

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4753088号  
(P4753088)

(45) 発行日 平成23年8月17日(2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年6月3日(2011.6.3)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K 48/00	Z N A
A 61 K 31/7088	(2006.01)	A 61 K 31/7088	
A 61 P 29/00	(2006.01)	A 61 P 29/00	
A 61 P 37/02	(2006.01)	A 61 P 37/02	
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1

請求項の数 14 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2006-537550 (P2006-537550)  
 (86) (22) 出願日 平成16年10月26日 (2004.10.26)  
 (65) 公表番号 特表2007-509186 (P2007-509186A)  
 (43) 公表日 平成19年4月12日 (2007.4.12)  
 (86) 國際出願番号 PCT/IL2004/000978  
 (87) 國際公開番号 WO2005/039480  
 (87) 國際公開日 平成17年5月6日 (2005.5.6)  
 審査請求日 平成19年10月17日 (2007.10.17)  
 (31) 優先権主張番号 158600  
 (32) 優先日 平成15年10月26日 (2003.10.26)  
 (33) 優先権主張国 イスラエル(IL)

(73) 特許権者 506143724  
 イッサム リサーチ ディベロプメント  
 カンパニー オブ ザ ヘブル ユニバー  
 シティ オブ エルサレム  
 イスラエル国 91390 エルサレム  
 ジヴァット ラム エドモンド ジエイ  
 サフラ キャンパス ハイ テク パーク  
 ピー. オー. ボックス 39135  
 (74) 代理人 100060715  
 弁理士 松原 伸之  
 (74) 代理人 100070116  
 弁理士 村木 清司  
 (74) 代理人 100112209  
 弁理士 中山 健一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗炎症薬としてのA C h Eアンチセンスデオキシオリゴヌクレオチド

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

炎症誘発性サイトカイン放出の抑制のための薬学的組成物の調製における A C h E 発現のインヒビターの使用であって、

前記組成物が、任意選択的に、薬学的に許容可能な添加剤、キャリア、および／または希釈剤をさらに含み、

前記 A C h E 発現のインヒビターは、A C h E 特異的リボザイム、A C h E 遺伝子の R N A 干渉用の R N A 配列、および A C h E に指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか一つである、A C h E 発現のインヒビターの使用。

## 【請求項 2】

前記 A C h E 発現のインヒビターが、A C h E に指向するヌクレアーゼ耐性アンチセンスヌクレオチドである、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 3】

前記 A C h E 発現のインヒビターが、配列番号 1、配列番号 2、および配列番号 7 のいずれか一つに記載の配列を有する A C h E に指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 2 に記載の使用。

## 【請求項 4】

前記炎症誘発性サイトカインが、I L - 1 、T N F 、I L - 6 、I L - 8 、I L - 1 2 、および I L - 1 8 のいずれか一つである、請求項 1 から請求項 3 のいずれか一項に記載の使用。

**【請求項 5】**

前記炎症誘発性サイトカインがIL-1である、請求項4に記載の使用。

**【請求項 6】**

前記炎症誘発性サイトカインの放出が、ストレス、細菌感染、薬物、照射、AChEインヒビターへの曝露、脳卒中、自己免疫疾患、化学物質頻回曝露感度、および任意の年齢依存性累積損傷のいずれか一つによって誘発される、請求項1から請求項5のいずれか一項に記載の使用。

**【請求項 7】**

必要とする哺乳動物被験体の炎症応答を誘発する容態の治療のための薬学的組成物の調製におけるAChE発現のインヒビターの使用であって、

10

前記AChE発現のインヒビターは、AChE特異的リボザイム、AChE遺伝子のRNA干渉用のRNA配列、またはAChEに指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか一つであり、

薬学的に許容可能な添加剤、キャリア、および／または希釈剤を任意選択的にさらに含む、AChE発現のインヒビターの使用。

**【請求項 8】**

必要とする哺乳動物被験体の関節、中枢神経系、胃腸管、心内膜、心膜、肺、眼、皮膚、および尿生殖器系の炎症の治療および／または予防のための薬学的組成物の調製におけるAChE発現のインヒビターの使用であって、

20

前記AChE発現のインヒビターは、AChE特異的リボザイム、AChE遺伝子のRNA干渉用のRNA配列、またはAChEに指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか一つであり、

薬学的に許容可能な添加剤、キャリア、および／または希釈剤を任意選択的にさらに含む、AChE発現のインヒビターの使用。

**【請求項 9】**

前記哺乳動物被験体がヒトであり、前記AChE発現のインヒビターが配列番号1および配列番号7のいずれか一つに記載のAChEに指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項7または請求項8に記載の使用。

**【請求項 10】**

前記哺乳動物被験体が非ヒト哺乳動物であり、前記AChE発現のインヒビターが配列番号2に記載のAChEに指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項7または請求項8に記載の使用。

30

**【請求項 11】**

前記薬学的組成物を0.001 μg/gと50 μg/gとの間の有効成分の投薬量を必要とする被験体に毎日使用する、請求項8から請求項10のいずれか一項に記載の使用。

**【請求項 12】**

前記有効成分の投薬量は、0.01～5.0 μg/gである、請求項9から請求項11のいずれか一項に記載の使用。

**【請求項 13】**

前記有効成分の投薬量は、0.15～0.50 μg/gである、請求項9から請求項12のいずれか一項に記載の使用。

40

**【請求項 14】**

前記容態が、ストレス、細菌感染、薬物、照射、AChEインヒビターへの曝露、脳卒中、自己免疫疾患、化学物質頻回曝露感度、および任意の年齢依存性累積損傷のいずれか一つから選択される、請求項9から請求項13のいずれか一項に記載の使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗炎症薬分野に関する。より詳細には、本発明は、特に、関節、中枢神経系、胃腸管、心内膜、心膜、肺、眼、皮膚、および尿生殖器系の治療および／または予防の

50

ための抗炎症薬としてのアセチルコリンエステラーゼ (AChE) ヌクレオチド配列のコードドメインにターゲティングするアンチセンスオリゴヌクレオチドの新規の使用を提供する。

#### 【0002】

##### 連邦政府資金による研究

本研究は、米国陸軍研究所および米国陸軍資材コマンド (U.S. Army Medical Research and Material Command) (DAMD) 17-99-1-9647 (1999年7月～2004年8月) および高等研究計画局 (DARPA) N66001-01-C-8015 (2001年5月～2004年5月) から資金援助を受けた。合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

10

#### 【背景技術】

#### 【0003】

本出願を通して記載の全ての刊行物は、本明細書中で参考として十分に援用され、本明細書中で引用した全ての引例が含まれる。

#### 【0004】

炎症は、病原体の侵入からの防御ならびに種々の型の損傷後の治癒および回復過程で重要な役割を果たす。しかし、過剰な炎症反応は有害であり、自己免疫疾患、神経変性、敗血症、外傷、および他の病的状態を引き起こし得るので、炎症応答の規模および持続時間は厳重に制御されなければならない。炎症反応の制御は、免疫応答（特に、抗炎症性サイトカインの分泌）および神経内分泌因子、特に、下垂体-副腎軸の活性化および糖質コルチコイドの分泌の両方によって媒介されることが長きにわたり認識されている。最近、神経機構も炎症応答の制限に関与することが明らかになっている。特に、コリン作動性ニューロンが急性炎症を阻害し、それにより、急速で局在化し、且つ適合性の抗炎症反射系が得られることが見出された (Tracy, 2002)。末梢で、アセチルコリン (ACh) は、主に、遠心性迷走神経によって放出される。アセチルコリンは、炎症誘発性サイトカイン TNF<sub>α</sub>、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-6、および IL-18 の産生を減少させるが、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を減少させない (Tracy, K. J. (2002) Nature 420, 853-859] )。相互に、IL-1 は、PC12 細胞およびラット皮質の両方で AChE を過剰産生させ (Li, Y. et al. (2000) J. Neurosci. 20, 149-155)、ループ閉じ、それにより、ACh は IL-1 を抑制し、AChE 産生の誘導を消耗させることが示唆される。

20

#### 【0005】

哺乳動物の脊髄内で、介在ニューロンのいくつかのサブセットは、一斉に同調した運動ニューロンの活動への集中した皮質入力を翻訳するように機能する (Noga, B. R. et al. (1995) J. Neurosci. 15, 2203-2217; Phelips, P. E. et al. (1990) J. Comp. Neurol. 291, 9-26; Sherriff, F. E. & Henderson, Z. (1994) Brain Res. 634, 150-154; Perlmutter, S. I. et al. (1998) J. Neurophysiol. 80, 2475-2494; Prut, Y. & Fetz, E. E. (1999) Nature 401, 590-594)。この複雑に制御された経路のアロスタティックな崩壊は、種々のストレッサー（グリシン作動薬（ストリキニン）もしくはコリン作動薬（サクシニルコリン）が含まれる）の存在下または筋無力性クリーゼもしくは麻酔後の影響下で起こり得る (Becker, C. M. et al. (1992) Neuron 8, 283-289; Millard, C. B. & Broomfield, C. A. (1995) J. Neurochem. 64, 1909-1918; Subramony, S. H. et al. (1986) Muscle Nerve 9, 64-68; Krasowski, M. D. et al. (1997) Can. J. Anaesth. 44, 525-534)。これらおよび他の急性ストレッサーは、大きな (massive) 振戦および痙攣性麻痺を誘導し、おそらく脊髄運動ニュ

30

40

50

ロンにおけるコリン作動性ホメオスタシスを持続するように作用する品質管理過程の不具合を反映し得る。これらのコリン作動性神經伝達の調整に加えて、損傷および化学的ストレッサーは共に脊髄における炎症誘発性サイトカイン（例えば、実験精髄損傷後のIL-1）またはアセチルコリンエステラーゼ（AChE）の有機リン酸エステルの上方制御を誘導する（Wang, C. X. et al. (1997) *Brain Res* 759, 190-196; Svensson, I. et al. (2001) *Neurotoxicology* 22, 355-362; Dyer, S. M. et al. (2001) *Toxicology* 169, 177-185）。したがって、炎症誘発性サイトカインの末梢放出におけるコリン作動性制御により（cholinergic control）（Bernik, T. R. et al. (2002) *J. Exp. Med.* 195, 781-788; Borovikova, L. V. et al. (2000) *Nature* 405, 458-462; Tracey, K. J. et al. (2001) *Faseb J.* 15, 1575-1576）、コリン作動性アロスタシスが中枢神經系（CNS）ニューロンにおいても炎症誘発応答を制御するのに役立つかどうかという疑問が呼び起こされる。

#### 【0006】

脊髄運動ニューロンがAChに対して応答するので、推測される品質管理過程はコリン作動性神經伝達の際に調節効果を發揮するはずである。品質管理過程は迅速に機能する必要があるので、短命の分子が関与する可能性が高い。さらに、広範囲にするために、提案された機構は幅広く多様なストレッサーの存在下で誘導される可能性が高い。通常は稀なストレス誘導性アセチルコリンエステラーゼ変異型AChE-Rは、このような応答のインデューサーからの全ての要求を満たす。AChE-Rは、心理学的、化学的、および物理的ストレス下で過剰産生される（Soreq, H. & Seidman, S. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294-302に概説されている）。並行ストレス応答は、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）（Kauffer, D. et al. (1998) *Nature* 393, 373-377）およびゲノム的に関連した小胞アセチルコリン輸送体（VACHT）（Weihe, E. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3547-3552）の下方制御に関与し、これらは共にアセチルコリンの產生および小胞封入を制限する一方でその分解を促進する。これにより、多くのストレスに関連するコリン作動性過興奮が下方制御される。より長い範囲では、このストレス応答は、コリン作動性神經伝達のアゴニストおよびアンタゴニストの両方に対する過敏症（Meshorer, E. et al. (2002) *Science* 295, 508-512）ならびにAChE-R mRNAのアンチセンス崩壊下で除去され得る異常な運動活性（Cohen, O. et al. (2002) *Mol. Psychiatry* 7, 874-885）に関連する。したがって、脊髄運動ニューロンによるストレス管理の重要な構成要素としてAChE-Rレベルの精巧に調節された制御として現れる。AChレベルを抑制するAChE-Rの過剰発現により、IL-1产生が増加する。これが事実である場合、AChE-Rのアンチセンス抑制（Brenner, T. et al. (2003) *Faseb J.* 17 (2), 214-222）により、AChレベルが増加し、CNSニューロンにおける炎症誘発性サイトカインレベルが減少するであろう。

#### 【0007】

対照的に、特に脳内でのサイトカインの並行炎症応答および產生により、アルツハイマー病（Arendt, T. (2001) *Neuroscience* 102: 723-65）、多発性硬化症（Thornton, A. E. et al. (2002) *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 8: 395-409）、後天性免疫不全症候群（Navia, B. A. et al. (1986) *Ann. Neurol.* 19: 517-24）、および感染症（Capuron, L. et al. (1999) *Psychiatry Med.* 29: 291-7）のような病状に起因する記憶機能の疾患関連変化が、少なくとも部分的に免疫活性化によって媒介されることが示唆されている（Rachal Pug 50

h C . , et al . ( 2 0 0 1 ) *Neurosci . Biobehav . Rev .* 25 : 2 9 - 4 1 ; Maier S . F . and Watkins L . R . ( 1 9 9 8 ) *Psycho . Rev .* 1 0 5 : 8 3 - 1 0 7 ; Yirmiya R . ( 1 9 9 7 ) *Current Opinion in Psychiatry ,* 1 0 : 4 7 0 - 4 7 6 ; Yirmiya , R . et al . ( 2 0 0 2 ) *Neurobiology of Learning and Memory ,* 7 8 : 3 7 9 - 3 8 9 。ヒト(癌およびC型肝炎患者が含まれる)(Capuron L . et al . ( 2 0 0 1 ) *Psychosom . Med .* 6 3 : 3 7 6 - 8 6 ; Meyers C . A . ( 1 9 9 9 ) *Adv . Exp . Med . Biol .* 4 6 1 : 7 5 - 8 1 )および実験動物(Gibertini M . ( 1 9 9 6 ) *Adv . Exp . Med . Biol .* 4 0 2 : 2 0 7 - 1 7 ; Oitzl M . S . et al . ( 1 9 9 3 ) *Brain Res .* 6 1 3 : 1 6 0 - 3 )のサイトカイン誘導性記憶障害は、この概念を支持する。したがって、学習および記憶に影響を与えることが知られている多くの他のストレスの多い刺激(Kim J . J . and Diamond D . M . ( 2 0 0 2 ) *Nat . Rev . Neurosci .* 3 : 4 5 3 - 6 2 )のように、炎症は記憶機能を顕著に変化させることができる。内毒素(リポ多糖類)(全てのグラム陰性細菌の外膜で見出される複合糖脂質)の投与は、ヒトにおける感染に対する急性宿主応答の認知的所産(consequence)の評価に役立つ。内毒素投与により、発熱、倦怠、ならびにサイトカイン(特に、TNF-、IL-6、IL-1、およびIL-1ra、およびコルチゾール)(概説については、Burrell R . ( 1 9 9 4 ) *Circ . Shock .* 4 3 : 1 3 7 - 5 3 を参照のこと)およびプロテアーゼ(Fahmi H . and Chaby R . ( 1 9 9 4 ) *Immunol . Invest .* 2 3 : 2 4 3 - 5 8 )の產生および分泌の増加が誘導される。健常なヒトでは、内毒素誘導性サイトカイン分泌は、言語および非言語陳述記憶機能の障害に相関する(Reichenberg A . et al . ( 2 0 0 1 ) *Arch . Gen . Psychiatry* 5 8 : 4 4 5 - 5 2 )。

#### 【 0 0 0 8 】

記憶障害および深在性の神経行動症状および神経内分泌症状も実験動物におけるサイトカインの内毒素誘導性分泌に相関すると報告されている(Hauss-Wegryniak B . et al . ( 2 0 0 0 ) *Neuroreport* 1 1 : 1 7 5 9 - 6 3 ; Pugh C . R . et al . ( 1 9 9 8 ) *Brain Behav . Immun .* 1 2 : 2 1 2 - 2 9 ; Shaw K . N . et al . ( 2 0 0 1 ) *Behav . Brain Res .* 1 2 4 : 4 7 - 5 4 )。これらの所見によりサイトカインが記憶に対する内毒素の影響の媒介に関与すると示唆される一方で、これらのサイトカインの活動に関連する神経伝達経路はほとんど知られていない。本発明者らは、中枢神経系(CNS)でコリン作動性応答が認識機能のいくつかの重要な態様(注意力、学習、および記憶が含まれる)で顕著に関与するので、コリン作動性過程が内毒素応答に関連するという可能性を調査し始めた(概説については、Levin E . D . and Simon B . B . ( 1 9 9 8 ) *Psychopharmacology* (Berl ) 1 3 8 : 2 1 7 - 3 0 ; Segal M . and Auerbach J . M . ( 1 9 9 7 ) *Life Sci .* 6 0 : 1 0 8 5 - 9 1 を参照のこと)。さらに、内毒素は、脳のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性を減少させ(Willard L . B . et al . ( 1 9 9 9 ) *Neuroscience* 8 8 : 1 9 3 - 2 0 0 )、これは精神的ストレスの効果と類似している(Kaufer ( 1 9 9 8 ) id ibid )。末梢では、内因性およびが陰性アセチルコリン(ACh)は、内毒素刺激ヒトマクロファージからの炎症誘発性サイトカインの放出を弱める(Borovikova ( 2 0 0 0 ) id ibid . ; Bernik ( 2 0 0 2 ) id ibid . ; Tracey ( 2 0 0 1 ) id ibid . )。ACh加水分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)は、AChEがAChレベルを制御し、AChEインヒビターが臨床的および実験的パラダイムの両方において認識機能を改善するので、これらの突起に特に関連する可能性があると見なされた(Palmer A . M . ( 2 0 0 2 ) *Trends Pharmacol . Sci .* 2 3 : 4 2 6 - 3 3 50

; Weinstock M. (1995) Neurodegeneration 4 : 349 - 56). さらに、AChEの過剰発現は、急性および慢性のストレスの多い発作によって誘発され (Meshorer (2002) id ibid.)、トランスジェニックマウスで証明されるように、進行性記憶障害を誘導する (Beeri R. et al. (1995) Curr. Biol. 5 : 1063 - 71).

#### 【0009】

AChE遺伝子発現のストレス誘導性転写活性化は、通常は稀な「読み過ぎし」AChEスプライス変異型の蓄積に関連する (Soreq and Seidman (2001) id ibid.). 短期では、過剰なAChE-Rはストレス誘導性コリン作動性過興奮を誘導し (Kauffer (1998) id ibid.), 長期では、コリン作動性アゴニストおよびアンタゴニストに対する過敏症を誘導する (Meshorer (2002) id ibid.). AChE-SおよびAChE-Rの両方を過剰発現するマウスは、樹状細胞が漸増し、且つ脊椎が消失し (Beeri R. et al. (1997) J. Neurochem. 69 : 2441 - 51), 不安応答が変化する (Erk C. et al. (2001) J. Neurochem. 77 : 638 - 46). さらに、これらのマウスは、早期発症性の社会的認識の欠損およびストレスの多い発作に対する応答性の悪化を示す。これらを、従来の抗コリンエステラーゼ治療によって短期間で改善することができるか、AChE-RのmRNAの破壊を特異的に誘導することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドによってより長い期間で改善することができ (Cohen (2002) id ibid.), AChE-Rが主な原因であることが示唆される。したがって、AChE-R産生により、認識に対して正の効果および負の効果の両方が得られ得る。

#### 【0010】

学習および記憶におけるコリン作動性機構の役割、ストレス応答におけるAChE-Rの関与、AChによる炎症誘発性サイトカイン産生の抑制、および記憶機能に対する内毒素の影響により、内毒素誘導性記憶の変化におけるAChE-Rの関与が示唆される。ストレスの多い発作により、末梢 (例えば、小腸) でもAChE-R産生が誘導され、嫌悪刺激に対する応答におけるこの産生の誘導の失敗により、比較的穏やかなストレッサーに対して過敏症を引き起こす (Shapiro M. et al. (2000) Hum. Mol. Genet. 9 : 1273 - 1281)。これにより、末梢AChEの調整が内毒素誘導性の認識の変化の代替マーカーとしても役立ち得るという可能性が高まった。しかし、血漿では、AChE-Rのタンパク質分解性切断により、造血ストレス応答を容易にする短い免疫陽性C末端ペプチドが血清中に出現する (Grisaruk D. et al. (2001) Mol. Med. 7, 93 - 105)。したがって、本発明者らは、健常なヒトボランティアにおけるAChE活性およびAChE-R切断に対する内毒素投与の影響を調査し、これらのパラメータ間の潜在的な相関関係、サイトカインまたはコルチゾールの分泌、および記憶機能における経時変化を検討した。海馬および前頭葉前方構造の協奏的機能による事実および事象の意識的にアクセス可能な記録に関する陳述記憶に加えて (Kim and Diamond (2002) id ibid.), 本発明者らは、認識機能に必要な情報の一時的保存および操作に関する作業記憶に対する内毒素の影響およびAChE切断との相互作用を評価し (Baddeley A. (1992) Science 255 : 556 - 9), 前頭葉前方コリン作動性機構に関与することが示されている (Furey M. L. et al. (2000) Science 290 : 2315 - 9)。

#### 【0011】

非常に低濃度での優れた特異性および作用の治療薬の予想により、種々のmRNAに対してターゲティングされるアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ON) の開発が刺激される。細胞のRNAプロセシング機構へのアクセス、特定の細胞型と使用される化学的防御様式との間の潜在的な相違が依然として問題である。目的の細胞がCNS内に存在する場合、アクセスの問題は、血液脳関門の存在によってより悪化する (Tavitian

, B. et al. (1998) Nat. Med. 4, 467 - 471)。それにもかかわらず、靈長類でさえもいくつかの試みが成功している (Kasuya, E. et al. (1998) Regul. Pept. 75 - 76, 319 - 325; Mizuno, M. et al. (2000) Endocrinology 141, 1772 - 1779)。本発明者らは、培養ラット細胞およびヒト細胞 (Galayam, N. et al. (2001) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11, 51 - 57; Grisaru, D. et al. (2001) id ibid.)、生きたマウス (Cohen et al. (2002) id ibid.; Shohami, E. et al. (2000) J. Mol. Med. 78, 228 - 236)、ならびにラット (Brenner, T. et al. (2003) id ibid.) におけるストレス誘導性の変化後に正常な細胞機能および生理学的機能に回復することができるストレス誘導性 AChE - R mRNA のアンチセンス抑制を以前に証明している。これらの全研究における試験結果が標的タンパク質および mRNA の直接的測定に制限される一方で、作業仮説により、コリン作動性均衡のアンチセンス回復に対する抗炎症効果が予想された。ここでは、本発明者らは、カニクイザルにおける注射ストレス下でのストレス誘導性過剰産生および正常な AChE - R レベルの選択的 AS - ON 回復に取り組むことを目的とした実験結果を報告する。所見は、AS - ON 応答に対する特定のニューロン型の感受性の相違および脊髄ニューロンにおけるコリン作動性均衡の回復後の IL - 1 および IL - 6 の付随する抑制を証明する。

## 【0012】

10

本発明者らは、以前に、AChE の一般的なコード領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが AChE - R 産生の抑制に有用であることを見出している (WO 98 / 26062 を参照のこと)。特に、本発明者らは、重症筋無力症治療のための AChE 配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を示している (WO 03 / 002739 および US 10 / 402,016)。

## 【0013】

本発明者らの本明細書中に記載の結果に基づいて、本発明は、新規の抗炎症薬としての AChE mRNA 配列に対して指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドの新規の使用を提供する。

## 【0014】

30

本発明の他の目的および利点は、説明するにつれて明らかとなる。

## 【特許文献1】WO 98 / 26062 号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0015】

第一の態様では、本発明は、抗炎症薬としての AChE 発現のインヒビターの使用について言及する。好ましくは、AChE 発現のインヒビターは、以下の配列の任意の一つを有する AChE に指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである：

5' CTGCCACGTTCTCCCTGCACC 3' (配列番号1);

5' - CTGCAATATTTCTTGCACC - 3' (配列番号2); および

5' CTGCCACGTTCTCCCTGCAC\* C \* C \* 3' (配列番号7) (配列中、三つの 3' 末端残基は、2-O-メチル基で修飾されている (\*))。

## 【0016】

40

別の態様では、本発明は、炎症誘発性サイトカイン放出のサプレッサーとしての本明細書中に定義の AChE 発現のインヒビターの使用を提供する。好ましくは、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

## 【0017】

さらなる態様では、本発明は、活性成分として上記定義の AChE 発現のインヒビターを含む、炎症応答を誘発する容態の治療のための薬学的組成物を提供することを意図する。任意選択的に、組成物は、添加剤、キャリア、および / または希釈剤をさらに含む。好

50

ましくは、A C h E 発現のインヒビターは、A C h E に指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。より好ましくは、アンチセンスヌクレオチドは、配列番号 1 に記載の配列を有する。

#### 【 0 0 1 8 】

なおさらなる態様では、本発明は、活性成分として上記定義の A C h E 発現のインヒビターを含み、任意選択的に、添加剤、キャリア、および / または希釈剤のいずれか一つをさらに含む、関節、中枢神経系、胃腸管、心内膜、心膜、肺、眼、皮膚、および尿生殖器系の炎症の治療および / または予防のための薬学的組成物を提供する。好ましくは、A C h E 発現のインヒビターは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。より好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 に記載の配列を有する。

10

#### 【 0 0 1 9 】

本明細書中に定義の A C h E 発現のインヒビターは、本発明の薬学的組成物の調製で使用すべきである。

#### 【 0 0 2 0 】

最後に、本発明は、有効量の本明細書中に定義の A C h E 発現のインヒビターまたは活性成分として本明細書中に定義のように調製した A C h E 発現のインヒビターを含む組成物を投与する工程を含む、炎症応答を誘発する容態の治疗方法を教示する。

#### 【 0 0 2 1 】

好ましくは、本発明の方法で使用すべき A C h E 発現のインヒビターは、より好ましくは、配列番号 1 に記載の配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

#### 【 発明を実施するための最良の形態 】

#### 【 0 0 2 2 】

明白にするために、以下の略語および用語を本明細書中に定義する。

#### 【 0 0 2 3 】

- A C h E : アセチルコリンエステラーゼ
- A C h E - R : アセチルコリンエステラーゼの「読み過ごし」変異型またはイソ型、その m R N A は偽イントロン I 4 を含む。

#### 【 0 0 2 4 】

- A C h E - S : アセチルコリンエステラーゼのシナプス変異型またはイソ型
- A S - O N : アンチセンスオリゴヌクレオチド

30

#### - C N S : 中枢神経系

- E N 1 0 1 : ( A S 3 とも呼ぶことができる ) ヒト、ラット、またはマウスの A C h E m R N A に対してターゲティングするアンチセンスオリゴヌクレオチド ( それぞれ h E N 1 0 1 、 r E N 1 0 1 、または m E N 1 0 1 )

- E 3 0 1 : ( m E N 1 0 1 とも呼ぶことができる ) マウスの A C h E m R N A に対してターゲティングするアンチセンスオリゴヌクレオチド

#### - i . v . : 静脈内

#### - i . p . : 腹腔内

#### - o . g . : 経口摂食

#### - p . o . : 経口

40

アンチセンスオリゴヌクレオチド : A C h E m R N A 配列に対して本質的に逆の相補配列を含むヌクレオチド。ヌクレオチドは、好ましくは、オリゴヌクレオチドであるが、リボヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、またはその混合物も本発明によって意図される。そのヌクレアーゼ耐性を増強するため、その膜横断能力を改善するため、またはその両方のためにアンチセンスオリゴヌクレオチドを修飾することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは線状であり得るか、二次構造を含み得る。リボザイム活性などの酵素活性も含み得る。

#### 【 0 0 2 5 】

コリン作動性アロスタシスおよび C N S 炎症過程が相互関連するかどうかを明らかにするために、本発明者らは、h E N 1 0 1 ( 配列番号 1 ) ( A C h E - R m R N A の破壊

50

を誘導する 2' - オキシメチル化アンチセンスオリゴヌクレオチド) で一週間毎日処置した後のカニクイザル由来の脊髄ニューロンを研究した。hEN101は、血漿 AChE 活性のストレス誘導性増加を防止し、ニューロンの AChE - R mRNA およびインターロイシン1 および6 レベルを用量および細胞サイズ依存性要旨生きで選択的に抑制した。対照的に、VACHT およびCHAT レベルは、全ての取扱ったストレスを受けたサルで用量依存性に減少し、対応する遺伝子の明らかな調節が示された。これらの所見は、靈長類 CNS におけるコリン作動性アロスタシスと炎症応答との間の原因となる関係を暗示し、これらの両障害の管理のための AChE - R 蓄積へのアンチセンス介入が示唆される。

## 【0026】

10

第一の態様では、本発明は、抗炎症薬としての AChE 発現のインヒビターの使用について言及する。

## 【0027】

本明細書中で定義するように、AChE 発現のインヒビターは、特に、その mRNA との相互作用によって AChE 遺伝子の発現を遮断または妨害することができる任意の薬剤である。したがって、インヒビターは、AChE 特異的リボザイム、AChE 遺伝子の RNA 干渉様の二本鎖ヌクレオチド配列、または AChE に指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。アンチセンスヌクレオチドは、好ましくは、ヌクレアーゼ耐性を示す。

## 【0028】

20

好ましくは、AChE 発現のインヒビターは、AChE - R mRNA を選択的に阻害し、その結果として選択的に AChE - R イソ型の発現を阻害する。これに関して、可溶性 AChE - R イソ型を阻害することができる任意の薬剤はまた、抗炎症薬であり得る。したがって、AChE - R の発現および機能を遮断することができる推定分子は、抗炎症薬であろう。

## 【0029】

実施例 1 に示すように、処置サルの血漿中の BuChE レベルは、有意に変化せず、AChE のみに対する選択的アンチセンス効果の概念を支持する。血漿 AChE 活性およびニューロン AChE mRNA 標識は共に、150 μg / Kg の hEN101 で処置したサルで増加し、毎日の試験での産生の増加を反映していた(表 1 およびデータ示さず)。あるいはまたは加えて、hEN101 の p.o. 投与のためのカニューレ挿入に関連する穏やかなストレスが原因であり得る。より高用量の 500 μg / Kg hEN101 で同様に処置したサルにおける血漿 AChE 活性の抑制から示されるように、hEN101 の非存在下での血漿 AChE の増加はより高くなる可能性が高いであろう。この低 hEN101 用量下での血漿 AChE の薬物誘導性の減少で見かけ上 3 時間の遅延が認められたが、おそらく、その標的タンパク質合成のアンチセンス薬による防止を反映している。これは、in vivo での靈長類 AChE - R mRNA の短い半減期をさらに示し、このことは、本発明者らおよび他の以前の所見と一致する(Brenner et al. (2003) id ibid.; Chan, R.Y. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 9727 - 9733)。

30

## 【0030】

40

AChE - R mRNA 陽性ニューロン画分、AChE - R mRNA 標識の強度、および AChE - R mRNA 標識過程を有する細胞画分は全てアンチセンス治療下で減少した(図 2A ~ 2J および 3A ~ 3C)。アンチセンス抑制に対する AChE - R 過剰産生のニューロン感受性は、細胞体のサイズに反比例して現れ、おそらく、異なる膜および/または代謝特性、異なる細胞体積、およびこれらの特性の寄与の組み合わせを反映する。さらに、VACHT および CHAT のアンチセンス依存性減少は、小胞再利用の減速を示す可能性が高く(Soreq, H. et al. (1990) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 87: 9688 - 9692)、コリン作動性神経伝達のペースを潜在的に調整する。ナイーブ条件下で、AChE - S mRNA は AChE - R

50

mRNAよりも多数の脊髄神経突起で出現し、ラット脊髄前角でVACHT標識に類似のパターンが得られた(Weihet al.(1996)id ibid.)。予想されるように、hEN101処置は、ニューロンAChE-R mRNAを使用すると有効性が高く、AChE-S mRNAを使用すると有効性がずっと低い。しかし、ニューロンAChE-S mRNA標識強度の減少は、ニューロンAChE-S mRNAレベルの限定的減少も反映している可能性が高かった。hEN101処置下で、過程中のAChE-S mRNAは減少し、ストレス下でのげっ歯類および靈長類のAChE-S mRNA転写物の樹状突起転座の共通の経口が示唆された(Meschorer et al.(2002)id ibid.)。この相違により、ナイーブサルが実際にストレス下に無いという概念(動物数が厳格に制限されている研究における重要な事実)がさらに強調された。処置サルの神経突起におけるAChE-S mRNAの減少は、治療および/または薬物で誘導することができる。処置から7日後、一次AChE-S mRNA転写物からストレス誘導性アンチセンス抑制性AChE-R mRNAへのシフトを、神経突起中に視覚化することができる(図2A~2J)。

#### 【0031】

好ましくは、AChE発現のインヒビターは、以下の配列の任意の一つを有するAChEに指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである:

5' CTGCCACGTTCTCCCTGCACC 3' (配列番号1); および  
5' CTGCCACGTTCTCCCTGCA\*C\*C\* 3' (配列番号7) (配列中、三つの3'末端残基は、2-O-メチル基で修飾されている(\*))

配列番号1または配列番号7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書中でEN101またはhEN101ともいう。

#### 【0032】

AChEに指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、過去に本発明者らによって説明されており(WO 03/002739)、神経筋病変である重症筋無力症の治療で十分に効果があることが示された(出願人の同時係属US10/402,016)。本発明者らの本明細書中に記載の結果では、実施例5および図4に示すように、AChEに指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドは炎症誘発性サイトカインであるIL-1の放出を減少させることができた。

#### 【0033】

実施例1に示すように、運動ニューロン中のAChE-R mRNAレベルの影響は最小であった。しかし、脊髄のより小さなニューロン中のAChE-R産生の消失は、VACHTおよびChATのストレス誘導性減少にもかかわらず、処置組織内のAChシグナル伝達を潜在的に増加させた(Kauffer et al.(1998)id ibid.)。これにより、AChE-RはCNSにおけるAChレベルの調節における主な役割を担うと考えられる。他の所見は、脊髄介在ニューロンの電気生理学的活動パターンの大きな変動性および(Perlmutter(1996)id ibid.)脊髄介在ニューロン中の運動前に支持された(premovement instructed)遅延活動(Prut and Fetz(1999)id ibid.)を示す。本発明者らにより、小細胞(おそらく、介在ニューロン)内でのAChE-Rレベルの最も大きな変動性が認められ、これらの調整はこれらのニューロン間の広範な電気生理学的変動性に寄与し得ることが示唆された。したがって、通常の条件下で、脊髄の後角に局在した小コリン作動性ニューロン中のAChE-R発現は、運動ニューロン活動(例えば、運動反射)の制御に寄与し得る。運動ニューロンへのコリン作動性入力に影響を与えるC末端構造は、運動ニューロン自体に接近して発生すると見なされた(Hellstrom(1999)id ibid.)。この研究により、この起源が腰髄の前角および中間帯に存在するAChE mRNA陽性介在ニューロンおよび小コリン作動性ニューロンに帰すると考えられる。運動ニューロン細胞体周囲のVACHT標識C末端数は、取扱った全動物で減少した。この所見により、この減少は取扱いストレス(handling stress)に帰するとされ、これは海馬ニューロン中のChATおよびVACHT mRNAのスト

10

20

30

40

50

レス誘導性減少と一致した (Kauf er et al. (1998) id ibid.)。

**【0034】**

さらなる AChE に指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドも記載されており、mEN101について実施例16で証明するように、潜在的に、hEN101 と同一の抗炎症効果を有する。これらは、マウスおよびラットの AChE 相同配列由来のアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、以下の配列を有する：

mEN101 5' - C T G C A A T A T T T C T T G C A C C - 3' (配列番号2)  
[Grifman and Soreq, (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7(4): 351-9]  
EN301とも呼ばれる。

**【0035】**

rEN101 5' - C T G C C A T A T T T C T T G T A C C - 3' (配列番号3)

hEN103 5' - G G G A G A G G A G G A G G A A G A G G - 3' (配列番号4)  
[Grisaru, D. et al. (1999) Mol. Cell Biol. 19(1): 788-95]

実施例16は、どのようにして mEN101 (EN301) の投与によって脳内の AChE-R レベルを減少することができたのかを証明する。これを、血液脳関門の横断の際に直接行うことができるか、マクロファージによる炎症誘発性サイトカインの産生を抑制する末梢 AChE レベルの減少、ACh レベルの増加によって間接的に行うことができる。

**【0036】**

したがって、別の態様では、本発明は、炎症誘発性サイトカイン放出のサプレッサーとしての本明細書中に定義の AChE のインヒビターの使用を提供する。好ましくは、AChE のインヒビターは、配列番号1、配列番号2、および配列番号7 のいずれか一つに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。より好ましくは、AChE のインヒビターは、配列番号1 または配列番号7 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

**【0037】**

公知の炎症誘発性サイトカインは、特に、IL-1、TNF、IL-6、IL-8、IL-12、およびIL-18 である。好ましくは、IL-1 は、配列番号1、配列番号2、および配列番号7 のいずれか一つに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドによって抑制されるべき炎症誘発性サイトカインである。

**【0038】**

炎症誘発性サイトカイン放出を、後天的な化学的起源または遺伝子起源の因子によって誘発することができる。特に、これらは、ストレス、細菌感染、薬物、照射、AChE インヒビターへの曝露、脳卒中、自己免疫疾患、化学物質頻回曝露感度、または任意の年齢依存性累積損傷であり得る。

**【0039】**

炎症誘発性サイトカイン放出を誘発する公知の条件は、細菌感染、薬物、照射、AChE インヒビターへの曝露、脳卒中、自己免疫疾患、化学物質頻回曝露感度、または任意の年齢依存性累積損傷である。

**【0040】**

AChE-R の AS-ON 阻害後のストレス誘導性脊髄 IL-1 過剰産生および脊髄 IL-1 抑制は、CNS 中の抗炎症応答のコリン作動性調節の概念を支持する。このスキームにしたがって、「ストレスを与えられた」ニューロンは、高レベルの AChE-R を産生し、ACh を減少させ、通常の条件下で IL-1 を発現しない CNS ニューロン中の IL-1 を連続的に産生する。ストレス誘導性 AChE-R のアンチセンス抑制に

10

20

30

40

50

より、AChレベルが増加し、その後CNSニューロン中のIL-1産生を抑制することができる。CNS内の炎症応答のこのようなコリン作動性調節は、コリン作動性不均衡下（例えば、有機リン酸化合物への曝露）での炎症誘発性サイトカインの増加（Svensson (2001) *id ibid.*; Dyer (2001) *id ibid.*）およびコリン作動性均衡の回復下（例えば、アンチセンス処置下、図6を参照のこと）での同一のサイトカインの減少の両方を説明することができる。これにより、保守的なAChEインヒビター（ピリドスチグミン）と比較したEN101を毎日経口投与したEAMGラットにおける生存状態および臨床状態の改善が新規に理解される（Brenner (2003) *id ibid.*）。

## 【0041】

10

IL-1は、Col2遺伝子発現の抑制によって軟骨細胞で炎症を誘導することが公知である（Hollander et al. (1994) *J. Clin. Invest.* 93: 1722; Hollander et al. (1995) *J. Clin. Invest.* 96: 2859; Bi et al. (1999) *Nat. Genet.* 22: 85; Lefebvre et al. (1997) *Mol. Cell Biol.* 17: 2336; Murakami et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 3687; Tanaka et al. (2000) *Mol. Cell Biol.* 20: 4428）。したがって、本明細書中に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドによるIL-1放出の阻害により、軟骨が再生され得る。したがって、本発明はまた、軟骨再生のインデューサーとしての本明細書中に定義のAChE発現のインヒビターの使用を提供する。

## 【0042】

20

本発明で抗炎症薬として使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、ヌクレアーゼ耐性を示す。所与のオリゴヌクレオチドに対するヌクレアーゼ耐性を付与する改変が多数存在する。例えば、リン酸ジエステルヌクレオチド間結合のホスホロチオエート結合への置換、一つまたは複数のヌクレオチドの2'-水酸基の2'-O-メチル基への置換、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の3'末端への生理学的条件下でループ構造を形成することができるヌクレオチド配列の付加によってオリゴヌクレオチドをヌクレアーゼ耐性にすることができることを開示したWO98/26062を参照する。ループ形成構造の例は、配列5' CGCGAAGCGであり、これは、ヌクレオチド耐性を付与するために所与のアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に付加することができる。

## 【0043】

30

ホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチドは、一般に、安全且つ副作用が無いと見なされる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、部分的にホスホロチオエートとして有効であり、部分的に2'-O-メチル保護オリゴヌクレオチドとしてより有効であることが見出されている。WO98/26062は、約20のヌクレオチド間結合のうち三つのホスホロチオエート結合を含むAChEアンチセンスオリゴヌクレオチドが、一般に、約1μMと10μMとの間の濃度で使用することが安全であることを教示している。しかし、長期適用については、分解した場合に有毒な基を放出しないオリゴヌクレオチドが好ましいかもしれない。これらには、2'-O-メチル保護オリゴヌクレオチドが含まれるが、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは含まれない。ホスホロチオエート保護における2'-O-メチル保護のさらなる利点は、AChE抑制に必要なオリゴヌクレオチド量が減少することである。この相違は、2'-O-メチル保護オリゴヌクレオチドを使用した場合に得られる二重鎖の安定性の改善に関連すると考えられる（Lessnik, E. A. & Freier, S. M., *Biochemistry* 37, 6991-7, (1998))。2'-O-メチルオリゴヌクレオチドのより高い有効性についての別の説明としては、この修飾によりオリゴヌクレオチド鎖の細胞膜の貫通を促進することができるということである。2'-O-メチル保護のさらなる利点は、ヌクレアーゼ媒介分解に対する保護がより優れており、それにより、この方法で保護されたアンチセンスオリゴ

40

50

スクレオチドの有用な寿命が延長されることである。

【0044】

さらに、上記定義のAChEのインヒビターを、解熱薬として使用することもできる。好ましくは、AChEのインヒビターは、配列番号1、配列番号2、および配列番号7のいずれか一つに記載のアンチセンスオリゴスクレオチドである。

【0045】

麻酔薬に応答して、神経の調節により、体温の急速な低下が誘導される。実施例12に示すように、宿主AChE-Rが上昇したトランスジェニックマウスは、株、性、および年齢適合コントロールと比較して、本質的により高い体温を示す。さらに、その体温は、麻酔下で高温が維持され、調節の悪化およびAChE-Rと発熱応答との一時的関連を示す。したがって、AChE-R発現のインヒビターはまた、炎症反応の特徴を示す体温上昇の低下に効果がある。10

【0046】

本発明によれば、アンチセンスオリゴスクレオチドの投薬量は、処置した哺乳動物被験体の体重1gあたり約0.001~50μgオリゴスクレオチドである。好ましくは、投薬量は、約0.01~約5.0μg/gである。より好ましくは、投薬量は、約0.05~約0.7μg/gである。したがって、ラット、サル、およびヒトの最適な投薬量範囲は、50~500μg/g処置被験体体重である。

【0047】

さらなる態様では、本発明は、活性成分として上記定義のAChE発現のインヒビターを含む、必要とする哺乳動物被験体の炎症応答を誘発する容態の治療のための薬学的組成物を提供することを意図する。任意選択的に、組成物は、薬学的に許容可能な添加剤、キャリア、および/または希釈剤をさらに含む。好ましくは、AChE発現のインヒビターは、AChEに指向するアンチセンスオリゴスクレオチドである。20

【0048】

より好ましくは、哺乳動物被験体はヒトであり、アンチセンススクレオチドは配列番号1および配列番号7のいずれか一つに記載の配列を有する。

【0049】

あるいは、哺乳動物被験体は非ヒト哺乳動物であり、アンチセンススクレオチドは配列番号2および配列番号3のいずれか一つに記載の配列を有する。30

【0050】

なおさらなる態様では、本発明は、活性成分として上記定義のAChE発現のインヒビターを含み、任意選択的に、薬学的に許容可能な添加剤、キャリア、および/または希釈剤をさらに含む、必要とする哺乳類動物被験体の関節、中枢神経系、胃腸管、心内膜、心膜、肺、眼、皮膚、および尿生殖器系の炎症の治療および/または予防のための薬学的組成物を提供する。好ましくは、AChE発現のインヒビターは、アンチセンスオリゴスクレオチドである。

【0051】

より好ましくは、哺乳動物被験体はヒトであり、アンチセンススクレオチドは配列番号1および配列番号7のいずれか一つに記載の配列を有する。40

【0052】

あるいは、哺乳動物被験体は非ヒト哺乳動物であり、アンチセンススクレオチドは配列番号2および配列番号3のいずれか一つに記載の配列を有する。

【0053】

上記定義のAChE発現のインヒビターは、本発明の薬学的組成物の調製で使用すべきである。

【0054】

したがって、本発明のアンチセンスオリゴスクレオチドは、一般に、薬学的組成物の形態で提供される。組成物は、注射、局所投与、または経口摂取で用いる。

【0055】

50

あるいは、本発明の薬学的組成物は、活性成分として、本発明で定義の少なくとも二つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはその機能的アナログ、誘導体、もしくはフラグメントの組み合わせを含み得る。

【0056】

「アナログおよび誘導体」は、核酸分子の「フラグメント」、「変異型」、「アナログ」、または「誘導体」を意味する。本発明の任意のオリゴヌクレオチド配列などの分子の「フラグメント」は、分子の任意のヌクレオチドサブセットをいうことを意味する。このような分子の「変異型」は、全分子またはそのフラグメントのいずれかと実質的に類似する天然に存在する分子をいうことを意味する。分子の「アナログ」は、パラロガスまたはオルソロガスな分子（例えば、それぞれ同一の種由来または異なる種由来の相同分子）であり得るが、これらに限定されない。10

【0057】

注射による本発明の薬学的組成物の好ましい使用は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、および筋肉内注射である。

【0058】

本発明の薬学的組成物は、一般に、緩衝剤（その浸透圧を調整する薬剤）および、任意選択的に、例えば、風味、色、または潤滑性などを薬学的組成物に付加するための当該分野で公知の一つまたは複数のキャリア、賦形剤、および／または添加剤を含む。

【0059】

好ましい緩衝剤は、10 mM Tris (pH 7.5 ~ 8.0) からなり、溶液を浸透圧についても調整したTrisである。20

【0060】

in vivoでの使用のために、アンチセンスを、滅菌蒸留水または滅菌生理食塩水に懸濁する。

【0061】

キャリアには、デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体（例えば、微結晶性セルロース、およびキサンタンガムなど）が含まれ得る。潤滑剤には、硬化ヒマシ油などが含まれ得る。

【0062】

局所投与のための薬学的組成物には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、液滴、ドロップ、座剤、スプレー、液体、または粉末が含まれ得る。従来の薬学的キャリア、水溶液、粉末または油性の基剤、および増粘剤などが必要とされ得るか望ましい。30

【0063】

経口投与用組成物には、粉末または顆粒、水性媒体または非水性媒体の懸濁液または溶液、カプセル、サシェ、または錠剤が含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散剤、または結合剤も望ましい。

【0064】

非経口、鞘内、または脳室内投与のための組成物および処方物には、緩衝液、希釈剤、および他の適切な添加剤（透過増強剤、キャリア化合物、および他の薬学的に許容可能なキャリアまたは賦形剤などであるが、これらに限定されない）も含み得る滅菌水溶液が含まれ得る。40

【0065】

本発明の薬学的組成物には、溶液、乳濁液、およびリポソーム含有処方物が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物を、種々の成分（予備形成液体、自己乳化型固体、および自己乳化型半固体が含まれるが、これらに限定されない）から生成することができる。

【0066】

単位投薬形態で都合良く存在することができる本発明の薬学的組成物を、製薬産業で周知の従来技術に従って調製することができる。このような技術は、有効成分を薬学的キャリアまたは賦形剤と組み合わせる工程を含む。一般に、有効成分と液体キャリアまたは微50

粉化固体キャリアまたはその両方との均一且つ密な組み合わせ、必要に応じて、その後の生成物の成形によって処方物を調製する。このような組成物を、多数の可能な投薬形態のいずれか(錠剤、カプセル、液体シロップ、ソフトゲル、座剤、および浣腸剤などであるが、これらに限定しない)に処方することができる。本発明の組成物を、水性もしくは非水性懸濁液または混合媒体としても処方することができる。水性懸濁液は、懸濁液の粘度を増加させる物質(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランが含まれる)をさらに含み得る。懸濁液はまた、安定剤も含み得る。

#### 【0067】

本発明の一つの実施形態では、薬学的組成物を、フォームとして処方し、使用することができる。薬学的フォームには、乳濁液、マイクロエマルジョン、クリーム、ゼリー、およびリポソームなどの処方物が含まれるが、これらに限定されない。基本的に事実上類似しているが、これらの処方物は、最終生成物の成分および硬度が異なる。

#### 【0068】

一つの実施形態では、本発明の薬学的組成物を、約0.001μg/gと約50μgとの間の投薬量の有効成分をこのような治療を必要とする被験体に毎日使用する。好ましくは、治療および/または予防は、約0.01~約5.0μg/gの投薬量の有効成分を投与する工程を含む。最も好ましくは、有効成分の投薬量は、約0.05~約0.70μg/gであり、さらに最も好ましくは、投薬量は、必要とする被験体の1gあたり0.15~0.50μgである。

#### 【0069】

当業者は、体液または組織中のアンチセンスオリゴヌクレオチドの測定された滞留時間および濃度に基づいて投与の繰返し率を容易に評価することができる。首尾の良い処置後、病状の再発を予防するために、オリゴヌクレオチドを、0.01μg~100g/kg体重の範囲の維持用量で一日一回またはそれ以上から20年毎に一回投与する維持療法を患者に施すことが望ましいかもしれない。

#### 【0070】

薬学的組成物の調製は当該分野で周知であり、多くの論文およびテキストブックに記載されている(例えば、Gennaro A.R.ed.(1990)Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvaniaの特に1521~1712を参照のこと)。

#### 【0071】

本明細書中に記載の結果は、靈長類CNS神経伝達に影響を与える生物アンチセンス応答を最初に証明している(実施例1)。アカゲザルにおける陽電子放出型断層撮影(PET)画像化研究により、ホスホチオエート薬と比較して、脳内で制限されているが、比較的長期間持続する2'-O-メチル化オリゴヌクレオチドが証明された(Tavitaian(1998)id ibid.)。さらに、げっ歯類よりも靈長類の血液脳関門を容易に通過することができ、これは、本発明者らの最近の所見と一致する(Tomkins, O. et al.(2001)Cell Mol Neurobiol 21:675-691)。

#### 【0072】

ヒトAChE配列をターゲティングするアンチセンス薬(実施例を参照のこと)は、マウス(Cohen et al.(2002)id ibid.)およびラット(Brenner et al.(2003)id ibid.)における対応する薬剤と同一のナノモル用量にてカニクイザルで有効なようである。頭部損傷マウスの場合のように、長期AChE-R過剰産生は、AChE-R産生のアンチセンス抑制下での改善に感受性を示す歩行障害コントロールに関連する(Shohami(2000)id ibid.)。現在の研究では実験動物数が制限されているにもかかわらず、静脈内および経口投与様式の両方で有効なようであり、用量依存性は、150μg/Kg/日で経口投与したHE

10

20

30

40

50

N101と比較して500 µg / Kg / 日でのより顕著な効果を反映した。

**【0073】**

最後に、本発明は、治療有効量の本明細書中に定義のAChE発現のインヒビターまたは活性成分として上記のように調製したAChE発現のインヒビターを含む組成物を必要とする哺乳動物被験体に投与する工程を含む、炎症応答を誘発する容態の治療方法を教示する。

**【0074】**

好ましくは、本発明の方法で使用すべきAChE発現のインヒビターは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは、哺乳動物被験体はヒトであり、アンチセンスヌクレオチドは配列番号1および配列番号7のいずれか一つに記載の配列を含む。 10

**【0075】**

あるいは、哺乳動物被験体は非ヒト哺乳動物であり、アンチセンスヌクレオチドは配列番号2および配列番号3のいずれか一つに記載の配列を有する。

**【0076】**

治療有効量(投与量)は、治療すべき病状の重症度および応答性、数日から数カ月に及ぶ治療単位、または治癒するまでもしくは病態の減衰が達成されるまでの期間に依存する。最適な投与スケジュールを、患者の体内の薬物蓄積の測定値から計算することができる。当業者は、最適な投薬量、投与法、および繰り返し率を容易に決定することができる。最適投薬量は、各オリゴヌクレオチドの相対効力に依存して変化し、一般に、*in vitro*および*in vivo*で有効であることが見出されるEC<sub>50</sub>に基づいて評価することができる。 20

**【0077】**

変異型の特異性、低用量、およびアンチセンス薬の長期持続有効性は、急性ストレス誘導性症状および炎症応答の妨害の両方において保守的な薬物よりも明らかに有利であり得るので、神経変性の予防に有利であり得る。これらの考慮は、種々の病態(筋萎縮性側索硬化症(Shaw, P. J. & Eggertt, C. J. (2000) *J. Neurol.* 247 Suppl 1: I17-27)、筋無力症候群(Becker et al. (1992) *id ibid.*)、キンジストロフィ(Cifuentes-Diaz, C. et al. (2001) *J. Cell Biol.* 152: 1107-1114)、脊髄性筋萎縮症(Sendtner, M. (2001) *Curr. Opin. Neurol.* 14: 629-634)、および敗血症媒介性重症疾患多発神経障害(Hund, E. (2001) *J. Neurol.* 248: 929-934)が含まれる)に関連し得る。したがって、霊長類CNSニューロンにおける炎症応答のコリン作動性弱化(atenuation)のアンチセンス促進により、興味深い治療上の利点を得ることができる。 30

**【0078】**

実施例6~11に示すように、健常なボランティアへの低用量の内毒素の投与により、炎症誘発性サイトカインおよびコルチゾールの分泌が誘導され、コリン作動性ホメオスタシスに障害が生じ、記憶が変化する。心理学的(Maes M. et al. (1998) *Cytokine* 10: 313-8)および物理的(Goodman J. C. et al. (1990) *J. Neuroimmunol.* 30: 213-7)ストレッサーは、同様にヒトにおける炎症誘発性サイトカイン(TNF-αおよびIL-6が含まれる)の産生に関連する。ストレスの多い刺激への曝露により、一般にコリン作動性ホメオスタシス、特にAChE-Rの産生および細胞分布に対して計り知れない影響を発揮する。したがって、サイトカインとコリン作動性ホメオスタシスの変化(AChE-R調整を反映する)との間の相互作用および記憶機能に対するこれらの相互作用の影響を研究するための有効なモデルとして実験内毒素血症が現れる。疾患の自覚的感覚は関与しなかったので、内毒素誘導性の記憶の変化は、感知される身体的疾患に関連する窮迫に帰し得ない。認められた記憶の変化の選択性は、他によるコルチゾールが注意力、実行機能、または覚醒に影響を与えないという報告と一致した(Iupien et al. (1996) R 40

ev. Neurosci. 10 : 117 - 39)。

【0079】

図11は、パラメータ間の関係を測定および仮定した異なるパラメータについての速度論的追跡をまとめたスキームを示し、サイトカインの誘導、ホルモン分泌、AChE調整、および得られた記憶の変化の間の潜在的に原因となる関係を予想した。興味深いことに、第一の試験期間中の陳述記憶の内毒素誘導性障害が最も高く、サイトカイン分泌と正に相關するのに対して、作業記憶の改善は処置から3時間で明らかとなり、サイトカイン分泌との相関関係は示されなかった。対照的に、両記憶変化型は、AChE-R切断と有意に相關するが、作業記憶に関するコリン作動性コントロールは陳述記憶よりも早く開始されるようである(3時間対9時間の注射後、それぞれ図11Bおよび図11C)。

10

【0080】

以前の報告は、健常なボランティアへの内毒素投与後(Reichenberg (2001) id ibid.)、サイトカイン(特に、インターフェロンおよびインターロイキン-2)治療後(Meyers C.A. (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 461 : 75 - 81; Capuron L. et al. (2001) Psychosom. Med. 63 : 376 - 86)、ウイルス(例えば、インフルエンザ)感染後(Capuron (1999) id ibid.)、またはコルチゾール投与後(de Quervain, D.J. et al. (2000) Nat. Neurosci. 3 : 313 - 4)に陳述記憶の減少を報告している。本研究では、陳述記憶能力の内毒素誘導性減少は、最初の試験期間のみにおけるサイトカイン分泌と関連した。対照的に、サイトカイン濃度がベースラインに戻るが、AChE活性とAChE-R切断との間の相違は内毒素と偽薬条件との間で依然として最大である場合、これは、最後の期間でのAChE活性およびAChE-R切断レベルと関連した。これらの所見により、免疫媒介性過程が初期内毒素誘導性記憶障害で顕著であるのに対して、後期の効果はおそらくコリン作動系によって媒介されることを示唆することができる。

20

【0081】

この研究は、内毒素曝露後の記憶機能の変化が炎症誘発性サイトカインおよびAChE-R切断の誘導に同時に関連することを証明する。これらの変化が生じうる一時的経路は、コリン作動性神経伝達の変化およびサイトカイン分泌の増加を含む(図11)。これらは、特に脳内の炎症過程(例えば、脳卒中、脳外傷、および欠陥性痴呆などの神経変性疾患)を含む多数の病状と関連する(McGeer P.L. and McGeer E.G. (1995) Brain Res. Rev. 21 : 195 - 218; Saito H. et al. (1995) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 22 : S257 - 9; Levin and Simon (1998) id ibid.)。例えば、閉鎖性頭部外傷により、TNF-αおよび他の炎症誘発性サイトカインが産生され(Goodman et al. (1990) id ibid.; Trembovler V. et al. (1999) J. Interferon Cytokine Res. 19 : 791 - 5)、脳内にAChE-Rが過剰に蓄積する(Shohami et al. (2000) id ibid.)。本明細書中に示した所見により、サイトカイン-コリン作動性相互作用が、これらの条件に付随する記憶の変化で重要な役割を果たし、能力の改善を妨害することなく対応する記憶障害に反作用する新規の予防的処置および治療上の処置の開発を洞察することができる事が示唆される。

30

【0082】

開示および記載のように、本発明は、本明細書中に開示の特定の例、工程段階、および材料に制限されず、それにより、工程段階および材料をいくらか変化させることができると理解すべきである。本明細書中で使用した専門用語を特定の実施形態を説明することのみを目的として使用し、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲およびその等価物によってのみ制限されるので、本発明を制限することを意図しないことも理解すべきである。

40

【0083】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される、文脈中で明確に示されない限り、

50

単数形「a」、「an」、および「the」には複数形が含まれることを留意しなければならない。

#### 【0084】

本明細書および特許請求の範囲全体で、文脈上で他の意味を必要としない限り、用語「comprise」および「comprises」および「comprising」などの変形形態は、規定の整数もしくは工程または整数もしくは工程の群を含むが、いかなる他の整数もしくは工程または整数もしくは工程の群も排除しないことを意味すると理解される。

#### 【0085】

以下の実施例は、本発明の態様の実施における本発明者らが使用した技術の代表である。これらの技術は本発明の実施のための好ましい実施形態の例であると認識すべきであり、当業者は、本開示を考慮して、本発明の精神および意図する範囲から逸脱することなく多数の修正形態を実施することができると認識する。 10

#### 【0086】

##### 実施例

本研究を導く基本的作業仮説は、ニューロン AChE 変異型、ChAT、および VAChT のレベルおよび組成の刺激誘導性調整は共に靈長類運動ニューロンにおけるコリン作動性ホメオスタシスの維持に寄与することである。この予想されるニューロン AChE - R の過剰産生ならびに ChAT および VAChT の抑制も穏やかなストレス下にある（例えば、取扱いまたは注射）。この仮説を試験するために、本発明者らは、血漿 AChE 活性を測定し、hEN101 で処置したか処置していないカニクイザルの腰髄切片中の AChE - R mRNA、ChAT、および VAChT を標識した。運動行動、臨床的徵候、または心電図の一般的追跡によって評価したところ、一週間のナノモル用量の hEN101 の毎日の投与後に hEN101 処置サルの運動機能の変化は示されなかった。処置に関連する毒性または炎症の影響は、白血球 (WBC) 数または死後に認められず、このオリゴヌクレオチドによって誘導された調整がそのアンチセンス効果の結果のみを反映し、このような影響下でのコリン作動性均衡の一般的維持を示すことが示唆された。AChE - R mRNA に対するその特異性のために、本発明者らは、hEN101 が末梢 AChE のレベルおよび / または組成物を変化させると予想した。本発明者らは、運動ニューロン中の AChE、ChAT、および VAChT レベルが取扱いストレス下で変化するかどうかをさらに予想し、そうであれば、AChE - R のアンチセンス抑制によりニューロン IL - 1 蓄積が減少かどうかを予想する。 20

#### 【0087】

##### 実験手順

靈長類脊髄における hEN101 の抗炎症効果の研究で使用した実験手順

動物：15月齢の実験用交配カニクイザルは、Charles River (UK) Ltd. から提供された。UK における動物実験の関連規則にしたがって、Huntingdon Life Sciences Ltd. (Huntingdon, UK) でアンチセンス投与を行った。 30

#### 【0088】

試験物質：ヒト (h) HPLC 精製 GLP グレード EN101 (キャピラリー電気泳動によって検証したところ、純度 95%) を、Avecia Biotechnology (Milford, MA) から購入した。一次 hEN101 配列 5' CTGCCACGT TCTCCCTGCA \* C \* C \* 3' (配列番号 1) は、三つ全ての AChE 変異型と共に通のエクソン 2 内の AChE mRNA (GeneBank アクセッション番号 NM\_000665、ヌクレオチドの位置は 733 - 752) のコード配列と相補的である (Soreq, H. & Zakut, H. (1993) Human cholinesterases, Academic Press, INC. San Diego; Ben Aziz-Aloya, R. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 2471 - 24 40

50

20

30

50

40

50

75)。三つの3'末端残基(\*)を、2'位でオキシメチル基を使用してスクレアーゼからの攻撃に対して保護した。修飾した3'末端塩基内のhEN101を示す配列を、配列番号7に示す。凍結乾燥オリゴスクレオチドを、滅菌二回蒸留水中に再懸濁し(24mg/ml)、-20で保存した。

#### 【0089】

アンチセンス薬のためのいくつかの化学的保護様式は、現在ヒト研究において臨床試験されている(最近の概説については、Opalinska, J. B. & Gewirtz, A. M. (2002) Nat. Rev. Drug Discov. 1: 503-514を参照のこと)。本研究で使用した化学的保護プロトコール(すなわち、三つの3'末端2'-オキシメチル基)は、オリゴスクレオチドがその非保護部分にRNアーゼHを補充する能力の維持を組み合わせる一方で、2'-O-メチル基を介してハイブリッド形成結合を強化し(Soreq and Seidman (2001) id ibid.)、改善された腸透過性を付与する(Geary, R. S. et al. (2001) J. Pharmacol. Exp. Ther. 296: 890-7)。この保護スキームのさらなる利点は、保護された3'末端の除去により露出したままになり、それ故に容易に分解される脆弱なオリゴスクレオチドが得られるという点である。他のAS-ONと異なり(Bennett, C. F. (2002) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 12: 215-224; Braasch, D. A. & Corey, D. R. (2002) Biochemistry 41: 4503-4510; Sazani, P. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20: 1228-1233)、この場合、段階的な核酸分解性の(nucleolytic)破壊によって短縮ON薬の非特異的相互作用は導かれない。  
10  
20

#### 【0090】

hEN101安定性: -20±5、4±、および25±2(相対湿度は60±5%)での保存中の凍結乾燥hEN101の安定性を、暗闇でHPLCによって試験した。各保存条件由来のこれらのサンプルを、3、6、および9ヶ月後に回収し、これらの安定性をHPLCによって分析した。hEN101は、これらの保存条件下で、-20にて少なくとも6ヶ月間安定であることが見出された。

#### 【0091】

hEN101の投与: 三組の1.5~2.5Kgのカニクイザル(雄1頭および雌1頭)に、以下のようにhEN101を7日間投与した: 経口摂食による150μg/Kg/日/os(p.o.)(0.9%生理食塩水中に15μg/ml)を毎日もしくは500μg/Kgを毎日(p.o.、生理食塩水中に50μg/ml)、または静脈内(i.v.)注射(生理食塩水中に100μg/ml)。血漿サンプルを、処置第二日目の後の示した時間で取り出し、使用するまで-20で維持した。毎日の処置から一週間後、動物を安楽死させ、腰髄調製物を、標準的な手順によってパラフィン包埋した。一頭のナイーブサルをコントロールとして使用した。  
30

#### 【0092】

毒物検査:hEN101の潜在的毒性を、処置中および処置後にHuntingdonで試験した。そのうちで示したパラメータは、体重、食品消費、一般的な運動様式(10 comotor behavior)、心電図記録法、血圧、血球数、プロトロンビン時間、および準的な血液化学(Hitachi 917臨床化学分析器)であった。死後の所見には、臓器重量、ヘマトキシリソのスキャンニング、ならびに脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脊髄、および胃のエオシン染色切片が含まれていた。  
40

#### 【0093】

in situハイブリッド形成: 組織を4%パラホルムアルデヒドで固定し、7μmのパラフィン包埋切片に切断した。腰髄切片を脱パラフィンし、連続エタノール希釈を使用して再水和し、プロテイナーゼKで透過処理した(10μg/ml、37で10分)。スライドを、ヒトAChE偽イントロン4またはエクソン6にそれぞれ相補的な5'ビオチン化した完全に2'-オキシメチル化したAChE-RまたはAChE-S特異的5  
50

0量体cRNAプローブに曝露した(Microsynth, Belgach, Switzerland)。以下のプローブを使用した：

- ヒトAChE-Rプローブ(GenBankアクセション番号S 71129の88~38ヌクレオチド位；配列番号5)：

5' - C U A G G G G G A G A A G A G A G G G G U U A C A C U G G C G G G C U C C  
C A C U C C C C U C C U C - 3' ;

- ヒトAChE-Sプローブ(GenBankアクセション番号NM 000665の2071~2022mヌクレオチド位；配列番号6)：

5' - C C G G G G G A C G U C G G G G U G G G G G U G G G G A U G G G C A G A G U  
C U G G G G C U C G U C U - 3' .

#### 【0094】

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  プローブ、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$  酵母tRNA、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$  ヘパリン、および50%ホルムアミドを含む $375\text{mM}$  塩化ナトリウム、 $37.5\text{mM}$  クエン酸ナトリウム( $\text{pH } 4.5$ )を含むハイブリッド形成混合物中にて $52^\circ\text{C}$  で一晩ハイブリッド形成を行った。スライドを洗浄して非ハイブリッド形成プローブを除去し、 $0.01\%$  Tween-20および $2\text{mM}$  レバミゾール(非特異的染色を抑制するために使用したアルカリホスファターゼインヒビター)を含む1%スキムミルクでブロッキングし、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼとインキュベートした(Amersham Pharmacia, Little Chalfont Bucks, UK)。検出のためにFast Red基質(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用した。

#### 【0095】

免疫組織化学：再水和脊髄切片を、 $0.01\text{M}$  クエン酸緩衝液( $\text{pH } 6.0$ )中でのマイクロ波処理によって熱誘導性抗原回復に供した。非特異的結合を、4%ナイープヤギまたはロバ血清を含む $0.3\%$  Triton X-100および $0.05\%$  Tween 20を有するPBSによってブロッキングした。スライドを、同一の緩衝液で希釈した一次抗体とインキュベートした(1時間、室温、一晩、4 $^\circ\text{C}$ )。切片をリノンスし、同一の緩衝液で希釈した(200倍)ビオチン抱合二次抗体とインキュベートした(3時間、室温)。一次抗体を、ウサギポリクローナル抗VAcHT(1:100, Sigma, St. Louis, MO)、ヤギポリクローナル抗ChAT(1:50, Chemicon International, Temecula, CA)、ヤギ抗IL-1(1:20, R&D systems, Minneapolis, MN)とインキュベートした。ビオチン化二次抗体は、ロバ抗ウサギ(Chemicon)およびロバ抗ヤギ(Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA)であり、共に200倍希釈で使用した。抗VAcHTおよびChAT抗体についてはFast Red基質を使用し、抗IL-1抗体についてはVectastain ABCペルオキシダーゼキット(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を使用して検出した。

#### 【0096】

共焦点顕微鏡法：Plan Apochromat 40X1.3液浸対物レンズを備えたZeiss Axiovert 135倒立顕微鏡(Oberkochen, ドイツ)に連結したBio-Rad MRC 1024共焦点スキャンヘッド(Hemel Hempstead, Hertfordshire, U.K.)を使用して実施した。Fast Redを $488\text{nm}$ で励起し、 $580\text{df}32$ 干渉フィルター( $580 \pm 16\text{nm}$ )によって発光を測定した。免疫標識切片を、 $0.5\mu\text{m}$ 毎にスキャンし、投影図をImage Pro Plus 4.0(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)ソフトウェアを使用して分析した。

#### 【0097】

10

20

30

40

50

コリンエステラーゼ活性の測定：血漿サンプルを、マルチウェルプレートリーダーに適合させたコリンエステラーゼ触媒活性測定に供した (E l l m a n , G . L . e t a l . ( 1 9 6 1 ) B i o c h e m . P h a r m a c o l . 7 , 8 8 - 9 9 )。アセチルコリン (A T C h) 加水分解率を、 $5 \times 10^{-5}$  M のブチリルコリンエステラーゼ (B u C h E) インヒビターであるテトライソプロピルピロホスホラミド (イソ - O M P A) との 30 分間の予備インキュベーション後に測定した。総血漿コリンエステラーゼ活性を、インヒビターの非存在下で測定した。

## 【 0 0 9 8 】

A C h E - R 、サイトカイン、および記憶との間の関係の研究で使用した実験手順  
記憶研究の被験体：10人の男性被験体が、独立した倫理委員会によって承認された研究に参加した。被験体の要件ならびに身体的および精神医学的スクリーニングを、他の場所に記載した (R e i c h e n b e r g A . e t a l . ( 2 0 0 1 ) i d i b i d . )。本研究は、以前の計画に含まれる被験体のサブセットを含み、これに血清 A C h E および作業記憶試験を加えたものである。経験豊富な精神科医によるインタビューにより、D S M - I V にしたがって第一軸精神障害の存在および病歴を排除した (A m e r i c a n P s y c h i a t r i c A s s o c i a t i o n ( 1 9 9 4 ) D i a g n o s t i c a n d s t a t i s t i c a l m a n u a l f o r m e n t a l d i s o r d e r s , 4 t h e d . W a s h i n g t o n D C )。スクリーニング手順を首尾よく合格し、インフォームドコンセント書類に署名した被験体のみが参加資格があると見なされた。包括的評価を行い、これはバランスの取れた無作為の二重盲検の交差法を使用して、臨床研究施設で多数の身体検査および神経心理検査を実施した各被験体を含んでいた。  
10

## 【 0 0 9 9 】

記憶試験の手順。全技術装置（採血デバイスが含まれる）を、遮音実験室に隣接した部屋に格納した。各被験体は、試験セッションに 20 日間を要し、各実験セッション前に研究施設で一晩過ごした。その最初の夕方の到着時の適応について一連の神経心理学検査（記憶、学習、および注意力の評価）を行い、その後の練習効果を最小にした (M c C a f f r e y , R . J . a n d L y n c h , J . K . ( 1 9 9 2 ) N e u r o p s y c h o l . R e v . 3 : 2 3 5 - 4 8 )。これらの試験の別のバージョンを、実験セッションで使用した。翌朝、一方のセッションでの断続的採血および内毒素の静脈内 (i . v . ) 注射 (0 . 8 n g のサルモネラ・アボルタス・エクイ内毒素 / K g 体重) または他の場合の同体積の 0 . 9 % N a C l (生理食塩水) 溶液の静脈内 (i . v . ) 注射のために、静脈内カニューレを前肘前腕静脈に挿入した。被験体の半分に最初に生理食塩水を投与し、残りの半分に最初に内毒素注射を行って注射の順序のバランスをとった。いずれの年齢、就学年数、または体重においても治療順序によって定義される群の間で有意差は認められなかった。実験者および被験体を、群の割り当てについて盲検化した。各セッション中、被験体を、注射から 1 ~ 2 時間後、3 ~ 4 時間後、および 9 ~ 10 時間後の三回試験した。  
20 i . v . 注射前のベースラインおよび各試験期間の開始時に採血した。サーミスタプローブを使用して直腸温度を継続的に測定した。自己報告した医師の疾患症状（頭痛、筋肉痛、震え、吐気、呼吸困難、および疲労）を、5 ポイント L e i k a r t スケール (0 - 症状なし、4 - 非常に重篤な症状) を使用した問診票によって試験期間の終了時に評価した。  
30

## 【 0 1 0 0 】

サルモネラ・アボルタス・エクイ内毒素：ヒト用に調製されたこの内毒素は、タンパク質および核酸を含まない滅菌溶液として利用可能であった。使用した内毒素調製物は、他のグループの種々の研究 (B u r r e l l R . ( 1 9 9 4 ) i d i b i d . ) および 1991 年から 100 を超える被験体を含む M a x P l a n c k i n s t i t u t e o f P s y c h i a t r y での研究 (P o l l m a c h e r T . e t a l . ( 1 9 9 6 ) J . I n f e c t . D i s . 1 7 4 : 1 0 4 0 - 5 ) で安全性が証明されている。  
40

## 【0101】

AChEおよびその分解産物、サイトカイン、ならびにコルチゾールの血漿レベル：Na-EDTAおよびアプロチニンを含む試験管に採血し、直ちに遠心分離した。血漿を等分し、-80で凍結した。AChEの触媒活性を、 $1 \times 10^{-5}$ Mのテトライソプロピルピロホスホラミド(イソ-OMP A)(血清ブチリルコリンエステラーゼ(BChE)の選択的インヒビター)の存在下でのアセチルチオコリン(ATCh)加水分解能力として測定した(Soreq H. and Glick D. (2000) : Novel roles for cholinesterases in stress and inhibitor responses. In: Giacobini E. (ed.) Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors: Basic, Preclinical and Clinical Aspects. London, Martin Dunitz, pp 47-61)。内毒素誘導性の相違を、内毒素の非存在下での活性を引くことによって計算したが、この場合、各個体をそのコントロールとして使用し、時間を毎日慎重に適合させた。AChE-Rの濃度および完全性を評価するために、血漿タンパク質(40μg)を、完全な変性条件下で4~20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し(BioRad Laboratories, Hercules, CA)、ニトロセルロースフィルターにプロットし、ウサギ抗AChE-R抗体(Sternfeld M. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8647-8652)およびペルオキシダーゼ抱合免疫グロブリンとインキュベートし、ECL(商標)検出(Amersham Pharmacia Biotech, UK)、デンシトメトリー分析、および記載の定量(Shohami (2000) id ibid.)に供した。コルチゾールの血漿レベルを、放射免疫アッセイによって決定し、サイトカインおよび可溶性サイトカイン受容体の血漿レベルを、市販の酵素結合免疫吸着アッセイによって評価した(Mullington J. et al. (2000) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 278: R947-55)。血管内皮細胞中のAChE-R mRNAおよびそのタンパク質産物の標識：報告されるように非特異的腎臓血管炎または腎臓拒絶後に起因する臨床的炎症を有するか有さない患者の手術で取り出した生検由来のパラフィン包埋組織切片を使用して、mAChE-R mRNAおよびAChE-Rタンパク質の蛍光in situハイブリッド形成および免疫組織化学を行い、定量した(Cohen (2002) id ibid.; Perry, C. et al. (2002) Oncogene 21: 8428-8441)。

## 【0102】

免疫標識タンパク質のMALDI-TOF-MS分析：プロッティングした膜における抗AChE-R抗体によって標識されたタンパク質およびペプチドを同定するために、マトリックス支援レーザ脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)を使用した。基質：酵素比が200:1のAchromobacter lyticus(Wako Chemicals, Inc., USA)由来のエンドプロテアーゼLyseCを使用して、ゲル溶離ペプチドのタンパク質分解を行った。4M尿素を含む0.05M Tris-HCl(pH 9.0)中にて30で分解した。

## 【0103】

神経心理学的評価：対話想起試験を使用して陳述記憶を評価した(Green P. and Allen L.M. (1995) : Manual for the Cogva Story Recall test CogniSyst Inc., Durham, NC)。被験体に25項目の対話をプレゼンテーションの直後および30分後に記憶から繰り返すように要求した。正確な逐語的想起の総数を計数した。記憶期間および作業記憶を、Digit Span forward & backward(Wechsler D. (1987) : Wechsler Memory Scale, Revised Manual The Psychological Corp, San Antonio, TX)を使用して評価した。被験体に正しいプレゼンテーション順序(正

10

20

30

40

50

方向条件 - 期間の評価) または逆の順序 (逆方向条件 - 作業記憶の評価) のいずれかで二つのリスト毎に数字が増加する数字のリストを繰り返すように要求した。正確に繰り返したりスト数を計数した。Ruff f 2 & 7 抹消検査を使用して注意力を評価した (Ruff f R . M . and Allen C . C . ( 1996 ) : Ruff f 2 & 7 Selective Attention Test : Professional Manual . Psychological Assessment Resources Inc . , Lutz , FL ) : 被験体に、文字間または数字間のいずれかに無作為に置かれた数字 2 および数字 7 のいずれかに印をつけるように指導した。5 分間の試験における正確な応答数を計数した。

## 【0104】

10

統計分析 : AChE 活性、AChE - R レベル、および神経心理学的能力に対する治療効果に関する主な仮説を、反復測定による分散分析 (ANOVA) を使用して試験した。反復測定による ANOVA を使用して、身体疾患の症状、サイトカインおよびコルチゾールの血漿レベル、ならびに体温に対する治療効果も試験した。有意性レベルを、 $p = 0.05$  の棄却限界に設定した (両側)。有意な治療 - 時間相互作用が見出されたときはいつもでも、示唆されるように、簡潔な効果を分析し (Winer B . et al . ( 1991 ) : Statistical Principles in Experimental Design , 3rd ed . McGraw - Hill , New York ) 、 テューキーの調整を適用した。

## 【0105】

20

AChE 活性、AChE - R レベル、ならびに生理学的 (サイトカインおよびコルチゾールの分泌) および神経心理学的パラメータにおける偽薬から内毒素条件への変化の間の関連を評価するために、ピアソンの相関係数を計算した。

## 【0106】

通常の分布からの逸脱がないことがいずれかの従属変数で明白であった。Zスコアを使用して一変量外れ値は見出されず、マハラノビスの距離を使用して多変量外れ値は見出されなかった (Tabachnick B . G . and Fidell L . S . ( 2001 ) Using Multivariate Statistics , 4th ed . Allyn and Bacon , Boston , MA ) 。被験体内効果についての共分散の任意の非均一性を調整するために、本発明者らは、ホイン・フェルト法を使用して調整される  $p$  値を使用した (Norusis M . J . ( 1994 ) SPSS advanced statistics 6 . 1 . SPSS Inc . , Chicago , IL ) 。SPSS 10 を使用して分析した。

30

## 【0107】

分析したニューロンの AChE - R および IL - 1 陽性画分の分析のために二つの関連サンプルについてウィルコクスンの線形順位検定を使用し、各群の少なくとも四つの切片について測定した。SAS 8 . 0 ソフトウェアを使用して約 0 . 05 またはそれ未満の  $p$  値が得られた場合、相違は有意であると見なした。脊髄切片中の VACHT 含有末端の数および体積の分析のためにスチュードント  $t$  検定を使用した。

## 【実施例 1】

40

## 【0108】

実施例 1 : 処置による脊髄運動ニューロン中の VACHT および ChAT 標識の減少。

VACHT が神経小胞に ACh を負荷する場合、AChT は、運動ニューロンで囲まれたコリン作動性 (C) 末端中に予想どおり濃縮された (Weihue ( 1996 ) id ibid . ) 。ナイープ状態と比較して、HEN101 処置サル由来の脊髄運動ニューロン (細胞直径 = 40  $\mu m$  ) の共焦点顕微鏡の投影図は、細胞あたり VACHT 陽性 C 末端の平均数で小さいが有意な用量独立性減少 ( $p < 0 . 01$  、スチュードント  $t$  検定) を示し ((図 1A、1B) 、これにより、C 末端の ACh 負荷に対する取扱いストレスの影響が示唆される。VACHT 標識 C 末端は、コントロール切片と比較して、150  $\mu g / K g$  / 日の p . o . 投与下で有意に小さく (60  $\mu m^3$  未満) (図 1B および 1C 、  $p < 0$

50

. 0 1、スチューデントt検定)、おそらく、小胞へのV A C h Tの転位および/またはV A C h T安定性の変化を反映する。

#### 【0109】

V A C h T産生は大部分がC h A Tと同時調節され(U s d i n , T . B . e t a l . ( 1 9 9 5 ) T r e n d s N e u r o s c i . 1 8 , 2 1 8 - 2 2 4 )、これは、両者が一つの遺伝子複合体(いわゆる、「コリン作動性遺伝子座」)から產生されるからである(E r i c k s o n , J . D . e t a l . ( 1 9 9 6 ) P r o g . B r a i n R e s . 1 0 9 , 6 9 - 8 2 )。運動ニューロンのC末端のC h A T染色は、実際、V A C h T染色で認められた変化と類似の変化を示した(データ示さず)。さらに、抗C h A T抗体は、コントロール切片においていくつかの分配細胞を標識し(図1D)、これらから運動ニューロンにコリン作動性末端が出現する(B a r b e r , R . P . e t a l . ( 1 9 8 4 ) J . C o m p . N e u r o l . 2 2 9 , 3 2 9 - 3 4 6 )。h E N 1 0 1処置サル由来の腰髄切片は、投与量または投与様式と無関係に、C h A T陽性分配細胞の染色強度を顕著に減少させ(図1E)、A C h産生の取扱いストレス関連抑制および小胞再循環の減速をさらに示す。  
10

#### 【実施例2】

#### 【0110】

##### 実施例2：血漿A C h E - R活性のストレス誘導性減少のE N 1 0 1による予防

h E N 1 0 1投与の第二日目に採取した血漿サンプル中のコリンエステラーゼ活性を測定した。血漿中のA T C h加水分解は、大部分が血清B u C h E(一般的に変化しない今まである非相同m R N Aによってコードされる一次血清コリンエステラーゼ)に起因する。しかし、血漿はまた、小さいが有意なA C h E活性を含み(Z a k u t , H . e t a l . ( 1 9 9 8 ) C a n c e r 6 1 , 7 2 7 - 7 3 7 )、この活性は、 $5 \times 1 0^{-5}$  MのB u C h E特異的インヒビター(イソ-OMP A)の存在下での予備インキュベーション後に測定可能である。A C h E活性は、1 5 0 μ g / K gのE N 1 0 1のストレスの多い経口投与から5時間以内に、処置前(投与前)の値と比較して増加し(表1)、これは、潜在的に取扱い下での產生の増加を反映している。これは、in vivoでの靈長類A C h E - R m R N Aの短い半減期をさらに示し、このことは、以前の所見と一致する(C h a n ( 1 9 9 1 ) i d i b i d ; B r e n n e r e t a l . ( 2 0 0 3 ) i d i b i d . )。より高い経口用量(5 0 0 μ g / K g)のE N 1 0 1によって増加が有效地に抑制され、5 0 0 μ g / K gのE N 1 0 1のi . v .投与後ではなおさらにより抑制され(表1)、これはおそらくA C h E - R合成の用量依存性h E N 1 0 1防止を反映する。  
20  
30

【表1】

hEN101の用量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		150	500	500
投与様式		p.o.	p.o.	i.v.
	処置後の時間 (時間)			
総ChE活性 (処置前に対する比率 <sup>2)</sup>	0	100±1	100±2	100±1
	3	92±9	105±1	89±2
	6	102±3	96±2	94±1
	12	98±2	96±1	93±1
AChE活性 (処置前に対する比率 <sup>3)</sup>	0	100±4	100±6	100±4
	3	117±2	114±6	105±4
	6	135±1	100±5	89±5
	12	123±3	112±4	94±3

<sup>1</sup> 示した量および投与経路のhEN101で二日連続2回処置したサル由来の血漿サンプル中のATCh加水分解率の変化率。<sup>2</sup> インヒビターの非存在下では、加水分解率は血漿中の豊富なコリンエステラーゼ(BChe)活性を反映する。<sup>3</sup> 5×10-5MのBuChE特異的インヒビター(イソ-OMP A)の存在下で測定したAChE特異的活性。値は、2頭のサル由来の血漿サンプルにおける六つの測定値由来の平均±SEMを示す。平均AChEおよびBChe絶対活性。

## 血漿AChE活性の処置関連増加のhEN101誘導性の防止

30

## 【実施例3】

## 【0111】

実施例3：サル脊髄ニューロン中のAChE-R mRNAおよびAChE-S mRNAに対するEN101の影響

hEN101にて1日一回で7日間処置したカニクイザル由来の腰髄のパラフィン包埋切片を、高分解能蛍光in situハイブリッド形成(FISH)に供した。変異型特異的FISHプローブ(図2A)により、多数の穿刺(punctuate)領域および縦長の筋、おそらく神経突起を通過した断面および縦長の区域でAChE-R mRNA標識を超えるAChE-S mRNAが明らかとなった(図2B~2C)。この相違は、統計的に有意ではないにもかかわらず、通常の条件下でのマウス神経突起中でAChE-S mRNAを示すが、AChE-R mRNAを示さない以前の所見と一致する(Meshorer(2002)id ibid.)。より高い経口およびi.v.用量により、AChE-R mRNA標識が減少した(より低用量の図2Eと比較した図2Gおよび2I)。AChE-S mRNA標識ニューロンは、EN101誘導性の抑制は制限され(図2Dと比較した図2Hおよび2J)、神経突起標識が減少した(図2F、2H、および2J)。アカゲザルにおける陽電子放出型断層撮影(PET)画像化研究により、ホスホチオエート薬と比較して、2'-O-メチル化オリゴヌクレオチドの制限されているが比較的有効な脳への透過が証明された(Tavitian(1998)id ibid.)。さらに、げっ歯類よりも靈長類の血液脳関門を容易に通過することができる(Tomkins, O. et al. (2001) Cell Mol. Neurobiol.).

40

50

21 : 675 - 91)。それにもかかわらず、これは、靈長類 CNS 神經伝達に影響を与える生物アンチセンス応答を最初に証明している。

#### 【0112】

マウス (Cohen (2002) id ibid.) およびラット (Brenner (2003) id bid.) における対応する薬剤と同一のナノモル用量で、ヒトEN101の送達は、ラットでそうであったように、カニクイザルにおいて静脈内投与様式および経口投与様式の両方で有効なようであった (Brenner (2003) id ibid.)。動物数が制限されているにもかかわらず、用量依存性は、 $150\text{ }\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$  の経口投与 hEN101 と比較して  $500\text{ }\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$  のより顕著な効果を反映した。

10

#### 【実施例4】

#### 【0113】

実施例4：AChE-R mRNA のアンチセンス破壊は、神經細胞形質サイズと反比例する

ヘマトキシリン - エオシン染色脊髄切片中の類似のサイズのニューロン (図3A) を、その細胞体の直径にしたがって以下の三つのサイズ群に分類した (図3B)：運動ニューロン (=  $40\text{ }\mu\text{m}$ 、総計数ニューロンの 20 ~ 35 %、前角および中間帯中の運動核に局在)、中間サイズのニューロン ( $20 \sim 40\text{ }\mu\text{m}$ 、約 60 %、脊髄全体、主に前角および中間帯に分散している)、小型ニューロン ( $10 \sim 20\text{ }\mu\text{m}$ 、5 ~ 20 %、主に後角中に存在する)。各群由来の AChE-S および AChE-R mRNA 標識細胞画分を、小サイズおよび中間サイズの AChE-R 陽性細胞 (直径  $40\text{ }\mu\text{m}$  未満) の隣接切片中で評価し、ナイープ状態と比較して 4 倍であった (小細胞については  $p = 0.057$ 、ウィルコクスン検定)。

20

#### 【0114】

AChE-R 陽性のより小さなニューロン画分は、 $150\text{ }\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$  処置と比較してより高い hEN101 経口用量下で有意に減少し ( $p = 0.033$ 、ウィルコクスン検定)、i.v. 投与ではなおさらには有意に減少した ( $p = 0.015$ )。中間サイズの画分は、 $150\text{ }\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$  の p.o. 投与と比較して、 $150\text{ }\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$  の i.v. 投与後に有意に減少した ( $p = 0.030$ )。染色強度の減少により、運動ニューロンにおける一定のアンチセンス効果が示唆されたが、同時に、有効性は比較的限定される。しかしながら、いかなる処置によっても標識された巨大細胞体の全画分の減少は識別できなかった ( $p > 0.100$ )。これは、おそらく、明確な膜および / または代謝特性、異なる細胞体積、またはこれらの性質の寄与の組み合わせを反映する。AChE-S mRNA について、巨大陽性細胞体数は変化しないままであるのに対して、陽性の小サイズおよび中間サイズのニューロンは、ナイープと比較して低用量または高用量の hEN101 のいずれかでそれぞれ 50 % および 20 % 減少した。AChE-S mRNA の変化についての見かけ上の用量独立性は、これらの変化がアンチセンス駆動ではないという仮説と一致するが、おそらく、AChE-S から AChE-R へのスプライシングの変化に対する取扱いストレスの影響を反映し得る (Kauffer (1998) id ibid.)。

30

#### 【実施例5】

#### 【0115】

実施例5：ニューロン炎症誘発性サイトカインの hEN101 抑制

hEN101 処置サル由来の腰髄切片は、ナイープ切片よりも高い巨大サイズおよび中間サイズの IL-1 陽性細胞体の画分を含んでおり、ストレス誘導性炎症応答が示唆された (図4A、それぞれ  $p = 0.051$  および  $0.034$ 、ウィルコクスン検定)。 $150\text{ }\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$  の p.o. 処置サルと比較して、 $500\text{ }\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$  の hEN101 の i.v. 処置サル由来の切片で、より低い IL-1 標識細胞体の画分が示された (図4A、両サイズ群について、 $p = 0.067$ 、ウィルコクスン検定)。関連分析は、中間サイズではニューロン AChE-R と IL-1 レベルとの間に推定相関関係が認められたが、巨大細胞では認められなかった (図4B、データ示さず)。IL-6 標識も、 $50$

40

50

$0 \mu\text{g} / \text{Kg}$  の p.o. 処置マウスと比較して  $500 \mu\text{g} / \text{Kg}$  hEN101 の i.v. 投与後に有意に抑制された（図 4 C、中間ニューロンおよび巨大ニューロンについてそれぞれ  $p = 0.03$  および  $0.015$ ）。

#### 【実施例 6】

##### 【0116】

実施例 6：内毒素は、AChE-R の活性および完全性の障害を誘導する

内毒素投与により、ブチリルコリンエステラーゼ（BChE）インヒビター（イソ-O-MPA）の存在下での ATCh 加水分解率の定量によって測定したところ、血漿 AChE 活性が時間依存性に減少した。この減少は、有意な処置・時間相互作用を示した（図 5 A）（ $F(2, 16) = 3.94$ 、 $p = 0.04$ ）。生理食塩水投与（偽薬）により、AChE 活性は変化せず、注射ストレスまたは概日作用によって誘導されるという可能性が排除された。加水分解活性の低下は、潜在的に、AChE タンパク質の喪失を反映する。この可能性を試験するために、電気泳動によって分離した血漿タンパク質を、AChE-R に固有の C 末端ペプチドについて選択的な抗体と免疫反応させた（Sternfeld et al. (2000) id ibid.）。これらの抗体は、66 kD タンパク質（全長 AChE-R である可能性が高い）および見かけ上のサイズが 6.5 kD のより短いペプチドを標識した。ストレスを与えたマウスの血清における並行標識パターン（Grissaru et al. (2001) id ibid.）により、これが AChE-R の免疫陽性 C 末端切断産物であることが示唆された。内毒素投与により、僅かであるが持続的な AChE-R 切断産物の増加が誘導された（図 5 B、5 C）。この増加は、統計的有意性に達しなかった（治療効果については、 $F(1, 8) = 2.32$ 、 $p = 0.16$ ）（図 5 C）。しかし、処置から 9 時間後、内毒素誘導性の AChE 活性の減少は、内毒素誘導性の AChE-R 切断の増加と有意に相關した（ $r = -0.65$ ）（図 5 D）。

#### 【実施例 7】

##### 【0117】

実施例 7：AChE-R 切断産物の MALDI-TOF-MS 分析

AChE-R 切断産物をさらに特徴づけるために、より大きな血清サンプル（ $180 \mu\text{g} / \text{レーン}$ ）を、電気泳動によって分離した。抗 AChE-R 抗体で標識したバンドと同時移動したタンパク質バンドをゲルから切り出し、MALDI-TOF-MS 分析に供した。より大きなバンドの溶離産物は、主に血清アルブミンから構成されると同定され（分子量 69367）、これは AChE-R がヒト血清タンパク質のこのサイズ画分中の唯一の副成分であるという仮定と一致した。しかし、切り出したバンドから溶離したより短いペプチドは、分子量が 3613 ~ 3615 の単一ピークを示した。図 6 は、この溶離ペプチドの MALDI-TOF-MS プロフィールを示す。ペプチドの性質の計算により、算出分子量が 3614 である AChE-R の C 末端から 36 残基の推定タンパク質分解的切断部位を位置づけた。これらの想定下で、AChE-R 転換部位に対して上流のアスパラギン残基とアルギニン残基との間で切断され得る（図 6）。

##### 【0118】

いくつかの個体由来のゲル溶離産物中に並行サイズのペプチドが認められ、矛盾のない切断過程が証明された。LysC タンパク質分解は、このペプチドをさらに短くできなかった。エドマン分解は成功せず、これはおそらく N 末端の遮断に起因し、材料の不足により、さらなる実験を回避した。したがって、質量分析アプローチにより、ヒト AChE スプライスイソ型の間で逸脱する C 末端スプライス部位付近の内毒素ストレス下でヒト血漿中の AChE-R 切断部位が示されたが、結論に至っていない。

#### 【実施例 8】

##### 【0119】

実施例 8：血管内皮細胞は、AChE-R を產生する

血漿 AChE-R の潜在的な細胞型起源を求めて、本発明者らは、炎症疾患（腎臓血管炎）を罹患しているか罹患していない患者由来のヒト組織に対して蛍光 *in situ* ハイブリッド形成（FISH）および免疫組織化学を行った。血管内皮細胞は、AChE-

10

20

30

40

50

R c r N A および抗A C h E - R 抗体の両方での標識を示した(図7 A、7 B)。シグナル強度の定量により、炎症性血管炎を罹患しているか罹患していない患者におけるA C h E - R m R N A レベルとA C h E - R タンパク質レベルとの間で著しい類似性が明らかとなり、その結果、m R N A 標識があまり明らかでない組織も僅かなタンパク質標識を示した(図7 C)。これにより、連続的血漿A C h E - R 產生の推定部位としてニューロンニコチン酸アセチルコリン受容体も有する血管内皮細胞が示された(Heeschen et al. (2002) J. Clin. Invest. 110: 527-36)。

## 【実施例9】

## 【0120】

実施例9：A C h E - R 切断はサイトカイン分泌と関連する

10

内毒素により、コルチゾール、T N F - 、およびI L - 6 の血漿レベルの一過性の有意な増加が誘導されるが(図8 A ~ 8 C)、使用した用量では、内毒素は身体の疾患または行動疾患の症状の主観的評価に対していかなる有意な結果ももたらさない(Reichenberg (2001) id ibid.)。認識機能または知的機能に対する主観的C N S の非影響下での末梢サイトカインレベルの選択的増加により、これらの条件下での記憶機能の変化が主観的内毒素誘導性変化を反映することが示唆された。第一および第二の試験期間中にコルチゾールレベルが増加し、第一の試験期間中にT N F - およびI L - 6 がピークになり、その後減少し、第二の期間中に直腸温度がピークになった(示さず)。これらの時間依存性効果は、有意な治療・時間相互作用を反映した(それぞれF (2, 16) = 41.2, 10.6, 10.5, 3.2、全てp < 0.05、H - F)。

20

## 【0121】

各試験期間中、相関分析により、試験個体の生化学的応答と機能的応答を比較することができた。したがって、内毒素誘導性A C h E - R 切断(内毒素条件から偽薬条件までの一定の個体の変化として計算)は、最後の試験期間中にコルチゾール分泌と有意(p < 0.05)且つ正に相関した(r = 0.70)(図8 A)。A C h E - R 切断は、第一の試験期間中にT N F - およびI L - 6 の分泌と有意(p < 0.01)且つ負に相関するが(それぞれ、r = 0.72および-0.66)(図8 B、8 C)、その後の試験期間中では相関しなかった。

## 【実施例10】

## 【0122】

実施例10：A C h E - R 切断は、陳述記憶の内毒素誘導性障害と関連する

30

内毒素の投与により、全試験期間中に陳述記憶試験で能力が減少した。これは、対話項目の即時想起の減少(F (1, 8) = 6.5、p = 0.03)(図9 A)および遅延対話想起の減少(F (1, 8) = 3.5、p = 0.09)を反映していた(データ示さず)。対話項目の即時想起および遅延想起の内毒素誘導性の減少は有意であり(p < 0.05)、第一の試験期間中にT N F - およびI L - 6 分泌と負に相関するが(r = -0.59~-0.67)、他の試験期間中では相関せず(データ示さず)、これらにより、陳述記憶の内毒素誘導性障害におけるさらなる機構の潜在的関与が示唆された。最後の試験期間では、対話項目の即時想起の内毒素誘導性の減少は有意であり(p < 0.05)、且つA C h E - R 切断と負に関連し(r = -0.63)(図9 B)、おそらく連続的に抑制されたサイトカイン産生と組み合わせた結果として起こるA C h E レベルの増加が陳述記憶を妨害することを示す。この概念は、サイトカインレベルが既に減少しているが、より早い試験期間中では減少していない場合、最後の試験期間中にA C h E 活性が減少する陳述記憶障害の正の(r = 0.68)関連によって支持された(図9 C)。

40

## 【実施例11】

## 【0123】

実施例11：A C h E - R 切断の作業記憶との関連

内毒素投与により、作業記憶機能の有意な改善を誘導し、これは、全試験期間中の数字短期間逆方向復唱スコアの増加を反映した(F (1, 8) = 12.3、p = 0.008)(図10 A)。数字短期間順方向復唱試験(記憶期間を評価する)は有意に変化しないか

50

、注意力試験 (Ruff 2 & 7 抹消検査) は明らかであり (データ示さず) 、認められた相違の選択性が強調された。

#### 【0124】

作業記憶機能の内毒素誘導性の改善は、TNF- 、IL-6 またはコルチゾールの分泌に有意に関連しないが、AChE-R 切断と負に関連した。第二および第三の試験期間中の関連は有意であった (< 0.05) (それぞれ  $r = -0.84$  および  $-0.64$ ) (図 10B、データ示さず)。したがって、AChE-R 切断の内毒素誘導性の上昇がより高い (且つ、おそらく ACh レベルの増加がより高い) 被験体は、作業記憶機能の内毒素誘導性の改善がより低く、且つ陳述記憶の内毒素誘導性障害がより高かった。

#### 【実施例 12】

10

#### 【0125】

実施例 12 : AChE-S トランスジェニックマウスは、体温の上昇を示す。

#### 【0126】

発熱は、より高い循環炎症誘発性サイトカインレベルの結果の一つである。ヒトシナブス AChE (hAChE-S) の構成性発現 (Beeriet al. (1995) id ibid.) および結果として起こるマウス AChE-R の過剰発現 (Cohen et al. (2002) id ibid.) が動物における炎症誘発性サイトカインの放出に影響を与えるかどうかを検証するために、本発明者らは体温を測定した。5 匹のトランスジェニック FVB/N hAChE-S および mAChE-R を過剰発現する雌 (3 ~ 5 月齢) は、体温の変化を誘導するために投与した麻酔から 5 分後と 55 分後との間に測定した体温を有していた。グラフに示すように (図 12A ~ B) 、体温は処置時間が経過するにつれて減少した。興味深いことに、トランスジェニックマウスの平均体温は、コントロールマウスよりも常に 2 高かった。これにより、その遺伝性のコリン作動性不均衡が体温調節を悪化させたと示唆される。これらの所見は、パラオクソンの投与に対するこれらのトランスジェニックマウスの低体温応答障害を記載した本発明者らの以前の報告と一致する (Beeriet al. (1995) id ibid.)。

20

#### 【実施例 13】

#### 【0127】

海馬中の LPS 誘導性 IL-1 分泌および血清中の IL-1 および TNF- 分泌に対するタクリンの影響

30

雄 C57 マウスに、生理食塩水またはタクリン (1.5 mg / Kg) のいずれかを注射し (i.p.) 、その後に、生理食塩水または LPS (1.0 mg / Kg) のいずれかを注射した (n = 5 動物 / 群)。2 時間後、マウスを、24 μg ネムブタール / マウスで深く麻酔し、心臓穿刺によって採血し、海馬を切り出し、500 μl の RPMI + 100 KIU アプロチニンを含むチューブに入れた。海馬中の IL-1 レベル (図 13A) ならびに血清中の IL-1 (図 13B) および TNF- (図 13C) のレベルを、市販の ELISA キット (R&D Systems) を使用して評価した。LPS は、海馬および血清の IL-1 の有意な増加を誘導したが、タクリン処置マウスでは有意に弱められた。対照的にタクリンは、血清中の LPS 誘導 TNF- 分泌を小さく且つ非有意に弱めた。

40

#### 【実施例 14】

#### 【0128】

実施例 14 : 海馬中の LPS 誘導性 IL-1 分泌および血清中の IL-1 および TNF- 分泌に対するリバスティグミンの影響

雄 C57 マウスに、生理食塩水または三つの用量のリバスティグミン (0.5、1.5 および 3.0 mg / Kg) の一つのいずれかを注射し (i.p.) 、その後に、生理食塩水または LPS (1.0 mg / Kg) のいずれかを注射した (n = 5 動物 / 群)。2 時間後、マウスを、24 μg ネムブタール / マウスで深く麻酔し、心臓穿刺によって採血し、海馬を切り出し、500 μl の RPMI + 100 KIU アプロチニンを含むチューブに入れた。IL-1 レベルおよび TNF- レベルを、市販の ELISA キット (R&

50

D Systems)を使用して評価した。LPSは、海馬IL-1の有意な増加を誘導したが、高用量のリバステイグミンのみによって有意に弱められた(図14A)。血液中のLPS誘導性IL-1分泌は、1.5mg/Kgおよび3.0mg/Kgのリバステイグミンの用量によって用量依存的に抑制された(図14B)。血液中のLPS誘導性TNF- 分泌は、より高い用量でさえもリバステイグミン処置に影響を受けなかった。(図14C)。

#### 【実施例15】

##### 【0129】

手術に起因するストレスの感情および認識効果のメディエーターとしてのサイトカインいくつかの一連の証拠は、ストレスは種々の認識機能(記憶が含まれる)に影響を与えることを示す。特に、ストレスへの曝露により、陳述記憶を悪化させることが見出された一方で、手続き記憶はインタクトなままであった。ストレスは多くの免疫機能(サイトカインの産生および分泌が含まれる)に影響を及ぼすことも周知である。種々のストレッサーへの曝露後、ヒトおよび実験動物の両方においてIL-2の減少に付随して末梢IL-6ならびにIL-1 およびTNF が増加する。

##### 【0130】

ストレスの感情および認識への影響をの媒介におけるサイトカインの役割を試験するために研究をデザインした。以下のストレスの多い二つの状況型を、同一の被験体で調査した:精神的ストレス - 手術を待っている間(すなわち、手術当日の朝)および手術ストレス - 手術後。

##### 【0131】

20人の全体的に健常なボランティアに、包括的神経心理学試験群(小手術前後の感情パラメータおよび認識パラメータを評価する)を受けさせた(腹腔鏡下胆囊摘出術またはヘルニア)。各被験体を、以下の三つの状況で試験した:(a)手術数日前(ベースライン=t0)、(b)手術当日の朝=t1、(c)手術後=t2。各セッションで血液サンプルを採取し、サイトカイン(IL-1、IL-6)の血清レベルを測定した。15人のコントロール被験体に同一の手順を施した。

##### 【0132】

手術当日の朝に、不安レベル(STAI)(図15A)および鬱レベル(DACL)(図15B)が有意に増加した(それぞれ $F(2, 82) = 3.871, p < 0.025$ 、および $F(2, 82) = 11.189, p < 0.0001$ )。疲労レベルおよび痛みレベルは変化しなかった(それぞれ、15Cおよび15D)。手術後の朝に、鬱はさらに増加したが、不安は増加せず、それと同時に、痛みおよび疲労が有意に増加した(それぞれ、 $F(2, 80) = 24.588, p < 0.0001$ および $F(2, 80) = 10.148, p < 0.0001$ )。

##### 【0133】

認識パラメータ(図15E~15H)に関して、手術当日の朝に、試験は、単語リスト想起課題(HVLT)の能力の有意な低下を示した( $F(2, 70) = 4.120, p < 0.021$ )。手術後の朝に、単語リスト想起および複雑な数字の認識に関する視覚的記憶課題(MCG)の能力のさらなる低下が見出された( $F(2, 70) = 3.973, p < 0.023$ )。

##### 【0134】

各パラメータのために(心理学的能力、サイトカインレベルなど)、各ストレスの多い状況(t1、t2)とベースライン(t0)との間の相違を計算した。サイトカインレベルと心理学的変数との間のピアソン相関を計算した(図16A~C)。

##### 【0135】

手術当日の朝に(t1)、IL-1 レベルの増加と鬱状態の進行との間に有意な相関関係が存在した( $r = 0.525$ )(図16b)。

##### 【0136】

手術後の朝(t2)、IL-1 レベルの増加と即時および遅延論理的記憶(対話想起試

10

20

40

50

験)の悪化との間に有意な相関関係が存在した(それぞれ、 $r = -0.627$  および  $-0.532$ )。IL-6 レベルの増加と用語リスト想起(HVLT)試験における遅延想起の改善との間( $r = 0.386$ )および即時と遅延した複雑な数字想起試験(MCG)の改善との間(それぞれ、 $r = 0.502$  および  $0.590$ )に有意な相関関係が得られた。IL-6 が有意に増加した( $F(2, 38) = 29.114$ 、 $p < 0.0001$ )(図 16C)。

#### 【実施例 16】

##### 【0137】

実施例 16 : EN301 処置マウスの脳における AChE-R mRNA の選択的消失  
実験手順

3 月齢の FVB/N 雌マウスに、 $500 \mu\text{g} / \text{Kg}$  の EN301 ( $n = 7$ ) または賦形剤(PBS、 $n = 6$ )を毎日腹腔内注射した。EN301 は、配列番号 2 に記載の mEN101 に対応する。このアンチセンスオリゴヌクレオチドを、マウス AChE エクソン 2 配列のエクソン 2 内の配列にターゲティングする。EN301 を、動物試験のために比較的大量に Microsynth, Switzerland で產生させた。処置を 3 日間連続で継続し、4 日目にマウスを屠殺した。脳を採取し、液体窒素で急速冷凍し、-70 度保存した。

##### 【0138】

脳から全 RNA を抽出し、マウス AChE cDNA のエクソン 2 の共通配列または AChE-S 変異型に特異的なエクソン 6 中の固有の配列をターゲティングするプライマーを使用して RT-PCR 反応を行った。サイクル 25、31、および 35 の  $50 \mu\text{l}$  の PCR 反応混合物から  $5 \mu\text{l}$  のサンプルを取出した。サンプルを、1.5% アガロースゲルで泳動した。31 サイクル後のエクソン 2 配列に特異的な PCR の結果を、図 17A に示す。写真を撮影し、Photoshop ソフトウェアを使用して蛍光を定量し、結果をヒストグラムに示した(図 17B ~ 17C)。

##### 【0139】

結果：本発明の目的は、EN301 処置下で AChE 遺伝子発現の減少を試験することであったが、AChE-S mRNA レベルが維持され、これはコリン作動性神経伝達の維持を反映する。

##### 【0140】

RNA 量に対する正規化により、EN301 処置脳は、共通の転写レベルで有意な 25% 減少( $=0.01$ 、スチューデント t 検定)を示したのに対し(図 17B)、S 変異型は非有意な 17% 増加を示し(図 17C)、これは、非処置脳と比較して mRNA の総量からの AChE-S mRNA の比較的より大きな割合を反映する。

##### 【0141】

AChE-S : 共通(S/Com) 転写物の間の比は、EN301 処置脳において、S/Com 比が有意に増加することを示した( $0.65 \sim 0.98$ )。したがって、異なるプライマー対は異なる効率で機能し得るので、分析した転写物の絶対量の比較のために RT-PCR データを使用することができなかった。しかし、これらの二つの試験は同方向に向かっている(すなわち、EN301 処置脳で AChE-R mRNA は減少するが AChE-S mRNA は減少せず、処置下で AChE-S mRNA の相対濃度が増加するが、有意ではない)ことは、この薬剤が脳遺伝子発現にも影響を及ぼすという概念を支持する。

##### 【0142】

この結果は、EN301 処置によって EN301 処置脳中に AChE-R mRNA が選択的に分布されながら本質的に変化されていない AChE-S レベルが維持されるという結論に至る。このような効果を発揮するために、EN301 が必ずしも血液脳関門を通過する必要はないことに留意のこと。むしろ、末梢 AChE レベルの減少により、アセチルコリンレベルが増加し、炎症誘発性サイトカイン(例えば、IL-1)のマクロファージによる産生が抑制される(Wang, H. et al. (2003) Nature 450, 505-508)。

21, 384-8)。IL-1はAChE遺伝子発現を促進し(Lietal.(2000)J.Neurosci.20, 149-155)、末梢炎症誘発性サイトカインが脳に影響を与えることが知られているので(Picketal.(2004)Annals NY Acad Sci. in press)、このような効果により、脳内のAChE-Rレベルを最終的に減少させる。

**【図面の簡単な説明】**

**【0143】**

【図1A-F】処置したサルのコリン作動性末端および分配細胞(partition cell)におけるVACHT蓄積の減少。

10

**【0144】**

図1A：抗VACHT抗体で免疫標識した(白)脊髄運動ニューロン(細胞の直径=40 μm)の共焦点顕微鏡の投影図。標識末端の総体積および細胞あたりの平均数を、Image-Pro Plusソフトウェアを使用して測定し、各処置の結果(1、2、3、および4)を、図1Bおよび1Cに示すグラフにプロットした。

**【0145】**

図1B：標識末端(切片で検出された全運動ニューロンが含まれる)の体積の平均値および細胞あたりの平均数。

**【0146】**

図1C：標識末端(切片で検出された全運動ニューロンが含まれる)の体積の個体群分布(population distribution)および細胞あたりの平均数。

20

**【0147】**

図1D：図1B、1C分析の平均値(±平均の評価標準(Standard Evaluation of the Mean))。有意な減少を、アスタリスクでマークする( $p < 0.01$ 、スチュードントt検定)。

**【0148】**

図1E：中心管に極めて近接して局在したナイープ脊髄由来の分配細胞中の抗ChAT抗体での免疫標識(矢印)。バックグラウンド染色のためにヘマトキシリンを使用した。

**【0149】**

1F：ナイープサル(1)、150 μg/Kg/日のhEN101の経口投与後(p.o.)、500 μg/Kg/日のhEN101の経口投与後(3)、および500 μg/Kg/日のhEN101のi.v.投与後(4)のより高い倍率のChAT陽性分配細胞。用量と無関係の取扱いにより、末端の体積および密度の両方の減少が誘導されることに留意のこと。

30

**【0150】**

略語：n、ナイープ；Term.、末端；vol.、体積；Part. C e.、分配細胞；Cent. Can.、中心管。

【図2A-J】サル脊髄ニューロンにおけるhEN101による選択的AChE-R mRNAの抑制。

40

**【0151】**

図2A：エクソンをコードするヒトAChE遺伝子ならびに二つのその別の転写物、シナプスAChE-S(S)mRNAおよびストレス関連AChE-R(R)mRNAの図である。S転写物は、エクソン2、3、4、および6を含むのに対し、R転写物は、エクソン2、3、4、5、および偽イントロン4'を含む。これらの特徴は、アスタリスクで示した転写物特異的プローブを調製するのに役立つ。

**【0152】**

図2B：切開したサル腰髄上のサンプリング部位を、矢印で示す。

**【0153】**

図2C～J：腰髄由来の組織切片を、記載の用量のhEN101でのp.o.およびi.v.投与での治療から7日後に調製した。記載のプローブを使用したニューロン標識パタ

50

ーンを比較するために使用した *in situ* ハイブリッド形成を示す。核を、D A P I 染色で視覚化した(白)。試験切片と全細胞数および/または一般的組織学との間の相違はなかった。A C h E - S m R N A 標識は神経突起切片においてのみ治療後に有意な変化が示されたのに対して(2 Dと比較した2 F、2 H、および2 J)、ニューロンA C h E - R m R N A 標識は細胞体で顕著に減少したこと留意のこと。

## 【0154】

図2 C : 処置なし、A C h E - R m R N A に特異的な染色。

## 【0155】

図2 D : 処置なし、A C h E - S m R N A に特異的な染色。

## 【0156】

図2 E : 150 μg / kg / 日のEN101のp. o. 投与での処置、A C h E - R m R N A に特異的な染色。

10

## 【0157】

図2 F : 150 μg / kg / 日のEN101のp. o. 投与での処置、A C h E - S m R N A に特異的な染色。

## 【0158】

図2 G : 500 μg / kg / 日のEN101のp. o. 投与での処置、A C h E - R m R N A に特異的な染色。

20

## 【0159】

図2 H : 500 μg / kg / 日のEN101のp. o. 投与での処置、A C h E - S m R N A に特異的な染色。

## 【0160】

図2 I : 500 μg / kg / 日のEN101のi. v. 投与での処置、A C h E - R m R N A に特異的な染色。

## 【0161】

図2 J : 500 μg / kg / 日のEN101のi. v. 投与での処置、A C h E - S m R N A に特異的な染色。

【図3 A - C】ニューロンA C h E - R m R N A 抑制の細胞サイズ依存有効性。

## 【0162】

図3 A : 腰髄およびその三つの区画の図：中間帯および中心管で分けられた前角および後角。

30

## 【0163】

図3 B : 腰髄の中間帯中の代表的な領域の組織染色(ヘマトキシリンおよびエオシン)。三つの細胞を以下のその神経細胞形質の直径にしたがってマークする：10 ~ 20 μm(矢印、これらの細胞の大部分は後角に存在する)、20 ~ 40 μm(アスタリスク)、および= 40 μm(矢印)。

## 【0164】

図3 C : 異なる治療計画下での三つのサイズ群由来のA C h E - R 陽性ニューロンの画分を示す。差し込み図：p. o. での150 μg / kg / 日の投与計画から採取した異なるサイズ群由来の代表的ニューロン。カラムは、複数の切片中の全腰髄の灰白質の反復分析を示す各サイズ群における平均A C h E - R 陽性細胞 ± S E Mを示す。星印は、有意差を示す(p < 0.05、ウィルコクスン検定)。

40

## 【0165】

略語：C e n t . C a n . 、中心管；D . h . 、後角；I . z . 、中間帯；V . H . 、前角；p o s . c e . 、陽性細胞；s i . g r . 、サイズ群；C e . B o . D i a m . 、細胞体の直径。

【図4 A - C】A C h E - R 発現を伴うアンチセンス介在下でのストレス誘導性ニューロン炎症誘発性サイトカインの抑制。

## 【0166】

図4 A : 異なる治療計画下での中間および大きなサイズのI L - 1 陽性脊髄ニューロン

50

の画分を示す（複数の切片中の腰髄の前角および中間帯の反復分析を示すカラム  $\pm$  S E M）。差し込み図：p . o . での  $500 \mu\text{g} / \text{Kg} / \text{日}$  の投与計画から採取した代表的な中間サイズおよび大きなサイズの陽性ニューロン。\*\*P = 0 . 0 5、\*\*P = 0 . 0 6 7。

#### 【0167】

図4B：異なる h E N 1 0 1 処置における A C h E - R と I L - 1 陽性中間サイズ細胞 ( $20 \sim 40 \mu\text{m}$ ) の平均画分の間の相関関係を示すグラフ。大きなサイズの細胞 ( $40 \mu\text{m}$  超) は、このような相関関係を示さなかった ( $R^2 = 0 . 1778$ )。

#### 【0168】

図4C：I L - 6 陽性脊髄ニューロン画分を、本質的に 4A と同様に評価した。 $500 \mu\text{g} / \text{Kg} / \text{日}$  の E N 1 0 1 で処置したサルの脊髄ニューロン中の I L - 1 および I L - 6 両方の減少に留意のこと。

#### 【0169】

略語：p o s . c e . 、陽性細胞。

#### 【図5A-D】A C h E 活性のヒト血漿レベルおよびA C h E - R 切断の経時変化。

#### 【0170】

図5A：加水分解活性：注射後の示した間隔にて内毒素または生理食塩水（偽薬）を二回注射した 10 人のボランティアの血漿 A C h E 活性（平均  $\pm$  S E M）を示す。注射前（ベースライン）A C h E レベルを、各個体の 100 % と見なした。アスタリスクは、統計上の相違を示す ( $p < 0 . 0 5$ )。

20

#### 【0171】

図5B：免疫プロット：一個体の連続的結果を示す。血漿サンプルを S D S - P A G E による電気泳動に供し、プロットを抗 A C h E - R 抗体で免疫反応させた。6 . 5 k D a の A C h E - R 切断産物に留意のこと。左のレーンは、偽薬注射に対する応答を示す；右のレーンは、内毒素に応答した A C h E - R 切断の増加を示す。

#### 【0172】

図5C：デンシトメトリー強度。ベースラインの % としての内毒素および偽薬で処置した個体の血漿中の迅速に移動する A C h E - R 切断産物の平均値（平均  $\pm$  S E M）を示す（A に記載）。

30

#### 【0173】

注釈：内毒素処置被験体の A C h E - R 切断の増加は、A C h E 活性の減少と同時に現れた。

#### 【0174】

図5D：関連分析。最後の試験期間 ( $t = 9$  時間) の間の内毒素下での A C h E - R 切断の増加および A C h E 活性の減少の間に高度に有意な負の関連（相関係数、 $r = -0 . 65$ ）が現れた。各点は、一個体を示す。

#### 【0175】

略語：A c t . 、活性；b a s . 、ベースライン；H . p . i n j . 、注射後（時間）；T . p . i n j . 、注射後の時間；P l a c . 、偽薬；E n d o t . 、内毒素；C l e a v . P r o d . 、切断産物。

40

【図6】ゲル溶離バンドの質量分析。抗 A C h E - R 抗体と免疫反応したゲル溶離による迅速に移動したバンドの電子スプレー質量分析の結果を示す。主なペプチドの分子量が 3613 ~ 3615 であることに留意のこと。予測質量の計算により、A C h E - R の C 末端から 36 残基のタンパク質分解切断部位（示した配列中のアスパラギン残基とアルギニン残基との間）が推定され、推定切断部位を矢印で示し、転換部位を星印で示した。

#### 【0176】

略語：R e l . a b u n d . 、相対存在量。

#### 【図7A-C】A C h E - R は、種々の組織由来のヒト血管内皮細胞中に発現する。

#### 【0177】

図7A : A C h E - R m R N A。炎症過程（皮膚過敏性血管炎；ピンク色でラベリング

50

し、赤い矢印で示す)を罹患したヒト血管内皮細胞の切片に対するAChE-R mRNA A変異型に選択的な5'ビオチン化cRNAプローブを使用したin situハイブリッド形成の結果を示す。

【0178】

図7B: AChE-Rタンパク質。AChE-RのC末端ペプチドでターゲティングした抗体(赤色の矢印)で標識した血管炎患者由来のヒト腎臓血管内皮細胞の免疫顕微鏡写真を示す。

【0179】

図7C: 画像分析。定義した強度範囲内の赤色ピクセルの比率としての腎臓、皮膚、および筋肉の血管内皮細胞における平均AChE-R mRNAおよびAChE-Rタンパク質の標識強度(それぞれ黒色および白色のカラム)(平均値±SEM)を示す。  
10

【0180】

略語: prot.、タンパク質; int.、強度; k.rej.、腎臓拒絶; k.vas.、腎臓血管; non spec.、非特異的; n.end.、正常な内皮; m.筋肉、hyp.vasc.、過敏性血管炎。

【図8A-C】AChE-R切断とコルチゾールおよびサイトカインの変化との間の二方向性の関係。

【0181】

内毒素または偽薬で処置した10人の患者のコルチゾール、TNF-、およびIL-6の血漿レベルにおける経時変化の平均±SEM(左)ならびにこれらの変化とAChE-R切断(C末端AChE-R切断産物のデンシティメトリー法による定量によって測定)との間の示した時点での関連(右)を示す。  
20

【0182】

図8A: コルチゾール。

【0183】

図8B: TNF-。

【0184】

図8C: IL-6。

【0185】

略語: r.、相関関数; t.、注射後の時間; Plac.、偽薬; end.、内毒素; H.p. inj.、注射後の時間(時間); Cleav. prod.、切断産物。  
30

【図9】: 内毒素は、陳述記憶を悪化させる。治療後の示した時間に処置した内毒素および偽薬の即時対話想起試験(immediate story recall test)の能力についての平均±SEMならびに注射から9時間後のこれらの値の変化とAChE-R切断(b)およびAChE活性(c)との関係を示す。

【0186】

略語: I.s.r.、即時対話想起; plac.、偽薬; endot.、内毒素; H.p. inj.、注射後の時間; cleav. prod.、切断産物; act.、活性。

【図10】作業記憶における内毒素誘導性障害。内毒素および偽薬処置個体についての期間バックグラウンド試験(sdpn background test)の能力値(平均±SEM)(a)ならびに注射から3時間後のこの能力の変化とAChE-R切断との関連(b)を示す。  
40

【0187】

略語: r.、相関係数; t.、注射後の時間(時間); S.b.、短期間逆方向復唱(span backward); cleav. prod.、plac.、偽薬; endot.、内毒素; H.p. inj.、注射後の時間(時間); cleav. prod.、切断産物; act.、活性。

【図11A-C】スキーム-内毒素は、記憶に対する相関するサイトカイン-コリン作動性の影響を誘導する。本研究で調査し、記憶過程の変化および処置後観察期間におけるこれらの変化の動的改変を説明する細胞および生化学的事象を示す。矢印の濃淡は、関連過  
50

程の相対強度を反映する。

**【0188】**

図11A：処置1時間後：内毒素は、サイトカイン、コルチゾール、およびプロテアーゼの放出を誘導する。サイトカインの上昇は、医学的側頭葉関連現象である陳述記憶の障害と関連する。コルチゾールは、血漿中の免疫陽性AChE-R量を上昇させるAChE-R産生を誘導する。血管AChは、シナプス間隙に放出され、ニューロンの電気生理学に影響を及ぼし、新皮質関連特性である作業記憶を改善することができる。周囲中、AChは、マクロファージにおけるサイトカイン産生を抑制し始める（円形の矢印）。

**【0189】**

図11B：処置3時間後：プロテアーゼは、AChE-Rから36アミノ酸長のC末端フラグメントを放出してさらなる破壊を開始し、その後AChE活性を減少させる。内毒素は既に消失し、AChはサイトカイン産生を有効に抑制する；AChレベルの増加（分泌の増加およびAChEの加水分解活性の減少を反映する）は、おそらく作業記憶の活性化に関連するのに対して、AChE-R切断産物の増加は、作業記憶の改善の低下に関連する。

10

**【0190】**

図11C：処置9時間後：コルチゾールも消失する。しかし、AChEの持続的であるが緩やかな減少はおそらくACh增加による陳述記憶の悪化および作業記憶の活性化に関連する。AChE-R切断産物の安定した増加は、陳述記憶の悪化がより大きく、且つ作業記憶の改善がより小さいことの両方に関連する。

20

**【0191】**

略語：*i n c . l e v .*、レベルの増加；*d e c . l e v .*、レベルの減少；*c l e a v . P r o d .*、切断産物。

**【図12A-B】**トランスジェニックマウスは、野生型マウスよりも高い体温を示す。

**【0192】**

図12A：各マウスの経時の体温を示すグラフであり、四角はトランスジェニックマウスを示し、円はコントロールを示すグラフ。

**【0193】**

図12B：各群（トランスジェニック群またはコントロール群）の経時の平均体温を示し、菱形はトランスジェニックマウスを示し、四角はコントロールを示すグラフ。

30

**【0194】**

略語：*A n . T .*、肛門温度；*A v e r . A n . T .*、平均肛門温度；*T . p . a n e s t .*、麻酔後の時間。

**【図13A-C】**海馬中のLPS誘導性IL-1分泌および血清中のIL-1およびTNF- 分泌に対するタクリンの影響。

**【0195】**

図13A：海馬中のIL-1 レベルを示すグラフ。

**【0196】**

図13B：血清中のIL-1 レベルを示すグラフ。

40

**【0197】**

図13C：血清中のTNF- レベルを示すグラフ。

**【0198】**

略語：*p r o t .*、タンパク質；*s e r .*、血清；*s a l .*、生理食塩水。

**【図14A-C】**海馬中のLPS誘導性IL-1分泌および血清中のIL-1およびTNF- 分泌に対するリバステイグミンの影響。

**【0199】**

図14A：海馬中のIL-1 レベルを示すグラフ。

**【0200】**

図14B：血清中のIL-1 レベルを示すグラフ。

**【0201】**

50

図 14 C : 血清中の TNF - α レベルを示すグラフ。

【0202】

略語 : prot.、タンパク質；ser.、血清；sal.、生理食塩水。

【図 15 A - H】感情および認識パラメータに対する手術ストレスの影響。

【0203】

図 15 A : 不安に対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

【0204】

図 15 B : 鬱病に対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

【0205】

図 15 C : 疲労に対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

10

【0206】

図 15 D : 痛みに対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

【0207】

図 15 E : 単語リストの想起に対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

【0208】

図 15 F : 単語リストの認識に対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

【0209】

図 15 G : 対話想起に対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

【0210】

図 15 H : 数字想起に対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

20

【0211】

略語 : Cont.、コントロール；str.、ストレス；T.、時間；Anx. : 不安、Dep.、鬱病；Fat.、疲労；P.、痛み；W.L.R.、単語リストの想起、W.L.Recog.、単語リストの認識；S.R.、対話想起；Fig.R.、数字想起。

【図 16 A - C】サイトカインレベルに対する手術ストレスの影響。

【0212】

図 16 A : IL - 1 レベルおよび IL - 6 レベルに対する手術ストレスの影響を示すグラフ。

【0213】

図 16 B : IL - 1 と鬱病との間の相関関係。

30

【0214】

図 16 C : サイトカインと認識パラメータとの間の相関関係。

【図 17 A - C】EN301 処置の際の AChE 発現の減少。

【0215】

図 17 A : RT - PCR 反応の分析 (31 PCR サイクル後の AChE エクソン 2 産物)。左から右 : レーン 1、マーカー；レーン 2 ~ 8、EN301 処置マウス由来のサンプル；レーン 9 ~ 14、PBS 処置マウス由来のサンプル。

【0216】

図 17 B : マウス AChE cDNA のエクソン 2 中の共通配列をターゲティングするプライマーを使用した PCR 反応で得られた結果の定量分析を示すヒストグラム。

40

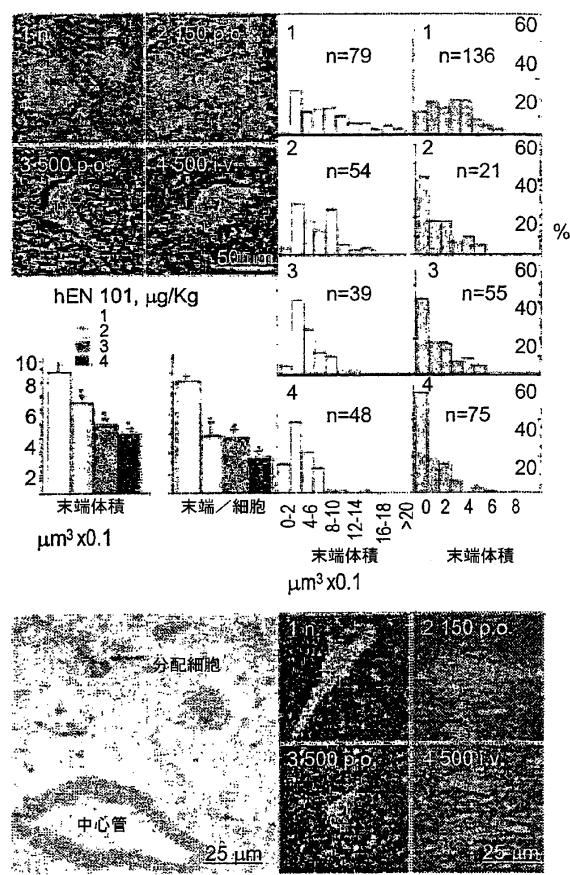
【0217】

図 17 C : AChE - S 変異型に固有のエクソン 6 中の配列をターゲティングするプライマーを使用した PCR 反応で得られた結果の定量分析を示すヒストグラム。

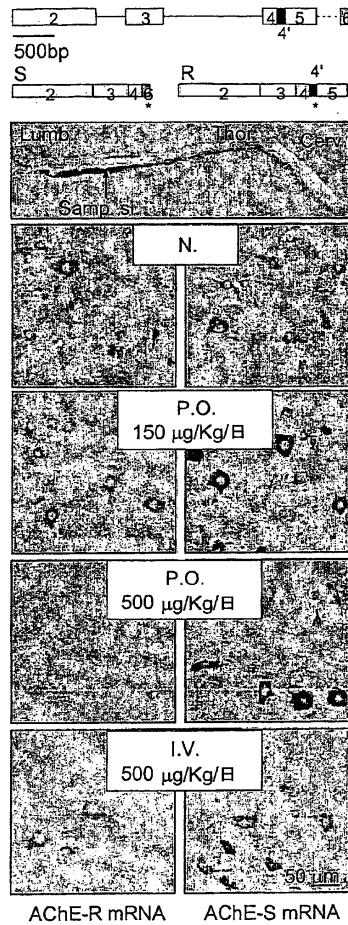
【0218】

略語 : c.d.、共通ドメイン；Arb.U.、任意単位；sal.、生理食塩水。

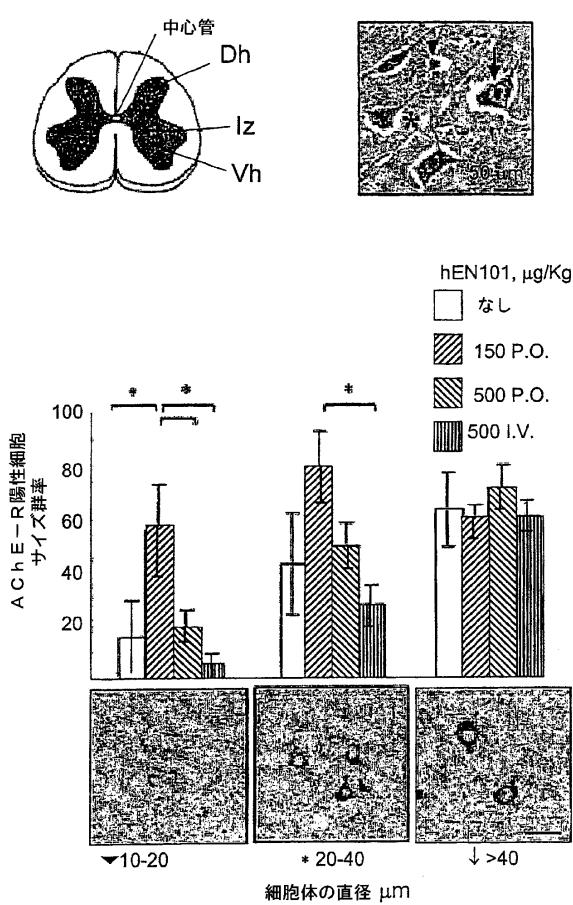
【図 1 A - F】



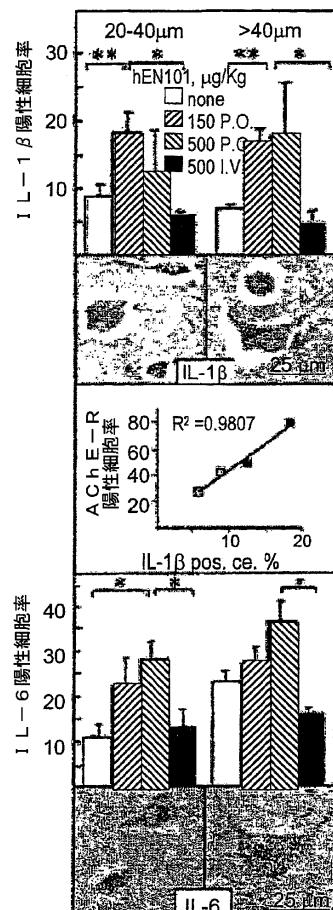
【図 2 A - J】



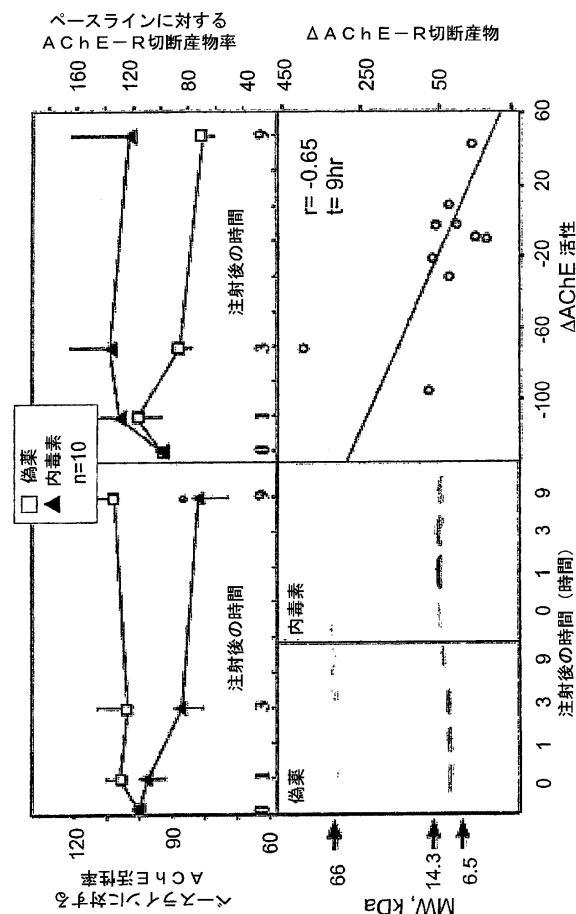
【図 3 A - C】



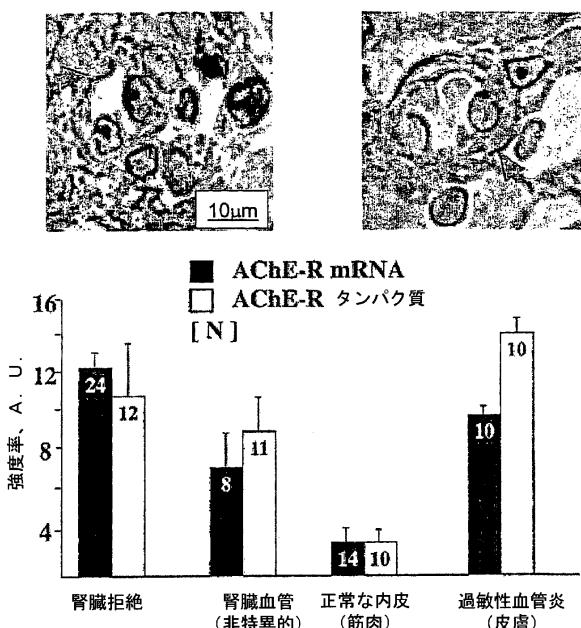
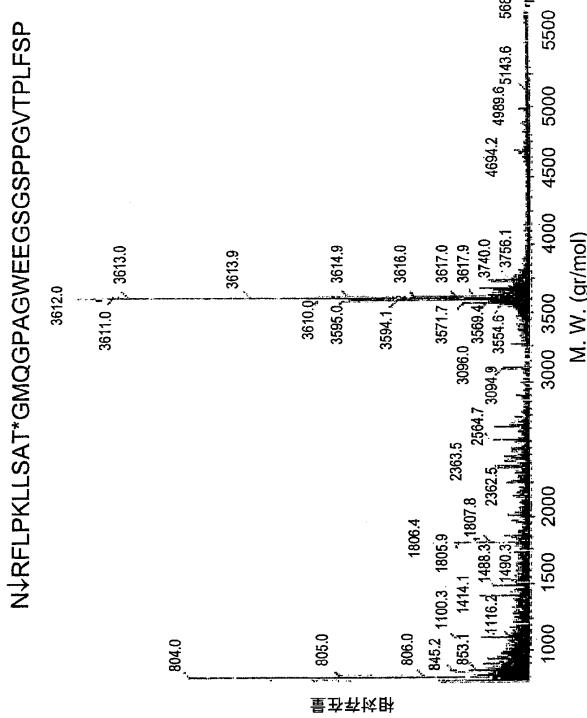
【図 4 A - C】



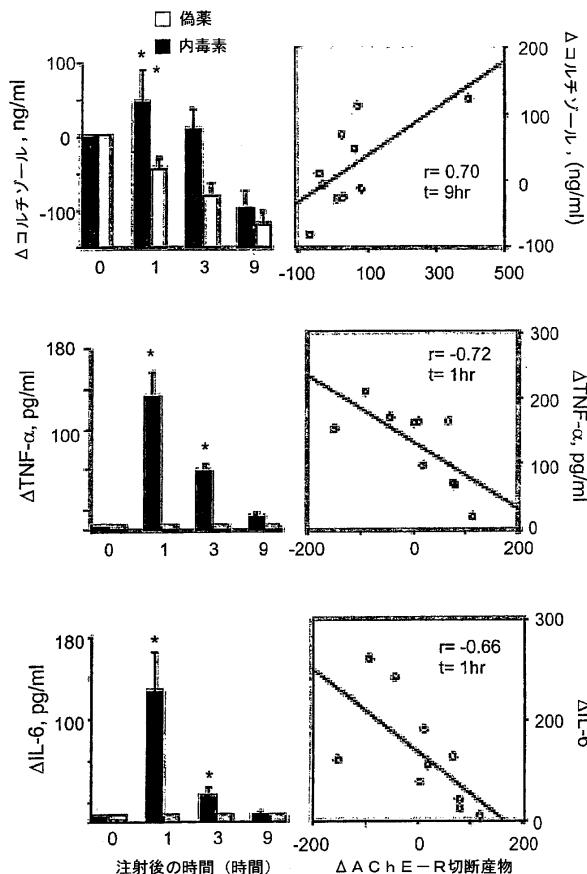
【図 5 A - D】



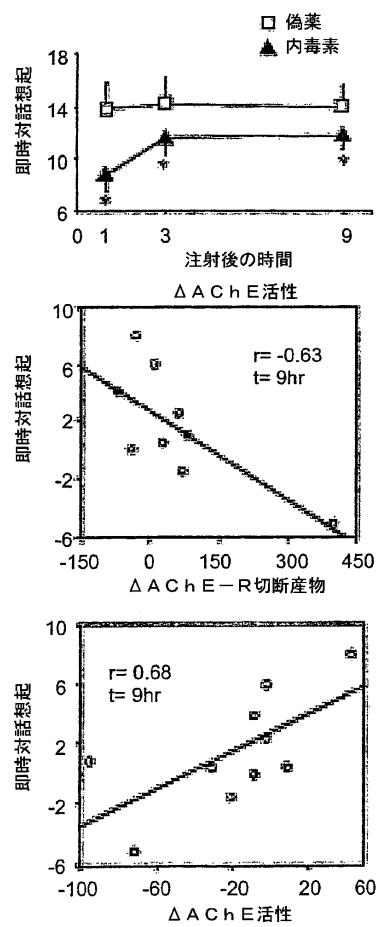
【図 6】



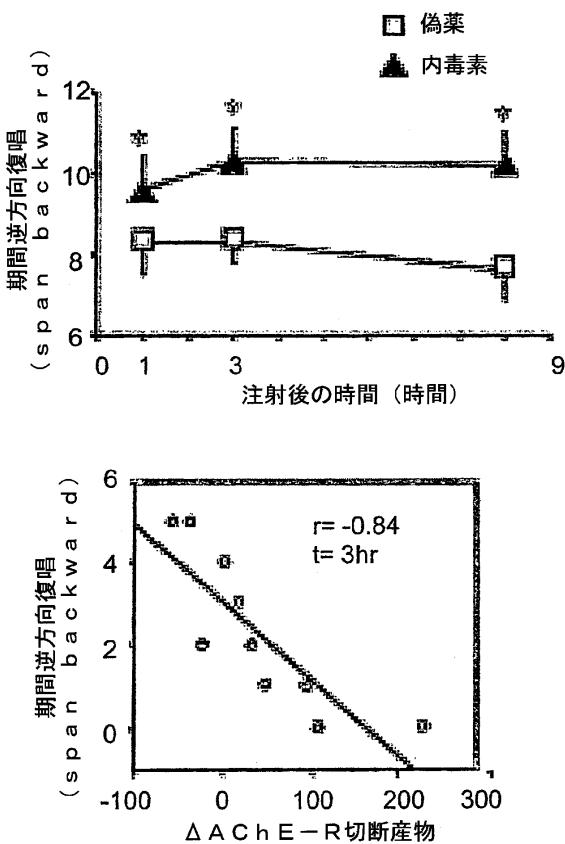
【図 8 A - C】



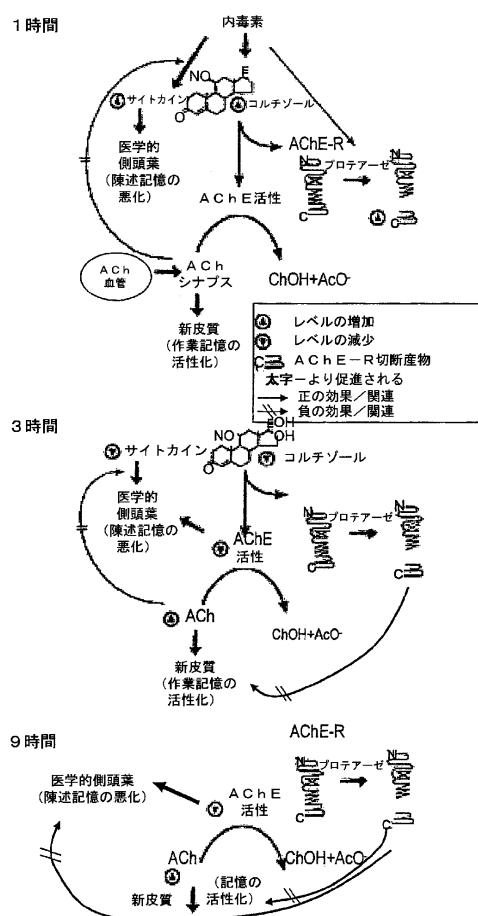
【図9】



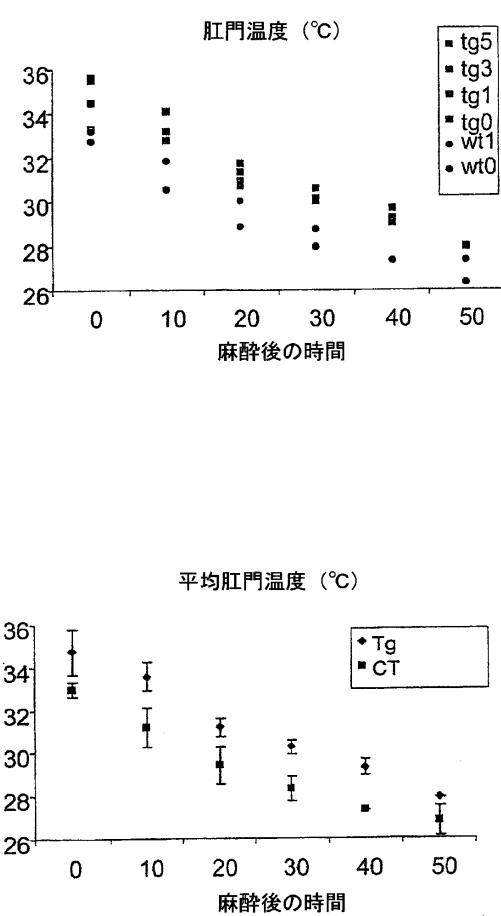
【図10】



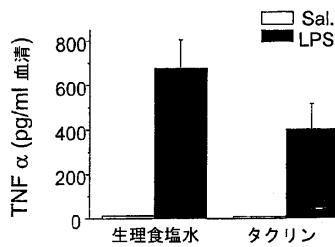
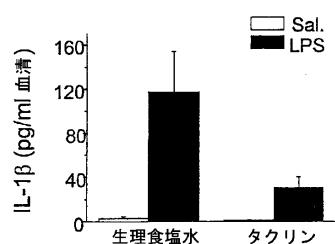
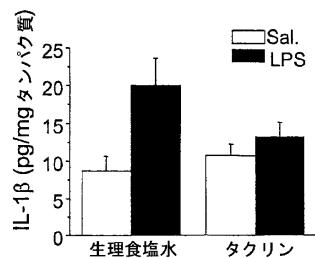
【図11A-C】



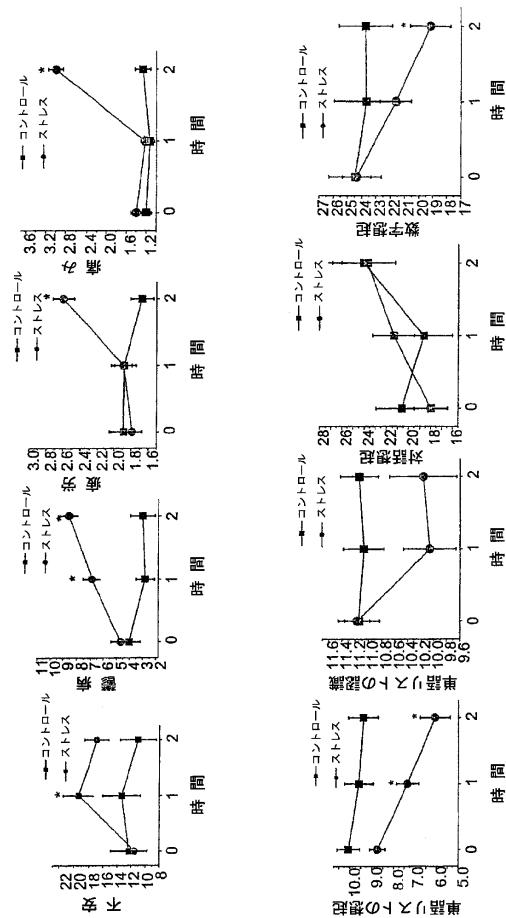
【図12A-B】



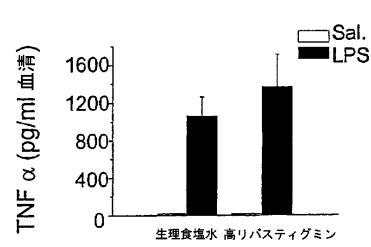
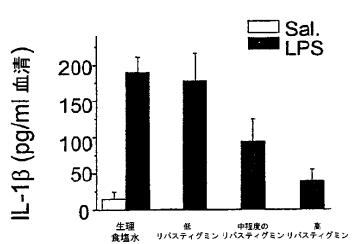
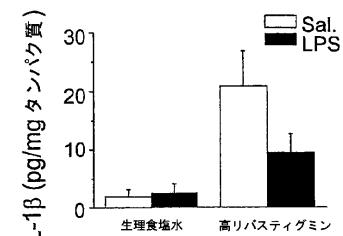
【図 13 A - C】



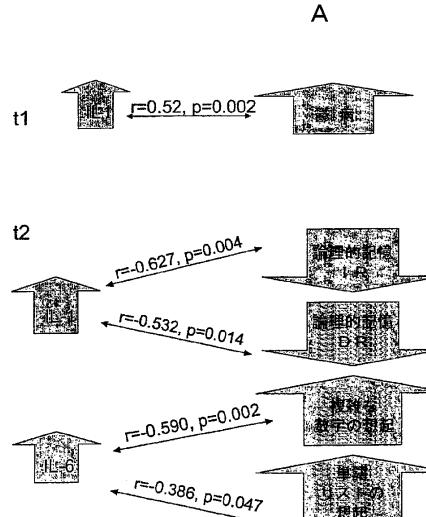
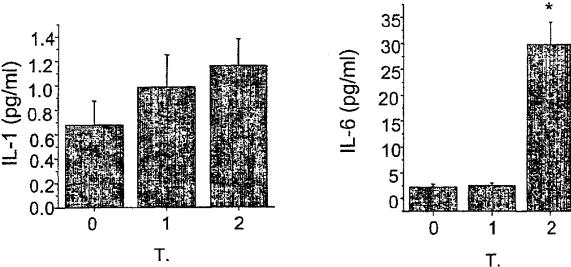
【図 15 A - H】



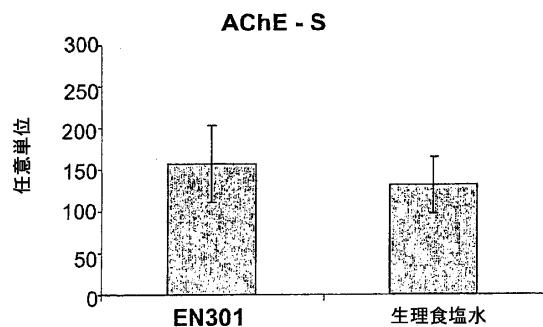
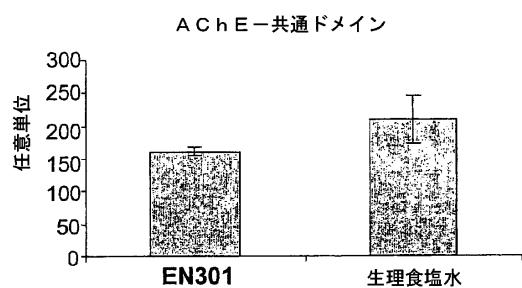
【図 14 A - C】



【図 16 A - C】



【図 1 7 A - C】



【配列表】

0004753088000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100095304  
弁理士 橋本 千賀子  
(74)代理人 100103643  
弁理士 松嶋 さやか  
(74)代理人 100120433  
弁理士 高部 育子  
(74)代理人 100135127  
弁理士 石田 正己  
(72)発明者 ソレク ヘルモナ  
イスラエル国 95930 エルサレム ハマアヤン ストリート 14  
(72)発明者 イラミヤ ラズ  
イスラエル国 97855 マクヴォ ダカール ストリート 5

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 特表2001-510336 (JP, A)  
国際公開第03/002739 (WO, A1)  
国際公開第99/008672 (WO, A1)  
米国特許第05891725 (US, A)  
MESHORER, E. et al., Advances in Behavioral Biology, 2000年, Vol.51, pp.45-48  
WANG, H. et al., Nature, 2003年 1月, Vol.421, pp.384-388  
SHOHAMI, E. et al., J. Mol. Med., 2000年, Vol.78, pp.228-236  
SOREQ, H. et al., I.M.A.J., 2000年, Vol.2, pp.81-85  
LICASTRO, F. et al., Journal of Neuroimmunology, 2000年, Vol.103, pp.97-102

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 45/00  
A61K 48/00  
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)