

(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2013-525416

(P2013-525416A)

(43) 公表日 平成25年6月20日(2013.6.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 1
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	S 4 C O 8 4
G O 1 N 27/62 (2006.01)	G O 1 N 27/62	V 4 C O 8 6
G O 1 N 30/72 (2006.01)	G O 1 N 27/62	X
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	G O 1 N 30/72	C

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-506743 (P2013-506743)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月19日 (2011. 4. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月25日 (2012. 12. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/050770
 (87) 国際公開番号 WO2011/135332
 (87) 国際公開日 平成23年11月3日 (2011. 11. 3)
 (31) 優先権主張番号 1006961.5
 (32) 優先日 平成22年4月27日 (2010. 4. 27)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 507404514
 バブラハム・インスティテュート
 BABRAHAM INSTITUTE
 英国シービー22・3エイティ、ケンブリ
 ッジ、バブラハム・リサーチ・キャンパス
 、バブラハム・ホール
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ミチャエル クオルエマン
 英国 シービー22 3エーティー ケン
 ブリッジ ケンブリッジシャー バブラハ
 ム バブラハム ホール バブラハム バ
 イオサイエンシイズ グループ バブラハ
 ム バイオサイエンシイズ インスティテ
 ユート

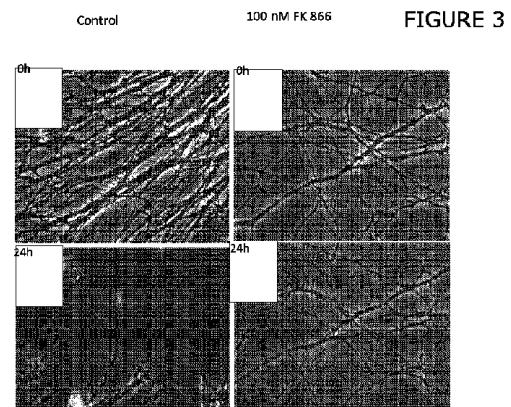
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性障害の治療のためのNMNモジュレーター

(57) 【要約】

本発明は、神経変性障害、非限定的に特に、ワラー変性などの神経組織の軸索変性を伴う障害の治療において神経保護薬として有用であるニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)モジュレーター、軸索変性のバイオマーカーとしてのNMNの使用、NMNに基づくバイオマーカーを使用する軸索変性の検出表示方法、軸索変性を検出するための診断キット、NMNモジュレーターのスクリーニング方法、及び、上記スクリーニング方法を使用して同定されたNMNモジュレーターに関する。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経変性障害の治療における神経保護薬としてのニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)モジュレーターの使用。

【請求項 2】

前記NMNモジュレーターがNMNレベルを減少させる、請求項1記載の使用。

【請求項 3】

前記NMNモジュレーターがNamp1阻害剤である、請求項1又は請求項2記載の使用。

【請求項 4】

前記Namp1阻害剤が、N-[4-(1-ベンゾイル-4-ピペリジニル)ブチル]-3-(3-ピリジニル)-2E-プロペンアミド(FK866)、又は、N-(6-クロロフェノキシヘキシル)-N'-シアノ-N''-4-ピリジルグアニジン(CH828)を含む、請求項3記載の使用。 10

【請求項 5】

前記Namp1阻害剤が、N-[4-(1-ベンゾイル-4-ピペリジニル)ブチル]-3-(3-ピリジニル)-2E-プロペンアミド(FK866)を含む、請求項4記載の使用。

【請求項 6】

前記NMNモジュレーターが、Nmnat2活性化剤などのNmnat活性化剤である、請求項1又は請求項2記載の使用。

【請求項 7】

前記NMNモジュレーターが、NMN隔離剤である、請求項1又は請求項2記載の使用。 20

【請求項 8】

前記神経変性障害が軸索変性を伴う、請求項1~7のいずれか1項記載の使用。

【請求項 9】

前記神経変性障害がワーラー変性を伴う、請求項1~7のいずれか1項記載の使用。

【請求項 10】

前記ワーラー変性がニューロン損傷に起因する、請求項9記載の使用。

【請求項 11】

前記ニューロン損傷が、疾患、外傷、又は化学療法薬に起因する、請求項10記載の使用。

【請求項 12】 30

前記神経変性障害が、アルツハイマー病、多発性硬化症、パーキンソン病、糖尿病性神経障害、又は緑内障などの眼の障害の1種以上である、請求項1~11のいずれか1項記載の使用。

【請求項 13】

請求項1~7のいずれか1項記載のモジュレーターを含む、医薬組成物。

【請求項 14】

Namp1阻害剤とNmnat活性化剤との組み合わせを含む、請求項13記載の医薬組成物。

【請求項 15】

NMN、又はその誘導体、フラグメント、若しくは代謝産物の、軸索変性、特にワーラー様変性のバイオマーカーとしての使用。 40

【請求項 16】

試験対象由来の試料において、請求項14又は請求項15記載のバイオマーカーを検出及び/又は定量化することを含む、軸索変性、特にワーラー様変性を検出表示する方法。

【請求項 17】

検出及び/又は定量化が、SELDI(-TOF)、MALDI(-TOF)、1次元ゲルベース分析、2次元ゲルベース分析、質量分析法(MS)、逆相(RP)LC、サイズ透過法(ゲル濾過)、イオン交換法、アフィニティ法、HPLC、UPLC、又は他のLC若しくはLC-MSベース技術から選択される1種以上の方法によって行われる、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

前記検出及び/又は定量化が、バイオセンサー、又は、微量分析システム、マイクロ設計 50

システム、マイクロ分離システム、若しくはイムノクロマトグラフィシステムを使用して行われる、請求項17記載の方法。

【請求項19】

バイオセンサーを使用する検出及び/又は定量化が、免疫学的方法によって行われる、請求項17記載の方法。

【請求項20】

軸索変性、特にワーラー様変性を検出するための診断キットであって、請求項14又は請求項15記載のバイオマーカーを検出及び/又は定量化するように構成されたバイオセンサー、及び、請求項16～19に記載の方法に従って該キットを使用するための説明書を備える、前記診断キット。

10

【請求項21】

前記バイオセンサーが抗体である、請求項19又は請求項20記載の方法又は診断キット。

【請求項22】

- a) 生物学的試料中のNMN又はNMNの容易に検出可能な改変物の合成をブロックする工程、
- b) 試験分子とともに前記試料をインキュベートする工程、及び、
- c) NMN関連シグナルを経時的に測定する工程、

を含み、対照減衰曲線との差がNMNモジュレーターであることを示す、NMNモジュレーターのスクリーニング方法。

【請求項23】

請求項22記載の方法によって同定されたNMNモジュレーター。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、神経変性障害、非限定的に特に、ワーラー変性(Wallerian degeneration)などの神経組織の軸索変性を伴う障害の治療において神経保護薬として有用であるニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)モジュレーター、軸索変性のバイオマーカーとしてのNMNの使用、NMNに基づくバイオマーカーを使用する軸索変性の検出表示方法、軸索変性を検出するための診断キット、NMNモジュレーターのスクリーニング方法、及び、上記スクリーニング方法を使用して同定されたNMNモジュレーターに関する。

30

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

神経変性疾患は、末梢神経系又は中枢神経系からの生存神経細胞の減少により特徴付けられる。多くの事例において、この減少に先立って、ニューロンの軸索の変性が起こることが示されており、この変性は、軸索突起の近位端よりも遠位端で決まってより顕著である。このより顕著な遠位の軸索変性の説明を試みる2つのモデルがある。1つ目は、神経末端から逆行的に変性が広がる「逆行変性(dying back)」である。2つ目はワーラー変性であり、このモデルでは、変性は損傷部位から損傷の種類に応じてどちらの方向にも広がり、最終的には、近位部は無傷のまま、損傷部位より遠位の軸索の減少をもたらす。厳密に言えば、ワーラー変性は専ら軸索の物理的な損傷を受けて起こるが、そのような損傷が生じていない疾患において、類似のメカニズムが働く。後者は「ワーラー様」変性と呼ばれる。以下、両方のタイプの変性を一緒に「ワーラー変性」と呼ぶ。

40

【0003】

最近発見されたWldSマウスは、これらの2つのプロセスの理解に進展をもたらした。これらの動物において、ワーラー変性は、野生型動物よりほぼ10倍遅い速度で起こる。研究により、この変異が、軸索末端の逆行変性を伴うと信じられてきた病状も遅らせるということが示された。それ故に、このWldS遺伝子は、軸索変性の2つのモデルの間を機構的に関連付ける。

【0004】

50

軸索変性は、治療的要望がまだ満たされていない領域である。該軸索変性は、運動ニューロン疾患、緑内障、アルツハイマー病及び多発性硬化症の症状の主な要因である。糖尿病において、軸索変性は神経因性疼痛及び遠位感覚消失を引き起こし、これが手足の切断の主な要因である。軸索変性は、癌の化学療法において、投与量制限を生じさせる副作用である。伸展損傷による進行性軸索変性は、外傷性脳損傷の主な病状であり、白質を保護し損ねると脳卒中の治療が制限される。およそ人口の半分がこれらの障害の1種以上を患い、生活の質を大きく低下させるだろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

WldS遺伝子の同定及び特徴付けにもかかわらず、ワラー変性の分子トリガーの理解へ向けた進展は限られている。このトリガーの情報には、「逆行変性」神経変性疾患の早期段階の理解に関する重大な効果があるだろう。

軸索変性の有効な治療法はなく、予防の手段もない。そして、CNSにおける自然治癒もほとんど無いので、軸索変性を低減させる新しい分子標的が強く求められている。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1は、哺乳動物のNAD⁺代謝経路の概略図である(Hassaらの文献「微生物学及び分子生物学レビュー」(Microbiology and Molecular Biology Reviews)70(3), 789-829(2006)から改変)。

【図2】図2は、Namp1阻害剤FK866のNADレベルへの影響の分析結果を表す。

【図3】図3は、Namp1阻害剤FK866の切断された神経突起への影響の分析結果を表す。

【図4】図4は、Namp1阻害剤FK866の切断された神経突起に対する保護効果をNMN⁺がどのように元に戻す(revert)のかを示す。

【図5】図5は、神経毒性の化学療法薬であるピンクリスチンで処理した神経突起へのNamp1阻害剤FK866の影響の分析結果、及びピンクリスチンで処理した神経突起に対するFK866の保護効果をNMN⁺がどのように元に戻すのかを示す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

(発明の詳細な説明)

本発明の第1の態様は、神経変性障害の治療における神経保護薬としてのニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)モジュレーターの使用が提供する。

NMN(NMN⁺とも言う)は、NAD⁺の形成の前駆体であるので、NAD⁺(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)生合成のサルベージ経路(図1)の構成要素である。

【0008】

本明細書において使用される用語「モジュレーター」は、直接的又は間接的にNMNの細胞内レベルを変化させることができる分子を指す。一実施態様において、モジュレーターはNMNの細胞内レベルを直接的に変化させる。NMNレベルの低減が、培養における損傷した軸索の保護に関連し(実施例2及び図3を参照されたい。これらはNAD⁺レベルの低下を示している。)、遅延型ワラー変性(Wld^S)の表現型を模倣したことを示すデータが、本明細書に提供されている。さらには、この効果はNMNを培養に添加した場合に取り消された(実施例3及び図4を参照)。それ故に、本文脈において、目的はNMNレベルを減少させることである。したがって、一実施態様において、NMNモジュレーターは、NMN生成の阻害剤、すなわち、NMNレベルを減少させることができる作用物質である。

NMNレベルの減少がいくつかの手段で成し遂げられることが理解されるであろう。例えば、一実施態様において、NMN阻害剤はNamp1阻害剤である。

【0009】

Namp1(EC番号2.4.2.12; ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、PBEF、NAPRT又はビスファチンとしても知られる。)は、NAD⁺(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)生合成のサルベージ経路の必須酵素であり、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチ

10

20

30

40

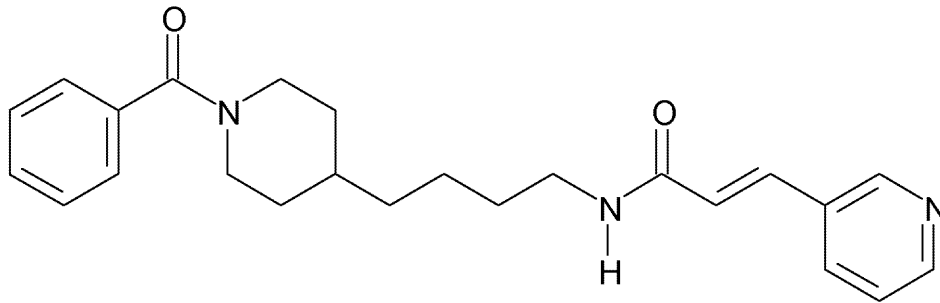
50

ド(NAD⁺)の生合成の中間段階である、NMNを生じるニコチンアミドと5-ホスホリボシル-1-ピロホスファートとの縮合を触媒する。図1のNAD経路を観察すれば、Namp1の阻害がNMNレベルを減少させる効果を有するのは明らかである。

【0010】

NAD⁺生合成経路(図1)は、癌治療の分野において十分に特徴付けられてきており、それ故にNamp1阻害剤は公知であり、市販され、広く研究されてきた。したがって、一実施態様において、Namp1阻害剤は、N-[4-(1-ベンゾイル-4-ピペリジニル)ブチル]-3-(3-ピリジニル)-2E-プロペンアミド(FK866; K 22.175; CAS番号: 658084-64-1)

【化1】



FK866

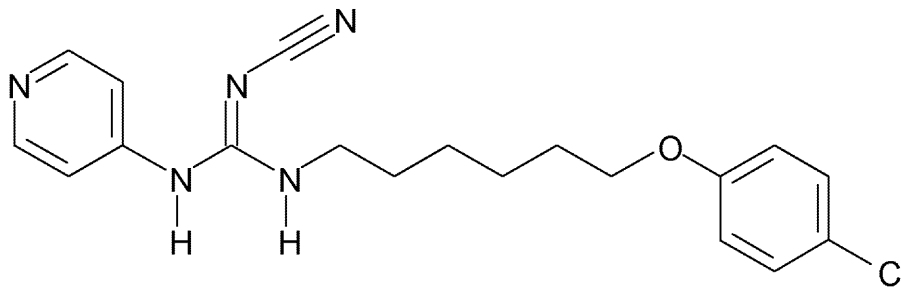
である。

FK866は、特異性の高いNamp1の非競合阻害剤であり(Ki=0.4nM)、NAD⁺を徐々に欠乏させる(Hasmann, M., Schemainda, Iの文献Cancer Res 63; 7436-7442(2003))。

【0011】

別の実施態様において、Namp1阻害剤は、N-(6-クロロフェノキシヘキシル)-N'-シアノ-N''-4-ピリジルグアニジン(CHS828)

【化2】



CHS828

である。

【0012】

FK866と同様に、CHS828もNamp1阻害剤であり、NAD⁺を欠乏させることによって癌細胞を死滅させることが知られている(Olesen, UHらの文献「Biochemical and biophysical research communications」367(4), 799-804(2008))。

他の抗癌化学療法剤に関する臨床癌研究では、軸索変性を、頻繁に起こる、投与量の制限を生じさせる副作用であると特定しており(たとえば、タキソール、ベルケイド及びビンクリスチンは末梢神経障害を引き起こすことが知られている。)、それ故に、本発明が、神経保護効果をNamp1阻害剤(すなわちFK866)などの抗癌剤と関連付けたという事実は、驚くべき発見となる。

【0013】

本発明の使用がNamp1阻害剤を含む場合、Namp1阻害剤はニコチン酸アデニンジヌクレオ

10

20

30

40

50

チド(NaAD)をさらに含んでよい。本発明者らは、FK866などのNamp1阻害剤は軸索に対する神経保護効果を有しているが、そのような効果は細胞体にまでは拡大されない(データは示していない。)ということを見いだした。これはNMNの欠乏及びそれ故のNADの欠乏の結果であろうと思われる。NAD又はNMNを添加することで、細胞体に対する有害な影響は回避されるであろうが、Namp1阻害剤によってもたらされる軸索保護効果が元に戻る可能性がある。一方、NaADなどのNAD上昇剤の添加は、Namp1阻害剤の有益な効果を元に戻すことなく、細胞体の生存能を回復させるという利益をもたらす可能性がある。

【0014】

別の実施態様において、NMNモジュレーターはNmnat活性化剤である。

Nmnat(ニコチンアミド/ニコチネートモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ)は、NAD⁺(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)生合成経路の中心的な酵素であり、NMN⁺(ニコチンアミドモノヌクレオチド)からのNAD⁺の形成、及びNaMN(ニコチン酸モノヌクレオチド)からのNaAD(ニコチン酸アデニンジヌクレオチド)の形成を触媒する。図1のNAD経路を観察すれば、Nmnatの活性化がNMNレベルを減少させる効果を有するであろうことは明らかである。

10

【0015】

この酵素の3つのアイソフォームが特定されており、哺乳動物において3つの異なる遺伝子によって発現されている。すなわちNmnat1、Nmnat2及びNmnat3である。Nmnatアイソフォームの他の別称には、Nmnat2タンパク質についてはK1AA0479、Nmnat1タンパク質をコードする遺伝子についてはD4Cole1e、又はNmnat2タンパク質をコードする遺伝子についてはEnsadin 0625がある。Nmnat2は、2以上のスプライシング型で存在し得て、その全てを本明細書においてNmnat2と言う。Nmnat2は主に脳、心臓及び筋組織で発現されているらしく、これに対してNmnat1及びNmnat3は様々な組織にわたって幅広い分布パターンを示す。細胞レベルでは、Nmnat1は核において最も多く、Nmnat2はゴルジ複合体及び軸索内の小胞に多く、Nmnat3はミトコンドリアに多い。それぞれの場合において他の細胞内配置もあり得る。

20

【0016】

保護性Wld^Sタンパク質に組み込まれた、Nmnat1とは異なるアイソフォームであるNmnat2のノックダウンが、急速なワーラー様変性を誘導したことを示すデータが以前に提示された。一方、Nmnat1又はNmnat3の発現の実験的な低減は、軸索変性の速度に影響を与えなかった。

30

【0017】

本明細書において使用される用語「Nmnat活性化剤」は、軸索におけるNmnat活性の合計レベルを増加させる作用物質を指す。そのような活性化剤の例には、Nmnatタンパク質発現を増加させる、軸索へのNmnat送達を増加させる、Nmnat代謝回転を遅くする、潜在的に重要な酵素補助因子の濃度を高める、アロステリックに酵素を活性化する、酵素への基質の結合を高める、重要部位への細胞内ターゲティングを高める、又は、Nmnatとの直接的な相互作用によるか、その分解に関与するタンパク質との相互作用によるかにかかわらず、酵素の半減期を向上させる、作用物質が含まれる。

【0018】

理論により拘束されるわけではないが、FK866によるNmnat活性化及びNamp1阻害(これらはそれぞれNAD⁺を合成及び欠乏させる)の生存促進作用は、Namp1による生成物であるNMN⁺又は誘導体が軸索に有害であるため、その効果を発揮し得るものと考えられる。現在Nmnatは、NMN⁺を利用することがわかっている唯一の細胞質内酵素であるから、Nmnat2が弱まると、損傷した又は病的な軸索にNMN⁺が蓄積し得る。この場合において、存在する場合にはWld^SがこのNMN⁺を除去し、FK866がNamp1によるその生成を防止するであろう。

40

【0019】

FK866による軸索保護は以前に分析されたが(Sasakiらの文献「The Journal of Neuroscience」29(17), 5525-5535(2009))、この先の研究は、Nmnat介在性の軸索保護が細胞内NAD⁺レベルと相関しないことを示した。より批評的には、この先の研究は、Namp1の遺伝子

50

的阻害はニューロンのNMN及びNAD⁺レベルを大きく低減させるが、軸索保護(又は変性)にはつながらず、Nmnat介在性のニューロン保護が、ニューロンのNAD⁺又はNMNレベルを変化させることによって作用するわけではないと断定した。これらの知見に反して、NMN⁺を添加してNamp1をバイパスすることによりNamp1阻害剤FK866の保護効果が一貫して元に戻ること(図4)を示すデータが、本明細書にはっきりと提示されている。

【0020】

さらなる別の実施態様において、NMNモジュレーターはNMN隔離剤(sequestering agent)である。理論により拘束されるわけではないが、そのようなNMN隔離剤は、Nmnat及び/又はNamp1活性から完全に独立したメカニズム又は経路でNMNを隔離するよう機能するものと考えられる。そのようなメカニズム又は経路の一例には、別のタンパク質又は化学物質に結合する作用物質が含まれ得る。メカニズム又は経路のさらなる例には、作用物質がNMNを別の分子に変換する代謝反応が含まれ得る。

10

【0021】

本明細書において使用される用語「神経保護の(neuroprotective)」は、中枢又は末梢神経系のニューロン又はその軸索若しくはシナプスを損傷又は死から保護する能力を指す。多くの様々な種類の損傷原因がニューロンの損傷又は死をまねく可能性があり、その例には例えば、低酸素状態により引き起こされる代謝ストレス、低血糖、糖尿病、イオンの恒常性の喪失又は他の有害プロセス、ニューロンの物理的損傷、毒性物質への曝露、及び、遺伝的障害を含む神経系に影響を与える多数の疾患がある。これは単なる説明のためのリストであり、多くの他の例が文献の中に見いだされるであろうことが理解されよう。保護されていないニューロンで機能的健全性を喪失させ得る損傷原因に曝された時にも、神経保護薬が存在すれば、ニューロンは生存可能な状態を保つことができるであろう。

20

【0022】

本明細書において使用される用語「医薬」は、疾患を治療する、治癒させる、若しくは改善するのに有用な、又は、疾患の症状を治療する、寛解させる、若しくは緩和するのに有用な医薬製剤を指す。医薬製剤は、投与対象に有害でない形態の薬理学的活性成分、及び活性成分を安定化し、かつ循環又は標的組織へのその吸収に影響を及ぼすようにデザインされたさらなる成分を含む。

【0023】

本発明の1つの態様において、本明細書においてこれまでに規定したモジュレーターを含む医薬組成物が提供される。一実施態様において、医薬組成物は、Namp1阻害剤及びNmnat活性化剤の組み合わせを含む。そのような実施態様は、Namp1の阻害(すなわちNMN生成の低減)及びNmnatの活性化(すなわちNMNのNADへの変換の増大)の双方の相乗効果をもたらすであろう。

30

【0024】

本発明の医薬組成物は、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19版, Gennaro編, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995」に開示されているものなどの従来技術に従って、医薬として許容し得る担体又は希釈剤、ならびに任意の他の公知のアジュバント及び賦形剤とともに製剤されてよい。

【0025】

好適な医薬担体は、不活性の固体の希釈剤又は充填剤、滅菌水溶液、及び様々な有機溶媒を含む。固体担体の例には、ラクトース、白土、スクロース、シクロデキストリン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、マグネシウムステアレート、ステアリン酸、及びセルロースの低級アルキルエーテルがある。液体担体の例には、シロップ、ピーナッツ油、オリーブオイル、リン脂質、脂肪酸、脂肪酸アミン、ポリオキシエチレン、及び水がある。

40

【0026】

本発明の1つの態様において、対象にNMNモジュレーターを投与することを含む、例えば、軸索変性を伴う障害などの神経変性障害の治療方法が提供される。

本発明の1つの態様において、例えば、軸索変性を伴う障害などの神経変性障害の治療

50

に使用するための、NMNモジュレーターを含む医薬組成物が提供される。

【0027】

本発明によるNMNモジュレーターの投与は様々な経路を介してよく、例えば、経口、経直腸、経鼻、経肺、局所(口腔及び舌下を含む)、経皮、腹腔内、経膈、非経口(皮下、筋肉内、皮内を含む)、くも膜下腔内、又は脳室内がある。好ましい経路が、治療対象の全身症状及び年齢、治療される症状の性質、ならびに選択された活性成分によることが理解されよう。

【0028】

非経口投与は、シリンジ、任意にペン様シリンジによる、皮下、筋肉内、腹腔内、又は静脈内注射によって行われてよい。あるいは、非経口投与は輸液ポンプによって行うことができる。さらなるオプションは、経鼻又は肺スプレー(nasal or pulmonary spray)の形態でのNMNモジュレーターの投与のための溶液又は懸濁液であってもよい製剤である。さらなるオプションとして、本発明のNMNモジュレーターを含む製剤は、経皮投与(例えば、無針注射によるもの、又はパッチ、任意にイオン導入パッチからのもの)、又は経粘膜投与(例えば、口腔内投与)に適合させることもできる。

【0029】

本発明のNMNモジュレーターは、いろいろな剤形で投与されてよく、その例を挙げると、液剤、懸濁剤、乳剤、マイクロエマルジョン、多重エマルジョン、泡剤、膏薬、ペースト剤、硬膏剤、軟膏、錠剤、コーティング錠、リンス剤、カプセル剤(例えば、硬ゼラチンカプセル及び軟ゼラチンカプセル)、坐剤、直腸カプセル、滴剤、ゲル剤、スプレー剤、散剤、エアロゾル、吸入剤、点眼剤、眼軟膏剤、眼病用リンス剤、膈坐薬、膈リング、膈軟膏、注射液、インサイチュ転換溶液(in situ transforming solutions)(例えば、インサイチュゲル化、インサイチュ固化、インサイチュ沈殿、インサイチュ結晶化)、輸液、及びインプラント剤がある。

【0030】

本発明のNMNモジュレーターは、さらに組成物の安定性を高めるため、生体利用効率を高めるため、溶解度を高めるため、有害作用を低下させるため、当業者に周知の時間治療を達成するため、及び患者の服薬遵守を高めるため、又はこれらの任意の組み合わせのために、例えば、共有結合的、疎水的、及び静電的相互作用によって、薬物担体、薬物送達システム、及び高度薬物送達システムにさらに混合され、又はこれに付加されてもよい。

【0031】

担体、薬物送達システム、及び高度薬物送達システムの例を挙げると、重合体(例えば、セルロース及び誘導體)、多糖類(例えば、デキストラン及び誘導體、デンプン及び誘導體)、ポリ(ビニルアルコール)、アクリレート重合体及びメタクリレート重合体、ポリ乳酸及びポリグリコール酸及びそれらのブロックコポリマー、ポリエチレングリコール、キャリアタンパク質(例えば、アルブミン)、ゲル(例えば、熱ゲル化システム(例えば、当業者に周知のブロックコポリマー系))、ミセル、リボソーム、ミクروسフェア、ナノ粒子、液晶及びその分散系、脂質-水系における相挙動の分野の当業者に周知のL2相及びその分散系、高分子ミセル、多重エマルジョン、自己乳化性、自己微乳化性シクロデキストリン及びその誘導體、及びデンドリマーがあるが、これらに限定されない。

【0032】

本発明のNMNモジュレーターは、全て当業者に周知の装置、例えば、定量吸入器、ドライパウダー吸入器、及び噴霧器を使用する場合に、肺投与用の固体、半固体、粉末、及び溶液の組成物の形態で有用であり得る。

本発明のNMNモジュレーターは、制御放出、徐放、延長放出、遅延放出、及び持続放出の薬物送達システムの組成物において有用であり得る。限定するものではないが、より具体的には、モジュレーターは、当業者に周知の非経口の制御放出及び徐放システム(両システムともに、投与回数において何倍もの低減をもたらす。)の組成物において有用である。さらにより好ましくは、制御放出及び徐放システムは皮下に施される。本発明の範囲

10

20

30

40

50

を限定することなく、有用な制御放出システム及び組成物の例は、ハイドロゲル、油性ゲル、液晶、高分子ミセル、ミクロスフェア、及びナノ粒子である。

【0033】

本発明の組成物に有用な制御放出システムの製造方法は、結晶化、圧縮、共結晶化、沈殿、共沈、乳化、分散、高圧均質化、カプセル化、噴霧乾燥、マイクロカプセル化、コアセルベーション、相分離、ミクロスフェアを生成する溶媒蒸発、エクストルージョン、及び超臨界流体プロセスを含むが、これらに限定されない。概括的には「医薬制御放出のハンドブック(Handbook of Pharmaceutical Controlled Release)」(Wise, D.L. 編 Marcel Dekker, New York, 2000)及び「薬物及び薬学(Drug and the Pharmaceutical Science) vol. 99: タンパク質組成物及び送達(Protein Composition and Delivery)」(MacNally, E. J. 編 Marcel Dekker, New York, 2000)を参照すること。

10

【0034】

NMNモジュレーターは、例えば、ワラー変性などの軸索変性を伴う神経変性障害の治療に有用であることが予測される。そのような変性が重要であり得る障害の例を挙げると、アレキサンダー病、アルパーズ病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、パッテン病、カナパン病、脳性麻痺、コケイン症候群、皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、糖尿病性神経障害、前頭側頭葉変性症、緑内障、ギラン・バレー症候群、遺伝性痙攣性対麻痺、ハンチントン病、HIV関連認知症、ケネディ病、クラッペ病、レビー小体型認知症、運動ニューロン疾患、多系統萎縮症、多発性硬化症、ナルコレプシー、神経ボレリア症、ニーマン・ピック病、パーキンソン病、ペリツェウス・メルツパッヘル病、末梢神経障害、ピック病、原発性側索硬化症、プリオン病、進行性核上性麻痺、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、脊髄小脳失調症、脊髄損傷、脊髄性筋萎縮症、スティール・リチャードソン・オルゼウスキー病、脳卒中及び他の虚血性障害、脊髄癆又は外傷性脳損傷がある。このリストは単に説明を目的とするものであり、限定するものではなく、網羅的なものではない。一実施態様において、神経変性障害は、アルツハイマー病、多発性硬化症、パーキンソン病、糖尿病性神経障害、又は緑内障などの眼の障害の1種以上から選択される。

20

【0035】

一実施態様において、モジュレーターは、ニューロン損傷に起因する神経変性障害の治療における神経保護薬としての使用が意図されている。

30

さらなる実施態様において、モジュレーターは、ニューロン損傷に起因する軸索変性(すなわちワラー変性)を伴う神経変性障害の治療における神経保護薬としての使用が意図されている。

【0036】

本明細書において使用される用語「損傷」は、細胞体内か、又は、軸索突起若しくは樹状突起内かにかかわらず、ニューロンに加えられた損傷を指す。これは、従来の意味における物理的損傷、すなわち、対象に加えられた外力により引き起こされた脳、脊髄、又は末梢神経への外傷性の損傷である。他の損傷を与える外部因子は、例えば、水銀、及び他の重金属、ヒ素、殺虫剤、及び溶媒などの環境毒素である。あるいは、損傷は、対象内部から生じるニューロンへの損傷原因に起因し得、その例には、虚血性脳卒中及び糖尿病性神経障害に見られるような酸素及びエネルギー供給の低減、多発性硬化症に見られるような自己免疫攻撃、又は、筋萎縮性側索硬化症において重要であると考えられている酸化ストレス及びフリーラジカル生成がある。本明細書において、損傷は、軸索輸送のメカニズムにおけるいかなる欠陥をも意味するものとして使用される。

40

【0037】

別の実施態様において、モジュレーターは、神経保護薬としての使用が意図されており、ここで、神経変性障害は、疾患に起因するニューロン損傷によって引き起こされるものである。

一実施態様において、ニューロン損傷は外傷に起因する。

【0038】

50

一実施態様において、障害は、化学療法薬によって誘導されるニューロン損傷である。タキソール、ベルケイド及びビンクリスチンなどの癌の化学療法に使用されるいくつかの薬物は、これらの薬物を使用できる最大投与量を制限する末梢神経障害を引き起こす。最近の研究によって、タキソール又はビンクリスチンの毒性を受けたニューロンが、その形態及び潜在的な分子事象においてワーラー様の変化を受けていることが示唆されている。この条件においては、ニューロンが一時的に神経毒性薬に曝露されているだけなので、ワーラー変性の障害が、特に有効である可能性がある。それ故に、タキソール又はビンクリスチンを、癌にさらに対抗するNamp1阻害薬物に加えて、ワーラー変性を障害する作用物質とともに同時投与すれば、現在可能な投与量よりも実質的に多い投与量で薬物を使用することができる可能性がある。ビンクリスチンに起因する神経突起変性に対する、Namp1阻害剤FK866の神経保護効果を示すデータが、本明細書に示されている(実施例4)。

10

【0039】

本発明の他の態様において、NMN、又はその誘導體、フラグメント、若しくは代謝産物の、軸索変性、特にワーラー様変性のバイオマーカーとしての使用が提供される。NMNレベルの増加が、軸索変性、特にワーラー様変性の存在に関する診断的に有用なマーカーを提供する可能性があることを示すデータが本明細書に提示されている。本明細書において使用される用語「バイオマーカー」は、プロセス、事象、又は状態の、特徴的な生物学的指標又は生物学的に誘導された指標を指す。

【0040】

バイオマーカーは、診断方法(例えば、臨床的スクリーニング及び予後評価)、療法の結果のモニタリング、及び、特定の治療に対して最も反応しそうな患者の特定、さらには、薬物のスクリーニング及び開発に使用することができる。バイオマーカーは、基礎研究及び医学的研究にも使用することができる。バイオマーカー及びその使用は、新しい薬物治療の確認、及び、薬物治療の新しい標的の発見において有用である。本文脈において、バイオマーカーは、生物学的経路においてバイオマーカーの上流又は下流に見いだされる分子、又はその測定可能なフラグメントによって置き換えることができる。

20

【0041】

本発明のさらなる態様において、試験対象由来の試料において、本明細書にこれまでに規定したバイオマーカーを検出及び/又は定量化することを含む、軸索変性、特にワーラー様変性を検出表示する方法が提供される。

30

本明細書において使用される用語「検出」は、試料中に存在するバイオマーカーの存在を確認することを指す。試料中に存在するバイオマーカーの量の定量化は、試料中に存在するバイオマーカーの濃度を測定することを含んでよい。検出及び/又は定量化は、試料に対して直接的に、あるいは、その抽出物又はその希釈物に対して間接的に行ってもよい。

【0042】

検出及び/又は定量化は、患者由来の生物学的試料、又は生物学的試料の精製物若しくは抽出物、又はその希釈物中の特定のタンパク質の存在及び/又は量を特定するのに適した任意の方法によって行うことができる。本発明の方法において、定量化は、1つ以上の試料中のバイオマーカーの濃度を測定することにより行われ得る。

40

【0043】

本発明の方法において試験され得る生物学的試料は、生きている対象由来の、又は、死後に採取された、組織ホモジネート、組織切片、及び生検標本を含む。試料は、適切な場合には、調製、希釈、又は濃縮することができ、通常の方法で保存することができる。生物学的試料は、脳脊髄液(CSF)、全血、血清、血漿、尿、唾液、又は他の体液も含むことができる。

【0044】

一実施態様において、検出及び/又は定量化は、以下から選択される1種以上の方法によって行われる。該方法には、SELDI(-TOF)、MALDI(-TOF)、1次元ゲルベース分析、2次元ゲルベース分析、質量分析法(MS)、逆相(RP)LC、サイズ透過法(size permeation)(ゲル

50

濾過)、イオン交換法、アフィニティ法、HPLC、UPLC、又は他のLC若しくはLC-MSベース技術がある。適切なLC MS技術は、ICAT(登録商標)(Applied Biosystems社, CA, USA)、又は、iTRAQ(登録商標)(Applied Biosystems社, CA, USA)を含む。NMNのある分子への酵素的変換も、分光測定法又は他の方法によって検出可能である。

【0045】

液体クロマトグラフィー(例えば、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、又は低圧液体クロマトグラフィー(LPLC))、薄層クロマトグラフィー、NMR(核磁気共鳴)分光法も使用することができる。

バイオマーカーは、例えば、SELDI又はMALDI-TOFによって直接検出されてもよい。あるいは、バイオマーカーは、バイオマーカーに特異的に結合することができる、例えば、抗体若しくはそのバイオマーカー結合性フラグメントなどの1種以上のリガンド、又は、他のペプチド、又は、リガンド(例えばアプタマー)、又はオリゴヌクレオチドとの相互作用を介して、直接的又は間接的に検出されてもよい。リガンドは、例えば、発光性、蛍光性、又は放射性の標識、及び/又はアフィニティタグなどの検出可能な標識を有していてもよい。

【0046】

一実施態様において、検出及び/又は定量化は、バイオセンサー、微量分析システム、マイクロ設計(microengineered)システム、マイクロ分離システム、又はイムノクロマトグラフィーシステムを使用して行われる。

本明細書において使用される用語「バイオセンサー」は、バイオマーカーの存在を検出することができるものを指す。予測的バイオマーカーを使用して、バイオセンサーなどの適切な診断ツールを開発することができる。バイオセンサーには、1種以上のバイオマーカーの免疫学的検出方法、電気的技術、熱的技術、磁氣的技術、光学的技術(例えばホログラム)、又は音波技術を組み込むことができる。そのようなバイオセンサーを使用して、生物学的試料中に見いだされる予期された濃度で、1種以上の標的バイオマーカーを検出することができる。

【0047】

一実施態様において、検出及び/又は定量化は、免疫学的方法によって行われる。この方法は、バイオマーカーに特異的に結合することができる抗体、又は、そのフラグメントに依拠してよい。好適な免疫学的方法を挙げると、サンドイッチELISAなどのサンドイッチ免疫測定法(この方法では、バイオマーカー上の異なるエピトープを認識する2つの抗体を使用してバイオマーカーの検出が行われる。)、放射性免疫測定法(RIA)、直接法、間接法、若しくは競合法の酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法、免疫組織化学法、及び任意の粒子ベース免疫測定法(例えば、金、銀、若しくはラテックス粒子、磁性粒子、又はQdotを使用するもの)がある。免疫学的方法は、例えば、マイクロタイタープレートフォーマット、又はストリップフォーマットで行われてよい。

【0048】

一実施態様において、検出及び/又は定量化は、免疫組織化学的な方法によって行われる。

本発明による免疫学的方法は、例えば、以下の方法のいずれかに基づくものでよい。

免疫沈降法は最も単純な免疫測定法であり、この方法では、試薬抗体が試料とともにインキュベートされて、その中に存在する標的抗原と反応し、不溶性の凝集物を形成した後、生じる沈降物の量を測定する。免疫沈降反応は、定性的でも定量的でもよい。

粒子免疫測定法においては、いくつかの抗体が粒子につながれ、粒子は多くの抗原分子に同時に結合することができる。これは、認識できる反応の速度を大きく加速する。この方法は、バイオマーカーの迅速かつ高感度な検出を可能にする。

【0049】

免疫比濁法において、抗体とバイオマーカー上の標的抗原との相互作用は、小さすぎて沈降しない免疫複合体を形成する。しかし、これらの複合体は入射光を散乱し、これによ

10

20

30

40

50

り比濁計を使用した測定が可能になる。抗原、すなわちバイオマーカの濃度は、反応後数分以内に測定できる。

【0050】

放射性免疫測定法(RIA)は、抗原又は抗体を標識するのに、 I^{125} などの放射性同位体を使用する。使用される同位体はガンマ線を発し、これは通常、結合していない(遊離の)放射性標識を除去した後で測定される。RIAの主なメリットは、他の免疫測定法と比較して、感度が高く、シグナル検出が容易で、定評のある迅速なアッセイであることである。主なデメリットは、放射線の使用によりもたらされる健康及び安全のリスク、ならびに、認可された放射線安全確保及び廃棄プログラムの維持に付随する時間と費用である。このため、RIAは通常の臨床研究所業務において、酵素免疫測定法によってほとんど取って代わられてきた。

10

【0051】

酵素免疫測定法(EIA)は、放射性免疫測定法(RIA)の代替法として開発された。この方法は、抗体又は標的抗原を標識するのに酵素を使用する。EIAの感度は、放射性同位体によりもたらされる危険性を伴うことなく、RIAの感度に迫っている。検出用に最も広く使用されているEIA法の1つが、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)である。

【0052】

ELISA法は、2つの抗体を使用してよく、その一方は標的抗原に特異的であり、他方は酵素に連結されていて、酵素の基質を添加すると、化学発光シグナル又は蛍光シグナルを発生する。

20

蛍光免疫測定法(FIA)とは、蛍光標識、又は、基質に作用して蛍光産物を生成する酵素標識を利用する免疫測定法のことを指す。蛍光測定は、比色分析的(分光光度的)測定よりも本質的に感度が高い。それ故に、FIA法は、EIA法より高い分析感度を有しており、これは吸光度(光学密度)測定を使用する。

【0053】

化学発光免疫測定法は化学発光標識を利用し、その標識は化学エネルギーにより励起されると光を生成する。この発光が光検出器を使用して測定される。

本発明の免疫学的方法は、このように、周知の方法を使用して行うことができる。任意の直接法(例えば、センサーチップを使用するもの)又は間接法を、本発明のバイオマーカの検出に使用してよい。

30

【0054】

ビオチン-アビジンシステム又はビオチン-ストレプトアビジンシステムは、本発明の免疫学的方法における使用に適合することができる一般的な標識化システムである。一方の結合パートナー(ハプテン、抗原、リガンド、アプタマー、抗体、酵素等)はビオチンで標識され、他方のパートナー(表面(例えば、ウェル、ビーズ、センサー等))はアビジン又はストレプトアビジンで標識される。これは、免疫測定法、遺伝子プローブアッセイ、及び(バイオ)センサーの従来技術であるが、直接的な固定化経路ではなく間接的なものである。例えば、本発明のバイオマーカに特異的な、ビオチン化したリガンド(例えば、抗体又はアプタマー)は、アビジン又はストレプトアビジン表面に固定化されてよく、そして固定化されたリガンドは、本発明のバイオマーカを検出及び/又は定量化するために、バイオマーカを含む又は含むことが疑われる試料に曝露されていてもよい。そして、固定化された抗原の検出及び/又は定量化は、本明細書に記載される免疫学的方法によって行われ得るものである。

40

【0055】

本発明のさらなる態様において、本明細書においてこれまでに規定したバイオマーカを検出及び/又は定量化するように構成されたバイオセンサー、及び、本明細書においてこれまでに規定した方法に従ってキットを使用するための説明書を備える、軸索変性、特にワーラー様変性を検出するための診断キットが提供される。

【0056】

一実施態様において、バイオセンサーは抗体である。本明細書において使用される用語

50

「抗体」は、これらに限定されないが、含まれるのは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント及びF(ab')₂フラグメント、Fab発現ライブラリーにより生成されるフラグメント、抗イデオタイプ(抗Id)抗体、及び上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントがある。本明細書において使用される用語「抗体」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活性部位、すなわち、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子のことも指す。本発明の免疫グロブリン分子は、任意のクラス(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD及びIgA)又は免疫グロブリン分子のサブクラスであり得る。

【0057】

本発明の別の態様において、

a)生物学的試料中のNMN又はNMNの容易に検出可能な改変物(version)の合成をブロックする工程、

b)試験分子とともに前記試料をインキュベートする工程、及び、

c)NMN関連シグナルを経時的に測定する工程、

を含み、対照減衰曲線との差がNMNモジュレーターであることを示す、NMNモジュレーターのスクリーニング方法が提供される。

【0058】

NMNの容易に検出可能な改変物が、例えば、タンパク質を蛍光タンパク質などのレポーターでタグ付けすることによる、ハイスループットシステムにおける迅速な定量化に適するようにする改変を含むことが理解されよう。NMN合成は、例えば、誘導発現系の使用、発現のノックダウン、又は一般的なタンパク質合成阻害剤の添加によってブロックすることができる。

【0059】

本発明のバイオマーカー、使用、及び方法に基づくハイスループットスクリーニング技術(例えば、アレイフォーマットで構成されているもの)は、有用である可能性がある治療的化合物(例えば、バイオマーカーに結合できる可能性がある、天然化合物、合成化合物(例えば、コンビナトリアルライブラリーからのもの)、ペプチド、モノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体、若しくはそれらのフラグメントなどのリガンド)を特定するために、バイオマーカーの特性をモニターするのに適している。

【0060】

本発明の方法は、アレイフォーマットで(例えば、チップ上で、又はマルチウェルアレイとして)行うことができる。該方法は、単一の試験、又は複数の同一の若しくは複数の非同一の試験用のプラットフォームに適合させることができ、そしてハイスループットフォーマットで行うことができる。本発明の方法は、1種以上の追加的な異なる試験を行って、診断を確認若しくは無視すること、及び/又は、さらに状態を特徴付けることを含んでいてもよい。

本発明の別の態様において、本明細書においてこれまでに規定したスクリーニング方法によって同定されたNMNモジュレーターが提供される。

以下、付属の実施例を参照して、本発明を説明するが、これらは単なる例である。

【実施例】

【0061】

(材料及び方法)

(SCG外植片培養、切断損傷、及びFK866処理)

上頸神経節(SCG)を0-2日齢の仔マウスから切除した。外植片をL15(Leibovitz)培地(Invitrogen社)に載置し、他の組織を除去して、半分に切断し、半分にした6つの外植片を、ポリ-L-リシン(20 µg/ml 2時間; Sigma社)、及びラミニン(20 µg/ml 2時間; Sigma社)でプレコートした3.5cm組織培養ディッシュの中心に載置した。外植片を、4500mg/Lのグルコース及び110mg/Lのピルビン酸ナトリウム(Sigma社)、2mMのグルタミン、1%のペニシリン/ストレプトマイシン 1/50 B27血清サプリメント、及び100ng/mlの7S NGF(全てInvitrogen社)、及び4 µMのアフィジコリン(Sigma社)を含有するDMEMで培養し、非神経細胞の増

10

20

30

40

50

殖をブロックした。全ての培養において、何らかの処理をする前に、神経突起を7日間伸長させた。この後、メスを使用して細胞体から神経突起を分離した。FK866(最終濃度100nM)を、切断損傷の1日前、同時(時間0)、又は切断後最大6時間までの1時間間隔で、増殖培地に添加した。いくつかの実験において、NMN、NAD、ニコチン酸アデニンジヌクレオチド(NaAD)、又はニコチン酸(NA)を、FK866とともにt=0で培地に添加した。別の一連の実験において、FK866をt=0で添加し、NMN又はNADを、切断損傷の数時間後にFK866処理培養に添加した。分析ソフトウェアを実行するPCに接続したSoft Imaging Systems社製F-Viewカメラを使用してオリンパス社製IX81倒立顕微鏡上で明視野画像を取り込んだ。切断損傷の直後、又は、切断損傷後最大48-72時間までの規則的な間隔で神経突起の同一視野の画像を取り込んだ。

10

【0062】

(結果)

(実施例1: NADレベルに対するNamp1阻害剤FK866の効果)

この実験では、細胞内NAD(P)⁺レベルに対するNamp1阻害剤FK866の効果を分析した。この実験においては、FK866(最終濃度1-100nM)を適用し、培養はその薬物の存在下に8-72時間保持した。今回は、Billingtonらの文献(J Biol Chem 283(10), 6367-6374(2008))に記載されているNAD(P)⁺測定のために100 μlのH₂O中に外植片を回収した。

【0063】

この分析の結果は図2で見ることができる。FK866がNamp1の強力な阻害剤であり、それ故に生成物NMN⁺の細胞内レベルを低減させるであろうことが知られている。この研究の結果は、Namp1阻害が、さらにNAD⁺サルベージ経路(図1に示されている)を伝わってNAD⁺の欠乏ももたらす、ということをはっきりと示している。それ故に、NMN⁺の細胞内レベルの低減は、Nmnatのアイソフォームによる、NMN⁺のNAD⁺への代謝回転を低減させる。図2は、未処理のSCG培養、又は、100nMのFK866で8時間若しくは24時間処理したSCG培養のNAD(P)⁺レベル(未処理のSCG培養に対する百分率として表現されている)を示す。

20

【0064】

(実施例2: 切断した神経突起に対するFK866の効果)

この実験では、先に述べた方法論を用いて、切断した神経突起に対するNamp1阻害剤FK866の効果を分析した。結果は図3に示されており、これは、FK866が一貫してWld^Sの表現型を模倣し、切断直後に添加したとしても初代培養において損傷した神経突起を保護することを示している。この実験において、SCGニューロンは前記方法論において記載したとおり7日間培養し、その後メスによって細胞体から神経突起を分離し、切断部に対して神経突起の遠位部分を、切断直後又は切断の24時間後に撮像した。いくつかのSCG培養においては、FK866(最終濃度100nM)を切断の前日に添加した(右側のパネル)。おそらくNAD⁺欠乏が他の負の効果をもっているために、Wld^Sの表現型よりも効果が短かったが、神経突起の生存率は、Namp1阻害剤FK866の存在下において4倍上がったと評価された。

30

【0065】

(実施例3: 切断した神経突起に対するFK866及びNMN⁺の効果)

この実験は、切断した神経突起に、Namp1阻害剤FK866と組み合わせてNMN⁺も添加したこと以外は、実施例2に記載されたものと類似する方法で行った。この研究の結果は図4に示されており、Namp1をバイパスするNMN⁺の添加により、ワーラー変性を遅延させるFK866の保護効果が一貫して元に戻ることがわかる。

40

【0066】

これらの研究の結果は、NMN⁺レベルとワーラー変性の間を強く結びつける。例えば、FK866によるNamp1の阻害(NMN⁺レベルを低減することが知られている)は、切断した神経突起に対して神経保護効果をもたらす(図3)、Namp1阻害剤に対するNMN⁺の添加(すなわち、NMN⁺レベルを上昇させること)は、神経保護効果を元に戻した。

【0067】

(実施例4: ピンクリスチン処理神経突起に対するFK866及びNMN⁺の効果)

この実験は実施例2及び3に記載されたものと類似する方法で行ったが、神経突起を、

50

切断により細胞体から分離する代わりに、神経毒性の化学療法薬であるビンクリスチンで処理した。この実験においては、SCGニューロンを前記方法論において記載したとおり7日間培養し、その後、0.02 μMのビンクリスチン単体で、0.02 μMのビンクリスチン及び10 nMのFK866で、又は0.02 μMのビンクリスチン及び100nMのFK866ならびに1mMのNMNで処理した。神経突起の遠位部分を、薬物添加直後、及び、薬物添加の24、48、及び72時間後に画像化した。

ビンクリスチンは、神経突起の進行性の遠位から近位への変性を引き起こす。図5は、100nMのFK866により与えられたこの毒性作用に対する保護を示す。この保護効果は、FK866とともに1mMのNMNも添加すると元に戻る。

【 図 1 】

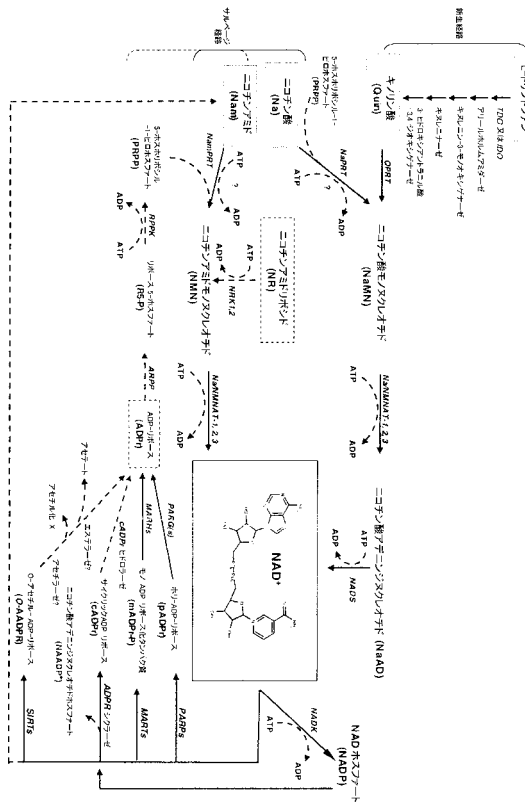


図 1

【 図 2 】

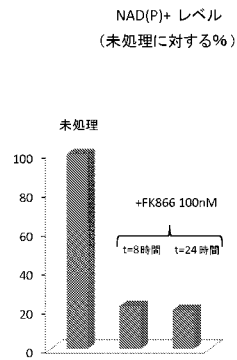


図 2

【 図 3 】

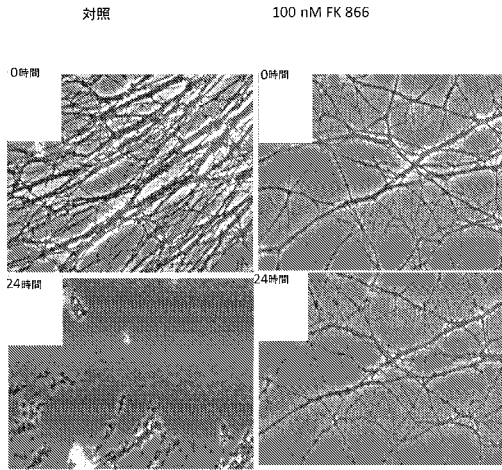


図 3

【 図 4 】

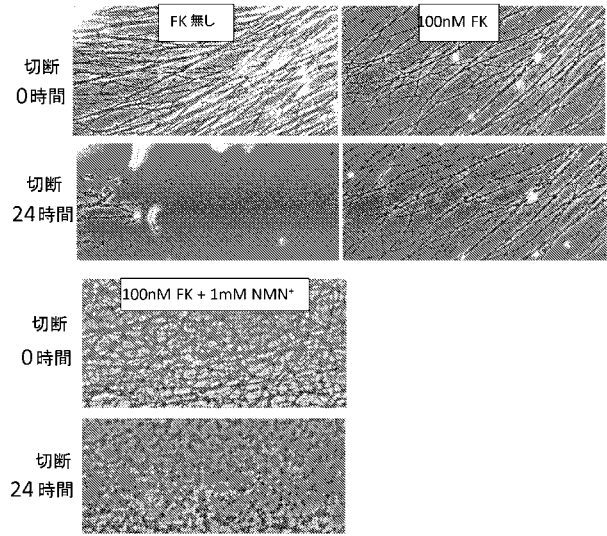


図 4

【 図 5 - 1 】

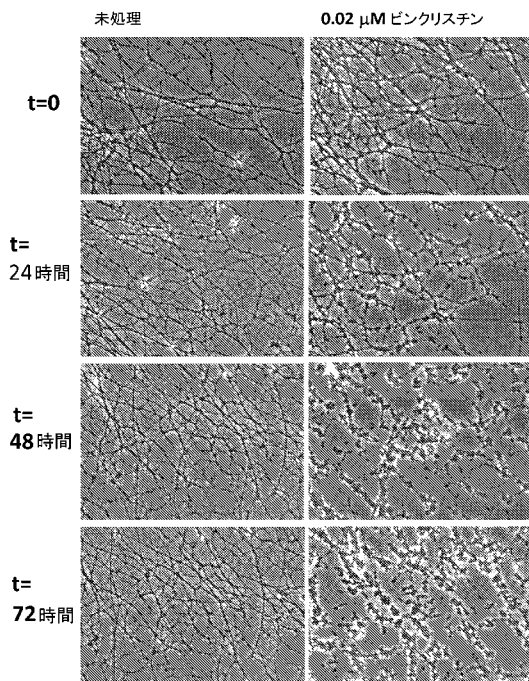


図 5

【 図 5 - 2 】

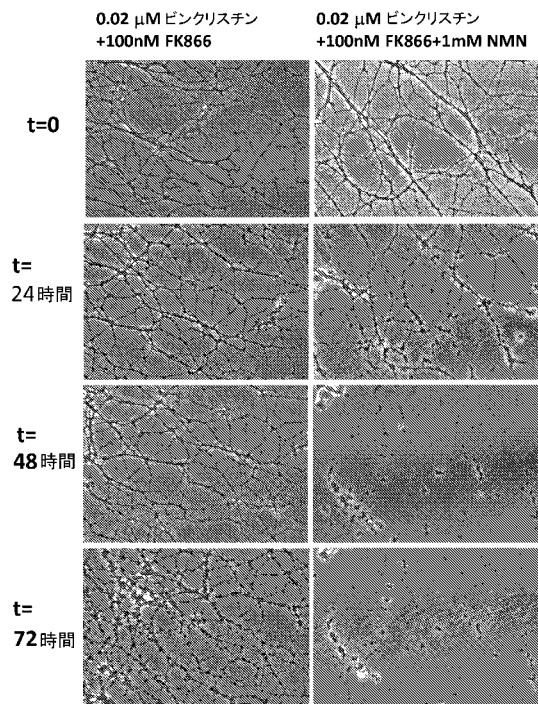


図 5 (続き)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/GB2011/050770
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/4409 A61K31/445 A61P25/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2009/109610 A1 (TOPOTARGET SWITZERLAND S A [CH]; LEO OBERDAN [BE]; VAN GOOL FREDERIC []) 11 September 2009 (2009-09-11) See page 1, lines 17-24, page 2, lines 14-29; page 52, lines 10, 13; figures and Example, claim 14: FK 866, the preferred NMN "modulator" of the present application, for the treatment of central nervous system ischemia reperfusion injury, traumatic brain injury, spinal cord injury ----- -/--	1-5,13 1-5,8-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 26 October 2011		Date of mailing of the international search report 03/11/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Veronese, Andrea

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2011/050770

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>WO 2007/136744 A1 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; WANG TAO [US]; WOLBERGER CYNTHIA [US]) 29 November 2007 (2007-11-29) See paragraphs [0014, 0015, 0016, 0030, 0031, 0035, 0036, and claims 17, 18, 19: Namp1 inhibitors and their use for the treatment of neurodegenerative disorders See claims 17, 27: methods for detecting/identifying Namp1 inhibitors</p> <p>-----</p>	1-5,13
X	<p>PLOS ONE 2009 LNKD- PUBMED:19936064, vol. 4, no. 11, 2009, page E7897, XP002639795, ISSN: 1932-6203 See abstract, figure 8, page 11 right hand column, page 13, left hand column: FK-866 strikingly reduces neurological damage and clinical manifestation of autoimmune encephalomyelitis</p> <p>-----</p>	1-5,13
Y	<p>FORMENTINI L ET AL: "Detection and pharmacological modulation of nicotinamide mononucleotide (NMN) in vitro and in vivo", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 77, no. 10, 15 May 2009 (2009-05-15), pages 1612-1620, XP026037382, ISSN: 0006-2952, DOI: DOI:10.1016/J.BCP.2009.02.017 [retrieved on 2009-03-05] See abstract and page 1616: FK866 decreases NMN content in vivo in different tissues, including the brain See page 1615, paragraph 3.1, discloses fluorescent derivatives of NMN and compositions and methods (i.e. also kits) for its detection.</p> <p>-----</p>	1-5,8-13
X	<p>WO 2010/023307 A1 (TOPOTARGET AS [DK]; CHRISTENSEN METTE KNAK [DK]; BJOERKLING FREDRIK [S]) 4 March 2010 (2010-03-04) See page 6, paragraph after "brief description of the invention"; page 35, paragraph "medical uses" and claims 1, 18, 19, 20 and in particular see NAMPRT inhibitors for the treatment of multiple sclerosis, Alzheimer's disease, brain cancer</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-3,13

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2011/050770

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	<p>WO 2010/092317 A1 (BABRAHAM INST [GB]; COLEMAN MICHAEL PHILIP [GB]; GILLEY JONATHAN NICH0) 19 August 2010 (2010-08-19) See claims: Nmnat-2 modulators for the treatment of neurodegenerative disorders, in particular involving a Wallerian degeneration. See pages 11-13 and claims 16-22: use of a Nmnat2 or fragment or metabolite thereof, as a marker of Wallerian degeneration; see also tests to detect wallerian degeneration; abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,13
X	<p>WO 2004/035823 A2 (EVOTEC NEUROSCIENCES GMBH [DE]; VON DER KAMMER HEINZ [DE]; POHLNER JOH) 29 April 2004 (2004-04-29) See page 13, first paragraph: modulators of translation product of Ensadin 0625 (Nmnat-2), and their use for the treatment of neurodegenerative disorders: see page 7, lines 30-38, page 9, lines 9-17</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,13
X	<p>WO 03/082187 A2 (INDIANA UNIVERSITY [US]; JAYARAM HIREMAGALUR N [US]; YALOWITZ JOEL A []) 9 October 2003 (2003-10-09) See page 6, lines 3-4; claim 11: compounds modulating (activating) NMNAT, and in particular NMNAT-2 and their use for the treatment of "neurodegenerative disorders"</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,13
X	<p>YAN T ET AL: "Nmnat2 delays axon degeneration in superior cervical ganglia dependent on its NAD synthesis activity", NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 56, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 101-106, XP026858822, ISSN: 0197-0186 [retrieved on 2009-09-22] See abstract, discussion, NMAT-2 delays Wallerian degeneration and injury related axon degeneration</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2011/050770

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>MACK T G A ET AL: "WALLERIAN DEGENERATION OF INJURED AXONS AND SYNAPSES IS DELAYED BY A UBE4B/NMNAT CHIMERIC GENE", NATURE NEUROSCIENCE, NATURE AMERICA, INC, US, vol. 4, no. 12, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 1199-1206, XP008017577, ISSN: 1097-6256, DOI: DOI:10.1038/NN770 See abstract: The NMN modulator Nmnat protects from wallerian degeneration See abstract and discussion, page 1203, left had-column, last paragraph: Nmnat, the enzyme converting NMN to NAD+, modulates axonal degeneration.</p> <p>-----</p>	1-5, 8-12, 15-20
Y	<p>WO 99/45393 A1 (UNIV CINCINNATI [US]) 10 September 1999 (1999-09-10) See claims 14-30: method for the detection of axonal degeneration including detection in the cerebrospinal fluid of proteins derived from the axon</p> <p>-----</p>	15-20
Y	<p>WO 03/029414 A2 (UNIV EMORY [US]; GLASS JONATHAN D [US]; RICH MARK M [US]) 10 April 2003 (2003-04-10) See pages 37-38 and in particular page 37, lines 22-25: WLDS polypeptides for use in the detection of axonal degeneration</p> <p>-----</p>	15-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2011/050770**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-5, 8-20
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ GB2011/ 050770

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 3-5(completely); 1, 2, 8-14(partially)

A nicotinamide mononucleotide (NMN) modulator being a Nampt inhibitor and pharmaceutical composition thereof, for use in the treatment of neurodegenerative disorders.

2. claims: 6(completely); 1, 2, 8-14(partially)

A nicotinamide mononucleotide (NMN) modulator being a Nmnat-2 activator and pharmaceutical composition thereof, for use in the treatment of neurodegenerative disorders.

3. claims: 7(completely); 1, 2, 8-14(partially)

A nicotinamide mononucleotide modulator being an NMN sequestering agent and pharmaceutical composition thereof, for use in the treatment of neurodegenerative disorders

4. claims: 1, 2, 8-14(all partially)

A nicotinamide mononucleotide (NMN) modulator not belonging to any of the aforementioned classes and pharmaceutical composition thereof, for use in the treatment of neurodegenerative disorders.

5. claims: 15-20

Methods and kits for detecting axon degeneration including detection of a biomarker, such as NMN.

6. claims: 22, 23

Method of screening for an NMN modulator as described in claim 22 and NMN modulators as defined in claim 23.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2011/050770

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009109610 A1	11-09-2009	EP 2098231 A1	09-09-2009
WO 2007136744 A1	29-11-2007	NONE	
WO 2010023307 A1	04-03-2010	AU 2009286604 A1 CA 2735373 A1 CN 102186822 A EP 2342181 A1	04-03-2010 04-03-2010 14-09-2011 13-07-2011
WO 2010092317 A1	19-08-2010	NONE	
WO 2004035823 A2	29-04-2004	AU 2003294696 A1	04-05-2004
WO 03082187 A2	09-10-2003	AU 2003220201 A1	13-10-2003
WO 9945393 A1	10-09-1999	AU 3070399 A EP 1058850 A1 US 6797478 B1	20-09-1999 13-12-2000 28-09-2004
WO 03029414 A2	10-04-2003	CA 2462632 A1 EP 1446014 A2	10-04-2003 18-08-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 K	31/4545 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 K	31/4409 (2006.01)	A 6 1 K	31/4545
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/4409
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	27/06 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
		A 6 1 P	27/06

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

(72)発明者 ルアウラ クオンフォルトイ

英国 シービー 2 2 3 エーティアー ケンブリッジ ケンブリッジシャー バブラハム バブラハム
ム ホール バブラハム バイオサイエンシイズ グループ バブラハム バイオサイエンシイズ
インスティテュート

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA03 DA04 EA04 FA06 HA01 LA07 LA08
4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA162 ZA332 ZC802
4C086 AA01 AA02 BC17 BC21 GA07 GA08 MA01 MA04 NA14 ZA02
ZA16 ZA33 ZC80

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013525416A5	公开(公告)日	2014-06-19
申请号	JP2013506743	申请日	2011-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	巴布拉哈姆研究院		
申请(专利权)人(译)	Baburahamu研究所		
[标]发明人	ミチャエルクオルエマン ルアウラクオンフォルトイ		
发明人	ミチャエル クオルエマン ルアウラ クオンフォルトイ		
IPC分类号	A61K45/00 G01N33/53 G01N27/62 G01N30/72 A61P25/28 A61P43/00 A61K31/4545 A61K31/4409 A61P25/00 A61P25/16 A61P27/06		
CPC分类号	A61K31/4409 A61K31/445 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/06 A61P43/00 A61K31/4545		
FI分类号	A61K45/00 G01N33/53.S G01N27/62.V G01N27/62.X G01N30/72.C A61P25/28 A61P43/00.111 A61K31/4545 A61K31/4409 A61P25/00 A61P25/16 A61P27/06		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA03 2G041/DA04 2G041/EA04 2G041/FA06 2G041/HA01 2G041/LA07 2G041 /LA08 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA162 4C084/ZA332 4C084/ZC802 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/BC17 4C086/BC21 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA16 4C086/ZA33 4C086/ZC80		
代理人(译)	石川彻		
优先权	2010006961 2010-04-27 GB		
其他公开文献	JP2013525416A		

摘要(译)

本发明是一种烟酰胺单核苷酸 (NMN) 调节剂, 其在神经退行性疾病的治疗中用作神经保护剂, 所述神经退行性疾病特别是但不限于涉及神经组织的轴突变性, 例如轴突变性的沃勒氏变性。使用NMN作为生物标志物, 使用基于NMN的生物标志物检测和显示轴突变性的方法, 用于检测轴突变性的诊断试剂盒, NMN调节剂的筛选方法以及筛选方法与已识别的NMN调制器有关。[选择图]图3