間保護を得るには有効性が低かった。保護期間の長期化には反復投薬が指示される。

10

#### 【0042】

ポリアルギニンによって媒介される保護には、最低5個の連続アルギニン残基が必要とされる。このポリアルギニンペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにシステインを配置すると神経保護作用が長期化される。

#### 【0043】

R(7)-C処置では、NMDA傷害からの短期間保護と長期間保護の両方がもたらされたが、これは、CR(7)またはC-s-s-CR(7)で処置した網膜と有意に異なることが示された。

20

#### 【0044】

d-アミノ酸塩基およびl-アミノ酸塩基を用いて作製したペプチドのデータを比較した。この結果でも、d-CdR(7)およびd-C-s-s-dCdR(7)異性体によってNMDA傷害からの十分な短期間および長期間神経保護がもたらされたこと、ならびにもたらされた保護レベルは、対応するl-アイソフォームまたは未処置網膜と有意に異ならなかったことが示される。これらの所見は、CR(7)ペプチドの立体特異性が興奮毒性刺激(excitotoxic challenge)からの神経保護の媒介に必要とされないことを示す。

30

#### 【0045】

なんら特定の理論に拘束されないが(without being bound by any particular)、データにより、R(7)、CR(7)およびC-s-s-CR(7)は、ミトコンドリア誘発性酸化ストレスを阻止し、興奮毒性ストレス後のミトコンドリア過分極を減衰させることが示される。一例の試験において、R(7)、CR(7)またはC-s-s-CR(7)で前処理した培養HEK293細胞を、ミトコンドリア膜電位におけるミトコンドリア呼吸変化、および該培養細胞に対する制御された化学的誘発性興奮毒性刺激後の酸化ストレスに供した。結果により、3種類のペプチドはすべて、擬似的処置した対照と比べ、酸化ストレスおよびミトコンドリア膜電位におけるストレス誘発性過分極において有意な減衰を示すことが示された。また、本発明者らのグループによる試験により、該3種類の化合物はすべて、ミトコンドリア酸化ストレスを有意に抑制したことも示されており、該ペプチドは、直接または間接的のいずれかでミトコンドリアを標的化し、ニューロン細胞減少と関連する細胞死シグナル伝達事象を起始することを阻止することが示される。

40

#### 【実施例】

#### 【0046】

##### 実施例1

##### 脳卒中患者

57歳の男性が救急救命室に搬送され、中大脳動脈が関与する虚血事象と診断され、総

50

体的症状の始まりは1時間未満である。即座に、患者に、制限された領域への血液供給を回復させながらポリアルギニン(R(7)C-s-s-C, 5 mg/kg)の補給を静脈内投与によって行なった。毎日の認知系および運動系の試験では、身体能力または精神力の欠損は示されていない。また、CT/MRI画像でも、回復直後の障害領域における病変化の徴候は示されておらず、これは維持され、追跡画像および行動試験によって確認した。

#### 【0047】

##### 実施例2

##### 脳卒中後患者

64歳の女性が、家での脳卒中後、EMSによって蘇生され、80マイル離れた最も近い病院に救急搬送される。病院に到着時、患者は、左側に虚弱の徴候を示していると判定される。また、彼女は目がかすむと訴え、はっきりと話すことに困難を示す。彼女に即座に、脳卒中後ニューロン損傷を止めるための4 mg/kg/時で5日間にわたるポリアルギニン(R(7))の静脈内投与を開始する。患者を回復の徴候についてモニタリングする。次の30日間で彼女の話し方に改善がみとめられ、このとき、左側の筋緊張も増大し、筋力および障害四肢の使用も回復する。

10

#### 【0048】

##### 実施例3

##### TBI患者

17歳の高校生のフットボール選手が地元の病院の救急救命室に救急搬送され、相手選手とのヘルメット同士の衝突後の重度の脳震盪に苦しんでいる。患者は、最初、フィールド上で20分間にわたって意識不明である。EMS隊員が到着したとき、患者は刺激に応答したが、完全に見当識障害であり、筋肉運動を協調させること、明確に話すこと、または目の動きの焦点を定めることができなかった。ERに到着したら、患者に、R(7)C-s-s-Cペプチドを0.05 mg/kgで含有する静脈内投与を行なう。該ペプチドの送達は、衝突に起因する脳の腫脹が正常な状態に戻るまで継続した(3~5日間)。なんら特定の理論に拘束されないが、この治療は、このような記述された外傷後の影響に起因するニューロン細胞死を止めるためのものである。この期間中(およびそれ以降)の患者のモニタリングでは、彼は、TBIおよび脳震盪後の影響について無症状のままである(すなわち、短期間記憶喪失、または長期間学習能力低下の発現が回避されている)ことが示される。

20

30

#### 【0049】

##### 実施例4

##### TBI患者

この場合、ポリアルギニンをR(7)-C(C-末端)にし、投薬量を4 mg/kgにすること以外は実施例3と同じ状況がみとめられる。

#### 【0050】

##### 実施例5

##### TBI患者

この場合、ポリアルギニン組成物をR(7)にし、投薬量を4 mg/kgにすること以外は実施例3と同じ状況がみとめられる。

40

#### 【0051】

##### 実施例6

##### TBI患者

この場合、ポリアルギニンをR(7)C-Cにし、投薬量を0.05 mg/kgにすること以外は実施例3と同じ状況がみとめられる。

#### 【0052】

##### 実施例7

##### TBI患者

この場合、ポリアルギニン組成物をR(7)にし、投薬量を0.04 mg/kgにすること

50

こと以外は実施例 3 と同じ状況がみとめられる。

【 0 0 5 3 】

実施例 8

脊髄損傷

30 歳の女性が自動車事故後に脊髄損傷を示す。この被験体は、意識はあるが脚を動かすことができない。マルチスライススパイラルコンピュータ断層撮影 (M S C T) により、脊柱管内の T h 1 1 - T h 1 2 レベルで異物が示される。T h ( 1 1 ) - L ( 2 ) 椎弓切除を行なうとともに異物を回収し、硬膜を修復する。入院時、患者に、R ( 7 ) C - s - s - C ペプチドを 0 . 1 5 m g / k g で含有する静脈内投与を行なう。該ペプチドの送達 は 1 日おきに 3 0 日間継続し、この時点で、彼女の脚を動かす能力はかなり元に戻る。

10

【 0 0 5 4 】

実施例 9

緑内障治療

60 歳の女性が、1 週間の左目のかすみ目の愁訴を呈する。彼女の I O P は 2 1 m m H g より高い。緑内障の診断が下される。外科的な I O P の低減を試みる。術後モニタリングにおいて、I O P レベルは、期待される正常レベルより高いままである。高 I O P への長期曝露に起因する網膜の損傷を予防するため、患者に、角膜浸透性親油性懸濁液中に懸濁させた点眼薬の形態の C R ( 7 ) を投与する。各 2 0  $\mu$  l の点眼液には 1 . 2 5  $\mu$  g の C R ( 7 ) が含有されている。全適用 / 処置量を 2 . 5  $\mu$  g とする。朝に 2 回分の点眼液および夜に 2 回分の点眼液を投与する。

20

【 0 0 5 5 】

処置を絶えず継続しており、ニューロン細胞死の進行は検出されていない。

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 26 年 12 月 16 日 (2014.12.16)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2015514771000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/38938

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/08; A61P 25/00, 27/06 (2013.01)

USPC - 514/17.7, 328; 435/114

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)

IPC(8): A61K 38/00, 38/08, 38/10, 38/03, 38/04, 31/13, 31/132, 31/145; A61P 3/04, 25/00, 27/00, 27/02, 27/06 (2013.01)

USPC: 514/17.7, 17.9, 18.1, 18.2, 18.3, 18.4, 18.5, 1.1, 636, 606; 435/106, 113, 114, 128, 129, 130; 530/300, 328, 329, 330

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; DialogPRO; ACS; poly\*arg\*, oligo\*arg\*, peptide, protein, oligopeptide, arginine, neuro\*, neural\*, protect\*, neuro\*protect\*, termin\*, cysteine\*, disulfide, 'nh2, amino, adjacent, contiguous

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 7229961 B2 (ROTHBARD, JB et al.), June 12, 2007; abstract; column 11, lines 2-49; column 13, lines 14-31; column 15, lines 32-40; column 24, lines 22-34	1, 2, 6, 7, 9-12, 13/11, 13/12 ----- 3-5, 14-16
X	US 7820626 B2 (ROTHBARD, JB et al.), October 26, 2010; abstract; column 3, lines 6-19; column 20, lines 16-24; column 30, lines 34-52	17, 18
Y	ZHANG, R et al. Dependence Of Formation Of Small Disulfide Loops In Two-Cysteine Peptides On The Number And Types Of Intervening Amino Acids. The Journal Of Biological Chemistry. 05 November 1989, Vol. 264, No. 31, pp. 18472-18479; abstract; page 18472, column 1, paragraph 1; page 18474, column 1, paragraph 4 to column 2, paragraph 1.	3-5, 14-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

\* 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 application or patent 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 2013 (29.07.2013)

Date of mailing of the international search report

13 AUG 2013

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード ( 参考 )
<b>A 6 1 P</b>	<b>9/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>9/10</b>		
<b>A 6 1 P</b>	<b>27/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>25/00</b>	<b>1 0 1</b>	
<b>C 0 7 K</b>	<b>7/08</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>27/02</b>		
			<b>C 0 7 K</b>	<b>7/08</b>		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ゴーベル , デニス ジェイ .  
アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 3 9 3 , ウィクソム , シルバーメープル コート 2 2 0 5

(72) 発明者 マーシャル , ジョン  
アメリカ合衆国 ロードアイランド 0 2 8 0 6 , バーリントン , ウォルナット ロード 2  
7

F ターム ( 参考 ) 4C076 AA22 BB13 BB24 CC01 CC10  
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA09 BA16 BA17 CA59 MA23 MA58  
MA66 NA14 ZA012 ZA022 ZA332 ZA362  
4H045 AA10 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA32 EA20 FA10