

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6127063号
(P6127063)

(45) 発行日 平成29年5月10日(2017.5.10)

(24) 登録日 平成29年4月14日(2017.4.14)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 38/48	(2006.01)
A 61 P 3/10	(2006.01)
A 61 P 9/10	(2006.01)
A 61 P 25/00	(2006.01)
A 61 P 31/04	(2006.01)
A 61 K	37/547
A 61 P	3/10
A 61 P	9/10
A 61 P	25/00
A 61 P	31/04

請求項の数 17 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-548078 (P2014-548078)
(86) (22) 出願日	平成24年12月21日(2012.12.21)
(65) 公表番号	特表2015-502389 (P2015-502389A)
(43) 公表日	平成27年1月22日(2015.1.22)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/076691
(87) 國際公開番号	W02013/093027
(87) 國際公開日	平成25年6月27日(2013.6.27)
審査請求日	平成27年12月15日(2015.12.15)
(31) 優先権主張番号	11195254.5
(32) 優先日	平成23年12月22日(2011.12.22)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁(EP)
(31) 優先権主張番号	61/587,371
(32) 優先日	平成24年1月17日(2012.1.17)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	597070264 ツェー・エス・エル・ペーリング・ゲー・ エム・ベー・ハー ドイツ連邦共和国D-35041 マルブ ルク・エミル フォン ペーリング シュ トラーセ 76
(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(72) 発明者	クリストフ・クラインシュニッツ ドイツ連邦共和国97265ヘットシュタ ット・メロヴィンガーシュトラーセ7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】中枢神経系の続発性浮腫の治療のためのC 1 インヒビターの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における中枢神経系(CNS)の続発性浮腫の形成を予防する及び/又はサイズを減少させる方法における使用のためのC 1 インヒビターを含む医薬組成物であって、対象が、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷、及び脊髄損傷からなる群より選択される少なくとも1つの障害を有する又は有していた、上記医薬組成物。

【請求項 2】

前記CNSの続発性浮腫が、続発性脳浮腫又は続発性脊髄浮腫である、請求項1に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3】

前記続発性浮腫が実質的に血管原性浮腫である、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記続発性浮腫が、請求項1に記載の少なくとも1つの障害の原因となる最初の発作の1~10日後に生じる、請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

最初の損傷が血管閉塞又は脳内での出血である、請求項4に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記対象がヒトである、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

20

前記インヒビターが血漿由来又は組換えC1インヒビターである、請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記インヒビターが天然のヒトタンパク質又はその変異体と同一である、請求項1～7のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記インヒビターがヒトC1エステラーゼインヒビターである、請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項10】

続発性浮腫のサイズを、未治療の続発性脳浮腫のサイズと比較して少なくとも10%減少させる、請求項1～9のいずれか1項に記載の医薬組成物。 10

【請求項11】

前記インヒビターを静脈内又は皮下投与する、請求項1～10のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記インヒビターを、体重1kg当たり1～1000単位の用量で投与する、請求項1～11のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記インヒビターを、(i)注射若しくは注入として単回投与で、又は(ii)各々注射若しくは注入として、複数回投与で、又は(iii)長期注入若しくは適用として投与する、請求項1～12のいずれか1項に記載の医薬組成物。 20

【請求項14】

前記インヒビターを、最初の発作の遅くとも10日後に、投与する、請求項1～13のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項15】

前記インヒビターを、最初の発作に続く再灌流の開始の遅くとも10日後に、投与する、請求項1～14のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項16】

前記インヒビターを2回、1回目は最初の発作後かつ再灌流の開始前に、2回目は最初の発作に続く再灌流の開始後に投与する、請求項1～15のいずれか1項に記載の医薬組成物。 30

【請求項17】

対象における血液脳関門又は血液脊髄関門の透過性の増加を予防する又は減少させる方法における使用のためのC1インヒビターを含む医薬組成物であって、この透過性の増加が、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷、脊髄損傷、糖尿病、多発性硬化症、CNSの細菌感染症、脳に感染するウイルス感染症及び脳腫瘍からなる群より選択される障害と関連する、上記医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の主題は、最も一般的な局面において、続発性浮腫の予防及び/又は治療である。特に、本発明は、対象における中枢神経系(CNS)の続発性浮腫の形成を予防する及び/又はサイズを減少させる方法における使用のためのC1インヒビターであって、対象が、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷及び脊髄損傷からなる群より選択される少なくとも1つの障害を有する又は有していた、C1インヒビターに関する。好ましくは、CNSの続発性浮腫は続発性脳浮腫である。本発明の別の主題は、血液脳関門又は血液脊髄関門の透過性の増加と関連する障害の治療である。また、第3の主題は、脳虚血再灌流障害を予防する、減少させる又は治療する方法における使用のための血漿由来C1インヒビターである。

【0002】

50

40

50

本明細書において、多数の文献が援用されている。製造業者のマニュアルを含むこれらの文献の開示内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

脳虚血及びその後の再灌流に起因する損傷（脳虚血再灌流障害）の病理は、複雑であり、無数の異なる分子及び細胞経路を必要とする。これらの中で、持続性虚血の一つの特徴は血液脳関門の構造的崩壊であり、これは結果として脳浮腫の形成の原因となる。過度の浮腫は、単に機械的圧迫によって、そうでなければ健康な脳領域を害することができ、脳卒中患者における神経症状の悪化を頻繁に引き起こす。今まで、急性虚血性脳卒中における浮腫形成に対抗するための薬理学に基づく説得力のある戦略はなかった。

10

【0004】

脳浮腫は、脳実質内での流体の限局性又はびまん性異常蓄積から生じる脳体積の増加と定義される。一般に、脳浮腫は4つの異なるグループに分類される：血管原性、細胞傷害性、水頭症性（又は間質性）及び浸透圧性（又は沈下性）浮腫。異なる形態の浮腫のこの分類にもかかわらず、大抵の臨床状況では、疾患の時間的経過に応じて、異なるタイプの浮腫の組み合わせが存在する。脳血流量の妨害及び脳出血に続いての浮腫形成に関して、細胞傷害性及び／又は血管原性脳浮腫が主な役割を果たすようである。さらに、脳浮腫形成に関与するメディエーターに目を向けると、脳浮腫形成に対するそれらの効果以外の多くの特性を有する、多くのメディエーターが言及され得る（例えば、プラジキニン）（非特許文献1）。

20

【0005】

脳浮腫において最初は、脳体積の変化は脳脊髄液及び血液体積の減少によって補われ、そのため、原発性脳浮腫は主に細胞傷害性浮腫である。大きな半球病巣において、進行性膨潤はこれらの代償機構に勝り、頭蓋内圧の増加（即ち、続発性又は悪性脳浮腫の形成）は、死の原因となる脳組織のヘルニア形成をもたらす。従って、血管原性、悪性脳浮腫は、大きな脳梗塞、出血、外傷、感染症及び腫瘍などの様々なタイプの脳病態後の主な死亡原因であり続いている。脳浮腫についての有効な治療がないため、継続的な关心及び研究が依然として刺激される。

【0006】

虚血性脳卒中に関して、続発性脳浮腫は、虚血性脳卒中の経過の間、続発性梗塞増大及び続いての神経症状の悪化を頻繁に引き起こす（非特許文献2、3）。虚血性脳卒中において、悪性中大脳動脈（MCA）梗塞は、著しい占拠性影響及び脳組織のヘルニア形成を伴う完全MCA領域梗塞を記述するために使用される用語である。悪性MCA梗塞の発症率は、全ての脳卒中のうちの1%未満であると推定される。医学的処置の保守的な形式での死亡率はおよそ80%であり、昏睡は発症2～5日以内に脳死で終わる。死は、通常、虚血脳組織の進行性膨潤、脳組織偏位、頭蓋内圧の局所性増加、及び隣接する血管領域への虚血の拡大から生じる。この種の脳卒中の生存者は身体障害を有し、クオリティーオブライフが低い。今までのところ、脳虚血における脳浮腫を持続的に減少させると証明された薬物はなく、しばしば、救命処置としての最後の治療アプローチは減圧半頭蓋切開術である。さらに、虚血性脳卒中における浮腫形成及び引き続いての神経変性の基礎にある分子機構は、ほとんど不明である。

30

【0007】

カリクレイン-キニン系（KKS）は、血液凝固第XII因子（FXII、ハーゲマン因子）によって開始され、血管透過性及び浮腫形成の調節において重要な役割を果たす（非特許文献4）。KKSの活性化は、最近、脳卒中患者においても立証された（非特許文献5）。キニン（例えば、プラジキニン、カリジン）はKKSの最終産物を構成する。キニンは、脳虚血を含む様々な種類の組織損傷の間、それらの前駆体であるキニノーゲンからカリクレインによって放出される非常に活性な炎症性ペプチドホルモンである。キニンの細胞効果は、2つの異なるプラジキニン受容体、B1R及びB2Rによって媒介される。これらの受容体の活性化は、標的器官における炎症過程、例えば、炎症性サイトカインの放出又は免疫細胞の

40

50

誘引、並びに血管透過性の増加を誘発する

【0008】

最近、B2RではなくB1Rの遮断が、マウスにおける局所脳虚血（非特許文献6）及び外傷性脳損傷（非特許文献7）の実験モデルにおいて血液脳関門損傷及び浮腫形成を減少させ、このことは、虚血性脳卒中及び外傷性脳損傷の急性期における脳浮腫形成に対するKKSの機能的関連性を示唆している。

【0009】

負に帯電した表面との接触（接触活性化）で生理学的に活性化される、FXIIの阻害によってKKSの活性化を妨げる研究において、急性実験的脳卒中後の神経病理学的転帰が調べられた（非特許文献8、9）。

10

【0010】

C1エステラーゼインヒビター（C1-INH）は、セルピンと呼ばれるセリンプロテアーゼインヒビターのスーパーファミリーに属する478アミノ酸糖タンパク質である。その名称は、血液及び組織における古典的補体経路の唯一の公知の生理学的インヒビターとしての最初の記述に由来する。しかし、C1-INHはまた、活性化FXII及び血漿カリクレインを遮断することによるKKSの主要な調節因子である。いくつかの他の機能（例えば、FXIa阻害）は別として、それは、補体系の第1成分の活性化相同セリンプロテアーゼ、C1s及びC1rの唯一の公知の生理学的インヒビターである。

【0011】

以前の研究は、虚血性脳卒中自体（非特許文献10、11）並びに外傷性脳損傷（非特許文献12）及び外傷性脊髄損傷（非特許文献13）の動物モデルにおけるC1-INH製剤の有利な役割を実証したが、基礎にある分子機構はほとんど不明である。さらに、これらの研究は、急性神経病理学的転帰に注目していたが、（続発性）脳浮腫に対する効果、即ち、その形成の予防及び/又はそのサイズの減少は開示されなかった。さらに、de Simoniら（非特許文献14）は、血漿由来C1インヒビター（15U/マウス）は、再灌流の開始時に提供される場合、虚血/再灌流障害のマウスモデルにおいて有効なだけであり、一方、再灌流の開始の30分後に提供される場合、効能は完全に失われたことを開示している。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

30

【非特許文献1】Nag et al. (2009) *Acta Neuropathol.*; 118:197 - 217

【非特許文献2】Ayata and Ropper (2002) *J Clin Neurosci.*; 9:113 - 124

【非特許文献3】Bardutzky and Schwab (2007) *Stroke*; 38:3084 - 3094

【非特許文献4】Leeb - Lundberg et al. (2005) *Pharmacol. Rev.*; 57:1:27 - 77

【非特許文献5】Wagner et al. (2002) *J. Neurol. Sci.*; 202:75 - 76

【非特許文献6】Austinat et al. (2009) *Stroke*; 40:285 - 293

【非特許文献7】Raslan et al. (2010) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*; 30:1477 - 1486

【非特許文献8】Hagedorn et al. (2010) *Circulation*; 121:1510 - 1517

【非特許文献9】Kleinschnitz et al. (2006) *JEM*; 203(3):513

【非特許文献10】De Simoni et al. (2004) *Am. J. Pathol.*; 164:1857 - 1863

40

【非特許文献11】Gesuete et al. (2009) *Ann. Neurol.*; 66:332 - 342

【非特許文献12】Longhi et al. (2009) *Crit. Care Med.*; 37:659 - 665

【非特許文献13】Tei et al. (2008) *Neurol. Res.*; 30:761 - 767

【非特許文献14】de Simoni et al. (2004; *Am. J. Pathol.*; 164:1857 - 1863)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

従って、脳内での血管閉塞後に生じる続発性脳浮腫の治療又は予防用の医薬についての必要性が依然として存在することが明らかである。従って、本発明の目的は、そのような必要性を満たすことである。

50

【0014】

従って、本発明の基礎にある技術的課題は、続発性脳浮腫の治療及び／又は予防用のより満足な医薬の開発を可能にし得るか又は基礎を形成する、続発性脳浮腫を首尾よく標的化するための代替の及び／又は改善された手段及び方法を提供することであった。

【課題を解決するための手段】**【0015】**

この技術的課題の解決は、特許請求の範囲において特徴付けられる実施態様を提供することによって達成される。

【0016】

驚くべきことに、本出願人は、最初の損傷に続いて生じる続発性脳浮腫を、C1インヒビターの投与によって予防する又は減少させることができることを発見した。そのような最初の損傷又は原発性障害は、脳内での血管閉塞、例えば虚血性脳卒中、又は脳内での出血、例えば出血性脳卒中であり得る。

10

【0017】

従って、一般に、本発明は、対象における中枢神経系（CNS）の続発性浮腫の形成を予防する及び／又はサイズを減少させる方法における使用のためのC1インヒビターであって、対象が、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷、及び脊髄損傷からなる群より選択される少なくとも1つの障害を有する又は有していた、C1インヒビターに関する。特に、出血性脳卒中は、脳出血又はクモ膜下出血である。

【0018】

20

本発明の好ましい実施態様において、中枢神経系（CNS）の続発性浮腫は、続発性脳浮腫又は続発性脊髄浮腫である。

【0019】

本発明の別の局面は、対象における血液脳関門又は血液脊髄関門を安定させるためのC1インヒビターであって、対象が、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷、脊髄損傷、糖尿病、多発性硬化症、CNSの細菌感染症、例えば髄膜炎、脳に感染するウイルス感染症、例えばHIV、及び脳腫瘍、特に転移性脳腫瘍（metastasing brain tumor）からなる群より選択される少なくとも1つの障害を有する又は有していた、C1インヒビターを提供するということである。

【0020】

30

従って、対象における血液脳関門又は血液脊髄関門の透過性の増加と関連する障害を治療するためのC1インヒビターが特許請求され、障害は、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷、脊髄損傷、糖尿病、多発性硬化症、CNSの細菌感染症、例えば髄膜炎、脳に感染するウイルス感染症、例えばHIV、及び脳腫瘍、特に転移性脳腫瘍からなる群より選択される。

【0021】

さらに、対象における血液脳関門又は血液脊髄関門の透過性の増加を予防する又は減少させる方法における使用のためのC1インヒビターが特許請求され、この透過性の増加は、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷、脊髄損傷、糖尿病、多発性硬化症、CNSの細菌感染症、好ましくは髄膜炎、脳に感染するウイルス感染症、好ましくはHIV、及び脳腫瘍、好ましくは転移性脳腫瘍からなる群より選択される障害と関連する。

40

【0022】

本発明の第3局面は、対象における脳虚血再灌流障害を予防する、減少させる又は治療する方法における使用のための血漿由来C1インヒビターであって、インヒビターを再灌流の開始の30分以上後に投与する、血漿由来C1インヒビターである。

【0023】

血漿由来C1インヒビターでの脳虚血再灌流障害の治療に関するある実施態様において、該脳虚血再灌流障害は、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中及び周産期脳卒中からなる群より選択される障害の後に生じる。

50

【0024】

本発明によれば、用語「C1インヒビター」、「C1エステラーゼインヒビター」及び「C1 - INH」は、補体系と関連するプロテアーゼ、好ましくは、プロテアーゼC1r及びC1s並びにMASP - 1及びMASP - 2、カリクレイン - キニン系と関連するプロテアーゼ、好ましくは血漿カリクレイン及び第XIIa因子、並びに凝固系と関連するプロテアーゼ、好ましくは第XIa因子を阻害するようにセリンプロテアーゼインヒビターとして機能するタンパク質又はそれらのフラグメントを指す。さらに、C1 - INHは、内皮細胞へのセレクチン介在白血球接着を減少させる抗炎症性分子として役立ち得る。本明細書において使用されるC1 - INHは、天然のセリンプロテアーゼインヒビター又はその活性フラグメントであり得、又はそれは、同様の機能特性、例えば、プロテアーゼC1r及びC1s、並びに / 又はMASP - 1及びMASP - 2並びに / 又は第XIa因子並びに / 又は第XIa因子の阻害を提供する、組換えペプチド、合成ペプチド、ペプチド模倣物、又はペプチドフラグメントを含み得る。C1インヒビターの構造及び機能に関するさらなる開示については、それらの全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第4,915,945号；米国特許第5,939,389号；米国特許第6,248,365号；米国特許第7,053,176号；及びWO 2007 / 073186を参照のこと。10

【0025】

従って、本発明の好ましい実施態様において、インヒビターは血漿由来又は組換えC1インヒビターである。さらなる好ましい実施態様において、前記インヒビターは天然のヒトタンパク質又はその変異体と同一である。C1 - INHは、C1インヒビターと同一の機能を有する全ての天然対立遺伝子を包含する。最も好ましい実施態様において、前記インヒビターはヒトC1エステラーゼインヒビターである。20

【0026】

別の好ましい実施態様において、本発明に従うC1インヒビターは、バイオアベイラビティー及び / 若しくは半減期を改善するために、効能を改善するために、並びに / 又は潜在的な副作用を減少させるために、修飾される。修飾は組換え又は他の手段によって実現することができる。そのような修飾の例は記載のC1インヒビターのグリコシル化又はアルブミン融合であり得る。タンパク質のグリコシル化及びアルブミン融合に関するさらなる開示については、その全体が本明細書に組み入れられる、WO 01 / 79271を参照のこと。

【0027】

様々な実施態様において、C1インヒビターは、当業者に公知の方法に従って製造することができる。例えば、血漿由来C1 - INHは、数人のドナーから血漿を採取することによって製造することができる。血漿のドナーは、当技術分野において定義されるような健康であるべきである。好ましくは、数人（1000人以上）の健康なドナーの血漿がプールされ、場合によりさらに処理される。治療目的のためのC1インヒビターの例示的な製造方法は米国特許第4,915,945号に開示されており、この開示はその全体が本明細書に組み入れられる。あるいは、いくつかの実施態様において、C1 - INHは、当技術分野において公知の技術を使用して、天然組織供給源から集められ濃縮され得る。C1インヒビターを含む市販品は、例えば、血漿由来Cinryze（登録商標）（Viropharma）、組換えRuconest（登録商標）又はRhucin（登録商標）（両方ともPharming）、及び血漿由来Berinert（登録商標）（CSL Behring）である。Berinert（登録商標）は、遺伝性血管浮腫及び先天性欠損症の治療に適応される。組換えC1 - INHは公知の方法によって製造することができる。30

【0028】

用語「中枢神経系の浮腫」又は「CNSの浮腫」は、中枢神経系（CNS）の細胞内及び / 又は細胞外空間中の水の過剰な蓄積を指す。用語「脳浮腫（cerebral edema）」又は「脳浮腫（brain edema）」は、脳の細胞内及び / 又は細胞外空間中の水の過剰な蓄積を指す。CNSの急性又は原発性浮腫の病態生理学事象、好ましくは原発性脳浮腫形成、及び特にCNSの時間的に遅れた（即ち、脳卒中発症の数時間又は数日後の）悪性又は続発性浮腫、好ましくは続発性脳浮腫の発生、及びその関連する（分子）病理機構は、ほとんど不明であり、相当複雑であるようである。脳血流量の妨害及び脳出血に続いての浮腫形成に関して、血管原性及び / 又は細胞傷害性脳浮腫が主な役割を果たすようである。40

【0029】

CNSの原発性浮腫、好ましくは原発性脳浮腫は、最初の発作の間に又はその発作後間もなく若しくは直後に（即ち、数分以内に）生じる浮腫である。それは、主に、損傷した脳細胞による異常な水の吸収に起因する細胞傷害性浮腫である。

【0030】

対照的に、CNSの続発性浮腫、好ましくは続発性脳浮腫は、後で、即ち、発作の数時間後に又は数日後にさえ生じ、主に血管原性浮腫である。例えば外傷性脳損傷（TBI）において、悪性脳浮腫は稀（<10%）であるが、しばしば致命的な（約100%）合併症である。それは、医学的管理に不応性である損傷後数時間以内での頭蓋内圧（ICP）の急増によって診断される。

10

【0031】

従って、本明細書において使用される場合、用語「続発性脳浮腫（secondary brain edema）」若しくは「続発性脳浮腫（secondary cerebral edema）」又は「悪性脳浮腫（malignant brain edema）」若しくは「悪性脳浮腫（malignant cerebral edema）」は、任意の遅延性損傷後脳膨潤を指し、即ち、遅れた膨潤が最初の損傷後数時間又は数日以内に生じる。特に、本発明に従う続発性脳浮腫は実質的に血管原性浮腫である。このタイプの浮腫において、血液脳関門の崩壊に起因して、通常は遮断される血管内タンパク質及び流体が、脳実質細胞外空間中へ浸透する。いったん血漿成分が血液脳関門を通過すると、浮腫は広がり、これは非常に速く広範囲であり得る。

【0032】

20

本明細書において使用される場合、用語「続発性脊髄浮腫」は、任意の遅延性損傷後脊髄膨潤を指し、即ち、遅れた膨潤が最初の損傷後数時間又は数日以内に生じる。特に、本発明に従う続発性脊髄浮腫は実質的に血管原性浮腫である。このタイプの浮腫において、通常は遮断される血管内タンパク質及び流体が、脳実質細胞外空間中へ浸透する。いったん血漿成分が血液脊髄関門を通過すると、浮腫は広がり、これは非常に速く広範囲であり得る。

【0033】

30

好ましくは、続発性浮腫は、続発性脳浮腫と関連する、少なくとも1つの障害の原因となる最初の損傷の1～10日後に、より好ましくは2～5日後に生じる。いくつかの実施態様において、続発性浮腫は、最初の発作の2、3、4、若しくは5日後に又は各々の間の任意の時点で現れる。

【0034】

30

用語「続発性浮腫の形成を予防すること」は、続発性浮腫の形成が完全に又は部分的に予防される、C1インヒビターの使用方法を指す。完全な続発性浮腫の形成の予防は、C1インヒビターが形成の前に投与される場合、続発性浮腫が全く生じないことを意味する。部分的に続発性浮腫の形成を予防することは、続発性浮腫が生じ始める前の時点でC1インヒビターを投与し、後に生じる浮腫のサイズが未治療患者における浮腫のサイズよりも小さくなるシナリオで、続発性浮腫のサイズを減少させることを意味する。本発明の好ましい実施態様において、続発性浮腫のサイズ、即ち、続発性浮腫の体積は、未治療の続発性浮腫のサイズと比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%（又は間の任意のパーセンテージ）予防される。

40

【0035】

本明細書において使用される場合、用語「減少させること」は、人若しくは動物における続発性浮腫の可能性を低下させること、任意の症状の重症度を低下させること、及び/又は最初の損傷後の続発性浮腫の危険性がある集団中の患者の割合を低下させることを含む。従って、「減少させること」は、続発性浮腫の状態を弱めること、低下させること、減らすこと、限定すること、寛解させること、又は改善することを指す。続発性浮腫のサイズを減少させることは、例えば、続発性浮腫の発生を防ぐこと；続発性浮腫の危険性を減少させること、それが現れるにつれて、若しくはいったんそれが現れると、続発性浮腫の重症度を減少させること；続発性浮腫の損傷を限定すること；続発性浮腫の広がりを減

50

少させること、例えば、最初の発作後に現れる浮腫の体積を限定すること；又は、続発性浮腫と関連する脳若しくは脊髄における状態を改善することを含み得る。

【0036】

用語「続発性浮腫のサイズを減少させること」は、続発性浮腫の形成が投与の時点で始まっているか否かにかかわらず、続発性浮腫のサイズを独立して減少させる、C1インヒビターの使用方法を指す。従って、続発性浮腫のサイズを減少させることは、投与後に生じる既存の続発性浮腫のサイズを減少させるためにC1インヒビターを投与するシナリオで、並びに既に生じているが依然として成長している続発性浮腫のサイズを減少させるためにC1-INHを投与するシナリオで、続発性浮腫の体積を減少させることを意味する。本発明の好ましい実施態様において、続発性浮腫のサイズを減少させることは、続発性浮腫のサイズを、未治療の、即ち治療されていない、続発性浮腫のサイズ又は体積と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%（又は間の任意のパーセント）減少させることを意味する。

【0037】

従って、本発明の好ましい実施態様において、続発性浮腫のサイズを、未治療の続発性浮腫の体積と比較して、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%減少させる。

【0038】

本発明のある実施態様において、対象における続発性浮腫の前記治療は、予防的及び／又は治療的である。本発明に従うC1インヒビターの使用は、続発性浮腫の形成を予防するために及び／又は続発性浮腫のサイズを減少させるために、予防的に及び／又は治療的に使用することができる。

【0039】

続発性浮腫と関連する障害は、最初の損傷によって誘発され、これは、用語「最初の発作」の代わりに本明細書において使用され、即ち、最初の発作は、続発性浮腫と関連する少なくとも1つの障害の原因となる。本発明に従う最初の発作についての例は脳虚血である。好ましくは、この最初の損傷は、血管閉塞、例えば虚血性脳卒中、又は出血、例えば出血性脳卒中であり得る。より好ましくは、最初の発作は脳内での血管閉塞又は脳内での出血である。

【0040】

続発性浮腫と関連する、少なくとも1つの障害は、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷、及び脊髄損傷からなる群より選択される。あるいは、C1-INHは、感染症又は脳腫瘍などの障害を有する対象へ投与され得る。

【0041】

用語「脳卒中」は、本発明において使用される場合、当技術分野において周知であり、時には脳血管障害（CVA）又は脳梗塞とも呼ばれる。脳卒中は、特に虚血に起因する、脳機能の喪失をもたらす脳への血液供給の減少によって医学的に定義される医学的状態である。前記血液供給の減少は、例えば、血栓症又は塞栓症によって引き起こされ得る。さらに、脳卒中は、出血プロセスによって引き起こされ得る。従って、脳卒中は、一般に2つの主要なカテゴリー、即ち、i) 虚血性及びii) 出血性脳卒中に分類される。虚血は血液循環の中断に起因し、出血は血管破裂又は異常な血管構造に起因し、両方のシナリオとも最終的に脳組織の損傷をもたらす。脳卒中の約87%は虚血によって引き起こされ、残りは出血による。一部の出血は虚血の領域内で現れる（「出血性変化」）。どのようにして多くの出血が実際には虚血性脳卒中として始まるかは不明である。

【0042】

本発明によれば、従って、前記脳卒中は、好ましくは虚血性脳卒中又は出血性脳卒中である。

【0043】

10

20

30

40

50

虚血性脳卒中において、脳の一部への血液供給が減少し、その領域における脳組織の機能障害及び壊死に至る。主に3つの原因がある：血栓症（血餅が局所的に形成することによる血管の閉塞）、塞栓症（体内の他の場所からの血餅／塞栓に起因するもの）及び全身的低灌流（例えばショックにおける、血液供給の全体的な減少）。本発明によれば、血栓症は、好ましくは動脈、静脈、細動脈、細静脈、及び毛細血管において生じ得、一方、塞栓症は、好ましくは動脈、細動脈、及び毛細血管において生じ得る。

【0044】

出血性脳卒中、即ち、頭蓋内出血は、頭蓋内の任意の場所での血液の蓄積である。脳実質内出血（*intra-axial hemorrhage*）（脳の内側の血液）と脳実質外出血（*extra-axial hemorrhage*）（頭蓋の内側しかし脳の外側の血液）とで区別される。

10

【0045】

本発明の特に好ましい実施態様において、前記出血性脳卒中は、脳出血又はクモ膜下出血である。

【0046】

脳出血又は脳内出血は、脳組織自体内で生じる頭蓋内出血のサブタイプである。脳出血は、慢性高血圧症若しくは脳外傷によって引き起こされ得、又はそれは、例えば、抗血小板薬療法（例えば、アセチルサリチル酸）によって若しくは抗凝固療法（例えば、フェンプロクモンなどのビタミンK拮抗薬）によって薬物誘発され得、又はそれは出血性脳卒中において自然に生じ得る。非外傷性脳内出血は、脳組織中への自然出血である。脳出血は脳実質内出血であり；即ち、それは脳組織外ではなく脳組織内で生じる。2つの主要な種類の脳実質内出血がある：実質内出血及び脳室内出血（脳室系内の血液）。頭蓋内出血の他方のカテゴリーは、脳実質外出血、例えば、硬膜外、硬膜下、及びクモ膜下血腫であり、これらは全て頭蓋内でしかし脳組織外で生じる。

20

【0047】

クモ膜下出血は、クモ膜下腔 - クモ膜と脳を囲む軟膜との間の領域中への出血である。これは、自然に、通常、破裂脳動脈瘤から生じ得るか、又は頭部損傷から生じ得る。

【0048】

周産期脳卒中は、本発明において使用される場合、胎児期又は新生児期の間に脳の損傷の原因となる脳血管の局所性疾患である。周産期は妊娠中期（胎児期）から出生及び生後1ヶ月までの全体にわたる時間枠を指す。従って、周産期脳卒中は、妊娠28週後から出生後28日までの任意の時点での赤ん坊において生じる脳卒中を意味する。場合によっては、これは小児てんかんの原因となり得る。

30

【0049】

本発明に従う、頭蓋内損傷としても公知の、外傷性脳損傷（TBI）は、外力が脳に外傷を与える場合に生じる。TBIは、重症度、メカニズム（閉鎖性又は穿通性頭部損傷）、又は他の特徴（例えば、特定の場所において又は広範囲の領域にわたって生じる）に基づいて分類され得、多数の身体的、認知的、社会的、情動的、及び行動的影響を引き起こし得、転帰は、全快から永久的な障害又は死に及び得る。外傷性脳損傷は、機械的外力、例えば、急な加速若しくは減速、衝撃、爆風、又は弾丸による貫通に起因する脳への損傷と定義される。脳機能は一時的にあるいは永久に害され、構造損傷は現在の技術で検出可能である場合及び検出可能でない場合がある。

40

【0050】

用語「脊髄損傷」（SCI）は、本明細書において使用される場合、疾患の代わりに外傷によって引き起こされる脊髄への任意の損傷を指す。どこで脊髄及び神経根が損傷されるかに依存して、症状は、疼痛から麻痺、失禁まで、広範囲に異なり得る。脊髄損傷は、患者に対して影響を有さないことから変化し得る「不完全型」から機能の完全な喪失を意味する「完全型」損傷までの様々なレベルで記載される。脊髄損傷は、多くの原因を有するが、典型的には、例えば交通事故、転倒、スポーツ損傷、及び暴力由来の大きな外傷と関連する。

【0051】

50

しばしば単に糖尿病 (diabetes) と呼ばれる、糖尿病 (diabetes mellitus) は、体が十分なインスリンを産生しないためか、又は産生されるインスリンに細胞が応答しないために、人が高血糖を有する代謝性疾患の一群である。血液脳関門に関して著しい変化が生じ、これはバリア効果並びに輸送機能に影響を与える。

【0052】

多発性硬化症 (MS、播種性硬化症又は播種性脳脊髄炎としても公知) は、脳及び脊髄の軸索周囲の脂肪ミエリン鞘が損傷され、脱髓及び瘢痕化並びに広範囲の徴候及び症状へ至る、炎症性疾患である。MSはCNSの感染症であり、ここでリンパ球及びマクロファージがCNS内に侵入する。

【0053】

髄膜炎は、集合的に髄膜として公知の、脳及び脊髄を覆う保護膜の炎症である。炎症は、ウイルス、細菌、又は他の微生物による感染によって、及び一般的ではないが特定の薬物によって、引き起こされ得る。髄膜炎は、炎症が脳及び脊髄に近いために致死的であり得る。

【0054】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、免疫系の進行性不全が致死的な日和見感染症及び癌を発生させるヒトにおける状態である、後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こすレンチウイルス (レトロウイルス科のメンバー) である。HIVは感染直後に血液脳関門を突破する。

【0055】

脳腫瘍は、脳又は中央脊柱管内の腫瘍 (細胞の異常増殖と定義される) である、頭蓋内固形新生物である。

【0056】

本発明のある実施態様において、最初の損傷を有する対象は、C1インヒビターが先天的に不足していない対象であり、即ち、C1インヒビターは、C1エステラーゼインヒビターの先天的欠損を有する対象へ投与されない。

【0057】

本発明の好ましい実施態様において、C1インヒビターは、ヒトにおける続発性浮腫の形成を予防する及び/又はサイズを減少させるために使用され、即ち、本発明の好ましい対象はヒトである。しかし、本発明によれば、C1インヒビターは、動物、好ましくは飼育動物、より好ましくはイヌ、ネコ又はウマである対象へも投与することができる。

【0058】

ある実施態様において、C1 - INHを含む薬学的組成物は、CNSの続発性浮腫若しくは脳虚血再灌流障害の治療における使用のため及び/又は血液脳関門若しくは血液脊髄関門の透過性の増加を治療するために製造される。C1 - INHを含む薬学的組成物を処方する方法は、当技術分野において公知である。例えば、C1 - INHの粉末又は凍結乾燥形態 (例えば、フリーズドライによって) が提供され、水性製薬が望まれる場合、粉末は、薬学的製剤の水性成分と混合することによって溶解され、ボルテックス又は緩やかな攪拌などの適切な技術を使用して攪拌され得る。他の実施態様において、C1 - INHは凍結乾燥形態で提供され、投与前に水性薬学的成分 (例えば、追加の活性成分又は不活性成分、例えば、充填剤、安定剤、溶媒、若しくは担体) と混ぜ合わされる。

【0059】

ある実施態様において、薬学的組成物は、少なくとも1つの添加剤、例えば、充填剤、增量剤、緩衝剤、安定剤、又は賦形剤を含み得る。標準的な製剤処方技術は当業者に周知である (例えば、2005 Physicians' Desk Reference (登録商標), Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennaro et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000を参照のこと)。適切な薬学的添加剤としては、例えば、マンニトール、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥ス

10

20

30

40

50

キムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。ある実施態様において、薬学的組成物はまた、pH緩衝試薬及び湿潤剤又は乳化剤を含有してもよい。さらなる実施態様において、組成物は保存剤又は安定剤を含有してもよい。

【0060】

薬学的組成物の処方は、意図される投与経路及び他のパラメータに応じて異なり得る（例えば、Rowe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4th ed., APhA Publications, 2003を参照のこと）。いくつかの実施態様において、薬学的組成物は、凍結乾燥ケーキ又は粉末であり得る。凍結乾燥組成物は、例えば注射用滅菌水、USPを用いて、静脈内注射による投与のために再構成され得る。他の実施態様において、組成物は無菌非発熱性液剤であり得る。なおさらなる実施態様において、組成物は丸剤又は錠剤において粉末形態で送達される。

10

【0061】

記載の薬学的組成物は、唯一の活性化合物としてC1-INHを含んでもよく、又は少なくとも1つの他の化合物、組成物、若しくは生物学的材料と組み合わせて送達してもよい。そのような化合物の例としては、ビタミン、抗生物質、又は脳内での血餅形成を除去若しくは阻害するように意図される化合物（例えば、組織プラスミノーゲン活性化因子、アセチルサリチル酸、クロピドグレル、又はジピリダモール）が挙げられる。

【0062】

CNSの続発性浮腫の治療用並びに脳虚血再灌流障害の治療用又は血液脳関門若しくは血液脊髄関門の透過性の増加の治療用のキットをさらに開示する。ある実施態様において、キットは、(a) C1-INH、(b) CNSの続発性浮腫若しくは脳虚血再灌流障害の治療における使用についての又は血液脳関門若しくは血液脊髄関門の透過性の増加の治療における使用についての説明書、並びに場合により(c)少なくとも1つのさらなる治療的に活性な化合物又は薬物を含む。C1-INH成分は液体又は固体形態（例えば、凍結乾燥後）であり得る。液体形態の場合、C1-INHは、添加剤、例えば、安定剤及び/又は保存剤、例えば、プロリン、グリシン、若しくはスクロース、又は貯蔵寿命を延長する他の添加剤を含んでもよい。

20

【0063】

ある実施態様において、キットは、追加の化合物、例えば、C1-INHの投与前、同時又は後に投与される治療的に活性な化合物又は薬物を含有してもよい。そのような化合物の例としては、ビタミン、抗生物質、抗ウイルス剤などが挙げられる。他の実施態様において、脳内での血餅形成を除去又は阻害するように意図される化合物（例えば、組織プラスミノーゲン活性化因子、アセチルサリチル酸、クロピドグレル、又はジピリダモール）をキットに含むことができる。

30

【0064】

様々な実施態様において、キットの使用説明書は、CNSの続発性浮腫若しくは脳虚血再灌流障害の治療において又は血液脳関門若しくは血液脊髄関門の透過性の増加を治療するためにキット成分を使用する指示を含む。説明書は、C1インヒビターを調製する（例えば、フリーズドライタンパク質の場合、希釈する又は再構成する）方法に関する情報をさらに含有してもよい。説明書は、投薬量及び投与頻度に関するガイダンスをさらに含んでもよい。

40

【0065】

C1インヒビターの製剤は、任意の薬学的に適切な投与手段によって人へ送達され得る。様々な送達システムが公知であり、任意の好都合な経路によって組成物を投与するために使用することができる。好ましい実施態様において、C1インヒビターの製剤は全身投与される。全身使用のために、治療用タンパク質は、従来の方法に従って非経口又は経腸（例えば、経口、経膣若しくは直腸）送達用に処方される。非経口投与としては、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、脳内、硬膜下、髄腔内注射若しくは直接脳内への注射、肺内、経皮又は鼻腔内投与が挙げられ得るが、これらに限定されない。最も優先的な投与経路は静脈内投与である。製剤は連続的に注入によって又はボーラス注射によって投与することがで

50

きる。ある製剤は、徐放システムを含む。

【0066】

続発性浮腫の治療に関するある実施態様において、C1 - INHは、最初の損傷が始まってから5、10、20、30、40、若しくは50分、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、72、96、120、又は240時間後に（又は間の任意の時点で）投与される。好ましい実施態様において、投与は、最初の損傷の遅くとも10日後、好ましくは遅くとも5日後、より好ましくは遅くとも3日後、より好ましくは遅くとも1日後、より好ましくは遅くとも12時間後、より好ましくは遅くとも6時間後、より好ましくは遅くとも3時間後、より好ましくは遅くとも1時間後、より好ましくは遅くとも30分後、さらにより好ましくは最初の損傷の直後に（又は間の任意の時点で）行われる。 10

【0067】

ヒトC1エステラーゼインヒビターの長い半減期及び／又は予防的治療に関して、好ましい投与は、最初の損傷の発生後、可能な限り迅速であるべきである。

【0068】

他の好ましい実施態様において、C1 - INHでの治療は、最初の発作によって引き起こされた閉塞に続く再灌流の開始の直後又は10日後までに開始され得る。好ましくは、そのような治療は、再灌流の開始に続いて可能な限り早く行われる。ある実施態様において、治療は、最初の損傷に続く再灌流の開始の5、10、20、30、40、若しくは50分、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、72、96、120、若しくは240時間後に（又は間の任意の時点で）行われる（又は間の任意の時点で）。好ましい実施態様において、投与は、最初の損傷に続く再灌流の開始の遅くとも10日後、好ましくは遅くとも5日後、より好ましくは遅くとも3日後、より好ましくは遅くとも1日後、より好ましくは遅くとも12時間後、より好ましくは遅くとも6時間後、より好ましくは遅くとも3時間後、より好ましくは遅くとも1時間後、より好ましくは遅くとも30分後、さらにより好ましくは最初の損傷に続く再灌流の開始の直後に行われる。 20

【0069】

血漿由来C1インヒビターでの脳虚血再灌流障害の治療に関するある実施態様において、治療は、再灌流の開始後30分から10日までに開始され得る。好ましい実施態様において、治療は、再灌流の開始の30、40、若しくは50分、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、72、96、120、若しくは240時間後に（又は間の任意の時点で）行われる。他の実施態様において、投与は、再灌流の開始後10日まで、好ましくは5日まで、より好ましくは3日まで、より好ましくは1日まで、より好ましくは12時間まで、より好ましくは6時間まで、より好ましくは3時間まで、より好ましくは1時間まで、より好ましくは45分まで、さらにより好ましくは再灌流の開始後30分までに（又は間の任意の時点で）行われる。好ましくは、そのような治療は、再灌流の開始後30分から10日の間に、好ましくは30分から5日の間に、より好ましくは30分から3日の間に、より好ましくは再灌流の開始後30分から1日の間に（又は間の任意の期間で）行われる。 40

【0070】

患者への投与は、単回投与で若しくは反復投与で、並びに任意の様々な生理学的に許容される塩形態で、並びに／又は薬学的組成物の一部としての許容される薬学的担体及び／若しくは添加剤と共に、行ってもよい。従って、ある実施態様において、C1インヒビターは、（i）注射若しくは注入として単回投与で、又は（ii）各々注射若しくは注入として、複数回投与で、好ましくは2回投与で、又は（iii）長期注入若しくは適用として投与する。長期注入／適用は、ある期間にわたって、好ましくは30分～2週間、より好ましくは30分～1週間、より好ましくは30分～6日間、より好ましくは30分～5日間、より好ましくは30分～4日間、より好ましくは30分～3日間、より好ましくは30分～2日間、より好ましくは30分～1日間、より好ましくは30分～12時間、より好ましくは30分～6時間の 50

期間（又は間の任意の期間）にわたって与える。

【0071】

好ましい実施態様において、患者への投与を2回投与で、最初の発作後かつ再灌流の開始前に1回、最初の発作に続く再灌流の開始後に1回、行う。

【0072】

C1-INHを含む組成物は、治療的に有効な量で患者へ投与され得る。一般に、治療的に有効な量は、対象の年齢、全身状態及び性別、並びに対象における医学的状態の重症度で変動し得る。投薬量は医師によって決定され得、必要に応じて、観察される治療効果に適合するように調節され得る。ある実施態様において、C1-INHの用量はおよそ1U/kg～500U/kg体重の範囲にあり得る。様々な実施態様において、C1-INHの用量は、1、5、7、10、15、20、25、30、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、450、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、又は4500U/kg体重（又は間の任意の値）である。C1-INH投与についての例示的な治療域は、米国特許第5,939,389号にも開示されており、その開示はその全体が組み入れられる。好ましくは、C1インヒビターを、体重1kg当たり1～1000単位、より好ましくは体重1kg当たり5～500単位、より好ましくは体重1kg当たり10～200単位の用量で、最も好ましくは体重1kg当たり20～100単位の用量で、投与する。

【0073】

投与する薬学的組成物は、唯一の活性化合物としてC1-INHを含んでもよく、又は少なくとも1つの他の化合物、組成物、若しくは生物学的材料と組み合わせて送達してもよい。そのような化合物の例としては、ビタミン、抗生物質、又は脳内での血餅形成を除去若しくは阻害するように意図される化合物（例えば、組織プラスミノーゲン活性化因子、アセチルサリチル酸、クロピドグレル、又はジピリダモール）が挙げられる。

【0074】

本発明のさらなる実施態様において、対象における中枢神経系（CNS）の続発性浮腫の形成を予防する及び/又はサイズを減少させる方法であって、対象が、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、周産期脳卒中、外傷性脳損傷及び脊髄損傷からなる群より選択される少なくとも1つの障害を有する又は有していた、方法。好ましくは、前記CNSの続発性浮腫は、続発性脳浮腫又は続発性脊髄浮腫である。

【0075】

図は以下を示す：

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1a】C1-INHは、マウスにおける急性虚血性脳卒中後の死亡率を減少させ、機能転帰を改善する。（a）tMCAO後の第7日までのC1-INH処置マウス（それぞれ、7.5U又は15.0U）及び対照における死亡率（n=10/群）；**p=0.0087、*p=0.0215、対照マウスと比較してのログランク検定。

【図1b】C1-INHは、マウスにおける急性虚血性脳卒中後の死亡率を減少させ、機能転帰を改善する。（b）tMCAO後の第5日における長期間にわたる機能転帰（Bedersonスコア）（n=3～9/群）；**p<0.01、Kruskal-Wallis検定、続いてDunnの多重比較検定。

【図2a】C1-INHは虚血性脳卒中において大きな血液脳関門安定化及び抗浮腫効果を示す。（a）上パネル：血管トレーサーであるエバンスブルーの注射後の、tMCAO後の第1日（最初の発作の24時間後）における、対照マウス（Ctrl）及び7.5U C1-INH又は15.0U C1-INHで最初の発作の1時間後に処置されたマウスの代表的な対応する冠状脳切片。血管漏出はC1-INH処置後に有意に減少した。エバンスブルー溢出は、梗塞がC1-INH受容マウスにおいても存在する領域においてほとんど存在さえしなかったことに注意のこと（基底核、赤色矢印）。下パネル：tMCAOの24時間後に処置及び未処置マウスの虚血半球において平面面積測定法によって測定されたエバンスブルー溢出の体積（n=7～10/群）；*p<0.05、1-way ANOVA、Bonferroni事後検定、未処置対照マウスと比較。

30

20

10

50

【図2b】C1-INHは虚血性脳卒中において大きな血液脳関門安定化及び抗浮腫効果を示す。(b)tMCAO後の第1日(最初の発作の24時間後)における対照マウス(Ctrl)及び7.5U C1-INH又は15.0U C1-INHで最初の発作の1時間後に処置されたマウスの虚血半球における脳含水量によって測定された浮腫形成(n=5/群);***p<0.0001、1-way ANOVA、Bonferroni事後検定、未処置対照マウスと比較。

【図2c】C1-INHは虚血性脳卒中において大きな血液脳関門安定化及び抗浮腫効果を示す。(c)tMCAOの24時間後の、擬似手術したマウス、対照(Ctrl)及び7.5U C1-INH又は15.0U C1-INH(n=6~14/群)で最初の発作の1時間後に処置されたマウスの、皮質及び基底核におけるエンドセリン-1の相対的遺伝子発現。15.0U C1-INHは両方の脳領域においてエンドセリン-1の誘導を妨げたことに注意のこと;***p<0.0001、###p<0.0001、2-way ANOVA、Bonferroni事後検定、擬似手術したマウスと比較(それぞれ、皮質(*)又は基底核(#))。

【図2d】C1-INHは虚血性脳卒中において大きな血液脳関門安定化及び抗浮腫効果を示す。(d)対照マウス又はそれぞれ7.5U C1-INH若しくは15.0U C1-INHを受容したマウス(最初の発作の1時間後に処置)(n=4/群)における、tMCAO後の第1日(最初の発作の24時間後)における虚血基底核中のオクルディン発現のウェスタンプロット分析、*p<0.05、1-way ANOVA、Bonferroni事後検定、未処置マウスと比較。

【図3】C1-INH処置はラットにおいて脳卒中時の脳浮腫形成を減少させる。ラットを90分間のtMCAOへ供し、再灌流直後に20U/kg C1-INHで処置した。脳浮腫の程度を、第1日(最初の発作の24時間後)におけるTTC染色脳切片から平面面積測定法によって計算した(n=15/群);***p<0.0001、両側スチューデントt検定、ビヒクル処置対照と比較。

【図4a】C1-INH処置は脳卒中後の脳内血栓形成を減少させる。(a)上パネル:tMCAOの24時間後に免疫プロット法によって測定された、対照マウス(Ctrl)及び7.5U C1-INH又は15.0U C1-INHで処置されたマウスの、梗塞した(i)及び対側(c)の皮質及び基底核におけるフィブリン(フィブリノーゲン)の蓄積。各群の2つの代表的な免疫プロットを示す。下パネル:上記に示すマウス群及び脳領域における血栓形成の密度測定による定量化(n=3~5/群);***p<0.0001、##p<0.01、2-way ANOVA、Bonferroni事後検定、対照と比較(それぞれ、皮質(*)又は基底核(#))。

【図4b】C1-INH処置は脳卒中後の脳内血栓形成を減少させる。(b)上パネル:tMCAO後の第1日における対照マウス(Ctrl)及び15.0U C1-INHで処置されたマウスの梗塞した基底核からの代表的なH&E染色。血栓性血管は対照マウスにおいて豊富であり(矢印)、一方、微小血管開通性は15.0U C1-INH受容マウスにおいて有意に増加し(矢印)、これを血栓症インデックスの計算(n=5/群)によって確認した(下パネル);*p<0.05、1-way ANOVA、Bonferroni事後検定、対照と比較。スケールバー:100μm。

【図5-1】遅延C1-INH処置は脳内血栓形成を減少させる。上パネル:tMCAOの24時間後に免疫プロット法によって測定された、対照マウス(Ctrl)及び脳卒中の6時間後に7.5U C1-INH又は15.0U C1-INHで処置されたマウスの梗塞した皮質及び基底核におけるフィブリン(フィブリノーゲン)の蓄積。下パネル:上記に示すマウス群及び脳領域における血栓形成の密度測定による定量化(n=4/群);*p<0.05、**p<0.01、###p<0.0001、2-way ANOVA、Bonferroni事後検定、対照と比較(それぞれ、皮質(*)又は基底核(#))。

【図5-2】図5-1の続き。

【図6】C1-INHはtMCAO後の遅延設定で適用した場合も依然として有効である。(a)上記に示すマウス群(n=8~16/群)におけるtMCAO後の第1日(最初の発作の24時間後)における神経学的Bedersonスコア(上パネル)及びグリップ試験スコア(下パネル)。最初の発作の6時間後に15.0U C1-INHを受容したマウスは、対照又はより低い用量(7.5U)のC1-INHを受容したマウスと比較して有意によりよく機能した;*p<0.05、Kruskal-Wallis検定、続いてDunnの多重比較検定。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0077】

実施例によって本発明を説明するが、本発明を決して限定しない。

【0078】

虚血モデル。C57BL/6マウス及びCDラットを研究に含め、これを実験動物の使用についての制度ガイドラインに従って行い、プロトコルは政府機関 (Regierung von Unterfranken, Wuerzburg, Germany; Regierungspraesidium Giessen, Germany) によって承認された。管腔内フィラメント技術を使用する一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) によって60分間 (6 ~ 8 週齢又は20週齢C57BL/6マウス) 又は90分間 (7 ~ 9 週齢CDラット) 、局所脳虚血を誘発した (Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., & Cummins, R., Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20 (1):84 - 91; Kleinschnitz et al *Stroke* 2011)。脳卒中転帰に影響を与える重要な生理学的パラメータ (例えば、脳血流量) について、動物を制御した。最近公開されたARRIVEガイドライン (<http://www.nc3rs.org/ARRIVE>) に従って、全ての脳卒中実験を行った。データ収集及び分析に関与しない独立した人によって、動物は無作為に手術者に割り当てられた。本発明者らは、実験群に対して盲検化された状態で、手術及び全ての読み出しパラメータの評価を行った。除外基準を含む詳細な研究設計を下記に与える。

【0079】

マウスにおける脳虚血の誘発。記載されるように (Kleinschnitz et al., *J Exp Med* 2006; *PLoS Biol* 2010) 60分間の一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) によって 6 ~ 8 週齢又は 20週齢マウスにおいて局所脳虚血を誘発した。70% N₂O / 30% O₂ 混合物中 2.5% イソフルラン (Abbott, Wiesbaden, Germany) でマウスを麻酔した。フィードバック制御加熱装置を使用することによって、手術の間、深部体温を 37° に維持した。首における正中皮膚切開後、近位総頸動脈及び外頸動脈を結紮し、標準化シリコンゴムコーティング 6.0 ナイロンモノフィラメント (6021; Dccol Corp., Redlands, CA, USA) を、右内頸動脈を介して挿入し、前進させ、右MCAの起点を閉塞させた。管腔内縫合を60分間そのままにした。次いで、動物を再麻酔し、閉塞モノフィラメントを引き抜き、再灌流を可能にした。

【0080】

マウスにおける機能転帰の評価。tMCAO後の第 1 日 (最初の発作の24時間後) 及び第 5 日に、神経障害を Bederson (Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;173:472 - 476) に従ってスコア化及び定量化した: 0、障害無し; 1、前肢屈曲; 2、1についてと同様、及び横からの押しに対する抵抗の減少; 3、一方向に旋回; 4、縦方向に回転; 5、運動無し。グリップ試験 (Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC. Age - related learning deficits in transgenic mice expressing the 751 - amino acid isoform of human beta - amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;9212:5341 - 5345) について、マウスを 2 つの支持物間の糸の途中に置き、以下のように評価した: 0、落下する; 1、一方又は両方の前足によって糸へしがみつく; 2、1についてと同様、及び糸に上がろうとする; 3、一方又は両方の前足及び一方又は両方の後足によって糸へしがみつく; 4、前足及び後足によって糸へしがみつき、かつ尾を糸の周りに巻き付ける; 5、(支持物へ) 脱出する。

【0081】

ラットにおける脳虚血の誘発。7 ~ 9 週齢ラットを、管腔内フィラメント技術を使用して 90 分間の tMCAO へ供した (Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., & Cummins, R., Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20 (1):84 - 91)。詳細には、5% イソフルラン (CP Pharma, Burgdorf, Germany) を含むイソフルランチャンバ中において自発呼吸している動物に麻酔を導入し、続いてフェイスマスクによって 2.5% イソフルランで維持した。手術の間、動物を加熱装置上に置き、正常体温 (37°) を確実にした。首における正中皮膚切開後、左総頸動脈及び外頸動脈を分離及び結紮した。動脈切開に続いて、熱によってその先端が丸められた状態の

10

20

30

40

50

標準化シリコンコーティング4.0ナイロンモノフィラメント (Ethilon (登録商標) ; Johnson & Johnson, St - Stevens - Woluwe, Belgium) を内頸動脈中へ挿入し、軽い抵抗を感じられるまで中大脳動脈の起点へと頭方へ前進させた。閉塞フィラメントを90分間そのままにした。次いで、動物を再麻酔し、閉塞モノフィラメントを引き抜き、再灌流を可能にした。

【0082】

C1 - INH処置。tMCAO (最初の発作) の誘発の1時間又は6時間後、150 μl 担体溶液 (等張食塩水) 中に希釈された7.5単位(U) 又は15.0 Uの用量の血漿ヒトC1 - INH (Berninert (登録商標) P, CSL Behring GmbH, Marburg, Germany) の単回静脈内注射をマウスに受容させた。それぞれの用量は、脳虚血の齧歯動物モデルにおける以前公開された研究に基づいて選択し、15.0 Uは、マウスにおける補体溶血活性の90% ~ 95% 阻害を得るために必要とされるC1 - INHの量に対応する (Longhi L et al., Crit Care Med 2009; Storini C et al., Neurobiol Dis, 2005)。ラットにおいて、20 U / kg体重の用量でtMCAOの誘発の90分後に (再灌流の誘発直後に) C1 - INHを静脈内注射した。対照マウス及びラットには等しい体積の等張食塩水 (ビヒクル) を受容させた。

【0083】

脳卒中研究設計。ビヒクル処置マウス若しくはラット又はC1 - INH受容マウス若しくはラットは、データ収集及び分析に関与しない独立した人によって無作為に手術者に割り当てられた。本発明者らは、実験群に対して盲検化された状態で、手術及び全ての読み出しパラメータの評価を行った。以下の条件によってエンドポイント分析から動物を除外した (除外基準) :

1. MCAO後24時間以内の死。
2. クモ膜下出血 (SAH) (MRIによって又は脳サンプリングの間に肉眼によって評価した通り)
3. Bedersonスコア = 0 (tMCAOの24時間後、マウスのみ)

中断率は群間で均等に分布していた。

【0084】

血液脳関門漏出及び脳浮腫の測定。血液脳関門漏出を測定するために、0.9% NaCl中に希釈された2%エバンスブルートレーサー100 μl (Sigma Aldrich, Germany) を、tMCAOの誘発の1時間後にi. v. 注射した (Austinat et al., Stroke 2011)。24時間後、C1 - INH処置マウス及び対照に4%パラホルムアルデヒド (PFA) を経心的に灌流させ、脳を迅速に取り出し、マウスプレインスライスマトリックス (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) を使用して2mm厚の冠状切片に切断した。エバンスブルーによって染色された脳実質の平面面積測定 (ImageJソフトウェア, National Institutes of Health, USA) をを行い、血液脳関門損傷を評価した。

【0085】

続発性脳浮腫の程度を評価するために、C1 - INH処置マウス又は対照をtMCAOの24時間後に犠牲にした。脳を取り出し、半球を分離し、計量して湿重量 (WW) を評価した。その後、半球を60°で72時間乾燥させ、乾燥重量 (DW) を測定した。半球含水量 (%) を以下の式を使用して計算した : ((WW - DW) / WW) × 100 (Austinat et al., Stroke 2009)。

【0086】

ラットにおいて、続発性脳浮腫の程度を、以下の等式に従って、TTC染色された脳切片から平面面積測定法によって計算した :

$$\text{脳浮腫面積 (\%)} = [(AL + AI + AC) \times 100 / (AC \times 2)] - 100,$$

式中、ALはTTC陰性 (虚血) 脳組織の総面積を示し、AIは同側 (脳卒中) 半球の生存組織の総面積を示し、ACは対側 (健康) 半球の総面積を示す。

【0087】

ラットにおける脳浮腫の計算のために必要とされた、TTC (塩化2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム) 染色は、以下のプロトコルを使用して行った : ラットをtMCAOの24時間後に犠牲にした。脳を迅速に取り出し、カミソリ刀 (VWR International GmbH, Darmstadt, Darmstadt, Germany) を使用して脳を横断し、脳組織をTTC染色液 (Sigma Aldrich, Germany) に60分間曝露した。

Germany)を使用して6個の2-mm厚の冠状切片に切断した。切片をPBS中の2%TTC(Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Germany)で37にて15分間染色し、梗塞を視覚化した(Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*. 1986;176:1304-1308)。

【0088】

組織学及び免疫組織化学。凍結包埋した脳を10 μ m厚の切片に切断し、好中性顆粒球の染色についてはアセトン中に、又はミクログリア/マクロファージ及びオクルディンの染色についてはPBS中4%PFA中に固定した。エピトープのプロッキングを45分間のPBS中のウシ血清アルブミン(BSA)での前処理によって達成し、非特異的結合を防止した。侵入する免疫細胞の染色(Austinat et al., 2009)のために、1%BSAを含有するPBS中において、1:1000の希釈でラット抗マウスLy-6B.2同種異系抗原(好中性顆粒球; MCA771GA, AbD Serotec, Germany)及び1:100の希釈でラット抗マウスCD11b(ミクログリア/マクロファージ; MCA711, AbD Serotec, Germany)を4で一晩添加した。その後、スライドを、1%BSAを含有するPBS中に1:100希釈されたビオチン化抗ラットIgG(BA-4001, Vector Laboratories, USA)と共に室温で45分間インキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するためのアビジン/ビオチンプロッキング溶液(Avidin/Biotin Blocking Kit, Sp-2001, Vector Laboratories, Inc., California, USA)での処理に続いて、製造業者の説明書に従って、二次抗体をビオチン化ペルオキシダーゼ(POD)ヘストレプロトアビジンを介して連結させた(Vectorstain ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Vector Laboratories, Inc., California, USA)。色原体3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)(Kem-En-Tec Diagnostics, Denmark)を使用してPODによって、抗原を視覚化した。免疫細胞の定量化のために、C1-INH処置マウス及び対照由来の基底核(プレグマから0.5mm前方)のレベルでの同一の脳切片(厚み10 μ m)を選択し、Nikon顕微鏡Eclipse 50i(Nikon, Germany)下で4つの異なる動物由来の5つの連続する切片(距離10 μ m)から、細胞カウントを行った(Austinat et al., 2009)。

【0089】

オクルディンに対する免疫蛍光染色について、ウサギ抗マウスオクルディン抗体(ab31721, Abcam, UK)を、1%BSAを含有するPBS中において1:100の希釈で一晩(4)適用した。PBS中の1%BSA中において1:300の希釈で、Cy3標識ヤギ抗ウサギ二次抗体を用いて、タンパク質を検出した。DNAの染色について、蛍光性Hoechst色素(Hoechst 33342, Sigma-Aldrich, Germany)を0.4mg/mlの濃度で30分間添加し、切片をAxiophot 2(Carl Zeiss, Germany)下で分析した。

【0090】

血栓症インデックスの計算について、全脳をtMCAOの24時間後にスライスした。H&E染色を標準手順に従って行った。定量化について、CCDカメラ(Visitron Systems)を備えた顕微鏡(Axiophot2, Carl Zeiss AG)下にて盲検様式で染色を調べた。虚血基底核内の閉塞した血管の数を、40倍の倍率を使用して、対照マウス、又はそれぞれ7.5U C1-INH若しくは15.0U C1-INHで処置したマウスについて、10切片ごとにカウントした。

【0091】

全ての組織学実験についての陰性対照は、一次又は二次抗体の省略を含み、検出可能なシグナルを生じさせなかった(示さず)。

【0092】

PCR研究。組織均質化、RNA単離及びリアルタイムRT-PCRを記載されるように行った(Austinat et al., Stroke 2009)。TRIzol試薬(登録商標)(Invitrogen, Germany)を使用してMicra D-8パワー ホモジナイザー(ART, Germany)で全RNAを調製し、分光測光法によって定量化した。次いで、ランダムヘキサマーを使用して製造業者のプロトコルに従って、全RNA 1 μ gをTaqMan(登録商標)逆転写試薬(Applied Biosystems, Germany)で逆転写した。エンドセリン-1(アッセイID: Mm 00438656_m1, Applied Biosystems, Ger

10

20

30

40

50

many) の相対的遺伝子発現レベルを蛍光TaqMan(登録商標)技術で定量化した。GAPDH(遺伝子発現についてのTaqMan(登録商標)Predeveloped Assay Reagent, 部品番号: 4352 339E, Applied Biosystems, Germany)を内在性コントロールとして使用し、サンプルRNAの量を標準化した。TaqMan(登録商標)Universal 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems, Germany)を使用して、StepOnePlus(商標)Real - Time PCR System (Applied Biosystems, Germany)において、等しい量のcDNAを用いて、PCRを行った。反応物(総体積12.5 μ l)を50℃で2分間、95℃で10分間、続いて95℃で15秒間及び60℃で1分間の40サイクル、インキュベートした。水コントロールを含め、特異性を保証した。各サンプルをトリプリケートで測定し、増幅プロットの分析によって完全性についてデータポイントを調べた。比較Ct法を記載されるように遺伝子発現の相対的定量化のために使用した (Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25:402 - 408)。 10

【0093】

ウェスタンプロット。大脳皮質又は基底核をネイティブな脳から切開し、0.1% SDS及び4%プロテイナーゼ阻害剤(コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル, Roche)を含有するRIPAバッファー(25mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP - 40)中においてホモジナイズした。サンプルを10秒間超音波処理した(sonified)。その後、組織溶解物を4℃にて30分間15.000 × gで遠心分離し、上澄みをBCAタンパク質アッセイ及びその後のウェスタンプロット分析のために使用した。全溶解物を、95℃にて5分間、4 × SDS - PAGEローディングバッファー(最終濃度62.5mM Tris pH 6.8, 3% - メルカプトエタノール, 8% SDS, 15%グリセロール)で処理した。全タンパク質20 μ gを電気泳動させ、PVDF膜へ転写した。プロッキングバッファー(5%脱脂粉乳, 50mM Tris - HCl pH 7.5, 0.05% Tween - 20)で30分間プロッキングした後、膜を以下の希釈で、4℃にて一晩、一次抗体と共にインキュベートした: 抗フィブリノーゲンpAb 1:500 (Acris Antibodies)、抗オクルデインpAb 1:1000 (Abcam, UK)、及び抗アクチンmAb 1:75.000 (Dianova)。TBS - T(50mM Tris - HCl pH 7.5, 0.05% Tween - 20)での洗浄工程後、膜を1:5000の希釈でHRP結合ロバ抗ウサギIgG(フィブリノーゲン及びオクルデインについて) (Dianova, Germany)又はロバ抗マウスIgG(アクチンについて) (Dianova, Germany)と共に1時間インキュベートし、ECLplus(GE Healthcare)を使用して最終的に現像した (Kraft et al., Thrombin - activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) deficient mice are susceptible to intracerebral thrombosis and ischemic stroke. PLoS One 2010)。 20 30

【0094】

統計

25%百分位数及び75%百分位数を本文中の括弧内に提供して、中央値を含む散布図として表した機能転帰順序尺度を除いて、全ての結果を平均値 \pm 標準偏差(s.d.)として表した。梗塞体積に対する標準化効果サイズ0.15を検出するための実験数を、以下の仮定で事前の検定力分析によって計算した: $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.2$, 平均値, 標準偏差 平均値の10%。統計分析のために、GraphPad Prism 5.0ソフトウェアパッケージ(La Jolla, CA, USA)を使用した。データをD'Agostino及びPearsonのオムニバス正規性検定でガウス分布について試験し、次いで、1-way ANOVA又は同時に2つの因子の効果を測定する場合は2-way ANOVAによって分析し、p値については事後(post hoc) Bonferroni調整した。ノンパラメトリック機能転帰スコアを、Kruskal - Wallis検定及び事後Dunn多重比較検定によって比較した。生存曲線の比較のために、ログランク検定を使用した。ラットデータを独立両側Studentのt検定(脳卒中サイズ、脳浮腫)又はノンパラメトリックMann Whitney検定(機能スコア)によって比較した。p値 < 0.05 を統計的に有意と見なした。 40

【0095】

結果

虚血性脳卒中後の長期間にわたるC1 - INH処置マウス及び対照の機能転帰及び死亡率を測定した(図1a、b)。60分間のtMCAO後の7日間で、対照マウス10匹のうちの9匹(90%)が死に、これは以前の報告と一致している (Kleinschmitz et al., PLoS Biol 2010 50

）。対照的に、7.5 U C1 - INHで処置されたマウス10匹のうちの7匹（70%）及びより高い用量の15.0 U C1 - INHで処置されたマウス10匹のうちの9匹（90%）が第7日まで生存した（それぞれ、 $p < 0.05$ 又は $p < 0.01$ ）（図1a）。これらの知見と一致して、15.0 U C1 - INH受容マウスは、梗塞発症のより進行した段階でも、即ち、tMCAO後の第5日においても、対照よりも有意によりよいBedersonスコアを示した（Bedersonスコア：それぞれ、中央値 2.0 [2.0, 3.0] [対照] vs. 0.0 [0.0, 1.0] [15.0 U]； $p < 0.01$ ）（図1b）。

【0096】

C1 - INHは、第XIIa因子又は血漿カリクレインなどの接触 - キニン系（contact - kinin system）の重要なプロテアーゼを不活性化することによって、血管透過性の調節及び炎症の抑制において重要な役割を果たす（Alvin E. Davis III, Pedro Mejia, Fengxin Lu, Molecular Immunology 2008）。従って、虚血半球中の血液脳関門損傷及び浮腫形成の程度に取り組んだ。tMCAO後の第1日に、脳実質中へ漏出する血管トレーサー、エバンスブルーの体積によって決定した血液脳関門の完全性は、脳卒中の1時間後に15.0 U C1 - INHで処置したマウスにおいて保存され、7.5 U C1 - INHの注射後にも未処置対照と比較してあまり顕著ではなかった（それぞれ、平均値 $51.6 \pm 30.6 \text{mm}^3$ [対照] vs. $33.1 \pm 25.0 \text{mm}^3$ [7.5 U]又は $13.9 \pm 11.4 \text{mm}^3$ [15.0 U]； $p < 0.05$ [対照 vs. 15.0 U]）（図2a）。この知見は、治療用C1 - INH適用後の劇的により少ない続発性脳浮腫形成（湿潤 / 乾燥重量法）と相関し（それぞれ、平均値 $4.3 \pm 1.1\%$ [対照] vs. $2.9 \pm 1.0\%$ [7.5 U]又は $0.2 \pm 0.9\%$ [15.0 U]； $p < 0.0001$ [対照 vs. 15.0 U]）（図2b）、結果はラットにおいても確認することができた（図3）。重要なことには、C1 - INH処置マウスにおいても梗塞が規則に存在した脳領域（基底核）において、血液脳関門崩壊はほぼ見られなかった（図2a、矢印）。これは、C1 - INH群において見られたより少ない浮腫は、特殊な現象であり、機構的に関連しており、しかし、これらの動物におけるより小さな梗塞体積に単に起因するものではないことを示している。

【0097】

C1 - INH処置マウス及び対照の虚血脳におけるエンドセリン - 1の発現も分析した。エンドセリン - 1は、虚血性脳卒中を含む様々な病態生理学的状態で血管完全性及び浮腫形成の調節に決定的に関与することが示された（Matsuo Y, Mihara Si, Ninomiya M, Fujimoto M. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke. 2001;32:2143 - 2148; Barone FC, Globus MY, Price WJ, White RF, Storer BL, Feuerstein GZ, Busto R, Ohlstein EH. Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1994;14:337 - 342）。tMCAOの24時間後に、エンドセリン - 1 mRNAレベルが、擬似手術したマウスと比較して、ビヒクル処置マウス及び7.5 U C1 - INH受容マウスの皮質及び基底核において有意に上昇した（相対的遺伝子発現皮質：それぞれ、 1.0 ± 0.2 [擬似] vs. 16.0 ± 6.3 [対照]又は 15.6 ± 6.8 [7.5 U]、 $p < 0.0001$ ；相対的遺伝子発現 基底核：それぞれ、 1.0 ± 0.2 [擬似] vs. 4.3 ± 1.2 [対照]又は 4.2 ± 1.5 [7.5 U]、 $p < 0.0001$ ）（図2c）。対照的に、15.0 U C1 - INHでの処置後にはいずれの脳領域においてもエンドセリン - 1転写物の有意な誘導は観察されなかった（ $p > 0.05$ ）。再び記載するが、エンドセリン - 1発現は高用量（15.0 U）C1 - INH処置後の基底核においても低いままであったが（図2c）、基底核は全ての動物において梗塞領域中に一様に含まれた。

【0098】

脳卒中におけるC1 - INHの血液脳関門安定化効果と一致して、タイトジャンクションタンパク質オクルディンに対する免疫反応性は、免疫組織化学で実証されたように、15.0 U C1 - INHで処置されたマウス由来の虚血基底核の血管において保存されたが、対照マウス又は7.5 U C1 - INH受容マウスにおいては下方制御された。より詳細にオクルディンタンパク質発現を定量化するために、ウェスタンプロット分析も行った（図2d）。再び記載するが、未処置マウス由来の虚血基底核におけるtMCAO後の第1日における後のオクルディ

10

20

30

40

50

ンの量は、低かった（光学密度： 0.08 ± 0.10 ）。対照的に、有意により多いオクルディンタンパク質が、それぞれ、7.5 U（光学密度： 0.6 ± 0.3 ， $p < 0.05$ ）又は15.0U（光学密度： 0.5 ± 0.2 ， $p < 0.05$ ）C1 - INHでの処置後に検出可能であった。

【 0 0 9 9 】

C1 - INHは、細胞接着分子の結合によって血管から炎症部位への細胞移動を阻害することが示された（Cai S, Davis III, AE, 2004, J Immunol）。従って、免疫細胞化学によって虚血脳に侵入する免疫細胞の数を定量化した。tMCAOの誘発の24時間後、有意により多くの好中性顆粒球（平均値 299.1 ± 138.1 [対照] vs. 107.2 ± 109.5 [15.0 U]， $p < 0.05$ ）並びにマクロファージ / 小グリア細胞（平均値 676.3 ± 150.4 [対照] vs. 117.1 ± 64.9 [15.0 U]， $p < 0.0001$ ）が、脳卒中の1時間後に15.0 U C1 - INHで処置されたマウスに比べて未処置対照マウスの虚血基底核に入った。対照的に、より低い用量の7.5 U C1 - INHは、局所脳虚血後の細胞輸送を減少させることができなかった（ $p > 0.05$ ）。

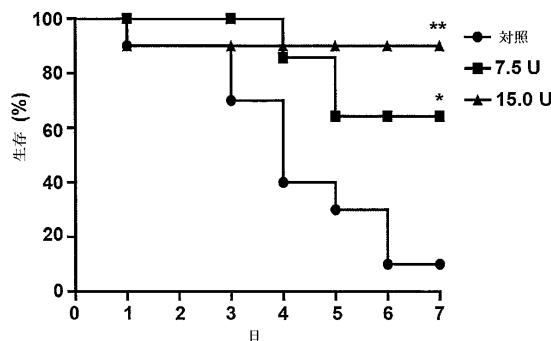
【 0 1 0 0 】

C1 - INHはまた、血液凝固の内因性経路の主要な活性化因子であるFXIIaに作用する（Alvin E. Davis III, Pedro Mejia, Fengxin Lu, Molecular Immunology 2008）。従って、本発明者らは、脳虚血 / 再灌流障害後の血栓活性に対するC1 - INHの効果を分析した。実際に、虚血皮質（それぞれ、平均光学密度 2.8 ± 1.1 [対照] vs. 1.7 ± 0.8 [7.5 U] 又は 0.03 ± 0.02 [15.0 U]； $p < 0.0001$ [対照 vs. 15.0 U]）及び基底核（それぞれ、平均光学密度 2.8 ± 1.0 [対照] vs. 1.2 ± 0.7 [7.5 U] 又は 0.3 ± 0.2 [15.0 U]； $p < 0.001$ [対照 vs. 15.0 U]）においてウェスタンプロットによって検出されたフィブリノゲン（フィブリノゲン）の量は、tMCAOの誘発の1時間後の高用量（15.0 U）C1 - INH適用に続く脳卒中後第1日に有意に減少した（図4 a）。従って、微小血管開通性が、未処置対照と比較してC1 - INH処置マウスにおいて増加した（血栓症インデックス：それぞれ、 15.8 ± 3.0 [対照] vs. 12.2 ± 2.8 [7.5 U] 又は 9.8 ± 2.4 [15.0 U]； $p < 0.05$ [対照 vs. 15.0 U]）（図4 b）。重要なことには、C1 - INHを遅延設定で、即ちtMCAOの6時間後に適用した場合、血栓活性は皮質及び基底核において依然として有意に減少した（図5）。

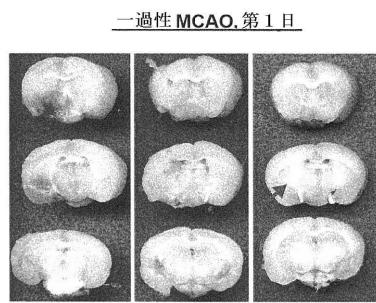
【 0 1 0 1 】

外因的に適用されるC1 - INHの治療時間ウィンドウを広げる目的で、C57BL / 6マウスにまた、遅延設定で、即ち、再灌流の開始の5時間後（即ち、tMCAOの誘発の6時間後）に、7.5 U又は15.0 U C1 - INHを受容させた。最も顕著なことには、神経機能障害は、第1日において7.5 U C1 - INH群又は対照動物と比較して15.0 U C1 - INH群において依然として有意に少なかった（Bedersonスコア：それぞれ、中央値 3.0 [$3.0, 4.0$] [対照] vs. 3.0 [$2.0, 3.0$] [7.5 U] 又は 3.0 [$1.0, 3.0$] [15.0 U]， $p < 0.05$ ；グリップ試験スコア：それぞれ、中央値 3.0 [$1.0, 4.0$] [対照] vs. 4.0 [$3.0, 4.0$] [7.5 U] 又は 4.0 [$3.0, 5.0$] [15.0 U]， $p < 0.05$ ）（図6）。

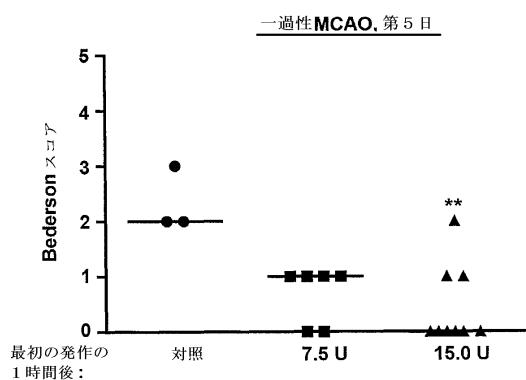
【図 1 a】



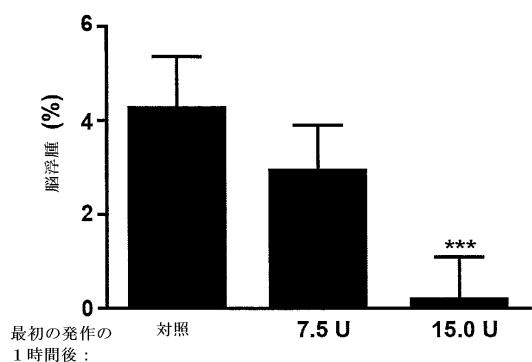
【図 2 a】



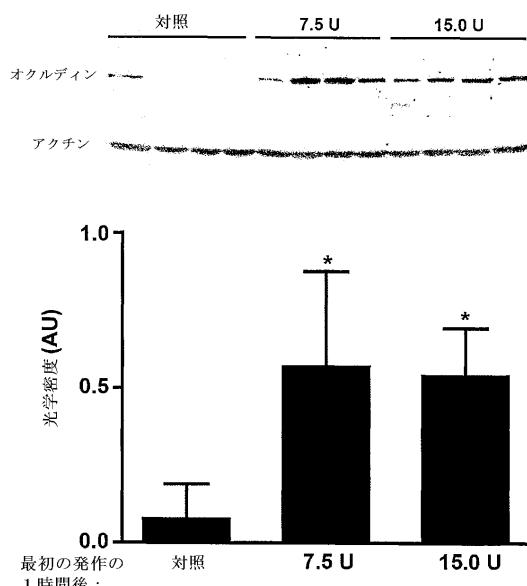
【図 1 b】



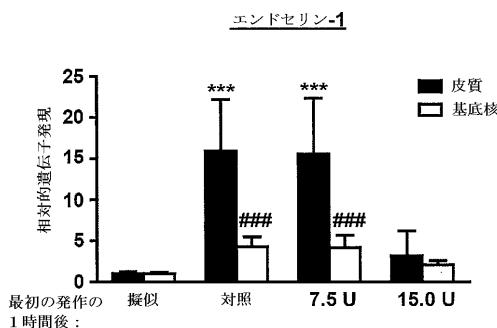
【図 2 b】



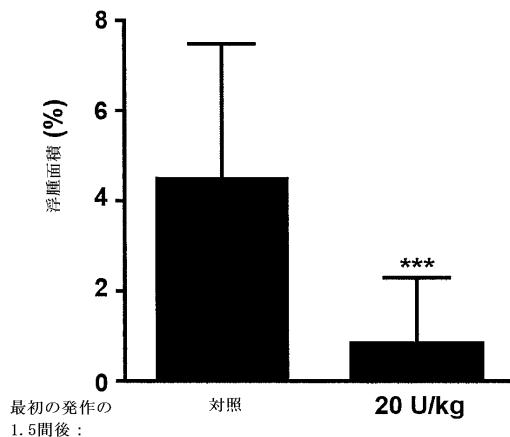
【図 2 d】



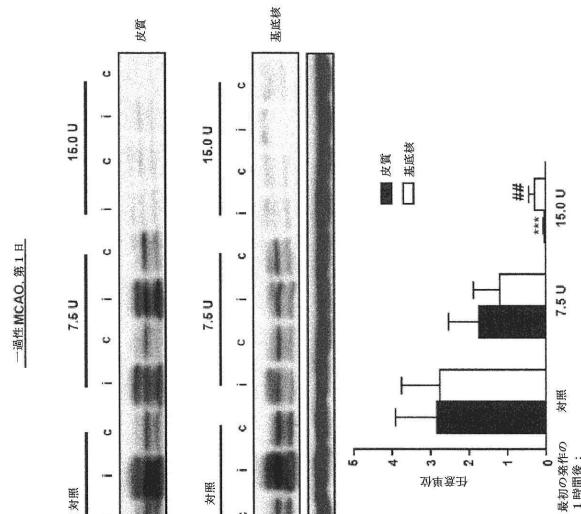
【図 2 c】



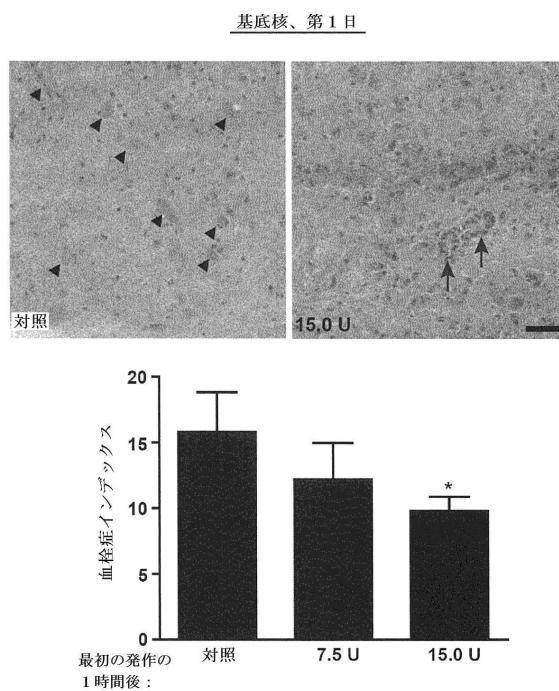
【図3】



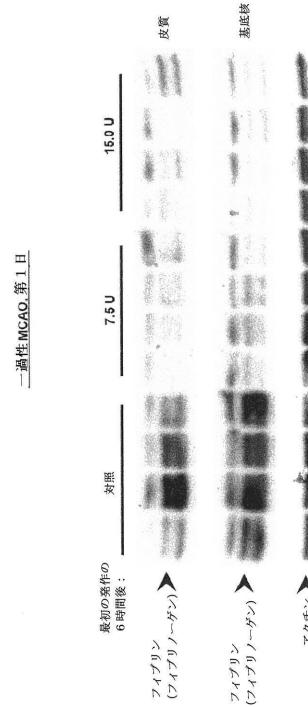
【図4 a】



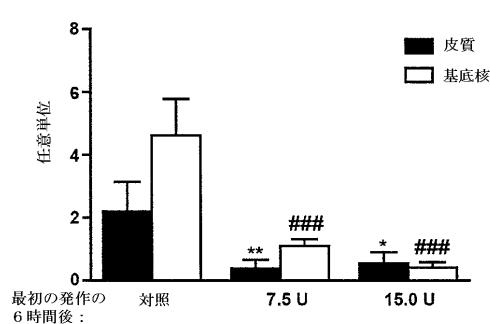
【図4 b】



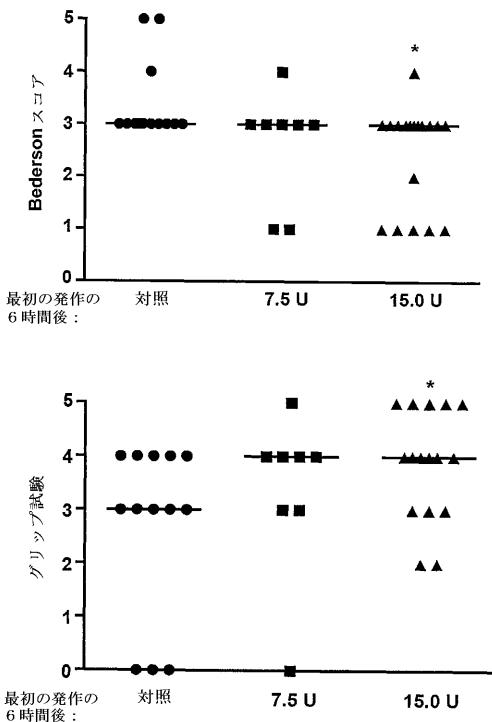
【図5-1】



【図5-2】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1

(72)発明者 マルク・ノルテ
ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 ミヒエルバッハ・アムクネヒタッカー 1 0

(72)発明者 グイド・シュトール
ドイツ連邦共和国 9 7 2 2 2 リムパー・フランケンシュトラーセ 2 0

(72)発明者 ゲルハルト・ディックナイト
ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 3 マルブルク・ツムノイエンヒーブ 3 1

(72)発明者 シュテファン・シュルテ
ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 3 マルブルク・バウエルバッハーシュトラーセ 4 6

(72)発明者 ベルンハルト・ニーズヴァント
ドイツ連邦共和国 9 7 2 4 6 アイベルシュタット・アムモルゲンロート 6

(72)発明者 インゴ・プラーカスト
ドイツ連邦共和国 3 5 5 4 9 エーダータール・ツムハンマー 1

審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献 Ann Neurol, 2 0 0 9 年, Vol.66, p.332-342
NEUROLOGICAL RESEARCH, 2 0 0 8 年, Vol.30, No.7, p.761-767
CRITICAL CARE MEDICINE, 2 0 0 9 年, Vol.37, No.2, p.659-665

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K	3 8 / 4 8
A 6 1 P	3 / 1 0
A 6 1 P	9 / 1 0
A 6 1 P	2 5 / 0 0
A 6 1 P	3 1 / 0 4
A 6 1 P	3 1 / 1 2
A 6 1 P	3 5 / 0 0
A 6 1 P	4 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)	
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)	