

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-537318

(P2023-537318A)

(43)公表日 令和5年8月31日(2023.8.31)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 C 0 7 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	

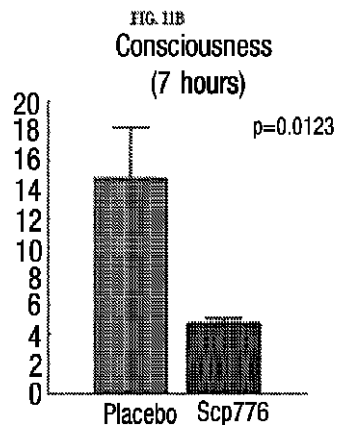
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全65頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-506330(P2023-506330)	(71)出願人	518112158
(86)(22)出願日	令和3年7月30日(2021.7.30)		シルバー・クリーク・ファーマシューテ
(85)翻訳文提出日	令和5年3月28日(2023.3.28)		イカルズ・インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/044019		Silver Creek Pharma
(87)国際公開番号	WO2022/026902		ceuticals, Inc.
(87)国際公開日	令和4年2月3日(2022.2.3)		アメリカ合衆国94158カリフォルニ
(31)優先権主張番号	63/058,888		ア州サンフランシスコ、イリノイ・スト
(32)優先日	令和2年7月30日(2020.7.30)		リート409番
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100145403
			弁理士 山尾 憲人
(31)優先権主張番号	17/390,206	(74)代理人	100106518
(32)優先日	令和3年7月30日(2021.7.30)		弁理士 松谷 道子
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(72)発明者	ファフ, サミュエル ジェイ
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 中枢神経系障害の処置のためのキメラタンパク質および使用方法

(57)【要約】

本開示の態様は、全体として、急性の中枢神経系の障害をキメラタンパク質およびこのようなキメラタンパク質を含む医薬組成物で処置するためのキットおよび方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療有効量のキメラタンパク質および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を、それを必要とする対象にボラス注射によって投与することを含む、急性の中樞神経系の損傷を処置する方法であって、

キメラタンパク質が、(a) 1つまたは複数の突然変異を含むヒトアネキシン 5 (AnxV) のバリエーションを含む標的化ドメインであって、1つまたは複数の突然変異が、C316 に対応する位置での、ならびに適宜、R63、K70、K101、E138、D139、N160、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなる、標的化ドメイン、(b) 1つまたは複数の突然変異を含むヒトインスリン様増殖因子 IGF-1 のバリエーションを含むアクチベータードメインであって、1つまたは複数の突然変異が、E3、Y24、Y31、Y60、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなり、IGF-1 のバリエーションが、野生型 IGF-1 と比較して IGF-1 受容体の活性化を低下させる、アクチベータードメイン、ならびに(c) 1つまたは複数の突然変異を含むヒト血清アルブミン(HSA) のバリエーションを含む半減期モジュレーターであって、1つまたは複数の突然変異が、C58 および N527、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなる、半減期モジュレーターを含み、

投与が、大脳皮質の細胞に対する酸化損傷の緩和、血液脳関門の修復または修復の加速、浮腫の低減、梗塞部容積の低減、血液脳関門透過性の低減、損傷を受けた脳組織の細胞内での IGF-1 受容体の選択的活性化によるセリン/スレオニンプロテインキナーゼ B (AKT) 経路のリン酸化の標的化された刺激、損傷を受けた脳組織への生存促進性シグナルの標的化された送達、脳卒中後の筋骨格系の協調の増大、脳卒中後の意識の改善、脳卒中後の神経学的機能の改善、および脳卒中後の運動機能の改善のうち少なくとも1つをもたらす、方法。

【請求項 2】

IGF-1 のバリエーションが、野生型 IGF-1 と比較して IGF-1 受容体の活性化を低下させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

IGF-1 のバリエーションが、野生型ヒト IGF-1 と比較して、E3R 置換および Y31A 置換を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ヒトアネキシン 5 のバリエーションが、野生型ヒトアネキシン 5 に対応するアミノ酸 2~320 を含み、また、野生型ヒトアネキシン 5 と比較して、R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A、C316A 置換を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ヒト血清アルブミンのバリエーションが、野生型ヒト血清アルブミンに対応するアミノ酸 26~609 を含み、また、野生型ヒト血清アルブミンと比較して C58S 置換および N527Q 置換を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

キメラタンパク質が、IGF1 (E3R/Y31A) _lk7_ HSA26-609 (C58S/N527Q) _lk7_ AnxV2-320 (R63A/K70A/K101A/E138A/D139G/N160A/C316A) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

リンカー lk7 が、-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

キメラタンパク質が、標的分子ホスファチジルセリンを含む細胞に対して選択的に標的化されており、また、キメラタンパク質が、セリン/スレオニンプロテインキナーゼ B (AKT) のリン酸化によって測定すると、標的分子を有さない細胞と比較して標的分子を有する細胞に対して少なくとも 2 倍強力な IGF-1 受容体活性化を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

急性の中枢神経系の損傷が、虚血性脳卒中、外傷性脳損傷、出血性脳卒中、後天性脳損傷、脊髄損傷、くも膜下出血であるか、または本質的に医原性である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

急性 CNS 損傷の診断の 72 時間以内に医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

約 0.01 mg/kg から約 20 mg/kg のキメラタンパク質を、それを必要とする対象に 1 日に 1 回投与することを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

約 5 mg/kg から約 20 mg/kg の総用量のキメラタンパク質を、それを必要とする対象に 4 から 7 日間の期間にわたり投与することを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

減少用量のキメラタンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

初日の、約 2 mg/kg から約 6 mg/kg のキメラタンパク質を含む初回用量と、それ以降の各日での、約 1 mg/kg から約 2 mg/kg のキメラタンパク質を含む用量とを、それを必要とする対象に投与することを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

医薬組成物を静脈内投与、動脈内投与、または髄腔内投与することを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

複数の個別の容器を含む、請求項 1 に記載の方法を実施するためのキットであって、それぞれの個別の容器が、約 20 mg から約 1000 mg のキメラタンパク質を含む、キット。

【請求項 17】

急性の中枢神経系の損傷を処置するためのキットであって、
 (a) それぞれの個別の容器が、治療有効量のキメラタンパク質および薬学的に許容される担体を含む一定容量の医薬組成物を含む、複数の個別の容器であって、医薬組成物がボラス注射用に製剤化されており、
 キメラタンパク質が、(i) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒトアネキシン 5 (AnxV) のバリエーションを含む標的化ドメインであって、1 つまたは複数の突然変異が、C316 に対応する位置での、ならびに適宜、R63、K70、K101、E138、D139、N160、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなる、標的化ドメイン、(ii) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒトインスリン様増殖因子 IGF-1 のバリエーションを含むアクチベータードメインであって、1 つまたは複数の突然変異が、E3、Y24、Y31、Y60、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなり、IGF-1 のバリエーションが、野生型 IGF-1 と比較して IGF-1 受容体の活性化を低下させる、アクチベータードメイン、ならびに (iii) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒト血清アルブミン (HSA) のバリエーションを含む半減期モジュレーターであって、1 つまたは複数の突然変異が、C58 および N527、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなる、半減期モジュレーター

10

20

30

40

50

を含み、
 複数の個別の容器のそれぞれが、約 1 m l から約 5 0 m l の範囲の容量を含み、
 複数の個別の容器のそれぞれが、約 2 0 m g から約 1 0 0 0 m g の範囲のキメラタンパク
 質の量を含む、
 容器と、

(b) 急性の中枢神経系の損傷の処置で使用するための指示
 とを含む、キット。

【請求項 1 8】

複数の容器が、約 5 m g / k g から約 2 0 m g / k g の総用量を含む、請求項 1 7 に記
 載のキット。

10

【請求項 1 9】

使用のための指示が、医薬組成物を 4 から 7 日間の期間にわたり静脈内投与または髄腔
 内投与するための指示を含む、請求項 1 7 に記載のキット。

【請求項 2 0】

使用のための指示が、減少用量のキメラタンパク質を静脈内投与、動脈内投与、または
 髄腔内投与するための指示を含む、請求項 1 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

20

本願は、その内容全体が参照によって本明細書に組み込まれる 2 0 2 0 年 7 月 3 0 日に
 出願された米国仮特許出願第 6 3 / 0 5 8 , 8 8 8 号および 2 0 2 1 年 7 月 3 0 日に
 出願された米国仮特許出願第 1 7 / 3 9 0 , 2 0 6 号への優先権およびこれらの利益を請求す
 る。

【0 0 0 2】

配列表の参照

本明細書は、本明細書と共に提出される配列表を含み、当該配列表は、その内容が参照
 によって本明細書に組み込まれる、2 0 2 1 年 7 月 2 9 日に作成された、7 0 9 5 8 バイ
 トのサイズを有する 1 3 2 4 6 3 - 0 1 0 4 0 1 _ S T 2 5 . t x t という表題のファイ
 ルを含む。

30

【0 0 0 3】

本開示の態様は、全体として、キメラタンパク質およびこのようなキメラタンパク質を
 含む医薬組成物、ならびにそれを必要とする対象において中枢神経系障害を処置するた
 めのこのようなキメラタンパク質の使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

脳損傷および中枢神経系障害は、人の認知能力および感覚運動能力の無能化および不可
 逆的低下をもたらし得る一般的な医学的状态である。神経細胞の死および損傷をもち
 得る脳損傷および中枢神経系障害は、虚血性脳卒中から変性障害までの範囲にわたる。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

中枢神経系の損傷または神経変性疾患を処置するための方法およびキットが提供される
 。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

一部の実施形態では、急性の中枢神経系の損傷を処置する方法が提供される。一部の実
 施形態では、本方法は、治療有効量のキメラタンパク質および薬学的に許容される担体
 を含む医薬組成物を、それを必要とする対象にボラス注射によって投与することを含み、
 キメラタンパク質は、(a) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒトアネキシン 5 (A n x

50

V)の変異体を含む標的化ドメインであって、1つまたは複数の突然変異が、C316に対応する位置での、ならびに適宜、R63、K70、K101、E138、D139、N160、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなる、標的化ドメイン、(b)1つまたは複数の突然変異を含むヒトインスリン様増殖因子IGF-1の変異体を含むアクチベータードメインであって、1つまたは複数の突然変異が、E3、Y24、Y31、Y60、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなり、IGF-1の変異体が、野生型IGF-1と比較してIGF-1受容体の活性化を低下させる、アクチベータードメイン、ならびに(c)1つまたは複数の突然変異を含むヒト血清アルブミン(HSA)の変異体を含む半減期モジュレーターであって、1つまたは複数の突然変異が、C58およびN527、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなる、半減期モジュレーターを含む。医薬組成物の投与は、大脳皮質の細胞に対する酸化損傷の緩和、血液脳関門の修復または修復の加速、浮腫の低減、梗塞部容積の低減、損傷を受けた脳組織の細胞内でのIGF-1受容体の選択的活性化によるセリン/スレオニンプロテインキナーゼB(AKT)経路のリン酸化の標的化された刺激、損傷を受けた脳組織への生存促進性シグナルの標的化された送達、脳卒中後の筋骨格系の協調の増大、脳卒中後の意識の改善、脳卒中後の神経学的機能の改善、および脳卒中後の運動機能の改善のうちの少なくとも1つをもたらす。

10

【0007】

一部の実施形態では、IGF-1の変異体は、野生型IGF-1と比較してIGF-1受容体の活性化を低下させる。一部の実施形態では、IGF-1の変異体は、野生型ヒトIGF-1と比較して、E3R置換およびY31A置換を含む。

20

【0008】

一部の実施形態では、ヒトアネキシン5の変異体は、野生型ヒトアネキシン5に対応するアミノ酸2~320を含み、また、野生型ヒトアネキシン5と比較して、R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A、C316A置換を含む。

【0009】

一部の実施形態では、ヒト血清アルブミンの変異体は、野生型ヒト血清アルブミンに対応するアミノ酸26~609を含み、また、野生型ヒト血清アルブミンと比較してC58S置換およびN527Q置換を含む。

【0010】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、IGF1(E3R/Y31A)_lk7_HSA26-609(C58S/N527Q)_lk7_AnxV2-320(R63A/K70A/K101A/E138A/D139G/N160A/C316A)である。

30

【0011】

一部の実施形態では、リンカーlk7は、-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Glyを含むかまたはそれからなる。

【0012】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、標的分子ホスファチジルセリンを含む細胞に対して選択的に標的化されており、セリン/スレオニンプロテインキナーゼB(AKT)のリン酸化によって測定した場合、標的分子を有さない細胞と比較して標的分子を有する細胞において少なくとも2倍強力なIGF-1受容体活性化を示す。

40

【0013】

一部の実施形態では、急性CNS損傷は虚血性脳卒中である。一部の実施形態では、急性CNS損傷は外傷性脳損傷である。一部の実施形態では、急性CNS損傷は出血性脳卒中である。一部の実施形態では、急性CNS損傷は後天性脳損傷である。一部の実施形態では、急性CNS損傷は脊髄損傷である。一部の実施形態では、急性CNS損傷はくも膜下出血である。一部の実施形態では、急性CNS損傷は本質的に医原性(iatrogenic)である。

【0014】

一部の実施形態では、本方法は、急性CNS損傷の診断の72時間以内に医薬組成物を

50

投与することを含む。一部の実施形態では、本方法は、急性 CNS 損傷の診断の 48 時間以内に医薬組成物を投与することを含む。

【0015】

一部の実施形態では、本方法は、約 0.01 mg/kg から約 20 mg/kg のキメラタンパク質を、それを必要とする対象に 1 日に 1 回投与することを含む。

【0016】

一部の実施形態では、本方法は、約 5 mg/kg から約 20 mg/kg の総用量のキメラタンパク質を、それを必要とする対象に 4 から 7 日間の期間にわたり投与することを含む。一部の実施形態では、本方法は、約 5 mg/kg から約 20 mg/kg の総用量のキメラタンパク質を、それを必要とする対象に 7 日間の期間にわたり投与することを含む。

10

【0017】

一部の実施形態では、本方法は、減少用量のキメラタンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。一部の実施形態では、本方法は、初日の、約 2 mg/kg から約 6 mg/kg のキメラタンパク質を含む初回用量と、それ以降の各日での、約 1 mg/kg から約 2 mg/kg のキメラタンパク質を含む用量とを、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0018】

一部の実施形態では、本開示の方法を実施するためのキットが提供される。一部の実施形態では、キットは複数の個別の容器を含み、それぞれの個別の容器は、約 20 mg から約 1000 mg のキメラタンパク質を含む。

20

【0019】

一部の実施形態では、急性の中枢神経系の損傷を処置するためのキットが提供される。一部の実施形態では、キットは、(a) それぞれの個別の容器が、治療有効量のキメラタンパク質および薬学的に許容される担体を含む一定容量の医薬組成物を含む、複数の個別の容器であって、医薬組成物がボラス注射用に製剤化されており、キメラタンパク質が、(i) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒトアネキシン 5 (AnxV) の変異体を含む標的化ドメインであって、1 つまたは複数の突然変異が、C316 に対応する位置での、ならびに適宜、R63、K70、K101、E138、D139、N160、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなる、標的化ドメイン、(ii) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒトインスリン様増殖因子 IGF-1 の変異体を含むアクチベータードメインであって、1 つまたは複数の突然変異が、E3、Y24、Y31、Y60、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなり、IGF-1 の変異体が、野生型 IGF-1 と比較して IGF-1 受容体の活性化を低下させる、アクチベータードメイン、ならびに (iii) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒト血清アルブミン (HSA) の変異体を含む半減期モジュレーターであって、1 つまたは複数の突然変異が、C58 および N527、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなる、半減期モジュレーターを含み、複数の個別の容器のそれぞれが約 1 ml から約 50 ml の範囲の容量を含み、複数の個別の容器のそれぞれが約 20 mg から約 1000 mg の範囲のキメラタンパク質の量を含む、容器と、(b) 急性の中枢神経系の損傷の処置で使用するための指示とを含む。

30

40

【0020】

一部の実施形態では、キットの複数の容器は、約 5 mg/kg から約 20 mg/kg の総用量を含む。

【0021】

一部の実施形態では、使用のための指示は、医薬組成物を 4 から 7 日間の期間にわたり静脈内投与、動脈内投与、または髄腔内投与するための指示を含む。

【0022】

一部の実施形態では、使用のための指示は、減少用量のキメラタンパク質を静脈内投与、動脈内投与、または髄腔内投与するための指示を含む。

【0023】

50

配列表の説明

配列番号 1 は、野生型ヒト IGF - 1 (成熟形態) のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 4 】

配列番号 2 は、E 3 R 置換および Y 3 1 A 置換を含む野生型ヒト IGF - 1 変異体のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 5 】

配列番号 3 は、ヒト IGF - 1 の変異体 (IGF - 1 L O N G) のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 6 】

配列番号 4 は、ヒト IGF - 1 の変異体 (IGF 1 E 3 R) のアミノ酸配列である。 10

【 0 0 2 7 】

配列番号 5 は、ヒト IGF - 1 の変異体 (IGF - 1 D e s 1 - 3) のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 8 】

配列番号 6 は、ヒト IGF - 1 の変異体 (IGF - 1 L R 3) のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 9 】

配列番号 7 は、ヒト IGF - 1 の変異体 (IGF 1 R 3 7 X) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 0 】

配列番号 8 は、残基 6 8 ~ 7 0 の欠失を有するヒト IGF - 1 の変異体 (IGF 1 3 X) のアミノ酸配列である。 20

【 0 0 3 1 】

配列番号 9 は、野生型ヒトアネキシン A 5 (A n x V) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 2 】

配列番号 1 0 は、野生型アネキシン 5 のアミノ酸 2 ~ 3 2 0、ならびに R 6 3 A、K 7 0 A、K 1 0 1 A、E 1 3 8 A、D 1 3 9 G、N 1 6 0 A、および C 3 1 6 A 置換を含む、野生型ヒトアネキシン 5 の変異体のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 3 】

配列番号 1 1 は、ヒトアネキシン A 5 の非内在化変異体 (n i - A n x V) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 4 】

配列番号 1 2 は、野生型ヒト血清アルブミン (H S A) のアミノ酸配列である。 30

【 0 0 3 5 】

配列番号 1 3 は、ヒト血清アルブミン変異体 m H S A (C 3 4 S 置換、N 5 0 3 Q 置換) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 6 】

配列番号 1 4 は、ヒト血清アルブミン変異体 m H S A 7 (C 3 4 S、N 5 0 3 Q、E 5 0 5 G、および V 5 4 7 A 置換) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 7 】

配列番号 1 5 は、野生型ヒト血清アルブミンのアミノ酸 2 6 ~ 6 0 9、ならびに C 5 8 S 置換および N 5 2 7 Q 置換を含む、変異型ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列である。 40

【 0 0 3 8 】

配列番号 1 6 は、ペプチドリナーのアミノ酸配列である。

【 0 0 3 9 】

配列番号 1 7 は、ヒトトランスフェリン (T f) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 0 】

配列番号 1 8 は、ヒトアルファフェトプロテイン (A F P) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 1 】

配列番号 1 9 は、ヒトビタミン D 結合タンパク質 (V D B P) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 2 】

配列番号 2 0 は、ヒトトランスサイレチン (T T R) のアミノ酸配列である。 50

【 0 0 4 3 】

配列番号 2 1 は、PAS 化モチーフのアミノ酸配列である。

【 0 0 4 4 】

配列番号 2 2 は、アルブミン結合ドメインヒト抗体 (a l d u d A B) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 5 】

配列番号 2 3 は、ペプチドリンカー l k 7 のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 6 】

配列番号 2 4 は、キメラタンパク質 s c p 7 7 6 のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 7 】

配列番号 2 5 は、キメラタンパク質 I G F 1 (E 3 R / Y 3 1 A) _ l k 7 _ H S A 2 6 - 6 0 9 (C 5 8 S / N 5 2 7 Q) _ l k 7 _ A n x V 2 - 3 2 0 (R 6 3 A / K 7 0 A / K 1 0 1 A / E 1 3 8 A / D 1 3 9 G / N 1 6 0 A / C 3 1 6 S) のアミノ酸配列である。

10

【 0 0 4 8 】

特許または出願書類は、少なくとも 1 つのカラー図面を含有する。カラー図面を含むこの特許または特許出願公開のコピーは、必要な費用の納付と共に請求により当局により提供される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 9 】

【 図 1 】 図 1 は、キメラタンパク質 s c p 7 7 6 は i n v i t r o で酸化的なニューロン細胞死から保護することを示すグラフである (L D H 放出リードアウトのパーセント)

20

【 図 2 】 図 2 は、キメラタンパク質 s c p 7 7 6 は i n v i t r o で酸化的なニューロン細胞死から保護することを示すグラフである (ニューロン細胞死リードアウトのパーセント) 。

【 図 3 】 図 3 は、急性虚血性脳卒中のラット t M C A O モデルにおけるフィラメント配置の概略的な表現である。

【 図 4 】 図 4 は、キメラタンパク質 s c p 7 7 6 の静脈内投与はラットにおいて虚血性脳卒中後に血液脳関門完全性を保護することを示すグラフである。

30

【 図 5 】 図 5 は、キメラタンパク質 s c p 7 7 6 の静脈内投与はラットにおいて虚血性脳卒中後に脳半球の腫脹を低減させることを示すグラフである。

【 図 6 】 図 6 は、キメラタンパク質 s c p 7 7 6 の静脈内投与はラットにおいて虚血性脳卒中後に梗塞サイズを低減させることを示すグラフである。

【 図 7 】 図 7 は、キメラタンパク質 s c p 7 7 6 は虚血性脳卒中後にラット脳組織中に蓄積することを示すグラフである。

【 図 8 】 図 8 は、キメラタンパク質 s c p 7 7 6 処置はラットにおいて虚血性脳卒中後に機能の回復を増強することを示すグラフである。

【 図 9 】 図 9 は、溶媒接近可能性、疎水性、および温度因子を考慮するアルゴリズムの適用を介して同定された I G F - 1 残基を示す。X により表されるのは、突然変異させることができる残基位置である。

40

【 図 1 0 】 図 1 0 は、I G F - 1 の疎水性コアの位置を示す。

【 図 1 1 A 】 図 1 1 A は、プラセボで処置されたおよび s c p 7 7 6 で処置された動物についての 4 8 時間 (2 日目) における神経学的欠損スコア (N D S) - 運動系スコアを示す。

【 図 1 1 B 】 図 1 1 B は、プラセボで処置されたおよび s c p 7 7 6 で処置された動物についての 7 日目における N D S - 意識スコアを示す。

【 図 1 1 C 】 図 1 1 C は、プラセボで処置された (上の曲線) および s c p 7 7 6 で処置された (下の曲線) 動物についての 1、2、3、7、10、および 14 日目における N D S - 筋骨格協調スコアを示す。

50

【図 1 1 D】図 1 1 D は、プラセボで処置された（上の曲線）および s c p 7 7 6 で処置された（下の曲線）動物についての 1、2、3、7、10、および 14 日目におけるトータル N D S スコアを示す。

【図 1 2】図 1 2 は、プラセボで処置されたおよび s c p 7 7 6 で処置された動物についての 8 時間、72 時間および 14 日目における病変サイズ（ mm^2 ）の M R I 分析の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

本明細書において使用される専門用語は、本開示の特定の実施形態を記載することのみを目的としており、限定することを意図したものではないことが理解される。

10

【0051】

別段の規定がない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が関係する分野の当業者によって一般に理解されているものと同一の意味を有する。

【0052】

本明細書において上記または以下で引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0053】

定義

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、内容から別段のことが明らかに示されない限り、複数形の参照を含む。

20

【0054】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、アミド結合（本明細書においてペプチド結合とも呼ばれる）によって共有結合した少なくとも 2 つのアミノ酸からなる配列ポリマーを示すために、区別せずに使用される。

【0055】

本明細書で使用される場合、用語「標的分子」は、組織（例えば、「リスクがある」、罹患している、または損傷している組織）と関連するあらゆる分子を指す。「標的細胞」は、タンパク質またはその標的化ドメインが特異的に結合し得る細胞を意味する。

30

【0056】

「結合」または「特異的結合」は本明細書において区別せずに使用され、タンパク質（またはその標的化ポリペプチドドメインもしくはそのアクチベータードメイン）が特異的分子に対してまたは当該分子を有する細胞もしくは組織に対して相当な親和性を示す（例えば、標的化ドメインが標的分子に対して相当な親和性を示す、またはアクチベータードメインが増殖因子受容体などの細胞の表面と関係する分子に対して相当な親和性を示す）ことを示し、そして、タンパク質（またはその標的化ポリペプチドドメインもしくはそのアクチベータードメイン）が特異的分子に対して相当な親和性を有し、他の分子と顕著な交差反応性を示さないという点で選択的である場合に生じると言われる。

【0057】

「同一性」は、当技術分野において公知であるように、配列を比較することによって決定する場合の 2 つ以上のポリペプチド配列またはタンパク質配列の間の関係である。当技術分野において、「同一性」はまた、このような配列鎖の間のマッチによって決定される場合のポリペプチドまたはタンパク質の間の配列関連性の程度も指す。「同一性」は、当技術分野において公知の任意の生体情報方法によって容易に計算することができる。

40

【0058】

用語「親ポリペプチド」は野生型ポリペプチドを指し、野生型ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列は、公的にアクセス可能なタンパク質データベース（例えば、EMBLヌクレオチド配列データベース、NCBI Entrez、Expasy、Protein Data Bank、およびこれらに類するもの）の一部である。

50

【 0 0 5 9 】

用語「突然変異ポリペプチド」または「ポリペプチド変異体」は、そのアミノ酸配列がその対応する野生型（親）形態、天然に存在する形態、またはあらゆる他の親形態のアミノ酸配列と異なるポリペプチドの形態を指す。突然変異ポリペプチドは、1つまたは複数の突然変異、例えば、置換、挿入、欠失、付加などを有し得、これらが、突然変異ポリペプチドを生じさせる。一般に、変異体は全体的に非常に類似しており、多くの領域において、参照ポリペプチドに同一である。本明細書で使用される場合、「変異体」は、天然タンパク質と配列が異なるが本明細書の他の箇所に記載されているまたはさもなくば当技術分野において公知であるその少なくとも1つの機能のおよび/または治療的特性は保持しているポリペプチドを指す。

10

【 0 0 6 0 】

用語「親ポリペプチドに対応する」は、ポリペプチドのアミノ酸配列が、対応する親ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも1つのアミノ酸変形形態の存在によってのみ異なる、本開示のポリペプチドを記載するために使用される。典型的には、変異型ポリペプチドおよび親ポリペプチドのアミノ酸配列は、高い同一性パーセンテージを示す。一実施例では、「親ポリペプチドに対応する」は、変異型ポリペプチドのアミノ酸配列が親ポリペプチドのアミノ酸配列に対して少なくとも約50%の同一性、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%の同一性、または少なくとも約99%の同一性を有することを意味する。別の実施例では、変異型ポリペプチドをコードする核酸配列は、親ポリペプチドをコードする核酸配列に対して少なくとも約50%の同一性、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%の同一性、または少なくとも約99%の同一性を有する。

20

【 0 0 6 1 】

本明細書で使用される場合の用語「実質的同一性」または「実質的類似性」は、核酸またはその断片に言及する場合、適切なヌクレオチド挿入または欠失を伴って別の核酸（またはその相補鎖）と最適にアラインされた場合に、配列の少なくとも約95%から99%においてヌクレオチド配列同一性が存在することを示す。本明細書で使用される場合の用語「実質的同一性」または「実質的類似性」は、タンパク質またはその断片に言及する場合、最適にアラインされた場合に配列の少なくとも約95%から99%においてアミノ酸配列同一性が存在することを示す。

30

【 0 0 6 2 】

用語「損傷細胞」または「損傷組織」は、本明細書で使用される場合、生物学的細胞または組織、例えば、限定はしないが外傷または化学的傷害によってダメージまたは損傷を受けた限定はしないがニューロン、グリア、または神経組織、組織への正常な血流の遮断をもたらすあらゆる手段によって損傷を受けた虚血性の組織、細胞、または組織を意味し、これを含む。

40

【 0 0 6 3 】

用語「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、研究者、獣医師、医師、または他の臨床医によって求められている、組織、系、動物、またはヒトの生物学的または医学的応答を引き起こすタンパク質または薬剤の量を意味する。

【 0 0 6 4 】

用語「薬学的に許容される」または「生理学的に許容される」は、本明細書で使用される場合、製剤の他の成分と適合しなくてはならない、またそのレシピエントに対して有害ではない、担体、希釈剤、または賦形剤を意味する。

【 0 0 6 5 】

50

用語「標的化部分」、「標的化ドメイン」、「標的化ポリペプチド」、または「標的化モジュール」は、本明細書において区別せずに使用され、キメラタンパク質を身体の特定の組織または領域に選択的に局在化させる分子を指す。局在化には、分子の抗原決定基の特異的認識、標的化ドメインの分子サイズ、イオン相互作用、疎水性相互作用、およびこれらに類するものが介在し得る。本明細書で使用される場合、用語「治療的部分」、「アクチベータードメイン」、「アクチベーターポリペプチド」、「シグナル伝達アーム」、および「エフェクターモジュール」は、本明細書において区別せずに使用され、治療に有用であるか、無毒であるか、細胞傷害性の影響を有さないか、または細胞にとって有害ではない、任意の薬剤を指す。このような薬剤としては、限定はしないが、増殖因子が含まれ得る。

10

【0066】**キメラタンパク質**

本明細書において提供されるキメラタンパク質は、2つ以上の異なる特異的分子に特異的結合することができる。一部の実施形態では、キメラタンパク質は、第1の特異的標的分子に対する結合特異性を有する標的化ドメイン、第2の標的分子に対する結合特異性を有するアクチベータードメイン、および半減期モジュレーターを含む。

【0067】

一部の態様では、アクチベータードメインは、細胞表面のチロシンキナーゼ受容体に対する結合特異性を有する。一部の実施形態では、チロシンキナーゼ受容体へのアクチベーターの結合は、細胞の生存に関連する細胞内シグナル伝達経路を活性化させる。一部の態様では、アクチベータードメインは、組織の再生をモジュレート/促進する受容体に対する結合特異性を有する。

20

【0068】

一部の実施形態では、標的化ドメインは、キメラタンパク質を標的細胞または標的組織に標的化するために機能し、一方、アクチベータードメインは、細胞の生存に関連する細胞内シグナル伝達経路を活性化させるために機能する。

【0069】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、キメラタンパク質の半減期を延長する。

【0070】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、半減期モジュレーターおよびアクチベーターポリペプチドに接続または結合している標的化ポリペプチドを有する融合タンパク質である。一部の実施形態では、操作されたタンパク質は、半減期モジュレーターに接続または結合している標的化ポリペプチドおよび増殖因子または突然変異した増殖因子を有するキメラタンパク質である。

30

【0071】

一部の実施形態では、突然変異した増殖因子（例えばIGF-1変異体）は、同族の増殖因子受容体を活性化する能力を保持しながら効力を低減させるように操作されている。一部の実施形態では、野生型増殖因子は、アクチベータードメインとして使用することができる。

40

【0072】

標的化ドメインは、キメラタンパク質を標的細胞に標的化するために一般に使用される。一部の実施形態では、標的細胞はアポトーシスを受けている。標的化ドメインの、その標的分子への結合は、標的細胞において顕著な生物学的影響を誘発しない。アクチベータードメインは、細胞表面上の受容体に結合する。アクチベータードメインの、その受容体への結合は、特異的な生物学的影響をモジュレートする、例えば、細胞の生存に関連する細胞内シグナル伝達経路を活性化することを目的としている。一部の実施形態では、アクチベータードメインの、その受容体への結合は、標的化された細胞または組織の生存を正に調節することを目的としている。特に、キメラタンパク質のアクチベータードメインは、生存シグナル伝達を促進することができる。

50

【 0 0 7 3 】

一部の実施形態では、キメラタンパク質のインビボ (*in vivo*) 活性は、限定はしないが、細胞表面受容体のリン酸化状態、またはホスホ - A K T もしくはホスホ - E R K (フローサイトメトリー、免疫蛍光、E L I S A、リン酸標識、処置された組織のウェスタン分析、もしくは当技術分野において公知のあらゆる他の方法論によって検出される場合) などの下流メディエーターを含む、アクチベータードメインによって調節される、分子におけるシグナル伝達の変化を検出することによって評価することができる。一部の実施形態では、キメラタンパク質は、アッセイによって検出される、調節された分子のレベル、機能的活性、またはリン酸化の顕著な (例えば、少なくとも 1 0 % の、少なくとも 2 0 % の、少なくとも 3 0 % の、少なくとも 4 0 % の、少なくとも 5 0 % の、またはそれを超える) 変化を誘発する場合、インビボで機能する。 10

【 0 0 7 4 】

アクチベータードメイン

アクチベータードメインは、細胞ネットワークの活性を検出可能にモジュレートする任意のポリペプチドであり得る。一部の実施形態では、アクチベータードメインは、細胞の表面にある受容体への結合によってシグナル伝達経路を活性化することができる。一部の実施形態では、ある特定のアクチベータードメインは、増殖因子ポリペプチドまたは任意の受容体アゴニストである。このようなモジュレーションが、細胞の増殖の誘発、細胞の成長の誘発、細胞の生存の促進、および / またはアポトーシスの阻害などの、細胞ネットワークの活性の増大であり得ることが、明らかとなる。 20

【 0 0 7 5 】

特定の適用のためのアクチベータードメインは、所望の治療結果に基づいて選択され得る。例えば、生存および神経保護を増大させるために、I G F - 1 (またはその変異体もしくは断片)、N R G 1 (またはその変異体もしくは断片)、F G F 2 (またはその変異体もしくは断片)、F G F 9 (またはその変異体もしくは断片)、C C L 4 (またはその変異体もしくは断片)、肝細胞増殖因子 (N K 1 またはその断片)、血管内皮増殖因子 A (またはその変異体もしくは断片)、B M P 2 (またはその変異体もしくは断片) を含むアクチベータードメインを使用することができる。

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態では、アクチベータードメインは、野生型形態のタンパク質と比較した、アミノ酸配列、タンパク質の三次元構造、および / またはタンパク質の活性の変化を含む。 30

【 0 0 7 7 】

一部の実施形態では、アクチベータードメインは、野生型増殖因子 (例えば I G F - 1) と比較したアミノ酸配列修飾を有する増殖因子を含むかまたはからなり、当該修飾は、その天然の受容体 (例えば I G F - 1 受容体) へのその結合を低下させるため、結合タンパク質 (例えば I G F 結合タンパク質) へのその結合を低下させるため、および / またはその天然の受容体 (例えば I G F - 1 受容体) のその活性化を低下させるためのものである。一部の実施形態では、アクチベータードメインは、その天然の受容体 (例えば I G F - 1 受容体) への結合を (例えば、約 1 ~ 5 %、5 ~ 1 0 %、1 0 % ~ 2 0 %、約 2 0 % ~ 4 0 %、約 5 0 %、約 4 0 % ~ 6 0 %、約 6 0 % ~ 8 0 %、約 8 0 % ~ 9 0 %、9 0 ~ 9 5 %) 低減させるアミノ酸配列修飾を有する増殖因子である。 40

【 0 0 7 8 】

増殖因子ポリペプチドは、増殖因子受容体の活性化を検出可能にモジュレートする。一部の実施形態では、二重特異的なタンパク質のアクチベータードメインは、野生型生物活性の少なくとも約 0 . 0 1 % を保持する増殖因子、その変異体または断片である。一部の実施形態では、二重特異的なタンパク質のアクチベータードメインは、野生型生物活性の少なくとも約 0 . 1 %、少なくとも約 1 %、少なくとも約 1 0 % を保持する増殖因子、その変異体または断片である。一部の実施形態では、二重特異的なタンパク質のアクチベータードメインは、野生型生物活性の約 0 . 0 1 % から約 0 . 1 % の間を保持する増殖因子 50

、その変異体または断片である。一部の実施形態では、二重特異的なタンパク質のアクチベータードメインは、野生型生物活性の約0.01%から約1%の間を保持する増殖因子、その変異体または断片である。一部の実施形態では、二重特異的なタンパク質のアクチベータードメインは、野生型生物活性の約0.01%から約10%の間を保持する増殖因子、その変異体または断片である。一部の実施形態では、二重特異的なタンパク質のアクチベータードメインは、野生型生物活性の約0.1%から約1%の間を保持する増殖因子、その変異体または断片である。一部の実施形態では、二重特異的なタンパク質のアクチベータードメインは、野生型生物活性の約0.1%から約10%の間を保持する増殖因子、その変異体または断片である。一部の実施形態の生物活性は、適切な細胞において対応する増殖因子受容体の活性化を測定することによって決定することができる。一部の実施形態では、活性化は、例えば、受容体キナーゼのリン酸化、または限定はしないがAKT、S6、ERK、JNK、mTORなどの下流のエフェクタータンパク質を測定することによって評価することができる。

10

【0079】

インスリン様増殖因子（IGF）およびその誘導体

インスリン様増殖因子（IGF）は、インスリン様特性および成長刺激特性を有するタンパク質のファミリーを構成している。IGFであるヒトIGF-1は、それぞれ、配列番号1で示されるタンパク質を有する、70のアミノ酸からなる塩基性ペプチドである。IGF-1および細胞外チロシンキナーゼ受容体（例えばIGF-1受容体）は、細胞の増殖および生存などの細胞プロセスにとって重要である。IGF-1受容体へのIGF-1またはその変異体の結合は、キナーゼ活性を刺激して複数の基質のリン酸化をもたらし、これによって、シグナル伝達カスケードを開始させる。本明細書において開示されているキメラタンパク質は、細胞外受容体、例えばIGF-1受容体を介してシグナル伝達する能力を維持し得る。アクチベータードメインIGF-1は、AKT経路の活性化を通して細胞の増殖および生存を刺激する。IGF-IがIGF-1受容体に結合すると、チロシンキナーゼは、2つの主要な基質であるIRS-1およびShc上のチロシン残基をリン酸化し、これが次に、Ras/Raf経路およびPI3キナーゼ/AKT経路を介してシグナル伝達する。

20

30

【0080】

IGF-1（およびIGF-2）とIGF-1受容体との相互作用は、IGF結合タンパク質（IGFBP）によって調節される。6つのIGFBPすべて（特にIGFBP5）はIGF作用を阻害することが示されているが、一部の 경우에는、刺激効果が観察されている。循環中のIGFの少なくとも99%が、IGFBPに通常は結合している。

【0081】

一部の実施形態では、アクチベータードメインは、ヒトIGF-1の変異体またはその断片である。一部の実施形態では、IGF-1の変異体またはその断片は、IGF-1受容体に対する選択性を維持し得る。図9は、溶媒露出度、疎水性、および温度因子を考慮するアルゴリズムの適用を介して同定された残基を示している。Xによって表されているものは、突然変異し得る残基位置である。総合して、これらの残基は、IGF-1の疎水性の核を表している。図10では、IGF-1の疎水性の核の位置は球として示されている（pdbモデル1H02）。

40

【0082】

一部の実施形態では、IGF-1変異体は、AKT経路を活性化するその能力を維持しながら野生型IGF-1と比較してIGF-1結合タンパク質（IGFBP）への結合を低減させるように修飾されている。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、pAKTEC50によって評価した場合、非標的細胞に対する効力が低下しているIGF-1受容体を活性化することができる。EC50は、pAKTシグナル伝達の最大半数レベルを達成するために必要な濃度として定義される。

50

【0083】

一部の実施形態では、IGF-1変異体は、チロシン残基の1つまたは複数での置換を含む。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、Y24位、Y31位、およびY60位での1つまたは複数の置換を含む。典型的な実施形態では、IGF-1変異体は、Y31位またはY24位またはY60位での単一のチロシン置換を含み得る。典型的な実施形態では、IGF-1変異体は、Y24位およびY31位、Y24位およびY60位、Y31位およびY60位、またはY24位およびY60位での単一のチロシン置換を含み得る。別の典型的な実施形態では、IGF-1変異体は、野生型IGF-1と比較して以下の置換Y24L、Y31A、およびY60Lの1つまたは複数を含み得る。例えば、IGF-1変異体はY24L置換およびY31A置換を含み得るか、またはIGF-1変異体はY24L置換、Y31A置換、およびY60Lを含み得る。一部の実施形態では、1つまたは複数のチロシン残基（Y24、Y31、Y60、またはこれらの組合せ）は、短鎖脂肪酸アミノ酸を置換し得る。一部の実施形態では、1つまたは複数のチロシン残基（Y24、Y31、Y60、またはこれらの組合せ）は、極性アミノ酸を置換し得る。一部の実施形態では、1つまたは複数のチロシン残基（Y24、Y31、Y60、またはこれらの組合せ）は、ロイシン、アラニン、イソロイシン、セリン、スレオニン、またはあらゆる他のアミノ酸を置換し得る。

10

【0084】

一部の実施形態では、IGF-1変異体は、ポリペプチドの3位でGlu、Lys、Met、Val、Ala、Leu、Ile、Gly、Ser、またはThrをArgに置き換える置換を含む。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、ポリペプチドの3位でGluをArgに置き換える置換（E3R）を含む。

20

【0085】

一部の実施形態では、IGF-1変異体は、3位および31位での置換を含む。例えば、IGF-1変異体は、E3R置換およびY31A置換を含む。一部の実施形態では、アクチベータードメインは、配列番号2を有するアミノ酸配列を有する。

【0086】

一部の実施形態では、アクチベータードメインは、以下の修飾：N末端での13残基の伸長（IGF-1 LONG）、アミノ酸1～3の欠失（Des-1-3）、ポリペプチドの3位でGluをArgに置き換える置換（E3R）、37位での無アルギニン（R37X）、アミノ酸68～70の欠失（3X）、N末端での13残基の伸長および野生型ポリペプチドの3位でGluをArgに置き換える置換（LR3）、チロシン残基のうちの1つまたは複数の置換（Y24、Y31、Y60、またはこれらの組合せ（例えば、Y24L、Y31A、Y60L置換、またはこれらの組合せ））、の1つまたは複数を含むヒトIGF-1の誘導体である。

30

【0087】

一部の実施形態では、アクチベータードメインは、1つまたは複数の残基24～37での突然変異（例えば、置換、欠失）を含む、ヒトIGF-1の変異体である。

【0088】

一部の実施形態では、アクチベータードメインはヒトIGF-1の誘導体であり、N末端での13残基の伸長（IGF-1 LONGとも呼ばれる、配列番号3）、突然変異E3R（配列番号4）、またはこれらの組合せ（LONG E3R、LR3とも呼ばれる、配列番号6）を含む。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、血清および他の体液中に存在するIGF結合タンパク質へのアクチベータードメインの結合を低下させるために、E3R置換、N末端での13残基の伸長、アミノ酸1～3の欠失（（Des1-3）、配列番号5）、またはこれらの組合せを含む。

40

【0089】

一部の実施形態では、アクチベータードメインはヒトIGF-1の誘導体であり、以下の修飾：N末端での13残基の伸長（配列番号3）、アミノ酸1～3の欠失（配列番号5）、ポリペプチドの3位でGluをArgに置き換える置換（配列番号4）、37位での

50

無アルギニン（R37X、配列番号7）、アミノ酸68～70の欠失（3X、配列番号8）、またはN末端での13残基の伸長および野生型ポリペプチドの3位でGluをArgに置き換える置換（配列番号6）、の1つまたは複数を含む。

【0090】

本明細書において記載されるIGF-1の変異体（例えば、E3R、IGF-1 LONG、IGF-1 LONG E3R（IGF-1（LR3）とも呼ばれる）、またはIGF1 Des1-3）を有する二重特異的なタンパク質は、野生型IGF-1と比較してIGF結合タンパク質に対する親和性が低下していると考えられている。一部の実施形態では、本明細書において記載される二重特異的なタンパク質のIGF-1変異体は、野生型IGF-1と比較して大きく低下したIGF-1結合タンパク質との相互作用を有しながら、シグナル伝達経路を活性化し得る。

10

【0091】

一部の実施形態では、IGF-1変異体は、IGF-1変異体に存在する1つまたは複数のグリコシル化部位のグリコシル化によって修飾され得る。

【0092】

一部の実施形態では、本明細書において記載されるIGF-1変異体を有するキメラタンパク質は、非標的細胞に対する野生型IGF-1よりも低い、非標的細胞に対する効力を有する。

【0093】

増殖因子受容体に結合するある特定のアクチベータードメインは、本明細書において配列番号1～8で提供される。

20

【0094】

本明細書において開示されている配列のアミノ酸配列の変形形態、欠失、置換、または誘導体化などのさらなるペプチド配列修飾であって、ペプチドが未修飾のペプチドと実質的に同一の活性または機能を有する限りのペプチド配列修飾を含めることができる。特に、修飾されたペプチドは、未修飾のペプチドに伴う活性または機能を保持し、修飾されたペプチドは、未修飾の配列のアミノ酸配列と「実質的に相同な」アミノ酸配列を一般に有する。

【0095】

一部の実施形態では、IGF-1変異体は、配列番号1～8で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%の同一性、または少なくとも約99%の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、配列番号1～8で示されるアミノ酸配列に対して約85%から約90%、約90%から約95%、約95%から約98%、約98%の同一性から約99%の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、配列番号1～8のアミノ酸のうちいずれか1つの10、20、30、40、50、60、またはそれを超える連続するアミノ酸を含み得る。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、配列番号1～8のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有し得る。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、配列番号2～8のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有し得る。一部の実施形態では、IGF-1変異体は、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有し得る。

30

40

【0096】

一部の実施形態では、二重特異的なタンパク質は、健康な組織におけるよりも損傷した組織において少なくとも一桁低いEC50を有する二重特異的タンパク質をもたらすように選択された増殖因子変異体を有するアクチベータードメインを含む。例えば、二重特異的タンパク質ドメインは増殖因子変異体を含み、健康な組織におけるEC50よりも少なくとも10倍低い、少なくとも15倍低い、少なくとも20倍低い、少なくとも25倍低い、少なくとも30倍低い、少なくとも35倍低い、少なくとも40倍低い、少なくとも45倍低い、少なくとも50倍低い、少なくとも55倍低い、少なくとも60倍低い、少

50

なくとも65倍低い、少なくとも70倍低い、少なくとも75倍低い、少なくとも80倍低い、少なくとも85倍低い、少なくとも90倍低い、少なくとも95倍低い、少なくとも100倍低い、少なくとも110倍低い、損傷した組織におけるEC50を有する。

【0097】

一部の実施形態では、IGF-1変異体を有する二重特異的なタンパク質は、健康な組織におけるよりも損傷した組織において低い最大半数効果濃度（EC50）を有する。一部の実施形態では、IGF-1変異体を有する二重特異的なタンパク質は、健康な組織におけるよりも損傷した組織において少なくとも10倍低い、少なくとも15倍低い、少なくとも20倍低い、少なくとも25倍低い、少なくとも30倍低い、少なくとも35倍低い、少なくとも40倍低い、少なくとも45倍低い、少なくとも50倍低い、少なくとも55倍低い、少なくとも60倍低い、少なくとも65倍低い、少なくとも70倍低い、少なくとも75倍低い、少なくとも80倍低い、少なくとも85倍低い、少なくとも90倍低い、少なくとも95倍低い、少なくとも100倍低い、少なくとも110倍低い最大半数効果濃度（EC50）を有する。

10

【0098】

一部の実施形態では、このような変異型増殖因子を有する本明細書において提供されるキメラタンパク質は、標的化された損傷組織に対してより高い特異性を有する。

【0099】

標的分子

一部の態様では、標的分子は、標的細胞の外側で曝露されているかまたは富んでいる。一部の実施形態では、標的分子は、損傷細胞、初期アポトーシス細胞、またはアポトーシス細胞と結び付いているが、この標的分子は、生存能力があるまたは損傷していない細胞の細胞内にあり、損傷細胞内の細胞外空間に曝露されている。このような分子としては、例えば、壊死（DNAなど）もしくはアポトーシス（例えばホスファチジルセリン）を受ける細胞内で曝露される分子、ミオシン（その組織型特異的なサブタイプを含む）、ICAM-1、またはP-セレクチンが含まれる。さらに、他の実施形態では、標的分子は、健康なまたは機能的な細胞または組織で検出されるレベルと比較して、罹患しているまたは機能障害のある細胞または組織の表面に存在しているかまたは富んでいる分子である。一部の実施形態では、標的細胞は、腫瘍でもがん性細胞でもない。

20

【0100】

細胞は、脂質二重層を含む原形質膜（または細胞膜）によって結合されている。細胞膜は、サイトゾルに面している表面（細胞の細胞質側または内側）および細胞の外側または細胞外空間に面している表面を有すると考えられ得る。原形質膜の内葉から外葉への陰イオン性リン脂質の二重層貫通運動が、アポトーシスの際に生じる。アネキシンA5、シナプトタグミンI、またはラクトアドヘリンなどの陰イオン性リン脂質結合タンパク質を使用して、細胞膜外葉上のホスファチジルセリンの存在を検出することができる。ホスファチジルセリンは、生存能力があるまたは損傷していない細胞の膜の細胞質側に通常は限られ、かつ損傷細胞またはアポトーシスにおいて外側細胞表面上または細胞外空間に曝露されるようになる、リン脂質である。

30

【0101】

一部の実施形態では、標的分子は「虚血関連分子」である。「虚血関連分子」は、虚血（これは低酸素症を生じさせる）または低酸素症の後に、虚血性イベントを経験していない同一の組織の細胞におけるよりも著しく高い（例えば、少なくとも1.5倍高い、少なくとも2倍高い、少なくとも3倍高い、少なくとも4倍高い、少なくとも5倍高い）レベルで検出される任意の分子である（すなわち、当該分子は、虚血後組織に特異的であるかまたは当該組織において富んでいる）。虚血は、適切な酸素化をもたらすには血流量が不十分である場合に生じ、これは、組織の低酸素症（酸素の低減）または最も重度の形態の低酸素症としての酸素欠乏（酸素の不存在）を生じさせ、最終的には組織壊死およびアポトーシスを生じさせる。

40

【0102】

50

標的化ドメイン

一部の実施形態では、標的化ドメインは、組織と結び付いている標的分子（例えば虚血関連分子）に対して特異的結合親和性を有する。一部の実施形態では、標的化ドメインは、初期アポトーシス細胞の表面上に存在する標的分子に対して特異的結合親和性を有する。標的化ドメインは、この機能を担う任意のポリペプチド配列であり得る。一部の実施形態では、標的分子への標的化ドメインの結合は、生物活性を有さないか、または生物活性をモジュレーションしない。本明細書で使用される場合、「生物活性」は、タンパク質のドメインへの分子の曝露によって行われる規定された既知の活性を指す。

【0103】

一部の実施形態では、標的化ドメインは、標的分子に対する結合親和性を有する非抗体ポリペプチド、その断片、またはその変異体であり得る。さらに、他の実施形態では、標的化ポリペプチドドメインは、1つまたは複数の抗体可変領域（例えばs c F v）を含む。

10

【0104】

アネキシンA5およびその変異体

一部の実施形態では、標的化ドメインは、アネキシン、その変異体、またはその断片を含む。用語「アネキシン」は、リン脂質、特にホスファチジルセリン（PS）に結合し得るあらゆるタンパク質、およびアネキシンファミリーのメンバーを指す。一部の実施形態では、アネキシンはアネキシンA5であるが、他のアネキシンも等しく使用することができる。一部の実施形態では、標的化ドメインは、ヒトアネキシンA5、その機能的断片、またはその変異体である。アネキシンA5の変異体は、親野生型アネキシンA5ポリペプチド（配列番号9）の当該位置ではそのアミノ酸が見られない少なくとも1つの位置に、少なくとも1つのそのアミノ酸を含む。これに従ったアネキシン変異体は、1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、付加、またはこれらの組合せを含み得るが、当該アミノ酸の置換、欠失、または付加は、キメラタンパク質のアネキシンA5変異体の、PSなどの少なくとも1つのリン脂質に結合する能力にほとんど影響しない。一部の実施形態では、アネキシンA5変異体は、配列番号9で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%の同一性、または少なくとも約99%の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。一部の実施形態では、アネキシンA5変異体は、配列番号9のアミノ酸に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%の同一性、または少なくとも約99%の同一性を有する50、80、100、110、200、300、またはそれを超える連続するアミノ酸を含み得る。

20

30

【0105】

一部の実施形態では、アネキシンA5の変異体は、二量体の形成を低減させるために、315位のシステイン（C316に対応する）をセリンまたはアラニンで置換するように修飾されている。例えば、システインは、アラニンまたはセリンで置換され得る。本明細書で使用される場合、用語「～に対応する」は、ポリペプチド（例えばアネキシンA5）内のアミノ酸残基の位置/同一性を指すために使用される。当業者には、簡潔さを目的として、標準的な番号付けシステム（野生型アネキシンA5に基づく）が本明細書において利用され、その結果、316位の残基「に対応する」アミノ酸が、例えば、実際に特定のアミノ酸鎖の316番目のアミノ酸である必要は必ずしもなく、むしろ、例えばN末端メチオニンの翻訳後除去の前のアネキシンA5の316位で見られる残基に対応することが理解されよう。当業者には、対応するアミノ酸を同定する方法が容易に理解される。特に、メチオニン残基がプロセッシングの際に切断されるため、野生型アネキシンA5（配列番号9）のアミノ酸配列はメチオニンで開始されていないことに留意されたい。

40

【0106】

一部の実施形態では、アネキシンA5の変異体は、ホスファチジルセリン（PS）への結合親和性を維持しながら、細胞内への、アネキシンA5またはアネキシンA5の変異体を含むキメラタンパク質の内在化を低減させるように突然変異している、アミノ酸配列を

50

有する。一部の実施形態では、アネキシン A 5 の変異体またはアネキシン A 5 の変異体を含むキメラタンパク質は、ホスファチジルセリンへの結合親和性を有し、細胞内に内在化しないかまたは野生型アネキシン A 5 よりも遅い速度で内在化する。一部の実施形態では、標的化ドメインは、アネキシン A 5 の非内在化変異体、(n i - アネキシン A 5 または n i - A n x V と呼ばれる、配列番号 1 1) である。一部の実施形態では、アネキシン A 5 の変異体は、配列番号 1 0 で示されるアミノ酸を有する。一部の実施形態では、アネキシン A 5 の非内在化突然変異体は、配列番号 1 1 で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 % の同一性、または少なくとも約 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、アネキシン A 5 の非内在化突然変異体は、配列番号 1 1 で示されるアミノ酸配列に対して約 8 5 % から約 9 0 %、約 9 0 % から約 9 5 %、約 9 5 % から約 9 8 %、約 9 8 % から約 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。一部の実施形態では、アネキシン A 5 の変異体は、配列番号 1 1 におけるアミノ酸のうちのいずれか 1 つの 5 0、8 0、1 0 0、1 1 0、2 0 0、3 0 0、またはそれを超える連続するアミノ酸を含み得る。内在化をほとんど生じさせないアネキシン A 5 のあらゆる変形形態が構想される。

10

【 0 1 0 7 】

当然のことながら、アネキシン A 5 の非内在化変異体は、野生型 A 5 を有するキメラタンパク質と比較して、キメラタンパク質の半減期を延長し得る。一部の実施形態では、内在化をほとんど生じさせないアネキシン A 5 の変異体、または内在化をほとんど生じさせないアネキシン A 5 の変異体を有するキメラタンパク質は、野生型アネキシン A 5、または野生型アネキシン A 5 を有するキメラタンパク質と比較して、1 . 1 ~ 1 . 2、1 . 1 ~ 1 . 3、1 . 1 ~ 1 . 4、1 . 1 ~ 1 . 5、1 . 1 ~ 1 . 6、1 . 1 ~ 1 . 7、1 . 1 ~ 1 . 8、1 . 1 ~ 1 . 9、1 . 1 ~ 2、またはそれを超える半減期の延長を有し得る。

20

【 0 1 0 8 】

用語「非内在化」および「ほとんど内在化しない」は、本明細書で使用される場合、本明細書において開示されているキメラタンパク質の相当量の内在化が欠如していることを指す。例えば、「ほとんど内在化しない」という表現は、キメラタンパク質の 5 0 % 未満が、キメラタンパク質が結合している細胞に内在化している、またはキメラタンパク質の 2 5 % 未満が、キメラタンパク質が結合している細胞に内在化している、またはキメラタンパク質の 1 0 % 未満が、キメラタンパク質が結合している細胞に内在化している、またはキメラタンパク質の 5 % 未満が、キメラタンパク質が結合している細胞に内在化している、またはキメラタンパク質の 3 % 未満が、キメラタンパク質が結合している細胞に内在化している、またはキメラタンパク質の 1 % 未満が、二重特異的なタンパク質が結合している細胞に内在化していることであると理解される。

30

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態では、アネキシン A 5 の非内在化突然変異体は、ヒトアネキシン A 5 に対して少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 % の同一性、または少なくとも約 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。一部の実施形態では、アネキシン A 5 の非内在化変異体は、システイン残基がセリン (S e r)、アラニン (A l a)、ロイシン (L e u)、フェニルアラニン (P h e)、メチオニン (M e t)、またはトリプトファン (T r p) で置換されている、3 1 5 位 (C 3 1 6 に対応する) での置換を含む。一部の実施形態では、アネキシン A 5 の非内在化突然変異体は、ヒトアネキシン A 5 に対して少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 % の同一性、または少なくとも約 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。一部の実施形態では、アネキシン A 5 の非内在化変異体は、

40

50

システイン残基がセリン (Ser) またはアラニン (Ala) で置換されている、315位 (C316に対応する) での置換を含む。一部の実施形態では、アネキシンA5の非内在化突然変異体は、315位のシステイン (C316に対応する) をセリンまたはアラニンで置換するように修飾されたヒトアネキシンA5に対して少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%の同一性、または少なくとも約99%の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。

【0110】

一部の実施形態では、アネキシンA5またはアネキシンA5変異体 (例えば、C316位での置換を有する変異体) は、R62位、K69位、K100位、E137位、D138位、N159位、L313位 (野生型ヒトアネキシンA5のR63、K70、K101、E138、D139、N160、L314に対応する) での1つまたは複数の置換を含むように修飾されている。

【0111】

一部の実施形態では、アネキシンA5変異体は、

R62A、R62E、R62D、R62M、R62L、R62I、R62Y (野生型ヒトアネキシンA5のR63A、R63E、R63D、R63M、R63L、R63I、R63Yに対応する)、

K69A、K69E、K69D、K69M、K69L、K69I、K69Y (野生型ヒトアネキシンA5のK70A、K70E、K70D、K70M、K70L、K70I、K70Yに対応する)、

E137A、E137K、E137R、E137M、E137L、E137I、E137Y (野生型ヒトアネキシンA5のE138A、E138K、E138R、E138M、E138L、E138I、E138Y)、

D138G、D138K、D138R、D138M、D138L、D138I、D138Y (野生型ヒトアネキシンA5のD139G、D139K、D139R、D139M、D139L、D139I、D139Yに対応する)、

N159A、N160M、N160L、N160I、N160V、N160Y (野生型ヒトアネキシンA5のN160A、N160M、N160L、N160I、N160V、N160Yに対応する)、

L313E、L313D、L313K、L313R、L313H、L313Q、L313N、L313Y (野生型ヒトアネキシンA5のL314E、L314D、L314K、L314R、L314H、L314Q、L314N、L314Yに対応する)、

または前述のもののあらゆる組合せを含む。

【0112】

一部の実施形態では、アネキシンA5またはアネキシンA5変異体は、D143位および/またはE227位での1つまたは複数の置換を含む。一部の実施形態では、アネキシンA5変異体は、

D142G、D142A、D142K、もしくはD142R (D143G、D143A、D143K、もしくはD143Rに対応する) 置換、および/または

E226G、E226A、E226K、もしくはE226R (E227G、E227A、E227K、E227Rに対応する) 置換を含む。

【0113】

一部の実施形態では、アネキシンA5またはアネキシンA5変異体 (例えば、C316、D143、および/またはE227での置換を有する) は、以下の置換R62A、K69A、K100A、E137A、D138G、N159A、L313E (R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A、L314Eに対応する) のう

10

20

30

40

50

ちの1つまたは複数を含むように修飾されている。例えば、配列番号9を有するアネキシンA5は、C315A置換またはC315S置換（野生型アネキシンA5のC316AまたはC316Sに対応する）および以下の置換：R62A、K69A、K100A、E137A、D138G、N159A、L313E（野生型アネキシンA5のR63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A、L314Eに対応する）のうちの1つまたは複数を含むように修飾され得る。

【0114】

一部の実施形態では、ヒトアネキシンA5（配列番号9）は、以下の置換R62A、K69A、K100A、E137A、D138G、N159A、D143N、E227A、C315S、またはC315A（野生型アネキシンA5のR63A、K70A、K101A、E138A、D139G、D144N、N160A、E228A、C316S、またはC316Aに対応する）のうちの1つまたは複数を含むように修飾されている。

10

【0115】

一部の実施形態では、標的化ドメインは、野生型アネキシンA5のR63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A、およびC316A、またはC316S置換を有するように操作されているアネキシンA5である。例えば、標的化ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列を有し得る。

【0116】

一部の実施形態では、アネキシンA5変異体は、細胞内へのアネキシンの内在化をさらに減少させるために、異なる領域に1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、またはそれを超える置換を含む。例えば、アネキシンA5変異体は、R62AおよびK69A、R62AおよびK100A、R62AおよびE137A、R62AおよびD138G、R62AおよびN159A、R62AおよびK69AおよびK100A、R62AおよびK69AおよびE137A、R62A、K69AおよびK100A、R62A、K69A、K100A、ならびにE137Aなどを含み得る。

20

【0117】

これに従ったアネキシン変異体は、1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または付加をさらに含み得るが、当該アミノ酸の置換、欠失、または付加は、キメラタンパク質のアネキシンA5変異体の、PSなどの少なくとも1つのリン脂質に結合する能力にほとんど影響しない。

30

【0118】

天然ポリペプチドを標的化ドメインとして使用することができる。しかし、このような天然配列の一部、および改変された配列を有するポリペプチドもまた、このようなポリペプチドが以下でより詳細に記載される適切な結合親和性（Kd）で標的分子を結合する能力を保持しているならば使用可能であることが明らかとなる。

【0119】

抗体標的化ドメイン：

一部の実施形態では、抗ホスファチジルセリン抗体を標的化ドメインとして使用することができる。本明細書で使用される場合、用語「抗体」には、限定はしないが、(i) Fab断片、VL、VH、CL、およびCH1ドメインからなる一価の断片、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド結合によって結合されている2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab)₂断片およびF(ab')₂断片、(iii) VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一のアームのVLドメインおよびVHドメインからなるscFv断片、(v) VHドメインからなるdAb断片、ならびに(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。このような抗体は、当技術分野において公知の方法を使用して無傷抗体から産することができるか、または標準的な組換えDNAおよびタンパク質発現技術を使用して組換えによって産生することができる。

40

【0120】

標的化ドメインの結合

50

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、 10^{-6} M未満、好ましくは 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、または 10^{-10} M未満の K_d で標的分子に結合する。

【0121】

半減期モジュレーター

当業者には、治療用途で使用されるタンパク質が、比較的低い分子量であるために、最適な血清中半減期を示さない場合があることが理解されよう。一部の治療用途では、したがって、タンパク質の半減期を延長することが望ましい場合がある。一部の実施形態では、臓器の罹患している、損傷した、またはダメージを受けた区域へのキメラタンパク質の蓄積を達成するために、キメラタンパク質は、半減期モジュレーターとコンジュゲートしているか作動可能に結び付いているかまたは融合している。好ましくは、半減期モジュレーターは、非免疫原性ポリペプチドである。

10

【0122】

例えば、短い半減期は、治療薬としての野生型増殖因子の最も制限的な特性である。静脈内投与されたIGF-1は、ヒトにおいて1時間未満の血清中半減期を有する。IGF-1と比較した、本明細書において開示されているキメラタンパク質の半減期の延長は、例えば、1) 頻度の低い投与と同等な有効性、2) より低い用量での同等な曝露、3) 同等な曝露レベルでのより低いCmax、を可能にし、Cmaxに関連する毒性のリスクを低減させる。

【0123】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、キメラタンパク質のインビボでの半減期を増大させ得る。例えば、半減期モジュレーターを含むキメラタンパク質の半減期は、約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、またはそれを超える時間である。例えば、キメラタンパク質の半減期は、カニクイザルで試験すると、約8時間以上であり得る。一部の実施形態では、半減期モジュレーターを含むキメラタンパク質の半減期は、約24時間以上である。一部の実施形態では、半減期モジュレーターを含むキメラタンパク質の半減期は、約1週間以上である。

20

【0124】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、ヒトにおいて非免疫原性である。

【0125】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、リソソーム分解経路(例えば、FcRn受容体介在性のリサイクリング)の回避を促進する細胞機構と相互作用するポリペプチドである。

30

【0126】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、ヒト血清アルブミン(HSA)などの血清成分への結合を介してキメラタンパク質の半減期を延長させるように設計されている。HSAは血液中で最も豊富なタンパク質であり、ヒトにおいて安全性が実証されている。

【0127】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターはHSA変異体である。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列(wtHSA、配列番号12)に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも200個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも300個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態

40

50

では、半減期モジュレーターは、野生型ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも400個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも500個の連続するアミノ酸を含む。

【0128】

一部の実施形態では、HSA変異体は、以下の置換：

例えばセリン(C58S)、アラニン(C58A)、アスパラギン(C58N)、ロイシン(C58L)、またはグルタミン(C58Q)で置換され得るシステインC58、 10

例えばグルタミン酸(K420E)、アスパラギン酸(K420D)、ロイシン(K420L)、またはメチオニン(K410M)で置換され得るリシンK420、

例えばグルタミン(N527Q)、アスパラギン酸(N527D)、ヒスチジン(N527H)、またはチロシン(N527Y)で置換され得るアスパラギンN527、

例えばグリシン(E505G)、アラニン(E505A)、ロイシン(E505L)、リシン(E505K)、バリン(E505V)、イソロイシン(E505I)、メチオニン(E505M)、またはグルタミン(E505Q)で置換され得るグルタミン酸E505

、
例えばアラニン(V547A)、グリシン(V547G)、ロイシン(V547L)、リシン(V547K)、イソロイシン(V547I)、メチオニン(V547M)で置換され得るバリンV547、 20

例えばグルタミン(N527Q)、アスパラギン酸(N503D)、ヒスチジン(N503H)、またはチロシン(N503Y)、またはグルタミン(V547Q)で置換され得るアスパラギンN503

の1つまたは複数を有し得る。

【0129】

一部の実施形態では、HSA変異体は、アミノ酸26~609を有し得、また、以下の置換：

例えばセリン(C58S)、アラニン(C58A)、アスパラギン(C58N)、ロイシン(C58L)、またはグルタミン(C58Q)で置換され得るシステインC58、 30

例えばグルタミン酸(K420E)、アスパラギン酸(K420D)、ロイシン(K420L)、またはメチオニン(K410M)で置換され得るリシンK420、

例えばグルタミン(N527Q)、アスパラギン酸(N527D)、ヒスチジン(N527H)、またはチロシン(N527Y)で置換され得るアスパラギンN527、

例えばグリシンG(E505G)、アラニン(E505A)、ロイシン(E505L)、リシン(E505K)、バリン(E505V)、イソロイシン(E505I)、メチオニン(E505M)、またはグルタミン(E505Q)で置換され得るグルタミン酸E505、

例えばアラニン(V547A)、グリシン(V547G)、ロイシン(V547L)、リシン(V547K)、イソロイシン(V547I)、メチオニン(V547M)で置換され得るバリンV547、 40

例えばグルタミン(N503Qおよび/もしくはN527Q)、アスパラギン酸(N503Dおよび/もしくはN527D)、ヒスチジン(N503Hおよび/もしくはN527H)、またはチロシン(N503Yおよび/もしくはN527Y)で置換され得るアスパラギンN503および/またはN527

の1つまたは複数を有する。

【0130】

一部の実施形態では、HSA変異体(本明細書においてmHSAと呼ばれる)は、以下の置換C34S、N503Qを有する(配列番号13)。一部の実施形態では、HSA変 50

異体（本明細書においてmHSA7と呼ばれる）は、以下の置換C34S、N503Q、E505G、およびV547Aを有する（配列番号14）。一部の実施形態では、HSA変異体は、アミノ酸26～609および以下の置換C58SおよびN527Qを有する（配列番号15）。

【0131】

一部の実施形態では、HSAの503位および/または527位にあるアスパラギンは、脱アミドされていてよく、半減期を短縮し得るが、N503Q置換および/またはN527Q置換によって除去されてもよい。一部の実施形態では、HSAのシステインC34は、遊離システインを除去し、代替りのジスルフィド結合形成を最少化するために、セリンまたはアラニン（SまたはA）に置換され得る。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、N503Q置換および追加の末端グリシンを有する、修飾されたHSAの修飾型のドメインIII（mHSA_dIII）である。このような修飾型は、HSAのFcRnへの結合特性および増大した血清中半減期を保持している。

10

【0132】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、抗体または一本鎖定常断片のFcドメインである。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、免疫グロブリン分子（例えばIgG）のFc領域を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、ヒトFcのアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。抗体のFcドメインは、FcRnを結合するための天然の能力を有しており、半減期の延長を生じさせる。一部の実施形態では、抗体のFcドメインは、Fc（ガンマ）Rを結合しないように操作されている。典型的な実施形態では、Fcドメインは、N297をQで置換するように操作されている（N297Q変異体）。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、Fcの単量体変異体形態（scFc）である。例えば、天然に二量体化してFcを形成するIgG重鎖のサブセットは、ヒンジ-CH2-CH3である。一部の実施形態では、Fcドメインは、ヒンジ-CH2-CH3をGGGGSGGGSGGGSGGGGS（配列番号16）などの可動性リンカーと結合することによって一本鎖を形成してヒンジ-CH2-CH3-リンカー-ヒンジ-CH2-CH3鎖を生じさせるように操作されている。典型的な実施形態では、一本鎖Fc（scFc）は、N297をQで置換し、C220をSで置換するように操作されている（N297Q、C220S）。

20

30

【0133】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、アルブミンまたは他の循環タンパク質に標的化された抗体の一本鎖可変断片（scFv）である。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、限定はしないがアルブミンなどの特異的抗原に向けられたscFvアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、限定はしないがアルブミンなどの特異的抗原に向けられたscFvアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも50個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個の連続するアミノ酸を含む。

40

【0134】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、ヒトトランスフェリン（Tf、配列番号17）などのトランスフェリンである。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、ヒトトランスフェリンのアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、ヒトトランスフェリンのアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少

50

なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個、少なくとも500個、少なくとも600個、少なくとも650個の連続するアミノ酸を含む。

【0135】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ヒトアルファフェトプロテインのアミノ酸配列（AFP、配列番号18）に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ヒトアルファフェトプロテイン（AFP）のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、AFPのN結合型のグリコシル化部位は、N251Q置換によって除去される。

10

【0136】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ビタミンD結合タンパク質のアミノ酸配列（VDBP、配列番号19）に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ビタミンD結合タンパク質（VDBP）のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、VDBPのN結合型のグリコシル化部位は、N288Q置換またはN288T置換によって除去することができる。

20

【0137】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ヒトトランスサイレチンのアミノ酸配列（TTR、配列番号20）に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、野生型ヒトトランスサイレチン（TTR）のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、トランスサイレチンは、N118のN-グリコシル化部位を除去するように修飾されている。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、単量体形態のTTRである。

30

【0138】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、PAS化のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。PAS化は、ペグ化を模倣する、プロリン、アラニン、および/またはセリンに富んだ配列である（WO/2008/155134を参照されたい）。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、PAS化のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。PAS化は、ペグ化を模倣する、プロリン、アラニン、および/またはセリンに富んだ配列である。プロリン、アラニン、および/またはセリンからなるポリペプチドストレッチは、大きな流体力学的半径を有する半構造化された三次元ドメインを形成し、これによって、融合タンパク質のクリアランスを低減させる。一部の実施形態では、PAS化のアミノ酸配列は、約200、300、400、500、または600アミノ酸長である。例えば、PAS化は、アミノ酸配列ASPAAPAPASPAAPAPSAAPA（配列番号21）の20回の反復である。

40

50

【0139】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、N末端および/もしくはC末端へのならびに/またはアミノ酸側鎖への化学的結合(例えば、システインへのPEG-マレイミドの結合)を介する、融合タンパク質への1つまたは複数のポリエチレングリコール(PEG)鎖の結合を含む。PEG鎖は、大きな流体力学的半径を有する半構造化された三次元ドメインを形成し、これによって、融合タンパク質のクリアランスを低減させる。

【0140】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、アルブミン結合ドメインヒト抗体(a1b u d A b)のアミノ酸配列(配列番号22)に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、アルブミン結合ドメインヒト抗体(a1b u d A b)のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。アルブミン結合ドメイン抗体は、血清アルブミンへの非共有結合によって融合タンパク質の半減期を増大させ得る(参照によってその全体が本明細書に組み込まれる、WO2008/096158を参照されたい)。一部の実施形態では、アルブミン結合ドメインヒト抗体は、C末端アルギニンを除去してL y s - A r g K e x 2プロテアーゼ部位を除去するように操作されている。

【0141】

代表的なこのような半減期モジュレーターとしては、配列番号12~15、17~22のいずれか1つで示されているものが含まれる。

【0142】

一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、システイン残基をセリン残基またはアラニン残基に置換して、ジスルフィド結合を形成する能力を低減させるように修飾されていてよい。

【0143】

一部の実施形態では、標的化ドメインおよびアクチベータードメインは、半減期モジュレーターを介して繋がっていてよい。したがって、半減期モジュレーターは、N末端およびC末端という2つの末端を有し得る。一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、一方の末端でペプチド結合を介して標的化ポリペプチドドメインに繋がっており、他方の末端でペプチド結合を介してアクチベータードメインに繋がっている。ある特定の実施形態では、半減期モジュレーターは、N末端で標的化ポリペプチドドメインのC末端に繋がっており、C末端でアクチベータードメインのN末端に繋がっている。他の実施形態では、半減期モジュレーターは、C末端で標的化ポリペプチドドメインに繋がっており、N末端でアクチベータードメインに繋がっている。さらに、他の実施形態では、半減期モジュレーターは、二重特異的タンパク質の末端の一方で繋がっている。例えば、一部の実施形態では、半減期モジュレーターは、C末端でアクチベータードメインのN末端に繋がっている。他の実施形態では、半減期モジュレーターは、N末端で標的化ドメインのC末端に繋がっている。他の実施形態では、半減期モジュレーターは、N末端でアクチベータードメインのC末端に繋がっていてよい。さらに、他の実施形態では、半減期モジュレーターは、N末端で標的化ドメインのC末端に繋がっていてよい。

【0144】

ペプチドリンカー

一部の実施形態では、アクチベータードメイン、半減期モジュレーター、および標的化ドメインは、ペプチドリンカー(例えば、2~40、2~50、2~100アミノ酸残基)によって結合しており、その結果、標的の認識および標的化ドメインによる結合の際には、アクチベータードメインの提示が、所与の表面密度(例えば、 -5×10^2 分子/1000 \times 2)で標的を提示している細胞の表面上の細胞外受容体への結合および当該受容体の活性化のために最適化される。

10

20

30

40

50

【0145】

特異的標的を提示している細胞または組織上の受容体の活性化のためのアクチベータードメイン、例えばIGF-1の、標的化された送達には、アクチベータードメインおよび標的化ドメインの両方の適切な提示が必要である。一部の実施形態では、リンカーの可動性は、結合したキメラタンパク質の適正な幾何学に最適化される。幾何学的制約の主要な決定要因の一部は、細胞表面から標的および受容体までの距離である。

【0146】

さらなる最適化が、受容体および標的分子の相対数によって行われ得る。受容体：標的分子の比率が大きいと、両ドメインの結合が反応律速である。標的分子が受容体よりも豊富である場合、両ドメインの占有率が拡散律速である。反応律速下では、アクチベータードメインの最適な送達は、短く堅固なリンカーを介して達成される。拡散律速下では、長く可動性のリンカーによって、アクチベータードメインがより広い表面域にアクセスすることが可能となる。複雑な形状（すなわち、細胞体および神経突起）ならびに受容体の分布を有する細胞では、リンカーの可動性の適切な設計によって、細胞より小さい領域への正確な標的化が可能となり得る。

【0147】

一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、一方の末端または両端において、半減期モジュレーターのアミノ末端、C末端、またはN末端およびC末端の両方で提示されている。リンカーのN末端で使用するための適切な短鎖コネクタポリペプチドとしては、例えば、-Gly-Ser-(GS)、-Gly-Ala-(GA)、および-Ala-Ser-(AS)などのジペプチドが含まれる。リンカーのC末端で使用するための適切なペプチドリンカーとしては、例えば、-Leu-Gln-(LQ)および-Thr-Gly-(TG)などのジペプチドが含まれる。一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、2アミノ酸よりも長い。例えば、ペプチドリンカーは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20アミノ酸長であるか、またはそれより長い。一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、20以上、30以上、40以上、50以上、60以上、70以上、80以上、90以上、100以上のアミノ酸長である。好ましくは、このようなペプチドリンカーは、可動性である（例えばグリシンに富んでいる）かまたは構造化されている（例えばアルファヘリックスに富んでいる）。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly（配列番号23）を含むかまたはそれからなる。

【0148】

上記のものに加えたエレメントが本明細書において提供されるタンパク質に含まれてもよいことが明らかとなろう。このようなエレメントは、二重特異的融合タンパク質の発現、調製、もしくは精製の促進、または標的化機能の実行を含む様々な目的のために存在し得る。

【0149】

代表的なキメラタンパク質

一部の実施形態では、代表的な二重特異的融合タンパク質は、（N末端からC末端方向で）：

(a) 非内在化ヒトアネキシンV変異体を含むかまたはそれからなる（例えば、野生型ヒトアネキシン5のアミノ酸2~320およびC316、R63、K40、K101、E138、D139、N160での置換を含むかまたはそれからなる）標的化ポリペプチドドメイン、

(b) リンカーペプチド（例えば、-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly）、

(c) 半減期モジュレーター（例えば、野生型ヒトHSAのアミノ酸26~609を含むかまたはそれからなり、C58およびN527での置換を含む、HSA変異体）、

(d) リンカーペプチド（例えば、-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly）、

10

20

30

40

50

(e) I G F - 1 変異体 (例えば、 E 3 および Y 3 1 での置換を含む) を含むかまたはそれからなるアクチベータードメインを含む。

【 0 1 5 0 】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、 I G F 1 (E 3 R / Y 3 1 A) _ _ l k 7 _ _ H S A 2 6 - 6 0 9 (C 5 8 S / N 5 2 7 Q) _ _ l k 7 _ _ A n x V 2 - 3 2 0 (R 6 3 A / K 7 0 A / K 1 0 1 A / E 1 3 8 A / D 1 3 9 G / N 1 6 0 A / C 3 1 6 A) (本明細書において s c p 7 7 6 と呼ばれる) を含むかまたはそれからなる。一部の実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列を有する。

【 0 1 5 1 】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、 I G F 1 (E 3 R / Y 3 1 A) _ _ l k 7 _ _ H S A 2 6 - 6 0 9 (C 5 8 S / N 5 2 7 Q) _ _ l k 7 _ _ A n x V 2 - 3 2 0 (R 6 3 A / K 7 0 A / K 1 0 1 A / E 1 3 8 A / D 1 3 9 G / N 1 6 0 A / C 3 1 6 S) を含むかまたはそれからなる。一部の実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号 2 5 で示されるアミノ酸配列を有する。

【 0 1 5 2 】

核酸

本明細書において、 R N A の形態または D N A の形態であり得る、キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドが提供され、前記 D N A としては、 c D N A および合成 D N A が含まれる。 D N A は二本鎖または一本鎖であり得る。本開示の変異体をコードするコード配列は、遺伝子コードの冗長性または縮重の結果として変化し得る。

【 0 1 5 3 】

医薬組成物 - 処置の方法

中枢神経系 (C N S) 障害の処置の方法、および C N S 障害の処置において使用するための医薬組成物が提供される。一部の実施形態では、 C N S 障害は脳損傷である。脳卒中、外傷、脳震盪などの血流量の低減に例えば起因する脳の損傷、または神経変性障害は、神経学的障害、行動機能の喪失、または死亡をもたらし得る。脳卒中は、米国における主な死因の 1 つである。脳卒中は、「虚血性脳卒中」 (約 8 7 %) および「出血性脳卒中」 (約 1 0 %) にカテゴライズすることができる。虚血性脳卒中は、脳への血液供給が突然妨げられると生じ、これは一般に、脳に血液供給している血管の 1 つにおける血栓の停留または形成によって生じる。出血性脳卒中は、脳の周辺に位置する血管がバーストして、脳組織への血液の直接的な漏出および蓄積がもたらされると起こる。介入処置は、症候の開始の数時間以内に始められなくてはならず、さもないと、虚血によって永続性の神経学的障害または死亡が生じ得る。外傷性脳損傷 (T B I) はほとんどの場合、外力が脳を損傷させると生じる局所的虚血をもたらす。軽度および中等度の T B I は主に、様々な程度の脳打撲をもたらす、浮腫を伴う脳虚血を生じさせる。中等度および重度の T B I は、罹患した脳領域における虚血状態を伴い得る、血管の破壊、頭蓋内出血、脳組織の破壊などの多外傷性の損傷をもたらす。

【 0 1 5 4 】

神経学的障害および認知障害における急性 C N S 損傷。中等度から重度の T B I 患者の 6 5 % 超が、認知機能に関する長期の問題を報告している。このような障害は、患者の転帰に対して大きな長期の影響を有し得る。

【 0 1 5 5 】

一部の実施形態では、急性 C N S 損傷を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、急性 C N S 損傷は虚血性脳卒中である。一部の実施形態では、急性 C N S 損傷は外傷性脳損傷 (T B I) である。一部の実施形態では、急性 C N S 損傷は出血性脳卒中である。一部の実施形態では、急性 C N S 損傷は後天性脳損傷である。一部の実施形態では、急性 C N S 損傷は脊髄損傷である。一部の実施形態では、急性 C N S 損傷はくも膜下出血である。一部の実施形態では、急性 C N S 損傷は本質的に医原性である。一部の実施形態では、急性 C N S 損傷の神経保護のための方法が提供される。一部の実施形態では、本方法

10

20

30

40

50

は、以下の神経学的機能の改善、精神機能の改善、認知機能の改善、および生存率の上昇の少なくとも1つ以上または複数をもたらす。神経学的機能の程度は、Rankinスコア、修正Rankinスコア、パーセルインデックス、修正パーセルインデックス、NIH脳卒中スコア、および臨床的神経学的検査を用いて評価することができる。

【0156】

一部の実施形態では、慢性神経変性疾患（例えば、アルツハイマー、パーキンソン病、ALS）を処置および/または神経保護する方法が提供される。一部の実施形態では、アルツハイマー病を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、パーキンソン病を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、筋萎縮性側索硬化症を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、以下の神経学的機能の改善、精神機能の改善、および生存率の上昇のうち少なくとも1つまたは複数をもたらす。神経学的機能の程度は、パーキンソン病統一スケール（UPDRS）、Sandoz Clinical Assessment - Geriatric（SCAG）スケール、およびALS機能評価スコア、またはこれらのスコアの変形形態を用いて評価することができる。

10

【0157】

治療有効量の少なくとも1つの本明細書において記載されるキメラタンパク質を少なくとも1つの生理学的に許容される担体と共に含む医薬組成物が提供される。このような組成物は、組織損傷に罹患しているまたは組織損傷のリスクがある患者を処置して、組織の損傷を予防するため、または損傷した組織、例えば神経系組織を修復するもしくは再生させるために使用することができる。本明細書において記載されるキメラタンパク質および医薬組成物は、神経保護作用を有し得、ニューロンの死亡を予防するまたは止めることができる。このような患者としては、例えば、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、脳外傷、または神経変性障害を経験した患者が含まれる。必要に応じて、幹細胞、または損傷した組織の修復を促進する他の薬剤などの、他の活性成分もまた、医薬組成物に含まれてよい。

20

【0158】

「患者」または「対象」は、哺乳動物、好ましくはヒトである。用語「処置（treating）」（または「treat」もしくは「treatment」）は、症候、障害、状態、または疾患の進行または重症度を減速、低減、または逆転させることを意味する。

30

【0159】

用語「治療有効量」は、患者に単回または複数回投与されると所望の処置をもたらす、本明細書において記載されるキメラタンパク質の量または用量を指す。

【0160】

一部の実施形態では、本明細書において記載される組成物またはキメラタンパク質は、血液脳関門（BBB）を通過することによってまたは血液脳関門の透過化に起因して、虚血性損傷を有する中枢神経系（CNS）組織に局在化する。

【0161】

一部の実施形態では、本明細書において記載される組成物またはキメラタンパク質は、生存促進性シグナルを対象のニューロンおよびグリアに送達する。

40

【0162】

一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物またはキメラタンパク質は、それを必要とする対象の血液脳関門に対する修復プロセスを加速させる。一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物またはキメラタンパク質は、それを必要とする対象の血液脳関門を保護する。

【0163】

一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物またはキメラタンパク質は、急性CNS損傷の診断の後に投与することができる。一部の実施形態では、急性CNS損傷は、急性の脊髄損傷または急性の脳損傷である。一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物またはキメラタンパク質は、神経血管疾患または急性CNS

50

損傷の最初の発現で投与される。一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物またはキメラタンパク質は、CNSの主要な臓器に血液を供給する動脈の閉塞を確認する最初のイメージング評価の後に投与することができる。一部の実施形態では、急性CNS損傷は、臨床検査、神経学的検査、イメージング、急性CNS損傷の生化学的マーカー指標、または当技術分野において公知の任意の診断技術によって診断することができる。一部の実施形態では、急性CNS損傷は、磁気共鳴イメージング(MRI)、コンピュータ断層撮影(CT)スキャン、またはこれらの組合せを使用して診断することができる。MRIおよびCTイメージングは、骨折、脳出血、血腫、打撲傷、または脳組織の腫脹を示すことができる。脳組織の腫脹はまた、頭蓋骨を通して挿入される頭蓋内圧プローブを使用することによっても評価することができる。

10

【0164】

一部の実施形態では、本明細書において記載される組成物またはキメラタンパク質は、血栓塞栓症に罹患している、それを必要とする対象における介入的再灌流の時点で、対象に投与することができる。

【0165】

一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物またはキメラタンパク質は、診断の30分以内、診断の1時間以内、診断の2時間以内、診断の3時間以内、診断の4時間以内、診断の5時間以内、診断の6時間以内、診断の7時間以内、診断の8時間以内、診断の10時間以内、診断の12時間以内、診断の14時間以内、診断の16時間以内、診断の18時間以内、診断の20時間以内、診断の22時間以内、診断の24時間以内、診断の30時間以内、診断の36時間以内、診断の42時間以内、診断の48時間以内、または診断の72時間以内に投与することができる。

20

【0166】

一部の実施形態では、キメラタンパク質を含む医薬組成物の初回用量は、診断の30分以内、診断の1時間以内、診断の2時間以内、診断の3時間以内、診断の4時間以内、診断の5時間以内、診断の6時間以内、診断の7時間以内、診断の8時間以内、診断の10時間以内、診断の12時間以内、診断の14時間以内、診断の16時間以内、診断の18時間以内、診断の20時間以内、診断の22時間以内、診断の24時間以内、診断の30時間以内、診断の36時間以内、診断の42時間以内、診断の48時間以内、または診断の72時間以内に投与することができる。

30

【0167】

一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物またはキメラタンパク質は、生じた損傷への酸素送達を増大させる治療の後に、および神経保護特性を有する他の治療法と組み合わせて投与することができる。

【0168】

一部の実施形態では、医薬組成物またはキメラタンパク質は、組織または臓器の変性を予防または処置するために、それを必要とする対象に投与することができる。例えば、医薬組成物は、限定はしないが急性虚血性脳卒中、出血性脳卒中、一過性虚血性発作、医原性脳卒中、外傷性脳損傷(TBI)、脳震盪、後天性脳損傷、脊髄損傷、くも膜下出血、ルー・ゲーリック病としても知られている筋萎縮性側索硬化症(ALS)、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、ハンチントン病、糖尿病性神経障害、および脊髄性筋萎縮症などの、中枢神経系障害を処置するために使用することができる。一部の実施形態では、急性CNS損傷はくも膜下出血である。一部の実施形態では、急性CNS損傷は本質的に医原性である。

40

【0169】

医薬組成物はまた、限定はしないが網膜症、黄斑変性、緑内障、白内障、および急性網膜動脈虚血などの、眼の障害を処置するためにも使用することができる。

【0170】

一部の実施形態では、医薬組成物は、当技術分野において公知の既存の処置(すなわち、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子など)と

50

組み合わせて、またはこれらへのコメディケーション (c o - m e d i c a t i o n) と
して、投与することができる。

【 0 1 7 1 】

本明細書で使用される場合、用語「生理学的に許容される」は、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されていること、または米国薬局方もしくは他の一般に認識されている薬局方において動物での、さらに特にヒトでの使用について列挙されていることを意味する。用語「担体」は、それと共に二重特異的融合タンパク質が投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または媒体を指す。生理学的に許容される担体は、水、および石油由来、動物由来、植物由来、または合成由来の油を含む油（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、またはごま油）などの無菌の液体であり得る。水は、医薬組成物が静脈内投与される場合に好ましい担体である。生理食塩水ならびに水性デキストロス溶液およびグリセロール溶液もまた、液体担体として、特に注射可能溶液に利用することができる。適切な薬学的賦形剤としては、例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、およびエタノールが含まれる。医薬組成物は、必要に応じて、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、または pH 緩衝剤を含有していてもよい。

10

【 0 1 7 2 】

一部の実施形態では、医薬組成物は、静脈内 (I V) 注射用に製剤化された液体製剤である。一部の実施形態では、組成物は、I V ポーラス注射用に製剤化されている。

20

【 0 1 7 3 】

一部の実施形態では、医薬組成物の pH は、7 ~ 8、例えば約 7.5 である。一部の実施形態では、医薬組成物は、トロメタミンまたはリン酸水素二ナトリウムなどのアルカリ化剤を含む。一部の実施形態では、アルカリ化剤は、10 ~ 50 mM、例えば 20 mM の濃度であり得る。一部の実施形態では、医薬組成物は界面活性剤を含む。一部の実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート 80 またはポリソルベート 20 などの非イオン性界面活性剤であり、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、または 1% (w / v) の濃度で存在し得る。一部の実施形態では、医薬組成物はショ糖を含む。一部の実施形態では、ショ糖は、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10% (w / v) の濃度で存在し得る。

30

【 0 1 7 4 】

一部の実施形態では、キメラタンパク質を含む医薬組成物は、アルカリ化剤、界面活性剤、ショ糖、またはこれらの組合せを含む。

【 0 1 7 5 】

本開示の医薬組成物は、pH 調整剤および緩衝剤、張性調整剤、湿潤剤、洗剤、防腐剤、およびこれらに類するものなどの、生理学的状態に近づけるための薬学的に許容される補助物質を、必要に応じて含有し得る。

【 0 1 7 6 】

一部の実施形態では、医薬組成物は、pH 7.5 で、約 1 ~ 約 100 g / l のキメラタンパク質、約 10 mM から約 50 mM のトロメタミン、約 2 から約 15% (w / v) のショ糖、約 0.001% から約 0.04% (w / v) のポリソルベート 80 を含む。

40

【 0 1 7 7 】

一部の実施形態では、キメラタンパク質 (約 1 から約 100 g / l) は、pH 7.5 で (H C l の添加を介して)、20 mM のトロメタミン、7.5% のショ糖、および 0.02% のポリソルベート 80 中で製剤化される。

【 0 1 7 8 】

一部の実施形態では、液体組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌されるかまたは滅菌濾過される。一部の実施形態では、液体組成物はバイアル内にある。

50

【0179】

一部の実施形態では、医薬組成物は、それを必要とする対象に、ボラス注射を介して静脈内投与または動脈内投与される。ボラス注射は、例えば、例えば10秒未満（もしくは20秒未満、30秒未満、40秒未満、50秒未満、60秒未満）の高速の静脈内注射、またはおよそ3分未満、4分未満、5分未満、6分未満、7分未満、8分未満、9分未満、もしくは10分未満にわたる静脈内注入を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、それを必要とする対象に静脈内投与される。一部の実施形態では、組成物は、I.V.プッシュとして投与される。一部の実施形態では、投与は、5分以下、4分以下、3分以下、2分以下、1分以下（例えば、50秒、40秒、30秒、20秒、またはこれらの間に入るあらゆる投与時間）にわたる。他の実施形態では、組成物は、低速のI.V.注射として投与される。 10

【0180】

一部の実施形態では、医薬組成物は、0.5~25mL/分の速度でシリンジ注射ポンプを使用して対象に静脈内投与される。

【0181】

一部の実施形態では、医薬組成物は、0.05~10mL/分の速度でシリンジ注射ポンプを使用して対象に動脈内投与される。

【0182】

一部の実施形態では、医薬組成物は、当技術分野において公知の技術を使用して対象に髄腔内投与される。 20

【0183】

一部の実施形態では、治療有効量は一般に、用量当たり約0.01mg/kgから約100.0mg/kgの範囲である。一部の実施形態では、本明細書において開示されているタンパク質の治療有効量は、例えば、用量当たり約0.01mg/kgから約0.1mg/kg、用量当たり0.01mg/kgから約1mg/kg、用量当たり0.01mg/kgから約10mg/kg、用量当たり0.01mg/kgから約100.0mg/kg、用量当たり0.1mg/kgから約1mg/kg、用量当たり0.1mg/kgから約10mg/kg、用量当たり0.1mg/kgから約100mg/kg、用量当たり1mg/kgから約100mg/kg、または用量当たり10mg/kgから約100mg/kgであり得る。 30

【0184】

一部の実施形態では、治療有効量は一般に、用量当たり約0.01mg/kgから約20.0mg/kgの範囲である。一部の実施形態では、治療有効量は、用量当たり約0.01mg/kgから約10.0mg/kgの範囲であり得る。

【0185】

一部の実施形態では、本明細書において開示されているタンパク質の治療有効量は、用量当たり約0.01mg/kgから約0.02mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.03mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.04mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.05mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.06mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.07mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.08mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.09mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.1mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.2mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.3mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.4mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.5mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.6mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.7mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.8mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約0.9mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約1mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約2mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約3mg/kg、用量当たり約0.01mg/kgから約4 40 50

mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 5 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 6 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 7 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 8 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 9 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 10 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 11 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 12 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 13 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 14 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 15 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 16 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 17 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 18 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 19 mg / kg、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 20 mg / kg であり得る。

10

【0186】

一部の実施形態では、本明細書において開示されているタンパク質の治療有効量は、用量当たり約 0.01 mg / kg から約 0.05 mg / kg、用量当たり約 0.05 mg / kg から約 0.1 mg / kg、用量当たり約 0.1 mg / kg から約 0.5 mg / kg、用量当たり約 0.05 mg / kg から約 1 mg / kg、用量当たり約 1 mg / kg から約 2 mg / kg、用量当たり約 2 mg / kg から約 3 mg / kg、用量当たり約 3 mg / kg から約 4 mg / kg、用量当たり約 4 mg / kg から約 5 mg / kg、用量当たり約 5 mg / kg から約 6 mg / kg、用量当たり約 6 mg / kg から約 7 mg / kg、用量当たり約 7 mg / kg から約 8 mg / kg、用量当たり約 8 mg / kg から約 9 mg / kg、用量当たり約 9 mg / kg から約 10 mg / kg、用量当たり約 10 mg / kg から約 11 mg / kg、用量当たり約 11 mg / kg から約 12 mg / kg、用量当たり約 12 mg / kg から約 13 mg / kg、用量当たり約 13 mg / kg から約 14 mg / kg、用量当たり約 14 mg / kg から約 15 mg / kg、用量当たり約 15 mg / kg から約 16 mg / kg、用量当たり約 16 mg / kg から約 17 mg / kg、用量当たり約 17 mg / kg から約 18 mg / kg、用量当たり約 18 mg / kg から約 19 mg / kg、用量当たり約 19 mg / kg から約 20 mg / kg であり得る。

20

【0187】

一部の実施形態では、本明細書において開示されているタンパク質の治療有効量は、用量当たり約 0.01 mg / kg、用量当たり約 0.02 mg / kg、用量当たり約 0.03 mg / kg、用量当たり約 0.04 mg / kg、用量当たり約 0.05 mg / kg、用量当たり約 0.06 mg / kg、用量当たり約 0.07 mg / kg、用量当たり約 0.08 mg / kg、用量当たり約 0.09 mg / kg、用量当たり約 0.1 mg / kg、用量当たり約 0.2 mg / kg、用量当たり約 0.3 mg / kg、用量当たり約 0.4 mg / kg、用量当たり約 0.5 mg / kg、用量当たり約 0.6 mg / kg、用量当たり約 0.7 mg / kg、用量当たり約 0.8 mg / kg、用量当たり約 0.9 mg / kg、用量当たり約 1 mg / kg、用量当たり約 1.1 mg / kg、用量当たり約 1.2 mg / kg、用量当たり約 1.3 mg / kg、用量当たり約 1.4 mg / kg、用量当たり約 1.5 mg / kg、用量当たり約 1.6 mg / kg、用量当たり約 1.7 mg / kg、用量当たり約 1.8 mg / kg、用量当たり約 1.9 mg / kg、用量当たり約 2 mg / kg、用量当たり約 2.1 mg / kg、用量当たり約 2.2 mg / kg、用量当たり約 2.3 mg / kg、用量当たり約 2.4 mg / kg、用量当たり約 2.5 mg / kg、用量当たり約 2.6 mg / kg、用量当たり約 2.7 mg / kg、用量当たり約 2.8 mg / kg、用量当たり約 2.9 mg / kg、用量当たり約 3 mg / kg、用量当たり約 3.1 mg / kg、用量当たり約 3.2 mg / kg、用量当たり約 3.3 mg / kg、用量当たり約 3.4 mg / kg、用量当たり約 3.5 mg / kg、用量当たり約 3.6 mg / kg、用量当たり約 3.7 mg / kg、用量当たり約 3.8 mg / kg、用量当たり約 3.9 mg / kg、用量当たり約 4 mg / kg、用量当たり約 4.1 mg / kg、用量当たり約 4.2 mg / kg、用量当たり約 4.3 mg / kg、用量当たり約 4.4 mg / kg、用量当たり約 4.5 mg / kg、用量当たり約 4.6 mg / kg、用量当たり約 4.7 mg / kg、

30

40

50

用量当たり約 4.8 mg / kg、用量当たり約 4.9 mg / kg、用量当たり約 5 mg / kg、用量当たり約 5.1 mg / kg、用量当たり約 5.2 mg / kg、用量当たり約 5.3 mg / kg、用量当たり約 5.4 mg / kg、用量当たり約 5.5 mg / kg、用量当たり約 5.6 mg / kg、用量当たり約 5.7 mg / kg、用量当たり約 5.8 mg / kg、用量当たり約 5.9 mg / kg、用量当たり約 6 mg / kg、用量当たり約 6.1 mg / kg、用量当たり約 6.2 mg / kg、用量当たり約 6.3 mg / kg、用量当たり約 6.4 mg / kg、用量当たり約 6.5 mg / kg、用量当たり約 6.6 mg / kg、用量当たり約 6.7 mg / kg、用量当たり約 6.8 mg / kg、用量当たり約 6.9 mg / kg、用量当たり約 7 mg / kg、用量当たり約 7.1 mg / kg、用量当たり約 7.2 mg / kg、用量当たり約 7.3 mg / kg、用量当たり約 7.4 mg / kg、用量当たり約 7.5 mg / kg、用量当たり約 7.6 mg / kg、用量当たり約 7.7 mg / kg、用量当たり約 7.8 mg / kg、用量当たり約 7.9 mg / kg、用量当たり約 8 mg / kg、用量当たり約 8.1 mg / kg、用量当たり約 8.2 mg / kg、用量当たり約 8.3 mg / kg、用量当たり約 8.4 mg / kg、用量当たり約 8.5 mg / kg、用量当たり約 8.6 mg / kg、用量当たり約 8.7 mg / kg、用量当たり約 8.8 mg / kg、用量当たり約 8.9 mg / kg、用量当たり約 9 mg / kg、用量当たり約 9.1 mg / kg、用量当たり約 9.2 mg / kg、用量当たり約 9.3 mg / kg、用量当たり約 9.4 mg / kg、用量当たり約 9.5 mg / kg、用量当たり約 9.6 mg / kg、用量当たり約 9.7 mg / kg、用量当たり約 9.8 mg / kg、用量当たり約 9.9 mg / kg、用量当たり約 10 mg / kg、用量当たり約 11 mg / kg、用量当たり約 12 mg / kg、用量当たり約 13 mg / kg、用量当たり約 14 mg / kg、用量当たり約 15 mg / kg、用量当たり約 16 mg / kg、用量当たり約 17 mg / kg、用量当たり約 18 mg / kg、用量当たり約 19 mg / kg、用量当たり約 20 mg / kg であり得る。

【0188】

一部の実施形態では、治療有効量は一般に、用量当たり約 1 mg / kg から約 10.0 mg / kg の範囲である。一部の実施形態では、本明細書において開示されているタンパク質の有効量は、例えば、用量当たり約 1 mg / kg から約 10 mg / kg、用量当たり 1 mg / kg から約 9 mg / kg、用量当たり 1 mg / kg から約 8 mg / kg、用量当たり 1 mg / kg から約 7 mg / kg、用量当たり 1 mg / kg から約 6 mg / kg、用量当たり 1 mg / kg から約 5 mg / kg、用量当たり 1 mg / kg から約 4 mg / kg、用量当たり 1 mg / kg から約 3 mg / kg、または用量当たり 1 mg / kg から約 2 mg / kg であり得る。

【0189】

投薬は、単回投薬量または累積投薬量（連続投与）であり得、当業者によって容易に決定され得る。例えば、神経系障害の処置は、本明細書において開示されている医薬組成物の有効用量の 1 回限りの投与を含み得る。非限定的な例として、本明細書において開示されている組成物の有効用量は、患者に 1 回、例えば単回の注射またはボラスとして投与され得る。あるいは、神経系障害の処置は、例えば 1 日に 4 回、1 日に 3 回、1 日に 2 回、1 日に 1 回、数日に 1 回、週に 1 回、月に 1 回、または年に 1 回などの様々な期間にわたって行われる、本明細書において開示されている医薬組成物の有効用量の複数回投与を含み得る。非限定的な例として、本明細書において開示されている組合せは、週に 1 回または 2 回、患者に投与され得る。投与のタイミングは、患者の症候の重症度などの因子に応じ得る。例えば、本明細書において開示されている組成物の有効用量は、1 ヶ月間から不定の期間で 1 回、または哺乳動物がもはや治療を必要としなくなるまで、患者に投与され得る。

【0190】

一部の実施形態では、治療有効量は一般に、1 日当たり約 0.01 mg / kg から約 200.0 mg / kg の範囲である。一部の実施形態では、本明細書において開示されているタンパク質の有効量は、例えば、1 日当たり約 0.01 mg / kg から約 0.1 mg /

kg、1日当たり0.01mg/kgから約1mg/kg、1日当たり0.01mg/kgから約10mg/kg、1日当たり0.01mg/kgから約100.0mg/kg、1日当たり0.01mg/kgから約200.0mg/kg、1日当たり0.1mg/kgから約1mg/kg、1日当たり0.1mg/kgから約10mg/kg、1日当たり0.1mg/kgから約100mg/kg、1日当たり0.1mg/kgから約200mg/kg、1日当たり1mg/kgから約100mg/kg、1日当たり1mg/kgから約200mg/kg、1日当たり10mg/kgから約100mg/kgまたは1日当たり10mg/kgから約100mg/kgであり得る。

【0191】

一部の実施形態では、治療有効量は一般に、1日当たり約0.01mg/kgから約20.0mg/kgの範囲である。一部の実施形態では、治療有効量は一般に、1日当たり約0.01mg/kgから約10.0mg/kgの範囲である。一部の実施形態では、治療有効量は一般に、1日当たり約1mg/kgから約20.0mg/kgの範囲である。一部の実施形態では、治療有効量は一般に、1日当たり約1mg/kgから約10.0mg/kgの範囲である。一部の実施形態では、本明細書において開示されているタンパク質の有効量は、例えば、1日当たり約1mg/kgから約10mg/kg、1日当たり1mg/kgから約9mg/kg、1日当たり1mg/kgから約8mg/kg、1日当たり1mg/kgから約7mg/kg、1日当たり1mg/kgから約6mg/kg、1日当たり1mg/kgから約5mg/kg、1日当たり1mg/kgから約4mg/kg、1日当たり1mg/kgから約3mg/kg、または1日当たり1mg/kgから約2mg/kgであり得る。

【0192】

一部の実施形態では、本明細書において開示されているキメラタンパク質の治療有効量は、1日当たり約0.01mg/kgから約0.02mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.03mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.04mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.05mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.06mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.07mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.08mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.09mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.1mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.2mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.3mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.4mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.5mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.6mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.7mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.8mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約0.9mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約1mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約2mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約3mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約4mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約5mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約6mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約7mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約8mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約9mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約10mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約11mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約12mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約13mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約14mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約15mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約16mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約17mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約18mg/kg、1日当たり約0.01mg/kgから約19mg/kg、または1日当たり約0.01mg/kgから約20mg/kgであり得る。

【0193】

一部の実施形態では、本明細書において開示されているキメラタンパク質の治療有効量

は、1日当たり約0.01mg/kgから約0.05mg/kg、1日当たり約0.05mg/kgから約0.1mg/kg、1日当たり約0.1mg/kgから約0.5mg/kg、1日当たり約0.05mg/kgから約1mg/kg、1日当たり約1mg/kgから約2mg/kg、1日当たり約2mg/kgから約3mg/kg、1日当たり約3mg/kgから約4mg/kg、1日当たり約4mg/kgから約5mg/kg、1日当たり約5mg/kgから約6mg/kg、1日当たり約6mg/kgから約7mg/kg、1日当たり約7mg/kgから約8mg/kg、1日当たり約8mg/kgから約9mg/kg、1日当たり約9mg/kgから約10mg/kg、1日当たり約10mg/kgから約11mg/kg、1日当たり約11mg/kgから約12mg/kg、1日当たり約12mg/kgから約13mg/kg、1日当たり約13mg/kgから約14mg/kg、1日当たり約14mg/kgから約15mg/kg、1日当たり約15mg/kgから約16mg/kg、1日当たり約16mg/kgから約17mg/kg、1日当たり約17mg/kgから約18mg/kg、1日当たり約18mg/kgから約19mg/kg、または1日当たり約19mg/kgから約20mg/kgであり得る。

10

【0194】

一部の実施形態では、本明細書において開示されているキメラタンパク質の治療有効量は、1日当たり約0.01mg/kg、1日当たり約0.02mg/kg、1日当たり約0.03mg/kg、1日当たり約0.04mg/kg、1日当たり約0.05mg/kg、1日当たり約0.06mg/kg、1日当たり約0.07mg/kg、1日当たり約0.08mg/kg、1日当たり約0.09mg/kg、1日当たり約0.1mg/kg、1日当たり約0.2mg/kg、1日当たり約0.3mg/kg、1日当たり約0.4mg/kg、1日当たり約0.5mg/kg、1日当たり約0.6mg/kg、1日当たり約0.7mg/kg、1日当たり約0.8mg/kg、1日当たり約0.9mg/kg、1日当たり約1mg/kg、1日当たり約1.1mg/kg、1日当たり約1.2mg/kg、1日当たり約1.3mg/kg、1日当たり約1.4mg/kg、1日当たり約1.5mg/kg、1日当たり約1.6mg/kg、1日当たり約1.7mg/kg、1日当たり約1.8mg/kg、1日当たり約1.9mg/kg、1日当たり約2mg/kg、1日当たり約2.1mg/kg、1日当たり約2.2mg/kg、1日当たり約2.3mg/kg、1日当たり約2.4mg/kg、1日当たり約2.5mg/kg、1日当たり約2.6mg/kg、1日当たり約2.7mg/kg、1日当たり約2.8mg/kg、1日当たり約2.9mg/kg、1日当たり約3mg/kg、1日当たり約3.1mg/kg、1日当たり約3.2mg/kg、1日当たり約3.3mg/kg、1日当たり約3.4mg/kg、1日当たり約3.5mg/kg、1日当たり約3.6mg/kg、1日当たり約3.7mg/kg、1日当たり約3.8mg/kg、1日当たり約3.9mg/kg、1日当たり約4mg/kg、1日当たり約4.1mg/kg、1日当たり約4.2mg/kg、1日当たり約4.3mg/kg、1日当たり約4.4mg/kg、1日当たり約4.5mg/kg、1日当たり約4.6mg/kg、1日当たり約4.7mg/kg、1日当たり約4.8mg/kg、1日当たり約4.9mg/kg、1日当たり約5mg/kg、1日当たり約5.1mg/kg、1日当たり約5.2mg/kg、1日当たり約5.3mg/kg、1日当たり約5.4mg/kg、1日当たり約5.5mg/kg、1日当たり約5.6mg/kg、1日当たり約5.7mg/kg、1日当たり約5.8mg/kg、1日当たり約5.9mg/kg、1日当たり約6mg/kg、1日当たり約6.1mg/kg、1日当たり約6.2mg/kg、1日当たり約6.3mg/kg、1日当たり約6.4mg/kg、1日当たり約6.5mg/kg、1日当たり約6.6mg/kg、1日当たり約6.7mg/kg、1日当たり約6.8mg/kg、1日当たり約6.9mg/kg、1日当たり約7mg/kg、1日当たり約7.1mg/kg、1日当たり約7.2mg/kg、1日当たり約7.3mg/kg、1日当たり約7.4mg/kg、1日当たり約7.5mg/kg、1日当たり約7.6mg/kg、1日当たり約7.7mg/kg、1日当たり約7.8mg/kg、1日当たり約7.9mg/kg、1日当たり約8mg/kg、1日当たり約8.1mg/kg、1日当たり約8.2mg/kg、

20

30

40

50

1日当たり約8.3mg/kg、1日当たり約8.4mg/kg、1日当たり約8.5mg/kg、1日当たり約8.6mg/kg、1日当たり約8.7mg/kg、1日当たり約8.8mg/kg、1日当たり約8.9mg/kg、1日当たり約9mg/kg、1日当たり約9.1mg/kg、1日当たり約9.2mg/kg、1日当たり約9.3mg/kg、1日当たり約9.4mg/kg、1日当たり約9.5mg/kg、1日当たり約9.6mg/kg、1日当たり約9.7mg/kg、1日当たり約9.8mg/kg、1日当たり約9.9mg/kg、1日当たり約10mg/kg、1日当たり約11mg/kg、1日当たり約12mg/kg、1日当たり約13mg/kg、1日当たり約14mg/kg、1日当たり約15mg/kg、1日当たり約16mg/kg、1日当たり約17mg/kg、1日当たり約18mg/kg、1日当たり約19mg/kg、または1日当たり約20mg/kgであり得る。 10

【0195】

一部の実施形態では、有効用量は、それを必要とする対象に2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、またはそれを超える期間にわたり投与される。一部の実施形態では、有効用量は、急性CNS損傷を有する対象に、最短で2日間から14日間までの期間、例えば、4、5、6、7日間の期間にわたり投与される。

【0196】

一部の実施形態では、有効用量は、自律神経疾患を有する対象に、最短で2日間から少なくとも1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間、7ヶ月間、8ヶ月間、9ヶ月間、10ヶ月間、11ヶ月間、1年間、2年間、3年間、4年間、5年間、6年間、7年間、8年間、9年間、10年間、11年間、12年間、13年間、14年間、15年間、16年間、17年間、18年間、19年間、または20年間までの期間にわたり投与される。 20

【0197】

一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に1日に1回（または24時間ごと）に投与される。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、またはそれを超える期間にわたり1日に1回投与される。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に、最長2日間、最長3日間、最長4日間、最長5日間、最長6日間、最長7日間、最長8日間、最長9日間、最長10日間、最長11日間、最長12日間、最長13日間、最長14日間の期間にわたり1日に1回投与される。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に、7日間の期間にわたり1日に1回投与される。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に、1日に2回、3回、またはそれを超える回数投与される。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、またはそれを超える期間にわたり、1日に2回、3回、またはそれを超える回数投与される。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に、最長2日間、最長3日間、最長4日間、最長5日間、最長6日間、最長7日間、最長8日間、最長9日間、最長10日間、最長11日間、最長12日間、最長13日間、最長14日間の期間にわたり、1日に2回、3回、またはそれを超える回数投与される。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に、7日間の期間にわたり、1日に2回、3回、またはそれを超える回数投与される。 30 40

【0198】

一部の実施形態では、約5~100mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量が、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与される。一部の実施形態では、約5~100mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量が、7日間の期間にわたり投与される。一部の実施形態では、約5~90mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量が、4日間、5日 50

、6日間、または7日間の期間にわたり投与される。一部の実施形態では、約140mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量が、7日間の期間にわたり投与される。

【0200】

一部の実施形態では、処置レジメンは、減量投薬量レジメンを含む。減量投薬量レジメンでは、対象において投与される本開示のキメラタンパク質の投与量は、処置期間の経過と共に低減する。一部の実施形態では、2日目に投与される用量は、2日目に投与される用量よりも少ない。他の実施形態では、2日目に投与される用量は2日目に投与される用量と等しく、3日目に投与される用量は2日目に投与される用量よりも少ない。一部の実施形態では、処置レジメンは、約2mg/kgから約200mg/kg、約2mg/kgから約20mg/kg、約2mg/kgから約10mg/kg、約100mg/kgから約200mg/kg、約100mg/kgから約150mg/kgの総用量を所定の期間（例えば、4、5、6、または7日間）にわたり提供する。一部の実施形態では、処置レジメンは、約5mg/kg、約10mg/kg、または約20mg/kgの総用量を所定の期間（例えば、4、5、6、または7日間）にわたり提供する。

10

【0201】

一部の実施形態では、初回1日用量が初日に投与され、初回用量中に存在するキメラタンパク質の量の約85%から約95%を含む第2の1日用量が2日目に投与され、第2の用量中に存在するキメラタンパク質の量の約65%から約85%で第2の用量よりも少ない量を含む第3の1日用量が3日目に投与され、初回用量中に存在するキメラタンパク質の量の約45%から約65%で第3の用量よりも少ない量を含む第4の用量が4日目に投与され、初回用量中に存在するキメラタンパク質の量の約35%から約45%で第4の用量よりも少ない量を含む第5の用量が5日目に投与され、初回用量中に存在するキメラタンパク質の量の約25%から約35%で第5の用量よりも少ない量を含む第6の用量が6日目に投与され、そして初回用量中に存在するキメラタンパク質の量の約15%から約25%で第6の用量よりも少ない量を含む第7の用量が7日目に投与される。一部の実施形態では、減量処置レジメンは、初回1日用量を1日目に、初回1日用量の約90%に対応する第2の1日用量を2日目に、初回1日用量の約70%に対応する第3の1日用量を3日目に、初回1日用量の約50%に対応する第4の1日用量を4日目に、初回1日用量の約40%に対応する第5の1日用量を5日目に、初回1日用量の約30%に対応する第6の1日用量を6日目に、そして初回1日用量の約20%に対応する第7の1日用量を7日目に投与することを含む。

20

30

【0202】

一部の実施形態では、初回1日用量が1日目に投与され、初回用量中に存在するキメラタンパク質の量の約85%から約95%（例えば約90%）を含む第2の1日用量が2日目に投与され、第2の用量中に存在するキメラタンパク質の量の約65%から約85%（例えば約70%）で第2の用量よりも少ない量を含む第3の1日用量が3日目に投与され、初回用量中に存在するキメラタンパク質の量の約45%から約65%（例えば約50%）で第3の用量よりも少ない量を含む第4の用量が4日目に投与される。

【0203】

一部の実施形態では、初回1日用量が1日目に投与され、2日目に投与される第2の1日用量は同一であり、初回用量中に存在するキメラタンパク質の量の約65%から約90%（例えば約75%）を含む第3の1日用量が3日目に投与され、第2の用量中に存在するキメラタンパク質の量の約45%から約65%（例えば約50%）で第2の用量よりも少ない量を含む第4の1日用量が4日目に投与される。

40

【0204】

一部の実施形態では、処置レジメンまたは減量処置レジメンは、約2mg/kgから約20mg/kgの総用量を7日間の期間にわたり提供する。一部の実施形態では、処置レジメンは、約2mg/kgから約20mg/kgの総用量を4日間の期間にわたり提供する。一部の実施形態では、処置レジメンまたは減量処置レジメンは、約2mg/kgから

50

約 10 mg / kg の総用量を 7 日間の期間にわたり提供する。一部の実施形態では、処置レジメンまたは減量処置レジメンは、約 2 mg / kg から約 10 mg / kg の総用量を 4 日間の期間にわたり提供する。一部の実施形態では、処置レジメンまたは減量処置レジメンは、約 5 mg / kg、約 10 mg / kg、または約 20 mg / kg の総用量を 7 日間の期間にわたり提供する。一部の実施形態では、処置レジメンまたは減量処置レジメンは、約 5 mg / kg、約 10 mg / kg、または約 20 mg / kg の総用量を 4 日間の期間にわたり提供する。

【 0 2 0 5 】

一部の実施形態では、処置レジメンは、s c p 7 7 6 などのキメラタンパク質の 5 日間コースの静脈内投与を含む。一部の実施形態では、処置レジメンは、s c p 7 7 6 などのキメラタンパク質の 7 日間コースの静脈内投与を含む。一部の実施形態では、処置レジメンは、s c p 7 7 6 などのキメラタンパク質の 4 日間コースの静脈内投与を含む。一部の実施形態では、処置レジメンは、s c p 7 7 6 などのキメラタンパク質の 3 日間コースの静脈内投与を含む。一部の実施形態では、処置レジメンは、s c p 7 7 6 などのキメラタンパク質の 2 日間コースの静脈内投与を含む。一部の実施形態では、処置レジメンは、初日の、約 2 mg / kg から約 6 mg / kg の初回用量と、それ以降の各日での、約 1 mg / kg から約 2 mg / kg の 1 用量とを静脈内投与することを含む。一部の実施形態では、初回および第 2 の用量は同一であり（例えば 2 mg / kg）、第 3 の用量は初回用量よりも少ない。例えば、4 日間の処置コースで、初回用量は 2 mg / kg であり得、第 2 の用量は 2 mg / kg であり得、第 3 の用量は 1 . 5 mg / kg であり得、そして第 4 の用量は 1 mg / kg であり得る。一部の実施形態では、第 2 の用量は初回用量よりも少なく、第 3 の用量は第 2 の用量よりも少ない、などである。例えば、4 日間の処置コースで、初回用量は 2 mg / kg であり得、第 2 の用量は 1 . 8 mg / kg であり得、第 3 の用量は 1 . 4 mg / kg であり得、そして第 4 の用量は 1 mg / kg であり得る。一部の実施形態では、第 2 の用量は初回用量よりも少なく、第 3 の用量は第 2 の用量と同一である、などである。例えば、コースは、もし当該コースが 5 日間のコースであれば、初日の約 5 . 2 mg / kg の初回用量、ならびに 2 日目、3 日目、4 日目、および 5 日目の約 1 . 3 mg / kg の 1 用量を含み得る。

【 0 2 0 6 】

一部の実施形態では、処置のコースは、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、10 日間、11 日間、12 日間、13 日間、14 日間、またはそれを超える日数にわたる有効量の投与を含む。一部の実施形態では、処置のコースは、7 日間にわたる有効量の投与を含む。一部の実施形態では、処置のコースは、4 日間にわたる有効量の投与を含む。一部の実施形態では、処置のコースは、連続する日数にわたる有効量の投与を含む。一部の実施形態では、処置のコースは、毎日、2 日間に 1 回、3 日間に 1 回、または 4 日間に 1 回の有効量の投与を含む。

【 0 2 0 7 】

一部の実施形態では、本明細書において記載されるキメラタンパク質または医薬組成物で処置される、それを必要とする対象は、正常血糖を維持するためにデキストロース溶液を連続注入される。一部の実施形態では、デキストロース溶液は、約 5 % (w / v) のデキストロースから約 50 % (w / v) のデキストロースを含む。一部の実施形態では、デキストロース溶液は、滅菌水または通常生理食塩水中にある。例えば、それを必要とする対象は、正常血糖を維持するために、すなわち通常生理食塩水中の 5 % デキストロースまたは滅菌水中の 10 % デキストロースを投与され得る。一部の実施形態では、それを必要とする対象は、ポラス注射を介してまたは髄腔内に、本明細書において記載されるキメラタンパク質または医薬組成物を投与され、連続注入によってデキストロース溶液を投与される。一部の実施形態では、対象は、デキストロース溶液を 48 時間注入される。一部の実施形態では、対象は、デキストロース溶液をキメラタンパク質での処置の終わりまで注入される。一部の実施形態では、対象は、デキストロース溶液をキメラタンパク質での処置の終わりの最大 24 時間後まで注入される。例えば、対象は、本明細書において記載

される医薬組成物で4日間にわたり処置され得、対象は、デキストロース溶液を最大4日間または5日間注入され得る。

【0208】

一部の実施形態では、ヒト用量レジメンは、非ヒト霊長類用量レジメンとヒト用量レジメンとの相対成長スケーリングに基づいて計算することができる。

【0209】

有効な投薬レジメンに対するヒト等価用量 (HED) の推定は、相対成長スケーリングを介して得ることができる (USDHHS, FDA, CDER, Guidance for Industry, 2005)。相対成長スケーリングは、体表面積に基づく補正因子を所与の種における目的の用量に適用することによって、種間の代謝率が異なるという課題を処理する。相対成長スケーリングは、ファースト・イン・ヒューマン研究のための安全な開始用量の推定において最も頻繁に使用されているが、動物からヒトへの有効用量の変換でも一般に適用されている。3 kg のアカゲザルからヒトへの投与量変換のための、FDA が推奨する補正因子は、3.1 である (USDHHS, FDA, CDER, Guidance for Industry, 2005)。一部の実施形態では、有効な用量レジメンの推定される HED は、 $16 \text{ mg} / \text{kg} \div 3.1 = 5.2 \text{ mg} / \text{kg}$ の初回用量と、その後の、 $4 \text{ mg} / \text{kg} \div 3.1 = 1.3 \text{ mg} / \text{kg}$ の 24 時間間隔でのさらなる用量を含む。

10

【0210】

一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物は、損傷した組織もしくは細胞の処置に役立つおよび/または組織再生プロセスを促進する1つまたは複数のさらなる生物活性剤または治療剤または成分をさらに含み得る。一部の実施形態では、さらなる治療剤は血栓溶解剤である。一部の実施形態では、血栓溶解剤は、組換え組織プラスミノーゲン活性化因子 (rt-PA) である。一部の実施形態では、さらなる治療剤は、神経保護薬を含む。一部の実施形態では、さらなる治療剤は、グルココルチコイド、FK506、シクロスポリン、シロリムス、ネリネチド、酸素運搬治療薬 (パーフルオロカーボン)、またはこれらに類するものを含むかまたはそれからなる。

20

【0211】

一部の実施形態では、本方法は、2つ以上 (例えば、2つ、3つ、またはそれを超える) 医薬組成物を投与することを含む。異なる医薬組成物が、任意の順序でおよび任意の適切な間隔で対象に投与され得る。例えば、一部の実施形態では、1つまたは複数の一部の実施形態の組成物が、同時にまたはほぼ同時に投与される。一部の実施形態では、本方法は、2つ以上の一部の実施形態の組成物の交互の投与を含み、この場合、第1の一部分の実施形態の組成物が投与され、第2の一部分の実施形態の組成物はある程度後の時点で投与される。所望の治療効果をもたらす任意の適切な投与間隔が使用され得る。

30

【0212】

ある特定の実施形態では、本方法はさらなる効果を有し、この場合、治療剤または手順の組合せの投与の全体的な効果は、各治療剤または手順を単独で投与した場合の効果の合計にほぼ等しい。他の実施形態では、本方法は相乗効果を有し、この場合、治療剤または手順の組合せの投与の全体的な効果は、各治療剤または手順を単独で投与した場合の効果の合計よりも大きい。

40

【0213】

一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物およびキメラタンパク質は、急性 CNS 損傷を有する対象に投与されると、大脳皮質の細胞に対する酸化損傷の緩和、血液脳関門の修復または修復の加速、浮腫の低減、梗塞部容積の低減、血液脳関門透過性の低減、損傷を受けた脳組織への生存促進性シグナルの標的化された送達、脳卒中後の筋骨格系の協調の増大、脳卒中後の意識の改善、脳卒中後の神経学的機能の改善、および脳卒中後の運動機能の増大のうちの少なくとも1つまたは複数をもたらす。

【0214】

一部の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物およびキメラタンパク質は、神経変性疾患を有する対象に投与されると、運動機能の改善および疾患の症候の減少

50

、例えば、PDを有する対象における震えの減少、ALSを有する対象における自律神経機能障害の減少、またはADを有する対象における記憶の喪失およびせん妄などのAD症候の減少をもたらす。

【0215】

一部の実施形態では、治療有効量の、キメラタンパク質を含む医薬組成物は、神経系障害に関連する少なくとも1つの症候を、例えば少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%低減させる。一部の実施形態では、治療有効量のキメラタンパク質は、神経系障害に関連する少なくとも1つの症候を、例えば少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%低減させる。一部の実施形態では、治療有効量の本明細書において開示されているキメラタンパク質は、神経系障害に関連する少なくとも1つの症候を、例えば約10%から約100%、約10%から約90%、約10%から約80%、約10%から約70%、約10%から約60%、約10%から約50%、約10%から約40%、約20%から約100%、約20%から約90%、約20%から約80%、約20%から約20%、約20%から約60%、約20%から約50%、約20%から約40%、約30%から約100%、約30%から約90%、約30%から約80%、約30%から約70%、約30%から約60%、または約30%から約50%低減させる。一部の実施形態では、治療有効量のキメラタンパク質は、神経系障害に関連する少なくとも1つの症候を、例えば少なくとも1週間、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも7ヶ月、少なくとも8ヶ月間、少なくとも9ヶ月間、少なくとも10ヶ月間、少なくとも11ヶ月間、または少なくとも12ヶ月間にわたり低減させる。

10

20

【0216】

一部の実施形態では、治療有効量の、キメラタンパク質を含む医薬組成物は、少なくとも1つの神経学的機能または認知機能の例えば少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも99%、または約100%の改善をもたらす。一部の実施形態では、治療有効量のキメラタンパク質は、少なくとも1つの神経学的機能または認知機能の例えば少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%の改善をもたらす。一部の実施形態では、治療有効量の本明細書において開示されているキメラタンパク質は、少なくとも1つの神経学的機能または認知機能の例えば約10%から約100%、約10%から約90%、約10%から約80%、約10%から約70%、約10%から約60%、約10%から約50%、約10%から約40%、約20%から約100%、約20%から約90%、約20%から約80%、約20%から約20%、約20%から約60%、約20%から約50%、約20%から約40%、約30%から約100%、約30%から約90%、約30%から約80%、約30%から約70%、約30%から約60%、または約30%から約50%の改善をもたらす。一部の実施形態では、治療有効量のキメラタンパク質は、少なくとも1つの神経学的機能または認知機能の例えば少なくとも1週間、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも7ヶ月、少なくとも8ヶ月間、少なくとも9ヶ月間、少なくとも10ヶ月間、少なくとも11ヶ月間、または少なくとも12ヶ月間にわたる改善をもたらす。

30

40

【0217】

一部の実施形態では、急性CNS損傷を有する対象への有効量の投与は、筋骨格系の協調、意識、運動系などの神経学的欠損スコアリング(Neurologic Defic

50

it Scoring (NDS) の低下によって評価される神経学的機能の著しい改善、または、当技術分野において公知のあらゆる他の神経学的機能スケール（例えば、NIH 脳卒中スケール、修正 Rankin スケール、修正バーセルインデックス、もしくはグラスゴー・コーマ・スケール、MDS 統一型パーキンソン病評価スケール (MDS - Unified Parkinson's Disease Rating Scale)、もしくは Hunt - Hess 分類) によって評価される改善をもたらす。

【0218】

一部の実施形態では、急性 CNS 損傷を有する対象への有効量の投与は、病変容量、灌流障害、血液脳関門透過性、または損傷の重症度の当技術分野において公知のあらゆる他のイメージング評価（例えば Fisher スケール）の著しい低減をもたらす。一部の実施形態では、低減は、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または少なくとも 99%、または約 100% である。

【0219】

一部の実施形態では、急性 CNS 損傷を有する対象への有効量の投与は、例えば限定はしないが NIH 脳卒中スコア、修正 Rankin スコア、および / または修正バーセルインデックスによって評価される認知機能の著しい改善をもたらす。

【0220】

一部の実施形態では、神経変性疾患を有する対象への有効量の投与は、例えば限定はしないが USPD RS、SCAG、および ALS FRS によって評価される認知機能の著しい改善をもたらす。

【0221】

中枢神経系（すなわち脳および脊髄）障害を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の本明細書において記載される組成物またはキメラタンパク質をボラス注射によって投与することを含み、この場合、投与は、大脳皮質の細胞に対する酸化損傷の緩和、血液脳関門の修復または修復の加速、浮腫の低減、梗塞部容積の低減、血液脳関門透過性の低減、損傷を受けた脳組織への生存促進性シグナルの標的化された送達、脳卒中後の筋骨格系の協調の増大、脳卒中後の意識の改善、脳卒中後の神経学的機能の改善、および脳卒中後の運動機能の改善のうち少なくとも 1 つまたは複数をもたらす。

【0222】

脳、中枢神経系の損傷、および眼の疾患を処置する方法が提供される。

【0223】

一部の実施形態では、脳または中枢神経系の損傷を処置する方法は、それを必要とする対象に治療有効量のキメラタンパク質をボラス注射によって投与することを含む。一部の実施形態では、脳または中枢神経系の損傷を処置する方法は、それを必要とする対象に治療有効量のキメラタンパク質を含む医薬組成物をボラス注射によって投与することを含む。一部の実施形態では、キメラタンパク質は、(a) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒトアネキシン 5 (AnxV) の変異体を含む標的化ドメインであって、1 つまたは複数の突然変異が、C316 に対応する位置での、ならびに適宜、R63、K70、K101、E138、D139、N160、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなる、標的化ドメイン、(b) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒトインスリン様増殖因子 IGF-1 の変異体を含むアクチベータードメインであって、1 つまたは複数の突然変異が、E3、Y24、Y31、Y60、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなり、IGF-1 の変異体が、野生型 IGF-1 と比較して IGF-1 受容体の活性化を低下させる、アクチベータードメイン、ならびに (c) 1 つまたは複数の突然変異を含むヒト血清アルブミン (HSA) の変異体を含む半減期モジュレーターであって、1 つまたは複数の突然変異が、C58 および N527、およびこれらの組合せに対応する 1 つまたは複数の位置での置換からなる、半減期モジュレーターを含む。一部の実施形態では、キメラタンパク質の投与は、初代皮質培養物における

酸化損傷の緩和、血液脳関門の修復または修復の加速、浮腫の低減、梗塞部容積の低減、血液脳関門透過性の低減、損傷を受けた脳組織への局在化、脳卒中後の運動機能の増大のうち少なくとも1つをもたらす。

【0224】

一部の実施形態では、IGF-1の変異体は、野生型IGF-1と比較してIGF-1受容体の活性化を低下させる。一部の実施形態では、IGF-1の変異体は、野生型ヒトIGF-1と比較してE3R置換およびY31A置換を含む。

【0225】

一部の実施形態では、ヒトアネキシン5の変異体は、野生型ヒトアネキシン5に対応するアミノ酸2~320を含み、野生型ヒトアネキシン5と比較して、R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A、C316A置換を含む。 10

【0226】

一部の実施形態では、ヒト血清アルブミンの変異体は、野生型ヒト血清アルブミンに対応するアミノ酸26~609を含み、野生型ヒト血清アルブミンと比較して、C58S置換およびN527Q置換を含む。

【0227】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、IGF1(E3R/Y31A)_1k7_HSA26-609(C58S/N527Q)_1k7_AnxV2-320(R63A/K70A/K101A/E138A/D139G/N160A/C316A)である。一部の実施形態では、リンカー1k7は、-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Glyを含む。 20

【0228】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、標的分子ホスファチジルセリンを含む細胞に対して選択的に標的化されており、セリン/スレオニンプロテインキナーゼB(AKT)のリン酸化によって測定した場合、標的分子を有さない細胞と比較して、標的分子を有する細胞において少なくとも2倍強力なIGF-1受容体活性化を示す。

【0229】

一部の実施形態では、脳損傷は虚血性脳卒中である。一部の実施形態では、投与は神経血管疾患の最初の発現で行われる。

【0230】

一部の実施形態では、それを必要とする対象はアルツハイマー病を有する。 30

【0231】

一部の実施形態では、用量当たり0.01mg/kgから100mg/kgが、それを必要とする対象に投与される。一部の実施形態では、最大200mg/kgのキメラタンパク質が、それを必要とする対象に投与される。

【0232】

キット

本開示の態様は、単位用量およびキットに関する。一部の実施形態では、キットは、キメラタンパク質を含む個々の単位用量の供給物、および使用のための指示を含む。一部の実施形態では、各単位用量は、適切な容器または充填済みのパッケージ、例えば、シリンジ、アンプル、またはバイアルで供給されている。一部の実施形態では、各キットは、個々の患者を処置のコースのための適切な日数にわたり処置するために十分な数の容器または単位用量を有する。 40

【0233】

一部の実施形態では、キットの成分は、別々に、または単位用量に共に混合されて、例えば、活性薬剤の量を示すアンプル、バイアル、シリンジ、またはサシェなどの密閉容器内の凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、供給される。活性薬剤が凍結乾燥されている場合、活性薬剤を注射の前に混合することができるよう、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供されてもよい。

【0234】

一部の実施形態では、キットは、バイアルなどの複数の適切な容器、および使用のための指示を含む。バイアルには、バイアルの内容物を引き抜くためのシリンジの進入を可能にするためのゴム製のセプタムがはめられていてもよい。一部の実施形態では、各バイアルは、1～50 mlの間の液体製剤の抽出可能容量またはこれらの間の任意の容量を含む。一部の実施形態では、各バイアルは、1～10 mlの間の液体製剤の抽出可能容量を含む。一部の実施形態では、各バイアルは、5 mlの液体製剤の抽出可能容量を含む。一部の実施形態では、キットは、異なる容量の液体製剤を有する複数のバイアルを含み、この場合、複数のバイアルのうちの1つまたは複数は、異なる量のキメラタンパク質を含んでいる。一部の実施形態では、複数の容器は、1 mlから50 mlの範囲の容量またはこれらの間の任意の容量で投与される、キメラタンパク質を含む液体製剤を含む。一部の実施形態では、溶液は、約20 mg/mlのキメラタンパク質を含む。一部の実施形態では、複数の容器は、1 mlから50 mlの範囲の容量またはこれらの間の任意の容量で投与される、20 mgから約1 gのキメラタンパク質を含む液体製剤を含む。一部の実施形態では、液体製剤は、すぐに注射できる状態である。一部の実施形態では、液体製剤は、標準的なIV流体（例えば、通常生理食塩水、通常生理食塩水中の5%デキストロース、または水中の10%デキストロース）に希釈される。

10

【0235】

一部の実施形態では、キットにおけるバイアルの容量は1 mlから50 mlの間であり、20 mgから1 gのscp776などのキメラタンパク質に対応する。

【0236】

20

本明細書において記載されるキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および本明細書において記載される任意の方法を行うための指示を有する包装挿入物を含む、商業的におよび利用者の立場から望ましい他の材料をさらに含み得る。

【0237】

一部の実施形態では、使用のための指示は、供給物の単位用量を供給面で1日に1回静脈内投与または動脈内投与することを記載している。一部の実施形態では、使用のための指示は、供給物の単位用量を供給面で1日に2回、3回、またはそれを超える回数静脈内投与または動脈内投与することを記載している。一部の実施形態では、使用のための指示は、供給物の単位用量を供給面で1日に1回髄腔内投与することを記載している。一部の実施形態では、使用のための指示は、供給物の単位用量を供給面で1日に2回、3回、またはそれを超える回数髄腔内投与することを記載している。

30

【0238】

一部の実施形態では、供給物は、単一の処置コースをサポートする。一部の実施形態では、供給物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、またはそれを超える個々の単位用量（例えばバイアル）を含む。一部の実施形態では、供給物は、患者の体重の変動および利便性を考慮に入れるために、4日間の処置コースのための8つの個々の単位用量（例えばバイアル）を含む。一部の実施形態では、供給物は、患者の体重の変動および利便性を考慮に入れるために、7日間の処置コースのための14の個々の単位用量（例えばバイアル）を含む。

【0239】

40

一部の実施形態では、個々の単位用量は、1つまたは複数のパッケージに含まれ得、「用量1」、「用量2」、「用量3」など、または「1日目」、「2日目」、「3日目」などと適宜ラベル付けされていてもよい。

【0240】

一部の実施形態では、2日目に投与するための単位用量（本明細書において第2の用量と呼ばれる）は、初日に投与するための単位用量（本明細書において初回用量と呼ばれる）中に存在するキメラタンパク質の量の約85%から約95%（例えば約90%）を含み、3日目に投与するための単位用量（本明細書において第3の用量と呼ばれる）は、第2の用量中に存在するキメラタンパク質の量の約65%から約85%（例えば約70%）で第2の用量よりも少ない量を含み、4日目に投与するための単位用量は、初回用量中に存

50

用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与するための、約10mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間の期間にわたり投与するための、約10mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、7日間の期間にわたり投与するための、約10mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与するための、約5mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、7日間の期間にわたり投与するための、約5mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間の期間にわたり投与するための、約5mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。

10

【0242】

一部の実施形態では、キットは、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与するための、約100~500mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、7日間の期間にわたり投与するための、約100~500mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与するための、約100~400mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、7日間の期間にわたり投与するための、約100~400mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与するための、約100~300mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、7日間の期間にわたり投与するための、約100~300mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与するための、約100~200mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、7日間の期間にわたり投与するための、約100~200mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与するための、約100~150mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、7日間の期間にわたり投与するための、約100~150mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、4日間、5日間、6日間、または7日間の期間にわたり投与するための、約140mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。一部の実施形態では、キットは、7日間の期間にわたり投与するための、約140mg/kgの本明細書において記載されるキメラタンパク質の総用量を含む。

20

30

【0243】

一部の実施形態では、使用のための指示は、パンフレットまたは文書情報などの読取り可能なメディアに、投薬スケジュール処置を含む。一部の実施形態では、読取り可能なメディアは、活性薬剤、調製の指示、投与量の変形形態、保存の指示、投与の指示、医薬品成分の副作用、投与の禁忌、安定性のデータ、または患者のケアのための本明細書において記載される組成物の使用に関するあらゆる他の情報もしくは医師の情報の明記を含む。

40

【0244】

本開示の態様は、急性の中枢神経系の損傷を処置するための医薬組成物であって、治療有効量の本明細書において記載されるキメラタンパク質および薬学的に許容される担体を含み、ボラス注射の形態で投与される、医薬組成物の使用に関する。本開示の他の態様は、自律神経疾患を処置するための医薬組成物であって、治療有効量の本明細書において記載されるキメラタンパク質および薬学的に許容される担体を含み、ボラス注射の形態

50

で投与される、医薬組成物の使用に関する。一部の実施形態では、キメラタンパク質は、(a) 1つまたは複数の突然変異を含むヒトアネキシン5 (AnxV) の変異体を含む標的化ドメインであって、1つまたは複数の突然変異が、C316に対応する位置での、ならびに適宜、R63、K70、K101、E138、D139、N160、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなる、標的化ドメイン、(b) 1つまたは複数の突然変異を含むヒトインスリン様増殖因子IGF-1の変異体を含むアクチベータードメインであって、1つまたは複数の突然変異が、E3、Y24、Y31、Y60、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなり、IGF-1の変異体が、野生型IGF-1と比較してIGF-1受容体の活性化を低下させる、アクチベータードメイン、ならびに(c) 1つまたは複数の突然変異を含むヒト血清アルブミン(HSA)の変異体を含む半減期モジュレーターであって、1つまたは複数の突然変異が、C58およびN527、およびこれらの組合せに対応する1つまたは複数の位置での置換からなる、半減期モジュレーターを含む。

10

【実施例】

【0245】

以下の実施例は、限定ではなく実例として提供される。他に指定されなければ、すべての試薬および溶媒は、標準的な商用グレードのものであり、さらなる精製なしで使用される。以下の実施例において提供される手順は、慣例的な改変を使用して、本開示の範囲内の他の二特異性融合タンパク質および医薬組成物を製造および使用するために当業者により変更され得る。

20

【0246】

[実施例1]

酸化ストレスからの初代皮質細胞のScp776媒介性In Vitro保護

方法：

ラット混合皮質培養物の調製

ラット混合皮質培養物をE18ウイスターラット胚から無菌条件下で調製した。要約すると、麻酔後に、胚を子宮から取り出し、粉碎した。皮質を解剖で取り出し、冷えた10 mM HEPESおよび10 µg/mLゲンタマイシン(HBSS-A)緩衝剤を含有するディッシュ中に置いた。組織を小片に切断し、15 mLコニカルチューブに移し、DNaseおよびパピンを用いて15分間37 °Cで消化した。細胞を遠心分離(1500 rpm、5分、RT)により収集した。上清を除去し、2 mMグルタミン、10 µg/mLゲンタマイシン、10%熱不活性化胎仔ウシ血清(FBS-HI)および10%熱不活性化ウマ血清(HS-HI)を補充した1 mLのMEM(2 g/Lグルコース)をチューブに加え、組織をピペットを用いて粉碎した。細胞をカウントし、次に同じ培地中の400,000細胞/ウェルの細胞密度において、ポリ-L-リシン被覆48ウェルプレートにプレティングした。プレートを、加湿された37 °C/5% CO₂、95%空気インキュベーター中に置いた。3~4 h後に、培地を、2 mMグルタミン、10 µg/mLゲンタマイシンおよび5% HS-HIを補充したMEM(2 g/Lグルコース)(MEM+)に交換した。in vitroで3日後に、培地を、2 mMグルタミン、10 µg/mLゲンタマイシンおよび5% FBS-HIおよび5% HS-HIを補充したMEM(2 g/Lグルコース)を含有する新鮮な培地で置き換えた。in vitroで6日目に、シトシンアラビノシド(MEM+中10 µMの最終濃度)を24 h加えることにより望ましくない細胞分裂を阻害した。翌日(in vitroで7日目に)、培地を新鮮なMEM+で置き換えた。

30

40

【0247】

H₂O₂曝露

健康な細胞単層を有する培養ウェルをin vitroでの単離後10日目に実験的処置のために選択した。細胞培養培地をウェルから完全に除去し、scp776、陽性対照、または媒体対照(DPBS)をウェル中MEM+中の270 µlの容量において加えた。37 °Cで30分のプレインキュベーション期間後に、30 µlの500 µM H₂O₂

50

(ウェル中で最終50 μM)を加え、細胞を37 / 5% CO₂、95%空気のインキュベーターにおいて60分間インキュベートした。その後、H₂O₂培地を除去し、化合物または媒体対照(DBPS)を含有する通常の培養培地(MEM+)をピペットでウェルに加え、プレートを正常酸素(37 / 5% CO₂、95%空気)インキュベーター中にさらに23時間置いた。

【0248】

L D H測定による細胞死の評価

23時間のH₂O₂曝露後に培養培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)のレベルを定量化することにより細胞死を評価した。20時間後にすべてのウェルから培養培地を収集し、存在し得る細胞デブリを遠心分離(13,000 rpm、3分、4) 10
により除去した。各々の試料からの100 μLのアリコートを用いて96ウェルマイクロタイタープレートに複製物としてピペットで加え、等しい容量のLDH基質をピペットでウェルに加えた。340 nmにおける吸光度を直ちに、Multiskan MS ELISAリーダーにおいて3分速度論的測定プロトコルを使用して測定した。放出されたLDHに正比例する、吸光度/分における変化を決定した。

【0249】

NeuN免疫細胞化学によるニューロン細胞数の評価

NeuNを標的化するニューロン特異的な抗体を用いてニューロンを免疫染色することによりニューロン細胞数を定量化した。培養培地を除去した後に、細胞をPBS中の4%ホルムアルデヒドを用いて30分間、RTで固定し、次にPBSを用いて2回洗浄した。 20
固定された細胞を透過処理し、非特異的な結合を遮断緩衝剤(PBS中の1%ウシ血清アルブミンおよび0.3% Triton-X-100)との30分のインキュベーションにより遮断した。細胞を一次抗体、マウス抗NeuN(Millipore、カタログ# MAB377、1:1,000希釈)と24時間、RTでインキュベートし、続いて洗浄し、次に二次抗体、ビオチン化ヤギ抗マウス(Vector Laboratories、カタログ# BA-9200 1:200)とRTで2時間インキュベートした。ウェルをPBSを用いて2回洗浄し、細胞を次にアビジン-HRP複合体(Vector Laboratories、カタログ# PK-6100 1:400)と2時間インキュベートし、ニッケル増強DAB(Vector Laboratories、カタログ# SK-4100)を用いて顕色させた。各々のウェルを、明視野AxioVert A1 30
顕微鏡(Carl Zeiss)を使用し、LD A-Plan 20x対物レンズ[NA / 1.0(PS)](Carl Zeiss)を使用して4つのランダムな位置においてイメージングした。捕捉された画像を、ZENソフトウェア(Carl Zeiss)を使用してtiffファイルとしてエクスポートした。tiff画像を、Image J v1.48e(NIH)を使用するニューロン数分析のために使用した。画像を手動で閾値設定して、NeuNで染色されたニューロンの境界を定め、それらを、Image Jソフトウェアにおいて利用可能なCounting Particles機能を使用することによりサイズに従ってカウントした。NeuN陽性ニューロンを処置に対して盲検の実験者によりカウントした。全部で、各々のウェルのために4つの視野をカウントした。

【0250】

結果

E18ウイスターラット胚からの初代混合皮質培養物を通常の増殖条件下で10日間維持した。細胞を次に媒体、陽性対照化合物、またはscp776(10、50または100 nM)を用いて30分間前処置した。酸化ストレスを次に50 μM H₂O₂の追加により誘導した。H₂O₂誘導性酸化ストレス下での1時間後に、増殖培地を、異なる濃度(10、50または100 nM)の媒体、陽性対照化合物、またはscp776を含有する新鮮な培地で置き換えた。23時間後に、培地を除去し、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、細胞死で培地中に放出される細胞内酵素の存在についてアッセイした。放出されたLDHにおける有意な低減が、媒体(H₂O₂のみ)と比較して10、50または100 40
50

nMにおいてs c p 7 7 6を用いて処置された培養物において観察されたことを図1は示す[ダネットの多重比較検定を伴う一元配置ANOVA; $p = 0.0023$ (10 nM)、 $p < 0.0001$ (50、100 nM)]。

【0251】

E18ウイスターラット胚からの初代混合皮質培養物を通常の増殖条件下で10日間維持した。細胞を次に異なる濃度(10、50または100 nM)の媒体、陽性対照化合物、またはs c p 7 7 6を用いて30分間前処置した。酸化ストレスを次に50 μ M H₂O₂の追加により誘導した。H₂O₂誘導性酸化ストレス下での1時間後に、増殖培地を、媒体、陽性対照化合物、またはs c p 7 7 6(10、50または100 nM)を含有する新鮮な培地で置き換えた。23時間後に、免疫細胞化学技術を使用して、細胞を固定し、ニューロン核の特異的なマーカー、NeuNについて染色した。NeuN陽性細胞を光学顕微鏡法によりカウントした。NeuN陽性細胞における有意な増加(細胞死における低減)が、媒体(H₂O₂のみ)と比較して10、50または100 nMのs c p 7 7 6を用いて処置された細胞において観察されたことを図2は示す[ダネットの多重比較検定を伴う一元配置ANOVA; $p = 0.0007$ (10 nM)、 $p < 0.0001$ (50、100 nM)]。

10

【0252】

結論

S c p 7 7 6は、*in vitro*で酸化的なニューロンおよびグリア細胞死から保護した。過酸化水素を用いた酸化ストレスの刺激の前、間および後におけるs c p 7 7 6を用いたラット初代混合皮質培養物の処置は、細胞培地中へのLDH放出によりおよびインタクトなニューロン核のカウントにより測定された場合に細胞死を低減させた。

20

【0253】

[実施例2]

急性虚血性脳卒中(AIS)の齧歯動物モデルにおけるS c p 7 7 6有効性
方法

一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO)モデルは、急性虚血性脳卒中の代表となる脳に対する虚血性傷害を作り出す。虚血の持続期間は閉塞性フィラメントの配置により制御され、再灌流の瞬間はフィラメントの除去により決定される。この機械的なモデルは、標準的な血管再建モダリティー(例えば、IV組織プラスミノゲン活性化因子、動脈内血栓溶解、機械的血栓切除術)に類似している。

30

【0254】

各々のラットを誘導チャンパー中で麻酔し(70% N₂Oおよび30% O₂中の2~5%イソフルラン; 流れ300 mL/分)、手術用プラットフォーム上でその背中を加熱パッド上に置いた。加熱パッドを37℃に設定し、直腸プローブを滑沢剤の助けと共に動物の直腸中に挿入した。麻酔を1.5~2.5%において維持した。

【0255】

正中皮膚切開後に、右総頸動脈(CCA)を露出させ、外頸動脈(ECA)を頸動脈分岐から遠位で結紮した。シリコンカバー付きの先端を有するフィラメント(Doccolフィラメント4-0、直径0.185 mm、シリコン5~6 mm/直径0.35 mm)を内頸動脈(ICA)中に22~23 mm、MCAの起点まで挿入した(図3)。手術後に、ラットを清潔なケージ中で加熱パッド上に置いて麻酔から目覚めさせた。フィラメントを90分間(一部のインプリメンテーションにおいて120分間)適所に残した。

40

【0256】

再灌流のために、上記されるように麻酔を誘導し、動物の背中を加熱パッド上に戻し、直腸プローブを挿入した。頸部創傷を慎重に再開放し、腔内フィラメントを慎重に除去して再灌流を開始させた。フィラメントの除去後に、組織を適所に戻して配置し、ナイロン糸を用いて創傷を縫合して閉じた。予め温めた4 mLの0.9% NaClを腹腔内(I.P.)に与えて、ラットに水分を再補給した。手術後に、ラットを清潔なケージ中で加熱パッド上に置いて麻酔から目覚めさせた。最後に、ラットをそのホームケージに戻し、

50

食品および水に自由にアクセスさせた。

【0257】

シャムラットに、麻酔レジメンを含む、同一の手順を行ったが、フィラメント挿入、結紮、および実際の t M C A O 閉塞は伴わなかった。

【0258】

このモデルにおいて s c p 7 7 6 有効性を評価するために使用された分析方法は、T 2 強調 M R I (梗塞サイズ、脳半球の腫脹)、G d 増強 M R I [血液脳関門 (B B B) 完全性、梗塞サイズ]、組織ホモジネート E L I S A (s c p 7 7 6 蓄積)、自動化された運動力学的歩行分析を含んだ。

【0259】

投薬：

ラットに複数の投薬レジメンにおいて s c p 7 7 6 または媒体を投薬した。すべての投薬は静脈内 (I . V .) ボーラス投与であった。モデルの一部のインプリメンテーションにおいて、ラットに再灌流の 1 ~ 5 分前に 2 5 m g / k g s c p 7 7 6 または媒体の単回 I . V . 用量を与えた。他のインプリメンテーションにおいて、ラットに以下の時点：再灌流の 1 ~ 5 分前、再灌流の 4 時間後および再灌流の 8 時間後に 2 5 m g / k g s c p 7 7 6 または媒体の 3 回の I . V . 用量を与えた。

【0260】

結果

s c p 7 7 6 の I V 投与はラットにおいて虚血性脳卒中後に血液脳関門完全性を保護する。スプラーグドローラットを虚血性脳卒中の t M C A O モデルまたはシャム手順に供した。再灌流の時点において、t M C A O ラットに s c p 7 7 6 (2 5 m g / k g) または媒体の I V ボーラスを投薬し；シャムラットに媒体を投薬した。血液脳関門 (B B B) 完全性を再灌流の 2 時間後にガドリニウム増強 M R I により評価した。図 4 は B B B 漏出 (G d 増強リードアウトのパーセント) を示す。個々のデータ点および平均 ± S D を各々の群について示す。対応のない t 検定は、媒体と比較して、s c p 7 7 6 処置群における B B B 完全性における有意な改善 (p = 0 . 0 1 4) を示した。

【0261】

s c p 7 7 6 の I V 投与はラットにおいて虚血性脳卒中後に脳半球の腫脹を低減させる。スプラーグドローラットを虚血性脳卒中の t M C A O モデルまたはシャム手順に供した。再灌流の時点において、t M C A O ラットに s c p 7 7 6 (2 5 m g / k g) または媒体の I V ボーラスを投薬し；シャムラットに媒体を投薬した。脳半球の腫脹を再灌流の 2 時間後に T 2 強調 M R I により評価した。図 5 は脳半球の腫脹を示す (デルタ虚血性 / 健康 % リードアウト)。個々のデータ点および平均 ± S D を各々の群について示す。脳半球の腫脹の低減の傾向が、媒体と比較して s c p 7 7 6 を与えられた動物において観察された (対応のない t 検定 ; p = 0 . 1 0) 。

【0262】

s c p 7 7 6 の I V 投与はラットにおいて虚血性脳卒中後に梗塞サイズを低減させる (図 6 を参照)。スプラーグドローラットを虚血性脳卒中の t M C A O モデルまたはシャム手順に供した。再灌流の時点において、t M C A O ラットに s c p 7 7 6 (2 5 m g / k g) または媒体の I V ボーラスを投薬し；シャムラットに媒体を投薬した。梗塞サイズを再灌流の 2 時間後に T 2 強調 M R I により評価した。個々のデータ点および平均 ± S D を各々の群について示す。梗塞サイズの低減の傾向が、媒体と比較して s c p 7 7 6 を与えられた動物において観察された (対応のない t 検定 ; p = 0 . 1 7) 。

【0263】

S c p 7 7 6 処置はラットにおいて虚血性脳卒中後の機能の回復を増強する (図 7 を参照)。スプラーグドローラットを虚血性脳卒中の t M C A O モデルまたはシャム手順に供した。再灌流の時点において、t M C A O ラットに s c p 7 7 6 (2 5 m g / k g) または媒体の I V ボーラスを投薬し；シャムラットに媒体を投薬した。t M C A O に供された動物の群に、再灌流の 4 および 8 時間後に s c p 7 7 6 の追加の 2 5 m g / k g 用量を

10

20

30

40

50

与えた（複数用量群）。微細運動の運動力学的分析を t M C A O 後 10 日目に行った。ラットを、歩行行動タスク（ステップ、ストライド、立脚、遊脚分析、肢協調）を使用して M o t o R a t e r 試験において分析した。試験の日に、ラットの身体の適切な位置、例えば肢の関節および尾の部分に印をしてデータ分析プロセスを容易にした。3つの異なる方向から（下方および両方の側方から）高速カメラ（300フレーム/秒）を使用して運動データを捕捉した。異なる歩行パターンおよび運動を、特製の自動化された分析システムを使用して分析した。分析されたパラメーターは、1）一般的な歩行パターンパラメーター（ストライド時間および速度、ステップ幅、ストライドの間の立脚および遊脚時間、肢間協調）、2）身体姿勢およびバランス（トゥクリアランス、腸骨稜および臀部高さ、後肢の前突および後退、尾の位置および運動）、ならびに3）微細運動能力（ストライドの間の遊脚速度、遊脚相の間の躍度指標、異なる関節の角度範囲および逸脱、鉛直および水平の頭運動）を含む。分析されたパラメーターを、平均シャム（健康）動物からの全体的な運動における逸脱を表す動物当たりの単一のスコアに組合せ；このパラメーター「シャムからの距離」は図8のy軸にある。複数用量群は図8において s c p 7 7 6 として標識されており；単一用量群は示されていない。s c p 7 7 6 の3回の用量を与えられた動物は、媒体を与えられた動物よりも健康な動物に有意により類似していたことを図8は示す（チューキーの H o n e s t S i g n i f i c a n t D i f f e r e n c e 検定を伴う一元配置 A N O V A ; $p = 0 . 0 1 4 7$ ）。

【0264】

結論

S c p 7 7 6 は、傷害生理学のいくつかの直接的な指標により脳卒中のラット t M C A O モデルにおいて有効性を示した。急性傷害相の間に、再灌流および投薬の2時間後に、s c p 7 7 6 で処置された動物は、媒体で処置された動物と比較して、B B B 完全性の改善、梗塞性の半球の腫脹の低減および梗塞部容積の低減を示した。損傷を受けた脳における明白な有益な活性と連結して、s c p 7 7 6 は、傷害の2時間後および24時間後の両方において、損傷を受けた脳における蓄積の増強を示した。

【0265】

S c p 7 7 6 はまた、傷害の10日後に t M C A O ラットに対する機能的な利益を示した。自動化された運動力学的歩行分析は、高速ビデオを使用して97個のパラメーターにおいてラットの歩行ストライドを定義する。関連するパラメーターをクラスター化するためならびに健康な動物および t M C A O 動物におけるそれらのクラスターの間の差異を評価するためにソフトウェアパッケージが使用される。t M C A O 手順を受け、s c p 7 7 6 の3回の用量を与えられた動物は、媒体を与えられた動物と比較して有意に改善された全体的な歩行プロファイルを示した。

【0266】

損傷を受けた脳組織への局在性は予想外であった。損傷を受けた脳における B B B の易透化に起因するのか、それともアポトーシスの領域への活発な輸送に起因するのかによらず、損傷を受けた脳にキメラタンパク質、例えば s c p 7 7 6 を送達する能力は、中枢神経脳障害を処置するための多くの治療的な機会を開き得る。特に、虚血性脳卒中の10日後に s c p 7 7 6 で処置された動物において観察された歩行における機能的な改善は予想外および驚くべきものであった。

【0267】

[実施例3]

虚血性脳卒中の非ヒト霊長動物モデル（NHP）における s c p 7 7 6 の有効性研究方法

1. カニクイザル（*Macaca fascicularis*）における一過性中大脳動脈閉塞（t M C A O）虚血性脳卒中（IS）モデルの説明

麻酔下で、右の眼球を取り出した。手術用顕微鏡（Kom300、Konan Medical、Hogo、Japan）下で、眼窩内容物を解剖および切除した。頭蓋の基部における視神経の孔の直前まで直径約10mmの窓を開いた。右中大脳動脈（MCA）の

主要な幹は、硬膜の下にある窓を通じて可視的であった。硬膜を開いた後に、2つの微小血管クリップ (Mini #81, Sugita Aneurysm Clips, Mizuho Medical Corp., Tokyo, Japan) を、1つは主MCA幹の近位部分において、および他方は遠位から眼窩前頭への分岐において使用してtMCAOを行った。これらのクリップをMCA閉塞の4時間後に除去した。MCA血流の再確立の視覚的確認後に、Clearfil New Bond (Kuraray Noritake Dental, Inc., Tokyo, Japan) を使用して穿頭孔を閉じ、切開を縫合した。新たなクリップのペアを各々のマカクのために使用した。

【0268】

クリップの配置および/または除去の間の任意の異常な観察、例えば血管破裂または出血は、記録され、報告された。 10

【0269】

2. 神経学的欠損スコア付け (NDS) 方法

閉塞の24時間 (±2時間)、48時間 (±2時間)、72時間 (±2時間)、7、10および14日後に、Kito et al. (J. Neurosci. Meth., 2001; 105: 45-53) により記載される方法に従って神経学的欠損を得た。

【0270】

図11Aは、プラセボで処置されたおよびs c p 776で処置された動物の48時間 (2日目) におけるNDS運動系スコアを示す。

【0271】

図11Bは、プラセボで処置されたおよびs c p 776で処置された動物の7日目におけるNDS意識スコアを示す。 20

【0272】

図11Cは、プラセボで処置されたおよびs c p 776で処置された動物の1、2、3、7、10、および14日目におけるNDS筋骨格協調スコアを示す。

【0273】

図11Dは、プラセボで処置されたおよびs c p 776で処置された動物の1、2、3、7、10、および14日目におけるトータルNDSスコアを示す。

【0274】

3. 磁気共鳴画像 (MRI) 法 30

MRIを使用して脳画像を再灌流の4時間後 (すなわち閉塞の8時間後)、閉塞の72時間 (±2時間)、および14日後に得た。

【0275】

イメージングの間に、プロポフォル (12~20mg/kg; 丸石製薬株式会社、大阪、日本) を用いてマカクを麻酔した。動物をMRIベッド (Signa Explorer 1.5T, GE Healthcare, Milwaukee, WI) 上に固定し、連続的な冠状画像 (6mmの厚さ、眼窩外耳道線に対して鉛直面) を得た。すべてのイメージングシーケンスは、以下からなるものであった:

- ・拡散強調イメージング (DWI);
- ・動脈スピン標識法 (ASL);
- ・見かけの拡散係数 (ADC);
- ・T1;
- ・流体減衰反転回復 (Fluid-attenuated inversion-recovery; FLAIR); および
- ・T2強調イメージング。

【0276】

8時間の時点において実行されるMRIのために、処置後の血液脳関門 (BBB) 妨害を可視化するために、コントラスト増強T1強調イメージングは、ガドブトロール造影剤 (1.0mmol/mL, 0.2mL/kg; Gadovist; Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Osaka, Japan) の静脈内注 50

射の前および約5分後に獲得されたT1強調全脳容量からなるものであった。すべての動物は0.2 mL/kgの用量容量を与えられた。

【0277】

見かけの拡散係数(ADC)のマップ、大脳血流(CBF)、および灌流欠損を、研究において行われたすべてのMRIのためにMRスキャナーコンソール上で利用可能なソフトウェア(READY View、GE Healthcare)を用いて生成した。

【0278】

病変容量(mm³)を各々の切片の梗塞面積および厚さ(6mm)の和として算出した。病変容量を大脳皮質、白質および大脳基底核において算出し、総病変容量はこれらの容量の和であった。

【0279】

BBB妨害の面積(mm²)を、OsiriX MDバージョン12.0.0を使用して各々のコントラスト増強T1強調画像から導出した。BBB妨害を、トレースコントラスト増強T1強調画像を使用して手動で導出した。BBB妨害の容量(mm³)を各々の切片(6mmの厚さ)のBBB妨害の面積の和として算出した。

【0280】

投薬

すべての動物にクリップの解放の30分前(またはクリップ配置の3.5時間後)に1 mL/kgの1回の用量を与え、約30秒にかけての静脈内(i.v.)スロープッシュを介した計5用量にわたる24時間だけ分離された追加の4用量を与えた。プラセボは、媒体単独(20 mM Tris、7.5% w/vスクロース、0.02% w/vポリソルベート80、pH 7.5)に対応する。

【0281】

すべての動物に計5用量を与えた。投薬レジメンを以下の表に示す。用量16 mg/kgは16 mg/mLのキメラタンパク質に対応し、用量4 mg/kgは4 mg/mLのキメラタンパク質に対応する。投与の間隔は20時間以上かつ28時間以下であった。投与の間隔がこの範囲(20~28時間)外にある任意の事例は報告された。

【0282】

【表1】

プラセボ (n = 12)	日:	1	2	3	4	5
	処置:	プラセボ	プラセボ	プラセボ	プラセボ	プラセボ
分割用量 (n = 10)	日:	1	2	3	4	5
	処置:	16 mg/kg scp776	4 mg/kg scp776	4 mg/kg scp776	4 mg/kg scp776	4 mg/kg scp776

【0283】

デキストロース補充

一部の実施形態では、処置されている動物は、正常血糖を持続させるためにデキストロースを0.5 mL/kg/hrの速度で連続的に注入される。デキストロース溶液は、無菌水または食塩水溶液中の約5%~約50%(w/v)のデキストロースを含むことができる。

【0284】

NDS、MRI、および生存結果の要約

NDSスコア付けを使用して動物を評価した：NDSスコア付けシステムのための4つのシステムは、運動、意識、筋骨格協調、および感覚である。トータルNDSスコアは4つのシステムの和である。

【0285】

scp776を用いた処置は、プラセボを用いた処置と比較された場合にNDSスコア付けにおいて評価される4つのシステムのうちの3つにおいて神経学的機能を有意に改善する。

10

20

30

40

50

・意識に対する有意な改善が3日目（示されていない）および7日目において観察された（図11Bを参照）。

・運動系に対する有意な改善が2日目において観察された（図11Aを参照）。

・筋骨格協調に対する有意な改善が、1、2、3、7、10、および14日目において観察された（図11Cを参照）。

・トータルNDスコアに対する改善がすべての時点において観察された。トータルNDスコアに対する有意な改善が1日目および3日目において観察された（図11Dを参照）。

【0286】

評価されたすべての時点において、s c p 7 7 6を用いた処置は、プラセボを用いた処置よりも小さい病変サイズまたは面積を結果としてもたらした（図12を参照）。 10

・病変容量における低減は8時間における大脳皮質および総病変容量において統計的有意性を達成した。

・総病変容量はs c p 7 7 6処置により72時間において有意に低減された。

・大脳皮質における病変の容量は、s c p 7 7 6処置により14日において有意に低減された。

【0287】

S c p 7 7 6処置は、統計的に有意な生存利益を結果としてもたらした。プラセボ群において、動物の50%は脳卒中傷害の結果として死亡したが、s c p 7 7 6を与えられた動物の10%のみが研究完了の前に死亡した。この生存差異は、ログランク法およびカイ二乗分布により評価された場合に、0.039のp値を明らかにする（Bewick et al. Critical Care 2004, 8:389-394）。 20

【0288】

[実施例4]

パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、およびアルツハイマー病（AD）の処置

パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、およびアルツハイマー病（AD）は、中枢または末梢神経系の進行性の変性により特徴付けられる。これらの疾患の各々は、筋骨格協調および運動系制御の障害と関連付けられる。非ヒト霊長動物における急性虚血性脳卒中のモデルは、筋骨格協調および運動制御の両方における有意な機能不全を誘導する。s c p 7 7 6の神経保護活性はこれらの機能不全を有意に低減させる。s c p 7 7 6の神経保護活性は、損傷を受けた組織を結果としてもたらず損傷の種類から独立している。慢性神経学的疾患において、脳組織もまた損傷を受け、細胞レベルにおける類似した困難を受ける。以上を合わせると、これらの結果および疾患進行のモードは、s c p 7 7 6が症候の進行の間に投与されるのであれば、急性虚血性脳卒中のモデルにおいて観察される神経保護アウトカムは慢性疾患の状況に翻訳されるであろうことを指し示す。 30

【0289】

パーキンソン病の処置に対するs c p 7 7 6の効果を調べるために実験が実行される。S c p 7 7 6は、毎日約0.01mg/kg～約20mg/kgで投薬される。投与は、以下に限定されないが例えば、運動機能の指標の改善、および神経変性症状における減少、例えば振戦の減少を結果としてもたらす。 40

【0290】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の処置に対するs c p 7 7 6の効果を調べるために実験が実行される。S c p 7 7 6は、毎日約0.01mg/kg～約20mg/kgで投薬される。投与は、以下に限定されないが例えば、運動機能の指標の改善、およびALS症状、例えば自律神経機能障害における減少を結果としてもたらす。

【0291】

アルツハイマー病（AD）の処置に対するs c p 7 7 6の効果を調べるために実験が実行される。S c p 7 7 6は、毎日約0.01mg/kg～約20mg/kgで投薬される。投与は、以下に限定されないが例えば、認知機能の指標の改善、ならびにAD症状、例 50

えば記憶喪失および錯乱における減少を結果としてもたらず。

【0292】

組成物、方法およびキットの特有の例が、実例の目的のために本明細書に記載されている。これらは例に過ぎない。本明細書で提供される技術は、上記される例示的なシステム以外のシステムに応用され得る。多くの変更、修飾、追加、省略、および順列組合せが本発明の実施内で可能である。本開示は、特徴、要素および/もしくは行為を同等の特徴、要素および/もしくは行為で置き換えること；異なる実施形態からの特徴、要素および/もしくは行為の組合せおよびマッチング；本明細書に記載されている実施形態からの特徴、要素および/もしくは行為を他の技術の特徴、要素および/もしくは行為と組み合わせること；ならびに/または記載される実施形態からの特徴、要素および/もしくは行為を組み合わせることを省略することにより得られるバリエーションを含む、当業者に明らかであろう記載される実施形態におけるバリエーションを含む。

10

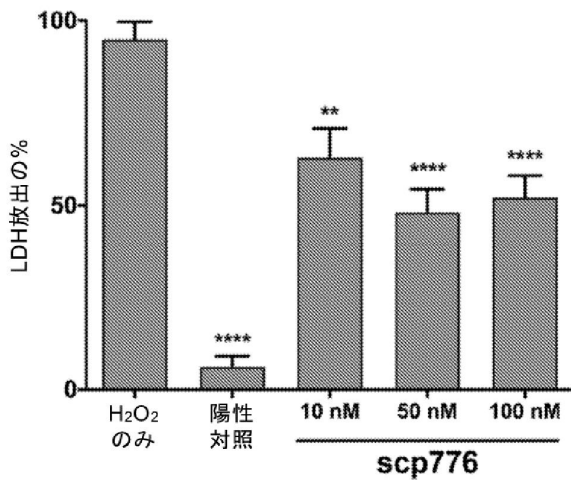
【0293】

参照による組込み

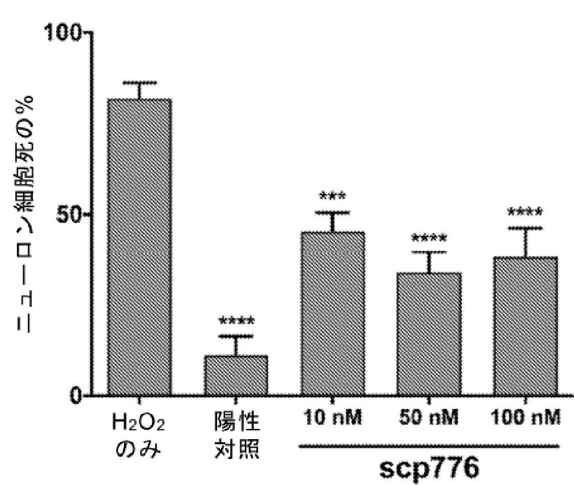
本明細書で言及されるすべての刊行物、特許および配列データベースエントリーは、各々の個々の刊行物または特許が参照により組み込まれることを特におよび個々に指し示されたかのようにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

【図1】



【図2】



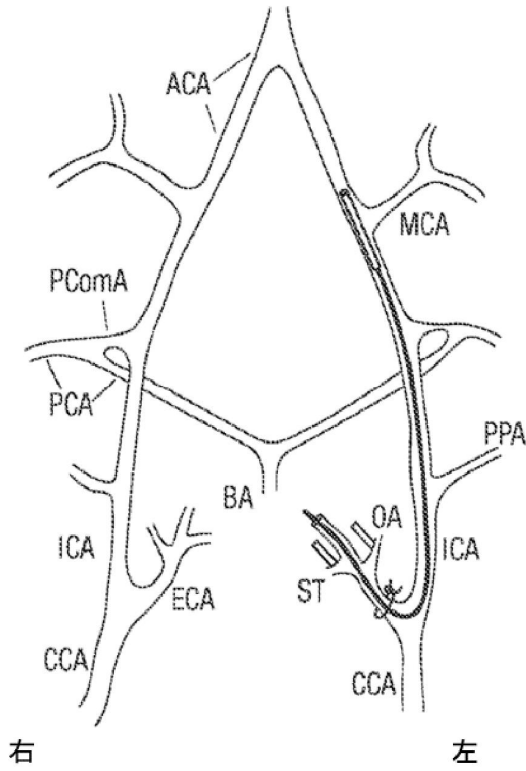
20

30

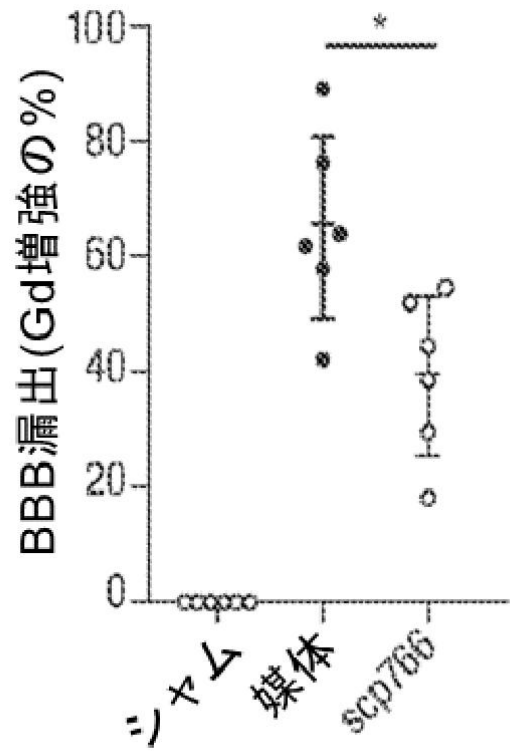
40

50

【 図 3 】



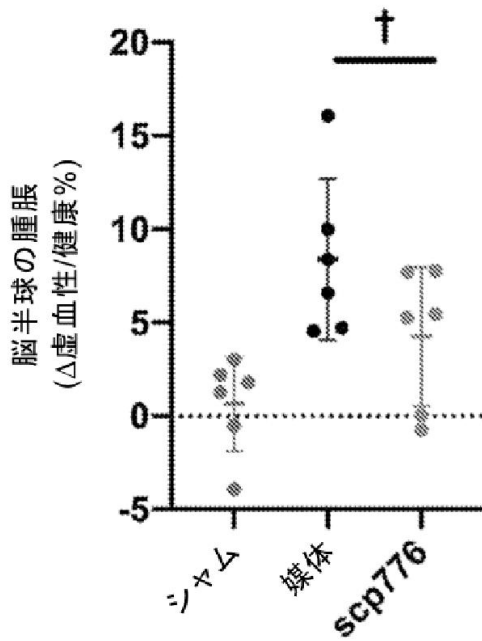
【 図 4 】



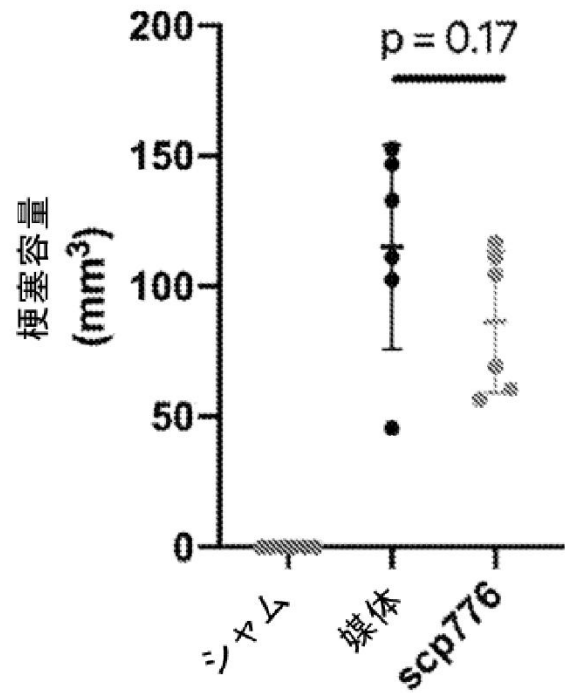
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

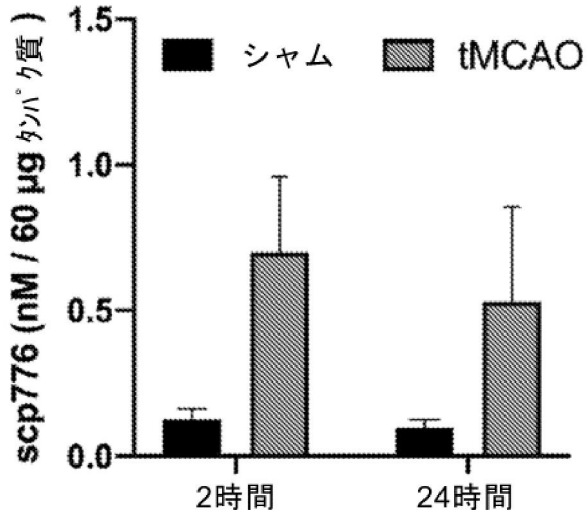


30

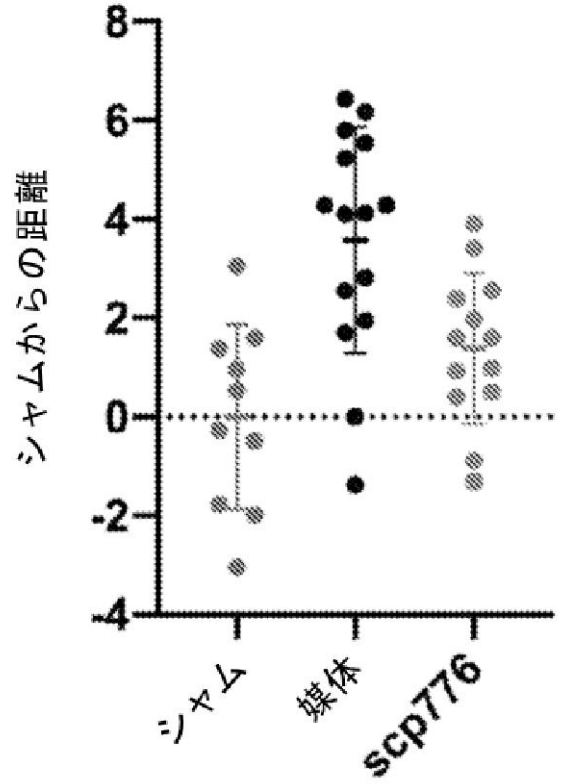
40

50

【図7】



【図8】

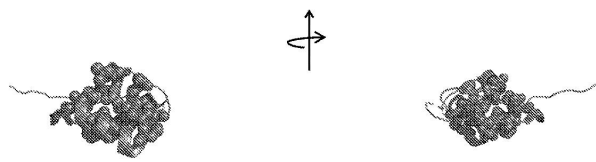


10
20

【図9】

GPETLCGAEL VDAIQFVCGD RGFYFNKPTG YGSSRRAPQ TGIVDECCFR
 SCDLRRLEMY CAPLKPAKSA (配列番号1)
 XXXXLXXXL XXXLXXXCXX XXFXFXXXXX XXXXXXXXXXXX XXIXXXCXX
 XCXLXXXLXXX CXXXXXXXXXX

【図10】

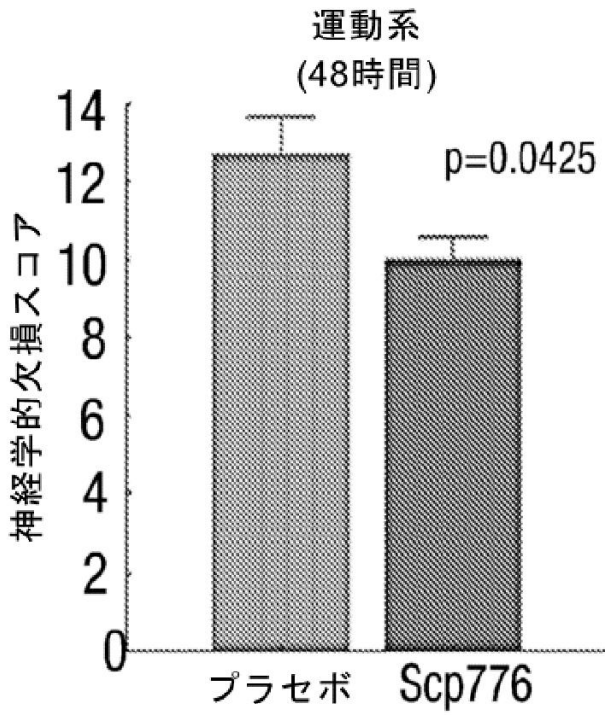


30

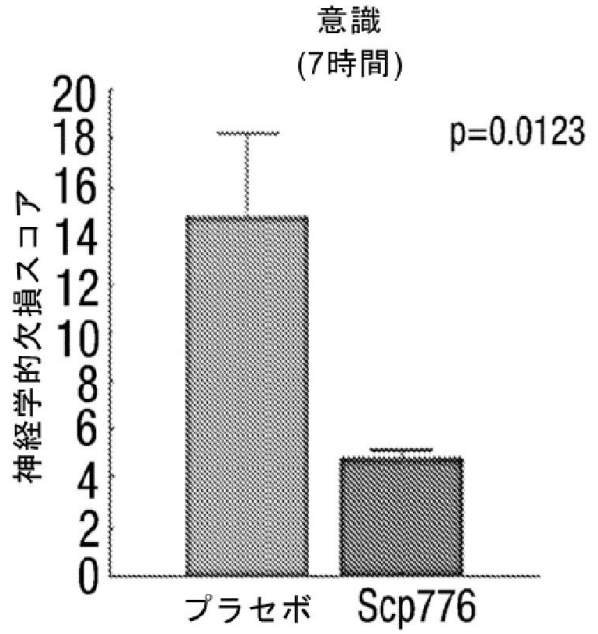
40

50

【図 1 1 A】



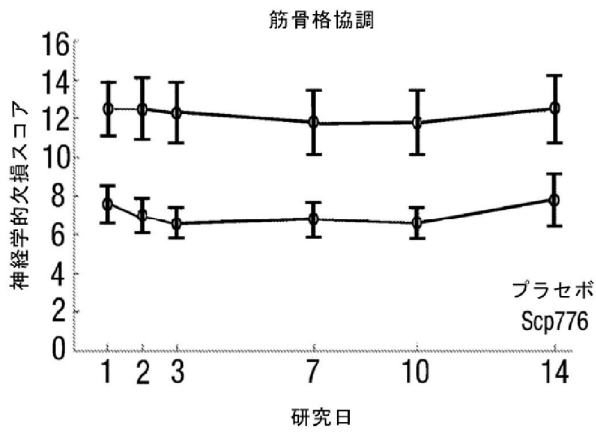
【図 1 1 B】



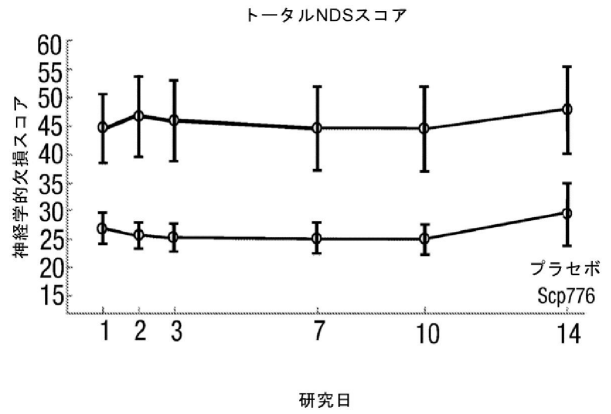
10

20

【図 1 1 C】



【図 1 1 D】

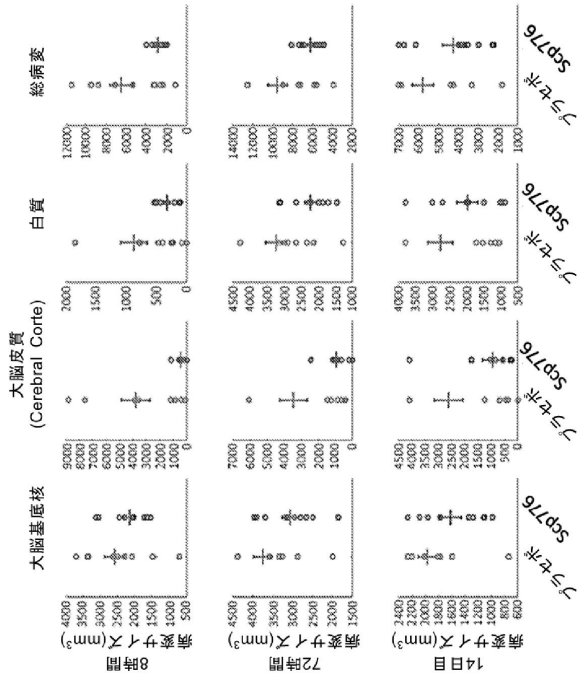


30

40

50

【 図 1 2 】



10

20

【 配列表 】

202353731800001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/44019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 38/00; C12N 15/62 (2021.01) CPC - A61P 25/00; C07K 2319/00; A61K 38/00; C12N 15/115; A61K 47/66; A61K 9/0019; A61M 2205/00; A61M 5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	US 2020/0207826 A1 (SILVER CREEK PHARMA INC) 02 July 2020; paragraphs [0177], [0176], [0179], [0232], [0238], [0438], claim 1	1-5, 8-9, 15 ---
Y	WO 2012/145183 A2 (PFIZER INC, et al.) October 28, 2012; page 22, lines 1-9; page 23, line 14; page 33, lines 20-32; page 35, lines 4-10; page 34, lines 27-28	10 11, 16-20
Y	WO 2008/079290 A2 (AMGEN INC, et al.) July 03, 2008; paragraphs [00165], [00187], [00193], table 3	16-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 December 2021 (16.12.2021)		Date of mailing of the international search report JAN 18 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/44019

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/44019

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

20

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I+, Claims 1-20; C316 mutation (human Annexin 5 mutation); E3 mutation (human insulin-like growth factor IGF-1 mutation); C58 mutation (human serum albumin mutation); mitigation of oxidative damage in primary cortical cultures (effect)

30

Remark on Protest

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

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/44019

.-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking.-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-20, C316 mutation (human Annexin 5 mutation), E3 mutation (human insulin-like growth factor IGF-1 mutation), and C58 mutation (human serum albumin mutation) are directed toward methods and kits for treating acute central nervous systems disorders with chimeric proteins and pharmaceutical compositions comprising such chimeric proteins.

10

The methods and kits will be searched to the extent that they encompass a chimeric protein comprising a C316 mutation (first exemplary human Annexin 5 mutation), a E3 mutation (first exemplary human insulin-like growth factor IGF-1 mutation), a C58 mutation (first exemplary human serum albumin mutation), and mitigation of oxidative damage in primary cortical cultures (first exemplary effect). Applicant is invited to elect additional mutation(s) and/or effect(s), to be searched. Additional mutation(s) and/or effect(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-5 (each In-part), 8-16 (each In-part), and 17-20 (each In-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a C316 mutation (human Annexin 5 mutation), E3 mutation (human insulin-like growth factor IGF-1 mutation), C58 mutation (human serum albumin mutation), and mitigation of oxidative damage in primary cortical cultures (effect). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected mutation(s) and/or effect(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a Y24 mutation (human insulin-like growth factor IGF-1 mutation) and a N527 mutation (human serum albumin mutation).

No technical features are shared between the mutations and effects of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a method of treating acute central nervous system injury, the method comprising administering by bolus injection to a subject in need thereof a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a chimeric protein and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the chimeric protein comprises (a) a targeting domain comprising a variant of human Annexin 5 (AnxV) comprising one or more mutations; (b) an activator domain comprising a variant of human insulin-like growth factor IGF-1 comprising one or more mutations, and (c) a half-life modulator comprising a variant of human serum albumin (HSA) comprising one or more mutations; a kit for practicing the method, the kit comprising a plurality of individual containers, each individual container comprising about 20 mg to about 1,000 mg of the chimeric protein; a kit for treating acute central nervous system injury, the kit comprising: (a) a plurality of individual containers, each individual container comprising a volume of a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a chimeric protein and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the pharmaceutical composition is formulated for bolus injection, wherein the chimeric protein comprises (i) a targeting domain comprising a variant of human Annexin 5 (AnxV) comprising one or more mutations; (ii) an activator domain comprising a variant of human insulin-like growth factor IGF-1 comprising one or more mutations, wherein the one or more mutations, and (iii) a half-life modulator comprising a variant of human serum albumin (HSA) comprising one or more mutations, and combinations thereof, wherein each of the plurality of the individual containers comprises a volume ranging from about 1 ml to about 50 ml, wherein each of the plurality of the individual containers comprises an amount of chimeric protein ranging from about 20 mg to about 1,000 mg; and (b) instructions for use in treating acute central nervous system injury; these shared technical features are previously disclosed by US 2020/0207826 A1 (SILVER CREEK PHARMACEUTICALS, INC.) (hereinafter 'Silver') in view of WO 2008/079290 A2 (AMGEN INC.) (hereinafter 'Amgen').

20

Silver discloses a method of treating acute central nervous system injury (method of treating ischemic stroke (acute central nervous system injury); paragraphs [0431], [0438]), the method comprising administering by bolus injection to a subject in need thereof a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a chimeric protein and a pharmaceutically acceptable carrier (the method comprising administering by bolus injection to a subject in need thereof a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a chimeric protein and a pharmaceutically acceptable carrier; paragraphs [0232], [0236], [0438], [0467]), wherein the chimeric protein comprises (a) a targeting domain comprising a variant of human Annexin 5 (AnxV) comprising one or more mutations (wherein the chimeric protein comprises (a) a targeting domain comprising a variant of human Annexin 5 (AnxV) comprising one or more mutations; paragraphs [0017], [0025]; claim 1); (b) an activator domain comprising a variant of human insulin-like growth factor IGF-1 comprising one or more mutations; claim 1), and (c) a half-life modulator comprising a variant of human serum albumin (HSA) comprising one or more mutations (a half-life modulator comprising a variant of human serum albumin comprising one or more mutations; figure 10; paragraphs [0014], [0020]); a kit for practicing the method (a kit for practicing the method; paragraph [0429]), the kit comprising a container (paragraph [0428]); a kit for treating acute central nervous system injury (a kit for treating ischemic stroke (acute central nervous system injury); paragraphs [0428]-[0429], [0431], [0438]), a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a chimeric protein and a pharmaceutically acceptable carrier (kit comprising one or more of the bi-specific proteins for use to treat tissue damage wherein pharmaceutical compositions comprise a therapeutically effective amount of a chimeric protein and a pharmaceutically acceptable carrier; paragraphs [0231], [0428]-[0429], [0467]), wherein the pharmaceutical composition is formulated for bolus injection (wherein the pharmaceutical composition is formulated for bolus injection; paragraph [0438]), wherein the chimeric protein comprises (i) a targeting domain comprising a variant of human Annexin 5 (AnxV) comprising one or more mutations (wherein the chimeric protein comprises (a) a targeting domain comprising a variant of human Annexin 5 (AnxV) comprising one or more mutations; paragraphs [0017], [0025]; claim 1); (ii) an activator domain comprising a variant of human insulin-like growth factor IGF-1 comprising one or more mutations (an activator domain comprising a variant of human insulin-like growth factor IGF-1 comprising one or more mutations; claim 1), and (iii) a half-life modulator comprising a variant of human serum albumin (HSA) comprising one or more mutations (a half-life modulator comprising a variant of human serum albumin comprising one or more mutations; figure 10; paragraphs [0014], [0020]), and combinations thereof; and (b) instructions for use in treating acute central nervous system injury (instructions for use in treating acute central nervous system injury; paragraph [0428]-[0429], [0431], [0438]). Silver further discloses 20 mg to 1,000 mg of the chimeric protein (paragraph [0443]).

30

Silver does not disclose the kit comprising a plurality of individual containers, each individual container comprising about 20 mg to about 1,000 mg of the chimeric protein; the kit comprising: (a) a plurality of individual containers, each individual container comprising a volume

40

.-***-Continued Within the Next Supplemental Box.-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US21/44019

-Continued from previous Supplemental Box-

of a pharmaceutical composition, wherein each of the plurality of the individual containers comprises a volume ranging from about 1 ml to about 50 ml, wherein each of the plurality of the individual containers comprises an amount of chimeric protein ranging from about 20 mg to about 1,000 mg.

Amgen discloses the kit comprising a plurality of individual containers (kit comprising a plurality of vials (individual containers); paragraphs [00165], [00187]); the kit comprising: (a) a plurality of individual containers, each individual container comprising a volume of a pharmaceutical composition (each individual container comprising a volume of a pharmaceutical composition; paragraph [00193]), wherein each of the plurality of the individual containers comprises a volume ranging from about 1 ml to about 50 ml (wherein each of the plurality of the individual containers comprises a volume ranging from about 1 ml to about 50 ml; paragraph [00193]); wherein each of the plurality of the individual containers comprises an amount of chimeric protein ranging from about 20 mg to about 1,000 mg (wherein each of the plurality of the individual containers comprises an amount of protein ranging from about 20 mg to about 1,000 mg; Table 3).

10

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure Silver to include a kit comprising a plurality of individual containers, each individual container comprising about 20 mg to about 1,000 mg of the chimeric protein; the kit comprising: (a) a plurality of individual containers, each individual container comprising a volume of a pharmaceutical composition, wherein each of the plurality of the individual containers comprises a volume ranging from about 1 ml to about 50 ml, wherein each of the plurality of the individual containers comprises an amount of chimeric protein ranging from about 20 mg to about 1,000 mg, as disclosed by Amgen, in order to provide new formulations that retain increased stability of a biopharmaceutical under a variety of different manufacturing and storage conditions, for faster administration by bolus injection to subject in need thereof.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Silver and Amgen references, unity of invention is lacking.

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 39/06 (2006.01)	A 6 1 P 39/06	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 47/65	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/475 (2006.01)	C 0 7 K 14/475	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 0 7 K 14/765 (2006.01)	C 0 7 K 14/765	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

アメリカ合衆国 9 4 1 3 2 カリフォルニア州サンフランシスコ、トゥエンティフォース・アベニ
ュー 3 0 9 0

(72)発明者 ジャン, ヤン

アメリカ合衆国 9 4 1 2 1 カリフォルニア州サンフランシスコ、トゥエンティフォース・アベニ
ュー 5 3 9

(72)発明者 クッチェンベッカー, クリストファー エム

アメリカ合衆国 8 5 0 1 8 アリゾナ州フェニックス、イースト・カーネーション・サークル 6 1 1
9

(72)発明者 チャウラ, ラクミル エス

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、ジマー・コーブ 5 0 1 0

F ターム (参考) 4C076 AA11 AA94 BB11 BB13 BB14 CC01 CC09 CC11 EE41 EE59

FF31 FF34 FF68

4C084 AA02 AA03 BA01 BA20 BA23 BA41 MA16 MA66 NA14 ZA01

ZA15 ZA16 ZA36 ZA94 ZC37

4H045 BA10 CA40 CA42 EA20 FA74