

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5336384号
(P5336384)

(45) 発行日 平成25年11月6日(2013.11.6)

(24) 登録日 平成25年8月9日(2013.8.9)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 38/27	(2006.01)	A 61 K 37/36	Z N A
A 61 P 25/28	(2006.01)	A 61 P 25/28	
A 61 P 25/14	(2006.01)	A 61 P 25/14	
A 61 P 25/16	(2006.01)	A 61 P 25/16	
A 61 P 21/02	(2006.01)	A 61 P 21/02	

請求項の数 11 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-536348 (P2009-536348)
(86) (22) 出願日	平成19年11月13日 (2007.11.13)
(65) 公表番号	特表2010-509345 (P2010-509345A)
(43) 公表日	平成22年3月25日 (2010.3.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/023951
(87) 國際公開番号	W02008/057609
(87) 國際公開日	平成20年5月15日 (2008.5.15)
審査請求日	平成22年9月17日 (2010.9.17)
(31) 優先権主張番号	60/858,022
(32) 優先日	平成18年11月10日 (2006.11.10)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	302062403 ジェナポン バイオファーマシューティカルズ エルエルシー
	アメリカ合衆国 カリフォルニア モンテベロ、ノース ウィルコックス アベニュー 830
(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(74) 代理人	100147131 弁理士 今里 崇之
(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】MNTFペプチドおよびその類似体を用いて神経細胞障害を治療する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその塩を有効成分として含む、神経疾患又は神経障害の治療用医薬組成物であって、

前記医薬組成物は、静脈内投与されるものであり、

前記ポリペプチド又はその塩は、静脈投与されることで患者の血液脳関門を通過することを特徴とし、かつ、

前記疾患又は障害は、脳卒中、脳虚血、脊髄傷害、ハンチントン病、パーキンソン病、多発性硬化症(MS)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)及びアルツハイマー病からなる群より選択されるいづれか1つである。

前記医薬組成物。

【請求項2】

前記疾患又は障害が脳卒中である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記疾患又は障害が脊髄傷害である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記疾患又は障害が脳虚血である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記疾患又は障害がハンチントン病である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項6】

10

20

前記疾患又は障害がパーキンソン病である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記疾患又は障害がM S である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記疾患又は障害がA L S である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記疾患又は障害がアルツハイマー病である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記患者が哺乳類である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記患者がヒトである、請求項 1 に記載の医薬組成物。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は、一般に、M N T F ペプチドおよびその類似体を用いて神経細胞障害を治療するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

以下は、本開示を理解する上で有用である可能性がある情報を含む。本明細書において提供されるいづれの情報も、従来技術であるもしくは本開示に関連性があると認めるものではなく、または明示的もしくは非明示的に参照されるいづれの出版物もしくは書類も、従来技術であると認めるものではない。 20

【0 0 0 3】

胎仔性運動ニューロンの生存は、関連する発達中の骨格筋に由来する特異的な栄養物質に依存することが明らかになっている。特定の骨格筋は、胎仔性運動ニューロンの変性およびその後の自然細胞死を防ぐことにより、運動ニューロンの生存および発達を促進する能力を持つ物質を産生すると報告されている。これらの物質は、広く神経栄養因子 (N T F) と言われる特殊なタンパク質のグループであり、選択された神経細胞集団の生存、成長、維持、および機能的能力を促進する役割を果たす（例えば、Chau, R. M. W., et al., 6 Chin. J Neuroanatomy 129, 1990 を参考）。 30

【0 0 0 4】

中枢および/または末梢神経系に影響を及ぼす様々な神経変性、神経筋および神経の疾患、障害、または状態は、急性または進行性の機能的な神経組織の損失によって、全部または一部を特徴付けることができる。これらには、例えば、脊髄傷害 (S C I)、神経変性疾患、脳卒中または虚血（例えば、脳虚血）、ハンチントン病 (H D)、パーキンソン病 (P D)、多発性硬化症 (M S)、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、アルツハイマー病 (A D)、および糖尿病性神経障害等の状態を含む。 40

【0 0 0 5】

米国特許第 6 3 0 9 8 7 7 号、同第 7 1 8 3 3 7 3 号、同第 6 8 4 1 5 3 1 号、同第 6 7 5 9 3 8 9 号、および同第 2 0 0 6 0 0 5 2 2 9 9 号は、運動ニューロンに栄養作用を発揮する能力を持つ、運動ニューロン栄養因子 (M N T F) と称される特異的な神経栄養因子 (N T F) について報告している。これらの内容は、参照することにより、その全体が本明細書に一体化される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 6】

【特許文献 1】米国特許第 6 3 0 9 8 7 7 号 50

【特許文献2】米国特許第7183373号

【特許文献3】米国特許第6841531号

【特許文献4】米国特許第6759389号

【特許文献5】米国特許出願公開第20060052299号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本明細書には、これらに限定されないが、本発明の概要に規定されるまたは記載されるまたは参照される多くの特質および実施形態を有する技術が記載される。すべてを網羅することは意図されず、特許請求の範囲は、本発明の概要に同定される特性もしくは実施形態に限定されるものではなく、例証目的のためのみに含まれるものであり、制限されるものではない

10

【0008】

したがって、一態様において、本開示は、神経細胞の生存率および増殖を調節するために有用なMNTF分子の一部を含有する、新しいペプチドおよび組成物を対象とし、それにより、中枢および/または末梢神経系における幅広い神経変性、神経筋の疾患、障害、または状態を治療する上で、容易に合成することができ、治療的に有効である可能性がある神経栄養ペプチドを提供する。

【0009】

一態様において、運動ニューロンの欠損および/または神経細胞障害を対象において治療する方法であって、運動ニューロン栄養因子(MNTF)の類似体を、それを必要とする対象に投与するステップを含み、該神経細胞障害は、脊髄傷害、神経変性疾患、脳卒中または脳虚血、ハンチントン病、パーキンソン病、多発性硬化症、ALS、アルツハイマー病、および糖尿病性神経障害から選択され、該運動ニューロン栄養因子(MNTF)の類似体は、該神経細胞障害を治療するための十分な量で投与される方法が提供される。

20

【0010】

一態様において、本開示は、WMLSAFSRYARドメインの一部(WMLSAFS、FSRYAR、および配列番号：1～142の他の領域を含む)を含む合成および/または精製されたMNTFペプチド類似体と、神経細胞の生存率および成長を誘導または調節するために有用な、切断された配列の相同体および類似体を含む、その構造および/またはその機能を模倣する分子とを対象とする。

30

【0011】

特定の実施形態において、MNTFペプチド類似体は、配列番号：1～7および配列番号：8～142を含む配列の類似体を含んでもよい(図25を参照)。

【0012】

LGTFWGDTLN CWMLSAFSRY ARCLAEGHDG PTQ(配列番号：1)

【0013】

FSRYAR(配列番号：2)

【0014】

WMLSAFS(配列番号：3)

40

【0015】

MLSAFSRYAR(配列番号：4)

【0016】

FSRYARCLAE G(配列番号：5)

【0017】

CWMLSAFSRY ARC(配列番号：6)

【0018】

MLS AF S R Y A R CLA E G H D G P T Q(配列番号：7)

【0019】

50

本明細書に記載されるMNTFペプチド類似体は、MNTFに由来する（すなわち配列番号：1に由来する）ポリペプチドおよびかかる派生的なポリペプチドの類似体である。これらの化合物は、配列番号：1～7に記載されるMNTFペプチド類似体の機能的誘導体を含む配列番号：2～7のいずれか等の、配列番号：1～142のうちの1つのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。かかるポリペプチドの塩、エステル、および他の通常の剤形は、本明細書に記載される技術において有用であり、1つ以上のアミノ酸残基が、非自然発生の（例えば、D異性体）アミノ酸残基によって置き換えられたポリペプチドも同様である。本明細書に記載されるように、他の類似体（配列番号：1において開示される残基の保存的な置き換えであるアミノ酸残基を含む）が、これらの残基うちの1つ以上の代わりとして用いられてもよい。

10

【0020】

別の態様においては、細胞増殖を促進するため、もしくは不適切な細胞死を安定化するため、および／またはいずれかの場合において正常な細胞挙動を回復するために、インビトロで細胞培養物に、またはインビボで神経傷害または神経変性疾患に罹患する個体に、MNTFペプチド類似体を投与することにより、神經細胞の生存率および／または成長を調節するための組成物および方法。

【0021】

一態様においては、対象において損傷した神經経路を修復する方法であって、該方法は、運動ニューロン栄養因子（MNTF）の類似体をそれを必要とする対象に投与するステップを含み、上記損傷した神經経路は、脊髄傷害、神經変性疾患、脳卒中または脳虚血、ハンチントン病、パーキンソン病、多発性硬化症、ALS、アルツハイマー病、および糖尿病性神經障害と関連し、上記運動ニューロン栄養因子（MNTF）の類似体は、上記神經細胞障害を治療するために十分な量で投与され、それによって上記対象において損傷した神經経路が修復される方法が提供される。

20

【0022】

一態様においては、神經経路損傷の症状を有する対象において運動機能を向上する方法であって、該方法は、運動ニューロン栄養因子（MNTF）の類似体をそれを必要とする対象に投与するステップを含み、上記損傷した神經経路は、脊髄傷害、神經変性疾患、脳卒中または脳虚血、ハンチントン病、パーキンソン病、多発性硬化症、ALS、アルツハイマー病、および糖尿病性神經障害と関連し、上記運動ニューロン栄養因子（MNTF）の類似体は、上記対象において上記損傷した神經経路を治療するために十分な量で投与され、それによって運動機能が向上される方法が提供される。

30

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】野生型マウスの脳における、例示的なMNTF_{6-mer}ペプチドの類似体（GM6；FSRYAR，配列番号：2）のレベルを示した図である。野生型マウス：ビヒクル対照（生理食塩水）、MNTF_{0.2mg/kg}またはMNTF_{2mg/kg}。図に示す被験物質を時間0で投与し、ELISAによる分析のために4時間後に脳を採取した。

【図2】図2A 一過性虚血の後で、例示的なMNTFペプチド_{6-mer}（FSRYAR，GM602または配列番号：2）がマウスにおける梗塞容積に及ぼす影響を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に24時間の再灌流に供した。虚血終了時に、ビヒクル（対照）またはGM602を1mg/kgまたは5mg/kgで動物の静脈内に投与した。動物は2日目に屠殺し、梗塞容積を決定するために処理した。図2B 虚血／再灌流傷害に供し、続いてGM602または対照の1回用量を静脈注射した2つの脳の画像であって、GM602は、微少のダメージ（白色の領域）（左側：処理した脳の4セクション）を示しており、ビヒクル（右側：対照脳の4セクション）は、脳内における広範囲のダメージを示している。1時間の虚血および24時間の再灌流に供したマウスの脳の代表的な写真である。虚血終了時に、GM602（5mg/kg）またはビヒクルを動物に注射した。

40

【図3】虚血／再灌流傷害に供した動物の脳血流の評価のデータを示した図である。すべ

50

てのマウスは1時間の脳虚血後に24時間の再灌流に供した。虚血終了時に、ビヒクル(対照)またはGM602を1mg/kgまたは5mg/kgで動物の静脈内に投与した。各試験群につき、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)に血流を測定した。

【図4】虚血/再灌流傷害に供したマウスの血圧測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に24時間の再灌流に供した。虚血終了時に、ビヒクル(対照)またはGM602を1mg/kgまたは5mg/kgで動物の静脈内に投与した。各試験群につき、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)に、血圧を測定した。

【図5】虚血/再灌流傷害に供したマウスの心拍測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に24時間の再灌流に供した。虚血終了時に、ビヒクル(対照)またはGM602を1mg/kgまたは5mg/kgで動物の静脈内に投与した。各試験群につき、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)に、心拍数を測定した。

【図6】虚血/再灌流傷害に供したマウスの血液ガス測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に24時間の再灌流に供した。虚血終了時に、ビヒクル(対照)またはGM602を1mg/kgまたは5mg/kgで動物の静脈内に投与した。各試験群につき、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)に血液ガス(pO₂およびpCO₂)を測定した。

【図7】虚血/再灌流傷害に供したマウスのpH測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に24時間の再灌流に供した。虚血終了時に、ビヒクル(対照)またはGM602を1mg/kgまたは5mg/kgで動物の静脈内に投与した。各試験群につき、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)に、pHを測定した。

【図8】虚血/再灌流傷害に供したマウスの神経学的欠損の測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に24時間の再灌流に供した。虚血終了時に、ビヒクル(対照)またはGM602を1mg/kgまたは5mg/kgで動物の静脈内に投与した。再灌流終了時に神経学的欠損を測定した。

【図9】脊髄傷害の後で、例示的なMNTFペプチド類似体GM603(FSRYAR,配列番号:2)がマウスにおける病変の容積に及ぼす影響を示した図である。すべてのマウスを脊椎傷害に供した後、14日間回復させた。傷害後、屠殺まで毎日ビヒクル(対照)およびGM603を動物の静脈内に投与した。動物は14日目に屠殺し、病変の容積を決定するために処理した。

【図10】脊髄傷害(SCI)後の脊髄の損傷領域を示した画像である。すべてのマウスを脊髄傷害に供した後、14日間回復させた。組織切片を切断し、損傷の領域を評価するために処理した。A. SCIでビヒクル処理したマウス、B. 5mg/kgのGM603で処理したマウス損傷領域は赤く着色され、損傷のない領域は青く着色される。図に見られるように、Bの損傷領域は、GM603で処理した動物において有意に小さい。

【図11】脊髄傷害に供した動物に対するロータロッドトレッドミル試験の結果を示した図である。すべてのマウスを脊髄傷害に供した後、図に示す日数を経過させた。傷害後、行動解析を行った。

【図12】脊髄傷害させたマウスにおけるオープンフィールド行動の測定値である。すべてのマウスを脊髄傷害に供した後、図に示す日数を経過させた。傷害後、行動解析を行った。

【図13】例示的なMNTFペプチド類似体GM604(FSRYAR,配列番号:2)が、ALSMマウスにおける疾患の発症年齢に及ぼす影響を示した図である。80日目から屠殺まで毎日、すべてのマウスにビヒクル(対照)またはGM604を静脈内に注射した。動物の疾患発症時期について記録した。

【図14】例示的なMNTFペプチド類似体GM604が、ALSMマウスの死亡年齢に及ぼす影響を示した図である。80日目から屠殺まで毎日、全てのマウスにビヒクル(対照)

10

20

30

40

50

) または G M 6 0 4 を静脈内に注射した。後肢麻痺に基づいて、動物の死亡時期について記録した。

【図 15】A L S 動物のロータロッドトレッドミル試験を示した図である。すべてのマウスに G 9 3 A S O D 変異株の遺伝子を導入し、図に示すように、生理食塩水または例示的な M N T F ペプチド類似体 G M 6 0 4 で処理した。図に示した時間に行動解析を行った。

【図 16】A L S 動物の握力試験を示した図である。すべてのマウスに G 9 3 A S O D 変異株の遺伝子を導入し、図に示すように生理食塩水または G M 6 0 4 で処理した。A L S 動物の臨床スコア。すべてのマウスに G 9 3 A S O D 変異株の遺伝子を導入し、図に示すように生理食塩水または G M 6 0 4 で処理した。方法のセクションに概説されるように、図に示した時間に臨床スコアを測定した。脱力感の兆候なし(0)、振戻および傾斜上での反射の喪失(1)、後肢 1 本の不全麻痺(2)、後肢 2 本の不全麻痺(3)、後肢 1 本または 2 本の麻痺(4)(図 16 B)

【図 17】サルソリノール処理後、例示的な M N T F ペプチド類似体(G B 被験物質)が、S H - S Y 5 Y 神経細胞における細胞生存率に及ぼす影響を示した図である。方法のセクションに概説されるように、すべての培養物は培地で成長させた。培養物は、様々な濃度のビヒクリル(対照)および M N T F ペプチド類似体 G M 6 を用いて、サルソリノール(S a l)有り/無しで培養した。また、作用の機構を決定するために、いくつかの培養物はワートマニン(W)を用いて培養した。化合物を用いて培養物を 24 時間インキュベートし、細胞生存率について分析した。

【図 18】1 次神経細胞の培養物における、C S F による細胞死の誘導を示した図である。12 日間培養した後で、対照および様々な神経障害の C S F を 1 次ラットの神経細胞培養物に 2 日間適用した。図に示す被験物質を時間 0 で投与し、M T T アッセイを用いて細胞生存率について培養物を調べた。

【図 19】C S F 誘導細胞死における、例示的な M N T F ペプチドの神経細胞の喪失に対する保護効果を示した図である。12 日間培養した後で、対照および様々な神経障害の C S F を 1 次ラットの神経細胞培養物に 2 日間適用した。C S F 添加の 2 時間前に M N T F (+ M) を加えた。図に示す被験物質を時間 0 で投与し、M T T アッセイを用いて細胞生存率について培養物を調べた。

【図 20】図 20 A および図 20 B P D 誘導および G M 6 処理後のマウスにおける行動決定を示した図である。行動変化について動物を調べた。

【図 21】図 21 A、図 21 B、図 21 C M P T P 処理後のモノアミンおよび代謝物のレベルを示した図である。雄 C 5 7 B L / 6 マウスに M P T P、続いて G M 6 を、図に示した用量で 5 日間注射した。試験終了時に、モノアミンおよび代謝物のレベルについて動物を評価した。

【図 22】P D 誘導および G M 6 処理したマウスの黒質緻密部における細胞数を示した図である。雄 C 5 7 B L / 6 マウスに M P T P、続いて G M 6 を、図に示した用量で 5 日間注射した。試験終了時に、細胞数について動物を評価した。

【図 23】M S 誘導および G M 6 処理したマウスにおける平均臨床スコアを示した図である。雌 J J L / J マウスに P L P、続いて G M 6 を、図に示した用量で 7 日間注射した。1 日おきに臨床スコアについて動物を評価した。

【図 24】図 24 A、図 24 B、図 24 A M S 誘導および G M 6 処理したマウスの脳内における病変数を示した図である。雌 J J L / J マウスに P L P、続いて G M 6 を、図に示した用量で 7 日間注射した。試験終了時に、脳病変について動物を評価した。24 B . M S 誘導および G M 6 処理したマウスの脊髄における病変数を示した図である。雌 J J L / J マウスに P L P、続いて G M 6 を、図に示した用量で 7 日間注射した。試験終了時に、脊髄病変について動物を評価した。

【図 25】図 25 A、25 B、25 C、25 D、25 E、25 F、および 25 G から構成される図 25 は、例示的な M N T F ペプチド類似体の部分的なリストである。各々の配列番号に対応する配列が示されている。

10

20

30

40

50

【図26】GM602が一過性虚血後のマウスにおける梗塞容積に及ぼす影響の試験データを示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に14日間再灌流を行った。虚血から図に示す時間後(3、6、12、24時間)に、5mg/kgのビヒクル(対照)およびGM602を動物の静脈内に注射した。さらに、障害から3日間毎日動物に注射を行った。動物は14日目に屠殺し、梗塞容積を決定するために処理した。

【図27】虚血/再灌流傷害に供した動物の脳血流の試験データを示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に14日間再灌流を行った。虚血発症から3、6、12、および24時間後に被験物質を投与した。虚血前、虚血後、および再灌流後に血流を測定した。

【図28】虚血/再灌流傷害に供したマウスにおける血圧測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に14日間再灌流を行った。虚血発症から3、6、12、および24時間後に被験物質を投与した。虚血前、虚血中、および虚血終了後に血圧を測定した。10

【図29】虚血/再灌流傷害に供したマウスにおける心拍測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に14日間再灌流を行った。虚血発症から3、6、12、および24時間後に被験物質を投与した。虚血前、虚血中、および虚血終了後に心拍数を測定した。

【図30】図30Aおよび30B 虚血/再灌流傷害に供したマウスにおける血液ガス測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に14日間再灌流を行った。虚血発症から3、6、12、および24時間後に被験物質を投与した。虚血前、虚血中、および虚血終了後に血液ガス pO_2 (30A)および pCO_2 (30B)を測定した。20

【図31】虚血/再灌流傷害に供したマウスにおけるpH測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に14日間再灌流を行った。虚血発症から3、6、12、および24時間後に被験物質を投与した。虚血前、虚血中、および虚血終了後にpHを測定した。

【図32】虚血/再灌流傷害に供したマウスにおける神経学的欠損の測定値を示した図である。すべてのマウスは1時間の脳虚血後に14日間再灌流を行った。虚血発症から3、6、12、および24時間後に被験物質を投与した。再灌流終了時に神経学的欠損を測定した。

【図33】虚血後のラットにおける梗塞容積へのGM602の効果を示した図である。すべてのラットは28日間の永久脳虚血を行った。虚血開始から3時間後、0、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を動物に静脈内投与した。動物は28日目に屠殺して、梗塞容積を決定するために処理した。30

【図34】虚血した動物の脳血流を示した図である。すべてのラットは脳虚血してから28日間回復させた。虚血発症から3時間後、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を、動物の静脈内に注射した。各試験群について、虚血前(第1のカラム、虚血前ベースラインのCBF)、虚血中(第2のカラム、永久虚血の3時間前かつ被験物質の投与前のCBF)、および被験物質の注射後(第3のカラム、被験物質投与から1時間後のCBF)に血流を測定した。

【図35】虚血したラットにおける血圧測定値を示した図である。すべてのラットは永久脳虚血してから28日間回復させた。虚血発症から3時間後、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を、動物の静脈内に注射した。各試験群について、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)に血圧を測定した。40

【図36】虚血したラットにおける心拍測定値を示した図である。すべてのラットは永久脳虚血してから28日間回復させた。虚血発症から3時間後、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を、動物の静脈内に注射した。各試験群について、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)に心拍数を測定した。

【図37】図37Aおよび図37B 虚血したラットにおける血液ガス測定値を示した図50

である。すべてのラットは永久脳虚血してから28日間回復させた。虚血発症から3時間後、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を、動物の静脈内に注射した。各試験群について、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)に、血液ガスpO₂(図37A)およびpCO₂(図37B)を測定した。

【図38】虚血したラットにおけるpH測定値を示した図である。すべてのラットは永久脳虚血してから28日間回復させた。虚血発症から3時間後、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を、動物の静脈内に注射した。各試験群について、虚血前(第1のカラム)、虚血中(第2のカラム)、および被験物質の注射後(第3のカラム)にpHを測定した。

10

【図39】虚血傷害に供したラットにおける神経学的欠損の測定値を示した図である。すべてのラットは永久脳虚血してから28日間回復させた。虚血発症から3時間後、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を、動物の静脈内に注射した。図39A. 前肢留置、図39B. 後肢留置、図39C. 平均台、図39D. 神経学的欠損(自発運動活性)を測定した。図39Dでは、第1の棒は被験物質投与前のスコアであり、第2の棒は被験物質投与から28日後のスコアである。

【図40】虚血性傷害に供したラットにおけるバイオマーカーの測定値を示した図である。すべてのラットは永久脳虚血してから28日間回復させた。虚血発症から3時間後、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を、動物の静脈内に注射した。動物は28日目に屠殺して、TNF免疫組織化学解析のために脳切片を処理した。

20

【図41】虚血性傷害に供したラットにおけるバイオマーカーの測定値を示した図である。すべてのラットは永久脳虚血してから28日間回復させた。虚血発症から3時間後、2.5、10または20mg/kgのビヒクル(対照)またはGM602を、動物の静脈内に注射した。動物は28日目に屠殺して、Fluoro-Jade免疫組織化学解析のために脳切片を処理した。

【発明を実施するための形態】

【0024】

胎仔性運動ニューロンの生存は、関連する発達中の骨格筋に由来する特異的な栄養物質に依存することが明らかになっている。骨格筋は、胎仔性運動ニューロンの変性および続いて起こる自然細胞死を防ぐことにより、運動ニューロンの生存および発達を促進する能力を持つ物質を産生すると報告されている(O'Brian, R.J. and Fischbach, G.D., 6 J. Neurosci. 3265 (1986); Holliday, M. and Hamburger, V., 170 J. Comp. Neurol. 311 (1976). McManaman, J.L., et al., 263 J. Biol. Chem. 5890 (1988); Oppenheim, R.W., et al., 240 Science, 919 (1988); and Smith, R.G., et al., 6 J. Neurosci. 439 (1986))。

30

【0025】

ヒトの運動ニューロン栄養因子(MNTF)は、運動ニューロン損傷部位において炎症を減少させ、神経再生を増進し、運動ニューロンの生存を促進することが明らかになっている骨格筋組織に由来する特異的なNTFである。MNTFは、末梢の坐骨神経(下肢筋肉を制御する)、末梢の筋皮神経(上肢筋肉を制御する)、脳顔面神経(顔面および頭部の筋肉を制御する)、脳舌下神経(舌を制御する)、および首、胸部、および上肢の筋肉を制御する脊髄の一部を含む、様々なラット神経系において試験してきた。脊髄モデルにおいて、MNTFはラットの片側脊髄の神経移植に適用された。MNTFは、炎症を抑え、変性を制限し、移植された神経の再生を増進した。MNTFまたはそのペプチド類似体が神経に直接適用された場合の、栄養および刺激作用のためのラット末梢神経系モデルにおける合成されたMNTFまたはそのペプチド類似体の有効性を、多くの試験が実証している。また、MNTFは運動ニューロンの再生および生存を促進することが明らかになっ

40

50

ている。

【0026】

神経細胞死は、一定期間の成長および発達の間に脊椎動物の神経系で発生する。よって、関連する標的組織からの可溶性のニューロン栄養因子を添加することは、この神経細胞の死という現象を緩和する役割を果たす可能性がある。

【0027】

したがって、本開示の態様および実施形態は、神経細胞障害の治療のための方法およびMNTFペプチド類似体およびその誘導体を含む組成物を提供する。

【0028】

本開示の態様および実施形態は、運動ニューロン栄養因子の作用と関連する機能性タンパク質ドメインMNTF1分子の短い重複配列に同定および位置付けされる。「WMLSAFSRYSR」、「WMLSAFS」、「FSRYSR」および配列番号1～142からの他のドメインを含むこれらのタンパク質ドメインは、神経細胞の生存率および増殖を調節するために十分である。さらに、これらのドメインまたは類似体（配列断片の類似体またはその機能類似体）を包括する切断されたMNTF1種は、それら自体が、運動ニューロン／神経芽細胞腫細胞のハイブリッドにおける刺激生物活性を実証するのに十分である。

10

【0029】

定義

【0030】

20

本開示が関連する技術を説明する文脈において用いられる、特定の用語を規定する。特に指定されない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、以下の用語は以下の意味を持つ。以下または明細書の別の箇所で定義されていない用語は、当該技術分野で認められている意味を持つものとする。

【0031】

本明細書において、「運動ニューロン栄養因子(motoneuronotrophic factor)」または「運動ニューロン栄養因子(motoneuron tropic factor)」は、運動ニューロンの栄養または維持に関する因子を含む。「運動ニューロン刺激因子」、「MNTF」、「MNTFペプチド」、「運動ニューロン栄養因子類似体」、および「MNTF類似体」という用語は、それらが本明細書に定義される機能特性を有する限り、交換可能に使用され得る。これらは、基準MNTF配列の配列および機能的相同意を含んでもよい。運動ニューロン栄養因子は、寄与した神経系の前駆細胞の発達および分化をさらに助成する、または分化した神経系細胞の成長（例えば、神経突起伸長）および生存を誘導または促進する可能性がある。本開示の運動ニューロン栄養因子は、典型的には、CNSまたはPNSの完全に分化した神経系細胞（例えば、運動ニューロン）を生成するための有効量で提供される。量についての指針は本明細書に提供されるが、本明細書に開示される既知の手順および方法に基づいて、当業者により容易に決定されてもよい。

30

【0032】

例示的なMNTFペプチドおよびそのペプチド類似体は、Chau, R.M.W., et al., Muscle Neuronotrophic Factors Specific for Anterior Horn Motoneurons of Rat Spinal Cord. In: Recent Advances in Cellular and Molecular Biology, Vol. 5, Peeters Press, Leuven, Belgium, pp. 89-94 (1992)に報告されるもの、ならびに、例えば、米国第6309877号、同第7183373、同第6841531号、同第6759389号、および同第20060052299号に見られるものを含んでもよい。その内容全体は、参照することにより本明細書に一体化される。特定の実施形態において、例には、神経細胞の生存率および成長を誘導または調節するため有用なWMLSAFSRYSRドメインの一部(WMLSAFS、FSRYSR、およ

40

50

び配列番号1～142の他の領域を含む)と、切断された配列の相同体および類似体を含む、その構造および/またはその機能を模倣する分子とを含む、合成および/または精製されたMNTFペプチド類似体を含んでもよい。

【0033】

また、例示的なMNTFペプチドおよびそのペプチド類似体は、Chau, R.M.W., et al., The Effect of a 30kD Protein from Tectal Extract of Rat on Cultured Retinal Neurons, 34 Science in China, Series B, 908 (1991); Chau, R.M.W., et al., Muscle Neuronotrophic Factors Specific for Anterior Horn Motoneurons of Rat Spinal Cord In: Recent Advances in Cellular and Molecular Biology, Vol. 5, Peeters Press, Leuven, Belgium, pp. 89-94 (1992); Chau, R.M.W., et al., The Effect of a 30kD Protein from Tectal Extract of Rat on Cultured Retinal Neurons, 34 Science in China, Series B, 908 (1991); Chau, R.M.W., et al., Cloning of Genes for Muscle-Derived Motoneuronotrophic Factor 1 (MNTF1) and Its Receptor by Monoclonal Antibody Probes, (abstract) 19 Soc. for Neurosci. part 1, 252 (1993), Chau, R.M.W., et al., Cloning of Genes for Muscle-Derived Motoneuronotrophic Factor 1 (MNTF1) and Its Receptor by Monoclonal Antibody Probes, (abstract) 19 Soc. for Neurosci. part 1, 252 (1993)に記載されるものを含んでもよく、その内容全体は、参照することにより本明細書に一体化される。特定の実施形態において、MNTFまたはその類似体は合成であるかまたは精製される。

【0034】

特定の実施形態において、MNTFペプチド類似体は、MNTFドメインの活性部位の1つ(例えば、配列番号2のような6個のアミノ酸のMNTF類似体)からの配列を含んでもよい。

【0035】

特定の実施形態において、MNTFペプチド類似体は、配列番号1～142を含む配列の類似体を含んでもよい。

【0036】

特定の実施形態において、MNTFペプチド類似体は、配列番号1～142に記載されるペプチド類似体の機能的誘導体を含んでもよい。

【0037】

他の特定の実施形態において、MNTFペプチドの類似体および誘導体は、配列番号1～142に記載される配列から構成されてもよい。

【0038】

本出願で用いられる「類似体」とは、参照される配列における1つ以上のアミノ酸が、MNTFの活性に実質的に影響を及ぼすことなく変更されたペプチドを意味する。特定の実施形態において、本開示に従う類似体は、「保存的」な置換を含む。保存的アミノ酸置換は、十分に類似した物理化学特性を有するために、グループのメンバー間における置換がその分子の生物学的機能を保存する、同じグループの同義アミノ酸とアミノ酸を置き換えることを含む(Grantham, Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974))。

10

20

30

40

50

【0039】

同義アミノ酸基は、表I、II、およびIIIで定義されるものを含む。

【0040】

表I

【0041】

同義アミノ酸の広範囲な基

【0042】

アミノ酸 - 同義の基

【0043】

Ser Ser、Thr、Gly、Asn

10

【0044】

Arg Arg、Gln、Lys、Glu、His

【0045】

Leu Ile、Phe、Tyr、Met、Val、Leu

【0046】

Pro Gly、Ala、Thr、Pro

【0047】

Thr Pro、Ser、Ala、Gly、His、Gln、Thr

【0048】

Ala Gly、Thr、Pro、Ala

20

【0049】

Val Met、Tyr、Phe、Ile、Leu、Val

【0050】

Gly Ala、Thr、Pro、Ser、Gly

【0051】

Ile Met、Tyr、Phe、Val、Leu、Ile

【0052】

Phe Trp、Met、Tyr、Ile、Val、Leu、Phe

【0053】

Tyr Trp、Met、Phe、Ile、Val、Leu、Tyr

30

【0054】

Cys Ser、Thr、Cys

【0055】

His Glu、Lys、Gln、Thr、Arg、His

【0056】

Gln Glu、Lys、Asn、His、Thr、Arg、Gln

【0057】

Asn Gln、Asp、Ser、Asn

【0058】

Lys Glu、Gln、His、Arg、Lys

40

【0059】

Asp Glu、Asn、Asp

【0060】

Glu Asp、Lys、Asn、Gln、His、Arg、Glu

【0061】

Met Phe、Ile、Val、Leu、Met

【0062】

Trp Trp

【0063】

表II

50

【0064】		
同義アミノ酸の中範囲の基		
【0065】		
アミノ酸 - 同義の基		
【0066】		
Ser Ser		
【0067】		
Arg His, Lys, Arg		
【0068】		10
Leu Ile, Phe, Met, Leu		
【0069】		
Pro Ala, Pro		
【0070】		
Thr Thr		
【0071】		
Ala Pro, Ala		
【0072】		
Val Met, Ile, Val		
【0073】		20
Gly Gly **		
【0074】		
Ile Ile, Met, Phe, Val, Leu		
【0075】		
Phe Met, Tyr, Ile, Leu, Phe		
【0076】		
Tyr Phe, Tyr		
【0077】		
Cys Ser, Cys		
【0078】		30
His Arg, Gln, His		
【0079】		
Gln Glu, His, Gln		
【0080】		
Asn Asp, Asn		
【0081】		
Lys Arg, Lys		
【0082】		
Asp Asn, Asp		
【0083】		40
Glu Gln, Glu		
【0084】		
Met Phe, Ile, Val, Leu, Met		
【0085】		
Trp Trp		
【0086】		
表III		
【0087】		
同義アミノ酸の狭範囲の基		
【0088】		50
アミノ酸 - 同義の基		

【0089】		
S e r S e r		
【0090】		
A r g A r g		
【0091】		
L e u I l e 、 M e t 、 L e u		
【0092】		
P r o P r o		
【0093】		
T h r T h r		10
【0094】		
A l a A l a		
【0095】		
V a l V a l		
【0096】		
G l y G l y		
【0097】		
I l e I l e 、 M e t 、 L e u		
【0098】		
P h e P h e		20
【0099】		
T y r T y r		
【0100】		
C y s S e r 、 C y s		
【0101】		
H i s H i s		
【0102】		
G l n G l n		
【0103】		
A s n A s n		30
【0104】		
L y s L y s		
【0105】		
A s p A s p		
【0106】		
G l u G l u		
【0107】		
M e t I l e 、 L e u 、 M e t		
【0108】		
T r p T r p		40
【0109】		

本明細書において提供される化合物に用いられるアミノ酸（例えば、ペプチドおよびタンパク質）は、遺伝的にコードされたアミノ酸、自然発生の非遺伝的にコードされたアミノ酸、または合成のアミノ酸であってもよい。上述したうちのいずれかのLおよびDエナンチオマーの両方が化合物に用いられてもよい。以下の遺伝的にコードされたアミノ酸（およびその残基）には、以下の略語が本明細書において用いられてもよい。アラニン（A l a、A）、アルギニン（A r g、R）、アスパラギン（A s n、N）、アスパラギン酸（A s p、D）、システイン（C y s、C）、グリシン（G l y、G）、グルタミン酸（G l u、E）、グルタミン（G l n、Q）、ヒスチジン（H i s、H）、イソロイシン（I l e、I）、ロイシン（L e u、L）、リジン（L y s、K）、メチオニン（M e t、M）

)、フェニルアラニン(Ph e、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)、およびバリン(Val、V)。

【0110】

遺伝的にコードされておらず、本明細書に記載する化合物に存在してもよい一般的に遭遇するアミノ酸には、β-アラニン(b-Ala)および3-アミノプロピオン酸(Dap)、2,3-ジアミノプロピオン酸(Dpr、Z)、4-アミノ酪酸等のその他のα-アミノ酸、β-アミノイソ酪酸(Aib)、γ-アミノヘキサン酸(Aha)、γ-アミノ吉草酸(Ava)、メチルグリシン(Megly)、オルニチン(Oorn)、シトルリン(Cit)、t-ブチルアラニン(t-BuA)、t-ブチルグリシン(t-BuG)、N-メチルイソロイシン(MeIle)、フェニルグリシン(Phg)、シクロヘキシリジン(Cha)、ノルロイシン(Nle、J)、2-ナフチルアラニン(2-Nal)、4-クロロフェニルアラニン(Ph e(4-C1))、2-フルオロフェニルアラニン(Ph e(2-F))、3-フルオロフェニルアラニン(Ph e(3-F))、4-フルオロフェニルアラニン(Ph e(4-F))、ペニシラミン(Pen)、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸(Tic)、β-2-チエニルアラニン(Thi)、メチオニンスルホキシド(MSO)、ホモアルギニン(hArg)、N-アセチルリジン(AcLys)、2,3-ジアミノ酪酸(Dab)、2,3-ジアミノ酪酸(Dbu)、p-アミノフェニルアラニン(Ph e(pNH2))、N-メチルバリン(MeVal)、ホモシステイン(hCys)、3-ベンゾチアゾール-2-イル-アラニン(BztAla、B)、およびホモセリン(hSer)を含むが、これらに限定されない。企図されるさらなるアミノ酸類似体には、リン酸化セリン、リン酸化スレオニン、リン酸化チロシン、ヒドロキシプロリン、β-カルボキシグルタミン酸、馬尿酸、オクタヒドロインドール-2カルボン酸、スタチン、β-メチル-アラニン、パラ-ベンゾイル-フェニルアラニン、プロパルギルグリシン、およびサルコシンを含む。本明細書に記載されるペプチドは、L型またはD型構成の上記アミノ酸のうちのいずれか、あるいは本明細書に記載されるまたは現在もしくは未来において当該技術分野で既知である、他のいずれのアミノ酸を有してもよい。

【0111】

互いに置換可能なアミノ酸は、通常、類似するクラスまたはサブクラス内に属する。当業者には既知であるように、アミノ酸は、主にアミノ酸側鎖の化学的および物理的特性に依存して、異なるクラスに分類することができる。例えば、アミノ酸の中には、通常、親水性または極性アミノ酸であると考えられるものがある一方で、疎水性または非極性アミノ酸であると考えられるものもある。極性アミノ酸には、酸性、塩基性、または親水性の側鎖を有するアミノ酸を含み、非極性アミノ酸には、芳香族または疎水性の側鎖を有するアミノ酸を含む。非極性アミノ酸は、特に、脂肪族アミノ酸を含むようにさらに細分化されてもよい。本明細書において用いられるアミノ酸のクラスの定義は以下の通りである。

【0112】

「非極性アミノ酸」とは、生理的pHでは電荷を帯びず、極性ではなく、通常は水溶液に忌避される側鎖を有するアミノ酸を言う。遺伝的にコードされた疎水性アミノ酸の例には、Ala、Ile、Leu、Met、Trp、TyrおよびValを含む。非遺伝的にコードされた非極性アミノ酸の例にはt-BuA、ChaおよびNleを含む。

【0113】

「芳香族アミノ酸」とは、共役電子系を有する少なくとも1つの環(芳香族基)を含有する側鎖を有する非極性アミノ酸を言う。芳香族基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシル、スルホニル、ニトロ、およびアミノ基等の置換基、またその他の置換基でさらに置換されてもよい。遺伝的にコードされた芳香族アミノ酸の例には、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンを含む。一般的に遭遇する非遺伝的にコードされた芳香族アミノ酸には、フェニルグリシン、2-ナフチルアラニン、β-2-チエニルアラニン、3-ベンゾチアゾール-2-イル-アラニン、1,2,3,4-テトラヒドロ

イソキノリン - 3 - カルボン酸、4 - クロロフェニルアラニン、2 - フルオロフェニルアラニン、3 - フルオロフェニルアラニンおよび4 - フルオロフェニルアラニンを含む。

【0114】

「脂肪族アミノ酸」とは、飽和または不飽和の直鎖、分岐鎖、または環状炭化水素の側鎖を有する非極性アミノ酸を言う。遺伝的にコードされた脂肪族アミノ酸の例には、A1a、Leu、ValおよびIleを含む。コードされていない脂肪族アミノ酸の例にはNleを含む。

【0115】

「極性アミノ酸」とは、生理的pHでは電荷を帯びるかまたは電荷を帯びず、2つの原子によって共有される1対の電子が、その原子のうちの1つにより密接に保持される結合を有する側鎖を有する親水性アミノ酸を言う。極性アミノ酸は一般に親水性であり、つまりは水溶液に引き付けられる側鎖を有するアミノ酸を有する。遺伝的にコードされた極性アミノ酸の例には、アスパラギン、システイン、グルタミン、リジンおよびセリンを含む。非遺伝的にコードされた極性アミノ酸の例には、シトルリン、ホモシステイン、N - アセチルリジン、およびメチオニンスルホキシドを含む。

10

【0116】

「酸性アミノ酸」とは、pK値7未満の側鎖を有する親水性アミノ酸を言う。酸性アミノ酸は、典型的には、水素イオンの損失のために、生理的pHでは負電荷を帯びる側鎖を有する。遺伝的にコードされた酸性アミノ酸の例には、アスパラギン酸(アスバルテート)およびグルタミン酸(グルタメート)を含む。

20

【0117】

「塩基性アミノ酸」とは、pK値7を上回る側鎖を有する親水性アミノ酸を言う。塩基性アミノ酸は、水素イオンの会合のために、生理的pHでは正電荷を帯びる側鎖を有する。遺伝的にコードされた塩基性アミノ酸の例には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンを含む。非遺伝的にコードされた塩基性アミノ酸の例には、オルニチン、2,3 - ジアミノプロピオン酸、2,4 - ジアミノ酪酸、およびホモアルギニンを含む。

【0118】

「イオン化可能なアミノ酸」とは、生理的pHで電荷を帯びることができるアミノ酸を言う。かかるイオン化可能なアミノ酸は、例えば、D - アスパラギン酸、D - グルタミン酸、D - ヒスチジン、D - アルギニン、D - リジン、D - ヒドロキシリジン、D - オルニチン、L - アスパラギン酸、L - グルタミン酸、L - ヒスチジン、L - アルギニン、L - リジン、L - ヒドロキシリジン、またはL - オルニチン等の酸性および塩基性アミノ酸を含む。

30

【0119】

当業者には理解されるように、上記分類は絶対的なものではない。アミノ酸の中には、1つより多くの特徴的な特性を示すために、1つより多くのカテゴリーに含まれてもよいものもある。例えば、チロシンは、非極性芳香族環および極性ヒドロキシル基の両方を有する。よって、チロシンは、非極性、芳香族、および極性と称することのできるいくつかの特徴を有する。しかしながら、非極性の環が優性であるために、チロシンは一般的に非極性であると考えられている。同様に、ジスルフィド結合を形成することができることに加えて、システインも非極性の特徴を有する。よって、疎水性または非極性アミノ酸として厳密には分類されないものの、多くの場合、ペプチドに疎水性または非極性を与えるためにシステインを用いることができる。

40

【0120】

ある実施形態では、本明細書において企図される極性アミノ酸は、例えば、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、ホモシステイン、リジン、ヒドロキシリジン、オルニチン、セリン、スレオニン、および構造的に関連するアミノ酸を含んでもよい。一実施形態において、極性アミノ酸は、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、ヒドロキシリジン、リジン、またはオルニチン等のイオン化可能なアミノ酸である。

50

【0121】

用いることのできる極性または非極性アミノ酸残基の例には、例えば、アラニン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン等を含む。

【0122】

本明細書において「塩」という用語は、カルボキシル基の塩および本明細書に記載されるペプチドおよびその類似体のアミノ基の酸付加塩の両方を言う。カルボキシル基の塩は、当該技術分野で既知である手段を用いて形成されてもよく、例えば、ナトリウム、カルシウム、アンモニウム、第二鉄または亜鉛塩等の無機塩、および、例えば、トリエタノールアミン、アルギニンまたはリジン、ピペリジン、プロカイン等のアミンで形成される有機塩基を有する塩を含んでもよい。酸性塩には、例えば塩酸または硫酸等の鉱酸を含む塩、および、例えば酢酸またはシュウ酸等の、有機酸を有する塩を含む。当然ながら、いずれのかかる塩も、本明細書に開示されるペプチドまたはそれらの類似体と実質的に同様の活性を持たなければならない。10

【0123】

本明細書で用いられる「機能的誘導体」の定義は、アミノ酸部分の側鎖またはNもしくはC基の末端に存在する官能基から、既知の方法に従って調製することができ、それらが医薬的に許容される場合、すなわちタンパク質活性を破壊しない、またはそれらを含有する医薬組成物に毒性を与えない場合に、本開示に含まれる誘導体を言う。かかる誘導体は、例えば、カルボキシル基のエステルもしくは脂肪族アミド、および遊離アミノ基のN-アシル誘導体または遊離ヒドロキシル基のO-アシル誘導体を含んでもよく、例えば、アルカノイル基またはアロイル基等のアシル基で形成される。20

【0124】

本明細書で開示される「前駆体」とは、ヒトまたは動物の体内でペプチドに変換される化合物である。

【0125】

本開示のペプチドは、固相合成または液相合成等、当該技術分野で周知であるいずれの手順によっても調製することができる。固相合成としては、例えば、合成されるべきペプチドのC末端に対応するアミノ酸は、有機溶媒に不溶性である支持部に結合され、交互に繰り返す反応により、適切な保護基で保護された-N-アミノ基および側鎖官能基を有するアミノ酸がC末端からN末端の順序で1つずつ濃縮されて、樹脂またはペプチドの-N-アミノ基の保護基に結合したアミノ酸が放出される、という様式でペプチド鎖が拡張される。固相合成法は、使用される保護基の種類に依存して、t B o c 法とF m o c により大きく分類される。30

【0126】

典型的に使用される保護基には、アミノ基としてt B o c (t-ブトキシカルボニル)、C 1 - Z (2-クロロベンジルオキシカルボニル)、B r - Z (2-ブロモベンジルオキシカルボニル)、B z 1 (ベンジル)、F m o c (9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)、M b h (4, 4'-ジメトキシジベンズヒドリル)、M t r (4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル)、T r t (トリチル)、T o s (トシリル)、Z (ベンジルオキシカルボニル)およびC 1 2 - B z 1 (2, 6-ジクロロベンジル)、グアニジノ基としてN O 2 (ニトロ)およびP m c (2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル)、ヒドロキシル基としてt B u (t-ブチル)を含む。40

【0127】

所望のペプチドは合成された後、脱保護反応に供され、固体支持部より切り取られる。かかるペプチド切断反応は、B o c 法にはフッ化水素またはトリフルオロメタンスルホン酸を用いて行われてもよく、F m o c 法にはT F A を用いて行われてもよい。

【0128】

得られた粗ペプチドは、その後に精製される。精製は、本目的のために既知であるいずれの方法を用いて、すなわち、抽出、沈殿、クロマトグラフィー、電気泳動等を伴う任意の50

従来手順によって行われる。例えば、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）が用いられてもよい。溶出は、タンパク質精製に一般的に利用される水 - アセトニトリル系溶媒を用いて行われてもよい。

【0129】

本明細書に記載されるペプチドは、MNTF活性および／またはそれによる調節を必要とする病態において、有効成分として医薬組成物中で使用するために適切であるように、実質的に精製された形態で提供されてもよい。

【0130】

本明細書で用いられる「生物学的に活性なペプチド」および「生物学的に活性な断片」という用語は、運動ニューロン分化因子（MND F）および／または運動ニューロン栄養因子（MNT F）の上記説明に従うペプチドまたはポリペプチドを言い、MND Fは幹細胞を運動ニューロンおよびMNT Fに分化し、MNT Fは神経の保護、修復、および治療的機能を示す。10

【0131】

「相補的」という用語は、例えば、許容的な塩および温度条件下における、塩基対形成によるポリヌクレオチドの天然結合を言う。例えば、配列「A - G - T」は、相補的な配列「T - C - A」に結合する。2本の単鎖分子間の相補性は、核酸のうちのいくつかのみが結合するように「部分的」であってもよく、または単鎖分子間に全面的な相補性が存在するように「完全」であってもよい。核酸分子間の相補性の程度は、それらの間のハイブリダイゼーションの効率および強度に有意な影響を及ぼす。「ハイブリダイズ可能な」および「相補的」という用語は、意図する作用を行うために十分に安定した結合等が、例えば、核酸の間で起こるために、十分な程度の相補性を指して用いられる。オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズされるべきその標的核酸配列に100%相補的である必要はないことを理解されたい。20

【0132】

「組成物」という用語は、1つ以上の成分を含む生成物を包含することが意図される。

【0133】

「分化した」という用語は、比較される細胞よりも発達の経路をさらに進んだ細胞である「分化細胞」の関連語である。本明細書でさらに用いられる「分化した神経細胞」とは、一般に、中枢神経系（CNS）または末梢神経系（PNS）の部分的に分化したまたは完全に分化した細胞を言う。前駆体細胞は、発達および分化の最中に、一連の細胞分裂により異なる細胞系列を発生させる親細胞である。神経前駆体細胞は、例えば、最終的にはCNSまたはPNSの完全に分化した神経細胞へと発達する細胞系列に寄与されるが、かかる神経前駆体細胞は、神経細胞の特定の種類またはサブクラスに未だ付されていない場合がある。神経前駆体細胞は、特定の種類の神経細胞へと分化する細胞株に寄与し、その後、完全に分化した神経細胞を発生させる可能性がある。したがって、本明細書に記載される部分的に分化した神経細胞は、方向性もしくは位置性の特徴を獲得した、または特定のクラスの神経細胞へと発達することが寄与されている、神経の同一性を有する細胞であってもよいが、完全に分化した神経細胞ではない。例えば、単独でまたはRA等のモルフォゲンと組み合わせて、MNT FペプチドでES細胞を処理することにより、本明細書に記載される部分的に分化した神経細胞または神経前駆体細胞を発生させることができる。30

【0134】

「障害」とは、本明細書に記載される分子または組成物を用いた治療の恩恵を受ける任意の状態である。これには、該当する疾患に哺乳類を罹患させる病理学的な状態等の、慢性および急性の障害または疾患を含む。

【0135】

「支持細胞」または「フィーダー」は、通常、2番目の種類の細胞が成長できる環境を提供するために、他の種類の細胞と共に培養した1種類の細胞を含む。例えば、特定の種類のpPS細胞は、1次マウスの胚線維芽細胞、固定マウス胚線維芽細胞、またはhES細胞から分化したヒト線維芽細胞様細胞によって支持されても良い。40

【0136】

「機能的均等物」とは、例えば、M L S A F S R Y A R ドメイン、および保存された相同性の6-mer（例えば、配列番号：2）、7-mer、8-mer、9-mer、または10-merの生物学的活性と、実質的に同様の生物学的活性を有するペプチドおよびその誘導体を意味する。それには、かかる活性または特徴を有する「断片」、「変異体」、「類似体」、「相同体」、または「化学的誘導体」を含む。M L S A F S R Y A R ドメインおよび上記その他の機能的均等物は、同一のアミノ酸配列を共有してもまたは共有しなくてもよく、従来型または非従来型のアミノ酸の保存的または非保存的アミノ酸置換が可能である。

【0137】

10

本明細書で用いられる「M L S A F S R Y A R、W M L S A F S、およびF S R Y A R ドメイン」という用語は、幹細胞が運動ニューロン、およびペプチド、および/またはその構造および/または機能を模倣する分子に分化するために十分であることが本明細書において実証される、ポリペプチドドメインを指す。さらなるドメインは、配列番号：1～142に示す通りである。

【0138】

特定の態様において、配列番号：1～142のうちのいずれかのアミノ酸を含むペプチドおよびその機能的均等物が提供される。

【0139】

20

「遺伝子産物」という用語は、遺伝子から転写されるRNA分子、またはその分子によってコードされるもしくはそのRNAから翻訳される、ポリペプチドを言う。

【0140】

「成長環境」とは、該当する細胞が、適切な条件下においてインビトロで増殖、分化、または成熟できる環境である。かかる条件には、例えば、細胞が培養される培地、存在することが可能ないずれの成長因子または分化誘導因子、および固体表面または支持構造を含んでもよい。

【0141】

本明細書でその様々な形態において用いられる「調節因子」および「調節」という用語は、具体的な標的の発現または作用または活性の全部または一部の、上方制御または抑制を包括することが意図される。

30

【0142】

本開示の目的のために、「神経前駆体細胞(neural progenitor cell)」または「神経前駆体細胞(neural precursor cell)」という用語は、神経細胞（例えば、神経細胞前駆体または成熟ニューロン）またはグリア細胞（例えば、グリア前駆体、成熟アストロサイト、または成熟オリゴデンドロサイト）のいずれかである子孫を產生することができる細胞を含む。細胞は、典型的には、細胞系列の特徴を示すいくつかの表現型マーカーを発現し、インビトロにおいて単独で培養される場合、通常は他の胎仔性胚葉層の子孫は生成しない。

【0143】

40

「神経前駆体細胞(neural progenitor cell)」または「神経前駆体細胞(neural precursor cell)」は、成熟ニューロンであり、時にはグリア細胞を產生する能力を有する子孫を產生することができる細胞を含む。

【0144】

「多能性神経前駆体細胞集団」には、神経細胞である子孫およびグリア細胞である子孫の両方、ならびに時として他の種類の細胞を產生する能力を有する細胞集団を含む。多能性神経前駆体である個々の細胞が存在してもよいが、この用語は、集団内の個々の細胞が両方の種類の子孫を形成する能力を有することを必要としない。

【0145】

「ペプチド模倣物」および「模倣物」という用語は、それらが模倣するタンパク質領域と実質的に同じ構造および機能的特長を有する、自然発生および合成による化学化合物を含

50

む。

【0146】

鑄型ペプチドの特性と相似する特性を有するペプチド類似体は、非ペプチド薬剤であってもよい。ペプチド系化合物を含む「ペプチド模倣物（peptide mimetics）」または「ペプチド模倣物（peptidomimetics）」は、かかる非ペプチド系化合物も含む（Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber and Freidinger; TINS; 392 (1985); and Evans et al., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987); Beeley N., Trends Biotechnol. Jun; 12 (6) : 213 - 6 (1994); Kieber-Emmons T, et al.; Curr Opin Biotechnol. Aug; 8 (4) : 435 - 41 (1997)）。治療的に有用なペプチドと構造的に類似するペプチド模倣物は、均等物または強化された治療効果もしくは予防効果を產生するために用いられてもよい。一般にペプチド模倣物は、パラダイムポリペプチド（すなわち、生物学的または薬理学的な機能または活性を有するポリペプチド）と構造的に同一または同様であるが、例えば、-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH-（シスおよびトランス）、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-、および-CH₂SO-からなる群から選択される結合によって任意選択的に置き換えられる、1つ以上のペプチド結合を有してもよい。模倣物は、天然のアミノ酸もしくはアミノ酸の非天然類似体のいずれかから全体的に構成されていてもよいか、または部分的に天然であるペプチドアミノ酸およびアミノ酸の部分的に非天然である類似体のキメラ分子である。また、かかる置換が実質的に模倣活性を改変しない限り、模倣物は任意の量の天然アミノ酸を保存する置換を含んでもよい。10

【0147】

本明細書で用いられる「防ぐ」とは、全体的または部分的に防ぐこと、または寛解させることもしくは制御することを意味する。

【0148】

本明細書で用いられる「治療する」とは、治療的処置および予防または防止手段の両方を言う。治療を必要とする対象は、既に障害を持つ対象、および障害に罹患し易い対象または障害があると診断された対象または障害が防がれるべき対象を含む。20

【0149】

本明細書に記載される化合物または組成物に関して本明細書で用いられる「有効量」とは、所望の生物学的、医薬的、または治療的な結果を導くために十分な量を言う。上記結果は、疾患もしくは障害もしくは状態の兆候、症状、もしくは原因の軽減、または生物系の他のいずれの所望の変更であってもよい。30

【0150】

本明細書において、「同時に」は、MNTF組成物が1つ以上の治療剤と同時に投与されることを意味するために用いられるのに対し、「併用して」は、同時ではない場合または物理的な組み合わせではない場合に、両方の物質が治療的に作用することが可能な時間枠内に「経時的に」投与されることを意味して用いられる。よって、MNTFおよび1つ以上の別の薬剤の両方が有効量で同時に存在する限りは、「経時的」投与は、1つの薬剤の投与後、他方の薬剤が数分（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30分）以内、または数時間、数日、数週もしくは数ヶ月以内に投与されることを容認する可能性がある。成分の正確な性質、化合物間の相互作用、およびそれぞれの半減期に依存して、化合物の投与間の時間遅延は異なる。40

【0151】

本明細書で用いられる「ペプチド類似体」という用語は、鑄型ペプチドの特性と相似する特性を有し、非ペプチド薬剤であってもよい、化合物を指す。ペプチド系化合物を含む「ペプチド模倣物（peptide mimetics）」または「ペプチド模倣物（peptidomimetics）」も、ペプチド類似体等のかかる非ペプチド系化合物を含む。治療的に有用なペプチドと構造的に類似するペプチド模倣物は、均等物または強化さ50

れた治療効果もしくは予防効果を產生するために用いることができる。一般にペプチド模倣物は、パラダイムポリペプチド（すなわち、生物学的または薬理学的な機能または活性を有するポリペプチド）の構造的または機能的な模倣物（例えば、同一または同様）であるが、例えば、-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH-（シスおよびトランス）、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-、および-CH₂SO-からなる群から選択される結合によって任意選択的に置き換えられる、1つ以上のペプチド結合を有してもよい。模倣物は、天然のアミノ酸、合成の化学化合物、アミノ酸の非天然類似体のいずれかから全体的に構成されてもよいか、または部分的に天然であるペプチドアミノ酸およびアミノ酸の部分的に非天然である類似体のキメラ分子である。また、かかる置換が実質的に模倣物の活性を改変しない限り、模倣物は任意の量の天然アミノ酸の保存的置換を含んでもよい。

10

【0152】

本明細書で用いられる「タンパク質」という用語は、1つのアミノ酸（またはアミノ酸残基）の炭素に結合したカルボン酸基のカルボキシル炭素原子が、隣接するアミノ酸の炭素に結合するアミノ基のアミノ窒素原子に共有結合的に結合すると発生する、ペプチド結合を介して連結した2つ以上の別個のアミノ酸（自然発生であってもなくても）の任意のポリマーを言う。これらのペプチドの連結部分およびそれらを構成する原子（すなわち、炭素原子、カルボキシル炭素原子（およびそれらの置換基の酸素原子）およびアミノ窒素原子（およびそれらの置換基の窒素原子））は、タンパク質の「ポリペプチド主鎖」を形成する。また、本明細書で用いられる「タンパク質」という用語は、「ポリペプチド」および「ペプチド」（本明細書において、時に交換可能に用いられてもよい）という用語を含むことを理解されたい。同様に、タンパク質の断片、類似体、誘導体、および変異体は、本明細書において「タンパク質」と称されてもよく、特に記載されない限り、「タンパク質」として見なされるものとする。タンパク質の「断片」という用語は、タンパク質のすべてのアミノ酸残基よりも少ない残基を含むポリペプチドを言う。タンパク質の「ドメイン」も断片であり、活性または機能を与えることを要求されるタンパク質のアミノ酸残基を含む。

20

【0153】

「パーセント（%）同一性」というフレーズは、2つ以上の配列を比較した際に見られる配列の類似性の割合を指す。パーセント同一性は、例えば、いずれの好適なソフトウェアを用いて、電子的に決定されてもよい。同様に、2つの配列（またはそれらのいずれかもしくは両方の1つ以上の部分）の間の「類似性」は、1つの配列を2番目の配列と比較することにより決定される。

30

【0154】

「医薬的に許容される」化合物および組成物または製剤のその他の成分（例えば、担体、希釈剤、または賦形剤）は、その受け手への投与に好適な成分である。

【0155】

「ストリンジエントな条件」という用語は、該当するMNTFペプチドをコードするポリヌクレオチド間のハイブリダイゼーションを可能にする条件を指す。ストリンジエントな条件は、塩濃度、有機溶媒（例えば、ホルムアミド）の濃度、温度、および当該技術分野で周知であるその他の条件によって定義することができる。ストリンジエンシーは、塩濃度を低下させること、有機溶媒（例えば、ホルムアミド）の濃度を上昇させること、およびハイブリダイゼーション温度を上昇させることによって高めることができる。例えば、ストリンジエントな塩濃度は、通常は、約500mMのNaClおよび50mMクエン酸三ナトリウム未満のように約750mMのNaClおよび75mMクエン酸三ナトリウム未満であり、約250mMのNaClおよび25mMクエン酸三ナトリウム未満であってもよい。低ストリンジエンシーのハイブリダイゼーションは、例えば、ホルムアミド等の有機溶媒の不在下において達成することが可能である一方、高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーションは、有機溶媒（例えば、少なくとも約50%ホルムアミド等、少なくとも約35%のホルムアミド）の存在下において達成することが可能である。ストリンジ

40

50

エントな温度条件は、通常、少なくとも約30°、少なくとも約37°、または少なくとも約42°の温度を含む。さらなる様々なパラメータ、例えば、ハイブリダイゼーションの時間、活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS））の濃度、および担体DNAの組み入れまたは除外は、当業者には周知である。様々なレベルのストリンジエンシーは、これらの様々な条件を必要に応じて組み合わせることにより達成され、当該技術分野の範囲内である。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、約5°～約20°の範囲または標的配列の融解温度（Tm）を25°下回る温度条件、および標的に正確にまたはほぼ正確な相補性を示すプローブによっても定義することができる。本明細書で用いられる融解温度とは、二本鎖核酸分子の集団が半分解離して一本鎖になる温度である。核酸のTmを計算するための方法は当該技術分野において既知である（例えば、Berg 10 and Kimmell, Methods In Enzymology, Vol. 152: Guide To Molecular Cloning Techniques, San Diego (1987) : Academic Press, Inc. and Sambrook et al., Molecular Cloning (1989) : A Laboratory Manual, 2nd Ed., Vols. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratoryを参照）。標準的な参考資料に示されるように、核酸が1M NaClで水溶液中にある場合、方程式 $T_m = 81.5 + 0.41(\%G + C)$ を用いて、Tm値の単純推定が計算されてもよい（例えば、Anderson and Young, "Quantitative Filter Hybridization" in Nucleic Acid Hybridization (1985) を参照）。ハイブリッドの融解温度（つまりはストリンジエントなハイブリッドの条件）は、プローブの長さや性質（DNA、RNA、塩基組成）および標的の性質（DNA、RNA、塩基組成、溶液中の存在、または固定化等）、ならびに塩および他の成分の濃度（例えば、ホルムアミド、デキストラン硫酸、ポリエチレングリコールの有無）等の様々な要因に影響される。これらの要因の影響は当該技術分野では既知であり、当該分野における標準的な参考資料に記載されている。例えば、Sambrook, supra, and Ausubel, supraを参照。典型的には、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、約1.0Mナトリウムイオン、典型的には約0.01～1.0Mナトリウムイオン（pH 7.0～8.3）の塩濃度、および短いプローブ（例えば、10～50個のヌクレオチド）には少なくとも約30°、長いプローブ（50個を上回るヌクレオチド）には少なくとも約60°の温度である。記載したように、ストリンジエントな条件は、低めの温度が用いられる場合には、ホルムアミド等の脱安定化剤（desstabiliizing agents）の添加により達成することができる。本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチドは、摂氏約50～60°で0.03M塩化ナトリウムおよび0.03Mクエン酸ナトリウム等の、中程度から高度のストリンジエンシーの条件下において、標的mRNAにハイブリダイズするポリヌクレオチドであってよい。

【0156】

本明細書で用いられる「対象」とは、イヌ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウシ等のヒト、家畜および農場で飼育される動物、および動物園、スポーツ用、またはペットの動物を含む、哺乳類として分類される任意の動物を言う。対象はヒトである可能性もある。

【0157】

「治療的な有効量」という用語は、例えば、研究者、獣医、医学博士、または他の臨床医により求められる、例えば、組織、系、動物または人間の生物学的もしくは医学的応答等、所望の応答を導く対象化合物の量を意味する。

【0158】

「治療」とは、治療上の処置および予防または防止手段の両方を言う。治療を必要とする対象は、既に障害を持つ対象、および、障害が防がるべき対象を含む。

【0159】

「ベクター」という用語は、プラスミド、ファージ、またはウイルスが、細菌、酵母、無脊椎動物、および／または哺乳類の宿主細胞とともに機能的となる細胞に核酸を送達する

10

20

30

40

50

ために、プラスミド、ファージ、ウイルス、またはその他の系（自然発生または合成）の形態をとる核酸分子の増殖、複製、およびまたは発現ビヒクルを言う。ベクターは、宿主細胞のゲノムDNAから独立した状態であってもよいか、またはゲノムDNAと全体的もしくは部分的に統合していてもよい。ベクターは、必ずではないが一般的には、適合するいずれの宿主細胞においても機能的であるようにすべての必要な要素を含有する。「発現ベクター」は、適切な条件下において、外来性のポリヌクレオチド（例えば、結合ドメイン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド）の発現を導くことができるベクターである。

【0160】

本明細書に記載される「相同性（homology）および相同体（homologues）」という用語は、該当するタンパク質配列に対してアミノ酸配列の相同体を有するペプチドであってもよい。かかるペプチドは、典型的には少なくとも約70%の相同性を有し、例えば、該相同配列の少なくとも約15、20、30、40、50、100個のより近接したアミノ酸／ポリペプチドの領域上で、関連する配列と少なくとも約80%、90%、95%、97%または99%相同性であってもよい。

10

【0161】

相同性は、当該技術分野における任意の方法に基づいて計算することができる。例えば、相同性を計算するために用いることができるUWGCG Packageは、BESTFITプログラムを提供する（例えば、そのデフォルト設定で用いられる）（Devereux et al., Nucleic Acids Research 12, p387-395 (1984)）。PILEUPおよびBLASTアルゴリズムは、相同性または整列した配列を計算するために用いることができる（典型的には、それらのデフォルト設定で）。例えば、Altschul S. F. ; J Mol Evol 36:290-300 (1993) ; Altschul, S. F. et al. ; J Mol Biol 215:403-10 (1990) に記載される。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）から公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列において同じ長さのワードと整列した時に、ある正の数の閾値スコアTと一致するかまたはそれを満足させるかのいずれかである、問い合わせ配列にある長さWの短いワードを同定することにより、高いスコアの配列対を最初に同定することに関与する。Tは隣接ワードスコア閾値（neighborhood word score threshold）と称される（Altschul et al. , supra）。これらの初期の隣接ワードのヒットは、それらを含有するHSPを見つけ出すために検索を初期化するためのシードとしての役割を果たす。ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加することが可能な限り、各配列に沿って両方向に拡張される。各方向におけるワードヒットの拡張は、以下の場合に停止される：累積アラインメントスコアが、その最高到達値から量Xの分だけ低下する場合、1つ以上の負のスコアを持つ残基アラインメントの累積により、累積スコアが0またはそれ以下となる場合、またはいずれかの配列の末端に到達する場合。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTプログラムは、11のワード長（W）、50のBLOSUM62スコアリングマトリクス（Henikoff and Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 (1992) を参照）アラインメント（B）、10の期待値（E）、M = 5、N = 4、および両方の鎖の比較を、デフォルトとして用いる。

20

【0162】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計解析を行う（例えば、Karl in and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993) を参照）。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小合計確率（P(N)）であり、これにより、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間の一一致が偶然に起こる確率の指標が提供される。例

30

40

50

えば、第1の配列の比較における最小合計確率が約1未満である場合に、配列はもう1つの配列に類似すると見なされ、また配列は、約0.1、0.01、または0.001未満であってもよい。

【0163】

相同性の配列は、典型的には、少なくとも（または多くとも）約1、2、5、10、15、20またはそれ以上の突然変異（置換、消失、または挿入であってもよい）により、関連する配列とは異なる。これらの突然変異は、相同性の計算と関連して、上述したいずれの領域を横断して測定されてもよい。相同配列は、典型的には、バックグラウンドを有意に上回るレベルで元の配列に選択的にハイブリダイズする選択的ハイブリダイゼーションは、典型的には、中程度から高度のストリンジエンシー（例えば、約50～約60で¹⁰、0.03M塩化ナトリウムおよび0.03Mクエン酸ナトリウム）の条件を用いて達成される。しかしながら、かかるハイブリダイゼーションは、当該技術分野で既知であるいずれの好適な条件下で実行されてもよい（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989)を参照）。例えば、高いストリンジエンシーを必要とする場合、好適な条件は60で0.2×SSCを含む。低いストリンジエンシーを必要とする場合、好適な条件は60で2×SSCを含む。

【0164】

「組換え」という用語は、合成されたか、もしくは別様にインビトロで操作されたポリヌクレオチド（例えば「組換えポリヌクレオチド」）、細胞もしくは他の生物系で遺伝子産物を生成するために組換えポリヌクレオチドを用いる方法、または組換えポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド（「組換えタンパク質」）を言う。そのため、「組換えポリヌクレオチド」は、その生成方法またはその構造のいずれかによって定義される。その生成方法に関連して、該プロセスは、例えば、ヌクレオチド配列における人的介入、典型的には選択または生成を伴う、組換え核酸技術の使用を参照する。代替として、天然では互いに接触していない2つ以上の断片の融合を含む、配列の產生によって作製されるポリヌクレオチドであってもよい。よって、例えば、細胞を非自然に発生する任意のベクターで転換することによって作製される生成物が含まれ、任意の合成オリゴヌクレオチド過程を用いて生成される配列を含むポリヌクレオチドも含まれる。同様に、「組換え」ポリペプチドは、組換えポリヌクレオチドから発現されるポリペプチドである。²⁰

【0165】

「組換え宿主細胞」とは、ベクター（例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター）を含有する細胞、または別様に該当するタンパク質を発現させるための組換え技術によって操作された細胞である。

【0166】

治療の一般的な態様

【0167】

対象に運動ニューロン栄養因子（MNTF）ペプチド類似体を投与するステップを含む、神経細胞障害に罹患する対象を治療する方法が提供される。

【0168】

本明細書で用いられる神経細胞障害は、急性、進行性または漸進的な神経組織の損失に、全部または一部関連するまたは特徴付けられる疾患、障害、または状態を含んでもよい。例示的な神経細胞障害には、脊髄傷害、神経変性疾患、脳卒中または一過性もしくは持続性の虚血性状態（例えば脳虚血）、ハンチントン病（HD）、パーキンソン病（PD）、多発性硬化症（MS）、ALS、アルツハイマー病、糖尿病性神経障害、脊髄性筋萎縮症（SMA）および横断性脊髄炎を含んでもよい。⁴⁰

【0169】

また、例示的な神経変性疾患には、アレキサンダー病、アルパース病、毛細血管拡張性失調症、バッテン病（スピールマイヤー-フォークト-シェーグレン-バッテン病としても知られる）、牛海綿状脳症（BSE），カナバン病、コケイン症候群、大脳皮質基底核変

10

20

30

40

50

性症、クロイツフェルトヤコブ病、H I V関連認知症、ケネディ病、クラッペ病、レウイー小体認知症、マシャドジョセフ病（3型脊髄小脳失調症）、多系統萎縮症、ナルコレプシー、神経ボレリア症、ペリツェウス・メルツバッハ病、ピック病、原発性側索硬化症、プリオント病、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病をさらに含んでもよい。

【0170】

「神経変性疾患」とは、進行性、漸進的な機能的神経組織の損失によって特徴付けられる、中枢または末梢神経系と関連する条件を指す。

【0171】

「筋萎縮性側索硬化症」または「A L S」は、当該技術分野において理解される用語であり、本明細書においては、上部運動ニューロン（脳内の運動ニューロン）および／または下部運動ニューロン（脊髄内の運動ニューロン）に影響を及ぼし、運動ニューロンの死をもたらす、進行性の神経変性疾患を意味するために用いられる用語である。本明細書で用いられる「A L S」という用語は、これらに限定されないが、古典的A L S（典型的には下部および上部両方の運動ニューロンに影響を及ぼす）、原発性側索硬化症（P L S、典型的には上部運動ニューロンのみに影響を及ぼす）、進行性球麻痺（P B Pまたは球発症、典型的には嚥下、咀嚼、および発話の困難から始まるA L Sの種類）、行性筋萎縮症（P M A、典型的には下部運動ニューロンのみに影響を及ぼす）および家族性A L S（A L Sの遺伝的な種類）を含む、当該技術分野において既知であるA L Sのすべての分類を含む。10

【0172】

A L Sの例示的な臨床症状には、筋力低下、筋消耗、筋痙攣、筋攣縮、それつの回らないまたはゆっくりとした話し方、嚥下困難、および緩慢な非協調性の動作を含む。A L Sのさらなる例示的な臨床症状は、例えば、正常と比較して細胞比率C D 4 : C D 8の増加、正常と比較してC D 1 4 + 細胞数の減少、正常なC D 1 4 + 細胞と比較してC D 1 4 + 細胞のH L A - D Rの発現増加、正常と比較して活性化した単球またはマクロファージのレベル上昇、増殖性マクロファージの存在、正常と比較して低下した血清I g Gおよび／またはI g等の、A L Sを有するまたは有することが疑われる対象から獲得した生物学的サンプルにおいて検出可能な症状を含む。本明細書において用いられる「正常」とは、対象がA L Sの影響を受けていないこと、または、かかる影響を受けていない対象の細胞を意味する。よって、「治療する」とは、疾患の進行を緩和する、寛解させる、安定化させる、逆転させる、ゆっくりにするもしくは遅らせる、疾患の発症を遅らせるおよび／またはさらには防ぐ等の望ましい随伴効果が得られる可能性がある、1つ以上の臨床症状における低下を実現することを包含する。20

【0173】

「多発性硬化症」または「M S」は、当該技術分野において理解される用語であり、本明細書においては、特に脳および脊髄の神経細胞を覆うミエリンの破壊をもたらす、進行性的神経変性疾患を意味するように用いられる。本明細書で用いられる場合、「M S」には、これらに限定されないが、再発寛解型多発性硬化症（R R M S）（典型的には、発作後の部分的または全般的な回復により特徴付けられる（悪化、再発、または再燃とも称される））、2次性進行型多発性硬化症（S P M S）（一般に、障害および症状の増加を伴う、より少ない再発によって特徴付けられる）、および1次性進行型多発性硬化症（P P M S）（一般に、緩解することなく症状および障害が進行することにより特徴付けられる）を含む、当該分野において既知であるM Sのすべての分類を含む。30

【0174】

M Sの例示的な臨床症状には、疲労（M S疲労感とも言われる）、筋疲労、錯覚、歩行困難および／または平衡障害、痺れ、有棘、または疼き等の感覚異常、疼痛、膀胱機能障害、腸管機能不全、認知機能における変化（記憶力、注意力、集中力、判断力、および問題解決に関するを含む）、めまいおよび回転性めまい、情緒障害（例えばうつ病）、性機能障害、ならびに視覚障害を含む。重度の症例では、部分的または完全な麻痺（霞目もしくは複視、赤緑色盲、または片目失明等）を伴う可能性がある。その他の症状には、頭痛40

、難聴、痒み、発作、痙攣、発話および嚥下障害、ならびに振戦を含む。さらなるMSの例示的な臨床症状には、例えば、正常と比較して細胞比率CD4:CD8の増加、正常と比較してCD14+細胞数の減少、正常なCD14+細胞と比較してCD14+細胞のHLA-DRの発現増加、正常と比較して活性化した単球またはマクロファージのレベル上昇、増殖性マクロファージの存在、正常と比較して低下した血清IgGおよび/またはIg等の、MSを有するまたは有することが疑われる対象から獲得した生物学的サンプルにおいて検出可能な症状を含む。本明細書において用いられる「正常」とは、対象がMSの影響を受けていないこと、または、かかる影響を受けていない対象の細胞を意味する。よって、「治療する」とは、疾患の進行を緩和する、寛解させる、安定化させる、逆転させる、ゆっくりにするもしくは遅らせる、疾患の発症を遅らせるおよび/またはさらには防ぐ等の望ましい随伴効果が得られる可能性がある、1つ以上の臨床症状における低下を実現することを包含する。10

【0175】

「アルツハイマー病」または「AD」は、当該技術分野において理解される用語であり、本明細書においては、認知症により特徴付けられ、アメリカ心理学協会(American Psychiatric Association)により記憶障害を含む複数の認知障害の発達として定義される(DSM IV)、進行性の神経変性疾患を意味するよう用いられる。

【0176】

ADの例示的な臨床症状には、最近の出来事、活動、または見慣れた人々や物の名前が思い出せない等の軽度の物忘れ；簡単な数学問題を解くのが困難である；簡単な課題をどのようにするのかが思い出せない(例えば、歯を磨くまたは髪をとかす等)；明瞭に思考することができない；話す、理解する、読む、または書くことが困難である；および不安もしくは攻撃性、または家から出て徘徊する傾向を含む。20

【0177】

本明細書で用いられる場合、「対象」は、哺乳類(例えば、ヒト)等の脊椎動物であってもよい。哺乳類には、これらに限定されないが、農場で飼育される動物、スポーツ用の動物、げっ歯類、靈長類、およびペットを含む。

【0178】

本明細書で用いられる「パーキンソン病(Parkinson's disease)」(Parkinson diseaseまたはPDとしても知られる)は、しばしば罹患者の運動能力および発話が損なわれる中枢神経系の変性状態により、全体的または部分的に特徴付けられる。パーキンソン病は、運動障害と称される状態の群に属する。該状態は、筋固縮、振戦、身体運動の緩慢化(動作緩慢)、および極端な症例においては、身体運動の喪失(アキネジア)により一部特徴付けられる。1次症状は、通常、脳のドーパミン作動性ニューロンにおいて生成されるドーパミンの不十分な形成および作用が原因となる、基底核による運動皮質の刺激不足の結果である。2次症状には、高レベルの認知障害およびわずかな言語障害を含んでもよい。PDは、慢性的であり、かつ進行性である。PDは、一群の類似する症状であるパーキンソニズムの最も一般的な原因である。PDは、「原発性パーキンソン症候群」または「突発性PD」(原因不明の)とも称される。ほとんどのパーキンソニズムの形態が突発性である一方で、中には、毒性、薬剤、遺伝子の突然変異、頭部外傷、またはその他の医学的障害に起因する症状が見られる症例も存在する。3040

【0179】

ハンチントン病(HD)は、ハンチントン(Htt)遺伝子のエクソン1におけるCAG三ヌクレオチドの伸長に起因する、常染色体優性の神経変性により特徴付けられてもよい(E.g. Perutz et al., Trends Biochem. Sci. 1999; 24: 58-63; and Rubinsztein et al., J. Med. Genet. 1999; 36: 265-270)。HD患者は、異常な動作、認知症、および精神医学的問題の存在により特徴付けることができる。

【0180】

概要

【0181】

ラット筋肉組織からの2つの運動ニューロン栄養因子(MNTF1およびMNTF2)の単離および特徴付け、ならびにその後のヒト網膜芽細胞腫cDNAライブラリー由来の組換えMNTF1-F6遺伝子のクローニングは、米国特許第6,309,877号、第6,759,389号、および第6,841,531号(および同時係属中の米国特許出願第U10/858,144号、第10/858,286号、第10/858,543号および第10/858,545号)に記載され、参照することにより、それらの全体は本明細書に一体化される。それらにおいて配列番号:1と称されるMNTF1-F6遺伝子配列は、33番目のアミノ酸配列をコードする。国際出願番号PCT/US2004/038651に記載されるように(参照することにより、その全体は本明細書に一体化される)、MNTF1ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ヒト染色体16q22内に位置することが分かっている。10

【0182】

MNTF1の既知の生物学的活性に十分であると思われるMNTF1-F6分子内で、重複する2つのドメインが同定された。国際出願番号第PCT/US04/01468号または米国特許出願第10/541,343号(米国特許第7,183,373号として発行)を参照のこと(参照することにより、その全体は本明細書に一体化される)。本明細書において「WMLSAFS」および「FSRYAR」ドメインと表されるそれぞれのドメインは、MNTF1-F6の33-merと同様に、運動ニューロンに由来する細胞株の増殖を刺激するために十分であった。同様に、「FSRYAR」ドメインは、MNTF1-F6の33-merと同様に、インビボで運動ニューロンによる筋肉標的の選択的な神経再生を導くために十分である。また、「FSRYAR」ドメインは、MNTF1-F6の33-merを含む「FSRYAR」配列を含有するいかなるMNTFペプチドをも認識する抗体を産生させるために十分な抗原性エピトープを提供する。20

【0183】

運動ニューロン栄養因子(MNTF)は、ヒト妊娠期間における胎仔期中9週目の発現でピークに達する(Di, X. et al., Acta Anatomica Sinica 29:86-89, 1998)。ヒトの発達におけるMNTFの発現に基づいて、我々は、MNTFが運動ニューロンの分化および/または生存を促進する可能性があると判断した。これを検討するために、我々は、MNTFが多能性胚性幹細胞の運動ニューロンへの分化を調節し、ES細胞由来の運動ニューロンの生存を促進するかどうかを定義した。30

【0184】

本明細書に開示されるように、発明者は、ES細胞のRAおよびMNTF類似体への曝露が、これらの細胞の運動ニューロン産生を導くことを決定した。

【0185】

使用方法

【0186】

本明細書において運動ニューロン分化因子(MDNF)と称されるMLSAFSRYARドメインを含むMNTFおよび切断されたMNTF分子が、幹細胞または部分的に分化した神経細胞の運動ニューロンへの分化を誘導することが、本明細書において実証される。かかる薬剤は、幹細胞培養物から運動ニューロンの集団を産生および/または単離するための新しい方法を提供する。40

【0187】

本明細書に記載される方法は、胚性幹細胞をレチノイン酸(RA)および運動ニューロン分化因子(MNDF)に接触させるステップを含む。本明細書に記載される一実施形態において、胚性幹細胞は、運動ニューロン分化因子と同時にRAに接触される。代替として、当該方法は、部分的に分化した神経細胞を運動ニューロン分化因子と接触させるステップを含む。上記因子は、分化した神経細胞を生成するために有効な量で提供される。当業者は、本明細書に開示される既知の手順および方法に基づいて、これらの量を容易に決定50

できる。

【0188】

MNTF1および/またはそのペプチド類似体も、インビトロでの哺乳類運動ニューロンの生存を促進する。したがって、本明細書に記載される技術は、有効量のMNTFペプチド類似体を用いて幹細胞由来の神経細胞をインビトロで培養することにより、幹細胞由来の神経細胞株の生存を促進する方法を含む、神経細胞培養物の成長因子/栄養補助剤としてのMNTFペプチド類似体の使用を提供する。

【0189】

発明者は、神経栄養因子の存在下で培養されたニューロンは、生存して突起を発達させることも発見した。したがって、別の実施形態において、本明細書に記載される方法は、例えば、RAおよび運動ニューロン分化因子との接触の後で、幹細胞由来の運動ニューロンを少なくとも1つのMNTFペプチド類似体(本明細書に記載されるMNTFペプチド類似体、または、代替として、Shhアゴニストを含むソニックヘッジホッグ(Shh)等)と接触させるステップを含む。10

【0190】

分化した運動ニューロンは、例えば、FACSソーティングにより単離または濃縮される。例えば、GFPに基づく運動ニューロンのマーキング法は、ES細胞由来運動ニューロンの純粋な集団を特徴付けることを可能にする。胚様体から細胞の混合集団を、続いてそこから細胞の純粋な運動ニューロン集団を単離するために、このプロトコルを用いた。コラゲナーゼおよびディスパーゼを用いて、胚様体を単細胞に脱凝集した。HB9プロモーターに制御されたGFPを発現する細胞が、集団における真の運動ニューロンであるため、これらの単細胞をGFPについてFACSソートした。20

【0191】

したがって、本明細書に記載される技術の別の態様は、以下のステップ(a)~(f)により、分化した神経細胞の集団を単離および/または精製するための方法を対象とする:(a)運動ニューロン特異的プロモーターの制御下において、高感度緑色蛍光タンパク質(eGFP)を発現する胚性幹細胞の培養物を獲得または產生するステップ、(b)胚性幹細胞の培養物を、eGFPを発現する分化した神経細胞を生成するために有効な量のRAおよびMNTFと接触させるステップ、(d)分化した神経細胞においてeGFPの発現を検出するステップ、および(f)eGFPを発現する分化した神経細胞を単離するステップ。30

【0192】

発明者は、MNTFおよび特定のMNTF類似体は、哺乳類ニューロンの生存、成長、増殖、および/または維持を促進する能力により、神経細胞障害を治療するために有用であることを発見した。さらに発明者は、特定の実施形態に従うと、MNTFペプチドまたはMNTF類似体は、ソニックヘッジホッグ経路に非依存的(例えば、実施形態に依存して部分的または完全に非依存的である)なシグナル伝達経路を調節することを発見した。同じように、発明者は、MNTFペプチドおよびMNTF類似体は、特定のチロシンキナーゼおよび増殖因子受容体の発現または活性を含む、特定のタンパク質キナーゼ経路を調節することを発見した。制御されるシグナル伝達経路またはタンパク質キナーゼ経路には、例えば、ソニックヘッジホッグ非依存的経路を含む。40

【0193】

ソニックヘッジホッグ(Shh)は、その膜貫通受容体成分であるpatched-smoothenedを介して作用する、尾側ニューロンの腹側化を司る重要な成分である。本明細書に提示されるデータは、インビトロでのマウスES細胞の分化において、MNTFペプチドが、レチノイン酸の存在下で効率的にソニックヘッジホッグを運動ニューロンに置換することを示している(実施例5)。これらのES培養物にMNTFを添加することは、成熟運動ニューロン転写因子(HB9およびIslet 1/2)の発現、成熟運動ニューロンのマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の発現、および活動電位を伝導する能力を持つニューロンの產生をもたらす。上記データは、MN50

T F ペプチドが、smoothened受容体シグナリングの特異的阻害物質（シクロパミン - KAAD）の存在下において、有糸分裂後の成熟運動ニューロンを産生する能力を持つことも示している。特定の理論または機構に拘束されることなく、発明者は、上記データがMNTFシグナルが、Shhまたは平滑化の下流にある経路とは異なる経路を通過することを示していると考える。本明細書に提示されるデータに基づき、発明者はさらに、哺乳類ニューロンの生存、成長、増殖、および／または維持を促進するために、MNTFペプチドは、本明細書に記載されるシグナル伝達経路を通過して作用すると決定した。よって、本明細書に記載される技術の別の態様において、MNTF因子またはMNTF類似体は、特定のシグナル伝達成分の発現または活性を調節するために投与される。我々のデータはさらに、ES細胞のMNTF処理が、インスリン受容体（IR）のTyro972およびTyro1162/1163の自己リン酸化をもたらすことを実証した（実施例5）。これらの残基はIR活性化のマーカーである。また、免疫共沈降試験は、ES細胞のMNTF処理の結果として、特異的SH2ドメインとIRとの関連（PI3キナーゼのp85サブユニット）を示した。実施例5は、IGF-1RをブロックすることはMNTFが運動ニューロンを産生する能力に影響を及ぼさなかったが、IRをブロックすることでその能力が破壊されたことを示している。

【0194】

特定の実施形態において、インスリン受容体基質タンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子（MNTF）類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。インスリン受容体基質タンパク質（IRSタンパク質）は、インスリンおよびIGFの両方によって開始されるシグナルのエフェクターである。それらは、N末端近くのPHおよびPTBドメイン、およびC末端領域内の複数のTyroリン酸化モチーフを共有する。チロシンリン酸化IRSタンパク質に結合するタンパク質は、PI3キナーゼp85、GRB2、SHP2、Nck、CrkおよびFynを含む。IRS-1は、主にIGFシグナルおよび細胞骨格の成長に関与していると思われる。遺伝子除去がII型糖尿病を引き起こすため、IRS-2は、インスリンシグナルの重要なメディエーターであると思われる。IRS-3は、主に脂肪細胞中に発現する、PDキナーゼの強力な活性化因子である。IRS-4は、他のIRSタンパク質がSHP2に結合するために用いられるチロシン残基を持たない。

【0195】

特定の実施形態において、IGF-1、IGF-II、またはそのいずれかの受容体のタンパク質発現または活性は、運動ニューロン栄養因子（MNTF）類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。IGF-IおよびIGF-IIは、インスリン受容体と相同性であるIGF-I受容体を通過する。高親和性IGF-II受容体は、シグナリングにおいて直接的な役割は果たさないが、遊離IGF-IIの濃度を制御する。IGFは骨格の成長に関与しており、アポトーシスの防止に不可欠である。遊離IGFの血清レベルは、IGFを封鎖するIGF結合タンパク質（IGFBP）の作用により低く保たれる。IGFBPの過剰発現は、おそらくは遊離IGFの低下により、アポトーシスを引き起こす可能性がある。IGFBPレベルは、特定の癌においても変更される。IGF-I受容体は、他の成長因子受容体ほど分裂促進的ではないが、インスリン受容体基質（IRS）タンパク質を通過してPI3キナーゼ経路を活性化する能力は、細胞の生存を仲介するために非常に重要である。

【0196】

特定の実施形態において、ホスファチジルイノシトール-3キナーゼタンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子（MNTF）類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。PI3キナーゼ（ホスファチジルイノシトール-3キナーゼ）は、生存シグナル、およびインスリン作用に必要とされる強力な2次メッセンジャーであるPI(3、4、5)P3を産生するために、PI(4、5)P2のイノシトール環の3位のリン酸化を司る。PI3キナーゼは、85kDa制御サブユニットおよび110kDa触媒サブユニットからなるヘテロ二量体複合体である。成長因子受

10

20

30

40

50

容体のチロシンリン酸化は、受容体上の p 85 の結合のためのドッキング部位（その SH2 ドメインを介して）を作製する。p 85 がそれを p 110 に結び付けることにより、膜上のホスホリピド基質に近位となる。PI3 キナーゼは、Ras、およびヘテロ三量体 G タンパク質の : サブユニットによっても活性化される。PB キナーゼは、PI3 キナーゼシグナル経路の試験に有用なツールであるワートマニンにより阻害することができる。

【 0197 】

特定の実施形態において、Akt キナーゼタンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子 (MNTF) 類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。Akt は、PI3 キナーゼ経路の主要な既知のエフェクターである。PIP3 の產生は PDK1 の活性化をもたらし、Thr308 上の Akt、およびその他のキナーゼ（予測される PDK2）をリン酸化し、Ser473 上の Akt をリン酸化する。これらのリン酸化は、Akt Ser / Thr キナーゼ活性をさらに活性化し、これらの部位のうちのいずれかを標的とするリン酸化状態特異的な抗体の使用は Akt の活性化を意味する可能性がある。Akt の活性化は、免疫沈降の後で、放射標識した ATP を用いて既知の基質をリン酸化することにより、直接的に測定することができる。Akt は Ser136 上の Bad をリン酸化し、アポトーシスから保護する結果となる。Akt の他の基質には、GLUT4、心臓 PFK2、および GSK3 を含み、このリン酸により不活性化される。

【 0198 】

特定の実施形態において、Bad キナーゼタンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子 (MNTF) 類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。Bad、または「細胞死の Bcl-2 アゴニスト」は、Bcl-2 ファミリーのメンバーであり、生死の重要な制御因子である。非リン酸化 Bad は、Bcl-2 と Bcl-XL を二量体化し、それらの抗アポトーシス性の活性を中和する。PI3 キナーゼ経路の活性化は、セリン136 上の Bad をリン酸化する Akt の活性化につながる。MAP キナーゼ経路はセリン112 上の BAD をリン酸化し、最近になって、PKA がセリン155 上の BAD をリン酸化することが明らかになった。リン酸化された Bad は、アポトーシス促進性の役割から Bad を除外する 14-3-3 タンパク質、またおそらくは他の因子に結合する。これらの部位に特異的なリン酸化状態特異的な抗体を用いたアッセイは、細胞生存経路の活性化の読み取りとしての役目を果たす。

【 0199 】

特定の実施形態において、PI(3、4、5)P3 依存キナーゼタンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子 (MNTF) 類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。PI(3、4、5)P3 依存キナーゼ 1 (PDK1) は、PH ドメインを有する Ser / Thr キナーゼであり、PIP3 により強く刺激される。PDK1 の最も十分に特徴付けられた基質は Akt であり、Akt 活性化に貢献する Thr308 上の PDK1 によってリン酸化される。PDK1 の 2 つのアイソフォームが同定されている。PDK1 は、p70 S6 キナーゼの活性化においても役割を果たすと考えられており、T 細胞の活性化中の T 細胞受容体から NFKB へのシグナリングにとって重要である。

【 0200 】

特定の実施形態において、Bax タンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子 (MNTF) 類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。Bax タンパク質は、高度に保存されたドメインを Bcl-2 と共有し、アポトーシスを誘導するタンパク質をサイトゾル内に放出することにより多くの細胞のアポトーシス経路において重要な役割を果たす、ミトコンドリアの脂質二重層にイオン伝導チャネルを形成することができる。Bax は、癌または神経変性障害等、アポトーシスに関与する多くの疾患に対する興味深い治療標的を提示する。

【 0201 】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、p 5 3 遺伝子産物の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子（M N T F）類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。ヒトの癌全体のおよそ半分において、p 5 3 遺伝子は突然変異している。その遺伝子産物は細胞障害性ストレスに対する細胞の応答に関与し、p 1 9 A R Fとともにp 2 1 C i p 1 の発現を誘導して細胞周期停止を引き起こす。また、p 5 3 は、転写性および非転写性機構の両方により、アポトーシスを誘導することができる。p 5 3 のアミノ末端の8 3 個のアミノ酸は、トランス活性化ドメイン、および転写非依存性の成長抑制に関する領域を含有する。カルボキシ末端領域は、3つのリン酸化イベントおよび潜在的にはアセチル化によっても調節される、D N A 結合領域を含有する。

【0202】

10

特定の実施形態において、一酸化窒素合成酵素タンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子（M N T F）類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。一酸化窒素合成酵素（N O S）は、一酸化窒素を生成する二量体のヘム含有酵素であり、C 末端のレダクターゼドメインおよびN 末端のオキシゲナーゼドメインを含有する。N O S の3つのカテゴリーには、主に神経細胞組織において発現されるn N O S / N O S I / N O S 1、炎症性刺激によってマクロファージおよび他の特定の細胞内に誘導することができるi N O S / N O S I I / N O S 2、および恒常に発現されるN O S の上皮形態であるe N O S / N O S I I I / N O S 3を含む。恒常に発現されるn N O S およびe N O S は、活性のためにC a 2 + を必要とし、C a 2 + の流入によって抑制される。i N O S は、C a 2 + に依存性ではない。多数の部位で異なるアイソフォームをリン酸化することは、タンパク質活性に様々な効果（あるものは阻害性、あるものは活性化を図る）を及ぼす。

【0203】

20

特定の実施形態において、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3タンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子（M N T F）類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。グリコーゲン合成酵素キナーゼ3（G S K）は、シグナル経路活性の不在下においても活性であるという点で、大抵のセリン／スレオニンキナーゼとは異なる。G S K 3 およびG S K 3 の2つのアイソマーが存在する。G S K 3 の機能は、グリコーゲン合成酵素をリン酸化することにより、不活性化することである。インスリンの活性はP I 3 キナーゼ経路を刺激し、G S K 3 をリン酸化して不活性化するA k t の活性化をもたらす。その後、グリコーゲン合成酵素は急速に脱リン酸化され、活性化される。その他のG S K 3 基質には、J u n （阻害部位上の）、およびe I F 2 B を含む。G S K 3 によるT a u のリン酸化は、アルツハイマー病の発達と関連する可能性がある。G S K 3 上のA k t 部位（S e r 2 1）を標的とするリン酸化状態特異的な抗体は、経路の活性化状態の代替アッセイに好適である。

【0204】

30

特定の実施形態において、カスパーゼタンパク質の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子（M N T F）類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。C . エレガンスC E D - 3 の死に関連するタンパク質であるシステインアスパルチルプロテアーゼは、カスパーゼファミリーを含む。すべては、タンパク質分解によって活性化される酵素前駆体として発現される。アポトーシスにおける役目に関して、カスパーゼは、受容体クラスター形成によって活性化されるか（イニシエーター）またはミトコンドリアの膜透過性遷移によって活性されるか（エフェクター）に依存して、イニシエーター／カスパーゼ（カスパーゼ8、9、10）およびエフェクター／カスパーゼ（カスパーゼ3、6、7）に細分類することができる。エフェクターカスパーゼ、中でも特にカスパーゼ3は、多数の基質を切断して、アポトーシスと関連する形態学的变化に影響を及ぼす。カスパーゼ3基質の中で、D F F 4 5 / I C A D は、D F F のD N A s e サブユニットを遊離させてクロマチン分解を引き起こし、ゲルゾリン、P A K 2 、D 4 G D I は、細胞骨格系、核ラミンおよびP A R P に関与する。P A R P 切断の有意性は明白ではないが、カスパーゼ活性化および進行中のアポトーシスの推定のための優秀なマーカーである

40

50

。

【0205】

特定の実施形態において、RAS遺伝子産物の発現または活性は、運動ニューロン栄養因子(MNTF)類似体の患者または標的器官、組織、もしくは細胞への投与に応答して調節される。Rasタンパク質は小さなGTP結合タンパク質であり、ヘテロ三量体Gタンパク質とは異なり、単一のポリペプチド内にすべてのGTPaseおよびエフェクター機能を保有する。Ki-Ras、Ha-Ras、およびN-Rasの、少なくとも3のRasのアイソフォームが存在し、それらの発現パターンは異なるが、類似するシグナル活性を示す。Rasは、カルボキシ末端でパルミトイル化およびファルネシル化されて、膜にアンカーされる。静止細胞において、RasはGDPで充填されて受容体の成長ホルモン刺激に続いて活性化され、Rasグアニンヌクレオチド交換因子が膜の平面に補充される。交換因子のRasタンパク質に対する近接性が、GDPの放出、およびそのGTPによる置き換えの原因となる。そのGTP結合形態において、RasはRaf、RalGDS、およびPI3キナーゼを含むいくつかのタンパク質に結合する。Rasの不活性化はGTP加水分解によって起こり、既知の2つのRas GTPase活性化タンパク質であるRasGAPまたはNF-1によって大きく加速される。ライセートを、Ras:GTPに選択的に結合するRaf-1のRas結合ドメインとともにインキュベートすることにより、Ras活性化をアッセイすることができる。
10

【0206】

幹細胞培養物

20

【0207】

胚性幹(ES)細胞は、不確定に複製する能力を持つ胚盤胞段階の胚の多能性内部細胞塊に由来する、培養細胞である。通常、ES細胞は、他の細胞に分化する潜在性を有する(すなわち多能性である)ため、新しい細胞の持続的な源としての役割を果たす可能性を持つ。胚性幹細胞は、哺乳類(例えば、ヒト、家畜、または市販の動物)等のいずれの動物から獲得されてもよい。一実施形態において、胚性幹細胞は成熟した胚性幹細胞である。別の実施形態において、胚性幹細胞はヒトから獲得される。

【0208】

哺乳類幹細胞を培養するために好適である方法は、当該技術分野において既知であり、例えば、米国特許出願第10/362,437号、第10/789,266号、第10/789,308号、第10/928,805号、および米国特許第6,833,269号に規定され、参照することにより、それらの全体は本明細書に一体化される。明示的に指定されていない限り、本明細書に記載される技術は、いずれの脊椎動物種(例えば、ヒト、およびヒト以外の靈長類、家畜(domestic animals)、家畜(livestock)、およびその他のヒト以外の哺乳類)の幹細胞を用いても実践することができる。本明細書に記載される使用に好適である幹細胞の中には、妊娠期間中の任意の時点で採取された胚盤胞または胎仔組織または胚組織等、妊娠後に形成された組織に由来する靈長類多能性幹(pPS)細胞を含む。限定されない例は、初代培養物または胚性幹細胞もしくは胚生殖細胞の確立された細胞株である。

30

【0209】

特定の実施形態において、原型の「靈長類多能性幹細胞」(pPS細胞)が用いられる。pPS細胞には、受精後の任意の時点での着床前組織、胚組織、または胎仔組織に由来する多能性細胞を含む。適切な条件下において、それらは、3つの胚葉層(内胚葉、中胚葉、および外胚葉)の誘導体であるいくつかの異なる細胞種の子孫を生成する能力を持つ。pPS細胞は、Thomson et al., Science 282:1145(1998)に記載されるヒト胚性幹(hES)細胞、アカゲザル等他の靈長類からの胚性幹細胞(Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, (1995))、マーモセット幹細胞(Thomson et al., Biol. Reprod. 55:254(1996))およびヒト胚生殖(hEG)細胞(Shambrook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50

95:13726(1998)を含む、多様な種類の胚細胞、ならびに当該技術分野において既知である他の種類の多様性細胞を包含する。胚組織、胎仔組織、またはその他の源に由来するかどうかに関係なく、3つの胚葉層全部の誘導体である子孫を生成する能力を持つ靈長類由来のいずれの細胞が含まれる。通常、pPS細胞は悪性源に由来しないため、核型正常である可能性がある。

【0210】

pPS細胞培養物は、集団内における幹細胞とその誘導体との実質的な比が、胚または大人由来の分化細胞と比較して容易に明白である形態的特徴を示す場合に、「未分化」とあると称される。未分化pPS細胞は、当業者に容易に認識され、典型的には細胞コロニーにおける顕微鏡を用いた2次元画像に見られる。集団内の未分化細胞のコロニーが、分化した隣接細胞に囲まれることはよくあることである。10

【0211】

分化神経細胞

【0212】

前駆細胞、部分的に分化した細胞、および完全に分化した神経細胞を培養するために好適な方法は当該技術分野において既知であり、例えば、米国特許出願第10/362,437号、第10/789,266号、第10/789,308号、第10/928,805号および米国特許第6,833,269号に規定され、それらの全体は本明細書に一体化される。20

【0213】

また、本明細書で用いられる場合、「神経細胞」または「ニューロン」は、神経系の伝導性細胞または神経細胞であり、典型的には、核および細胞質を含有する細胞体（核周部）；いくつかの短い、放射状の突起（樹状突起）；および1つの長い突起（軸索）から構成され、枝様の分岐部（終末分枝）で終端し、その途中に分岐部（側枝）を有していてよい。ニューロンの例には運動ニューロンを含む。20

【0214】

分化神経細胞の特徴付け

【0215】

ES細胞の部分的にまたは完全に分化した神経細胞への分化は、既知の細胞または分子手順、ならびに本明細書に開示されるアッセイおよび方法を用いて検出されてもよい。例えば、細胞培養物は、NeuN（ニューロンマーカー）および/またはHB9もしくはChAT等の特異的な運動ニューロンマーカー等のニューロンマーカーについて探査されてもよい。30

【0216】

別の実施形態において、本明細書に記載されるように、分化した神経細胞は、通常、高感度緑色蛍光タンパク質（eGFP）を発現することでマークされる。eGFP遺伝子マーカーは、分化神経細胞の集団を単離および/もしくは精製するための方法において、または脊髄の増殖を監視するための方法において、特に有用である可能性がある。

【0217】

レチノイン酸

【0218】

RA、またはビタミンAは、モルフォゲンであると思われるアルデヒド分子である。RAは容易に入手可能であり、例えば、Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) から調達することができる。最終濃度約0.0.001~1μMでRAを用いた処理は、幹細胞から神経前駆細胞への効率的な分化をもたらす。40

【0219】

MNTFペプチド

【0220】

当該技術分野および開示に精通する当業者は理解するように、MNTF活性ドメインおよびそのペプチド類似体を含む配列は、運動ニューロンに対する神経の保護、修復、および50

治療的機能をインビボおよびインビトロで与えることができる。本明細書に記載されるMNTF因子は、合成的もしくは組換えて生成されてもよく、または天然細胞から単離されてもよい。

【0221】

本開示のMNTFペプチド類似体を含むタンパク質またはペプチドにおけるアミノ酸残基の配列は、本明細書において、一般的に用いられる3文字の記号表示の使用によるか、または1文字の記号表示によるかのいずれかで表される。これら3文字および1文字の記号表示のリストは、Biochemistry, Second Edition, Lehninger, A., Worth Publishers, New York, N.Y. (1975)等の教科書に見ることができる。アミノ酸配列が水平に列記されている場合は、アミノ末端は左端にあることが意図され、カルボキシ末端は右端にあることが意図される。

10

【0222】

当業者は、様々なMNTFペプチド類似体を含むペプチドの正確な化学構造は、因子の数に依存して異なることを理解するであろう。例えば、イオン化可能なカルボキシル基およびアミノ基が分子中に認められるため、所与のポリペプチドは酸性または塩基性の塩として得られてもよい。開示の目的のために、WMLSAFS、FSRYAR、MLSafsRyARドメイン、およびMNTF1 33merペプチドの生物学的活性を保持する配列番号：1～142に列記されるその他の配列／ドメインを含む任意の形態のペプチドは、本明細書に記載される技術の範囲内であることが意図される。

20

【0223】

図25は、本開示に従うMNTFペプチドの特定の例示的な実施形態を示した図である。

【0224】

MNTF1 - F6 33-mer

【0225】

米国特許第6,309,877号において、次のアミノ酸配列を有するポリペプチドが提供される：L G T F W G D T L N C W M L S A F S R Y A R C L A E G H D G P T Q（配列番号：1）。この配列を有するポリペプチドは、本明細書においてMNTF1 33-merと称される。

【0226】

30

この配列を含有する組換えタンパク質は、MNTF-1に対するモノクローナル抗体と反応し、運動ニューロンの生存率を維持し、神経突起の成長を増加し、運動ニューロンの細胞死／アポトーシスを減少し、運動ニューロンが、拡張した成長円錐を含有する軸索を有する、巨大な、活性ニューロンへと成長するおよび「広がる」ことを支持した。

【0227】

以下の実施例において使用するために、固相合成によりMNTF1 33-merを合成した。このMNTF-1分子は、以下「33mer」と称される。低濃度のRAとともに用いられた場合に、直鎖状33-merはES細胞の運動ニューロンへの分化を誘導した。さらに、MNTF1が誘導したES細胞の分化は、ソニックヘッジホッグシグナル伝達経路の阻害物質によってブロックされなかった。MNTF1 33-merを用いた胚様体の処理は、インスリン受容体（IR）および／またはインスリン様成長因子受容体（IGF-R）の自己リン酸化と関連しており、MNTFがIR / IGF-R媒介シグナル伝達経路を介して機能することを示唆した。

40

【0228】

本開示は、神経保護を行い、運動ニューロンの生存、維持および／または修復を促進する、または特定の場合において、幹細胞を運動ニューロンへと分化するMNTF1の能力を保持する、MNTF1のペプチド類似体の使用を含む。本明細書に記載される使用のためのMNTFペプチド類似体は、典型的には6～33アミノ酸長であり、配列番号：1のアミノ酸残基12～18に対応するWMLSAFSドメイン（配列番号：3）、または配列番号：1のアミノ酸残基17～22に対応するFSRYARドメイン（配列番号：2）を

50

含有してもよい。また、MNTFペプチド類似体の特定の実施形態は、活性ドメイン（配列番号：2または3）を含有する配列番号：1の6～33個の連続するアミノ酸残基の断片を含む。

【0229】

代替の実施形態において、運動ニューロン栄養因子ペプチド類似体のアミノ酸配列は、BLAST解析によって決定されたように、配列番号：4の10個の連続するアミノ酸残基に少なくとも60%同一、配列番号：4の10個の連続するアミノ酸残基に少なくとも70%同一、配列番号：4の10個の連続するアミノ酸残基に少なくとも80%同一、配列番号：4の10個の連続するアミノ酸残基に少なくとも90%同一である。

【0230】

ポリペプチド配列を対応する配列番号：1断片と比較するために、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）（World Wide Web上のncbi.nlm.nih.gov）から公的に入手可能であるBLASTプログラムを用いて、配列のグローバルアラインメントを行うことができる。グローバルアラインメントを行う前に、配列番号：1がGenBankに提出されてもよい。国立バイオテクノロジー情報センターによって提供されるデフォルトのパラメータがグローバルアラインメントに用いられてもよい。

【0231】

10 -mer

【0232】

一実施形態において、次のアミノ酸配列を有するペプチドが提供される：配列番号：1のアミノ酸残基13-22に対応するMLSAFSRYAR（配列番号：4）。例示的なMNTF断片には、WMLSAFSドメインの大半およびFSRYARドメイン全体を含んでもよい。この断片およびその変異体は、神経保護を行い、運動ニューロンの生存、維持および/または修復を促進する、または特定の場合において、幹細胞を運動ニューロンへと分化する、MNTF1の能力を保持する。

【0233】

MNTF10merは、0.01μg/mlまでの低い濃度で、胚性幹細胞のインビトロでの運動ニューロンへの分化を刺激する際、少なくとも全長MNTF33merと同じくらい効果的であった。また、MNTF10merは、幹細胞由来運動ニューロンの生存を増進する際に、ほぼMNTF33merと同じくらい効果的であった。MNTF-1分子のこの部分は、以下「10mer」と称される。

【0234】

6-merおよび類似体

【0235】

別の実施形態において、次のアミノ酸配列を有するペプチドが提供される：配列番号：1のアミノ酸残基17-22に対応するFSRYAR（配列番号：2）。この断片およびその変異体は、神経保護を行い、運動ニューロン（幹細胞由来運動ニューロンを含む）の生存、維持および/または修復を促進する、MNTF1の能力を保持する。MNTF-1分子のこの部分は、以下「6mer」と称される。

【0236】

特定の実施形態において、MNTFペプチド類似体は、6-merペプチドの配列または機能的類似体を含んでもよい。

【0237】

7-mer

【0238】

別の実施形態において、次のアミノ酸配列を有するペプチドが提供される：配列番号：1のアミノ酸残基12-18に対応するWMLSAFS（配列番号：3）。このMNTF1の7個のアミノ酸断片は、FSRYARドメインのFS残基と重複する。この断片および

10

20

30

40

50

その変異体は、神経保護を行い、運動ニューロン（幹細胞由来運動ニューロンを含む）の生存、維持および／または修復を促進する、MNTF1の能力を保持する。MNTF-1分子のこの部分は、以下「7mer」と称される。

【0239】

11-mer

【0240】

別の実施形態において、次のアミノ酸配列を有するペプチドが提供される：配列番号：1のアミノ酸残基17-27に対応するFSRYARCLAE G（配列番号：5）。MNTF1 11-merはFSRYARドメインを含有する。この断片およびその変異体は、神経保護を行い、運動ニューロン（幹細胞由来運動ニューロンを含む）の生存、維持および／または修復を促進する、MNTF1の能力を保持する。MNTF-1分子のこの部分は、以下「11mer」と称される。10

【0241】

21-mer

【0242】

別の実施形態において、次のアミノ酸配列を有するペプチドが提供される：配列番号：1のアミノ酸残基13-33に対応するMLSAFSRYAR CLAEGHDGPT Q（配列番号：6）。このMNTF1 21-merは、「WMLSAFS」ドメインの大半およびFSRYARドメイン全体を含有する。断片およびその変異体は、神経保護を行い、運動ニューロン（幹細胞由来運動ニューロンを含む）の生存、維持および／または修復を促進する、MNTF1の能力を保持する。MNTF-1分子のこの部分は、以下「21mer」と称される。20

【0243】

MNTFペプチド類似体

【0244】

本明細書に記載される技術は、1つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたペプチド類似体の使用を含むことを理解されたい。1つの代替において、運動ニューロン栄養因子のペプチド類似体は、配列番号：1の6～32個の連続するアミノ酸残基に対して1つ以上の保存的アミノ酸置換を含有する。

【0245】

当然のことながら、通常、ペプチドの本質的な活性が実質的に変わらない限り、MNTFペプチド類似体は、MNTFペプチドの改変形態であってもよい。本明細書で用いられる「改変形態」という用語は、その自然発生による構造を変更するために処理されたペプチドを言う。改変形態は、例えば、MNTF1ペプチド断片を不溶性の支持マトリクスと架橋することによる、またはMNTF1ペプチド断片を担体タンパク質と架橋することによる、MNTF1ペプチド断片の共有結合的な修飾によって調製することができる。30

【0246】

MNTF1ペプチド類似体は、MNTF1ペプチド断片と抗原的に関連するペプチド断片であってもよい。抗原的に関連する2つのペプチドは、免疫学的な交差反応性を示す。例えば、第1のペプチドに対する抗体は、第2のペプチドも認識する。40

【0247】

MNTF1ペプチド類似体は、異種のタンパク質に付着されたMNTF1ペプチド断片を含有する融合タンパク質であってもよい。異種のタンパク質は、MNTF1ペプチド断片に実質的に類似していないアミノ酸配列を有する。異種のタンパク質は、MNTF1ペプチド断片のN末端またはC末端に融合されていてもよい。融合タンパク質には、これらに限定されないが、poly-His融合、MYCタグ付き融合、Ig融合、および酵素融合タンパク質（例えば、-ガラクトシダーゼ融合）を含んでもよい。かかる融合タンパク質、特にpoly-His融合は、組換えMNTF1ペプチド断片の精製を促進することができる。

【0248】

10

20

30

40

50

MNTFペプチドのペプチド模倣物も、本明細書に記載される技術の範囲内であり、例えば、WMLSAFS、FSRYAR、または配列番号：1～142に記載される他のいずれの配列もしくは機能的ドメインを含むタンパク質の機能をブロックすることにより、神経細胞の生存率および成長を調節するための薬剤として作用することができる。医薬品産業において、ペプチド模倣物は、模倣されたペプチドの特性と類似する特性を有する非ペプチド薬剤を含むことは一般に理解される。ペプチド模倣物の設計の原理および実践は、当該技術分野において既知であり、例えば、Fauchere J., Adv. Drug Res. 15: 29 (1986)；およびEvans et al., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)に記載される。

【0249】

10

治療的に有用なペプチドと構造的類似性を有するペプチド模倣物は、同等の治療または予防効果を生成するために用いることができる。典型的には、かかるペプチド模倣物は、任意選択的に連結部によって置き換えられた1つ以上のペプチド連結部を有し、インビボでの化学分解等の望ましい特性を変換してもよい。かかる連結部は、-CH₂NH--、--CH₂S--、--CH₂-CH₂--、--CH=CH--、--COCH₂--、--CH(OH)CH₂--、および--CH₂SO--を含んでもよい。ペプチド模倣物は、それらの治療薬としての使用を特に望ましくする、薬理学的特性（生物学的半減期、吸収率等）の強化、異なる特異性、安定化の増加、生産経済性、抗原性の低下等を示してもよい。

【0250】

20

モデル化された（または試験的に決定された）ペプチド構造に基づく、WMLSAFS、FSRYAR、またはその他の類似するドメイン模倣物もしくは結合分子の合理的な設計は、合理的薬物設計の既知の方法を用いて当業者によって実行されてもよい。合理的薬物設計のゴールは、生物学的に活性なポリペプチドまたは標的化合物の構造的類似体を生成することである。かかる類似体を作製することで、天然の分子よりも活性もしくは安定した、改変に対する異なる感受性を有する、または他の様々な分子の機能に影響を及ぼすことのできる、薬物を構築することが可能である。1つのアプローチにおいて、標的分子、またはその断片のための3次元構造を产生する。これは、X線結晶学、コンピュータモデル、または両方を組み合わせたアプローチによって、実現することができる。

【0251】

30

作製方法

【0252】

本開示のMNTFペプチド組成物は、これらに限定されないが、固相合成による化学合成およびHPLCを用いた化学反応物の他の生成物からの精製を含む当該技術分野において周知である方法によって、またはインビトロ翻訳系もしくは生細胞における、本明細書に記載されるMNTFペプチドを含むペプチドもしくはポリペプチドをコードする核酸配列（例えば、DNA配列）の発現による生成によって、作製されてもよいことを理解されたい。上記組成物のMNTFペプチドは、単離されて1つ以上の望ましくない低分子量分子を除去するために大規模に透析されてもよいか、および／または望ましいビヒクル内により容易に使用できる製剤となるよう凍結乾燥されてもよい。MNTFペプチド成分中で作製されるさらなるアミノ酸、突然変異、化学修飾等がある場合には、MNTFドッキング配列の受容体認識を実質的に妨害するべきではないことをさらに理解されたい。

40

【0253】

MNTF1の1つ以上の断片に対応するペプチドまたはポリペプチドは、通常、少なくとも6アミノ酸残基の長さであるべきであり、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約15、約20または約30個くらいまでの残基を含有してもよい。ペプチド配列は、例えば、Applied Biosystems (Foster City, CA)から入手可能な自動化ペプチド合成機を用いたペプチド合成等、当業者に既知の方法によって合成されてもよい。本明細書に記載される技術は、配列番号：1～142に由来する環状ペプチドの合成および使用を含む。

50

【0254】

標的とするアミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応する能力を持つ有機誘導体化剤と反応させることにより、ペプチドに共有結合的修飾を導入することができる。有機誘導体化剤を用いたポリペプチドの共有結合的修飾は、当業者には周知である。例えば、システイニル残基を、クロロ酢酸またはクロロアセトアミド等の - ハロアセテート（および対応するアミン）と反応させて、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生じさせることができる。ヒスチジル残基は、ジエチルピロカーボネート（pH 5.5 ~ 7.0）との反応により、または1Mカコジル酸ナトリウム中のパラ - ブロモフェナシルプロミド（pH 6）との反応により、誘導体化させることができる。リシン（lysine）およびアミノ末端残基は、コハク酸またはその他のカルボン酸無水物と反応させることができる。アルギニル残基は、1つまたはいくつかの従来型試薬、中でも、フェニルグリオキサール、2,3 - ブタンジオン、1,2 - シクロヘキサンジオン、およびニンヒドリンとの反応により修飾することができる。芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応により、スペクトルレベルをチロシル残基に導入することができる。最も一般的には、N - アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンが、それぞれO - アセチルチロシル種および3 - ニトロ誘導体を形成するために用いられる。カルボキシル側鎖（アスパルチルまたはグルタミル）は、1 - シクロヘキシル - 3 - (2 - モルホリニル - (4 - エチル)カルボジイミドまたは1 - エチル - 3 (4アゾニア4,4 - ジメチルフェニル)カルボジイミド等のカルボジイミド（R' - N - C - N - R'）との反応により、選択的に修飾することができる。さらにアスパルチルおよびグルタミル、残基は、アンモニウムイオンとの反応により、アスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。グルタミルおよびアスパラギニル残基は、対応するグルタミルおよびアスパルチル残基に脱アミドすることができる。他の修飾は、プロリンおよびリジンの水酸化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化（T. E. Creighton, 1983, Proteins: Structure and Molecule Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 - 86）、N末端アミンのアセチル化を含み、ある場合においては、C末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0255】

本明細書に記載されるMNTFペプチド類似体は、遊離形態またはタンパク質もしくは固体粒子等の担体分子に結合された状態のいずれか、および標識またはトレーサー（例えば、ビオチンまたはフルオレセインイソチオシアネート）に結合する修飾されたペプチドとして、アッセイまたはアッセイ用のキットにおいて用いることができる。

【0256】

MNTF1のペプチド断片の水不溶性支持マトリクスとの架橋は、1,1ビス（ジアゾアセチル）2フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシこはく酸イミドエステル（例えば、4 - アジドサリチル酸とのエステル）、3,3' - ジチオビス（サクシニミジルプロピオネート）等の酸ジサクシンイミジルエステルを含むホモ二機能性イミドエステル、およびビス - N - マレイミド - 1,8 - オクタン等の二機能性マレイミドを含む、当該技術分野で既知である二機能性試薬を用いて行うことができる。メチル - 3 - [(p - アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデート等の二機能性試薬は、光の存在下において架橋を形成する能力を持つ、光で活性化され得る中間体をもたらす。代替として、臭化シアンによって活性化した炭水化物等の反応性水不溶性マトリクスが、タンパク質の固定化に用いられてもよい。

【0257】

MNTF1ペプチド断片の第2のタンパク質（第2のMNTF1ペプチド断片を含む）への架橋は、本明細書に記載される二機能性試薬を用いて行うことができる。別の代替において、例えば、ジチオール基またはジアミノ基または複数のアミノ酸残基（例えば、グリシン）等のスペーサーが挿入される。スペーサーは、ホモまたはヘテロの二機能性架橋剤

、例えば、ヘテロ二機能性架橋剤N-(4-カルボキシ-シクロヘキシリ-メチル)-マレイミドであってもよい。

【0258】

長めのペプチドまたはポリペプチド(例えば、融合タンパク質)は、標準的な組換えDNA技術によって生成することができる。例えば、MNTF1ペプチド断片をコードするDNA断片は、既に異種のタンパク質を含有する商業的に入手可能な発現ベクターにクローニングすることができ、その結果、MNTF1ペプチド断片はフレーム内で異種のタンパク質に融合される。

【0259】

特定の実施形態において、MNTF1ペプチドおよび/または本明細書に記載される成分をコードする核酸は、例えば、本明細書に記載される様々な組成物および方法のために、ペプチドをインビトロまたはインビボで生成するために用いられてもよい。例えば、特定の実施形態において、MNTF1ペプチドをコードする核酸は、例えば、組換え細胞中のベクターの成分である。核酸は、MNTF1ペプチド配列を含むペプチドまたはポリペプチドを生成するために発現されてもよい。ペプチドまたはポリペプチドは、細胞から分泌されてもよく、または細胞の一部としてもしくは細胞内で分泌されてもよい。

【0260】

化合物のスクリーニング

【0261】

別の実施形態において、MNTFペプチドまたはMNTFペプチドの細胞内シグナル伝達経路に関する部分の発現レベルを変更する化合物が同定される。特定の実施形態において、これらの化合物は、本明細書に記載される様々な神経障害の治療を標的とする。

20

【0262】

神経保護のアゴニストおよびアンタゴニストを識別することができ、その後に行われる本明細書に記載されるおよび当該技術分野で既知である神経細胞を用いた試験により、化合物の有効性を評価することができる。

【0263】

本明細書に記載されるスクリーニング手順によって同定される化合物はさらに識別することができ、当該技術分野において容認される動物細胞培養物の疾患および障害モデル系において神経細胞障害を治療する能力に基づいて、該化合物の有効性を評価することができる。

30

【0264】

化合物および天然抽出物の信頼性を試験する多くの薬物スクリーニングアッセイにおいて、調査する化合物の数を一定期間内に最大化するためにはハイスループットアッセイが望ましい。精製されたまたは部分的に精製されたタンパク質に由来してもよい無細胞系において実施されるアッセイは、試験化合物に媒介される分子標的内の変化を急速に生じさせて、比較的容易に検出できるように産生することができる。「主要な(primarily)」スクリーンとして用いられることが多い。さらに、通常、インビトロ系においては、試験化合物の細胞毒性の影響および/または生物学的利用率は無視するため、主にアッセイの焦点は、受容体タンパク質との結合親和性の変化に顕在する薬物の分子標的に対する影響に合わせられる。

40

【0265】

よって、別の態様において、運動ニューロンの成長または生存を促進するために有用な化合物を同定する方法が提供される。一実施形態において、当該方法は、i)候補化合物を含むサンプルを調製するステップ、ii)細胞を上記サンプルと接触させるステップ、iii)シグナル伝達経路に関する化合物の発現または活性が調節されたかどうかを決定するステップ、およびiv)上記細胞が運動ニューロンの成長または生存を促進する能力を持つかどうかを決定するステップを含みる。特定の実施形態において、当該方法は、候補化合物を含むサンプルがインスリン受容体のTyr972およびTyr1162/1163の自動リン酸化をインビトロまたはインビボで刺激するかどうかを決定するステップ

50

をさらに含む。他の実施形態において、当該方法は、候補化合物を含むサンプルが、MNTF信号伝達経路を制御するかどうかを決定するステップをさらに含む。他の実施形態において、当該方法は、候補化合物を含むサンプルが、インスリン受容体、IGF-1受容体、IGF-2受容体、Shh、Akt、Bad(細胞死のbcl-2アンタゴニスト)、PI(3、4、5)P3-依存キナーゼ1(PDK1)、Bax、p53遺伝子産物、pp60-Src、JAK2、一酸化窒素合成酵素(NOS)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3(GSK)、カスパーゼ、PI3キナーゼ(ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ)、およびRasから選択される1つ以上のタンパク質の発現または活性を調節するかどうかを決定するステップをさらに含む。他の実施形態において、当該方法は、候補化合物を含むサンプルが、MNTF類似体によって制御されるかどうか、または代替的にMNTF類似体によって制御されるかどうか(例えば、活性、発現等)を決定するステップをさらに含む。別の態様において、本明細書に記載される技術は、本明細書に記載されるスクリーニング手順を用いて同定される化合物を投与することにより、神経細胞障害の治療のために運動ニューロンの成長または生存を促進する方法を含む。
10

【0266】

例示的なスクリーニングアッセイでは、通常MNTFペプチドを結合することができる条件下において、該当するタンパク質を、MNTF結合タンパク質(例えば、MNTFペプチド受容体を発現する細胞)とMNTFペプチドとを含む混合物に接触させる。その混合物に、試験化合物を含有する組成物を加える。受容体/MNTFペプチド複合体の検出および定量化は、受容体タンパク質とMNTFペプチドとの複合体形成を阻害する(または増強する)際の試験化合物の有効性を決定するための手段を提供する。単離および精製されたMNTFペプチドを受容体タンパク質に加え、試験化合物の不在下において受容体/MNTFペプチド複合体の形成を定量化するコントロールアッセイも、比較のためのベースラインを提供するために行うことができる。
20

【0267】

MNTFペプチドとMNTFペプチドとの複合体形成は、様々な技術によって検出されてもよい。例えば、複合体形成の調節は、例えば、放射標識された、蛍光で標識された、または酵素的に標識されたMNTFペプチド等の検出可能に標識されたタンパク質を用いて、イムノアッセイによって、またはクロマトグラフィーによる検出によって、定量化することができる。無細胞アッセイでは、典型的には、タンパク質のうちの1つの非複合体形態からの受容体/MNTFペプチド複合体の分離を促進するため、およびアッセイの自動化を図るために、MNTFペプチドまたはMNTFペプチド結合タンパク質のいずれかを固定化することが望ましい。例えば、タンパク質がマトリクスに結合することを可能にするドメインを加える融合タンパク質が提供されてもよい。例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ/受容体(GST/受容体)融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, Mo.)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上で吸収されてもよく、その後MNTFペプチド(例えば、35S-標識化MNTFペプチド)および試験化合物と組み合わされ、複合体形成を助長する条件下(例えば、塩およびpHのための生理的条件で)においてインキュベートされるが、わずかによりストリンジェントな条件であるのが望ましい場合がある。インキュベーション後、あらゆる非結合MNTFペプチドを除去するためにビーズを洗浄して、マトリクスピーズに結合させた放射標識が、直接的に(例えば、シンチラントに留置したビーズ)、または受容体/ヘッジホッグ複合体が解離された後で上清中に決定した。代替として、複合体をビーズから解離し、SDS-PAGEゲルを用いて分離して、ビーズ断片中に見られるMNTFペプチドのレベルを標準的な電気泳動技術を用いて定量化してもよい。
30
40

【0268】

マトリクス上でタンパク質を固定化するための他の技術も、対象とするアッセイにおいて用いるために利用可能である。例えば、MNTFペプチドタンパク質の可溶性タンパク質は、ビオチンとストレプトアビシンの結合を利用して固定化することができる。例えば、
50

ビオチン化された受容体分子は、当該技術分野において周知の技術（ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL）を用いてビオチン-NHS（N-ヒドロキシ-コハク酸イミド）から調製し、ストレプトアビシンでコーティングした96ウェルプレート（Pierce Chemical）内に固定化することができる。代替として、MNTFペプチドには反応するがヘッジホッグ結合を妨害しない抗体は、プレートのウェル、および抗体結合によってウェル内に閉じ込められた受容体に誘導体化されてもよい。上記のように、MNTFペプチドと試験化合物の調製物を、プレートの受容体が存在するウェル内でインキュベートして、ウェル内に閉じ込められた受容体／ヘッジホッグ複合体の量を定量化することができる。GST固定化複合体について上述した方法の他に、かかる複合体を検出するための例示的な方法には、MNTFペプチドに反応する抗体、または受容体タンパク質に反応してMNTFペプチドとの結合において競合する抗体を用いた複合体の免疫検出、およびMNTFペプチドと関連する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイを含む。後者の場合、酵素は化学的に結合されてもよいか、またはMNTFペプチドとの融合タンパク質として提供されてもよい。例を挙げると、MNTFペプチドは化学的に架橋されてもよいか、または遺伝子的にアルカリホスファターゼと融合されてもよく、複合体中に閉じ込められたMNTFペプチドの量は、酵素（例えば、パラニトロフェニルリン酸）の発色基質で評価することができる。同様に、MNTFペプチドとグルタチオンS-トランスフェラーゼとを含む融合タンパク質を提供することも可能であり、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンを用いてGST活性を検出することにより、複合体形成を定量化することができる（Habig et al., J Biol Chem, 249: 7130 (1974)）。複合体中に閉じ込められたタンパク質のうちの1つを定量化するための免疫検出には、抗MNTFペプチド抗体等のタンパク質に対する抗体を用いてもよい。代替として、複合体中に検出されるべきタンパク質は、融合タンパク質の形態をとる「エピトープタグ付き」であってもよく、それには、MNTFペプチドまたはMNTFペプチド配列の他に、抗体が容易に入手できる（例えば、販売元から）第2のポリペプチドを含む。例えば、上述のGST融合タンパク質は、GST部分に対する抗体を用いた結合の定量化のためにも用いることができる。その他の有用なペプチドタグには、c-mycからの10残基配列を含むmyc-ペプチド（例えば、Elision et al., J Biol Chem 266: 21150-21157 (1991)を参照）、およびpFLAG系（International Biotechnologies, Inc.）またはpEZ-Z-タンパク質A系（Pharmacia, N.J.）を含む。

【0269】

組成物

【0270】

医薬組成物には、本明細書に開示される1つ以上のMNTFペプチド類似体とともに、医薬的に許容される希釈剤および／または担体を含んでもよい。好適な担体／希釈剤は当該技術分野において周知であり、任意選択的に緩衝塩および保存剤、またはその糖、デンプン、塩もしくはそれらの混合物等の追加成分を含む、生理食塩水またはその他の無菌の水性培地を含む。

【0271】

MNTFペプチドを含有する組成物は、投与のプロトコルおよび／または患者の必要性に適切である任意の好適な形態における使用のために提供されてもよい。

【0272】

本明細書に記載される技術は、幹細胞、神経前駆体細胞、分化した神経細胞、および幹細胞由来運動ニューロンを確立および増殖するために有用な培養培地を含む。該培地は、該幹細胞の分化および幹細胞由来運動ニューロンの長期培養に特に好適である。

【0273】

細胞培養培地は、望ましくはモルフォゲンおよび／または成長因子で補充され、培養されるのに望ましい個別の細胞種に従って最適化される。かかる補充および最適化は、通常の

10

20

30

40

50

当該技術の範囲内である。いくつかの実施形態において、細胞培養培地は、以下のモルフオゲンおよび／または成長因子のうちのいずれかまたはすべてを用いて、以下の適切なレベルで（または有効数字以下で）補充されてもよい：0.001～1 μMのRA、0.001～1 μMのShhもしくはShhアゴニスト、および／または0.01～250 μg/mlの1つ以上のMNTFペプチド類似体。

【0274】

本明細書に記載される医薬製剤は、任意選択的な成分として、医薬的に許容される担体、希釈剤、可溶化剤または乳化剤、および当該技術分野で入手可能な種類の塩を含んでもよい。かかる物質の例には、生理的に緩衝された生理食塩溶液および水等の生理食塩溶液を含む。医薬製剤において有用な担体および／または希釈剤の特定の制限されない例には、水およびリン酸緩衝生理食塩溶液（pH 7.0～8.0）等の生理的に許容される緩衝生理食塩溶液を含む。好適な医薬担体には、これらに限定されないが、滅菌水、塩類溶液（リングル液等）、アルコール、ポリエチレンジコール、ゼラチン、ラクトース、アミロースまたはデンプン等の炭水化物、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等を含む。医薬調製物は滅菌され、所望に応じて、例えば、滑沢剤、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝剤、着色剤、および／または活性化合物と有害に反応しない芳香族物質等の補助剤と混合される。それらは、所望に応じて、代謝分解を低下させるために、他の活性物質（例えば、酵素阻害剤）と組み合わされてもよい。

10

【0275】

本明細書において提供される化合物は、ペプチドの他に、医薬的に許容される担体、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤、表面活性剤、中性脂質またはカチオン脂質、脂質複合体、リポソーム、浸透促進剤、担体化合物およびその他の医薬的に許容される担体もしくは賦形剤等を含む可能性がある医薬組成物中に処方されてもよい。

【0276】

通常、医薬組成物は、治療目的で投与するために処方される。医薬組成物は、インターフェロン、抗菌剤、抗炎症剤、麻酔剤等の1つ以上の活性成分を含んでもよい。非経口投与のための製剤は、緩衝剤、リポソーム、希釈剤およびその他の好適な添加剤を含有する可能性がある無菌水溶液を含んでもよい。本明細書において提供されるペプチドを含む医薬組成物は、ペプチドの消化運搬を促進するために浸透促進剤を含んでもよい。浸透促進剤は、5つの広義のカテゴリー、すなわち、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤、界面活性剤および非界面活性剤のうちの1つに属すると分類することができる（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 8, 91-192 (1991); Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 7, 1-33 (1990)）。これらの広義のカテゴリーのうちの1つ以上からの1つ以上の浸透促進剤が含まれてもよい。

20

【0277】

様々な脂肪酸および浸透促進剤として作用するこれらの誘導体には、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、リシノール酸、モノオレイン（1-モノオレオイル-*rac*-グリセロールとしても知られる）、ジラウリン、カブリル酸、アラキドン酸、グリセリル1-モノカプリン酸、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン（acylcholines）、モノグリセリドおよびジグリセリドならびに生理的にこれらの許容される塩（すなわち、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸等。）を含む。（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems page 92 (1991); Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic

30

40

50

Drug Carrier Systems 7, 1 (1990); El-Hariri et al, J. Pharm. Pharmacol. 44, 651 - 654 (1992)。

【0278】

胆汁の生理的な役目には、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が含まれる (Brunton, Chapter 38 In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. McGraw-Hill, New York, N.Y., pages 934 - 935 (1996))。様々な天然の胆汁酸塩およびそれらの合成誘導体は、浸透促進剤として作用する。よって、「胆汁酸塩」 10 という用語には、胆汁のあらゆる自然に発生する成分およびそれらのあらゆる合成誘導体を含む。

【0279】

1つ以上の浸透促進剤を含む複合体製剤が用いられてもよい。例えば、胆汁酸塩は、複合体製剤を作製するために脂肪酸と組み合わせて用いることができる。キレート化剤には、これらに限定されないが、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、クエン酸、サリチル酸 (例えば、サリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチル酸およびホモバニレート (homovanillic acid))、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9、および -ジケトンのN-アミノ-アシル誘導体 (エナミン) を含む [Lee et al, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems page 92 (1991); Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 7, 1 - 33 (1990); Buur et al, J. Control Re. 14, 43 - 51 (1990)]。キレート化剤は、デオキシリボヌクレアーゼ阻害剤としての役割も果たすという付加的利点を有する。 20

【0280】

界面活性剤には、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル (Lee et al, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems page 92 (1991))、およびFC-43 (Takahashi et al, J. Pharm. Pharmacol. 40, 252 - 257 (1988)) 等の全フッ素置換化合物乳濁液を含む。非界面活性剤には、例えば、不飽和環状尿素、1-アルキル-および1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体 (Lee et al, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems page 92 (1991))、およびジクロフェナクナトリウム、インドメタシンおよびフェニルブタゾン等の非ステロイド系抗炎症剤 (Yamashita et al, J. Pharm. Pharmacol. 39, 621 - 626 (1987)) を含む。 30

【0281】

典型的な医薬的に許容される担体には、これらに限定されないが、結合剤 (例えば、予めゼラチン化されたトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース等)、充填剤 (ラクトースおよび他の糖、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリル酸又はリン酸水素カルシウム等)、滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、水素化植物油、コーンスター、ポリエチングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等)、崩壊剤 (例えば、デンプン、デンブングリコール酸ナトリウム等)、または湿潤剤 (例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等) を含む。 40

【0282】

本明細書において提供される組成物は、医薬組成物中に慣習的に見出される他の補助的成 50

分を、それらの技術上確立された使用レベルでさらに含有することができる。よって、例えば、組成物は、適合性のある医薬的活性物質、例えば、鎮痙薬、収斂薬、局所麻酔もしくは抗炎症剤等をさらに含有してもよく、または、着色料、香味剤、保存剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤および安定化剤等、本明細書に記載される組成物の様々な剤形を物理的に処方するために有用なさらなる物質を含有してもよい。しかしながら、かかる物質は、加えられた時に、本明細書に提供される組成物の成分の生物学的活性を過度に妨害してはならない。

【0283】

化合物が患者に導入される方法に関係なく、ペプチドのインビボでの安定性を促進するために、および／またはペプチドを特定の器官、組織もしくは細胞種に標的化するために、コロイド状分散系が送達ビヒクルとして用いられてもよい。コロイド状分散系には、これらに限定されないが、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、および水／油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、リポソームおよび特徴のない構造の脂質-ペプチド複合体を含む脂質系を含む。コロイド状分散系の一例は、複数のリポソームである。リポソームは、二層構成に配置された脂質からできた1つ以上の外層に囲まれた水性コアを有する顕微鏡レベルの球体である（一般に、Chonn et al, Current Op. Biotech. 6, 698 - 708 (1995) を参照）。

10

【0284】

特定の実施形態において、MNTFペプチドまたはMNTF類似体または本明細書において提供される他の化合物の体内分布を所望の標的の近くに方向付けるために、またはその持続的放出を可能にするために、MNTFペプチドおよびMNTF類似体は、1つ以上のポリマーを含む体内分布指向部分（biodistribution direction moiety）に組み入れられても、またはそれと組み合わせて用いられてもよい。活性物質には、例えば、治療効果を高めるために、体内分布および生物学的利用率を最適化するために、組織損傷を低減するために、治癒を促進するために、または患者の快適さを増すために、有用な化合物を含む。例示的な活性物質には、血管作動性物質、麻酔剤、虚血の治療剤、成長因子およびサイトカインを含む。代替として、微粒子またはナノ粒子ポリマービーズの剤形が、本明細書に提供される組成物において用いられてもよい。本明細書に提供される化合物は、活性物質と組み合わせて用いられ、それに付着する多数のリガンドまたは抗リガンド分子を有する粒子剤形中に封入されてもよい。

20

【0285】

この様式において、単独または他の活性物質と組み合わされた、MNTFペプチドおよびMNTF類似体ならびに本明細書で提供される他の化合物は、その部位において経時的に持続する治療効果を提供するために放出される。持続する放出剤形は、成長因子、サイトカイン等の本明細書に記載される方法において有用なその他の活性物質に関しても有用である。粒子剤形からの活性物質の放出は、核酸および粒子マトリクスの侵食の両方の結果として起こる可能性がある。生分解速度は、活性物質放出動態に直接的な影響を及ぼす。

30

【0286】

特定の実施形態において、MNTFペプチド、MNTF類似体、および本明細書に記載される化合物の制御放出の非経口製剤は、移植片、油性注射剤として、または粒子系として作製することができる。粒子系には、ミクロスフェア、微小粒子、マイクロカプセル、ナノカプセル、ナノ球体、およびナノ粒子を含む。マイクロカプセルは、治療タンパク質を中心として含有する。ミクロスフェアにおいて、治療薬は粒子中に分散される。リポソームは、制御放出および閉じ込められた薬物の薬物標的化のために用いることができる。

40

【0287】

特定の実施形態において、MNTFペプチドおよびMNTF類似体を含む本明細書に記載される医薬組成物は、局在的に、局所的に、経鼻的に、経口的に、経消化管的に、気管支内に、膀胱内に、膣内に、子宮内に、皮下に、筋肉内に、関節周囲に、関節内に、脳脊髄液（ICSF）内に、脳組織内に（例えば、頭蓋内投与）、脊髄内に、創傷内に、腹腔内もしくは腹膜内に、または全身に（例えば、静脈内に、動脈内に、門脈内または直接器官

50

に)投与することができる。

【0288】

当該技術分野で既知であるように、冠内送達を達成するために多様なカテーテルおよび送達経路を用いることができる。例えば、様々な汎用性カテーテル、および本明細書に記載される使用に好適であるように変更されたカテーテルが、Advanced Cardiovacular Systems (ACS)、Target Therapeuticics および Cordis 等の販売供給者から入手可能である。また、当該技術分野で既知であるように、冠動脈に直接注射することにより心筋への送達が達成される場合、冠動脈にカテーテルを導入するために多くのアプローチを用いることができる。例として、カテーテルは大腿動脈に都合よく導入され、腸骨動脈および腹部大動脈を逆方向に通されて冠動脈に入る。代替として、カテーテルは、最初に上腕動脈または頸動脈に導入され、冠動脈まで逆行して通されてもよい。これらの詳細な説明およびその他の技術は、当該技術分野において見出すことができる(例えば、Topol, E J (ed.), The Textbook of Interventional Cardiology, 2nd Ed. (W. B. Saunders Co. 1994); Rutherford, R B, Vascular Surgery, 3rd Ed. (W. B. Saunders Co. 1989); Wyngaarden J B et al. (eds.), The Cecil Textbook of Medicine, 19th Ed. (W. B. Saunders, 1992); および Sabiston, D, The Textbook of Surgery, 14th Ed. (W. B. Saunders Co. 1991) を参照)。

【0289】

本明細書において提供される化合物は、非経口的に投与されてもよい。特定の化合物は、医薬組成物を生成するために医薬的に許容される担体または希釈剤と組み合わされる。好適な担体および希釈剤には、等張性の生理食塩溶液、例えば、リン酸緩衝食塩水を含む。組成物は、非経口、筋肉内、脳内、静脈内、皮下、または経皮投与のために処方されてもよい。投与される製剤はかかる薬剤を含有してもよい。これらの薬剤の例には、カチオン剤(例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストラン)およびリポフェクション剤(lipofectants)(例えば、リポフェクタミン(Lipofectamine)(登録商標)およびトランスフェクタム(Transfectam)(登録商標))を含む。

【0290】

局所投与のための製剤は、経皮パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、ドロップ剤、座薬、スプレー剤、液剤および散剤を含んでもよい。従来の医薬担体、水性、粉末または油性の基剤、増粘剤等は必要であるかまたは望ましい場合がある。コーティングされた手袋、コンドーム等も有用である可能性がある。経口投与のための組成物は散剤または顆粒剤、水または非水性培地中の懸濁剤または溶液、カプセル剤、サシェ剤または錠剤を含む。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤または結合剤が望ましい可能性がある。非経口投与のための組成物は、緩衝剤、希釈剤およびその他の好適な添加剤を含む無菌水溶液を含んでもよい。ある場合においては、治療計画の有効性を高めるために、ペプチドとその他の従来の治療モダリティーを合わせて患者を治療することがより効率的である場合がある。本明細書で用いられる場合、「治療計画」という用語は、治療、対症療法および予防モダリティーを包含することを意味する。

【0291】

投薬は、治療されるべき疾患状態の重症度および応答性、および数日から数ヶ月まで、または治癒がもたらされるもしくは疾患の状態の軽減が達成されるまで続く治療経過を含む、数多くの要因に依存する。本明細書において提供される化合物の毒性および治療有効量は、細胞培養物または実験動物における標準的な製薬手順により決定することができる。例えば、LD₅₀(集団における50%致死量)および(集団における治療上の50%有効量)を決定するためである。毒性と治療効果の用量比は治療係数であり、LD₅₀/E

D₅₀ の比で表すことができる。高い治療係数を示す化合物が有用である。毒性副作用を示す化合物が使用されてもよいが、非感染細胞への潜在的な損傷を最小限に抑え、それにより副作用を低減するために、かかる化合物を患部組織の部位へと標的化する送達系を設計する際には注意を払う必要がある。

【0292】

細胞培養アッセイおよび動物試験から取得したデータは、ヒトにおける使用のための様々な用量を処方するために用いることができる。かかる化合物の用量は、わずかな毒性があるかまたは無毒性である、ED₅₀ を含む循環濃度の範囲内であるべきである。用量は、用いられる剤形および用いられる投与経路に依存して変化してもよい。本明細書に記載される通りに使用されるいずれの化合物についても、細胞培養アッセイから治療上の有効量を推測することが可能である。用量は、細胞培養物において決定されるIC₅₀（すなわち、症状の半分の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度の範囲を達成するように動物にモデルにおいて処方されてもよい。かかる情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために用いることができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定されてもよい。投薬スケジュールは、患者の体内における薬物の蓄積の測定値から計算することができる。用量は、MNTFペプチドおよびMNTF類似体を含む個々の化合物の相対的な作用強度に依存して変化してもよく、通常、インビトロで、およびインビボの動物モデルにおいて効果的であるとみなされたEC₅₀に基づいて推定することができる。当業者は、どのようにおよびどこでMNTFペプチドが投与されるか（例えば、インビトロ、インビボ、局所的に、全身に等）に依存して用量が変化することを理解するであろう。10

【0293】

例えば、一態様において、MNTFペプチドおよびMNTF類似体は、1mlあたり約0.01マイクログラム(μg/ml)～1mg/ml、約0.1μg/ml～約50μg/ml、約0.1μg/ml～約150μg/ml、約1μg/ml～約200μg/ml、および約0.1μg/ml～約500μg/ml（標的部位（例えば、ES幹細胞の細胞培養物中）での最終濃度として、これらの範囲内の任意の範囲を含む）を達成するために投与されてもよい。

【0294】

代替として好適な用量は、投与経路に依存して、例えば、約0.1μgから合計用量約1グラムまで変化してもよい。具体的な用量および送達方法に関する指針は文献に提供されており、通常は当該技術分野における実践者に入手可能である。当業者は、ヌクレオチドには、タンパク質またはそれらの阻害物質とは異なる処方を用いるであろう。同様に、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および本明細書において提供される化合物の送達は、特定の細胞、状態、および位置に特異的である。一般に、用量は0.01mg/kg～1000mg/体重kg、またより典型的には、例えば、0.1mg/kg～300mg/体重kgの範囲であり、毎日、毎週、もしくは毎年1回以上、または2～20年の期間に渡って1回以上与えられてもよい。特定の実施形態において、投薬は手術直後から24時間以内に行われてもよく、別の実施形態においては、投薬は2時間から24時間までの間に行われる。長時間作用性の組成物は、特定の製剤の半減期およびクリアランス速度に依存して、3～4日ごと、毎週、または隔週で投与されてもよい。当業者は、測定された薬物の体液または組織内での常時時間および濃度に基づいて、投薬を繰り返す割合を容易に推定できる。治療の成功に続いて、疾患の再発を防ぐために、患者に維持療法を受けさせることが望ましい場合がある（選択された化合物が0.01mg/kg～100mg/体重kg、1日1回以上～20年ごとに1回以上の範囲内の維持量で投与される）。特定の状態の治療または防止において、一般に適切な用量レベルは約0.001～100mg/患者の体重kg/日であり、単一または複数回の用量で投与することができる。好適な用量レベルは、約1～約40mg/kg/dayであってもよい。特定の実施形態において、MNTFペプチドおよびMNTFペプチド類似体を含む本明細書に提供される化合物は、約1マイクロモル～約1マイクロモル、約10マイクロモル～約500マイクロモル304050

、または約30マイクロモル～約300マイクロモル、および約25マイクロモル～約300マイクロモルの損傷部位における最終濃度、および約25マイクロモル、または約160マイクロモル、または約300マイクロモルの損傷部位における最終濃度、またさらにより典型的には約1マイクロモル～約100マイクロモルの間のインピボ濃度を実現するための量で、投与される。

【0295】

特定の実施形態において、1、5、10、20、50、100、150、または200mg/kgの用量が投与されてもよい。

【0296】

本明細書に記載される化合物は、診断法、治療法、予防法、研究試薬およびキットにおいて用いることができる。該当する化合物（例えば、MNTFペプチドおよびMNTF類似体）を検出するための手段の提供は、ルーチン的に実現することができる。かかる提供には、酵素結合、放射標識、または他のいずれの好適な検出系を含んでもよい。該当する化合物の有無を検出するためのキットも調製することができる。10

【0297】

本明細書で用いられる場合、脊髄傷害は、腫瘍、機械的外傷、および化学的外傷に起因する損傷を含んでもよい。同じまたは類似する方法は、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、または脊髄傷害に罹患する対象において運動機能を回復させることが企図される。

【0298】

特定の実施形態において、MNTF類似体のうちの1つを投与することは、予防的機能も提供する。かかる投与は、対象におけるまたは筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、もしくは脊髄傷害に罹患する恐れのある対象において、運動機能を保存する効果を有する。20

【0299】

特定の実施形態において、MNTF類似体の投与は、MNTF経路の完全性を保つ。

【0300】

特に、脊髄傷害、神経変性疾患、脳卒中もしくは脳虚血、ハンチントン病、パーキンソン病、多発性硬化症、ALS、アルツハイマー病、および糖尿病性神経障害を治療する（症状の前または後に）ための方法は、配列番号：1～142からなる群から選択されるMNTFペプチド類似体を投与するステップを含む。

【0301】

特定の態様において、組成物および、損傷した経路を修復するステップ、またはさらなる損傷を阻害するステップを含む、神経経路への損傷時、またはかかる損傷が見込まれる時に、神経経路を維持するために十分な時間および濃度で本明細書に定義されるように治療的有効量のMNTF類似体タンパク質を患者に投与するステップを含む治療的な処置法が提供される。30

【0302】

別の態様において、本明細書に記載される技術は、神経経路を維持するための組成物および治療的な処置法を含む。かかる治療的な処置法には、神経経路への損傷時、またはかかる損傷が見込まれる時に、内在するMNTFの治療的に有効な濃度を刺激する化合物を患者に投与することを含む。40

【0303】

本明細書に記載される態様および実施形態は、神経傷害に対する身体の免疫および炎症応答に関連する組織破壊の影響からニューロンを保護するための方法を提供する。

【0304】

特定の実施形態において、損傷した樹状突起または軸索を再生することを含む、損傷したニューロンおよび神経経路の細胞修復を刺激するための方法、組成物およびデバイスが提供される。

【0305】

一態様において、本明細書に記載されるMNTF類似体は、末梢神経系の損傷した神経経路の修復において有用である。具体的には、MNTFは、切除されたまたは別様に損傷し50

た神経線維を含む、損傷した神経経路を修復するために有用である。特に、本明細書に記載されるMNTFは、血管新生およびミエリン外筒の再形成を含む、完全な軸索神経再生を刺激する能力を持つ。MNTFは、MNTFをその部位に維持することができる生体適合性、生体吸収性の担体内において損傷部位に提供することができ、必要があれば、軸索を切断されたニューロンの近位端から遠位端へと方向付けるための手段として提供することができる。例えば、軸索の成長を方向付けるための手段は、10mmを上回るような延長距離を越えて神経再生が誘導される場合に必要である。これらの機能を提供する能力を持つ多くの担体が想定される。例えば、有用な担体には、実質的に不溶性の物質、またはラミニン、ヒアルロン酸もしくはコラーゲン、またはその他の好適な合成の生体適合性ポリマー物質（ポリ乳酸、ポリグリコール酸もしくはポリ酪酸および／またはそのコポリマー等を含む）を含む、本明細書に開示されるように調製された粘性溶液を含む。

【0306】

特定の実施形態において、MNTF類似体は、損傷した経路の距離に及ぶ神経ガイダンスチャネル（nerve guidance channel）に配置される。チャネルは、保護用の覆いとして、および神経突起の成長を導くための物理的手段としての両方の役目を果たす。有用なチャネルは、修復されるべき神経の隙間を補うのに十分な寸法を有し、切断されたニューロン端を受けるために適応した開口部を有する管状の構造を持つ、生体適合性の膜を有する。膜は、シリコンまたは生体適合性ポリマー等（ポリエチレンまたはポリエチレンビニルアセテート等）の任意の生体適合性、非刺激性の物質から作製されてもよい。ケーシングも、例えば、コラーゲン、ヒアルロン酸、ポリ乳酸、ポリ酪酸、およびポリグリコール酸を含む、生体適合性、生体吸収性のポリマーから構成されてもよい。一実施形態において、チャネルの外側表面は実質的に不透過性である。

【0307】

別の態様において、本明細書に記載されるMNTFは、神経組織への初期損傷に対する身体の免疫／炎症応答に関連した損傷から保護するために有用である。かかる応答は、自己免疫機能障害、腫瘍性病変感染、化学的外傷もしくは機械的外傷、疾患によって、ニューロンまたはグリア細胞への血流中断によって、または神経もしくは周囲の物質へのその他の外傷によって引き起こされる、神経組織への外傷の後に起こる可能性がある。例えば、塞栓性発作に見られるような神経の血液供給の閉塞に続いての低酸素または虚血・再灌流に起因する主な損傷は、免疫学的に関連していると考えられる。また、多くの原発性脳腫瘍と関連した損傷の少なくとも一部も、免疫学的に関連していると思われる。MNTF類似体の適用は、直接的または全身的のいずれかで、免疫学的に神経傷害と関連した応答を緩和および／または阻害する。

【0308】

別の実施形態において、本明細書に記載される技術は、保存的アミノ酸配列の変異体、変性ヌクレオチド配列の変異体によってコードされるタンパク質、および保存されたMNTFドメインを共有し、標準的なストリンジエンシー条件下において、本明細書に開示されるMNTFタンパク質をコードするDNAにハイブリダイズするための能力を持つDNAによってコードされるMNTFタンパク質を制限なく含む、本明細書に列挙されるあらゆるMNTFペプチドの生物学的に活性な種（系統的）変異体の使用を包含する。

【0309】

本明細書に記載される化合物は、研究目的のために用いられてもよい。よって、ペプチドによって示される特異的ハイブリダーゼーションは、アッセイ、精製、細胞性生物の調製、および当業者に理解される可能性のあるその他の方法論において用いることができる。

【0310】

本明細書において用いられる技術的および科学的用語は、他に定義されない限りは、本開示が関係する当業者に一般的に理解される意味を有する。本明細書において当業者に既知である様々な方法論が参照される。参照されるかかるそれらの方法論を規定する出版物およびその他の資料は、参照することにより、それらの全体がすべて規定されているかのごとく本明細書に一体化される。組換えDNA技術の一般原理を規定する標準的な参考資料

10

20

30

40

50

には、Sambrook, J., et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Planview, N.Y. (1989) and Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001) (本明細書において、ともにまたは個別に「Sambrook」として参照される); McPherson, M.J., Ed., Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1991); Jones, J., Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford Science Publications, Oxford (1992); Austen, B.M. and Westwood, O.M.R., Protein Targeting and Secretion, IRL Press, Oxford (1991); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al, eds., 1987, including supplements through 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al, eds., 1991); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W.H. Albert, and N.A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York, and Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (一緒に、および個別に、本明細書において、Harlow and Laneと称する), Beaucage et al eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); and Agrawal, ed., Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties Human Press Inc., New Jersey, 1993); Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach (E.J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. (1987); Guide to Techniques in Mouse Development (P.M. Wasserman et al eds., Academic Press (1993); Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro (M.V. Wiles, Meth. Enzymol 225: 900 (1993); Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for 10 20 30 40 50

Application to Human Biology and Gene Therapy (P. D. Rathjen et al, Reprod. Fertil Dev., 10: 31 (1998)); CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances, M. H. Tuszyński & J. H. Kordower, eds., Academic Press, (1999)を含む。

【0311】

本明細書に記載される技術の実践において有用である特定の技術は、脳組織から得られる多分化脳神経幹細胞について報告する米国特許第5,851,832号；新生児の大脳半球からの神経芽細胞の生成について報告する同第5,766,948号；哺乳類の神経堤幹細胞の使用について報告する同第5,654,183号および同第5,849,553号；哺乳類の多分化性CNS幹細胞の培養物から分化したニューロンをインビトロでの產生することについて報告する同第6,040,180号；神経上皮肝細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞、および系列限定(lineage-restricted)神経細胞前駆体の再生および単離を報告するWO98/50526およびWO99/01159；ならびに胎仔性前脳から得られ、グルコース、トランスフェリン、インスリン、セレン、プロゲステロンおよびその他の成長因子を含む培地で培養される神経幹細胞について報告する米国特許第5,968,829号を含む、様々な特許および特許出願に記載されている。

【0312】

当業者に既知であるいずれの好適な物質および/または方法が、本明細書に記載される技術を実施するために用いられてもよいが、物質および/または方法の制限されない例は本明細書に記載される。

【0313】

本明細書に開示される技術は、制限するためではなく例示のために提供される以下の実施例を参照することにより、特定の態様において理解され得る。以下の実施例において参照される物質、試薬等は、特に記載が無い限りは、販売元から入手される。

【0314】

以下に記載される特定の例は、本明細書において提供される参照文献を含んでいた。

【0315】

Chau RMW, Ren F, Huang W, Jen LS. Muscle neurotrophic factors specific for anterior horn motoneurons of rat spinal cord. Recent Advances in Cell. And Mol. Biol. 1992, 5: 89-94.

【0316】

Copeland RL Jr, Leggett YA, Kanaan YM, Taylor RE, Tizabi Y. Neuroprotective effects of nicotine against salsolinol-induced cytotoxicity: implications for Parkinson's disease. Neurotox Res 2005 Nov; 8(3-4): 289-93.

【0317】

KM Biotech. Published PCT Patent Application: WO 98/13492, 1998.

【0318】

Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Shimazu S, Oude H, Yoneda F, Iwasa K, Naoi M. Neuroprotective function of R-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane, [R-(-)-BPAP], aga

10

20

30

40

50

inst apoptosis induced by N-methyl(R)salsolinol, an endogenous dopaminergic neurotoxin, in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Life Sci.* 2004 May 21; 75(1):107-17.

【0319】

Nussbaum D, Ash D, Jabs E, Brushart T. Mononeuron trophic factor (MNTF) From Gene to Function. *Soc. For Neuroscience, New Orleans*, LA, 2003.

10

【0320】

Shavali S, Ren J, Ebadi M. Insulin-like growth factor-1 protects human dopaminergic SH-SY5Y cells from salsolinol-induced toxicity. *Neurosci Lett.* 2003 Apr 10; 340(2):79-82.

【0321】

Wang AM, Chau RMW, Chow SP, Zhang ZY, Li ZM. Effects of myogenic 22 and 35kD neurotrophic factors on axonal regeneration in free peripheral autografts into rat spinal cord. 1995, 5(6):248-252.

20

【0322】

Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchtenhaler I, Kindy MS, Wise PM. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98:1952-1957.

30

【0323】

Ellsworth JL, Garcia R, Yu J, Kindy MS. Time window of fibroblast growth factor-18-mediated neuroprotection after occlusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004, 24:114-123.

【0324】

Ellsworth JL, Garcia R, Yu J, Kindy MS. Fibroblast growth factor-18 reduced infarct volumes and behavioral deficits after transient occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke.* 2003, 34:1507-1512.

40

【0325】

Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998, 18:1283-1287.

【0326】

KM Biotech International Patent WO 98/13

50

492, 1998.

【0327】

Mattson MP, Zhu H, Yu J, Kindy MS. Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia in vivo and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis. *J Neurosci*. 2000, 20: 1358-1364.

【0328】

Di X, Huang W. Localization and morphometric study on motoneuronotrophic factor 1 and its receptor in developing chorionic villi of human placenta. *Acta Anatomica Sinica*, 1998, 29: 86-89.

【0329】

Xinyu D, Weiquan H. Localization and morphometric study on motoneuronotrophic factor 1 and its receptor in developing chorionic villi of human placenta. *Acta Anatomica Sinica*, 1998, 29: 86-89.

【0330】

本明細書において用いられる場合、MNTFペプチドおよび配列ならびに／またはその機能的類似体の有効性は、以下の実施例に記載される実質的に類似するおよび／または同等のプロトコルによって決定されてもよいことが企図される。また、配列番号：1～142に規定されるいずれのMNTFペプチド類似体およびその変異体の有効性は、本明細書に規定される実験条件に従って決定されてもよいことが企団される。

【0331】

本明細書において用いられる場合、例示的なMNTFペプチド類似体GM6、GM602、GM603、GM604、MNTF6merのすべては、配列FSRYAR（配列番号：2）を含有するMNTF6-merを参照する。

【実施例1】

【0332】

MNTF血液脳関門通過試験

【0333】

本実施例に関する略語／専門用語

【0334】

「MNTF」は、運動ニューロン栄養因子、またはそのペプチド類似体を意味する。

【0335】

「GM6」および「6mer」は、MNTFの例示的な6アミノ酸ペプチド類似体、すなわちFSRYAR（配列番号：2）を意味する。

【0336】

「BBB」は、血液脳関門を意味する。

【0337】

「Genervon」および「GB」は、Genervon Biopharmaceuticals, LLCを意味する。

【0338】

「I.V.」は、静脈内を意味する。

【0339】

「抗6mer抗体」は、抗GM6抗体を意味する。

10

20

30

40

50

【0340】

「NTS」は、開発業務受託機関であるNeurological Testing Serviceを意味する。

【0341】

血液脳閂門を横断して脳に至るための、運動ニューロン栄養因子(MNTF)の合成6アミノ酸類似体(GM6;FSRYAR)を試験する。

【0342】

GM6は、合成された6アミノ酸ペプチドMNTF類自体である。GM6は固体として提供され、製剤はNTSにより調製された(溶液は4℃で保存)。

【0343】

MNTFは、末梢の坐骨神経、末梢の筋皮神経、脳顔面神経、脳舌下神経、および首、胸部、および上肢の筋肉を制御する脊髄の一部を含む、様々なラット神経系において試験されてきた。脊髄モデルにおいて、MNTFはラットの片側脊髄の神経移植に適用された。MNTFは、炎症を抑え、変性を制限し、移植された神経の再生を増進した。多くの試験が、MNTFまたはGM6が神経に直接適用された場合の栄養および刺激作用について、合成されたMNTFまたはGM6の有効性を十分確立されたラット末梢神経系モデル系において実証している。また、MNTFは運動ニューロンの再生および生存を促進することが明らかになっている。

10

【0344】

さらに、この株において運動ニューロン変性疾患につながる遺伝子欠損から運動ニューロンを救助するMNTFの能力を調査するために、二重劣性遺伝子を有する動搖病マウスのモデルを代用として選択した。予備実験において、6週齢において筋肉内投与された1回用量のMNTFは、運動ニューロン疾患の発達を減退させた。これは、未処置の動搖病マウスの生存を、9~12週から、処置された動搖病マウスにおける28~63週まで有意に増加させた。

20

【0345】

様々な動物系に対するMNTFおよびGM6の効果を評価した。1000匹を超えるSprague Dawleyラットならびに動搖病マウスおよび正常な同腹子の両方の15匹を用いた研究では、安全性の問題は特定されなかった。神経保護、炎症および神経再生においてMNTFが果たす潜在的な役割のために、神経障害の処置について、MNTFおよびそのペプチド類似体を含む医薬組成物を評価した。中枢神経系疾患および障害の処置に対する大きな障害は、薬剤を中枢神経系に送達することが困難であることである。薬剤の治療可能性を評価するために、薬剤の生物学的利用能および様々な神経障害に対する効果の決定を行った。

30

【0346】

gm6の静脈注射による脳に対する利用可能性の評価

【0347】

方法および材料

【0348】

試験デザイン

40

【0349】

C57BL/6マウスにGM6を示された用量で投与し、脳内のGM6を調べた。脳の半分をGM6の免疫細胞化学的分析に使用し、残り半分(脳)をELISA分析用に凍結した。

【0350】

インビボ法

【0351】

それぞれ体重約25グラムの雄C57BL/6(Jackson Laboratory)マウスに、実験前および実験中、自由に餌および水を与えた。実験前に1週間、動物を順化させた。ビヒクリまたはGM6を、0.2または2mg/kgで、動物に尾静脈から

50

静脈内ボーラス注射した。GM6を4℃で保存された100%生理食塩溶液でもどすことにより、GM6を原液として調剤した。ビヒクル対照には生理食塩溶液を投与した。

【0352】

免疫組織化学解析

【0353】

組織切片を脱パラフィン化してトリス緩衝生理食塩水(TBS) pH 7.4 中で洗浄し、適切な血清(ヤギ)でブロックした。切片を4℃で一晩ブロックし、次いで1次抗体(抗6-mer抗体)に4℃で一晩処理した。切片をTBS中で洗浄し、2次抗体を添加して、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、Vector ABC Eliteキットで説明される通りに切片をインキュベートし、ジアミノ安息香酸(DAB)で染色した。水中で反応を停止し、キシレンへの処理後にカバースリップをのせた。Quick Captureフレームグラバカードを備えたPower Macintoshコンピュータ、オリンパス社製顕微鏡に装着された日立CCDカメラおよびカメラスタンドで構成されるコンピュータ支援画像分析システムで、各切片において免疫細胞化学的染色された領域を決定した。NIH Image Analysis Software、v.1.55を使用した。10切片に対し、画像を撮影してGM6ペプチドの総領域を決定した。処置状態に対し盲検化された1人の操作者が、すべての測定を行った。

10

【0354】

ELISA分析

【0355】

20

試料中のGM6レベルを測定するために、競合ELISAキットを使用した。親和性精製ウサギ抗6Merを被覆緩衝液中10ug/mlでELISAプレート上に被覆した。アッセイ系中の1μM(最終希釈)で6Mer-ビオチンを使用した。既知濃度のGM6(コンペティター)を参照用標準として使用し、検量線を確立するための試験において、80μMから開始し、0.625μMまで2桁漸減させた。検量線に基づき、被験試料の濃度をそのOD450観察から推定した。

【0356】

2%BSA含有100mMトリスHCl、pH 7.0、1M NaCl、4mM EDTA、2%トリトンX-100、0.1%アジ化ナトリウム、およびプロテアーゼ阻害剤(Complete TM, Mini, Boehringer Mannheim)を含有する細胞溶解緩衝液中で、脳組織を調製した。組織湿重量に対し、10体積量の緩衝液中でホモジネートを調製した。ホモジネートを14,000×gで30分間遠心分離した。得られた上清を、適切な体積調整を行いELISAに使用した。

30

【0357】

アッセイのために、抗6Mer-pAbをELISA被覆緩衝液中10μg/mlまで希釈した。96ウェルマイクロタイタープレートを希釈pAbの100μl/ウェルで被覆した。プレートにカバーして一晩冷蔵保存した。翌日、プレートを、3%BSAを含む200μl/ウェルTBSでブロックし、室温で60分間保持した。プレートをTBST(TBS+0.05%Tween 20)で3回洗浄した。各プレートに対し、10ml 1μM 6Mer-ビオチンおよび1ml標準ミックスを以下のように調製した：80μM

40

6Merを含む1μM 6Mer-ビオチン。各プレートに対し、レーン1および2を検量線に使用した。1μM 6Mer-ビオチン(100μl)をA1およびA2以外のすべてのウェルに添加し、200μl/ウェルの標準ミックスをA1およびA2に添加した。各ウェルから100μl試料を取り出し次のウェルに混合する、つまり少なくともピペット操作を少なくとも8回行うことにより、ウェルA1およびA2からウェルH1およびH2までの連続的な2桁希釈を行った。最終ウェル(H1およびH2)での余分な100μlは廃棄した。試験試料(脳ホモジネート)をAb希釈緩衝液中で希釈し、1μM 6Mer-ビオチンと1:50で混合した。加振器で、プレートを400rpmで2時間、室温で混合した。試料をTBSTで6回洗浄した。Ab希釈緩衝液中でストレプトアビジン-HRPを1:2000に希釈することにより、ストレプトアビジン-HRP(プレ

50

ート毎 10 ml) 溶液を調製した。加振器で、プレートをさらに 1 時間、室温で混合した。試料を T B S T で 8 回洗浄した。50 µl / ウェル基材 (T M B S , G e n e t e l) を添加し、5 分間発育させた。反応を 50 µl 1 M H C l で停止し、すぐに O D 450 を読み取った。

【 0 3 5 8 】

統計解析

【 0 3 5 9 】

結果は平均 ± 標準偏差として表される (S D) 。 E L I S A および免疫組織学的データにおける差の有意性を、t - 検定を用いて分析した。

【 0 3 6 0 】

試験からの動物の除外

【 0 3 6 1 】

以下のいくつかの基準に基づき、動物を試験から除外する。

【 0 3 6 2 】

試験の終了前に (任意の時点で) 死亡した動物。

【 0 3 6 3 】

被験物質の投与後に重度の合併症を発現した動物。

【 0 3 6 4 】

処置群

【 0 3 6 5 】

すべての群は G M 6 に供されたか、または対照であった。動物 (30 匹の動物) を、示された用量のビヒクルまたは M N T F の尾静脈による静脈内ボーラス注射に供した。

【 表 1 】

表—マウス B B B モデル :

群	化合物	用量 (m g / k g)	経路
C 5 7 B L / 6 マウス			
1 (n = 10 マウス)	ビヒクル	0	I V
2 (n = 10 マウス)	G M 6	0. 2 m g / k g	I V
3 (n = 10 マウス)	G M 6	2 m g / k g	I V

10

20

30

【 0 3 6 6 】

評価項目

【 0 3 6 7 】

脳内 G M 6 。

【 0 3 6 8 】

すべての試験群を N T S に提供した。G M 6 は固体材料として N T S に提供した。試験群のすべての動物には、上に示した通り投与を行った。

【 0 3 6 9 】

試験の終わりに、脳の 1 / 2 を G M 6 の免疫細胞化学的分析に使用した。残り 1 / 2 を G M 6 の E L I S A 分析に使用した。

40

【 0 3 7 0 】

結果

【 0 3 7 1 】

マウスにおける M N T F 。血液脳関門試験

【 0 3 7 2 】

脳内の G M 6 の相対的利用可能性を評価した。ビヒクルまたは G M 6 の静脈注射を受けたマウス (野生型) からのデータ。

【 0 3 7 3 】

免疫細胞化学的分析 :

50

【0374】

G M 6 : M N T F 投与後、脳を取り出し、抗 6 m e r 抗体を使用して、G M 6 の免疫細胞化学的分析のために検査した。対照動物と比較して、いずれの動物の組織においても、免疫反応性は検出されなかった。

【0375】

E L I S A 分析 :

【0376】

競合 E L I S A キットを使用して脳試料中の G M 6 レベルを測定するために、上述のように試料を調製して E L I S A に供した。図 1 および表 4 に示されるように、E L I S A アッセイを用いて脳内に M N T F G M 6 が検出された。E L I S A は、基底レベルの脳内の内因性 G M 6 を検出した (0.4 μM)。0.2 mg / kg の G M 6 を注射された動物では、G M 6 の 400 % の増加が検出され (1.760 μM)、一方、2 mg / kg の G M 6 の注射は、4 時間後の脳内で G M 6 の 3000 % の増加を発生させた (12.92 μM)。これらのデータは、G M 6 の静脈注射は、脳内のペプチドの分配を可能にすることを示唆している。

【表 2】

表 4. 脳内 M N T F (L V 注射) 、(図 1 に示される)

化合物	マウス株	E L I S A M N T F (μM)	P 値 (増加)
ビヒクル	WT	0.4050 ± 0.3027	0
M N T F 0.2 mg / kg	WT	1.760 ± 0.9834	0.0001 (434%)
M N T F 2 mg / kg	WT	12.92 ± 4.635	0.0001 (3190%)

死亡率：本試験では死亡は見られなかった。

【0377】

これらのデータに基づき、M N T F は、神経障害からの保護を提供することができ、また傷害または移植後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、M N T F (G M 6) の 6 アミノ酸類似体の、効果的かつ効率的に血液脳関門を横断する能力を実証している。0.2 mg / kg および 2 mg / kg 単回ボーラス用量での G M 6 の静脈内投与は、脳内の G M 6 レベルの用量依存性の増加を実証した。これは、G M 6 が静脈内投与を介して脳にアクセスでき、有益な効果を決定するために様々な疾患モデルに使用可能であることを示した。

【0378】

静脈内投与された場合、G M 6 は 4 時間後に脳に存在することが判明した。脳内の G M 6 レベルは用量依存性であったが、G M 6 が静脈内投与を介して脳にアクセスできることを示している。

【0379】

実施例 2

【0380】

脳卒中：M C A O モデルにおける脳卒中の M N T F 処置

【0381】

M N T F ペプチド類似体 G M 6 0 2 (配列番号 : 2 , F S R Y A R) を、中大脳動脈閉塞 (M C A O) マウスモデルにおける有効性について試験した。M C A O マウスモデルにおける G M 6 0 2 の有効性を決定するために、マウスを 1 時間の虚血および 24 時間の再灌流に供した。再灌流開始直後に、尾静脈からの静脈内ボーラスにより G M 6 0 2 をいくつかの用量でマウスに注射し、脳血流 (C B F) 、心拍数 (H R) 、血圧 (B P) 、p O₂ 、p C O₂ 、p H 、神経学的欠損 (N D) 、梗塞容積 (I F V) の変化について検査した。G M 6 0 2 (1 mg / kg または 5 mg / kg) の静脈内 (I V) 単回投与を検査した。G M 6 0 2 の投与は、H R 、B P 、p O₂ 、p C O₂ 、または p H の変化を示さなかつた。G M 6 0 2 投与により、対照群を上回る再灌流後の C B F の有意な増加が観察され、

10

20

30

40

50

これは血流の閉塞により引き起こされた虚血効果の低減を助ける。GM602注射後、NDおよびIFVに用量依存性の変化が検出された。1mg/kgおよび5mg/kgの両方において、GM602は、梗塞損傷からの有意な保護を示したが、これは、神経学的欠損の維持と解釈される。これらのデータは、MCAOのマウスモデルにおいて、GM602が、IV注射後に脳に対する神経保護作用を有することを示唆している。

【0382】

本実施例に関する略語／専門用語

【0383】

「MNTF」は、運動ニューロン栄養因子を意味する。

【0384】

「MNTF_{6mer}」は、MNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体、例えばFSRYARを意味する。

10

【0385】

「GM602」は、脳卒中に対するMNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体を意味する。

【0386】

「GM602(1)」は、1mg/kgのGM602用量を意味する。

【0387】

「GM602(5)」は、5mg/kgのGM602用量を意味する。

【0388】

「MCAO」は、中大脳動脈閉塞を意味する。

20

【0389】

「GB」は、Gener von Biopharmaceuticals LLCを意味する。

【0390】

「IV」は、静脈内を意味する。

【0391】

「CBF」は、脳血流を意味する。

【0392】

「HR」は、心拍数を意味する。

【0393】

30

「BP」は、血圧を意味する。

【0394】

「ND」は、神経学的欠損を意味する。

【0395】

「IFV」は、梗塞容積を意味する。

【0396】

MNTFは、機能により発見される特定のヒト染色体の場所を有する内因性神経栄養因子である。MNTFは、ヒト神経系に対し非常に特異的であり、妊娠第1期の人間の胎児における完全な神経系の発育の間に急速に発現し、9週目にピークを迎える(Dian Huang, 1998)。MNTFは、非常に特異的な受容体に完全に結合する神経信号分子である。動物試験およびインビオ試験において実証されるように、MNTFの特異的な機能は、胚性幹細胞の運動ニューロンへの分化、運動ニューロンの維持および生存、運動性軸索の誘導による再生、および目標筋肉および器官の再弱体化である(Chau et al., 1992; Nussbaum et al., 2003)。中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)が、疾患、障害、または傷害により引き起こされる攻撃下にある場合、MNTFは、神経保護、抗アポトーシス、抗酸化、抗炎症、および抗瘢痕的な神経再生および修復のための保護的および許容的な環境を形成する。

40

【0397】

多くの研究が、末梢の坐骨神経、末梢の筋皮神経、脳顔面神経、脳舌下神経、および首、胸部、および上肢の筋肉を制御する脊髄の一部を含む、様々なラット神経系におけるMN

50

TF の有効性を実証している (Wang et al., 1995)。半切片化ラット脊髓モデルにおいて、MNTF は、炎症を抑え、変性を制限し、移植された神経の再生を増進した (KM Biotech PCT, 1998)。多くの試験が、合成された MNTF または MNTF 6mer (FSRYAR ; 配列番号 : 2) の栄養および刺激作用を、十分確立されたラット抹消神経系モデルにおいて実証している (Nussbaum et al., 2003)。また、MNTF は運動ニューロンの再生および生存を促進することが明らかになっている (KM Biotech PCT, 1998)。さらに、6週齢時に1回用量の 35 ng MNTF を投与された二重劣性遺伝子を有する動搖病マウス (NIH) は、この株における神経変性遺伝疾患を減退させた (KM Biotech PCT, 1998)。

10

【0398】

MNTF の活性部位の 1 つに対する 6 アミノ酸の配列類似体 (FSRYAR) を、MNTF 活性を有する薬剤候補として調査した。独立した研究グループが、独自の確立されたアッセイおよびプロトコルを用いて以下の CNS および PNS 実験を行った。1. MNTF 6mer 類似体は、血液脳関門を通過して IV 注射により脳に進入することができる事が示されている。2. L-2 - ヒドロキシグルタル酸 (LGA) は、神経系において酸化ストレスおよびアポトーシスを誘発する。ゼブラフィッシュバイオアッセイにおいて、MNTF 6mer は CNS において LGA 誘発アポトーシスを保護し、中脳においてアポトーシスを 85 % 低減した。3. 8 mm ギャップでのラット坐骨神経離断試験では、MNTF 処置動物は、用量応答的に運動ニューロン再生を有意に改善し (最適用量で $p < 0.002$)、DRG 神経再生を促進した。4. 離断大腿神経ラットモデルにおいては、運動ニューロンの数は、MNTF 6mer 処置動物において用量応答的に筋肉に正確に投射した。最適用量では、筋肉に正確に投射した運動ニューロンの数は、皮膚に不正確に投射した運動ニューロンの数の 3 倍である ($p < 0.0001$)。5. ゼブラフィッシュバイオアッセイにおいて、MNTF 6mer は PNS において LGA 誘発アポトーシスを保護し、末梢神経筋接合部においてアポトーシスを 49 % 低減した。

20

【0399】

例示的な MNTF ペプチド GM602 (FSRYAR ; 配列番号 : 2) 、運動ニューロン栄養因子の 6 - アミノ酸ペプチド類似体 (MNTF 6mer) の、脳を急性虚血および再灌流傷害から保護する能力を評価した。GM602 は、GMP コンプライアンス (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lot C811) のもとで化学的に合成された。本試験は、Neurological Testing Service, Inc. (NTS, Charleston, SC) との契約の下で行われた。GM602 は固体として NTS に提供され、製剤は NTS により調製された (溶液は 4 度保存)。

30

【0400】

方法および材料

【0401】

それぞれ体重 22 - 25 グラムの動物 C57BL / 6 マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、実験前に自由に餌および水を与えた。動物をハロタンで麻酔した (マスクにより 70 % / 30 % NO₂ / O₂ に 1 %)。テルカフ装置を介して平均動脈圧 (MAP) を監視し、動脈 pH レベルおよび PaCO₂ および PaO₂ を決定するために、血液試料を採取した。Visitech System 血圧モニタを使用して、MAP および心拍数を記録した。

40

【0402】

直腸体温計および側頭筋に挿入されたサーミスタプローブで、脳の温度を監視した。動物の体温は、ウォータージャケット付き加熱パッドを使用して 37 °C に維持した。脳の温度を、虚血前 1 時間から虚血後 6 時間まで監視し、30 分間隔で記録した。

【0403】

実験群

50

【0404】

すべての動物を、1.0時間の虚血、続いて24時間の再灌流に供した。ビヒクル群($n = 10$)または1mg/kgまたは5mg/kgの用量でのGM602の静脈注射で処置した群($n = 10$)に、動物を無作為に割り当てた。GM602の調剤(CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lot C811)は、NTSにより、GM602を4℃で保存された生理食塩溶液でもどすことにより原液として行われた。ビヒクル対照には生理食塩溶液を投与した。再灌流の開始直後に、尾静脈からの静脈内ボーラス注射を行った。調査者は、処置群については情報を与えられなかった。

【0405】

虚血の誘発

10

【0406】

本試験は、虚血の一過性モデルに関連した。各マウスを麻酔し、外頸動脈(CEA)および総頸動脈(CC A)を分離した。サーミスタプローブを直腸および側頭筋に挿入し、体温および脳の温度を監視し、外部加温により36~37℃に維持した。左総頸動脈(CC A)を、頸部の正中切開により露出した。上甲状腺動脈および上後頭動脈を、電気凝固して分割した。マイクロ手術クリップを外頸動脈(CEA)の起点の周りに設置した。6-0の絹糸でCEA遠位端を結紮し、離断した。6-0絹糸は、CEA断端の周りに緩く縛った。クリップを取り外し、5-0ナイロン縫合糸(シリコーン被覆)の火造り先端(fire-polished tip)を優しくCEA断端に挿入した。6-0絹糸の輪を断端の周りで締め付け、内頸動脈ICA内に、およびそれを通して、前大脳動脈 ACAに収まるまでナイロン縫合糸を約13mm前進させ(体重により調節される)、それにより前交通動脈および中大脳動脈を閉塞させた。ナイロン縫合糸を1時間設置した後、それをCEAに引き戻し、切開部を閉鎖した。

20

【0407】

組織学的検査

【0408】

虚血を誘発してから24時間後、組織学的検査のために、ペントバルビタールナトリウム(50mg/kg)の腹腔内注射で動物を麻酔した。4℃の10%リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で経心臓的に脳を灌流した。脳を取り出し、Rodent Brain Matrix内に入る前に-20度で15分間冷凍した。冠状切片(1mm厚)を調製し、37℃での2%塩化トリフェニルテトラゾリウム(TTC)染色に供した。前頭極からの2mmから始め、梗塞の吻側端-尾端を通した7つの連続した1mm厚の冠状切片を各脳から採取した。TTC染色切片を10%中性緩衝ホルマリンに入れ、少なくとも24時間、暗所で4℃で保持した。Quick Captureフレームグラバカードを備えたPower Macintoshコンピュータ、オリンパス社製顕微鏡に装着された日立CCDカメラおよびカメラスタンドで構成されるコンピュータ支援画像分析システムで、各切片における梗塞領域を決定した。NIH Image Analysis Software、v. 1.55を使用した。7切片に対し、画像を撮影して損傷の総領域を決定した。処置状態に対し盲検化された1人の操作者が、すべての測定を行った。切片の梗塞容積を加算することにより、梗塞容積を計算した。以下の式を用いて、梗塞サイズ(%)を計算し、浮腫の効果を排除した:(対側容積 - 同側非損傷容積) × 100 / 対側容積。

30

【0409】

脳血流の測定

【0410】

レーザードップラー流量計を使用して脳血流(CBF)を監視した。レーザードップラー流量計により表示される値は絶対値ではなかったため、CBF値はパーセンテージとして決定された。上述のように、動物をハロタンで麻酔した(マスクにより70%/30%NO₂/O₂に1%)。MCA閉塞と同側の半球において、座標は以下の通りであった:A点、プレグマに対し0.5mm後方、および正中線に対し2mm側方; B点、プレグマに対し1mm後方、および正中線に対し1.2mm側方; D点、プレグマに対し1mm前

40

50

方、および正中線に対し 1 . 7 mm 側方；対側半球における C 点、プレグマに対し 1 mm 後方、および正中線に対し 2 mm。虚血の発症の 15 分前、被験物質の注射前の虚血の間（虚血の開始から 15 分後）、および注射から 30 分後で、CBF を比較した（虚血の 15 分前から、化合物の注射終了後 30 分まで、連続的に測定を行い、30 分ごとに記録した）。MCA栓塞前の平均値をベースラインとして用い、それ以降のデータを、ベースライン値のパーセンテージとして表した。

【0411】

行動の評価

【0412】

虚血性傷害の前後で、マウスにおける行動解析（神経学的欠損）を決定した。神経学的スコアは以下の通りであった：0：正常な運動機能；1：動物を尾部で持ち上げた際の胴体および対側前肢の屈曲；2：平面上において尾部で保持した際の対側への旋回、ただし静止時は正常な姿勢；3：静止時の対側への傾き；4：自発運動活性なし。

10

【0413】

試験からの動物の除外

【0414】

以下のいくつかの基準に基づき、動物を試験から除外した：

【0415】

試験の終了前に（任意の時点で）死亡する動物。死亡時まで収集されたデータは、GBに提供された。

20

【0416】

脳血流は、閉塞後、ベースライン値の $20 \pm 5\%$ に減少しなかった（すなわち非虚血とみなされた）か、または、血流は再灌流後にベースライン値の $90 \pm 15\%$ に回復しなかった。

【0417】

虚血性傷害後、動物は発作様の活動を発現した。

【0418】

虚血中、または虚血直後に、過度の出血が検出された。

【0419】

統計解析

30

【0420】

結果は平均 \pm 標準偏差 (SD) として表した。生理学的および組織学的データにおける差の有意性を、一元配置分散分析 (ANOVA) と、続いて Fishe r のポストホック試験を用いて分析した。反復測定 ANOVA は監視データに対し計算し、群間の有意差は Fishe r のポストホック試験で評価した。

【0421】

処置群。すべての群は GM602 に供されたか、または対照であった。動物（30 匹の動物）を、示された用量のビヒクルまたは GM602 の IV 投与に供した。

【表3】

マウス脳卒中モデル

40

群	化合物	用量 (mg/kg)	経路
C57BL/6マウス			
1 (n=10マウス)	ビヒクル	0	IV
2 (n=10マウス)	GM602	1 mg/kg	IV
3 (n=10マウス)	GM602	5 mg/kg	IV

【0422】

評価項目：

【0423】

虚血および再灌流傷害からの神経保護作用に対する、GM602 の効果。脳血流 (CBF)

50

)、心拍数(H R)、血圧(B P)、 pO_2 、 pCO_2 、 pH 、神経学的欠陥(N D)、および梗塞容積(I F V)について動物を評価した。

【 0 4 2 4 】

すべての試験群を N T S に提供した。G M 6 0 2 は固体材料として N T S に提供した。試験群のすべての動物には、上に示した通り投与を行った。

【 0 4 2 5 】

結果

【 0 4 2 6 】

マウスにおける虚血(虚血試験)。これらの試験において虚血の相対的重症度を評価した。データは、ビヒクルまたは G M 6 0 2 を静脈注射された虚血性傷害に罹患したマウスからのものであった。

【 0 4 2 7 】

梗塞容積：ビヒクル注射群と比較して、G M 6 0 2 処置群(1 m g / k g と 5 m g / k g の両方で)において脳内の梗塞容積は有意に減少した。G M 6 0 2 は、梗塞容積の用量依存的な低減を示した(表 5)。梗塞容積対 G M 6 用量が図 2 A にプロットされている。脳内の梗塞容積の減少割合を表 5 に示す。表に示されるように、虚血後の G M 6 0 2 の 0 、 1 、または 5 m g / k g での I V 投与は、 5 7 、 3 9 、および 1 2 % の梗塞サイズを示した。梗塞容積は、ビヒクル群で 7 3 . 3 7 m m 3 、 1 m g / k g または 5 m g / k g での G M 6 0 2 処置群でそれぞれ 4 5 . 9 3 m m 3 および 2 0 . 2 9 m m 3 である。したがって、 1 m g / k g または 5 m g / k g での G M 6 0 2 の虚血後 I V 投与は、ビヒクルと比較して、それぞれ 3 8 % および 7 3 % の梗塞容積の減少をもたらした。

【 表 4 】

表 5. 脳内の梗塞の減少割合。

群	用量	G B I D 化合物	梗塞サイズ (%)	梗塞サイズの 低減割合	化合物梗塞 容積 (m m ³)	梗塞サイ ズの低減 割合	P 値
1	0	ビヒクル	57%	0	73.37±4.43	0	
2	1mg	G M 6 0 2	39%	31.6%	45.93±3.99	38%	0.0004*
3	5mg	G M 6 0 2	12%	79%	20.29±2.87	73%	0.0001*

減少割合は、それぞれのビヒクル対照動物と比較されている。

対照と比較して、すべての群は $P < 0.0001$

死亡率：本試験では死亡は見られなかった。

【 0 4 2 8 】

生理学的パラメータ

【 0 4 2 9 】

虚血中、または再灌流後(図 3 ~ 7)において、ビヒクルのマウスと処置されたマウスの間で、生理学的パラメータ(平均動脈圧、血液 pO_2 、 pCO_2 、および pH)においてベースラインに有意差は見られなかつたが、ただし、 5 m g / k g の G M 6 0 2 で処置された群において、再灌流後にビヒクル群を超える脳血流の有意な増加があつたが、これは、血流の閉塞により引き起こされた虚血効果の低減を助けるものである。

【 表 5 】

化合物	再灌流後 C B F	ビヒクルと比較した P 値
ビヒクル	84.9	
G M 6 0 2 (1)	89.6	$P < 0.07$
G M 6 0 2 (5)	91.2	$P < 0.003$

【 0 4 3 0 】

行動の測定

10

20

30

40

50

【0431】

0から4のスケールに基づき、神経学的欠損について動物を評価した。GM602で処置した動物は、用量依存的な神経学的欠損の減少を示した（データを図8にも示す）。

【表6】

化合物	神経学的欠損	ビヒクルと比較したP値
ビヒクル	2.7±0.30	
GM602 (1)	1.8±0.249	P<0.04
GM602 (5)	1.3±0.153	P<0.0006

10

【0432】

アメリカ合衆国では、脳卒中は3番目に多い死亡原因であり、障害の腫瘍原因である。局所性脳虚血後の結果および梗塞容積は、「壊死」（パラトーシス）細胞死、および虚血の境界における遅発性神経細胞損失（プログラム細胞死またはアポトーシス）の両方により決定される。虚血性脳卒中を処置するため、最新の療法が見られるようになった。しかしながら、これらの処置は、ほとんどの場合、血栓の溶解を扱うが、一旦神経細胞死サイクルがトリガされた際の、神経保護作用、行動の欠陥の低減、または脳梗塞容積には留意されていなかった。細胞損失に影響を与える基本的メカニズムを理解することは、虚血性傷害と関連した細胞死を低減するための薬剤や用途の設計に役立つ。

【0433】

20

MNTFは、神経障害からの保護を提供することができ、また傷害または虚血性脳卒中後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、GM602、MNTFの6-アミノ酸（FSRYAR）類似体の、効果的および効率的に脳虚血および再灌流傷害の有害な影響から脳を保護する能力を示している。1mg/kgおよび5mg/kg単回ボーラス用量でのGM602の静脈内投与は、虚血/再灌流傷害に対する、梗塞容積の減少、行動的属性の改善、および脳血流の増加による、脳における用量依存的な保護効果を示した。これらの試験は、GM602が脳卒中において有益な効果を有し得ることを示唆している。

【0434】

30

静脈内投与された場合、GM602は、マウスにおける虚血/再灌流傷害に対する神経保護作用を有することが判明した。これらの試験は、脳卒中および他の神経変性障害におけるGM602の有益な効果を決定するための将来の研究の基礎を築いた。

【0435】

実施例3

【0436】

脊髄傷害：脊髄傷害マウスマodelにおける、GM603（例示的MNTF6mer-FSRYAR）試験

【0437】

MNTF類似体GM603（配列番号：2；FSRYAR）を、脊髄傷害（SCI）マウスマodelにおける有効性について試験した。SCIマウスマodelにおけるGM603の有効性を決定するために、マウスを脊髄衝撃および14日間の回復に供した。傷害直後および14日間毎日、いくつかの用量でGM603をマウスに静脈注射した。病変の容積（LV）および行動回復（BR）の変化について動物を検査した。複数回用量でのGM603（1mg/kgまたは5mg/kg）の静脈内（i.v.）投与を検査した。GM603の投与は、LVおよびBRの両方における変化を明示したが、これは用量依存的な効果を示している。1mg/kgおよび5mg/kg両方のGM603は、病変の容積の有意な低減を示したが、これは、神経学的欠損の維持につながる。これらのデータは、SCIのマウスマodelにおいて、GM603が、i.v.注射後に脊髄において神経保護作用を有することを実証した。

40

【0438】

50

本実施例に関する略語 / 専門用語

【0439】

「MNTF」は、運動ニューロン栄養因子を意味する。

【0440】

「MNTF_{6mer}」は、MNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体を意味する。

【0441】

「GM603」は、SCIに対するMNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体(FSRYAR)を意味する。

【0442】

「GM603-1」は、GM603 1mg/kg；配列番号：2、FSRYARを意味する。 10

【0443】

「GM603-5」は、GM603 5mg/kgを意味する。

【0444】

「SCI」は、脊髄傷害を意味する。

【0445】

「GB」は、Gener von Biopharmaceuticals, LLCを意味する。

【0446】

「I.V.」は、静脈内を意味する。 20

【0447】

「BR」は、行動回復を意味する。

【0448】

MNTF_{6mer}は比較的小さいため、安定性、溶解度、変異原性、免疫原性、または、遺伝子導入もしくは遺伝子組み換え方法による高コスト製造の点での、大きなペプチドの欠点を有しない。固相合成6aaのコストは比較的低い。

【0449】

中大脳動脈閉塞(MOAC)マウス脳卒中モデルでは、IV注射によるMNTF_{6mer}の後処理は、脳内の梗塞容積を低減し、用量依存的に神経学的欠損を低減した。高用量のMNTF_{6mer}は、ビヒクルと比較して脳梗塞容積を74%低減し、神経学的欠損をp < 0.0001で有意に低減したが、これは、MNTF_{6mer}が脳卒中において有益な効果を有し得ることを示唆している。 30

【0450】

L-2-ヒドロキシグルタル酸(LGA)は、神経系において酸化ストレスおよびアポトーシスを誘発する。ゼブラフィッシュバイオアッセイにおいて、MNTF_{6mer}はCN SにおいてLGA誘発アポトーシスを保護し、中脳においてアポトーシスを85%低減した(Parng et al., 2004)。

【0451】

8mmギャップでのラット坐骨神経離断試験では、MNTF_{6mer}処置動物は、用量応答的に運動ニューロン再生を有意に改善し(最適用量でp < 0.0002)、DRG神経再生を促進した(Nussbaum et al., 2003)。 40

【0452】

離断大腿神経ラットモデルにおいては、運動ニューロンの数は、MNTF_{6mer}処置動物において用量応答的に筋肉に正確に投射した。最適用量では、筋肉に正確に投射した運動ニューロンの数は、皮膚に不正確に投射した運動ニューロンの数の3倍である(p < 0.0001)。(Nussbaum et al., 2003)。

【0453】

ゼブラフィッシュバイオアッセイにおいて、MNTF_{6mer}はPNSにおいてLGA誘発アポトーシスを保護し、末梢神経筋接合部においてアポトーシスを49%低減した(Parng et al., 2004)。 50

【0454】

G B G M 6 0 3 、運動ニューロン栄養因子の 6 - アミノ酸ペプチド類似体 (F S R Y A R ; 配列番号 : 2) (M N T F 6 m e r) の、ボーラス静脈注射により脊髄を損傷または傷害から保護する能力を決定した (Tyor et al . , 2 0 0 2 ; Engesser - Cesar et al . , 2 0 0 5) 。 G M 6 0 3 は、G M P コンプライアンス (C S B i o C o . , M e n l o P a r k , C A , G M P 0 1 3 , l o t C 8 1 1) のもとで化学的に合成された。本試験は、N e u r o l o g i c a l T e s t i n g S e r v i c e , I n c . (N T S , C h a r l e s t o n , S C) との契約の下で行われた。 G M 6 0 3 は固体として N T S に提供され、製剤は N T S により調製された (溶液は 4 ° で保存) 。

10

【0455】

方法および材料

【0456】

動物

【0457】

それぞれ体重 2 2 - 2 5 グラムの C 5 7 B L / 6 マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y , B a r H a r b o r , M E) に、実験前に自由に餌および水を与えた。十分特性決定された空気衝撃デバイスを用いて、若年成体雌マウス (2 5 g m) に脊髄挫傷を与えた。

【0458】

20

実験群

【0459】

外科的処置の前に、所与の手術日においてすべての処置が含まれるように、マウスを乱塊法に基づき異なる処置群に割り当てた。調査者は、処置群については情報を与えられなかった。 G M 6 0 3 の調剤 (C S B i o C o . , M e n l o P a r k , C A , G M P 0 1 3 , l o t C 8 1 1) は、 N T S により、 G M 6 0 3 を 4 ° で保存された生理食塩溶液でもどすことにより原液として行われた。ビヒクル対照には生理食塩溶液を投与した。再灌流の開始直後に、尾静脈からの静脈内ボーラス注射を行った。

【0460】

脊髄傷害の誘発

30

【0461】

第 1 0 胸椎 (T 1 0) で椎弓切除術を行う前に、マウスをケタミン (8 0 m g / k g) およびキシラジン (1 0 m g / k g) で麻酔した。胸髄上部 (T 8) および腰髄上部 (T 1 1) レベルに脊柱を角度付クランプで固定し、直径 2 m m の真鍮チップを、背側脊髄を覆う露出した無傷硬膜上に空気圧で駆動した。衝撃器をすぐに取り外し、創傷を生理食塩水で注水し、筋肉および皮膚の開口部を縫合した。

【0462】

処置

【0463】

化合物の適用に関し、 G M 6 0 3 を 2 週間毎日 i . v . 注射した。傷害直後、 2 つの異なる用量 (1 m g / k g および 5 m g / k g) で G M 6 0 3 を適用した。傷害に関連した麻痺のため、および膀胱を空にしやすいことから、雌の動物を使用した。

40

【0464】

行動解析 : ロータロッドおよびオープンフィールド試験

【0465】

行動解析に関し、手術前、ならびに手術後 1 、 3 、 5 、 7 、および 1 4 日目に動物を試験した。 B a s s o - B e a t t i e - B r e s n a h a n (B B B) 運動評定尺度を用いて確実にすべての被験体が最大スコアである 2 1 を得るように、動物をオープンフィールドチャンバ (直径 1 2 0 c m 、壁の高さ 2 5 c m) に 4 分間入れた。マウスをオープンフィールドに 4 分間置き、ビデオテープに記録して評価した。さらに、ロータロッド上に留

50

まることができる能力についてマウスを試験した。ロータロッド試験のために、マウスを1週間の学習期間に供し、その後で、マウスは加速するロータロッド上で活動することができた。第1、3、5、7、および14日目に試験を行い、3回の連続的な試行において回転棒の上に10秒より長く留まることができなくなるまでマウスを試験し、これをロータロッド失敗として定義する。最長時間は90秒に設定した。処置群のスコアを記録し、傷害後の時間の関数として中央値をプロットした。

【0466】

組織学

【0467】

試験の終わりに動物を致死させ、脊髄を4%パラホルムアルデヒド中に固定した。分析のために、20 μm低温切開片に対しエリオクロムシアニン(E C)の染色を行い、白質と細胞体とを差別化し、病変部位を免れた組織の量を計算した。組織に対して免疫細胞化学的分析を行った。組織の温存は、傷害後T10断片にわたる、10個の均一に罹患した切片からのコンピュータ画像分析により決定された。総断面容積で割った壊死組織の容積を、パーセンテージに変換し、100%から差し引いた。

10

【0468】

試験からの動物の除外

【0469】

以下のいくつかの基準に基づき、動物を試験から除外した：

【0470】

試験の終了前に(任意の時点で)動物が死亡する。死亡時まで収集されたデータは、GBに提供された。

20

【0471】

傷害後、動物は発作様の活動を発現した。

【0472】

傷害中、または傷害直後に、過度の出血が検出された。

【0473】

統計解析

【0474】

結果は平均±標準誤差(S E M)として表される。病変の容積および行動回復の差の有意性を、t-検定を用いて分析した。

30

【表7】

脊髄傷害マウスモデル

群	マウスの数	化合物	用量	適用	用量／容積
1	10	ビヒクル	0	I V	0
2	10	GM603	1 mg / k g	I V	0. 100 ml
3	10	GM603	5 mg / k g	I V	0. 100 ml

30

【0475】

評価項目

【0476】

行動的欠損

【0477】

組織学的解析

【0478】

GM603の脊髄傷害からの保護効果。脊髄傷害について動物を評価した。

40

【0479】

すべての試験群をNTSに提供した。GM603は固体材料としてNTSに提供した。試

50

験群のすべての動物には、上に示した通り投与を行った。

【0480】

結果

【0481】

マウスにおける脊髄傷害。SCI試験。これらの試験においてSCIの相対的重症度を評価した。データは、ビヒクルまたはGM603を静脈注射されたSCIに罹患したマウスからのものであった。

【0482】

病変の容積：ビヒクル注射群と比較して、GM603群（1mg/kgと5mg/kgの両方）において脊髄内の病変の容積は有意に減少した。GM603は、1mg/kgから5mg/kgで病変の容積の用量依存的な低減を示した（表6）。病変の容積は図9にプロットされている。脊髄に存在する病変の容積の減少割合を表6に示す。表に示されるように、1mg/kgまたは5mg/kgでのGM603は、ビヒクルと比較して、病変の容積においてそれぞれ28%または53%の減少を示した。図10は、傷害動物からの脊髄の代表的な写真を示す。図10は、ビヒクル処置動物においては、病変の容積（赤色染色）が非常に大きく、一方GM603処置動物（5mg/kg）においては、病変の容積（赤色染色）がそれより著しく小さいことを示している。

【表8】

表6.

群	用量	化合物	病変の容積 (mm ³)	病変の容積に おける低減割合	P値
1	0	ビヒクル	2. 696 ± 0. 2902	0	
2	1mg	GM603	1. 912 ± 0. 3139	28%	0. 05*
3	5mg	GM603	1. 274 ± 0. 2680	53%	0. 002*

減少割合は、それぞれのビヒクル対照動物と比較されている。

*第1群（ビヒクル）と比較

死亡率：本試験では死亡は見られなかった。

【0483】

行動の測定

【0484】

マウスをロータロッド試験に供した。最長時間90秒の間、ロータロッド上に留まり続ける能力について、動物を試験した。運動能力を測定するために使用したロータロッド試験でマウスを試験した。装置（モデルD S 37）は、直径25cmのディスクにより6つの区画にさらに分割された、2.5cmの直径を有する棒で構成された。棒は22rpmの一定速度で回転した。1、3、5、7、および14日目に動物を試験した。回転する棒に留まった時間（最大90秒）を記録した。図11に示されるように、すべての動物が、ロータロッド上に留まる初期の能力を示した。しかしながら、3日後、群間で明確な差別が見られた。3日目および5日目において差は有意であり（P < 0.05）、7日目には有意性はさらに大きくなかった（P < 0.01）。

【0485】

Basso - Beattie - Bresnahan (BBB) 運動評定尺度を用いて確実にすべての被験体が最大スコアである21を得るように、動物をオープンフィールドチャンバー（直径120cm、壁の高さ25cm）で4分間評価した。マウスをオープンフィールドに4分間置き、ビデオテープに記録して評価した。図12に見られるように、傷害に起因して、1日目にすべての動物が同じ運動欠損を示した。しかしながら、3日目には、GM603処置動物は、ビヒクル処置動物と比較して有意な改善を示した。5日目までに、有意性はP < 0.01であった。

10

20

30

40

50

【0486】

考察

【0487】

MNTFは、神経障害からの保護を提供することができ、また傷害または移植後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、MNTF 6mer類似体GM603の、効果的および効率的にSCIの有害な影響から脊髄を保護する能力を示している。14日間毎日の1mg/kgおよび5mg/kgでの注射によるGM603の静脈内投与は、病変の容積および行動的属性の減少による、脊髄におけるSCIに対する用量依存的な保護効果を示した。これらの試験は、GM603がSCIにおいて有益な効果を有し得ることを示唆している。

10

【0488】

静脈内投与された場合、GM603は、マウスにおける脊髄傷害に対する保護作用を有することが判明した。

【0489】

実施例4

【0490】

ALS：筋萎縮性側索硬化症マウスモデルにおけるGM604試験

【0491】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)マウスモデルにおける有効性について、MNTFペプチド類似体GM604(FSRYAR；配列番号：2)を試験した。ALSマウスモデルにおけるGM604の有効性を決定するために、GM604を2つの用量でマウスに80日齢で静脈注射し、死亡するまで続けた。疾患発症年齢、死亡年齢、および疾患の行動発現の変化について動物を検査した。複数回用量でのGM604(1mg/kgまたは5mg/kg)の静脈内(i.v.)投与を検査した。GM604の投与は、疾患発症年齢、死亡年齢、および疾患の行動発現の変化を示したが、これは用量依存的效果を示していた。1mg/kgおよび5mg/kg両方のGM604は、動物における推定寿命の有意な延長を示したが、これは、神経学的欠損の維持につながる。これらのデータは、GM604がALSマウスモデルにおける神経保護作用を有し得ることを示している。

20

【0492】

本実施例に関する略語／専門用語。

30

【0493】

「MNTF」は、運動ニューロン栄養因子を意味する。

【0494】

「MNTF 6mer」は、MNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体を意味する。

【0495】

「GM604」は、ALSに対するMNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体(FSRYAR)を意味する。

【0496】

「GM604-1」は、GM604 1mg/kgを意味する。

【0497】

「GM604-5」は、GM604 5mg/kgを意味する。

40

【0498】

「ALS」は、筋萎縮性側索硬化症を意味する。

【0499】

「GB」は、Gener von Biopharmaceuticals, LLC.を意味する。

【0500】

「I.V.」は、静脈内を意味する。

【0501】

GB被験物質GM604、運動ニューロン栄養因子の6-アミノ酸ペプチド類似体(FS

50

R Y A R ; 配列番号 : 2) (M N T F 6 m e r) の、 A L S マウスモデルにおける A L S 疾患の臨床的兆候の発症、臨床的兆候の改善、および疾患の末期を遅延または調整する能力の評価。動物を、 G M P コンプライアンス (C S B i o C o . , M e n l o P a r k , C A , G M P 0 1 3 , l o t C 8 1 1) のもとで化学的に合成された G M 6 0 4 の静脈注射に供した。 G M 6 0 4 は固体および製剤として提供された (溶液は 4 ℃ で保存) 。

【 0 5 0 2 】

方法および材料

【 0 5 0 3 】

動物

10

【 0 5 0 4 】

A L S マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y , B a r H a r b o r , M E) を、特定病原体を含まない (S P F) 条件下で飼育および維持した。それぞれ体重 22 - 25 グラムの動物に、実験前に自由に餌および水を与えた。若年成体マウス (25 g m) を、 G M 6 0 4 の静脈注射に供した。

【 0 5 0 5 】

実験群

【 0 5 0 6 】

外科的処置の前に、所与の手術日においてすべての処置が含まれるように、マウスを乱塊法 (r a n d o m i z e d b l o c k d e s i g n) に基づき異なる処置群に割り当てた。調査者は、処置群については情報を与えられなかった。 G M 6 0 4 の調剤は、 G M 6 0 4 を 4 ℃ で保存された生理食塩溶液でもどすことにより原液として行われた。ビヒカル対照には生理食塩溶液を投与した。尾静脈を介した静脈内ボーラス注射。

20

【 0 5 0 7 】

処置

【 0 5 0 8 】

化合物の適用に関し、 G M 6 0 4 を、動物が死亡するまで毎日 i . v . 注射した。 2 つの異なる用量 (1 m g / k g および 5 m g / k g) で G M 6 0 4 を適用した。この試験に必要とされる動物の数のために、雄および雌の両方を使用した。

【 0 5 0 9 】

30

行動解析 :

【 0 5 1 0 】

ロータロッド

【 0 5 1 1 】

行動解析に関し、疾患の発症 (80 日目) 前および動物が死亡するまで 2 日おきに動物を試験した。ロータロッド上に留まることができる能力についてマウスを試験した。ロータロッド試験のために、マウスを 1 週間の学習期間に供し、その後で、マウスは加速するロータロッド上で活動することができた。試験は 2 日おきに行い、 3 回の連続的な試行において回転棒の上に 10 秒より長く留まることができなくなるまでマウスを試験し、これをロータロッド失敗として定義する。最長時間は 180 秒に設定した。処置群のスコアを記録し、年齢の関数として中央値をプロットした。

40

【 0 5 1 2 】

握力

【 0 5 1 3 】

握力計 (S a n D i e g o I n s t r u m e n t s) を使用して、週 2 回、マウスの前肢の力をニュートンで測定した。これは、尾部により直線的にセンサから引き離したときにマウスが前肢で棒に加えた力のピーク量を測定した。 4 回の試行後、最も高い結果を分析に使用した。

【 0 5 1 4 】

尾部試験

50

【0515】

マウスを尾部で空中に持ち上げ、後肢の伸長を検査した。後肢の伸長の欠如は、尾部試験失敗と定義された。

【0516】

臨床評価

【0517】

以下の基準に基づき、マウスに対し 0 から 4 の臨床スコアを評点した。脱力感の兆候なし（0）；振戦および傾斜での反射の喪失（1）；後肢 1 本の不全麻痺（2）；後肢 2 本の不全麻痺（3）；後肢 1 本または 2 本の麻痺（4）。人道的理由から、レベル 4 のマウスは屠殺した。

10

【0518】

組織学

【0519】

試験の終わりに動物を致死させ、分析のために脊髄を 4 % パラホルムアルデヒド中に固定した。

【0520】

試験からの動物の除外

【0521】

いくつかの基準に基づき、動物を試験から除外した：

20

【0522】

試験から除外された動物はなかった。

【0523】

統計解析。

【0524】

結果は平均 ± 標準誤差 (S E M) として表される。発症年齢、死亡年齢、および行動発現の差の有意性を、t - 検定を用いて分析した。

【表9】

ALS マウスモデル

群	マウスの数	化合物	用量	適用	用量／容積
1	10	ビヒクル	0	I V	0
2	10	GM604	1 mg / kg	I V	0.100 ml
3	10	GM604	5 mg / kg	I V	0.100 ml

30

【0525】

評価項目

【0526】

疾患発症年齢

【0527】

死亡年齢

40

【0528】

行動の欠陥

【0529】

組織学的解析

【0530】

すべての試験群を NTS に提供した； GM604 は固体材料として NTS に提供した。試験群のすべての動物には、上に示した通り投与を行った。

【0531】

結果

50

【0532】

ALS 試験。これらの試験において ALS の相対的重症度を評価した。データは、ビヒクルまたは GM 604 を静脈注射された ALS 罹患マウスからのものであった。

【0533】

疾患発症年齢：ビヒクル注射群と比較して、GM 604 (1 mg / kg と 5 mg / kg の両方) で処置された ALS マウスにおいて、疾患発症年齢が有意に延長した。GM 604 は、1 mg / kg から 5 mg / kg で疾患発症年齢の用量依存的な遅延を示した（表 7）。疾患発症の特性が図 13 にプロットされている。疾患発症年齢の増加割合を表 7 に示す。表に示されるように、1 mg / kg または 5 mg / kg での GM 604 は、ビヒクルと比較して、疾患発症年齢においてそれぞれ 12% または 27% の増加を示した。

【表 10】

表 7. ALS マウスにおける疾患発症年齢。

群	用量	化合物	疾患発症年齢（中央値）	発症年齢の増加割合	P 値
1	0	ビヒクル	114.5	0	
2	1 mg	GM 604	128	12%	0.001*
3	5 mg	GM 604	145.5	27%	0.001*

増加割合は、それぞれのビヒクル対照動物と比較されている。

* 第 1 群（ビヒクル）と比較

【0534】

死亡年齢

【0535】

ビヒクル注射群と比較して、GM 604 (1 mg / kg と 5 mg / kg の両方) で処置された ALS マウスにおいて、死亡年齢が有意に延長した。GM 604 は、1 mg / kg から 5 mg / kg で死亡年齢の用量依存的な遅延を示した（表 8）。死亡年齢が図 14 にプロットされている。死亡年齢の増加割合を表 8 に示す。表に示されるように、1 mg / kg または 5 mg / kg での GM 604 は、ビヒクルと比較して、死亡年齢においてそれぞれ 16% または 30% の増加を示した。

【表 11】

表 8. ALS マウスにおける死亡年齢。

群	用量	化合物	死亡年齢（中央値）	死亡年齢の増加割合	P 値
1	0	ビヒクル	126	0	
2	1 mg	GM 604	146.5	16%	0.001*
3	5 mg	GM 604	163.5	30%	0.001*

増加割合は、それぞれのビヒクル対照動物と比較されている。

* 第 1 群（ビヒクル）と比較

【0536】

死亡率

【0537】

本試験において、疾患と関連しない死亡は見られなかった。

【0538】

行動の測定。

【0539】

ロータロッド：

【0540】

マウスをロータロッド試験に供した。最長時間 180 秒の間、ロータロッド上に留まり続ける能力について、動物を試験した。運動能力を測定するために使用されるロータロッド試験でマウスを試験した。装置（モデル DS 37）は、直径 25 cm のディスクにより 6 つの区画にさらに分割された、2.5 cm の直径を有する棒で構成された。棒は 22 rpm の一定速度で回転した。80 日目から始め、動物を週 2 回試験した。回転する棒に留ま

10

20

30

40

50

った時間（最大180秒）を記録した。図15に見られるように、疾患の発症まで、すべての動物がロータロッド上を能率的に進むことができた（図15参照）。

【表12】

表9. ALSマウスにおけるロータロッド分析。

群	用量	化合物	年齢（中央値）	ロータロッド能力の増加割合	P値
1	0	ビヒクル	124	0	
2	1 mg	GM604	141	14%	0.001*
3	5 mg	GM604	174.5	41%	0.001*

増加割合は、それぞれのビヒクル対照動物と比較されている。

*第1群（ビヒクル）と比較

10

【0541】

握力

【0542】

疾患の進行中、およびGM604の存在下で、握力についてマウスを検査した。GM604で処置されたALSマウスは、対照マウスと比較すると、握力の低下において有意な遅延を示した（図16Aおよび表10）。全般的に、1mg/kgまたは5mg/kgのGM604で処置されたマウスは、対照動物よりも能力は勝っていた。

【表13】

表10. ALSマウスにおける握力。

20

群	用量	化合物	年齢（中央値）	握力の増加割合	P値
1	0	ビヒクル	120	0	
2	1 mg	GM604	137	14%	0.001*
3	5 mg	GM604	169	41%	0.001*

増加割合は、それぞれのビヒクル対照動物と比較されている。

*第1群（ビヒクル）と比較

【0543】

臨床評価

【0544】

30

疾患の進行中、およびGM604の存在下で、臨床スコアについてマウスを検査した。GM604で処置されたALSマウスは、対照マウスと比較すると、臨床スコアの低下において有意な遅延を示した（図16Bおよび表11）。全般的に、1mg/kgまたは5mg/kgのGM604で処置されたマウスは、対照動物よりも能力は勝っていた。

【表14】

表11. ALSマウスにおける臨床スコア

群	用量	化合物	年齢（中央値）	臨床スコアの増加割合	P値
1	0	ビヒクル	113	0	
2	1 mg	GM604	139	23%	0.001*
3	5 mg	GM604	173	53%	0.001*

40

増加割合は、それぞれのビヒクル対照動物と比較されている。

*第1群（ビヒクル）と比較

【0545】

MNTFは、神経障害からの保護を提供することができ、また傷害または移植後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、MNTF 6mehr類似体GM604の、効果的および効率的にALSの有害な影響から脊髄を保護する能力を示している。毎日1mg/kgおよび5mg/kgでの注射のGM604の静脈内投与は、疾患発症年齢、死亡年齢、および行動パラメータの増加による、ALSマウスモデルにおける用量依存的な保護効果を示した。これらの試験は、GM604がALSにおいて有益

50

な効果を有し得ることを示した。

【0546】

静脈内投与された場合、GM604は、マウスにおけるALSに対する保護作用を有することが判明した。

【0547】

実施例5A

【0548】

マウスパーキンソン病モデル

【0549】

GM6(FSRYAR, 配列番号: 2) (CS Bio Co., Menlo Park 10, CA)を、マウスパーキンソン病(PD)モデルにおける有効性について試験した。

【0550】

PDにおけるGM6の有効性を決定するために、マウスに1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)を注射してPDを誘発し、いくつかの用量でGM6を静脈注射して、PDの減衰に対する影響を決定した。GM6(1、5、10、または20mg/kg)の5日間(1日2回)の静脈内(i.v.)投与を検査した。GM6の投与は、マウスにおけるPDの用量依存的な減衰を示し、20mg/kgで最も高い有効性を示した。行動、生化学、および組織学的解析は、GM6のPDにおける独特の効果を実証する減衰を示した。これらのデータは、GM6が、i.v.注射後にPDのマウスモデルにおいて効果的であり、PD患者の潜在的な処置法となり得ることを示唆している。 20

【0551】

本実施例に関する略語/専門用語。

【0552】

「MNTF」は、運動ニューロン栄養因子を意味する。

【0553】

「GM6」および「6mer」は、それぞれ、MNTFの6アミノ酸ペプチド類似体を意味する。

【0554】

「PD」は、パーキンソン病を意味する。 30

【0555】

「MPTP」は、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジンを意味する。

【0556】

「DOPAC」は、ジヒドロキシフェニル酢酸を意味する。

【0557】

「HVA」は、ホモバニリン酸を意味する。

【0558】

「DA」は、ドーパミンを意味する。

【0559】

「Genervon」および「GB」は、それぞれGenervon Biopharmaceuticals, LLCを意味する。 40

【0560】

「I.V.」は、静脈内を意味する。

【0561】

GM6のパーキンソン病(PD)マウスモデルにおける有効性を決定するための、運動ニューロン栄養因子(MNTF)の6アミノ酸類似体(GM6)の能力の決定。

【0562】

GM6は、合成6アミノ酸ペプチド(MNTF)である。GM6は固体としてNTSに提供され、製剤はNTSにより調製された(溶液は4%で保存)。 50

【 0 5 6 3 】

中枢神経系疾患および障害の処置に対する大きな障害は、薬剤を中枢神経系に送達することが困難であることである。薬剤の生物学的利用能および様々な神経障害に対する効果の決定は、可能性のある治療的介入のために重要である。

【 0 5 6 4 】

静脈注射による、P D マウスモデルにおける G M 6 の有効性の評価。

【 0 5 6 5 】

方法および材料

【 0 5 6 6 】

試験デザイン。雄 C 5 7 B L / 6 マウスに、後述するように M P T P を注射し、示された用量の G M 6 による P D からの保護について検査した。行動発現、生化学および組織学的变化について、動物を検査した。 10

【 0 5 6 7 】

M P T P 処置。C 5 7 B L / 6 に注射し (i . p . 、 0 . 1 m l 水中で 2 0 m g / k g で、 2 時間間隔で 4 つの用量の 1 - メチル - 4 - フェニル - 1 , 2 , 3 , 6 - テトラヒドロピリジン、 M P T P 、 S i g m a M - 0 8 9 6) 、注射から 1 週間後に検査した。各群における対照マウスは、生理食塩水の 4 回の i . p . 注射を受けた。注射後 2 4 時間の間、マウスを加熱ブランケット上に保持した。

【 0 5 6 8 】

M N T F (G M 6) 処置のための M N T F 投与について、マウスは 1 日 2 回 (1 2 時間間隔) 、 1 、 5 、 1 0 、または 2 0 m g / k g の様々な用量の生理食塩水中 M N T F の静脈注射を受けたが、第 1 の M P T P 注射から 3 0 分後には開始し、さらに M P T P の最後の注射から 4 日間を通して続けた。対照マウスには生理食塩水のみを投与した。各群 N = 1 0 である。 20

【 0 5 6 9 】

行動試験。行動試験には雄のマウスを使用した。すべての動物を、 1 2 時間の明暗サイクル (0 7 0 0 から 1 9 0 0 まで明かりをつける) に維持し、自由に餌および水を採らせた。自発運動活性を評価するために、それぞれ 3 つの赤外線ビームおよび自動計数システムを備えた 4 つのプレキシグラス円筒 (2 3 c m × 3 0 c m 、直径 × 高さ) から成る活性モニタを使用した。自発運動活性試験は、マウスを円筒内に置くことで開始した。 3 分間の環境適応の後、 5 分間あたりフォトセル装置を横切る赤外線ビームの数を計数することにより、活性を評価した。感覚運動の連携を評価するために、マウスをロータロッド上のタスクで評価した。ロータロッドユニットは、回転スピンドル (直径 7 . 3 c m) 、および 1 度に 5 匹のマウスを試験するための 5 個の個別の区画で構成される。連続 2 日間の 1 日 2 回のトレーニング (1 日目は速度 1 2 r p m 、 2 日目は 1 8 r p m) の後、試験セッションの 3 日目に試験の回転速度を 2 5 r p m に増加させた。各マウスが回転する棒に留まった時間を、 5 分間隔および最大試行長さを 1 試行あたり 6 0 秒として、 3 回の試行について記録した。データは、 3 回の試験試行に対する回転棒上の平均時間として示されている。 30

【 0 5 7 0 】

脳内モノアミンの定量。

【 0 5 7 1 】

解剖した脳の領域を 0 . 1 M 過塩素酸および 0 . 1 m M E D T A (1 0 m g / 1 0 0 μ l) 中で超音波照射した。次いで抽出物を 1 5 分間遠心分離し、上清を回収して - 2 0 で保存した。モノアミン (ドーパミン、 [D A]) および代謝産物 (ジヒドロキシフェニル酢酸 [D O P A C] 、ホモバニリン酸 [H V A]) を、電気化学検出を用いた高圧液体クロマトグラフィー (H P L C) で測定した。

【 0 5 7 2 】

免疫組織化学。すべてのマウス (1 / 2 脳) を 4 % P F A 中に入れ固定した。脳を 4 % P F A 中で 1 2 時間、 4 で固定し、次いで P B S 中 3 0 % スクロース中に保存した。 5 0 50

マイクロメートルの切片を切り出し、免疫組織化学のために、1 : 1 0 0 0 希釀の T H 抗体で処理した (Sigma T - 1 2 9 9)。チロシンヒドロキシラーゼ (T H) 免疫反応性を、モノクローナル抗 T H 抗体を使用して可視化した。黒質および腹側被蓋領域における T H 免疫陽性細胞の予備的定量化を、画像分析を使用して行った。切片を乾燥させて D e p e x に設置した。細胞計数は、コンピュータ支援ステレオロジカルツールボックスを使用して行った。すべての細胞計数は、薬物処置についての情報を伏せて行い、1 0 0 倍の倍率で行った。

【 0 5 7 3 】

統計解析。結果は平均 ± 標準偏差 (S D) として表した。データにおける差の有意性を、t - 検定を用いて分析した。

10

【 0 5 7 4 】

試験からの動物の除外。

【 0 5 7 5 】

以下のいくつかの基準に基づき、動物を試験から除外した：

【 0 5 7 6 】

試験の終了前に（任意の時点で）死亡した動物。

【 0 5 7 7 】

被験物質の投与後に重度の合併症を発現した動物。

【 0 5 7 8 】

処置群。すべての群は G M 6 に供されたか、または対照であった。動物（60 匹の動物）を、示された用量のビヒクルまたは M N T F の尾静脈によるボーラス注射に供した。5 日間、1 日あたり 2 回動物に注射した。

20

【表 1 5 】

G M 6 を使用するマウス P D モデル：例示的な M N T F 6 - m e r F S R Y A R 配列
番号：2）：

群	化合物	用量 (m g / k g)	経路
C 5 7 B L / 6 雄マウス			
1 (n = 1 0 マウス)	ビヒクル	0	I V
2 (n = 1 0 マウス)	例示的な M N T F G M 6 : F S R Y A R	1 m g / k g / 日	I V
3 (n = 1 0 マウス)	例示的な M N T F G M 6 : F S R Y A R	5 m g / k g / 日	I V
4 (n = 1 0 マウス)	例示的な M N T F G M 6 : F S R Y A R	1 0 m g / k g / 日	I V
5 (n = 1 0 マウス)	例示的な M N T F G M 6 : F S R Y A R	2 0 m g / k g / 日	I V
6 (n = 1 0 マウス)	対照	対照	該当せず

30

【 0 5 7 9 】

40

評価項目

【 0 5 8 0 】

マウスにおける P D の調節

【 0 5 8 1 】

すべての試験群を N T S に提供した。G M 6 は固体材料として N T S に提供した。試験群のすべての動物には、上に示した通り投与を行った。

【 0 5 8 2 】

行動試験。M S のマウスモデルにおける G M 6 の有効性を評価した。ビヒクルまたは G M 6 の（示された用量で）静脈内注射を受けたマウスからのデータ。

【 0 5 8 3 】

50

行動解析：MPTPを用いてPDを誘発した後、上に示された用量でGM6をマウスに投与した。動物を2日目および毎日検査して、MPTPおよびGM6による動物の行動を決定した。マウスにMPTP投与を開始してから5日間、毎日、GM6を注射した。GM6を最終のMPTPを注射してから30分後に開始し、さらに4日間継続した。表12および13に示されるように、ビヒクルで処置したマウスは、対照または処置動物と比較して、行動スコア（自発的活性およびロータロッド試験）の有意な増加を示した。GM6を用いた処置は、行動において有意な改善（減衰）を示した。5、10、20mg/kgでのGM6は、有意な利益を示したが、1mg/kgでは、全く改善を示さなかった。

【0584】

自発運動活性

【表16】

表12. 自発活性

処置	運動数／5分間
ビヒクル	67. 60±13. 28 (該当せず)
GM6 (1mg/kg)	74. 50±19. 12 (0. 3610)
GM6 (5mg/kg)	121. 6±21. 69 (<0. 0001)
GM6 (10mg/kg)	161. 5±24. 95 (<0. 0001)
GM6 (20mg/kg)	254. 9±26. 69 (<0. 0001)
対照	292. 0±33. 75 (<0. 0001)

10

20

【0585】

ロータロッド試験

【表17】

表13. ロータロッド試験

処置	潜伏期
ビヒクル	41. 40±3. 645 (該当せず)
GM6 (1mg/kg)	42. 70±4. 237 (0. 4741)
GM6 (5mg/kg)	38. 00±2. 331 (0. 0947)
GM6 (10mg/kg)	33. 90±3. 091 (0. 0006)
GM6 (20mg/kg)	23. 80±1. 003 (<0. 0001)
対照	20. 29±5. 254 (<0. 0001)

30

死亡率：本試験では死亡は見られなかった。

【0586】

MPTP処置動物の脳内のモノアミンおよび代謝物のレベル。MPTPを用いた処置中、変化し、PDのマーカーである、脳におけるモノアミンおよび代謝物のレベルのGM6の有効性を決定した。表14および図21A～21Cに見られるように、ドーパミン、DOPAC、およびHVAのすべてのレベルは、ビヒクル処置動物と比較して、GM6処置動物において高かった。20mg/kg/日は、MPTP処置後、最大の保護を示した。

40

【表18】

表14. モノアミンおよび代謝物のレベル

領域	用量 (mg/kg)	レベル平均+/-S D	P値	差異率%	
ドーパミン	0	0.8830±0.3168	該当せず	該当せず	10
	1	1.202±0.3910	0.0074	+136	
	5	2.497±0.6475	<0.0001	+283	
	10	3.908±0.9202	<0.0001	+443	
	20	8.386±1.344	<0.0001	+950	
	対照	12.02±1.943	<0.0001	+1361	
DOPAC	0	0.2145±0.08036	該当せず	該当せず	20
	1	0.3030±0.09937	0.0037	+141	
	5	0.5915±0.1579	<0.0001	+276	
	10	0.9740±0.2344	<0.0001	+454	
	20	2.109±0.3608	<0.0001	+983	
	対照	3.354±0.7365	<0.0001	+1564	
HVA	0	0.08685±0.03286	該当せず	該当せず	30
	1	0.1205±0.03791	0.0048	+139	
	5	0.2495±0.06460	<0.0001	+287	
	10	0.3970±0.09381	<0.0001	+457	
	20	0.8440±0.1399	<0.0001	+972	
	対照	1.210±0.2017	<0.0001	+1393	

【0587】

細胞数。行動学的試験後、動物は、7日目で屠殺して、脳の1/2を採取し、黒質緻密部(SNpc)内のチロシンヒドロキシラーゼ(TH)陽性神経細胞を染色した。MPTPは、これらの神経細胞を選択的に殺し、これは、疾患の減衰におけるGM6の効果を決定するための優れたマーカーである。SNpc内の細胞数は、TH陽性神経細胞の数を数えることによって決定し、表15および図22に示した。表および図に見られるように、GM6の用量が増加すると、細胞数は、脳内で(細胞消失を阻止した)。これは、GM6がPD誘発の有害な影響から脳を保護することを示唆している。

【表19】

表15. 細胞数

領域	用量 (mg/kg)	細胞数平均+/-SD	P値	差異率%	
SNpc	0	2698±510.6	該当せず	該当せず	40
	1	2988±763.3	0.3314	+111	
	5	4820±823.2	<0.0001	+179	
	10	6494±944.1	<0.0001	+241	
	20	9993±1025	<0.0001	+370	
	対照	11797±1339	<0.0001	+437	

【0588】

MNTFは、神経障害からの保護を提供することができ、また傷害または移植後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、マウスモデルにおけるPDを減衰するMNTFの6アミノ酸類似体(GM6)の有効性を実証している。1、5、10、および20mg/kgボーラス用量でのGM6の静脈内投与は、5日間にわたつ

て、P D 行動、生化学、および組織学の用量依存的な減少を実証した。これは、G M 6 が静脈内投与を介してマウスにおける P D の程度を限定するのに有効であり、本疾患を処置するのに有益であり得ることを実証した。

【 0 5 8 9 】

静脈内投与された場合、G M 6 は P D のマウスモデルにおいて有効であることが判明した。G M 6 の有効性は、用量依存的であり、G M 6 が P D に有効であり得ることを示す。

【 0 5 9 0 】

実施例 5 B

【 0 5 9 1 】

パーキンソン病の細胞培養モデルにおけるM N T F の試験

10

【 0 5 9 2 】

M N T F を、パーキンソン病（P D）の細胞培養モデルにおける有効性について試験した。P D の細胞培養モデルにおけるM N T F の有効性を決定するために、S H - S Y 5 Y 細胞を 24 時間のサルソリノール（100 μM）暴露に供した。M N T F の有無に関わらず、細胞を異なる濃度で処置し、細胞生存率について検査した。サルソリノールは、24 時間の暴露後、S H - S Y 5 Y 細胞内に細胞死を誘発した。培地へのM N T F の付加は、サルソリノール暴露からの用量依存的な保護を示した。また、ワートマニン（P I 3 K 阻害剤）を用いた処置は、M N T F の効果を無効にした。これらのデータは、M N T F が P D の細胞培養モデルにおいて、サルソリノールの投与後に神経保護作用を有し、P I 3 K 経路を通じて機能を果たし得ることを実証した。

20

【 0 5 9 3 】

本実施例に関する略語 / 専門用語

【 0 5 9 4 】

「M N T F」は、運動ニューロン栄養因子を意味する。

【 0 5 9 5 】

「P D」は、パーキンソン病を意味する。

【 0 5 9 6 】

「G B」は、Genervon Biopharmaceuticals, LLC を意味する。

30

【 0 5 9 7 】

「C V」は、細胞生存率を意味する。

【 0 5 9 8 】

「G M」は、M N T F を意味する。

【 0 5 9 9 】

「W R T」は、ワートマニンを意味する。

【 0 6 0 0 】

「S a l」は、サルソリノールを意味する。

【 0 6 0 1 】

多くの研究が、末梢の坐骨神経、末梢の筋皮神経、脳顔面神経、脳舌下神経、および首、胸部、および上肢の筋肉を制御する脊髄の一部を含む、様々なラット神経系におけるM N T F の有効性を実証している（Wang et al., 1995）。さらに、6 週齢時に 1 回用量の 35 ng M N T F を投与された二重劣性遺伝子を有する動搖病マウス（N I H）は、この株における神経変性遺伝疾患を停止した。

40

【 0 6 0 2 】

独立した研究グループが、独自の確立されたアッセイおよびプロトコルを用いて以下の C N S および P N S 実験を行った。1. G M 6 の血液脳関門通過の研究において、0.2 mg / kg および 2 mg / kg 単回ボーラス用量での G M 6 の静脈内投与は、4 時間後、脳内に G M 6 レベルの用量依存的増加を実証した。2. 中大脳動脈閉塞（M O A C）マウス脳卒中モデルでは、I V 注射による G M 6 の後処置は、脳内の梗塞容積を低減し、用量応答的に神経学的欠損を低減した。高用量の G M 6 は、ビヒクルと比較して脳梗塞容積を 7

50

4 % 低減し、神経学的欠損を $p < 0.0001$ で有意に低減した。3 . L - 2 - ヒドロキシグルタル酸 (L G A) は、神経系において酸化ストレスおよびアポトーシスを誘発する。ゼブラフィッシュバイオアッセイにおいて、GM 6 は C N S において L G A 誘発アポトーシスを保護し、中脳においてアポトーシスを 85 % 低減した。4 . 8 mm ギャップでのラット坐骨神経離断試験では、GM 6 処置動物は、用量応答的に運動ニューロン再生を有意に改善し（最適用量で $p < 0.0002$ ）、D R G 神経再生を促進した。5 . 離断大腿神経ラットモデルにおいては、運動ニューロンの数は、GM 6 処置動物において用量応答的に筋肉に正確に投射した。最適用量では、筋肉に正確に投射した運動ニューロンの数は、皮膚に不正確に投射した運動ニューロンの数の 3 倍である（ $p < 0.0001$ ）。6 . ゼブラフィッシュバイオアッセイにおいて、GM 6 は P N S において L G A 誘発アポトーシスを保護し、末梢神経筋接合部においてアポトーシスを 49 % 低減した。7 . C N S 疾患に罹患する患者からの脳脊髄液 (C S F) は、可溶性因子を含み、神経突起絶縁および神経細胞死を誘発する。GM 6 は、ハンチントン病 (271 %) 、M S (246 %) 、脳卒中 (205 %) 、パーキンソン (198 %) 、アルツハイマー (191 %) 、および A L S (175 %) に罹患する患者の C S F において、有意に細胞生存率を向上させた。これらのデータは、M N T F が、動物所見の強い確証である、神経疾患に罹患する患者の C S F により刺激された細胞死に対して神経細胞を保護することができる事を示唆している。
10

【 0 6 0 3 】

パーキンソン病の細胞培養モデルにおける、G M P グレード GM 6 の有効性（本報告書では M N T F と称する）(Shavali et al . , 2003)。本試験は、損傷から S H - S Y 5 Y 細胞を保護するための M N T F の能力を試験するために実施された。M N T F は固体として提供され、製剤は調製された（溶液は 4 度保存）。
20

【 0 6 0 4 】

方法および材料

【 0 6 0 5 】

細胞

【 0 6 0 6 】

S H - S Y 5 Y 細胞を American Type Culture Collection (Manassas , VA) から購入し、最小必須培地、Hams F - 12 培地、および Hanks Balanced Salt Solution Gibco - BRL を 2 : 1 : 1 の割合で含む、完全培地に培養した。培地はまた、ペニシリノ (50 U / ml) およびストレプトマイシン (50 mg / ml) とともに、10 % ウシ胎仔血清も含んだ。細胞は、フラスコ内で培養され、37 度、大気中 5 % C O ₂ を含む加湿されたインキュベーターで維持された。培地は、2 ~ 3 日ごとに交換された。
30

【 0 6 0 7 】

実験群

【 0 6 0 8 】

操作前に、培養は、乱塊法計画に基づいて、異なる処置群に割り当てられた。調査者は、処置群については情報を与えられなかった。
40

【 0 6 0 9 】

パーキンソン病の細胞モデルの誘発

【 0 6 1 0 】

細胞生存率の実験のために、S H - S Y 5 Y 細胞 (0 . 5 × 105 / ウェル) を、96 ウェル細胞培養プレート中で培養し、(±) S A L (Sigma , St . Louis , MO) のみ、または異なる濃度の (GM 6) (Gener von) とともに、ホスファチジルイノシトール - 3 - キナーゼ (PI - 3 キナーゼ) 阻害剤である、ワートマニン (W R T) (Sigma , St . Louis , MO) を用いて、または用いずに、24 時間処置した。細胞生存率は、Thiazolyl blue (M T T) アッセイにより決定された。

50

【0611】

統計解析

【0612】

結果は平均±標準偏差(SD)として表され、統計的有意性は、Sigma-statソフトウェアを使用して、Student's t-検定によって算出され、P < 0.05を有意な値として見なされた。

【表20】

PD細胞培養モデル：

群	培養数	化合物	用量
1	10	ビヒクル	0
2	10	GM6	0, 1 mg/ml
3	10	GM6	1 mg/ml
4	10	GM6	10 mg/ml
5	10	GM6/WRT	10 mg/ml + WRT (10 μM)
6	10	Sal	100 μM
7	10	Sal/GM6	100 μM/0, 1 mg/ml
8	10	Sal/GM6	100 μM/1 mg/ml
9	10	Sal/GM6	100 μM/10 mg/ml
10	10	Sal/GM6/WRT	100 μM/10 mg/ml + WRT (10 μM)

10

20

【0613】

評価項目

【0614】

細胞数

【0615】

すべての試験群をNTSに提供した。MNTFは固体材料としてNTSに提供した。試験群のすべての培養には、上に示した通り投与を行った。サルソリノールおよびワートマニンをSigmaから購入した。GM6 = 例示的なMNTF FSYAR配列番号：2。

30

【0616】

結果

【0617】

PDの細胞培養モデル。PD試験。細胞生存率における相対的変動は、GM6±サルソリノール(Sal)で培養された場合、SH-SY5Y細胞において評価された。データは、ビヒクルまたはMNTF(GM6)で処置された細胞培地からであった。

【0618】

細胞生存率。細胞培養は、様々な濃度のGM6(0.1~10 mg/ml)±サルソリノール(100 μM)およびワートマニン(WRT、10 μM)でインキュベートし、細胞数を決定した。得られたデータに基づいて、GM6は、対照処置細胞と比較して、細胞数の用量依存的増加を示した。10 mg/mlで、対照処置細胞と比較して、細胞数が19.2%増加した。10 mMで、ワートマニンを用いた細胞の処置は、GM6の作用におけるPI3Kの役割を示唆する細胞数の増加を阻止した。

40

【0619】

100 μMで、サルソリノールを用いた細胞の処置は、ドーパミン作動性SH-SY5Y細胞において、細胞生存率の減少を実証した。サルソリノールを用いた処置から24時間後、細胞数が63.7%減少した。細胞へのGM6の付加は、Sal誘発細胞死を阻止し、MTTアッセイによって評価されるように、細胞生存を有意に増加した。100 μM濃度で、SALは、36.5%まで細胞生存率を減少させ、0.1、1.0、および10.0 mg/mlで、GM6を用いた同時処置は、それぞれ、66%、85%、および95%

50

まで細胞生存率を増加した(図17)。WRT(10 μM)は、GM6の神経防護作用効果をブロックした(図17)。

【表21】

表16. GM6およびサルソリノールの処置後、細胞生存率における変化率

群	用量	処置	化合物	生存率(細胞率) 平均±SD	細胞数の変化割合	P値
1	0mg/ml	ビヒクル	ビヒクル	100.6±5.187	該当せず	該当せず
2	0.1mg/ml	GM6	ビヒクル	101.2±7.260	+0.6%**	0.8394**
3	1mg/ml	GM6	ビヒクル	108.0±8.249	+7.4%**	0.0283**
4	10mg/ml	GM6	ビヒクル	119.9±14.01	+19.2%**	0.0007**
5	10mg/ml	GM6	WRT	93.81±9.246	-6.7%	0.0576**
6	0mg/ml	サルソリノール	ビヒクル	36.48±12.78	該当せず	該当せず
7	0.1mg/ml	GM6/Sal	ビヒクル	65.85±10.80	+80.5%*	<0.0001*
8	1mg/ml	GM6/Sal	ビヒクル	85.19±10.18	+133.5%*	<0.0001*
9	10mg/ml	GM6/Sal	ビヒクル	95.57±8.328	+162%*	<0.0001*
10	10mg/ml	GM6/Sal	WRT	41.35±10.79	+13.4%*	0.3689*

*第7～10群の細胞数の変化割合は、サルソリノール処置細胞(第6群)と比較される。

**第2～5群の細胞数の変化割合は、ビヒクル処置細胞(第1群)と比較される。

【0620】

サルソリノール(Sal)を100 μMで加え、ワートマニン(WRT)を10 μMで加えた。

【0621】

MNTF(GM)は、神経障害からの保護を提供することができ、また傷害または移植後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、効果的かつ効率的に、PD(サルソリノール)の有害な影響からドーパミン作動性ニューロン(SH-SY5Y細胞)を保護するためのMNTFの能力を実証している。24時間、0.1、1、および10mg/mlでのMNTFの投与は、細胞数の増加によって、サルソリノールを用いて細胞死に対するSH-SY5Y細胞の用量依存的な保護効果を実証した。これらの試験は、MNTFがPDにおいて有益な効果を有し得ることを実証した。

【0622】

MNTF(GM6)を投与した場合、細胞死(アポトーシスを誘発したサルソリノール)のPD細胞培養モデルから保護することが明らかであった。

【0623】

実施例6

【0624】

C SF傷害に対する保護におけるMNTFの試験

【0625】

GM6を、神経傷害のモデルにおける有効性について試験した。対照群および8つの神経疾患群のそれぞれからの5つの疾患特異的ヒト脳脊髄液(CSF)試料を、第1次神経細胞で試験し、神経細胞死における効果を決定した。また、GM6の効果を、CSFにより誘発される傷害からの保護について検査した。疾患特異的ヒトの8つの異なる神経障害からのCSFは、10%溶液として適用する場合、神経細胞死を誘発した。GM6は、本傷害からの保護を提供した。これらの試験は、神経疾患に罹患するヒトからのCSFが、細胞死を誘発する因子を含み、GM6が、これらの効果から保護し得ることを実証した。これらの試験は、神経障害のモデルにおけるGM6の有効性をさらに実証する。

【0626】

本実施例に関する略語/専門用語

【0627】

「MNTF」は、運動ニューロン栄養因子を意味する。

【0628】

「GM6」および「6mer」はそれぞれ、MNTFの例示的な6アミノ酸ペプチド類似

10

20

40

50

体 : F S R Y A R (配列番号 : 2) を意味する。

【0629】

「C S F」は、脳脊髄液を意味する。

【0630】

「G e n e r v o n」および「G B」はそれぞれ、G e n e r v o n Biopharmaceuticals, LLCを意味する。

【0631】

「N C C」は、神経細胞培養を意味する。

【0632】

C S F 傷害に対する保護におけるM N T F の試験

10

【0633】

U C L A Human Brain and Spinal Fluid Resource Center (Los Angeles, CA)により供給された同定および臨床診断、ならびに神經病理学診断とともに、9つの試験群のそれぞれの5人の疾患特異的な患者／ドナーからの死後のC S F 試料を使用して、試験を行い、C S F 傷害の保護におけるM N T F ペプチドの能力を評価した。C S F 試料を第1次神経細胞で試験し、神経細胞死における効果を決定した。また、M N T F 6 m e r / G M 6 の効果を、C S F により誘発される傷害からの保護について検査した。G M 6 は、G M P コンプライアンス (C S Bio Co., Menlo Park, CA, G M P 0 1 3 , l o t C 8 1 1) のもとで化学的に合成された。本試験は、Neurological Testing Service, Inc. (NTS, Charleston, SC)との契約の下で行われた。G M 6 は固体としてNTSに提供され、製剤はNTSにより調製された（溶液は4度保存）。

【0634】

方法および材料

【0635】

試験デザイン

【0636】

S prague Dawley ラット皮膚神経細胞を18日齢の胎児から単離し、12日間の培養において増殖させた。対照および神經疾患ドナーからの死後のC S F を、培養に適用し、神經生存率について検査した。また、M N T F を培養に加え、細胞を傷害から保護した。

30

【0637】

インビトロ法

【0638】

神經培養を18日齢のS prague - Dawley ラットの胎児から調製した。胎児ラットの中脳を解剖し、10mM HEPES (G I B C O Life Technologies, Paisley, Scotland) で緩衝化したCa²⁺ およびMg²⁺ 不含のハンクス緩衝液 (H B S S) 中の2mg / mL のトリプシン溶液にて15分間インキュベートした。その後、組織をダイズトリプシン阻害剤 (H B S S 中の1mg / mL) に2分間暴露し、H B S S 中で3回洗浄処置した。細胞を、粉碎により解離し、96 ウェルまたは24 ウェルのポリ - L - リジン被覆したプラスチック製の培養プレート (Costar, Cambridge, MA) に分配した。初期のプレート密度は、約160 ~ 180 細胞 / mm² であった。プレートに入れた時点で、0.2mLのD M E M / F 1 2 培地 (G I B C O Life Technologies, NY) を含んだそれぞれのウェルは、100mL / L のウシ胎仔血清 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) を補った。24時間後、D M E M / F 1 2 培地を2mM Glutamax および0.5% w / v D - (+) グルコース (G I B C O Life Technologies) で補った0.15mLの2% v / v B - 2 7 Neurobasal 培地で置換した。週に2回、Neurobasal 培地の2 / 3を、同一の組成物の新たに調

40

50

製した培地で置換した。培養物は、培養してから 12 日後、神経毒性実験に使用された。NTS の調査者らは、試験前、試験中、および予備データを Sponsor (GB) に提示する際、材料のことを知らなかった。

【0639】

UCLA Human Brain and Spinal Fluid Resource Center (Los Angeles, CA) は、同定および臨床診断、ならびに神経病理学診断とともに、9つの試験群のそれぞれの5人のドナーからの死後のCSF 試料を供給した。試料は、出荷前に -170°で保存され、ドライアイスとともに出荷された。試験群は、対照（神経疾患なし）、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ニューロパシー (NP)、多発性硬化症 (MS)、アルツハイマー病 (AD)、バッテン病 (BD)、ハンチントン病 (HD)、パーキンソン病 (PD)、および脳虚血（脳卒中）であった。
10

【0640】

神経細胞生存におけるCSF の効果を試験するために、CSF を、10%CSF を含むNeurobasal 培地中の培養に加えた。CSF を培養物に加え、48 時間後、検査した。培養の画像を取得した後、培養物はMTT アッセイ（下記参照）に供され、細胞死率を決定した。さらに培養物は、CSF を加える2時間前に培養物に加えられたMNTF (100 nM) とともにインキュベートされた。

【0641】

MTT アッセイ。記載されるように、第1次神経生存率を決定した。生存細胞の相対数を、ビヒクルで刺激された細胞に対する値を 100% として、3重測定で決定した。細胞生存を、MTT アッセイを介して、処置されてから2日目に評価した。MTT (3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド) を、ハンクス溶液 (Biochrom) 中で 200 mMまで希釈し、37°で2時間培養に加えた。MTT ホルマザン産物をジメチルスルホキシドを加えることにより細胞から放出させ、Ultrospect III 分光光度計 (Pharmacia) において、570 nmで測定した。その後、未処置の対照と比較して相対的生存を決定することができた。
20

【0642】

統計解析。結果は平均 ± 標準偏差 (SD) として表される。データにおける差の有意性を、t - 検定を用いて分析した。

【0643】

処置群。

【表22】

神経傷害モデル

群	化合物	用量	経路
1 対照	CSF	10%	インビトロ
2 ALS	CSF	10%	インビトロ
3 NP	CSF	10%	インビトロ
4 MS	CSF	10%	インビトロ
5 AD	CSF	10%	インビトロ
6 BD	CSF	10%	インビトロ
7 HD	CSF	10%	インビトロ
8 PD	CSF	10%	インビトロ
9 脳卒中	CSF	10%	インビトロ

【0644】

MNTF 効果

10

20

30

40

【表23】

群	化合物	用量	経路
1 対照+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ
2 ALS+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ
3 NP+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ
4 MS+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ
5 AD+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ
6 BD+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ
7 HD+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ
8 PD+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ
9 脳卒中+MNTF	CSF	10% (100nM)	インビトロ

*カッコ内は、MNTFの用量を示す。

【0645】

コード

【0646】

「ALS」は、筋萎縮性側索硬化症を意味する。

【0647】

「NP」は、神經因性疼痛を意味する。

【0648】

「MS」は、多発性硬化症を意味する。

【0649】

「AD」は、アルツハイマー病を意味する。

【0650】

「BD」は、バッテン病を意味する。

【0651】

「HD」は、ハンチントン病を意味する。

【0652】

「PD」は、パーキンソン病を意味する。

【0653】

「脳卒中」は、脳虚血を意味する。

【0654】

結果

【0655】

神經細胞培養中のCSF - 試験。神經細胞死におけるCSFの効果は、神經細胞傷害のインビトロモデルにおいて評価された。CSFを、全容積の10%で、第1次ラット神經細胞培養物に加えた。細胞を、細胞死に対する顕微解析およびMTTアッセイにより検査した。

【0656】

顕微解析

【0657】

神經細胞培養物を、対照または様々な神經疾患ドナーからの10%CSFで48時間処置した後、細胞消失について評価した。対照CSFは、細胞生存における有意な効果を有しなかったが、神經疾患からのCSFでの細胞の処置は、細胞死を誘発した。

【0658】

MTTアッセイ

【0659】

ラット第1次神經細胞培養物におけるCSFにより誘発された細胞消失率を測定するために、培養物をMTTアッセイについて分析した。図18に見られるように、対照の患者からのCSFは、対照試料と比較した場合、明らかな細胞死を全く誘発しなかった。しかし

10

20

30

40

50

ながら、細胞死を誘発した様々な神経疾患からのC S Fは、細胞消失の様々な程度をもたらした（表17および図18）。図および表に見られるように、M Sは、最大の細胞消失（70%）を誘発するが、N Pは、最少量の細胞死（32%）を誘発した。これらのデータは、神経疾患は、神経細胞消失を誘発する、または増悪させる化合物を刺激する、またはその放出をもたらすことを示唆している。

【表24】

表17. C S Fにより誘発された神経細胞消失

C S F	用量	細胞生存率（平均±S D）	P値（減少率）
対照	10%	92.00±9.181	0(0)
ALS	10%	41.33±13.76	<0.0001(55)
N P	10%	62.73±13.42	<0.0001(32)
M S	10%	27.40±7.149	<0.0001(70)
A D	10%	37.53±12.45	<0.0001(59)
B D	10%	57.00±8.443	<0.0001(38)
H D	10%	29.40±10.35	<0.0001(68)
P D	10%	39.67±11.45	<0.0001(57)
脳卒中	10%	39.07±11.13	<0.0001(57.5)

【0660】

神経細胞培養中のC S FにおけるM N T Fの効果。神経細胞死におけるC S FのM N T Fの効果は、神経細胞傷害のインビトロモデルにおいて評価された。M N T Fを、C S Fを加える2時間前に、細胞培養に100nMで加えた。C S Fを、全容積の10%で、第1次ラット神経細胞培養物に加えた。細胞を、細胞死に対する顕微解析およびM T T アッセイにより検査した。

【0661】

顕微解析

【0662】

神経細胞培養物を、100nMのM N T Fで2時間処置した後、対照または様々な神経疾患からの10%C S Fでさらに48時間加えた後、細胞消失について評価した。M N T Fは、C S Fへの細胞の前処置で、細胞生存における有意な効果を有しなかった。

【0663】

M T T アッセイ

【0664】

C S F処置ラット第1次神経細胞培養物におけるM N T Fにより誘発された細胞保護率を測定するために、培養物をM T T アッセイについて分析した。図2に見られるように、M N T Fは、神経疾患に罹患する対照患者からのC S Fにより誘発された細胞死における神経細胞培養への保護レベルを得た（表18および図19）。図19および表18に見られるように、M N T Fは、H D C S Fにおいて最大値（271%）、M S（246%）、脳卒中（205%）、パーキンソン（198%）、アルツハイマー（191%）、およびA L S（175%）のC S Fにおいて有意に細胞生存率を向上させたが、M N T Fは、B D C S Fにおいて、最小の細胞生存率（114%）を向上させた。これらのデータは、M N T Fが、神経疾患に罹患する患者のC S Fにより刺激された細胞死から神経細胞を保護することができることを示唆している。

10

20

30

40

【表25】

表18. MNTFにより誘発された神経細胞保護

C S F	用量	細胞生存率 (平均±S D)	P値(減少率(↓) または増加率(↑))
対照	10%	92.00±9.181	0(0)
ALS	10%	41.33±13.76	<0.0001(55↓)
ALS+MNTF	10%+100nM	72.33±10.83	<0.0001(175↑)
NP	10%	62.73±13.42	<0.0001(32↓)
NP+MNTF	10%+100nM	75.47±13.22	<0.014(120↑)
MS	10%	27.40±7.149	<0.0001(70↓)
MS+MNTF	10%+100nM	67.33±11.65	<0.0001(246↑)
AD	10%	37.53±12.45	<0.0001(59↓)
AD+MNTF	10%+100nM	71.53±10.81	<0.0001(191↑)
BD	10%	57.00±8.443	<0.0001(38↓)
BD+MNTF	10%+100nM	65.20±11.04	<0.03(114↑)
HD	10%	29.40±10.35	<0.0001(68↓)
HD+MNTF	10%+100nM	79.80±8.768	<0.0001(271↑)
PD	10%	39.67±11.45	<0.0001(57↓)
PD+MNTF	10%+100nM	78.53±8.806	<0.0001(198↑)
脳卒中	10%	39.07±11.13	<0.0001(57.5↓)
脳卒中+MNTF	10%+100nM	80.07±8.548	<0.0001(205↑)

10

20

【0665】

MNTFは、神経障害からの保護を提供する可能性があり、また傷害または移植後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、神経傷害における神経疾患CSFの有害な影響から保護するために、MNTFの6アミノ類似体(GM6)の能力を実証している。100nMの用量でGM6のインビトロ適用は、ほとんどの場合において、神経細胞の保護を実証した。これは、GM6が様々な神経疾患に対する保護効果を有することを実証した。

【0666】

神経細胞にインビトロ投与された場合、GM6は、神経障害からCSFに対する保護作用を有することが判明した。

30

【0667】

実施例7

【0668】

MSモデル

【0669】

GM6(CS Bio Co., Menlo Park, CA)を、マウス多発性硬化症(MS)モデルにおける有効性について試験した。MSにおけるGM6の有効性を決定するために、MSを誘発するためにミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)をマウスに注射した後、MSの減衰における影響を決定するために数回用量でGM6を静脈注射した。7回用量(1日1回)で、GM6(1、5、10、または20mg/kg)の静脈内(i.v.)投与を検査した。GM6の投与は、最も有効性を示す20mg/kgで、マウスにおけるMSの用量依存的減衰を実証した。臨床および組織学的解析はともに、MSにおけるGM6の特異的効果を示す減衰を実証した。これらのデータは、GM6が静脈注射後のMSのマウスモデルに効果的であり、MS患者に対する潜在的処置である可能性があることを示唆している。

40

【0670】

本実施例に関する略語/専門用語

【0671】

「MNTF」は、運動ニューロン栄養因子を意味する。

50

【0672】

「GM6」および「6mer」はそれぞれ、MNTFの例示的な6アミノ酸ペプチド類似体を意味する。

【0673】

「MS」は、多発性硬化症を意味する。

【0674】

「EAE」は、実験的自己免疫性脳脊髄炎を意味する。

【0675】

「PLP」は、ミエリンプロテオリピドタンパク質を意味する。

【0676】

「Genervon」および「GB」はそれぞれ、Genervon Biopharmaceuticals, LLCを意味する。

10

【0677】

「I.V.」は、静脈内を意味する。

【0678】

本実験的デザインは、多発性硬化症のマウスモデルにおけるGM6の有効性を決定するために、運動ニューロン栄養因子(MNTF)の6アミノ酸類似体(GM6)の能力を評価することである。GB被験物質は、合成した6アミノ酸ペプチド(MNTF)(CS Bio Co., Menlo Park, CA)である。

【0679】

20

静脈注射を介してMSのマウスモデルにおけるGM6の有効性の評価

【0680】

方法および材料

【0681】

試験デザイン。下に記載のように、PLPを雌SJL/Jマウスに注射し、示された用量でGM6によりMSを誘発されたEAEからの保護について検査した。動物を、臨床所見および組織学的变化について検査した。

【0682】

実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)誘発。雌SJL/Jマウス(8~10週齢、the Jackson Laboratory)を実験に使用した。EAE誘発および処置ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)(p139~151, HSLGKWLGHPDKF, SynPep Corporation)を免疫に使用した。EAEを完全フロイントアジュvant(CFA, Difco Laboratories)に溶解した25μgのPLPを皮下注射により、雌SJL/Jマウスに誘発した。免疫日および48時間後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の200ngの百日咳毒素(PT, List Biological laboratories, Inc)をマウス尾静脈に注射した。

30

【0683】

MNTFの投与。マウスを無作為にMNTF処置群(n=10/群)に分割した:MNTFを、臨床的な症候群の発病日に(スコア \geq 1)開始してから7日間連続で静脈投与し、本処置プロトコルを臨床的に関連させた。MNTFの用量は、予備試験に基づいて、1、5、10、または20mg/kgであった。EAE対照群(n=10):EAEマウスを、実験群として使用される生理食塩水の同一量で処置した。

40

【0684】

臨床的観察。マウスを、毎日、EAEの臨床的兆候について観察し、隔日に体重を量った。臨床スコアを、以下のように指定した:0:EAEの検出可能な兆候なし;1:尾緊張に影響;2:尾麻痺;3:軽度の後肢の感覚異常;4:重度の後肢の感覚異常;5:片後肢の感覚異常;6:完全な後肢の感覚異常;7:完全な後肢および前肢の感覚異常;および8:死亡。

【0685】

臨床的EAE評価に関しては、以下のパラメータを使用した:発症日は、EAE症状の初

50

めて出現した日として、それぞれの動物に対して定義した。EAE持続時間は、それぞれの動物が病気である記録された日数を総記録日数で割ることによって算出し、パーセンテージで示した。累積発現率は、実験期間中、EAEに発展した動物のパーセンテージとして定義された。実験期間にわたって平均スコアは、すべての個人スコアの合計を測定数で割ることによって算出し、それぞれの動物について算出された。最大スコアは、実験期間中、それぞれの動物に対する最高の臨床スコアとして定義された。マウスが実験の進行中にEAEで死亡した場合、すべての以下の時点で8のスコアをこれらのマウスに割り当てる。マウスがEAE症状の明らかな発症前に死亡した場合、これらのマウスを実験から除外した。重度にEAEに罹患した動物を含む、すべての動物は、実験中、食物および水を得ることが可能であった。

10

【0686】

組織学。脳および脊髄を20日後除去し、10%の緩衝ホルマリン(Sigma)に固定された。パラフィン包埋切片(厚さ6μm)をH&Eで染色し、脳および脊髄における損傷数を評価した。これらを得点し、記録した。

【0687】

統計解析。結果は平均±標準偏差(SD)として表された。データにおける差の有意性を、t-検定を用いて分析した。

【0688】

試験からの動物の除外。いくつかの基準に基づき、動物を試験から除外した：

【0689】

試験の終了前に(任意の時点で)死亡した動物。

20

【0690】

被験物質の投与後に重度の合併症を発現した動物。

【0691】

処置群。すべての群はGM6に供されたか、または対照であった。動物(50匹の動物)を、示された用量のビヒクルまたはMNTFの尾静脈による静脈内ボーラス注射に供した。

【表26】

マウスマodel：

30

群	化合物	用量(mg/kg)	経路
SJL雌マウス			
1(n=10マウス)	ビヒクル	0	IV
2(n=10マウス)	MNTF	1mg/kg/日	IV
3(n=10マウス)	MNTF	5mg/kg/日	IV
4(n=10マウス)	MNTF	10mg/kg/日	IV
5(n=10マウス)	MNTF	20mg/kg/日	IV

【0692】

40

評価項目

【0693】

マウスにおけるMSの調節

【0694】

すべての試験群をNTSに提供した。GM6は固体材料としてNTSに提供した。試験群のすべての動物には、上に示した通り投与を行った。

【0695】

結果

【0696】

臨床的スコア。MSのマウスマodelにおけるGM6の有効性を評価した。ビヒクルまたは

50

GM 6 の（示された用量で）静脈内注射を受けたマウスからのデータ。

【0697】

臨床的解析

【0698】

GM 6 : PLLP を用いて MS の誘発後、示された用量で GM 6 をマウスに投与した（図 23）。動物は、0 日目の開始日から隔日で検査し、動物の臨床的スコアを決定した。マウスに PLLP 注射を開始してから 7 日間、毎日、GM 6 を注射した。図 23 に見られるように、ビヒクルを用いて処置したマウスは、臨床的スコアの有意な増加を示した。GM 6 を用いた処置は、疾患の有意な改善（減衰）を示した（図 23）。5、10、20 mg / kg での GM 6 は、有意な有用性を示すが、1 mg / kg では、全く回復を示さなかった。
10 表 20 は、GM 6 を用いた処置後、急性疾患を発現したマウスの数を示す。表に見られるように、10 mg / kg および 20 mg / kg は、急性疾患状況におけるマウスの総数の低減を示したが、慢性状況では示さなかった。

【表 27】

表 19. ビヒクル処置動物と比較した GM 6 投与の有意性

処置	P 値
ビヒクル	該当せず
GM 6 (1 mg / kg)	該当せず
GM 6 (5 mg / kg)	< 0.01
GM 6 (10 mg / kg)	< 0.001
GM 6 (20 mg / kg)	< 0.001

10

20

【表 28】

表 20. 臨床的兆候があるマウス/マウスの総数 (%) - 急性疾患

処置	P 値
ビヒクル	10 / 10 (100%)
GM 6 (1 mg / kg)	10 / 10 (100%)
GM 6 (5 mg / kg)	10 / 10 (100%)
GM 6 (10 mg / kg)	7 / 10 (70%)
GM 6 (20 mg / kg)	0 / 10 (0%)

30

【表 29】

表 21. 臨床的兆候があるマウス/マウスの総数 (%) - 慢性疾患

処置	P 値
ビヒクル	10 / 10 (100%)
GM 6 (1 mg / kg)	10 / 10 (100%)
GM 6 (5 mg / kg)	10 / 10 (100%)
GM 6 (10 mg / kg)	10 / 10 (100%)
GM 6 (20 mg / kg)	10 / 10 (100%)

40

死亡率：本試験では死亡は見られなかった。

【0699】

損傷数。脳および脊髄中の損傷数を、計数によって決定し、図 24 A および 24 B に示す

50

。GM6の用量が増加する場合、脳および脊髄中の損傷数は減少する。これは、GM6がMS誘発の有害な影響から脳および脊髄を保護することを示唆している。

【表30】

表22.

領域	用量 (mg / kg)	損傷数平均+/-SD	P値	差異率	
脳	0	69.20±10.99	該当せず	該当せず	10
	1	62.30±9.202	0.1454	-10	
	5	45.00±8.367	<0.0001	-35	
	10	24.90±6.871	<0.0001	-64	
	20	22.40±6.687	<0.0001	-68	
脊髄	0	59.90±9.098	該当せず	該当せず	10
	1	55.20±8.817	0.2560	-8	
	5	36.90±7.385	<0.0001	-38	
	10	24.50±6.671	<0.0001	-59	
	20	19.90±8.517	<0.0001	-67	

【0700】

MNTFは、神経障害からの保護を提供する可能性があり、また傷害または移植後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、マウスモデルにおけるMSを減衰するためのMNTFの6アミノ類似体(GM6)の有効性を実証している。1、5、10、および20mg/kgボーラス用量でのGM6の静脈内投与は、7日間にわたって、MS臨床的スコアおよび組織学の用量依存的な減少を実証した。これは、GM6が静脈内投与を介してマウスにおけるMSの程度を限定するのに有効であり、本疾患を処置するのに有益であり得ることを実証する。

【0701】

静脈内に投与された場合、GM6は、MSのマウスモデルにおいて有効であることが判明した。GM6の有効性は、用量依存的であり、GM6がMSの処置に有効であり得ることを示す。

【0702】

実施例8

【0703】

中大脳動脈閉塞のマウスモデルにおけるGM602(MNTF6mer)の試験

【0704】

Genervon Biopharmaceuticals, LLCの被験物質GM602を中大脳動脈閉塞(MCAO)マウスモデルについて有効性を試験した。MCAOマウスモデルにおけるGM602の有効性を決定するために、マウスを1時間の虚血および14日間の再灌流に供した。再灌流の開始から0、3、6、12、および24時間後、尾静脈からの静脈内ボーラスによりGM602をマウスに注射し、脳血流(CBF)、心拍数(HR)、血圧(BP)、pO₂、pCO₂、pH、神経学的欠損(ND)、および梗塞容積(IFV)の変化について検査した。虚血後、示された時間で、および3日間毎日、GM602(5mg/kg)の静脈内(i.v.)投与を神経保護作用について検査した。GM602の投与は、CBF、HR、BP、pO₂、pCO₂、またはpHの変化を示さなかった。NDおよびIFVに用量依存的な変化が検出され、それは、時間依存的であった。5mg/kgでのGM602において、0、3、6、および12時間で、梗塞損傷からの有意な保護を示したが、これは、神経学的欠損の維持につながる。これらのデータは、MCAOのマウスモデルにおいて、GM602が、i.v.注射後に脳に対する神経保護作用を有することを示唆している。

【0705】

略語 / 専門用語

20

30

40

50

【表31】

略語／専門用語	定義
MNTF	運動ニューロン栄養因子
MNTF 6mer	MNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体
GM602	脳卒中に対するMNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体
MCAO	中大脳動脈閉塞
GB	Genervon Biopharmaceuticals LLC
I.V.	静脈内
CBF	脳血流
HR	心拍数
BP	血圧
ND	神経学的欠損
IFV	梗塞容積

10

【0706】

GB被験物質であるGM602の急性虚血および再灌流傷害から脳を保護するための運動ニューロン栄養因子の6-アミノ酸ペプチド類似体(MNTF 6mer; F S R Y A R)の能力試験。GM602は、GMPコンプライアンス(CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lot C811)のもとで化学的に合成された。GM602は固体として提供され、製剤は調製された(溶液は4℃で保存)。

20

【0707】

方法および材料

【0708】

動物

【0709】

それぞれ体重22～25グラムのC57BL/6マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、実験前に自由に餌および水を与えた。動物をハロタンで麻酔した(マスクにより70%/30%NO₂/O₂に1%)。テールカフ装置を介して平均動脈圧(MABP)を監視し、動脈pHレベルおよびPaCO₂およびPaO₂を決定するために、血液試料を採取した。Visitech System血圧モニタを使用して、MABPおよび心拍数を記録した。

30

【0710】

直腸体温計および側頭筋に挿入されたサーミスタプローブで、脳の温度を監視した。動物の体温は、ウォータージャケット付き加熱パッドを使用して37℃に維持した。脳の温度を、虚血前1時間から虚血後6時間まで監視し、30分間隔で記録した。

【0711】

実験群

【0712】

動物を、1.0時間の虚血、24時間の再灌流に供し、ビヒクル群(n=10)または5mg/kgの用量でのGM602の静脈内注射で処置した群(n=10)に、動物を分割した。GM602の調剤(CS Bio Co., Menlo Park, CA, CS1507, GMP013, lot C811)は、NTSにより、GM602を4℃で保存された(100%)生理食塩溶液でもどすことにより原液として行われた。ビヒクル対照には生理食塩溶液を投与した。再灌流の開始から0、3、6、12、および24時間後、続いて、傷害から3日間毎日、尾静脈からのGM602を用いたボーラスIV注射を行った。調査者は、処置群については情報を与えられなかった。

40

【0713】

虚血の誘発

【0714】

50

本試験は、虚血の一過性モデルに関連した。各マウスを麻酔し、外頸動脈（ECA）および総頸動脈（CCA）を分離した。サーミスタプローブを直腸および側頭筋に挿入し、体温および脳の温度を監視し、外部加温により36～37℃に維持した。左総頸動脈（CCA）を、頸部の正中切開により露出した。上甲状腺動脈および上後頭動脈を、電気凝固して分割した。マイクロ手術クリップを外頸動脈（ECA）の起点の周りに設置した。6-0の絹糸でECA遠位端を結紮し、離断した。6-0絹糸は、ECA断端の周りに緩く縛った。クリップを取り外し、5-0ナイロン縫合糸（シリコーン被覆）の火造り先端を優しくECA断端に挿入した。6-0絹糸の輪を断端の周りで締め付け、内頸動脈（ICA）内に、およびそれを通して、前大脳動脈（ACA）に収まるまでナイロン縫合糸を約13mm前進させ（体重により調節される）、それにより前交通動脈および中大脳動脈を閉塞させた。ナイロン縫合糸を1時間設置した後、それをECAに引き戻し、切開部を閉鎖した。
10

【0715】

組織学的検査

【0716】

虚血を誘発してから14日後、組織学的検査のために、ペントバルビタールナトリウム（50mg/kg）の腹腔内注射で動物を麻酔した。4%の10%リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で経心臓的に脳を灌流した。脳を取り出し、Rodent Brain Matrix内に入る前に-20℃で15分間冷凍した。冠状切片（1mm厚）を調製し、37℃での2%塩化トリフェニルテトラゾリウム（TTT染色）に供した。前頭極からの2mmから始め、梗塞の吻側端-尾端を通した7つの連続した1mm厚の冠状切片を各脳から採取した。TTT染色切片を10%中性緩衝ホルマリンに入れ、少なくとも24時間、暗所で4℃で保持した。Quick Captureフレームグラバカードを備えたPower Macintoshコンピュータ、オリンパス社製顕微鏡に装着された日立CCDカメラおよびカメラスタンドで構成されるコンピュータ支援画像分析システムで、各切片における梗塞領域を決定した。NIH Image Analysis Software、v.1.55を使用した。7切片に対し、画像を撮影して損傷の総領域を決定した。処置状態に対し盲検化された一人の操作者が、すべての測定を行った。切片の梗塞容積を加算することにより、梗塞容積を計算した。以下の式を用いて、梗塞サイズ（%）を計算し、浮腫の効果を排除した：（対側容積 - 同側非損傷容積）×100 / 対側容積。
20
30

【0717】

脳血流の測定

【0718】

レーザードップラー血流計を使用して脳血流（CBF）を監視した。レーザードップラーダラ血流計により表示される値は絶対値ではなかったため、CBF値はパーセンテージとして決定された。上に記載のように、動物をハロタンで麻酔した（マスクにより70%/30%NO₂/O₂に1%）。MCA閉塞に同側の半球において、座標は以下の通りであった：a点、ブレグマに対し0.5mm後方、および正中線に対し2mm側方；B点、ブレグマに対し1mm後方、および正中線に対し1.2mm側方；D点、ブレグマに対し1mm前方、および正中線に対し1.7mm側方；対側半球におけるC点、ブレグマに対し1mm後方、および正中線に対し2mm。CBFを、虚血の発症前に測定し、注入終了後、2時間継続した。測定を化合物の注射前および注射後に行った（連続測定を、虚血前15分から化合物の注射終了後30分まで行い、30分ごとに記録した）。MCA閉塞後および投与前の平均値を、ベースライン値として用い、その以降のデータを、ベースライン値のパーセンテージとして表した。
40

【0719】

行動評価

【0720】

虚血性傷害の前後で、マウスにおける行動解析（神経学的欠損）を決定した。神経学的スコアは以下の通りであった：0：正常な運動機能；1：動物を尾部で持ち上げた際の胴体
50

および対側前肢の屈曲；2：平面上において尾部で保持した際の対側への旋回、ただし静止時は正常な姿勢；3：静止時の対側への傾き；4：自発運動活性なし。

【0721】

試験からの動物の除外

【0722】

いくつかの基準に基づき、動物を試験から除外した：

【0723】

試験の終了前に（任意の時点で）死亡する動物。死亡時まで収集されたデータは、G Bに提供された。

【0724】

脳血流は、ベースライン値の $20 \pm 5\%$ に減少しなかった（すなわち、非虚血とみなされた）か、または、血流は、ベースライン値の $90 \pm 10\%$ に回復しなかった。

10

【0725】

虚血性傷害後、動物は発作様の活動を発現した。

【0726】

虚血中、または虚血直後に、過度の出血が検出された。

【0727】

統計解析

【0728】

結果は平均 \pm 標準偏差（S D）として表された。生理学的および組織学的データにおける差の有意性を、一元配置分散分析（A N O V A）と、続いてF i s h e rのポストホック試験を用いて分析した。反復測定A N O V Aは監視データに対し計算し、群間の有意差はF i s h e rのポストホック試験で評価した。

20

【0729】

処置群。すべての群はG M 6 0 2に供されたか、または対照であった。動物（30匹の動物）を、示された用量のビヒクルまたはG M 6 0 2のi . v . 投与に供した。

【表32】

マウス脳卒中モデル：

群	化合物	用量 (m g / k g)	経路
1 (n = 10マウス)	ビヒクル	0	I V
2 (n = 10マウス)	M N T F	虚血から0時間後、5 m g / k g	I V
3 (n = 10マウス)	M N T F	虚血から3時間後、5 m g / k g	I V
4 (n = 10マウス)	M N T F	虚血から6時間後、5 m g / k g	I V
5 (n = 10マウス)	M N T F	虚血から12時間後、5 m g / k g	I V
6 (n = 10マウス)	M N T F	虚血から24時間後、5 m g / k g	I V

30

【0730】

評価項目

【0731】

虚血および再灌流傷害からの神経保護作用のM N T Fの効果。脳血流（C B F）、心拍数（H R）、血圧（B P）、p O₂、P C O₂、p H、神経学的欠陥（N D）、および梗塞容積（I F V）について動物を評価する。

40

【0732】

すべての試験群をN T Sに提供した。G M 6 0 2は固体材料としてN T Sに提供した。試験群のすべての動物には、上に示した通り投与を行った。

【0733】

結果

【0734】

マウス試験における虚血。これらの試験において虚血の相対的重症度を評価した。データ

50

は、ビヒクルまたはGM602を静脈注射された虚血性傷害に罹患したマウスからのものであった。

【0735】

梗塞容積：ビヒクル注射群と比較して、脳内の梗塞容積は、GM602群で有意に減少した(0、3、6、および12時間)。GM602は、虚血から0から12時間後、梗塞容積の時間依存的な低減を示した(表1)。梗塞容積は図26にプロットされている。脳内に存在する梗塞容積の減少割合を表23に示す。表に示されるように、0、3、6、および12時間でのGM602は、梗塞サイズにおいて70、68、58、および36%低減を示した。しかしながら、24時間での梗塞容積の減少は、ビヒクル処置動物からの有意差を示さなかった。

10

【表33】

表23. 脳内の梗塞の減少割合

群	用量 (mg/kg)	梗塞容積 (mm ³)	梗塞容積の減少割合*	P値*
1	0	74.26±12.09	0	該当せず
2	5	22.05±7.292	70.3%	0.001
3	5	24.15±8.110	67.5%	0.001
4	5	31.03±9.255	58.2%	0.001
5	5	47.72±9.118	35.7%	0.001
6	5	64.13±12.51	13.4%	0.0821

減少割合は、それぞれのビヒクル対照動物と比較されている。

20

*第1群(ビヒクル)と比較

死亡率：本試験では死亡は見られなかった。

【0736】

生理学的パラメータ。生理学的パラメータ(脳血流、平均動脈圧、血液pO₂、pCO₂、およびpH)において、虚血中、または再灌流後のベースラインにおけるビヒクルマウスと処置マウスとの間で有意差を示さなかった(図27~31)。

【0737】

行動の測定。0から4のスケールに基づき、神経学的欠損について動物を評価した。GM602で処置した動物は、時間依存的な神経学的欠損の減少を示した(データを図32にも示す)。

30

【表34】

表24.

化合物(群)	神経学的欠損	ビヒクルと比較したP値
1-ビヒクル	3.600±0.163	該当せず
2-GM602	1.200±0.200	p=0.001
3-GM602	1.667±0.167	p=0.001
4-GM602	1.800±0.133	p=0.001
5-GM602	2.500±0.167	p=0.002
6-GM602	3.200±0.200	p=0.1387

40

【0738】

アメリカ合衆国では、脳卒中は3番目に多い死因であり、障害の腫瘍原因である。局所性脳虚血後の結果および梗塞容積は、「壊死」(パラトーシス)細胞死、および虚血の境界における遅発性神経細胞損失(プログラム細胞死またはアポトーシス)の両方により決定される。虚血性脳卒中を処置するため、最新の療法が見られるようになったが、しかしながら、これらの処置は、ほとんどの場合、血栓の溶解を扱うが、一旦神経細胞死サイクルがトリガされた際の、神経保護作用、行動の欠陥の低減、または脳梗塞容積には留意

50

されていなかった。細胞損失に影響を与える基本的メカニズムを理解することは、虚血性傷害と関連した細胞死を低減するための薬剤や用途の設計に役立つ。

【0739】

MNTFは、神経障害からの保護を提供する可能性があり、また傷害または虚血性脳卒中後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、効果的かつ効率的に、脳虚血および再灌流傷害の有害な影響から脳を保護するMNTFの6アミノ酸類似体である、GM602の能力を実証している。虚血性傷害後の様々な時間で、5mg/kgでのGM602の静脈内投与は、梗塞容積および行動的属性の減少により虚血／再灌流からの脳内の時間依存的な保護効果を実証した。これらの試験は、GM602が脳卒中において有益な効果を有し得ることを示唆している。

10

【0740】

静脈内に投与された場合、GM602は、マウスにおける虚血／再灌流傷害に対する神経保護作用を有することが判明した。

【0741】

実施例 9

【0742】

永久中大脳動脈閉塞のラットモデルにおけるGM602(MNTF 6mehr)の試験

【0743】

Genervon Biopharmaceuticals, LLCの被験物質GM602を永久中大脳動脈閉塞(MCAO)のラットモデルにおける有効性について試験した(Kindy, Study # 2C Stroke)。永久MCAOラットモデルにおけるGM602の有効性を決定するために、ラットを28日間の永久虚血に供した。虚血の開始から3時間後に、尾静脈からの静脈内ボーラスによりGM602をラットに注射した。ラットを、脳血流(CBF)、心拍数(HR)、血圧(BP)、pO₂、PCO₂、pH、神経学的欠損(ND)、および梗塞容積(IFV)の変化について評価した。GM602の投与は、HR、BP、pO₂、PCO₂、またはpHにおいて変化を実証しなかったが、GM602は、虚血から3時間後に投与した場合、CBFの増加を実証した。さらに重要なことには、GM602投与後、用量依存的に、ND、IFV、TNF(炎症バイオマーカー)、およびFluoro-Jade(神経変性のバイオマーカー)の有意な減少を示した。2.5、10、または20mg/kgでのGM602の静脈注射は、投与した場合、梗塞損傷からの有意な保護を示したが、これは、神経学的欠損の維持につながる。これらのデータは、MCAOの永久ラットモデルにおいて、虚血中、GM602の静脈内注射が、脳に対する神経保護作用を有することを示唆している。虚血の発症から3時間後、GM602を用いた処置は、保護効果を実証し、臨床試験に対して実行可能であり得る。

20

【0744】

略語／専門用語

30

【表35】

略語／専門用語	定義
MNTF	運動ニューロン栄養因子
MNTF6mer	MNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体
GM602	脳卒中に対するMNTFの6-アミノ酸ペプチド類似体 F S R Y A R
MCAO	中大脳動脈閉塞
GB	Genervon Biopharmaceuticals LLC
I. V.	静脈内
CBF	脳血流
HR	心拍数
BP	血圧
ND	神経学的欠損
IFV	梗塞容積
NS	統計的有意性なし

10

【0745】

これらのデータの管理下で、永久中大脳動脈閉塞（MCAO）のラットモデルにおいて、慢性虚血性傷害から脳を保護するための運動ニューロン栄養因子の6-アミノ酸ペプチド類似体（MNTF6mer）の、GB被験物質であるGM602の能力を試験するための決定をした。GM602は、GMPコンプライアンス（CS Bio Co., Menlo Park, CA, lot D294）のもとで化学的に合成された。

20

【0746】

方法および材料

【0747】

動物

【0748】

それぞれ体重約225～250グラムのSprague-Dawleyラット（Harlan）に、実験前、自由に餌および水を与えた。動物をハロタンで麻酔した（マスクにより70%/30% NO₂/O₂に1%）。血液試料を採取し、動脈pHレベル、PaCO₂、およびPaO₂を決定した。Visitech Systemを使用して、MAPおよび心拍数を記録した。

30

【0749】

直腸体温計および側頭筋に挿入されたサーミスタプローブで、脳の温度を監視した。動物の体温は、ウォータージャケット付き加熱パッドを使用して37℃に維持した。脳の温度を、虚血前1時間から虚血後6時間まで監視し、30分間隔で記録した。

【0750】

実験群

【0751】

すべてのラットは、永久虚血に供された。ビヒクル群（n=10）または2.5、10、または20mg/kgの用量でのGM602の静脈注射を用いて処置した3つの群（n=10）のうちの1つに、動物を無作為に割り当てた。虚血の発症から3時間後、尾静脈からのGM602を用いたボーラスIV注射を行った。調査者は、処置群については情報を与えられなかった。GM6の調剤は、NTSにより行われ、GM6を4℃で保存された正常な生理食塩溶液を用いて原液としてもとした。ビヒクル対照には生理食塩溶液を投与した。

40

【0752】

虚血の誘発

【0753】

本試験は、虚血の永久モデルに関連した。各ラットを麻酔し、外頸動脈（ECA）および

50

総頸動脈（ C C A ）を分離した。サーミスタプローブを直腸および側頭筋に挿入し、体温および脳の温度を監視し、外部加温により 36 ~ 37 にラットを維持した。左総頸動脈（ C C A ）を、頸部の正中切開により露出した。上甲状腺動脈および上後頭動脈を、電気凝固して分割した。マイクロ手術クリップを外頸動脈（ E C A ）の起点の周りに設置した。6 - 0 の絹糸で E C A 遠位端を結紮し、離断した。6 - 0 絹糸は、 E C A 断端の周りに緩く縛った。クリップを取り外し、5 - 0 ナイロン縫合糸（シリコーン被覆）の火造り先端を優しく E C A 断端に挿入した。6 - 0 絹糸の輪を断端の周りで締め付け、内頸動脈（ I C A ）内に、およびそれを通して、前大脳動脈（ A C A ）に収まるまでナイロン縫合糸を約 1.7 mm 前進させ（体重により調節される）、それにより前交通動脈および中大脳動脈を閉塞させた。外科用ステープルを使用して、ナイロン縫合糸の挿入直後、外傷を閉じた。縫合糸は 28 日間そのままにした。

10

【 0754 】

組織学的検査

【 0755 】

虚血を誘発してから 28 日後、組織学的検査のために、ペントバルビタールナトリウム（ 50 mg / kg ）の腹腔内注射で動物を麻酔した。4 の 10 % リン酸緩衝生理食塩水（ P B S ）、続いて、4 % パラホルムアルデヒド（ 4 ）で経心臓的に脳を灌流した。脳を取り出し、4 % パラホルムアルデヒド中で一晩、続いて、4 で 24 時間、30 % スクロースで固定した。組織を OCT 培地に埋め込み、ドライアイスで冷凍した（ -80 で保存）。これらを組織学的および免疫細胞化学的分析に使用した。脳を虚血の発症から 28 日後に採取し、冷凍し、16 μm 切片に分割した。冠状切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、虚血性傷害の範囲を明確にした。梗塞容積を、それぞれの脳の +2.46 、 +1.66 、 +0.86 、 +0.06 、 0.74 、 1.54 、 2.34 、および 3.14 mm のブレグマ点から採取した 16 μm の染色した冠状切片における傷害の領域を積分することにより算出した。総体的な、皮膚の、海馬の梗塞容積をコンピュータ支援画像分析システムを用いて定量化した（ N I H I M A G E , V e r s i o n 1.6 ）。処置状態に対し盲検化された一人の操作者が、すべての測定を行った。切片の梗塞容積を加算することにより、梗塞容積を計算した。以下の式を用いて、梗塞サイズ（ % ）を計算し、浮腫の効果を排除した：（対側容積 - 同側非損傷容積） × 100 / 対側容積。

20

【 0756 】

脳血流の測定

【 0757 】

レーザードップラー血流計で、脳血流（ C B F ）を監視した。レーザードップラー流量計により表示される値は絶対値ではなかったため、 C B F 値はパーセンテージとして決定された。上述のように、動物をハロタンで麻酔した（マスクにより 70 % / 30 % N O 2 / O 2 に 1 % ）。 M C A 閉塞に同側の半球において、座標は以下の通りであった： A 点、ブレグマに対し 0.5 mm 後方、および正中線に対し 2 mm 側方； B 点、ブレグマに対し 1 mm 後方、および正中線に対し 1.2 mm 側方； D 点、ブレグマに対し 1 mm 前方、および正中線に対し 1.7 mm 側方；対側半球における C 点、ブレグマに対し 1 mm 後方、および正中線に対し 2 mm 。 C B F を、虚血の発症前、虚血の誘発から 3 時間後であるが、被験物質の投与前、被験物質の投与から 1 時間後に測定した。 M C A 栓塞前の平均値をベースラインとし用い、それ以降のデータを、ベースライン値のパーセンテージとして表した。

30

【 0758 】

行動評価

【 0759 】

虚血性傷害前の 3 日間、毎日、10 分間動物に触れた。傷害の前日、動物を行動変化について検査した。

40

【 0760 】

すべての行動試験を脳卒中手術直前、および被験物質の投与から 28 日後に施行した。そ

50

それぞれの期間で、動物を、試験を開始する30分前に試験室に適合させた。

【0761】

前肢配置試験 - 別のスコアをそれぞれの前肢について得た。視覚性配置副試験のために、動物を検者がまっすぐに持ち、テーブル面に近づけた。テーブルで肢の正常な配置を0として採点し、遅延性の配置(<2s)を1として採点し、配置なし、または非常に遅延性の配置(>2s)を2として採点した。動物を前進させた後、再度、動物をテーブルに対して横向きにした場合に、最初に別のスコアを得た(片肢あたり最大スコア、4;いずれの場合も、高い数字がより欠陥があることを示した)。触覚配置副試験のために、動物が見えない、またはその頬ひげでテーブル面に触れないように、抑えた。前肢の背面は、動物をまず前進させた後、テーブルに横向きにした場合、若干テーブル面に触れた。配置するたびに、上述のように採点した(片肢あたり最大スコア、4)。固有覚配置副試験のために、動物を前進だけさせ、より大きな圧力を前肢の背面に適用させ、設置を上述のように採点した(片肢あたり最大スコア、2)。これらの副スコアを加え、片肢あたり前肢配置の総スコアを得た(範囲、0~10)。

10

【0762】

後肢配置試験 - 後肢配置試験を後肢に対して上述と同一の方法で行うが、触覚および固有覚副試験のみ伴う(最大スコア、それぞれ4および2;総スコア範囲、0~6)。

【0763】

修正された平均台試験 - 修正された平均台試験は、動物が狭い梁(30×1.3cm)上で60秒間、平衡を保つ場合、前庭運動反射活性を検査した。梁上の平衡を保つ能力は以下の通りに採点された:動物は、梁上ですべての4本の肢で平衡を保つ、1;動物は、梁の側に肢を置く、または梁上で揺れる、2;1本または2本の肢を梁から滑らせる、3;3本の肢を梁から滑らせる、4;動物は、梁上に肢で平衡を保とうと試みるが、落下する、5;動物は、梁上にもたれるが、落下する、6;動物は、平衡を保つ試みもせず、梁から落下する、7。動物は、手術前に3回の訓練試験を受けた。これらの最終のスコアをベースラインのスコアとして得た。

20

【0764】

自発運動活性 - 動物は、狭いガラス円筒(16.5×25cm)に置かれ、手術前日、および手術から1週間後、10分間、ビデオテープに録画した。動物を自発運動について採点した。スコアは以下の通りであった:0:運動なし;1:ほとんど、または全く探査なし(限定された動き);2:いくつかの探査あり(いくつかの制限的な運動);3:非制限的な運動(対照、正常探査)。

30

【0765】

バイオマーカー解析

【0766】

厚さ16μmの冠状切片を装着した後、顕微鏡のスライド上で乾燥させた。スライドを80%アルコール(20mLの5%NaOHを80mLの絶対アルコールに加えた)中の1%水酸化ナトリウムを含む溶液に、5分間浸漬した。その後、70%アルコール中に2分間、蒸留水中に2分間浸漬した。スライドを0.06%過マンガン酸カリウムの溶液に10分間移動した。スライドを2分間蒸留水内で洗浄処置した。染色液をFluoro-Jade(登録商標)B用の0.01%原液から調製した。染色液中で20分後、スライドを3つの蒸留水洗浄のそれに1分間ずつ洗浄処置した。紙タオル上で垂直にスライドの水分抜きを行い、一時的に(約15秒)過剰水を取り除いた。その後、スライドをスライドウォーマー上に設置し、それらが完全に乾燥するまで(例えば、5~10分)、約50°で設置した。乾燥スライドを、非水かつ非蛍光性のプラスチック製のマウンティング培地である、DPX(Fluka, Milwaukee WI, またはSigma Chem. Co., St. Louis, MO)を用いてカバースリップにのせる前の少なくとも1分間、キシレン中に浸水させることによりきれいにした。サイトカイン解析(TNF)のために、組織切片をトリス緩衝食塩水(TBS)pH7.4中で洗浄し、適切な血清(ヤギ)でブロックした。切片を4°で一晩ブロックし、次いで1次抗体に4°で一

40

50

晚供した。切片をTBS中で洗浄し、2次抗体を添加して、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、Vector ABC Eliteキットで説明される通りに切片をインキュベートし、ジアミノ安息香酸(DAB)で染色した。水中で反応を停止し、キシレンへの処置後にカバースリップをのせた。

【0767】

試験からの動物の除外

【0768】

いくつかの基準に基づき、動物を試験から除外した：

【0769】

試験の終了前に(任意の時点で)死亡した動物。死亡時まで収集されたデータは、GBに提供された。10

【0770】

脳血流は、閉塞後、ベースライン値の $20 \pm 5\%$ に減少しなかった(すなわち非虚血とみなされた)。

【0771】

虚血性傷害後、動物は発作様の活動を発現した。

【0772】

虚血中、または虚血直後に、過度の出血が検出された。

【0773】

処置群。すべての群はGM602に供されたか、または対照であった。動物は、虚血の誘発から3時間後、ビヒクルまたはGM602の静脈投与を受けた。20

【表36】

ラット脳卒中モデル：

群	化合物	用量 (mg/kg)	経路
1 (n=10ラット)	ビヒクル	0	IV
2 (n=10ラット)	GM602	2.5 mg/kg	IV
3 (n=10ラット)	GM602	10 mg/kg	IV
4 (n=10ラット)	GM602	20 mg/kg	IV

30

【0774】

評価項目

【0775】

虚血および再灌流傷害からの神経保護作用のGM602の効果。動物は、脳血流量(CBF)、心拍数(HR)、血圧(BP)、pO₂、pCO₂、pH、神経学的欠損(ND)、梗塞量(IFV)、炎症バイオマーカー、およびニューロン変性のバイオマーカーについて動物を評価する。

【0776】

すべての試験群をNTSに提供した。GM602は固体材料としてNTSに提供した。試験群のすべての動物には、上に示した通り投与を行った。40

【0777】

統計解析

【0778】

結果は、平均±標準偏差(SD)として表された。生理学的および組織学的データにおける差の有意性を、一元配置分散分析(ANOVA)と、続いてFisherのポストホック試験を用いて分析した。反復測定ANOVAは監視データに対し計算し、群間の有意差はFisherのポストホック試験で評価した。

【0779】

結果

50

【0780】

マウスにおける虚血試験。これらの試験において虚血の相対的重症度を評価した。データは、ビヒクルまたはGM602を静脈注射された虚血性傷害に罹患したラットからのものであった。

【0781】

梗塞容積：すべての試験群の梗塞容積は図33にプロットされている。GM602の永久虚血静脈投与から3時間後、動物の脳内の梗塞容積が低減した。梗塞容積の減少割合を表25に示す。

【表37】

10

表25、脳における梗塞の減少割合

群	用量mg/kg	梗塞容積 (mm ³)	梗塞容積の減少割合*	P値*
1	0	283.7±42.66	0	該当せず
2	2.5	217.5±48.44	23.3%	p<0.0045
3	10	159.6±44.84	43.6%	p<0.0001
4	20	124.3±33.82	56.2%	p<0.0001

減少割合は、ビヒクル対照動物と比較されている。

*第1群(ビヒクル)と比較

死亡率：本試験では死亡は見られなかった。

【0782】

20

生理学的パラメータ。生理学的パラメータ(平均動脈圧、血液pO₂、pCO₂、およびpH)において、虚血中、または試験薬物投与後のベースラインにおけるビヒクルマウスと処置マウスとの間で有意差を示さなかった(図35~38)。しかしながら、脳血流のGM602媒介した有意な増加を、GM602を用いて処置した群において監視した(図34)。

【表38】

表26-GM602投与後のCBFの増加

化合物(群)	虚血中のCBF	薬物投与後のCBF	虚血後の薬物投与前対 薬物投与後	GM602群対 ビヒクル
1-ビヒクル (生理食塩水投与)	16.80±2.53	17.90±2.767	p=0.37	該当せず
2-GM602(2.5mg/kg)	16.50±2.99	24.10±2.424	p<0.0001	p<0.0001
3-GM602(10mg/kg)	14.40±3.20	25.40±2.459	p<0.0001	p<0.0001
4-GM602(20mg/kg)	16.20±2.49	29.50±3.923	p<0.0001	p<0.0001

30

【0783】

行動測定。動物を、いくつかの異なるパラメータに基づいて神経学的欠損について評価し、それを下に示す。GM602を用いて処置した動物は、神経学的欠損の用量依存的な減少を示した(データは図39にも示される)。

【表39】

40

表27-GM602投与後の前肢設置試験

化合物(群)	試験のスコア	ビヒクルと比較したP値
1-ビヒクル	14.40±2.119	該当せず
2-GM602(2.5mg/kg)	11.10±2.514	p<0.
3-GM602(10mg/kg)	7.800±2.466	p<0.0001
4-GM602(20mg/kg)	6.300±2.003	p<0.0001

【表40】

表28-GM602投与後の後肢設置試験

化合物(群)	試験のスコア	ビヒクルと比較したP値
1-ビヒクル	5.1±0.74	該当せず
2-GM602(2.5mg/kg)	3.9±1.20	p<0.02
3-GM602(10mg/kg)	2.7±0.95	p<0.0001
4-GM602(20mg/kg)	2.0±0.82	p<0.0001

10

【表41】

表29-GM602投与後の平均台試験

化合物(群)	試験のスコア	ビヒクルと比較したP値
1-ビヒクル	5.300±1.059	該当せず
2-GM602(2.5mg/kg)	4.100±0.9944	p<0.0177
3-GM602(10mg/kg)	3.200±0.7888	p<0.0001
4-GM602(20mg/kg)	2.700±0.4930	p<0.0001

20

【表42】

表30-GM602投与後の自発的活性

化合物(群)	試験のスコア	ビヒクルと比較したP値
1-ビヒクル	0.2±0.42	該当せず
2-GM602(2.5mg/kg)	0.9±0.74	p<0.02
3-GM602(10mg/kg)	1.6±0.52	p<0.0001
4-GM602(20mg/kg)	1.9±0.74	p<0.0001

30

【0784】

バイオマーカー解析。組織断片をバイオマーカー解析のために採取した(Fluoro-JadeおよびTNF)。

【0785】

用量依存的に、GM602投与群において、28日目で組織断片に見られるTNF染色における有意的な低減を示した。(表31および図8)。永久虚血性傷害後、GM602投与から28日目に見られるFluoro-Jadeに対する染色における有意な低減を示した(表32および図41)。

【表43】

表31-GM602投与後のTNFレベルの減少

化合物(群)	TNFレベル(対照率)	ビヒクルと比較したP値
1-ビヒクル	89.07±17.96	該当せず
2-GM602(2.5mg/kg)	64.24±16.18	p<0.005
3-GM602(10mg/kg)	49.03±12.60	p<0.0001
4-GM602(20mg/kg)	32.72±11.15	p<0.0001

40

【表44】

表32-GM602投与後のFluoro-Jadeの減少

化合物(群)	Fluoro-Jade(細胞数)	ビヒクルと比較したP値
1-ビヒクル	7007±1054	該当せず
2-GM602(2.5mg/kg)	4899±1248	p<0.0007
3-GM602(10mg/kg)	3504±959.4	p<0.0001
4-GM602(20mg/kg)	2889±719.6	p<0.0001

【0786】

10

アメリカ合衆国では、脳卒中は3番目に多い死亡原因であり、障害の腫瘍原因である。局所性脳虚血後の結果および梗塞容積は、「壊死」(パラトーシス)細胞死、および虚血の境界における遅発性神経細胞損失(プログラム細胞死またはアポトーシス)の両方により決定される。虚血性脳卒中を処置するため、最新の療法が見られるようになった。しかしながら、これらの処置は、ほとんどの場合、血栓の溶解を扱うが、一旦神経細胞死サイクルがトリガされた際の、神経保護作用、行動の欠陥の低減、または脳梗塞容積には留意されていなかった。細胞損失に影響を与える基本的メカニズムを理解することは、虚血性傷害と関連した細胞死を低減するための薬剤や用途の設計に役立つ。

【0787】

20

MNTFは、神経障害からの保護を提供する可能性があり、また傷害または虚血性脳卒中後の神経組織の再生を可能とし得る栄養因子である。ここで行われた試験は、効果的かつ効率的に、ラットにおける永久脳虚血傷害の有害な影響から脳を保護するMNTFの6アミノ酸類似体である、GM602の能力を実証している。虚血性傷害から3時間後、2.5、10、または20mg/kgでのGM602の静脈内投与は、梗塞容積の減少および改善した行動的属性、脳血流の増加、ならびに炎症および神経変性の減少より、虚血性傷害からの脳内の用量依存的な保護効果を実証した。これらの試験は、GM602が永久脳卒中において有益な効果を有し得ることを示唆している。

【0788】

静脈内に投与された場合、GM602は、ラットにおける虚血性傷害から神経保護作用を有することが判明した。

30

【0789】

すべての特許、刊行物、科学論文、ウェブサイト、および他の文書および参照された、または本明細書に記載された文献は、本開示が関連する当業者のレベルで示され、それぞれのこのようない参考文書および文献は、その全体が個別に参照することにより一体化される、またはその全体が本明細書に規定されるように、同程度で参照することにより本願に一体化される。出願者は、任意のこのようない特許、刊行物、科学論文、ウェブサイト、電子的に利用可能な情報、および他の参考文献もしくは文書からの任意のおよびすべての文献および情報を、本明細書に物理的に組み込む権利を留保する。

【0790】

40

本明細書に記載の特定の方法および組成物は、いくつかの実施形態の代表的かつ例示的なものであり、添付の特許請求の範囲において限定することを意図しない。他の対象、態様、および実施形態は、本明細書の検討後、当業者に生じ得、特許請求により定義されるように、本開示の精神内に含まれる。その範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示された技術に、代替および修正の変更を行い得ることは、当業者に容易に明白となるであろう。本明細書に例示的に記載される技術は、任意の要素、または限定がない場合でも、適切に実践され得るが、本明細書においては不可欠なものとして具体的に開示されない。したがって、例えば、本明細書のそれぞれの例、本技術の実施形態または実施例において、「含む」、「必須としてなる」、および「～からなる」の用語のいずれかは、本明細書の他の2つの用語のいずれかに置換されてもよい。また、「含む」、「包含する」、「含有する」等の用語は、制限されず、広範に読み取られる。本明細書に例示的に記載

50

される方法および工程は、異なるステップの順番に実践される可能性があることが望ましく、本明細書または本特許請求の範囲に示されたステップの順番に、必ずしも限定されない。また、本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられるように、単数形「a」、「an」、「the」は、文脈により明確に指示されない限りは、複数の指示対象を含む。いかなる場合でも、本特許は、本明細書に具体的に開示される具体的な実施例または実施形態または方法に限定されると解釈されない。いかなる場合でも、本特許は、特許商標庁の任意の審査官、または任意の役人、あるいは被雇用者によりなされるいかなる記述によっても限定されるものと解釈されないが、そのような記述が、具体的に、かつ無制限または無条件に、出願者によって、応答文書において、明示的に採択される場合を除く。

【0791】

10

用いられている用語および表現は、限定するものではなく、説明の用語として使用されるが、示されるおよび記載される機能またはその部分の任意の同等物を除くような用語および表現の使用に意図することはないが、様々な修正は、特許請求される技術の範囲内で可能であることを理解される。したがって、本技術は、ある実施形態および任意の機能により具体的に開示されているが、本明細書に開示される概念の修正および変更は、当業者により手段を用いられ得、このような修正および変更は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲内であると見なされることを理解されるであろう。

【0792】

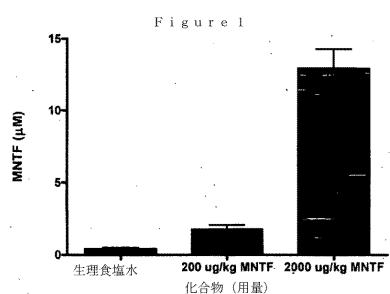
20

本技術は、本明細書に広範かつ一般的に記載されている。一般的開示範囲内である下位種および亜属の分類のそれぞれもまた、開示の一部を形成する。これは、切除された材料が本明細書に具体的に示されるか否かにかかわらず、属からの任意の主題を除外する条件付き、または消極的な限定で、技術の一般的記述を含む。

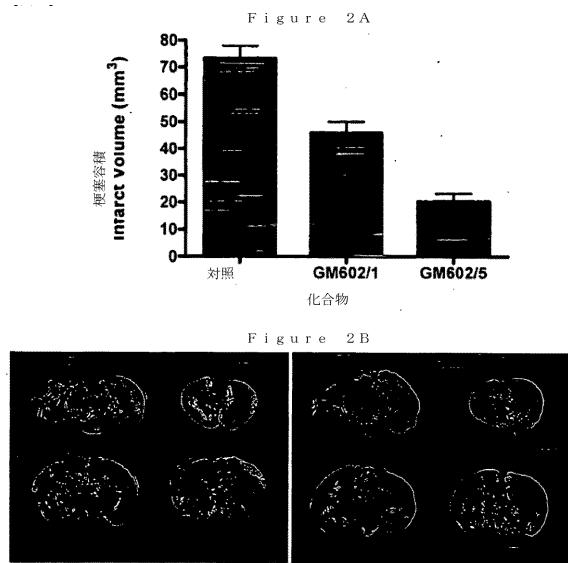
【0793】

他の実施形態は、以下の特許請求範囲内である。また、技術の特性または態様は、Markush groupに関して記載される場合、当業者は、技術もそれにより、Markush groupのいずれの個別のメンバーまたはメンバーのサブグループに関して記載されることを理解するであろう。

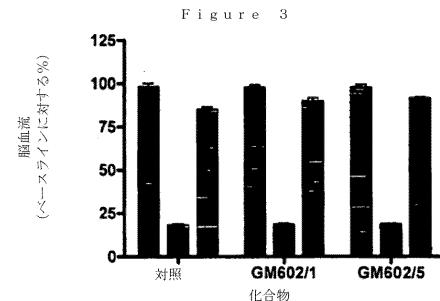
【図1】



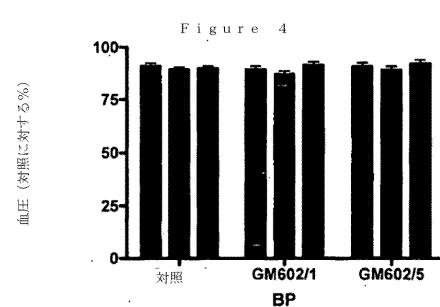
【図2】



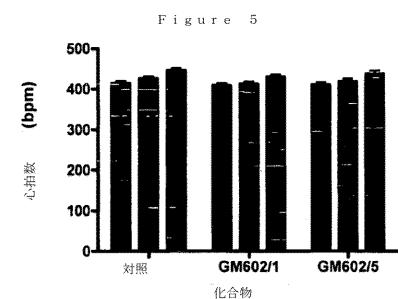
【図3】



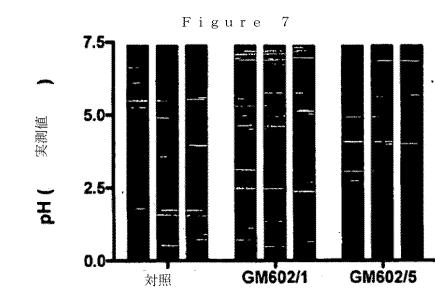
【図4】



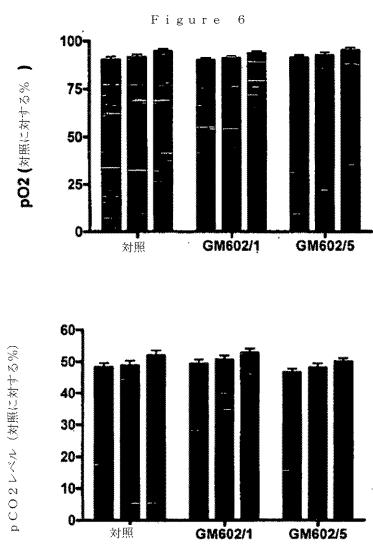
【図5】



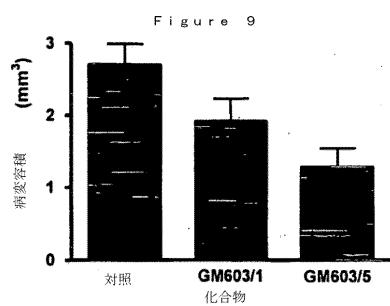
【図7】



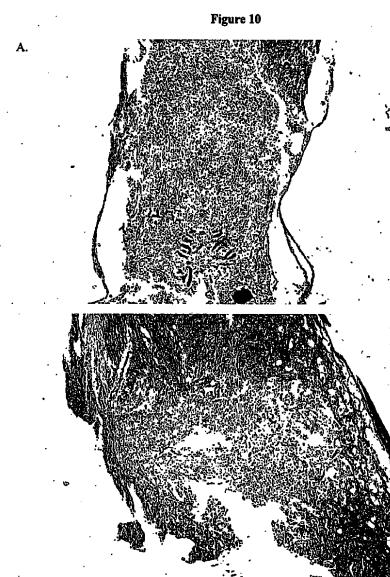
【図6】



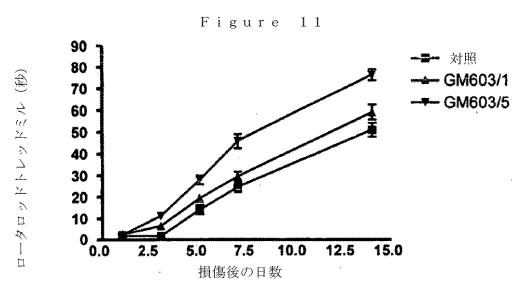
【図9】



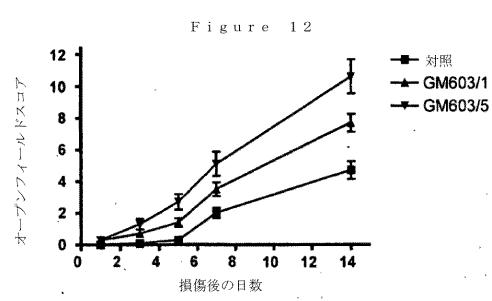
【図10】



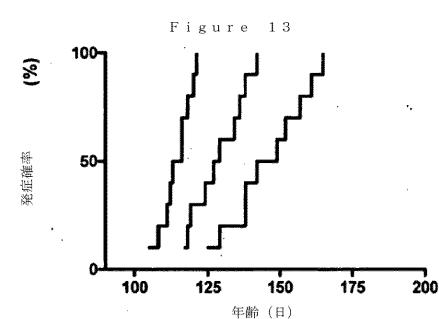
【図11】



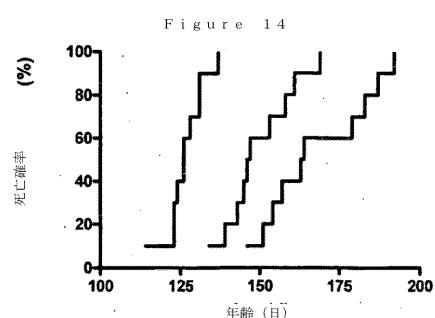
【図12】



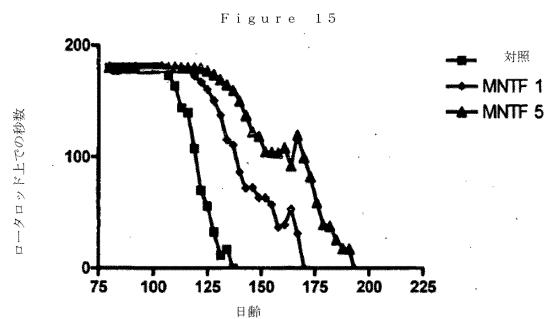
【図13】



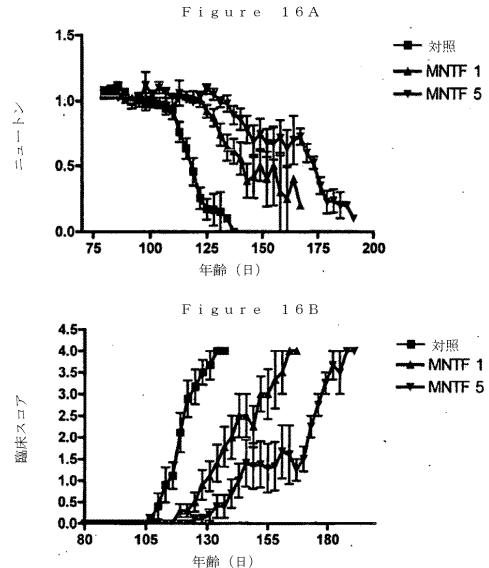
【図14】



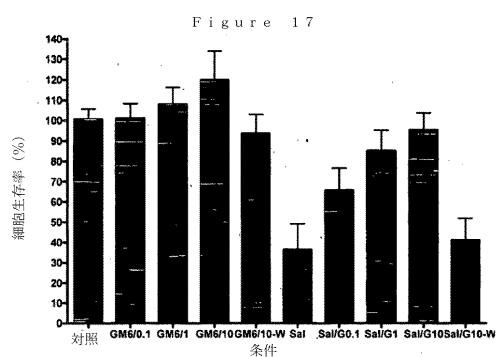
【図15】



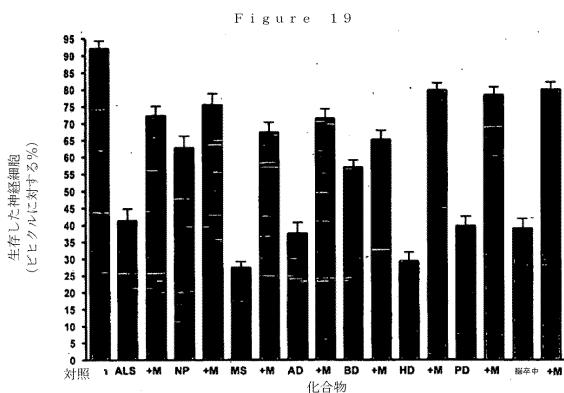
【図16】



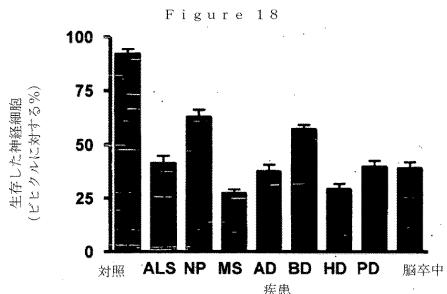
【図17】



【図19】

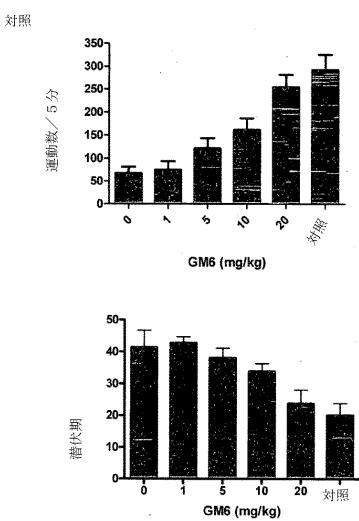


【図18】



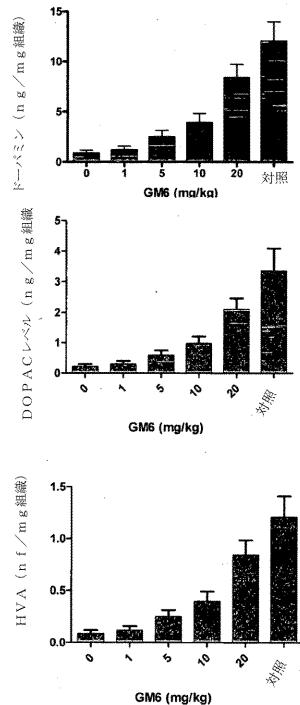
【図20】

Figure 20 A and 20 B



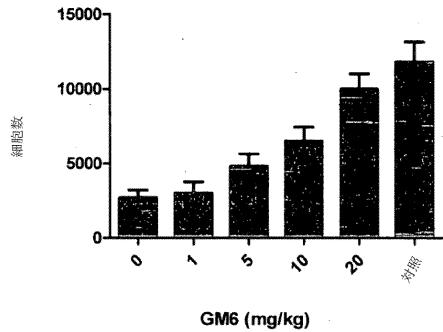
【図21】

Figure 21 A, 21 B, 21 C



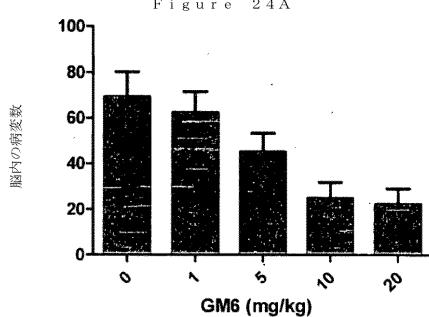
【図22】

Figure 22



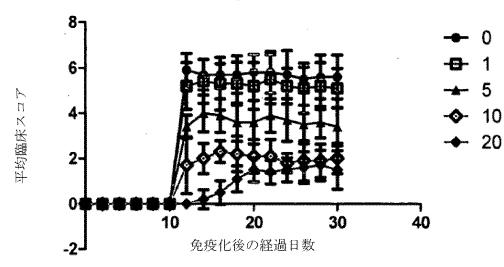
【図24 A】

Figure 24 A



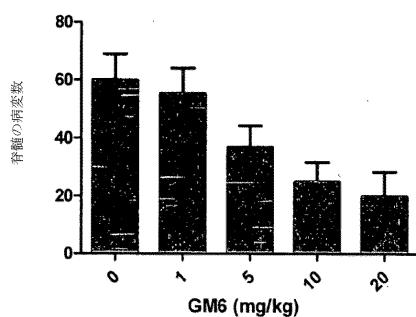
【図23】

Figure 23



【図24 B】

Figure 24 B



【図25A】

Figure 25A

【図25C】

Figure 25C

【図25D】

Figure 25D

【図25B】

	A	F	S	R	Y	A	R	C	L		26	
L	N	C	W	M	L	S	A	F	S		27	
	N	C	W	M	L	S	A	F	S		28	
	C	W	M	L	S	A	F	S	R		29	
	W	M	L	S	A	F	S	R	Y		30	
	M	L	S	A	F	S	R	Y	A		31	
	L	S	A	F	S	R	Y	A	R		4	
	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C		
	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L		
	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A		
T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S		35
L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R		36
	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R		37
	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y		38
	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A		39
	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R		40
	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C		41
	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	
	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	
	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	
	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	
	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A		43
	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E		44
	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	5

Figure 25B

【図25E】

Figure 25E

【図25F】

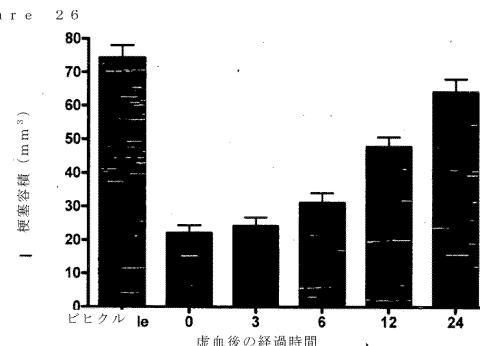
S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	G	
	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	G	
	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	G	
	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	G	P	
G	T	F	W	G	D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	
T	F	W	G	D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	
F	W	G	D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	
W	G	D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	
G	D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	
D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	
T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	
T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L
L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	
N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	
C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	
W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	
M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	
L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	
S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	G	
A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	G	P	
F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	G	P	T	
L	G	T	F	W	G	D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F
G	T	F	W	G	D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S

Figure 25F

【図25G】

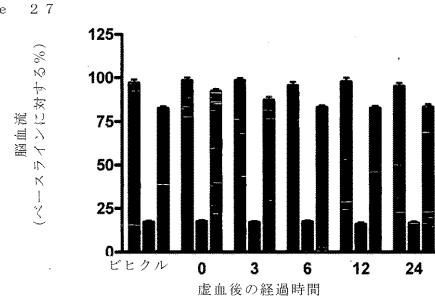
i g u r e 2 5 G

【図26】



0、3、6、12時間群はビヒクル群と比較して $p < 0.001$ 。
ビヒクル群に対して24時間群は $p = \text{N.S.}$ 。

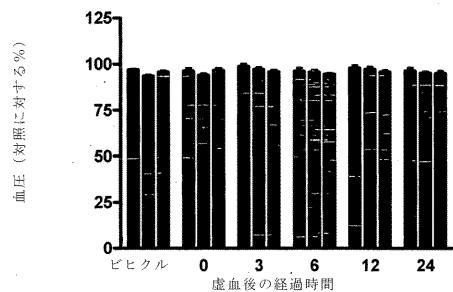
【 図 27 】



ビヒクルと比較してすべてのサンプルは $p = N.S.$

【図28】

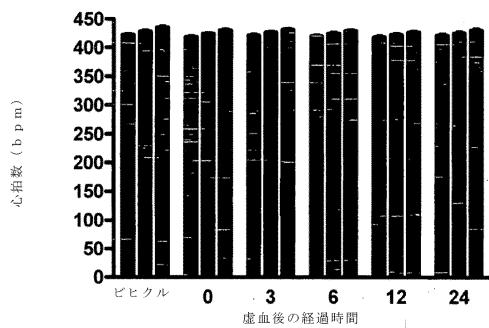
Figure 28



ビヒクルと比較してすべてのサンプルは $p = \text{N.S.}$ 。

【図29】

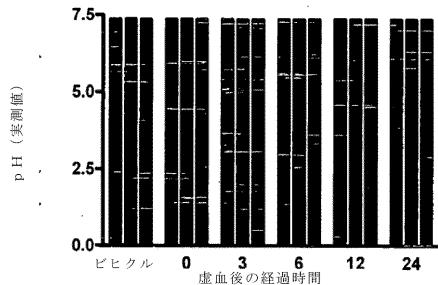
Figure 29



ビヒクルと比較してすべてのサンプルは $p = \text{N.S.}$ 。

【図31】

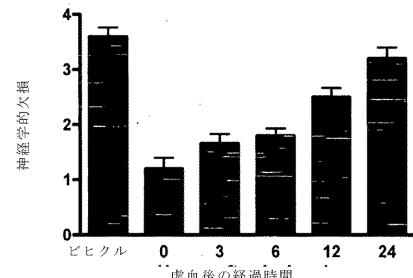
Figure 31



ビヒクルと比較してすべてのサンプルは $p = \text{N.S.}$ 。

【図32】

Figure 32



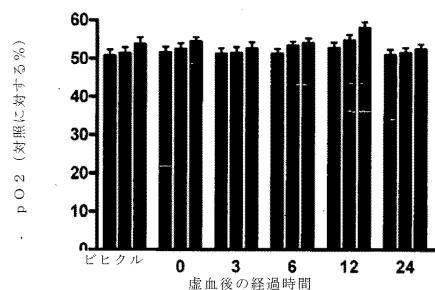
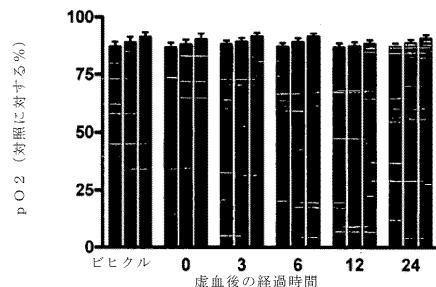
ビヒクルと比較して 0、3、6 時間群は $p < 0.001$ 。

ビヒクルと比較して 12 時間群は $p < 0.002$ 。

ビヒクルと比較して 24 時間群は $p = \text{N.S.}$ 。

【図30】

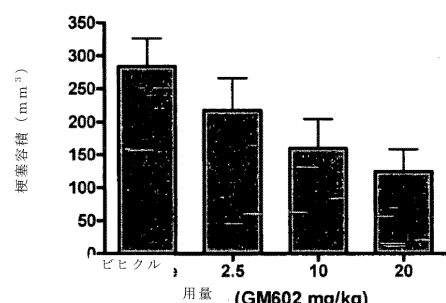
Figure 30 A and 30 B



ビヒクルと比較してすべてのサンプルは $p = \text{N.S.}$ 。

【図33】

Figure 33

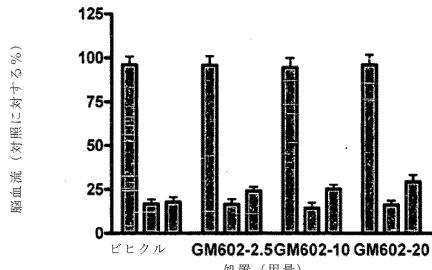


ビヒクルと比較して 2.5 mg/kg 群は $p < 0.0045$ 。

ビヒクルと比較して 10 オおよび 20 mg/kg 群は $p < 0.0001$ 。

【図34】

Figure 34



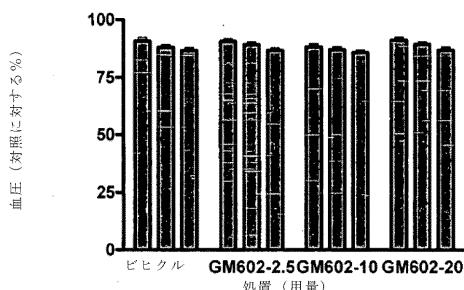
虚血前群と比較してすべての虚血後群の CBF 是 $p < 0.0001$ 。

虚血後ビヒクル群の生理食塩水投与前投与後の CBF 是 $p < \text{N.S.}$ 。

永久虚血後 GM602 各群の GM602 投与前投与後の CBF 是 $p < 0.0001$ 。

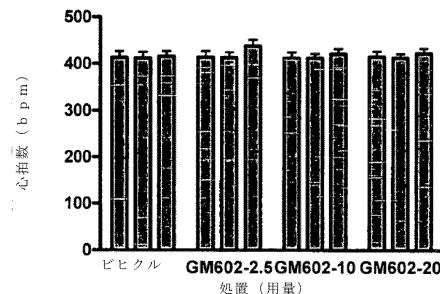
【図35】

Figure 35

ビヒクルと比較してすべての群は $p = \text{N.S.}$

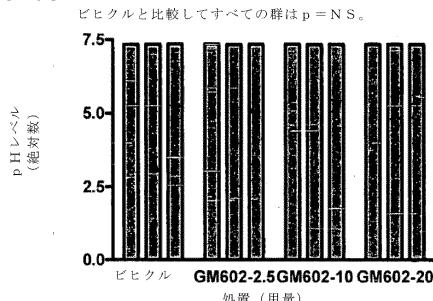
【図36】

Figure 36

ビヒクルと比較してすべての群は $p = \text{N.S.}$

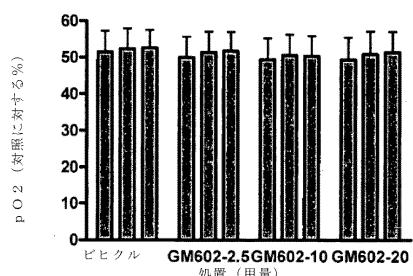
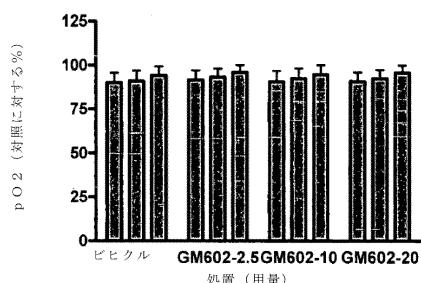
【図38】

Figure 38

ビヒクルと比較してすべての群は $p = \text{N.S.}$

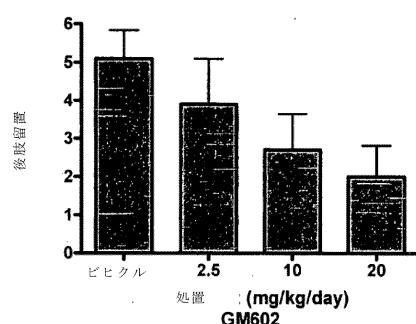
【図37】

Figure 37 A and 37 B

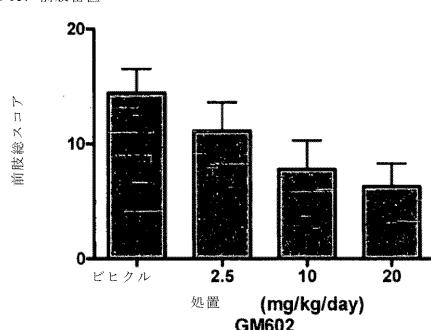
ビヒクルと比較してすべての群は $p = \text{N.S.}$

【図39B】

Figure 39 B 後肢留置

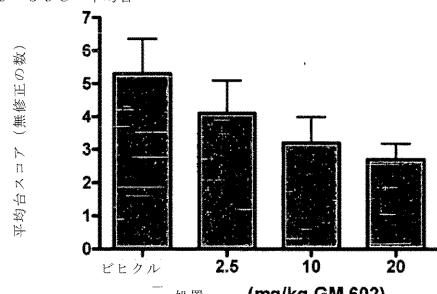


【図39A】

Figure 39 A~39 D:
39 A. 前肢留置

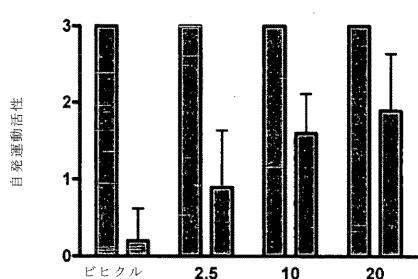
【図39C】

Figure 39 C 平均台



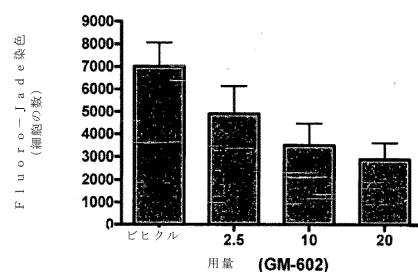
【図 39D】

Figure 39D 自発運動



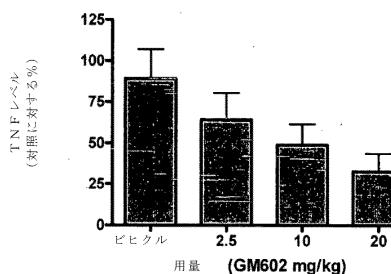
【図 41】

Figure 41



【図 40】

Figure 40



ビヒクル処置群と比較して、2.5 mg/kg の GM602 で処置されたすべての群は $p < 0.0007$ 。
ビヒクル処置群と比較して、10 および 20 mg/kg の GM602 で処置されたすべての群は $p < 0.0001$ 。

【配列表】

0005336384000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)
C 0 7 K	7/06	(2006.01)
C 0 7 K	7/08	(2006.01)
C 0 7 K	14/00	(2006.01)
		A 6 1 P 9/10
		A 6 1 P 3/10
		C 0 7 K 7/06
		C 0 7 K 7/08
		C 0 7 K 14/00

(72)発明者 プイ - ユク・ドロシー・コ

アメリカ合衆国 9 1 7 5 4 カリフォルニア州モンテレー・パーク、デ・ラ・フエンテ・ストリート
1 0 3 0 番

(72)発明者 マーク・エス・キンディ

アメリカ合衆国 2 9 4 6 6 サウスカロライナ州マウント・プレザント、シャグバーク・サークル 3
3 8 4 番

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 特表 2 0 0 6 - 5 1 6 2 8 7 (JP, A)
特表 2 0 0 1 - 5 2 3 9 4 2 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 8