

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6562948号  
(P6562948)

(45) 発行日 令和1年8月21日(2019.8.21)

(24) 登録日 令和1年8月2日(2019.8.2)

(51) Int. Cl.	F I				
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C O 7 K	7/06	Z N A		
<b>C07K 7/08 (2006.01)</b>	C O 7 K	7/08			
<b>A61K 38/08 (2019.01)</b>	A 6 1 K	38/08			
<b>A61K 38/10 (2006.01)</b>	A 6 1 K	38/10			
<b>A61P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P	25/00			

請求項の数 12 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-564407 (P2016-564407)  
 (86) (22) 出願日 平成27年1月19日 (2015.1.19)  
 (65) 公表番号 特表2017-506258 (P2017-506258A)  
 (43) 公表日 平成29年3月2日 (2017.3.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/050856  
 (87) 国際公開番号 W02015/107182  
 (87) 国際公開日 平成27年7月23日 (2015.7.23)  
 審査請求日 平成29年12月20日 (2017.12.20)  
 (31) 優先権主張番号 14305074.8  
 (32) 優先日 平成26年1月20日 (2014.1.20)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 512269708  
 ヴェクトーオール  
 VECT-HORUS  
 フランス国 エフ-13344 マルセイユ  
 セデ 15 セエス-80011 ブルヴァー  
 ピエール ドゥラマル 51  
 ファキュルテ デ メデシン セクター  
 ノー  
 (73) 特許権者 506316557  
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシュ  
 ルシュ シアンティフィック  
 フランス国 75794 パリ セデック  
 ス 16、リュ ミシェル - アンジュ  
 、3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性化ニューロテンシン分子及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

活性化基に共有結合したニューロテンシンポリペプチドからなり、  
 前記ニューロテンシンポリペプチドは、  
 配列番号2の配列からなるか、又は

NT(1-13)、NT(2-13)、NT(6-13)、NT(8-13)、Lys-NT(8-13)、[Tle12]NT(8-13)、[Lys8,Tle12]NT(8-13)、[Lys9,Tle12]NT(8-13)、[Trp11,Tle12]NT(8-13)、及び[Lys8,Trp11,Tle12]NT(8-13)から選ばれ、

前記活性化基は、アミノ酸配列：M - a a 1 - R - L - R (ここで、a a 1は、プロリン、又は、ピペコリン酸 (P i p) 及びチアゾリジン - 4 - カルボン酸 (T h z) から選ばれるプロリン類似体である) からなるものである、化合物。

【請求項2】

前記活性化基は、配列番号5～11の配列のいずれか1つ、好ましくは配列番号9の配列又は配列番号11の配列からなる、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

前記活性化基及びニューロテンシンポリペプチドは、リンカー基を介してコンジュゲートされている、請求項1又は2に記載の化合物。

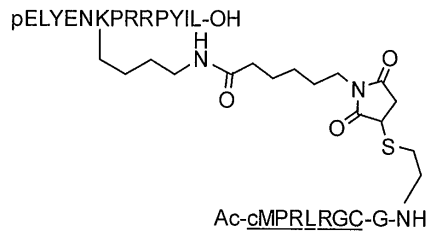
【請求項4】

前記リンカー基は、ポリエチレングリコール、ポリG l y、A h x スペース基、又はペプチド結合からなる、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

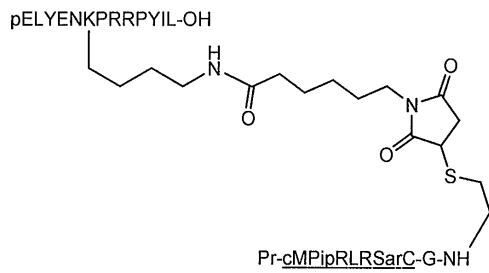
以下の化合物 ( I ) ~ ( X X ) から選ばれる、化合物：

【化 1】



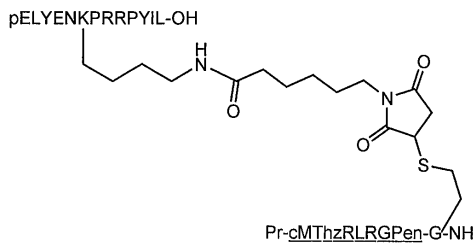
(I)、

10



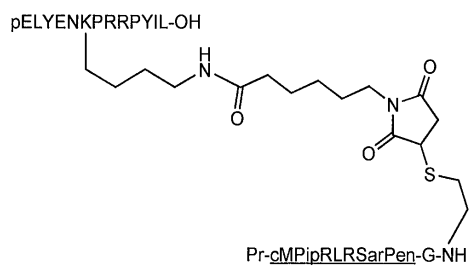
(II)、

20



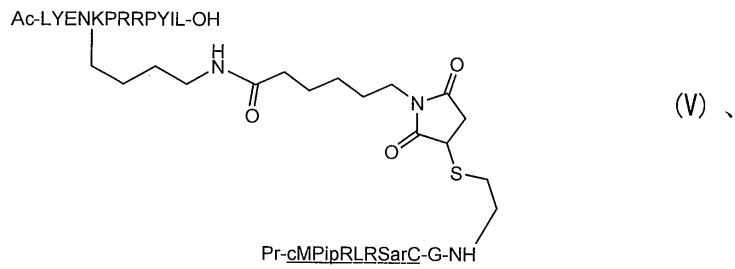
(III)、

30

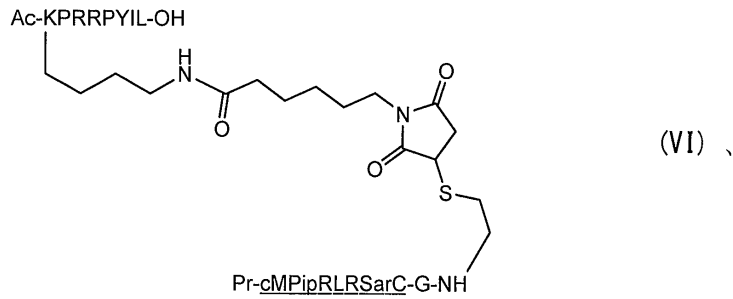


(IV)、

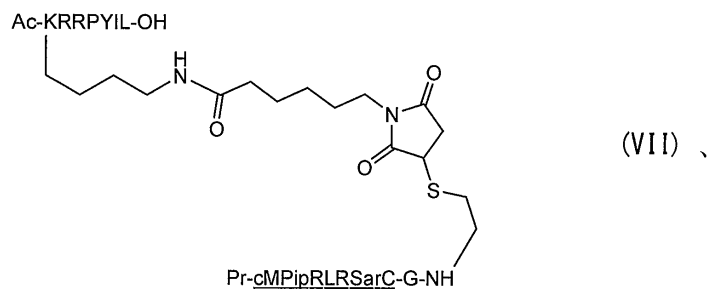
## 【化 2】



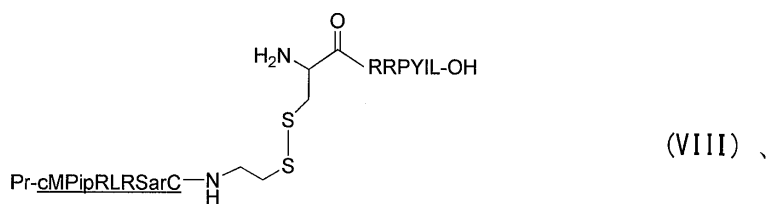
10



20



30



Pr-cMPipRLRSarC-RRPYIL-OH (IX)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-GGG-KPRRPYIL-OH (X)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-Ahx-KPRRPYIL-OH (XI)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-Ahx-RRPYIL-OH (XII)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-PEG2-RRPYIL-OH (XIII)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-PEG6-RRPYIL-OH (XIV)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-RRPYTleL-OH (XV)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-KRPYTleL-OH (XVI)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-RKPYTleL-OH (XVII)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-RRPWTleL-OH (XVIII)、  
 Pr-cMPipRLRSarC-KRPWTleL-OH (XIX)、及  
 Pr-cMPipRLRSarPen-KRPYTleL-OH (XX)。

40

## 【請求項 6】

50

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の化合物、及び  
医薬的に許容されるキャリアー又は賦形剤  
からなる、医薬組成物。

【請求項 7】

ニューロテンシンポリペプチドを、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つで定義された活性化基  
に共有結合させること  
からなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の化合物の製造方法。

【請求項 8】

哺乳動物対象において、体温を低下させるために使用される、請求項 1 ~ 5 のいずれか  
1 つに記載の化合物。

10

【請求項 9】

突然の心停止後の、もしくは卒中、新生児虚血、心臓手術、外傷性頭部又は脊髄損傷、  
発作、疼痛、又は高熱を有する哺乳動物対象において、低体温を誘導するために使用され  
る、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 10】

哺乳動物対象において、脳損傷を保護、予防、又は軽減するために使用される、請求項  
1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 11】

哺乳動物対象において、痙攣を軽減するために使用される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1  
つに記載の化合物。

20

【請求項 12】

哺乳動物対象において、疼痛を軽減するために使用される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1  
つに記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ニューロテンシン又は活性化基にコンジュゲートされたその類似体（「活性  
化ニューロテンシン」ともいう）からなる新規化合物、それからなる医薬組成物、及びそ  
の使用に関する。本発明の化合物及び組成物は、それを必要としている哺乳動物の体温を  
低下させるため（例えば、コントロールされた薬理的正常体温又は低体温を誘導するため  
）、特に、神経保護を誘導するために使用される。これらは特に、疼痛の処置は勿論のこと、  
例えば、虚血、外傷、又は発作と関連している中枢神経系（CNS）の損傷を低減する  
ために使用される。本発明の化合物及び組成物は、また、痙攣、高熱、又はニューロテ  
ンシンの生物活性からの恩恵がある何らかの病状の処置に使用される。

30

【背景技術】

【0002】

体温を低下させること（低体温）は、例えば、卒中、心停止又は新生児虚血と関連して  
いる脳虚血、発作、深刻な外傷性脳及び脊髄損傷、もしくは心臓手術といった種々の状況  
で起こる傷害に対して効力のある神経保護的アプローチである。また、体温上昇を伴う病  
理的状況（例えば、頭蓋内圧亢進（ICP）、虚血性又は出血性卒中、外傷性脳損傷（T  
BI）、敗血症、もしくは発熱に関連した何らかのウィルス、細菌又は寄生虫感染等）に  
おいて、高熱から正常体温への還元は当然である。

40

【0003】

従来、冷却材料又は処置といった外的方法（例えば、冷却布、氷浴等）、もしくは内的  
方法（例えば、冷却プローブ、低温流体の注入等）、もしくは双方を含む、体温を低下さ  
せるための物理的なアプローチが採用されている。しかしながら、これらの物理的なアプ  
プローチは、実行することが困難で、高額であり、作用及び/又は一時的効果の発現を遅延  
させ、麻痺性又は鎮静作用を有する薬剤を含む追加の処置剤の投与を必要とする、悪寒等  
の望ましくない副作用を誘導する。

【0004】

50

物理的なアプローチにより、本質的にニューロテンシン又はその類似体を使用することが示唆されてきている。ニューロテンシン (NT) は、アミノ酸配列：p y r o G l u - L e u - T y r - G l u - A s n - L y s - P r o - A r g - A r g - P r o - T y r - I l e - L e u - O H からなる線形トリデカペプチドである。哺乳動物において、内在性 NT は、主に CNS にて発現され、ここで、ドーパミン作動系と相互作用する神経伝達物質及び神経調節物質として動作する。NT は、また、末梢組織、主に消化管で発現し、ここで、消化管運動の一因となる。加えて、NT 系の規制解除は、数種の癌と同様に、多くの精神神経疾患の病態生理に参与してきている。脳又は脊髄に直接投与したとき、NT は、有力な  $\mu$  - 独立抗侵害受容効果及び低体温を齎す。NT の臨床的な使用により、多くの病態生理学的疾患を処置するための、興味深く、革新的な手段が得られるが、これは、全身投与での血漿における非常に急速なタンパク質切断によって妨害される。さらに、不十分な血液脳関門 (BBB) 浸透性により、脳又は脊髄に直接投与されない限り、その治療能力は妨害される。したがって、ニューロテンシンを基礎とする化合物の設計によって全身投与での中枢活性が引き出されるような医化学的な方法が必要とされている。抗体等の作用因子の配送 (国際公開番号 WO 2011/127580 号公報) 又はペプチドの移送 (国際公開番号 WO 2010/063122 号公報) のために、ニューロテンシン類似体を設計すること及び/又はニューロテンシンあるいはその類似体をコンジュゲートすることが提案されている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0005】

【特許文献 1】国際公開番号 WO 2011/127580 号公報

【特許文献 2】国際公開番号 WO 2010/063122 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、従来技術において、ニューロテンシンを基礎とする薬剤には、疼痛の処置は勿論のこと、高熱、興奮毒性プロセス、神経炎症、痙攣といった異なる病態生理学的疾患における急速な作用の発現及び生物活性を含む、向上した効能及び安全性プロファイルが必要とされる。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、向上した治療効果を有する新規ニューロテンシン化合物、及び哺乳動物、特にヒト対象におけるその使用を開示する。本発明は、活性化基 (b) に共有結合した NT 又はその類似体 (a) からなる新規分子の設計に基づいている。本発明の「活性化 NT」化合物により、BBB 浸透性及びタンパク質切断への耐性が高まっており、極めて向上した生物活性が実証されている。特に、全身投与で、本発明の活性化 NT 化合物は、種々の治療疾患での低体温、てんかん重積状態での抗痙攣効果、並びに神経保護及び抗神経炎症効果を含む、インビボにおける顕著な治療効果を齎した。重要なのは、本発明の化合物は、非常に急速に作用が発現し、強い生物活性を示すと共に、比較的作用の持続時間が短く、安全性プロファイルに非常に優れることである。これらの特性により、安全な治療介入を必要とする急性疾患における生化学的効果の細かい制御及び調律のための、非常に優れた薬力学的な安全性必要条件が得られる。さらに、本発明の化合物は、反復投与でいくらかの活性を維持しており、反復又は亜慢性処置に使用することができる。

40

【0008】

本発明の目的は、したがって、活性化基に共有結合したニューロテンシンポリペプチドからなる化合物を提供することである。該活性化基は、アミノ酸配列：M - a a 1 - R - L - R (ここで、a a 1 はプロリン又はその類似体である) からなるものである。NT ポリペプチドへのカップリングは、直接的であってもよく、間接的、すなわちリンカー基を介したものであってもよい。

50

## 【0009】

本発明のさらなる目的は、上記定義された化合物、及び医薬的に許容されるキャリアー又は賦形剤からなる医薬組成物を提供することである。

## 【0010】

本発明の別の目的は、ニューロテンシンポリペプチドを、上記定義された活性化基に共有結合させること、好ましくはリンカー基を用いて間接的に共有結合させることからなる、上記定義された化合物の製造方法を提供することである。

## 【0011】

本発明のさらなる目的は、上記定義された化合物又は組成物の、薬剤としての使用を提供することである。該化合物又は組成物は、疼痛の処置は勿論のこと、哺乳動物対象において、体温を低下させるため（例えば、低体温又は正常体温を誘導するため）に使用されてもよく、神経保護を誘導するため（例えば、脳損傷を低減するため）に使用されてもよい。

10

## 【0012】

本発明のさらなる目的は、上記定義された化合物又は組成物の、脳損傷を有する対象を処置するための使用を提供することである。

## 【0013】

本発明のさらなる態様は、哺乳動物対象において低体温を誘導する方法に関する。該方法は、上記定義された化合物又は組成物を、該対象に全身投与することからなる。

## 【0014】

本発明のさらなる目的は、脳損傷を有する対象を処置する方法を提供することである。該方法は、上記定義された化合物又は組成物を、該対象に全身投与することからなる。

20

## 【0015】

本発明は、ヒト患者等の何らかの哺乳動物対象における脳損傷の処置（例えば、脳損傷の影響に対する保護、予防、又は軽減）のために使用されてもよい。本発明は特に、脳虚血、発作、心停止又は新生児虚血、痙攣、深刻な外傷性頭部及び脊髄損傷、心臓手術、ICH、敗血症、もしくは発熱に関連した何らかのウイルス、細菌又は寄生虫感染を有する対象の処置に適している。本発明はまた、標準的な抗痙攣剤に対する耐性がある痙攣を有する対象、もしくは、標準的な解熱薬剤に対する耐性又は該薬剤と患者の熱をより急速に冷ますための標準的な冷却技術との組合せに対する耐性がある高熱を有する対象の処置に適している。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0016】

【図1】図1は、NTモル当量8mg/kgの投与量でNTを静脈内注射（急速）した後の、スイス（CD-1）マウスの直腸体温に対する、生理食塩水（NaCl：0.9%）、NT、又は化合物Iの効果を示す。

【図2】図2は、NTモル当量0.5～8mg/kgの範囲の投与量で化合物Iを静脈内注射（急速）されたスイス（CD-1）マウスにおける、低体温についての用量-反応関係性を示す。

【図3】図3は、スイス（CD-1）マウスにおける、化合物I、化合物II、及び化合物IVの低体温反応を示す。化合物I、化合物II、及び化合物IVを、NTモル当量0.5mg/kgの同じ投与レベルでマウスに静脈内注射（急速）した。

40

【図4】図4は、NTモル当量0.03～10mg/kgの範囲の投与量で化合物IIを静脈内注射（急速）されたスイス（CD-1）マウスにおける、低体温についての用量-反応関係性を示す。最少有効量（MED）は、NTモル当量0.35mg/kgで、最大効果は、NTモル当量10mg/kgで観察された。

【図5】図5は、生体位での脳灌流を用いた、マウスにおける[<sup>3</sup>H-Tyr3]-NT、[<sup>3</sup>H-Tyr3]-化合物I、及び[<sup>3</sup>H-Tyr3]-化合物XIVの、BBB-並びに血液網膜関門（BRB）-移送を示す。

【図6】図6は、NT、化合物I、化合物IV、及び化合物XIVの、インビトロでの血

50

液安定性を示す。スイス(CD-1)マウスの新鮮な採取血液において、ペプチドを37でインキュベートし、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分光(LC-MS/MS)分析法によって、血漿蛋白分画における残存無傷ペプチドのパーセンテージを、表示された時点で定量化した。

【図7】図7は、スイス(CD-1)マウスにおける低体温反応の、化合物IIと、NTのより短い類似体からなる本発明の活性化ニューロテンシン化合物との比較を示す。化合物II、化合物V、化合物VI、又は化合物VIIを、NTモル当量0.5mg/kgの同じ投与レベルでマウスに静脈内注射(急速)した。全てのコンジュゲートが同様の低体温効能を示した。

【図8】図8は、スイス(CD-1)マウスにおける化合物II及びVIIの低体温効果を示す。化合物II又は化合物VIIを、NTモル当量10mg/kgの同じ投与レベルでマウスに静脈内注射(急速)した。

【図9】図9は、スイス(CD-1)マウスにおける低体温反応の、N末端配列番号9の配列を有する活性化基と、C末端NT(6-13)又はNT(8-13)部分との間の別個のリンカーからなるニューロテンシンコンジュゲートの比較を示す。リンカー基なし(化合物IX)、GGGリンカー(化合物X)、Ahxリンカー(化合物XII)、PEG2リンカー(化合物XIII)、又はPEG6リンカー(化合物XIV)からなるコンジュゲートを、NTモル当量10mg/kgの同じ投与レベルでマウスに静脈内注射(急速)した。

【図10】図10は、NT(8-13)類似体からなる、配列番号9のタンデム配列-NT(8-13)又は配列番号11のタンデム配列-NT(8-13)コンジュゲートの、スプラグドローラットにおける低体温反応の比較を示す。NT(8-13)配列における、[Tle12](化合物XV)、[Lys8, Tle12](化合物XVI及び化合物XX)、[Lys9, Tle12](化合物XVII)、[Trp11, Tle12](化合物XVIII)、又は[Lys8, Trp11, Tle12](化合物XIX)置換体からなるコンジュゲートを、NTモル当量5mg/kgの同じ投与レベルでラットに静脈内注射(急速)した。

【図11】図11は、化合物XIVの反復投与による、体温への効果を示す。NTモル当量4mg/kgの投与量で、4日間に渡って、化合物XIVをスイス(CD-1)マウスに毎日静脈内注射(急速)し、投与処置の後、各日3時間の間に、低体温反応を評価した。

【図12】図12は、酵母誘発高熱(yeast-induced hyperthermia)のマウスモデルにおける、化合物XIVの解熱作用を示す。NMR1マウスに酵母懸濁液を皮下注射すると、直腸温度が0.8上昇した(ベースライン2、高熱対ナイーブマウス)。化合物XIVを指示投与レベルで静脈内注射(急速)すると、解熱作用が示されただけでなく、中程度及び高い投与レベルで、強くかつ投与に依存した低体温が誘発された。

【図13】図13は、てんかん重積状態(SE)における体温及び発作強度への、化合物XIVの効果を示す。SEの特性2時間後にステージ5又はステージ6の発作を誘発し、大抵は高熱と関連がある痙攣促進薬物カイナイト(KA)を、マウスに投与した。SE発現後30分(SE30)で、NTモル当量2又は4mg/kgの投与量で化合物XIVを投与すると、常に、少なくとも2時間持続する一過性低体温が誘導された(図13(a))。化合物XIVに誘発された低体温は、SE30+化合物XIVグループにおける発作の著しい減少と関連していた。発作モデルにおける抗痙攣効果の陽性コントロールとして用いられるジアゼパム(DZP)を、高投与量で、一部の動物に腹腔内投与した。SE発現後30分でニューロテンシン(NT8-13)を投与した場合、SE動物と比較して、体温又は発作強度の重篤な変化は観察されなかった(図13(b))。

【図14】図14は、KAに誘発されたSE後の激しい興奮毒性損傷及び神経炎症を伴うマウスにおける、化合物XIVの神経保護及び抗神経炎症効果を示す。免疫組織化学的ラベリング(図14(a))を用い、SHAM(A, D, G)、SE(B, E, H)、及び

10

20

30

40

50

SE + 化合物XIV (SE + HT) (C, F, I) 動物からの海馬体の冠状切片における脳損傷の規模を評価した。神経細胞を、神経細胞特定核タンパク質をラベルする抗NeuN抗体で、A、B、及びCとラベルした。歯状回(DG)の門部(H)と同様に、CA1及びCA3錐体細胞層においても、神経細胞を矢印で示す。各々アストロサイトの及びミクログリアの反応性をモニタリングして、抗GFAP(D, E, F)及びIba1(G, H, I)抗体で神経炎症を評価した。小さい矢印は、反応性アストロサイト及びミクログリアを示す。スケールバーは500µmである。SE誘発グリオシスは、ミクログリア及びアストログリア細胞型を引き起こした。SHAM動物において、GFAP及びIba1についての基本的なラベリングが、海馬中で検出された(図14(a))。SE動物において、グリア細胞の非常に強力な活性が、全海馬層中で発生した。SE発現後30分で化合物XIV(SE + HT)を投与した場合、該炎症反応は著しく低減した。NeuN及びFluoro-jade Cラベリングを用い、神経細胞死及び化合物XIVの効果を定量化した(図14(b))。SHAM動物において、海馬中で神経細胞死は観察されなかった。SE動物において、CA1~3錐体細胞層及びDG中で多くの神経細胞死が観察された。SE動物で観察された神経変性は、SE発現後30分で化合物XIV又はDZPを投与した場合には著しく低減したが、NT(8-13)を投与した場合には変化が見られなかった(図14(b))。

10

【図15】図15は、SE後8週間に海馬中で、化合物XIVによって苔状線維新芽形成が軽減することを示す。苔状線維の異常な新芽形成又は歯状回顆粒細胞の軸索は、門細胞損失にตอบสนองして内部分子層(IML)において起こり、動物発作モデル及びヒトのてんかんにおいて十分に立証されている。化合物XIVによる新芽形成の効果は、SE発現後8週間で、亜鉛小胞輸送体3(ZnT3)に対する免疫組織化学的ラベリングで評価した。SHAM動物において、苔状線維末端は、CA3領域の門部及び淡明層に存在し、DGのIMLで末端は観察されなかった。SE動物において、苔状線維末端は、IML内部で観察された。SE動物と比較して、SE発現後30分で化合物XIV(SE + HT、図15(a))又はDZPが投与された動物において、IMLを神経支配する末端の数は著しく減少したが、NT(8-13)が投与された場合には、比較的变化がなかった(図15(a)(b))。

20

【図16】図16は、マウスにおけるライジング(悶え)試験での化合物XIVの抗侵害受容効果を示す。0.5%酢酸を10mL/kgで腹腔内注射する30分前に、NTモル当量0.5、1、及び5mg/kgと投与レベルを増加させて、化合物XIVをマウスに静脈内注射(急速)した。酢酸の腹腔内注射後5分で開始した10分間のピリオドにおいて、各マウスで発生する腹部ストレッチの数を測定した(ライジングカウント/10分)。

30

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0017】

本発明は、ニューロテンシンを基礎とする新規化合物、それからなる医薬組成物、及びその使用、例えば、コントロールされた体温の低下(例えば、低体温又は正常体温)、コントロールされた抗痙攣効果、もしくはそれを必要としている対象の鎮痛を誘導するための使用を提供する。

40

##### 【0018】

特に、本発明の目的は、活性化基に共有結合したニューロテンシンポリペプチドからなる化合物に属する。該活性化基は、アミノ酸配列：M - a a 1 - R - L - R(ここで、a a 1はプロリン又はその類似体である)からなるものである。

##### 【0019】

実験例のセクションで図示しているように、本発明の活性化ニューロテンシン化合物は、生来のNTと比較したとき、強化したBBB浸透性及びタンパク質切断への高い耐性の双方を含む、高度に改善された生物学的特性を示す。該化合物は、高い耐性及び安全性プロファイルを有すると共に、非常に急速に作用が発現し、全身投与において低い投与レベルで強力な生物活性を示す。特に、本発明の化合物は、

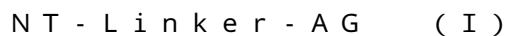
50

- i) 生来のNTで得られたものよりも、最高80倍優れた中枢低体温効果 (central hypothermic effect) を誘発し、
- ii) 低体温に関連した悪寒を誘発せず、
- iii) 潜在的で致命的に大きな低体温を防ぐ平坦効果を実証し、
- iv) 静脈内注射 (急速) での最少有効量 (MED) と最大耐量 (MTD) との間で非常に安全な余地を示し、
- v) 反復又は亜慢性処置を必要とする疾患に対する自身の適合性を実証する、反復静脈内投与で重要な生物活性を保持し、
- vi) 効力のある解熱活性を示し、
- vii) 運動発作を効果的に低減又は半減し、
- viii) 神経保護及び抗神経炎症活性を示し、
- ix) 発作に続いて及びてんかんにおいて、異常軸索新芽形成を効果的に軽減し、そして
- x) 明瞭な病態生理学的疾患における予想外の薬効及び効能を実証する、重要な鎮痛効果を誘発する。

10

## 【0020】

本発明の化合物は、本質的に、活性化基に共有結合したニューロテンシンポリペプチドからなる。該活性化基は、ニューロテンシンポリペプチドと、直接的に、又は間接的に、すなわちリンカー基を介して、共有結合していればよい。該化合物は、また、以下の式 (I) :



20

(ここで、

NT: ニューロテンシン活性を有するいずれかのポリペプチド、

Linker: 同一でも異なっていてもよい少なくとも2つの反応基を有する、架橋分子又はプラットフォーム、及び

AG: 前記特定のアミノ酸配列からなる活性化基である)

で表されてもよい。立体配置、リンク方法、及び構成成分の互いの固定点は、最適な活性が得られるように調整されるべきである。

## 【0021】

<ニューロテンシンポリペプチド>

30

「ニューロテンシンポリペプチド」は、ニューロテンシン、ニューロテンシン類似体、又はニューロテンシンレセプターのポリペプチドアゴニスト等の、ニューロテンシン活性を有するいずれかのポリペプチドを示す。前記「類似体」には、低体温又は鎮痛を誘発する能力等のニューロテンシンの1種又は数種の生物活性を維持している、野生型ニューロテンシンのいずれかの変異体又はフラグメントが含まれる。より好ましくは、ニューロテンシンポリペプチドは、生来のニューロテンシン又はその類似体を示す。さらに好ましい実施形態において、「ニューロテンシンポリペプチド」には、ニューロテンシンの1種又は数種の生物活性を維持している、ヒトニューロテンシン、もしくはそのフラグメント又は変異体が含まれる。

## 【0022】

40

ヒト野生型ニューロテンシンは、以下の配列:



を有する13のアミノ酸ペプチドである。

## 【0023】

本発明のニューロテンシンポリペプチドには、したがって、好ましくは、以下の(i)~(iv)からなるいずれかのポリペプチドが含まれる。

(i) 配列番号1の配列

(ii) (i)の天然変異体

(iii) (i)又は(ii)のフラグメント、もしくは

(iv) (i)~(iii)のいずれかの配列の類似体、好ましくは、1つ又はそれ以上のアミノ酸置

50

換体もしくは修飾体からなるもの、より好ましくは、1、2、3、4、5、6、又は7つのアミノ酸残基、さらに好ましくは1、2、3、又は4つのアミノ酸残基の置換体もしくは修飾体からなるもの

(該ポリペプチドは、低体温又は鎮痛等の、ニューロテンシンの1種又は数種の生物活性を引き起こす能力を有する)

【0024】

ここで用いられる配列のフラグメントは、該配列の、少なくとも4つ、より好ましくは少なくとも5つの連続したアミノ酸からなるいずれかのフラグメントを示す。この点において、本発明に係る好適なニューロテンシンポリペプチドには、ヒトニューロテンシンの少なくともアミノ酸8~13「NT(8-13)」、ヒトニューロテンシンの少なくともアミノ酸6~13「NT(6-13)」、又はヒトニューロテンシンの少なくともアミノ酸2~13「NT(2-13)」からなるニューロテンシンフラグメントが含まれる。少なくともC末端NT(8-13)フラグメントからなるこのようなフラグメントは、ニューロテンシンの生物活性の、全てではないが、殆どを引き起こすことが報告されている。以下に、対応するアミノ酸配列を示す。

NT(8-13): RRPYIL (配列番号2)

NT(6-13): KPRRPYIL (配列番号3)

NT(2-13): LYENKPRRPYIL (配列番号4)

【0025】

特に好ましい実施形態において、本発明に係るニューロテンシンポリペプチドの配列は、野生型ニューロテンシンポリペプチド又はそのフラグメントに照らして、1、2、3、又は4つのアミノ酸修飾体(すなわち、置換体又は挿入体又は化学修飾体)からなる。この点において、以下のアミノ酸置換体又は修飾体は、独立して又は組み合わせて、NT又はそのフラグメントとなり、本発明で用いられるニューロテンシンの生物活性類似体が得られる。

【0026】

- ・N末端アセチル化、すなわち、アセチルNT(2-13)、又はアセチルNT(6-13)、又はアセチルNT(8-13)の生成;

- ・(D)-Arg、Lys、(D)-Lys、HLys(ホモリジン)、Dab(ジアミノブチル酸)、Orn(オルニチン)、(D)-Orn、又は -デスアミノ-N,N-ジメチルホモリジンによるArg8の置換、すなわち、[(D)-Lys8]NT(8-13)、[Lys8]NT(8-13)、又は[HLys8]NT(8-13)の生成;

- ・Lys、(D)-Lys、Orn、(D)-Orn、Dab、(D)-Arg、HLys(ホモリジン)、又は -デスアミノ-N,N-ジメチルホモリジンによるArg9の置換、すなわち、[Lys9]NT、[Lys9]NT(8-13)、[(D)-Orn9]NT、又は[(D)-Orn9]NT(8-13)の生成;

- ・Trp、(D)-Trp、neoTrp、(D)-Tyr、Phe、(D)-Phe、Na1(ナフチルアラニン)、又は(D)-3,1-ナフチルアラニンによるTyr11の置換、すなわち、[Trp11]NT(8-13)、[(D)-Tyr11]NT(8-13)、[Trp11]NT、又は[(D)-Tyr11]NTの生成;

- ・Tle(tert-ブチルロイシン)によるIle12の置換、すなわち、[Tle12]NT(8-13)、又は[Tle12]NTの生成;

- ・Arg8、Arg9、Tyr11、及びIle12の組み合わせ置換、すなわち、[(D)-Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13)、[Lys9, Trp11, Tle12]NT(8-13)、[Lys8, Tle12]NT(8-13)、[Lys9, Tle12]NT(8-13)、[Trp11, Tle12]NT(8-13)、[Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13)、又は[HLys8, Tle12]NT(8-13)の生成;

- ・8-9、9-10、10-11、11-12、又は12-13位における、CH<sub>2</sub>NH(psi)還元結合でのペプチド結合の修飾; 及び/又は

10

20

30

40

50

・前記可能なアミノ酸置換体又は修飾体のいずれかで、又はいずれもなしでの、NT(8-13)のダイマーの環化である。

【0027】

好適な実施形態において、ニューロテンシンポリペプチドは、ヒトNT、NT(2-13)、NT(6-13)又はNT(8-13)、もしくは1~4のアミノ酸修飾体を有するその類似体から選ばれる。

【0028】

この点において、最も好適な実施形態において、ニューロテンシンポリペプチドは、[Lys8]NT(8-13)、[Lys9]NT(8-13)、[HLys8]NT(8-13)、[(D)-Lys8]NT(8-13)、[(D)-Orn9]NT(8-13)、[Lys8,Lys9]NT(8-13)、[(D)-Lys8,Lys9]NT(8-13)、[Trp11]NT(8-13)、[neoTrp11]NT(8-13)、[Tle12]NT(8-13)、[Trp11,Tle12]NT(8-13)、[neoTrp11,Tle12]NT(8-13)、[Lys8,Tle12]NT(8-13)、[(D)-Lys8,Tle12]NT(8-13)、[(D)-Lys8,Trp11]NT(8-13)、[(D)-Lys8,neoTrp11]NT(8-13)、[Lys8,Trp11,Tle12]NT(8-13)、[(D)-Lys8,Trp11,Tle12]NT(8-13)、[(D)-Lys8,neoTrp11,Tle12]NT(8-13)、[(D)-Lys8,Lys9,Trp11,Tle12]NT(8-13)、[(D)-Lys8,Lys9,neoTrp11,Tle12]NT(8-13)、[Lys9,Tle12]NT(8-13)、[Lys9,Trp11]NT(8-13)、[Lys9,neoTrp11]NT(8-13)、[Lys9,Trp11,Tle12]NT(8-13)、[Lys9,neoTrp11,Tle12]NT(8-13)、[HLys8,Tle12]NT(8-13)、[HLys8,Trp11]NT(8-13)、[HLys8,neoTrp11]NT(8-13)、[HLys8,Trp11,Tle12]NT(8-13)、[HLys8,neoTrp11,Tle12]NT(8-13)、[(D)-Orn9,Tle12]NT(8-13)、[(D)-Orn9,Trp11]NT(8-13)、[(D)-Orn9,neoTrp11]NT(8-13)、[(D)-Orn9,Trp11,Tle12]NT(8-13)、又は[(D)-Orn9,neoTrp11,Tle12]NT(8-13)から選ばれる。

【0029】

別の好適な実施形態において、本発明のニューロテンシンポリペプチドは、前記アミノ酸置換体のいずれかからなる、完全サイズのNTポリペプチド、又はNT(2-13)ポリペプチド、又はNT(6-13)ポリペプチドである。

【0030】

最も好適な実施形態において、ニューロテンシンポリペプチドは、NT(8-13)、又はニューロテンシンの1種又は数種の生物活性を維持しているその類似体である。

【0031】

本発明での使用に好適なさらなるニューロテンシンポリペプチド又はニューロテンシン置換体は、例えば、Rivier et al., J Med Chem 1977、Tokumura et al., Chem Pharm Bull (Tokyo) 1990、Labbe-Jullie et al., J Pharm Exp Ther 1994、Tyler et al., Brain Res. 1998、Podstawka-Proniewicz et al., J Phys Chem 2011、Kitabgi et al., Mol. Pharm. 18, 11-19 1980、米国特許公開US2009/0062212号公報、国際公開WO2008/137720号公報、WO1999/052539号公報、WO2007/070672号公報、WO2010/063122号公報、又はWO2012/000118号公報に記載されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 2 】

## &lt; 活性化基 &gt;

本発明の活性化ニューロテンシン化合物は、自身の活性を促進する活性化基からなる。一般的な態様において、該活性化基は、LDLレセプター(LDLR)をBBBに結合させる、いずれかのペプチド配列からなる。NTのLDLR媒介細胞輸送が認められることによって、驚くほどの生物活性を伴う活性化化合物が生成された。この点において、より好適な実施形態において、活性化基は、アミノ酸配列：M - a a 1 - R - L - R(ここで、a a 1はプロリン残基(「P」)又はその類似体である)からなる。前記式において、Mはメチオニンを示し、Rはアルギニンを示し、Lはロイシンを示す。実験例のセクションで示しているように、このような活性化基は、本発明の活性化ニューロテンシン分子に、改善された生物活性及び薬理活性型を与える。特に、静脈内投与の場合、体温の低下について、内在性NTよりも最高80倍のより優れた効力のある活性化ニューロテンシン分子が、このような活性化基のグラフトにより生成される。このような顕著な低体温効果に加え、該化合物は、予想外の解熱活性を示す。これらはまた、興奮毒性に関連した神経細胞死及び神経炎症を阻害することによって、並びに、痙攣及びてんかんに関連した異常軸索新芽形成を軽減することによって、運動発作を軽減又は半減し、効力のある予想外の神経保護活性を実証する可能性を示す。加えて、本発明の活性化ニューロテンシン分子は、全身投与における急速な作用の発現、低い投与レベルでの強力な低体温活性、並びに、低体温に関連した悪寒がなく、潜在的で致命的に大きな低体温を防ぐ平坦効果、及びMEDとMTDとの間での400倍の安全な余地を伴う非常に良好な安全性プロファイルと共に、非常に良好な薬物動態及び薬力学的プロファイルを示す。最終的に、該化合物は、静脈内投与により、重要な鎮痛効果を示した。

10

20

## 【 0 0 3 3 】

したがって、本発明は、活性化ニューロテンシン化合物に関する。該化合物は、アミノ酸配列：M - a a 1 - R - L - R(ここで、a a 1は、プロリン残基「P」又はその類似体である)からなる活性化基を有する。好ましくは、プロリン類似体は、P i p及びT h zから選ばれる。P i pは、ピペコリン酸を表し、T h zは、チアゾリジン - 4 - カルボン酸を表す。

## 【 0 0 3 4 】

好ましい実施形態では、前記活性化基は、以下のアミノ酸配列の1つからなる。

M - P - R - L - R (配列番号5)、

M - P i p - R - L - R (配列番号6)、又は

M - T h z - R - L - R (配列番号7)

## 【 0 0 3 5 】

さらに特別な実施形態では、活性化基におけるアミノ酸配列は、L型又はD型でのさらなるN末端システイン残基「C」を有する。すなわち、該アミノ酸配列は、アミノ酸配列：C - M - a a 1 - R - L - R又はc - M - a a 1 - R - L - R(ここで、a a 1は、前記のとおりである)を含む。最も好ましい実施形態では、該N末端システイン残基「C」はD型である。

## 【 0 0 3 6 】

別の特別な実施形態では、活性化基におけるアミノ酸配列は、2つのさらなるC末端残基を有する。すなわち、該アミノ酸配列は、配列：M - a a 1 - R - L - R - a a 2 - a a 3、好ましくは、配列：c - M - a a 1 - R - L - R - a a 2 - a a 3(ここで、a a 1は、前記のとおり、a a 2は、G l y又はその類似体S a r(サルコシン)、及びa a 3は、C y s又はその類似体P e n(ペニシラミン)である)を含む。

40

## 【 0 0 3 7 】

特定の、かつ、最も好ましい活性化基は、以下のアミノ酸配列の1つからなる。

c - M - P - R - L - R - G - C (配列番号8)

c - M - P i p - R - L - R - S a r - C (配列番号9)

c - M - T h z - R - L - R - G - P e n (配列番号10)

50

c - M - P i p - R - L - R - S a r - P e n ( 配列番号 1 1 )

【 0 0 3 8 】

< 活性化ニューロテンシンの設計 >

本発明の好ましい活性化ニューロテンシン分子は、1つのニューロテンシンポリペプチドと、1つの活性化基とからなる。しかしながら、別の実施形態では、数個のNT分子と1つの活性化基との組合せ、又はその逆の組合せが有利であるかもしれない。この点において、本発明の特別な化合物は、

式：(NT)<sub>1</sub> - Linker - AG、又は

式：NT - Linker - (AG)<sub>1</sub>

(ここで、1は、2と5との間の整数、代表的には、2又は3である)

で表される。

【 0 0 3 9 】

活性化基は、好ましくはニューロテンシン分子に共有結合している。ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基が天然アミノ酸のみからなる場合、化学反応、生化学反応、又は酵素反応等の、技術分野においてそれ自体が周知ないずれかの反応もしくはプロセスによって、あるいは、遺伝子工学によって、カップリング(結合)が行われる。

【 0 0 4 0 】

カップリングは、-OH、-SH、-CO<sub>2</sub>H、-NH<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-CN、-N<sub>3</sub>、-NCS、マレイミドエステル、コハク酸イミドエステル、又は-PO<sub>2</sub>H等の反応要素が天然で存在するか、もしくは導入されている、活性化基及びニューロテンシンポリペプチドのいずれかの部位で行われる。このように、カップリングは、N末端、又はC末端、及び/又は側鎖により媒介される反応基にてなされ得る。活性化基は、共有結合によって、ニューロテンシンポリペプチドに直接的にカップリングし得る。一方、活性化基はまた、リンカー基によって非直接的にもカップリングし得る。共有化学カップリングには、好ましくは、エステル、アルデヒドもしくはアルキル又はアリアル酸によるアルキル基、アリアル基又はペプチド基；ケトン；アンヒドリド；スルフヒドリル又はヒドロキシル基；臭化又は塩化シアン由来の基；アジド；ニトリル；マレイミド；カルボニルジイミダゾール；コハク酸イミドエステル；あるいはスルホン酸ハロゲン化物を含有する二官能又は多官能剤の使用が含まれる。好ましい化学カップリング剤は、スルホ-EMCS(N-マレイミドカプロイル-オキシスルホコハク酸イミドエステル)であり、これを、例えば、ニューロテンシンポリペプチドに添加し、次いで、活性化基と共有結合させる。

【 0 0 4 1 】

好適なリンカーの例には、例えばLys、Glu、Asp、ポリLys、Gly-Lys等のジペプチド、もしくはGGG又はG<sub>4</sub>S等のマルチアミノ酸からなる、モノ、ジ、トリ、もしくはマルチアミノ酸が含まれる。その他にも、該リンカーには、例えば、コハク酸、Ahx(アミノヘキサン酸)、又はPEG(ポリエチレングリコール)分子が含まれる。

【 0 0 4 2 】

好ましい実施形態において、ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基は、PEG分子から選ばれたリンカーを用いてカップリングされる。いずれかのPEG分子、特に、PEG2(12-アミノ-4,7,10-トリオキサデカン酸)、PEG3、PEG4、PEG5、又はPEG6(21-アミノ-4,7,10,13,16,19-ヘキサオキサヘンエイコサン酸)等が用いられる。より好ましくは、リンカーにはPEG2又はPEG6分子が含まれ、PEG6がより一層好ましい。

【 0 0 4 3 】

別の好ましい実施形態では、ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基は、ペプチド結合によって直接的にカップリングされる。

【 0 0 4 4 】

別の好ましい実施形態では、ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基は、ポリG分子、より好ましくは、Gアミノ酸又はGGGトリペプチド、もしくは線形アミノヘキサン

10

20

30

40

50

酸から選ばれた可動性リンカーを用いてカップリングされる。

【0045】

別の好ましい実施形態では、ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基は、切断可能なジスルフィド架橋を用いてカップリングされる。

【0046】

別の好ましい実施形態では、ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基は、ヘテロニ官能架橋剤、より好ましくは、スルホ-E M C S 試薬を用いてカップリングされる。

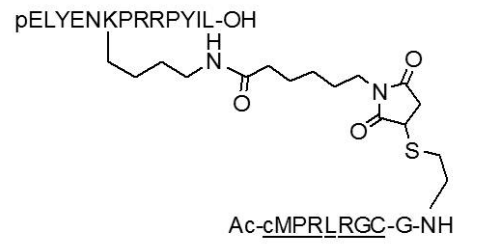
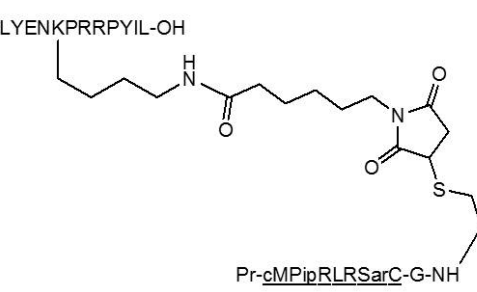
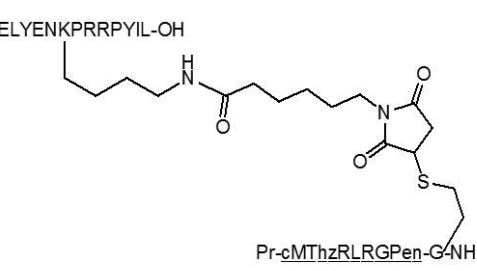
【0047】

本発明に係る、最も好ましい活性化ニューロテンシン分子のリストを、以下の表 A に記載する。例えば配列番号 1 の配列を「配列番号 1」とのみ表記する場合があります、他の配列も同様である。

【0048】

【表 1】

表 A

化合物	式	化学構造	分子量 (g/mol)	実効電荷 (pH7.4)
	NT	pELYENKPRRPYIL-OH	1672.92	+1 (3+/2-)
I	NT- 配列番号 8	 <p>Ac-cMPRLRGCG-NH</p>	2957.60	+2 (4+/2-)
II	NT- 配列番号 9	 <p>Pr-cMPipRLRSarCG-NH</p>	2999.60	+2 (4+/2-)
III	NT- 配列番号 10	 <p>Pr-cMThzRLRGPenCG-NH</p>	3017.64	+2 (4+/2-)

10

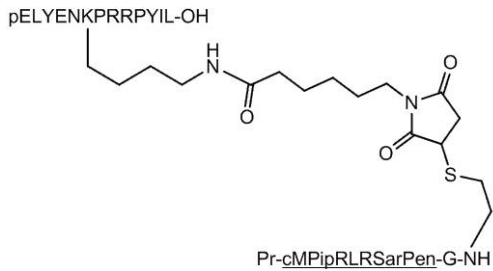
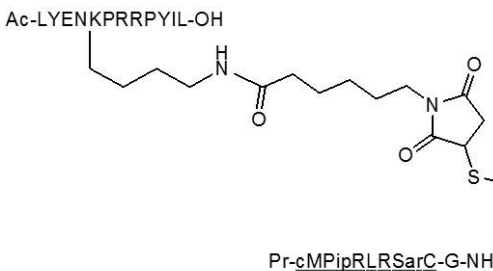
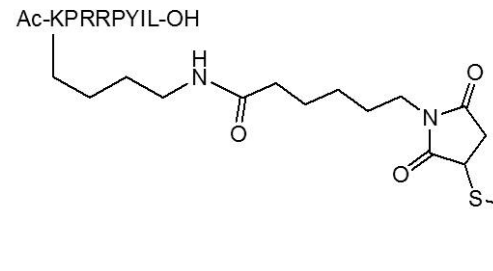
20

30

40

【表 2】

表 A (続き)

化合物	式	化学構造	分子量 (g/mol)	実効電荷 (pH7.4)	
IV	NT- 配列番号 11	 <p>pELYENKPRRPYIL-OH</p> <p>Pr-cMPipRLRSarPen-G-NH</p>	3027.65	+2 (4+/2-)	10
V	NT(2-13)- 配列番号 9	 <p>Ac-LYENKPRRPYIL-OH</p> <p>Pr-cMPipRLRSarC-G-NH</p>	2930.54	+2 (4+/2-)	20
VI	NT(6-13)- 配列番号 9	 <p>Ac-KPRRPYIL-OH</p> <p>Pr-cMPipRLRSarC-G-NH</p>	2410.99	+3 (4+/1-)	30

【表 3】

表 A (続き)

化合物	式	化学構造	分子量 (g/mol)	実効電荷 (pH7.4)
VII	Lys- NT(8-13)- 配列番号 9		2313.88	+3 (4+/1-)
VIII	NT(8-13)-SS- 配列番号 9		2051.6	+4 (5+/1-)
IX	配列番号 9- NT(8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-RRPYIL-OH	1816.27	+3 (4+/1-)
X	配列番号 9- GGG-NT(6-13)	Pr-cMPipRLRSarC-GGG-KRRPYIL-OH	2212.71	+4 (5+/1-)

10

20

【表 4】

表 A (続き)

化合物	式	化学構造	分子量 (g/mol)	実効電荷 (pH7.4)
XI	配列番号 9- Ahx-NT (6-13)	Pr-cMPipRLRSarC-Ahx-KPRRPYIL-OH	2154.71	+4 (5+/1-)
XII	配列番号 9- Ahx-NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-Ahx-RRPYIL-OH	1929.4	+3 (4+/1-)
XIII	配列番号 9- PEG2-NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-PEG <sub>2</sub> -RRPYIL-OH	1963.4	+3 (4+/1-)
XIV	配列番号 9- PEG6-NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-PEG <sub>6</sub> -RRPYIL-OH	2151.7	+3 (4+/1-)
XV	配列番号 9- [Tle12]NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-RRPYTleL-OH	1816.29	+3 (4+/1-)
XVI	配列番号 9- [Lys8, Tle12] NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-KRPYTleL-OH	1788.27	+3 (4+/1-)
XVII	配列番号 9- [Lys9, Tle12] NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-RKPYTleL-OH	1788.27	+3 (4+/1-)
XVIII	配列番号 9- [Trp11, Tle12] NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-RRPWTleL-OH	1839.32	+3 (4+/1-)
XIX	配列番号 9- [Lys8, Trp11, Tle12] NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-KRPWTleL-OH	1811.31	+3 (4+/1-)
XX	配列番号 11- [Lys8, Tle12] NT (8-13)	Pr-cMPipRLRSarPen-KRPYTleL-OH	1816.33	+3 (4+/1-)

## 【0049】

本発明の活性化ニューロテンシン分子の詳細な製造方法は、実験例のセクションに記載する。この点において、本発明はまた、ニューロテンシンポリペプチドと前記定義された活性化基とを、(直接的に又は非直接的に)共有結合させるステップからなる、活性化ニューロテンシン分子の製造方法に関する。該方法は、活性化ニューロテンシンを収集する又は精製するさらなるステップ、及び/又は、活性化ニューロテンシンを修飾するさらなる任意のステップ、及び/又は、活性化ニューロテンシンを適用可能な賦形剤で処方するさらなる任意のステップを含んでいてもよい。

## 【0050】

特別な実施形態では、ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基は、まず、別々に合成され、その後、例えば、化学カップリング、酵素カップリング、又は生化学カップリングによって、共有結合される。前記のとおり、ニューロテンシン及び/又は活性化基に存在している、並びに/もしくは、挿入される、種々の反応性官能剤を介して、そして任意に適したリンカーを用いて、カップリングがなされる。

## 【0051】

別の特別な実施形態では、ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基は、単一分子として直接合成される。例えば、活性化ニューロテンシン分子は、唯一の分子実体として、

10

20

30

40

50

ポリペプチド合成機で製造される。また、活性化ニューロテンシン分子は、遺伝子的融合及び組換え宿主細胞における発現によって製造される。このような方法は、両成分が天然アミノ酸からなる場合に適している。

【0052】

この点において、本発明はまた、本発明の活性化ニューロテンシンをエンコードする核酸分子に関する。ここで、ニューロテンシンポリペプチド及び活性化基は、天然起源のアミノ酸からなり、アミノ酸結合又はリンカーによって結合している。

【0053】

本発明のさらなる目的は、このような核酸分子からなるクローニング又は発現ベクター（例えば、プラスミド、ファージ、ウィルス、コスミド等）、及び、このような核酸又はベクターからなる組換え宿主細胞を提供することである。

10

【0054】

本発明の活性化ニューロテンシン分子は、自身の活性をさらに上昇させるため、又は、薬物動態的特性を向上させるために、周知の技術を用いて修飾されてもよい。例えば、該分子をポリマー（PEG、アルブミン）に結合させてもよく、親油性置換基の添加、又は化学的反応性基の添加によって修飾してもよい。また、天然起源のアミノ酸は、ペプチド模倣薬又はアミノ酸類似体によって取り換えられてもよく、及び/又は環状ポリペプチドが生成してもよい。

【0055】

< 医薬組成物及び方法 >

20

本発明は、前記定義された活性化ニューロテンシン分子と、医薬的に許容される1つ又はそれ以上の賦形剤とからなる医薬組成物に関する。

【0056】

活性化ニューロテンシンは、医薬的に許容されるいずれかの塩の形態で用いることができる。「医薬的に許容される塩」という表現は、限定されるものではないが、例えば、医薬的に許容される塩基又は酸付加塩、水和物、エステル、溶媒和物、前駆体、代謝物、もしくは立体異性体を示す。

【0057】

「医薬的に許容される塩」という表現は、好ましくは、遊離塩基と適した有機又は無機酸とを反応させることによって一般に調製することができる非毒性塩を示す。これらの塩は、遊離塩基の生物学的効力及び特性を保持する。このような塩の代表例には、水溶性及び水不溶性塩、例えば、酢酸塩、N-メチルグルカミンアンモニウム、アムソナート（4,4-ジアミノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸塩）、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、重硫酸塩、重酒石酸塩、ホウ酸塩、臭化水素酸塩、臭化物、酪酸塩、カンシラート、炭酸塩、塩酸塩、塩化物、クエン酸塩、クラブラン酸塩、ジクロロヒドレート、ニリン酸塩、エデト酸塩、エデト酸カルシウム、エジシラート、エストラート、エシラート、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニル酸塩、ヘキサフルオロリン酸塩、ヘキシルレゾルシン酸塩、ヒドラバミン、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨージド、イソチオン酸塩、乳酸塩、ラクトピオン酸塩、ラウリン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシラート、メチルプロミド、メチル硝酸塩、メチル硫酸塩、ムカート、ナプシル酸塩、硝酸塩、3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩（1,1-メチレン-ビス-2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸塩又はエンボン酸塩）、パントテン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ポリガラクツロン酸塩、プロピオン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、スルホサリチル酸塩、スラマート、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクル酸塩、トシラート、トリエチオジド、トリフルオロ酢酸塩、及び吉草酸塩が含まれる。

30

40

【0058】

本発明はまた、前記定義した核酸、ベクター、又は宿主細胞と、医薬的に許容される1つ又はそれ以上の賦形剤とからなる医薬組成物に関する。

50

## 【0059】

本発明の組成物は、例えば希釈剤、固体キャリアー、安定剤、防腐剤、界面活性剤等の医薬産業で古くから用いられている賦形剤から選ばれた医薬的に許容される賦形剤を含むことが有益である。該組成物は、固体、半固体、又は液体の形態で処方され得る。

## 【0060】

液体組成物が好ましい。このような液体、特に注入可能なものは、例えば、医薬的に許容される溶媒、例えば、水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノール、オイル、及びこれらの類似体に、活性化ニューロテンシン分子を溶解又は分散させることによって調製することができる。

## 【0061】

錠剤、ピル、粉末、又は顆粒等の固体組成物について、活性物質は、  
 a) 希釈剤、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロース、及び/又はグリシン；  
 b) 滑沢剤、例えば、シリカ、タルク、ステアリン酸、そのマグネシウムもしくはカルシウム塩、及び/又はポリエチレングリコール；  
 c) 結合剤、例えば、ケイ酸マグネシウム及びケイ酸アルミニウム、デンプンペースト、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び/又はポリビニルピロリドン；  
 d) 崩壊剤、例えば、デンプン、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩、又は発泡性混合物；及び/又は  
 e) 吸着剤、色素、着香剤及び甘味料  
 と組み合わせることができる。賦形剤は、例えば、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、ショ糖、炭酸マグネシウム、及び医薬的特質の類似体である。

## 【0062】

坐薬等の半固体組成物について、賦形剤は、例えば、乳化剤又は油性懸濁剤、もしくは、ポリプロピレングリコール等のポリアルキレングリコール基剤である。

## 【0063】

本発明で好適に用いられるさらなる賦形剤は、国際公開番号WO2012/090070号公報又は米国特許公開2012/0172454号明細書に記載の化合物である。

## 【0064】

本発明はまた、前記定義された組成物と薬剤配送デバイス又はマニュアルとを含むコンテナからなるキットに関する。該薬剤配送デバイスは、好ましくはシリンジである。

## 【0065】

本発明の組成物は、特に限定がないが、例えば、非経口、経口、直腸内、局所、又は鼻腔内経路等のいずれかの適した経路によって投与することができる。

## 【0066】

非経口投与は、例えば、腹腔内、皮下、静脈内、眼内、又は筋肉内注射等の注入によって、任意に延長又は遅延放出、もしくは徐放を伴って行えばよい。経口投与（又はper os）は、例えば、コーティング錠又は素錠、ゼラチンカプセル、粉末、ペレット、懸濁液、もしくは経口溶液の形態（1つのこのような経口投与形態は、即時放出を伴う場合もあり、延長又は遅延放出、もしくは徐放を伴ってもよい）を用いて行えばよい。直腸内経路は、例えば、坐剤の形態を用いて行えばよい。さらなる経路には、例えばパッチ、ボマード又はゲルの形態での局所経路、特に経皮経路、例えばエアロゾル及びスプレー形態での鼻腔内経路、経舌経路、眼内経路、もしくは腹腔内経路が含まれる。

## 【0067】

前記医薬組成物は、典型的には、有効量の本発明の活性化ニューロテンシンを含む。本明細書に記載の「治療有効量」は、所定の条件及び投与スケジュールについて治療効果をもたらす用量を示す。典型的には、それは、疾病又は病的状態に伴う症状の一部の改善に責任があるか、もしくは貢献すると期待された生化学的効果が明確に達成されるように投

10

20

30

40

50

与する際の、活性物質の平均用量である。例えば、CNSの障害又は異常を治療する際、前記疾患又は異常の原因もしくは症状の1つを減少させる、予防する、遅延させる、排除する又は停止させる用量は、治療に有効である。活性物質の「治療有効量」は、必ずしも疾患又は異常を治癒するとは限らないが、この疾患又は異常の発現が遅延される、妨げられる又は予防される、もしくはその症状が減弱される、もしくはその期間が変更される又は例えばあまり重症でなくなる、もしくは患者の回復が加速されるように、この疾患又は異常への治療が行われる。

【0068】

特に人間に対する「治療有効量」は、患者の年齢、体重、全体的な健康状態、性別、及び/又は食事だけでなく、活性物質の活性/効力、その投与時間、その投与経路、その排出率及びその代謝、並びに予防又は治療に基づいて処置された疾患（又は異常）の重症度を含む種々の要因に依存していると考えられる。このように、有効量は熟練の技術者によって調整される。しかしながら、一般に、有効量（ニューロテンシンに対するモル当量で表される）は、0.001mg/kgと10mg/kgとの間、より好ましくは0.002mg/kgと5mg/kgとの間である。有効量の適した範囲は、0.01mg/kgと2mg/kgとの間である。このような用量範囲は、特に非経口注入、なかでも静脈内注射（急速）に適している。

10

【0069】

本発明の分子及び組成物は、哺乳動物における薬理的低体温を誘発するために、及び低体温から恩恵を受けることができるいずれかの疾患又は病状を処置するために用いられる。

20

【0070】

本発明は、特に、全体的な、局所的な、及び新生児のCNS虚血、CNS外傷、心臓手術、疼痛、並びに高熱に関連したCNS疾患を処置するのに適している。より特別に、本発明は、心停止、卒中、新生児虚血、痙攣、深刻な外傷性頭部及び脊髄損傷、心臓手術によって対象のCNSにおいて起こる興奮毒性神経細胞損傷及び神経炎症を、予防又は軽減又は最少化すること、ICH、敗血症、もしくは発熱に関連した何らかのウィルス、細菌又は寄生虫感染による高熱を軽減すること、並びに、疼痛を軽減することに適している。

【0071】

本発明の目的の1つは、哺乳動物対象における低体温を誘発するための、及び/又は、脳損傷を有する対象を処置するための、前記定義された化合物又は組成物の使用を提供することである。

30

【0072】

本発明のさらなる態様は、哺乳動物対象において低体温を誘発する方法に関するものであり、該方法は、前記定義された化合物又は組成物を、該対象に全身投与することからなる。

【0073】

本発明のさらなる態様は、哺乳動物対象において体温を低下させる方法に関するものであり、該方法は、前記定義された化合物又は組成物を、該対象に全身投与することからなる。

40

【0074】

本発明のさらなる目的は、脳損傷を有する対象を処置する方法を提供することであり、該方法は、前記定義された化合物又は組成物を、該対象に全身投与することからなる。

【0075】

本発明のさらなる目的は、対象における疼痛を軽減する方法を提供することであり、該方法は、前記定義された化合物又は組成物を、該対象に全身投与することからなる。

【0076】

本発明のさらなる目的は、対象における痙攣を軽減する方法を提供することであり、該方法は、前記定義された化合物又は組成物を、該対象に全身投与することからなる。

【0077】

50

本発明は、ヒト患者等のいずれかの哺乳動物対象における脳損傷の影響を処置（例えば、保護、予防、又は低減）するために使用されてもよい。本発明は、特に、突然の心停止後の、卒中、新生児虚血、痙攣を有する、深刻な外傷性頭部及び脊髄損傷後の、心臓手術中の対象を処置し、ICH、敗血症、もしくは発熱に関連した何らかのウィルス、細菌又は寄生虫感染による高熱を軽減するのに適している。

【0078】

「処置」、「処置すること」、「処置する」という用語、並びに他の同様の表現は、例えば体温の低下といった薬理及び／又は生理的効果、並びに、患者の病状へのいずれかの間接的で有益な効果を達成することを示す。この効果は、病人における疾患又は症状の悪化、又は健常対象におけるその伝播を、完全にもしくはある程度予防するための、予防的効果もしくは予防効果となること、及び／又は、疾患及び／又はそれに関連した有害作用を、完全にもしくはある程度処置するための治療的効果となること、が可能である。本明細書に用いる用語「処置」は、哺乳動物、特にヒト対象における疾患のいずれかの処置を包含し、

(a) 疾患の予防、もしくは、この病態又は障害の素因を有するが未だ陽性診断を受けていない人間において生じ得る状態の予防、

(b) 例えばその進行を止めることによる、疾患の遅速、もしくは

(c) 例えば疾患に伴う症状を低減させることによる、疾患からの解放

を含む。「処置」という用語はまた、個体または患者における状態を介護、治癒、解放、改善、軽減又は抑制するための活性物質のいずれかの投与を含む。

【0079】

本発明はまた、対象の体温を低下させる方法に関するものであり、該方法は、それを必要とする対象に、前記定義された化合物又は組成物を、該対象の体温を低下させるのに十分な量で投与することからなる。該対象は、例えば、突然の心停止、卒中、新生児虚血、脳又は脊髄損傷、痙攣、高熱等を患っているか、又は最近患っていた状態でもよく、心臓手術を受けていてもよく、神経保護を必要としていてもよい。

【0080】

本発明のさらなる態様及び利点は、以下の実施例を考慮することによって明らかになるであろう。これらの実施例は、実際は単なる例示であり、本出願の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0081】

<実施例1>

NT-Lys6による活性化NT(1-13)-AG薬剤の合成

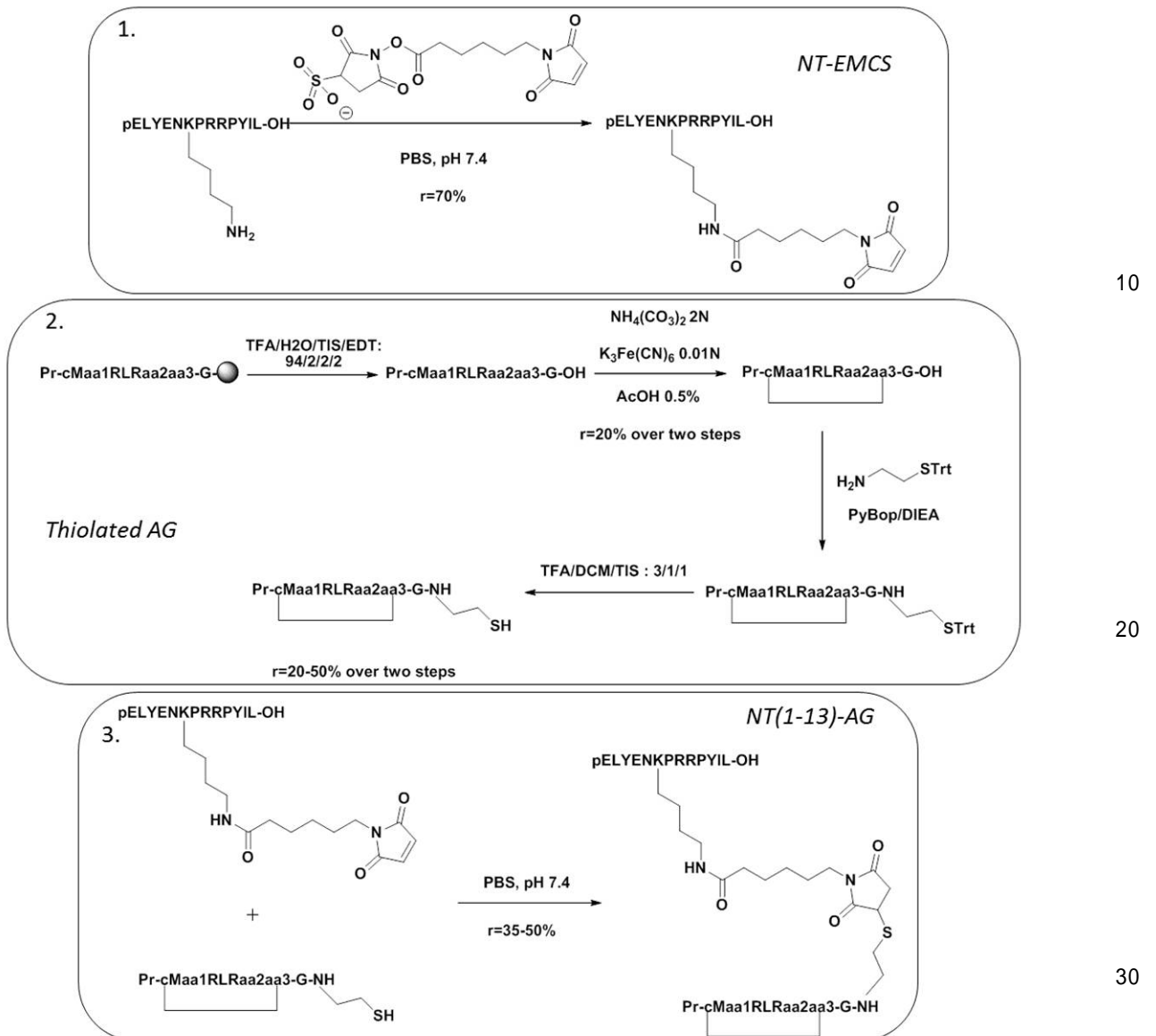
第1ステップにおいて、完全サイズのニューロテンシン：pELYENKPRRPYL-OH(NT)を、本発明者らが開発した種々の活性化基(AG)にカップリングさせた。目的は、AG/NTの最適な組み合わせを選択することであった。このような分子を合成するために、ニューロテンシン配列中のリシン6側鎖のアミン反応性を利用した。市販のスルホ-EMCS(N-マレイミドカプロイル-オキシスルホコハク酸イミドエステル)を、そのコハク酸イミドエステル部位を介してリシン6にカップリングさせた。精製後、官能化ニューロテンシン(NT-EMCS)を、異なるチオール化AGにコンジュゲートした。

【0082】

したがって、最終的に所望のコンジュゲートを達成するために、3つのステップ(2つの官能化成分、NT-EMCS及びチオール化AG、の合成、並びにこれらの結合)を行った。これらのステップを以下に図示する。

【0083】

## 【化1】



## 【0084】

(分析及び精製方法)

反応の進行及び精製のモニタリングは、C18 Kinetex (商標) カラム (5  $\mu\text{m}$ 、150 mm  $\times$  4.6 mm) を備えた Dionex Ultimate (登録商標) 3000 システムにて行った。検出は 214 nm で行った。溶出系は、 $\text{H}_2\text{O} / 0.1\% \text{TFA}$  (溶液 A) 及び  $\text{MeCN} / 0.1\% \text{TFA}$  (溶液 B) であった。流速は、4 分間で溶液 B を 0 ~ 100% の濃度勾配として、2 mL / min であった。

## 【0085】

粗生成物を、C18 Luna (商標) カラム (5  $\mu\text{m}$ 、100 mm  $\times$  21.2 mm) を備えた Dionex Ultimate (登録商標) 3000 システムの RP-HPLC にて精製した。検出は 214 nm で行った。溶出系は、 $\text{H}_2\text{O} / 0.1\% \text{TFA}$  (溶液 A) 及び  $\text{MeCN} / 0.1\% \text{TFA}$  (溶液 B) であった。流速は 20 mL / min であった。

## 【0086】

## 1. NT-EMCS の合成

完全サイズの NT を Biochem AG 社から購入し、スルホ-EMCS (N-マレイミドカプロイル-オキシスルホコハク酸イミドエステル) を Thermo Scientific 社 (Pierce Biotechnology) から購入した。

10

20

30

40

50

## 【0087】

スルホ - E M C S の溶液 ( 9 . 2 m g 、 1 5  $\mu$  m o l 、 1 m L の P B S ( 4 倍 ) に お い て 1 当 量 、 p H = 7 . 4 ) を 、 N T の 溶 液 ( 2 5 m g 、 1 5  $\mu$  m o l 、 1 . 2 5 m L の P B S ( 4 倍 ) に お い て 1 当 量 、 p H = 7 . 4 ) に 加 え 、 官 能 化 N T - E M C S を 調 製 し た 。 反 応 混 合 物 を 室 温 で 攪 拌 し た 。 反 応 の モ ニ タ リ ン グ は 、 分 析 R P - H P L C で 行 っ た 。 一 晩 攪 拌 し た 後 、 3 0 分 間 で 溶 液 B を 2 1 ~ 3 0 % の 濃 度 勾 配 と し て 、 粗 混 合 物 を 調 製 R P - H P L C で 精 製 し た 。 純 度 9 5 % を 超 え る フ ラ ク シ ョ ン を 回 収 し 、 凍 結 乾 燥 し て 、 精 製 白 色 粉 末 を 得 た ( m = 2 1 m g 、 収 量 = 7 5 % 、 純 度 > 9 5 % ) 。 質 量 を 、 M A L D I - T O F M S 分 析 で 確 認 し た ( m / z [ M + H ] <sup>+</sup> 、 計 算 値 = 1 8 6 5 . 9 8 、 実 測 値 = 1 8 6 5 . 9 7 ) 。

10

## 【0088】

2 . チ オ ー ル 化 A G の 合 成

官 能 化 N T の マ レ イ ミ ド 部 位 へ の A G コ ン ジ ュ ゲ ー ト の た め に 、 チ オ ー ル 反 応 基 を 、 候 補 A G 各 々 に 導 入 し た 。

## 【0089】

( ペ プ チ ド : P r - c M a a 1 R L R a a 2 a a 3 - G - O H の 合 成 )

ペ プ チ ド 固 相 合 成 ( S P P S ) 法 に よ り 、 L i b e r t y ( 商 標 ) ( C E M ) マ イ ク ロ 波 シ ン セ サ イ ザ ー で 、 F m o c / t B u ス トラテジーと、I r i s B i o t e c h 社 から 購 入 し た F m o c - G l y - W a n g 樹 脂 ( 1 0 0 ~ 2 0 0 メ ッ シ ュ 、 1 % D V B 、 ロ ー デ ィ ン グ 0 . 7 m m o l / g ) と を 用 い て 、 ペ プ チ ド : P r - c M a a 1 R L R a a 2 a a 3 - G - O H を 合 成 し た 。 こ の よ う な 樹 脂 に よ っ て 、 そ の 側 鎖 及 び C 末 端 に お い て 完 全 に 脱 保 護 さ れ て い る ペ プ チ ド が 合 成 さ れ る 。

20

## 【0090】

N - - F m o c - 保 護 ア ミ ノ 酸 を 、 標 準 的 な 直 交 側 鎖 保 護 で 選 択 し た 。 該 N - - F m o c - 保 護 ア ミ ノ 酸 は 、 F m o c - C y s ( T r t ) - O H ( D 型 又 は L 型 ) 、 F m o c - P e n ( T r t ) - O H ( D 型 又 は L 型 ) 、 F m o c - M e t - O H 、 F m o c - P r o - O H 、 F m o c - P i p - O H 、 F m o c - T h z - O H 、 F m o c - A r g ( P b f ) - O H 、 F m o c - L e u - O H 、 F m o c - G l y - O H 、 及 び F m o c - S a r - O H で あ る 。 こ れ ら は 全 て 、 I r i s B i o t e c h から 購 入 し た 。 ピ ペ リ ジ ン 、 ト リ フ ル オ ロ 酢 酸 ( T F A ) 、 ジ イ ソ プ ロ ピ ル エ チ ル ア ミ ン ( D I E A ) 、 エ タ ン ジ チ オ ー ル ( E D T ) 、 ト リ イ ソ プ ロ ピ ル シ ラ ン ( T I S ) 、 2 - ( 1 H - ベ ン ゴ ト リ ア ザ ー ル - 1 - イ ル ) - 1 , 1 , 3 , 3 - テ ト ラ メ チ ル ウ ロ ニ ウ ム ヘ キ サ フ ル オ ロ ホ ス フ ェ ー ト ( H B T U ) 、 及 び 1 - [ ビ ス ( ジ メ チ ル ア ミ ノ ) メ チ レ ン ] - 1 H - 1 , 2 , 3 - ト リ ア ザ ー ル [ 4 , 5 - ] ピ リ ジ ニ ウ ム - 3 - オ キ シ ド ヘ キ サ フ ル オ ロ ホ ス フ ェ ー ト ( H A T U ) も 同 様 に 、 I r i s B i o t e c h から 購 入 し た 。 ジ メ チ ル ホ ル ム ア ミ ド ( D M F ) 、 ジ ク ロ ロ メ タ ン ( D C M ) 及 び プ ロ ピ オ ン 酸 無 水 物 ( P r <sub>2</sub> O ) は 、 S i g m a - A l d r i c h から 購 入 し た 。

30

## 【0091】

a a / D I E A / H B T U = 4 / 4 / 8 ( 当 量 、 樹 脂 に 対 し て ) を 0 . 2 5 m m o l ス ケ ー ル 合 成 で 、 及 び 、 a a / D I E A / H B T U = 5 / 5 / 1 0 ( 当 量 、 樹 脂 に 対 し て ) を 0 . 1 m m o l ス ケ ー ル 合 成 で 用 い 、 n + 1 ア ミ ノ 酸 の 酸 官 能 の マ イ ク ロ 波 活 性 化 に よ っ て 、 ア ミ ノ 酸 を カ ッ プ リ ン グ さ せ た 。 カ ッ プ リ ン グ 時 間 は 1 0 分 間 に 調 整 し た 。 a a 1 導 入 後 の メ チ オ ニ ン 及 び シ ス テ イ ン の 組 み 込 み に は 、 ダ ブ ル カ ッ プ リ ン グ が 必 要 で あ っ た 。 こ の よ う に カ ッ プ リ ン グ さ れ た 新 規 ア ミ ノ 酸 の F m o c 基 の 脱 保 護 は 、 2 0 % ピ ペ リ ジ ン の D M F 溶 液 を 用 い て 行 っ た 。 ペ プ チ ド 伸 長 の 間 に カ ッ プ リ ン グ さ れ た 最 終 ア ミ ノ 酸 を 、 5 0 % プ ロ ピ オ ン 酸 無 水 物 又 は 酢 酸 無 水 物 の D C M 溶 液 を 用 い て 、 プ ロ ピ オ ニ ル 化 又 は ア セ チ ル 化 し た 。 N 末 端 カ ッ プ リ ン グ の 目 的 は 、 合 成 し た ネ オ ペ プ チ ド を 安 定 化 さ せ る こ と で あ り 、 ま た 、 例 え ば C 末 端 位 置 で の 共 有 結 合 の 間 の 二 次 反 応 の リ ス ク を 軽 減 す る こ と で あ る 。 ト リ チ ウ ム 標 識 し た プ ロ ピ オ ニ ル コ ハ ク 酸 イ ミ ド エ ス テ ル を 用 い て N 末 端 ア ミ ノ 基 で 時 折 標 識 さ れ て い る 、 い く つ か の 放 射 能 標 識 ペ プ チ ド の も の と 似 た N 末 端 化 学 構 造 を

40

50

維持するために、アセチル部位よりもプロピオニル部位を選んだ。それから、TFA/TIS/H<sub>2</sub>O/EDT = 94/2/2/2の溶液を用い、少なくとも2時間に渡って室温(RT)で、樹脂結合ペプチドを切断した。樹脂1gにつき、最少15mLの切断溶液を用いた。次いで、粗ペプチドを、氷冷エーテルを用いて沈殿させ、3000rpmで8分間遠心分離し、H<sub>2</sub>O/0.1%TFA中で凍結乾燥させた。得られた白色固体を、さらなる精製なしで次のステップに供した。

【0092】

(ペプチド: Pr - c M a a 1 R L R a a 2 a a 3 - G - O Hの環化)

2つの適した保護CysもしくはPen(L型又はD型)の2つのチオール官能からの分子内環化により、ジスルフィド架橋が得られた。AcOH、K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]、及び炭酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich社から購入した。粗Pr - c M a a 1 R L R a a 2 a a 3 - G - O Hペプチドを、0.5%AcOHに溶解させ、0.5mg/mLの最終濃縮物を得た。炭酸アンモニウム(2N)をペプチド溶液に添加し、塩基性pH8~9に到達させた。次いで、K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>](0.01N)を、明るい持続的な黄色となるまで反応混合物に添加した。反応のモニタリングは、分析RP - HPLCにて行った。通常、反応は30分未満で定量的であった。反応混合物を0.45µmの膜で濾過し、調製RP - HPLCで精製した。純度95%を超えるフラクションを回収し、凍結乾燥して、精製白色粉末を得た(最終純度 > 95%)。詳細な濃度勾配、収量、及び質量分析を以下の表に示す。

【0093】

【表5】

ペプチド	濃度勾配 (30分間での 溶液B(%))	収量(%)	質量 (厳密値/実測値)
配列番号8	14~24	12	1032.40/1032.42
配列番号9	14~20	15	1074.49/1074.50
配列番号10	15~25	20	1092.47/1092.47
配列番号11	18~24	25	1101.52/1101.54

【0094】

(環化Pr - c M a a 1 R L R a a 2 a a 3 - G - O Hペプチド上でのシステアミンカップリング)

2 - トリチルチオ - 1 - エチルアミンヒドロクロリド(Trt - システアミン)はIris Biotech社から購入した。他の成分は前記のとおりである。Trt - システアミン(2当量)、DIEA(4当量)、及び遊離C末端(1当量)を含む環化ペプチドの溶液を、無水DMF(ペプチドに対して0.05M)中で調製した。PyBop(0.13Mの無水DMFにおいて1.1当量)を最終的に混合物に添加した。出発ペプチドの完全な消失が示された2分後、HPLCモニタリングと程なくして、反応の完了に到達した。DMFを真空下で蒸発させ、薄黄色油を得た。トリチルチオール保護を除去するために、DCM/TIS/TFA = 3/1/1の溶液を添加した(出発ペプチドの約0.5mL/mg)。反応混合物を室温で攪拌した。反応のモニタリングは、分析RP - HPLCにて行った。次いで、不活性ガスバブリングを用いてDCM及びTFAを蒸発させ、Et<sub>2</sub>Oにより粗ペプチド沈殿物を得た。3000rpmで8分間遠心分離した後、粗ペプチドをH<sub>2</sub>O/0.1%TFA中で凍結乾燥させ、調製RP - HPLCで精製した。純度95%を超えるフラクションを回収し、凍結乾燥して、精製白色粉末を得た(最終純度 > 95%)。詳細な濃度勾配、収量、及び質量分析を以下の表に示す。

【 0 0 9 5 】

【表 6】

ペプチド	濃度勾配 (30分間での 溶液 B(%))	収量 (%)	質量 (厳密値/実測値)
配列番号 8-G-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	12~22	66	1091.40/1091.44
配列番号 9-G-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	19~29	43	1133.51/1133.54
配列番号 10-G-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	20~30	56	1152.47/1152.63
配列番号 11-G-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	19~27	58	1161.54/1161.56

10

【 0 0 9 6 】

### 3. チオール化 AG への NT - EMCS コンジュゲートによる NT ( 1 - 1 3 ) - AG の合成

チオール反応基を含む AG を PBS ( 1 倍、1 当量、0.003 M、pH 7.4 ) 中で可溶化させ、NT - EMCS ( 1 当量 ) に添加した。反応混合物を室温で攪拌した。NT - EMCS の可溶化は通常の超音波により進行した。反応のモニタリングは、分析 RP - HPLC にて行った。反応が完了した後、粗生成物を調製 RP - HPLC にて精製した。純度 95% を超えるフラクションを回収し、凍結乾燥して、精製白色粉末を得た ( 最終純度 > 95% )。詳細な濃度勾配、収量、及び質量分析を以下の表に示す。

20

【 0 0 9 7 】

【表 7】

分子	化合物	濃度勾配 (30分間での 溶液 B(%))	収量 (%)	質量 (厳密値/実測値)
NT-配列番号 8	I	18~27	39	2958.52/2958.45
NT-配列番号 9	II	21~31	40	2998.50/2998.57
NT-配列番号 10	III	20~30	40	3016.45/3016.62
NT-配列番号 11	IV	21~32	39	3026.53/3026.59

30

【 0 0 9 8 】

&lt; 実施例 2 &gt;

### インビトロでの本発明の活性化 NT 薬剤の結合親和性

ニューロテンシンの主要な低体温効果は、NTR - 1 レセプターの活性化によって介在される。低体温効果等の生物活性を引き起こすために、ニューロテンシンコンジュゲートは、少なくとも生来のニューロテンシンのそれに似た親和性で NTR - 1 を結合するべきであり、これがすなわち、NT ( 1 - 1 3 ) である。

40

【 0 0 9 9 】

ニューロテンシンコンジュゲートの結合親和性を、ヒト及びラット双方のニューロテンシンレセプタータイプ 1 ( hNTR - 1、rNTR - 1 ) での競合結合アッセイを用いて評価した。hNTR - 1 用の強化細胞膜は、Perkin Elmer 社から購入した。ラット NTR - 1 は、HEK 293 細胞をラット NTSR 1 プラスミドコンストラクト ( Origene 社製 ( ロックビル、アメリカ ) ) に導入することによって得られた。

【 0 1 0 0 】

hNTR - 1 での活性化 NT 薬剤の結合親和性は、メーカー ( Perkin Elme

50

r社)の指示を僅かに変更してなされた。詳細には、安定してヒトNTR-1を発現するCHO細胞から調製された膜ホモジネートを用いて、最終濃度0.5 µg/wellで、及び濃度3 nMの放射性リガンド [<sup>3</sup>H]-ニューロテンシン(比放射能99.8 Ci·mmol<sup>-1</sup>、Perkin-Elmer社製)で、NTR-1結合を測定した。放射性リガンドの特異結合を、0.81 nMのK<sub>D</sub>値と、膜たんぱく質1 mgあたり34 pmolのB<sub>max</sub>とで判定した。5 µMのニューロテンシンの存在下、非特異結合が判定された。

**【0101】**

ラットニューロテンシンレセプタータイプ1(rNTR1)でのアッセイは、rNTR-1を発現するHEK 293細胞からの膜ホモジネートを用いて、最終濃度0.75 µg/wellで行った。これらホモジネートでの放射性リガンドの特異結合を、0.93 nMのK<sub>D</sub>値と、膜たんぱく質1 mgあたり2.5 pmolのB<sub>max</sub>とで判定した。

10

**【0102】**

結合バッファー(50 mMのTris-HCl、pH 7.4、0.1% BSA)において、総反応容積100 µLの96ウェルプレートで、各アッセイを行った。続いてアッセイを室温で24時間インキュベートした。各ウェルの内容物を、MicroBeta Filter Mate-96 Harvester(Perkin-Elmer社製)を用いて、Unifilter(登録商標)-96、GF/C(登録商標)フィルター(Perkin-Elmer社製、25 µLの0.5%ポリエチレンイミンにて予浸)にて急速に濾過した。次いで、各ウェルを、洗浄バッファー(10 mMのTris-HCl、pH 7.2)で5回濯いだ。各乾燥フィルターの放射活性(cpm)を、25 µLのMicroScint(商標)-O(Perkin社製)を添加して測定し、TopCount NXT(商標) Microplate Scintillation and Luminescence Counter(Perkin-Elmer社製)を用いて定量化した。典型的に、特異結合は総結合の90%以上であった。投与-反応カーブを、KaleidaGraphを用いてプロットし、IC50値を決定した。アッセイは2回行った。チェン-プルソフ式を用いて、平均IC50値からK<sub>i</sub>値を決定した。

20

**【0103】**

【表 8】

化合物	式	NTR-1 結合親和性 Ki (nM)	
		ヒト NTR-1	ラット NTR-1
	NT (1-13)	0.82 ± 0.50	0.34 ± 0.08
	NT (8-13)	0.05 ± 0.01	0.12 ± 0.04
IX	配列番号 9-NT (8-13)	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.02
X	配列番号 9-GGG-NT (8-13)	0.13 ± 0.07	決定されず
XIV	配列番号 9-PEG6-NT (8-13)	0.22 ± 0.06	1.06 ± 0.47
XV	[Tle12]NT (8-13)	0.20 ± 0.10	0.43 ± 0.12
	配列番号 9-[Tle12]NT (8-13)	0.40 ± 0.20	0.06 ± 0.02
XVI	[Lys8, Tle12]NT (8-13)	0.22 ± 0.05	0.68 ± 0.59
	配列番号 9-[Lys8, Tle12]NT (8-13)	0.15 ± 0.06	0.12 ± 0.06
XVII	[Lys9, Tle12]NT (8-13)	1.70 ± 0.40	4.20 ± 1.60
	配列番号 9-[Lys9, Tle12]NT (8-13)	0.47 ± 0.19	0.19 ± 0.07
XVIII	[Trp11, Tle12]NT (8-13)	3.10 ± 1.50	0.85 ± 0.29
	配列番号 9-[Trp11, Tle12]NT (8-13)	2.98 ± 1.08	0.02 ± 0.01
XIX	[Lys8, Trp11, Tle12]NT (8-13)	13.80 ± 2.90	3.31 ± 1.26
	配列番号 9-[Lys8, Trp11, Tle12]NT (8-13)	6.34 ± 2.25	0.03 ± 0.02
XX	配列番号 11-[Lys8, Tle12]NT (8-13)	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.06

10

20

30

## 【 0 1 0 4 】

これらの結果から、本発明の活性化分子は、ナノモル範囲で又はそれよりも小さくとも、NTR-1に対する非常に高い親和性を維持していることが分かる。実際、大抵の場合、AGにより、NTR-1に対する異なるNT薬剤の親和性が大幅に増大した。コンジュゲートによって、どちらかと言えばレセプター結合を逆に妨げることが予期されるので、このような結果は、顕著で、かつ予期されないものである。

## 【 0 1 0 5 】

&lt;実施例 3&gt;

## インビボでの本発明の活性化NT薬剤の評価

ニューロテンシンの主要な薬理活性での本発明の活性化NT薬剤の薬効を、スイス(CD-1)マウスにおける低体温反応のモニタリングによって調べた(図1)。8mg/kgのNTを静脈内注射(急速)した後、マウスは、直腸体温において、注射後15分で基準から-1の最大効果という、僅かではあるが重要な低下を示した。この効果は24mg/kgで増大し、注射後30分で-2.6の最大効果に到達した。これに反して、8mg/kgモル当量の投与量(NTモル当量8mg/kg)で、化合物I(活性化基として配列番号8の配列を含む、本発明の活性化NT薬剤)を静脈内注射すると、注射後15分で重要な効果を示し、注射後30分から60分の間で-3.7の最大効果に到達するといった、急速かつ大きな体温の低下が誘発された。その後、注射後3時間以内で基準温度に戻るまで、この薬理低体温は次第に減少した。実験中、これらのマウスにおいて悪寒

40

50

は観察されなかった。

【0106】

化合物Iについての低投与レベルでの評価により、NTモル当量8mg/kgでのより強い効果はなく、NTモル当量0.5mg/kgの最少有効量(MED)、NTモル当量1.21mg/kgのED<sub>50</sub>、及びNTモル当量4mg/kgで観測された約-4の最大効果という、投与量依存低体温効果が示された(図2)。低投与レベルでの注射後15分から高投与レベルでの注射後30~60分へと投与レベルが高くなるにつれて、最大効果に到達する時間が増大した。8mg/kgのMEDを示すNT単独と比較したとき、この活性化NT薬剤は、主要な低体温効果において16倍の増大を示した。

【0107】

次いで、本発明に係る別の活性化基(AG)を試験した。NTモル当量0.5mg/kgの同じ投与レベルでの化合物Iと比較したとき、例えば、活性化基として配列番号9の配列又は配列番号11の配列を含む活性化NT薬剤、すなわち、化合物II(NT-配列番号9)及び化合物IV(NT-配列番号11)は、マウスにおいて、注射後30分で各々-4.1及び-3.4の最大効果という、より一層大きな低体温反応を引き起こした(図3)。化合物IIをさらなる調査に用いた。

【0108】

化合物IIの投与-反応関係性の評価により、NT単独の場合よりも80倍低い、NTモル当量0.1mg/kgのMED、及びNTモル当量1.25mg/kgのED<sub>50</sub>が示された(図4)。高投与レベルで、化合物IIは、注射後60分で、NTモル当量10mg/kgで-7の最大効果に到達するといった、より一層強い体温低下を引き起こした。この高投与レベルで、マウスは、低体温効果に適時に匹敵する、低減した自発運動活性を示したが、異種の刺激に対する十分な反応能力を維持していた。また、30前後の体温を示すマウスであっても、悪寒は観察されなかった。

【0109】

<実施例4>

本発明の活性化NT薬剤のBBB移送

本発明の活性化ニューロテンシン薬剤のBBB浸透性及びインビトロでの血液安定性を評価した。

【0110】

成体オスC57Bl/6マウスにおける原位置脳灌流技術(in situ brain perfusion technique)を用いて、本発明のコンジュゲートのBBB及び血液網膜関門(BRB)での移送運動を評価した。[3H]Tyr3-NTとAGとのカップリング又はトリチウム標識されたAGのNT分子へのカップリングにより、放射能標識された活性化NT化合物を得た。NTの放射能標識は、トリチウムガスを用いて、ヨードTyr3-NTを触媒脱ハロゲン化することによって行い、一方AGの放射能標識は、トリチウム標識されたプロピオニルコハク酸イミドエステルをAGのN末端にカップリングさせることによって行った。比放射能(SRA)は、典型的には、50Ci/mmolの範囲であった。各合成のための放射能の総量は、通常、100µCiと1000µCiとの間であった。

【0111】

動物において、通常の生理学的及び解剖学的状態のもとで、全身分布のかく乱因子なしで、脳の細胞及び血管新生を維持するために、原位置脳灌流技術によって、人工灌流液の組成の総合的な管理が可能となる。原位置脳灌流は、Dagenaisらによって、最初にラットにおいて開発され、マウスに適用された(Dagenais et al., 2000, J Cereb Blood Flow Metab., 20(2), 381-6)。これにより、目的のレセプター、酵素、もしくは異種の流入又は流出移送体について、遺伝子組み換え並びにKO変異マウスにおいて、BBB及びBRBを渡る化合物の移送運動が評価される。

【0112】

放射能標識された本発明の化合物の原位置脳灌流を、 $2 \text{ mL} / \text{min}$ の灌流液の流速で120秒間行った。初期移送を、移送係数 $K_{in}$ （試験化合物の分布容積（血管容積に換算）と脳灌流時間との関係）として表した。試験化合物の急性毒性がないゆえに、放射能標識されたスクロースと通常はBBBを渡らない化合物との共同灌流により、また、BBBの物理的な完全性の評価がなされた。

【0113】

文献に記載のデータと一致して、NTにより、脳における、 $\sim 0.4 \times 10^{-4} \text{ mL} / \text{s} / (\text{脳組織}) \text{ g}$ の $K_{in}$ 値という非常に低い初期移送が実証された。眼におけるNT移送はより一層低かった（図5、白色棒グラフ）。重要であるのは、放射能標識された本発明の活性化NT薬剤で得られた結果により、一致して、脳及び眼への非常に高い移送運動が示されたうえに、本発明の活性化基を備えたNTの活性により、これらの他の非浸透性器官への移送が特に強化されたことが実証されていることである。特に、化合物XIVは、脳において、 $\sim 3.65 \times 10^{-4} \text{ mL} / \text{s} / \text{g}$ の $K_{in}$ 値を示し、これは遊離NTと比較して9倍増であり、また、眼において、 $\sim 32.0 \times 10^{-4} \text{ mL} / \text{s} / \text{g}$ の $K_{in}$ 値を示した（図5、黒灰色棒グラフ）。さらに、スクロースの脳分布容積がコントロール値と似ているので、化合物Iにより、BBBの完全性は変わらなかった。

10

【0114】

<実施例5>

インビトロでの本発明の活性化NT薬剤の安定性

本発明の薬剤のインビトロでの血液安定性（半減期 $t_{1/2}$ ）を評価し、NT単独の場合と比較した。すなわち、スイス（CD-1）マウスの新鮮な採取血液において、 $2 \mu\text{M}$ の通常濃度で、各ペプチドを37℃で3時間以下インキュベートした。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分光（LC-MS/MS）分析法によって、数回の時点で、血漿蛋白分画において検体を定量化した。インビトロでの半減期（ $t_{1/2}$ ）を、各運動プロファイル（一時反応運動： $C(t) = C_0 e^{-k t}$ ）の対数回帰から推量し、 $t_{1/2} = \ln 2 / k$ とした。

20

【0115】

結果より、血漿分解に対して生来のNTは、インビトロでの半減期がほんの7分間という、非常に低い耐性を有することが確認された。これは、内因性ペプチド及び天然アミノ酸のみを含む通常の小さな線形ペプチドの急速な酵素タンパク質分解と一致する（Foltz et al., 2010, J. Nutr., Jan; 140(1): 117-8）。著しく対照的に、本発明の全ての活性化NT薬剤では、マウス血液における $t_{1/2}$ が大きく増長し、典型的には1時間を超えた。

30

【0116】

【表9】

試験分子	化合物	反応速度定数 k (h <sup>-1</sup> )	インビトロでの半減期 (分)
NT	—	5.779	7
NT-配列番号 8	I	0.813	51
NT-配列番号 11	IV	0.419	100

40

【0117】

纏めると、BBB移送運動、インビトロでの血液安定性、及び増強した中枢低体温効果により、本発明の活性化NT薬剤の、顕著で、かつ予期されない有益な効果の実証される。

【0118】

<実施例6>

NT(x-13)を基礎とする活性化ニューロテンシン分子の合成

50

実施例 1 ~ 5 において、配列番号 9 の配列が、完全サイズの NT の活性化において特に効果的であることが示された。これらの実施例及び後の実施例において、配列番号 9 の配列について、NT フラグメントに基づく効果的な活性化ニューロテンシン分子を生成する能力を試験した。

#### 【 0 1 1 9 】

数種の切断されたニューロテンシン類似体は、特にアミノ酸 8 - 1 3 に相当する最小配列が存在するとき、完全サイズの内因性ニューロペプチドと同様に効果的であることが、文献で報告されている。これに基づき、製造コストを最小限に抑え、NT の N 末端部位でタンデムコンジュゲートさせながら、さらに効果的な薬剤の生成を目的として、サイズを小さくした NT 類似体を用いて新規活性化 NT 薬剤を調製した。

10

#### 【 0 1 2 0 】

完全サイズのニューロテンシンからなるコンジュゲートのために採用されるいくつかのコンジュゲート方法 ( 実施例 1 参照 ) によって、3 つのニューロテンシンフラグメント : NT ( 2 - 1 3 ) ( ピログルタミン酸のみが欠損 ) ; NT ( 6 - 1 3 ) ( 最小活性配列からなる ) ; 及び L y s - NT ( 8 - 1 3 ) ( 最小活性配列からなり、さらに A G へのカップリングに用いられるリシン 6 を少なくとも含む ) に重点を置いて、コンジュゲートを合成した。分析及び精製は、実施例 1 と同様の方法で行った。

#### 【 0 1 2 1 】

##### 1 . NT ( x - 1 3 ) ペプチド合成

ペプチド固相合成 ( S P P S ) 法により、L i b e r t y ( 商標 ) ( C E M ) マイクロ波シンセサイザーで、F m o c / t B u ストラテジーを用いて、切断されたニューロテンシン類似体を合成した。アミノ酸カップリングは、手動でプレローディングした F m o c - L e u - W a n g 樹脂 ( 1 0 0 ~ 2 0 0 メッシュ、1 % D V B ) から行った。このような樹脂によって、その側鎖及び C 末端において完全に脱保護されているペプチドが合成される。

20

#### 【 0 1 2 2 】

W a n g 樹脂 ( ロードイング 0 . 2 m m o l / g ) は、I r i s B i o t e c h 社から購入した。その他の原料は、先に記載したとおりである。

#### 【 0 1 2 3 】

樹脂のプレローディングについて、F m o c - L e u - O H / H O B t / D I C ( 6 当量 / 6 当量 / 6 当量 ) の D M F ( 0 . 0 5 5 M 、アミノ酸に対して ) 溶液を樹脂に添加した。次いで、D M A P ( 1 当量 ) を添加した。一晚機械的に攪拌した後、樹脂を洗浄し、そのロードイングを評価した。通常のロードイングは、0 . 1 m m o l / g と 0 . 1 6 m m o l / g との間である。

30

#### 【 0 1 2 4 】

ペプチド伸長は、先に記載したとおりに行った。5 0 % 酢酸無水物の D C M 溶液を用いてペプチド N 末端をアセチル化し、内因性ペプチド中で発見されたペプチド結合を再現して、代謝安定性を向上させた。樹脂結合ペプチドを前記と同様にして切断し、R P - H P L C で精製した。純度 9 5 % を超えるフラクションを回収し、凍結乾燥して、精製白色粉末を得た ( 最終純度 > 9 5 % ) 。詳細な濃度勾配、収量、及び質量分析を以下に示す。

40

#### 【 0 1 2 5 】

【表 1 0】

ペプチド	濃度勾配 (30 分間での 溶液 B(%))	収量 (%)	質量 (厳密値/実測値)
NT(2-13)	19~29	決定されず	1603.89/1603.72
NT(6-13)	精製なし	決定されず	1084.66/1084.44
Lys-NT(8-13)	16~26	27	987.6/987.635

10

## 【 0 1 2 6 】

## 2. NT(x-13) - EMCS 合成

NT(x-13) 官能化を、実施例 1 に記載の完全サイズ NT と同様の方法で行った。生成したペプチドは、純度が少なくとも 95% の精製白色粉末であった。詳細な濃度勾配、収量、及び質量分析を以下に示す。

## 【 0 1 2 7 】

【表 1 1】

ペプチド	濃度勾配 (30 分間での 溶液 B(%))	収量 (%)	質量 (厳密値/実測値)
NT(2-13)-EMCS	30~40	51	1796.96/1796.39
NT(6-13)-EMCS	20~34	24	1277.51/1277.74
Lys-NT(8-13)-EMCS	17~27	20	1180.68/1180.67

20

## 【 0 1 2 8 】

## 3. チオール化配列番号 9 の合成

チオール化配列番号 9 を、実施例 1 に記載の方法で合成した。

## 【 0 1 2 9 】

## 4. コンジュゲート NT(x-13) - 配列番号 9 の合成

配列番号 9 の配列への NT(x-13) - EMCS のカップリングは、実施例 1 に記載の NT(1-13) - AG 合成と同じ方法で行った。生成したコンジュゲートは、純度が少なくとも 95% の精製白色粉末であった。詳細な濃度勾配、収量、及び質量分析を以下に示す。

## 【 0 1 3 0 】

【表 1 2】

ペプチド	化合物	濃度勾配 (30 分間での 溶液 B(%))	収量 (%)	質量 (厳密値/実測値)
NT(2-13)-配列番号 9	V	30~40	43	2929.47/2929.69
NT(6-13)-配列番号 9	VI	30~40	46	2410.24/2410.38
Lys-NT(8-13)-配列番号 9	VII	25~40	42	2313.19/2313.24

40

## 【 0 1 3 1 】

## &lt; 実施例 7 &gt;

## 本発明の活性化 NT(x-13) 薬剤の低体温反応

NT モル当量 0.5 mg / kg の同じ投与レベルで、各コンジュゲートをスイス (CD

50

- 1) マウスに静脈内注射(急速)し、活性化薬剤の低体温反応を評価した。

【0132】

全ての切断されたNTを基礎とする薬剤により、注射後30分で体温低下が最大約-2.5という、マウスにおいて同程度の低体温が引き起こされた(図7)。これらの結果より、最短C末端NT(8-13)フラグメントは、本発明の活性化薬剤と関連して強い生物活性を引き起こすのに充分であることが示される。

【0133】

<実施例8>

#### ジスルフィド架橋を用いた活性化NT薬剤コンジュゲートの合成

EMCSリンカー及びNT配列において天然に存在するか又は導入されるリシン残基を用いて、実施例1~4に記載の本発明の活性化NT薬剤コンジュゲートを合成した。新しくリンクしているストラテジーを評価する目的で、NT(8-13)及び配列番号9の配列を、ジスルフィド架橋を介してコンジュゲートした。このような切断可能なリンカーは、脳実質における十分に活性なNT(8-13)の放出を引き起こす可能性があるいくつかの細胞内区画の還元性環境(特にBBBの内皮細胞)において切断され得る一方、体循環において良好な安定性を示す。さらに、リンカーの変更により、別の潜在的に有益なPK、気質、及び代謝特性を備える新しい薬剤が齎される。

【0134】

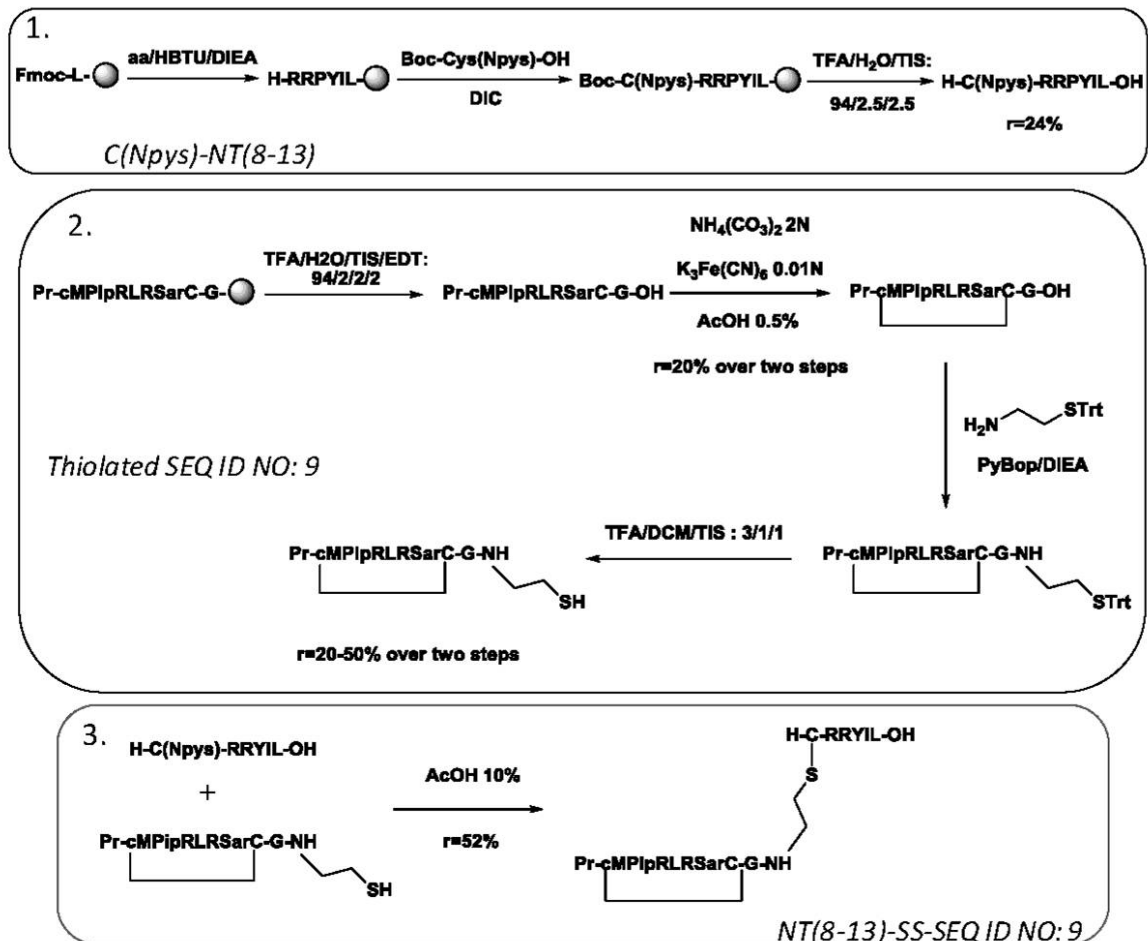
ジスルフィド架橋は、コンジュゲートされる両成分に天然に存在するか又は導入される2つのチオール基から形成される。本発明と関連して、コンジュゲートされる二成分は、遊離システインを提示せず、それゆえに2つのチオール官能は、AG及びNTに化学的に導入された。このために、チオール活性Npysによって保護されたシステイン残基は、NT(8-13)のN末端で導入された。Npys誘導体化Cysは、遊離チオールに対して特異的に反応性が高く、それゆえにヘテロジスルフィド架橋の形成を好む。NT-EMCSへのコンジュゲートと同様の方法にて、システアミンでのC末端官能化により、チオール化された配列番号9の配列を生成した。両成分を個々に製造した後、最終ステップで互いにコンジュゲートさせた。カップリングステップを以下に図示する。分析及び精製方法は実施例1に記載のとおりである。

【0135】

10

20

## 【化2】



10

20

## 【0136】

## 1. ペプチドC(Npys)-NT(8-13)の合成

Boc-Cys(Npys)-OH及びDIC(ジイソプロピルカルボジイミド)は、Iris Biotechから購入した。

30

## 【0137】

N末端を制限しなかったほかは実施例6と同様にして、H-NT(8-13)を調製した。Boc-Cys(Npys)-OH(5当量)及び無水DMF(0.33M)におけるDIC(5当量)の溶液を10分間室温で前活性化させ、樹脂に添加した。一晩機械的に攪拌した後、樹脂をDMF及びDCMで洗浄し、樹脂結合ペプチドを切断して、先の実施例と同様の方法で処置した。30分間で溶液Bを17~26%の濃度勾配として粗ペプチドを精製し、精製薄黄色粉末を得た( $m=25.9\text{mg}$ 、収量=24%、純度>95%)。質量を、MALDI-TOF MS分析で確認した( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>、計算値=1074.49、実測値=1074.47)。分析の間にMALDI-TOFにおいてNpys保護が切断されたとき、この基を有さない生成物も観察された( $M$ -Npys+H+H]<sup>+</sup>、計算値=920.51、実測値=920.475)。

40

## 【0138】

## 2. チオール化配列番号9の合成

チオール化配列番号9を、実施例1に記載の方法で製造した。

## 【0139】

## 3. 活性化NTコンジュゲートNT(8-13)-SS-配列番号9(化合物VII I)の合成

不活性雰囲気(0.02M)下、脱ガスした10%酢酸溶液にC(Npys)-NT(8-13)(1.3当量)を溶解させた。不活性雰囲気(0.015M)下、脱ガスした

50

10%酢酸溶液にチオール化された配列番号9の配列(1当量)を溶解させ、すぐにC(Npys)-NT(8-13)溶液に添加した。不活性雰囲気下、反応混合物を室温で攪拌した。反応のモニタリングは、分析RP-HPLCで行った。48時間攪拌後、反応混合物にC(Npys)-NT(8-13)(0.45当量)を再度添加した。反応の完了後、30分間で溶液Bを17~27%の濃度勾配として、粗混合物を調製RP-HPLCにて精製し、精製白色粉末を得た(m=7.8mg、収量=52%、純度>95%)。質量を、MALDI-TOF MS分析で確認した(m/z [M+H]<sup>+</sup>、計算値=2050.00、実測値=2051.08)。

【0140】

<実施例9>

NT(8-13)-SS-配列番号9活性化薬剤コンジュゲートの低体温反応

NTモル当量10mg/kgの投与レベルでスイス(CD-1)マウスに静脈内注射(急速)し、NT(8-13)-SS-配列番号9(化合物VII)の低体温反応を評価して、システアミン-EMCSリンカーを用いて得られた薬剤、すなわち化合物IIと比較した。

【0141】

化合物VIIは、化合物IIと同程度に、マウスにおいて有効な低体温を引き起こした。両化合物は、各々、注射後45分で体温低下が最大-5.8、及び注射後1時間で体温低下が最大-6.7という低体温を引き起こした(図8)。このように、ジスルフィドリンカーを用いたNT(8-13)のカップリングにより、NTを活性化するのに適した戦略が発見され、一方、脳毛細血管内皮細胞等の還元性環境において、NTがおそらく放出される。

【0142】

<実施例10>

タンデムAG-NT活性化薬剤の合成

NT及びAG成分を個々に調製し、官能化させ、次いでこれらをカップリングさせることにより、先の実施例で開示した活性化NT薬剤を合成した。本実施例において、タンデム合成及びSPPS適合スペーサーを用い、活性化NT薬剤の新シリーズを製造した。一方、ペプチド結合により、NT及びAG成分を直接カップリングさせた。これらの薬剤の合成は、タンデムにおいて2つのステップのみで行うことができる。2つのステップとは、支持体上でのペプチドの伸長、及びAGジスルフィド結合形成である。この戦略を用い、最適なNT(8-13)フラグメント及びその類似体に基づく活性化NT薬剤を、35%以下の全収量で調製した。さらに、タンデム合成により、AG成分とNTポリペプチドとの間のスペーサーとして、多数のリンカーの使用が可能となる。重要なのは、遊離カルボキシル末端は、NTレセプターへの結合のために必須であるので、NTポリペプチドは、コンジュゲートのC末端で導入されたことである。これらの中で、一般的なリンカーは、トリグリシン等のアミノ酸を基礎とするリンカーである。また、アミノヘキサン酸も選択された。この非天然アミノ酸は、ペプチドと他の成分との間の距離を増大させるために用いられる、一般的な疎水性リンカーである。最終的には、2つのPEGスペーサーがまた、コンジュゲートに、より親水性を付与し、それゆえにより水溶性かつ生物学的な耐性を付与するかを評価した。2つのPEG分子を試験し、その生物活性に対する、AGとNTポリペプチドとの間の距離の影響を評価した。薬剤コンジュゲートに導入された全てのリンカー/スペーサーにより、NTポリペプチドによるターゲット-レセプターの最適認識にとって重要な適応性が、薬剤に付与された。分析及び精製は、実施例1に記載の方法で行った。

【0143】

1. 配列番号9-NT(8-13)、配列番号9-GGG-NT(6-13)、配列番号9-Ahx-NT(6-13)、及び配列番号9-Ahx-NT(8-13)の合成

ペプチド固相合成(SPPS)法により、Liberty(商標)(CEM)マイクロ波シンセサイザーで、Fmoc/tBu戦略と、前記方法にて手動でプレローデ

10

20

30

40

50

ィングした Fmoc - Leu - Wang 樹脂 (100 ~ 200メッシュ、1% DVB、ローディング 0.09 mmol / g) とを用いて、化合物 IX (配列番号 9 - NT (8 - 13))、化合物 X (配列番号 9 - GGG - NT (6 - 13))、化合物 XI (配列番号 9 - Ahx - NT (6 - 13))、及び化合物 XII (配列番号 9 - Ahx - NT (8 - 13)) を合成した。

【0144】

Fmoc - Ahx - OH は、Iris Biotech から購入した。他の原料については、前記のとおりである。

【0145】

ペプチド伸長、切断、及び処置は、先の実施例に記載のものと同じ方法で行った。D - Cys、Met、及び NT - Arg 9 アミノ酸について、ダブルカップリングを行った。50% プロピオン酸無水物の DCM 溶液を用い、ペプチド N 末端をプロピオニル化した。30 分間で溶液 B を 15 ~ 25% の濃度勾配として、調製 RP - HPLC にて粗ペプチドである配列番号 9 - GGG - NT (6 - 13) を精製した。スパーサーなし (ペプチド結合のみ) か、又は Ahx スパーサーを含む粗ペプチドを、さらに精製することなく、次の環化ステップに用いた。

【0146】

実施例 1 で詳細に説明したものと同じプロトコルを用い、AG に含まれる 2 つのシステイン (1 及び 8 位) からの分子内環化により、ジスルフィド架橋を得た。白色粉末の精製薬剤を得た (最終純度 > 95%)。詳細な濃度勾配、収量、及び質量分析を以下に示す。

【0147】

【表 13】

ペプチド	化合物	濃度勾配 (30 分間での 溶液 B (%))	収量 (%)	質量 (厳密値/実測値)
配列番号 9-NT(8-13)	IX	18~28	7	1815.96/1815.92
配列番号 9-GGG-NT(6-13)	X	17~25	4	2212.17/2212.10
配列番号 9-Ahx-NT(6-13)	XI	19~28	4	2154.19/2154.11
配列番号 9-Ahx-NT(8-13)	XII	17~27	21	1929.04/1929.00

【0148】

2. 配列番号 9 - PEG 2 - NT (8 - 13) 及び配列番号 9 - PEG 6 - NT (8 - 13) の合成

PEG スパーサーを手動で導入した以外は、ペプチド固相合成 (SPPS) 法により、Liberty (商標) (CEM) マイクロ波シンセサイザーで、化合物 XIIII (配列番号 9 - PEG 2 - NT (8 - 13)) 及び化合物 XIV (配列番号 9 - PEG 6 - NT (8 - 13)) を合成した。Fmoc / tBu ストラテジーと、前記方法にて手動でプレローディングした Fmoc - Leu - Wang 樹脂 (100 ~ 200メッシュ、1% DVB、ローディング 0.09 mmol / g) とを用いた。

【0149】

Fmoc - 12 - アミノ - 4, 7, 10 - トリオキサドデカン酸 (Fmoc - PEG 2 - OH) 及び Fmoc - 21 - アミノ - 4, 7, 10, 13, 16, 19 - ヘキサオキサヘンエイコサン酸 (Fmoc - PEG 6 - OH) は、Poly Peptide Laboratories から購入した。他の原料については、前記のとおりである。

【0150】

ペプチド伸長は、先の記載と同じ方法で、Liberty (商標) マイクロ波シンセサイザーにて、PEG 導入まで、及びその手動導入後に行った。D - Cys、Met、及び

10

20

30

40

50

NT - Arg9アミノ酸について、ダブルカップリングを行った。手動カップリングとして、PEGアミノ酸(2当量)を、COMU(2当量)及び無水DMF(PEGに対して0.2M)におけるDIEA(4当量)にて、5分間前活性化させた。次いで、活性化PEGを樹脂に添加し、混合物を一晩、室温で機械的に攪拌した。50%プロピオン酸無水物のDCM溶液を用い、ペプチドN末端をプロピオニル化した。通常の切断及び処置の後、粗ペプチドを、さらに精製することなく、次の環化ステップに用いた。

## 【0151】

実施例1で説明したものと同一プロトコルを用い、AGに含まれる2つのシステイン(1及び8位)からの分子内環化により、ジスルフィド架橋を得た。白色粉末の精製コンジュゲートを得た(最終純度>95%)。詳細な濃度勾配、収量、及び質量分析を以下に示す。

## 【0152】

## 【表14】

ペプチド	化合物	濃度勾配 (30分間での 溶液B(%))	収量(%)	質量 (厳密値/実測値)
配列番号9-PEG2-NT(8-13)	XIII	21~31	35	1962.03/1961.25
配列番号9-PEG6-NT(8-13)	XIV	22~32	17	2151.15/2151.50

## 【0153】

3. 配列番号9-[Tle12]NT(8-13)、配列番号9-[Lys8, Tle12]NT(8-13)、配列番号9-[Lys9, Tle12]NT(8-13)、配列番号9-[Trp11, Tle12]NT(8-13)、配列番号9-[Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13)、及び配列番号11-[Lys8, Tle12]NT(8-13)の合成

ペプチド固相合成(SPPS)法により、Liberty(商標)(CEM)マイクロ波シンセサイザーで、化合物XV(配列番号9-[Tle12]NT(8-13))、化合物XVI(配列番号9-[Lys8, Tle12]NT(8-13))、化合物XVII(配列番号9-[Lys9, Tle12]NT(8-13))、化合物XVIII(配列番号9-[Trp11, Tle12]NT(8-13))、化合物XIX(配列番号9-[Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13))、及び化合物XX(配列番号11-[Lys8, Tle12]NT(8-13))を合成した。Fmoc/tBuストラテジーと、前記方法にて手動でプレローディングしたFmoc-Leu-Wang樹脂(100~200メッシュ、1%DVB、ローディング0.09mmol/g)を用いた。

## 【0154】

Fmoc-Lys-OH、Fmoc-Trp-OH、及びFmoc-Tle-OHは、Iris Biotechから購入した。他の原料については、前記のとおりである。

## 【0155】

ペプチド伸長、切断、及び処置は、先の実施例に記載のものと同じ方法で行った。D-Cys、Met、及びNT-Arg9アミノ酸について、ダブルカップリングを行った。50%プロピオン酸無水物のDCM溶液を用い、ペプチドN末端をプロピオニル化した。通常の切断及び処置の後、粗ペプチドを、さらに精製することなく、次の環化ステップに用いた。

## 【0156】

10

20

30

40

【表 15】

ペプチド	化合物	濃度勾配 (30 分間での 溶液 B(%))	収量 (%)	質量 (厳密値/実測値)
配列番号 9- [Tle12]NT (8-13)	XV	20~30	6	1815.96/1816.03
配列番号 9- [Lys8, Tle12]NT (8-13)	XVI	20~30	26	1787.95/1787.96
配列番号 9- [Lys9, Tle12]NT (8-13)	XVII	20~30	19	1787.95/1787.91
配列番号 9- [Trp11, Tle12]NT (8-13)	XVIII	23~33	5	1838.97/1838.94
配列番号 9- [Lys8, Trp11, Tle12]NT (8-13)	XIX	24~34	10	1810.97/1811.03
配列番号 11- [Lys8, Tle12]NT (8-13)	XX	20~30	22	1788.27/1786.95

10

20

## 【0157】

&lt;実施例 11&gt;

## タンデム A G - N T 活性化薬剤の低体温反応

タンデム合成手段を用いて得られた活性化 N T 薬剤の低体温効果を実証するために、各薬剤を、化合物 I I と同様に、N T モル当量 10 mg / kg の投与レベルでスイス (C D - 1) マウスに静脈内注射 (急速) し、注射後 3 時間に渡って直腸体温をモニタリングした。

## 【0158】

試験した全ての薬剤は、マウスにおいて有効な同程度の低体温反応を引き起こした。全ての薬剤は、注射後 60 分で約 - 6 / - 7 に到達し、同じように体温及び動態が最も低下した (図 9)。

30

## 【0159】

化合物 X I V は、注射後 60 分で - 6 . 7 に到達し、この投与レベルで大きな低体温効果を示す一方、最も良好な耐性プロファイルを示した。化合物 X I V の E D<sub>50</sub> は、N T モル当量 1 . 53 mg / kg であり、これは、化合物 I 及び化合物 I I についての測定値と似ている。化合物 I と比較すると、化合物 X I V は、脳及び眼における K<sub>i n</sub> が、各々 3 . 65 × 10<sup>-4</sup> mL / s / g 及び 3 . 30 × 10<sup>-4</sup> mL / s / g と増大しており (図 5、黒色棒グラフ)、高い血液安定性を示し、推定半減期が 96 分であった (図 6)。N T モル当量 20 mg / kg でマウスに注射したとき、化合物 X I V は、さらなる安全性の懸念なしで、まだ十分に耐性があった。この投与レベルで、さらなる体温の低下は観察されず、N T モル当量 10 mg / kg で薬理的な低体温反応の飽和状態であることが示された。最大耐量 (M T D) は N T モル当量 40 mg / kg であり、L D<sub>50</sub> (致死量、50%) には到達しなかった (> N T モル当量 40 mg / kg)。M E D は、N T モル当量約 0 . 1 mg / kg であり、この薬力学 / 毒性プロファイルは、

40

i) それは、激化した薬理的な低体温による潜在的致死過量投与を阻止する、かつ、  
ii) 静脈内 (急速) 投与モードを用い、M E D と M T D との間の増加倍率として表される治療ウィンドウが、最大低体温反応を誘発する投与レベルと軽度 / 無致死毒性を引き起こす投与レベルとの間が 4 倍の安全保障で、約 400 である  
ので、優れた安全性の前提条件を構成する。

## 【0160】

50

## &lt; 実施例 1 2 &gt;

置換 NT からなる タンデム 活性化薬剤の 低体温 反応

タンデム合成手段を用いて得られた NT ( 8 - 1 3 ) の置換体を含む活性化 NT 薬剤の低体温効果を実証するために、各薬剤を、非置換化合物 IX と同様に、NT モル当量 5 mg / kg でスプラグドローラットに静脈内注射 ( 急速 ) し、注射後 3 時間に渡って直腸体温をモニタリングした。

## 【 0 1 6 1 】

NT ( 8 - 1 3 ) 配列における安定置換体を含む全ての薬剤は、非置換化合物 IX と比較して、ラットにおいてより高い低体温反応を引き起こした ( 図 1 0 ) 。 NT モル当量 5 mg / kg での体温の最大低下は、化合物 IX について、注射後 3 0 分で - 1 . 2 であり、化合物 XV 、 XVI 、 XVII 及び XX について、注射後 6 0 ~ 9 0 分で - 2 前後であり、化合物 XVIII 及び XIX について、注射後 9 0 分で - 2 . 8 前後であった。

10

## 【 0 1 6 2 】

## &lt; 実施例 1 3 &gt;

本発明の活性化 NT 薬剤の 反復投与

本発明の活性化 NT をマウスに反復投与した際の低体温反応性を実証するために、NT モル当量 4 mg / kg で、化合物 XIV を、スイス ( CD - 1 ) マウスに 4 日間毎日静脈内注射 ( 急速 ) することを試みた。各日注射後 3 時間の間に、直腸体温をモニタリングした。

20

## 【 0 1 6 3 】

1 日目に、マウスは典型的に、注射後 4 5 分で - 5 . 5 という体温の最大低下を示した ( 図 1 1 ) 。 2 日目に低体温反応は僅かに低くなったが、その後、注射後 3 0 分で - 3 という平均した体温低下で、効果は有意にかつ安定して維持された ( 2 日目 ~ 4 日目 ) 。

## 【 0 1 6 4 】

3 日間の反復投与で効果を示さない安定 NT 類似体 ( Boules et al . , 2 0 0 3 , Brain Res . , 9 8 7 ( 1 ) : 3 9 - 4 8 ) に反して、これらの結果によって、本発明の活性化 NT 薬剤は、効果的かつ安全な投与レベルでの反復又は亜慢性投与が可能であり、限られた耐性で固有の薬力学的特性を提示することが実証される。

30

## 【 0 1 6 5 】

## &lt; 実施例 1 4 &gt;

本発明の活性化 NT 薬剤の 解熱効果

ナイーブマウスに静脈内注射したときに有意な低体温効果を誘発することに加えて、酵母誘発高熱を伴うマウスにおける本発明の活性化 NT 薬剤の解熱効果を評価した。つまり、まず、オス NMRI マウスの直腸温度を、直腸プローブを用いて試験の 1 4 時間前に測定した ( ベースライン 1 、最低 5 分間のインターバルで 2 回独立して測定 ) 。次いで、高熱反応を誘発する酵母懸濁液 ( 5 1 2 mg / kg ) 又はヒドロキシプロピルメチルセルロース ( HPMC ) の 0 . 9 % 生理食塩水液を、マウスに皮下注射した。ベースライン温度での酵母又は HPMC 注射の効果を評価するために、1 4 時間後、再度マウスの直腸温度を測定した ( ベースライン 2 、最低 5 分間のインターバルで 2 回独立して測定 ) 。次いで、マウスを無作為に選出して、活性化ニューロテンシン分子 ( 化合物 XIV ) 又はコントロール ( 0 . 9 % 生理食塩水 ) を静脈内注射し、1 5 、 3 0 、 4 5 、 6 0 、 1 2 0 、及び 1 8 0 分後に再度直腸温度を測定した。

40

## 【 0 1 6 6 】

酵母懸濁液を注射し、生理食塩水を与えたコントロールマウスは、典型的な 0 . 6 ~ 1 の高熱を示した。本発明の活性化 NT 分子の解熱効果を、誘発された高熱を覆す自身の能力として評価した。結果により、化合物 XIV は、注射後 1 5 分で同じ動物のベースライン 2 と比較した場合、又は生理食塩水で処置しており、注射後の時間が一致した動物と比較した場合、 - 2 . 2 という最大効果を示して、NT モル当量 2 mg / kg のマウス

50

において急激に、高熱を大きく覆すことが示された（図12）。化合物XIVの解熱効果は、NTモル当量6mg/kgの投与レベルで、4.7へと体温をさらに低下させる可能性を伴って、投与-反応関係性を示した。この顕著な結果により、コントロールされた正常体温、又は本発明の活性化NT分子によって誘発された穏やかな治療的低体温でさえも、局所的脳虚血、深刻な外傷性脳損傷、ICH、ウイルス、細菌又は寄生虫感染、及び局所的炎症反応が高熱を誘発するかもしれない何らかの急性疾患等の、高熱に起因した急性疾患における神経保護に対して、使用可能であることが示された。

【0167】

<実施例15>

てんかん及び興奮毒性神経細胞死のマウスモデルにおける、活性化NT薬剤の抗痙攣、神経保護並びに抗神経刺激効果

10

本実施例において、本発明の活性化NT薬剤の、痙攣及び発作に起因した興奮毒性の後の神経保護を促進する能力を評価した。その他の細胞よりもさらに、神経細胞は特に、酸素及びグルコース除去、グルタミン酸塩の大量放出を誘発する状況、神経細胞の主な興奮性神経伝達物質に対して敏感である。神経細胞による過剰のグルタミン酸塩放出により、次に、過剰の神経細胞活性が誘発され、これは急速な神経細胞死及び有害な神経炎症を起こす。この興奮毒性のプロセスは、脳虚血の全ての形態、すなわち、次の突然の心停止（全体的な脳虚血）、次の卒中（局所的虚血）、及び新生児虚血にとって一般的である。興奮毒性はまた、発作の間、並びにてんかん、次の脳及び脊髄外傷において起こる。全てのケースで、興奮毒性に対して神経細胞が特に敏感な、海馬等の神経系の領域において観察される急速な神経細胞死により、しばしば重篤なハンディキャップ又は死を伴うような元の状態に戻せない神経細胞損傷が導かれる。発作はまた、異常軸索新芽形成、特に、発作の始まりから数週間における海馬の苔状線維のそれに起因する。

20

【0168】

本ケースにおいて、興奮毒性は、てんかん重積状態（SE）を誘発すると知られている副駆虫剤であるカイニン酸（KA）の皮下（s.c.）注射によって誘発された。該てんかん重積状態は、KA投与後3～7日で観察される興奮毒性、神経炎症、及び海馬における重篤な神経細胞損傷、並びにKA投与後7～8週間で観察される歯状回苔状線維の異常軸索新芽形成を伴って誘発される。化合物XIVについて

i) てんかん活性（反復性発作の持続性）

30

ii) 神経変性、神経炎症、及び結果として生じた脳組織損傷、並びに

iii) 歯状回苔状線維の異常軸索新芽形成

の効果を試験した。

【0169】

FVB/N成長オスマウスに、KAを単回投与（40～45mg/kg、s.c.）で注射し、SEの保証として自然再発する発作を伴うマウスを得た。マウスのネガティブコントロール群に、KAの代わりに0.9%生理食塩水を投与し、さらなる処置は何も行わなかった（「SHAM」、n=5）。SE発現後30分で、NTモル当量4mg/kgの投与量で化合物XIVを（処置グループ「SE+HT」、n=5）、又は0.9%生理食塩水を（グループ「SE」、n=5）、又は15mg/kgの高投与量で有効抗痙攣及び抗てんかん薬剤のジアゼパム（DZP）を（ポジティブコントロールグループ「SE+DZP」）、マウスに急速静脈内（尾血管）注射した。直腸プローブを用い、KA注射の前、及びその後6時間以内に15分ごとに、体温をモニタリングした。この期間中、運動発作の発生及び重症度についてマウスを評価した。1週間後、この興奮毒性のモデルにおいて、脳内の主要構成である海馬体が組織損傷を示しており、これらの動物について、冠状切片上の神経細胞死の組織学的評価を断念した。同じ処置を行った別の動物グループについては、8週間で歯状回苔状線維の異常軸索新芽形成の組織学的評価を断念した。

40

【0170】

1) てんかん重積状態における体温及び発作強度に対する活性化NT薬剤の効果：抗痙攣特性を有する化合物XIV

50

K Aの投与(40~45 mg/kg、s.c.)により特徴的な連続的行動の変化が引き起こされた。注射直後、すべての動物において不動症が発現した(ステージ1)。K A注射後30分以内で、點頭痙攣での自動症、前肢クローヌス、及び循環行動が観察された(ステージ2~3)。次いで、ほとんどの動物について進展が一時中断し(ステージ4)、前肢クローヌス及び落下行動を伴う継続した飼育が続いた(ステージ5)。何匹かのマウスでは、激しい全身強直性間代性発作があった(ステージ6)。少なくともラシーヌステージ5発作に到達した動物のみが、研究に含まれた。K A注射後2時間前後で発生したS Eは、ステージ5~6発作によって特徴づけられ、しばしば高熱に起因した(図13(a))。S E発現後30分(S E 30)で投与された化合物X I Vにより、常に、少なくとも2時間は持続する一時的な低体温へと導かれた(図13(a))。S E 30+化合物X I V動物について、S E動物と比較して、体温(B T)の平均低下度として、-2.5及び-3.6が各々記録された( $F = 52.34$ 、 $***P < 0.001$ )。この低体温は、S Eグループと比較して、S E 30+化合物X I Vグループにおける発作の大きな減少に起因していた( $F = 823.96$ 、 $***P < 0.001$ 、図13(b))。S E 30+化合物X I V動物により、実験の休止期間に、ステージ2発作の平均又はそれ未満が提示された。動物のサブセットに、高投与量のジアゼパム(D Z P)を腹腔内投与した。S E 30+化合物X I V動物についてのように、実験の休止期間に、D Z P処置動物は急速なステージ1~2発作を示し、これらの動物において、低体温もまた観察された( $F = 823.96$ 、 $***P < 0.001$ 、図13(a)(b))。S Eが始まった30分後にニューロテンシンN T(8-13)を投与した場合、S E動物と比較して、B T又は発作強度の重要な変化は観察されなかった。このように、S E動物(S E+H Tグループ)においてN Tモル当量4 mg/kgの投与量で化合物X I Vを投与することにより、薬剤の有効な抗痙攣効果を実証され、運動発作の明確な減少又は穏やかな抑制が誘発された。この効果は、2.5時間の間に体温が-3~-6低下したことと関連があった。

#### 【0171】

2) てんかん重積状態後の海馬における、活性化N T薬剤による神経保護の促進

各々神経細胞特定核タンパク質及び神経細胞死をラベルする抗NeuN抗体及びFluoro-jade Cを用い、S H A M動物と比較すると(図14(a)-パネルA)、コントロールS E動物の海馬におけるいくつかの歯状門神経細胞だけでなく、C A 1及びC A 3錐体細胞の広範囲な損失が観察された(図14(a)-パネルB)。S E発現後30分で化合物X I V又はD Z Pを投与した際には、S E動物で観察された神経変性はかなり減少したが(図14(a)(b))、N T(8-13)を投与した際には、変化がなかった。S E 30+化合物X I V動物について得られた結果は、S E 30+N T(8-13)グループで観察された結果と大きく異なっていたが、S E 30+D Z Pマウスで観察された結果とは差異がなかった。

#### 【0172】

3) てんかん重積状態後の海馬における、活性化N T薬剤によるグリア介在性炎症反応の軽減

S E誘発グリオシスは、ミクログリア及びアストログリア細胞型を引き起こした。G F A P及びI b a 1免疫ラベリングを用い、神経炎症に対する化合物X I Vの効果を評価した。S H A M動物において、G F A P及びI b a 1についての基本的なラベリングがH F中で検出された(図14(a)-パネルD)。S E動物において、グリア細胞の非常に強力な活性が、全海馬層中で発生した(図14-パネルE、H)。S E発現後30分で化合物X I V又はD Z Pを投与した際には、この炎症反応は著しく低減したが(図14-パネルF、I)、N T(8-13)を投与した際には、変化がなかった。S E 30+化合物X I V動物について得られた結果は、S E 30+N T(8-13)グループで観察された結果と大きく異なっていたが、S E 30+D Z Pマウスで観察された結果とは差異がなかった。

#### 【0173】

4) てんかん重積状態後の海馬における、活性化N T薬剤による苔状線維発芽の低減

一般に、KA処置マウス及びてんかんにおいて、苔状線維（歯状回顆粒細胞の軸索）の発芽は、十分に証明されている。この異常軸索は、門細胞損失に応答して内部分子層（IML）において起こることが提議されてきている。化合物XIVの神経保護効果をさらに研究するために、SE後8週間で苔状線維発芽の程度を評価した。亜鉛イオンにおいて、苔状線維末端は非常に強化されており、図15に示すように、亜鉛小胞輸送体3（ZnT3）に対する免疫組織化学的ラベリングを用い、苔状線維の発芽を検出した。全てのSHAM動物において、苔状線維末端は、CA3領域の門部及び淡明層に存在し、DGのIMLで末端は観察されなかった（図15（a）-パネルA、B、図15（b））。SE動物において、苔状線維末端は、SHAMマウスのように肺門及びCA3領域で観察されただけでなく、IML内部でも観察された（図15（a）-パネルC、D、図15（b））。SE動物と比較して、SE発現後30分で化合物XIV又はDZPを投与した動物において、IMLを神経支配する末端の数は著しく減少したが（図15（a）-パネルE、F、図15（b））、NT（8-13）を投与した場合には、著しい変化はなかった（図15（b））。

10

#### 【0174】

本発明の活性化NT分子は、興奮毒性神経細胞死及び神経炎症による脳組織損傷を阻害する魅力的なアプローチを表すだけでなく、恐らく、低体温によって神経細胞活性を低減して運動発作を抑制する効力を有することが、これら全ての結果によって明確に実証されている。

#### 【0175】

<実施例16>

#### タンデム活性化NT薬剤の抗侵害受容効果

活性化NT薬剤の抗侵害受容性効力を評価するために、化合物XIVについて、マウスにおける実験疼痛モデルで試験を行った。急性内臓疼痛のモデルとしてライジング試験を用い、静脈内投与後の化合物XIVの効果を評価した。化合物XIVを投与されたマウスにおいて、体温が最も低下する時間が注射後45分前後であることを考えると、この疼痛モデルにおいて、類似した薬力学的動力学が仮定された。マウスにまず、投与レベルを増加させて化合物XIVを静脈内注射（急速）し、その後30分で、続いて0.7%酢酸を腹腔内注射した（10mL/kg）。コントロールマウスにおいて、酢酸の腹腔内注射により、早くも注射後2~3分で、特徴的かつ定量化可能な腹部ストレッチ（体の伸長及び前肢の拡張）を得て、注射後5~15分間でピークに到達した。したがって、NTモル当量0.5、1、又は5mg/kgで生理食塩水もしくは化合物XIVを投与したマウスにおける腹部ストレッチの数（10分間を超える観察でのライジングカウント）の評価に、この時間ウィンドウを用いた。

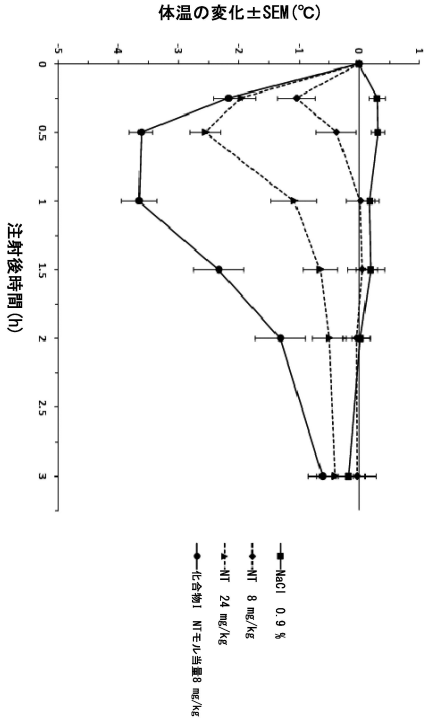
20

30

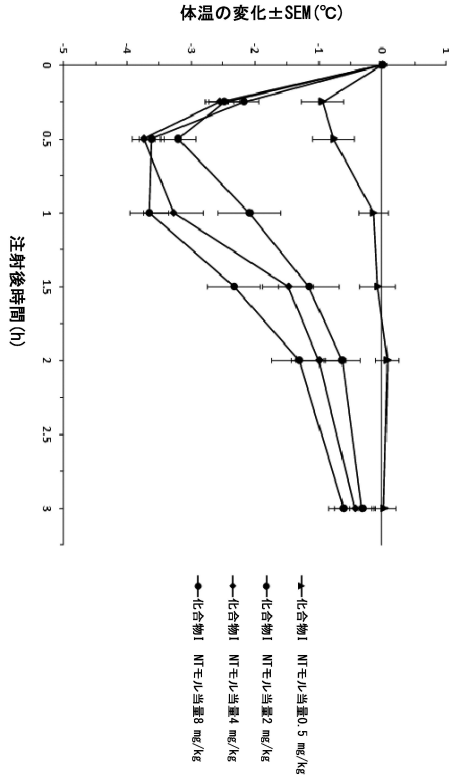
#### 【0176】

このモデルにおいて、化合物XIVにより、NTモル当量0.5mg/kgでは効果がなく、NTモル当量1及び5mg/kgでは、ライジングカウントが各々50%及び64%低減するという、重大であり、かつ投与量に依存した抗侵害受容効果が得られた（図16）。

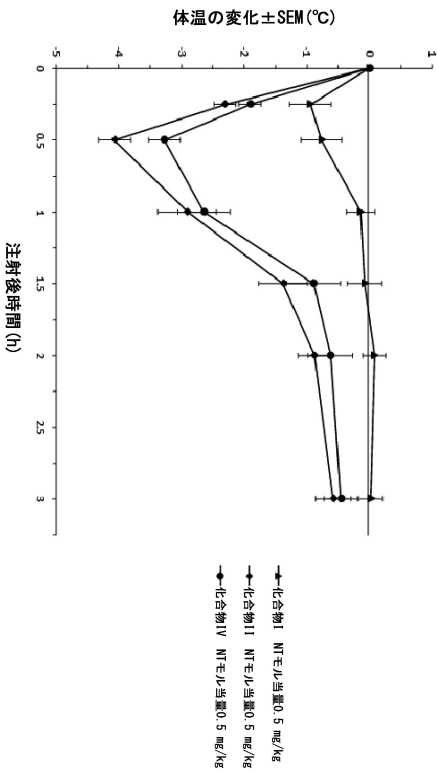
【 図 1 】



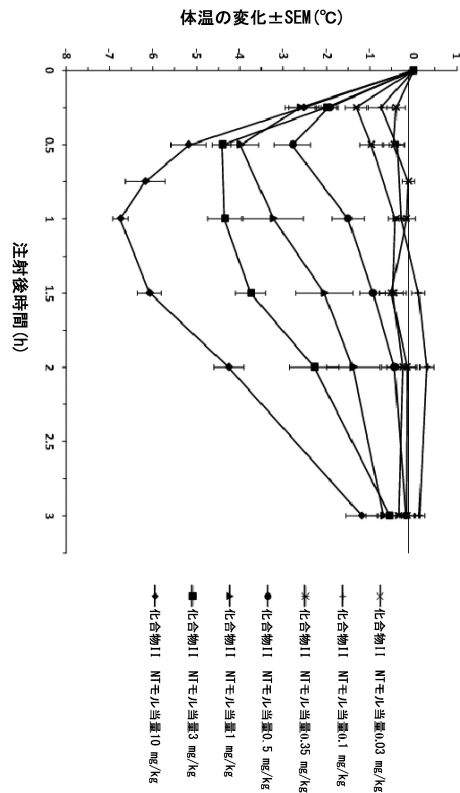
【 図 2 】



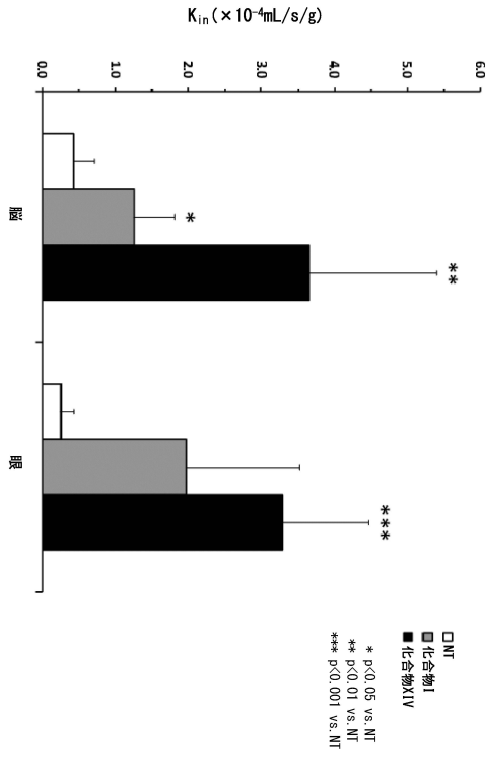
【 図 3 】



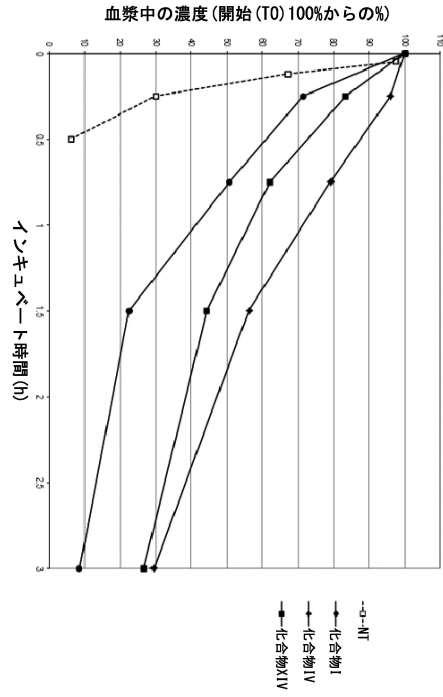
【 図 4 】



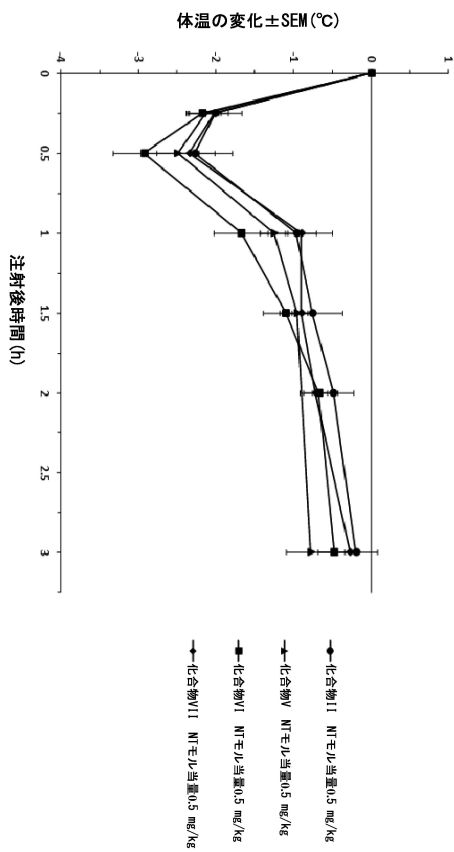
【 図 5 】



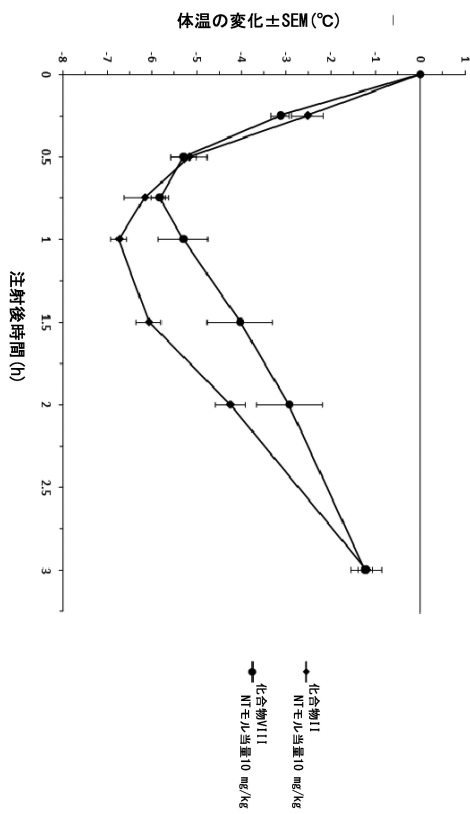
【 図 6 】



【 図 7 】

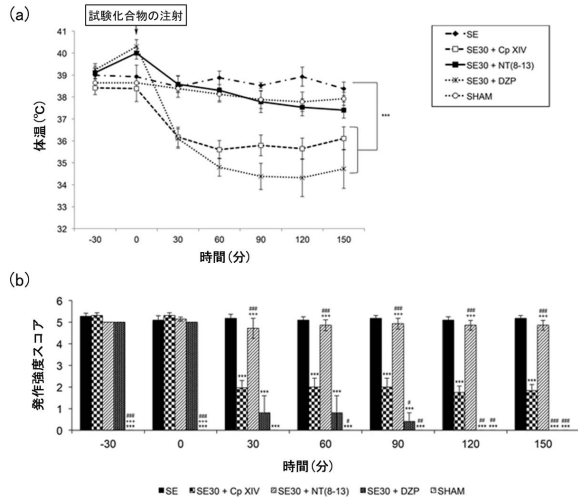


【 図 8 】





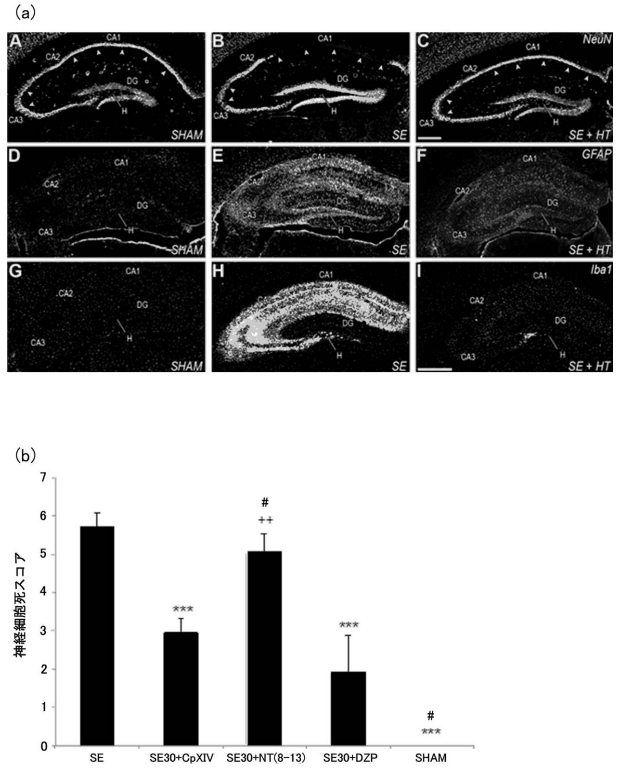
【 図 1 3 】



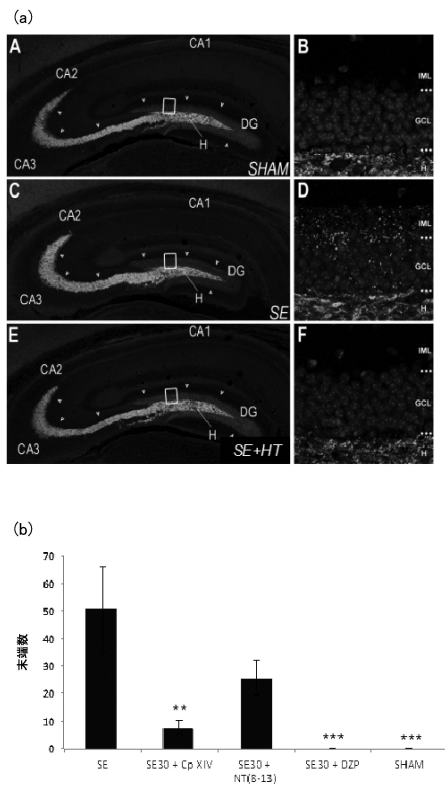
(a): ANOVA + post hoc Dunnett 試験:  
\*\*\* p<0.001

(b): ANOVA + post hoc Tukey 試験:  
\* SE グループとの対比  
# SE30 + 化合物 XIV グループとの対比  
+ DZP グループとの対比  
p<0.05; pp<0.01; pop<0.001

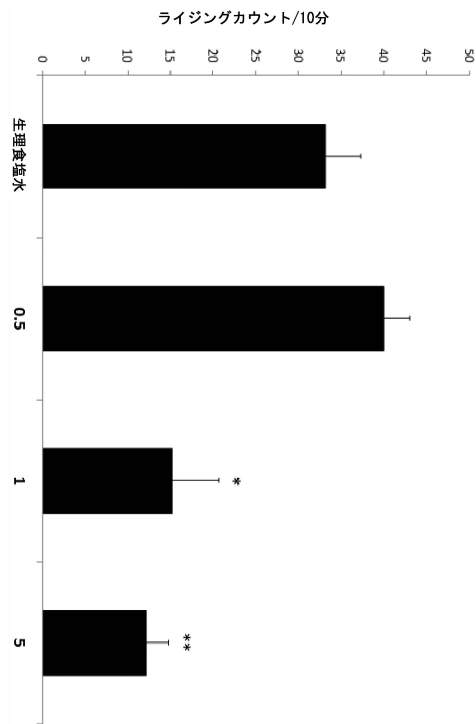
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【配列表】

0006562948000001.app

## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 P 25/08 (2006.01) A 6 1 P 25/08  
 A 6 1 P 25/04 (2006.01) A 6 1 P 25/04
- (74)代理人 100121728  
 弁理士 井関 勝守
- (74)代理人 100165803  
 弁理士 金子 修平
- (72)発明者 ジャックオ, ギヨーム  
 フランス国 エフ - 1 3 1 0 0 ポールキュイユ アヴェニュー・ジュリアン・ゴージェ 2 0  
 ヴィラ 5 ベー
- (72)発明者 ルコーシュ, パスカリーヌ  
 フランス国 エフ - 1 3 0 0 4 マルセイユ リュ・ジャンヌ・ジュガン 2 8
- (72)発明者 クレチャティスキー, ミシェル  
 フランス国 エフ - 1 3 0 0 7 マルセイユ ブールバード・ボンパール 5 2

審査官 金田 康平

- (56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 3 0 9 9 3 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 2 - 5 1 0 7 9 6 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 2 - 5 0 6 4 0 7 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 3 - 5 2 5 3 3 6 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 2 - 5 2 7 0 9 3 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I ( S  
 T N )