

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-526785
(P2009-526785A)

(43) 公表日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47 ZNA	4C084
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4C085
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08	4H045
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-554593 (P2008-554593)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月12日 (2007.2.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月9日 (2008.10.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2007/000070
 (87) 国際公開番号 WO2007/093177
 (87) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23)
 (31) 優先権主張番号 PA200600212
 (32) 優先日 平成18年2月14日 (2006.2.14)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

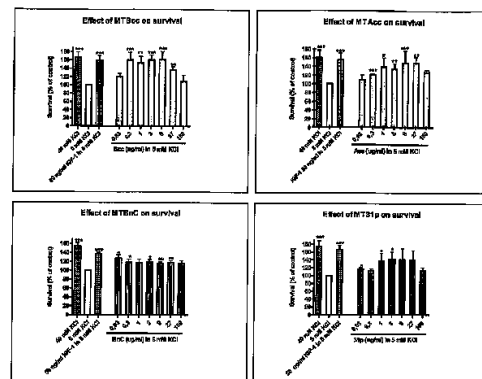
(71) 出願人 508246777
 ウラディミール, ベレジン
 Vladimir, BEREZIN
 デンマーク ディーケー-2200 コペンハーゲン エヌ, ノレプロゲイド 223, 1. ティエイチ.
 (71) 出願人 508246788
 エリザベス, ボック
 Elisabeth, BOCK
 デンマーク ディーケー-2920 チャーロッテンルンド, トニスヴェグ 20

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メタロチオネイン由来ペプチド断片

(57) 【要約】

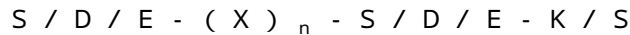
本発明は、神経細胞の生存、分化および増殖を促進するメタロチオネイン (MT) 由来のペプチド断片と、該ペプチド断片を含む薬学的組成物と、神経細胞の増殖、分化および/または生存を促進する効果、および/または学習や記憶に関与する神経可塑性を促進する効果が治療に有益である疾患および病態の治療のための前記薬学的組成物の使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の化学式



(式中、 $(X)_n$ は任意のアミノ酸残基の配列であり、 n は 4 ~ 6 の整数である) で表されるアミノ酸モチーフを含む、最大 25 個の連続するアミノ酸残基を含むペプチド。

【請求項 2】

n が 4 である、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

n が 6 である、請求項 1 に記載のペプチド。

10

【請求項 4】

前記アミノ酸配列 (X) が、K、S、E または C のアミノ酸残基の少なくとも 1 つを含む、請求項 2 または 3 に記載のペプチド。

【請求項 5】

前記ペプチドが、請求項 1 に記載のモチーフを含む、約 10 個のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が少なくとも 1 つのアミノ酸残基 G を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 6】

アミノ酸残基 G が、請求項 1 に記載のモチーフのアミノ酸残基 S / D / E の前に配置される、請求項 5 に記載のペプチド。

20

【請求項 7】

前記モチーフの 2 つのアミノ酸残基 S / D / E の 1 つが、アミノ酸残基 C で置換される、請求項 6 に記載のペプチド。

【請求項 8】

前記ペプチドが約 15 個のアミノ酸残基、例えば 13 ~ 17 個のアミノ酸残基を含む、先行する請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9】

前記ペプチドが、以下の配列から選択されるアミノ酸配列、またはその断片もしくは変異体を含む、請求項 8 に記載のペプチド：

30

K K S S C S C S P V G S A K (配列番号 1)

A Q G S I S K G A S D K S S (配列番号 2)

M D P N S S S A A G D S S T (配列番号 3)

S A G S S K S K E S K S T S (配列番号 4)

A Q G S I C K G A S D K S S (配列番号 5)

M D P N C S C A A G D S S T (配列番号 6)

S A G S C K C K E S K S T S (配列番号 7)

K G G E A A E A E A E K (配列番号 8) ,

【請求項 10】

前記アミノ酸配列が、メタロチオネインタンパク質ファミリーのタンパク質のサブ配列と相同性を示し、前記タンパク質が、ヒトの

40

メタロチオネイン - 1 A (M T 1 A)、メタロチオネイン - 1 B (M T 1 B)、

メタロチオネイン - 1 E (M T 1 E)、メタロチオネイン - 1 F (M T 1 F)、

メタロチオネイン - 1 G (M T 1 G)、メタロチオネイン - 1 H (M T 1 H)、

メタロチオネイン - 1 I (M T 1 I)、メタロチオネイン - 1 K (M T 1 K)、

メタロチオネイン - 1 L (M T 1 L)、メタロチオネイン - 1 R (M T 1 R)、

メタロチオネイン - 1 X (M T 1 X)、メタロチオネイン - 2 (M T 2)、

メタロチオネイン - 3 (M T 3)、またはメタロチオネイン - 4 (M T 4)

から選択される、請求項 9 に記載のペプチド。

【請求項 11】

前記サブ配列が、以下のアミノ酸配列の 1 つを含む、請求項 10 に記載のペプチド：

50

K K S C C S C C P M S C A K (配列 番号 9)	
K K C C C S C C P V G C A K (配列 番号 1 0)	
K K S C C S C C P V G C A K (配列 番号 1 1)	
K K S C C S C C P V G C S K (配列 番号 1 2)	
K K S C C S C C P V G C A K (配列 番号 1 3)	
K K S C C S C C P L G C A K (配列 番号 1 4)	
K K S C C S C C P V G C A K (配列 番号 1 5)	
K K S C C S C C P V G C A K (配列 番号 1 6)	
K K S C C S C C P V G C A K (配列 番号 1 7)	
K K S C C S C C P M G C A K (配列 番号 1 8)	10
K K S C C S C C P V G C A K (配列 番号 1 9)	
K K S C C S C C P V G C A K (配列 番号 2 0)	
K K S C C S C C P A E C E K (配列 番号 2 1)	
R K S C C P C C P P G C A K (配列 番号 2 2)	
A Q G C I C K G A S E K C S (配列 番号 2 3)	
A Q G C V C K G S S E K C S (配列 番号 2 4)	
A Q G C V C K G A S E K C S (配列 番号 2 5)	
A Q G C V C K G A S E K C S (配列 番号 2 6)	
A Q G C I C K G A S E K C S (配列 番号 2 7)	
A Q G C I C K G A S E K C S (配列 番号 2 8)	20
A Q G C I C K G A S E K C S (配列 番号 2 9)	
A Q G C I C K G A S E K C S (配列 番号 3 0)	
A Q G C I C K G T S D K C S (配列 番号 3 1)	
A Q G C V C K G A S E K C S (配列 番号 3 2)	
A Q G C I C K G T S D K C S (配列 番号 3 3)	
A Q G C I C K G A S D K C S (配列 番号 3 4)	
A K D C V C K G G E A A E A E A E K C S (配列 番号 3 5)	
A R G C I C K G G S D K C S (配列 番号 3 6)	
M D P N C S C A T G G S C T (配列 番号 3 7)	
M D P N C S C T T G G S C A (配列 番号 3 8)	30
M D P N C S C A T G G S C T (配列 番号 3 9)	
M D P N C S C A A G V S C T (配列 番号 4 0)	
M D P N C S C A A G V S C T (配列 番号 4 1)	
M D P N C S C E A G G S C A (配列 番号 4 2)	
M D P N C S C A A G V S C T (配列 番号 4 3)	
M D P N C S C A A A G V S C T (配列 番号 4 4)	
M D P N C S C S P V G S C A (配列 番号 4 5)	
M D P N C S C A T G G S C S (配列 番号 4 6)	
M D P N C S C D P V G S C A (配列 番号 4 7)	
M D P N C S C A A G D S C T (配列 番号 4 8)	40
M D P E T C P C P S G G S C T (配列 番号 4 9)	
M D P R E C V C M S G G I C M (配列 番号 5 0)	
C T G S C K C K E C K C N S (配列 番号 5 1)	
C A G S C K C K E C K C T S (配列 番号 5 2)	
C A G S C K C K E C K C T S (配列 番号 5 3)	
C A G S C K C K E C K C T S (配列 番号 5 4)	
C A S S C K C K E C K C T S (配列 番号 5 5)	
C A G S C K C K K C K C T S (配列 番号 5 6)	
C A G S C K C K E C K C T S (配列 番号 5 7)	
C A S S C K C K E C K C T S (配列 番号 5 8)	50

C A G S C K C K E C K C T S (配列番号 5 9)
 C A S S C K C K E C K C T S (配列番号 6 0)
 C A G S C K C K E C K C T S (配列番号 6 1)
 C A G S C K C K E C K C T S (配列番号 6 2)
 C A D S C K C E G C K C T S (配列番号 6 3)
 C G D N C K C T T C N C K T (配列番号 6 4) .

【請求項 1 2】

前記サブ配列が、配列番号 9 ~ 2 2 として同定される配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列である、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 3】

前記サブ配列が、配列番号 2 3 ~ 3 6 として同定される配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列である、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 4】

前記サブ配列が、配列番号 3 7 ~ 5 0 として同定される配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列である、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 5】

前記サブ配列が、配列番号 5 1 ~ 6 4 として同定される配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列である、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 6】

前記アミノ酸配列が、M T 1 A のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 9 、 2 3 、 3 7 または 5 1 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 7】

前記アミノ酸配列が、M T 1 B のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 0 、 2 4 、 3 8 または 5 2 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 8】

前記アミノ酸配列が、M T 1 E のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 1 、 2 5 、 3 9 または 5 3 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 9】

前記アミノ酸配列が、M T 1 F のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 2 、 2 6 、 4 0 または 5 4 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 2 0】

前記アミノ酸配列が、M T 1 G のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 3 、 2 7 、 4 1 または 5 5 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 2 1】

前記アミノ酸配列が、M T 1 H のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 4 、 2 8 、 4 2 または 5 6 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 2 2】

前記アミノ酸配列が、M T 1 I のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 5 、 2 9 、 4 3 または 5 7 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 2 3】

前記アミノ酸配列が、M T 1 K のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 6 、 3 0 、 4 4 または 5 8 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 2 4】

前記アミノ酸配列が、M T 1 L のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 7 、 3 1 、 4 5 または 5 9 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 2 5】

前記アミノ酸配列が、M T 1 R のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1 8 、 3 2 、 4 6 または 6 0 から選択される、請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 2 6】

前記アミノ酸配列が、M T 1 X のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号 1

10

20

30

40

50

9、33、47または61から選択される、請求項10に記載のペプチド。

【請求項27】

前記アミノ酸配列が、MT2のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号20、34、48または62から選択される、請求項10に記載のペプチド。

【請求項28】

前記アミノ酸配列が、MT3のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号21、35、49または63から選択される、請求項10に記載のペプチド。

【請求項29】

前記アミノ酸配列が、MT4のサブ配列と同一性を示し、該サブ配列が、配列番号22、36、50または64から選択される、請求項10に記載のペプチド。

10

【請求項30】

前記ペプチドが、受容体に結合する能力、および/または細胞の生存および/または細胞の分化および/または記憶や学習に参与する細胞可塑性を促進する能力、および/または炎症を抑制する能力を有する、先行する請求項のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項31】

前記細胞が神経系の細胞である、請求項30に記載のペプチド。

【請求項32】

前記細胞がニューロン細胞である、請求項31に記載のペプチド。

【請求項33】

前記受容体がメガリンである、請求項30に記載のペプチド配列。

20

【請求項34】

前記受容体がメタロチオネイン(MT)である、請求項30に記載のペプチド配列。

【請求項35】

前記メタロチオネインが、ヒトの
メタロチオネイン-1A(MT1A)、
メタロチオネイン-1B(MT1B)、
メタロチオネイン-1E(MT1E)、
メタロチオネイン-1F(MT1F)、
メタロチオネイン-1G(MT1G)、
メタロチオネイン-1H(MT1H)、
メタロチオネイン-1I(MT1I)、
メタロチオネイン-1K(MT1K)、
メタロチオネイン-1L(MT1L)、
メタロチオネイン-1R(MT1R)、
メタロチオネイン-1X(MT1X)、
メタロチオネイン-2(MT2)、
メタロチオネイン-3(MT3)、またはメタロチオネイン-4(MT4)
から選択される、請求項34に記載のペプチド。

30

【請求項36】

前記メタロチオネインがMT2である、請求項35に記載のペプチド。

40

【請求項37】

前記ペプチドが、配列番号1~64から選択されるアミノ酸配列、または該配列の断片もしくは変異体を含む、先行する請求項のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項38】

前記変異体が、配列番号1~64の配列から選択される配列と少なくとも65%の配列類似性を有し、かつ配列番号1~64から選択される配列の少なくとも1つの機能活性を有する少なくとも6個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列である、請求項9または37に記載のペプチド。

【請求項39】

配列番号1~8から選択される配列から構成されるペプチド。

50

【請求項 40】

メタロチオネインの断片であるペプチドであって、
 該ペプチドが最大20個のアミノ酸残基からなる配列であり、該配列が、神経突起の伸長を促進する能力、ニューロンの生存を促進する能力、学習や記憶に關与する神経可塑性を促進する能力、および/または炎症を抑制する能力を有する、ペプチド。

【請求項 41】

メタロチオネインが、
 メタロチオネイン - 1A (MT1A)、メタロチオネイン - 1B (MT1B)、
 メタロチオネイン - 1E (MT1E)、メタロチオネイン - 1F (MT1F)、
 メタロチオネイン - 1G (MT1G)、メタロチオネイン - 1H (MT1H)、
 メタロチオネイン - 1I (MT1I)、メタロチオネイン - 1K (MT1K)、
 メタロチオネイン - 1L (MT1L)、メタロチオネイン - 1R (MT1R)、
 メタロチオネイン - 1X (MT1X)、メタロチオネイン - 2 (MT2)、
 メタロチオネイン - 3 (MT3)、またはメタロチオネイン - 4 (MT4)
 から選択されるヒトのメタロチオネインである、請求項40に記載のペプチド。

10

【請求項 42】

前記ペプチドが、配列番号9~64から選択される配列、または該配列の断片もしくは変異体を含む、請求項41に記載のペプチド。

【請求項 43】

前記ペプチドが、配列番号9~64から選択される配列、または該配列の断片または変異体からなる、請求項42に記載のペプチド。

20

【請求項 44】

請求項1~43のいずれか1項に記載のペプチドを含む化合物。

【請求項 45】

前記化合物が、前記ペプチドのシングルコピーを含む、請求項44に記載の化合物。

【請求項 46】

前記化合物が、前記ペプチドの複数のコピーからなる多量体、例えば二量体または四量体として配合される、請求項44に記載の化合物。

【請求項 47】

前記多量体がデンドリマーである、請求項46に記載の化合物。

30

【請求項 48】

神経突起の伸長、神経細胞の生存、および/または学習や記憶に關与する神経可塑性を促進する能力を有する化合物としての、請求項1~43のいずれか1項に記載のペプチド、または請求項44~47のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【請求項 49】

請求項1~43のいずれか1項に記載のペプチド、または請求項44~47に記載の化合物を使用することを含む、神経細胞の生存、分化、増殖、および/または記憶や学習に關与する可塑性を促進する方法。

【請求項 50】

医薬品を製造するための、請求項1~43のいずれか1項に記載のペプチド、または請求項44~47のいずれか1項に記載の化合物の使用。

40

【請求項 51】

前記医薬品が病態または疾患の治療に使用され、神経細胞の生存、分化、増殖および/または学習や記憶に關与する可塑性の促進が、治療に有益である、請求項50に記載の使用。

【請求項 52】

前記病態または疾患が、中枢神経系および末梢神経系の病態または疾患である、請求項51に記載の使用。

【請求項 53】

前記病態または疾患が、手術後の神経損傷、外傷性神経損傷、神経線維の髄鞘形成障害

50

、脳梗塞などの虚血後の損傷、糖尿病に合併する神経変性、体内時計または神経筋伝達に影響を及ぼす疾患から選択される、請求項 5 1 に記載の使用。

【請求項 5 4】

前記医薬品が、臓器移植後の、あるいは遺伝性または外傷性筋萎縮性疾患などの、神経筋接合部の機能障害を伴う病態を含む筋肉の病態または疾患から選択される病態または疾患の治療に使用される、請求項 5 0 に記載の使用。

【請求項 5 5】

前記医薬品が癌の治療に使用される、請求項 5 0 に記載の使用。

【請求項 5 6】

前記癌が血管新生を伴う何らかの癌である、請求項 5 5 に記載の使用。

【請求項 5 7】

前記癌が神経系の癌である、請求項 5 5 に記載の使用。

【請求項 5 8】

前記病態または疾患が、学習能力障害および / または記憶障害である、請求項 5 1 に記載の使用。

【請求項 5 9】

前記病態または疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、または多発脳梗塞性認知症などの認知症である、請求項 5 8 に記載の使用。

【請求項 6 0】

前記病態または疾患が、思考および / または気分障害などの精神疾患、双極性障害 (B P D) を含む精神神経疾患、遺伝関連性単極性情動障害、妄想性障害、パラフレニー、妄想性精神病、統合失調症、統合失調症性障害、統合失調性感情障害、統合失調性双極性感情障害および遺伝関連性単極性情動障害、心因性精神病、緊張病、周期性双極性感情障害および遺伝関連性単極性情動障害、循環型精神病、分裂病質人格障害、妄想性人格障害、双極性情動障害関連性情動障害および遺伝関連性単極性情動障害関連性情動障害、単極性情動障害の亜型などの精神疾患である、請求項 5 1 に記載の使用。

【請求項 6 1】

前記医薬品が、アルコールの消費による身体の損傷の治療に使用される、請求項 5 0 に記載の使用。

【請求項 6 2】

前記医薬品が、プリオン病の治療に使用される、請求項 5 0 に記載の使用。

【請求項 6 3】

前記医薬品が、持続性炎症反応の存在を特徴とする病態または疾患の治療に使用される、請求項 5 0 に記載の使用。

【請求項 6 4】

前記病態または疾患が、脳の炎症または自己免疫性疾患である、請求項 6 3 に記載の使用。

【請求項 6 5】

前記病態または疾患が、ギラン・バレー症候群、ミラー・フィッシャー症候群などのその異型、または別の補体依存性神経筋疾患である、請求項 6 3 に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 66】

抗体を産生するための、請求項 1 ~ 43 のいずれか 1 項に記載のペプチド、または請求項 44 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

【請求項 67】

請求項 1 に記載のアミノ酸モチーフ、または請求項 1 ~ 43 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含むエピトープを認識し、結合する能力を有する、抗体、抗原結合断片、またはそれらの変異体。

【請求項 68】

前記エピトープが、配列番号 1 ~ 64 から選択されるアミノ酸配列、または前記配列の断片もしくは変異体を含む、請求項 67 に記載の抗体。

10

【請求項 69】

請求項 1 ~ 43 のいずれか 1 項に記載のペプチド、または請求項 44 ~ 47 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む薬学的組成物。

【請求項 70】

請求項 67 ~ 68 に記載の抗体を含む薬学的組成物。

【請求項 71】

請求項 1 ~ 43 に記載のペプチド、請求項 44 ~ 47 に記載の化合物、または請求項 69 もしくは 70 に記載の薬学的組成物の有効量を、必要とする個体に投与することを含む、病態または疾患を治療する方法。

20

【請求項 72】

請求項 1 ~ 43 のいずれか 1 項に記載のペプチド配列、請求項 44 ~ 47 に記載の化合物、または請求項 67 ~ 68 に記載の抗体を使用することを含む、試料中のメタロチオネインタンパク質を検出する方法。

【請求項 73】

請求項 1 ~ 43 に記載の少なくとも 1 つのペプチド、請求項 44 ~ 47 に記載の化合物、および / または請求項 67 ~ 68 に記載の抗体を含むキット。

【請求項 74】

前記少なくとも 1 つのペプチド、化合物、および / または抗体が、検出可能な標識を含む、請求項 73 に記載のキット。

30

【請求項 75】

前記キットが、試料中のメタロチオネインの濃度を評価するステップを含む診断法で使用される、請求項 72 ~ 74 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経細胞の生存、分化および増殖を促進するメタロチオネイン (MT) 由来のペプチド断片、前記ペプチド断片を含む薬学的組成物、および神経細胞の増殖、分化および / または生存を促進する効果、および / または学習や記憶に關与する神経可塑性を促進する効果が治療に有益である疾患および病態の治療へのそれらの使用に関する。

40

【背景技術】

【0002】

メタロチオネイン (MT) は、遍在的に発生する、硫黄系の金属クラスターを含有する低分子量のシステインリッチおよび金属リッチタンパク質群である。これらのクラスターが無脊椎動物、脊椎動物および細菌の MT の三次元構造中に保存されることが多くなっていることから、この構造モチーフの重要性が示されている。哺乳動物の MT が、亜鉛ホモオスタシスへの關与、重金属毒性や酸化損傷からの保護を含む多種多様の機能を有することが次第に明らかになってきている (Vasak et al., 2005)。哺乳動物の MT は、N 末端にアセチルメチオニンを、さらに多くの場合カルボキシル末端にアラニ

50

ンを有する、61、60または68個のアミノ酸残基の、一本鎖のポリペプチドである。哺乳動物のMTは、20個のシステイン残基を含有し、これらが金属結合の中心となる。MTは、特有のC-X-C、C-Y-C、およびC-C配列を有する(式中、XおよびYはシステイン以外のアミノ酸である)。20個のシステインごとに7個の二価イオンが存在し、金属チオラート錯体を形成する(2個のドメイン構造において、1モルのMTにつき7~10gの金属原子)(Hussain et al., 1996)。

【0003】

MTの亜群には、MT1、MT2、MT3およびMT4の4個が存在する。1つの負電荷のみが異なるMT1とMT2のアイソフォームは、

種々の組織に最も広く発現しているアイソフォームである。ヒトMT遺伝子は、染色体16番上の単一の遺伝子座においてクラスターを形成しており、これまでに同定された17個のうちの少なくとも14個の遺伝子が機能している。これらの遺伝子は、MT1(MT1A、B、E、F、G、H、I、K、LおよびX)、MT2、MT3、およびMT4の複数のアイソフォームをエンコードしている(Miles et al., 2000)。

【0004】

MTの発現を誘導し得る刺激物は、金属、ホルモン(例えば、糖質コルチコイド)、サイトカイン、その他種々の化学物質、炎症、およびストレスである。MTの分解は主にリソソーム内で行われる。金属が結合した状態では、MTのタンパク質分解が起こりにくいと考えられている。in vivoでは、金属-MTの半減期がアポMTよりもはるかに長い(Miles et al., 2000)。

【0005】

MT1およびMT2は脳および脊髄の至るところに存在し、これらのMTアイソフォームを発現している主な細胞種は星状細胞である。しかし、上皮細胞、脈絡叢の上皮細胞、軟膜の髄膜細胞、および血管の内皮細胞にもMT1およびMT2の発現が認められた(Hidalgo et al., 2001)。

【0006】

MTは、金属ホメオスタシスを維持し、フリーラジカルに対するスカベンジ作用を有するストレス誘導タンパク質である。MTの主要な機能が金属代謝に関与していることが一般的に認められている。想定される機能としては、食事の変化と生理学的変化に応じた細胞の銅代謝および亜鉛代謝の調節、ならびに重金属の解毒と保存が挙げられる。星状細胞は、上皮細胞と同様に、MTを豊富に発現しているため、この2個の細胞種は、血液または脳脊髄液から実質的に輸送される金属から中枢神経系を保護するために働くという興味をそそる仮説がある。アルツハイマー病罹患体では、大脳白質は、強い免疫反応性を示す細胞体を有するMT1およびMT2を発現した星状細胞を多数の含んでいる(Zambenedetti et al., 1998)。慢性炎症は、アルツハイマー病の病因に免疫学的要素が含まれる可能性を高めていると仮定している。例えば、アルツハイマー病においてサイトカインやインターロイキン(IL)-1が上昇すると、星状細胞におけるMT1およびMT2の産生が誘導されるが、このことは、いくつかの金属イオンの浸透圧調節に関与する複合的な代償機序をもって酸化損傷、傷害および炎症に対する長期的な防御を提供する上で、これらのタンパク質が関連する役割を有していることを示唆している。また、MT1およびMT2の発現に関する中枢神経系の損傷の明確な影響が検討されている。これらの研究では、カニン酸誘発性発作、低温傷害、虚血に反応して、また6-アミノニコチンアミドによる治療後に、これらのMTアイソフォームが劇的に誘導されることが示されている(Penkowa et al., 1995; 2000; 2001)。MT1およびMT2は、中枢神経系におけるアポトーシス細胞死の重要な抑制剤である(Giralt et al., 2002)。MT1およびMT2欠乏マウスは、てんかん発作、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、ならびに下記の外傷性脳損傷の際に、酸化ストレスとニューロン細胞のアポトーシスが増加することを示した。同様に、MT1過剰発現トランスジェニックマウスでは、外傷性脳損傷、局所脳虚血、および脳幹の6-アミノニコチンアミド(6-AN)誘導毒性の際に、酸化的な組織損傷と細胞死が著しく減少

10

20

30

40

50

することを示した。さらに、MT1およびMT2は、種々の中枢神経障害において臨床転帰を改善し、死亡率を低下する (Penkowa, 2002)。最近では、パーキンソン病の遺伝子改変マウスモデルにおいて、MTが神経保護作用を仲介することが示されている (Ebadi et al., 2005)。

【0007】

近年、MT2による治療では、ドーパミン作動性ニューロンおよび海馬ニューロンのいずれからも神経突起伸長が有意に刺激されることが示されている。さらに、MT2による治療では、6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)に曝露されたドーパミン作動性ニューロンの生存が有意に増加し、またアミロイド-βペプチド誘導神経毒性から海馬ニューロンが有意に保護される (Kohler et al., 2003)。運動ニューロン疾患、頭部損傷、アルツハイマー病、およびパーキンソン病に対して、MT2やその他のMTを使用した治療が提唱されている (国際公開WO03105910)。MTの神経突起生成作用および神経保護作用の分子機序は、現在のところ不明である。

【0008】

近年では、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質2(LRP2)/メガリンにMT1が結合すること、およびMT1中の対応する結合部位が同定されていることが示されている (Klassen et al., 2004)。

【0009】

メガリン/LRP2はスカベンジャー受容体であるが、これはその多機能結合特性によるものである。そのリガンドには、リポタンパク質、ビタミン結合および担体タンパク質、薬剤、ホルモン、および酵素、ならびにシグナル分子がある。メガリンの細胞内ドメインはシグナル伝達アダプター分子と相互作用し、これらの分子がエンドサイトーシスの調節に関与することが示されている (May et al., 2005参照)。しかし、細胞外シグナルを細胞内の結合パートナーに伝達することで、メガリンが細胞のシグナル伝達カスケードに直接関与するかどうかについては、現在のところ不明である。

【0010】

メガリンの生理学的機能の中で最も特徴的なものの一つは、近位尿細管における低分子量タンパク質の再摂取である (Zou et al., 2004)。その他の恒久的な特徴は、メガリンが適正な前脳形成に必要とされることであり、すなわち、メガリンノックアウトマウスが全前脳胞症を呈する点である (Willnow et al., 1996)。

参考文献

Vasak M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol.* 2005, 19:13-17.

Giralt M, Penkowa M, Lago N, Camats J, Hernandez J, Molinero A and Hidalgo J. Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp. Neurol.* 2002, 173pp: 114-128.

Ebadi M, Brown-Borg H, El Refaev H, Singh BB, Garret S, Shavali S and Sharma SK. Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. 2005, 134:67-75.

Hidalgo H, Aschner M, Zatta P, and Vasak M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001, 55:133-145.

Hussain S, Slikker W, and Ali SF. Role of metallothioneins and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection, *Neurochem. Int.* 1996, 29:145-152.

10

20

30

40

50

Klassen RB, Crenshaw K, Kozyraki R, Verroust PJ, Tio L, Atrian S, Allen PL, Hammond TG Megalin mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004, 287:F393-403.

Kohler LB, Berezin V, Bock E and Penkowa M. The role of metallothionein II in neuronal differentiation and survival. *Brain Res.* 2003, 992:128-136.

May P, Herz J, Bock HH. 2005 Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci.* 62:2325-2338.

10

Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000, 35:35-70.

Penkowa M and Moos T. Disruption of the blood-brain interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes. *Glia* 1995, 13:217-227.

Penkowa M and Hidalgo J, Metallothionein I+II expression and their role in experimental encephalomyelitis. *Glia* 2000, 32:247 -263.

20

Penkowa M, Giralt M, Carrasco J, Hadberg H and Hidalgo H. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 2000, 32:271-285.

Penkowa M, Giralt M, Thomsen P, Carrasco J and Hidalgo J. The zinc or copper deficiency-induced impaired inflammatory response to brain trauma may be caused by the concomitant metallothionein changes. *J. Neurotrauma* 2001, 18:447 -463.

30

Penkowa M, Metallothionein expression and roles in the central nervous system. *Biomed. Rev.* 2002, 13:1 -18.

Ronn LC, Ralets I, Hartz BP, Morten B, Berezin A, Berezin V, Moller A, and Bock E. A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J. Neurosci. Meth.* 2000, 100:25-32.

Tang W, Kido T, Gross WA, Nogawa K, Sabbioni E and Shaikh ZA. Measurement of cadmium-induced metallothionein in urine by ELISA and prevention of overestimation due to polymerization. *J. Anal. Toxicol.* 1999, 23:153-158.

40

Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer AE, Burns DK, et al. 1996. Defective forebrain development in mice lacking gp339/megalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8460-8464.

Zambenedetti P, Giordano R and Zatta P. Metallothioneins are highly expressed in astrocytes and microcapillaries in Alzheimer's disease. *J. Chem. Neuroanat.* 1998, 15:21 -26.

50

Zou Z, Chung B, Nguyen T, Mentone S, Thompson B, and Biemesderfer D. 2004
Linking receptor-mediated endocytosis and cell signalling: evidence for
regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule. J Biol Chem
179:34302-34310.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、ニューロン細胞の分化、ニューロン細胞の生存、および学習や記憶に關する神経可塑性を促進する能力を有し、酸化ストレスや炎症反応を抑制し、生存および神経保護作用を調節し、成長因子および調節分子ならびにこれらの受容体の効果を促進する能力を有する、短ペプチド配列に關する。

10

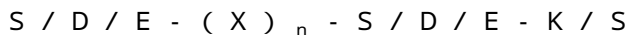
【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の一態様によれば、本明細書に記載のペプチド配列は、ペプチドの生物活性に不可欠な共通の構造モチーフを含む。

【0013】

本発明によるこのようなペプチドは、化学式



(式中、 $(X)_n$ は任意のアミノ酸残基の配列であり、 n は 4 ~ 6 の整数である) で表されるアミノ酸モチーフを含む、最大 25 個の連続するアミノ酸残基の配列を含む。

20

【0014】

本発明によれば、上記のようなペプチドは、メタロチオネインファミリータンパク質のサブ配列であるメタロチオネイン (MT) と同源性を示し、前記サブ配列は、MT による神経突起の伸長、神経細胞の生存、学習や記憶に關する神経可塑性の促進、および / または酸化ストレス、炎症反応の抑制に關する MT の機能ドメインであり、メタロチオネインのホモ二量体化 (同種結合) にも關与している。したがって、本発明のアミノ酸モチーフを含むペプチド配列は、後述する MT 機能ドメインの構造類似体であるだけでなく、上述の MT の機能の実行に關する MT 機能ドメイン由来の MT タンパク質または MT のペプチド断片の機能類似体でもある。

【0015】

30

したがって、別の態様において、本発明は、MT の生物学的機能を模倣する能力を有する MT のペプチド断片に關し、例えば、神経突起の伸長、ニューロン細胞の生存、学習や記憶に關する神経可塑性を促進する、および / または炎症を抑制する能力を有する MT のペプチド断片に關する。さらに、別の態様において、本発明は、MT の同種結合を促進または抑制することにより、あるいはその受容体への MT の結合を促進または抑制することにより、MT の生物学的機能を調節する能力を有する MT の断片に關する。

【0016】

本発明はまた、本発明のモチーフおよび / または MT のペプチド断片を含むペプチド配列を含む化合物にも關する。

【0017】

40

本発明のさらなる態様は、以下に關する ;

- 医薬品としての、または医薬品の製造のための本発明のペプチド配列の使用、ただし、前記医薬品が、神経突起の伸長、神経細胞の生存、学習や記憶に關する神経細胞の可塑性を促進し、および / または炎症を抑制することを含む病態の治療のために使用される、
- 本発明のペプチド配列またはこれを含む化合物を含む薬学的組成物、
- 本発明のペプチド配列を含むエピトープに結合する能力を有する抗体、
- 本発明の抗体を含む薬学的組成物、および
- 本発明のペプチド配列、化合物、医薬品、抗体、またはこれらを含む薬学的組成物を使用することを含む治療方法。

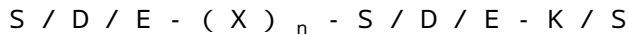
【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 1 8 】

1. ペプチド

第一の態様において、本発明は、化学式



(式中、 $(X) _ n$ は任意のアミノ酸残基の配列であり、 n が 4 ~ 6 の整数である) で表されるアミノ酸モチーフを含む、最大 25 個の連続するアミノ酸残基から構成されるペプチドに関する。

【 0 0 1 9 】

一実施形態において、 $(X) _ n$ はアミノ酸配列であり、式中、 n は 4 であり、別の実施形態においては n が 6 である。アミノ酸配列 $(X) _ n$ は、任意のアミノ酸残基の配列であるが、いくつかの好適な実施形態においては、アミノ酸残基 K、S、E または C の少なくとも 1 つを含むことができる。

10

【 0 0 2 0 】

本発明は、好ましくは、8 ~ 25 個の範囲のアミノ酸残基、例えば 9 ~ 25 個のアミノ酸残基、例としては 10 ~ 25 個のアミノ酸残基を含むペプチド配列に関する。ある実施形態において、ペプチド配列は、11 ~ 25 個のアミノ酸残基、例えば 12 ~ 25 個のアミノ酸残基、例としては 13 ~ 25 個のアミノ酸残基であってもよい。他の実施形態において、アミノ酸配列は、約 15 個のアミノ酸残基、例えば 14 または 16 個のアミノ酸残基を含んでもよく、あるいは長さが約 20 個のアミノ酸残基、例えば 17 ~ 19 個のアミノ酸残基であってもよく、あるいは 20 ~ 25 個のアミノ酸残基を含むこともできる。最大で 20 個の連続するアミノ酸残基を含む短アミノ酸配列が好ましいが、本発明は、本発明の適用範囲に、約 23 または 25 個のアミノ酸残基、例えば 21、22、23、24、25 または 26 個のアミノ酸残基を含む場合があるアミノ酸配列、あるいは約 30 個のアミノ酸残基、例えば 27、28 または 29 個のアミノ酸残基である場合があるアミノ酸配列、あるいは約 35 個のアミノ酸残基、例えば 31 ~ 34 個のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態において、本発明のモチーフを含むペプチドは、モチーフを含む 10 個のアミノ酸残基の配列内に、少なくとも 1 つのアミノ酸残基 G を含むことができ、好ましくは、前記アミノ酸残基 G が、モチーフ中の対応するいかなる位置においてもアミノ酸残基 S / D / E よりも前に配置される。

30

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、上記のようなペプチドであって、アミノ酸残基 S / D / E はモチーフ中のいかなる位置にあってもアミノ酸残基 C で置換されるペプチドにも関する。

【 0 0 2 3 】

上記のようなペプチドは、例えば、以下の配列から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいはこれらから構成されてもよく、あるいはこれらの配列の任意の断片または変異体であってもよい：

KKSSCSCSPVGS AK (配列番号 1)

AQGSISKGASDKSS (配列番号 2)

MDPNSSSAAGDSS T (配列番号 3)

SAGSSKSKESKSTS (配列番号 4)

AQGSICKGASDKSS (配列番号 5)

MDPNCSCAAGDSS T (配列番号 6)

SAGSCKCKESKSTS (配列番号 7)

KGGEAAEA EA EK (配列番号 8)。

40

【 0 0 2 4 】

本発明によれば、配列番号 1 ~ 8 から選択される配列を含むペプチドは、メタロチオネイン - 1 A (MT1A)、メタロチオネイン - 1 B (MT1B)、メタロチオネイン - 1 E (MT1E)、メタロチオネイン - 1 F (MT1F)、

50

メタロチオネイン - 1 G (M T 1 G)、メタロチオネイン - 1 H (M T 1 H)、
 メタロチオネイン - 1 I (M T 1 I)、メタロチオネイン - 1 K (M T 1 K)、
 メタロチオネイン - 1 L (M T 1 L)、メタロチオネイン - 1 R (M T 1 R)、
 メタロチオネイン - 1 X (M T 1 X)、メタロチオネイン - 2 (M T 2)、
 メタロチオネイン - 3 (M T 3)、およびメタロチオネイン - 4 (M T 4)
 からなる群から選択されるメタロチオネインのサブ配列と同一性を示す。後述するメタロ
 チオネインの配列は、Gene Bankにおいて、受入番号
 Q 9 B Q N 2、P 0 4 7 3 1、P 0 7 4 3 8、P 0 4 7 3 2、P 0 4 7 3 3、
 P 1 3 6 4 0、P 8 0 2 9 4、P 8 0 2 9 5、P 8 0 2 9 6、Q 9 3 0 8 3、
 P 8 0 2 9 7、P 0 2 7 9 5、P 2 5 7 1 3、P 4 7 9 4 4
 としてそれぞれ確認される。

10

【 0 0 2 5 】

より具体的には、配列番号 1 ~ 8 から選択される配列を含むペプチドは、以下のアミノ
 酸配列のうちの一つを含む M T のサブ配列と同一性を示す：

K K S C C S C C P M S C A K (配列番号 9)
 K K C C C S C C P V G C A K (配列番号 1 0)
 K K S C C S C C P V G C A K (配列番号 1 1)
 K K S C C S C C P V G C S K (配列番号 1 2)
 K K S C C S C C P V G C A K (配列番号 1 3)
 K K S C C S C C P L G C A K (配列番号 1 4)
 K K S C C S C C P V G C A K (配列番号 1 5)
 K K S C C S C C P V G C A K (配列番号 1 6)
 K K S C C S C C P V G C A K (配列番号 1 7)
 K K S C C S C C P M G C A K (配列番号 1 8)
 K K S C C S C C P V G C A K (配列番号 1 9)
 K K S C C S C C P V G C A K (配列番号 2 0)
 K K S C C S C C P A E C E K (配列番号 2 1)
 R K S C C P C C P P G C A K (配列番号 2 2)
 A Q G C I C K G A S E K C S (配列番号 2 3)
 A Q G C V C K G S S E K C S (配列番号 2 4)
 A Q G C V C K G A S E K C S (配列番号 2 5)
 A Q G C V C K G A S E K C S (配列番号 2 6)
 A Q G C I C K G A S E K C S (配列番号 2 7)
 A Q G C I C K G A S E K C S (配列番号 2 8)
 A Q G C I C K G A S E K C S (配列番号 2 9)
 A Q G C I C K G A S E K C S (配列番号 3 0)
 A Q G C I C K G T S D K C S (配列番号 3 1)
 A Q G C V C K G A S E K C S (配列番号 3 2)
 A Q G C I C K G T S D K C S (配列番号 3 3)
 A Q G C I C K G A S D K C S (配列番号 3 4)
 A K D C V C K G G E A A E A E A E K C S (配列番号 3 5)
 A R G C I C K G G S D K C S (配列番号 3 6)
 M D P N C S C A T G G S C T (配列番号 3 7)
 M D P N C S C T T G G S C A (配列番号 3 8)
 M D P N C S C A T G G S C T (配列番号 3 9)
 M D P N C S C A A G V S C T (配列番号 4 0)
 M D P N C S C A A G V S C T (配列番号 4 1)
 M D P N C S C E A G G S C A (配列番号 4 2)
 M D P N C S C A A G V S C T (配列番号 4 3)
 M D P N C S C A A A G V S C T (配列番号 4 4)

20

30

40

50

MDPNCSCSPVGS CA (配列番号45)
 MDPNCSCATGGSCS (配列番号46)
 MDPNCSCDPVGS CA (配列番号47)
 MDPNCSCAAGDST (配列番号48)
 MDPETCPGPSGSCS (配列番号49)
 MDPRECVCMSSGGICM (配列番号50)
 CTGSKCKECKKNS (配列番号51)
 CAGSKCKECKCTS (配列番号52)
 CAGSKCKECKCTS (配列番号53)
 CAGSKCKECKCTS (配列番号54)
 CASSCKCKECKCTS (配列番号55)
 CAGSKCKCKCKCTS (配列番号56)
 CAGSKCKECKCKCTS (配列番号57)
 CASSCKCKECKCKCTS (配列番号58)
 CAGSKCKCKECKCKCTS (配列番号59)
 CASSCKCKECKCKCTS (配列番号60)
 CAGSKCKCKECKCKCTS (配列番号61)
 CAGSKCKCKECKCKCTS (配列番号62)
 CADSKCKCEGCKCTS (配列番号63)
 CGDNCKCTTCNCKT (配列番号64) .

10

20

【0026】

本発明の別の実施形態において、選択されたサブ配列群の特定のサブ配列と同一性を示すペプチドを選択することが好まし。したがって、一実施形態において、配列番号9～22として同定されるサブ配列の群から選択されるサブ配列と同一性を示すペプチドである場合がある。

【0027】

別の実施形態において、前記ペプチドは、配列番号23～36からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むサブ配列と同一性を示すペプチドである場合がある。

【0028】

他の実施形態において、前記ペプチドは、配列番号37～50として同定される配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むサブ配列と、または配列番号51～64として同定される配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むサブ配列と同一性を示すペプチドであってもよい。

30

【0029】

さらに、他の実施形態において、ペプチドは、例えば、配列番号9、23、37または51から選択されるMT1Aのサブ配列と、あるいは、配列番号10、24、38または52から選択されるMT1Bのサブ配列と同一性を示す特定のMTのサブ配列と同一性を示してもよい。以下は、本発明の適用範囲に含まれる、特定のMTの好適なサブ配列のその他の例である：

40

- 配列番号11、25、39または53から選択されるMT1Eサブ配列、
- 配列番号12、26、40または54から選択されるMT1Fサブ配列、
- 配列番号13、27、41または55から選択されるMT1Gサブ配列、
- 配列番号14、28、42または56から選択されるMT1Hサブ配列、
- 配列番号15、29、43または57から選択されるMT1Iサブ配列、
- 配列番号16、30、44または58から選択されるMT1Kサブ配列、
- 配列番号17、31、45または59から選択されるMT1Lサブ配列、
- 配列番号18、32、46または60から選択されるMT1Rサブ配列、
- 配列番号19、33、47または61から選択されるMT1Xサブ配列、
- 配列番号20、34、48または62から選択されるMT2サブ配列、

50

- 配列番号 21、35、49 または 63 から選択される MT3 サブ配列、
- 配列番号 22、36、50 または 64 から選択される MT4 サブ配列。

【0030】

また、上記のように同定される MT のサブ配列はいずれも、本発明によるペプチドのアミノ酸配列の一部であってもよい。したがって、本発明のさらなる態様は、配列番号 9 ~ 64 から選択されるアミノ酸配列を含むペプチド、または前記配列の断片もしくは変異体を含むペプチド、あるいはこれらの配列、断片または変異体のいずれかからなるペプチドに関する。

【0031】

配列相同性は、B L O S U M 30、B L O S U M 40、B L O S U M 45、B L O S U M 50、B L O S U M 55、B L O S U M 60、B L O S U M 62、B L O S U M 65、B L O S U M 70、B L O S U M 75、B L O S U M 80、B L O S U M 85、または B L O S U M 90 などの周知のアルゴリズムを使用して計算することができる。「配列類似性」、「配列同一性」、および「配列相同性」という用語は、照合した 2 個のアミノ酸配列における、同一のまたは類似するアミノ酸残基の数または割合に言及する場合、本願において交換可能に使用される。「類似するアミノ酸残基」は、同じ群の「同類」アミノ酸残基に由来するアミノ酸残基である。後者の群については、本願においてさらに詳細に考察する。

【0032】

本願においては、アミノ酸残基を示す標準的なアルファベット 1 文字のコードは、標準的なアルファベット 3 文字のコードと同様に適用される。アミノ酸の略号は、生化学命名に関する I U P A C - I U B 委員会の勧告に従う (E u r . J . B i o c h e m , 1 9 8 4 , v o l . 1 8 4 , p p 9 - 3 7) 。本願の明細書および請求項の全体にわたって、天然アミノ酸を表す 3 文字コードまたは 1 文字コードのいずれかが使用される。L 型または D 型を明記していない場合、当該アミノ酸は、形成されるペプチドが、L 型、D 型のアミノ酸、または L 型と D 型が混合した配列で構成することができるように、天然の L 型 (P u r e & A p p l . C h e m . V o l . (5 6 (5) p p 5 9 5 - 6 2 4 (1 9 8 4) を参照) または D 型を有すると解されるべきある。

【0033】

特に断らない限り、本発明のペプチドの C 末端アミノ酸は、遊離カルボン酸として存在し、これは「-OH」と明記される場合もあると理解される。しかし、本発明の化合物の C 末端アミノ酸はアミド化された誘導体であってもよく、これは「-NH₂」と表わされる。他に断らない限り、ポリペプチドの N 末端アミノ酸は遊離アミノ基を含み、これはまた「H-」と明記される場合がある。

【0034】

他に断らない限り、アミノ酸は、天然であるか否かにかかわらず、例えばアルファアミノ酸、ベータアミノ酸、および/またはガンマアミノ酸などの任意のアミノ酸から選択することができる。したがって、前記群は、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T r p、M e t、G l y、S e r、T h r、C y s、T y r、A s n、G l n、A s p、G l u、L y s、A r g、H i s、A i b、N a l、S a r、O r n、リジン類似体、D A P、D A P A、および 4 H y p を含むが、これらに限定されない。

【0035】

また、本発明によれば、例えば、アミノ酸のグリコシル化および/またはアセチル化などの前記化合物/ペプチドの修飾を行うこともできる。

【0036】

本発明によれば、塩基性アミノ酸残基は、アミノ酸 A r g、L y s、および H i s の残基によって表され、酸性アミノ酸残基は、アミノ酸 G l u および A s p の残基によって表される。塩基性および酸性アミノ酸残基は、荷電アミノ酸残基の群を構成する。疎水性アミノ酸残基の群は、アミノ酸 L e u、I l e、V a l、P h e、T r p、T y r、M e t、A l a および P r o によって表される。

10

20

30

40

50

【0037】

本発明は、天然、合成／遺伝子組み換えによって作製されたペプチド配列／断片、および／またはより大きなポリペプチドを酵素的／化学的に開裂により作製されたペプチド配列／断片に関し、該ペプチド配列／断片は前記のより大きなポリペプチドの不可欠な部分である。本発明は分離した個々のペプチド配列に関する。

【0038】

上述の通り、本発明は、本願に記載のペプチド配列の変異体にも関する。

【0039】

一態様において、「ペプチド配列の変異体」という用語は、例えば1つ以上のアミノ酸残基の置換によりペプチドを修飾できることを意味する。L型およびD型アミノ酸の両方を用いることができる。その他の修飾は、エステル、糖などの誘導体を含む場合がある。例としてはメチルおよびアセチルエステルが挙げられる。

10

【0040】

別の態様において、「変異体」は、挿入、欠損、ならびに同類置換を含む置換の数と範囲が増加するにつれて、好適な所定の配列との相違が次第に大きくなるアミノ酸配列を示すものとして理解することができる。この相違は、所定の配列と変異体の間の相同性の低下として測定される。

【0041】

さらに別の態様において、本発明によるペプチド断片の変異体は、同じ変異体またはその断片、あるいは異なる変異体またはその断片中に、少なくとも1つの置換、例えば互いに独立して導入される複数の置換を含むことができる。したがって、錯体の変異体またはその断片は、互いに独立して同類置換を含むことができ、この場合、

20

前記変異体またはその断片の少なくとも1つのグリシン(Gly)は、Ala、Val、LeuおよびIleからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのアラニン(Ala)は、Gly、Val、LeuおよびIleからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはその断片の少なくとも1つのバリン(Val)は、Gly、Ala、LeuおよびIleからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

30

前記変異体またはその断片の少なくとも1つのロイシン(Leu)は、Gly、Ala、ValおよびIleからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのイソロイシン(Ile)は、Gly、Ala、ValおよびLeuからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはその断片の少なくとも1つのアスパラギン酸(Asp)は、Glu、AsnおよびGlnからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

40

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのアスパラギン(Asn)は、Asp、GluおよびGlnからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのグルタミン(Gln)は、Asp、GluおよびAsnからなるアミノ酸群から選択されるアミノ酸によって置換され、

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのフェニルアラニン(Phe)は、Tyr、Trp、His、Proからなるアミノ酸群から、好ましくはTyrおよびTrpからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのチロシン(Tyr)は、Phe、Tr

50

p、His、Proからなるアミノ酸群から、好ましくはPheおよびTrpからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記断片の少なくとも1つのアルギニン(Arg)は、LysおよびHisからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのリジン(Lys)は、ArgおよびHisからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのプロリン(Pro)は、Phe、Tyr、TrpおよびHisからなるアミノ酸群から、ならびにそれらから独立して変異体またはそれらの断片から選択されるアミノ酸で置換され、

前記変異体またはそれらの断片の少なくとも1つのシステイン(Cys)は、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Asn、Gln、Ser、ThrおよびTyrからなるアミノ酸群から選択されるアミノ酸によって置換される。

【0042】

したがって、上記を踏まえると、ペプチド断片の同じ機能的等価物、または前記機能的等価物の断片は、本明細書において上記で定めた複数の同類のアミノ酸の群からの、複数の同類のアミノ酸の置換を含むことができる。本明細書において「同類アミノ酸置換」という用語は、「相同アミノ酸置換」という用語と同意語として使用される。

【0043】

同類のアミノ酸の群は以下の通りである：

- P、A、G (中性、弱疎水性)
- S、T (中性、親水性)
- Q、N (親水性、酸性アミン)
- E、D (親水性、酸性)
- H、K、R (親水性、塩基性)
- L、I、V、M、F、Y、W (疎水性、芳香族)
- C (架橋形成)

【0044】

同類置換は、本発明の好ましい所定のペプチドまたはその断片の任意の位置に、導入することができる。しかし、非同類置換、特に任意の1つ以上の位置に1つの非同類置換を導入するのが望ましいが、これに限定されない。特に、変異体は、例えば配列番号1～64から選択される配列である本発明のモチーフを有する配列などの本発明のアミノ酸配列に対して少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%の相同性を示すアミノ酸配列であるか、あるいは例えば配列番号1～64から選択される配列である本発明のモチーフを有する配列などの本発明のアミノ酸配列に比べて、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%のアミノ酸一致率を有するアミノ酸配列である場合もある。本明細書において、肯定的なアミノ酸一致率は、比較する2個の配列中の同じ位置にあるアミノ酸の物理的および/または化学的特性により定義される同一性または類似性として定義される。本発明の好ましい肯定的なアミノ酸一致率は、RとK、DとE、MとL、EとQ、VとI、LとI、SとA、WとY、QとK、TとS、SとN、およびRとQである。1つのアミノ酸配列と別のアミノ酸との相同性は、2個の照合した配列中の同一アミノ酸のパーセンテージとして定義される。上述のような配列の相同性は、B L O S U M 30、B L O S U M 40、B L O S U M 45、B L O S U M 50、B L O S U M 55、B L O S U M 60、B L O S U M 62、B L O S U M 65、B L O S U M 70、B L O S U M 75、B L O S U M 80、B L O S U M 85、またはB L O S U M 90などの周知のアルゴリズムを使用して、決まりきったルーチンで計算する

10

20

30

40

50

ことができる。

【0045】

本発明のペプチドの機能的に等しい断片の形成をもたらす非同類置換は、例えば、

- i) 極性が著しく異なることになり、例えば、非極性側鎖を有する残基 (Ala、Leu、Pro、Trp、Val、Ile、Leu、Phe または Met) が、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn または Gln などの極性側鎖を有する残基、あるいは Asp、Glu、Arg または Lys などの荷電アミノ酸で置換されたか、あるいは荷電残基または極性残基が非極性残基で置換される、および / または
- ii) ペプチド骨格の配向性に関する影響が著しく異なることになり、例えば、Pro または Gly が置換されるか、または Pro または Gly が別の残基で置換され、および / または
- iii) 電荷が著しく異なることになり、例えば、Glu または Asp などの負に帯電した残基が、Lys、His または Arg などの正に帯電した残基で置換され (ならびにそれとは逆に置換され)、および / または
- iv) 立体バルクが著しく異なることになり、例えば、His、Trp、Phe または Tyr などの大型の残基が、例えば、Ala、Gly または Ser などの小さな側鎖を有する残基で置換される (ならびにそれとは逆に置換される)。

10

【0046】

一実施形態において、アミノ酸の置換は、それらが有する疎水性値および親水性値や、荷電、大きさなどを含むアミノ酸側鎖置換基の相対的類似性に基づいて行われる。前述の種々の特徴を考慮した例示的なアミノ酸置換は、当業者に周知であり、アルギニンとリジン、グルタミン酸塩とアスパラギン酸塩、セリンとスレオニン、グルタミンとアスパラギン、およびバリン、ロイシンとイソロイシンを含む。

20

【0047】

本発明においては、以下の変異体が好ましい：

1. 配列番号 1 ~ 64 の配列から選択される配列と少なくとも 65 % の配列類似性を有する、少なくとも 6 個のアミノ酸残基のアミノ酸配列である変異体、好ましくは、配列番号 1 ~ 64 の配列から選択される配列と 70 % を超える配列類似性、例えば 71 ~ 80 % の類似性、好ましくは 81 ~ 85 %、より好ましくは 86 ~ 90 %、さらに好ましくは 91 ~ 95 %、さらに好ましくは 95 % を超える配列類似性を有する、6 から 20 個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列である変異体；
2. 配列番号 1 ~ 64 の配列からなる変異体であって、前記配列が、例えば上述のような修飾などのアミノ酸残基の 1 つ以上の修飾を含む変異体。

30

【0048】

上述の通り、本発明は、本願に記載のペプチド配列の断片にも関する。

【0049】

本発明の好適な断片は、配列番号 1 ~ 64 から選択される配列の断片であって、前記配列の長さの約 40 % の長さを有する断片、より好ましくは少なくとも 50 %、さらに好ましくは少なくとも 60 %、さらに好ましくは少なくとも 70 %、さらに好ましくは少なくとも 80 %、さらに好ましくは少なくとも 90 %、さらに好ましくは少なくとも 95 % の長さを有する断片である。

40

【0050】

本発明は、配列番号 1 ~ 64 から選択される配列の少なくとも 1 つの機能活性を有する上記の変異体および断片に関する。したがって、本発明の好適な変異体および断片は、配列番号 1 ~ 64 として同定されるアミノ酸配列の機能的等価物 / 相同体である。

【0051】

したがって、本文脈における「機能的等価物 / 相同体」という用語は、配列番号 1 ~ 64 から選択される配列と少なくとも 65 % の相同性を有するアミノ酸配列、あるいは配列番号 1 ~ 64 から選択される配列の少なくとも 40 % の長さを有する配列であって、前記

50

配列が相同性を示すか、あるいは断片である配列の少なくとも1つの機能活性を有する、例えば、

神経細胞の分化に関与するおよび/または記憶と学習に関与する神経可塑性を促進する能力を有するか、あるいは細胞の生存を促進する、例えばアポトーシスを抑制する能力を有するか、あるいは受容体に結合し、前記受容体の活性を調節する能力を有するか、あるいは炎症を抑制する能力を有する。

【0052】

本発明は、天然、合成または遺伝子組み換えによって作製されたペプチド、およびタンパク質の酵素的/化学的に開裂によって作製されたペプチドの両方に関する。より大きなポリペプチドのサブ配列に対応するアミノ酸配列を有するペプチド、例えば上述のMTのサブ配列を含むか、これらの配列からなるペプチドは、前記のより大きなポリペプチドまたはタンパク質の配列に由来するが理解されるであろう。これらのペプチドは、タンパク質の酵素開裂によって産生することができ、あるいは遺伝子組み換え発現または化学的合成によって作製することができる。

【0053】

したがって、本発明はさらに、メタロチオネインの断片に関し、前記断片は、好ましくはヒトのメタロチオネインに由来し、より好ましくは

メタロチオネイン-1A (MT1A)、メタロチオネイン-1B (MT1B)、
メタロチオネイン-1E (MT1E)、メタロチオネイン-1F (MT1F)、
メタロチオネイン-1G (MT1G)、メタロチオネイン-1H (MT1H)、
メタロチオネイン-1I (MT1I)、メタロチオネイン-1K (MT1K)、
メタロチオネイン-1L (MT1L)、メタロチオネイン-1R (MT1R)、
メタロチオネイン-1X (MT1X)、メタロチオネイン-2 (MT2)、
メタロチオネイン-3 (MT3)、またはメタロチオネイン-4 (MT4)

に由来する。本発明は、神経突起の伸長、ニューロン細胞の生存を促進する能力、受容体を活性化する能力、学習や記憶に関与する神経可塑性を促進する能力、および/または炎症を抑制する能力を有するメタロチオネインの断片に関する。特に、本発明は、配列番号9~64から選択される配列または前記配列の断片を含むか、またはこれらから構成される、上述のメタロチオネインの断片に関する。特定の実施形態においては、上述の特定の配列を含むか、またはこれから構成されるペプチド断片が好ましい場合がある。本発明は、好ましくは最大で20個のアミノ酸残基を含むメタロチオネインの断片に関する。

【0054】

2. 化合物

化合物は、上述のいずれかから選択される個々のアミノ酸配列のシングルコピーを含むことができ、あるいはこのようなアミノ酸配列の複数のコピーを含むことができる。このことは、

本発明の化合物が、単量体のペプチド配列として、例えば単一の個々のペプチド配列を含むように配合できること、あるいは

前記化合物が、多量体のペプチド配列として、すなわち

複数の個々のペプチド配列を含む配列として配合できることを意味し、

ここで、前記の個々のペプチド配列は、同じ配列の複数のコピー、または複数の異なる個々のペプチド配列で表わすことができる

ことを意味する。

多量体はまた、完全長の配列とその1つ以上の断片の組み合わせを含むことができる。一実施形態において、化合物は2個のアミノ酸配列を含むことができ、このような化合物は本明細書において二量体と定義される。別の実施形態において、化合物は3個以上のアミノ酸配列、例えば3個、4個、またはそれ以上を含むことができる。本発明は、好ましくは本発明の2個または4個のペプチド配列を含む化合物に関する。しかしながら、3個、

10

20

30

40

50

5個、6個、7個、8個またはそれ以上の配列を含む化合物もまた、本発明の適用範囲に含まれる。

【0055】

化合物は、同一のアミノ酸配列または異なるアミノ酸配列を有する個々のペプチド断片の複数のコピーを含む、二量体または多量体として配合することができる。このような化合物の一例として、配列番号1および配列番号2を含む二量体化合物、または配列番号1および配列番号3を含む二量体化合物が挙げられる。種々の実施形態に応じて、本発明の配列のその他いずれの組み合わせも作ることができる。配列は、ペプチド結合を介して互いに結合することができ、あるいはリンカー分子または群化によって互いに結合することができる。

10

【0056】

既に上記した通り、本発明の化合物は、単一配列の複数のコピー、例えば配列番号1~64から選択される配列のいずれかの2個のコピーを含むことができ、前記2個の配列は、リンカー分子または群化によって互いに結合することができる。配列がリンカーによる群化によって結合される化合物が好ましい。このような結合群化の一例として、アキラルなジカルボン酸、トリカルボン酸、またはテトラカルボン酸が挙げられる。適切なアキラルなジカルボン酸、トリカルボン酸、またはテトラカルボン酸、およびこのような化合物を産生方法(リガンド提示集合(LPA)法)は、国際公開WO0018791およびWO2005014623に記載されている。リンカーとして使用し得る別の例には、アミノ酸リジンが挙げられる。個々のペプチド配列は、リジンなどのコア分子に結合し、それによって個々のペプチド配列(複数可)の樹枝状多量体(デンドリマー)を形成する。デンドリマーの産生もまた当業界で周知であり(国際出願PCT/US90/02039; Lu et al., (1991) Mol Immunol. 28: 623-630; Defoort et al., (1992) Int J Pept Prot Res. 40: 214-221; Drijfhout et al., (1991) Int J Pept Prot Res. 37: 27-32)、デンドリマーは現在は研究および医学的用途で広く使用されている。本発明の好ましい実施形態の1つは、リジンのコア分子に結合する4個の個々のアミノ酸配列を含むデンドリマー化合物を提供することである。また、4個の個々のアミノ酸配列のうち少なくとも1つが、上記で定めた化学式のアミノ酸配列を含むことも好ましい。デンドリマー化合物の4個の個々のアミノ酸配列すべてが、上で定めた化学式のアミノ酸配列をそれぞれ含むならばさらに好ましい。

20

30

【0057】

LPA二量体またはリシンデンドリマーなどの本発明の多量体化合物は、本発明の化合物の中で好ましい化合物である。しかし、実施形態によっては、本発明の複数の個々の配列を含む他の種類の多量体化合物が好ましい場合もある。

【0058】

3. 生物学的活性

本発明のペプチド配列、および本発明の配列を含む化合物は、生物学的活性を有する。本発明は、好ましくは、以下から選択される生物活性に関する：

- 例えば、ニューロン細胞の前駆体の分化を促進することによる、幹細胞を分化する能力
- 例えば、神経突起の伸長を促進することによる、神経細胞の分化および/または神経再生を促進する能力、
- 例えば、シナプス効力を促進することによる、記憶や学習に關与する神経可塑性を促進する能力、
- 例えば、神経細胞のアポトーシスを抑制することによる、細胞の生存、特にニューロン細胞の生存を促進する能力、
- 例えば、反応性酸素種のスカベンジ作用の発現を促進することによる、酸化ストレス反応を抑制する能力、
- 例えばBDNF、NT-3、GDNF、ノルトリン、アルテミン、NGF、各種線維芽

40

50

細胞成長因子 (F G F)、S 1 0 0 タンパク質 (S 1 0 0 A 4、S 1 0 0 A 6、S 1 0 0 A 1 0、S 1 0 0 A 1 2、S 1 0 0 B)、I G F - 2、ニューレグリンなどの神経保護性成長因子やタンパク質を発現するために星状細胞を刺激する能力などのアストログリオシスを活性化する能力、

- 例えば、ミクログリアやマクロファージの活性化を抑制する、炎症性サイトカインの発現を抑制する、および / または抗炎症反応を促進することによる、炎症を抑制する能力、

- 例えば、V E G F および F G F 2 などの血管形成を促進する成長因子の発現を促進することによる、病変部における血管形成を促進する能力、

- 受容体、例えばメガリン受容体 (S w i s s - p r o t 受入番号 P 9 8 1 6 4) または M T タンパク質に結合する能力、および

メガリン受容体を介した血液脳関門を越えるトランスサイトーシスを促進する能力、および / または

前記受容体の活性を調節する能力、例えば、この受容体に関連するシグナル伝達を活性化または抑制する能力、あるいは受容体の生物学的機能を活性化または抑制する能力、

- メタロチオネインに結合し、メタロチオネインの神経保護機能および神経再生機能を増進する能力。

【 0 0 5 9 】

本発明によれば、脳内で発生する生理学的プロセスに関与する、あるいは神経系の正常な状態または病的状態に関与するペプチドの生物活性が好ましい。ペプチドの生物活性に関する分子プロセスは、好ましくは、神経系の細胞に、より好ましくはニューロン細胞に関連しえるプロセスである。したがって、本発明によるペプチドの好ましい活性の1つは、ニューロン細胞の分化を促進する能力である。

【 0 0 6 0 】

本明細書において「ニューロン分化」という用語は、神経前駆細胞、または神経幹細胞の分化と、神経細胞の更なる分化、例えばニューロン細胞の成熟の両方として理解される。このような分化の例には、未成熟なニューロンからの神経突起の伸長、神経突起の分岐、さらにはニューロンの再生が挙げられる。

【 0 0 6 1 】

したがって、本発明の好ましい一実施形態は、神経前駆細胞 / 幹細胞または未成熟なニューロンの分化の促進、および / または成熟ニューロン、例えば損傷を受けたが生存し、そして損傷したプロセスを再生しようとするニューロンからの神経突起の伸長の促進に関与するペプチド配列の生物活性に関する。

【 0 0 6 2 】

本文脈において「分化」とは、ニューロンの成熟と神経突起の伸長のプロセスに関し、これらは前記ニューロンの最終細胞分裂後に行われる。本発明の化合物は、神経細胞の分裂を停止し、前記細胞の成熟を開始し、例えば神経突起の伸長を開始することができる。それ以外の場合、「分化」とは、当業界で定められるような正常なニューロン細胞の機能的特性を有する細胞の形成を導くニューロン前駆細胞、未成熟な神経細胞、または胚幹細胞の遺伝子的、生化学的、形態学的、および生理学的変換のプロセスの開始に関する。本発明では、「未成熟な神経細胞」を、神経細胞の特徴的特性として当業界で認められている、神経細胞の少なくとも1つの特徴を有する細胞と定義する。

【 0 0 6 3 】

ある種の内因性栄養因子などのニューロン細胞の再生および / または分化を促進するのと同様に神経突起の伸長を促進する潜在能力を有する物質は、例えば、ニューロン再生やその他の形態のニューロン可塑性を促進する化合物を探索する際の主要な標的となる。本化合物の潜在能力を評価するために、神経突起の伸長に関連するシグナル伝達を促進する能力、細胞接着を妨げる能力、神経突起の伸長、神経の再生を促進する能力を調査する。

本発明の化合物は神経突起の伸長を促進することが示されており、したがってニューロン細胞結合の再生の優れた促進物質であると考えられ、ゆえに、このような効果が求められるその他の状態におけるニューロン機能の促進物質と同様に損傷後の機能回復促進物質であると考えられている。

【0064】

本発明によれば、上記のペプチド配列の少なくとも1つを含む化合物は、神経突起の伸長を促進する能力を有する。本発明は、神経突起の伸長の向上/促進、例えば対照/非刺激細胞の神経突起の伸長値を上回る約75%の向上/促進、例としては50%（例えば約150%）の向上/促進、例としては100%（例えば約250%）の向上/促進、例としては200%（例えば約350%）の向上/促進、例としては300%（例えば約450%）の向上/促進、例としては400%（例えば500%）の向上/促進に関する。

10

【0065】

神経突起の伸長を促進する候補化合物の能力の評価は、例えば後記の実施例に記載したような、神経突起の伸長を評価するための任意の既知の方法または検定を使用することにより行うことができる。

【0066】

本発明によれば、化合物は、細胞増殖基質の不溶性の不動成分と、細胞増殖培地の可溶性成分の両方で、神経突起伸長活性を有する。本文脈において「不動」とは、化合物が水または水溶液に溶解しない物質に結合/付着し、その結果、化合物が同様にこのような溶液に溶解しなくなることを意味する。医学的用途に関しては、不溶性および可溶性の両化合物が本願で考慮されるが、可溶性化合物が好ましい。「可溶性化合物」は、水または水溶液に溶解する化合物であると理解される。

20

【0067】

したがって、本発明はまた、本発明のペプチド配列または該配列を含む化合物を使用するステップを含む、ニューロン細胞の分化を促進する方法にも関する。

【0068】

本発明の最も好適な実施形態の一つは、学習や記憶に関連するペプチド配列の活性、特にシナプス可塑性、スパイン形成、シナプス効力を促進するペプチド配列の能力に関する。したがって、本発明はまた、本発明のペプチド配列および/または該配列を含む化合物を使用することを含む、記憶および/または学習を促進する方法にも関する。本発明は、短期記憶および長期記憶の両方に関する。

30

【0069】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明のペプチド配列は、細胞の生存、特にニューロン細胞の生存を促進する機能を有する。本発明は、外傷および変性疾患の両方による細胞の生存を促進する機能に関する。したがって、本発明は、本発明のペプチド配列および/または該配列を含む化合物を使用して、細胞の生存、好ましくはニューロン細胞の生存を促進する方法に関する。

40

【0070】

損傷および疾患におけるニューロン細胞の変性および/またはアポトーシスを抑制すると同様に、損傷のせいでニューロン細胞の生存を増強する潜在能力を有する物質は、例えばアルツハイマー病またはパーキンソン病などの神経変性疾患を治療するための新薬用の候補化合物を探索する際の主要な標的となる。本ペプチドの潜在能力を評価するために、生存に関連するシグナル伝達を促進する能力、アポトーシス関連性細胞反応を抑制する能力、神経の再生を促進する能力を調査する。

本発明の化合物は、神経細胞の生存を促進し、細胞消失を減少させることが示されており、したがって脳および/または末梢神経系における神経細胞結合の再生を促進するための

50

有力な候補と考えられ、ゆえに、このような効果が求められる任意のその他の病態におけるニューロン機能の促進物質と同様に、外傷または疾患による損傷後の機能回復の有力な候補であると考えられる。

【0071】

本文脈において「生存」とは、細胞の損傷後、細胞機能の維持および/または回復に関与するプロセスに関する。本発明の化合物は、細胞を死に至らしめるプロセスを停止するまたは弱めることができ、例えば外傷または疾患による細胞の損傷によって開始される神経細胞のアポトーシスを抑制することができる。それ以外の場合「生存」とは、細胞死を導く細胞損傷に関与するプロセスを抑制すること、および

特にニューロン細胞、例えば当業界で定義される正常な機能的特性を有する前駆細胞、未熟な神経細胞または胚幹細胞、または成熟神経細胞などの細胞を遺伝的、生化学的、形態学的、および生理学的変換または再構成するプロセスを開始することに関する。本発明では、「未成熟な神経細胞」を、神経細胞の特徴的特性として当業界で認められている神経細胞の少なくとも1つの特性を有する細胞と定義している。

【0072】

本発明によれば、少なくとも1つの上記のペプチド配列を含む化合物は、神経細胞の生存を促進する能力を有する。本発明は、神経細胞の生存の促進、例えば対照/非刺激細胞の生存の数値を上回る約75%の促進、

例としては50%（例えば150%）の促進、

例としては100%（例えば約250%）の促進、

例としては200%（例えば約350%）の促進、

例としては300%（例えば約450%）の促進、

例としては400%（例えば500%）の促進

に関する。

【0073】

候補化合物が神経細胞の生存を促進する能力の評価は、細胞の生存を評価する任意の既知の方法または検定、例えば本願の実施例に記載のものを使用することにより行うことができる。

【0074】

本発明によれば、化合物は、不溶性および可溶性化合物の両方とも、生存を促進する活性を有する。本文脈において「不溶性」とは、化合物が水または水溶液に溶解しない物質に結合/付着し、このために、化合物も同様にこのような溶液に溶解しなくなることを意味する。医学的用途に関しては、不溶性および可溶性の両化合物が本願で考慮されるが、可溶性化合物が好ましい。「可溶性化合物」は、水または水溶液中に溶解する化合物であると理解される。

【0075】

別の実施形態において、本発明のペプチド配列はまた、炎症プロセス、特に脳における炎症プロセスを抑制する能力も有する。

【0076】

炎症とは、機械的損傷、あるいは細菌性、ウイルス性またはその他の微生物感染による組織の損傷によって引き起こされる防御反応である。炎症反応は次の3つの主要な段階を伴う。第1に、血流を増やすための毛細血管の拡張、第2に、微小血管の構造変化と血流から血漿タンパク質の漏出、および第3に、内皮細胞を通過する白血球浸潤と損傷および感染部位での蓄積。炎症反応は、炎症性メディエーターの放出とともに始まる。炎症性メディエーターは、組織の損傷および感染部位およびより離れた部位において局所的に働く可溶性、拡散性の分子であり、炎症性反応の結果として起こる成り行きに影響を及ぼす。炎症性メディエーターは、

例えば細菌産物または毒素のように外因性であってもよければ、

免疫系それ自体内で、損傷した組織細胞、リンパ球、肥満細胞、血漿タンパク質と同様に

産生される内因性であってもよい。

10

20

30

40

50

【0077】

神経炎症がアルツハイマー病の進行に重要な役割を果たし、海馬などの損傷を受けやすい領域で変性の原因となる。神経炎症は、細胞外グルタミン酸塩の上昇レベルに関与し、また N - メチル - D - アスパラギン酸型のグルタミン酸受容体の刺激の促進に関与する可能性もある。

【0078】

抗炎症活性は、本発明のペプチド配列の別の重要な生物学的活性である。したがって、本発明は、特に脳内で発生する持続的な炎症反応の抑制剤として働くことができる抗炎症性ペプチドに関する。

【0079】

外傷および/または感染から数日または数週間の間細菌産物や生存細菌までもが局所的に存在する状態が続くと、それに応じて例えば TNF などの炎症性メディエーターが体内に存在する状態が続き、それによって例えば発熱、腫れおよび疼痛などの炎症に対する反応が促進する。炎症反応が続くと人体に極めて大きい害を及ぼすことがすでに明らかにされている。細菌産物または生存細菌が局所病巣から全身へあまねく広がると、炎症反応は重篤化し、制御不能となって、敗血症を発症し、最終的には重篤な敗血症、さらには敗血症性ショックへと進行する。抗炎症性ペプチドは、血液や、肺、肝臓、消化管、脳および腎臓などの重要臓器における大規模かつ有害なサイトカインカスケードによって代表される、重篤な持続性炎症反応を阻止または鎮静するために使用することができる。

【0080】

本文脈において「抗炎症性化合物」という用語は、以下の活性のうちの少なくとも1つを有する化合物を意味する：

i) 細菌産物、生存細菌または外傷に反応して、炎症性メディエーターのシグナル伝達に関与する炎症性メディエーターや転写因子の受容体を含む内因性の炎症性メディエーターを産生するように、免疫細胞、好ましくは単球/マクロファージにおける遺伝子発現を低下するかまたは抑制する活性、ただし、前記メディエーターは、好ましくは、サイトカインを含む群から、TNF、IL-1、IL-6、G-CSF、GM-CSF、M-CSFの群から選択され、ケモカインは、IL-8、MCP-1からなる群から選択され、受容体は、組織因子およびIL-2Rの群から選択される、

ii) 接触相系によるブラジキニンの産生を低下するかまたは抑制する活性、

iii) 単球に関する誘導潜在能力を減少するかまたは抑制する活性、および/または iv) アポトーシスの誘導因子として機能する単球、好中球およびその他の免疫系細胞の寿命を低下するかまたは抑制する活性、

v) 血管内皮細胞による接着分子の発現を低下するかまたは抑制する活性、ただし、前記接着分子は、好ましくは、PECAM、ICAM-1、E-セレクトリン、VCAM-1からなる群から選択される、

vi) 血管透過性の増加を導くブラジキニンを産生する接触相系の活性化を低下するかまたは抑制する活性、

vii) IL-10およびIL-12の群から選択される抗炎症性メディエーターの合成を促進する活性、

viii) 補体活性化を抑制する活性、

ix) 慢性的な神経炎症の存在下で神経細胞、例えばNMDA型グルタミン酸受容体を発現するニューロンの変性リスクを低下する活性。

【0081】

とりわけ好ましい本発明のペプチドの別の生物学的活性は、ペプチドの受容体結合能である。

【0082】

本文脈において「受容体」という用語は、特定の分子(例えば、小さな分子、タンパク質、ウイルス)と強固に結合するタンパク質様機能性構造体として定義される。本発明は、細胞の原形質膜(表面)の受容体、細胞の原形質膜の内側に存在する受容体、すなわち

10

20

30

40

50

自由に浮動する受容体、可溶性タンパク質様分子、すなわち担体タンパク質、細胞の内部に存在し、当該細胞の核やミトコンドリアなどの種々のコンパートメントに關与する受容体に関する。

【0083】

両タイプの受容体（膜、細胞内）とも、細胞への情報伝達（すなわち、シグナル伝達）の機能的部位である。総括すると、一度結合すれば、受容体とその「結合した要素」は複合体として、エンドサイトーシスと呼ばれるプロセスを通して細胞に取り込まれ、結合した複合体の近傍でその細胞膜が陥入する。このプロセスにより、細胞内部に膜の「バブル」が形成され、その後これが分離してエンドサイトーシス小胞が形成される。受容体は、次に、細胞のリソソーム内における開裂によって結合要素から放出される。受容体は細胞（例えば、低密度リポタンパク質受容体）の表面にリサイクルされる（戻される）。場合により、受容体は、その結合した分子とともに、細胞のリソソーム内に認められる強力な加水分解酵素によって分解することができる

（例えば、インスリン受容体、上皮成長因子受容体、および神経成長因子受容体）。エンドサイトーシス（受容体や、ホルモンなどの結合リガンドの細胞内移行）によって血液循環からホルモンが取り除かれ、細胞表面の受容体の数が減少することから、細胞のホルモンに対する反応性が一時的に低下する。そのため、細胞は（新しいシグナルに対して）反応することができる。

【0084】

好適な実施形態において、本発明はメガリン受容体に関する。本発明のペプチド配列は、メガリンに結合する能力、メガリンに関連するシグナル伝達を活性化する能力、またはメガリンに直接関連しないシグナル伝達を活性化する能力を有する。後述する様式の「シグナル受容」は、結合後に膜貫通タンパク質（例えば、メガリン）が、細胞内部に存在する膜貫通（すなわち、原形質膜を通る）タンパク質の一部を活性化するとき起こる。このような「活性化」によって、細胞内部のエフェクターが細胞内で「シグナル」化学物質を産生し、それによって細胞の核が（遺伝子発現を介して）元の細胞外化学シグナル（膜貫通タンパク質の受容体部分にそれ自体を結合するシグナル）に反応する。

【0085】

本発明のペプチド配列は、メガリンに結合する能力を有する。メガリンはスカベンジャー受容体であり、多数のリガンドを有することから、本発明のペプチド配列は、メガリンへのリガンドの結合を競合的に阻害し、それによって前記リガンドに結合する前記受容体の活性を調節する。

【0086】

本発明の配列の別の種類の受容体には、可溶性MTタンパク質がある。MTの同種結合部位に由来するペプチド配列は、この同種結合部位への結合能を有しており、したがってMTの1つ以上の分子の同種結合に影響を及ぼす。これは、人体の多くの生理学的プロセスに重要であるMTの機能に大きな影響を及ぼす場合がある。したがって、本発明は、配列の好ましい生物学的活性として、本発明のペプチド配列をMTに結合する能力にも関する。

【0087】

4. 個々のペプチド配列の産生

本発明のペプチド配列は、該ペプチド配列が誘導される従来のいずれかの合成方法、遺伝子組み換えDNA技術、完全長タンパク質の酵素開裂、または前記方法の組合せによって作製することができる。

【0088】

遺伝子組み換えによる作製

したがって、一実施形態において、本発明のペプチドは、遺伝子組み換えDNA技術を使用して作製される。

【0089】

ペプチド、またはそのペプチドの起源となる対応する完全長タンパク質をコードするD

10

20

30

40

50

NA配列は、確立された標準的な方法、例えばBeaucage and Caruthers, 1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1869に記載のホスホアミジン法、またはMatthes et al., 1984, EMBO J. 3: 801-805に記載の方法により合成で調製することができる。このホスホアミジン法によれば、オリゴヌクレオチドは、例えば自動DNA合成装置で合成され、精製され、アニールされ、ライゲートされ、適切なベクターにクローニングされる。

【0090】

ペプチドをコードするDNA配列はまた、標準的なプロトコルにしたがって、DNAase Iを使用し、ペプチド起源の対応する完全長タンパク質をコードするDNA配列を断片化することにより、調製することもできる (

Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory manual. 2nd ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。本発明は、上記に同定したタンパク質群から選択される完全長タンパク質に関する。あるいは、本発明の完全長タンパク質をコードするDNAが、特定の制限酵素を使用して断片化することができる。DNAの断片は、Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory manual. 2nd ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, 1989に記載の標準的な手順を使用してさらに精製される。

【0091】

完全長タンパク質をコードするDNA配列はまた、ゲノムDNAまたはcDNA由来でよく、例えば、ゲノムDNAまたはcDNAライブラリーを作成し、標準的な技法に従って、合成オリゴヌクレオチドプローブを使用したハイブリダイゼーションにより、完全長タンパク質のすべてまたは一部をコードするDNA配列をスクリーニングすることにより得られる (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989を参照)。DNA配列はまた、例えば、米国特許第US 4,683,202号またはSaiki et al., 1998, Science 239: 487-491に記載される特定のプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応によって作製することができる。

【0092】

次に、DNA配列を組み換え発現ベクターに挿入するが、このベクターは、遺伝子組み換えDNA法を便利に施すことができるどのようなベクターであってもよい。ベクターの選択は、ベクターが導入される宿主細胞によって決定されることが多い。したがって、ベクターは、自己複製ベクター、すなわち染色体外要素として存在し、その複製が染色体の複製とは関係ないベクター、例えばプラスミドであってもよい。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入される際に、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体(複数可)とともに複製されるベクターであってもよい。

【0093】

ベクターでは、ペプチドまたは完全長タンパク質をコードするDNA配列を適切なプロモーター配列に操作可能に結合しなければならない。プロモーターは、選択された宿主細胞において転写活性を示す宿主細胞と相同または非相同いずれかのタンパク質をコードする遺伝子に由来してもよい任意のDNA配列である。哺乳動物の細胞内でコードDNA配列の転写を誘導するのに適切なプロモーターの例としては、SV40プロモーター (Suzbramani et al., 1981, Mol. Cell. Biol. 1: 854-864)、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子)プロモーター (Palmiter et al., 1983, Science 222: 809-814)、またはアデノウイルス2主後期プロモーターがある。昆虫細胞での使用に適したプロモーターは、ポリヘドリンプロモーター (Vasudevian et al., 1992, FEBS Lett. 311: 7-11)である。酵母宿主細胞での使用に適したプロモーターには、酵母解糖系遺伝子由来のプロモーター (Hitzeman et al., 1980, J.

10

20

30

40

50

Biol. Chem. 255:12073-12080; Alber and Kawasaki, 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1:419-434)、またはアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子由来のプロモーター (Young et al., 1982, in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaender et al., eds., Plenum Press, New York)、またはTPI1 (米国特許第4,599,311号)またはADH2-4c (Russell et al., 1983, Nature 304:652-654)プロモーターが挙げられる。糸状菌宿主細胞での使用に適したプロモーターは、例えば、ADH3プロモーター (McKnight et al., 1985, EMBO J. 4:2093-2099)またはtpiAプロモーターである。

10

【0094】

コードDNA配列はまた、適切なターミネーター、例えばヒト成長ホルモントーミネーター (Palmiter et al., 前掲)または(菌類宿主の場合)TPI1 (Alber and Kawasaki 前掲)またはADH3 (McKnight et al., 前掲)プロモーターに操作可能に結合されていてもよい。ベクターは、さらにポリアデニル化シグナル (例えば、SV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のシグナル)、転写エンハンサー配列 (例えば、SV40エンハンサー)、および翻訳エンハンサー配列 (例えば、アデノウイルスVAのRNAをコードする配列)などの要素を含むことができる。

20

【0095】

遺伝子組み換え発現ベクターは、さらに件の宿主細胞内におけるベクターの複製を可能にするDNA配列を含むことができる。このような配列の一例としては、(宿主細胞が哺乳動物細胞の場合)SV40由来の複製がある。ベクターはまた、選択マーカー、例えばその産物が宿主細胞の欠陥を補う遺伝子、例えばジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)をコードする遺伝子、または薬剤 (例えば、ネオマイシン、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなど)に対する耐性を付与する遺伝子を含んでもよい。

【0096】

ペプチドまたは完全長タンパク質をコードするDNA配列、プロモーターおよびターミネーターをそれぞれライゲーションし、複製に必要な情報を含む適切なベクターにそれら

30

【0097】

本発明の遺伝子組み換えペプチドを得るために、コードDNA配列は、第2のペプチドコード配列とプロテアーゼ開裂部位コード配列と有用に融合させて、融合タンパク質をコードするDNA構築物を得ることができ、

前記プロテアーゼ開裂部位コード配列は、HBP断片と第2のペプチドコードDNAの間に位置し、

遺伝子組み換え発現ベクターに挿入され、遺伝子組み換え宿主細胞内で発現する。一実施形態において、前記第2のペプチドは、グルタチオンS還元酵素、ウシサイモシン、細菌性チオレドキシン、またはヒトユビキチンの天然または合成変異体、またはそれらのペプチドからなる群から選択されるが、これらに限定されない。別の実施形態において、プロテアーゼ開裂部位を含むペプチド配列は、

40

ファクターXa (アミノ酸配列IEGRを有する)、

エンテロキナーゼ (アミノ酸配列DDDDKを有する)、

トロンピン (アミノ酸配列LVPR/GSを有する)、または

アクロモバクター・リティカス (アミノ酸配列XKXを有する)の開裂部位である場合がある。

【0098】

発現ベクターが導入される宿主細胞は、ペプチドまたは完全長タンパク質を発現する能

50

力を有する任意の細胞でよく、好ましくは真核細胞、例えば無脊椎動物（昆虫）細胞または脊椎動物細胞、例としては、アフリカツメガエルの卵母細胞、または哺乳動物細胞、特に昆虫および哺乳動物細胞である。適切な哺乳動物細胞株の例として、HEK293（ATCC CRL-1573）、COS（ATCC CRL-1650）、BHK（ATCC CRL-1632、ATCC CCL-10）またはCHO（ATCC CCL-61）細胞株がある。哺乳動物細胞をトランスフェクトし、細胞に導入したDNA配列を発現させる方法は、例えば、Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.* 159, 1982, pp.601-621; Southern and Berg, 1982, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341; Loyter et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:422-426; Wilger et al., 1978, *Cell* 14:725; Corsano and Pearson, 1981, in *Somatic Cell Genetics* 7, p.603; Graham and van der Eb, 1973, *Virology* 52:456; および、Neumann et al., 1982, *EMBO J.* 1:841-846に記載されている。

10

20

30

40

50

【0099】

あるいは、真菌細胞（酵母細胞を含む）は宿主細胞として使用することができる。適切な酵母細胞の例としては、サッカロミセス属菌またはシゾサッカロミセス属菌、特にサッカロミセス・セレヴィシエの菌株の細胞が挙げられる。その他の真菌細胞の例には、糸状菌の細胞、例えばアスペルギルス属菌またはニューロスポラ属菌、特にアスペルギルス・オリゼーまたはアスペルギルス・ニガーの菌株がある。タンパク質発現のためのアスペルギルス属菌の使用については、例えば欧州特許EP238023に記載されている。

【0100】

細胞培養に使用される培地は、哺乳動物細胞の成育に適した従来任意の培地、例えば適切な補助成分を含有する血清含有培地または血清非含有培地、あるいは昆虫、酵母、または真菌細胞の生育に適した培地を用いることができる。適切な培地は、民間の納入業者より入手可能であるか、あるいは公表されている製造法（例えば、American Type Culture Collectionのカatalogなどに記載の）に従って調製することができる。

【0101】

次に、遠心分離または濾過によって宿主細胞を培地から分離し、上清またはろ液のタンパク質様成分を例えば硫酸アンモニウムなどの塩を使用して沈殿し、種々のクロマトグラフィー法（例えば、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなど）で精製するステップを含む従来手法によって、細胞から遺伝子組み換え技術により産生されたペプチドまたは完全長タンパク質を、培養培地から回収することができる。

【0102】

合成による調製

ペプチドを合成によって作製する方法は、当業界で周知である。合成ペプチドの産生に関する詳細な説明ならびに実用的な助言は、*Synthetic Peptides: A User's Guide (Advances in Molecular Biology)*; Grant G.A. ed., Oxford University Press, 2002; または *Pharmaceutical Formulation: Development of Peptide and Proteins*, Frokjaer and Hovgaard eds., Taylor and Francis, 1999に記載されている。

【0103】

ペプチドは、例えば、Fmoc化学法、およびAc基で保護したシステインを使用することにより合成することができる。ペプチドは、逆相HPLCによる精製後、さらに処理して、例えば環状またはC末端もしくはN末端修飾アイソフォームを得ることができる

。環化または末端修飾の方法は、当業界で周知であり、上で引用したマニュアルに詳細に記されている。

【0104】

好ましい実施形態において、本発明のペプチド配列は、合成によって、特に配列支援ペプチド合成 (SAPS) 法を使用して産生される。

【0105】

SAPS法により、ペプチドは、濾過用のポリプロピレンフィルターを備えたポリエチレン容器内でバッチ式で、あるいは全自動ペプチド合成装置で、N - a - アミノ基の保護基として、および側鎖の官能基の適切な共通保護基として 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) または tert - ブチルオキシカルボニル (Boc) を使用して、連続流のポリアミド固相法 (Dryland, A. and Sheppard, R.C., (1986) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 125 - 137) で合成することもできる。

10

【0106】

合成が終了したら、当業界で周知の技法を使用して個々のペプチド配列を多量体として配合することができ、例えば、

国際公開 W O O O / 1 8 7 9 1 に記載の L P A 法を使用して配列の二量体を、および国際出願 P C T / U S 9 0 / 0 2 0 3 9 に記載の M A P 合成を使用してデンドリマーポリマーを得ることができ。

20

【0107】

5. 抗体

本発明の別の目的は、本発明のモチーフ、または配列番号 1 ~ 6 4 から選択される配列、または前記配列の断片を含むエピトープを認識し選択的に結合する能力を有する抗体、抗原結合断片またはそれらの遺伝子組み換えタンパク質を提供することであり、好ましくは、前記エピトープは、MTタンパク質の配列、例えば、

メタロチオネイン - 1 A (M T 1 A)、メタロチオネイン - 1 B (M T 1 B)、

メタロチオネイン - 1 E (M T 1 E)、メタロチオネイン - 1 F (M T 1 F)、

メタロチオネイン - 1 G (M T 1 G)、メタロチオネイン - 1 H (M T 1 H)、

メタロチオネイン - 1 I (M T 1 I)、メタロチオネイン - 1 K (M T 1 K)、

メタロチオネイン - 1 L (M T 1 L)、メタロチオネイン - 1 R (M T 1 R)、

メタロチオネイン - 1 X (M T 1 X)、メタロチオネイン - 2 (M T 2)、

メタロチオネイン - 3 (M T 3)、メタロチオネイン - 4 (M T 4) に存在する。

30

【0108】

「エピトープ」という用語は、(その抗原の)抗体(それにより免疫反応を起こす)によって認識される(抗原分子上の)特定の群の原子を意味する。「エピトープ」という用語は、「抗原決定基」と同義である。エピトープは、3個以上のアミノ酸残基、例えば4、5、6、7、8個のアミノ酸残基を含むことができ、これらは、例えば隣接するアミノ酸配列内などびったり近接しているか、あるいは抗原のアミノ酸配列から離れた部分に位置するとしても、タンパク質の折りたたみによって互いに近接している。

40

【0109】

抗体分子は免疫グロブリンと呼ばれる血漿タンパク質ファミリーに属し、その構成要素、免疫グロブリンフォールドまたはドメインは、免疫系やその他の生物学的認識システムの多くの分子において種々の形で使用される。典型的な免疫グロブリンは、可変領域として知られる抗原結合領域と、定常領域として知られる非可変領域を含む4個のポリペプチド鎖を有する。

【0110】

天然抗体および免疫グロブリンは、通常、約 1 5 0 , 0 0 0 ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質であり、2本の同一の軽鎖(L鎖)と2本の同一の重鎖(H鎖)からなる。軽鎖はそれぞれ重鎖とジスルフィド共有結合で結合しているが、ジスルフィド結合の数は、種々の免疫グロブリンのアイソタイプの重鎖間で異なる。それぞれの軽鎖および重鎖は

50

また、規則的な間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。重鎖は、それぞれの一端に可変ドメイン(VH)があり、いくつかの定常ドメインが続いている。各軽鎖は、その一端に可変ドメイン(VL)を有し、他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと並んでおり、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。特定の amino 酸残基は、軽鎖と重鎖の可変ドメインの間に接触部分を形成すると考えられている(Novotny J, & Haber E. Proc Natl Acad Sci USA. 82(14): 4592-6, 1985)。

【0111】

これらの重鎖が有する定常ドメインの amino 酸配列によって、免疫グロブリンは種々のクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンのクラスには、以下の少なくとも5つの主要なクラス、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、これらのいくつかはさらにサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG-1、IgG-2、IgG-3およびIgG-4; IgA-1およびIgA-2に分けることができる。免疫グロブリンの各種クラスに対応する重鎖の定常ドメインは、それぞれアルファ()、デルタ()、イプシロン()、ガンマ()、およびミュー(μ)と呼ばれる。抗体の軽鎖は、それらの定常ドメインの amino 酸配列に基づいて、カッパ()およびラムダ()と呼ばれる明確に異なる2つのタイプのいずれか1つに分けられる。各種クラスの免疫グロブリンのサブユニット構造や三次元形状は周知である。

10

【0112】

抗体の可変ドメインにおける「可変」という用語は、可変ドメインの特定の部位の配列が抗体間で大きく異なることを意味する。可変ドメインは、結合のためのものであり、特定の抗体おのものが有する、それらの特定の抗原への特異性を決定するものである。しかし、抗体の可変ドメイン全体にわたって可変性が等しく分布するわけではない。可変性は、軽鎖および重鎖の両可変ドメインに存在する超可変領域としても知られる相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つのセグメントに集中している。

20

【0113】

可変ドメインのより高度に保存された部位は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ4つのFR領域を含み、これらの大部分はシート構造をとり、3つのCDRによって結合しており、これらはシート構造に結合するループを形成し、場合によりその一部を形成している。それぞれの鎖のCDRは、FR領域によってぴったり近接して互いに保持されており、他方の鎖のCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。定常ドメインは抗体と抗原の結合に直接関与しないが、例えば抗体依存性細胞毒性における抗体の参加などの種々のエフェクター機能を示す。

30

【0114】

したがって、本発明での使用が企図される抗体は、免疫グロブリン全体、Fv、Fabなどの抗体の断片や類似の断片、可変ドメインの相補性決定領域(CDR)を含む一本鎖抗体、ならびに同様の形態のものを含む種々の形態のいずれかであってよく、これらはすべて、本明細書で使用される「抗体」という広義の用語に該当する。本発明は、抗体の任意の特異性(ポリクローナル性またはモノクローナル性)を使用することを企図するものであり、特定の抗原を認識し、免疫反応を行う抗体に限定されない。好適な実施形態において、以下に記載する治療法およびスクリーニング法の両方法では、本発明の抗原またはエピトープに免疫学的に特異的な抗体またはその断片が使用される。

40

【0115】

「抗体断片」という用語は、完全長抗体の一部、一般的には抗原結合領域または可変領域を指す。抗体断片の例として、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片が挙げられる。抗体をパイン消化すると、それぞれ単一の抗原結合部位を有するFab断片と、容易に結晶化するその能力を反映した名称の残りの「Fc」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片が産生される。ペプシン処理により、抗原と架橋結合する能力を有する2つの抗原結合断片を有するF(ab')₂断片が得られ、残りの他の断片(pFc'

50

と呼ばれる)が得られる。更なる断片として、ダイアボディ、線状抗体、一本鎖抗体分子、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体を挙げることができる。本明細書で使用される、抗体に関する「機能的断片」とは、Fv、F(ab)、F(ab')₂断片を指す。

【0116】

本明細書において「抗体断片」という用語は、「抗原結合断片」という用語と交換可能に使用される。

【0117】

抗体断片は、約4個のアミノ酸、5個のアミノ酸、6個のアミノ酸、7個のアミノ酸、9個のアミノ酸、約12個のアミノ酸、約15個のアミノ酸、約17個のアミノ酸、約18個のアミノ酸、約20個のアミノ酸、約25個のアミノ酸、約30個のアミノ酸、またはそれ以上のアミノ酸であってもよい。一般的に、本発明の抗体断片は、本明細書で配列番号1~85として同定される配列、または該配列の断片のいずれかから選択されるペプチド配列を含むエピトープと特異的に結合する抗体に対して、同様の特性または免疫学的特性を有する限りは、任意のサイズ上限を有することができる。したがって、本発明の文脈において「抗体断片」という用語は、「抗原結合断片」という用語と同一である。

10

【0118】

抗体断片は、その抗原または受容体と選択的に結合するある程度の能力を保有する。いくつかのタイプの抗体断片は、以下のように定義される：

(1) Fabは、抗体分子の一価の抗原結合断片を含む断片である。Fab断片は、パイン酵素で抗体全体を消化し、1本の無傷な軽鎖と1本の重鎖の一部を得ることによって、産生することができる。(2) Fab'は、抗体全体をペプシンで処理した後、還元を行い、1本の完全な軽鎖と重鎖の一部とを得ることによって得られる、抗体分子の断片である。1個の抗体分子につき2つのFab'断片が得られる。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域に由来する1個以上のシステインを含む重鎖のCH1ドメインのカルボキシル末端に数個の残基が添加されている点でFab断片と異なる。(3) (Fab')₂は、酵素のペプシンで抗体全体を処理することによって、その後の還元を行わなうことなく得られる抗体の断片である。(4) F(ab')₂は、2つのジスルフィド結合で互いに保持される2つのFab'断片の二量体である。Fvは、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、強固な非共有結合性により会合している、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの二量体(V_H-V_L二量体)で構成される。この構造では、各可変ドメインの3つのCDRが相互に作用して、V_H-V_L二量体の表面上に抗原結合部位を定める。これらの6つのCDRが一緒になって、抗体に抗原結合特異性をもたらす。しかし、たとえ単一の可変ドメイン(または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でも、結合部位全体よりも親和性に劣るものの、抗原を認識し結合する能力を有する。(5) 一本鎖抗体(SCA)は、適切なポリペプチドリナーによって結合した軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を、遺伝子的に融合された一本鎖分子として含む、遺伝子操作された分子として定義される。このような一本鎖抗体は、「一本鎖Fv」または「sFv」抗体断片とも呼ばれる。一般的に、Fvポリペプチドは、さらに、抗原結合に望ましい構造をsFvが形成できるVHドメインとVLドメインの間にポリペプチドリナーを含む。sFvのレビューについては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113:269-315 Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, NY, 1994を参照されたい。

20

30

40

【0119】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、この断片は、軽鎖可変ドメイン(VL)に結合した重鎖可変ドメイン(VH)を同じポリペプチド鎖内に含む(VH-VL)。同じ鎖上でこれら2つのドメイン間の対合を行うには短すぎるリンカーを使用することで、これらのドメインは、他方の鎖の相補的なドメ

50

インと対合させられて、2つの抗原結合部位を作り出す。ダイアボディは、例えば、欧州特許EP404,097；国際公開WO93/11161；およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)により詳細に記載されている。

【0120】

本発明は、本発明に基づきエピトープと結合する能力を有する、ポリクローナルおよびモノクローナルの両抗体、抗原結合断片およびそれらの遺伝子組み換えタンパク質を企図するものである。

【0121】

ポリクローナル抗体の調製は、当業者に周知である。例えば、Green et al., 1992. Production of Polyclonal Antisera, in: Immunochemical Protocols (Manson, ed.), pages 1-5 (Humana Press); Coligan, et al., Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats Mice and Hamsters, in: Current Protocols in Immunology, section 2.4.1 を参照されたい。これらはここで参考文献として援用される。

【0122】

同様に、モノクローナル抗体の調製も従来どおりである。例えば、Kohler & Milstein, Nature, 256:495-7(1975); Coligan, et al., sections 2.5.1-2.6.7; およびHarlow, et al., in: Antibodies: A Laboratory Manual, page 726, Cold Spring Harbor Pub.(1988)を参照されたい。モノクローナル抗体は、十分に確立された各種の技法を使用して、ハイブリドーマ培養物から単離および精製することができる。このような単離法として、プロテインAセファロースを使用したアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。例えば、Coligan, et al., sections 2.7.1-2.7.12 and sections 2.9.1-2.9.3; Barnes, et al., Purification of Immunoglobulin G (IgG). in: Methods in Molecular Biology, 1992, 10:79-104, Humana Press, NY を参照されたい。

【0123】

モノクローナル抗体のin vitroおよびin vivoでの操作法は、当業者に周知である。例えば、本発明にしたがって使用されるモノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, 1975, Nature 256, 495-7によって初めて発表されたハイブリドーマ法を使用して作製することができ、あるいは、例えば、米国特許US4,816,567に記載の遺伝子組み換え法を使用して作製することができる。本発明とともに使用するモノクローナル抗体は、Clackson et al., 1991, Nature 352:624-628、ならびにMarks et al., 1991, J Mol Biol 222:581-597に記載の技法を使用して、ファージ抗体ライブラリーからも単離することができる。別の方法としては、ヒトに特異的かつ認識可能な配列を含む抗体を作製する遺伝子組み換え法を使用してモノクローナル抗体をヒト化して、ステップを伴う。例えば、Holmes, et al., 1997, J Immunol 158:2192-2201; およびVaswani, et al., 1998, Annals Allergy, Asthma & Immunol 81:105-115を参照されたい。

【0124】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団、すなわち、わずかに存在する可能性がある天然の変異体を除けば、集団を構成する個

10

20

30

40

50

々の抗体が同一である、集団から得られる抗体を指す。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原部位に誘導される。さらに、種々の抗原決定基（エピトープ）に対して作られる種々の抗体を通常含む従来のポリクローナル抗体製剤とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して誘導される。これらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他の免疫グロブリンにより汚濁されないという点で有利である。「モノクローナルの」という修飾語は実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示すものであり、何らかの特定の方法による抗体の産生が必要であると解釈されるものではない。

【0125】

本明細書において、モノクローナル抗体として、具体的には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、あるいは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性を示す「キメラ」抗体（免疫グロブリン）が挙げられ、

一方で、残りの鎖（複数可）は、別の種に由来するか、あるいは別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と、このような抗体の断片と同様に、同一であるか、相同性を示す（所望の生物学的活性を示す限り）（米国特許US4,816,567; Morrison et al., 1984, Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855）。

【0126】

抗体断片を作製する方法もまた、当業界で周知である（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988を参照、ここで参考文献として援用される）。本発明の抗体断片は、抗体のタンパク質加水分解によって、または断片をコードするDNAを大腸菌で発現させることによって調製することができる。抗体断片は、従来の方法である、抗体全体のペプシンまたはパインの消化により得ることができる。例えば、抗体断片は、ペプシンを使用して抗体を酵素的に開裂することにより産生することができ、 $F(ab')_2$ で表される5Sの断片を供することができる。この断片は、チオール還元剤、および所望によりジスルフィド結合の開裂から得られるスルフヒドリル基用の封鎖基を使用して、さらに開裂することができ、3.5SのFab'の一価の断片を産生することができる。あるいは、ペプシンを使用した酵素開裂により、2つの一価のFab'断片と1つのFc断片が直接産生される。これらの方法は、例えば、米国特許US4,036,945およびUS4,331,647号、ならびにこれらに含まれる参考文献に記載されている。これらの特許は全体が参考文献として本明細書に援用される。

【0127】

断片が完全な抗体によって認識される抗原に結合する限りは、抗体を開裂するその他の方法、例えば重鎖を分離して一価の軽鎖-重鎖断片を形成する方法、断片をさらに開裂する方法、あるいはその他の酵素的、化学的または遺伝子学的技法もまた使用することができる。例えば、Fv断片は、 V_H 鎖と V_L 鎖との会合を含む。この会合は非共有結合でよく、あるいは可変鎖が、分子間ジスルフィド結合によって結合されても、グルタルアルデヒドなどの化学物質で架橋されてもよい。好ましくは、Fv断片は、ペプチドリナーによって結合した V_H 鎖と V_L 鎖を含む。これらの一本鎖抗原結合タンパク質（sFv）は、オリゴヌクレオチドによって結合した V_H および V_L ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構成することにより調製される。構造遺伝子は発現ベクターに挿入され、発現ベクターはその後大腸菌などの宿主細胞に導入される。遺伝子組み換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する、一本のポリペプチド鎖を合成する。sFvの産生方法は、例えば、Whitlow, et al., 1991, in: Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97; Bird et al., 1988, Science 242:423-426; 米国特許US4,946,778; およびPack, et al.,

10

20

30

40

50

1993, *BioTechnology* 11:1271-77に開示されている。

【0128】

抗体断片の別の形態には、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドがある。CDRペプチド(「最小の認識ユニット」)は、抗原の認識と結合に関与することが多い。CDRペプチドは、対象となる抗体のCDRをコードする遺伝子をクローニングまたは構築することにより得ることができる。このような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAから可変ドメインを合成するポリメラーゼ連鎖反応を使用して調製される。例えば、Larrick, et al., *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 106 (1991)を参照されたい。

10

【0129】

本発明は、ヒト抗体、およびヒト化した非ヒト(例えば、マウス)抗体を企図する。このようなヒト化抗体は、非ヒトの免疫グロブリン由来の最小配列、例えばエピトープ認識配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらの断片(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体のその他の抗原結合サブ配列)である。ヒト化抗体の大部分は、所望の特異性、親和性および機能を有するヒト以外の種(ドナー抗体)、例えばマウス、ラットまたはウサギのCDRの残基によって、レシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が置換される、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。本発明の抗体(複数可)の最小配列(複数可)を含むヒト化抗体(複数可)、例えば本明細書に記載のエピトープ(複数可)を認識する配列(複数可)は、本発明の好適な実施形態の1つである。

20

【0130】

場合により、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワークの残基は、対応する非ヒトの残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、取り込まれたCDRまたはフレームワーク配列のいずれにも見られない残基を含むことができる。これらの修飾は、抗体の性能をさらに改良し最適化するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインのほぼすべてを含み、CDR領域のすべてまたはほぼすべてが、ヒト以外の免疫グロブリンの領域に対応し、FR領域のすべてまたはほぼすべてが、ヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列の領域である。ヒト化抗体は、好ましくは、少なくとも免疫グロブリンの定常領域(Fc)の一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの一部を含む。より詳細には、Jones et al., 1986, *Nature* 321, 522-525; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332, 323-329; Presta, 1992, *Curr Opin Struct Biol* 2:593-596; Holmes et al., 1997, *J Immunol* 158:2192-2201; および Vaswani, et al., 1998, *Annals Allergy, Asthma & Immunol* 81:105-115を参照されたい。

30

【0131】

抗体の作製は、
 メタロチオネイン-1A(MT1A)、メタロチオネイン-1B(MT1B)、
 メタロチオネイン-1E(MT1E)、メタロチオネイン-1F(MT1F)、
 メタロチオネイン-1G(MT1G)、メタロチオネイン-1H(MT1H)、
 メタロチオネイン-1I(MT1I)、メタロチオネイン-1K(MT1K)、
 メタロチオネイン-1L(MT1L)、メタロチオネイン-1R(MT1R)、
 メタロチオネイン-1X(MT1X)、メタロチオネイン-2(MT2)、
 メタロチオネイン-3(MT3)、またはメタロチオネイン-4(MT4)
 などのヒトMTタンパク質の天然または遺伝子組み換え断片を使用して、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を産生するために当業界で標準的に使用される任意の方法で達成することができる、前記断片は、抗原として本発明の構造モチーフを含み、例えば、配列番号9~64から選択される配列、例としては配列番号1~64から選択される配列を

40

50

含む。このような抗体はまた、配列番号 1 ~ 64 のペプチド配列の変異体、ホモログまたは断片を使用して作製することができ、前記変異体、ホモログ、および断片は、以下の基準を満たす免疫原性ペプチド配列である：

- (i) 少なくとも 6 個のアミノ酸の連続するアミノ酸配列である、
- (i i) 本発明のモチーフを含む。

【 0 1 3 2 】

抗体はまた、治療を受ける個体を使用して、例えば、当該個体に本発明の免疫原性断片を投与することにより、*in vivo* で産生することができる。したがって、本発明はさらに、上述の免疫原性断片を含むワクチンにも関する。

【 0 1 3 3 】

本願はまた、本発明の抗体を作製する方法に関し、該方法は上述の免疫原性断片を用意する工程を含む。

【 0 1 3 4 】

本発明は、

メタロチオネイン - 1 A (M T 1 A)、メタロチオネイン - 1 B (M T 1 B)、
メタロチオネイン - 1 E (M T 1 E)、メタロチオネイン - 1 F (M T 1 F)、
メタロチオネイン - 1 G (M T 1 G)、メタロチオネイン - 1 H (M T 1 H)、
メタロチオネイン - 1 I (M T 1 I)、メタロチオネイン - 1 K (M T 1 K)、
メタロチオネイン - 1 L (M T 1 L)、メタロチオネイン - 1 R (M T 1 R)、
メタロチオネイン - 1 X (M T 1 X)、メタロチオネイン - 2 (M T 2)、
メタロチオネイン - 3 (M T 3)、またはメタロチオネイン - 4 (M T 4)

の生物学的機能を調節する、例えば、増強または減退する能力を有する抗体、
ならびに本発明のエピトープへの結合の際に M T の機能を調節しない抗体の両方に関する。
本文脈において、

メタロチオネイン - 1 A (M T 1 A)、メタロチオネイン - 1 B (M T 1 B)、
メタロチオネイン - 1 E (M T 1 E)、メタロチオネイン - 1 F (M T 1 F)、
メタロチオネイン - 1 G (M T 1 G)、メタロチオネイン - 1 H (M T 1 H)、
メタロチオネイン - 1 I (M T 1 I)、メタロチオネイン - 1 K (M T 1 K)、
メタロチオネイン - 1 L (M T 1 L)、メタロチオネイン - 1 R (M T 1 R)、
メタロチオネイン - 1 X (M T 1 X)、メタロチオネイン - 2 (M T 2)、
メタロチオネイン - 3 (M T 3)、またはメタロチオネイン - 4 (M T 4)

の好ましい生物学的機能は、細胞の分化または細胞の生存を促進する能力、
神経の再生を促進する能力、
酸化ストレス反応を抑制する能力、
星状細胞を活性化し、生存を促進する成長因子およびタンパク質の産生を活性化する能力

、
炎症を抑制する能力、

神経細胞の形態学および機能的可塑性を促進する能力、

例えば新生ニューロンによる新たな機能的シナプスの形成を促進するシナプス可塑性を増強させる能力

である。

【 0 1 3 5 】

6. キット

本発明は、M T に結合する能力を有する化合物を開示する。一実施形態において、本発明は、上述のアミノ酸モチーフを含む、または上述の M T の断片を含むか、該断片から構成されるペプチド配列に関する。別の実施形態において、本発明は、上述のエピトープに結合する能力を有する抗 M T 抗体に関する。ペプチド配列および抗体の両方とも、個体から採取した試料、例えば体液または生検の試料中の M T を検出するために使用することができる。

【 0 1 3 6 】

一態様においては、MTの機能に関連する疾患を発症する被験体のリスクを診断または予測するためのキットが提供される。このようなキットの非限定的な使用例には、原発性黒色腫の進行により増大するリスクの評価（種々の癌におけるMTの過剰発現は、抗癌剤や放射線治療への耐性、ならびにこのような疾患の貧弱な予後に関連する（Weinlich et al., Br J Dermatol. 2003, 149(3): 535-41)）、慢性C型肝炎ウイルス感染（HCV）の重症度の評価（MTの発現は慢性HCV感染の重篤度を反映する可能性があり、インターフェロン治療に反応したことによる良好な臨床転帰に関連する因子の1つとなる可能性がある（Carrera et al., Am J Gastroenterol. 2003, 98(5): 1142-9)）が挙げられる。

10

【0137】

したがって、さらなる実施形態において、本発明は、本発明のペプチド配列、本発明の化合物、および/または本発明の抗体を含むキットを使用することを含む、診断方法に関する。該診断方法は、MTが病因に役割を果たす疾患の診断に使用されるものである。本発明によるキットは、個体から採取した試料中のMTを検出するために使用することができる。本発明の診断方法で使用される試料は、例えば血液、尿、体組織または腫瘍組織の試料などの任意の生体試料、あるいはその他いずれかの適切な生体試料である。

【0138】

別の実施形態においては、溶液中のMTの重合を抑制するためのキットが提供され（MTの凝集は重大な問題であり、罹患体試料中におけるタンパク質の過剰検出につながる（Tang et al., J Anal Toxicol. 1999 May-Jun; 23(3): 153-8）、メタロチオネインの重合もまた、メタロチオネインの構造や機能の研究プロセスにおいて通常遭遇する難題の1つである（Hou et al., Protein Sci. 2000 9(12): 2302-12)）。

20

【0139】

本発明によるキットは、好ましくは、MTに結合する能力を有する少なくとも1つのペプチド配列、および/または少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片を含み、ここで、前記ペプチド配列および/または抗体または抗体断片は、検出可能な標識と結合する。

【0140】

検出可能な標識は、使用する検出法にしたがって選択される任意の種類の標識でよい。適切な標識は、任意の市販の標識から選択され、製造業者の指示にしたがって、本発明のキットの任意の部分、すなわちペプチド配列、化合物および/または抗体に標識を付けるために使用することができる。

30

【0141】

7. 薬学的組成物

本発明はまた、上記で定義した化合物の1つ以上を含む薬学的組成物に関し、前記化合物は、神経突起の伸長および/または神経細胞の分化、神経細胞の生存を促進する能力、および/または学習および/または記憶を促進する能力を有する。したがって、本発明は、ニューロン細胞の分化を促進する能力、および/またはニューロン細胞の再生を促進する能力、および/または学習や記憶に関与するニューロン可塑性を促進する能力、および/または神経細胞の生存を促進する能力を有する薬学的組成物に関する。

40

【0142】

本文脈において「薬学的組成物」という用語は、「医薬品」という用語の同義語として使用される。

【0143】

組成物中では、上述の通り、単離された個々のペプチド断片またはそれらの多量体または二量体を含むように、ペプチド配列を配合することができる。

【0144】

薬学的組成物は、細胞に対する *in vitro* または *in vivo* での上述の効果

50

を有することができ、前記組成物は被験体に投与される。

【0145】

本発明の医薬品は、上記で定めた化合物の1つ以上を有効量含むか、あるいは上記で定めた組成物を薬学的に許容される添加剤と組み合わせる。このような医薬品は、経口、経皮、筋肉内、静脈内、頭蓋内、髄腔内、脳室内、鼻腔内または肺内投与用として適切に配合することができる。

【0146】

本発明の化合物に基づく医薬品および組成物の製剤開発における計画は、一般的にその他の任意のタンパク質系薬品の製剤計画と一致する。潜在的な問題と、これらの問題を解決するために必要なガイダンスについては、例えば“Therapeutic Peptides and Protein Formulation, Processing and Delivery Systems”, Ed. A. K. Banga, Technomic Publishing AG, Basel, 1995などのいくつかの文献で取り扱われている。

10

【0147】

注射物質は、通常、溶液または懸濁液として、あるいは注射前に液体に溶解または懸濁するのに適した固体として調製される。製剤はまた乳化することもできる。有効成分は、薬学的に許容され、有効成分と相溶性を示す賦形剤と混合されることが多い。適切な賦形剤には、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせがある。さらに所望であれば、製剤は、微量の補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、あるいは製剤の有効性または輸送を高める物質を含有することができる。

20

【0148】

本発明の化合物の製剤は、当業者に周知の技法を使用して調製することができる。製剤は、マイクロスフェア、リポソーム、マイクロカプセル、ナノ粒子などを含めた、薬学的に許容される担体や賦形剤を含有することができる。

【0149】

製剤は、注射によって、所望により有効成分がその効果を発揮できる部位に、適切に投与することができる。その他の投与様式に適した他の製剤としては、坐薬、経鼻投与製剤、経肺投与製剤、および場合により経口投与製剤が挙げられる。坐薬の場合、従来の結合剤および担体には、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドが含まれる。このような坐薬は、有効成分(複数可)を0.5~10%、好ましくは1~2%含有する混合物から形成することができる。経口用製剤としては、通常使用される賦形剤、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、徐放性製剤、または粉末の形態をとり、一般的には有効成分(複数可)を10~95%、好ましくは25~70%含有する。

30

【0150】

その他の製剤には、経鼻または経肺投与に適したものの、例えば吸入剤またはエアロゾルがある。

40

【0151】

活性化合物は、中性または塩の状態に配合することができる。薬学的に許容される塩には、酸付加塩(ペプチド化合物の遊離アミノ基で形成)が含まれ、これらは、例えば、塩酸またはリン酸などの無機酸、あるいは酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸を使用して形成される。遊離カルボキシル基で形成される塩はまた、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基に、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導することができる。

【0152】

50

製剤は、投与製剤に適合する方法で、かつ治療効果を発揮する量にて投与される。投与量は、治療を受ける被験体（例えば被験体の体重や年齢を含む）、治療する疾患、および疾患段階に依存する。適切な用量の範囲は、1回の投与で体重1kgにつき有効成分の量が通常は数百 μg のオーダーであり、好ましくは体重1kgにつき約0.1~5000 μg である。化合物の単量体型を使用すると、多くの場合、適切な用量は、体重1kgにつき0.1 μg ~5000 μg 、例えば体重1kgにつき約0.1 μg ~3000 μg 、特に体重1kgにつき約0.1 μg ~1000 μg である。化合物の多量体型を使用すると、多くの場合、適切な用量は、体重1kgにつき0.1 μg ~1000 μg 、例えば体重1kgにつき約0.1 μg ~750 μg 、特に体重1kgにつき約0.1 μg ~500 μg 、例えば体重1kgにつき約0.1 μg ~250 μg である。特に、鼻腔内に投与する場合は、他の経路で投与する場合よりも少ない用量が使用される。投与は1回の場合もあれば、あるいは追加の投与が行われる場合もある。用量も投与経路に依存し、治療を受ける被験体の年齢や体重に応じて変化する。多量体型の好ましい用量は、体重70kgあたり1mg~70mgである。

10

【0153】

一部の適応症においては、局所投与または実質的な局所投与が好ましい。

【0154】

本発明の化合物の一部は十分な活性を有するが、その他の一部については、製剤が薬学的に許容される添加剤および/または担体もさらに含む場合に効果が高まる。このような添加剤および担体は、当業界で周知であろう。場合によっては、有効成分のその標的部位への送達を促進する化合物を含むことが有利となる。

20

【0155】

多くの場合は、製剤を複数回投与することが必要となる。投与は、1日数回、1日1回、1週間に複数回、週1回などにより多い用量での、脳室内注入または投与などの連続注入であってもよい。細胞死をもたらす可能性がある要因（複数可）に個体が曝露される前、または曝露された直後に医薬品の投与を開始することが好ましい。好ましくは、医薬品は、要因の発生から8時間以内、例えば要因の発生から5時間以内に投与される。化合物の多くは長期的な効果を示すことから、化合物の投与は、例えば1週間隔または2週間隔といった長い間隔で行うことができる。

30

【0156】

神経ガイドでの使用と関連して、投与は連続であってもよく、あるいは有効成分（複数可）の制御放出に基づいて少量であってもよい。さらには、放出速度および/または放出部位を制御するために前駆物質を使用することができる。その他の種類の移植や経口投与も、同様に制御放出および/または前駆物質の使用に基づくことができる。

【0157】

上記で考察した通り、本発明は、*in vitro*または*in vivo*で神経細胞の分化を誘導する、再生を促進する、可塑性および生存を促進するための個体の治療に関し、該治療は上記で定めた化合物の1つ以上を有効量投与することを伴う。

【0158】

別の投与法には、問題の化合物を発現し分泌する能力を有する細胞を移植または注入することである。これにより、化合物は、それが作用する場所において産生することができる。

40

【0159】

8. 治療

外傷性損傷、ペラグラ認知症/毒性；てんかん、脳虚血/脳梗塞；EAE/MS（多発性硬化症）；感染性脳障害；筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病；末梢神経損傷、脳マラリア、高齢化/老年期認知症、神経筋損傷、および糖尿病などの脳疾患はすべて、MTの活性と関連があった。アルツハイマー病、ピック病およびALSなどの変性疾患中、MS、ピンスヴァンガー脳症および虚血の最中、ならびに神経筋損傷および糖尿病の最中に、ヒト組織またはヒトの罹患者におけるMTの役割は、

50

部分的にまたはすべてが確認されている。また、幾つかの一般的な自己免疫性疾患、炎症性疾患、およびアレルギー性疾患においても確認されている。

【0160】

したがって、さらなる態様において、本発明は、疾患の治療に使用する医薬品としての、上述のペプチド、またはそれらの断片もしくは変異体、化合物、および抗体に関し、それらが有する以下の能力が治療に不可欠である：

- 例えば、ニューロン細胞の前駆体の分化を促進することなどによる、幹細胞を分化する能力、
- 例えば、神経突起の伸長を促進することによる、神経細胞の分化および/または神経再生を促進する能力、
- 例えば、シナプス効力を促進することによる、記憶や学習に關与する神経可塑性を促進する能力、
- 例えば、神経細胞のアポトーシスを抑制することによる、細胞の生存、特にニューロン細胞の生存を促進する能力、
- 例えば、反応性酸素種のスカベンジ作用の発現を促進することなどによる、酸化ストレス反応を抑制する能力、
- アストログリオシスを活性化する能力、例えば星状細胞による神経保護性成長因子やタンパク質、例えばBDNF、NT-3、GDNF、ノルトリン、アルテミン、NGF、各種線維芽細胞増殖因子(FGF)、S100タンパク質(S100A4、S100A6、S100A10、S100A12、S100B)、IGF-2、ニューレグリンの発現を促進する能力、
- 例えば、ミクログリアやマクロファージの活性化を抑制する、炎症性サイトカインの発現を抑制する、および/または抗炎症反応を促進することなど、炎症を抑制する能力、
- 例えば、血管形成を促進する成長因子(例えばVEGFおよびFGF2)の発現を促進することなど、病変部における血管形成を促進する能力、
- 受容体、例えばメガリン受容体(Swiss-prot受入番号P98164)またはMTタンパク質に結合する能力、およびメガリン受容体を介した血液脳関門を越えるトランスサイトーシスを促進する能力、および/または前記受容体の活性を調節する能力、例えば、この受容体に関連するシグナル伝達を活性化または抑制する、あるいは受容体の生物学的機能を活性化または抑制する能力、
- メタロチオネインに結合し、メタロチオネインの神経保護機能および神経再生機能を促進する能力。

10

20

30

【0161】

一実施形態において、本発明による化合物/組成物を使用した治療は、

その部位に存在するか、あるいは注入または移植される

細胞の分化の誘導、増殖の調節、ならびに再生、ニューロン可塑性および生存の促進に有用である。

【0162】

したがって、前記治療は、中枢神経系および末梢神経系の疾患または病態に關連する細胞損傷および/または細胞死、例えば

手術後の神経損傷、

脊髄損傷に起因する外傷性ニューロン損傷、

神経線維の髓鞘形成能の障害、

梗塞、多発脳梗塞性認知症、多発性硬化症に起因する虚血後の損傷、

糖尿病に付随するニューロン変性、

神経筋編成、統合失調症、アルツハイマー病、パーキンソン病、またはハンチントン病、

の治療および/または予防を含む。

40

【0163】

また、神経筋接合部の機能障害、例えば遺伝性または外傷性の萎縮性筋疾患を伴う病態を含む、筋肉の疾患または病態に關連して、または

50

各種臓器の疾患または病態、

例えば生殖腺の変性病態、膵臓の変性病態、例えば1型および2型糖尿病、

腎臓の変性病態、例えばネフローゼなど、の治療のために、

本発明の化合物は、分化の誘導、増殖の調節、再生、ニューロン可塑性および生存の促進、すなわち生存を促進するために使用することができる。

【0164】

さらなる実施形態において、化合物および/または薬学的組成物は、学習能力および/または短期および/または長期の記憶能力を促進するために使用される。

【0165】

具体的に、本発明の化合物および/または薬学的組成物は、臨床的病態の治療に使用することができる：

例えば精神病、例えば老年性または初老性の器質性精神症状、アルコール精神病、薬物性精神病、一過性器質性精神症状、アルツハイマー病、脳類脂質沈着症、てんかん、進行麻痺（梅毒）、肝レンズ核変性症、ハンチントン舞踏病、ヤコブ・クロイツフェルト病、多発性硬化症、脳ピック病、梅毒、統合失調症、躁うつ病、神経症性障害、性格神経症を含む人格障害、器質脳症候群に付随する非精神病性人格障害、妄想性人格障害、狂信的人格、偏執性人格（障害）、妄想性特性、性的逸脱および性的障害、知的障害、神経系および感覚器官の疾患、認知異常、中枢神経系の炎症性疾患、例えば髄膜炎、脳炎、小脳変性症、例えばアルツハイマー病、ピック病、脳の老年性変性、交通性水頭症、閉塞性水頭症、その他の錐体外路系疾患および異常行動疾患を含むパーキンソン病、脊髄小脳疾患、小脳性運動失調症、Marie型、Sanger-Brown型ミオクロオス性小脳性共同運動障害、原発性小脳変性症、例えば脊髄性筋萎縮症、家族性、若年性、成人筋萎縮、運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症、運動ニューロン疾患、進行性球麻痺、仮性球麻痺、原発性側索硬化症、その他の前角細胞疾患、前角細胞疾患、その他の不特定の脊髄の疾患、脊髄空洞症および延髄空洞症、血管性ミエロパシー、脊髄急性梗塞（塞栓症）（非塞栓性）、脊髄動脈血栓症、脊髄浮腫、亜急性壊死ミエロパシー、他の部位で特定された疾患における亜急性連合性脊髄変性症、ミエロパシー、薬剤誘導性、放射線誘導性脊髄炎、自律神経系疾患、末梢自律神経系、交感神経系、副交感神経系または植物性神経系疾患、家族性自律神経障害（ライリー-デイ症候群）、突発性末梢自律性ニューロパシー、頸動脈洞性失神または症候群、頸部交感神経性ジストロフィまたは麻痺、他の部位で特定された疾患における末梢自律性ニューロパシー、アミロイドーシス、末梢神経系疾患、上腕神経叢病変、頸肋症候群、肋骨鎖骨症候群、前斜角筋症候群、胸郭出口症候群、新生児に発生するものを含めた上腕神経炎または神経根炎、炎症性および中毒性ニューロパシー、例えば感染性急性多発性神経炎、ギラン-バレー症候群、感染後多発性神経炎、膠原血管病における多発ニューロパシー、眼球の複数の構造に影響を及ぼす疾患、化膿性内眼球炎、耳および乳様突起の疾患、新生児における、神経系を含めた臓器および軟部組織の異常、陣痛および分娩時の麻酔薬またはその他の鎮静剤の投与による合併症、感染症を含めた皮膚疾患、血液循環不足による問題、手術後のものを含めた傷害、挫滅外傷、火傷、神経断裂を含めた神経および脊髄の損傷、連続性病変（開放創を伴うまたは伴わない）、外傷性神経腫（開放創を伴うまたは伴わない）、外傷性一過性麻痺（開放創を伴うまたは伴わない）、医療行為中の偶発的な穿通または裂傷、視神経および視覚経路の損傷、視神経傷害、第2脳神経、視交叉の損傷、視覚経路の損傷、視覚野の損傷、詳細不明の失明、その他脳神経（複数可）の損傷、その他のおよび不特定の神経の損傷、薬剤、薬物および生物学的物質による中毒、遺伝性または外傷性筋萎縮性疾患、

あるいは、様々な臓器の疾患または病態の治療のために使用することができる：例えば、生殖腺の変性病態、膵臓の変性病態、例えば1型および2型糖尿病、腎臓の変性病態、例えばネフローゼ、新生物、例えば悪性新生物、良性新生物、性状不詳の上皮内癌および新生物、より具体的には、乳腺、甲状腺、膵臓、脳、肺、腎臓、前立腺、肝臓、心臓、皮膚、血液系（CMLおよびAMLを含むがこれらに限定されない）、筋肉（肉腫）の癌、機能障害および/または特定の受容体の過剰発現もしくは発現低下および/または変異型受

10

20

30

40

50

容体の発現を伴う、あるいはErb受容体およびFGF受容体などが含まれる（しかし、これらに限定されない）可溶性受容体に関連する癌、自己免疫疾患、例えば関節リウマチ、SLE、ALSおよびMS、抗炎症性作用、アミロイドーシス、慢性リウマチ性心疾患、虚血性心疾患、不整脈、喘息およびその他のアレルギー反応；酸素などを感知する肺系、気管支系疾患、喘息、陣痛および分娩時の麻酔薬またはその他の鎮静剤の投与による合併症、急性心筋梗塞、および急性心筋梗塞のその他の関連疾患または続発症；代謝性障害、例えば脂質障害（例えば、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化症）、1型および2型糖尿病、内分泌腺の疾患、例えば1型および2型糖尿病、下垂体腫瘍、アミノ酸輸送および代謝障害、プリンおよびピリミジン代謝障害、通風、ミエロパシー、薬剤誘発性、放射線誘発性脊髄炎、骨疾患、例えば骨折、骨粗しょう症、骨関節炎（OA）、肥満；*in vivo*または*in vitro*での幹細胞保護または成熟、神経細胞新生などの治療に使用することができる。

10

【0166】

脳の炎症は、感染症、自己免疫プロセス、中毒、およびその他の病態の結果であることが多い。ウイルス感染は、この病態の比較的多い原因である。脳炎は、トガウイルス感染症、ヘルペスウイルス感染症、アデノウイルス感染症、フラビウイルス科ウイルス感染症、ブニヤウイルス感染症、ピコルナウイルス感染症、パラミクソウイルス感染症、オルトミクソウイルス感染症、レトロウイルス感染症、およびアレナウイルス感染症の原発性または続発性の徴候として発生する場合がある。

20

【0167】

したがって、本発明のペプチド、化合物または薬学的組成物は、ウイルス感染症に関連する脳の炎症の治療に使用することができる。

【0168】

補体活性化がギラン・バレー症候群に発生するニューロン細胞損傷およびグリア損傷にとって重要な機序であることは、多くの臨床および実験データによって示される。したがって、補体活性化の抑制は、疾患の進行を制限することが予想される（Halstead et al. (2005) *Annals of Neurology* 58:203-21）。

30

【0169】

したがって、別の実施形態において、ペプチド配列、化合物、および薬学的組成物は、ギラン・バレー症候群や、その異型であるミラー・フィッシャー症候群、ならびにその他の補体依存性神経筋疾患の治療に使用することができる。

【0170】

ペプチド配列、化合物、および薬学的組成物はまた、自閉症の小児の治療に使用することができる。

【0171】

自閉症は、幼児期に発症し、成人期に入った後も継続する脳の疾患であり、発達の重大な3つの領域、コミュニケーション、社会的相互作用、および創造性と想像力に富んだ遊びに影響を及ぼす。小児1000人に2～5人がこの疾患に罹患していると推定されており、女兒よりも男児の方が4倍多く発症する。自閉症児は、社会的相互作用とコミュニケーションに問題を抱えており、反復行動を示したり、対象物や日課に異常な執着を持つことがある。

40

【0172】

近年では、自閉症児における免疫系の異常という科学的な手がかりが示されている。

【0173】

したがって、ペプチド配列、化合物、またはそれらを含む組成物は、炎症、特に脳の炎症の治療に有利に使用することができる。

50

【0174】

本発明のさらなる態様は、薬学的組成物を製造するプロセスであって、本発明の1つ以上の化合物の有効量、または本発明の薬学的組成物の有効量を、1つ以上の薬学的に許容される添加剤または担体と混合すること、および少なくとも1つの前記化合物または前記薬学的組成物の有効量を被験体に投与することを含むプロセスである。

【0175】

上述のプロセスの一実施形態において、化合物は人工装填具と組み合わせて使用され、該装填具は人工神経ガイドである。したがって、さらなる態様において、本発明は、上記で定めた1つ以上の化合物または薬学的組成物を含むことを特徴とする人工神経ガイドに関する。神経ガイドは当業界で既知である。

10

【0176】

本発明の別の態様は、上記で定めた化合物の使用に関する。特に、本発明による化合物の使用は、薬学的組成物を製造するためである。薬学的組成物は、好ましくは上述のいずれかの疾患および病態の治療または予防のために使用される。

【0177】

さらなる態様において、本発明は、本明細書で定める化合物を投与することにより、上記で考察した疾患または病態を治療する方法に関する。

【実施例】

【0178】

ペプチド

MTAn: K K S S C S C S P V G S A K (配列番号1)

MTAc: A Q G S I S K G A S D K S S (配列番号2)

MTBn: M D P N S S S A A G D S S T (配列番号3)

MTBc: S A G S S K S K E S K S T S (配列番号4)

MTAcc: A Q G S I C K G A S D K S S (配列番号5)

MTBnc: M D P N C S C A A G D S S T (配列番号6)

MTBcc: S A G S C K C K E S K S T S (配列番号7)

MT3lp: K G G E A A E A E A E K (配列番号8)

【0179】

ニューロン分化

方法

生後7日齢のラットから得た小脳顆粒ニューロン(CGN)の初代培養物を、8ウェルのPermanoxチャンバースライドに10,000個/cm²の密度で接種し、種々の濃度のペプチドの存在下で24時間分化した。細胞を固定し、GAP-43免疫染色を行って、ニューロンのみを可視化した。CGN培養物を4%パラホルムアルデヒドに固定した後、1%BSAでブロッキングを行い、ラットGAP-43に対するウサギポリクローナル抗体

(Chemicon、AH Diagnostics、デンマーク オーフス)(1%BSAで1:1000に希釈)とともにインキュベートし、その後、ヤギ抗ウサギ二次抗体Alexa Fluor(登録商標)488(Molecular Probes、米国オレゴン州ユージーン)(1%BSAで1:700に希釈)とともにインキュベートした。神経突起の長さは立体的手法を使用して算定した(Ronn et al., 2000)。結果は、未処理の対照を100%として、神経突起伸長の割合±SEMで表す。統計は対応のあるスチューデントt検定で行う(* = p < 0.05、** = p < 0.01、*** = p < 0.001)。特に断らない限り、各条件について実験を4回実施した。

40

【0180】

結果

小脳から分離したニューロン(CGN)を、個々のペプチドの存在下で24時間生育した。図1~5からは、MTAc、MTBc、MTAcc、MTBncおよびMTBccの

50

ペプチドにより、小脳の初代ニューロンの分化が促進されたこと分かる。すべてのペプチドによって誘導された神経突起の伸長は、用量依存的なものであり、釣鐘曲線であった。MTBnおよびMT31pのペプチドの効果も検討したが、これらのペプチドは神経突起伸長促進活性を持たないことが分かった。

【0181】

*in vitro*でのニューロン細胞の生存

方法

1. 細胞生存検定

生後7日齢のラットから得た初代CGN培養物を、ポリ-D-リジンでコーティングした8ウェルのPermanoxチャンバースライドに100,000個/cm²の密度で接種し、40mMのKClを添加した培地中で培養した。24時間後、培養物にシトシン-D-アラビノフラノシドを添加し、ニューロン細胞以外の細胞の増殖を抑制した。5mMのKCl単独(陰性対照)、40mMのKCl(陽性対照)、または5mMのKCl+種々の濃度のペプチドのいずれかを含有する枯渇培地に細胞を移すことにより、アポトーシスが誘導されるまで、ニューロンを*in vitro*でさらに6日間分化させた。アポトーシス誘導から48時間後に、細胞を固定し、Hoechst 33258で染色した。核の形態に基づいて生存ニューロンの量をニューロンの総数と比較することにより、ニューロン細胞の生存能力を算定した。少なくとも4回の独立した実験で得られた結果(図6~9を参照)を、陰性対照を100%として生存の割合±SEMで表す。統計は対応のあるスチューデントt検定で行う(* = p < 0.05、** = p < 0.01、*** = p < 0.001)。

10

20

【0182】

2. TUNEL検定(DNA断片化)

生後7日齢のラットから得た初代培養物を、ニューロン細胞の生存に関して上記の通り、接種し、培養して、アポトーシスが起こるように誘導したが、細胞の固定はアポトーシス誘導の24時間後に行った。DNAの遊離端を緑色の蛍光色素で標識するフルオレセインFragEL DNA断片化キットを使用して、DNA断片化が起こったニューロンの量は算定でき、プロピジウムイオダイドで染色した細胞の総数と比較することができる。少なくとも4回の独立した実験で得られた結果(図10を参照)は、陰性対照を100%として、TUNEL陽性細胞の割合±SEMで表される。統計は対応のあるスチューデントt検定で行う(* = p < 0.05、** = p < 0.01、*** = p < 0.001)。

30

【0183】

結果

生後7日齢のラットから採取したCGNを、高濃度のカリウムを含有する培地中で、7日間にわたり分化誘導した後、IGF-1の非存在下または存在下(陽性対照)、あるいはMT由来ペプチドの存在下のいずれかにおいて、低カリウム培地で2日間ニューロンを生育した。図6~9から明らかのように、培地中でカリウム濃度を低下させることにより誘導される細胞死は、IGF-1で処理することによって回避することができた。さらに、MT由来ペプチドであるMTAc、MTBc、MTBn、MTAcc、MTBcc、MTBnc、およびMT31pで処理すると、いずれの場合にもCGNの生存が用量依存的に促進された。

40

【0184】

MT由来ペプチドの抗アポトーシス効果は、DNA断片化検定を使用して確認した。図10からは、MTAccおよびMTBccのペプチドで処理することにより、アポトーシスを起こしたニューロンの数が著しく減少したことが分かる。

【0185】

*in vivo*でのニューロン細胞保護と組織修復

方法

すでに詳細に記した通り(Penkowa and Moos, 1995)、マウスで

50

は30秒間、ラットでは60秒間、ドライアイス片(-78)を直接頭蓋部に当てて、右前頭頭頂葉皮質上に局在性脳損傷を作成した。損傷作成の1日前、ならびに損傷作成の1日後および2日後に、

四量体型のMTAccペプチド(AQGSI CKGASDKSS)を

ラットに皮下注射した(10mg/体重kg/回)。損傷作成の3日後に、パラホルムアルデヒドによる経心臓的灌流法を使用して動物を固定した。固定した動物から採取した臓器から切り出した切片について、組織化学検査および免疫組織化学検査(IHC)を行った。免疫組織化学的調査用に脳を切り出し、Zamboni固定液に後固定を2~3時間行い、段階系列のアルコールで脱水後キシロールに通し、続いてパラフィンに包埋した後、病変部全体を厚さ3 μ mの前額断切片にカットした。Fragment End Labeling(FragEL(登録商標))検出キット(Calbiochem、米国、コードQIA33)を使用して、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)仲介性デオキシウリジン三リン酸(dUTP)-ビオチニック末端標識化(TUNEL)を行った。FragELキットは以下で使用する材料をすべて含有し、各工程は製造業者が推奨する方法に従って実施した。また、Penkowa et al(2000)による記載の通り、チロシン残基やマロンジアルデヒド(MDA)のペルオキシナイトライト誘導性ニトロ化(NITT)などの酸化ストレスマーカー、ならびにインターロイキン(IL)-1、IL-12、および腫瘍壊死因子(TNF)などの炎症性マーカーを使用して、切片の免疫染色を行った。

【0186】

結果

図11からは、MTAccペプチドでラットを処理することにより、アポトーシスを起こした細胞の数が劇的に減少し(TUNEL染色で判定)、酸化ストレスが抑制され(NITTおよびMDA免疫染色で判定)、病変部の炎症性反応が抑制された(炎症性マーカーIL-1、IL-12、TNFを使用した免疫染色で判定)ことがわかる。

【0187】

in vitroでのペプチドとMT2タンパク質の結合

方法

表面プラズモン共鳴(SPR)解析

ランニングバッファー(リン酸緩衝生理食塩水、PBS)として150mM NaClを含有する10mM、pH7.4のリン酸ナトリウムを使用し、BIAcore Xシステム(Biosensor AB、スウェーデン ウプサラ)で25にて結合の解析を行った。流速は5 μ L/分とした。データは、製造業者のソフトウェアを使用して、非線形曲線適合法により解析した。MT2タンパク質(Sigmaより入手)を、アミンカップリングキット(Biosensor AB)を使用して以下の通りセンサーチップCM5上に固定化した。チップを20 μ Lの活性化溶液で活性化し、pH6.0の10mMリン酸ナトリウム緩衝液中で、12 μ Lの20 μ g/mlタンパク質を使用してタンパク質を固定化した後、35 μ Lのブロッキング溶液でチップのブロッキングを行った。記載の濃度の各種ペプチドをセンサーチップに注入した。MT2とブランクチップへの結合間の差に対応する曲線を解析に使用した。

【0188】

結果

MTが生体液中でオリゴマー化できることは知られている(Tang et al., 1999)が、重合に関与する機序と結合部位については未だに解明されていない。本発明者等は、SPRを使用することにより、MT由来のペプチドがMTタンパク質に結合できるかどうかを検討した。図1、図2および図3からは、MTAcc、MTBccおよびMTAnのペプチドが、表1に示した平衡解離定数(Kd)でセンサーチップ上に固定化されたMT2タンパク質に特異的に結合するように見える。

【0189】

【表 1】

親和性結合定数

	$k_a (M^{-1} s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (M)$
MT-2 : MT A c c	$4.54 \pm 0.21 \times 10^3$	$4.00 \pm 0.27 \times 10^{-4}$	$8.95 \pm 1.00 \times 10^{-8}$
MT-2 : MT B c c	$2.83 \pm 0.93 \times 10^3$	$5.01 \pm 1.75 \times 10^{-4}$	$1.60 \pm 0.23 \times 10^{-7}$
MT-2 : MT A n	$1.57 \pm 0.05 \times 10^4$	$5.74 \pm 0.19 \times 10^{-3}$	$3.67 \pm 0.16 \times 10^{-7}$

10

親和性結合定数

$k_a (M^{-1} s^{-1})$ $k_d (s^{-1})$ $K_D (M)$ MT-2 : MT A c c $4.54 \pm 0.21 \times 10^3$ $4.00 \pm 0.27 \times 10^{-4}$ $8.95 \pm 1.00 \times 10^{-8}$ MT-2 : MT B c c $2.83 \pm 0.93 \times 10^3$ $5.01 \pm 1.75 \times 10^{-4}$ $1.60 \pm 0.23 \times 10^{-7}$ MT-2 : MT A n $1.57 \pm 0.05 \times 10^4$ $5.74 \pm 0.19 \times 10^{-3}$ $3.67 \pm 0.16 \times 10^{-7}$

【図面の簡単な説明】

【0190】

【図1】MT A c ペプチドの神経突起の伸長における効果を示す。

【図2】MT B c ペプチドの神経突起の伸長における効果を示す。

【図3】MT A c c ペプチドの神経突起の伸長における効果を示す。

【図4】MT B c c ペプチドの神経突起の伸長における効果を示す。

【図5】MT B n c ペプチドの神経突起の伸長における効果を示す。

【図6】MT A c ペプチドのニューロンの生存における効果を示す。

【図7】MT B c ペプチドのニューロンの生存における効果を示す。

【図8】MT B n ペプチドのニューロンの生存における効果を示す。

【図9】MT B c c、MT A c c、MT B n c、MT 3 1 p ペプチドのニューロンの生存における効果を示す。

【図10】MT A c c およびMT B c c ペプチドのDNA断片化における効果を示す。

【図11】in vivoにおけるMT A c c ペプチドのニューロンの生存における効果を、炎症 (IL-1、IL-2 およびTHF)、酸化ストレス (NIT T およびMDA)、およびアポトーシス細胞死 (TUNEL) から選択したマーカーについて、免疫染色で明らかにする細胞数で実証した。

【図12】SPR解析により検討したMT A c c ペプチドのMTへの結合を示す。約2000レゾナンスユニット (RU) のMT 2 タンパク質 (Sigma) をセンサーチップ上に固定化した。固定化したMT 2 およびブランクセンサーチップ (非特異的結合) とセンサーチップへの結合との間に見られる反応の差として結合が示される。ペプチドは、濃度が0.87 μMでセンサーチップに注入した。実験は4回繰り返した。

【図13】SPR解析により検討したMT B c c ペプチドのMTへの結合を示す。約2000レゾナンスユニット (RU) のMT 2 タンパク質 (Sigma) をセンサーチップ上に固定化した。固定化したMT 2 およびブランクセンサーチップ (非特異的結合) とセンサーチップへの結合の間に見られる反応の差として結合が示される。ペプチドは、濃度が8.32 μMでセンサーチップに注入した。実験は4回繰り返した。

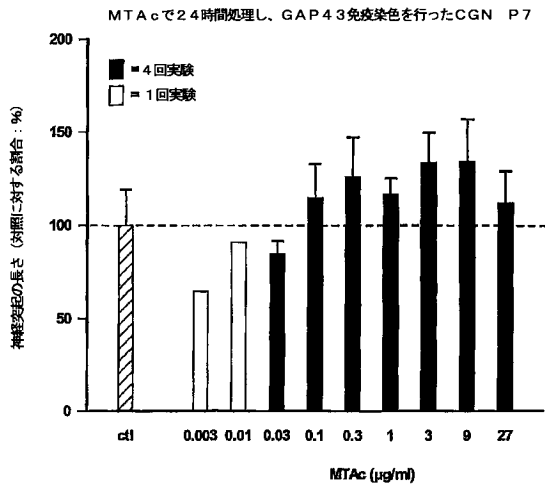
【図14】SPR解析により検討したMT A n ペプチドのMTへの結合を示す。約2000レゾナンスユニット (RU) のMT 2 タンパク質 (Sigma) をセンサーチップ上に固定化した。固定化したMT 2 およびブランクセンサーチップ (非特異的結合) とのセンサーチップへの結合の間に見られる反応の差として結合が示される。ペプチドは、濃度が1.7 μMでセンサーチップに注入した。

20

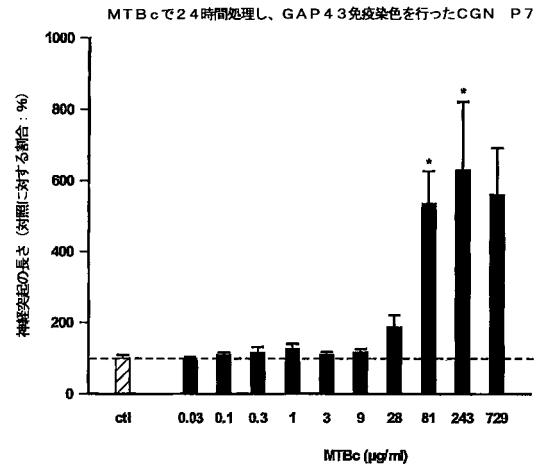
30

40

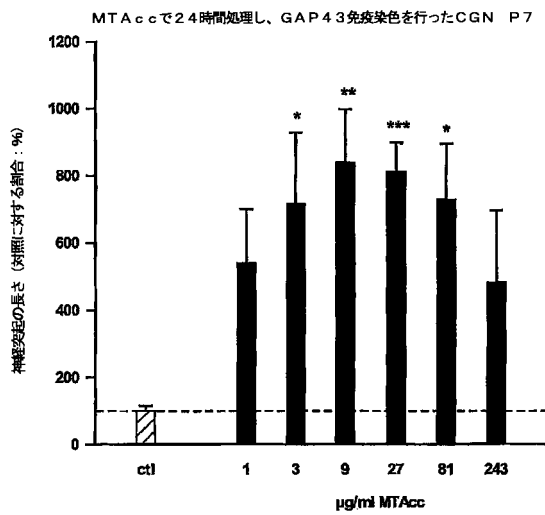
【 図 1 】



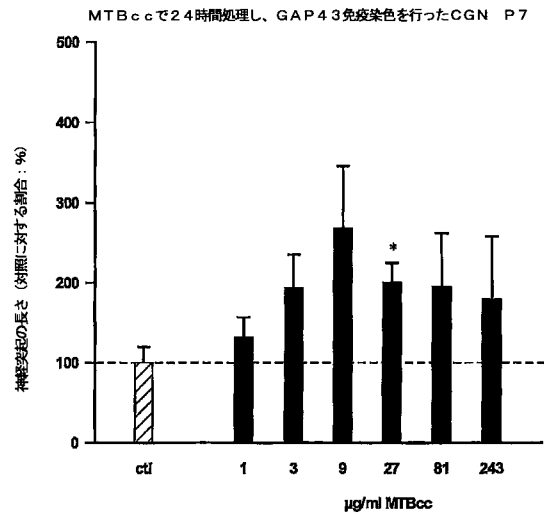
【 図 2 】



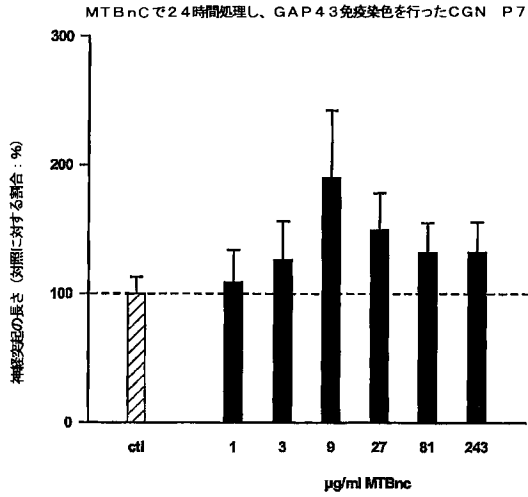
【 図 3 】



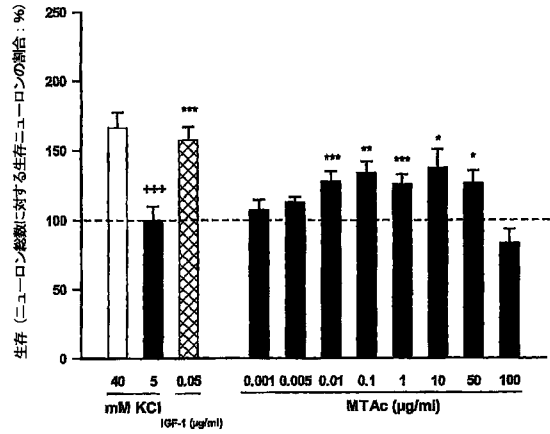
【 図 4 】



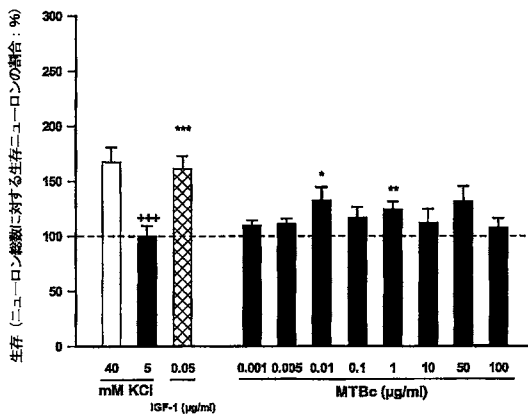
【 図 5 】



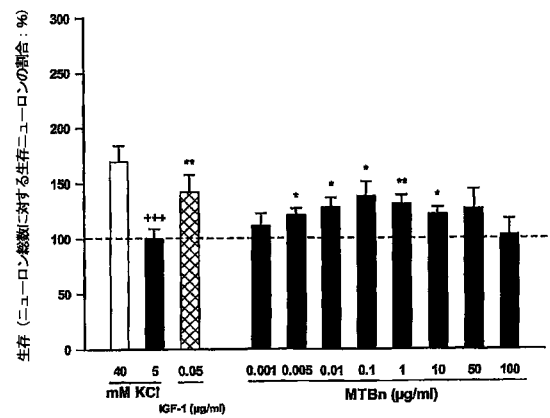
【 図 6 】



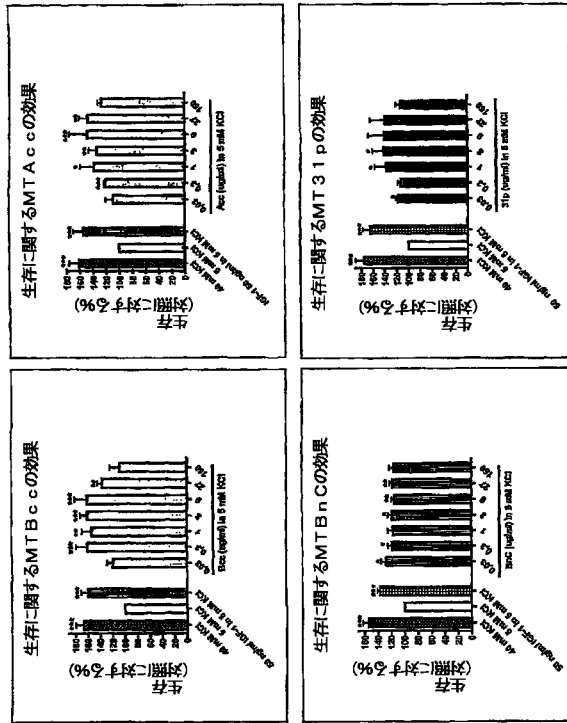
【 図 7 】



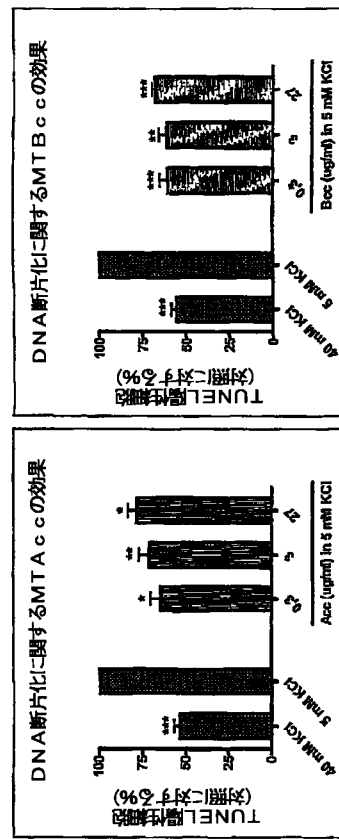
【 図 8 】



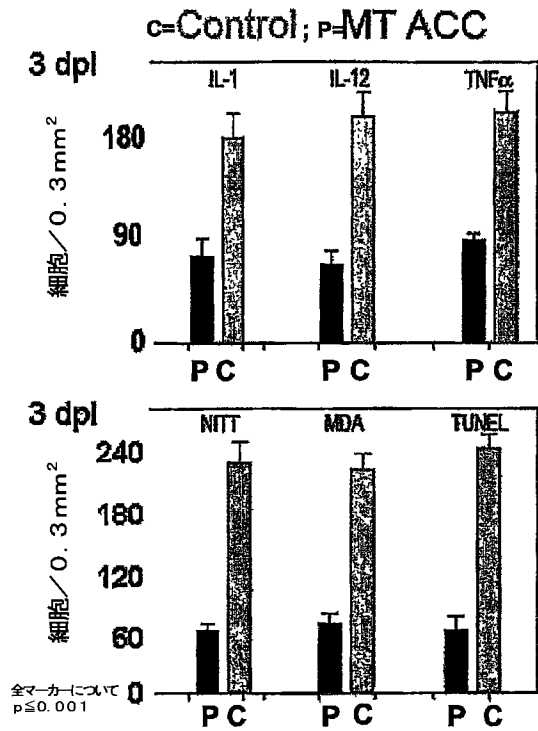
【 図 9 】



【 図 10 】

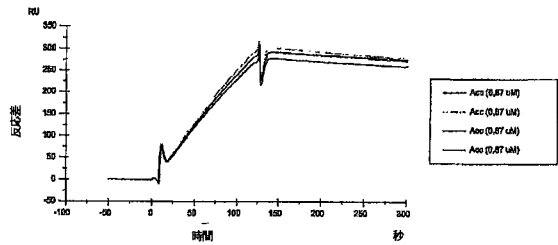


【 図 11 】

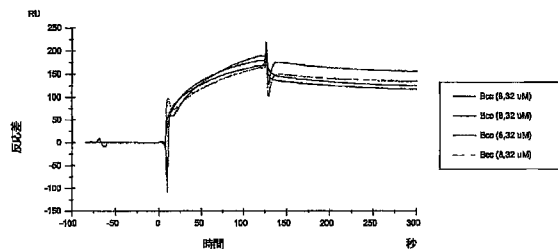


全マーカーにおいて
p ≤ 0.001

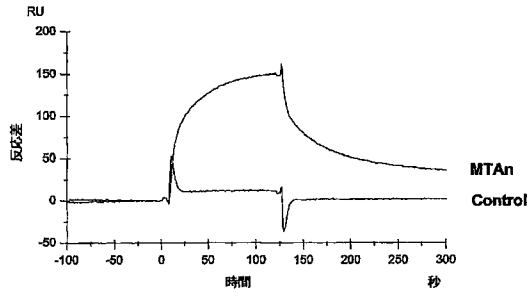
【 図 12 】



【 図 13 】



【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

2009526785000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DK2007/000070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/825 A61K38/00		
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) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included In the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, Sequence Search, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TROJAN ANDREAS ET AL: "Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies" NATURE MEDICINE, vol. 6, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 667-672, XP002441484 ISSN: 1078-8956	1,3,4,9, 30,37, 44,69,73
A	table 1 ----- -/-	10-29, 31-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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		"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 2 October 2007		Date of mailing of the international search report 25. 10. 2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Voigt-Ritzer, Heike

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/DK2007/000070

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 26 January 2000 (2000-01-26). SCHMIDT F. AND SKERRA A.: "Strep-tag II-Affinitätsanhängsel" XP002442529 retrieved from EBI Database accession no. CAB70506 abstract	1,2,4
X	----- WO 99/57142 A (UNIV ALBERTA [CA]) 11 November 1999 (1999-11-11) figure 10	7,8
X	----- KININGHAM KELLEY ET AL: "Neuronal localization of metallothioneins in rat and human spinal cord" NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL, vol. 27, no. 1, 1995, pages 105-109, XP002441485 ISSN: 0197-0186 page 106, column 1, paragraph 2 figures 1,2,4 page 108, column 2, paragraph 2	67,68, 72-75
X	----- UCHIDA YOKO ET AL: "The N-terminal Portion of Growth Inhibitory Factor Is Sufficient for Biological Activity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 7, 1995, pages 3365-3369, XP002441486 ISSN: 0021-9258 abstract; figure 3	40-45,48
X	----- MOLONY M S ET AL: "Hydroxylation of Lys residues reduces their susceptibility to digestion by trypsin and lysyl endopeptidase." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 10 APR 1998, vol. 258, no. 1, 10 April 1998 (1998-04-10), pages 136-137, XP002442522 ISSN: 0003-2697 page 136	1,3,5,6
A	----- HASLER DANIEL W ET AL: "Metal-thiolate clusters in the C-terminal domain of human neuronal growth inhibitory factor (GIF)" BIOCHEMISTRY, vol. 37, no. 42, 20 October 1998 (1998-10-20), pages 14966-14973, XP002441487 ISSN: 0006-2960 table 1	1-75
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DK2007/000070

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IRIE YOSHIFUMI ET AL: "Anti-amyloid beta activity of metallothionein-III is different from its neuronal growth inhibitory activity: Structure-activity studies." BRAIN RESEARCH, vol. 960, no. 1-2, 17 January 2003 (2003-01-17), pages 228-234, XP002441488 ISSN: 0006-8993 abstract	1-75
A	----- WO 03/105910 A (UNIV TASMANIA [AU]; WEST ADRIAN KEITH [AU]; CHUAH MENG INN [AU]; VICKE) 24 December 2003 (2003-12-24) cited in the application page 2, paragraph 3 examples 1-3 table 1	1-75
A	----- KOHLER LENE B ET AL: "The role of metallothionein II in neuronal differentiation and survival." BRAIN RESEARCH, vol. 992, no. 1, 28 November 2003 (2003-11-28), pages 128-136, XP002441489 ISSN: 0006-8993 cited in the application abstract	1-75
A	----- OKADA Y ET AL: "AMINO-ACIDS AND PEPTIDES XIII. SYNTHESIS OF A NONACOSAPEPTIDE CORRESPONDING TO THE AMINO-TERMINAL SEQUENCE 1-29 BETA-FRAGMENT OF HUMAN LIVER METALLOTHIONEIN II AND ITS HEAVY METAL-BINDING PROPERTIES" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN (TOKYO), vol. 34, no. 3, 1986, pages 986-998, XP001536298 ISSN: 0009-2363 figure 2 -----	37, 38, 44, 45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK2007/000070**Box 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.: **partially 71**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 71 directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:
1-75 partially
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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ DK2007/ 000070

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 71 directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/ DK2007/ 000070

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-75 partially

peptide comprising Seq ID No:1, first and second medical use
, Ab, kit and composition comprising said peptide

2. claims: 1-75 partially

peptide comprising Seq ID No:2, first and second medical use
, Ab, kit and composition comprising said peptide

3. claims: 1-75 partially

peptide comprising Seq ID No:3, first and second medical use
, Ab, kit and composition comprising said peptide

4. claims: 1-75 partially

peptide comprising Seq ID No:4, first and second medical use
, Ab, kit and composition comprising said peptide

5. claims: 1-75 partially

peptide comprising Seq ID No:5, first and second medical use
, Ab, kit and composition comprising said peptide

6. claims: 1-75 partially

peptide comprising Seq ID No:6, first and second medical use
, Ab, kit and composition comprising said peptide

7. claims: 1-75 partially

peptide comprising Seq ID No:7, first and second medical use
, Ab, kit and composition comprising said peptide

8. claims: 1-75 partially

peptide comprising Seq ID No:8, first and second medical use
, Ab, kit and composition comprising said peptide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2007/000070

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9957142	A	11-11-1999	AU 758235 B2	20-03-2003
			AU 3591099 A	23-11-1999
			CA 2328495 A1	11-11-1999
			EP 1082342 A2	14-03-2001
			JP 2002513802 T	14-05-2002

WO 03105910	A	24-12-2003	EP 1531905 A1	25-05-2005
			US 2005130888 A1	16-06-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/18
A 6 1 P	25/22	(2006.01)	A 6 1 P 25/22
A 6 1 P	25/32	(2006.01)	A 6 1 P 25/32
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P	39/02	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 39/02
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/08
A 6 1 P	33/06	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 21/04
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P 33/06
A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P 37/08
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 15/08
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/18
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P 7/02
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/02 1 0 3
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P 9/06
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P 3/06
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P 19/06
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P 19/10
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P 3/04
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/22
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 P 31/14
 A 6 1 P 25/24
 G 0 1 N 33/53 D

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

(71)出願人 508246766
 ミレーナ, ペンコワ
 Milena, PENKOWA
 デンマーク ディーケイ - 1 7 1 8 コペンハーゲン ブイ, ソマーステッドゲイド 1 3, 2 .
 ティエイチ .

(74)代理人 110000774
 特許業務法人 もえぎ特許事務所

(72)発明者 ウラディミール, ベレジン
 デンマーク ディーケイ - 2 2 0 0 コペンハーゲン エヌ, ノレプロゲイド 2 2 3, 1 . ティ
 エイチ .

(72)発明者 エリザベス, ボック
 デンマーク ディーケイ - 2 9 2 0 チャーロツテンルンド, トニスヴェグ 2 0

(72)発明者 ミレーナ, ペンコワ
 デンマーク ディーケイ - 1 7 1 8 コペンハーゲン ブイ, ソマーステッドゲイド 1 3, 2 .
 ティエイチ .

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA02 BA08 BA18 BA19 CA18 CA59
 DC50 NA14 ZA01 ZA02 ZA05 ZA06 ZA15 ZA16 ZA18 ZA20
 ZA22 ZA24 ZA33 ZA36 ZA38 ZA40 ZA45 ZA54 ZA59 ZA66
 ZA70 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZA97 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15
 ZB21 ZB26 ZB27 ZB31 ZB33 ZB35 ZB38 ZC21 ZC31 ZC33
 ZC35 ZC37 ZC39 ZC52
 4C085 AA13 AA14 CC03 DD62 EE01 GG01
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18
 CA40 DA76 EA21 EA50 FA10 FA72 FA74 GA21 GA26

专利名称(译)	金属硫蛋白衍生的肽片段		
公开(公告)号	JP2009526785A	公开(公告)日	2009-07-23
申请号	JP2008554593	申请日	2007-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	VLADIMIR Berezin 伊丽莎·博克 ELISABETH BOCK 米莱娜笔恐惧 Penkowa		
申请(专利权)人(译)	弗拉基米尔, Berejin 伊丽莎·博克 米莱娜, Penkowa		
[标]发明人	ウラディミールベレジ エリザベスボック ミレーナペンコワ		
发明人	ウラディミール,ベレジ エリザベス,ボック ミレーナ,ペンコワ		
IPC分类号	C07K14/47 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 A61K38/00 A61P25/28 A61P25/00 A61P25/02 A61P43/00 A61P21/00 A61P35/00 A61P25/16 A61P25/14 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/32 A61P31/00 A61P29/00 A61P37/06 A61K39/395 A61P39/02 A61P25/08 A61P9/10 A61P21/04 A61P33/06 A61P3/10 A61P37/08 A61P15/08 A61P1/18 A61P13/12 A61P31/04 A61P7/02 A61P19/00 A61P27/02 A61P17/00 A61P9/00 A61P17/02 A61P35/02 A61P19/02 A61P9/06 A61P11/06 A61P3/00 A61P3/06 A61P19/06 A61P19/10 A61P3/04 A61P31/12 A61P31/22 A61P31/20 A61P31/14 A61P25/24 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/10 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/32 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/06 A61P35/00 C07K14/825 C07K7/08		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 A61K37/02 A61P25/28 A61P25/00 A61P25/02 A61P43/00 A61P21/00 A61P35/00 A61P25/16 A61P25/14 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/32 A61P31/00 A61P29/00 A61P37/06 A61K39/395.N A61K39/395.D A61P43/00.105 A61P39/02 A61P25/08 A61P9/10 A61P21/04 A61P33/06 A61P3/10 A61P37/08 A61P15/08 A61P1/18 A61P13/12 A61P31/04 A61P7/02 A61P25/02.103 A61P19/00 A61P27/02 A61P17/00 A61P9/00 A61P17/02 A61P35/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P9/06 A61P11/06 A61P9/10.103 A61P3/00 A61P3/06 A61P19/06 A61P19/10 A61P3/04 A61P31/12 A61P31/22 A61P31/20 A61P31/14 A61P25/24 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/CA18 4C084/CA59 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA02 4C084/ZA05 4C084/ZA06 4C084/ZA15 4C084/ZA16 4C084/ZA18 4C084/ZA20 4C084/ZA22 4C084/ZA24 4C084/ZA33 4C084/ZA36 4C084/ZA38 4C084/ZA40 4C084/ZA45 4C084/ZA54 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA70 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZA97 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZB31 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZB38 4C084/ZC21 4C084/ZC31 4C084/ZC33 4C084/ZC35 4C084/ZC37 4C084/ZC39 4C084/ZC52 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA21 4H045/GA26		

摘要(译)

本发明涉及源自金属硫蛋白 (MT) 的神经细胞存活, 分化和增殖促进肽片段, 包含所述肽片段的药物组合物及其用于治疗其中刺激神经细胞增殖, 分化和/或刺激的作用的疾病和病症的用途。生存和/或刺激与学习和记忆相关的神经可塑性对治疗有益。

