

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6383151号
(P6383151)

(45) 発行日 平成30年8月29日 (2018. 8. 29)

(24) 登録日 平成30年8月10日 (2018. 8. 10)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/47 (2006. 01)
 A 6 1 K 38/46 (2006. 01)
 A 6 1 P 25/00 (2006. 01)
 A 6 1 P 25/14 (2006. 01)
 A 6 1 P 25/18 (2006. 01)

C O 7 K 14/47 Z N A
 A 6 1 K 38/46
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/18

請求項の数 14 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-529343 (P2013-529343)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月15日 (2011. 9. 15)
 (65) 公表番号 特表2014-505010 (P2014-505010A)
 (43) 公表日 平成26年2月27日 (2014. 2. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/051827
 (87) 国際公開番号 W02012/037397
 (87) 国際公開日 平成24年3月22日 (2012. 3. 22)
 審査請求日 平成26年8月29日 (2014. 8. 29)
 審判番号 不服2017-3550 (P2017-3550/J1)
 審判請求日 平成29年3月9日 (2017. 3. 9)
 (31) 優先権主張番号 61/383, 208
 (32) 優先日 平成22年9月15日 (2010. 9. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503128320
 エスティーシー. ユーエヌエム
 S T C. U N M
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ州 8 7
 1 0 2, アルバカーキ, スイート 1
 1 0 0, 1 0 1 ブロードウェイ プー
 ルバード ノースイースト, ロボ レイ
 ンフォレスト ビルディング
 L o b o R a i n f o r e s t B u i
 l d i n g, 1 0 1 B r o a d w a y
 B l v d. N E, S u i t e 1 1
 0 0, A l b u q u e r q u e, N M
 8 7 1 0 2 U S A

(74) 代理人 100079980
 弁理士 飯田 伸行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳損傷治療用 S T E P 誘導ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S T E P タンパク質の K I M ドメインおよび K I S ドメインを具備してなる S T E P 誘導ペプチドであり、前記 K I M ドメインのセリン 4 9 残基を非リン酸化性アミノ酸に変換させて易リン酸化部位のリン酸化を防止することでペプチドの S T E P 活性を活性化し、同時に、前記 K I S ドメインのスレオニン 5 9 残基および／またはセリン 7 2 残基を模倣リン酸化性アミノ酸に変換させて内因性 S T E P タンパク質よりも安定なペプチドとすることを特徴とする、S T E P 誘導ペプチド (各残基は S T E P _{4 6} 変異型からの番号付け (numbering) を用いる)。

【請求項 2】

前記 K I M ドメインの前記セリン 4 9 残基 (前記 S T E P _{4 6} 変異型からの番号付け (numbering) を用いて) がアラニンに変換されている請求項 1 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 3】

前記 K I S ドメインの前記セリン 7 2 残基 (前記 S T E P _{4 6} 変異型からの番号付け (numbering) を用いて) が模倣リン酸化性アミノ酸に変換されている請求項 1 又は 2 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 4】

前記 K I S ドメインの前記スレオニン 5 9 残基 (前記 S T E P _{4 6} 変異型からの番号付け (numbering) を用いて) が模倣リン酸化性アミノ酸に変換されている請求項 1 又は 2 に

記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 5】

前記 K I S ドメインの前記セリン 7 2 残基(前記 S T E P_{4 6} 変異型からの番号付け (numbering) を用いて)および前記スレオニン 5 9 残基(前記 S T E P_{4 6} 変異型からの番号付け (numbering) を用いて)の双方が模倣リン酸化性アミノ酸に変換されている請求項 1 又は 2 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 6】

前記模倣リン酸化性アミノ酸がグルタミン酸残基又はアスパラギン酸残基である請求項 1、2、3、4 又は 5 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 7】

前記模倣リン酸化性アミノ酸がグルタミン酸残基である請求項 1、2、3、4、5 又は 6 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 8】

C y s 2 3 残基(前記 S T E P_{4 6} 変異型からの番号付け (numbering) を用いて)がアラニンに変換されたものである請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 9】

前記ペプチドの 1 領域が細胞透過性となるようにさらに構成されている請求項 1、2、3、4、5、6、7 又は 8 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 10】

細胞透過性となるように構成された前記ペプチドの前記 1 領域が T A T ドメインである請求項 9 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 11】

観察可能なマーカーとして作用するように構成された領域をさらに有する請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 12】

観察可能なマーカーとして作用するように構成された前記領域が m y c 領域である請求項 11 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 13】

S E Q I D . N o . 4 , 8 , 1 0 または 1 1 からなる群から選択される請求項 1 に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【請求項 14】

過剰なグルタメートの作用から発症する脳損傷の作用を治療または緩和するために使用され、静脈注射により患者に送られる請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の S T E P 誘導ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府支援研究に関する報告

本発明は N I N D S によって認可された政府支援 5 R 0 1 N S 0 5 9 9 6 2 - 0 4 に関する発明である。米国政府は、本発明に関し、一定の権利を有する。

関連出願に関する相互参照

【0002】

本出願は、2010年9月15日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 3 8 3 , 2 0 8 号の優先権を主張する出願であり、その全体を援用する出願である。

配列リスト

【0003】

本明細書には配列リストを添付する。この配列リストは、7 1 2 0 1 0 2 _ S E Q _ S T 2 5 . t x t のタイトルもつ . t x t f i l e であり、サイズは 1 2 k b である。配列リストの全体をここに援用するものとする。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0004】

発作などの虚血性損傷、外傷による病変や各種の神経疾患を原因とする脳損傷は顕著なニューロ減成を生起することが多く、損傷度は中程度から重篤にわたり、時には患者の死を招くこともある。現在の治療法には限界があり、例えば脳への初期損傷を原因とするダメージを局限化または元の状態に戻すのではなく、侵襲的な外科手術や損傷後のリハビリ治療に頼っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

10

【非特許文献1】Lipton S. A. and Rosenberg P. A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. The New England journal of medicine 330, 613-622.

【非特許文献2】Arundine M. and Tymianski M. (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. Cell Mol Life Sci 61, 657-668.

【非特許文献3】Barone F. C, Irving E. A., Ray A. M., Lee J. C, Kassiss S., Kumar S., Badger A. M., Legos J. J., Erhardt J. A., Ohlstein E. H., Hunter A. J., Harrison D. C, Philpott K., Smith B. R., Adams J. L. and Parsons A. A. (2001a) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. Medicinal research reviews 21, 129-145.

20

【非特許文献4】Barone F. C, Irving E. A., Ray A. M., Lee J. C, Kassiss S., Kumar S., Badger A. M., White R. R, McVey M. J., Legos J. J., Erhardt J. A., Nelson A. H., Ohlstein E. H., Hunter A. J., Ward K., Smith B. R., Adams J. L. and Parsons A. A. (2001b) SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 296, 312-321.

【非特許文献5】Luo J., Wang Y., Yasuda R. P., Dunah A. W. and Wolfe B. B. (1997) The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). Molecular pharmacology 51, 79-86.

30

【非特許文献6】Tovar K. R. and Westbrook G. L. (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. J Neurosci 19, 4180-4188.

【非特許文献7】Kohr G. (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. Cell and tissue research 326, 439-446.

【非特許文献8】Liu Y., Wong T. P., Aarts M., Rooyakkers A., Liu L., Lai T. W., Wu D. C, Lu J., Tymianski M., Craig A. M. and Wang Y. T. (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. J Neurosci 27, 2846-2857.

40

【非特許文献9】Tu W., Xu X., Peng L., Zhong X., Zhang W., Soundarapandian M. M., Balel C, Wang M., Jia N., Zhang W., Lew F., Chan S. L., Chen Y. and Lu Y. (2010) DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. Cell 140, 222-234.

【非特許文献10】Rodrigues S. M., Schafe G. E. and LeDoux J. E. (2001) Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. J Neurosci 21, 6889-6896.

【非特許文献11】Zhao M. G., Toyoda H., Lee Y. S., Wu L. J., Ko S. W., Zhang X. H., Jia Y., Shum F., Xu H., Li B. M., Kaang B. K. and Zhuo M. (2005) Roles of N

50

MDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47, 859-872.

【非特許文献1 2】Walker D. L. and Davis M. (2008) Amygdala infusions of an NR2B-selective or an NR2A-preferring NMDA receptor antagonist differentially influence fear conditioning and expression in the fear-potentiated startle test. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y. 15, 67-74.

【非特許文献1 3】Boulanger L. M., Lombroso P. J., Raghunathan A., During M. J., Wahle P. and Naegle J. R. (1995) Cellular and molecular characterization of a brain-enriched protein tyrosine phosphatase. *J Neurosci* 15, 1532-1544.

【非特許文献1 4】Bult A., Zhao F., Dirks R., Jr., Raghunathan A., Solimena M. and Lombroso P. J. (1997) STEP: a family of brain-enriched PTPs. Alternative splicing produces transmembrane, cytosolic and truncated isoforms. *European journal of cell biology* 72, 337-344.

【非特許文献1 5】Pulido R., Zuniga A. and Ullrich A. (1998) PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *The EMBO journal* 17, 7337-7350.

【非特許文献1 6】Paul S., Snyder G. L., Yokakura H., Picciotto M. R., Nairn A. C. and Lombroso P. J. (2000) The Dopamine/D1 receptor mediates the phosphorylation and inactivation of the protein tyrosine phosphatase STEP via a PKA-dependent pathway. *J Neurosci* 20, 5630-5638.

【非特許文献1 7】Paul S., Olausson P., Venkitaramani D. V., Ruchkina I., Moran T. D., Tronson N., Mills E., Hakim S., Salter M. W., Taylor J. R. and Lombroso P. J. (2007) The striatal-enriched protein tyrosine phosphatase gates long-term potentiation and fear memory in the lateral amygdala. *Biological psychiatry* 61, 1049-1061.

【非特許文献1 8】Poddar R. and Paul S. (2009) Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death. *Journal of neurochemistry* 110, 1095-1106.

【非特許文献1 9】Xu J., Kurup P., Zhang Y., Goebel-Goody S. M., Wu P. H., Hawasli A. H., Baum M. L., Bibb J. A. and Lombroso P. J. (2009) Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci* 29, 9330-9343.

【非特許文献2 0】Nguyen T. H., Liu J. and Lombroso P. J. (2002) Striatal enriched phosphatase 61 dephosphorylates Fyn at phosphotyrosine 420. *The Journal of biological chemistry* 277, 24274-24279.

【非特許文献2 1】Braithwaite S. P., Xu J., Leung J., Urfer R., Nikolich K., Oksenberg D., Lombroso P. J. and Shamloo M. (2008) Expression and function of striatal enriched protein tyrosine phosphatase is profoundly altered in cerebral ischemia. *The European journal of neuroscience* 27, 2444-2452.

【非特許文献2 2】Bullock R, Zauner A, Woodward J, Young HF. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke*. 1995;26:2187-2189

【非特許文献2 3】Davalos A, Castillo J, Serena J, Noya M. Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. *Stroke*. 1997;28:708-710

【非特許文献2 4】Mehta SL, Mannas N, Raghunir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 2007;54:34-66

【非特許文献2 5】Chazot PL. The nmda receptor nr2b subunit: A valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr Med Chem*. 2004;11:389-396

【非特許文献2 6】Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic

10

20

30

40

50

stroke: An integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22:391-397

【非特許文献 2 7】Kemp JA, McKernan RM. Nmda receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci.* 2002;5 Suppl:1039-1042

【非特許文献 2 8】Lipton SA. Failures and successes of nmda receptor antagonists : Molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx.* 2004;1: 101-110

【非特許文献 2 9】Nito C, Kamada H, Endo H, Niizuma K, Myer DJ, Chan PH. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase a2 signaling pathway in blood-brain barrier disruption after focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:1686-1696

【非特許文献 3 0】Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S, Ross ME. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and n-methyl-d-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 ;98: 1294-1299.

【非特許文献 3 1】Deb I, Poddar R, Paul S. Oxidative stress-induced oligomerization inhibits the activity of the non-receptor tyrosine phosphatase STEP61. *J Neurochem.* 2011 ;116:1097-1111.

【非特許文献 3 2】Braithwaite SP, Adkisson M, Leung J, Nava A, Masterson B, Urfer R, Oksenberg D, Nikolic K. Regulation of NMDA receptor trafficking and function by striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP). *Eur J Neurosci.* 2006;23:2847-2856.

【非特許文献 3 3】Candelario-Jalil E, Gonzalez-Falcon A, Garcia-Cabrera M, Leon OS, Fiebich BL. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 2004 ; 1007:98- 108.

【非特許文献 3 4】Lombroso, P. J., Naegle, J. R., Sharma, E., and Lerner, M. (1993) *J Neurosci* 13(7), 3064-3074

【非特許文献 3 5】Bult, A., Zhao, F., Dirks, R., Jr., Sharma, E., Lukacs, E., Solimena, M., Naegle, J. R., and Lombroso, P. J. (1996) *J Neurosci* 16(24), 7821-7831

【非特許文献 3 6】Paul, S., Nairn, A. C., Wang, P., and Lombroso, P. J. (2003) *Nature neuroscience* 6(1), 34-42

【非特許文献 3 7】Thomas, G. M., and Huganir, R. L. (2004) *Nature reviews* 5(3), 173-183

【非特許文献 3 8】Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K., and Greengard, P. (2005) *Nature neuroscience* 8(8), 1051-1058

【非特許文献 3 9】Mukherjee, S.; Poddar, R.; Deb, I., Paul, S., (2011) "Dephosphorylation of Specific Sites in the KIS domain leads to Ubiquitin-Mediated Degradation of the tyrosine Phosphatase" (In preparation)

【非特許文献 4 0】Deb, I.; Poddar, R.; Paul, S.; (2011) "Oxidative stress induced dimerization inhibits the activity of the non-receptor tyrosine phosphatase STEP61" *Journal of Neurochemistry* (In publication)

【0006】

各種の研究は、ニューロ減成には興奮毒性のグルタメート受容体の活性化に関与し、その後虚血性損傷、外傷による病変、および広範な神経疾患が発症することを示している (Lipton and Rosenberg 1994; Arudine and Tymianski 2004)。病理学的状態では、神経伝達物質であるグルタメートの過剰放出が、グルタメート受容体のNMDAサブタイプの活性化につながり、この活性化が興奮毒性による細胞死に関与していることが知られている p38ミトゲン活性化蛋白質

10

20

30

40

50

キナーゼ (p38MAPK) などのエフェクター分子のCa²⁺過負荷および活性化を始めとする細胞内事象の有害なカスケードをトリガーする (Barone et al., 2001a; Barone et al., 2001b)。近年の研究は、サブユニットを含むNR2A (NR2A-NMDAR) またはNR2B (NR2B-NMDAR) の存在によって定義される2つの機能上異なるNMDA受容体 (NMDAR) のプールの存在を示唆している (Luo et al., 1997; Tovar and Westbrook 1999; Kohr 2006)。一般に、NR2B-NMDARは細胞死、それに続く興奮毒性損傷による脳ダメージをトリガーする (Liu et al., 2007; Tu et al., 2010)。ところが、NR2B-NMDAR拮抗薬の投与は臨床的には奏功していない。これらが興奮毒性カスケードを阻害するだけでなく、受容体の生理学的機能に干渉するからである (Rodrigues et al., 2001; Zhao et al., 2005; Walker and Davis 2008)。

10

【0007】

即ち、NMDAR信号伝達下流側の細胞内信号伝達カスケードを標的にした成分は、興奮毒性に干渉する治療方法を対象とする新規な化合物になり得ると考えられる。

【0008】

(STriatalリッチ化ホスファターゼ (STriatal Enriched Phosphatase) またはPTPN5としても知られている) 脳リッチ化チロシンホスファターゼSTEPは、NMDARの刺激後に活性化し、ニューロンの生死に関する重要な調節体として発現する一つのこのような標的分子である。STEPは、線条体、新生大脳皮質および海馬のニューロンに特異的に発現する (Boulanger et al., 1995)。2つのSTEPイソ体であるSTEP₆₁およびSTEP₄₆ (Bult et al., 1997) は、キナーゼ相互作用モチーフ即ちKIMドメインと呼ばれる高度に保存された基質結合ドメインを含有する (Pulido et al., 1998)。KIMドメイン内部の臨界的なセリン残基のリン酸化は、蛋白質キナーゼA (PKA) 経路のドーパミン/D1受容体依存活性化を介して媒介される (Paul et al., 2000)。この残基がグルタメート/NMDA受容体刺激後にCa²⁺依存ホスファターゼカルシニューリンによって脱リン酸化すると、STEPの基質に対する結合性が活性化する (Paul et al., 2003)。次に、活性STEPが調節チロシン残基のチロシン脱リン酸化を介して基質に結合し、基質の活性を調節する。STEPの既知基質としては、ERK (細胞外調節キナーゼ1/2) およびp38MAPK (Paul et al., 2007; Poddar et al., 2010; Xu et al., 2009)、Src族チロシンキナーゼおよびNMDARサブユニット (Nguyen et al., 2002; Braithwaite et al., 2006) があり、いずれもニューロンの生死に関与している。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】STEP₆₁の概略図である。【図2】STEP₄₆の概略図である。

【図3】PKAリン酸化部位*が修飾された(modified)、本発明の一実施態様のSTEP誘導ペプチドを示す概略図である。

40

【図4】PKAリン酸化部位*およびKISドメインリン酸化部位の両者が修飾された、本発明の別な実施態様のSTEP誘導ペプチドを示す概略図である。

【図5】PKAリン酸化部位*が修飾され、そしてさらにペプチドのN-末端にTAT配列を有する本発明のさらに別な実施態様のSTEP誘導ペプチドを示す概略図である。

【図6】PKAリン酸化部位*およびKISドメインリン酸化部位の両者が修飾され、そしてさらにペプチドのN-末端にTAT配列を有する本発明の別な実施態様のSTEP誘導ペプチドを示す概略図である。

【図7】PKAリン酸化部位*が修飾され、そしてさらにペプチドのN-末端にTAT配列およびKIMドメインのC-末端にmyc-tagを有する本発明のさらに別な実施態

50

様のSTEP誘導ペプチドを示す概略図である。

【図8】PKAリン酸化部位*およびKISドメインリン酸化部位の両者が修飾され、そしてさらにペプチドのN-末端にTAT配列およびKIMドメインのC-末端にmyc-tagを有する本発明の別な実施態様のSTEP誘導ペプチドを示す概略図である。

【図9】TAT-STEPペプチドの注射部位を示す概略図である。

【図10】外因性のTAT-STEPを検出する抗myc抗体を投与した線条体の冠状断面の免疫組織化学を示す図である。

【図11】外因性のTAT-STEPを検出する抗myc抗体を投与した大脳皮質の免疫組織化学を示す図である。

【図12】虚血性症状の発症直前に治療薬を投与した生理食塩水(saline)とTAT-STEP-myc治療群の代表的なTTC(塩化トリフェニルテトラゾリウム)染色部分を示す図である。

【図13】梗塞体積の定量分析を示す図である。なお、梗塞体積は対側(対照)半球の百分率として表わされ、データは平均±SEM($p < 0.01$)である。

【図14】虚血性症状の発症1.5時間後に治療薬を投与した生理食塩水(saline)とTAT-STEP-myc治療群の代表的なTTC(塩化トリフェニルテトラゾリウム)染色部分を示す図である。

【図15】梗塞体積の定量分析を示す図である。なお、梗塞体積は対側(対照)半球の百分率として表わされ、データは平均±SEM($p < 0.01$)である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の各種実施態様において、本発明はニューロン特異性チロシンホスファターゼの修飾誘導体である複数の新規なペプチド配列を提供するものである。具体的には、新規なペプチド配列は、線条体リッチ化チロシンホスファターゼ(STEP)の修飾誘導体である。各ペプチド配列において、STEPはグルタメート毒性、低酸素症および/または一過性虚血性傷害を原因とする脳損傷を緩和および治療できるように修飾されている。本発明のペプチド配列が治療に有効な脳損傷のタイプの実例を挙げると、発作を原因とする急性脳損傷、外傷性脳損傷、およびハンチントン舞踏病や統合失調症などの慢性疾患がある。さらに、本発明のペプチド配列はPTSDなどの恐怖体験記憶に関連する疾患の治療および緩和にも有効である。

【0011】

大脳中において最もよく認められる興奮の神経伝達物質であるグルタメートは、虚血性発作における臨床的介入の主目標物質である。グルタメートが持続的に高くなることは、急性虚血性発作患者に少なくとも24時間見られる症状である(Bullock et al., 1995; Davalos et al., 1997)。この持続的なグルタメート興奮毒性は、初期発症後数時間から数日間にわたる虚血性脳損傷の進行に関係があると考えられる。グルタメート毒性につながる症状は、虚血を原因として酸素およびグルコースが欠乏する結果、グルタメートが過剰に放出され、引き続き大脳中のすべての興奮受容体のうち約80%を占めるグルタメート受容体のN-メチル-D-アスパラギン酸塩(NMDA)-サブタイプが過剰活性化する間に発症する。グルタメートが媒介するNMDAR刺激が生じ、細胞間 Ca^{2+} が大きく増加し、損傷した脳における炎症反応の進行および持続に参与する多数の信号伝達経路が活性化する(Mehta et al., 2007)。特に $p38$ MAPK信号伝達経路の活性化が虚血性脳損傷に参与し、反応性酸素種の炎症反応および発生に参与する主要酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2の産生に関係がある(Nito et al., 2008; Iadecola et al., 2001; Barone et al., 2001a and b)。ところが、NMDA受容体拮抗物質の薬学的応用における重要な関心は、これらが病理学的作用を阻害するだけでなく、興奮シナプス伝達および塑性を有するNMDARの生理学的機能に干渉することに向けられている(Chazot et al., 2004; Dirnagl et al., 1999; Kemp et al., 2002; Lipton et al., 2000; Lipton et al., 2001; Lipton et al., 2002; Lipton et al., 2003; Lipton et al., 2004; Lipton et al., 2005; Lipton et al., 2006; Lipton et al., 2007; Lipton et al., 2008; Lipton et al., 2009; Lipton et al., 2010; Lipton et al., 2011; Lipton et al., 2012; Lipton et al., 2013; Lipton et al., 2014; Lipton et al., 2015; Lipton et al., 2016; Lipton et al., 2017; Lipton et al., 2018; Lipton et al., 2019; Lipton et al., 2020; Lipton et al., 2021; Lipton et al., 2022; Lipton et al., 2023; Lipton et al., 2024; Lipton et al., 2025; Lipton et al., 2026; Lipton et al., 2027; Lipton et al., 2028; Lipton et al., 2029; Lipton et al., 2030; Lipton et al., 2031; Lipton et al., 2032; Lipton et al., 2033; Lipton et al., 2034; Lipton et al., 2035; Lipton et al., 2036; Lipton et al., 2037; Lipton et al., 2038; Lipton et al., 2039; Lipton et al., 2040; Lipton et al., 2041; Lipton et al., 2042; Lipton et al., 2043; Lipton et al., 2044; Lipton et al., 2045; Lipton et al., 2046; Lipton et al., 2047; Lipton et al., 2048; Lipton et al., 2049; Lipton et al., 2050; Lipton et al., 2051; Lipton et al., 2052; Lipton et al., 2053; Lipton et al., 2054; Lipton et al., 2055; Lipton et al., 2056; Lipton et al., 2057; Lipton et al., 2058; Lipton et al., 2059; Lipton et al., 2060; Lipton et al., 2061; Lipton et al., 2062; Lipton et al., 2063; Lipton et al., 2064; Lipton et al., 2065; Lipton et al., 2066; Lipton et al., 2067; Lipton et al., 2068; Lipton et al., 2069; Lipton et al., 2070; Lipton et al., 2071; Lipton et al., 2072; Lipton et al., 2073; Lipton et al., 2074; Lipton et al., 2075; Lipton et al., 2076; Lipton et al., 2077; Lipton et al., 2078; Lipton et al., 2079; Lipton et al., 2080; Lipton et al., 2081; Lipton et al., 2082; Lipton et al., 2083; Lipton et al., 2084; Lipton et al., 2085; Lipton et al., 2086; Lipton et al., 2087; Lipton et al., 2088; Lipton et al., 2089; Lipton et al., 2090; Lipton et al., 2091; Lipton et al., 2092; Lipton et al., 2093; Lipton et al., 2094; Lipton et al., 2095; Lipton et al., 2096; Lipton et al., 2097; Lipton et al., 2098; Lipton et al., 2099; Lipton et al., 2100; Lipton et al., 2101; Lipton et al., 2102; Lipton et al., 2103; Lipton et al., 2104; Lipton et al., 2105; Lipton et al., 2106; Lipton et al., 2107; Lipton et al., 2108; Lipton et al., 2109; Lipton et al., 2110; Lipton et al., 2111; Lipton et al., 2112; Lipton et al., 2113; Lipton et al., 2114; Lipton et al., 2115; Lipton et al., 2116; Lipton et al., 2117; Lipton et al., 2118; Lipton et al., 2119; Lipton et al., 2120; Lipton et al., 2121; Lipton et al., 2122; Lipton et al., 2123; Lipton et al., 2124; Lipton et al., 2125; Lipton et al., 2126; Lipton et al., 2127; Lipton et al., 2128; Lipton et al., 2129; Lipton et al., 2130; Lipton et al., 2131; Lipton et al., 2132; Lipton et al., 2133; Lipton et al., 2134; Lipton et al., 2135; Lipton et al., 2136; Lipton et al., 2137; Lipton et al., 2138; Lipton et al., 2139; Lipton et al., 2140; Lipton et al., 2141; Lipton et al., 2142; Lipton et al., 2143; Lipton et al., 2144; Lipton et al., 2145; Lipton et al., 2146; Lipton et al., 2147; Lipton et al., 2148; Lipton et al., 2149; Lipton et al., 2150; Lipton et al., 2151; Lipton et al., 2152; Lipton et al., 2153; Lipton et al., 2154; Lipton et al., 2155; Lipton et al., 2156; Lipton et al., 2157; Lipton et al., 2158; Lipton et al., 2159; Lipton et al., 2160; Lipton et al., 2161; Lipton et al., 2162; Lipton et al., 2163; Lipton et al., 2164; Lipton et al., 2165; Lipton et al., 2166; Lipton et al., 2167; Lipton et al., 2168; Lipton et al., 2169; Lipton et al., 2170; Lipton et al., 2171; Lipton et al., 2172; Lipton et al., 2173; Lipton et al., 2174; Lipton et al., 2175; Lipton et al., 2176; Lipton et al., 2177; Lipton et al., 2178; Lipton et al., 2179; Lipton et al., 2180; Lipton et al., 2181; Lipton et al., 2182; Lipton et al., 2183; Lipton et al., 2184; Lipton et al., 2185; Lipton et al., 2186; Lipton et al., 2187; Lipton et al., 2188; Lipton et al., 2189; Lipton et al., 2190; Lipton et al., 2191; Lipton et al., 2192; Lipton et al., 2193; Lipton et al., 2194; Lipton et al., 2195; Lipton et al., 2196; Lipton et al., 2197; Lipton et al., 2198; Lipton et al., 2199; Lipton et al., 2200; Lipton et al., 2201; Lipton et al., 2202; Lipton et al., 2203; Lipton et al., 2204; Lipton et al., 2205; Lipton et al., 2206; Lipton et al., 2207; Lipton et al., 2208; Lipton et al., 2209; Lipton et al., 2210; Lipton et al., 2211; Lipton et al., 2212; Lipton et al., 2213; Lipton et al., 2214; Lipton et al., 2215; Lipton et al., 2216; Lipton et al., 2217; Lipton et al., 2218; Lipton et al., 2219; Lipton et al., 2220; Lipton et al., 2221; Lipton et al., 2222; Lipton et al., 2223; Lipton et al., 2224; Lipton et al., 2225; Lipton et al., 2226; Lipton et al., 2227; Lipton et al., 2228; Lipton et al., 2229; Lipton et al., 2230; Lipton et al., 2231; Lipton et al., 2232; Lipton et al., 2233; Lipton et al., 2234; Lipton et al., 2235; Lipton et al., 2236; Lipton et al., 2237; Lipton et al., 2238; Lipton et al., 2239; Lipton et al., 2240; Lipton et al., 2241; Lipton et al., 2242; Lipton et al., 2243; Lipton et al., 2244; Lipton et al., 2245; Lipton et al., 2246; Lipton et al., 2247; Lipton et al., 2248; Lipton et al., 2249; Lipton et al., 2250; Lipton et al., 2251; Lipton et al., 2252; Lipton et al., 2253; Lipton et al., 2254; Lipton et al., 2255; Lipton et al., 2256; Lipton et al., 2257; Lipton et al., 2258; Lipton et al., 2259; Lipton et al., 2260; Lipton et al., 2261; Lipton et al., 2262; Lipton et al., 2263; Lipton et al., 2264; Lipton et al., 2265; Lipton et al., 2266; Lipton et al., 2267; Lipton et al., 2268; Lipton et al., 2269; Lipton et al., 2270; Lipton et al., 2271; Lipton et al., 2272; Lipton et al., 2273; Lipton et al., 2274; Lipton et al., 2275; Lipton et al., 2276; Lipton et al., 2277; Lipton et al., 2278; Lipton et al., 2279; Lipton et al., 2280; Lipton et al., 2281; Lipton et al., 2282; Lipton et al., 2283; Lipton et al., 2284; Lipton et al., 2285; Lipton et al., 2286; Lipton et al., 2287; Lipton et al., 2288; Lipton et al., 2289; Lipton et al., 2290; Lipton et al., 2291; Lipton et al., 2292; Lipton et al., 2293; Lipton et al., 2294; Lipton et al., 2295; Lipton et al., 2296; Lipton et al., 2297; Lipton et al., 2298; Lipton et al., 2299; Lipton et al., 2300; Lipton et al., 2301; Lipton et al., 2302; Lipton et al., 2303; Lipton et al., 2304; Lipton et al., 2305; Lipton et al., 2306; Lipton et al., 2307; Lipton et al., 2308; Lipton et al., 2309; Lipton et al., 2310; Lipton et al., 2311; Lipton et al., 2312; Lipton et al., 2313; Lipton et al., 2314; Lipton et al., 2315; Lipton et al., 2316; Lipton et al., 2317; Lipton et al., 2318; Lipton et al., 2319; Lipton et al., 2320; Lipton et al., 2321; Lipton et al., 2322; Lipton et al., 2323; Lipton et al., 2324; Lipton et al., 2325; Lipton et al., 2326; Lipton et al., 2327; Lipton et al., 2328; Lipton et al., 2329; Lipton et al., 2330; Lipton et al., 2331; Lipton et al., 2332; Lipton et al., 2333; Lipton et al., 2334; Lipton et al., 2335; Lipton et al., 2336; Lipton et al., 2337; Lipton et al., 2338; Lipton et al., 2339; Lipton et al., 2340; Lipton et al., 2341; Lipton et al., 2342; Lipton et al., 2343; Lipton et al., 2344; Lipton et al., 2345; Lipton et al., 2346; Lipton et al., 2347; Lipton et al., 2348; Lipton et al., 2349; Lipton et al., 2350; Lipton et al., 2351; Lipton et al., 2352; Lipton et al., 2353; Lipton et al., 2354; Lipton et al., 2355; Lipton et al., 2356; Lipton et al., 2357; Lipton et al., 2358; Lipton et al., 2359; Lipton et al., 2360; Lipton et al., 2361; Lipton et al., 2362; Lipton et al., 2363; Lipton et al., 2364; Lipton et al., 2365; Lipton et al., 2366; Lipton et al., 2367; Lipton et al., 2368; Lipton et al., 2369; Lipton et al., 2370; Lipton et al., 2371; Lipton et al., 2372; Lipton et al., 2373; Lipton et al., 2374; Lipton et al., 2375; Lipton et al., 2376; Lipton et al., 2377; Lipton et al., 2378; Lipton et al., 2379; Lipton et al., 2380; Lipton et al., 2381; Lipton et al., 2382; Lipton et al., 2383; Lipton et al., 2384; Lipton et al., 2385; Lipton et al., 2386; Lipton et al., 2387; Lipton et al., 2388; Lipton et al., 2389; Lipton et al., 2390; Lipton et al., 2391; Lipton et al., 2392; Lipton et al., 2393; Lipton et al., 2394; Lipton et al., 2395; Lipton et al., 2396; Lipton et al., 2397; Lipton et al., 2398; Lipton et al., 2399; Lipton et al., 2400; Lipton et al., 2401; Lipton et al., 2402; Lipton et al., 2403; Lipton et al., 2404; Lipton et al., 2405; Lipton et al., 2406; Lipton et al., 2407; Lipton et al., 2408; Lipton et al., 2409; Lipton et al., 2410; Lipton et al., 2411; Lipton et al., 2412; Lipton et al., 2413; Lipton et al., 2414; Lipton et al., 2415; Lipton et al., 2416; Lipton et al., 2417; Lipton et al., 2418; Lipton et al., 2419; Lipton et al., 2420; Lipton et al., 2421; Lipton et al., 2422; Lipton et al., 2423; Lipton et al., 2424; Lipton et al., 2425; Lipton et al., 2426; Lipton et al., 2427; Lipton et al., 2428; Lipton et al., 2429; Lipton et al., 2430; Lipton et al., 2431; Lipton et al., 2432; Lipton et al., 2433; Lipton et al., 2434; Lipton et al., 2435; Lipton et al., 2436; Lipton et al., 2437; Lipton et al., 2438; Lipton et al., 2439; Lipton et al., 2440; Lipton et al., 2441; Lipton et al., 2442; Lipton et al., 2443; Lipton et al., 2444; Lipton et al., 2445; Lipton et al., 2446; Lipton et al., 2447; Lipton et al., 2448; Lipton et al., 2449; Lipton et al., 2450; Lipton et al., 2451; Lipton et al., 2452; Lipton et al., 2453; Lipton et al., 2454; Lipton et al., 2455; Lipton et al., 2456; Lipton et al., 2457; Lipton et al., 2458; Lipton et al., 2459; Lipton et al., 2460; Lipton et al., 2461; Lipton et al., 2462; Lipton et al., 2463; Lipton et al., 2464; Lipton et al., 2465; Lipton et al., 2466; Lipton et al., 2467; Lipton et al., 2468; Lipton et al., 2469; Lipton et al., 2470; Lipton et al., 2471; Lipton et al., 2472; Lipton et al., 2473; Lipton et al., 2474; Lipton et al., 2475; Lipton et al., 2476; Lipton et al., 2477; Lipton et al., 2478; Lipton et al., 2479; Lipton et al., 2480; Lipton et al., 2481; Lipton et al., 2482; Lipton et al., 2483; Lipton et al., 2484; Lipton et al., 2485; Lipton et al., 2486; Lipton et al., 2487; Lipton et al., 2488; Lipton et al., 2489; Lipton et al., 2490; Lipton et al., 2491; Lipton et al., 2492; Lipton et al., 2493; Lipton et al., 2494; Lipton et al., 2495; Lipton et al., 2496; Lipton et al., 2497; Lipton et al., 2498; Lipton et al., 2499; Lipton et al., 2500; Lipton et al., 2501; Lipton et al., 2502; Lipton et al., 2503; Lipton et al., 2504; Lipton et al., 2505; Lipton et al., 2506; Lipton et al., 2507; Lipton et al., 2508; Lipton et al., 2509; Lipton et al., 2510; Lipton et al., 2511; Lipton et al., 2512; Lipton et al., 2513; Lipton et al., 2514; Lipton et al., 2515; Lipton et al., 2516; Lipton et al., 2517; Lipton et al., 2518; Lipton et al., 2519; Lipton et al., 2520; Lipton et al., 2521; Lipton et al., 2522; Lipton et al., 2523; Lipton et al., 2524; Lipton et al., 2525; Lipton et al., 2526; Lipton et al., 2527; Lipton et al., 2528; Lipton et al., 2529; Lipton et al., 2530; Lipton et al., 2531; Lipton et al., 2532; Lipton et al., 2533; Lipton et al., 2534; Lipton et al., 2535; Lipton et al., 2536; Lipton et al., 2537; Lipton et al., 2538; Lipton et al., 2539; Lipton et al., 2540; Lipton et al., 2541; Lipton et al., 2542; Lipton et al., 2543; Lipton et al., 2544; Lipton et al., 2545; Lipton et al., 2546; Lipton et al., 2547; Lipton et al., 2548; Lipton et al., 2549; Lipton et al., 2550; Lipton et al., 2551; Lipton et al., 2552; Lipton et al., 2553; Lipton et al., 2554; Lipton et al., 2555; Lipton et al., 2556; Lipton et al., 2557; Lipton et al., 2558; Lipton et al., 2559; Lipton et al., 2560; Lipton et al., 2561; Lipton et al., 2562; Lipton et al., 2563; Lipton et al., 2564; Lipton et al., 2565; Lipton et al., 2566; Lipton et al., 2567; Lipton et al., 2568; Lipton et al., 2569; Lipton et al., 2570; Lipton et al., 2571; Lipton et al., 2572; Lipton et al., 2573; Lipton et al., 2574; Lipton et al., 2575; Lipton et al., 2576; Lipton et al., 2577; Lipton et al., 2578; Lipton et al., 2579; Lipton et al., 2580; Lipton et al., 2581; Lipton et al., 2582; Lipton et al., 2583; Lipton et al., 2584; Lipton et al., 2585; Lipton et al., 2586; Lipton et al., 2587; Lipton et al., 2588; Lipton et al., 2589; Lipton et al., 2590; Lipton et al., 2591; Lipton et al., 2592; Lipton et al., 2593; Lipton et al., 2594; Lipton et al., 2595; Lipton et al., 2596; Lipton et al., 2597; Lipton et al., 2598; Lipton et al., 2599; Lipton et al., 2600; Lipton et al., 2601; Lipton et al., 2602; Lipton et al., 2603; Lipton et al., 2604; Lipton et al., 2605; Lipton et al., 2606; Lipton et al., 2607; Lipton et al., 2608; Lipton et al., 2609; Lipton et al., 2610; Lipton et al., 2611; Lipton et al., 2612; Lipton et al., 2613; Lipton et al., 2614; Lipton et al., 2615; Lipton et al., 2616; Lipton et al., 2617; Lipton et al., 2618; Lipton et al., 2619; Lipton et al., 2620; Lipton et al., 2621; Lipton et al., 2622; Lipton et al., 2623; Lipton et al., 2624; Lipton et al., 2625; Lipton et al., 2626; Lipton et al., 2627; Lipton et al., 2628; Lipton et al., 2629; Lipton et al., 2630; Lipton et al., 2631; Lipton et al., 2632; Lipton et al., 2633; Lipton et al., 2634; Lipton et al., 2635; Lipton et al., 2636; Lipton et al., 2637; Lipton et al., 2638; Lipton et al., 2639; Lipton et al., 2640; Lipton et al., 2641; Lipton et al., 2642; Lipton et al., 2643; Lipton et al., 2644; Lipton et al., 2645; Lipton et al., 2646; Lipton et al., 2647; Lipton et al., 2648; Lipton et al., 2649; Lipton et al., 2650; Lipton et al., 2651; Lipton et al., 2652; Lipton et al., 2653; Lipton et al., 2654; Lipton et al., 2655; Lipton et al., 2656; Lipton et al., 2657; Lipton et al., 2658; Lipton et al., 2659; Lipton et al., 2660; Lipton et al., 2661; Lipton et al., 2662; Lipton et al., 2663; Lipton et al., 2664; Lipton et al., 2665; Lipton et al., 2666; Lipton et al., 2667; Lipton et al., 2668; Lipton et al., 2669; Lipton et al., 2670; Lipton et al., 2671; Lipton et al., 2672; Lipton et al., 2673; Lipton et al., 2674; Lipton et al., 2675; Lipton et al., 2676; Lipton et al., 2677; Lipton et al., 2678; Lipton et al., 2679; Lipton et al., 2680; Lipton et al., 2681; Lipton et al., 2682; Lipton et al., 2683; Lipton et al., 2684; Lipton et al., 2685; Lipton et al., 2686; Lipton et al., 2687; Lipton et al., 2688; Lipton et al., 2689; Lipton et al., 2690; Lipton et al., 2691; Lipton et al., 2692; Lipton et al., 2693; Lipton et al., 2694; Lipton et al., 2695; Lipton et al., 2696; Lipton et al., 2697; Lipton et al., 2698; Lipton et al., 2699; Lipton et al., 2700; Lipton et al., 2701; Lipton et al., 2702; Lipton et al., 2703; Lipton et al., 2704; Lipton et al., 2705; Lipton et al., 2706; Lipton et al., 2707; Lipton et al., 2708; Lipton et al., 2709; Lipton et al., 2710; Lipton et al., 2711; Lipton et al., 2712; Lipton et al., 2713; Lipton et al., 2714; Lipton et al., 2715; Lipton et al., 2716; Lipton et al., 2717; Lipton et al., 2718; Lipton et al., 2719; Lipton et al., 2720; Lipton et al., 2721; Lipton et al., 2722; Lipton et al., 2723; Lipton et al., 2724; Lipton et al., 2725; Lipton et al., 2726; Lipton et al., 2727; Lipton et al., 2728; Lipton et al., 2729; Lipton et al., 2730; Lipton et al., 2731; Lipton et al., 2732; Lipton et al., 2733; Lipton et al., 2734; Lipton et al., 2735; Lipton et al., 2736; Lipton et al., 2737; Lipton et al., 2738; Lipton et al., 2739; Lipton et al., 2740; Lipton et al., 2741; Lipton et al., 2742; Lipton et al., 2743; Lipton et al., 2744; Lipton et al., 2745; Lipton et al., 2746; Lipton et al., 2747; Lipton et al., 2748; Lipton et al., 2749; Lipton et al., 2750; Lipton et al., 2751; Lipton et al., 2752; Lipton et al., 2753; Lipton et al., 2754; Lipton et al., 2755; Lipton et al., 2756; Lipton et al., 2757; Lipton et al., 2758; Lipton et al., 2759; Lipton et al., 2760; Lipton et al., 2761; Lipton et al., 2762; Lipton et al., 2763; Lipton et al., 2764; Lipton et al., 2765; Lipton et al., 2766; Lipton et al., 2767; Lipton et al., 2768; Lipton et al., 2769; Lipton et al., 2770; Lipton et al., 2771; Lipton et al., 2772; Lipton et al., 2773; Lipton et al., 2774; Lipton et al., 2775; Lipton et al., 2776; Lipton et al., 2777; Lipton et al., 2778; Lipton et al., 2779; Lipton et al., 2780; Lipton et al., 2781; Lipton et al., 2782; Lipton et al., 2783; Lipton et al., 2784; Lipton et al., 2785; Lipton et al., 2786; Lipton et al., 2787; Lipton et al., 2788; Lipton et al., 2789; Lipton et al., 2790; Lipton et al., 2791; Lipton et al., 2792; Lipton et al., 2793; Lipton et al., 2794; Lipton et al., 2795; Lipton et al., 2796; Lipton et al., 2797; Lipton et al., 2798; Lipton et al., 2799; Lipton et al., 2800; Lipton et al., 2801; Lipton et al., 2802; Lipton et al., 2803; Lipton et al., 2804; Lipton et al., 2805; Lipton et al., 2806; Lipton et al., 2807; Lipton et al., 2808; Lipton et al., 2809; Lipton et al., 2810; Lipton et al., 2811; Lipton et al., 2812; Lipton et al., 2813; Lipton et al., 2814; Lipton et al., 2815; Lipton et al., 2816; Lipton et al., 2817; Lipton et al., 2818; Lipton et al., 2819; Lipton et al., 2820; Lipton et al., 2821; Lipton et al., 2822; Lipton et al., 2823; Lipton et al., 2824; Lipton et al., 2825; Lipton et al., 2826; Lipton et al., 2827; Lipton et al., 2828; Lipton et al., 2829; Lipton et al., 2830; Lipton et al., 2831; Lipton et al., 2832; Lipton et al., 2833; Lipton et al., 2834; Lipton et al., 2835; Lipton et al., 2836; Lipton et al., 2837; Lipton et al., 2838; Lipton et al., 2839; Lipton et al., 2840; Lipton et al., 2841; Lipton et al., 2842; Lipton et al., 2843; Lipton et al., 2844; Lipton et al., 2845; Lipton et al., 2846; Lipton et al., 2847; Lipton et al., 2848; Lipton et al., 2849; Lipton et al., 2850; Lipton et al., 2851; Lipton et al., 2852; Lipton et al., 2853; Lipton et al., 2854; Lipton et al., 2855; Lipton et al., 2856; Lipton et al., 2857; Lipton et al., 2858; Lipton et al., 2859; Lipton et al., 2860; Lipton et al., 2861; Lipton et al., 2862; Lipton et al., 2863; Lipton et al., 2864; Lipton et al., 2865; Lipton et al., 2866; Lipton et al., 2867; Lipton et al., 2868; Lipton et al., 2869; Lipton et al., 2870; Lipton et al., 2871; Lipton et al., 2872; Lipton et al., 2873; Lipton et al., 2874; Lipton et al., 2875; Lipton et al., 2876; Lipton et al., 2877; Lipton et al., 2878; Lipton et al., 2879; Lipton et al., 2880; Lipton et al., 2881; Lipton et al., 2882; Lipton et al., 2883; Lipton et al., 2884; Lipton et al., 2885; Lipton et al., 2886; Lipton et al., 2887; Lipton et al., 2888; Lipton et al., 2889; Lipton et al., 2890; Lipton et al., 2891; Lipton et al., 2892; Lipton et al., 2893; Lipton

004)。従って、NMDAR刺激に続いて活性化し、NMDARの病理学的作用に選択的に干渉する特異的な分子ターゲットを確認できれば、これは虚血性脳損傷の緩和に役立つ新規な化合物になる。

【0012】

STEPは、中枢神経系において排他的に発現する細胞内蛋白質チロシンホスファクターゼ(PTP)であり、またSTEPは、基底核、海馬、大脳皮質および関連構造のニューロンにおいて優先的に発現する(Lombrose et al. 1993, Boulanger et al. 1995)。PTPaseのSTEP族は、独立した一つの遺伝子の選択的スプライシングによって形成する膜関連(STEP₆₁)変異型および細胞質ゾル(STEP₄₆)の変異型の両者を含む(Bult et al. 1997)。STEP₆₁は、そのN-末端に付加的な172のアミノ酸が存在する点でSTEP₄₆とは相違する(Bult et al. 1996)。本明細書では、STEPタンパク質における特異的なアミノ酸残基については、STEP₄₆変異型のからカウントした番号で呼ぶことがある。本明細書で説明するSTEPタンパク質の107アミノ酸配列は、動物種間で高度に保存され、マウスとヒトとの間の配列相同性は95%である(SEQ ID1とSEQ ID2との比較)。本発明は、有効なペプチドを獲得するために多数の考えられるSTEPタンパク質の突然変異を実現するものである。本発明の突然変異部位が種間に保存される場合、本発明の各種のSTEP系ペプチドは、多様な種からのSTEPタンパク質に基づくか、あるいはこれら種から誘導することができ、また本発明ペプチドは、治療対象および/又は研究対象の種に対して内因性の蛋白質から誘導されたペプチドか、あるいは誘導されないペプチドであってもよい。従って、本発明のペプチドは、配列リストに含まれる特異的なペプチドに限定されるものではない。

【0013】

STEPは、他の二つのPTP、PTPRRおよびHePTPとともにキナーゼ相互作用モチーフ(KIMドメイン)と呼ばれる高度に保存された16-アミノ酸基質-結合ドメインを含有するPTP族に属する(Pulido et al. 1998)。調節セリン残基であるser49(STEP₆₁におけるser221)は、KIMドメインの中央に位置し、この残基が脱リン酸化すると、STEPのその基質に結合できる能力が活性化する。ser49のリン酸化を媒介するのは、cAMP/PKA経路のドーパミン/D1受容体依存活性化であり(Paul et al. 2000)、一方脱リン酸化を媒介するのはCa²⁺依存ホスファターゼ即ちカルシニューリンのグルタメート/NMDA受容体誘導活性化である(Paul et al. 2003)。

【0014】

KIMドメインに対する第2の保存ドメインカルボキシー末端はSTEP、PTP-SLおよびHePTP内に存在する。以下にさらに詳しく記載するように、このドメイン、ここではキナーゼ特異性配列(KISドメイン)と呼ぶドメインが2つのリン酸化部位、即ちThr59(STEP₆₁におけるThr231)およびSer72(STEP₆₁におけるSer244)を有し、これらがSTEP蛋白質の安定性を調節するさいに重要な役割を果たすことが確認された。

【0015】

図1および図2はそれぞれSTEP₆₁およびSTEP₄₆を示す概略図であり、STEPの活性化およびそれに続く減成に関与するホスファターゼドメイン、推定蛋白質分解部位(PEST)、膜透過(transmembrane)ドメイン(TM)、ポリプロリンリッチドメイン(PP)、キナーゼ相互作用モチーフ(KIM)、キナーゼ特異性配列(KIS)および上記リン酸化部位の位置を示す図である。さらに、分子内二量化に関与することが分かっているシステイン残基(STEP₄₆におけるCys23/STEP₆₁におけるCys195)の位置、およびERKおよびp38MAPKの両者によってリン酸化が可能であることが知られているスレオニン残基(STEP₄₆におけるThr18/STEP₆₁におけるThr190)の位置も図示してある。

【0016】

STEPが活性形態にある場合、細胞外調節キナーゼ1/2 (ERK1/2)、即ち記憶形成に關与する重要な蛋白質の活性を調節することによってシナプス組成を変調できる (Paul et al. 2007およびThomas and Huganir 2004)。活性STEPの場合、恐らくは上流側キナーゼFynの調節 (Nguyen et al. 2002) およびNR2B-NMDA受容体サブユニットのチロシン脱リン酸化 (Snyder et al. 2005) を通じて、シナプス膜に輸送されるNMDA受容体に干渉することによってNMDA受容体依存長期相乗作用を調節することも可能である。またいくつかの研究によると、活性STEPはp38MAPKの調節によって神経保護を行う役割を持つ (Poddar et al. 2010, Xu et al., 2009)。

10

【0017】

STEP蛋白質の場合、NMDARに干渉することが知られているため、STEP蛋白質に基づく構成活性を示すペプチドは、虚血性脳損傷の治療、緩和および／または予防について考えられる候補である。図3は、本発明の一実施態様の構成活性を示すSTEP誘導ペプチドを示す図である。このペプチドは、KIMドメインおよびKISドメインを含むSTEP₄₆の第1の107アミノ酸を含有する。さらに、図3に示すように、PKAリン酸化部位*として作用するセリン残基 (Ser49) は修飾されている (SEQ. ID. No. 3を参照)。本発明のこの実施態様では、標準的な点突然変異技術を使用してSer49をアラニンに変換している。このアラニンは、リン酸化できないため、構成活性を示すペプチドになる。PKAリン酸化部位を修飾すると、STEP-誘導ペプチドのリン酸化による不活性化問題に対処することができる。

20

【0018】

Mukherjee et al. 2011に記載されているようないくつかの研究によれば、活性STEP蛋白質は減成しやすい。Mukherjee et al. の研究はその焦点を活性STEPのレベル調節におけるKISドメインの役割に向けている。本発明によれば、KISドメインにおける2つのSP/TP部位 (図2、Thr59およびSer72) の外因性リン酸化が、主にERKおよびp38MAPKの基底活性を通じて媒介作用を行うことが確認された。これら2つの部位が脱リン酸化すると、活性形態のSTEPが選択的にユビキチン媒介プロテアソーム減成する。これら知見は、活性STEPのユビキチン媒介プロテアソーム減成が、二次的なp38MAPKの活性化にもつながることを含意している。

30

【0019】

従って、生体内で安定性を示し、かつユビキチン-媒介プロテアソーム減成傾向のない活性STEP-誘導ペプチドを製造することが望まれている。

【0020】

図4は、Ser49が、リン酸化できないアラニンに変換し、そしてThr59およびSer72がグルタミン酸に変換し、リン酸化可能な形態を模倣できる、本発明の一実施態様のSTEP-誘導ペプチドを示す概略図である (SEQ ID. No. 4を参照)。なお、例えばアスパラギン酸等を始めとする他のホスホ擬態 (phospho-mimics) も使用できることは言うまでもない。

40

【0021】

Deb et al., 2011に記載されているごく最近の研究によれば、STEP₆₁およびSTEP₄₆の酵素活性も分子内二量化によって調節できる。STEPの二量化の場合、いくつかのシステイン残基を包含する分子内ジスルフィド結合形成が関係し、酸化ストレスがあると、STEPの二量体形成が増加し、結果として活性が低下する。分子内二量化に關与するこのような一つのシステイン残基 (STEP₄₆におけるCys23/STEP₆₁におけるCys195) は、本発明のSTEP誘導ペプチドに存在する。虚血性損傷および／または再灌流時に酸化ストレスがあると、STEP誘導ペプチドの少なくとも一部が二量化する結果、治療効果が低下する可能性がある。従って、本発

50

明は、突然変異Cys23残基（システイン→アラニン変換）（SEQ. ID. No. 5）を含むSTEPペプチドを提供するものでもある。

【0022】

本発明のSTEP誘導ペプチドには別なリン酸化部位もあることが確認された（STEP₄₆におけるThr18/STEP₆₁におけるThr190）。試験管研究によれば、この部位はERKおよびp38MAPKの両者によってリン酸化することができる。リン酸化の機能的意味に基づいて、本発明はさらに非リン酸化性または模倣リン酸化性形態のThr18を提供するものである（SEQ. ID. No. 6, グルタミン酸に突然変異したThr18、およびSEQ. ID. No. 7、アラニンに突然変異したThr18を参照）。 10

【0023】

SEQ. ID. No. 8は、上記で説明したすべての突然変異点を含むヒトSTEPペプチドのアミノ酸配列になる。

【0024】

本発明のいくつかの実施態様の場合、過剰なグルタメート放出および酸化的ストレスを原因とする脳損傷の予防、治療または緩和に関する。即ち、本発明は、発作などを発症した結果この種の損傷に罹患しているか、罹患した患者の脳に送り込むことができるSTEP誘導ペプチドを提供するものでもある。図5および図6は、ペプチドのN-末端にTAT配列を有する上記構成活性を示すSTEP誘導ペプチドの概略図である。図5では、KIMドメインのリン酸化部位のみが変更され（SEQ. ID. No. 9を参照）、そして 20 図6では、KIMドメインおよびKISドメイン両者のリン酸化部位が変更されている（SEQ. ID. No. 10を参照）。TATは、ペプチド配列が細胞透過性になり、かつこれらペプチドが血液脳関門を横断できる11アミノ酸ペプチドである。STEP誘導ペプチドが血液脳関門を横断できるため、脳への直接的な手術を必要とする従来の治療機序よりも、侵襲性がかなり低い例えば大腿静脈などの静脈注射によって患者の脳へペプチドを送り込むことができる。当業者ならば、例えば公知の標的送り込みシステムやウィルス送り込みシステムなどの他の好適な送り込み機序に精通しているはずである。

【0025】

実験目的では、研究対象分子に観察可能な標識（tag）を付けることが有効な場合が多い。即ち、本発明はさらに観察可能な標識を付けたSTEP誘導ペプチドを提供するものでもある。図7および図8は、N-末端にTAT配列を有する上記の構成活性を示すSTEPペプチドであって、ペプチドのC-末端を修飾してmyc標識を付けたSTEP誘導ペプチドを示す概略図である。図7では、KIMドメインのリン酸化部位のみが変更され、そして図8では、KIMドメインおよびKISドメイン両者のリン酸化部位が変更されている。当業者ならば、ペプチドを修飾して、各種の観察可能な標識および機序を付け加えることについて精通しているはずである。 30

【0026】

グルタメート毒性の細胞培養モデルを使用して、STEP活性化の機能上の意味を調べ、興奮毒性NMDA受容体刺激の後のSTEP活性化の機能上の意味を調べた。Paul et al., 2010に記載されているように、興奮毒性損傷に引き続き、NR2B 40 -NMDA受容体が媒介してCa²⁺が増加し、STEPが脱リン酸化し、次に活性化することが実証された。Poddar et al., 2010に記載されているように、基質捕獲突然変異体を使用して、p38MAPKがSTEPの基質であり、そしてSTEPのKIMドメインがSTEP-p38相互作用に関与していることを確認した。STEPのNR2B-NMDAR媒介活性化が起きると、p38MAPK信号伝達経路が下方調節（down-regulating）され、細胞が持続的に生存する。ところが、NMDAR刺激を持続的に与えると、活性STEPが減成し、p38MAPKが二次的に活性化し、細胞死経路をトリガーする。これらの知見に基づいて、不可逆的にp38MAPKに結合できる構成活性形態のSTEPペプチドを産生した。ヒト免疫欠損ウィルスタイプI即ちTATの蛋白質導入ドメインに融合することによってこれは細胞透過性になった。 50

興奮量のグルタメート（100 μM、30分）で治療する前に、あるいは治療直後に培養ニューロンに精製TAT-STEPmycペプチドを導入した場合、24時間後にヘキストDNA染色法によって評価したところニューロン細胞死を阻止できた。さらにグルタメート毒性の動物モデルで研究を続けたところ、グルタメートの前に線条体に定位注射されたTAT-STEPペプチドによって生体内のグルタメート誘導興奮毒性細胞死を減らすことができた。

【0027】

引き続き脳虚血症の試験管モデルとして酸素－グルコース欠損（OGD）を使用して、虚血性損傷後の神経保護におけるTAT-STEPペプチドの作用役割を評価した。ペプチドの存在下および不在下で低酸素室（酸素－グルコース欠損、OGD）において培養ニューロンをグルコース不含有干渉液に浸漬し、細胞生存性を24時間後にヘキストDNA染色法によって試験した。この結果得られた知見によれば、TAT-STEPペプチドで予め培養した場合、OGD誘導細胞死に有意な減少が見られる（発表原稿は準備中）。

【0028】

以上説明してきた本発明の具体的な方法および組成物は、好ましい実施態様を代表するもので、例示であり、本発明の範囲を制限するものではない。本明細書を検討すれば、他の目的、態様及び実施態様も当業者にとって明らかになるはずであり、いずれも特許請求の範囲に記載されている本発明の精神に包含されるものである。また、当業者にとって、本発明の範囲および精神から逸脱することなく以上開示してきた本発明に各種の置換および変更を加えることは容易なはずである。以上参考として開示してきた本発明は、本明細書において本質的なものとして具体的に開示していない一つか複数の要素、または一つか複数の限定要件なしでも実施可能である。以上参考として開示してきた方法およびプロセスは異なる工程順で実施することができ、また必ずしも本明細書および特許請求の範囲の工程順に限定されない。本明細書および特許請求の範囲において、単数表現は、文脈が明らかにそうではないこと示していない限り、複数表現を含意するものである。従って、例えば“一つの宿主細胞”は、複数の（例えば培養液または集団の）このような宿主細胞を含意する。

【0029】

本発明は、どのような状況においても以上具体的に記載してきた具体的な実施例、実施態様または方法に制限されるものではない。また、どのような状況においても特許庁の審査官またはその他の公務員や雇用人によってなされた陳述によって制限されるものではない。ただし、このような陳述が出願人による意見書において具体的に、かつ無条件または保留なしに明示されている場合にはこの限りではない。

【0030】

本明細書で使用した用語・術語および表現は、記述を目的とするもので、制限を目的とするものではなく、このような用語・術語および表現を使用するさいに、図示の特徴および開示してきた特徴やその一部の等価物を排除するものではなく、特許請求の範囲に記載した本発明の範囲内で各種の変更が可能である。従って、本発明を好適な実施態様および選択的な特徴によって説明してきたが、当業者ならば、以上説明してきた技術思想の変更および改変を実施することができ、またこれら変更および改変も特許請求の範囲に記載した本発明の範囲内に包含されるものである。

【0031】

上記で言及した、および／または上記の特許文献および非特許文献はいずれも、本発明が対象とする技術分野の技術レベルを示す文献であり、各文献は個別に全体が援用されるように、あるいは全体が開示されているように援用されるものである。出願人は本明細書に、これら文献に記載されている一部または全部の知見および情報を物理的に援用する権利を保有するものである。

【0032】

実験－TAT-STEPペプチドを用いる脳損傷の予防、治療および緩和

（90分間中位大脳動脈閉塞により塞栓症発作を発症させた後に24時間再灌流処置す

10

20

30

40

50

る) 脳虚血症の動物モデルを使用して、活性STEPの減成がニューロン細胞死および引き続き生じる脳損傷に寄与するかどうか、そして修飾STEPペプチドが虚血性脳損傷を緩和できるかどうかを評価した。まず、STEPの活性化、引き続き生じる減成、その後の脳虚血症および再灌流の時間的なプロファイルを調べ、これらのp38MAPK活性化との相関関係を評価した。虚血性損傷後15分経たないうちにp38MAPKのリン酸化に急激ではあるが遷移的な増加が認められた。その後、30分経過から時間が経つにつれてp38リン酸化が減少し、90分までに基底レベルに戻った。この虚血性損傷の結果、p38MAPKが急激に活性化するだけでなく、STEPの脱リン酸化および引き続き生じる活性化が生じ、これは30分で開始し、90分までに完全な脱リン酸化が生じた。この結果、活性STEPがp38MAPKの活性化持続時間を制限することになる。減成による活性STEPの進行的な下方調節は、p38MAPKの二次活性化に結果する再灌流後～6時間目から明らかになる。p38MAPK経路の一次的ではないが二次的な活性化は、p38MAPKの活性化にリンクし、かつ炎症反応および反応性酸素種の発生に関与する(発表原稿は準備中)主要酵素であるシクロオキシゲナーゼ2(COX-2)の発現と相関関係にある。以上の知見は、本発明の仮説に一致し、STEPが細胞死経路のネガティブな調節体であり、活性STEPの減成が信号カスケードをトリガーし、虚血性脳損傷につながることを示している。

10

【0033】

次に、生体内に送り込まれた修飾TAT-STEPペプチドが虚血性脳損傷を抑制できるかどうかを調べた。ここでの大きな技術的課題は、非侵襲的にペプチドを巧く脳内に送り込むことであった。図9～図15に、成獣ラットの大腿静脈にTAT-STEPペプチドを一回静脈注射した後、このペプチドは大脳皮質(図10)および線条体(図11)の両者において検出可能であったことを示す。これら実験では、雄のWistarラットの大腿静脈に図8のTAT-STEPペプチドを1ml(1mg/ml)一回静脈注射した(図9)。注射1時間後に検出を行った。

20

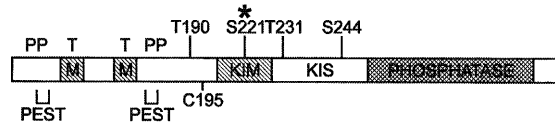
【0034】

虚血性脳損傷の緩和におけるペプチドの効能を確認するために、SEQ ID. No. 11のTAT-STEPペプチドを発作開始の直前および1.5時間直後に静脈投与した。これらの知見から、急性虚血性発作前後のいずれかにおける細胞透過性STEPペプチドの静脈注射が、虚血性脳損傷に対して有意な保護を与えることを実証できる。これら実験において、急性虚血性発作を発症させるために、Cadelario-Jalile et al., 2004に記載されている管内縫合法を使用して、雄のWistarラット(260～280g)に中位大脳動脈閉塞(MCAO)を90分間発症させた。MCAO直前(図12～図13)に、あるいはMCAOの1.5時間後(図14～図15)にTAT-STEPペプチドまたは生理的食塩水を注射した後、24時間再灌流を行った。発作開始の1.5時間後にペプチドを注射した場合でも、虚血性脳損傷を緩和できた事実は、内因性STEPの減成後のp38MAPKの二次活性が、細胞内死経路をトリガーしたことを示唆している。総合的に考えると、以上の知見は、修飾STEP-誘導ペプチドが、興奮毒性が関与する疾病の、NMDAR下流側にある代替的な治療標的対象になり得ることを暗示している。

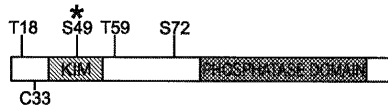
30

40

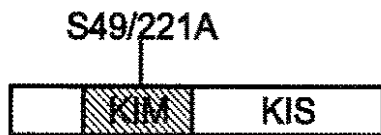
【図 1】



【図 2】



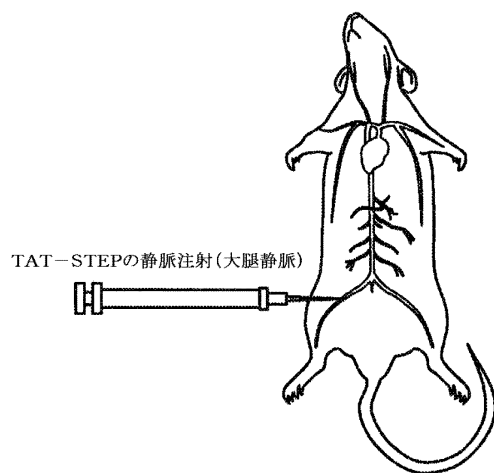
【図 3】



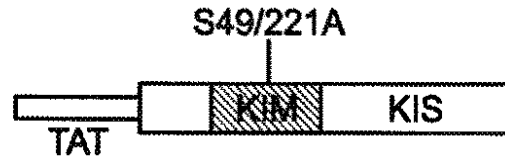
【図 4】



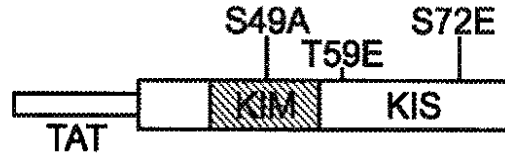
【図 9】



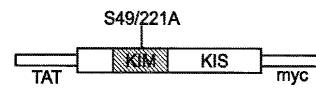
【図 5】



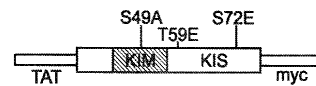
【図 6】



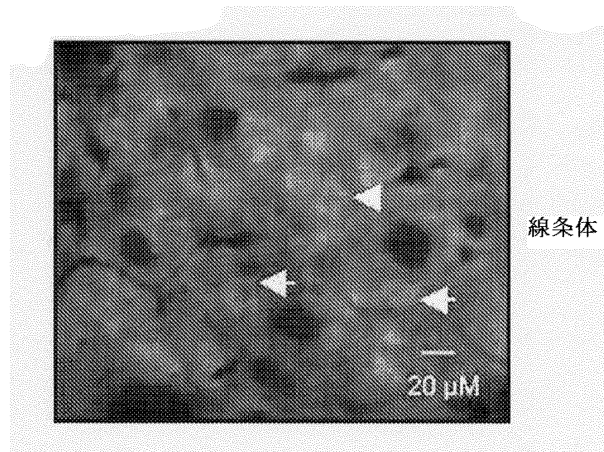
【図 7】



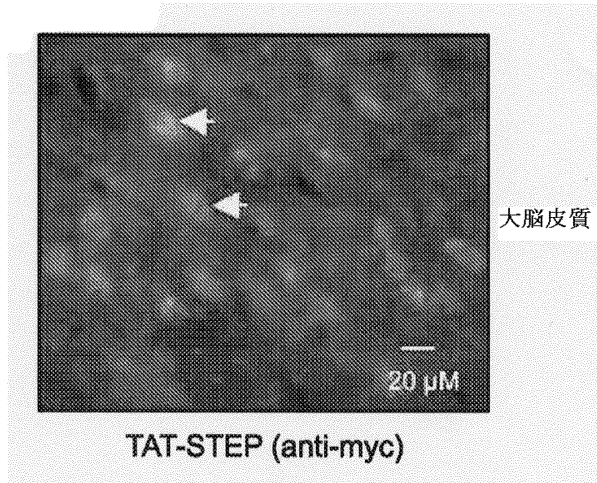
【図 8】



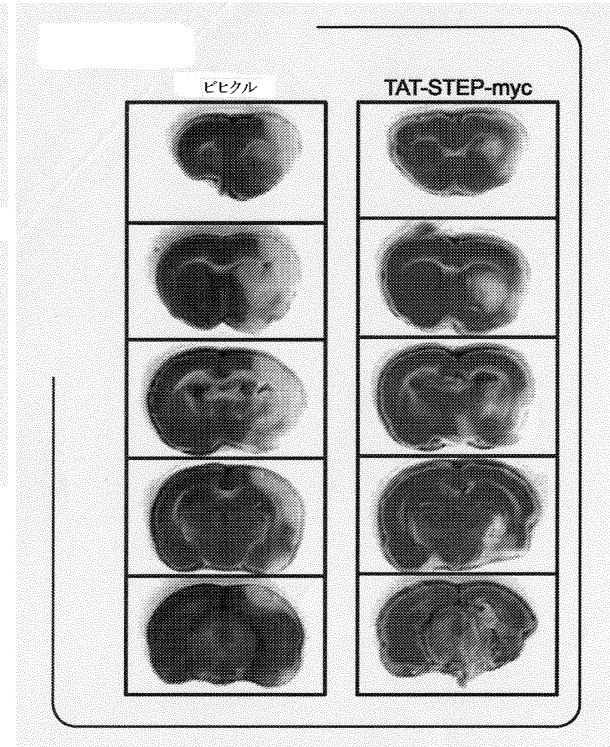
【図 10】



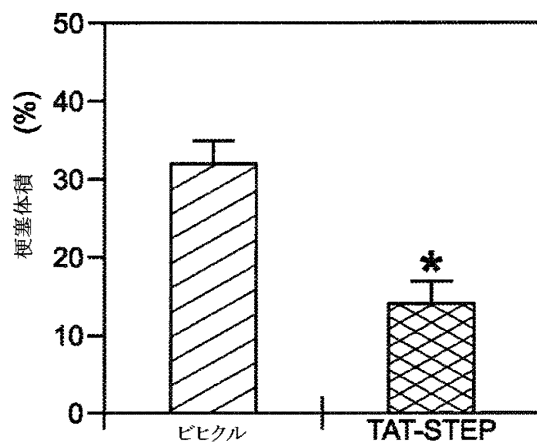
【図 1 1】



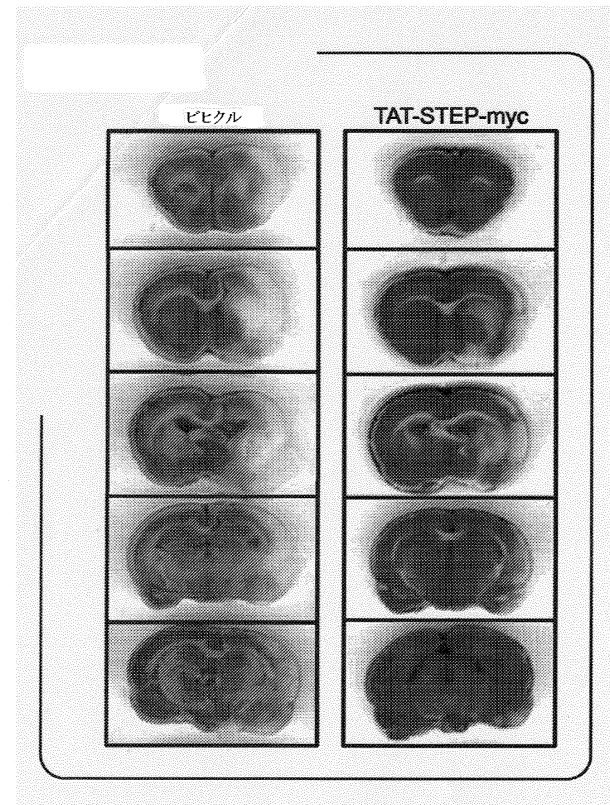
【図 1 2】



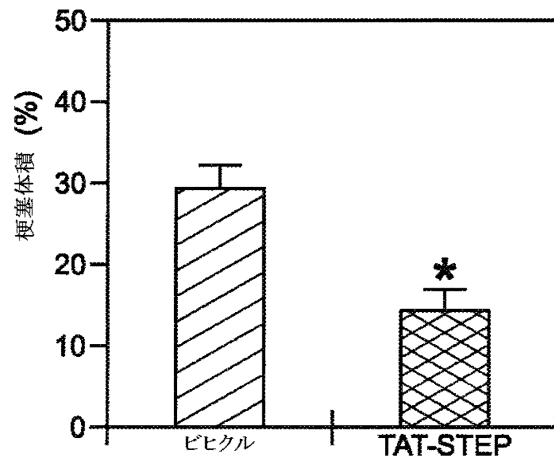
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



【配列表】

0006383151000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28
C 1 2 N 15/52 (2006.01) C 1 2 N 15/52 Z

(74)代理人 100167139

弁理士 飯田 和彦

(72)発明者 ポール, スロジット

アメリカ合衆国 ニューメキシコ 8 7 1 2 2, アルバカーキ, ノースイースト, グリーンアーバ
ー ロード 8 9 1 0

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 中島 庸子

審判官 山中 隆幸

(56)参考文献 Nature Neuroscience, 2002年, Vol. 6, p. 34-42
The Journal of Neuroscience, 2000年, Vol. 20, No
. 15, p. 5630-5638

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C07K 1/00-19/00

PubMed