

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-530234

(P2009-530234A)

(43) 公表日 平成21年8月27日 (2009. 8. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/22 (2006. 01)	A 6 1 K 37/24	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 25/28 (2006. 01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/14 (2006. 01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 21/02 (2006. 01)	A 6 1 P 21/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

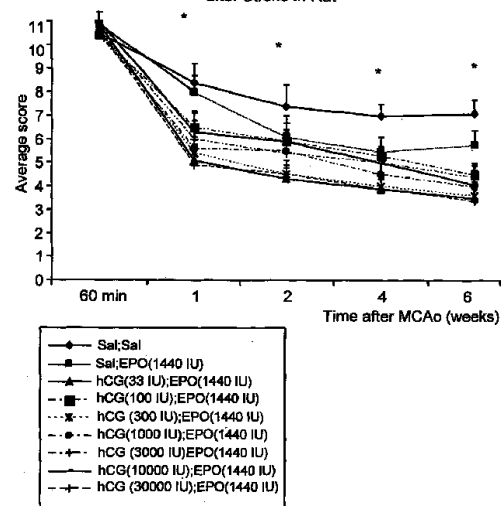
(21) 出願番号	特願2008-558609 (P2008-558609)	(71) 出願人	506274785
(86) (22) 出願日	平成19年3月16日 (2007. 3. 16)		ステム セル セラピューティクス コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成20年11月11日 (2008. 11. 11)		カナダ国 ティー2アール 1エイチ5
(86) 国際出願番号	PCT/CA2007/000426		アルバータ, カルガリー, 4ティーエ
(87) 国際公開番号	W02007/106986		イチ ストリート エス. ダブリュー.
(87) 国際公開日	平成19年9月27日 (2007. 9. 27)		1 5 2 0, スイート 1 0 0 0
(31) 優先権主張番号	60/783, 500	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成18年3月17日 (2006. 3. 17)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/789, 132		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成18年4月5日 (2006. 4. 5)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/862, 669		
(32) 優先日	平成18年10月24日 (2006. 10. 24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患の治療のための LH または HCG、および EPO についての投与レジメン

(57) 【要約】

本明細書では、神経幹細胞増殖および分化剤のための有効な投与レジメン、神経幹細胞増殖および分化剤のための有効な投与レジメンを含むキット、およびその使用を提供する。こうしたキットおよび方法を短期的または長期的に用いて、神経変性疾患または病態を治療することができる。さらに、その組成物および方法を、各種投与レジメンにおいて連続的にまたは断続的に使用することができる。本発明は特に、哺乳類における神経変性疾患または病態の治療または改善用のキットであって、EPO および少なくとも 3 用量単位の hCG または LH を含むキットを提供する。

Effect of hCG; then EPO on Recovery of Neurological Score after Stroke in Rat



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類における神経変性疾患または病態を治療または改善する方法であって、哺乳類に有効量の hCG または LH および有効量の EPO を投与するステップを含み、該 hCG または LH を少なくとも 3 回全身投与する方法。

【請求項 2】

前記神経変性疾患または病態の症状の出現または診断から 0 ～約 14 日以内に、hCG または LH の初回用量を前記哺乳類に投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記神経変性疾患または病態の症状の出現または診断から 0 ～約 5 日以内に、hCG または LH の初回用量を前記哺乳類に投与する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

少なくとも約 3、4、5、6、7、または 14 日間の治療期間にわたって前記 hCG または LH を前記哺乳類に投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

hCG の用量単位が、前記哺乳類において約 0.03 IU/L ～約 5,000,000 IU/L の血中血清 hCG レベルをもたらす、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

hCG の用量単位が、前記哺乳類において約 0.003 IU/L ～約 5,000 IU/L の脳脊髄液 hCG レベルをもたらす、請求項 1 または 4 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記哺乳類に投与する hCG の量が約 0.5 IU/kg/日～約 3,000,000 IU/kg/日である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記哺乳類に投与する hCG の量が約 10,000 IU/日である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記哺乳類に投与する LH の量が約 0.5 IU/kg/日～約 300,000 IU/kg/日である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 10】

前記哺乳類に投与する LH の量が約 10,000 IU/日である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記哺乳類に投与する EPO の量が約 100 IU/kg/日～約 1000 IU/kg/日である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 12】

前記哺乳類に投与する EPO の量が約 570 IU/kg/日～約 950 IU/kg/日である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 13】

前記哺乳類に投与する EPO の量が約 765 IU/kg/日である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記哺乳類に投与する EPO の量が約 30,000 IU/日である、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 15】

治療期間中前記 hCG または LH を連続的に投与する、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 16】

治療期間中前記 hCG または LH を断続的に投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

50

治療期間の第 1 日、第 3 日、および第 5 日に前記 h C G または L H を投与する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

第 1 治療期間に前記 h C G または L H を投与し、第 2 治療期間に前記 E P O を投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

第 1 治療期間中前記 h C G または L H を断続的に投与し、第 2 治療期間中前記 E P O を連続的に投与する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

第 1 治療期間の第 1 日、第 3 日、および第 5 日に前記 h C G または L H を送達し、第 2 治療期間の第 1 日、第 2 日、および第 3 日に前記 E P O を送達する、請求項 1 9 に記載の方法。

10

【請求項 2 1】

前記哺乳類に、約 1 0, 0 0 0 I U / 日の h C G と、約 3 0, 0 0 0 I U / 日の E P O とを投与する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記神経変性疾患または病態が脳卒中である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記第 1 治療期間が少なくとも約 3、4、5、6、7、または 1 4 日間である、請求項 1 9 に記載の方法。

20

【請求項 2 4】

前記第 2 治療期間が少なくとも約 3、4、5、6、7、または 1 4 日間である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記第 2 治療期間が前記第 1 治療期間の少なくとも 1 日後に始まる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記神経変性疾患または病態が、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋委縮性側索硬化症、パーキンソン病、C N S 損傷、多発性硬化症、および統合失調症からなる群から選択される、請求項 1、2、4、1 6、または 1 7 に記載の方法。

30

【請求項 2 7】

前記神経変性疾患または病態が C N S 損傷である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 C N S 損傷が脳卒中、脳または脊髄損傷、脳震盪、薬剤により生じる損傷、冠動脈バイパス術に関連する損傷、あるいは出産時の虚血である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

C N S 損傷の少なくとも 1 日後に神経幹細胞増殖剤の初回用量を哺乳類に投与する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

哺乳類における神経変性疾患または病態を治療または改善する方法であって、第 1 治療期間に有効量の h C G または L H を哺乳類に投与した後で、第 2 治療期間に有効量の E P O を該哺乳類に投与するステップを含む方法。

40

【請求項 3 1】

前記神経変性疾患または病態の症状の出現または診断から 0 ～約 1 4 日以内に、h C G または L H の初回用量を前記哺乳類に投与する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記神経変性疾患または病態の症状の出現または診断から 0 ～約 5 日以内に、h C G または L H の初回用量を前記哺乳類に投与する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記第 1 治療期間が少なくとも約 3、4、5、6、7、または 1 4 日間である、請求項

50

30に記載の方法。

【請求項34】

前記第2治療期間が少なくとも約3、4、5、6、7、または14日間である、請求項30に記載の方法。

【請求項35】

前記第2治療期間が前記第1治療期間の少なくとも1日後に始まる、請求項30、31、32、33、または34に記載の方法。

【請求項36】

前記第1治療期間に前記hCGまたはLHを断続的に送達し、前記第2治療期間に前記EPOを連続的に送達する、請求項30に記載の方法。

10

【請求項37】

前記第1治療期間の第1日、第3日、および第5日に前記hCGまたはLHを送達し、前記第2治療期間の第1日、第2日、および第3日に前記EPOを送達する、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

哺乳類における神経変性疾患または病態の治療または改善用のキットであって、EPOおよび少なくとも3用量単位のhCGまたはLHを含むキット。

【請求項39】

さらに、前記hCGまたはLHの全身投与用の説明書を含む、請求項38に記載のキット。

20

【請求項40】

前記説明書が前記hCGまたはLHの断続的投与用である、請求項39に記載のキット。

【請求項41】

前記EPOが少なくとも3用量単位である、請求項38、39、または40に記載のキット。

【請求項42】

さらに、EPOの連続的投与用の説明書を含む、請求項38、39、または40に記載のキット。

【請求項43】

さらに、第1治療期間における神経幹細胞増殖剤投与、および第2治療期間におけるEPO投与用の説明書を含む、請求項38、39、または40に記載のキット。

30

【請求項44】

さらに、少なくとも1つの薬剤送達機器を含む、請求項38、39、または40に記載のキット。

【請求項45】

さらに、ヘマクリットレベルをモニターするための機器を含む、請求項38、39、または40に記載のキット。

【請求項46】

さらに、対象から血液試料を採取するための機器を含む、請求項38、39、または40に記載のキット。

40

【請求項47】

医療施設において使用するための、請求項38、39、または40に記載のキット。

【請求項48】

医療施設からの退院後に使用するための、請求項38、39、または40に記載のキット。

【請求項49】

前記LHまたはhCGの用量単位が単一の容器内にある、請求項38、39、または40に記載のキット。

【請求項50】

50

前記 L H または h C G の用量単位が複数の容器内にある、請求項 38、39、または 40 に記載のキット。

【請求項 51】

分化剤の用量単位が単一の容器内にある、請求項 38、39、または 40 に記載のキット。

【請求項 52】

分化剤の用量単位が複数の容器内にある、請求項 38、39、または 40 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

10

【0001】

（関連出願への相互参照）

本願は、2006年3月17日に出願された米国仮特許出願第60/783,500号；2006年4月5日に出願された米国仮特許出願第60/789,132号；2006年10月24日に出願された米国仮特許出願第60・862,669号に対する優先権および利益を主張する。これらの出願は、本明細書中に、その全体が参考として援用される。

【0002】

（背景）

多能性神経幹細胞（例えば、特許文献1、特許文献2、特許文献3を参照のこと）の単離技術および *in vitro* 培養技術の開発により、神経変性疾患および病態の治療の見通しが著明に改善された。胎児脳を用いて、*in vitro* で多能性神経幹細胞を単離し培養できることが発見された。さらに、成体脳細胞は脳細胞を複製または再生することができないという長年抱かれていた考えに反して、神経幹細胞は、成体哺乳類の脳からも単離しうるということが判明した。胎児脳または成体脳に由来するこれらの幹細胞は、自己複製が可能である。子孫細胞は、ニューロン、星状膠細胞、および希突起膠細胞を含む、神経細胞系列内のいずれの細胞にも増殖または分化することができる。したがって、これらの知見は、移植に用いることのできる神経細胞源を提供するだけでなく、成体脳における多能性神経幹細胞の存在をも示すものである。

20

【0003】

神経幹細胞増殖剤など、ある種の薬剤が、*in vitro* または *in vivo* における神経幹細胞数を増大させることが判明している。こうした増大の機構は、神経幹細胞の増殖の刺激、分化の抑制、および／または死滅の阻害を含みうる。追加の薬剤である幹細胞分化剤が、*in vitro* または *in vivo* におけるニューロン前駆細胞またはグリア前駆細胞の産生を選択的に促進することが判明している。したがって、これらの増殖剤および分化剤を使用して、ニューロンおよびグリア細胞を増大させ選択的に促進することができる。

30

【特許文献1】米国特許第5,750,376号明細書

【特許文献2】米国特許第5,980,885号明細書

【特許文献3】米国特許第5,851,832号明細書

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

（要旨）

本明細書では、神経幹細胞増殖剤および分化剤のための有効な投与レジメン、キット、およびその使用を提供する。こうした物質組成物および方法は、短期的（例えば、神経損傷後または神経症状の出現後数日以内）に用いることもでき、または長期的（例えば、持続性神経損傷または進行性神経症状用）に用いることもできる。さらに、その組成物および方法は、連続的にまたは断続的に使用することができる。

【0005】

50

したがって、哺乳類における神経変性疾患または病態を治療または改善する方法を提供する。その方法は、哺乳類に有効量のhCGまたはLHおよび有効量のEPOを投与するステップを含み、場合によってはキットの使用により、hCGまたはLHを少なくとも3回全身投与する。hCGまたはLHおよび／またはEPOは、連続的にまたは断続的に投与することができる。さらに、hCGまたはLHを第1治療期間に投与し、EPOを第2治療期間に投与することができる。例えば、hCGまたはLHを第1治療期間の第1、第3、および第5日に断続的に投与し、次いでEPOを第2治療期間の第1、第2、および第3日に連続的に投与することができる。

【0006】

本明細書では、哺乳類における神経変性疾患または病態を治療または改善する、さらなる方法も提供する。その方法は、場合によってはキットの使用により、哺乳類に、第1治療期間に有効量のhCGまたはLHを投与した後、第2治療期間に有効量のEPOを投与するステップを含む。第1治療期間中hCGまたはLHを断続的に送達し、第2治療期間中EPOを連続的に送達することができる。例えば、第1治療期間の第1、第3、および第5日にhCGまたはLHを断続的に投与し、次いで第2治療期間の第1、第2、および第3日にEPOを連続的に投与することができる。

【0007】

その方法およびキットにおいて、治療期間は、例えば、少なくとも3日間である。その投与方法は、第2、第3、第4、第5その他の治療期間を用いて、数回または多数回反復することができる。その投与方法は、投与回数が1回、2回、数回、または多数回のいずれであれ、1つまたは複数のキットの形をとることができる。

【0008】

方法およびキットの詳細を、添付した図面および以下の説明に示す。その方法およびキットの他の特徴、目的、および利点は、その説明および図面、ならびに請求項から明らかとなるであろう。

【0009】

種々の図面中の同種の参照記号は、同種の要素を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

(詳細な説明)

現在のところ、神経疾患または病態の治療における使用が臨床的に承認されている神経幹細胞増殖剤および分化剤は存在しない。これらの薬剤は、神経疾患または病態の治療に有用であるため、これらの薬剤を用いる有効な投与レジメンが必要である。神経幹細胞増殖剤および分化剤のための有効な投与レジメン、神経幹細胞増殖剤のための有効な投与レジメンを含むキット、およびその使用を、本明細書で提供する。こうしたキットおよび方法は、短期的（例えば、外傷後または神経変性疾患または病態の出現後数日以内）あるいは長期的（例えば、慢性の神経変性疾患または病態用）に用いることができる。さらに、その組成物および方法は、以下でさらに説明するように、連続的にまたは断続的に使用することができる。

【0011】

本明細書に記載の方法は、神経変性疾患または病態の治療または改善のために神経幹細胞増殖剤を用いる。これらの方法において、神経幹細胞増殖剤は、第1治療期間に投与する。神経幹細胞増殖剤は、第1治療期間にわたって、連続的にまたは断続的に投与することができる。第1治療期間に、さらに神経幹細胞分化剤を追加することができる。実施例および説明は、神経幹細胞増殖剤（例えば、プロラクチン、hCG、LH、CSF、G-CSF、GM-CSF、VEGF）および神経幹細胞分化剤（例えば、EPO、BDNF、BMP、PACAP）の使用を含むが、本明細書で教示する方法、機器、またはキットのいずれにおいても、こうした薬剤の類似体、断片、または変異体を同様に用いることができる。特殊な実施例として、有効量のhCGまたはLH、および有効量のEPOを哺乳類に投与するに際し、hCGまたはLHを少なくとも3回、全身投与する方法を開示する

。

【0012】

神経変性疾患または病態の治療または改善のために神経幹細胞増殖剤を用いるこれらの方法は、さらに、第1治療期間の終了後に開始する第2治療期間において、神経細胞分化剤の投与を含むことができる。第2治療期間は、少なくとも3日間でありうる。神経幹細胞分化剤は、第2治療期間中連続的にまたは断続的に投与することができる。第2治療期間は、第2治療期間の少なくとも1日後に開始することができる。特殊な実施例として、第1治療期間に神経幹細胞増殖剤を少なくとも3回、全身に連続的に投与し、第2治療期間に神経幹細胞分化剤を投与する方法を開示する。さらなる実施例として、第1治療期間が5日間で神経幹細胞増殖剤を断続的に投与し、第2治療期間が第1治療期間終了の1日後に開始して、神経幹細胞分化剤を少なくとも3日間連続的に投与する方法を開示する。追加の実施例として、第1治療期間に有効量のhCGまたはLHを投与した後、第2治療期間に有効量のEPOを投与することができる。

10

【0013】

本明細書で用いる、対象に物質を連続的に送達するまたは連続的に投与するとは、連続する一定日数において、1日に少なくとも1回、その物質を送達または投与することを意味する。例えば、その物質は、注射（例えば、筋肉内または皮下）により全身投与してもよく、または1日に1回毎日経口投与してもよく、または対象の組織もしくは血流内に毎日送達するよう注入により投与してもよい。場合によっては、その物質は、注入または注入以外の方法で送達する。本明細書で用いる、全身にという用語は、脳室内注入を含まない。その物質を連続的に送達または投与する期間または治療期間は、3日間から数年間にわたって継続する可能性があり、対象の残りの生涯にわたって継続する可能性もある。例えば、その期間は、3～6日間、3～14日間、3～21日間、3～28日間、1～4カ月間、1～6カ月間、1～9カ月間、1～12カ月間、1～2年間、1～3年間、1～5年間、1～10年間などでよい。さらなる例として、連続的送達のための治療期間は、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも14日間でありうる。さらに、その物質は、投与期間の第1、第2、および第3日に連続的に送達することができる。

20

【0014】

本明細書で用いる、対象に物質を断続的に送達するまたは断続的に投与するとは、例えば、ある期間にわたり2、3、4、5、または7日ごとに1回を含む、毎日より少ない頻度で、その物質を送達または投与することを意味する。例えば、治療期間の隔日、例えば、治療期間の第1、第3、または第5日に、その物質を送達または投与してよい。その物質を断続的に送達または投与する期間または治療期間は、3日間から数年間にわたって継続する可能性があり、対象の残りの生涯にわたって継続する可能性もある。例えば、その期間は、3～6日間、3～14日間、3～21日間、3～28日間、1～4カ月間、1～6カ月間、1～9カ月間、1～12カ月間、1～2年間、1～3年間、1～5年間、1～10年間、などであってよい。さらなる例として、断続的送達の治療期間は、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも14日間でありうる。

30

40

【0015】

本明細書で提供する方法は、神経変性疾患または病態を示す対象に対して有効量の神経幹細胞増殖剤を投与することで、神経変性疾患または病態を治療するために、例えば、プロラクチン、hCG、LH、CSF、G-CSF、GM-CSF、またはVEGFなどの増殖剤を用いることができる。実施例として、増殖剤hCGおよびLHは、同一の受容体に結合するので、本明細書で提供する特殊な実施例における等効力用量において、互換的に用いることができる。さらなる例として、増殖剤hCGを約120～200IU/kg/日の用量で筋肉内(IM)投与した後で、約570～950IU/kg/日のEPOを静脈内(IV)投与することができる。さらなる例として、hCGを約160IU/kg/日の用量で筋肉内投与した後で、765IU/kg/日のEPOを静脈内投与すること

50

ができる。hCGおよびLHの断続的投与は、場合によって、数日間のhCGまたはLH投与（例えば、第1、第3、または第5日）を含む。神経幹細胞刺激剤のこうした投与の後に、数日間にわたりEPOなどの分化剤を、断続的投与（例えば、第7、第9、第11日）または連続的投与（例えば、第7、第8、および第9日）することができる。同様のレジメンで、等効力用量の他の神経幹細胞増殖剤をも用いることができる。

【0016】

こうして、実施例4は、プロラクチン（別の増殖剤）の投与レジメンを示す。各量のプロラクチンを6日間にわたり毎日投与し、神経幹細胞数に対する効果を検討した。結果は、約150～200 $\mu\text{g}/\text{日}$ （例えば、170 $\mu\text{g}/\text{日}$ を含む）が、本投与スケジュールにおける最適であることを示した。次いで、6日間にわたり170 $\mu\text{g}/\text{日}$ の本投与レジメンを投与期間を短縮し（170 $\mu\text{g}/\text{日}$ で3日間）または毎日の高用量と期間の短縮とを組み合わせると同様の総用量（3日間で約396 μg ）を実現することにより変化させた。結果は、長期間における低用量の連続的送達の方が、有効であることを示した。

【0017】

本明細書で提供する連続的送達または断続的送達を含む方法が、神経学的状態を改善することができる。意味を限定することなく、この改善は、哺乳類における神経幹細胞数の増大と関連しうる。有効量の神経幹細胞増殖剤の有効性を最適化して、哺乳類における神経幹細胞数、または神経学的状態を増大させることができる。その方法は、一定期間にわたり哺乳類に神経幹細胞増殖剤を連続的にまたは断続的に投与するステップを含み、前記期間に投与する神経幹細胞増殖剤の総用量が有効量に等しく、第1治療期間にわたって少なくとも3回その薬剤を投与する。

【0018】

本明細書に記載の方法を最適化し、哺乳類における神経変性疾患または病態の治療または改善において、有効量の神経幹細胞増殖剤の有効性を増大させることができる。その方法は、一定期間にわたり哺乳類に神経幹細胞増殖剤を連続的にまたは断続的に投与するステップを含み、前記期間に投与する神経幹細胞増殖剤の総用量が有効量に等しく、第1治療期間に少なくとも3回その薬剤を投与する。

【0019】

中枢神経系（CNS）の損傷、症状の出現、または診断から約14日以内（例えば、0～約14日間）に、神経幹細胞増殖剤を哺乳類に投与することができる。本明細書で用いる0日間とは、CNSの損傷、症状の出現、または診断の時点を指す。場合によって、CNSの損傷、症状の出現、または診断から約13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1日以内（例えば、0～約5日間）に、神経幹細胞増殖剤を哺乳類に投与することができる。場合によって、CNSの損傷、症状の出現、または診断から24時間以内に、神経幹細胞増殖剤を哺乳類に投与することができる。場合によって、CNSの損傷、症状の出現、または診断から12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1時間以内に、神経幹細胞増殖剤を哺乳類に投与することができる。

【0020】

断続的治療のために高用量の薬剤を用いることができ、または連続的治療を用いることができる。とくに、高用量の断続的投与と対照的に、神経幹細胞増殖剤は、哺乳類対象に低用量で連続的に送達できる。神経幹細胞増殖剤は、場合によって、神経損傷または神経症状の出現から24～72時間以内に送達する。場合によって、神経幹細胞増殖剤の連続的投与は、2～5日間にわたる。例えば、プロラクチン、またはプロラクチンの類似体、断片、もしくは変異体の所与の総有効用量に対して、総量の1/6を6日間毎日送達することを含む投与レジメンの方が、総量の1/3を3日間毎日送達することよりも有効であった。同様の枠組みで、等効力用量の他の神経幹細胞増殖剤をも用いることができる。

【0021】

本明細書に記載の方法は、哺乳類の体液中における神経幹細胞増殖剤または神経幹細胞分化剤のレベルをモニターするステップをも含む。モニターされる体液は、例えば、脳脊髄液または血液でありうる。例えば、治療期間中または治療期間後のいずれかの投与後に

、血清中のhCG（または別の神経幹細胞増殖剤もしくは神経幹細胞分化剤）レベルを測定することができる。等効力レベルの各種神経幹細胞増殖剤または神経幹細胞分化剤を、体液中において測定かつモニターすることができる。

【0022】

本明細書では、哺乳類における神経変性疾患または病態の治療または改善用のキットをも提供する。そのキットは、第1治療期間における投与のために、少なくとも3用量単位の神経幹細胞増殖剤を含む。その第1治療期間において投与する神経幹細胞増殖剤の総用量は、有効量と等しくすることができる。治療期間は、少なくとも3日間でありうる。そのキットは、キットの説明書を含むことができる。その説明書は、神経幹細胞増殖剤の連続的投与用、または断続的投与用でありうる。

10

【0023】

そのキットは、さらに、少なくとも3用量単位の分化剤を提供することができる。分化剤は、第1治療期間にわたって用いることができる。第1治療期間において投与する分化剤の総用量は、有効量に等しくすることができる。治療期間は、少なくとも3日間でありうる。分化剤の治療期間は、場合によっては、神経幹細胞増殖剤による1つまたは複数の治療期間に後続する第2またはそれ以降の治療期間である。そのキットは、分化剤を使用するための説明書を含むことができる。その説明書は、神経幹細胞増殖剤の連続的投与用、または断続的投与用でありうる。

【0024】

そのキット中の各神経幹細胞増殖剤、同分化剤、または他の薬剤の総用量は、1つの容器、複数の容器、またはその任意の組合せでありうる。例えば、1つまたは複数の神経幹細胞増殖剤の総用量は、例えば、被投与者、または介護者などの他者が計量する用量を提供するのに好適な、または用量を抽出するのに好適な1つの容器に封入しうる。単一の容器の代わりに、毎日、毎週、毎月などの投与に好適な用量のために一定量ずつを提供する複数の容器において、1つまたは複数の神経幹細胞増殖剤を提供することができる。分化剤または他の薬剤のための単一の容器または複数の容器も、そのキットにおいて同様に提供することができる。そのキットには、神経幹細胞増殖剤は一容器であるが分化剤は複数容器である組合せをも含めてよく、またはその逆の組合せを含めてもよい。また、第1治療期間のための神経幹細胞増殖因子の総用量が単一の容器もしくは複数の容器内にあってもよく、または第2治療期間のための総用量が単一の容器もしくは複数の容器内にあってもよく、あるいはその任意の組合せでもよい。

20

30

【0025】

神経幹細胞増殖剤または分化剤は、場合によっては、1つまたは複数の治療期間に送達すべき神経幹細胞増殖剤および分化剤の総量をキット中に含むよう、キットにパッケージ化することができる。そのキットは、場合によって、例えば、血液試料採取機器またはその構成成分を含む、他の構成成分または他の構成成分の組合せを含むことができる。

【0026】

そのキットは、さらに、患者におけるヘマトクリットレベルをモニターするための機器または手段、あるいは患者から一定量の血液を採取するために好適な機器、あるいはモニターおよび血液試料採取機器の両方を含むことができる。ヘマトクリットレベルが許容できるレベルを超えて上昇することがあるので、血液試料採取およびモニターが望ましい。許容できるヘマトクリットレベルは、当技術分野において確立したいずれの基準によっても判定することができる。

40

【0027】

場合によって、1つまたは複数の神経幹細胞増殖剤および／または1つまたは複数の分化剤を含むキット中に、投与のための薬剤送達機器を含めることができる。

【0028】

そのキットは、入院患者治療施設または救急患者治療施設などの医療施設における使用に好適でありうる。医療施設は、例えば、病院を含む。そのキットは、入院患者治療施設からの退院後の使用またはその施設への入院なしでの使用にも好適である。キットの形で

50

パッケージ化することは、例えば、自己治療、外来治療、または自宅、長期ケア施設などでの介護者もしくは医療提供者による投与により、長期ケア施設または自宅での患者治療を可能とすることで、医療施設からの患者の早期退院を促進する利点を有する。同様に、キットの形でパッケージ化することは、救急治療室を含む緊急の状況における、または現場の救急ケア提供者による（例えば、救急医療技術者、アスレチックトレーナーなどによる）患者の即時治療を可能とする。

【0029】

その方法およびキットにおいて、期間は、例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、21、28、または3～28日間の任意の日数であってよい。場合によっては、その方法およびキットは、第2治療期間において哺乳類に神経幹細胞増殖剤を連続的に投与するステップを含んでよく、第2治療期間がその期間の終了後少なくとも1、2、または3日間の間隔を置いて開始し、第2治療期間が少なくとも3日間である。第2治療期間は、第1治療期間と同様に、例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、21、または28日間であってよい。第1治療期間と次の治療期間との間隔は、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、21、または28日間であってもよい。この治療スケジュールは、複数回または多数回反復することができる。第2以降の治療期間で使用する神経幹細胞増殖剤は、第1治療期間で使用する神経幹細胞増殖剤または他の治療期間で使用する神経幹細胞増殖剤と同じかまたは異なっていてよい。さらに、単一の治療期間において、複数の神経幹細胞増殖剤を用いてよい。こうして、その方法で有用なキットは、1つまたは複数の治療期間のために1つまたは複数の神経幹細胞増殖剤を含むことがある。

【0030】

静脈内、動脈内、結腸内、気管内、腹腔内、鼻腔内、血管内、髄腔内、頭蓋内、骨髄内、胸膜内、皮内、皮下、筋肉内、経口、外用投与、肺内投与、またはその任意の組合せなど、当技術分野で確立された任意の方法により、1つまたは複数の神経幹細胞増殖剤あるいは他の薬剤（例えば、分化剤）を投与することができる。場合によって、神経幹細胞増殖剤を含むキットに、投与のための薬剤送達機器またはその構成成分を含めることができる。

【0031】

神経幹細胞増殖剤は、*in vitro*または*in vivo*において、哺乳類の神経幹細胞数を増大させることのできる任意の物質であってよい。本明細書で用いる促進剤は、増殖剤と同じ意味を有する。神経幹細胞数を増大させることのできる薬剤は、以下を含むがこれに限定されない。

1. LHと呼応して作用し、LH受容体の発現を誘発することが多いために、LHシグナル伝達効果を高める濾胞刺激ホルモン（FSH）。
2. 神経幹細胞増殖を刺激することができる成長ホルモン（GH）。
3. GHに応答して多数の組織から放出され、GHの成長増殖効果の多くを媒介し、神経幹細胞増殖を刺激するソマトメジンである、IGF-1を含むインスリン成長因子（IGF）。
4. 視床下部から分泌され、下垂体前葉からのGH放出を誘発し、循環GHレベルの上昇を生じるホルモン放出成長ホルモン（GHRH）。
5. 下垂体前葉から分泌され、神経幹細胞増殖を促進するプロラクチン（PRL）。
6. プロラクチン放出の誘因となるプロラクチン放出ペプチド（PRP）。
7. 神経幹細胞の分裂促進剤である線維芽細胞成長因子（FGF）。
8. 例えば視床下部内を含む神経幹細胞の増殖を促進するエストロゲン。
9. 視床下部における神経幹細胞の増殖を促進するセロトニン。
10. 神経幹細胞の分裂促進剤である上皮細胞成長因子（EGF）。
11. 神経幹細胞の分裂促進剤である形質転換成長因子アルファ（TGF α ）。
12. LH放出の誘因となるゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）。
13. gp130サブユニット経由で神経幹細胞の自己再生を刺激するシグナル伝達経路

によりシグナル伝達することで、脳の神経幹細胞集団を増大させる毛様体神経栄養因子（CNTF）および白血病抑制因子（LIF）。

14．コロニー刺激因子（CSF）。

15．顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）。

16．顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）。

17．血管内皮細胞成長因子（VEGF）。

18．黄体形成ホルモン（LH）。

19．ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）。

【0032】

さらに、神経細胞分化剤を投与して、ニューロン発生またはグリア細胞発生を選択的に促進することができる。これらの分化剤は、投与レジメンおよびキットに従って送達することもできる。典型的な分化剤は、以下を含むがこれに限定されない。

1．神経幹細胞の神経細胞系列へのコミットメントを促進し、脳卒中のマウスおよびラットモデルへの投与に有用であるエリスロポエチン（EPO）。

2．既知の生存因子であり、神経細胞系列を促進する分化剤である脳由来神経栄養因子（BDNF）。

3．神経細胞系列および特定の神経細胞表現型（例えば、脊髄における知覚介在ニューロン）の発生を促進する分化剤である形質転換成長因子ベータおよび骨形成タンパク質（BMP）。

4．希突起膠細胞の成熟および発生を促進する分化剤である甲状腺ホルモン（T3およびT4のいずれの形態をも含むTH）。例えば、Rodriguez-Pena、1999年を参照のこと。

5．下垂体前葉からのTH放出を促進し、循環THレベルを増大させる、甲状腺刺激ホルモン（TSH）および甲状腺放出ホルモン（TRH）。本剤は、LHまたはhCGと併用して、神経幹細胞からの希突起膠細胞発生を促進しうると考えられる。

6．発達段階における発達中のCNSのパターンを定め、異なる濃度で、特定の種類のニューロン（例えば、脊髄における運動ニューロン）および希突起膠細胞の発生を促進するモルフォゲンであるソニックヘッジホッグ（SHH）。本剤は、LHまたはhCGと併用して、神経幹細胞からのニューロン発生および／または希突起膠細胞発生を促進しうると考えられる。

7．神経幹細胞からの希突起膠細胞発生および分化を促進する血小板由来成長因子（PDGF）。本剤は、LHまたはhCGと併用して、神経幹細胞からの希突起膠細胞発生を促進しうると考えられる。

8．サイクリックAMP、およびニューロン産生を選択的に促進する下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（PACAP）やセロトニンなど、cAMP経路を促進する薬剤。

【0033】

その方法およびキットのいずれもが、複数の神経幹細胞増殖剤および／または神経細胞分化剤を含みうる。こうして、1つまたは複数の神経幹細胞増殖剤を同時または順次投与することができ、別個の組成物により、または単一の組成物内で組み合わせて投与することができる。さらに、1つまたは複数の神経幹細胞増殖剤、および1つまたは複数の神経幹細胞分化剤を、同時または順次投与することができ、別個の組成物により、または単一の組成物内で組み合わせて投与することができる。例えば、PRLとLHまたはhCGとを併用することにより、神経幹細胞増殖を最大化することができる；PRPとLHまたはhCGとを併用することにより、神経幹細胞増殖を最大化することができる；GnRHをLHまたはhCGと組み合わせて、あるいはLHまたはhCGの代わりに用いることにより、LHの循環レベルを増大させ、神経幹細胞増殖を促進することができる；ならびにCNTFおよびLIFとLHまたはhCGとを併用することにより、神経幹細胞増殖を促進し、CNS内における神経幹細胞集団の規模を増大させることができる。さらに、例えば、プロラクチンをEPOと併用することができ、LHをEPOと併用することができ、h

CGをEPOと併用することができる。明示しないが、他のすべての組合せをも用いることができる。

【0034】

当技術分野で確立された方法に従い、その因子に適切な用量を定めることができる。例として、プロラクチンの用量は、例えば、約0.510～約100,000、約0.510～約75,000、約0.510～約50,000、約0.510～約25,000、約0.510～約10,000、約100～約5,000、約100～約2,000、約500～約2,000、約1,000～約2,000、約100～約1,000、約200～約800IU/kg/日など、約0.510IU/kg/日～約100,000IU/kg/日の範囲であってよい。hCGの用量は、例えば、約0.5～約2,000,000、約0.5～約1,000,000、約0.5～約500,000、約0.5～約250,000、約0.5～約100,000、約0.5～約50,000、約10～約25,000、約10～約10,000、約240～約216,000、約1,200～約2,000、約2,160、または約1,600IU/kg/日など、約0.5IU/kg/日～約3,000,000IU/kg/日の範囲であってよい。hCGは、10,000IU/日の用量で投与することもできる。LHの用量は、例えば、約0.5～約300,000、約0.5～約200,000、約0.5～約100,000、約0.5～約50,000、約0.5～約25,000、約24～約21,600、約1000、約120～約200、約216、または約160IU/kg/日など、約0.5IU/kg/日～約500,000IU/kg/日の範囲であってよい。LHは、10,000IU/日の用量で投与することもできる。EPOの用量は、例えば、約100～約1500、約100～約1000、約160～約1000、約570～約950、約765、または約1020IU/kg/日など、約100IU/kg/日～約2000IU/kg/日の範囲であってよい。EPOは、30,000IU/日の用量で投与することもできる。等効力用量の他の薬剤をも用いることができる。本明細書における用量は、全治療期間中に毎日または断続的に送達する平均用量を指す。例えば、神経幹細胞増殖剤または分化剤を毎日送達しない場合は、治療期間に送達する薬剤の総量を、間隔日数を含む治療期間の総日数で割ることにより、1日あたりの用量が得られる。

【0035】

神経幹細胞増殖剤または分化剤用に、特定の用量単位（すなわち、治療期間の一連の投与内における投与量または単回投与）を定め、本明細書で開示する方法と併用することができる。これらの用量単位は、本明細書で定める特定の用量および用量範囲内でありうる。用量単位は、対象において神経幹細胞増殖または分化剤の所望のレベルを達成するために投与しなければならない量との関係で定めることができる。例えば、血清中の神経幹細胞増殖または分化剤レベルとして0.03IU/L～5,000,000IU/Lを与える神経幹細胞増殖剤の用量単位。または、さらなる例として、脳脊髄液中の増殖剤レベルとして約0.003IU/L～約5,000IU/Lを与える神経幹細胞増殖または分化剤の用量単位。

【0036】

神経幹細胞増殖剤または分化剤を全身投与する場合、場合によっては、血液脳関門透過促進剤をそのキットに含める、またはその方法で用いることにより、脳内への侵入を容易にすることができる。血液脳関門透過促進剤は、当技術分野では知られており、例えば、米国特許第5,686,416号、同第5,506,206号、および同第5,268,164号に記載のブラジキニンおよびブラジキニンアゴニスト（NH₂-アルギニン-プロリン-ヒドロキシプロキシプロリン-グリシン-チエニルアラニン-セリン-プロリン-4-Me-チロシンΨ（-CH₂NH）-アルギニン-COOHなど）を含む。

【0037】

あるいは、送達すべき神経幹細胞増殖剤または分化剤は、米国特許第6,329,508号、同第6,015,555号、同第5,833,988号、または同第5,527,527号に記載のトランスフェリン受容体抗体に結合させることができる。神経幹細胞増

殖剤および分化剤は、神経幹細胞増殖剤または分化剤と、トランスフェリン受容体（例えば、米国特許第5,977,307号を参照のこと）など脳毛細血管内皮細胞受容体と反応性のリガンドと、を含む融合タンパク質としても送達することができる。

【0038】

薬剤組成物は、所望の治療用薬剤と、目的の投与経路に好適な、場合によっては、適切な薬剤送達機器における使用に好適な賦形剤と、を混合することによって調製することができる。本発明の薬剤組成物を作製するに際し、治療用薬剤は通常、賦形剤と混合し、賦形剤により希釈し、またはカプセル、サシェ、紙、もしくは他の容器の形態でありうる担体内に封入する。薬学的に許容できる賦形剤が希釈剤の役割を果たす場合、その賦形剤は、固体、半固体、または液体の材料でありえ、治療用薬剤の賦形剤、担体、または媒体として作用する。こうして、その組成物は、例えば、重量で最大10%の治療用薬剤、硬軟のゼラチンカプセル、坐薬、滅菌注射溶液、および滅菌包装済み粉末を含む、錠剤、丸薬、粉末、トローチ剤、サシェ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、乳化剤、溶液、シロップ剤、エアゾール剤（固体として、または液体媒体中）、軟膏の形態でありうる。

【0039】

好適な賦形剤の一部の例は、人工脳脊髄液、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギニン酸、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微小質セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、滅菌水、シロップ、およびメチルセルロースを含む。その製剤は、さらに、以下を含む。タルク、ステアリン酸マグネシウム、およびミネラル油などの潤滑剤；保湿剤；乳化剤および懸濁剤；メチルヒドロキシベンゾエートおよびプロピルヒドロキシベンゾエートなどの防腐剤；甘味剤；ならびに芳香剤。本発明の組成物は、当技術分野において知られた手順を用いての患者への投与後、治療用薬剤の即時放出、持続放出、または遅延放出をもたらすように製剤することができる。

【0040】

錠剤などの固体組成物を調製する場合、その治療用薬剤を薬剤賦形剤と混合して、本発明の化合物の均一な混合物を含む、固体のプレフォーミュレーション組成物を形成する。これらのプレフォーミュレーション組成物が均一であるとは、その治療用薬剤が、その組成物中に均等に分散するため、その組成物を、錠剤、丸薬、およびカプセルなど、等しく有効な単位剤形に容易に分割してよいことを意味する。本発明の錠剤または丸薬は、コーティングし、または別の方法で合成することにより、持続性作用の利点をもたらす剤形を提供してよい。例えば、錠剤または丸薬は、内側および外側の用量成分を含み、後者は前者を覆う外皮の形態でありうる。2つの成分は、胃における分解に抗し、内側の成分を無変化のまま十二指腸へ通過させる、または放出を遅延させるために役立つ腸溶性層により分離することができる。こうした腸溶性層または腸溶性コーティングには各種の材料を用いることができ、こうした材料は、多数のポリマー酸、ならびにポリマー酸と、セラック、セチルアルコール、および酢酸セルロースなどの材料と、の多数の混合物を含む。

【0041】

経口または注射による投与のために、本発明の新規の組成物を組み込んでよい液体の剤形は、水溶液、好適な香料を添加したシロップ、水性または油性の懸濁液、およびエリキシル剤および同様の薬剤用賦形剤のほか、コーン油、綿実油、ゴマ油、ココナッツ油、またはピーナッツ油などの食用油をとまなう、香料入り乳化剤を含む。

【0042】

吸入または注気用の組成物は、薬学的に許容できる水性または有機性溶媒中の溶液および懸濁液、あるいはこれらの混合物、ならびに粉末を含む。液体または固体の組成物は、本明細書に記載の、好適で薬学的に許容できる賦形剤を含んでよい。その組成物は、口腔または鼻腔の気管経路により投与し、局所性または全身性の効果を得る。好適で薬学的に許容できる溶媒中の組成物は、不活性ガスを用いて噴霧してよい。噴霧化した溶液は、噴霧器から直接に吸入してもよく、または噴霧器を顔面マスク付きテント、もしくは断続的陽圧呼吸器に取り付けてもよい。

【0043】

溶液、懸濁液、または粉末の組成物を、製剤を適切なやり方で送達する薬剤送達機器から、好ましくは、経口または経鼻で投与してよい。本発明のその方法において用いる別の製剤は、経皮送達機器（「パッチ」）を用いる。こうした経皮パッチを用いて、制御された量における本発明の治療用薬剤を、連続注入または不連続注入してよい。薬剤送達用の経皮パッチの構成および使用は、当技術分野においてよく知られている。例えば、参照により本明細書に組み込む、米国特許第5,023,252号を参照のこと。薬剤の連続的送達、パルス送達、または必要に応じた送達のために、こうしたパッチを構成する場合がある。本発明において用いるための他の好適な製剤は、「Remington's Science and Practice of Pharmacy」、第21版、University of the Sciences in Philadelphia編、Lippincott, Williams & Wilkins社、ペンシルベニア州フィラデルフィア、2005年、中に見出すことができる。

10

【0044】

本明細書に記載の方法およびキットを用いて投与を受ける哺乳類は、仔体、幼若体、または成体のいずれの年齢でもありうる。

【0045】

本出願で用いる用語は、とくに示さない限り、以下の通りに定義する。

【0046】

神経幹細胞とは、神経細胞系列内の幹細胞である。幹細胞とは、自己再生が可能な細胞である。言い換えれば、幹細胞分裂から生じる娘細胞は、幹細胞を含む。神経幹細胞は、最終的には、ニューロン、星状膠細胞、および希突起膠細胞を含む、神経細胞系列内のすべての細胞種別に分化することができる。星状膠細胞および希突起膠細胞は、グリアまたはグリア細胞と総称される。こうして、本明細書で言及する神経幹細胞は、多能性神経幹細胞である。

20

【0047】

神経幹細胞増殖剤とは、例えば、増殖の刺激、分化の抑制、および／または神経幹細胞死の阻害により、神経幹細胞数を増加させることのできる物質である。

【0048】

神経変性疾患または病態とは、ニューロンの喪失または機能不全をともなう疾患または病態である。神経変性疾患または病態の例は、神経変性疾患、中枢神経系の損傷または機能不全を含む。神経変性疾患は、例えば、アルツハイマー病または他の認知症、多発性硬化症（MS）、統合失調症、黄斑変性症、緑内障、糖尿病性網膜症、末梢神経障害、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、およびパーキンソン病を含む。CNS損傷は、例えば、脳卒中などの脳血管事象（例えば、出血性脳卒中、限局性虚血性脳卒中、または広範性虚血性脳卒中）、眼虚血症、および硬膜静脈洞血栓症；外傷性脳損傷または外傷性脊髄損傷（例えば、脳または脊髄の手術または物理的事故により生じる損傷）；脳震盪；薬剤により生じる損傷（例えば、化学療法剤、レクリエーションドラッグ、および神経遮断薬）；冠動脈バイパスグラフト（CABG）術；および出産時の虚血を含む。CNS機能不全は、例えば、うつ病、てんかん、神経症、および精神病を含む。神経変性病態の例は、老化を含む。脳室下帯における神経幹細胞数は、老化マウスにおいて著明に減少する。したがって、老化に関連する問題の改善は、その方法およびキットに従う神経幹細胞増殖剤の投与、場合によっては、神経幹細胞分化剤の投与によって達せられる。

30

40

【0049】

治療および改善とは、疾患または病態の1つまたは複数の症状（神経症状または行動能力を含む）の抑制または完全な除去を意味する。こうした治療または改善は、疾患または病態の危険性にある患者への投与時における、1つまたは複数の症状の出現の遅延または除去を含む。治療または改善の成功を調べる試験は、当技術分野においてよく知られている。

【0050】

50

天然因子と実質的な配列類似性を共有するポリペプチドは、アミノ酸レベルで、天然因子と少なくとも約30%相同である。そのポリペプチドは、アミノ酸レベルで、天然因子と少なくとも約40%相同であることが好ましく、少なくとも約60%相同であることがより好ましく、少なくとも約70%相同であることがさらにより好ましく、少なくとも約80%相同であることがもっとも好ましい。こうして、実質的な類似性は、約30～約99%の同一性を構成しうる。

【0051】

類似体または変異体と天然因子とのパーセント相同性または%相同性という語句は、2つの配列を整列したとき、類似体または変異体中에서도見出される天然因子中のアミノ酸配列の百分率を指す。パーセント同一性は、L A L I G NまたはB L A S Tなど、当技術分野で確立された任意の方法またはアルゴリズムにより決定することができる。

10

【0052】

ポリペプチドは、天然因子の受容体に結合可能、または天然因子に対して作製したポリクローナル抗体により認識可能である場合、天然因子の生物活性を有する。そのポリペプチドは、受容体結合アッセイにおいて、天然因子の受容体に特異的に結合できることが好ましい。

【0053】

天然因子の機能的アゴニストは、天然因子との実質的な配列類似性を必ずしも共有しないが、天然因子の受容体に結合し、これを活性化す化合物である。

【0054】

黄体形成ホルモンまたはLHは、天然哺乳類（例えば、ヒト）LHまたは天然哺乳類LHと同等なペプチド配列を含むタンパク質である。本明細書で用いるLH類似体、同変異体、または同断片は、（1）天然哺乳類LH、好ましくは、天然のヒトLHと実質的な配列類似性を共有するポリペプチドを含み（2）天然哺乳類LHの生物活性を有する。天然哺乳類LHは、下垂体前葉が分泌するゴナドトロピンである。LHは、非共有的に結合するアルファおよびベータサブユニットからなるヘテロダイマーである。アルファサブユニットは、LH、FSHおよびhCGの間で共通であり、ベータサブユニットは、各ホルモンに特殊である。本方法およびキットにおいて有用なLHは、天然哺乳類LHと実質的な配列類似性を共有するベータサブユニットとともに、天然のアルファサブユニットを有してよい。あるいは、LHは、天然哺乳類LHと実質的な配列類似性を共有するアルファサブユニットとともに、天然のベータサブユニットを有してよい。LH類似体、同変異体、または同断片は、対応する天然のサブユニットと実質的な配列類似性を共有する、アルファおよびベータのいずれのサブユニットを有してもよい。こうして、LH類似体または変異体という用語は、天然LHサブユニットの欠失的、挿入的、または置換的突然変異体を含む。さらに、LHという用語は、他の種からのLHおよびその天然の変異体を包含する。加えて、LH類似体は、天然哺乳類LH受容体の機能的アゴニストであってもよい。

20

30

【0055】

ヒト絨毛性ゴナドトロピンまたはhCGは、天然哺乳類（例えば、ヒト）hCGまた天然哺乳類hCGと同等なポリペプチド配列を含むタンパク質である。本明細書で用いるhCG類似体、同変異体、または同断片は、（1）天然hCGと実質的な配列類似性を共有するポリペプチドを含み（2）天然哺乳類hCGの生物活性を有する。天然hCGは、非共有的に結合するアルファおよびベータサブユニットからなるヘテロダイマーである。アルファサブユニットは、LH、FSHおよびhCGの間で共通であり、ベータサブユニットは、各ホルモンに特殊である。ただし、hCGおよびLHのベータサブユニットは、85%の配列類似性を共有する。本方法およびキットにおいて有用なhCGは、天然hCGと実質的な配列類似性を共有するベータサブユニットとともに、天然のアルファサブユニットを有してよい。あるいは、hCGは、天然hCGと実質的な配列類似性を共有するアルファサブユニットとともに、天然のベータサブユニットを有してよい。hCG類似体、同変異体、または同断片は、対応する天然のサブユニットと実質的な配列類似性を共有するアルファおよびベータのいずれのサブユニットを有してもよい。こうして、hCG類似

40

50

体、同変異体または同断片という用語は、天然 h C G サブユニットの欠失的、挿入的、または置換的突然変異体を含む。さらに、h C G という用語は、他の種からの h C G 対応物およびその天然の変異体を包含する。加えて、h C G 類似体は、天然哺乳類 h C G / L H 受容体の機能的アゴニストであってもよい。

【0056】

プロラクチンは、天然哺乳類（例えば、ヒト）プロラクチンまたは天然哺乳類プロラクチンと同等なポリペプチド配列を含むポリペプチドである。本明細書で用いるプロラクチン類似体、同変異体、または同断片は、（１）天然哺乳類プロラクチン、好ましくは、天然ヒトプロラクチンと実質的な配列類似性を共有し、（２）天然哺乳類プロラクチンの生物活性を有する。天然哺乳類プロラクチンは、おもに下垂体で合成される 199 アミノ酸のポリペプチドである。こうして、プロラクチンという用語は、天然プロラクチンの欠失的、挿入的、または置換的突然変異体である、プロラクチン類似体、同変異体、または同断片を包含する。さらに、プロラクチンという用語は、他の種からのプロラクチンおよびその天然の変異体を包含する。

【0057】

加えて、プロラクチン類似体、同変異体、または同断片は、天然哺乳類プロラクチン受容体の機能的アゴニストであってもよい。例えば、その機能的アゴニストは、プロラクチン受容体に関する米国特許第 6, 333, 031 号に開示の活性化アミノ酸配列；プロラクチン受容体に対するアゴニスト活性を有する、金属錯体を含む受容体リガンド（米国特許第 6, 413, 952 号）；ヒト成長ホルモンの類似体であるが、プロラクチンアゴニストとして作用する G120RhGH（Modera、1996 年）；米国特許第 5, 506, 107 号および同第 5, 837, 460 号に記載のプロラクチン受容体のリガンドであってもよい。

【0058】

上皮細胞成長因子または EGF は、天然哺乳類 EGF または天然哺乳類 EGF と同等なポリペプチド配列を含むタンパク質である。本明細書で用いる EGF 類似体、同変異体、または同断片は、天然 EGF との実質的なアミノ酸配列類似性のほか、EGF 受容体への結合など、天然 EGF と少なくとも 1 つの生物活性を共有する。任意の種の天然 EGF、TGF α 、または組換え修飾 EGF を、とくに EGF として含める。特殊例は、2 つの C 末端側アミノ酸の欠失、および位置 51 における中性アミノ酸置換を有する組換え修飾 EGF（とくに、EGF51 gln51；米国特許出願公開第 20020098178 A1 号）、位置 16 における His 残基が、中性または酸性のアミノ酸で置換された、EGF 突然変異タンパク質（EGF-X₁₆）（米国特許第 6, 191, 106 号）、天然 EGF のアミノ末端側残基を欠く EGF の 52 アミノ酸欠失突然変異体（EGF-D）、N 末端側残基のほか 2 つの C 末端側残基（Arg-Leu）が欠失する EGF 欠失突然変異体（EGF-B）、位置 21 における Met 残基が酸化される EGF-D（EGF-C）、位置 21 における Met 残基が酸化される EGF-B（EGF-A）、ヘパリン結合 EGF 様成長因子（HB-EGF）、ベータセルリン、アンフィレグリン、ニューレグリン、または上記のいずれかを含む融合タンパク質を含むが、以上に限定されない。他の有用な EGF 類似体、同変異体、または同断片は、米国特許出願公開第 20020098178 A1 号、ならびに米国特許第 6, 191, 106 号および同第 5, 547, 935 号に記載されている。

【0059】

加えて、EGF 類似体、同変異体、または同断片は、天然哺乳類 EGF 受容体の機能的アゴニストであってもよい。例えば、その機能的アゴニストは、EGF 受容体に関する米国特許第 6, 333, 031 号に開示の活性化アミノ酸配列、または EGF 受容体に対するアゴニスト活性を有する抗体（Fernandez-Pol、1985 年および米国特許第 5, 723, 115 号）であってもよい。

【0060】

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドまたは PACAP は、天然哺乳類（例

10

20

30

40

50

えば、ヒト) P A C A P、または天然哺乳類 P A C A P と同等なポリペプチド配列、を含むポリペプチドである。本明細書で用いる P A C A P 類似体、同変異体、または同断片は、天然 P A C A P との実質的なアミノ酸配列類似性のほか、P A C A P 受容体への結合など、天然 P A C A P と少なくとも 1 つの生物活性を共有する天然 P A C A P または任意の P A C A P 類似体、同変異体もしくは同断片である。有用な P A C A P 類似体、同変異体、または同断片は、P A C A P の 38 アミノ酸変異体および 27 アミノ酸変異体（それぞれ、P A C A P 38 および P A C A P 27）、ならびに、例えば、米国特許第 5, 128, 242 号、同第 5, 198, 542 号、同第 5, 208, 320 号、同第 5, 326, 860 号、同第 5, 623, 050 号、同第 5, 801, 147 号、および同第 6, 242, 563 号に開示の類似体および変異体を含むが、以上に限定されない。

10

【0061】

加えて、P A C A P 類似体、同変異体、または同断片は、天然哺乳類 P A C A P 受容体の機能的アゴニストであってもよい。例えば、その機能的アゴニストは、P A C A P 1 型受容体の特殊アゴニストとして作用するポリペプチドである、マキサジラン (M o r o r a、1997 年) であってもよい。

【0062】

エリスロポエチンまたは E P O は、天然哺乳類（例えば、ヒト）E P O または天然哺乳類 E P O と同等なポリペプチド配列を含むタンパク質である。本明細書で用いる E P O 類似体、同変異体、または同断片は、天然 E P O との実質的なアミノ酸配列類似性のほか、E P O 受容体への結合など、天然 E P O と少なくとも 1 つの生物活性を共有する。E P O 類似体、同変異体、または同断片の例は、例えば、米国特許第 6, 048, 971 号および同第 5, 614, 184 号に開示されている。

20

【0063】

加えて、E P O 類似体、同変異体、または同断片は、天然哺乳類 E P O 受容体の機能的アゴニストであってもよい。例えば、その機能的アゴニストは、E P O 模倣ペプチド 1 (E M P 1 ; J o h n s o n ら、2000 年) ; W r i g h t o n ら、1996 年および米国特許第 5, 773, 569 号に記載される E P O の短ペプチド模倣体の 1 つ ; K a u s h a n s k y、2001 年に開示される任意の小分子 E P O 模倣体 ; 米国特許第 5, 885, 574 号および国際公開第 96 / 40231 号、同第 97 / 48729 号、F e r n a n d e z - P o l、1985 年または米国特許第 5, 723, 115 号に記載の、E P O 受容体を活性化する抗体 ; E P O 受容体に関する米国特許第 6, 333, 031 号に開示の活性化アミノ酸配列 ; E P O 受容体に対するアゴニスト活性を有する、金属錯体を含む受容体リガンド (米国特許第 6, 413, 952 号)、または米国特許第 5, 506, 107 号および同第 5, 837, 460 号に記載の E P O 受容体のリガンドであってもよい。

30

【0064】

L H / h C G 誘発剤は、動物に投与すると、動物における L H または h C G 量を増加させることができる物質である。例えば、L H 放出ホルモン (L H R H) は、L H の分泌を刺激する。

【0065】

哺乳類フェロモンは、天然哺乳類（例えば、ヒト）フェロモンまたは天然哺乳類フェロモンと同等なポリペプチド配列もしくは類似の小分子を含むタンパク質または小分子でありうる。本明細書で用いるフェロモン類似体、同変異体、または同断片は、同一種の別の動物、通常は異性の動物に対するシグナルとして役立つ物質である。フェロモンは、2 - s e c - ブチル - 4, 5 - ジヒドロチアゾール (S B T)、2, 3 - デヒドロ - e x o - ブレビコミン (D H B)、アルファおよびベータファルネセン、6 - ヒドロキシ - 6 - メチル - 3 - ヘプタノン、2 - ヘプタノン、t r a n s - 5 - ヘプテン - 2 - オン、t r a n s - 4 - ヘプテン - 2 - オン、n - ペンチルアセテート、c i s - 2 - ペンテン - 1 - イルアセテート、2, 5 - ジメチルピラジン、ドデシルプロピオネート、および (Z) - 7 - ドデセン - 1 - イルアセテート (例えば、D u l a c ら、2003 年を参照のこと

40

50

）からなる群から選択することが好ましい。

【0066】

有効量とは、意図する目的を達成するのに十分な治療用薬剤の量である。例えば、神経幹細胞数を増加させるためのLHまたはhCGの有効量は、適用例に応じ*in vivo*または*in vitro*において、神経幹細胞数を増加させるために十分な量である。神経変性疾患または病態を治療または改善するためのLHまたはhCGの有効量は、神経変性疾患または病態の1つまたは複数の症状を抑制または除去するために十分なLH/hCG量である。所与の治療用薬剤の有効量は、その薬剤の性質、投与経路、治療用薬剤を投与される動物のサイズおよび種、ならびに投与目的などの因子により変化する。各個の適用例における有効量は、当技術分野において確立した方法により、当業者が経験的に決定してよい。

10

【0067】

神経幹細胞増殖剤の等効力量とは、別の神経幹細胞増殖剤と同一または同等の効果をを得るために必要な神経幹細胞増殖剤の量である。等効力量は、等効力量の相対的レベルまたは結果により指定することができる。こうして、等効力量または等効力用量は、血清または脳脊髄液中において、別の特殊な神経幹細胞増殖剤と同一のレベルを得るために必要な神経幹細胞増殖剤の量または用量でありうる。

【0068】

薬剤送達機器とは、有効量の神経幹細胞増殖剤または分化剤の投与に好適なものである。薬剤送達機器は、例えば、非経口、静脈内、動脈内、結腸内、気管内、腹腔内、鼻腔内、血管内、髄腔内、頭蓋内、骨髓内、胸膜内、皮内、経皮、皮下、筋肉内、腹腔内、経口、直腸内、腔内、外用投与、肺内投与、またはその任意の組合せを含む、当技術分野で確立された任意の方法により、神経幹細胞増殖剤または分化剤を投与することができる。全身送達は、例えば、非経口、静脈内、動脈内、結腸内、気管内、腹腔内、鼻腔内、血管内、髄腔内、頭蓋内、骨髓内、胸膜内、皮内、経皮、皮下、筋肉内、腹腔内、経口、直腸内、腔内、外用投与、肺内投与、またはその任意の組合せを含む技術により実現することができる。薬剤送達機器は、例えば、植え込み式機器またはポンプ（例えば、浸透圧ポンプ）、持続性薬剤（徐放）による製剤の送達、または（注射針を有するまたは有さない）注射ペンでありうる。場合によって、薬剤送達機器は、注入器またはその構成成分、あるいは、注入以外の手段のための機器である。

20

30

【0069】

以下の実施例は、本発明のある種の実施形態をさらに例示することを意図するものであり、請求項の適用範囲を制限することを意図するものではない。

【実施例】

【0070】

以下の実施例において、以下の略記は以下の意味を有する。定義のない略記は、一般的に許容されている意味を有する。

°C = 摂氏度

h r = 時間

min = 分

μM = マイクロモル濃度

mM = ミリモル濃度

M = モル濃度

ml = ミリリットル

μl = マイクロリットル

mg = ミリグラム

μg = マイクログラム

FBS = ウシ胎仔血清

PBS = リン酸緩衝生理食塩水

DMEM = ダルベッコ改変イーグル培地

40

50

MEM = 改変イーグル培地
 EGF = 上皮細胞成長因子
 NSC = 神経幹細胞
 SVZ = 脳室下帯
 PACAP = 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド
 BMP = 骨形成タンパク質
 RSA = ラット血清アルブミン

(実施例 1)

rhCG + EPO を用いる脳卒中後の機能改善

右中大脳動脈 (MCA) の一時的閉塞により雄ラットに損傷を与えた後、組換えヒト絨毛性ゴナドトロピン (rhCG) を用量を漸増させて投与し、次いで、3 日間、エリスロポエチン (EPO、EpoGen 1440 IU/日) を投与した。 10

【0071】

雄のロングエバン斯拉ット (280 ~ 330 g) を、一晩絶食させたが、水は自由に与えた。硫酸アトロピン (0.5 mg/kg、腹腔内) を、麻酔の 10 分前に注射した。70 % 亜酸化窒素と 30 % 酸素との混合気体中の 3.5 % のイソフルランにより、麻酔を誘発した。ラット全例に経口挿管し、人工呼吸した。人工呼吸中、臭化パンクロニウム (0.6 mg/kg、腹腔内) により、ラットを麻痺させた。

【0072】

Zea Longa ら (Stroke、第 20 号、84 頁、1989 年) が述べ、(Belayev ら、Stroke、第 27 号、1616 頁、1996 年) が改変した通りに、90 分間にわたり MCA を一時的に閉塞させた。結紮後、頸部切開を閉じ、ラットを麻酔から覚醒させた。MCA の 60 分後に、標準化された神経行動バッテリー上でラットを調べ、神経学的欠損の存在を確認した (Belayev ら、1996 年)。左上肢の不全麻痺を示さなかったラット (総神経学的スコアが 9 未満; 下記および図 1 の行動学的試験を参照のこと) を、さらなる試験から除外した。MCA の 90 分後に、ラットに再麻酔し、体温プローブを再挿入し、管腔内の結紮を注意深く除去した。 20

【0073】

MCA 前および閉塞中 (60 分後) のラット全例において、行動学的試験を実施し、MCA の成功を確認した。そのバッテリーは、神経学的機能の各態様を評価するために以前に用いた以下の 2 つの試験からなった。(1) 尾で吊下げられる間の上半身の姿勢を検査するために Bederson ら (Stroke、第 17 号、472 頁、1986 年) が開発した、姿勢反射試験; および (2) 視覚的、触覚的、および固有覚的刺激に対して応答する前肢における感覚運動的統合を検査するために De Ryck ら (Stroke、第 20 号、1383 頁、1989 年) が開発した、前肢置き直し試験。神経学的機能は、0 ~ 12 のスケール (正常時のスコア = 0、最大スコア = 12) で評価した。 30

【0074】

投与および実験群は、以下の通りであった。

【0075】

第 1 群: n = 8; 手術後第 1、第 3、第 5 日に生理食塩溶液 (筋肉内投与する hCG と等量) を筋肉内投与した後で、第 7、第 8、第 9 日から、ALZET (登録商標) ポンプ (カリフォルニア州、クパチーノ; Alzet 浸透圧ポンプ) により、生理食塩水を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の 24 時間後に投与した。 40

【0076】

第 2 群: n = 8; MCA 閉塞後第 1、第 3、第 5 日に生理食塩溶液 (筋肉内投与する hCG と等量) を筋肉内投与した後で、第 7、第 8、第 9 日から、ALZET (登録商標) ポンプにより、EPO (1440 IU/日) を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の 24 時間後に投与した。

【0077】

第 3 群: n = 8; MCA 閉塞後第 1、第 3、第 5 日に hCG (33 IU/日) を筋肉内 50

送達した後で、第7、第8、第9日から、ALZET（登録商標）ポンプにより、EPO（1440 IU／日）を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の24時間後に投与した。

【0078】

第4群：n = 8；MCA閉塞後第1、第3、第5日にhCG（100 IU／日）を筋肉内送達した後で、第7、第8、第9日から、ALZET（登録商標）ポンプにより、EPO（1440 IU／日）を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の24時間後に投与した。

【0079】

第5群：n = 8；MCA閉塞後第1、第3、第5日にhCG（300 IU／日）を筋肉内送達した後で、第7、第8、第9日から、ALZET（登録商標）ポンプにより、EPO（1440 IU／日）を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の24時間後に投与した。

10

【0080】

第6群：n = 8；MCA閉塞後第1、第3、第5日にhCG（1000 IU／日）を筋肉内送達した後で、第7、第8、第9日から、ALZET（登録商標）ポンプにより、EPO（1440 IU／日）を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の24時間後に投与した。

【0081】

第7群：n = 8；MCA閉塞後第1、第3、第5日にhCG（3000 IU／日）を筋肉内送達した後で、第7、第8、第9日から、ALZET（登録商標）ポンプにより、EPO（1440 IU／日）を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の24時間後に投与した。

20

【0082】

第8群：n = 8；MCA閉塞後第1、第3、第5日にhCG（10,000 IU／日）を筋肉内送達した後で、第7、第8、第9日から、ALZET（登録商標）ポンプにより、EPO（1440 IU／日）を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の24時間後に投与した。

【0083】

第9群：n = 8；MCA閉塞後第1、第3、第5日にhCG（30,000 IU／日）を筋肉内送達した後で、第7、第8、第9日から、ALZET（登録商標）ポンプにより、EPO（1440 IU／日）を静脈内投与した。初回注射は、脳卒中手術の24時間後に投与した。

30

【0084】

図1に見られるように、hCGの後にEPOを投与されるこれらのラットの機能改善は、EPO単剤を投与されるラットの場合よりも良好であった。

【0085】

ヒトにおける投与への変換は、相対成長係数8に従い、ラットに投与するmg/kgを、ヒトにおける投与のためのmg/m²に変換する。この変換のために確立されたガイドライン（「Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers」、U. S. Department of Health and Human Services、FDA Center for Drug Evaluation and Research、2005年7月）に従い、ラットについて観察された300 IU／日の最適用量を、以下に変換する。

40

$$HD = [AD \times AK_m] / HK_m$$

ここで、

HD＝ヒトにおける用量

AD＝ラットにおける用量

50

$A K_m$ = ラットにおける k_m 係数

$H K_m$ = ヒトにおける k_m 係数

したがって、体重 305 g の平均的なラットに対する 300 IU/日 (1 日あたり 30 μ g の hCG に相当、すなわち、本試験では、1 μ g hCG = 10 IU hCG) は、ラットにおける 98.4 μ g/kg の用量に相当する。したがって、ラットにおける k_m 係数を 8、ヒトにおける k_m 係数を 37 とすると、ヒトにおける投与のための hCG の最適用量は、以下のように計算される。

$$H D = 98.4 \mu g / k g \times 8 / 37 = 21.28 \mu g / k g \text{ または } 212.8 \text{ IU} / k g / \text{日}$$

ヒトにおける EPO 用量は、体重 305 g の平均的なラットに対する EPO 用量を 1440 IU/日とする本実施例における活量により、ラットにおける 4,721.3 IU/kg の用量に相当する。したがって、ラットにおける k_m 係数を 8、ヒトにおける k_m 係数を 37 とすると、ヒトにおける投与のための EPO の最適用量は、以下のように計算される。

$$H D = 4,721.3 \text{ IU} / k g \times 8 / 37 = 1020.82 \text{ IU} / k g$$

(実施例 2)

hCG + EPO を用いる脳卒中後の機能改善

実施例 1 に述べた通り、右中大脳動脈 (MCA) の一時的閉塞により雄ラットの別の群に損傷を与えた後、ヒト由来のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を投与し、次いで、実施例 1 に述べた通り、3 日間、エリスロポエチン (EPO、EpoGen 1440 IU/日) を投与した。

【0086】

雄のロングエバンスラット (280 ~ 330 g) を一晩絶食させたが、水は自由に与えた。硫酸アトロピン (0.5 mg/kg、腹腔内) を、麻酔の 10 分前に注射した。70% 亜酸化窒素と 30% 酸素との混合気体中の 3.5% のイソフルランにより、麻酔を誘発した。ラット全例に経口挿管し、人工呼吸した。人工呼吸中、臭化パンクロニウム (0.6 mg/kg、腹腔内) により、ラットを麻痺させた。

【0087】

実施例 1 に述べた通り、MCA 前および閉塞中 (60 分後) のラット全例において、行動学的試験を実施し、MCA の成功を確認した。

【0088】

投与および実験群は、以下の通りであった。

【0089】

第 1 群: $n = 10$; 手術後第 1、第 3、第 5 日に生理食塩溶液 (筋肉内投与する hCG と等量) を筋肉内投与した後で、第 7、第 8、第 9 日から、ALZET (登録商標) ポンプにより、生理食塩水を静脈内投与した。

【0090】

第 2 群: $n = 10$; MCA 閉塞後第 1、第 3、第 5 日に hCG (440 IU/日) を筋肉内送達した後で、第 7、第 8、第 9 日から、ALZET (登録商標) ポンプにより、EPO (1440 IU/日) を静脈内投与した。

【0091】

第 3 群: $n = 10$; MCA 閉塞後第 1、第 3、第 5 日に hCG (440 IU/日) を筋肉内送達した後で、第 7、第 8、第 9 日から、ALZET (登録商標) ポンプにより、生理食塩水を等量で静脈内投与した。

【0092】

第 4 群: $n = 10$; MCA 閉塞後第 1、第 3、第 5 日に生理食塩水を筋肉内送達した後で、第 7、第 8、第 9 日から、ALZET (登録商標) ポンプにより、EPO (1440 IU/日) を静脈内投与した。

【0093】

第 5 群: $n = 5$ 、MCA なし、投与なし; 第 1、第 1、第 2、第 3、第 4、および

10

20

30

40

50

第6週に、4つの行動学的タスクによりラットを訓練し調べた。

【0094】

図2は、0～12のスケールで評価した、脳卒中後の同時点における試験群間の神経学的機能の差を示す。見られる通り、本明細書に述べるやり方でhCGの投与後にEPOを投与すると、著明な機能的改善が認められる。さらに、図3は、これらの試験群の百分率による組織喪失（非脳卒中の脳半球と比較）を表すグラフを示し、図4は、各群の組織喪失の代表的な画像を示す。

【0095】

加えて、血清hCGレベルは、第3回のhCG腹腔内投与後に測定した。図5に示す通り、循環hCGレベルは、投与を受けたラットにおいて著明に高値であった。

10

【0096】

（実施例3）

ヒトにおける急性脳卒中の治療におけるhCG+EPOの使用

ヒト脳卒中患者各例に、試験参加の第1、第3、および第5日における毎日1回ずつ3回の筋肉内hCG投与（10, 000 IU/回）の後、1日の休薬期間（第6日）を置いて、試験参加の第7、第8、および第9日における毎日1回ずつ3回の静脈内エリスロポエチン投与（30, 000 IU/回）を行う試験を始めた。初回の筋肉内hCG投与は、中等度～高度の脳卒中事象の24～48時間後に送達することを目標とする。患者は、脳卒中の発症後6週間および3カ月など、治療期間の複数の時点において検査を受ける。ベースライン時の評価は、臨床／安全性状態、神経学的状態、血液学的状態、および血管状態のほか、脳MRIを含む。臨床／安全性状態、神経学的状態、血液学的状態、および血管状態の評価は、治療終了の1日後、15日後、および80日後に繰り返す。脳MRIは、比較のために、治療終了の80日後（脳卒中発症の約90日後）に繰り返す。

20

【0097】

（実施例4）

プロラクチンの投与

雄ラット（250～300g）を、2つのプロラクチン投与実験に用いた。プロラクチンは、ミニ浸透圧ポンプによる皮下注入（ALZET（登録商標）ミニポンプ）—毎日1回注射—により投与した。原料のプロラクチンは、重炭酸緩衝液中で希釈し、さらに、生理食塩水中1mg/mlのラット血清アルブミン（RSA）で希釈して注射した。ラットは、虚血性損傷を受けなかった。第6日に、ラットに10時間で6回のBrdU（Sigma-Aldrich社製）注射（60mg/kg、腹腔内）を行い、最終回BrdU注射の30分後にラットを屠殺した。脳の凍結切片を作製し、1匹あたり8切片を用いて、SVZにおけるBrdU+細胞を測定した。結果は、SVZにおけるBrdU+細胞総数、または図の説明に記した通り、切片あたりの平均として示した。

30

実験#1

ラットには6日間投与し、RSA（対照）またはラットプロラクチン（カリフォルニア州、トーランス、National Hormone and Peptide Program）の皮下注入を、以下の用量で行った（各群にラット3例ずつ）。

* 10×=99ul/ポンプ（2mg/0.25ml PRL）—113μg/日

40

** 15×=148.5ul/ポンプ（2mg/0.25ml PRL）—170μg/日

*** 20×=198ul/ポンプ（2mg/0.25ml PRL）—226μg/日

ここで、

* 10×=脳室内注入のために投与した用量（約11μg/日）の10倍

** 15×=脳室内注入のために投与した用量の15倍

*** 20×=脳室内注入のために投与した用量の20倍

結果

図6に示す通り、170μg/日が、前脳SVZ内の増殖（BrdU+細胞数）で最大の増加をもたらした。

50

実験 # 2

ラットには3または6日間投与し、RSAまたはラットプロラクチン（カリフォルニア州、トーランス、National Hormone and Peptide Program）の毎日の単回腹腔内注射を、以下の用量で行った（各群にラット3例ずつ）。

3日間にわたり170 μ g/日

3日間にわたり396 μ g/日

6日間にわたり170 μ g/日

結果

図7に示す通り、6日間にわたり送達した170 μ g/日が、前脳SVZ内の増殖（BrdU+細胞数）で最大の増加をもたらした。

10

【0098】

（実施例5）

hCGの投与

本試験の目的は、運動皮質に軟膜剥離による血管遮断性の虚血性損傷を与えた、成体雄ラットの脳前帯における細胞増殖および組織再生を最大化するhCG用量を決定することである。

方法

動物と手術

すでに記された（GonzalezおよびKolb、「A comparison of different models of stroke on behavior and brain morphology」、Eur J Neurosci、2003年、第18巻、第7号、1950～1962頁）通りに、250～300gの雄ラットの運動皮質に、軟膜剥離による血管遮断性の虚血性損傷を与えた。ラットをペントバルビタールナトリウム麻酔下に置き（60mg/kg）、ブレグマから前/後方向に+4～-2mmおよび正中線から横方向に1.5～4.5mmの直角の穴を、ドリルで前頭骨および頭頂骨に開けた。硬膜を除去し、無菌の生理食塩水に漬けた綿棒を用いて、皮質表面から軟膜および付随の血管を除去した。

20

投与

脳卒中の1日後（24時間後）から、ラットにhCG（カリフォルニア州、トーランス、National Peptide and Hormone Program）の単回筋肉内（i.m.）注射を行った。投与は表1に記した通りに行い、5日間に3回の注射（第1、第3、および第5日に投与）または1週間毎日の注射のいずれかにより送達し、注射は各日午前9時に行った。対照ラットには、食塩水中のラット血清アルブミン（RSA；Sigma社製、1mg/ml）の注射を行った。最終投与日において、hCG注射の30分後から、10時間に6回のBrdU注射をラットに行った。BrdU（Sigma-Aldrich社製）は、60mg/kgの用量で腹腔内投与した。4%パラホルムアルデヒドにより、心臓経由でラットを灌流した。脳を解剖し、スクロースで凍結保護し、凍結切片を作製した。スライドあたり8切片とする8スライドずつの2シリーズにより、14ミクロン厚で脳の凍結切片を作製した。ウサギ抗ホスホヒストンH3（抗pHH3、1:100、Upstate Biotechnologies社製）、ラット抗BrdU（1:100、Seralab社製）、ヤギ抗ダブルコルチン（DCX、1:100、Santa Cruz Biotechnologies社製）を用いて、免疫染色を行った。各ラットの側脳室周囲の前脳室下帯（SVZ）における、ホスホヒストンH3（pHH3：分裂活性細胞のマーカー）、BrdU、およびダブルコルチン（DCX：未成熟ニューロンのマーカー）に陽性の細胞数を、8切片において測定し、側脳室あたりの平均陽性細胞数として提示した。

30

40

統計学的分析

値は、平均±平均の標準誤差（SEM）である。有意性は、一元配置ANOVAを用いた後、テューキーHSDポストホック検定により判定した（* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ ）。各群にラット3例とした。

50

結果

本試験では、hCGの筋肉内注射が、脳卒中後における成体の前脳脳室下帯（SVZ）に存在する神経幹細胞および前駆体細胞の増殖を促進する能力を検討した。ラットには、軟膜剥離による血管遮断術を行い、運動皮質に限局性の虚血性損傷を誘発し、24時間後に投与を開始した。高用量ボラス投与法では、表1にまとめた通り、5日間にわたり第1（脳卒中の24時間後）、第3、および第5日に3回のhCG投与を行った。前脳SVZにおける増殖レベルを分析するため、第5日にラットを屠殺した。表2および図8に示す通り、本投与計画は、RSA対照注射を投与した脳卒中ラットと比べ、増殖の増大に有効であった。図9に示す通り、1000 μ g投与時に、増殖はほぼ2.5倍増大し、これらのラットのSVZ中で新たに産生されたダブルコルチン陽性（DCX+）ニューロン数も、同様に著明に増大した。

【0099】

別の試験では、表1にまとめた通り、脳卒中の24時間後から7日間、ラットにhCGを毎日投与し、第7日に10時間以内にわたりBrdUを投与し、次いでラットを屠殺した。図10Aに示す通り、pHH3免疫反応性が示すSVZ中の分裂細胞数は、330 μ g/回群において、他のすべての群と比べ著明に増大した。この増大は、これらのラットのSVZにおけるBrdU+細胞数を、RSA対照と比べて測定することにより確認した（図11）。100 μ g投与群においては、軟膜を剥離したRSA対照と比べ、レベル増大の傾向が見られた（図10Aおよび11）。図10の非投与ラットには注射を行わず、軟膜剥離による脳卒中も誘発しなかったことに注意のこと。内部対照として、1群に330 μ g/回群と同じ総用量を投与した（表1を参照のこと）が、第1、第3、および第5日に770 μ g/回のhCGを3回投与し、第5日にラットを屠殺した。本試験によれば、330 μ g/回で毎日行う低用量の定期的なhCG投与が、脳における虚血性損傷後の前脳SVZにおける増殖の増大にはもっとも有効であった。

【0100】

どの投与計画が、新たな皮質組織の成長をもたらしうるかを判定するため、発明者らは、hCG治療動物の皮質における病変部位を分析した。組織の再成長は、330 μ g/注射を投与する群のラットのための、低用量で定期的な毎日の投与計画において、とくに著明であった（図10B）。

【0101】

本明細書で言及する任意の特許または刊行物は、本発明が関連する当業者の水準を示す。個々の刊行物をそれぞれ参照により組み込むため具体的かつ個々に示す場合と同程度に、これらの特許および刊行物を、その全体において参照により本明細書に組み込む。

【0102】

本発明は、そのいくつかの態様の例示であることを意図する実施例において開示される実施形態により範囲を制限されず、機能的に等価であるいずれの実施形態も、本発明の範囲内にある。方法およびキットの、本明細書で示し記載したものに加えての各種の変更は、当業者には明らかとなり、添付した特許請求の範囲内にあるものとする。さらに、上述の実施形態では、本明細書に開示する組成物のある種の代表的な組合せのみを具体的に述べたが、その組成物の他の組合せも、当業者には明らかとなり、添付した特許請求の範囲内にあるものとする。したがって、本明細書では、ステップまたは組成物の組合せについて明示的に言及する場合がある。ただし、明示的に述べない場合であっても、ステップまたは組成物の他の組合せを含む。

表1 hCG投与法を示す表である。脳卒中後24時間から5日間に3回、または7日間毎日、ラットにhCGの筋肉内（I. M.）注射を行った。対照ラットには、RSA注射のみを行った。

【0103】

【表 1】

総用量	用量／回	用量／回
(IU単位によるhCG)	(IU単位によるhCG)	(マイクログラム(μg)単位によるhCG)
 図8および9		
第1日、第3日、および第5日に投与		
RSA (脳卒中なし)		
RSA		
330	110	11
990	330	33
9900	3300	330
30000	10000	1000
 図10および11		
7日間毎日の投与		
非投与(脳卒中なしおよび注射なし)		
RSA		
7000	1000	100
23100	3300	330
46200	6600	660
70000	10000	1000
 第1日、第3日、および第5日に投与		
23100	7700	770

10

20

30

表2 軟膜剥離による血管遮断性の脳卒中後24時間にhCGを投与したラットにおけるpHH3+、BrdU+、およびDCX+細胞を対照と比べて測定するために、側脳室あたりの平均陽性細胞数として提示する、実測値±SEM。

【0104】

【表 2】

投与条件(μg/回)	pHH3+細胞	BrdU+細胞
脳室あたりの陽性細胞数		
1週間毎日の投与		
非投与 脳卒中なし	8.7±2	---
RSA	9.3±0.3	374±15
10	19.3±5	459±138
330	27±3**	874±91*
660	12.3±2	---
1000	17±2	---
770(第1日、第3日、および第5日に投与)	16±1	---
		DCX+細胞
第1日、第3日、および第5日に注射を行う5日間の投与		
RSA	8.7±1	280±15
11	8±2	---
33	8±0.1	---
330	13±1	---
1000	19±1*	533±42*

10

20

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】中大脳動脈閉塞(MCAo)による脳卒中に罹患したラットの機能回復に対し、hCG用量を増加させるhCGの筋肉内(IM)投与後に、1日あたり1440IUのEPOを静脈内(IV)投与した場合の効果を示す図である。

【図2】MCAo脳卒中に罹患したラットの機能回復に対する、1日あたり440IUのhCGと1440IU EPOの静脈内投与との併用、hCG単剤、またはEPO単剤の効果の差異を、非投与対照と比べて示す図である。

【図3】MCAo脳卒中に罹患したラットにおける百分率による組織喪失(非脳卒中の脳半球と比較)を、1日あたり440IUのhCGと1440IU EPOの静脈内投与との併用、hCG単剤、またはEPO単剤の各場合について、非投与対照の場合と比べて示すグラフである。

30

【図4】MCAo脳卒中に罹患したラットにおける組織喪失の代表的な画像を、1日あたり440IUのhCGと1440IU EPOの静脈内投与との併用、hCG単剤、またはEPO単剤の各場合について、非投与対照の場合と比べて示す図である。

【図5】実施例2において、hCGの第3回筋肉内投与後に測定した、血清hCGレベルを示す棒グラフである。

【図6】脳室内注入に用いた濃度の10、15、および20倍の濃度で、雄ラットにプロラクチンを6日間皮下注入した時の結果を示す図である。ラット各例からの8切片について、脳室下帯(SVZ)におけるプロモデオキシウリジン陽性(BrdU+)細胞総数を提示する。SVZ増殖レベルは、15倍投与(6日間にわたり170μg/日)時に最大の増加が観察された(10倍=113μg/日、20倍=226μg/日、対照=ラット血清アルブミン(RSA)のみ)。対照と比べた有意性: 10×=* p<0.05、15×=** p<0.01、20×=p<0.05、いずれの条件についてもn=3、チューキーポストホック検定による一元配置分散分析(ANOVA)。

40

【図7】毎日の単回腹腔内注射を用いて、雄ラットにプロラクチンを投与した結果を示す図である。各投与計画について、切片あたりのBrdU+細胞総数を示す。(A)3日間の高用量投与では、SVZ増殖のわずかな増加が観察された。(B)6日間にわたり毎日170μg/日の低用量を用いる投与条件が、SVZ増殖レベルの増加にもっとも頑健であった。有意性は、RSA対照と比べた。n=3、* p<0.05、** p<0.01、

50

チューキーポストホック検定による一元配置ANOVA。

【図8】脳卒中後第1、第3、第5日（脳卒中＝第0日）におけるhCGの単回筋肉内注射が、前脳SVZにおける増殖を著明に増大させることを示す図である。1000 μ gの投与条件（ $n=3$ 、* $p<0.05$ 、チューキーポストホックによる一元配置ANOVA）において、脳室あたりのホスホヒストンH3陽性（pHH3+）細胞数の著明な増加が観察された。画像は、軟膜を剥離したRSA対照ラット側脳室の背側角における核標識ヘキストおよびpHH3発現を、1000 μ g hCG投与ラットと比べて示す図であり、1000 μ g投与ラットのSVZにおける総細胞数およびpHH3発現の増大を意味する。

【図9】脳卒中後第1、第3、第5日（脳卒中＝第0日）におけるhCGの1日あたり1000 μ g単回筋肉内注射が、前脳SVZにおけるニューロン発生を増大させることを示す図である。投与ラットにおけるダブルコルチン+のニューロン数を測定したところ、1000 μ g投与ラット（ $n=3$ 、** $p<0.01$ ）において倍増した。

【図10A】脳卒中後24時間から7日間（脳卒中＝第0日）にわたり毎日、hCGの単回筋肉内注射を投与した結果を示す図である。（A）毎日330 μ g／回の投与計画が、SVZにおける増殖数（pHH3+細胞）を、他のすべての投与条件および対照と比べて有意に増加させた（ $n=3$ 、* $p<0.01$ 、** $p<0.01$ 、チューキーポストホックによる一元配置ANOVA）。（B）投与ラットの運動皮質における虚血性病変を観察したところ、毎日330 μ g／回の投与計画を受けるラットが、新たな組織成長および組織プラグによる病変部位の充填を示すことが明らかとなった。

【図10B】脳卒中後24時間から7日間（脳卒中＝第0日）にわたり毎日、hCGの単回筋肉内注射を投与した結果を示す図である。（A）毎日330 μ g／回の投与計画が、SVZにおける増殖数（pHH3+細胞）を、他のすべての投与条件および対照と比べて有意に増加させた（ $n=3$ 、* $p<0.01$ 、** $p<0.01$ 、チューキーポストホックによる一元配置ANOVA）。（B）投与ラットの運動皮質における虚血性病変を観察したところ、毎日330 μ g／回の投与計画を受けるラットが、新たな組織成長および組織プラグによる病変部位の充填を示すことが明らかとなった。

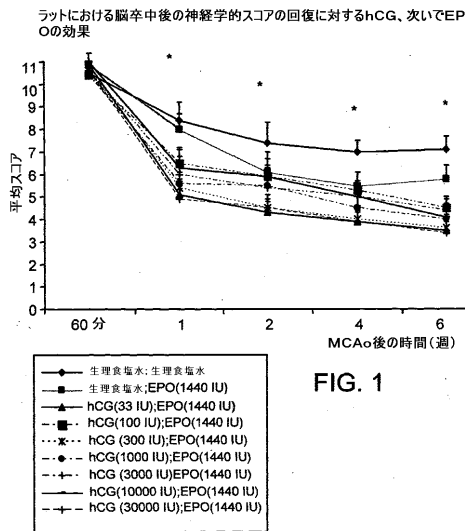
【図11】BrdU+細胞カウントで確認した通り、毎日330 μ g／回のhCGを投与したラットのSVZにおける増殖の増大を示す図である。脳室あたりのBrdU+細胞数は、330 μ g／回の条件において、対照および100 μ g／回の場合と比べ有意に増大した（ $p<0.01$ 、 $n=3$ 、チューキーポストホック検定による一元配置ANOVA）。以上の結果は、pHH3染色により観察される増殖の増大をさらに裏付けた。

10

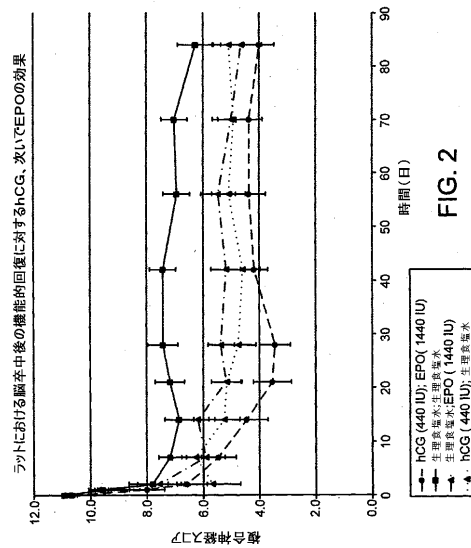
20

30

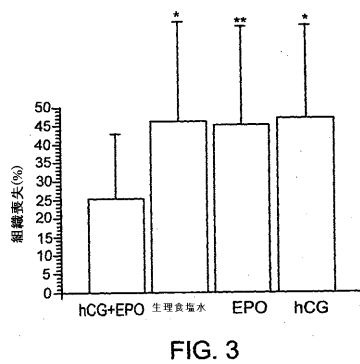
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

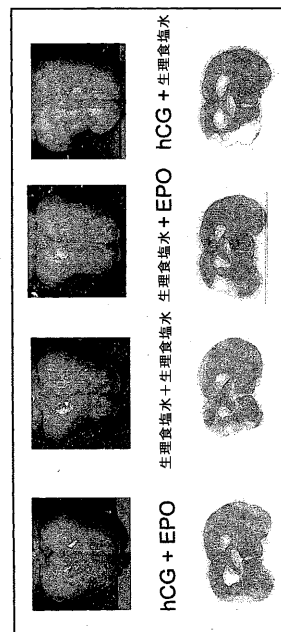


FIG. 4

【図 5】

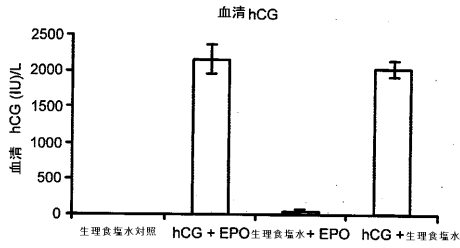


FIG. 5

【図 6】

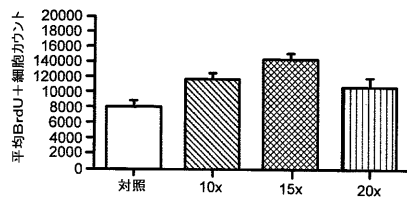


FIG. 6

【図 7】

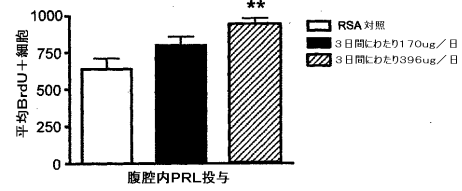


FIG. 7A

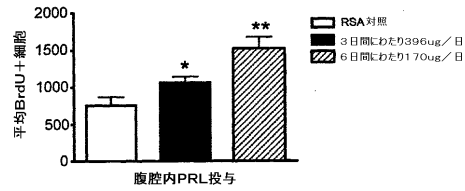


FIG. 7B

【図 8】

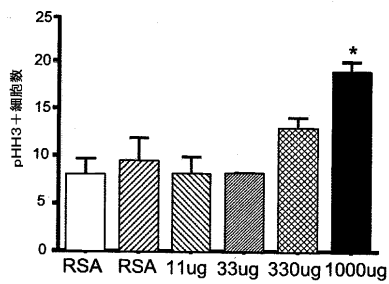
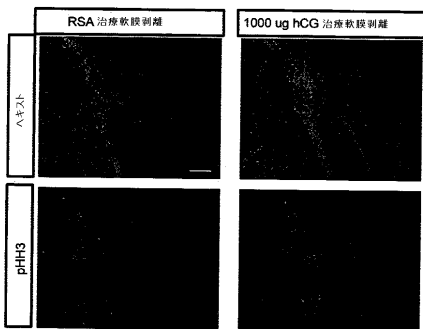


FIG. 8

【図 9】

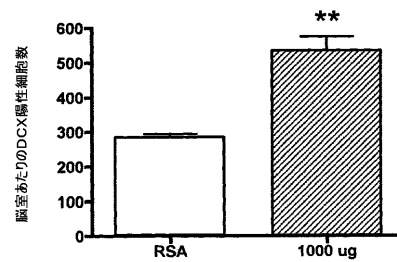


FIG. 9

【図 10 A】

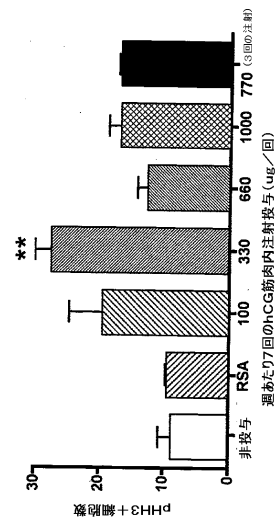


FIG. 10A

【図 10 B】

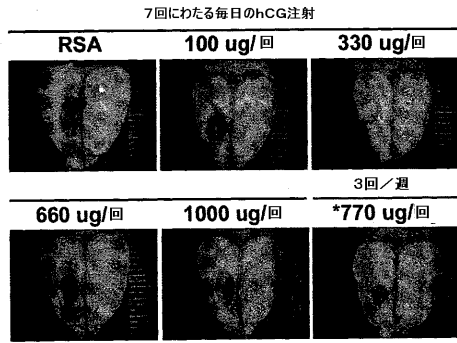


FIG. 10B

【図 11】

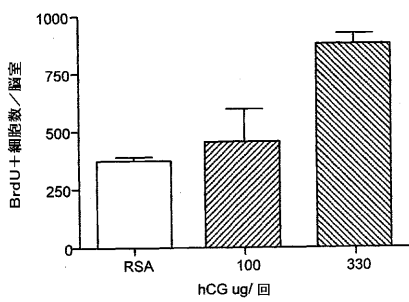


FIG. 11

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2007/000426		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>A61K 38/24</i> (2006.01) , <i>A61K 38/18</i> (2006.01) , <i>A61P 25/28</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>A61K 38/24</i> (2006.01) , <i>A61K 38/18</i> (2006.01) , <i>A61P 25/28</i> (2006.01)				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields				
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms Canadian Patent Database, Delphion, C.Aplus, Pubmed; Keywords neural stem cell, proliferating agent, LH, hCG, EPO, gonadotropin, neurodegeneration, neurogenesis, neurotrophic, dose, in vivo				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant	Relevant to claim No.		
X	CA2556266 A1 (STEM CELL THERAPEUTICS CORP., CA) 25 August 2005 whole document especially examples 4-6, pages 42-45	1-52		
P,A	TANAKA, R "Activation of Endogenous Adult Neural Stem Cells to Promote Functional Recovery Following Stroke" JUNTENDO IGAKU, 2008, vol. 52, no. 1, pages 2-10 abstract	1-52		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box ☒ See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td> * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
10 May 2007 (10-05-2007)		17 July 2007 (17-07-2007)		
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Nicole Harris 819- 997-4541		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2007/000426

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. ☒ Claim Nos. : 1-37
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Although claims 1-37 encompass methods of treatment of a human or animal which this Authority is not obliged to search under Rule 39.1(iv) of the PCT, the search has been carried out based on the alleged effects of the compounds referred to therein.
2. ☐ Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. ☐ Claim Nos. :
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/CA2007/000426

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
CA 2556266 A1	25-08-2005	AU 2005211847A1 EP 1740202A1 US 2005245436A1 US 2006105958A1 WO 2005077404A1	25-08-2005 10-01-2007 03-11-2005 18-05-2006 25-08-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ウェイス, サミュエル
カナダ国 ティー２エヌ １エー４ アルバータ, カルガリー, ７ティーエイチ アベニュー
エヌダブリュー ２６３８

(72)発明者 グレッグ, クリストファー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８, ケンブリッジ, アルパイン ストリート
９６

(72)発明者 デイビッドオフ, アレン
カナダ国 ティー３エイチ ４ダブリュー７ アルバータ, カルガリー, クーガーストーン
サークル エヌダブリュー １１３

(72)発明者 タッカー, ジョセフ
カナダ国 ティー３ジー ４ゼット２ アルバータ, カルガリー, シテダル メドレー
エヌダブリュー ４３９

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA44 CA62 DB25 DB49 DB56 MA66 NA14 ZA012 ZA022
ZA152 ZA162 ZA182 ZC752