

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4601816号
(P4601816)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/708 (2006.01)	A 6 1 K 31/708
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
C O 7 H 19/167 (2006.01)	C O 7 H 19/167

請求項の数 36 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2000-508376 (P2000-508376)
 (86) (22) 出願日 平成10年2月20日(1998.2.20)
 (65) 公表番号 特表2001-516695 (P2001-516695A)
 (43) 公表日 平成13年10月2日(2001.10.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/003001
 (87) 国際公開番号 WO1999/011274
 (87) 国際公開日 平成11年3月11日(1999.3.11)
 審査請求日 平成17年2月21日(2005.2.21)
 (31) 優先権主張番号 08/921,902
 (32) 優先日 平成9年9月2日(1997.9.2)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

特許法第30条第1項適用 Soc. Neurosci.
 . Abstr. Vol. 23, Part 2, p. 17
 08, 1997に発表

(73) 特許権者 591044027
 チルドレンズ メディカル センター コ
 ーポレーション
 CHILDREN'S MEDICAL
 CENTER CORPORATION
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 1 5 ポストン シャタックストリー
 ト 5 5
 (74) 復代理人 110000523
 アクシス国際特許業務法人
 (74) 代理人 100067817
 弁理士 倉内 基弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中枢神経系ニューロンの軸索の伸出を調節するためのプリンヌクレオシドの利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中枢神経系ニューロンの軸索の伸出を調節する方法において使用する、本質的に有効量のイノシンからなる医薬組成物であって、該方法が、中枢神経系ニューロンを、当該医薬組成物と、軸索の伸出が刺激されるように接触させることを含む、当該医薬組成物。

【請求項 2】

前記の中枢神経系ニューロンが哺乳動物の当該ニューロンである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

傷害後に中枢神経系ニューロンの軸索伸出を刺激する方法において使用するイノシンよりなる医薬組成物であって、該方法が該医薬組成物を患者に、軸索伸出が刺激されるように投与することを含む、請求項 1 又は 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4】

傷害が卒中によるものである、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

傷害が外傷性脳障害(TBI)によるものである、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

傷害が大脳動脈瘤によるものである、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

傷害が脊髄損傷によるものである、請求項 3 に記載の医薬組成物。

10

20

【請求項 8】

脊髄損傷を、単麻痺、両側麻痺、対麻痺、半側麻痺及び四肢麻痺よりなる群から選択する、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

中枢神経系ニューロンとの接触におけるイノシン濃度が $2.5 \mu\text{M}$ である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

イノシンを $5 \mu\text{M} \sim 1000 \mu\text{M}$ の濃度で投与する、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

イノシンを $10 \mu\text{M} \sim 500 \mu\text{M}$ の濃度で投与する、請求項 3 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 12】

イノシン を患者の中枢神経系への導入により投与する、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

イノシン を患者の脳脊髄液中に導入する、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

イノシン を髄膜下へ導入する、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

イノシン を脳室中に導入する、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 16】

イノシン を腰椎部に導入する、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

イノシン を大槽中に導入する、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

イノシン を製薬上許容し得る配合物にて投与する、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

製薬上許容し得る配合物が分散系である、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

製薬上許容し得る配合物が脂質ベースの配合物を含む、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 21】

製薬上許容し得る配合物がリボソーム配合物を含む、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

製薬上許容し得る配合物が多小胞性リボソーム配合物を含む、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

製薬上許容し得る配合物がポリマーマトリクスを含む、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

製薬上許容し得る配合物が小型ポンプ内に含まれる、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 25】

製薬上許容し得る配合物が、その製薬上許容し得る配合物を患者に投与した後少なくとも 1 週間にわたる イノシン の患者への持続的送達を与える、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

製薬上許容し得る配合物が、その製薬上許容し得る配合物を患者に投与した後少なくとも 1 ヶ月にわたる イノシン の患者への持続的送達を与える、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

50

患者が哺乳動物である、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

哺乳動物がヒトである、請求項 2 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

中枢神経系ニューロンが網膜神経節細胞である、請求項 1 又は 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

患者における哺乳動物中枢神経系ニューロンの軸索伸出を刺激するための医薬品製造に使用される、イノシンよりなる医薬。

【請求項 3 1】

医薬がイノシン以外の如何なる神経成長モジュレーターをも含まない、請求項 3 0 に記載の医薬。

10

【請求項 3 2】

医薬が、中枢神経系、脳脊髄液、髄膜下、脳室、腰椎部及び大槽よりなる群から選択する患者中の部位への投与に適している、請求項 3 0 に記載の医薬。

【請求項 3 3】

イノシンが 2 5 μ M の濃度で存在する、請求項 3 0 に記載の医薬。

【請求項 3 4】

医薬が患者におけるイノシンの持続的送達を与える、請求項 3 0 に記載の医薬。

【請求項 3 5】

医薬が、卒中による傷害、外傷性脳障害(TBI)による傷害、大脳動脈瘤による傷害及び脊髄損傷よりなる群から選択する傷害の治療に適している、請求項 3 0 に記載の医薬。

20

【請求項 3 6】

イノシンと製薬上許容し得るキャリアーを含む請求項 1 に記載の製薬組成物をパッケージ化されたこの製薬組成物の使用についての指示と共に含む、中枢神経系疾患の治療のためのパッケージ化された配合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

幼児期後における中枢神経系(CNS)への傷害は、大抵は不可逆性の機能障害を生じる。脳又は脊髄内では、卒中、外傷その他の原因から生じたダメージは、認識、感覚及び運動機能の終生の喪失を生じ得るし、生活機能の維持さえも喪失し得る。失われた神経細胞は、取替えられることはなく、傷の部位の近くでは限られた量の局所的なシナプス再編成が起こり得るにもかかわらず、予備の細胞は、一般に、切断された連絡を再生することはできない。失われた機能は、現在、治療することはできない。

30

【0002】

CNSにおける再生不能は、軸索の生長を抑制するグリア細胞表面上の阻害性分子の存在；生長を促進する適当な基質分子例えばラミニンの不在及び細胞の生存と分化に必要な遺伝子発現のプログラムを活性化するのに必要とされる適当な栄養因子の不在を含む幾つかの因子に帰せられてきた。

【0003】

40

対照してみると、末梢神経系(PNS)内では、傷害を受けた神経繊維は、結果的に機能の良好な回復を伴って、長距離にわたって再生し得る。過去15年間に、神経科学者は、これが末梢神経系と中枢神経系の神経細胞間の本来的な差の結果ではないということ；著しくCNSのニューロンは、PNS(例えば、座骨神経)の移植片を通して生長する機会を与えられれば非常に長距離にわたって軸索を伸ばすであろうことを認識するに至った。それ故、CNSのニューロンは、細胞外環境からの正しいシグナルを受ければ生長する能力を保持している。CNSとPNSの異なる潜在的生長能力に寄与する因子には、CNS中で神経繊維を囲むがPNS中の同等の細胞集団(シュワン細胞)にはそれ程多くない希突起グリア細胞表面上の部分的に特性決定された生長阻害性分子；PNSでは生長を促進するがCNS中には存在しない基底層その他の表面の分子(例えば、ラミニン)；及び細胞の生存

50

と分化の基礎となる遺伝子発現のプログラムを活性化する栄養因子、可溶性ポリペプチドが含まれる。かかる栄養因子は神経細胞の生存力と分化の維持に必須と考えられているが、CNSにおける軸索の再生の誘導の原因である特定のものは、未確認のままである。その結果、今日まで、CNS傷害に対する有効な治療薬は、開発されなかった。

【0004】

従って、CNSニューロンの伸出を調節するための方法及び組成物が、依然として、必要とされている。

【0005】

発明の要約

本発明は、中枢神経系ニューロン特に哺乳動物の中枢神経系ニューロンの軸索の伸出を調節するための方法及び組成物を提供する。この発明は、少なくとも部分的に、プリンヌクレオシド及びそのアナログが、哺乳動物のCNSニューロンを含むCNSニューロン(例えば、網膜神経節ニューロン)の軸索の伸出を調節する(即ち、刺激するか又は阻害する)ことができるという発見に基づいている。その上、この発明のプリンヌクレオシド及びそれらのアナログは、何ら更なる神経成長モジュレーター(神経成長因子等)の存在なしでCNSニューロンの軸索の伸出の調節に有効である。

【0006】

従って、この発明の方法は、一般に、中枢神経系ニューロンをプリンヌクレオシド又はそのアナログと接触させることを包含する。一面において、この発明は、好ましくはイノシン若しくはグアノシンヌクレオシド又はこれらのアナログを用いて伸出を刺激する方法を提供する。他の面において、この発明は、好ましくは6-チオグアニンを用いて伸出を刺激する方法を提供する。特に好適な具体例においては、この発明の方法は、網膜神経節細胞の軸索の伸出を調節する。

【0007】

この発明の中枢神経系ニューロンの軸索の伸出を刺激する方法は、CNSニューロンに対するダメージ又は他の傷害(例えば、卒中、外傷性脳障害、大脳動脈瘤、脊髄損傷等)の後に用いることができる。この発明のCNSニューロンの軸索の伸出を阻害する方法は、異所的軸索伸出が起こり得る神経増殖性疾患例えば癲癇(例えば、外傷後癲癇)及び神経障害性疼痛症候群において用いることができる。

【0008】

一面において、プリンヌクレオシド又はそのアナログを、本発明に従って、患者の中枢神経系に(例えば、患者の脳脊髄液中に)導入することにより、患者に投与する。この発明のある面においては、プリンヌクレオシド又はそのアナログを髄膜下に例えば脳室、腰椎部又は大槽中に導入する。好適具体例において、この発明の刺激方法は、ダメージを受けた網膜神経節細胞の伸出を促進する。かかる状況において、プリンヌクレオシド又はそのアナログを局所的に網膜神経節細胞に投与して軸索の伸出を刺激することができる。

【0009】

この発明の更に別の面においては、プリンヌクレオシド又はそのアナログを、製薬上許容し得る配合物にて投与する。製薬上許容し得る配合物は、分散系例えば脂質ベースの配合物、リポソーム配合物又は多小胞性リポソーム配合物であってよい。製薬上許容し得る配合物は又、例えば合成ポリマー例えばポリエステル(PLA、PLGA)、ポリエチレングリコール、ポロキシマー、無水ポリマー及びプルロニックから選択するポリマーマトリクス又は天然から誘導されたポリマー例えばアルブミン、アルギネート、セルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン及び多糖類から選択するポリマーマトリクスをも含むことができる。

【0010】

好適具体例において、製薬上許容し得る配合物は、プリンヌクレオシドの患者への送達であって、製薬上許容し得る配合物の患者への投与後少なくとも1週間(一層好ましくは、少なくとも1ヶ月)にわたる持続的送達例えば「緩慢な放出」を与える。この発明の配合物の持続的送達を達成するための好適なアプローチには、この配合物を含む緩慢な放出用

10

20

30

40

50

のポリマー製カプセル又は浸出ポンプの利用が含まれる。

【 0 0 1 1 】

この発明は、更に、中枢神経系ニューロン(好ましくは、哺乳動物の CNS ニューロン)の軸索の伸出を調節するための医薬の製造におけるプリンヌクレオシド又はそのアナログの利用をも包含する。好適具体例において、この医薬は、プリンヌクレオシド又はそのアナログ以外の神経成長モジュレーターを含まない。例えば、一具体例において、この医薬は、神経成長因子を含まない。

【 0 0 1 2 】

この発明のプリンヌクレオシド又はそのアナログ及び製薬上許容し得るキャリアーを含む製薬組成物及びパッケージ化された配合物も又、この発明により与えられる。

10

【 0 0 1 3 】

この発明の他の特徴及び利点は、下記の詳細な説明及び請求の範囲から明らかとなる。

【 0 0 1 4 】

詳細な説明

本発明は、中枢神経系(CNS)ニューロンの軸索の伸出を調節するための方法、特に、哺乳動物の CNS ニューロンの軸索伸出を調節する方法を提供する。この発明は、少なくとも部分的に、ある種のプリンヌクレオシド(例えば、イノシン及びグアノシン)及びそれらのアナログが金魚並びに哺乳動物の網膜神経節細胞からの軸索の伸出の刺激を誘導するという発見に基づいている(それぞれ、実施例 I 及び X I を参照されたい)。この発明は、更に、少なくとも部分的に、他のプリンヌクレオシド例えばアデノシンヌクレオシド及びそのアナログが網膜神経節細胞からの軸索伸出の阻害を誘導するという発見に基づいている(実施例 X 参照)。実施例 I I に示すように、プリンヌクレオシドは、それらの対応ヌクレオチドより一層活性であり、それらは、細胞内経路によってそれらの効果を発揮する(実施例 V I 参照)。その上、脱アミドによるアデノシンのイノシンへの変換(例えば、外因性のアデノシンデアミナーゼによる)は、軸索伸出の刺激を生じるが、アデノシンの脱アミドの妨害は、軸索伸出の阻害を生じる(実施例 I V 参照)。尚、更に、これらのプリンヌクレオシド又はそれらのアナログの軸索伸出に対するこの効果は、他の神経成長モジュレーター(例えば、神経成長因子)の存在を必要としない。

20

【 0 0 1 5 】

従って、CNS ニューロンの軸索伸出を調節するためのこの発明の方法は、一般に、中枢神経系ニューロンをプリンヌクレオシド又はそのアナログに、軸索伸出が調節されるように接触させることを含む。

30

【 0 0 1 6 】

好適具体例において、この発明の方法を用いて、傷害例えば卒中、外傷性脳障害、大脳動脈瘤又は脊髄損傷の後に、中枢神経系ニューロンの軸索伸出を刺激する(例えば、イノシン又はグアノシンを用いて)。

【 0 0 1 7 】

他の好適具体例においては、この発明の方法を用いて、例えば、異所的又は過度の軸索伸出が起こり得る神経増殖性疾患例えば癲癇又は神経障害性疼痛疾患における CNS ニューロンの軸索伸出を阻害する(例えば、6 - チオグアニンを用いて)。癲癇例えば外傷後癲癇においては、錐体ニューロンの傷害を受けた軸索の発芽は、過度に頻発的な興奮性シナプス及び過興奮性の神経ネットワークの形成へと導くということが観察されている(Prince D.A. 等(1997)Nature Medicine 3:957-958 ; 及びMcKinney R.A. 等(1997)Nature Medicine 3:990-996を参照されたい)。その上、神経障害性疼痛症候群は、望ましくない神経末端発芽と関連付けられてきた(例えば、Woolf C.J. 等(1983)Nature 306:686-688に記載されている)。

40

【 0 0 1 8 】

ここで用いる場合、「中枢神経系ニューロンの軸索伸出を調節する」という言いまわしは、中枢神経系ニューロンの軸索伸出を様々なレベルに(例えば、標的の CNS 傷害の治療を可能にするレベルまで)刺激し又は阻害する能力を包含することを意図している。

50

【 0 0 1 9 】

ここで用いる場合、用語「伸出」(即ち、軸索伸出)は、CNSニューロンからの軸索の生長の過程をいう。この伸出は、全く新しい軸索を生じてもよいし、部分的にダメージを受けた軸索の修復を生じてもよい。伸出は、典型的には、少なくとも5つの細胞直径の長さの軸索突起の伸長により証明される。その上、軸索伸出は、GAP-43発現(これは、例えば、免疫染色により検出することができる)により証明され得る。

【 0 0 2 0 】

ここで用いる場合、用語「CNSニューロン」は、神経成長因子(NGF)に不応答性の脳及び脊髄のニューロンを包含することを意図している。この用語は、支持細胞又は保護細胞例えば星状細胞、希突起グリア細胞、小グリア細胞、上皮等を包含することも、末梢神経系(例えば、体性神経系、自律神経系、交感神経系又は副交感神経系)ニューロンを包含することも意図していない。好適なCNSニューロンは、哺乳動物ニューロン、一層好ましくは、ヒトのニューロンである。

10

【 0 0 2 1 】

ここで用いる場合、「接触させる」という言いまわしは、プリンヌクレオシド又はそのアナログをCNSニューロンの近くに、そのプリンヌクレオシド又はアナログが該CNSニューロンからの軸索突起の伸出を調節することができるようにもたらすイン・ビボ又はイン・ビトロの方法の両方を包含することを意図している。

【 0 0 2 2 】

ここで用いる場合、術語「プリンヌクレオシド」は、当分野で認められ、且つ糖に結合した任意のプリン塩基又はそのアナログを包含することを意図している。例えば、プリンヌクレオシドには、グアノシン、イノシン又はアデノシンが含まれ、アナログには6-チオグアニン(6-TG)等が含まれる。ここで用いる場合、プリンヌクレオシドの「アナログ」は、機能活性に必要なプリンヌクレオシドの化学構造例えば糖に結合したプリン環を保持しているが天然のプリンヌクレオシド中に見出されないある種の化学構造例えば側基(例えば、チオ又はクロロ基)の改変をも含む化合物をいう。

20

【 0 0 2 3 】

一具体例において、CNSニューロンの軸索伸出を、好ましくはイノシン若しくはグアノシンヌクレオシド又はこれらのアナログを用いて刺激する。他の具体例においては、CNSニューロンの軸索伸出を、好ましくは6-チオグアニンをを用いて阻害する。アデノシンは、阻害性プリンヌクレオシドとして機能するが、アデノシンデアミナーゼにより刺激性プリンヌクレオシドのイノシンに変換される。従って、アデノシンは、それがイノシンに脱アミド化される状況(例えば、外因性のアデノシンデアミナーゼ活性の存在下)においては、刺激性プリンヌクレオシドとして用いることができる。或いは、アデノシンデアミナーゼの活性がブロックされる状況においては、アデノシンを刺激性プリンヌクレオシドとして用いることができる。アデノシンアナログ、2-クロロアデノシンも又、阻害性ヌクレオシドとして用いることができるが、その例えばA1、A2及びノ又はA3レセプターにおける別の効果はそれをイン・ビボで用いるのに一層好ましくないものにし得る。

30

【 0 0 2 4 】

この発明は又、傷害の後に中枢神経系ニューロンの伸出を刺激する方法をも提供する。この方法は、患者にプリンヌクレオシド(例えば、イノシン又はグアノシン)又はそのアナログを投与することを含む。

40

【 0 0 2 5 】

ここで用いる場合、用語「患者」は、CNS傷害を受け易い動物好ましくは哺乳動物(最も好ましくは、ヒト)を包含することを意図している。好適具体例において、患者は、霊長類である。一層好適な具体例においては、霊長類は、ヒトである。患者の他の例には、イヌ、ネコ、ヤギ及びウシが含まれる。

【 0 0 2 6 】

ここで用いる場合、用語「傷害」は、CNSの正常機能に直接又は間接に影響を及ぼすダメージを包含することを意図している。例えば、傷害は、網膜神経節細胞に対するダメー

50

ジ；外傷性脳障害；卒中による傷害；大脳動脈瘤による傷害；脊髄損傷(単麻痺、両側麻痺、対麻痺、半側麻痺及び四肢麻痺を含む)；神経増殖性疾患；癲癇例えば外傷後癲癇；又は神経障害性疼痛症候群であってよい。

【0027】

ここで用いる場合、用語「卒中」は、当分野で認められ且つ、極度の興奮又は脳の動脈の閉塞(例えば、血餅によるもの)により引き起こされる意識、感覚及び随意運動の突然の減少又は喪失を包含することを意図している。

【0028】

ここで用いる場合、用語「外傷性脳障害」は、当分野で認められ且つ、頭部に対して外傷を与える打撃が脳及び繋がっている脊髄にダメージを引き起こす状態(しばしば、頭蓋を貫通しない)を包含することを意図している。通常、最初の外傷が膨張性血腫、蜘蛛膜下出血、大脳浮腫、高い頭蓋内圧(ICP)及び大脳低酸素症を生じ、これらは、更に、低い大脳血流(CBF)のために重大な二次的事象へと導き得る。

【0029】

製薬上許容し得る配合物

この発明の方法において、プリンヌクレオシド又はそのアナログは、製薬上許容し得る配合物にて投与することができる。かかる製薬上許容し得る配合物は、典型的には、プリンヌクレオシド又はそのアナログ並びに製薬上許容し得るキャリアー及び/又は賦形剤を含む。ここで用いる場合、「製薬上許容し得るキャリアー」は、任意の及びすべての生理学的に適合性の溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等を包含する。例えば、このキャリアーは、脳脊髄液中への注射に適当であり得る。賦形剤には、製薬的に許容し得る安定剤及び錠剤分解物質が含まれる。本発明は、合成の又は天然のポリマーを、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア又はビーズの形態で含む任意の製薬的に許容し得る配合物、及び水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、合成膜小胞及び封じ直した赤血球を含む脂質ベースの配合物に関係する。

【0030】

一具体例において、製薬上許容し得る配合物には、ポリマーマトリクスが含まれる。

【0031】

用語「ポリマー」又は「ポリマー製」は、当分野で認められており、標的の病状例えばCNS傷害の治療を生じるようにプリンヌクレオシド又はそのアナログを送達することのできる反復するモノマーユニットよりなる構造的フレームワークを包含する。これらの用語は又、コポリマー及びホモポリマー(例えば、合成又は天然のもの)をも包含する。直鎖状ポリマー、分枝鎖ポリマー及び架橋したポリマーも又、含まれる。

【0032】

例えば、本発明で用いられる製薬上許容し得る配合物を形成するのに適したポリマー材料には、天然から誘導されたポリマー例えばアルブミン、アルギネート、セルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン及び多糖類並びに合成ポリマー例えばポリエステル(PLA、PLGA)、ポリエチレングリコール、ポロキシマー、ポリ無水物及びブルロニックが含まれる。これらのポリマーは、中枢神経系を含む神経系に対して生体適合性であり、それらは、中枢神経系内で生物分解性であって如何なる毒性の分解副生物も生成せず且つ、それらは、ポリマーの速度論特性を操作することによりプリンヌクレオシド放出の様式及び持続時間を改変する能力を有する。ここで用いる場合、用語「生物分解性」は、ポリマーが、患者の体内で、酵素の作用により、加水分解作用により及び/又は他の類似の機構により時間をかけて分解されることを意味する。ここで用いる場合、用語「生体適合性」は、ポリマーが、毒性でも有害でもないことにより、及び免疫学的拒絶を引き起こさないことにより、生きている組織又は生物体と適合性であることを意味する。

【0033】

ポリマーは、当分野で公知の方法(Sandler, S.R.; Karo, W. Polymer Syntheses; Harcourt Brace: Boston, 1994; Shalaby, W.; Ikeda, Y.; Langer, R.; Williams, J. Polymers of Biological and Biomedical Significance (ACS Symposium Series 540; American Chemical

10

20

30

40

50

Society: Washington, DC, 1994)を用いて製造することができる。ポリマーは、可撓性であるようにデザインすることができる；生物活性な側鎖の間の距離及びポリマー主鎖とこの基の間のリンカーの長さを制御することができる。他の適当なポリマー及びそれらの製造方法は、米国特許第5,455,044号及び5,576,018号に記載されており、これらの内容を本明細書中に参考として援用する。

【0034】

ポリマー配合物は、米国特許第4,883,666号(この特許の教示を、参考として本明細書中に援用する)に記載されているように、液化ポリマー中のプリンヌクレオシドの分散により又は、Odian G., Principles of Polymerization and ring opening polymerization, 第二版, John Wiley & Sons, New York, 1981(内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されているように、バルク重合、界面重合、溶液重合及びリング重合等の方法によって形成することができる。これらの配合物の特性は、反応温度、ポリマーとプリンヌクレオシドの濃度、用いる溶媒の種類、及び反応時間等のパラメーターを変えることにより制御される。

【0035】

プリンヌクレオシド又はそのアナログを、一種以上の製薬上許容し得るポリマーに封入して、マイクロカプセル、ミクロスフェア又はマイクロパーティクル(これらの用語は、ここでは、交換可能に用いる)を形成することができる。マイクロカプセル、ミクロスフェア及びマイクロパーティクルは、慣用的に、直径2ミリメートル以下(通常、直径500ミクロン以下)の球状粒子よりなる易流動性粉末である。1ミクロン未満の粒子は、慣用的に、ナノカプセル、ナノパーティクル又はナノスフェアと呼ばれる。大抵、マイクロカプセルとナノカプセル、ミクロスフェアとナノスフェア、又はマイクロパーティクルとナノパーティクルの間の差異は、大きさであり；一般に、これら2者の内部構造の間に差異は、あるにしても殆どない。本発明の一面において、平均直径は、約45 μm 未満、好ましくは20 μm 未満、一層好ましくは約0.1 ~ 10 μm である。

【0036】

他の具体例において、製薬上許容し得る配合物は、脂質ベースの配合物を包含する。任意の公知の脂質ベースの薬物送達システムを、この発明の実施に用いてもよい。例えば、多小胞リボソーム(MVL)、多重膜リボソーム(多重膜小胞又は「MLV」としても知られる)、小型単膜リボソームを含む単膜リボソーム(単膜小胞又は「SUV」としても知られる)及び大型単膜リボソーム(大型単膜小胞又は「LUV」としても知られる)は、すべて、カプセル封入されたプリンヌクレオシド又はそのアナログの持続的放出速度が確立され得る限り、用いることができる。一具体例において、脂質ベースの配合物は、多小胞リボソームシステムであってよい。制御された放出用の多小胞リボソームの薬物送達システムの作成方法は、PCT出願US96/11642、US94/12957及びUS94/04490に記載されている(これらの内容を、参考として本明細書中に援用する)。

【0037】

合成膜小胞の組成は、通常、リン脂質の組合せ(普通、ステロイド特にコレステロールとの組合せ)である。他のリン脂質又は他の脂質を用いることもできる。

【0038】

合成膜小胞生成において有用な脂質の例には、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド及びガングリオシドが含まれる。好ましくは、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール及びジオレオイルホスファチジルグリセロールを含むリン脂質を用いる。

【0039】

プリンヌクレオシド又はそのアナログを含む脂質ベースの小胞の製造においては、プリンヌクレオシドのカプセル封入の効率、プリンヌクレオシドの不安定性、生成した小胞集団の均一性及び大きさ、プリンヌクレオシド対脂質の比、透過性、この調製物の不安定性、

10

20

30

40

50

及びこの配合物の製薬的許容性等の変数を考慮すべきである(Szoka等,Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering,9:467,1980; Deamer等,Liposomes,Marcel Dekker,New York,1983,27; 及びHope等,Chem.Phys.Lipids,40:89,1986を参照されたい。これらの内容を参考として本明細書中に援用する)。

【0040】

製薬上許容し得る配合物の投与

この発明の製薬上許容し得る配合物を、プリヌクレオシド又はそのアナログが中枢神経系ニューロンと接触して、それにより、軸索伸出を調節するように投与する。これらの配合物の局所的及び全身投与の両方とも、この発明により企図されるが、局所投与は、プリヌクレオシド又はアナログの有効な局所的濃度を達成するのに並びにこの薬剤の全身投与から起こり得る副作用を回避するのに適している。一具体例において、プリヌクレオシド又はそのアナログを、患者の中枢神経系例えば患者の脳脊髄液中に導入することにより投与する。この発明のある面において、プリヌクレオシド又はそのアナログを髄膜下に例えば脳室、腰椎部又は大槽内に導入する。他の面においては、プリヌクレオシド又はそのアナログを眼球内に導入し、それにより、網膜神経節細胞に接触させる。

10

【0041】

製薬上許容し得る配合物は、容易に水性ビヒクル中に懸濁させることができ、慣用の皮下注射針により又は注入ポンプを用いて導入することができる。導入の前に、これらの配合物を、好ましくは米国特許第436,742号(内容を参考として本明細書中に援用する)に記載のようにガンマー線照射又は電子線滅菌により滅菌することができる。

20

【0042】

一具体例において、ここに記載のプリヌクレオシド配合物を、患者に、傷害の時から傷害が起きた後約100時間までの期間中(例えば、傷害の時から24、12又は6時間以内)に投与する。

【0043】

この発明の他の具体例において、プリヌクレオシド配合物を、患者に、髄膜下に投与する。ここで用いる場合、用語「髄膜下投与」は、プリヌクレオシド配合物を直接患者の脳脊髄液中に、穿頭孔を通しての側脳室注入又は大槽若しくは腰椎部穿刺等を含む技術により送達することを包含することを意図している(Lazorthes等,Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery,143-192及びOmayya等,Cancer Drug Delivery,1:169-179に記載されている。これらの内容を参考として本明細書中に援用する)。用語「腰椎部」は、第3及び第4腰椎の間の領域(背中の下部)を包含することを意図している。用語「大槽」は、頭の後ろで頭蓋が終わって脊髄が始まる領域を包含することを意図している。用語「脳室」は、脊髄の中心管と繋がっている脳内の空所を包含することを意図している。上記の何れへのプリヌクレオシドの投与も、プリヌクレオシド配合物の直接注射により又は注入ポンプの使用により達成することができる。注射のために、この発明のプリヌクレオシド配合物を溶液(好ましくは、生理的に適合性の緩衝液例えばハanks溶液又はリンゲル液)中に配合することができる。更に、このプリヌクレオシド配合物は、固体形態に配合して、使用直前に再溶解又は懸濁させることができる。凍結乾燥形態も含まれる。この注射は、例えば、プリヌクレオシド配合物のボーラス注射又は連続注入(例えば、注入ポンプ使用)の形態であってよい。

30

40

【0044】

この発明の一具体例においては、プリヌクレオシド配合物を、側脳室注射により患者の脳に、好ましくは傷害の起きた時から100時間以内に(例えば、傷害の時から6、12又は24時間以内に)投与する。この注射は、例えば、患者の頭蓋に開けた穿頭孔から行うことができる。他の具体例においては、この配合物を、患者の脳室中に外科的に挿入したシャントを通して、好ましくは傷害が起きた時から100時間以内に(例えば、傷害の時から6、12又は24時間以内に)投与する。例えば、この注射を両側脳室内に行うことができ、これらは、第3、第4の一層小さい脳室中への注射も行うことができるにしても、一層大きい。更に別の具体例においては、プリヌクレオシド配合物を、注射により

50

、患者の大槽又は腰椎部に、好ましくは傷害が起きた時から 100 時間以内に(例えば、傷害の時から 6、12 又は 24 時間以内に)投与する。

【0045】

投与の持続時間及びレベル

この発明の方法の好適具体例においては、プリンヌクレオシド又はそのアナログを、CNS ニューロンと長時間接触させて軸索伸出の調節を実施する。このプリンヌクレオシド又はアナログとの持続的接触は、例えば、このプリンヌクレオシドまたはアナログの長期間例えば 1 週間、数週間、1 ヶ月又はもっと長期間にわたっての反復投与により達成することができる。一層好ましくは、プリンヌクレオシド又はアナログの投与のために用いられる製薬上許容し得る配合物は、このプリンヌクレオシド又はアナログの患者への持続的送達例えば「緩慢な放出」を与える。例えば、この配合物は、この製薬上許容し得る配合物が患者に投与された後に、プリンヌクレオシド又はアナログを少なくとも 1、2、3 又は 4 週間にわたって送達することができる。好ましくは、本発明に従って治療される患者は、少なくとも 30 日間にわたってこのプリンヌクレオシド又はアナログで治療される(反復投与により又は持続的送達システムの利用により、或はこれら両方により)。

10

【0046】

ここで用いる場合、用語「持続的送達」は、プリンヌクレオシド又はそのアナログのイン・ビボでの、投与後のある期間(好ましくは、少なくとも数日間、1 週間、数週間、1 ヶ月又はもっと長期間)にわたる連続的送達を包含することを意図している。プリンヌクレオシド又はそのアナログの持続的送達は、例えば、期間にわたるプリンヌクレオシド又はそのアナログの連続的治療効果により示され得る(例えば、プリンヌクレオシド又はそのアナログの持続的送達は、期間にわたる CNS ニューロンの連続的伸出又は連続的伸出阻害により示され得る)。或は、プリンヌクレオシド又はそのアナログの持続的送達は、そのプリンヌクレオシド又はアナログの存在を期間にわたってイン・ビボで検出することにより示すことができる。

20

【0047】

持続的送達のための好ましいアプローチは、この配合物を送達するためのポリマーカプセル又は小型ポンプの利用を包含する。ポリマーカプセルは、前に記載したようにして製造することができる。移植可能な注入ポンプシステム(例えば、Infusaid; 例えば、Zierski, J. 等(1988)Acta Neurochem. Suppl. 43:94-99; Kanoff, R.B. (1994)J. Am. Osteopath. Assoc. 94:487-493参照)及び浸透ポンプ(Alza社より市販されている)は、当分野で利用可能である。投与の他の様式は、移植可能な外部からプログラムすることのできる注入ポンプによるものである。適当な注入ポンプシステム及びリザーバーシステムも又、Blomquistの米国特許第 5,368,562 号及びDoanの米国特許第 4,731,058 号に記載されており、Pharmacia Deltec Inc.により開発されている。

30

【0048】

この発明の方法において用いられる製薬配合物は、治療上有効な量のプリンヌクレオシド又はそのアナログを含有する。「治療上有効な量」は、所望の結果を達成するための必要な期間にわたる有効な投与量をいう。プリンヌクレオシド又はそのアナログの治療上有効な量は、患者の病状、年齢及び体重等の因子及び患者において所望の応答を(単独で又は一種以上の他の薬剤と組み合わせて)誘出するこのプリンヌクレオシド又はそのアナログの能力によって変化し得る。投薬養生法は、最適の治療応答を与えるように調節することができる。治療上有効な量は、このプリンヌクレオシド又はそのアナログの何らかの毒性又は有害な効果よりも治療上有益な効果が勝っているものでもある。非制限的な投薬範囲は、約 5 μ M ~ 1000 μ M であるが、特に最適の投薬量は、他の因子の内で、使用する特定のプリンヌクレオシド又はそのアナログによって変化する。

40

【0049】

イノシンによる軸索伸出の刺激を達成するためには、治療上有効な濃度の非制限的な範囲は、5 μ M ~ 1000 μ M であり、一層好ましくは 10 μ M ~ 500 μ M である。尚一層好ましくは、CNS ニューロンと接するイノシンの局所的濃度は、約 25 μ M である。

50

【 0 0 5 0 】

グアノシンによる軸索伸出の刺激を達成するためには、治療上有効な濃度の非制限的な範囲は、 $5\text{ }\mu\text{M} \sim 1000\text{ }\mu\text{M}$ であり、一層好ましくは $10\text{ }\mu\text{M} \sim 500\text{ }\mu\text{M}$ である。尚一層好ましくは、CNSニューロンと接するグアノシンの局所的濃度は、約 $100\text{ }\mu\text{M}$ である。

【 0 0 5 1 】

6 - チオグアニンによる軸索伸出の阻害を達成するためには、CNSニューロンと接する6 - チオグアニンの局所的濃度は、好ましくは $50\text{ }\mu\text{M}$ 以下である。アデノシンを(そのイノシンへの変換を阻止するように)比較的高い投与量例えば 5 mM より高濃度で用いて、神経突起伸出を阻害することができる。しかしながら、かかる濃度では、アデノシンは、毒性となり得る。従って、アデノシンアナログ例えば6 - チオグアニンが、軸索生長を阻害するための哺乳動物患者への投与に好ましい。

10

【 0 0 5 2 】

投薬量の値は軽減すべき病気の重さによって変化し得るということは、注意すべきである。任意の特定の患者について、期間にわたって、個々の必要性に応じて及びプリンヌクレオシド若しくはそのアナログを投与する又は投与を監視する専門家の判断に応じて特別の投薬養生法が調節されるべきであるということ、並びにここに示した投薬量の範囲は単なる例であって請求している発明の範囲又は実施を制限することを意図するものではないということは、更に理解されるべきである。

20

【 0 0 5 3 】

この発明は、他の具体例において、本質的にプリンヌクレオシド又はそのアナログ(例えば、イノシン、グアノシン、6 - チオグアニン)及び製薬上許容し得るキャリアーよりなる製薬組成物、並びにCNSニューロンをこの組成物に接触させることにより軸索伸出を調節するためのそれらの利用方法を提供する。用語「本質的に・・・よりなる」とは、製薬組成物が如何なる他の神経成長モジュレーター例えば神経成長因子(NGF)をも含まないことを意味する。一具体例において、この発明の製薬組成物は、パッケージされた配合物として提供され得る。このパッケージされた配合物は、一の容器中のこの発明の製薬組成物と、中枢神経系ニューロンの傷害例えば網膜神経節細胞に対する傷害、脊髄損傷又は外傷性脳障害に関係する病気を有する患者を治療するためのその組成物の投与のための印刷された指示を包含し得る。CNSニューロン(例えば、哺乳動物のCNSニューロン)の伸出を調節するための医薬の製造におけるこの発明のプリンヌクレオシド及びそのアナログの利用も又、この発明に包含される。

30

【 0 0 5 4 】

CNSニューロンのイン・ビトロ治療

CNSニューロンを、更に、イン・ビトロでプリンヌクレオシド又はそのアナログと接触させて、イン・ビトロで軸索伸出を調節することができる。従って、当分野で周知の技術を用いてCNSニューロン細胞を患者から単離してイン・ビトロで生育させ、その後、本発明に従って処理して軸索伸出を調節することができる。簡単にいえば、CNSニューロン細胞培養を、適当な培養基(例えば、培養皿)に付着した神経組織の断片から神経細胞を移動させることにより又はその組織を例えば機械的に若しくは酵素的にばらばらにすることにより得て、CNSニューロン細胞の懸濁液を生成することができる。例えば、酵素のトリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、DNアーゼ、プロナーゼ、ディスパーゼ又はこれらの様々な組合せを用いることができる。トリプシン及びプロナーゼは、最も完全な分離を与えるが、細胞にダメージを与え得る。コラゲナーゼ及びディスパーゼは、一層完全でない分離を与えるが、一層無害である。組織(例えば、神経組織)を単離する方法及び細胞(例えば、CNSニューロン細胞)を得るための組織の分離は、Freshney R.I., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 第三版、1994に記載されている(この内容を参考として本明細書中に援用する)。

40

【 0 0 5 5 】

かかる細胞を、続いて、上記のような量及び持続時間で、プリンヌクレオシド又はそのア

50

ナログと接触させることができる。一度CNSニューロンにおいて軸索伸出の調節が達成されれば、これらの細胞を例えば移植によって患者に再投与することができる。

【0056】

この発明を、更に、下記の実施例により説明するが、制限するものと解するべきではない。この出願中で引用されているすべての参考文献、特許及び公開された特許出願を参考として本明細書中に援用する。

【0057】

実施例

下記の実施例においては、下記の方法論を用いた：

試料の調製

軸索生成因子1を、本質的に、Schwalb等,1995及びSchwalb等,Neuroscience, 72:901-910, 1996(これらの内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されたようにして得た。

視神経を切開して、1mm長の断片に切り、3mlのL-15培地(GibcoBRL)又はリン酸緩衝塩溶液(GibcoBRL)中に6神経の割合でインキュベートした。3~4時間後に、神経断片を、0.22µm細孔の低蛋白質結合フィルター(Gelman)を通して濾過することにより取り出した。調整培地の低分子量画分を、最初は3kDaの分子量カットオフ(Amicon Centrprep-3)を用い、次いで、1kDaのカットオフ(Filtron)を用いて、限外濾過により調製した。濾液を20~30%終濃度で陽性対照として用いた。アデノシン、アデノシン5'-リン酸、アデノシンデアミナーゼ、アデノシンニリン酸、アデノシン三リン酸、8-プロモ3',5'-サイクリックグアノシン-リン酸、3',5'-サイクリックアデノシン-リン酸、5'-サイクリックグアノシン-リン酸、シチジン、グアノシン、ヒポキサンチン、イノシン、5'-イノシン-リン酸、α-トコフェロール、6-チオグアニン、チミジン、ウリジン及びキサンチンをすべてSigma Chemical Co.(ミズーリ、St.Louis在)から得、8-p-スルホフェニル-テオフィリン、ジブチルサイクリックアデノシン-リン酸及び2-デオキシコフォルマイシンをCalbiochemから得、2-クロロアデノシン、エリスロ-9-(2-ヒドロキシ-3-ノニル)アデニン及びIB-MECAをResearch Biochemicals, Inc.(マサチューセッツ、Natick在)から得、そして4-(ニトロベンジル-6-チオイノシン)をAldrich Chemicals, Inc.から得た。cAMP及びcGMPの膜透過性の加水分解できないアナログ、8プロモアデノシン-3',5'-サイクリックモノホスホロチオエート及び8-(4-クロロフェニルチオ)グアノシン-3',5'-サイクリック-リン酸をBiologから得た。

【0058】

分離した網膜の培養

6~10cm長の金魚(ヘンシルベニア、Parnell山、Parnell山漁場、Comet品種)を暗順応させて、それらの網膜を切開した。網膜をパパイン(20µg/ml)とインキュベートし、システイン(2.8mM)で30分間室温で活性化し、その後、穏やかにすりつぶすことにより分離した。すりつぶしと沈降分離の反復サイクルは、神経節細胞においてほぼ均質な培養を生成したが、それは、卵形の形状、相の明るい外観、大きさ(直径15µm)及び一様な内径の1つ又は2つだけの神経突起の伸長により容易に同定される；これらの特徴は、逆行標識により確認されている(Schwartz及びAgranoff, Brain Res. 206:331-343, 1981及びSchwalb等, J. Neuroscience 15:5514-5625, 1995参照。これらの内容を参考として本明細書中に援用する)。低密度培養を、ポリL-リジン被覆された24ウェル培養皿(マサチューセッツ、Cambridge在, Costar)中に 5×10^3 細胞/ウェルでプレートすることにより達成した。細胞を、Schwalb等, 1995(内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されたように、血清なしで、インシュリン、セレニウム、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、ホルモン類及びビタミン類をイーグルL-15培地中に含む規定培地中で21日に維持した。精製したラット網膜神経節細胞の分離された培養を、Barres等, Neuron, 1:791-803, 1988(内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されたように、イムノパニングにより調製した。簡単に言えば、生後8日目のSparague-Dawleyラットから網膜を、システインで活性化したパパイン

10

20

30

40

50

を用いて分離した。マクロファージを、抗ラットマクロファージ抗体(Accurate)とのインキュベーションとその後の抗ウサギIgG抗体を用いるイムノパニングにより除去した。神経節細胞を抗Thy-1抗体を用いるイムノパニングにより単離してから、低密度培養で用いるためにトリプシンで移動させた。ラット網膜神経節細胞を、37℃で、CO₂インキュベーター中に、上記と同じ培地(但し、30mMの重炭酸塩が存在する)を用いて維持した。

【0059】

実験のデザイン

典型的実験においては、試料を、4連で、24ウェルプレートの無作為の位置にプレートして、コードを隠して、生長が盲目的様式で評価されることを確実にした。各実験は、負の対照の4ウェル(培地に栄養補足物のみを加えたもの)と正の対照の4ウェル(公知の活性の標準化したAF-1試料)を含んだ。生長及び生存を、すべての神経節細胞について、6日後に、各ウェルの25連続視野において、位相差顕微鏡検査を用いて、倍率400で評価した(c.ウェル当たり150神経節細胞を計数)。5細胞直径の長さの突起の伸長が、刺激された細胞を負の対照から明確に区別するので、生長の基準であった(Schwalb等,1995参照)。計数終了後に、コードを破いて、データを表にし、平均と標準誤差を各試料の4つの複製のウェルについてクリケットグラフ(ニューヨーク、Islandia, CA Associates)を用いて計算した。データを、負の対照における生長(通常、4~5%)を引き、正の対照における生長で割ることにより標準化した。最も順調な実験においては、AF-1にさらされた網膜神経節細胞(RGC)の50%より多くが、6日後に、5細胞直径の長さの軸索を伸ばした。グループ比較は、ペア様式の2テイルドスチューデントt検定に基づいた。幾つかの独立の実験を、図面の説明に記したように殆どの試料について行った。幾つかの場合において、細胞生存力を、染料5,6-カルボキシフルオレセインジアセテートを用いて評価した。高倍率の視野当たりの生存力のあるRGCの数として細胞生存を報告する。

【0060】

実施例I. 金魚網膜神経節細胞からの軸索伸出のプリン誘導された刺激

視神経膠により分泌される低分子量の成長因子AF-1は、金魚の網膜神経節細胞から劇的な伸出を誘導した。規定培地だけを用いた対照条件では、殆ど伸出は起きなかった。これらの2つの限界を、他の因子についての結果を標準化する基礎とした。ヌクレオシド(A、G、C、U及びT)を1~100μMの濃度で試験した場合には、アデノシンとグアノシンがAF-1と殆ど同じ位に金魚の網膜神経節細胞からの伸出を刺激した(図1A参照)。ピリミジン塩基は、この濃度範囲にわたって活性を有しなかった。一層完全なこれらのプリンについての投与量-応答曲線は、アデノシンが10~15μMのEC₅₀を有して2つの内で一層活性であることを示している(図1B参照)。50~100μMの濃度では、アデノシンは、AF-1により誘導されるレベルの60%に匹敵する最大応答を誘導したが、一層高濃度では伸出は減少した。グアノシンは、アデノシンより一層高いEC₅₀(25μM、図1B参照)を有し、100μMの濃度では、アデノシンと同じ最大レベルの活性を刺激したが、一層高濃度において明確な活性減少はなかった。

【0061】

実施例II. プリンヌクレオチドは、ヌクレオシドより活性が低い

細胞外においては、アデノシンは、P₁レセプター(本質的に、アデノシンに対して最大に応答性)又はP₂レセプター(ATP又は他のヌクレオチドに対して最大に応答する)の何れかを刺激することができた。AMPとADPは、100μM(p005)で、僅かに有意のレベルの活性を示したが、ATPは10μMで示した(100μMでは示さなかった)(図1C参照)。これらのプリンヌクレオチドの活性がプリン自体の活性よりもかなり低いので、P₂レセプターが関与していることはありそうにない。これらのプリンは、細胞内で、軸索生成における二次メッセンジャーとして働き得る環状ヌクレオチドの前駆体として機能することができたというのが、もっともらしい。それ故、cAMP及びcGMPの膜透過性アナログの生物学的活性を調べた。ジブチルcAMP(dBcAMP)も8-Br c

10

20

30

40

50

GMPも、 $1 \sim 100 \mu\text{M}$ で何らの活性も示さなかった(図1D参照)。もっと最近開発された加水分解されない膜透過性のcAMPアナログ(8-プロモアデノシン-3', 5'-サイクリックモノホスホロチオエート: Sp-8-Br-cAMPS)及びcGMPアナログ(8-(4-クロロフェニルチオ)グアノシン-3', 5'-サイクリックモノホスフエート: 8-pcpt-cGMP)も又、 1mM 以下の濃度で試験した場合に不活性であることが見出された(図1D参照)。

【0062】

実施例III. アデノシンの正の効果は、細胞外のアデノシンレセプターにより媒介されるのではない

Collis等, Brit. J. Pharmacol. 92:69-75, 1987(内容を参考として本明細書中に援用する)に記載された8-p-(スルホフェニルテオフィリン)(8-PS T)は、2つの最も一般的なアデノシンレセプター(A1及びA2)の阻害剤である。ラットにおいてアデノシンのレセプター媒介による効果を殆ど完全にブロックする投薬量である $20 \mu\text{M}$ において、8-PS Tは、アデノシン、グアノシン又はAF-1により刺激される伸出に対して何らの効果も有しなかった(図2参照)。アデノシンの正の効果が細胞外アデノシンレセプターによって媒介されるのではないということの更なる証拠は、A1、A2及びA3レセプターのアゴニストである加水分解されないアナログ2-クロロアデノシン(2CA)を用いる研究から生じる。 10 及び $100 \mu\text{M}$ の濃度で、2-CAは、3つの独立した実験の内の3つにおいて、基線を下回る小さいが有意の生長の減少を引き起こした(図2参照)。

【0063】

実施例IV. アデノシンは、生長を刺激するのにイノシンに加水分解されなければならない

アデノシンの活性が活性な代謝産物の形成によるものかどうかを研究するために、ADAの活性を、デオキシコフォルマイシン(DCF)又はエリスロ-9-(2-ヒドロキシ-3-ノニル)アデノシン(EHNA)を用いて阻害した。 $10 \mu\text{M}$ DCFの存在下で、 $100 \mu\text{M}$ アデノシンは、生長を刺激できないだけでなく、基線レベルより下に低下させた(図3、レーンe対d)。細胞の生存も、アデノシンの加水分解をブロックした場合に減少した。 $10 \mu\text{M}$ DCFの存在下において、 $10 \mu\text{M}$ アデノシンは、生存を20%減少させ(示してない)、 $100 \mu\text{M}$ アデノシンは、生存を57%低下させた(図3、下段、レーンe)。DCFの伸出及び生存に対する効果は、DCFを単独で、AF-1と共に又はグアノシンと共に用いた場合には起きなかったので、特に加水分解されないアデノシンの存在と関係していた(図3、レーンb及びh)。DCFと同様に、 $10 \mu\text{M}$ EHNAは、アデノシン($100 \mu\text{M}$)を伸出の刺激において無効にし、細胞生存を約30%低下させた(データは示してない)。しかしながら、EHNAは又、非特異的な効果をも示し、グアノシン又はAF-1により刺激される生長を約50%減じたが、細胞生存は変化させなかった。アデノシンの正の効果がその加水分解を必要とするということの更なる証拠は、外因性ADAを加える実験から生じる。 0.4U/ml で、この酵素は、 $100 \mu\text{M}$ アデノシンにより刺激される軸索伸出を減少させなかったし、細胞生存にも影響しなかった(図3、レーンf参照)。

【0064】

実施例V. イノシンは、活性な代謝産物である

アデノシンの脱アミドの主要生成物であるイノシンは、軸索伸出の強力なアクチベーターであることが判明した。図4に示すように、イノシンの EC_{50} は、 $10 \sim 15 \mu\text{M}$ であり、最大応答(AF-1により達成されるレベルの約60%に匹敵する)を $25 \mu\text{M}$ より高濃度で達成した。この EC_{50} 及びイノシンにより誘導される最大応答はアデノシンのものと類似していたが、一つの顕著な差異は、一層高濃度においてイノシンは、アデノシンの場合と異なり、生長を低下させなかったことであった。イノシンの更なる加水分解は、ヒポキサンチンを生じるが、これは、全く活性を示さなかった(図4参照)。イノシン5'-リン酸($5' \text{IMP}$)は、 $10 \mu\text{M}$ では不活性であり、 $100 \mu\text{M}$ では、 $10 \mu\text{M}$ のイノシンより低い活性を示した(図4参照)。

【 0 0 6 5 】

実施例 V I . プリンは、細胞内経路によって生長を刺激する

プリントランスポーターの2つの阻害剤であるニトロベンジルチオイノシン(N B T I)及びジピリダモールを用いて、イノシン及びグアノシンが伸出を刺激するのにニューロン内に入ることが必要かどうかを研究した。20 μ Mで、N B T Iは、イノシン又はグアノシンにより誘導される生長の約90%をブロックした(図5参照; 50 μ Mイノシンについては、活性の86%が消失、 $p < 0.001$; 100 μ Mグアノシンについては、活性の93%が消失、 $p < 0.01$)。ジピリダモール(10 μ M)も、イノシンにより誘導される生長を減少させた(114%の減少; $p < 0.01$; 示してない; グアノシンは試験してない)。対照的に、A F - 1は、N B T Iにより殆ど阻害を示さず(10%低下、 $n.s.$), ジピリダモールではもう少しだけ阻害された(25%低下、 $n.s.$ 、示してない)。N B T Iが関連するプリンの活性の消失は、A F - 1よりも遙かに大きかった($p < 0.001$)。

10

【 0 0 6 6 】

実施例 V I I . A F - 1 活性は、イノシンによるものではない

A F - 1 標品が依然としてそれらの生物学的活性の幾らかを説明することのできるプリンを含み得るかどうかを扱うために、天然のA F - 1とイノシンを、セファデックスG - 10(スウェーデン国、Uppsala在、Pharmacia Biotech)を用いるサイズ排除カラム上でのクロマトグラフィーにかけた(直径1 cmで、長さ10 cm)。試料を0.5 mlの容積に載せて1 mlの画分中に集めた。カラムの緩衝液は、20%メタノール(蒸留水中)又は0.14 M NaClであった。カラムを、30%の濃度で生物検定にかけた。図6 Aに示したように、イノシン活性のピークは、9~10分であったが、A F - 1のそれは7分に起きた。

20

【 0 0 6 7 】

実施例 V I I I . 軸索伸出は、イノシンとグアノシンの効果であり、二次的因子の効果ではない

ここで用いた培養は、70~90%の神経節細胞を含み、残りは、網膜の他の神経性及び非神経性の構成要素であった(Schwartz及びAgranoff, 1982及びSchwalb等, 1995参照。これらの内容を参考として本明細書中に援用する)。この不均一性が、イノシン又はグアノシンが、網膜神経節細胞を刺激して生長させる二次的因子を分泌する他の細胞集団上で最初に作用し得る可能性を高めた。この場合、プリンの効果は、任意の二次的因子の濃度が細胞密度に比例して増大するので、細胞密度と共に変化することが予想される。これを調べるために、軸索伸出を、イノシン又はグアノシンの固定された濃度に対する応答について、3~4倍の範囲の細胞密度にわたって研究した。イノシンとグアノシンのデータの両方についての回帰線は、生長が細胞密度の関数ではないことを示しており(図6 B参照)、これは、濃度依存性の二次的因子の存在の反証である。

30

【 0 0 6 8 】

実施例 I X . リン蛋白質 G A P - 4 3 の発現のプリンによる誘導

イン・ビボでの視神経の再生の一つの証明は、膜リン蛋白質G A P - 4 3の増大された発現である。このアップレギュレーションがプリンにより誘導されるかどうかを研究するために、免疫組織化学を、組換え金魚G A P - 4 3に対するポリクローナルウサギ抗血清を用いて行った。組換えゼブラフィッシュG A P - 4 3を、スイス国、バーゼル大学のEva Reinhard博士により単離されたc D N A (Reinhard等, Development, 120:1757-1775, 1994参照。その内容を参考として本明細書中に援用する)で大腸菌をトランスフォームすることにより作成して、原核生物用発現ベクターp T r c H i s B (Invitrogen)中にサブクローン化した。この生成された蛋白質を、 Ni^{2+} -N T A - アフィニティークロマトグラフィーにより精製して、ウサギを免役するのに用いた。その結果生成した抗体の特異性を、ウェスタンブロットで示したが、該ブロットにおいて、この抗体は、金魚の脳由来の再生中の網膜神経節細胞又はシナプトソームの原形質膜中で富化されているユニークな48 k D aのバンドを認識した。

40

50

【0069】

A F - 1、イノシン及びグアノシンは、すべて、L - 15 処理された対照と比較して、G A P - 43 レベルの大きい増加を引き起こした。半定量的分析を、0 (なし)、1 (中位)又は2 (強い)のG A P - 43 免疫反応性レベルを割り当てて、染色強度を、L - 15、イノシン又はA F - 1 で処理した150 ~ 200 細胞について、細胞の軸索の長さ相関させることにより行った。イノシンは、L - 15 を超えて強く染色される細胞数の5 . 5 倍の増加を生じたが、A F - 1 は、8 倍の増加を生じた。3つのすべての場合に、G A P - 43 免疫染色の強度は、軸索の長さとは強く相関した。

【0070】

実施例 X . 軸索伸出の6 - チオグアニン(6 - T G)による阻害

10

金魚R G Cにおいて、10 μ Mの6 - T Gは、A F - 1 により刺激されるすべての生長をブロックした(図7 A、レーン2 参照)が、細胞生存には影響を有しなかった(図7 B 参照)。同じ濃度の6 - T Gは、25 μ Mのイノシンにより刺激される伸出を50 %だけ減じた(図7 A、レーン3 及び4 参照)が、100 μ Mイノシン又は100 μ Mグアノシンにより刺激される生長には効果を有しなかった(図7 A、レーン5 ~ 8 参照)。100 μ Mにおいて、イノシンは、10 μ M 6 - T Gの存在下でA F - 1 により誘導される生長をもとのレベルまで完全に回復させたが、これは、イノシンのみにより誘導される生長のレベルより有意に高かった(図7 A、レーン10 対6 参照)。それ故、イノシン及び6 - T Gは、伸出を刺激するためにA F - 1 によっても利用される細胞内シグナリングのレベルで競争的に作用するのである。イノシンがA F - 1 シグナリングにより利用されるのと同じ経路を活性化することができるということの更なる証拠は、これら二者をE C₅₀レベルで合わせた場合にそれらが相加効果を示したが、飽和濃度では高レベルのA F - 1 のみにより刺激されたレベルで生長が飽和するという観察から生じた(図7 C、レーン9 参照)。6 - T Gは遊離のチオールを有するので、プリンアナログとしてよりは還元剤として作用することができた。しかしながら、2つの他の還元剤、 α - トコフェロール(30 μ M)又はグルタチオン α - メチルエステル(M E G)(100 μ M)は、A F - 1 により刺激される伸出に対する効果を有しなかった(図7 D 参照)。他の可能性は、イノシンが、6 - T Gの伸出に対する阻害効果をその細胞内への輸送を邪魔することによりブロックすることができたということである。しかしながら、イノシン、N B T I 及びジピリダモールの活性をブロックした2つの輸送阻害剤は、6 - T GがA F - 1 により刺激される伸出をブロックすることを阻止できなかった(図7 D 参照)。

20

30

【0071】

実施例 X I . 哺乳動物の網膜神経節細胞は、イノシンに応答して軸索を伸ばす

網膜神経節細胞を、8 日齢のラットから、Barres等, Neuron, 1:791-803, 1988 (内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されたように、イムノパニングにより単離して、規定培地中で生長させた。イノシンは、25 又は50 μ Mで、5 細胞直径の長さの軸索を伸ばしている細胞数の50 %増加を刺激した(図8 参照)。毛様体神経栄養因子(C N T F)は、伸出の一層大きい増加を誘導し(図8 参照)、細胞生存を増大させた。10 μ Mで、6 - T Gは、C N T F 誘導される伸出をブロックした。50 μ Mのイノシンの添加は、C N T F 誘導される伸出を殆ど最初のレベルまで回復させた(図8 参照)。

40

【0072】

同等物

当業者は、ここに記載したこの発明の特定の具体例に対する多くの同等物を認識し、又は日常の実験を用いて確認することができるであろう。かかる同等物は、後記の請求の範囲に包含されるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1 A - D】 軸索の伸出に対するプリン作動性の効果を示すグラフである。

【図1 A】 示した通りの1、10 及び100 μ Mの濃度のヌクレオシドアデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)及びチミジン(T)に反応しての軸索生長を描いたグラフである。データは、負の対照における生長のレベルを引いてから20 ~ 30 %のA F - 1

50

で処理した正の対照における正味の生長で除することにより標準化してある。

【図1B】 アデノシンとグアノシンに関して投与量 - 応答曲線を描いたグラフである。これらのデータから見積もられた EC_{50} 値は、アデノシンにつき $10 \sim 15 \mu M$ であり、グアノシンについては $20 \sim 30 \mu M$ である。

【図1C】 アデノシンヌクレオチドの効果を描いたグラフである。

【図1D】 サイクリックAMPの膜透過性アナログ(dBcAMP、ジブチリルサイクリックAMP; Sp-8-Br-cAMPs、8-プロモアデノシン-3', 5'サイクリックモノホスホロチオエート)又はサイクリックGMPの膜透過性アナログ(8-Br-cGMP、8-プロモサイクリックGMP; 8-pcpt-cGMP、8-(4-クロロフェニルチオ)グアノシン-3', 5'-サイクリックモノホスフェート)の効果を描いたグラフである。データは、平均 + 平均の標準誤差(SEM; 0.02未満であれば示さない)を表し、2~4の独立した実験からプールしたものである。p値は、2テイルドt検定に基づくものである(生長を負の対照のそれと比較)。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

【図2】 アデノシンが、細胞外レセプターを介して生長を刺激するのではないことを示すグラフである。AF-1(a-b)、 $100 \mu M$ アデノシン(Ado)(c-d)又は $100 \mu M$ グアノシン(Guo)(e-f)により刺激された伸出は、 $20 pM$ 8-PST(A1及びA2アデノシンレセプターの阻害剤)の添加により影響されない(a、c及びeにおける生長をb、d及びfと比較されたい)。加水分解されないアデノシンのアナログである2-クロロアデノシン(2-CA、 $100 \mu M$)は、生長を基線レベルより低く減じる(g) (3実験で、 $p < 0.001$)。

【図3】 アデノシンは、伸出を刺激するには加水分解されなければならないことを示すグラフである。上段: AF-1(a-c)、アデノシン(d-f)及びグアノシン(g、h)により誘導された伸出に対するデオキシコフォルマイシン(DCF)及び外因性アデノシンデアミナーゼ(ADA)の効果を描いたグラフ。下段: AF-1(a-c)、アデノシン(d-f)及びグアノシン(g、h)により誘導された生存に対するデオキシコフォルマイシン(DCF)及び外因性アデノシンデアミナーゼ(ADA)の効果を描いたグラフ。外因性ADAによりアデノシンの加水分解を促進させることは、不変のアデノシンの活性を残す(f)が、外因性ADA活性をDCFでブロックすることは、アデノシンによる成長(e、上段)及び生存(e、下段)の抑制を引き起こす。*** $p < 0.001$ 。

【図4】 イノシンに関する投与量 - 応答曲線を描いたグラフである。約 $50 \mu M$ の濃度で、イノシンは、AF-1で達成される成長の最大レベルの約60%刺激する。イノシンの EC_{50} は、 $10 \sim 15 \mu M$ と見積もられる。5'IMPはイノシンの活性の1/10未満を有するようであるが、ヒポキサンチンは不活性であった。 $10 \mu M$ を超えるすべての濃度のイノシンにより刺激された伸出は、バックグラウンドを有意に超えている($p < 0.001$)。

【図5】 イノシンとグアノシンが細胞内機構により成長を刺激することを描いたグラフである。NBTI(プリン輸送の阻害剤)は、 $20 \mu M$ で、AF-1の活性に対して何の効果も有しないが、イノシン($50 \mu M$)又はグアノシン($100 \mu M$)の活性の90%をブロックする。*** (薬物を伴う成長と伴わない成長の差異)は、 $p < 0.001$ で有意である。データは、4つの独立の実験からプールしたものである。

【図6A】 AF-1が見かけのイノシン活性を含まないことを示すグラフである。G-10セファデックスカラムにおいて、AF-1は、7分のピークにて溶出し、ピークのイノシン溶出時(即ち、9~10分)に活性は検出されなかった。

【図6B】 イノシンとグアノシンの効果が細胞密度に無関係であることを示すグラフである。多くの独立した実験からのデータ(各々を単一の点で示す)を、細胞伸出に対するプレート密度の効果について分析した。すべての場合に、イノシン又はグアノシンの濃度は、 $100 \mu M$ に維持した。回帰線を、最小二乗適合法(クリケットグラフ)により計算し、これらの符号の下に示した。

【図7A-D】 AF-1の効果が6-チオグアニンにより阻害されるがイノシンにより

10

20

30

40

50

回復されることを示すグラフである。

【図 7 A】 プリンアナログの 6 - T G が、10 μ M で、A F - 1 により誘導された生長を基線より下に抑制し、25 μ M イノシン (I n o - 25) により誘導された生長を約 50 % 減じたことを示している (レーン 4 対 3) ; 一層高濃度のイノシン又はグアノシン (G u o - 100 : レーン 8 対 7) により誘導された生長は、影響を受けなかった。100 μ M のイノシンは、10 μ M の 6 - T G の存在下で A F - 1 により誘導された生長のすべてを回復した (レーン 10) (該生長は、試料単独でも、10 μ M の 6 - T G を伴っても、100 μ M のイノシンにより誘導される生長より有意に高い ($p < 0.01$))。

【図 7 B】 ここで用いた 6 - T G の濃度が細胞生存に影響を有しないことを示すグラフである。

10

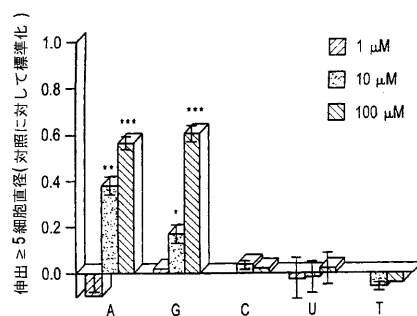
【図 7 C】 A F - 1 とイノシンが、部分的に、相加効果を有することを示すグラフである。伸出を、A F - 1 とイノシンについて、各々 0、 EC_{50} 又は飽和濃度にて評価した。各々の最大濃度の半分の効果は相加的であったが (レーン 5)、生長は、各々の一層高濃度の存在下でプラトーレベルに達した (レーン 6、8、9)。

【図 7 D】 6 - チオグアニンの効果に関する更なる研究を示している。A F - 1 により刺激された伸出は、6 - T G (10 μ M) により完全にブロックされ、イノシンの活性を抑制するプリン輸送ブロッカー阻害剤の N B T I (N、20 μ M) 及び / 又はジピリダモール (D、10 μ M) の存在下で回復されなかった。6 - T G の阻害効果は、2 つの還元剤 a - トコフェロール (a - t o c、30 μ M) 又はグルタチオン a - メチルエステル (M E G、100 μ M) により模倣されなかった。

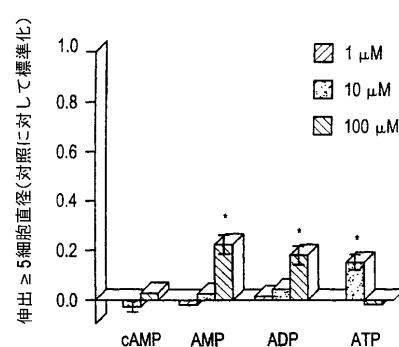
20

【図 8】 ラットの網膜神経節細胞に対するプリンの効果を描いたグラフである (定量的研究)。C N T F 刺激された生長は、6 - T G (10 mM) により阻害されるが、25 μ M イノシンの添加により完全に回復される。対照との差の有意性 : * $p = 0.03$; *** $p < 0.001$ 。結果は、3 つの独立した研究からプールしたものである。

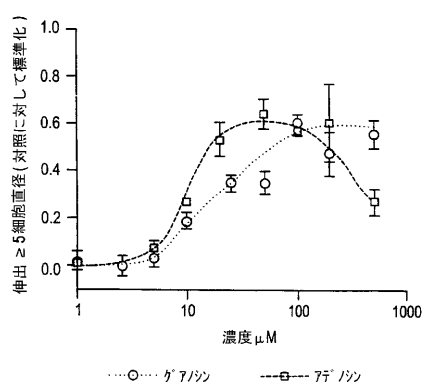
【図 1 A】



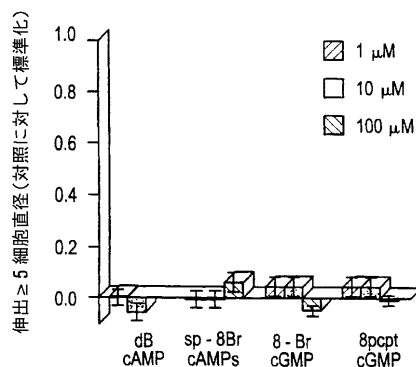
【図 1 C】



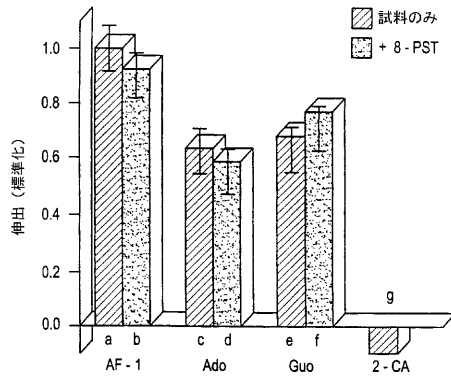
【図 1 B】



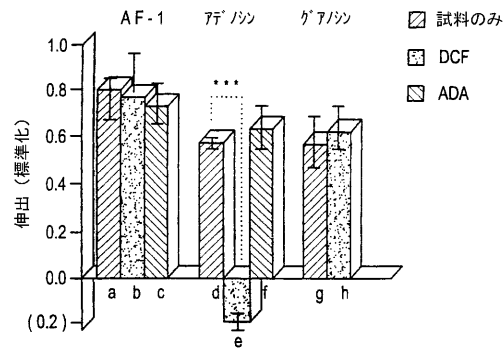
【図 1 D】



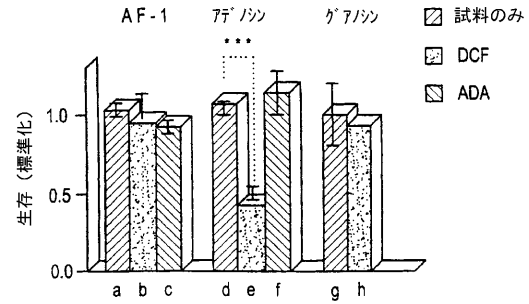
【図 2】



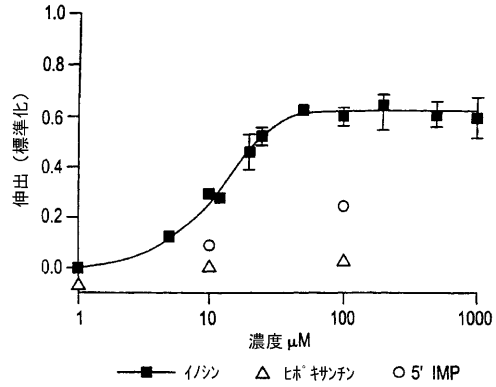
【図 3 A】



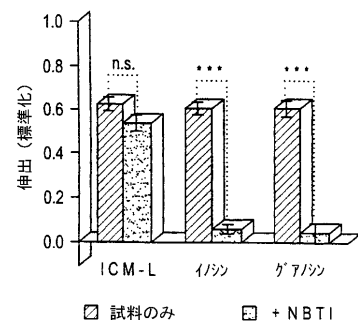
【図 3 B】



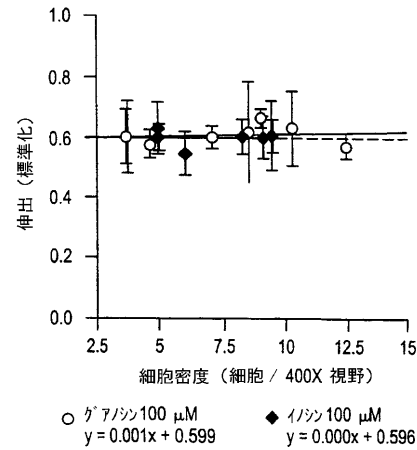
【図 4】



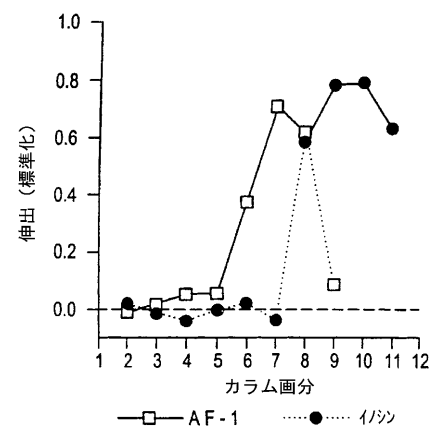
【図 5】



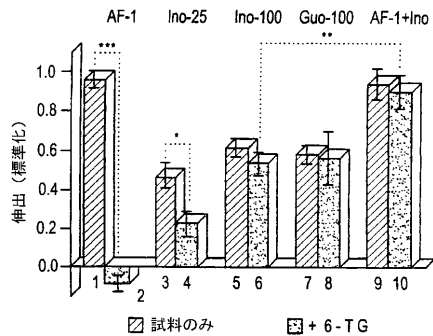
【図 6 B】



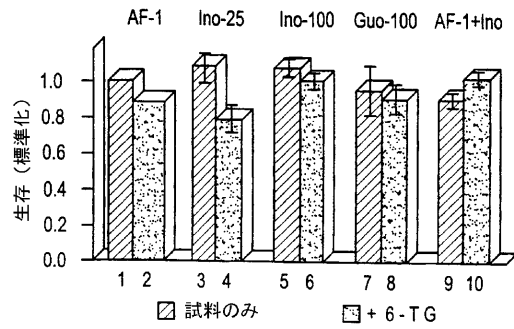
【図 6 A】



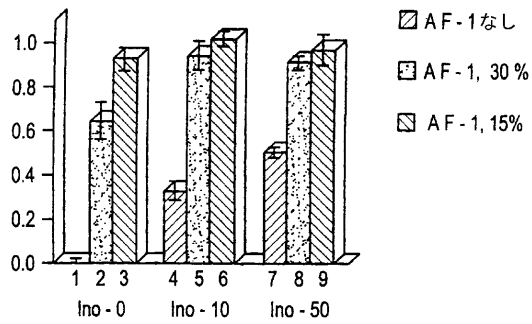
【図 7 A】



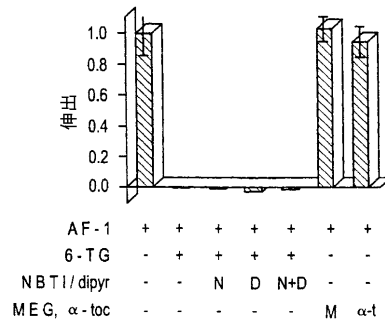
【図 7 B】



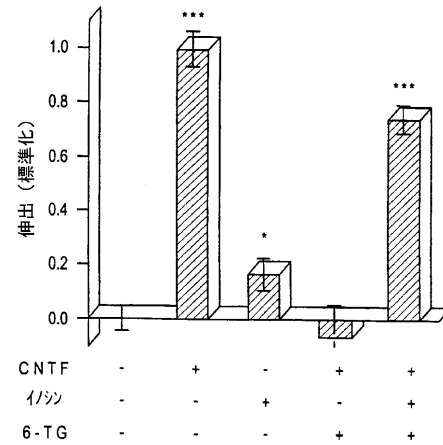
【図 7 C】



【図 7 D】



【図 8】



フロントページの続き

(72)発明者 ラリー アイ . ペノウィッツ

アメリカ合衆国 02159 マサチューセッツ、ニュートン センター、モアランド アベニュー 45

審査官 荒木 英則

(56)参考文献 国際公開第94/000132 (WO, A1)

特表平05-506842 (JP, A)

GYSBERS, J.W., et al., GTP AND GUANOSIDE SYNERGISTICALLY ENHANCE NGF-INDUCED NEURITE OUTGROWTH FROM PC12 CELLS, Int. J. Devl. Neurosci., 14(1), pp.19-34 (1996)

J.W.GYSBERS, GUANOSINE ENHANCES NGF-STIMULATED NEURITE OUTGROWTH IN PC12 CELLS, NeuroReport, 3(11), pp.997-1000 (1992)

HUFFAKER, T., et al., Adenosine Inhibits Cell Division and Promotes Neurite Extension in PC12 Cells, J. Cell. Physiol., 120(2), pp.188-196 (1984)

CUI, L., et al., Effect of Nucleoside Analogs on Neurite Regeneration and Mitochondrial DNA Synthesis in PC-12 Cells, J. Pharmacol. Exp. Ther., 280(3), pp.1228-1234 (1997)

RATHBONE, M.P., et al., Extracellular Purine Nucleoside Stimulate Cell Division and Morphogenesis: Pathological and Physiological Implications, Medical Hypotheses, 37, pp.232-240 (1992)

GREENE, L.A., et al., PURINE ANALOGS INHIBIT NERVE GROWTH FACTOR-PROMOTED NEURITE OUTGROWTH BY SYMPATHETIC AND SENSORY NEURONS, J. Neurosci., 10(5), pp.1479-1485 (1990)

VOLONTE, C., et al., Differential Inhibition of nerve Growth Factor Responses by Purine Analogues: Correlation with Inhibition of a Nerve Growth Factor-activated Protein Kinase, J. Cell Biol., 109, pp.2395-2403 (1989)

KADOTA, T., et al., Expression of Dopamine Transporter at the Tips of Growing Neurites of PC12 Cells, J. Histochem. Cytochem., 44(9), pp.989-996 (1996)

山口 英俊ら, PC12細胞におけるNGF誘導神経突起伸長に対するアニラセタムの作用, 薬理と治療 (Jpn. Pharmacol. Ther.), 25(7), pp.1801-1805

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00-31/80

A61P 1/00-43/00

C07H 1/00-99/00

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)