

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7611149号
(P7611149)

(45)発行日 令和7年1月9日(2025.1.9)

(24)登録日 令和6年12月25日(2024.12.25)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/04 (2006.01)	A 6 1 K	47/04
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	51/00 2 0 0
請求項の数 15 (全63頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-543970(P2021-543970)	(73)特許権者	520430088
(86)(22)出願日	令和1年9月30日(2019.9.30)		ユニバーシティ オブ ロチェスター
(65)公表番号	特表2022-508609(P2022-508609 A)		アメリカ合衆国, 1 4 6 4 2, ニューヨーク, ロチェスター, ボックス ユーアールヴィ, エルムウッド アベニュー 6 0 1
(43)公表日	令和4年1月19日(2022.1.19)	(74)代理人	110002077
(86)国際出願番号	PCT/US2019/053808		国田・小林弁理士法人
(87)国際公開番号	WO2020/072357	(72)発明者	ネダーガード, マイケン
(87)国際公開日	令和2年4月9日(2020.4.9)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 4 6 4 2, ロチェスター, エルムウッド アベニュー 6 0 1, ボックス 6 4 5, シー／オー ユニバーシティ オブ ロチェスター メディカル センター, デパートメント オブ ニューロサージェリー
審査請求日	令和4年5月31日(2022.5.31)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	62/741,295		
(32)優先日	平成30年10月4日(2018.10.4)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			

(54)【発明の名称】 血漿浸透圧を操作することによるグリNPパティク送達の改善

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象の中樞神経系間質、脳間質および／または脊髄間質への組成物の送達の改善における使用のための高張液であって、前記使用が、

- (1) グリNPパティク系の流入を増強すること；および
- (2) 前記組成物を大槽内または髄腔内に投与することにより、中樞神経系間質、脳間質および／または脊髄間質へ送達すること
- を含み、

グリNPパティク系の流入を増強することが、高張液を静脈内、動脈内、または腹腔内投与することにより、対象の血液中に送達することを含み、

高張液は、(i) NaClまたはマンニトールを含み、かつ(ii) 対象の血液に対して高張である、高張液。

【請求項2】

組成物は、画像化組成物または治療用組成物である、請求項1に記載の高張液。

【請求項3】

対象の神経障害の治療における使用のための高張液であって、前記使用が、

- (1) グリNPパティク系の流入を増強すること；および
- (2) 治療用組成物を大槽内または髄腔内に投与することにより、中樞神経系間質、脳間質および／または脊髄間質へ送達すること

を含み、

グリンパティック系の流入を増強することが、高張液を静脈内、動脈内、または腹腔内投与することにより、対象の血液中に送達することを含み、

高張液は、(i) NaCl またはマンニトールを含み、かつ (ii) 対象の血液に対して高張である、高張液。

【請求項 4】

高張液は、静脈内または腹腔内投与により送達される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の高張液。

【請求項 5】

組成物、画像化組成物、または治療用組成物が、髄腔内に投与される、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の高張液。

【請求項 6】

組成物、画像化組成物、または治療用組成物が、グリンパティック系の流入が増強されるのとはほぼ同時にまたはその後に投与される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の高張液。

【請求項 7】

組成物、画像化組成物、または治療用組成物が、小分子、ウイルス、大分子、ペプチド、抗体、核酸、またはそれらの生物学的に活性な断片を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の高張液。

【請求項 8】

組成物、画像化組成物、または治療用組成物が抗体を含む、請求項 7 に記載の高張液。

【請求項 9】

抗体が、血液脳関門を横切る輸送を促進するリガンドに結合している、請求項 8 に記載の高張液。

【請求項 10】

リガンドが、BBB 受容体に特異的に結合する、請求項 9 に記載の高張液。

【請求項 11】

抗体が抗 A β 抗体である、請求項 8 に記載の高張液。

【請求項 12】

対象が哺乳動物である、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の高張液。

【請求項 13】

哺乳動物がヒトまたは非ヒト霊長類である、請求項 12 に記載の高張液。

【請求項 14】

哺乳動物が治療を必要とする患者であり、患者が高齢者または高齢者であってもよい、請求項 12 に記載の高張液。

【請求項 15】

神経障害は、ニューロパチー、アミロイドーシス、癌、眼疾患または障害、ウイルスまたは微生物感染、炎症、虚血、神経変性疾患、発作、行動障害、およびリソソーム蓄積症からなる群から選択される、請求項 3 ～ 14 のいずれか一項に記載の高張液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 10 月 4 日に提出された米国仮出願第 62 / 741,295 号の優先権を主張する。本出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の利益

本発明は、国立衛生研究所によって授与された R01NS100366 および RF1AG057575 の下で、ならびに国防総省次官室によって授与された W81XWH-16-1-0555 の下で政府の支援を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を

10

20

30

40

50

有する。

【0003】

本発明は、中枢神経系への薬剤の送達を改善することに関する。

【背景技術】

【0004】

中枢神経系（CNS）疾患を治療するために、様々な治療薬が開発されてきた。しかしながら、脳への治療薬の送達は、大部分が不透過性である血液脳関門（BBB）によって、また治療薬の脳への浸透性が低いため、非常に限られている。CNSへの薬物送達を改善することは、特に免疫療法の状況において重要な臨床的課題である（4、19、55）。例えば、モノクローナル抗体（mAb）に基づく療法が、アルツハイマー病（AD）（1）、パーキンソン病（2）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）（3）、前頭側頭葉型認知症（FTLD）（4）、およびCNS腫瘍（5）等のCNS疾患のために現在開発中である。しかし、有望な前臨床結果にもかかわらず、臨床試験はさほど芳しくなく、有害事象に悩まされてきた（8-10）。これは、治療用mAbの脳への浸透性が低く、その結果としてターゲットエンゲージメントが十分でないことを反映している可能性がある（11）。抗Aβ免疫療法が脳の深部脳構造に位置するプラークに結合できないことは、これらの療法が日常的なAD治療に結びつかない一因であり得る（4、12）。脳脊髄液（CSF）への直接注入に関連する侵襲性および高度な合併症のために、治療用抗体は最も一般的には静脈内注入によって投与される（13-15）。しかしながら、循環抗体はBBBの浸透性が低く、脳に進入するのはわずか0.1~0.2%である（16）。その結果、治療用抗体は、末梢組織における標的抗原の適切な結合を達成するために必要な濃度より1000倍高い用量で投与されることが多く（1、17）、臨床試験におけるこれらの高用量は、アミロイド関連画像異常（ARIA）等（19、20）の有害事象の罹患率を増加させる（1、9、18）。したがって、CNSへの治療薬の改善された送達の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、CNSへの組成物の送達を改善するための方法を提供することによってこの必要性に対応する。

【0006】

一態様において、本発明は、対象の中枢神経系間質、脳間質および／または脊髄間質への組成物の送達を改善するための方法を提供する。この方法は、（1）グリンパティック系の流入を増強することと、（2）中枢神経系間質、脳間質および／または脊髄間質に組成物を送達することとを含む。グリンパティック系の流入を増強するステップは、いくつかの方法で行われ得る例えば、このステップは、中枢神経系間質を通して流体をポンピングすること、または対象に薬剤を投与することを含み得る。

【0007】

薬剤は高張液であり得る。一例では、高張液は、対象の血液または血漿に投与される。高張液は、NaClまたはマンニトールを含むことができる。他の例では、薬剤は、Stat-3阻害剤、骨形成タンパク質（BMP）シグナル伝達の軸分子、AVP（バソプレシン）のアンタゴニスト、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）のアンタゴニスト、アンジオテンシンIIのアンタゴニスト、AT2R受容体のアンタゴニスト、またはAT1受容体のアンタゴニストを含み得る。

【0008】

組成物は、大槽内または髄腔内等の任意の好適な方法で送達することができる。組成物は、グリンパティック系の流入が増強されるのとほぼ同時にまたはその後またはその前に送達することができる。組成物は、画像化組成物または治療用組成物であり得る。組成物は、小分子、ウイルス、大分子、ペプチド、抗体、核酸（例えば、アンチセンス分子およびRNAi剤）、またはそれらの生物学的に活性な断片を含み得る。一例では、治療用組成物は抗体を含む。抗体は、血液脳関門（別名「BBB」）を横切る輸送を促進するリ

ガンドに結合させることができる。例えば、リガンドは、BBB受容体（トランスフェリン受容体、IGF-R、LDL-R、LRP1、LRP2、およびLRP8等）に特異的に結合することができる。

【0009】

別の態様において、本発明は、対象における神経障害を治療するための方法を提供する。障害の例として、ニューロパチー、アミロイドーシス、癌、眼疾患または障害、ウイルスまたは微生物感染、炎症、虚血、神経変性疾患、発作、行動障害、およびリソソーム蓄積症が挙げられる。この方法は、(1) グリンパティック系の流入を増強することと、(2) 中枢神経系間質、脳間質および／または脊髄間質に治療用組成物を送達することを含む。上述のように、グリンパティック系の流入を増強するステップは、いくつかの方法で行われ得る。一例では、このステップは、中枢神経系間質を通して流体をポンピングすることを含む。別の例では、グリンパティック系の流入を増強するステップは、対象に薬剤を投与することを含む。

【0010】

薬剤は高張液であり得る。一例では、高張液は、対象の血液または血漿に投与される。高張液は、NaClまたはマンニトールを含むことができる。他の例では、薬剤は、Stat-3阻害剤、BMPシグナル伝達の軸分子、AVP（バソプレシン）のアンタゴニスト、ANPのアンタゴニスト、アンジオテンシンIIのアンタゴニスト、AT2R受容体のアンタゴニスト、またはAT1受容体のアンタゴニストを含み得る。

【0011】

組成物は、大槽内または髄腔内等の任意の好適な方法で送達することができる。組成物は、グリンパティック系の流入が増強されるのとほぼ同時にまたはその後またはその前に送達することができる。組成物は、小分子、ウイルス、大分子、ペプチド、抗体、核酸（例えば、アンチセンス分子およびRNAi剤）、またはそれらの生物学的に活性な断片を含み得る。一例では、治療用組成物は抗体を含む。抗体は、血液脳関門を横切る輸送を促進するリガンドに結合させることができる。例えば、リガンドは、トランスフェリン受容体、IGF-R、LDL-R、LRP1、LRP2、およびLRP8等のBBB受容体に特異的に結合することができる。

【0012】

抗体は抗Aβ抗体であり得る。対象は、ヒトまたは非ヒト霊長類等の哺乳動物であり得る。一実施形態において、哺乳動物は、高齢者または高齢者等の治療を必要とする患者である。

【0013】

さらに別の態様において、本発明は、対象のCNSへの組成物（例えば、画像化組成物または治療用組成物）の送達を改善するためのキットを特徴とする。キットは、組成物と、グリンパティック系の流入を増強する薬剤とを含む。薬剤は、NaClまたはマンニトールを含む高張液等の高張液であり得る。薬剤は、Stat-3阻害剤、BMPシグナル伝達の軸分子、AVP（バソプレシン）のアンタゴニスト、ANPのアンタゴニスト、アンジオテンシンIIのアンタゴニスト、AT2R受容体のアンタゴニスト、またはAT1受容体のアンタゴニストであり得る。組成物は、小分子、ウイルス、高分子、ペプチド、抗体、核酸、またはそれらの生物学的に活性な断片を含み得る。抗体は、血液脳関門を横切る輸送を促進するリガンドに結合させることができる。抗体の例は抗Aβ抗体である。

【0014】

さらなる態様において、本発明は、経頭蓋マクロスコピックイメージング法を提供する。この方法は、対象の中枢神経系に有効量の造影剤を導入することと、対象の脳を画像化することを含む。造影剤は、大槽内または髄腔内に導入することができる。好ましい実施形態において、造影剤はフルオロフォアを含み、画像化のステップは蛍光マクロスコピーを含む。いくつかの例では、フルオロフォアは、励起されると赤外領域（例えば、近赤外領域、中赤外領域、または遠赤外領域）の光を再放出する。

【0015】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、以下の明細書に記載される。本発明の他の特徴、目的、および利点は、明細書および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A-1I】CSF流入のインビボ経頭蓋全脳イメージングを示す一連の図および写真である。(A)．マクロスコープを使用して、無傷の頭蓋骨を通してマウスを画像化した。(B) 蛍光タンパク質トレーサー(BSA-647nm)を大槽内に送達し(2μL/分、5分)、注入開始から30分間トレーサーの流入を画像化した。大槽内注入の開始時に、全てのマウスに等張食塩水を腹腔内投与した。(C) 麻酔した(KX)および覚醒した野生型マウス、ならびに麻酔したAqp4^{-/-}マウス(KX-Aqp4^{-/-})におけるトレーサー注入後の最初の30分間にわたるCSF流入の代表的なタイムラプス画像。画像(8ビットのピクセル深度)は、任意単位(A.U.)でピクセル強度(PI)を表すために色分けされている。スケールバー=2mm。注入後早くも5分で、背側皮質表面から約5~6mm下の脳の基部で蛍光が検出された。(D) (c)に示される30分間のインビボイメージングシリーズの平均ピクセル強度(MPI)の定量化(平均±SEM; n=5~7マウス/群; 反復測定二元配置分散分析、シダックの多重比較検定; *P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001対KX)。(E) イメージングセッションにわたるCSFトレーサー流入の代表的なフロントトラッキング分析。フロントは分単位で時間符号化されている。(F) 分析(e)からの経時的な流入領域の定量化(平均±SEM; n=5~7マウス/群; 反復測定二元配置分散分析、シダックの多重比較検定; ****P<0.0001 KX対覚醒およびKX-Aqp4^{-/-})。(G) (c)および(e)の群データから生成された平均流入速度マップ(μm/分)。(H) KXおよび覚醒した野生型、ならびにKXで麻酔したAqp4^{-/-}群における、頭蓋骨から取り外した時(左下; スケールバー=2mm)、および皮質表面への深いトレーサー浸透度を評価するために冠状切片を作製した後(上; スケールバー=1mm)の、脳の代表的な従来のエキスビボ蛍光画像。血管周囲トレーサーの高倍率画像は、レーザー走査型共焦点顕微鏡を使用して取得した(右下; スケールバー=50μm)。(I) KXおよび覚醒野生型、ならびにKXで麻酔したAqp4^{-/-}群のエキスビボ冠状断の蛍光MPIの定量化(平均±SEM; n=3~8マウス/群; 一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; *P<0.05、**P<0.01)。

【図2A-2J】麻酔したマウスにおいて、血漿高浸透圧がCSF流入を増加させたことを示す一連の図および写真である。(A) 蛍光BSA-647を、麻酔したマウスの大槽(CM)内に送達した。CM注入の開始時に、等張食塩水(KX)、高張食塩水(+HTS)、または高張マンニトール(+マンニトール)のいずれかをマウスに腹腔内投与した。(B) KX、+HTS、および+マンニトール群におけるCM注入直後の30分間にわたるBSA-647流入の代表的なタイムラプス画像。画像(8ビットのピクセル深度)は、任意単位(A.U.)でピクセル強度(PI)を表すために色分けされている。スケールバー=2mm。(C) 全ての群のイメージングセッションにわたるCSFトレーサー流入の代表的なフロントトラッキング分析。フロントは分単位で時間符号化されている。

(D) 経時的な流入領域の定量化(平均±SEM; n=6~7マウス/群; 反復測定二元配置分散分析、シダックの多重比較検定; ****P<0.0001 KX対+HTSおよび+マンニトール)。全ての群の(E) トレーサー流入速度マップ(μm/分)および(F) 平均流入速度の定量化(平均±SEM; n=6マウス/群; 一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; *P<0.05、***P=0.001)。(G) 全ての群からの、頭蓋骨から取り外した時の無傷の脳(左下; スケールバー=2mm)、および冠状切片を作製した後(上; スケールバー=1mm)の代表的な従来のエキスビボ蛍光画像。冠状断を高出力共焦点レーザー走査顕微鏡で画像化して、血管周囲トレーサーを評価した(右下; スケールバー=50μm)。(H) エクスビボ冠状断の蛍光MPIの定量化(平均±SEM; n=5~7マウス/群; 一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; **P<0.01、***P=0.003)。3つの群全てにおけるCSF送達(I) ³H-デキ

10

20

30

40

50

ストラン (40 kDa) または (J) ^{14}C -イヌリン (6 kDa) の総脳取り込み (平均 $\pm$ SEM; $n=5$ マウス/群; 一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; $**P=0.001$ 、 $***P=0.0009$ 、 $****P<0.0001$)。注入された用量のパーセント (%ID) として表す。図1と同じKX群。

【図3A-3H】血漿高浸透圧がグリンパティック機能の覚醒状態 (arousal state) の阻害を無効にしたことを示す一連の図および写真である。(A) ヘッドプレートで固定された、覚醒しているマウスに、大槽内BSA-647を投与した。大槽 (CM) 注入の開始時に、等張食塩水 (覚醒)、高張食塩水 (+HTS)、または高張マンニトール (+マンニトール) のいずれかをマウスに腹腔内投与した。(B) 覚醒、+HTS、および+マンニトール群におけるCM注入直後の30分間にわたるBSA-647流入の代表的なタイムラプス画像。画像 (8ビットのピクセル深度) は、任意単位 (A.U.) でピクセル強度 (PI) を表すために色分けされている。スケールバー=2 mm。背側皮質表面から約5~6 mm下の脳の基部で最初に蛍光が検出された。(C) 全ての群のイメージングセッションにわたるCSFトレーサー流入の代表的なフロントトラッキング分析。フロントは分単位で時間符号化されている。(D) 経時的な流入領域の定量化 (平均 $\pm$ SEM; $n=5\sim7$ マウス/群; 反復測定二元配置分散分析、シダックの多重比較検定; $****P<0.0001$ 覚醒対+HTSおよび+マンニトール)。全ての群の (E) トレーサー流入速度マップ ($\mu\text{m}/\text{分}$) および (F) 平均流入速度の定量化 (平均 $\pm$ SEM; $n=5\sim7$ マウス/群; 一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; $**P=0.0024$ 、 $***P=0.0003$)。(G) 全ての群からの代表的なエキスピボ冠状断 (スケールバー=1 mm)。(H) エクスピボ冠状断の蛍光MPIの定量化 (平均 $\pm$ SEM; $n=5\sim6$ マウス/群; 一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; $**P=0.0063$ 、 $***P=0.003$)。図1と同じ覚醒群。

【図4A-4K】血漿高浸透圧が生後6ヶ月のAPP/PS1マウスにおいてA β 抗体の送達を改善し、ターゲットエンゲージメントを増強したことを示す一連の図および写真である。(A) (B) アミロイドプラークは24時間前にメトキシ-X04 (MeX04) で標識した。次に、マウスを麻酔し、蛍光抗A β 抗体を大槽内に注入した。大槽内注入の開始時に、等張食塩水 (対照) または高張食塩水 (+HTS) のいずれかをマウスに腹腔内投与した。120分後、マウスを蛍光レクチンで灌流固定して血管系を標識した。(C) 頭蓋骨から取り外した時 (左下; スケールバー=2 mm) の無傷の脳、および脳への抗体浸透度を評価するために冠状切片を作製した後 (上; スケールバー=500 μm) の代表的なエキスピボ画像。貫通動脈の血管周囲腔を取り囲む抗体およびA β プラーク (矢印) の共焦点画像 (右下; スケールバー=100 μm)。(D) エクスピボ冠状断のA β 抗体蛍光MPIの定量化 (平均 $\pm$ SEM; $n=5$ マウス/群; 対応のない両側t検定; $**P=0.0039$)。(E) 血管周囲のA β プラークの代表的な高倍率共焦点画像 (スケールバー=20 μm)。(F) MeX04+A β プラークを用いた抗体の共標識によって示されるターゲットエンゲージメントの割合 (平均 $\pm$ SEM; $n=5$ マウス/群; 対応のないt検定; $**P=0.005$)。(G) 最も近い血管周囲腔 (PVS) からの共標識プラークの平均距離の最近傍分析 (μm) (平均 $\pm$ SEM; 共標識プラークの総数/群内のマウスの数; 対応のないt検定; $****P<0.0001$)。(H) 共標識されたプラークの数と最も近いPVSからの距離のヒストグラムおよび累積頻度のプロット。(I) プラークの表面に結合する抗A β 抗体を示す直交図を伴う代表的な高倍率共焦点画像 (矢印)。スケールバー=20 μm 。(J) プラーク表面を標的として結合する抗体を示す+HTS処理マウスからのA β プラークの3次元再構築 (両方のスケールバー=20 μm)。(K) プラーク負荷は群間で同じであった (平均 $\pm$ SEM; $n=5$ マウス/群; 対応のないt検定; $P=0.6165$)。

【図5A-5B】経頭蓋マクロスコピックイメージングシステムを示す一連の図および写真である。(A) 光学模式図。このシステムは、最大16の異なる波長を個別に制御できる調整可能なLED照明システムを使用する。647 nmフルオロフォアの励起は、635 nmの波長を使用して達成された。イメージングソフトウェアは、波長間の迅速な切り

10

20

30

40

50

替えを制御し、クアッドフィルターキューブと組み合わせると、フィルターターレットを回転させる必要なく高速4チャンネルイメージング(約100Hz)を可能にする。マクロスコープは4~40倍の総倍率を有し、0.63倍の対物レンズによって、この試験に使用される倍率で約11.7mmの視野(F.O.V.)で、長い作業距離(W.D.)および高い開口数(N.A.)が可能となる。この設定では、13.312×13.312mmの有効面積および2048×2048ピクセルのフル解像度を有する科学的CMOSカメラを使用して、高速画像取得(100フレーム/秒)を可能にする。このシステムは、デュアルCSFトレーサー試験用の同時2チャンネルアプリケーション用の画像分割光学系と互換性がある。(B)マクロスコピックイメージングシステムの写真。

【図6A-6G】画像の浸透深度分析を示す一連の図および写真である。(A)Alexa Fluor 647(BSA)に結合したウシ血清アルブミンを人工CSF(aCSF)中で10~1×10⁻⁴mg/mLに段階希釈した。10μLの液滴を96ウェルプレートに等分し、インビボ実験で使用したのと同じ倍率および露光時間を使用して、635nmの波長で、マクロスコープで画像化した。画像は、0~255の任意単位(A.U.)でピクセル強度(PI)ごとに色分けされている(スケールバー=2mm)。(B)平均ピクセル強度(MPI)は、10μLの液滴ごとに計算し、トレーサー濃度の関数としてプロットした。データは、可変勾配のシグモイド関数に適合させた。インビボ実験の範囲内にあるトレーサーの最適な希釈は0.1mg/mLであった。(C)寒天に埋め込まれたBSA-647を充填したキャピラリー上に配置された、厚さが増加する急性冠状切片を示す実験設定の概略図。(D)焦点面における蛍光キャピラリーの代表的なPIの色分けされた画像:組織なし(0μm)、キャピラリーの上に配置された厚さ500μmおよび厚さ1,000μmの冠状切片(スケールバー=2mm)。(E)200~4000μmの厚さが増加する冠状切片を通して取得されたキャピラリーを中心とした6000μmラインスキャンからの生PI。(F)(E)の生データのガウスフィットは、4,000μm(R²=0.55)を除いて全てに良好な一致を示した(R²>0.924)。(G)関心領域を冠状切片の周囲内のキャピラリー上に描き、MPIを測定し、深さの関数としてプロットした。データは、一相指数関数的減衰関数(R²=0.96)を使用して適合させ、(F)の結果と一致して、蛍光シグナルが組織の厚さ1~2mm間でプラトーになることを示している。

【図7A-7G】インビボ経頭蓋イメージングが、全ての時点で背側皮質へのトレーサー輸送およびエクスピボ定量化と相関していたことを示す一連の図および写真である。麻酔したマウスに、インビボイメージング中にBSA-647(BSA)の大槽(CM)注入を行い、脳を抽出し、注入開始後5~30分の間に5分間隔で固定した(n=3マウス/6時点)。(A)矢状および冠状投影におけるCM注入後の時間の関数として色分けされたトレーサー輸送。(B)CM注入後5、15、および30分の時点の冠状断であり、トレーサーが外側皮質湾曲に沿って脳の基部から輸送され、後者の時点で背側凸面に到達したことを示している(スケールバー=2mm)。(C)経頭蓋インビボイメージングからの最後のフレームの平均ピクセル強度(MPI)は、6つ全ての時点でわたって同じ脳からの6つの冠状断のMPIと相関していた(ピアソン相関、P=0.0003)。(D)インビボおよびエクスピボの両方で定量化して、両方のデータセットが一相指数関数的減衰関数との良好な一致を示す場合、MPIは同様の動態を有する(インビボ:R²=0.838、エクスピボ:R²=0.834)。(E)トレーサーの深さを推定するために、任意単位(A.U.)のMPIを、全ての時点で背側皮質から開始して1mm ROIで定量化した。トレーサーの存在は、バックグラウンド(破線)より2標準偏差高いMPI値として決定した。(F)大槽内注入の開始後の背側皮質の下のトレーサーの推定距離。エラーバーは、1mm幅の関心領域を反映している。データは、一相指数関数的減衰にも適合させた(R²=0.976)。(G)(D)および(F)からのインビボ、エクスピボ、およびトレーサーの深さを、それぞれ、Zスコア変換し、一相指数関数的減衰関数に適合させた。追加の二乗和F検定により、3つのデータセット全てが単一のグローバルモデルに適合し、有意差はないと結論付けられ(P=0.288;R²=0.913)、こ

10

20

30

40

50

れは、経頭蓋光学イメージングにおけるM P Iの増加が、脳の基部から背側皮質に向かって移動するトレーサーと相関していることを示唆している。データは、トレーサーの大部分が皮質表面から5～6 mm下にある場合、C M注入後早くも5分で蛍光が検出されることを示しており、最終的なエキスピボ法に匹敵する全脳トレーサーの定量化に高い感度を提供するものである。

【図8 A－8 G】経頭蓋イメージングで見られるC S Fトレーサー流入が、動脈周囲の血管周囲腔に沿って発生し、以前のインビボイメージングモダリティ同様の動態を示したことを示す一連の図および写真である。(A)大槽内注入後の両方の中大脳動脈(M C A)の分布に沿った脳全体のC S Fトレーサー(B S A－6 4 7)の流入を示す典型的な実験からのマクロスコピックイメージ(スケールバー＝2 mm)。(B)C S F流入が発生する解剖学的経路を評価するために、血管系を標識するためのB S A－T e x a s R e d (T x R d)の大槽内注入およびF I T Cデキストランの静注後、二光子レーザー走査顕微鏡を使用して頭蓋窓から別の群のマウスを画像化した。(スケールバー＝5 0 μm)。硬膜は無傷の状態に残し、頭蓋内圧の損失を防ぐために、頭蓋窓をアガロースおよびカバースリップで密封した。イメージングは、硬膜の血管の下で、M C Aの両側の2つの血管周囲腔(P V S)に沿って流れるトレーサーを示した(矢印)。(C)(A)の挿入図からの拡大画像は、M C Aの左後分岐部の両側にあるC S Fトレーサーを示している(スケールバー＝5 0 0 μm)。(D)(C)の黒い線からのラインスキャンは、M C Aの両側に任意単位(A . U .)の高いピクセル強度(P I)を示し、動脈全体の蛍光が減少していることを示している。(D)で測定された空間の幅は、(B)で見られたものに匹敵する。(E)(B)の青い線からの直交再構成は、C S Fトレーサーがくも膜下腔内ではなく、M C A周辺の軟膜下P V Sに限定されていることを示している(S A S；スケールバー＝5 0 μm)。(F)パーセントとして表されるイメージングセッションの最大蛍光強度($\Delta F / F_{MAX}$)に正規化された、M C Aに沿った3つの血管周囲関心領域の平均からの定量化。血管の標識チャンネルからのブリードスルーにより、2－Pではより高いベースラインバックグラウンド蛍光が見られる。(G)大槽内注入の開始後のトレーサー出現までの時間。(平均±S E M；n＝4～5マウス／群；n s：有意ではない；対応のないt検定；P＝0.8761)。

【図9】C S F流入経路の経頭蓋マクロスコピックイメージングを示す一連の写真である。大槽内にトレーサーが送達した後、無傷の頭蓋骨を通していくつかの頭蓋内構造を特定することが可能である(破線)。(上パネル)麻酔したマウスでは、嗅覚洞、上矢状静脈洞、および左右の横行静脈洞等の髄膜構造が観察される(青)。前に示したように、トレーサーは、嗅覚前頭槽(o l f a c t o f r o n t a l c i s t e r n)(紫)および松果体陥凹(緑)の周りのように、脳を取り囲むくも膜下C S Fの大きなプールで最初に見られる。トレーサーの脳への取り込みは、特に中大脳動脈の前部および背部皮質セグメントの分布に続いて、軟膜動脈(赤)の血管周囲腔内で発生し、その後、貫通動脈に沿ってさらに脳内へと続く。最終的に、トレーサーは、皮質の架橋静脈の静脈周囲腔および髄膜洞の周囲に見ることができる。(下パネル)覚醒したマウスでは、最も前部および後部の構造のいくつかはヘッドプレートで覆われているが、全ての軟膜血管周囲腔は容易に特定できる。この手法は、ヘッドプレートの端に見られるように、透明な歯科用セメントを通るトレーサーの流動を特定することが依然として可能であるため、長期イメージングにも使用することができる。

【図10】無傷の頭蓋骨を介して画像化されたC S Fトレーサーの流入経路がエキスピボ脳でも見つかったことを示す一連の写真である。(中央)大槽内注入の30分後の、麻酔したマウスからのエキスピボ全脳イメージング(スケールバー＝2 mm)。(左)左皮質表面(紺色)からの高倍率の挿入図は、C S Fトレーサーが前中大脳動脈(a M C A)および後部M C A(p M C A)の分岐部に沿って見られ、赤でトレースされていることを示している(スケールバー＝1 mm)。(右)右皮質(水色)からの挿入図は、トレーサーの流入がa M C Aおよびp M C Aの同じセグメントに沿って発生することを示している(赤いトレース；スケールバー＝1 mm)。

【図11A-11E】血漿高浸透圧の誘発を示す表および一連の図である。(A) 試験を通して使用された溶液の組成および用量。(B) 血漿の張度が変化する溶液の測定された浸透圧。(C) 麻酔(KX)および覚醒状態(awake condition)の両方の対照、+HTS、および+マンニトール群における腹腔内注入の30分後の血漿浸透圧(平均±SEM; n=5~15マウス/群; 通常の二元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; *P=0.0151、***P=0.0001、****P<0.0001)。(D) 腹腔内注入の30分後の血漿Na⁺([Na⁺] 血漿)および(E) Cl⁻([Cl⁻] 血漿)濃度。+HTS群における高い[Na⁺] 血漿および[Cl⁻] 血漿は、(c)に見られる高浸透圧を説明する。マンニトール誘導性の血漿高浸透圧は、[Na⁺] 血漿および[Cl⁻] 血漿に影響を与えず、上昇浸透圧ギャップによってもたらされる。(平均±SEM; n=5マウス/群; 通常の二元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; ***P<0.0001、****P<0.0001)。

10

【図12A-12C】血漿の張度の操作が血液脳関門を破壊しなかったことを示す一連の図および写真である。(A) 麻酔した動物における等張食塩水(KX)、高張食塩水(+HTS)、および高張マンニトール(+マンニトール)溶液の腹腔内投与の30分後のFITC-デキストラン(1% m/v、70 kDa) 血管外漏出の代表的なエキスピボ冠状断像。陽性対照には頸動脈内2Mマンニトール(+ICマンニトール)を投与した。(スケールバー=1 mm)。(B) (A)に示した6つの冠状断からの面積パーセントとして表される閾値蛍光の定量化により、実験群間で血管外漏出したFITC-デキストランの有意な増加は見られなかったが、実験群と陽性対照との間で有意差を示したことが明らかになった(平均±SEM; n=5~6マウス/群; 一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定、ns: 有意ではない、P>0.999; ***P<0.0002)。(C) FITC-デキストランの血漿濃度を分光光度法で評価したところ、いずれの実験群間にも有意差は見られなかったが、陽性対照群ではデキストランの血管外漏出の増加を示したことが明らかになった(平均±SEM; n=5~6マウス/群; 一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定、*P=0.0426)。

20

【図13A-13B】血漿高浸透圧がAqp4^{-/-}マウスのグリンパティック阻害を無効にしたことを示す一連の写真および図である。蛍光BSA-647を、麻酔したAqp4^{-/-}マウスの大槽(CM)に送達した。CM注入の開始時に高張食塩水(Aqp4^{-/-}+HTS)または高張マンニトール(Aqp4^{-/-}+マンニトール)のいずれかをマウスに腹腔内投与した。(A) Aqp4^{-/-}+HTS群およびAqp4^{-/-}+マンニトール群におけるCM注入直後の30分間にわたるBSA-647流入の代表的なタイムラプス画像。画像(8ビットのピクセル深度、0~255)は、任意単位(A.U.)でピクセル強度(PI)を表すために色分けされている。スケールバー=2 mm。(B) 図2の野生型群と比較した経時的な平均ピクセル強度(MPI)の定量化(WT+HTS、WT+マンニトール; 平均±SEM; n=3~5マウス/群; 反復測定二元配置分散分析、シダックの多重比較検定; 群効果: P=0.1029; ns: 有意ではない)。

30

【図14A-14D】インビボ経頭蓋イメージングが、蛍光および放射性標識トレーサーのエキスピボ定量化と相関していたことを示す一連の図および写真である。(A) インビボイメージングの30分後に取得した画像を、フロントトラッキングソフトウェア(緑)を使用して、平均ピクセル強度(MPI; 紫)および流入領域について分析した。マウスを固定し、マクロスコープを使用して同じ脳から背側全脳(青)および冠状断(赤)の画像を取得した。(B) 全ての結果についてZスコアを計算し、そのデータから多重線形回帰モデルを生成し、95%信頼区間でプロットした。全てのメトリックは、有意な正の線形関係を示し、エキスピボ冠状断と強く相関していた(全脳: R²=0.8473; インビボMPI: R²=0.7354; インビボ流入領域: R²=0.8355)。3つの回帰全ての傾きには、互いに有意差はなかった(P=0.8209)。(C) エキスピボ冠状断および(D) インビボイメージング(流入領域)からの蛍光トレーサーの定量化も、予測因子として血漿浸透圧を使用した2つの別々の放射性トレーサー、³H-デキストラン(40 kDa)および¹⁴C-イヌリン(6 kDa)の定量化と緊密に相関していた:

40

50

(冠状断: $R^2 = 0.589$; インビボ: $R^2 = 0.8072$; ^3H -デキストラン: $R^2 = 0.6832$; ^{14}C -イヌリン: $R^2 = 0.6973$)。全ての回帰の全体的な傾きに有意差はなかった ($P > 0.05$)。

【図15A-15D】血漿高浸透圧が、平均動脈圧または脳血流量を変化させることなく、頭蓋内圧および間質液量の減少を引き起こしたことを示す一連の図である。(A) 麻酔したマウス(KX)の大腿動脈の平均動脈圧(MAP)を、等張食塩水(対照)、高張食塩水(+HTS)、および高張マンニトール溶液(+マンニトール)の腹腔内注入の5分前から開始して、30分間mmHgで記録した(平均±SEM、 $n = 4 \sim 5$ マウス/群; 反復測定二元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; $**P < 0.01$ 、色分けされたアスタリスクは、異なる時点でのKXと+HTSまたはKXと+マンニトールの違いを示す)。(B) 相対的脳血流量(rCBF; 圧力単位、p.U.)を、レーザードップラー流速計を使用して測定した(平均±SEM; $n = 3 \sim 5$ マウス/群; 反復測定二元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; $**P < 0.01$ 、色分けされたアスタリスクは、異なる時点でのKXと+マンニトールの違いを示す)。(C) 0分での腹腔内注入の5分前および30分後の頭蓋内圧(ICP)の記録(平均±SEM; $n = 4 \sim 5$ マウス/群; 反復測定二元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; $****P < 0.0001$)。(D) 対照群および高張群における腹腔内注入後30分の脳水分量(平均±SEM; $n = 4 \sim 10$ マウス/群; 通常二元配置分散分析、テューキーの多重比較検定; $****P = 0.0001$ 、 $****P < 0.0001$)。

【図16】等張および高張条件下での血漿、脳、およびCSFの間の関係の3コンパートメントモデルを示す一連の図である。等張血漿の状況では、間質液量(V_{ISF} ; 脳水分量、BWC)または圧力(P_{ISF} ; 頭蓋内圧、ICP)に変化はなく、その結果、グリンパティックの流れの正味方向または大きさに変化はない。高張条件では、血漿のオスモライト含有量が増加すると、ISFの正味の再吸収が起こり、ISFの量が減少し、脳内へのCSFの流入を増強する負のISF圧が発生する。

【図17】等張および高張条件下での経頭蓋光学イメージング、ならびにCSF内へのA β 抗体送達(左パネル)およびCSFトレーサーとA β 抗体(右パネル)を示す一連の図および写真である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

CNS疾患に対する免疫療法の初期に見られた明るい見通しにもかかわらず、最近の複数の臨床試験は失敗に終わっている。これは、一つには、脳脊髄液(CSF)および脳実質に対する抗体の浸透性が特徴的に低く、ターゲットエンゲージメントが不十分であることに起因し得る。治療用抗体および他の薬剤のCNSへの送達を改善する必要がある。

【0018】

本発明は、新規の経頭蓋マクロスコピックイメージングを利用して、CSF蛍光トレーサーのインビボ送達経路を非侵襲的に評価することを開示する。CSF中のトレーサーは、グリンパティック系という名称の、動脈周囲腔の脳全体のネットワークを介して分布していることが証明された。予期せぬことに、血漿浸透圧を増加させることにより、血液脳関門を破壊することなく、CSFトレーサーの進入を実質的に増強することができるが見出された。さらに、アルツハイマー病のマウスモデルにおいて、血漿高浸透圧が、覚醒状態を特徴付けるグリンパティック輸送の阻害を無効にし、グリンパティック抑制を逆転させたことは予想外であった。本明細書に開示されるように、血漿高浸透圧は、アミロイド β (A β)抗体の送達を増強し、A β ブラークに結合する抗体の5倍の増加を得た。したがって、グリンパティック活動の操作は、CNSに対する抗体等の治療薬の浸透性を改善するための新規戦略を表す。

【0019】

バルクフロー経路は、脳へのCSF循環のために、軟膜および貫通動脈を取り囲む血管周囲腔(PVS)に沿って存在する(21-25)。抗体はCNSの細胞外空間で限られた拡散輸送を示すが(26、27)、血管周囲および実質の対流を利用することで、脳へ

の送達を増強することができる。溶質クリアランスにおけるその役割と、グリアの水チャネルであるアクアポリン-4 (AQP4) (21) への依存性からグリンパティック系と称されるこのバルクフロー経路は、CNSへの薬物送達の理想的な機構を意味する。グリンパティック系内の高速の対流流体の流れは、高分子量の溶質を効果的に送達するが(21)、脳の状態(28)、加齢(29)、動脈の拍動性(30)、および体の姿勢(31)によって強く制限される。

【0020】

本発明は、生きているマウスの無傷の脳における皮質CSFの流れをリアルタイムで追跡することを可能にする、新規の非侵襲的経頭蓋マクロスコピックイメージング手法を提供する。本発明において、この技術は、グリンパティックの流入の治療的増強が、脳へのCSFベースのトレーサーの送達を増加させるかどうかを評価するために使用された。高張食塩水またはマンニトール等の高張液で血漿浸透圧を増加させると、BBBを破壊することなくグリンパティックの流入が増加することが予想外に見出された。

【0021】

本明細書に開示されるのは、げっ歯類のCSF流のパターンを評価するための非侵襲的経頭蓋マクロスコピックイメージングの使用を説明する最初の研究である。以下の実施例に開示されるように、発明者らは、以前に検証された放射測定および蛍光によるエクスピボ定量化法と一致する、大脳動脈を取り囲む軟髄膜PVS内の移流トレーサーの流入を観察した(21)。さらに、マクロスコピックイメージングは、覚醒状態およびAQP4発現に関連する以前の所見を裏付けた(21)。重要なことに、例えば腹腔内高張食塩水またはマンニトールによる高浸透圧療法は、流入速度を約70%増加させながら、大槽内に送達されたCSFトレーサーの浸透性を2倍にすることが実証された。この反応は、ISFから血漿への流出の増加に起因しており、BBBを破壊することなくICPの減少を引き起こす(図16)。血液からCNSへのより多くの薬物の進入を可能にするBBBの制御された開放は、薬物送達の改善に有望な結果を示しているものの、この介入が脳機能およびグリンパティッククリアランスに及ぼす影響はいまだに不明であり、さらなる評価が必要である。この介入は、覚醒状態、AQP4枯渇、および病的AD脳を特徴付けるCSF流入の抑制を克服した(28、35)。より具体的には、血漿高浸透圧は、フルオロフォア結合Aβ抗体の送達を急激に改善した。脳全体にわたる抗体の分布は、有意により多くのプラーク結合をもたらし、CSF循環時間が短いにもかかわらず、標的とされるプラークがPVSから明らかに遠くに位置していた。静脈内高張液を用いた高浸透圧療法は、脳浮腫の治療のためにすでに臨床的に承認されている(49)。高浸透圧療法は、脳実質の深部への免疫療法薬の送達を増強するはずである。抗体は大きな分子であるが、2,000kDaもの大きなタンパク質が、大槽内送達後に脳実質に進入することができる(21、26)。実際、AD等の病的条件下では、抗体(>100kDa)はPVSを通して輸送される(27)。この輸送は主にバルクフローによって媒介されるため、より小さな分子の輸送も同様に増強され得る。

【0022】

本明細書に開示される研究は、血漿高浸透圧がマウスADモデルにおいて障害のあるグリンパティック機能をレスキューし、Aβに対する受動免疫療法の送達およびターゲットエンゲージメントを増強することができることを示す。この研究はまた、以前の研究で必要とされたよりも実質的に少ない抗体を使用することができる一方で、より大きなターゲットエンゲージメントを達成することができることも示している(27、58)。本明細書に開示されるように、高浸透圧治療を利用して覚醒状態、加齢、および疾患において低下するグリンパティックの流動を克服することは、対流増強送達戦略と組み合わせることができる。

【0023】

血漿高浸透圧およびCSF流入の増加

本発明は、対象の中枢神経系間質、脳間質および／または脊髄間質への組成物の送達を改善するための方法を提供する。この方法は、グリンパティック系の流入を増強すること

と、中枢神経系間質、脳間質および／または脊髄間質に組成物を送達することを含む。

【0024】

様々な方法によってグリンパティック系の流入を増強することができる。例えば、WO 2014/130777に記載されているもの等の当該技術分野で既知の方法および薬剤を使用して、中枢神経系間質を通して流体をポンピングすることができる。例えば、グリンパティック系の流入を増強することは、グリンパティッククリアランスを増加させる薬剤、例えば、Stat-3阻害剤またはBMPシグナル伝達の軸分子を、対象（哺乳動物等）に投与するステップを含み得る。他の実施形態において、薬剤は、トルバプタン、コニバプタン、もしくはVPA-985等のAVP（バソプレシン）のアンタゴニスト、アナンチン等の心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）のアンタゴニスト、ロサルタン等のアンジオテンシンIIのアンタゴニスト、PD123319等のAT2R受容体のアンタゴニスト、またはバルサルタン等のAT1受容体のアンタゴニストである。別の実施形態において、薬剤は、不眠症の治療において、または睡眠の補助剤として使用するための薬剤であり、限定されないが、以下に列挙されるものを含む。

【表1】

薬剤の種類	例
抗ヒスタミン剤	ALLEGRA(登録商標)(フェキソフェナジン)、BENADRYL(登録商標)(ジフェンヒドラミン)、CLARITIN(登録商標)またはTAVIST(登録商標)(ロラタジン)、CHLOR-TRIMETON(登録商標)(マレイン酸クロルフェニラミン)、DIMETANE(登録商標)(ブロムフェニラミン、フェニルプロパノールアミン)、およびZYRTEC(登録商標)(セチリジン)
非処方箋睡眠補助剤	Unisom Nighttime Sleep-Aid、Dormin、Nytol、Simply Sleep、Sominex、Extra Strength Tylenol PM、塩酸ジフェンヒドラミン、およびExcedrin PM
ベンゾジアゼピン:	PROSUM(登録商標)(エスタゾラム)、DALMANE(登録商標)(フルラゼパム)、DORAL(登録商標)(クアゼパム)、RESTORIL(登録商標)(テマゼパム)、HALCION(登録商標)(トリアゾラム)、およびVALIUM(登録商標)(ジアゼパム)
非ベンゾジアゼピン:	イミダゾピリジン:AMBIEN(登録商標)、AMBIEN(登録商標)CR、INTERMEZZO(登録商標)(ゾルピデム)(独自のクラス)、およびSONATA(登録商標)(ピラゾロピリミジン)(独自のクラス) メラトニン受容体刺激剤:ROZEREM(登録商標)(ラメルテオン)、NOTED(登録商標)(抱水クロラル)、PRECEDEX(登録商標)(塩酸デクスメドミジン)、およびLUNESTA(登録商標)(エスゾピクロン)
バルビタール	NEMBUTAL(登録商標)(フェノバルビタール)、MEBARAL(登録商標)(メホバルビタール)、およびアモバルビタール塩(アモバルビタールナトリウム)、BUTISOL(登録商標)(ブタバルビタールナトリウム)、およびSECONAL(登録商標)Sodium Pulvules(セコバルビタールナトリウム)

【0025】

別の実施形態において、薬剤は、JNJ-17299425またはJNJ-17306861等の、AQP4脱分極またはAQP4分極の喪失を防止する薬剤であり得る。別の実施形態において、グリンパティックの流入を増加させるステップは、中枢神経系間質を通して流体をポンピングするステップを含む。ポンピングは、当該技術分野で既知の任意の装置または方法によって、例えば、機械的ポンプ、注入ポンプ等を使用することによって、達成することができる。

【0026】

10

20

30

40

50

代替として、グリンパティック系の流入を増強するステップは、高張剤を対象に投与することを含む。好ましくは、高張剤は、対象の血漿に投与することができる高張液である。

【0027】

上記の各薬剤は、単独で、または他の薬剤のうちの1つまたは複数と組み合わせて使用することができる。

【0028】

本明細書で使用される場合、「高張」および「低張」は、例えば、生理学的浸透圧に関連する相対的な用語であるが、中枢神経系間質、脳間質および／または脊髄間質へのグリンパティックの流れの流入を促進するために、最終目標である浸透圧差または浸透圧勾配が2つのコンパートメント（血漿と中枢神経系間質等）の間で達成される限り、それと異なってもよい。したがって、「高張液」は、高張食塩水または糖溶液を含む、生理学的浸透圧に関して高張である任意の生理学的および／または薬学的に許容される溶液を指す。本明細書で述べるように、本発明において好ましい高張液は、BBB破壊を引き起こさない。

【0029】

本発明の方法は、血液に関して高張である注射用の薬剤（例えば、医薬品）を提供する。医薬品が血液に関して高張であるかどうかを判断するには、希釈剤を含む溶液の全ての化学成分のオスモル濃度を計算する。張度は、液体および溶解または希釈された薬剤について計算することができ、流体1リットル当たり（ mOsm/L ）または溶媒1キログラムあたり（ mOsm/kg ）のミリオスモルの数値で表される。これらの2つの値は、それぞれオスモル濃度（*osmolarity*）および浸透圧（*osmolality*）としても知られている。血液のオスモル濃度は $285 \sim 310 \text{ mOsm/L}$ の範囲であり、血液の浸透圧は $275 \sim 299 \text{ mOsm/kg}$ の範囲である。

【0030】

溶液のオスモル濃度は、浸透性および浸透圧の概念に一部基づいている。浸透性は、溶質（溶解した粒子）の拡散、または血管もしくは細胞膜等の半透膜を通した流体の移動である。膜を横切る分子の輸送を促進する浸透圧（*osmotic pressure*）は、オスモル濃度（*osmolar concentrations*）で表され、血液または血漿等の生体液と比較した場合に、低浸透圧（低張）、等浸透圧（等張）、または高浸透圧（高張）と称される。「張度」および「浸透圧」という用語は、しばしば同義語とみなされる。

【0031】

浸透圧は、「浸透圧勾配」（すなわち、膜の両側で異なる粒子濃度）に応答して半透膜を通過する水の動きに対抗するために必要な静水圧（または水圧）である。血清浸透圧は、浸透圧計を使用して測定することができるか（以下の実施例3を参照）、または溶液中に存在する溶質の濃度の合計として計算することができる。

【0032】

本明細書で使用される場合、張度と浸透圧は同義であるといみなされるべきであり、広義に理解されるべきである。張度は、有効浸透圧を意味することができ、細胞膜を含む膜を横切る浸透力を発揮する能力を有する溶液中の溶質の濃度の合計に等しい。厳密な意味では、浸透圧は特定の溶液の特性であり、いずれの膜にも関係しない。張度は、特定の膜に関する溶液の特性である。しかしながら、本発明は、血液または血漿等の生体液に関して等張、高張、または低張である溶液を指し、この言及は、特定の溶液が、血液もしくは血漿または他の生体液中の細胞の細胞膜に関して血液または血漿と等張、高張、または低張であるという意味を含むものとする。

【0033】

張度の操作上の定義は、この用語を説明するために使用することができる。これは、全血に試験溶液を添加して結果を観察する実験に基づき得る。全血中のRBCが膨潤して破裂した場合、試験溶液は正常な血漿と比較して低張であると言われる。RBCが収縮して円鋸歯状になる場合、試験溶液は正常な血漿と比較して高張であると言われる。RBCが

同じ状態のままである場合、試験溶液は血漿と等張であると言われる。RBC細胞膜は参照膜であり得る。例えば、生理食塩水（すなわち、0.9%塩化ナトリウム）中に入れられた全血は膨潤しないため、生理食塩水は等張であると言われる。

【0034】

本明細書に記載の方法は、血漿または血液に関して高張である薬学的な溶液または調製物を対象に投与することを含む。高張液は、血液に注入されると、細胞からの流体の移動および様々な悪影響を引き起こす可能性があるため、重大な血栓症および／または血管刺激を引き起こすほど高張ではない、適切な浸透圧を選択するように注意する必要がある。一実施形態において、溶液／調製物は、以下の実施例に記載の様式で対象に注入してから30分後に得られた血漿浸透圧が約320mOsmL・kg⁻¹超であり、かつ600mOsmL・kg⁻¹未満である場合、例えば、約340または350超であり、約375、400、425、450、475、500、または約575mOsmL・kg⁻¹未満である場合に、好適な浸透圧を有するとみなされる。一般に、本発明において有用な高張液は、約320mOsmL・kg⁻¹超の張度、例えば、340～3,000（例えば、500～2,000、1,000～2,000、1,500～1,800）mOsmL・kg⁻¹の張度を示す。浸透圧が約600mOsmL・kg⁻¹超である溶液は、注意して注入に使用されるべきである。

【0035】

高張液／静脈内注入用調製物の調製には、様々な一次増量剤を使用することができる。例として、NaCl等のイオン化剤、および非イオン化が挙げられる。非イオン化増量剤の例として、限定されないが、マンニトール、グリシン、スクロース、ラクトース、他の二糖類、治療用タンパク質もしくは製剤自体の活性成分、または当業者に既知の他の増量剤が挙げられる。非イオン化増量剤の濃度は、溶液が十分なイオン強度を有しているかどうかには大きな影響を与えない。しかしながら、それらの濃度はオスモル濃度に影響を与えるため、それらの濃度は張度に影響を与える可能性がある。特定の例において、NaClまたはマンニトールが使用される。浸透圧利尿剤マンニトールまたは高張食塩水は、血漿と脳細胞との間に浸透圧勾配を確立し、BBBを横切って血管コンパートメント内に水を引き込むことができる。マウスの例示的な投与量は、以下の実施例に記載されている。ヒト等価用量（HED）は、当該技術分野で既知の方法を使用して得ることができる。例えば、Nair AB, Jacob S. J Basic Clin Pharm. 2016 Mar; 7 (2) : 27-31. doi: 10.4103/0976-0105.177703およびFDAの業界向けガイダンスである、Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthyを参照されたい。例えば、ヒト対象に対して、NaClは30mg/kg以上（例えば、30～300mg/kg）で投与され得、マンニトールは、130mg/kg以上（例えば、130～1300mg/kg）で投与され得る。

【0036】

図16は、等張および高張条件下での血漿、脳、およびCSFの間の関係の3コンパートメントモデルを示している。等張血漿の状況では、間質液量（V_{ISF}；脳水分量、BWC）または圧力（P_{ISF}；頭蓋内圧、ICP）に変化はなく、その結果、グリンパティックスの流れの正味方向または大きさに変化はない。高張条件では、血漿のオスモライト含有量が増加すると、ISFの正味の再吸収が起こり、ISFの量が減少し、脳内へのCSFの流入を増強する負のISF圧が発生する。

【0037】

実際に、以下の例に示すように、例えば腹腔内高張食塩水またはマンニトールによる高浸透圧療法は、流入速度を約70%増加させながら、大槽内に送達されたCSFトレーサの浸透性を2倍にした。この反応は、ISFから血漿への流出の増加に起因しており、BBBを破壊することなくICPの減少を引き起こす。したがって、同じ手法を使用して、CNS間質への目的の任意の組成物または化合物の送達を改善することができる。

【0038】

いくつかの実施形態において、送達される組成物または化合物（例えば、治療用組成物または画像化組成物）は、大槽内または髄腔内に投与される。他の投与経路（例えば、非経口送達、静脈内送達、皮内、または筋肉内筋肉内）も使用することができる。その場合、組成物または化合物はBBBを通過する必要がある。その場合、当該技術分野で既知の様々な手段を使用して、BBB横断を容易にすることができる。例えば、米国特許第9675849号、米国特許第7943129号、US2018/0134797、US2018/0237496、およびUS2017/0145076を参照されたい。

【0039】

例えば、組成物または化合物は、BBB受容体に結合し、BBBを横切って輸送することができるポリペプチドで修飾され得るか、それと連結され得るか、または結合され得る。BBB受容体は、BBB内皮、ならびに他の細胞および組織の種類で発現する。ポリペプチドのBBB受容体への結合は、ポリペプチドの内在化を開始し、BBBを横切って輸送することができる。このような受容体は、限定されないが、TMEM30A、トランスフェリン受容体(TfR)、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体(IGF-R)、低密度リポタンパク質受容体(LDLR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1(LRP1)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質2(LRP2)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質8(LRP8)、GLUT1、バシギン、ジフテリア毒素受容体、ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子の膜結合前駆体(HB-EGF)、メラノトランスフェリン、およびバソプレシン受容体を含む。

【0040】

化合物が抗体である場合、抗体の特定のドメイン（例えば、Fc領域または抗原結合ドメインの1つ）を、変異Fc領域、または血液脳関門受容体に結合することができる二重特異性抗体を生成するように改変することができる。米国特許第9676849号、US2018/0134797、およびUS2018/0237496。

【0041】

非ポリペプチド化合物はまた、BBB受容体結合ポリペプチドに結合され得る。そのような薬剤は、細胞傷害性薬剤、造影剤、DNAもしくはRNA分子、または小分子化合物を含む。いくつかの実施形態において、化合物は、例えば、1000Da未満、750Da未満、または500Da未満の小分子である。

【0042】

ポリペプチドまたは非ポリペプチドのいずれかの化合物は、化合物がBBB受容体結合ポリペプチドのBBB受容体への結合(binding)に干渉しない限り、BBB受容体結合ポリペプチドのN末端もしくはC末端領域に結合(join)することができるか、またはポリペプチドの任意の領域に付着することができる。様々な実施形態において、結合(conjugates)は、周知の化学架橋試薬およびプロトコルを使用して生成することができる。例えば、当業者に既知であり、ポリペプチドを目的の化合物と架橋するのに有用な多数の化学的架橋剤が存在する。

【0043】

治療法

上記の高浸透圧によって媒介されるCSF流入は、治療法に使用することができる。いくつかの態様において、本発明は、治療用組成物または化合物を患者または対象のCNSに輸送する方法を提供する。患者または対象は、非限定的に、アルツハイマー病(AD)、脳卒中、認知症、筋ジストロフィー(MD)、多発性硬化症(MS)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、嚢胞性線維症、アンジェルマン症候群、リドル症候群、パーキンソン病、ピック病、パジェット病、癌、外傷性脳損傷等を含む神経障害を有するものであり得る。

【0044】

いくつかの実施形態において、神経障害は、ニューロパチー、アミロイドーシス、癌（例えば、CNSまたは脳を含む）、眼疾患または障害、ウイルスまたは微生物感染、炎症（例えば、CNSまたは脳の）、虚血、神経変性疾患、発作、行動障害、リソソーム蓄積

10

20

30

40

50

症等から選択される。本発明の方法は、1つまたは複数の関連する活性成分または治療用化合物を、それらの分子的、細胞的、またはウイルス的／微生物的な基盤を見つける CNS／脳に輸送する能力のために、そのような神経障害の治療に特に適している。

【0045】

ニューロパチー障害は、不適切または制御されていない神経シグナル伝達またはその欠如を特徴とする神経系の疾患または異常であり、限定されないが、慢性疼痛（侵害受容性疼痛を含む）、体組織への傷害によって引き起こされる疼痛（癌関連疼痛、神経障害性疼痛（神経、脊髄、または脳における異常によって引き起こされる疼痛）、および心因性疼痛（全体的にまたは大部分が精神的疾患に関連する）を含む）、頭痛、片頭痛、ニューロパチー、ならびに眩暈または悪心等のそのようなニューロパチー障害に付随することの多い症状および症候群を含む。

10

【0046】

ニューロパチー障害の場合、限定されないが、麻薬性／オピオイド鎮痛薬（すなわち、モルヒネ、フェンタニル、ヒドロコドン、メペリジン、メタドン、オキシモルフォン、ペンタゾシン、プロボキシフェン、トラマドール、コデインおよびオキシコドン）、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）（すなわち、イブプロフェン、ナプロキセン、ジクロフェナク、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、インドメタシン、ケトロラク、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、オキサプロジン、ピロキシカム、スリンダク、およびトルメチン）、コルチコステロイド（すなわち、コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロンおよびトリアムシノロン）、抗片頭痛薬（すなわち、スマトリプテン、アルモトリプタン、フロバトリプタン、スマトリプタン、リザトリプタン、エレトリプタン、ゾルミトリプタン、ジヒドロエルゴタミン、エレトリプタン、およびエルゴタミン）、アセトアミノフェン、サリチル酸塩（すなわち、アスピリン、サリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム、ジフルニサル、およびサルサレート）、抗痙攣薬（すなわち、カルバマゼピン、クロナゼパム、ガバペンチン、ラモトリギン、プレガバリン、チアガビン、およびトピラメート）、麻酔薬（すなわち、イソフルラン、トリクロロエチレン、ハロタン、セボフルラン、ベンゾカイン、クロロプロカイン、コカイン、シクロメチカイン、ジメトカイン、プロボキシカイン、プロカイン、ノボカイン、プロパラカイン、テトラカイン、アルチカイン、ブピバカイン、カルチカイン、シンコカイン、エチドカイン、レボブピバカイン、リドカイン、メピバカイン、ピペロカイン、プリロカイン、ロピバカイン、トリメカイン、サキシトキシシンおよびテトロドトキシシン）、およびシクロオキシゲナーゼ-2阻害剤（すなわち、セレコキシブ、ロフェコキシブ、およびバルデコキシブ）を含む鎮痛薬である神経薬が選択され得る。眩暈を伴うニューロパチー障害の場合、限定されないが、メクリジン、ジフェンヒドラミン、プロメタジン、およびジアゼパムを含む抗眩暈剤である神経薬が選択され得る。悪心を伴うニューロパチー障害の場合、限定されないが、プロメタジン、クロルプロマジン、プロクロルペラジン、トリメトベンズアミド、およびメトクロプラミドを含む鎮吐薬である神経薬が選択され得る。

20

30

【0047】

アミロイドーシスは、CNSの細胞外タンパク性沈着物に関連する疾患および障害の群であり、限定されないが、二次性アミロイドーシス、加齢性アミロイドーシス、アルツハイマー病（AD）、軽度認知障害（MCI）、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血（オランダ型）；グアムパーキンソン-認知症複合体、脳アミロイド血管障害、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、多発性硬化症；クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、伝達性海綿状脳症、HIV関連認知症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、封入体筋炎（IBM）、およびβ-アミロイド沈着に関連する眼疾患（すなわち、黄斑変性症、ドルーゼン関連視神経症、および白内障）を含む。

40

【0048】

アミロイドーシスの場合、限定されないが、ベータセクレターゼ、タウ、プレゼニリン、アミロイド前駆体タンパク質もしくはその部分、アミロイドベータペプチドまたはその

50

オリゴマーもしくはフィブリル、死受容体 6 (DR6)、最終糖化産物の受容体 (RAGE)、パーキン、およびハンチンチンから選択される標的に特異的に結合する抗体または他の結合分子 (限定されないが、小分子、ペプチド、アプタマー、もしくは他のタンパク質結合体を含む) ; コリンエステラーゼ阻害剤 (すなわち、ガランタミン、ドネペジル、リバスチグミン、およびタクリン) ; NMDA 受容体アンタゴニスト (すなわち、メマンチン)、モノアミン枯渇薬 (すなわち、テトラベナジン) ; メシル酸エルゴロイド ; 抗コリン性抗パーキンソン病薬 (すなわち、プロシクリジン、ジフェンヒドラミン、トリヘキシルフェニジル、ベンズトロピン、ビペリデン、およびトリヘキシフェニジル) ; ドーパミン性抗パーキンソン病薬 (すなわち、エンタカポン、セレギリン、プラミペキソール、ブロモクリプチン、ロチゴチン、セレギリン、ロピニロール、ラサギリン、アポモルフィン、カルビドパ、レボドパ、ペルゴリド、トルカポン、およびアマンタジン) ; テトラベナジン ; 抗炎症薬 (限定されないが、非ステロイド系抗炎症薬 (すなわち、インドメタシンおよび上に列挙される他の化合物) を含む) ; ホルモン (すなわち、エストロゲン、プロゲステロン、およびロイプロリド) ; ビタミン (すなわち、葉酸およびニコチンアミド) ; ジメボリン ; ホモタウリン (すなわち、3-アミノプロパンスルホン酸 ; 3APS) ; セロトニン受容体活性調節剤 (すなわち、キサリプロデン) ; インターフェロン、および糖コルチコイドを含む神経薬が選択され得る。

【0049】

CNS の癌は、1 つまたは複数の CNS 細胞 (すなわち、神経細胞) の異常増殖を特徴とし、限定されないが、神経膠腫、多形性神経膠芽腫、髄膜腫、星状細胞腫、聴神経腫、軟骨腫、乏突起神経膠腫、髄芽細胞腫、神経節膠腫、シュワン腫、神経線維腫、神経芽細胞腫、および硬膜外、髄内または硬膜内腫瘍を含む。癌の場合、化学療法剤である神経薬が選択され得る。

【0050】

化学療法剤の例として、チオテパおよび CYTOXANO シクロスホスファミド等のアルキル化剤 ; プスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン等のスルホン酸アルキル ; ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ等のアジリジン ; アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン ; アセトゲニン (特にプラタシンプおよびラタシノン) ; デルター 9-テトラヒドロカンナビノール (ドロナビノール、MARINOL) ; β -ラパコン ; ラパコール ; コルヒチン ; ベツリン酸 ; カンプトテシン (合成類似体トポテカン (HYCAMTIN)、CPT-11 (イリノテカン、CAMPOTOSAR)、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン、および 9-アミノカンプトテシンを含む) ; ブリオスタチン ; カリスタチン ; CC-1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む) ; ポドフィロトキシン ; ポドフィリン酸 ; テニポシド ; クリプトフィシン (特にクリプトフィシン 1 およびクリプトフィシン 8) ; ドラスタチン ; デュオカルマイシン (合成類似体、KW-2189 および CB1-TM1 を含む) ; エリュテロピン ; パンクラチスタチン ; サルコジクチン ; スポンジスタチン ; クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード ; カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン等のニトロソウレア ; エンジン抗生物質 (例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン γ I I およびカリケアマイシン ω I I 等の抗生物質 (例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994) を参照) ; ダイネミシン A を含むダイネミシン ; エスペラミシン ; ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アンスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシ

ン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN、ドキシソルビシン（モルホリノードキシソルビシン、シアノモルホリノードキシソルビシン、2-ピロリノードキシソルビシンおよびデオキシドキシソルビシンを含む）、エビルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンC等のマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）等の代謝拮抗薬、デノブテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート等の葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン等のプリン類似体；アンシタビン、アザシジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジン等のピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストトラクトン等のアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の抗副腎剤；フロリン酸などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグルコシド；アミノレブリン酸；エニルラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルフォルニチン；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシンおよびアンサマイトシン等のメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖類複合体（JH S Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2'', 2'''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2トキシン、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン（ELDISINEO、FIELD E SIN）；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；チオテパ；タキソイド、例えば、TAXOLパクリタキセル）、ABRAXANE（クレモフォルを含まない、アルブミン操作されたパクリタキセルのナノ粒子製剤）（American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, III）、およびTAXOTEREドキセタキセル（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロランブシル；ゲムシタビン（GEMZAR）；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチン等の白金類似体；ビンブラスチン（VELBAN）；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン（ONCOVIN）；オキサリプラチン；ロイコボピン；ピノレルビン（NAVELBINE）；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸等のレチノイド；カペシタビン（XELODA）；上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体；ならびにCHOP（シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ピンクリスチン、およびブレドニゾンの併用療法の略語）、およびFOLFOX（5-FUおよびロイコボピンと組み合わされたオキサリプラチン（ELOXATIN）による治療レジメンの略語）等の上記の2つ以上の組み合わせが挙げられる。

【0051】

化学療法剤のこの定義には、癌の増殖を促進する可能性のあるホルモンの効果を調節、低減、遮断、または阻害するように作用し、多くの場合、全身性の、すなわち体全体の治療の形態である、抗ホルモン剤も含まれる。それら自体がホルモンであってもよい。

【0052】

癌の治療または予防のための神経薬として選択され得る化合物の別の群は、抗癌免疫グロブリン（限定されないが、トラスツズマブ、ペルツズマブ、ベバシズマブ、アレムツク

スマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、イブリツモマブ、チウキセタン、パニツムマブおよびリツキシマブを含む）である。いくつかの例では、抗体を毒性標識またはコンジュゲートと併用して、限定されないが、 ^{131}I 放射標識を有するトシツモマブ、またはトラスツズマブエムタンシンを含む所望の細胞（すなわち、癌細胞）を標的として死滅させることができる。

【0053】

CNSのウイルス感染または微生物感染は、限定されないが、ウイルス（すなわち、インフルエンザ、HIV、ポリオウイルス、風疹）、細菌（すなわち、*Neisseria* 属、*Streptococcus* 属、*Pseudomonas* 属、*Proteus* 属、*E. coli*、*S. aureus*、*Pneumococcus* 属、*Meningococcus* 属、*Haemophilus* 属、および *Mycobacterium tuberculosis*）、および真菌（すなわち、酵母、*Cryptococcus neoformans*）、寄生虫（すなわち、*Toxoplasma gondii*）、または限定されないが、急性もしくは慢性であり得る、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脈管炎、および膿瘍を含む、CNS病態生理学をもたらすアメーバ等の他の微生物による感染を含む。

【0054】

ウイルス性または微生物性疾患の場合、抗ウイルス化合物（限定されないが、アダマンタン抗ウイルス薬（すなわち、リマンタジンおよびアマンタジン）、抗ウイルスインターフェロン（すなわち、ペグインターフェロン $\alpha-2b$ ）、ケモカイン受容体アンタゴニスト（すなわち、マラビロク）、インテグラーゼ鎖転移阻害剤（すなわち、ラルテグラビル）、ノイラミニダーゼ阻害剤（すなわち、オセルタミビルおよびザナミビル）、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（すなわち、エファビレンツ、エトラビルン、デラビルジンおよびネビルアピン）、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（テノホビル、アバカビル、ラミブジン、ジドブジン、スタブジン、エンテカビル、エムトリシタビン、アデホビル、ザルシタビン、テルビブジンおよびジダノシン）、プロテアーゼ阻害剤（すなわち、ダルナビル、アタザナビル、ホスアンプレナビル、チプラナビル、リトナビル、ネルフィナビル、アンプレナビル、インジナビル、およびサキナビル）、プリンヌクレオシド（すなわち、バラシクロビル、ファムシクロビル、アシクロビル、リバビリン、ガンシクロビル、バルガンシクロビルおよびシドホビル）、および種々の抗ウイルス薬（すなわち、エンフビルチド、ホスカルネット、パリビズマブおよびホミビルセン）を含む）、抗生物質（限定されないが、アミノペニシリン（すなわち、アモキシシリン、アンピシリン、オキサシリン、ナフシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルコキサシリン、テモシリン、アズロシリン、カルベニシリン、チカルシリン、メズロシリン、ピペラシリン、およびバカムピシリン）、セファロスポリン（すなわち、セファゾリン、セファレキシン、セファロチン、セファマンドール、セフトリアキソン、セフォタキシム、セフォドキシム、セフトラジウム、セファドロキシル、セフラジン、ロラカルベフ、セフォテタン、セフロキシム、セフプロジル、セファクロル、およびセフォキシチン）、カルバペネム／ペネム（すなわち、イミペネム、メロペネム、エルタペネム、ファロペネム、およびドリペネム）、モノバクタム（すなわち、アズトレオナム、チゲモナム、ノルカルジシンA、およびタプトキシニン- β -ラクタム、別の β -ラクタム抗生物質と複合した β -ラクタマーゼ阻害剤（すなわち、クラブラン酸、タゾバクタム、およびスルバクタム）、アミノグリコシド（すなわち、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルミシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、およびパロモマイシン）、アンサマイシン（すなわち、ゲルダナマイシンおよびヘルビマイシン）、カルバセフェム（すなわち、ロラカルベフ）、糖ペプチド（すなわち、テイコプラニンおよびバンコマイシン）、マクロリド（すなわち、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン、テリスロマイシン、およびスペクチノマイシン）、モノバクタム（すなわち、アズトレオナム）、キノロン（すなわち、シプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロバフロキサシン、グレパフロキ

10

20

30

40

50

サシン、スパルフロキサシン、およびテマフロキサシン)、スルホンアミド(すなわち、マフェニド、スルホンアミドクリソイジン、スルファセトアミド、スルファジアジン、スルファメチゾール、スルファニルアミド、スルファサラジン、スルフィソキサゾール、トリメトプリム、トリメトプリム、およびスルファメトキサゾール)、テトラシクリン(すなわち、テトラシクリン、デメクロシクリン、ドキシシクリン、ミノシクリン、およびオキシテトラシクリン)、抗悪性腫瘍薬または細胞傷害性抗生物質(すなわち、ドキシソルビシン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、プリカマイシン、マイトマイシン、ペントスタチン、およびバルビシン)、ならびに種々の抗細菌性化合物(すなわち、バシトラシン、コリスチン、およびポリミキシンB)を含む)、抗真菌薬(すなわち、メトロニダゾール、ニタゾキサニド、チニダゾール、クロロキン、ヨードキノール、およびパロモマイシン)、ならびに抗寄生虫薬(限定されないが、キニン、クロロキン、アモジアキン、ピリメタミン、スルファドキシム、プログアニル、メフロキン、アトバコン、プリマキン、アルテメシニン、ハロファントリン、ドキシシクリン、クリンダマイシン、メペンダゾール、パモ酸ピランテル、チアペンダゾール、ジエチルカルバマジン、イベルメクチン、リファンピン、アンホテリシンB、メラルソプロール、エホニチン、およびアルペンダゾール)を含む神経薬が選択され得る。

10

【0055】

CNSの炎症は、限定されないが、身体的損傷であり得るCNSへの損傷(すなわち、事故、手術、脳外傷、脊髄損傷、脳震盪に起因する)、およびCNSの他の1つまたは複数の疾患または障害に起因または関連する損傷(すなわち、膿瘍、癌、ウイルスまたは微生物感染)によって引き起こされる炎症を含む。CNS炎症の場合、炎症自体に対応する神経薬(すなわち、イブプロフェンまたはナプロキセン等の非ステロイド性抗炎症剤)、または炎症の根本的な原因を治療するもの(すなわち、抗ウイルス薬または抗癌剤)が選択され得る。

20

【0056】

本明細書で使用される場合、CNSの虚血は、脳内の異常な血流または血管挙動またはその原因に関連する一群の疾患を指し、限定されないが、局所脳虚血、全脳虚血、脳卒中(すなわち、くも膜下出血および脳内出血)、および動脈瘤を含む。虚血の場合、限定されないが、血栓溶解薬(すなわち、ウロキナーゼ、アルテプラゼ、レテプラゼおよびテネクテプラゼ)、血小板凝集阻害剤(すなわち、アスピリン、シロスタゾール、クロピドグレル、プラスグレルおよびジピリダモール)、スタチン(すなわち、ロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン、セリバスタチンおよびピタバスタチン)、ならびに血流または血管の柔軟性を改善するための化合物(例えば、血圧薬を含む)を含む神経薬が選択され得る。

30

【0057】

神経変性疾患は、CNSにおける神経細胞の機能喪失または死に関連する疾患および障害の群であり、限定されないが、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、アルパーズ病、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、バッテン病、コカイン症候群、大脳皮質基底核変性症、アミロイドーシスによって引き起こされる、またはそれに関連する変性、フリードライヒ運動失調症、前頭側頭葉変性症、ケネディ病、多系統萎縮症、多発性硬化症、原発性側索硬化症、進行性核上性麻痺、脊髄性筋萎縮症、横断性脊髄炎、レフサム病、および脊髄小脳失調症を含む。

40

【0058】

神経変性疾患の場合、成長ホルモンまたは神経栄養因子である神経薬が選択されてもよく、例として、限定されないが、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン-4/5、線維芽細胞成長因子(FGF)-2および他のFGF、ニューロトロフィン(NT)-3、エリスロポエチン(EPO)、肝細胞成長因子(HGF)、上皮成長因子(EGF)、形質転換成長因子(TGF)- α 、TGF- β 、血管内皮成長因子(VEGF)、インターロイキン-1受容体アンタゴニスト(IL-1r

50

a)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、グリア由来神経栄養因子(GDNF)、ニューロトロフィン、血小板由来成長因子(PDGF)、ヘレグリン、ニューレグリン、アルテミン、パーセフィン、インターロイキン、グリア細胞株由来神経栄養因子(GFR)、顆粒球コロニー刺激因子(CSF)、顆粒球マクロファージCSF、ネトリン、カルジオトロフィン-1、ヘッジホッグ、白血病抑制因子(LIF)、ミッドカイン、プレイオトロフィン、骨形成タンパク質(BMP)、ネトリン、サポシン、セマホリン、および幹細胞因子(SCF)が挙げられる。

【0059】

CNSの発作性疾患および障害は、CNS内の不適切かつ／または異常な電気伝導を伴い、限定されないが、癲癇(すなわち、アブサンス発作、脱力発作、良性ローランド癲癇、小児アブサンス、間代発作、複雑部分発作、前頭葉癲癇、熱性痙攣、幼児痙攣、若年性ミオクローヌス癲癇、若年性アブサンス癲癇、レノックス・ガストー症候群、ランドウ・クレフナー症候群、ドラベ症候群、オオタハラ症候群、ウェスト症候群、ミオクローヌス発作、ミトコンドリア病、進行性ミオクローヌス癲癇、心因性発作、反射癲癇、ラスムッセン症候群、単純部分発作、二次全身性発作、側頭葉癲癇、強直間代性発作、強直性発作、精神運動発作、辺縁系癲癇、部分発作、全般発作、癲癇重積状態、腹部癲癇、無動発作、自律神経発作、両側汎発性ミオクローヌス、月経随伴性癲癇、失立発作、情動発作、局所性発作、笑い発作、ジャクソン・マーチ、ラフォラ病、運動発作、多焦点性発作、夜間発作、光過敏性発作、偽発作、感覚発作、微細発作、シルヴァン発作、離脱性痙攣、および視覚性反射発作)を含む。

【0060】

発作性疾患の場合、限定されないが、バルビツレート抗痙攣薬(すなわち、プリミドン、メタルビタール、メホバルビタール、アロバルビタール、アモバルビタール、アプロバルビタール、アルフェナール、バルビタール、ブラロバルビタール、およびフェノバルビタール)、ベンゾジアゼピン抗痙攣薬(すなわち、ジアゼパム、クロナゼパム、およびロラゼパム)、カルバメート抗痙攣薬(すなわち、フェルバメート)、カルボン酸脱水酵素阻害剤抗痙攣薬(すなわち、アセタゾラミド、トピラメート、およびゾニサミド)、ジベンザゼピン抗痙攣薬(すなわち、ルフィンアミド、カルバマゼピン、およびオキシカルバゼピン)、脂肪酸誘導体抗痙攣薬(すなわち、ジバルプロエックスおよびバルプロ酸)、 γ -アミノブチル酸類似体(すなわち、プレガバリン、ガバペンチン、およびビガバトリン)、 γ -アミノブチル酸再取り込み阻害剤(すなわち、チアガビン)、 γ -アミノブチル酸トランスアミナーゼ阻害剤(すなわち、ビガバトリン)、ヒダントイン抗痙攣薬(すなわち、フェニトイン、エトトイン、ホスフェニトイン、およびメフェニトイン)、種々の抗痙攣薬(すなわち、ラコサミドおよび硫酸マグネシウム)、プロゲスチン(すなわち、プロゲステロン)、オキサゾリジンジオン抗痙攣薬(すなわち、パラメタジオンおよびトリメタンジオン)、ピロリジン抗痙攣薬(すなわち、レベチラセタム)、スクシンイミド抗痙攣薬(すなわち、エトスキシミドおよびメトスキシミド)、トリアジン抗痙攣薬(すなわち、ラモトリギン)、ならびに尿素抗痙攣薬(すなわち、フェナセミドおよびフェネツリド)を含む抗痙攣薬または抗癲癇薬である神経薬が選択され得る。

【0061】

行動障害は、罹患した対象側の異常な行動を特徴とするCNSの障害であり、限定されないが、睡眠障害(すなわち、不眠症、睡眠時随伴症、夜驚症、概日リズム睡眠障害、およびナルコレプシー)、気分障害(すなわち、うつ病、自殺的うつ病、不安症、慢性感情障害、恐怖症、パニック発作、強迫性障害、注意欠陥多動障害(ADHD)、注意欠陥障害(ADD)、慢性疲労症候群、広場恐怖症、外傷後ストレス障害、双極性障害)、摂食障害(すなわち、拒食症または過食症)、精神病、発達性行動障害(すなわち、自閉症、レット症候群、アスペルガー症候群)、人格障害および精神障害(すなわち、統合失調症、妄想性障害等)を含む。

【0062】

行動障害の場合、神経薬は、限定されないが、非定型抗精神病薬(すなわち、リスペリ

10

20

30

40

50

ドン、オランザピン、アブリピプラゾール、クエチアピン、パリペリドン、アセナピン、クロザピン、イロペリドンおよびジプラシドン)、フェノチアジン系精神安定剤(すなわち、プロクロルペラジン、クロルプロマジン、フルフェナジン、ペルフェナジン、トリフルオペラジン、チオリダジンおよびメソリダジン)、チオキサンテン(すなわち、チオチキセン)、種々の抗精神病薬(すなわち、ピモジド、リチウム、モリンドン、ハロペリドールおよびロキサピン)、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(すなわち、シタロプラム、エスシタロプラム、パロキセチン、フルオキセチンおよびセルトラリン)、セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(すなわち、デュロキセチン、ベンラファキシン、デスベンラファキシン、三環系抗うつ薬(すなわち、ドキセピン、クロミプラミン、アモキサピン、ノルトリプチリン、アミトリプチリン、トリミプラミン、イミプラミン、プロトリプチリンおよびデシプラミン)、四環系抗うつ薬(すなわち、ミルタザピンおよびマプロチリン)、フェニルピペラジン抗うつ薬(すなわち、トラゾドンおよびネファゾドン)、モノアミンオキシダーゼ阻害剤(すなわち、イソカルボキサジド、フェネルジン、セレギリンおよびトラニルシプロミン)、ベンゾジアゼピン(すなわち、アルプラゾラム、エスタゾラム、フルラゼパム、クロナゼパム、ロラゼパムおよびジアゼパム)、ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(すなわち、ブプロピオン)、CNS刺激剤(すなわち、フェンテルミン、ジエチルプロピオン、メタンフェタミン、デキストロアンフェタミン、アンフェタミン、メチルフェニデート、デクスメチルフェニデート、リスデキサメフェタミン、モダフィニル、ペモリン、フェンジメトラジン、ベンズフェタミン、フェンジメトラジン、アルモダフィニル、ジエチルプロピオン、カフェイン、アトモキセチン、ドキサプラム、およびマジンドール)、抗不安薬/鎮静薬/催眠薬(限定されないが、バルビタール系薬剤(すなわち、セコバルビタール、フェノバルビタールおよびメホバルビタール)、ベンゾジアゼピン(上記の通り)、および種々の抗不安薬/鎮静薬/催眠薬(すなわち、ジフェンヒドラミン、ナトリウムオキシベート、ザレプロン、ヒドロキシジン、抱水クロラル、アオルピデム、ブスピロン、ドキセピン、エスゾピクロン、ラメルテオン、メプロバメートおよびエトクロルビノール))、セクレチン(例えば、Ratlif-Schaub et al. Autism 9:256-265 (2005)を参照)、オピオイドペプチド(例えば、Cowen et al., J. Neurochem. 89:273-285 (2004)を参照)、および神経ペプチド(例えば、Hethwa et al. Am. J. Physiol. 289:E301-305 (2005)を参照))を含む行動修飾化合物から選択することができる。

【0063】

リソソーム蓄積症は、場合によっては、CNSに関連するまたはCNS特有の症状を示す代謝障害である。そのような障害は、限定されないが、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ムコ多糖症(タイプI、II、III、IV、V、VIおよびVII)、糖原病、GM1ガングリオシドーシス、異染性白質ジストロフィー、ファーバー病、カナバンの白質ジストロフィー、および神経セロイドリポフスチン症1型および2型、ニーマン・ピック病、ポンペ病、ならびにクラッペ病を含む。

【0064】

リソソーム蓄積症の場合、それ自体がまたは別様に、疾患で損なわれている酵素の活性を模倣する神経薬が選択され得る。リソソーム蓄積障害の治療のための例示的な組換え酵素として、限定されないが、例えば、米国特許出願公開第2005/0142141号に記載されるもの(すなわち、 α -L-イズロニダーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、N-スルファターゼ、 α -N-アセチルグルコサミニダーゼ、N-アセチル-ガラクトサミン-6-スルファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アリールスルファターゼB、 β -グルクロニダーゼ、酸性 α -グルコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼA、ヘキソサミニダーゼA、酸性スフィンゴミエリナーゼ、 β -ガラクトセレブロシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アリールスルファターゼA、酸性セラミダーゼ、アスパルトアシラーゼ、パルミトイル-タンパク質チオエステラーゼ1およびトリペプチジルアミノペプチダーゼ1)が挙げられる。

【0065】

上記の治療用組成物薬剤は、非経口、肺内、および鼻腔内を含む任意の好適な手段によって投与することができ、局所治療に必要な場合は、病巣内投与を行うことができる。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与を含む。投薬は、投与が短期であるか長期であるかに一部依存して、例えば静脈内注射または皮下注射等の注射によって、任意の好適な経路によることができる。本明細書では、限定されないが、様々な時点にわたる単回または複数回の投与、ボラス投与、およびパルス注入を含む様々な投薬スケジュールが企図される。

【0066】

核酸分子は、ベクター、プラスミド、リボソーム、DNA注射、電気穿孔、遺伝子銃、静脈内注射または肝動脈注入を含む、当該技術分野で既知の技術を使用して投与することができる。遺伝子治療の実施形態で使用するためのベクター（ウイルスベクターを含む）は、当該技術分野で既知である。

【0067】

特定の実施形態によれば、本発明の方法は、高度に制御された方法で脳から血液への水の流動を可能にする。治療用組成物は、高張液と組み合わせて使用することができる。有利には、治療用組成物および高張液を同時に投与することができる。

【0068】

マクロスコピックイメージング

別の態様において、本発明は、生きている対象の無傷の脳における皮質CSFの流れをリアルタイムで追跡することを可能にする、新規の非侵襲的経頭蓋マクロスコピックイメージング手法を提供する。この方法は、対象の中樞神経系に有効量の造影剤を導入することと、対象の脳を画像化することを含む。造影剤は、大槽内または髄腔内に送達することができる。好ましい実施形態において、造影剤はフルオロフォアを含み、画像化のステップは蛍光マクロスコピーを含む。例において、フルオロフォアは、励起されると赤外領域（例えば、近赤外領域、中赤外領域、または遠赤外領域）の光を再放出する。

【0069】

本明細書に開示されるように、この新しいイメージング手法は、脳全体の血管周囲腔のシステムを用いて、治療薬の送達を迅速かつ効果的に増強する。この目的のために、本発明はまた、CSF輸送の非侵襲的かつ動的な測定を可能にする新規の経頭蓋光学イメージング手法も提供する。これにより、MRIでは達成できない空間的および時間的分解能を得る一方で、二光子顕微鏡によって可視化された狭い視野とは対照的に、CSFトレーサーの脳全体のイメージングを得ることができる。高フレームレートの取得は、ピクセルレベルの解像度でトレーサーフロントの進行を測定することによってげっ歯類の脳内におけるCSF輸送を定量化するフロントトラッキングソフトウェアの使用と互換性がある（56）。マクロスコプは、固定構成または動作構成（例えば、ランニングホイールまたは認知テスト）において小動物を画像化するための大きなガントリーを有する。非侵襲的な長期用シアノアクリレート頭蓋窓を設置することにより、繰り返し画像化することが可能になる（57）。したがって、経頭蓋光学イメージングは、クリアランスを評価するために脳室内または実質内トレーサー研究に適用することができる。

【0070】

キットおよび製造品

本発明の別の態様において、本発明は、上記の方法に有用な材料を含むキットまたは製造品を提供する。製造品は、容器と、容器上のまたは容器に関連付けられたラベルまたは添付文書とを含む。好適な容器は、例えば、ボトル、バイアル、注射器、IV輸液バッグ等を含む。容器は、ガラスまたはプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は、それ自体で、あるいは（1）対象の中樞神経系間質、脳間質および／もしくは脊髄間質への組成物の送達を改善するのに有効な、または（2）上記の状態の1つもしくは複数を経験、予防および／もしくは診断するのに有効な別の組成物と組み合わせて、組成物を保持する。容器は、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によっ

10

20

30

40

50

て穿通可能なストッパーを有する静脈内輸液バッグまたはバイアルであり得る)。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、高分子治療薬、例えば抗体であり得る。ラベルまたは添付文書は、組成物が選択された状態を治療するために使用されることを示す。

【0071】

さらに、製造品は、(a) その中に組成物が含まれる第1の容器であって、組成物がグリnpaティック系の流入を増強する薬剤を含む、第1の容器と、(b) その中に組成物が含まれる第2の容器であって、組成物が治療薬または造影剤を含む、第2の容器とを含んでもよい。本発明のこの実施形態における製造品は、組成物が特定の状態を治療するために使用され得ることを示す添付文書をさらに含んでもよい。代替として、または付加的に、製造品は、注射用静菌水(BWF I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液等の薬学的に許容される緩衝液を含む第3の容器をさらに含み得る。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、および注射器を含む、商業的およびユーザーの観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

【0072】

いくつかの実施形態において、キットまたは製造品は、本明細書に記載の方法を実施するための指示(すなわち、プロトコル)を含む指示材料(例えば、組成物を投与するためにキットを使用するための説明)をさらに含む。指示材料は、典型的には書面または印刷物を含むが、それらに限定されるものではない。そのような命令を記憶し、それらをエンドユーザーに伝達することができる任意の媒体が、本発明によって企図される。そのような媒体は、電子記憶媒体(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えば、CD-ROM)等を含むが、これらに限定されない。そのような媒体は、そのような指示材料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含み得る。

【0073】

定義

本明細書で使用される場合、溶液の「浸透圧」は、溶媒1キログラム当たりの溶質のオスモル数である。浸透圧は、溶液中に存在する粒子の数の尺度であり、粒子のサイズまたは重量とは無関係である。それは、粒子濃度のみに依存する溶液の特性を使用することによってのみ測定することができる。これらの特性は、蒸気圧降下、凝固点降下、沸点上昇、および浸透圧であり、集合的に束一性と称される。溶液の「オスモル濃度」は、溶液1リットル当たりの溶質のオスモル数である。

【0074】

「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語は、一本鎖のアミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書で互換的に使用される。この用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。アミノ酸ポリマーは、完全にL-アミノ酸、完全にD-アミノ酸、またはLアミノ酸とDアミノ酸との混合物を含み得る。本明細書で使用される「タンパク質」という用語は、ポリペプチド、または一本鎖ポリペプチドの二量体(すなわち、2つ)もしくは多量体(すなわち、3つ以上)のいずれかを指す。タンパク質の一本鎖ポリペプチドは、共有結合、例えば、ジスルフィド結合、または非共有相互作用によって結合され得る。

【0075】

「核酸」という用語は、糖、リン酸、およびプリンまたはピリミジンのいずれかである塩基を含むモノマー(ヌクレオチド)から構成される、一本鎖または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマーを指す。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、かつ天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝される天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。「核酸断片」は、所与の核酸分子の画分である。「ヌクレオチド配列」という用語は、任意選択的に、DNAまたはRNAポリマーに組み込むことができる合成、非天然または改変ヌクレオチド塩基を含む、一本鎖または二本鎖であり得るDNAまたはRNAのポリマーを指す。「核酸」、「核酸分子」、「核酸断片」、「核酸配列」もしくはセグメント

」、または「ポリヌクレオチド」という用語はまた、遺伝子、cDNA、DNA、および遺伝子によってコードされるRNAと互換的に使用され得る。

【0076】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重抗体）、および抗体断片を含むがこれらに限定されない様々な抗体構造を包含する。「抗体断片」は、無傷の抗体が結合する抗原に結合する無傷の抗体の一部を含む、無傷の抗体以外の分子を指す。抗体断片の例は当該技術分野で周知であり（例えば、Nelson、MAbs（2010）2（1）：77-83を参照）、限定されないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab₂)およびFv；ダイアボディ；線形抗体；非限定的に、一本鎖可変断片（scFv）、リンカーを含むまたは含まない（かつ任意選択的にタンデムで）軽鎖および／または重鎖の抗原結合ドメインの融合物を含む一本鎖抗体分子；および抗体断片（限定されないが、Fc領域を欠く複数の可変ドメインから構築される多重特異性抗体を含む）から形成される単一特異性または多重特異性抗原結合分子を含む。

10

【0077】

「抗Aβ抗体」は、ヒトAβに特異的に結合する抗体を指す。抗Aβ抗体の非限定的な例はクレネズマブである。抗Aβ抗体の他の非限定的な例は、ソラネズマブ、バピネオズマブ、ガンテネルマブ、アデユカヌマブ、ポネズマブ、および以下の刊行物に開示されている任意の抗Aβ抗体である：WO2000/162801、WO2002/046237、WO2002/003911、WO2003/016466、WO2003/016467、WO2003/077858、WO2004/029629、WO2004/032868、WO2004/032868、WO2004/108895、WO2005/028511、WO2006/039470、WO2006/036291、WO2006/066089、WO2006/066171、WO2006/066049、WO2006/095041、およびWO2009/027105。

20

【0078】

「神経障害」は、CNSに影響を及ぼす、および／またはCNSに病因を有する疾患または障害を指す。例示的なCNS疾患または障害として、限定されないが、ニューロパチー、アミロイドーシス、癌、眼疾患または障害、ウイルスまたは微生物感染、炎症、虚血、神経変性疾患、発作、行動障害、およびリソソーム蓄積症が挙げられる。神経障害の特定の例として、限定されないが、神経変性疾患（非限定的にレビー小体病、ポリオ後症候群、シャイドレイガー症候群、オリブ橋小脳萎縮症、パーキンソン病、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、タウオパチー（非限定的にアルツハイマー病および核上性麻痺を含む）、プリオン病（非限定的に、ウシ海綿状脳症、スクレイピー、クロイツフェルトヤコブ症候群、クールー、ゲルストマン-シュトロイスラー-シャインカー病、慢性消耗病、および致死性家族性不眠症を含む）、球麻痺、運動ニューロン疾患、および神経系ヘテロ変性障害（非限定的にカナバン病、ハンチントン病、神経セロイドリポフスチン症、アレキサンダー病、トゥーレット症候群、メンケス縮れ毛症候群、コケイン症候群、ハラールフォルデン-シュパッツ症候群、ラフォラ病、レット症候群、肝レンズ核変性症、レッシュ-ナイハン症候群、およびウンフェルリヒトールントボルク症候群を含む）、認知症（非限定的にピック病、および脊髄小脳失調症を含む）、癌（例えば、体内の他の場所の癌に起因する脳転移を含む、CNSの癌）が挙げられる。

30

40

【0079】

「神経障害薬」は、1つまたは複数の神経障害を治療する薬物または治療薬である。本発明の神経障害薬は、限定されないが、抗体、ペプチド、タンパク質、1つまたは複数のCNS標的の天然リガンド、1つまたは複数のCNS標的の天然リガンドの修飾型、アプタマー、抑制性核酸（すなわち、小さな抑制性RNA（siRNA）および短いヘアピンRNA（shRNA））、リボザイム、および小分子、または前述のいずれかの活性断片を含む。神経障害薬およびそれらが治療するために使用され得る障害の非限定的な例が本

50

明細書に提供される。

【0080】

「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞機能を阻害もしくは妨害する、および／または細胞死もしくは細胞破壊を引き起こす物質を指す。細胞傷害性薬剤は、限定されないが、放射性同位元素（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Rc^{186} 、 Rc^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、およびLuの放射性同位元素）；化学療法剤または薬物（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキシソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤）；成長阻害剤；核酸分解酵素等の酵素およびその断片；抗生物質；小分子毒素等の毒素、または細菌、真菌、植物もしくは動物由来の酵素活性毒素（それらの断片および／または変異体を含む）；ならびに本明細書に開示される様々な抗腫瘍剤または抗癌剤を含む。

10

【0081】

本明細書で使用される場合、「抑制性核酸」は、哺乳動物細胞に投与されると、標的遺伝子の発現の低下をもたらす、二本鎖RNA、RNA干渉、miRNA、siRNA、shRNA、もしくはアンチセンスRNA、またはそれらの一部、またはそれらの模倣物である。典型的には、核酸阻害剤は、標的核酸分子もしくはそのオルソログの少なくとも一部を含むか、または標的核酸分子の相補鎖の少なくとも一部を含む。典型的には、標的遺伝子の発現は10%、25%、50%、75%、さらには90~100%低減する。

【0082】

本明細書で使用される「治療用RNA分子」または「機能性RNA分子」は、アンチセンス核酸、リボザイム（例えば、米国特許第5,877,022号に記載される）、スプライスソーム媒介トランススプライシングをもたらすRNA（Puttaraju et al. (1999) Nature Biotech. 17:246；米国特許第6,013,487号；米国特許第6,083,702号を参照）、遺伝子サイレンシングを媒介するsiRNA、shRNAまたはmiRNAを含む干渉RNA（RNAi）（Sharp et al., (2000) Science 287:2431を参照）、ならびに当該技術分野で既知であるような「ガイド」RNAおよびCRISPR RNA等の他の非翻訳RNA（Gorman et al. (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:4929；米国特許第5,869,248号）等であり得る。

20

30

【0083】

「アンチセンス」は、長さに関係なく、核酸配列のコード鎖またはmRNAに相補的な核酸配列を指す。アンチセンスRNAは、個々の細胞、組織、またはオルガノイドに導入することができる。アンチセンス核酸は、修飾された骨格、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、もしくは当該技術分野で知られている他の修飾された骨格を含み得るか、または非天然のヌクレオシド間結合を含み得る。

【0084】

本明細書で言及される場合、「相補的核酸配列」は、相補的ヌクレオチド塩基対からなる別の核酸配列とハイブリダイズすることができる核酸配列である。「ハイブリダイズする」とは、ストリンジェンシーの好適な条件下で、相補的ヌクレオチド塩基間で二本鎖分子を形成する対を意味する（例えば、DNAにおいて、アデニン（A）はチミン（T）と塩基対を形成し、同様にグアニン（G）はシトシン（C）と塩基対を形成する）。（例えば、Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399；Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507を参照のこと）。

40

【0085】

本明細書で使用される場合、「siRNA」という用語は、特定の遺伝子または転写後の遺伝子の発現に干渉する二本鎖RNA分子を意図する。いくつかの実施形態において、siRNAは、RNA干渉経路を使用して遺伝子発現に干渉するかまたはそれを阻害するように機能する。同様の干渉または阻害効果は、ショートヘアピンRNA（shRNA）

50

、マイクロRNA (mRNA) および／または1つもしくは複数の修飾核酸残基を含む核酸 (siRNA、shRNA、またはmiRNA)、例えば、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド核酸 (LNA)、アンロックド核酸 (UNA)、またはトリアゾール連結DNA うちの1つまたは複数によって達成され得る。最適には、siRNAは18、19、20、21、22、23または24ヌクレオチド長であり、その3'末端に2塩基のオーバーハングを有する。これらのdsRNAは、個々の細胞または培養系に導入することができる。このようなsiRNAは、mRNAレベルまたはプロモーター活性を下方制御するために使用される。

【0086】

「造影剤」は、その存在および／または位置を直接的または間接的に検出することを可能にする1つまたは複数の特性を有する化合物である。そのような造影剤の例として、検出を可能にする標識部分を組み込んだタンパク質および小分子化合物が挙げられる。造影剤は、画像化においてシグナルまたはコントラストを提供するために使用される任意の化学物質または物質であり得る。例として、有機分子、金属イオン、塩もしくはキレート、粒子、標識ペプチド、タンパク質、ポリマー、またはリポソームが挙げられる。

【0087】

「個人」または「対象」は哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物 (例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ)、霊長類 (例えば、ヒト、およびサル等の非ヒト霊長類)、ウサギ、およびげっ歯類 (例えば、マウスおよびラット) を含む。特定の実施形態において、個人または対象はヒトである。

【0088】

「投与する」という用語は、生物学的作用の所望の部位に薬剤、化合物、または組成物を送達する方法を指す。これらの方法は、限定されないが、局所送達、非経口送達、静脈内送達、皮内送達、筋肉内送達、髄腔内送達、結腸送達、直腸送達、または腹腔内送達を含む。一実施形態において、本明細書に記載のポリペプチドは静脈内投与される。

【0089】

本明細書で使用される場合、「治療」(および「治療する」または「治療すること」等のその文法上の変形)は、治療されている個人の自然経過を変化させようとする試みにおける臨床的介入を指し、予防のためにまたは臨床病理学の過程においてのいずれかで行うことができる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患の進行速度の低下、病態の改善または緩和、および寛解または予後の改善を含む。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅らせるために、または疾患の進行を緩徐にするために使用される。

【0090】

薬剤、例えば医薬製剤の「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために必要な投与量および期間での有効な量を指す。

【0091】

「薬学的に許容される」という句は、健全な医学的判断の範囲内で、妥当な利益／リスク比に見合って、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織との接触における使用に適した、これらの化合物、材料、組成物および／または剤形を指す。本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、製薬業界で一般的に使用される薬学的に許容される担体と組み合わせた活性剤を指す。

【0092】

本明細書で使用される場合、「ウイルスベクター」、「ベクター」または「遺伝子送達ベクター」という用語は、核酸送達ビヒクルとして機能し、ビリオン内にパッケージ化されベクターゲノム (例えば、ウイルスDNA [vDNA]) を含む、ウイルス (例えば、AAV) 粒子を指す。代替として、いくつかの文脈において、「ベクター」という用語は、ベクターゲノム／vDNAのみを指すために使用されてもよい。

【0093】

本明細書に開示されるように、いくつかの範囲の値が提供される。文脈上明確に別段の指示のない限り、下限の単位の10分の1までの、その範囲の上限と下限との間にある各介在値もまた具体的に開示されることを理解されたい。任意の記載される値または記載される範囲内の介在値と、その記載される範囲内の任意の他の記載される値または介在値との間の各小さい範囲は、本発明に含まれる。これらのより小さい範囲の上限および下限は、その範囲に独立して含まれてもまたは除外されてもよく、記載される範囲内に任意の具体的に除外される限界があることを条件として、より小さい範囲にいずれか一方もしくは両方の限界が含まれるか、またはどちらも含まれていない各範囲も本発明に包含される。記載される範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界のいずれかまたは両方を除外した範囲も本発明に含まれる。

10

【0094】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値の許容範囲内を意味し、これは、値がどのように測定または決定されるか、例えば、測定システムの限界に一部依存する。例えば、「約」は、所与の値の最大20%、好ましくは最大10%、より好ましくは最大5%、なおもより好ましくは最大1%の範囲を意味することができる。代替として、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、値の1桁以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内を意味することができる。特に記載されない限り、「約」という用語は、特定の値の許容可能な誤差範囲内を意味する。

【実施例】

【0095】

20

実施例1 材料および方法

この実施例では、以下の実施例2～5で使用される材料および方法について説明する。

【0096】

動物。全ての実験に、8～12週齢の雄のC57BL/6マウス(Charles River)を使用した。指示された場合、8～12週齢のC57BL/6バックグラウンドの雄の全アクアポリン-4ノックアウト(Aqp4^{-/-})マウスを使用した(21)。雄の生後6ヶ月のAPP/PS1^{+/+}マウス(Jackson Laboratory)をAβ抗体実験に使用した。

【0097】

大槽内注入。KX群のマウスの体重を測定し、ケタミン(100mg/kg、i.p.)とキシラジン(10mg/kg、i.p.)の混合物で麻酔した。その後、動物を定位固定フレームに固定し、実体顕微鏡を使用して大槽を外科的に露出させた。ハミルトン注射器にポリエチレンチューブを介して取り付けられた30G針を使用して、大槽腔にカニユーレを挿入した。実験パラダイムに応じて、針をシアノアクリレート接着剤で固定し、シリンジポンプ(Harvard Apparatus)でトレーサーを注入した(以下を参照)。覚醒群に無作為化されたマウスを2%イソフルランで麻酔し、頭蓋骨をカスタマイズされたヘッドプレートに接着し、拘束チューブに入れてから、上記と同じ外科的処置を行った。注入開始時間後30分間トレーサーを循環させ、CSFコンパートメントが減圧されるのを防ぐために、実験の間、針を所定の位置に留置した。コア温度(37℃)および麻酔深度は実験を通して維持した。30分の終了時に、動物を断頭し、脳を蛍光または放射性同位元素トレーサー分析のために処理した。

30

40

【0098】

CSFトレーサー。AlexaFluor647結合ウシ血清アルブミン(BSA-647、66kDa、Invitrogen)を人工CSF(0.5% m/v)中で構成し、蛍光CSFトレーサーとして使用した。放射性標識¹⁴C-イヌリン(6kDa、Perkin Elmer)および³H-デキストラン(40kDa、American Radiolabeled Chemicals)を、それぞれ、0.1および10μCi/μLの濃度で人工CSFに溶解した。APP/PS1実験では、AlexaFluor488結合抗β-アミロイド抗体(クローン6E10、1mg/mL; BioLegend、カタログ番号803013)を注入し、120分間循環させた。蛍光トレーサーおよび

50

抗体を、 $10\mu\text{L}$ の総量で $2\mu\text{L}/\text{分}$ または $1\mu\text{L}/\text{分}$ の速度で大槽内に注入した。放射性同位元素トレーサーは、 $5\mu\text{L}$ の総量で $1\mu\text{L}/\text{分}$ で注入した。 $2\mu\text{L}/\text{分}$ と $1\mu\text{L}/\text{分}$ の注入速度を直接比較すると、インビボイメージング ($P=0.971$ 、双方向反復測定ANOVA) またはエクスピボ冠状断 ($P=0.939$ 、対応のないt検定) でBSA-647の流入に差は見られなかった。

【0099】

経頭蓋インビボマクロスコピックイメージング。インビボイメージングのために、大槽にカニューレを挿入する前に、背側頭蓋冠を覆っている皮膚を切開し、横方向後方に曲げた。CSFトレーサーの脳内への進入は、PRIOR Lumen1600-LED光源およびFlash4.0デジタルカメラ (Hamamatsu) を使用した蛍光マクロスコピー (MVX10, Olympus) によって画像化した。定位固定フレームに固定されたマウスを顕微鏡ステージに置き、20倍の倍率の画像を遠赤色発光チャネル (647nm) で取得した。MetaMorph Basicイメージングソフトウェア (Molecular Devices) を使用して、注入開始後0~30分間、1分間隔で画像 (2048×2048 ピクセル; $5.7120\mu\text{m}/\text{ピクセル}$) を収集した。露光時間は、イメージングシーケンスの期間を通しておよび実験群間で一定に維持した。

【0100】

フロントトラッキング。脳内の蛍光CSFトレーサー流入の領域および速度を定量化するために、発明者らは移流-反応-拡散の観点から最近開発されたアルゴリズムを採用した (56)。2次元濃度フィールドの時系列を考慮して、このアルゴリズムにより低濃度領域と高濃度領域を分離する「フロント」の位置を追跡した。アルゴリズムは、フロントの伝播を定量化する空間的および時間的に分解された速度測定値を出力する。流入速度は、群のデータ全体を平均して、各群の平均フロントスピード測定値を取得することによって計算した。伝播フロントは、(0~255の8ビットスケール上で) 175の閾値を使用して特定された; しかしながら、その結果は、異なる閾値の選択に対してかなりロバストであることが留意された。これと同じ閾値が全ての時系列の画像に使用され、全ての実験にわたって同様のイメージング条件を維持するように注意が払われたため、これを正当化した。固定閾値は、フロントの物理的意味を保持し、異なる実験からの集団間の定量的比較を可能にした。さらなる詳細およびMATLAB (MathWorks) 用に記述されたコードのコピーは、オンラインで入手可能である (56)。

【0101】

インビボ二光子イメージング。麻酔したマウスの右頭頂骨の上に3mmの頭蓋窓を設置した。窓をアガロース (37°C で0.8%) で覆い、ガラス製のカバーガラスで密封した。イメージングは、Chameleon Ultra IIレーザー (Coherent) および20倍の水浸対物レンズ (1.0NA , Olympus) を備えた共鳴スキャナーのBスコープ (Thorlabs) を使用して行われた。テキサスレッドに結合したウシ血清アルブミン (BSA-TxRd、 66kDa) のCMトレーサー注入の前に、血管内フルオレセインイソチオシアネート-デキストラン (FITC-デキストラン、 $2,000\text{kDa}$) を投与した。注入の開始から30分間、毎分MCA上でZスタックを撮影した。CSFの流入を測定するために、血管周囲腔に3つの円形の関心領域 (ROI) の輪郭を描き、各ROIの測定を時点ごとに行った (ThorImageLS)。3つ全てのROIの蛍光強度を平均し、ピーク蛍光 ($\Delta F/F_{\text{max}}$) に対して正規化し、パーセントで表した。トレーサーが出現するまでの時間は、蛍光がバックグラウンドシグナルを上回った最初の時点として計算した。直交再構成は、Imaris (Bitplane) を使用して行った。

【0102】

溶液。対照マウスに等張生理食塩水 (ddH_2O 中0.34MのNaCl、 $20\mu\text{L}/\text{g}$ 、i.p.) を投与した。マンニトール (0.34M NaCl中1M、 $30\mu\text{L}/\text{g}$ 、i.p.) または高張食塩水 (ddH_2O 中1MのNaCl、 $20\mu\text{L}/\text{g}$ 、i.p.) のいずれかで高浸透圧を誘発した。腹腔内注入の30分後、血漿試料を採取し、マウス

を断頭した。マイクロ浸透圧計 (Advanced Instruments) を使用して、血漿浸透圧を3回測定した。

【0103】

脳水分量測定。脳を切開し、直ちに秤量した (w_{wet} ; g)。一定の重量に達するまで組織を 65°C で乾燥させた (約48時間)。脳を再秤量し (w_{dry})、組織の水分含有量 (mL/g 乾燥重量) を計算した

$$\frac{w_{wet} - w_{dry}}{(w_{dry})}$$

【0104】

頭蓋内圧および動脈圧の測定。別の群の動物をケタミン／キシラジンの混合物で麻酔した。その後、aCSFを充填した剛性ポリエチレンチューブに接続された30G針を上記のように大槽に挿入し、動脈カテーテルを大腿動脈に配置した。ラインを圧力変換器およびモニター (World Precision Instruments) に接続した。記録を安定させた後、35分間継続的に記録した (5分のベースラインおよび腹腔内注入後30分)。Digidata 1440AデジタイザーおよびAxoScopeソフトウェア (Axon Instruments) を使用してシグナルをデジタル化し、記録した。頭蓋内圧および平均動脈圧の記録は、MATLAB (MathWorks) を使用して処理および分析した。

【0105】

レーザードップラー流速計測。脳血流量 (rCBF) の相対的变化は、レーザードップラー流速計 (マイクロチップ付きPF5010 Laser Doppler Perfusion Module、PR 418-1、Perimed) を使用して測定した。光ファイバプローブの先端を、シアノアクリレート接着剤で露出した頭蓋骨に直接固定した。シグナルは、1440AデジタイザーおよびAxoScopeソフトウェア (Axon Instruments) を使用して収集した。各マウスについて、腹腔内溶液の投与の5分前と30分後の両方でrCBFを記録した。rCBF記録は、MATLAB (MathWorks) を使用して処理および分析した。

【0106】

BBBの透過性の評価。BBB破壊の定量化のために、生理食塩水中のFITC結合デキストラン (70kDa; Sigma-Aldrich) の1%溶液 (4mL/kg 体重) を大腿静脈から注入した。血漿の張度の操作後30分間デキストランを循環させ、その時点で血漿試料を採取し、マウスを以下に記載するように灌流固定した。デキストランの5分後に、右外頸動脈のカテーテルを介して陽性対照に2Mマンニトール注入 (0.64mL/分 で30秒間) を行った。脳を採取し、切片を作製し、FITCの血管外漏出を画

像化して定量化した（以下を参照）。F I T Cデキストランの血漿濃度は、血漿試料をP B Sで1：4に希釈し、室温（24℃）で、蛍光マイクロプレートリーダー（S p e c t r a M a x M 2、M o l e c u l a r D e v i c e s）で、カットオフ530nm超で励起458nm、発光538nmで3回分析することにより計算した。デキストラン濃度は、試料の相対蛍光を、線形回帰に適合させた標準曲線（0.0～1.0mg/mL、0.1mg/mLステップ；P B S中のF I T C-デキストラン70kDa）と比較することによって推定した。溶血が見られる血液試料は、分光光度法による吸光度の読み取りに干渉するため、分析から除外された。

【0107】

イメージング深度分析。マクロスコピックイメージングを使用した蛍光検出の深度は、照明源の出力、フルオロフォアの励起／発光波長、および露光時間に大きく依存する。しかしながら、発明者らは、経頭蓋光学イメージングの検出の深さを推定しようとした。このために、以前のようにB S A-647の大槽内注入を行いながら、マクロスコプを使用して麻酔したマウスを画像化した。画像は、5、10、15、20、25、または30分のいずれかの期間、60秒ごとに取得した。対応する停止時間の直後にマウスを殺した。脳を採取し、4% P F A中で一晩滴下して固定した後、切片を作製した（以下を参照）。冠状切片におけるトレーサー蛍光を定量化して、蛍光検出の深さを決定した（画像分析を参照）。別の一連の実験では、イメージングの浸透深度を635nmの波長で計算した。イメージングに最適なトレーサー濃度を決定するために、B S A-647を段階希釈し（10～1×10⁻⁴mg/mL、10刻み）、10μLを黒色の96ウェルプレートに等分した。各ウェルは、インビボ実験と同じ倍率および露光時間（100ms）を用いてマクロスコプで画像化した。その後、キャピラリーに0.1mg/mL B S A-647をロードし、両側を密封し、4%アガロースを含むペトリ皿に表面と同じ高さで埋め込んだ。厚さが増加する（200～4000μm）急性冠状スライスを対照マウスから得、画像化のために色素を充填したキャピラリー上に切片を置いた。スライスは、組織の光学特性を維持するために、イメージングの間はa C S F中に維持した。

【0108】

アミロイド-βプラーク標識。大槽への注入の24時間前に、D M S O（10%）、プロピレングリコール（45%）、およびP B S（45%）に溶解したM e t h o x y - X 04（M e X 04、T o c r i s、10mg/kg、i. p.）を、以前に記載されたようにA P P / P S 1マウスに腹腔内注入した（59）。

【0109】

組織収集および処理。蛍光C S Fトレーサー流入分析のために、注入開始の30分後にマウスを断頭し、4℃で一晩、脳を4%パラホルムアルデヒド（P F A；S i g m a - A l d r i c h）中で滴下して固定した。画像取得が完了してから30秒以内に脳を採取して固定した。B B Bの透過性を評価するために、マウスを0.1Mの氷冷P B S（pH 7.4、S i g m a - A l d r i c h）、続いて4% P F Aで経心的に灌流した。脳組織を頭蓋骨および硬膜から注意深く切開し、4℃の4% P F A中で一晩後固定した。免疫組織化学では、マウスを以前と同じように灌流固定したが、P F A灌流ステップの前に、T r i t i c u m v u l g a r i s由来のF I T C結合レクチン（25μg/mL；S i g m a - A l d r i c h）を氷冷P B S溶液に添加した。A P P / P S 1実験では、マウスを上記のようにレクチン灌流したが、A l e x a F l u o r 647結合小麦胚芽凝集素（W G A）レクチン（15μg/mL；I n v i t r o g e n）を使用した。

【0110】

免疫組織化学。C S Fトレーサーが動脈周囲腔を介して脳内に進入したかどうかを確認するために、フリーフロート法を使用して冠状スライスをA Q P 4について染色した。スライスを室温で1時間ブロックし（7%正常口バ血清、N D S、P B S中0.5% T r i t o n）、次に一次ウサギ抗A Q P 4（1：500；0.1% T r i t o n / P B S中1% N D S、M i l l i p o r e、カタログ番号A B 3594）抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。次に、切片を二次C y 3結合口バ抗ウサギ（1：250；J a c k s

on ImmunoResearchカタログ番号711-165-152)抗体とともに室温で2時間インキュベートし、洗浄した。DAPI (Invitrogen)を含むProLong Gold Antifadeで脳切片をマウントし、イメージング前に24時間乾燥させた。

【0111】

エキスピボ蛍光イメージング。切片作製の前に、実体顕微鏡(MVX10、Olympus)でCSFトレーサー(BSA-647)の背側全脳画像を16倍の倍率で取得した。その後、キャリブレーションされたビブラトム(VT1200S、Leica)を使用して、冠状スライス(厚さ100 μ m)を取得した。脳梁の前面から開始して、各動物について合計6つの切片が取得されるまで、5つの区分ごとに1つの切片を収集した。MeX04実験用に、DAPI (Invitrogen)を含むProLong Gold AntifadeおよびFluoromount-G (SouthernBiotech)を用いて脳切片をマウントした。CSFトレーサーの脳内への進入は、落射蛍光マクロスコープ(MVX10、Olympus)によって評価した。シングルチャンネル画像は、MetaMorph Basicソフトウェア(Molecular Devices)を用いて低倍率(20倍)で取得した。露光は対照脳に基づいて決定し、全ての群で一定に維持した。脳内へのトレーサーの動きをよりよく視覚化するために、発明者らは、CSFトレーサー(BSA-647)、生体内レクチン(FITC)で冠状スライスを画像化し、FluoView (FV500、Olympus)ソフトウェアを使用してレーザー走査型共焦点顕微鏡(IX81、Olympus)でAQP4(Cy3)について染色した。左右両方の背側皮質からのマルチチャンネル画像を取得した(40倍の倍率でステップサイズ2 μ mの40 μ mzスタック)。APP/PS1マウスにおいて、モンタージュ落射蛍光顕微鏡(BX51 OlympusおよびCellSensソフトウェア)を使用して冠状断を4倍の倍率で画像化し、共焦点で高倍率の20倍および100倍の画像を使用した(Leica SP8およびLASXソフトウェア)。

【0112】

画像分析。全ての画像は、ImageJソフトウェア(国立衛生研究所、imagej.nih.gov/ij/)を使用して分析した(60)。インビボでグリーンパティックの流入を測定するために、カスタマイズされたマクロを開発した。関心領域(ROI)は、露出した頭蓋骨の周囲に基づいて定義し、イメージングセッションで収集された31画像(8ビット; 2048 $\times$ 2048ピクセル)のスタックにオーバーレイした。マクロにより、各時点(0~30分)の平均ピクセル強度を定量化した。ImageJルックアップテーブル(Jet)を使用して画像に疑似カラーを付け、ピクセル強度(0~255)をより良好に表示した。以前に記載したように、トレーサーおよび抗体の浸透性も、冠状切片においてエキスピボで定量化した¹。各スライスを平均ピクセル強度について分析し、1つの脳から採取した6つの切片全てについて平均を計算した。A β プラークの定量化のために、Fijiを使用して4 $\times$ モンタージュ冠状画像を分析した(61)。画像はMeX04チャンネルで自動的に閾値処理され(円法)、各プラークにROIを生成した。プラーク負荷は、各マウスの3つの冠状断からの1 cm²当たりのプラークの平均数から計算した。閾値処理したMeX04画像をマスクに変換し、MeX04陽性領域の割合を計算するために使用した。同じプロセスに従ってA β 抗体蛍光のマスクを生成し、MeX04陽性領域全体に対するMeX04抗体陽性とA β 抗体陽性の両方の面積パーセントをターゲットエンゲージメントとみなした。同じ冠状断を使用して、共標識されたプラークおよび最も近い血管周囲腔の最近傍分析をFijiおよびAmira(FEI)を使用して実行した。3次元再構成は、100倍の共焦点Zスタック(0.5 μ mステップサイズ、Leica SP8)からAmira(FEI)を使用して行われた。蛍光検出の深さを推定するために、Fijiを使用して、個々のマウスからの6つの冠状断について、背側凸面から脳の基部(合計7mm)までの7つの関心領域(それぞれ深さ1mm)の平均ピクセル強度を描画した。5分の時点の全ての冠状スライスからバックグラウンド蛍光を計算し、バックグラウンドより2標準偏差上にシグナルの閾値を配置した。各冠状断からの

全ての1mm ROIの平均を、個々のマウスについて計算した。群内の全てのマウスのMPIが閾値よりも高い場合、トレーサーが存在するとみなされた。FITC-デキストランに対するBBBの透過性は、閾値手法を使用して、各マウスの6つの冠状断の面積パーセントとして定量化した。閾値は、陽性対照群からの全ての冠状断に対してフィジー（Otsu）を使用し、全てのスライスの平均を計算して設定した。次に、平均閾値レベルを実験群の全ての断面に適用した。

【0113】

放射性同位元素の流入。脳内への溶質の流入を評価するために、放射性標識トレーサー³H-デキストラン（50 μCi）および¹⁴C-イヌリン（0.5 μCi）を上記のように大槽内に注入した。30分後、動物を迅速に断頭し、頭蓋骨および硬膜を取り除き、脳を採取した。脳の放射活性は、大槽内注入の直前にシンチレーションバイアルに直接入れた5 μLアリコートで検出された総放射活性に対して正規化した。全ての脳組織を秤量し、0.5 mLの組織可溶化剤（Solvable、PerkinElmer）中で一晩可溶化した。可溶化してから、5 mLのシンチレーションカクテル（Ultima Gold、PerkinElmer）を添加した。注入物対照は、組織試料と同じ方法で処理した。全ての試料は、シンチレーションカウンター（LS 6500多目的シンチレーションカウンター、ベックマンコールター）を使用して、液体シンチレーション分光法によって分析した。注入後に脳内に残っている放射活性（1分当たりの崩壊数：dpm）（注入された用量のパーセント：%ID）は、

$$\frac{R_b}{R_i} \times 100$$

として決定され、式中、 R_b は実験終了時に脳内に残っている放射能であり、 R_i は各実験の注入対照における放射活性である。流入率は%IDとして推定された。デキストランおよびイヌリンは、CNS内で活発に輸送されない不活性な極性分子であり、分子量が異なるため、バルクフローの存在を評価するための理想的なトレーサーである。

【0114】

統計分析。全ての統計的検定は、GraphPad Prism 7（GraphPad Software）で行われた。検定は、分析されるデータセットに基づいて選択され、

図の凡例に報告されている。全ての統計的検定は両側検定であり、正確なP値は0.05レベルの有意性で計算された。特に明記しない限り、全ての値は平均±SEMとして表される。

【0115】

研究の承認。全ての実験は、米国の法律、農務省の規制を順守し、国立衛生研究所のガイドラインに従って行われた。実験はUniversity of RochesterのUniversity Committee on Animal Resources (プロトコル番号2011-023)によって承認され、使用される動物の数を最小限に抑えるための努力がなされた。

【0116】

実施例2 インビボ経頭蓋蛍光マクロスコープは、グリンパティック系の流れの非侵襲的な脳全体のイメージングを可能にし、覚醒マウスおよびAqp4^{-/-}マウスにおけるCSF流入低減の二光子顕微鏡およびエキスビボ顕微鏡の所見を裏付ける。

グリンパティック系内のCSF-間質液(ISF)交換に関する以前の研究では、CSFまたはISFベースのトレーサーの流動を画像化するために、従来のエキスビボの蛍光顕微鏡法およびインビボの二光子顕微鏡法を利用していた(21、22、28、29、35、36)。詳細な細胞および分子組織を含む脳全体のグリンパティック機能の評価には優れているものの、脳断面のエキスビボイメージングは動的な時間情報を欠いており、グリンパティック系の流れの時間的パターンおよび速度についての間接的な推論を行う必要がある。逆に、インビボ二光子イメージングは、視野が比較的狭く、イメージング深度が浅いにもかかわらず、個々のマウスの脳組織におけるCSFトレーサーの出現速度をリアルタイムで測定することができる(21、28、29)。

【0117】

その結果、発明者らは、蛍光マクロスコープを使用して経頭蓋的なグリンパティック系の流れの非侵襲的なインビボタイムラプスイメージングのための新しい技術を開発した。

(図5)。この技術は、フルオロフォアを励起するためのLED照明源と、蛍光検出用の高効率CMOSカメラを備えたマクロズーム顕微鏡とを使用して、無傷の頭蓋骨を通して生げっ歯類の大槽内に送達された蛍光トレーサーを画像化することからなる。調整可能なLEDにより波長間的高速切り替えを実現することができ、クアッドフィルターキューブにより、高速のマルチチャンネル画像取得が可能になる。マクロスコープは広い視野を有し、皮質表面全体、および最大1~2mmの浸透深度のメゾスコピックイメージングを可能にする(図6)。

【0118】

この技術を検証する際に、発明者らは、覚醒マウスおよびAQP4を欠くマウス(Aqp4^{-/-})におけるグリンパティック系のCSF流入の低減に関する以前のインビボおよびエキスビボの所見を最初に複製した(21、28)。全ての群の麻酔したマウスは、背側頭蓋冠を覆う頭皮を反転させ、大槽内にカニュレを留置した。野生型およびAqp4^{-/-}マウスの群は、その後、ケタミン/キシラジン(KX)麻酔(KXおよびKX-Aqp4^{-/-})下に維持し、一方、別の群の野生型マウスは、頭部を固定するために頭蓋骨に金属プレートを固定し、目を覚ます(覚醒)前にプラスチック製の拘束チューブに入れた。

【0119】

続いて、動的画像取得のためにマウスを蛍光マクロスコープのステージに移動し、AlexaFluor647結合ウシ血清アルブミン(BSA-647、66kDa)を大槽内に注入した(図1Aおよび図1B)。頭蓋内注入は、ICPの軽度の一時的な増加を引き起こしたが、トレーサーの出現前に正常化した(30)。トレーサーが皮質表面から約5~6mm下の基底槽に到達すると直ちに蛍光が検出された(図7)。脳を採取して4%パラホルムアルデヒド(PFA)中で固定し、緩衝液中で洗浄する前に、脳内へのBSA-647の流入を30分にわたって画像化した(図1B)。

【0120】

麻酔したマウスと覚醒マウスの両方で、この経頭蓋マクロスコピック手法により、イン

10

20

30

40

50

ビボ二光子（図8）およびエクスビボイメージング技術を使用して以前に特徴付けられたものと同じのグリンパティック系のCSF流入のパターンが明らかになった。蛍光タンパク質トレーサーは、最初に、嗅覚前頭槽および松果体陥凹等の大きな吻側および尾側のくも膜下腔内に出現し、軟膜動脈周囲腔内の背側大脳凸面上を数分以内に運ばれた（図8）。このトポグラフィーは、中大脳動脈の前部および後部皮質部の領域を追跡した（MCA；図8および図9）。

【0121】

注入ポンプは、5分で、またはMCAの基部でかすかな蛍光シグナルが最初に認められたときに停止し、その後の全てのトレーサーの出現が生理学的バルクフローに起因する可能性があることが示された。30分間のイメージング実験の終わりに向かって、トレーサーは硬膜静脈洞に隣接する皮質架橋静脈のPVS内に蓄積し始めた。以前に報告された所見を裏付けるように、KXマウスと比較して覚醒群とKX-Aqp4^{-/-}群の両方で有意に少ないグリンパティックの流入が見られた（図1Cおよび図1D）。興味深いことに、30分の時点で、麻酔したAqp4^{-/-}マウスでは、覚醒群よりもグリンパティックの流入が有意に低く（図1D）、水路の欠損によるグリンパティック機能への影響が意識状態の影響を上回っていたことが示唆される。

【0122】

上記のように、脳への髄腔内容物のCSFベースの送達に関する以前の研究では、トレーサーによってカバーされる表面積と流入動態を同時に定量化することはできなかった。MRIでさえ、空間分布および時間的力学を特徴付ける独自の能力にもかかわらず、PVSのレベルでCSFフローを評価するために必要な空間分解能を欠いている（22）。この制限を克服するためにマクロスコピックイメージングパラダイムと組み合わせてフロントトラッキング分析を使用して、軟膜動脈周囲腔内のCSFの流れが、KXで麻酔したマウスでより高く、覚醒群およびKX-Aqp4^{-/-}群の2%未満と比較して背側皮質表面の約10%を占めていたことを実証した（図1E-G）。さらに、覚醒群とノックアウト群では、血管周囲腔には本質的にトレーサーがなく、蛍光領域のほとんどが嗅覚前頭槽に限定されていた（図1E）。

【0123】

画像化されたグリンパティックの流動がくも膜下腔内でのみ発生している可能性を排除するために、採取された脳にエクスビボで従来の蛍光イメージングを行った。この分析は、背側皮質全体の蛍光シグナルの分布が、インビボでのシーケンスの最終30分時点で見られるものと一致することを示し（図10）、したがって、マクロスコプで観察されたCSFフローが、くも膜下腔内ではなく組織レベルで発生していたことを支持するものである。

【0124】

冠状切片の作製に続いて、脳スライスを画像化して、より深い脳構造へのトレーサー浸透度を決定した。この場合も、インビボイメージングシリーズでの観察と並行して、覚醒マウスおよびKX-Aqp4^{-/-}マウスの脳組織には、KX群よりも有意に少ないトレーサーが存在していた（図1H、上パネル、1I）。最後に、高解像度の共焦点画像は、血管周囲腔のスペーストレーサー分布が覚醒マウスおよびKX-Aqp4^{-/-}マウスよりもKXコホートで高いことを示し（図1H、右下パネル）、これらの群に血管周囲の流入がないというインビボ観察が裏付けられ、また軟膜表面に沿った拡散を介してトレーサーの流入が発生しないことが裏付けられた（27）。

【0125】

まとめると、これらの所見は、インビボにおけるグリンパティックのCSF流入の脳全体にわたる経頭蓋イメージングのための蛍光マクロスコピーの使用の正当性を立証するものであり、これらの流れが血管周囲のAQP4発現および睡眠に伴う間質腔容積の拡大に依存することを示す以前の研究を要約している（21、28）。さらに、これらの新しいデータは、AQP4欠損による血管周囲腔と間質腔との間の流体の流れに対する抵抗の増加が、覚醒に関連する間質腔の収縮よりもはるかに重大な抑制効果をグリンパティックの

10

20

30

40

50

流れに与えることを示唆している。グリンパティック機能におけるAQP4の重要な役割に関する最近の批判(37)は、マウス脳内の溶質分散におけるAQP4の不可欠な役割を実証する4つの独立した研究室からの最近の研究によって検証されている(38)。

【0126】

実施例3 血漿高浸透圧は、麻酔したマウスにおけるCSF流入を有意に増加させた。

この実施例では、血漿高浸透圧がより大きな脳の容積へのCSFベースのトレーサーの送達を増強できるかどうか、およびそのような増強がグリンパティック経路を含む血管周囲腔のネットワークを介して起こるかどうかを調べるためにアッセイを行った。

【0127】

血漿高浸透圧は、高張食塩水(HTS)またはマンニトール注入のいずれかを使用してICP上昇の治療のために臨床的に誘発されることが多い(49)。グリンパティック機能への影響を評価するために、両方の高浸透圧法を用いて、HTSまたはマンニトールの特異性を排除した。簡単に言えば、上記のように調製されたKXで麻酔した野生型マウスに、等張食塩水(KX)、高張食塩水(+HTS)、または高張マンニトール(+マンニトール)のいずれかの腹腔内(i.p.)注入を行ったところ(図11Aおよび図11B)、一貫して30分間続く有意に上昇した血漿浸透圧がもたらされた(図11C~図11E)。特に、HTSおよびマンニトールを注入したマウスで達成された血漿張度では、BBBの透過性の有意な増加は見られなかった(図12A~図C)。両方の処理群において、等張液または高張液の腹腔内注入の直後に、BSA-647を大槽に注入し、トレーサーの分布領域および動態を上記の経頭蓋顕微鏡手法を用いて30分間画像化した(図2A)。以前の研究(27、50、51)と一致して、脳内へのCSFトレーサー進入の主な経路は、MCAを取り囲む血管周囲腔を経由していた(図2B)。

【0128】

これらのデータは、容量調節の課題に応じて、血管周囲腔が、実際に、容量が減少した脳にくも膜下CSFを送達するための高速導管として機能することを示している。しかしながら、さらに特筆すべきは、HTSまたはマンニトールチャレンジのいずれかによる血漿高浸透圧が流入領域のほぼ5倍の増加をもたらし、CSFトレーサーが背側皮質表面の約60%を覆う一方で、送達する時間約半分に短縮したという発見であった。(図2Cおよび図2D)。等張対照と比較して、HTSおよびマンニトール群の皮質表面全体で流入速度が大幅に増加したことが分かった(図2Eおよび図2F)。血漿高浸透圧は、Aqp4-/-マウスで見られるCSF流入の阻害を、野生型に匹敵するレベルまで無効にすることができたため、この効果はAQP4発現とは無関係であった(図13)。

【0129】

このトレーサー流入の増強がくも膜下腔に限定されているという可能性を排除するために、脳および軟髄膜を頭蓋冠から取り除き、従来のエキスビボ蛍光顕微鏡検査の前に脳組織を洗浄した。この場合、トレーサー分布のパターンは、インビボイメージング実験の30分の時点で見られたものを反映しており、トレーサーのほとんどが軟膜下または軟膜の血管周囲腔を占めている(図2G、左下パネルおよび図2B、30分のパネル)。さらに、冠状脳断面のイメージングは、HTSおよびマンニトール群の脳実質内の深い位置で有意に大きなトレーサーシグナルを示しており、皮質の貫通動脈の血管周囲腔を介して脳内に運ばれたことは明らかである(図2G、右上および右下のパネル;図2H)。相関分析により、新たに記載されたインビボ経頭蓋マクロスコピック手法を用いてキャプチャされた蛍光シグナル、およびエキスビボ全脳蛍光と、エキスビボ冠状断から従来の方法で取得されたシグナルとの間に強い正の関係が明らかになり(図14Aおよび図14B)、ここでも同様に、インビボトレーサーの動態は、組織レベルのCSFおよび溶質の流動を反映していることが示唆される。

【0130】

最後に、蛍光トレーサーの量と相対的な蛍光ユニットとの関係は、飽和していないシグナルレベルでのみ線形であるため、³H-デキストラン(40kDa)および¹⁴C-イヌリン(6kDa)の2つの放射性トレーサーを使用して、脳組織へのグリンパティックの

10

20

30

40

50

C S F 流入の高浸透圧によって誘発される増強を定量化した。脳実質内へのトレーサーの進入が注入パラダイムのアーティファクトではなく、生理学的バルクフローを真に表していることを確認するために、蛍光トレーサーの半分の速度体および積で放射性同位元素トレーサーを大槽 C S F に注入した（1 対 2 μ L / 分、それぞれ 5 分以上）。血漿高浸透圧の両方の条件で、注入されたトレーサー全体の約 40 % が脳実質に送達され、脳へのトレーサー取り込みの割合が約 125 % 増加することが分かった（図 2 I および図 2 J）。特に、血漿浸透圧を予測因子として使用すると、インビボ経頭蓋またはエキスビボ冠状断の蛍光領域に対する組織の放射性同位元素の取り込みの線形回帰分析は、同様の回帰の傾きで有意な正の関係を示した（図 14 C および図 14 D）。これらの 2 つの独立した証拠は、蛍光トレーサーと放射性同位元素トレーサーの分子量における 10 倍以上の違いに関係なく、バルクフローがトレーサー流入を媒介するという概念を支持し、さらに、非侵襲的に取得されたインビボ蛍光データと最終的な放射性同位元素試験の両方がグリーンパティック動態の同様の定量的評価を提供することを示唆している。

10

【0131】

実施例 4 血漿高浸透圧は、グリーンパティック機能の覚醒状態依存性阻害を無効にする

以前の研究では、覚醒状態でのグリーンパティック機能の大幅な抑制が実証されているため（28）、血漿高浸透圧が覚醒に関連した C S F 流入の阻害を克服できるかどうかを調べるためにアッセイを行った。上記と同様の手法を使用して、等張食塩水、H T S、または高張マンニトールのいずれかの腹腔内注入後、覚醒マウスに B S A - 647 の大槽内注入を行い、脳の取り外しおよび固定の前に 30 分間の経頭蓋マクロスコピックイメージングを行った（図 3 A）。

20

【0132】

驚くべきことに、インビボ経頭蓋イメージングシーケンスのフロントトラッキング分析により、血漿高浸透圧が 30 分でトレーサー流入領域の約 20 倍の増加を引き起こしたことが示されたことが分かった（図 3 B ~ 図 3 D）。さらに、トレーサーの流入速度は、覚醒高浸透圧チャレンジ群の背側皮質全体で約 1.5 倍速かった（図 3 E および図 3 F）。最後に、冠状断の検査により、K X 麻酔コホートでの観察と一致して、H T S およびマンニトール注入群の両方で深部脳構造へのトレーサー流入の有意な増加が示された。この場合も、このトレーサー流入の増強は、貫通動脈の血管周囲腔を介して発生する傾向があった（図 3 G および図 3 H）。

30

【0133】

H T S およびマンニトール等の高浸透圧剤は、平均動脈圧（M A P）、脳血流量、および I C P に影響を与えることが以前に示されている（52、53）。その結果、これらのパラメーターの 1 つにおける張度によって誘発される変化が、観察されたグリーンパティックの C S F 流入の増強の原因である可能性があるかどうかを決定するためにアッセイを行った。ここでは、両方の高浸透圧チャレンジが M A P を低減させたが、H T S の効果は一時的であり、腹腔内注入から 15 ~ 20 分以内に消滅することが分かった（図 15 A）。同様に、マンニトール投与後、相対的脳血流量（r C B F）がわずかに低減したが、H T S 群では 30 分間の記録期間を通して r C B F が維持された（図 15 B）。それどころか、I C P は、等張対照と比較して、両方の高浸透圧群で有意にかつ一貫して低下した（図 15 C）。この正味の負の I C P は、B B B を横切る I S F の流出に起因し（図 15 D）、脳組織への C S F 流入を増加させるために必要な推進力を提供した可能性が高い。重要なことに、血管柱への脳水のこの移動は、無傷の B B B を横切って発生した（図 12 A ~ C）。

40

【0134】

実施例 5 血漿高浸透圧は、生後 6 ヶ月の A P P / P S 1 マウスにおけるグリーンパティック輸送をレスキューし、抗 A β 抗体の送達およびターゲットエンゲージメントを増強する。

麻酔および覚醒の両方の条件で、血漿高浸透圧が脳への C S F 流入を増加させることが実証されたため、発明者らは次に、このパラダイムがグリーンパティック経路を介した実験的治療薬の脳全体にわたる分布を改善するツールとして使用できるかどうかを判断しよう

50

とした。結果的に、血漿高浸透圧がADのマウストラנסジェニックモデル（APP／PS1⁺／-）におけるグリンパティックのCSF流入の障害をレスキューできるかどうか、さらにグリンパティック機能の増強が抗Aβ抗体の脳全体への送達ならびに血管周囲および実質の両方のAβプラークとのその相互作用を改善できるかどうか問われた。

【0135】

上記と同様の手法を使用して、AlexaFluor488結合抗Aβ抗体（クローン6E10）の大槽内送達（脳の取り外しおよび固定の前に120分間循環させた）の直前に、KXで麻酔した生後6か月のAPP／PS1⁺／-マウスに等張食塩水（対照）または高張食塩水（+HTS）のいずれかの腹腔内注入を行った（図4Aおよび図4B）。大槽内抗体注入の1日前に、腹腔内MeX04でAβプラークの生体内標識を得た（図4B）。HTSは、rCBFへの影響がなく、MAPに一時的な影響を与えるのみであるため、CSF流入を増強するために使用した（図15Aおよび図15B）。

【0136】

HTSは、APP／PS1⁺／-マウスで以前に報告されたグリンパティック機能障害を逆転させ（35）、等張対照と比較して大脳全体で抗Aβ抗体送達の有意な増加を引き起こしたことが分かった。さらに、抗体は血管周囲腔を介して脳実質へのアクセスを獲得すると考えられた（図4Cおよび図4D）。抗Aβ抗体は、対照群の貫通動脈の血管周囲腔に限定されていたが、HTS処理マウスではMeX04⁺プラークとの有意な抗体結合が見られ、血漿高浸透圧が血管周囲溶質のより深い間質部位への再分布をもたらすことが示唆された（図4C、右下のパネル；図4Eおよび図4F）。これは、等張対照と比較して、+HTS群の最も近い血管周囲腔からの共標識されたプラークのより大きな距離を示す最近傍分析によって支持される（図4G）。

【0137】

共標識されたプラークが最も豊富に発生するのは、貫通動脈のすぐ周囲の領域であり、血管周囲腔から離れるほど頻度が低下した。しかしながら、ほぼ全ての共標識プラークは、対照群の最も近い動脈周囲腔から100μm以内で発生したが、この平均分離はHTS群では300μm超に増加した（図4H）。共焦点Zスタックの3次元再構成は、+HTS群でプラーク表面への抗体結合の増加を示したが、興味深いことに、群間でのプラーク負荷に有意差はなかった（図4I-K）。これは、実験の急な設定が原因である可能性が高く、120分の抗体結合後に終了した。血漿高浸透圧の設定におけるより長期間の増強されたプラーク結合は、最終的にプラーク負荷を低減し、ADマウスの認知能力をレスキューすることが期待される。本発明の観察はまた、APP／PS1トランスジェニックマウスにおけるAQP4の遺伝子欠失が認知機能低下およびアミロイド負荷を加速したという以前の発見を拡張するものである（54）。

【0138】

参考文献

1. Sevigny J et al. The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016; 537 (7618): 50-6.
2. Schenk DB et al. First-in-human assessment of PRX002, an anti-alpha-synuclein monoclonal antibody, in healthy volunteers. *Mov Disord*. 2017; 32 (2): 211-218.
3. Gros-Louis F, Soucy G, Lariviere R, Julien JP. Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *J Neurochem*. 2010; 113 (5): 1188-99.
4. Gallardo G, Holtzman DM. Antibody Therap

eutics Targeting Abeta and Tau. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7 (10)

5. Sampson JH, Maus MV, June CH. Immunotherapy for Brain Tumors. J Clin Oncol. 2017;35 (21) :2450–2456.

6. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol Med. 2016;8 (6) :595–608.

7. Klyubin I et al. Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. Nat Med. 2005;11 (5) :556–61.

8. Salloway S et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2014;370 (4) :322–33.

9. Doody RS et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2014;370 (4) :311–21.

10. Honig LS et al. Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. N Engl J Med. 2018;378 (4) :321–330.

11. Vandenberghe R et al. Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease in two global, randomized, phase 3 trials. Alzheimers Res Ther. 2016;8 (1) :18.

12. Brody DL, Holtzman DM. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. Annu Rev Neurosci. 2008;31:175–93.

13. Calias P, Banks WA, Begley D, Scarpa M, Dickson P. Intrathecal delivery of protein therapeutics to the brain: a critical reassessment. Pharmacol Ther. 2014;144 (2) :114–22.

14. Cohen-Pfeffer JL et al. Intracerebroventricular Delivery as a Safe, Long-Term Route of Drug Administration. Pediatr Neurol. 2017;67:23–35.

15. Prins ND, Scheltens P. Treating Alzheimer's disease with monoclonal antibodies: current status and outlook for the future. Alzheimers Res Ther. 2013;5 (6) :56.

16. Banks WA, Terrell B, Farr SA, Robinson SM, Nonaka N, Morley JE. Passage of amyloid beta protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. Peptides. 2002;23 (12) :2223–6.

17. Banks WA, Farr SA, Morley JE, Wolf KM, Gylis V, Steinitz M. Anti-amyloid beta protein antibody passage across the blood-brain barrier in the SAMP8 mouse model of Alzhei

10

20

30

40

50

mer's disease: an age-related selective uptake with reversal of learning impairment. *Exp Neurol*. 2007;206 (2) :248-56.

18. Salloway S, Sperling R, Brashear HR. Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014;370 (15) :1460.

19. Thakker DR et al. Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106 (11) :4501-6.

20. Sperling RA et al. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement*. 2011;7 (4) :367-85.

21. Iliff JJ et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med*. 2012;4 (147) :147ra111.

22. Iliff JJ et al. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest*. 2013;123 (3) :1299-309.

23. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*. 2015;40 (12) :2583-99.

24. Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR, Fujimoto K, Grady PA. Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Res*. 1985;326 (1) :47-63.

25. Rennels ML, Blaumanis OR, Grady PA. Rapid solute transport throughout the brain via paravascular fluid pathways. *Adv Neurol*. 1990;52:431-9.

26. Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG. Probing the extracellular diffusion of antibodies in brain using in vivo integrative optical imaging and ex vivo fluorescence imaging. *J Control Release*. 2015;197:78-86.

27. Pizzo ME et al. Intrathecal antibody distribution in the rat brain: surface diffusion, perivascular transport, and osmotic enhancement of delivery. *J Physiol*. 2018;59

10

20

30

40

50

6 (3) : 445–475.

28. Xie L et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*. 2013 ; 342 (6156) : 373–7.

29. Kress BT et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol*. 2014; 76 (6) : 845–61.

30. Iliff JJ et al. Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF–interstitial fluid exchange in the murine brain. *J Neurosci*. 2013; 33 (46) : 18190–9.

31. Lee H et al. The Effect of Body Posture on Brain Glymphatic Transport. *J Neurosci*. 2015; 35 (31) : 11034–44.

32. Pullen RG, DePasquale M, Cserr HF. Bulk flow of cerebrospinal fluid into brain in response to acute hyperosmolality. *Am J Physiol*. 1987; 253 (3 Pt 2) : F538–45.

33. Cserr HF, DePasquale M, Patlak CS. Volume regulatory influx of electrolytes from plasma to brain during acute hyperosmolality. *Am J Physiol*. 1987; 253 (3 Pt 2) : F530–7.

34. Cserr HF, DePasquale M, Nicholson C, Patlak CS, Pettigrew KD, Rice ME. Extracellular volume decreases while cell volume is maintained by ion uptake in rat brain during acute hypernatremia. *J Physiol*. 1991; 442 : 277–95.

35. Peng W et al. Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2016; 93 : 215–25.

36. Yang L et al. Evaluating glymphatic pathway function utilizing clinically relevant intrathecal infusion of CSF tracer. *J Transl Med*. 2013; 11 : 107.

37. Smith AJ, Yao X, Dix JA, Jin BJ, Verkman AS. Test of the 'glymphatic' hypothesis demonstrates diffusive and aquaporin-4-independent solute transport in rodent brain parenchyma. *Elife*. 2017; 6.

38. Mestre H et al. Aquaporin-4 dependent glymphatic solute transport in rodent brain. *bioRxiv*. 2017.

39. Lundgaard I et al. Glymphatic clearance controls state-dependent changes in brain lactate concentration. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017; 37 (6) : 2112–2124.

40. Murlidharan G, Crowther A, Reardon RA, Song J, Asokan A. Glymphatic fluid transport

10

20

30

40

50

controls paravascular clearance of AAV vectors from the brain. *JCI Insight*. 2016;1 (14) :e88034.

41. Jiang Q et al. Impairment of the glymphatic system after diabetes. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37 (4) :1326–1337.

42. Rangroo Thrane V et al. Paravascular microcirculation facilitates rapid lipid transport and astrocyte signaling in the brain. *Sci Rep*. 2013;3:2582.

43. Achariyar TM et al. Glymphatic distribution of CSF-derived apoE into brain is isoform specific and suppressed during sleep deprivation. *Mol Neurodegener*. 2016;11 (1) :74.

44. Lundgaard I et al. Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nat Commun*. 2015;6:6807.

45. Venkat P et al. White matter damage and glymphatic dysfunction in a model of vascular dementia in rats with no prior vascular pathologies. *Neurobiol Aging*. 2017;50:96–106.

46. Benveniste H et al. Anesthesia with Dexmedetomidine and Low-dose Isoflurane Increases Solute Transport via the Glymphatic Pathway in Rat Brain When Compared with High-dose Isoflurane. *Anesthesiology*. 2017;127 (6) :976–988.

47. Gaberel T et al. Impaired glymphatic perfusion after strokes revealed by contrast-enhanced MRI: a new target for fibrinolysis? *Stroke*. 2014;45 (10) :3092–6.

48. Ringstad G, Vatnehol SAS, Eide PK. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain*. 2017;140 (10) :2691–2705.

49. Brain Trauma F, American Association of Neurological S, Congress of Neurological S, Joint Section on N, Critical Care AC, Bratton SL, et al. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. II. Hypertonic therapy. *J Neurotrauma*. 2007;24 Suppl 1:S14–20.

50. Ma Q, Ineichen BV, Detmar M, Proulx ST. Outflow of cerebrospinal fluid is predominantly through lymphatic vessels and is reduced in aged mice. *Nat Commun*. 2017;8 (1) :1434.

51. Bedussi B et al. Paravascular channels

, cisterns, and the subarachnoid space in the rat brain: A single compartment with preferential pathways. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017; 37 (4) : 1374-1385.

52. Muizelaar JP, Lutz HA 3rd, Becker DP. Effect of mannitol on ICP and CBF and correlation with pressure autoregulation in severely head-injured patients. *J Neurosurg.* 1984; 61 (4) : 700-6.

53. Domaingue CM, Nye DH. Hypotensive effect of mannitol administered rapidly. *Anaesth Intensive Care.* 1985; 13 (2) : 134-6.

54. Xu Z et al. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain Abeta accumulation and memory deficits. *Mol Neurodegener.* 2015; 10 : 58.

55. Golde TE. Open questions for Alzheimer's disease immunotherapy. *Alzheimers Res Ther.* 2014; 6 (1) : 3.

56. Nevins TD, Kelley DH. Front tracking for quantifying advection-reaction-diffusion. *Chaos.* 2017; 27 (4) : 043105.

57. Silasi G, Xiao D, Vanni MP, Chen AC, Murphy TH. Intact skull chronic windows for mesoscopic wide-field imaging in awake mice. *J Neurosci Methods.* 2016; 267 : 141-9.

58. Demattos RB et al. A plaque-specific antibody clears existing beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron.* 2012; 76 (5) : 908-20.

59. Klunk WE et al. Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61 (9) : 797-805.

60. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9 (7) : 671-5.

61. Schindelin J et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9 (7) : 676-82.

【0139】

前述の実施例および好ましい実施形態の記載は、特許請求の範囲によって定義される本発明を限定するものではなく、例示するものとして解釈されるべきである。容易に理解されるように、上記の特徴の多数の変形例および組み合わせは、特許請求の範囲に記載される本発明から逸脱することなく用いられ得る。そのような変形例は、本発明の範囲からの逸脱とはみなされず、そのような全ての変形例は、以下の特許請求の範囲に含まれることが意図される。本明細書において言及される全ての参考文献は、その全体が参考により組み込まれる。

10

20

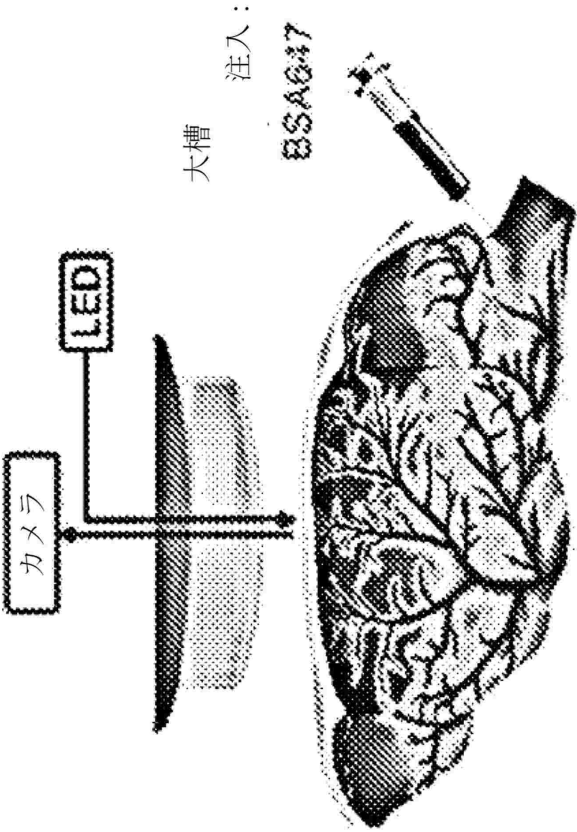
30

40

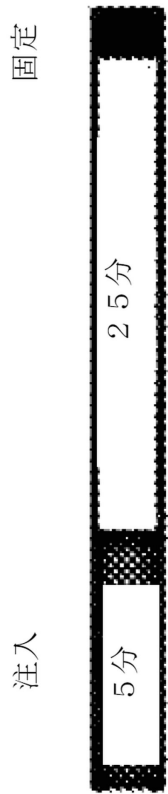
50

【図面】

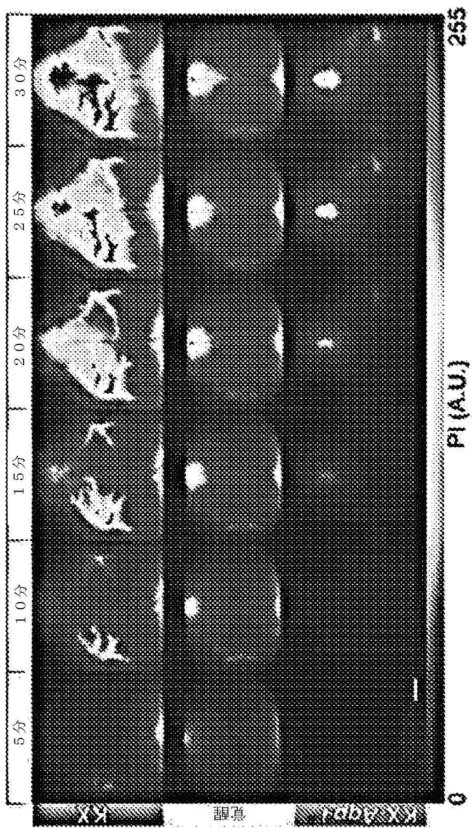
【図 1 A】



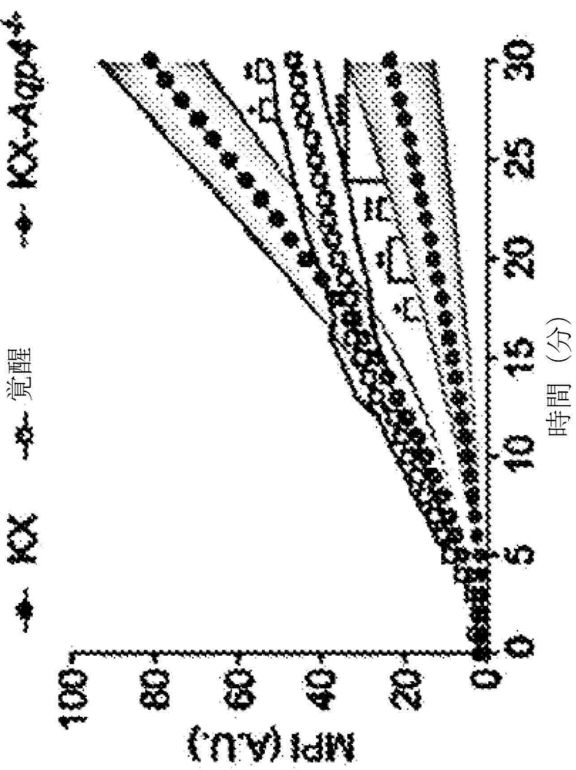
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



10

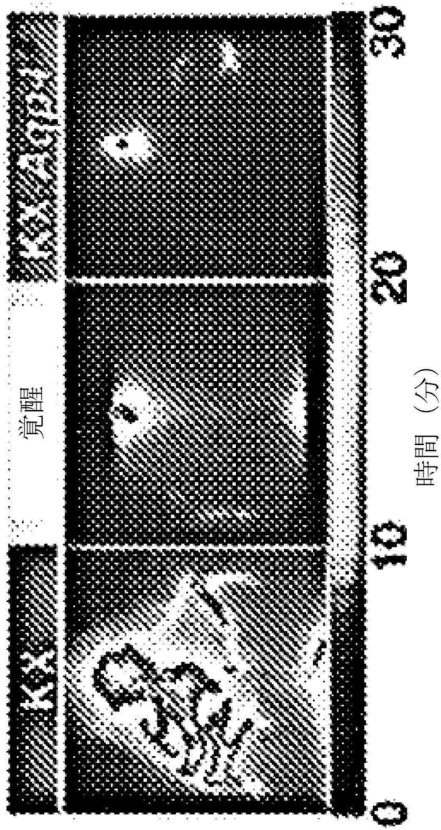
20

30

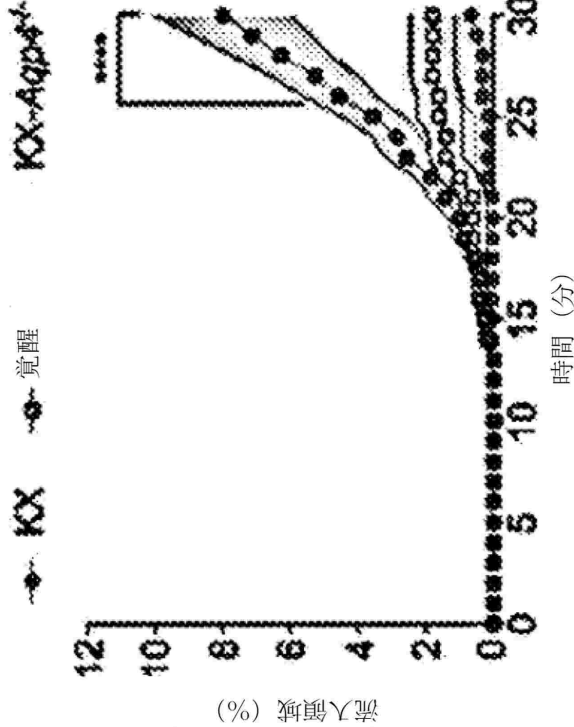
40

50

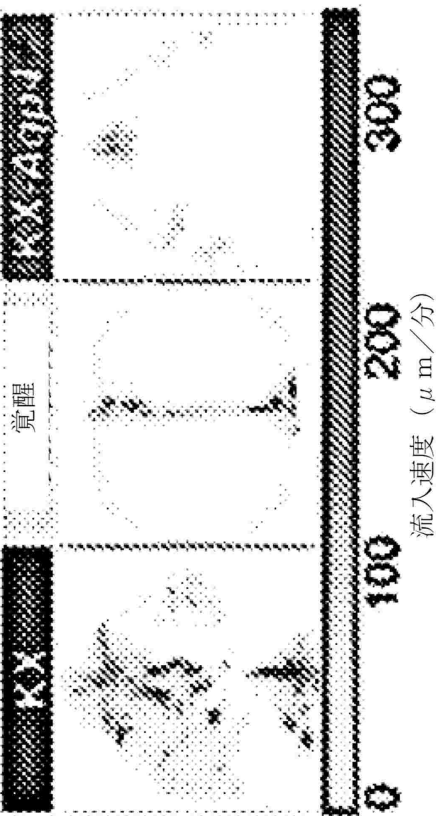
【図 1 E】



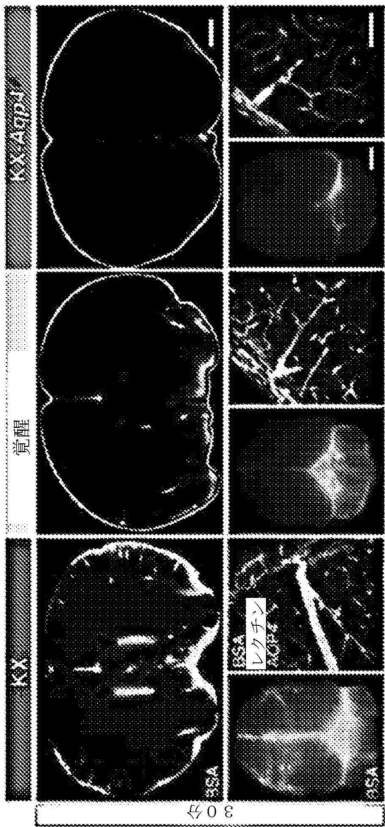
【図 1 F】



【図 1 G】



【図 1 H】



10

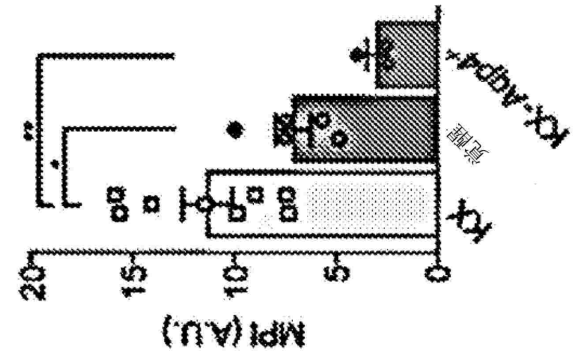
20

30

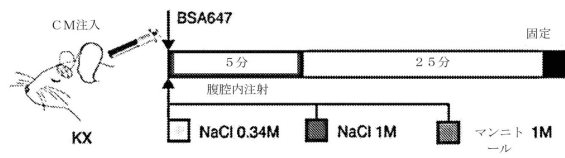
40

50

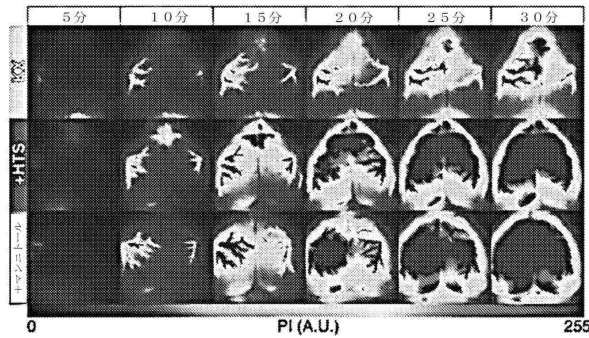
【図 1 I】



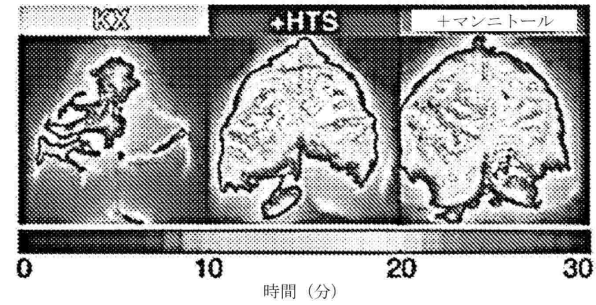
【図 2 A】



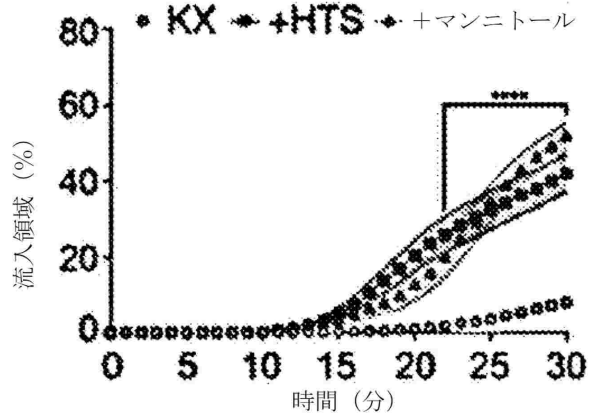
【図 2 B】



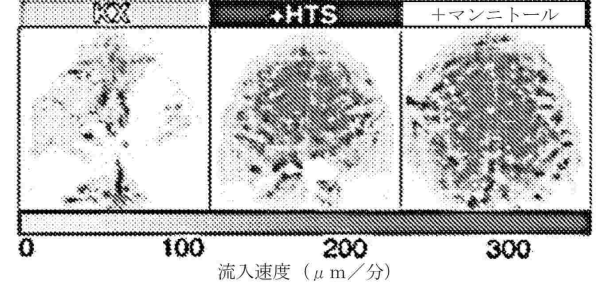
【図 2 C】



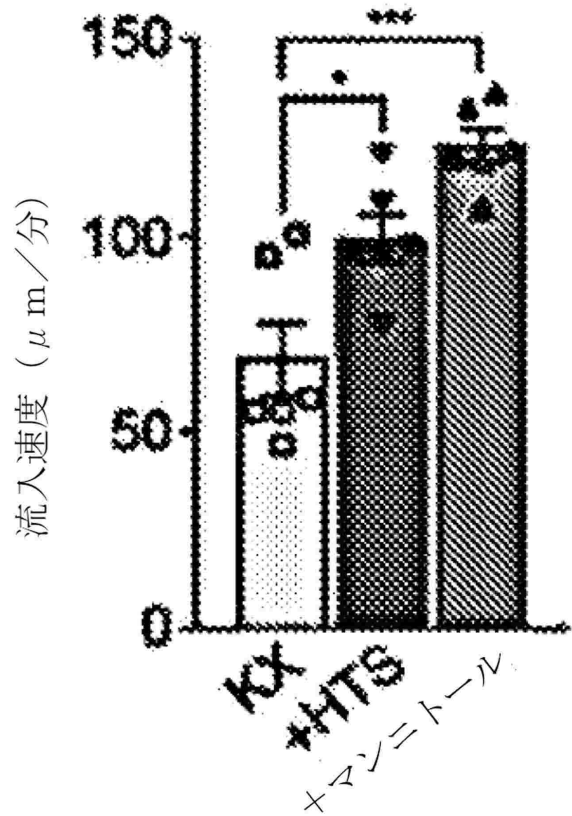
【図 2 D】



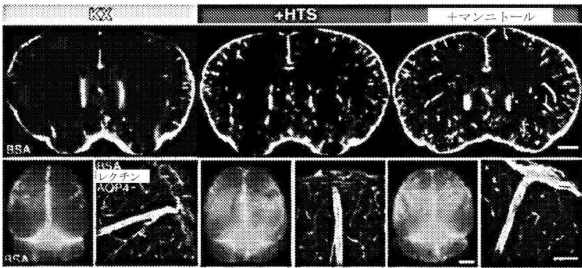
【図 2 E】



【図 2 F】



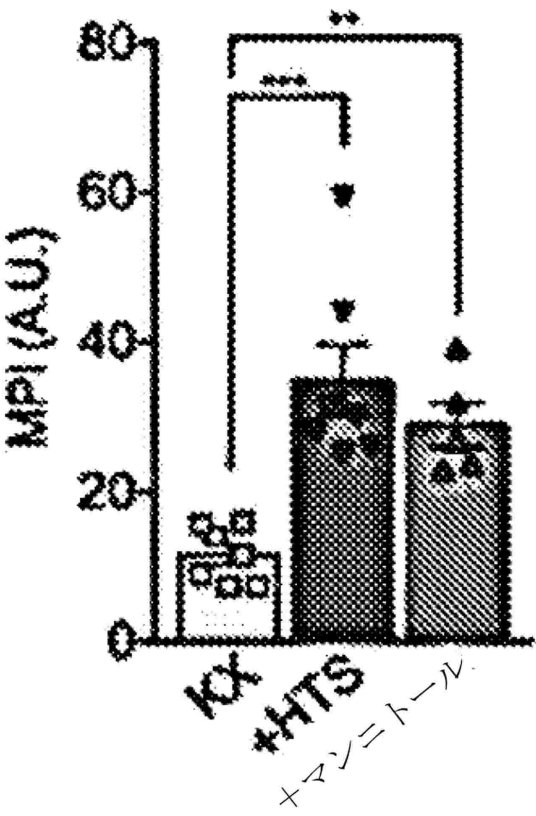
【図 2 G】



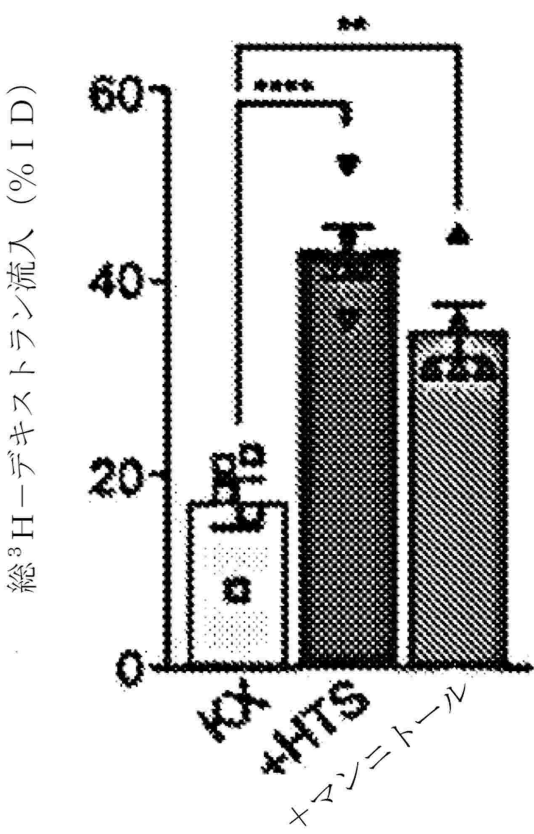
10

20

【図 2 H】



【図 2 I】

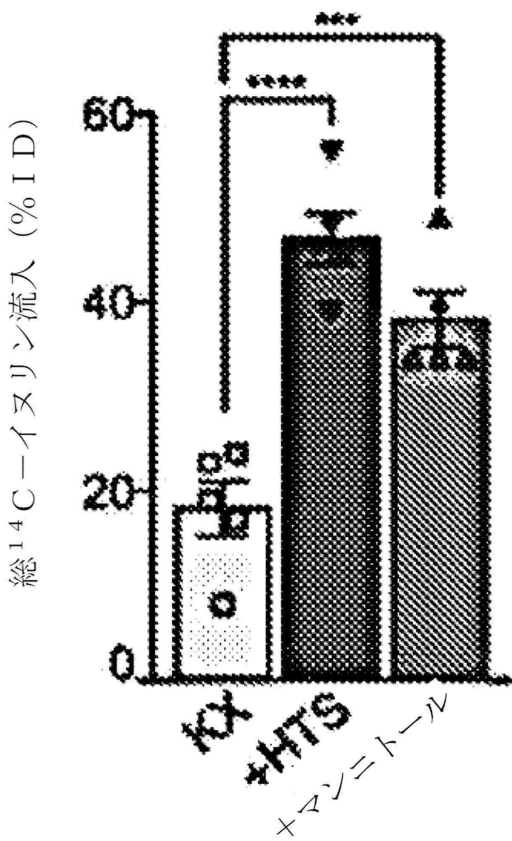


30

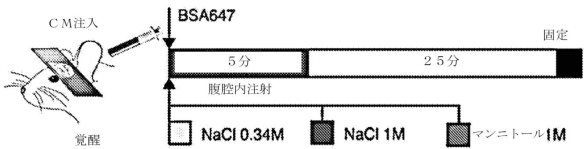
40

50

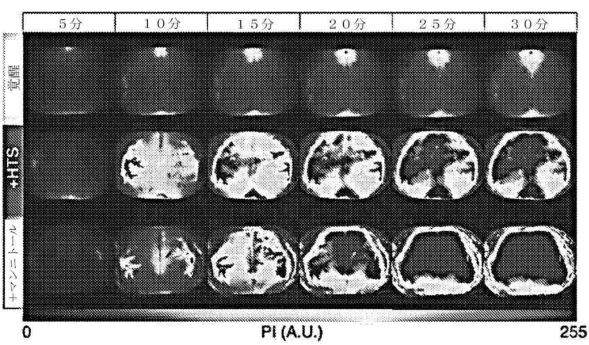
【図 2 J】



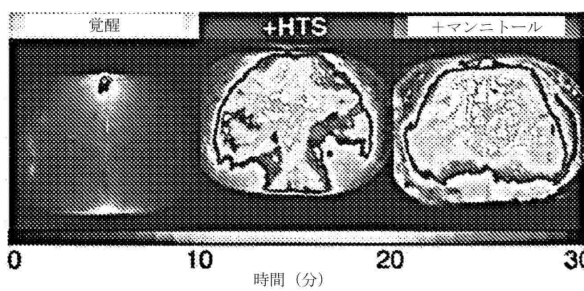
【図 3 A】



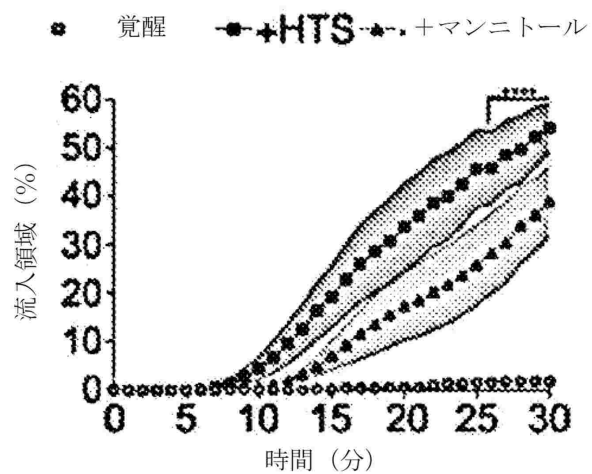
【図 3 B】



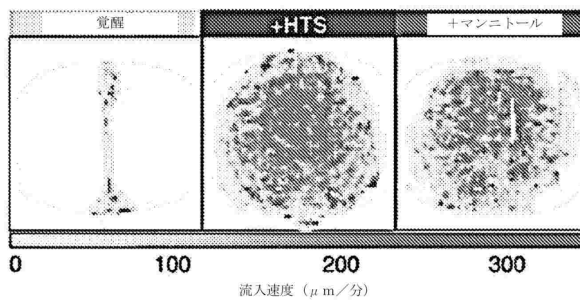
【図 3 C】



【図 3 D】

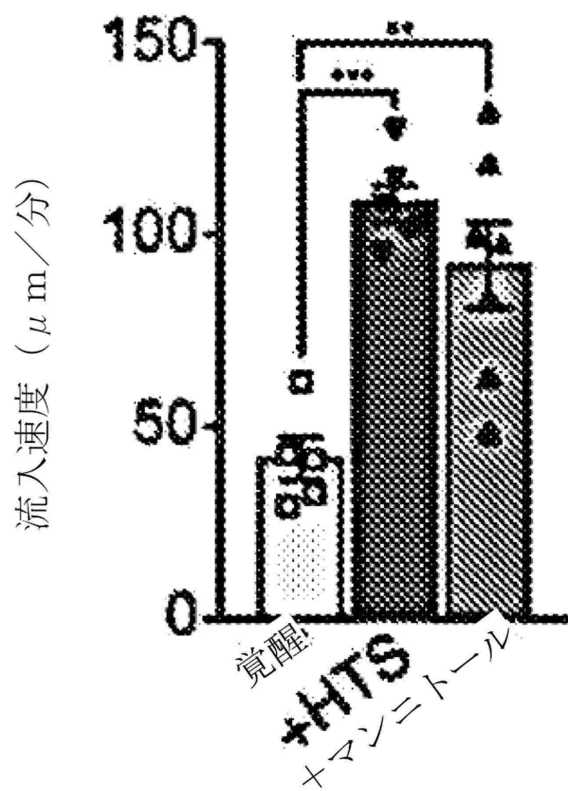


【図 3 E】



10

【図 3 F】



【図 3 G】



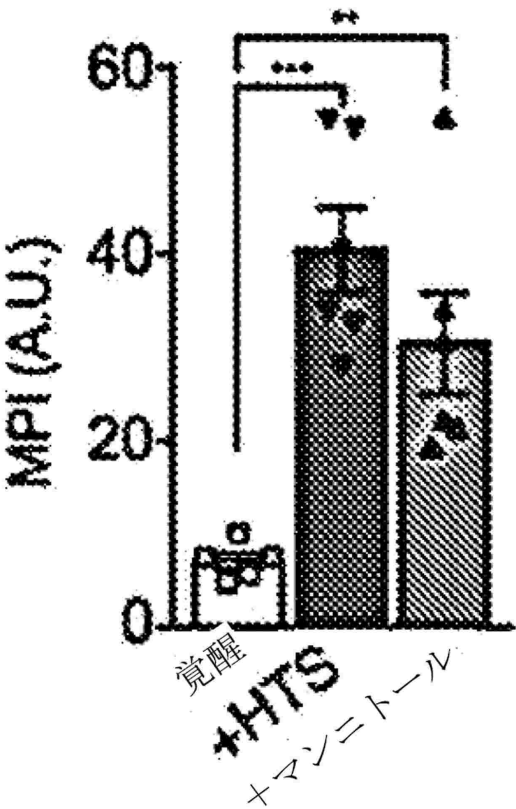
20

30

40

50

【図 3 H】



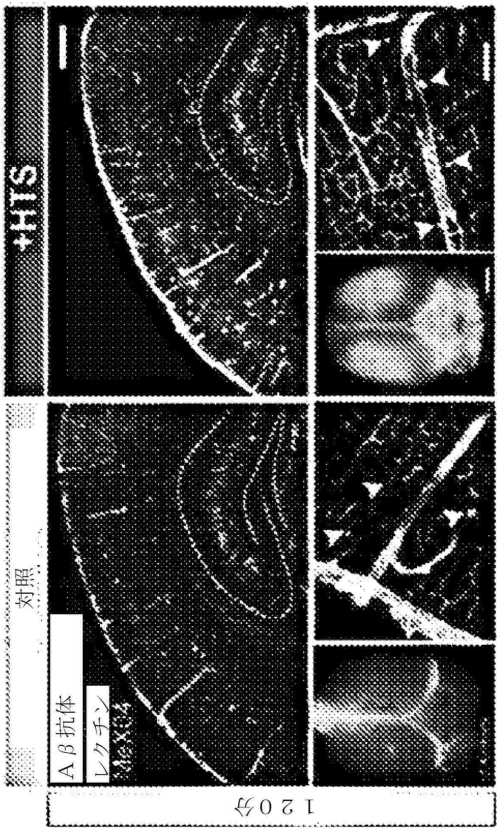
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

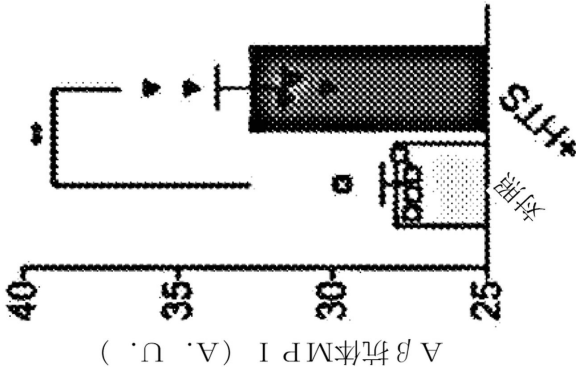
20

30

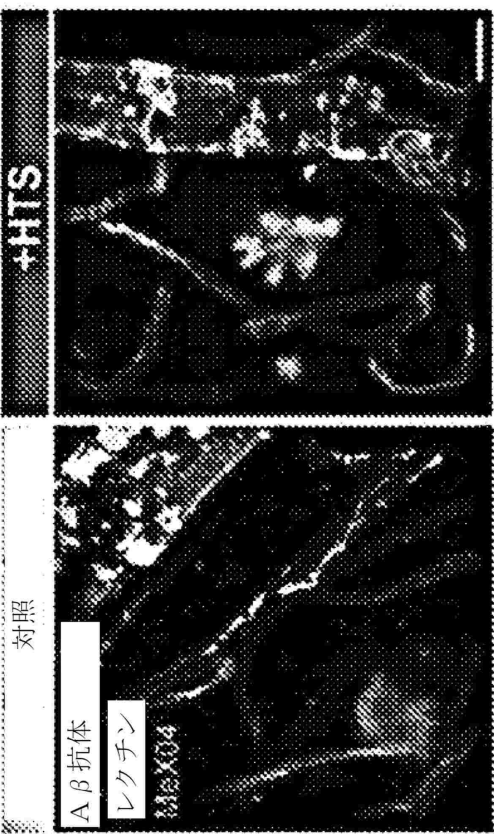
40

50

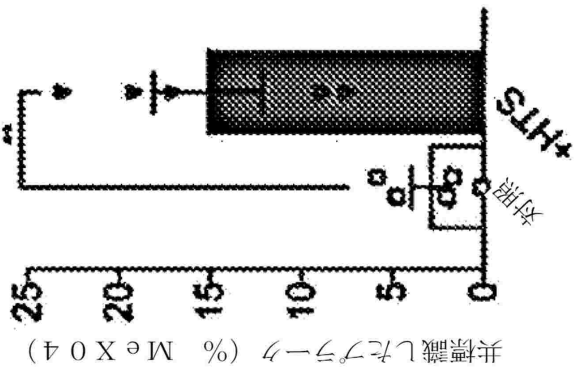
【図 4 D】



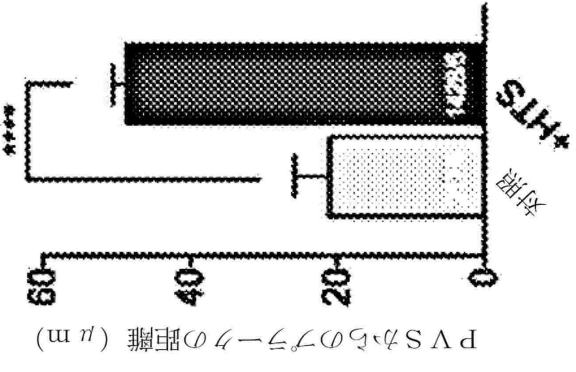
【図 4 E】



【図 4 F】



【図 4 G】



10

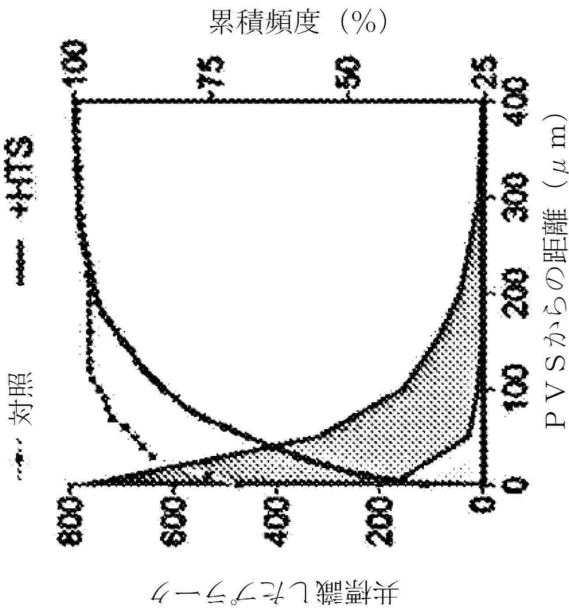
20

30

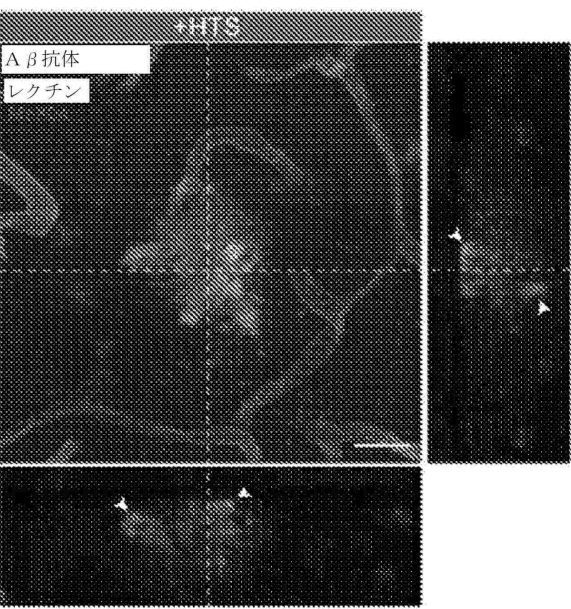
40

50

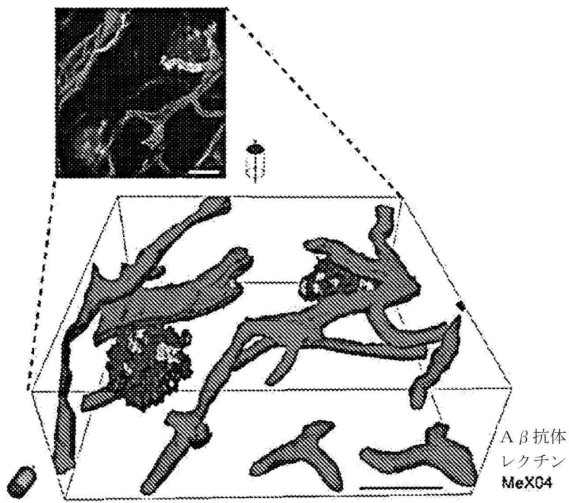
【図 4 H】



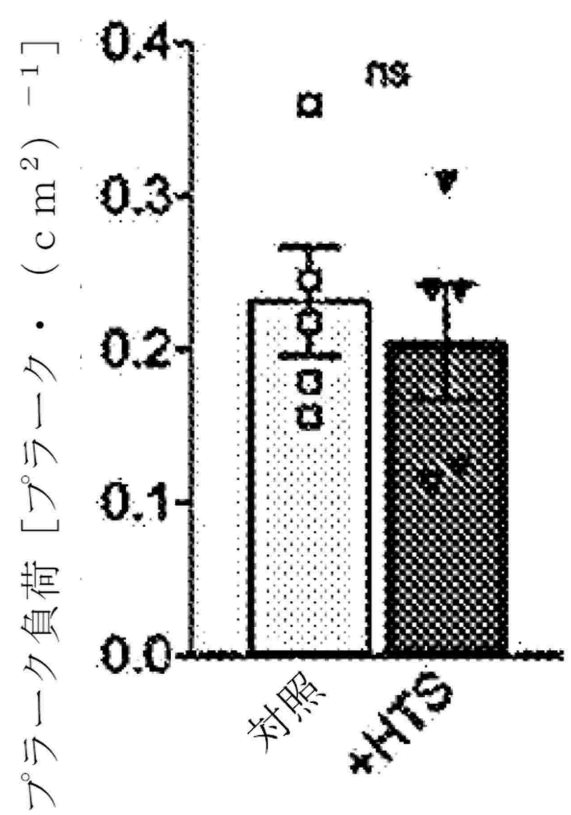
【図 4 I】



【図 4 J】



【図 4 K】



10

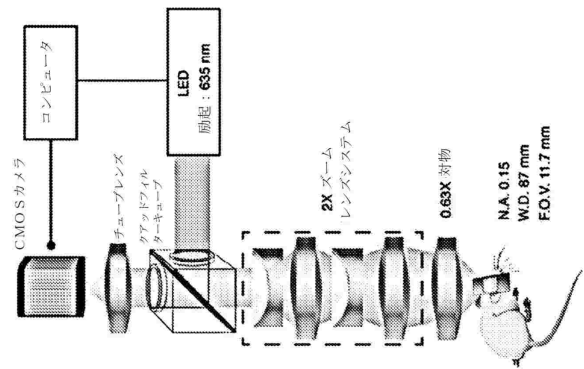
20

30

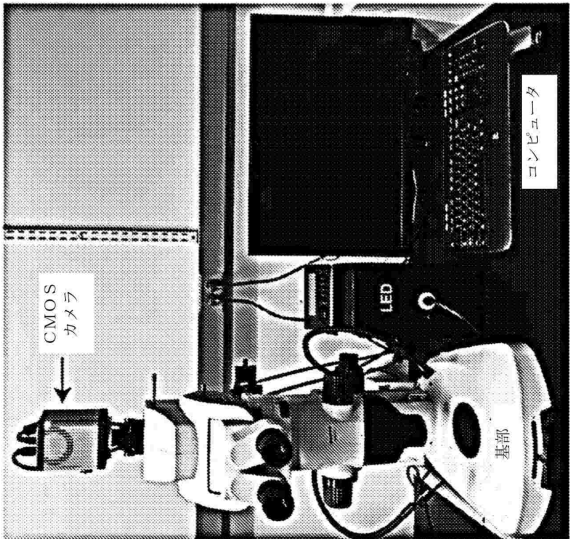
40

50

【図 5 A】

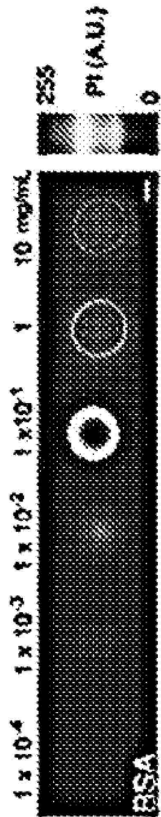


【図 5 B】

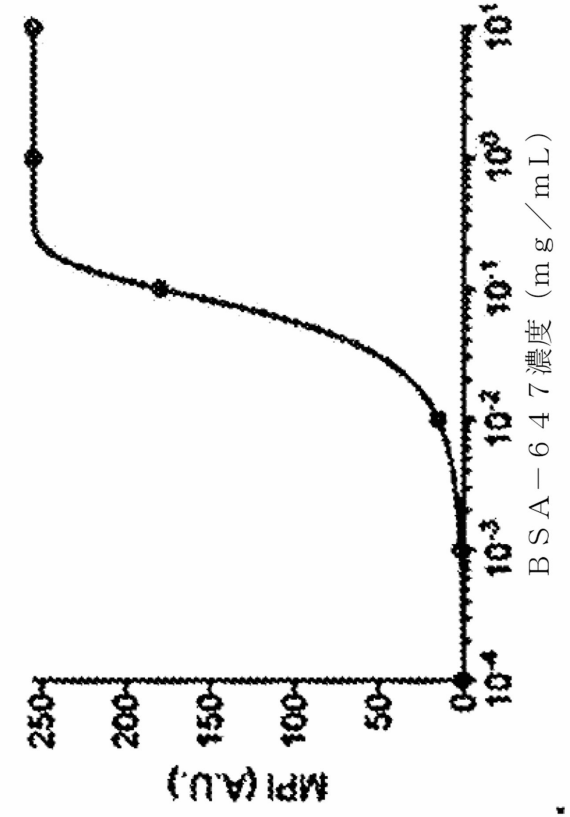


10

【図 6 A】



【図 6 B】



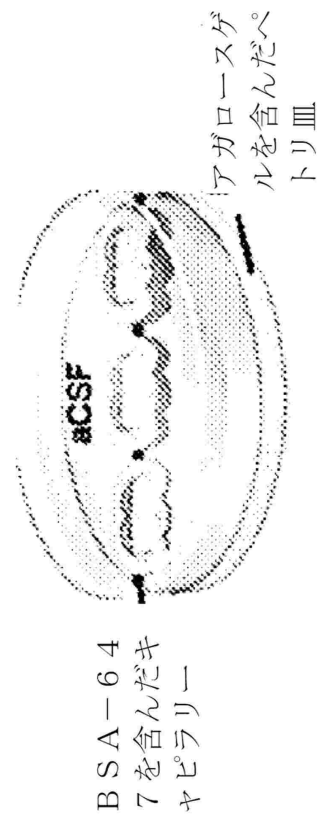
20

30

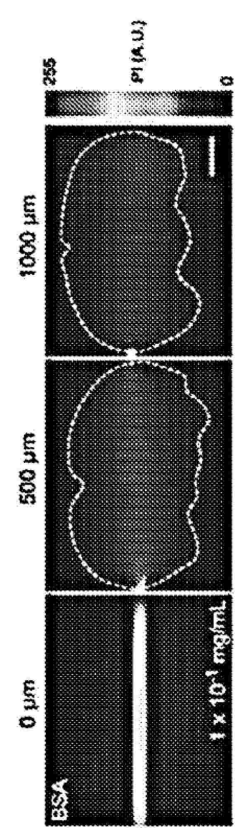
40

50

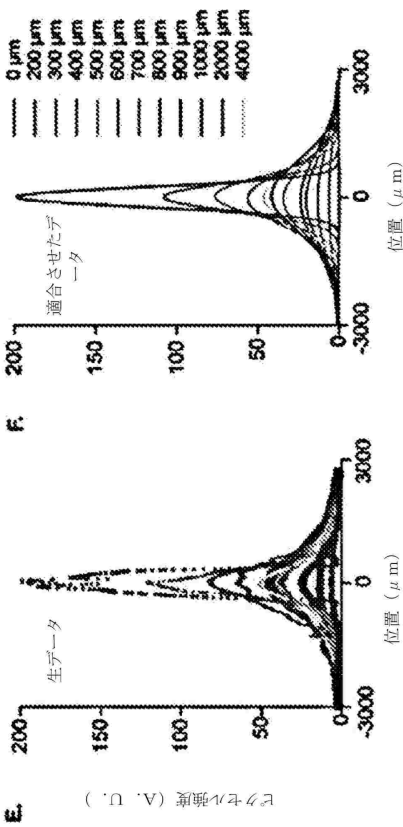
【図 6 C】



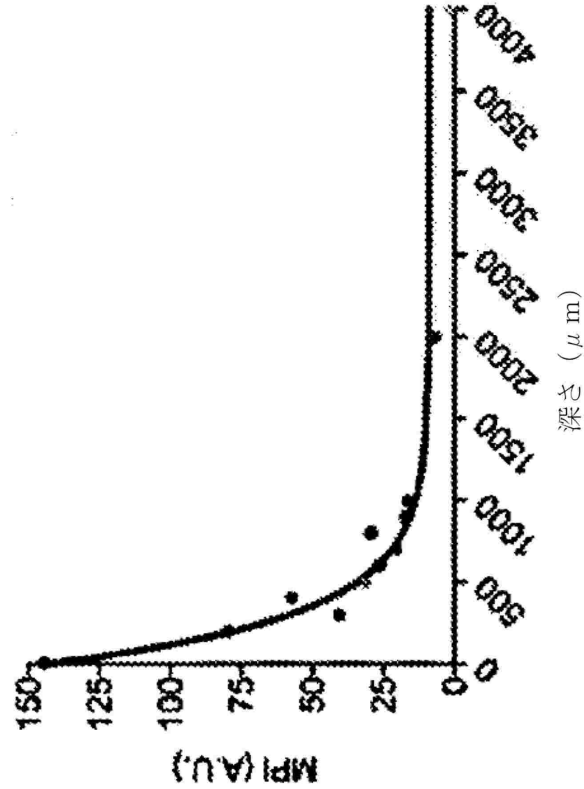
【図 6 D】



【図 6 E - F】



【図 6 G】



10

20

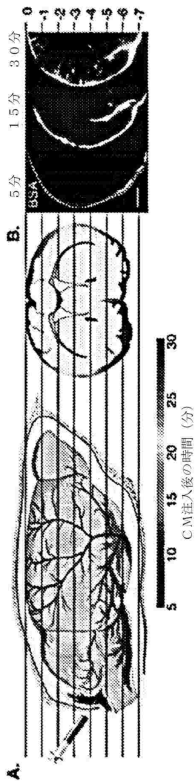
30

40

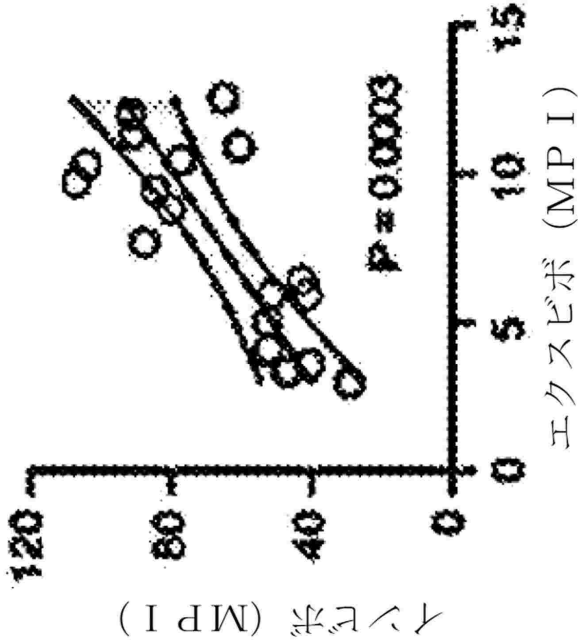
50

【図 7 A - B】

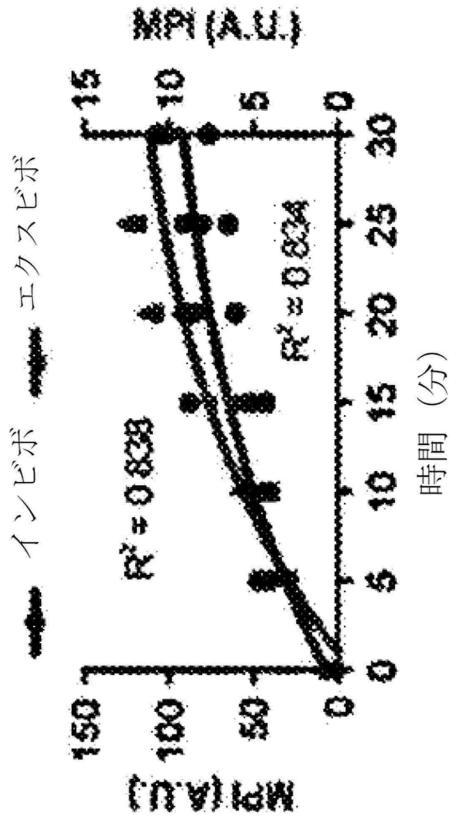
背側皮質からの距離 (mm)



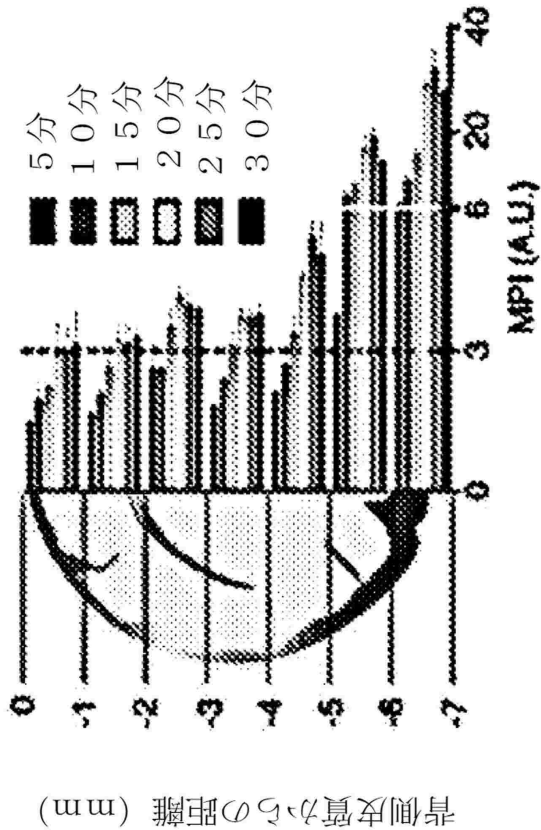
【図 7 C】



【図 7 D】



【図 7 E】



10

20

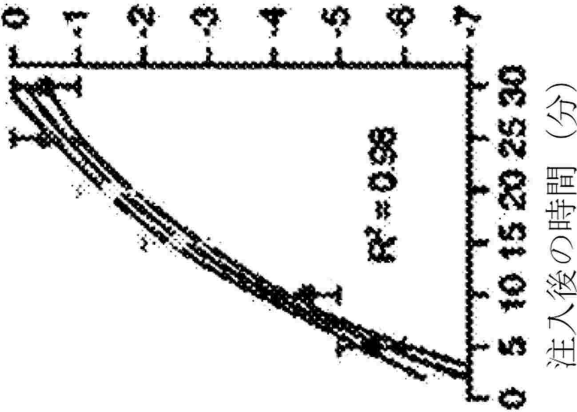
30

40

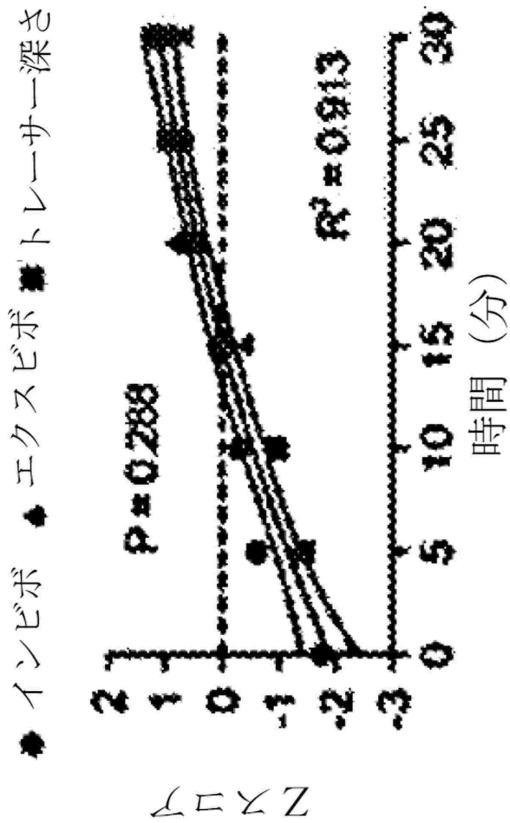
50

【図 7 F】

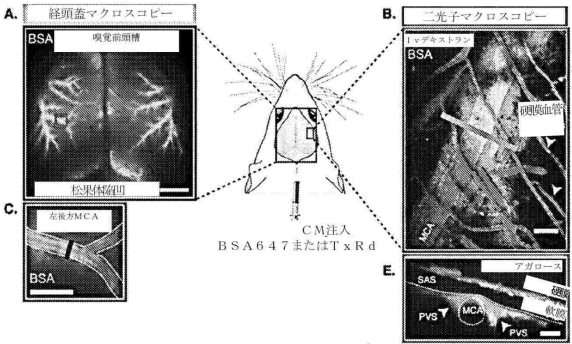
背側皮質からの距離 (mm)



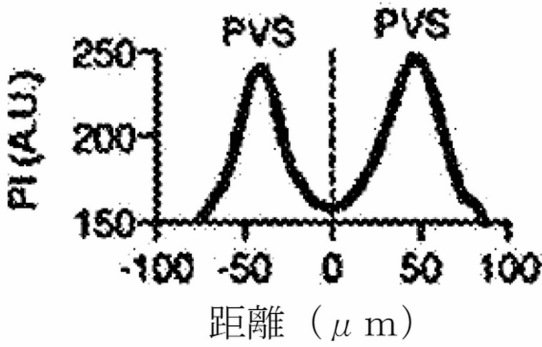
【図 7 G】



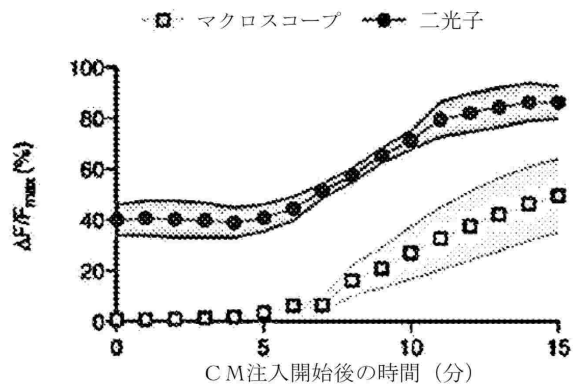
【図 8 A - B - C - E】



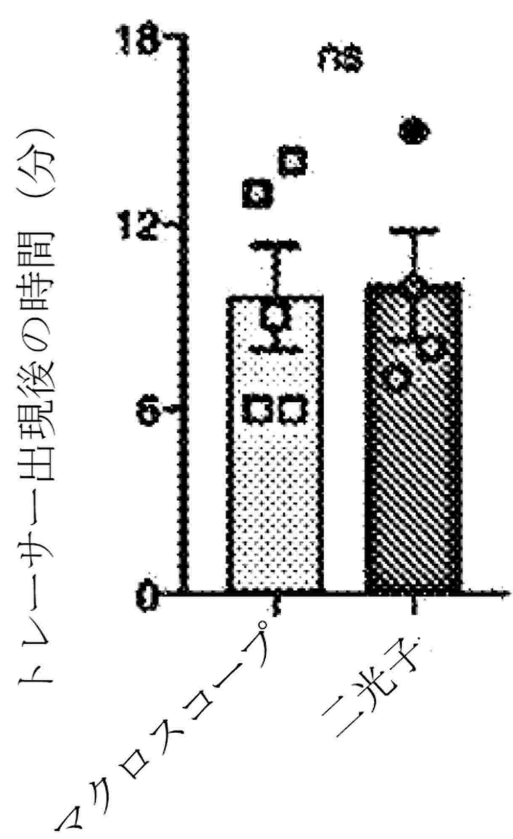
【図 8 D】



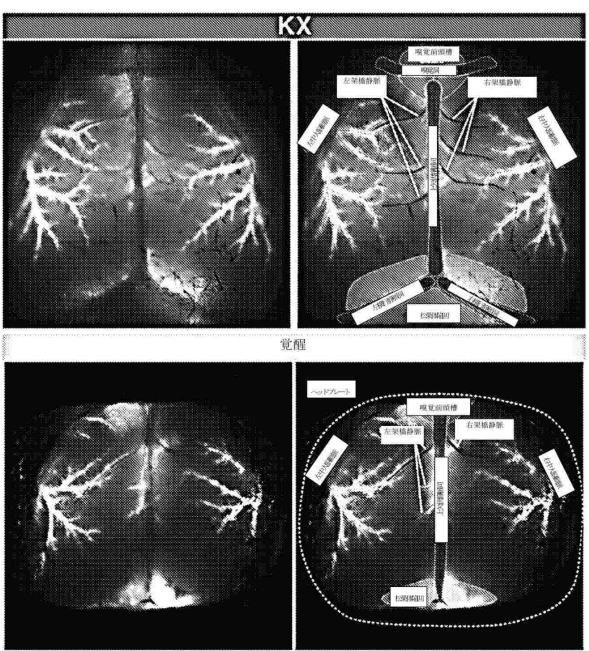
【図 8 F】



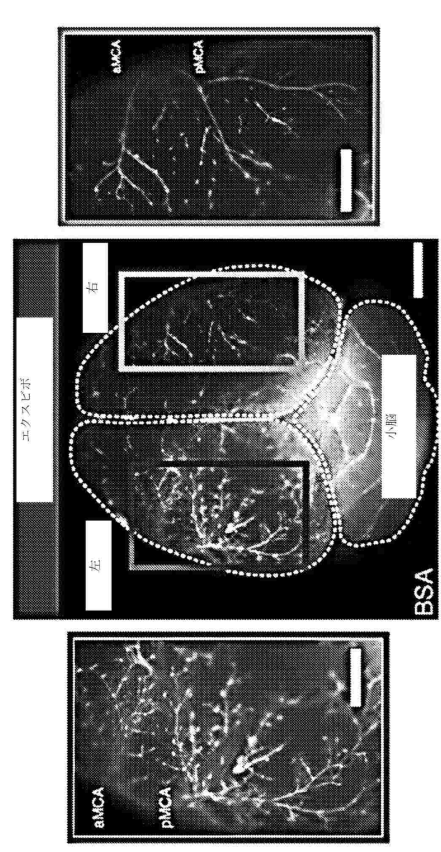
【図 8 G】



【図 9】



【図 10】



10

20

30

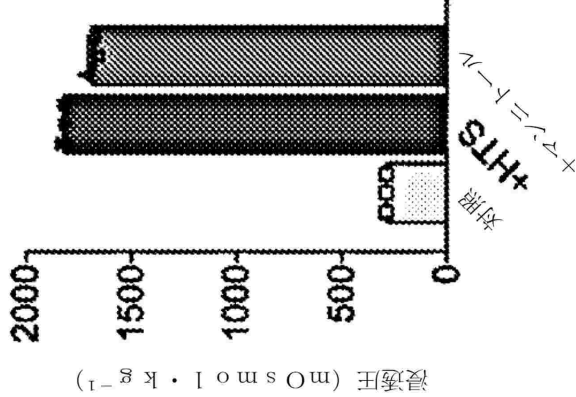
40

50

【図 1 1 A】

溶液	内容	用量
対照	0.34M NaCl	20 μ l/g
HTS	1M NaCl	20 μ l/g
マンニトール	0.34M NaCl 中の 1M マンニトール	30 μ l/g

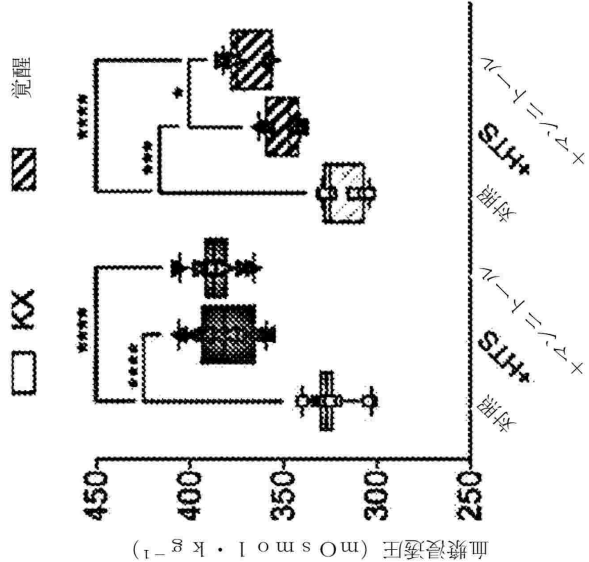
【図 1 1 B】



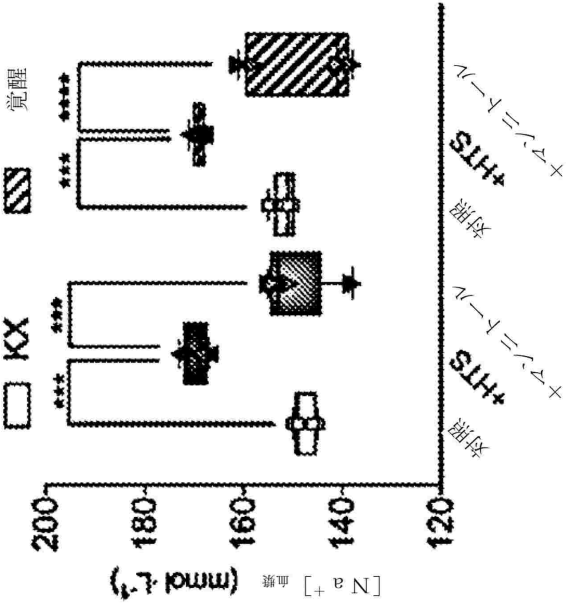
10

20

【図 1 1 C】



【図 1 1 D】

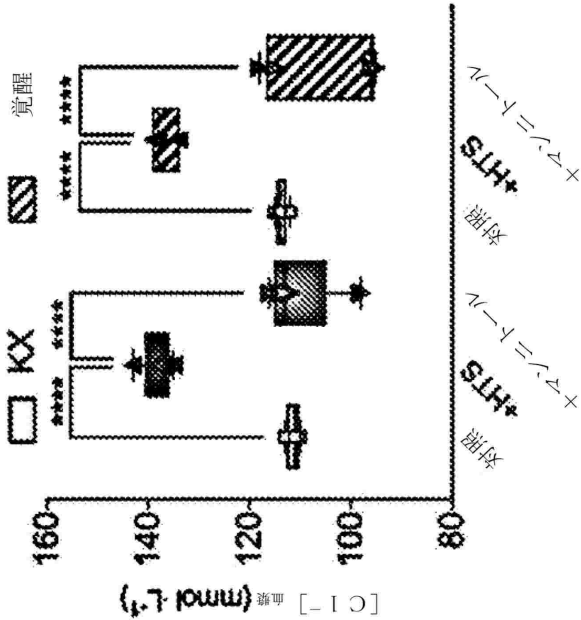


30

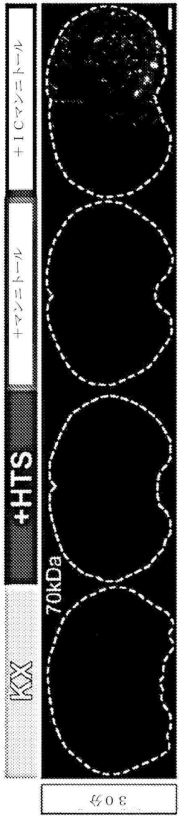
40

50

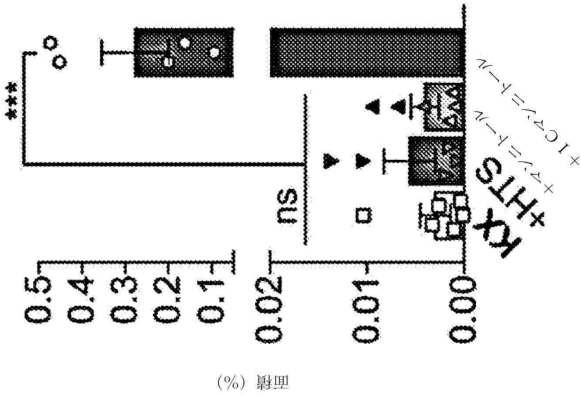
【図 1 1 E】



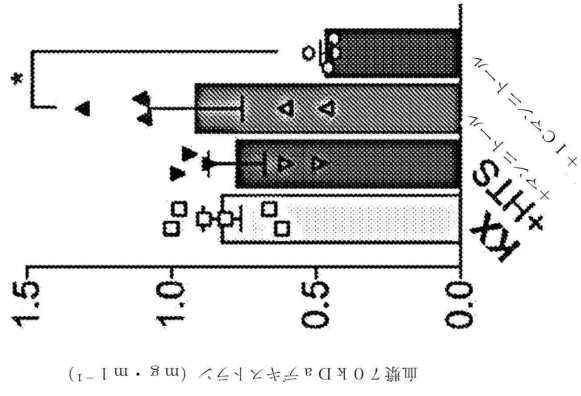
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



10

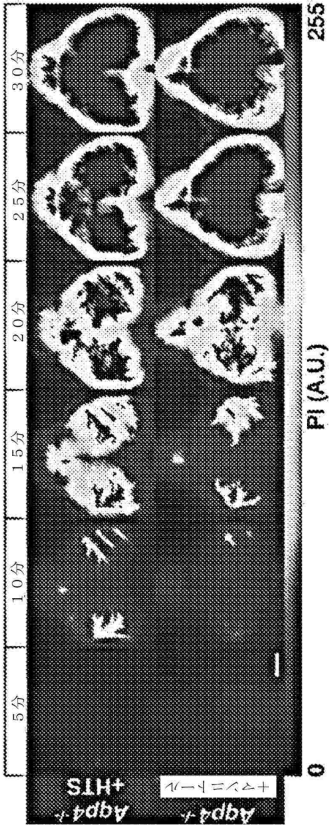
20

30

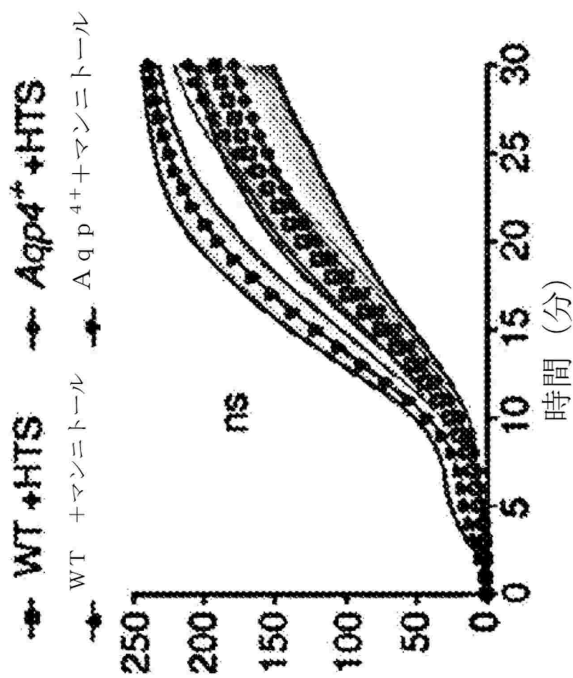
40

50

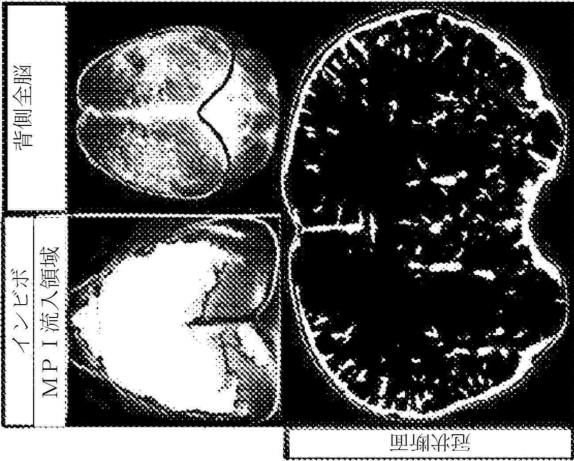
【図 1 3 A】



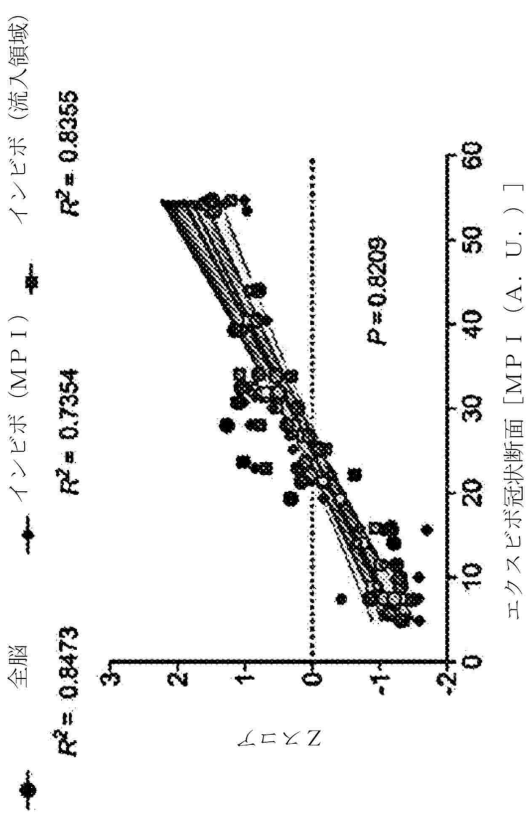
【図 1 3 B】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



10

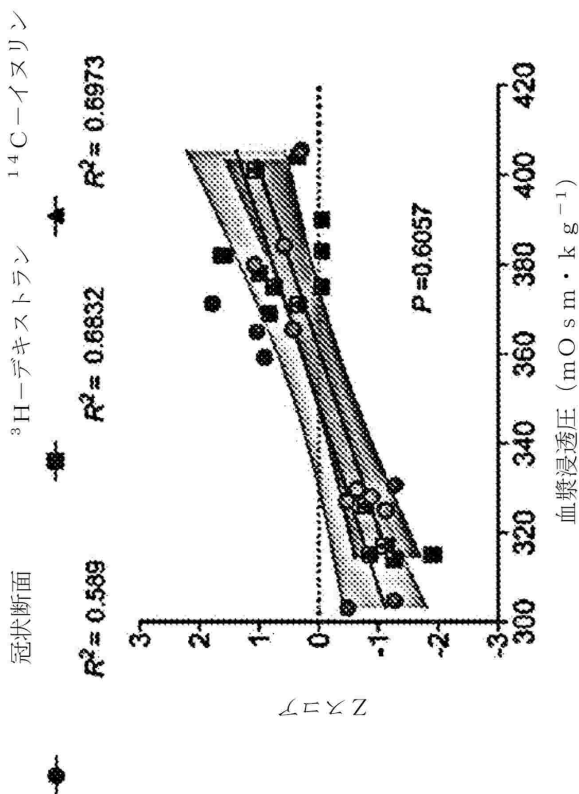
20

30

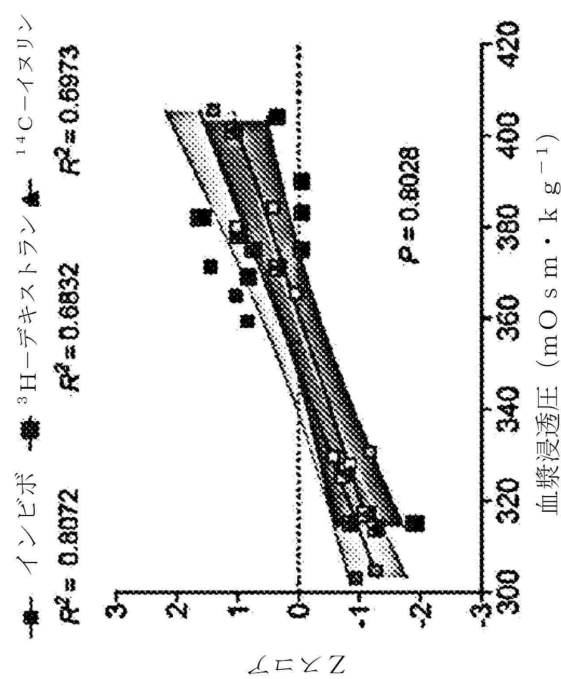
40

50

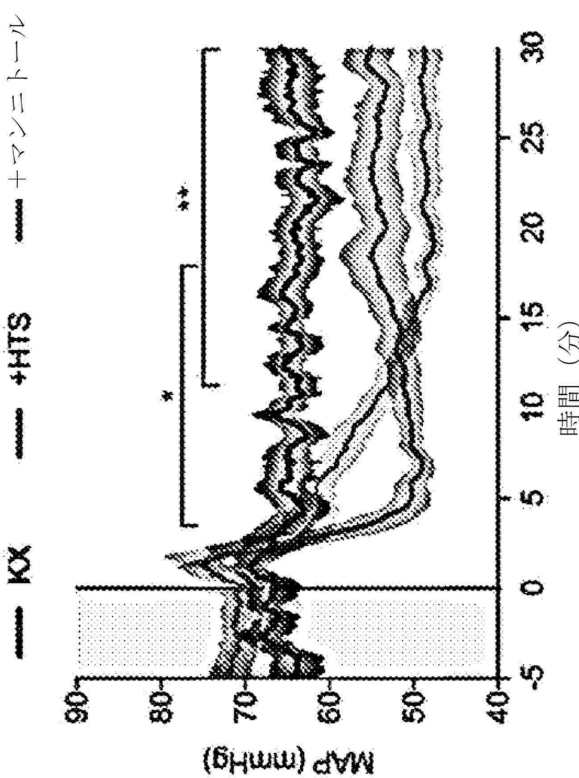
【図 1 4 C】



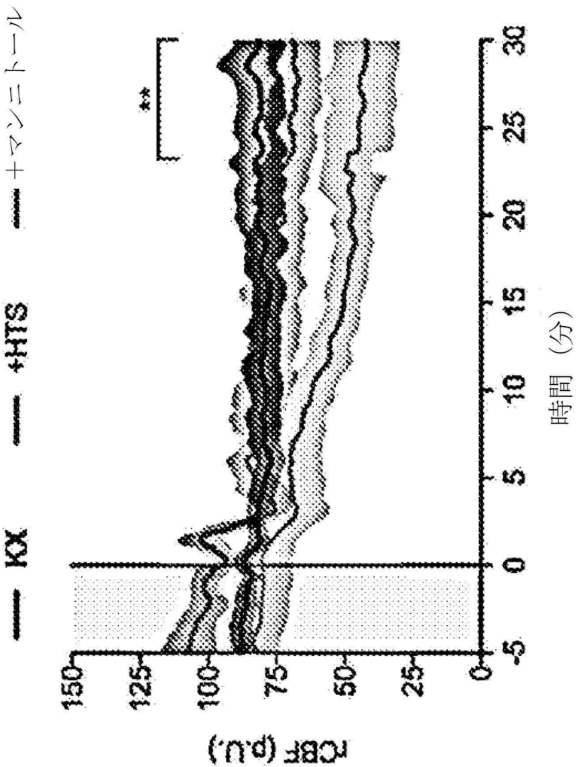
【図 1 4 D】



【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



10

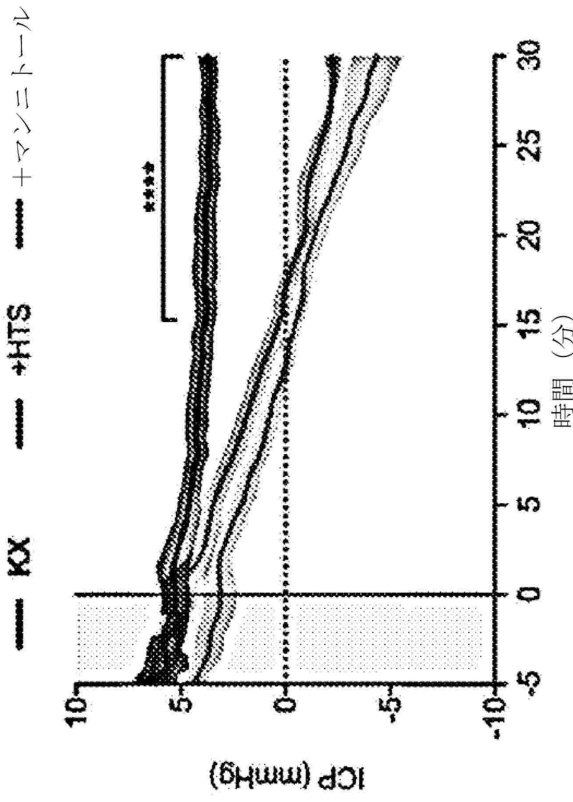
20

30

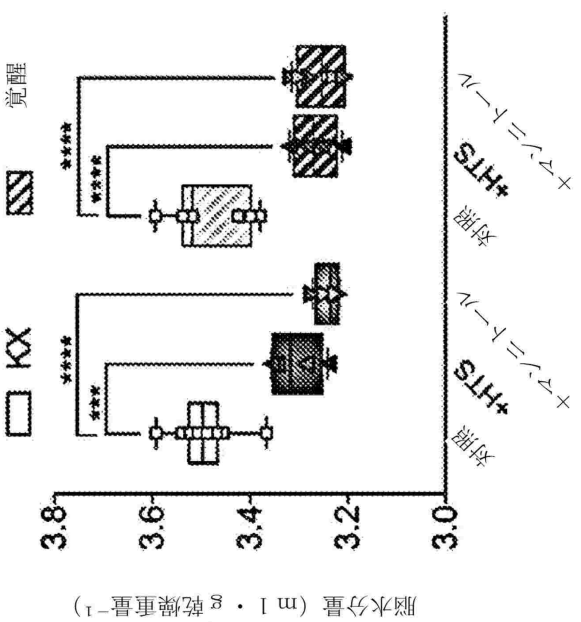
40

50

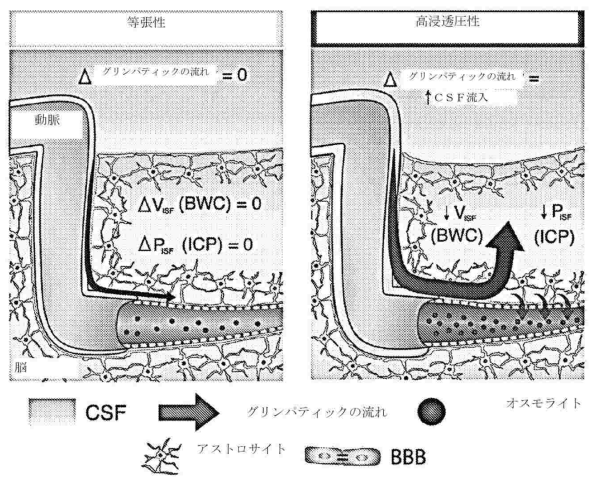
【図 15 C】



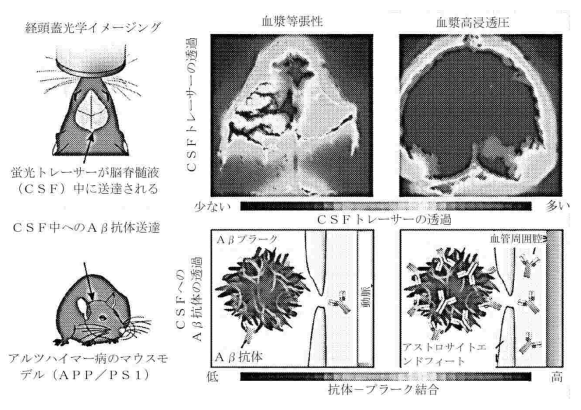
【図 15 D】



【図 16】



【図 17】



フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	M
		A 6 1 P	25/00	
		A 6 1 P	25/28	

(72)発明者 プログ, ベンジャミン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 4 6 4 2, ロチェスター, エルムウッド アベニュー 6 0 1, ボックス 6 4 5, シー/オー ユニバーシティ オブ ロチェスター メディカル センター, デパートメント オブ ニューロサージェリー

(72)発明者 メストレ, ハンベルト

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 4 6 4 2, ロチェスター, エルムウッド アベニュー 6 0 1, ボックス 6 4 5, シー/オー ユニバーシティ オブ ロチェスター メディカル センター, デパートメント オブ ニューロサージェリー

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 1 0 5 9 2 7 (U S, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 2 7 1 7 9 6 (U S, A 1)

Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011年, Vol.108(46), pp.18837-18842, 10.1073/pnas.1111405108

血液脳関門通過技術, ファルマシア, 2016年, Vol.52(11), pp.1051-1053

Molecular Pain, 2010年, Vol.6, p.31, 10.1186/1744-8069-6-31

American Journal of Physiology, 1987年, Vol.253, pp.F538-F545

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 4 9 / 0 0

A 6 1 K 5 1 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 0 0