

(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2019-537582

(P2019-537582A)

(43) 公表日 令和1年12月26日 (2019.12.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/185 (2006.01)	A 6 1 K 31/185	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/221 (2006.01)	A 6 1 K 31/221	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/41 (2006.01)	A 6 1 K 31/41	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-522710 (P2019-522710)	(71) 出願人	518423869
(86) (22) 出願日	平成29年10月27日 (2017.10.27)		ハフ イアー インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	令和1年6月25日 (2019.6.25)		アメリカ合衆国 7 3 1 1 2 オクラホマ
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/058834		州, オクラホマ シティ, ノースウェスト
(87) 国際公開番号	W02018/081614		フィフティシックス ストリート
(87) 国際公開日	平成30年5月3日 (2018.5.3)		3 4 0 0
(31) 優先権主張番号	62/415, 101	(74) 代理人	100149076
(32) 優先日	平成28年10月31日 (2016.10.31)		弁理士 梅田 慎介
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100119183
(31) 優先権主張番号	62/488, 740		弁理士 松任谷 優子
(32) 優先日	平成29年4月22日 (2017.4.22)	(74) 代理人	100173185
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 森田 裕
		(74) 代理人	100162503
			弁理士 今野 智介
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 シナプス形成および神経突起形成を増強するための方法

(57) 【要約】

本明細書では、蝸牛シナプトパッチーもしくは前庭シナプトパッチーまたは中枢神経系の疾患もしくは状態を患う対象における、シナプス形成および/もしくは神経突起形成を増強し、神経変性を低減し、かつ/またはタウタンパク質の蓄積もしくは凝集を低減するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の 2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロン (2, 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法が開示される。方法は、N - アセチルシステイン (N A C) を、対象へと投与するステップをさらに含む。

【選択図】 図 3

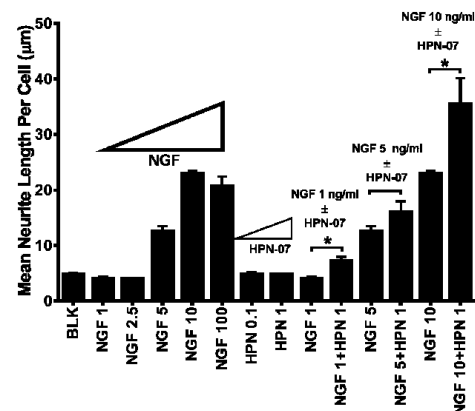


FIGURE 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蝸牛シナプトパチーまたは前庭シナプトパチーを患う対象における、シナプス形成および/または神経突起形成を増強するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の 2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2, 4 - DSPBN) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

【請求項 2】

2, 4 - DSPBN または薬学的に許容されるその塩を、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物として投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

2, 4 - DSPBN または薬学的に許容されるその塩を、対象へと、経口投与、静脈内投与、皮下 (subcutaneously) 投与、舌下投与、皮下 (subdermally) 投与、髄腔内投与、吸入により投与、または耳内に局所投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

N - アセチルシステイン、アセチル - L - カルニチン、グルタチオンモノエチルエステル、エブセレン、D - メチオニン、カルバマチオン、および Szeto - Schiller ペプチド、ならびにこれらの機能的な類似体からなる群から選択される、1 または複数の化合物を投与するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

N - アセチルシステインを投与するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

対象が、慢性聴覚損傷または慢性難聴を患う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

慢性聴覚損傷または慢性難聴が、老化により引き起こされたものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

慢性聴覚損傷または慢性難聴が、急性または慢性の、爆音または騒音への曝露により引き起こされたものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

2, 4 - DSPBN または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

2, 4 - DSPBN または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

慢性聴覚損傷または慢性難聴が、感染により引き起こされたものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

2, 4 - DSPBN または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

2, 4 - DSPBN または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

慢性聴覚損傷または慢性難聴が、毒素への曝露により引き起こされたものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 15】

2, 4 - DSPBN または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、請求項 14 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

対象がまた、耳鳴りも患う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

対象がまた、聴覚過敏も患う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

対象がまた、老人性難聴も患う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

対象がまた、平衡障害またはシナプス喪失を伴うメニエール病も患う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩の投与が、対象における蝸牛神経突起または前庭神経突起の再生を増強する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

対象における内有毛細胞上の、生存神経接合の数を増大させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

対象におけるコルチ器の、トノトピー領域内のシナプスの数を増大させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

対象が、蝸牛有毛細胞または前庭有毛細胞の実質的な喪失を患っていない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

対象が、蝸牛有毛細胞または前庭有毛細胞の実質的な喪失を患っている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、聴覚損傷または難聴の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、聴覚損傷または難聴の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

対象における、神経変性を低減するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の 2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2, 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

【請求項 29】

対象における、タウタンパク質の蓄積を低減するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の 2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2, 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

【請求項 30】

中枢神経系の疾患または状態を患う対象における、シナプス形成および神経突起形成を増強するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の 2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2, 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

関連出願の相互参照

本出願は、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、2016年10月31日に出願された、米国仮出願第62/415,101号、2017年4月22日に提出された、米国仮出願第62/488,740号、2017年5月24日に提出された、米国仮出願第62/510,596号、および2017年8月25日に提出された、米国仮出願第62/550,345号に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

慢性難聴、耳鳴り、聴覚過敏、老人性難聴、または平衡障害などの慢性疾患は、患者における、有毛細胞の喪失に依存しない、騒音関連および/または加齢関連の、蝸牛シナプトパッチおよび前庭シナプトパッチと関連することが多い。例えば、Kujawara、J. Neurosci.、29:14077~14085(2009);およびLinら、JARO、12:605~616(2011)は、軽度騒音外傷についての、マウスモデルおよびモルモットモデルにおける、正常な有毛細胞の補充にもかかわらず、騒音誘導性の内有毛細胞神経突起喪失(例えば、シナプトパッチ)が、広範にわたることを裏付けた。この機構は、騒音損傷または累積的な加齢関連難聴(例えば、老人性難聴)により引き起こされる聴力障害に寄与する可能性が高い。

10

【0003】

Sergeyenkoら、J. Neurosci.、33:13686~13694(2013)は、蝸牛におけるシナプスの喪失が、若齢~老齢において進行し、老人性難聴についてのマウスモデルでは、加齢関連の、閾値または有毛細胞カウントの変化のはるかに以前に、蝸牛全体にわたることを裏付けた。さらに、Makaryら、JARO、12:711~717(2011)は、老化しつつあるヒトの耳では、有毛細胞を完全に補充しても、平均値螺旋神経節細胞(SGC、すなわち、蝸牛ニューロン)喪失が、95歳で、約30%に達することから、神経変性が、有毛細胞の喪失に先行し、かつ/またはこれとは独立に生じることが指し示されることを裏付けた。さらに、ヒトにおける関連する研究では、Vianaら、Hear Res.、327:78~88(2015)は、蝸牛シナプトパッチおよび末梢神経軸索の変性が、有毛細胞の喪失と独立に生じ、老人性難聴に寄与する可能性が高いことの証拠を提示した。これらの種類の、拡散性のシナプスまたはSGCの喪失は、必ずしも、聴力閾値に影響を及ぼさない場合もあるが、騒がしい環境における、聴覚処理の困難および聴力の低下に寄与する場合もあり、耳鳴りまたは聴覚過敏など、関連する不適応の続発症をもたらす場合もある。蝸牛シナプトパッチおよびその機能的な帰結についてはまた、Schaeffterら、J. Neurosci.、31:13452~13457(2011);Wanら、Hear Res.、329:1~10(2015);およびLiebermanら、PLoS One、11(9):e0162726(2016)においても記載されている。

20

30

【0004】

耳に対する爆音損傷は、簡易爆発物(IED)のために、現代の軍事行動では、極めて一般的であり、感覚神経性難聴および耳鳴りを引き起こしうる。耳鳴りおよび難聴は、兵役関連の身体障害を伴う退役軍人の間で報告される、最も一般的な有害医学状態である。爆音曝露はまた、中枢聴覚系に対する損傷も誘導する場合があるが、この病態生理学的応答では、遷延性の酸化ストレスが、基本的な役割を果たすと考えられる。

40

【0005】

タウオパッチと、蝸牛神経変性とは、酸化ストレスが、進行中の損傷と病態生理学的に相関し、それを潜在的に伝搬させる点が共通する。より具体的には、いくつかの研究は、酸化ストレスが、タウの高リン酸化および凝集の両方を誘導するための直接的な触媒として作用することを明らかにしている。この相関は、スーパーオキシドジスムターゼ2ヌルマウスにおける研究によりさらに裏付けられ、このマウスは、慢性酸化ストレス条件下で、高用量の触媒性抗酸化剤処置により効率的に軽減されうる出生後早期の病理学的事象として、構成的な高リン酸化タウを呈する。この機構的な優位点と符合して、抗酸化剤を使

50

用する、酸化ストレスの治療的ターゲティングが、広範なスペクトルにわたるタウオパチーにおいて改善をもたらすことが実証されている。

【0006】

さらに、Selkoe、Science、198：789～791（2002）は、アルツハイマー病が、ニューロンの変性の前に、海馬シナプスの機能不全で始まること、シナプスの機能不全が、アミロイドペータタンパク質の、拡散性のオリゴマーアセンブリーにより引き起こされること、および少なくとも1つのマウス系統が、シナプス数の有意な低減により引き起こされる機能障害を示したことを観察した。Shengら、Cold Spring Harb Perspect Biol、4：a005777（2012）は、アルツハイマー病の発症機序についての、2つの主要な主題について論じた。第1に、オリゴマーAβ分子種は、シナプスの機能および構造、特に、シナプス後側に対して、強い有害作用を及ぼし、第2に、プレセニン機能の低下は、シナプス伝達を損ない、神経変性を促進する。加えて、Goldsteinら、Sci. Transl. Med.、4（134）：doi：10.1126/scitranslmed.3003716（2012）は、アメリカンフットボール選手において観察されるCTEの神経病態と同様な、単回の爆音への曝露の2週間後の野生型C57BL/6マウスにおける慢性外傷性脳症（CTE）の証拠を報告し、爆音誘導性の、海馬依存的な学習および記憶の欠損の遷延が、軸索伝導の機能障害、および活動依存的長期シナプス伝達強化の欠損と関連することを開示した。これらの観察は、アルツハイマー病、CTE、および他の中枢神経系疾患の処置のための、シナプス形成および神経突起形成の重要性を強調する。

10

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、蝸牛シナプトパチーもしくは前庭シナプトパチー、または中枢神経系の疾患もしくは状態、特に、慢性難聴、耳鳴り、聴覚過敏、老人性難聴、または平衡障害と関連する、蝸牛シナプトパチーまたは前庭シナプトパチーを患う患者における、シナプス形成および神経突起形成を増強する方法に対する必要が存在する。神経変性およびタウタンパク質の凝集（例えば、爆音への曝露により引き起こされる）はまた、神経変性およびタウタンパク質の蓄積または凝集を低減する方法に対する別の必要も強調する。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、蝸牛シナプトパチーまたは前庭シナプトパチーを患う患者における、シナプス形成および神経突起形成を増強するための方法および組成物を提供することにより、前述の医療上の必要を満たすことに成功した。したがって、本明細書で記載される本発明の、少なくとも1つの態様は、蝸牛シナプトパチーまたは前庭シナプトパチーを患う対象における、シナプス形成および神経突起形成を増強するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の2，4-ジスルホニル-フェニル三級ブチルニトロン（2，4-DSPBN）または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法に関する。本開示はまた、対象における神経変性またはタウタンパク質の蓄積を低減する方法であって、前記対象へと、有効な2，4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法も提示する。

40

【0009】

一部の実施形態では、2，4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物として投与する。

【0010】

一部の実施形態では、2，4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、対象へと、経口投与、静脈内投与、皮下（subcutaneously）投与、舌下投与、皮下（subdermally）投与、髄腔内投与、吸入により投与、または耳内に局所投与する。

【0011】

50

一部の実施形態では、方法は、N - アセチルシステイン (N A C)、アセチル - L - カルニチン、グルタチオンモノエチルエステル、エブセレン、D - メチオニン、カルバマチオン、および S z e t o - S c h i l l e r ペプチド、ならびにこれらの機能的な類似体からなる群から選択される、1または複数の化合物を投与するステップをさらに含む。

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、方法は、N A C を投与するステップをさらに含む。

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、対象は、慢性聴覚損傷または慢性難聴を患う。一部の実施形態では、慢性聴覚損傷または慢性難聴は、老化により引き起こされたものである。

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、慢性聴覚損傷または慢性難聴は、急性または慢性の、爆音または騒音への曝露により引き起こされたものである。一部の実施形態では、2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する。一部の実施形態では、2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも1年後において、対象へと投与する。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、慢性聴覚損傷または慢性難聴は、感染により引き起こされたものである。一部の実施形態では、2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する。一部の実施形態では、2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも1年後において、対象へと投与する。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、慢性聴覚損傷または慢性難聴は、毒素への曝露により引き起こされたものである。一部の実施形態では、2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する。一部の実施形態では、2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも1年後において、対象へと投与する。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、対象は、耳鳴りを患う。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、対象は、聴覚過敏を患う。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、対象は、老人性難聴を患う。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、対象は、平衡障害を患う。一部の実施形態では、対象は、シナプス喪失を伴うメニエール病を患う。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩の投与は、対象における蝸牛神経突起または前庭神経突起の再生をもたらす。一部の実施形態では、内有毛細胞上の、生存神経接合の数を増大させる。一部の実施形態では、コルチ器の、トノトピー領域内のシナプスの数を増大させる。

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態では、患者は、蝸牛有毛細胞または前庭有毛細胞の実質的な喪失を患っていない。

【 0 0 2 3 】

本明細書で記載される、本発明の、少なくとも別の態様は、中枢神経系の疾患または状態を患う対象における、シナプス形成および神経突起形成を増強するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の2 , 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2 , 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップ

10

20

30

40

50

を含む方法に関する。

【0024】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物として投与する。一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、対象へと、経口投与、静脈内投与、皮下 (subcutaneously) 投与、舌下投与、皮下 (subdermally) 投与、髄腔内投与、吸入により投与、または耳内に局所投与する。一部の実施形態では、方法は、NACを、前記対象へと、共投与するステップをさらに含む。

【0025】

一部の実施形態では、対象は、アルツハイマー病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、前頭側頭型認知症、ピック病、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性皮質下神経膠症、筋萎縮性側索硬化症、石灰化を伴う、びまん性神経原線維変化、慢性外傷性脳症、拳闘家認知症、TOD (tangle-only dementia)、ダウン症候群、ゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー病、ハラールフォルデン - シュバツツ病、クロイツフェルト - ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン - ピック病、PrP-CAA (prion protein cerebral amyloid angiopathy)、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う、非グアム型運動ニューロン疾患、および脳炎後パーキンソニズムから選択される、中枢神経系の疾患または状態を患う。

【0026】

これらの特徴および他の特徴は、これらの組織化および作用方式と併せて、付属の図面と共に理解される場合、以下の、発明を実施するための形態から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】HPN-07が、in vitroの、マウス螺旋神経節 (SG) 組織外植片内で、神経突起形成性応答を誘導したことを示す図である。HPN-07は、同じ器官型培養培地中で培養された非処置対照 (NC、正常対照) と比べて、顕著な神経突起の成長を誘導した。HPN-07の存在下において、各SG外植片から放射状に伸びる神経突起の数、および増大したこれらの伸展の各々の、対応する長さの両方である。

【図2】HPN-07が、カノニカルの蝸牛の神経突起形成性成長因子、脳由来神経栄養因子 (BDNF) により誘導される神経突起形成を強化したことを示す図である。マウス螺旋神経節外植片を、BDNF (10 ng/mL) またはBDNF (10 ng/mL) + HPN-07 (0.1 μM) を伴うか、または伴わない無血清培地中で、48時間にわたり培養し、次いで、固定し、-チューブリンで免疫標識化して、神経突起を可視化した。

【図3】PC12細胞系内の、細胞1個当たりの平均値神経突起長を示す図である。HPN-07と、漸増用量のNGFとによる組合せ処置は、HPN-07が、ニューロン様のPC12細胞系内の、NGF媒介性の神経突起の伸長 (すなわち、平均値神経突起長の増大) を著明に増強することを明らかにした。

【図4】著明な神経突起の成長を呈する、PC12細胞の百分率を示す図である。HPN-07と、漸増用量のNGFとによる組合せ処置は、HPN-07が、処置後において、神経突起を有する細胞の百分率の有意な増大により証拠立てられる通り、ニューロン様のPC12細胞内の、NGF誘導性の神経突起形成を著明に増強することを明らかにした。

【図5】HPN-07による、カイニン酸 (KA) 誘導性の興奮毒性による、内有毛細胞 (IHC) のリボンシナプスの完全性の喪失の好転を示す図である。

【図6】KAへの興奮毒性曝露後における、非処置蝸牛外植片、BDNF処置蝸牛外植片、またはHPN-07処置蝸牛外植片に由来するIHC間の、リボンの数および空間的分布についてのターゲティングされた比較による定量的査定をまとめる図である。

【図7】シナプス前マーカーの定量化 (C末端結合性タンパク質2、CtBP2) およびシナプス後マーカーの定量化 (Glur2/3) を示す図である。上パネルでは、ラット

10

20

30

40

50

を、1.5分間隔で繰り返される、14 p s iで、3回にわたる、継起的なオープンフィールドの爆音へと曝露し、次いで、最後の爆音の1時間後に、HPN-07/NACを注射し(i.p.)、次いで、続く48時間にわたり、1日2回ずつ注射した。下パネルでは、ラットを、単回で、8 p s iの、ショックチューブ内の爆音へと曝露し、次いで、最後の爆音の1時間後に、HPN-07/NACを注射し(i.p.)、次いで、続く48時間にわたり、1日2回ずつ注射した。

【図8】抗酸化剤処置が、爆音誘導性の外傷に応答する、蝸牛リボンシナプスの喪失に対して保護することを示す図である。共焦点イメージングは、曝露の21日後における、爆音へと曝露された動物(D~F)におけるOCの、中回転(16 kHz領域)内の、IHC基底外側膜に沿った、CtBP2およびGlur2/3による免疫標識化の、非曝露非投薬の、週齢をマッチさせた対照(A~C)と比べた低減を示す。爆音への曝露後に、HPN-07と、NACとの組合せで処置された動物は、OCのこの領域内の、シナプス叢の、このような粗大なIHCの喪失を示さなかった(G~I)。シナプス前リボンを、抗CtBP2抗体(赤)で標識化し、シナプス後肥厚を、抗Glur2/3抗体(緑)で標識化する。右端パネル内の融合画像は、各状態について、2つのシナプスマーカーの、重複シグナル強度(黄)を明らかにする。共焦点画像は、16 kHz領域内の、IHC 8~10個以内のリボンの、zスタックの最大射影である。A~Iの、I内で、スケールバー=5 μmである。

【図9】HPN-07およびNACによる急性治療的介入が、爆音へと曝露された動物のOCの、16~32 kHz領域における、IHC内のリボンシナプスの喪失を低減することを示す図である。週齢をマッチさせた、非曝露非投薬対照、ならびに爆音への曝露の7日後(7D; AおよびB)または21日後(21D; CおよびD)における、爆音へと曝露された動物の、非処置コホートおよび抗酸化剤処置コホートにおける、OCの、2、4、8、16、32、および48 kHz領域内のIHCにおいて、シナプスマーカーの計数を実施した。非処置の爆音へと曝露された動物の、8~48 kHz領域(7D)および16~48 kHz領域(21D)におけるIHCでは、シナプス前マーカーおよびシナプス後マーカーの両方の、同時発生的で、統計学的に有意な喪失が観察された。OCの8 kHz領域および16 kHz領域では、これらのシナプスのマーカーの、爆音誘導性の喪失に抗するための、抗酸化剤による著明な処置効果が同定され、32 kHz領域(7Dおよび21D)および48 kHz領域(7D)では、抗酸化剤処置について、統計学的に有意となる傾向が観察された。爆音への曝露の21日後における、48 kHz領域では、このような処置効果は観察されなかった。リボンシナプスの喪失についての、群の統計学的有意差を、*、**、または***のそれぞれを、 $p < 0.05$ 、 0.01 、または 0.001 とするアステリスクで指し示す一方、抗酸化剤処置効果の統計学的有意性を、 $p < 0.01$ について、##で表示する。誤差バーは、平均値の標準誤差(SEM)を表す。カッコ内の数は、各コホート内で査定されるOCの総数を表す。

【図10】抗酸化剤との組合せによる介入が、骨SL内の、爆音誘導性の神経線維の喪失に対して保護することを示す図である。A~Cにおける画像は、正常対照(A); 傷害の21日後における、非処置の爆音へと曝露されたラット(B); および爆音の21日後における、抗酸化剤で処置された爆音へと曝露されたラット(C)の中回転に由来する、SLの断面図(A~C)内の、NF-200で陽性染色された神経線維の例である。爆音への曝露の21日後における、非処置の爆音へと曝露された動物の蝸牛のSL(B)では、正常対照(A)、ならびにHPN-07およびNACで処置された爆音へと曝露された動物(C)と比較して、少数のNF-200陽性神経線維が観察された。各実験コホートに由来する蝸牛の中回転および基底回転におけるSL内の、NF-200陽性神経線維の定量化を行い、神経突起の密度を推定し、統計学的に解析した(D)。非処置の爆音へと曝露された動物のSL内の、NF-200陽性神経突起の数は、爆音への曝露の21日後において、NCと比較して、著明に減少した($p < 0.05$; *)。SL内の、NF-200陽性神経突起の、このような低減は、爆音への曝露の21日後における、HPN-07/NACで処置された爆音へと曝露された動物では観察されなかった($p < 0.01$; #

10

20

30

40

50

; 非処置の爆音へと曝露された動物と比較した)。早期の時点では、コホートのうちのいずれの間でも、神経突起密度の有意な変化は観察されなかった(全てについて、 $p > 0.05$)。A ~ C の C では、スケールバー = $10 \mu m$ である。カッコ内の数は、各時点において、各コホート内で査定された動物の総数を表す。D における誤差バーは、SEM を表す。

【図 1 1】抗酸化剤処置が、SG 内の、爆音誘導性の神経変性の証拠を低減することを示す図である。A ~ C における画像は、正常対照 (A) ; 爆音の 21 日後における、非処置の爆音へと曝露されたラット (B) ; および 21 日後における、処置された爆音へと曝露されたラット (C) の基底回転における、SG 内の、NF - 200 染色の例である。SG 内のニューロンの大部分が、NF - 200 について陽性染色される(軽度の陽性)一方で、各コホート内の、少数のニューロンは、強く免疫反応性であった(強く陽性; A ~ C における矢印)。A ~ C における矢印は、NF - 200 抗体により免疫標識化されなかったニューロンを描示する。SG 内の、NF - 200 による軽度の陽性ニューロン、または強い陽性ニューロンの数を定量化し、各試料中の、それらの相対百分率を、ニューロンの総数との比較に基づき計算した (D および E)。次いで、各時点における、コホート間の、これらの百分位数の差違を、統計学的に解析した。爆音への曝露の 21 日後における、非処置の爆音へと曝露された動物の SG 内では、NC と比較して、軽度の NF - 200 陽性ニューロンの百分率の減少が観察された ($p < 0.001$; * * *)。この時点では、軽度の NF - 200 陽性細胞の喪失に対する、統計学的に有意な、肯定的な処置効果が観察された (21 D - B 対 21 D - B / T, $p < 0.001$; # # # ; D)。爆音への曝露の 7 および 21 日後における、非処置の爆音へと曝露された動物の SG 内では、NC と比較して、強い NF - 200 陽性ニューロンの百分率の増大が観察された(全てについて、 $p < 0.01$; * *)。爆音への曝露の 21 日後には、強い NF - 200 陽性細胞の増大に対する、統計学的に有意な、肯定的な処置効果が観察された (21 D - B 対 21 D - B / T, $p < 0.05$; # ; E)。カッコ内の数は、各時点において、各コホート内で査定された動物の総数を表す。誤差バーは、D および E における SEM を表す。A ~ C の C では、スケールバー = $20 \mu m$ である。

【図 1 2】HPN - 07 および NAC による治療的介入が、爆音に応答する、SG 内の、NF - 68 による免疫標識化の病理学的増大を、著明に低減したことを示す図である。A ~ C における画像は、NC ラット (A) ; 損傷の 7 日後における、非処置の爆音へと曝露されたラット (B) ; および爆音への曝露の 7 日後における、抗酸化剤処置動物 (C) に由来する基底回転における、SG についての NF - 68 免疫染色の例である。一部の小型のニューロンは、全ての条件下で、NF - 68 陽性 (A ~ C における矢印) であったが、独特なことには、複数の、大型の、NF - 68 陽性ニューロンが存在することが、損傷の 7 日後の、爆音へと曝露された動物において明白であった (B における矢印) ことに注目されたい。NF - 68 陽性ニューロンの総数を、各コホート内、各サンプリング間隔でカウントし、NF - 68 陽性ニューロンの百分率を計算し、統計学的に解析した (D)。爆音への曝露の 7 および 21 日後における、非処置の爆音へと曝露された動物の SG 内では、NF - 68 陽性ニューロンの数の有意な増大が観察された(全てについて、 $p < 0.001$; * * *)。爆音への曝露後 7 および 21 日間のいずれの時点においても、有意な抗酸化剤処置効果が同定された(全てについて、 $p < 0.05$; #)。A ~ C の C におけるスケールバー = $20 \mu m$ である。D における誤差バーは、SEM を表す。カッコ内の数は、各時点において、各コホート内で査定された動物の総数を表す。

【図 1 3】抗酸化剤処置が、SG 内の、爆音誘導性の神経変性の証拠を低減することを示す図である。非曝露非投薬対照、ならびに爆音への曝露の 21 日後の、非処置動物および HPN - 07 / NAC 処置動物の両方において、螺旋神経節ニューロンの最大直径を測定し、統計学的に解析した。非処置の爆音へと曝露された動物の蝸牛では、3 つの回転全てにおける、非曝露非投薬対照と比較して、細胞体直径の、有意な減少が観察された(全てについて、 $p < 0.001$; * * *)。HPN - 07 / NAC で処置された爆音へと曝露された動物では、3 つの回転全てにおける、平均値細胞体直径が、非曝露非投薬対照と、

10

20

30

40

50

統計学的に識別不能であった（全てについて、 $p > 0.05$ ）。カッコ内の数は、各コホート内で査定された動物の総数を表す。

【図14】抗酸化剤処置が、SG内の、爆音誘導性の、高リン酸化タウの蓄積を低減することを示す図である。A～Cにおける画像は、正常対照動物（A）；爆音の7日後における、非処置の爆音へと曝露されたラット（B）；および損傷の7日後における、抗酸化剤処置ラット（C）に由来する中回転における、SGのAT8免疫染色の例である。AT8陽性SGN（BおよびCにおける矢印）の数をカウントし、AT8陽性ニューロンの百分率を計算し、各時点における、実験コホート間の統計学的比較のために使用した（D）。爆音への曝露の7日後の、非処置ラットおよび処置ラットでは、SGN内の、AT8の蓄積の増大が観察された（ $p < 0.01$ または 0.001 ；* * または* * *）。爆音への曝露後のこの時点では、有意なHPN-07/NAC処置効果が観察された（ $p < 0.05$ ；#）。A～CのCでは、スケールバー＝ $20\mu m$ である。カッコ内の数は、各時点において、各コホート内で査定された動物の総数を表す。Dにおける誤差バーは、SEMを表す。

10

【図15】抗酸化剤処置が、SG内の、爆音誘導性の、病原性タウオリゴマーの蓄積を低減することを示す図である。A～Cにおける画像は、正常対照ラット（A）；爆音の7日後における、非処置の爆音へと曝露されたラット（B）；および損傷の7日後における、抗酸化剤処置ラット（C）に由来する中回転における、SGの、オリゴマータウの免疫染色（T22）の例である。非処置の爆音へと曝露された動物（Bにおける矢印）および抗酸化剤で処置された爆音へと曝露された動物（Cにおける矢印）では、T22陽性ニューロンが観察された。SG内のT22陽性ニューロンの数を定量化し、各時点における、各コホート内のT22陽性ニューロンの百分率を計算し、統計学的に解析した（D）。全ての被験時点の、非処置の爆音へと曝露された動物のSG内では、T22陽性ニューロンの数の増大が観察された（ $p < 0.05$ または 0.001 ；* または* * *）。爆音への曝露後7および21日間の時点については、有意な処置効果が観察された（ $p < 0.05$ または 0.01 ；# または# #）が、爆音後急性、24時間の時点では、有意な処置効果が観察されなかった（ $p > 0.05$ ）。A～CのCでは、スケールバー＝ $20\mu m$ である。カッコ内の数は、各時点において、各コホート内で査定された動物の総数を表す。Dにおける誤差バーは、SEMを表す。

20

【図16】爆音への曝露が、SGN内の細胞体における、オリゴマータウとNF-68断片との、同時的な蓄積を結果としてもたらすことを示す図である。画像は、爆音への曝露の24時間後（A～D）、または7日後（E～H）の非処置動物の、中回転におけるSG内の、T22およびNF-68による二重標識化の例である。爆音に応答するSG内では、独特なことに、細胞体におけるNF-68、ならびに核および細胞質におけるT22の両方について免疫陽性のSGNが観察された（緑；A、B、D、E、F、およびHにおける矢印）。SG内では、一部の、NF-68標識化を伴わない、T22陽性ニューロンもまた観察された（赤；A、E、D、およびHにおける矢印）。核は、DAPIにより染色した（青）。A～HのHでは、スケールバー＝ $5\mu m$ である。

30

【図17】抗酸化剤処置が、聴覚野（AC）内の細胞体における、爆音誘導性の、タウの蓄積を低減することを示す図である。A～Cにおける画像は、正常対照ラット（A）；爆音の7日後における、非処置の爆音へと曝露されたラット（B）；および損傷の21日後における、抗酸化剤処置ラット（C）の深部層における、タウ1による免疫染色の例である。正常対照（Aにおける矢印）、非処置の爆音へと曝露された動物（Bにおける矢印）、および抗酸化剤で処置された爆音へと曝露された動物（Cにおける矢印）では、タウ1陽性ニューロンが観察された。AC内のタウ1陽性ニューロンの数を定量化し、各時点における、各コホート内のタウ1陽性ニューロンの百分率を計算し、統計学的に解析した（D）。損傷後全ての時点の、爆音へと曝露された動物のAC内では、タウ1陽性細胞体を伴うニューロンの数の増大が観察された（ $p < 0.05$ 、 0.001 、または 0.001 ；*、* *、または* * *）。抗酸化剤処置は、7および21日間のサンプリング間隔の、爆音へと曝露されたラットにおける、この異常な免疫染色パターンを低減したが、肯定

40

50

的な処置効果についての統計学的有意性が結論づけられたのは、21日間のコホートに限られた ($p < 0.001$; ###)。カッコ内の数は、各時点において、各コホート内で査定された動物の総数を表す。A～CのCでは、スケールバー = $20 \mu\text{m}$ である。誤差バーは、SEMを表す。

【図18】HPN-07/NAC処置が、SG内の、爆音誘導性の酸化ストレスを低減することを示す図である。画像は、非曝露非投薬ラット (A)；爆音への曝露の24時間後における、非処置の爆音へと曝露されたラット (B)；およびHPN-07/NACで処置された爆音へと曝露されたラット (C) に由来する、蝸牛の基底回転における、SG内の8-OHdG免疫染色の例である。SG内の、8-OHdG陽性ニューロンの数を定量化し、各コホート内で結果として得られる百分位数を計算し、統計学的に解析した (D)。非処置の爆音へと曝露された動物のSG内では、8-OHdG陽性ニューロンの数の増大が観察された ($p < 0.001$; ***)。HPN-07/NAC処置は、この爆音誘導性のストレス応答を、有意に低減した ($p < 0.01$; ***)。カッコ内の数は、各コホート内で査定された動物の総数を表す。A～CのCでは、スケールバー = $25 \mu\text{m}$ である。誤差バーは、SEMを表す。

【図19】抗酸化剤処置が、IHCの神経支配帯域内における、爆音誘導性の、神経突起の喪失に対して保護することを示す図である。A～Fにおける画像は、非曝露非投薬ラット (A、D)；爆音への曝露の21日後における、非処置の爆音へと曝露された動物 (B、E)；および爆音の21日後における、HPN-07/NACで処置された爆音へと曝露された動物 (C、F) に由来する、蝸牛の中回転の、IHC領域内の、NF-200で陽性染色された神経突起 (ピンク；A～Cにおける矢印) の例である。A～Cにおける矩形は、D～Fの画像を収集した位置を指し示す。非処置の爆音へと曝露された動物の蝸牛内の、IHCの神経支配帯域 (Eにおける矢印) に沿って、正常対照 (Dにおける矢印) またはHPN-07およびNACで処置された爆音へと曝露された動物 (Fにおける矢印) と比較して少数のNF-200陽性神経突起が観察された。A～Cにおける矢印およびブラケットは、それぞれ、IHCおよびOHC (緑) を指し示す。核は、DAPIにより染色した (青)。蝸牛の中回転内および基底回転内各IHCに隣接する、NF-200陽性神経突起の数を、カウントし、各サンプリング間隔の、各コホートについて、統計学的に解析した (G)。爆音の7および21日後における、非処置の爆音へと曝露された動物 (7D-Bおよび21D-B) では、IHC 1個当たりのNF-200陽性神経突起の数の、正常対照と比較して有意な低減 (NC；* または***、 $p < 0.01$ または 0.001) が見られた。爆音への曝露の7および21日後の両方において、HPN-07およびNACで急性処置された、爆音へと曝露された動物 (7D-B/Tおよび21D-B/T) では、IHCの神経支配帯域内の、NF-200陽性神経突起の喪失に対する、非処置の爆音へと曝露された動物と比較して有意な程度の保護 (# または ###、 $p < 0.05$ または 0.001) が観察された。誤差バーは、平均値の標準誤差 (SEM) を表す。カッコ内の数は、各時点において、各コホート内で査定された動物の総数を表す。Cにおけるスケールバー = $5 \mu\text{m}$ は、A～Cに当てはまり、Fにおけるスケールバー = $5 \mu\text{m}$ は、D～Fに当てはまる。

【図20】HPN-07/NAC処置が、爆音誘導性の難聴を軽減することを示す図である。ABR閾値のシフトは、2～16kHzにわたり平均したものであり、爆音への曝露後3つの時点における、処置動物と、非処置動物とを比較する。各時点において、HPN-07/NACで処置された爆音へと曝露された動物 (B/T) の、平均ABR閾値のシフトは、非処置の爆音へと曝露された対照のシフトより有意に小さかった (B)。カッコ内の数は、群1つ当たりの耳の数を表す。*、* *、* * * は、処置された爆音へと曝露された動物と、非処置の爆音へと曝露された動物との間の、 $p < 0.01$ および 0.001 を指し示す。### は、爆音の7日後 (7D) または21日後 (21D) における、ABR閾値のシフトのHPN-07/NAC媒介性の低減を、爆音の24時間後 (24H) において観察されるシフトの低減と比較する、 $p < 0.001$ を指し示す。誤差バーは、SEMを指し示す。

10

20

30

40

50

【図 2 1】HPN - 0 7 および NAC が、騒音誘導性の難聴を緩和したことを示す図である。(A) 騒音の 1 日後における、ABR 閾値のシフトを示す図であり；(B) 騒音の 15 日後における、ABR 閾値のシフトを示す図である。騒音により引き起こされた難聴は、HPN - 0 7 / NAC 処置により緩和された。* および * * * は、それぞれ、二元 ANOVA に続く、ボンフェローニの事後検定について、所与の任意の周波数における、有意な試料効果である、 $p < 0.05$ および 0.001 を表す。

【図 2 2】騒音への曝露後における、有毛細胞の喪失が、最小限であり、蝸牛の基底領域内だけで現れたことを示す図である。

【図 2 3】HPN - 0 7 および NAC が、*in vivo* において、騒音誘導性の、IHC リボンシナプスの興奮毒性喪失を好転させたことを示す図である。1 回の騒音 (110 dB で、2 時間にわたる、8 ~ 16 kHz の騒音) は、Sprague Dawley ラットの高周波数におけるシナプスのうちの、30% ~ 40% の喪失を引き起こした。HPN - 0 7 / NAC 処置は、損傷を好転させた。騒音単独群と、騒音 + HPN - 0 7 / NAC 群との比較を行った。* * および * * * は、それぞれ、 $p < 0.01$ および 0.001 を表す。損傷の 24 時間後には、リボンシナプスの喪失は、恒久的となるので、回復は、再生性でなければならない。

【図 2 4】HPN - 0 7 が、螺旋神経節ニューロン外植片内の、BDNF 誘導性の神経突起形成を強化することを示す図である。螺旋神経節ニューロンは、損傷後で神経線維を再増殖させる、生得的であるが、限定的な能力を有する。内因性ニューロトロフィン、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、回復を容易としうる。HPN - 0 7 は、BDNF に加えて、神経線維の数および広がり、大幅に増大させた。* * * は、NC と比較した $p < 0.001$ を表す。# # は、BDNF (10 ng / ml) と比較した $p < 0.01$ を表す。

【図 2 5】HPN - 0 7 が、螺旋神経節ニューロン外植片内の、BDNF 誘導性の神経突起形成を強化する実験では、神経突起長が、処置のうちのいずれによっても、正常対照 (NC) と比較して、それほど変化しないことを示す図である。

【図 2 6】HPN - 0 7 が、NT - 3 誘導性の神経突起形成を強化したことを示す図である。BDNF 誘導性の神経突起形成と同様に、NT - 3 誘導性の神経突起形成もまた、HPN - 0 7 により増強される。* * * は、NC と比較した、 $p < 0.001$ を表す。# および # # は、それぞれ、NT - 3 (10 ng / ml) と比較した、 $p < 0.1$ および $p < 0.01$ を表す。

【図 2 7】HPN - 0 7 が、NT - 3 誘導性の神経突起形成を強化した実験では、神経突起長が、処置のうちのいずれによっても、正常対照 (NC) と比較して、それほど変化しないことを示す図である。

【図 2 8】NHPN - 1010 処置 (HPN - 0 7 + NAC) が、確立された難聴についてのパイロット研究において、聴力機能を回復したことを示す図である。オープンフィールドの爆音傷害により、恒久的な閾値シフトを確立した。損傷の 4 週間後に、毎日 2 回、300 mg / kg で、14 日間にわたり投与される、HPN - 0 7 + NAC による処置を開始した。損傷の 14 週間後 (処置の 8 週間後) における ABR 閾値の改善が、処置前と対比して示された。

【図 2 9】NHPN - 1010 処置 (HPN - 0 7 + NAC) が、確立された慢性難聴モデルにおいて、IHC リボンシナプス数を回復させたことを示す図である。NHPN - 1010 処置は、損傷の 4 週間後に開始し、14 日間にわたり、毎日投与した。損傷の 8 週間後に、リボンシナプスカウントは、有意に回復した。

【図 3 0】NHPN - 1010 処置 (HPN - 0 7 + NAC) が、確立された慢性難聴モデルにおいて、ABR の波 I の振幅の回復をもたらしたことを示す図である。プラセボ群における、80 および 70 dB の両方の音圧レベル (SPL) の、4 kHz および 8 kHz の刺激に応答する振幅は、爆音への曝露により低減され、時間の経過と共に減少し続けた。80 dB の SPL の、8 kHz の刺激に応答する振幅の低減は、NHPN - 1010 処置の 8 週間後に、処置前のレベルへと、完全に回復した。

【図 3 1】16、32、48 kHz の爆音の後で、リボンシナプスが、低減され、NHP

10

20

30

40

50

N - 1 0 1 0 処置 (H P N - 0 7 + N A C) により、保存 / 回復されることを示す図である。

【図 3 2】N H P N - 1 0 1 0 処置 (H P N - 0 7 + N A C) が、一次求心性聴覚ニューロンが低減される、逆行性神経変性に対する、爆音の影響を改善しうることを示す図である。

【図 3 3】H P N - 0 7 および N A C が、i n v i v o において、騒音誘導性のシナプス喪失を好転させたことを示す図である。この実験では、5 回にわたる H P N - 0 7 / N A C 処置の投与が、騒音誘導性のシナプス喪失を好転させるのに、2 回の投与より有効であると考えられた。騒音単独群と、騒音 + H P N - 0 7 / N A C 群 (5 回の投与) との比較を行った。* * は、 $p < 0.01$ を表す。

10

【図 3 4】H P N - 0 7 / N A C が、i n v i v o において、騒音誘導性の A B R 振幅異常を回復させることを示す図である。処置群の、A B R の波 I の振幅および波 V / I の振幅比は、非処置群とは対照的に、騒音への曝露の 15 日後において、騒音前と比較して変化しなかった。いずれの群の波 V の振幅も、変化しなかった。* * 反復測定二元 A N O V A について、周波数にわたり有意な主要効果である、 $p < 0.01$ 。

【図 3 5】中枢聴覚系における、活性調節型細胞骨格関連タンパク質 (A R C) についての免疫染色を示す図である。A r g 3.1 としてもまた公知の A R C は、可塑性タンパク質である。中枢聴覚系における A R C の減少は、耳鳴りと関連する。爆音への曝露は、A C 内、I C 内、および D C N 内の A R C を下方調節した。H P N - 0 7 / N A C 処置は、A C 内、I C 内、および D C N 内の A R C の発現を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化した。*、* * * は、N C と比較した場合の、 $p < 0.05$ または 0.001 を指し示し、# # # は、処置を伴わない爆音群と比較した場合の $p < 0.001$ を指し示す。

20

【図 3 6】中枢聴覚系における、成長関連タンパク質 43 (G A P - 43) についての免疫染色およびウェスタンブロットを示す図である。G A P - 43 は、軸索の成長円錐に位置する、膜関連リンタンパク質である。G A P - 43 は、軸索の成長、シナプス形成、およびシナプスのリモデリングについてのマーカーである。爆音への曝露は、A C 内、I C 内、および D C N 内の G A P - 43 を上方調節した。H P N - 0 7 / N A C 処置は、A C 内、I C 内、および D C N 内の G A P - 43 の発現を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化した。

【図 3 7】蝸牛背側核 (D C N) 内の、G A B A A 受容体 1 (G A B A A R 1) についての免疫染色を示す図である。G A B A A 受容体は、イオンチャネル型受容体であり、リガンド開口型イオンチャネルである。その内因性リガンドは、中枢神経系における、主要な阻害性神経伝達物質である、- アミノ酪酸 (G A B A) である。爆音への曝露は、D C N 内の、G A B A A R 1 の発現を上方調節した。H P N - 0 7 / N A C 処置は、D C N 内の G A B A A R 1 の発現を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化した。

30

【図 3 8】D C N 内の、G A B A A R 1 (赤) および G A D 67 (緑) についての共標識化を示す図である。G A D 67 が、阻害性ニューロンについてのバイオマーカーであることから、G A B A A R 1 陽性細胞は、阻害性ニューロンであることが指し示される。

40

【図 3 9】D C N 内の、グルタミン酸受容体 2 (G l u R 2) についての免疫染色を示す図である。G l u R 2 は、中枢神経系における興奮性神経伝達物質である、A M P A のイオンチャネル型受容体である。グルタミン酸受容体の過剰刺激は、興奮毒性を介して、神経変性およびニューロンの損傷を引き起こす。爆音への曝露は、D C N 内の、G l u R 2 の発現を上方調節した。H P N - 0 7 / N A C 処置は、D C N 内の G l u R 2 の発現を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化した。

【図 4 0】螺旋神経節 (S G) 内の、一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリー V メンバー 1 (T R P V 1) についての免疫染色を示す図である。カプサイシン受容体およびパニロイド受容体 1 としてもまた公知の T R P V 1 は、高温の酸性条件、カプサイシン、および刺激性化合物により活性化する。S G 内の、T R P V 1 の上方調節は、耳鳴り

50

と関連する。爆音への曝露は、SG内の、TRPV1を上方調節した。HPN-07/NAC処置は、SG内のTRPV1を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化した。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本明細書で記載される本発明は、シナプス形成および神経突起形成を促進または増強するための方法であって、蝸牛シナプトパチーまたは前庭シナプトパチーを患う対象へと、有効量の2,4-ジスルホニル-フェニル三級ブチルニトロソ(2,4-DSPBN、またはHPN-07)または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法を提供する。任意選択で、2,4-DSPBNを、NACと共に共投与する。

【0029】

略号

AVCN: 蝸牛腹側前核; AC: 聴覚野; bTBI、爆音誘導性外傷性脳損傷である。CtBP2: C末端結合性タンパク質2; DCN: 蝸牛背側核; GluR2/3: グルタミン酸受容体2/3; HPN-07: 2,4-ジスルホニル-フェニル三級ブチルニトロソ; IC: 下丘; IHC: 内有毛細胞; mTBI: 軽度爆音誘導性外傷性脳損傷; NAC: N-アセチルシステイン; NF: 神経線維; OC: コルチ器; OHC: 外有毛細胞; 8-OHdG: 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン; psi: 1平方インチ当たりのポンド; PVCN: 蝸牛腹側後核; SNHL: 感覚神経性難聴; SG: 螺旋神経節; SGN: 螺旋神経節ニューロン; SL: 螺旋板である。

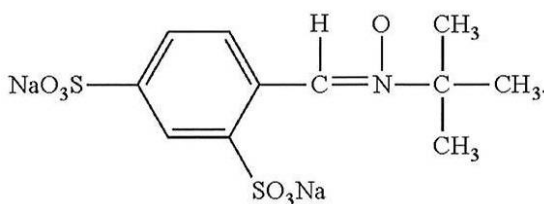
【0030】

2,4-ジスルホニル-フェニル三級ブチルニトロソ(2,4-DSPBN)

2,4-ジスルホニル-フェニル三級ブチルニトロソはまた、2,4-ジスルホニルPBN、2,4-DSPBN、NXY-059、またはHPN-07とも称する。これは、以下の構造:

【0031】

【化1】



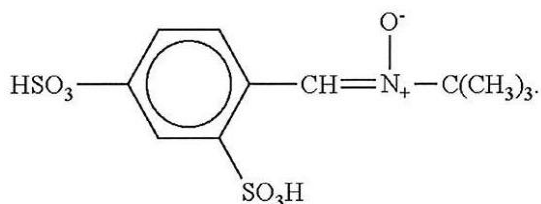
を有する。

【0032】

化合物の酸形態は、以下の構造:

【0033】

【化2】



を有する。

【0034】

酸形態は、固体の場合もあり、低pH溶液中で見出される場合もある。化合物のイオン化塩形態は、高pHで存在し、以下の構造:

【0035】

10

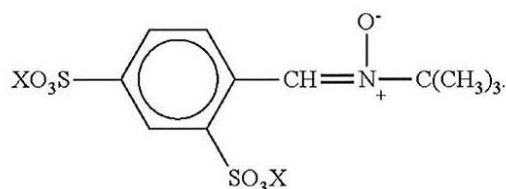
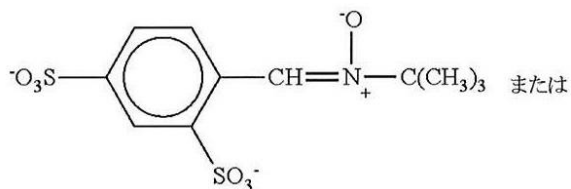
20

30

40

50

【化 3】



10

のうちのいずれかにより表されうる。

【0036】

塩形態では、Xは、薬学的に許容されるカチオンである。最も一般に、このカチオンは、ナトリウム、カリウム、またはアンモニウムなどの一価材料であるが、また、多価材料単独の場合もあり、薬学的に許容される一価アニオンと組み合わせたカチオン、例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物、ヒドロキシル、硝酸、スルホン酸、酢酸、酒石酸、シュウ酸、コハク酸、パモ酸などのアニオンと組み合わせたカルシウム；このようなアニオンと組み合わせたマグネシウム；このようなアニオンと組み合わせた亜鉛などの場合もある。これらの材料の中では、遊離酸、および単純なナトリウム塩、カリウム塩、またはアンモニウム塩が最も好ましく、カルシウム塩およびマグネシウム塩もまた好ましいが、何らかの形で、それほど好ましくはない。2,4-DSPBNについては、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,488,145号により、詳細に記載されている。2,4-DSPBNの塩もまた、本明細書で記載される2,4-DSPBNの使用と同様の形で、シナプス形成および神経突起形成を促進または増強するために使用されうる。

20

30

【0037】

シナプス形成および神経突起形成を促進または増強するために、2,4-DSPBNを、例えば、体重1kg当たり約1mg～体重1kg当たり約500mgの間、または体重1kg当たり約5mg～体重1kg当たり約400mgの間、または体重1kg当たり約10mg～体重1kg当たり約300mgの間、または体重1kg当たり約10mg、または体重1kg当たり約20mg、または体重1kg当たり約50mg、または体重1kg当たり約100mg、または体重1kg当たり約150mg、または体重1kg当たり約200mg、または体重1kg当たり約250mg、または体重1kg当たり約300mgの用量で投与することができる。

【0038】

ヒト対象における、シナプス形成および神経突起形成を促進または増強するために、2,4-DSPBNを、例えば、毎日約100mg～約20,000mgの間、または約500mg～約10,000mgの間、または約1,000mg～約5,000mgの間、または約100mg、または約200mg、または約500mg、または約1,000mg、または約2,000mg、または約3,000mg、または約5,000mg、または約8,000mg、または約10,000mgの用量で投与することができる。

40

【0039】

対象に、毎日1回の投与、または毎日2回の投与、または毎日3回の投与、または毎日4回の投与、または毎日5回の投与を行うことができる。

【0040】

50

2, 4 - DSPBNを、NACと組み合わせ、シナプス形成および神経突起形成を促進または増強することができる。一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNと、NACとを、混合物として共投与する。一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNと、NACとを、別個の剤形として、逐次的に投与し、または同時に投与する。

【0041】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNと、任意選択で、NACとは、経口投与される。他の送達法は、静脈内送達、皮下(subcutaneously)送達、舌下送達、皮下(subdermally)送達、髄腔内送達、吸入による送達、または耳内への局所送達を含むがこれらに限定されない。さらに、活性組成物は、ナノ粒子またはデンドリマー製剤としても投与することができる。ナノ粒子は、多機能性であり、ポリマーと、常磁性の酸化鉄粒子とから構成されて、内耳または蝸牛背側核など、所望の標的への薬物の送達の一助となるように、外部の磁力の適用を可能としうる。加えて、組成物は、経口吸収を増強し、バイオアベイラビリティ動態を変更するように、当業者に公知の添加剤と共に製剤化されうる。

10

【0042】

2, 4 - DSPBNの代わりに、またはこれに加えて、シナプス形成および神経突起形成を促進または増強するのに、他のニトロ化合物もまた使用することができる。一部の実施形態では、ニトロ化合物は、フェニルブチルニトロ(PBN)およびその誘導体から選択される。一部の実施形態では、ニトロ化合物は、PBNである。一部の実施形態では、ニトロ化合物は、4 - ヒドロキシ - フェニルブチルニトロ(4 - OH PBN)である。一部の実施形態では、ニトロ化合物は、2 - スルホニル - フェニル三級ブチルニトロ(S - PBN)である。

20

【0043】

したがって、本明細書で開示される実施形態の全てにおいて、本出願は、2, 4 - DSPBNの代わりに、またはこれに加えて、前述のニトロ化合物のうちのいずれかの使用を明示的に対象とする。よって、フェニルブチルニトロ(PBN)、4 - ヒドロキシ - フェニルブチルニトロ(4 - OH PBN)、および2 - スルホニル - フェニル三級ブチルニトロ(S - PBN)のうちの1または複数を、2, 4 - DSPBNの代わりに、またはこれに加えて使用する方法が開示される。

30

【0044】

シナプス形成および/または神経突起形成を増強するための方法

本明細書で記載される本発明は、シナプス形成および神経突起形成を促進または増強するための方法であって、蝸牛シナプトパッチまたは前庭シナプトパッチを患う対象へと、有効量の2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法を提供する。任意選択で、2, 4 - DSPBNを、NACと共に共投与する。また、蝸牛シナプトパッチまたは前庭シナプトパッチを患う対象における、シナプス形成または神経突起形成を促進または増強するための方法であって、それを必要とする対象へと、有効量の2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロまたは薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法も提供される。

40

【0045】

シナプトパッチとは、シナプスの機能不全または喪失に関連する、脳、脊髄または末梢神経系の疾患を指す。慢性難聴、耳鳴り、聴覚過敏、老人性難聴、または平衡障害は、有毛細胞の喪失に依存しない、騒音関連および加齢関連の蝸牛シナプトパッチまたは前庭シナプトパッチと関連することが多い。蝸牛シナプトパッチについては、それらの全てが、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Kujawara, J. Neurosci., 29: 14077 ~ 14085 (2009); Linら, JARO, 12: 605 ~ 616 (2011); Sergeyenkoら, J. Neurosci., 33: 13686 ~ 13694 (2013); Makaryら, JARO, 12: 711 ~ 717 (2011); Vianaら, Hear Res., 327: 78 ~ 88 (2015); Schaetteら, J. Neurosci., 31: 13452 ~ 13457 (

50

2011); Wanら、Hear Res.、329:1~10(2015); および Libermanら、PLOS One、11(9):e0162726(2016)において記載されている。

【0046】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、慢性聴覚損傷または慢性難聴を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、慢性聴覚損傷または慢性難聴に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、蝸牛神経突起の再生を増強する。一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、聴覚損傷または難聴を患っている対象へと、少なくとも1カ月間、少なくとも3カ月間、少なくとも6カ月間、少なくとも1年間、または少なくとも2年間にわたり投与する。

10

【0047】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、老化により引き起こされた慢性聴覚損傷または慢性難聴を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、老化により引き起こされた慢性聴覚損傷または慢性難聴に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、蝸牛神経突起の再生を増強する。一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、少なくとも65歳、または少なくとも70歳、または少なくとも75歳、または少なくとも80歳である対象へと投与する。

20

【0048】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、爆音または騒音への曝露により引き起こされた慢性聴覚損傷または慢性難聴を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、爆音または騒音への曝露により引き起こされた慢性聴覚損傷または慢性難聴に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、蝸牛神経突起の再生を増強する。

【0049】

一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、対象へと、爆音または騒音への曝露の、少なくとも1カ月後、少なくとも3カ月後、少なくとも6カ月後、少なくとも1年後、または少なくとも2年後に投与する。一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、対象へと、爆音または騒音への曝露後2週間以内、1週間以内、4日間以内、2日間以内、1日間以内、12時間以内、または4時間以内には投与しない。

30

【0050】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、感染により引き起こされた慢性聴覚損傷または慢性難聴を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、感染により引き起こされた慢性聴覚損傷または慢性難聴に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、蝸牛神経突起の再生を増強する。

40

【0051】

一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、対象へと、感染の、少なくとも1カ月後、少なくとも3カ月後、少なくとも6カ月後、少なくとも1年後、または少なくとも2年後に投与する。

【0052】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、毒素への曝露により引き起こされた慢性聴覚損傷または慢性難聴を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容

50

されるその塩と、任意選択のNACとは、毒素への曝露により引き起こされた慢性聴覚損傷または慢性難聴に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、蝸牛神経突起の再生を増強する。

【0053】

一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、対象へと、毒素への曝露の、少なくとも1カ月後、少なくとも3カ月後、少なくとも6カ月後、少なくとも1年後、または少なくとも2年後に投与する。

【0054】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、耳鳴りを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、耳鳴りに対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、蝸牛神経突起の再生を増強する。一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、耳鳴りを患っている対象へと、少なくとも1カ月間、少なくとも3カ月間、少なくとも6カ月間、少なくとも1年間、または少なくとも2年間にわたり投与する。

10

【0055】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、聴覚過敏を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、聴覚過敏に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、蝸牛神経突起の再生を増強する。一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、聴覚過敏を患っている対象へと、少なくとも1カ月間、少なくとも3カ月間、少なくとも6カ月間、少なくとも1年間、または少なくとも2年間にわたり投与する。

20

【0056】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、老人性難聴を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、老人性難聴に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、蝸牛神経突起の再生を増強する。一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、老人性難聴を患っている対象へと、少なくとも1カ月間、少なくとも3カ月間、少なくとも6カ月間、少なくとも1年間、または少なくとも2年間にわたり投与する。

30

【0057】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、平衡障害を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、平衡障害に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、前庭神経突起の再生を増強する。一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、平衡障害を患っている対象へと、少なくとも1カ月間、少なくとも3カ月間、少なくとも6カ月間、少なくとも1年間、または少なくとも2年間にわたり投与する。

40

【0058】

一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、シナプス喪失を伴うメニエール病を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、シナプス喪失を伴うメニエール病に対する治療的利益を、対象へと送達するのに十分なレベルまで、前庭神経突起の再生を増強する。一部の実施形態では、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとを、シナプス喪失を伴

50

うメニエール病を患っている対象へと、少なくとも1カ月間、少なくとも3カ月間、少なくとも6カ月間、少なくとも1年間、または少なくとも2年間にわたり投与する。

【0059】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、蝸牛神経突起または前庭神経突起の再生率を、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも500%、または少なくとも1000%増大させる。

【0060】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、処置の1もしくは2もしくは4週間後に、または処置の4週間を超える期間の後に、内有毛細胞上の、生存神経接合の数を、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、または少なくとも100%増大させる。内有毛細胞上の、生存神経接合の数の増大を測定するための方法については、Kujawara, J. Neurosci., 29: 14077 ~ 14085 (2009); および Libermanら、PLOS One, 11(9): e0162726 (2016) において記載されている。

10

【0061】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、処置の1もしくは2もしくは4週間後に、または処置の4週間を超える期間の後に、コルチ器の、トノトピー領域内のシナプス(例えば、リボンシナプス)の数を、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、または少なくとも100%増大させる。コルチ器の、トノトピー領域内のシナプスの数の増大を測定するための方法については、Kujawara, J. Neurosci., 29: 14077 ~ 14085 (2009); および Libermanら、PLOS One, 11(9): e0162726 (2016) において記載されている。

20

【0062】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、処置の1もしくは2もしくは4週間後に、または処置の4週間を超える期間の後に、IHCのリボンシナプスカウントを、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、または少なくとも100%増大させる。

30

【0063】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、処置の1もしくは2もしくは4週間後に、または処置の4週間を超える期間の後に、AC、IC、および/またはDCNにおけるARCの発現を、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、または少なくとも100%増大させる。

【0064】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、処置の1もしくは2もしくは4週間後に、または処置の4週間を超える期間の後に、AC、IC、および/またはDCNにおけるGAP-43の発現を、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、または少なくとも100%増大させる。

40

【0065】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、処置の1もしくは2もしくは4週間後に、または処置の4週間を超える期間の後に、DCNにおけるGABAA R 1の発現を、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、または少なくとも100%減少させる。

50

【0066】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、処置の1もしくは2もしくは4週間後に、または処置の4週間を超える期間の後に、DCNにおけるGluR2の発現を、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、または少なくとも100%減少させる。

【0067】

一部の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとの投与は、処置の1もしくは2もしくは4週間後に、または処置の4週間を超える期間の後に、SGにおけるTRPV1の発現を、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、または少なくとも100%減少させる。

10

【0068】

聴覚系における、神経変性および/またはタウタンパク質の蓄積を低減する方法

蝸牛の神経変性一般に、老化、耳毒性、または騒音または爆音の強い過圧への曝露から生じる、有毛細胞の喪失を伴う。爆音過圧へと曝露された非トランスジェニックラットは、微小管関連タンパク質である、タウの神経毒性変異体の、海馬内の細胞体への顕著な蓄積を呈した。別の態様では、本開示は、爆音への曝露に応答する、聴覚系における、神経変性および病理性タウの蓄積を低減することと、この病理学的過程の回避に対する、抗酸化剤の潜在的治療効果について査定することとに関する。爆音による損傷は、非処置動物の蝸牛内で、リボンシナプス喪失と、逆行性神経変性とを誘導した。螺旋神経節～聴覚野にわたる、末梢聴覚系および中枢聴覚系のいずれに由来するニューロン内でも、核周部における、ニューロフィラメント軽鎖および病理性タウオリゴマーの蓄積の随伴が観察された。

20

【0069】

その同時的な蓄積パターン、および十分に記録された神経毒性のために、病理性タウオリゴマーの蓄積は、爆音誘導性の蝸牛神経変性に、能動的に寄与しうる。2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (HPN - 07) と、N - アセチルシステイン (NAC) との組合せレジメンによる治療的介入は、蝸牛および聴覚野における、病理性タウの蓄積、および進行中の神経変性の徴候のいずれも、著明に低減した。本開示は、爆音への曝露の直後に投与される、HPN - 07と、NACとの組合せが、爆音誘導性外傷性脳損傷を伴う軍人または民間人において、聴覚機能を保存するための、潜在的治療戦略として用いられうることを提起する。

30

【0070】

したがって、本明細書で記載される本開示は、聴覚系における、神経変性および/またはタウタンパク質の蓄積を、低減または緩徐化するための方法であって、罹患する対象へと、有効量の2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法を提示する。任意選択で、2, 4 - DSPBNを、NACと共に共投与する。別の実施形態では、2, 4 - DSPBNを、タウ凝集阻害剤と共に共投与する。本開示では、「タウ」という用語は、タウの天然単量体形態、またはタウの他の配座異性体、例えば、タウのオリゴマーまたは凝集物を指す。「タウ」という用語はまた、集合的に、タウの、全ての種類および形態を指すのにも使用される。神経細胞内で夥多であり、はるかに低度ではあるが、希突起膠細胞内および星状細胞内にも存在するタウタンパク質は、微小管を安定化させる機能を果たす。タウタンパク質が、欠損し、微小管を十分に安定化させなくなると、アルツハイマー病など、神経系の病態が発症しうる。

40

【0071】

一実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物として投与する。別の実施形態では、2, 4 - DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、対象へと、経口投与、静脈内投与、皮下 (subcutaneously) 投与、舌下投与、皮下 (subdermally) 投与、

50

髄腔内投与、吸入により投与、または耳内に局所投与する。

【0072】

一実施形態では、方法は、N - アセチルシステイン、アセチル - L - カルニチン、グルタチオンモノエチルエステル、エブセレン、D - メチオニン、カルバマチオン、および S z e t o - S c h i l l e r ペプチド、ならびにこれらの機能的な類似体からなる群から選択される、1または複数の化合物を投与するステップをさらに含む。別の実施形態では、方法は、N - アセチルシステインを投与するステップをさらに含む。

【0073】

一実施形態では、神経変性は、老化により引き起こされたものであり、または急性もしくは慢性の、爆音もしくは騒音への曝露により引き起こされたものである。別の実施形態では、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する。一実施形態では、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも1年後において、対象へと投与する。

10

【0074】

一実施形態では、神経変性は、感染により引き起こされたものである。一実施形態では、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する。別の実施形態では、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも1年後において、対象へと投与する。

20

【0075】

一実施形態では、神経変性は、毒素への曝露により引き起こされたものである。別の実施形態では、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する。一実施形態では、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも1年後において、対象へと投与する。

30

【0076】

一実施形態では、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩の投与は、対象におけるタウタンパク質の蓄積を低減する。一実施形態では、タウタンパク質は、聴覚系に蓄積されている。一部の実施形態では、方法は、タウ凝集阻害剤を投与するステップをさらに含む。タウ凝集阻害剤は、共有結合性阻害剤の場合もあり、非共有結合性阻害剤の場合もある。タウ凝集阻害剤の非限定例は、クルクミン、分子的ピンセット（例えば、C L R 0 1）、テトラスルホン酸フタロシアニン、オレオカンタール、シンナムアルデヒド、バイカレイン、イソプレナリン、ドパミン、ドブタミン、レボドパ、レボドパ/カルビドパ、トリメトキノール、ヘキソプレナリン、メチルドパ、およびドロキシドパを含む。

【0077】

中枢神経系疾患を処置するための方法

本明細書で記載される本発明はまた、それを必要とする対象の中枢神経系における、シナプス形成および神経突起形成を促進または増強するための方法であって、対象へと、有効量の2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、対象が、アルツハイマー病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、前頭側頭型認知症、ピック病、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性皮質下神経膠症、筋萎縮性側索硬化症、石灰化を伴う、びまん性神経原線維変化、慢性外傷性脳症、拳闘家認知症、T O D (t a n g l e - o n l y d e m e n t i a)、ダウン症候群、ゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー病、ハラールフォルデン - シュパッツ病、クロイツフェルト - ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン - ピック病、P r P - C A A (p r i o n p r o t e i n c e r e b r a l a m y l o i d a n g i o p a t h y)、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う、非グアム型運動ニューロン疾患、および脳炎後パーキンソニズムから選択される、中枢神経系の疾患または状態を患う方法も提示する。任意選択で、2, 4 - D S P B N を、有効量のN A C と共に共投与する。2, 4 - D S P B N と、N A C とは、同時に共投与することもでき、逐次的に共投与

40

50

することもできる。2, 4 - D S P B N と、N A C とは、1 つの組成物により共投与することもでき、個別の組成物により共投与することもできる。

【0078】

本発明のさらなる態様は、アルツハイマー病を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の 2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、N A C とを、アルツハイマー病を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択の N A C とは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはアルツハイマー病に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

10

【0079】

本発明のさらなる態様は、パーキンソン病を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の 2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、N A C とを、パーキンソン病を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択の N A C とは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはパーキンソン病に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。一部の実施形態では、方法は、患者の中枢神経系における、タウタンパク質の蓄積を低減する。

20

【0080】

本発明のさらなる態様は、進行性核上性麻痺 (P S P) を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の 2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、N A C とを、P S P を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択の N A C とは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/または P S P に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

【0081】

本発明のさらなる態様は、前頭側頭型認知症 (F T D) を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の 2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、N A C とを、F T D を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択の N A C とは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/または F T D に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

30

【0082】

本発明のさらなる態様は、ピック病を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の 2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、N A C とを、ピック病を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択の N A C とは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはピック病に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

40

【0083】

本発明のさらなる態様は、嗜銀顆粒性認知症 (A G D) を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の 2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、N A C とを、A G D を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩と、任意選択の N A C とは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/または A G D に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

50

【0084】

本発明のさらなる態様は、大脳皮質基底核変性症（CBD）を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、CBDを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはCBDに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

【0085】

本発明のさらなる態様は、進行性皮質下神経膠症（PSG）を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、PSGを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはPSGに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

10

【0086】

本発明のさらなる態様は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、ALSを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはALSに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

20

【0087】

本発明のさらなる態様は、石灰化を伴う、びまん性神経原線維変化（DNCTC）を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、DNCTCを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはDNCTCに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

30

【0088】

本発明のさらなる態様は、慢性外傷性脳症を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、慢性外傷性脳症を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/または慢性外傷性脳症に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

40

【0089】

本発明のさらなる態様は、拳闘家認知症（DP）を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、DPを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはDPに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

【0090】

本発明のさらなる態様は、TOD（tangle-only dementia）を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬

50

学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、TODを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはTODに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

【0091】

本発明のさらなる態様は、ダウン症候群を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、ダウン症候群を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはダウン症候群に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

10

【0092】

本発明のさらなる態様は、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病(GSS)を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、GSSを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはGSSに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

20

【0093】

本発明のさらなる態様は、ハラフォルデン-シュパッツ病(HSD)を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、HSDを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはHSDに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

【0094】

本発明のさらなる態様は、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、CJDを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはCJDに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

30

【0095】

本発明のさらなる態様は、多系統萎縮症(MSA)を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、MSAを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および/もしくはシナプス形成を増強し、かつ/またはMSAに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病理性タウタンパク質の量を低減する。

40

【0096】

本発明のさらなる態様は、C型ニーマン-ピック病(NPC)を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、NPCを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起

50

形成および／もしくはシナプス形成を増強し、かつ／またはNPCに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病原性タウタンパク質の量を低減する。

【0097】

本発明のさらなる態様は、PrP-CAA (prion protein cerebral amyloid angiopathy) を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、PrP-CAAを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および／もしくはシナプス形成を増強し、かつ／またはPrP-CAAに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病原性タウタンパク質の量を低減する。

10

【0098】

本発明のさらなる態様は、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、SSPEを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および／もしくはシナプス形成を増強し、かつ／またはSSPEに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病原性タウタンパク質の量を低減する。

20

【0099】

本発明のさらなる態様は、筋強直性ジストロフィーを処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、筋強直性ジストロフィーを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および／もしくはシナプス形成を増強し、かつ／または筋強直性ジストロフィーに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病原性タウタンパク質の量を低減する。

【0100】

本発明のさらなる態様は、神経原線維変化を伴う、非グアム型運動ニューロン疾患を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、神経原線維変化を伴う、非グアム型運動ニューロン疾患を患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および／もしくはシナプス形成を増強し、かつ／または神経原線維変化を伴う、非グアム型運動ニューロン疾患に対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病原性タウタンパク質の量を低減する。

30

【0101】

本発明のさらなる態様は、脳炎後パーキンソニズム(PEP)を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、有効量の2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択で、NACとを、PEPを患うヒト患者へと投与するが、この場合、2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩と、任意選択のNACとは、神経突起形成および／もしくはシナプス形成を増強し、かつ／またはPEPに対する治療的利益を、患者へと送達するのに十分なレベルまで、中枢神経系における、病原性タウタンパク質の量を低減する。

40

【0102】

一部の実施形態では、方法は、アルツハイマー病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、前頭側頭型認知症、ピック病、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性皮質下神経膠症、筋萎縮性側索硬化症、石灰化を伴う、びまん性神経原線維変化、慢性外傷性脳症、拳闘家認知症、TOD (tangle-only dementia)、ダウン症

50

候群、ゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー病、ハラーフォルデン - シュパッツ病、クロイツフェルト - ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン - ピック病、PrP - C A A (p r i o n p r o t e i n c e r e b r a l a m y l o i d a n g i o p a t h y)、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う、非グアム型運動ニューロン疾患、および脳炎後パーキンソニズムから選択される、中枢神経系の疾患または状態を患う患者の中枢神経系における、タウタンパク質の蓄積を低減する。

【0103】

一部の実施形態では、方法は、アルツハイマー病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、前頭側頭型認知症、ピック病、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性皮質下神経膠症、筋萎縮性側索硬化症、石灰化を伴う、びまん性神経原線維変化、慢性外傷性脳症、拳闘家認知症、TOD (t a n g l e - o n l y d e m e n t i a)、ダウン症候群、ゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー病、ハラーフォルデン - シュパッツ病、クロイツフェルト - ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン - ピック病、PrP - C A A (p r i o n p r o t e i n c e r e b r a l a m y l o i d a n g i o p a t h y)、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う、非グアム型運動ニューロン疾患、および脳炎後パーキンソニズムから選択される、中枢神経系の疾患または状態を患う患者の中枢神経系における神経変性を緩徐化するか、を停止させるか、またはこれを好転させる。

10

【0104】

20

さらなる実施形態

実施形態1．蝸牛シナプトパチーまたは前庭シナプトパチーを患う対象における、シナプス形成および神経突起形成を増強するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の2，4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2 ， 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

実施形態2．2，4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物として投与する、実施形態1の方法。

実施形態3．2，4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、対象へと、経口投与、静脈内投与、皮下 (s u b c u t a n e o u s l y) 投与、舌下投与、皮下 (s u b d e r m a l l y) 投与、髄腔内投与、吸入により投与、または耳内に局所投与する、実施形態1の方法。

30

実施形態4．N - アセチルシステイン、アセチル - L - カルニチン、グルタチオンモノエチルエステル、エブセレン、D - メチオニン、カルバマチオン、および S z e t o - S c h i l l e r ペプチド、ならびにこれらの機能的な類似体からなる群から選択される、1または複数の化合物を投与するステップをさらに含む、実施形態1の方法。

実施形態5．N - アセチルシステインを投与するステップをさらに含む、実施形態1の方法。

実施形態6．対象が、慢性聴覚損傷または慢性難聴を患う、実施形態1の方法。

実施形態7．慢性聴覚損傷または慢性難聴が、老化により引き起こされたものである、実施形態6の方法。

40

実施形態8．慢性聴覚損傷または慢性難聴が、急性または慢性の、爆音または騒音への曝露により引き起こされたものである、実施形態6の方法。

実施形態9．2，4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する、実施形態8の方法。

実施形態10．2，4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも1年後において、対象へと投与する、実施形態8の方法。

実施形態11．慢性聴覚損傷または慢性難聴が、感染により引き起こされたものである、実施形態6の方法。

実施形態12．2，4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する、実施形態11の方法。

50

実施形態 13 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、実施形態 11 の方法。

実施形態 14 . 慢性聴覚損傷または慢性難聴が、毒素への曝露により引き起こされたものである、実施形態 6 の方法。

実施形態 15 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、実施形態 14 の方法。

実施形態 16 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、実施形態 14 の方法。

実施形態 17 . 対象がまた、耳鳴りも患う、実施形態 1 の方法。

実施形態 18 . 対象がまた、聴覚過敏も患う、実施形態 1 の方法。

実施形態 19 . 対象がまた、老人性難聴も患う、実施形態 1 の方法。

実施形態 20 . 対象がまた、平衡障害またはシナプス喪失を伴うメニエール病も患う、実施形態 1 の方法。

実施形態 21 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩の投与が、対象における蝸牛神経突起または前庭神経突起の再生を増強する、実施形態 1 の方法。

実施形態 22 . 対象における内有毛細胞上の、生存神経接合の数を増大させる、実施形態 1 の方法。

実施形態 23 . 対象におけるコルチ器の、トノトピー領域内のシナプスの数を増大させる、実施形態 1 の方法。

実施形態 24 . 対象が、蝸牛有毛細胞または前庭有毛細胞の実質的な喪失を患っていない、実施形態 1 の方法。

実施形態 25 . 対象が、蝸牛有毛細胞または前庭有毛細胞の実質的な喪失を患っている、実施形態 1 の方法。

実施形態 26 . 蝸牛シナプトパチーまたは前庭シナプトパチーを患う対象における、シナプス形成または神経突起形成を増強するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の 2 , 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2 , 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

実施形態 27 . 対象における、神経変性を低減するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の 2 , 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2 , 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

実施形態 28 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物として投与する、実施形態 27 の方法。

実施形態 29 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、対象へと、経口投与、静脈内投与、皮下 (s u b c u t a n e o u s l y) 投与、舌下投与、皮下 (s u b d e r m a l l y) 投与、髄腔内投与、吸入により投与、または耳内に局所投与する、実施形態 27 の方法。

実施形態 30 . N - アセチルシステイン、アセチル - L - カルニチン、グルタチオンモノエチルエステル、エブセレン、D - メチオニン、カルバマチオン、および S z e t o - S c h i l l e r ペプチド、ならびにこれらの機能的な類似体からなる群から選択される、1 または複数の化合物を投与するステップをさらに含む、実施形態 27 の方法。

実施形態 31 . N - アセチルシステインを投与するステップをさらに含む、実施形態 27 の方法。

実施形態 32 . 神経変性が、老化により引き起こされたものである、実施形態 27 の方法。

実施形態 33 . 神経変性が、急性または慢性的、爆音または騒音への曝露により引き起こされたものである、実施形態 27 の方法。

実施形態 34 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、実施形態 33 の方法。

実施形態 35 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、実施形態 33 の方法。

10

20

30

40

50

実施形態 36 . 神経変性が、感染により引き起こされたものである、実施形態 27 の方法。

実施形態 37 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、実施形態 36 の方法。

実施形態 38 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、実施形態 36 の方法。

実施形態 39 . 神経変性が、毒素への曝露により引き起こされたものである、実施形態 27 の方法。

実施形態 40 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、実施形態 39 の方法。

実施形態 41 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、実施形態 39 の方法。

実施形態 42 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩の投与が、対象におけるタウタンパク質の蓄積を低減する、実施形態 27 の方法。

実施形態 43 . タウタンパク質が、聴覚系に蓄積されている、実施形態 42 の方法。

実施形態 44 . タウ凝集阻害剤を投与するステップをさらに含む、実施形態 27 の方法。

実施形態 45 . 対象における、タウタンパク質の蓄積を低減するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の 2 , 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (2 , 4 - D S P B N) または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

実施形態 46 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物として投与する、実施形態 45 の方法。

実施形態 47 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、対象へと、経口投与、静脈内投与、皮下 (s u b c u t a n e o u s l y) 投与、舌下投与、皮下 (s u b d e r m a l l y) 投与、髄腔内投与、吸入により投与、または耳内に局所投与する、実施形態 45 の方法。

実施形態 48 . N - アセチルシステイン、アセチル - L - カルニチン、グルタチオンモノエチルエステル、エブセレン、D - メチオニン、カルバマチオン、および S z e t o - S c h i l l e r ペプチド、ならびにこれらの機能的な類似体からなる群から選択される、1 または複数の化合物を投与するステップをさらに含む、実施形態 45 の方法。

実施形態 49 . N - アセチルシステインを投与するステップをさらに含む、実施形態 45 の方法。

実施形態 50 . タウタンパク質の蓄積が、老化により引き起こされたものである、実施形態 45 の方法。

実施形態 51 . タウタンパク質の蓄積が、急性または慢性的、爆音または騒音への曝露により引き起こされたものである、実施形態 45 の方法。

実施形態 52 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、実施形態 51 の方法。

実施形態 53 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、爆音または騒音への曝露の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、実施形態 51 の方法。

実施形態 54 . タウタンパク質の蓄積が、感染により引き起こされたものである、実施形態 45 の方法。

実施形態 55 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも 1 カ月後において、対象へと投与する、実施形態 54 の方法。

実施形態 56 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、感染の、少なくとも 1 年後において、対象へと投与する、実施形態 54 の方法。

実施形態 57 . タウタンパク質の蓄積が、毒素への曝露により引き起こされたものである、実施形態 45 の方法。

実施形態 58 . 2 , 4 - D S P B N または薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露

10

20

30

40

50

の、少なくとも1カ月後において、対象へと投与する、実施形態57の方法。

実施形態59. 2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、毒素への曝露の、少なくとも1年後において、対象へと投与する、実施形態57の方法。

実施形態60. タウ凝集阻害剤を投与するステップをさらに含む、実施形態45の方法。

実施形態61. 中枢神経系の疾患または状態を患う対象における、シナプス形成および神経突起形成を増強するための方法であって、それを必要とする前記対象へと、有効量の2, 4-ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ(2, 4-DSPBN)または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含む方法。

実施形態62. 2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物として投与する、実施形態61の方法。

実施形態63. 2, 4-DSPBNまたは薬学的に許容されるその塩を、対象へと、経口投与、静脈内投与、皮下(subcutaneously)投与、舌下投与、皮下(subdermally)投与、髄腔内投与、吸入により投与、または耳内に局所投与する、実施形態61の方法。

実施形態64. N-アセチルシステインを、前記対象へと投与するステップをさらに含む、実施形態61の方法。

実施形態65. 対象が、アルツハイマー病を患う、実施形態61の方法。

実施形態66. 対象が、パーキンソン病を患う、実施形態61の方法。

実施形態67. 対象が、進行性核上性麻痺を患う、実施形態61の方法。

実施形態68. 対象が、前頭側頭型認知症を患う、実施形態61の方法。

実施形態69. 対象が、ピック病を患う、実施形態61の方法。

実施形態70. 対象が、嗜銀顆粒性認知症を患う、実施形態61の方法。

実施形態71. 対象が、大脳皮質基底核変性症を患う、実施形態61の方法。

実施形態72. 対象が、進行性皮質下神経膠症を患う、実施形態61の方法。

実施形態73. 対象が、筋萎縮性側索硬化症を患う、実施形態61の方法。

実施形態74. 対象が、石灰化を伴う、びまん性神経原線維変化を患う、実施形態61の方法。

実施形態75. 対象が、拳闘家認知症を患う、実施形態61の方法。

実施形態76. 対象が、TOD(tangle-only dementia)を患う、実施形態61の方法。

実施形態77. 対象が、ダウン症候群を患う、実施形態61の方法。

実施形態78. 対象が、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病を患う、実施形態61の方法。

実施形態79. 対象が、ハラーフォルデン-シュパッツ病を患う、実施形態61の方法。

実施形態80. 対象が、クロイツフェルト-ヤコブ病を患う、実施形態61の方法。

実施形態81. 対象が、多系統萎縮症を患う、実施形態61の方法。

実施形態82. 対象が、C型ニーマン-ピック病を患う、実施形態61の方法。

実施形態83. 対象が、PrP-CAA(prion protein cerebral amyloid angiopathy)を患う、実施形態61の方法。

実施形態84. 対象が、亜急性硬化性全脳炎を患う、実施形態61の方法。

実施形態85. 対象が、筋強直性ジストロフィーを患う、実施形態61の方法。

実施形態86. 対象が、神経原線維変化を伴う、非グアム型運動ニューロン疾患を患う、実施形態61の方法。

実施形態87. 対象が、脳炎後パーキンソニズムを患う、実施形態61の方法。

実施形態88. 対象が、慢性外傷性脳症を患う、実施形態61の方法。

【0105】

実施例

以下の例は、例示的な目的だけのものであり、特許請求される本発明に対する限定とし

10

20

30

40

50

て解釈すべきではない。当業者には、意図される発明を実施して成功することを同様に可能とする、多種多様な、代替的技法および代替の手順が利用可能である。

【実施例 1】

【0106】

生存動物研究では、2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (HPN - 07) で処置された騒音損傷チンチラが、非処置対照と比べて著明に大きな内有毛細胞神経突起集団を呈し、独特なことには、処置期間後、長期にわたり、漸進的な度合いの機能的な回復を呈することが発見されたが、これは、HPN - 07 により誘導される、有毛細胞に対する再神経支配が進行中であることを示す。これは、HPN - 07 が、特に、蝸牛螺旋神経節ニューロン (SGN) において、神経突起形成促進特性を有する潜在的 가능성이導かれた。HPN - 07 を、3つの *in vitro* 神経突起形成性モデル (蝸牛螺旋神経節外植片、PC12細胞、およびSGN外植片の、付着させた有毛細胞との共培養物 [SGN - HC]) において調べた。これらの解析からの実験データは、(1) HPN - 07 が、有毛細胞を伴わない螺旋神経節外植片内で、神経突起形成を促進したこと；(2) HPN - 07 が、PC12細胞系において、神経成長因子 (NGF) 誘導性神経突起形成を強化すること；および(3) HPN - 07 が、興奮毒性によるリボンシナプス喪失を好転させ、カイニン酸 (KA) により誘導される興奮毒性外傷後において、SGN - HC 共培養物中のIHCの基部に沿って、神経突起密度を増大させることを裏付けた。爆音へと曝露された生存ラットにおけるHPN - 07 / NAC処置は、爆音後において、著明に多数の、内有毛細胞上の、生存神経接合を促進し、一部のトノトピー領域内では、非曝露非投薬の、損傷していない耳において典型的に観察されるシナプス数を超えるシナプス数をもたらした。

10

20

【0107】

図1に示される通り、HPN - 07 は、*in vitro* の、マウス螺旋神経節組織外植片内で、神経突起形成性応答を誘導した。HPN - 07 は、同じ器官型培養培地中で培養された非処置対照 (NC、正常対照) と比べて、顕著な神経突起の成長を誘導した。HPN - 07 の存在下において、各SG外植片から放射状に伸びる神経突起の数、および増大したこれらの伸展の各々の、対応する長さの両方である。PC12細胞内で、神経突起形成を誘導するのに、10mMの濃度を要求するPBNとは対照的に、HPN - 07 は、マウス螺旋神経節ニューロンの器官型培養物中の神経突起形成性応答を誘導するのに、100μMの濃度で十分であった。

30

【0108】

図2に示される通り、HPN - 07 は、カノニカルな蝸牛の神経突起形成性成長因子、脳由来神経栄養因子 (BDNF) により誘導される神経突起形成を強化した。マウス螺旋神経節ニューロン外植片を、BDNF (10ng/mL) またはBDNF (10ng/mL) + HPN - 07 (0.1μM) を伴うか、または伴わない無血清培地中で、48時間にわたり培養し、次いで、固定し、 α -チューブリン抗体で免疫標識化して、神経突起を可視化した。

【0109】

図3に示される通り、HPN - 07 はまた、PC12細胞系内の、NGF誘導性の神経突起の伸長も強化した。神経成長因子 (NGF) による処置は、神経突起形成研究のための、標準的なニューロンのモデルである、PC12細胞内の、神経突起の伸長を、用量依存的に誘導した。この文脈では、このNGF誘導性の神経突起形成性応答は、見かけ上、10ng/mLおよびこれを上回る濃度で可飽和であった。しかし、この系において、HPN - 07 単独による処置が、低濃度では、神経突起長を増大させなかったのに対し、1μMのHPN - 07 と、漸増用量のNGF (1、5または10ng/mL) とによる組合せ処置は、HPN - 07 が、NGFを増強 (1および5ng/mLのNGF) し、おそらく、これと相乗作用して (10ng/mLのNGF)、神経突起形成を促進することを明らかにした。10ng/mLのNGFおよび1μMのHPN - 07 の濃度で、平均値神経突起長は、可飽和NGFの用量漸増系列で達成された、最大長を顕著に超えた (細胞は、

40

50

6 日間にわたり処置した)。

【0110】

図4は、有意な神経突起の成長を伴うPC12細胞の百分率を提示する。この図で観察されるパターンは、処置に誘導される、平均神経突起長の増大について観察されるパターンと同様である。まとめると、これらの査定は、HPN-07が、NGFと協調的に作用して、平均値神経突起長の増大を裏付けるような形で、デノボの神経突起の成長、および神経突起の安定性またはアセンブリー動態の変化の両方を促進するが、これらの両方は、IHCによる再神経支配の所望される特徴であるという解釈を裏付ける。成長因子は、哺乳動物の蝸牛内で構成的に発現し、聴覚外傷後において、上方調節されることが多いので、この治療的特質は、聴覚機能を回復するために、著明な臨床的影響を及ぼすことができた。

10

【0111】

さらに、図5に示される通り、HPN-07は、IHCリボンシナプスの完全性の、カイニン酸(KA)誘導性の興奮毒性喪失を好転させた。かつての知見を、興奮毒性外傷についての、マウスSGN-IHC共培養物モデルへと適用した。聴覚感覚上皮(コルチ器官、OC)と、関連する螺旋神経節ニューロン(NC)との、非損傷の共培養物のIHCでは、シナプス前C末端結合性タンパク質2(CtBP2)と免疫反応性の点(小さな赤色ドット)の大半は、IHC核(大きな赤丸)の下方にあるか、またはこれを取り囲む、細胞の基底面に沿って位置する、「典型的」な細胞構築位置に位置している。この典型的な、CtBP2の、基底側の免疫反応性パターンから、より頂端側の分布パターンへの顕著なシフトは、興奮毒性グルタミン酸類似体であるカイニン酸(KA)への曝露の後で生じた。この異常な傾向は、シナプス後肥厚マーカーである、PSD-95についての共免疫標識化の粗大な喪失と相関したことから、CtBP2で標識化された点の、頂端側へのシフトは、KA誘導性の、リボンシナプスの完全性の喪失と、基底面に沿って活動性のシナプスにアンカリングしたPSDの解離とに帰せられる可能性が高かったことが指し示される。SG外植片(10μM)内の神経突起形成を誘導することが示された濃度のHPN-07による興奮毒性後処置は、この病原性シフトを好転させ、IHCに、CtBP2で共標識化される基底側PSDを、カノニカル神経栄養成長因子であるBDNFにより達成される形と同様の形で再生させた。HPN-07が、この共培養物モデルにおける、興奮毒性外傷後のIHCにおいて、リボンシナプスの構造的完全性を回復させる能力は、この文脈では、シナプス形成(すなわち、再神経支配)を促進するように作用するHPN-07と符合する。

20

30

【0112】

図6は、KAへの興奮毒性曝露後における、非処置外植片、BDNF処置外植片、またはHPN-07処置外植片に由来するIHC間の、リボンの数および空間的分布についてのターゲティングされた比較による定量的査定についてまとめる。KAへの曝露後、非処置培養物は、シナプス前密度の、「典型的」(核の下方における)分布から「頂端側」(核の上方における)分布へのシフトを呈した。BDNFおよびHPN-07のいずれも、この病原性変化を好転させたことから、この文脈において、IHCを再神経支配するための、それらの有用性が裏書きされる。しかし、HPN-07による処置は、損傷していない組織内で観察される全リボン数により近接する、より大きな全リボン数を結果としてもたらした。各データ点は、約10回にわたる独立の測定の実験数を表す。

40

【0113】

図7に示される通り、爆音へと曝露された生存ラットにおけるHPN-07/NAC処置は、爆音後において、著明に多数の、内有毛細胞上の、生存神経接合を促進し、一部のトノトピー領域内では、非曝露非投薬の、損傷していない耳において典型的に観察されるシナプス数を超える、シナプス数へと移行した。上パネルでは、ラットを、1.5分間隔で繰り返される、14psiで、3回にわたる、継起的なオープンフィールドの爆音へと曝露した。次いで、動物に、最後の爆音の1時間後に、HPN-07/NACを注射し(i.p.)、次いで、続く48時間にわたり、1日2回ずつ注射した。3週間後に、動物

50

を安楽死させ、それらの蝸牛組織を固定し、採取し、顕微解剖し、内有毛細胞 (CtBP2) 内のリボンシナプスと、これと関連する神経突起とのシナプス界面におけるシナプス後肥厚 (GluR2/3) とをターゲティングする抗体で共免疫標識化した。両方のマーカーの存在は、存続可能なシナプス接合を示す。コルチ器の、16 kHz のトノトピー領域では、シナプスの密度に対する、著明な処置効果が観察され、この位置における、正常数を超えるシナプス数 (非曝露非投薬対照と比べて) となる傾向が示された。下パネルでは、ラットを、単回で、8 psi の、ショックチューブ内の爆音へと曝露した。次いで、動物に、最後の爆音の1時間後に、HPN-07/NACを注射し (i.p.)、次いで、続く48時間にわたり、1日2回ずつ注射した。8週間後に、動物を安楽死させ、それらの蝸牛組織を固定し、採取し、顕微解剖し、上記で記載した、CtBP2 および GluR2/3 に対する抗体で共免疫標識化した。これらのラットのコルチ器の、32 kHz のトノトピー領域では、著明な処置効果が観察され、8 および 16 kHz の領域における、正常数を超えるシナプス数 (非曝露非投薬対照と比べて) となる傾向が示された。

【実施例2】

【0114】

動物、爆音への曝露、および薬物の投与

本研究で使用される組織試料は、リボンシナプスの査定のために使用された蝸牛組織試料を除き、既に記載されている (Ewertら、Hear. Res., 285, 29~39 (2012)) 通りに回収した。爆音への曝露、抗酸化剤の投与、および聴性脳幹反応の測定については、本発明者らのかつての報告 (Ewertら、Hear. Res., 285, 29~39 (2012)) において、詳細に記載した。動物の使用および取扱いに関する全ての手順は、Oklahoma Medical Research Foundation (OMRF) Institutional Animal Care and Use Committee および U.S. Department of Navy Office of Naval Research により精査および承認された。

【0115】

本研究では、体重を、360~400 gの間とする、雄ロング-エバンス有色ラット (Harlan Laboratories, Indianapolis, Indiana) を使用した。動物は、OMRFの動物施設内で飼育した。各ラットを、1.5分間の間隔で繰り返される、3回の継起的な、1平方インチ当たり14ポンド (psi) の爆音へと曝露した。爆音プロトコールは、著明な難聴と、低発生率の鼓膜破裂とを誘導した (Ewertら、Hear. Res., 285, 29~39 (2012))。鼓膜が破裂した耳は、研究から除外した。聴性脳幹反応 (ABR) 閾値および歪成分耳音響放射 (DPOAE) レベルは、爆音への曝露前、ならびに曝露の24時間後 (24H)、7日後 (7D)、および21日後 (21D) のサンプリング間隔で得、本発明者らのかつての刊行物において報告した (Duら、PLOS One, e80138 (2013); Ewertら、Hear. Res., 285, 29~39 (2012))。

【0116】

NACの20%溶液は、Hospira, Inc. (Lake Forest, IL) から購入され、HPN-07は、APAC Pharmaceuticals, LLC (Columbia, MD) により合成され、用意された。爆音へと曝露された、抗酸化剤処置群 (B/T) 内の動物に、生理食塩液溶液 (5 mL/kg) 中に溶解させた、300 mg/kg のNAC + 300 mg/kg のHPN-07の組合せを、腹腔内 (i.p.) 注射した。薬物投与は、爆音への曝露の1時間後に開始し、次いで、後続の2日間にわたり、1日2回ずつ継続した。非処置の爆音へと曝露された群 (B) 内の動物には、処置群と同じスケジュールに従い、等容量の生理食塩液を、i.p. 注射した。爆音へも曝露されず、薬物処置も施されない、さらなる11匹のラットを、正常対照 (NC) として使用した。

【0117】

リボンシナプスの査定のための、蝸牛組織の回収

爆音への曝露の、1または3週間後に、動物の頭部を、ケタミンおよびキシラジンによる深い麻酔下で切り落とした。蝸牛を、側頭骨から、速やかに切り分け、低温PBSに入れた。正円窓および卵円窓を切開し、頂回転骨を除去した。組織固定のために、PBS中に4パーセントのホルムアルデヒド溶液を、蝸牛へと還流させた。蝸牛を、同じ固定剤中に、4で、さらに10分間にわたり入れた。固定の後、蝸牛を、PBS中で、さらに切り分け、次いで、1%のTriton X-100および5%の正常ウマ血清を含有するPBS中で、1時間にわたりブロッキングしてから、ウサギ抗GluR2/3抗体(Millipore Bioscience、型番AB1506、1:100)と、マウス抗C末端結合性タンパク質抗体(CtBP2、BD Transduction Laboratories、型番612044、1:200)との組合せにより、37で、20時間にわたり免疫標識化した。組織を、PBSですすぎ、Alexa Fluor 488ニワトリ抗ウサギ(1:1000、Life Technologies、Co.、Grand Island、NY)と共に、37で、1時間にわたりインキュベートした。組織を、PBSですすぎ、Alexa Fluor 488ヤギ抗ニワトリ抗体(1:1000、Life Technologies、Co.、Grand Island、NY)、およびAlexa Fluor 568ヤギ抗マウス抗体(1:1000、Life Technologies、Co.、Grand Island、NY)と共に、37で、1時間にわたりインキュベートした(Furmanら、2013)。組織を、DAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)により、室温で、10分間にわたり対比染色して、核を標識化し、次いで、抗褪色剤培地と共に、スライド上にマウントした。

10

20

【0118】

全蝸牛を、落射蛍光顕微鏡で撮影した。蝸牛の長さを測定し、周波数は、カスタムのブラグイン型ImageJソフトウェア(<http://www.masseyeandear.org/research/ent/eaton-peabody/epl-histologyresources/>)を使用して計算した。蝸牛の6つの周波数位置である、2、4、8、16、32、48kHzを、共焦点zスタックとしての画像収集のために選択した。画像は、Zeiss LSM-710共焦点顕微鏡(Carl Zeiss Microimaging, LLC、NY)を使用して、z面内に0.5μmのステップを伴う、1024×1024ピクセルのフレーム内に収集した。コルチ器を、内リンパ面から見ると、各スタックは、リボンシナプスのセット全体を伴う、6~9個のIHCを含有した。3D形態計測は、Amira 3Dソフトウェア(FEI、Burlington、MA)を使用することにより処理した。全ての定量的解析は、生の画像スタックにより実施した。シナプス前リボン(赤チャネル)およびシナプス後肥厚(緑チャネル)は、既に公表された方法(KujawaおよびLieberman、J. Neurosci.、29、14077~14085(2009))に従い、セグメンテーションにより同定し；各スタック内の、重合せの曖昧さまたは過大評価を回避するために、z次元で定量化し、追跡し、顕微鏡視野内のIHC総数で除した。

30

【0119】

蝸牛および脳組織の回収および切片化

40

爆音の24時間後、7日後、または21日後に、各実験群(時点1つ当たりのラット6~8匹)内で、蝸牛および脳の切片化のために使用した動物を安楽死させ、生理食塩液に続き、0.1Mのリン酸緩衝生理食塩液(PBS、pH7.2)中に4%のバラホルムアルデヒドで心内還流した。蝸牛、脳、および脳幹を摘出し、同じ固定剤で(蝸牛については、一晩にわたり、脳組織については、1週間にわたり)後固定し、PBS中で洗浄し、PBS中、4で保存した。固定された蝸牛を、PBSで洗浄し、次いで、10%のEDTA中で、各週2回ずつ溶液を交換しながら、2週間にわたり脱灰した。蝸牛を乾燥させ、パラフィン内に包埋し、蝸牛軸を含む面内、6μmの厚さで切片化し、10番目ごとの切片を、スライド上にマウントした(蝸牛1つ当たり、合計10枚のスライド)。次いで、マウントされた切片を、免疫組織化学解析のために加工した。

50

【0120】

各動物に由来する脳および脳幹は、PBS中に30%のスクロース中、4 で、組織が、容器の底部へと沈殿するまで凍結防止処理し、このとき、組織を、Tissue-Tek (Sakura Finetek USA Inc.、Torrance、CA)内に包埋し、Thermo Cryotome (Thermo Fisher Scientific, Inc.、Waltham、MA)により、18~20 μm ごとに継起的に、冠状面内で切片化した。各脳および脳幹に由来する、切片10個ごとに、そのうちの1個を、ゼラチンであらかじめコーティングされたスライドへとマウントした(各脳幹について、合計10枚のスライドであり、各脳について、合計20枚のスライドである)。各スライド上の、2つの隣接する切片の間の距離は、約200 μm であった。次いで、切片を、免疫組織化学解析のために加工した。

10

【0121】

蝸牛内の螺旋神経節ニューロンおよび神経突起の定量化

2つのバイオマーカーである、ニューロフィラメント(NF)軽鎖サブユニット(68 kDa、NF-68)および重鎖サブユニット(200 kDa、NF-200)を使用して、爆音へと曝露されたラットにおける、蝸牛神経変性について検討した。蝸牛切片を、キシレン中で脱パラフィン化し、系列濃度のエタノールおよび蒸留水中で再水和させた。次いで、これらの切片を、PBSで洗浄し、PBS中に1%のウシ血清アルブミン(第V画分)と、1%の正常ウマ血清または1%の正常ヤギ血清とによりブロッキングし、PBS中に0.2%のTriton X-100(PBS/T)中で透過処理した。次いで、ブロッキングされ、透過処理された切片を、マウス抗ニューロフィラメント68(1:200、クローンNR4、Sigma、St. Louis、MO、型番N5139)またはニワトリ抗ニューロフィラメント200(1:1000、EMD Millipore、Billerica、MA、型番AB5539)と共に、室温で、一晚にわたりインキュベートした。PBS/Tによる洗浄の後で、ビオチニル化ヤギ抗ニワトリIgGまたはウマ抗マウスIgG(1:200、Vector Laboratories, Inc.、Burlingame、CA)を、スライドへと、室温で、1時間にわたり適用し、Vectastain ABC and DABキット(Vector Laboratories, Inc.、Burlingame、CA)を、免疫標識の視覚化のために使用した。免疫陽性細胞は、標的エピトープ部位において、褐色の反応生成物を呈した。メチルグリーンを、核の対比染色のために使用した。陰性対照は、一次抗体を除外することによりなされた。正常対照および爆音へと曝露されたラットのSG内のニューロンを染色して、平均ニューロンサイズおよび損傷誘導性の損耗について検討するのに、トルイジンブルーを使用した。

20

30

【0122】

脳および蝸牛における、タウについての免疫組織化学染色

上記で記載したのと同じ免疫組織化学染色プロトコールを、タウ染色のために使用した。組織切片を、セリン部位195、198、199、および202におけるリン酸化を欠くタウタンパク質の、公知の電気泳動分子種の全てを認識する、マウス抗タウ-1抗体(1:200、クローンPC1C6、EMD Millipore、Billerica、MA、型番MAB3420)、タウの6つの天然アイソフォーム全てを認識する、マウス抗タウ46(1:100、Sigma、St. Louis、MO、型番T9450)、マウス抗ホスホ(Ser202/Thr205)タウ抗体(1:250、クローンAT8、Thermo Scientific、Waltham、MA、型番MN1020)、またはウサギ抗オリゴマータウ抗体(T22血清、1:300; University of Texas Medical Branch、Galveston、TXのRakez Kaye博士の恵与; Hawkinsら、2013)と共に、一晚にわたりインキュベートした。

40

【0123】

爆音への曝露後の蝸牛における、オリゴマータウ/NF-68およびミオシンV I I a /

50

NF - 200 による二重標識化解析

蝸牛切片を、T22抗体(1:200)および抗ニューロフィラメント68(1:200)、またはNF-200(1:1000)およびウサギ抗ミオシンVIIa(1:1000; Proteus Biosciences Inc.、Ramona、CA、型番25-6790)と共に、室温で、一晚にわたりインキュベートした。PBSによる洗浄の後で、切片を、適切なAlexa Fluor(登録商標)488、同568、または同647二次抗体(1:1000、Life Technologies、Co.、Grand Island、NY)と共に、室温で、2時間にわたりインキュベートするの続き、DAPI標識化を行い、抗褪色剤培地中にマウントした。画像は、Zeiss LSM-710共焦点顕微鏡により収集した。

10

【0124】

爆音への曝露後の蝸牛における、酸化ストレスバイオマーカーについての解析

DNA酸化の生成物である、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)のレベルを、爆音へと曝露された動物における、蝸牛ニューロン内の酸化ストレス誘導性の損傷の変化について査定するためのバイオマーカーとして検討した。上記で記載した、同じ免疫組織化学染色プロトコルを、8-OHdG免疫染色のために使用した。組織切片を、ウサギ抗8-OHdG抗体(1:100、Bioss antibodies、Woburn、MA、型番bs-1278R)と共に、一晚にわたりインキュベートした。

20

【0125】

バイオマーカーについての免疫染色の定量化

画像は、BX51 Olympus顕微鏡(SGおよび脳)またはZeiss Axiovert 200m Inverted Fluorescent Microscope(螺旋板(SL)内およびコルチ器(OC)内の神経線維)により収集した。蝸牛内で、画像(SG、SLおよびHC(IHC)領域内の神経線維)は、各スライド上の全ての切片の基底回転および中回転から収集した。NF-68陽性ニューロン、NF-200陽性ニューロン、または8-OHdG陽性ニューロンの数は、ImageJソフトウェア(米国立保健研究所)を使用して定量化した。SG内の、NF-68陽性ニューロン、NF-200陽性ニューロン(弱く染色されるか、または強く染色された)、および8-OHdG陽性ニューロンの百分率(陽性染色されたニューロン数/ニューロン総数×100%)を計算し、統計学的に解析した。SL内の、NF-200陽性神経線維、タウ46陽性神経線維、AT8陽性神経線維、またはT22陽性神経線維の密度(1mm²当たりの神経線維の数)もまた、ImageJソフトウェアを使用して推定した(Jensenら、PLoS One 10、doi:10.1371/journal.pone.0125160(2015))。爆音への曝露の21日後における、SGNの喪失について検討するため、NCおよび爆音へと曝露されたラットの的中回転および基底回転におけるSGのサイズを測定し、SGNの相対密度(1mm²当たりの、トルイジンブルー染色されたニューロンの数)を計算し、統計学的に解析した。爆音への曝露の21日後における、SGNのサイズについて検討するため、NCおよび爆音へと曝露されたラットの蝸牛内の、トルイジンブルー染色されたSGNの最大直径を測定した(Bichler、1984)。

。画像は、蝸牛切片の、頂回転、基底回転、および中回転から収集し、SGN(μm)の平均最大直径を計算し、統計学的に解析した。トルイジンブルー陽性ニューロンだけを、解析に組み入れた。

30

40

【0126】

蝸牛背側核(DCN)では、画像は、内側第3切片(内側)、中間第3切片(中間)、および外側第3切片(外側)から収集した。下丘(IC)では、画像は、ICの中心核(CIC)から収集した。ACでは、画像は、全ての層(1つの切片上の全ての層をカバーする、2つの画像)から収集した。改変二次元定量化法を用いて、これらの核内または領域内の陽性免疫染色細胞をカウントした(Dura、PLoS One、e80138(2013))。各画像内の陽性細胞の総数は、ImageJソフトウェアを使用して定量化

50

し、各クラスのタウ陽性細胞の密度（1 mm²当たりの陽性細胞の数）を計算し、統計学的に解析した。暗褐色の染色細胞だけをカウントした。細胞および神経突起の計数は、各スライド上の試料の識別を知らされていない技師が行った。

【0127】

統計学的解析

一元ANOVAまたは二元ANOVA（SPSS 14.0 for Windows）および事後検定（チューキーのHSD）を使用して、各サンプリング間隔において、3群（NC、B、およびB/T）間で、統計学的有意差が存在するのかどうかを決定した。これらの解析では、0.05未満のp値を、統計学的に有意であると考えた。

【0128】

爆音への曝露後における、蝸牛内の神経変性

蝸牛の神経変性は、典型的に、HCを神経支配する、脆弱な軸索の神経突起内で始まり、しばしば、SL内の神経線維の喪失として、進行性に顕在化し、最終的に、SGNの喪失に至る（Jensenら、PLoS One 10. doi: 10.1371/journal.pone.0125160（2015））。結果としての、OC内の、爆音誘導性の神経外傷は、非曝露非投薬ラットおよび爆音へと曝露されたラットにおける、IHCの神経支配帯域内の、リボンシナプスおよびNF-200陽性（I型）神経突起の相対密度を検討することにより査定した。主要なリボンマーカー（C末端結合性タンパク質2、CtBP2）、およびシナプス後グルタミン酸受容体パッチについてのマーカー（GluR2/3）に対する抗体を使用する、二重免疫標識化解析は、損傷の7および21日後の両方における、OCの基底回転～中回転にわたる、シナプス前構造およびシナプス後構造の、同時発生的な、爆音誘導性の低減（図8、A～F）を明らかにした。これに対し、頂回転内の、低周波数のトノトピー位置は、一見すると、爆音誘導性のシナプス喪失を免れていた。これらのシナプス前マーカーおよびシナプス後マーカーについての、独立の定量化は、爆音へと曝露されたラットの、基底回転～中回転において、重症度がグレード付けされた、トノトピー特異的シナプトパッチについての明らかな証拠をもたらした（図9）。非曝露非投薬ラットでは、OCの基底回転～中回転にわたる、全載標本共焦点切片内の、IHC 1個当たり、約11～24の、二重標識化されたシナプス叢が観察された。非処置の爆音へと曝露されたラットでは、曝露の7日後の、基底回転（すなわち、48 kHzトノトピー領域）内のIHCにおいて、正常数の50%未満のシナプス後エレメントが観察されるように、これらの数は、急激に低下した。リボンシナプス密度もまた、この査定間隔における、非処置ラットの、8～32 kHzのトノトピー範囲（8、16、および32 kHz領域において、それぞれ、IHC 1個当たりのCtBP2点の、38.1、35.8、および37.3%の低減、ならびにIHC 1個当たりのGluR2/3点の、34.7、28.8、および34.7%の低減）にわたり、有意に低減された。曝露の21日後において、リボンシナプス密度の有意な低減は、非処置動物の、16～48 kHzのトノトピー範囲にわたり、依然として明白であった（図9）。しかし、リボンシナプス密度は、これらの動物の、より頂端側の、8 kHzのトノトピー位置では、この最終時点までに回復すると考えられた（図9）ことから、おそらく、時間経過にわたる、限局的な程度の、自発的な再神経支配が示される。

【0129】

この爆音誘導性の神経障害性応答が、末梢の軸索退縮へと転換されたのかどうかを、時間経過にわたり追跡するために、相対神経突起密度の縦断的な変化を、爆音後、24時間、7日間、および21日間の継起的時点における、IHCの神経支配帯域に沿って精査した。非曝露非投薬ラットでは、IHC 1個当たり約8つの、はっきりとしたNF-200陽性神経突起が、OCの基底回転～中回転にわたる切片系列において観察された（図19Aおよび19D）。爆音へと曝露されたラットにおける縦断的解析は、損傷による傷害後の継起的時点における、IHCの神経支配帯域に沿って、NF-200陽性神経突起数の明らかな減少を明らかにした（図19Bおよび19E）。これらの神経突起の、正式の定量化は、この界面に沿う、免疫標識化の、明らかな時間依存的喪失を確認し、有意な損

10

20

30

40

50

耗は、爆音の7日後に初めて明白となった(図19G)。21日間の最終サンプリング間隔では、非処置の爆音へと曝露された動物における、OCの基底回転～中回転内の中回転におけるIHCに隣接して、約60%の平均神経突起の喪失が観察された。この神経突起喪失の程度は、この時点において、この同じ領域に沿って測定された、爆音誘導性の平均リボンシナプス喪失から予期される程度より、やや大きく、接線方向断面による、神経突起密度の定量化と関連する、固有の分解能の低減を反映しうる。にもかかわらず、これらの結果は、わずか1～2%のIHCの喪失が記録された条件下における、爆音損傷に応答する、中～高周波数範囲内の末梢聴覚系からの神経伝達の顕著な減少を指し示す(図9および図19)。

【0130】

骨SL内の、NF-200陽性神経線維の相対密度を、非処置の爆音へと曝露されたラットの蝸牛内の進行性逆行性神経変性について、さらに査定する手段として研究した。図10に示される通り、SGから外部の側方へと突出して、HCを神経支配する、NF-200陽性神経線維の束は、非曝露非投薬対照ラットの骨SL内に緊密に充填されている(図10A)。爆音の24時間後および7日後には、これらの神経線維の密度の見かけの差違は、明白ではなかったが、爆音への曝露の21日後には、NF-200染色強度および神経線維密度の、感知可能な低減が、ラットにおいて、初めて区別可能となった(図10B)。時間経過にわたる、SL神経線維密度についての、正式の定量化は、これらの初期観察を裏付けることから、有意な損耗が、爆音後7日間～21日間の間に生じたことを明らかにした(図10D)。これらの結果は、IHCシナプス接合に沿った、神経突起の初期喪失より進んだ、進行性逆行性神経変性が、7日間のサンプリング間隔で、初めて観察されたこと(図19G)を指し示す。

【0131】

この一時的な神経障害性傾向はまた、SGを含むニューロンにおいても、爆音への曝露の21日後において、この蝸牛神経中枢の、中回転および基底回転におけるNF-200染色の、最初の感知可能な喪失が明白となるように顕在化した(図11B)。正常対照動物では、ニューロンの細胞体の大部分は、NF-200による標識化について、免疫陽性であり、各断面内の少数の細胞体は、強い免疫組織化学強度を呈した(図11A)。これらの強く標識化されたNF-200陽性ニューロンは、II型ニューロンを表すことが既に表示されており、したがって、非曝露非投薬対照において、軽度の核周部染色を伴うニューロンは、I型ニューロンであると推定される。爆音へと曝露された動物に由来するSGにおいて観察される変性ニューロンの種類を明らかにするために、弱く染色されたNF-200陽性細胞体および強く染色されたNF-200陽性細胞体の両方の百分率を、独立に計算し、統計学的に解析した。爆音の21日後において、弱いNF-200免疫陽性ニューロンの百分率が、正常対照動物と比較して、有意に減少する一方で、NF-200染色について強く免疫陽性であるニューロンは、爆音への曝露の7日後には、著明に増大し、21日間の回復期間の残余を通して、高値を維持した(図11Dおよび11E)。爆音へと曝露された動物のSG内の、NF-200の、核周部への蓄積のこの増大は、外傷誘導性の脱髄および進行中の神経変性と関連する、I型ニューロンの、細胞骨格の不安定化を表す可能性が高い。

【0132】

まとめると、これらの時空間的査定からの結果は、初期の爆音誘導性の外傷後において、進行性蝸牛神経変性は、逆行的に生じ、最終的には、SG内のI型ニューロンにおける、ニューロフィラメントの完全性の見かけの喪失に至ることを示唆した。理論に束縛されずに述べると、蝸牛ニューロンの進行性不安定化は、爆音に応答する、SG内のNF-68免疫染色の、時間依存的な増大により補完されうる。

【0133】

図12に示される通り、非曝露非投薬ラットに由来するSGの、NF-68による免疫標識化は、暗色で染色されたニューロンが、比較的希少である、拡散性の染色パターン(すなわち、0.5%未満;図12Aおよび12D)を結果としてもたらした。しかし、爆

10

20

30

40

50

音へと曝露されたラットでは、爆音の24時間後に、異常なNF-68免疫反応性パターンが、急性で観察され、bTBIの21日後には、強いNF-68免疫染色を伴うSGNの数が、非曝露非投薬対照において観察される数の7倍を越えて増大するように、時間と共に、ますます顕著となった(図12Bおよび12D)。これらの結果は、NF-200による免疫標識化で明らかにされ、感知された、神経変性応答パターンと符合する(図11)。細胞体における、その測定可能な蓄積にもかかわらず、非曝露非投薬対照、または爆音への曝露後の任意の時点における爆音へと曝露されたラットに由来するSL内のSG神経線維では、異常なNF-68免疫反応性は検出されなかった。

【0134】

外傷の21日後の、非処置の爆音へと曝露された動物の蝸牛の、3つの回転全てではまた、SGニューロンの平均細胞体直径も、非曝露非投薬対照と比較して、有意に減少したこと(全てにおいて、 $p < 0.001$; 図13)は、この、明らかな神経変性応答を裏付けた。しかし、SGN密度についての解析は、トルイジンブルー陽性SGNの総数は、この最終時点において、有意に低減されなかったもので、ニューロンの萎縮が、いまだ、ニューロンの有意な喪失へと転換されなかったこと(全てについて、 $p > 0.05$)を指し示した。

【0135】

抗酸化剤は、爆音への曝露後における、蝸牛内の神経変性を低減する

この処置レジメンの、爆音へと曝露された蝸牛ニューロンの構造的完全性に対する一時的な効果について具体的に検討するために、本出願者らは、爆音へと曝露され、その後、HPN-07およびNACで処置された動物のコホートにおいて、上記で記載したリボンシナプスおよびニューロフィラメントの免疫染色パターンについて査定した。非処置の爆音へと曝露された動物と対照的に、外傷の7日後に、抗酸化剤処置ラットは、OCの8kHz領域および16kHz領域における、リボンシナプスの、統計学的に有意な喪失を呈さなかった(図9、AおよびB)。抗酸化剤処置動物の、16kHz領域内では、リボンシナプス密度が、非曝露非投薬対照と識別不能であったので、これらの治療効果は、爆音の21日後まで、一時的に拡張された(図8、パネルG~Iおよび図9、CおよびD)。この最終時点では、抗酸化剤による、見かけの肯定的な処置効果はまた、32kHz領域でも観察されたが、効果の程度は、統計学的有意性についての、本発明者らの基準を満たさなかった(すなわち、 $p > 0.05$ 、図9、CおよびD)。HPN-07およびNAC処置また、神経障害性爆音レベルに応答する、中回転および基底回転における、IHCの神経支配帯域内の、粗大な神経突起喪失も低減した(図19Cおよび19F)。さらに、最終の21日後の時点で、処置された爆音へと曝露された動物では、IHC 1個当たりの神経突起数の、非曝露非投薬対照と比べた有意差が見られなかった(図19G)ように、抗酸化剤処置動物では、非処置ラットで観察された、シナプスの神経突起の進行性喪失が、事実上存在しなかった。

【0136】

抗酸化剤による介入は、急性爆音傷害により誘導された、骨SL内の神経線維の、伝搬性の喪失に、効率的に対抗した(図10C)ので、この治療効果の派生効果はまた、逆行的な形でも顕在化した。これらの処置動物では、SL神経線維の密度は、爆音の21日後の、最終サンプリング間隔において、非曝露非投薬対照と識別不能であった(図10D)。処置効果はまた、弱く染色された、NF-200陽性I型ニューロンの完全な補充が、HPN-07およびNACを投与された爆音へと曝露されたラットにおける実験の時間経過を通して検出されたSGにおいても明白であった(図11)。この観察は、爆音後の各サンプリング間隔における、SG内のNF-68陽性ニューロン数の、処置誘導性の、有意な低減により補完された(図12Cおよび12D)。さらに、非処置の爆音へと曝露されたラットにおいて観察された効果とは対照的に、HPN-07およびNACで処置された動物の、3つの回転全てにおけるSGニューロンの平均サイズは、爆音の21日後の、最終サンプリング間隔において、非曝露非投薬対照と識別不能であった(全てにおいて、 $p > 0.05$; 図13)。したがって、抗酸化剤との組合せによる介入は、末梢聴覚系に

10

20

30

40

50

おける、爆音誘導性の神経変性を、効率的に回避すると考えられた。

【0137】

爆音への曝露は、螺旋神経節ニューロン内のタウの、高リン酸化およびオリゴマー化を誘導する

これらの爆音条件に応答して、海馬タウの、広汎性の高リン酸化およびオリゴマー化が誘導されたが、これらのいずれも、損傷の明白な進行とは独立に、プリオン様の伝搬する、細胞間機能不全の波を誘発することが示されている。蝸牛ニューロン内の、神経毒性タウの蓄積を、爆音と同時的な続発症として検討した。

【0138】

蝸牛の査定は、セリン部位195、198、199、および202においてリン酸化を欠く、タウの生理学的アイソフォームを認識し、病理学的区別と対比した、生理学的区別を行うのに有用な内因性タウ抗体である、タウ1により開始した。しかし、タウ1抗体は、正常な蝸牛ニューロンまたは神経線維との、検出可能な免疫反応性を呈しなかった。生理学的条件下で、タウは、代替的スプライシングから生じる、6つの別個のアイソフォームのうちの1つとして存在しうる(Bueeら、Brain Res. Rev.、33、95～130(2000))。さらに、これらのアイソフォームは、微小管との機能的な相互作用をモジュレートする、示差的なリン酸化を含む、文脈特異的翻訳後修飾を受ける。したがって、本出願者らは、タウの6つの天然アイソフォームの全てを認識する、代替的な、生理学的に妥当な抗体であるタウ46を使用した。この抗体を使用したところ、S L内の神経線維、および正常なO C内のH C下方の神経線維において、強いタウ46陽性染色が観察された。柱状細胞、ダイテルス細胞、およびヘンセン細胞の細胞質ではまた、中程度のタウ46免疫標識化も観察され、I H Cおよび外H C(O H C)では、比較的弱い染色が観察された。この蝸牛分布パターンは、この器官内の生理学的タウ、ならびにアルファ-チューブリンおよびベータ-チューブリンなど、他の微小管関連タンパク質について、かつての報告(Despresら、1994; Oshimaら、1992; Duら、2003; SlepeckyおよびUlfendahl 1992)において記載されたパターンと同様である。S Gでは、ニューロンの細胞体内で、拡散性の陽性タウ46染色が観察された。しかし、非曝露非投薬ラットでは、S G Nのうちの約10%は、強い陽性染色を呈した(表1)。螺旋靱帯および血管条もまた、拡散性のタウ46染色を呈した(データは示さない)。これらの結果は、かつての報告とは対照的に、タウタンパク質の局在および分布は、一見すると、蝸牛内で、極めて広範にわたり(Despresら、1994; Oshimaら、1992; SlepeckyおよびUlfendahl 1992)蝸牛ニューロン内および感覚上皮内のタウの、正常なリン酸化状態は、海馬ニューロン内で観察されるリン酸化状態とは、異なる可能性が高い(Duら、2016)ことを指し示す。

【0139】

表1: 爆音への曝露および抗酸化剤処置の後の聴覚系における、正常タウ染色

【表 1】

	NC	24H-B	24H-B/T	7D-B	7D-B/T	21D-B	21D-B/T	処置効果
SG(タウ-46, %)	9.04±0.6	10.01±1.28	9.29±0.79	10.01±0.68	8.23±0.8	12.39±1.08	7.74±0.92	21D ($p<0.05$)
SG(タウ-1)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	なし
AVCN(タウ-1;1mm ² 当たりの数)	58.82±6.95	58.3±10.18	59.99±9.82	83.59±8.09	59.91±7.79	54.38±9.07	46.95±6.6	なし
PVCN(タウ-1;1mm ² 当たりの数)	45.69±5.12	64.06±8.18	64.43±10.72	82.22±8.23*	81.92±8.18*	32.52±4.97	47.64±4.95	なし
DCN(タウ-1;1mm ² 当たりの数)	94.78±5.94	118.4±8.21	94.29±5.67	122.3±7.55	107.8±5.71	79.17±6.63	100.1±5.23	なし
IC(タウ-1;1mm ² 当たりの数)	56.6±8.02	54.75±6.91	26.65±4.73*	80.33±5.09	55.46±7.22	47.71±7.07	54.93±7.66	24H ($p<0.05$)
AC(タウ-1, 1mm ² 当たりの数)	7.58±1.13	17.1±1.66***	17.76±1.68***	14.69±1.82*	10.56±1.29	27±1.94***	15.46±1.43**	21D ($p<0.001$)

10

20

30

40

50

注: 数は、平均値 ± SEMを表し; 「NS」とは、陽性染色なしを意味し; 「*、**、***」とは、NCと比較して、それぞれ、 $p<0.05$ 、 0.01 、 0.001 を意味し; 「処置効果」とは、爆音へと曝露された場合(B)と、爆音へと曝露され、処置された場合(B/T)との比較を意味する。

【0140】

正常なタウタンパク質の、細胞体における蓄積は、軸索の微小管の不安定化に応答する、多くの、急性および慢性の神経変性障害の特徴である(KowallおよびKosik、1987; Wolfe、2012)。しかし、非処置の爆音へと曝露されたラットのSGNにおける、細胞体タウ46の免疫反応性パターンについての、定性的査定および定量的査定は、爆音への曝露後の任意の時点において、全タウレベルの、非曝露非投薬対照で観察される全タウレベルとの、検出可能な差違を明らかにしなかった(全てにおいて、 $p>0.05$)。SL内の、タウ46免疫反応性もまた、最終の21日後の時点に測定し、統計学的に解析したところ、この解析からの結果は、タウ46について強く免疫陽性である神経線維の数の、中程度の増大(非曝露非投薬対照における $1462 \pm 158.66 / \text{mm}^2$ と比較して、 $1846 \pm 182.83 / \text{mm}^2$ ($p<0.05$))を明らかにした。HPN-07/NACで処置された爆音へと曝露されたラットでは、タウ46陽性の神経線維密度($1313.98 \pm 128.23 / \text{mm}^2$)は、非処置の爆音へと曝露されたラットと比較して、有意に低減され($p<0.01$)、非曝露非投薬対照と、統計学的に識別不能($p>0.05$)であった。

【0141】

病理学的状態では、酸化ストレスを含む毒性傷害は、特殊なキナーゼおよびホスファターゼの活性の不均衡をもたらす場合があるが、これは、極めて重要な微小管調節部位における、タウの高リン酸化の結果としてもたらすことから、ニューロンの細胞体内の、非結合性の、高リン酸化タウレベルの上昇をもたらす(Nobleら、2013; Tanig

uchira、2001)。爆音へと曝露されたラットでは、SGNが、この不安定性のストレス応答パターンの影響を受けやすいのかどうかを見分けるために、本出願者らは、これらの動物および非曝露非投薬対照に由来する蝸牛組織を、高リン酸化タウを特異的に認識する抗体である、AT8で免疫標識化した。図14に示される通り、非曝露非投薬ラットのSGは、大部分、AT8抗体による免疫標識化に対して、応答しなかった(図14Aおよび14D)。しかし、爆音への曝露は、SGNの細胞体におけるAT8免疫標識化の、急性および慢性両方の増大を誘導し、ピークの免疫反応性は、爆音後7日間のサンプリング間隔において観察された(図14Bおよび14D;表2)。しかし、爆音の21日後のSGNでは、これらの神経毒性変異体のレベルが、一見すると、低下していたことから、爆音の、この微小管関連タンパク質に対する有害な影響は、一過性の現象でありうることが示唆された。SGNが、非処置ラットにおいて、統計学的に有意なAT8の蓄積を呈した時点である、爆音への曝露の7日後には、SL内の、AT8陽性神経線維の密度もまた測定し、統計学的に解析した。しかし、爆音へと曝露されたラットのSLでは、AT8陽性神経線維の相対密度は、この時点において、処置にかかわらず(非処置ラットおよび処置ラットについて、それぞれ、 227.53 ± 22.20 および $253.93 \pm 24.90 / \text{mm}^2$)、非曝露非投薬対照(169.17 ± 20.98 ;全てにおいて、 $p > 0.05$)と比較して、有意に増大しなかった。

10

【0142】

表2: 爆音への曝露および抗酸化剤処置の後の聴覚系における、AT8染色

【表2】

20

AT-8	NC	24H-B	24H-B/T	7D-B	7D-B/T	21D-B	21D-B/T	処置効果
SG(%)	3.18± 0.88	8.39± 1.63	3.74± 1.1	14.21± 1.57***	9.39± 0.79**	7.69± 1.34	4.59± 0.91	7D ($p<0.05$)
AVCN(1mm ² 当たりの数)	39.6± 8.58	40.82± 8.51	32.17± 8.07	45.87± 10.51	63.49± 11.02	34.84± 10.24	17.18± 5.38	なし
PVCN(1mm ² 当たりの数)	29.12± 6.63	31.34± 7.89	30.64± 8.07	47.37± 8.19	51.91± 9	29.51± 9.64	25.18± 6.82	なし
DCN(1mm ² 当たりの数)	26.12± 3.91	47.9± 7.23	27.12± 5.49	72.91± 6.79***	73.41± 8.41***	33.23± 6.24	29.38± 5.21	なし
IC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
AC(1mm ² 当 たりの数)	3.23± 0.71	7.17± 1.42	6.75± 1.42	15.33± 2.36***	16.08± 3.02***	1.68± 0.42	3.04± 0.76	なし

30

【0143】

初期に、その微小管結合能を不安定化させるリン酸化事象は、自己会合する傾向を呈する構造的コンフォメーションを結果としてもたらす(Iqbalら、2013)ので、タウの高リン酸化は、タウオリゴマー化の病因的前駆症状であることが多い。タウの生理学的アイソフォームも、高リン酸化アイソフォームと共に、終端の病理学的複合体へと動員され、それらの神経変性特性を強化する(Takashima、2013)ので、このアフニティーパターンの変更は、さらなるタウの機能不全をもたらさう。本発明者らの爆音への曝露モデルがまた、SGN内のタウに対して、オリゴマー化の影響も誘導したのかどうかについて調べるため、本出願者らは、爆音後の縦断的な時点からのSG切片を、病理学的タウオリゴマーを特異的に認識する抗体である、T22で免疫標識化した(Lasagna-Reevesら、2012)。AT8抗体についての観察(図14A)と同様に、非曝露非投薬SGNの大部分(>99%;図15D)は、T22抗体と免疫反応性ではなかった(図15A)。これに対し、解析された全ての時点の、爆音へと曝露された

40

50

ラットに由来するSGNでは、細胞体における、新規で広汎性のT22免疫反応性が観察された(図15Bおよび15D;表3)。このT22免疫標識化パターンの遍在度は、時間と共により大きくなったことから、その免疫反応性が、爆音の7日後においてピークレベルに達した後で、低下した、AT8抗体について観察される傾向(図14D)と対比される。SGN内のT22の蓄積が最大となる時点(すなわち、爆音の21日後)において、SL内の、T22陽性神経線維の密度もまた測定し、統計学的に解析した。この時点では、T22陽性神経線維の、顕著で、非曝露非投薬対照($136.67 \pm 15.38 / \text{mm}^2$; $p < 0.001$)と比較して、統計学的に有意な増大はまた、非処置の爆音へと曝露されたラット($516.99 \pm 58.17 / \text{mm}^2$)のSLでも観察された。爆音へと曝露されたラットにおける、この異常なT22SGN免疫標識化パターンの恒常化は、この聴覚神経中枢における、持続性または進行性の病態を示す。

【0144】

表3: 爆音への曝露および抗酸化剤処置の後の聴覚系における、T22染色

【表3】

	NC	24H-B	24H-B/T	7D-B	7D-B/T	21D-B	21D-B/T	処置効果
SG (%)	0.85± 0.17	3.12±0.64*	1.77± 0.33	3.67±0.69***	1.04± 0.22	4.34±0.66***	2.27± 0.38	7D($p<0.01$)および 21D($p<0.05$)
AVCN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	なし
PVCN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	なし
DCN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	なし
IC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	なし
AC(1mm ² 当 たりの数)	0.34± 0.14	0.46± 0.13	0.52± 0.19	34.16±5.59***	31.42±5.68***	13.89± 4.00	12.35±2. 22	なし

【0145】

爆音へと曝露されたラットにおいて観察されたT22プロファイルは、このコホートについて上記で記載した、NF-68の、縦断的な免疫標識化パターンを想起させた。これは、本発明者らに、これらの相補的な傾向が、同じ変性SGN内の、同時的な病態生理学的応答として顕在化したのかどうかを決定するように促した。この目的で、爆音へと曝露されたラットに由来するSG組織切片を、NF-68およびオリゴマータウに対する抗体と共に共インキュベートし、次いで、これらの2つの病理学的エピトープの、潜在的な共局在化について査定した。この免疫蛍光解析の例を、図16に描示する。これらの解析に基づく、T22による免疫標識化は一般に、急性サンプリング間隔および慢性サンプリング間隔のいずれにおいても、NF-68より遍在的であるが、各時点において、複数のT22陽性ニューロンが、NF-68抗体と共に共標識化される(図16)ことが明白であった。これらの二重標識化されたニューロンのサイズおよび形状は、I型SGNと符合した。これらの結果は、タウ機能の、進行性で神経毒性の不安定化と、ニューロフィラメントの不安定化とは、爆音へと曝露されたラットにおけるSGNの変性において、関連する事象であることを指し示す。

【0146】

抗酸化剤処置は、螺旋神経節ニューロン内の、神経毒性タウ変異体の、爆音誘導性の蓄積を低減する

示差的なニューロフィラメント染色により明らかにされた、HPN-07およびNACによる介入の、蝸牛神経変性に対する、明らかな治療効果が、SG内のタウ機能不全へと拡張されうるのかどうかを決定するために、本出願者らは、各サンプリング間隔における

、抗酸化剤で処置された爆音へと曝露されたラットに由来する適切な組織切片を、非曝露非投薬対照および非処置の爆音へと曝露されたコホートとの比較のために、AT8抗体およびT22抗体で免疫標識化した。図14（パネルCおよびD）で描示される通り、HPN-07と、NACとの組合せレジメンによる損傷後急性介入は、全ての被験時点における、高リン酸化タウの発現を低減した。非処置の爆音コホート内で、AT8レベルがピークに達した、7日間のサンプリング間隔では、処置されたラットにおいて、AT8免疫陽性ニューロン数の有意な低減が観察された（図14Dおよび表2）ことは、特に、注目に値する。しかし、この時点では、抗酸化剤処置は、AT8陽性ニューロンの数を、非曝露非投薬対照において観察されるレベルまでは低減しなかったことから、おそらく、SG内の、異常なタウリン酸化に対する、爆音の可飽和影響または酸化ストレス非依存性影響が裏書きされる。

10

【0147】

オリゴマータウ抗体による補完的解析は、爆音へと曝露された動物のSG内のニューロンにおける、HPN-07/NACによる介入の、なおより顕著な効果を明らかにした。これらの条件下で、抗酸化剤による介入は、研究時間経過全体を通して、非処置の爆音へと曝露されたラットの細胞体内で観察される、T22による免疫標識化の病理学的増大を、著明かつ効率的に遮断した（図15、パネルCおよびD；表3）。この肯定的な処置効果は、SLでもまた観察され、この場合、T22陽性神経線維密度（ $193.53 \pm 21.37 / \text{mm}^2$ ）は、最終サンプリング間隔において、非処置の爆音へと曝露されたラットの場合（ $516.99 \pm 58.17 / \text{mm}^2$ 、 $p < 0.001$ ）より有意に小さく、非曝露非投薬対照とは、統計学的に識別不能（ $p > 0.05$ ）であった。SGN内のNF-200染色の保存に対する、肯定的な処置効果（図11）、および病原性NF-68の蓄積の緩和（図12）と共に、これらの結果は、爆音へと曝露された動物における、この組合せによる抗酸化剤レジメンの、既に指し示された治療的効果を、末梢聴覚系における、神経変性および進行性タウ調節異常の阻害を含むように拡張しうることを裏付ける。

20

【0148】

抗酸化剤は、爆音へと曝露されたラットの聴覚野内のニューロンにおける、細胞体へのタウの蓄積を低減する

HPN-07/NACによる組合せ処置は、末梢聴覚系における、進行中の、bTBIに関連するタウ機能不全の徴候を明らかに改善したが、実験は、爆音への繰り返しの曝露が、中枢聴覚系のタウにおいてもまた、病原性変化を誘導し、抗酸化剤による治療的介入が、これに対抗するのかどうかを決定しようとした。この目的で、蝸牛腹側前核（AVCN）、蝸牛腹側後核（PVCN）、DCN、IC、およびACに由来する組織切片を、爆音に応答するタウの調節異常の、免疫細胞学的証拠について査定した。蝸牛組織と対照的に、中枢聴覚経路内のニューロンは、非曝露非投薬の対照ラットにおいて、従来の生理学的タウ1抗体と、拡散的に免疫反応性であった（図17A）。この観察は、海馬ニューロンにおける、タウの免疫プロファイリングについての、本出願者らによるかつての研究（Duら、2016）と符合する。非曝露非投薬対照では、タウ1陽性ニューロンは、DCNの全ての層、ならびにVCNおよびICの全ての領域に分布し（表1）、細胞体における強い免疫反応性は、極めて低頻度であった。本発明者らによる、海馬ニューロンについてのかつての査定と対照的に、爆音への曝露は、AVCN内またはDCN内の細胞体におけるタウ1染色の有意な変化を誘導せず、細胞体におけるタウ1免疫反応性の一過性増大だけが、曝露後7日間のサンプリング間隔において、非処置の爆音へと曝露された動物のPVCN内で検出された（ $p < 0.05$ ；表1）。

30

40

【0149】

非曝露非投薬対照のACでは、タウ1陽性ニューロンは主に、ニューロンの深部層に位置した。しかし、爆音への曝露後では、タウ1陽性ニューロンはまた、中層内でも観察された。図17のグラフにまとめられる通り、爆音への曝露後の全ての時点では、AC内のニューロンにおいて、有意に多くのタウ1陽性細胞体が観察された。この爆音誘導性の影響は、爆音の24時間後～7日後の間の初期のプラトーの後、AC内の、細胞体が、タウ

50

1により、暗色に染色されたニューロンの数は、爆音の21日後に、おそらく、正常なタウ機能の、急性かつ進行性の調節異常を反映して、さらに増大したので、二相性であると考えられる。

【0150】

A T 8 抗体による中枢聴覚組織切片の検討は、A V C N内、P V C N内、またはI C内の、爆音誘導性の高リン酸化の有意な誘導を明らかにしなかった(表2)。爆音の7日後の、D C Nのニューロンでは、細胞体におけるA T 8免疫標識化の、わずかな、一過性の増大($p < 0.05$; 2.8倍の増大)が観察されたが、24時間後または21日後の時点には、検出可能な変化が明白ではなかった(表2)。一次A Cでは、爆音の7日後において、A T 8免疫反応性の、D C N内で検出された増大と比べて、より顕著ではあるが($p < 0.01$; 4.76倍の増大)、なおさらに一過性の増大が観察された。しかし、この病原性の染色パターンは、一見すると、21日間のサンプリング間隔までに消失した。

10

【0151】

T 2 2による免疫標識化は、爆音へと曝露された動物の、中枢聴覚経路内のA T 8抗体により観察されたパターンと同様の免疫標識化パターンを呈した。非曝露非投薬動物の、A V C N内、P V C N内、D C N内、またはI C内では、T 2 2反応性ニューロンが検出されなかった(表3)。さらに、本発明者らのb T B Iモデルは、研究による実験の時間経過にわたり、脳の、これらの中枢聴覚領域内で、細胞体におけるT 2 2免疫反応性の、有意な増大を誘導しなかった(表3)。これに対し、A C内の、T 2 2陽性ニューロンの遍在度は、爆音の7日後において、有意に上昇した($p < 0.001$; 100倍の増大)。しかし、この異常な免疫標識化パターンは、研究の最終(21日後)時点までに、有意に低減された(表3)。まとめると、これらの結果は、b T B Iが、A Cのニューロン内の、生理学的タウの、進行性ではないが、持続的な、細胞体における蓄積を誘導し、これは、この中枢聴覚の中枢内の、高リン酸化タウおよびオリゴマータウの、一過性であるが、遅延した(爆音の7日後)蓄積と連動することを明らかにした。

20

【0152】

爆音後において、ラットに、抗酸化剤との組合せ(H P N - 07 / N A C)処置レジメンを投与したところ、爆音後7日間および21日間のいずれの時点でも、一次A Cのニューロンの、細胞体における生理学的タウ蓄積の発生(すなわち、細胞体におけるタウ1との反応性)は、有意に低減された(図17;表1)。肯定的な処置効果は、細胞体におけるタウ1陽性ニューロンの相対遍在度が、非処置の爆音へと曝露されたラットにおいて観察された相対遍在度の約2倍未満となった、最終の21日後の時点において、最も顕著であったことから、処置特異的な効果が示される($p < 0.001$)。しかし、細胞体におけるタウ1の蓄積について観察された効果とは対照的に、抗酸化剤処置は、爆音へと曝露された動物の、これらの中枢聴覚核内で観察された、タウの高リン酸化およびオリゴマー化の、一過性であるが、遅延した増大に対して、区別可能な影響を及ぼさないと考えられた(表2および3)ので、この処置効果は、D C N内および/またはA C内で観察される、異常なA T 8またはT 2 2の免疫反応性パターンへは拡張されなかった。したがって、爆音へと曝露されたラットのニューロン内の、神経毒性タウ蓄積についての、病原性パターンおよび処置応答パターンは、末梢聴覚経路におけるニューロンと、中枢聴覚経路におけるニューロンとで、明らかに異なり、おそらく、それらの相対的な解剖学的位置、ならびに爆音により誘導される、伝搬性の酸化ストレスおよび神経変性の、状況による影響の受けやすさを反映する。

30

40

【0153】

抗酸化剤は、爆音へと曝露されたラットの螺旋神経節内のニューロンにおける、酸化ストレスを低減する

爆音誘導性の酸化ストレスが、実のところ、蝸牛の神経変性と関連する病態生理学的応答に寄与することを確認するため、本出願者らは、爆音の24時間後において、S G N組織を、酸化によるDNA損傷についてのバイオマーカーである、8-O H d Gで免疫標識化した(V a l a v a n i d i sら、2009)。非処置の爆音へと曝露されたラットの

50

、SGNの核内では、強い8-OHdG陽性染色が観察されたことから、これらのニューロン内の、酸化ストレスによる損傷レベルが示される(図18B)。図18Dのグラフにまとめられる通り、これらの動物のSG内では、非曝露非投薬対照と比較して、有意に多数の8-OHdG陽性ニューロンが観察された($p < 0.001$)。組合せ抗酸化剤レジメンで処置された動物では、強い8-OHdG免疫反応性を伴うSGNの遍在度が、有意に低減された($p < 0.001$)。これらの結果は、SG内の爆音誘導性の神経変性における、主要な因子ではないにせよ、寄与的な因子としての、酸化ストレスと、抗酸化剤処置の、ストレス応答の低減に対する、肯定的な治療的効果とについての、直接的な証拠を提示する。

【0154】

抗酸化剤は、爆音へと曝露されたラットにおける聴覚機能の喪失を低減する

本研究によるABR結果は、本発明者らのかつての報告(Ewertら、2012)で詳述されており、図20にまとめられる。一般に、爆音への曝露後の全ての時点において、非処置の爆音へと曝露された動物では、有意なABR閾値のシフトが観察された。非処置の爆音へと曝露された群と比較して、HPN-07/NAC処置群におけるABR閾値のシフトは、爆音の24時間後において、約10dB低減され、爆音7日後および21日後において、21dB低減された(全て、 $p < 0.001$)。抗酸化剤処置群では、爆音への曝露の7および21日後のいずれにおいても、全ての被験周波数(2~16kHz)にわたり、ABR閾値シフトの有意な回復が測定された($p < 0.01$ または 0.001)。これらのABR結果が、HPN-07およびNACの、爆音へと曝露されたラットにおいて、聴覚機能の進行性喪失を結果としてもたらす、進行中の病態生理学的応答を中断させる、明確に肯定的な特質を反映することは、進行性のSG神経変性について観察される治療効果と符合する。

【0155】

さらなる解析

本発明者らの爆音モデルは、感覚神経機能の減弱を示す、有意かつ恒久的なABR閾値のシフトを誘導することが示されたが、損傷の21日後における、非処置の爆音へと曝露されたラットの中回転および基底回転で観察された、IHCの喪失は、1~2パーセントだけであったことから、これらの動物において評価がなされていない、ある程度の神経変性が示唆される(Ewertら、2012; Duら、2013であるが、データは示さない)。

【0156】

実際、損傷の7日後に始めて、本発明者らは、非処置の爆音へと曝露されたラットにおける、OCの、中回転および基底回転の、IHCの神経支配帯域に沿って、神経突起数の有意な減少を観察し、これらの領域では、研究の、最終の21日後の時点において、元の神経突起集団のうちの半分以上を超える集団の明らかな喪失を測定した(図19)。これらの結果は、外傷の、最終の21日後の時点における、この領域の広がりに沿ったIHCにおける、有意な爆音誘導性のリボンシナプスの喪失と相関し(図8および9)、末梢聴覚の、脳へのシグナル伝達の、顕著な低減を示す。これらの動物では、SL内の末梢軸索の数骨は、爆音の21日後まで、それほど減少しなかった(図10)。これらの結果は、急性音響外傷へと曝露されたマウスにおいて記録されていること(Jensenら、2015)と同様に、本発明者らによる爆音へと曝露されたパラダイムに応答する、IHCシナプスの喪失による、段階的ではあるが、進行性の、軸索退縮と符合する。この期間にわたり、病原性のNF-68染色は、SGNの細胞体内で、有意な上昇を維持した(図12)ことから、持続的な機能不全が指し示される。他方、SGNの細胞体の、正常なNF-200免疫標識化パターンにおける有意な不均衡は、爆音の7日後まで、観察されず、I型様の免疫反応性パターンを有するニューロン数の明らかな減少は、損傷の21日後において、初めて明白となった(図11)。これらの結果は、病原性NF-68の蓄積が、SGNにおける、NF-200の免疫反応性の喪失より、進行中の爆音誘導性の神経障害についての、より高感度であるか、または優位の病原性マーカーであることを指し示すと考えら

10

20

30

40

50

れる。

【0157】

本発明者らの爆音損傷モデルに応答して、SGN内で観察される、進行性の病態生理学的応答パターンは、軽度の爆音誘導性TBI(mTBI)、および他の臨床的に類縁の神経障害と関連する神経変性に特徴的である(Goldsteinら、2012; Sajjaら、2015; WalkerおよびTesco、2013)。本発明者らの爆音過圧モデルの強度(14 psi)が、SG内の、爆音誘導性の神経変性のタイミングおよび程度において、鍵となる役割を果たした可能性が高い。マウスにおける関連する研究では、Choらは、94 kPa(13.63 psi)または123 kPa(17.84 psi)の爆音へと曝露された動物では、SGニューロンの喪失が観察されなかったが、181 kPa(26.25 psi)の爆音は、外傷の7日後という早期に、有意なSGN喪失を誘導すること(Choら、2013)を裏付けた。本研究では、トルイジンブルー染色およびNF-200染色の結果は、最終実験の時点(21日後)において、SGでは、有意なニューロンの喪失が見られないことを指し示した。にもかかわらず、本発明者らが、本発明者らの研究の時間経過を通して観察した、SGN内の、NF-68および神経毒性タウ変異体の両方の、持続的な病理性蓄積は、最終的に、この末梢ニューロン集団の有意な減少をもたらす可能性がある、ある程度の、爆音誘導性の神経障害と符合する。本発明者らが、爆音の21日後の、非処置の爆音へと曝露されたラットの蝸牛内のSGNにおける、平均値細胞体直径の、統計学的に有意な低減を観察したことから、これらの動物における、進行中のニューロンの萎縮が示されることは、この原理と符合する(図13)(Raffら、2002)。さらに、本明細書で用いられるmTBIモデルは、軍人が遭遇するmTBIを模倣する可能性が高いので、退役軍人において一般に観察される、時空間進行性の神経変性(McKeeおよびRobinson、2014; Yankaskas、2013)に対する潜在的な洞察ももたらす。

【0158】

爆音の過圧への曝露から生じるmTBIは、酸化ストレスの遷延を誘導することが公知である(Abdul-Muneerら、2013; Kochanekら、2013; Readnowerら、2010)。したがって、本発明者らは、カノニカル抗酸化剤である、N-アセチルシステインと、フリーラジカルスピントラップ剤である、HPN-07とから構成される抗酸化剤製剤による、外傷後介入の、OC内の、爆音誘導性の病態生理学的応答に対する治療効果について検討した。本発明者らは、この治療戦略が、本発明者らの爆音損傷モデルに対する病態生理学的応答により発生する酸化ストレスの直接的な症状に対して、有意に保護し(図18)、爆音へと曝露されたラットにおける、IHCの神経支配帯域内の、NF-200陽性神経突起の、急性および慢性両方の喪失に対して保護し、SL内の神経線維の喪失に対しても保護する(図19および図10)ことを見出した。この治療効果はまた、OCの、16 kHz領域内の、有意なりボンシナプスの保存、および32 kHz領域内の、肯定的な処置効果の徴候へも転換された(図8および9)。さらに、HPN-07/NAC介入また、SGNの細胞体内の、病理性NF-68の蓄積、およびNF-200免疫染色の神経障害性不均衡も著明に低減し、これらのニューロン集団内の、平均値細胞体直径の、爆音誘導性の低減を緩和した(図11~13)。これらの肯定的な処置効果が、HPN-07およびNACの、ニューロン内および神経突起内の酸化ストレスの低減に対する直接的な効果の結果であったのか、持続的なHCの生存を介する、間接的な保護効果の結果であったのか、またはこれらの両方の組合せであったのかは、明らかでなかった。しかし、上記で述べた通り、本発明者らの研究の全時間経過にわたり観察された、IHCの喪失は、1~2%に過ぎなかった(Ewertら、2012; Duら、2013)。非処置の爆音へと曝露されたラットにおける、IHCによる神経突起の、比較的早期の喪失に照らし、抗酸化剤処置動物において観察された治療効果は、SGNの神経突起に対する直接的な保護の論拠となる。実際、OCの広がりに沿った、平均末梢軸索密度の維持について観察される、リボンシナプスの完全性の保存と比べて、より頑健な処置効果は、抗酸化剤による介入が、さらなる軸索退縮を緩徐化するか、または停止

10

20

30

40

50

させることを指し示しうるが、これは、生得的であるか、または治療による、再神経支配戦略の効果を増強する治療転帰である (Tongら、2013; Wanら、2014)。

【0159】

微小管関連タンパク質であるタウの、異常なリン酸化および凝集は、酸化ストレスにより、誘導され、かつ、強化される (Melovら、2007; Mondragon-Rodriguezら、2013)。さらに、多くの場合、タウ機能の急性の低下は、慢性の細胞骨格の不安定化をもたらす可能性があり、これは、変性ニューロンに由来する病原性タウオリゴマーが、機能的なタウを、神経毒性オリゴマーへと徴集するので、細胞間で伝搬する (Clavaguraら、2013; Guoら、2011)。これらの観察と、本発明者らによる、爆音へと曝露されたラットのCNSにおけるタウについてののかつての研究 (Duら、2016) とに基づき、本発明者らは、末梢聴覚経路および中枢聴覚経路が、感覚神経性難聴に寄与しうる、タウオパチー性応答についての証拠を示すのかどうかについて検討した。

10

【0160】

本発明者らの、bTBIについてのモデルを使用して、本発明者らは、爆音への曝露が、非処置ラットにおけるSGニューロンの細胞体内で、急性タウ高リン酸化を誘導し、これが、外傷の7日後において、ピークに達すること (表2および図14) を発見した。この病原性応答は、本発明者らの研究の、実験の時間経過を通して、高値を維持した、オリゴマータウ封入体の蓄積により反映された (表3および図15)。まとめると、これらの結果は、爆音誘導性のタウ機能不全が、OC内の、ニューロフィラメントの不安定化および神経変性と同時的な、分子的続発症であることを指し示し、SGニューロン間における、細胞骨格の完全性に対する、広範かつ持続的な負の影響を示す。

20

【0161】

本発明者らの爆音モデルにおける、NF-68についての病原性応答パターンと、タウ染色についての病原性応答パターンとが、互いに、緊密に反映され合うという事実、ならびにニューロフィラメントと、タウ機能不全とが、しばしば、慢性外傷性脳症、筋萎縮性側索硬化症、およびアルツハイマー病などの神経変性障害において、相互に関連するという事実に基づき、本発明者らは、これらの2つの病原性マーカーが、爆音後における、変性SGNの細胞体内で、共存するのかどうかについて検討した (Dekoskyら、2013; LinおよびSchlaepfer、2006; Nguyenら、2001; Schmidtら、1990; Vickersら、1994)。本発明者らは、NF-68の蓄積と、タウのオリゴマー化とが、実際、SGN内で、共局在化可能な続発症であるが、それらの相対遍在度に基づく、タウのオリゴマー化が、この病原性の文脈では、ニューロフィラメントの不安定化に対して、優位の前駆症状でありうることを (図16) を発見した。

30

【0162】

酸化ストレスは、CNSにおける、タウの高リン酸化およびオリゴマー化の誘導および恒久化を統御する因子であるが、これらの病理学的応答を連関させる、正確な生理学的機構については、ほとんど知られていない (Alavi NainiおよびSoussi-Yanicostas、2015)。にもかかわらず、本発明者らの結果が、HPN-07およびNACによる早期の介入の、SGニューロンおよびそれらの末梢神経線維における、タウによる、これらの神経毒性症状の軽減に対する、明らかな治療的利益を裏付けた (図14および15) ことは、爆音誘導性の酸化ストレスがまた、末梢聴覚系における、このタウオパチー性応答も駆動しうることを根拠と符合する。本発明者らによる、抗酸化剤との組合せ製剤が、SG内の、爆音への急性曝露後における、急性および慢性両方のオリゴマータウの蓄積を、顕著に低減した (図15) ことは、特に、注目に値する。タウオリゴマーは、アルツハイマー病を含む、多くのタウオパチーにおいて、主要な伝播性神経毒性物質として作用すると、広く考えられている (Lasagna-Reevesら、2010および2012; Usenovicら、2015; Violetら、2015) ので、早期のHPN-07およびNACによる介入が、SGN内のそれらの形成を抑制する

40

50

能力は、蝸牛内の、進行性神経変性に対する、長期にわたる著明な保護を付与しうる。

【0163】

タウと同様に、NF - 68は、酸化ストレス誘導性の高リン酸化およびオリゴマー化の影響を受けやすく、機能不全性のNF - 68の凝集物が、タウのオリゴマー化を促進する、非生理学的シャペロンとして作用するという証拠が存在する (Ishiharaら、2001)。かつての*in vitro*研究は、古典的な抗酸化剤 (例えば、NAC)、およびアルファ - フェニルN - 三級ブチルニトロソ (PBN) など、HPN - 07と類縁のフリーラジカルスピントラップ剤のいずれも、天然タウおよびNF - 68を、酸化ストレス誘導性の凝集から保護しうること (Kimら、2003および2004; Oliveriら、2001) を裏付けた。本発明者らの神経障害性爆音研究における、NF - 68および神経毒性タウ変異体の、SGNの細胞体における蓄積に対する、HPN - 07およびNACによる、同時的な改善の効果は、この治療用製剤による外傷後の介入が、*in vivo*における、これらの相互関連性の分子的ストレス応答パターンもまた回避する潜在的可能性を有することを指し示す。

10

20

30

40

50

【0164】

爆音への曝露は、末梢聴覚系および中枢聴覚系のいずれにおいても、病原性のタウについての免疫染色を結果としてもたらしたが、本発明者らは、SG内およびAC内のニューロンが、CN内およびIC内のニューロンより、この不適応応答の影響を受けやすいことを見出した (Valiyaveetilら、2012)。しかし、抗酸化剤による介入は、処置効果が、高リン酸化タウまたはオリゴマータウの蓄積ではなく、生理学的タウの、細胞体における蓄積に限定される、中枢聴覚系より、末梢聴覚器官における、異常なタウ修飾を軽減するのに有効であった (表1~3および図17)。この懸隔は、HPN - 07およびNACの、血液蝸牛関門と対比した、血液脳関門の相対透過度の差違、またはこれらの組織に由来する病態生理学的応答の差違を反映しうる。同じ抗酸化剤との組合せレジメンが、海馬ニューロン内の、これらのタウオパチー性応答の各々を中断するのに十分であることが裏付けられたことから、少なくとも、脳の、この皮質下領域内では、薬物が、爆音誘導性のタウ機能不全を軽減するのに十分な濃度に到達した (Duら、2016) ことが示唆される。したがって、中枢聴覚系における、病原性のタウ蓄積に、より有効に対処するには、これらの抗酸化剤処置の延長または高用量が要求される可能性がある。

【0165】

まとめると、本発明者らの結果は、爆音への曝露により引き起こされたmTBIが、末梢聴覚系における、進行性の逆行性神経変性を誘導し、HPN - 07およびNACによる早期の介入が、この転帰に対する有意な保護をもたらすことを裏付ける。さらに、爆音に応答する、広範にわたるタウ機能不全、およびSGN内の病原性凝集を防止する、これらの抗酸化剤の能力は、内耳内の伝搬性の神経毒性を制限するための、それらの長期にわたる改善の利益をさらに裏書きする。

【実施例3】

【0166】

2, 4 - ジスルホニル - フェニル三級ブチルニトロソ (HPN - 07) で処置された騒音損傷動物が、非処置対照と比べて、著明に大きなIHC神経突起集団を呈し、HPN - 07処置は、独特なことに、これらの動物において、漸進的な度合いの機能的な回復を誘導したことが発見され、これは、再神経支配が進行中であることを示す。したがって、本発明者らは、HPN - 07が、神経突起形成およびシナプス形成を誘導するのに強力であるのかどうかについて調べた。

【0167】

HPN - 07を、3つの*in vitro*神経突起形成性モデル (PC12細胞、蝸牛螺旋神経節外植片、およびSGN外植片の、付着させた有毛細胞 (HC) との共培養物) において調べた。これらの解析からの実験データは、(1) HPN - 07が、PC12細胞系において、NGF誘導性神経突起形成を強化すること; (2) HPN - 07が、有毛細胞を伴わない螺旋神経節外植片内で、神経突起形成を促進したこと; および(3) HP

N - 07 が、興奮毒性によるリボンシナプス喪失を好転させ、カイニン酸 (K A) により誘導される興奮毒性外傷後において、S G N - H C 共培養物中の I H C の基部に沿って、神経突起密度を増大させることを裏付けた。

【0168】

*in vitro*において、HPN - 07 の神経突起形成促進特性をさらに特徴付け最適化し、また、*in vivo*において、HPN - 07 による処置が I H C - S G N シナプスを再生する効果を調べるために、蝸牛の I H C の最小限閾値シフトは誘導するが恒久的求心路遮断は誘導しないことが示されている音響過剰曝露パラダイムを使用してデザインされた生存動物実験において、これらの知見を治療転帰へと橋渡しするように HPN - 07 を拡張した。実験結果は、(1) HPN - 07 が、S G N 外植片内の、BDNF 誘導性の神経突起形成および NT - 3 誘導性の神経突起形成のいずれも強化したこと；(2) HPN - 07 (NAC と共に製剤化された、HPN - 07 / NAC) が、ラットにおける、騒音誘導性の難聴を防止したこと；(3) HPN - 07 / NAC が、ラットにおける、I H C リボンシナプスの、騒音誘導性の興奮毒性喪失を好転させたこと；および (4) HPN - 07 / NAC が、ラットにおける、騒音誘導性の A B R 振幅異常を回復したことを示した。

10

【0169】

本発明者らは、HPN - 07 が、*in vitro*における、螺旋神経節組織外植片内の I 型軸索の、BDNF 誘導性の神経突起形成および NT - 3 誘導性の神経突起形成を、用量依存的に強化したことを確認した。BDNF および NT - 3 は、蝸牛螺旋神経節 (S G N) の発生および生存に不可欠な、内耳内の、生得的な神経栄養因子である。図 24 ~ 27 において示される通り、外因性の BDNF および NT - 3 は、 $10 \mu M$ で、同じ器官型培養培地中で培養された非処置対照 (NC、正常対照、図 24 A および図 26 A) と比べて、有意な神経突起の成長 (図 24 B および図 26 B) を誘導した。HPN - 07 は、BDNF または NT - 3 に加えて、神経線維の数および広がりをもさらに増大させた (図 24 C ~ 24 D および図 26 C ~ 26 D)。処置のうちのいずれによっても、神経突起長は、NC と比較して変化しなかった (図 25 および図 27)。

20

【0170】

*in vivo*におけるシナプス形成実験は、以下の通りにデザインした。体重を 250 ~ 300 g とする Sprague Dawley ラット (Charles River) を、3 つの群：NC (騒音なし)、騒音単独 (生理食塩液で処置される)、および騒音 + HPN - 07 / NAC (HPN - 07 / NAC、 $300 mg / kg$ で処置される) へと分けた。ラットを、 $110 dB$ で、2 時間にわたる、オクターブバンドの騒音 (8 ~ 16 kHz) へと曝露した。処置は、騒音への曝露の 24 時間後に開始したが、この場合、処置の 5 回の投与は、3 日間以内に行った。処置の 2 週間後、蝸牛試料を回収し、解析した (有毛細胞およびシナプスの計数)。聴力は、A B R により、騒音の前に調べ、騒音の 1 日後および 15 日後に、再度調べた。

30

【0171】

騒音の 1 日間後に測定される、一時的閾値シフト (T T S) により検出された短期難聴は、非処置群と処置群との間で同様であり (図 21 A)、これは、騒音が、いずれの群においても、同様の損傷を引き起こしたことを意味する。後続の HPN - 07 / NAC 処置は、騒音への曝露の 15 日後に測定された、騒音誘導性の恒久的難聴を防止した (図 21 B)。T T S とは、騒音への曝露後すぐの難聴であって、時間経過にわたり回復する難聴である。全ての T T S が、消失するわけではなく、最終的な難聴の残存を、恒久的難聴と呼ぶ。騒音への曝露後における、有毛細胞の喪失は、最小限であり、蝸牛の最基底領域だけに現れた (図 22)。研究された 3 群の間で、有意差は見られなかった。

40

【0172】

1 回の騒音 ($110 dB$ で、2 時間にわたる、8 ~ 16 kHz の騒音) は、Sprague Dawley ラットの高周波数におけるシナプスのうちの、30% ~ 40% の喪失を引き起こした。損傷の 24 時間後から始まる HPN - 07 / NAC 処置は、損傷を好転

50

させた。シナプスとは、感覚有毛細胞により解読された音情報を、脳へと受け渡す「コネクター」である（図23の赤色および緑色の点を参照されたい）。シナプスの喪失は、騒がしい環境における発話の理解の困難、加齢関連難聴、耳鳴り（耳内で音が鳴ること）などを引き起こすことが示唆されている。

【0173】

図34に示される通り、曝露の2週間後、SPLを80dBとするときの、聴性脳幹反応（ABR）の波Iの振幅および波V/Iの振幅比は、騒音前ベースラインの非処置群と比較して、著明に減少した。これと比較して、HPN-07/NAC処置群では、ABRの波Iの振幅および波V/Iの振幅比は、変化しなかった。ABRの波Vの振幅は、処置群または非処置群で変化しなかった。ABR試験は、音に応答する聴覚神経反応を、客観的に測定し、聴力のための、内耳（蝸牛）および脳経路についての情報を与える。ABR試験は一般に、臨床および研究のいずれにおいても使用される。ABRの波Iは、末梢または聴覚神経の遠位部分において発生すると考えられる。ABRの波Iは、脳幹の外側毛帯および下丘において発生すると考えられる。非処置群では、波Iの振幅が減少したことから、シナプスの喪失に起因する、内耳からの聴覚入力の低減が指し示されるので、これを補償しようと、脳幹において、波Vの振幅および波V/Iの振幅比が増大したことから、中枢神経系における神経活動の増大が指し示されるが、これは、耳鳴り（耳内で音が鳴ること）を引き起こすことが示唆されている。HPN-07/NAC処置により、波Iの振幅が回復したことは、シナプス喪失の回復と符合し（図34を参照されたい）、このため、波Vは、変化しなかった。本発明者らの結果は、HPN-7/NACが、騒音により引き起こされた聴力機能不全を回復させることが可能であり、ABR波振幅を使用して、シナプスの喪失および薬による処置効果をモニタリングしうることを示す。

10

20

【0174】

まとめると、本発明者らの結果は、HPN-07が、内耳内の失われたリボンシナプスを再生する、安全な薬理学的手段を表し、蝸牛シナプトパチー、および騒がしい環境における発話の理解の困難、老人性関連難聴、聴覚過敏、および耳鳴りなど、その関連する一般的な臨床症状を処置するための、有望で非侵襲的な代替法をもたらすことを示す。

【実施例4】

【0175】

確立された難聴 / 慢性難聴

30

図28に示される通りに、確立された難聴についてのパイロット研究をデザインした。オープンフィールドの爆音傷害により、恒久的な閾値シフトを確立した。損傷の4週間後に、毎日2回、300mg/kgで、14日間にわたり投与される、HPN-07+NACによる処置を開始した。図28は、損傷の14週間後（処置の8週間後）における、処置前と対比した、ABR閾値の改善をさらに示す。

【0176】

図29に示される通り、NHPN-1010処置（HPN-07+NAC）は、確立された慢性難聴モデルにおいて、IHCリボンシナプス数を回復させた。NHPN-1010処置は、損傷の4週間後に開始し、14日間にわたり、毎日投与した。損傷の8週間後に、リボンシナプスカウントは、有意に回復した。

40

【0177】

図30に示される通り、NHPN-1010処置は、確立された慢性難聴モデルにおいて、ABRの波Iの振幅の回復を結果としてもたらした。プラセボ群における、80および70dBの両方のSPLの、4kHzおよび8kHzの刺激に応答する振幅は、爆音への曝露により低減され、時間の経過と共に減少した。80dBのSPLの、8kHzの刺激に応答する振幅の低減は、NHPN-1010処置の8週間後に、処置前のレベルへと、完全に回復した。

【0178】

さらに、図31に示される通り、リボンシナプスは、16、32、48kHzの爆音の後で低減され、NHPN-1010処置（HPN-07+NAC）により、保存 / 回復さ

50

れる。加えて、図32にまとめられる通り、NHPN-1010処置(HPN-07+NAC)は、一次求心性聴覚ニューロンが低減される、逆行性神経変性に対する、爆音の影響を改善しうる。

【実施例5】

【0179】

耳鳴りバイオマーカー

爆音(B)群には、1回のショックチューブ爆音(10psi)を施した。爆音/処置(B/T)群には、合計5回のHPN-07/NAC投与をさらに施した。組織は、爆音への曝露の8~9週間後に回収した。各実験群(時点1つ当たりのラット6~8匹)内動物を安楽死させ、生理食塩液に続き、0.1Mのリン酸緩衝生理食塩液(PBS、pH7.2)中に4%のパラホルムアルデヒドで心内還流した。蝸牛、脳、および脳幹を摘出し、同じ固定剤中で(蝸牛については、一晩にわたり、脳組織については、1週間にわたり)後固定した。固定された蝸牛を、PBSで洗浄し、次いで、10%のEDTA中で、各週2回ずつ溶液を交換しながら、2週間にわたり脱灰した。蝸牛を乾燥させ、パラフィン内に包埋し、蝸牛軸を含む面内、6μmの厚さで切片化し、10番目ごとの切片を、スライド上にマウントした(蝸牛1つ当たり、合計10枚のスライド)。次いで、マウントされた切片を、免疫組織化学解析のために加工した。各動物に由来する脳および脳幹は、PBS中に30%のスクロース中、4で、組織が、容器の底部へと沈殿するまで凍結防止処理し、このとき、組織を、Tissue-Tek(Sakura Finetek USA Inc.、Torrance、CA)内に包埋し、Thermo Cryotome(Thermo Fisher Scientific, Inc.、Waltham、MA)により、18~20μmごとに継起的に、冠状面内で切片化した。各脳および脳幹に由来する、切片10個ごとに、そのうちの1個を、ゼラチンであらかじめコーティングされたスライドへとマウントした(各脳幹について、合計10枚のスライドであり、各脳について、合計20枚のスライドである)。次いで、これらの切片を、PBS中で洗浄し、PBS中に1%のウシ血清アルブミンと、1%の正常ウマ血清または1%の正常ヤギ血清とによりブロッキングし、PBS中に0.2%のTriton X-100(PBS/T)中で透過処理した。次いで、ブロッキングされ、透過処理された切片を、一次抗体と共に、室温で、一晩にわたりインキュベートした。PBS/Tによる洗浄の後で、ビオチニル化二次抗体(1:200、Vector Laboratories, Inc.、Burlingame、CA)を、スライドへと、室温で、1時間にわたり適用し、Vectastain ABC and DABキット(Vector Laboratories, Inc.、Burlingame、CA)を、免疫標識の視覚化のために使用した。画像は、バイオマーカー定量化のために、BX51 Olympus顕微鏡により収集した。蛍光免疫標識化のために、切片を、適切なAlexa Fluor(登録商標)二次抗体(1:1000、Life Technologies, Co.、Grand Island、NY)と共に、室温で、2時間にわたりインキュベートするの続き、DAPI標識化を行い、抗褪色剤培地中にマウントした。画像は、Zeiss LSM-710共焦点顕微鏡により収集した。

【0180】

Arg3.1としてもまた公知の活性調節型細胞骨格関連タンパク質(ARC)は、可塑性タンパク質である。中枢聴覚系におけるARCの減少は、耳鳴りと関連する。図35は、中枢聴覚系における、ARCについての免疫染色を示す。爆音への曝露は、AC内、IC内、およびDCN内のARCを下方調節した。HPN-07/NAC処置は、AC内、IC内、およびDCN内のARCの発現を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化した。

【0181】

成長関連タンパク質43(GAP-43)は、軸索の成長円錐に位置する、膜関連リンタンパク質である。GAP-43は、軸索の成長、シナプス形成、およびシナプスのリモデリングについてのマーカーである。図36は、中枢聴覚系における、GAP-43につ

いての免疫染色およびウェスタンブロットを示す。爆音への曝露は、AC内、IC内、およびDCN内のGAP-43を上方調節した。HPN-07/NAC処置は、AC内、IC内、およびDCN内のGAP-43の発現を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化した。

【0182】

GABAA受容体は、イオンチャネル型受容体であり、リガンド開口型イオンチャネルである。その内因性リガンドは、中枢神経系における主要な阻害性神経伝達物質である - アミノ酪酸 (GABA) である。図37は、DCN内の、GABAA受容体 1 (GABAA R 1) についての免疫染色を示す。図38は、DCN内の、GABAA R 1 (赤) およびGAD67 (緑) についての共標識化を示す。GAD67が、阻害性ニューロンについてのバイオマーカーであることから、GABAA R 1陽性細胞は、阻害性ニューロンことが指し示される。

10

【0183】

グルタミン酸受容体2 (GluR2) は、中枢神経系における興奮性神経伝達物質である、AMPAのイオンチャネル型受容体である。グルタミン酸受容体の過剰刺激は、興奮毒性を介して、神経変性およびニューロンの損傷を引き起こす。図39は、DCN内の、GluR2についての免疫染色を示す。

【0184】

爆音への曝露は、DCN内のGABAA受容体およびグルタミン酸受容体の両方の発現を上方調節したことから、DCN内の阻害および興奮の再組織化が指し示される。HPN-07/NAC処置は、DCN内のGABAA受容体およびグルタミン酸受容体の発現を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化し、DCN内の阻害と興奮との平衡を回復した。

20

【0185】

カプサイシン受容体およびパニロイド受容体1としてもまた公知の、一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリーVメンバー1 (TRPV1) は、高温の酸性条件、カプサイシン、および刺激性化合物により活性化する。SG内の、TRPV1の上方調節は、耳鳴りと関連する。図40は、SG内の、TRPV1の免疫染色を示す。爆音への曝露は、SG内の、TRPV1を上方調節した。HPN-07/NAC処置は、SG内のTRPV1を、処置を伴わない爆音群と比較して正常化した。

30

【0186】

そうでないことが文脈により明確に指示されない限りにおいて、本明細書で使用する単数形の「ある (a)」、「ある (an)」、および「その」とは、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、そうでないことが文脈により明確に指示されない限りにおいて、ある化合物に対する言及は、複数の化合物を含みうる。

【0187】

本明細書で使用する「実質的に」、「実質的な」、および「約」という用語は、小さな変動について記載し、説明するのに使用される。事象または状況と共に使用される場合、用語は、事象または状況が、正確に生じる場合のほか、事象または状況が、近似的に生じる場合を指す場合もある。例えば、用語は、±5%以下、±4%以下、±3%以下、±2%以下、±1%以下、±0.5%以下、±0.1%以下、または±0.05%以下など、±10%以下を指す場合がある。

40

【0188】

加えて、本明細書では、場合によって、量、比、および他の数値は、範囲フォーマットで提示される。このような範囲フォーマットは、簡便さおよび簡略さのために使用されるものであり、範囲の限界として、明示的に指定された数値を含むが、また、各数値および部分範囲が、明示的に指定された場合と同様に、この範囲内に包含される、全ての個々の数値または部分範囲も含むように、柔軟に理解すべきであることを理解されたい。例えば、約1~約200の範囲内の比は、明示的に列挙された、約1および約200の限界値を含むが、また、約2、約3、および約4などの個々の比、ならびに約10~約50、約2

50

0～約100などの部分範囲も含むように理解すべきである。

【0189】

前出の記載で、当業者には、本発明の範囲および精神から逸脱しない限りにおいて、本明細書で開示される本発明に対して、様々な代用および改変を施しうることがたやすく明らかであろう。本明細書で例示的に記載される本発明は、本明細書で具体的には開示されていない、任意の、1または複数の要素、1または複数の限定の非存在下で実施しうると適切である。用いられた用語および表現は、記載の用語として使用されるものであり、限定の用語として使用されるものではなく、このような用語および表現の使用においては、示される特徴、記載される特徴、またはこれらの部分のいかなる均等物を除外する意図も存在せず、本発明の範囲内では、多様な改変が可能であることが認識されている。したがって、本発明を、特殊な実施形態および任意選択の特徴により例示してきたが、当業者は、本明細書で開示される概念の改変および/または変動を採用することができ、このような改変および変動が、本発明の範囲内にあると考えられることを理解されたい。

10

【0190】

均等物

本開示について、上記の実施形態と共に記載してきたが、前出の記載および例は、本開示の範囲を例示することを意図するものであり、これを限定することを意図するものではないことを理解されたい。本開示が関する技術分野の当業者には、本開示の範囲内の、他の態様、利点、および改変も明らかであろう。

20

【0191】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される、全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。

【0192】

本明細書で例示的に記載される実施形態は、本明細書で具体的には開示されていない、任意の、1または複数の要素、1または複数の限定の非存在下で実施しうると適切である。したがって、例えば、「～を含むこと (comprising)」、「～を含むこと (including)」、「～を含有すること」などの用語は、限定を伴わずに、包括的に読むべきである。加えて、本明細書で用いられる用語および表現は、記載の用語として使用されるものであり、限定の用語として使用されるものではなく、このような用語および表現の使用においては、示される特徴、および記載される特徴、またはこれらの部分のいかなる均等物を除外する意図も存在せず、本開示の範囲内では、多様な改変が可能であることが認識されている。

30

【0193】

したがって、本開示について、特殊な実施形態および任意選択の特徴により、具体的に開示してきたが、当業者は、本明細書で開示される、その中の実施形態の改変、改善、および変動を採用することができ、このような改変、改善、および変動は、本開示の範囲内にあると考えられることを理解されたい。本明細書で提示される、材料、方法、および例は、特定の実施形態を表し、例示的なものであり、本開示の範囲に対する限定として意図されるものではない。

40

【0194】

本明細書では、本開示の範囲について、広範に、かつ、一般的に記載してきた。一般的な開示内に収まる、より狭い種および亜属の群分けの各々もまた、本開示の一部を形成する。これは、除外される材料が、本明細書で、具体的に列挙されるのかどうかにかかわらず、条件付きであるか、または任意の対象物を属から除外する、否定的な限定を伴う、一般的な記載を含む。

【0195】

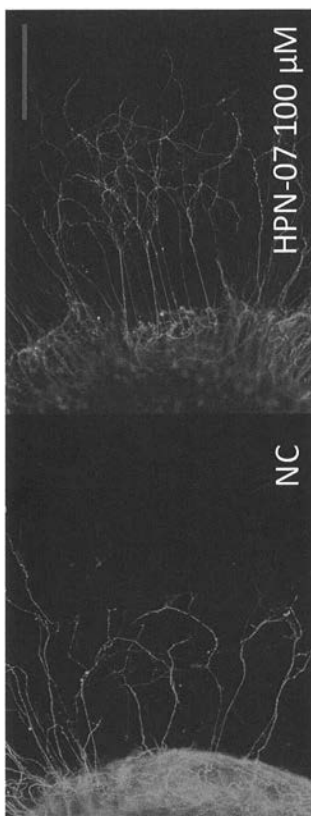
加えて、本開示の特徴または態様を、マーカッシュ群との関係で記載する場合、当業者は、これにより、本開示の実施形態はまた、マーカッシュ群の個々のメンバーまたはメンバーの亜群との関係でも記載されうることが認識するであろう。

50

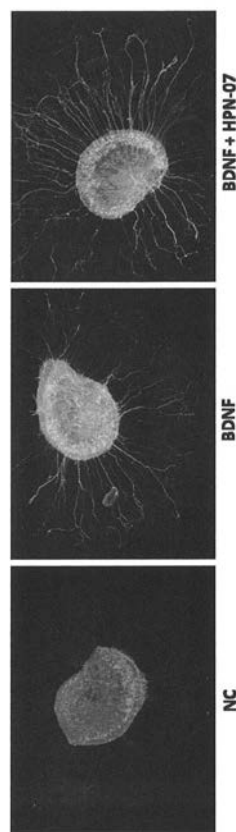
【 0 1 9 6 】

本明細書で言及される、全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、各々が、参照により個別に組み込まれた場合と同じ程度に、参照によりそれらの全体において、明示的に組み込まれる。齟齬の場合は、定義を含む本明細書により管理する。

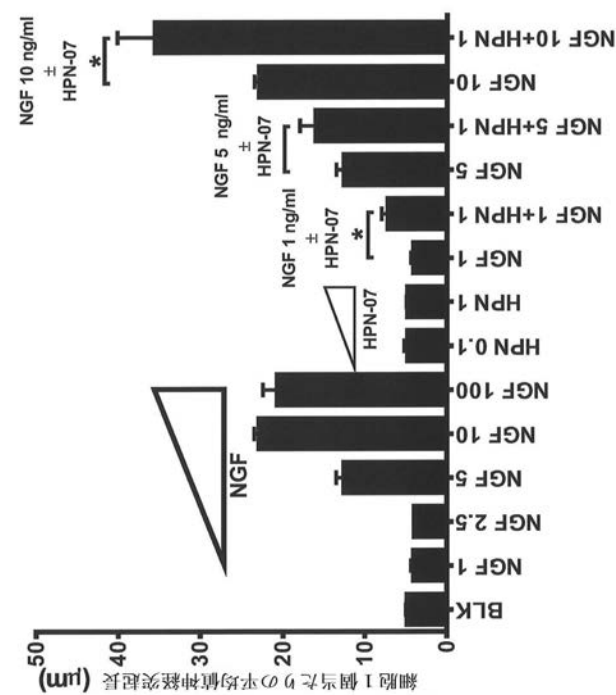
【 図 1 】



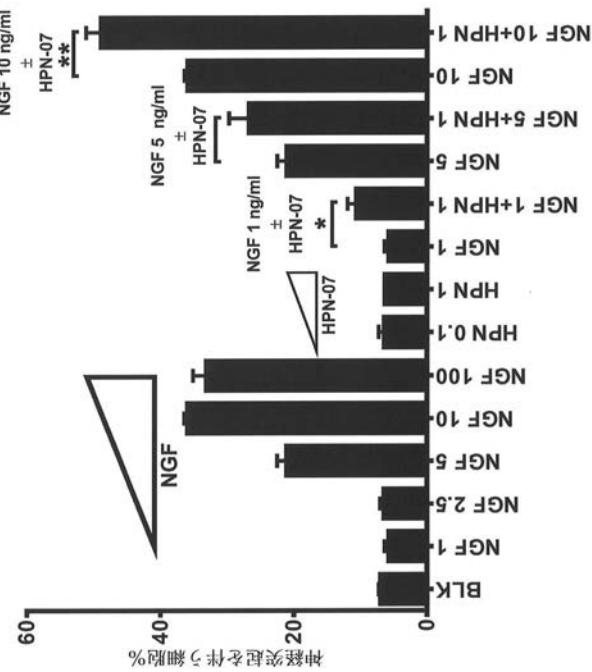
【 図 2 】



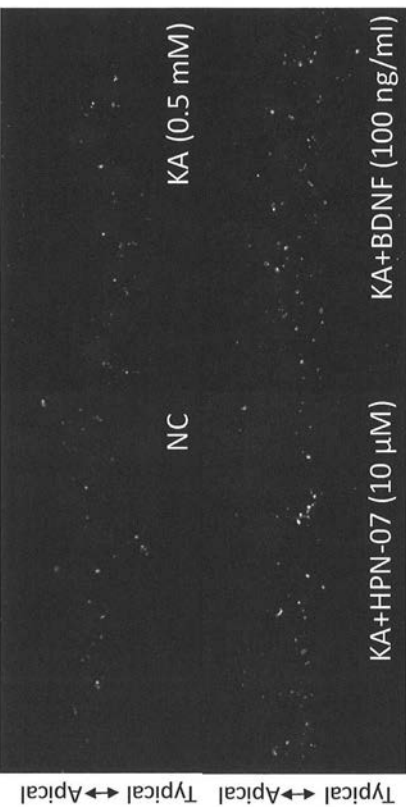
【 図 3 】



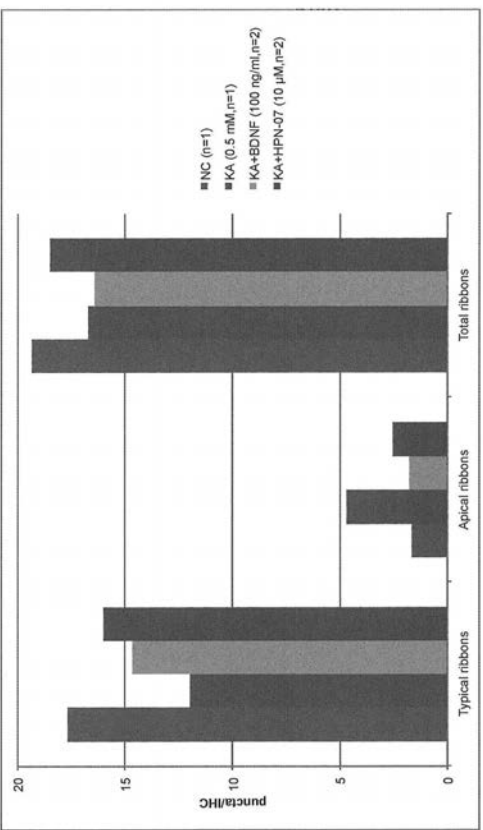
【 図 4 】



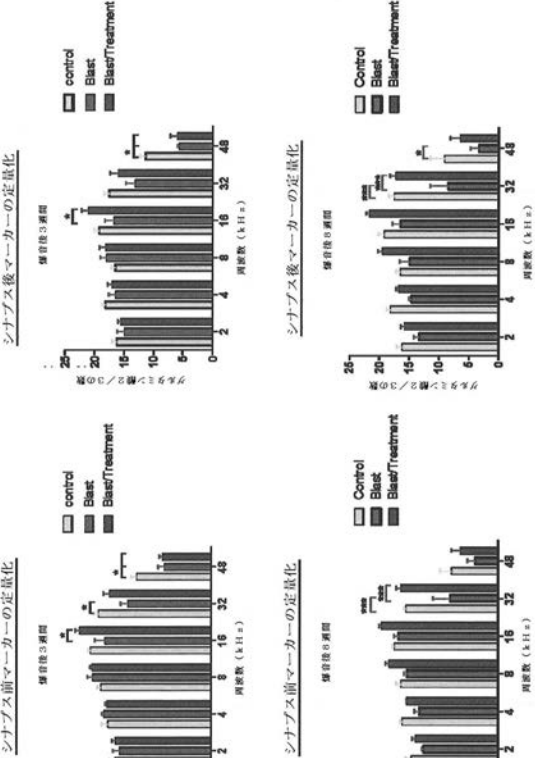
【 図 5 】



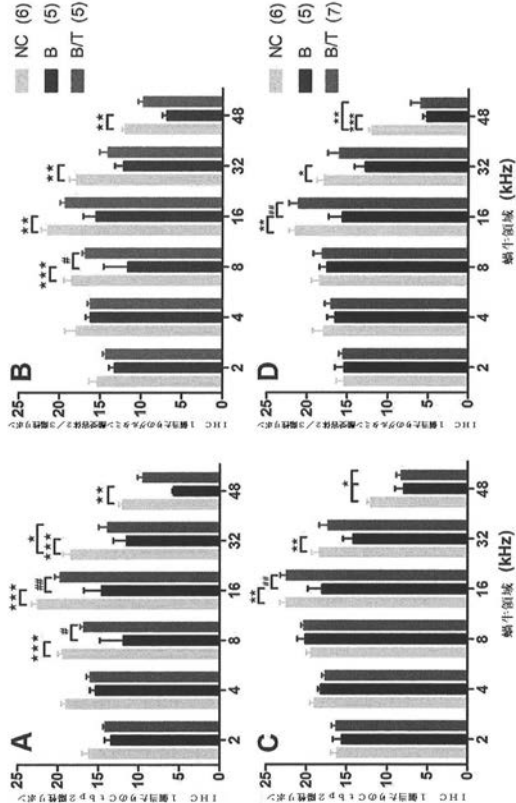
【 図 6 】



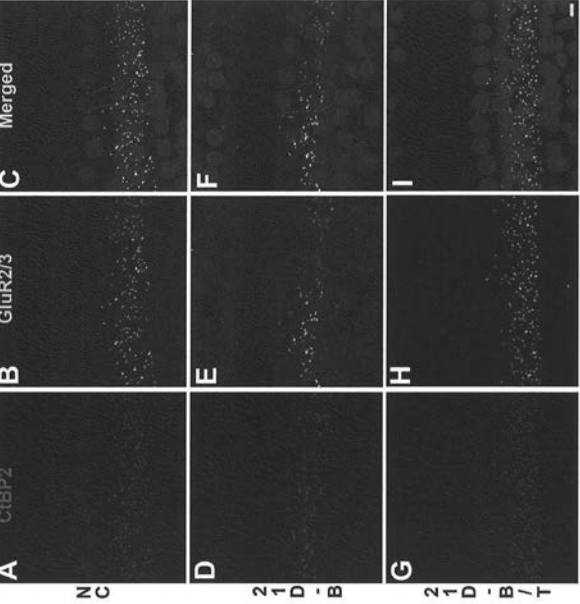
【図 7】



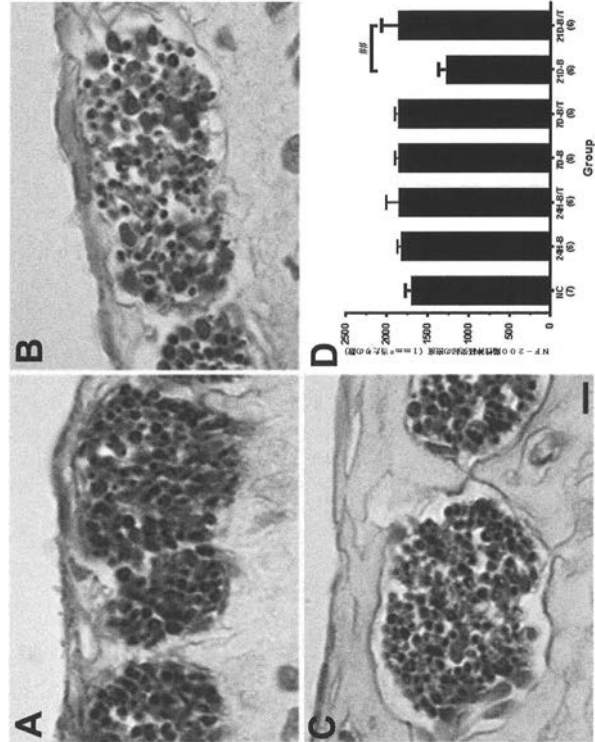
【図 9】



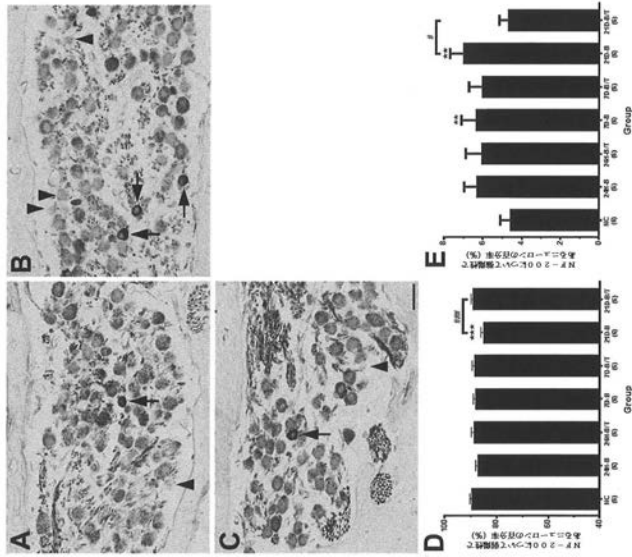
【図 8】



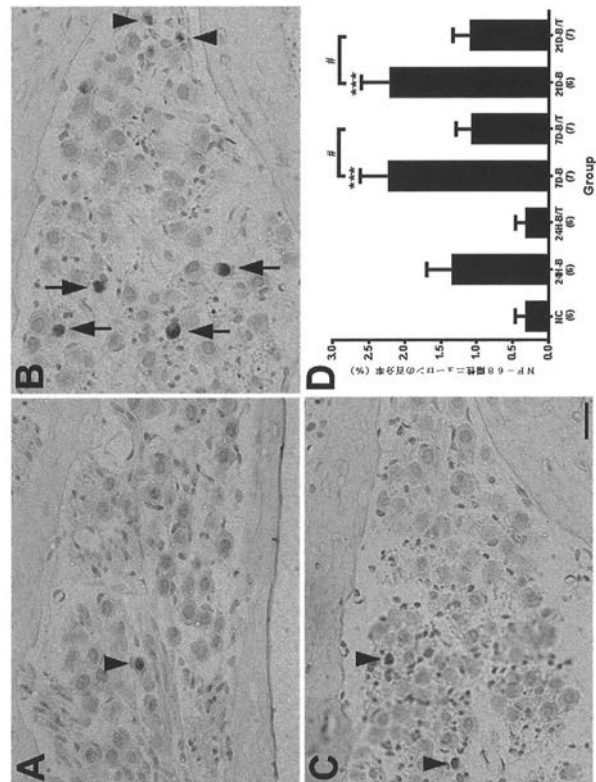
【図 10】



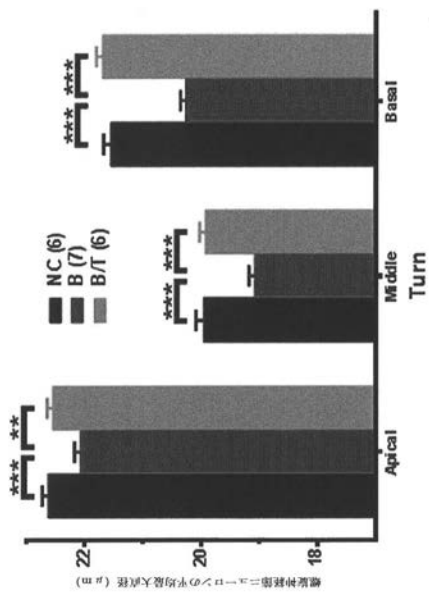
【図 1 1】



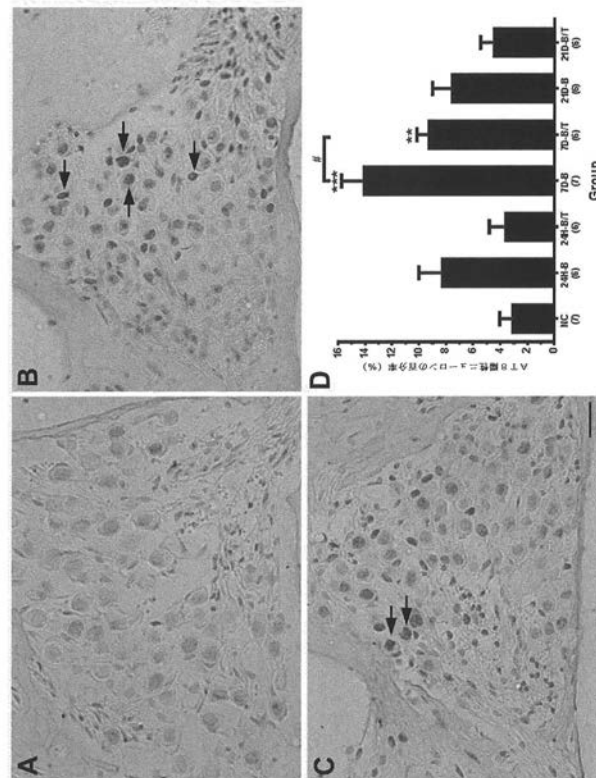
【図 1 2】



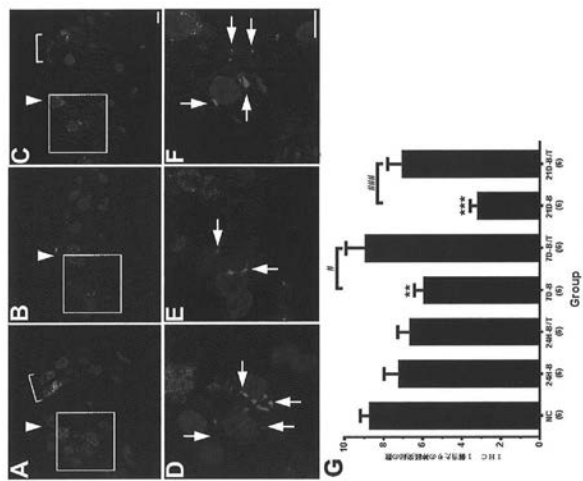
【図 1 3】



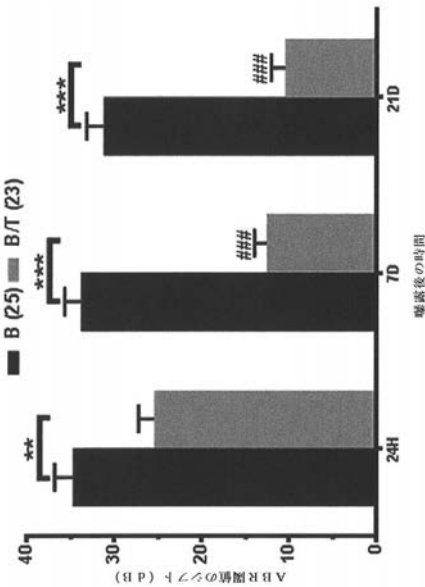
【図 1 4】



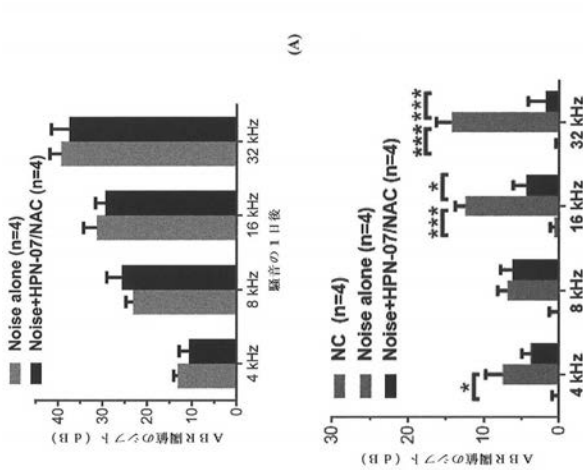
【 図 1 9 】



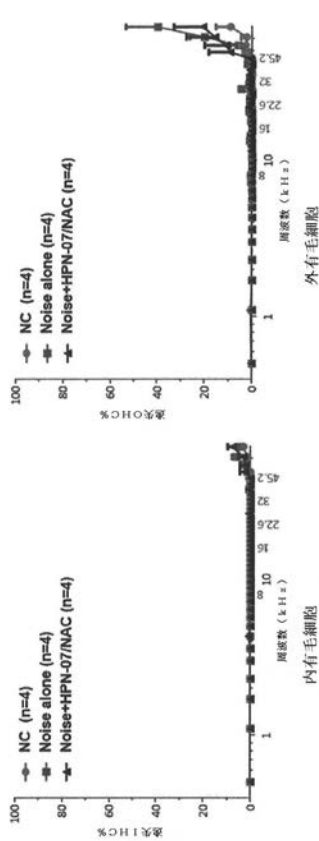
【 図 2 0 】



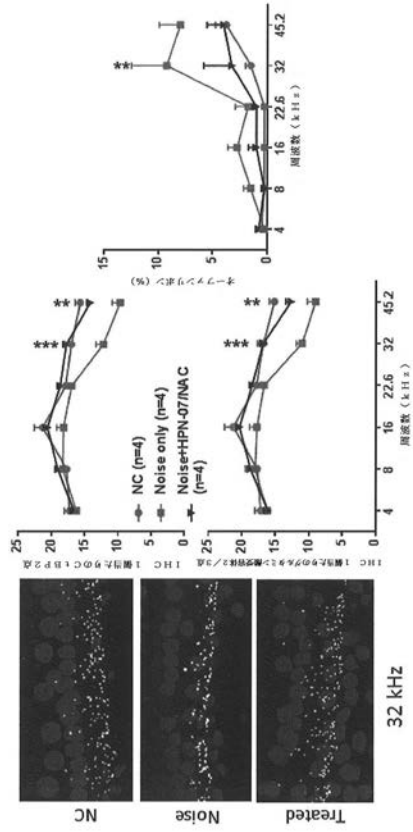
【 図 2 1 】



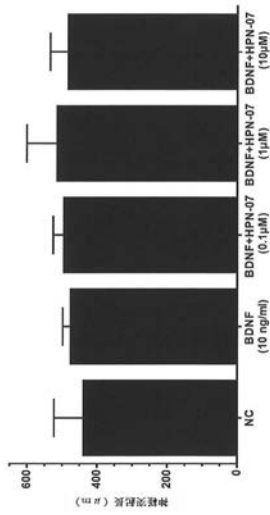
【 図 2 2 】



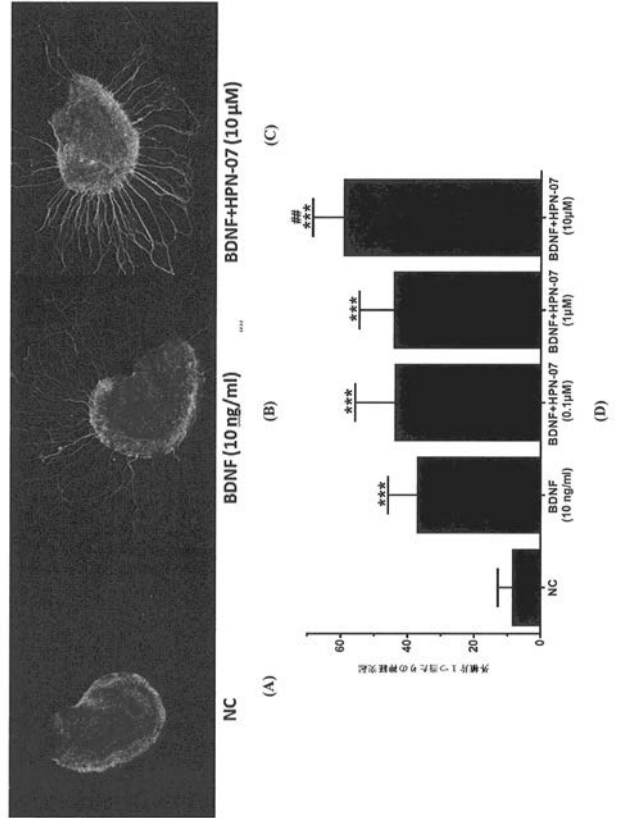
【図 2 3】



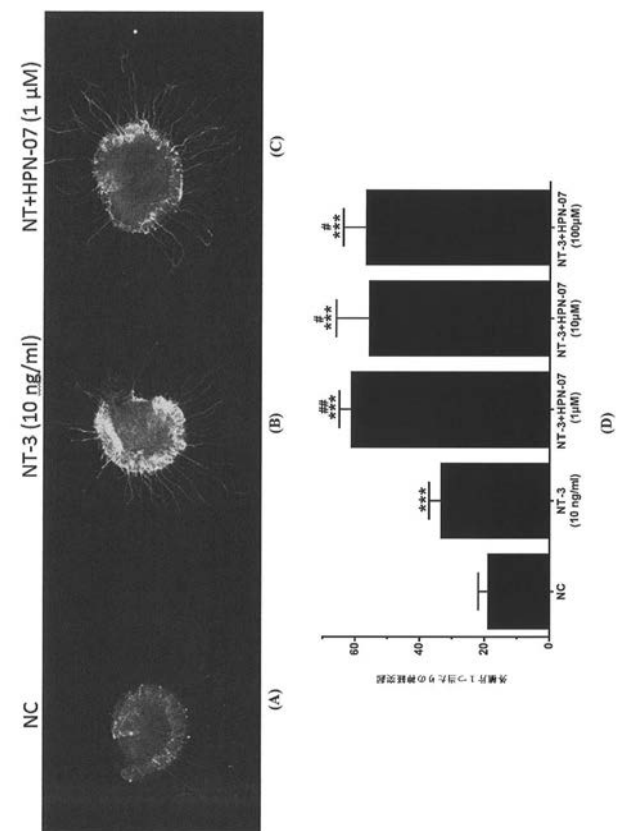
【図 2 5】



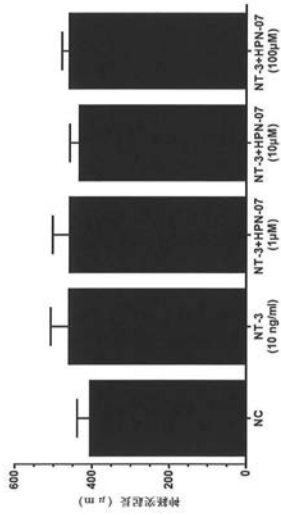
【図 2 4】



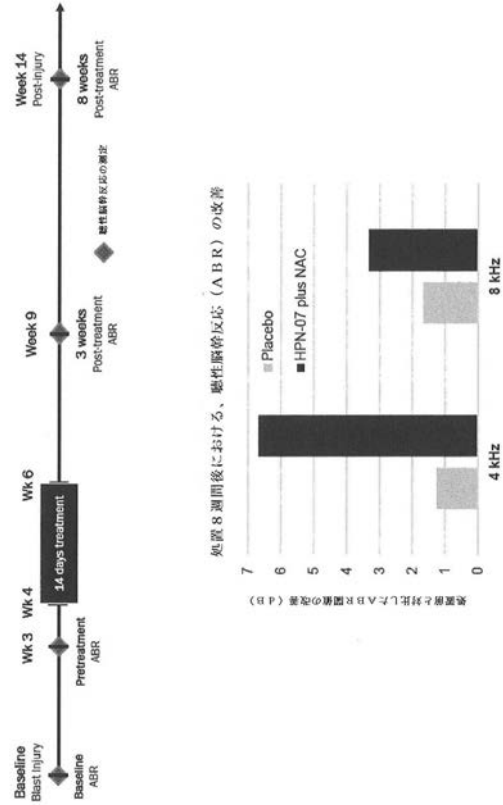
【図 2 6】



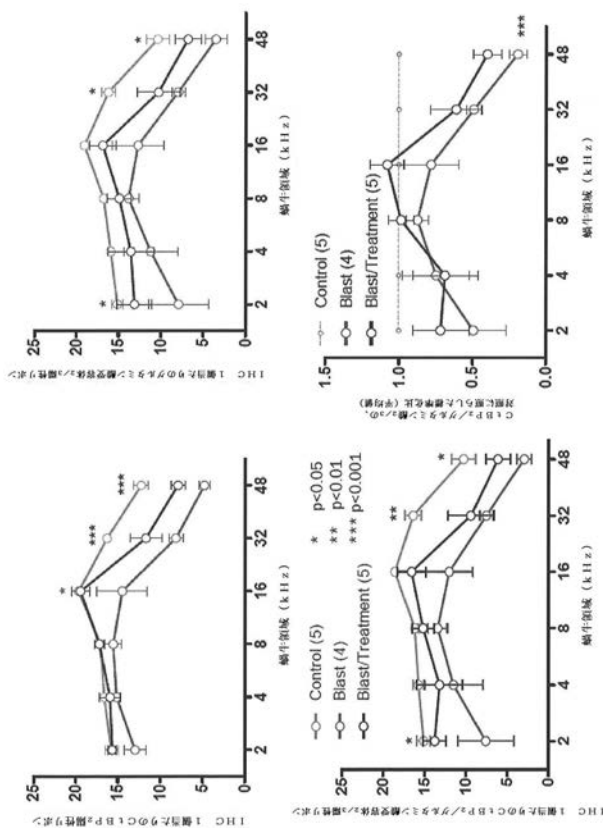
【図 27】



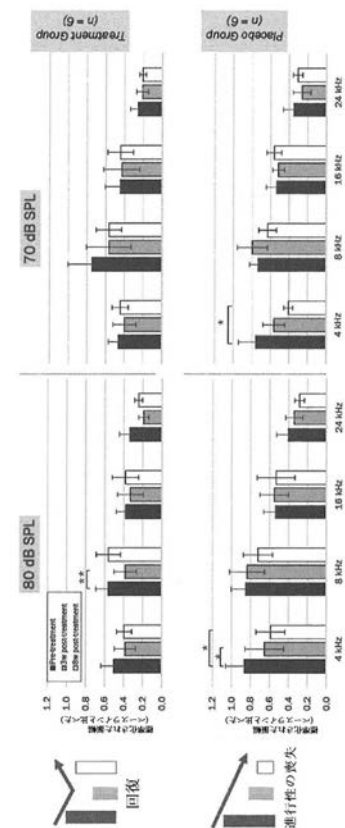
【図 28】



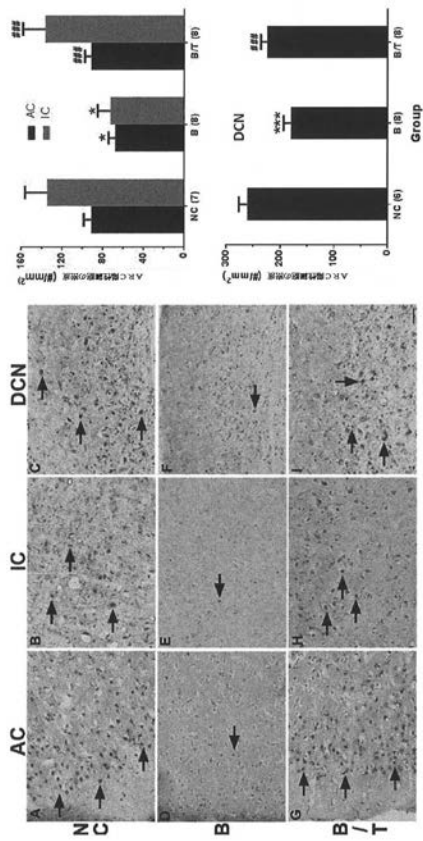
【図 29】



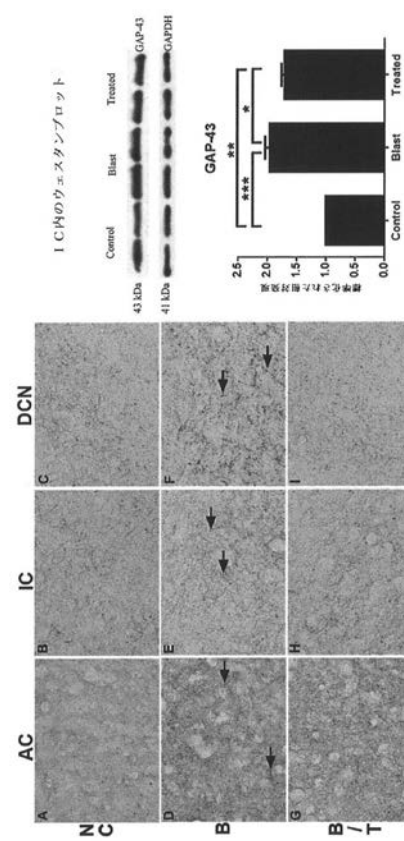
【図 30】



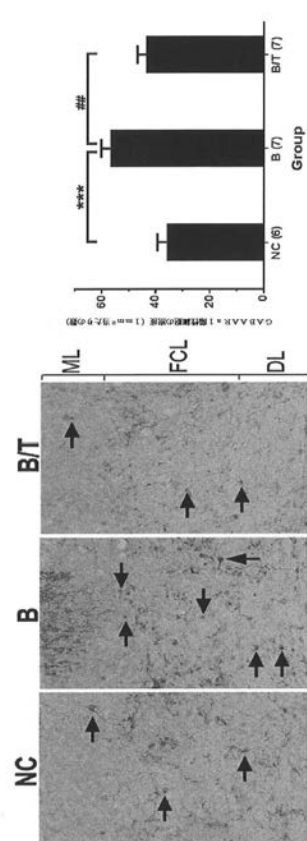
【図 35】



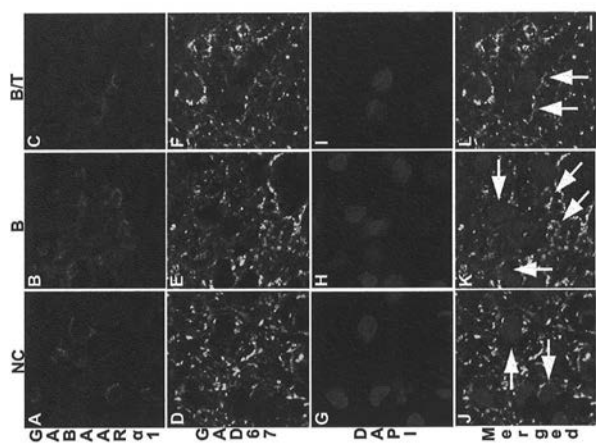
【図 36】



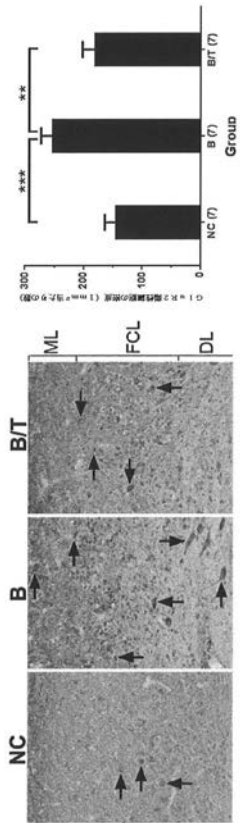
【図 37】



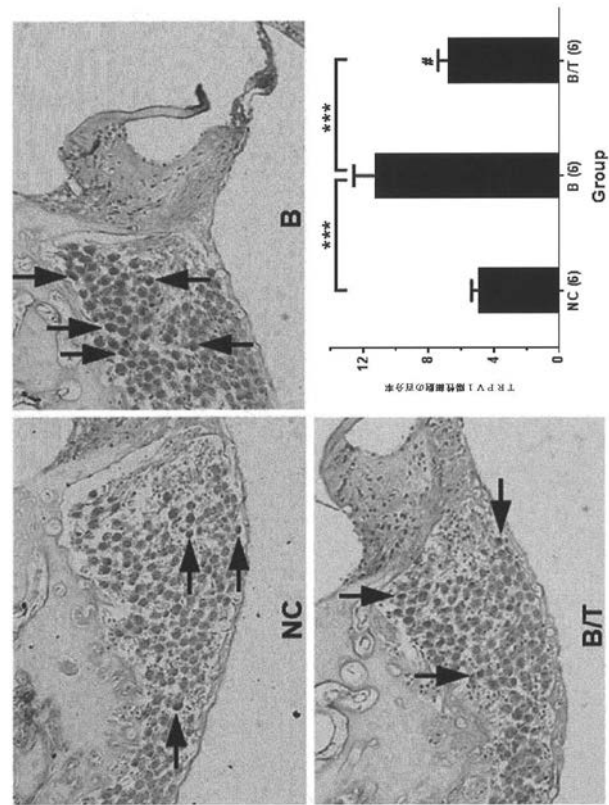
【図 38】



【図 39】



【図 40】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/58834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 31/15, 31/185; A61P 25/00; C07C 309/46 (2017.01)

CPC - A61K 31/15, 31/185; C07C 309/46

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	US 2016/0158173 A1 (HOUGH EAR INSTITUTE et al.) 9 June 2016; paragraphs [0003], [0006], [0030], [0039]-[0044], [0051], [0057]; claims 1, 5	1-6, 8-9, 17, 26, 28 — 7, 10-16, 18-22, 24-25, 27, 29-30 — 23
Y	US 2009/0306225 A1 (LICHTER, J et al.) 10 December 2009; paragraphs [0002], [0154], [0275], [0420], [0505], [0556], [0557], [0612], [0823], [0881]	7, 10-16, 18-19, 22, 27
Y	WO 2014/014828 A1 (CORNELL UNIVERSITY) 23 January 2014; paragraphs [0003], [0016], [0055]	20
Y	US 2002/0115706 A1 (YLIKOSKI, J et al.) 22 August 2002; paragraphs [0002], [0140]-[0042], [0127], [0137], [0764], [1170]-[1172]; Table 2	21, 24-25
Y	WO 2014/195322 A1 (ACTURUM LIFE SCIENCE AB) 11 December 2014; page 1, lines 15-19; page 2, lines 23-25	29

☒ 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 doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December 2017 (12.12.2017)

Date of mailing of the international search report

09 JAN 2018

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/58834

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2012/0070407 A1 (LAZDUNSKI, MMJ et al.) 22 March 2012; paragraphs [0003], [0117], [0166]	30 ----- 23
A	US 2015/0209367 A1 (MASSACHUSETTS EYE & EAR INFIRMARY) 30 July 2015; paragraph [0135]	23
A	GAO, SS et al.; Vibration of the organ of Corti within the cochlear apex in mice. Journal of Neurophysiology. 2014;112(5):1192-1204. doi:10.1152/jn.00306.2014; abstract; page 5	23

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	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	27/16
A 6 1 K	38/06	(2006.01)	A 6 1 K	38/06
A 6 1 K	38/07	(2006.01)	A 6 1 K	38/07
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/02 1 0 1
C 0 7 K	5/08	(2006.01)	C 0 7 K	5/08
C 0 7 K	5/037	(2006.01)	C 0 7 K	5/037

(31)優先権主張番号 62/510,596

(32)優先日 平成29年5月24日(2017.5.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/550,345

(32)優先日 平成29年8月25日(2017.8.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. W I N D O W S

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 コピケ, リチャード ディー.

アメリカ合衆国 7 3 1 5 1 オクラホマ州, オクラホマ シティ, クリーク メドー ドライヴ

1 0 3 0 1

(72)発明者 リー, ウェイ

アメリカ合衆国 7 3 0 1 2 オクラホマ州, エドモンド, ジュリーズ トレイル 2 7 0 1

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA08 BA09 BA14 BA16 BA23 BA44 DC31 MA02

MA52 MA57 MA66 ZA021 ZA211 ZA341 ZC521 ZC751

4C086 AA01 AA02 BC95 MA01 MA02 MA04 MA52 MA57 MA65 MA66

NA05 NA14 ZA02 ZA21 ZA34 ZC52 ZC75

4C206 AA01 AA02 FA59 JA09 JA27 JA28 JA59 MA01 MA02 MA04

MA72 MA77 MA86 ZA02 ZA21 ZA34 ZC52 ZC75

4H045 AA30 BA12 BA13 BA50 EA20