



10. (EP3006040) METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING NEUROPATHIES

国内書誌情報 明細書 請求の範囲 図面 書類

注意: このテキストは、OCR 処理によってテキスト化されたものです。法的な用途には PDF 版をご利用ください。

説明

政府の興味

[0001] この作業は、uphs5RO1NS40745の下で、連邦政府からの資金で少なくとも部分的にサポートされた。米国政府は、本発明において特定の権利を有することができる

関連アプリケーションデータ

[0002] 本出願は、米国仮出願シリアル番号の米国特許法(119)の下で利益を主張するものである 60/577,233, filed June 4, 2004 米国仮出願シリアル番号 60/641,330, filed January 4,2005これらの出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる

フィールド

[0003] 技術分野本発明は、一般に、ニューロンを含む疾患および状態に関し、より詳細には、神経変性および神経変性を含む他の疾患および症状を治療または予防するための方法および組成物に関する。神経障害を治療または予防するための薬剤を同定する方法も含まれる

背景

[0004] 本発明は、パーキンソン病およびアルツハイマー病のような様々な神経変性疾患および外傷時に、軸索変性が起こる、ニューロンに対する毒性または虚血性の傷害。このような疾患および状態は、軸索障害を含む軸索疾患と関連する。軸索障害の一例は、ウォールエリス変性(wler)である Mootrans. R. soc. lod. (140) (411-429)、(1850)は、軸索の遠位部分がセル本体から切断されたときに生じる。切断された軸索は、縮退を急速に阻止する。したがって、軸索障害は、神経障害性疾患および状態の重要な特徴であり、軸索欠損は、患者の身体障害の重要な成分であり得る

要約

[0005] 従って、本発明者らは、軸索変性が発生することを発見することに成功した罹患したおよび/または傷害されたニューロンにおけるnad活性を増加させることにより、減少または防止することができる。増加したnad活性は、サーチェイン活性を増加させるように作用し得、これにより、傷害された神経細胞の軸索変性の減少が生じると考えられる。したがって、軸索変性を防止するための(1つ)のアプローチは、サーチェイン分子を活性化すること、すなわち、サーチェイン分子を活性化することであり得る 傷害された哺乳動物軸索におけるsirt1。SIRT1の活性化は、SIRT1分子に直接作用することができ、またはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の供給を増加させることによって行うことができる)SIRT1のヒストン/タンパク質デアセチラーゼ活性の基質として作用する。SIRT1の活性化は、軸索変性の重症度の低下または軸索変性の防止をもたらす また、nad活性の増加は、サーチェインを伴わない他のメカニズムを介して作用する可能性もあると考えられる。これにより、SIRT1活性を増加させるか、または(1つ)またはそれ以上を介して作用するnad活性を増加させることができるさらに他のメカニズムまたは両者は、損傷した哺乳動物軸索における軸索変性を減少または防止することができる

[0006] したがって、様々な実施形態において、本発明は、哺乳動物における神経障害を治療または予防する方法に関する、特に、その必要性のある人では、。この方法は、サーチェイン活動を増加させるように作用する有効量のエージェントを投与することと、特に、罹患したおよび/または傷害されたニューロンにおけるsirt1活性

[0007] 種々の実施形態において、薬剤は、nad活性を増加させることによりsirt1活性を増加させることができる。Nadがsirt1の基質として作用することができるので、nad活性を高めることにより、サーチェイン活性を高めることができると考えられる。このような薬剤はnadまたはnadhの前駆体を含むことができる、Nadサルベージ経路中の中間体、またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ(NMNAT)のようなnadを発生する物質である)ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼをコードする核酸。前記ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼは、NMNAT1タンパク質であることができる

[0008] 種々の実施形態において、薬剤は、SIRT1活性を直接的に増加させるように作用することもでき、したがって、そのようなものとしても作用することができる、サーチェインポリペプチドまたはサーチェインポリペプチドをコードする核酸またはスチルベンなどの物質であってもよい、フラボン、イソフラボン、フラバノンまたはカテキンを含有することを特徴とする。このような化合物としては、レスバトロール、ピセトナノール、デオキシハブテン、及び、トランス-スチルベン及びハブテンからなる群から選択されたカルコンと、パテニン、3、4'、4'、6'-ペンタヒドロキシコンを含むイソキリチゲンおよび3、3、4'、4'、6'-ペンタヒドロキシコンを含む、フィセクチン、5、7、3'、4'、5'-ペンタヒドロキシフラボン、黄体、3、6、3'からなる群から選択されるフラボン、4'-テトラヒドロキシフラボン、ケルセチン、7、3'、4'、5'-テトラヒドロキシフラボン、カイフェロール、6-ヒドロキシアピゲニン、アピゲニン、3、6、2'、4'-テトラヒドロキシフラボン、7、4'-ジヒドロキシフラボン、7、8、3'、4'-テトラヒドロキシフラボン、3、6、2'、3'-テトラヒドロキシフラボン、4'-ヒドロキシフラボン、5、4'-ジヒドロキシフラボン、5、7-ジヒドロキシフラボン、morin、フラボン、5-ヒドロキシフラボン；ダイゼインおよびゲニステインからなる群から選択されるイソフラボンと、ナリンゲニン、3、5、7、3'からなる群から選択されるフラバノンと、4'-ペンタヒドロキシフラボン、および(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキン、(-)-カテキン、(+)-カテキン、(+)-カテキン、(+)-エピカテキン

[0009] 種々の実施形態において、本発明はまた、哺乳動物に投与して神経障害を治療する方法を含むことができ、特に、人間、罹患したおよび/または傷害されたニューロンにおける核nad活性を増加させることによって作用する作用物質の有効量および/または、例えば、神経膠細胞、筋細胞、線維芽細胞等

[0010] このような薬剤は、nadまたはnadh、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドまたはその誘導体であってもよい；ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼのようなnadを発生する酵素、またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼをコードする核酸のようなnadを発生する酵素をコードする核酸、または、経路中の酵素をコードする核酸の発現を増加させる薬剤をコードする核酸を含む Nadまたはnad活性を増加させる薬剤を生成する経路中の酵素の活性および/または安定性を増加させるnadまたは薬剤を生成する。前記ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼは、NMNAT1タンパク質であることができる

[0011] 種々の実施形態において、本発明はまた、必要とされる哺乳動物における視神経障害を治療または予防する方法を含むことができる。本方法は、罹患した

Translated by Wipo Translate Back to original

およびまたは傷害されたニューロンにおけるnad活性を増加させることによって作用する有効量の薬剤を哺乳動物に投与することを含むことができる。前記哺乳動物に投与することは、前記眼に投与することを含むことができる、持続放出送達システムを用いて薬剤を投与することにより、または、薬剤を含む持続放出ペレットを眼に投与することによって行うことができる。

[0012] 前記薬剤は、nadまたはnadh、ニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドであってもよい；または、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼのようなnadを発生する酵素を提供する；ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼをコードする核酸、またはnad活性を増加させる薬剤などのnadを発生する酵素をコードする核酸を提供する。前記ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼは、NMNAT1タンパク質またはnmnat3タンパク質であることができる。

[0013] 本発明の方法の様々な実施形態では、軸索分解に関連する神経障害は、多くの神経障害のいずれであってもよい、例えば、パーキンソン病に関連する遺伝性または先天性のものである、アルツハイマー病、ヘルペス感染、糖尿病、筋萎縮性側索硬化症、脱髄性疾患、虚血または卒中、化学的傷害、熱的傷害、aidsなどに加えて、上記のような神経変性疾患、ならびに上記のサブセットだけでなく、本発明の方法により、上記の疾患を治療することもできる。このような疾患のサブセットは、パーキンソン病またはパーキンソン病を含むことができる、アルツハイマー病または非アルツハイマー病等。

[0014] 種々の実施形態において、本発明はまた、哺乳動物における神経障害を治療するためのスクリーニング剤の方法に関する。これらの方法は、神経細胞に投与することを含むことができる。Invitroまたは、生体内では、神経細胞への軸索傷害を生じさせ、損傷した神経細胞の軸索変性の減少を検出する候補剤。種々の実施形態において、本方法は、候補エージェントによって生成されたnad活性の増加をセル内で検出することと、特に神経細胞である。Nad活性の増加は、核nad活性の増加であってもよい。

[0015] ニューロン中のサーチチェーン活性を増加させる薬剤をスクリーニングするための方法、ならびにニューロン中のnad生成活性を増加させるスクリーニング剤も提供される。本方法は、哺乳動物神経細胞に投与することを含むことができる。Invitroまたは、Invivo神経細胞への軸索傷害を生じさせ、損傷した神経細胞の軸索変性の減少を検出する候補剤。このような方法は、いくつかの実施形態では、二次アッセイが、サーチチェーン活性またはnadおよび酵素またはnad生成またはサルベージ経路の成分と関連する活性をさらに描写する一次スクリーニング方法であってもよい。

[0016] 本発明のスクリーニング方法の様々な実施形態では、軸索傷害は、神経細胞を化学的に損傷させることを含む多くの方法によって製造することができる、神経細胞を熱的に損傷させ、神経細胞を酸素欠乏させ、神経細胞を物理的に損傷させることを含む。

[0017] 組換えベクターもまた、様々な実施形態において提供される。ベクターは、哺乳動物のnmnat1タンパク質またはnmnat3タンパク質をコードする配列に機能的に連結されたプロモーターを含むことができる。このような実施形態の様々な態様において、組換えベクターは、レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスであり得る。

[0018] また、種々の態様において、SIRT1タンパク質をコードする配列に機能的に連結されたプロモーターを含む組換えベクターが提供される。このような実施形態の様々な態様において、組換えベクターは、レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスであり得る。

#### 図面の簡単な説明

[0019] 図(1)は、wldのnmnat1活性を示す<sup>s</sup>融合タンパク質は、傷害された軸索の遅延した変性を生成する。

1. A)レンチウイルス感染された背根神経節(DRG)におけるインピトロの壁変性wldタンパク質またはegfpを発現する神経外植体培養物であって、チューブリンβiii-免疫反応性神経突起が、トランセクションおよびt2、(48)の前に示されている、2時間後の72時間後の72時間後(スケールバー=(1mm、)""は除去前のセル体の位置を表し、""は除去前のセル体の位置を示す。
2. Egfpのみ、wldタンパク質を発現する、レンチウイルス感染drgニューロンにおけるインピトロの壁変性、EGFP(Ufd2a(1-70)-egfp)に融合したwldタンパク質のUfd2a部分(70残基)、Ufd2a(1-70)-egfpは、c末端核局在化信号を有することを特徴とする、egfpに融合したwldタンパク質のnmnat1部分、支配的なUfd2a(Ufd2a(P1a))またはUfd2a sirna構築物の、神経突起の代表画像と、残りの神経突起数の定量分析データ(前トランパート±sdに対する残りの神経突起のパーセンテージ)を含む各構築物(左下)を有する指示された時点で表示される)が示され、""が有意差(p<0)を示す(0001)Egfp感染ニューロン；transsection確認トランセクション発現(最下行；スケールバー=50μm)の前にegfpシグナルを示す)レンチウイルス遺伝子導入によるタンパク質発現を確認するイムノプロット解析と、Ufd2aタンパク質(右下パネル)。

[0020] 図(2)は、増加したnad供給が、傷害後の軸索を変性から保護することを示している。

1. 課題を解決するための手段野生型の酵素活性と、指示されたタンパク質を発現するhek293細胞から溶解物を調製した変異型wldおよびnmnat1タンパク質を、ニコチンアミドモノヌクレオチドを基質としたnad産生についてアッセイし、1時間で発生したnadの量をnadhに変換した、蛍光強度によって定量化され、かつ、両方の突然変異体が本質的に酵素活性を有しないことを示す全タンパク質濃度に正規化されている。
2. NMNAT1またはwldタンパク質を発現するレンチウイルス感染drgニューロンにおけるインピトロの壁変性、NAD-合成活性nmnat1(W170A)およびwld(W258A)を欠くこれらのタンパク質の変異体、またはegfpであって、棒グラフは、各構築物に対する表示された時点での残りの神経突起の数の定量的分析データを示す(pre-transsection±sdに対する残りの神経突起のパーセンテージ)""は有意差(p<0)を示す(0001)Egfp感染したニューロンを有する。
3. (C)βhisタグに対する抗体を用いたイムノプロット分析によって検出されたレンチウイルス感染細胞におけるタンパク質発現。
4. D)NMNAT1またはegfpのいずれかを発現するdrg神経キソ植物(対照)0.5μmのピンクリスチンで培養され、神経突起の代表的な画像(位相-コントラスト；Bar=1mm)が示されており、指示された時点における保護効果の定量化は、処置前に神経突起によって覆われた領域に対して神経突起によって覆われた領域としてプロットされている。

[0021] 図(3)は、軸索保護が、傷害前にnadを有するニューロンの前処理を必要とすることを示している。

1. 課題を解決するための手段本発明は、A)様々な濃度のnadが、軸索の横断の前に24時間加えられ、そして、24時間前に添加される。
2. B)1mmnadと共に(4)、(8)、(12)、(24)にプレインキュベートされるdrg外植体、または48時間前に、棒グラフは、各実験における残りの神経突起の数(前横断±sdに対する残りの神経突起のパーセンテージ)を示す)の各々において、""は、対照(p<0.0001)と比較して有意な軸索保護を示す。

[0022] 図(4)は、nad依存性軸索保護がsir1活性化によって媒介されていることを示している。

1. A)1mmnad単独でプレインキュベートされたdrg外植体培養物を用いたインピトロのwalrian変性または100μmのサーティオール(sir2阻害剤)の存在下での存在下で、または100μmのサーティオール(sir2阻害剤)の存在下で、または少なくとも(1つ)のsirtinol(sir2阻害剤)または20mM3-アミノアミノミド(3AB、pparp阻害剤)または20mM3-アミノアミノミド(3AB、pparp阻害剤)。
2. (B)レスバトローレル(10)、(50)または100μmと共にインキュベートされたdrg外植体培養物を用いたインピトロのwalrian変性。
3. C)drgエキソ植物培養物を感染させたインピトロのwalrian変性を有するsir2ファミリー(SIRT1-7の各メンバーに特異的なsirnaを発現するレンチウイルス)前記棒グラフは、前記残りの神経突起の数の定量的分析(前横断±sdに対する残りの神経突起のパーセンテージ)を示す、請求項に記載の方法)各条件についての指示された時点で、""は、対照(p<0.0001)と有意に異なる点を示す。  
ミドル表：各sirnaの有効性(野生型mnaレベルの%として表される)感染nih3T3細胞におけるqrt-pcrを使用して、SIRT1に対する抗体を用いたイムノプロットで、SIRT1の発現を減少させるnad依存性軸索保護を効果的に遮断したsir1 sirnaの存在下で行う。

[0023] 図(5)は、予測された哺乳動物nad生成が、酵母および下等真核生物(略語)からの酵素発現分析および研究に基づいて示されている哺乳動物nad生成経路を示す；QPRT、キノリン酸ホスホリルトランスフェラーゼ、NaPRT、ニコチン酸ホスホリルトランスフェラーゼ、NmPRT、ニコチンアミドホスホリボ

シルトランスフェラーゼ、Nrk、ニコチンアミドリボサイドキナーゼ、NMNAT、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、QNS、nadシテターゼ)

[0024] 図(6)は、(A)nad合成酵素mnaレベルを(1)、(3)、(7)に示す哺乳動物におけるnad合成酵素の発現分析を示す、各サンプルにおけるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ発現に対して発現レベルを正規化したqrt-pcrにより、ラットdrgにおける神経転移の14日後を決定し、非軸索drgにおける発現レベルに対して指示する(B)インキュベーションdrgにより1 $\mu$ mまたは0.1 $\mu$ mのrotenoneに示された時間で導入された神経突起変性、および(B)nad合成酵素mnaレベルは、本文に記載されるようにqrt-pcrによって決定された

[0025] 図(7)は、nmna酵素の細胞内局在化と、それらの軸索を保護する能力とを示している(A)NMNAT1を発現するレンチウイルス感染drg神経工キソ植物培養物を用いたインビトロ壁紙変性アッセイ、取引後12時間及び72時間で撮影された代表画像が表示されているcymnmat1、NMNAT3、またはnunmna3と、(B)NMNAT1の細胞下局在化、セルnmnaat1、NMNAT3に免疫組織化学を用いたhek293細胞中のnunmna3または6xhisタグに対する抗体との免疫組織化学を用いて、各タンパク質を検出し、核マーカー色素(ビスベンズイミド)を用いて細胞の染色を検出する)を比較して、各タンパク質の核対細胞質位置を決定する(スケールバー=25 $\mu$ m))と、(C)野生型の酵素活性と、6xhrがタグ付けされた変異型nmna1とnmna3とを含むそれぞれNMNAT1を発現するhek293細胞のライセートから、細胞外at1、NMNAT3を発現するタンパク質を精製した、37°Cで1時間後に発生したnadの量がnahdに変換されたnunmna3、定量化され、タンパク質濃度に正規化され、(D)NMNAT1、cymnmat1、NMNAT3のタンパク質発現、各ウイルスに感染したhek293細胞のイムノブロット解析により確認されたレンチウイルス遺伝子導入によるnunmna3と、(E)NMNAT1を発現する、レンチウイルス感染drg神経工キソ植物培養物を用いたインビトロwalrian変性アッセイである(12)、(24)、(48)、72時間後の残りの神経突起数の定量分析データを示すnunmna3、または、軸索切断後72時間後の残存数の定量分析データを示す

[0026] 図(8)は、nad合成基材の外的な適用と、軸索を保護する能力とを示す(A)(12)で撮影された代表画像を有するnad、nmrを外因的に適用した後drgニューロン外植物培養物を使用するインビトロwalrian変性アッセイである、(24)、(48)、72時間後に表示され、(B)Nam、Nam、NaMN、NMN、NaAD、nadを外因的に適用した後drg神経外植物培養物を用いたインビトロwalrian変性アッセイ、及びnmrは、(12)における残りの神経突起番号の定量分析データを示す、(24)、(48)、および72時間後に示されている(C)nat発現レンチウイルスを感染させたdrg神経外植片であって、ax切断前24時間、1mm以上のnaと共にインキュベートされたdrg神経外植片、(12)における残りの神経突起番号の定量的な分析データを示すインビトロ壁紙変性アッセイである、(24)、(48)、72時間後に撮影することを特徴とする

[0027] 図(9)は、nad合成基質nad、NMN、nmrの硝子体内注射後の視神経横断面を示す、またはnamを左ラット眼の硝子体内に注射し、その後24時間網膜神経節細胞を組み込むことを可能とした左視神経を眼核で横分けし、横断後4日後に左右の視神経を採取し、軸索切断前に何ら処置なしにマウスから横切開した視神経をネガティブコントロールに用いたウェスタンブロットリングにより分析した;に示すように、非横断的なesdに対する横断的な視神経からの残りの神経フィラメントの免疫反応性のパーセンテージの定量的分析データ

#### 詳細な説明

[0028] 本発明は、神経障害を治療するための方法および組成物を含む。本方法は、罹患したおよび/または傷害されたニューロンにおけるnad活性を増加させる有効な物質を哺乳動物に投与することを含むことができる。増加したnad活性はサーチェイン活性を増加させるように作用し得、これにより、エージェントで処理されていない損傷神経細胞に生じる軸索変性と比較して、損傷した神経細胞の軸索変性の減少が生じると考えられる。このような軸索変性の減少は、ニューロンに対する傷害の完全または部分的な改善を含むことができる。また、nad活性の増加は、サーチェイン分子を含まない他のメカニズムを介して作用して、軸索変性の減少の産生に寄与し得るか、または貢献することも可能であると考えられる

[0029] Sirtとして参照される7個の既知のサーチェイン分子は、哺乳動物におけるヒストン/タンパク質デアセチラーゼのsir2ファミリーを構成し、そのようなサーチェイン分子はすべて、本発明の範囲内に含まれる。7人のヒトサーチェイン、SIRT1-SIRT7、nblouslinkidno(23411)に関連して十分に記載されているnad依存性ヒストン/タンパク質デアセチラーゼである、(23408、23408)、(51548)、51547(<http://www.ncbi.nlm.nih>を参照) Govlouslink/)前記ncbiリンク参照サイトは、参照により本明細書に組み込まれる。様々な実施形態において、本発明の方法および組成物は、サーチェインのいずれかまたは複数の活性を増加させることができ、特に、本発明の種々の方法は、SIRT1の活性を高める

[0030] 物質の活性により、特定の物質の濃度または物質の機能的有効性のいずれかを参照する。物質の濃度は、例えば、合成を増加させ、破壊を減少させることを含む多くの要因によって増加させることができる。物質の生物学的利用能を高めたり、物質の結合を減少させたり、あるいは使用可能な量の自由物質を増加させることができる。機能的有効性を高めることは、例えば、分子形態の変化から得ることができる。物質が作用している状態の変化、物質に対する感受性の変化等を検出することができる。サーチェイン分子に対する活性を増加させることは、濃度の増加を意味すること、または機能的有効性を高めること、または(nadの利用可能性を増加させること、またはnadまたはnadのための1つ以上の合成経路を通る流れを増加させることを意図している これらの任意の組み合わせ

[0031] 神経障害は、例えば、神経膠のようなニューロンおよび/または支持細胞を含む任意の疾患または状態を含むことができる、筋細胞、線維芽細胞等、特に軸索の損傷を伴う疾患または状態を検出することができる。軸索損傷は、外傷性傷害または疾患または状態による非機械的損傷によって引き起こされ得、そのような損傷の結果は、軸索の変性または機能不全または機能性神経活動の喪失であり得る。このような軸索損傷に関連する疾患および状態は、多数の神経障害性疾患および状態の中にある。このような神経障害は、末梢神経障害、中枢神経障害、およびそれらの組み合わせを含むことができる。さらに、末梢神経障害症状は、中枢神経系に主に焦点を合わせた疾患によって生成することができる。例えば、中枢神経系の発現は、本発明に末梢または全身的な疾患によって生じることができる

[0032] 末梢神経障害は末梢神経の損傷を含み、これは神経の疾患または全身性疾患の結果によって引き起こされ得る。このような疾患のいくつかは、糖尿病、尿毒症、aidsまたはレブシエのような感染性疾患、栄養欠乏症を含むことができる。アテローム性動脈硬化症のような血管またはコラーゲン疾患、および全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患、強皮症、サルコイドーシス、関節リウマチ、及び多発性動脈炎末梢神経変性はまた、外傷性、すなわち神経への機械的損傷、ならびに神経に対する化学的または熱的損傷から生じる可能性がある。末梢神経を損傷するこのような状態は、緑内障、手根管症候群、直接的な外傷のような圧縮または捕捉の損傷を含む、骨折、骨折、またはずれた骨、表面神経(una、放射状)の長期間の使用や、長期間の位置に滞在することが可能な、または腫瘍からの持続時間の経過に起因することが可能な、または、パーワン(perneal)を提供する;鼻内出血;虚血;冷たは放射線または特定の薬剤または有害物質、例えば、エルミートまたは農業の暴露。特に、神経損傷は、細胞毒性抗癌剤による化学的損傷から生じる可能性がある。例えば、ビンクリスチンなどのビンカルカロイド。このような末梢神経障害の典型的な症状としては、脆弱性、麻痺、知覚過敏(燃焼のような異常な感覚)が挙げられる。腕、手、脚及び又は足の痛みを軽減する。神経障害はまた、ミトコンドリア機能障害に関連付けることができる。このような神経障害は、減少したエネルギーレベル、すなわち、減少したレベルのnadおよびatpを示すことができる

[0033] 末梢神経障害はまた、代謝および内分泌神経障害であってもよく、これは、代謝起源の全身性疾患に関連する広範囲の末梢神経疾患を含む。これらの疾患としては、例えば、糖尿病、低血糖、尿毒症、甲状腺機能低下、肝障害等が挙げられる。多糖質、アミロイドーシス、アクトガニン、ポリフィリリア、脂質/糖質代謝障害、栄養。ビタミン欠損症、およびミトコンドリア障害のうちの少なくとも(1つ)を含む。これらの疾患の共通の特徴は、代謝経路障害によるミエリンおよび軸索の構造または機能の変化による末梢神経の関与である

[0034] 神経障害はまた、緑内障のような視神経障害、網膜色素および網膜神経障害に関連するもののような網膜神経節変性を含む;多発性硬化症に関連するものを含む視神経神経炎および/または変性;例えば腫瘍除去中の傷害を含むことができる視神経への外傷性傷害; kjer病およびleberの遺伝性視神経障害のような遺伝性光学神経障害; 巨大細胞動脈炎に二次的なものなどの虚血性視神経障害; 前述したleberの神経障害を含む神経変性疾患のような代謝性神経障害、ビタミンb12や葉酸の欠損やエタポロールやシアン化物等の毒性等の栄養欠陥; 副作用による神経障害、及び、ビタミン欠損による神経障害 虚血性視神経障害はまた、非動脈性の前虚血性視神経障害を含む

[0035] 中枢神経系における神経障害または軸索障害に関連する神経変性疾患は、種々の疾患を含む。このような疾患としては、例えば、進行性筋萎縮を含むものが挙げられる、アルツハイマー病、老人性痴呆、ヒック病、及びハンチントン病; 例えばパーキンソン病のような筋肉機能に影響を及ぼす中枢神経系疾患、運動ニューロン疾患および筋萎縮性側索硬化症のような進行性失調症; 例えば多発性硬化症のような脱髄性疾患; ウイルス性脳炎、例えば、エンテロウイルス、カルボウイルス、および単純ヘルペスウイルスによって引き起こされるウイルス、ならびにプリオン病。また、緑内障や外傷のような機械的な損傷は、脳および脊髄における神経の損傷や変性を引き起こす可能性もある。に加えて、虚血および脳卒中ならびに栄養欠乏症および神経疾患などの症状を含む化学療法剤などの化学毒性は中枢神経系神経障害を引き起こす可能性がある

[0036] 本明細書で使用される“治療”という用語は、神経損傷の発生の前または後のいずれかを含むことを意図される。このように、治療は、一次傷害前の投与に

よる神経障害を防止することができるニューロンへの一次傷害後の投与による神経損傷を改善することができる。ニューロンへのこのような一次傷害は、神経障害に関連する任意の疾患または状態を含み得るか、またはその結果を含むことができる"治療"はまた、神経障害の進行を防止することを含む。本明細書で使用される"治療"は、薬物および/または合成物質の投与を含むことができる、タンパク質、核酸などの生物学的物質の投与、ウイルス性ベクター等、ならびに、好中球、食品添加物、または機能性食品などの物質の投与

[0037] 本発明の方法および組成物は、哺乳動物の治療に有用である。このような哺乳動物は、ヒトならびに非ヒト哺乳動物を含む。非ヒト哺乳動物は、例えば、イヌおよびネコなどのコンパニオン動物を含む、牛、ウマ等の生きている動物、動物等の動物に投与する

[0038] 哺乳動物におけるサーチェン活性を増加させることができる物質は、その一部が先に説明されたポリフェノールを含むことができる(例えば、[Howitz et al., Nature 425:191-196, 2003](#) 前記用紙に付随する付帯情報を参照して、前記用紙に付随する付帯情報を取得することとを特徴とする)このような化合物としては、レスベラトロール、ピセトナール、デオキシハブテンなどのスチルベン類を挙げることができ、トランス-スチルベン、ラプトンチン、パテン、イソピキリチゲン、3、3、2等のカルコンを挙げることができる、4'、6'-ペンタヒドロキシカルコン、カルコン等のフラボン、フィセクチン等のフラボン、5'-ペンタヒドロキシフラボン、黄体、3、6、3'、5'-ペンタヒドロキシフラボン、黄体、3、6、3'、5'-ペンタヒドロキシフラボン、黄体、3、6、3'、5'-ペンタヒドロキシフラボン、4'-テトラヒドロキシフラボン、ケルセチン、7、3'、4'、5'-テトラヒドロキシフラボン、カイフェロール、6-ヒドロキシアピゲニン、アピゲニン、3、6、2'、4'-テトラヒドロキシフラボン、7、4'-ジヒドロキシフラボン、7、8、3'、4'-テトラヒドロキシフラボン、3、6、2'、3'-テトラヒドロキシフラボン、4'-ジヒドロキシフラボン、5、7-ジヒドロキシフラボン、4'-ヒドロキシフラボン、5、4'-ジヒドロキシフラボン、5、7-ジヒドロキシフラボン、モルイン、フラボン、5-ヒドロキシフラボン、ダイゼイン、ゲニステイン等のイソフラボン類、ナリンゲニン等のフラボン類、3、5、7、3'、4'-ペンタヒドロキシフラボン、およびフラボンまたはカテキン類、例えば(-)-エピカテキン、(-)-カテキン、(-)-カテキン、(+)-カテキン、(+)-エピカテキン

[0039] 追加のポリフェノールまたはサーチェン。デアセチラーゼ活性を増加させる他の物質は、本明細書に記載のアッセイシステムならびに蛍光酵素アッセイ(biomolinternational)のような市販のアッセイを使用して同定することができる、シンクロエア等はまた、サーチェン活動を増加させることができる物質を開示している([Sindair et al., WO2005/02672](#) その全体が参考として援用される)

[0040] 種々の実施形態において、他の物質は、nad活性を増加させることにより、サーチェン活性を間接的に増加させることができるnad依存性ヒストンタンパク質デアセチラーゼ活性を介して機能する特定のサーチェンの結果。Nadまたはnadhの投与とnadを合成することによりnad活性を高めることができる。(3つの主要な経路を介してnadを合成することができる *Denovo* Nadがトリプトファンから合成される経路、本発明に係るnadサルベージ経路は、ニコチンアミド等の変化したnad生成物をリサイクルしてnadを生成するnadサルベージ経路であって、[Lin et al. Current Opin. Cell Biol. 15:241-246, 2003](#); [Magni et al., Cell Mol. Life Sci. 61:19-34, 2004](#))と、ニコチンアミドリボシドがニコチンアミドリボシドキナーゼ([Bieganowski et al., Cell 117:495-502, 2004](#)の前駆体を損傷したニューロンに投与することにより、*Denovo* 例えば、トリプトファンまたはニコチン酸塩などの経路、およびまたは、nadサルベージ経路の中の物質を含む、例えば、ニコチンアミド、ニコチン酸、ニコチン酸モノヌクレオチド、または脱アミド-nadおよびまたはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路中の物質を含む、例えば、ニコチンアミドリボシドまたはニコチンアミドモノヌクレオチドは、潜在的にnad活性を増加させることができる以下に示すように、nadに加えて、ニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドを含む、ニコチン酸およびニコチンアミドと同様の程度に軸索変性に対して保護されていたが、ニコチン酸およびニコチンアミドは存在しなかった。増加したnad活性は、次いで、損傷したニューロンにおけるサーチェンヒストンタンパク質デアセチラーゼ活性を増加させ、軸索変性を減少または防止することができる 加えて、他の物質は、酵素活性を増加させることにより、またはnad、ニコチンアミドモノヌクレオチドのレベルを増加させることによって作用することができると考えられる、ニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチンアミドリボシドまたはサーチェン酵素、またはnadの還元性を減少させることによる、ニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチンアミドリボシドまたはサーチェン酵素

[0041] 種々の態様において、nadを合成する酵素を含むnadまたは核酸を合成する酵素を投与することにより、損傷したニューロンにおいてnadを増加させることができる。このような酵素は、酵素を含むことができる *Denovo* Nadを合成するための経路、nadサルベージ経路の酵素、または、前記ニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素または前記酵素をコードする核酸を、前記酵素をコードする核酸と反応させることにより、*Denovo* Nadを合成するための経路、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素、特に、例えばnmnat1のようなニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ(NMNAT)などのnadサルベージ経路の酵素したがって、(1つ)の非限定的な例では、NMNAT1またはnmnat3または核酸のようなnmnatの投与NMNAT1またはnmnat3のようなnmnatをコードする配列を含むことにより、損傷したニューロンにおける軸索変性を低減または防止することができる

[0042] ヒトnmnat1酵素(E. C. (2.7.7.18)は、ヒトnmnat1遺伝子およびまたはタンパク質についてのgenbank評価番号に従って表される: NP\_073624; NM\_022787; AAL76934; AF459819; およびnp\_073624; AF314163。この遺伝子の変異体はnmnat-2(KIAA0479)である)であり、そのヒトのバージョンは、genbank受託番号np\_055854およびnm\_015039で見出されることができる

[0043] 本明細書で使用される場合、用語"パーセント同一"または"パーセント同一性"または"%"(2つ)のアミノ酸配列間または(2つ)のヌクレオチド配列間の配列同一性をいう。同一性は、比較のために位置合わせされ得る各シーケンスにおける位置を比較することによってそれぞれ決定することができる 前記比較された配列中の等価位置が同一の塩基またはアミノ酸によって占有されている場合には、前記比較配列中の等価位置が同一の塩基またはアミノ酸によって占有されている場合には、分子はその位置で同一である; 同一または類似のアミノ酸残基(例えば、立体および/または電子的性質に類似するが占有する等価部位が存在する場合には、同一または類似のアミノ酸残基で占められている等価部位(例えば、立体的および/または電子的性質が類似している))、分子をその位置で相同(類似)と呼ぶことができる 相同性の百分率としての表現、同一または類似のアミノ酸の回数、比較された配列によって共有される位置をいう。FASTA、BLAST、またはentrezを含む、様々な位置合わせアルゴリズムおよびまたはプログラムを使用することができる。Fastaおよびblastは、gcgsequenceanalysispackage(universityofwisconsin, Madison, wi)の一部として利用可能である)であってもよく、例えば、デフォルト設定と共に使用することができる [ENTREZ is available through the National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md](#)—実施形態では、(2つ)のシーケンスのパーセント同一性を決定することができることにより、(1)のギャップ重みを有するgcgプログラム、各アミノ酸ギャップは、(2つ)の配列間の単一のアミノ酸またはヌクレオチドミスマッチであったかのように重み付けされる。位置合わせのための他の技術が説明される [Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis \(1996\), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USA](#)好ましくは、シーケンス内のギャップを許容する位置合わせプログラムを利用して、シーケンスを整列させる。Smith-watermanは、一種類のアルゴリズムであるシーケンス整列におけるギャップを可能にする。を参照されたい [Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 \(1997\)](#) また、needlemanおよびwunschアライメント法を用いたgapプログラムを利用して、シーケンスを整列させることができる。代替的な検索戦略は、mpsrchソフトウェアを使用し、このmpsrchソフトウェアは、masparコンピュータ上で実行される。Mpsrchは、Smith-watermanアルゴリズムを用いて、超並列コンピュータ上のシーケンスをスコア付けする。このアプローチは、速くに関連するマッチをピックアップする能力を改善し、特に小さなギャップおよびヌクレオチド配列エラーに対して耐性がある核酸コード化アミノ酸配列を用いて、タンパク質およびdnaデータベースの両方を検索することができる。個々の配列を有するデータベースは、methodsinenzymology、eddoollittle、前出に記載されている。データベースは、日本(DDBJ)のgenbank、EMBL、およびdnaデータベースを含む

[0044] ポリペプチドの"変異体"は、1以上のアミノ酸残基で変化するポリペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。この変異は、"保存的な"変化を有することができる、置換されたアミノ酸は類似の構造的または化学的性質(例えば、ロイシンとイソロイシンとの置換)を有する)変異体は、"非保存的"変化(例えば、グリシンとトリプトファンとの置換)を有することができる 類似の小変動はまた、アミノ酸の欠失または挿入、またはその両方を含むことができる。どのアミノ酸残基が置換されていてもよいかを決定するためのガイダンス、当該技術分野で周知のコンピュータプログラムを使用して、生物学的または免疫学的活性を損なうことなく欠失させることができる、例えば、lasergeneソフトウェア(DNASTAR)

[0045] 用語"変異体"は、ポリヌクレオチド配列の文脈で使用される、特定の遺伝子またはそのコーディング配列に関連するポリヌクレオチド配列を含むことができる。この定義は、例えば、"対立遺伝子"を含むこともできる、"スプライス"、"種"、または"多形"変異体 スプライス変異体は、基準分子に対して有意な同一性を有することができる、mna処理中にエクソンを交互にスプライシングすること起因して、一般的に、より多いまたは少ない数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、付加的な機能ドメインまたはドメインの非存在を有することができる。種変異体は、(1つ)の種から別の種に変化するポリヌクレオチド配列である 得られたポリペプチドは、一般に、互いに有意なアミノ酸同一性を有する。多形変動は、所与の種の個体間の特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列の変化である。多型変異体はまた、ポリヌクレオチド配列が(1つ)の塩基によって変化する"塩基多型"(snp)を包含し得る Snpの存在は、例えば、を示すことができる、特定の集団、疾患状態、または疾患状態の傾向を示す

[0046] 本発明の方法および組成物に従って神経障害を治療または予防するのに使用することができる薬剤は、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ(NMNAT)によって構成することができる)nmnatをコードするポリヌクレオチド 特に、前記薬剤は、nmnat活性を有する酵素であってもよく、少なくとも50%であってよいヒトnmnat3との同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも50%の同一性を有する、ヒトnmnat3と少なくとも60%の同一性、またはヒト

nmnat3との少なくとも60%の同一性を有する、ヒトnmnat3との少なくとも(1つ)の同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも70%の同一性を有する、ヒトnmnat3との少なくとも80%の同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも80%の同一性を有する、ヒトnmnat1と少なくとも90%の同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも90%の同一性を有する、ヒトnmnat3と少なくとも95%の同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも95%の同一性を有する。さらに、前記薬剤は、ヒトnmnat1、ヒトnmnat3またはそれらの保存的に置換された変異体から構成することができる

[0047] 本発明の薬剤は、ヒトnmnat1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチド、またはヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチドとの少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチドによって構成することもできる、ヒトnmnat1をコードする核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチド、または少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドと、少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドと、ヒトnmnat3をコードする核酸、核酸のコード化と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチドヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するヒトnmnat1またはポリヌクレオチド、ヒトnmnat1をコードする核酸と少なくとも80%の同一性を有するポリヌクレオチド、または、ヒトnmnat1をコードする核酸と少なくとも80%の同一性を有するヒトnmnat3をコードする核酸との少なくとも80%の同一性、少なくとも90%を有するポリヌクレオチド、少なくとも90% ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも90%の同一性を有するポリヌクレオチドをコードする核酸との同一性、ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド、またはヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドとの少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド。本発明の薬剤は、ヒトnmnat1、ヒトnmnat3またはそれらの変異体をコードするポリヌクレオチドであってもよい

[0048] この薬剤は、サーチュインポリペプチドまたはサーチュインポリペプチドをコードする核酸によっても構成することができる。特に、前記薬剤は、sirt活性を有し、ヒトsirt1と少なくとも50%の同一性を有する酵素を含むことができる、ヒトsirt1と少なくとも60%の同一性を有する、ヒトsirt1と少なくとも70%の同一性を有し、ヒトsirt1と少なくとも80%の同一性を有する、ヒトsirt1と少なくとも90%の同一性、またはヒトsirt1と少なくとも95%の同一性を有する。さらに、本発明の薬剤は、ヒトsirt1またはその保存的に置換された変異体から構成することができる。該薬剤はまた、ヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチドによって構成することもできる、ヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチド、ヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチド、ヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも80%の同一性を有するポリヌクレオチド、ヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも90%の同一性を有するポリヌクレオチド、またはヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。さらに、前記薬剤は、ヒトsirt1またはその変異体をコードするポリヌクレオチドを含むことができる

[0049] 投与は、口腔、歯科、心内頸部、筋肉内を含む任意の適切な投与経路によって行うことができる。静脈内、眼内、腹腔内、胸腔内、クモ膜内、気管内、気管内、脳内、内腔、内腔、内腔、内腔、子宮内、血管内、静脈内、膀胱内、鼻内、眼科、経口、耳、胆管灌流を含むことを特徴とする、経皮、舌下、局所、膈内、経皮、経皮、経皮、経皮、経皮、経皮、経皮、経皮、経皮、経皮、経皮、経皮、尿管、尿道。剤形は、計量されたエアゾール、チュアブル錠、カプセルを含むエアゾールであってもよい、被覆ベレットを含有するカプセル、遅延放出ベレットを含有するカプセル、延長放出ベレットを含有するカプセル、濃縮物、クリーム、増強クリーム、坐剤クリーム、ディスク、ドレッシング、elisa、エマルジョン、洗腸、拡張離型繊維、拡張離型フィルム、ガス、ゲル、計量ゲル、顆粒、遅延放出顆粒、発泡性顆粒、チューインガム、インプラント、吸入剤、注射可能な、注射可能な脂質複合体、注射可能なリポソーム、挿入物、拡張放出インサート、子宮内装置、ゼリー、液体、徐放性液体、ローション、増強ローション、シャンプーローション、油、軟膏、増強軟膏、ペースト、ベレット、粉体、延長放出粉、計量粉、リング、シャンプー、石鹸液、スラッシュ用溶液、溶液/液滴、濃縮液、ゲル形成液/液滴、スポンジ、スプレー、計量スプレー、坐剤、懸濁液、懸濁液/液滴、延長放出懸濁液、綿棒、シロップ、錠剤、チュアブル錠、被覆粒子を含有する錠剤、遅延放出錠剤、分散性錠剤、発泡性錠剤、拡張放出錠剤、口腔内崩壊性錠剤、タンポン、テープ又はトローチ

[0050] 眼内投与は、眼内注射を含む注射による投与、点眼および経皮送達による投与を含むことができる

[0051] 投与はまた、ヒトまたはコバニオン動物の機能性食品中のような哺乳動物の食餌中に含めることによって行うことができる

[0052] サーチュイン活性を増加させる組成物を含有する特定の製剤を経口投与することも企図される。このような製剤は、好ましくはカプセル化され、固体剤形で適切な担体で処方される適切な担体、賦形剤および希釈剤のいくつかの例は、ラクトース、デキストロース、スクロースを含む、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、珪酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、メチルおよびプロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、マグネシウム、ステアレート、水、鉱油等が挙げられる配合物は、さらに、潤滑剤、湿潤剤、乳化および懸濁剤、保存剤、甘味剤または香料を含むことができる。本発明の組成物は、迅速な持続性を提供するように配合することができる、当該技術分野で周知の手順を採用することにより、患者への投与後の活性成分の放出を遅延させることができる。製剤はまた、タンパク質分解を減少させ、例えば界面活性剤のような吸収を促進する物質を含むことができる

[0053] 特定線量は、患者のおおよその体重または体表面積、または占有される身体空間の体積に応じて算出することができる。用量は、選択された特定の投与経路にも依存する。治療のための適切な投与量を決定するために必要な計算のさらなる改良は、当業者によって日常的に行われるこのような計算は、ある種の化合物について記載されているようなアッセイ調製物における活性に照らして当業者によって過度の実験を行わずに行うことができる例えば、[Howitz et al., Nature 425:191-196, 2003](#) 標準的な線量-応答の研究に関連して、正確な投薬量を伴う補助的な情報を決定することができる。実際に投与される組成物の量は、医師によって決定されることが理解されるであろう、処理対象となる条件や条件を含む関連状況の光に含まれる、投与される組成物の選択、年齢、体重、および個々の患者の応答、患者の症状の重篤度、および選択された投与経路

[0054] 様々な実施形態において、本発明はまた、候補エージェントをスクリーニングする方法を提供する。(1つ)のそのようなアッセイ法において、傷害された神経細胞の軸索変性を減少または防止する有効性について、薬剤を試験する。このようにして、傷害を受けた神経細胞に候補薬剤を投与し、損傷した神経細胞の軸索変性の減少を検出する典型的には、薬剤は、損傷を生成する前に添加されるが、いくつかの例では、候補化合物を添加する前に、傷害を発生させることができる。本方法は、実施されているようなアッセイ調製物における活性に照らして当業者によって過度の実験を行わずに行うことができる。いくつかの哺乳動物神経細胞のいずれかを用いて試験を実施することができる。使用可能な哺乳動物神経細胞型の例は、一次後根神経節細胞であることにより、神経細胞体または神経細胞体の除去のいずれかを行うことを特徴とする神経細胞体の製造方法以下に記載するようなピンクリスチンを含む培地中の増殖。[解決手段] *In vivo* 試験は、例えば末梢神経再生(*m*)のマウスモデル)のようなインタクトな動物において実施することができる [Pan et al., J. Neurosci. 23:11479-11488, 2003](#))または進行性運動神経障害のマウスモデル(*Schmalbruch et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 50:192-204, 1991*; [Ferri et al., Current Biol. 13:669-673, 2003](#))

[0055] これは、神経損傷の減少または予防のメカニズムが、サーチュイン分子のnad依存性ヒストン/タンパク質デアセチラーゼ活性の増加、このアッセイ法は、サーチュイン活性を直接的に増加させるか、またはnad活性を増加させるかのいずれかである物質のための一次スクリーンとしても使用することができる。このようにして、上記方法を使用して、nad生合成活性を阻害する薬剤、またはニューロン中のサーチュイン活性を増加させる薬剤をスクリーニングすることができる

[0056] サーチュイン分子をコードする核酸またはnadの生合成のための酵素の担体として働く組換えベクターもまた、本発明の範囲内である。このような組換えベクターは、哺乳動物のnmnat1タンパク質またはsirt1タンパク質のような哺乳動物のサーチュインタンパク質をコードする配列に機能的に連結されたプロモーターを含むことができる。このような組換えベクターは、例えばレンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスなどの任意の適切なベクターであり得る。任意の適切なプロモーター、例えばユビキチンプロモーターを使用することもできる、cmvプロモーターまたはβ-アクチンプロモーター

[0057] 本発明は、以下の実施例を参照することによってさらに理解することができる

#### 実施例(1)

[0058] 本実施例では、widを表すベクトルを用いて、ニューロンからの横方向の軸索が進行することを示している<sup>°</sup>タンパク質は、コントロールニューロンと比較して、遅延した変性を示す

[0059] [解決手段] *Wid* マウスは、軸索傷害に応答したwairian縮退が、遅延されていることが示されている([Gillingwater, et al., JPhysiol, 534:627-639, 2001](#))遺伝子解析は、*Wid* 突然変異は、(85kb)のタンデムトリプレックスを含み、これはキメラ核分子(*Wid*)の過剰発現をもたらす<sup>°</sup>タンパク質)このタンパク質は、Ufd(ユビキチン融合分解タンパク質のn末端(70aa)から構成される)(2a)と、ユビキチンチェーン集合因子、の完全な配列に融合している)と、前記核内にnadを発生させるnadサルベージ経路中の酵素と、を含むことを特徴とする。*Wid*<sup>°</sup>タンパク質はnmna活性を有するが、ユビキチンリガーゼ機能を欠いている、軸索保護が、Ufd2a機能の増加されたnmnat1活性または支配的なネガティブ阻害のいずれかから誘導されることを示唆する

[0060] Wldによって媒介される遅延された軸索変性のメカニズムを識別する<sup>9</sup>本発明者らは、*In vitro* ウォールエリス変性モデル。適切なタンパク質を発現するレンチウイルスに、一次drg外植ニューロンを感染させた、および軸索は、神経細胞体の除去またはピンクリスチン(毒性)の成長のいずれかによって損傷した

[0061] [解決手段]Lois, et al., *Science* 295:868-72, 2002、Fugwベクターを改変して、目的-IRES-増強yfp(Venus)の一般発現シャトルfuiiv(ユビキチンプロモーター遺伝子)を生成させる)対象遺伝子を発現する細胞におけるyfp発現を向上させることができるベクター。C末端にヘキサヒスチジンタグを有する以下のタンパク質をfuiivベクター:wldにクローニングした<sup>9</sup>点突然変異を含むキメラ突然変異タンパク質;Ufd2a)は、野生型ufd2a機能を"支配的陰性"(Ufd2a(P)として阻害することが以前に示されている1140))以下の遺伝子をfugwベクターにクローニングした(1)Ufd2aの最初の70%(wldに含まれる部分)<sup>9</sup>EGFP(Ufd2a(1-70)-egfp)のn末端に融合したタンパク質)C-末端(Ufd2a(1-70)-nuegfp)(2)における核局在化シグナルを有するegfpと、wldのnmnat1部分とを含む<sup>9</sup>EGFP(EGFP-NMNAT1)のc末端に融合したタンパク質

[0062] Ufd2a/Ube4b(mKIAA0684)のマウスcdnaは、カザスdna研究機関により提供された。NMNAT1のマウスcdna(受託番号:BC038133)atccから購入した。Por媒介突然変異誘発を用いて、Ufd2a、NMNAT1およびwldにおける点突然変異を生成した<sup>9</sup>。

[0063] 本発明者らは、ヒトu6プロモーターおよびpoli終結シグナルで、続いてsv40プロモーター-ピューロマイシン-N-アセチル-トランスフェラーゼ遺伝子により、ユビキチンプロモーターおよびgfpcdnaを置換することにより、fugw主鎖から生成されたfsp-siベクター中にsima構築物を生成した。Sima構築物のクローニングは、前述したように実施され、それにより、simaがu6プロモーター()Castanotto, et al., *RNA*, 8:1454-60, 2002タンパク質発現のsimaダウンレギュレーションに使用される配列は、SIRT1の1692-1710であった、SIRT2の(103-1050)、SIRT4のsirt3、(12121-1249)の-556、SIRT5の(37-55)、SIRT6の(1390-1408)、SIRT7の(450-468)を含む。各レンチウイルス発現およびsima構築物の完全性は、dna配列決定によって確認された

[0064] E12.5胚からのマウスdrg外植片を、(1nM)の神経成長因子の存在下で培養した。5-フルオロウラシルを培地に添加することにより、非神経細胞を培養物から除去した。神経細胞体を除去するために18ゲージの針を用いて10-20divで神経突起の横断を行った。B-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(Sigma)またはサータニール(Calbiochem)とのインキュベーションは、テキストまたは図形に示される条件を用いて行われた

[0065] 上記のようにhek293細胞を用いてレンチウイルス発現ベクターを作製した。レンチウイルス由来のタンパク質発現を確認するために、HEK293細胞をレンチウイルスに感染させ、感染後3日間細胞を溶解させた。これらの溶解物を、抗hisタグモノクローナル抗体(qiagen)を使用する免疫プロットにより分析した)各ヘキサヒスチジンタグ付きタンパク質の発現を検出する。Drgニューロンのレンチウイルス感染は、-10をインキュベートすることによって行った<sup>9</sup>-10<sup>7</sup>軸索横断の3-7日前に、24時間のdrgexplantを有するpfu/mlウイルス。感染したニューロンを倒立蛍光顕微鏡で検査して、検出可能なレンチウイルス介在トランスジーン発現を、ニューロンの>95%で確実にした

[0066] 軸索変性の定量分析は、先に説明したように行った(実施例(1)Zhai, et al., *Neuron* 39:217-25, 2003簡単に言えば、培養物は、指示された時間に位相差顕微鏡を用いて検査された。断片化された、非屈折性の外観を有する軸索は、"縮退"として指定された。各時点で、少なくとも200個の単独で識別可能な軸索は、各培養物のいくつかのランダムに撮影された画像から盲目的にスコアされた。各実験において、各条件を3回の外植片で試験した。各条件について2-4個の独立した実験から結果を得た統計的解析は、生徒の検定によって行われた。神経突起被覆領域の計算のための方法。(2つ)の独立した実験の4重サンプルからのデジタル的に捕捉された画像を、分析3.1ソフトウェア(ソフタイムイメージング。システム、ラケウッド、CO)を用いて分析した

[0067] 本発明者らは、wldを表すニューロンからの横方向の軸索を発見した<sup>9</sup>本発明は、神経細胞の遅延動態特性に起因するタンパク質の変性を抑制することを目的とするWld(Buckmaster, et al., *Eur J Neurosci* 7:1596-602,1995図(1A)に示すようなマウス

[0068] 次に、本発明者らは、wldを過剰発現するニューロンにおけるトランセクション後の軸索変性を比較した<sup>9</sup>Wldを構成するufd2aまたはnmnat1部分を発現するものを有するタンパク質<sup>9</sup>Egfpに連結されたタンパク質。結果を図(1B)に示す

[0069] 本発明者らは、wldに匹敵する、EGFP-NMNAT1遅延軸索変性の発現を見出した<sup>9</sup>タンパク質自体は、Ufd2a(egfpと融合した)のn末端(70AAを有する)は、核または細胞質に標的化され、軸索変性に影響を及ぼさなかった。これらの効果の定量は、神経細胞体を除去した後の種々の時間における残りの神経突起のパーセンテージを計数することによって行った。この解析は、wldと同様に、EGFP-NMNAT1が存在することを示した<sup>9</sup>タンパク質自体は、損傷後72時間後に無傷の神経節において>10倍の増加をもたらした。Wldにおけるupsの直接的な関与をさらに排除する<sup>9</sup>本発明者らは、タンパク質介在性軸索保護を用いて、Ufd2a阻害の効果を検出したドミナントネガティブufd2a突然変異体またはufd2asima構築物のいずれかである。しかしながら、これらの方法のいずれも、軸索切断に反応して軸索の遅延を遅延させなかった。これらの実験では、wldのnmnat1部分が一緒になっていることが実証された<sup>9</sup>タンパク質は、遅延された軸索変性が観察されることに関与するWldマウス

#### 実施例(2)

[0070] この例では、全長nmnat1およびwldにおける突然変異が示されている<sup>9</sup>タンパク質の軸索保護効果を阻害するタンパク質

[0071] NMNAT1は、ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)の変換を触媒する核ナドサルベージ経路中の酵素である)ニコチン酸モノヌクレオチド(nan)をnadに、ニコチン酸アデニンモノヌクレオチド(NaAD)をそれぞれ合成することを特徴とする。Nmat1過剰発現ニューロンにおいて観察される軸索保護は、NAD(すなわち、その酵素活性)を合成する能力によって媒介され得る)、または、おそらく、このタンパク質の他の未知の機能によって、他の未知の機能を提供することができるこの問題に対処するために、本発明者らは、NMNAT1結晶構造を用いて、基質結合に関与すると予測されるいくつかの残基を同定した。これらの残基(W170A)のうちの1つ)における突然変異は、全長nmnat1およびwldに設計された<sup>9</sup>タンパク質。インビトロの酵素アッセイは、これらの両方が確認された突然変異タンパク質は、nadを合成する能力が厳しく制限された(図(2A)。これらの突然変異体およびそれらのそれぞれの野生型対応物をニューロンに導入して、軸索を分解から保護する能力を評価した。本発明者らは、これらの酵素的に不活性な突然変異体を発現するニューロンは、軸索保護効果を有さなかったことを見出した(図(2A)は、NAD/naad産生が、軸索の劣化を防止するためのnmnat1の能力に関与していることを示す

#### 実施例(3)

[0072] 本実施例は、ピンクリスチンで傷害されたニューロンにおけるnmnat1活性の増加が、遅延された軸索分解を示すことを示している

[0073] 機械的な横断に加えて、軸索の保護Wldマウスはまた、虚血および毒素(例えば、虚血および毒素)のような他の損傷剤に対しても観察されるColeman, et al., *Trends Neurosci* 25:532-37, 2002; Gillingwater, et al., *J Cereb Blood Flow Metab* 24:62-66, 2004本発明者らは、nmnat1活性が増加するか否かを、ピンクリスチンのような他の種類の軸索傷害に反応して軸索分解を遅延させるか否かを決定することを追求した。優れた軸索毒性を有する癌化学療法剤。NMNAT1またはegfp(対照)のいずれかを発現するニューロンは、0.5μmのピンクリスチン中で9dまで増殖させた本発明者らは、NMNAT1を発現するニューロンの軸索が、それらの元の長さおよび屈折性を維持したことを見出した、egfpを発現するニューロンから放出された軸索は徐々に後退し、9日目にほとんど縮退した(図(2B)。これらの結果は、nmnat1活性がそれ自体が、いくつかの島から軸索を保護し、かつ、その中で観察された保護効果を媒介することを示すWldマウス

#### 実施例(4)

[0074] この実施例は、外因的に投与されたnadが、軸索変性から損傷したニューロンを保護することができることを示す

[0075] 以前の試験は、細胞内に細胞外nadを結合し輸送することができる膜タンパク質を神経細胞が発現することを示した(図Bruzzone, et al., *Faseb J* 15:10-12, 2001)このことは、外因的に投与されたnadが軸索の変性を防止することができないかどうかを調査することである。本発明者らは、軸索の横断に先立って種々の濃度のnadを神経培養物に添加し、軸索の劣化の程度を検査した。本発明者らは、軸索切断に先立って24時間前に添加された0.1-1mmnadが、軸索変性を有意に遅延させたことを見出した、外因的に適用されたnadは、レンチウイルス介在nmnat1発現よりも、軸索保護においてわずかに効果的であった(図(3A)これらの結果は、増加したnad供給が軸索の劣化を防止することができるという考えを直接的にサポートする

**実施例(5)**

[0076] この実施例は、神経細胞体を除去する前にnadが必要とされ、軸索変性から損傷したニューロンを保護することを示している

[0077] Nad依存性軸索保護(NDAP)のメカニズムへの洞察を得る)を用いて、神経細胞体を除去する前にnadが必要であるか否かを調べた、または、高レベルのnadへの切断された軸索の直接的な露出が保護を提供するのに十分であるかどうかを判定する(図(3B)。神経培養物を調製し、軸索横断時または様々な時間(4-48時間)で1mmnadを培地に添加した)傷害前に、

[0078] [課題を解決するための手段]本発明者らは、軸索横断の際にnadを投与することを見出した、傷害前まで8時間までの間に、軸索に対する保護効果はなかった。しかしながら、傷害の前に、より長い時間にわたって、ニューロンがnadと共にインキュベートされたときに、有意な軸索障害が観察された、少なくとも24時間のnad前処理の後に生じる最大の効果を有する これらの結果は、 nad依存性軸索保護が軸索自体の中で迅速な翻訳後修飾によって仲介されないことを示す

[0079] 損傷にตอบสนองして軸索の劣化を防止するために、無傷のニューロンのnadへの長期暴露の必要性は、保護プロセスが必要とすることを示唆する *Denovo* 転写および/または翻訳イベント。興味深いことに、wldは両方とも、wldである<sup>s</sup>タンパク質およびnmnat1は、核内に位置する(データは示さず)同様に、酵母におけるnadサルベージ経路を構成するほとんどの酵素も、核内に区画化されている。本発明者らは、感受性マイクロスケール酵素アッセイ()を使用してdrgニューロンを発現する野生型およびnmnat1のnadレベルを比較した Szabo, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:1753-58, 1996しかしながら、全体的な細胞nadレベルの変化は見られなかった(データは示されていない)これは、この核経路の活性化がnadの全体的なレベルを変化させなかった酵母における観察と同様である() Anderson, et al., *J Biol Chem*, 277:18881-90,2002; Huh, et al., *Nature*, 425:686-91, 2003)さらに、野生型の脳内の組織nadのレベルと、野生型の脳における組織nadのレベルと、 *Wld* マウスは、nmnat1活性の増加したレベルにもかかわらず類似している *Wld* マウス(マウス) Mack, et al., *Nat Neurosci*, 4:1199-206, 2001これらのデータは、細胞質nad依存性プロセスとは対照的に、核におけるnad依存性酵素活性が示唆される、増加されたnmnat1活性にตอบสนองして観察された軸索保護を媒介する可能性が高い

**実施例(6)**

[0080] この実施例は、Sir2の阻害がnad依存性軸索保護に関与していることを示す

[0081] タンパク質デアセチラーゼおよびポリ(ADP-リボース)のsir2ファミリーポリメラーゼ(PARP)は、主要なnad依存性核酵素活性である。Sir2は、ヒストンおよび他のタンパク質のnad依存性デアセチラーゼである、その活性化は、酵母および、*elegans*中の増加した寿命を促進するための中央である() Bitterman, et al., *Microbiol Mol Biol Rev*, 67:376-99, 2003; Hekimi, et al., *Science* 299:1351-54, 2003)Pparpはdna損傷により活性化され、dna修復に関与する() S.D. Skaper, *Ann NY Acad Sci*, 993:217-28 and 287-88, 2003)これらの酵素、特にsir2タンパク質、最近では、カロリー制限と老化プロセスにおけるその効果との間の潜在的なリンクを提供するので、多大な関心が得られてきた。これらのnad依存性酵素の重要性は、遺伝子活性を調節することである、軸索劣化の自己破壊過程におけるそれらの役割を調査するように促される [課題を解決するための手段]従って、本発明者らは、Sir2(Sirtinol)およびparp(3-アミノベンズアミド(3AB)の阻害剤が存在するかどうかを試験した)がnad依存性軸索保護(NDAP)に影響を及ぼす可能性がある(図(4A)。ニューロンを1mmnadの存在下で培養し、サーティロール(100μm)または3AB(20mM)のいずれかの存在下で培養した)神経細胞体を除去して軸索横断を行い、軸索分解の程度を12-72時間後に評価した 本発明者らは、sirtinolがnapを効果的に遮断し、Sir2タンパク質がこのプロセスの可能性のあるエフェクターであることを示すことを見出した。対照的に、3abはndapに影響を及ぼさず、parpは軸索保護において役割を果たさないことを示していた。Ndapにおけるsir2タンパク質の役割をさらに調べるために、我々は、レスベラトロール(10-100μm)の効果を試験した)、Sir2活性を向上させるポリフェノール化合物(例えば、ポリフェノール化合物) Howitz, et al., *Nature*, 425:191-96, 2003[課題を解決するための手段]本発明者らは、軸索切断前にレスベラトロールで処理されたニューロンが、 nadを用いて得られたものに匹敵する軸索分解の減少を示したことを見出した(Fig.4A)、Sir2タンパク質が、増加されたnmnat1活性によって媒介される軸索保護のエフェクターであるという考えをさらにサポートすることを含む

**実施例(7)**

[0082] この実施例は、SIRT1がnad依存性軸索保護に関与していることを示す

[0083] ヒトおよびげっ歯類において、Sir2保存ドメイン(SIRT)(1)を共有する(7つの分子7)が同定されているが、これらのタンパク質の一部はヒストン/タンパク質デアセチラーゼ活性を有するようではない() Buck, et al., *J Leukoc Biol*, S0741-5400, 2004SIRT1は核内に位置し、クロマチンリモデリングに関与し、p53(p53) J. Smith, *Trends Cell Biol*, 12:404-406, 2002)他のsir2タンパク質の細胞位置は明らかでない、いくつかは、細胞質およびミトコンドリアにおいて見出されている。Sir2タンパク質を決定する(s)は、nad依存性軸索保護に関与し、本発明者らは、sir2ファミリーの各メンバーを特異的に標的化するためにsirna構築物を用いてノックダウン実験を行った。特定のsirna構築物を発現するレンチウイルスに感染させ、それらの意図する標的の発現を効果的に抑制した(図(4B) 感染したニューロンを1mmnadで培養し、細胞体を除去して軸索転移を行った。SIRT1sirna構築物は、sirnaの軸索保護効果をSirtinol阻害剤として遮断するのに有効なだけであったことを見出した。対照的に、他のsir2タンパク質の阻害はndapに有意な影響を及ぼさなかった(図(4B)これらの結果は、SIRT1が、軸索の自己破壊を効果的に防止する増加したnad供給の主要なエフェクターであることを示す。SIRT1は、軸索安定性に直接関与するタンパク質を脱アセチル化することができる、効果的な保護のための傷害前のnad-24時間の必要性と共に、主に核の位置である、SIRT1は、軸索保護につながる遺伝的なプログラムを規定することを示唆している

[0084] 軸索変性は、傷害後だけでなく、化学療法にตอบสนองして観察される活性な自己破壊現象である、経時的にも関連付けられていることを特徴とする、糖尿病性神経障害、神経変性疾患等の代謝性疾患。本発明者らの結果は、軸索保護の分子機構が、 *Wld* マウスは、nadサルベージ経路の活性が増強され、結果としてヒストン/タンパク質デアセチラーゼsirt1が活性化されることによるnadの供給が増加することによる

**実施例(8-11)**

[0085] 実施例(8-11)では、以下の材料および方法を用いた

[0086] 発現プラスミドの構築および突然変異誘発。本発明のnad合成酵素のコード領域は、マウスnmnat1のestクローンbc038133と、マウスニコチンアミドヌクレオチドデアデニルtransferase3(NMNAT3)のbc005737とからpcr増幅された)を使用する)ヒトnad合成酵素(QNS)ヘキサヒスチンタグ付きcdnaは、Dr. N. Hara (shianeuniversity, shiane, Japan)により、家系に提供された)各cdnaの3'末端にヘキサヒスチンタグを添加した NMNAT1サイトソル突然変異体(cytoneat1)は、pcr媒介性部位特異的突然変異誘発により生成された。NMNAT3のc末端に核局在化信号を付加することにより、NMNAT3(numnat3)の核形態を生成した。各pcr増幅nad合成酵素断片を、先に説明したようにfcivレンチウイルスベクターにクローニングした。すべての構築物の完全性は、配列決定された Taq ダイデオキシターミネーター周期配列決定キット(appliedbiosystems)およびappliedbiosystems373dnaシーケンサ

[0087] Nad合成基材。Nad合成酵素のための全ての基質は、σ(Na, Nam)から購入した、NMN, NaMN, ニコチン酸アデニンジヌクレオチド(NaAD)、NAD)nmrをnmnから合成した。Nmnのnmrへの変換は、逆相カラムlc-18T(supelcoを用いた)hplc(Waters)によって確認された)nmrは260±10秒で溶出し、nmnは(50mM)のkを含む緩衝液1ml/分の流速で150±10秒で溶出する  $2\text{H}_2\text{PO}_4$  50Mm  $\text{K}_2\text{PO}_4$  [課題を解決するための手段]上記課題を解決するために、本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、上記課題を解決するために、上記課題を解決するために、請求項(1)に記載の発明チャールズ。Brenner(dartportmedicalschooll, newhampshire, USA)から提供された酵母株

[0088] リアルタイム定量逆転写-pcr分析。全ての外科的処置は、ワシントン大学における実験動物のケアおよび使用のための国立衛生協会(nationalinstituteofhealth)指針に従って行われた。神経傷害後の発現解析については、C57BL/6マウスの坐骨神経を横引きし、L4-L5とした。指示された時点でdrを収集し、プールしてmaを抽出した。E14からのラットdrg外植片 5胚をこの方法にしたがって14日間培養し、10nmピンリスチンを含有する培地で示された期間培養し、抽出したmaを抽出した。プールされた組織源またはdrg外植片培養物からの全maを調製した。標準的な方法を用いて1μgの各maから第1鎖cdna鋳型を調製した。各ma試料について(2つの独立したcdna合成を行った) 定量逆転写(RT)-pcrは、TaqMan7700配列検出システム(appliedbiosystems)におけるsybr-green色素の蛍光の増加をリアルタイムでモニタリングすることにより行った

[0089] 細胞培養、インビトロ軸索切断、および軸索変性の定量。E12.5胚からのマウスdrg外植片を、10%fcsおよび1nm神経成長因子を含有するdmem中で培養

した。5-フルオロウラシルを培地に添加することにより、非神経細胞を培養物から除去した。神経細胞を除去するために18ゲージの針を用いて14-21divで神経突起の横断を行った。レンチウイルス発現ベクターを作成したこのレンチウイルス感染は、軸索横断に24時間前に3-7日前に実施した。神経突起変性の定量分析を行った

[0090] タンパク質発現および局在化の決定。タンパク質発現を確認するための方法、各nad合成酵素を発現するウイルスでhek293細胞を感染させた。免疫プロットにより分析される感染後5日目に細胞を溶解し、抗-6xhisタグモノクローナル抗体(R& ; amp ; amp ; dsystems)により、ヘキサ-ヒスチジンタグを有する各タンパク質の発現を検出した。各nad合成酵素についてウイルスシャトルベクターで一過的にトランスフェクトされたhek293細胞を用いて、各タンパク質の細胞内局在化を分析した。0.1%Tween-20(PBS-を含有するpbs中、4%パラホルムアルデヒド中に細胞を固定した)T)5%bsaを含有するpbs-tと共に1時間インキュベートする、1:1000希釈抗-6xhisタグ抗体(R& ; amp ; amp ; dsystems)で覆われている)1%bsaを含有するpbs-t中で、4℃で16時間インキュベートすることを特徴とする細胞をpbs-tで洗浄し、alexafluor594結合二次抗体(分子プローブと共にインキュベートした)1時間のpbs-tにおいて、蛍光顕微鏡(Nikon)で検査する

[0091] Nmnatタンパク質過剰発現、親和性精製および酵素アッセイ。リン酸カルシウム沈殿を用いて、各酵素の発現プラスミドでhek293細胞をトランスフェクションした。3日後、細胞をpbsで2回洗浄し、50mmリン酸ナトリウム(pH8.0)を含む緩衝液中に懸濁させた)、300mMNaCl(緩衝液a)次いで、SONIFIRE450(baransonにより細胞を均質化した)上清を10分間10分間遠心分離することにより回収し、His-選択ニッケル親和性ゲル(o)を緩衝液aで洗浄し、50%ゲル懸濁液(0.1ml)を上清(1ml)に添加し、4℃で10分間インキュベートした、ビーズ結合ヘキサ-ヒスチジン標識タンパク質を緩衝液で広範囲に洗浄し、50mmリン酸ナトリウム(pH8)を含む溶液100μlを添加することによりタンパク質を溶出させた(0)、300MmNaCl、250mmイミダゾール。相対的nmnat酵素活性を、前に記載したような親和性精製タンパク質を用いて測定し、mockトランスフェクト細胞から得られた値を差し引いて、濃度測定により決定された組換えタンパク質の量で正規化した

[0092] Nad合成基質及び視神経横断面の投与。Nam、NMN、NmR、またはnadを100mmまたは1m濃度のpbsに溶解し、5μlの溶液を、麻酔下の左の硝子体内成分に0.5μl/秒の割合で注入した。硝子体内注射後24時間後に左視神経を切開し、指示時刻に視神経を回復させた視神経組織を100mmtris-HCl(pH6.8)を含む緩衝液100μl中でホモジナイズした)、1%SDS、1mMdtc。各試料について、50μgのタンパク質を、抗神経フィラメント抗体2H3(発生研究ハイブリドマセーターを用いたウェスタンブロッティングにより分析した)ペルオキシダーゼ結合二次抗体(jacksonimmunoresearch)前記変性率は、横断した対側神経の神経フィラメント免疫反応性の比から算出した

#### 実施例(8)

[0093] 本実施例は、哺乳動物nad合成酵素のnad合成経路および発現分析を示す

[0094] Nadは、原核生物および真核生物の両方において、(3つ)の主要な経路を介して合成される。Denovo経路では、nadがトリプトファンから合成される(図(5))。サルベージ経路において、ニコチン酸およびニコチンアミドを含むビタミンからnadを生成する。また、最近では、Preiss-handler非依存経路と呼ばれるニコチンアミドリボシドからの第3の経路が発見されているDenovo経路の最後の酵素反応は、QPRT(EC2.4.2.19)によるキノリン酸のnanへの変換を含む)この時点で、デノボ経路は、サルベージ経路に収束する。Nar(EC2.4.2.11)はnaをnanに変換し、これをnmnat(EC2.7.7.1)によりnaadに変換する)qn1(EC6.3.5.1)は、naadをnadに変換する。NmPRT(EC2.4.2.12) ; ビスファンンとしても報告されている)namをnmnに変換する。Nmnlはnmnatによりnadに変換される。ニコチンアミダーゼ(PNC、EC3.5.1 [解決手段]。Preiss-handler非依存経路において、Nrk(EC2.7.1.22)は、nmrをnmnに変換し、サルベージ経路に収束させる。これらの哺乳動物酵素の大部分は、QPRT、NmPRT、qn1を含む、Nrk1/2およびnmnat1/2/3が以前にクローニングされ、特徴付けられていることを特徴とする。Narの哺乳動物相合同体はまた、細菌narの哺乳動物相合同体として注釈されたestとしても同定された

[0095] 神経系における哺乳動物nad合成酵素の発現を調べるために、マウス脳からのmaを用いて定量的rt-pcrを行った、E14、P0、P7、P14、P21の年齢における網膜、脊髄、drgを含む。全ての酵素は、神経系において、発達中及びadulthood中でユビキチン的に発現される、全ての検査された組織(図示せず)において、その表現が非常に低いnrk2を除いて、神経刺激に反応してnad合成酵素の誘導性を同定する、本発明者らは、(1)における各酵素のma発現を比較した、(3)、(7)、14日後、非損傷drgに抗して神経変性させた後、14日間放置することを特徴とする。図に示されているように、ほとんどの酵素は、傷害後2-8倍までアップレギュレーションされた。これらの中で、Nrk2発現は、軸索切断の14日後に例外的に高度に誘導される(20倍以上)本発明者らは、培養ラットdrgニューロンにおける神経毒によって引き起こされる軸索変性中のnad合成酵素の発現も分析した。Drgニューロンを0.1μmおよび1μmのロテロンで処理して軸索変性を生じさせ、そしてrotenoneを添加した24時間後に収集したmaを収集した。Nrk2の発現は、rotenone処理後(図(6B))に6倍以上増加したこれらの結果は、nad合成経路における全ての酵素活性がユビキチン的に存在することを示唆している、Nrk2は、神経刺激後にnad合成基質を供給する役割を果たすことができる

#### 実施例(9)

[0096] この実施例は、核および細胞質のnマット酵素の両方が、変性から軸索を保存することを示している

[0097] NMNAT1の核局在化が、軸索保護を提供するのに不可欠であるか否かを決定する、本発明者らは、インビトロwalrian変性アッセイにおけるnmnat酵素の細胞下分布の効果を分析し、細胞質および核nmnatの過剰発現間の軸索保護の程度を比較した。NMNAT1は、NMNAT1タンパク質の211-217個のアミノ酸における推定核局在化シグナルpgkrkwを有する本発明者らは、この核局在化シグナルがpgaaaawとして変更され、細胞下分布を検査した、細胞質nmnat1として指定された変異体nmnat1を生成した。図に示されるように、サイトソル中に位置するサイトソルの大部分は、予想される

[0098] 次に、細胞外at1の酵素活性を確認した、親和性ゲルを用いて、タンパク質のいずれかを発現する細胞溶解物から、NMNAT1およびその変異型サイトnmnat1を精製した。上記のようにして、親和性精製タンパク質の酵素活性を測定し、その変異により、細胞毒性が変化しなかったことを見出した(図(7C))。Drgニューロン中の細胞nmnat1の過剰発現後、本発明者らは、強い神経突起保護ならびに核野生nmnat1を観察した(図(7A、)E)。本発明者らは、核局在化シグナルを欠いたnmnat1イソ酵素を使用することにより、この結果をさらに確認した。(2つ)のnmnatイソ酵素の中で、NMNAT3は、外部核およびミトコンドリアを特定するために以前に報告されており、NMNAT1と同等の酵素活性を有する。NMNAT3のc端子にヒトポイソメラーゼの核局在化信号kpkkkiedを加えて、核nmnat3を生成する本発明者らは、HEK293細胞におけるヘキサ-ヒスチジン標識nmnat3またはnmnmat3を発現し、細胞内局在化およびその酵素活性を分析した。NMNAT3は、前に報告されているように、明穿染色を含む核の外側に分布しており、核に主に局在化されたnmnmat3は、サイトソル中にある程度の穿刺染色を有する(図(7B)) NMNAT3およびnmnmat3の酵素活性を測定し、両方のタンパク質がnmnat1と比較して同等の酵素活性を有する(図(7C))。次いで、これら(2つ)のnmnat3酵素の過剰発現後に、インビトロwalrian縮退アッセイを実施した、NMNAT3およびnmnmat3の両方の過剰発現は、神経突起変性ならびにnmnat1(図(7A、)E)において同じ程度の遅延を示したことを見出した各酵素のレンチウイルス介在発現をウェスタンブロッティングにより確認した(図(7D))。これらの実験により、核またはサイトソルのいずれかを標的とするnmnatは、変性から神経突起を保護することが確認された

#### 実施例(10)

[0099] この実施例は、nad合成酵素に対する基質の外因的適用が、変性から軸索を保護することを示している

[0100] 本発明者らは、培養培地中の外因的に適用されたnadがインビトロで軸索の節約効果を示すことを以前に示した。ここで、nmprtの発現は、namがニューロンにおけるnad合成のための基質として使用されることを示唆する軸索保護を示すことを示した。図に示されるどの基板を決定する(5)は、ニューロンにおけるnad合成に使用され、nad前駆体のいずれかが識別されるであってよい本発明者らは、本発明者らは、nadと同様の、または可能性に優れた軸索を保存することができ、本発明者らは、Na、namを適用する、NmR、NaMN、NMN、またはnaadを培養培地中に導入し、インビトロwalrian変性アッセイで実施する。神経突起の転移が変性から神経突起をうまく保存する前に、1mmnmnを24時間適用する 定量分析は、nmn治療が、外因的に適用されたnadによって達成されるものと同様の程度まで神経突起保護をもたらすことを明らかにした(図(8B))。これらの結果は、他のnad合成基質の増加した供給が、神経突起を変性から節約する能力を有する可能性をさらに示唆する 次いで、本発明者らは、Na、namを含む1mmのnad合成基質を外因的に適用した、napa、NaAD、nmrを24時間、drgニューロンに導入し、神経突起横断を行う。図(8A)および図(8)に示されるように、namまたはnmr治療はまた、神経突起ならびにnadを保存する。Naadはわずかな保護を示したが、naは神経突起を保存するために失敗したが、naおよびnamは全く影響を及ぼさなかった 定量分析により、1mmnmn、NMN、nmrの外因的な適用が明らかになった、またはnadは、トランセクション(図(8B))の48時間後にインタクトな神経突起の同程度の増加を引き起こす。Namnの保護効果はnmnに等しいからである、qnsによるnaadからnadを合成する工程は、naadの増加した供給下で神経突起を保存するのに十分な活性である。それにもかかわらず、naadの外因的適用は、NAD(図(8B))と比較して48時間無傷の神経突起の増加が少ないことを示す これは、本発明のアッセイ条件において、細胞への組み込みが不十分であるか、ま



たはnaadの不安定性があることを示す。これらの実験は、NMN、nan、およびnmrの外因的な適用を含む神経突起を保存するためのいくつかの異なる方法があることを示唆している。これらの処理の全てはnadの増加した供給を引き起こすように思われ、nad適用またはnmnat1過剰発現が変性から神経突起を保存することを示す以前の実験と一致している

#### 実施例(11)

[0101] この実施例は、nad生成成基質の硝子体内適用が網膜神経節細胞の軸索変性を遅延させることを実証する

[0102] 視神経のトランセクションは、ウォールエリニン変性および網膜神経節細胞(RGC)に至るメカニズムを調査するために使用することができる生体内モデルである線内障等のヒト疾患で観察される死亡。本発明のc57BL/wldマウス株では、軸索切断後の壁変性における視神経変性が劇的に遅くなる。また、化合物のスクリーニングに硝子体内注射を用いる生体内での変性からrgcaxを保護することにより、本発明者らは、NAD、NMN、nmrおよびnamを含む化合物の眼内注射による生体内の各nad生成成基質の軸索保護効果。インビトロwalrian変性アッセイから、(1mM)のnad、nmnを含む、培地中のnmrは、変性から軸索を保護するのに十分である。本発明者らは、最初に、5 $\mu$ lの100mmまたは1mnnad溶液を左の硝子体内区画に注射した。24時間のインキュベーションの後、左視神経を横方向に切断し、コントロール(右)を制御し(右)、軸索された(左に)視神経は、横断後、(3)、(4)、および5日後に収集された。軸索された視神経からの神経フィラメントの免疫反応性を測定し、視神経の右側から得られた値に対して正規化した[課題を解決するための手段]本発明者らは、transectionの4日後の免疫反応性が、1mおよび100mnnad注射ラットにおける非軸索視神経の77 $\pm$ 27%および78 $\pm$ 22%であったことを見出した、対照動物は7 $\pm$ 16%しか示さなかった(図9)

[0103] 次に、5 $\mu$ lの100mnmn、nmrを注入する、左の視神経のトランセクションの4日後に、左の硝子体内隔壁および収集された視神経を左の硝子体内隔壁に導入する。Nmnnおよびnmr注射視神経から得られる免疫反応性は、非軸索神経の60 $\pm$ 25および72 $\pm$ 19%であった。Am注射された動物は、対照動物とのいかなる差も示さなかった。これらの結果は、nadを示したインビトロ研究と一致している、NMN、nmrは、axon保存活性を有しているが、namは有さない。本発明者らのインビトロ研究は、nad生成成経路に関与するこれらの小分子が、変性から軸索を保存するのに有用なツールであることを明らかにした

[0104] 本明細書において引用された全ての参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で引用された参考文献の任意の議論は、単にそれらの著者によってなされたアサーションを要約することを意図しており、いずれかの参照またはその一部が関連する先行技術を構成することを許可されていない。本出願人は、引用された参考文献の正確性および妥当性をチャレンジする権利を予約する

#### 節:

[0105]

1. 本発明は、哺乳動物における神経障害または軸索障害を、その必要性に応じて治療または予防する方法に関する、疾患および/または損傷したニューロンにおけるサーチュイン活性を増加させ、細胞を支持することにより作用する有効量の薬剤を哺乳動物に投与することを含む方法
2. 前記エージェントは、SIRT1活性を増加させることにより作用する、項に記載の方法
3. 前記薬剤がnad、NADH、nadを合成するためのデノボ経路の中間体である項(1)に記載の方法、nadサルベージ経路の中間体、ニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の中間体、またはそれらの組合せである
4. 前記作用剤がnad、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドである項(1)に記載の方法
5. 前記薬剤が、nadを合成するためのデノボ経路の酵素を含む、項に記載の方法、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素；nadを合成するためのデノボ経路の酵素をコードする核酸、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素；nadを合成するためのデノボ経路の酵素の発現を増加させる薬剤、Nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素；または、nadを合成するためのデノボ経路の酵素の触媒活性および/または安定性を増加させる薬剤を提供する、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素
6. 前記薬剤がニコチンアミドモノヌクレオチドアデニルチルチルフェラーゼ(NMNAT)を含む、項(5)に記載の方法nmnatをコードする核酸を含むことを特徴とする
7. 前記薬剤がnmnat活性を有する酵素を含み、ヒトnmnat3との少なくとも50%の同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも50%の同一性を有する
8. 前記エージェントが少なくとも70%を有する、項に記載の方法ヒトnmnat3との同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも70%の同一性を有する
9. 請求項(6)に記載の方法であって、前記エージェントは、ヒトnmnat1からなる群から選択されることを特徴とする方法、ヒトnmnat3およびその保存的に置換された変異体
10. 前記薬剤が、少なくとも50%の同一性を有する核酸を含む、項に記載の方法ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有する核酸をコードする核酸
11. 前記薬剤が、少なくとも70%の同一性を有する核酸を含む、項に記載の方法ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有する核酸をコードする核酸
12. ヒトnmn3またはその核酸変異体をコードする核酸を含む、項(11)に記載の方法
13. サーチュインポリペプチドまたはサーチュインポリペプチドをコードする核酸を含む、項(1)に記載の方法
14. 項(6)に記載の方法、sirt1活性を有し、ヒトsirt1と少なくとも50%の同一性を有する酵素を含む
15. 前記薬剤がヒトsirt1と少なくとも70%の同一性を有する、項(14)に記載の方法
16. 項(15)に記載の方法、前記薬剤は、ヒトsirt1およびその保存的に置換された変異体からなる群から選択される
17. 前記薬剤が核酸を含む、項に記載の方法を有するヒトsirt1をコードする核酸との少なくとも50%の同一性を有する
18. 前記薬剤が核酸を含む、項(17)に記載の方法を有するヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有する
19. 前記薬剤が、ヒトsirt1またはその核酸変異体をコードする核酸を含む、項に記載の方法
20. 前記エージェントがスチルベンである項(1)に記載の方法、フラボン、イソフラボン、フラボンまたはカテキンを含有することを特徴とする
21. 前記作用剤が、レスベラトロール、ピネタノールからなる群から選択されるスチルベンである、項に記載の方法、デシル化スズ、トランス-スチルベン、及び、ハロゲン、及び、ブレン、イソキリチゲン、及び、3、3、2'からなる群から選択されたカルボンであることを特徴とする、4、6'-ペンタヒドロキシシロ、フィセクテン、5、7、3、4'からなる群から選択されるフラボン、5'-ペンタヒドロキシフラボン、ルテオリン、3、6、3'、4'-テトラヒドロキシフラボン、ケルセチン、7、3'、4'、5'-テトラヒドロキシフラボン、カイフェロール、6-ヒドロキシアピゲニン、アピゲニン、3、6、2'、4'-テトラヒドロキシフラボン、7、4'-ジヒドロキシフラボン、7、8、3'、4'-テトラヒドロキシフラボン、3、6、2'、3'-テトラヒドロキシフラボン、4'-ヒドロキシフラボン、5、4'-ジヒドロキシフラボン、5、7'-ジヒドロキシフラボン、morin、フラボン、及び5'-ヒドロキシフラボン；ダイゼインおよびグニステインからなる群から選択されるイソフラボン；ナリゲニン、3、5、7、3'、4'-ペンタヒドロキシフラボンからなる群から選択されるフラボンと、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキン、(-)-カテキン、(-)-カテキン、(+)-カテキン、(+)-エピカテキン
22. 神経障害または軸索障害が、神経変性疾患に関連する遺伝性または先天性である、項(1)に記載の方法、運動ニューロン疾患、新形成、内分泌障害、代謝疾患、栄養欠乏症、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、機械的傷害、化学的または薬物誘発性傷害、熱的損傷、放射線損傷、神経圧迫、網膜または視神経障害、ミトコンドリア機能障害、進行性痴呆脱髄疾患虚血および/または脳卒中感染症；または炎症性疾患
23. 神経障害または軸索障害が細胞毒性抗癌剤により誘導される、項(22)に記載の方法
24. 視神経障害が線内障である項(22)に記載の方法、網膜神経節変性、視神経炎および/または変性、黄斑変性、虚血性視神経障害、視神経、遺伝性視神経障害、代謝視神経障害に対する外傷性傷害、有害な薬剤による神経障害または有害な薬物反応やビタミン欠損による神経障害
25. ミトコンドリア機能障害に関する神経障害が、酸化的損傷から生じる、項(22)に記載の方法、ミトコンドリアゲノムまたは核ゲノムのいずれかでコードされたミトコンドリアタンパク質の突然変異から選択される、毒素への暴露から、または老化の過程から毒素への暴露から選択されることを特徴とする
26. 前記哺乳動物がヒトである項(1)に記載の方法
27. 本発明は、哺乳動物における神経障害または軸索障害を、その必要性に応じて治療または予防する方法に関する、疾患および/または損傷したニューロンおよび/または支持細胞におけるnad活性を増加させることによって作用する有効量の薬剤を哺乳動物に投与することを含む方法
28. 前記薬剤がnad、NADH、nadを合成するためのデノボ経路の中間体である項27記載の方法、nadサルベージ経路の中間体、ニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の中間体、またはそれらの組合せである
29. 前記薬剤がnad、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドである項28記載の方法
30. 前記薬剤が、nadを合成するためのデノボ経路の酵素を含む、項27記載の方法、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素；nadを合成するためのデノボ経路の酵素をコードする核酸、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素；

- nadを合成するためのデノボ経路の酵素の発現を増加させる薬剤、Nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素；または、nadを合成するためのデノボ経路の酵素の触媒活性および/または安定性を増加させる薬剤を提供する、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素
31. 31. 前記薬剤がニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ(NMNAT)を含む、項(30)に記載の方法)nmnatをコードする核酸を含むことを特徴とする
  32. 32. 前記薬剤が、nmnat活性を有する酵素を含み、ヒトnmnat3との少なくとも50%の同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも50%の同一性を有する
  33. 33. 前記エージェン트가少なくとも70%を有する、項に記載の方法ヒトnmnat3との同一性、またはヒトnmnat3との少なくとも70%の同一性を有する
  34. 34. 請求項(31)に記載の方法であって、前記エージェン트는、ヒトnmnat1からなる群から選択されることを特徴とする方法、ヒトnmnat3およびその保存的に置換された変異体
  35. 35. 前記薬剤が、少なくとも50%の同一性を有する核酸を含む、項(31)に記載の方法ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有する核酸をコードする核酸
  36. 36. 前記薬剤が、少なくとも70%の同一性を有する核酸を含む、項35記載の方法ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有する核酸をコードする核酸
  37. 37. ヒトnmnat1またはヒトnmnat3をコードする核酸またはその核酸変異体を含む、項(36)に記載の方法
  38. 38. 神経障害または軸索障害が、神経変性疾患に関連する遺伝性または先天性である、項(27)に記載の方法、運動ニューロン疾患、新形成、内分泌障害、代謝疾患、栄養欠乏症、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、機械的傷害、化学的または薬物誘発性傷害、熱的損傷、放射線損傷、神経圧迫、網膜または視神経障害、ミトコンドリア機能障害、進行性痴呆脱髄疾患虚血および/または脳卒中感染症；または炎症性疾患
  39. 39. 神経障害または軸索障害が細胞毒性抗癌剤により誘導される、項38記載の方法
  40. 40. 視神経障害が緑内障である項(22)に記載の方法、網膜神経節変性、視神経炎および/または変性、黄斑変性、虚血性視神経障害、視神経、遺伝性視神経障害、代謝視神経障害に対する外傷性傷害、有害な薬剤による神経障害または有害な薬物反応やビタミン欠損による神経障害
  41. 41. ミトコンドリア機能障害に関連する神経障害が、酸化的損傷から生じる、項(38)に記載の方法、ミトコンドリアゲノムまたは核ゲノムのいずれかでコードされたミトコンドリアタンパク質の突然変異から選択される、毒素への暴露から、または老化の過程から毒素への暴露から選択されることを特徴とする
  42. 42. 前記哺乳動物がヒトである、項27記載の方法
  43. 43. 哺乳動物における神経障害を治療するための薬剤のスクリーニング方法、インビトロまたはインビボで哺乳動物神経細胞に投与することを含む方法、神経細胞への軸索傷害を発生させることを含む；傷害された神経細胞の軸索変性の減少を検出することを含むことを特徴とする
  44. 44. 神経細胞に軸索傷害を生じさせることは、神経細胞を化学的に損傷させることを含む、項43記載の方法、神経細胞を熱欠乏させる、神経細胞を物理的に損傷させること、エネルギー代謝を阻害すること、またはそれらの組み合わせを含むこと
  45. 45. 哺乳動物における神経障害を治療するための薬剤のスクリーニング方法、候補エージェン트가によって生成されたnad活性を含む方法
  46. 46. ニューロンにおけるサーチェン活性を増加させる薬剤のスクリーニング方法、インビトロまたはインビボで哺乳動物神経細胞に投与することを含む方法、神経細胞への軸索傷害を発生させることを含む；傷害された神経細胞の軸索変性の減少を検出することを含むことを特徴とする
  47. 47. ニューロンにおけるnad活性を増加させる薬剤のスクリーニング方法、インビトロまたはインビボで哺乳動物神経細胞に投与することを含む方法、神経細胞への軸索傷害を発生させることを含む；傷害された神経細胞の軸索変性の減少を検出することを含むことを特徴とする
  48. 48. ヒトnmnat1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチドまたはヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチドと動作可能に連結されたプロモーターを含む組換えベクター
  49. 49. ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチド、またはヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチドとの少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチドを含む、(48)に記載の組換えベクター
  50. 50. ヒトnmnat1またはヒトnmnat3をコードするポリヌクレオチドまたはそのポリヌクレオチド変異体を含む項(48)に記載の組換えベクター
  51. 51. レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを含む項(48)に従った組換えベクター
  52. 52. ヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するpoyヌクレオチドに動作可能に連結されたプロモーターを含む組換えベクター
  53. 53. ヒトsirt1をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチドを含む項(52)に記載の組換えベクター
  54. 54. ヒトsirt1またはそのポリヌクレオチド変異体を含む項(52)に記載の組換えベクター
  55. 55. レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを含む項(52)に記載の組換えベクター
  56. 56. 哺乳動物における視神経障害を必要とすることを治療または予防する方法、罹患したおよび/または傷害されたニューロンにおけるnad活性を増加させることによって作用する有効量の薬剤を哺乳動物に投与することを含む方法
  57. 57. 前記哺乳動物に投与することは、眼内投与を含む、項56記載の方法
  58. 58. 眼内投与が持続放出送達システムの眼内投与を含む、項57記載の方法
  59. 59. 眼内投与は、硝子体内注射、点眼による投与またはトランス-強膜送達による投与を含む、項(57)に記載の方法
  60. 60. 前記薬剤がnad、NADH、nadを合成するためのデノボ経路の中間体である項(56)に記載の方法、nadサルベージ経路の中間体、ニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の中間体、またはそれらの組合せである
  61. 61. 前記薬剤がnad、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドである項60記載の方法
  62. 62. 前記薬剤が、nadを合成するためのデノボ経路の酵素を含む、項56記載の方法、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素；nadを合成するためのデノボ経路の酵素をコードする核酸、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素を合成するためのデノボ経路の酵素の発現を増加させる薬剤、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素；または、nadを合成するためのデノボ経路の酵素の触媒活性および/または安定性を増加させる薬剤を提供する、nadサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボサイドキナーゼ経路の酵素
  63. 63. 本発明の方法は、前記薬剤が、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ(NMNAT)を含む、項(62)に記載の方法)nmnatをコードする核酸を含むことを特徴とする
  64. 64. 前記薬剤が、少なくとも50%の同一性を有する核酸を含む、項(62)に記載の方法ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有する核酸をコードする核酸
  65. 65. 前記薬剤が、少なくとも70%の同一性を有する核酸を含む、項(64)に記載の方法ヒトnmnat3をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有する核酸をコードする核酸
  66. 66. ヒトnmnat1またはヒトnmnat3をコードする核酸またはその核酸変異体を含む、項65記載の方法
  67. 67. 視神経障害が緑内障である項(22)に記載の方法、網膜神経節変性、視神経炎および/または変性、黄斑変性、虚血性視神経障害、視神経、遺伝性視神経障害、代謝視神経障害に対する外傷性傷害、有害な薬剤による神経障害または有害な薬物反応やビタミン欠損による神経障害
  68. 68. 前記哺乳動物がヒトである、項56記載の方法

Wipo Translate enjp ...

[Continue translation]

100%