

[illegible]

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントと生組織を接触させることを含んでなり、それにより N T P のセグメントは細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害するのに十分な量で存在する、生組織中の細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害する方法。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントが：

- a) T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; H H A R L I F ;
- b) H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I L ; 10
- H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ; A R C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ; A R L I F ;
- c) L H A R L C L A N F C G R N R V ;
- d) L A R L C L A N F C G N N N V ;
- e) C A R Y R T G H H A R L M ;
- f) H H A R L P L A N F C G ;
- g) R T G H H A R L C L A N F C ;
- h) C E S A R Y R T G H H A R L C ;
- i) D N T H H A R L I L ; 20
- j) S H H A R L I L ; 並びに、
- k) H A R L M L ; H A R L V L ; および H A K L I L

からなる群より選択されるアミノ酸配列、並びにその変異体、相同体、誘導体、および模倣体を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントと生組織を接触させることを含んでなり、それにより N T P のセグメントは細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害するのに十分な量で存在する、細胞死および／または組織壊死に関連した状態を治療する方法。

【請求項 4】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントが：

- a) T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; H H A R L I F ;
- b) H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I L ;
- H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ; A R C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ; A R L I F ;
- c) L H A R L C L A N F C G R N R V ;
- d) L A R L C L A N F C G N N N V ;
- e) C A R Y R T G H H A R L M ;
- f) H H A R L P L A N F C G ;
- g) R T G H H A R L C L A N F C ; 40
- h) C E S A R Y R T G H H A R L C ;
- i) D N T H H A R L I L ;
- l) S H H A R L I L ; 並びに、
- m) H A R L M L ; H A R L V L ; および H A K L I L

からなる群より選択されるアミノ酸配列、並びにその変異体、相同体、誘導体、および模倣体を含む、請求項 3 の方法。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントを含む組成物と生きた哺乳動物脳組織を接触させることによって生きた哺乳動物脳組織中の細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害する方法であって、それにより組成物は N T P のセグメントが血液脳関門を 50

通過することを可能にする成分をさらに含む、前記方法。

【請求項 6】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントが：

- a) T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; H H A R L I F ;
- b) H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I L ;
- H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ; A R
- C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ; A R L I
- F ;
- c) L H A R L C L A N F C G R N R V ;
- d) L A R L C L A N F C G N N N V ;
- e) C A R Y R T G H H A R L M ;
- f) H H A R L P L A N F C G ;
- g) R T G H H A R L C L A N F C ;
- h) C E S A R Y R T G H H A R L C ;
- i) D N T H H A R L I L ;
- n) S H H A R L I L ; 並びに、
- o) H A R L M L ; H A R L V L ; および H A K L I L

からなる群より選択されるアミノ酸配列、並びにその変異体、相同体、誘導体、および模倣体を含む、請求項 5 の方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントを含む組成物と生きた哺乳動物脳組織を接触させることによって神経変性障害を治療する方法であって、それにより組成物は N T P のセグメントが血液脳関門を通過することを可能にする成分をさらに含む、前記方法。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントが：

- a) T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; H H A R L I F ;
- b) H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I L ;
- H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ; A R
- C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ; A R L I
- F ;
- c) L H A R L C L A N F C G R N R V ;
- d) L A R L C L A N F C G N N N V ;
- e) C A R Y R T G H H A R L M ;
- f) H H A R L P L A N F C G ;
- g) R T G H H A R L C L A N F C ;
- h) C E S A R Y R T G H H A R L C ;
- i) D N T H H A R L I L ;
- p) S H H A R L I L ; 並びに、
- q) H A R L M L ; H A R L V L ; および H A K L I L

からなる群より選択されるアミノ酸配列、並びにその変異体、相同体、誘導体、および模倣体を含む、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

神経変性障害がアルツハイマー病である、請求項 7 の方法。

【請求項 10】

神経変性障害がアルツハイマー病である、請求項 8 の方法。

【請求項 11】

N T P のセグメントと N T P のセグメントが血液脳関門を通過することを可能にする成分を含んでなる、細胞死および／または組織壊死に関連した状態を治療するための組成物。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの N T P のセグメントが：

10

20

30

40

50

- a) THARL I L ; HHARL C L ; MFARL I L ; HHARL I F ;
- b) HHARL ; HARL ; HARL I ; HARL I L ; HHARL C L ; ARL I L ; HHARL I F ; THARL I L ; ARL I ; ARL ; HARL C L ; ARL C L ; ARL C L ; MFARL I L ; FARL I L ; FARL I ; FARL ; HARL I F ; ARL I F ;
- c) LHARL C L A N F C G R N R V ;
- d) LARL C L A N F C G N N N V ;
- e) CARYRTGHHARLM ;
- f) HHARL P L A N F C G ;
- g) RTGHHARL C L A N F C ;
- h) CESARYRTGHHARLC ;
- i) DNTHHARL I L ;
- r) SHHARL I L ; 並びに、
- s) HARLML ; HARLV L ; および HAKL I L

からなる群より選択されるアミノ酸配列、並びにその変異体、相同体、誘導体、および模倣体を含む、請求項 11 の方法。

【請求項 13】

NTP が治療目的のために投与された部位にかまたはその近くにある生組織中の細胞死および／または組織壊死を予防、変調、制御、改善 (ameliorate) および／または阻害する方法であって、少なくとも 1 つの NTP のセグメントと生組織を接触させることを含んでなり、それにより NTP のセグメントは、NTP の治療上の投与により引き起こされる細胞死および／または組織壊死を予防、変調、制御、改善および／または阻害するのに十分な量で存在する、前記方法。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの NTP のセグメントが：

- a) THARL I L ; HHARL C L ; MFARL I L ; HHARL I F ;
- b) HHARL ; HARL ; HARL I ; HARL I L ; HHARL C L ; ARL I L ; HHARL I F ; THARL I L ; ARL I ; ARL ; HARL C L ; ARL C L ; ARL C L ; MFARL I L ; FARL I L ; FARL I ; FARL ; HARL I F ; ARL I F ;
- c) LHARL C L A N F C G R N R V ;
- d) LARL C L A N F C G N N N V ;
- e) CARYRTGHHARLM ;
- f) HHARL P L A N F C G ;
- g) RTGHHARL C L A N F C ;
- h) CESARYRTGHHARLC ;
- i) DNTHHARL I L ;
- t) SHHARL I L ; 並びに、
- u) HARLML ; HARLV L ; および HAKL I L

からなる群より選択されるアミノ酸配列、並びにその変異体、相同体、誘導体、および模倣体を含む、請求項 13 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、「神経線維タンパク質 (Neural Thread Protein) のセグメントを使用する細胞死の予防法」と題した、米国仮特許出願第 60 / 290, 971 号への優先権を主張し、前記出願の開示はそのまま本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

10

20

30

40

50

1. 発明の分野

本発明は、細胞死を予防する方法、並びに、細胞死および組織壊死の予防、阻害、および／または改善 (ameliorate) を必要とする状態を治療する方法に関する。本発明には、神経線維タンパク質 (NTP) のセグメント、またはその相同体、誘導體、変異体、または模倣体を、細胞死を体験している哺乳動物へ投与することが含まれる。このセグメントは、筋肉内、経口、静脈内、腹腔内、大脳内 (実質内)、脳室内、腫瘍内、病巣内、皮内、鞘内、鼻腔内、眼球内、動脈内、局所的、経皮的に、エアゾール、注入、ボーラス注射、埋込み器具、持続放出系などにより、単独でかまたは担体へコンジュゲートして投与可能である。あるいは、セグメントは、当該セグメントを発現する遺伝子を投与することによって、こうした産生を誘導するワクチンを投与することによって、または、該セグメントを *in vivo* で発現する細胞、細菌、またはウイルスを導入することによって、遺伝子修飾かまたは他の方法のいずれかにより *in vivo* で発現させてもよい。

【0003】

2. 関連技術

アルツハイマー病 (AD) は、記憶、行動、言語、および視空間の能力の進行性障害を特徴とし、最終的には死で終わる、複雑な神経変性障害である。易損性領域内の特徴的な病理には、細胞外 β -アミロイド沈着、細胞内神経原線維のもつれ、シナプス損失、および広範なニューロン細胞死が含まれる。アルツハイマー病の原因および治療に関する研究は、研究者を数多くの研究手段へ導いてきた。かなりの証拠が、ヒトアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の産生若しくはプロセッシングにおける改変がこの疾患の病因であることを示唆している。しかしながら、詳細な研究は、ADが、多くの異なる、おそらくは重複している病因のある多因子疾患であることを証明している。

【0004】

このために、当該技術分野の研究者は、脳の内部と神経細胞の異なる集団の内部の両方における構造の欠損症、化学変化、および機能異常を研究するために、有意義なリサーチや臨床調査を行ってきた。こうした調査および試験の深さは、以下の刊行物に代表されるが、これはこの分野における膨大な報告のひと握りでしかない：「アルツハイマー病の神経生物学 (Neurobiology of Alzheimer's Disease)」(D. DawbarnおよびS. J. Allen監修), Bios, オックスフォード 1995；「痴呆症 (Dementia)」(J. Whitehouse監修), F. A. デービス・カンパニー、フィラデルフィア、1993；「アルツハイマー病：老人性痴呆症と関連障害 (Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders)」(Katzman, R, およびR. L. Bick監修)、ラヴェンプレス、ニューヨーク、1994 47-51頁；「アルツハイマー病と関連障害、病因、病理発生、および治療薬 (Alzheimer's Disease and Related Disorders, Etiology, Pathogenesis and Therapeutics)」(Iqbol, K. ら, 監修), ウィリー、チチェスター、1999；「アルツハイマー病：臨床および基礎研究の進歩 (Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research)」(Corain, B. 監修)、ウィリー、ニューヨーク、1993；「アルツハイマー病：臨床および治療の展望 (Alzheimer's Disease: Clinical and Treatment Perspectives)」(Cutler, N. R. ら, 監修)、ウィリー、チチェスター、1995；「アルツハイマー病；治療戦略 (Alzheimer's Disease: Therapeutic Strategies)」(Giacobini, E., Becker, R. 監修)、パークハウザー、ボストン、1994；Paykelら, Arch. Gen. Psychiat., 51: 325-332 (1994)；Amaducciら, Neurology, 36: 922-931 (1986)；McKhannら, Neurology 34: 939-944 (1984)；Heston

ら, Arch. Gen. Psychiatry 38:1085-1090 (1981) ; 「脳の老化 (Aging of the Brain)」 (GispénおよびTrauber, 監修者)、エルセヴィエ・サイエンス・パブリッシャーズ、アムステルダム、1983, 275-281頁; Heymanら, Ann. Neurol 15:335-341 (1984); Brayne C. および P. Calloway, Lancet 1:1265-1267 (1988); Rothら, Br. J. Psychiatry 149:698-709 (1986); Medical Research Council (医学研究協議会), 「NRCアルツハイマー病ワークショップ報告」、ロンドン、イングランド、1987; Morrisら, Neurology 41:469-478 (1991); および、これら刊行物のそれぞれの中で引用されている参考文献。

10

【0005】

今日、アルツハイマー病は、米国で三番目に高額な疾患であり、毎年ほぼ1000億ドルを社会に課している。これは、高齢者集団に最も蔓延している病気の1つであり、社会の高齢化に伴って、さらに重大なものとなろう。ADに関連したコストには、ナーシングホームでのケアのような直接医療コスト、在宅日のケアのような直接非医療コスト、患者およびケア提供者の損失生産性のような間接コストが含まれる。医学的治療と行動療法 (behavior modification) は、認知低下の速度を遅らせること、施設収容を先延ばしにすること、ケア提供者の時間を削減すること、および生命の質を向上させることによって経済的な利益をもたらす可能性がある。ファルマコエコノミクス評価は、薬物療法および行動療法のナーシングホーム配置 (プレースメント)、認知、およびケア提供者の時間に及ぼす効果に関してプラスの結果を示している。

20

【0006】

神経線維タンパク質 (NTP) は、最近特性決定された脳タンパク質のファミリーである。このファミリーの1つのメンバーであるAD7C-NTPは、神経炎突起に関連した機能を有する~41kDの膜結合性リンタンパク質である (de la Monteら, J. Clin. Invest., 100:3093-3104 (1997); de la Monteら, Alz. Rep., 2:327-332 (1999); de la Monte SMおよびWands JR, Journal of Alzheimer's Disease, 3:345-353 (2001))。AD7C-NTPをコードする遺伝子とAD7C-NTPの予測タンパク質配列が同定され、記載されている (de la Monteら, J. Clin. Invest., 100:3093-3140 (1997))。~41kDaの種に加えて、他の種の神経線維タンパク質 (~26kDa, ~21kDa, ~17kDa, および~15kDa) が同定され、神経外胚葉腫瘍、星状細胞腫および膠芽腫や、低酸素症、シュマ (schema)、または脳梗塞による損傷に関連づけられてきた (Xuら, Cancer Research, 53:3823-3829 (1993); de la Monteら, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55 (10):1038-50 (1996); de la Monteら, J. Neurol. Sci., 138 (1-2):26-35 (1996); de la Monteら, J. Neurol. Sci., 135 (2):118-25 (1996); de la Monteら, J. Clin. Invest., 100:3093-3104 (1997); および de la Monteら, Alz. Rep., 2:327-332 (1999))。

30

40

【0007】

数種の神経線維タンパク質が、いずれも「神経線維タンパク質の遺伝子発現とアルツハイマー病の検出」についての米国特許第5,948,634号; 5,948,888号; および5,830,670号、並びに「神経学的疾患若しくは機能不全の検出法」についての米国特許第6,071,705号に記載され、特許請求されている。これらの特許の開示は、そのまま本明細書に特別に援用される。そこに記載されるように、NTPは、細胞死の間にアップレギュレートされ、産生される。従って、死んだ神経細胞や瀕死の神経細胞は、NTPを過剰産生しているとして記載され、故に、その存在は神経細胞の死やアル

50

ツハイマー病（AD）の発症のしるしとなる。

【0008】

他の神経線維タンパク質の種は、AD7C-NTF遺伝子の他の産物（例、NCBI Entrez-タンパク質データベース寄託番号XP_032307 PIDg15928971に記載される112アミノ酸タンパク質）として、または神経線維タンパク質に類似のもの（例、NCBI Entrez-タンパク質データベース寄託番号AAH14951 PIDg15928971に記載される106アミノ酸タンパク質、NCBI Entrez-タンパク質データベース寄託番号XP_039102 PIDg18599339に記載される別の106アミノ酸タンパク質、およびNCBI Entrez-タンパク質データベース寄託番号AAH02534 PIDg12803421に記載される61アミノ酸タンパク質）として同定された。 10

【0009】

神経線維タンパク質の特にAD7C-NTF種を、ADとADにおける細胞死の間のそのアップレギュレーションと結びつける有力な証拠がある。AD7C-NTFのmRNAが対照に比べてAD脳においてアップレギュレートされている；脳中およびCSF中のAD7C-NTFタンパク質レベルが対照よりもADにおいてより高い；そして、老人斑において、神経原線維のもつれ（NFT）において、ADおよびダウン症候群の脳の変性ニューロン、神経線維網の線維、および栄養失調性神経炎突起においてAD7C-NTFの免疫反応性が見出される（Ozturkら, Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 86:419-423 (1989)；de la Monteら, J. Clin. Invest., 86(3):1004-13 (1990)；de la Monteら, J. Neurol. Sci., 113(2):152-64 (1992)；de la Monteら, Ann. Neurol., 32(6):733-42 (1992)；de la Monteら, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55(10):1038-50 (1996)；de la Monteら, J. Neurol. Sci., 138(1-2):26-35 (1996)；de la Monteら, J. Neurol. Sci., 135(2):118-25 (1996)；de la Monteら, J. Clin. Invest., 100:3093-3104 (1997)；およびde la Monteら, Alz. Rep., 2:327-332 (1999)）。免疫細胞化学により、ADおよびダウン症候群の両方の脳において、AD7C-NTFタンパク質が細胞の内部、神経線維網内の微細突起内に局在化しているか、または細胞外にあることが実証された。de la Monteら, Ann. Neurol., 32(6):733-42 (1992)。ニューロンと星状細胞という2種類の細胞がAD7C-NTFを含有する（同上）。罹患したニューロンは大錐体種となり、典型的には、AD脳において公知の神経原線維のもつれを含有する（同上）。 20 30

【0010】

AD患者のCSFおよび尿の両方において上昇レベルのAD7C-NTFタンパク質が見出されていて、この破壊的な病気の生化学マーカーとしてのその正確度を示している（de la MonteおよびWands, Front Biosci 7:989-96 (2002)；de la MonteおよびWands, Journal of Alzheimer's Disease 3:345-353 (2001)；Munzarら, Alzheimer's Reports 4:61-65 (2001)；Kahlら, Neurology 54:1498-1504 (2000) およびAverback Neurology 55:1068 (2000)；Munzarら, Alzheimer Reports 3:155-159 (2000)；de la Monteら, Alzheimer's Reports 2:327-332 (1999)；Ghanbariら, J Clin Lab Anal 12:285-288 (1998)；Ghanbariら, J Clin Lab Anal 12:223-226 (1998)；Ghanbariら, Journal of Contemporary Neurology 1998; 4A:2-6 (1998)；およびde la Monte 40 50

ら, J Clin Invest 100:3093-3104 (1997))。

【0011】

AD7C-NTF遺伝子の過剰発現もアルツハイマー病における細胞死のプロセスに関連づけられてきた(de la MonteおよびWands, J. Neuropathol. and Exp. Neurol., 60:195-207 (2001); de la MonteおよびWands, Cell Mol Life Sci 58:844-49 (2001))。AD7C-NTFは、ダウン症候群の脳組織においても同定された(Wandsら, 国際特許公報第WO90/06993号; de la Monteら, J Neurol Sci 135:118-25 (1996); de la Monteら, Alz. Rep., 2:327-332 (1999))。AD7C-NTF遺伝子の過剰発現が正常眼圧緑内障にも関連している可能性があるという証拠もある(Golubnitschaja-Labudovaら, Curr Eye Res 21:867-76 (2000))。 10

【0012】

「神経線維タンパク質を使用して腫瘍と関連状態を治療する方法」と題した、出願中の米国特許出願第__号(この開示はそのまま本明細書に援用される)に開示されるように、本発明者は、最近、遊離されたAD7C-NTFタンパク質が(瀕死の細胞そのものにより産生されるアップレギュレートされたAD7C-NTFと比べて)細胞傷害性であり、組織中の他の細胞へ細胞死を引き起こすことが可能であることを発見した。従って、特にAD脳中の神経線維タンパク質に関連した細胞死および組織壊死を予防する、阻害する、変調させる、または改善することは望ましいであろう。 20

【0013】

「神経線維タンパク質の好ましいセグメントとそれを使用する方法」と題した、出願中の米国特許出願第09/697, 590号(この開示はそのまま本明細書に援用される)に開示されるように、NTFのセグメントが結合アッセイ、NTFの精製、およびNTFの代用品としての診断薬として使用可能であることも最近発見された。

【0014】

関連技術に関する上記の記載を含め、本記載を通し、いずれかおよびすべての米国特許を含む、本明細書に記載のいずれかおよびすべての公的に利用可能な文献がそのまま本明細書に特別に援用される。関連技術に関する上記の記載は、出願中の米国特許出願を含め、そこに記載された文献がいずれも本発明への先行技術であるという公認を意図するものではない。 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

発明の概要

細胞死および組織壊死を予防、阻害、変調および/または改善する方法を開発することへのニーズが存在する。特に、脳中の細胞死および/または組織壊死を予防、阻害、および/または改善することが可能な方法を開発することへのニーズが存在する。細胞死および/または組織壊死に関連した状態を治療する方法を開発することへのニーズも存在する。 40
生きた哺乳動物脳組織中の細胞死および/または組織壊死を予防、阻害および/または改善することによってADのような神経変性障害を治療する方法を開発することへのニーズも存在する。ヒトにおける良性若しくは悪性腫瘍のような有害であるかまたは望まれない組織若しくは細胞要素を除去するかまたは破壊するために投与されるNTFにより引き起こされる、生組織中の細胞死および/または組織壊死を制御、阻害、変調、または改善する方法を開発することへのニーズも存在する。

【0016】

故に、細胞死および/または組織壊死を予防、阻害および/または改善する方法を提供することが本発明の態様の特徴である。この方法には、少なくとも1つのNTFのセグメント(またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体)と生組織を接触させることが含 50

まれ、それにより該セグメントは細胞死および／または組織壊死を予防、阻害、抑制、制御および／または改善するのに十分な量で存在する。

【0017】

本発明の態様の別の特徴によれば、細胞死および／または組織壊死を予防、阻害、および／または改善するのに十分な量で存在する、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）を含有する成分と生きた哺乳動物脳組織を接触させることによって、生きた哺乳動物脳組織中の細胞死および／または組織壊死を予防、阻害および／または改善する方法が提供される。該成分は、血液脳関門を通過することが可能である。

【0018】

本発明の態様の別の特徴によれば、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）を含有する成分と生きた哺乳動物脳組織を接触させることによって神経変性障害を治療する方法が提供される。該成分は、血液脳関門を通過することが可能である。

【0019】

本発明の態様のさらに別の特徴によれば、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）と生組織を接触させることを含んでなる、細胞死および／または組織壊死に関連した状態を治療する方法が提供される。NTPのセグメントは、細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害するのに十分な量で存在する。この方法によれば、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）が、細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害するのに十分な量で、細胞死および／または組織壊死に関連した状態を有する哺乳動物へ投与される。

【0020】

本発明の態様の別の特徴によれば、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）とNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）が血液脳関門を通過することを可能にする成分を含んでなる組成物が提供される。

【0021】

本発明の態様のさらに別の特徴によれば、遺伝子をその必要な哺乳動物へ投与することを含んでなり、それにより該遺伝子は少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）を発現し、そしてそれによりこの投与はNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）が生組織と接触することをもたらし、細胞死および／または組織壊死に関連した状態を治療する方法が提供される。該遺伝子は、NTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）が細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害するのに十分な量で存在するようなやり方で投与される。

【0022】

本発明の態様の追加の特徴によれば、ワクチンをその必要な哺乳動物へ投与することを含んでなり、それにより該ワクチンは少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）を発現するかまたは他のやり方で産生するように哺乳動物を誘導し、そしてそれによりこの投与は少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）が生組織と接触することをもたらし、細胞死および／または組織壊死に関連した状態を治療する方法が提供される。該ワクチンは、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）が細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害するのに十分な量で存在するようなやり方で投与される。

【0023】

本発明の態様のさらに別の特徴によれば、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）を *in vivo* で発現することが可能で

10

20

30

40

50

ある細胞、細菌またはウイルスをその必要な哺乳動物へ導入または投与、または埋込むことを含んでなり、それにより該細胞、細菌、またはウイルスは、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）を発現し、そしてそれによりこの投与は少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）が生組織と接触することをもたらし、細胞死および／または組織壊死に関連した状態を治療する方法が提供される。該細胞、細菌またはウイルスは、少なくとも1つのNTPのセグメント（またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体）が細胞死および／または組織壊死を予防、阻害および／または改善するのに十分な量で存在するようなやり方で、そしてそのような量で導入、投与または埋込みされる。

【0024】

10

本発明の上記および他の特徴は、以下に続く詳細な説明を読めば、当業者には容易に明らかになる。しかしながら、詳細な説明と特定の実施例は、本発明の好ましい態様を示すが、本発明の精神および範囲内での様々な変更および修飾が本記述から当業者に明らかとなるので、例示のためにのみ与えられると理解されるべきである。他に特定しなければ、本明細書に引用される文献のそれぞれの内容は、そのまま本明細書に援用される。

【課題を解決するための手段】

【0025】

好ましい態様の詳細な説明

用語「AD7C-NTP」は、de la Monteら, J. Clin. Invest., 100:3093-104 (1997), 米国特許第5,948,634号、5,948,888号、および5,830,670号の配列120および121、並びにNCBI Entrez-タンパク質データベース寄託番号AF010144に記載される、～41kDのタンパク質とそれをコードする遺伝子および核酸配列を意味する。

【0026】

本記載を通し、用語「NTP」または「神経線維タンパク質」は、神経線維タンパク質と（腓臓線維タンパク質を含む）関連分子、並びにそれらタンパク質をコードする核酸配列を意味し、以下のタンパク質とこれらタンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列が（限定されないが）含まれる：

- (a) AD7C-NTP；
- (b) 米国特許第5,948,634号、5,948,888号、5,830,670号、および6,071,705号、並びにde la Monteら, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55(10):1038-50 (1996)；de la Monteら, J. Neurol. Sci., 138(1-2):26-35 (1996)；de la Monteら, J. Neurol. Sci., 135(2):118-25 (1996)；de la Monteら, J. Clin. Invest., 100:3093-3104 (1997)；およびde la Monteら, Alz. Rep., 2:327-332 (1999)に記載される、～42、～26、～21、～17、～14、および～8kDの神経線維タンパク質の種；
- (c) 寄託番号HB-12546としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、バージニア州マナッサスに保管されたモノクローナル抗体#2、または寄託番号HB-12545としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、バージニア州マナッサスに保管されたモノクローナル抗体#5により特異的に認識されるタンパク質；
- (d) AD7C-NTP遺伝子によりコードされるタンパク質；
- (e) 米国特許第5,830,670号、5,948,634号、および5,948,888号からの配列40に記載され、NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAE25447, PIDg10048540に収載される122アミノ酸の神経線維タンパク質（このアミノ酸配列を図2に図示する）；
- (f) NCBI Entrez-タンパク質寄託番号XP_032307, PIDg14725132に収載される112アミノ酸の神経線維タンパク質（このアミノ酸配列を図3に図示する）；

50

(g) NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAH14951 PIDg15928971に収載される106アミノ酸の神経線維タンパク質様タンパク質（このアミノ酸配列を図4に図示する）；

(h) NCBI Entrez-タンパク質寄託番号XP_039102, PIDg18599339に収載される106アミノ酸の神経線維タンパク質様タンパク質（このアミノ酸配列を図5に図示する）；

(i) 米国特許第5,830,670号、5,948,634号、および5,948,888号からの配列30に記載され、NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAE13612, PIDg10048538に収載される98アミノ酸の神経線維タンパク質（このアミノ酸配列を図6に図示する）；

10

(j) 米国特許第5,830,670号、5,948,634号、および5,948,888号からの配列48に記載され、NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAE25448, PIDg10048541に収載される75アミノ酸の神経線維タンパク質（このアミノ酸配列を図7に図示する）；

(k) 米国特許第5,830,670号、5,948,634号、および5,948,888号からの配列36に記載され、NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAE25446, PIDg10048539に収載される68アミノ酸の神経線維タンパク質（このアミノ酸配列を図8に図示する）；

(l) NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAH02534, PIDg12803421に収載される61アミノ酸の神経線維タンパク質様タンパク質（このアミノ酸配列を図9に図示する）；

20

(m) 腓膵線維タンパク質；

(n) 米国特許第6,071,705号に記載の神経腓膵線維タンパク質（nPTP）；
並びに

(o) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに保管されたHB9934、HB9935、およびHB9936からなる群からのハイブリドーマにより産生される抗体により特異的に認識されるタンパク質。

【0027】

用語「NTP」にはまた、哺乳動物組織に由来するかまたは組換え技術を使用して産生されるNTPが含まれ、NTPの断片、変異体、誘導体、および相同体が含まれる。

30

本明細書に記載のアミノ酸およびアミノ酸残基は、以下の表に提供する公認の1文字若しくは3文字コードに従って言及してよい。他に特定しなければ、これらのアミノ酸または残基は、天然に存在するL立体異性体の型である。

【0028】

【表1】

表1

アミノ酸	1文字記号	3文字記号
アラニン	A	A l a
アルギニン	R	A r g
アスパラギン	N	A s n
アスパラギン酸	D	A s p
システイン	C	C y s
グルタミン	Q	G l n
グルタミン酸	E	G l u
グリシン	G	G l y
ヒスチジン	H	H i s
イソロイシン	I	I l e
ロイシン	L	L e u
リジン	K	L y s
メチオニン	M	M e t
フェニルアラニン	F	P h e
プロリン	P	P r o
セリン	S	S e r
スレオニン	T	T h r
トリプトファン	W	T r p
チロシン	Y	T y r
バリン	V	V a l

10

20

30

40

50

【0029】

本明細書で使用する用語「H a r l i l 配列」または「H a r l i l ペプチド」は、以下の配列の1以上を含むかまたは含有する生物学的に活性なペプチドを意味する：

1. 図1に記載の T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; および H H A R L I F ;
2. H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I L ; H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ; A R C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ; および A R L I F ;
3. L H A R L C L A N F C G R N R V (「NTP-1」) ;
4. L A R L C L A N F C G N N N V (「NTP-2」) ;
5. C A R Y R T G H H A R L M (「NTP-3」) ;
6. H H A R L P L A N F C G (「NTP-4」) ;
7. R T G H H A R L C L A N F C (「NTP-5」) ;
8. C E S A R Y R T G H H A R L C (「NTP-6」) ;
9. D N T H H A R L I L (「NTP-7」) ;
10. S H H A R L I L (「NTP-8」) ; 並びに、
11. H A R L M L , H A R L V L , および H A K L I L 。

【0030】

本明細書で使用する用語「H a r l i l 配列」または「H a r l i l ペプチド」には、H

a r l i l 配列またはH a r l i l ペプチドの生物学的に活性な変異体、相同体、誘導体、およびペプチド模倣体も含まれ、上記の副項 1 ～ 1 1 に列挙された諸配列のいずれかの配列をH a r l i l 配列の前または後にあるリンカーペプチドの追加のアミノ酸残基とともに含有する生物学的に活性なペプチドが含まれる。

【0031】

本明細書で使用する用語「N T P のセグメント」は、ある種のN T P、好ましくはA D 7 C - N T P の生物学的に活性な断片を意味し、特にH a r l i l 配列およびH a r l i l ペプチドが（限定されないが）含まれる。

【0032】

用語「生物学的に活性な」は、N T P または他の分子へ結合する能力を有するタンパク質、ペプチド、H a r l i l ペプチド、またはN T P のセグメントを意味する。 10

用語「断片」は、N T P タンパク質またはN T P のセグメントのアミノ酸配列の隣接するサブ配列からなるタンパク質若しくはポリペプチドを意味し、スプライス変異体のような天然に存在する断片と天然に存在する i n v i v o プロテアーゼ活性から生じる断片が含まれる。こうした断片は、アミノ末端、カルボキシ末端で、および／または（天然のスプライシングのように）内部で切り取られる場合がある。こうした断片は、アミノ末端メチオニンがあってもなくても調製可能である。用語「断片」には、同一のN T P タンパク質またはN T P のセグメントに由来し、直接的にかまたはリンカーを介するかのいずれかで一緒に連結する隣接アミノ酸配列を共有するかまたはしない、同一であるかまたは異なる断片が含まれる。 20

【0033】

用語「変異体」は、N T P タンパク質またはN T P のセグメントのアミノ酸配列に比べて、1 以上のアミノ酸の置換、欠失、および／または挿入が存在するタンパク質またはポリペプチドを意味し、N T P タンパク質またはN T P のセグメントの天然に存在する対立遺伝子変異体または選択的スプライス変異体が含まれる。用語「変異体」には、ペプチド配列中の 1 以上のアミノ酸を、類似または相同の（諸）アミノ酸、または似ていない（諸）アミノ酸で置き換えることが含まれる。類似または相同なものとしてアミノ酸を等級付けることが可能な多くの尺度がある（Gunnar von Heijne, 「分子生物学の配列解析（Sequence Analysis in Molecular Biology）」123-39 頁（アカデミック・プレス、ニューヨーク州ニューヨーク 1987）。好ましい変異体には、1 以上のアミノ酸位置でのアラニン置換が含まれる。他の好ましい置換には、タンパク質の全体の正味電荷、極性、または疎水性にほとんどまたはまったく影響を及ぼさない保守的な置換が含まれる。保守的な置換を以下の表 2 に示す。 30

【0034】

【表 2】

表 2

保守的なアミノ酸置換

塩基性：	アルギニン
	リジン
	ヒスチジン
酸性：	グルタミン酸
	アスパラギン酸
非電荷一極性：	グルタミン
	アスパラギン
	セリン
	スレオニン
	チロシン
非極性：	フェニルアラニン
	トリプトファン
	システイン
	グリシン
	アラニン
	バリン
	プロリン
	メチオニン
	ロイシン
	イソロイシン

10

20

30

【 0 0 3 5 】

表 3 は、別のアミノ酸置換のスキームを示す。

【 0 0 3 6 】

【表 3】

表 3

元の残基	置換基
A l a	g l y ; s e r
A r g	l y s
A s n	g l n ; h i s
A s p	g l u
C y s	s e r
G l n	a s n
G l u	a s p
G l y	a l a ; p r o
H i s	a s n ; g l n
I l e	l e u ; v a l
L e u	i l e ; v a l
L y s	a r g ; g l n ; g l u
M e t	l e u ; t y r ; i l e
P h e	m e t ; l e u ; t y r
S e r	t h r
T h r	s e r
T r p	t y r
T y r	t r p ; p h e
V a l	i l e ; l e u

10

20

30

40

50

【0037】

他の変異体は、（a）例えば、シート若しくはらせんのコンホメーションのような、置換の領域にあるポリペプチド骨格の構造、（b）標的部位での分子の電荷または疎水性、または（c）側鎖の大きさを維持することに及ぼすその効果がより有意に異なる残基を選択することのような、より保守的ではないアミノ酸置換からなる場合がある。機能に対してより有意な効果を及ぼすことが概して予期される置換は、（a）グリシンおよび／またはプロリンが別のアミノ酸により置換されるか、または欠失または挿入される；（b）親水性残基、例えばセリルまたはスレオニルが、疎水性残基、例えばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル、またはアラニルで（または、により）置換される；（c）システイン残基が他のいずれかの残基で（または、により）置換される；（d）電気陽性側鎖、例えばリジル、アルギニル、またはヒスチジルを有する残基が電気陰性電荷を有する残基、例えばグルタミルまたはアスパルチルを有する残基で（または、により）置換される；または（e）大きい側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンをこうした側鎖を有さないもの、例えばグリシンで（または、により）置換するものである。他の変異体には、新規のグリコシル化および／またはリン酸化部位を産生するように設計されたもの、または既存のグリコシル化および／またはリン酸化部位を欠失させるように設計されたものが含まれる。変異体には、グリコシル化部位、タンパク分解切断部位、および／またはシステイン残基での少なくとも1つのアミノ酸置換が含まれる。変異体には、NTPまたはNTPのセグメントのアミノ酸配列の前または後にあるリンカーペプチドに追加のアミノ酸残基を有する、NTPタンパク質またはNTPのセグメントも含まれる。例えば、NTPのセグメントのアミノ末端とカルボキシ末端の両方でシステイン残基を加え、ジスル

フィド結合の形成によるNTPのセグメントの環化を可能にしてよい。用語「変異体」には、Harllilペプチドの3'または5'末端のいずれかに隣接する少なくとも1つで25までの追加アミノ酸が付いたHarllilペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。

【0038】

用語「誘導体」は、プロセシングや他の翻訳後修飾のような天然のプロセスによるだけでなく、例えば、1以上のポリエチレングリコール分子、糖、リン酸、および／または他のこうした分子の付加によるような化学修飾技術により（ここで、上記の分子または諸分子は、天然では野生型NTPタンパク質若しくはセグメントへ付かない）化学的に修飾された、化学修飾タンパク質若しくはポリペプチドを意味する。誘導体には塩が含まれる。こうした化学修飾は、基本テキストやより詳細な研究論文、並びに大部の研究文献に十分に記載され、それらは当業者に公知である。同じ種類の修飾があるタンパク質またはポリペプチド中のいくつかの部位に同一であるかまたは変動する度合いで存在してよいと理解されよう。また、あるタンパク質またはポリペプチドは、多くの種類の修飾を含有してよい。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ若しくはカルボキシル末端を含む、タンパク質またはポリペプチドのどこで生じててもよい。修飾には、例えば、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有付加、ヘム部分の共有付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有付加、脂質または脂質誘導体の共有付加、ホスファチジルイノシトールの共有付加、架橋形成、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋連結の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク分解プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、グリコシル化、脂質付加、硫酸化、グルタミン酸残基の γ -カルボキシル化、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化、セレノイル化、硫酸化、（アルギニル化のような）転移RNA仲介性のアミノ酸のタンパク質への付加、およびユビキチン化が含まれる。例えば、「タンパク質—構造と分子特性 (Proteins—Structure and Molecular Properties)」第2版、T. E. Creighton監修、W. H. フリーマン・アンド・カンパニー、ニューヨーク（1993）と、「タンパク質の翻訳後共有修飾 (Posttranslational Covalent Modification Of Proteins)」, B. C. Johnson監修、アカデミック・プレス、ニューヨーク（1983）中、Wold, F., 「翻訳後タンパク質修飾：将来展望 (Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects)」1-12頁；Seiffterら, Meth. Enzymol. 182: 626-646（1990）、およびRattanら, 「タンパク質合成：翻訳後修飾と老化 (Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging)」, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62（1992）を参照されたい。用語「誘導体」には、タンパク質またはポリペプチドが分岐鎖になるか、または分岐化を伴うかまたは伴わずに環式になる化学修飾が含まれる。環式、分岐鎖、および分岐鎖—環式のタンパク質またはポリペプチドは、翻訳後の天然プロセスから生じる場合があり、完全に合成の方法により作製してもよい。

【0039】

用語「相同体」は、場合により、2つのポリペプチドのアミノ酸の位置の類似性を比較するために通常使用される標準法により決定されるように、NTPタンパク質、AD7C-NTP、またはNTPのセグメントのアミノ酸配列において少なくとも75%同一であるタンパク質を意味する。2つのタンパク質間の類似性若しくは同一性の度合いは既知の方法により容易に計算可能であり、それには、限定されないが、「計算分子生物学 (Computational Molecular Biology)」, Lesk, A. M. 監修、オックスフォード大学出版局、ニューヨーク、1988；「バイオコンピューティング：インフォーマティクスとゲノムプロジェクト (Biocomputing: Inf

10

20

30

40

50

ormatics and Genome Projects)」、Smith D. W. 監修、アカデミック・プレス、ニューヨーク、1993；「配列データのコンピュータ解析、第I部 (Computer Analysis of Sequence Data, Part I)」、Griffin, A. M. および Griffin, H. G. 監修、ヒュマナ・プレス、ニュージャージー、1994；「分子生物学における配列解析 (Sequence Analysis in Molecular Biology)」、von Heinje, G. アカデミック・プレス、1987；「配列解析プライマー (Sequence Analysis Primer)」、Gribskov, M. および Devereux, J. 監修、M ストックトン・プレス、ニューヨーク、1991；並びに、Carillo H. および Lipman, D., SIAM, J. Applied Math., 48:1073 (1988) に記載の方法が含まれる。同一性を決定するための好ましい方法は、検査する配列間で最大の適合 (マッチ) を与えるように設計される。同一性および類似性を決定する方法は、公的に利用可能なコンピュータ・プログラムに体系化されている。

【0040】

2つの配列間の同一性および類似性を決定するのに有用な好ましいコンピュータ・プログラム方法には、限定されないが、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J. ら, Nucleic Acids Research, 12 (1):387 (1984))、BLASTP, BLASTIN, および FASTA, Altschul, S. F. ら, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990) が含まれる。BLAST X プログラムは、NCBI や他の供給元より公的に利用可能である (BLAST マニュアル、Altschul, S. ら, NCBI NLM NIH メリーランド州ベテスダ、20894; Altschul, S. ら, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990))。例えば、GAP (遺伝学コンピュータ・グループ、ウィスコンシン大学、ウィスコンシン州マジソン) のようなコンピュータ・アルゴリズムを使用して、配列パーセント同一性を決定すべき2つのタンパク質若しくはポリペプチドをそれぞれのアミノ酸の最適マッチング (アルゴリズムにより決定されるような「適合スパン」) のために並列する。

【0041】

ギャップ空白ペナルティ (平均項 (average diagonal) の3x (倍数) として計算する；「平均項」は、使用される比較マトリックスの項の平均であり；「項」は、特別の比較マトリックスによりそれぞれの完全なアミノ酸へ割り当てられるスコアまたは数である) とギャップ延長ペナルティ (これは、通常、ギャップ空白ペナルティの1/10倍である)、並びに PAM250 または BLOSUM62 のような比較マトリックスをアルゴリズムと一緒に使用する。標準的な比較マトリックス (PAM250 比較マトリックスについては、「タンパク質の配列および構造アトラス (Atlas of Protein Sequence and Structure)」第5巻、補遺3 [1978] 中: Dayhoff ら、を参照されたい；BLOSUM62 比較マトリックスについては、Henikoff ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 [1992] を参照されたい) もこのアルゴリズムにより使用可能である。次いで、パーセント同一性をこのアルゴリズムにより計算する。相同体は、典型的には、NTP、AD7C-NTP、NTP のセグメント、または Harill 配列と比べて、1以上のアミノ酸置換、欠失、および/または挿入を有するものである。

【0042】

用語「ペプチド模倣体」または「模倣体」は、ペプチドまたはタンパク質の生物学的活性を模倣するが、もはや化学的性質がペプチドではない、生物学的に活性な化合物を意味し、即ち、それはもはやペプチド結合 (つまり、アミノ酸間のアミド結合) を含有しない。ここで、用語「ペプチド模倣体」は、偽性ペプチド、半ペプチド、およびペプトイドのような、性質がもはや完全にはペプチドではない分子を包含するようにより広義に使用される。この広義のペプチド模倣体の例 (ここでは、ペプチド結合を欠く構造によりペプチド

の一部が置き換えられている)を以下に記載する。完全に非ペプチドであれ、または部分的に非ペプチドであれ、本発明によるペプチド模倣体は、ペプチド模倣体に基づいた抗体、抗体誘導体、または抗体断片における活性基の三次元配置にきわめてよく似ている反応化学部分の空間配置を提供する。この類似の活性部位幾何学の結果として、ペプチド模倣体は、ペプチドの生物学的活性に似ている効果を生物学的システムに及ぼす。

【0043】

本発明のペプチド模倣体は、好ましくは、三次元形状と生物学的活性の両方において、本明細書に記載のNTPのセグメントに実質的に類似している。ペプチド模倣体を創製するためにペプチドを構造的に修飾する、当該技術分野で知られた方法の例には、骨格のキラル中心を転換してD-アミノ酸残基をもたらすことが含まれ、これは、特にN末端で、活性に悪影響を及ぼすことなくタンパク分解的な破壊に対して高められた安定性をもたらす。1例が論文「トリチウム化D-alal¹-ペプチドT結合 (Tritiated D-alal¹-Peptide T Binding)」, Smith C. S. ら, Drug Development Res., 15, 371-379頁 (1988) に示される。第二の方法は、NからCへの鎖間イミドおよびラクタムのような、安定性のための環式構造を改変することである (SmithおよびRivier (監修)「ペプチド:化学と生物学 (Peptides: Chemistry and Biology)」, エスコム、ライデン (1991) 中: Ede ら, 268-270頁)。この例は、その開示がそのまま本明細書に援用される、米国特許第4,457,489号 (1985), Goldstein, G. ら, に開示されるような、コンホメーションが束縛されたサイモペンチン (thymopentin) 様化合物において示される。第三の方法は、NTPのセグメント中のペプチド結合を、タンパク分解への抵抗性を与える偽性ペプチド結合に置換することである。

10

20

【0044】

ペプチドの構造および生物学的活性に概して影響を及ぼさないいくつかの偽性ペプチド結合が記載されている。このアプローチの1つの例は、逆反転 (retro-inverso) 偽性ペプチド結合に置換することである (Rivier, J. E. および Marshall, G. R. (監修)「ペプチド、化学、構造、および生物学 (Peptides, Chemistry, Structure and Biology)」, エスコム、ライデン (1990) 中: 「生物学的に活性なサイモペンチンの逆反転類似体 (Biologically active retroinverso analogues of thymopentin)」, Sisto A. ら, 722-773頁、および Dal Pozzo ら (1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41: 561-566, 本明細書に援用される)。この修飾によれば、ペプチドのアミノ酸配列は、1以上のペプチド結合が逆反転偽性ペプチド結合に置き換えられることを除けば、上記のNTPのセグメントの配列に同一であり得る。好ましくは、最もN末端のペプチド結合が置換される。なぜなら、こうした置換がN末端に作用するエクソペプチダーゼによるタンパク分解への抵抗性をもたらすからである。アミノ酸の化学基を類似構造の他の化学基で置き換えることによって、さらなる修飾を行ってもよい。生物学的活性の喪失を少しも、またはほとんど伴わずに酵素的切断に対する安定性を高めることが知られている別の好適な偽性ペプチド結合は、還元された同配体の偽性ペプチド結合である (Coudere ら (1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41: 181-184, そのまま本明細書に援用される)。

30

40

【0045】

このように、これらペプチドのアミノ酸配列は、1以上のペプチド結合が同配体偽性ペプチド結合に置き換えられていることを除けば、NTPのセグメントの配列またはHarlil配列に同一であり得る。好ましくは、最もN末端のペプチド結合が置換される。なぜなら、こうした置換がN末端に作用するエクソペプチダーゼによるタンパク分解への抵抗性をもたらすからである。1以上の還元された同配体偽性ペプチド結合を有するペプチドの合成は、当該技術分野で知られている (Coudere ら (1993), 上記に引用)。

50

他の例には、ケトメチレン若しくはメチルスルフィド結合を導入してペプチド結合を置き換えることが含まれる。

【0046】

NTPのセグメントまたはHarlil配列のペプチド誘導体は、生物学的活性に重要な構造決定基を保持しながらもペプチド結合を除去し、それによりタンパク分解への抵抗性を与える別のクラスのペプチド模倣体を表す(Simonら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9367-9371, そのまま本明細書に援用される)。ペプチドは、N置換グリシンのオリゴマーである。天然アミノ酸の側鎖にそれぞれ対応する、いくつかのN-アルキル基が記載されている(Simonら(1992), 上記に引用)。NTPのセグメントまたはHarlil配列のアミノ酸のいくつかまたは全部を、置き換えられるアミノ酸に対応するN置換グリシンに置き換えてよい。

10

【0047】

用語「ペプチド模倣体」または「模倣体」には、以下に定義されるような逆D-ペプチドおよび鏡像異性体も含まれる。

用語「逆D-ペプチド」は、NTPのセグメントまたはHarlil配列のL-アミノ酸配列に比べて逆の順序で配置されたD-アミノ酸からなる生物学的に活性なタンパク質若しくはペプチドを意味する。従って、NTPのL-アミノ酸セグメントのカルボキシ末端残基が、このD-アミノ酸ペプチドのアミノ末端になる、という具合である。例えば、AD7C-NTP断片のHARLILは、 $L_d I_d L_d R_d A_d H_d$ となり、ここで A_d 、 H_d 、 I_d 、 L_d 、および R_d は、L-アミノ酸のA、H、I、L、およびRにそれぞれ対応するD-アミノ酸である。

20

【0048】

用語「鏡像異性体」は、NTPのセグメントのアミノ酸配列中の1以上のL-アミノ酸残基が対応するD-アミノ酸残基で置き換えられている、生物学的に活性なタンパク質若しくはペプチドを意味する。

【0049】

本記載を通し、用語「神経変性障害」は：

1. 以下の徴候の1つ以上を特徴とする病理学的状態：脳萎縮、細胞消失、神経原線維のもつれ、アミロイド斑、および／または、組織および／または体液におけるNTPの存在；
2. アルツハイマー病の疾患群、即ち、アルツハイマー病（初老性痴呆症、老人性痴呆症）；ダウン症候群に関連したアルツハイマー病；家族性アルツハイマー病；プレセニリン1、プレセニリン2、等のような突然変異による遺伝性アルツハイマー病；パーキンソン病、リューイ小体病、および脳血管系疾患のような他の中枢神経系疾患に関連したアルツハイマー病；
3. （家族性または非家族性アルツハイマー病に関連または非関連の）親コンゴ染料性脈管障害；
4. 異常原線維（「アミロイド原線維」）および／または関連の非原線維アミロイド前駆体または非前駆体分子の沈着を特徴とする病理学的状態；
5. 前頭側頭痴呆症、進行性核上麻痺（PSP）、皮質脳幹神経節変性（CBD）、およびタウ遺伝子の突然変異に関連した状態を含む、タウの異常沈着を特徴とする病理学的状態；および／または
6. その開示がそのまま本明細書に援用される米国特許第6,001,331号に開示されるような他の障害および疾患。

30

40

【0050】

本記載を通し、表現「アミロイド斑」および「アミロイド原線維」は、老人斑、神経炎性斑、アミロイド斑、アミロイド星状体、アミロイド中核、初期斑、標準斑、枯渴（バーンアウト）斑、拡散斑、陰影斑、神経原線維のもつれ、アミロイド原線維、対合らせんフィラメント、等を明示する。

【0051】

50

本記載を通し、用語「哺乳動物」は、すべての哺乳動物を明示し、好ましくは、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ、無尾猿、有尾猿、マウス、ラット、およびヒトを明示し、最も好ましくは、ヒトを明示する。

【0052】

本記載を通し、表現「NTPのセグメント」、「Harlil配列」、および「Harlilペプチド」は、相互交換可能的に使用される。「NTPのセグメント」、「Harlil配列」、または「Harlilペプチド」が使用されるときはいつでも、本発明にはその好適な相同体、変異体、誘導体、およびペプチド模倣体が含まれる。

【0053】

本記載を通し、表現「NTPを含有する組織」は、NTPの全部または一部を含有する組織、NTPと細胞情報伝達していて、それを含有し得るかまたは他のやり方ではそれを含有し得ない組織、NTPと接触したことがあるが、もはやそれをその原形では含有しない組織、並びに、ある時点でNTPと接触する可能性がある組織を明示する。 10

【0054】

本発明は、細胞死および／または組織壊死を予防する方法へ向けられる。NTPは知られていて、文献に記載されてきたが、NTPを産生する細胞以外の細胞の細胞死の原因がNTPであることは、これまで知られていなかった。ある理論に束縛されるつもりはないが、本発明者は、生組織におけるNTPの存在は、以前から報告されてきたように、特定の神経細胞死を示唆するだけでなく、他の生組織の細胞死を引き起こす限りにおいて、有毒でもあると考えている。本発明者は、特に生きた哺乳動物脳組織中に存在するAD7C-NTPがアルツハイマー病（AD）のマーカーであり、それが存在する生組織中で細胞死および／または組織壊死を引き起こすことによってADを悪化させると考えている。 20

【0055】

従って、哺乳動物がADに罹患すると、神経細胞死により、AD7C-NTPを選好的に産生する遺伝子がアップレギュレートされ、それによりその部位でAD7C-NTPが産生されると考える。次いで、このように産生されたAD7C-NTPは、その近傍にある他の生組織（例、他の神経細胞、グリア細胞、等）を破壊しはじめ、それによりこの疾患の進行を悪化させる。故に、本発明者は、例えば、AD7C-NTPの効果を中和することが、例えば、AD7C-NTPを含有する生組織中の細胞死および／または組織壊死を予防、阻害、および／または改善することに役立つと考える。NTPのセグメントがAD7C-NTPへ結合し、AD7C-NTPを含有する生組織中の細胞死および／または組織壊死を予防、阻害、および／または改善することが可能であることを見出したのは驚くべきことであった。 30

【0056】

NTPは既知であり、例えば、その開示が本明細書にそのまま援用される、米国特許第5,948,634号、5,948,888号、5,830,670号、および6,017,705号に記載されている。NTPを組換え的にかまたは他のやり方で作製する方法が上記の文献に開示される。ADや他の関連障害および疾患を診断し得るようにNTPに対する抗体を産生することも上記の文献に開示される。NTPの相同体、誘導体、模倣体、および変異体、並びに多様な供給源（例、天然、臍臓、精製、合成、または様々なin vitro発現系、など）由来のNTPを使用して、本発明に有用なセグメントをいずれも作製可能であることが当業者には明らかであろう。 40

【0057】

本発明は、細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害する方法へ向けられる。本発明には少なくとも1つのNTPのセグメントと生組織を接触させることが含まれ、それにより該セグメントは、細胞死および／または組織壊死を予防および／または阻害するのに十分な量で存在する。NTPのセグメントは、好ましくはAD7C-NTPのサブ配列であり、最も好ましくは、AD7C-NTPの以下のリピート配列の少なくとも1つを含有する：

(a) 45-51

THARLIL

(b) 90-96 HHARLCLL
(c) 263-269 MFARLLIL
(d) 291-297 HHARLLIF

図1を参照されたい。

【0058】

本発明には、領域 (a)、(b)、(c)、(d) のいずれかの配列を有するペプチド、またはこれらの (限定されないが、「HARLLML」を含む) 相同体、誘導体、変異体、および模倣体が含まれる。Harllil ペプチドはまた、Harllil 配列の前または後でリンカーペプチドに追加のアミノ酸残基を有する場合がある。追加のアミノ酸残基またはリンカーペプチドは、Harllil 配列の前および後の NTP 配列に見出されるものであってよい。例えば、アミノ酸残基 G I T G M C T が残基 46 の前に現れ、アミノ酸残基 Y F F L V が NTP 配列のアミノ酸 51 の後に現れる。従って、本発明における NTP のセグメントとして有用な Harllil ペプチドには、NTP ペプチド: G I T G M C T H A R L L I L Y F F L V が含まれてよい。(b)、(c)、および (d) に列挙される Harllil ペプチドについては、追加のアミノ酸残基は、好ましくは、NTP 配列中のこの Harllil 配列に隣接するものである。好ましくは、追加のアミノ酸残基を有する Harllil ペプチドは、長さにおいて全 25 アミノ酸残基を超えない。

【0059】

Harllil リピート配列は、好ましくは、NTP へ結合するユニークな特性を有する。NTP へ結合するこの能力は、Harllil リピート配列が、NTP を含有する生組織中の細胞死および/または組織壊死を予防、阻害、または改善するのに有用であることを示唆する。

【0060】

本発明は、Harllil 配列ペプチドとその相同体、誘導体、変異体、およびペプチド模倣体の、細胞死および/または組織壊死に関連した状態の治療のための NTP や他の分子のアフィニティー結合パートナーとしての使用に向けられる。本発明はまた、細胞死および/または組織壊死に関連した状態を治療する方法、並びに、bbb を通過することが可能である、Harllil ペプチドまたはその相同体、誘導体、変異体、およびペプチド模倣体を含有する組成物へ向けられる。

【0061】

Harllil ペプチドとその相同体、誘導体、および変異体は、慣用のペプチド合成技術を使用して作製可能である。Harllil ペプチドの模倣体は、コンビナトリアルケミストリー技術を使用して開発することが可能である。

【0062】

Harllil ペプチドに対応する核酸は、例えば、(a) 標準組換え法、(b) 合成技術、または (c) これらの組み合わせを使用して作製可能である。

Harllil 配列は、AD7C-NTP や他の分子へ結合する。その開示がそのまま本明細書に援用される、「神経線維タンパク質の好ましいセグメントとそれを使用する方法」と題した、出願中の米国特許出願第 09/697, 590 号を参照されたい。

【0063】

本発明には、AD7C-NTP へ結合可能である Harllil 配列が、AD7C-NTP を含有する生組織中の細胞死および/または組織壊死を予防または阻害し得るという驚くべき発見が含まれる。

【0064】

AD7C-NTP が神経変性カスケードに参画するという証拠がある。AD7C-NTP を標的にすることによってこのカスケードを妨害するかまたは向けなおす能力は、治療機会を提供する。例えば、AD7C-NTP 結合部位と相互作用する Harllil ペプチドの能力を使用し、それにより AD7C-NTP の潜在的な活性部位を遮断することによって、治療的に介入することが可能になるかもしれない。

【0065】

10

20

30

40

50

あるいは、本発明のH a r l i l ペプチドは、H a r l i l ペプチドを発現する細胞へ薬物を標的化すること、またはH a r l i l 配列の発現をi n v i v oで誘導する遺伝子またはワクチンを創製するのに有用であるかもしれない。

【0066】

H a r l i l 配列が作動する実際の機序はまだ知られていないが、本発明者は、A D 7 C - N T Pを含有する生組織へのH a r l i l 配列の投与が、H a r l i l 配列の非存在下では別な具合に生じる細胞死および組織壊死を予防および／または阻害および／または改善することを見出した。

【0067】

「H A R L I L」部位が他の脳タンパク質と相互作用し、A D 7 C - N T Pおよび／または他のN T Pまたは他の分子の機能性においてある役割を担い得る可能性がある。 10

こうしたH a r l i l 配列、またはその機能的な相同体若しくは類似体を作製して検出する方法が、その開示がそのまま本明細書に援用される、「神経線維タンパク質の好ましいセグメントとそれを使用する方法」と題した、同時出願中の米国特許出願第09／697,590号に記載されている。

【0068】

本発明の文脈において特に有用であるN T Pのペプチドセグメントは、上記に記載され、A D 7 C - N T PのH A R L I Lアミノ酸配列の少なくとも一部を包含するものである。有用なH a r l i l 配列には、以下のリストより選択されるアミノ酸配列が含まれる：

- (a) H H A R L ;
- (b) H A R L ;
- (c) H A R L I ;
- (d) H A R L I L ;
- (e) H H A R L C L ;
- (f) A R L I L ;
- (g) H H A R L I F ;
- (h) T H A R L I L ;
- (i) A R L I ;
- (j) A R L ;
- (k) H A R L C L ;
- (l) A R L C L ;
- (m) A R C L ;
- (n) M F A R L I L ;
- (o) F A R L I L ;
- (p) F A R L I ;
- (q) F A R L ;
- (r) H A R L I F ;
- (s) A R L I F ;

20

30

および、その相同体、変異体、誘導體、および模倣体。

【0069】

上記のリストより選択される様々なペプチドとその相同体、変異体、誘導體、および模倣体は、本発明において、N T Pのセグメントとして使用可能である。例えば、ペプチドはアミノ酸配列A R L Iを有し、このペプチドの3'若しくは5'末端のいずれかに隣接する少なくとも1から25までの追加アミノ酸を含んでよい。ペプチドはまた、アミノ酸配列H A R L Iを有し、このペプチドの3'若しくは5'末端のいずれかに隣接する少なくとも1から25までの追加アミノ酸を含んでよい。さらに、ペプチドはアミノ酸配列F A R Lを有し、このペプチドの3'若しくは5'末端のいずれかに隣接する少なくとも1から25までの追加アミノ酸を含んでよい。ペプチドはまた、アミノ酸配列A R Lを有し、このペプチドの3'若しくは5'末端のいずれかに隣接する少なくとも1から25までの追加アミノ酸を含んでなるものより選択してよい。本発明においてさらに別の有用なペプ 50

40

50

チドには、アミノ酸配列 A R L C を有し、このペプチドの 3' 若しくは 5' 末端のいずれかに隣接する少なくとも 1 から 25 までの追加アミノ酸を含んでなるものが含まれる。最後に、NTP のセグメントは、H a r l i l ペプチドの少なくとも 2 つの繰り返しを含んでなる、このペプチド配列のポリマーであってよい。

【0070】

H a r l i l 配列が以下のアミノ酸配列を有するペプチドであることは、本発明においてさらにより好ましい。

1. (NTP-1) L H A R L C L A N F C G R N R V
2. (NTP-2) L A R L C L A N F C G N N N V
3. (NTP-3) C A R Y R T G H H A R L M
4. (NTP-4) H H A R L P L A N F C G
5. (NTP-5) R T G H H A R L C L A N F C
6. (NTP-6) C E S A R Y R T G H H A R L C
7. (NTP-7) D N T H H A R L I L
8. (NTP-8) S H H A R L I L

10

上記の配列は、システインを介して担体タンパク質へコンジュゲートしてよい。従って、1 以上のシステイン残基の存在により、ペプチド NTP-1 および NTP-2 から産生される混合コンジュゲートが生じる。故に、ペプチド NTP-5 および NTP-6 では、第二のシステインをアセトアミドメチル (C_3H_6NO) (ACM) で遮断した。

【0071】

20

A D 7 C-NTP 中に同定される配列の位置を図 1 から見る事が可能である。H a r l i l 類似体のすべてはいくらかの反応性を示したが、特に好ましい H a r l i l 類似体は、NTP-1、NRP-3、および NTP-7 より選択されるものである。H a r l i l 類似体 NTP-1 においては、第一アミノ酸の「L」をリジンまたは「K」で置き換えてもよいことに注目すべきである。

【0072】

H a r l i l 配列、または NTP のセグメントを、好ましくは、NTP を含有する生組織と接触させる。NTP を含有する生組織、NTP に接触して NTP がもはや存在しないかその原形においては存在しない生組織、またはある時点では NTP を含有する可能性がある生組織がいずれも本発明に含まれる。好ましくは、組織は、哺乳動物組織より選択される組織である。

30

【0073】

本発明の態様には、NTP を含有する生組織の壊死により引き起こされる状態を治療する方法が含まれる。この文脈において、生組織の壊死と細胞死は、NTP を産生する瀕死の細胞以外の細胞の細胞死および／または組織壊死を明示する。この方法においては、こうした状態に罹患している哺乳動物へ NTP のセグメントまたは H a r l i l 配列が投与される。H a r l i l 配列は、生組織壊死を予防および／または阻害するのに十分な量において、そして十分な時間の間、投与される。

【0074】

当業者は、H a r l i l 配列を直接投与することの代わりに、H a r l i l 配列またはその相同体、変異体、誘導体、または模倣体を、遺伝子発現（例、遺伝子治療）を介してかまたはワクチンを介して哺乳動物により産生または発現させることが可能であることを理解されよう。当業者は、H a r l i l 配列、またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体の発現を誘導するのに有用な好適な遺伝子またはワクチンを、本明細書に提供されるガイドラインを使用して創製、単離、および精製することが可能である。

40

【0075】

例えば、遺伝子治療は、様々な哺乳動物疾患を治療し、特定のタンパク質や他の細胞産物の産生を亢進させる方法として広い関心をひきつけてきた。遺伝子治療は、一般に、外来の遺伝物質を哺乳動物患者の細胞へ導入することによって達成される。導入された遺伝物質は、哺乳動物患者の異常（欠陥）遺伝子に置き換わるように設計可能である（「遺伝子

50

置換療法」)か、またはいかなる欠陥遺伝子の置換もせずに、コードされるタンパク質や他の治療産物の発現用に設計可能である(「遺伝子増強法」)。多くの先天性および獲得性医学障害は様々な遺伝子産物の不十分な産生から生じるので、遺伝子治療は、治療産物をコードする外来核酸の一過性または安定した発現を介してこれらの疾患を治療する手段を提供する。

【0076】

遺伝子治療は、哺乳動物被検者内の標的細胞の直接的な形質転換(in vivo 遺伝子治療)によるか、または細胞をin vitroで形質転換した後でこの形質転換細胞を哺乳動物被検者へ埋込むこと(ex vivo 遺伝子治療)のいずれかにより達成可能である。in vivo 遺伝子治療は、本発明における使用に特に好ましい。体細胞の修復だけでなく、in vivo 遺伝子治療はまた、遺伝子治療に広い適用がある、全身治療の領域にも使用可能であることが一般に知られている。全身治療には、標的細胞を目的のDNAでトランスフェクトすること、コードタンパク質をその細胞中で発現させること、並びにその製造されたタンパク質をその後血液へ分泌する形質転換細胞の能力が関与する。

【0077】

機械的な手段(例、核酸の標的細胞への直接注入、または粒子衝突)、組換えウイルス、リポソーム、および受容体仲介性エンドサイトーシス(RME)を含む多様な方法が、in vivo 形質転換を達成するために開発されてきた(概説については、Changら, 1994 Gastroenterol. 106:1076-84; Morsyら, 1993 JAMA 270:2338-45; および、Ledley 1992 J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 14:328-37を参照されたい)。

【0078】

Harllil配列またはNTPのセグメント、またはその相同体、変異体、誘導体、または模倣体のin vivo発現を誘導するのに適した遺伝子およびワクチンを開発して投与する好適な方法は、例えば、米国特許第6,210,919号および6,225,290号に開示される。これら特許のそれぞれの開示は、そのまま本明細書に援用する。

【0079】

細胞死および壊死に関連したどの状態も本発明に従って治療可能である。好ましくは、状態は、AD、ピック病、リューイ小体病、またはパーキンソン病のような神経変性疾患より、または卒中、脳腫瘍や他の脳疾患、または緑内障より選択される。

【0080】

本発明の好ましい態様によれば、本方法には、細胞死および/または組織壊死を予防するのに十分な量の少なくとも1つのNTPのセグメント(またはその相同体、誘導体、変異体、または模倣体)と生組織を接触させることが含まれる。NTPのセグメントを投与する方法には、NTPのセグメントを筋肉内、経口、静脈内、腹腔内、大脳内(実質内)、脳室内、腫瘍内、病巣内、皮内、鞅内、鼻腔内、眼球内、動脈内、局所的、経皮的に、エアゾール、注入、ボーラス注射、埋込み器具、持続放出系などにより、単独でかまたは担体へコンジュゲートして投与することが含まれる。さらに、NTPのセグメントは、上記のように、当該タンパク質を発現する遺伝子の投与により、こうした産生を誘導するワクチンの投与により、または、該セグメントをin vivoで発現する細胞、細菌、またはウイルスの導入によりin vivoで発現または産生させてよい。

【0081】

神経系障害や他の脳関連障害の治療は、動物または患者における神経系の機能若しくは機能不全に影響を及ぼす薬物を投与することによって達成可能である。典型的には、こうした薬物は、経口によるかまたは全身経路により、末梢適用によって投与される。血液脳関門(bbb)を通過することが可能である薬物もあれば、bbbを効率的に通過しないか、またはまったく通過せず、脳へ直接投与するときしか有効でない薬物もある。本明細書で使用する用語「血液脳関門」または「bbb」は、厳格な意味でのbbbだけでなく、

血液脳関門も意味する。脳血管の内皮、基底膜、および神経膠細胞からなる血液脳関門は、物質の脳への浸透を制限するように作用する。時々、bbbの構造は、内皮若しくは毛細血管関門と上皮関門という2つの成分へ細分される。Banks, W. A., Kastin, A. J., Barrera, 「中枢神経系へのペプチドの搬送：ジレンマと戦略 (Delivering peptides to the central nervous system: Dilemmas and strategies)」, Pharm. Res. 8:1345-1350 (1991)。

【0082】

bbbを通過する物質浸透の本質はまだ決定されていないが、サイトカイン、トランスフェリン、エンケファリン、およびエンドルフィンのような脳機能のレギュレーターの多くは血管からbbbを通過し得ることが知られている。Raeissi, S., Audus, J., 「 δ 睡眠誘発ペプチドに対する血液脳関門透過性のin vitro特性決定 (In vitro characterization of blood-brain barrier permeability to delta sleep-inducing peptide)」, J. Pharm. Phy. 41:848-852 (1989); Zlokovich, B., Susie, V. T., Davson, H., Begley, D. J., Jankov, R. M., Mittrivic, B. M., Lipovac, M. N., 「血管灌流モルモット脳の血液脳関門での δ 睡眠誘発ペプチド (DSIP) の飽和可能機序 (Saturable mechanism for delta sleep-inducing peptide (DSIP) at the blood-brain barrier of the vascularly perfused guinea pig brain)」, Peptides 10:249-254 (1989); および、Zlokovich, B., 「血液脳関門でのペプチド相互作用を研究するためのin vivoアプローチ (In vivo approaches for studying peptide interaction at the blood-brain barrier)」, J. Control. Rel. 13:185-201 (1990)。しかしながら、アデノシン、 β -エンドルフィン、内因性ペプチドの合成類似体のような、中枢神経系（またはCNS）に影響を及ぼすことが可能である多くの物質、並びにある種の興奮性および阻害性アミノ酸や栄養因子は、bbbをわずかに通過するか、またはまったく通過しない。Houghten, R. A. Swan, R. W., Li, C. H., 「 β -エンドルフィン：ラットおよびウサギにおけるトリチウム化ペプチドの静脈内注射後の安定性、クリアランス行動、および中枢神経系へのエンタリー (β -Endorphin: Stability, clearance behavior and entry into the central nervous system after intravenous injection of the tritiated peptide in rats and rabbits)」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4588-4591 (1980); Levin, E. R., Frank, H. J. K., Weber, M. A., Ismail, M., Mills M., 「心房性ナトリウム利尿因子による血液脳関門の浸透に関する研究 (Studies on penetration of the blood-brain barrier by atrial natriuretic factor)」, Biochem. Biophys. Res. Commun. 147:1226-1231 (1987); Sakane, T., Tanaka, C., Yamamoto, A., Hashida, M., Sesaki, H., Ueda, H., Takagi, H., 「ポリソルベート80の脳取込みに及ぼす効果とD-kyotoの鎮痛効果 (The effect of polysorbate 80 on brain uptake and analgesic effect of D-kyoto)」, Int. J. Pharm. 57:77-83 (1989)。現在のところ、bbb浸透性がないかまたはbbb浸透性が乏しい薬物は、直接のCNS注入によるか、または制御放出ポリマーの埋込みによってのみ与えることができる（例えば

、米国特許第4, 883, 666号、S a b e lら, を参照されたい)。

【0083】

従来の薬物療法の限界のいくつかを克服する1つのやり方は、b b bを通過する薬物の相対量を増加させることである。これは、ある薬物または診断物質の末梢用量を減らしながら、b b bを通過する薬物の量を増やすことができれば、所望の効果を脳中で維持すると同時に、薬物の末梢での副作用もさほど重篤でなくなるという考え方である。b b bを通過する薬物浸透を高めるのに有効なものとしていくつかのアプローチが記載されてきた。

【0084】

1つのアプローチは、b b bそのものの機能を改変させることであった。例えば、浸透剤を末梢より(静脈内注射によるようにして)与えると、b b bの開口をもたらす。さらに、CNSに作用する薬物には、他の物質へのb b bの透過性を変化させ得るものがある；例えば、コリン模倣性のアレコリンは、b b bを通過する薬物浸透の変化を誘発すると報告された。S a i j a, A. , P r i n c i, P. , D e P a s q u a l e, R. , C o s t a, G. , 「ハロペリドールではなく、アレコリンは、ラットの血液脳関門の透過性に変化をもたらす(A r e c o l i n e b u t n o t h a l o p e r i d o l p r o d u c e s c h a n g e s i n t h e p e r m e a b i l i t y o f t h e b l o o d - b r a i n b a r r i e r i n t h e r a t)」, J. P h a r m. P h a. 42:135-138(1990)。

b b bの透過性を改変させるために投与可能である他の薬物は、米国特許第5, 059, 415号および5, 124, 146号(いずれもE. A. N e u w e l tへ発行)に開示される。ブラジキニンは、こうした効果のある1つの特定の薬物である(米国特許第5, 112, 596号、M a l f r o y - C a m i n eへ発行)。別の方法は、A-7やその配座類似体のような易透過剤(permeabilizer)ペプチドを投与することを含む(WO92/18529, J. W. K o z a r i c hらの出願)。b b bを開けるためにS t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e(肺炎連鎖球菌)のような真性細菌の精製された細胞壁若しくは細胞壁断片の非経口注射液を投与する、A. T o m a s zおよびE. T u o m a n e n (WO91/16064)による比較的侵襲的な方法が提唱された。

【0085】

米国特許第5, 260, 210号(L. L. R u b i nらへ発行)は、サイクリックAMP濃度を低下させるかまたはそれに緩衝するか、またはサイクリックGMP濃度を高める剤を投与することによって血液脳関門の透過性を高める方法を開示する。

【0086】

別のアプローチは、薬物分子そのものの修飾である。例えば、タンパク質のような高分子はb b bをまったく通過しないか、またはかろうじて通過するか、またはタンパク質の効力に不都合に影響する改変を伴って通過する。例えば、この高分子の活性部位、即ち、生物学的に望ましいイベントの引き金となる分子の部分をはじめに単離してから、この活性部位のみを使用することが可能である。大きさは、b b bの透過を可能にする要因の1つであるので、より小さい分子がb b bを通過し得るように、縮小したサイズが使用可能である。b b bの通過を試みる高分子への他の修飾には、タンパク質を糖化(glycate)することによりそのb b b浸透性を亢進させること、またはプロドラッグを形成させることが含まれる。米国特許第5, 260, 308号(J. F. P o d u s i oおよびG. L. C u r r a nへ発行)はタンパク質の糖化について論じ、一方、米国特許第4, 933, 324号およびWO89/07938(いずれも、V. E. S h a s h o u aの出願)はプロドラッグの形成を開示する。これらのプロドラッグは、脂肪酸担体とそれ自身ではb b bを通過することができない神経活性薬から形成される。同様の系がWO98/07938に開示される。

【0087】

さらに別のアプローチは、有効成分をマトリックス系から放出する制御放出ポリマーを神経組織へ直接埋込むことである。しかしながら、このアプローチは侵襲的であり、脳や脊

10

20

30

40

50

髄へ直接埋込むならば、外科的介入を必要とする（S a b e l ら，米国特許第4，883，666号；および、S a b e l ら，米国特許出願第07／407，930号を参照されたい）。また、その開示がそのまま本明細書に援用される、米国特許第5，800，390号に開示されるように、組成物を脳の内側部分へ直接投与することも知られている。上記の方法は、持続放出の固形調製物および半固形調製物を脳組織へ直接搬送することを可能にする。

【0088】

これらの限界を克服するために、リポソーム、赤血球ゴースト、抗体コンジュゲート、およびモノクローナル抗体コンジュゲートのような薬物担体系を使用する別のアプローチが試されてきた。標的化ドラッグ・デリバリー（薬物搬送）の主要な問題の1つは、注射された担体が細網内皮系（R E S）により、特に肝臓および脾臓中のマクロファージにより速やかにオプソニン処置をされて取込まれることである。この障害は、リポソームの場合は、ホスファチジルイノシトール、モノシアロガングリオシド、またはスルホガラクトシルセラミドのようないわゆる「偽装（s t e a l t h）」脂質の取込みにより一部克服することが可能である。

10

【0089】

米国特許第5，182，107号および5，154，924号（いずれもP. M. F r i d e nへ発行）は、薬物を抗体とコンジュゲートする方法を教示し、ここで抗体は、トランスフェリン受容体と反応する。トランスフェリン受容体は、脳毛細血管の内皮細胞に位置し、それにより神経成長因子のような薬物を、b b bを通して輸送することができる。米国特許第5，004，697号（P a r d r i d g eへ発行）は、特定の等電点を有するカチオン化抗体を提供することによって、こうした抗体-コンジュゲート法を改善する（P a r d r i d g eによるW O 89／01343も参照されたい）。

20

【0090】

別のアプローチは、活性剤をコンジュゲートするキメラペプチドを創製することである（米国特許第4，801，575号、やはりP a r d r i d g eへ発行）。こうした系については、米国特許第4，902，505号（P a r d r i d g eおよびS c h i m m e lへ発行）でもさらに考察され、ここでは、ヒストンのようなキメラペプチドがトランスサイトosisによりb b bを通過することが可能である。

【0091】

米国特許第5，187，158号および5，017，566号（いずれもN. S. B o d o rへ発行）は、脳特異的な薬物搬送法を開示し、ここでは中枢作用性の薬物が、ドーパミンのようなジヒドロピリジン反応-ピリジン塩酸化還元担体の還元された生物酸化可能ナリポイド型とともに投与される（米国特許第4，880，816号（やはりB o d o rへ発行）も参照されたい）。

30

【0092】

遺伝物質を脳へ搬送するには、かなり侵襲的なアプローチが採られる。これは、例えば、b b bを化学的に破壊してから、b b bを通して遺伝子を搬送するウイルスを使用することによってなされる（米国特許第4，866，042号（E. A. N e u w e l tへ発行）を参照されたい）。ここでは、矯正的な遺伝物質をウイルスへ取込ませてから、このウイルスを血流へ注射する。

40

【0093】

最後に、b b bを通過して薬物を搬送するさらに別の担体系は、F. D. C o l l i n sおよびR. C. T h o m p s o n（W O 91／04014）により開示されるように、リポソームの使用である。ここでは、b b bを通過して特定のリガンドを輸送する特定の内因性脳輸送系へリポソームを標的化する。

【0094】

別のアプローチが米国特許第6，117，454号（K r e u t e r らへ発行）に開示される。K r e u t e r 特許の主題事項には、広範囲の薬物の薬物担体（または標的指向分子）として界面活性剤でコートしたナノ粒子を使用してb b bを通過する薬物または診断

50

剤の浸透を高めるための方法、組成物、および薬物標的指向系が含まれる。

【0095】

別のアプローチは、薬物を鼻腔内に投与して、脳への直接アクセスを可能にし、血流を回避することである。これは、3つの神経ペプチド、メラノコルチン、バソプレッシン、およびインスリンでは実験モデルにおいて成功裡になされた：Born J ら、「吸鼻性の神経ペプチド：ヒト脳への経鼻アプローチ (Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain)」, *Nature Neuroscience* アドバンス・オンライン・パブリケーション：2002年5月6日、DOI：10.1038/nn849。

【0096】

経口投与用の固形剤形には、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、および顆粒剤が含まれる。こうした固形剤形では、通常、活性化化合物を以下の少なくとも1つと混合する：(a) クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウムのような、1以上の不活性賦形剤（または担体）；(b) デンプン、乳糖、スクロース、グルコース、マンニトール、および珪酸のような、充填剤または増量剤；(c) カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、およびアカシアのような、結合剤；(d) グリセロールのような、加湿剤 (humectants)；(e) 寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ若しくはタピオカデンプン、アルギン酸、特定の複合珪酸塩、および炭酸ナトリウムのような、崩壊剤；(f) パラフィンのような、溶解遅延剤；(g) 四級アンモニウム化合物のような、吸収促進剤；(h) アセチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールのような、湿潤剤；(i) カオリンおよびベントナイトのような、吸着剤；および(j) タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、またはこれらの混合物のような、滑沢剤。カプセル剤、錠剤、および丸剤では、剤形が緩衝剤も含んでよい。

【0097】

経口投与用の液体剤形には、製剤的に許容される乳剤、溶液剤、懸濁液剤、シロップ剤、およびエリキシル剤が含まれる。液体剤形は、活性のあるHarllil配列化合物に加えて、水または他の溶媒、可溶化剤、および乳化剤のような当該技術分野で通常使用される不活性希釈剤を含んでよい。例示の乳化剤は、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、綿実油、落花生油、トウモロコシ油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油のようなオイル、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、ソルビタンの脂肪酸エステル、またはこれらの物質の混合物、等である。こうした不活性希釈剤以外に、組成物には、湿潤剤、乳化および懸濁剤、甘味剤、芳香剤、および発香剤のようなアジュバントも含めてよい。

【0098】

NTPのセグメントを投与する別の方法は、経皮または経皮膚的 (transcutaneous) 経路による。こうした態様の1つの例は、パッチの使用である。特に、パッチは、例えば、ジメチルスルホキシド (DMSO)、または綿実油とDMSOの混合物中のNTPのセグメントの微細懸濁液を用いて調製し、治療部位から離れた哺乳動物の皮膚と接触させることが可能である。組成物は、皮膚ポケットの内側に存在してよい。他の媒体または他の溶媒および固形支持体とその混合物も、同様に機能するだろう。パッチは、NTPのセグメントを溶液または懸濁液の型で含有することが可能である。次いで、例えば、皮膚にひだを作り、縫合し、クリップ、または他の固定器具により皮膚を一緒に固定することによって形成される患者の皮膚ポケットへパッチを挿入することにより、それを患者の皮膚へ適用することが可能である。このポケットは、皮膚との継続的な接触が哺乳動物の干渉を受けずに確保されるようなやり方で利用されるべきである。皮膚ポケットを使用すること以外に、皮膚と接触したパッチのしっかりとした位置を確実にするどんな器具を使用してもよい。例えば、接着ガーゼ包帯を使用してパッチを皮膚上に固定してよい。

10

20

30

40

50

【0099】

本発明の組成物にある有効成分の実際の投与量レベルは、特別の組成物と投与の方法に対して望ましい組織壊死阻害性の治療応答を得るのに有効であるNTPのセグメント含有組成物を得るために変動する場合がある。故に、選択される投与量レベルは、所望の治療効果、投与の経路、所望の治療期間、および他の要因に依存する。

【0100】

ヒトを含む哺乳動物では、体表面積に基づいて有効量を投与することが可能である。様々な大きさの動物、種、およびヒトへの投与量の相互関係 ($\text{mg}/\text{体表面積}(\text{M}^2)$ に基づく) が、E. J. Freireichら, Cancer Chemother. Rep., 50(4):219(1966)に記載されている。体表面積は、個体の身長および体重から近似的に決定可能である (例えば、「科学表 (Scientific Tables)」、ガイギー・フェーマシューティカルズ、ニューヨーク州アーズリィ、537-538頁を参照されたい)。

【0101】

宿主へ投与されるNTPのセグメントの全1日量は、単回用量または分割用量であってよい。投与単位組成物は、1日用量を構成するために使用可能であるような、そうした量のそうしたまとまり (submultiples) を含有してよい。しかしながら、特別な患者への特定の用量レベルは、体重、一般健康状態、性別、食事、投与の時間および経路、投与薬物の効力、吸収および排泄の速度、他の薬物との組み合わせ、および治療される特別な疾患の重症度を含む、様々な要因に依存するものである。

【0102】

本発明のNTPのセグメント含有組成物は、好ましくは、生きた脳組織を治療するために、NTPのセグメントが血液脳関門を通過することを可能にする成分を含有する。上記の多様な成分はいずれもセグメントが血液脳関門を通過することを可能にするために使用可能である。例えば、NTPのセグメントは、血液脳関門を横断するほどに小さい場合がある。この場合、追加の成分は必要とされないだろう。

【0103】

NTPのセグメントは、米国特許第5,260,308号に開示されるように、bbbの透過性を高めるために糖化されるか、または米国特許第4,933,324号およびWO89/07938に開示されるように、プロドラッグへ形成してもよい。これらのプロドラッグは、好ましくは、脂肪酸担体と、それ自身ではbbbを通過し得ないNTPのセグメントから形成される。

【0104】

代わりのアプローチは、NTPのセグメントをマトリックス系から神経組織中へ直接放出する制御放出ポリマーの埋込みである (Sabelら, 米国特許第4,883,666号; およびSabelら, 米国特許出願第07/407,930号を参照されたい)。リポソーム、赤血球ゴースト、抗体コンジュゲート、およびモノクローナル抗体コンジュゲートのような薬物担体系を使用することも可能である。本発明のこの態様によれば、ホスファチジルイノシトール、モノシアログングリオシド、またはスルホガラクトシルセラミドのようないわゆる「偽装」脂質が、上記の抗体および抗体コンジュゲートを含有するリポソームを形成するために使用可能である。

【0105】

米国特許第5,182,107号および5,154,924号に開示されるように、NTPのセグメントは、トランスフェリン受容体と反応する抗体とコンジュゲートさせることが可能である。トランスフェリン受容体は、脳毛細血管の内皮細胞に位置し、それにより神経成長因子のような薬物、またはNTPのセグメントを、bbbを通して輸送する。上記に記載のNTPのセグメント-抗体コンジュゲートは、米国特許第5,004,697号およびWO89/01343に開示されるように、特定の等電点を有するカチオン化抗体を提供することによって、さらに向上させることが可能である。

【0106】

本発明の別の態様には、米国特許第4,801,575号に開示されるように、NTPの活性セグメントがコンジュゲートされるキメラペプチドを創製することが含まれる。キメラペプチドは、好ましくはヒストンであり、これは、米国特許第4,902,505号に開示されるように、トランスサイトーシスによりbbbを通過することが可能である。本発明のさらなる態様には、米国特許第4,880,816号、5,187,158号、および5,017,566号に開示されるように、ドーパミンのようなジヒドロピリジン反応ーピリジン塩酸化還元担体の還元された生物酸化可能なリポイド型と一緒にNTPのセグメントを提供することが含まれる。

【0107】

NTPのセグメントを脳へ搬送するために、別のアプローチも採ってよい。これは、米国特許第4,866,042号に開示されるように、bbbを化学的に破壊してから、bbbを通してNTPのセグメントを搬送するウイルスを使用することによってなし得る。ここでは、矯正的な遺伝物質をウイルスへ取込ませてから、このウイルスを血流へ注射する。bbbを通過してNTPのセグメントを搬送するために使用可能であるさらに別の担体系は、F. D. CollinsおよびR. C. Thompson (WO91/04014)により開示されるように、リポソームの使用である。ここでは、好ましくは、bbbを通過して特定のリガンドを輸送する特定の内因性脳輸送系へリポソームを標的化する。米国特許第6,117,454号に開示されるように、界面活性剤でコートしたナノ粒子も、本発明のNTPのセグメントがbbbを通過するその浸透を高めるための薬物担体（または標的指向分子）として使用可能である。

【0108】

別のアプローチは、L-アミノ酸オキシダーゼを使用して血漿レベルのNTPのセグメントを還元し、NTPのセグメントのbbbを通過する輸送を可能にすることである。こうしたアプローチは、その開示がそのまま本明細書に援用される、米国特許第5,695,751号により詳しく記載されている。

【0109】

本発明による別のアプローチは、NTPのセグメントを含んでなる組成物を局所的に投与することである。組成物を脳の内側部分へ投与するのに有用な器具が、例えば、その開示がそのまま本明細書に援用される、米国特許第5,800,390号に記載されている。持続放出の固形調製物および半固形調製物を脳組織へ直接投与してよい。こうした投与は、場合により頭部の中に埋込まれるこうした脳内器具の針状部分を、ガイドの遠位端を投与の部位に位置づけるように挿入することによって達成可能である。

【0110】

細胞死および／または組織壊死に関連した状態に罹患している哺乳動物への投与に好ましい本発明の組成物は、NTPのセグメントと、NTPのセグメントがbbbを通過することを可能にする成分を含有する。本発明の他の好ましい組成物には、NTPのセグメントを発現する遺伝子と、遺伝子がbbbを通過することを可能にする成分が含まれる。本発明の追加の好ましい組成物には、NTPのセグメントの発現を誘導するワクチンと、ワクチンがbbbを通過することを可能にする成分が含まれる。

【0111】

本発明において、生組織に接触するNTPのセグメントの量は、細胞死および／または組織壊死を阻害、予防、および／または改善するのに十分な量であることが好ましい。当業者は、本明細書に提供されるガイドラインを使用して、特定の量を決定することができる。NTPのセグメントが存在せず、細胞死が抑制されていない対照と比較して、細胞死および／または組織壊死を50%より多く抑制するのに十分なNTPのセグメントが投与されることが好ましい。より好ましくは、NTPのセグメントが存在せず、細胞死または組織壊死が抑制されていない対照と比較して、細胞死または組織壊死を60%より多く、さらにより好ましくは70%より多く、そして最も好ましくは75%より多く抑制するためにNTPのセグメントが投与される。

【0112】

こうした量は、特別の組織の種類、使用するNTPのセグメント、並びにNTPまたは他の分子標的の量に常に依存するものである。上記の米国特許第5,948,634号、5,948,888号、5,830,670号、および6,071,705号のいずれにも開示される方法を使用して、存在するNTPまたは他の分子標的の相対量を推定してから、上記の米国特許に開示される供給源のいずれかのような様々な供給源から入手される哺乳動物組織を使用する一連の*in vitro*実験を実施し、NTPまたは他の分子標的の組織中の量を決定してから、必要な度合いの細胞死または組織壊死の予防（即ち、好ましくは、対照に比較したときに60%より大きい）を得るために求められる必要なNTPのセグメントの量を決定することができる。当業者は、本明細書に提供されるガイドラインを使用するだけでなく、当該技術分野で知られた技術を使用して、これらの実験を行うことが可能である。 10

【0113】

次いで、哺乳動物へ投与すべきNTPのセグメントの量が、哺乳動物の体重と組織への予測される搬送量に基づいて容易に決定可能である。哺乳動物脳組織へ搬送されることが予測されるNTPのセグメントの量は、NTPのセグメントがbbbを通過することを可能にするために利用される特別の機序に依存する。同じことは、NTPのセグメントを発現する遺伝子の投与と、NTPのセグメントの発現または産生を誘導するワクチンの投与にもあてはまる。また、当業者は、そのまま本明細書に援用される上記特許に記載の技術を使用して、そして上記特許と本明細書に提供されるガイドラインを使用して、哺乳動物へ投与すべき遺伝子、ワクチン、NTPのセグメントの適正な用量を決定することが可能である。 20

【0114】

以下の実施例は、本発明を例示するために提供する。しかしながら、これらの実施例に記載される特定の条件または詳細事項に本発明は制限されないと理解されるべきである。

【実施例1】

【0115】

実施例1

本実施例は、AD7C-NTPの存在による生組織中（*in vivo*）の細胞死を明示する。

【0116】

AD7C-NTPは、米国特許第5,948,634号、5,948,888号、5,830,670号、および6,071,705号のいずれかに概説される手順に従って入手した。 30

【0117】

8匹の正常ラットの皮膚および皮下に、それぞれ3つの異なる病巣（*foci*）において、プラスチックシリンジからステンレス鋼26ゲージ針を通して搬送される、生理食塩水中0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の精製組換えAD7C-NTPを注射した。

【0118】

動物を24時間観察し、24時間目に無痛的に屠殺した。24個の浸潤病巣を切除し、10%ホルマリンに固定し、パラフィンに埋込み、標準的な組織病理法により染色して検査した。 40

【0119】

対照ラットの類似群には、（1）生理食塩水中のウシ血清アルブミン、（2）正常ヒト血清、および（3）生理食塩水を注射し、上記と同じように検査して屠殺し、注射の切除病巣を上記のように処理した。

【0120】

AD7C-NTPの注射は、すべての実施例において、注射部位に組織の急性壊死をもたらした。この壊死は、AD7C-NTPを注射した部位にある筋肉組織、皮下結合組織、および真皮において明らかである。24時間の時点で、細胞は色が薄くなり、萎縮し、壊死したように見え、炎症細胞を伴う浸潤が存在する。この壊死は注射の領域に相関し、注 50

射部位の先へ広がるようには見えない。

【0121】

対照は壊死や細胞損失の証拠を示さなかった。対照の注射には、軽度〜ごくわずかな急性炎症と針による局所性の微量出血があった。

【実施例2】

【0122】

実施例2

本実施例の目的は、AD7C-NTTP神経線維タンパク質のいくつかのHarli1配列を同定し、そのAD7C-NTTPとの反応性を決定することであった。

【0123】

以下のHarli1配列を合成し（シンペップ [Synpep]、カリフォルニア州ダブリン）、マレイミド活性化ウサギIgG（ジャクソン・イムノリサーチ、ペンシルヴェニア州ウェストグロブ）へコンジュゲートし、そのNTTP免疫反応性について評価した。AD7C-NTTPの90-96HHARLCL配列の前または後に出現する、このタンパク質配列の繰り返し部分であるリンカーを加えた。

【0124】

1. (NTP-1) L H A R L C L A N F C G R N R V
2. (NTP-2) L A R L C L A N F C G N N N V
3. (NTP-3) C A R Y R T G H H A R L M
4. (NTP-4) H H A R L P L A N F C G
5. (NTP-5) R T G H H A R L C L A N F C
6. (NTP-6) C E S A R Y R T G H H A R L C
7. (NTP-7) D N T H H A R L I L
8. (NTP-8) S H H A R L I L

担体タンパク質へのコンジュゲーションは、システインを介した。従って、ペプチドNTTP-1およびNTTP-2は、1以上のシステイン残基があるために、混合コンジュゲートの結果を生じた。故に、ペプチドNTTP-5およびNTTP-6では、第二のシステインをアセトアミドメチル (C_3H_6NO) (ACM) で遮断した。

【0125】

AD7C-NTTP中に同定される配列の位置を図1に見ることが可能である。上記のように、Harli1ペプチドの相同体、誘導体、模倣体、および変異体も本発明の範囲に含まれる。本実施例の相同ペプチドの構築には、相同アミノ酸を使用した。使用する置換の判断基準は電荷および／またはサイズであった。従って、NTTPペプチド3においてシステインにメチオニンを代用する選択は、これら2つのアミノ酸間の全体的な類似性とこの特別なアミノ酸のストレッチから反応性システインを除去する欲求に基づいた。システインにプロリンを代用する選択は、それがタンパク質中においてシステインがジスルフィド連結にある場合のペプチドのコンホメーション型がこれにより模倣できるかどうかを見るための試みであった。

【0126】

アフィニティー相互作用に影響を及ぼすかまたはそれを試験するための当業者に知られた他の変化には、限定されないが、例えば、ロイシンを、イソロイシン、バリン、アラニン、またはグリシンのような他の疎水性アミノ酸と相互交換すること；酸性アミノ酸または塩基性アミノ酸を相互交換すること；ヒスチジンをフェニルアラニンと相互交換して、電荷対空間の効果を決定すること；アスパラギンをアスパラギン酸と、またはグルタミンをグルタミン酸と相互交換して電荷対空間の効果を評価すること；並びに、セリンをスレオニンと、スレオニンをシステインと、アスパラギン酸をグルタミン酸と、アルギニンをリジンまたはヒスチジンと、そしてチロシンをトリプトファンまたはフェニルアラニンと相互交換することが含まれる。隣接配列へ導入される変化を行って、ペプチドをより非塩基性または疎水性にした。

【実施例3】

【0127】

実施例3

本実施例は、NTPへ結合するNTPのセグメント、またはその相同体、変異体、模倣体、または誘導体を、NTPを含有する組織へ投与することによって生組織の壊死を（*in vivo*で）予防および／または阻害することを明示する。

【0128】

AD7C-NTPは、実施例1において上記に記載されるようにして入手した。

上記の実施例2に従って調製したHarlil配列のNTP-1、NTP-3、およびNTP7を本実施例に使用した。

【0129】

組換えAD7C-NTPサンプル（100ng/mL～10μg/mL）を、上記のHarlil配列とともに室温で5分～1時間インキュベートしてから、実施例1に記載のようにラットへ注射した。

【0130】

あるいは、Harlil配列の溶液を、1マイクログラム/mL～1ミリグラム/mLの範囲の濃度で調製した。組換えAD7C-NTPを含有する溶液も、Harlil配列の添加なしに、上記のように調製した。約100マイクロリットルのAD7C-NTP溶液と約100マイクロリットルのHarlil溶液を動物に注射した。

【0131】

動物を24時間観察し、24時間目に無痛的に屠殺した。24の個別の浸潤病巣を切除し、10%ホルマリンに固定し、パラフィンに埋込み、標準的な組織病理法により染色して検査した。

【0132】

対照ラットの類似群には、（1）実施例1に記載のAD7C-NTP単独、（2）生理食塩水中のウシ血清アルブミン、（3）正常ヒト血清、および（4）生理食塩水を注射し、上記と同じように検査して屠殺し、注射の切除病巣を上記のように処理した。

【0133】

AD7C-NTP単独の対照注射は、実施例1に記載されるように、組織壊死をもたらした。ウシ血清アルブミン（BSA）、正常ヒト血清、および生理食塩水は、壊死や細胞損失の証拠を示さなかった。上記の対照注射には、軽度～ごくわずかな急性炎症と針による局所性の微量出血があった。

【0134】

Harlil配列のNTP-1、NTP-3、およびNTP-7のそれぞれと一緒に注射したAD7C-NTPサンプルは、AD7C-NTP単独で注射した対照サンプルに比べて、組織壊死の95%を超える抑制を示した。微小結節形成を伴う炎症細胞病巣の局所性の小結節が時々存在したが、これはおそらくAD7C-NTPとHarlil配列の凝集物であるように見えた。全体的な組織損傷は、AD7C-NTPだけを注射した対照と比べると、NTPのセグメント（またはHarlil配列）の投与により>95%抑制された。

【0135】

本発明を特に好ましい態様および実施例を参照にして詳しく記載したが、当業者は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく様々な変更を本発明に対してなし得ることを理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】図1は、完全なAD7C-NTP配列と完全なAD7C-NTP配列内のHarlil配列の位置を示す（de la Monteら、J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55:1038-1050（1996））。

【図2】図2は、122アミノ酸の神経線維タンパク質の完全なアミノ酸配列（米国特許第5,948,634号からの配列40；NCBI Entrez-タンパク質寄託番号

10

20

30

40

50

AAE25447)を示す。

【図3】図3は、112アミノ酸の神経線維タンパク質の完全なアミノ酸配列(NCBI Entrez-タンパク質寄託番号XP_032307)を示す。

【図4】図4は、NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAH14951 PIDg15928971に収載される106アミノ酸の神経線維タンパク質を示す。

【図5】図5は、NCBI Entrez-タンパク質寄託番号XP_039102, PIDg18599339に収載される106アミノ酸の神経線維タンパク質を示す。

【図6】図6は、98アミノ酸の神経線維タンパク質の完全なアミノ酸配列(米国特許第5,830,670号からの配列30;NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAE13612)を示す。

10

【図7】図7は、75アミノ酸の神経線維タンパク質の完全なアミノ酸配列(米国特許第5,948,634号からの配列48;NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAE25448)を示す。

【図8】図8は、68アミノ酸の神経線維タンパク質の完全なアミノ酸配列(米国特許第5,948,634号からの配列36;NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAE25446)を示す。

【図9】図9は、61アミノ酸の神経線維タンパク質様タンパク質の完全なアミノ酸配列(NCBI Entrez-タンパク質寄託番号AAH02534)を示す。

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)



PCT

WO 02/092115 A2

(74) Agent: **BERESKIN & PARR**; 40 King Street West, Box 401, 40th Floor, Toronto, Ontario M5H 3Y2 (CA).

461, 46th Floor, Toronto, Ontario M5H 5T2 (CA).

(81) **Designated States (national):** AL, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

(81) *Designated States (national):* AI, AG, A1, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FG, GD, GE, GI, GM, GR, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PI, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PI, PT, RO, RU, SD, SI, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD OF PREVENTING CELL DEATH USING SEGMENTS OF NEURAL THREAD PROTEINS

[illegible]

(57) Abstract: Disclosed is a method of preventing, inhibiting, and/or ameliorating cell death and/or tissue necrosis in live tissue by contacting live tissue with at least a segment of NTP, or homologue, variant, derivative or mimetic thereof, where the segment of NTP, or homologue, variant, derivative or mimetic thereof is present in an amount effective to prevent, inhibit, and/or ameliorate cell death and/or tissue necrosis. The method is capable of treating conditions requiring prevention, inhibition, and/or amelioration of cell death and/or tissue necrosis.

WO 02/092115 A2

WO 02/092115 A2 

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

METHOD OF PREVENTING CELL DEATH USING SEGMENTS OF NEURAL THREAD PROTEINS

This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/290,971, entitled: "Method of Preventing Cell Death Using Segment of Neural Thread Proteins," the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. Field of the Invention

10 The present invention relates to methods for preventing cell death, and to methods of treating conditions that require prevention, inhibition, and/or amelioration of cell death and tissue necrosis. The invention encompasses administering a segment of neural thread proteins (NTP), or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof, to a mammal experiencing cell death. The segment can be
15 administered intramuscularly, orally, intravenously, intraperitoneally, intracerebrally (intraparenchymally), intracerebroventricularly, intratumorally, intralesionally, intradermally, intrathecally, intranasally, intraocularly, intraarterially, topically, transdermally, via an aerosol, infusion, bolus injection, implantation device, sustained release system etc., either alone or conjugated to a
20 carrier. Alternatively, the segment can be expressed *in vivo* by administering a gene that expresses the segment, by administering a vaccine that induces such production or by introducing cells, bacteria or viruses that express the segment *in vivo*, either because of genetic modification or otherwise.

25 2. Description of Related Art

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disorder characterized by progressive impairments in memory, behavior, language, and visuo-spatial skills, ending ultimately in death. Hallmark pathologies within vulnerable regions include extracellular β -amyloid deposits, intracellular

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

neurofibrillary tangles, synaptic loss, and extensive neuronal cell death. Research on the causes and treatments of Alzheimer's disease has led investigators down numerous avenues. Considerable evidence has implicated alterations in production or processing of the human amyloid precursor protein (APP) in the etiology of the disease. However, intensive research has proven that AD is a multifactorial disease with many different, perhaps overlapping, etiologies.

Because of this, those in the field have conducted significant research and clinical investigations to study the structural deficiencies, chemical changes, and functional abnormalities both within the brain and within different populations of nerve cells. The depth of such investigations and studies are represented by the following publications, which represent only a handful of the vast reports in this arena: *Neurobiology of Alzheimer's Disease* (D. Dawbarn and S. J. Allen, Editors), Bios, Oxford 1995; *Dementia*, (J. Whitehouse, Ed.), F.A. Davis Company, Philadelphia, 1993; *Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders* (Katzman, R. and R. L. Bick, Eds), Raven Press, New York, 1994, pages 47-51; *Alzheimer's Disease and Related Disorders, Etiology, Pathogenesis and Therapeutics* (Iqbol, K., et al., Eds.), Wiley, Chichester, 1999; *Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research* (Corain, B, Ed.), Wiley, New York, 1993; *Alzheimer's Disease: Clinical and Treatment Perspectives* (Cutler, N.R., et al., Eds.), Wiley, Chichester, 1995; *Alzheimer's Disease: Therapeutic Strategies* (Giacobini, E., Becker, R., Eds.), Birkhauser, Boston, 1994; Paykel, et al., *Arch. Gen. Psychiat.*, **51**:325-332 (1994); Amaducci, et al., *Neurology*, **36**:922-931 (1986); McKhann, et al., *Neurology* **34**:939-944 (1984), Heston et al., *Arch. Gen. Psychiatry* **38**:1085-1090 (1981); *Aging of the Brain* (Gispen and Traber, editors), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1983, pages 275-282; Heyman et al., *Ann. Neurol* **15**:335-341 (1984); Brayne C. and P. Calloway, *Lancet* **1**:1265-1267 (1988); Roth et al., *Br. J. Psychiatry* **149**:698-709 (1986); Medical Research Council, *Report from the NRC Alzheimer's Disease Workshop*, London, England, 1987; Morris et al., *Neurology* **41**:469-478 (1991); and the references cited within each of these publications.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

To date, Alzheimer's disease is the third most expensive disease in the United States, costing society approximately \$100 billion each year. It is one of the most prevalent illnesses in the elderly population, and with the aging of society, will become even more significant. Costs associated with AD include
 5 direct medical costs such as nursing home care, direct non-medical costs such as in-home day care, and indirect costs such as lost patient and care giver productivity. Medical treatment and behavior modification may have economic benefits by slowing the rate of cognitive decline, delaying institutionalization, reducing care giver hours, and improving quality of life. Pharmacoeconomic
 10 evaluations have shown positive results regarding the effect of drug therapy and behavior modification on nursing home placement, cognition, and care giver time.

Neural thread proteins (NTP) are a family of recently characterized brain proteins. One member of this family, AD7C-NTP, is a ~41 kD membrane associated phosphoprotein with functions related to neuritic sprouting (de la
 15 Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104 (1997); de la Monte *et al.*, *Alz. Rep.*, 2:327-332 (1999); de la Monte SM and Wands JR, *Journal of Alzheimer's Disease*, 3:345-353 (2001)). The gene that encodes AD7C-NTP and predicted protein sequence for AD7C-NTP has been identified and described (de la Monte
et al., *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104 (1997)). In addition to the ~41 kD species,
 20 other species of neural thread protein (~26 kD, ~21 kD, ~17 kD, and ~15 kD) have been identified and associated with neuroectodermal tumors, astrocytomas, and glioblastomas and with injury due to hypoxia, schema, or cerebral infarction (Xu *et al.*, *Cancer Research*, 53:3823-3829 (1993); de la Monte *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10):1038-50 (1996), de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2):26-35 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 135(2):118-25
 25 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104 (1997); and de la Monte *et al.*, *Alz. Rep.*, 2:327-332 (1999)).

Species of neural thread protein have been described and claimed in U.S. Patent Nos. 5,948,634; 5,948,888; and 5,830,670, all for "Neural Thread Protein
 30 Gene Expression and Detection of Alzheimer's Disease" and in U.S. Patent No. 6,071,705 for "Method of Detecting Neurological Disease or Dysfunction." The

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

disclosures of these patents are specifically incorporated herein by reference in their entirety. As described therein, NTP is upregulated and produced during cell death. Thus, dead and dying nerve cells are described as overproducing NTP, and accordingly, its presence indicates the death of nerve cells and the onset of

5 Alzheimer's disease (AD).

Other species of neural thread protein have been identified as other products of the AD7C-NTP gene (e.g. a 112 amino acid protein described in NCBI Entrez-Protein database Accession #XP_032307 PID g15928971) or as being similar to neural thread proteins (e.g. a 106 amino acid protein described in NCBI
10 Entrez-Protein database Accession #AAH14951 PID g15928971, another 106 amino acid protein described in NCBI Entrez-Protein database Accession #XP_039102 PID g18599339 and a 61 amino acid protein described in NCBI Entrez-Protein database Accession #AAH02534 PID g12803421).

There is compelling evidence linking the AD7C-NTP specie of neural
15 thread protein in particular with AD and its upregulation during cell death in AD. AD7C-NTP mRNA is upregulated in AD brain compared to controls; AD7C-NTP protein levels in brain and in CSF are higher in AD than controls; and AD7C-NTP immunoreactivity is found in senile plaques, in neurofibrillary tangles (NFT), in degenerating neurons, neuropil threads, and dystrophic neurotic sprouts in AD and
20 Down syndrome brains (Ozturk *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:419-423 (1989); de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 86(3):1004-13 (1990); de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 113(2):152-64 (1992); de la Monte *et al.*, *Ann. Neurol.*, 32(6):733-42 (1992); de la Monte *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10):1038-50 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2):26-35 (1996);
25 de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 135(2):118-25 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104 (1997); and de la Monte *et al.*, *Alz. Rep.*, 2:327-332 (1999)). Immunocytochemistry demonstrated that the AD7C-NTP protein is localized within cells, within fine processes within the neuropil, or is extracellular in both AD and Down's Syndrome brains. de la Monte *et al.*, *Ann. Neurol.*,
30 32(6):733-42 (1992). Two types of cells contain AD7C-NTP: neurons and

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

astrocytes (*Id.*). The affected neurons are the large pyramidal type that typically contain the neurofibrillary tangles well known in AD brain (*Id.*).

Elevated levels of AD7C-NTP protein have been found in both CSF and urine of AD patients, showing its accuracy as a biochemical marker for this
 5 devastating illness (de la Monte and Wands, *Front Biosci* 7: 989-96 (2002); de la Monte and Wands, *Journal of Alzheimer's Disease* 3: 345-353 (2001); Munzar *et al.*, *Alzheimer's Reports* 4: 61-65 (2001); Kahle *et al.*, *Neurology* 54: 1498-1504 (2000) and Averback *Neurology* 55: 1068 (2000); Munzar *et al.*, *Alzheimer Reports* 3: 155-159 (2000); de la Monte *et al.*, *Alzheimer's Reports* 2: 327-332
 10 (1999); Ghanbari *et al.*, *J Clin Lab Anal* 12: 285-288 (1998); Ghanbari *et al.*, *J Clin Lab Anal* 12: 223-226 (1998); Ghanbari *et al.*, *Journal of Contemporary Neurology* 1998; 4A: 2-6 (1998); and de la Monte *et al.*, *J Clin Invest* 100: 3093-3104 (1997).

Over-expression of the AD7C-NTP gene also has been linked to the
 15 process of cell death in Alzheimer's disease (de la Monte and Wands, *J. Neuropathol. and Exp. Neuro.*, 60:195-207 (2001); de la Monte and Wands, *Cell Mol Life Sci* 58: 844-49 (2001). AD7C-NTP has also been identified in Down's Syndrome brain tissue (Wands *et al.*, International Patent Publication No. WO 90/06993; de la Monte *et al.*, *J Neurol Sci* 135: 118-25 (1996); de la Monte *et al.*,
 20 *Alz. Rep.*, 2:327-332 (1999)). There is some evidence that over-expression of the AD7C-NTP gene also may be associated with normal tension glaucoma (Golubnitschaja-Labudova *et al.*, *Curr Eye Res* 21: 867-76 (2000)).

The present inventor recently discovered that released AD7C-NTP protein was cytotoxic and capable of causing cell death to other cells in tissue (as
 25 compared with up-regulated AD7C-NTP produced by the dying cell itself), as disclosed in pending United States patent application Serial No. _____ and entitled "Methods of Treating Tumors and Related Conditions Using Neural Thread Proteins," the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety. Accordingly, it would be desirable to prevent, inhibit, modulate or
 30 ameliorate cell death and tissue necrosis associated with neural thread proteins, especially in AD brain.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

It has also recently been discovered that segments of NTP could be used in binding assays, purification of NTP, and as diagnostics as a substitute for NTP, as disclosed in pending United States patent application serial No. 09/697,590 and entitled: "Preferred Segments of Neural Thread Protein and Methods of Using the Same," the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety.

Throughout this description, including the foregoing description of related art, any and all publicly available documents described herein, including any and all U.S. patents, are specifically incorporated by reference herein in their entirety. The foregoing description of related art is not intended in any way as an admission that any of the documents described therein, including pending United States patent applications, are prior art to the present invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

There exists a need to develop a method of preventing, inhibiting, modulating and/or ameliorating cell death and tissue necrosis. In particular, there exists a need to develop a method capable of preventing, inhibiting and/or ameliorating cell death and/or tissue necrosis in the brain. There also exists a need to develop a method of treating conditions associated with cell death and/or tissue necrosis. There also exists a need to develop a method of treating neurodegenerative disorders such as AD by preventing, inhibiting and/or ameliorating cell death and/or tissue necrosis in live mammalian brain tissue. There also exists a need to develop a method of controlling, inhibiting, modulating or ameliorating cell death and tissue necrosis in live tissue caused by NTP administered in order to remove or destroy harmful or unwanted tissue or cellular elements such as benign or malignant tumors in humans.

It is therefore a feature of an embodiment of the invention to provide a method of preventing, inhibiting and/or ameliorating cell death and/or tissue necrosis. The method includes contacting the live tissue with at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof), whereby the segment is present in an amount sufficient to prevent, inhibit, reduce, control and/or ameliorate cell death and/or tissue necrosis.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

In accordance with another feature of an embodiment of the invention, there is provided a method of preventing, inhibiting and/or ameliorating cell death and/or tissue necrosis in live mammalian brain tissue by contacting the live mammalian brain tissue with a component containing at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) that is present in an amount sufficient to prevent, inhibit, and/or ameliorate cell death and/or tissue necrosis. The component is capable of crossing the blood-brain barrier.

In accordance with another feature of an embodiment of the invention, there is provided a method of treating neurodegenerative disorders by contacting live mammalian brain tissue with a component containing at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof). The component is capable of crossing the blood-brain barrier.

In accordance with yet another feature of an embodiment of the invention, there is provided a method of treating conditions associated with cell death and/or tissue necrosis comprising contacting live tissue with at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof). The segment of NTP is present in an amount sufficient to prevent and/or inhibit cell death and/or tissue necrosis. In accordance with this method, at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) is administered to a mammal having a condition associated with cell death and/or tissue necrosis in an amount sufficient to prevent and/or inhibit cell death and/or tissue necrosis.

In accordance with another feature of an embodiment of the invention, there is provided a composition comprising at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) and a component that enables the segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) to cross the blood-brain barrier.

In accordance with yet another feature of an embodiment of the invention, there is provided a method of treating conditions associated with cell death and/or tissue necrosis comprising administering a gene to a mammal in need thereof, whereby the gene expresses at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof), and whereby the administration results in

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

the segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) contacting live tissue. The gene is administered in such a fashion that the segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) is present in an amount sufficient to prevent and/or inhibit cell death and/or tissue necrosis.

5 In accordance with an additional feature of an embodiment of the invention, there is provided a method of treating conditions associated with cell death and/or tissue necrosis comprising administering a vaccine to a mammal in need thereof, whereby the vaccine induces the mammal to express or otherwise produce at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or
10 mimetic thereof), and whereby the administration results in the at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) contacting live tissue. The vaccine is administered in such a fashion that the at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) is present in an amount sufficient to prevent and/or inhibit cell death and/or tissue
15 necrosis.

In accordance with yet another feature of an embodiment of the invention, there is provided a method of treating conditions associated with cell death and/or tissue necrosis comprising introducing or administering to or implanting in a mammal in need thereof cells, bacteria or viruses that are capable of expressing *in*
20 *vivo* at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof), whereby the cells, bacteria or viruses express at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof), and whereby the administration results in at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) contacting live tissue. The cells, bacteria or viruses
25 are introduced, administered or implanted in such a fashion and in such a quantity that at least one segment of NTP (or a homologue, derivative, variant or mimetic thereof) is present in an amount sufficient to prevent, inhibit and/or ameliorate cell death and/or tissue necrosis.

These and other features of the invention will be readily apparent to those
30 skilled in the art upon reading the detailed description that follows. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples,

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

while indicating preferred embodiments of the invention are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this description. Unless otherwise specified, the respective contents of the documents cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the complete AD7C-NTP sequence and the location of the Harlil sequences within the complete AD7C-NTP sequence (de la Monte et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55:1038-1050 (1996)).

Figure 2 shows the complete amino acid sequences of the 122 amino acid neural thread protein (Sequence 40 from U.S. Patent No. 5,948,634; NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25447).

Figure 3 shows the complete amino acid sequences of the 112 amino acid neural thread protein (NCBI Entrez-Protein Accession #XP_032307).

Figure 4 shows the 106 amino acid neural thread protein listed in NCBI Entrez-Protein Accession # AAH14951 PID g15928971.

Figure 5 shows the 106 amino acid neural thread protein listed in NCBI Entrez-Protein Accession # XP_039102, PID g18599339.

Figure 6 shows the complete amino acid sequences of the 98 amino acid neural thread protein (Sequence 30 from U.S. Patent No. 5,830,670; NCBI Entrez-Protein Accession #AAE13612).

Figure 7 shows the complete amino acid sequences of the 75 amino acid neural thread protein (Sequence 48 from U.S. Patent No. 5,948,634; NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25448).

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

Figure 8 shows the complete amino acid sequences of the 68 amino acid neural thread protein (Sequence 36 from U.S. Patent No. 5,948,634; NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25446).

Figure 9 shows the complete amino acid sequences of the 61 amino acid neural thread protein-like protein (NCBI Entrez-Protein Accession #AAH02534).

DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

The term "AD7C-NTP" refers to the ~41kD protein and the gene and the nucleic acid sequences coding for it described in de la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, 100:3093-104 (1997), in Sequences 120 and 121 of U.S. Patent Nos. 5,948,634, 5,948,888, and 5,830,670 and in NCBI Entrez-Protein database Accession #AF010144.

Throughout this description, the term "NTP" or "neural thread protein" refers to neural thread proteins and related molecules (including pancreatic thread protein) and the nucleic acid sequences coding for those proteins, and includes (but is not limited to) the following proteins and the nucleic acid sequences encoding the amino acid sequences for these proteins:

- (a) AD7C-NTP;
- (b) the ~42, ~26, ~21, ~17, ~14, and ~8 kD species of neural thread protein as described in U.S. Patent Nos. 5,948,634, 5,948,888, 5,830,670, and 6,071,705 and in de la Monte et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10):1038-50 (1996), de la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2):26-35 (1996); de la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, 135(2):118-25 (1996), de la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104 (1997) and de la Monte et al., *Alz. Rep.*, 2:327-332 (1999);
- (c) proteins specifically recognized by monoclonal antibody #2 on deposit with the American Type Culture Collection, Manassas, Va., under accession number HB-12546 or monoclonal antibody

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

#5 on deposit with the American Type Culture Collection,
Manassas, Va., under accession number HB-12545;

- (d) proteins coded by the AD7C-NTP gene;
- (e) the 122 amino acid neural thread protein described in Sequence
40 from U.S. Patent Nos. 5,830,670, 5,948,634, and 5,948,888
and listed in NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25447, PID
g10048540, the amino acid sequences for which is illustrated in
Figure 2;
- (f) the 112 amino acid neural thread protein listed in NCBI Entrez-
Protein Accession #XP_032307, PID g14725132, the amino acid
sequences for which is illustrated in Figure 3;
- (g) a 106 amino acid neural thread protein-like protein listed in
NCBI Entrez-Protein Accession #AAH14951 PID g15928971,
the amino acid sequences for which is illustrated in Figure 4;
- (h) a 106 amino acid neural thread protein-like protein listed in NCBI
Entrez-Protein Accession #XP_039102, PID g18599339, the
amino acid sequences for which is illustrated in Figure 5;
- (i) the 98 amino acid neural thread protein described in Sequence 30
from U.S. Patent Nos. 5,830,670, 5,948,634, and 5,948,888 and
listed in NCBI Entrez-Protein Accession #AAE13612, PID
g10048538, the amino acid sequences for which is illustrated in
Figure 6;
- (j) the 75 amino acid neural thread protein described in Sequence 48
from U.S. Patent Nos. 5,830,670, 5,948,634, and 5,948,888 and
listed in NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25448, PID
g10048541, the amino acid sequences for which is illustrated in
Figure 7;
- (k) the 68 amino acid neural thread protein described in Sequence 36
from U.S. Patent Nos. 5,830,670, 5,948,634, and 5,948,888 and
listed in NCBI Entrez-Protein Accession #AAE25446, PID

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

g10048539, the amino acid sequences for which is illustrated in Figure 8;

- (l) the 61 amino acid neural thread protein-like protein listed in NCBI Entrez-Protein Accession #AAH02534, PID g12803421, the amino acid sequences for which is illustrated in Figure 9;
- (m) pancreatic thread protein;
- (n) the neural pancreatic thread protein (nPTP) described in U.S. Patent No. 6,071,705; and
- (o) proteins specifically recognized by the antibodies produced by a hybridoma from the group consisting of HB 9934, HB 9935, and HB 9936 deposited at the American Type Culture Collection.

The term "NTP" also includes NTP derived from mammalian tissue or produced using recombinant techniques and includes fragments, variants, derivatives, and homologues of NTP.

Amino acids and amino acid residues described herein may be referred to according to the accepted one or three-letter code provided in the table below. Unless otherwise specified, these amino acids or residues are of the naturally occurring L stereoisomer form.

Table 1

Amino Acid	One-Letter Symbol	Three-Letter Symbol
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartic acid	D	Asp
Cysteine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln
Glutamic acid	E	Glu
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Methionine	M	Met

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

	Phenylalanine	F	Phe
	Proline	P	Pro
	Serine	S	Ser
	Threonine	T	Thr
5	Tryptophan	W	Trp
	Tyrosine	Y	Tyr
	Valine	V	Val

As used herein, the term or "Harlil sequence" or "Harlil peptide" refers to a biologically active peptide that comprises or contains one or more of the following sequences:

1. THARLIL; HHARLCL; MFARLIL; and HHARLIF as described in Figure 1;
2. HHARL; HARL; HARLI; HARLIL; HHARLCL; ARLIL; HHARLIF; THARLIL; ARLI; ARL; HARLCL; ARLCL; ARL; MFARLIL; FARLIL; FARLI; FARL; HARLIF; and ARLIF;
3. LHARLCLANFCGRNRV ("NTP-1");
4. LARLCLANFCGNNNV ("NTP-2");
5. CARYRTGHHARLM ("NTP-3");
6. HHARLPLANFCG ("NTP-4");
7. RTGHHARLCLANFC ("NTP-5");
8. CESARYRTGHHARLC ("NTP-6");
9. DNTHHARLIL ("NTP-7");
10. SHHARLIL ("NTP-8"); and
11. HARLML, HARLVL and HAKLIL

The term "Harlil sequence" or "Harlil peptide" as it is used herein also includes biologically active variants, homologues, derivatives and peptide mimetics of Harlil sequences or Harlil peptides and includes biologically active peptides containing the sequence of any of the sequences listed in subparagraphs 1 to 11 above with additional amino acid residues before or after the Harlil sequence on linker peptides.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

As used herein, the term "segment of NTP" refers to a biologically active fragment of a species of NTP, preferably AD7C-NTP, and specifically includes (but is not limited to) Harlil sequences and Harlil peptides.

The term "biologically active" refers to a protein, peptide, Harlil peptide, or segment of NTP that has the ability of binding to NTP or other molecules.

The term "fragment" refers to a protein or polypeptide that consists of a continuous subsequence of the amino acid sequence of a NTP protein or segment of NTP and includes naturally occurring fragments such as splice variants and fragments resulting from naturally occurring *in vivo* protease activity. Such a fragment may be truncated at the amino terminus, the carboxy terminus, and/or internally (such as by natural splicing). Such fragments may be prepared with or without an amino terminal methionine. The term "fragment" includes fragments, whether identical or different, from the same NTP protein or segment of NTP, with a contiguous amino acid sequence in common or not, joined together, either directly or through a linker.

The term "variant" refers to a protein or polypeptide in which one or more amino acid substitutions, deletions, and/or insertions are present as compared to the amino acid sequence of an NTP protein or segment of NTP and includes naturally occurring allelic variants or alternative splice variants of an NTP protein or segment of NTP. The term "variant" includes the replacement of one or more amino acids in a peptide sequence with a similar or homologous amino acid(s) or a dissimilar amino acid(s). There are many scales on which amino acids can be ranked as similar or homologous. (Gunnar von Heijne, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, p. 123-39 (Academic Press, New York, NY 1987.) Preferred variants include alanine substitutions at one or more of amino acid positions. Other preferred substitutions include conservative substitutions that have little or no effect on the overall net charge, polarity, or hydrophobicity of the protein. Conservative substitutions are set forth in Table 2 below.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

TABLE 2
Conservative Amino Acid Substitutions

5	Basic:	arginine
		lysine
		histidine
5	Acidic:	glutamic acid
		aspartic acid
10	Uncharged Polar:	glutamine
		asparagine
		serine
15	Non-Polar:	threonine
		tyrosine
		phenylalanine
		tryptophan
		cysteine
20		glycine
		alanine
		valine
		proline
		methionine
		leucine
		isoleucine

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

Table 3 sets out another scheme of amino acid substitution:

TABLE 3		
	Original Residue	Substitutions
5	Ala	gly; ser
	Arg	lys
	Asn	gln; his
	Asp	glu
10	Cys	ser
	Gln	asn
	Glu	asp
	Gly	ala; pro
	His	asn; gln
15	Ile	leu; val
	Leu	ile; val
	Lys	arg; gln; glu
	Met	leu; tyr; ile
	Phe	met; leu; tyr
20	Ser	thr
	Thr	ser
	Trp	tyr
	Tyr	trp; phe
25	Val	ile; leu

Other variants can consist of less conservative amino acid substitutions, such as selecting residues that differ more significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. The substitutions that in general are expected to have a more significant effect on function are those in which (a) glycine and/or proline is substituted by another amino acid or is deleted or inserted; (b) a hydrophilic residue, e.g., seryl or threonyl, is substituted for (or by) a hydrophobic residue, e.g., leucyl, isoleucyl, phenylalanyl, valyl, or alanyl; (c) a cysteine residue is substituted for (or by) any other residue; (d) a residue having an electropositive side chain, e.g., lysyl, arginyl, or histidyl, is substituted for (or by) a residue having an electronegative charge, e.g., glutamyl or aspartyl; or (e) a residue having a bulky side chain, e.g.,

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

phenylalanine, is substituted for (or by) one not having such a side chain, e.g., glycine. Other variants include those designed to either generate a novel glycosylation and/or phosphorylation site(s), or those designed to delete an existing glycosylation and/or phosphorylation site(s). Variants include at least one amino acid substitution at a glycosylation site, a proteolytic cleavage site and/or a cysteine residue. Variants also include NTP proteins or segments of NTP with additional amino acid residues before or after the NTP or segment of NTP amino acid sequence on linker peptides. For example, a cysteine residue may be added at both the amino and carboxy terminals of a segment of NTP in order to allow the cyclisation of the segment of NTP by the formation of a di-sulphide bond. The term "variant" also encompasses polypeptides that have the amino acid sequence of a Harilil peptide with at least one and up to 25 additional amino acids flanking either the 3' or 5' end of the Harilil peptide.

The term "derivative" refers to a chemically modified protein or polypeptide that has been chemically modified either by natural processes, such as processing and other post-translational modifications, but also by chemical modification techniques, as for example, by addition of one or more polyethylene glycol molecules, sugars, phosphates, and/or other such molecules, where the molecule or molecules are not naturally attached to wild-type NTP proteins or segments. Derivatives include salts. Such chemical modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature, and they are well known to those of skill in the art. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degree at several sites in a given protein or polypeptide. Also, a given protein or polypeptide may contain many types of modifications. Modifications can occur anywhere in a protein or polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains, and the amino or carboxyl termini. Modifications include, for example, acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

- linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic
- 5 processing, phosphorylation, prenylation, racemization, glycosylation, lipid attachment, sulfation, gamma-carboxylation of glutamic acid residues, hydroxylation and ADP-ribosylation, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins, such as arginylation, and ubiquitination. See, for instance, *Proteins--Structure And Molecular Properties*,
- 10 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993) and Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects," pgs. 1-12 in *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990) and Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications
- 15 and Aging," *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62 (1992). The term "derivatives" include chemical modifications resulting in the protein or polypeptide becoming branched or cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched circular proteins or polypeptides may result from post-translational natural processes and may be made by entirely synthetic methods, as well.
- 20 The term "homologue" refers to a protein that is at least 75 percent identical in its amino acid sequence of an NTP protein, AD7C-NTP or a segment of NTP, as the case may be, as determined by standard methods that are commonly used to compare the similarity in position of the amino acids of two polypeptides. The degree of similarity or identity between two proteins can be
- 25 readily calculated by known methods, including but not limited to those described in *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994;
- 30 *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

Press, New York, 1991; and Carillo H. and Lipman, D., SIAM, *J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Preferred methods to determine identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are codified in publicly available computer programs.

5 Preferred computer program methods useful in determining the identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, and FASTA, Atschul, S. F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215: 403-410 (1990). The **BLAST** X program is publicly available from NCBI
10 and other sources (**BLAST** Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990). By way of example, using a computer algorithm such as GAP (Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), the two proteins or polypeptides for which the percent sequence identity is to be determined are aligned for optimal
15 matching of their respective amino acids (the "matched span", as determined by the algorithm).

A gap opening penalty (which is calculated as 3 x (times) the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the diagonal of the comparison matrix being used; the "diagonal" is the score or number assigned to each perfect
20 amino acid by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 1/10 times the gap opening penalty), as well as a comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard comparison matrix (see Dayhoff *et al.* in: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supp.3 [1978] for the PAM250 comparison
25 matrix; see Henikoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:10915-10919 [1992] for the BLOSUM 62 comparison matrix) also may be used by the algorithm. The percent identity then is calculated by the algorithm. Homologues will typically have one or more amino acid substitutions, deletions, and/or insertions as compared with NTP, AD7c-NTP, a segment of NTP, or Harlil sequence.

30 The term "peptide mimetic" or "mimetic" refers to biologically active compounds that mimic the biological activity of a peptide or a protein but are no

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

longer peptidic in chemical nature, that is, they no longer contain any peptide bonds (that is, amide bonds between amino acids). Here, the term peptide mimetic is used in a broader sense to include molecules that are no longer completely peptidic in nature, such as pseudo-peptides, semi-peptides and peptoids. Examples of peptide mimetics in this broader sense (where part of a peptide is replaced by a structure lacking peptide bonds) are described below. Whether completely or partially non-peptide, peptide mimetics according to this invention provide a spatial arrangement of reactive chemical moieties that closely resemble the three-dimensional arrangement of active groups in the antibody, antibody derivative or antibody fragment on which the peptide mimetic is based. As a result of this similar active-site geometry, the peptide mimetic has effects on biological systems that are similar to the biological activity of the peptide.

The peptide mimetics of this invention are preferably substantially similar in both three-dimensional shape and biological activity to the segments of NTP described herein. Examples of methods of structurally modifying a peptide known in the art to create a peptide mimetic include the inversion of backbone chiral centers leading to D-amino acid residue structures that may, particularly at the N-terminus, lead to enhanced stability for proteolytical degradation without adversely affecting activity. An example is given in the paper "Tritiated D-ala¹ - Peptide T Binding", Smith C. S. *et al.*, *Drug Development Res.*, 15, pp. 371-379 (1988). A second method is altering cyclic structure for stability, such as N to C interchain imides and lactams (Ede *et al.* in Smith and Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and Biology", Escom, Leiden (1991), pp. 268-270). An example of this is given in conformationally restricted thymopentin-like compounds, such as those disclosed in U.S. Pat. No. 4,457,489 (1985), Goldstein, G. *et al.*, the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety. A third method is to substitute peptide bonds in the segment of NTP by pseudopeptide bonds that confer resistance to proteolysis.

A number of pseudopeptide bonds have been described that in general do not affect peptide structure and biological activity. One example of this approach is to substitute retro-inverso pseudopeptide bonds ("Biologically active

retroinverso analogues of thymopentin", Sisto A. *et al* in Rivier, J. E. and Marshall, G. R. (eds) "Peptides, Chemistry, Structure and Biology", *Escom, Leiden* (1990), pp. 722-773) and Dalpozzo, *et al.* (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:561-566, incorporated herein by reference). According to this

5 modification, the amino acid sequences of the peptides may be identical to the sequences of a segment of NTP described above, except that one or more of the peptide bonds are replaced by a retro-inverso pseudopeptide bond. Preferably the most N-terminal peptide bond is substituted, since such a substitution will confer resistance to proteolysis by exopeptidases acting on the N-terminus. Further
10 modifications also can be made by replacing chemical groups of the amino acids with other chemical groups of similar structure. Another suitable pseudopeptide bond that is known to enhance stability to enzymatic cleavage with no or little loss of biological activity is the reduced isostere pseudopeptide bond is a (Couder, *et al.* (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:181-184, incorporated herein by
15 reference in its entirety).

Thus, the amino acid sequences of these peptides may be identical to the sequences of a segment of NTP or Harlil sequence, except that one or more of the peptide bonds are replaced by an isostere pseudopeptide bond. Preferably the most N-terminal peptide bond is substituted, since such a substitution would
20 confer resistance to proteolysis by exopeptidases acting on the N-terminus. The synthesis of peptides with one or more reduced isostere pseudopeptide bonds is known in the art (Couder, *et al.* (1993), cited above). Other examples include the introduction of ketomethylene or methylsulfide bonds to replace peptide bonds.

Peptoid derivatives of segments of NTP or Harlil sequence represent
25 another class of peptide mimetics that retain the important structural determinants for biological activity, yet eliminate the peptide bonds, thereby conferring resistance to proteolysis (Simon, *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-9371, incorporated herein by reference in its entirety). Peptoids are oligomers of N-substituted glycines. A number of N-alkyl groups have been
30 described, each corresponding to the side chain of a natural amino acid (Simon, *et al.* (1992), cited above). Some or all of the amino acids of the segment of NTP or

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

Harilil sequence may be replaced with the N-substituted glycine corresponding to the replaced amino acid.

The term "peptide mimetic" or "mimetic" also includes reverse-D peptides and enantiomers as defined below.

5 The term "reverse-D peptide" refers to a biologically active protein or peptide consisting of D-amino acids arranged in a reverse order as compared to the L-amino acid sequence of a segment of NTP or Harilil sequence. Thus, the carboxy terminal residue of an L-amino acid segment of NTP becomes the amino terminal for the D-amino acid peptide and so forth. For example, the AD7c-NTP
10 fragment, HARLIL, becomes L₄L₃L₂R₄A₃H₂, where A₄, H₄, L₃, L₂, and R₄ are the D-amino acids corresponding to the L-amino acids, A, H, I, L, and R respectively.

The term "enantiomer" refers to a biologically active protein or peptide where one or more the L-amino acid residues in the amino acid sequence of a segment of NTP is replaced with the corresponding D-amino acid residue(s).

15 Throughout this description, the term "neurodegenerative disorder" refers to:

1. pathological conditions characterized by one or more of the following signs: brain atrophy, cell loss, neurofibrillary tangles, amyloid plaques, and/or the presence of NTP in tissue and/or bodily fluids;
- 20 2. the Alzheimer group of diseases, namely, Alzheimer's disease (pre-senile dementia, senile dementia); Alzheimer's disease associated with Down's syndrome; familial Alzheimer's Disease; genetic Alzheimer's disease due to mutations such as Presenilin 1, Presenilin 2, and others; Alzheimer's disease associated with other central-nervous-system
25 diseases, such as Parkinson's disease, Lewy Body Disease, and cerebrovascular diseases;
3. congophilic angiopathy (associated or not associated with Alzheimer's disease, familial or not familial);
- 30 4. pathological conditions characterized by the deposition of abnormal fibrils ("amyloid fibrils") and/or related non-fibrillar amyloid precursor or non-precursor molecule(s);

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

5. pathological conditions characterized by the abnormal deposition of tau including frontotemporal dementia, progressive supranuclear palsy (PSP), corticobasal ganglionic degeneration (CBD) and conditions relating to mutations of the tau gene; and/or
- 5 6. other disorders and diseases such as those disclosed in U.S. Patent No. 6,001,331, the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety.

Throughout this description, the expressions "amyloid plaques" and "amyloid fibrils" denote senile plaques, neuritic plaques, amyloid plaques, amyloid stars, amyloid cores, primitive plaques, classical plaques, burn out plaques, diffuse plaques, shadow plaques, neurofibrillary tangles, amyloid fibrils, paired helical filaments, and the like.

Throughout this description, the term "mammal" denotes all mammals, and preferably denotes, sheep, cows, dogs, cats, apes, monkeys, mice, rats, and humans, and most preferably denotes a human.

Throughout this description, the expressions "segment of NTP," "Harilil sequence" and "Harilil peptide" are used interchangeably. It is to be understood that, whenever "segment of NTP," "Harilil sequence" or "Harilil peptide" is used, the invention encompasses suitable homologues, variants, derivatives and peptic mimetics thereof.

Throughout this description, the expression "tissue containing NTP" denotes tissue containing all or a portion of NTP, tissue in cellular communication with NTP that may or may not otherwise contain it, tissue that has been contacted with NTP, but no longer contains it in its original form, and tissue that may at some point in time be in contact with NTP.

The present invention is directed toward methods of preventing cell death and/or tissue necrosis. While NTP has been known and described in the literature, it was not heretofore known that NTP was a cause of cell death of cells other than the cells producing the NTP. While not intending on being bound by any theory, the present inventor believes that the presence of NTP in live tissue not only is an indication of certain nerve cell death, as previously reported, but it also is toxic

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

insofar as it causes other live tissue cell death. The present inventor believes that AD7C-NTP in particular present in live mammalian brain tissue is a marker for Alzheimer's Disease (AD), and it exacerbates AD by causing cell death and/or tissue necrosis in the live tissue in which it exists.

5 Accordingly, it is believed that, as a mammal becomes afflicted with AD, nerve cell death up-regulates the gene that preferably produces AD7C-NTP, thereby producing AD7C-NTP at that site. The AD7C-NTP so produced then begins destroying other live tissue (e.g., other nerve cells, glial cells, etc.) in the vicinity thereof, thereby exacerbating the progression of the disease. The inventor
10 therefore believes that neutralizing the effect of, for example, AD7C-NTP will help prevent, inhibit, and/or ameliorate cell death and/or tissue necrosis in live tissue that contains, for example, AD7C-NTP. It was surprising to find that segments of NTP could bind to the AD7C-NTP and prevent, inhibit, and/or ameliorate cell death and/or tissue necrosis in live tissue that contains AD7C-
15 NTP.

 NTP is known and described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,948,634, 5,948,888, 5,830,670, and 6,071,705, the disclosures of which are incorporated by reference herein in their entirety. Methods of making NTP recombinantly or otherwise are disclosed in the aforementioned documents. Raising antibodies
20 against NTP so that one can diagnose AD and other associated disorders and diseases, also is disclosed in these documents. It will be evident to those skilled in the art that one may use NTP homologues, derivatives, mimetics and variants, as well as NTP from diverse sources (e.g., natural, pancreatic, purified, synthesized, or from different expression systems *in vitro*, etc.) to make any of the
25 segments useful in the present invention.

 The present invention is directed to a method of preventing and/or inhibiting cell death and/or tissue necrosis. The method includes contacting live tissue with at least one segment of NTP, whereby the segment is present in an amount sufficient to prevent and/or inhibit cell death and/or tissue necrosis. The
30 segment of NTP preferably is a subsequence of AD7C-NTP and most preferably contains at least one of the following repeat sequences of AD7C-NTP:

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

(a)	45-51	T H A R L I L
(b)	90-96	H H A R L C L
(c)	263-269	M F A R L I L
(d)	291-297	H H A R L I F

5 See Figure 1.

The invention encompasses peptides having the sequence of any of regions (a), (b), (c), (d), or homologues, derivatives, variants and mimetics of these (including but not limited to "H A R L M L"). The Harlil peptides also can have additional amino acid residues before or after the Harlil sequence on linker

10 peptides. The additional amino acid residues or linker peptides may be those found in the NTP sequence before and after the Harlil sequence. For example, the amino acid residues G I T G M C T occur before residue 46 and the amino acid residues Y F F L V occur after amino acid 51 in the NTP sequence. Thus, a Harlil peptide useful as a segment of NTP in the present invention can include the NTP
15 peptide G I T G M C T H A R L I L Y F F L V. For the Harlil peptides recited in (b), (c), and (d), the additional amino acid residues preferably are those that flank the Harlil sequence in the NTP sequence. Preferably, the Harlil peptide having additional amino acid residues does not exceed 25 total amino acid residues in length.

20 The Harlil repeat sequence preferably has the unique characteristic of binding to NTP. This ability to bind to NTP suggests that the Harlil repeat sequence is useful in preventing, inhibiting or ameliorating cell death and/or tissue necrosis in live tissue containing NTP.

The present invention is directed to the use of Harlil sequence peptides and
25 their homologues, derivatives, variants and peptide mimetics as affinity binding partners of NTP and other molecules for the treatment of conditions associated with cell death and/or tissue necrosis. The invention also is directed to methods of treating conditions associated with cell death and/or tissue necrosis as well as compositions containing Harlil peptides or their homologues, derivatives,
30 variants, and peptide mimetics that are capable of crossing the bbb.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

Harilil peptides and homologues, derivatives, and variants thereof can be made using conventional peptide synthesis techniques. Mimetics of Harilil peptides can be developed using combinatorial chemistry techniques.

5 Nucleic acids corresponding to Harilil peptides can be made, for example, using (a) standard recombinant methods, (b) synthetic techniques, or (c) combinations thereof.

Harilil sequences bind to AD7C-NTP and other molecules. See pending United States patent application serial No. 09/697,590 and entitled: "Preferred Segments of Neural Thread Protein and Methods of Using the Same," the
10 disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety.

This invention includes the surprising discovery that a Harilil sequence that can bind to AD7C-NTP can prevent or inhibit cell death and/or tissue necrosis in live tissue containing AD7C-NTP.

15 There is evidence that AD7C-NTP participates in the neurodegenerative cascade. The ability to interrupt or redirect the cascade by targeting AD7C-NTP offers a therapeutic opportunity. For example, it may be possible to intervene therapeutically by using the ability of the Harilil peptides to interact with AD7C-NTP binding sites, thus blocking potential reactive sites on AD7C-NTP.

20 Alternatively, the Harilil peptides of the invention may be useful to target drugs to cells expressing the Harilil sequence, or to create genes or vaccines that induce expression of the Harilil sequence *in vivo*.

Although the actual mechanism by which the Harilil sequence operates is not yet known, the present inventor has found that administration of a Harilil sequence to live tissue that contains AD7C-NTP prevents and/or inhibits and/or
25 ameliorates cell death and tissue necrosis that otherwise occurs in the absence of the Harilil sequence.

It is possible that the "HARLIL" sites interact with other brain proteins and may play a role in the functionality of AD7C-NTP and/or other NTP or other molecules.

30 Methods of making and detecting such Harilil sequences, or their functional homologues or analogues are described in copending United States

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

patent application serial No. 09/ 697,590, and entitled: "Preferred Segments of Neural Thread Protein and Methods of Using the Same," the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety.

The peptide segments of NTP that are particularly useful in the context of the present invention are those described above that include at least a portion of the HARLIL amino acid sequence of AD7C-NTP. Useful Harlil sequences include those amino acid sequences selected from the following list:

- (a) H H A R L;
- (b) H A R L;
- 10 (c) H A R L I;
- (d) H A R L I L;
- (e) H H A R L C L;
- (f) A R L I L;
- (g) H H A R L I F;
- 15 (h) T H A R L I L;
- (i) A R L I;
- (j) A R L;
- (k) H A R L C L;
- (l) A R L C L;
- 20 (m) A R C L;
- (n) M F A R L I L;
- (o) F A R L I L;
- (p) F A R L I;
- (q) F A R L;
- 25 (r) H A R L I F;
- (s) A R L I F;

and homologues, variants, derivatives and mimetics thereof.

Various peptides selected from the above list, and homologues, variants, derivatives and mimetics thereof can be used in the present invention as the segment of NTP. For example, the peptide can have the amino acid sequence A R L I, and comprise at least one and up to 25 additional amino acids flanking either the 3' or 5' end of the peptide. The peptide also can have the amino acid

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

sequence H A R L, and comprise at least one and up to 25 additional amino acids flanking either the 3' or 5' end of the peptide. In addition, the peptide can have the amino acid sequence F A R L, and comprise at least one and up to 25 additional amino acids flanking either the 3' or 5' end of the peptide. The peptide
 5 also can be selected from one that has the amino acid sequence A R L, and comprising at least one and up to 25 additional amino acids flanking either the 3' or 5' end of the peptide. Yet another useful peptide in the present invention includes those having the amino acid sequence A R L C, and comprising at least one and up to 25 additional amino acids flanking either the 3' or 5' end of the
 10 peptide. Finally, the segment of NTP can be a polymer of a Harlil peptide sequence comprising at least two repetitions of the peptide.

It is even more preferred in the present invention that the Harlil sequences be peptides having the following amino acid sequences.

- | | | |
|----|---------|---------------------------------------|
| 1. | (NTP-1) | L H A R L C L A N F C G R N R V |
| 15 | 2. | (NTP-2) L A R L C L A N F C G N N N V |
| | 3. | (NTP-3) C A R Y R T G H H A R L M |
| | 4. | (NTP-4) H H A R L P L A N F C G |
| | 5. | (NTP-5) R T G H H A R L C L A N F C |
| | 6. | (NTP-6) C E S A R Y R T G H H A R L C |
| 20 | 7. | (NTP-7) D N T H H A R L I L |
| | 8. | (NTP-8) S H H A R L I L |

The above sequences can be conjugated to carrier proteins through a cysteine. Thus, peptides NTP-1 and NTP-2 produced mixed conjugate results due to the presence of more than one cysteine residue. Therefore, for peptides NTP-5
 25 and NTP-6, the secondary cysteine was blocked with Acetamido Methyl (C₃H₆NO) (ACM).

The location of the identified sequences in the AD7C-NTP can be seen from Figure 1. While all of the Harlil analogues showed some reactivity, particularly preferred Harlil analogs are those selected from NTP-1, NTP-3, and
 30 NTP-7. It should be noted that in the Harlil analog NTP-1, the first amino acid, "L" may be replaced with Lysine, or "K."

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

The Harlil sequences, or segments of NTP preferably are contacted with live tissue containing NTP. Any live tissue that contains NTP, that was contacted by NTP and the NTP no longer exists or does not exist in its original form, or that might at some point in time contain NTP is encompassed by the present invention.

5 Preferably, the tissue is tissue selected from mammalian tissue.

An embodiment of the invention includes a method of treating conditions caused by necrosis of live tissue containing NTP. In this context, the necrosis of live tissue and cell death denotes cell death and/or tissue necrosis of cells other than the dying cells that produce the NTP. In the method, a segment of NTP or a Harlil sequence is administered to a mammal suffering from such a condition. The Harlil sequence is administered in an amount and for a period of time sufficient to prevent and/or inhibit the live tissue necrosis.

Those skilled in the art will appreciate that instead of directly administering the Harlil sequence, the Harlil sequence or homologue, variant, derivative or mimetic thereof, can be produced or expressed by the mammal through gene expression (e.g., gene therapy) or through a vaccine. Skilled artisans are capable of creating, isolating and purifying suitable genes or vaccines useful in inducing expression of a Harlil sequence, or homologues, derivatives, variants or mimetics thereof, using the guidelines provided herein.

20 For example, gene therapy has attracted wide attention as a method to treat various mammalian diseases and enhance production of specific proteins or other cellular products. Gene therapy generally is accomplished by introducing exogenous genetic material into a mammalian patient's cells. The introduced genetic material can be designed to replace an abnormal (defective) gene of the mammalian patient ("gene replacement therapy"), or can be designed for expression of the encoded protein or other therapeutic product without replacement of any defective gene ("gene augmentation"). Because many congenital and acquired medical disorders result from inadequate production of various gene products, gene therapy provides a means to treat these diseases through either transient or stable expression of exogenous nucleic acid encoding the therapeutic product.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

Gene therapy can be accomplished by either direct transformation of target cells within the mammalian subject (*in vivo* gene therapy) or transformation of cells *in vitro* and subsequent implantation of the transformed cells into the mammalian subject (*ex vivo* gene therapy). *In vivo* gene therapy is particularly preferred for use in the present invention. In addition to repair of somatic cells, it is generally known that *in vivo* gene therapy also can be used for systemic treatment, an area in which gene therapy has broad applications. Systemic treatment involves transfecting target cells with the DNA of interest, expressing the coded protein in that cell, and the capability of the transformed cell to subsequently secrete the manufactured protein into blood.

A variety of methods have been developed to accomplish *in vivo* transformation including mechanical means (e.g. direct injection of nucleic acid into target cells or particle bombardment), recombinant viruses, liposomes, and receptor-mediated endocytosis (RME) (for reviews, see Chang *et al.* 1994 *Gastroenterol.* 106:1076-84; Morsy *et al.* 1993 *JAMA* 270:2338-45; and Ledley 1992 *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 14:328-37).

Suitable methods of developing and administering genes and vaccines suitable to induce *in vivo* expression of the Harlil sequences or segments of NTP, or homologues, variants, derivatives or mimetics thereof are disclosed in, for example, U.S. Patent Nos. 6,210,919 and 6,225,290. The disclosures of each of these patents are incorporated by reference herein in their entirety.

Any condition associated with cell death and necrosis can be treated in accordance with the present invention. Preferably, the condition is selected from a neurodegenerative disease such as AD, Pick's Disease, Lewy body Disease, or Parkinson's Disease, or from stroke, brain tumor, and other brain diseases, or glaucoma.

In accordance with preferred embodiments of the invention, the method includes contacting live tissue with at least one segment of NTP (or homologue, derivative, variant or mimetic thereof) in an amount sufficient to prevent cell death and/or tissue necrosis. Methods of administering the segment of NTP include administering the segment of NTP intramuscularly, orally, intravenously,

intraperitoneally, intracerebrally (intraparenchymally), intracerebroventricularly, intratumorally, intralesionally, intradermally, intrathecally, intranasally, intraocularly, intraarterially, topically, transdermally, via an aerosol, infusion, bolus injection, implantation device, sustained release system etc., either alone or
5 conjugated to a carrier. In addition, the segment of NTP can be expressed or produced *in vivo* by administration of a gene that expresses the protein, by administration of a vaccine that induces such production, or by introduction of cells, bacteria or viruses that express the segment *in vivo*, as described above.

The treatment of nervous system disorders or other brain-related disorders
10 can be achieved by administering drugs that affect nervous system function or dysfunction in animals or patients. Typically, such drugs are administered by peripheral application, either via the oral or the systemic route. While some drugs are able to cross the blood brain barrier (bbb), others do not pass the bbb efficiently or not at all and are only effective when given directly into the brain.
15 The term "blood-brain barrier" or "bbb", as used herein, refers to the bbb proper as well as to the blood-spinal barrier. The blood-brain barrier, which consists of the endothelium of the brain vessels, the basal membrane and neuroglial cells, acts to limit penetration of substances into the brain. Sometimes the structure of the bbb is subdivided into two components: the endothelial or capillary barrier and the
20 ependymal barrier. Banks, W. A., Kastin, A. J., Barrera, "Delivering peptides to the central nervous system: Dilemmas and strategies," *Pharm. Res.* 8:1345-1350 (1991).

The nature of the substance penetration through the bbb has not yet been determined but it is known that many of the regulators of brain function such as
25 cytokines, transferrin, encephalins and endorphines can pass through the bbb from the blood vessels into the brain Raess, S., Audus, J., "In vitro characterization of blood-brain barrier permeability to delta sleep-inducing peptide." *J. Pharm. Phys.* 41:848-852(1989); Zlokovich, B., Susie, V. T., Davson, H., Begley, D. J., Jankov, R. M., Mitrovic, B. M., Lipovac, M. N., "Saturable mechanism for delta sleep-inducing peptide (DSIP) at the blood-brain barrier of the vascularly perfused
30 guinea pig brain." *Peptides* 10:249-254(1989); and Zlokovich, B., "In vivo

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

- approaches for studying peptide interaction at the blood-brain barrier." *J. Control. Rel.* 13:185-201(1990). However, many substances that can affect the Central Nervous System (or CNS) such as adenosine, β -endorphin, synthetic analogs of endogenous peptides Houghten, R. A. Swann, R. W., Li, C. H., " β -Endorphin: Stability, clearance behaviour and entry into the central nervous system after intravenous injection of the tritiated peptide in rats and rabbits." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4588-4591(1980); Levin, E. R., Frank, H. J. K., Weber, M. A., Ismail, M., Mills M., "Studies on penetration of the blood-brain barrier by atrial natriuretic factor." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147:1226-1231(1987)
- 10 Sakane, T., Tanaka, C., Yamamoto, A., Hashida, M., Sesaki, H., Ueda, H., Takagi, H., "The effect of polysorbate 80 on brain uptake and analgesic effect of D-kyoto." *Int. J. Pharm.* 57:77-83(1989), as well as some excitatory and inhibitor amino acids and trophic factors, penetrate poorly or not at all through the bbb. At present, drugs with no bbb penetration or poor bbb penetration can only be given
- 15 by direct CNS infusion or by implantation of controlled-release polymers. (See, e.g., U.S. Pat. No. 4,883,666, Sabel *et al.*).

One way to overcome some of the limitations of traditional drug therapy is to increase the relative amount of drug that passes the bbb. The belief is that if one can increase the amount of the drug crossing the bbb while reducing the

20 peripheral dose of a given drug or diagnostic substance, the peripheral side effects of the drug are also less severe, while at the same time maintaining the desired effect in the brain. A number of approaches have been described as effective in increasing drug penetration through the bbb.

One approach has been to alter the function of the bbb itself. For instance,

25 osmotic agents, when given peripherally (such as by intravenous injection), result in the opening of the bbb. Further, some drugs acting on the CNS can change the permeability of the bbb for other substances; cholinomimetic arecolines, for instance, have been reported to induce changes of drug penetration through the bbb Saija, A., Princi, P., De Pasquale, R., Costa, G., "Arecoline but not

30 haloperidol produces changes in the permeability of the blood-brain barrier in the rat." *J. Pharm. Pha.* 42:135-138 (1990).

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

Other drugs that can be administered to alter the permeability of the bbb are disclosed in U.S. Pat. Nos. 5,059,415 and 5,124,146, both issued to E. A. Neuwelt. Bradykinin is one specific drug with such effects. (U.S. Pat. No. 5,112,596, issued to Malfroy-Camine). Another method comprises administering permeabilizer peptides such as A-7 or conformational analogs thereof. (WO 92/18529, an application of J. W. Kozarich et al.). A relatively invasive method has been proposed by A. Tomasz and E. Tuomanen (WO 91/16064) who administer parenteral injections of purified cell wall or cell wall fragments of eubacteria such as *Streptococcus pneumoniae* to open the bbb.

U.S. Pat. No. 5,260,210 issued to L. L. Rubin *et al.*, discloses a method whereby the permeability of the blood-brain barrier is increased by administering an agent that reduces or interferes with cyclic AMP concentrations or that increases cyclic GMP concentrations.

Another approach is the modification of the drug molecules themselves. For instance, macromolecules, such as proteins, do not pass the bbb at all, or pass through with difficulty or with alterations that adversely impact the proteins efficacy. For example, one can first isolate the macromolecule active site, *i.e.*, the portion of the molecule that triggers the biologically desirable event, and then use only this active site. Since size is one of the factors in allowing permeability of the bbb, the reduced size can be used so that the smaller molecule can now pass the bbb. Other modifications to macromolecules to attempt passage of the bbb include glycomating the proteins, thereby enhancing their permeability of the bbb, or forming a prodrug. U.S. Pat. No. 5,260,308, issued to J. F. Podusio and G. L. Curran, discusses glycomating proteins, while U.S. Pat. No. 4,933,324 and WO 89/07938, both on applications of V. E. Shashoua, disclose formation of a prodrug. These prodrugs are formed from a fatty acid carrier and a neuroactive drug which is unable to pass across the bbb on its own. A similar system is disclosed in WO 89/07938.

Still another approach is the implantation of controlled release polymers that release the active ingredient from a matrix-system directly into the nervous tissue. However, this approach is invasive and requires surgical intervention if

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

implanted directly into the brain or spinal cord (see Sabel *et al.* U.S. Pat. No. 4,883,666; and Sabel *et al.* U.S. patent application Ser. No. 07/407,930). It also is known to administer compositions directly to internal portions of the brain, as disclosed on U.S. Pat. No. 5,800,390, the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety. These methods enable the delivery of sustained release, solid preparations and semi-solid preparations directly to brain tissue.

To overcome these limitations, another approach has been tried in which drug carrier systems are used such as liposomes, erythrocyte ghosts, antibody-conjugates, and monoclonal antibody conjugates. One of the major problems in targeted drug delivery is the rapid opsonization and uptake of injected carriers by the reticuloendothelial system (RES), especially by the macrophages in the liver and spleen. This obstacle may be partially overcome in the case of liposomes by incorporation of so-called "stealth" lipids, such as phosphatidylinositol, monosialoganglioside, or sulfogalactosylceramide.

U.S. Pat. Nos. 5,182,107 and 5,154,924, both issued to P. M. Friden, teach a method of conjugating a drug with an antibody where the antibody is reactive with a transferrin receptor. Transferrin receptors are located on brain capillary endothelial cells, which thus can transport a drug, such as nerve growth factor, across the bbb. U.S. Pat. No. 5,004,697 (issued to Pardridge) improves such an antibody-conjugate method by providing cationized antibodies with a specific isoelectric point (see also WO 89/01343 by Pardridge).

Another approach is to create chimeric peptides to which the active agents are conjugated (U.S. Pat. No. 4,801,575, also issued to Pardridge). Such a system is further discussed also in U.S. Pat. No. 4,902,505, issued to Pardridge and Schimmel, in which the chimeric peptide, such as histone, is capable of crossing the bbb by transecytosis.

U.S. Pat. Nos. 5,187,158 and 5,017,566, both issued to N. S. Bodor, disclose a brain-specific drug delivery method wherein a centrally acting drug is given with the reduced, biooxidizable lipoidal form of a dihydropyridine reaction-pyridine salt redox carrier such as dopamine. (See also U.S. Pat. No. 4,880,816, also issued to Bodor).

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

A rather invasive approach is taken to deliver genetic material to the brain. This is done, for example, by chemically disrupting the bbb and then using viruses to deliver genes across the bbb. (See, U.S. Pat. No. 4,866,042, issued to E. A. Neuwelt). Here, a corrective genetic material is incorporated into a virus and the virus is then injected into the bloodstream.

Finally, yet another carrier system to deliver drugs across the bbb is the use of liposomes, as disclosed by F. D. Collins and R. C. Thompson (WO 91/04014). Here, liposomes are targeted to specific endogenous brain transport systems that transport specific ligands across the bbb.

Another approach is disclosed in U.S. Patent No. 6,117,454, to Kreuter, *et al.* The subject matter of the Kreuter patent includes a method, composition and drug targeting system using surfactant coated nanoparticles as a drug carrier (or targeting molecule) for a wide range of drugs in order to enhance the penetration of drugs or diagnostic agents across the bbb.

Another approach is to administer the drugs intranasally, allowing for direct access to the brain and bypassing the bloodstream. This has been successfully done in an experimental model for three neuropeptides, melanocortin, vasopressin and insulin: Born J *et al.* "Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain" *Nature Neuroscience* Advance online publication: 6 May 2002, DOI:10.1038/nn849.

Solid dosage forms for oral administration include capsules, tablets, pills, powders, and granules. In such solid dosage forms, the active compound usually is admixed with at least one of the following: (a) one or more inert excipients (or carrier), such as sodium citrate or dicalcium phosphate; (b) fillers or extenders, such as starches, lactose, sucrose, glucose, mannitol, and silicic acid; (c) binders, such as carboxymethylcellulose, alginates, gelatin, polyvinylpyrrolidone, sucrose and acacia; (d) humectants, such as glycerol; (e) disintegrating agents, such as agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain complex silicates, and sodium carbonate; (f) solution retarders, such as paraffin; (g) absorption accelerators, such as quaternary ammonium compounds; (h) wetting agents, such as acetyl alcohol and glycerol monostearate;

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

(i) adsorbents, such as kaolin and bentonite; and (j) lubricants, such as talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, or mixtures thereof. For capsules, tablets, and pills, the dosage forms may also comprise buffering agents.

5 Liquid dosage forms for oral administration include pharmaceutically acceptable emulsions, solutions, suspensions, syrups, and elixirs. In addition to the active Harlil sequence compounds, the liquid dosage forms may comprise inert diluents commonly used in the art, such as water or other solvents, solubilizing agents, and emulsifiers. Exemplary emulsifiers are ethyl alcohol, 10 isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propyleneglycol, 1,3-butyleneglycol, dimethylformamide, oils, such as cottonseed oil, groundnut oil, corn germ oil, olive oil, castor oil, and sesame oil, glycerol, tetrahydrofurfuryl alcohol, polyethyleneglycols, fatty acid esters of sorbitan, or mixtures of these substances, and the like. Besides such inert diluents, the 15 composition can also include adjuvants, such as wetting agents, emulsifying and suspending agents, sweetening, flavoring, and perfuming agents.

 Another method of administering the segment of NTP is by a transdermal or transcutaneous route. One example of such an embodiment is the use of a patch. In particular, a patch can be prepared with a fine suspension of segment of 20 NTP in, for example, dimethylsulfoxide (DMSO), or a mixture of DMSO with cottonseed oil and brought into contact with the skin of the mammals away from the treatment site. The composition may be present inside a skin pouch. Other mediums or mixtures thereof with other solvents and solid supports would work equally as well. The patch can contain the segment of NTP in the form of a 25 solution or a suspension. The patch can then be applied to the skin of the patient, for example, by means of inserting it into a skin pouch of the patient formed by folding and holding the skin together by means of stitches, clips or other holding devices. This pouch should be employed in such a manner so that continuous contact with the skin is assured without the interference of the mammal. Besides 30 using a skin pouch, any device can be used which ensures the firm placement of the patch in contact with the skin. For instance, an adhesive bandage could be

used to hold the patch in place on the skin.

Actual dosage levels of the active ingredients in the compositions of the invention may be varied to obtain a segment to NTP-containing composition that is effective in obtaining a desired tissue necrosis-inhibiting therapeutic response for a particular composition and method of administration. The selected dosage level therefore depends upon the desired therapeutic effect, the route of administration, the desired duration of treatment, and other factors.

With mammals, including humans, the effective amounts can be administered on the basis of body surface area. The interrelationship of dosages for animals of various sizes, species, and humans (based on mg/M^2 of body surface) is described by E. J. Freireich et al., *Cancer Chemother. Rep.*, 50(4):219 (1966). Body surface area may be approximately determined from the height and weight of an individual (*see e.g.*, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y. pp. 537-538 (1970)).

The total daily dose of the segment of NTP that is administered to a host may be in single or divided doses. Dosage unit compositions may contain such amounts of such submultiples thereof as may be used to make up the daily dose. It will be understood, however, that the specific dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including the body weight, general health, sex, diet, time and route of administration, potency of the administered drug, rates of absorption and excretion, combination with other drugs and the severity of the particular disease being treated.

The segment of NTP-containing compositions of the present invention preferably contain a component that enables the segment of NTP to cross the blood-brain barrier to treat live brain tissue. Any of the variety of components described above can be used to render the segments capable of crossing the blood-brain barrier. For example, the segments of NTP may be small enough to traverse the blood-brain barrier. In this case, no additional component would be required.

The segments of NTP thereof may be glycosylated to enhance the permeability of the bbb, as disclosed in U.S. Pat. No. 5,260,308, or formed into a prodrug, as disclosed in U.S. Pat. No. 4,933,324 and WO 89/07938. These prodrugs

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

preferably are formed from a fatty acid carrier and an segment of NTP, which is unable to pass across the bbb on its own.

An alternative approach is the implantation of controlled release polymers that release the segments of NTP from a matrix-system directly into the nervous tissue (see Sabel *et al.* U.S. Pat. No. 4,883,666; and Sabel *et al.* U.S. patent application Ser. No. 07/407,930.). It also is possible to use drug carrier systems such as liposomes, erythrocyte ghosts, antibody-conjugates, and monoclonal antibody conjugates. In accordance with this embodiment of the invention, so-called "stealth" lipids, such as phosphatidylinositol, monosialoganglioside, or sulfogalactosylceramide can be used to form the liposomes containing the aforementioned antibodies and antibody conjugates.

The segments of NTP may be conjugated with an antibody that is reactive with a transferrin receptor, as disclosed in U.S. Pat. Nos. 5,182,107 and 5,154,924. Transferrin receptors are located on brain capillary endothelial cells, which thus transport a drug, such as nerve growth factor, or segments of NTP, across the bbb. The segment of NTP-antibody conjugate described above can be further enhanced by providing cationized antibodies with a specific isoelectric point, as disclosed in U.S. Pat. No. 5,004,697 and WO 89/01343.

Another embodiment of the invention encompasses creating chimeric peptides to which the active segments of NTP are conjugated, as disclosed in U.S. Pat. No. 4,801,575. The chimeric peptide preferably is histone, which is capable of crossing the bbb by transcytosis, as disclosed in U.S. Pat. No. 4,902,505. A further embodiment of the invention includes providing the segments of NTP together with the reduced, biooxidizable lipoidal form of a dihydropyridine reaction-pyridine salt redox carrier such as dopamine, as disclosed in U.S. Pat. Nos. 4,880,816, 5,187,158, and 5,017,566.

Another approach also can be taken to deliver the segments of NTP to the brain. This can be done by chemically disrupting the bbb and then using viruses to deliver the segments of NTP across the bbb, as disclosed in U.S. Pat. No. 4,866,042. Here, it is preferred that a corrective genetic material is incorporated into a virus and the virus is then injected into the bloodstream. Yet another carrier

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

system that can be used to deliver the segments of NTP across the bbb is the use of liposomes, as disclosed by F. D. Collins and R. C. Thompson (WO 91/04014). Here, liposomes preferably are targeted to specific endogenous brain transport systems that transport specific ligands across the bbb. Surfactant coated
5 nanoparticles also can be used as a drug carrier (or targeting molecule) for the segments of NTP of the invention in order to enhance the penetration thereof across the bbb, as disclosed in U.S. Patent No. 6,117,454.

Another approach is to use L-amino acid oxidase to reduce the plasma level of the segments of NTP to allow transport of the segments of NTP across the
10 bbb. Such an approach is described in more detail in U.S. Patent No. 5,695,751, the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety.

Another approach in accordance with the present invention is to administer compositions comprising the segments of NTP locally. Devices useful in administering compositions to an internal portion of the brain are described in, for
15 example, U.S. Patent No. 5,800,390, the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety. Sustained release, solid preparations and semi-solid preparations can be administered directly to brain tissue. Such administration can be accomplished by inserting a needle-like member of such an intracerebral device that is optionally implanted in the head so that a distal end of
20 the guide is positioned at a site of administration.

A preferred composition of the present invention for administration to a mammal suffering from a condition associated with cell death and/or tissue necrosis contains the segments of NTP, and a component that enables the segments of NTP to cross the bbb. Other preferred compositions of the present
25 invention include a gene that expresses the segments of NTP and a component that enables the gene to cross the bbb. An additional preferred composition of the present invention includes a vaccine that induces expression of the segments of NTP and a component that enables the vaccine to cross the bbb.

It is preferred in the present invention that the amount of segments of NTP
30 that contacts the live tissue be an amount sufficient to inhibit, prevent, and/or ameliorate cell death and/or tissue necrosis. The specific amount can be

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

determined by those skilled in the art, using the guidelines provided herein. It is preferred that enough segments of NTP be administered to reduce cell death or tissue necrosis by more than 50%, when compared to a control where no segment of NTP is present and cell death goes unchecked. More preferably, the segments
5 of NTP are administered to reduce cell death or tissue necrosis by more than 60%, even more preferably by more than 70%, and most preferably by more than 75%, when compared to a control where no segment of NTP is present and cell death or tissue necrosis goes unchecked.

Such an amount will invariably depend on the particular type of tissue, the
10 segments of NTP used, as well as the amount of NTP or other molecular target. Using the methods disclosed in any of the aforementioned U.S. Patent Nos. 5,948,634, 5,948,888, 5,830,670, and 6,071,705, one can estimate the relative amount of NTP or other molecular target present, and then conduct a series of *in vitro* experiments using mammalian tissue obtained from various sources, such as
15 any of those disclosed in the aforementioned U.S. patents, determining the amount of NTP or other molecular target in the tissue, and then determining the requisite amount of segments of NTP that is required to obtain the requisite degree of cell death or tissue necrosis prevention (*i.e.*, preferably by more than 60% when compared to a control). Skilled artisans are capable of carrying out these
20 experiments using techniques known in the art, as well as using the guidelines provided herein.

The amount of segments of NTP to be administered to the mammal then can readily be determined based on the body weight of the mammal, and the expected delivery amount to the tissue. The amount of segments of NTP that will
25 be expected to be delivered to the brain tissue of a mammal will depend on the particular mechanism that is employed to render the segments of NTP capable of crossing the bbb. The same holds true for administration of genes that express the segments of NTP or for the administration of vaccines that induce expression or production of the segments of NTP. Again, those skilled in the art are capable of
30 determining the appropriate dose of gene, vaccine, segments of NTP to administer to a mammal using the techniques described in the aforementioned patents that are

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

incorporated by reference herein in their entirety, and by using the guidelines provided therein and herein.

The following examples are provided to illustrate the present invention. It should be understood, however, that the invention is not to be limited to the specific conditions or details described in these examples.

Example 1

This example demonstrates cell death in live tissue (*in vivo*) due to the presence of AD7C-NTP.

AD7C-NTP was obtained in accordance with the procedures outlined in any one of U.S. Patent Nos. 5,948,634, 5,948,888, 5,830,670, and 6,071,705.

Eight normal rats were injected in the skin and subcutaneously, each in 3 different foci, with purified recombinant AD7C-NTP in saline at concentrations of 0.1-1.0 µg/mL delivered from plastic syringes through stainless steel 26 gauge needles.

The animals were observed for 24 hours and painlessly sacrificed at 24 hours. The 24 individual foci of infiltration were excised, fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and stained and examined by standard histopathological methods.

Similar groups of control rats were injected with (1) bovine serum albumin in saline, (2) normal human serum, and (3) physiological saline, and examined and sacrificed as above, with the excised foci of injection treated as above.

Injection of AD7C-NTP in all examples produced acute necrosis of tissue at the injection sites. The necrosis is evident in muscle tissue, subcutaneous connective tissue, and dermis at the sites where the AD7C-NTP was injected. At 24 hours, cells appear pale, shrunken, and necrotic, and there is infiltration with inflammatory cells. The necrosis correlates with the areas of injection and does not appear to spread far beyond the site of injection.

Controls showed no evidence of necrosis or cell loss. Control injections had mild to minimal acute inflammation and focal microhemorrhages from the needles.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

Example 2

The purpose of this example was to identify several Harlil sequences of the AD7C-NTP neural thread protein and determine their reactivity with AD7C-NTP.

5 The following Harlil sequences were synthesized (Synpep, Dublin CA) and conjugated to maleimide activated Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) and assessed for their NTP immunoreactivity. A linker was added, which was a repetition of the protein sequence occurring before and after the 90-96 H H A R L C L sequence of AD7C-NTP.

- | | | | |
|----|----|---------|---------------------------------|
| 10 | 1. | (NTP-1) | L H A R L C L A N F C G R N R V |
| | 2. | (NTP-2) | L A R L C L A N F C G N N N V |
| | 3. | (NTP-3) | C A R Y R T G H H A R L M |
| | 4. | (NTP-4) | H H A R L P L A N F C G |
| | 5. | (NTP-5) | R T G H H A R L C L A N F C |
| 15 | 6. | (NTP-6) | C E S A R Y R T G H H A R L C |
| | 7. | (NTP-7) | D N T H H A R L I L |
| | 8. | (NTP-8) | S H H A R L I L |

Conjugation to carrier proteins was through a cysteine. Thus, peptides NTP-1 and NTP-2 produced mixed conjugate results because there were more
 20 than one cysteine residue. Therefore, for peptides NTP-5 and NTP-6, the secondary cysteine was blocked with Acetamido Methyl (C_3H_6NO) (ACM).

The location of the identified sequences in the AD7C-NTP sequence can be seen in Fig. 1. As mentioned above, homologues, derivatives, mimetics and variants of the Harlil peptides are also encompassed by the scope of the invention.
 25 For construction of the homologous peptides of this example, homologous amino acids were used. The substitution criteria used were charge and/or size. Thus, the choice to substitute methionine for cysteine in NTP peptide 3 was based on overall similarity between these two amino acids and the desire to remove a reactive cysteine from this particular stretch of amino acids. The choice to
 30 substitute proline for cysteine was an attempt to see if this would mimic the

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

conformational form of the peptide when it was in the protein and the cysteine was in disulfide linkage.

Other changes known to persons of skill in the art to affect or study affinity interactions include, but are not limited to, for example, interchanging
5 leucine with other hydrophobic amino acids, such as isoleucine, valine, alanine or glycine; interchanging acidic amino acids or basic amino acids; interchanging histidine with phenylalanine to determine the effect of charge vs spatial; interchanging asparagine with aspartic, or glutamine with glutamic, to evaluate the effect of charge vs spatial; and interchanging serine with threonine, threonine
10 with cysteine, aspartic with glutamic, arginine with lysine or histidine, and tyrosine with tryptophan or phenylalanine. The changes introduced to the flanking sequences were done to render the peptide less basic or hydrophobic

Example 3

This example demonstrates preventing and/or inhibiting necrosis of live
15 tissue (*in vivo*) by administering a segment of NTP or homologue, variant, mimetic or derivative thereof that binds NTP to tissue that contains NTP.

AD7C-NTP was obtained as described above in Example 1.

The Harlil sequences NTP-1, NTP-3, and NTP-7 prepared in accordance with Example 2 above were used in this example.

20 Recombinant AD7C-NTP samples 100 ng/mL-10 µg/mL were incubated at room temperature for 5 minutes to one hour with the aforementioned Harlil sequences and then injected into rats as described in Example 1.

Alternatively, a solution of the Harlil sequence was made up in concentrations ranging from 1 microgram/mL to 1 milligram/mL. Solutions
25 containing the recombinant AD7C-NTP also were made up as described above, without the addition of the Harlil sequence. The animals were injected with about 100 microliters of the AD7C-NTP solution, and with about 100 microliters of the Harlil solution.

The animals were observed for 24 hours and painlessly sacrificed at 24
30 hours. The 24 individual foci of infiltration were excised, fixed in 10% formalin,

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

embedded in paraffin, and stained and examined by standard histopathological methods.

5 Similar groups of control rats were injected with (1) AD7C-NTP alone as described in Example 1, (2) bovine serum albumin in saline, (3) normal human serum, and (4) physiological saline, and examined and sacrificed as above, with the excised foci of injection treated as above.

10 The control injections of AD7C-NTP alone produced tissue necrosis, as described in Example 1. Control injections of bovine serum albumin (BSA), normal human serum, and physiological saline all showed no evidence of necrosis or cell loss. The above control injections had mild to minimal acute inflammation and focal microhemorrhages from the needles.

The AD7C-NTP samples that were injected together with each of the Harlil sequences NTP-1, NTP-3, and NTP-7 showed over 95% reduction in tissue necrosis, when compared to the control samples injected with AD7C-NTP alone.

15 There were occasional focal nodules of inflammatory cell foci with micronodule formation which appeared to possibly be aggregation of AD7C-NTP and the Harlil sequence. The overall tissue injury was reduced by >95% by administration of the segment of NTP (or Harlil sequence), when compared to controls that were injected only with AD7C-NTP.

20 While the invention has been described in detail with reference to particularly preferred embodiments and examples, those skilled in the art will appreciate that various modifications may be made to the invention without departing from the spirit and scope thereof.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

What is claimed is:

1) A method of preventing and/or inhibiting cell death and/or tissue necrosis in live tissue comprising contacting the live tissue with at least one segment of NTP, whereby the segment of NTP is present in an amount sufficient to prevent and/or inhibit cell death and/or tissue necrosis.

2) The method of claim 1 wherein at least one segment of NTP contains an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- a) THARLIL; HHARLCL; MFARLIL; HHARLIF;
- b) HHARL; HARL; HARLI; HARLIL; HHARLCL; ARLIL; HHARLIF; THARLIL; ARLI; ARL; HARLCL; ARLCL; ARCL; MFARLIL; FARLIL; FARLI; FARL; HARLIF; ARLIF;
- c) LHARLCLANFCGRNRV;
- d) LARLCLANFCGNNNV;
- e) CARYRTGHHARLM;
- f) HHARLPLANFCG;
- g) RTGHHARLCLANFC;
- h) CESARYRTGHHARLC;
- i) DNTHHARLIL;
- j) SHHARLIL; and
- k) HARLML; HARLV L; and HAKLIL

and variants, homologues, derivatives, and mimetics thereof.

3) A method of treating conditions associated with cell death and/or tissue necrosis, comprising contacting live tissue with at least one segment of NTP, whereby the segment of NTP is present in an amount sufficient to prevent and/or inhibit cell death and/or tissue necrosis.

4) The method of claim 3 wherein at least one segment of NTP contains an amino acid sequence selected from the group consisting of :

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

- a) THARLIL; HHARLCL; MFARLIL; HHARLIF;
- b) HHARL; HARL; HARLI; HARLIL; HHARLCL; ARIL; HHARLIF; THARLIL; ARLI; ARL; HARLCL; ARLCL; ARCL; MFARLIL; FARLIL; FARLI; FARL; HARLIF; ARLIF;
- c) LHARLCLANFCGRNRV;
- d) LARLCLANFCGNNNV;
- e) CARYRTGHHARLM;
- f) HHARLPLANFCG;
- g) RTGHHARLCLANFC;
- h) CESARYRTGHHARLC;
- i) DNTHHARLIL;
- l) SHHARLIL; and
- m) HARLML; HARVL; and HAKLIL

and variants, homologues, derivatives, and mimetics thereof.

5) A method of preventing and/or inhibiting cell death and/or tissue necrosis in live mammalian brain tissue by contacting the live mammalian brain tissue with a composition containing at least a segment of NTP, whereby the composition further comprises a component that enables the segment of NTP to cross the blood-brain barrier.

6) The method of claim 5 wherein at least one segment of NTP contains an amino acid sequence selected from the group consisting of :

- a) THARLIL; HHARLCL; MFARLIL; HHARLIF;
- b) HHARL; HARL; HARLI; HARLIL; HHARLCL; ARIL; HHARLIF; THARLIL; ARLI; ARL; HARLCL; ARLCL; ARCL; MFARLIL; FARLIL; FARLI; FARL; HARLIF; ARLIF;
- c) LHARLCLANFCGRNRV;
- d) LARLCLANFCGNNNV;

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

- e) CARYRTGHHARLM;
- f) HHARLPLANFCG;
- g) RTGHHARLCLANFC;
- h) CESARYRTGHHARLC;
- i) DNTHHARLIL;
- n) SHHARLIL; and
- o) HARLML; HARLVL; and HAKLIL

and variants, homologues, derivatives, and mimetics thereof.

7) A method of treating a neurodegenerative disorder by contacting live mammalian brain tissue with a composition containing at least a segment of NTP, whereby the composition further comprises a component that enables the segment of NTP to cross the blood-brain barrier.

8) The method of claim 7 wherein at least one segment of NTP contains an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- a) THARLIL; HHARLCL; MFARLIL; HHARLIF;
- b) HHARL; HARL; HARLI; HARLIL; HHARLCL; ARLIL; HHARLIF; THARLIL; ARLI; ARL; HARLCL; ARLCL; ARCL; MFARLIL; FARLIL; FARLI; FARL; HARLIF; ARLIF;
- c) LHARLCLANFCGRNRV;
- d) LARLCLANFCGNNNV;
- e) CARYRTGHHARLM;
- f) HHARLPLANFCG;
- g) RTGHHARLCLANFC;
- h) CESARYRTGHHARLC;
- i) DNTHHARLIL;
- p) SHHARLIL; and
- q) HARLML; HARLVL; and HAKLIL

and variants, homologues, derivatives, and mimetics thereof.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

9) The method of claim 7 wherein the neurodegenerative disorder is Alzheimer's disease.

10) The method of claim 8 wherein the neurodegenerative disorder is Alzheimer's disease.

11) A composition for treating conditions associated with cell death and/or tissue necrosis comprising a segment of NTP and a component that enables the segment of NTP to cross the blood-brain barrier.

12) The method of claim 11 wherein at least one segment of NTP contains an amino acid sequence selected from the group consisting of :

- a) THARLIL; HHARLCL; MFARLIL; HHARLIF;
- b) HHARL; HARL; HARLI; HARLIL; HHARLCL; ARLL; HHARLIF; THARLIL; ARLI; ARL; HARLCL; ARLCL; ARCL; MFARLIL; FARLIL; FARLI; FARL; HARLIF; ARLIF;
- c) L HARLCLANFCGRNRV;
- d) LARLCLANFCGNNNV;
- e) CARYRTGHHARLM;
- f) HHARLPLANFCG;
- g) RTGHHARLCLANFC;
- h) CESARYRTGHHARLC;
- i) DNTHHARLIL;
- r) SHHARLIL; and
- s) HARLML; HARLVL; and HAKLIL

and variants, homologues, derivatives, and mimetics thereof.

13) A method of preventing, modulating, controlling, ameliorating and/or inhibiting cell death and/or tissue necrosis in live tissue at or near the site where

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

NTP has been administered for therapeutic purposes, comprising contacting the live tissue with at least one segment of NTP, whereby the segment of NTP is present in an amount sufficient to prevent, modulate, control, ameliorate and/or inhibit cell death and/or tissue necrosis caused by the therapeutic administration of NTP.

14) The method of claim 13 wherein at least one segment of NTP contains an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- a) THARLIL; HHARLCL; MFARLIL; HHARLIF;
- b) HHARL; HARL; HARLI; HARLIL; HHARLCL; ARLL; HHARLIF; THARLIL; ARLI; ARL; HARLCL; ARLCL; ARL; MFARLIL; FARLIL; FARLI; FARL; HARLIF; ARLIF;
- c) LHARLCLANFCGRNRV;
- d) LARLCLANFCGNNNV;
- e) CARYRTGHHARLM;
- f) HHARLPLANFCG;
- g) RTGHHARLCLANFC;
- h) CESARYRTGHHARLC;
- i) DNTHHARLIL;
- t) SHHARLIL; and
- u) HARLML; HARLV L; and HAKLIL

and variants, homologues, derivatives, and mimetics thereof.

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

1/9

Figure 1

```
1      tttttttttttgag  ATG  GAG  TTT  TCG  CTC  TTG  TTG  CCC  AGG  CTG  GAG  TGC  AAT  GGC  GCA  ATC  62
1      M      E      P      S      L      L      L      P      R      L      E      C      N      G      A      I      16

63     TCA  GCT  CAC  CCC  AAC  CTC  CGC  CTC  CCG  GGT  TCA  AGC  GAT  TCT  CCT  GCC  TCA  GCC  TCC  CCA  122
17     S      A      H      R      N      L      R      L      P      G      S      S      D      S      P      A      S      A      S      P      36

123    GTA  GCT  GGG  AAT  ACA  GGC  ATG  TGC  ACC  CAC  GCT  CGG  CTA  ATT  TTG  TAT  TTT  TTT  TTA  GTA  182
37     V      A      G      I      T      G      M      C      T      H      A      R      L      I      L      Y      F      F      L      V      56

183    GAG  ATG  GAG  TTT  CTC  CAT  GTT  GGT  CAG  GCT  GGT  CTC  GAA  CTC  CGG  ACC  TCA  GAT  GAT  CCC  242
57     E      M      E      F      L      H      V      G      Q      A      G      L      E      L      P      T      S      D      D      P      76

243    TCC  GTC  TCG  GCC  TCC  CAA  AGT  GCT  AGA  TAC  AGG  ACT  GGC  CAC  CAT  GCC  CGG  GAT  TGC  CTG  302
77     S      V      S      A      S      Q      S      A      R      Y      R      T      G      H      H      A      R      L      C      L      96

303    GCT  AAT  TTT  TGT  GGT  AGA  AAC  AGG  GTT  TCA  CTG  ATG  TGC  CCA  AGC  TGG  TCT  CCT  GAG  CTC  362
97     A      N      F      C      G      R      N      R      V      S      L      M      C      P      S      W      S      P      E      L      116

363    AAG  CAG  TCC  ACC  TGC  CTC  AGC  CTC  CCA  AAG  TGC  TGG  GAT  TAC  AGG  CGT  GCA  GCC  GTG  CCT  422
117    K      Q      S      T      C      L      S      L      P      K      C      W      D      Y      R      R      A      A      V      P      136

423    GGC  CTT  TTT  ATT  TTA  TTT  TTT  TTA  AGA  CAC  AGG  TGT  CCC  ACT  CTT  ACC  CAG  GAT  GAA  GTG  482
137    G      L      F      I      L      F      F      L      R      H      R      C      P      T      L      T      Q      D      S      V      156

483    CAG  TGG  TGT  GAT  CAC  AGC  TCA  CTG  CAG  CCT  TCA  ACT  CCT  GAG  ATC  AAG  CAT  CCT  CCT  GCC  542
157    Q      W      C      D      H      S      S      L      Q      P      S      T      P      E      I      K      H      P      P      A      176

543    TCA  GCC  TCC  CAA  GTA  GCT  GGG  ACC  AAA  GAC  ATG  CAC  CAC  TAC  ACC  TGG  CTA  ATT  TTT  ATT  602
177    S      A      S      Q      V      A      G      T      K      D      M      H      H      Y      T      W      L      I      F      I      196

603    TTT  ATT  TTT  AAT  TTT  TTG  AGA  CAG  AGT  CTC  AAC  TCT  GTC  ACC  CAG  GCT  GGA  GTG  CAG  TGG  662
197    F      I      F      N      F      L      R      Q      S      L      N      S      V      T      Q      A      G      V      Q      W      216

663    GGC  AAT  CTT  GGC  TCA  CTG  CAA  CCT  CTG  CCT  CCC  GGG  TTC  AAG  TTA  TTC  TGC  TGC  CCC  AGC  722
217    R      N      L      G      S      L      Q      P      L      P      P      G      F      K      L      F      S      C      P      S      236

723    CTC  CTG  AGT  AGC  TGG  GAC  TAC  AGG  CGC  CCA  CCA  CGC  CTA  GGT  AAT  TTT  TTT  GTA  TTT  TTA  782
237    L      L      S      S      W      D      Y      R      R      P      P      R      L      A      N      F      F      V      F      L      256

783    GTA  GAG  ATG  GGG  TTC  ACC  ATG  TTC  GCC  AGG  TGG  ATC  TTG  ATC  TCT  GGA  CCT  TGT  GAT  CTG  842
257    V      E      M      G      F      T      M      F      A      R      L      I      L      I      S      G      P      C      D      L      276

843    CCT  GCC  TCG  GCC  TCC  CAA  AGT  GCT  GGG  ATT  ACA  GGC  GTG  AGC  CAC  CAC  GCC  CGG  CTT  ATT  902
277    P      A      S      A      S      Q      S      A      G      I      T      G      V      S      H      H      A      R      L      I      296

903    TTT  AAT  TTT  TGT  TTG  TTT  GAA  ATG  GAA  TCT  CAC  TCT  GTT  ACC  CAG  GCT  GGA  GTG  CAA  TGG  962
297    F      N      F      C      L      F      E      M      E      S      H      S      V      T      Q      A      G      V      Q      W      316

963    CCA  AAT  CTC  GGC  TCA  CTG  CAA  CCT  CTG  CCT  CCC  GGG  CTC  AAG  CGA  TTC  TCC  TGT  CTC  AGC  1022
317    P      N      L      G      S      L      Q      P      L      P      P      G      L      K      R      F      S      C      L      S      336

1023   CTC  CCA  AGC  AGC  TGG  GAT  TAC  GGG  CAC  CTG  CCA  CCA  CAC  CCC  GCT  AAT  TTT  TGT  ATT  TTC  1082
337   L      P      S      S      W      D      Y      G      H      L      P      F      H      P      A      N      F      C      I      F      356

1083   ATT  AGA  GGC  GGG  GTT  TCA  CCA  TAT  TTG  TCA  GGC  TGG  TCT  CAA  ACT  CCT  GAC  CTC  AGG  Tgac  1143
357   I      R      G      G      V      S      F      Y      L      S      G      W      S      Q      T      P      D      L      R      375

1144   ccacctgacctcagccttccaaagtgcctggattacagggctgagccacctcaccacggcggtataatttagataaaaaaat  1223

1224   atgtgcaatgggggggtctctgctatgttgccaggctgggtctcaaaactctctggttcattgcaatccttccaaatgagcca  1303

1304   caaccccccagccagtcacattttttaaacagttacactcttttatitttagtatactagaagtaatacaataaacatgtcaaa  1383

1384   acctgcaaatcagtagtaacagagttcttttataactttttaaacaaagcttttagagca  1442
```

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

2/9

Figure 2

NIP[122]

1 Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
M M V C W N R F G K

11 Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
W V Y F I S A I F N

21 Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val-
F G P R Y L Y H G V

31 Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
P F Y F L I L V R I

41 Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
I S F L I G D M E D

51 Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
V L L N C T L L K R

61 Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
S S R F R F W G A L

71 Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser
V C S M D S C R F S

81 Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
R V A V T Y R F I T

91 Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
L L N I P S P A V W

101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-
M A R N T I D Q Q V

111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
L S R I K L E I K R

121 Cys-Leu
C L

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

3/9

Figure 3

NTP[112]

```
1   Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-The-Ser-  
    M  A  Q  S  R  L  T  A  T  S  
11  Ala-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-  
    A  S  R  V  Q  A  I  L  L  S  
21  Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala-  
    Q  P  P  K  Q  L  G  L  R  A  
31  Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-  
    P  A  N  T  P  L  I  F  V  F  
41  Ser-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-His-His-Ile-Cys-  
    S  L  E  A  G  F  H  H  I  C  
51  Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly-  
    Q  A  G  L  K  L  L  T  S  G  
61  Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-  
    D  P  P  A  S  A  F  Q  S  A  
71  Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-Leu-Thr-Gln-  
    G  I  T  G  V  S  H  L  T  Q  
81  Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser-  
    P  A  N  L  D  K  K  I  C  S  
91  Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-  
    N  G  G  S  C  Y  V  A  Q  A  
101 Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-  
    G  L  K  L  L  A  S  C  N  P  
111 Ser-Lys  
    S  K
```

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

4/9

Figure 4

NTP[106]

1 Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-
M W T L K S S L V L

11 Leu-Leu-Cys-Leu-Thr-Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-
L L C L T C S Y A F

21 Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser-
M F S S L R Q K T S

31 Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-
E P Q G K V P C G E

41 His-Phe-Arg-Ile-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-
H F R I R Q N L P E

51 His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp-
H T Q G W L G S K W

61 Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-
L W L L F A V V P F

71 Val-Ile-Leu-Lys-Cys-Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-
V I L K C Q R D S E

81 Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe-
K N K V R M A P F F

91 Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-
L H H I D S I S G V

101 Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe
S G K R M F

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

5/9

Figure 5

NTP [106]

1 Met-Phe-Phe-Val-Leu-Tyr-Arg-Phe-Cys-Phe-
M F F V L Y R F C F

11 Cys-Phe-Phe-Glu-Thr-Glu-Ser-His-Ser-Leu-
C F F E T E S H S L

21 Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Cys-Glu-Leu-
T Q A G V Q W C E L

31 Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Ser-Gly-Phe-
G S P Q P L P S G F

41 Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Leu-Ser-
K R F S C L S L L S

51 Ser-Trp-Asp-Tyr-Ser-His-Glu-Pro-Pro-His-
S W D Y S H E P P H

61 Pro-Val-Ile-Cys-Ser-Phe-Leu-Met-Glu-Lys-
P V I C S F L M E K

71 Cys-Leu-Ile-Leu-Tyr-Lys-Pro-Asn-Gly-Asp-
C L I L Y K P N G D

81 Thr-Ile-Gly-Pro-Ile-Leu-Val-Gln-Gln-Gly-
T I G P I L V Q Q G

91 Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Tyr-Ile-Ser-Ala-Asp-
K R Q K L Y I S A D

100 Leu-Val-His-Leu-Ile-Ala
L V H L I A

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

6/9

Figure 6

NTP[98]

1 Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-
E A Y Y T M L H L P

11 Thr-Thr-Asn-Arg-Pro-Lys-Ile-Ala-His-Cys
T T N R P K I A H C

21 Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg-
I L F N Q P H S P R

31 Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-
S N S H S H P N P L

41 Lys-Leu-His-Arg-Arg-Ser-His-Ser-His-Asn-
K L H R R S H S H N

51 Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile-
R P R A Y I L I T I

61 Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-
L P S K L K L R T H

71 Ser-Gln-Ser-His-His-Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-
S Q S H H N P L S R

81 Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-
T S N S T P T N S F

91 Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg
L M T S S K P R

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

7/9

Figure 7

NTP[75]

```
1  Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-
   S  S  S  L  G  L  P  K  C  W
11 Asp-Tyr-Arg-His-Glu-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-
   D  Y  R  H  E  L  L  S  L  A
21 Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys
   L  M  I  N  F  R  V  M  A  C
31 Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-
   T  F  K  Q  H  I  E  L  R  Q
41 Lys-Ile-Ser-Ile-Val-Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-
   K  I  S  I  V  P  R  K  L  C
51 Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile-
   C  M  G  P  V  C  P  V  K  I
61 Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-
   A  L  L  T  I  N  G  H  C  T
71 Trp-Leu-Pro-Ala-Ser
   W  L  P  A  S
```

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

8/9

Figure 8

NTP[68]

1 Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
M F V F C L I L N R

11 Glu-Lys-Ile-Lys-Gly-Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-
E K I K G G N S S F

21 Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln-
F L L S F F F S F Q

31 Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-
N C C Q C F Q C R T

41 Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-
T E G Y A V E C F Y

51 Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-
C L V D K A A F E C

61 Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr
W W F Y S F D T

WO 02/092115

PCT/CA02/00712

9/9

Figure 9

NTP[61]

```
1  Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-  
   M  E  P  H  T  V  A  Q  A  G  
11 Val-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-  
   V  P  Q  H  D  L  G  S  L  Q  
21 Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser-  
   S  L  L  P  R  F  K  R  F  S  
31 Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-  
   C  L  I  L  P  K  I  W  D  Y  
41 Arg-Asn-Met-Asn-Thr-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-  
   R  N  M  N  T  A  L  I  K  R  
51 Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-  
   N  R  Y  T  P  E  T  G  R  K  
61 Ser  
   S
```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092115 A3(51) International Patent Classification⁷: A61K 38/08,
38/16, A61P 25/28, C07K 7/06, 7/08(74) Agent: BERESKIN & PARR; 40 King Street West, Box
401, 40th Floor, Toronto, Ontario M5H 3Y2 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA02/00712

(22) International Filing Date: 16 May 2002 (16.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/290,971 16 May 2001 (16.05.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): NYMOX
CORPORATION [CA/CA]; 9900 Blvd., Cavendish, Suite
306, St. Laurent, Québec H4M 2V2 (CA).(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD OF PREVENTING CELL DEATH USING SEGMENTS OF NEURAL THREAD PROTEINS

(57) Abstract: Disclosed is a method of preventing,
inhibiting, and/or ameliorating cell death and/or tissue
necrosis in live tissue by contacting live tissue with
at least a segment of NTP, or homologue, variant,
derivative or mimetic thereof, where the segment of NTP,
or homologue, variant, derivative or mimetic thereof is
present in an amount effective to prevent, inhibit, and/or
ameliorate cell death and/or tissue necrosis. The method
is capable of treating conditions requiring prevention,
inhibition, and/or amelioration of cell death and/or tissue
necrosis.

WO 02/092115 A3

WO 02/092115 A3 **Published:**

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the international search report:

15 May 2003

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In
		onal Application No
		EP/CA 02/00712
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 A61K38/08 A61K38/16 A61P25/28 C07K7/06 C07K7/08		
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 7 A61K A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 948 888 A (DE LA MONTE SUZANNE ET AL) 7 September 1999 (1999-09-07) abstract column 6, line 1 - line 14 column 29, line 1 - line 4 column 32, line 31 - line 54	1-14
A	WO 94 23756 A (GEN HOSPITAL CORP) 27 October 1994 (1994-10-27) abstract page 9, line 27 - page 10, line 6 page 49, line 19 - line 21 page 55, line 18 - line 6 -/-	1-14
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating 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 ** 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, each contribution being chosen to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 March 2003		26/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5516 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-2010		Authorized officer Pilling, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 02/00712

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02 34915 A (AVERBACK PAUL ; NYMOX PHARMACEUTICALS CORP (CA); BIBIANO RIZA (US)); 2 May 2002 (2002-05-02) page 6, line 20 - line 25 page 7, line 24 - line 28 -----	1-14
P, X	WO 01 46440 A (MAO YUMIN ; XIE YI (CN); BIOWINDOW GENE DEV INC SHANGHA (CN)) 28 June 2001 (2001-06-28) abstract -----	1-4
P, X	WO 01 46237 A (MAO YUMIN ; XIE YI (CN); BIOWINDOW GENE DEV INC SHANGHA (CN)) 28 June 2001 (2001-06-28) abstract -----	1-4
E	WO 02 074323 A (AVERBACK PAUL) 26 September 2002 (2002-09-26) page 7, line 2 - line 6 -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/CA 02/00712

Patent document disclosed in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5948888 A	07-09-1999	US 5948634 A	07-09-1999
		AU 4650096 A	06-06-1996
		WO 9615272 A1	23-05-1996
		US 5830670 A	03-11-1998
		AU 674581 B2	02-01-1997
		AU 6666994 A	08-11-1994
		CA 2161097 A1	27-10-1994
		EP 0697893 A1	28-02-1996
		JP 8509808 T	15-10-1996
		NZ 266072 A	27-07-1997
		WO 9423756 A1	27-10-1994
		US 6071705 A	06-06-2000
		AT 145285 T	15-11-1996
		AU 4837990 A	10-07-1990
		AU 641376 B2	23-09-1993
		AU 5265393 A	17-03-1994
		CA 2006332 A1	21-06-1990
		DE 68927459 D1	19-12-1996
		DE 68927459 T2	24-04-1997
		EP 0378924 A2	25-07-1990
		ES 2094733 T3	01-02-1997
		GR 3022287 T3	30-04-1997
		JP 4502364 T	23-04-1992
		JP 3309972 B2	29-07-2002
		WO 9006993 A1	28-06-1990
WO 9423756 A	27-10-1994	AU 674581 B2	02-01-1997
		AU 6666994 A	08-11-1994
		CA 2161097 A1	27-10-1994
		EP 0697893 A1	28-02-1996
		JP 8509808 T	15-10-1996
		NZ 266072 A	27-07-1997
		WO 9423756 A1	27-10-1994
		US 5948634 A	07-09-1999
		US 5948888 A	07-09-1999
		US 5830670 A	03-11-1998
WO 0234915 A	02-05-2002	AU 3239202 A	06-05-2002
		WO 0234915 A2	02-05-2002
WO 0146440 A	28-06-2001	CN 1300778 A	27-06-2001
		AU 1985201 A	03-07-2001
		WO 0146440 A1	28-06-2001
WO 0146237 A	28-06-2001	CN 1300779 A	27-06-2001
		AU 1985301 A	03-07-2001
		WO 0146237 A1	28-06-2001
WO 02074323 A	26-09-2002	WO 02074323 A2	26-09-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C O 7 K 7/08

F I

C O 7 K 7/08 Z N A

テーマコード (参考)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 アヴァーバック, ポール・エイ

カナダ国ケベック エイチ9ダブリュー・4ジェイ1, ビーコンズフィールド, レークショア・ロード 383

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA08 BA13 BA17 BA18 CA28 DC50 NA14 ZA011

ZA161 ZB211 ZB212

4H045 AA10 AA30 BA15 BA16 BA17 CA45 EA21 FA34