

(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2017-529325

(P2017-529325A)

(43) 公表日 平成29年10月5日(2017.10.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/59 (2017.01)	A 6 1 K 47/59	4 C 0 7 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P 25/20 (2006.01)	A 6 1 P 25/20	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-507403 (P2017-507403)	(71) 出願人	398076227
(86) (22) 出願日	平成27年8月13日 (2015. 8. 13)		ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティー
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月29日 (2017. 3. 29)		アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/045112		1 8、ボルチモア、ノース・チャールズ・
(87) 国際公開番号	W02016/025745		ストリート 3 4 0 0
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016. 2. 18)	(71) 出願人	507395016
(31) 優先権主張番号	62/036, 839		ケネディー クリーガー インスティテュート、
(32) 優先日	平成26年8月13日 (2014. 8. 13)		インコーポレイテッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0
(31) 優先権主張番号	62/036, 675		5、ボルチモア、ノース ブロードウェイ 7 0 7
(32) 優先日	平成26年8月13日 (2014. 8. 13)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 神経障害および CNS 障害の処置におけるデンドリマー組成物および使用

(57) 【要約】

脳または中枢神経系への全身投与のための、デンドリマー製剤、例えば P A M A M デンドリマーまたは多重腕 P E G ポリマー製剤が開発された。好ましい実施形態では、デンドリマーは、神経変性障害、神経発達障害または神経障害、例えばレット症候群または自閉症スペクトラム障害の 1 つまたは複数の症状を処置するための少なくとも 1 つの治療薬剤、予防薬剤または診断薬剤に共有結合的に連結している、ポリ(アミドアミン)(P A M A M) ヒドロキシル末端デンドリマーを含む、デンドリマーナノ粒子の形態であり、世代 D 6 のデンドリマーは、脳傷害の領域への取込みの有意な向上を提供し、診断および薬物送達のための手段を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

脳の神経障害、神経変性障害、または神経発達障害を処置するための方法であって、前記障害を処置または診断するための治療薬剤、予防薬剤または診断薬剤にコンジュゲートしているかまたはこれらと複合体形成している dendritic 分子を含む薬学的に許容される組成物を、被験体に全身投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記 dendritic 分子が、少なくとも 1 つの治療薬剤に共有結合的に連結している、世代 4 ~ 10 のポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端 dendritic 分子である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記 PAMAM dendritic 分子が、世代 6 の PAMAM dendritic 分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

治療薬剤にコンジュゲートしているかまたは治療薬剤と複合体形成している前記 dendritic 分子が、前記被験体のレット症候群および/または自閉症スペクトラム障害の 1 つまたは複数の症状を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

治療薬剤にコンジュゲートしている前記 dendritic 分子が、興奮毒性障害の 1 つまたは複数の症状を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 6】

前記治療薬剤が、抗炎症薬剤または免疫抑制薬剤である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記治療薬剤が、ステロイド系抗炎症薬剤、非ステロイド系抗炎症薬剤、および金化合物抗炎症薬剤からなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記治療薬剤が、抗興奮毒性薬剤である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 9】

前記治療薬剤が、バルプロ酸、D-アミノホスホノバレレート、D-アミノホスホノヘプタノエート、グルタミン酸形成/放出の阻害剤、バクロフェン、NMDA 受容体アンタゴニスト、1-メチルトリプトファン、バルプロ酸、2-(3-グルタミン酸-カルボキシペプチダーゼ阻害剤(GCP-III)、例えばメルカプトプロピル)ペンタン二酸(2-MPPA)、2-(ホスホノメチル)ペンタン二酸(2-PMPA)、およびグルタミナーゼ阻害剤、例えば N-(5-{2-[2-(5-アミノ-[1,3,4]-チアジアゾール-2-イル)-エチルスルファニル]-エチル}-[1,3,4]-チアジアゾール-2-イル)-2-フェニルアセトアミド、(ビス-2-[(1,2,4-チアジアゾール-2-イル)-5-フェニルアセトアミド]エチルスルフィド)、ラニピズマブ、ミノサイクリン、ならびにラパマイシンからなる群より選択される抗興奮毒性薬剤である、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記 dendritic 分子が、第 1 の治療薬剤と、治療薬剤、予防薬剤、および診断薬剤からなる群より選択される第 2 の薬剤とにコンジュゲートしている、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記 dendritic 分子が、2 つの治療薬剤にコンジュゲートしている、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

50

前記デンドリマーが、抗炎症薬剤および抗興奮毒性薬剤にコンジュゲートしている、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

デンドリマー複合体が、ミクログリアおよび星状膠細胞に局在化し、これらを標的化するための治療的に活性な薬剤を含む、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

デンドリマー - 治療薬剤が、RTT を有する個体に投与される、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

デンドリマーコンジュゲートまたは複合体が、懸濁物、乳濁液、または溶液中で製剤化される、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 16】

デンドリマー組成物が、自閉症スペクトラム障害を有する個体に投与される、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

デンドリマー組成物が、RTT を有する個体に投与される、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

デンドリマー組成物が、興奮毒性障害を有する個体に投与される、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 19】

前記組成物が、1 日おき、3 日毎、4 日毎、毎週、隔週、毎月、および隔月からなる群より選択される期間で、前記被験体に投与される、請求項 1 から 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

デンドリマー - 診断薬剤コンジュゲートを投与することと、次いで、脳内の前記コンジュゲートの場所を検出することを含む、脳傷害の存在、場所または程度を評価するための、請求項 1 から 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

脳脊髄液および血清中のレベルを決定することと、比を評価することを含む、請求項 1 から 20 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 22】

請求項 1 から 13 のいずれかに記載の方法における使用のための、デンドリマー組成物。

【請求項 23】

器官組織と比較して、脳脊髄液または脳中で高い濃度を有する、請求項 21 に記載のデンドリマー組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

関連出願への相互参照

この出願は、2014 年 8 月 13 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 036, 675 号および 2014 年 8 月 13 日に出願された同第 62 / 036, 839 号（これらは、参考として援用される）への優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

脳および中枢神経系（CNS）への薬物送達は、とりわけ CNS 内の特定の細胞への標的化送達が望ましい場合、困難である。薬物および送達ビヒクルは、血液脳関門（BBB）を克服し、脳組織内に移動し、標的細胞に局在化しなければならない。神経疾患、例えばパーキンソン病、アルツハイマー病、脳腫瘍、および大部分の神経遺伝障害を有する患

50

者は、重度の消耗性症状を患い、治癒的処置をもたらす治療選択肢が欠如している。脳への全身送達に対する主要な障壁である血液脳関門 (BBB) を操作または迂回するために、様々な戦略が開発されている [Jain, *Nanomedicine (Lond)*, 2012 年、7 巻 (8 号) : 1225 ~ 33 頁; Wohlfarth, *J Control Release*, 2012 年、161 巻 (2 号) : 264 ~ 273 頁]。これらの手法には、CNS への局所投与 [Patel, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012 年、64 巻 (7 号) : 701 ~ 705 頁] および集束超音波による BBB の可逆的破壊 [Marquet, *PLoS One*, 2011 年、6 巻 (7 号) : e22598 頁; Downs, *PLoS One*, 2015 年 5 月 6 日; 10 巻 (5 号) : e0125911 頁] または化学試薬 [Kroll, *Neurosurgery*, 1998 年、42 巻 (5 号) : 1083 ~ 1099 頁; discussion, 1099 ~ 100 頁。] が含まれる。しかしながら、一たび BBB を越えると、脳細胞間に存在する異方性で静電的に荷電した細胞外マトリックス (ECM) が、別の決定的な障壁として広く認識されている [Thorne, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006 年 4 月 4 日; 103 巻 (14 号) : 5567 ~ 72 頁; Nance, *Sci Transl Med*, 2012 年、4 巻 (149 号) : 149ra119 頁; Sykova, *Physiol Rev*, 2008 年、88 巻 (4 号) : 1277 ~ 1340 頁; Zamecnik, J., *Acta Neuropathol*, 2005 年、110 巻 (5 号) : 435 ~ 442 頁]。この「脳組織障壁」は、投与方法にかかわらず、脳内の高分子およびナノ粒子の広範な分布を妨げ、それによって神経疾患の散在する標的領域全体にわたるそれらの網羅を限定する [Voges, J., *Ann Neurol*, 2003 年、54 巻 (4 号) : 479 ~ 487 頁; Nance, E. A., *Sci Transl Med*, 2012 年、4 巻 (149 号) : 149ra119 頁; Sykova, *Physiol Rev*, 2008 年、88 巻 (4 号) : 1277 ~ 340 頁; MacKay, *Brain Res*, 2005 年、1035 巻 (2 号) : 139 ~ 153 頁]。ECM は、ヒアルロナン、コンドロイチン硫酸、プロテオグリカン、リンクタンパク質およびテネイシンに富み、カチオン性ポリマー担体の貫通に対して負に荷電した接着性障壁を与えうる [Sykova, *Physiol Rev*, 2008 年、88 巻 (4 号) : 1277 ~ 1340 頁; Zimmermann, *Histochem Cell Biol*, 2008 年、130 巻 (4 号) : 635 ~ 653 頁]。さらに、ECM の孔径は、CNS 内のナノ粒子の移動に立体障壁を設け、非接着性の 114 nm の粒子は、脳組織内に貫通することができるが、200 nm の粒子はできない [Nance, E. A., *Sci Transl Med*, 2012 年、4 巻 (149 号) : 149ra119 頁; Kenny, G. D., *Biomaterials*, 2013 年、34 巻 (36 号) : 9190 ~ 9200 頁。親水性の中性に荷電したポリエチレングリコール (PEG) で極めて良好に被覆された 100 nm 未満のナノ粒子は、脳 ECM 中に急速に拡散して、治療薬の広範な分布を可能にすることが示されている [Nance, *ACS Nano*, 2014 年 10 月 28 日; 8 巻 (10 号) : 10655 ~ 64 頁、doi : 10.1021/nn504210g、Epub 2014 年 10 月 8 日; Nance, E. A., *Sci Transl Med*, 2012 年、4 巻 (149 号) : 149ra119 頁]。

【0003】

CNS 疾患の自然歴を変更または逆転させうる特定の遺伝子標的に関する知識の蓄積により、遺伝子療法は、魅力的な治療戦略となっている [O'Mahony, A. M., *J Pharm Sci*, 2013 年、102 巻 (10 号) : 3469 ~ 3484 頁; Lentz, *Neurobiol Dis*, 2012 年、48 巻 (2 号) : 179 ~ 188 頁。]。複数の前臨床および臨床研究は、先進的なウイルスまたは非ウイルス遺伝子ベクターを使用して、CNS への核酸の送達を改善することを目的としており、脳組織全体にわたる導入遺伝子発現のレベルおよび分布を向上させることに特に焦点を合わせている [O'Mahony, *J Pharm Sci*, 2013 年、102 巻 (10 号) :

3469～3484頁。; Perez - Martinezら、J Alzheimers Dis、2012年、31巻(4号):697～710頁]。

【0004】

ウイルス遺伝子ベクターは、比較的効率的であるが、低いパッケージング容量、スケールアップの技術的困難、高い生産コスト[Thomasら、Nat Rev Genet、2003年、4巻(5号):346～358頁。]および突然変異誘発のリスク[OlsenおよびStein、N Engl J Med、2004年、350巻(21号):2167～2179頁。]を含む、1つまたは複数の欠点によって限定されている。さらに、CNSの免疫特権性にもかかわらず、反復投与または事前曝露に続発して、中和免疫応答が起こりうる[Lentzら、Neurobiol Dis、2012年、48巻(2号):179～188頁;Xiao, X.ら、J Virol、1996年、70巻(11号):8098～8108頁;Chirmule, N.ら、J Virol、2000年、74巻(5号):2420～2425頁;Lowenstein, P.R.ら、Curr Gene Ther、2007年、7巻(5号):347～60頁;Lowenstein, P.R.ら、Neurotherapeutics、2007年、4巻(4号):715～724頁;Voges, J.ら、Ann Neurol、2003年、54巻(4号):479～487頁。]。

10

【0005】

非ウイルス遺伝子ベクターは、これらの限定の多くが存在しない、遺伝子送達のための魅力的な代替戦略を提供しうる[O'Mahony, A.M.ら、J Pharm Sci、2013年、102巻(10号):3469～3484頁]。カチオン性ポリマーベースの遺伝子ベクターは、in vitroおよびin vivoでのDNA凝縮および効率的な遺伝子移入のための調整可能なプラットフォームを提供する。それらの正電荷密度は、負に荷電した核酸の安定なコンパクションを可能にし[Sun, X.およびN. Zhang、Mini Rev Med Chem、2010年、10巻(2号):108～125頁;Dunlap, D.D.ら、Nucleic Acids Res、1997年、25巻(15号):3095～3101頁]、それらを酵素分解から保護する[Kukowska-Latallo, J.F.ら、Hum Gene Ther、2000年、11巻(10号):1385～1395頁。]。また、プロトン化可能なアミンの数は、「プロトンスポンジ効果(proton sponge effect)」によってエンドソーム逸脱を促進する緩衝能の増加を提供して、効率的なトランスフェクションにつながる[Akinc, A.ら、J Gene Med、2005年、7巻(5号):657～663頁]。多種多様なカチオン性ポリマーがこの目的のために開発され、多様な物理化学的プロファイルおよびin vivo挙動を有する遺伝子ベクターが提供されている[Mintzer, M.A.およびE.E. Simanek, Chem Rev、2009年、109巻(2号):259～302頁;Pathakら、Biotechnol J、2009年、4巻(11号):1559～72頁。]。しかしながら、非ウイルス遺伝子ベクターはなお、脳内の標的細胞に到達する前にいくつかの障壁に直面する[O'Mahonyら、J Pharm Sci、2013年、102巻(10号):3469～3484頁]。

20

30

40

【0006】

対流強化送達(convection enhanced delivery)(CED)は、頭蓋内投与中に圧力勾配を提供することによって、治療薬の分布をさらに向上させるために適用されうる[Allardら、Biomaterials、2009年、30巻(12号):2302～2318頁。]。しかしながら、CEDは、接着性相互作用および/または立体妨害に起因して粒子が脳実質内で捕捉されたままである場合、顕著な利益を提供しない可能性が高い。脳実質内の制約のない拡散を可能にする粒子の物理化学的特性は、CEDに従って粒子貫通の向上を達成するために依然として肝要である[Allardら、Biomaterials、2009年、30巻(12号):2302～18頁;Kennyら、Biomaterials、2013年、34巻(36号):91

50

90～9200頁]。CEDに従っても、正に荷電した粒子と負に荷電したECMとの間の相互作用により、カチオン性ナノ粒子が注射点および血管周囲腔に閉じ込められ、脳実質へのそれらの貫通が限定される[MacKayら、Brain Res、2005年、1035巻(2号):139～153頁;Kennyら、Biomaterials、2013年、34巻(36号):9190～9200頁;Writerら、J Control Release、2012年、162巻(2号):340～8頁。]。

【0007】

血液脳関門を克服し、脳実質内に拡散することに加えて、重大な課題は、脳内の疾患プロセスに關与する特定の細胞、例えば免疫プロセスに關与するミクログリアおよび星状膠細胞を標的化することである。これは、広汎性神経炎症が重大な因子であり、かつCNS内のいくつかの領域が關与しうるいくつかの神経炎症性障害、神経発達障害および神経変性障害において、とりわけ肝要となる[Kannan Sら、Sci Transl Med、2012年、18:4(130:130fs8)]。

10

【0008】

要約すれば、脳への薬物および遺伝子の送達は、BBB、脳微小環境、および神経炎症の広汎性に起因して、困難である。したがって、結果として、多くの神経障害、とりわけ神経発達障害は、治療選択肢が限定され、技術開発が限定されている。

【0009】

レット症候群(RTT)は、消耗性神経発達障害の一例である。RTTは、初めは正常に見える小児において、発達を遅らせ、続いて機能を突然退行させることによって女兒に影響を及ぼす。これらの小児は、手の意図的動作の喪失、手揉み(hand wringing)の増加、呼吸困難、脳の成長の減少、歩行/這行不能、発語不能、知的能力障害および痙攣発作(seizure)を有する。RTTを有する患者は、自閉症において見られるいくつかの特色を示し、自閉症の重症型とみなされる場合がある。脳の炎症は、RTTおよび自閉症を有する小児における病因および症状の悪化において重大な役割を果たす。これらの障害に利用可能な治療法は存在しない。

20

【0010】

RTTにおいて、血液脳関門もしくは脳微小環境が処置に対する最大の障壁であるか、または大部分の神経疾患の場合のように、両方の組合せであるかは公知でない。現在の療法には、抗痙攣剤による薬物療法および運動能力障害に対する作業療法が含まれる。炎症を減弱させる標的化療法は、レットおよび自閉症スペクトラム障害の両方において影響をもたらす。神経炎症に關与する細胞を抑制する全身投与療法が脳に到達できれば、有効性の改善、副作用およびコストの低減において大きな意義を有する。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Jain、Nanomedicine (Lond)、2012年、7巻(8号):1225～33頁

【非特許文献2】Wohlfartら、J Control Release、2012年、161巻(2号):264～273頁

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、本発明の一目的は、改善された送達、例えば傷害細胞の特異的標的化、ならびに脳およびCNS内のこれらの細胞における複数の経路の同時標的化を提供することである。

【0013】

本発明のさらなる目的は、脳および中枢神経系の神経障害、神経発達障害、および神経変性障害、とりわけ自閉症およびRTTを処置する手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 1 4 】

治療薬剤、予防薬剤および／または診断薬剤を送達するデンドリマーを含む医薬組成物は、全身投与されて、脳および中枢神経系内の標的細胞に到達しうる。好ましい実施形態では、デンドリマー組成物は、脳およびCNSの神経障害、神経発達障害、および神経変性障害、例えば自閉症スペクトラム障害およびRTTを処置するために使用される。RTTマウスモデルを使用して実証されるように、抗炎症薬剤のデンドリマーへのコンジュゲーションは、無処置または遊離薬物処置と比較して、移動性(mobility)、歩行、足揉み(paw wringing)、足の握りしめ(paw clenching)、振戦および呼吸パターンの有意な改善をもたらす。デンドリマーコンジュゲートは、薬物単独よりも有意に良好に、無処置動物と比較して、死亡率および運動／行動機能を改善する。本明細書に記載された表面属性を有するデンドリマーは、多くの現在の「脳組織障壁」に関連した課題を克服する。

10

【 0 0 1 5 】

好ましい実施形態では、デンドリマーは、少なくとも1つの治療薬剤、予防薬剤または診断薬剤に共有結合的に連結している、ポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端デンドリマーを含む、デンドリマーナノ粒子の形態である。RTTまたは自閉症スペクトラム障害を処置するための特に好ましい実施形態では、デンドリマーナノ粒子は、被験体のレット症候群または自閉症スペクトラム障害の1つまたは複数の症状を処置するのに有効な量の、生物学的に活性な薬剤に共有結合的に連結している、1つまたは複数の、エチレンジアミンコアのPAMAMヒドロキシル末端世代4～10の(G4-OH)デンドリマーを含む。興奮毒性障害もまた、同じ組成物を使用して処置されうる。

20

【 0 0 1 6 】

結果は、世代4のデンドリマーと比較して、世代6のデンドリマーで、損傷または疾患脳による取込みの有意な向上が観察されることを実証する。実施例に記載するように、世代6のデンドリマーは、脳傷害の大型動物モデルにおいて非常に望ましい脳脊髄液(CSF)対血清レベルを有することが示され、これらの組成物が、CNS薬物を傷害脳に選択的に送達するのに優れていることが示される。臨床的に関連する大型動物モデル(多くの態様でヒトに類似する)における肯定的結果は、知見の重要性を強調する。これは、診断および処置のための手段を提供する。デンドリマーの別の利益は、同じデンドリマーを使用して、2つまたはそれ超の異なる薬剤を送達できることである。これは、2つの異なる治療薬剤であってもよく、治療薬剤と、1つまたは複数の診断薬剤または予防薬剤との組合せであってもよい。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 7 】

【 図 1 】 図 1 A は、MeCP2 欠損マウスにおけるNACおよびD-NAC療法後のKaplan-Meier生存曲線である。MeCP2 欠損マウスにおける週2回のNACまたはD-NAC療法後に、生存を評価した。D-NACは、非処置動物(PBS)と比較して、生存を改善しない。D-NACは、NACの安全性を改善する。D-NACおよびPBSで処置したMeCP2 欠損マウスは、NACで処置したマウスと比較して、有意に良好な50%生存を有しており($p = 0.014$)、遊離製剤として与えられた場合のNACの潜在的毒性が示される。図 1 B は、MeCP2 欠損マウスにおけるD-NAC療法後の神経行動学的転帰の線グラフである。MeCP2 欠損マウスを、3週齢(PND 21)で始めて、食塩水(PBS)、10mg/kgのNAC、または10mg/kg(NACベース)のD-NACで処置した。マウスを週2回処置した。行動試験を、ベースラインを決定するためにPND 10およびPND 1で実施し、PND 21で始める各処置日の処置前に実施した。同腹のTマウスを、体重および行動の両方の対照として使用した。D-NAC療法は、NACおよびPBS処置と比較して、行動的転帰を有意に改善した。D-NACは、非処置マウスと比較して、MeCP2 欠損マウスの全体的な外観を改善した。非処置マウスは、痩せ衰え、複数の握りしめた足、猫背姿勢、および眼状態不良を有していた。

40

50

【図 2 - 1】図 2 A ~ 2 F は、T (白抜きバー) および MeCP2 欠損 (斜線バー) マウスにおける炎症促進性および抗炎症性 mRNA 発現レベルの発現のグラフである。図 2 A、TNF- α ; 図 2 B、I-6 ; 図 2 C、I-I β ; 図 2 D、TGF- β ; 図 2 E、I-10 ; および図 2 F、I-4。

【図 2 - 2】図 2 A ~ 2 F は、T (白抜きバー) および MeCP2 欠損 (斜線バー) マウスにおける炎症促進性および抗炎症性 mRNA 発現レベルの発現のグラフである。図 2 A、TNF- α ; 図 2 B、I-6 ; 図 2 C、I-I β ; 図 2 D、TGF- β ; 図 2 E、I-10 ; および図 2 F、I-4。

【図 2 - 3】図 2 A ~ 2 F は、T (白抜きバー) および MeCP2 欠損 (斜線バー) マウスにおける炎症促進性および抗炎症性 mRNA 発現レベルの発現のグラフである。図 2 A、TNF- α ; 図 2 B、I-6 ; 図 2 C、I-I β ; 図 2 D、TGF- β ; 図 2 E、I-10 ; および図 2 F、I-4。

【図 3 - 1】図 3 A ~ 3 C は、T ならびに症状前 (pre-symptomatic) および症候性の MeCP2 欠損マウスの脳における炎症プロファイルのグラフである。炎症促進性および抗炎症性サイトカインの mRNA レベルを、T (白抜き) および MeCP2 欠損 (斜線) 仔マウスの脳において、1、2、3、5、および 週齢で測定した。2 $\Delta\Delta$ CT 中央値が提示され、エラーバーは上下四分位範囲によって表される。(図 3 A) 経時的な炎症プロファイルの変化を、TNF α 、I-6、および I-1 β を含む複合炎症促進スコアの、TGF- β 、I-10、および I-4 を含む複合抗炎症スコアに対する比として提示する。複合スコアは、各週齢で、所与の遺伝子型におけるその週齢の全ての仔マウスについて、全ての炎症促進 2 $\Delta\Delta$ CT 値または全ての抗炎症 2 $\Delta\Delta$ CT 値の中央値を取ることによって生成した。(図 3 B) MeCP2 欠損マウスにおける炎症促進プロファイルは、2 週および 週で、炎症促進マーカーの増加傾向を示す。しかしながら、抗炎症性 mRNA 発現 (図 3 C) は、2 週、5 週、および 週齢で、同齢および同腹の T マウスと比較して、MeCP2 欠損マウスにおいて有意な減少を示す。これは、MeCP2 欠損マウスにおける神経炎症プロセスが、炎症促進性発現の増加傾向ではなく、抗炎症性発現の有意な減少によって引き起こされることを示唆する。

【図 3 - 2】図 3 A ~ 3 C は、T ならびに症状前および症候性の MeCP2 欠損マウスの脳における炎症プロファイルのグラフである。炎症促進性および抗炎症性サイトカインの mRNA レベルを、T (白抜き) および MeCP2 欠損 (斜線) 仔マウスの脳において、1、2、3、5、および 週齢で測定した。2 $\Delta\Delta$ CT 中央値が提示され、エラーバーは上下四分位範囲によって表される。(図 3 A) 経時的な炎症プロファイルの変化を、TNF α 、I-6、および I-1 β を含む複合炎症促進スコアの、TGF- β 、I-10、および I-4 を含む複合抗炎症スコアに対する比として提示する。複合スコアは、各週齢で、所与の遺伝子型におけるその週齢の全ての仔マウスについて、全ての炎症促進 2 $\Delta\Delta$ CT 値または全ての抗炎症 2 $\Delta\Delta$ CT 値の中央値を取ることによって生成した。(図 3 B) MeCP2 欠損マウスにおける炎症促進プロファイルは、2 週および 週で、炎症促進マーカーの増加傾向を示す。しかしながら、抗炎症性 mRNA 発現 (図 3 C) は、2 週、5 週、および 週齢で、同齢および同腹の T マウスと比較して、MeCP2 欠損マウスにおいて有意な減少を示す。これは、MeCP2 欠損マウスにおける神経炎症プロセスが、炎症促進性発現の増加傾向ではなく、抗炎症性発現の有意な減少によって引き起こされることを示唆する。

【図 4】図 4 は、複合行動スコアに基づく脳傷害の重症度の関数としての、脳内の D-Cy5 量 (μ g/g) のグラフである。この取込みと傷害の重症度との相関関係の実証は、傷害の程度を診断するための手段を提供する。

【図 5】図 5 は、時間単位の経時的な脳脊髄液中の D-Cy5 濃度 / 血清中の D-Cy5 濃度のグラフである。

【図 6】図 6 は、海馬、皮質および小脳内のデンドリマー蓄積 (μ g/g) のグラフである。

【図 7】図 7 は、様々な器官および脳内のデンドリマー蓄積 (μ g/g) のグラフである

10

20

30

40

50

。

【発明を実施するための形態】

【0018】

I. 定義

用語「治療薬剤」は、疾患または障害の1つまたは複数の症状を防止または処置するために投与することのできる薬剤を指す。例としては、以下に限定されないが、核酸、核酸類似体、小分子、ペプチド模倣剤 (peptidomimetic)、タンパク質、ペプチド、炭水化物、もしくは糖、脂質、もしくは界面活性剤、またはそれらの組合せが挙げられる。

【0019】

用語「処置すること」は、疾患、障害、または状態の1つまたは複数の症状を防止または軽減することを指す。疾患または状態を処置することは、このような薬剤が痛みの原因を処置しなくても鎮痛薬剤の投与によって被験体の痛みを処置することなど、根底にある病態生理が影響を受けないとしても、特定の疾患または状態の少なくとも1つの症状を改善することを含む。

【0020】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医療上の判断の範囲内で、合理的な利益／リスクの比に見合う過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴うことなく、人間および動物の組織に接触させる際の使用に適した、組成物、ポリマー、および他の材料ならびに／または剤形を指す。「薬学的に許容される担体」という語句は、薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクル、例えば液体または固体の充填剤、希釈剤、溶媒、または一器官もしくは身体の一部から別の器官もしくは身体の一部までの任意の対象組成物の運搬もしくは輸送に関与する被包装材料を指す。各担体は、対象組成物の他の成分と適合性があり、かつ患者に害にならないという意味で、「許容される」でなければならない。

【0021】

「治療有効量」という語句は、任意の医学的処置に適用可能な合理的な利益／リスクの比で、いくらかの所望の効果をもたらす治療薬剤の量を指す。有効量は、処置されている疾患もしくは状態、投与されている特定の標的化構築物、被験体のサイズ、または疾患もしくは状態の重症度などの要因に応じて、様々であることがある。当業者は、過度な実験を必要とすることなく、特定の化合物の有効量を経験的に決定してもよい。

【0022】

II. 製剤

A. デンドリマー

本明細書に使用されるとき用語「デンドリマー」としては、以下に限定されないが、内部コアと、この起点コアに規則的に付着している繰り返し単位の内部層（または「世代」と、最も外側の世代に付着している末端基の外部表面とを有する、分子構造物が挙げられる。デンドリマーの例としては、以下に限定されないが、PAMAM、ポリエステル、ポリリジン、およびPPIが挙げられる。PAMAMデンドリマーは、カルボキシル、アミン、およびヒドロキシル末端を有することができ、任意の世代のデンドリマーとすることができるが、そのようなものとしては、以下に限定されないが、世代1のPAMAMデンドリマー、世代2のPAMAMデンドリマー、世代3のPAMAMデンドリマー、世代4のPAMAMデンドリマー、世代5のPAMAMデンドリマー、世代6のPAMAMデンドリマー、世代7のPAMAMデンドリマー、世代8のPAMAMデンドリマー、世代9のPAMAMデンドリマー、または世代10のPAMAMデンドリマーが挙げられる。ともに使用するのに適したデンドリマーとしては、以下に限定されないが、ポリアミドアミン (PAMAM)、ポリプロピルアミン (POPAM)、ポリエチレンイミン (polyethyleneimine)、ポリリジン、ポリエステル、イブチセン、脂肪族ポリ(エーテル)、および／または芳香族ポリエーテルのデンドリマーが挙げられる。デンドリマー複合体の各デンドリマーは、他のデンドリマーと同様のまたは異なる化学的性質を

有していてもよい（例えば、第1のデンドリマーは、PAMAMデンドリマーを含んでもよく、一方で、第2のデンドリマーは、POPAMデンドリマーを含んでもよい）。一部の実施形態では、第1または第2のデンドリマーは、追加の薬剤をさらに含んでいてもよい。多重腕のPEGポリマーとしては、スルフヒドリルまたはチオピリジン末端基を保有する少なくとも2つの分枝を有するポリエチレングリコールが挙げられる。しかし、本明細書に開示される実施形態は、このクラスに限定されず、他の末端基、例えばスクシンイミジルまたはマレイミド末端などを保有するPEGポリマーを、使用することができる。分子量10kDaから80kDaのPEGポリマーを使用することができる。

【0023】

デンドリマー複合体は、多種のデンドリマーを含む。例えば、本デンドリマー複合体は、第3のデンドリマーを含むことができる。ここで、第3のデンドリマーは、少なくとも1つの他のデンドリマーと複合体形成している。さらに、第3の薬剤は、第3のデンドリマーと複合体形成することができる。別の実施形態では、第1および第2のデンドリマーは、それぞれ第3のデンドリマーと複合体形成し、ここで、第1および第2のデンドリマーは、PAMAMデンドリマーであり、第3のデンドリマーは、POPAMデンドリマーである。本発明の趣旨を逸脱することなく、追加のデンドリマーを組み入れることができる。多種のデンドリマーを利用する際には、多種の薬剤も組み入れることができる。これは、互いに複合体形成するデンドリマーの数によって限定されない。

【0024】

本明細書に使用されるとき、用語「PAMAMデンドリマー」は、ポリ（アミドアミン）デンドリマーを意味し、それは、アミドアミン基本要素を含む異なるコアを含有することがある。それらを作製するための方法は、当業者によって公知であり、概して、中心の起点コアの周りにある樹状のβ-アラニン単位の同心の殻（世代）を生成する、2ステップの反復する反応シーケンスを含む。このPAMAMコア殻構造物は、追加される殻（世代）の関数として、線状に直径を成長させる。その間に、表面基が、樹状-分枝形成の数学に従って、各世代で指数関数的に増幅する。それらは、5種の異なるコアタイプと10個の表面官能基を有する世代G0~10で利用可能である。デンドリマー分枝型ポリマーは、ポリアミドアミン（PAMAM）、ポリグリセロール、ポリエステル、ポリエーテル、ポリリジン、またはポリエチレングリコール（PEG）、ポリペプチドのデンドリマーからなってもよい。

【0025】

一部の実施形態に従って、使用されるPAMAMデンドリマーは、世代4のデンドリマーまたはそれを超えるものとしてことができ、それらは、その表面官能基に付着したヒドロキシル基を有する。多重腕のPEGポリマーは、スルフヒドリルまたはチオピリジン末端基を保有する2つまたはそれを超える分枝を有する、ポリエチレングリコールを含む。しかし、実施形態は、このクラスに限定されず、スクシンイミジルまたはマレイミド末端など、他の末端基を保有するPEGポリマーを使用することができる。分子量10kDaから80kDaのPEGポリマーを使用することができる。

【0026】

一部の実施形態では、本デンドリマーは、ナノ粒子の形態であり、国際特許公報WO 2009/046446に詳細に記載されている。

【0027】

PAMAM-NACの調製

下記は、リンカーとしてN-スクシンイミジル3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）を使用して、N-アセチルシステインをアミン末端第4世代PAMAMデンドリマー（PAMAM-NH₂）にコンジュゲートするための合成スキームである。

【0028】

N-スクシンイミジル3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）の合成は、2ステップの手順、スキーム1によって実施される。最初に、3-メルカプトプロピオン酸を2,2'-ジピリジジルスルフィドとチオール-ジスルフィド交換によって反応

10

20

30

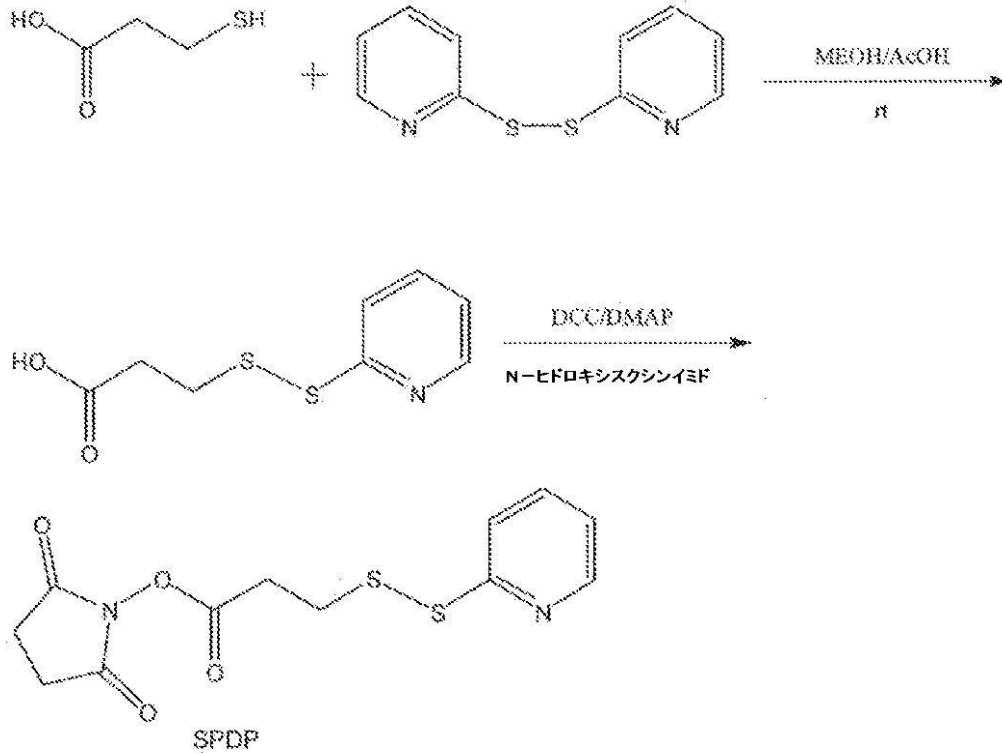
40

50

させて、2 - カルボキシエチル 2 - ピリジルジスルフィドを得る。アミン末端デンドリマーの S P D P への連結を促進するために、N , N' - ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび 4 - ジメチルアミノピリジンを使用することによる N - ヒドロキシスクシンイミドでのエステル化によって、スクシンイミド基を 2 - カルボキシエチル 2 - ピリジルジスルフィドと反応させて、N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネートを得る。

【化 1】

スキーム 1



10

20

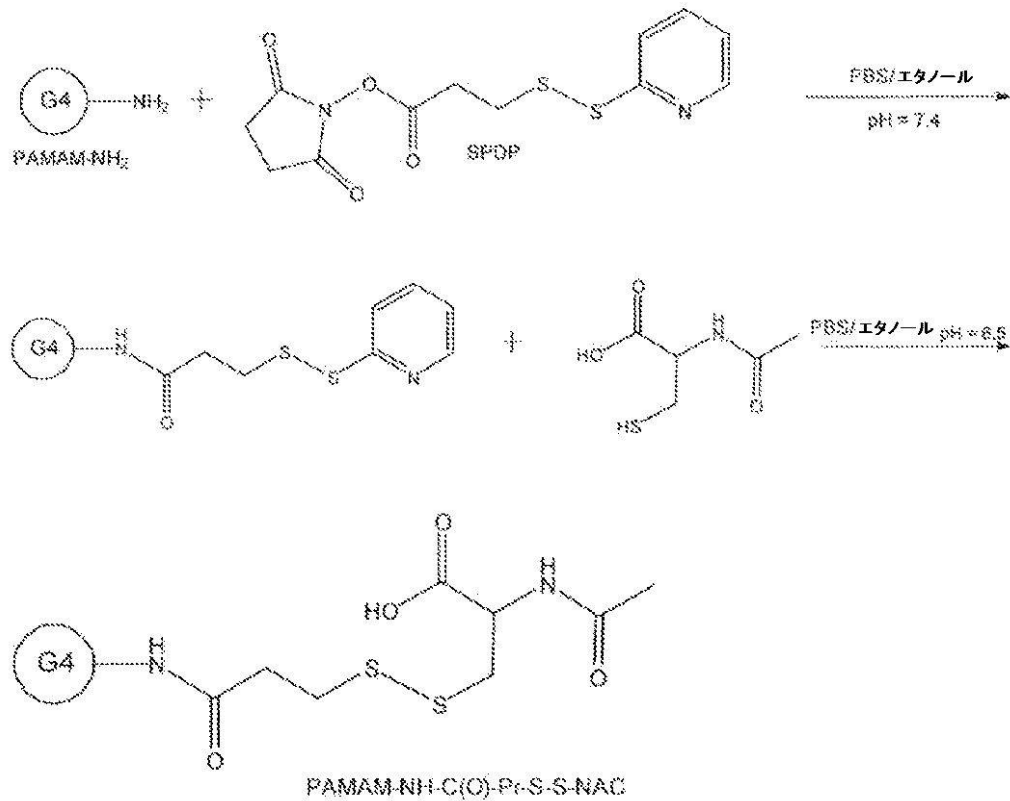
30

【0029】

スルフヒドリル反応性基を導入するために、PAMAM - NH₂ デンドリマーをヘテロ二官能性架橋剤 SPDP と反応させる、スキーム 2。SPDP の N - スクシンイミジル活性化エステルは、末端第一級アミンとカップリングして、アミド連結 2 - ピリジルジチオプロパノイル (PDP) 基を生じる、スキーム 2。SPDP との反応後に、PAMAM - NH - PDP を RP - HPLC を使用して分析して、SPDP がデンドリマーと反応した程度を決定することができる。

【化 2】

スキーム2



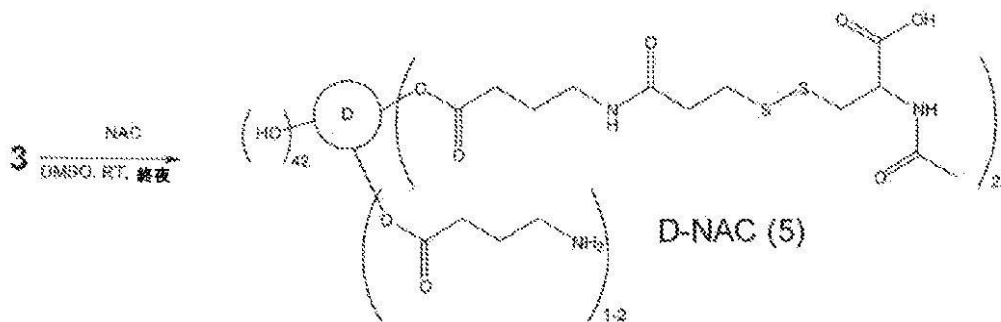
10

20

【0030】

別の実施形態では、D-NACを合成するために、下記のスキーム4に記載された合成ルートを用いて、化合物3をDMSO中でNACと室温で終夜反応させて、D-NAC 5を得る。

【化 3】



30

【0031】

デンドリマー-PEG-バルプロ酸コンジュゲート(D-VPA)の調製

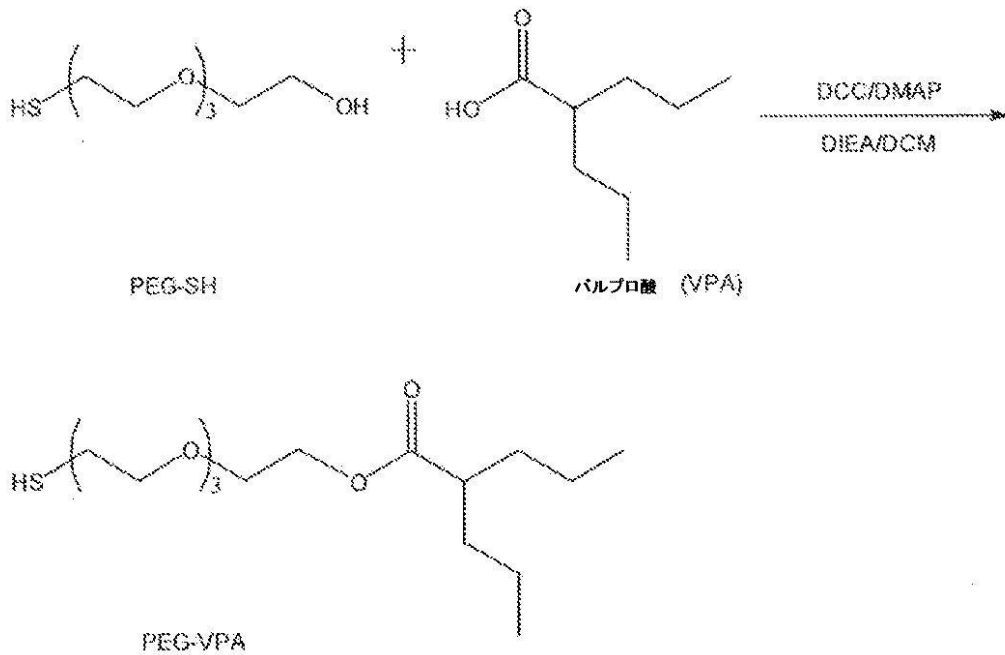
初めに、バルプロ酸をチオール反応性基で官能化する。スキーム3に示すように、 $(\text{CH}_2)_2\text{O}$ -の3つの繰り返し単位を有する短鎖PEG-SHをバルプロ酸と、カップリング試薬としてDCCを使用して反応させる。得られた粗製のPEG-VPAをカラムクロマトグラフィーによって精製し、プロトンNMRによって特徴付けた。NMRスペクトルにおいて、PEGのOH基に近接する CH_2 プロトンのピークの3.65 ppmから4.25 ppmへのダウンシフトが存在し、それにより、PEG-VPAの形成が確認された。チオール基はまた、酸性官能基と反応しやすい場合があるが、NMRスペクトルは、PEGのチオール基に隣接する CH_2 プロトンに属するピークのいかなる下方シフトも示さなかった。これは、チオール基がチオール反応性官能化デンドリマーと自由に反応できることを示唆する。

40

50

【化 4】

スキーム3



10

20

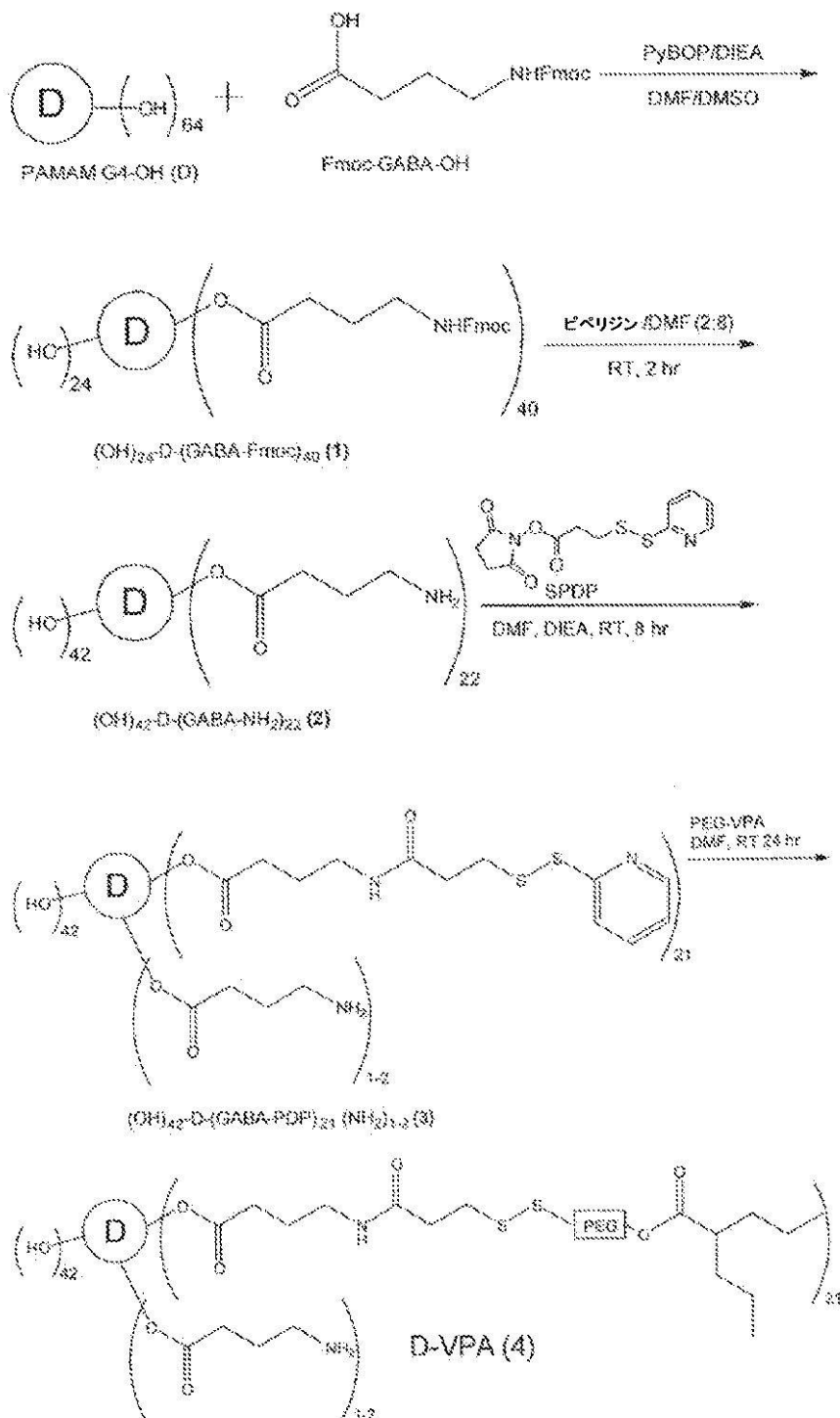
【 0 0 3 2 】

PEG-VPAをPAMAM-OHにコンジュゲートするために、デンドリマーとバルプロ酸との間にジスルフィド結合を導入する、スキーム4。最初に、デンドリマーをフルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)保護したγ-アミノ酪酸(GABA)と反応させることによって、デンドリマーを二官能性デンドリマー1に変換する。PEG-VPAの二官能性デンドリマーへのコンジュゲーションは、2ステップのプロセスを伴い、第1のステップは、アミン官能化二官能性デンドリマー1とN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネート(SPDP)との反応であり、第2のステップは、チオール官能化バルプロ酸をコンジュゲートすることを伴う。SPDPを中間体2とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)の存在下で反応させて、ピリジルジチオ(PDP)官能化デンドリマー3を得る。

30

【化 5】

スキーム4



【0033】

これは *in situ* 反応プロセスであるが、構造を ^1H NMR によって確立した。スペクトルにおいて、ピリジル基の芳香族プロトンの 6.7 から 7.6 ppm の間の新規ピークにより、生成物の形成が確認された。ピリジル基の数および GABA リンカーの数は同じであることが検証され、これは、アミン基の大部分が SPDP と反応したことを示す。これは、薬物の dendrimer への conjugation のための重大なステップであることから、アミン基当たりの SPDP のモル当量の使用および反応の所要時間を確認した。最後に、PEG-VPA を PDP 官能化 dendrimer と *in situ* で反応させて、dendrimer-PEG-pyruvic acid (D-VPA) を得る。最終 conjugate の形成お

10

20

30

40

50

よびVPAのローディングを¹H NMRによって確認し、コンジュゲートの純度を逆相HPLCによって評価した。NMRスペクトルにおいて、VPAの脂肪族プロトンの0.85から1.67 ppmの間の多重線(multiplet)、PEGのCH₂プロトンの3.53から3.66 ppmの間の多重線、およびピリジルの芳香族プロトンの非存在により、コンジュゲート形成が確認された。VPAのローディングは、プロトン積分法を使用して推定して約21分子であり、これは、1~2個のアミン基が未反応で残存することを示唆する。HPLCチャートにおいて、D-VPAの溶出時間(17.2分)は、G4-OHの溶出時間(9.5分)と異なっており、このことは、コンジュゲートが純粋であり、測定可能な微量のVPA(23.4分)およびPEG-VPA(39.2分)を含まないことが確認される。デンドリマーに対するVPAローディングの百分率は、約12 w/w%であり、3つの異なるパッチにおけるグラム分量を作製するための方法を確認する。

【0034】

B. カップリング剤およびスペーサー

デンドリマー複合体は、デンドリマーまたは多重腕のPEGにコンジュゲートまたは付着している治療的に活性な薬剤または化合物(以降「薬剤」とする)から形成され得る。付加は、薬剤とデンドリマーとの間にジスルフィド架橋を提供する適切なスペーサーを介して起こりうる。本デンドリマー複合体は、体内に見出される還元条件下で、in vivoでチオール交換反応によって、薬剤を速やかに放出することが可能である。

【0035】

本明細書に使用されるとき用語「スペーサー」は、治療的に活性な薬剤をデンドリマーに連結するために使用される組成物を含むことが意図される。スペーサーは、一緒に連結されてポリマーと治療薬剤またはイメージング剤とを架橋する、単一の化学実体かまたは2つもしくはそれを超える化学実体のどちらかとする事ができる。スペーサーとしては、スルフヒドリル、チオピリジン、スクシンイミジル、マレイミド、ビニルスルホン、およびカーボネート末端を有する、任意の小さな化学実体、ペプチド、またはポリマーを挙げることができる。

【0036】

スペーサーは、スルフヒドリル、チオピリジン、スクシンイミジル、マレイミド、ビニルスルホン、およびカーボネート基で終結する化合物のクラスの中から選択することができる。スペーサーは、チオピリジン末端化合物、例えばジチオジピリジン、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエートLC-SPDP、またはスルホ-LC-SPDPを含むことができる。また、スペーサーとしては、ペプチドを挙げることができ、ここで、ペプチドは、線状または環状であり、本質的にはスルフヒドリル基、例えばグルタチオン、ホモシステイン、システイン、およびその誘導体、arg-gly-asp-cys(RGDC)、シクロ(Arg-Gly-Asp-d-Phe-Cys)(c(RGDFC))、シクロ(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Cys)、シクロ(Arg-Ala-Asp-d-Tyr-Cys)を有する。スペーサーは、メルカプト酸誘導体、例えば3メルカプトプロピオン酸、メルカプト酢酸、4メルカプト酪酸、チオラン-2-オン、6メルカプトヘキサノ酸、5メルカプト吉草酸など、および他のメルカプト誘導体、例えば2メルカプトエタノール、および2メルカプトエチルアミンとすることができる。スペーサーは、チオサリチル酸およびその誘導体、(4-スクシンイミジルオキシカルボニル-メチル-α-2-ピリジチオ)トルエン、(3-[2-ピリジチオ(pyridithio)]プロピオニルヒドラジドとすることができる。スペーサーは、マレイミド末端を有することができ、ここで、スペーサーは、ポリマーまたは小さな化学実体、例えばビス-マレイミドジエチレングリコールおよびビス-マレイミドトリエチレングリコール、ビス-マレイミドエタン、ビスマレイミドヘキサンを含む。スペーサーは、1,6-ヘキサン-ビス-ビニルスルホンなどのビニルスルホンを含むことができる。スペーサーは、チオグルコースなどのチオグリコシドを含むことがで

10

20

30

40

50

きる。スパーサーは、還元タンパク質、例えばウシ血清アルブミンおよびヒト血清アルブミン、ジスルフィド結合を形成することが可能な任意のチオール末端化合物とすることができる。スパーサーとしては、マレイミド、スクシンイミジルおよびチオール末端を有するポリエチレングリコールを挙げることができる。

【0037】

C. 治療薬剤、予防薬剤および診断薬剤

本明細書で使用される「デンドリマー複合体」という用語は、デンドリマーと、治療的に活性な薬剤、予防的に活性な薬剤および/または診断的に活性な薬剤との組合せを指す。デンドリマーはまた、標的化薬剤を含んでもよいが、実施例によって実証されるように、これらは、傷害脳への送達には必要ではない。これらのデンドリマー複合体は、in vivoで存在する還元条件下で薬物を細胞内に優先的に放出できる、PAMAMデンドリマーまたは多重腕PEGに付着またはコンジュゲートしている薬剤を含む。デンドリマー複合体は、i.v.注射によって投与された場合、疾患状態でのみ血液脳関門(BBB)を優先的に横断することができ、正常状態では横断しない。デンドリマー複合体はまた、神経炎症、脳性麻痺、ALSならびに炎症および組織への損傷を特徴とする他のCNS疾患における治療薬の標的化送達に有用である。

【0038】

薬剤は、共有結合的に付着しているか、または分子内に分散もしくは被包されているかのいずれかでありうる。デンドリマーは、好ましくは、カルボキシル、ヒドロキシル、またはアミン末端を有する世代10までのPAMAMデンドリマーである。PEGポリマーは、2つまたはそれ超のアームを有し、かつ10kDaから80kDaの分子量を有する星型ポリマーである。PEGポリマーは、スルフヒドリル、チオピリジン、スクシンイミジル、またはマレイミド末端を有する。デンドリマーは、ジスルフィド、エステルまたはアミド結合で終端するスパーサーを介して薬剤に連結している。

【0039】

代表的な治療薬剤(プロドラッグを含む)、予防薬剤または診断薬剤は、ペプチド、タンパク質、炭水化物、ヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、小分子、またはそれらの組合せでありうる。例示的な治療薬剤には、抗炎症薬物、抗増殖剤、化学治療薬剤、血管拡張剤、および抗感染薬剤が含まれる。抗生物質には、β-ラクタム、例えばペニシリンおよびアンピシリン、セファロスポリン、例えばセフトロキシム、セファクロル、セファレキシン、セフトロキシル(cephalexin)、セフトロキシム(ceftriaxone)およびプロキシチル、テトラサイクリン抗生物質、例えばドキシサイクリンおよびミノサイクリン、マイクロライド(microcide)抗生物質、例えばアジスロマイシン、エリスロマイシン、ラバマイシンおよびクラリスロマイシン、フルオロキノロン、例えばシプロフロキサシン、エンロフロキサシン(enrofloxacin)、オフロキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシンおよびノルフロキサシン、トブラマイシン、コリスチン、またはアズトレオナム、ならびに抗炎症活性を保有することが公知である抗生物質、例えばエリスロマイシン、アジスロマイシン、またはクラリスロマイシンが含まれる。好ましい抗炎症剤は、抗酸化薬物、例えばN-アセチルシステインである。好ましいNSAIDには、メフェナム酸、アスピリン、ジフルニサル、サルサレート、イブプロフェン、ナプロキセン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、デキскетプロフェン(decetoprofen)、フルルビプロフェン、オキサプロジン、ロキソプロフェン、インドメタシン、スリダク、エトドラク、ケトロラク、ジクロフェナク、ナブメトン、ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、ドロキシカム、ロルノキシカム、イソキシカム、メクロフェナム酸、フルフェナム酸、トルフェナム酸、セレコキシブ(celcoxib)、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ、ルミラコキシブ、エトリコキシブ、フィロコキシブ(firocoxib)、スルホンアニリド、ニメスリド、ニフルム酸、およびリコフェロン(licochalcone)が含まれる。

【0040】

代表的な小分子には、ステロイド、例えばメチルプレドニゾン、デキサメタゾン、非ス

10

20

30

40

50

テロイド系抗炎症薬剤、例えばC O X - 2 阻害剤、コルチコステロイド抗炎症薬剤、金化合物抗炎症薬剤、免疫抑制薬剤、抗炎症薬剤および抗血管新生薬剤、抗興奮毒性薬剤、例えばバルプロ酸、D - アミノホスホノバレレート、D - アミノホスホノヘプタノエート、グルタミン酸形成 / 放出の阻害剤、バクロフェン、N M D A 受容体アンタゴニスト、サリチル酸系抗炎症薬剤、ラニビズマブ、抗 V E G F 薬剤、例えばアフリベルセプト、ならびにラパマイシンが含まれる。他の抗炎症薬物には、非ステロイド系薬物、例えばインドメタシン、アスピリン、アセトアミノフェン、ジクロフェナクナトリウムおよびイブプロフェンが含まれる。コルチコステロイドは、フルオシノロンアセトニドおよびメチルプレドニゾロンでありうる。ペプチド薬物は、ストレプトキナーゼ (s t r e p t i d o k i n a s e) でありうる。

10

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態では、分子は、抗体、例えばダクリズマブ、ベバシズマブ (a v a s t i n (登録商標))、ラニビズマブ (L u c e n t i s (登録商標))、バシリキシマブ、ラニビズマブ、およびペガブタニブナトリウムまたは S N 5 0 等のペプチド、ならびに N F のアンタゴニストを含みうる。

【 0 0 4 2 】

代表的なオリゴヌクレオチドには、s i R N A、m i c r o R N A、D N A、および R N A が含まれる。治療薬剤は、アミンまたはヒドロキシル末端を有する P A M A M デンドリマーでありうる。

【 0 0 4 3 】

例示的な診断薬剤としては、常磁性分子、蛍光化合物、磁性分子、ならびに放射性核種、x 線イメージング剤、および造影剤が挙げられる。これらはまた、上述のものをを用いて標識されているリガンドまたは抗体であってもよいし、または当業者に公知の方法によって検出可能な標識化リガンドもしくは抗体に結合してもよい。

20

【 0 0 4 4 】

例示的な診断薬剤としては、色素、蛍光色素、近赤外色素、S P E C T イメージング剤、P E T イメージング剤、および放射性同位体が挙げられる。代表的な色素としては、カルボシアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、ツイカルボシアニン (t h u i c a r b o c y a n i n e) およびメロシアニン、ポリメチン、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセイン、ハウ素 - ジピロメタン (B O D I P Y)、C y 5、C y 5 . 5、C y 7、V i v o T a g - 6 8 0、V i v o T a g - S 6 8 0、V i v o T a g - S 7 5 0、A l e x a F l u o r 6 6 0、A l e x a F l u o r 6 8 0、A l e x a F l u o r 7 0 0、A l e x a F l u o r 7 5 0、A l e x a F l u o r 7 9 0、D y 6 7 7、D y 6 7 6、D y 6 8 2、D y 7 5 2、D y 7 8 0、D y L i g h t 5 4 7、D y l i g h t 6 4 7、H i L y t e F l u o r 6 4 7、H i L y t e F l u o r 6 8 0、H i L y t e F l u o r 7 5 0、I R D y e 8 0 0 C W、I R D y e 8 0 0 R S、I R D y e 7 0 0 D X、A D S 7 8 0 W S、A D S 8 3 0 W S、および A D S 8 3 2 W S が挙げられる。

30

【 0 0 4 5 】

代表的な S P E C T または P E T イメージング剤としては、ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (D T P A)、1, 4, 7, 10 - テトラ - アザシクロドデカン - 1, 4, 7, 10 - テトラ酢酸 (D O T A)、ジアミンジチオール、活性化メルカプトアセチル - グリシル - グリシル - グリシン (g y l c i n e) (M A G 3)、およびヒドラジノニコチンアミド (h y d r a z i d o n i c o t i n a m i d e) (H Y N I C) などのキレート剤が挙げられる。

40

【 0 0 4 6 】

代表的な同位体としては、T c - 9 4 m、T c - 9 9 m、I n - 1 1 1、G a - 6 7、G a - 6 8、G d ^{3 +}、Y - 8 6、Y - 9 0、L u - 1 7 7、R e - 1 8 6、R e - 1 8 8、C u - 6 4、C u - 6 7、C o - 5 5、C o - 5 7、F - 1 8、S c - 4 7、A c - 2 2 5、B i - 2 1 3、B i - 2 1 2、P b - 2 1 2、S m - 1 5 3、H o - 1 6 6、お

50

よび D y - i 6 6 が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

標的化部分としては、葉酸、線状または環状のどちらかの R G D ペプチド、T A T ペプチド、L H R H、および B H 3 が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

R T T および自閉症スペクトラム障害を処置するための一実施形態では、デンドリマーナノ粒子は、被験体のレット症候群および自閉症スペクトラム障害を処置するのに有効な量の、少なくとも 1 つの生物学的に活性な薬剤に共有結合的に連結している、P A M A M ヒドロキシル末端デンドリマーから形成される。

【 0 0 4 9 】

生物活性化合物または治療的に活性な薬剤に連結しているデンドリマー複合体は、標的化、病的部位での局在化、薬物の放出、およびイメージングの目的を含む、いくつかの機能を果たすために使用することができる。デンドリマー複合体は、デンドリマーと薬剤またはイメージング剤との間のジスルフィド結合がスパーサーまたはリンカー分子を介して形成されるように、標的化部分を用いてまたは用いずにタグ付けされうる。

【 0 0 5 0 】

D . デバイスおよび製剤

本デンドリマーは、硬膜下、静脈内、羊膜内 (i n t r a - a m n i o t i c)、腹腔内、または皮下の経路によって、非経口的に投与することができる。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される担体または希釈剤は、固形製剤のための固形担体もしくは希釈剤、液体製剤のための液体担体もしくは希釈剤、またはそれらの混合物であってもよい。

【 0 0 5 2 】

液体製剤のために、薬学的に許容される担体は、例えば、水性または非水性の溶液、懸濁物、乳濁液、または油であってもよい。非経口的なビヒクル (皮下、静脈内、動脈内、または筋肉内注射のための) としては、例えば、塩化ナトリウム溶液、リンゲル・デキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、ならびに不揮発性油が挙げられる。非水性の溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。水性担体としては、例えば、水、アルコール性 / 水性溶液、シクロデキストリン、乳濁液または懸濁物が挙げられ、食塩水および緩衝化媒体を含む。本デンドリマーはまた、乳濁液で、例えば油中水で投与することができる。油の例は、石油、動物、植物、または合成由来のもの、例えばピーナツ油、ダイズ油、鉱油、オリーブ油、ヒマワリ油、魚肝油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ、ペトロラタム、および鉱物である。非経口的な製剤での使用に適した脂肪酸としては、例えばオレイン酸、ステアリン酸、およびイソステアリン酸が挙げられる。オレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピルは、適した脂肪酸エステルの例である。

【 0 0 5 3 】

非経口投与に適した製剤は、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、ならびに目的のレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質、ならびに懸濁剤を含むことのできる水性および非水性の滅菌懸濁物、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、ならびに保存剤を含み得る。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養補充剤、電解質補充剤、例えば、リンゲル・デキストロースをベースにするものなどを挙げることができる。概して、水、食塩水、水性デキストロース、および関連の糖溶液、およびプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコールが、好適な液体担体であり、特に注射可能な溶液に好適である。

【 0 0 5 4 】

注射可能な組成物に用いるための注射可能な医薬担体は、当業者に周知である [例えば P h a r m a c e u t i c s a n d P h a r m a c y P r a c t i c e , J . B . L i p p i n c o t t C o m p a n y , フィラデルフィア、ペンシルバニア州、 B a n k e r a n d C h a l m e r s 編、238 ~ 250 頁 (1982 年)、ならびに A S

10

20

30

40

50

HP Handbook on Injectable Drugs, Trissel, 第15版、622～630頁(2009年)を参照]。

【0055】

対流強化送達 (convection enhanced delivery) (「CED」) のための製剤は、小分子量の塩 (salts) および糖、例えばマンニトールなどの溶液を含む。

【0056】

III. 処置方法

A. 脳およびCNSへの送達

治療薬剤、予防薬剤または診断薬剤に連結している、デンドリマー、好ましくは少なくとも第4世代のデンドリマー、より好ましくは少なくとも世代6のデンドリマーを含む、デンドリマー複合体組成物は、脳性麻痺を含む、いくつかの神経変性疾患の病因において重大な役割を果たすミクログリアおよび星状膠細胞を選択的に標的化することができる。これらの細胞を標的化することによって、デンドリマーは、神経炎症を処置するために特異的に薬剤を送達する。

10

【0057】

N-アセチルシステイン (「NAC」) は、広範に調査され、研究されている。母子感染症に関連する神経炎症についても調査されている。しかしながら、NACは、高い血漿タンパク質結合に起因して、バイオアベイラビリティが低い。デンドリマー複合体組成物は、NACの活性に影響を及ぼすことなく、血漿タンパク質結合を克服する。

20

【0058】

単回 i.v. 投与で、G4 PAMAM-NACは、遊離薬物NACよりも、in vivoで10から100倍効果的でありうる。遊離薬物NACは、非常に高い血漿タンパク質結合を示し、バイオアベイラビリティの低減をもたらす。本デンドリマー複合体の主要な利点の1つは、望ましくない薬物血漿タンパク質間相互作用を制限することによってバイオアベイラビリティを向上させ、薬物の細胞内への速やかな放出を選択的にもたらし、所望の治療作用を示すことである。

【0059】

G4 PAMAM-NAC中の薬物NACの高いペイロードは、非常に少ない分量 (約50mg/kg) の担体、PAMAMデンドリマー、およびより少ない分量の薬物 (約10mg/kg) を必要とし、それによって投与される量を低減する。対照的に、遊離NACは、典型的には、動物モデルにおいて100～300mg/kgの1日用量で使用される。薬剤の分量の減少により、薬剤に関連する副作用が限定される。薬剤のバイオアベイラビリティは依然として高いことから、より少ない分量の薬剤の投与にもかかわらず、薬剤の効能 (positive effect) は低下しない。デンドリマー-薬物コンジュゲートを含むデンドリマー複合体は、組織および器官へのその生体内分布を制限し、薬物を標的部位で優先的に送達し、それによって望ましくない副作用を低減する。

30

【0060】

デンドリマー複合体は、BBBを越えて有効に輸送し、したがって、神経障害、神経発達障害、および神経変性障害ならびに脳傷害における標的化された薬物送達に有用である。G4-PAMAM-S-S-S-NACコンジュゲートは、神経炎症性障害における活性化ミクログリア細胞および星状膠細胞を特異的に標的化する。

40

【0061】

発達中のウサギ脳 (脳性麻痺の動物モデル) において、白質傷害およびミエリン形成減少を誘導するためのリポ多糖 (LPS) による2日間の動物処置の後に、G4-PAMAM-S-S-S-NACデンドリマーコンジュゲートの治療効力を評価した。G4-PAMAM-S-S-S-NACデンドリマー複合体から選択的に送達されたNACは、炎症促進性サイトカイン (TNF- α 、IL-6 mRNA)、炎症性シグナル伝達因子、例えばNF- κ Bおよびニトロチロシンを強力に抑制し、GSHレベルを向上させた。G4-PAMAM-S-S-S-NACは、遊離NACと比較して、10から100倍効果的

50

であることが見出された。これは、G 4 - P A M A M - S - - S - N A C が B B B を通過したという結論を裏付ける。デンドリマー複合体から活性化ミクログリア細胞への N A C の標的化送達、脳性麻痺の新生仔ウサギモデルにおいて、運動欠陥および L P S 誘導性脳傷害からの回復の減弱を改善した。

【 0 0 6 2 】

G 4 - P A M A M - S - - S - N A C デンドリマー複合体の投与により、炎症促進性サイトカイン (T N F - α 、I L - 6 m R N A) の有意な低減が観察された。N A C および G 4 - P A M A M - S - - S - N A C で処置した仔ウサギは、食塩水で処置した仔ウサギと比較して、胎仔炎症応答の減少および運動欠陥の改善を示した。G 4 - P A M A M - S - - S - N A C コンジュゲートからの N A C の持続的送達に起因して、G 4 - P A M A M - S - - S - N A C コンジュゲートで処置した仔ウサギは、N A C 単独を受けた仔ウサギと比較して、行動変化が少なく、脳内のミクログリア活性化が低かった。結果は、G 4 - P A M A M - S - - S - N A C コンジュゲートが、活性化マクロファージおよびミクログリア細胞によって優先的に取り込まれることから、N A C 単独よりも大きな効果を有し、炎症作用ならびに酸化およびニトロソ化 (n i t r o s a t i v e) 作用を低減することを示した。

10

【 0 0 6 3 】

G 4 - P A M A M - S - - S - N A C デンドリマー複合体による処置は、白質傷害およびミクログリア活性化を低減した。遊離 N A C について観察された応答と同様の応答を誘発するために、G 4 - P A M A M - S - - S - N A C として投与された場合、N A C の用量の有意な低減が観察された。1 0 0 m g / k g の濃度の遊離 N A C および 1 0 m g / k g の濃度の G 4 - P A M A M - S - - S - N A C はいずれも、1 0 m g で同一の応答が誘発され、デンドリマーへのコンジュゲートにより、用量の低減が達成されることが実証される。G 4 - P A M A M - S - - S - N A C は、遊離 N A C よりも低い濃度において、L P S 誘導性脳傷害に対する有意な保護効果、T N F - α の抑制および I L - 6 活性の下方調節を示す。デンドリマー - N A C コンジュゲートのこの活性は、シグナル伝達因子 N F - κ B およびニトロチロシンを遮断または改変し、それによって細胞活性化をモジュレートすることによって初期炎症応答に干渉するその能力を原因とする。

20

【 0 0 6 4 】

海馬における T N F - α および I L - 6 の下方調節は、脳内のミクログリア細胞による特異的な細胞取込みによる、デンドリマー複合体の優先的な生体内分布を原因とすると思われる。デンドリマー - N A C 複合体は、母体感染症に関連する臨床症状を発症し、乳児において P V L および C P を発症するリスクが増加した妊婦の処置に使用することができる。結果は、デンドリマー - N A C によるミクログリア細胞、星状膠細胞の障害が、新生ウサギ脳における白質傷害を減少させたことを示す。さらに、デンドリマーは、コンジュゲートしている薬物の持続的放出を示し、長期にわたり薬物の有効性を向上させる。より低い用量において、デンドリマー - N A C コンジュゲートは、N A C 単独よりも有効であった。デンドリマー - N A C コンジュゲートは、有意な用量低減、バイオアベイラビリティの向上、および投薬の低減を含む、より多くの利点を提供するようである。

30

【 0 0 6 5 】

6 および 8 アーム P E G - N A C コンジュゲートは、細胞内 G S H 濃度 (2 および 1 0 m M) で、7 4 % の N A C を 2 時間以内に放出した。0 . 0 0 8 ~ 0 . 8 m M の間の濃度範囲において、コンジュゲートは、ミクログリア細胞に対して非毒性であった。等モル濃度の N A C (0 . 5 m M) において、6 アーム P E G - S - - S - N A C および 8 アーム P E G - S - - S - N A C は、遊離 N A C よりも効率的に G S H 枯渇を阻害した。6 および 8 アーム P E G - S - - S - N A C コンジュゲートはいずれも、それぞれ 0 . 5 m M および 5 m M の濃度において、等モル濃度の遊離 N A C と比較して、R O S 産生の有意な阻害を示した。これらの研究は、コンジュゲートが、遊離 N A C と比較して、N O 産生の阻害に優れていることを実証する。最高濃度 (5 m M) において、遊離薬物は、H ₂ O ₂ レベルおよび亜硝酸塩レベルを 3 0 ~ 4 0 % 低減したのに対し、コンジュゲートは、H ₂ O

40

50

2 および亜硝酸塩レベルを70%超低減した。これは、コンジュゲートが、薬物を細胞内に運搬し、薬物を遊離形態で放出することができ、遊離薬物よりも有意に効果的であることを示す。5 mMの濃度において、6 アーム PEG-S-S-S-NAC コンジュゲート(1)は、等濃度のNACと比較して、TNF- α 産生の有意な阻害(70%)を示した(Pb0.05)。8 アーム PEG-S-S-S-NAC コンジュゲート(3)は、5 mMにおいて、等濃度のNACと比較して、TNF- α 産生の有意な阻害(70%)を示した(Pb0.05 および Pb0.01)。PEGはヒトへの使用が承認されていることから、ペグ化NACは、製薬業界への有用性を有する dendritic 複合体であり、この方策は、NACの限定に対処し、より大きな効力をもたらす。

【0066】

10

実施例において実証されるように、世代6の dendritic 複合体は、とりわけ損傷を受けた脳組織へのさらに大きな送達を提供する。世代4の dendritic 複合体で決定された用量を、送達の増加を相殺するために相応に調整する。当業者は、過度の実験なしに相対的投薬を決定することができる。

【0067】

典型的には、担当医は、種々の要因、例えば年齢、体重、全身の健康状態、食事、性別、投与される化合物、投与経路、および処置されている状態の重症度などを考慮して、各被験体を処置するのに用いる組成物の投薬量を決定することになる。組成物の用量は、処置される被験体の体重1 kg 当たり約0.0001 から約1000 mg/kg、約0.01 から約100 mg/kg 体重、約0.1 mg/kg から約10 mg/kg、および約0.5 mg から約5 mg/kg 体重でありうる。

20

【0068】

概して、投与のタイミングおよび頻度は、所与の処置または診断スケジュールの有効性と、所与の送達系の副作用とのバランスを取るように調整されることになる。例示的な投薬頻度としては、持続注入、単回および多回の投与、例えば毎時、毎日、毎週、毎月、または毎年の投薬などが挙げられる。

【0069】

本発明の方法において使用される投薬レジメンは、被験体のレット症候群および/または関連した自閉症スペクトラム障害を処置するのに十分な任意の長さの時間でありうる。ことが、当業者には理解されよう。本明細書で使用される「長期の」という用語は、投薬レジメンの時間の長さが、数時間、数日、数週、数か月、または場合により数年でありうることを意味する。

30

【0070】

dendritic 複合体は、上記で論じた状態または疾患を処置できることが公知である1つまたは複数の追加の治療的に活性な薬剤と組み合わせて投与することができる。

【0071】

B. 処置される障害または疾患

脳の炎症は、RTTおよび自閉症スペクトラム障害を有する小児における病因および症状の悪化において重大な役割を果たす。本明細書で使用される場合、「脳の炎症性疾患」という用語は、American Psychiatric AssociationのDiagnostic and Statistical Manual Vにおいて分類されるように、脳のミクログリアまたは星状膠細胞の活性化に関連する脳の疾患、例えばRTTおよび自閉症スペクトラム障害を意味する。

40

【0072】

レット症候群

レット症候群(RTT)は、消耗性神経発達障害の一例であり、自閉症スペクトラム障害と共通する多くの態様を有する。RTTは、初めは正常に見える小児において、発達を遅らせ、続いて機能を突然退行させることによって女兒に影響を及ぼす。脳の炎症は、RTTおよび自閉症を有する小児における病因および症状の悪化において重大な役割を果たす。これらの障害に利用可能な治療法は存在しない。

50

【 0 0 7 3 】

レット症候群を有する小児は、多くの場合、初期段階において自閉症様行動を示す。レット症候群の最も初期の症状は、生後 6 から 18 か月頃に現れ、自閉症によく似ている：小児は、社会参加 (s o c i a l e n g a g e m e n t) から撤退し、コミュニケーション能力を喪失し、手揉み等の反復動作を生じる。レット症候群を有する患者の C S F ではグルタミン酸の増加が見られ、自閉症を有する患者の剖検標本ではミクログリア活性化の増加が見られる。

【 0 0 7 4 】

レットの動物モデルは、レットに関連する最も一般的な遺伝子異常、すなわち M e C P 2 欠失を有する。マウスは、レットおよび自閉症を有する患者において見られる特徴的な足揉みおよび足組み (p a w c l a s p i n g) 動作を示す。このモデルにおいて、動物は、3 週齢での症状の発症から約 7 週齢までの死亡へと急速に進行する。

10

【 0 0 7 5 】

1 週齢または 3 週齢のいずれかから始める週 1 回のデンドリマー - 抗炎症薬剤 (D - N A C 10 m g / k g) による処置は、処置されていない動物と比較して、症状の改善、症状発症の遅延および / または症状の無進行をもたらすが、これは、生存率の有意な増加に関連しない。デンドリマー - N A C 処置は、処置された動物における体重増量の増加をもたらした。処置された動物におけるミクログリアの形態および表現型もまた改善される。

【 0 0 7 6 】

ヒトにおいて、症状の改善は、大きな進歩となる。好ましい実施形態では、デンドリマー複合体は、抗炎症薬剤 (D - N A C) ならびに抗興奮毒性および D - 抗グルタミン酸薬剤を送達するために使用される。好ましい候補は、M K 801、メマンチン、ケタミン、1 - M T、J H U - 29、抗グルタミンアーゼ阻害剤ならびに G C P I I 阻害剤、例えば 2 - M P P A および 2 - P M P A である。

20

【 0 0 7 7 】

自閉症スペクトラム障害

自閉症スペクトラム障害 (A S D) は、以下を特徴とする：

複数の状況にわたる社会的コミュニケーションおよび社会的相互作用の持続的欠陥；

制限された、反復的パターンの行動、関心、または活動；

30

症状が、発達初期において存在しなければならない (典型的には、生後最初の 2 年以内に認識される) ；および

症状が、社会的、職業的、または他の重要領域の現在の機能における臨床的に有意な機能障害を引き起こす。

【 0 0 7 8 】

「スペクトラム」という用語は、A S D を有する小児が有しうる幅広い症状、技能、および機能障害または能力障害のレベルを指す。一部の小児は、その症状によって軽度の機能障害を受け、他の小児は、重度の能力障害を受ける。最新版の D i a g n o s t i c a n d S t a t i s t i c a l M a n u a l o f M e n t a l D i s o r d e r s (D S M - 5) には、アスペルガー症候群は含まれなくなったが、アスペルガー症候群の特徴は、A S D の広義のカテゴリー内に含まれる。

40

【 0 0 7 9 】

一部の場合、A S D を有する乳児は、その発達の非常に初期において、異なって見える場合がある。一部の乳児は、1 歳の誕生日前にさえ、ある特定の対象物に過度に集中し、ほとんど目を合わせず、典型的な双方向的遊び (b a c k - a n d - f o r t h p l a y) および親との喃語に参加することができない。他の小児は、生後 2 年目またはさらに 3 年目まで正常に発達するが、その後他者への関心を喪失し始め、寡黙になり、引きこもり、または社会的シグナル (s o c i a l s i g n a l) に無関心になる場合がある。正常な発達の喪失または逆転は、退行と呼ばれ、A S D を有する小児の一部において起こる。

50

【0080】

自閉症スペクトラム障害（ASD）の診断は、多くの場合、2段階のプロセスである。第1の段階は、小児科医または幼児期医療提供者による小児健診中の一般的な発達スクリーニングを伴う。何らかの発達の問題を示す小児は、追加評価に回される。第2の段階は、医師チームおよび幅広い専門分野を有する他の医療専門家による徹底的な評価を伴う。この段階において、小児は、ASDまたは別の発達障害を有すると診断されうる。

【0081】

現時点で、ASDの態様を処置するためにFDAによって承認されている薬物療法は、抗精神病剤リスペリドン（Risperdal）およびアリピプラゾール（aripiprazole）（Abilify）のみである。これらの薬物療法は、小児年齢における易刺激性・攻撃性、自傷行為、またはかんしゃくを意味する・を低減するのに役立つ。

10

ASDを有する小児のために適応外処方されうる一部の薬物療法には、以下が含まれる：

【0082】

抗精神病剤による薬物療法は、重度の精神病、例えば統合失調症を処置するために、より一般的に使用される。これらの薬は、ASDを有する小児を含む、小児における攻撃性および他の深刻な行動の問題を低減するのに役立つ。これらはまた、反復行動、多動、および注意の問題を低減するのに役立つ。

【0083】

抗うつ剤による薬物療法、例えばフルオキセチンまたはセルトラリンは、うつ病および不安を処置するために通常処方されるが、反復行動を低減するために処方される場合もある。一部の抗うつ剤はまた、ASDを有する小児における攻撃性および不安を制御するのに役立つ。

20

【0084】

刺激剤による薬物療法、例えばメチルフェニデート（Ritalin）は、注意欠陥多動性障害（ADHD）を有する人を処置するのに安全かつ有効である。メチルフェニデートはまた、ASDを有する小児における多動を有効に処置することが示されている。しかし、ASDを有する小児で処置に応答する者はそれほど多くなく、応答する者は、ADHDを有しASDを有さない小児よりも多くの副作用を示している。

30

【0085】

本明細書に記載されたデンドリマーコンジュゲートは、死後脳標本における活性化ミクログリアおよび星状膠細胞の存在の増加ならびにサイトカインのCSFレベルの増加によって見られるように、自閉症を有する患者が神経炎症の証拠を有することを示す近年の研究を特に考慮して、そのような個体の処置および診断に効力を有するはずである。Vargasら、Ann Neurol.、2005年1月；57巻（1号）：67～81頁。訂正：Ann Neurol.、2005年2月；57巻（2号）：304頁。

【0086】

興奮毒性障害

興奮毒性は、神経細胞が過剰に刺激されたことに起因して損傷を受けるプロセスである。脳卒中、外傷性脳傷害、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および脊髄傷害を含むいくつかの状態は、興奮毒性に関係する。神経細胞への損傷は、対応する神経症状をもたらす、症状は、損傷を受けた細胞および損傷の程度に応じて変動する。神経細胞は、一度損傷を受けると、修復することができず、患者は恒久的な機能障害を経験する。

40

【0087】

興奮毒性が起こるプロセスは、グルタミン酸の上昇から始まる。グルタミン酸は、神経細胞間の電気シグナル伝達を促進する働きをする興奮性神経伝達物質である。しかしながら、グルタミン酸レベルが上がりすぎると、ニューロンを開放位置で本質的に動かなくし、カルシウムを細胞内に自由に流入させる。カルシウムは、細胞の構造およびDNAに損

50

傷を与え、細胞が死滅し、グルタミン酸を放出し、それが近接細胞に溢れ出るようなカスケード反応を生み出して、損傷を広がらせる。

【0088】

A M P A および N D M A 受容体を含む、神経細胞上のいくつかの受容体は、グルタミン酸に感作される。ニューロン間のこの相互作用は、興奮性または阻害性のいずれかでありうる。主要な興奮性アミノ酸神経伝達物質は、グルタミン酸およびアスパラギン酸であり、G A B A (γ - アミノ酪酸)、グリシン (アミノ酢酸)、およびタウリンは、阻害性である。

【0089】

脳卒中、外傷、てんかん、さらには神経変性状態、例えばハンチントン病、エイズ認知複合症、および筋萎縮性側索硬化症を含む、難解な多様性のある神経障害であるが、この疾患スペクトラムは、ニューロンの傷害および死滅の同じ機序を共有するとは通常考えられない。外傷は、細胞外グルタミン酸レベルを大幅に上昇させる鈍的機序である。正常な細胞外グルタミン酸濃度は、約 $0.6 \mu\text{mol/L}$ である。実質的なニューロンの興奮毒性傷害は、2 から $5 \mu\text{mol/L}$ のグルタミン酸濃度で起こる。

10

【0090】

ニューロンへの外傷性傷害は、約 $10 \mu\text{mol/L}$ の正常な細胞内グルタミン酸濃度の細胞外空間への露出により、悲惨な結果を生じさせうる。したがって、単一のニューロンへの機械的傷害により、近接するニューロン全てが危険にさらされる。このタイプのグルタミン酸放出から、周囲のニューロンへの顕著な二次的傷害が起こる。1つの近年の治療戦略は、頭部または脊柱への傷害を有する人を、グルタミン酸受容体遮断剤で直ちに処置して、直接の物理的に破壊されたニューロンを越えたニューロンの死滅の広がりを最小限に抑えることである。

20

【0091】

過剰なグルタミン酸蓄積のいくつかの機序は、虚血におそらく関わる。ニューロン小胞内の貯蔵部位からのグルタミン酸の異常放出は、少なくとも1つの因子である。この放出されたグルタミン酸が追加のグルタミン酸放出を刺激することから、フィードバックループが生成される。虚血はまた、グルタミン酸輸送体による再取り込みを害するエネルギー不全を引き起こす。これらの輸送体は、共輸送体として挙動し、これは、グルタミン酸をその濃度勾配に逆らって細胞内に移動させる細胞膜を横切るナトリウム勾配に依拠する。しかしながら、ナトリウム勾配は、エネルギー依存性ポンプによって維持され、これは、虚血において不全を起こす。そのような不全は、シナプス間隙 (s y n a p t i c s p a c e) からのグルタミン酸輸送に影響を及ぼすだけでなく、輸送体を逆走させ、細胞外グルタミン酸の吸収源ではなく供給源となる。虚血は、ニューロンから酸素およびグルコースを欠乏させて、エネルギー不全をもたらすが、エネルギー不全それ自体は、ニューロンに対して特に毒性でない。神経毒性は、結果として生じるグルタミン酸受容体依存性機序のカスケードの活性化により起こる。これらの受容体が適切なアンタゴニストによって遮断されると、ニューロンは、酸素および代謝基質が欠乏する期間を生き抜くことができる。これは、急性虚血事象を処置するためのグルタミン酸受容体遮断剤が近年開発され、検査されている論理的根拠である。梗塞を起こしたゾーンを救済することはできないが、危険にさらされた隣接ペナンプラへの周囲損傷を防止することが望まれている。

30

40

【0092】

これらの受容体遮断剤はまた、脳の急性虚血領域への灌流を再確立する介入的かつ薬理的に関連した試みの開発途上分野において肝要でありうる。受容体または細胞内レベルのいずれかにおける興奮毒性カスケードの同時停止を伴わない組織再灌流および虚血領域への酸素濃度の増加は、スーパーオキシドアニオンの形態の追加のフリーラジカルを提供することによって、およびミトコンドリアカルシウム貯蔵の放出を刺激することにより細胞内サイトゾルカルシウムレベルを増加させることによって、ニューロンの損傷を減少させるのではなく増加させうる。

【0093】

50

ニューロンの傷害に至るグルタミン酸興奮毒性カスケードを中断し、影響を与え、または一時的に停止させる試みで、いくつかの薬物が開発され、使用されている。1つの戦略は、グルタミン酸放出を減少させる「上流の」試みである。このカテゴリーの薬物には、ナトリウムチャンネル遮断剤であるリルゾール、ラモトリギン、およびリファリジン (l i f a r i z i n e) が含まれる。一般的に使用されるニモジピンは、電位依存性チャンネル (L型) 遮断剤である。共役したグルタミン酸受容体それ自体の様々な部位に影響を及ぼす試みもまたなされている。これらの薬物の一部には、フェルバメート、イフェンブロジル、マグネシウム、メマンチン、およびニトログリセリンが含まれる。これらの「下流の」薬物は、フリーラジカル形成、酸化窒素形成、タンパク質分解、エンドヌクレアーゼ活性、およびICE様プロテアーゼ形成 (プログラム細胞死、またはアポトーシスにつながるプロセスにおける重要要素) 等の細胞内事象に影響を与えることを試みたものである。

【0094】

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照することによってさらに理解されよう。

【実施例】

【0095】

(実施例1)

RTTを有するマウスへのデンドリマー-薬物コンジュゲートの全身投与。

材料および方法

【0096】

デンドリマー-Cy5およびデンドリマー-薬物コンジュゲートを作製するためのプロトコルを含む、下記の実験において使用した詳細な材料および方法は、Kannan Sら著、Sci. Transl. Med.、4巻: 130ra46頁(2012年) および米国特許第8,889,101号に記載されている。

【0097】

RTTマウスは、Jackson Laboratoryから入手可能なAdrian Birdモデルであった。

【0098】

デンドリマー注射および動物の屠殺。RTTマウスにデンドリマーを静脈内注射した。静脈内注射については、100 μ Lの滅菌PBSに溶解した600 μ gのD-Cy5を、30g針によって、大腿部に小切開を加えた後、大腿静脈に注射した。遊離Cy5およびPBSを注射した動物が、この研究のための陽性または陰性対照として機能した。デンドリマー注射後の適切な時点(24時間、72時間および21日、および6週間まで)において、動物をケタミン/キシラジンを使用して麻酔し、致死用量のペントバルビタールナトリウムを使用して安楽死させた。脳を直ちに取出し、免疫組織化学分析のために処理した。

【0099】

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析。デンドリマー-Cy5コンジュゲート(D-Cy5)の純度を、Watersインライン脱気装置、バイナリーポンプ、フォトダイオードアレイ(PDA)検出器、マルチ蛍光 λ 検出器およびEmpowerソフトウェアとインターフェースで接続したオートサンプラー(4で維持した)を備えたWaters HPLC機器(Waters Corporation、Milford、マサチューセッツ州)を使用して分析した。HPLCクロマトグラムを、デンドリマーの210nmおよびCy5の650nmでの吸光度についてWaters 2998 PDA検出器を使用して、ならびに645nmで励起し、662nmで発光する蛍光についてWaters 2475蛍光検出器を使用して、同時にモニタリングした。水/アセトニトリル(0.1w/w% TFA)を新たに調製し、濾過し、脱気し、移動相として使用した。TSK-Gelガードカラムに接続されたTSK-Gel ODS-80 Ts(250 $\times$ 4.6mm、長さ25cm、粒径5 μ m)を使用した。勾配流を使用し、初期条件は90:10(H₂O/ACN)であり、次いで、30分でアセトニトリル濃度を徐々に増加させて10:90(H₂O/ACN)とし、60分で元の初期条件90:10(H₂O/

A C N) に戻し、流量は 1 m l / 分であった。

【 0 1 0 0 】

動物および炎症の評価

体重および行動もまた評価した。炎症マーカーの評価のための標準的なマウスプライマーを使用して、サイトカインを測定した (K a n n a n S ら、 S c i . T r a n s l . M e d . 、 4 巻 : 1 3 0 r a 4 6 頁 (2 0 1 2 年)) 。

【 0 1 0 1 】

免疫組織化学および共焦点顕微鏡法。脳スライスを P B S 中 2 % パラホルムアルデヒド (P F A) 中で固定した。脳を、 1 : 2 の比の 2 0 % スクロースおよび最適切断温度化合物 (O C T) (S a k u r a F i n e t e k U S A I n c . 、 T o r r a n c e 、 C A) 中で、イソペンタン中ドライアイスで丁重に使用して凍結した。クライオブロックを切片化するまで - 8 0 で保存する。クライオスタットを使用して、凍結ブロックから 8 μ m の切片を切断した。切片を、ミクログリア細胞マーカーであるウサギ抗イオン化カルシウム結合アダプター 1 分子 (I b a - 1) (W a k o c h e m i c a l s 、 米国) 中でインキュベートし、ヤギ抗ウサギ - C y 3 二次抗体を加えた。切片を Z e i s s 5 1 0 共焦点顕微鏡で分析した。 I V 注射した動物における全ての組織を分析するための、励起および発光波長ならびにレーザー設定は同一であった。切片の Z スタックを取得し、分割 (c o l l a p s e) して、切片全体の深さにわたる画像を得た。

10

【 0 1 0 2 】

デンドリマーコンジュゲートのコンジュゲーション。デンドリマーの C y 5 へのコンジュゲーションは、以前に報告された方法を使用して行った (K a n n a n ら、 S c i e n c e T r a n s . M e d (2 0 1 2 年 4 月)) 。薬物実験については、デンドリマーを N - アセチル - システインにコンジュゲートし、異なる時点において 2 ~ 2 0 m g / k g の範囲の用量で投与した。

20

【 0 1 0 3 】

マウスに D - 薬物または P B S を 3 ~ 4 日毎に注射した。統計分析。 2 群間の有意性を決定するためにスチューデントの t 検定を使用して、データの再現性を分析した。 0 . 0 5 に等しいまたはそれ未満の p 値を有意とみなした。

【 0 1 0 4 】

結果

デンドリマーコンジュゲートは、脳内で、炎症を媒介する活性化ミクログリア中に蓄積しうる。症候性の R T T マウスにおいて、 C y 5 標識デンドリマーを 3 週齢で全身投与し、脳を採取し、灌流し、固定して、ミクログリアへのデンドリマー局在化を調べた。

30

【 0 1 0 5 】

デンドリマーは、事前研究により傷害または損傷が示された脳の領域内のミクログリアに局在化した。健康な対照マウスは、脳内の蓄積を示さない。

【 0 1 0 6 】

デンドリマー - 薬物コンジュゲート (D - 薬物) は、 R T T を代表する症状を提示するマウスにおいて全身投与された場合、同様の疾患重症度を有する非処置マウスと比較して、 8 週齢までの全体的な仔マウスの健康、外観、および疾患の顕著な行動的特徴の有意な改善を示す。 3 週齢で全身投与した C y 5 にコンジュゲートしているデンドリマーは、 R T T マウスの外側皮質のミクログリア中に蓄積する。

40

【 0 1 0 7 】

デンドリマー - 薬物 (D - 薬物) コンジュゲートは、症候性の R T T マウスにおいて 3 週齢で始めて 3 ~ 4 日毎に全身投与された場合、 8 週齢での全体的な健康および外観の有意な改善を提供した。 P B S で処置したマウスは、重度の足の握りしめ、猫背姿勢、および失明を示した。

【 0 1 0 8 】

処置されたマウスは、遊離薬物と比較して、生存率の改善を示した (図 1 A) 。図 1 A は、 M e C P 2 欠損マウスにおける N A C および D - N A C 療法後の K a p l a n - M e

50

i e r 生存曲線である。M e C P 2 欠損仔マウスにおける週 2 回の N A C または D - N A C 療法後に、生存率を評価した。D - N A C は、非処置動物と比較して、生存率を改善しない。D - N A C は、N A C の安全性を改善する。D - N A C および P B S で処置した M e C P 2 欠損仔マウスは、N A C で処置した仔マウスと比較して、有意に良好な 5 0 % 生存を有しており ($p = 0 . 0 1 4$)、遊離製剤として与えられた場合の N A C の潜在的毒性が示される。実際に、コンジュゲートしていない遊離薬物 (N A C) は、デンドリマー - 薬物コンジュゲート (D N A C) 上の薬物と同等の用量において、非処置レットマウスよりも低い生存率につながった。デンドリマー - 薬物コンジュゲートによる処置は、P B S で処置したレットマウスと比較して、有意に改善された行動を維持した (図 1 B)。図 1 B は、M e C P 2 欠損マウスにおける D - N A C 療法後の神経行動学的転帰のグラフである。M e C P 2 欠損マウスを、3 週齢 (P N D 2 1) で始めて、食塩水 (P B S、黒破線)、1 0 m g / k g の N A C (赤線)、または 1 0 m g / k g (N A C ベース) の D - N A C (青線) で処置した。仔マウスを週 2 回処置した。行動試験を、ベースラインを決定するために P N D 1 0 および P N D 1 7 で実施し、P N D 2 1 で始める各処置日の処置前に実施した。同腹の W T 仔マウス (黒実線) を、体重および行動の両方の対照として使用した。D - N A C 療法は、N A C および P B S 処置と比較して、行動的転帰を有意に改善した。D - N A C は、非処置仔マウスと比較して、M e C P 2 欠損マウスの全体的な外観を改善した。非処置仔マウスは、ひどく痩せ衰え、複数の握りしめた足、猫背姿勢、および眼状態不良を有していた。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 9 】

動物を 3 ~ 4 日毎に処置前に録画し、移動性、歩行、振戦、足の握りしめ、足の握りしめ時間、足揉み、および呼吸を 0 ~ 3 の尺度で全てスコア付けし、「 0 」は最低スコアを示し、「 3 」は最高または正常である。複合スコアを生成し (0 ~ 2 1 の範囲、正常な健康マウスは 2 0 ~ 2 1 のスコアを有する)、群間で比較し、低いスコアは行動の悪化を示す。同様の生存 (6 6 日齢、または 6 週の処置) を示した研究における全てのマウスで、スコアを平均した。

【 0 1 1 0 】

T および M e C P 2 欠損マウスにおける脳内取込みおよび細胞局在化を決定し、比較した。症状前の期間 (1 週齢) において、デンドリマー (D - C y 5、赤) の局在化は、主として、脳室上部 (s u p r a v e n t r i c u l a r) 領域内で、ミクログリア (I b a) におけるものであり、星状膠細胞 (G F A P) にはない。症候性の期間に入った 週齢までに、D - C y 5 は、皮質のミクログリアおよび脳室上部領域の星状膠細胞に局在化する。D - C y 5 は、両方の週齢の T マウスにおいて、血管に局在化したままであった。

【 0 1 1 1 】

ミクログリア形態を T および M e C P 2 欠損マウスにおいて評価した。M e C P 2 欠損マウス (K O) において、ミクログリア (I b a) は、1 週齢では脳室周辺の領域内でアメーバ状である。K O マウスにおけるミクログリアは、2 週および 5 週齢では少数の細い突起を有し、 週齢ではより多くの突起を有するが、 週での T ミクログリアと比較してあまり接続されていない。

【 0 1 1 2 】

T ならびに症状前および症候性の M e C P 2 欠損マウスの脳における炎症プロファイルを測定した (図 2 A ~ 2 F)。炎症促進性および抗炎症性サイトカインの m R N A レベルを、T および M e C P 2 欠損仔マウスの脳において、1、2、3、5、および 週齢で測定した。

【 0 1 1 3 】

2 Δ Δ C T 中央値が提示され、エラーバーは上下四分位範囲によって表される。(図 3 A) 経時的な炎症プロファイルの変化を、T N F α、I - 6、および I - 1 β を含む複合炎症促進スコアの、T G F - β、I - 1 0、および I - 4 を含む複合抗炎症スコアに対する比として提示する。複合スコアは、各週齢で、所与の遺伝子型におけるその週齢の全ての仔マウスについて、全ての炎症促進 2 Δ Δ C T 値または全ての抗炎症 2 Δ Δ C T 値の中

央値を取ることによって生成した。(図3B) MeCP2欠損マウスにおける炎症促進プロファイルは、2週および 週で、炎症促進マーカーの増加傾向を示す。しかしながら、抗炎症性mRNA発現(図3C)は、2週、5週、および 週齢で、同齢および同腹のTマウスと比較して、MeCP2欠損マウスにおいて有意な減少を示す。これは、MeCP2欠損マウスにおける神経炎症プロセスが、炎症促進性発現の増加ではなく、抗炎症性発現の減少によって引き起こされることを示唆する。

【0114】

図4は、複合行動スコアに基づく脳傷害の重症度の関数としての、脳内のD-Cy5量($\mu\text{g/g}$)のグラフである。この取込みと傷害の重症度との相関関係の実証は、傷害の程度を診断するための手段を提供する。

10

【0115】

(実施例2)

イヌ類モデルにおける脳傷害の処置

材料および方法

低体温循環停止のイヌ類動物モデルにおけるデンドリマーの脳内取込みおよび脳傷害に対する標的化療法は、Manojら著、ACS Nano、2014年、8巻(3号)、2134~2147頁に記載されている。

【0116】

エチレンジアミン(EDA)コアを有する世代6の第一級ヒドロキシル官能化PAMAMデンドリマーを、これらの研究において使用した。

20

【0117】

コンジュゲートの調製

コンジュゲートは、上記のように調製した。

【0118】

イヌ類HCAモデルおよび実験計画

全ての実験は、Baumgartner laboratoryで開発されたHCAのイヌ類モデルを使用した。(Redmondら、Ann. Thorac. Surg.、1995年、59巻、579~584頁;Redmondら、Thorac. Cardiovasc. Surg.、1994年、107巻、776~786頁)この大型動物モデルは、低体温循環停止に関連する神経傷害に対処するための容易に転換可能な治療モデルを開発するために、ヒトとイヌ類との間のある特定の固有の生理学的類似性を活用している。これは大型動物モデルであることから、ヒトの手術室において経験されるものに極めて忠実に外科手術を再現することができ、最悪のヒト症例において見られるものと同様の神経傷害の程度を再現することができる。

30

【0119】

馴化させたイヌ系状虫陰性の6~12月齢のオスのクラスAイヌ(およそ30kg)を、全ての実験に使用した(Marshall Bioresources、North Rose、NY)。実験は、The Johns Hopkins University School of MedicineのMedicine Animal Care and Use Committeeによって承認され、「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(1996年、米国国立衛生研究所)に準拠した。

40

【0120】

イヌにメトヘキシタールナトリウム(12mg/kg IV、分割用量)を投与し、気管内挿管し、イソフルラン吸入麻酔($0.5\sim2.0\%$)、 100% 酸素、およびIVフェンタニル($150\sim200\mu\text{g}$ /用量)、およびミダゾラム(2.5mg /用量)で維持した。実験を通じて、鼓膜、食道、および直腸プローブにより体温をモニタリングした。血圧のモニタリングおよび動脈血ガスのサンプリングのために、CPBの開始前に左大腿動脈カニューレを留置した。EKGを継続的にモニタリングした。右大腿動脈にカニューレ挿入し、カニューレを下行胸大動脈に進めた。静脈カニューレを右大腿および右外頸

50

静脈から右心房に進めた。非開胸C P Bを開始し、動物を冷却した。60～100 mL / kg / 分のポンプ流量により、60～80 mmHgの平均動脈圧を維持した。鼓膜温が18℃に到達したら、ポンプを止め、血液を重力でレザバに排出した。標準的な血液希釈および動脈血ガスのアルファスタット調節を用いて、イヌに2時間のH C Aを施した。H C Aの後に、C P Bを再開し、動物を2時間にわたり37℃の中核温に再加温した。洞調律が自発的に戻らない場合、心臓を32℃で除細動した。連続血液ガスレベルを取得して適正なp Hを確実に、電解質濃度を検証し、動脈カニューレを利用して継続的な血行動態測定値を記録した。37℃において、各イヌをC P Bから離脱させ、カニューレを取り外した。バイタルサイン、動脈血ガス、および尿排出量を頻繁にモニタリングして、イヌが挿管中に麻酔から回復した。一部の動物は、バイパスからの離脱を成功させるために、この段階において血行動態補助およびアシドーシスの是正を必要とした。血行動態的および臨床的に安定したら、イヌを抜管し、回復および生存のためにケージに移し、神経学的評価を24時間間隔で所望の終了点（バイパス後24または72時間）まで行った。

10

20

30

40

50

【0121】

デンドリマー投与（生体内分布研究用）

デンドリマー-フルオロフォアコンジュゲートを、低体温循環停止の24時間後に1回ボラスとして注射した。3匹のイヌを、D - F I T C（140 mg / 動物、およそ5 mg / kg）の静脈内注入およびD - C y 5（5 mg / 動物、0.17 mg / kg）の槽内（I C M、「脳内」）注射で同時に処置し、コンジュゲート投与の48時間後に安楽死させた。続いて、組織内取込みおよび生体内分布を屠殺時に測定した（投与の48時間後）。F I T CおよびC y 5をそれらの別個の特徴的波長で分析したことから、それらの生体内分布を同時に評価することができる。

【0122】

デンドリマー投与（効力研究用）

遊離薬物（V P AおよびN A C）またはデンドリマー-薬物コンジュゲートを、H C Aの前および後に静脈内投与した。遊離薬物投与の用量は、遊離V P Aで神経保護が達成された本発明者らの以前の研究に基づいており、遊離N - アセチルシステインについては文献に基づいていた。以前の研究により、N A Cによる前処置は、心停止のモデルにおいて保護的であることが報告されている。デンドリマー-薬物コンジュゲートの用量は、遊離薬物用量の1 / 10（V P A）または1 / 30（N A C）に設定し、ウサギC Pモデルにおけるそのような用量比での顕著な神経保護に関する事前の知見に基づいていた。遊離薬物については、動物を100 mg / kgのV P Aおよび300 mg / kgのN A Cで処置し、そのうち、用量の半分を心停止前に静脈内投与し、残りを心停止後に投与した。デンドリマー-薬物コンジュゲートについては、イヌを10 mg / kgのN A Cを含有するD - N A Cおよび/または10 mg / kgのV P Aを含むD - V P Aで静脈内処置した。D - V P Aは、25%をボラスとしてH C A前に、続いて75%を2時間にわたる注入としてH C Aが完了した後に静脈内投与した。D - N A Cは、50%をボラスとしてH C A前に、50%を2時間にわたる注入としてH C Aが完了した後に静脈内投与した。これらのレジメンは、遊離薬物に使用されたものと同様である。

【0123】

安楽死

動物を放血によって安楽死させた。鎮静および挿管の後、動物に胸骨正中切開を施し、22 F r e n c hカニューレを使用して上行大動脈にカニューレ挿入した。下行大動脈をクランプして、脳を12 Lの氷冷蔵塩水（4℃）で60 mmHgで灌流することを確実にした後に、C P Bを開始した。右心耳を横切開し、静脈還流を流出させた。灌流の直後に脳を採取し、半球を分離し、一方の半球は10%中性緩衝ホルマリン中で固定し（免疫組織化学的評価およびイメージング用）、他方の半球は1 cmの冠状スライスに切断し、速やかに凍結した（生体内分布定量化用）。

【0124】

蛍光顕微鏡法

海馬および小脳のクライオスタット切片を、退色防止媒体 (Prolong Gold with DAPI、Molecular Probes, Inc.、Eugene、OR) でマウントした。Zeiss AxioImager M2を使用して、各脳領域の全てのサンプルについて等しい露光時間で、蛍光画像を得た。画像のコントラストおよび輝度を最適化するために、表示設定を各画像セット内で等しく調整した。

【0125】

神経学的評価

神経学的臨床評価を、全ての動物において、屠殺まで24時間毎に実施した。この研究において使用したイヌ特異的行動尺度は、International Resuscitation and Research Center、University of Pittsburgh School of Medicineで確証された。神経学的機能の以下の5つの要素を評価した：意識レベル、呼吸パターン、脳神経機能、運動および感覚機能、ならびに行動。2人の調査者が、独立して、各要素に0（正常）から100（重度の傷害）の間のスコアを割り当て、これらを平均し合計して、0（正常）から500（脳死）の範囲を取りうる総スコアを得た。

10

【0126】

結果

低体温循環心停止誘導性脳傷害のイヌ類モデルにおいて実証されるように、傷害を受けたBBBを横切って薬物を送達するために、G6 PAMAM dendrimerは、G4 dendrimerよりも優れている。G6 dendrimerは、持続的期間にわたり高い脳脊髄液 (CSF) 対血清比を維持した。そのような高いCSF / 血清比を維持することは、多くのCNS薬物にとっての重大な難点である。図5を参照されたい。傷害脳において見られる高いCSFレベルは、重大な新規特色である。Dendrimerの蓄積は、傷害の程度に依存し（図4参照）、G6 dendrimerが活性化ミクログリアおよび傷害ニューロンによって内在化されることを示す研究に基づいている (ACS Nano, 2014年3月25日; 8巻(3号): 2134~47頁)。

20

【0127】

図5に示すように、G6 dendrimerは、脳脊髄液 (CSF) 中への高い分配を有し、CSF / 血清比は、イヌ592および593について24時間まで10%超であり、72時間で約4~5%である。注入時間中およびその直後に、比は、傷害の程度に応じて40%まで上がりうる。

30

【0128】

図6に示すように、G6 dendrimerの脳内蓄積は領域依存性であり、海馬内の蓄積が最も高く、続いて小脳および皮質であり、傷害のパターンと一致する。

【0129】

Dendrimer投与後48時間において、G6 dendrimerは、脳内の全領域にわたって、G4 dendrimer（検出限界未満）よりも有意に高い脳内蓄積を示した。図6を参照されたい。傷害領域におけるG6 dendrimerのレベルは、投与後48時間でさえ、6時間の初期時点でのG4 dendrimerのレベルよりも何倍も高い。

40

【0130】

海馬において、G6 dendrimerは、CA1およびCA3領域よりも歯状回で高い蓄積を示した。海馬において、G6 dendrimerは、異なるタイプの細胞局在化を示し、主に活性化ミクログリアおよび傷害ニューロンによって取り込まれる。

【0131】

図7によって示されるように、G6 dendrimerは、第2のボラス用量後48時間において、腎皮質および肝臓内に主に蓄積し、このことにより、腎および肝クリアランスはいずれも、循環からのDendrimer除去に重要であることが示唆される。

【0132】

G4 dendrimerと比較して、G6 dendrimerは、低い腎臓レベルを示し、高い血清レベルと一致する。

50

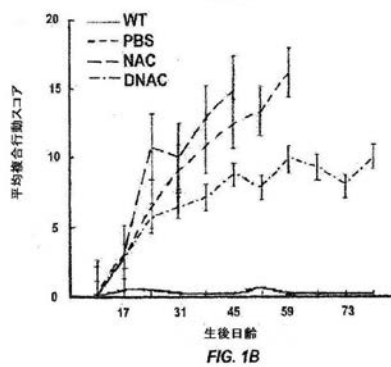
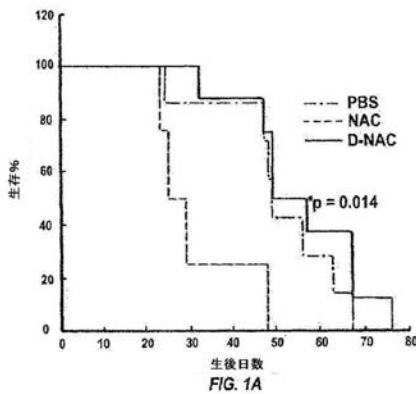
【 0 1 3 3 】

結果は、G 4 および G 6 デンドリマーのいずれも、5 0 0 倍高い用量において毒性でなく、腎臓を介して無傷で除去されないことを実証する。

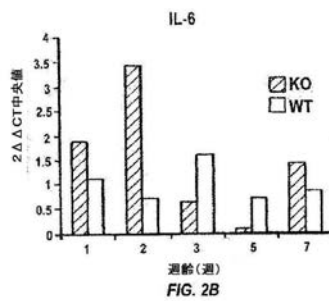
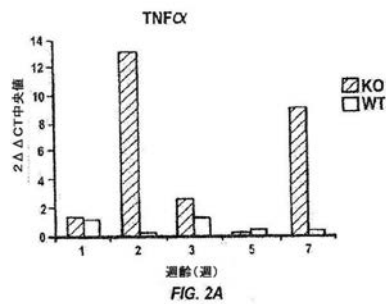
【 0 1 3 4 】

本明細書に記載の方法および材料の改変および変形は、当業者に明らかになるものであり、特許請求の範囲によって包含されることを意図するものである。

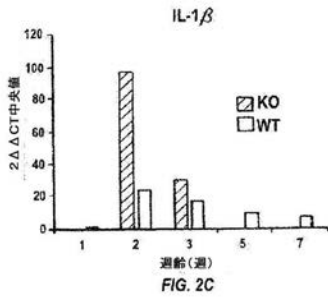
【 図 1 】



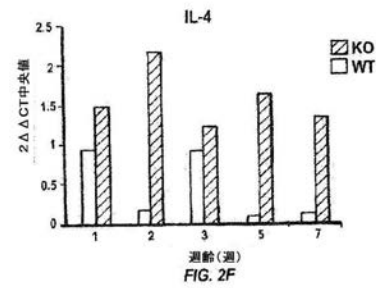
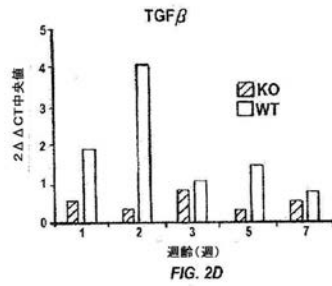
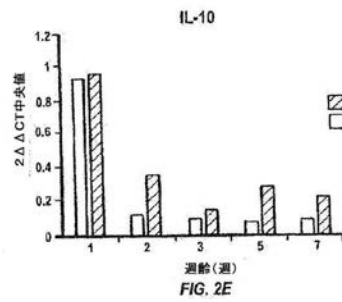
【 図 2 - 1 】



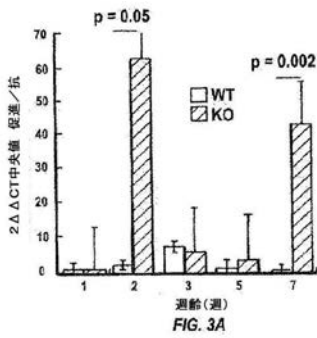
【 図 2 - 2 】



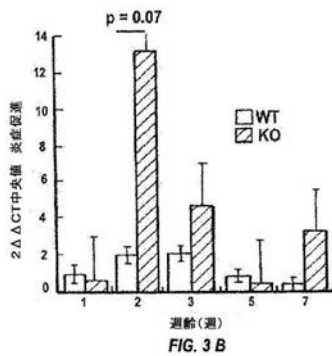
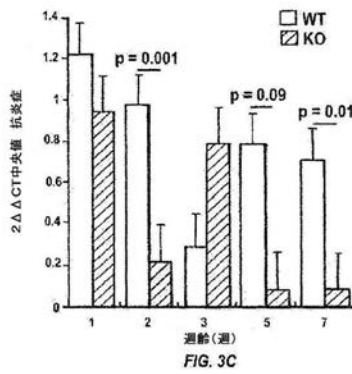
【 図 2 - 3 】



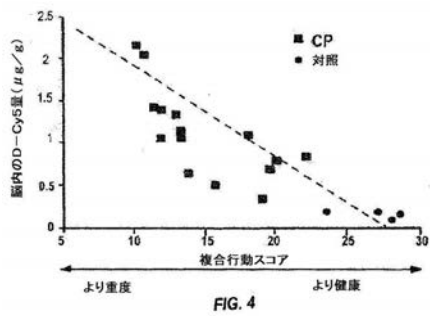
【 図 3 - 1 】



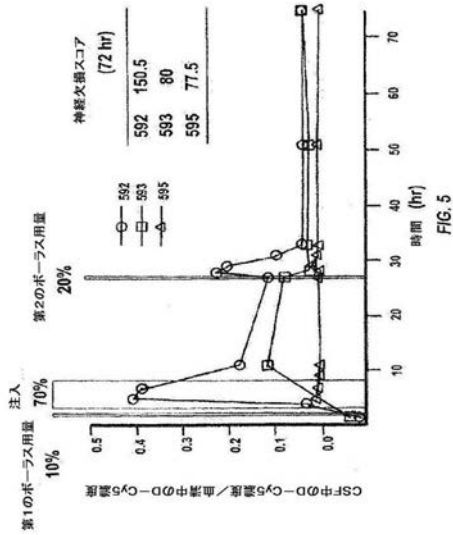
【 図 3 - 2 】



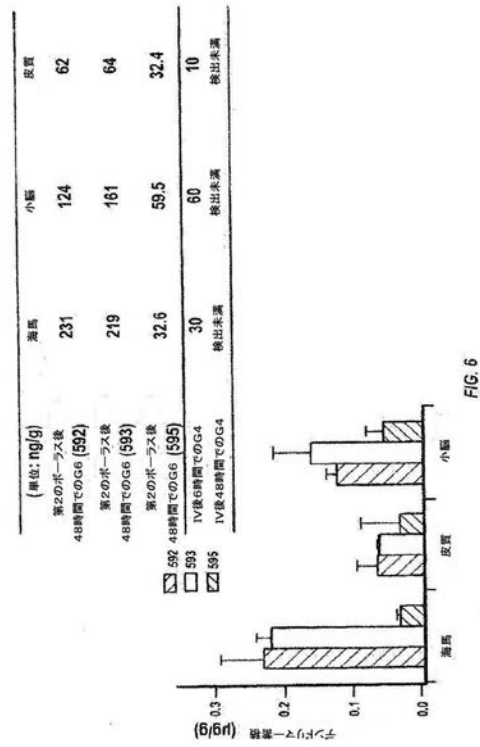
【 図 4 】



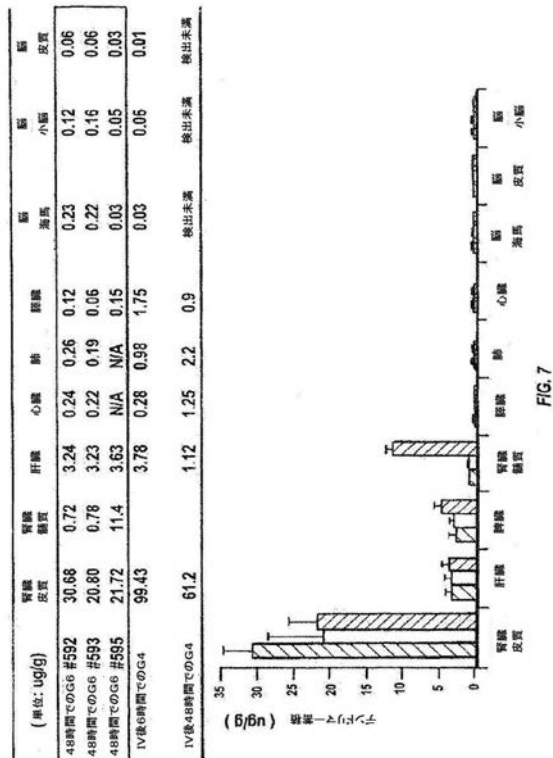
【 図 5 】



【 図 6 】



【 圖 7 】



【手続補正書】

【提出日】平成29年3月29日(2017.3.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

脳の神経障害、神経変性障害、または神経発達障害を処置するための、前記障害を処置または診断するための治療薬剤、予防薬剤または診断薬剤にコンジュゲートしているかまたはこれらと複合体形成している dendritic tree を含む組成物であって、前記組成物が、前記被験体に全身投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項2】

前記 dendritic tree が、少なくとも1つの治療薬剤に共有結合的に連結している、世代4～10のポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端 dendritic tree である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記 PAMAM dendritic tree が、世代6の PAMAM dendritic tree である、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

治療薬剤にコンジュゲートしているかまたは治療薬剤と複合体形成している前記 dendritic tree が、前記被験体のレット症候群および/または自閉症スペクトラム障害の1つまたは複数の症状を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、請求項1から3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

治療薬剤にコンジュゲートしている前記 dendritic tree が、興奮毒性障害の1つまたは複数の症状を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、請求項1から3のいずれかに記載の組成物。

【請求項6】

前記治療薬剤が、抗炎症薬剤または免疫抑制薬剤である、請求項1から5のいずれかに記載の組成物。

【請求項7】

前記治療薬剤が、ステロイド系抗炎症薬剤、非ステロイド系抗炎症薬剤、および金化合物抗炎症薬剤からなる群より選択される、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

前記治療薬剤が、抗興奮毒性薬剤である、請求項1から3のいずれかに記載の組成物。

【請求項9】

前記治療薬剤が、バルプロ酸、D-アミノホスホノバレレート、D-アミノホスホノヘプタノエート、グルタミン酸形成/放出の阻害剤、バクロフェン、NMDA受容体アンタゴニスト、1-メチルトリプトファン、バルプロ酸、2-(3-グルタミン酸-カルボキシペプチダーゼ阻害剤(GCP-III)、例えばメルカプトプロピル)ペンタン二酸(2-MPPA)、2-(ホスホノメチル)ペンタン二酸(2-PMPA)、およびグルタミンナーゼ阻害剤、例えばN-(5-{2-[2-(5-アミノ-[1,3,4]-チアジアゾール-2-イル)-エチルスルファニル]-エチル}-[1,3,4]-チアジアゾール-2-イル)-2-フェニルアセトアミド、(ビス-2-[(1,2,4-チアジアゾール-2-イル)-5-フェニルアセトアミド]エチルスルフィド)、ラニピズマブ、ミノサイクリン、ならびにラパマイシンからなる群より選択される抗興奮毒性薬剤である、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

前記デンドリマーが、第 1 の治療薬剤と、治療薬剤、予防薬剤、および診断薬剤からなる群より選択される第 2 の薬剤とにコンジュゲートしている、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 1】

前記デンドリマーが、2 つの治療薬剤にコンジュゲートしている、請求項 1 から 1 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記デンドリマーが、抗炎症薬剤および抗興奮毒性薬剤にコンジュゲートしている、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

デンドリマー複合体が、ミクログリアおよび星状膠細胞に局在化し、これらを標的化するための治療的に活性な薬剤を含む、請求項 1 から 1 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 4】

デンドリマー - 治療薬剤を含む前記組成物が、R T T を有する個体に投与されることを特徴とする、請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 5】

デンドリマーコンジュゲートまたは複合体が、懸濁物、乳濁液、または溶液中で製剤化される、請求項 1 から 1 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 6】

組成物が、自閉症スペクトラム障害を有する個体に投与されることを特徴とする、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 7】

組成物が、R T T を有する個体に投与されることを特徴とする、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 8】

組成物が、興奮毒性障害を有する個体に投与されることを特徴とする、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記組成物が、1 日おき、3 日毎、4 日毎、毎週、隔週、毎月、および隔月からなる群より選択される期間で、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項 1 から 1 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 0】

デンドリマー - 診断薬剤コンジュゲートを含む前記組成物が投与され、次いで、脳内の前記コンジュゲートの場所が検出されることを特徴とする、脳傷害の存在、場所または程度を評価するための、請求項 1 から 1 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 1】

脳脊髄液および血清中のレベルが決定され、比が評価されることを特徴とする、請求項 1 から 2 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 2】

器官組織と比較して、脳脊髄液または脳中で高い濃度を有する、請求項 2 1 に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 6】

結果は、世代 4 のデンドリマーと比較して、世代 6 のデンドリマーで、損傷または疾患

脳による取込みの有意な向上が観察されることを実証する。実施例に記載するように、世代 6 のデンドリマーは、脳傷害の大型動物モデルにおいて非常に望ましい脳脊髄液 (CSF) 対血清レベルを有することが示され、これらの組成物が、CNS 薬物を傷害脳に選択的に送達するのに優れていることが示される。臨床的に関連する大型動物モデル (多くの態様でヒトに類似する) における肯定的結果は、知見の重要性を強調する。これは、診断および処置のための手段を提供する。デンドリマーの別の利益は、同じデンドリマーを使用して、2 つまたはそれ超の異なる薬剤を送達できることである。これは、2 つの異なる治療薬剤であってもよく、治療薬剤と、1 つまたは複数の診断薬剤または予防薬剤との組合せであってもよい。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

脳の神経障害、神経変性障害、または神経発達障害を処置するための方法であって、前記障害を処置または診断するための治療薬剤、予防薬剤または診断薬剤にコンジュゲートしているかまたはこれらと複合体形成しているデンドリマーを含む薬学的に許容される組成物を、被験体に全身投与することを含む、方法。

(項目 2)

前記デンドリマーが、少なくとも 1 つの治療薬剤に共有結合的に連結している、世代 4 ~ 10 のポリ (アミドアミン) (PAMAM) ヒドロキシル末端デンドリマーである、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記 PAMAM デンドリマーが、世代 6 の PAMAM デンドリマーである、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

治療薬剤にコンジュゲートしているかまたは治療薬剤と複合体形成している前記デンドリマーが、前記被験体のレット症候群および / または自閉症スペクトラム障害の 1 つまたは複数の症状を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、項目 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 5)

治療薬剤にコンジュゲートしている前記デンドリマーが、興奮毒性障害の 1 つまたは複数の症状を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、項目 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 6)

前記治療薬剤が、抗炎症薬剤または免疫抑制薬剤である、項目 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 7)

前記治療薬剤が、ステロイド系抗炎症薬剤、非ステロイド系抗炎症薬剤、および金化合物抗炎症薬剤からなる群より選択される、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

前記治療薬剤が、抗興奮毒性薬剤である、項目 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

前記治療薬剤が、バルプロ酸、D - アミノホスホノバレレート、D - アミノホスホノヘプタノエート、グルタミン酸形成 / 放出の阻害剤、バクロフェン、NMDA 受容体アンタゴニスト、1 - メチルトリプトファン、バルプロ酸、2 - (3 - グルタミン酸 - カルボキシペプチダーゼ阻害剤 (GCP - II)、例えばメルカプトプロピル) ペンタン二酸 (2 - MPAA)、2 - (ホスホノメチル) ペンタン二酸 (2 - PMPAA)、およびグルタミナーゼ阻害剤、例えば N - (5 - {2 - [2 - (5 - アミノ - [1, 3, 4] - チアジアゾール - 2 - イル) - エチルスルファニル] - エチル} - [1, 3, 4] チアジアゾール - 2 - イル) - 2 - フェニルアセトアミド、(ビス - 2 - [(1, 2, 4 - チアジアゾール - 2 - イル) - 5 - フェニルアセトアミド] エチルスルフィド)、ラニビズマブ、ミノサイクリン、ならびにラパマイシンからなる群より選択される抗興奮毒性薬剤である、

項目 8 に記載の方法。

(項目 1 0)

前記デンドリマーが、第 1 の治療薬剤と、治療薬剤、予防薬剤、および診断薬剤からなる群より選択される第 2 の薬剤とにコンジュゲートしている、項目 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1)

前記デンドリマーが、2 つの治療薬剤にコンジュゲートしている、項目 1 から 1 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 2)

前記デンドリマーが、抗炎症薬剤および抗興奮毒性薬剤にコンジュゲートしている、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

デンドリマー複合体が、ミクログリアおよび星状膠細胞に局在化し、これらを標的化するための治療的に活性な薬剤を含む、項目 1 から 1 2 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4)

デンドリマー - 治療薬剤が、R T T を有する個体に投与される、項目 1 から 1 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5)

デンドリマーコンジュゲートまたは複合体が、懸濁物、乳濁液、または溶液中で製剤化される、項目 1 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 6)

デンドリマー組成物が、自閉症スペクトラム障害を有する個体に投与される、項目 1 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 7)

デンドリマー組成物が、R T T を有する個体に投与される、項目 1 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 8)

デンドリマー組成物が、興奮毒性障害を有する個体に投与される、項目 1 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 9)

前記組成物が、1 日おき、3 日毎、4 日毎、毎週、隔週、毎月、および隔月からなる群より選択される期間で、前記被験体に投与される、項目 1 から 1 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 0)

デンドリマー - 診断薬剤コンジュゲートを投与することと、次いで、脳内の前記コンジュゲートの場所を検出することを含む、脳傷害の存在、場所または程度を評価するための、項目 1 から 1 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 1)

脳脊髄液および血清中のレベルを決定することと、比を評価することを含む、項目 1 から 2 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 2)

項目 1 から 1 3 のいずれかに記載の方法における使用のための、デンドリマー組成物。

(項目 2 3)

器官組織と比較して、脳脊髄液または脳中で高い濃度を有する、項目 2 1 に記載のデンドリマー組成物。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

【図1】図1Aは、MeCP2欠損マウスにおけるNACおよびD-NAC療法後のKaplan-Meier生存曲線である。MeCP2欠損マウスにおける週2回のNACまたはD-NAC療法後に、生存を評価した。D-NACは、非処置動物(PBS)と比較して、生存を改善しない。D-NACは、NACの安全性を改善する。D-NACおよびPBSで処置したMeCP2欠損マウスは、NACで処置した仔マウスと比較して、有意に良好な50%生存を有しており($p = 0.014$)、遊離製剤として与えられた場合のNACの潜在的毒性が示される。図1Bは、MeCP2欠損マウスにおけるD-NAC療法後の神経行動学的転帰の線グラフである。MeCP2欠損マウスを、3週齢(PND21)で始めて、食塩水(PBS)、10mg/kgのNAC、または10mg/kg(NACベース)のD-NACで処置した。仔マウスを週2回処置した。行動試験を、ベースラインを決定するためにPND10およびPND1で実施し、PND21で始める各処置日の処置前に実施した。同腹のWT仔マウスを、体重および行動の両方の対照として使用した。D-NAC療法は、NACおよびPBS処置と比較して、行動的転帰を有意に改善した。D-NACは、非処置仔マウスと比較して、MeCP2欠損マウスの全体的な外観を改善した。非処置仔マウスは、痩せ衰え、複数の握りしめた足、猫背姿勢、および眼状態不良を有していた。

【図2-1】図2A~2Fは、WT(白抜きバー)およびMeCP2欠損(斜線バー)マウスにおける炎症促進性および抗炎症性mRNA発現レベルの発現のグラフである。図2A、TNF- α ; 図2B、IL-6; 図2C、IL-1 β ; 図2D、TGF- β ; 図2E、IL-10; および図2F、IL-4。

【図2-2】図2A~2Fは、WT(白抜きバー)およびMeCP2欠損(斜線バー)マウスにおける炎症促進性および抗炎症性mRNA発現レベルの発現のグラフである。図2A、TNF- α ; 図2B、IL-6; 図2C、IL-1 β ; 図2D、TGF- β ; 図2E、IL-10; および図2F、IL-4。

【図2-3】図2A~2Fは、WT(白抜きバー)およびMeCP2欠損(斜線バー)マウスにおける炎症促進性および抗炎症性mRNA発現レベルの発現のグラフである。図2A、TNF- α ; 図2B、IL-6; 図2C、IL-1 β ; 図2D、TGF- β ; 図2E、IL-10; および図2F、IL-4。

【図3-1】図3A~3Cは、WTならびに症状前(pre-symptomatic)および症候性のMeCP2欠損マウスの脳における炎症プロファイルのグラフである。炎症促進性および抗炎症性サイトカインのmRNAレベルを、WT(白抜き)およびMeCP2欠損(斜線)仔マウスの脳において、1、2、3、5、および7週齢で測定した。2 $\Delta\Delta$ CT中央値が提示され、エラーバーは上下四分位範囲によって表される。(図3A)経時的な炎症プロファイルの変化を、TNF- α 、IL-6、およびIL-1 β を含む複合炎症促進スコアの、TGF- β 、IL-10、およびIL-4を含む複合抗炎症スコアに対する比として提示する。複合スコアは、各週齢で、所与の遺伝子型におけるその週齢の全ての仔マウスについて、全ての炎症促進2 $\Delta\Delta$ CT値または全ての抗炎症2 $\Delta\Delta$ CT値の中央値をとることによって生成した。(図3B)MeCP2欠損マウスにおける炎症促進プロファイルは、2週および7週で、炎症促進マーカーの増加傾向を示す。しかしながら、抗炎症性mRNA発現(図3C)は、2週、5週、および7週齢で、同齢および同腹のWTマウスと比較して、MeCP2欠損マウスにおいて有意な減少を示す。これは、MeCP2欠損マウスにおける神経炎症プロセスが、炎症促進性発現の増加傾向ではなく、抗炎症性発現の有意な減少によって引き起こされることを示唆する。

【図3-2】図3A~3Cは、WTならびに症状前および症候性のMeCP2欠損マウスの脳における炎症プロファイルのグラフである。炎症促進性および抗炎症性サイトカインのmRNAレベルを、WT(白抜き)およびMeCP2欠損(斜線)仔マウスの脳において、1、2、3、5、および7週齢で測定した。2 $\Delta\Delta$ CT中央値が提示され、エラーバ

ーは上下四分位範囲によって表される。(図3A)経時的な炎症プロファイルの変化を、 $TNF\alpha$ 、 $IL-6$ 、および $IL-1\beta$ を含む複合炎症促進スコアの、 $TGF-\beta$ 、 $IL-10$ 、および $IL-4$ を含む複合抗炎症スコアに対する比として提示する。複合スコアは、各週齢で、所与の遺伝子型におけるその週齢の全ての仔マウスについて、全ての炎症促進 $\Delta\Delta CT$ 値または全ての抗炎症 $\Delta\Delta CT$ 値の中央値を取ることによって生成した。(図3B) $MeCP2$ 欠損マウスにおける炎症促進プロファイルは、2週および7週で、炎症促進マーカーの増加傾向を示す。しかしながら、抗炎症性mRNA発現(図3C)は、2週、5週、および7週齢で、同齢および同腹のWTマウスと比較して、 $MeCP2$ 欠損マウスにおいて有意な減少を示す。これは、 $MeCP2$ 欠損マウスにおける神経炎症プロセスが、炎症促進性発現の増加傾向ではなく、抗炎症性発現の有意な減少によって引き起こされることを示唆する。

【図4】図4は、複合行動スコアに基づく脳傷害の重症度の関数としての、脳内のD-Cy5量($\mu g/g$)のグラフである。この取込みと傷害の重症度との相関関係の実証は、傷害の程度を診断するための手段を提供する。

【図5】図5は、時間単位の経時的な脳脊髄液中のD-Cy5濃度/血清中のD-Cy5濃度のグラフである。

【図6】図6は、海馬、皮質および小脳内のデンドリマー蓄積($\mu g/g$)のグラフである。

【図7】図7は、様々な器官および脳内のデンドリマー蓄積($\mu g/g$)のグラフである。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0110

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0110】

WTおよび $MeCP2$ 欠損マウスにおける脳内取込みおよび細胞局在化を決定し、比較した。症状前の期間(1週齢)において、デンドリマー(D-Cy5、赤)の局在化は、主として、脳室上部(supraventricular)領域内で、ミクログリア(Iba)におけるものであり、星状膠細胞(GFAP)にはない。症候性の期間に入った7週齢までに、D-Cy5は、皮質のミクログリアおよび脳室上部領域の星状膠細胞に局在化する。D-Cy5は、両方の週齢のWTマウスにおいて、血管に局在化したままであった。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0111

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0111】

ミクログリア形態をWTおよび $MeCP2$ 欠損マウスにおいて評価した。 $MeCP2$ 欠損マウス(KO)において、ミクログリア(Iba)は、1週齢では脳室周辺の領域内でアメーバ状である。KOマウスにおけるミクログリアは、2週および5週齢では少数の細い突起を有し、7週齢ではより多くの突起を有するが、7週でのWTミクログリアと比較してあまり接続されていない。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 1 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 1 2 】

WTならびに症状前および症候性のMeCP2欠損マウスの脳における炎症プロファイルを測定した(図2A~2F)。炎症促進性および抗炎症性サイトカインのmRNAレベルを、WTおよびMeCP2欠損仔マウスの脳において、1、2、3、5、および7週齢で測定した。

【手続補正7】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 1 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 1 3 】

2ΔΔCT中央値が提示され、エラーバーは上下四分位範囲によって表される。(図3A)経時的な炎症プロファイルの変化を、TNFα、IL-6、およびIL-1βを含む複合炎症促進スコアの、TGF-β、IL-10、およびIL-4を含む複合抗炎症スコアに対する比として提示する。複合スコアは、各週齢で、所与の遺伝子型におけるその週齢の全ての仔マウスについて、全ての炎症促進2ΔΔCT値または全ての抗炎症2ΔΔCT値の中央値を取ることによって生成した。(図3B)MeCP2欠損マウスにおける炎症促進プロファイルは、2週および7週で、炎症促進マーカーの増加傾向を示す。しかしながら、抗炎症性mRNA発現(図3C)は、2週、5週、および7週齢で、同齢および同腹のWTマウスと比較して、MeCP2欠損マウスにおいて有意な減少を示す。これは、MeCP2欠損マウスにおける神経炎症プロセスが、炎症促進性発現の増加ではなく、抗炎症性発現の減少によって引き起こされることを示唆する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/045112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 A61K49/00 A61K31/19 A61K31/198 A61P25/00 ADD. A61P25/28 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 practicable, search terms used) EP0-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/147831 A1 (UNIV WAYNE STATE [US]; NAT INST HEALTH [US]; KANNAN RANGARAMANUJAM M []) 23 December 2010 (2010-12-23) page 18, lines 9-10 page 18, line 31 - page 19, line 1 page 21, lines 22-24 page 22, line 27 - page 28, line 10 page 24, line 19 page 43, lines 25-29 page 82, lines 5-23 page 84, line 30 - page 85, line 7 examples 18,21-26 figures 1-11 ----- -/--	1-13, 15-23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt 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 17 November 2015		Date of mailing of the international search report 23/11/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Villard, Anne-Laure

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/045112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MICHAEL BERK ET AL: "The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry", TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES., vol. 34, no. 3, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 167-177, XP055228721, GB ISSN: 0165-6147, DOI: 10.1016/j.tips.2013.01.001 abstract pages 167-169, section "effects on neurotransmission; glutamate" -----	1-13, 15-23
X	WO 2011/123591 A1 (UNIV WAYNE STATE [US]; NAT INST HEALTH [US]; KANNAN RANGARAMANUJAM M [US]) 6 October 2011 (2011-10-06) page 71 claims -----	1-13, 15-23
X	WO 2009/046446 A2 (UNIV WAYNE STATE [US]; KANNAN RANGARAMANUJAM M [US]; IEZZI RAYMOND [US]) 9 April 2009 (2009-04-09) page 1, lines 4-6 page 19, line 28 - page 21, line 8 example 2 claim 29 -----	1-3, 5-13,16, 19-23
A	LESNIAK W G ET AL: "Biodistribution of fluorescently labeled PAMAM dendrimers in neonatal rabbits: Effect of neuroinflammation", MOLECULAR PHARMACEUTICS 20131202 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY USA, vol. 10, no. 12, 2 December 2013 (2013-12-02), pages 4560-4571, XP008178090, ISSN: 1543-8384 the whole document -----	1-13, 15-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/045112

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010147831 A1	23-12-2010	AU 2010260349 A1 CA 2767163 A1 EP 2442797 A1 US 2012003155 A1 US 2015141350 A1 WO 2010147831 A1	02-02-2012 23-12-2010 25-04-2012 05-01-2012 21-05-2015 23-12-2010
WO 2011123591 A1	06-10-2011	CA 2830052 A1 EP 2552458 A1 US 2013136697 A1 WO 2011123591 A1	06-10-2011 06-02-2013 30-05-2013 06-10-2011
WO 2009046446 A2	09-04-2009	CA 2701291 A1 EP 2214646 A2 JP 5484339 B2 JP 2010540664 A US 2011034422 A1 WO 2009046446 A2	09-04-2009 11-08-2010 07-05-2014 24-12-2010 10-02-2011 09-04-2009

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 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/00 1 0 1	
	G 0 1 N 33/53 G	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74) 代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74) 代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 ランガラマヌジャム, カナン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 7 7 7, ハイランド, グリーン ホロー ウェイ 6 8 4 0

(72) 発明者 カナン, スハタ

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 7 7 7, ハイランド, グリーン ホロー ウェイ 6 8 4 0

(72) 発明者 ナンス, エリザベス

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 2 4, ボルチモア, エス. カーリー ストリート 8 2 0

(72) 発明者 ブルー, メアリー イー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 9, ボルチモア, ケン オーク ロード 2 4 1 3

(72) 発明者 ジョンストン, マイケル ブイ.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 0, ボルチモア, ウッドラーン ロード 5 0 9

(72) 発明者 バウムガートナー, ウィリアム

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 4, ラックストン, モルバーン コート 2

(72) 発明者 ザン, ファン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 8, ボルチモア, ノース チャールズ ストリート 2 9 0 5, アpartment 1 0 8

(72) 発明者 ウィルソン, メアリー アン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 5, コロンビア, ドーン デイ ドライブ 6 2 6 7

(72) 発明者 スラッシャー, パーバラ

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 0 8 7, キングスビル, ロングフィールド ドライブ 7 4 2 4

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC41 EE25 EE59 FF34

4C084 AA17 NA13 NA14 ZA011 ZA021 ZA051 ZA151 ZB081 ZB111

专利名称(译)	树枝状聚合物组合物和用于治疗神经病和CNS病症		
公开(公告)号	JP2017529325A	公开(公告)日	2017-10-05
申请号	JP2017507403	申请日	2015-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学 肯尼迪克里格研究所有限公司		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学 肯尼迪克里格研究所有限公司		
[标]发明人	ランガラマヌジャムカナン カナン スハタ ナンス エリザベス ブルーメアリーイー ジョンストンマイケルブイ バウムガートナーウィリアム ザンファン ウィルソンメアリーアン スラッシャーバーバラ		
发明人	ランガラマヌジャム, カナン カナン, スハタ ナンス, エリザベス ブルー, メアリー イー. ジョンストン, マイケル ブイ. バウムガートナー, ウィリアム ザン, ファン ウィルソン, メアリー アン スラッシャー, バーバラ		
IPC分类号	A61K47/59 A61P25/28 A61K45/00 A61K45/06 A61P25/20 A61P29/00 A61P37/06 A61P25/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K45/06 A61K49/0032 A61K49/0054 A61K31/19 A61K31/198 A61K47/595 A61P25/00 A61P25/20 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/06 A61K9/0019		
FI分类号	A61K47/59 A61P25/28 A61K45/00 A61K45/06 A61P25/20 A61P29/00 A61P37/06 A61P25/00 A61P25/00.101 G01N33/53.G		
F-TERM分类号	4C076/AA95 4C076/CC41 4C076/EE25 4C076/EE59 4C076/FF34 4C084/AA17 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA051 4C084/ZA151 4C084/ZB081 4C084/ZB111		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/036839 2014-08-13 US 62/036675 2014-08-13 US		
其他公开文献	JP6531164B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

已经开发了树枝状大分子制剂，例如PAMAM树枝状聚合物或多臂PEG聚合物制剂，用于对脑或中枢神经系统的全身给药。在一个优选实施方案中，树枝状聚合物，神经变性障碍，神经发育障碍或神经疾病，例如，雷特氏综合征，或一种或多种用于治疗至少一种治疗剂自闭症谱系障碍，预防或诊断症状聚（酰氨基胺）（PAMAM）羟基末端de与药物共价连接树枝状聚合物纳米颗粒是一种树枝状聚合物，包括内共聚体，D6树枝状聚合物可以显著改善对脑损伤区域的摄取，并提供诊断和给药的方法。

(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2017-529325 (P2017-529325A)	
				(43) 公表日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)	
(51) Int. Cl.		F 1		テーマコード (参考)	
A 6 1 K 47/59 (2017.01)		A 6 1 K 47/59		4 C O 7 6	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28		4 C O 8 4	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00			
A 6 1 K 45/06 (2006.01)		A 6 1 K 45/06			
A 6 1 P 25/20 (2006.01)		A 6 1 P 25/20			
		審査請求 有		予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号		特願2017-507403 (P2017-507403)		(71) 出願人	
(86) (22) 出願日		平成27年8月13日 (2015. 8. 13)		ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ	
(85) 翻訳文提出日		平成29年3月29日 (2017. 3. 29)		イー	
(86) 国際出願番号		PCT/US2015/045112		アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2	
(87) 国際公開番号		W02016/025745		1 8、ボルチモア、ノース・チャールズ・	
(87) 国際公開日		平成28年2月18日 (2016. 2. 18)		ストリート 3 4 0 0	
(31) 優先権主張番号		62/036, 839		(71) 出願人	
(32) 優先日		平成26年8月13日 (2014. 8. 13)		507395016	
(33) 優先権主張国		米国 (US)		ケネディー クリーガー インスティテュ	
(31) 優先権主張番号		62/036, 675		ート、 インコーポレイテッド	
(32) 優先日		平成26年8月13日 (2014. 8. 13)		アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0	
(33) 優先権主張国		米国 (US)		5、 ボルチモア、 ノース ブロードウ	
				エイ 7 0 7	
				(74) 代理人	
				100078282	
				弁理士 山本 秀兼	
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 神経障害およびCNS障害の処置におけるアンドリマー組成物および使用					