

(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2004-523470

(P2004-523470A)

(43) 公表日 平成16年8月5日(2004.8.5)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 9/10	A 6 1 K 9/10	4 B O 2 4
A 6 1 K 9/127	A 6 1 K 9/127	4 B O 5 0
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	4 B O 6 3
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12	4 C O 7 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-524539 (P2002-524539)	(71) 出願人	596115687 チルドレンズ メディカル センター コーポレーション アメリカ合衆国 マサチューセッツ州02115 ポストン ロングウッド アベニュー300
(86) (22) 出願日	平成13年9月7日 (2001.9.7)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月7日 (2003.3.7)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/027691	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02002/020056	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		
(31) 優先権主張番号	09/656, 915		
(32) 優先日	平成12年9月7日 (2000.9.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者に神経有益効果をもたらす方法及び組成物

## (57) 【要約】

患者に神経有益効果をもたらす方法及び組成物を提供する。これらの方法は、一般的に、N - キナーゼの活性を調節する化合物、又はその類似体を治療上有効な量患者に投与することを含む。本発明の化合物、例えばN - キナーゼの活性を調節する化合物を含む医薬包装剤も提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者に、N - キナーゼの活性を調節する化合物を治療上有効量投与することによって、前記患者に神経有益効果をもたらすことを含む方法。

## 【請求項 2】

神経有益効果が、神経細胞の生存を調節することによって前記患者にもたらされる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

神経有益効果が、神経細胞の再生を調節することによって前記患者にもたらされる、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

神経有益効果が、神経細胞の軸索成長を調節することによって前記患者にもたらされる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

神経有益効果が、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節することによって前記患者にもたらされる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

中枢神経系の神経細胞が網膜神経節細胞である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

N - キナーゼの活性を調節する化合物が、神経細胞損傷領域への導入によって投与される、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 8】

N - キナーゼの活性を調節する化合物が、患者の脳脊髄液に導入される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

N - キナーゼの活性を調節する化合物が、患者のくも膜下に導入される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

N - キナーゼの活性を調節する化合物が、患者の脳室、腰椎部、及び大槽からなる群から選ばれる領域に導入される、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

N - キナーゼの活性を調節する化合物が、医薬上許容しうる製剤の形態で患者に投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

医薬上許容しうる製剤が分散系である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

医薬上許容しうる製剤が脂質ベースの製剤を含む、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 14】

医薬上許容しうる製剤がリポソーム製剤を含む、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

医薬上許容しうる製剤が多胞リポソーム製剤を含む、請求項 13 に記載の方法。

40

## 【請求項 16】

医薬上許容しうる製剤がポリマーマトリックスを含む、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 17】

医薬上許容しうる製剤がミニポンプ内に含有されている、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 18】

医薬上許容しうる製剤が、医薬上許容しうる製剤を患者に投与後少なくとも 1 週間、該患者に N - キナーゼの活性を調節する化合物の持続送達を提供する、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 19】

50

医薬上許容しうる製剤が、医薬上許容しうる製剤を患者に投与後少なくとも1ヶ月間、該患者にN-キナーゼの活性を調節する化合物の持続送達を提供する、請求項11に記載の方法。

【請求項20】

患者が哺乳動物である、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

哺乳動物がヒトである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記患者が神経障害を患っている、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

前記神経障害が脊髄損傷である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

脊髄損傷が、単麻痺、両麻痺、対麻痺、片麻痺及び四肢麻痺を特徴とする、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記神経障害がてんかんである、請求項22に記載の方法。

【請求項26】

前記神経障害が脳卒中である、請求項22に記載の方法。

【請求項27】

前記神経障害がアルツハイマー病である、請求項22に記載の方法。

【請求項28】

N-キナーゼの活性を調節する化合物を、神経障害を患っている患者に治療上有効な量投与することによって、神経障害を患っている前記患者を治療することを含む方法。

【請求項29】

N-キナーゼの活性を調節する化合物を患者に投与する前に神経系機能の第一回目の評価を行い、N-キナーゼの活性を調節する化合物を患者に投与した後に神経系機能の第二回目の評価を行うことをさらに含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

神経系機能が、感覚機能、コリン性神経支配、又は前庭運動機能である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物の識別法であって、N-キナーゼ又はその生物活性フラグメントを試験化合物と接触させ、該試験化合物のN-キナーゼの活性を調節する能力を測定することによって、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物を識別することを含む方法。

【請求項32】

N-キナーゼがヒトN-キナーゼである、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

ヒトN-キナーゼが組換え製造されたN-キナーゼである、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

N-キナーゼがウシN-キナーゼである、請求項31に記載の方法。

【請求項35】

ウシN-キナーゼがウシ原料から精製される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

試験化合物の、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する能力を測定することをさらに含む、請求項31に記載の方法。

【請求項37】

試験化合物がN-キナーゼの活性を阻害する、請求項31に記載の方法。

【請求項38】

試験化合物がN-キナーゼの活性を刺激する、請求項31に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 39】

N - キナーゼの活性を調節する試験化合物の能力が、基質の N - キナーゼ依存性リン酸化を調節する試験化合物の能力を評価することによって測定される、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 40】

患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物の識別法であって、N - キナーゼ又はその生物活性フラグメントを、試験化合物、N - キナーゼ基質、放射性 ATP、及び  $Mn^{+2}$  と接触させ；そして基質の N - キナーゼ依存性リン酸化を調節する試験化合物の能力を測定することによって、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物を識別する、  
ことを含む方法。

10

## 【請求項 41】

N - キナーゼ基質がヒストン H F - 1 タンパク質である、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 42】

放射性 ATP が [  $-3^2 P$  ] ATP である、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 43】

N - キナーゼがヒト N - キナーゼである、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 44】

ヒト N - キナーゼが組換え製造された N - キナーゼである、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

N - キナーゼがウシ N - キナーゼである、請求項 40 に記載の方法。

20

## 【請求項 46】

ウシ N - キナーゼがウシ原料から精製される、請求項 45 に記載の方法。

## 【請求項 47】

試験化合物の、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する能力を測定することをさらに含む、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 48】

請求項 40 に記載の方法によって識別された、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物。

## 【請求項 49】

( a ) 新生児の脳組織に存在する；  
( b ) 6 - チオグアニンの存在下で阻害される；  
( c )  $Mn^{+2}$  の存在下で活性化されるが、 $Mg^{+2}$  又は  $Ca^{+2}$  によっては活性化されない；  
( d ) 約 49 k D a の分子量を有する；そして  
( e ) NaCl 濃度 1 . 5 ~ 1 . 75 M でシバクロンブルーカラムから溶離される、種類の単離 N - キナーゼポリペプチド。

30

## 【請求項 50】

請求項 49 の N - キナーゼポリペプチドのエピトープと特異的に反応する抗体。

## 【請求項 51】

抗体が細胞内抗体である、請求項 50 に記載の抗体。

40

## 【請求項 52】

エピトープが ATP 結合ドメインを含む、請求項 50 に記載の抗体。

## 【請求項 53】

フラグメントが少なくとも 15 個の隣接アミノ酸を含む、請求項 49 の N - キナーゼポリペプチドのフラグメント。

## 【請求項 54】

フラグメントが少なくとも 30 個の隣接アミノ酸を含む、請求項 53 に記載のフラグメント。

## 【請求項 55】

50

フラグメントが少なくとも50個の隣接アミノ酸を含む、請求項53に記載のフラグメント。

【請求項56】

フラグメントが少なくとも100個の隣接アミノ酸を含む、請求項53に記載のフラグメント。

【請求項57】

フラグメントが免疫応答を引き出すことが可能な、請求項49のN-キナーゼポリペプチドのフラグメント。

【請求項58】

配列番号1のポリペプチドをコードする単離核酸分子。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

#### 関連出願

本願は、米国特許出願第09/656,915号、出願日2000年9月7日に基づく優先権を主張し、前記出願特許の全内容を本引用によって本明細書に援用する。

【0002】

#### 発明の背景

末梢及び中枢神経系の障害は広く存在するが、これらの障害の多くは有効な治療的介入法がない。

【0003】

#### 発明の要旨

本発明は、患者、例えば神経障害を患っている患者に神経有益効果をもたらす方法及び組成物を提供する。そのような効果とは、患者の神経細胞の生存、軸索成長、神経細胞の再生、又は正常化神経機能を促進することを含む。本発明は、少なくとも一部は、正常な哺乳動物神経細胞組織からの高度に精製された形態のN-キナーゼポリペプチドの単離、その化学構造(アミノ酸配列を含む)の分子的特徴付け、プリン調節に対するその感受性の実証、及び当該キナーゼが、網膜の神経節神経細胞のような哺乳動物のCNS神経細胞を含むCNS神経細胞の軸索成長に積極的な役割を果たしているという発見に基づく。今般、N-キナーゼが軸索成長の重要な細胞内媒介物であることの確認、及びその構造の化学的特徴付けがなされたことにより、N-キナーゼの活性を調節することによって患者に神経有益効果をもたらす能力が提供されることになった。さらに、このN-キナーゼの精製及び特徴付けにより、患者に神経有益効果をもたらすことができる追加の化合物を識別するためのスクリーニングアッセイへの応用も可能となる。

20

30

【0004】

従って、一側面において、本発明は、患者にN-キナーゼの活性を調節する化合物を治療上有効量投与することによって、該患者に神経有益効果をもたらすことを含む方法を提供する。

【0005】

一側面において、N-キナーゼの活性を調節する化合物は、本発明に従って、該化合物が患者の中枢神経系の神経細胞と接触するように患者に投与される。例えば、該化合物は、該化合物を脳室、腰椎部、又は大槽に導入することにより、くも膜下腔内の患者の脳脊髄液に投与できる。このような場合、N-キナーゼの活性を調節する化合物は、神経有益効果をもたらすために、皮質神経細胞又は網膜の神経節細胞に局所的に投与できる。

40

【0006】

ある態様において、N-キナーゼの活性を調節する化合物は、医薬上許容しうる製剤を用いて患者に投与できる。医薬上許容しうる製剤は、持続送達を可能にするので、患者に有効量のN-キナーゼの活性を調節する化合物を、医薬上許容しうる製剤を最初に患者に投与してから少なくとも1週間、又は他の態様では少なくとも1ヶ月間提供できる。本発明の化合物の持続送達を達成するための方法は、本発明の化合物を分散させる緩徐放出ポリマーカプセル、生分解性マトリックス、又は注入ポンプの使用を含む。注入ポンプは、皮

50

下、頭蓋内、又は医学的に望ましいと考えられる他の場所に埋め込んでもよい。ある態様では、本発明の化合物はカテーテルを介して注入ポンプで脳脊髄液又は局所送達望ましい部位、例えば神経細胞損傷部位もしくは神経変性部位に分配される。

**【0007】**

本発明の一態様において、N - キナーゼの活性を調節する化合物は、小分子、N - キナーゼポリペプチドもしくはそのフラグメント、抗N - キナーゼ抗体、アンチセンスN - キナーゼ核酸分子、リボザイム、又はN - キナーゼ遺伝子もしくはそのフラグメントである。

**【0008】**

さらに別の側面において、本発明は、N - キナーゼの活性を調節する化合物を、神経障害を患っている患者に治療上有効な量投与することによって、神経障害を患っている該患者を治療することを含む方法に関する。一態様において、該方法は、N - キナーゼの活性を調節する化合物を患者に投与する前に神経系機能、例えば感覚機能、コリン性神経支配、又は前庭運動機能の第一回目の評価を行い、該化合物を患者に投与した後に神経系機能の第二回目の評価を行うことをさらに含む。

10

**【0009】**

更なる側面において、本発明は、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物を、N - キナーゼ又はその生物活性フラグメントを試験化合物と接触させ、該試験化合物のN - キナーゼの活性調節能力を測定することによって識別する方法に関する。それによって、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物が識別される。好適な態様において、試験化合物のN - キナーゼの活性を調節する能力は、基質、例えばヒストンH F - 1タンパク質のN - キナーゼ依存性リン酸化を調節する試験化合物の能力を評価することによって測定される。

20

**【0010】**

一態様において、本発明の方法に使用されるN - キナーゼは、ヒトN - キナーゼ、例えば組換え製造されたヒトN - キナーゼである。別の態様において、本発明の方法に使用されるN - キナーゼは、ウシN - キナーゼ、例えばウシ新生仔脳組織などのウシ原料から精製されたN - キナーゼである。

**【0011】**

別の態様において、本発明のスクリーニング法は、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する試験化合物の能力を測定することをさらに含む。

30

別の側面において、本発明は、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物の識別法を提供する。該方法は、N - キナーゼ又はその生物活性フラグメントを、試験化合物、N - キナーゼ基質（例えばヒストンH F - 1タンパク質）、放射性ATP（例えば $[ \text{-}^{32}\text{P} ] \text{ATP}$ ）、及び $\text{Mn}^{+2}$ と接触させ；そして基質のN - キナーゼ依存性リン酸化を調節する試験化合物の能力を測定することによって、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物を識別することを含む。好適な態様において、本発明の方法は、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する試験化合物の能力を測定することをさらに含む。

**【0012】**

別の側面において、本発明は、前述のいずれかの方法で確認された、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物を提供する。

40

更なる側面において、本発明は、( a ) 新生児の脳組織（例えばヒト、ウシ、ラット又はマウスの新生児脳組織）に存在する；( b ) 6 - チオグアニンによって阻害される；( c )  $\text{Mn}^{+2}$ によって活性化されるが、 $\text{Mg}^{+2}$ 又は $\text{Ca}^{+2}$ によっては活性化されない；( d ) 約49 kDaの分子量を有する；および( e ) NaCl濃度1.5 ~ 1.75 Mでシバクロンブルーカラムから溶離される種類の単離N - キナーゼポリペプチドを提供する。

**【0013】**

更なる側面において、本発明は、N - キナーゼポリペプチドのエピトープと特異的に反応する抗体、例えば細胞内抗体を提供する。好適な態様において、該抗体は、N - キナーゼのATP結合ドメインを含むエピトープと反応する。

50

## 【0014】

別の側面において、本発明は、N - キナーゼポリペプチドのフラグメント、例えば、N - キナーゼポリペプチドの少なくとも15、20、25、30、40、50、100、150、又は200個の隣接アミノ酸を含むフラグメントを提供する。好適な態様において、N - キナーゼポリペプチドのフラグメントは免疫応答を引き出すことが可能である。

## 【0015】

更なる側面において、本発明は、配列番号1のポリペプチドをコードする単離核酸分子を提供する。

本発明の組成物（例えばN - キナーゼの活性を調節する化合物）及び医薬上許容しうる担体を含む医薬組成物並びに包装製剤も本発明によって提供される。

10

## 【0016】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及びクレームから明らかになるであろう。

詳細な説明

本発明は、患者、例えば神経障害を患っている患者に神経有益効果をもたらす方法及び組成物を提供する。本発明は、少なくとも一部は、哺乳動物由来のN - キナーゼポリペプチドの高度に精製された形態での単離、及び該キナーゼが、網膜神経節神経細胞又は皮質錐体細胞などの哺乳動物のCNS神経細胞を含むCNS神経細胞の軸索成長に積極的役割を果たしているという発見に基づく。

## 【0017】

従って、本発明は、患者にN - キナーゼの活性を調節する化合物を治療上有効な量投与することによって、該患者に神経有益効果をもたらす方法に関する。

20

本明細書中で使用している“N - キナーゼ”という用語は、すべての形態のN - キナーゼを含む。例えばヒトN - キナーゼ、ウシN - キナーゼ、マウスN - キナーゼ、ラットN - キナーゼ、及びブタN - キナーゼを含むが、これらに限定されない。ヒトN - キナーゼのアミノ酸及びヌクレオチド配列は、Zhou T - Hら(2000) J. Biol. Chem. 275(4): 2513 - 2519及びGenBank Accession Number AF083420に記載されており、これらの内容は引用によって本明細書に援用する。ヒトN - キナーゼのアミノ酸配列を図2及び配列番号1に示す。好適な態様において、用語“N - キナーゼ”は、6 - チオグアニンによって阻害され、 $Mn^{+2}$ によって活性化されるが、 $Mg^{+2}$ 又は $Ca^{+2}$ によっては活性化されない、約49kDaの分子量を有するN - キナーゼのアイソフォームを含む。

30

## 【0018】

本明細書中で使用している“N - キナーゼの活性を調節する化合物”という表現は、例えば本明細書中に記載のアッセイによって測定されるN - キナーゼの活性を調節、例えば刺激又は阻害する能力を有する任意の化合物を含む。そのような化合物は次のうちの一つ以上を調節することが可能である：(a) 基質、例えばヒストンH2F - 1タンパク質をリン酸化するN - キナーゼの能力；(b) 非N - キナーゼ分子、例えば軸索成長のシグナリング経路の下流にある分子と相互作用、例えば結合するN - キナーゼの能力；(c) ATP又は $Mn^{+2}$ を結合するN - キナーゼの能力；又は(d) 中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節するN - キナーゼの能力。

40

## 【0019】

好適な態様において、N - キナーゼの活性を調節する化合物は、軸索成長のシグナリング経路でAF - 1又は他の成長因子の下流で作用する。軸索成長のシグナリング経路でAF - 1又は他の成長因子の下流で作用する化合物の能力は、本明細書中に記載のアッセイの一つを用いて測定できる。例えば、化合物がN - キナーゼの活性を刺激（例えば基質のN - キナーゼ依存性リン酸化を刺激）できると判定されたら、N - キナーゼを当該化合物と6 - チオグアニンの両方に接触させればよい。6 - チオグアニンが該化合物の刺激作用を阻害できなければ、該化合物は軸索成長シグナリング経路において6 - チオグアニンの下流で作用していることを示し、6 - チオグアニンが該化合物の刺激作用を阻害できれば、

50

該化合物はシグナリング経路の上流で（又は同じ点で）作用していることを示すことになる。あるいは、化合物がN - キナーゼの活性を阻害（例えば基質のN - キナーゼ依存性リン酸化を阻害）できると判定されたら、N - キナーゼを当該化合物とイノシンの両方に接触させればよい。イノシンが該化合物の阻害作用を妨害できなければ、該化合物は軸索成長シグナリング経路においてイノシンの下流で作用していることを示し、イノシンが該化合物の阻害作用を妨害できれば、該化合物はシグナリング経路の上流で（又は同じ点で）作用していることを示すことになる。

**【0020】**

本発明のある態様において、N - キナーゼの活性を調節する化合物は、プリン塩基（例えば、グアニン、イノシン、アデノシン、及びキサンチン）、例えばリボース、デオキシリボース並びにそれらの類似体及び誘導體などの糖に連結したプリン塩基でなければ、任意の化合物であってよい。本発明のその他のある態様では、N - キナーゼの活性を調節する化合物は、プリン塩基の類似体又はその誘導體でなければ、任意の化合物であってよい。

10

**【0021】**

N - キナーゼの活性を調節する化合物の例は、小分子、N - キナーゼポリペプチドもしくはそのフラグメント、抗N - キナーゼ抗体、アンチセンスN - キナーゼ核酸分子、リボザイム、又はN - キナーゼ遺伝子もしくはそのフラグメントである。

**【0022】**

本明細書中で使用している“小分子”という用語は、ペプチド、擬似ペプチド、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、1モルあたり約10,000g未満の分子量を有する有機又は無機化合物（すなわちヘテロ有機化合物及び有機金属化合物を含む）、1モルあたり約5,000g未満の分子量を有する有機又は無機化合物、1モルあたり約1,000g未満の分子量を有する有機又は無機化合物、1モルあたり約500g未満の分子量を有する有機又は無機化合物、並びにそのような化合物の塩、エステル、および他の医薬上許容しうる形態などを含むが、これらに限定されない。

20

**【0023】**

本明細書中で使用している“神経有益効果”とは、神経細胞、神経系の一部、又は神経系全般の健康又は機能に対して有益な応答又は結果を意味する。そのような効果の例は、神経細胞又は神経系の一部の、障害に抵抗する、再生する、望ましい機能を維持する、成長する又は生存するなどの能力に改善がみられることを含む。“神経有益効果をもたらす”という句は、神経系の構成成分内の機能又は回復力に、そのような応答又は改善をもたらす又は達成することを含む。例えば、神経有益効果をもたらすことの例として、神経細胞損傷後の軸索成長を刺激する；神経細胞にアポトーシスに対する抵抗性を持たせる；神経細胞に - アミロイド、アンモニア、又は他の神経毒などの毒性化合物に対する抵抗性を持たせる；加齢に伴う神経細胞の萎縮又は機能喪失を元に戻す；又は加齢に伴うコリン性神経支配を元に戻す、などが考えられる。

30

**【0024】**

本明細書中で使用している“中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する”という表現は、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を様々なレベルに刺激又は阻害する能力を含むことを意味する。様々なレベルとは、例えば標的とする神経障害の治療を可能にするレベルである。

40

**【0025】**

本明細書中で使用している“成長”（すなわち軸索成長）という用語は、軸索がCNS神経細胞から軸索が成長する過程に関して言う。この成長で、完全に新しい軸索又は部分的に損傷した軸索の修復をもたらされうる。成長は典型的には、軸索突起の長さが少なくとも細胞径の5倍伸びることで証明される。さらに、軸索成長はGAP - 43の発現（これは例えば免疫染色によって検出できる）によっても証明できる。

**【0026】**

本明細書中で使用している“CNS神経細胞”という用語は、神経成長因子（NGF）に

50

反応しない脳及び脊髄の神経細胞を含むことを意図する。この用語には、星状神経膠細胞、乏突起神経膠細胞、小グリア細胞、脳室上衣などの支持細胞又は保護細胞は含まれず、また末梢神経系（例えば体神経系、自律神経系、交感神経系、副交感神経系）の神経細胞も含まれないことを意図する。好適なCNS神経細胞は、哺乳動物の神経細胞、更に好ましくはヒトの神経細胞である。

【0027】

患者に“投与する”という用語は、医薬製剤中の活性化化合物を、患者体内の所望の場所に該活性化化合物を送達するのにふさわしい任意の適切な経路によって患者に分配、送達又は塗布することを含む。例えば、非経口又は経口経路のいずれかによる送達、筋肉内注射、皮下/皮内注射、静脈内注射、頬内投与、経皮送達、及び直腸、結腸、膣、鼻腔内又は気道経路による投与などを含む。

10

【0028】

本明細書中で使用している“接触させる”という表現は、N-キナーゼの活性を調節する化合物が、CNS神経細胞からの軸索突起の成長を調節することができるように、N-キナーゼの活性を調節する化合物をCNS神経細胞に接近させるインビボ又はインビトロ両方の方法を含むことを意図する。

【0029】

本明細書中で使用している“患者”という用語は動物を含むことを意図する。特別の態様において、患者は哺乳動物、ヒト又はヒト以外の霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ又は齧歯類である。

20

【0030】

本明細書中で使用している“有効量”という用語は、必要な用量及び期間で、患者に神経有益効果をもたらすに足るような所望の結果を達成するための有効な量を含む。本明細書中に規定された活性化化合物の有効量は、患者の病状、年齢及び体重などの要因、並びに患者に所望の応答を引き出す活性化化合物の能力によって異なりうる。投与計画は最適な治療応答が提供されるように調整できる。有効量とは、活性化化合物の有毒又は有害作用（あるとすれば）に治療上の有益効果が優る量でもある。

【0031】

活性化化合物の治療上有効な量又は用量は、約0.001~30mg/kg体重の範囲であろう。本発明の他の範囲としては、約0.01~25mg/kg体重、約0.1~20mg/kg体重、約1~10mg/kg、約2~9mg/kg、約3~8mg/kg、約4~7mg/kg、約5~6mg/kg体重などである。当業者であれば、ある種の要因が患者を効果的に治療するのに必要な用量に影響を及ぼしうることは分かるであろう。ある種の要因とは、疾患又は障害の重症度、過去の治療、患者の一般的健康状態及び/又は年齢、並びに他の既存疾患などを含むが、これらに限定されない。さらに、活性化化合物の治療上有効な量で患者を治療するということには、1回の治療又は連続治療が含まれうる。一例では、患者を、約0.1~20mg/kg体重の範囲の活性化化合物で、週1回、約1~10週間、あるいは2~8週間、約3~7週間、又は約4、5、もしくは6週間治療する。また、治療に使用する活性化化合物の有効用量は、個々の治療期間中増減できることも理解されるであろう。

30

40

【0032】

“神経障害”は、患者の神経系の正常な機能又は解剖学的所見に直接又は間接的影響を及ぼす疾患、障害又は状態を含むことを意図する。本発明の化合物及び方法で効果的に治療できる障害にさらされる神経系の要素は、神経系の中樞、末梢、体、自律、交感及び副交感成分、眼・耳・鼻・口又は他の器官内の神経感覚組織、並びに神経細胞及び構造に付随するグリア組織などである。神経障害は、機械的損傷又は毒性化合物による傷害などの神経細胞損傷によって、神経細胞の異常成長又は発生によって、又は神経細胞活性の調節不良（例えばダウンレギュレーション又はアップレギュレーション）によってもたらされる。神経障害は、感覚機能（体内及び外界の変化を感知する能力）；統合機能（変化を解釈する能力）；及び運動機能（解釈に応答して筋収縮又は腺分泌などの作用を開始する能力）

50

）などの神経系の機能に有害な影響を及ぼすことができる。神経障害の例は、末梢神経又は脳神経、脊髄に対する、又は脳、脳神経に対する外傷又は毒性傷害、外傷性脳傷害、脳卒中、虚血、脳動脈瘤、及び脊髄損傷などである。他の神経障害は、アルツハイマー病、アルツハイマーに関連する痴呆（ピック病など）、パーキンソン病及び他のびまん性レーヴィ小体病、老人性痴呆、ハンチントン病、ジル・ド・ラ・ツレット症候群、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、遺伝性運動及び感覚ニューロパシー（シャルコー・マリー・トゥース病）、糖尿病性ニューロパシー、進行性核上麻痺、てんかん、及びヤコブ・クロイツフェルト病などの認知及び神経変性障害などである。自律神経機能障害は、高血圧及び睡眠障害を含む。うつ、精神分裂病、分裂情動性障害、コルサコフ精神病、躁病、不安障害、又は恐怖障害、学習もしくは記憶障害（健忘及び加齢関連の記憶喪失など）、注意欠陥障害、自閉症、胸腺障害、大抑うつ障害、躁病、強迫性障害、精神作用性物質の使用による障害、不安、恐怖、パニック障害、双極性感情病、心因性疼痛症候群、及び摂食障害などの神経精神障害も本発明の化合物及び方法による治療の対象である。その他の神経障害の例は、感染症（髄膜炎、種々の病因による高熱、HIV、梅毒、又は小児麻痺後症候群など）による神経系への傷害、電気（電気接触、電撃、及び電気痙攣による精神医学的療法に由来する合併症を含む）による神経系への傷害などである。発達中の脳は、妊娠の各期だけでなく乳幼児期にわたる中枢神経系の発達中、神経毒性の標的となり、本発明の方法は、神経学的な先天異常児を含め、子宮内の胚子又は胎児、未熟児、又はそのような治療を必要とする小児の神経障害の予防又は治療に利用できる。さらにその他の神経障害は、例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine (Braunwaldら、McGraw-Hill, 2001) 及び the American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV (American Psychiatric Press, 2000) に記載されているものなどである。この2文献は、その全内容を引用によって本明細書に援用する。

【0033】

“脳卒中”は専門用語で、脳動脈の破裂又は閉塞（例えば血液凝固による）によって発生する意識、知覚、及び随意運動の突然の減退又は喪失を含むことを意図する。

【0034】

“外傷性脳傷害”は専門用語で、頭部への外傷性打撃によって脳又は接続する脊髄が、多くは頭蓋骨の貫通なしに損傷される状態を含むことを意図する。通常、初期外傷で、拡張性血腫、くも膜下出血、脳水腫、頭蓋内圧上昇、及び脳低酸素が起き、ひいては脳血流低下による重篤な二次的事象に至る可能性がある。

【0035】

別の側面において、本発明は、(a) 新生児の脳組織（例えばヒト、ウシ、ラット又はマウスの新生児脳組織）に存在する；(b) 6-チオグアニンによって阻害される；(c)  $Mn^{+2}$  によって活性化されるが、 $Mg^{+2}$  又は  $Ca^{+2}$  によっては活性化されない；(d) 約 49 kDa の分子量を有する；そして (e) NaCl 濃度 1.5 ~ 1.75 M でシバクロンブルーカラムから溶離される種類の単離 N-キナーゼポリペプチドを提供する。本明細書中で使用している“単離”N-キナーゼポリペプチドは、N-キナーゼタンパク質が誘導される原料の細胞又は組織に由来する細胞物質又は他の混入タンパク質が実質的に除去されている（すなわち除去率 95% 超）、あるいは化学合成した場合には化学前駆体又は他の化学物質が実質的に除去されている。“細胞物質が実質的に除去されている”という表現は、N-キナーゼが単離又は組換え製造された細胞の細胞成分からタンパク質が分離されている N-キナーゼ調整品を含む。一態様では、“細胞物質が実質的に除去されている”という表現は、約 20% 未満（乾燥重量）の非 N-キナーゼタンパク質（すなわち混入タンパク質）、更に好ましくは約 10% 未満の非 N-キナーゼタンパク質、なお更に好ましくは約 5% 未満の非 N-キナーゼタンパク質、最も好ましくは約 3% 未満の非 N-キナーゼタンパク質しか含まない N-キナーゼタンパク質調整品を含む。N-キナー

ゼタンパク質又はその生物活性部分が組換え製造された場合、培養培地も実質的に除去されているのが好ましい。すなわち培養培地は、タンパク質調整品の体積の約20%未満、更に好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満である。

【0036】

更に別の側面において、本発明は、N-キナーゼポリペプチド、例えば配列番号1のN-キナーゼポリペプチドをコードする単離核酸分子も提供する。

本発明の様々な側面を以下の小節で更に詳細に説明する。

患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物の識別法

一側面において、本発明は、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物を、N-キナーゼポリペプチド又はその生物活性フラグメントを試験化合物と接触させ、該試験化合物のN-キナーゼの活性調節能力を測定することによって識別する方法を提供する。それによって患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物が識別される。 10

【0037】

本発明の試験化合物は、当該技術分野で知られているコンビナトリアルライブラリー法の数多くの手法のいずれかを用いて得ることができる。例えば、生物ライブラリー；空間的にアドレス可能な並列固相又は溶液相ライブラリー；解析（デコンヴォリューション）を要する合成ライブラリー法；‘one-bead one-compound’ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィー選別を用いる合成ライブラリー法を含む。生物ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、他の四つの手法は、ペプチド、非ペプチドオリゴマー又は小分子の化合物ライブラリーに適用可能である（Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145）。 20

【0038】

分子ライブラリーの合成法の例は、例えば：DeWittら(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909；Erbら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422；Zuckermannら(1994) *J. Med. Chem.* 37:2678；Choら(1993) *Science* 261:1303；Carrellら(1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059；Carrellら(1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061；及びGalloppら(1994) *J. Med. Chem.* 37:1233に見つけることができる。 30

【0039】

化合物のライブラリーは、溶液中（例えばHoughten(1992) *Biotechniques* 13:412-421）、又はビーズ上（Lam(1991) *Nature* 354:82-84）、チップ（Fodor(1993) *Nature* 364:555-556）、細菌（Ladner *USP* 5,223,409）、胞子（Ladner *USP* 409）、プラスミド（Cullら(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869）又はファージ上（Scott及びSmith(1990) *Science* 249:386-390）；（Devlin(1990) *Science* 249:404-406）；（Cwirllaら(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382）；（Felicci(1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310）；（Ladner 上記）に提供できる。 40

【0040】

一態様において、アッセイは細胞ベースのアッセイである。すなわち、N-キナーゼタンパク質又はその生物活性部分を発現している細胞を試験化合物と接触させ、N-キナーゼの活性を調節する試験化合物の能力を測定する。N-キナーゼの活性を調節する試験化合物の能力の測定は、例えば、N-キナーゼを発現している細胞に産生された一つ以上の特異的代謝産物をモニタすることによって達成できる（例えば、Saadaら(2000) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 269:382-386参照）。細胞は、例えば哺乳動物由来の、例えば神経細胞であり得る。 50

## 【0041】

N - キナーゼの活性を調節する試験化合物の能力の測定は、さらに、例えば、N - キナーゼの基質リン酸化能力を測定することによっても達成できる。基質（例えばヒストンH F - 1タンパク質）をリン酸化するN - キナーゼの能力は、例えばインビトロキナーゼアッセイによって測定できる。簡単に述べると、N - キナーゼを、 $MnCl_2$ 、例えば5 mMの $MnCl_2$ 含有緩衝液中で、基質及び放射性ATP、例えば $[ \gamma - ^{32}P ] - ATP$ とインキュベートする。インキュベーション後、基質を免疫沈降又はTCAで沈降又はフィルタ上に回収（他のキナーゼがない場合）し、還元条件下でSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、膜、例えばPVDF膜に転写し、オートラジオグラフィで記録できる。オートラジオグラフ上に検出可能なバンドが出現したら、基質がリン酸化されたことを示す。あるいは、実施例1に記載のインゲル（*in-gel*）アッセイを用いて、N - キナーゼの基質リン酸化能力を測定することもできる。リン酸化された基質のホスホアミノ酸分析を行えば、タンパク質のどの残基がリン酸化されたかを調べることができる。簡単に説明すると、放射性リン酸化タンパク質のバンドをSDSゲルから切り取り、部分酸加水分解を行う。次に、生成物を一次元電気泳動によって分離し、例えばホスホイメージャー（*phospho imager*）で分析し、ニンヒドリン染色ホスホアミノ酸標準と比較すればよい。

## 【0042】

軸索成長のシグナリング経路の下流にあるような非キナーゼ分子に結合しているN - キナーゼを調節する試験化合物の能力も測定できる。非キナーゼ分子に結合しているN - キナーゼを調節する試験化合物の能力の測定は、例えば、非N - キナーゼ分子に放射性同位体又は酵素標識を連結し、非N - キナーゼ分子とN - キナーゼとの結合を、複合体中の標識非キナーゼ分子の検出によって測定することで達成できる。

## 【0043】

N - キナーゼ又はその生物活性部分と相互作用する、例えば結合する試験化合物の能力の測定も本発明の範囲に含まれる。本発明のアッセイに使用されるN - キナーゼタンパク質の好適な生物活性部分は、非キナーゼ分子との相互作用に参加するフラグメント、例えば表面プロバビリティスコアの高いフラグメントを含む。N - キナーゼを結合する試験化合物の能力の測定は、例えば、化合物に放射性同位体又は酵素標識を連結し、化合物とN - キナーゼとの結合を、複合体中の標識N - キナーゼ化合物の検出によって測定することで達成できる。例えば、試験化合物は、 $^{125}I$ 、 $^{35}S$ 、 $^{14}C$ 、又は $^3H$ で直接又は間接的に標識でき、放射性同位体は、放射発光の直接計数又はシンチレーション計数によって検出できる。あるいは、試験化合物を、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、又はルシフェラーゼで酵素標識してもよく、酵素標識は適当な基質の生成物への転換を測定することによって検出できる。

## 【0044】

N - キナーゼと相互作用する試験化合物の能力の測定は、いずれの反応物も標識せずに達成できる。例えば、マイクロフィジオメーターを使用すれば、化合物又はN - キナーゼのどちらかを標識しなくても化合物とN - キナーゼとの相互作用が検出できる。McConnell, H. M. ら（1992）*Science* 257: 1906 - 1912。本明細書中で使用している“マイクロフィジオメーター”（例えばCytosensor）は、細胞がその環境を酸性化する速度を光アドレス可能電位計測法（LAPS）を用いて測定する分析機器である。この酸性化速度の変化を、化合物とN - キナーゼ間の相互作用の指標として使用できる。

## 【0045】

N - キナーゼ又はその生物活性部分に結合する試験化合物の能力の測定は、リアルタイム生体分子間相互作用解析（*Biomolecular Interaction Analysis*、BIA）のような技術を用いても達成できる。Sjolander, S. 及びUrbaniczky, C.（1991）*Anal. Chem.* 63: 2338 - 2345並びにSzabóら（1995）*Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:

699-705。本明細書中で使用している“BIA”は、いずれの反応物も標識せずに生物特異的な相互作用をリアルタイムで研究するための技術である（例えばBIAcore）。表面プラズモン共鳴（SPR）の光学現象の変化を、生物分子間のリアルタイム反応の指標として使用できる。

【0046】

代替の態様では、試験化合物のN-キナーゼの活性調節能力の測定は、N-キナーゼタンパク質が更にN-キナーゼ標的分子の下流エフェクターの活性を調節する能力の測定によっても達成できる。例えば、適当な標的に対するエフェクター分子の活性を測定しても、又は適当な標的へのエフェクターの結合を前述のように測定してもよい。

【0047】

本発明の上記アッセイ法の一つ以上の態様において、いずれかの反応物、例えばN-キナーゼ又は非N-キナーゼ分子を固定して、一つ又は両方のタンパク質の非複合体から複合体の分離を容易にし、並びにアッセイの自動化に対応させるのが望ましいと思われる。試験化合物とN-キナーゼとの結合、又は試験化合物の存在下および非存在下におけるN-キナーゼと非N-キナーゼ分子との相互作用は、反応物を含有するのに適切な任意の容器中で達成できる。そのような容器の例は、マイクロタイタプレート、試験管、及びマイクロ遠心分離管などである。一態様では、一つ又は両方のタンパク質をマトリックスに結合させるドメインを付加する融合タンパク質を使うこともできる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/N-キナーゼ融合タンパク質又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, ミズーリ州セントルイス）又はグルタチオン誘導マイクロタイタプレート上に吸着させることができる。次に、これを試験化合物、又は試験化合物及び吸着させてない非N-キナーゼ分子又はN-キナーゼのいずれかと組み合わせ、その混合物を複合体形成に導く条件下でインキュベートする（例えば塩及びpHについては生理的条件下で）。インキュベーション後、ビーズ又はマイクロタイタプレートのウェルを洗浄し、非結合成分があればそれを除去し、ビーズの場合マトリックスを固定し、複合体を例えば前述のように直接的又は間接的に測定する。あるいは、複合体をマトリックスから解離し、N-キナーゼの結合又は活性のレベルを標準技術を用いて測定してもよい。

10

20

【0048】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術も、本発明のスクリーニングアッセイに使用できる。例えば、N-キナーゼ又は非N-キナーゼ分子のいずれかを、ビオチン-ストレプトアビジン複合体を利用して固定することができる。ビオチン化N-キナーゼ又は非N-キナーゼ分子は、当該技術分野で公知の技術を用いて（例えばビオチン化キット、Pierce Chemicals、イリノイ州ロックフォード）、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシ-スクシンイミド）から製造でき、それをストレプトアビジン被覆96穴滴板（Pierce Chemical）のウェルに固定する。あるいは、N-キナーゼ又は非N-キナーゼ分子と反応するが、N-キナーゼのその標的非N-キナーゼ分子への結合は妨害しない抗体をプレートのウェルに誘導体化し、結合していない非N-キナーゼ分子又はN-キナーゼをウェル中で抗体結合によって捕捉してもよい。そのような複合体の検出法は、GST-固定複合体に関して前述した方法の他に、N-キナーゼ又は非N-キナーゼ分子と反応する抗体を用いる複合体の免疫検出法、並びにN-キナーゼ又は非N-キナーゼ標的分子に付随する酵素活性の検出に頼る酵素連結アッセイ法などがある。

30

40

【0049】

別の態様では、N-キナーゼ発現モジュレーターを、細胞を候補化合物と接触させ、細胞中のN-キナーゼのmRNA又はタンパク質発現を測定するという方法で識別する。候補化合物の存在下でのN-キナーゼのmRNA又はタンパク質の発現レベルを、候補化合物の不在下でのN-キナーゼのmRNA又はタンパク質の発現レベルと比較する。この比較を基にして、候補化合物がN-キナーゼ発現モジュレーターであると識別できる。例えば、N-キナーゼのmRNA又はタンパク質発現が候補化合物の不在下よりも存在下で大きい（統計的に有意に大きい）場合、該候補化合物はN-キナーゼのmRNA又はタンパク

50

質発現のステイミュレーター (stimulator) と確認される。又は、N - キナーゼの mRNA 又はタンパク質の発現が候補化合物の不在下よりも存在下で小さい (統計的に有意に小さい) 場合、該候補化合物は N - キナーゼの mRNA 又はタンパク質発現のインヒビターと確認される。細胞中の N - キナーゼの mRNA 又はタンパク質発現レベルは、N - キナーゼの mRNA 又はタンパク質の検出に関して本明細書中に記述した方法によって測定できる。

#### 【0050】

本発明の更に別の側面では、N - キナーゼタンパク質を two - hybrid アッセイ又は three - hybrid アッセイの “bait (おとり) タンパク質” として使用することができる (例えば、米国特許第 5, 283, 317 号; Zervos ら (1993) Cell 72: 223 - 232; Madura ら (1993) J. Biol. Chem. 268: 12046 - 12054; Bartel ら (1993) Biotechniques 14: 920 - 924; Iwabuchi ら (1993) Oncogene 8: 1693 - 1696; 及び Brent WO94/10300 参照)。そうすることで、N - キナーゼに結合又は相互作用するタンパク質 (“N - キナーゼ結合タンパク質” 又は “N - キナーゼ - bp”) であって、N - キナーゼの活性に関与する他のタンパク質を確認することができる。このような N - キナーゼ結合タンパク質は、例えば N - キナーゼが介在するシグナリング経路の下流エレメントとして、N - キナーゼタンパク質又は N - キナーゼ標的によるシグナルの伝播にも関与しているようである。あるいは、このような N - キナーゼ結合タンパク質は、N - キナーゼインヒビターの可能性もある。

10

20

#### 【0051】

two - hybrid 法は、ほとんどの転写因子のモジュール (構造単位) の性質を利用したものである。転写因子は分離可能な DNA 結合ドメインと活性化ドメインからなる。簡単に述べると、本アッセイは、二つの異なる DNA 構成体を利用する。一方の構成体は、N - キナーゼタンパク質をコードする遺伝子を、既知転写因子 (例えば GAL - 4) の DNA 結合ドメインをコードする遺伝子に融合させておく。他の構成体は、未確認タンパク質 (“prey (えじき)” 又は “試料”) をコードする DNA 配列ライブラリーから選んだ DNA 配列を、既知転写因子の活性化ドメインをコード化する遺伝子に融合させておく。“bait” と “prey” タンパク質はインビボで相互作用できれば、N - キナーゼ依存性複合体を形成し、転写因子の DNA 結合ドメインと活性化ドメインは接近する。この接近によりレポーター遺伝子 (例えば LacZ) の転写が可能になる。レポーター遺伝子は、転写因子に応答する転写調節部位に機能可能に連結されている。レポーター遺伝子の発現は検出できるので、機能する転写因子を含有している細胞コロニーを単離して、N - キナーゼタンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローン遺伝子を得るのに使用できる。

30

#### 【0052】

別の側面において、本発明は、本明細書中に記載の二つ以上のアッセイの組合せに関する。例えば、調節化合物は、細胞ベース又は細胞を使用しないアッセイを用いて識別でき、該化合物の N - キナーゼタンパク質調節能力はインビボで確認できる。ここで言うインビボとは、例えば、中枢神経系の神経細胞の異常な、例えば不十分な軸索成長を特徴とする状態用の動物モデルのような動物体内である。そのような動物モデルの例は、例えば、Benowitz ら (1999) PNAS 96 (23): 13486 - 90 に記載されている。てんかん動物モデルも当該技術分野では知られている。

40

#### 【0053】

本発明はさらに、前述のスクリーニングアッセイで確認された新規化合物にも関する。従って、本明細書に記載のようにして確認された化合物を適当な動物モデルに使用することも本発明の範囲に含まれる。例えば、本明細書に記載のようにして確認された化合物 (例えば、N - キナーゼ調節化合物、アンチセンス N - キナーゼ核酸分子、N - キナーゼ特異的抗体、又は N - キナーゼ結合パートナー) を動物モデルに使用して、そのような化合物を用いた治療の有効性、毒性、又は副作用を調べることができる。あるいは、本明細書

50

に記載のようにして確認された化合物を動物モデルに使用して、そのような化合物の作用機序を調べることもできる。さらに、本発明は、前述のスクリーニングアッセイによって確認された新規化合物を本明細書に記載のような治療に使用することにも関する。

**【0054】**

一態様では、本発明の方法に使用するN-キナーゼはヒトN-キナーゼ、例えば組換え製造されたN-キナーゼである。N-キナーゼ、例えばヒトN-キナーゼは、標準技術を用いて組換え発現ベクターに導入し、原核細胞又は真核細胞に発現させてよい。例えば、ヒトN-キナーゼのようなN-キナーゼは、大腸菌のような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いて）、酵母細胞、又は哺乳動物細胞に発現できる。適切な宿主細胞については、さらに、GoeddelのGene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, カリフォルニア州サンジエゴ（1990）に記載されている。あるいは、ヒトN-キナーゼのようなN-キナーゼを含有する組換え発現ベクターを、例えばT7プロモーター調節配列及びT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写及び翻訳してもよい。

10

**【0055】**

別の態様では、本発明の方法に使用するN-キナーゼはウシN-キナーゼ、例えば、本明細書中、例えば実施例1に記載のようなウシ新生仔脳組織などのウシ原料から精製されたN-キナーゼである。

**【0056】**

別の態様において、本発明の方法は、さらに、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する試験化合物の能力の測定も含む。中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する試験化合物の能力の測定は、例えば、精製ラット網膜神経節細胞の解離培養物を用いて達成できる。精製ラット網膜神経節細胞の解離培養物は、例えば、Barresら、Neuron, 1: 791-803, 1988（この内容は引用によって本明細書に援用する）に記載のような免疫パンニング法によって製造できる。簡単に述べると、Sprague-Dawleyラットの網膜はシステインで活性化されたパパインをを用いて解離できる。マクロファージは、抗ラットマクロファージ抗体（Accurate）とのインキュベーション、次いで抗ウサギIgG抗体による免疫パンニングによって除去される。神経節細胞は、抗Thy-1抗体による免疫パンニングによって単離し、次いで低密度培養に使用するためにトリプシンで取り除く。ラット網膜神経節細胞は、30mMの炭酸水素塩が存在する以外は前述のと同じ培地を用いて、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で37℃に維持される。

20

30

**【0057】**

試料を24穴滴板の無作為の4ヶ所に入れ、試験化合物と接触させる。成長を盲検法で確認するためにコードは隠す。各実験は、4ウェルの陰性対照（培地とサプリメントだけ）と4ウェルの陽性対照（例えば活性が既知の標準化AF-1試料）を含みうる。各ウェルの25の連続した領域におけるすべての神経節細胞について、成長と生存を6日後に位相差顕微鏡を用いて400倍の倍率で評価する（1ウェルあたり約150個の神経節細胞を数えた）。5細胞径分の長さの突起の伸長を成長の基準として使用する。というのは、それによって、刺激された細胞が陰性対照から明らかに区別できるからである（Schwallbら、1995）。計数の完了後、コードを明らかにし、データを表にまとめて、平均と標準誤差をCrickit Graph（CA Associates, ニューヨーク州アイランディア）を用いて各試料の4ヶ所のウェルについて算出する。データは、陰性対照の成長（通常4~5%）を差し引き、陽性対照の正味成長で割って標準化する。

40

**【0058】**

金魚網膜神経節細胞（Benowitzら（1998）J. Biol. Chem. 273（45）: 29626-34）並びにラットと金魚の神経節細胞混合物も使用できる。

**【0059】**

さらに、患者に神経有益効果をもたらす試験化合物の能力も各種の公知手順及びアッセイを用いて評価できる。例えば、CNS損傷などの傷害後の神経細胞の接続及び/又は機能

50

を再確立する試験化合物の能力は組織学的に判定できる（神経細胞組織をスライスして神経細胞の分枝を見る、又は染料の細胞質輸送を示す、のいずれかにより）。CNS損傷などの傷害後の神経細胞の接続及び/又は機能を再確立する本発明の化合物の能力は、神経網膜もしくは視神経の損傷後、網膜電図を完全にもしくは部分的に回復する；又は損傷眼の光に対する瞳孔反応を完全にもしくは部分的に回復する試験化合物の能力をモニタすることによっても評価することができる。

【0060】

患者に神経有益効果をもたらすN-キナーゼモジュレーター的能力を測定するのに使用できる他の試験は、脊髄損傷のヒト患者又は動物モデルにおける神経機能の標準試験（例えば、標準反射試験、泌尿器試験、尿力学試験、深部痛及び表在痛評価試験、後肢の固有受容配置、歩行、及び誘発電位試験）を含む。さらに、神経有益効果が生じた指標として、伝導活動電位の測定などによって患者の神経インパルス伝導を測定してもよい。

10

【0061】

本発明のアッセイでの使用に適切な動物モデルは部分離断ラットモデル（Weidnerら（2001）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3513-3518に記載）を含む。この動物モデルで、ほぼ完全に離断された索の無傷の残存フラグメントの生存と発芽を化合物がいかによく増進できるかを試験する。従って、N-キナーゼモジュレーターの投与後、これらの動物のある種の機能、例えばラットが前脚でペレット餌をいかにうまく扱えるかといった機能の回復を評価する（関係する索の97%が切除されている）。

20

【0062】

本発明のアッセイでの使用に適切な別の動物モデルは脳卒中ラットモデル（Kawamuraら（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(15):8179-8184に記載）を含む。この論文に、四肢の感覚運動機能及び傷害後の前庭運動機能を評価するのに使用できる様々な試験が詳細に解説されている。これらの動物に本発明のN-キナーゼモジュレーターを投与すると、所定の化合物、投与経路、又は用量によって、神経有益効果をもたらされたかどうか、例えば試験動物の機能レベルが向上した、又は機能回復速度もしくは機能保持程度が増加したかどうかを評価するのに使用できる。

【0063】

脳卒中後のヒト患者の進行を評価するのに使用される標準の神経学的評価も、患者に神経有益効果をもたらすN-キナーゼモジュレーター的能力を評価するのに使用できる。そのような標準の神経学的評価は、医学分野では日常的なものであり、例えばMohr及びGautier編“Guide to Clinical Neurobiology”（Churchill Livingstone Inc. 1995）に記載されている。

30

【0064】

末梢神経系の機能評価のための標準試験は、筋電図、神経伝導速度測定、誘発電位評価及び上肢/下肢体性感覚誘発電位などである。筋電図試験は、筋肉の電気活性を記録するので、神経及び筋肉の機能の評価に使用される。電極を筋肉に挿入し、その電気活性を記録する。筋肉が静止している間及び収縮している間、挿入中の活性を記録する。神経伝導速度試験は、電気インパルスが伝わる速さを記録することによって末梢神経の健康度を評価する。末梢神経は脊髄と筋肉間の情報を伝達する。いくつかの神経系の疾患はこのインパルス速度を低下させうる。皮膚に配置した電極が、インパルスが神経に沿って動いた後の電気信号を検出し記録する。第二の刺激電極から神経に沿ってわずかな電荷を送る。刺激と応答間の時間が記録され、インパルスがいかに迅速に全面的に送られるかが調べられる。

40

【0065】

脳神経機能の標準試験は、神経医学分野の専門家には公知の通り、顔面神経伝導試験；眼輪筋反射試験（まばたき反射試験）；局所顔面神経病変、ベル麻痺、三叉神経痛、及び非定型顔面痛に使用されるような三叉神経-顔面神経反射評価；誘発電位評価；視覚性、脳

50

幹及び聴覚性誘発電位測定；熱診断細線維試験；及びコンピュータ支援による定量感覚試験などである。

患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物

別の側面において、本発明は、前述のいずれかの方法で確認された、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物にも関する。

【0066】

一態様では、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物は、アンチセンスN - キナーゼ核酸分子である。“アンチセンス”核酸は、タンパク質をコードする“センス”核酸に対して相補的、例えば二本鎖cDNA分子のコード鎖に対して相補的又はmRNA配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。従って、アンチセンス核酸はセンス核酸に水素結合できる。アンチセンス核酸は、全N - キナーゼコード鎖に対して、又はその一部のみに対して相補的であり得る。一態様では、アンチセンス核酸分子は、N - キナーゼをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の“コード領域”に対してアンチセンスである。“コード領域”という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域のことである。別の態様では、アンチセンス核酸分子は、N - キナーゼをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の“非コード領域”に対してアンチセンスである。“非コード領域”という用語は、アミノ酸に翻訳されない、コード領域に隣接する5'及び3'配列のことである(すなわち、5'及び3'非翻訳領域とも呼ばれる)。

【0067】

N - キナーゼをコードするコード鎖配列が与えられれば、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンとクリックの塩基対の規則に従って設計できる。アンチセンス核酸分子は、N - キナーゼmRNAの全コード領域に対して相補的であってもよいが、N - キナーゼmRNAのコード又は非コード領域の一部にだけアンチセンスであるオリゴヌクレオチドのほうが好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、N - キナーゼmRNAの翻訳開始部位周辺の領域に対して相補的でありうる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50ヌクレオチドの長さであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、化学合成及び当該技術分野で公知の手順による酵素連結反応を用いて構築できる。例えば、アンチセンス核酸(例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然に存在するヌクレオチドを用いて、又は分子の生物学的安定性を増大させるように、あるいはアンチセンス及びセンス核酸間に形成された二本鎖の物理的安定性を増大させるように設計された様々に修飾されたヌクレオチドを用いて化学合成できる。例えばホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチドが使用できる。アンチセンス核酸の作成に使用できる修飾ヌクレオチドの例は、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、- D - ガラクトシルキユーオシン、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、- D - マンノシルキユーオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、キユーオシン(queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、及び2, 6 - ジアミノプリンなどである。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス指向でサブクロニングされている発現ベクターを用いて生物的に製造することもできる(すなわち、挿入核酸から転写されたRNAは、興味ある標的核酸に対

10

20

30

40

50

してアンチセンス指向となる。以下の小節でさらに解説)。

【0068】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には患者に投与されるかまたは生体内原位置 (in situ) で生成され、N-キナーゼタンパク質をコードする細胞の mRNA 及び/又はゲノム DNA とハイブリッドを形成する又は結合し、それによって、例えば転写及び/又は翻訳を阻害することによって、タンパク質の発現を阻害する。ハイブリッド形成は、安定な二本鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によるか、又は例えば DNA 二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的相互作用による。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例は、例えば脳の組織部位における直接注入を含む。あるいは、アンチセンス核酸分子を選択された細胞を標的とするように改変して全身投与することもできる。例えば、全身投与の場合、例えば、アンチセンス核酸を細胞表面の受容体又は抗原に結合するペプチド又は抗体に連結することによって、選択された細胞表面に発現された受容体又は抗原に特異的に結合させるようにアンチセンス分子を改変できる。アンチセンス核酸分子は、本明細書中に記載のベクターを用いて細胞に送達することもできる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、ベクターの構成体は、アンチセンス核酸分子を強力な pol II 又は pol III プロモーターの制御下に置くようなものが好ましい。

10

【0069】

さらに別の態様では、アンチセンス N-キナーゼ核酸分子は、 $\beta$ -アノマー核酸分子であり得る。 $\beta$ -アノマー核酸分子は、相補的 RNA と特異的な二本鎖ハイブリッドを形成するが、これは、通常の  $\alpha$ -ユニットとは反対に鎖が互いに平行に走っている (Gaultierら (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641)。アンチセンス核酸分子は、2'-*o*-メチルリボヌクレオチド (Inoueら (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) 又はキメラ RNA-DNA 類似体 (Inoueら (1987) *FEB S Lett.* 215:327-330) を含むこともできる。

20

【0070】

さらに別の態様では、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する化合物はリボザイムである。リボザイムは、mRNA のような一本鎖核酸を切断できるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒 RNA 分子であり、一本鎖核酸に対する相補的領域を有している。従って、リボザイム (例えばハンマーヘッドリボザイム (Haselhoff 及び Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591 に記載)) を利用して N-キナーゼ mRNA の転写物を触媒的に切断すれば、N-キナーゼ mRNA の翻訳を阻害できる。N-キナーゼをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、N-キナーゼ cDNA のヌクレオチド配列に基づいて設計できる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が N-キナーゼをコードする mRNA 中の切断されるヌクレオチド配列に対して相補的な、テトラヒメナ L-19 IVS RNA の誘導体を構築できる。例えば、Cechら米国特許第 4,987,071 号; 及び Cechら米国特許第 5,116,742 号参照。あるいは、N-キナーゼ mRNA は、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒 RNA を RNA 分子プールから選ぶのに使用することができる。例えば、Bartel, D. 及び Szostak, J. W. (1993) *Science* 261:1411-1418 参照。

30

40

【0071】

あるいは、N-キナーゼ遺伝子発現は、N-キナーゼの調節領域 (例えば N-キナーゼプロモーター及び/又はエンハンサー) に対して相補的なヌクレオチドを標的にして、標的細胞内で N-キナーゼ遺伝子の転写を防止する三重らせん構造を形成することによって阻害することもできる。一般的に、Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, C. ら (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660:27-36; 及び Maher, L. J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-15 参照。

【0072】

50

さらに別の態様では、中枢神経系の神経細胞の軸索成長を調節する化合物は、抗N-キナーゼ抗体である。全長N-キナーゼタンパク質、又はその代わりにN-キナーゼの抗原ペプチドフラグメントを免疫原として使用して抗N-キナーゼ抗体を作製する。N-キナーゼの抗原ペプチドは、配列番号1で示したアミノ酸配列の少なくとも8個のアミノ酸残基を含み、N-キナーゼのエピトープも包含する。その結果、ペプチドに対して作られた抗体は、N-キナーゼタンパク質と特異的な免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原ペプチドは、少なくとも10個のアミノ酸残基、更に好ましくは少なくとも15個のアミノ酸残基、なお更に好ましくは少なくとも20個のアミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも30個のアミノ酸残基を含む。

#### 【0073】

抗原ペプチドに包含される好適なエピトープは、タンパク質表面に位置するN-キナーゼの領域、例えば親水性領域、並びに高抗原性の領域である。

N-キナーゼ免疫原は、典型的には適切な対象（例えばウサギ、ヤギ、マウス又は他の哺乳動物）を免疫原で免疫化して抗体を製造するのに使用される。適切な免疫原調製物は、例えば、組換え発現されたN-キナーゼタンパク質又は化学合成されたN-キナーゼポリペプチドを含有できる。該製剤は、さらにフロイント完全又は不完全アジュバントのようなアジュバント、又は同様の免疫刺激剤を含んでもよい。免疫原N-キナーゼ調製物による適切な対象の免疫化によって、ポリクロナール抗N-キナーゼ抗体反応が誘発される。

#### 【0074】

本明細書中で使用している“抗体”という用語は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、N-キナーゼのような抗原を特異的に結合する（免疫反応をする）抗原結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例は、抗体をペプシンのような酵素で処理することによって得られるF(ab)及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含む。本発明は、N-キナーゼ分子を結合するポリクロナール及びモノクロナール抗体を提供する。本明細書中で使用している“モノクロナール抗体”又は“モノクロナール抗体組成物”という用語は、N-キナーゼの特定のエピトープと免疫反応することが可能な1種の抗原結合部位のみを含有する抗体分子集団のことである。従って、モノクロナール抗体組成物は、典型的には、それが免疫反応する特定のN-キナーゼタンパク質に対して単一の結合親和性を示す。

#### 【0075】

ポリクロナール抗N-キナーゼ抗体は、前述のように適切な対象をN-キナーゼ免疫原で免疫化することによって製造できる。免疫化された対象の抗N-キナーゼ抗体価は、固定したN-キナーゼを用いてエンザイムイムノアッセイ(ELISA)のような標準技術によって時間に対してモニタできる。所望であれば、N-キナーゼに対する抗体分子を哺乳動物（例えば血液）から単離し、プロテインAクロマトグラフィーのような周知技術によってさらに精製し、IgGフラクションを得ることもできる。免疫化してから適当な時間経過後、例えば抗N-キナーゼ抗体価が最大になったら、抗体産生細胞を被験者から採取し、原著がKohler及びMilstein(1975)Nature 256:495-497のハイブリドーマ技術(Brownら(1981)J. Immunol. 127:539-46; Brownら(1980)J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yehら(1976)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31;及びYehら(1982)Int. J. Cancer 29:269-75も参照)、より最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら(1983)Immunol Today 4:72)、EBV-ハイブリドーマ技術(Coleら(1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)又はトリオーマ技術のような標準技術によってモノクロナール抗体を製造するのに使用できる。モノクロナール抗体ハイブリドーマの製造技術はよく知られている(一般的に、Monoclonal Antibodiesに収載されているR. H. KennethのA New Dimension In Biological Analyses, Plenum P

10

20

30

40

50

ublishing Corp., ニューヨーク州ニューヨーク (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54: 387-402; M. L. Gefterら (1977) Somatic Cell Genet. 3: 231-36 参照)。簡単に述べると、不死細胞系 (典型的には骨髄腫) を、前述のように、N-キナーゼ免疫原で免疫化した哺乳動物のリンパ球 (典型的には脾細胞) に融合させ、得られたハイブリドーマ細胞の培養物上清をスクリーニングして、N-キナーゼを結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを識別する。

#### 【0076】

リンパ球と不死化細胞系を融合するのに使用される多くの周知プロトコルのいずれもが、抗N-キナーゼモノクローナル抗体の製造に適用できる (例えば、G. Galfreら (1977) Nature 266: 55052; Gefterら、Somatic Cell Genet. (上記); Lerner、Yale J. Biol. Med. (上記); Kenneth、Monoclonal Antibodies (上記) 参照)。さらに、当業者であれば、同様に有用な、そのような方法の多くの変形があることは理解されよう。典型的には、不死細胞系 (例えば骨髄腫細胞系) はリンパ球と同種の哺乳動物から誘導される。例えば、マウスのハイブリドーマは、本発明の免疫原製剤で免疫化したマウスのリンパ球をマウスの不死化細胞系と融合させることによって製造できる。好適な不死細胞系は、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地 (“HAT培地”) に感受性のあるマウスの骨髄腫細胞系である。いくつかの骨髄腫細胞系、例えばP3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653又はSp2/O-Ag14骨髄腫細胞系のいずれもが、標準技術に従って融合パートナーとして使用できる。これらの骨髄腫細胞系はATCCから入手できる。典型的には、HAT感受性マウス骨髄腫細胞を、ポリエチレングリコール (“PEG”) を用いてマウスの脾細胞に融合する。融合の結果得られたハイブリドーマ細胞は、次にHAT培地を用いて選別する。HAT培地は、非融合細胞及び生産力のない融合骨髄腫細胞を死滅させる (非融合脾細胞は、形質転換されないために数日後に死滅する)。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、ハイブリドーマ培養物の上清をN-キナーゼを結合する抗体について、例えば標準のELISAアッセイを用いてスクリーニングすることによって検出される。

#### 【0077】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを製造する代わりに、N-キナーゼを用いて組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー (例えば抗体ファージディスプレイライブラリー) をスクリーニングすることによって、モノクローナル抗N-キナーゼ抗体を識別し単離することができる。これにより、N-キナーゼを結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離できる。ファージディスプレイライブラリーを作成及びスクリーニングするためのキットは市販されている (例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01; 及びStratagene SurfZAP (商標) Phage Display Kit、カタログ番号240612)。また、抗体ディスプレイライブラリーの作成及びスクリーニングに使用するのに特になじみやすい方法及び試薬の例は、例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号; Kangら、PCT国際特許公開番号WO92/18619; Dowerら、PCT国際特許公開番号WO91/17271; Winterら、PCT国際特許公開番号WO92/20791; Marklandら、PCT国際特許公開番号WO92/15679; Breitlingら、PCT国際特許公開番号WO93/01288; McCaffertyら、PCT国際特許公開番号WO92/01047; Garrardら、PCT国際特許公開番号WO92/09690; Ladnerら; PCT国際特許公開番号WO90/02809; Fuchsら (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hayら (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85; Huseら (1989) Science 246: 1275-1281; Griffithsら (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkinsら (1992) J. Mol. Biol

. 226 : 889 - 896 ; Clark son 氏 ( 1991 ) Nature 352 : 624 - 628 ; Gram 氏 ( 1992 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 89 : 3576 - 3580 ; Garrad 氏 ( 1991 ) Bio / Technology 9 : 1373 - 1377 ; Hoogenboom 氏 ( 1991 ) Nuc . Acid Res . 19 : 4133 - 4137 ; Barbasa 氏 ( 1991 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 88 : 7978 - 7982 ; 及び McCafferty 氏、Nature ( 1990 ) 348 : 552 - 554 に見つけることができる。

【0078】

また、標準の組換えDNA技術で作製できる、ヒト及び非ヒト部分の両方を含むキメラ及びヒト化モノクローナル抗体のような組換え抗N - キナーゼ抗体も本発明の範囲に含まれる。そのようなキメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の組換えDNA技術を用いて製造できる。例えば、Robinson 氏、国際出願番号PCT / US 86 / 02269 ; Akira 氏、欧州特許出願第184 , 187号 ; Taniguchi , M .、欧州特許出願第171 , 496号 ; Morrison 氏、欧州特許出願第173 , 494号 ; Neuberger 氏、PCT国際特許公開番号WO86 / 01533 ; Cabilly 氏、米国特許第4 , 816 , 567号 ; Cabilly 氏、欧州特許出願第125 , 023号 ; Better 氏 ( 1988 ) Science 240 : 1041 - 1043 ; Liu 氏 ( 1987 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 84 : 3439 - 3443 ; Liu 氏 ( 1987 ) J . Immunol . 139 : 3521 - 3526 ; Sun 氏 ( 1987 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 84 : 214 - 218 ; Nishimura 氏 ( 1987 ) Canc . Res . 47 : 999 - 1005 ; Wood 氏 ( 1985 ) Nature 314 : 446 - 449 ; 及び Shaw 氏 ( 1988 ) J . Natl . Cancer Inst . 80 : 1553 - 1559 ) ; Morrison , S . L . ( 1985 ) Science 229 : 1202 - 1207 ; Oi 氏 ( 1986 ) BioTechniques 4 : 214 ; Winter , 米国特許第5 , 225 , 539号 ; Jones 氏 ( 1986 ) Nature 321 : 552 - 525 ; Verhoeyan 氏 ( 1988 ) Science 239 : 1534 ; 及び Beidler 氏 ( 1988 ) J . Immunol . 141 : 4053 - 4060 に記載の方法を用いる。

【0079】

一態様では、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物は、N - キナーゼに特異的な細胞内抗体である。細胞のタンパク質機能を阻害するために細胞内抗体を使用することは当該技術分野で公知である ( 例えば、Carlson , J . R . ( 1988 ) Mol . Cell . Biol . 8 : 2638 - 2646 ; Biocca , S 氏 ( 1990 ) EMBO J . 9 : 101 - 108 ; Werge , T . M . 氏 ( 1990 ) FEBS Letters 274 : 193 - 198 ; Carlson , J . R . ( 1993 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 90 : 7427 - 7428 ; Marasco , W . A . 氏 ( 1993 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 90 : 7889 - 7893 ; Biocca , S 氏 ( 1994 ) Bio / Technology 12 : 396 - 399 ; Chen , S - Y 氏 ( 1994 ) Human Gene Therapy 5 : 595 - 601 ; Duan , L 氏 ( 1994 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 91 : 5075 - 5079 ; Chen , S - Y 氏 ( 1994 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 91 : 5932 - 5936 ; Beerli , R . R . 氏 ( 1994 ) J . Biol . Chem . 269 : 23931 - 23936 ; Beerli , R . R . 氏 ( 1994 ) Biochem . Biophys . Res . Commun . 204 : 666 - 672 ; Mhashilkar , A . M . 氏 ( 1995 ) EMBO J . 14 : 1542 - 1551 ; Richardson , J . H . 氏 ( 1995 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 92 : 3137 - 3141 ; Marasco 氏、PCT公開番号WO94 / 02610 ; 及びDuan 氏、PCT公開番号WO95 / 03832 参照 ) 。

10

20

30

40

50

## 【0080】

細胞内抗体を用いてタンパク質活性を阻害するには、組換え発現ベクターを作製するが、これは、ベクターが細胞内に導入されると、抗体鎖が細胞の細胞内コンパートメントで機能性抗体として発現されるような形態で抗体鎖をコードしている。

## 【0081】

さらに別の態様では、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物は小分子である。本明細書中で使用している“小分子”という用語は、ペプチド、擬似ペプチド、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、1モルあたり約10,000g未満の分子量を有する有機又は無機化合物(すなわちヘテロ有機化合物及び有機金属化合物を含む)、1モルあたり約5,000g未満の分子量を有する有機又は無機化合物、1モルあたり約1,000g未満の分子量を有する有機又は無機化合物、並びにそのような化合物の塩、エステル、および他の医薬上許容しうる形態などであるが、これらに限定されない。

10

## 【0082】

また更に別の態様では、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物は、N-キナーゼポリペプチド又はその部分、例えば、少なくともN-キナーゼポリペプチドの15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、又は200個の隣接アミノ酸を含むフラグメントである。例えば、該化合物は、N-キナーゼの構造的に活性な触媒ドメインを含むことができる。

20

## 【0083】

また更に別の態様では、患者に神経有益効果をもたらすことが可能な化合物は、N-キナーゼ核酸分子又はその部分である。

好適な態様では、N-キナーゼの活性を調節する化合物は、細胞に進入し、細胞内で作用することが可能である。例えば、膜トランスロケーションドメインを用いて、N-キナーゼのペプチドモジュレーターを細胞内に誘導する。そのような膜トランスロケーションドメインは当該技術分野で公知で、アンテナペディアホメオドメインタンパク質の第3ヘリックス及びHIV-1タンパク質Tat、並びに、例えば、Derossiら(1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10444-10450; Lindgrenら(2000) *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 99-103; Hora, *Cancer Research* 61, 474-477(2001); 米国特許第5,888,762号; 米国特許第6,015,787号; 米国特許第5,846,743号; 米国特許第5,747,641号; 米国特許第5,804,604号; 及び公開PCT出願のWO98/52614、WO00/29427及びWO99/29721に記載のものなどであるが、これらに限定されない。前記各参考文献の全内容は引用によって本明細書に援用する。

30

## 【0084】

このほか、N-キナーゼの活性を調節する化合物(すなわちN-キナーゼモジュレーター)の細胞内への移動を容易にするための当該技術分野における公知技術は、例えば、Lindgren Mら(2000) *Trends Pharmacol. Sci.* 21(3): 99-103; Gariépy Jら(2001) *Trends Biotechnol* 19(1): 21-28; Vyas SPら(2001) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 18(1): 1-76; Morris M Cら(2000) *Curr Opin Biotechnol* 11(5): 461-466; 及びDerossi Dら(1998) *Trends Cell Biol.* 8(2) 84-87に記載のものなどを含む。これらすべての内容は引用によって本明細書に援用する。

40

## 【0085】

治療的遺伝子、アンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムを発現する構成体は、ウィルスベクター、並びに例えば、Hope MJら(1998) *Mol Membr B*

50

i o l 15 ( 1 ) : 1 - 1 4 に記載のものを含む非ウイルス性の送達システムによって細胞内に送達できる。

#### 医薬上許容しうる製剤

本発明は、N - キナーゼの活性を調節する化合物及び医薬上許容しうる担体を含む医薬組成物並びに包装製剤も提供する。

##### 【0086】

本発明の方法において、N - キナーゼの活性を調節する化合物は、医薬上許容しうる製剤にして投与できる。そのような医薬上許容しうる製剤は、N - キナーゼモジュレーター並びに医薬上許容しうる担体及び/又は賦形剤を含むことができる。本明細書中で使用している“医薬上許容しうる担体”は、生理的に適合性のあるいずれか及びすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌薬及び抗真菌薬、等張剤及び吸収遅延剤などを含む。例えば、担体は脳脊髄液への注入に適したものであり得る。賦形剤は、医薬上許容しうる安定剤及び崩壊剤を含む。本発明は、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、又はビーズの形態の合成又は天然ポリマー、並びに水中油形乳剤、ミセル、混合ミセル、合成膜小胞、及び再封入赤血球を含む脂質ベースの製剤を含むいずれかの医薬上許容しうる製剤に関する。

10

##### 【0087】

一態様では、医薬上許容しうる製剤はポリマーマトリックスを含む。“ポリマー”又は“ポリマーの”は専門用語で、神経障害などの標的とする状態の治療が行えるようにN - キナーゼモジュレーターを送達することが可能な、モノマー単位の反復で構成される構造枠を含む。当該用語には、合成又は天然のコポリマー又はホモポリマーも含まれる。線状ポリマー、分枝ポリマー、及び架橋ポリマーも含まれるとする。

20

##### 【0088】

例えば、本発明で使用する医薬上許容しうる製剤の形成に適切なポリマー材料は、天然誘導ポリマーの、アルブミン、アルギネート、セルロース誘導體、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、及び多糖類など、並びに合成ポリマーの、ポリエステル(PLA, PLGA)、ポリエチレングリコール、ポロキサマー(poloxamer)、ポリ無水物、及びブルロニクスなどを含む。これらのポリマーは、中枢神経系を含む神経系と生体適合性があり、何らの有毒分解副産物を生ずることなく中枢神経系内で生分解性があり、しかもポリマーの動力学特性を操作することによって活性化化合物の放出様式及び期間を変更する能力を持つ。本明細書中で使用している“生分解性”という用語は、酵素の作用によって、加水分解作用によって、及び/又は他の同様の機序によって、患者の体内で時間をかけて分解するポリマーを意味する。本明細書中で使用している“生体適合性”という用語は、ポリマーが、有毒又は有害でなく、免疫拒絶も起こさないことによって、生組織又は生体と適合性があることを意味する。ポリマーは当該技術分野で公知の方法を用いて製造できる。

30

##### 【0089】

ポリマー製剤は、活性化化合物の液化ポリマー内への分散(米国特許第4,883,666号に記載、該特許の教示内容は引用によって本明細書に援用する)、又はバルク重合、界面重合、溶液重合、及び環重合などの方法(Odian G., Principles of Polymerization and ring opening polymerization、第2版、John Wiley & Sons、ニューヨーク、1981に記載、この内容は引用によって本明細書に援用する)によって作製できる。製剤の性質及び特性は、反応温度、ポリマー及び活性化化合物の濃度、使用する溶媒の種類、及び反応時間などのパラメータを変化させることによって制御される。

40

##### 【0090】

治療用活性化化合物は、一つ以上の医薬上許容しうるポリマーに被包して、マイクロカプセル、マイクロスフェア、又はマイクロ粒子(これらの用語は本明細書中では互換的に使用する)に形成できる。マイクロカプセル、マイクロスフェア、又はマイクロ粒子は、従来、直径2mm以下、通常直径500µm以下の球状粒子からなる自由流動粉末である。1

50

$\mu\text{m}$ 未満の粒子は、従来、ナノカプセル、ナノ粒子又はナノスフェアと呼ばれている。大部分の場合、マイクロカプセルとナノカプセル、マイクロスフェアとナノスフェア、又はマイクロ粒子とナノ粒子間の違いは大きさであり、両者の内部構造間の相違は、一般的に、あったとしてもごくわずかである。本発明の一側面において、平均直径は、約 $45\mu\text{m}$ 未満、好ましくは $20\mu\text{m}$ 未満、さらに好ましくは約 $0.1\sim 10\mu\text{m}$ である。

#### 【0091】

別の態様では、医薬上許容しうる製剤は脂質ベースの製剤を含む。公知の脂質ベースの薬物送達システムのいずれも本発明の実施に使用できる。例えば、多胞リポソーム、多重膜リポソーム及び単膜リポソームは、被包された活性化合物の持続放出速度が確立できる限り、いずれも使用可能である。制御放出用の多胞リポソーム薬物送達システムの製造法は、PCT出願番号US96/11642、US94/12957及びUS94/04490に記載されており、これらの内容は引用によって本発明に含める。

10

#### 【0092】

合成膜小胞の組成物は、通常リン脂質の組合せ、通常ステロイド、特にコレステロールとの組合せである。他のリン脂質又は他の脂質も使用できる。

合成膜小胞の製造に有用な脂質の例は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴリピド、セレブロシド、及びガングリオシドなどで、好適な態様は、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、及びジオレオイルホスファチジルグリセロールである。

20

#### 【0093】

活性化合物を含有する脂質小胞の製造に当たっては、活性化合物のカプセル化の有効性、活性化合物の不安定性、小胞の均一性及び得られた集団の大きさ、活性化合物：脂質の比率、透過性、製剤の不安定性、及び製剤の医薬的許容性といった変数を考慮しなければならない。

#### 【0094】

導入の前に、製剤は、線又は電子線滅菌のような、当該技術分野で利用できる数多くの技術のいずれかによって滅菌することができる。

#### 医薬上許容しうる製剤の投与

30

本発明の医薬上許容しうる製剤は、活性化合物が患者の神経系と接触して、神経有益効果をもたらすように投与される。本発明は、製剤の局所投与及び全身投与の両方を考えている。局所投与の望ましい特徴は、活性化合物の有効な局所濃度が達成できること、並びに活性化合物の全身投与による有害な副作用が避けられることである。一態様では、活性化合物は患者の脳脊髄液への導入によって投与される。本発明のある種の側面において、活性化合物は、脳室、腰椎部、又は大槽に導入される。別の側面において、活性化合物は、神経損傷部位又は索損傷部位、疼痛部位又は神経変性部位、又は視神経網膜細胞に接触させるために眼内に、といったように局所投与される。

#### 【0095】

医薬上許容しうる製剤は、水性媒体中に懸濁できるので、従来の皮下針を通して、又は注入ポンプを用いて導入される。

40

一態様では、本明細書中に記載の活性化合物製剤は、例えば、CNSへの傷害が発生したときから傷害発生後約100時間までの間、例えば傷害時から24、12、又は6時間以内に患者に投与される。

#### 【0096】

本発明の別の態様では、活性化合物製剤は、患者のくも膜下に投与される。本明細書中で使用している“くも膜下投与”という用語は、活性化合物製剤を、骨孔から側脳室注入又は大槽穿刺もしくは腰椎穿刺などの技術によって、患者の脳脊髄液に直接送達することを含むことを意図している(Lazorthesら、Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neu

50

rosurgery, 143-192及びOmayara, Cancer Drug Delivery, 1:169-179に記載、これらの内容は引用によって本明細書に援用する)。“腰椎部”という用語は、第3腰椎と第4腰椎(下背)間の領域を含むことを意図する。“大槽”という用語は、後頭部の頭蓋が終わり脊髄が始まる領域を含むことを意図する。“脳室”という用語は、脊髄中心管とつながっている脳腔を含むことを意図する。前述のいずれかの部位への活性化化合物の投与は、活性化化合物製剤の直接注入又は注入ポンプの使用によって達成できる。植込型又は外部式のポンプとカテーテルが使用できる。

#### 【0097】

注入の場合、本発明の活性化化合物製剤は、液体溶液、好ましくはハックス溶液又はリンガー溶液のような生理学的に適合性のある緩衝液の形態に製剤化される。また、活性化化合物製剤は、固体の形態に製剤化し、使用直前に再溶解又は懸濁させてもよい。凍結乾燥形も含まれる。注入は、例えば、活性化化合物製剤のボラス注入又は連続注入(例えば注入ポンプを用いて)の形態で実施できる。

10

#### 【0098】

本発明の一態様では、活性化化合物製剤は、患者の脳内に側脳室注入によって、好ましくは傷害(中枢神経系の神経細胞の異常、不十分又は不適切な軸索成長を特徴とする状態に至る)発生の100時間以内(例えば傷害時の6、12、又は24時間以内)に投与する。注入は、例えば患者の頭蓋骨に作った骨孔を通して行うことができる。別の態様では、製剤は、外科的に挿入したシャントを通して、患者の脳室に、好ましくは傷害発生の100時間以内(例えば傷害時の6、12、又は24時間以内)に投与する。例えば、注入は、小さい第3及び第4脳室にも行うことは可能であるが、より大きい側脳室に行うことができる。さらに別の態様では、活性化化合物製剤は、患者の大槽又は腰椎部に、好ましくは傷害発生の100時間以内(例えば傷害時の6、12、又は24時間以内)に注入によって投与する。

20

#### 【0099】

頭蓋内組織へのその他の投与手段は、本発明の化合物を嗅上皮に適用し、次に嗅球に伝達、そして脳により近い部分に移動させることを含む。そのような投与は、噴霧又はエアゾール製剤によって行うことができる。

#### 【0100】

本発明の別の態様では、活性化化合物製剤を、患者の傷害部位に、好ましくは傷害発生の100時間以内(例えば傷害時の6、12、又は24時間以内)に投与する。

30

#### 投与期間及び投与レベル

本発明の方法の好適な態様では、神経有益効果、例えば有効な軸索成長の調節を生み出すために、活性化化合物を患者に長期間投与する。活性化化合物との持続接触は、例えば活性化化合物を長期にわたって、例えば、1週間、数週間、1ヶ月又はそれより長期間反復投与することによって達成できる。更に好ましくは、活性化化合物の投与に使用する医薬上許容しうる製剤は、患者に活性化化合物の持続送達、例えば“緩徐放出”を提供する。例えば、医薬上許容しうる製剤を患者に投与後、少なくとも1、2、3、又は4週間の間、製剤は活性化化合物を送達できる。好ましくは、本発明に従って治療されるべき患者は、少なくとも30日間活性化化合物で治療される(反復投与又は持続送達システムの使用のいずれか、又は両方によって)。

40

#### 【0101】

本明細書中で使用している“持続送達”という用語は、投与後長期にわたって、好ましくは少なくとも数日間、1週間、数週間、1ヶ月、又はそれより長期間、インビボにおける活性化化合物の連続送達を含むことを意図する。活性化化合物の持続送達は、例えば活性化化合物の治療効果の長期持続によって示すことができる(例えば、患者に神経有益効果が持続的にもたらされることによって、活性化化合物の持続送達を示すことができる)。あるいは、活性化化合物の持続送達は、インビボにおける活性化化合物の長期存在を検出することによって示してもよい。

#### 【0102】

50

持続送達のための好適な方法は、ポリマーカプセル、製剤送達のためのミニポンプ、生分解性インプラント、又は移植トランスジェニック自己細胞（米国特許第6,214,622号に記載）の使用を含む。埋込可能な注入ポンプシステム（例えばInfusaid；例えばZierski, J.ら（1988）Acta Neurochem. Suppl. 43:94-99；Kanoff, R. B.（1994）J. Am. Osteopath. Assoc. 94:487-493参照）及び浸透ポンプ（Alza Corporationによって販売）は、当該技術分野で利用可能である。別の投与様式は、埋込と外部からのプログラミングが可能な注入ポンプである。適切な注入ポンプシステム及び貯蔵所システムは、Blomquistによる米国特許第5,368,562号及びDoanによる米国特許第4,731,058号にも記載され、Pharmacia Deltec Inc.によって開発されている。

10

#### 【0103】

用量値は、緩和されるべき状態の重症度によって異なることに注意する。また、特定の患者のための具体的な投与計画は、個人の必要性及び活性化化合物を投与、又は投与を監督している人物の専門的判断に従って、時間をかけて調整されるべきであり、本明細書中に記載の用量範囲は単に例示的なものであって、クレームした発明の範囲又は実施を制約することを意図するものでないことも理解されるべきである。

#### 【0104】

本発明は、別の態様で、本質的にN-キナーゼモジュレーター及び医薬上許容しうる担体からなる医薬組成物、並びに、CNS神経細胞を該組成物と接触させることによって軸索成長を調節する該組成物の使用法を提供する。“本質的に～からなる”という用語は、該医薬組成物が他の神経細胞成長モジュレーター、例えば神経成長因子（NGF）を含有しないことを意味する。一態様では、本発明の医薬組成物は包装製剤として提供できる。包装製剤には、容器に入れた本発明の医薬組成物、及び神経障害を有する患者に神経有益効果をもたらすための組成物の投与方法に関する指示書の印刷物を含みうる。医薬製造時に神経細胞の軸索成長を調節するためのN-キナーゼモジュレーター誘導因子を使用することも本発明に含まれる。

20

#### CNS神経細胞のインビトロ治療

CNS神経細胞は、さらに、インビトロで軸索成長を調節するために、N-キナーゼの活性を調節する化合物とインビトロで接触させることができる。従って、当該技術分野で周知の技術を用いて、患者からCNS神経細胞を摘出し、インビトロで成長させ、次いで軸索成長を調節するために本発明に従って治療する。簡単に述べると、CNS神経細胞培養物は、適切な基質（例えば培養皿）に付着している神経細胞組織のフラグメントから神経細胞を遊離移動させることによって、又は機械的もしくは酵素的に組織を分解してCNS神経細胞の懸濁物を作製することによって得ることができる。例えば、酵素のトリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、DNase、プロナーゼ、ディスパーゼ、又はそれらの様々な組合せが使用できる。トリプシンとプロナーゼは最も完全な分解を行うが、細胞を損傷する可能性がある。コラゲナーゼとディスパーゼは、完全な分解とは言えないが、有害性も少ない。組織（例えば神経組織）の摘出法及び組織を分解して細胞（例えばCNS神経細胞）を得る方法は、Freshney R. I., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique、第3版、1994年、に記載されている。この内容は引用によって本明細書に援用する。

30

40

#### 【0105】

こうして得た細胞は、次に、N-キナーゼの活性を調節する化合物に、前述の量及び期間接触させる。CNS神経細胞の軸索成長の調節が達成されたら、これらの細胞は患者に、例えば移植によって再投与できる。患者の体内で統合が最もうまくいくのは原始細胞であるので、細胞はインビトロで広く分化させないようにするのが好ましい。

#### 【0106】

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これを更なる制約と解釈すべきではな

50

い。本願中に引用したすべての参考文献、特許、公開特許出願、並びに図及び配列リストは、引用によって本明細書に援用する。

【0107】

【実施例】

実施例 I . N - キナーゼポリペプチドの単離及び特徴付け

ウシの脳の新皮質灰白質を、プロテアーゼ及びホスファターゼインヒビターを含有する緩衝液中でホモジナイズし、粒子状物質は遠心沈降させた。約 1 k g の組織から得た可溶性画分を N - キナーゼ単離の出発物質として使用した。

【0108】

精製過程中、キナーゼ活性はインゲル ( i n - g e l ) キナーゼ法を用いてモニタした。この方法では、ヒストン H F - 1 基質タンパク質を 10 % のポリアクリルアミドゲルに重合化した後、分析する試料を該ゲル中で電気泳動した。電気泳動の完了後、タンパク質をグアニジウムイソチオシアネートで部分再生し、6 - T G が存在する場合又は存在しない場合で、 $[^3\text{P}] - \text{ATP}$  と  $\text{Mn}^{2+}$  の存在下でインキュベートした。(  $\text{Mn}^{2+}$  で活性化されるが、 $\text{Mg}^{2+}$  又は  $\text{Ca}^{2+}$  で活性化されないのは N - キナーゼの特有の性質である ) 。キナーゼの精製は、ゲル中でキナーゼが H F - 1 基質をリン酸化する部位に対応する 6 - T G で阻害可能な放射性バンドを見つけることによってモニタした。

10

【0109】

精製過程の第一段階で、出発物質を陽イオン交換クロマトグラフィーにかけた ( P h a r m a c i a の F a s t - S カラム使用 ) 。6 - T G で阻害可能なキナーゼ活性はこのカラムに強力に結合しているので、0 . 3 M の N a C l で溶離した。次に、N - キナーゼを含有する陽イオン交換カラム画分をシバクロンブルーカラム ( P h a r m a c i a ) で分離した。これにより、アデニンヌクレオチド結合タンパク質が分離される。6 - T G で阻害可能な 47 ~ 50 k D a のポリペプチドは強力に結合しており、溶離するのに 1 . 5 M N a C l の N a C l 濃度を要した ( 図 1 A 参照 ) 。

20

【0110】

N - キナーゼポリペプチドを含有する溶離画分を、次に、C 4 疎水性相互作用カラム ( P h a r m a c i a ) を用いて逆相クロマトグラフィーにかけた。簡単に述べると、N - キナーゼを含有するシバクロンブルーカラム画分を C 4 カラムに適用し、アセトニトリル - イソプロパノール濃度を増加させる傾斜溶離を行った。カラム画分のキナーゼ活性をインゲル ( i n - g e l ) キナーゼアッセイで評価すると、6 - T G で阻害可能な、H F - 1 リン酸化活性が画分 24 ~ 26 に溶離されたこと ( 図 1 B ) が示された。より純度を上げるために、これらの画分をプールし、同じカラムに再適用して、アセトニトリル - イソプロパノール濃度を増加させる傾斜溶離による分離を繰り返した。N - キナーゼポリペプチドは、再度画分 24 ~ 26 に溶離された。

30

【0111】

最高濃度の N - キナーゼを含有するカラム画分を凍結乾燥し、10 % ポリアクリルアミド SDS ゲルに適用した。少量の試料を並列ゲルに流してインゲル ( i n - g e l ) キナーゼアッセイを行った。ゲルをクーマシーブルーで染色すると、49 k D a におけるバンドがはっきりと見えた。これは、その移動の位置が 6 - T G で阻害可能なキナーゼ活性と一致していた。このバンドを切り取って、H F - 1 リン酸化活性を含有していることを確認した。

40

【0112】

次に、N - キナーゼポリペプチドを含有しているゲルバンドを、部分タンパク質分解によって消化した。タンパク質分解フラグメントを質量分析で分析し、フラグメントの質量を、例えば Eng J . K . ら ( 1994 ) J . A m . S o c . M a s s . S p e c t r o m . 5 : 976 - 989 ; Chittum H . S . ら ( 1998 ) B i o c h e m i s t r y 37 : 10866 - 870 ; 及び LeRoy G . ら ( 1998 ) S c i e n c e 282 : 1900 - 04 に記載の方法を用いて種々の公知ペプチドの質量と比較した。前記参考文献の内容は引用によって本明細書に援用する。

50

【 0 1 1 3 】

この分析から、N - キナーゼは、M S T - 3のアイソフォーム、すなわちM S T - 3そのもの、M S T - 3 b、又は未定義のアイソフォームのいずれかであることが分かった。これらのタンパク質は、動物界に遍く見られるセリン - トレオニンキナーゼのS T Eファミリーのメンバーである。S T Eファミリーメンバーは、一般的に、細胞分化の種々の側面に関与しているモジュラーシグナリングカセットの成分である。図2にN - キナーゼのアミノ酸配列を示す。精製タンパク質と公表配列間の直接対応は青で示す。K 6 5 (太字)は、キナーゼドメインのA T P結合領域にある。

【 0 1 1 4 】

均等物

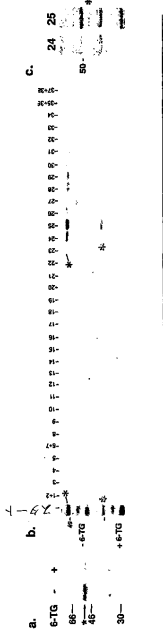
当業者であれば、単なる日常の実験を用いて、本明細書中に記載の本発明の特定の態様に対する多くの均等物を認識し、又は確認できるであろう。そのような均等物も以下のクレームに含まれるとする。

【 図面の簡単な説明 】

【 図1 】 A ~ CはN - キナーゼポリペプチドの精製を表すS D S - P A G Eゲルを示す図である。精製の各段階におけるN - キナーゼバンドを星印で示す。図1 Aは、顕著な49 k D aのバンドを表しているが、これはシバクロンブルーカラムに強力に結合しており、溶離するのに1 . 5 ~ 1 . 7 5 MのN a C lを要する。図1 Bは、C 4疎水性相互作用カラムでの分離によって得られたタンパク質画分を表す。24 ~ 26画分は、N - キナーゼポリペプチドを含有する。図1 Cは、S D S - P A G Eによって達成された精製の最終段階を示す。星印で示したバンドは、インゲル ( i n - g e l ) キナーゼ法で検定した並列ゲルで視覚化した通り、その移動位置がN - キナーゼの活性と一致した。

【 図2 】 ヒトN - キナーゼのアミノ酸配列 ( 配列番号1 ) を示す図である。精製タンパク質と公表配列間の直接対応は青で示す。K 6 5 (太字)は、キナーゼドメインのA T P結合領域にある。

【 図1 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/20056 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 45/00 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/27691
- (22) International Filing Date:  
7 September 2001 (07.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/656,915 7 September 2000 (07.09.2000) US
- (71) Applicant: CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION [US/US]; 300 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (US).
- (72) Inventor: BENOWITZ, Larry, L., 45 Moreland Avenue, Newton, MA 02159 (US).
- (74) Agent: HANLEY, Elizabeth, A., Labive & Cockfield, LLP, 28 State Street, Boston, MA 02109 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/20056 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR PRODUCING A NEURO-SALUTARY EFFECT IN A SUBJECT

(57) Abstract: Methods and compositions for producing a neurosalutary effect in a subject are provided. These methods generally involve administering to subject a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of N-kinase, or analog thereof. Pharmaceutical and packaged formulations including the compounds of the invention, e.g., compounds that modulate the activity of N-kinase, are also provided.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

METHODS AND COMPOSITIONS FOR PRODUCING A NEUROSAFUTARY  
EFFECT IN A SUBJECT

5

*Related Applications*

This application claims priority to U.S. Application Serial No. 09/656,915, filed on September 7, 2000, the entire contents of which are incorporated herein by this reference.

10

*Background of the Invention*

Disorders of the peripheral and central nervous system are widespread, and for many of these conditions effective therapeutic interventions are lacking.

15

*Summary of the Invention*

The present invention provides methods and compositions for producing a neurosalutary effect in a subject, *e.g.*, a subject suffering from a neurological condition. Such an effect includes promoting neuronal survival, axonal outgrowth, neuronal regeneration or normalized neurological function in a subject. The present invention is based, at least in part, on the isolation of a highly purified form of the N-kinase polypeptide from normal mammalian neuronal tissue, molecular characterization of its chemical structure (including amino acid sequence), demonstration of its sensitivity to purine regulation and the discovery that this kinase plays an active role in the axonal outgrowth of CNS neurons, including mammalian CNS neurons, such as retinal ganglion neurons. The identification of N-kinase as a critical intracellular mediator of axonal outgrowth, and the chemical characterization of its structure, now provides for the ability to produce a neurosalutary effect in a subject by modulating N-kinase activity. Furthermore, this purification and characterization of N-kinase now allows for its use in screening assays to identify additional compounds capable of producing a neurosalutary effect in a subject.

30

Accordingly, in one aspect, the present invention provides a method which includes administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of N-kinase, thereby producing a neurosalutary effect in the subject.

35

In one aspect, the compound that modulates the activity of N-kinase is administered to a subject in accordance with the present invention such that the compound is brought into contact with neurons of the central nervous system of the subject. For example, the compound may be administered into the cerebrospinal fluid of

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-2-

the subject into the intrathecal space by introducing the compound into a cerebral ventricle, the lumbar area, or the cisterna magna. In such circumstances, the compound that modulates the activity of N-kinase can be administered locally to cortical neurons or retinal ganglion cells to produce a neurosalutary effect.

5           In certain embodiments, the compound that modulates the activity of N-kinase may be administered to a subject using a pharmaceutically acceptable formulation. The pharmaceutically acceptable formulation may allow for sustained delivery, providing effective amounts of the compound that modulates the activity of N-kinase to a subject for at least one week, or in other embodiments, at least one month, after the  
10 pharmaceutically acceptable formulation is initially administered to the subject. Approaches for achieving sustained delivery of a compound of the invention include the use of a slow release polymeric capsule, a bioerodible matrix, or an infusion pump that disperses the compounds of the invention. The infusion pump may be implanted subcutaneously, intracranially, or in other locations as would be medically desirable. In  
15 certain embodiments, the compounds of the invention would be dispensed by the infusion pump via a catheter either into the cerebrospinal fluid, or to a site where local delivery was desired, such as a site of neuronal injury or a site of neurodegenerative changes.

          In one embodiment of the invention, the compound that modulates the activity  
20 of N-kinase is a small molecule, the N-kinase polypeptide or fragment thereof, an anti-N-kinase antibody, an antisense N-kinase nucleic acid molecule, a ribozyme, or the N-kinase gene or fragment thereof.

          In yet another aspect, the invention features a method which includes  
25 administering a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of N-kinase to a subject suffering from a neurological disorder, thereby treating the subject suffering from a neurological disorder. In one embodiment, the method further includes making a first assessment of a nervous system function, e.g., a sensory function, cholinergic innervation, or a vestibulomotor function, prior to administering the compound that modulates the activity of N-kinase to the subject and making a  
30 second assessment of the nervous system function after administering the compound to the subject.

          In a further aspect, the invention features a method for identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject by contacting N-kinase, or a biologically active fragment thereof, with a test compound and determining the ability of  
35 the test compound to modulate the activity of N-kinase, thereby identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject. In a preferred embodiment, the ability of the test compound to modulate the activity of N-kinase is determined by

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-3-

assessing the ability of the test compound to modulate N-kinase dependent phosphorylation of a substrate, *e.g.*, a histone HF-1 protein.

In one embodiment, the N-kinase used in the methods of the invention is a human N-kinase, such as a recombinantly produced human N-kinase. In another embodiment, the N-kinase used in the methods of the invention is a bovine N-kinase, such as an N-kinase which is purified from a bovine source, *e.g.*, neonatal bovine brain tissue.

In another embodiment, the screening method of the invention further includes determining the ability of the test compound to modulate axonal outgrowth of a central nervous system neuron.

In another aspect, the invention features a method for identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject. The method includes contacting N-kinase, or a biologically active fragment thereof, with a test compound, an N-kinase substrate (*e.g.*, a histone HF-1 protein), radioactive ATP (*e.g.*, [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP), and  $Mn^{2+}$ ; and determining the ability of the test compound to modulate N-kinase dependent phosphorylation of the substrate, thereby identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject. In a preferred embodiment, the method of the invention further includes determining the ability of the test compound to modulate axonal outgrowth of a central nervous system neuron.

In another aspect, the invention features a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject identified by any of the foregoing methods.

In yet another aspect, the invention features an isolated N-kinase polypeptide of the type that: (a) is present in neonatal brain tissue (*e.g.*, neonatal human, bovine, rat, or mouse brain tissue); (b) is inhibited by 6-thioguanine; (c) is activated by  $Mn^{2+}$  but not by  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ ; (d) has a molecular weight of approximately 49 kDa; and (e) is eluted from a Cibacron Blue column at a NaCl concentration of 1.5-1.75 M.

In a further aspect, the invention features an antibody, *e.g.*, an intracellular antibody, which is specifically reactive with an epitope of the N-kinase polypeptide. In a preferred embodiment, the antibody is reactive with an epitope which includes the ATP binding domain of the N-kinase.

In another aspect, the invention features a fragment of the N-kinase polypeptide, for example, a fragment that includes at least 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 150, or 200 contiguous amino acids of the N-kinase polypeptide. In a preferred embodiment, the fragment of the N-kinase polypeptide is able to elicit an immune response.

35

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-4-

In a further aspect, the invention features an isolated nucleic acid molecule that encodes the polypeptide of SEQ ID NO:1.

Pharmaceutical compositions, and packaged formulations, comprising a composition of the invention (*e.g.*, a compound that modulates the activity of N-kinase) and a pharmaceutically acceptable carrier are also provided by the invention.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, and from the claims.

#### **Brief Description of the Drawings**

10 *Figures 1A-C* are SDS-PAGE gels depicting the purification of the N kinase polypeptide. The N-kinase band at each stage of the purification is indicated by an asterisk. *Figure 1A* depicts a prominent 49 kDa band which binds strongly to a Cibacron Blue column and requires 1.5-1.75 M NaCl to be eluted. *Figure 1B* depicts the protein fractions obtained from the separation on a C4 hydrophobic-interaction column. 15 Fractions 24-26 contain the N-kinase polypeptide. *Figure 1C* depicts the final stage of purification which was accomplished by SDS-PAGE. The band indicated by the asterisk coincided in its migration position with N-kinase activity, as visualized in a parallel gel assayed with the in-gel kinase method.

20 *Figure 2* depicts the amino acid (SEQ ID NO:1) sequence of the human N-kinase. Direct matches between the purified protein and the published sequence are shown in blue. K65 (bold type) lies in the ATP-binding region of the kinase domain.

#### **Detailed Description**

25 The present invention provides methods and compositions for producing a neurosalutary effect in a subject, *e.g.*, a subject suffering from a neurological disorder. The invention is based, at least in part, on the isolation of a highly purified form of the N-kinase polypeptide from a mammalian source and the discovery that this kinase plays an active role in the axonal outgrowth of CNS neurons, including mammalian CNS neurons, such as retinal ganglion neurons, or cortical pyramidal cells.

30 Accordingly, the present invention is directed to methods which include administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of N-kinase, thereby producing a neurosalutary effect in the subject.

35 As used herein, the term "N-kinase" includes all forms of N-kinase including but not limited to human N-kinase, bovine N-kinase, murine N-kinase, rat N-kinase, and porcine N-kinase. The amino acid and nucleotide sequences of the human N-kinase are described in Zhou T-H. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275(4):2513-2519 and in GenBank Accession Number AF083420, the contents of which are incorporated herein by

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-5-

reference. The amino acid sequence of the human N-kinase is shown in Figure 2 and in SEQ ID NO:1. In a preferred embodiment, the term "N-kinase" includes the isoform of N-kinase that is inhibited by 6-thioguanine, that is activated by  $Mn^{2+}$  but not by  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ , and that has a molecular weight of approximately 49 kDa.

5 As used herein, the language "a compound that modulates the activity of N-kinase" includes any compound which has the ability to modulate, *e.g.*, stimulate or inhibit, the activity of N-kinase as determined by, for example, the assays described herein. Such compounds are able to modulate one or more of the following: (a) the ability of N-kinase to phosphorylate a substrate, *e.g.*, a histone H1 protein; (b) the  
10 ability of N-kinase to interact with, *e.g.*, bind to, a non-N-kinase molecule, such as a downstream molecule in the axonal outgrowth signaling pathway; (c) the ability of N-kinase to bind ATP or  $Mn^{2+}$ ; or (d) the ability of N-kinase to modulate the axonal outgrowth of central nervous system neurons.

In a preferred embodiment, the compound that modulates the activity of N-kinase  
15 acts downstream of AF-1 or other growth factors in the axonal outgrowth signaling pathway. The ability of the compound to act downstream of AF-1 or other growth factors in the axonal outgrowth signaling pathway may be determined using one of the assays described herein. For example, once a compound has been determined to be capable of stimulating the activity of N-kinase (*e.g.*, stimulating the N-kinase dependent  
20 phosphorylation of a substrate), N-kinase may be contacted both with this compound and with 6-thioguanine. The inability of 6-thioguanine to inhibit the stimulatory effect of the compound would indicate that the compound is acting downstream of 6-thioguanine in the axonal outgrowth signaling pathway, whereas the ability of 6-thioguanine to inhibit the stimulatory effect of the compound would indicate that the  
25 compound is acting upstream (or at the same point) in the signaling pathway. Alternatively, once a compound has been determined to be capable of inhibiting the activity of N-kinase (*e.g.*, inhibiting the N-kinase dependent phosphorylation of a substrate), N-kinase may be contacted both with this compound and with inosine. The inability of inosine to counteract the inhibitory effect of the compound would indicate  
30 that the compound is acting downstream of inosine in the axonal outgrowth signaling pathway, whereas the ability of inosine to counteract the inhibitory effect of the compound would indicate that the compound is acting upstream (or at the same point) in the signaling pathway.

In certain embodiments of the invention, the compound that modulates the  
35 activity of N-kinase can be any compound with the proviso that it is not a purine base (*e.g.*, guanine, inosine, adenosine, and xanthine), such as a purine base linked to sugars, such as ribose, deoxyribose, and analogs and derivatives thereof. In certain other embodiments of the invention, the compound that modulates the activity of N-kinase can

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-6-

be any compound with the proviso that it is not a purine base analog or derivative thereof.

5 Examples of compounds that modulate the activity of N-kinase include small molecules, the N-kinase polypeptide or fragments thereof, an anti-N-kinase antibody, an antisense N-kinase nucleic acid molecule, a ribozyme, or the N-kinase gene or fragments thereof.

10 As used herein, the term "small molecule" includes, but is not limited to, peptides, peptidomimetics, amino acids, amino acid analogs, polynucleotides, polynucleotide analogs, nucleotides, nucleotide analogs, organic or inorganic compounds (*i.e.*, including heteroorganic and organometallic compounds) having a molecular weight less than about 10,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 5,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 1,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 500 grams per mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds.

15 As used herein, a "neurosalutary effect" means a response or result favorable to the health or function of a neuron, of a part of the nervous system, or of the nervous system generally. Examples of such effects include improvements in the ability of a neuron or portion of the nervous system to resist insult, to regenerate, to maintain desirable function, to grow or to survive. The phrase "producing a neurosalutary effect" includes producing or effecting such a response or improvement in function or resilience within a component of the nervous system. For example, examples of producing a neurosalutary effect would include stimulating axonal outgrowth after injury to a neuron; rendering a neuron resistant to apoptosis; rendering a neuron resistant to a toxic compound such as  $\beta$ -amyloid, ammonia, or other neurotoxins; reversing age-related neuronal atrophy or loss of function; or reversing age-related loss of cholinergic innervation.

30 As used herein, the language "modulating the axonal outgrowth of central nervous system neurons" is intended to include the capacity to stimulate or inhibit axonal outgrowth of central nervous system neurons to various levels, *e.g.*, to levels which allow for the treatment of a targeted neurological disorder.

35 As used herein, the term "outgrowth" (*i.e.*, axonal outgrowth) refers to the process by which axons grow out of a CNS neuron. The outgrowth can result in a totally new axon or the repair of a partially damaged axon. Outgrowth is typically evidenced by extension of an axonal process of at least 5 cell diameters in length. Moreover, axonal outgrowth can be evidenced by GAP-43 expression (which can be detected by, for example, immunostaining).

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-7-

As used herein, the term "CNS neurons" is intended to include the neurons of the brain and the spinal cord which are unresponsive to nerve growth factor (NGF). The term is not intended to include support or protection cells such as astrocytes, oligodendrocytes, microglia, ependyma and the like, nor is it intended to include  
5 peripheral nervous system (e.g., somatic, autonomic, sympathetic or parasympathetic nervous system) neurons. Preferred CNS neurons are mammalian neurons, more preferably human neurons.

The term "administering" to a subject includes dispensing, delivering or applying an active compound in a pharmaceutical formulation to a subject by any suitable route  
10 for delivery of the active compound to the desired location in the subject, including delivery by either the parenteral or oral route, intramuscular injection, subcutaneous/intradermal injection, intravenous injection, buccal administration, transdermal delivery and administration by the rectal, colonic, vaginal, intranasal or respiratory tract route.

As used herein, the language "contacting" is intended to include both *in vivo* or *in vitro* methods of bringing a compound that modulates the activity of N-kinase into proximity with a CNS neuron, such that the compound that modulates the activity of N-kinase can modulate the outgrowth of axonal processes from the CNS neuron.

As used herein, the term "subject" is intended to include animals. In particular  
20 embodiments, the subject is a mammal, a human or nonhuman primate, a dog, a cat, a horse, a cow or a rodent.

As used herein, the term "effective amount" includes an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired result, such as sufficient to produce a neurosalutary effect in a subject. An effective amount of an  
25 active compound as defined herein may vary according to factors such as the disease state, age, and weight of the subject, and the ability of the active compound to elicit a desired response in the subject. Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum therapeutic response. An effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the active compound are outweighed by the therapeutically  
30 beneficial effects.

A therapeutically effective amount or dosage of an active compound may range from about 0.001 to 30 mg/kg body weight, with other ranges of the invention including about 0.01 to 25 mg/kg body weight, about 0.1 to 20 mg/kg body weight, about 1 to 10 mg/kg, 2 to 9 mg/kg, 3 to 8 mg/kg, 4 to 7 mg/kg, and 5 to 6 mg/kg body weight. The  
35 skilled artisan will appreciate that certain factors may influence the dosage required to effectively treat a subject, including but not limited to the severity of the disease or disorder, previous treatments, the general health and/or age of the subject, and other diseases present. Moreover, treatment of a subject with a therapeutically effective

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-8-

amount of an active compound can include a single treatment or a series of treatments. In one example, a subject is treated with an active compound in the range of between about 0.1 to 20 mg/kg body weight, one time per week for between about 1 to 10 weeks, alternatively between 2 to 8 weeks, between about 3 to 7 weeks, or for about 4, 5, or 6 weeks. It will also be appreciated that the effective dosage of an active compound used for treatment may increase or decrease over the course of a particular treatment.

"Neurological disorder" is intended to include a disease, disorder, or condition which directly or indirectly affects the normal functioning or anatomy of a subject's nervous system. Elements of the nervous system subject to disorders which may be effectively treated with the compounds and methods of the invention include the central, peripheral, somatic, autonomic, sympathetic and parasympathetic components of the nervous system, neurosensory tissues within the eye, ear, nose, mouth or other organs, as well as glial tissues associated with neuronal cells and structures. Neurological disorders may be caused by an injury to a neuron, such as a mechanical injury or an injury due to a toxic compound, by the abnormal growth or development of a neuron, or by the misregulation (such as downregulation or upregulation) of an activity of a neuron. Neurological disorders can detrimentally affect nervous system functions such as the sensory function (the ability to sense changes within the body and the outside environment); the integrative function (the ability to interpret the changes); and the motor function (the ability to respond to the interpretation by initiating an action such as a muscular contraction or glandular secretion). Examples of neurological disorders include traumatic or toxic injuries to peripheral or cranial nerves, spinal cord or to the brain, cranial nerves, traumatic brain injury, stroke, ischemia, cerebral aneurism, and spinal cord injury. Other neurological disorders include cognitive and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, dementias related to Alzheimer's disease (such as Pick's disease), Parkinson's and other Lewy diffuse body diseases, senile dementia, Huntington's disease, Gilles de la Tourette's syndrome, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, hereditary motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease), diabetic neuropathy, progressive supranuclear palsy, epilepsy, and Jakob-Creutzfeldt disease. Autonomic function disorders include hypertension and sleep disorders. Also to be treated with compounds and methods of the invention are neuropsychiatric disorders such as depression, schizophrenia, schizoaffective disorder, Korsakoff's psychosis, mania, anxiety disorders, or phobic disorders, learning or memory disorders (such as amnesia and age-related memory loss), attention deficit disorder, autism, dysthymic disorder, major depressive disorder, mania, obsessive-compulsive disorder, psychoactive substance use disorders, anxiety, phobias, panic disorder, bipolar affective disorder, psychogenic pain syndromes, and eating disorders. Other examples of neurological disorders include injuries to the

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-9-

nervous system due to an infectious disease (such as meningitis, high fevers of various etiologies, HIV, syphilis, or post-polio syndrome) and injuries to the nervous system due to electricity (including contact with electricity or lightning, and complications from electro-convulsive psychiatric therapy). The developing brain is a target for neurotoxicity in the developing central nervous system through many stages of pregnancy as well as during infancy and early childhood, and the methods of the invention may be utilized in preventing or treating neurological deficits in embryos or fetuses in utero, in premature infants, or in children with need of such treatment, including those with neurological birth defects. Further neurological disorders include, for example, those listed in Harrison's Principles of Internal Medicine (Braunwald et al., McGraw-Hill, 2001) and in the American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV (American Psychiatric Press, 2000) both incorporated herein by reference in their entirety.

The term "stroke" is art recognized and is intended to include sudden diminution or loss of consciousness, sensation, and voluntary motion caused by rupture or obstruction (for example, by a blood clot) of an artery of the brain.

"Traumatic brain injury" is art recognized and is intended to include the condition in which, a traumatic blow to the head causes damage to the brain or connecting spinal cord, often without penetrating the skull. Usually, the initial trauma can result in expanding hematoma, subarachnoid hemorrhage, cerebral edema, raised intracranial pressure, and cerebral hypoxia, which can, in turn, lead to severe secondary events due to low cerebral blood flow.

In another aspect, the invention features an isolated N-kinase polypeptide of the type that: (a) is present in neonatal brain tissue (e.g., neonatal human, bovine, rat, or mouse brain tissue); (b) is inhibited by 6-thioguanine; (c) is activated by  $Mn^{2+}$  but not by  $Mg^{+2}$  or  $Ca^{+2}$ ; (d) has a molecular weight of approximately 49 kDa; and (e) is eluted from a Cibacron Blue column at a NaCl concentration of 1.5-1.75 M. As used herein, an "isolated" N-kinase polypeptide is substantially free (i.e., greater than 95% free) of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the N-kinase protein is derived, or substantially free from chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of N-kinase in which the protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. In one embodiment, the language "substantially free of cellular material" includes preparations of N-kinase protein having less than about 20% (by dry weight) of non-N-kinase protein (i.e., contaminating protein), more preferably less than about 10% of non-N-kinase protein, still more preferably less than about 5% of non-N-kinase protein, and most preferably less than about 3% non-N-kinase protein. When the N-

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-10-

kinase protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, *i.e.*, culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the protein preparation.

- 5 In yet another aspect, the invention features an isolated nucleic acid molecule encoding an N-kinase polypeptide, *e.g.*, the N-kinase polypeptide of SEQ ID NO:1.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections:

10

Methods For Identifying A Compound Capable Of Producing A Neurosalutary Effect In A Subject

- In one aspect, the invention features a method for identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject by contacting an N-kinase polypeptide, or a biologically active fragment thereof, with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate the activity of N-kinase, thereby identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject.

- The test compounds of the present invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the 'one-bead one-compound' library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

- Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and in Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

- Libraries of compounds may be presented in solution (*e.g.*, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), or on beads (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacteria (Ladner USP 5,223,409), spores (Ladner USP '409), plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 89:1865-1869) or on phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwiria *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner *supra.*).

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-11-

In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses an N-kinase protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to modulate N-kinase activity is determined. Determining the ability of the test compound to modulate N-kinase activity can be accomplished by monitoring, for example, the production of one or more specific metabolites in a cell which expresses N-kinase (see, e.g., Saada *et al.* (2000) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 269: 382-386). The cell, for example, can be of mammalian origin, e.g., a neuronal cell.

Determining the ability of the test compound to modulate N-kinase activity can further be accomplished by, for example, determining the ability of N-kinase to phosphorylate a substrate. The ability of N-kinase to phosphorylate a substrate (e.g., a histone H1 protein) can be determined by, for example, an *in vitro* kinase assay. Briefly, the N-kinase can be incubated with the substrate and radioactive ATP, e.g., [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP, in a buffer containing  $MnCl_2$ , e.g., 5 mM  $MnCl_2$ . Following the incubation, the substrate can be immunoprecipitated or precipitated with TCA or collected on a filter (if no other kinases are present) and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions, transferred to a membrane, e.g., a PVDF membrane, and autoradiographed. The appearance of detectable bands on the autoradiograph indicates that the substrate has been phosphorylated. Alternatively, the in-gel assays described in Example I may be used to determine the ability of N-kinase to phosphorylate a substrate. Phosphoaminoacid analysis of the phosphorylated substrate can also be performed in order to determine which residues on the protein are phosphorylated. Briefly, the radiophosphorylated protein band can be excised from the SDS gel and subjected to partial acid hydrolysis. The products can then be separated by one-dimensional electrophoresis and analyzed on, for example, a phosphoimager and compared to ninhydrin-stained phosphoaminoacid standards.

The ability of the test compound to modulate N-kinase binding to a non-N-kinase molecule, such as a downstream molecule in the axonal outgrowth signaling pathway, can also be determined. Determining the ability of the test compound to modulate N-kinase binding to a non-N-kinase molecule can be accomplished, for example, by coupling the non-N-kinase molecule with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the non-N-kinase molecule to N-kinase can be determined by detecting the labeled non-N-kinase molecule in a complex.

It is also within the scope of this invention to determine the ability of a test compound to interact with, e.g., bind to, N-kinase or biologically active portions thereof. Preferred biologically active portions of the N-kinase proteins to be used in assays of the present invention include fragments which participate in interactions with non-N-kinase molecules, e.g., fragments with high surface probability scores. Determining the ability

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-12-

of the test compound to bind N-kinase can be accomplished, for example, by coupling the compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the compound to N-kinase can be determined by detecting the labeled N-kinase compound in a complex. For example, test compounds can be labeled with  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , or  $^3\text{H}$ , either  
5 directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, test compounds can be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product.

10 Determining the ability of a test compound to interact with N-kinase may also be accomplished without the labeling of any of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect the interaction of a compound with N-kinase without the labeling of either the compound or the N-kinase. McConnell, H. M. *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912. As used herein, a "microphysiometer" (*e.g.*, Cytosensor)  
15 is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a compound and N-kinase.

Determining the ability of the test compound to bind to N-kinase or a biologically active portion thereof, can also be accomplished using a technology such as  
20 real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA). Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 and Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705. As used herein, "BIA" is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIAcore). Changes in the optical phenomenon of surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of  
25 real-time reactions between biological molecules.

In an alternative embodiment, determining the ability of the test compound to modulate the activity of N-kinase can be accomplished by determining the ability of the N-kinase protein to further modulate the activity of a downstream effector of an N-kinase target molecule. For example, the activity of the effector molecule on an  
30 appropriate target can be determined or the binding of the effector to an appropriate target can be determined as previously described.

In more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it may be desirable to immobilize any of the reactants, *e.g.*, N-kinase or a non-N-kinase molecule, to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of  
35 one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to N-kinase, or interaction of N-kinase with a non-N-kinase molecule in the presence and absence of a test compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtitre plates,

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-13-

test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided which adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase/N-kinase fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtitre plates, which are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed non-N-kinase molecule or N-kinase, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtitre plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of N-kinase binding or activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either N-kinase or a non-N-kinase molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated N-kinase or non-N-kinase molecule can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques known in the art (*e.g.*, biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies reactive with N-kinase or a non-N-kinase molecule but which do not interfere with the binding of N-kinase to its target non-N-kinase molecule can be derivatized to the wells of the plate, and unbound non-N-kinase molecule or N-kinase trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with N-kinase or a non-N-kinase molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with N-kinase or a non-N-kinase target molecule.

In another embodiment, modulators of N-kinase expression are identified in a method wherein a cell is contacted with a candidate compound and the expression of N-kinase mRNA or protein in the cell is determined. The level of expression of N-kinase mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to the level of expression of N-kinase mRNA or protein in the absence of the candidate compound. The candidate compound can then be identified as a modulator of N-kinase expression based on this comparison. For example, when expression of N-kinase mRNA or protein is greater (statistically significantly greater) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of N-kinase mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of N-kinase mRNA or

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-14-

protein is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of N-kinase mRNA or protein expression. The level of N-kinase mRNA or protein expression in the cells can be determined by methods described herein for detecting N-kinase mRNA or protein.

5 In yet another aspect of the invention, the N-kinase proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with N-kinase ("N-kinase-binding proteins" or "N-kinase-bp") and are involved in N-kinase activity. Such N-kinase-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the N-kinase proteins or N-kinase targets as, for example, downstream elements of an N-kinase-mediated signaling pathway.

15 Alternatively, such N-kinase-binding proteins are likely to be N-kinase inhibitors.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for an N-kinase protein is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (e.g., GAL-4). In the other construct, a DNA sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming an N-kinase-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (e.g., LacZ) which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene which encodes the protein which interacts with the N-kinase protein.

30 In another aspect, the invention pertains to a combination of two or more of the assays described herein. For example, a modulating compound can be identified using a cell-based or a cell free assay, and the ability of the compound to modulate the activity of an N-kinase protein can be confirmed *in vivo*, e.g., in an animal such as an animal model for a condition characterized by aberrant, e.g., insufficient axonal outgrowth of central nervous system neurons. Examples of such animal models are described in, for example, Benowitz *et al.* (1999) *PNAS* 96(23):13486-90. Epilepsy animal models are also known in the art.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-15-

This invention further pertains to novel compounds identified by the above-described screening assays. Accordingly, it is within the scope of this invention to further use a compound identified as described herein in an appropriate animal model. For example, a compound identified as described herein (*e.g.*, an N-kinase modulating compound, an antisense N-kinase nucleic acid molecule, an N-kinase-specific antibody, or an N-kinase-binding partner) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such a compound. Alternatively, a compound identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such a compound. Furthermore, this invention pertains to uses of novel compounds identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.

In one embodiment, the N-kinase used in the methods of the invention is a human N-kinase, such as a recombinantly produced N-kinase. N-kinase, *e.g.*, human N-kinase, may be introduced into a recombinant expression vector using standard techniques and expressed in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, N-kinase, *e.g.*, human N-kinase, can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (using baculovirus expression vectors) yeast cells or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternatively, a recombinant expression vector containing N-kinase, *e.g.*, human N-kinase, can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

In another embodiment, the N-kinase used in the methods of the invention is a bovine N-kinase, such as an N-kinase which is purified from a bovine source, *e.g.*, neonatal bovine brain tissue, as described herein in, for instance, Example 1.

In another embodiment, the method of the invention further includes determining the ability of the test compound to modulate axonal outgrowth of a central nervous system neuron. Determining the ability of the test compound to modulate axonal outgrowth of a central nervous system neuron can be accomplished by, for example, using dissociated cultures of purified rat retinal ganglion cells. Dissociated cultures of purified rat retinal ganglion cells can, for example, be prepared by immunopanning as described in Barres *et al.*, *Neuron*, 1: 791-803, 1988, the contents of which are incorporated herein by reference. In brief, retinas from Sparague-Dawley rats can be dissociated using papain activated with cysteine. Macrophages are removed by incubation with an anti-rat macrophage antibody (Accurate) followed by immunopanning with an anti-rabbit IgG antibody. Ganglion cells are isolated by immunopanning with an anti-Thy-1 antibody, then dislodged with trypsin for use in low-

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-16-

density cultures. Rat retinal ganglion cells are maintained at 37° C in a CO<sub>2</sub> incubator using the same medium described above except for the presence of 30 mM bicarbonate.

Samples are plated in quadruplicate in randomized positions of a 24-well plate, contacted with the test compound, and the code is concealed to ensure that growth is evaluated in a blinded fashion. Each experiment may contain 4 wells of a negative control (media plus supplements only) and 4 wells of a positive control (e.g., a standardized AF-1 sample of known activity). Growth and survival are assessed after 6 days for all ganglion cells in 25 consecutive fields of each well using phase contrast microscopy at 400X magnification (c. 150 ganglion cells counted per well). Extension of a process 5 cell diameters in length is used as the criterion for growth, since it clearly distinguishes stimulated cells from negative controls (Schwab *et al.*, 1995). After the completion of counting, the code is broken, the data tabulated, and means and standard errors are calculated for the 4 replicate wells of each sample using Cricket Graph (CA Associates, Islandia, NY). Data are normalized by subtracting the growth in the negative controls (usually 4-5%) and dividing by the net growth in the positive controls.

Goldfish retinal ganglion cells (Benowitz *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273(45):29626-34) as well as mixtures of rat and goldfish ganglion cells may also be used.

The ability of a test compound to produce a neurosalutary effect in a subject may further be assessed using any of a variety of known procedures and assays. For example, the ability of a test compound to re-establish neural connectivity and/or function after an injury, such as a CNS injury, may be determined histologically (either by slicing neuronal tissue and looking at neuronal branching, or by showing cytoplasmic transport of dyes). The ability of compounds of the invention to re-establish neural connectivity and/or function after an injury, such as a CNS injury, may also be assessed by monitoring the ability of the test compound to fully or partially restore the electroretinogram after damage to the neural retina or optic nerve; or to fully or partially restore a pupillary response to light in the damaged eye.

Other tests that may be used to determine the ability of an N-kinase modulator to produce a neurosalutary effect in a subject include standard tests of neurological function in human subjects or in animal models of spinal injury (such as standard reflex testing, urologic tests, urodynamic testing, tests for deep and superficial pain appreciation, proprioceptive placing of the hind limbs, ambulation, and evoked potential testing). In addition, nerve impulse conduction can be measured in a subject, such as by measuring conduct action potentials, as an indication of the production of a neurosalutary effect.

Animal models suitable for use in the assays of the present invention include the rat model of partial transection (described in Weidner *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3513-3518). This animal model tests how well a compound can enhance

the survival and sprouting of the intact remaining fragment of an almost fully-transected cord. Accordingly, after administration of the N-kinase modulator these animals may be evaluated for recovery of a certain function, such as how well the rats may manipulate food pellets with their forearms (to which the relevant cord had been cut 97%).

5 Another animal model suitable for use in the assays of the present invention includes the rat model of stroke (described in Kawamata *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(15):8179-8184). This paper describes in detail various tests that may be used to assess sensorimotor function in the limbs as well as vestibulomotor function after an injury. Administration to these animals of an N-kinase modulator of  
10 the invention can be used to assess whether a given compound, route of administration, or dosage provides a neurosalutary effect, such as increasing the level of function, or increasing the rate of regaining function or the degree of retention of function in the test animals.

Standard neurological evaluations used to assess progress in human patients after  
15 a stroke may also be used to evaluate the ability of an N-kinase modulator to produce a neurosalutary effect in a subject. Such standard neurological evaluations are routine in the medical arts, and are described in, for example, "Guide to Clinical Neurobiology" Edited by Mohr and Gautier (Churchill Livingstone Inc. 1995).

For assessing function of the peripheral nervous system, standard tests include  
20 electromyography, nerve conduction velocity measurements, evoked potentials assessment and upper/lower extremity somato-sensory evoked potentials. Electromyography tests record the electrical activity in muscles, and is used to assess the function of the nerves and muscles. The electrode is inserted into a muscle to record its electrical activity. It records activity during the insertion, while the muscle is at rest, and  
25 while the muscle contracts. The nerve conduction velocity test evaluates the health of the peripheral nerve by recording how fast an electrical impulse travels through it. A peripheral nerve transmits information between the spinal cord and the muscles. A number of nervous system diseases may reduce the speed of this impulse. Electrodes placed on the skin detect and record the electrical signal after the impulse travels along  
30 the nerve. A second stimulating electrode is sends a small electrical charge along the nerve; the time between the stimulation and response will be recorded to determine how quickly and thoroughly the impulse is sent.

Standard tests for function of the cranial nerves, as known to those skilled in the neurological medical art, include facial nerve conduction studies; orbicularis oculi  
35 reflex studies (blink reflex studies); trigeminal-facial nerve reflex evaluation as used in focal facial nerve lesions, Bell's palsy, trigeminal neuralgia and atypical facial pain; evoked potentials assessment; visual, brainstem and auditory evoked potential

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-18-

measurements; thermo-diagnostic small fiber testing; and computer-assisted qualitative sensory testing.

Compounds Capable Of Producing A Neurosalutary Effect In A Subject

5 In another aspect, the invention features a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject identified by any of the foregoing methods.

In one embodiment, the compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject is an antisense N-kinase nucleic acid molecule. An "antisense" nucleic acid comprises a nucleotide sequence which is complementary to a "sense" nucleic acid  
10 encoding a protein, *e.g.*, complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence. Accordingly, an antisense nucleic acid can hydrogen bond to a sense nucleic acid. The antisense nucleic acid can be complementary to the entire N-kinase coding strand, or to only a portion thereof. In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a "coding region" of the  
15 coding strand of a nucleotide sequence encoding an N-kinase. The term "coding region" refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid residues. In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding N-kinase. The term "noncoding region" refers to 5' and 3' sequences which  
20 flank the coding region that are not translated into amino acids (*i.e.*, also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Given the coding strand sequence encoding N-kinase, antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of  
25 N-kinase mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of N-kinase mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of N-kinase mRNA. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An antisense nucleic acid of the  
30 invention can be constructed using chemical synthesis and enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (*e.g.*, an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between the  
35 antisense and sense nucleic acids, *e.g.*, phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used. Examples of modified nucleotides which can be used to generate the antisense nucleic acid include 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-19-

(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)<sub>w</sub>, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (*i.e.*, RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

15 The antisense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject or generated *in situ* such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding an N-kinase protein to thereby inhibit expression of the protein, *e.g.*, by inhibiting transcription and/or translation. The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an antisense nucleic acid molecule which binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An example of a route of administration of antisense nucleic acid molecules of the invention include direct injection at a tissue site, *e.g.*, in the brain. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically.

25 For example, for systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, *e.g.*, by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies which bind to cell surface receptors or antigens. The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient intracellular concentrations of the antisense molecules, vector constructs in which the antisense nucleic acid molecule is placed under the control of a strong pol II or pol III promoter are preferred.

In yet another embodiment, the antisense N-kinase nucleic acid molecule may be an  $\alpha$ -anomeric nucleic acid molecule. An  $\alpha$ -anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual  $\beta$ -units, the strands run parallel to each other (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids. Res.* 15:6625-6641). The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-20-

methylribonucleotide (Inoue *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

In still another embodiment, the compound that modulates axonal outgrowth of a central nervous system neuron is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity which are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (*e.g.*, hammerhead ribozymes (described in Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) can be used to catalytically cleave N-kinase mRNA transcripts to thereby inhibit translation of N-kinase mRNA. A ribozyme having specificity for an N-kinase-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of an N-kinase cDNA. For example, a derivative of a *Tetrahymena* L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in an N-kinase-encoding mRNA. See, *e.g.*, Cech *et al.* U.S. Patent No. 4,987,071; and Cech *et al.* U.S. Patent No. 5,116,742. Alternatively, N-kinase mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, *e.g.*, Bartel, D. and Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

Alternatively, N-kinase gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the N-kinase (*e.g.*, the N-kinase promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the N-kinase gene in target cells. See generally, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84; Helene, C. *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; and Maher, L.J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

In still another embodiment, the compound that modulates axonal outgrowth of a central nervous system neuron is an anti-N-kinase antibody. A full-length N-kinase protein or, alternatively, antigenic peptide fragments of N-kinase may be used as immunogens to generate anti-N-kinase antibodies. The antigenic peptide of N-kinase comprises at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:1 and encompasses an epitope of N-kinase such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the N-kinase protein. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of N-kinase that are located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with high antigenicity.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-21-

An N-kinase immunogen typically is used to prepare antibodies by immunizing a suitable subject, (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal) with the immunogen. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, recombinantly expressed N-kinase protein or a chemically synthesized N-kinase polypeptide. The preparation can further include an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory agent. Immunization of a suitable subject with an immunogenic N-kinase preparation induces a polyclonal anti-N-kinase antibody response.

The term "antibody" as used herein includes immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site which specifically binds (immunoreacts with) an antigen, such as an N-kinase. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include F(ab) and F(ab'), fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as pepsin. The invention provides polyclonal and monoclonal antibodies that bind N-kinase molecules. The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of N-kinase. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular N-kinase protein with which it immunoreacts.

Polyclonal anti-N-kinase antibodies can be prepared as described above by immunizing a suitable subject with an N-kinase immunogen. The anti-N-kinase antibody titer in the immunized subject can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized N-kinase. If desired, the antibody molecules directed against N-kinase can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A chromatography to obtain the IgG fraction. At an appropriate time after immunization, e.g., when the anti-N-kinase antibody titers are highest, antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (see also, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; and Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), the more recent human B cell hybridoma technique (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol Today* 4:72), the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.* (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) or trioma techniques. The technology for producing monoclonal antibody hybridomas is well known (see generally R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-22-

Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). Briefly, an immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes) from a mammal immunized with an N-kinase immunogen as described above, and the culture supernatants of the resulting hybridoma cells are screened to identify a hybridoma producing a monoclonal antibody that binds N-kinase.

Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating an anti-N-kinase monoclonal antibody (see, *e.g.*, G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* 10 *Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited *supra*). Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of such methods which also would be useful. Typically, the immortal cell line (*e.g.*, a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made 15 by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line. Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines that are sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"). Any of a number of 20 myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, *e.g.*, the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from ATCC. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because 25 they are not transformed). Hybridoma cells producing a monoclonal antibody of the invention are detected by screening the hybridoma culture supernatants for antibodies that bind N-kinase, *e.g.*, using a standard ELISA assay.

Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-N-kinase antibody can be identified and isolated by screening a 30 recombinant combinatorial immunoglobulin library (*e.g.*, an antibody phage display library) with N-kinase to thereby isolate immunoglobulin library members that bind N-kinase. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (*e.g.*, the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, Catalog No. 240612). 35 Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.* PCT International Publication No. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT International Publication No. WO 91/17271; Winter *et al.*

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-23-

- PCT International Publication WO 92/20791; Markland *et al.* PCT International Publication No. WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT International Publication No. WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT International Publication No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT International Publication No. WO 92/09690; Ladner *et al.* PCT International Publication No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377;
- 10 Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; and McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554.
- Additionally, recombinant anti-N-kinase antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of
- 15 the invention. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in Robinson *et al.* International Application No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison *et al.* European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.* PCT
- 20 International Publication No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.* European Patent Application 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature*
- 25 314:446-449; and Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; and Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.
- In one embodiment, the compound capable of producing a neurosalutary effect in
- 30 a subject is an intracellular antibody specific for N-kinase. The use of intracellular antibodies to inhibit protein function in a cell is known in the art (see *e.g.*, Carlson, J. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2638-2646; Biocca, S. *et al.* (1990) *EMBO J.* 9:101-108; Werge, T.M. *et al.* (1990) *FEBS Letters* 274:193-198; Carlson, J.R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7427-7428; Marasco, W.A. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
- 35 90:7889-7893; Biocca, S. *et al.* (1994) *Bio/Technology* 12:396-399; Chen, S-Y. *et al.* (1994) *Human Gene Therapy* 5:595-601; Duan, L. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5075-5079; Chen, S-Y. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5932-5936; Beerli, R.R. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:23931-23936; Beerli, R.R. *et al.* (1994)

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-24-

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:666-672; Mhashilkar, A.M. *et al.* (1995) *EMBO J.* 14:1542-1551; Richardson, J.H. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3137-3141; PCT Publication No. WO 94/02610 by Marasco *et al.*; and PCT Publication No. WO 95/03832 by Duan *et al.*).

5 To inhibit protein activity using an intracellular antibody, a recombinant expression vector is prepared which encodes the antibody chains in a form such that, upon introduction of the vector into a cell, the antibody chains are expressed as a functional antibody in an intracellular compartment of the cell.

10 In still another embodiment, the compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject is a small molecule. As used herein, the term "small molecule" includes, but is not limited to, peptides, peptidomimetics, amino acids, amino acid analogs, polynucleotides, polynucleotide analogs, nucleotides, nucleotide analogs, organic or inorganic compounds (*i.e.*, including heteroorganic and organometallic compounds) having a molecular weight less than about 10,000 grams per mole, organic  
15 or inorganic compounds having a molecular weight less than about 5,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 1,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 500 grams per mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds.

20 In still another embodiment, the compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject is an N-kinase polypeptide or portion thereof, *e.g.*, a fragment that includes at least 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, or 200 contiguous amino acids of the N-kinase polypeptide. For example, the compound could comprise the constitutively active catalytic domain of the N-kinase.

25 In still another embodiment, the compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject is an N-kinase nucleic acid molecule or a portion thereof.

In a preferred embodiment, the compound that modulates the activity of N-kinase is capable of entering a cell and acting intracellularly. For example, membrane translocation domains may be used to guide peptidic modulators of the N-kinase into a  
30 cell. Such membrane translocation domains are known in the art and include, but are not limited to, the third helix of the *antennapedia* homeodomain protein and the HIV-1 protein Tat and are described in, for example, Derossi *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10444-10450; Lindgren *et al.*, (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 99-103; Ho *et al.*, *Cancer Research* 61, 474-477 (2001); U.S. Patent No. 5,888,762; U.S. Patent No. 35 6,015,787; U.S. Patent No. 5,846,743; U.S. Patent No. 5,747,641; U.S. Patent No. 5,804,604; and Published PCT applications WO 98/52614, WO 00/29427 and WO 99/29721. The entire contents of each of the foregoing references are incorporated herein by reference.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-25-

Further art known techniques for facilitating the transfer of the compound that modulates the activity of N-kinase (*i.e.*, the N-kinase modulator) into a cell include those described in, for example, Lindgren M *et al.* (2000) *Trends Pharmacol Sci.* 21(3):99-103; Garipey J. *et al.* (2001) *Trends Biotechnol* 19(1):21-28; Vyas SP *et al.* (2001) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 18(1):1-76; Morris MC *et al.* (2000) *Curr Opin Biotechnol* 11(5):461-466; and Derossi D *et al.* (1998) *Trends Cell Biol.* 8(2):84-87, the contents of all of which are incorporated herein by reference.

Constructs expressing therapeutic genes, antisense oligonucleotides and ribozymes can be delivered into cells by viral vectors, as well as by non-viral delivery systems including those described in, for example, Hope MJ *et al.* (1998) *Mol Membr Biol* 15(1):1-14.

#### Pharmaceutically Acceptable Formulations

Pharmaceutical compositions and packaged formulations comprising a compound that modulates the activity of N-kinase and a pharmaceutically acceptable carrier are also provided by the invention.

In a method of the invention, the compound that modulates the activity of N-kinase, can be administered in a pharmaceutically acceptable formulation. Such pharmaceutically acceptable formulation may include the N-kinase modulator as well as a pharmaceutically acceptable carrier(s) and/or excipient(s). As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and anti fungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. For example, the carrier can be suitable for injection into the cerebrospinal fluid. Excipients include pharmaceutically acceptable stabilizers and disintegrants. The present invention pertains to any pharmaceutically acceptable formulations, including synthetic or natural polymers in the form of macromolecular complexes, nanocapsules, microspheres, or beads, and lipid-based formulations including oil-in-water emulsions, micelles, mixed micelles, synthetic membrane vesicles, and resealed erythrocytes.

In one embodiment, the pharmaceutically acceptable formulations comprise a polymeric matrix. The terms "polymer" or "polymeric" are art-recognized and include a structural framework comprised of repeating monomer units which is capable of delivering an N-kinase modulator such that treatment of a targeted condition, such as a neurological disorder, occurs. The terms also include co-polymers and homopolymers such as synthetic or naturally occurring. Linear polymers, branched polymers, and cross-linked polymers are also meant to be included.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-26-

For example, polymeric materials suitable for forming the pharmaceutically acceptable formulation employed in the present invention, include naturally derived polymers such as albumin, alginate, cellulose derivatives, collagen, fibrin, gelatin, and polysaccharides, as well as synthetic polymers such as polyesters (PLA, PLGA), polyethylene glycol, poloxomers, polyanhydrides, and pluronics. These polymers are biocompatible with the nervous system, including the central nervous system, they are biodegradable within the central nervous system without producing any toxic byproducts of degradation, and they possess the ability to modify the manner and duration of the active compound release by manipulating the polymer's kinetic characteristics. As used herein, the term "biodegradable" means that the polymer will degrade over time by the action of enzymes, by hydrolytic action and/or by other similar mechanisms in the body of the subject. As used herein, the term "biocompatible" means that the polymer is compatible with a living tissue or a living organism by not being toxic or injurious and by not causing an immunological rejection. Polymers can be prepared using methods known in the art.

The polymeric formulations can be formed by dispersion of the active compound within liquefied polymer, as described in U.S. Pat. No. 4,883,666, the teachings of which are incorporated herein by reference or by such methods as bulk polymerization, interfacial polymerization, solution polymerization and ring polymerization as described in Odian G., Principles of Polymerization and ring opening polymerization, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 1981, the contents of which are incorporated herein by reference. The properties and characteristics of the formulations are controlled by varying such parameters as the reaction temperature, concentrations of polymer and the active compound, the types of solvent used, and reaction times.

The active therapeutic compound can be encapsulated in one or more pharmaceutically acceptable polymers, to form a microcapsule, microsphere, or microparticle, terms used herein interchangeably. Microcapsules, microspheres, and microparticles are conventionally free-flowing powders consisting of spherical particles of 2 millimeters or less in diameter, usually 500 microns or less in diameter. Particles less than 1 micron are conventionally referred to as nanocapsules, nanoparticles or nanospheres. For the most part, the difference between a microcapsule and a nanocapsule, a microsphere and a nanosphere, or microparticle and nanoparticle is size; generally there is little, if any, difference between the internal structure of the two. In one aspect of the present invention, the mean average diameter is less than about 45  $\mu\text{m}$ , preferably less than 20  $\mu\text{m}$ , and more preferably between about 0.1 and 10  $\mu\text{m}$ .

In another embodiment, the pharmaceutically acceptable formulations comprise lipid-based formulations. Any of the known lipid-based drug delivery systems can be used in the practice of the invention. For instance, multivesicular liposomes,

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-27-

multilamellar liposomes and unilamellar liposomes can all be used so long as a sustained release rate of the encapsulated active compound can be established. Methods of making controlled release multivesicular liposome drug delivery systems are described in PCT Application Serial Nos. US96/11642, US94/12957 and US94/04490, the contents of which are incorporated herein by reference.

The composition of the synthetic membrane vesicle is usually a combination of phospholipids, usually in combination with steroids, especially cholesterol. Other phospholipids or other lipids may also be used.

Examples of lipids useful in synthetic membrane vesicle production include phosphatidylglycerols, phosphatidylcholines, phosphatidylserines, phosphatidylethanolamines, sphingolipids, cerebrosides, and gangliosides, with preferable embodiments including egg phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylglycerol, and dioleoylphosphatidylglycerol.

In preparing lipid-based vesicles containing an active compound such variables as the efficiency of active compound encapsulation, lability of the active compound, homogeneity and size of the resulting population of vesicles, active compound-to-lipid ratio, permeability, instability of the preparation, and pharmaceutical acceptability of the formulation should be considered.

Prior to introduction, the formulations can be sterilized, by any of the numerous available techniques of the art, such as with gamma radiation or electron beam sterilization.

#### 25 Administration of the Pharmaceutically Acceptable Formulation

The pharmaceutically acceptable formulations of the invention are administered such that the active compound comes into contact with a subject's nervous system to thereby produce a neurosalutary effect. Both local and systemic administration of the formulations are contemplated by the invention. Desirable features of local administration include achieving effective local concentrations of the active compound as well as avoiding adverse side effects from systemic administration of the active compound. In one embodiment, the active compound is administered by introduction into the cerebrospinal fluid of the subject. In certain aspects of the invention, the active compound is introduced into a cerebral ventricle, the lumbar area, or the cisterna magna. In another aspect, the active compound is introduced locally, such as into the site of nerve or cord injury, into a site of pain or neural degeneration, or intraocularly to contact neuroretinal cells.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-28-

The pharmaceutically acceptable formulations can be suspended in aqueous vehicles and introduced through conventional hypodermic needles or using infusion pumps.

5 In one embodiment, the active compound formulation described herein is administered to the subject in the period from the time of, for example, an injury to the CNS up to about 100 hours after the injury has occurred, for example within 24, 12, or 6 hours from the time of injury.

10 In another embodiment of the invention, the active compound formulation is administered into a subject intrathecally. As used herein, the term "intrathecal administration" is intended to include delivering an active compound formulation directly into the cerebrospinal fluid of a subject, by techniques including lateral cerebroventricular injection through a burrhole or cisternal or lumbar puncture or the like (described in Lazorthes *et al.* *Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*, 143-192 and Omayya *et al.*, *Cancer Drug Delivery*, 1: 169-179, the  
15 contents of which are incorporated herein by reference). The term "lumbar region" is intended to include the area between the third and fourth lumbar (lower back) vertebrae. The term "cisterna magna" is intended to include the area where the skull ends and the spinal cord begins at the back of the head. The term "cerebral ventricle" is intended to include the cavities in the brain that are continuous with the central canal of the spinal  
20 cord. Administration of an active compound to any of the above mentioned sites can be achieved by direct injection of the active compound formulation or by the use of infusion pumps. Implantable or external pumps and catheter may be used.

For injection, the active compound formulation of the invention can be formulated in liquid solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as  
25 Hank's solution or Ringer's solution. In addition, the active compound formulation may be formulated in solid form and re-dissolved or suspended immediately prior to use. Lyophilized forms are also included. The injection can be, for example, in the form of a bolus injection or continuous infusion (such as using infusion pumps) of the active compound formulation.

30 In one embodiment of the invention, the active compound formulation is administered by lateral cerebroventricular injection into the brain of a subject, preferably within 100 hours of when an injury (resulting in a condition characterized by aberrant, insufficient or inadequate axonal outgrowth of central nervous system neurons) occurs (such as within 6, 12, or 24 hours of the time of the injury). The injection can be made,  
35 for example, through a burr hole made in the subject's skull. In another embodiment, the formulation is administered through a surgically inserted shunt into the cerebral ventricle of a subject, preferably within 100 hours of when an injury occurs (such as within 6, 12 or 24 hours of the time of the injury). For example, the injection can be made into the

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-29-

lateral ventricles, which are larger, even though injection into the third and fourth smaller ventricles can also be made. In yet another embodiment, the active compound formulation is administered by injection into the cisterna magna, or lumbar area of a subject, preferably within 100 hours of when an injury occurs (such as within 6, 12, or 24 hours of the time of the injury).

An additional means of administration to intracranial tissue involves application of compounds of the invention to the olfactory epithelium, with subsequent transmission to the olfactory bulb and transport to more proximal portions of the brain. Such administration can be by nebulized or aerosolized preparations.

In another embodiment of the invention, the active compound formulation is administered to a subject at the site of injury, preferably within 100 hours of when an injury occurs (such as within 6, 12, or 24 hours of the time of the injury).

#### Duration and Levels of administration

In a preferred embodiment of the method of the invention, the active compound is administered to a subject for an extended period of time to produce a neurosalutary effect, such as effect modulation of axonal outgrowth. Sustained contact with the active compound can be achieved by, for example, repeated administration of the active compound over a period of time, such as one week, several weeks, one month or longer. More preferably, the pharmaceutically acceptable formulation used to administer the active compound provides sustained delivery, such as "slow release" of the active compound to a subject. For example, the formulation may deliver the active compound for at least one, two, three, or four weeks after the pharmaceutically acceptable formulation is administered to the subject. Preferably, a subject to be treated in accordance with the present invention is treated with the active compound for at least 30 days (either by repeated administration or by use of a sustained delivery system, or both).

As used herein, the term "sustained delivery" is intended to include continual delivery of the active compound *in vivo* over a period of time following administration, preferably at least several days, a week, several weeks, one month or longer. Sustained delivery of the active compound can be demonstrated by, for example, the continued therapeutic effect of the active compound over time (such as sustained delivery of the active compound can be demonstrated by continued production of a neurosalutary effect in a subject). Alternatively, sustained delivery of the active compound may be demonstrated by detecting the presence of the active compound *in vivo* over time.

Preferred approaches for sustained delivery include use of a polymeric capsule, a minipump to deliver the formulation, a bioerodible implant, or implanted transgenic autologous cells (as described in U.S. Patent No. 6,214,622). Implantable infusion

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-30-

pump systems (such as Infusaid; see such as Zierski, J. *et al.* (1988) *Acta Neurochem. Suppl.* 43:94-99; Kanoff, R.B. (1994) *J. Am. Osteopath. Assoc.* 94:487-493) and osmotic pumps (sold by Alza Corporation) are available in the art. Another mode of administration is via an implantable, externally programmable infusion pump. Suitable infusion pump systems and reservoir systems are also described in U.S. Patent No. 5, 368,562 by Blomquist and U.S. Patent No. 4,731,058 by Doan, developed by Pharmacia Deltec Inc.

It is to be noted that dosage values may vary with the severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the active compound and that dosage ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed invention.

The invention, in another embodiment, provides a pharmaceutical composition consisting essentially of an N-kinase modulator and a pharmaceutically acceptable carrier, as well as methods of use thereof to modulate axonal outgrowth by contacting CNS neurons with the composition. By the term "consisting essentially of" is meant that the pharmaceutical composition does not contain any other modulators of neuronal growth such as, for example, nerve growth factor (NGF). In one embodiment, the pharmaceutical composition of the invention can be provided as a packaged formulation. The packaged formulation may include a pharmaceutical composition of the invention in a container and printed instructions for administration of the composition for producing a neurosalutary effect in a subject having a neurological disorder. Use of an N-kinase modulator derived factor in the manufacture of a medicament for modulating the axonal outgrowth of neurons is also encompassed by the invention.

#### In vitro Treatment of CNS Neurons

CNS neurons can further be contacted with a compound that modulates the activity of N-kinase, *in vitro* to modulate axonal outgrowth *in vitro*. Accordingly, CNS neuron cells can be isolated from a subject and grown *in vitro*, using techniques well known in the art, and then treated in accordance with the present invention to modulate axonal outgrowth. Briefly, a CNS neuron cell culture can be obtained by allowing neuron cells to migrate out of fragments of neural tissue adhering to a suitable substrate (*e.g.*, a culture dish) or by disaggregating the tissue, *e.g.*, mechanically or enzymatically, to produce a suspension of CNS neuron cells. For example, the enzymes trypsin, collagenase, elastase, hyaluronidase, DNase, pronase, dispase, or various combinations thereof can be used. Trypsin and pronase give the most complete disaggregation but may damage the cells. Collagenase and dispase give a less complete disaggregation but

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-31-

are less harmful. Methods for isolating tissue (*e.g.*, neural tissue) and the disaggregation of tissue to obtain cells (*e.g.*, CNS neuron cells) are described in Freshney R. I., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Third Edition, 1994, the contents of which are incorporated herein by reference.

- 5 Such cells can be subsequently contacted with a compound that modulates the activity of N-kinase in amounts and for a duration of time as described above. Once modulation of axonal outgrowth has been achieved in the CNS neuron cells, these cells can be re-administered to the subject, *e.g.*, by implantation. It is preferred that the cells are not allowed to differentiate extensively *in vitro*, as cells that integrate most  
10 successfully in a subject are primitive cells.

- The invention is further illustrated by the following examples, which should not be construed as further limiting. The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application, as well as the Figures and the  
15 Sequence Listing are hereby incorporated by reference.

#### Examples

##### Example I. Isolation and Characterization of the N-kinase Polypeptide

- 20 Neocortical gray matter from bovine brain was homogenized in buffer containing protease and phosphatase inhibitors, and particulate material was centrifuged down. The soluble fraction from approximately 1 kg of tissue was used as the starting material for isolation of the kinase.

- 25 During the purification process, kinase activity was monitored using an in-gel kinase method. In this method, a histone HF-1 substrate protein is polymerized into a 10% polyacrylamide gel before the samples to be analyzed are electrophoresed in the gel. Following completion of the electrophoresis, proteins are partially renatured with guanidium isothiocyanate and incubated in the presence [<sup>32</sup>P]-ATP plus Mn<sup>2+</sup>, with or  
30 without 6-TG present. (Activation by Mn<sup>2+</sup>, but not by Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup>, is a distinctive property of N-kinase). The purification of the kinase was monitored by looking for a 6-TG-inhibitible radioactive band corresponding to the site where the kinase phosphorylates the HF-1 substrate in the gel.

- In the first step of the purification process the starting material was subjected to  
35 cation-exchange chromatography (using a Fast-S column, Pharmacia). A 6-TG inhibitible kinase activity bound strongly to this column and eluted with 0.3 M NaCl. The cation-exchange column fraction containing N-kinase was subsequently separated on a Cibacron Blue column (Pharmacia), which allows for the separation of adenine

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-32-

nucleotide-binding proteins. A 6-TG inhibitable, 47-50 kDa polypeptide bound strongly and required a NaCl concentration of 1.5 M NaCl for elution (see Figure 1A).

The eluted fraction containing the N-kinase polypeptide was, then, subjected to reversed-phase chromatography with a C4 hydrophobic interaction column (Pharmacia).

5 Briefly, the Cibacron Blue column fraction containing the N-kinase was applied to the C4 column and eluted with a gradient of increasing acetonitrile-isopropanol concentration. Evaluation of the kinase activity of the column fractions by in-gel kinase assays showed that the 6-TG-inhibitable, HF-1-phosphorylating activity eluted in fractions 24-26 (Figure 1B). To achieve a higher level of purification, these fractions  
10 were pooled, re-applied to the same column, and the separation was repeated with a gradient of increasing acetonitrile-isopropanol concentration. The N-kinase polypeptide, again, eluted at fractions 24-26.

The column fractions containing the highest concentrations of N-kinase were lyophilized and applied to a 10% polyacrylamide SDS gel. A small portion of the  
15 sample was run on a parallel gel to carry out in-gel kinase assays. A band at 49 kDa was clearly visible after staining the gel with Coomassie blue; this coincided in its migration position with the 6-TG-inhibitable kinase activity. This band was cut out and it was verified that it contained HF-1-phosphorylating activity.

The gel band containing the N-kinase polypeptide was then subjected to partial  
20 proteolytic digestion, the proteolytic fragments were analyzed by mass spectroscopy and the masses of the fragments compared to those of various known peptides using the process described in, for example, Eng J.K. *et al.* (1994) *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 5:976-989; Chittum H.S. *et al.* (1998) *Biochemistry* 37:10866-870; and LeRoy G. *et al.* (1998) *Science* 282:1900-04, the contents of which are incorporated herein by reference.

25 This analysis revealed that N-kinase is an isoform of MST-3, *i.e.*, either MST-3 itself, MST-3b, or an as yet undefined isoform. These proteins are members of the STE family of serine-threonine kinases that are found throughout the animal kingdom. STE family members are generally components of modular signaling cassettes that are involved in various aspects of cellular differentiation. Figure 2 depicts the amino acid  
30 sequence of the N-kinase. Direct matches between the purified protein and the published sequence are shown in blue. K65 (bold type) lies in the ATP-binding region of the kinase domain.

#### *Equivalents*

35 Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-33-

**CLAIMS**

We claim:

- 5           1.     A method comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of N-kinase, thereby producing a neurosalutary effect in said subject.
2.     The method of claim 1, wherein the neurosalutary effect is produced in  
10   said subject by modulating neuronal survival.
3.     The method of claim 1, wherein the neurosalutary effect is produced in said subject by modulating neuronal regeneration.
- 15          4.     The method of claim 1, wherein the neurosalutary effect is produced in said subject by modulating neuronal axonal outgrowth.
5.     The method of claim 1, wherein the neurosalutary effect is produced in said subject by modulating axonal outgrowth of central nervous system neurons.  
20
6.     The method of claim 5, wherein the central nervous system neurons are retinal ganglion cells.
7.     The method of claim 1, wherein the compound that modulates the  
25   activity of N-kinase is administered by introduction into a region of neuronal injury.
8.     The method of claim 1, wherein the compound that modulates the activity of N-kinase is introduced into the cerebrospinal fluid of the subject.
- 30          9.     The method of claim 1, wherein the compound that modulates the activity of N-kinase is introduced to the subject intrathecally.
10.    The method of claim 1, wherein the compound that modulates the activity of N-kinase is introduced into a region selected from the group consisting of a  
35   cerebral ventricle, the lumbar area, and the cisterna magna of the subject.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-34-

11. The method of claim 1, wherein the compound that modulates the activity of N-kinase is administered to the subject in a pharmaceutically acceptable formulation.
- 5 12. The method of claim 11, wherein the pharmaceutically acceptable formulation is a dispersion system.
13. The method of claim 11, wherein the pharmaceutically acceptable formulation comprises a lipid-based formulation.
- 10 14. The method of claim 13, wherein the pharmaceutically acceptable formulation comprises a liposome formulation.
- 15 15. The method of claim 13, wherein the pharmaceutically acceptable formulation comprises a multivesicular liposome formulation.
16. The method of claim 11, wherein the pharmaceutically acceptable formulation comprises a polymeric matrix.
- 20 17. The method of claim 11, wherein the pharmaceutically acceptable formulation is contained within a minipump.
18. The method of claim 11, wherein the pharmaceutically acceptable formulation provides sustained delivery of the compound that modulates the activity of
- 25 N-kinase, to a subject for at least one week after the pharmaceutically acceptable formulation is administered to the subject.
19. The method of claim 11, wherein the pharmaceutically acceptable formulation provides sustained delivery of the compound that modulates the activity of
- 30 N-kinase, to a subject for at least one month after the pharmaceutically acceptable formulation is administered to the subject.
20. The method of claim 1, wherein the subject is a mammal.
- 35 21. The method of claim 20, wherein the mammal is a human.
22. The method of claim 1, wherein said subject is suffering from a neurological disorder.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-35-

23. The method of claim 22, wherein said neurological disorder is a spinal cord injury.
- 5 24. The method of claim 23, wherein the spinal cord injury is characterized by monoplegia, diplegia, paraplegia, hemiplegia and quadriplegia.
25. The method of claim 22, wherein said neurological disorder is epilepsy.
- 10 26. The method of claim 22, wherein said neurological disorder is stroke.
27. The method of claim 22, wherein said neurological disorder is Alzheimer's disease.
- 15 28. A method comprising administering a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of N-kinase to a subject suffering from a neurological disorder, thereby treating said subject suffering from a neurological disorder.
- 20 29. The method of claim 28, further comprising making a first assessment of a nervous system function prior to administering the compound that modulates the activity of N-kinase to the subject and making a second assessment of the nervous system function after administering the compound that modulates the activity of N-kinase to the subject.
- 25 30. The method of claim 29, wherein the nervous system function is a sensory function, cholinergic innervation, or a vestibulomotor function.
31. A method for identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject, comprising contacting N-kinase, or a biologically active fragment thereof, with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate the activity of N-kinase, thereby identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject.
- 30 32. The method of claim 31, wherein the N-kinase is human N-kinase.
- 35 33. The method of claim 32, wherein the human N-kinase is a recombinantly produced N-kinase.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-36-

34. The method of claim 31, wherein the N-kinase is bovine N-kinase.
35. The method of claim 34, wherein the bovine N-kinase is purified from a  
5 bovine source.
36. The method of claim 31, further comprising determining the ability of the test compound to modulate axonal outgrowth of a central nervous system neuron.
- 10 37. The method of claim 31, wherein the test compound inhibits the activity of N-kinase.
38. The method of claim 31, wherein the test compound stimulates the activity of N-kinase.  
15
39. The method of claim 31, wherein the ability of the test compound to modulate the activity of N-kinase is determined by assessing the ability of the test compound to modulate N-kinase dependent phosphorylation of a substrate.
- 20 40. A method for identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject, comprising  
contacting N-kinase or a biologically active fragment thereof, with a test compound, an N-kinase substrate, radioactive ATP, and  $Mn^{+2}$ ; and  
determining the ability of the test compound to modulate N-kinase dependent  
25 phosphorylation of the substrate, thereby identifying a compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject.
41. The method of claim 40, wherein the N-kinase substrate is a histone H1 protein.  
30
42. The method of claim 40, wherein the radioactive ATP is [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP.
43. The method of claim 40, wherein the N-kinase is human N-kinase.
- 35 44. The method of claim 43, wherein the human N-kinase is a recombinantly produced N-kinase.
45. The method of claim 40, wherein the N-kinase is bovine N-kinase.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-37-

46. The method of claim 45, wherein the bovine N-kinase is purified from a bovine source.
- 5 47. The method of claim 40, further comprising determining the ability of the test compound to modulate axonal outgrowth of a central nervous system neuron.
48. A compound capable of producing a neurosalutary effect in a subject identified by the method of claim 40.
- 10 49. An isolated N-kinase polypeptide of the type that:  
(a) is present in neonatal brain tissue;  
(b) is inhibited in the presence of 6-thioguanine;  
(c) is activated in the presence of  $Mn^{2+}$  but not by  $Mg^{+2}$  or  $Ca^{+2}$ ;  
15 (d) has a molecular weight of approximately 49 kDa; and  
(e) is eluted from a Cibacron Blue column at a NaCl concentration of 1.5-1.75 M.
50. An antibody which is specifically reactive with an epitope of the N-kinase polypeptide of claim 49.
- 20 51. The antibody of claim 50, wherein the antibody is an intracellular antibody.
- 25 52. The antibody of claim 50, wherein the epitope comprises an ATP binding domain.
53. A fragment of the N-kinase polypeptide of claim 49, wherein the fragment comprises at least 15 contiguous amino acids.
- 30 54. The fragment of claim 53, wherein the fragment comprises at least 30 contiguous amino acids.
55. The fragment of claim 53, wherein the fragment comprises at least 50  
35 contiguous amino acids.
56. The fragment of claim 53, wherein the fragment comprises at least 100 contiguous amino acids.

WO 02/20056

PCT/US01/27691

-38-

57. A fragment of the N-kinase polypeptide of claim 49, wherein the fragment is able to elicit an immune response.
- 5 58. An isolated nucleic acid molecule that encodes the polypeptide of SEQ ID NO:1.



FIGURE 1

MAHSPVQSGLPGMQNLK...

MST-3b

MDSRAQLWGLALNKRRTLPHPGGSTNLKADPEELFTKLEKIGKGSFGEVFKGIDNRTQK  
VVAIKIIDLEEADEIEDIQQEITVLSQCDSFYVTKYYSYLKDTKLWIIMEYLGGSAL  
DLEFPGLDETQIATILREILKGLDYHSEKKIHRDIKAANVLLSEHGVEKLDVGVAGQ  
LTDTQIKRNTFVGTFFWMAPEVIKQSAYDSKADIWSLGITAIELARGEPPHSELHPMKVL  
FLIPKNNPPTLEGNYSKPLKEFVEACLNKEPSFRPTAKELLKHKPILRNAKTSYLTTELI  
DRYKRWKAEQSHDDSSSESDAETDQASGGSDSGDWIFTIREKDPKNLENGALQPSDLD  
RNKMKDIPKRPPSQCLSTIISPLFARLKEKSQACGGNLGSIIEBLRGAIVLAEEACPGISD  
TMVAQLVQRRLQRYSLSGGGTSSH (443)

FIGURE 2

WO 02/20056

PCT/US01/27691

1

## SEQUENCE LISTING

<110> Children's Medical Center Corporation

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR PRODUCING A NEURO-SALUTARY EFFECT IN A SUBJECT

<130> CMZ-129CPPC

<140>

<141>

<150> 09/656,915

<151> 2000-09-07

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 272

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Ser Arg Ala Trp Gly Ala Asn Lys Arg Arg Ala Thr His Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Thr Asn Lys Ala Asp Thr Lys Lys Gly Lys Gly Ser Gly Val  
 20 25 30  
 Lys Gly Asp Asn Arg Thr Lys Val Val Ala Lys Asp Ala Asp Asp Thr  
 35 40 45  
 Val Ser Cys Asp Ser Tyr Val Thr Lys Tyr Tyr Gly Ser Tyr Lys Asp  
 50 55 60  
 Thr Lys Trp Met Tyr Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Thr Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Arg Lys Gly Asp Tyr His Ser Lys Lys His Arg Asp Lys Ala Ala Asn  
 85 90 95  
 Val Ser His Gly Val Lys Ala Asp Gly Val Ala Gly Thr Asp Thr Lys  
 100 105 110  
 Arg Asn Thr Val Gly Thr Trp Met Ala Val Lys Ser Ala Tyr Asp Ser  
 115 120 125  
 Lys Ala Asp Trp Ser Gly Thr Ala Ala Arg Gly His Ser His Met Lys  
 130 135 140  
 Val Lys Asn Asn Thr Gly Asn Tyr Ser Lys Lys Val Ala Cys Asn Lys  
 145 150 155 160  
 Ser Arg Thr Ala Lys Lys His Lys Arg Asn Ala Lys Lys Thr Ser Tyr  
 165 170 175  
 Thr Asp Arg Tyr Lys Arg Trp Lys Ala Ser His Asp Asp Ser Ser Ser  
 180 185 190  
 Asp Ser Asp Ala Thr Asp Gly Ala Ser Gly Gly Ser Asp Ser Gly Asp  
 195 200 205  
 Trp Thr Arg Lys Asp Lys Asn Asn Gly Ala Ser Asp Asp Arg Asn Lys  
 210 215 220  
 Met Lys Asp Lys Arg Ser Cys Ser Thr Ser Ala Lys Lys Ser Ala Cys  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Asn Gly Ser Arg Gly Ala Tyr Ala Ala Cys Gly Ser Asp Thr  
 245 250 255  
 Met Val Ala Val Arg Arg Tyr Ser Ser Gly Gly Gly Thr Ser Ser His  
 260 265 270

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/020056 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 38/18, C07K 14/475
- (21) International Application Number: PCT/US01/27691
- (22) International Filing Date: 7 September 2001 (07.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/856,915 7 September 2000 (07.09.2000) US
- (71) Applicant: CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION [US/US]; 300 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (US).
- (72) Inventor: BENOWITZ, Larry, I.; 45 Moreland Avenue, Newton, MA 02159 (US).
- (74) Agents: RESNICK, David, S. et al.; Nixon Peabody LLP, 101 Federal Street, Boston, MA 02110 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 13 March 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/020056 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR PRODUCING A NEUROSALUTARY EFFECT IN A SUBJECT

(57) Abstract: Methods and compositions for producing a neurosalutary effect in a subject are provided. These methods generally involve administering to subject a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of N-kinase, or analog thereof. Pharmaceutical and packaged formulations including the compounds of the invention, e.g., compounds that modulate the activity of N-kinase, are also provided.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/27691										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K38/18 C07K14/475												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K												
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, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH												
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	WO 99 11274 A (BENOWITZ LARRY I ;CHILDRENS MEDICAL CENTER (US)) 11 March 1999 (1999-03-11) page 6, line 7 - line 21; claims 1-56	1,4-28										
X	ROWLAND-GAGNE E ET AL: "MULTIPLE PATHWAYS OF N KINASE ACTIVATION IN PC12 CELLS" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 54, no. 2, 1990, pages 424-433, XP009001251 ISSN: 0022-3042 page 425, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 4	1-58										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*I* Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*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)</td> <td>*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.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*B* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*I* Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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	*B* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*I* Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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	*B* 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 19 November 2002	Date of mailing of the international search report 05/12/2002											
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-2000, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3916	Authorized officer Ntchogiannopoulou, A											

Form PCT/ISA-210 (second sheet) July 1993

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 01/27691

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>VOLONTE CINZIA: "Dexamethasone abolishes the activation by nerve growth factor of protein kinase N: Effects of nerve growth factor and dexamethasone on protein kinase N."</p> <p>NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 159, no. 1-2, 1993, pages 119-122, XP009001249 ISSN: 0304-3940 page 120, right-hand column, paragraph 3 -page 121, left-hand column, paragraph 1; figure 1</p>	1-58
X	<p>GREEN L A ET AL: "PURINE ANALOGS INHIBIT NERVE GROWTH FACTOR-PROMOTED NEURITE OUTGROWTH BY SYMPATHETIC AND SENSORY NEURONS"</p> <p>JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 10, no. 5, 1 May 1990 (1990-05-01), pages 1479-1485, XP002069124 ISSN: 0270-6474 page 1482, right-hand column, paragraph 1 -page 1484, right-hand column, paragraph 1</p>	1-58
X	<p>ZHOU T H ET AL: "Identification of a human brain-specific isoform of mammalian STE20-like kinase 3 that is regulated by cAMP-dependent protein kinase."</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, UNITED STATES 28 JAN 2000, vol. 275, no. 4, 28 January 2000 (2000-01-28), pages 2513-2519, XP002221526 ISSN: 0021-9258 cited in the application page 2515, left-hand column, paragraph 4; figure 1</p>	49

Form PCTISA/210 (continuation of session) sheet 1 (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/27691
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(e) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  Although claims 1-47 are 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.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	1-30 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.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	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.:
<b>Remark on Protest</b>		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 27691

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-30

Present claims 1-30 relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely their ability to modulate the activity of N-kinase.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides neither support within the meaning of Article 6 PCT nor disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

A search has therefore only been performed for the general effect of N-kinase inhibition in neuronal cells.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of 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.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 01/27691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911274 A	11-03-1999	US 6440455 B1	27-08-2002
		AU 748961 B2	13-06-2002
		AU 6656898 A	22-03-1999
		CA 2302156 A1	11-03-1999
		CN 1286632 T	07-03-2001
		EP 1009412 A1	21-06-2000
		JP 2001516695 T	02-10-2001
		WO 9911274 A1	11-03-1999
		US 2002137721 A1	26-09-2002
		US 2002128223 A1	12-09-2002
		US 2002055484 A1	09-05-2002
		US 2002042390 A1	11-04-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 16/40	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 9/12	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 9/12	
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100092886  
弁理士 村上 清

(72) 発明者 ベノウィッツ, ラリー・アイ  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 5 9, ニュートン, モアランド・アベニュー 4 5

F ターム(参考) 2G045 AA35 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02  
4B024 AA01 AA11 CA02  
4B050 CC03 DD11 LL01 LL03  
4B063 QA18 QQ95 QR07 QR48 QR50 QX07  
4C076 AA19 CC01  
4C084 AA17 NA12 NA14 ZA02 ZA06 ZA16 ZB21  
4H045 AA11 CA45 DA75 EA21

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004523470A5</a>	公开(公告)日	2008-02-07
申请号	JP2002524539	申请日	2001-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	儿童医学中心公司		
申请(专利权)人(译)	儿童医学中心公司		
[标]发明人	ベノウィッツラリーアイ		
发明人	ベノウィッツ,ラリー・アイ		
IPC分类号	A61K45/00 A61K9/10 A61K9/127 A61P9/10 A61P9/12 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P43/00 C07K16/40 C12N9/12 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/09		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 C12N9/1205 G01N33/6896 G01N2500/00		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61K9/10 A61K9/127 A61P9/10 A61P9/12 A61P25/00 A61P25/02.103 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N9/12 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA02 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QQ95 4B063/QR07 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QX07 4C076/AA19 4C076/CC01 4C084/AA17 4C084/NA12 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA06 4C084/ZA16 4C084/ZB21 4H045/AA11 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/EA21		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 村上 清		
优先权	09/656915 2000-09-07 US		
其他公开文献	JP2004523470A		

#### 摘要(译)

提供为患者提供神经学有益效果的方法和组合物。这些方法通常包括给患者施用治疗有效量的调节N-激酶或其类似物活性的化合物。还提供了包含本发明化合物的药物包装制剂，例如调节N-激酶活性的化合物。