

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-192397

(P2017-192397A)

(43) 公開日 平成29年10月26日(2017.10.26)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 9/10 (2006.01)	C 12 N 9/10	Z N A 4 B 0 5 0
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 C 0 7 6
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00	4 C 0 8 4
A 61 K 38/45 (2006.01)	A 61 K 38/45	4 H 0 4 5
A 61 K 47/66 (2017.01)	A 61 K 47/66	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-141679 (P2017-141679)	(71) 出願人	512306151 バイオアクソン バイオサイエンシーズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 138 ケンブリッジ スピネリ プレ イス コンコード アベニュー 763イ ー
(22) 出願日	平成29年7月21日 (2017.7.21)	(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
(62) 分割の表示	特願2016-76887 (P2016-76887) の分割	(74) 代理人	100131392 弁理士 丹羽 武司
原出願日	平成19年12月12日 (2007.12.12)	(72) 発明者	マケラッチャー, リサ カナダ ケベック H2X 2N1 モン トリオール ルー セイント-アーバイン 2115 ナンバー302 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	11/643, 940		
(32) 優先日	平成18年12月22日 (2006.12.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	11/808, 773		
(32) 優先日	平成19年6月12日 (2007.6.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 ADPリボシルトランスフェラーゼ融合バリアントタンパク質

## (57) 【要約】

【課題】腫瘍細胞の中に進入し、低投与量でRhoを迅速に不活性化する能力を有する、C3様タンパク質組成物を提供することを課題とする。

【解決手段】活性薬剤領域に共有結合した少なくとも1つの輸送薬剤領域を含むポリペプチドであって、前記輸送薬剤領域はプロリンリッチ領域であり、前記輸送薬剤領域は前記ポリペプチドのカルボキシ末端に存在し、前記活性薬剤領域は前記ポリペプチドのアミノ末端に存在し、前記活性薬剤領域は、ADPリボシルトランスフェラーゼC3及びADPリボシルトランスフェラーゼ活性を保持したその断片からなる群より選択され、前記プロリンリッチ領域は配列番号48のアミノ酸配列で示される、ポリペプチドを提供する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

活性薬剤領域に共有結合した少なくとも 1 つの輸送薬剤領域を含むポリペプチドであって、前記輸送薬剤領域はプロリンリッチ領域であり、前記輸送薬剤領域は前記ポリペプチドのカルボキシ末端に存在し、前記活性薬剤領域は前記ポリペプチドのアミノ末端に存在し、前記活性薬剤領域は、ADPリボシリルトランスフェラーゼC3 及びADPリボシリルトランスフェラーゼ活性を保持したその断片からなる群より選択され、前記プロリンリッチ領域は配列番号48のアミノ酸配列で示される、ポリペプチド。

**【請求項 2】**

配列番号43のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1に記載のポリペプチド。

10

**【請求項 3】**

配列番号6、配列番号14、配列番号18及び配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1に記載のポリペプチド。

**【請求項 4】**

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む、縫内障を治療するための医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

20

本発明は、新規のC3様Rh<sub>0</sub>キメラアンタゴニスト、及び、網膜を含む損傷したほ乳類の中枢神経系におけるニューロンの修復及びニューロンの生存の促進やガン細胞の増殖の抑制のためのその使用方法に関する。

**【0002】****【関連出願の相互参照】**

本出願は米国特許出願第11/643,940号(2006年12月22日提出)の一部継続出願であり、前記の米国特許出願第11/643,940号は米国特許出願第10/902,878号(2004年8月2日提出)及び米国特許出願第10/902,959号(2004年8月2日提出)の一部継続出願であり、更に米国仮特許出願60/506,162号(2003年9月29日提出)の優先権を主張する。前記の米国特許出願第10/902,878号及び米国特許出願第10/902,959号の両出願は、カナダ特許出願第2,342,970号(2001年4月12日提出)、カナダ特許出願第2,362,004号(2001年11月13日提出)、カナダ特許出願第2,367,636号(2002年1月15日提出)、の優先権を主張する。この全ての記載内容は参照により本明細書中で完全に援用される。

30

**【背景技術】****【0003】**

40

脊髄の外傷性損傷は恒久的な機能障害となる。脊髄の損傷に付随する欠損の殆どは、中枢神経系(CNS)の損傷である軸索の損失に起因する。同様に、脳梗塞、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、認知症、プリオントン病、パーキンソン病、アルツハイマー症、多発性硬化症、外傷性脳損傷、黄斑変性症、及び縫内障といった他のCNSの疾病は、軸索の損失や退縮に付随する。多くの眼病を含むこれらCNS疾病に共通することは、軸索の標的との接合が失われ、細胞が死滅することである。病気に冒された、或いは病的なニューロン集団からの軸索の成長を刺激する能力は、失われた神経機能の修復や、細胞死からの防御を促すであろうし、損傷の拡大を制限できる。例えば、白質に於ける梗塞に続いて軸索は損傷し、失われ、神経細胞は生存していたとしても、灰白質の梗塞により多くのニューロンや非ニューロン細胞(グリア細胞)が死ぬ。損傷した軸索からの軸索発芽誘発に効果を有する脅威は幾つかのタイプの梗塞に対しても同様に脅威となる(Chen et al, 2002, PNAS 99: 9031-9036)。しばしば、ニューロン保護薬剤が梗塞の後の損傷の制限する潜在的な化合物として試験された。成長促進及びニュ

50

ロン保護を示す化合物は特に梗塞や神経再生病の良い候補である。

【0004】

例えば神経病変などにより切断した軸索の再生を刺激する薬剤としての、種々のRhoアンタゴニストの使用が提案されている（カナダ特許出願2,304,981号（McKerracher et al.）及びカナダ特許出願2,300,878号（Strittmatter）参照）。これらの特許出願明細書は、軸索の再生に使用するための既存のトランス-4アミノ（アルキル）-1-ピリジルカラボモイルシクロヘキサン複合体又はRhoキナーゼインヒビターから選択される薬剤と同様、例えばキメラC3タンパク質と言った既存のRhoアンタゴニストの使用を提案する。C3はRhoをADP-リボシレーションにより不活化するが、それは細胞に対して非毒性である（Dillon and Feig, 1995, Methods in Enzymology: Small GTPases and their regulators Part. B, 256: 174-184）。

10

【0005】

Rhoアンタゴニストによる治療は末梢神経の軸索成長率の増幅にも用いられ、それにより、例えば、切断された肢を再接着することにも効果を有する。加えて、Rhoは悪性腫瘍や転移ガンの治療への標的（Clark et al., 2000, Nature, 406: 532-535）や高血圧の治療標的（Uehata et al., 1997, Nature, 389: 990）として重要であり、RhoAについては心臓保護作用が報告されている（Lee et al., FASEB J., 15: 1886-1884）。

20

【0006】

軸索再生の為の、Rho及びRhoキナーゼを含む、細胞内シグナル機能を標的とすることは提案されている（カナダ特許出願第2,304,981号）。クロストリジウムボツリヌムC3エクソトランスフェラーゼ（本明細書では単にC3として引用される）は損傷した軸索の再形成と出芽を刺激することが出来る；C3はクロストリジウムボツリヌムから精製された毒物である（Wilde et al., 2000, J. Biol. Chem., 275: 16478）。クロストリジウムボツリヌムからのC3ファミリー複合体はRhoをADP-リボシレーションの過程により不活化し、よってRho機能又は効果のアンタゴニストとして（Rhoアンタゴニスト）作用する。

30

【0007】

C3タンパク質は再生促進に効果を有するが、C3は容易に細胞内に浸透せず、効果を有するためには大量の投与量で投与しなければならないことが言及されている。機能上の回復を促進するのに必要な大量の投与量のC3組み換え体は、in vivoで再生促進をするためのC3の使用の実質的な制約または制限を提供する。組織培養の研究では、抑制薬剤下、成長を抑制するのに使われる最小量のC3は25μg/mlであることが実証されている（Lehmann et al. 1999, J. Neurosci. 19: 7537-7547）。もし細胞が粉碎されていなければ、この投与量ですら有効量ではない。マウス20gに対し少なくとも40μgのC3が損傷したマウスの脊髄又はラットの視神経の処方に必要であると推測される（カナダ特許出願第2,325,842号）。成人ヒトの扱いに必要と思われる処方量を重量に対する投与量が等しいとして計算すると（ラットやマウスの実験に使われた投与量から拡大すると）損傷したヒトの脊髄に適用するのには120mg/kgのC3が必要である。必要量の大量の組み換えC3タンパク質は、大規模なタンパク質精製と費用の点で、製造の上で重大な問題を引き起こす。それはまた最小有効量に必要な投与量であっても大量のタンパク質であり、検査することが出来る投与量の幅を制限する。

40

【0008】

損傷したCNSを促進するC3の使用に際する他の関連する制限は、それは容易に生体細胞の細胞膜を透過しないことである。

C3の生物学的効果が試験/分析されたいつかの組織培養研究に於いて、それは細胞に

50

直接マイクロインジェクションされるか (R id l e y a n d H a l l , 1 9 9 2 , C e l l , 7 0 : 3 8 9 - 3 9 9 ) 、または細胞膜を破壊するまで細胞を粉碎することにより適用された (L e h m a n n e t a l . , 1 9 9 9 , J . N e u r o s c i . , 1 9 : 7 5 3 7 - 7 5 4 7 ) 。なぜなら損傷した軸索はすぐにその環境から物質を取り上げ始めるため、I n v i v oでの軸索損傷の場合、C 3タンパクは容易に細胞に入りやすい。不完全な脊髄の障害 (S C I ) の後、運動系の可塑性は脊髄の電気回路を含む皮質及び皮質下のレベルによる。この可塑性は側副及びシナプスの強化又は弱化の軸索又は樹状発芽による。さらに、いくつかの腹側両面線維は、背骨の中枢パターン発生器を通した移動のパターンの開始とコントロールにとって重要であるので、いくつかの腹側両面線維の補償が移動性能における著しい違いに変換されるかもしれない事が示されている。これは、補償された脊髄皮質側枝の認識は脊髄損傷後に起き、機能的な修復に貢献することが良く確認されている。予備の線維の再組織化と出芽の過程は、C 3様タンパク質が非損傷ニューロンに入ることが出来るようにする処理により増幅されるであろう。これは軸索の自然発生的な可塑性と機能的な回復を助けるのが知られている樹枝状の改造を高めるであろう。

10

## 【0 0 0 9】

i n v i t r oにおけるC 3を輸送する他の方法は、受容体が仲介するメカニズに利用される組み換えタンパク質の作成を含む (B o q u e t e t a l . , 1 9 9 5 , M e t h . E n z y m o l . , 2 5 6 : 2 9 7 - 3 0 6 ) 。この方法の難点は、治療を要するセルが、必要な受容体を発現しなければならないということである。最後に、組織培地へのC 2 I I 結合タンパク質の添加により、C 2 1 N - C 3溶融毒素と共に、受容体を介した飲食作用によりC 3の利用が可能になる (B a r t h e e t a l . , 1 9 9 8 , I n f e c t i o n a n d I m m u n i t y , 6 6 : 1 3 6 4 ) 。このシステムの難点は、セルの中のC 3の多くが膜分画の中で抑えられるということである。より重要なのは、輸送が起きるためには、別々に2個の異なったタンパク質を加えなければならないことであり、それは、生体内の病気の治療にこのシステムを適用するのを難しくする。

20

## 【0 0 1 0】

現在、眼疾患を有する人々の病変退行を止めることが出来る治療法を見つける必要性が有る。網膜のニューロンはC N Sから派生し、例えば、加齢性黄斑病変 (A M D) のような、C N Sの他の領域で効果の有る治療に対応することが期待されている。今日、最も研究の進んでいる治療の形態はA M Dの湿性形態及び、標的特異的新血管形成に対処する。病気に冒された患者の1 0 ~ 1 5 %に起こる、網膜下新血管膜のレーザー光凝固は、中心窓外脈絡膜血管新生を激しく発現する、黄斑変性に伴う個人に利益をもたらす。

30

ドライA M Dに対する、酸化亜鉛 (8 0 m g ; 高濃度の亜鉛は目の組織、特に網膜、色素上皮および脈絡膜に存在する) と同様、ビタミンC (5 0 0 m g ) 、ビタミンE (4 0 0 I U ) 、ベータカロチン (1 5 m g ) などの抗酸化剤の一日あたりの大量の投与は、一つの目の中における、中間体サイズのドルーセン、大型ドルーセン、または、非中央地図状萎縮、または進行性黄斑変性症の進行の危険性を若干減少させる。現在、これらの眼病を、視神経を保護する化合物で処置する必要性が有る。また、現在、急性の眼性萎縮症をもつ人々の治療が必要である。眼性萎縮症または視神経の麻痺は不可逆的な視神経の細胞死の原因になり、永久的な視覚機能障害を引き起こす。この疾病は、A M Dのための現在の治療に反応しないものと見られている。C 3様タンパク質は、前記の細胞死や前記疾病の進行を減少させる可能性が有る。

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0 0 1 1】

したがって、新規のC 3様タンパク質が、R h o活性の抑制が必要な種々の病気に有用であると期待されていた。それ故に、化合物、治療の方法、及び剤形に対して、R h o活性の抑制が必要である病気を治療又は抑止するための必要性が存在する。また、腫瘍細胞の

50

中に進入し、低投与量で R h o を迅速に不活性化する能力を有する、 C 3 様タンパク質組成物が供給されることが望まれていた。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

[ 本発明の要約 ]

本発明は、新規のキメラ C 3 様 R h o アンタゴニスト、及び、網膜を含む損傷したほ乳類の中核神経系におけるニューロンの修復及びニューロンの生存の促進や、ガン細胞の増殖の抑制のためのその使用方法に関する。

一つの態様では新規の R h o キメラアンタゴニストはポリペプチドを含有する組成物と同様に供給される。他の態様では、これらのポリペプチドを用いる治療法及び本発明の組成物は本発明のポリペプチド及び生成物の使用と同様に供給される。

10

【 0 0 1 3 】

1 つの態様では、本発明のポリペプチドは、例えば C 3 様融合タンパク、及び C 3 キメラ融合タンパク質といった、連結した、又は融合したタイプのタンパク（ポリペプチド）である。本発明のポリペプチドの例としては配列番号 4 、配列番号 6 、配列番号 1 4 、配列番号 1 8 、配列番号 2 0 、配列番号 2 5 、配列番号 3 0 、配列番号 3 5 、配列番号 3 7 、及び配列番号 1 0 、およびそれらのアナログまたはバリエントが含まれる。他の様態では、本発明のポリペプチドは配列番号 4 、配列番号 6 、配列番号 1 4 、配列番号 1 8 、配列番号 2 0 、配列番号 2 5 、配列番号 3 0 、配列番号 3 5 、配列番号 3 7 および配列番号 1 0 を含み、これらのポリペプチドは N 末端が 2 0 アミノ酸短くなっているか、又はこれらのポリペプチドは C 末端で 1 0 アミノ酸短くなっているか、これらのポリペプチドは N 末端で 2 0 アミノ酸 C 末端が 1 0 アミノ酸短くなっている。他の態様では本発明のポリペプチドはここで開示されたポリペプチドの全てを含む。他の態様では本発明のポリペプチドは P E G 化されている。

20

【 0 0 1 4 】

他の態様では、本発明のポリペプチドは配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 6 、配列番号 8 、配列番号 1 0 、配列番号 1 3 、配列番号 1 4 、配列番号 1 5 、配列番号 1 6 、配列番号 1 7 、配列番号 1 8 、配列番号 1 9 、配列番号 2 0 、配列番号 2 1 、配列番号 2 2 、配列番号 4 3 、配列番号 4 4 、配列番号 7 8 及び配列番号 7 9 を含む。

30

【 0 0 1 5 】

さらなる態様では、本発明のポリペプチドは輸送剤としてのアミノ酸配列と共有結合しており、レセプター非依存性の機構又はレセプター依存性の機構による摂取を促進する。一つの態様では前記輸送剤は配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 4 5 、配列番号 4 6 、配列番号 4 7 、配列番号 4 8 、配列番号 4 9 、配列番号 5 0 、配列番号 5 1 、配列番号 5 2 、配列番号 5 3 、配列番号 5 4 、配列番号 5 5 、配列番号 5 6 、配列番号 5 7 、配列番号 5 8 、配列番号 5 9 、配列番号 6 0 、配列番号 6 1 、配列番号 6 2 、配列番号 6 3 、配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、配列番号 6 6 、配列番号 6 7 、配列番号 6 8 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、配列番号 7 1 、配列番号 7 2 、配列番号 7 3 、配列番号 7 4 、配列番号 7 5 、配列番号 7 6 及び / 又は配列番号 7 7 を含む。

40

さらなる態様では本発明のポリペプチドは、ポリペプチド性細胞膜輸送部分を含む細胞透過性融合タンパク質複合体であり、本発明の薬学組成物は、本発明のポリペプチド性細胞膜輸送部分及び実質的に精製されたポリペプチドを含む細胞透過性融合タンパク質複合体である。他の態様では、ポリペプチド性細胞膜輸送部分は 5 から約 5 0 アミノ酸が供給されたタンパク質を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明は又、本発明のポリペプチドを含む医薬組成物に関する。一つの態様では、前記医薬組成物は薬学的に許容される担体を含む。一つの態様では、前記医薬組成物は無菌状態、無菌可能、又は滅菌されている。さらなる様態では、前記医薬組成物は単位投与量毎のバイアル瓶であるか、又は単位投与量の整数倍である。更に他の態様では前記医薬組成物は乾燥、凍結乾燥されているか、脱水した基質を含有するか、又は凍結乾燥した基質中の

50

融合タンパク質を含有する。さらに、本発明の医薬組成物は組織接着物質、及び／又はフィブリンを含有しても良く、例えばティーセル（登録商標）のようなフィブリンシーリング剤でも良い。

#### 【0017】

本発明の組成物に用いられる、薬学的に許容される担体はポリ（エチレン-ビニル酢酸）共重合体、PVA、部分的に加水分解されたポリ（エチレン-ビニル酢酸共重合体）、ポリ（エチレン-酢酸ビニル-ビニルアルコール共重合体）、架橋ポリ（エチレン-酢酸ビニル）、部分的に加水分解された架橋ポリ（エチレン-酢酸ビニル共重合体）、架橋ポリ（エチレン-酢酸ビニル-ビニルアルコール共重合体）、ポリ-D、L-乳酸、ポリ-L-乳酸、ポリグリコール酸、PGA、乳酸とグリコール酸の共重合体（PLGA）、ポリカプロラクトン、ポリバレロラクトン、ポリ（無水物）、ポリカプロラクトンとポリエチレングリコールの共重合体、ポリ乳酸とポリエチレングリコールの共重合体、ポリエチレングリコール；およびこれらの組み合わせ及び混合物が例示されるが、これらに限定されない。

10

#### 【0018】

他の態様では、薬学的に許容される担体は水溶性ゼラチン、水溶性タンパク質、重合体からなる担体、交差結合した薬剤やそれらの組み合わせである。他の態様では、前記薬学的に許容される担体は基質である。

更に他の態様では、薬学的に許容される担体は、水、薬学的に許容される緩衝塩、薬学的に許容される緩衝液、薬学的に許容される抗酸化剤、アスコルビン酸、1種乃至複数の低分子量の薬学的に許容されるポリペプチド、約2から約10アミノ酸残基を含むペプチド、1種乃至複数の薬学的に許容されるタンパク質、1種乃至複数の薬学的に許容されるアミノ酸、ヒト必須アミノ酸、1種乃至複数の薬学的に許容される炭化水素、1種乃至複数の薬学的に許容される炭化水素派生物質、非還元糖、グルコース、スクロース、ソルビトール、トレハロース、マンニトール、マルトデキストリン、デキストリン、シクロデキストリン、薬学的に許容されるコーティング剤、EDTA、DTPA、二価金属イオン用のキレート剤、三価金属イオン用のキレート剤、グルタチオン、薬学的に許容される非特異的血清アルブミン、及び／又はそれらの組み合わせを含む。

20

#### 【0019】

本発明はまた、ポリペプチド又は本発明のポリペプチドや組成物を被療者に投与することを含む治療法に関する。一つの態様では、医療的に効果の有る量のポリペプチドや組成物が投与される。他の態様では前記被療者がそのような治療を必要とする。いくつかの態様では、前記被療者は哺乳類、特にヒトでも良い。一つの態様では、本発明のポリペプチドや組成物は注射による投与でも良い。

30

#### 【0020】

一つの態様では、本発明は哺乳類神経系修復の分野（例えば中枢神経系（CNS）損傷部位、損傷した網膜の修復や末梢神経系（PNS）損傷部位の修復）軸索再生および軸索芽、神経突起成長、神経防護作用の活動、神経変性および虚血性傷害、および／または衝撃的に損傷を受けた神経系の治療に関する。本発明の一態様では軸索纖維の損傷の場合、神経軸索の再生をすること、末梢神経及び中枢神経系の他の病気において神経突起成長を刺激することである。本発明の他の態様は末梢神経系でのニューロン再生を促進することである。

40

#### 【0021】

以下の治療方法は被療者の黄斑病変の処理方法を提供する：被療者の眼内部の黄斑病変を伴う、網膜下の新血管形成及び／又は新生血管組織の増殖の比率を抑制又は減少させる方法；被療者の眼内部の黄斑病変に伴う細胞死から網膜フォトレセプターを保護する方法；及び／又は被療者の転移性腫瘍性ガン細胞の制御を外れた増殖、拡散、又は転移の防止又は抑制。他の態様では、本発明は、切除端における、被療者のガンの腫瘍の切除部位に近接した宿主細胞又は、転移性の腫瘍性細胞の、制御できない増殖、拡散、移動を抑制又は制止する方法に関する。投与は被療者に残る切除部位の、切除部位の表面に直接行われる

50

か、切除部位の表面の下、又は切除部位の中に行われる。及び、投与は腫瘍の摘出又は除去に先行するか、除去に引き続くか、或いはそれらの両方で行われる。

#### 【0022】

更なる態様では、被療者の宿主組織中の悪性細胞からの腫瘍の成長を防止する方法が提供される。ポリペプチド、融合タンパク質、又は本発明の組成物は同時に、少なくとも2種の悪性細胞の移動、悪性細胞の増殖、血管新成又は管状構造形成又は悪性細胞に近接する毛細血管ネットワークの成長、及び悪性細胞からの活性メタロプロテイナーゼの分泌を抑えるか抑止する可能性がある。被療者の第一のガンの腫瘍や、ガンの残留する腫瘍細胞から成る第2の腫瘍の切除や除去をした部位に近位の宿主組織の切除端の中の成長の防止の方法もまた提供される。投与は、被療者に残存する、切除端の表面又は切除端の表面下に直接的に、または、切除端に近位の組織にされるものでもよく、そして、最初の腫瘍切除又は除去に対して時間を空けて前に或いは後にされてもよく、または前及び後の両方でもよく、前記融合タンパク質は、残存腫瘍細胞遊走、残存腫瘍細胞増殖、血管形成もしくは管状構造形成、又は残存腫瘍細胞近隣の毛細血管ネットワークの成長、及び腫瘍と残留腫瘍細胞からの活性メタロプロテイナーゼの分泌の少なくとも2つを同時に防ぐか或いは妨げる。一つの態様では、ガンは、乳がん、脳腫瘍、結腸ガン、皮膚ガン、腎臓ガン、肝臓ガンである。他の態様では、ガンは例えば、膠腫、ニューロン腫瘍、松果体腫瘍、髄膜腫瘍、神経鞘の腫瘍、リンパ腫、先天異常の腫瘍といった脳腫瘍や、肺ガン、乳がん、黒色腫、腎臓ガン、消化管の腫瘍などに由来する脳に位置する転移性の腫瘍である。更なる態様では、前記ガンは、未分化星状細胞腫、多形性膠芽腫、毛様細胞性星状細胞腫、乏突起膠腫、上衣腫、粘液乳頭型脳室上衣腫、上衣下腫、脈絡叢乳頭腫、神経芽細胞腫、神経節芽細胞腫、神経節細胞腫、および髄芽腫、松果体芽細胞腫及び松果体細胞腫、髄膜腫、髄膜血管周囲細胞腫、髄膜肉腫、シュワン腫（神経鞘腫）、神経纖維腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫の一次及び二次サブタイプ、非ホジキンリンパ腫の一次及び二次サブタイプ、頭蓋咽頭腫、類表皮囊胞、類皮囊胞、及び膠質囊胞からなる群から選ばれる脳腫瘍である。

10

20

30

40

50

#### 【0023】

一つの態様では、治療効果の有る量は、1ccあたり約0.001μgから約50μg、又は1立方センチメートルあたり約0.0001μgから約100μgの融合タンパク質、又は、1mlあたり約1μgの融合タンパク質、1mlあたり約10μgから約50μgの融合タンパク質である。投与は、注射のそば、一時的な適用の近く、または、移植のそばであってもよい。一つの態様では、投与は関節内、眼内、鼻腔内、神経内、皮膚内、骨内、舌下、口内、局所的、膀胱内、クモ膜下腔内、静脈内、腹膜内で、頭蓋内で、筋肉内で、皮下であり、噴霧化及び吸入により、腫瘍へ直接適用することにより、病変部位へ直接適用することにより、腫瘍切除後に残った縁の上又は中に直接適応することにより、腸より、胃カメラを用いた手法と共に腸より、及び/又はECRPによるものであってよい。

#### 【0024】

他の態様では、黄斑変性症を防ぐか処理する方法及び/又はガンを防ぐか処理する方法と同様に秘術者の脊髄損傷を処理する方法が提供される。

#### 【0025】

本発明は、脊髄損傷、黄斑変性症及び/又はガン（例えば乳がん、脳腫瘍、大腸ガン、皮膚ガン、腎臓ガン、肝臓ガン）の処理のための、ポリペプチド及び本発明の組成物使用法にも関する。一つの態様では、被療者の軸索や神経突起の再生又は成長が促進される。他の態様では、本発明は脊髄損傷、黄斑変性症、及び/又はガン（例えば乳がん、脳腫瘍、大腸ガン、皮膚ガン、腎臓ガン、肝臓ガン）の治療等のための薬剤の加工におけるポリペプチド及び本発明の組成物の使用に関する。

#### 【0026】

一つの態様では、被療者は神経疾病又は神経変性疾病を有するものであってよい。これらの例に限定されることなく、前記疾患は、スタルガルト病、リーバー先天性黒内症、ベ

スト病、先天性脈絡膜欠如、網膜分離症、バルデー・ビードル症候群、前方虚血性視覚神経障害、ブルチャエル網膜症、視神経炎、視神經円盤浮腫、コーツ病及び／又はレーバー粟粒性動脈瘤（免疫性で末梢性神経障害）、多発性硬化症、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、シャルコー・マリー・ティース病、巨大軸索神経障害、三叉神経痛、舌咽神経痛、ベル麻痺、重症筋無力症、筋ジストロフィー、進行性の筋萎縮症、進行性の延髄遺伝性筋萎縮症、ヘルニア性、破裂性あるいは脱出性の椎間板症候群、頸部脊椎症、叢疾患、胸部出口破壊症候群、アクリルアミド、ガンマ-ジケトン（シンナー中毒者の神経障害）、二硫化炭素、ダブソン、ダニ、ポルフィリン症、グレインバレー症候群、ハンチントン舞蹈病、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、認知症、プリオൺ病および緑内障を含む。他の態様では、被療者は、脳梗塞、手術、梗塞症、感染、毒物への暴露、悪性腫瘍または腫瘍隨伴性症候群から生じる神経系損害を有する。

10

## 【0027】

本発明のこれら及び他の態様は、関連する明細書及び添付した図面に基づき明らかになるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0028】

参照は現在、添付の図面によって行われ、それは図例の手段で1つの態様として示される。そしてそれらは以下の通りである：

【図1】本発明の配列番号43の融合タンパク質、及び配列番号43、配列番号6の不活性バリアントの活性の消失を、NG108細胞を用いたバイオアッセイにより表した図であり、ここでNG108細胞は配列番号43により培養され、神経突起伸長を加速した（バー42、およそ40%の神経細胞成長を示す）；及び、配列番号6で処理したNG-108細胞の神経突起伸長（カラム42、およそ40%の神経突起成長を示す）および、ここで、NG-108細胞の神経突起成長、はコントロール（カラム40、およそ神経突起成長の12%を示す）と同様である。

20

【図2】（A）WTC3エクソザイムのN末端配列、配列番号10及び配列番号43を示す図であり、ここで、イタリック体で示されたアミノ酸残基は、WTC3エクソザイムの内在性アミノ酸残基シグナルペプチドであり、太字は改変されたものである。（B）バリアントの略図である。（C）配列番号44の二量体化を示す勾配ゲルである。（D）配列番号10の強化された安定性を示す勾配ゲルである。（E）バリアント（配列番号44）の代表的な精製を示す勾配ゲルである。

30

【図3】配列番号10のバリアント（配列番号13-22）の短くなった配列を示す図であり、ここで、タンパク質配列のうち強調した部分は新規のトランケート配列 配列番号10バリアントを精製するために消去されたアミノ酸伸長部であり、ここにおいて灰色で強調されたアミノ酸は配列番号10のN末端又はC末端から削除され、下線部を引いたアミノ酸は膜輸送配列を示す。

【図4】分子量標準（レーン1）、精製したPEG-BA-220バリアント（レーン3）、PEG-BA-225バリアント（レーン4）、PEG-BA-230バリアント（レーン5）、PEG-BA-231バリアント（レーン6及び7）であるNuPAGEゲルの図であり、ここで図4Bは標準分子量（レーン1），精製したPEG-BA-230バリアント（レーン3）、PEG-BA-231バリアント（レーン4）、PEG-BA-235バリアント（レーン5）、PEG-BA-236バリアント（レーン6）及びPEG-BA-240バリアント（レーン8）であるNuPAGEゲルの図である。

40

【図5】緑内障網膜に於ける配列番号10の神経保護作用を示す図である。\*P<0.001 (ANOVA)。

【図6】成熟ラットH&E染色法を成熟ラットに用い、3日間光に曝し、1μgの配列番号10の存在下、5日後に測定した光受容体の生存率を図示したものである。

【図7】0.01μgの2回の注射後の光受容体の生存率が配列番号10により増加することを示した図である。

【図8】Rd1配列番号10の硝子体内への注入が、マウスの核膜外層を保護することを

50

示す図である。

【図 9】図 9 A は 100 ミクロン中の T U N E L ラベルされた光受容体の全量を表す図である。ここで図 9 B は R d 1 マウス網膜に於ける、配列番号 10 の減少が光受容体細胞の細胞死を示す。

【図 10】配列番号 10 の硝子体内への注入がネズミ網膜における生理的な血管形成を阻害することを示す図である。

【図 11】配列番号 10 の局所的な投与が病マウス角膜の血管形成を減少させることを示す図である。

【図 12】配列番号 10 の硝子体内への注入によりレーザーにより誘導されたマウスの網膜下の新血管形成が減少することを示す図である。

【図 13】A - C : C T 抗体で染色した視神経部位の写真であり、病変部位（矢印）へ遠心方向に再生する軸索を明らかになる。（A）非処理動物の 2 週間後の微細病変、（B）配列番号 4 4 処理動物、（C）配列番号 4 3 処理動物、（D - E）はコントロールと比較した、2 週間後の微細病変の再生定量化で（D）配列番号 4 4 処理動物、（E）配列番号 4 3 処理動物。スケールバー : A - C = 100  $\mu$ m, スチューデント t 検定による \*\* \* p < 0.001 ; \*\* p < 0.01 , \* p < 0.05 。

【図 14】（A）C T 抗体で染色した視神経部位の写真であり、配列番号 4 3 処理動物及び P B S コントロールにおける 2 週間後の病変部位（矢印）の遠心方向への軸索再生が明らかになる。配列番号 4 3 及び P B S は視神経損傷の 4 日後に硝子帯に注入した。スケールバー = 100  $\mu$ m (B) 配列番号 4 3 処理動物のコントロールと比較した場合の再生の定量評価；及び（C）即座の治療又は遅延し他治療後の各々の処理群の最長軸索の平均の比較。スチューデント t 検定において \*\* p < 0.01 ; \* p < 0.05 。

【図 15】視神経損傷の 1 週間前に後戻りしてラベルした R G C の図である。配列番号 4 3 又は賦形剤は視神経切断後に硝子体に注入し、軸索切断の 7 又は 14 日後に用意した網膜の全裁標本の後戻りしてラベルされた R G C の数を数えた。

【図 16】硝子体内注入の 24 時間後の、成熟ラット（E L I S A）網膜内での図 5 で述べられた低分子量 P E G - B A バリアントのレベルの図である。

【図 17】ラットにおける P E G - B A - バリアントの眼球内注入の 24 時間後の R h o A A D P - リボシレーションの図である。

【図 18】硝子体内注入の後の配列番号 10 対 B A - 2 3 1 (配列番号 10 の P E G 化したバリアント) におけるレチナール存在の経時変化の図である。

【図 19】眼球内注入の 24 時間及び 48 時間後における、成熟ラットの網膜内の、高分子量 P E G - B A バリアントのレベルの図である。

【図 20】B A バリアントの眼球内注入 24 及び 48 時間後の R h o A A D P - リボシレーションを示す分子量シフトを明らかにする S D S ゲルである。

【図 21】H E C 1 B ヒト子宮内膜腺ガン細胞の増殖において、融合タンパク質、配列番号 4 3 を含む本発明の組成物の効果を表す図であり、ここでは、トリチウム化したチミジン取り込みにより測定し、賦形剤（10）はリン酸緩衝生理食塩水であり、配列番号 4 3 を 1  $\mu$ g / m l (11), 10  $\mu$ g / m l (12) 及び 50  $\mu$ g / m l (13) の濃度で用い、ガン細胞増殖は投与量に依存する方式で減少した。

【図 22】融合タンパク質配列番号 4 3 を含む本発明の組成物の効果を、S K - M E L - 1 ヒト黒色腫細胞の増殖により表す図であり、トリチウム化チミジン取り込みにより測定した；賦形剤はリン酸緩衝生理食塩水であり、配列番号 4 3 を 1  $\mu$ g / m l, 10  $\mu$ g / m l, 及び 50  $\mu$ g / m l の濃度で用い、ガン細胞増殖は投与量に依存する方式で減少した。

【図 23】（A）M A T R I G E L (商品名) マトリックス内で培養した、H U V E C 内皮細胞の管状形態の図であり、ここでこの分析は血管形成のための細胞培養分析であり、管状形態形成は本発明の融合タンパク質を含まないコントロールでも見られる。（B）M A T R I G E L マトリックス内で培養した H U V E C 内皮細胞の管形成の減少の図であり、ここで培養液は融合タンパク質配列番号 4 3 を含む本発明の組成物で処理し、ボックス

31 出示されるように血管形成の阻害を論証するより少ない管を持つ。

【図24】融合タンパク質配列番号43を含む本発明の組成物により、TK-10ヒト肝臓ガン細胞の成長阻害を示し、スルフォダミンB(SRB)成長阻害分析により測定され、ここで配列番号43は0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/ml及び100μg/mlの濃度で用いられ、用いた全ての濃度においてガン細胞増殖は減少し、ガン細胞増殖の減少は投与量に依存し、100μg/mlの融合タンパク質の濃度において本発明の組成物はガン細胞の細胞死を引き起こす。

【図25】配列番号43を含む本発明の組成物による、HOP-62非小細胞ガン肺ガン細胞の成長抑制の図であり、スルフォダミンB(SRB)成長阻害分析により測定され、ここで配列番号43は0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/ml及び100μg/mlの濃度で用いられ、用いた全ての濃度においてガン細胞増殖は減少し、ガン細胞増殖の減少は投与量に依存した。

【図26】融合タンパク質配列番号43を含む本発明の組成物によるSF-286CNSガン細胞の成長抑制を示し、スルフォダミンB(SRB)成長阻害分析により測定され、ここで配列番号43は0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/ml及び100μg/mlの濃度で用いられ、用いた全ての濃度においてガン細胞増殖は減少し、ガン細胞増殖の減少は投与量に依存した。

【図27】10μg/mlの配列番号10とともにインキュベートした後の、本発明の融合タンパク質及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の投与から、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後及び24時間後の活性化したRh o Aの度合いの減少を示した図である。

【図28】配列番号43を含む組成物によるCaki-1肝臓ガン細胞の成長抑制(参照とした賦形剤コントロールに対する成長の度合い( % ) )を示す図であり、成長率( % )はSRB分析で測定し相対的な融合タンパク質の濃度は0.1、1、10及び100である。

【図29】ラット大動脈輪における血管形成の減少を示す図であり、ここでラット大動脈は1mmの小さな輪に切り、固化したECmatrix(商標)(matrix社製)で被覆した大動脈輪を配列番号10無し(コントロール)又は10μg/mlの配列番号10で0日から7-8日インキュベートし、配列番号10を含む培地(パネル2及び4)又は含まない培地(パネル1及び3)を4日目に補充した。(A)位相差コントラスト倒立顕微鏡下で25倍(上段パネル)100倍(下段パネル)の倍率で観察した輪からの血管形成(B)血管の長さを測定し、平均±SEMを報告した(結果は少なくとも3回分析した3回の独立した実験の代表値である。記号\*はコントロールの輪からの有意差を表す。)

【図30】配列番号10ADP-リボシレートRh o Aを示す図であり、準融合性のHUV E Cは、配列番号10(0~25μg/ml、上段パネル)又は10μg/mlの配列番号10(0.5~8hの様々な時間、下段パネル)の異なった濃度で24時間の間処理され、Rh o A ADP-リボシレーションはRh o Aを用いたウエスタンプロットで分析した。

【図31】配列番号10がHUV E Cにおける管の形成を減少させることを示す図であり、HUV E Cは、配列番号10無し(コントロール)、又は10μg/mlもしくは50μg/mlの配列番号10又は血管新生阻害剤のトラニラストを含む固化したECmatrix(商標)に播種し、細胞はまた10μM又は50μMのROCK阻害剤ファスジルと共にインキュベートし、毛細血管様の構造が6時間から20時間のインキュベーションの間に可視化した。(A)位相差コントラスト倒立顕微鏡下で40倍の倍率で撮影した写真(B)管の長さの定量は非処理細胞±SEMからの長さの百分率で説明する(写真及び定量化は少なくとも各々3回分析した2つの独立した実験の代表値である記号\*及び\*\*は非処理細胞との有意差(p(0.05))及び顕著な有意差(p(0.01))を表す。)

【図32】配列番号10が高濃度でHUV E Cの増殖に影響を与えることを示す図であり、HUV E Cは96穴プレート(collagen Iコート済み)に入れ、0から100

10

20

30

40

50

$\mu\text{g}/\text{mL}$  (又は  $\mu\text{M}$ ) の配列番号 10、ファスジル又はトラニラストと共に 24 時間又は 72 時間の間インキュベートし、4 時間から 24 時間培養した細胞を洗い、検査する化合物を含まない新鮮な培地を補給し 72 時間後まで放置し、処理の終わり (72 時間後) にアラーマーブルーを加え、4 時間インキュベートし蛍光を測定した。増殖は非処理細胞からの百分率 ( $0\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (S.D. であり 3 回の分析をした 2 つの独立した実験の代表値である。

【図 33】配列番号 10 は VEGF - 依存性 HUVEC 移動を修飾することが出来、(A) HUVEC は配列番号 10、ファスジル又はトラニラストを含む 24 穴フィプロネクチンコート済みトランスウェルチャンバーに播種し、 $10\text{ ng}/\text{mL}$  の検査する化合物を含む又は含まない VEGF で 20 時間移動を刺激し、移動した細胞は蛍光強度をカルセイン-AM をプローブとして用いて測定し、(B) HUVEC は移動が始まる前に予め  $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  の配列番号 10 で 24 時間前処理した (結果は VEGF (SEM で刺激しなかった非処理細胞に対する百分率で表し、2 回の測定をした 4 つの独立した実験の代表値である; 記号 \* 及び \*\* \* は各々非処理細胞 + VEGF (コントロール VEGF) に対しての有意差 ( $p(0.05)$ ) 及び顕著な有意差 ( $p(0.001)$ ) を表す; 記号 # # # は非処理細胞 - VEGF (コントロール - VEGF) からの顕著な有意差を表す)。

【図 34 A】ラット脊髄中への細胞新入生 C3 の侵入及び分布の分析結果である; (A) ラットの脊髄への配列番号 10 の侵入の野生タイプ C3 (配列番号 1) との比較を開示し、配列番号 10 は傷のない硬膜及び手術により開いた硬膜両方の打撲傷後のウエスタンプロットにより検出された。

【図 34 B】ラット脊髄中への細胞新入生 C3 の侵入及び分布の分析結果である; (B) 脊髄に沿った配列番号 10 の分布を開示した。

【図 34 C】ラット脊髄中への細胞新入生 C3 の侵入及び分布の分析結果である; (C) 打撲を与えた投与の 24 時間後の免疫組織化学的配列番号 10 ( $50\text{ }\mu\text{g}$ ) 侵入の検出を開示した。

【図 35】ラットの打撲後の配列番号 10 による時間及び投与量依存性 Rhod 不活化を示す (A) 硬膜外に Tisseel (登録商標) 成熟雌ラットの穏やかな打撲 ( $10\text{ g} \times 2.5\text{ mm}$ ) に引き続き即座に異なる投薬量の配列番号 10 を投与し、活性化のある Rhod 強度を SCI 後 24 時間後に測定した (B) Tisseel (登録商標) 中の  $50\text{ }\mu\text{M}$  の配列番号 10 の後脊髄を異なる回数損傷し (2 時間から 7 日間)、損傷後 3 時間後に組織を集め、Rhod 強度を測定した。

【図 36 A】マウスの機能的恢復を促進する、配列番号 10 による遅い処理を示す図である、(A) 成熟雌 BALB/c マウスの椎弓手術及び SCI 片側切断の後、 $1\text{ }\mu\text{g}$  の配列番号 10 入り Tisseel (登録商標) を脊髄に即座に投与した。

【図 36 B】マウスの機能的恢復を促進する、配列番号 10 による遅い処理を示す図である、(B) 処理は SCI の 24 時間後に遅延した。

【図 36 C】マウスの機能的恢復を促進する、配列番号 10 による遅い処理を示す図である、(C) 処理は SCI の 72 時間後に遅延した; 各々の治療グループはそれぞれのコントロールを用意し (Tisseel (登録商標) のみ)、多様性を 2 回数え、遅延した手術は 24 時間から 72 時間の処理を必要とし (代表的な処理投与が許容される)、初めの脊髄損傷を 0 日と考え、改良した 17 ポイントマウスのための Beattie-Bresnahan-Basso スケール (BBB スケール) を用いて運動性回復を 16 日間測定した。

【図 37 A】配列番号 10 は脊髄に局所的に投与された場合に耐性を持つ事を示した図である。(A) 各々のラットの体重 (配列番号 10 又は賦形剤) は手術の直前及び 8 週間毎の全ての週に測定した。

【図 37 B】配列番号 10 は脊髄に局所的に投与された場合に耐性を持つ事を示した図である。(B) 及び (C) ラット脊髄の椎弓手術及び処理の 3 ヶ月後の形態を示し (B) 賦形剤 (Tisseel (登録商標)) 処理ラットの脊髄長手方向切断面。

【図 37 C】配列番号 10 は脊髄に局所的に投与された場合に耐性を持つ事を示した図で

ある。(B)及び(C)ラット脊髄の椎弓手術及び処理の3ヶ月後の形態を示し(C)50 $\mu$ gの配列番号10処理ラットの脊髄長手方向切断面を示し;椎弓手術は行われるが硬膜は傷を付けず放置した;嘴骨は左側でバーは400 $\mu$ mを示す。

【図38A】配列番号10がラットの脊髄打撲の後の運動機能の促進をする事を示す図である。(A)各々のラットの体重を各週、8週目まで、手術前に測定したことを示す図である(配列番号10, n=11又は賦形剤, n=12)。

【図38B】配列番号10がラットの脊髄打撲の後の運動機能の促進をする事を示す図である。(B)椎弓手術及び穏やかな脊髄打撲(NYUインパクター、50mmの高さから10gの重りを落とした)を実行し、SCIのすぐ後に脊髄硬膜に配列番号10(15 $\mu$ g)のみ又は賦形剤の入ったTisseel(登録商標)を投与した成熟雄ラット。賦形剤及び配列番号10を処方したラットのBBBスコアは8週目まで毎週2重盲検定を行った。

【図38C】配列番号10がラットの脊髄打撲の後の運動機能の促進をする事を示す図である。(C)賦形剤処理群対配列番号10処理群における足底配置又は足踏み(BBBスコアは9から11)で支持された重量に達したラットの割合の経時変化を開示した。

【図39A】配列番号10が打撲傷を与えたラット脊髄に対する神経保護を示す(A)1cmの損傷に於ける予備の灰白質及び白質はルキソールファストブルーで染色し横断面を電子化したシステムで解析し、分析は損傷及び治療の8週間後に実行した。

【図39B】配列番号10が打撲傷を与えたラット脊髄に対する神経保護を示す(B)全損傷部位は2cmの脊髄の予備の組織から曲線から生じた割合(%)を各々のラットで計算する事により得た。

【図40】配列番号10はラットの打撲後の異痛症の発展に全く影響がない事を示す図であり、前足を引っ込めるVon Freyテストは配列番号10又は重篤な打撲症を与えた雌ラットに賦形剤処理後6週間後に行った。

【図41】配列番号10修飾したカドヘリン分布及び発現を示す図であり、HUVVECは8穴コラーゲン-Iコートしたチャンバースライドに播種し、A)穴毎に $2 \times 10^3$ 細胞又は $2 \times 10^4$ 細胞播種し、配列番号10無し(コントロール)又は25 $\mu$ g/mLの配列番号10のもとでインキュベートした;以下の細胞固定及び透過性においてカドヘリンの分布はマウスモノクローナルパン-カドヘリン及びFITC-有望2次抗体を用いた蛍光顕微鏡のもと可視化し;写真は400倍の倍率で撮影し少なくとも3回の計測をした2つの独立した実験の代表値を用いた;薄い矢印は細胞-細胞連絡のカドヘリンを指し、大きな矢印はカドヘリンの無い細胞連絡を指す;B)準融合性のHUVVECは0、10又は25 $\mu$ g/mLの配列番号10でインキュベートし、タンパク質は抽出され、7.5%のSDS-PAGEにかけ、マウスモノクローナルパン-カドヘリン抗体を用いて免疫検出された;細胞外調節キナーゼリプロービング(reprobining)は特異的細胞外調節キナーゼ1/2抗体を用いる事により、ゲルローディングコントロールにより同じメンブレン上に行った。;以下の免疫プロットの数は非処理細胞からの相対的な発現を代表し、少なくとも3回の分析をした2つの独立した実験の代表値である。

【図42】配列番号10がオクルディン分布と発現型を修飾した図であり、HUVVECは8穴コラーゲンIコート済みチャンバースライドに播種したA)各穴に $2 \times 10^4$ 細胞入れ配列番号10の無い状況(コントロール)又は25 $\mu$ g/mLの配列番号10下でインキュベートした;引き続き細胞を固定しオクルディン分布をウサギポリクローナルオクルディン及びFITC融合二次抗体を用いて蛍光顕微鏡下で可視化した;写真は400倍の倍率で撮影し、少なくとも2回の分析をした3回の独立した実験の代表値を用いた細い矢印は細胞-細胞連絡を示しB)準融合性のHUVVECは25 $\mu$ g/mLの配列番号10で24時間又は48時間インキュベートし、タンパク質を抽出し、7.5%SDS-PAGEに通し、同じオクリディン抗体を用いて免疫検出した;細胞外調節キナーゼリプロービング異的細胞外調節キナーゼ1/2抗体を用いる事により、ゲルローディングコントロールにより同じメンブレン上に行った。;免疫プロットの下の数字は非処理細胞の相対的な発現を表し、これは少なくとも2回分析した2つの独立した実験の代表値である。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0029】

## 〔発明の詳細な説明〕

本発明は、例えば、C3様融合タンパク質及びC3キメラ融合タンパク質を含む、複合、或いは融合タイプのタンパク質（ポリペプチド）に関する。本発明の融合タイプタンパク質は抗ガン化合物について論じられるのと同様に、特に、軸索の再生を促進する用途や神経保護について論じられるであろう。融合タンパク質が他の状況で同様に活用されるのが理解されるであろう。

## 【0030】

本発明は特に哺乳類の神経系の修復（例えば中枢神経系（CNS）病変部位、損傷した網膜の修復、又は末梢神経系（PNS）病変部位）、軸索再生及び軸索発芽、神経突起成長、神経防護作用活性及び、神経変性や虚血症損傷からの防護に関する。

10

## 【0031】

本発明は神経系の外傷の処理に有用である。特に本発明の方法及び組成物は、枝状の及び中心部の静脈／動脈閉塞、外傷、黄斑浮腫、閉塞隅角緑内障、解放隅角緑内障、加齢性黄斑変性症、網膜色素変性症、網膜剥離、レーザー治療（レーザー光治療を含む）に伴う損傷、糖尿病性網膜症、及び外科的な光誘起医原性網膜症に伴う損傷を治療するのに有用である。他の態様では、本発明の方法及び組成物はスタルガルト病、レーバー先天性黒内障、ベスト病、先天性脈絡膜欠如、網膜分離症、バルデー・ビードル症候群、前部虚血性視神経症、プルチエル網膜症、視神経炎、視神經円板浮腫、コーツ病及び／又はレーバー粟粒性動脈瘤に伴う損傷を処理するのに有用である。本発明は脊髄損傷、免疫性の又は末梢性の神経障害、多発性硬化症、パーキンソン筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー症、外傷性脳損傷、シャルコー・マリー・ツース病、巨大軸索神経障害、三叉神経痛、舌咽神経痛、ベル麻痺、重症筋無力症、筋ジストロフィー、進行性筋萎縮症、進行性眼球型遺伝性筋萎縮症、ヘルニア状の、破裂性の又は脱肛性の椎間板症候群、頸部脊椎症、神経叢疾患、胸郭出口破壊症候群、アクリルアミド、ガンマ-ジケトン（シンナー中毒者の神経障害）、二硫化炭素、ダプソン、ダニ、ポルフィリン症、グライン-バリー症候群、ハンチントン舞踏病、及び、脳梗塞、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、認知症、プリオント病及び緑内障といった軸索の損失や後退に伴う他の疾病のような疾病や状態を処理するのに有用である。

20

## 【0032】

緑内障は白内障に続き、世界中で2番目に多い失明原因である。5千万人以上の人々が緑内障に冒されていると推定されており、7百万人以上の人々がこの病気を原因とする両側性失明（両目）である（Quigley HA. 緑内障：Macrocosm to

Microcosm The Friedenwald Lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005; 46: 2663-2670）。緑内障は、視野の喪失や不可逆的な失明を導く進行性の視神経変性により特徴づけられている。原発性開放隅角緑内障、閉塞隅角緑内障、先天性緑内障を含む、幾つかの種類の緑内障がある。全てのタイプの緑内障に共通する特徴は、網膜神経節細胞（RGCs）の死である。大量のTGCsの損失があった場合、患者は段階的に進行的な視野の悪化を経験し、通常片目がもう片方より状態が悪い。視野損失は通常周辺より始まり、進展して中央の視野を含むようになる。この疾病的後期には、患者はまた夜間の視界において、困難を伴うことに気がつくであろう。

40

## 【0033】

眼圧の上昇は緑内障の進展のもう一つの主なリスク要因である。開放隅角緑内障及び閉塞隅角緑内障はこの疾病的最も一般的な病形であり、しばしば、高い眼圧を伴う。現在の緑内障の標準的な治療法は薬剤（例えば、プロスタグランдин治療）、及び／又は手術により眼圧を下げることである。しかしながら、これらの処理は危険性や副作用を伴う（Lee DA, Higginbotham EJ. 緑内障及びその治療：a review. Am. J. Health-Syst. Pharm. 2005; 62: 50

50

91 - 600）。顕著な割合の患者は圧力を低下させる薬剤が良く応答しているにも関わらず視野の損失を経験し続ける。さらに北アメリカのおよそ25%から30%の患者は「正常眼圧緑内障」を患っており、高眼圧が存在しないのに視神経変性が起きる（Anderson DR. Collaborative Normal Tension Glaucoma Study. Curr. Opin. Ophthalmol. 2003; 14: 86-90）。従って、現在の緑内障への治療戦略は不十分であり、疾患の進行を遅らせる新しいアプローチが緊急に必要とされている。

## 【0034】

本発明は脊髄損傷を処理するのに有用である。脊椎動物では脊髄及び脳は中枢神経系（CNS）を形成する。脊椎は体の長手方向の軸に沿って延長し、脊椎管で囲まれる。ヒトでは脊髄は8つの頸部、12の胸分節、5つの腰部、5つの仙骨分節、1無いし2つの尾骨分節に分けられる。中心灰白質は、側方向の突起（前角及び後角）と共に神経細胞の細胞体により形成され、周囲の白質は有髓神経纖維束により形成される。求心性の（上向性又は感覚に関する）神経経路及び、遠心性の（下向き又はエフェクターの）神経経路は白質を走る。脊髄の遠心性の経路はまたピラミッド型である（随意運動のため）又は錐体外路である（非随意運動及び筋緊張の分布のため）。ピラミッド型纖維は主に錐体側索路を渡り、精髄の様々な領域の前角及び後角の中の細胞へ錐体前策路を横切ること無しに小さい割合で走る。

## 【0035】

脊髄及び脳は2つのタイプの細胞で形成された：神経細胞又はニューロン及びグリア細胞である。グリア細胞は乏突起膠細胞又は星状細胞でありえる。乏突起膠細胞は神経軸索のミエリン鞘を形成し、星状細胞は神経細胞又はニューロンに栄養を供給し、分泌された神経伝達物質を吸収し、血液脳関門を形成する。ミエリンは脂肪の絶縁性の鞘で、らせん型の形状で神経を囲む。この被服物は神経に沿う電気インパルスの支障のない伝導を保証する。

## 【0036】

ミエリン鞘は多発性硬化症、軸索周囲性脳炎、広汎性硬化症、急性散在性脳脊髄炎、視神経脊髄炎、SMON（亜急性脊髄視束神経炎）、先天性脱髓疾患（大脳白質萎縮症）、および、神経に関するベーチェット病、および川崎病と言った、神経系の一般的な免疫介在性の炎症のような多くの病気により攻撃され破壊される。この損傷は、多くの輸送機能の損失を伴う電気伝導封鎖や神経症を導く。例えば事故の結果としての脊髄への損傷、は神経纖維の影響する伝導昨日の廃止の存続を導く。少なくとも1つの領域の完全な廃絶が原因である麻痺は対麻痺を伴う脊髄横断障害と呼ばれる。このことは、影響を受けた部位のもとの全ての領域に対する感覚機能（例えば、温感、痛覚又は圧覚）、運動機能（随意運動及び非随意運動）の損失及び栄養機能（例えば膀胱及び腸の機能）の損失を意味する。神経纖維は再生能力に乏しいため、随意運動の麻痺及び感覚の完全消失は恒久的である。

## 【0037】

一つの態様では、本発明は、例えば神経系損傷を持つ患者の、神経突起伸張、成長、又は再生の増加が望まれている所での処方計画に用いることが出来る。他の態様では、外傷的損傷（例えば脊髄外傷、脊髄損傷、又は他のCNS経路損傷を含むがこれに限られない）、外科的神経損傷、梗塞症の二次的損傷、感染症、毒性薬剤に対する暴露、悪性腫瘍、腫瘍随伴症候群、又は種々の型の中枢神経系の退行性損傷を患う患者の治療が含まれる。そのような損傷の例は萎縮性側索硬化症、進行性核上麻痺及びん致傷を含むがこれに限定されない。

## 【0038】

本発明の一つの態様は、脊髄が損傷した場合に傷ついた部位の神経軸索の再生を促進することや、末梢神経系及び中枢神経系の他の病変における神経の成長を刺激する事である。

## 【0039】

本発明の一つの態様では末梢神経系の神経再生を促進する事である。末梢神経系には中枢神経系（脳や脊髄）に属したり外側に伸びたりし、四肢や臓器を支える、神経及びニュー

10

20

30

40

50

ロンからなる。しかしながら、中枢神経系と異なり、PNS（末梢神経系）は骨や血液脳関門に守られておらず、毒や機械的損傷に曝されたままである。末梢神経系は体性神経系及び自律神経系に分けられる。

【0040】

本発明はまた、網膜色素変性症、黄斑変性症、眼性虚血性神経障害、といった眼疾患の治療にも有用である。網膜要素の変性は部分的或いは全体的な失明を引き起こす。黄斑変性症は眼内の網膜の黄斑部の変性である。黄斑の変性は急激な視力低下の原因となり、最終的には急性視力損失に至る。滲出型黄斑変性症は網膜中の異常な血管成長に関与し、血液を漏れ出させ、光受容体細胞の損傷の原因となる。

【0041】

加齢黄斑変性症（AMD）は臨床的に認識出来る、目に関して失明を引き起こす症候の集まりである。

【0042】

黄斑変性症は網膜中央、又は黄斑に影響する一群の疾病を含む。2つの基本的なタイプの黄斑変性症があり、「滲出型」及び「乾燥型」である。滲出黄斑変性症では、新生血管の異常な成長が存在する。これらの新生血管は壊れ、流体を漏れ出させ、網膜中央部の損傷の原因となる。この型の黄斑変性症はしばしば加齢に伴う。およそ90%の黄斑変性症は乾燥黄斑変性症である。乾燥黄斑変性症ではドーセンと呼ばれる沈殿物の堆積、及び光受容体細胞の細胞死により視力が損失する。この過程により網膜は薄くなり乾燥する。

【0043】

AMDの症候にはドーセンの存在、色素の凝集及び/又は脱落、網膜色素の上皮剥離、地形的萎縮、網膜下の新血管形成、及び皿上瘢痕を含む網膜領域上皮の攪乱が含まれる。加齢性黄斑変性症は、現在、特に55歳以上の人々の、治癒しない失明の主原因である。およそ65歳以上の4人に1人は加齢性黄斑変性症の兆候を持ち、75歳以上の7%は視力喪失を伴う進行性の黄斑変性症を有する。

ドーセンを有し、片目において合併症を患う患者は他方の目では合併症を患わない。合併症は網膜色素上皮萎縮、脈絡膜血管新生、漿液性網膜剥離、及び出血性網膜剥離からなる群から選ばれる1つ又は2つ以上を含む。ドーセンはコントラス感度に影響するかもしれない、人が暗がりの中で読書したり、夜間、細かいところが見え安全に自動車を運転したりするのに十分な視力を減ずる恐れがある。これらの兆候の全てがAMDが存在していると考えられるのに必要ではなく、ドーセン単独で直接視力喪失に伴うわけではない。黄斑変性症の正確な原因はまだ知られておらず、要因が同定され続けている。要因の集合的な結果は光受容細胞と網膜下組織の攪乱となる。ここで、網膜下組織は、直接下に存在し光受容細胞を支持する網膜色素上皮、及び下に位置し網膜色素上皮に栄養を与える脈絡膜を含む。

【0044】

網膜及び黄斑はフリーラジカルや一重項酸素といった酸素による酸化障害にさらされることがある。黄斑はポリ不飽和脂肪酸を含み、可視光及び近紫外光である高エネルギーの青色光を含む光に曝され、青色光は三重項酸素を一重項酸素に感光性を与え、酸化薬剤は黄斑中のポリ不飽和脂肪酸、DNA、タンパク質、脂質、及び炭水化物にダメージを与える事が出来る。黄斑変性症の病状に含まれる可能性のある要因は、低濃度コレステロールリポタンパク質（LDL）の血清濃度の上昇である。低濃度リポタンパク質コレステロールは酸化薬剤により酸化されLDLを形成し、LDLはアテローム斑にみられる。これらの酸化された産物は健康な網膜色素上皮に堆積する可能性があり、ネクローシスまたは昨日組織の死の原因となる。LDLコレステロールは網膜や網膜下組織の血管中にアテローム斑を形成し低酸素症を誘発し新生血管形成の原因となる。無競争エストロゲン置換両方を受けた更年期以降の女性は加齢性黄斑変性症による新血管形成の危険性が減少する可能性がある。血中のエストロゲン高濃度リポプロテインコレステロール（HDL）の量を増やす可能性があり、脂溶性抗酸化物の輸送と代謝において生産の変化を起こす可能性があり、網膜、網膜下組織及び血管において、酸化LDLコレステロールの堆積の限界をもうけ

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 4 5 】

進展した黄斑変性症の要因及び指示要因は黄斑中の光受容細胞の下層に存在する脈絡膜細胞の新生血管形成である。健康な成熟した目の脈管構造は通常不活発で、新規血管の発達において血管形成の陽性及び陰性の仲介物の間でホメオスタシスの状態にある。黄斑変性症は特に発達した時期において、黄斑の下に位置する脈絡膜において新規血管の病的な成長によって特徴づけられる。網膜下の脈絡膜中の新生血管形成による血管は視覚を遮る液体を漏らし盲目に導く可能性がある。

【 0 0 4 6 】

一つの態様では、滲出型黄斑変性症のような網膜の近位に生じる新生血管は、新生血管精製阻害活性を有する本発明の融合タンパク質を有する本発明の組成物の投与により新生血管の割合を減少するように治療する事も可能である。

10

【 0 0 4 7 】

他の態様では、滲出型黄斑変性症のような網膜の近位に生じる新生血管を示す目の疾病は、本発明の融合タンパク質を含有する本発明の組成物の投与により、光受容細胞の細胞死を防ぐか減少させるように治療されても良い。

【 0 0 4 8 】

疾病の結果としての、網膜近傍の新生血管形成、特に脈絡膜近傍の新生血管形成は患者の網膜中の光受容細胞の細胞死を導く可能性がある。網膜中の光受容細胞の細胞死は他の細胞死の機構と同様に、新生血管形成の結果としての病気に引き続き生産される。

20

【 0 0 4 9 】

進行した乾燥黄斑変性症はドルーセンの堆積と光受容細胞の死を含む。ドルーセン沈殿の機構は知られてないが、細胞からのエクソサイトーシスは細胞外空間へ排出される機構のようである。本発明の他の態様は、活性薬剤のアミノ酸配列と共有結合する輸送薬剤のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する細胞透過性融合タンパク質受容体による、ドルーセン沈殿の抑制及び光受容細胞の細胞死の防止を含み、前記活性薬剤のアミノ酸配列は A D P リボシリルトランスフェラーゼ C 3 又は、 A D P リボシリルトランスフェラーゼ活性を保持したその断片からなり、前記輸送薬剤のアミノ酸配列は、例えば C 3 A P L T 等の融合タンパク質である活性薬剤の細胞内摂取を促進させる。

一つの態様では、本発明のクロストリジウム・ボツルニム C 3 エクソトランスフェラーゼ単位は A D P リボシリルトランスフェラーゼ活性を、クロストリジウム・ボツルニム C 3 エクソトランスフェラーゼの 5 0 % から 5 0 0 % の範囲で示すタンパク質を含む。細胞膜侵入後の本発明の融合タンパク質による細胞中の R h o 不活性化はエクソサイトーシスをブロック又は阻害し、よってドルーセンを形成する細胞残骸又は細胞残骸物質からの放出をブロック又は阻害する。本発明の融合タンパク質は障害に誘導された C N S 中の細胞の障害誘導性細胞死を阻害する可能性がある。

30

【 0 0 5 0 】

新生血管形成は元々存在していた血管からの血管形成の複合化した過程である。この過程は生化学的及び細胞学的事象を含み（ 1 ）新生血管形成刺激による内皮細胞（ E C s ）の活性化（ 2 ）細胞外マトリックスの崩壊、活性化した内皮細胞の周囲の組織への侵入、および血管新生刺激源への移動及び（ 3 ）内皮細胞の増殖及び分化を含み、新規血管を形成する。脈絡膜中の血管新生は、フィブロblast成長因子（ b F G F ）のようなサイトカイン成長因子により誘導される可能性がある。網膜細胞の低酸素症はそのような成長因子の発現を誘導する可能性があり、ここで、低酸素症は細胞残渣又は、網膜や網膜下細胞の酸化損傷、又は酸化した L D L コレステロールの堆積により、網膜色素上皮中のドルーセン堆積を引き起こす可能性がある。

40

【 0 0 5 1 】

血管形成の制御は血管形成の刺激因子や阻害因子により高度に規制されている。健康なヒトや動物では、血管形成は特殊な制限された状況で起きる。例えば、血管形成は、通常、傷の治癒や黄体、子宮内膜及び胎盤の形成の間観察される。本発明の他の態様は、活性化

50

薬剤のアミノ酸配列と共有結合した輸送薬剤のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する細胞透過性融合タンパク質による、細胞透過性融合タンパク質複合体による血管形成の阻害を含み、ADPリボシルトランスフェラーゼC3又は、ADPリボシルトランスフェラーゼ活性を残したその断片からなり、前記輸送薬剤のアミノ酸配列は、例えば配列番号8又は配列番号10等の融合タンパク質である活性薬剤の細胞内摂取を促進させる。一つの態様では、クロストリジウム・ボツルニムC3エクソトランスフェラーゼ単位の機能的なアナログは、クロストリジウム・ボツルニムC3エクソトランスフェラーゼの50%から500%の範囲又はそれ以上の範囲でADPリボシルトランスフェラーゼ活性を示すタンパク質を含む。

## 【0052】

10

Rhoファミリータンパク質はガンとの関連で研究してきた。Ras(及び2次標的としてのRhoB)は翻訳後修飾を阻害する転移ガンの分子による標的である。しかしながら、これらの治療上の研究はRasに焦点を絞っており、Rhoファミリーメンバーの中のRhoBに限られる。

## 【0053】

RhoA及びRhoBのタンパク質レベルの上昇は大腸ガン、乳ガン及び肺ガンで発見された。RhoA及びRhoBレベルは頭部や頸部の扁平上皮ガンからの5μm切片において、これらのタンパク質に直接作用するポリクローナル後退を用いてVectra Stain kit (Vector Labs)を用いた画像解析による可視化により発見された。「非腫瘍性病変」領域の近傍をコントロールとして用いた。Rhoタンパク質レベルは腫瘍の進展により増加するが、RhoBレベルは体内のガン腫や高分化型腫瘍に比べ浸潤性腫瘍において減少する。

20

## 【0054】

RhoA及びRhoBの過剰発現は、通常の組織に比べ胸部腺ガンや肺腺ガンでより起こりやすく、Rhoタンパク質の発現は星状細胞腫瘍で減少し、逆にグレードIIからIVの悪性腫瘍に関する。

30

## 【0055】

Rhoは細胞の移動及び運動性の規制に関する。RhoAバリアント構成物を拡散導入したMM1ラット肝臓ガン細胞(Val14又はVal14Ile41)は構造的にRhoを活性化する。in vitroでの浸潤分析において、中皮ガン細胞層へ浸潤出来た播種した細胞の割合は形質転換したRhoAVal14の発現レベルに相関性がある。これらの活性化したRho形質転換細胞はin vitroの分析で、腹膜空洞に用いられ、模造の形質転換体が2~8であるのに対し、6~10の移植片は腫瘍小節になる。これらの結果は活性Rhoが腫瘍原性に関わりがあることを示している。

40

## 【0056】

ヒト1例、マウス1例の2つの転移性黒色腫モデル系と比較した遺伝子発現の総合的な研究、およびマクロアレイによる共有された遺伝子発現の刺激の比較により、RhoC発現が転移のレベルを上昇させる際に変えられると結論づけられた(Clark et al., 2000, Nature, 406: 532-535)。さらに、遺伝子発現が実験的に操作された場合、RhoC過剰発現はヒト黒色腫細胞ラインを誘導し、低い転移潜在性から高い転移潜在性へ切り替えられた。

50

## 【0057】

しかしながら、RhoAの過剰発現は観察されておらず、ドミナント・ネガティブバリアント(N19RhoA)は転移能を減少させた。

50

## 【0058】

ヒト乳ガンへの転移の傾向が相関する発現を有する70の遺伝子が同定された(van't Veer et al., 2002, Nature, 415: 530-536)。Rho遺伝子はまだ見つかっていないが、予後指標としての、疾病マーカーの値は必ずしも治療の標的としての値に関わらない。Rhoファミリーのシグナルの場合、転写レベルの測定単独のみでは明らかでない、酵素活性及びタンパク質-タンパク質相互作用の

複雑な制御が存在する。

【0059】

ガンでは細胞増殖の調節機構が異常になっている。組み替えC3エクソザイムによりRh<sub>0</sub>不活性化後にEL4ネズミTリンパ腫細胞の細胞死が起きる。NIH3t3細胞において、Rh<sub>0</sub>キナーゼ阻害因子Y-27632は特に固定依存性増殖を阻害する。一つの態様ではRh<sub>0</sub>不活性化により腫瘍細胞の増殖は阻害される可能性があり、本発明は、細胞増殖の減少又は停止、又は、ポリペプチド性細胞輸送部分及びクロストリジウム・ボリヌムC3エクソトランスフェラーゼ単位又はその機能的アナログを含む細胞浸透性融合タンパク質複合体によるアポトーシスの誘導を含む。

本発明の他の態様は、ポリペプチド細胞膜輸送部分及びクロストリジウム・ボリヌムC3エクソトランスフェラーゼ単位又はそれらの機能的アナログを含む細胞膜透過性融合タンパク質複合体を含む効果的な量の医薬組成物により、細胞増殖の減少又は停止を含むか、アポトーシスの誘導を含む。

【0060】

転移ガン細胞は高度に移動性がある。Rh<sub>0</sub>の不活性化は幾つかの細胞タイプにおいて細胞移動を防ぐ。C3トランスフェラーゼ及びRh<sub>0</sub>キナーゼ阻害因子Y-27632はHT29ヒト大腸ガン細胞による細胞侵入プロックする。v-Crk-誘導ラットフィプロプラスト3Y1細胞系統では、C3及びY-27632はv-Crkを阻害し、細胞の運動性を減少させる。

ドキソルビシン、放射又はタキソールで処理されたRh<sub>0</sub>B<sub>+</sub>/-中のRh<sub>0</sub>B<sub>-/-</sub>細胞、又はRh<sub>0</sub>B<sub>-/-</sub>MEF細胞におけるアポトーシスの減少はRh<sub>0</sub>Bタンパク質の欠失に原因がある。他の態様では、Rh<sub>0</sub>による血管新生は細胞移動及び転移を減少する可能性がある。一つの態様では、ポリペプチド性細胞膜輸送部分及びクロストリジウム・ボリヌムC3エクソトランスフェラーゼ単位又はそれらの機能的アナログを有する細胞透過性融合タンパク質複合体により本発明は細胞移動の抑制を含む。

【0061】

侵襲的な腫瘍細胞は、細胞外マトリックスを分解させるプロテアーゼを分泌する事により、腫瘍細胞を取り囲む細胞外マトリックスを分解出来る性質を有する。プロテアーゼの一つの主要なクラスはマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMPs)である。腫瘍細胞は異なるタイプのMMPを生産する事が出来、MMPはしばしば酵素前駆体として作られ切斷され活性化へ向け放出される。MMP-1はコラーゲンマトリックスを切断する。MMP-2は肺癌細胞の侵入の重要な役割を果たす。MMP-9はまた腫瘍細胞の侵入に関わる。他の態様では、本発明はMMP発現、MMPプロセッシング又は腫瘍細胞からのMMP分泌、ポリペプチド性細胞膜移動部分及びクロストリジウム・ボツリヌムC3エクソトランスフェラーゼユニット、又はその機能的アナログを含む細胞浸透性融合タンパク複合体による阻害を含む。

【0062】

脳は高度に機能的な局在をしている：例えば各々の特有の解剖学的領域は特有の機能を実行する。患者の脳の中の腫瘍の位置(及び脳の病変)は組織のタイプや腫瘍のタイプよりも重要になる可能性がある。脳の重要な部分の比較的小さな腫瘍又は病変は、より大きい、脳の比較的重要性の低い領域にあるより大きい病変よりも壊滅的である。脳の表面にある病変は外科的に比較的容易に切除する事が出来る可能性があるが、同程度のサイズであるが脳の奥深くに位置する腫瘍は、深い腫瘍へのアクセスが、深い腫瘍へ接近又はアクセスし取り除くために間にある組織を多くの致命的な構造を切り取る事などにより破壊する事が必要である可能性があるため、外科的に比較的容易には切除できない恐れがある。加えて、脳の良性腫瘍は患者にとって危険な物である可能性がある。良性腫瘍は重要な領域に成長し、周囲の脳の組織や機能に重大な損害を与えるかもしだい。良性腫瘍は外科的切除で治療できるかも知れないが、腫瘍を深部の組織から取り除く事は不可能である。もし検査を受けていない良性腫瘍が成長したら、体積が増加し頭蓋内の圧力が増加する可能性がある。もしそのような状況が処理されないまま放置されたら、脳の生命に関わる構造

10

20

30

40

50

は圧縮され、患者の死の原因後なる。C N S (中枢神経系) 悪性腫瘍の発生は10万人に約8~16例である。脳の一時的悪性腫瘍の予後は惨憺たるものであり、平均生存率は1年以内であり、外科的切除が続く。脳腫瘍は特に神経膠腫の場合、外科的切除の後元の病巣より約2センチメートル内に再発する。

【0063】

ここに記載した組成物及び方法を使用して治療する事が可能な脳腫瘍の代表例は、未分化星状腫のような神経膠腫、多形性膠芽腫、毛様細胞性星状細胞腫、乏突起膠腫、上衣腫、粘液乳頭型脳室上衣腫、上衣下腫、脈絡叢乳頭腫、神経芽細胞腫のような神経細胞腫、神経節芽細胞腫、神経節細胞腫、髓芽腫、松果体芽細胞腫や松果体細胞腫のような松果体の腫瘍、髓膜腫や髓膜血管周囲細胞腫といった髓膜の腫瘍、髓膜肉腫、神経鞘腫(神経線維鞘)や神経纖維腫といった神経鞘の腫瘍、ホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫といったリンパ腫、ホジキンリンパ腫の1次及び2次サブタイプ、(及び1次及び2次を含む多くのサブタイプ)、頭蓋咽頭腫のような悪性腫瘍、類表皮囊胞、皮様類皮囊腫、コロイド囊胞、一般的には肺、胸、黒色腫、腎臓及び消化管の腫瘍である実質的に全ての腫瘍から派生する可能性があり、脳の中に位置する転移性腫瘍、に使用する事が可能である。

10

【0064】

本発明の医薬組成物の投薬技術の例は目の後部を含む目への薬剤投与の開示を有する。例えば米国特許出願第5,707,643号は、硝子体の中の胸膜に切開を通して挿入される分解可能な強膜プラグに関する。眼中への薬剤の投与に関して、硝子帯への拡散による網膜の治療のため、プラグは硝子体の中に薬剤を放出する。

20

【0065】

眼中への他の投与の技術は米国特許出願第5,443,505号に開示され、扁平部炎又は外科的に誘導された血管の無い領域と言った、目の血管の無い領域の上の脈絡膜上腔に位置する移植を開示する。他の態様は部分的な無血管領域に渡る強膜弁の部分的な厚さを形成し、移植片を残りの強膜ベッドに挿入し、会う良いに穴を形成し、弁を閉じるように縫合する事を含む。薬剤は硝子体領域及び眼内構造物中に拡散する。他の態様は無血管部位の上に部分的な厚みのある強膜フラップを作ること、任意にその中に穴を空け、残りの強膜ベッドに移植片を挿入すること、および縫合し、フラップを閉じることを含有する。

【0066】

他の目への薬剤投与の運搬アプローチは薬剤タンパク質配列をコードするcDNAと共に網膜のニューロンを形質転換することである。そのような形態の投与がFischerら(J. Neuroscience, 2004, 24: 8726-2740)により開示されており、彼らはC3を網膜神経節ニューロンに核酸導入し、及び細胞の生存率上昇、及び網膜神経節ニューロン細胞軸索の再生増加を発見した。他の態様はトランケートした断片を細胞に形質導入する事、又は本明細書の図4で報告されているバリエントである。

30

【0067】

目への薬剤投与のための他の送達アプローチは、直接注射である。目の後部については、硝子体内注射が、硝子体に薬を送達するのに用いられた。この事は、眼内注射による種々の薬剤で黄斑変性症を治療することに関する米国特許第5,632,984号に関係する。目への薬剤投与のために、薬剤は望ましくはマイクロカプセルとして注射される。目の後ろの部分への眼内注射は、硝子体、網膜全体、脈絡膜、および対面する強膜を通して薬の拡散させることであってもよい。これに加え、米国特許第5,770,589号は、見たところでは薬の投与のために硝子体内に硝子体液に抗炎症薬を注射することによって黄斑変性症を治療することに関するものである。注射は、薬が後ろの部分に送達される間、目への損害を最小にするために、扁平部を通して管理されることができる。

40

【0068】

別の送達アプローチは、外科的手法によるものである。例えば、米国特許第5,767,079号は、効果量の成長因子を例えば目の異常部位に置くことによるTGF-の投与によって、黄斑円孔と黄斑変性症を含む眼科疾患を治療することに関するものである。

50

黄斑と網膜を扱う際に、目への薬の投与のために、前記成長因子が直接適用される前に、推定されるように、無血管域の目の前方セグメントの上に強膜への投与によって、または、硝子体、網膜と脈絡膜を通しての外科的治療を経た網膜の後の強膜の投与によって、中心硝子体切徐術または完全な扁平部硝子体切徐術を含む外科的治療が行われ、劇的な、非常に浸潤的な、技術は通常、部分的な視力損失がすでに起こったか、差し迫った脅威が存在する所で適当である。

【0069】

薬の目への投与のためのもう一つの送達アプローチは、装置とカニューレの使用によるものである。例えば、米国特許第5,273,530号は、網膜内送達やサンプルの回収とそれらのための装置に関するものである。直接的な眼内注射技術とは異なり、この特許で明らかにされる方法は、扁平部切除の使用を避けて、その代わりに眼窩外側を迂回して挿入経路を使うものである。曲がったハンドルと環部を有する先端のある装置は、カニューレが、硝子体を通過することなく、後方強膜を通して挿入され、そして、網膜下スペースに挿入される。環状部は、望ましい深さに侵入を規制するために規定されている。装置は、強膜域、脈絡域、網膜下域、網膜域と硝子体域を含む目のあらゆる部分に調節可能であることが記載されている。

10

【0070】

目への薬剤の投与のためのもう一つの送達アプローチは、強膜内注射によるものである。例えば、米国特許第6,397,849号は、網膜組織上に広がる強膜の外面上の場所を通して目の強膜層に、治療又は診断に効果的な量で注入することを含む強膜内注射の方法を開示する。注射状況により、材料は強膜層内に沈着物を形成することができ、脈絡膜および/または網膜のような下にある組織層に拡散することができ、および/または材料は強膜層を通して、そして、下にある層に推進することができる。強膜が網膜を含み目全体とともに動くので、強膜上の沈殿部位は網膜下に位置する点に対して比較的一定のままであり、同時に、黄斑の上に広がるサイトで強膜に材料を沈澱させることにより、目が部位特異的送達をするように眼窩の範囲内で動き、よって材料を黄斑斑と周囲の組織に送達させる。注射手順は、針を使わない小片/溶液と同様にカニューレまたは針を使用する。好みらしい態様において、カニューレは目と比較して回転方向で強膜に挿入され、強膜の表面に対して直角ではない。

20

【0071】

目への薬剤投与のためのもう一つの送達アプローチは米国特許第6,299,895号で開示され、カプセルを眼球周辺のテノン嚢下スペースに挿入することを含む、生物学的活性分子を目に送達する方法を開示し、前記カプセルは細胞由来の生物学的活性分子を含んでいる芯と周囲の生物学的適合性の被服物を含み、そして、前記被服物は生物学的に活性分子が目に拡散されるのを助け、送達される生物学的活性分子の適用量は1日につき、患者一人につき、片目に対して50pgから1000ngである。生物学的活性分子は抗血管新生因子であってよく、そして、第2の生物学上活性分子またはペプチドはカプセルから目に共同して送達されてもよい。前記方法は、黄斑変性症を含む目の障害を治療する有用な処方として開示される。

30

【0072】

本発明の組成物で役に立つことがありえる目への薬の投与のための他の送達アプローチは、周知の技術である。例えば、米国特許第5,399,163号は、流体注入剤に圧力をかけることによって噴射式注射を提供する方法を明らかにする；米国特許第5,383,851号は、針を使わない注入装置を明らかにする；米国特許第5,312,335号は、針を使わない注入システムを明らかにする；米国特許第5,064,413号は、注入装置を明らかにする；米国特許第4,941,880号は、薬物の非侵襲的な射出をするためのアンプルを明らかにする；米国特許第4,790,824号は、非侵襲性の皮下注射装置を明らかにする；米国特許第4,596,556号は、圧力により操作される皮下注射装置を明らかにする；米国特許第4,487,603号は、制御された率で薬物を調剤するために、移植可能マイクロ注入ポンプを明らかにする；米国特許第4,486,

40

50

194号は、皮膚を通して治療薬を管理する治療的な装置を明らかにする；米国特許第4,447,233号は、薬物を正確な注入率で送達するための薬剤注入ポンプを明らかにする；米国特許第4,447,224号は、連続薬送出のための可変流量移植可能な注入装置を明らかにする；米国特許第4,439,196号は、マルチチャンバーコンパートメントを持っている浸透圧薬物送達システムを明らかにする；そして、米国特許第4,75,196号は、浸透圧薬物送達システムを明らかにする。

【0073】

腫瘍切除部分への薬の投与のためのもう一つの送達アプローチは、腫瘍の外科的除去の後、手術部位に薬を注入すること、又はフィブリンマトリックス中に含み送達することを含む。

10

【0074】

ここで用いられる「Rhoアンタゴニスト」が含む用語はC3様タンパク質を含むC3タンパク質を含むが、これに限定されない。

【0075】

用語「C3タンパク質」は、ボツリヌス菌、セレウス菌または黄色ブドウ球菌から分離されるADPリボース転移酵素C3または組み換え型ADPリボース転移酵素に言及する。

20

【0076】

ここで用いられる用語の「C3様タンパク質」、「ADPリボース転移酵素C3-様タンパク質」、「ADPリボース転移酵素C3類似物」、「C3様転移酵素」または「C3キメラタンパク質」は、生物学的活性がADPリボース転移酵素C3と類似している（例えば、同じ、本質的に同様な）全てのタンパク質またはポリペプチドに言及する。C3様タンパク質の例として、配列番号：1、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：78と配列番号：79を含むがこれに限定されない。

【0077】

用語「神経損傷サイト」は、外傷性神経損傷の部位または病気に起因する神経損傷に言及する。神経損傷サイトは、一つの神経（例えば座骨神経または視神経）からなる可能性や、又は、多くの神経から成る神経路（例えば脊髄の損傷を受けた部位）である可能性がある。神経損傷サイトは、中枢神経系または末梢神経系、または、修復を必要としているあらゆるサイトである可能性でもよい。脳と視神経を含むCNSで脳梗塞に起因する損傷の結果として、神経損傷サイトができる可能性がある。手術や、脳腫瘍除去、またはガン障害の後の治療の結果として、神経損傷サイトは、脳内である可能性がある。神経損傷サイトは、脳梗塞、パーキンソン病、アルツハイマー症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、糖尿病または他のタイプのあらゆる神経変性病気からでも生じる可能性がある。

30

【0078】

ここで使われるよう、「実質的に精製される」という用語は80%以上の純度、望ましくは90%以上の純度、より望ましくは95%を超える純度を持っている製剤を意味する。より詳しくは、「実質的に精製される」という用語は、その国の環境で、タンパク質と関係している汚染物質を実質的に含まないということを意味する。

40

【0079】

ここに使われるよう、用語「PEG化またはPEG-バリアントは、PEG moietyが組織で薬の保持能を増やすためにC3融合タンパク質に共有結合して付けられる変性に関するものである。PEG化されたC3融合タンパク質は、配列番号：10又はこの出願で記述されるトランケートバリアントを含んでも良い。例として、C3融合構成の長さにおける変化からの異なる分子量のPEGバリアントを含み、そして、PEGの分子量の違いが使われる。

【0080】

ここに使われるよう、用語「送達薬剤」は貨物部分と輸送部分から成っている薬剤に関する。貨物部分の例は、ADPリボース転移酵素C3とADPリボース転移酵素C3類似

50

物を含む。輸送部分の例は、例えば配列番号：2とその類似物からなる。

【0081】

「ポリヌクレオチド」は、一般的に全てのポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドに言及し、それらは修飾されていないRNAまたはDNAであるかでもよく、修飾されたRNAまたはDNAでもよい。「ポリヌクレオチド」は、一重鎖DNA及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域の混成DNA、一本鎖及び二本鎖RNA、一本鎖と二本鎖地方の混合物であるRNA、一重鎖でも良いDNAとRNAを含む複合分子、より一般的に、二本鎖、あるいは、一本鎖-二本鎖領域の混成のものを含むがこれに限定されない。更に「ポリヌクレオチド」はRNA、DNA、又はRNAとDNA両方から成っている3本鎖領域言及する。用語、ポリヌクレオチドはまた、安定化又は他の目的のため修飾された骨格を有する、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を有するDNAまたはRNAを含む。「修飾された」塩基は、例えば、イノシンのようなトリチル化された塩基通常ではない塩基を含む。種々の修飾が、DNAとRNAになされた；従って、「ポリヌクレオチド」はウイルスや細胞に特有のDNAとRNAの化学形と同様に、自然界に典型的に見られる、化学的に、酵素的に、または、代謝的に修飾されたポリヌクレオチドの形態を包含する。「ポリヌクレオチド」は、線形及び末端が閉じた分子を含むが、これに限定されるものではない。「ポリヌクレオチド」はまた、オリゴヌクレオチドを包含する。

10

【0082】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合（すなわちペプチド等量式）によって互いに結合した2つ以上のアミノ酸から成るあらゆるペプチドまたはタンパク質にも言及する。「ポリペプチド」は、一般にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーとして参照される短い鎖、及び、通常、タンパク質と呼ばれるより長い鎖の両方に言及する。上記で述べたように、ポリペプチドは20の遺伝子によりコード化されたアミノ酸以外のアミノ酸を含む可能性がある。

20

【0083】

この発明の組成の細胞膜輸送を強化しているペプチド（また、「輸送部分」または「輸送薬剤」と呼ばれる）は1または複数のプロリンリッチ領域を含んでもよく、それらの各々は同じであるか異なる配列のアミノ酸でも良く、それらの各々は一つのペプチド結合又は複数のペプチド結合により共有結合しても良く、そして、非-プロリンリッチなアミノ酸配列が10以上のアミノ酸から成るとき、それぞれが同じ又は異なってもよい一つ以上の非-プロリンの豊富なアミノ酸配列各々から成っていてもよい。

30

【0084】

ここに使われるよう、「ニューロンが他の細胞との新しい接続をするのを助けるために」または「ニューロンが新しい細胞接続を作るのを助ける」ことは細胞（例えばニューロン）または組織を本発明の薬剤送達組成物、接合体、融合タンパク質、ポリペプチドまたは医薬組成物で治療する上で、ニューロンが例えば新しい樹状突起、新しい軸索または新しい神経突起（すなわち細胞芽）を成長させることや、既存の樹状突起、軸索または神経突起（すなわち細胞芽）は、より大きな範囲に増大させることを促進することを意味する。

40

【0085】

ここに使われるよう、用語「ベクター」は外来性のDNAまたはRNA断片が挿入されて、それから外来性のDNAまたはRNA分子のどちらの発現度または拡大が宿主細胞で伝播される、自立的に複製するDNAまたはRNA分子に言及する。用語「ベクター」は1つの有機体からもう一つへDNA配列を移すのに用いられることができるプラスミド（例えば、線形化しているかしていないか）を含有するが、これに限られない。

【0086】

用語「薬学的に許容されるキャリア」、そして、「アジュバント」、そして、「生理的に許容できる賦形剤」および類似物は、この発明の化合物と共に、患者に施される可能性があり、そして、その薬理学的活性を破壊しない許容できるキャリアまたはアジュバントに言及するものと理解される。さらにここに使われるよう、「薬学的に許容される担体」

50

または「製薬キャリア」は当業者に知られているものであり、そして、0.01-0.1Mの、望ましくは0.05Mのリン酸緩衝液または0.8%の食塩水を含むがこれに限定されない。その上、そのような薬学的に許容される担体は、水性であるか非水溶解決、懸濁液、エマルジョン類であってもよい。非水溶溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えばオリーブ油）やエチルオレイン酸のような注射可能な有機エステル類である。水溶性担体は、水、アルコール溶液／水溶液、エマルジョン類または懸濁液、およびこれらの食塩水又は緩衝液媒体を含む。非経口賦形剤は、塩化ナトリウム溶液、リングルのブドウ糖、ブドウ糖と塩化ナトリウム、リングル液と不揮発性油の乳化液を含む。静脈内溶媒は、流体で栄養を含む補充液、電解質補充液（例えばリングルのブドウ糖に基づくそれら）、などを含む。防腐剤と他の添加物が存在してもよく、例えば、抗菌物質、酸化防止剤、担体薬剤、不活性ガスなどであってもよい。

10

#### 【0087】

ここに使われるよう、「医薬組成物」は薬学的に許容できる希釈剤、防腐剤、溶解剤、乳化剤、アジュバントおよび／又はキャリアと共に治療的に効果的な量（服用）の薬剤を意味する。ここで用いられる「治療的に効果的な量」は、治療的な影響を所定の状態と投与療法に提供するこれらの量に言及する。

そのような組成物は液体または凍結乾燥されたか、さもなければ乾燥製剤で、いろいろな緩衝液内容物（例えばトリス-HCl、酢酸、リン酸塩）の希釈剤、pHおよびイオン強化剤、添加物（例えば表面にアルブミンまたはゼラチンを加え吸収を防ぐ）と洗剤（例えばTween 20、Tween 80、ブルロニックF68、胆汁酸塩類）を含む。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる可溶性薬剤（例えばグリセロール、ポリエチレングリセロール）、酸化防止剤（例えばアスコルビン酸、異性重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えばチメロサール、ベンジルアルコール、パラベン）、かさ高い物質または等張化修飾剤（例えばラクトース、マンニトール）、ポリエチレングリコールなどのポリマーのタンパク質への共有結合、ポリグリコール酸、ヒドロゲル、その他、であってよく、または、リポソーム、マイクロエマルション、ミセル、単層または多層賦形材、赤血球ゴースト、またはスフェロプラストに加えられても良い。

20

そのような組成物は、物理的な状態、可溶性、安定性、生体内放出率と生体内クリアランスの率に影響する。制御されたまたは徐放組成物は、親油性デポー（例えば脂肪酸、ワックス、油）中の製剤を含む。また本発明は、ポリマー（例えばポロキソマーまたはポロキソマイン）でおおわれている微粒子の組成物であると理解される。本発明の組成物の他の実施例は、非経口で、肺で、鼻で、口の経路を含む種々の投与経路のために、微粒子の形、保護コーティング、プロテアーゼ阻害剤または浸透性エンハンサーを採用する。1つの実施例において、非経口的に、ガンを経由して、経粘膜的に、経皮的に、筋内に、静注で、皮内に、皮下に、腹膜内に、脳室内で、頭蓋内に、腫瘍内に、または、より望ましくは、医薬組成物は中枢神経系（CNS）損傷部位または末梢神経系（PNS）損傷部位に直接、投与される。

30

#### 【0088】

加えて、用語「薬学的に効果的な量」または「治療的に効果的な量」は、例えば、神経損傷を有する患者を治療するのに効果的な量（服用）に言及する。ここで「薬学的に効果的な量」が望ましい治療的な影響を与えていたる量と解釈されることがよく理解されており、そして、1回の服用において、または、あらゆる投薬量または経路ででも、単独で、または、他の治療剤と結合してとられる。本発明の場合、「薬学的に効果的な量」が本発明のADPリボース転移酵素C3の量またはADPリボース転移酵素C3アナログ（例えば融合タンパク質）として理解されてもよく、これらは、例えばニューロン軸索成長の抑制を抑え（例えば、全体的または、部分的に）、軸索成長を容易にし、細胞アポトーシスを防ぎ、Rho活性を抑えて、傷ついた軸索の再生を助長し、または、ニューロンが他の細胞との新しい接続を形成するのを助ける可能性がある。

40

#### 【0089】

例えばC3またはC3類似タンパク質のような活性薬剤の治療的に効果的な量または投薬

50

量は、体重あたり 0.001 から 30 mg / kg であってよく、本発明の他の範囲は、およそ 0.01 ~ 25 mg / kg、およそ 0.025 ~ 10 mg / kg、およそ 0.3 ~ 20 mg / kg、およそ 0.1 ~ 20 mg / kg、およそ 1 ~ 10 mg / kg、2 ~ 9 mg / kg、3 ~ 8 mg / kg、4 ~ 7 mg / kg、5 ~ 6 mg / kg と 20 ~ 50 mg / kg を含んでよい。他の態様では、活性のある薬剤の治療に効果的な量または投薬量は合計で 0.001 から 50 mg の範囲でよく、本発明の他の範囲はおよそ 0.01 ~ 10 mg、およそ 0.3 ~ 3 mg、およそ 3 ~ 10 mg、およそ 6 mg、およそ 9 mg、およそ 10 ~ 20 mg、およそ 20 ~ 30 mg、およそ 30 ~ 40 mg 及び、およそ 40 ~ 50 mg の範囲を含んでもよい。

## 【0090】

10

加えて、当業者は、本発明の医薬組成物が静脈であるか皮下の投与のために策定されると理解できるであろう。例えば、およそ 25、およそ 40、およそ 60、およそ 100、およそ 150、およそ 200、およそ 300 またはおよそ 500 マイクログラムの活性のある薬剤が含まれている一回の服用バイアルが生産されてもよい。

## 【0091】

当業者は特定の要因が、被療者を効果的に扱うのに必要な投薬量に影響を与える可能性があることを認識する可能性が有り、これらの特定な要因は、被療者の病気または障害のひどさ、以前の治療、被療者の総体的な健康及び / または年齢、他の病気の存在を含むが、これらに限定されない。さらに、治療的に効果的な量の活性化合物による被療者の治療は、一回の治療または一連の治療を含んでもよい。一例では、被療者は、およそ 1 ~ 10 週の間で、週当たり 1 回、およそ 0.3 ~ 10 mg の範囲で、活性のある薬剤で治療され、または替わりに、2 ~ 8 週の間で、およそ 3 ~ 7 週の間で、または、およそ 4、5 または 6 週の間治療される。被療者は、1 週につき 1 回より多く、例えば 1 週につき 2、3、4 または 5 回以上、活発な化合物でも扱われる可能性がある。別の例では、被療者は代わりに、およそ 0.3 ~ 10 mg の範囲で 1 週につき 2 回、硝子体内注射によっておよそ 1 ~ 10 週の間で治療され、替わりに、2 ~ 8 週の間で、およそ 3 ~ 7 週の間で、または、およそ 4、5 または 6 週の間治療されてもよい。治療のために使われる活性のある化合物の効果的な投薬量が特定の治療のコースの上で増減するかもしれないとも認識されるであろう。

20

## 【0092】

30

ここに使われるようく、用語「被療者」は治療が必要な患者を意味する。1 つの態様において、被療者は哺乳類ある。他の態様において、被療者は人間である。

## 【0093】

加えて、例えば H I V T a t タンパク質のサブドメイン、アンテナペディアのホメオドメインのような輸送薬剤は、ADPリボース転移酵素 C3 または ADPリボース転移酵素 C3 類似物を含むポリペプチドが、複数回繰り返される可能性がある。輸送薬剤領域は、ADPリボース転移酵素 C3 または ADPリボース転移酵素 C3 類似物のアミノ末端領域の、または、両領域のカルボキシ末端領域であってもよい。輸送薬剤領域の繰り返しは、望ましい細胞によって、ADPリボース転移酵素 C3 または ADPリボース転移酵素 C3 類似物の取り込みに影響を及ぼす可能性がある（例えば、増加する）。

40

## 【0094】

異種融合は、異種ポリペプチドから本発明のポリペプチドの融合によって作られる新しいポリペプチドを含む。そのようなポリペプチドは、細菌のポリペプチド（ベータラクトマーゼ、グルタチオン - S - 転移酵素、または例えば大腸菌 t r p ローカスによってコード化される酵素）、イーストタンパク質、ウイルスタンパク質、ファージタンパク質、ウシ血清アルブミン、走化性ポリペプチド、免疫グロブリン定常部（または他の免疫グロブリン領域）、アルブミンまたはフェリチンを含む可能性が有るが、これらに限定されない。

## 【0095】

ここに記述される本発明のポリペプチドに対して、当業者に知られている方法で測定される少なくとも 50 % の同一性があるタンパク質とポリペプチド（例えば、方法は S m i t

50

h and Waterman, 1981, Ad. Appl. Math., 2: 482-489; またはNeedleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48: 443-453によって説明される)は本発明に含まれる。一つの態様では本発明のポリペプチドはここに記述したポリペプチドに対して、少なくとも約50%、少なくとも約55%、望ましくは、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、より望ましくは少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有する。一つの態様では、同一性は少なくとも5、または少なくとも20の隣接するアミノ酸領域にわたる。

## 【0096】

10

特に明記しない限り、本発明において利用される組み換えDNA技術は標準的な手法であり、当業者に知られている。それらの技術の例は、例えば、Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、及びAusubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates 及び、Wiley-Interscience (1988, 現在までのアップデートを含む)を情報源とする文献で説明され、参照によってここに取り入れられる。

20

## 【0097】

20

RhoGTPアーゼは、タンパク質のRho、RacとCdc42ファミリーのメンバーを含む。本発明は、RhoクラスのRhoファミリーに関係する。Rhoタンパク質は、異なる遺伝子によってコードされる異なるバリエントから成る。例えば、PC-12細胞(褐色細胞腫細胞系)は、RhoA、RhoBとRhoCを表す。C3ファミリータイプのRhoアンタゴニストは、全てのタイプのRho(例えばRhoA、RhoBその他)を機能させないので、細胞の中のRhoタンパク質を不活性化するために効果的である。対照的に、例えば病気にかかった細胞へのドミナントネガティブRhoAファミリーの導入などの遺伝子治療技術は、その特定のRhoAファミリーを機能させない可能性がある。

30

## 【0098】

リボース化活性を保持する組み換え型C3タンパク質またはC3タンパク質は、開示された送達系にも効果的で、この発明でもカバーされる。そのうえ、RhoキナーゼはRhoを活性化する、の良く知られた標的であり、そして、少なくとも神経突起または軸索成長に関して、Rhoキナーゼを不活性化することはRhoを不活性化するのと同じ影響を持つ。

## 【0099】

40

本発明のタンパク質は、細菌の細胞抽出物から、または、組み換え型技術を用いることにより準備されてもよい。一般に、本発明に準じるC3タンパク質は、適当な発現媒体中のC3をコードするDNA断片の全部または一部で、宿主細胞の形質転換(トランスフェクション、形質導入または感染)によって生産することができる。適当な発現媒体は、当業者に知られており、例えば:プラスミド、ウィルス小片とファージが含まれるがこれらに限定されない。昆虫細胞にはバキュロウイルス発現ベクターが適当である。発現媒体の全て、またはその部分は、宿主細胞ゲノムに結合することができる。いくつかの状況では、誘導可能な発現ベクターを使用することは、望ましい。

## 【0100】

50

発現媒体を宿している宿主細胞は、選ばれた遺伝子の活性化、選ばれた遺伝子の抑制、形質転換体の選択または選ばれた遺伝子の増幅の必要性に適応した、従来の栄養培地で培養されることができる。1つの発現システムは、pMAMneo発現ベクター(Clont

each, Palo Alto, Calif.) でトランスフェクトされたマウス 3T3 線維芽細胞宿主細胞である。

【0101】

分子生物学の分野の当業者は、多種多様な発現システムの全てが、組み換え型タンパク質を提供するのに用いることができると理解されるであろう。使われる正確な宿主細胞は、本発明はきわめて重大でない。C3タンパク質とC3様タンパク質は、原核ホスト（例えば大腸菌またはB. subtilis）で、または、真核生物ホスト（例えば、サッカロミセス属またはピキア属；哺乳類の細胞、例えばCOS、NIH 3T3、CHO、BHK、293またはヒーラー細胞；または昆虫細胞）で生産される可能性がある。

【0102】

タンパク質とポリペプチドは、植物細胞によっても生産される可能性がある。植物細胞として、ウィルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルスとタバコモザイク病ウイルス）とプラスミド発現ベクター（例えばTiプラスミド）が適当である。そのような細胞は、広範囲にわたるソース（the American Type Culture Collection, Rockland, Md.）から入手可能である。変化転換またはトランスフェクションの方法と発現媒体の選択は、選ばれる宿主系に依存する。

【0103】

C3ポリペプチドは、融合タンパク質として生産することが出来る。例えば、発現ベクターは、lacZ融合タンパク質をつくるのに用いられる可能性がある。pGEXベクターは、グルタチオンS-転移酵素（GST）による融合タンパク質として外来のポリペプチドを発現するのに用いることができる。一般に、そのような融合タンパク質は溶解性で、溶出に引き続き、グルタチオン-アガロースビーズの吸着による、溶解した細胞からの精製により簡単に精製することが出来る。クローンされた目標遺伝子産物がGST部分から自由になるように、pGEXベクターはトロンビンまたは因子Xaのプロテアーゼ切断部位を含むように設計されている。融合タンパク質を作るもう一つの戦略は、Hisタグシステムを使用することである。

【0104】

昆虫細胞の発現システムでは、スプドプテラ・フルギベルダ細胞中で育つ、（Autographa californica核ポリヘドローシスウイルスAcNPV）が、外来遺伝子を発現するベクトルとして使われる。C3コード配列はウイルスの必須ではない領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）に個々にクローンをつくられることができ、AcNPVプロモーター（例えばポリヘドリンプロモーター）の制御下に置かれることができる。C3タンパク質またはC3様タンパク質（ポリペプチド）をコードしている遺伝子の成功した挿入は、ポリヘドリン遺伝子の不活性化と、非閉塞型組み換えウイルス（すなわちポリヘドリン遺伝子によってコード化されるタンパク性のコートが不足しているウイルス）の生産に終わる。これらの組み換え型ウイルスは、それから、挿入された遺伝子が発現されるスプドプテラ・フルギベルダ細胞に感染させるのに用いられる。

【0105】

哺乳類の宿主細胞において、いくつかのウィルスベースの発現システムを利用することができる。アデノウイルスが発現媒体ベクターとして使われるケースでは、C3の核酸配列は、アデノウイルス転写/翻訳コントロール複合体（例えば遅いプロモーターや三部のリーダー配列）に結縁することができる。このキメラ遺伝子は、その後、試験管内、或いは生体内の組み換えによって、アデノウイルスゲノムに挿入されることができる。ウィルスゲノム（例えば領域E1またはE3）の必須ではない領域への挿入は、感染したホストで生存出来て、C3遺伝子産物を発現することができる組み換え型ウイルスになる。

【0106】

特定の開始シグナルは、挿入された核酸配列の効果的な翻訳のために必要である。これらの信号は、ATG開始コドンと隣接した配列を含む。これらの外生の翻訳制御シグナルと開始コドンは、自然物及び合成のいろいろな起源でありえる。発現の効率は、例えば適

10

20

30

40

50

切な転写エンハンサー因子または転写ターミネータ、その他の包含によって強化されるかもしれない。

【0107】

そのうえ、宿主細胞は、挿入された配列の発現力を調整する、または、特定の、望ましい型の遺伝子産物を修正し、そして、処理するように選択されても良い。タンパク質製品のそのような修正（例えばグリコシル化）と処理（例えば切断）は、タンパク質の機能にとって重要である可能性がある。異なる宿主細胞には、タンパク質と遺伝子産物の翻訳後処理と修正のために特徴のある特定のメカニズムがある。適当な細胞系またはホストシステムは、発現される異種タンパク質の正しい修正と処理を確実にするために選ばれることができる。このためには、遺伝子産物の主要な転写、グリコシル化とリン酸化の適当な処理のための細胞機構を備えている真核生物宿主細胞を使うことができる。

10

【0108】

あるいは、C3タンパク質は、安定してトランスフェクションする哺乳類の細胞系によって生産されることができる。哺乳類の細胞の安定したトランスフェクションにふさわしいいくつかのベクターは、一般者が利用できる；そのような細胞系を造る方法も、一般に公開されている。ある例では、C3タンパク質をコードしているcDNAは、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子を含む発現ベクターでクローニングをつくる。プラスミドの融合と、及び、それによって、C3またはC3様タンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞染色体への統合は、0.01-300 μM（マイクロモル）のメトトレキサートを細胞培養培地（Ausubelら、上記参照）に含むことによって選択される。この優性選択は、大部分の細胞タイプで達成される。組み換えタンパク質発現は、DHFRにより仲介されるトランスフェクションされた遺伝子の増幅によって増やされる可能性がある。遺伝子増幅を支えている細胞系を選ぶ方法は、当業者に知られている；そのような方法は、徐々に増加している濃度のメトトレキサートを含んだ、培地中の、一般に拡張された培養液を含む。この目的のために一般的に用いられるDHFRを含む発現ベクターは、pCVSEI-I-DHFRとpAdd26SVA（A）を含む。上述の宿主細胞または、望ましくは、DHFRが不足するCHO細胞系（例えばCHO DHFR細胞、ATCCアクセッション番号CRL 9096）の全ては、安定してトランスフェクションする細胞系またはDHFRによって仲介される遺伝子増幅のDHFRに好まれる宿主細胞の一つである。

20

【0109】

いくつかの他の選択システムが以下に限定されることなく使われる可能性があり、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ、ヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼとアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含み、そして、それぞれ、tk、hprtまたはprt細胞で使用されることができる。そのうえ、ミコフェノール酸の耐性を与えるgpt；アミノグリコシド系G-418に対する抵抗性を与えるneo；そして、ハイグロマイシンに対する耐性を与えるhygroが使われてもよい。

30

【0110】

あるいは、どんな融合タンパク質でも、発現されている融合タンパク質に特有の抗体を利用することによって、すぐに精製することができる。例えばJanknechtら（（1981）Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88, 8972,）に記載の系はヒト細胞系で発現される非変性融合タンパク質の迅速な精製を可能にする。この系では、遺伝子のオープン・リーディング・フレームが6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに並進的に融合するように、注目する遺伝子をワクシニア組み換えプラスミドにサブクローニングする。組み換え型ワクシニアウイルスに感染している細胞からの抽出物はNi2+ニトリロ酢酸アガロースカラムにロードされ、そして、ヒスチジンタグを付けたタンパク質はイミダゾールを含むバッファで選択的に溶出される。

40

【0111】

あるいは、C3、C3様、タンパク質又はそれらの部分（断片）は免疫グロブリンFc領域に融合することができる。そのような融合タンパク質は、タンパク質Aカラムを使って、すぐに精製されることができる。

50

## 【0112】

本発明の組成物の相対的な効果的 Rh o アンタゴニスト活性を決定するために、組織培養生物検定システムを使うことができる。例えば、およそ 0.01 からおよそ 10 g / ml (1 ミリグラムに対するマイクログラム) の範囲の濃度の配列番号 8 のような融合タンパク質が有用であり、細胞に対し毒性が無い。

## 【0113】

化合物は、例えば以下の手法のうちの 1 つにより、Rh o アンタゴニストであることが確かめられる：

a) 細胞は上記のような成長抑制基質の上で培養されて、候補の Rh o アンタゴニストにさらされる；

b) ステップ a の細胞を均質化し、そして、プルダウン分析評価を実行する。この分析評価は、GST - Rh o t e k t i n が GTP 結合 Rh o と結合する能力に基づく。領域 (GST - RBD) と結合している、組み換え型 GST - Rh o t e k t i n または GST rh o t e k t i n は、a) のように培養され細胞から作られた細胞均質液に加えられる。抑制基質が Rh o を活性化すること、及び、この活性化された Rh o GST - RBD によりプルダウンされることが観察される。上の a または b に記載されたように細胞が培養されるとき、Rh o アンタゴニストは Rh o の活性化を妨害し、したがって、効果的 Rh o アンタゴニストは Rh o の検出を妨害する。

c) このプルダウン分析評価のための交互の方法は、GTPase 活性化タンパク質で使われ、プルダウンの分析評価のおとりとしての Rh o - GAP は活性化される。

## 【0114】

化合物が Rh o アンタゴニストであることを確認するもう一つの方法は、以下の通りである：生細胞に添加されるとき、効果領域の ADP リボシル化により Rh o を不活性化するアンタゴニストは Rh o の分子量変動を見つけることによって特定されることがある。細胞を均質にすることにより Rh o アンタゴニストで細胞の処理した後、そして、 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって細胞均質液中のタンパク質を分離することにより、分子量シフトを検出することが出来る。タンパク質はニトロセルロース紙に転写され、そして、Rh o はウエスタンプロット法技術によって Rh o に特有の抗体で検出できる。

## 【0115】

本発明と共に益して用いられる可能性のある他の輸送薬剤が当業者に知られている。例えば、本発明のポリペプチドは HIV Tat タンパク質のサブドメイン又はアンテナペディアのホメオドメインのような輸送薬剤を含む可能性がある。輸送配列は、塩基性アミノ酸（例えばポリアルギニン配列）からなる領域を含む可能性がある。輸送薬剤のポリペプチドは複数回繰り返される可能性がある。輸送薬剤は、アミノ末端領域に、または、カルボキシ末端領域に、または、複合体の両方の領域に位置する可能性がある。輸送薬剤の重複は、細胞によって接合体の取り込みに影響を及ぼす（例えば、増加する）可能性がある。

## 【0116】

一つの態様において、輸送薬剤は、レセプターから独立したメカニズムにより活性化した薬剤の取り込みを容易にする。別の態様では、輸送配列は配列番号 45 - 51 を含むが、これらに限られない。本発明に包含されている他の輸送薬剤は、アンテナペディアタンパク質ホメオドメインの第 3 ヘリックス (Penetratin (商標) ; TAT 配列番号 52) 、シラプロリン複合体、ガンマ - アミノ - L - プロリンオリゴマー、ポリアルギニン（配列番号 54）、Transportan (SEQ ID NOS: 55 - 56) 、Pep - 1 (配列番号 57) 、S413 - PV (配列番号 58) 、VP22 タンパク質、MAO (Model sunthi c タンパク質；配列番号 59) 、SynB1 (配列番号 60) 、SynB3 (配列番号 61) 、SynB5 (配列番号 62) 、b - FGF 、FGF - 4 シグナル配列 (配列番号 63) 、pVEC (配列番号 64) 、SAP シート・アロー・ペプチド、hCT (9 - 32) - br ヒトカルシトニン、bPrP (プリオンタンパク質 N 末端、配列番号 65) ；BagP ペプチド、マイコバクテリウム細胞・エントリー・タンパク質 (Mce1A) 、合成ペプチド YTA2 及び YTA4 、配列番号 66 - 70) 。

10

20

30

40

50

番号 6 6 、 C 1 0 5 Y ( 1 - アンチトリプシンのアミノ酸 3 5 9 - 3 7 4 と一致する ; 配列番号 6 7 ) 、 T P 1 0 、 d y n o r o p h i n s A 及び B ; そして、 D i a t o s ペプチドベクター ( V e c t o c e l l ( 登録商標 ) ; 配列番号 6 8 - 7 7 ) を含むが、これに限定されるものではない。

【 0 1 1 7 】

他の文献で試験された他の輸送配列は（すなわち、リポーター配列を用いることによりそれらは働くことを示す）が知られている。1つの輸送ペプチドである12の構造単位 A A V L L P V L L A A P ( 配列番号 3 ) 、はプロリンに富んでいる。それは G S T - M T S 融合タンパク質として作られて、カポジ F G F 信号配列の h 領域に由来する。もう一つの例は、精子フェルチニンアルファペプチド ( H P I Q I A A F L A R I P P I S S I G T C I L K ) である ( 配列番号 4 ) 。しかし、プロリン ( P r o ) 残基のアルファヘリックス破壊傾向が一般的な規則でない点に注意されなければならず、精子フェルチニンアルファの推定融合ペプチドから、アルファはリポソームの存在下で高いアルファヘリックスの含有量を示す。しかし、 P r o - P r o 配列は、フェルチニンの効果的な融合特性のために必要である。テストされた配列番号 8 の融合タンパク質は、効果的輸送ペプチドを作るために2つのプロリンを持つ必要条件に適合する。したがって、効果的輸送の働きをするヘリックス破壊傾向があるプロリンの豊富な配列及びランダムな配列は C 3 に融和するならば効果的であるだろう。

10

【 0 1 1 8 】

図 1 に関し、配列番号 4 3 融合タンパク質の変異体の意図的な不活性化、例えば配列番号 6 ( ヌクレオチド配列は、配列番号 5 と一致する ) の不活性化は、すなわち、 N G - 1 0 8 細胞で生物検定によって分析するのと同様、図示される。本発明 ( 配列番号 4 3 ) の活性融合タンパク質とともに培養される N G - 1 0 8 細胞は、神経突起の成長促進を示し、その神経突起の成長は配列番号 4 3 の存在の結果である。しかし、故意的に不活性な変異体配列番号 6 で扱われる細胞の神経突起成長は、添加されたタンパク質で処理されていないコントロール細胞とどうようである。対照群への類似性は、故意に不活性化した変異体タンパク質配列番号 6 が神経突起成長の刺激に関して不活性なことを証明する。

20

【 0 1 1 9 】

本発明 ( 配列番号 4 3 ) の融合タンパク質の注射は、一回の注射の後に視神経の圧迫によって誘導される網膜神経節細胞 ( R G C s ) の細胞死を防ぐことができる ( 実質的に観察される率を減少させる ) 。軸索切断または視神経の軸索切断の後、賦形材 ( リン酸塩で緩衝された食塩水 ) の注入により細胞は死ぬ。配列番号 6 ( 配列番号 4 3 を故意に不活性化した変異体 ) が目に注射された時は、それは R G C s の細胞死を防ぐことができない。配列番号 4 3 の一回の注射は細胞死を防ぎ、そして、生存している細胞の数はコントロールのそれ ( 非軸索切断された網膜 ) と同様である。結果は、本発明の融合タンパク質としての配列番号 4 3 が網膜ニューロンの細胞死を防ぐことができるることを証明している ; 配列番号 4 3 の神経保護的な活性は、 C 3 融合タンパク質の酵素の活性が保持されることを必要とする。

30

【 0 1 2 0 】

黄斑変性症のための治療が必要な患者への、本発明の融合タンパク質を有する医薬組成物の投与は、哺乳類宿主の片目の中の、網膜下の新血管形成に伴う血管形成、黄斑下部の脈絡膜新血管形成、黄斑の近位にある網膜下の脈絡膜の新生血管組織の増殖を実質的に減らす、或いは防ぐことができる。一つの態様では、本発明は黄斑変性症の治療方法に関するものである。他の態様では、本発明の組成物は、網膜下の新血管形成の率と黄斑変性症に関連した新生血管組織の激増を妨げるか、大幅に減らすことに役立つ。この方法は、目で黄斑変性症の更なる開始または進行を防ぐ予防治療として有効でありえる。他の態様では、この方法は斑点でドルーセンの堆積と細胞死を防ぐ予防治療として有効でありえる。他の態様では、細胞死を規制する細胞内の機構に働きかけることによって、この方法は患者の眼中の光受容細胞の細胞死を防ぐことも出来る ( これらの光受容細胞は、ここで光受容器と参照される ) 。この方法は、黄斑変性症の視野を不明瞭にする徴候を示さない目で、

40

50

特に他方の目が黄斑変性症の視野を不明瞭にする徴候を示す患者の目において、黄斑変性症の開始または進行を防ぐために役立つこともありえる。

【0121】

本発明の他の態様では、黄斑変性症の治療の方法は、本発明のポリペプチドを治療的に効果的な量で目に近位の組織へ注射または移植することによるものを含む。そのうえ、本発明は注射可能な投与にふさわしい無菌の医薬組成物の投与、および、注射可能な使用（例えば、無菌で、滅菌可能で、血液の等張液）に適した、本発明のポリペプチド及びキャリアを含み、そのようなポリペプチドまたは医薬組成物は平均的な患者の目の、網膜下の新血管形成、黄斑の基礎をなす脈絡膜の新血管形成、及び、網膜下の脈絡膜に近位から黄斑への新血管組織の増殖、からなるグループと関連する血管形成の開始を防いだり、遅らせることができ、統計学的に関連した人口の平均的な患者が目の視力損失の始まりを遅らせる。

視力喪失の開始の遅れは前記アンタゴニストに起因することが出来、前記量のポリペプチドを投与しない、統計的に関連する患者の中の或る平均的な患者において、開始の平均的な遅れは視力損失の開始の平均的な時間に対して測定され、平均的な視力喪失の開始の遅れは少なくとも1ヶ月であることを含み、より好ましくは少なくとも6ヶ月であることを含み、より好ましくは6ヶ月より長期であることを含む。

【0122】

配列番号8（対応するヌクレオチド配列は、配列番号7と一致する）または配列番号10のような本発明の融合タンパク質を含む医薬組成物による血管形成の抑制は、*in vitro*のシステムで評価することができ、それは腫瘍の成長における新血管形成の研究に対し、例えば、内皮細胞を基底膜の抽出物の存在下で培養することを含む系で血管形成、及び哺乳類の眼中の新血管形成及び新血管細胞の増殖のモデルとして、有用でもある。実験的な状況の下で、血管形成または血管の毛細管形成に付随する毛細管様構造または毛細管は、顕微鏡下で見ることができる。配列番号8又は配列番号10と言った本発明の融合タンパク質による、血管形成の進行、管状毛細血管ネットワークの形成、又は腫瘍関連の血管形成の過程や進行の混乱の抑制効果は、マトリゲル（商標）分析評価において管状構造の消失に続くことによって観察される。

【0123】

マトリゲル（商標）マトリックス（BDバイオサイエンス社）はEngelbreth-Holm-Swarm（EHS）マウス肉腫から抽出され、可溶化された基底膜調合剤であり、そして、細胞外基質（ECM）タンパク質が豊富な腫瘍である。その主要構成要素は、ラミニン、コラーゲンIV、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとエンタクチンである。室温でBDマトリゲル（商標）マトリックスは重合化し、哺乳類の細胞基底膜に擬態することができる生物学的活性基材を生産し、ここで、試験管内で、細胞は生体内状況に類似した方法でふるまうことができる。マトリゲル（商標）Matrixは、生理的に関連した環境を細胞形態学、生化学機能、移動または侵入と遺伝子発現の研究に提供することができる。

【0124】

マトリゲル分析法では、マトリゲル（およそ12.5mg/mL）は約4で解凍される。マトリックス（およそ50マイクロリットル（μL））は96穴プレートの各穴に加えられる、そして、約37で約10分間、固まらせられる。固体のマトリゲルを含んでいるウェルは1ウェルにつきおよそ15,000セルの濃度でヒト臍静脈内皮細胞（HUV-EC細胞）と共に約30分間インキュベートした。細胞が接着した時は、培養液を除去して、配列番号8のような本発明の融合タンパク質を補われた新しい培養液で取り替えられ、そして、およそ約6~8時間、37でインキュベートした。コントロールのウェルは、培養液のみでインキュベートした。成長や、管の形成は例えば、およそ50Xの倍率による顕微鏡検査によって視覚化することにより分析された。血管形成から派生した毛管のネットワークの相対的な平均長さ（Yx）は、本発明の融合タンパク質（x）を含む医薬組成物の評価において観察され、ノーザン・イクリップス・ソフトウェアを使用して定量化

することができる。

【0125】

配列番号10（配列番号43のトランケートバリアント）の構造

配列番号10は、配列番号9の対応するヌクレオチド配列とともに、配列番号43（図2）の派生物である。配列番号43はGST配列が不足した配列番号8の派生物である。

【0126】

C3エクソエンザイムは、他の細菌の毒素に特有の特定の受容体結合と移動領域を占有しない。それゆえに、細胞取り込みは遅くて非特性であり、主に飲細胞運動によって促進される。配列番号44は、C3細胞外酵素をレセプターから独立した形式で原形質膜の交差するのを容易にするプロリンの豊富な輸送配列に結合することによって得られる融合タンパク質である。この設計された融合タンパク質は、神経突起成長分析評価によってin vitroでテストされるとき、C3より100倍以上効率的であることが示される。

10

【0127】

C3調合液の純度と収率を向上させるため、配列番号44はGST融合タンパク質pGE-X-4Tのベクトルから取り除かれて、pETベクターに移される。結果として生じる融合タンパク質、配列番号43は、標準的なクロマトグラフィステップを使用した高速タンパク質液体クロマトグラフィ（FPLC）によって精製される。精製されたタンパク質は95%以上の純度で、エンドトキシン（2単位/mg未満）が少なく、-70で2年以上安定であり、配列番号44と比較して、高いグリコヒドライゼ活性と神経細胞成長活性を示す。

20

【0128】

更なるバリアントを製造しているcGMPのための最終産物を安定させるため、配列番号10が造られる。15アミノ酸配列は、C3シグナル配列の8残基および、痕跡的なマルチプルクローニングサイトに由来する7つのアミノ酸を含み、配列番号4のN末端から除去される。結果として生じる配列番号10のN末端は、C.ボツリヌス菌の野生シグナル配列内在性切断の後で、WT酵素のそれとほとんど同一である。WT C3細胞外酵素（Swiss-ProtエントリーP15879）のN-終点の配列の配列番号10及び配列番号43は、イタリック体で示されるアミノ酸残基はWT C3細胞外酵素シグナルペプチドの内在性切断を表し、太字で表されたものは設計されたものであることが図2Aで示される。更に、バリアントの略図は、図2Bに示される。

30

【0129】

配列番号10は、その先行する配列番号44より安定である。配列番号44は研究室スケールで生産されたが、4の保存で数週間後ですら劣化した形跡はないが、大スケールで生産された配列番号44では同様ではない。サイズ除外HPLCまたは非還元SDS-PAGEは、配列番号44が自発的に、還元剤のジチオスレイトール（図2C）に敏感だった二量体を形成したことを示した。とりわけ、プレキャスト12%の勾配ゲル（非還元）は配列番号44の二量体化を示しており：レーン1=Bio-RadTM低分子量タンパク質基準、レーン2=-80の保存から取り出した研究室-スケールの配列番号44、レーン3=4で5日間保存した研究室スケールの配列番号44、レーン4=4で0.5mMのDTTの存在下5日間保存した研究室スケールの配列番号44は図2Cに示される。

40

【0130】

これらのデータは、分子間ジスルフィド結合がN末端で一つのシステイン残基を通して起こっていることを示唆する。二量体化が配列番号44の機能的な活性に影響するとは見られていないので、その除去は、還元剤の必要性を取り除くことにより、大規模な精製プロセスをかなり容易にする。これに加えて、高密度バイオリアクター発酵からの配列番号44の精製に引き続き、SDS-PAGE上で第2の主要なバンドが存在し、それは細菌の溶解物（図2D）のN末端切断によるものであり、大規模なスペクトル分析によって確かめられる。より詳しくは、プレキャスト12%勾配ゲル（減少方向へ）で、配列番号10の強化された安定性が見られ、そこで、レーン1=Bio-RadTM低分子量タンパ

50

ク質基準、レーン 2 = - 8 0 で保存されていた研究室スケール配列番号 4 4、レーン 3 = 4 で 8 週間保存されていた研究室スケールの配列番号 4 4、レーン 4 = 4 で 1 0 週間貯蔵されたバイオリアクター生産の配列番号 4 4、レーン 5 = - 8 0 の貯蔵から取り出されたバイオリアクター生産された配列番号 1 0、および、レーン 6 = 4 で 2 週間貯蔵されていたバイオリアクター生産された配列番号 1 0 (図 2 D)。

このように、N 末端をトランケートしたバリアントの配列番号 1 0 は、2 - 8 の保存により変性や二量体化を示さないように作られた。長期テストにより、18 ヶ月以上の - 7 0 および 2 - 8 の保存に於いてすらこのバリアントは完全な活性及び安定性を保持することが立証された (データーは示していない)。

精製されたタンパク質は 95 % 以上の純度で、エンドトキシンが少ない (2 単位 / mg 以下) (図 2 E)。プレキャスト 12 % 勾配ゲル (減少) は代表的なバリアント (配列番号 4 4) の精製を図 2 E で示す。ここでレーン 1 = Bio - Rad TM 10w - 範囲分子量タンパク質基準、レーン 2 = 細胞溶解物原液、レーン 3 = ポリ - ミニ P 処理後の上澄み、レーン 4 = 硫酸アンモニウム処理した再懸濁ペレット、レーン 5 = PD - 10 脱塩カラム処理物、レーン 6 = SP - XL 処理物、レーン 7 = SP - XL 溶出液ピーク、レーン 8 = Superdex - 75 溶出液ピーク、レーン 9 = Hi Prep 脱塩溶出液、レーン 10 = Q - セファロース溶出液、およびレーン 11 = 最終濃縮済み貯蔵物。

大スケールで製造された配列番号 1 0 は、その全物質、配列番号 4 3 及び 4 4 と機能的に交換可能であり、同等又は良い酵素活性及び生物活性を有するが、エンドトキシンのような少量の不純物を有する。

#### 【 0 1 3 1 】

##### トランケート配列番号 1 0 バリアントの構造

配列番号 1 0 のバリアントは輸送ペプチド配列を含まず、N 末端又は C 末端の連続するアミノ酸残基の群を削除することにより派生させた。バリアントは図 3 に図示した。バリアントは標準分子生物学的手法を用いて、配列番号 1 0 をコードする cDNA の先端を N 末端領域か C 末端領域のどちらかを切り取り、輸送配列をそのままにして、部位特異的な変異により作りだした。ここで開示される、トランケートバリアントの活性はここで説明される手法のどれかを用いることにより変化し、例えば、例 9 ~ 13 及び 18 に記載されている。理論に縛られないことを望むが、トランケートバリアントは細胞により容易に埋没するであろうと信じられている。本発明の一態様では、したがって、生物学的に活性のある配列番号 1 0 のより短いトランケート断片は必要に応じて投与される。

#### 【 0 1 3 2 】

加えて、配列番号 1 0 バリアントの物理的性質を表 1 に開示した。

#### 【 0 1 3 3 】

10

20

30

【表1】

表1

## トランケート配列番号10バリアントの物理的性質

バリエントの配列番号	アミノ酸配列番号3との配列同一性(%)	推定分子量(kDa) <sup>1</sup>	理論上の減衰係数(280nmにおけるAbs0.1%) <sup>2</sup>	予測pI <sup>1</sup>
10	232	94	25.9	0.72
13	222	90	24.6	0.65
14	212	86	23.6	0.44
15	202	82	22.4	0.34
16	192	78	21.2	0.3
17	182	74	20.2	0.32
18	154	62	17	0.38
19	121	49	13.3	0.38
20	203	82	22.7	0.76
21	214	87	24	0.77
22	224	91	25	0.74

<sup>1</sup> ExPasy ProtParamのウェブサイトより (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/protparam>) ;

<sup>2</sup> 値が得られる前にウェブサイトの新しいProtParamアルゴリズムは変わった。

10

20

30

## 【0134】

欠失ミュータントやバリアントはポリメラーゼ鎖反応やpET9aベクターへのサブクローンにより準備した。QuickChangeキット(ストラテジーン社)を用いた部位特異的突然変異生成により2種の織り後スクレオチドが設計された。ポリメラーゼ鎖反応が適当なバリアントプライマーセット(表2参照)を用いて行われた。サイクルプログラムは以下の通りである: 95 30秒、95 30秒、55 1分、68 10分を18サイクル、及び4 で保持。

## 【0135】

## 【表2】

表2

トランケート配列番号10バリアントのプライマー及び配列情報		D N A配列番号	プライマーの配列番号
バリアントの配列番号	プライマーセット		
10	—	A J 5 8 5 8 - 2	
13	MD 3 - 1 3 F / MD 3 - 1 3 R	MD 1 3 - 2	2 3 - 2 4
14	MD 3 - 2 3 F / MD 3 - 2 3 R	MD 2 3 - 1	2 5 - 2 6
15	MD 3 - 3 3 F / MD 3 - 3 3 R	MD 3 3 - 1	2 7 - 2 8
16	MD 3 - 4 3 F / MD 3 - 4 3 R	MD 4 3 - 3	2 9 - 3 0
17	MD 3 - 5 3 F / MD 3 - 5 3 R	MD 5 3 - 2	3 1 - 3 2
18	MD 3 - 8 1 F / MD 3 - 8 1 R	MD 8 1 - 1	3 3 - 3 4
19	MD 3 - 1 1 4 F / MD 3 - 1 1 4 R	MD 1 1 4 - 1	3 5 - 3 6
20	MD 1 8 3 - 2 1 1 F / MD 1 8 3 - 2 1 1 R	MD 1 8 3 - 1	3 7 - 3 8
21	MD 1 9 4 - 2 1 1 F / MD 1 9 4 - 2 1 1 R	MD 1 9 4 - 1	3 9 - 4 0
22	MD 2 0 4 - 2 1 1 F / MD 2 0 4 - 2 1 1 R	MD 2 0 4 - 1	4 1 - 4 2

## 【0136】

トランケートバリアントのプライマーは、B i o S & Tで合成され、凍結乾燥した粉末で供給された。再懸濁の後、分光学的測定によりプライマー濃度を変えた。突然変異生成反応は上記のプライマーをQ u i k C h a n g eキットにより提供される取扱説明書に従い行った。0.8%アガロースゲル上での反応の分析をもとに、反応が成功したかどうかを解析した。

## 【0137】

製造者の取扱説明書に従い、1  $\mu$  Lのこの生産物を用いて、D p n I消化及びX L - 1 ブルースーパーコンピテント細胞の形質転換を行った。それぞれの形質転換からの3クローンをプラスミドのミニプレップを得るために一晩培養した。トランケート配列番号10バリアントのそれぞれから一つのD N AサンプルをD N A配列解析に送った。配列データはN C B IのB l a s t 2分析ソフトウェアで解析され、M D 4 3 - 1以外は予想されたC 3バリアントコード配列と100%の配列である事が分かった。

## 【0138】

確かめられたそれぞれのD N Aサンプルは、製造業者の取扱説明書に従ったプラスミドD N Aと共に、B L 2 1 ( D E 3 )コンピテントセル(1ショットのB L 2 1 ( D E 3 ) : i n v i t r o g e n社)を形質転換するのに使用した。それぞれのクローンからの3つのコロニーはミニスケール誘導分析のため、30  $\mu$  g / m lカナマイシンを含有する分注されたL B培地に移された。タンパク質ゲルが実行され、クーマシーで染色し、スキャン濃度測定機を用いて定量化した。

## 【0139】

各々のトランケートバリアントのうち、最も良く発現するクローンを大型培養での発現と精製のため接種した。最初に、ブドウ糖を含む0.5 lのL培地のフラスコに研究用細胞

10

20

30

40

50

銀行 ( R C B ) の 2 本のバイアルを接種し、一晩培養した。始動培地は、10倍に薄められ、各々 500 ml の培地を含む 8 本のフラスコに分けられた。フラスコは 37 でインキュベートし、バリアントの発現を増加させるために、1 時間 20 分後にイソプロピルチオ - B - D - ガラクトシド ( IPTG ) を、加えた。更に 4 時間後に細胞を遠心分離により集菌し、必要になるまで、-80 で貯蔵した。集菌した培地のサンプルはトランケート型 SEQ ID NO 10 のために分析される。次に、細胞ペレットを融解し、抽出培養液中で超音波破碎した。SP - セファロース Fast - Flow カラム ( 1 ml ) ( HiTrap SP FF 、ファルマシア社 ) を通し、これらの生抽出物を約 90 % の純度に精製した。得られたタンパク溶液は、限外濾過で集結されて、次に、冷凍の前に 0.2 マイクロメータろ過膜を通した。分割量は、タンパク濃度を決定するために A 280 によって分析されて、- ポリアクリルアミドゲル SDS でサンプルにかけ、クーマシープル - で染色し、スキャンし濃度計測をすることによって、濃度を決定した。生物学的活性は、蛍光ベースの酵素 ( グルコヒドラーゼ ) 分析と細胞ベースの神経突起伸長分析の両方を使用し評価した。

10

20

30

## 【 0140 】

C3 バリアントの生物学的活性は、C3 バリアントの - NAD の加水分解の結果生産される - ADP リボースの生成を測定する、グリコヒドラーゼ活性を用いて決定された。C3 バリアントのグリコヒドラーゼ活性は - NAD + を、選択された波長で 10 倍高い蛍光強度の分子である - ADP - リボースに変換する。- ADP - リボースの蛍光強度は既知の - AMP 濃度の標準蛍光曲線を用いることにより形作られる - ADP の量により測定してきた。- AMP 及び - ADP - リボースの蛍光強度は 305 nm での反応の刺激化及び 410 nm での放出の記録を測定する事により測定される。活性の単位は 37 30 分で作られる ADP リボースのナノモルにより定義される。測定は少なくとも 12 μg の C3 変異タンパク質及び少なくとも 180 分のインキュベート時間まで直線状である。この測定は的確であり、正確であり、再現可能である。この分析は 70 のインキュベーション後の酵素活性の減少を測定するのに有用である事が知られており、上手く設計された安定性検定に用いられる場合、安定性の指標になると考えられている。C3 バリアントの生物活性を測定に用いる事の出来る他の方法は文献に記載されている。( 例えば、Winton et al. , 2002 , J Biol Chem , 277 : 32820 - 32829 を参照 )

30

## 【 0141 】

C3 バリアントの生物活性は NG108 細胞神経突起のバイオアッセイによても測定する事が出来る。このバイオアッセイの手順は NG - 108 細胞を 4 時間、C3 バリアントを含む 1 分割量の緩衝化した溶液と共にインキュベーションする事を含む。同時に他の同一のバイオアッセイを C3 バリアントの替わりに配列番号 10 を用いてポジティブコントロールとして行った。細胞はパラフォルムアルデヒドで固定し、クレシルバイオレットで染色し、各々のウェルの中の、細胞体の長さよりも長い神経突起を持つ細胞の濃度を、顕微鏡下で数を数える事により測定した。表 3 に示した結果は少なくとも 2 回の独立した実験による 3 回の測定をもとにする。

40

## 【 0142 】

## 【表3】

表3

配列番号10のN末端及びC末端トランケートバリアントのεNADグリコヒドライゼ活性及び樹状突起成長活性。

サンプル	G H (活性平均)	樹状突起成長 (コントロールの折りたたみ平均)
配列番号10	2 9	7 0
配列番号13	2 6	7 3
配列番号14	2	3 5
配列番号15	0	0
配列番号16	0	—
配列番号17	2 5	2 2

10

20

30

## 【0143】

これらのデータは実証された最小の機能を持つサイズはN末端トランケート配列番号10で212アミノ酸、そしてC末端トランケート配列番号10で224アミノ酸である事を示す。期待される両端からのアミノ酸の二重欠失はちょうど204アミノ酸残基以上の機能的なバリアントを生産するであろう。本発明に含まれる、二重欠失バリアントの例はSEQ ID No 78及び79のものを含むが、これに限られない。

## 【0144】

## 配列番号10のPEG化したバリアント

配列番号10分子は化学的に修飾され、ポリエチレングリコール部位が生物的な居住的性質を増幅させている(表4)。PEG化とはPEG構造を、他の大きな分子、例えば治療に用いるタンパク質又はポリペプチド(これらはよって“PEG化”と引用される)に共有結合する行為である。当業者には知られているように、種々のタンパク質又はポリペプチド、ポリ(エチレングリコール)が血液により運搬されるタンパク質の清掃率を遅らせる。このことは長期に素養する薬学的效果及び/又は毒性の減少を引き起こすであろうし、しがたって、より長い投与間隔が許容されるであろう。例えば、例9~13及び18で記載したように、ここで開示したPEG化バリアントの活性はここで記載されたあらゆる方法を用いて確かめる事が出来る。

## 【0145】

## 【表4】

表4

## 配列番号10のPEG化したバリアント

バリアント	PEG 付加物	観測された分子量 (kDa)
配列番号10	—	2 7
BA-220	Monomer-2.4 kDa	3 3
BA-225	Monomer-6.3 kDa	3 9
BA-230	Monomer-21 kDa	6 1
BA-231	Dimmer-21 kDa	8 3
BA-235	Monomer-30 kDa	6 4
BA-236	Dimmer-30 kDa	11 2
BA-240	Monomer-40 kDa	8 6

40

50

## 【0146】

mPEG-Butyryl LDを用いた配列番号10のPEG化と精製

予め秤量され、封入された分割量で、商業的に使用可能になっているmPEG-ブチルアルデヒド薬剤(Nectar Therapeutics)を用いて配列番号10のN末端PEG化を実施する事が出来る。標準的な反応は(クエン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5中の)配列番号10を脱気した0.1Mクエン酸ナトリウム-NaOH、pH5.0の0.5M EDTA中で最終濃度3.3mg/mLまで薄める事により開始する。PEG化反応の開始に先立ってmPEG-Butyryl LD薬剤は新鮮なM111iQ水で望ましい濃度まで溶解される。PEG化の程度は反応時間、pH、及び配列番号10に対するmPEG-Butyryl LD薬剤の割合を用いて制御される。例えば、N末端のモノ-PEG化には各々1:1の割合とpH5.5であることが望ましい。同時にジ-PEG化又はマルチ-PEG化はより高い配列番号10に対するmPEG-Butyryl LD薬剤割合を用いて生成される(2.4kDa mPEG-Butyryl LDには130:1; 6.3kDa mPEG-Butyryl LDには20:1; 及び21kDa mPEG-Butyryl LDには2:1)。

10

## 【0147】

mPEG-Butyryl LD溶液の1分取量を、配列番号10溶液に加え、穏やかに混ぜ、各30分の間隔で逆転で37で1時間インキュベートした。1時間後に、そして、2時間後に再び、新鮮な1分取量のPEG化試薬のを補った。反応液は3時間後までインキュベートされ、そしてその後、それらは85Lの1Mのナトリウムシアノボロハイドライド[Na(CN)BH3]の追加により止められ、シップ塩基中間体を減少させ、2級アミン結合を安定させるために室温で一晩インキュベートして放置した。最適環境の下で、配列番号10からPEG化配列番号10へ~25%の転換効率が得られることができた(表5参照)。

20

## 【表5】

表5

## 種々のPEGylated BA-210バリアントの収率

サンプル	量 (mL)	濃度 (mg/mL)	収率 (mg)	配列番号10の 初期割合(%)
BA-230	0.82	5.80	4.76	24
BA-231	0.08	4.54	0.36	2
BA-235	0.51	8.22	4.19	21
BA-236	0.16	3.55	0.57	3
BA-240	0.72	5.46	3.89	19

30

## 【0148】

PEG化された配列番号10を精製するのにHiTrap SP Fast-Flow 1ml(HiTrap SP FF、ファルマシア社)の陽イオン交換カラムを用いた。一方で、反応していない、非PEG化配列番号10は、樹脂と強固に結合する。PEG化された配列番号10は(結合したPEG部分の数に依存して)は、樹脂と強く結合しない。結合緩衝液は、0.05MのHEPES、0.075MのNaCl、0.5mMのEDTA、pH7.5から成る。溶出は、0-0.16M NaClの線形的勾配を用い、NaClの段階的な追加によって実行された。種々のPEG化された形態を含んでいるFPLC分画は、プールされて、Amicon YM-10を用いて濃縮され、それから、5mMのクエン酸ナトリウムpH6.5に対して(Slide-A-Lyser 10kDa 1ml取量の透析カセットを使用して透析した。クーマシーで染色したSDS-PAGEゲル類の分析により、3回の精製全てにおいて、精製された濃縮サンプルのいくつかがまだ少量の反応していない配列番号10を含むことが分かった。したがって、濃縮したサンプルは、HiTrap SP FF 1mlカラムを用いてFPLCによって再精製さ

40

50

れた。6 kDa のサンプルが 2 つのよく切り離されたピーク ( 図 5 A と図 B ) を示し、2 kDa の PEGylated サンプルの reduction からの溶出プロファイルは半分解されたピークを示した。3 つの精製物からのフラクションは NUPAGE ゲル上で分析され、純粋な断片はプールされた。

#### 【 0149 】

本発明の融合タンパク質を有する医薬組成物の抗転移特性

本発明の他の態様では、例えば注射や局所的投与、被覆による方法やここに記載する他の方法で、哺乳類の腫瘍の近位の細胞または最初の腫瘍に、治療の必要性に対応して、融合タンパク質を含む医薬組成物を投与することが出来、そして、哺乳類の転移性腫瘍の遊走を抑制することが出来、哺乳類の最初の腫瘍の部位に起源を持つ腫瘍細胞に対し、最初の腫瘍が残る組織に機能的に関連し近位にある哺乳類の健康的あるいは正常な組織の部位に、投与することが出来る。

例えば、本発明の融合タンパク質を含む医薬組成物は、哺乳類の腎臓に近位の組織に投与するか、あるいは肝臓ガンを含む肝臓組織に投与することが出来、転移性の肝臓ガン細胞が肝臓の腫瘍から、第一の腫瘍が残る同じ肝臓の健康な組織に遊走するのを防ぐことが出来る。

#### 【 0150 】

他の態様では、本発明の融合タンパク質を含む医薬組成物を投与することが出来、例えば注射で、塗布によりまたはここに記載する他の手法で、治療の必要のある哺乳類の最初の腫瘍の近くまたは腫瘍を含む組織に、投与することが出来、哺乳類の転移性腫瘍の遊走を抑制することが出来、哺乳類の最初の腫瘍の部位に起源を持つ腫瘍細胞に対し、最初の腫瘍が残る組織に機能的に切り離されたまたは遠位にある哺乳類の健康的あるいは正常な組織の部位に、投与することが出来る。

例えば、本発明の融合タンパク質を含む医薬組成物は、脳腫瘍を含む脳の組織に投与することができて、転移性脳腫瘍細胞が、例えば肝臓、脾臓または肺組織のような体のどこかほかの健康な組織に遊走することを防ぐことが出来る。

#### 【 0151 】

他の態様では、治療が必要な患者に、本発明の融合タンパク質を含む医薬組成物の投与の後、悪性腫瘍細胞の転移性の遊走は、防がれるか、抑制されて、実質的に二次腫瘍の形成を防がれ、患者の悪性ガンの蔓延を大幅に減じるあるいは防ぐことが出来る。

#### 【 0152 】

配列番号 43 のような本発明の融合タンパク質が細胞運動性を減らすことができる証明抗転移の薬剤としての本発明の融合タンパク質 ( 例えば配列番号 44 ) を含む医薬組成物の治療的な効果は、示される試験管内の二次元の細胞侵入分析評価によって、例えば量的に立証される。そのような分析法では、悪性細胞の転移の遊走能力の抑制は、購入されたボイデンチャンバーを用いることにより測られることが出来る。ボイデンチャンバーは 2 つのコンパートメントを持ち、上下のコンパートメントが膜によって切り離されている。細胞遊走の範囲は、上方のコンパートメントの中の細胞の総数の表面被覆により測定され、下のコンパートメントに遊走する細胞のその総数の分画を数える。成長因子は、細胞遊走を強化するために、下のコンパートメントに加えることができる。このモデルは、哺乳類の生体内ガン細胞移動モデルとして有効である。

哺乳類の血液と等張である無菌のリン酸緩衝食塩水中の本発明の融合タンパク質 ( 例えば配列番号 43 ) を含む医薬組成物の腫瘍細胞の遊走を妨げる能力を試すために、配列番号 43 を含む組成物は異なる濃度の配列番号 43 で上のコンパートメントに加えられる。

融合タンパク質組成物の存在下で、下のコンパートメントに遊走する細胞の総数の分画は、数えられて、融合タンパク質がゼロ濃度である対象群と比較される。対照群において移動するガン細胞の数は本発明の組成物で治療されていないガン患者の遊走のモデルとなる。本発明の組成物の一画分の存在下、遊走するガン細胞の数は、本発明の組成物の一分取量で処理されたガン患者のモデルとなる。

後者と対照実験の遊走細胞の数の違いは、パーセントで表されることができて、100%

10

20

30

40

50

(すなわち転移細胞の移動の完全な抑制)から5%まで、望ましくは100%からおよそ50%まで、より望ましくは約100%からおよそ75%まで、そして、最も望ましくは、およそ100%からおよそ90%にわたることができる。最初のコントロール賦形剤が最初のコントロール賦形剤と同じ可能性のある第2のコントロール賦形剤と比較されるとき、0%の量が観察されることができる。このパーセントの計算は、式 = { (対照群中の細胞遊走の数 - 融合タンパク質の存在下遊走する細胞の数) ÷ (対照群中の細胞遊走の数) } × 100%を解くことによってされる。

#### 【0153】

抗転移薬剤としての本発明の融合タンパク質(例えば配列番号44)を含む医薬組成物の治療的な効果は、少なくとも質的に示されることができ、一つの態様では、試験管内の三次元細胞侵入分析評価によることができる。

そのような分析法では、悪性細胞の転移性遊走能力の抑制は、融合タンパク質を含まないキャリア賦形剤を対照群のキャリア賦形剤として処理したマトリゲル(商標)マトリックスを通して遊走する悪性細胞の能力と比較した、キャリア賦形剤に本発明の融合タンパク質を含んだ本発明の薬学的に許容される剤形で細胞を治療した後、マトリゲル(商標)マトリックスを通して遊走した悪性細胞の相対的な能力、における変化により測定出来る。一つの態様では、本発明の融合タンパク質は、細胞の遊走率の縮小としての抑制変化を生じるか、または、時間的に離れた細胞の遊走の縮小として、組織マトリックスモデル中の転移性腫瘍細胞の遊走の抑制をすることが出来る。

#### 【0154】

モデルマトリックスを遊走する悪性西郷の距離の相対的变化は、融合タンパク質+賦形剤の存在下での前記細胞の遊走の距離と、融合タンパク質が存在しない条件で対照群賦形剤の存在下での前記細胞の遊走の距離の違いに等しい。

先記相対的变化はパーセントで表されることができ、およそ100%(転移細胞の遊走の完全な抑制)からおよそ5%の範囲にわたることができ、望ましくは100%からおよそ50%まで、より望ましくは、およそ100%からおよそ75%まで、最も望ましくは、100%からおよそ90%までの範囲である。0%の量は、最初の対照群賦形剤が最初の対照群賦形剤と同じ可能性のある第2の対照群賦形剤と比較されるとき観察されることがある。

#### 【0155】

1つの態様では、互いにアミノ酸配列において異なる2つの融合タンパク質AとBの有効性の比較と、例えばそれらおののの、配列により強化される細胞膜細胞膜貫通のような、はA及びBに起因する腫瘍細胞の抑制や遊走の割合の異なった観察結果を提供するかもしれない。抑制の相対的な違い(Aによる100%に対するBによる80%のような吸収率、またはAはBより良いと言ったような質的な違い)は腫瘍タイプは腫瘍タイプで同じことであるかもしれないし、腫瘍タイプと腫瘍タイプによって変わるかもしれない。

#### 【0156】

一つの態様では、本発明の融合タンパク質は、少なくとも1種類の腫瘍細胞の転移の遊走を実質的に(100%)抑制することができる。

#### 【0157】

他の態様では、この発明の融合タンパク質は、少なくとも2種類の腫瘍細胞の転移の移動を大幅に抑制することができる(100%)。

#### 【0158】

一つの有用な分析評価は、人工基底膜(マトリゲル(商標))中を遊走する浸潤ガン細胞において観察された能力に基づく。この分析法では、異なるガン細胞タイプの能力の変化、おのののは本発明の組成物とともに治療しない場合のマトリゲル(商標)中を遊走する異なった能力、および、異なった転移性浸潤は、本発明の融合タンパク質を0.1g/m<sup>2</sup>から100g/m<sup>2</sup>の範囲の濃度または投与量に露出されることにより評価される。好みの濃度範囲は、組織1立方センチメートル(cc)当たり約0.0001マイクログラムの融合タンパク質から、組織1立方センチメートルあたり約100マイクログラムで

10

20

30

40

50

ある。

【 0 1 5 9 】

マトリゲル（商標）マトリックス（BDバイオサイエンス社）はECMタンパク質が豊富な腫瘍であるEHSマウス肉腫から抽出された可溶化された基底膜調合剤である。その主要構成要素は、ラミニン、コラーゲンIV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン及びエンタクチンである。室温で、（哺乳類の細胞基底膜に擬態することができる生物学上活性基材材を生産するBDマトリゲル（商標）マトリックスは重合し、生物学的に活性のあるマトリックス物質を生産し、それは哺乳類の細胞基底膜を模倣することができる。マトリゲル（商標）マトリックスは、生理的に関連した環境を細胞形態学、生化学機能、遊走または侵入及び遺伝子発現などの研究に提供することができる。

10

【 0 1 6 0 】

本発明（例えば配列番号43）の融合タンパク質が、悪性細胞の表現型の複数の側面に影響を及ぼす事が出来るという挙動は、細胞を増殖、成長させることに強調する、トリチウム化されたチミジン編入をモニターすることによって示すことができ、そこで、媒体が細胞に持つていかかる、細胞培養培地に加えられたトリチウム化したチミジンは細胞に取り込まれ、各々の細胞がDNAを合成するのに使われる、チミジン三リン酸塩プールの一部となる。

20

トリチウム化チミジンは、細胞の各々で、DNA高分子に共有結合して取り込まれる。成長していない細胞、または、アポトーシスまたはネクローシスにより細胞死した細胞では、トリチウム化チミジンは細胞に取り込まれないか、又は、細胞溶解を通して細胞媒体に放出されることもない。

トリチウム化チミジン編入が、細胞成長、細胞分裂、細胞停止と細胞死に関する配列番号43のような本発明の融合タンパク質の影響の全体的な尺度として使われることができる。配列番号43が<sup>3</sup>Hチミジンの減少を誘導する細胞系は、ヒト子宮体がん細胞系HEC-1B、ヒト結腸直腸ガン細胞系CaCO-2、ヒト黒色腫ガン細胞系SK-MEL-2、及びCNSガン細胞系A-172を含む。

30

【 0 1 6 1 】

表6のデータは、本発明（配列番号43）の融合タンパク質を含む組成物の投薬量の変化の影響を例示し、8つのヒトガン細胞系（HEC-1B、CaCO-2、SK-MEL-1、HT1080、MCF7、SW480、293S及びA172）にトリチウム化チミジンを編入した3つのヒトガン細胞の代表例を施す。配列番号43の投与量は、1ミリリットルにつきおよそ1マイクログラムから、1ミリリットルにつきおよそ10マイクログラム、1ミリリットルにつきおよそ50マイクログラム（ $\mu$ g/mL）50倍で変動する。

【 0 1 6 2 】

トリチウム化されたチミジンの編入によって測定された融合タンパク質（BA07）の投与に関するヒト腫瘍細胞系の反応データ。

## 【表6】

表6

トリチウム化されたチミジンの組み込みによって測定された融合タンパク質 (B A 0 7) の投与に関するヒト腫瘍細胞系の反応データ。

ヒトガン細胞系	1ミリリットルに対する配列番号43の量(マイクログラム)		
	50	10	1
賦形材のみが存在するものをコントロールとし比較した、融合タンパク質の存在下での成長割合(%)			10
HEC 1 B	10	13	30
Caco-2	21	17	30
SK-MEL-1	34	30	33

## 【0163】

細胞系が示すこれらのヒト腫瘍が融合タンパク質の存在下で細胞増殖を減らしたことが予想外に観察される。表6は、100%の対照群の値と比較した、成長のパーセントを示す。

## 【0164】

腫瘍細胞系は、トリチウム化されたチミジン編入に関して3つの別々のグループに分けられることができる。配列番号43を含む本発明の組成物はHEC 1 B細胞系においてはつきりした影響を示し、それは子宮内膜癌細胞系であり、1 μg / mL未満の50%の抑制集中(ICC50)に関連した増殖の抑制である。抑制に加えて、配列番号43のより高い濃度で抑制を増やす投与量-反応の影響がある。

## 【0165】

表6で示されるように、Caco-2とSK-MEL-1細胞系は、各々の細胞系の細胞にトリチウム化チミジン編入の低いレベルで明示されるように、融合タンパク質は細胞増殖に対する抑制的な影響を示す。

## 【0166】

方法の例として、本発明の医薬組成物は、配列番号10(30mg / mLの貯蔵液または希釈溶液)を、例えはフィブリソ接着剤またはコラーゲンゲルのような組織接着剤である、生体内で治療的に許容できる基材を形成することができる流動可能なキャリア成分に混ぜることによって準備することができる。

## 【0167】

1つの態様では、本発明の医薬組成物は、配列番号10(30mg / mLの貯蔵液または希釈液)とキットの4つの構成要素を混ぜることによって準備することができる：

Tisseel(フィブリソシーラント)による

凍結乾燥されたトロンビン；

トロンビンを再結合する1mLのCaCl<sub>2</sub>再結合緩衝溶液；

凍結乾燥されたフィブリノゲン；そして、

フィブリノゲンを再構成する1mLの緩衝液。

## 【0168】

フィブリソシーラントは、フィブリノゲン濃縮物、塩化カルシウム及びトロンビンの3つの基本的な構成要素を有している。他の構成要素を、ゲル構造の特性に影響を及ぼすために加えてよい。

加えられた組成物は、溶解性組成物からフィブリソゲルが形成されるのに要する時間、形成されるタンパク質ネットワークのサイズとゲルの強度を調整するのに用いることが出来ても良く、そして、プロテアーゼ阻害剤は体に施された後、ジェルの除去を遅くする。

いくつかの異なる商業的な調合剤が、キットとして使われる。これらの限定されない例は

10

20

30

40

50

、Tissucool / Tisseel (Immuno社、ウィーン、(現在バクスターによって上市されている))、Berioplast P (ヘキスト、西ドイツ) 及びHemaseel (Haemacure社、カーランド、ケベック) を含む。

#### 【0169】

フィブリンをゲル化させるために、可溶性トロンбинとフィブリノゲンは、塩化カルシウム存在下で混ぜられる。構成要素が混ぜられると、フィブリノゲン分子がフィブリンモノマーを形成するためにトロンбинによって裂かれるので、フィブリン接着性ジェルが形成される。フィブリンモノマーポリメラーゼは自発的にフィブリンの三次元ネットワークを作り、凝固化カスケードの最期に共通の経路に擬態する反応、すなわちフィブリノゲンのフィブリンシーラントに転換する。商業的な準備に大切なことはフィブリノゲンとトロンбин成分を使用まで分けた状態で保つことである、そのため、重合化は体への適用の前か後に望ましいタイミングで制御することができる。

10

#### 【0170】

今日、生物学的接着剤としてのフィブリンのそのような使用は、広く受け入れられており、多くの外科的領域で応用例が見つかっている。HemaseelまたはTisseel VHは、腹部の鈍いか又は深い外傷による、心肺バイパス及び脾臓損傷を含む手術の手術で、縫合、結紮と焼灼を含む従来の外科的技術によって出血を制御するとき、止血の添加物として使われる。これらのフィブリンゲル類の作用は、心肺バイパスと脾臓の修復を必要としている外科的手技において出血を止めるのにも用いられる。Tisseel (登録商標) VHは、人工肛門形成の終了の添加物として効果的なシーラントであることが示された。

20

#### 【0171】

上記及び、米国特許第7,141,428号で言及されるように、それらの全内容はここに参照として取り入れられ、フィブリンシーラントはフィブリノゲン濃縮物、塩化カルシウム及びトロンбинの3つの基本的な構成要素を有する。他の構成要素は、塊り構造の時間と作られるタンパク質ネットワークのサイズに影響を及ぼすために加えられることができる。通常、構成要素が混ぜられるとき、フィブリノゲン分子がフィブリンモノマーを形成するためにトロンбинの作用を通して分解され、フィブリン凝塊は形成される。そして、重合化は自発的に、フィブリンの三次元ネットワークを作り、水素結合により大きく保持される。

30

#### 【0172】

これは自然血液凝固カスケードの最後の段階に相当し、凝固率は使われるトロンбинの濃度に依存する。抗張力を向上させるために、フィブリン鎖の間の共有結合クロスリンクはシーラント組成物中のFactor XIIaを含むことによって供給される。カルシウムイオンの存在下、トロンбинはFactor XIIaにFactor XIIaを起動させる。トロンбинと起動するFactor XIIaは、フィブリンのクロス結合に触媒作用を及ぼして、塊の強度を増やす。フィブリン塊の強度はフィブロネクチンの構成への追加によってさらに改善される。そして、フィブロネクチンがクロスリンクされて、作られるフィブリンネットワークに結合する。

40

傷治癒の間、塊物質は段階的な溶解を経て、完全に吸収される。フィブリン分解による早すぎるフィブリン塊の崩壊を防ぐため、フィブリンシーラント組成物はプラスミノゲン活性剤抑制剤またはプラスミン抑制剤(例えばアプロチニン)を含んでも良い。

そのような抑制剤は、フィブリノゲン組成物のあらゆる残存プラスミノゲンを原因とする線維素溶解活性を減らす。同様に、組成物はヒアルロン酸(または他のポリサッカライド)を含んでもよく、そして、これらは周囲の組織で常に存在するヒアルロニダーゼによってヒアルロン酸の酸成分の分解を防ぐ(すなわち、期間を延長する)ために、一つ以上のフラボノイド(または他のポリサッカライドのための対応する抑制剤)のようなヒアルロニダーゼ抑制剤を含んでも良い。ヒアルロン酸は、上記のように、クロスリンクされても良く市販されている、Hylan (Biomatrix, Rutherford, N.Y.、USAから入手可能な)。ヒアルロン酸組成物には、ゲル類、溶液、その他の形が例

50

えはあるかもしれない。

【0173】

フィブリン塊は薬学的に活性物質の投与に使われてもよい。薬、例えば抗生物質、成長因子等の薬剤を、その他を取り入れることによって、組織接着剤に、それは組織接着剤の使用に作られるフィブリンネットワークに入れられる。制御可能に組成物が放出されている間、薬が投与部位に保たれることができるとされる。

【0174】

ヒトのプラズマフィブリノゲン / Factor XI<sup>10</sup> XI<sup>11</sup> から準備されるフィブリンシーラント製品は、商業的に利用できる。1つの製品は、Tisseel フィブリンシーラントと呼ばれている組織接着剤である（バクスター・ハイランド・Immuno社；Tissu col / Tisseel、Immuno社、ウィーン）。もう一つの製品は、Berioplast P（ヘキスト、西ドイツ）である。冷凍剤形のフィブリン接着剤の1例は、2つの注射器システムで送達されるOmrix（ニューヨーク、米国）製のEvinel（商標）である。

【0175】

1つの態様では、本発明の医薬組成物を形成する／送達するのに用いられるフィブリンシーラントはバクスター・ヘルスケア社によって製造される、TISSUE VH、2コンポーネントフィブリンシーラント、蒸気過熱済みキット（TISSUE VH Fibrin Sealant）である。TISSUE VH フィブリンシーラントキットは、主な活性成分としてフィブリノゲン（密封剤タンパク質濃縮）とトロンビンを含む。それは、また、塩化カルシウム溶液及びフィブリン溶解阻害剤溶液（アプロチニン、ウシ）を含む。2つの再構成要素、シーラータンパク質溶液及びトロンビン溶液を混ぜて局所的に投与した。シーラータンパク質溶液及びトロンビン溶液は弾力のある教会に迅速に固まる溶液である。トロンビンは、フィブリンに濃縮シーラータンパク質をフィブリノゲンに変える非常に特異的なプロテアーゼである。大部分のトロンビンは、形成されるフィブリンによって吸着される。過剰なトロンビンは、あたたとしても、血液中でプロテアーゼ阻害剤によって不活性化される。線維素溶解阻害剤（アプロチニン）は、フィブリンの早い分解を防ぐ多価プロテアーゼ阻害剤である。

【0176】

本発明の医薬組成物を製剤し／送達するのに用いることができる他のフィブリンシーラントは、Cebus（商標）、Atelles（商標）およびProleus（商標）（PlasmaSeal社）；Vivostat（Vivolution社）；Cryosseal FS（登録商標）（サーモジェネシス社）；CoSeal（商標）（Angiotech社）；Duraseal（Confluent Surgical社）；Poliphase（登録商標）（アバロン メディカル社）；Biogluue（登録商標）（Cryolife社）；Avitene Flour（商標）（Davol社）；Dermabond（商標）（ジョンソン・アンド・ジョンソン社）；Hemaseel、Hemaseel-HMN およびHemaseel-トロンビン（Haemacure社）；Berioplast-P（登録商標）（アベンティス社）；Fibrocaps（登録商標）（Profibrix社）；そして、Crossseal（商標）、Evinel（商標）とThrombin（Omrix Pharmaceuticals社）である。

【0177】

あるいは、本発明の方法と組成物で使われてもよい他のフィブリンシーラントは、米国の特許で記述され、米国特許第RE39,298号、米国特許第RE39,321号、米国特許第4,427,650号、米国特許第4,427,651号、米国特許第4,414,976号、米国特許第4,640,834号、米国特許第5,290,552号、米国特許第5,607,694号、米国特許第5,714,370号、米国特許第5,750,657号、米国特許第5,773,418号、米国特許第5,962,405号、米国特許第5,962,420号、米国特許第6,117,425号、米国特許第6,162,241号、米国特許第6,262,236号、米国特許第6,780,411号、米国

10

20

20

30

40

50

特許出願第2005/0271646号、およびヨーロッパ特許第0804257号で、ここに示した全てが全て参照に取り入れられる。組織接着性製剤は米国特許第7,141,428号でも記述されている。そして、その全ては完全に参照によって取り入れられる。

【0178】

これらの組織接着剤が例として名が挙げられるが、制限するものではない理解されるべきである。フィブリンまたはコラーゲンジェルのようなどんな薬学的に許容できる組織接着剤でも本発明の方法と組成物で使われるかもしれないと認識する必要がある。

【0179】

T i s s e e l V H の構成要素

T i s s e e l V H は、4つの別々のバイアルに以下の物質を含む

1. (ヒト) 密封タンパク質濃縮液、蒸気加熱済み、凍結乾燥
2. 線維素溶解阻害剤溶液 (ウシ)
3. トロンビン (ヒト)、蒸気加熱済み、凍結乾燥
4. 塩化カルシウム溶液

【0180】

蒸気加熱した濃縮シーラータンパク質 (ヒト) は、プールしたヒトプラズマから作られる、無菌の、非発熱性の、凍結乾燥させた、蒸気加熱した粉の調合剤として製剤される。線維素溶解抑制溶液 (ウシ) は、カリクレイン抑制剤 3,000 単位 (KIU/mL) のプラスミンを含むプロテアーゼの阻害剤であるアプロチニン、を含んでいる無菌の、非発熱性の溶液として製剤される。フィブリン溶解阻害溶液中の凍結乾燥された濃縮シーラータンパク質の再構成後、生じたフィブリン溶解阻害剤溶液は以下を含む：

全タンパク質 : 100 - 0130 mg/mL；

フィブリノゲン : 75 - 0115 mg/mL；

フィブリン溶解抑制剤 : 2250 - 3750 KIU/ml；及び、

賦形剤

【0181】

蒸気加熱されたトロンビン (ヒト由来) は無菌の、非発熱性の、凍結乾燥、蒸気加熱した粉として、貯め置かれたヒト血漿より製剤された。塩化カルシウム溶液は、40モル/mLのCaCl<sub>2</sub>を含んだ、無菌の、非発熱性溶液として調整された。塩化カルシウム溶液中の凍結乾燥したトロンビンの再構成の後、結果としてトロンビン溶液は以下のものを含む；

トロンビン (ヒト) : 400 - 600 IU/mL

塩化カルシウム : 36 - 044 mol/mL

賦形剤 : 表4参照

【0182】

シーラータンパク質溶液とトロンビン溶液はそれから、D U P L O J E C T P r e p a r a t i o n と A p p l i c a t i o n システムを用いて結合され、あるいは、T I S S E E L V H フィブリンシーラントの用途のため F D A によってクリアにされた同等物の送達装置によりフィブリンシーラントが形成される。T I S S E E L V H フィブリンシーラントは 0.5、1.0、2.0 と 5.0 mL の 4 つの異なるキットサイズで供給される。そして、以下に明らかにされる構成要素が含まれる。

【0183】

米国公認のプラズマ収集センターから得られるソースプラズマは、濃縮シーラータンパク質と F E I B A バルクパウダーとしてトロンビンの開始材料を生産するのに用いられる。濃縮シーラータンパク質を得るために、ソースプラズマに由来する寒冷沈降物は、洗われ、緩衝液に溶かされ、濾過され、凍結乾燥される。フィブリン溶解阻害溶液は、バイエル社から得られる無菌の、非発熱性のアプロチニンバルク溶液から作られる。トロンビンは F E I B A バルクパウダーを溶かして、プロトロンビンを活性化するため溶液を塩化カルシウムと共にインキュベートし、トロンビンにし、引き続き、限外濾過 / 珪藻土濾過、除

10

20

30

40

50

菌濾過及び凍結乾燥が続く。塩化カルシウム溶液は、米国Pharmaceutical (U.S.P.) にリストされる仕様に従って、塩化カルシウムから準備される。

【0184】

濃縮シーラータンパク質及びトロンビンはプールされたヒト血漿から作られる。これらの製造において使われる二段階蒸気熱処理は、相当程度のウイルス減少が可能であることが示された。他のフィブリンシーラントが当業者に知られていて、本発明において使うことができる。例えば、フィブリンシーラントは米国特許第R E 39,299等で記述されると、米国特許第6,162,241号、米国特許第6,780,411号、米国特許第5,773,418号、米国特許第5,290,552号、米国特許第5,607,694号、米国特許第4,414,976号（米国特許第4,427,650号と米国特許第4,427,651号）に記載され、参照によってここに取り入れられる。

10

【0185】

本発明は、種々の態様で、以下の非限定的な例によってさらに例示される。

【実施例】

【0186】

〔実施例1〕

マトリゲル分析評価実験

典型的なマトリゲル分析評価実験からのデータ、例えば配列番号8のように設計される融合タンパク質を含む医薬組成物の、血管新生に派生する毛細血管の長さへの効果に関するデータは、表7に要約されている。これらのデータは、ネットワーク形成が用いた投与量と剤形の状態下で、コントロール賦形材により生産される抑制に対しておよそ13%～20%抑制される。ここで0抑制は100%の成長を提供する。

20

【0187】

血管形成に対するこの影響は、より高い融合タンパク質の投与量を用いることにより、そして、前記細胞をマトリゲルに添加するのに先立ち、配列番号8を用いてH U V E C細胞をブリインキュベートすることにより、強化することが出来る。

活性薬剤のアミノ酸配列に共有結合していて、活性薬剤のアミノ酸配列がADPリボース転移酵素活性を保っている輸送を助けるアミノ酸配列を含有する、本発明のポリペプチドを含む組成物の抗血管新生効果は、前記組成物を本発明の方法により投与した時、哺乳類宿主の網膜下の新生血管形成及び眼中の新生血管組織の増殖の速度を抑制するか、又は実質的に減少することに有用である可能性がある。

30

【0188】

【表7】

表7

マトリゲル（商標）マトリックス分析評価において、毛細血管ネットワークの平均長を用いた融合タンパク質（配列番号8）を含む医薬組成物の抗血管形成効果。

血管形成と関連した毛細血管ネットワークの平均長	賦形剤コントロールの存在下生産される毛細血管ネットワークの相対平均長	配列番号8を含む医薬組成物存在下（10 $\mu$ g/m1の濃度）で生じる毛細血管ネットワークの相対的な平均長
Y 1	100	86.4
Y 2	100	78.2
Y 3	100	86.7

40

【0189】

〔実施例2〕

配列番号43及び配列番号10の準備

50

配列番号 4 3 はポリメラーゼ連鎖反応によって準備され、配列番号 1 0 の製造のために、 p E T 9 a ベクターにサブクローンされる。2つのオリゴヌクレオチドは、 Q u i k C h a n g e (ストラタジーン) キットを使用し、部位特異的突然変異誘発法によりアミノ酸 3 - 1 7 を削除するように設計した。ポリメラーゼ連鎖反応は、 5 0 n g の p E T 9 a - C 3 - バリアント、 4 2 塩基の変異体プライマー：プライマー： 2 0 2 9 F 5 ' - G G A G A T A T A C A T A T G T C G G C T T A T T C A A A T A C T T A C C A G G A G - 3 (配列番号 1 1 ) ；および、プライマー、 2 0 2 9 R 5 ' - C T C C T G G T A A G T A T T T G A A T A A G C C \* G A C A T A T G T A T A T C T C C - 3 ' (配列番号配列番号 1 2 ) を用いてサー モサーキュラーを用いて行った。シンボル ( \* ) は 4 5 のヌクレオチド欠失が起こった接合点を示す。

10

## 【 0 1 9 0 】

D p n I 消化は製造者の使用説明書に従ってされ、この製品の 1  $\mu$  L は X L 1 - B l u e Super コンピテント細胞 ( I n V i t r o g e n ) を形質転換するのに用いられた。これらのプレートはそれから、 3 7 で一晩中インキュベートされた。推定される配列番号 1 0 のクローンが選択され、これらのプラスミド D N A は Q i a g e n M i d i - P r e p キットを使用して増幅、精製された。精製されたプラスミドは、制限消化分析によって分析される。3 候補のクローンからの D N A は、 T 7 及び T 7 T プライマーを用い、 B i o S & T ( L a c h i n e 、ケベック) で配列を決定された。変異体 A J C 3 1 1 - 2 は突然変異を含むことが確かめられ、そして、 D N A は B L 2 1 ( D E 3 ) ( I n V i t r o g e n ) 細胞を形質転換し、研究細胞バンク ( R C B ) に準備される。

20

## 【 0 1 9 1 】

精製された配列番号 1 0 は、大腸菌から準備される。最初に、ブドウ糖を入れた . 5 L ルーリア培地のフラスコに、研究細胞バンク ( R C B ) の 2 つのバイアルを接種し、一晩培養した。スターター培地を、 1 0 倍に希釈し、各々 5 0 0 m L の成長培地が入るように 8 つのフラスコへ分けられた。フラスコは 3 7 でインキュベートされ、 1 時間 2 0 分後に、イソプロピルチオ - B - D - ガラクトシド ( I P T G ) を配列番号 1 0 の発現を増やすために加えた。更に 4 時間後に、細胞を遠心分離によって集菌し、使用まで - 8 0 で保存した。

30

集められた培養液のサンプルの配列番号 1 0 の含有量を分析した。次に、細胞を解凍し、一次回復を受けさせ、ここで、研究室スケールの工程で配列番号 1 0 を生産するための一次回復とは、抽出緩衝液中の超音波処理である。

粗抽出液は、プラスに帯電したポリマーで処理し核酸を取り除き、硫酸アンモニウムで処理し若干のタンパク質を取り除き、量を減らした。過剰な塩は除去した。

タンパク質は、 4 つのクロマトグラフィカラムを通過させることによりさらに精製した。最終的な精製及び分離過程は、結果として精製されたタンパク質溶液 ( 限外濾過を使うことが出来る ) の濃縮、タンパク質溶液の濾過 ( 例えば、タンパク質溶液を滅菌に有用な 0 . 2 マイクロメートルの濾過膜を通す ) 、無菌の管に溶液を施すこと、タンパク質溶液を凍結させること、タンパク質を粉の形で製剤化するために凍結したタンパク質を凍結乾燥することにより構成される。配列番号 1 0 を精製した後、この融合タンパク質の、生産されたタンパク質、その純度、その力価、その生物学的活性 ( 例えば神経突起成長に関する A D P リボース転移酵素活性 ) を分析した。純度は、クーマシープルーで染色された S D S ポリアクリルアミドゲルを用いて濃度を精査することにより測定した。配列番号 1 0 の活性は、 N G 1 0 8 細胞を用いて 4 時間の神経突起成長を見ることにより決定された。生物検定の手順は、配列番号 1 0 を含む 1 分取量の緩衝液を用いて、 4 時間、 N G - 1 0 8 細胞をインキュベーションすることを含む。同時、そうでなければ同様の生物検定がポジティブコントロールとして行われ、ここでは、配列番号 8 が配列番号 1 0 の代わりに使われる。前記細胞はそれから、パラホルムアルデヒドで固定され、クレシルバイオレットで染色され、顕微鏡下で、そして、細胞体より長い神経突起を示した各々のウェルの細胞の割合 ( % ) が測定された。各々のデータポイントは、 3 回測定した中から決定した。

40

50

## 【0192】

## 〔実施例3〕

## 配列番号10融合タンパク質の準備

配列番号10は、細胞貫通C3細胞外酵素バリアント（配列番号44）に由来する。配列番号44は、発現を改良し、GST融合タグを除くために、pGEX-4TのベクターからpET9aベクターへ転換される。結果として生じるバリアント（配列番号43）は、Aktta Explorer TM（アマシャムBiosciences、モントリオール、QC）を使ってFPLCによって精製される。cGMP製造のための強力な方法を得るために、領域に誘導された突然変異生成は、N末端で痕跡的な残りを取り除き、プロテアーゼに敏感な残りを除くために使用され、配列番号10を得る。

10

## 【0193】

配列番号44または10は、当業者に知られている標準的な技術を使用して精製される。例えば、配列番号44または10は、4Lのフラスコで成長する大腸菌BL21（DE3）細胞で発現する。IPTGによる誘導の後、細胞は超音波処理により抽出され、ポリエチレンイミンと硫酸アンモニウムで沈殿するあるいは、濾過し、核酸の大半を取り除いた。溶解物は、中性pHでSPXLコラムを通した。抽出したバリアントは、このステップの後、85%以上の純度であることが分かった。更なる不純物の除去は、ゲル濾過（Superdex TM 75、アマシャムバイオサイエンス社、モントリオール、QC）と陰イオン交換ステップ（Q Sepharose TM、アマシャムバイオサイエンス社、モントリオール、QC）によって達成される。最終的な精製ステップは、除菌濾過に引き続  
く限外濾過によってなされる。

20

精製された画分は、-70で保存される。Limulus Amebocyte Lyse分析；BioWhittaker QCL-1000キットによって評価される。残留エンドトキシンは、2EU/mgより低濃度である。タンパク質濃度は、UV分光学（A280）又はブラッドフォード反応（クーマシー（登録商標）プラス試薬、ピアス社）を使って評価され、タンパク質完全性及び固有性は、還元剤の追加の有無にかかわらず、4-12%のアクリルアミド勾配ゲル（NuPAGE Bis-Tris；in vitroゲン、バーリントン、オンタリオ州）のクーマシー染色を使用して確立される。バリアントのグリコヒドラーゼ活性は、NADのADPリボースとニコチニアミドの間の切断を定量化する蛍光分析評価で測定される（LaskoとMcKerracher、2006、Methods Enzymol.、406：512-520）。神経細胞成長活性は、NG-108細胞を用い、神経突起成長分析評価によって評価される。

30

## 【0194】

## 〔実施例4〕

## 血管形成の抑制のための一般的な方法

図33を参照し、新しい血管の形成は、基底膜（Matrigel）の基盤の存在下で、成長する内皮細胞による細胞培養モデルにより研究される。ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）は、トリピニゼーションによって貯蔵培養液収集され、EBM-2（Cloneetics）、FBS、ヒドロコルチゾン、hFGF、VEGF、R3-IGF-1、アスコルビン酸、hEGF、GA-1000、ヘパリンを含む成長培地中に再懸濁される。マトリゲル（商標）（12.5mg/mL）は4で解凍され、そして、50mLのマトリゲル（商標）は96穴プレートの各々のウェルに加えら、そして、37で10分間固化される。15,000の細胞/ウェルの濃度の成長培地中の細胞が各々のウェルに加えられ、6時間付着させる。リン酸緩衝食塩水（PBS）中の本発明の融合タンパク質（例えば配列番号8）は10mg/mlくらいでウェルに加えられ、そして、他のウェルにはPBSはコントロールとして加えられる。培養組織は、更に6~8時間成長させておかれる。

40

チューブの成長は50Xの倍率で顕微鏡検査によって視覚化されることができ、そして、毛管のネットワークの平均長さはノーザンエクリプスソフトウェアを使用して定量化される。この発明（例えば配列番号8）の融合タンパク質によるマトリゲル（商標）分析評価の細胞の処理は、管形成（図33を参照）を減らす。

50

## 【0195】

## 〔実施例5〕

## 凍結乾燥製剤

薬学的に許容できる緩衝塩を含むに溶かしたおよび／またはすぐに水に溶ける薬学的に許容できる炭水化物（望ましくは薬学的に許容できる非還元糖またはシクロデキストリン）を含む、薬学的に許容できる等張性水性媒体に溶解した、配列番号8のような融合タンパク質を含む本発明の組成物の1投与量を含む溶液は、無菌状態で無菌濾過され（例えば0.2ミクロンフィルタによって）、濾過水は滅菌された小びんに置かれ、濾過水は凍結され、凍結水溶液は、薬学的に許容できる凍結乾燥装置で減圧され無菌的に凍結乾燥され、融合タンパク質を含んだ乾燥マトリックスは小びんに放置され、小びんは無菌の不活性気体の下で大気圧に戻され、小びんは無菌のストッパー（例えば波形キャップと共に）で封をされる。密封された小びんはその内容と投薬量についてのラベルが付けられ、単位剤形として溶液に融合タンパク質マトリックスを再構成するために凍結乾燥された融合タンパク質が入っている最初の小びんに移すのに必要な量で注射のために滅菌された水が入っている第2の密封された無菌の小びんと共に、キットに置かれる。もう一つの態様では、融合タンパク質は高緊張の水性媒体から成る水性媒体の初期量、不毛な濾過される解釈、小びんに満たされる濾過水に溶かされることができて、乾燥基材を形成するために凍結乾燥されることができる。この乾燥基材は、素より多い無菌水（静脈注射や注入によって例えば注射の等張性溶液をつくるのに十分なより大きなボリューム）量で溶かされることができるか、再構成されることができる。あるいは、高緊張の溶液がかなり薄められるよう、高緊張の溶液が等張性水性媒体のより大きな量が入っている点滴バッグへの注入により投与に使うことができる。任意で、単位剤形にマトリックスを再構成するために適当な量で無菌の水量が入っている小びんは、凍結乾燥されたタンパク質によるキットとして配布される。望ましくは、再構成された構成は、等張性溶液を含む。融合タンパク質は静脈配達や注入のために使われることができ、および／またはこの製剤で目に組織の近位または組織に、注射により送達することができる。

## 【0196】

## 〔実施例6〕

この発明の融合タンパク質の網膜の相対的な細胞保護能力を決定する一般的な手順

視覚のシステムでは、網膜神経節細胞は、視神経損傷の後細胞死を起こす。損傷の割合（すなわち死ぬ細胞の数）、そして、細胞死の率は、軸索損傷の目への近さに依存する。RGC生存に関してのRhodopsinの不活性化の結果を検査のために、C3転移酵素（配列番号8と配列番号43）の2つの細胞膜を透過している派生物（すなわち浸透性細胞膜）が使われる。同様に、配列番号10（図3）またはPEG化したBAバリアント（図4Aと図4B）のトランケート・バージョンを使うことができる。

## 【0197】

ラットは、2-3%のイソフルレン下で麻酔された。RGCsは、フルオロ・ゴールド（フルオロクローム社、デンバー、コロラド）で、上丘から逆行的にラベルされた。ラットの右中脳は骨に小さな円形の穴を作ることにより露出し、そして、皮質の吸引、上丘の上に横たわる軟膜物質の除去が続く。Gelfoamの小さな部分は2%のフルオロ・ゴールドを含む水性媒体に浸され、そして、10%のDMSOは右の上丘の表面に投与される。フルオロ・ゴールド投与の7日後に、左の視神経は、目から1mmの所で横に切断される。視神経は外科手術的に軌道骨の上縁をおおっている皮膚の切開を作ることによって眼窩の中で接続される。そして、眼窩上静脈を無傷のままにするように注意する。局所的な切除または涙腺の反転の後、上外眼筋は、後引筋とともに露出され、6-0で絹縫合される。

視神経は露出され、そして、視神経を露出させている間、周囲の鞘は血管を切ることを避けるために縦に切られる。視神経軟膜は傷つけられ、視神経はそれを取り除くために穩やかに動く、それから、はさみは目から1mmで綺麗に切除するために視神経の下にわずかに触れる程度にすべり込ませられる。サイトカインレベルの研究のために使われる動物に

10

20

30

40

50

おいて、ミクロクラッシュ障害が使われる。これらの研究のために、軟膜は無傷のままにされ、そして、視神経はさやから持ち上げて出されて、60秒の間10.0の縫合を持って締めつけによって眼球から1mmで押しつぶされる。

#### 【0198】

麻酔された動物は、視神経を切断した直後と4日後に、水性緩衝液中の配列番号8または配列番号43の一回の注射を受けた。眼内注射は、ガラスのマイクロピペットに付けられた10μlの注射器でなされた。穴は、視神経円板からおよそ4mmの上鼻網膜で、5μlの融合タンパク質（例えば配列番号43）または緩衝液対照群を注射するためのガラスのピペットの導入の前に、30gの針で作られた。針は、硝子体スペースに溶液の散布をさせるために、ゆっくり撤収される。強膜は、それから組織接着剤（Indermil、Tyco Healthcare、マンスフィールド、USA）で封をされる。世話は、白内障形成とRGCsの結果として生じる増加した生き残りを避けるために注射の間、レンズに損傷を与えないためにされる。皮膚は閉じられ、そして、網膜脈管構造の健全性は術後検眼鏡検査によって検査される。傷つけられた脈管構造のラットまたは白内障のラットは、実験の結果に含まれない。

10

#### 【0199】

フルオロ・ゴールドでラベルした網膜は、軸索切断の7または14日後に数える準備ができる。動物に4%のパラホルムアルデヒド（PFA）を注ぎ、そして、それらの目は角膜穿刺の後、取り出されて、4%のPFAで後固定される。目は、それから、1時間、リン酸緩衝食塩水（PBS）ですすぐれる。切り傷は4つの網膜四半部で各々の目でなされ、そして、網膜は取り出されて、ガラスの滑り面に平らに載せられる。過剰な硝子体は、紙芯で離れて吸い取られる。カバーガラスはマウントした網膜の上のスライドに置かれ、そして、RGCsが紫外線吸収フィルター（365/420）で調べられる。

20

ラベルされたRGCsは、0.1125mm×0.375mmの長方形のフィールド領域を提供するため、顕微鏡の1つの目の視野で、長方形挿入物を用いて、20X拡大の顕微鏡の下で数えられた。網膜の4つの標準的な長方形の領域は、ディスクから1及び2mmで数えられる。各々の領域のラベルをつけられた細胞の数は0.04125（長方形の領域をmm<sup>2</sup>で数えた）だけ分けられ、そして、各々の網膜のための平均密度はRGCs/mmとして計算される。細胞数は、同じ調査者ブラインド治療へ導かれる。軸索切断の後、フルオロ・ゴールドは内皮細胞とミクログリアル細胞にも存在する。これらの形態学によって同定される細胞は、RGCのカウントを実行される。統計はExcelで実行され、そして、治療を受けた動物からの結果はT-テストによって対照群の結果と比較される。

30

#### 【0200】

FPLC精製された配列番号8の一回の注射は神経保護的であり、軸索切断の7日後のすべてのRGCを救出し、そして、FPLC精製された配列番号43の一回の注射は神経保護的であり、軸索切断の7日後のすべてのRGCを救出する。配列番号43注射の後のRGC細胞生存がそのRhodriboース化活性以外の配列番号43の特性のため、増加されるかもしれないかどうか決定するために、配列番号6の影響は、RGC細胞生存についてテストされる。変異体タンパク質（配列番号6）はFPLCによって精製され、そして、配列番号43のために使用される方法で軸索切断の直後に1μgの注射がされる。配列番号6の管理の後の細胞生存数は、単独で軸索切断の後で細胞生存数とかなり異ならず、配列番号43の影響と、かなり異なる。したがって、他の影響（データは示されず）以外から、配列番号43の神経保護的な活性は、Rhodriboース化タンパク質とこのように不活性でADPリボース転移酵素の存在による。

40

#### 【0201】

虚血は、食塩水の眼内注入によって眼圧を上げることにより、アルビノのルイスラットの網膜でもたらすことができる（UnokiとLavail（Invest Ophthalmol Vis Sci. 35:907, 1994）。RGCsの生存率は、先に述べたように、網膜全載標本で逆行的にフルオロゴールドでラベルされたRGCsを数える

50

ことによって評価することができる。

【0202】

〔実施例7〕

緑内障モデルのRGCsの神経保護

神経保護治療としてのRho不活性の有効性は、緑内障の臨床前モデルで試験することができる。例えば、ケーシーEye研究所（ポートランド、オレゴン）でJ.モリソン博士と協力者によって開発されるブラウンドラットの眼性高血圧のモデルのような、目の高血圧動物モデル（それは多くの類似点をヒト緑内障と共有する）を使うことが出来る（Morrison et al., 1997, Exp. Eye Res., 64: 85-96）。眼圧（IOP）は、目の内側の液圧の測定値である。この流体（水様液と呼ばれている）は、循環して、それから特別な流出経路を通して排出される。排水システムがきちんと機能しないならば、緑内障の一般的な形の場合のように、目の内側の圧力は高まる。モリソンモデルは強膜上の静脈に高張の食塩水の注入を含む。そして、水様液流出経路の封鎖に至る。この手順は、目圧の段階的な増加とRGCsの進行的な死につながる。重要なことに、内部の網膜萎縮、視神経退化と改造することがこのモデルで観察した視神経乳頭は、ヒト緑内障で観察されるものと類似しているということである。このように、モリソンモデルは、齧歯目における緑内障（Morrison et al., 2005, Progress in Retinal and Eye Research, 217-240）の最高の臨床前モデルと考えられる。

10

20

【0203】

モリソンモデルは、本発明のC3変形が緑内障でRGC保護を提供するかどうか決定するのに用いられることができる。例えば、本発明はまたは食塩水（対照群）のポリペプチドは、目の高血圧手術に被療者の目の硝子体細胞に注射することができる。注射の後で生存したRGCs数は、ポリペプチドが緑内障の目の高血圧ラットモデルでかなりのRGC神経保護を与えるかどうか決定するために数えられることができる。

30

【0204】

〔実施例8〕

光受容体退化のラットモデルで光受容器細胞死を防ぐ有効性を計る手順

動物の取扱いは、Animal Careのカナダの会議のガイドラインに従った。動物は、水と食物を自由に摂取させ、12時間の明暗サイクル下に置かれた。成体の病原性のない雄と雌のスピローグ-ドーリーラット（8週）が使われた。手術の日に、外科的なチームが治療群に対して盲目的にされる間、動物はそれぞれのグループをランダム化した。術後治療は、再水和のために、皮下に0.9%の食塩水を含む（疼痛管理のためのBaytrilと感染を防ぐためのBuprenex）。日毎の点検は、膀胱機能評価と膀胱昨日不全評価を含み、椎弓切除場所の感染の所見と自己消耗の存在の検査がされた。当初研究に割り当てられる動物のどれも、分析から除外されなかった。

40

【0205】

ラット（スピローグ-ドーリー）は、右目後眼房に5μlの食塩水を、または、左目後眼房に5μl（1g）の配列番号10をハミルトン注射器／毛細管を使って注射した。注射の後で、ラットをケージに置いて、1または2日の間、恒常的な光（2000ルクス未満）を浴びせた。アトロピンを日に一度、または、露光期間の間に必要に応じて投与した。ラットは、それから、普通の飼育施設に戻され、さらに5日から7日の間飼われた。両目は集められ結合組織から切り取られ、ブアン液で24時間固定され、それから、パラフィンに封埋され切片化された。光受容体は、H&E染色（図6）を使用して可視化された。光処理により光受容体を破壊する効果は、受容体層の実質的な薄層化として、中央のパネルで明らかに示される。配列番号10の対応するレスキューエフェクトは、1μgの配列番号10（右側パネル）で治療された動物において、光受容体細胞の数の増加と結果として生じるより厚い層から明白になる。

50

【0206】

光受容体細胞のレスキューエフェクトは王立軍医大学（RCS）のラットで示された。これらのラッ

50

トは網膜変性を遺伝的に引き継ぐ (Faktorovich et al., Nature 347: 83, 1990)。水性緩衝液中の配列番号 8 の眼内注射は、10 μl の注射器をガラスのマイクロピペットに付けてなされる。ガラスピペットを導入し 1 μg の配列番号 8 または緩衝液対照群の 5 μl を注射する前に、穴は上鼻網膜の視神経円板からおよそ 4 mm の所に、30 g の針を使って作られる。針は硝子体スペースに溶液の拡散をさせるためゆっくり引き抜かれ、そして、強膜は組織接着剤で封をされた。レンズの損傷が白内障形成およびそれに伴う RGCs の生存率増加を引き起こす可能性が有るので、注射の間、レンズに損傷を与えないように注意される。皮膚は閉じられ、そして、網膜脈管構造の完全性は術後検眼鏡検査によって評価される。障害の起きた血管系を有するラットや白内障を起こしたラットは実験結果に加えなかった。

10

## 【0207】

治療的に治療された、又は無治療の RCS ラットの光受容体生存率の評価に役立つ組織学的分析は、麻酔された動物の血管かん流、動物の目のパラフィン包埋、ヘモトキシニンとエオシンによる、または、トルイジンブルーによる厚さ 6 ミクロンの薄片の染色、のステップからなる。生後 53 日の無治療の RCS ラットの目で (P53)、光受容体細胞を含む外核層は、僅か数層の細胞の厚みが減少した (同じ年齢の通常のラットに見られる厚みのおよそ 20%)。硝子体内投与による配列番号 8 の治療効果のある投与量 (例えば 1 マイクログラムのタンパク質を含む一回の注射) は、外核層の厚みを復元し、従って、光受容体細胞をレスキューする。

20

## 【0208】

あるいは、Lavailら (1992, PNAS USA 89: 11249) の手法の後に、1週間の恒常的な光 (115 - 200 フートキャンドル) に暴露したモデルで 2 ~ 3 カ月齢の雄のスピローグ - ドーリーラットを用いて、光受容体細胞のレスキューを示すことができる。配列番号 8 の水性緩衝液 (1 μg のタンパク質) は、連続照明の始まりの 48 時間前に、網膜下領域に、または、硝子体液に注射することができる。固定された回復期 (通常 10 日) に引き続き、組織学的試験と分析が、光受容体細胞の細胞死または損傷、およびレスキューまたは生存率を評価するのに用いられることになっている。

## 【0209】

網膜剥離もまた光受容体細胞の細胞死を導く。Ericksonら (1992, J Struct. Biol. 108: 148) によって記載された動物モデルは、ADP - リボース化活性を除くように変異されたタンパク質および未処理の対照群の緩衝液対照群の投与と比較して、配列番号 8 の投与の影響を示す *in vitro* の網膜細胞の生存率を強化することが出来る。

30

## 【0210】

## 〔実施例 9〕

本発明の融合タンパク質が光受容体変性したトランスジェニックマウスモデルにおいて光受容体の細胞死を防ぐ効果を計測する手順

配列番号 10 が網膜神経節細胞に対し神経保護作用があることが示されたように、その神経保護作用の性質は遺伝性網膜変性マウスモデル (rd) を使っている網膜ニューロンの上でよく研究されている。色素性網膜炎患者に見られるものと同様の遺伝子突然変異を内包するこれらのモデルは、進行性の光受容体細胞損失を示す。これらの rd モデルはヒト黄斑変性症において観察される多因子的な性質の変化 (例えばドルーセンの蓄積) を示さないが、これらの動物モデルは光受容体治療後の生存率に関しての洞察を提供する。Rd 1 突然変異のためのホモ接合のマウスは、錐体光受容体で発現される cGMP ホスホジエステラーゼのベータサブユニットをコード化している Pde6b 遺伝子の突然変異により、初期の網膜変性発症を有する。この突然変異は細胞体で第 2 のメッセンジャー cGMP の蓄積につながる。そして、これはアポトーシスの細胞死を誘発する。Rd 1 マウスにおいて、4 週未満の外核層の完全な消失において、変性は出産後 7 - 9 日 (P) ごろ始まる (Changら, 2002)

40

## 【0211】

50

グループにつき 4 匹のマウスに対し、配列番号 10 を異なる投与量 (0.001~0.1 g) で右目に二回（出産後の日 7 と出産後の日 14 に）注射し、そして、組織を 21 日目に集めた。すべての左の目には食塩水または BA - 304 (ヌクレオチド配列は、配列番号 80 と一致し、；アミノ酸配列は、配列番号 81 と一致する；酵素は不活性な変異体) を注射し、外科手術コントロールとして用いた。

#### 【0212】

図 7 の結果は、出生後 21 日の 0.01 μg のグループのマウス網膜（網膜の中心、中間、周辺）の 3 つの部位における細胞濃度（平均 100 ミクロン長以上）を表す。予想通りに、出生の 3 週間後に供給された R d 1 マウスには、極めて少数の光受容体が残った。外核層（ONL）は 1 層に減少し、そして、外の部分は大部分の動物でほぼ消失した。変性は、網膜を通して非常に均一で、通常のマウスでおよそ 200 であるのに対し、ONLにおいて 100 ミクロン長につきおよそ 17 の光受容体核が存在した。R d 1 マウスのアポトーシスの始まりの前に 0.01 g の配列番号 10 によって治療することは、網膜のすべての領域において光受容体をレスキューした。神経保護の効果は、網膜周辺でより劇的であり、光受容体生存率を約 50 % 増加させる。0.001 g 未満の投与量および、酵素的に不活性な変異体 BA - 304 (配列番号 81) について保護効果は観察されなかった。0.1 g の投与量による更なる効果は得られなかった（結果は示していない）。

10

#### 【0213】

活発な変性（P 13 - 16）の期間における、配列番号 10 の短期的な保護効果が調査された。図 8 は、0.05 g の配列番号 10 の 1 回注射を受けた目において、増加した外核層（ONL）の厚さを持つ、同じ動物の網膜の代表的な写真を表す。

20

#### 【0214】

光受容体の生存率をアポトーシスの範囲に関連させるため、光受容体数（図 8）のために使われる同じ動物のスライドも、ONL でアポトーシスの範囲を評価するために染色した。100 ミクロン長の TUNEL のラベルした光受容体の総数は、数えられて、9 A、図に示された。

#### 【0215】

配列番号 10 を注射されたマウス網膜のすべての領域で、アポトーシスを起こした細胞数の顕著な減少が、観察された（図 9 B）。

30

#### 【0216】

R d 1 マウスの結果は見込みが有り、厳格で速い網膜変性の動物モデルとして、抗アポトーシスの影響を伴う光受容体の神経保護作用を示す。前記疾病の退化の経時変化は、P 14 のあたりのアポトーシスのピークでよく知られている。配列番号 10 をピーク期間に注射すると、アポトーシスを起こした光受容体の数は網膜全体を通して約 40 % 減少する。注射の 3 日後に検査された全てのマウスにおいて、ビヒクル（生理的食塩水）を注射した対照群の目と比較して、配列番号 10 の処理をうけた目は常に、より多くの光受容体の列から出来たより厚い ONL を提示した。退化が活性化している段階の Rh o の不活性化は、この厳格な網膜変性モデルで、光受容体のアポトーシスの細胞死を遅くした。

#### 【0217】

ここで提示される結果は、配列番号 10 がいくつかの面白い生物学的活動を示すことを証明する。光受容体アポトーシス抑制と組み合わせられるその強い抗血管新生効果は、ヒト黄斑変性症患者のための、視力の延長につながる可能性が有る。

40

#### 【0218】

光受容体退化のいくつかのマウス遺伝子モデル（例えばペリフェリンの cGMP フォスフォジエステラーゼ rds 変異体のサブユニットの r d 変異体）は、上記の投与方法を使用することができ、融合タンパク質に関連する（例えば、配列番号 8 に関連する）光受容体細胞が生体内で生存率を強化する効果を証明するために使用されることができる。

#### 【0219】

R d 変異体マウスと rds - 変異体マウスは、出生の後、2、3 週以内に網膜変性を示す。先に述べたように融合タンパク質（例えば配列番号 8）の硝子体内注入の後で、組織は

50

上述の組織学的方法によって分析される。

【0220】

配列番号8を含有する培地で培養されるrd-変異体マウスからの網膜外植片は、Caf  
feら(1993, Curr. Eye Res., 12: 719)に記載された方法を使用して、外核層の厚みを分析した。このように、マウスの子は出生の48時間後に細胞核を取り除かれて、プロテイナーゼKで処理された。この酵素処理の後、網膜色素性上皮(RPE)に付属する神経網膜は回復し、マルチウェル培養皿に入れられ、1.2  
mlの培養基(例えばR16)の中で5%のCO<sub>2</sub>のもと37℃で4週間までで暖められる。固定された(例えば4%のパラホルムアルデヒド)切片のオプシンの免疫細胞化学的な染色は、光受容体細胞の変性とレスキューを評価するのに用いられる。rd-変異体マウスにおいて、外核層(光受容体細胞)は培地において2~4週後に変性された。培地は、網膜細胞機能(例えば変性からの外核層のレスキュー)に対する影響を成し遂げるために、配列番号8の投与範囲で補われることができる。生存率効果は、上述のモデルで分析される網膜部分の上でTUNEL法を使用して示されることもできる。

10

【0221】

〔実施例10〕

融合タンパク質の網膜の新血管形成を防ぐ有効性を決定する手順

細胞培養分析評価において観察された試験管内の血管抑制作用影響を確かめるために、異なる動物モデルで配列番号10の目の血管形成をテストされた。調査された最初のモデルは、生まれたばかりのラットの網膜生理的血管形成である。ラット網膜は生まれた時に無血管であり、そして、血管抑制作用薬可能性を評価する機会がある。

20

【0222】

出生後4日に同じラットの、一方の目に配列番号10が注射され、その間、不活性な種類のタンパク質であるBA-304(配列番号81)が反対側の目に注射された。配列番号10を硝子体内へ0.1gで注射した後は、目に不活性タンパク質(図10)を注射される時に比べ、ラットの子の網膜で顕著に生理的血管形成を妨げた。より低い投与量は血管新生の範囲を減少させなかった、そして、配列番号10の治療により、網膜血管の周皮細胞被覆率は変わらなかった(結果は示していない)。

【0223】

病理学的血管形成でRh不活性の結果を調査するために、C57マウスでアルカリ火傷によって角膜新血管形成を誘発した。動物は、BA-304(配列番号81)または配列番号10を生理的食塩水と共に、損傷後3日から8日の間、3回、局所的に投与した。通常、無血管の角膜への新しい血管の侵入は、すべての負傷したマウスで起こった(図11)。しかし、2μg/μLの度重なる配列番号10の投与により、角膜の新血管形成がされた領域は顕著に減少した。不活性なタンパク質であるBA-304(配列番号81)は血管の発達に対し全く影響は無かった。

30

【0224】

脈絡膜の新血管形成は、AMDを伴う患者の中心視力損失の大きな原因である。傷ついた領域において、局所的に生じた血管形成要因(例えばVEGF)の増加に応じて、血管は網膜下の空間と同様にブルッフの膜とRPEの間で成長する。配列番号10の使用が目の血管形成の抑制剤として機能するという、原則の証明を完了するために、レーザーによって誘発されたブルッフの膜の断裂が用いられた。この方法は、脈絡膜に端を発する新血管形成の非常に信頼できるモデルを提供する。レーザーによる衝撃は4匹のマウスの両眼に施され、そして、3日後に配列番号10は右目に注射され、その間、左目には同じ量の不活性タンパク質が投与された。最大限の新生血管反応を含んでいる領域の写真はそれぞれの衝撃ごとに撮られ、そして、血管新生の領域は損傷後10日後に測定された。

40

【0225】

テストされた2種の投与量(1μg及び0.2μg)において、同じ動物へのBA-304(配列番号81)注射と比較して、配列番号10は顕著に、レーザー光凝固によって誘発される網膜下血管成長を阻害することが図12において示される。1μgで処理された

50

同じ動物の両眼の障害の代表図は図 1 2 に示される。

【 0 2 2 6 】

配列番号 1 0 が前臨床研究で使われるすべてのモデル（ラットとマウス）で血管形成を妨げたので、内皮細胞の *in vitro* の研究からの結果はこのように動物モデルで裏付けられた。網膜下の新血管形成の抑制は、配列番号 1 0 が網膜を透過し、脈絡膜血管が発達する領域に達することを明らかに示唆する。さらに、それは一回の投与の後、目で病理学的血管形成に対する、強力で持続された効果を示す。

【 0 2 2 7 】

抑制されていない網膜血管形成は、滲出型黄斑変性症の病理学の一因となりえる。血管内皮成長因子（ V E G F ）生産は網膜の低酸素症によって増加し、そして、網膜の新血管形成はそれによって誘発される。

【 0 2 2 8 】

虚血により誘発された網膜新血管形成のマウスモデルは、出産後齢（ P ） 7 日から 1 2 日の間、哺乳親のもとで、 7 5 % の O<sub>2</sub> にさらされ、その後通常空気中に戻された、 C 5 7 B L / 6 J マウスを使用する。これを達成するため、マウスは P 7 日に体重を測定した後、 5 日の間、十分な食物と水を備えた酸素室としての役目を果たす、プレキシガラスボックスの中に置かれた。この箱の酸素流速は、 5 日の間、 1 . 5 L / 分で維持した。流速は、 1 日 2 回ベックマン酸素分析器（モデル D 2 、アーヴィング カルフォルニア州）を用いて確認した。前記酸素室は、 5 日間の過酸素環境の間、開かなかった。融合タンパク質（例えば配列番号 8 ）の眼内注射は P 1 2 日に実行され、そして、マウスは外気へ移され、それによって低酸素症を誘発する。 P 1 7 日において、マウスは生理的食塩水を用い、引き続き 4 % のパラホルムアルデヒド（ P F ）を用いて心かん流を施され、そして、それらの目は取り出されて、一晩 P F で固定される。その後、両目はすすぐれ、段階的なアルコールシリーズ中を通して、それから、放射断面を 6 μ m の厚さで切断した。視神経頭を通過する断片は、過沃素酸 / シップ試薬とヘマトキシリソで染色される。網膜を通過する 3 0 μ m 離れた切片から 3 0 0 μ m のスパンは、評価される。内部を規定する膜の前方の全ての網膜脈管の核は、各々の切片に於いて数えられる。 1 0 の数えられた切片の平均は、新生血管核の数の平均を与えるように一つの目につき一つの切片で決定される。

通常の、操作されていない動物では、制限膜前部の脈管細胞核は観察されない。融合タンパク質の投与は、融合タンパク質がない場合観察される数と比較して、大幅に網膜脈管核の数を減らす。

【 0 2 2 9 】

〔実施例 1 1 〕

配列番号 4 4 または配列番号 4 3 の硝子体内注射は、視神経の再生を刺激する R G C 細胞体の治療が生体内に再生を進めるかどうか調べるために、 R h o アンタゴニストを、視神経円板の 1 m m 後方における視神経の微細病変の直後に、硝子体に注射してもよい。初の実験で：配列番号 4 ( n = 4 ) が用いられる。対照群の動物は P B S 注射 ( n = 5 ) または微細病変 ( n = 5 ) だけを受ける。視神経の軸索再生は、順行性トレーサー C T の注射の後、 1 4 日後に評価した。

【 0 2 3 0 】

微細病変の 2 週後、実質的に、対照動物（図 1 3 A ）において C T 陽性の軸索は検出されず、多数の軸索が配列番号 4 4 ( 図 1 3 B ) および配列番号 4 3 で処理したラット ( 1 3 C 図 ) で損傷部位を通して見える。微細衝突損傷モデルは空洞現象を提供せず、明らかに確定した損傷部位を提供し、そして、損傷部位は暗視野顕微鏡検査および / または C T 染色によって確認される。損傷部位を通過する種々の距離に存在する軸索の数が、それから数えられる。

配列番号 4 4 ( 図 1 3 D ) または配列番号 4 3 ( 図 1 3 E ) で処理された動物は、損傷部位から 5 0 、 1 0 0 と 2 5 0 の μ m の距離で、各切片につき対照群よりも多くの再生した軸索を有する。配列番号 4 3 を注射された動物の再生は配列番号 4 4 の治療をうけた動物のそれと類似しており、より非常に精製された配列番号 4 3 ( 図 1 3 C ) で扱われる

10

20

30

40

50

何匹かの動物のより長い軸索のより大きな数が観察される。配列番号44は、微細病変形成の4週間後に再生を評価するにも用いられる。治療が軸索成長に持続する影響を及ぼすかどうか調べるために、処理された視神経の、軸索切断の2週間および4週間後の、最も長い軸索の平均長を、比較することができる。軸索長に関する有意差は2週目と比較した4週目に見つけられておらず（データは示していない）、一回の治療では継続された長期の成長にならないことが示唆された。目で注射の後、配列番号43の局在性を調べるために、視神経の微細病変形成の後の目に5 $\mu$ gの配列番号43を注射した。網膜と視神経のホモジエネートは、3日後のウエスタンプロットのため準備され、抗C3抗体でプローブされた。隔離されたレーンに通すことにより、配列番号43特異的バンドは、（組み換え型配列番号43タンパク質と比較された（データは示していない）。

10

## 【0231】

## 〔実施例12〕

配列番号43による遅れる治療は、障害傷跡を通して再生を刺激する

配列番号43による遅れる治療が障害傷跡を通してRGCsの再生を刺激するかどうか究明するために、配列番号43を視神経の微細病変形成の4日後、硝子体に注射し（n=8）、そして、再生の度合いを10日後に調べた。対照群動物には、PBS（n=5）を注射した。多数のCTに対して陽性の軸索が治療を受けた動物で損傷部位であった所において見られ、一方、PBSの対照群においては（図14A）ごく少数しか観察されない。配列番号43で処理された動物は、損傷部位（図14B）から50 $\mu$ m、100 $\mu$ m、250 $\mu$ mおよび500 $\mu$ mの距離において、切片に対し、対照群より著しく多数の軸索を再生させる。

20

切片に対する軸索の数の比較により、配列番号43の注射を即時治療したものであっても（図13D）、遅延して治療したものであっても（図14B）、動物の軸索の再生に於いて同様の数が示される。

最も長い軸索の平均は、PBS対照群（図14C）のものより、即時或いは遅延して、配列番号43の治療をした動物のほうがより長い。これらの結果は視神経損傷の後、Rhodopsinアンタゴニスト治療のために治療的な期間の存在を示しており、Rhodopsinの不活性化によりRGCが軸索が障害傷跡全体で成長させていることを示す。

30

## 【0232】

## 〔実施例13〕

配列番号43の硝子体内注射は、RGC生存率を増やす

視神経の損傷の後、RGCのおよそ半数は、1週後にアポトーシスによって死ぬ。配列番号43の一回の硝子体内注射がRGCを細胞死から保護するかどうか決定するために、RGC生存率は、網膜の全載標本で調べることができる。RGCは視神経軸索切断の1週前に逆行的にフルオロゴールドでラベルされ、そして、生存しているRGCsは配列番号43で処理された動物（7dのn=7、7日；n=5、14日）、または対照群ビヒクルにおいて7日後または14日後に数えられる（n=3、7日；n=4、14日）。配列番号43による治療は、軸索切断の1週後、ビヒクルを注射した動物における40%の生存率（図15）と比較してRGCを完全にレスキューする。一回の注射後のRGC生存率は継続されず、そして、RGCの数は1週後に減少する。しかし、14日目に、配列番号43の治療をされた細胞の生存率はまだ大幅に向上し、処理を受けた動物のRGCsの数は対照群と比較して2倍以上になる。

40

## 【0233】

## 〔実施例14〕

Rhodopsinアンタゴニストの反復投与がRGCの生存率を増加させる

目に於ける軸索切断の2週後のRGC密度は、1回、2回または、3回の1 $\mu$ gのC3-11であり、定量化されることがある。以下の配列番号43の治療計画を実行することが出来る：（i）視神経障害時（0日）の1回の注射；（ii）2回の注射（神経損傷後の0日後と5日後）；そして、（iii）3回の注射（0日後、5日後および10日後）。強膜を通しての穿孔の数は、0日後に実行された注射場所を用いて、全ての注射を同じ

50

部位を用いることにより、最高 2 箇所に限られる。網膜を通る切断や穿孔のような網膜損傷は齧歯類において、毛様体神経栄養因子 (C N T F) 、塩基性線維芽細胞成長因子 (b F G F) および F G F レセプター - 1 (F G F R - 1) の m R N A レベルを上昇させる可能性が有り、C N T F と b F G F の両方は視神経障害の後で R G C 生存率または再生を進めることが示されているため、これは重要な問題である。

#### 【 0 2 3 4 】

##### 〔実施例 1 5 〕

R h o アンタゴニストの反復投与が R G C の生存率を増加させる

更なる R h o 抑制剤の度重なる投与が軸索再生を強化するかどうか決定するために、実験的なプロトコルを、配列番号 4 3 (1  $\mu$  g) の複数の投与を 2 週期間にわたり実行し確立した。視神経の微細損傷は 0 日に実行された、そして、治療群は以下の通りである：(i) 3 回の投与 (神経損傷の後、0 日後、5 日後、10 日後)；(ii) 2 回の遅延投与 (4 日と 10 日)；および (iii) 2 回の初期投与 (0 日後と 5 日後)。一回の投与が 0 日後、または、4 日後に実行された時、再生の範囲が類似していることが明らかに分かっている (Bertrand et al., 2005, J Neurosci, 25: 1113-1121)、2 回投与プロトコルは初期および遅延投与計画に基づいて設計される。

#### 【 0 2 3 5 】

##### 〔実施例 1 6 〕

B A バリアントの活性

P E G 化バリアントの G H 活性は、上述されたように評価された。配列番号 1 0 P E G 化バリアントの R h o A D P リボシル化能力の半定量的な評価は、培養された P C - 1 2 細胞 (表 8) を使って行われる。分子レベルで、in vivo での細胞の C 3 酵素処理は R h o A の 4 1 A s n の A D P リボシル化に終わり、そして、不可逆的な不活性化に至る。

#### 【 0 2 3 6 】

表 3 で示されるように、C 3 バリアントの G H 活性と N G 1 0 8 細胞の神経細胞再生を進める能力の間には相関関係がある。この相関関係は、G H および A D P リボシル化活性を失った熱不活性 C 3 を用いて確かめられ、対応する神経細胞成長を進めることができなかった。類似した発見は in vivo にもあてはまり、そこで、その G H と A D P リボシル化活性を取り除かれた変異した C 3 のバリアントは視神経損傷に引き続く神経保護作用または神経再生作用を提供することができなかった。

#### 【 0 2 3 7 】

A D P リボシル化を評価するために、共有結合した A D P リボース基が S D S - P A G E の上で R h o G T P a s e の見た目の分子量を増やすという事実を利用することができ、抗 R h o 抗体を用いウエスタンプロットにより、容易に視覚化することができる。

R h o G T P a s e の見た目の分子量の変動は、A D P リボース部分の R h o 分子への期待される追加を確かめる。全ての P E G - 配列番号 1 0 バリアントは、A D P リボシル化された R h o A の高分子量バンドを示し、そして、彼らが P C - 1 2 細胞に浸透する能力とともに、それらの先天的な A D P リボシル化活性を保持したことを示した。

#### 【 0 2 3 8 】

10

20

30

40

## 【表8】

表8

## PEG化したバリアントのGH活性

PEG-配列番号10 バリアント	GH特異的活性, U	ADPリボシル化
配列番号10	31.8	+
BA-220	26.9	+
BA-225	25.9	+
BA-230	27.5	+
BA-231	27.2	+
BA-235	30.4	+
BA-236	22.5	+/-
BA-240	28.2	+

10

20

30

40

## 【0239】

## 〔実施例17〕

## PEG化配列番号10変形の生体内投与

配列番号10は、緑内障と加齢性黄斑変性症(AMD)のいくつかの動物のモデルにおいて、網膜細胞の神経細胞保護作用を提供する。

図18に関して、スピローグドーリーラットの目の薬物動態学的研究は、眼内に注射された配列番号10が送達後、1時間以内にピーク濃度で網膜組織の中に速く散布されたことを証明する。タンパク質は24時間経過するまで網膜でほとんど検出不可能である。数年をかけてゆっくり進行する疾病への実行可能な眼内注射治療を発展させるため、長い耐久性をもち、持続した放出製剤が必要である。これを達成する潜在的手段の一つはPEG化を通して注射されたタンパク質の生物学的住居時間を長くすることである。この戦略は、近年、滲出性AMDのために上市されたPEG化された治療的なアブタマーである、Macugenの場合で既に、成功であると証明されている。これを考慮して、配列番号10のPEG化した形態が、修飾が網膜存在時間の増加につながるかどうか調べるために、ラット目のPK検査においてテストされた。

## 【0240】

PEG化された配列番号10バリアントをテストする実験の第1セットのために、網膜は、5μlの等張生理的食塩水に希釈された10gのタンパク質の眼内注入(10μlハミルトン注射器を用いて後眼房の硝子体液に)の24時間後に集められた(グループにつき3匹のラット)。対照群の目は、ビヒクル(等張生理的食塩水)を注射される。動物は、過量投与した麻酔により供給され、生理的食塩水をかん流し、目を取り除き、解剖のために処理した。網膜を均質化し、そして、タンパク質は可溶化バッファで抽出した。各々の抽出液のタンパク質濃度は、修正されたラウリー分析評価を使って決定した。バリアントの組織濃度は、機密サンドイッチELISAを使用して測定された。手短に述べると、配列番号10に特異的なポリクローナル捕獲抗体は、固相をつくるために、マイクロプレートに吸着される。ウシ血清アルブミン(BSA)でプレートをブロックした後に、テストサンプル、標準および品質対照群は被覆段階抗体とともにインキュベートした。そして、それは溶液中でバリアントを捕獲する。同じポリクローナル抗体によるインキュベーションがビオチンに接合した後、ステプタビジン-HRPとそのサブストレート溶液(テトラメチルベンジン(TMB)/過酸化水素)で検出が実行される。発色現像は結合したBAバリアントの量と比例しており、そして、色強度は分光測光法によって定量化される。

## 【0241】

BA-220とBA-225に対して測定されたタンパク質濃度は配列番号10のそれに

50

等しく、そして、同様の薬物動態学的プロファイルを反映する。対照的に、B A - 2 3 1 は減少した組織クリアランスと、より長い滞留時間（図 1 6）を示す。この優れた結果は、配列番号 1 0 のより大きな P E G 付加物の合成につながる。

#### 【 0 2 4 2 】

##### 〔 実施例 1 8 〕

###### 配列番号 1 0 と P E G 化バリアントの薬力学的プロファイル

生物学的標的 R h o に関して、配列番号 1 0 と P E G 化バリアントの薬力学的プロフィールを調査するために、網膜 R h o A の A D P リボシル化は、ゲルシフト分析評価を用いて可視化される（上述）。図 1 7 を参照して、組織は先に述べたように E L I S A のために集められ、そして、網膜タンパク質はプロテアーゼ阻害剤を含んでいる R I P A 緩衝液の溶解によって抽出された。核後部抽出物は遠心分離によって得られ、1 2 . 5 % のポリアクリルアミドゲル上で S D S - P A G E ( L a e m m l i 1 9 7 0 ) によって、分解される（3 0  $\mu$  g のサンプル）。テストされるバリアントの全ては細胞内 R h o を A D P リボシル化することができ、そして、それらが組織と細胞（図 1 7）に浸透する能力をプラスして生物学的活性を保持したことを示す。

10

#### 【 0 2 4 3 】

親タンパク質と P E G 化バリアントの間で薬物動態学的プロフィールを比較するために、各々のタンパク質の 1 0  $\mu$  g は 5  $\mu$  l の生理的食塩水（グループにつき 3 匹のラット）の中に注射され、そして、網膜組織を E L I S A 分析のために所定の時点に先に述べたように集めた。

20

#### 【 0 2 4 4 】

網膜クリアランスの比較の経時変化は、d i - P E G - 2 1 k D a - B A - 2 3 1 を使って調査される。テストされた全ての時点で、このバリアントは親タンパク質（図 1 8）と比較して、より高い組織保持を示す。このように、P E G 化が顕著に、目の中の配列番号 1 0 の全体の滞留時間を少なくとも 4 8 時間後まで増やす。

30

#### 【 0 2 4 5 】

他のより高分子が付加した付加物の薬物動態学的プロフィールは、先に述べたように調査されることもできる（グループにつき 3 匹のラットにおいて、5  $\mu$  l の生理的食塩水中の 1 0  $\mu$  g のバリアントで）。配列番号 1 0 への 2 1 、 3 0 、および 4 0 k D a の E G グループの付加は、非 P E G 化されたバリアント（図 1 9）と比較して、2 4 時間および 4 8 時間後の網膜組織レベルが顕著に上昇している。

30

#### 【 0 2 4 6 】

同じ組織サンプルは、バリアントの生体内生物学的活性を確かめるために、先に述べたようにゲルシフト分析評価にかけることもできる。すべてのテストされたバリアントは、テストされた 2 つの点で（図 2 0）、R h o を A D P リボシル化することができる。

40

#### 【 0 2 4 7 】

##### 〔 実施例 1 9 〕

###### B A - 2 3 1 の神経保護能力（配列番号 1 0 の P E G 化された変形）

B A - 2 3 1 の潜在的神経保護能力は、網膜変性を遅らせやすいマウス系統で試されることができる。r d s マウスは、ヒトの光受容体 R D S ベリフェリン遺伝子内の突然変異に関連がある遺伝的に自然に起こる網膜色素変性症を有する。生後 4 カ月のものに残っている光受容体のおよそ 5 0 % で、このモデルの変性は、初期の発症と遅い進行を有する。これらのマウスは、網膜変性モデルで B A 変形の神経保護の可能性を研究するための、よく特徴づけられた再生可能な i n v i v o モデルを述べる。

#### 【 0 2 4 8 】

離乳期（3 週）から始め、0 . 1 g の配列番号 1 0 または B A - 2 3 1 を、マウス（グループにつき 5 匹）の右目に注射し、マウスが 4 カ月齢になるまで 2 または 3 週ごとに続ける。左目は、対照群を提供するために、同じ日程で度重なる生理的食塩水の注射を施した。イソフルラン麻酔のもと、1  $\mu$  l の投与量で微量注射器を使って眼内注射を実施した。動物は過量投与による麻酔によって供給され、そして、目を取り出し、パラフィン包埋の

50

前に Bouin 定着剤でインキュベートした。眼球は  $5 \mu\text{m}$  の連続切片に切り分けられ、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。視神経の近くでとられる網膜切片の写真を撮り、そして、光受容体計数は状態ごとに 6 ~ 8 枚の異なる写真 / 動物で行った。計数は、網膜の各々の半球を  $100 \times 100 \mu\text{m}$  の長さ ( 半球につき 3 ~ 4 の領域 ) の領域で代表して行った。

【 0 2 4 9 】

下の表 ( 表 9 ) の中で示したように、PEG 化バリアントは、修飾されていない配列番号 10 と比較して、rds 変異体マウスの網膜で周辺光受容体の生存率を大幅に向上させる ( 結果は、各々のマウスの治療された目と対照群の目の間の光受容体生存率のパーセンテージとして表される ) 。このデータは、増加した目の滞留時間を伴う、PEG 化した配列番号 10 バリアントが、度重なる投与と連続した薬剤暴露を必要とする長期のモデルで神経保護作用を増幅する、治療的に有利な点を与える。

10

【 0 2 5 0 】

【 表 9 】

表 9

漸進性網膜変性 ( rds ) のマウスモデルの繰り返される眼内注射による光受容体の神経保護作用。

BA-バリアント	投薬計画	ビヒクル注射した目と比較した末梢性光受容体生存率 (%)
配列番号 10	2 週毎に $0.01 \mu\text{g}$	0
	3 週毎に $0.01 \mu\text{g}$	0
BA-231	2 週毎に $0.01 \mu\text{g}$	13 % ( $p < 0.05$ )
	3 週毎に $0.01 \mu\text{g}$	15 % ( $p < 0.05$ )

20

【 0 2 5 1 】

〔 実施例 2 0 〕

融合タンパク質配列番号 43 がガン細胞の激増を減らすことを証明するために役に立つ、細胞増殖での尺度としてのトリチウム化されたチミジン取り込みの一般的な方法細胞株をマイクロプラズマについて検査し、研究開始の前にネガティブであることを確認した。細胞株は、ATCC から入手した。HEC-1B 株は、10 % の FBS と 1 % の HEPES で補った EMEM で培養した。Caco-2 株は、20 % の FBS、1 % の HEPES、1 mM のナトリウムビルビン酸塩と 0.1 mM の非必須アミノ酸を補った EMEM で培養した。SK-MEL-1 株は、McCoy を補給した 10 % の FBS と 1 % の HEPES で培養した。

30

【 0 2 5 2 】

融合タンパク質の 2 X 希釈標準溶液  $100 \mu\text{l}$  は、陽性のものとビヒクル対照群の各々の細胞 ( $4 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$ ) を含んだ 3 組の 96 穴マイクロタイタープレートに播種し、最終量を  $200 \mu\text{l}$  とした。前記プレートは 37 インキュベーターに湿度 100 % で、5 % の  $\text{CO}_2$  環境下においていた。およそ 54 時間のインキュベーションの後、 $20 \mu\text{l}$  のトリチウム化されたチミジン ( $^3\text{H}$ -チミジン) ( ICN 、モントリオール、カナダ) の量は、1.0 Ci を含み、各々に加えられた。 $^3\text{H}$ チミジンは、10 % の FBS で補われる RPMI-1640 で準備される。更に 18 時間、培養菌は上述の通り同じ状況で培養された。インキュベーション終了後、細胞はオートメーション化したセル ハーベスター ( Tomtec ) で集菌し、 $^3\text{H}$ チミジンの分毎のカウント ( cpm ) はマイクロプレートシンチレーションカウンター ( TopCount NXT 、パッカード ) で測定した。

40

【 0 2 5 3 】

例えば配列番号 43 のような本発明の融合タンパク質が悪性細胞の表現型の複数の面に影

50

響を及ぼすことが証明は、増殖し成長する細胞へのトリチウム化チミジン編入をモニターすることによって示されることができ、そこで、細胞培養培地に加えられたトリチウム化チミジンは細胞に取り込まれ、各々の細胞がDNAを合成するときに使う、その中のチミジン三リン酸塩プールの一部になる。

トリチウム化チミジンは、各々の細胞で、DNA高分子に共有結合して取り込まれる。成長しない細胞、または、アポトーシスまたはネクローシスに細胞死をする細胞では、トリチウム化されたチミジンは細胞に取り込まれないか、または細胞の溶解により細胞培地に放出される。トリチウム化チミジン編入は、細胞成長、細胞分裂、細胞停滞と細胞死に関する配列番号43といった本発明の融合タンパク質の影響の全体的尺度として使われることができる。配列番号43が<sup>3</sup>Hチミジンの減少を誘発する細胞系は、以下を含む：ヒト子宮体がん細胞株HEC-1B、ヒト結腸直腸ガン細胞株CaCo2、ヒト黒色腫ガン細胞株SK-MEL-2、およびヒトCNSガン細胞株A-172（図21～28を参照）。

#### 【0254】

##### 〔実施例21〕

配列番号10はRh o AをADPリボシル化する

細胞をin vitroでC3細胞外酵素処理すると、41AsnにおいてRh o A、BおよびCがADPリボシル化され、引き続き、それらの不活性化に至る。共有結合したADPリボースグループは、SDS-PAGEの上でRh o GTPasesの見た目の分子量を増やし、反Rh o 抗体を用いたウエスタンプロットですぐに視覚化することができる。配列番号10（図30）で扱われるH U V E Cの抗Rh o AウエスタンプロットのRh o GTPaseの見た目の分子量の変動は、Rh o 分子に仮想のADPリボース半分の添加を示す。1μg/mLの低さの配列番号10の濃度と30分の治療期間は、Rh o Aの完全なADPリボシル化をもたらすのに十分である。これらの知見は、配列番号10の比較的低い投与量が洗練されたH U V E Cの細胞質に能率的に深く入りこむのに十分なことを明らかに証明する。

#### 【0255】

##### 〔実施例22〕

配列番号10は、H U V E Cによって試験管内の管形成を減少させる

図31を参照して、血管形成で合図している経路Rh o - ロックの重要性を評価するために、トラニラスト（10μg/mLと50μg/mL）が明確な対照群として使われる。トラニラストが主要な血管形成ルート（すなわちV E G F経路）のうちの1本をふさぐことが知られている。一つにはて、V E G FがV E G F - Rに結合することは、P K Cの一部のシグナル経路の開始であるレセプターチロシン自己リン酸化を刺激する。トラニラストは、V E G Fに依存するP K C活性化を禁止することによって作用する。図31Aは、無治療のH U V E C（Ct1）が厚くてよく閉ざされた毛細管のような構造を作ったことを示す。テストされる両方の濃度の配列番号10は、制御細胞（図31A）で見られるものと比較して、細い、完全には閉じていない未熟なチューブを生産する。類似した形態は、テストされた両方の濃度で、R O C K抑制剤のファスジルを用いて得られた。予想通りのトラニラストは両方の濃度で、未熟な毛管の構造で特徴づけられる管形成の減少と多くのコロニーでの伸長の欠失を生じた。毛管の長さの測定により、配列番号10とトラニラストが濃度に依存して管の長さを少なくとも51%、有意に（p < 0.05またはp < 0.01）減少させ、一方ファスジルは高濃度の投与量でのみ（50μM）管形成を58%有意に（p < 0.05）減少させることができた（図31B）。先に提示されたすべての結果は、Rh o が能力を通して血管形成に従って働き、増殖と移動に対するその効果より大きな範囲で細胞骨格を制御することができることを示唆する。

#### 【0256】

##### 〔実施例23〕

配列番号10は、ラット大動脈輪で血管形成を減少させる

ラット（スピローグ - ドーリー）胸大動脈は、1mmの厚さの小さなリングに切られて、

10

20

30

40

50

固められた E C m a t r i x ( マトリゲル ( 商標 ) ) につつまれ、それから孵化された、配列番号 1 0 の非存在下 ( C t 1 ) または、 1 0  $\mu$  g / m L の配列番号 1 0 の存在下で、 0 日から 7 ~ 8 日まで、内皮基礎 2 培地 ( E B M - 2 ) で、 h E G F 、 G A - 1 0 0 0 、 V E G F 、 h F G F - B 、 r 3 - I G F - 1 、アスコルビン酸およびヘパリン ( E G M - 2 から F B S とヒドロコルチゾンを差し引いたものと一致する ) を補いインキュベートした。培地の補充は 4 日目に行った ( 配列番号 1 0 無し、または有りで ) 。リングからの血管形成は倒置型位相差顕微鏡を通して 2 5  $\times$  ( 上部パネル ) または 1 0 0  $\times$  ( 下部のパネル ) 拡大で観察した。画像はノーザンエクライプソフトウェアを使用して、示された倍率で処理された。低倍率 ( 2 5  $\times$  ) 位相差顕微鏡分析は制御リングからの細胞成長の発展を明らかにする ( 図 2 9 A 、パネル 1 ) 。より高い倍率 ( 1 0 0  $\times$  ) では、鎖とコードからなる結合した細長い細胞のよく形成された毛細管のような構造が明らかに見えた ( 図 2 9 A 、パネル 3 ) 。対照的に、低倍率の配列番号 1 0 治療をうけたリングの低い拡大図は、制御リングと比較してより少しの細胞成長を示した ( 図 2 9 A 、パネル 2 ) 。より高い倍率では、毛管のネットワークは深刻に崩壊し、制御リングのそれらと比較して非常に短くてより細い細管を含んだ ( 図 2 9 A 、パネル 4 ) 。

10

## 【 0 2 5 7 】

細管の長さは、平均  $\pm$  S E M ( 図 2 9 B ) として測定され、報告された。結果は、三つ組の一つで少なくとも分析される 3 つの独立した実験を代表する。シンボル \* は制御リングから有意差 (  $p < 0 . 0 5$  ) を示す。

20

細管長のこれらの定量分析は、配列番号 1 0 治療に起因する船長の 3 0 % の減少 (  $p < 0 . 0 5$  ) を示した。集団で、これらのデータは、配列番号 1 0 が強力な前の活発なモデルで血管形成の抑制を調停することができることを明らかに証明した。

## 【 0 2 5 8 】

## 〔 実施例 2 4 〕

配列番号 1 0 は、 H U V E C 増殖と遊走に最小の影響を及ぼす

コラーゲンコートしたウェルの上へ撒いた H U V E C 培養液において、アラマーブルー染色 ( 図 3 2 ) により評価されたように、配列番号 1 0 は、非常に高い投与量 ( 最高 1 0 0  $\mu$  g / m L 、 7 2 時間 ) でさえ増殖率に識別できる影響を及ぼさない。これに比べ、 R h o キナーゼ抑制剤のファスジルはトラニラストと同様、どちらも 2 4 時間または 7 2 時間後のどちらにおいても、 H U V E C 細胞の増殖に有意な (  $p < 0 . 0 1$  ) 縮小を生じさせる。配列番号 1 0 は能率的に R h o A をリボシル化し、したがって、これらの状況下のその活性を妨げ、このシステムにおける H U V E C の増加が、この部分の血管形成配列とともに、 R h o A 活性を独立して促進する。対照的に、 H U V E C 増殖は、おそらくトラニラストによってプロックされるプロテインキナーゼ C を含む標的の活性と同様に R h o キナーゼ活性に依存するようである。

30

## 【 0 2 5 9 】

他の細胞機能と R h o G T P a s e 抑制で混乱することが知られている血管形成プロセスの部分は、内皮細胞遊走である。 H U V E C 移動に関して配列番号 1 0 の影響を評価するために、細胞は望ましいテスト化合物とともに t r a n s w e l l インサートの上部で種をまかれ、そして、移動はそれから挿入物の底面で 1 0 n g / m L の V E G F で誘発される。 2 0 時間の遊走の後、挿入物の膜を通過する細胞は、カルセイン A M の調査についてのラベルし、蛍光を通して調べた。

40

予想通りに、 1 0 n g / m L の V E G F (  $p < 0 . 0 0 1$  ) は、未処理の支配細胞と比較して 2 . 2 倍 ( 図 3 3 A ) 、の有意差 (  $p < 0 . 0 0 1$  ) で H U V E C 遊走を刺激する。トラニラスト ( V E G F によって誘発された移動を禁止することが知られている明確な対照群 ) は、 1 0 ( 4 5 % 、  $p < 0 . 0 5$  ) と 5 0 ( 7 2 % 、  $p < 0 . 0 0 1$  ) g / m L で有意に H U V E C 移動を減少させる。 5 0 の M F a s u d i l が 6 6 % (  $p < 0 . 0 0 1$  ) 移動を減少させる間、配列番号 1 0 はテストされる両方の濃度でかろうじて H U V E C の移動を減少させる。 5 0 g / m L の配列番号 1 0 による 2 4 時間の前処理が V E G F に依存する H U V E C の減少 ( 1 7 % 、  $p < 0 . 0 5$  ) であった後にのみ、移動は観察さ

50

れた(図33B)。H U V E Cの増殖と遊走に関してR h o G T P a s e sとR h oキナーゼを妨げることの明瞭な違いは、関係する異なった細胞経路があることを示唆する。

#### 【0260】

結合し、配列番号10でR h o不活性を含むこれらの結果は、内皮細胞の増殖とV E G Fに依存する遊走が試験管内でH U V E Cチューブ形成において減少を管理しているメインイベントでないことを示唆する。おそらく、血管形成プロセスの他のステップは、R h o G T P a s eまたはR h oキナーゼの抑制の後で影響を受けなければならない。

#### 【0261】

##### 〔実施例25〕

ガン細胞の増殖抑制に関して融合タンパク質の影響を示す一般的な方法

10

細胞タンパク質含有量の試験管内の測定の検査法にしみをついているスルフォルホルダミンB(S R B(M o l e c u l a r P r o b e sから入手可能な))タンパク質は、開発されて、v i t r o抗腫瘍ふるい分け(S k e h a n e t a l . , 1990)において、N C Iで日常的な使用のためにその後採用された。S R Bは細胞タンパク質の塩基性アミノ酸と結合する、そして、比色評価は細胞数に関連がある全体のタンパク質多数の推定を提供する。この分析評価は、死んだ細胞も溶解して、手順の間、取り出されるか、さもなければ比色終点に貢献しないという仮定に基づく。S R B分析評価は、細胞の生き残っている分画を過大評価するかもしれない。

#### 【0262】

##### S R B検査のプロトコル

これらのテストは、N C I 60細胞系制御盤の上で行われる。細胞は、640のメディアが細胞系ごとにA T C C推薦に従って5%の胎児のウシ血清とL-グルタミンで補ったR M P I-Lで大きくなる。対数関数的成長の細胞は、トリプシン処理されて、数えられる。細胞は、成長メディアの100のμLで、個々の細胞系の二倍になっている時間に従い、96穴マイクロプレートで予防接種される。マイクロプレートは、指數関数的な成長を再び始めるために、24h 37、5%のC O<sub>2</sub>と100%の相対湿度でインキュベートした。24hの後、各々の細胞系の2枚のプレートは、テスト記事追加(T 0)の時点で細胞系ごとに細胞人口の測定を意味するために、i n s i t uでT C Aを固定した。T C Aは除去し、そして、プレートは乾くために少なくとも24h室温でインキュベートした。

20

#### 【0263】

この発明の融合タンパク質は、凍結乾燥された粉末として凍結貯蔵される。10mMのリン酸ナトリウム(緩衝pH7.4)でマイクロリットル当たりおよそ4.42マイクログラムの融合タンパク質で医薬組成物をつくることは、無菌の水で再構成することができる。服用点ごとに、貯蔵液の連続希釈剤は、200μg/mL、20μg/mL、2μg/mL、0.2μg/mLと0.02μg/mLで融合タンパク質を提供するために50μg/mLゲンタマイシンを含んでいる完全な媒体で準備される。それらのテスト記希釈剤の100μLの1投与量は、融合タンパク質のために最終的な対数希釈列の投与を成し遂げるために、すでに100μLの培地を含んでいる適当なウェルに加えられる。

30

#### 【0264】

融合タンパク質(すなわち薬剤)追加の後、マイクロプレートは37、5%のC O<sub>2</sub>と100%の相対湿度で追加時間の間インキュベートした。分析は、トリクロロ酢酸(T C A)を使いウェルの底の細胞中のタンパク質を固定することによって終了した。プレートは乾燥し、それから、1%の酢酸のS R B溶液0.4%(w/v)を100μL各々のウェルに加えた。プレートは、タンパク質結合染料と共に10分間室温でインキュベートした。

40

#### 【0265】

染色の後、結合しなかった染料は1%の酢酸で洗うことにより除去した、そして、プレートを乾燥した。プレートが穏やかに混ぜられる間、結合染料は10mMのトリズマ塩基を200μL加えることによって溶かした。染料の量は、515nmの波長でマイクロプレ

50

ートリーダーにより光学濃度を読むことによって計った。

データは、E x c e 1スプレッドシートで分析した。

T 0 = 融合タンパク質付加時(0時間)の平均吸収度;

C = コントロールにおける(薬を含んでいないテスト項目)平均吸収度;

T i = 融合タンパク質品(希釈剤列の異なる服用点)のための平均吸収度;

G I = 成長抑制;

T G I = 全成長抑制;

L C 5 0 = 致死濃度(全個体の50%致死);

成長率はそれぞれのテスト項目濃度について計算される:

【数1】

$$\text{成長率 (\%)} = \left[ \frac{(T_i - T_0)}{(C - T_0)} \right] \times 100 \quad \text{ここで濃度 } T_i > T_0$$

$$\text{成長抑制 (\%)} = \left[ \frac{(T_0 - T_i)}{(T_0)} \right] \times 100 \quad \text{ここで濃度 } T_i < T_0,$$

【0266】

成長抑制率(%)は、異なる投与量における効果を比較するためにチャートを準備するのに用いられることができる。百分率の成長プロットはプロットされ、点は、+50、0と-50のPG値を横切る用量反応曲線となり、G I 5 0、T G IとL C 5 0を計算するのに用いられた。G I 5 0、または、成長を50%妨げることに要求される濃度は、融合タンパク質に関連したパラメータである。

【0267】

〔実施例26〕

ヒトガン細胞系の細胞増殖の抑制を示すS R B分析法の特異的な使用

【0268】

【表10】

20

30

表10

S R B分析で測定される融合タンパク質治療後のG I 5 0  
(細胞増殖を50%抑制する濃度の)

細胞系	ガンの種類	G I 5 0 (μg / mL)
C a k i - 1	R e n a l	0. 0 5 4
T K - 1 0	R e n a l	0. 5 2
S F - 2 6 8	C N S	0. 3 2 6
H O P - 6 2	N o n - S C L C	0. 2 6 9
N C I - H 2 2 6	N o n - S C L C	4 8. 2
H S 5 7 8 T	B r e a s t	3 6. 6

40

【0269】

この発明の一つの融合タンパク質、配列番号43は<sup>3</sup>HチミジンとN C Iスクリーンの細胞系のおよそ10%に対する影響でテストされる6つのヒト腫瘍細胞系のうちの4つに影響を及ぼす。S R Bテストでは、それは細胞増殖抑制特性があるように見える;成長は規制と比較して妨げられる、しかし、タンパク質の全体的な量は時間ゼロ(T z)で計られる量と比較して減少しない。これらの結果は、C 3転移酵素が動物にとても有毒でないことを示している生体内データに同意する。観察されたG I 5 0価は、ナノモルからミクロモルの範囲で、およそ27kDaの分子量を融合タンパク質と対して与える(表10)。

50

## 【0270】

## 〔実施例27〕

## プルダウンアッセイによるRho活性の検出

NG108細胞は、5%の胎児のウシ血清(FBS)、1%ペニシリン・ストレプトマイシン(P/S)の存在下で、細胞培養した。細胞が定着した後(37で3~6時間)、BA05を培地に加えた。細胞を溶解させるために、それらは氷温トリス緩衝生理食塩水(TBS)で洗われ、改良したRIPAバッファ(50mMトリスpH7.2、1%のトリトンX-100、0.5%のデオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、500mMのNaCl、10mMのMgCl<sub>2</sub>、10g/mlのロイペプチジン、10μg/mlアプロチニン、1mMのフェニルメチル-スルホニルフッ化物(PMSF))で溶解する。細胞可溶化物は4で10分間、13,000gで遠心分離により透明化し-80に保った。

10

## 【0271】

GST-Rho結合ドメイン(GST-RBD)の精製は細胞溶解物を用いて行われ、それらは解凍され、500uLのRIPAバッファに100万細胞が含まれるように再懸濁した。GST-Rho結合ドメイン(GST-RBD)を作るため、PGEVベクター中でGST-RBDを発現しているバクテリアは、100μl/mlでアンピシリンを含むLB培地(LB)で育てた。一晩培養したものは、1:10の割合で3600mlのLBに薄められて、2時間37の条件下、震振細菌培養器で培養した。イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(0.5mM)は、2時間インキュベートした培地に加えられた。バクテリアは、それから15分間5,000gの遠心分離によって集菌した。ペレットは、それから40mlの溶解バッファ(50mMのトリス、pH7.5、1%のトリトン-X、150mMのNaCl、5mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT、10g/mlのロイペプチジン、10g/mlのアプロチニン、1mMのPMSF)で再懸濁した。超音波処理の後、溶解物は4で30分間14,000rpmで遠心分離した。

20

## 【0272】

凍った細胞培養は、RIPAバッファ(50mMのトリスpH7.2、1%のトリトンX-100、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%のSDS、500mMのNaCl、10mMのMgCl<sub>2</sub>、10g/mlロイペプチジン、10g/mlアプロチニン、1mM PMSF)で均質にした。ホモジエネートと細胞可溶化物は、2回の10分、13,000g、4の遠心分離により清澄化した。それらは、それからGST-RBDをグルタチオン結合アガロースビーズ(シグマ、Oakville、カナダ)に結合させて4で50分インキュベートした。ビーズは、それから4回洗い、サンプル緩衝液で抽出した。組織ホモジエネート中に存在するGTP結合Rhoと全体のRhoは、ウエスタンプロットによって検出された。タンパク質はニトロセルロースへ移されて、单クローンRhoA抗体(サンタクルス、サンタクルス、カリフォルニア)を使って調べられた。バンドはペルオキシダーゼにリンクされた2次抗体(プロメガ、マディソン、ワイオミング)で視覚化され、そして、HRPを基礎とする化学蛍光反応(ピアス、ロックフォード、イリノイ)を形成した。デンシトメトリー分析は、各々のバンドで信号の量をはかるために実行された。

30

## 【0273】

## 〔実施例28〕

配列番号43を例証として使用する、どの腫瘍がタンパク質融合治療に最も応じることができるかについて診断するあるいは確定する診断としてのRhoプルダウン分析の使用腫瘍の全てが取り除かれるとき、腫瘍の生検検体は外科的除去によって哺乳類(例えはヒト患者)の組織からとられ、残存組織を切除された腫瘍の縁に残した。サンプルは、ドライアイス上で、または、液体窒素中で凍らせた。およそ5mm<sup>2</sup>の切除された組織のサンプルは、500uL RIPAバッファ(50mMのトリスpH7.2、1%のトリトンX-100、0.5%のナトリウムdeoxycholate、0.1%のSDS、500mMのNaCl、10mMのMgCl<sub>2</sub>、10mg/mlのロイペプチジン、10mg/m

40

50

1 アプロチニン、1 mM PMSF) でホモジエナライズした。ホモジエネート液は、サンプルを更なる分析に提供するために、4 度で 13,000 g で 2 回の 10 分遠心分離によって清澄化した。サンプルは、それから、GST - RBD 結合グルタチオンアガロースビーズと共に、4 度で 50 分間インキュベートした。組織ホモジエネート液中に存在する GTP 結合 Rho と全 Rho は、ウエスタンプロットによって検出した。

【0274】

生検サンプルのどの細胞が Rho を活性化させたかについて検出するために、クリオスタッフ切片を準備した。RBD - GST の細菌の溶解物は、4 度で 30 分間 14000 rpm の遠心分離にて清澄化した。活性化した Rho は前記切片を RBD - GST を含む細菌溶解物でインキュベートすることにより検出した。生検サンプルクリオ切片は 4% PFA による後固定の後、細菌溶解物中で一晩インキュベートした。前記切片はそれから TBS で 3 回洗浄し BSA で 1 時間室温でブロックし、抗 GST 抗体 (Cell signal lining, New England Biolabs, ミシソーガ、カナダ) および細胞タイプ特異的抗体とともにインキュベートした。脳腫瘍の場合、ニューロンに特有の抗体 (NeuN) または星状細胞に特有の抗体 (GFAP) は、活性化 Rho を用いて細胞タイプを見つけるのに用いることができ、腫瘍診断を助ける。切片は TBS で洗われ、そして、FITC、テキサスレッドまたはローダミン結合 2 次抗体 (Jackson Immuno Research, ミシソーガ、カナダ) とともに室温で 2 時間インキュベートした。

10

【0275】

〔実施例 29〕

メタロプロテイナーゼ (MMP) 活性の減少を見つける一般的な方法

メタロプロテイナーゼ活性は、ザイモグラフィーで検出され、それにより酵素のタンパク質分解活性が非還元状況の下、ポリアクリルアミドゲル中で分離される。メタロプロテイナーゼ活性を見つけるために、Caki - 1 大腸癌細胞の成長からの培養基のゼラチン分解活性は、ゼラチンザイモグラフィーによって検出された。Caki - 1 細胞は 0.1、1.0 または 10 μg / ml の濃度の配列番号 43 とともにまたは対照群としての緩衝液とともに 24 時間インキュベートした。1 分画 (25 μL) の培地は 1 mg / ml のゼラチンを含んでいる 7.5% のポリアクリルアミドを伴う SDS / PAGE にかけられ、ポリペプチドを非還元状況の下で切り出した。MMP 活性を評価するため、SDS を 2.5% (v/v) のトリトン X - 100 で、室温で 30 分間インキュベーションすることによって取り除いた。このステップを繰り返し、ddH2O での 5 回すすいだ。次に、ゲルは 50 mM のトリス - HCl、pH 7.6、0.2 M の NaCl、5 mM の CaCl<sub>2</sub> と 0.02% (v/v) の Brij - 35 を含んでいるバッファで、37 度で 20 時間インキュベートした。ゲルはクーマシーブリリアントブルー R - 250 で染色され、脱色した。ゼラチン基板の酵素活性は、青い背景の透明なバンドとして見つけられる。これらの実験で、ゼラチナーゼ活性による MMP 酵素の特性は、HT - 1080 のようなポジティブコントロールで評価した。

20

30

【0276】

〔実施例 30〕

切除された腫瘍周辺を扱う一般的な方法

薬学的に許容できるクリームで明確に述べられて融合タンパク質 (例えば配列番号 43) を含む本発明の構成は、皮膚から切除部位を治療するのに用いられることができる。例は悪性黒色腫の治療です、そこで、そのようなクリームは腫瘍の切除部位を囲んでいる皮膚に付けられる。一つの態様では、配列番号 43 のような融合タンパク質を含有しているクリームのそのような製剤は、腫瘍の切除の前に皮膚に施されることができて、最初の生検の期間の間で、そして、明確な組織学的診断の前に腫瘍を治療するのに用いられることができる。腫瘍部位に投与する場合、クリームは腫瘍の拡散と転移を防ぐことができる。

40

【0277】

〔実施例 31〕

50

第2の腫瘍の予防が融合タンパク質から成っているこの発明の腫瘍余白A構成で成長して、配列番号43のような、水溶液のような例えは、外科用接着剤ジェル（例えはフィブリン接着剤またはヒドロゲル）で明確に述べられて、先に述べたように、または、例えは、腫瘍の外科的切除の領域を扱うのに用いられることがある。例は、大腸がんのためのcolonectomyの後の健康な結腸の治療です。さもなければ腫瘍の削除の前に腫瘍地域を囲んだ健康なコロン組織は、フィブリンシーラントのような外科的なジェルで、腫瘍と関連する組織の除去の後、配列番号43のような融合タンパク質組成で扱われることができる、残存組織で更なる障害の形成を防ぐために役に立つ。

## 【0278】

## 〔実施例32〕

10

哺乳類において臨床前有効性を示す一般的な方法

黒色腫細胞系は、ヌードマウスの最初のグループ（Charles River Laboratories）の皮下に移植される。腫瘍はマウスの最初の群れの成長したマウスで、収穫し、マウスの第2の群れの各々のマウス（マウスにつき1つの腫瘍）に、個々に移植した。

配列番号43と言った融合タンパク質の有効量（腫瘍1mLにつき10-100μgの範囲であると推定される）を薬学的に許容できるビヒクルに含んで、本発明の医薬組成物の毎日の注射は、マウスの第2のグループの各々のマウスに施される。対照群動物は、コントロールとしてビヒクルを注射した。腫瘍の発達は測られ、そして、ガンマ免疫タンパク質10（IP10）のような悪性ケラチン生成細胞のマーカーを測定するため、組織学的な検査を実行した。融合タンパク質を含む組成物は、第2のマウス群においてで実質的に腫瘍の成長を防ぐか、妨げる。

20

## 【0279】

## 〔実施例33〕

30

乳がんの再発の防止において挿入された胸装置の表面に投与される融合タンパク質を含む構成の使用融合タンパク質を含む、本発明の治療的に効果的な量の医薬組成物は、薬剤的に許容できる胸部移植片の表面上をおおう。腫瘍は、任意で、本発明の医薬組成物と共同投与し（手術前および/または手術後に）、患者の胸部組織から切除される。腫瘍の切除によってつくられる空所は、少なくとも融合タンパク質を含む医薬組成物でおおわれている胸部移植片で一部を満たされ、そして、切除や移植によって引き起こされる傷は閉じられる。第2の腫瘍の残留する腫瘍端組織の成長は、実質的に妨げられるか、防がれる。

## 【0280】

## 〔実施例34〕

30

患者の投与のための医薬組成物の準備

現在の発明の医薬組成物は、配列番号10（30mg/mLの貯蔵液または希釈溶液）とTisseel（フィブリンシーラント）キットの4つの構成要素を混ぜ合わせることによって準備されることがある：

凍結乾燥されたトロンビン；

トロンビンを再構成する1mLのCaCl<sub>2</sub>/再結合緩衝溶液；

40

凍結乾燥されたフィブリノゲン；そして、

フィブリノゲンを再構成する1mLの緩衝液。

配列番号10の貯蔵液は、-20で保存されて、使用の1時間前まで凍らせておかれる。配列番号10の貯蔵液は、2、3分の間手のひらにバイアルを置き解凍される。1mLの注射器を使い、配列番号10貯蔵液の0.3mLを取り出され、空のバイアルに注射した。無菌の注射器を使って0.15mLの無菌の水が加えられた。混和は、それから、穏やかにかき混ぜるによって実行される。1mLの注射器を使って、CaCl<sub>2</sub>溶液（Tisseelキットから）の0.3mLを取りだされて、捨てられる。

同じ注射器を使って、適当な配列番号10から0.3mLで、機能溶液は取りだされ、CaCl<sub>2</sub>小びんに注射されて、穏やかに渦巻くことによって混ざられた。1mLの注射器によるCaCl<sub>2</sub>/配列番号10バイアルの最大量は、取りだされて、トロンビン再構成

50

されたバイアルに注射される。トロンビン溶液は、使用まで37に保たれた。Tissuel Sealer Protein Concentrateは、使用の前に準備されなければならず、メーカーの指示に従って再構成されなければならない。トロンビン/配列番号10とTissuel Sealer Protein溶液とそれぞれのDuplicl Project注射器は取りだされる、そして、Tissuelは塊形成に引き続き投与される。

#### 【0281】

##### 〔実施例35〕

###### 硬膜外投与の後の配列番号10の配布

図34を参照して、配列番号10の分布は、通常の負傷したラット脊髄で特徴づけられることができる。脊髄組織中の配列番号10の浸透と分布は、個々のラット（各々の実験につきn=3-5ラット）から得られる組織に対しウエスタンプロット法を使用して評価した。すべてのプロットにつき、50μgのタンパク質は、各々のレーンに詰めた。12%のSDS-PAGE上の分離の後、タンパク質をニトロセルロースへ移されて、ブロックし、ポリクローナル抗配列番号10抗体を使って検査した。バンドはペルオキシダーゼにリンクされた第二の抗体（プロメガ）とHRPに基づく化学蛍光反応で視覚化した（Pierce Chemical Co.）。プロットはレーザーPersonal Densitometer SI（Molecular Dynamics）を用いて濃度をスキャンし、そして、バンドイメージはImageQuantソフトウェア版5.0（Molecular Dynamics）で分析した。背景サブトラクションの後、ソフトウェアによりバンドイメージの画素密度を測定し、そして、デンシトメトリー値は任意に設定した。

#### 【0282】

免疫組織化学のために、OCTに埋め込まれた脊髄を10μmの切片に処理し、スーパークロストガラススライドの上にのせ、4%のPFAで固定した。プロッキング溶液（5%正常ヤギ血清、PBS中の3%BSA）中の1時間のインキュベーションの後、配列番号10はモノクローナル抗体を使って検出し、FITC結合ヤギ抗マウス二次抗体（Jackson Immuno Research Laboratories）と1時間のインキュベーションの後、視覚化した。スライドは、ツァイスAxioskop 2蛍光顕微鏡で調べた。組織切片のイメージは、ノーザンEclipseソフトウェアを使用してとられた。Tissuel中のPBSのみ投与したラットは本実験の抗体特性と背景干渉を評価するコントロールとして使われた。

#### 【0283】

経時変化実験において、無傷の椎弓切除されたネズミで硬膜の上へ適用されるとき、脊髄組織を透過する配列番号10（50μg）の能力はTissuelと結合することにより確かめられる。硬膜は無傷のままにされ、そして、投与部位の1cmの組織は手術の1時間後に集めた。輸送配列を欠く野生型C3とは対照的に、配列番号10が速く脊髄（34A図）に深く入りこむとわかる。Tissuelマトリックスからの大量瞬時投与送出は、7日にまだ検出される残余レベルを伴う遅い放出段階につづき、投与の後、最初の2時間の間、最大で一定の脊髄レベルを与えた。

#### 【0284】

Rhoは、遍在するタンパク質で、通常細胞の機能に重要である。その全身的な抑制は、重要な副作用を生じる可能性がある。したがって、配列番号10送達が全体的な露出を制限するために、損傷脊髄を局所的に制限することは好ましい。硬膜外投与の後で、低レベルの配列番号10は、例えば皮膚と背中筋肉のような投与部位の近くの組織で検出される（5%未満の初期投与量）。しかし、Tissuelとともに局所的に投与されるとき、配列番号10（最高50μg）は前記投与量を使用した場合、傷治癒に対する明白な影響を実施しない。限られた露出は体循環（およそ0.5%の初回量、1時間のCmax）で見つかり、そして、タンパク質が器官（示されないデータ）でもそれ自体に集中することはみられない。更なる実験では、腎臓が除去（1時間に組織で見つけられる1%の初回量

10

20

30

40

50

)に関与することが分かり、そして、タンパク質は投与の後、最初の時間に尿で検出される。配列番号 10 は、腎臓で見つかるものより少ない量で、薬の摂取のすぐ直後に肝臓でも検出される。

#### 【0285】

配列番号 10 の背腹分布および頭尾部分布も評価した。送達の 24 時間後に、タンパク質は、ラットの挫傷をおい、治療を受けた、無傷あるいは開いた硬膜の、脊髄の背側と腹側で検出された(図 34 A)。脊髄外傷は、我々の実験的な状況の下で、配列番号 10 の分布に影響を及ぼさないことがわかる。椎弓切除された通常の脊髄に、配列番号 10 を 50  $\mu$ g 投与した 2 時間後に、普及はおよそ 2 cm (図 34 B) をカバーする距離で、投与部位から、尾方向および吻方向に拡散がみられる。免疫組織化学は、挫傷を負う脊髄上への投与の 24 時間後に、外因的に送達された配列番号 10 が脊髄の灰白質と白質の範囲内で吸収されて、分布することを確認した。免疫染色は、大部分は背面で検出され、硬膜の中で、そして、損傷中央で顕著である。脊髄は、ビヒクル治療をうけている動物から集められ、どんな標識化も示さない(図 34 C)。

10

#### 【0286】

##### 〔実施例 36〕

配列番号 10 治療による、時間および投与量に依存する Rh o 不活性化

図 35 を参照して、配列番号 10 の治療的な利益は、SCI の後で起こる Rh o の活性化を妨害する能力に依存する。したがって、硬膜外投与の後で脊髄の中で配列番号 10 の分布を確立した後に、活性のある Rh o レベルは挫傷を負った脊髄組織で、Rh o A のウエスタンプロット検出に続き、エフェクター・タンパク質であるロテキンの Rh o A 結合領域で親和性沈殿を用いて測定することが出来る。活性のある Rh o レベルは、ブルダウン分析評価を使って、免疫染色しより詳細に測定される。挫傷を負った脊髄の組織の活性のある Rh o レベルの画素密度は、処理した脊髄試料の正常化された活発な Rh o 濃度を計算するのに用いた。投与量の反映および可逆性実験のために、結果はグループにつき 3 ~ 9 匹のラットに対して平均化される。

20

#### 【0287】

Rh o 不活性化に関する投与量 - 反応曲線は、配列番号 10 の最小有効量を測定するため得られた。配列番号 10 の投与は中程度の挫傷(10 g の重量を 25 mm の高さから落とした)によって誘導される SCI の後で、ラットの脊髄上へ Tisseel を用いてすぐ投与され、そして、活性のある Rh o レベル(GTP 結合部位)を損傷の 24 時間後に精査した。

30

#### 【0288】

先に示されるように、打撲損傷は全てのラットにおいて強い Rh o 活性化を生じる。この活性レベルは、異なる状況の下で観察される活性化 Rh o レベルを正常化するのに用いられる。正常ラット脊髄の GTP 結合 Rh o レベルは、打撲を負ったラットにみられるものの約 15 % であると見られている。模擬手術(椎弓切除)は、Rh o 活性化を著しく誘導してはいない。Tisseel への配列番号 10 の投与は、通常の無傷であるか椎弓手術されたラット脊髄で見つかる基礎レベルへの打撲損害に起因する Rh o 活性化を妨害する。Rh o 活性化のこの抑制は、配列番号 10 の一回 15  $\mu$ g の投与量が最大である。15  $\mu$ g の投与量は、一貫して強く再生可能な Rh o 不活性を提供するため、効力の研究のため選択された。投与量反応曲線の回帰分析( $r^2 = 0.97$ )によりラット脊髄中の 50 % の Rh o 不活性のために必要な投与量は約 2  $\mu$ g であることが示される。

40

#### 【0289】

薬がどれくらい生体内で治療的なレベルに残ったかについて決定するために、配列番号(50  $\mu$ g)は脊髄損傷なしの硬膜に投与した。傷は再び開けられ、そして、脊髄は配列番号 10 投与(2 時間、24 時間、2 日、4 日と 7 日)の後、異なる時間に配列番号 10 送達部位で 2 等分し傷をつけた。動物は、それから 4 時間後にサンプルとして供給された。配列番号 10 による前処理は、SCI の最高 4 日前に、硬膜外投与の後で Rh o 活性化を防ぐことができる(図 35 B)。抑制は、Tisseel で投与の後、脊髄に配列番号 1

50

0の速い吸収を明白に示している2時間の処理前のグループに明らかである。治療的な配列番号10レベルは配達の後、少なくとも4日の間維持される、一方、投与の7日後は、配列番号10前処理はSCIの後のRhoの活性化を防がない。配列番号10によって引き起こされるRho ADPリボシル化が元に戻らない間、細胞のRhoの通常のタンパクターンオーバーは観察されるリバーシブルを説明することができる。

#### 【0290】

##### 〔実施例37〕

配列番号10の遅延治療は、マウスの機能的な回復を改善する

図36を参照して、細胞浸透性配列番号10が最適化されたあと、実験は半切除マウスマルで繰り返され、そして、1μgが機能的な回復を促進するのに十分な量であることが証明された。SCI患者は、損傷から2、3日以内に、通常手術を施し、減圧し、安定させ、脊髄を固定する。したがって、治療的な干渉のために時間の枠を理解することは重要である。マウスのより速い機能的な回復と操作の容易さのため、SCIの後の配列番号10送達のための時間枠は、このモデルで調べられた。行動の回復は、修正されたBBBスケールで(Dergham et al., 2002, J Neurosci, 22: 6570-6577)、2週間、後肢の運動を記録することによって評価される。即時または遅延した送達の後の配列番号10の運動機能への影響は、Tisseelで送達された1μgの量を使って比較した。より詳しくは、動物の運動機能は、バロー、ビティと、プレスナハン(BBB)オープン・フィールド運動率測定を使って15μgの配列番号10で治療された11匹のラットと12の対照群ラットについて評価された。BBBスコアは2人の観察者により4分間評価され、そして、運動はもう1人の観察者により、ビデオカメラを使ってテープ記録される。両後ろの四肢のための得点は、平均値をとり、各セッションの得点を得た。BBBスコアは、別々のシートを使って、毎回ブラインドで登録した。マウスの後肢運動の移動に関する回復は、治療群につき4~6匹のマウスについて、修正BBBスコア付けを使って測った。ラットとは対照的に、マウスは足の引きずり現象を示さず、そして、BBBスケールは21ポイントのラットスケールから17ポイントのスケールに修正した。

#### 【0291】

第2の変わりやすさを計測するため、各々の治療群はそれぞれ対照群を持ち、遅延手術は24または72時間に治療されることが望まれる。最初の脊髄損傷は、0日と考えた。

#### 【0292】

即時の送達を受けた動物のグループは、1回だけの手術を受けて、配列番号10かPBSを含むTisseel(登録商標)で治療された。24時間以内の初期の外傷後の回復段階の間、急速な改善が、恐らく配列番号10の神経保護的な効果のため存在する。頻繁な損傷後16日後、治療をうけている動物は、コントロールのマウス(図36A)で2~3の関節の動きで掃除すること(6のBBB)と比較して荷重足底ステップに達した。(10のBBB)。

#### 【0293】

疾病後24時間の治療をうけた動物に再麻酔をし、皮膚と筋肉を再び開き、そして脊髄の傷ついた表面に治療を施した。治療が24時間遅延した場合、改善された機能的回復は治療をうけているマウスでまだ観察される(図36B)。配列番号10治療をうけているマウスは、16日目に、コントロールのマウスより上の顕著な3ポイントの改善を示す。即座の治療群で観察されたように、それらの動物はまた一貫した、荷重足底ステップに合った。しかし、この実験では、段階がある早めの回復は、即座の治療群の場合のような記録は残さなかった。この影響は、マウスが24時間以内に2つの全身麻酔を受けたという事実によって隠された。

#### 【0294】

脊髄半切除の72時間後に配列番号10を受けた動物は、遅延した送達と全体的なより良い回復(図36C)に向かう傾向の最高3日後に、一過性の重要な改善を示した。しかし、この最初の改善の後、回復の傾斜は少なくなり、そして、最終的な平均的スコアは16

10

20

30

40

50

日（図36C）後の制御マウスとあまり異ならない。

【0295】

〔実施例38〕

Rhoアンタゴニスト配列番号10による硬膜外治療は、十分に耐性がある

図37を参照して、ラットの実験を行うことが出来、配列番号10または、図3と4に記載したバリアントによる治療の後、安全性と機能回復の評価をした。ラットの脊髄挫傷の後、機能的な回復を評価するために、合計25匹の雄の動物に手術を施し、ビヒクル（Tisseel中のPBS）群または15gの配列番号10を含むTisseelの群に2つの治療群に無作為割付けした。手術の後、膀胱機能が戻るまで、1日2回の膀胱の手動圧搾を含む術後ケアが行われた。すべてのラットは、治療群にかかわらず、10から15日のうちに自動的な膀胱機能を回復する。体重の分析により、動物のすべての群（配列番号10とビヒクルを治療されたもの）が通常重くなることが示される（図37A）。グループ間の有意差はない。もう一セットの実験では、50μgの投与量で治療されるラットは、1.5ヶ月の観察間にわたって、通常の体重増加を提示する。

10

【0296】

硬膜外投与の長期安全性は、ヒトで必要でありえる手順と同様に、ラットの別々のセットを使い、椎骨椎弓切除の後で、脊髄へのTisseel中の配列番号10の、ラットへの投与で確かめられた。組織は、10または50μgの一回の投与の3ヶ月後に集められた。配列番号10/Tisseel（登録商標）で扱われる脊髄の広範囲な組織学的分析は、形態学または細胞変化を示さない（通常の脊髄、偽物操作したコントロール、ビヒクルコントロール、および開けられた/無傷の配列番号10で処理した硬膜）。図37Bと37Cは、損傷後3ヶ月の、手術に引き続き、ビヒクルと50μgの配列番号10治療をうけた動物における、ラット脊髄の代表的な縦断面を示す。

20

【0297】

〔実施例39〕

配列番号10による治療は、ラットの運動能力回復を改善する

図38に関して、ラットの実験は、配列番号10で、または、図3および4で記述されるバリアント配列で治療の後の、機能的な回復の評価のために行われる。脊髄の圧迫深度は、打撲損傷の再生率の物指しとして観察された。圧迫深度の違いは、配列番号10と対照群の間で観察されなかった。

30

【0298】

動物は手術を施されて、賦形材（PBS）処理群（n=12匹）または15gの配列番号10（n=11匹）処理群の2つの治療群に無作為に割付けされた。すべての治療は、フィブリンシーラントで投与された。動物には膀胱機能が戻るまでの1日2回膀胱の手動発現を含む、術後ケアを施した。すべてのラットは、治療群で独立して10日から15日の間に自動的な膀胱機能を回復する。打撲傷の1日後に、すべてのラットは BBBスコアで1未満であることを伴う、後肢の弛緩性麻痺を示す。

【0299】

体重の分析法は、2つの治療群（配列番号10処理群と賦形材処理群）が通常体重であることを示す（図38A）。8週間以上の実験において両群の間で体重に違いは無かった（P=0.98、双方向ANOVAの反復計測）。もう一セットの実験では、配列番号10を50gの投与量で治療されたラットは、1.5ヶ月の観察期間にわたって、通常の体重増加を示した。

40

【0300】

ビヒクル/PBS処理された動物と比較して、配列番号10で処理されたラットの運動能力スコアの顕著な改善がみられた。回復は、配列番号10治療をうけているラットで典型的により速い。損傷から1週間後、治療を受けた動物は、腰、ひざ、および足首の全3つの関節で、運動と関連したBBBスコア>4を得た。コントロールの動物では、BBBスコアは2と3の間にあり、2つの関節での運動しか観察されない。コントロールの動物ではBBBスコアは四週目に落ち着くが、処理したラットでは依然良くなり続けている。損

50

傷から5～6週間後、移動に関する機能の最大の改善が全ラットで達成される。図38Cは、処理されたラット対コントロールのラットによって得られた進歩率および最終スコアの、全体図を与える。全体として、治療をうけているラットはより速く良くなり、それらの後四肢のいくつかの機能的な使用を回復する。足底の配置を支た処理をされたラットの体重のパーセンテージは、6週間後にBBBスコア>9で、コントロールのものが35%であるのに対し、75%に達する。さらに、損傷後6週で、治療をうけているラットは、コントロールのラットのどれと比較しても時折(BBB=10)であるか、一貫した(BBB=11)重さを裏づけられた足底のステップを実行しない。対照的に、大多数の対照動物は3つの共同の運動だけを示して、重さ支持なしで広い動作とともに動く(BBB<9)(図38C)。

10

## 【0301】

## 〔実施例40〕

## SCIとフィブリンマトリックスへのRhoアンタゴニストの配達

動物の取扱いは、Animal Careのカナダ会議のガイドラインに従った。動物は、12時間の明暗サイクルの下、水と食物の自由な摂取のもと飼育した。雌のBalb-cマウス(4週)を用いた。雌のBalb-cマウスは、0.4mL/kgのhypnormと5mg/kgのジアゼパムで麻酔した。椎弓切除の後、背部の半切除はT7において、バネハサミを用いて行った。一投与量の配列番号10(4μL中に1μg)またはビヒクル(PBS)はフィブリンシーラントにて、露出した索状組織に、15μLのフィブリノゲン(Tisseel(登録商標)kit VH, Baxter Corporation、オンタリオ)に15μLのトロンビンを混ぜることによって投与した。皮膚と筋肉が縫合される前に、溶液は2、3分の間に重合化した。

20

## 【0302】

イソフルラン麻酔(3-5%)のもとで、ラットのT9椎骨において、椎弓切除を行った。SCIは、NYU挫傷衝撃装置を用い、露出した脊髄の上25mmの高さから、10gの重さのロッドを落とすことにより誘導した。Rho不活性化実験で、数匹のラットは、背側部過片側切除により損傷を加えられた。衝撃装置からのロッド速度と圧縮は、記録される。この技術は、再生可能で段階的な方法で、後肢の麻痺を引き起こす。椎弓切除だけのものは、疑似手術として実行される。配列番号10(異なる濃度で)またはコントロールのビヒクル(PBS)は同じ5μL量で、15μLのトロンビンおよび15Lのフィブリノゲン(TisseelキットVH、Baxter社、オンタリオ)と混ぜ合わせた。テスト化合物投与の後、表面を覆う筋肉と皮膚は縫合された。

30

## 【0303】

形態的な評価のために、behavioralな研究会からのラットは麻酔薬の過剰投与量でサンプルとして供給され、0.9%の食塩水溶液として尾部に注入され、引き続き、4%パラホルムアルデヒド(PFA)リン酸塩緩衝液を注入した。T9に集中している脊髄組織は、脊柱から取り除かれ、一晩、4%のPFAに後固定される。1mmの脊髄の10の節は、頭部側および尾部側を、パラフィンブロックに埋め込み、予備組領域組織計測のためにミクロトームの上で横断面に沿って切片化した。脊髄組織もまた、集められ、もう一セットの実験のため、パラフィン包埋し、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。クリオスタッフ切片の免疫組織化学実験のために、1cmの脊髄(中心点)は、4%のPFAで後固定されて、30%の蔗糖溶液に変えた。翌日、組織は冷イソペンタンで瞬間冷凍され、O.C.Tに包埋された。

40

## 【0304】

ウエスタンプロットとプルダウン分析評価のために、動物は麻酔薬の過剰投与量サンプルとして供給され、0.9%の食塩水だけが注がれた。脊髄組織は、背側と腹側、または頭部から尾側まで異なる区域に分けられた。組織は食塩水で洗われ、そして、硬膜は取り出された。プルダウンアッセイのため、8mmの脊髄組織は、椎弓切除領域の上に液体窒素を注ぐことにより、凍結された。凍結した脊髄サンプルはVari-Mix IIIホモジエナイザー(Dentsply Caulk、トロント、カナダ)を用いて均質化さ

50

れ、ウエスタンプロットのために氷冷N P - 4 0 溶解バッファで可溶性にされた。

【 0 3 0 5 】

〔実施例 4 1 〕

配列番号 1 0 は挫傷を負うラット脊髄の損傷量を減少させる

図 3 9 で示されるように、配列番号 1 0 またはバリアントタンパク質で処理された脊髄損傷組織の組織学的分析は神経保護作用の測定のため用いることが出来る。

解放フィールド評価をするラット被療者はサンプルとして供給され、組織は組織学のため準備された。

脊髄の灰白質、白質および全切片領域の予備領域は 3 枚の領域毎の 5  $\mu$  m の横断面切片を用いて測定された。

複数の領域は、中心周辺に集中する 2 cm の地域に沿って、1 mm の間隔でサンプルとした。イメージは A x i o s k o p プラス光学顕微鏡 ( C a r l Z e i s s 、 ドイツ ) と Q I C A M デジタルカメラ ( Q i m a g i n g 、 B C 、 カナダ ) を使って撮影され、ノーザンエクライプソフトウェア ( E m p i x 、 O N 、 カナダ ) を使用して分析される。灰白色と白質の予備組織節領域は方程式  $S s p \% = ( G s p + W s p ) / T s * 1 0 0$  を用いて分析され、ここで、( G s p ) と ( W s p ) は各々、灰白質と白質の予備領域であり、( T s ) は全脊髄領域である。分析は、治療群に対してプラインドで実行される。

【 0 3 0 6 】

シグナルカスケードとしての、脊髄損傷に引き続く大量の組織の損失は神経細胞やグリア細胞を標的としたアポトーシス性細胞死の引き金となる。この過程を通じた細胞損失の範囲は損傷のから数日以内で決定され、大まかに損傷後の機能回復の程度を指定する。その理由のために、配列番号 1 0 が神経保護作用の特性を備えているかどうかがそして、挫傷の部位の障害のサイズを評価する。

残存する灰白色と白質の割合 ( % ) は、損傷後二ヶ月に、1 cm の障害サイトをおおう 2 cm の全長の上で、尾部から頭部にむかう、脊髄に沿って 1 mm の間隔で取られた領域の切片の画像分析により行われた。機能的回復群からのすべてのラットは、分析に含まれる ( n = 2 3 ) 。

全損傷部位の有意差がグループ間に存在し、配列番号 1 0 治療をうけている動物がコントロール群に対して 2 5 % の組織損失減少を提示した。この違いは、頭部から患部中央にかけて顕著で ( 図 3 9 A ; 2 5 % ) 、一方変化患部から尾部のサイトでは反応が薄い ( 1 0 % ) 。挫傷の 2 カ月後に、対照動物の T 9 脊髄の多くは、患部中央 ( 図 3 9 A ) に残っている明白な灰白質と 1 0 % 未満の白質なしで大きな囊胞性の空洞によって占められる。対照的に、治療をうけているラットの患部中央の脊髄は、周辺の縁からなる残存白質の平均 1 0 % の増加を持つ。処置をしたラットに生じる白質の増加は、中央から 4 mm の突起が生じる割合が 2 2 % に達した。

灰白質は、損傷部位中央から 2 ~ 4 mm で、治療をうけているラットでもかなり保存される。全体的な有意差は両方の白 ( P < 0 . 0 0 0 1 ) の障害場所に残っている脊髄組織の範囲で観察されました、そして、繰り返される 2 つの方法を使用している治療をうけていて制御ラットの間の灰色の問題 ( P = 0 . 0 3 8 ) は分散分析を測る。節約される組織の範囲は、全体の障害域を表すために各々のラットのためにカーブの下で領域を計算することによって、さらに特徴づける。図 3 9 B は、治療をうけているラットが障害によって占領される地域の 2 5 % の減少を示したことを証明する。ヒトと同様に、ラットの S C I の後の障害サイトの囊胞性の空洞の形成は一般的の出来事である。ルキソールファストブルー染色は、治療をうけているラットが対照動物より小さな空洞現象でより大量の小さいミエリンを示すことを証明する。これは、治療をうけているラット ( 対照群 1 0 . 3  $\pm$  0 . 7 mm 対治療をうけているもの 7 . 8  $\pm$  0 . 7 mm 、 P 0 . 0 1 、 非対称スチューデント T テスト ) ( 示されないデータ ) で、減少した縦の障害長によっても反映される。ついに、全体の障害域と最終的な B B B スコア間の有意な相関関係が配列番号 1 0 である線形回帰分析 ( D e m i n g ) は、ラット ( P = 0 . 0 2 ) ( 示されないデータ ) で示した。

【 0 3 0 7 】

10

20

30

40

50

## 〔実施例42〕

配列番号10治療はラットの変性症に影響を与えたなかった

図40で述べられたように、配列番号10またはバリアントタンパク質は、不必要的副作用を見つけるための神経性の痛みの動物モデルをテストすることが出来る。

成長している異常な軸索が脊髄精神的外傷の後、神経障害苦痛の発達に至ることは、知られている。増加している直径のVon Freyフィラメントに反応した手足禁断は、機械の刺激に感度を試験するのに用いられる。ラットは上昇した、純度の高い金属スクリーンでプレキシガラスボックスに置かれて、テストの前に60分の間慣れさせる。フィラメントは、後ろの手足ごとに足底の表面に投与される。フォンフレイフィラメント閾値（力のグラム量）は、4回から撤回3~4を引き出すのに必要な力として記録される。左右の後肢のためのデータは、平均値にされる。観察者は治療群に対してブラインドにされる。治療群に対して、5~7匹のラットが評価された。

## 【0308】

負傷したラットの感覚の結果に関する配列番号10の影響が、調べられることができる。Von Freyテストは、動物がひどい挫傷の6週間後に移動に関する回復の彼らの安定期に達したあと、感度の違いが機械の刺激にあるかどうか確かめるのに用いられる。感覚刺激への足撤回反応は、調整された調査で両後ろの四肢のために測られる。触覚型の異痛症の同じレベルは、独立して彼らの治療群の全ての負傷したラットで発達する。15または50gのビヒクルまたは配列番号10治療は、怪我（図40）の6週間後に、前肢引き込み閾値に影響を及ぼさない。

## 【0309】

## 〔実施例43〕

配列番号10はカドヘリンとオクルディンの発現と局在化を修正する

調査されるべき次の血管形成プロセスは細胞間接触点または交差点であり、それらの適当な機能は毛管の細管の形成とメンテナンスのために必要である。細胞間結合の完全性とRhodGTPasesの関係は、特に接合部タンパク質カドヘリンとオクルディンの関係で示されている（Hirase et al., 2001; Braga et al., 2002; Wojciak-Stothard and Ridley, 2003）。HUVEC培地においてこれらのタンパク質の状態を調べるために、それらはコラーゲンコートのスライドの上へおかれ、そして、24時間の間配列番号10（またはコントロールとしてのPBS）で処理された。スライドはそれから、汎カドヘリン抗体で固定されて、蛍光第二の抗体でインキュベートした。免疫蛍光顕微鏡検査は、コントロールHUVECにおいて、カドヘリンがより高い（ $2 \times 10^3$ ）細胞種まき密度（図41A左パネル中の小さな矢）と同様に、それ以下（ $2 \times 10^3$ ）のために細胞接觸地帯に沿って局所化されることを示す。しかし、25g/mLの配列番号10の存在下で行われる24時間のインキュベーションのために、より少ない細カドヘリン染色の胞間領域と同様（図41A右パネル小矢印）、一般的に膜関連でないカドヘリン染色であるように見え、細胞間ジャンクションは特に高い細胞播種濃度において、崩壊するように見え、細胞間の可視ギャップの結果となる（図41A、右のパネル、大矢印）。このように、カドヘリン染色が配列番号10治療をうけているHUVECの細胞細胞接觸地域のいくつかでまだ見られることができる間、細胞間境界の完全性は中断される。そして、連続的であるより斑点状に見える。そして、未処理の細胞のそれらと比較される。

## 【0310】

更なる、図で示した実施例により、

カドヘリンに対する免疫蛍光シグナルの強度の免疫蛍光強度がコントロールの細胞に比べ配列番号10処理した細胞で強くなることが明らかになる。

この発見は、配列番号10により不活性化されたRhodGTPaseがカドヘリンの局地化だけでなく、彼らの発現レベルも変えるかもしれないことを示唆する。この仮説は、10または25μg/mLの配列番号10で24時間処理した扱われた準融合性HUVEC抽出液上でウエスタンプロット分析を行うことによって調査される。また、免疫検出は汎

10

20

30

40

50

カドヘリン抗体を使って達成される。細胞抽出物タンパク質の等価量がゲルの各々のレンジにロードされるが、ゲル類から膜へのタンパク質の移動効率は、発現がカドヘリンと Rho GTPases から独立している Erk タンパク質に対する抗体を使ってモニターされる。配列番号 10 の両方の濃度は、コントロールの細胞（図 41B）と比較したカドヘリンのレベルを顕著に減少させる（10 μg / mL に対し、~40% および 25 μg / mL に対し ~70%；p < 0.001）。

#### 【0311】

類似した実験を、局在化と密着結合タンパク質であるオクルディンの発現に関しての配列番号 10 の効果の調査のために行つた。オクルディン免疫蛍光シグナルは比較的微弱であるので、高い細胞密度（2 × 10<sup>4</sup> 細胞）で播種した HUVEC によってのみ調べることが出来る。調査結果はカドヘリンのそれらと非常に類似していて、オクルディンがコントロールの HUVEC の連絡領域の細胞に沿って、連続したバンドにのみ局在化していることが示される（図 42、左パネルの矢印で示される）。

24 時間の 25 g / mL の配列番号 10 による治療の後で、少しの細胞連絡領域も見え無い。大部分のオクルディンシグナルは、細胞内分布と一致するように見える（図 42A、右パネル）。カドヘリンの場合とは異なり、HUVEC の 24 時間の治療に 25 g / mL の配列番号 10 を付け加え、オクルディンの強さの明らかな減少が、ウェスタンプロットをする事によりわかる（図 42B、左のパネル）。配列番号 10 治療が 48 時間まで広げられると、コントロールの細胞と比較して、著しい（~40%；p < 0.001）オクルディンのレベルの減少が、明らかになる（図 42B、右のパネル）。また、Erk ロード / 移動制御は、同程度の細胞タンパク質レベルがサンプル間にあることを明らかにする。

#### 【0312】

上述の免疫蛍光検査法実験のために、HUVEC はコラーゲン - I でおおわれている 8 穴チャンバースライドの上へ播種され、16 ~ 24 時間付着するのにまかせた。処理剤によるインキュベーションの後、細胞は 10% のホルマリンで固定され、それから、0.2% のトリトン X - 100（アクチンとカドヘリン視覚化のために）を 30 分間浸透させるか、或いは、100% の氷温 MeOH（オクルディン視覚化のために）で、5 分間の固定をした。アクチン染色のために、細胞は 45 分間 3% の BSA でブロックされ、それから、ローダミン（1 / 300）に結合するファロイジンとともに、室温で 1 時間インキュベートした。カドヘリン染色のために、固定された細胞は 10% のヤギ血清で 30 分間ブロックされ、そしてマウス单クローニングカドヘリン抗体（1 / 400）とともに、室温で 90 分の間インキュベートした。検出は、室温で 1 時間、FITC 結合ヤギ抗マウス IgG（1 / 400）を用いて行った。オクルディン染色のために、細胞は固定されて、カドヘリン検出のためにブロックされ、そしてウサギポリクローナルオクルディン抗体（1 / 50）を用いて、室温で 120 分間インキュベートした。発見は、FITC 結合ヤギ抗ウサギ IgG（1 / 400）を通して行った。Slow Fade（登録商標）グリセロール抗褪色剤は、蛍光の褪色を減少させるために用いられた。スライドは、倒置型蛍光顕微鏡（カールツァイス、西ドイツ）を使って調べた。顕微鏡写真は、ノーザン・エクライプ・ソフトウェアを使って撮影された。

#### 【0313】

カドヘリンの結果と共に、これらのオクルディンのデータは、配列番号 10 が、特に接合部タンパク質カドヘリンとオクルディンに関して、細胞間接触領域の構築の中止することを含み、in vitro での HUVEC の管形成の阻害を仲介することを示唆した。これらは違つて配布される接合部タンパク質であるだけでなくて、彼らの全体的な表現レベルは、かなり減らされるように見える。ここに提示される発見は配列番号 10 が主に血管形成の管形成ステップを抑制することを示し、そして、管形成のその配列番号 10 によって誘発された縮小は細胞間接触の損失で、そして、接合部分子カドヘリンとオクルディンの下の規制で相關する。

#### 【0314】

10

20

30

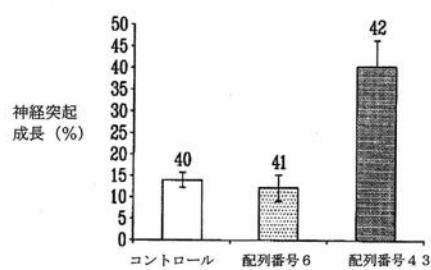
40

50

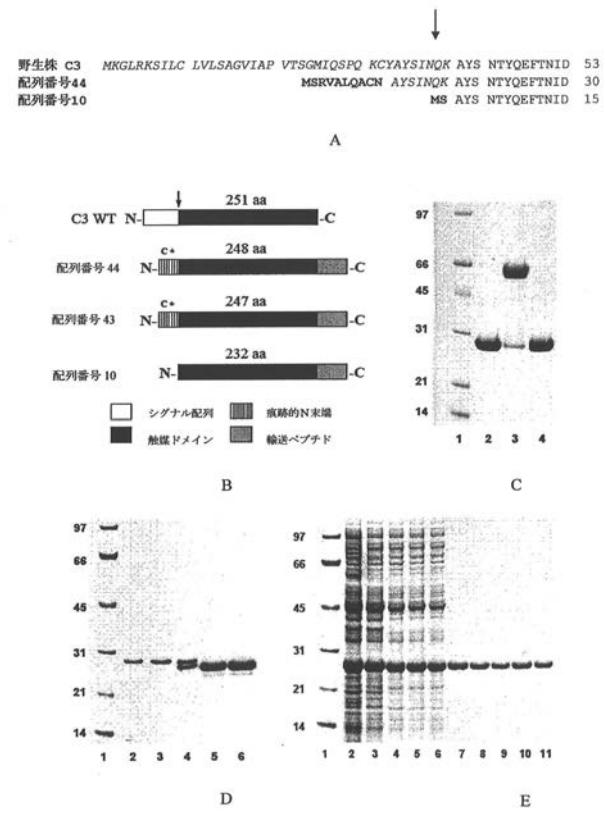
当業者は、所定の実験により認識、或いは確かめることができ、そして、特定の手順に対する多くの等価な例がここに記述される。そのような等価な例はこの発明の範囲内であると考えられて、特許請求の範囲によってカバーされる。

ここに引用されるすべての出版物の内容は、参照によってここに取り入れられる。

【図1】



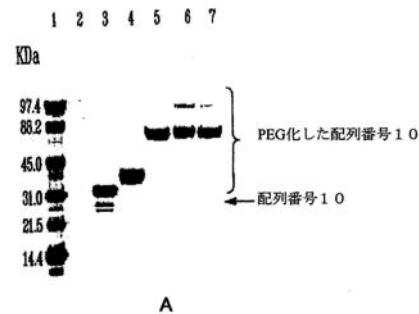
【図2】



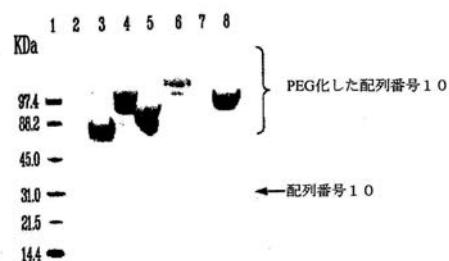
【図3】

配列番号 13	MSAVSNTYQE FTHIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTTSASEING KLRQNKGVIN	60
配列番号 14	MSAYSNTYQE FTHIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTTSASEING KLRQNKGVIN	60
配列番号 15	MSAYSNTYQE FTHIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTTSASEING KLRQNKGVIN	60
配列番号 16	MSAYSNTYQE FTHIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTTSASEING KLRQNKGVIN	60
配列番号 17	MSAYSNTYQE FTHIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTTSASEING KLRQNKGVIN	60
配列番号 18	MSAYSNTYQE FTHIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTTSASEING KLRQNKGVIN GFPSENLIKQV ELLDKSFNRM KTPENIMLFR GODPAYLGT E FQNTLNSNG TINKTAFERA	120
配列番号 19	MSAYSNTYQE FTHIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTTSASEING KLRQNKGVIN GFPSENLIKQV ELLDKSFNRM KTPENIMLFR GODPAYLGT E FQNTLNSNG TINKTAFERA	120
配列番号 20	RHSTYHIDOM RLSSDGKQII ITATM&GTAI NPKEFVN&NPA NAQGRHTPGT RL	232
配列番号 21	RHSTYHIDOM RLSSDGKQII ITATM&GTAI NPKEFVN&NPA NAQGRHTPGT RL	232
配列番号 22	RHSTYHIDOM RLSSDGKQII ITATM&GTAI NPKEFVN&NPA NAQGRHTPGT RL	232

【図4】

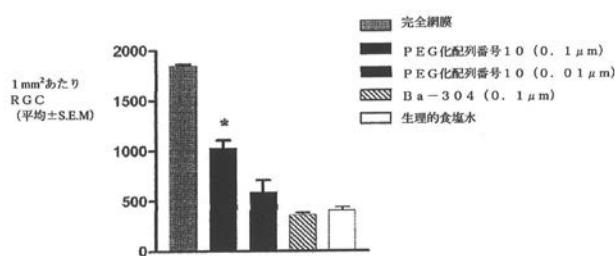


A

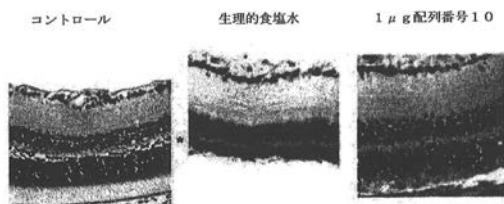


B

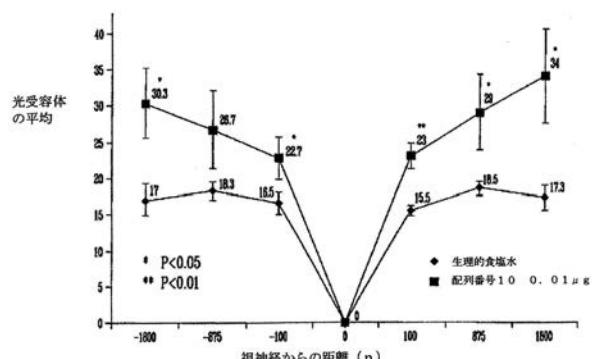
【図5】



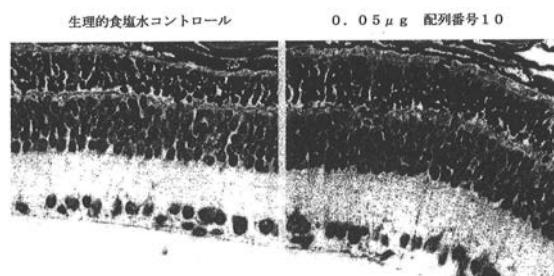
【図6】



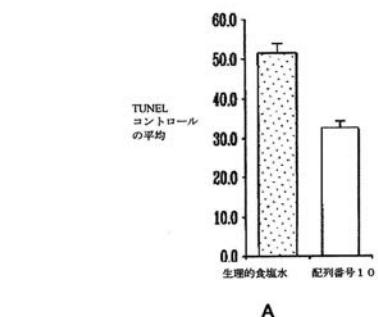
【図7】



【図8】

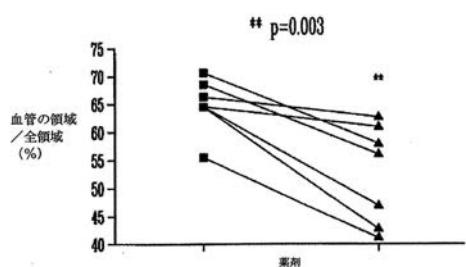


【図 9】

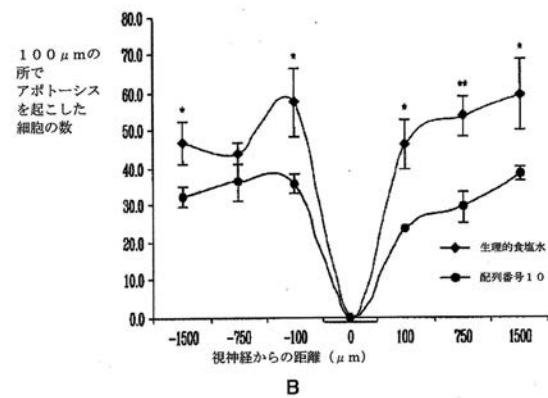


A

【図 10】



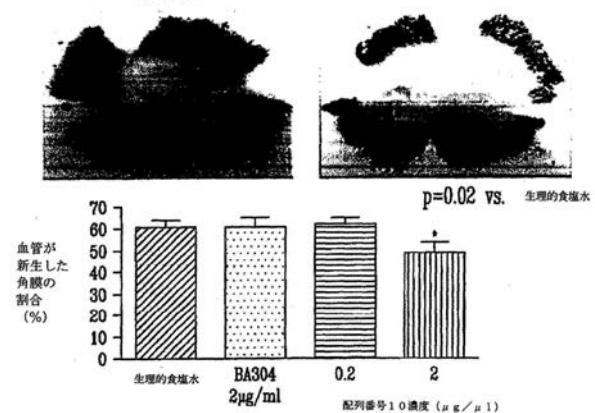
【図 11】



B

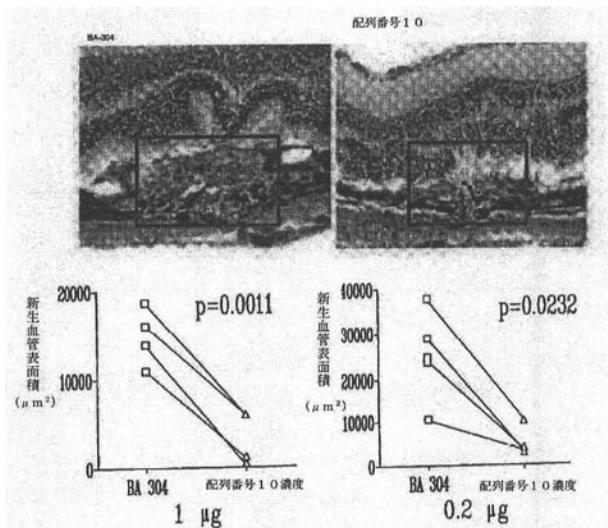
BA 304

配列番号 10

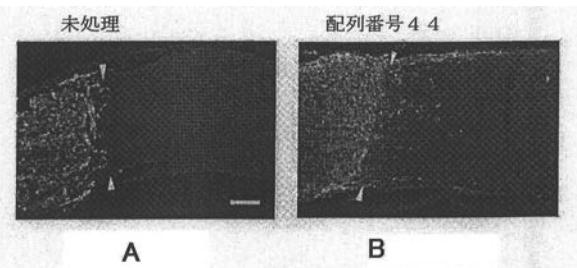


p=0.02 vs. 生理的食塩水

【図 12】



【図 13】

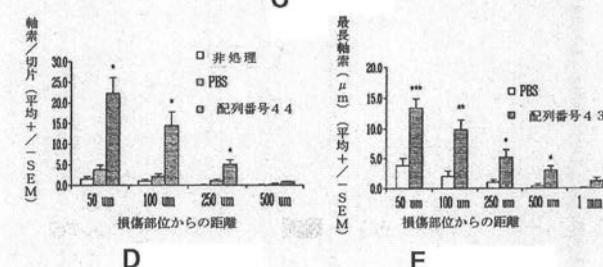


A

B



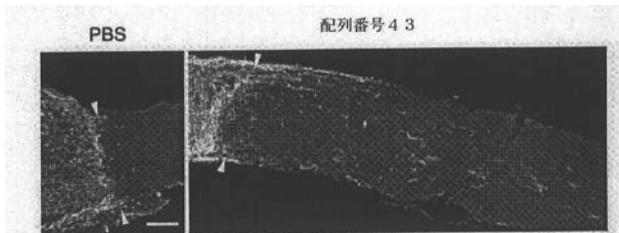
C



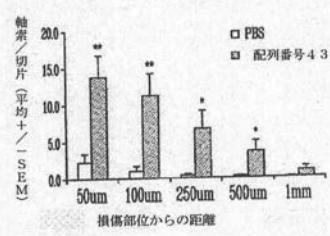
D

E

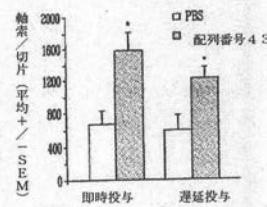
【図14】



A

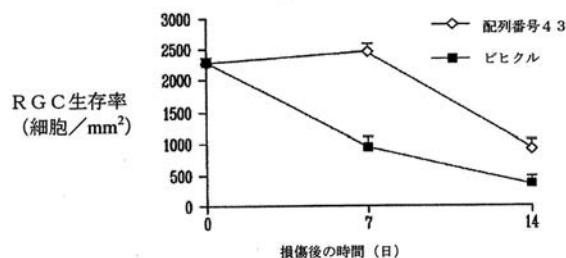


B

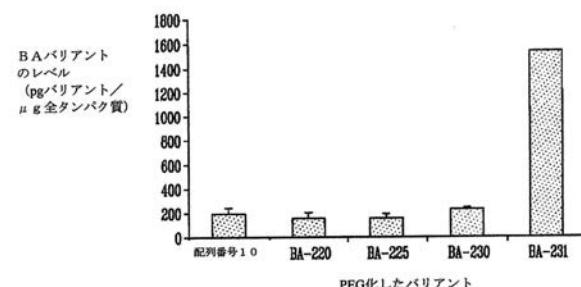


C

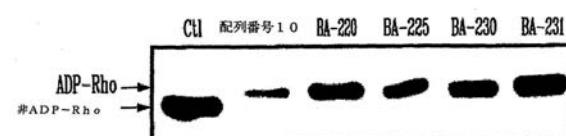
【図15】



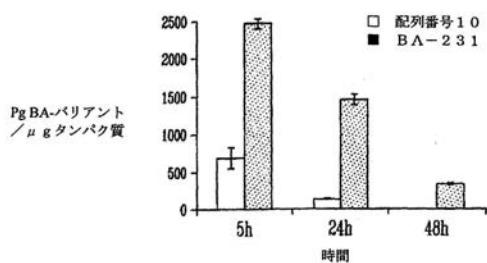
【図16】



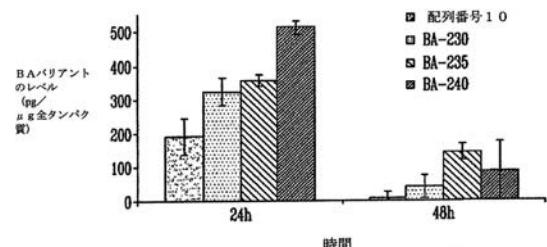
【図17】



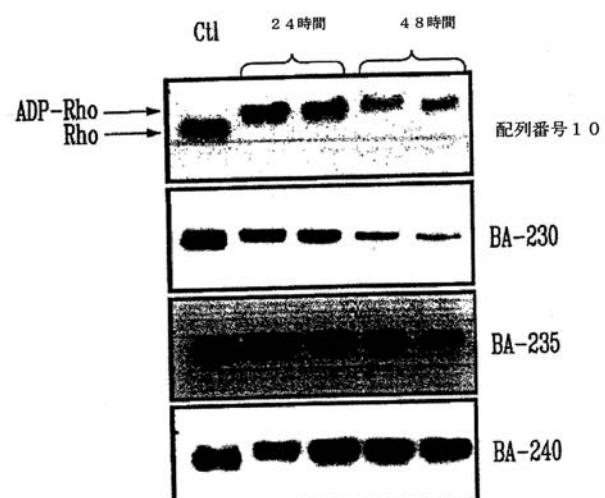
【図18】



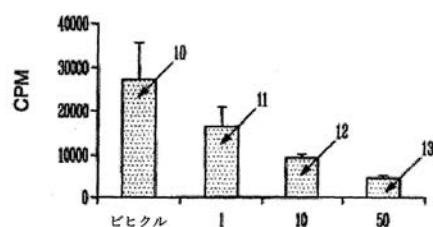
【図19】



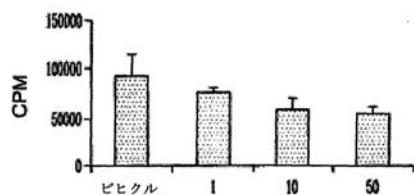
【図20】



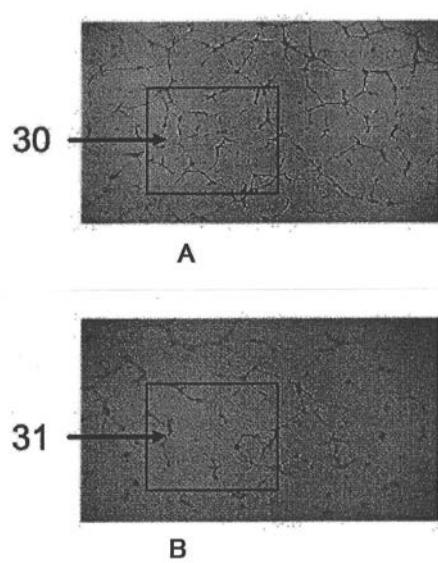
【図21】



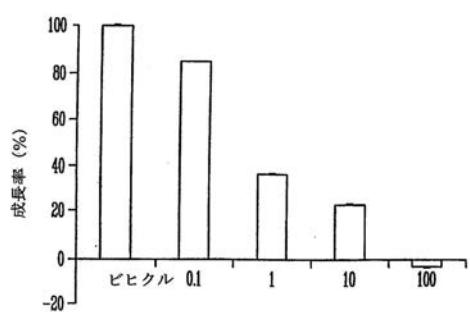
【図22】



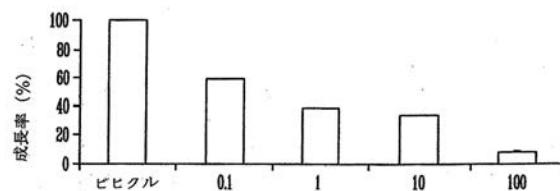
【図23】



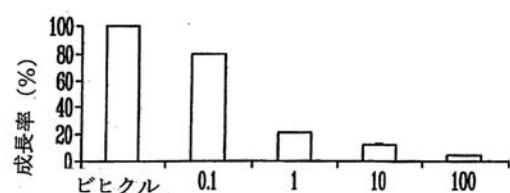
【図24】



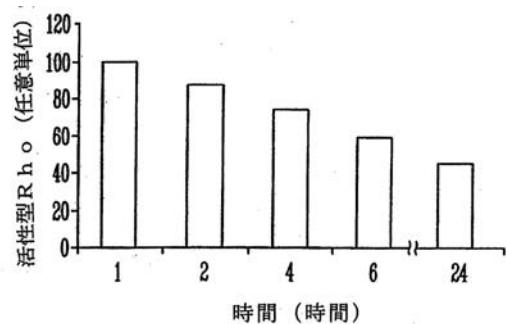
【図25】



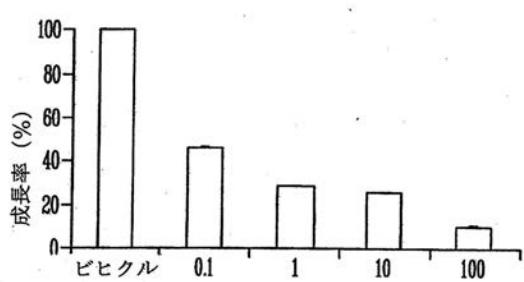
【図26】



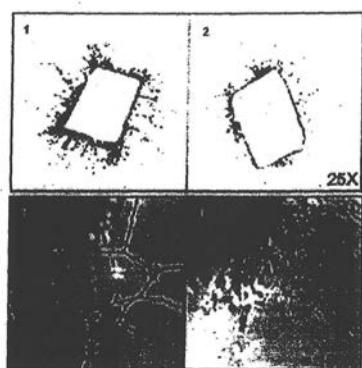
【図27】



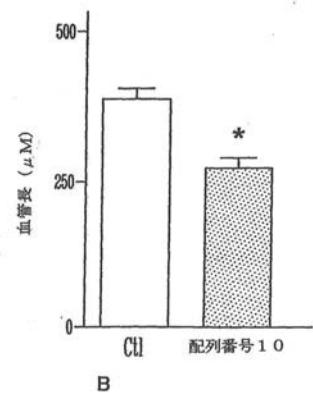
【図28】



【図29】

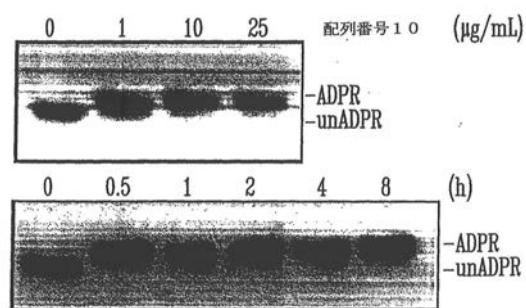


A

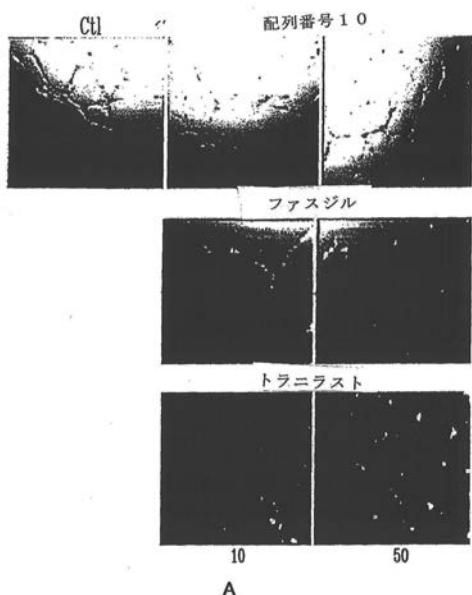


B

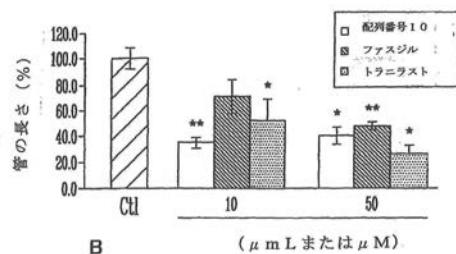
【図30】



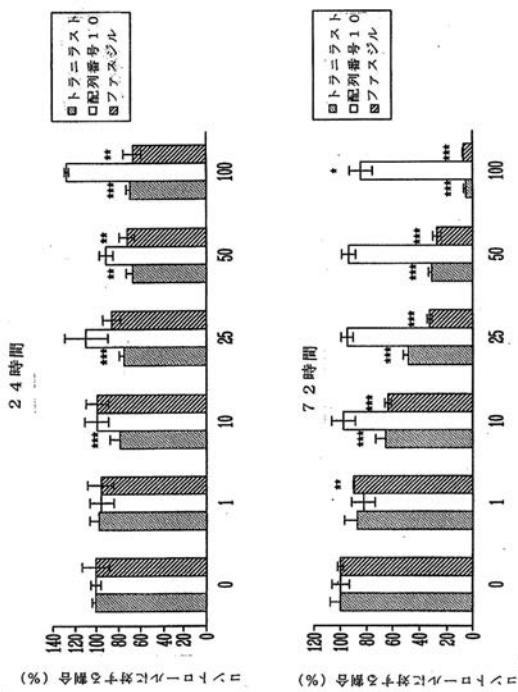
【図31】



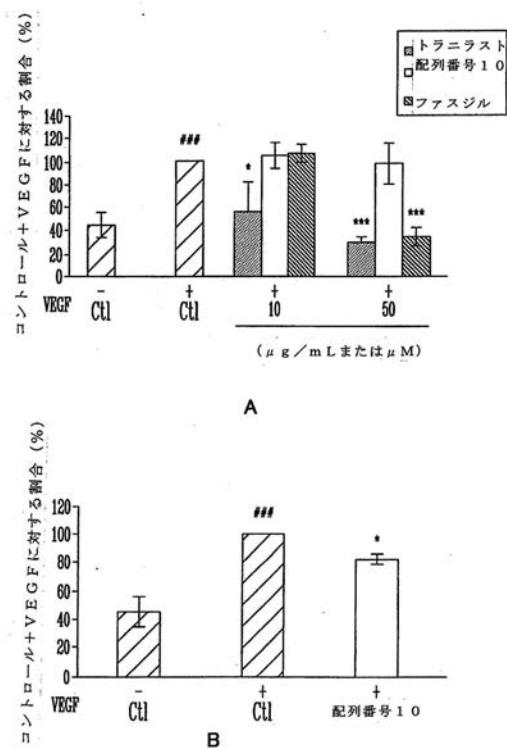
A

B ( $\mu\text{g/mL}$  または  $\mu\text{M}$ )

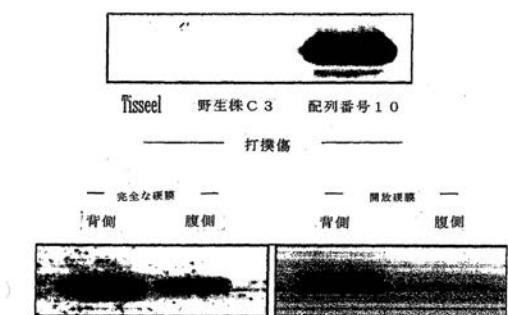
【図32】



【図33】



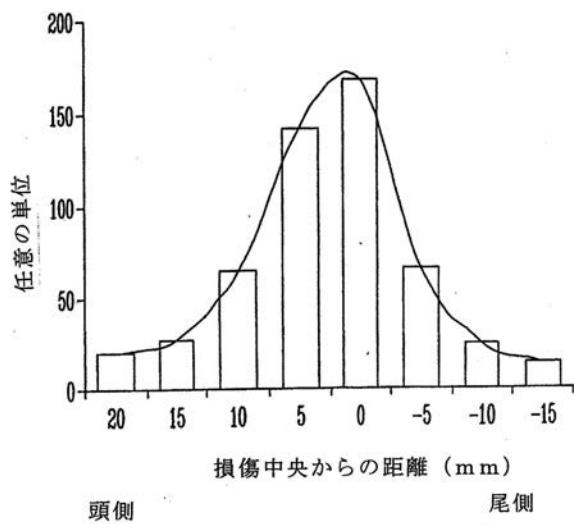
【図 3 4 A】



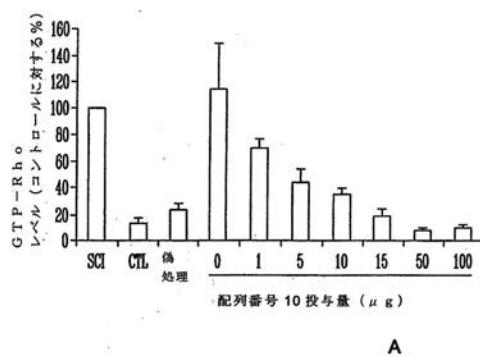
【図 3 4 C】



【図 3 4 B】

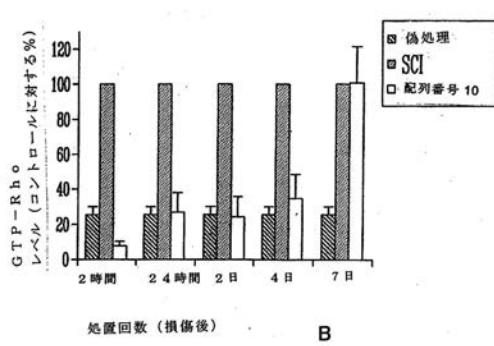
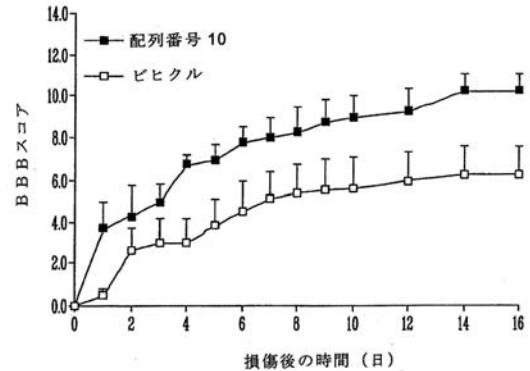


【図 3 5】



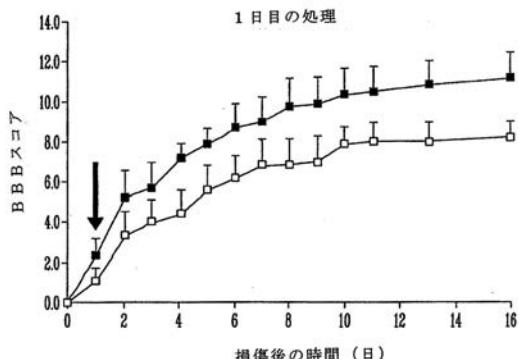
A

【図 3 6 A】

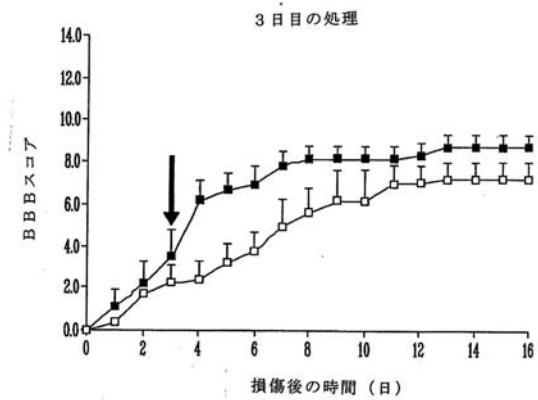


B

【図 3 6 B】



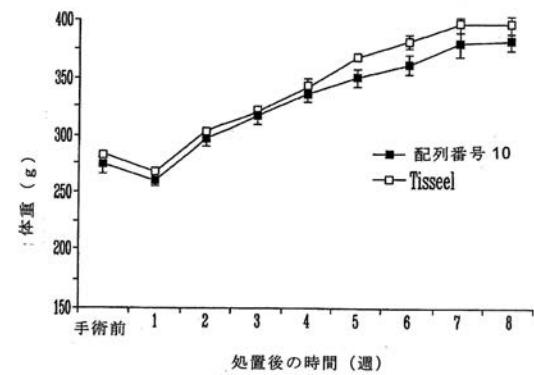
【図36C】



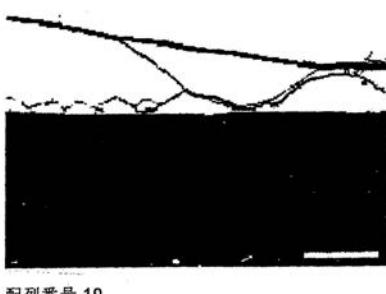
【図37B】



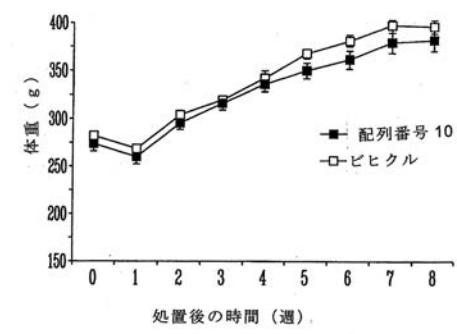
【図37A】



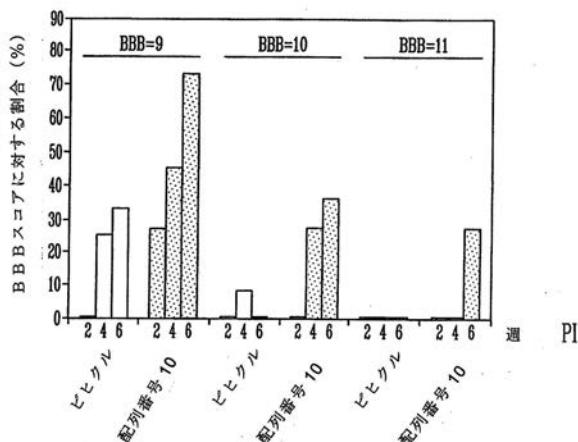
【図37C】



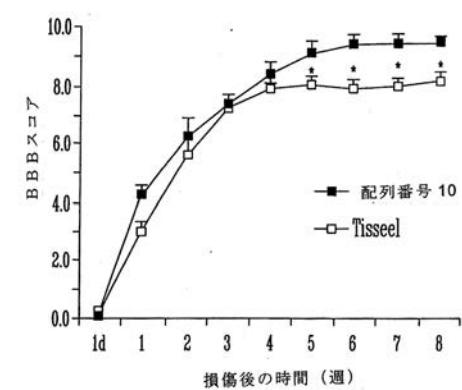
【図38A】



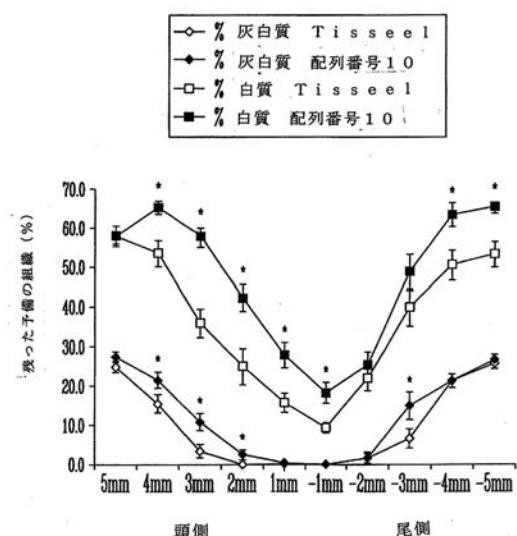
【図38C】



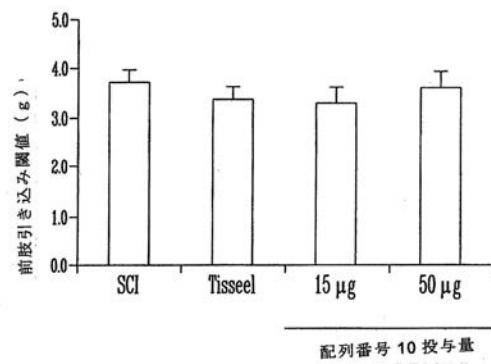
【図38B】



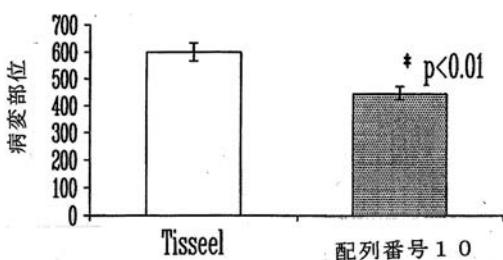
【図 39 A】



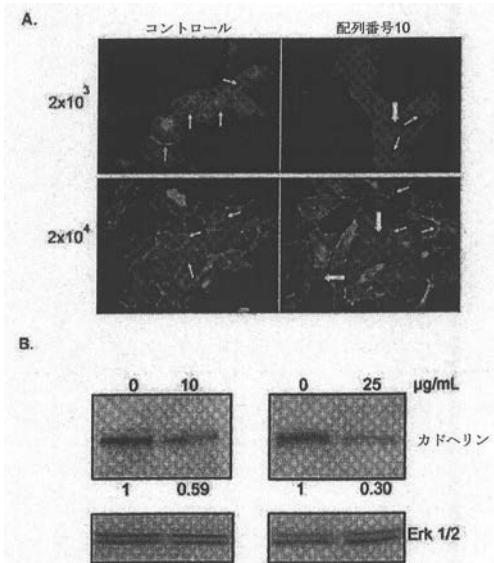
【図 40】



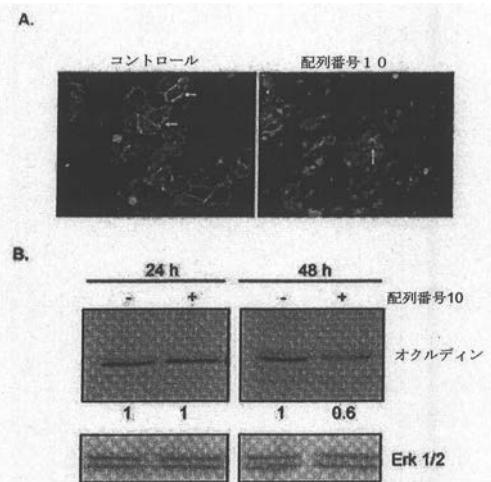
【図 39 B】



【図 41】



【図 42】



**【配列表】**2017192397000001.app**【手続補正書】****【提出日】**平成29年8月18日(2017.8.18)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

活性薬剤領域に共有結合した少なくとも1つの輸送薬剤領域を含むポリペプチドであつて、

前記輸送薬剤領域はプロリンリッチ領域であり、

前記輸送薬剤領域は前記ポリペプチドのカルボキシ末端に存在し、

前記活性薬剤領域は前記ポリペプチドのアミノ末端に存在し、

前記活性薬剤領域は、ADPリボシリルトランスフェラーゼC3<sub>3</sub>及びADPリボシリルトランスフェラーゼ活性を保持したその断片からなる群より選択され、

前記プロリンリッチ領域は配列番号3のアミノ酸配列で示される、ポリペプチド。

**【請求項2】**

配列番号8のアミノ酸配列またはPEG化された配列番号8のアミノ酸配列からなる、ポリペプチド。

**【請求項3】**

配列番号8のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項2に記載のポリペプチド。

**【請求項4】**

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

**【請求項5】**

脊髄損傷の治療に用いられる、請求項4に記載の医薬組成物。

**【請求項6】**

黄斑変性症の治療に用いられる、請求項4に記載の医薬組成物。

**【請求項7】**

緑内障の治療に用いられる、請求項4に記載の医薬組成物。

## フロントページの続き

(51) Int.CI. F I テーマコード(参考)  
A 6 1 P 27/06 (2006.01) A 6 1 P 27/06

(72)発明者 ムンザー,ジョン スコット  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01545 シュルーズベリー ラウンド テーブル ロード 15

F ターム(参考) 4B050 CC03 CC07 DD02 LL01  
4C076 AA11 AA30 AA95 BB13 BB15 BB16 BB21 BB25 BB27 BB31  
EE41 EE59 FF34  
4C084 AA02 AA07 BA41 DC25 MA16 MA43 MA44 MA57 MA59 MA66  
NA05 NA13 ZA33  
4H045 AA20 AA30 BA41 CA11 DA89 EA28 FA74