

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5960793号
(P5960793)

(45) 発行日 平成28年8月2日 (2016.8.2)

(24) 登録日 平成28年7月1日 (2016.7.1)

(51) Int. Cl.

F I

C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	

請求項の数 14 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-500540 (P2014-500540)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月22日 (2012.3.22)
 (65) 公表番号 特表2014-510101 (P2014-510101A)
 (43) 公表日 平成26年4月24日 (2014.4.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2012/050104
 (87) 国際公開番号 W02012/127475
 (87) 国際公開日 平成24年9月27日 (2012.9.27)
 審査請求日 平成27年3月20日 (2015.3.20)
 (31) 優先権主張番号 61/466,966
 (32) 優先日 平成23年3月24日 (2011.3.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 397058965
 ニューリム ファーマシューティカルズ (1991) リミテッド
 イスラエル国 69710 テル アヴィ
 ヴ ヘイネチョーシェット ストリート
 8
 (74) 代理人 100105050
 弁理士 鷲田 公一
 (72) 発明者 ピンナー エルハナン
 イスラエル国 42920 モシャヴ ペ
 イト イツハク ハシャロン ストリート
 46

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経保護ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 6、配列番号 3 4 および配列番号 4 5 のいずれかのアミノ酸配列からなる、単離ペプチド。

【請求項 2】

活性成分として請求項 1 の単離ペプチドと、薬学的に有効な担体と、含む医薬組成物。

【請求項 3】

請求項 1 の単離ペプチドの、神経変性疾患治療用の薬剤の製造における使用。

10

【請求項 4】

前記神経変性疾患が、パーキンソン病、多発性硬化症、ALS、多系統萎縮症、アルツハイマー病、脳卒中、外傷性脳損傷、進行性核上麻痺、第 17 番染色体に連鎖するパーキンソン症候群を伴う前頭側頭型認知症およびピック病からなる群から選択される、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

前記神経変性疾患が、パーキンソン病である、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 6】

前記神経変性疾患が、アルツハイマー病である、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 7】

20

前記単離ペプチドが、細胞透過剤に結合されている、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

【請求項 8】

前記細胞透過剤がペプチド剤である、請求項 7 に記載の単離ペプチド。

【請求項 9】

前記単離ペプチドが、細胞透過剤に結合されている、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記細胞透過剤がペプチド剤である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記単離ペプチドが、細胞透過剤に結合されている、請求項 3 ～ 6 のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 12】

前記細胞透過剤がペプチド剤である、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

前記薬剤が、皮下投与用に製剤化されたものである、請求項 3 ～ 6、11 および 12 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 14】

前記薬剤が、鼻腔内投与用に製剤化されたものである、請求項 3 ～ 6、11 および 12 のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、その一部の実施形態において、神経保護ペプチド剤およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）およびハンチントン病（HD）などの神経変性疾患は、成人発症型の慢性、進行性および不可逆的な重度の障害を引き起こす疾患であって、ニューロン死などのニューロンの構造および機能の進行性の消失が存在する疾患である。

【0003】

30

アルツハイマー病（AD）は、認知機能の進行性喪失を特徴とする最も一般的な神経変性疾患である。AD 組織病理学は、アミロイド - （A）の沈着および過剰リン酸化タウタンパク質からそれぞれ生じる、タンパク質異常、つまりプラークおよび神経原線維変化によって定義される。これらの病状は、ニューロンおよび白質の消失、コンゴウ好染血管障害、炎症および酸化的損傷を伴う [1]。AD における炎症は、老人斑周辺のミクログリア形態変化およびアストログリオシスによって明示される [2]。A ペプチドは、-アミロイド前駆タンパク質（APP）がまず - セクレターゼで切断され、次いでプレセニリン 1 を触媒コアとするタンパク質複合体である - セクレターゼで膜内消化されることにより産生される。生じたペプチドが分泌され、AD の特徴であるアミロイドプラークが沈着する [1]。

40

【0004】

パーキンソン病（PD）は、脳の黒質緻密部におけるドーパミン作動性ニューロンの選択的変性によって起こる、慢性および進行性神経変性疾患である。症状としては、振戦、硬直、動作の緩慢さ、および姿勢の不安定さなどの運動関連症状が挙げられる。非運動症状の中では、自律神経障害および感覚および睡眠の障害が挙げられる。認知症などの認知的小および神経行動学的問題は、疾患の進行した段階において一般的である。若年発症型の場合もあるが、PD は通常 60 歳前後で現れる。PD の主要な病理学的特徴は、黒質、さらに具体的には緻密部の腹側部分における細胞死であり、患者が死亡する時点までに細胞の 70 % までが冒される [3]。

【0005】

50

CD44は、広範な選択的スプライシングおよび翻訳後修飾から生じるI型膜貫通タンパク質のファミリーをコードする。その変異部は、タンパク質の細胞外膜 - 近位部分に位置し、バリエーションエクソンV2（マウスではV1）～V10によってコードされる[4]。CD44は、ヒアルロン酸（HA）の主要な細胞表面受容体であるが、コラーゲン、フィブロネクチン、フィブリノゲン、ラミニンおよびオステオポンチンなどのタンパク質に結合することも示されている[5]。CD44は、炎症部位への循環リンパ球の動員に必須である[6, 7]。バリエーションエクソンを全く含有しないCD44Sは、最も広く分布する形であり、大部分の細胞型によって発現される[8]。10個のバリエーションエクソンのうちの1つまたは複数が含まれるCD44バリエーションタンパク質は主に、癌[9]および慢性関節リウマチ[10]および多発性硬化症[11]などの自己免疫疾患に関連して報告されている。CD44スプライスバリエーションに関して示唆される固有の機能の1つは、シグナル伝達への関与である。一例として、CD44V6は、c-Met[12]およびVEGFR-2[13]などのチロシンキナーゼを介したシグナル伝達に必須であることが示された。

【0006】

脳内では、CD44は、白質の星状膠細胞に主に見られる[14-18]。それと対照的に、エクソンV4、V5およびV10を含有するCD44バリエーションはニューロンに局在した[17]。CD44の発現は、一過性前脳虚血後に、海馬の活性化ミクログリアにおいても見られた[19]。CD44は、その数がADの脳で劇的に増加する、CD44陽性星状膠細胞の特定のサブセットをAkizamaらが報告した際に、ADと関連して最初に言及された[14]。CNS再生におけるCD44の潜在的な役割が、網膜神経節細胞の軸索成長に必須であることが判明したとして報告された[20]。中大脳動脈閉塞後、CD44欠損マウスは、野生型マウスと比較して梗塞のサイズが小さいことから、CD44は、虚血性脳損傷において一役割を果たすことが示された[21]。Lammichら[22]によって、推定上の核シグナル伝達のために細胞外ドメインならびにCD44細胞内ドメインを遊離する、プレセニリン依存性セクレターゼ[22]による二重（dual）膜内切断をCD44が受けることが報告された。

【0007】

特許文献1には、スプライスバリエーションCD44V3、CD44V6およびCD44V10の発現が、非AD個体と比較してAD患者の海馬において有意に増加することが教示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第2009/007934号

【特許文献2】米国特許第4,666,828号明細書

【特許文献3】米国特許第4,683,202号明細書

【特許文献4】米国特許第4,801,531号明細書

【特許文献5】米国特許第5,192,659号明細書

【特許文献6】米国特許第5,272,057号明細書

【特許文献7】米国特許第3,791,932号明細書

【特許文献8】米国特許第3,839,153号明細書

【特許文献9】米国特許第3,850,752号明細書

【特許文献10】米国特許第3,850,578号明細書

【特許文献11】米国特許第3,853,987号明細書

【特許文献12】米国特許第3,867,517号明細書

【特許文献13】米国特許第3,879,262号明細書

【特許文献14】米国特許第3,901,654号明細書

【特許文献15】米国特許第3,935,074号明細書

【特許文献16】米国特許第3,984,533号明細書

- 【特許文献 1 7】米国特許第 3, 9 9 6, 3 4 5 号明細書
- 【特許文献 1 8】米国特許第 4, 0 3 4, 0 7 4 号明細書
- 【特許文献 1 9】米国特許第 4, 0 9 8, 8 7 6 号明細書
- 【特許文献 2 0】米国特許第 4, 8 7 9, 2 1 9 号明細書
- 【特許文献 2 1】米国特許第 5, 0 1 1, 7 7 1 号明細書
- 【特許文献 2 2】米国特許第 5, 2 8 1, 5 2 1 号明細書
- 【非特許文献】
- 【0 0 0 9】
- 【非特許文献 1】Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992) 10
- 【非特許文献 2】Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991
- 【非特許文献 3】John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984)
- 【非特許文献 4】Andersson Biopolymers 2000;55(3):227-50
- 【非特許文献 5】Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.
- 【非特許文献 6】"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition
- 【非特許文献 7】Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 20
- 【非特許文献 8】"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989)
- 【非特許文献 9】"Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994);
- 【非特許文献 1 0】Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)
- 【非特許文献 1 1】Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988)
- 【非特許文献 1 2】Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York 30
- 【非特許文献 1 3】Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)
- 【非特許文献 1 4】"Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)
- 【非特許文献 1 5】"Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition
- 【非特許文献 1 6】"Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)
- 【非特許文献 1 7】Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) 40
- 【非特許文献 1 8】Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)
- 【非特許文献 1 9】"Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984)
- 【非特許文献 2 0】"Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)
- 【非特許文献 2 1】"Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984)
- 【非特許文献 2 2】"Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986)
- 【非特許文献 2 3】"Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986)
- 【非特許文献 2 4】"A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 50

【非特許文献 2 5】"Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press

【非特許文献 2 6】"PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990)

【非特許文献 2 7】Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)

【非特許文献 2 8】Chorev, M. and M. Goodman, Recent developments in retro peptides and proteins--an ongoing topochemical exploration. Trends Biotechnol, 1995. 13(10): p. 438-45

【非特許文献 2 9】Soto, C., et al., beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. Nat Med, 1998. 4(7): p. 822-6

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、神経変性疾患の治療を必要とする対象において神経変性疾患を治療する方法であって、CD44V10アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸およびCD44V10アミノ酸配列の100個以下のアミノ酸を含み、かつ神経保護活性を含む、単離ペプチドを治療有効量で対象に投与することを含む、神経変性疾患の治療方法が提供される。

【0011】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、神経変性疾患の治療を必要とする対象において神経変性疾患を治療する方法であって、CD44V6アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸およびCD44V6アミノ酸配列の100個以下のアミノ酸を含み、かつ神経保護活性を含む、単離ペプチドを治療有効量で投与することを含む、神経変性疾患の治療方法が提供される。

【0012】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、CD44V10アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸およびCD44V10アミノ酸配列の20個以下のアミノ酸を含む、単離ペプチドが提供され、当該ペプチドは神経保護活性を含むが、配列番号：49または50に記載のアミノ酸配列からならないことを条件とする。

【0013】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、CD44V6アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸およびCD44V6アミノ酸配列の20個以下のアミノ酸を含む、単離ペプチドが提供され、当該ペプチドは神経保護活性を含むが、配列番号：1、51または52に記載のアミノ酸配列からならないことを条件とする。

【0014】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、CD44V10アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸およびCD44V10アミノ酸配列の100個以下のアミノ酸を含み、かつ神経保護活性を含む、作用薬(active agent)としての単離ペプチドと、薬学的に有効な担体と、を含む医薬組成物が提供される。

【0015】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、CD44V10アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸およびCD44V10アミノ酸配列の100個以下のアミノ酸を含み、かつ神経保護活性を含む、神経変性疾患の治療に使用される単離ペプチドが提供される。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の一部の実施形態によれば、そのペプチドは、式1：

$X_1 - G - Y - T - S$

(式中、 X_1 は、グルタミン酸またはグルタミンのいずれかである)のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

本発明の一部の実施形態によれば、アミノ酸配列は、ペプチドミメティックを含む。

【 0 0 1 8 】

本発明の一部の実施形態によれば、そのペプチドミメティックは、レトロインベルソ (retro-inverso) ミメティックを含む。

【 0 0 1 9 】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、配列番号： 2 6、4 5 または 4 6 に記載のとおりである。

【 0 0 2 0 】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、C D 4 4 V 1 0 アミノ酸配列からなる 10

【 0 0 2 1 】

本発明の一部の実施形態によれば、C D 4 4 V 1 0 アミノ酸配列は、ヒト C D 4 4 V 1 0 アミノ酸配列である。

【 0 0 2 2 】

本発明の一部の実施形態によれば、C D 4 4 V 6 アミノ酸配列は、ヒト C D 4 4 V 6 アミノ酸配列である。

【 0 0 2 3 】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、コア配列 $X_1 - X_2 - S - H$ (X_1 および X_2 は酸性アミノ酸である) を含む。 20

【 0 0 2 4 】

本発明の一部の実施形態によれば、 X_1 はグルタミン酸を含む。

【 0 0 2 5 】

本発明の一部の実施形態によれば、 X_2 はアスパラギン酸を含む。

【 0 0 2 6 】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、C D 4 4 V 6 アミノ酸配列からなる。

【 0 0 2 7 】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、配列番号： 8 ~ 1 5、1 8 ~ 4 5 または 4 6 に記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 8 】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、配列番号： 4 9 または 5 0 に記載のアミノ酸配列を含む。 30

【 0 0 2 9 】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、配列番号： 2 ~ 7、1 6 または 1 7 に記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 0 】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、C D 4 4 V 6 アミノ酸配列の少なくとも 3 個のアミノ酸および C D 4 4 V 6 アミノ酸配列の 1 0 0 個以下のアミノ酸を含み、かつ神経保護活性を含む、神経変性疾患の治療に使用される単離ペプチドが提供される。

【 0 0 3 1 】

本発明の一部の実施形態によれば、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、多発性硬化症、A L S、多系統萎縮症、アルツハイマー病、脳卒中、外傷性脳損傷、進行性核上麻痺、第 1 7 番染色体に連鎖するパーキンソン症候群を伴う前頭側頭型認知症およびピック病からなる群から選択される。 40

【 0 0 3 2 】

本発明の一部の実施形態によれば、神経変性疾患はパーキンソン病である。

【 0 0 3 3 】

本発明の一部の実施形態によれば、神経変性疾患はアルツハイマー病である。

【 0 0 3 4 】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、配列番号： 1 2、1 5、1 7、1 9、 50

24、26、31、32、34、36～38、43～46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0035】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、配列番号：26または45に記載のアミノ酸配列を含む。

【0036】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、CD44V6アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸およびCD44V6アミノ酸配列の100個以下のアミノ酸を含み、かつ神経保護活性を含む、作用薬としての単離ペプチドと、薬学的に有効な担体と、を含む医薬組成物が提供される。

10

【0037】

本発明の一部の実施形態によれば、そのペプチドは、細胞透過剤に結合される。

【0038】

本発明の一部の実施形態によれば、アミノ酸のうちの少なくとも1つは天然アミノ酸である。

【0039】

本発明の一部の実施形態によれば、アミノ酸のうちの少なくとも1つは合成アミノ酸である。

【0040】

本発明の一部の実施形態によれば、合成アミノ酸はD異性体を含む。

20

【0041】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドは、細胞透過剤に共有結合される。

【0042】

本発明の一部の実施形態によれば、細胞透過剤はペプチド剤である。

【0043】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、20個以下のアミノ酸である。

【0044】

本発明の一部の実施形態によれば、ペプチドは、5～10個の長さのアミノ酸である。

【0045】

本発明の一部の実施形態の態様によれば、神経変性疾患を治療するのに有用な薬物 (agent) を選択する方法であって：

30

(a) 神経毒剤の存在下にて、CD44v10/6ペプチドを神経細胞と接触させる工程；

(b) 神経細胞の細胞死をモニターする工程であって、CD44v10/6ペプチドの非存在下での神経細胞の細胞死の量または時間と比較される、CD44v10/6ペプチドの存在下での神経細胞の細胞死の量または時間の減少が、神経変性疾患の治療に有用な薬物を示す、工程；

を含む方法が提供される。

【0046】

本発明の一部の実施形態によれば、神経毒剤は、アミロイドペプチド、グルタミン酸塩、6-OHDA、MPTPおよびMPP⁺からなる群から選択される。

40

【0047】

本発明の一部の実施形態によれば、投与は、皮下投与を含む。

【0048】

本発明の一部の実施形態によれば、投与は、鼻腔内投与を含む。

【0049】

別段の指定がない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および/または科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同値または類似の方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験に使用することができるが、例示的な方法および/または材料を以下に記述す

50

る。矛盾する場合には、定義を含む本明細書に従う。さらに、材料、方法および例は、単に例証的なものであり、必ずしも制限することを意図するものではない。

【 0 0 5 0 】

本発明の一部の実施形態は、添付のイメージを参照しながら単に一例として述べられている。詳細な図面を具体的に参照するが、示される詳細は一例であり、本発明の実施形態の実例を説明する目的であることが強調される。この点に関しては、図面を参照した説明によって、本発明の実施形態がどのように実施され得るかは当業者には理解される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 1 】

【図 1】図 1 A ~ B は、種々の哺乳動物のタンパク質配列を特徴付ける C D 4 4 V 6 (図 1 A) および C D 4 4 V 1 0 (図 1 B) のタンパク質多重配列アラインメントである。アラインメントは、タンパク質 B l a s t アルゴリズムオンライン (N C B I) を用いて行った。種のいずれかにおいて非保存的置換が 1 つまでである、保存残基が、囲い枠でマークされている。保存残基における非保存的置換は、赤文字でマークされている。

【図 2】図 2 は、その合成が図 1 に示す保存領域に従って誘導された、V 6 (マウス) および V 1 0 (ヒト) ペプチドのリストを示す。

【図 3】図 3 は、8 0 μ M A (1 - 4 2) で 4 8 時間処置した後の、S K - N - S H ヒト神経芽細胞腫細胞の生存率 (viability) に対する 3 通りの濃度での V 6 および V 1 0 ペプチドの効果を示す棒グラフである。細胞生存率は X T T 比色定量アッセイを用いて決定した。

【図 4】図 4 A ~ B は、2 5 μ M A (2 5 - 3 5) で 4 8 時間処置した後の、N 2 A マウス神経芽細胞腫細胞の生存率に対する 1 n M での V 6 および V 1 0 ペプチドの効果を示す棒グラフである。X T T により測定された相対細胞生存率 (図 4 A) およびカスパーゼ 3 活性相対レベル (図 4 B) を示す。

【図 5】図 5 A ~ B は、2 0 0 μ M M P T P で 4 8 時間処置した後の、N 2 A マウス神経芽細胞腫細胞の生存率に対する 1 μ M での V 6 および V 1 0 ペプチドの効果を示す棒グラフである。相対細胞生存率 (図 5 A) およびカスパーゼ 3 活性レベル (図 5 B) を示す。

【図 6 A】3 0 μ M で 4 8 時間処置した後の、N 2 A マウス神経芽細胞腫細胞の生存率に対する 1 p M での、表 1 および図 2 に示されるヒト V 6 および V 1 0 ペプチドの効果を示すグラフである。相対生存率 (図 6 A) アラマーブルー蛍光によって測定された相対生存率を示す。

【図 6 B】3 0 μ M で 4 8 時間処置した後の、N 2 A マウス神経芽細胞腫細胞の生存率に対する 1 p M での、表 1 および図 2 に示されるヒト V 6 および V 1 0 ペプチドの効果を示すグラフである。カスパーゼ 3 活性 (図 6 B) を示す。アラマーブルー蛍光によって測定された相対生存率を示す。

【図 6 C】3 0 μ M で 4 8 時間処置した後の、N 2 A マウス神経芽細胞腫細胞の生存率に対する 1 p M での、表 1 および図 2 に示されるヒト V 6 および V 1 0 ペプチドの効果を示すグラフである。N 2 A 細胞において 3 0 μ M 6 - O H D A に対する N - アセチル化および C - アミド化 V 1 0 A 1 _ N + 4 ペプチドの保護効果を様々な濃度で試験した (図 6 C) 。アラマーブルー蛍光によって測定された相対生存率を示す。

【図 7】図 7 A ~ B は、2 5 μ M A (2 5 - 3 5) で 4 8 時間処置した後の、S K - N - S H ヒト神経芽細胞腫細胞の生存率に対する 1 p M での、表 1 および図 2 に示されるヒト V 6 および V 1 0 ペプチドの効果を示す棒グラフである。アラマーブルー蛍光によって測定された相対生存率 (図 7 A) およびカスパーゼ 3 活性 (図 7 B) を示す。

【図 8 A】図 8 A ~ B は、3 0 μ M 6 - O H D A (図 8 A) または 4 0 μ M 6 - O H D A (図 8 B) で 2 2 時間処置した後の、N 2 A マウス神経芽細胞腫細胞の生存率に対する、1 0 f M および 1 p M での、表 3 に示すヒト P 2 6 由来ペプチドの効果を示す棒グラフである。図 8 A では、6 - O H D A をペプチドと共に添加したが、図 8 B においては、6 - O H D A の添加前に、細胞をペプチドと共に 2 . 3 時間プレインキュベートした。ア

10

20

30

40

50

ラマーブルー蛍光によって測定された相対生存率を示す。

【図8B】図8A～Bは、 $30\mu\text{M}$ 6-OHDA（図8A）または $40\mu\text{M}$ 6-OHDA（図8B）で22時間処置した後の、N2Aマウス神経芽細胞腫細胞の生存率に対する、 10fM および 1pM での、表3に示すヒトP26由来ペプチドの効果を示す棒グラフである。図8Aでは、6-OHDAをペプチドと共に添加したが、図8Bにおいては、6-OHDAの添加前に、細胞をペプチドと共に2.3時間プレインキュベートした。アラマーブルー蛍光によって測定された相対生存率を示す。

【図9】図9は、新規物体認識（NOR）タスクにおける保持試験段階での識別指数に対する、P26（配列番号：26, 1, 10および 100ng /ラット）またはP34（配列番号：34, 10および 100ng /ラット）のIH/ICV反復投与の効果を示す棒グラフである。* * $P < 0.01$ ビヒクルを含むA（ $1-42$ ）vs コントロール群（A（ $1-42$ ）なし）、# # $P < 0.01$ vs ビヒクルコントロール。

10

【図10】図10A～Bは、A 微量注入後のモリス水迷路（MWM）空間記憶アッセイに対する皮下（SC）投与ペプチドの効果を示す棒グラフである。A．モリス水迷路における4回の訓練セッションにわたる平均潜時。ペプチド処置群の中で、P26群は、ビヒクル群と比較して、平均潜時の低いレベルを示した（2, 3および4日目に# $p < 0.001$ ）。B．試験セッションで対象の四分円で過ごした時間を示す。P26群は、ビヒクルと比較して高いレベルの、対象の四分円で過ごした時間を示した（# $p < 0.05$ ）。UT - 未処置群

【図11】図11は、A 微量注入後のNORアッセイでの皮下投与ペプチドの効果を示す棒グラフである。保持試験段階での識別指数を示す。* $P < 0.05$ vs コントロール群および# $p < 0.05$ vs A のみの群

20

【図12】図12は、用量 $1\text{mg}/\text{kg}$ でオスのSDラットにペプチド溶液を皮下投与した後に評価された、P26（配列番号：26）およびP26-RI（配列番号：45）の薬物動態を示す棒グラフである。血漿試料中の両方のペプチドを定量化するために、LC-MS/MS法を用いた。定量化の下限（LLOQ）は $22.34\text{ng}/\text{mL}$ であった。

【図13】図13は、CD44のゲノム構造の略図である。

【発明を実施するための形態】

【0052】

本発明の特定の実施形態の説明

30

本発明は、その一部の実施形態において、神経保護ペプチド剤およびその使用に関する。

【0053】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、以下の説明に記載される、または実施例によって例示される詳細に、その適用において必ずしも制限されないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態が可能であり、または様々な方法で実施または実行することができる。

【0054】

スプライスバリエントCD44V3、CD44V6およびCD44V10の発現は、非AD個体と比較してAD患者の海馬において有意に増加することが以前に見出された。CD44バリエントの発現をさらに特徴とし、主にニューロンであることが発見された[23]。

40

本発明の発明者らは、CD44V6およびV10エクソン配列に由来する複数のペプチドの機能のキャラクタリゼーションを行い、これらのペプチドが、アミロイド（A）、MPTPおよび6-OHDAなどの神経毒に対する耐性を神経細胞に付与することを発見し、これらのペプチドまたは誘導体が神経変性疾患を治療するための薬物としての役割を果たし得ることが示唆される。

【0055】

本発明の発明者らは、神経保護を付与する最小活性ドメインを明らかにするために構造機能分析を行った。その結果はさらに、パーキンソン病およびアルツハイマー病の動物モ

50

デルにおいて実証された。これらの発見によって、本発明のペプチドは薬物開発のリード化合物と位置付けられる。

【0056】

したがって、本発明の態様によれば、CD44V10アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸および前記CD44V10アミノ酸配列の20個以下のアミノ酸を含む単離ペプチドであって、神経保護活性を含むペプチドが提供される。

【0057】

本発明の更なる、または代わりの態様によれば、CD44V6アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸および前記CD44V6アミノ酸配列の20個以下のアミノ酸を含む単離ペプチドであって、神経保護活性を含むペプチドが提供される。

10

【0058】

一実施形態によれば、CD44V10アミノ酸配列は、以下の配列：
DSTDRIPATIRNDVTGGRR（配列番号：49）；または
NSNVNRSLSGDQDTFHPSG（配列番号：50）；
からならない。

【0059】

他の実施形態によれば、CD44V6アミノ酸配列は、以下の配列：
DSTDRIPATIQTTPSSSTE（配列番号：51）；または
DSHSTTTGTAGDQDTFHPSG（配列番号：52）；
からならない。

20

【0060】

以下にさらに詳述されるように、配列番号：49～52に記載のアミノ酸配列を含むペプチドを神経変性疾患の治療に使用することが考えられる。

【0061】

本明細書で使用される「CD44」とは、RefSeqアクセッション番号：NM__000610.3に記載の多数の哺乳動物細胞型で発現される細胞表面タンパク質を意味する。特定の実施形態によれば、CD44はヒトCD44遺伝子である。エクソン1～5および16～20を含む、CD44と呼ばれる標準アイソフォームは、大部分の細胞型において発現される。スプライスバリエーションCD44V6およびCD44V10を含む、遺伝子構造は図13に提供される。

30

【0062】

本明細書で使用される、「CD44V10」という用語は、配列番号：53のアミノ酸座標（coordinate）537～604：RefSeqアクセッション番号：NP__000601.3（ヒトCD44抗原アイソフォーム1前駆体，NCBI参照配列）に相当し、配列番号：2によって例示される。

【0063】

本明細書で使用される、「CD44V6」という用語は、配列番号：53のアミノ酸座標386～427：RefSeqアクセッション番号：NP__000601.3（ヒトCD44抗原アイソフォーム1前駆体，NCBI参照配列）に相当し、配列番号：8によって例示される。

40

【0064】

本明細書で使用される、「神経保護活性」という語句は、神経細胞死の防止を意味する。その効果は、アポトーシスまたは変性からの神経細胞、つまりニューロンの保護の形をとり得る。神経保護活性を例証するアッセイとしては、細胞生存率アッセイ（例えば、XTT、MTT）、形態学的アッセイ（例えば、細胞染色）またはアポトーシス生化学的アッセイ（例えば、カスパーゼ3活性等）が挙げられる。

【0065】

特定の実施形態によれば、CD44V6アミノ酸配列はヒトCD44V6アミノ酸配列である。

【0066】

50

特定の実施形態によれば、C D 4 4 V 1 0 アミノ酸配列はヒト C D 4 4 V 1 0 アミノ酸配列である。

【 0 0 6 7 】

更なる特定の実施形態によれば、ペプチドは、C D 4 4 V 6 アミノ酸配列（配列番号：2）からなる。

【 0 0 6 8 】

本発明をさらに実施しながら、本発明の発明者らは、神経保護を付与するペプチド部分（アミノ酸配列）が、コア配列 $X_1 - X_2 - S - H$ （ X_1 および X_2 は酸性アミノ酸である）を含むことを発見した。

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される、「酸性アミノ酸」という語句は、生理学的 pH にて極性であり、かつ負に帯電している天然または合成アミノ酸である。

【 0 0 7 0 】

特定の実施形態によれば、 X_1 はグルタミン酸を含む。

【 0 0 7 1 】

特定の実施形態によれば、 X_2 はアスパラギン酸を含む。

【 0 0 7 2 】

特定の実施形態によれば、ペプチドは配列番号：6 または 7 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 7 3 】

更なる実施形態によれば、C D 4 4 V 6 は、C D 4 4 V 6 アミノ酸配列（配列番号：2）からなる。

【 0 0 7 4 】

更なる実施形態によれば、ペプチドは、配列番号：2 ~ 7、16 または 17 に記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 7 5 】

上記のように、C D 4 4 V 1 0 のペプチドも本明細書において考えられる。このように例示的な実施形態によれば、このペプチドは、配列番号：8 ~ 15、18 ~ 46、または具体的には配列番号：8 ~ 15、18 ~ 38、39 ~ 42 または 43 ~ 46 に記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 7 6 】

本発明をさらに実施しながら、本発明の発明者らは、神経保護の付与において活性である、C D 4 4 V 1 0 の最小部分を同定することができた。

【 0 0 7 7 】

したがって、例示的な実施形態によれば、C D 4 4 V 1 0 ペプチドは、式 1 のアミノ酸配列：

$X_1 - G - Y - T - S$

（式中、 X_1 はグルタミン酸またはグルタミンである）を含む。

【 0 0 7 8 】

以下にさらに詳細に説明されるように、ペプチドのアミノ酸配列は、レトロインベルソなミメティック（例えば、配列番号：45 または 46）などのペプチドミメティックを含む。

【 0 0 7 9 】

例示的な実施形態によれば、ペプチドは、配列番号：26 に記載のとおりである。

【 0 0 8 0 】

例示的な実施形態によれば、ペプチドは、配列番号：26、45 または 46 に記載のとおりである。

【 0 0 8 1 】

更なる特定の実施形態によれば、ペプチドは、C D 4 4 V 1 0 アミノ酸配列（配列番号：8）からなる。

10

20

30

40

50

【0082】

本明細書に記載の「ペプチド」という用語は、ペプチド（分解生成物、人工的に合成されたポリペプチドまたは組換えポリペプチド）およびペプチドミメティック（例えば、インベルソ（*inverso*）、レトロ（*retro*）またはレトロインベルソな、一般に人工的に合成されたペプチド）、ならびに例えば、ペプチドを体内でより安定性にするか、または細胞内にさらに浸透することができるようにする修飾を有し得るポリペプチド類似体である、ペプチドおよびセミペプチドを包含する、天然または合成アミノ酸のポリマーを意味する。

【0083】

かかる修飾としては、限定されないが、N末端修飾、C末端修飾、ポリペプチド結合修飾、限定されないが $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 O=C-NH 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 S=C-NH 、 CH=CH または CF=CH 、主鎖修飾、および残基修飾などが挙げられる。ペプチドミメティック化合物を製造する方法は当技術分野でよく知られており、例えば、本明細書に完全に記載されているかのごとく、参照により本明細書に援用される、非特許文献1に明記されている。これに関して以下にさらに詳細に説明する。

【0084】

ポリペプチド内のポリペプチド結合（ -CO-NH- ）は、例えば、N-メチル化結合（ $\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$ ）、エステル結合（ $\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$ ）、ケトメチレン結合（ $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ ）、 α -アザ結合（ -NH-N(R)-CO- ）（Rは、いずれかのアルキル、例えばメチルである）、カルバ結合（ $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ）、ヒドロキシエチレン結合（ $\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ ）、チオアミド結合（ -CS-NH- ）、オレフィン性二重結合（ -CH=CH- ）、レトロ（*retro*）アミド結合（ -NH-CO- ）、ポリペプチド誘導体（ $\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$ ）（Rは、炭素原子上に天然に存在する「直鎖状の（*normal*）」側鎖である）によって置換されていてもよい。

【0085】

これらの修飾は、ポリペプチド鎖に沿った結合のいずれかに、さらには同時に数箇所（2～3）に存在し得る。

【0086】

天然芳香族アミノ酸、すなわちTrp、TyrおよびPheは、フェニルグリシン、ナフチルアラニン（*Nol*）、Pheの環メチル化誘導体、Pheまたは α -メチル-Tyrのハロゲン化誘導体などの合成非天然酸に置き換えられてもよい。

【0087】

上記に加えて、本発明のポリペプチドは、1つまたは複数の修飾アミノ酸または1つまたは複数の非アミノ酸モノマー（例えば、脂肪酸、複合炭水化物等）も含み得る。

【0088】

明細書および以下の特許請求の範囲において使用される、「アミノ酸（1つまたは複数）」という用語は、20の天然アミノ酸；*in vivo*で翻訳後に修飾されることが多いアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホトレオニンなど；および他の珍しいアミノ酸、限定されないが、2-アミノアジピン酸、ヒドロキシリジン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシンおよびオルニチンなどを包含すると理解される。さらに、「アミノ酸」という用語は、D-アミノ酸とL-アミノ酸の両方（立体異性体）を含む。

【0089】

以下の表AおよびBには、本発明で使用することができる、天然アミノ酸（表A）および非慣例的または修飾アミノ酸（表B）を列挙する。

【0090】

【表 1】

表A

アミノ酸	3文字略語	1文字記号
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V
任意の上記アミノ酸	Xaa	X

10

20

【表 2 - 1】

表B

非慣例的な アミノ酸	コード	非慣例的なアミノ酸	コード
α -アミノ酪酸	Abu	L-N-メチルアラニン	Nmala
α -アミノ- α -メチルブチレート	Mgab	L-N-メチルアルギニン	Nmarg
アミノシクロプロパン-	Cpro	L-N-メチルアスパラギン	Nmasn
カルボキシレート		L-N-メチルアスパラギン酸	Nmasp
アミノイソ酪酸	Aib	L-N-メチルシステイン	Nmcys
アミノノルボルニル-	Norb	L-N-メチルグルタミン	Nmgin
カルボキシレート		L-N-メチルグルタミン酸	Nmglu
シクロヘキシルアラニン	Chexa	L-N-メチルヒスチジン	Nmhis
シクロペンチルアラニン	Cpen	L-N-メチルイソロイシン	Nmile
D-アラニン	Dal	L-N-メチルロイシン	Nmleu
D-アルギニン	Darg	L-N-メチルリジン	Nmlys
D-アスパラギン酸	Das	L-N-メチルメチオニン	Nmmet
D-システイン	Dcys	L-N-メチルノルロイシン	Nmnle
D-グルタミン	Dgln	L-N-メチルノルバリニン	Nmnva
D-グルタミン酸	Dglu	L-N-メチルオルニチン	Nmorn
D-ヒスチジン	Dhis	L-N-メチルフェニルアラニン	Nmphe
D-イソロイシン	Dile	L-N-メチルプロリン	Nmpro
D-ロイシン	Dleu	L-N-メチルセリン	Nmser
D-リジン	Dlys	L-N-メチルトレオニン	Nmthr

10

20

30

【表 2 - 2】

表B (続き)

D-メチオニン	Dmet	L-N-メチルトリプトファン	Nmtrp
D-オルニチン	Dorn	L-N-メチルチロシン	Nmtyr
D-フェニルアラニン	Dphe	L-N-メチルバリン	Nmval
D-プロリン	Dpro	L-N-メチルエチルグリシン	Nmetg
D-セリン	Dser	L-N-メチル- ϵ -ブチルグリシン	Nmtbu
D-トレオニン	Dthr	L-ノルロイシン	Nle
D-トリプトファン	Dtrp	L-ノルバリン	Nva
D-チロシン	Dtyr	α -メチル-アミノイソブチレート	Maib
D-バリン	Dval	α -メチル- γ -アミノブチレート	Mgab
D- α -メチルアラニン	Dmala	α -エチルシクロヘキシルアラニン	Mchex
D- α -メチルアルギニン	Dmarg	α -メチルシクロペンチルアラニン	Mcpen
D- α -メチルアスパラギン	Dmasn	α -メチル- α -ナフチルアラニン	Manap
D- α -メチルアスパルテート	Dmasp	α -メチルペニシラミン	Mpen
D- α -メチルシステイン	Dmcys	N-(4-アミノブチル)グリシン	Nglu
D- α -メチルグルタミン	Dmgln	N-(2-アミノエチル)グリシン	Naeg
D- α -メチルヒスチジン	Dmhis	N-(3-アミノプロピル)グリシン	Norn
D- α -メチルイソロイシン	Dmile	N-アミノ- α -メチルブチレート	Nmaab
D- α -メチルロイシン	Dmleu	α -ナフチルアラニン	Anap
D- α -メチルリジン	Dmlys	N-ベンジルグリシン	Nphe
D- α -メチルメチオニン	Dmmet	N-(2-カルバミルエチル)グリシン	Ngln
D- α -メチルオルニチン	Dmorn	N-(カルバミルメチル)グリシン	Nasn

10

20

30

【表 2 - 3】

表B (続き)

D- α -メチルフェニルアラニン	Dmphe	N-(2-カルボキシエチル)グリシン	Nglu
D- α -メチルプロリン	Dmpro	N-(カルボキシメチル)グリシン	Nasp
D- α -メチルセリン	Dmser	N-シクロブチルグリシン	Ncbut
D- α -メチルトレオニン	Dmthr	N-シクロヘプチルグリシン	Nchep
D- α -メチルトリプトファン	Dmtrp	N-シクロヘキシルグリシン	Nchex
D- α -メチルチロシン	Dmtty	N-シクロデシルグリシン	Ncdec
D- α -メチルバリン	Dmval	N-シクロドデシルグリシン	Ncdod
D- α -メチルアラニン	Dnmala	N-シクロオクチルグリシン	Ncoct
D- α -メチルアルギニン	Dnmarg	N-シクロプロピルグリシン	Ncpro
D- α -メチルアスパラギン	Dnmasn	N-シクロウンデシルグリシン	Ncund
D- α -メチルアスパルテート	Dnmasp	N-(2,2-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhm
D- α -メチルシステイン	Dnmcys	N-(3,3-ジフェニルプロピル)グリシン	Nbhe
D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インドリルエチル)グリシン	Nhtrp
D-N-メチルリジン	Dnmlys	N-メチル- γ -アミノブチレート	Nmgabu
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchex	D-N-メチルメチオニン	Dnmme
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロペンチルアラニン	Nmcpn
N-メチルグリシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dmphe
N-メチルアミノイソブチレート	Nmaib	D-N-メチルプロリン	Dmpro
N-(1-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dmser

10

20

30

【表 2 - 4】

表B (続き)

N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nleu	D-N-メチルトレオニン	Dnmthr
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-メチルエチル)グリシン	Nva
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N-メチル α -ナフチルアラニン	Nmanap
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-メチルペニシラミン	Nmpen
γ -アミノ酪酸	Gaba	N-(<i>p</i> -ヒドロキシフェニル)グリシン	Nhtyr
L- <i>t</i> -ブチルグリシン	Tbug	N-(チオメチル)グリシン	Ncys
L-エチルグリシン	Etg	ペニシラミン	Pen
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L- α -メチルアラニン	Mala
L- α -メチルアルギニン	Marg	L- α -メチルアスパラギン	Masn
L- α -メチルアスパルテート	Masp	L- α -メチル- <i>t</i> -ブチルグリシン	Mtbug
L- α -メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグリシン	Metg
L- α -チルグルタミン	Mgln	L- α -メチルグルタメート	Mglu
L- α -メチルヒスチジン	Mhis	L- α -メチルホモフェニルアラニン	Mhphe
L- α -メチルイソロイシン	Mile	N-(2-メチルチオエチル)グリシン	Nmet
D-N-メチルグルタミン	Dnmgln	N-(3-グアニジノプロピル)グリシン	Narg
D-N-メチルグルタメート	Dnmglu	N-(1-ヒドロキシエチル)グリシン	Nthr
D-N-メチルヒスチジン	Dnmhis	N-(ヒドロキシエチル)グリシン	Nser
D-N-メチルイソロイシン	Dnmile	N-(イミダゾリルエチル)グリシン	Nhis
D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インドリルエチル)グリシン	Nhtrp
D-N-メチルリジン	Dnmlys	N-メチル- γ -アミノブチレート	Nmgabu

10

20

30

40

【表 2 - 5】

表B (続き)

N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-メチルメチオニン	Dnmm
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロペンチルアラニン	Nmcpe
N-メチルグリシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dnmph
N-メチルアミノイソブチレート	Nmaib	D-N-メチルプロリン	Dnmpr
N-(1-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmse
N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nleu	D-N-メチルトレオニン	Dnmth
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-メチルエチル)グリシン	Nval
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N-メチル α -ナフチルアラニン	Nmana
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-メチルペニシラミン	Nmpen
γ -アミノ酪酸	Gabu	N-(<i>p</i> -ヒドロキシフェニル)グリシン	Nhtyr
L- <i>t</i> -ブチルグリシン	Tbug	N-(チオメチル)グリシン	Ncys
L-エチルグリシン	Etg	ペニシラミン	Pen
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L- α -メチルアラニン	Mala
L- α -メチルアルギニン	Marg	L- α -メチルアスパラギン	Masn
L- α -メチルアスパルテート	Masp	L- α -メチル- <i>t</i> -ブチルグリシン	Mtbug
L- α -メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグリシン	Metg
L- α -メチルグルタミン	Mgln	L- α -メチルグルタメート	Mglu
L- α -エチルヒスチジン	Mhis	L- α -メチルホモフェニルアラニン	Mhphe
L- α -エチルイソロイシン	Mile	N-(2-メチルチオエチル)グリシン	Nmet
L- α -メチルロイシン	Mleu	L- α -メチルリジン	Mlys
L- α -メチルメチオニン	Mmet	L- α -メチルノルロイシン	Mnle

10

20

30

40

【表 2 - 6】

表B (続き)

L- α -メチルノルバリン	Mnva	L- α -メチルオルニチン	Morn
L- α -メチルフェニルアラニン	Mphe	L- α -メチルプロリン	Mpro
L- α -メチルセリン	mser	L- α -メチルトレオニン	Mthr
L- α -エチルバリン	Mtrp	L- α -メチルチロシン	Mtyr
L- α -メチルロイシン	Mval Nnbhm	L-N-メチルホモフェニルアラニン	Nmhph
N-(N-(2,2-ジフェニルエチル))		N-(N-(3,3-ジフェニルプロピル))	
カルバミルメチルグリシン	Nnbhm	カルバミルメチル(1)グリシン	Nnbhe
1-カルボキシ-1-(2,2-ジフェニルエチルアミノ)シクロプロパン	Nmbc		

10

20

【0091】

本発明のペプチドのアミノ酸は、保存的に、または非保存的に置換されていてもよい。

【0092】

本明細書に記載の「保存的置換」という用語は、ペプチドにおける天然配列に存在するアミノ酸を、天然または非天然アミノ酸または同様な立体特性を有するペプチドミメティックで置換することを意味する。置換されるべき天然アミノ酸の側鎖が極性または疎水性である場合には、保存的置換は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸との、または極性または疎水性であるペプチドミメティック部位（さらに、置換されたアミノ酸の側鎖と同じ立体特性を有する）との置換であるべきである。

【0093】

天然アミノ酸は一般に、その特性に従って分類され、本発明によれば、立体的に類似した非荷電アミノ酸による荷電アミノ酸の置換は、保存的置換であるとみなされることから天然アミノ酸による保存的置換を容易に決定することができる。

30

【0094】

非天然アミノ酸による保存的置換を行うために、当技術分野でよく知られているアミノ酸類似体（合成アミノ酸）を使用することも可能である。天然アミノ酸のペプチドミメティックは、当業者に公知の文献に十分に記述されている。

【0095】

保存的置換を起こす場合、置換するアミノ酸は、側鎖に元のアミノ酸と同じまたは類似の置換基を有さなければならない。

40

【0096】

本明細書で使用される「非保存的置換」という語句は、異なる電気化学特性および/または立体特性を有する、他の天然アミノ酸または非天然アミノ酸によって、親配列に存在するアミノ酸が置換されることを意味する。したがって、置換するアミノ酸の側鎖は、置換される天然アミノ酸の側鎖より著しく大きく（または小さく）かつ/または置換されるアミノ酸と比べて著しく異なる電子特性を有する官能基を有し得る。このタイプの非保存的置換の例としては、アラニンをフェニルアラニンまたはシクロヘキシルメチルグリシンで置換、グリシンをイソロイシンで置換、またはアスパラギン酸を - NH - CH [(- CH₂)₅ - COOH] - CO - で置換することが挙げられる。本発明の範囲内であるこれらの非保存的置換は、神経保護特性を有するペプチドを依然として構成する置換である。

50

【 0 0 9 7 】

上記のように、本発明のペプチドのNおよびC末端は、官能基によって保護され得る。適切な官能基は、その教示が参照により本明細書に援用される非特許文献2に記述されている。好ましい保護基は、例えば、化合物の親水性を低減し、化合物の親油性を高めることによって、それに結合した化合物の細胞内への輸送を促進する基である。

【 0 0 9 8 】

これらの部位は、細胞内で加水分解または酵素によって、生体内で切断される。ヒドロキシル保護基としては、エステル、カーボネートおよびカルバメート保護基が挙げられる。アミン保護基としては、N-末端保護基に関して上述のアルコキシおよびアリールオキシカルボニル基が挙げられる。カルボン酸保護基としては、C末端保護基に関して上述の脂肪族、ベンジルおよびアリールエステルが挙げられる。一実施形態において、本発明のペプチドにおける1つまたは複数のグルタミン酸またはアスパラギン酸残基の側鎖のカルボン酸基は、好ましくはメチル、エチル、ベンジルまたは置換ベンジルエステルで保護される。

10

【 0 0 9 9 】

N末端保護基の例としては、アシル基(-CO-R1)およびアルコキシカルボニルまたはアリールオキシカルボニル基(-CO-O-R1)(R1は、脂肪族、置換脂肪族、ベンジル、置換ベンジル、芳香族または置換芳香族基である)が挙げられる。アシル基の具体的な例としては、アセチル、(エチル)-CO-、n-プロピル-CO-、イソ-プロピル-CO-、n-ブチル-CO-、s-ブチル-CO-、t-ブチル-CO-、ヘキシル、ラウロイル、パルミトイル、ミリストイル、ステアリル、オレオイルフェニル-CO-、置換フェニル-CO-、ベンジル-CO-および(置換ベンジル)-CO-が挙げられる。アルコキシカルボニルおよびアリールオキシカルボニル基の例としては、CH₃-O-CO-、(エチル)-O-CO-、n-プロピル-O-CO-、イソ-プロピル-O-CO-、n-ブチル-O-CO-、s-ブチル-O-CO-、t-ブチル-O-CO-、フェニル-O-CO-、置換フェニル-O-CO-およびベンジル-O-CO-、(置換ベンジル)-O-CO-、アダマンタン、ナフタレン、ミリストレイル、トルエン、ピフェニル、シンナモイル、ニトロベンゾイル、トルオイル、フロイル、ベンゾイル、シクロヘキサン、ノルボルナン、Z-カブロンが挙げられる。N-アシル化を促進するために、グリシン残基1~4個が分子のN末端に存在することができる。

20

30

【 0 1 0 0 】

化合物のC末端のカルボキシル基は、例えばアミド(つまり、C末端のヒドロキシル基は、-NH₂、-NHR₂および-NR₂R₃で置き換えられ)またはエステル(つまり、C末端のヒドロキシル基は、-OR₂で置き換えられる)によって保護することができる。R₂およびR₃は独立して、脂肪族、置換脂肪族、ベンジル、置換ベンジル、アリールまたは置換アリール基である。さらに、R₂およびR₃は窒素原子と一体となって、窒素、酸素または硫黄などの更なるヘテロ原子0~2個を有するC4~C8複素環式環を形成することができる。適切な複素環式環の例としては、ピペリジニル、ピロリジニル、モルホリノ、チオモルホリノまたはピペラジニルが挙げられる。C末端保護基の例としては、-NH₂、-NHCH₃、-N(CH₃)₂、-NH(エチル)、-N(エチル)₂、-N(メチル)(エチル)、-NH(ベンジル)、-N(C1~C4アルキル)(ベンジル)、-NH(フェニル)、-N(C1~C4アルキル)(フェニル)、-OCH₃、-O-(エチル)、-O-(n-プロピル)、-O-(n-ブチル)、-O-(イソ-プロピル)、-O-(s-ブチル)、-O-(t-ブチル)、-O-ベンジルおよび-O-フェニルが挙げられる。

40

【 0 1 0 1 】

注目すべきは、本発明のペプチド(上述のようにCD44V6、CD44V10のいずれかに由来する)は、一般に本発明のCD44ペプチドと呼ばれる。

【 0 1 0 2 】

本発明のCD44ペプチド(つまり、神経保護効果(neuroprotecting)ペプチド部位

50

）は、3～100、または3～50、または3～40、または3～30アミノ酸の長さである。更なる実施形態によれば、このペプチドは、3～20、5～20、5～20、5～18、5～15、5～10、7～10、8～10アミノ酸の長さである。

【0103】

本発明のCD44ペプチドは、上述のその神経保護活性に関して、以下の実施例のセクションにおいて、神経保護状態および神経変性状態に対して*in vitro*モデルと*in vivo*モデルの両方を用いて認定され得る。

【0104】

本発明の教示はさらに、神経変性疾患の治療に有用な薬物を同定するために用いてもよい。

【0105】

したがって、

(a) 神経毒剤の存在下にて、CD44v10/6ペプチドを神経細胞と接触させる工程；

(b) 前記神経細胞の細胞死をモニターする工程であって、前記CD44v10/6ペプチドの非存在下での前期神経細胞の細胞死の量または時間と比較して、前記CD44v10/6ペプチドの存在下での前記神経細胞の細胞死の量または時間の減少が、神経変性疾患の治療に有用な薬物を示す、工程；
を含む方法が提供される。

【0106】

神経細胞死のモニター方法は当技術分野でよく知られており、(神経保護の下での)モニター方法は上記および以下の実施例でさらに記述する。

【0107】

本明細書で使用される、神経毒剤とは、神経細胞を通常殺すことによって、神経系および/または脳に損傷を与える分子を意味する。

【0108】

特定の実施形態によれば、神経毒剤は、アミロイド、グルタミン酸塩、6-OHDA、MPTPおよびMPP+からなる群から選択される。

【0109】

CD44ペプチドのバイオアベイラビリティを高めるために、ペプチドにおける1つの、一部の、またはすべてのアミノ酸が、酵素的タンパク質分解活性に影響を受けにくく、かつ薬剤としての本発明のペプチドの使用を全体的に向上させることができる、Dアミノ酸であることができる。本発明のペプチドは、透過剤(*penetrating agent*)に結合(共有結合または非共有結合)させてもよい。

【0110】

本明細書で使用される「透過剤」という語句は、細胞膜を通過する、結合ペプチドの移動を高める薬物を意味する。

【0111】

一実施形態によれば、透過剤はペプチドであり、かつペプチド結合を介してCD44ペプチドに結合(直接または間接的に)される。

【0112】

一般に、ペプチド透過剤は、リジンまたはアルギニンなど、高い相対存在量の正に荷電したアミノ酸を含有するアミノ酸組成を有するか、または極性/荷電アミノ酸と非極性、疎水性アミノ酸の交互パターンを含有する配列を有する。

【0113】

非制限的な一例として、細胞内への透過を高めるために、細胞透過ペプチド(CPP)配列を使用してもよい。CPPは、HIV-TATタンパク質のタンパク質導入ドメイン(PTD)の短いバージョンと長いバージョンを含み得る[YGRKKRR(配列番号:54)、YGRKKRRQRRR(配列番号:55)、またはRRQRR(配列番号:56)]。しかしながら、本発明の開示内容は、それほど制限されず、当業者に公知の適切

10

20

30

40

50

な透過剤を使用してもよい。

【0114】

特定の実施形態によれば、本発明のペプチドコンジュゲートは、25、30または40個以下のアミノ酸である（これは、上述の細胞透過ペプチドなど、結合された更なる配列と共にCD44ペプチドを含む）。

【0115】

本発明のペプチドは、例えば、ペプチドに結合された疎水性部位（種々の直鎖状、分岐状、環状、多環式または複素環式炭化水素および炭化水素誘導体）などの非アミノ酸部位；非ペプチド透過剤；種々の保護基（特に、化合物が直鎖状であり、分解を低減するために化合物の末端に結合される場合）も含み得る。分解またはクリアランスの低減；種々の細胞ポンプによる斥力の低減、免疫原性活性の向上、様々な投与形式の向上（腸等の様々なバリアの通過を可能にする種々の配列の結合など）；特異性の向上、親和性の向上、毒性の低減など、種々の生理学的特性を向上させるために、化合物中に存在する化学（非アミノ酸）基が含まれ得る。

【0116】

他の非アミノ酸剤への、本発明のペプチドのアミノ酸配列成分の結合は、共有結合による、非共有結合的な錯化による、例えば疎水性ポリマーとの錯体形成による（分解または切断されて、徐放することができる化合物が生成される）；リポソームまたはミセル内にペプチドのアミノ酸部分を封入して本発明の最終的なペプチドが生成されることによる；結合であってもよい。その会合（association）は、他の成分（リポソーム、ミセル）内にアミノ酸配列を封入することによる、またはポリマー内にアミノ酸配列を含浸（impregnation）して本発明の最終ペプチドが生成されることによる会合であってもよい。

【0117】

本発明のペプチドは直鎖状であっても環状であってもよい（環化は安定性を向上させ得る）。環化は、当技術分野で公知の手段によって行うことができる。その化合物が主にアミノ酸で構成される場合、環化は、N～C末端、N末端～側鎖およびN末端～主鎖、C末端～側鎖、C末端～主鎖、側鎖～主鎖および側鎖～側鎖を経ての環化、ならびに主鎖～主鎖の環化であり得る。ペプチドの環化は、ペプチドに含まれる非アミノ酸有機部位によって行うこともできる。

【0118】

本発明のペプチドは、標準固相技術などを用いることによって生化学的に合成することができる。これらの技術としては、独占的（exclusive）固相合成、部分固相合成法、フラグメント縮合、古典的な液相合成が挙げられる。固相ポリペプチド合成手順は当技術分野でよく知られており、さらに非特許文献3に記述されている。

【0119】

大規模なペプチド合成は非特許文献4に記述されている。

【0120】

合成ペプチドは、分取高性能液体クロマトグラフィーによって精製することができ（非特許文献5）、その組成はアミノ酸シーケンシングによって確認することができる。

【0121】

組換え技術を用いて、本発明のペプチドを産生してもよい。組換え技術を用いて本発明のペプチドを産生するために、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドが、宿主細胞における本発明のポリペプチドの構成的、組織特異的、または誘導的な転写を指示するのに適したシス制御配列（例えば、プロモーター配列）の転写制御下でのポリヌクレオチド配列を含む、核酸発現ベクター内にライゲートされる。

【0122】

宿主細胞において合成されることに加えて、本発明のペプチドは、*in vitro*発現系を用いて合成することもできる。これらの方法は当技術分野でよく知られており、その系の成分は市販されている。

【0123】

上記のように、その神経保護機能によって、神経変性疾患の治療に本発明のペプチドを用いることができる。

【0124】

したがって、本発明の態様によれば、神経変性疾患の治療を必要とする対象において神経変性疾患を治療する方法であって、CD44V10アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸および前記CD44V10アミノ酸配列の20個以下のアミノ酸を含み、かつ神経保護活性を含む、単離ペプチドを治療有効量で対象に投与する工程を含む、神経変性疾患を治療する方法が提供される。

【0125】

本発明の他の態様によれば、神経変性疾患の治療を必要とする対象において神経変性疾患を治療する方法であって、CD44V6アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸および前記CD44V6アミノ酸配列の20個以下のアミノ酸を含み、かつ神経保護活性を含む、単離ペプチドを治療有効量で対象に投与する工程を含む、神経変性疾患を治療する方法が提供される。

【0126】

本明細書で使用される、「治療を必要とする対象」または「対象」という語句は、神経の損傷を患う、または神経損傷を発症するリスクのある、あらゆる年齢の哺乳動物、好ましくはヒトを意味する。

【0127】

本明細書で使用される、「神経損傷」という語句は、急性および/または進行性損傷および/または神経細胞および/またはグリア細胞の消失を特徴とする、疾患、障害または症状を意味する。

【0128】

本発明の一部の実施形態によれば、神経損傷を伴う病態は、中枢神経系における神経細胞および/またはグリア細胞を冒す。

【0129】

神経細胞への急性または突然の損傷によって起こる病状の非制限的な例としては、脳損傷、脊髄損傷、頭部損傷、および脳卒中[脳血管障害(CVA)]が挙げられる。

【0130】

本発明の一部の実施形態によれば、神経損傷を伴う病態は癌である。神経細胞およびグリア細胞を冒す癌の非制限的な例としては、脳の膠芽腫、神経芽細胞腫、腺癌ならびに乳癌、肺癌などの遠隔癌の転移が挙げられる。

【0131】

本発明の一部の実施形態によれば、神経損傷を伴う病態は慢性病態である。

【0132】

本発明の一部の実施形態によれば、神経損傷を伴う病態は神経変性疾患である。

【0133】

例示的な神経変性疾患または症状としては、限定されないが、多系統萎縮症、脳卒中、進行性核上麻痺、第17番染色体に連鎖するパーキンソン症候群を伴う前頭側頭型認知症、外傷性脳損傷(TBI)、ピック病、多発性硬化症、エリテマトーデス、アルツハイマー病、パーキンソン病、老人性認知症、筋萎縮性側索硬化症、ダウン症候群、オランダ型遺伝性脳出血アミロイドーシス、反応性アミロイドーシス、家族性地中海熱、蕁麻疹および難聴を伴う家族性アミロイドネフロパシー、マッケル・ウェルズ症候群、特発性骨髄腫、マクログロブリンミア関連骨髄腫、家族性アミロイド多発ニューロパシー、家族性アミロイド心筋症、限局性心房心アミロイド、全身性老人性アミロイドーシス、成人発症型糖尿病、インスリノーマ、限局性心房アミロイド、甲状腺の髄様癌、家族性アミロイドーシス、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血、家族性アミロイド性多発ニューロパシー、スクレイピー、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症候群、ウシ海綿状脳症、プリオン病、およびハンチントン病が挙げられる。

【0134】

10

20

30

40

50

特定の実施形態によれば、神経変性疾患はアルツハイマー病である。

【 0 1 3 5 】

特定の実施形態によれば、神経変性疾患はパーキンソン病である。

【 0 1 3 6 】

本発明のペプチドは、それ自体で、または適切な担体もしくは賦形剤 (excipient) と混合される、医薬組成物の一部として提供され得る。

【 0 1 3 7 】

本明細書で使用される「医薬組成物」とは、生理学的に適切な担体および賦形剤などの他の化学成分を有する、本明細書に記載の有効成分のうちの 1 種または複数種の製剤 (preparation) を意味する。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすること

10

【 0 1 3 8 】

本明細書における「有効成分」という用語は、生物学的効果を構成するペプチドを意味する。

【 0 1 3 9 】

以下で、区別なく使用され得る「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という語句は、生物に著しい刺激を生じさせず、かつ投与された化合物の生物活性および特性を阻害しない、担体または希釈剤を意味する。補助剤 (adjuvant) は、これらの語句の下に包含される。

【 0 1 4 0 】

20

本明細書における「賦形剤」という用語は、有効成分の投与をさらに助けるために、医薬組成物に添加される不活性物質を意味する。賦形剤の例としては、限定されないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖および様々な種類のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが挙げられる。

【 0 1 4 1 】

配合技術および薬物の投与は、参照により本明細書に援用される、非特許文献 6 に記載されている。

【 0 1 4 2 】

適切な投与経路としては、例えば、経口、直腸、経粘膜投与、特に経鼻、腸管、または筋肉内、皮下および髄内注入ならびに髄腔内、直接脳室内、心腔内、例えば、右心室または左心室腔への投与、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注入などの非経口的送達

30

【 0 1 4 3 】

以下の実施例で詳述されるように、本発明のペプチドは、海馬内 (IH) 脳室内注入 (ICV)、頭蓋内 (IC) 投与または髄腔内投与など (本質的に局所投与形式であって、それぞれ本明細書において使用が意図される) によって脳内に直接投与した場合に、アルツハイマー病およびパーキンソン病に対して保護することができた。

【 0 1 4 4 】

中枢神経系 (CNS) への薬物送達の従来のアプローチとしては：神経外科的方策 (例えば、脳内または脳室内注入)；血液脳関門 (BBB) の内因性輸送経路の一つを利用する試みでの薬物の分子操作 (例えば、それ自体が BBB を通過できない薬物と組み合わせられた、内皮細胞表面分子に対する親和性を有する輸送ペプチドを含むキメラ融合タンパク質の産生)；薬物の脂溶性を高めるようにデザインされた薬理学的方策 (例えば、脂質またはコレステロールキャリアへの水溶性薬物のコンジュゲート)；および高浸透圧性破壊による BBB の完全性の一時的破壊 (頸動脈内へのマンニトール溶液の注入またはアンジオテンシンペプチドなどの生物活性剤の使用から生じる) が含まれる。しかしながら、これらの方策はそれぞれ、侵襲的外科処置に伴う固有のリスク、内因性輸送システムに固有の制限により課されるサイズの制限、CNS の外部で活性であり得るキャリアモチーフで構成されるキメラ分子の全身投与に伴う、潜在的に望ましくない生物学的副作用、および BBB が破壊されている脳の領域内での脳損傷の可能性のあるリスクなどの制限を有し、

40

50

そのため最適でない方法となる。

【0145】

本発明の医薬組成物は、当技術分野でよく知られているプロセスによって、例えば従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣形成、粉碎、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥を用いて製造することができる。

【0146】

このように、薬学的に使用することができる、有効成分を加工して製剤化するのを助ける、賦形剤および助剤を含む1種または複数種の生理学的に許容される担体を使用して、本発明によれば使用される医薬組成物を従来の手法で製剤化することができる。適切な製剤化は、選択される投与経路に依存する。

10

【0147】

注射に関しては、医薬組成物の有効成分は、水溶液中で、好ましくはハンクス液、リンゲル液、または生理食塩緩衝液などの生理学的に適合性の緩衝液中で製剤化され得る。経粘膜投与については、浸透すべきバリアに適した浸透剤 (penetrant) が製剤化に使用される。かかる浸透剤は、当技術分野で一般に公知である。

【0148】

経口投与に関しては、当技術分野でよく知られている薬学的に許容される担体と活性化化合物を組み合わせることによって、医薬組成物を容易に製剤化することができる。かかる担体によって、患者による経口摂取用の、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤等として医薬組成物を製剤化することが可能になる。固形賦形剤を用いて、得られた混合物を任意に粉碎し、所望の場合には適切な助剤を添加した後に、顆粒の混合物を加工し、錠剤または糖衣丸のコアを得て、経口用の薬理的製剤を製造することができる。適切な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類などの充填剤；例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース調製物；および/またはポリビニルピロリドン (PVP) などの生理学的に許容されるポリマーである。所望の場合には、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤を添加してもよい。

20

30

【0149】

糖衣錠のコアには、適切なコーティングが施される。この目的のために、場合によってはアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合液を任意に含有してもよい濃縮糖溶液が使用され得る。識別するために、または活性化化合物用量の様々な組み合わせを特徴付けるために、錠剤または糖衣錠コーティングに、色素または顔料を添加してもよい。

【0150】

経口的に使用することができる医薬組成物としては、ゼラチンで作られた嵌め込み式カプセル (push-fit capsule) ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤から作られた密封軟カプセルが挙げられる。嵌め込み式カプセルは、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、任意に安定剤との混合物の状態の有効成分を含有してもよい。軟カプセルにおいて、有効成分は、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体中に溶解または懸濁され得る。さらに、安定剤を添加してもよい。経口投与用のすべての製剤は、選択される投与経路に適切な剤形であるべきである。

40

【0151】

口腔投与については、組成物は、従来の手法で製剤化される錠剤またはトローチ剤の形をとってもよい。

【0152】

50

経鼻吸入による投与については、本発明によれば使用される有効成分は、適切な推進剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロ - テトラフルオロエタン、または二酸化炭素を使用して、加圧型パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形で便利に送達される。加圧型エアロゾルの場合、計量された量を送達するためのバルブを備えることによって、用量単位が決定されうる。ディスペンサーで使用される、例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物と、ラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤との混合粉末を含有させて、製剤化され得る。

【 0 1 5 3 】

本明細書に記載の医薬組成物は、例えばボラス注射または持続注入による非経口投与に製剤化され得る。注射用製剤は、単位剤形で、例えばアンプルで、または任意に保存剤が添加された複数回用量 (multidose) 容器で提供される。組成物は、油性または水性ビヒクルの懸濁液、溶液、またはエマルジョンであってもよく、かつ懸濁化剤、安定剤、および/または分散剤などの製剤化剤 (formulatory agent) を含有してもよい。

10

【 0 1 5 4 】

非経口投与用の医薬組成物は、水溶性形態の活性製剤 (active preparation) の水溶液を含む。さらに、有効成分の懸濁液は、適当な油性または水性注射用懸濁液として調製することができる。適切な親油性溶媒つまりビヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリドまたはリポソームなどの合成脂肪酸エステルが挙げられる。注射用水性懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなど、懸濁液の粘度を増加する物質を含有してもよい。任意に、懸濁液は、有効成分の溶解度を高めて、高度に濃縮された溶液の調製を可能にする適切な安定剤または薬物を含有してもよい。

20

【 0 1 5 5 】

代替的に、有効成分は、使用前に、適切なビヒクル、例えば発熱性物質不含滅菌水性溶液に溶解して使用するために粉末状とされうる。

【 0 1 5 6 】

本発明の医薬組成物は、例えばココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の座薬基剤を使用して、座剤または停留浣腸剤などの直腸用組成物に製剤化することもできる。

【 0 1 5 7 】

本発明の文脈において使用するのに適した医薬組成物は、意図する目的を達成するのに有効な量でその有効成分が含有される組成物を含む。さらに具体的には、治療有効量とは、障害 (例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病) の症状を予防、緩和または寛解するのに有効な、または治療される対象の生存時間を伸ばすのに有効な、有効成分 (CD44 ペプチド) の量を意味する。

30

【 0 1 5 8 】

治療有効量の決定は、特に本明細書に記載の詳細な開示内容に照らして、当業者の能力内に十分ある。

【 0 1 5 9 】

本発明の方法で用いられる調製に関して、その治療有効量または用量は、*in vitro* および細胞培養アッセイから最初に推定することができる。例えば、所望の濃度または力価を達成するように、動物モデルにおいて用量を定めることができる。かかる情報を用いて、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。

40

【 0 1 6 0 】

本明細書に記載の有効成分の毒性および治療有効性は、*in vitro*、細胞培養、または実験動物における標準製薬手順によって決定することができる。ヒトに使用される投薬量の範囲の決定に、これらの *in vitro* および細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータを使用することができる。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて異なり得る。正確な製剤化、投与経路、および投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択することができる (例えば、非特許文献 7 を参照)。

50

【0161】

投薬量および投与間隔は、生物学的効果（最小有効濃度，MEC）を誘導または抑制するのに十分な有効成分の脳または血中レベルに、個々に調整することができる。MECは、各製剤に対して変化するが、*in vitro* データから推定することができる。MECを達成するのに必要な投薬量は、個々の特徴および投与経路に応じて異なる。検出アッセイを用いて、血漿中濃度を測定することができる。

【0162】

治療される症状の重症度および反応性に応じて、投与は、数日から数週間、あるいは治癒するまで、または疾患状態の軽減が達成されるまで持続する治療過程を伴う、単回または複数回の投与であることができる。

10

【0163】

投与される組成物の量は当然のことながら、治療される対象、疾患の重症度、投与形式、処方する医師の判断等に依存する。

【0164】

所望の場合には、本発明の組成物は、有効成分を含有する1つまたは複数の剤形を含有し得る、FDA認可キットなどのパックまたはディスペンサー装置で提供され得る。そのパックは、例えばブリスター包装などの金属フォイルまたはプラスチックフォイルを含み得る。そのパックまたはディスペンサーデバイスは、投与のための説明書が添付され得る。パックまたはディスペンサーデバイスは、医薬品の製造、使用、または販売を規制する行政機関によって規定される形でキットに関連する注意書きが収容されていてもよく、その注意書きは、組成物の形態あるいはヒトまたは家畜への投与の、当局による認可を反映している。かかる注意書きは、例えば処方薬に対して米国食品医薬品局によって認可されたラベリングの、または認可された製品の添付文書の注意書きであることができる。上記でさらに詳述されるように、適合する薬剤担体中に配合された本発明の製剤（*preparation*）を含む組成物を調製し、適切な容器に入れ、指示される症状の治療に関するラベルを貼ってもよい。

20

【0165】

本明細書で使用される、「約」という用語は $\pm 10\%$ を意味する。

【0166】

本明細書で使用される、「方法」という用語は、限定されないが、化学、薬理学、生物学、生化学、および医学分野の専門家に公知の手法、手段、技術および手順、またはその専門家によって公知の手法、手段、技術および手順から容易に開発される、手法、手段、技術および手順などの、所定のタスクを行うための手法、手段、技術および手順を意味する。

30

【0167】

本明細書で使用される、「治療」という用語は、症状の進行を抑止する、実質的に抑制すること、遅くすること、または回復させること、病状の臨床的または審美的（*aesthetic*）症状を実質的に改善すること、または病状の臨床的または審美的症状を実質的に防ぐことを意味する。

【0168】

明確にするために個々の実施形態の文脈に記述される、本発明の特定の特徴は、1つの実施形態と組み合わせて提供することもできると理解されたい。その逆に、簡略のため1つの実施形態の文脈に記載の本発明の様々な特徴もまた、別個に、またはいずれかの適切なサブコンビネーションで、または本発明の他のいずれかの実施形態に適するように、提供され得る。種々の実施形態の文脈に記載の特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしで実施不可能ではない限り、それらの実施形態の本質的な特徴とはみなされない。上記および添付特許請求の範囲に記載された本発明の種々の実施形態および態様は、以下の実施例において実験的に支持される。

40

【実施例】

【0169】

50

上記の説明と共に、本発明の一部の実施形態を非制限的に例示する、以下の実施例を参照されたい。

【0170】

一般に、本明細書で使用される命名法および本明細書で用いられる実験手順は、分子的、生化学的、微生物学的および組換えDNA技術を含む。かかる技術は、文献において十分に説明されている（例えば、非特許文献8～13、特許文献2～6に記載の方法、非特許文献14～18を参照）。利用可能なイムノアッセイが特許および科学文献に広く記述されている（例えば、特許文献7～22及び非特許文献19～27を参照）。これらすべてが、本明細書に全体が記載されているかの如く参照により本明細書に援用される。他の一般的な参考文献はこの文書全体に提供される。そこに記載の手順は当技術分野でよく知られており、読者の便宜を図って提供されている。そこに含まれるすべての情報は参照により本明細書に援用される。

10

【0171】

実施例1

CD44のエクソン6および10からの活性ペプチドの同定

【0172】

材料および方法

LifeTein社(South Plainfield, NJ, USA)によって、純度>95%ですべてのペプチドが合成された。10%ウシ胎仔血清、L-Glutおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Beit Haemek社, Israel)が添加されたダルベッコ変法イーグル培地において、N2Aマウス神経芽細胞腫およびSK-N-SHヒト神経芽細胞腫(ATCC)を維持した。5%CO₂と共に37℃にてインキュベータ内で細胞を維持した。各実験前に、SK-N-SH細胞を3μM RA(Sigma-Aldrich社)で5日間処理し、その細胞を神経細胞に分化させた。24ウェルプレートで細胞を増殖させ、Aペプチドで48時間またはMTP(Sigma-Aldrich社, 24時間)で処理し、その後、XTT生存率アッセイにかけた。XTT生存率アッセイは、テトラゾリウム塩XTTをホルマザンのオレンジ色化合物に還元する、代謝活性細胞の能力に基づく。水溶性色素の強度は、代謝活性細胞の数に比例する。増殖培地で1:3希釈後の処理に続いて、XTT(Beit Haemek社, Israel)を添加し、1～2時間インキュベートした。吸光度を420nmで測定した。生存率アッセイの後に、製造元の説明書に従ってカスパーゼ3アッセイ(EnzChek Caspase 3 Assay kit, Invitrogen社, Carlsbad, CA, USA)を行った。

20

30

【0173】

結果

siRNAを用いたin vitroおよびin vivoでの機能喪失実験から、CD44V6およびCD44V10がAD、PDおよびALSなどの神経変性疾患においてある役割を果たしていることが示されている（未発表データ）。CD44Sおよびスプライスバリエントアイソフォームは、シグナル伝達経路を含む複数のタンパク質間相互作用に関与していることが示された(Pontara[9]によって概説されている)。したがって、本発明の発明者らは、かかる相互作用が、神経細胞死においてCD44V6およびCD44V10機能を仲介し、かつV6またはV10エクソン配列に由来するペプチドがこれらの相互作用の破壊に対して薬物としての役割を果たすのではないかと考えた。実際に、ヒトV6配列に由来する小さなペプチド(NRWHE-配列番号:1)は、Metチロシンキナーゼ受容体を介した肝細胞成長因子(HGF)シグナル伝達を阻害できることが示された[24]。

40

【0174】

かかるペプチドの同定を助け得る保存配列を同定するために、本発明の発明者らは、V6およびV10配列両方(図1)の複数種の配列アラインメントを作製した。保存配列に基づいて、V6およびV10エクソンにおける異なる領域をカバーするいくつかの合成ペ

50

プチドを合成した(図2)。神経芽細胞腫細胞系N2A(マウス)およびSK-N-SH(ヒト)の細胞死に対するその作用に関して、ペプチドを試験した。図3に示す実施例として、A1-42ペプチドによって誘導されるSK-N-SH細胞の細胞死に対する、マウスV6配列に由来する2種類のペプチドおよびヒトV10配列に由来する2種類のペプチドの作用を3通りの濃度で試験した。XTTの減少によって、細胞生存率を測定した。未処理細胞の生存率を100%と定義して、相対生存率が示される。4種すべてのペプチドが、ペプチドなしのコントロールと比較して、細胞に少なくとも部分的な保護を与えることが分かった(図3)。驚くべきことに、V6ペプチドにより与えられた保護は、20pMと低い濃度で最大であり、保護の程度は、濃度が高いほど低くなった。マウスV6およびヒトV10配列に由来する追加のペプチドをさらに合成し(6-21アミノ酸, 図2)、N2A細胞におけるA25-35毒性からの保護活性を比較した(図4A-B)。A25-35は、効力の増加と伴って完全長ペプチドの毒性および凝集性を模倣する[25]。生存率アッセイ(XTT, 図4A)およびカスパーゼ3活性(アポトーシス誘導のマーカーとして, 図4B)の両方によって測定されるように、濃度1nMにて、ペプチドの大部分が細胞を少なくとも部分的に保護した。これらのペプチドは、毒性カチオン1-メチル-4-フェニルピリジニウム(MPP+)へと代謝されるPDモデリング神経毒である1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)によって誘導される細胞死からの保護についても試験された。実際に、ペプチドの一部が、コントロール細胞(ペプチドなし)と比較して、1μMにてMPTPに対して保護効果を有することも判明した。結果を図5A-Bに示す。

【0175】

実施例2

CD44ペプチドの構造/機能解析

【0176】

材料および方法

すべての方法が上記の実施例1と同じである。ペプチドおよび6-ヒドロキシドパミンをSigma-Aldrich社(St. Lewis, USA)から購入した。

【0177】

結果

これらの発見から、V6B、V10AおよびV10Bヒト配列の保存領域に由来する、より小さなペプチドへと、ペプチドスクリーンを拡充することに、本発明の発明者らは駆り立てられた(表1)。

10

20

30

【表 3】

表 1 (図 6 および図 7 に関する)

名称	配列	配列番号
V6B1	TPKEDSH	16
V6B1_C4	EDSH	17
V10A/B_L	PVTSAKTGSFGVTAVT V	18
V10A/B_S	PVTSAKTGSFG	19
V10A2_C7	PVTSAKT	20
V10A2_C10	TFIPVTSAKT	21
V10A1_N12	TTLLEGYTSHYP	22
V10A1_N8	TTLLEGYT	23
V10A1_N6	TTLLEG	24
V10A1_N+2_6	LLEGYT	25
V10A1_N+4 (P26とも呼ば れる)	EGYTSHYP	26
V10A1_EGYT	EGYT	27
V10B3_N7	SLSGDQDT	28
V10B3_N6	SLSGDQD	29
V10B3_N5	SLSGD	30
V10B2.5_6	NVNRSL	31
V10B2.5_9	NVNRSLSGD	32
V10B2_N10	DSNSNVNRSL	33
V10B1_8 (P34とも呼ば れる)	FGVTAVTV	34
V10B1_7	FGVTAVT	35

【 0 1 7 8 】

6 - ヒドロキシドーパミン (6 - O H D A) で処理された N 2 A 細胞に対するその保護効果について、濃度 1 p M にてこれらのペプチドをスクリーニングした。6 - O H D A は、*i n v i t r o* および *i n v i v o* にてパーキンソン病を模倣するためにモデルシステムで一般に使用されるドーパミン類似体である。6 - O H D A は、反応性酸素種 (R O S) の放出によって、またおそらくはミトコンドリアの呼吸鎖に対する直接的な作用によって、アポトーシスを誘発する。この結果から、6 - O H D A 処理細胞での細胞生存率およびカスパーゼ 3 活性化に対するペプチドの特異な効果が示されている (図 6 A - B)。一部のペプチドの保護効果を広い用量範囲で試験した。例えば、8 m e r ペプチド V 1 0 A 1 _ N + 4 に関して、最適な保護用量は、およそフェントモル (f M) 濃度であることが判明した (図 6 C)。S K - N - S H ヒト神経芽細胞腫細胞における A (2 5 - 3 5) 誘発毒性に対するその効果について、p M 濃度にてペプチドパネルも試験した。A ストレスに対して有効なペプチドのプロファイルは、6 - O H D A に有効なペプチドと著しく異なった (図 7 A - B)

【 0 1 7 9 】

実施例 3

i n v i v o パーキンソン病モデルにおける本発明の一部のペプチドの *I n v i v o* 効果

【0180】

材料および方法

C57BLマウス(すべてオス, 8~12週齢, Harlan Laboratories Israelから入手)に、投与量100 μ l/マウスにて腹腔内(IP)注射によって、1日目および2日目に1日2回3時間空けて、18mg/kg MPTP(Sigma-Aldrich社)を投与した。研究0日目および連続して8日間、1mg/kgにて12 μ l/マウスでPBS(ビヒクル)またはペプチドのうちの1種類をマウスに鼻腔内投与した。in vivo研究で使用されたすべてのペプチドはLifeTein社によって合成され、N末端アセチル化およびC末端アミド化で修飾された。点鼻に関しては、各マウスに穏やかに麻酔をかけ(2.5%イソフルラン)、次いでマウスの首をテーブルに平行にして拘束し、保持しながら、総体積12 μ lを鼻孔内に投与した。6 μ lを左鼻孔に2滴(1滴3 μ l)投与し、続いて15秒保持し、6 μ lを右鼻孔に2滴(1滴3 μ l)投与し、続いて15秒保持した。8日目に、脊椎脱臼によってマウスを安楽死させた。安楽死の直後に、脳を取り出し、線条体を解剖し(左および右線条体をプールした)、計量し、ドライアイスで凍結した。80Wで5秒間音波処理することによって、0.1M過塩素酸および10ng/ml 3,4ジヒドロキシベンジルアミン(DHBA)を含有する溶液中で、線条体試料をホモジナイズした。コンディショニングセル5021モデルおよび分析セル5011モデルを備えた電気化学検出器Coullochém IEESAに連結された逆相カラム(GL-Science社, Inertsil ODS-2 5 μ m 4.6 \times 150mm, 室温)上のHPLCポンプ(Jasco PU-2080Plus)に直接、各組織抽出物の上清を注入した。コンディショニングセルで0.35V、分析セルで0.1Vおよび0.35Vに作業電位を設定した。移動相は、80mg/L EDTA、125mg/Lヘプタンスルホン酸、メタノール55mlおよびアセトニトリル50mlと共に0.05M一塩基リン酸ナトリウムであった(pH=2.7)。流量は1.5ml/分であった。ドーパミン、DOPACおよびHVA値をライセートタンパク質濃度に正規化した(BCA kit, Pierce)。

【0181】

結果

in vivo PDモデル、つまりマウスにおけるMPTP注入に関して、MPTPおよび6-OHDAに対して最も有効なペプチドが選択された。このモデルにおいて、MPTPの腹腔内注射(2日連続で3時間おきに18mg/kg)を繰り返した結果、黒質におけるドーパミン作動性ニューロン死および線条体のドーパミン欠乏が起こる。MPTPに曝露する1日前から開始して、1mg/kgで点鼻によって1日2回ペプチド(またはビヒクル)を投与し、研究の最後まで続けた。MPTPの注射から7日後に、マウスを屠殺し、ドーパミン(DA)、3,2-ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC)およびホモバニリン酸(HVA)の線条体レベルをHPLCによって評価した。8群において9種のペプチドを試験し、DA、DOPACおよびHVAレベルの結果を表2に示す。

【0182】

特に表2から、MPTP処理マウスにおけるドーパミンおよび代謝産物の線条体レベルに対するヒトV6およびV10由来ペプチド(1mg/kg, 鼻腔内投与)の効果が例証される。「材料および方法」に記載のプロトコルに従って、マウスを処理した。DA、DOPACおよびHVAの線条体レベルは、HPLCによって決定し、タンパク質総含有量の値で割り、ビヒクル処理マウスで得られたレベルに正規化した。群1および3は、正常な指定の類似体とレトロインベルソな類似体(逆配列のDアミノ酸)の1:1ミックスで処理された。群6は、10B2.5_6ペプチドと10B2.5_9ペプチドの1:1ミックスで処理された。

【表 4】

表 2

	配列番号	ペプチドの名称	DA	DOPAC	HVA
1	17	hV6B1_C4	20.7	41.7	16.6
2	19	V10A/B_S	26.6	27.2	13.7
3	24	V10A1_N6	17.7	24.3	-0.7
4	26	V10A1_N+4	58.0 *	61.8 *	28.5
5	15	hV10B3	18.1	22.5	44.2 *
6	31 および 32	10B2.5_6+10B2.5_9	13.6	35.1	53.0 *
7	34	10B1_8	46.6 *	75.9 **	83.3 **
8	12	hV10A2	24.7	54.8 *	73.4 **

* p 値 < 0.05

** p 値 < 0.01

【0183】

2 種類の 8-mer、V10 由来ペプチド、つまり V10A1_N+4 (配列番号: 26) および 10B1_8 (配列番号: 34) での処置は、ビヒクルコントロールと比較して、線条体 DA レベルに対して有意な正の効果を有した。これらのペプチド、ならびに他の 3 種のペプチド (hV10B3 - 配列番号: 15; V10A2 - 配列番号: 12; 10B2.5_6 - 配列番号: 31; および 10B2.5_9 - 配列番号: 32) もまた、2 DA 代謝産物、DOPAC および HVA のうちの少なくとも 1 つのレベルを有意に増加した (上記の表 2)。これらの結果は、CD44V10 由来のペプチドが、MPTP からドーパミン作動性ニューロンを *in vivo* で保護することができることを示しており、これらのペプチドはパーキンソン病の新規な薬物として開発されることが示唆される。

【0184】

実施例 4

本発明の一部の実施形態のペプチド内での活性な部分配列 (subsequence) の同定結果

さらに構造機能分析を行うために、V10A1_N+4 (以下「P26」, 配列番号: 26) が選択された。このペプチドに由来するペプチドを合成し、以下の表 3 に示す。

10

20

30

【表 5】

表 3

名称	配列番号	配列
26-1	36	EGYTSHY
26-2	37	EGYTSH
26-3	38	EGYTS
26-4	39	GYTSHYP
26-5	40	YTSHYP
26-6	41	TSHYP
26-7	42	GYTSHY
26-8	43	QGYTSHYP
26-9	44	EGYTSAYP
26-RI	45	*P*Y*H*S*T*Y* G*E
26-R	46	PYHSTYGE

*Dアミノ酸

【0185】

6-OHDAからN2Aを保護するその効果に関して、表3に示すペプチドを試験した(図8)。このデータから、少なくとも部分的な活性を維持しながら、P26配列の一部の修飾が許容され得ることが示されている。かかる修飾は、C末端切断(26-1、26-2および26-3)と、N末端グルタミン酸残基のグルタミン置換および7位ヒスチジンのアラニンによる置換とを含む(それぞれ26-8および26-9)。

【0186】

最も興味深いことに、レトロインベルソな(RI、一次配列が逆であり、L-アミノ酸よりもむしろD-アミノ酸が用いられている)P26誘導体(26-RI、配列番号:26)もまた、その神経保護活性を保持する。レトロインベルソなペプチドは、伸長されたコンフォメーションにおいて、その天然L-配列と類似しており、かつ、タンパク質分解に対して完全に耐性を有しつつ当該親分子の生物活性を保持した側鎖形態をとると仮定される(非特許文献28)。したがって、神経保護を仲介する最小配列は、配列番号:47に記載されており、STYG-X(XはEまたはQである)またはそのレトロ配置であり、いずれのアミノ酸もDまたはLアミノ酸であり得る。

【0187】

実施例5

A₍₁₋₄₂₎損傷からラットを保護する、V10A1__N+4(P26)およびP34ペプチドの海馬内(IH)/脳室内(ICV)注入

【0188】

材料および方法

動物-Laboratory Animal Center of University of South China, Hengyang, Hunan, Chinaから、オスの成体SDラットを入手した。到着後、食物および水に自由にアクセスできる、温度および湿度が調節された環境内にラットを個々に収容した。午前7時にライトを付けて、動物を12時間の明暗スケジュールで維持した。収容後、ラットを実験者に慣らすために、ラットを1週間手で触った(1日当たり5~6分/ラット)。National I

nstitutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsに従って、実験を行い、実験プロトコルは、University Animal Care and Use Committeeによって承認されている。

【0189】

薬物 - A ($1 - 42$) をSigma - Aldrich社 (USA) から購入した。ペプチドはLifeTein社 (USA) から入手した。

【0190】

アルツハイマー病 (AD) モデルの確立 - A ($1 - 42$) (Sigma - Aldrich社, USA) を濾過PBSに濃度 $6 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ で溶解し、その溶液を使用前に2日間37 で維持した。脳定位座標：ブレグマから $AP = -3.6$, $ML = 2.0$ かつ頭蓋から $DV = 3.0$ にて、ペントバルビタールナトリウム ($55 \text{ mg} / \text{kg}$, 腹腔内) 麻酔下にて、マイクロシリンジを使用して、溶液1マイクロリットルを右海馬に注入した。コントロールラットにPBS $1 \mu\text{l}$ を注入した。IH / ICV研究において、ペプチドまたはPBS $1 \mu\text{l}$ も、同じ脳定位座標で右海馬内に注入した。

【0191】

ペプチドの投与 - ICV注入については、以下の脳定位座標： $AP = 1$, $ML = 1.6$, $DV = 3.8$ に従って、微量注入カニューレを側脳室内に留置した。A 注入から24時間後、指定の用量でPBSまたはペプチドの最初のICV注入をラットに施した。皮下 (SC) 研究において、PBSまたはPBS中のペプチド溶液が $1 \text{ ml} / \text{ラット}$ にて用量 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ まで、毎日皮下注射され、21日間続けられた。

【0192】

新規物体認識 (NOR) タスク - A 注入から21日後に、NORタスクを試験した。

【0193】

トレーニング装置は、明るく照らされ、かつ隔離された部屋内に配置した、消音キャビネットに入れられた黒色プレキシグラスボックス ($50 \times 50 \times 40 \text{ cm}$) とした。照明は、キャビネットの天井に設置された15W家庭用白色ライトとし、65dB暗騒音は、キャビネット内の換気扇によって与えられた。ボックスの床をおがくずで覆った。タスクで使用される物体は、形または色の異なるガラスおよびプラスチックなどの撥水性材料で作製した。物体のサイズは約 $6 \times 6 \times 8 \text{ cm}$ とした。ボックス奥の角に2つの物体を常に配置した。ラットが一方の角または物体のみを好まないように位置及び物体を釣り合わせた。行動工程は、訓練および保持試験の2つの段階を含むものとした。訓練試験の間、ラットをボックスに入れ、2つの同一の物体を10分間探索させ、両方の物体の探索に費やした合計時間を記録した。距離 $< 1 \text{ cm}$ で鼻を物体に向けたことおよび / または鼻で当該物体に触れたことを物体探索として定義した。試験と試験の間に、おがくずをかき回し、箱および物体を40%エタノール溶液で清掃した。訓練試験 (保持試験) から24時間後、見慣れた物体のコピー1つと新規な物体を訓練段階中と同じ位置に刺激として入れた。ラットをボックスに3分間入れ、各物体を探索するのに費やした時間および両方の物体を探索するのに費やした合計時間を記録した。記憶を評価するために使用される識別指数は、新規な物体と馴染みのある物体を探索する時間の差として計算され、両方の物体を探索するのに費やした合計時間の比率として表された。

【0194】

モリス水迷路試験は、水 (25 ± 1) で深さ 40 cm まで満たされた、円形の水タンク (直径 200 cm , 高さ 60 cm) を用いて行った。プール端周辺の4つの等間隔の位置をスタート箇所として使用し、当該箇所によってプールが四分円に分割される。逃避プラットフォーム (直径 10 cm) をプールの水面から 2 cm 下に設置した。逃避プラットフォームは、プールのランダムに選択された四分円のうちの1つの中心に置かれ、実験全体にわたって同じ位置に保たれた。訓練が開始される前に、プラットフォームなしのプールでラットを120秒間自由に遊泳させた。動物は、4試行 / セッションからなる訓練セッションを4日間受け (各出発ポイントから1回)、各試行は遊泳時間上限120秒であ

10

20

30

40

50

り、試行の間隔は約30秒とした。隠れたプラットフォームに登った後、次の試行が開始される前の30秒間、ラットはそこに残った。ラットが、最高時間120秒以内に、隠れたプラットフォームに到達することができなかった場合、ラットをプラットフォームに優しく置き、同じ時間そこにとどまらせた。隠れたプラットフォームに到達するのに費やされた時間を測定した。獲得段階から24時間後、プラットフォームを取り除いて、ブローブ試験を行った。ラットをプールで120秒間自由に遊泳させ、隠れたプラットフォームを以前に含んでいた対象の四分円で過ごした時間を記録した。対象の四分円で過ごした時間は、学習後に起こった記憶固定の程度を示した。モリス水迷路試験は、A 注入から24時間後に開始された。

【0195】

10

統計解析

一元配置分散分析を用いて統計解析を行った。この後に、フィッシャーのLSD検定で比較を行った(SigmaStat 3.2)。すべてのデータを平均±SEMで示した。有意レベルを $p < 0.05$ で設定した。

【0196】

結果

in vivoでのアルツハイマー病(AD)モデルにおけるP26およびV10B1__8(以下、P34)ペプチドの有効性を試験するために、これらのペプチドをA₍₁₋₄₂₎微量注入ラットモデルにおいて試験した(非特許文献29)。このモデルにおいて、ラットは右海馬内にA₍₁₋₄₂₎6μgの単回微量注入を受けた。同時に、ペプチド溶液またはPBS(ピヒクル)1μlもまた、同じ位置に注入された。この処置の後、様々な用量のペプチドまたはピヒクル(PBS)の毎日のICV注入を行った。A 注入から21日後、新規物体認識アッセイ(NOR, 図9)についてラットを試験した。この結果から、100ng/ラットでのP26および10および100ng/ラットでのP34は、識別指数を有意に増加したことが分かる($p < 0.01$)。このデータから、P26およびP34ペプチドのICV/IH投与は、in vivoにてA の毒性効果を防ぐことが示されている。

20

【0197】

実施例6

A₍₁₋₄₂₎損傷からラットを保護する、V10A1__N+4(P26)ペプチドの末梢(peripheral)注入

30

【0198】

材料および方法

実験手順および皮下注入(SC)は上記の実施例5に記述されている。

【0199】

結果

A 毒性からのラットの保護について、皮下(SC)注入によるペプチドの非経口投与をアッセイした。したがって、A₍₁₋₄₂₎微量注入ラットモデルが適用され、続いて1mg/kg P26ペプチドならびにコントロールペプチド(cont1: AVAVEAA G配列番号: 48, n=10~11)の毎日の皮下注射が行われた。21日間の注入期間に続いて、モリス水迷路(MWM)およびNOR記憶アッセイが行われた。この結果から、皮下注射された3つのペプチドのうちP26のみが、両方のアッセイにおいて挙動を有意に改善したことが分かる(図10および11)。これらの結果から、P26ペプチドの神経保護効果は、ペプチドが非経口投与により与えられた場合にも確認されることが実証されており、そのペプチドが血液脳関門を通過することができ、かつ関連する脳領域において十分な濃度に達することが示唆される。

40

【0200】

実施例7

P26およびP26-IRの薬物動態

材料および方法

50

オスのSDラットにおいてペプチドを皮下投与した後に、ペプチドの薬物動態を評価した。ピヒクルとしてリン酸緩衝食塩水（pH 7.4）を使用して、ペプチド溶液を調製し、投与体積 2 mL / kg で用量 1 mg / kg にて皮下投与した。

【0201】

血液試料を0時点（投与前）にて、かつ投与して0.17、0.5、1、2、4、8および24時間後に採取した。各時点で、カニユーレ処置されたラットの頸静脈から血液約0.25 mLを採取し、200 mM K_2EDTA を含有する（20 μ L / mL血液）予めラベルが付けられたマイクロチューブに移した。試料採取に続いて、等体積のヘパリン生理食塩水をカテーテル内に流した。4 \pm 2 で5000 gにて血液試料を5分間遠心した。分析を行うまで、すべての血漿試料を-70 未満で保存した。血漿試料中のペプチドを定量化するために、目的に適したLC-MS/MS法を用いた。定量化の下限（LLOQ）は22.34 ng / mLであった。

【0202】

結果

ラットに1 mg / kgで皮下注射することによって、P26およびP26-IRの薬物動態を試験した（図12）。P26-RIによって、P12の130 ng / mLと比較して、見掛け C_{max} 1227 ng / mLの向上した皮下（SC）薬物動態が実証された。*in vitro*での活性と併せて、P26-IR類似体は10倍の活性向上があることから、P26-IRはP26に比べて低い用量で使用することができることが示唆される。

【0203】

本発明はその特定の実施形態と共に説明されているが、多くの代替、変形および変更が当業者には理解されることは明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および広い範囲内にある、かかる代替、変形および変更を含むことが意図される。

【0204】

それぞれの出版物、特許および特許出願が、参照により本明細書に援用されるように具体的かつ個々に示されるのと同程度に、本明細書に記載のすべての出版物、特許および特許出願は、その全体が参照により本明細書に援用される。さらに、本出願における参考文献の引用または同定は、かかる参考文献が従来技術として本発明に利用可能であるという許可として、解釈すべきではない。セクションの表題が用いられる範囲内で、それらが必ずしも制限されると解釈すべきではない。

【0205】

[参考文献]

（他の参考文献は本願に記載されている）

1. Querfurth, H.W. and F.M. LaFerla, Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 2010. 362(4): p. 329-44.
2. Glass, C.K., et al., Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 2010. 140(6): p. 918-34.
3. Davie, C.A., A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull*, 2008. 86: p. 109-27.
4. Naor, D., R.V. Sionov, and D. Ish-Shalom, CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, 1997. 71: p. 241-319.
5. Ilangumaran, S., B. Borisch, and D.C. Hoessli, Signal transduction via CD44: role of plasma membrane microdomains. *Leuk Lymphoma*, 1999. 35(5-6): p. 455-69.
6. DeGrendele, H.C., et al., CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med*, 1996. 183(3): p. 1119-30.
7. DeGrendele, H.C., P. Estess, and M.H. Siegelman, Requirement for C

10

20

30

40

50

CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science*, 1997. 278(5338): p. 672-5.

8. Ponta, H., D. Wainwright, and P. Herrlich, The CD44 protein family . *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. 30(3): p. 299-305.

9. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(1): p. 33-45.

10. Golan, I., et al., Expression of extra trinucleotide in CD44 variant of rheumatoid arthritis patients allows generation of disease-specific monoclonal antibody. *J Autoimmun*, 2007. 28(2-3): p. 99-113.

11. Garin, T., et al., CD44 variant DNA vaccination with virtual lymph node ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through the induction of apoptosis. *J Neurol Sci*, 2007. 258(1-2): p. 17-26.

12. Orian-Rousseau, V., et al., CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev*, 2002. 16(23): p. 3074-86.

13. Tremmel, M., et al., A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood*, 2009. 114(25): p. 5236-44.

14. Akiyama, H., et al., Morphological diversities of CD44 positive astrocytes in the cerebral cortex of normal subjects and patients with Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1993. 632(1-2): p. 249-59.

15. Moretto, G., R.Y. Xu, and S.U. Kim, CD44 expression in human astrocytes and oligodendrocytes in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993. 52(4): p. 419-23.

16. Bignami, A. and R. Asher, Some observations on the localization of hyaluronic acid in adult, newborn and embryonal rat brain. *Int J Dev Neurosci*, 1992. 10(1): p. 45-57.

17. Kaaijk, P., et al., Differential expression of CD44 splice variants in the normal human central nervous system. *J Neuroimmunol*, 1997. 73(1-2): p. 70-6.

18. Asher, R. and A. Bignami, Hyaluronate binding and CD44 expression in human glioblastoma cells and astrocytes. *Exp Cell Res*, 1992. 203(1): p. 80-90.

19. Kang, W.S., et al., Differential regulation of osteopontin receptors, CD44 and the alpha(v) and beta(3) integrin subunits, in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 2008. 1228: p. 208-16.

20. Ries, A., J.L. Goldberg, and B. Grimpe, A novel biological function for CD44 in axon growth of retinal ganglion cells identified by a bioinformatics approach. *J Neurochem*, 2007. 103(4): p. 1491-505.

21. Wang, X., et al., CD44 deficiency in mice protects brain from cerebral ischemia injury. *J Neurochem*, 2002. 83(5): p. 1172-9.

22. Lammich, S., et al., Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. *J Biol Chem*, 2002. 277(47): p. 44754-9.

23. Pinner, E., M. Laudon, and N. Zisapel, CD44 splice variants in neurodegenerative diseases. *WO/2009/007934*, 2009.

24. Matzke, A., et al., A five-amino-acid peptide blocks Met- and Rho-dependent cell migration. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6105-10.

25. Varadarajan, S., et al., Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1-42) and A beta(25-35). *J Am Chem Soc*, 2001. 123(24): p. 5625-31.

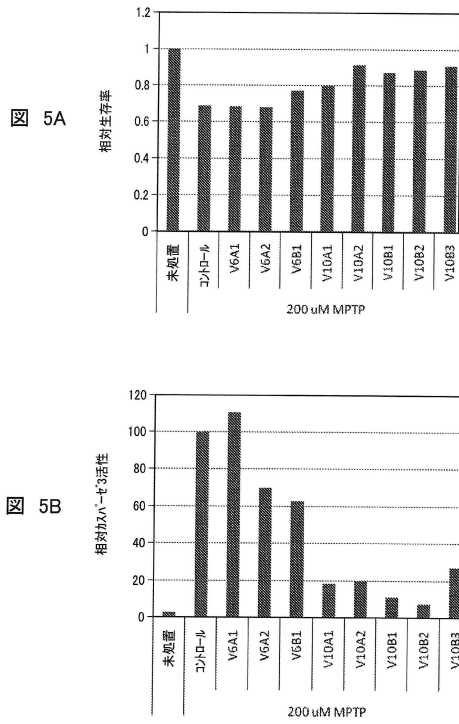
10

20

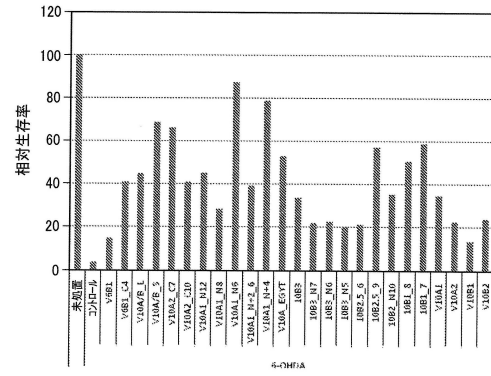
30

40

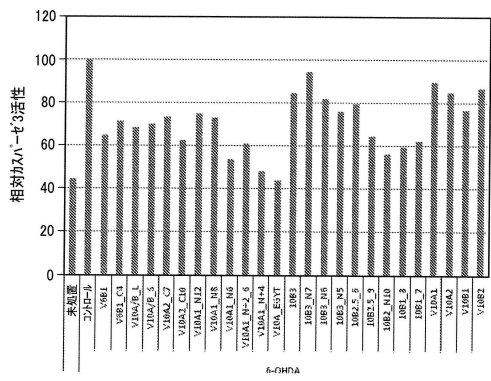
【図 5】



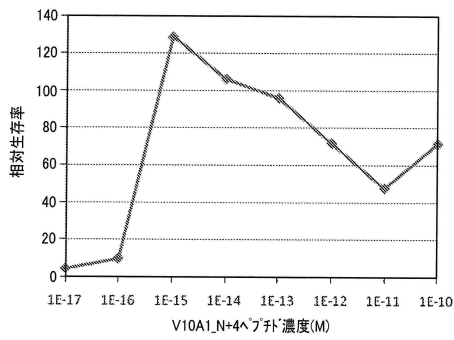
【図 6 A】



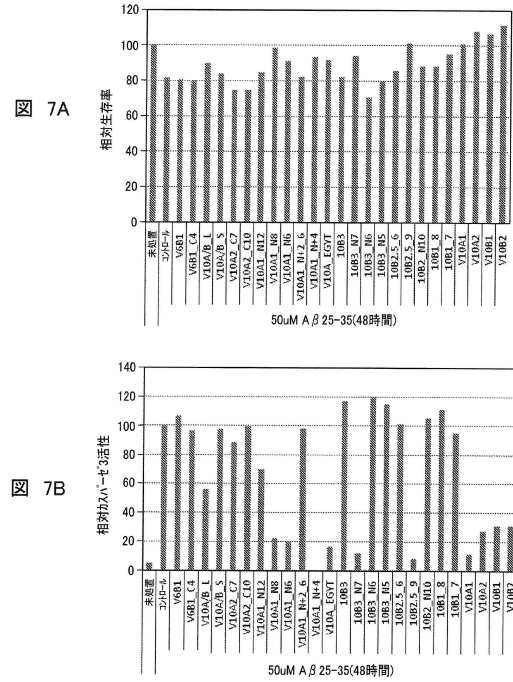
【図 6 B】



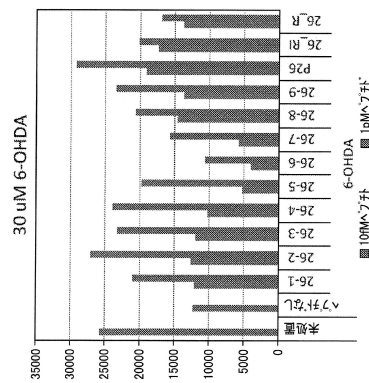
【図 6 C】



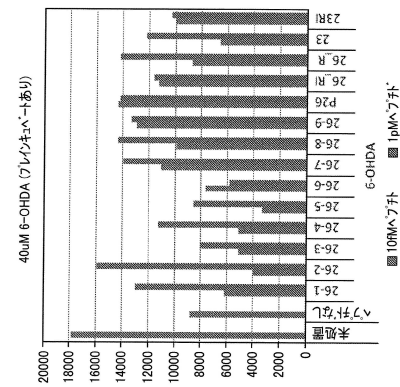
【図 7】



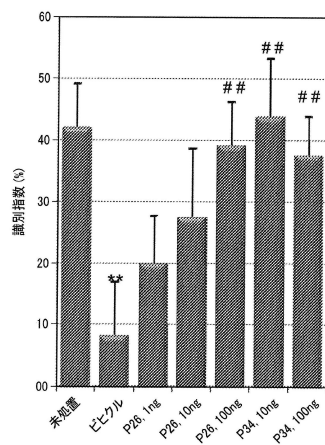
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9】



【図 10】

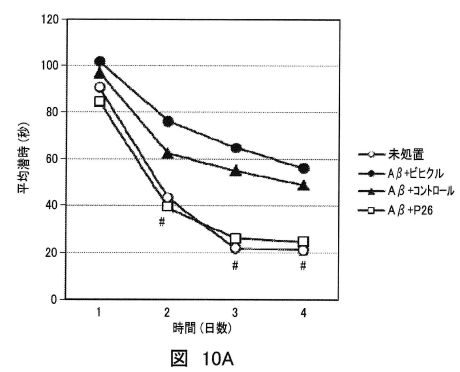


図 10A

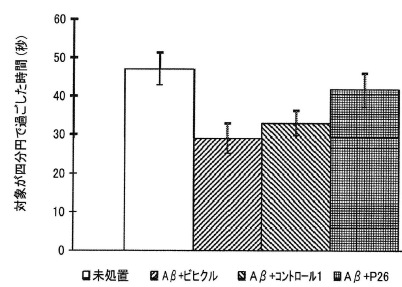
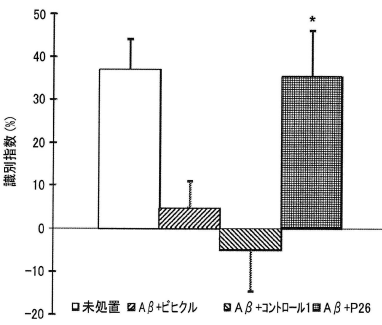
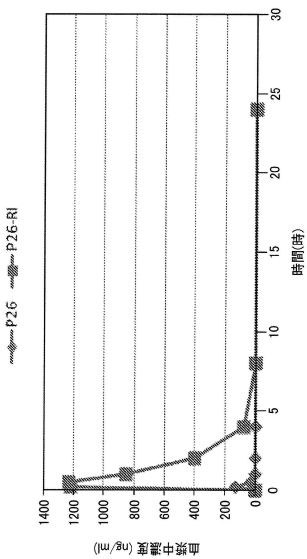


図 10B

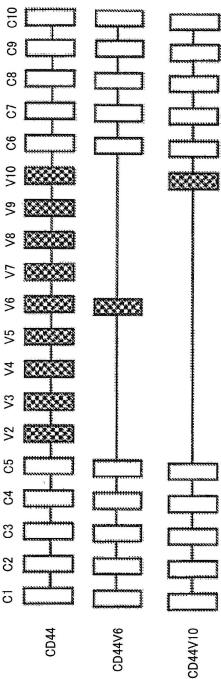
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

0005960793000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 25/00 (2006.01) A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/14 (2006.01) A 6 1 P 25/14

(72)発明者 ジサペル ナヴァ
 イスラエル国 6 9 8 6 5 テル アビブ イルヤフ ミフェララ ストリート 1 5

審査官 幸田 俊希

(56)参考文献 欧州特許出願公開第0 1 6 4 7 5 5 6 (E P , A 1)
 特表2 0 0 1 - 5 0 8 0 5 2 (J P , A)
 特表2 0 1 0 - 5 3 2 9 8 9 (J P , A)
 特表平0 9 - 5 0 8 2 6 5 (J P , A)
 国際公開第2 0 1 0 / 1 4 9 2 8 1 (W O , A 1)
 特表平0 8 - 5 1 1 4 1 9 (J P , A)
 MATZKE,A. et al. , A five-amino-acid peptide blocks Met- and Ron-dependent cell migrati
 on. , Cancer Res. , 2 0 0 5 年 7 月 1 5 日 , Vol.65, No.14 , p.6105-10

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 0 7 K 7 / 0 0
 C 0 7 K 1 4 / 0 0
 A 6 1 K 3 8 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 D W P I (T h o m s o n I n n o v a t i o n)