

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7381469号
(P7381469)

(45)発行日 令和5年11月15日(2023.11.15)

(24)登録日 令和5年11月7日(2023.11.7)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 38/44 (2006.01)

A 6 1 K 47/26 (2006.01)

A 6 1 P 25/08 (2006.01)

A 6 1 K 38/44

A 6 1 K 47/26

A 6 1 P 25/08

請求項の数 17 (全64頁)

(21)出願番号	特願2020-537006(P2020-537006)	(73)特許権者	599034952
(86)(22)出願日	平成31年1月3日(2019.1.3)		ザ、ペン、ステート、リサーチ、ファウンデーション
(65)公表番号	特表2021-509671(P2021-509671 A)		THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
(43)公表日	令和3年4月1日(2021.4.1)		アメリカ合衆国、ペンシルベニア州、ユニバーシティ、パーク、オールド、メイン、304
(86)国際出願番号	PCT/US2019/012208	(74)代理人	100078282
(87)国際公開番号	WO2019/136168		弁理士 山本 秀策
(87)国際公開日	令和1年7月11日(2019.7.11)	(74)代理人	100113413
審査請求日	令和3年12月29日(2021.12.29)		弁理士 森下 夏樹
(31)優先権主張番号	15/860,966	(74)代理人	100181674
(32)優先日	平成30年1月3日(2018.1.3)		弁理士 飯田 貴敏
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新生児痙攣薬としてのグルコースオキシダーゼ組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

新生児痙攣の処置を必要とする対象における、新生児痙攣を処置するための医薬品の製造のための、グルコースオキシダーゼを含む組成物の使用。

【請求項2】

前記組成物が、新生児痙攣の処置を必要とする前記対象において、グルコースをグルコネートへと変換する、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

非新生児と比較して上方調節されたCLC-3 C1-チャンネルを有する新生児における痙攣活性の低減において、補足的グルコースと組み合わせて医薬として使用するための、グルコースオキシダーゼを含む経口医薬組成物。

【請求項4】

前記新生児が、循環グルコースを有する、請求項3に記載の経口医薬組成物。

【請求項5】

前記グルコースオキシダーゼが、前記循環グルコースをグルコネートへと変換する、請求項4に記載の経口医薬組成物。

【請求項6】

前記グルコネートが、前記CLC-3 C1-チャンネルを阻害する、請求項5に記載の経口医薬組成物。

【請求項7】

前記 C L C - 3 C l - チャンネルの阻害が、前記新生児における前記痙攣活性を低減させる、請求項 6 に記載の経口医薬組成物。

【請求項 8】

前記新生児が、新生仔てんかんと診断されている、請求項 3 に記載の経口医薬組成物。

【請求項 9】

前記新生児が、1 月齢未満である、請求項 3 に記載の経口医薬組成物。

【請求項 10】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 3 に記載の経口医薬組成物。

【請求項 11】

新生児における痙攣活性の処置における医薬品として使用するための医薬製剤であって、固定用量の グルコースオキシダーゼ および不活性担体を含む、医薬製剤。

10

【請求項 12】

前記不活性担体が、食塩水である、請求項 11 に記載の医薬製剤。

【請求項 13】

前記新生児が循環グルコースを有し、前記グルコースオキシダーゼが、前記循環グルコースをグルコネートへと変換する、請求項 11 に記載の医薬製剤。

【請求項 14】

前記グルコースオキシダーゼが、補足的グルコースと組み合わせて前記新生児に投与されるものであり、前記補足的グルコースが、 $7.3 \text{ mg} / \text{kg} / \text{分}$ のグルコース注入速度の固定用量で 静脈内注射 により投与されるものである、請求項 11 に記載の医薬製剤。

20

【請求項 15】

前記新生児が、新生仔てんかんと診断されている、または前記新生児が、非新生児と比較して上方調節された C L C - 3 C l - チャンネルを有する、請求項 11 に記載の医薬製剤。

【請求項 16】

経皮パッチ剤によって前記新生児に投与されるものである、請求項 11 に記載の医薬製剤。

【請求項 17】

新生児痙攣の処置を必要とする対象における、新生児痙攣の処置のための、グルコースオキシダーゼを含む組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の支持の陳述

本発明は、The National Institutes of Health によって授与された助成金番号 MH083911 および AG045656 の下で政府の支持により行われた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0002】

本発明は、神経学的障害の分野に関する。特に、筋強直間代性痙攣、てんかん、ジャクソン障害 (Jacksonian disorder) および／または不随意振戦が含まれるがこれらに限定されない痙攣性障害の予防および処置である。例えば、一部の実施形態は、新生児および／または乳児において痙攣性障害を処置および予防することに関する。グルコネートベースの組成物およびグルコースオキシダーゼ組成物は、新生児および／または乳児において痙攣性障害を処置および／または予防するのに選択的に有効であることが見出された。

40

【背景技術】

【0003】

てんかんの発生率は、生後 1 年目に最も高く、米国では報告された発生率は 1,000 件の生児出生当たりおよそ 1.8 ~ 3.5 件である。Silverstein et al., "Neonatal seizures" Annals Of Neurology 62:112-120 (2007); および Jensen F., "Ne

50

onatal seizures: An update on mechanisms and management” Clinics In Perinatology 36:881-900 (2009)。多くの抗てんかん薬 (AED) が過去数十年にわたって開発されてきたが、新生児発作は、年かさの小児または成体においてより有効な現在のAEDに対して難治性である場合が多い。Painter et al., “Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures” The New England Journal Of Medicine 341:485-489 (1999); van Rooij et al., “Treatment of neonatal seizures” Seminars In Fetal & Neonatal Medicine 18:209-215 (2013); およびDzhala et al., “NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain” Nature Medicine 11:1205-1213 (2005)。
【0004】

10

一部の場合には、AED適用の後であってさえ、脳波 (EEG) 記録は、新生児において進行中の皮質てんかん活動を示し、これは、認知発達を損ない得、後にてんかんを生じ得る。Connell et al., “Clinical and EEG response to anticonvulsants in neonatal seizures” Archives Of Disease In Childhood 64:459-464 (1989); Glykys et al., “Differences in cortical versus subcortical GABAergic signaling: a candidate mechanism of electroclinical uncoupling of neonatal seizures” Neuron 63:657-672 (2009); およびPuskarjov et al., “Pharmacotherapeutic targeting of cation-chloride cotransporters in neonatal seizures” Epilepsia 55:806-818 (2014)。

【0005】

20

てんかん性発作は、脳回路の過剰興奮によって引き起こされる場合が多く、これは、成体脳における主要な阻害性受容体であるGABA_A受容体 (GABA_A-R) をブーストさせることによって阻害され得る。従って、ベンゾジアゼピンおよびバルビツレート薬物などのAEDが、GABA_A-R機能を増加させるためにしばしば開発される。Bialer, M. & White, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Nature reviews. Drug discovery 9, 68-82 (2010)。しかし、GABA_A-Rは、成体脳にでは主に阻害性であるが、発生中の脳では興奮性である。Chen, G., Trombley, P.Q. & van den Pol, A.N. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. The Journal of physiology 494 (Pt 2), 451-464 (1996); およびBen-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nature reviews. Neuroscience 3, 728-739 (2002)。

30

【0006】

発生中の脳における興奮性GABA作動性伝達は、新生児発作を制御するのにGABAアゴニストがしばしば無効であり、ときおり新生児発作活動を悪化させることさえあり得る理由もまた説明する。Farwell, J.R., et al. Phenobarbital for febrile seizures--effects on intelligence and on seizure recurrence. The New England journal of medicine 322, 364-369 (1990)。

【0007】

古典的に、GABAの興奮性機能対阻害性機能は、CL⁻コトランスポーターNKCC1およびKCC2による調節に帰せられてきた。Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M. & Voipio, J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. Nature reviews. Neuroscience 15, 637-654 (2014)。Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C. & Kaila, K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. Neuron 61, 820-838 (2009)。以前の研究は、NKCC1が、げっ歯類動物において新生児発作を促進し得ることを見出した¹²が、乳児における最近の臨床試験は、NKCC1遮断剤ブメタニドの重症な副作用、および新生児発作を処置するのに非常に限定的な有効性を見出した¹³。Dzhala, V.I., et al. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. Nature medicine 11, 1205-1213 (2005); およびPressler,

40

50

R.M., et al. Bumetanide for the treatment of seizures in newborn babies with hypoxic ischaemic encephalopathy (NEMO): an open-label, dose finding, and feasibility phase 1/2 trial. *Lancet Neurol* 14, 469-477 (2015).
【0008】

残念ながら、今日まで、新生児発作を首尾よく処置することができる有効な薬物は存在しておらず、新生児てんかんのための新たな薬物の緊急の研究を促進している。新生児発作の独自の特徴を処置するための単純で有効かつ安全な抗てんかん薬が、当技術分野で必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【文献】Silverstein et al., "Neonatal seizures" *Annals Of Neurology* 62:112-120 (2007)

【文献】Jensen F., "Neonatal seizures: An update on mechanisms and management" *Clinics In Perinatology* 36:881-900 (2009)

【文献】Painter et al., "Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures" *The New England Journal Of Medicine* 341:485-489 (1999)

【文献】van Rooij et al., "Treatment of neonatal seizures" *Seminars In Fetal & Neonatal Medicine* 18:209-215 (2013)

【文献】Dzhala et al., "NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain" *Nature Medicine* 11:1205-1213 (2005)

【文献】Connell et al., "Clinical and EEG response to anticonvulsants in neonatal seizures" *Archives Of Disease In Childhood* 64:459-464 (1989)

【文献】Glykys et al., "Differences in cortical versus subcortical GABAergic signaling: a candidate mechanism of electroclinical uncoupling of neonatal seizures" *Neuron* 63:657-672 (2009)

【文献】Puskarjov et al., "Pharmacotherapeutic targeting of cation-chloride cotransporters in neonatal seizures" *Epilepsia* 55:806-818 (2014)

【文献】Bialer, M. & White, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature reviews. Drug discovery* 9, 68-82 (2010)

【文献】Chen, G., Trombley, P.Q. & van den Pol, A.N. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *The Journal of physiology* 494 (Pt 2), 451-464 (1996)

【文献】Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature reviews. Neuroscience* 3, 728-739 (2002)

【文献】Farwell, J.R., et al. Phenobarbital for febrile seizures--effects on intelligence and on seizure recurrence. *The New England journal of medicine* 322, 364-369 (1990)

【文献】Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M. & Voipio, J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience* 15, 637-654 (2014)

【文献】Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C. & Kaila, K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61, 820-838 (2009)

【文献】Pressler, R.M., et al. Bumetanide for the treatment of seizures in newborn babies with hypoxic ischaemic encephalopathy (NEMO): an open-label, dose finding, and feasibility phase 1/2 trial. *Lancet Neurol* 14, 469-477 (2015)

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、神経学的障害の分野に関する。特に、筋強直間代性痙攣、てんかん、ジャクソン障害および／または不随意振戦が含まれるがこれらに限定されない痙攣性障害の予防および処置である。例えば、一部の実施形態は、新生児および／または乳児において痙攣性障害を処置および予防することに関する。グルコネートベースの組成物およびグルコースオキシダーゼ組成物は、新生児および／または乳児において痙攣性障害を処置および／または予防するのに選択的に有効であることが見出されている。

【0011】

一実施形態では、本発明は、a) i) グルコースを含み痙攣を示す新生児患者；および i i) グルコースオキシダーゼを含む組成物を用意するステップ；ならびに b) 前記痙攣が低減されるような条件下で、前記組成物を前記患者に投与するステップを含む方法を企図する。一実施形態では、前記条件は、前記グルコースのグルコネートへの変換を含む。一実施形態では、投与するステップは、補足的グルコースをさらに含む。一実施形態では、組成物は、補足的グルコースをさらに含む。一実施形態では、前記組成物および前記補足的グルコースは、順次投与される。一実施形態では、前記組成物および前記補足的グルコースは、同時に投与される。一実施形態では、前記条件は、前記補足的グルコースのグルコネートへの変換を含む。一実施形態では、前記組成物は、薬学的に許容される組成物である。一実施形態では、前記投与するステップは、有効量の前記組成物をさらに含む。

【0012】

一実施形態では、本発明は、a) i) 痙攣を示す新生児患者であって、二価カチオンベースの治療を必要としない、患者；および i i) グルコネート錯体を含む組成物を用意するステップ；ならびに b) 前記痙攣が低減されるような条件下で、前記組成物を前記患者に投与するステップを含む方法を企図する。一実施形態では、グルコネート錯体は、二価カチオンを欠く。一実施形態では、グルコネート錯体は、グルコン酸ナトリウムである。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、カルシウムベースの治療である。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、マグネシウムベースの治療である。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、亜鉛ベースの治療である。一実施形態では、グルコネート錯体は、グルコン酸誘導体を含む。

【0013】

一実施形態では、本発明は、a) i) 痙攣を示す新生児患者であって、二価カチオンベースの治療を必要としない、患者；i i) グルコネート錯体からなる組成物であって、前記錯体が二価カチオンを欠く、組成物を用意するステップ；ならびに b) 前記痙攣が低減されるような条件下で、前記組成物を前記患者に投与するステップを含む方法を企図する。一実施形態では、グルコネート錯体は、グルコン酸ナトリウムである。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、カルシウムベースの治療である。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、マグネシウムベースの治療である。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、亜鉛ベースの治療である。一実施形態では、グルコネート錯体は、グルコン酸誘導体を含む。

【0014】

一実施形態では、本発明は、グルコネート誘導体を含む組成物を企図し、ここで、少なくとも1つのヒドロキシル部分またはカルボン酸部分は、置換または非置換のアリールまたはヘテロアリール、非置換または置換のC1～C6-アルキル基、置換または非置換の5～6員の飽和または不飽和の縮合環、置換または非置換の5～6員の飽和または不飽和の環、天然アミノ酸残基または合成アミノ酸残基、トリハロメチル、置換または非置換のC1～C6-アルコキシ、NH₂、SH、チオアルキル、アミノアシル、アミノカルボニル、置換または非置換のC1～C6-アルコキシカルボニル、アリール、ヘテロアリール、1～3個のヘテロ原子を必要に応じて含む置換または非置換の4～8員の環式アルキル、カルボキシル、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、ニトロ、アセトキシ、アミノアシル、スルホキシ、スルホニル、C1～C6-チオアルコキシ、C1～C6-脂肪族アルキル、

1～3個のヘテロ原子を必要に応じて含み、アリールまたはヘテロアリールと必要に応じて縮合される置換または非置換の飽和環式C4～C8-アルキル；置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール（ここで、前記アリールまたはヘテロアリール基は、置換または非置換のC1～C6-アルキル、例えばトリハロメチル、置換または非置換のC1～C6-アルコキシ、置換または非置換のC2～C6-アルケニル、置換または非置換のC2～C6-アルキニル、アミノ、アミノアシル、アミノカルボニル、置換または非置換のC1～C6-アルコキシカルボニル、アリール、カルボキシル、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アセトキシ、アミノアシル、スルホキシ、スルホニル、C1～C6-チオアルコキシで必要に応じて置換されている）が含まれるがこれらに限定されない基で置換されている；あるいはR5およびR6は、一緒になって、置換または非置換の4～8員の飽和環式アルキルまたはヘテロアルキル基を形成していてもよい。

10

【0015】

一実施形態では、本発明は、a) i) 痙攣を示す新生仔患者であって、少なくとも1つのクロライドイオンチャネルを含む、患者；i i) クロライドイオンチャネル遮断剤を含む組成物を用意するステップ；ならびにb) 前記痙攣が低減されるような条件下で、前記組成物を前記患者に投与するステップを含む方法を企図する。一実施形態では、クロライドイオンチャネル遮断剤は、二価カチオンを欠くグルコネート錯体である。一実施形態では、クロライドイオンチャネル遮断剤には、ニフルミン酸（NFA）、フルフェナム酸、4, 4'-ジイソチオシアナト-2, 2'-スチルベンジスルホン酸二ナトリウム塩（DIDS）および5-ニトロ-2-（3-フェニルプロピルアミノ）安息香酸（NPPB）が含まれるがこれらに限定されない。一実施形態では、グルコネート錯体は、グルコン酸ナトリウムである。一実施形態では、患者は、二価カチオンベースの治療を必要としない。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、カルシウムベースの治療である。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、マグネシウムベースの治療である。一実施形態では、二価カチオンベースの治療は、亜鉛ベースの治療である。一実施形態では、グルコネート錯体は、グルコン酸誘導体を含む。

20

【0016】

定義

本発明の理解を促進するために、いくつかの用語を以下に定義する。本明細書で定義される用語は、本発明に関連する分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。「1つの（a）」、「1つの（an）」および「この（the）」などの用語は、単数形の实体だけでなく複数形の实体を指すことを意図し、そのうちの具体的な例が例示のために使用され得る、一般的なクラスもまた含む。本明細書の術語は、本発明の具体的な実施形態を記載するために使用されるが、それらの用法は、特許請求の範囲に概略されるものを除き、本発明の限界を定めるものではない。

30

【0017】

用語「グルコン酸」または「グルコネート」は、本明細書で使用される場合、5つのヒドロキシル部分および1つのカルボン酸部分を含む6- α -炭素鎖を指す。ヒドロキシル部分およびカルボン酸部分の各々は、伝統的な二価カチオン治療と比較して改善された臨床的有效性を有する抗痙攣薬グルコネート誘導体を提供するために、本明細書で開示されるように置換および／または誘導体化され得る。

40

【0018】

用語「痙攣」または「発作」は、本明細書で使用される場合、脳における異常な電氣的放電から生じる痙攣、感覚障害および／または意識消失が含まれるがこれらに限定されない、筋肉の任意の異常な激烈かつ不随意的収縮もしくは一連の収縮および／または肉体的所見を指す。

【0019】

用語「新生児」または「新生仔」は、本明細書で使用される場合、一般に1月齢未満の、任意の生まれたばかりの新生乳児を指す。一般に、新生児の齢に対する言及は、「P#」によって特徴付けられ、ここで、「P」は、出生後（postnatal）を指し、「

50

#」は、日齢を示し、P 0 は、出生日である。

【0020】

用語「二価カチオン」は、正の2の価数の電荷（例えば、 $2+$ ）を有する任意のイオンを指す。例えば、イオン Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および／または Zn^{2+} は、二価カチオンであるとみなされる。

【0021】

用語「約」は、任意のアッセイ測定値のいずれかとの関連で本明細書で使用される場合、所与の測定値の $+/-5\%$ を指す。

【0022】

用語「有効量」は、本明細書で使用される場合、臨床的に有益な結果（すなわち、例えば、症状の低減）を達成する治療剤を含む医薬組成物の特定の量を指す。かかる組成物の毒性および治療有効性は、例えば、 LD_{50} （集団の50%にとって致死的な用量）および ED_{50} （集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するために、細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順によって決定され得る。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、比 $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$ として表現され得る。大きい治療指数を示す化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイおよびさらなる動物研究から取得されたデータは、ヒト使用のための投薬量の範囲を製剤化する際に使用され得る。かかる化合物の投薬量は、好ましくは、毒性をほとんどまたは全く有さずに、 ED_{50} を含む循環濃度の範囲内に入る。投薬量は、使用される剤形、患者の感度および投与の経路に依存して、この範囲内で変動する。

【0023】

用語「症状」は、本明細書で使用される場合、患者によって観察される疾患または肉体的障害の任意の主観的または客観的証拠を指す。例えば、主観的証拠は通常、患者自身の報告に基づき、これには、疼痛、頭痛、視覚障害、悪心および／または嘔吐が含まれ得るがこれらに限定されない。あるいは、客観的証拠は通常、体温、全血球数、脂質パネル、甲状腺パネル、血圧、心拍数、心電図、組織および／または身体イメージングスキャンが含まれるがこれらに限定されない、医学的試験の結果である。

【0024】

用語「疾患」または「医学的状態」は、本明細書で使用される場合、生体機能の性能を妨害または改変する、生きた動物もしくは植物本体またはその部分のうち1つの、正常な状態の任意の障害を指す。典型的には、徴候および症状を識別することによって明らかにされるが、これは通常、以下に対する応答である：i) 環境因子（栄養不良、産業危険または気候など）；ii) 特定の感染性因子（虫、細菌またはウイルスなど）；iii) 生物の固有の欠損（遺伝子異常など）；および／またはiv) これらの因子の組合せ。

【0025】

用語「低減させる」、「阻害する」、「弱める」、「抑制する」、「減少させる」、「防止する／予防する」および文法的等価物（「より低い」、「より小さい」などを含む）は、処置された対象と比較した未処置の対象における任意の症状の発現に関連する場合、処置された対象における症状の量および／または大きさが、任意の医学的に訓練された職員によって臨床的に関連すると認識される任意の量分、未処置の対象中よりも低いことを意味する。一実施形態では、処置された対象における症状の量および／または大きさは、未処置の対象における症状の量および／または大きさよりも、少なくとも10%低い、少なくとも25%低い、少なくとも50%低い、少なくとも75%低いおよび／または少なくとも90%低い。

【0026】

用語「結合された (attached)」は、本明細書で使用される場合、媒体（または担体）と薬物との間の任意の相互作用を指す。結合は、可逆的または不可逆的であり得る。かかる結合には、共有結合、イオン結合、ファンデルワールス力または摩擦などが含まれるがこれらに限定されない。薬物は、含浸される、組み込まれる、コーティングされる、それとの懸濁物中にある、それとの溶液中にある、それと混合されるなどの場合、媒

10

20

30

40

50

体（または担体）に結合されている。

【0027】

用語「媒体」は、本明細書で使用される場合、薬物を処置ポイント（例えば、創傷、手術部位など）に送達するための担体またはビヒクルとして機能する、任意の材料、または材料の組合せを指す。従って、全ての実務的な目的のために、用語「媒体」は、用語「担体」と同義とみなされる。媒体は担体を含み、前記担体が、薬物（単数または複数）に結合されること、前記媒体が、前記担体の処置ポイントへの送達を促進することが、当業者によって認識されるべきである。さらに、担体は、結合された薬物を含み得、前記担体は、前記薬物の処置ポイントへの送達を促進する。好ましくは、媒体は、発泡体、ゲル（ヒドロゲルが含まれるがこれに限定されない）、キセロゲル、ミクロ粒子（すなわち、ミクロスフェア、リポソーム、マイクロカプセル剤など）、生体接着剤または液体を含むがこれらに限定されない群から選択される。ミクロ粒子とヒドロゲル、生体接着剤、発泡体または液体との組合せを含む媒体が、本発明によって具体的に企図される。好ましくは、ヒドロゲル、生体接着剤および発泡体は、本明細書で企図されるポリマーのいずれか1つまたはそれらの組合せを含む。本発明によって企図される任意の媒体は、制御放出製剤を構成し得る。例えば、一部の場合には、媒体は、およそ1日から6カ月まで持続する期間にわたって薬物の制御放出および持続放出を提供する薬物送達系を構成する。

10

【0028】

用語「薬物」または「化合物」は、本明細書で使用される場合、所望の効果を達成する、投与されることが可能な任意の薬理学的に活性な物質を指す。薬物または化合物は、合成のまたは天然に存在する、非ペプチド、タンパク質またはペプチド、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオチド、多糖または糖であり得る。

20

【0029】

用語「投与された」または「投与する」は、本明細書で使用される場合、組成物が患者に対してその意図した効果を有するように、組成物を患者に提供する任意の方法を指す。投与する例示的な方法は、直接的機構、例えば、局所組織投与（すなわち、例えば、血管外配置）、経口摂取、静脈内注射、経皮パッチ、外用、吸入、坐剤などによるものである。

【0030】

用語「患者」または「対象」は、本明細書で使用される場合、ヒトまたは動物であり、入院している必要はない。例えば、外来患者、養護施設にいる人は、「患者」である。患者は、任意の齢のヒトまたは非ヒト動物を含み得、従って、これには、成体および若年（すなわち、新生児、乳児および／または小児）の両方が含まれる。用語「患者」は、医学的処置の必要を含意しないことが意図され、従って、患者は、臨床的であれ基礎科学研究の支持下であれ、自発的または不本意に、実験の一部であり得る。

30

【0031】

用語「有効量」は、本明細書で使用される場合、臨床的に有益な結果（すなわち、例えば、症状の低減）を達成する治療剤を含む医薬組成物の特定の量を指す。かかる組成物の毒性および治療有効性は、例えば、LD50（集団の50％にとって致死的な用量）およびED50（集団の50％において治療的に有効な用量）を決定するために、細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順によって決定され得る。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、比LD50／ED50として表現され得る。大きい治療指数を示す化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイおよびさらなる動物研究から取得されたデータは、ヒト使用のための投薬量の範囲を製剤化する際に使用され得る。かかる化合物の投薬量は、好ましくは、毒性をほとんどまたは全く有さずに、ED50を含む循環濃度の範囲内に入る。投薬量は、使用される剤形、患者の感度および投与の経路に依存して、この範囲内で変動する。

40

【0032】

用語「薬学的に」または「薬理学的に許容される」は、本明細書で使用される場合、動物またはヒトに投与された場合に、有害な反応もアレルギー反応も他の厄介な反応も生じない、分子実体および組成物を指す。

50

【0033】

用語「薬学的に許容される担体」は、本明細書で使用される場合、任意のおよび全ての溶媒、または水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物が含まれるがこれらに限定されない分散媒、ならびに植物油、コーティング、等張剤および吸収遅延剤、リポソーム、市販の洗浄剤などを含む。補足的生理活性成分もまた、かかる担体中に組み込まれ得る。

【0034】

用語「小さい有機分子」は、本明細書で使用される場合、医薬品において一般に使用される有機分子に匹敵するサイズの任意の分子を指す。この用語は、生物学的高分子（例えば、タンパク質、核酸など）を排除する。好ましい小さい有機分子は、およそ100 Daから約5000 Daまで、より好ましくは2000 Daまで、最も好ましくは約1000 Daまでのサイズ範囲である。

【0035】

用語「生物学的に活性な」は、構造的、調節的または生化学的機能を有する任意の分子を指す。例えば、生物活性は、例えば、タンパク質活性を欠く細胞における野生型成長の回復によって決定され得る。タンパク質活性を欠く細胞は、多くの方法（すなわち、例えば、点突然変異およびフレームシフト突然変異）によって産生され得る。補完は、タンパク質活性を欠く細胞に、タンパク質、その誘導体またはその一部分を発現する発現ベクターをトランスフェクトすることによって達成される。

【0036】

用語「トランスフェクション」または「トランスフェクトされた」は、細胞中への外来DNAの導入を指す。

【0037】

用語「結合する (bind)」は、本明細書で使用される場合、永続的または一時的であり得る、任意の物理的結合 (attachment) または密接な会合を含む。一般に、水素結合、疎水性力、ファンデルワールス力、共有結合およびイオン結合などの相互作用は、目的の分子と測定されている分析物との間の物理的結合を促進する。「結合 (binding)」相互作用は、結合が化学反応を生じさせる状況などの場合、短時間であり得る。それは、結合構成要素が酵素であり、分析物が酵素の基質である場合に、典型的である。結合剤と分析物の間の接触から生じる反応もまた、本発明の目的のために、結合の定義の範囲内である。

【0038】

用語「補足的グルコース」は、本明細書で使用される場合、グルコースオキシダーゼと組み合わせた、静脈内グルコースの小児科患者への投与を指す。例えば、7.3 mg/kg/分のグルコース注入速度 (GIR) が好ましい。

【0039】

本特許のファイルは、カラーで実行される少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を有する本特許のコピーは、要求および必要な手数料の納付により、特許商標庁によって提供される。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)a)

i) グルコースを含み痙攣を示す新生児患者；および

ii) グルコースオキシダーゼを含む組成物

を用意するステップ；ならびに

b) 前記痙攣が低減されるような条件下で、前記組成物を前記患者に投与するステップを含む、方法。

(項目2)

前記条件が、前記グルコースのグルコネートへの変換を含む、項目1に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 3)

前記組成物が、薬学的に許容される組成物である、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記投与するステップが、有効量の前記組成物をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】【0040】

【図 1-1】図 1 は、培養されたニューロンに対するグルコネートの抗バースト活性を示す例示的なデータを示す。データは、平均 $\pm$ s. e. m. として示される。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。図 1 A：培養されたニューロンにおける自発的バースト作用電位は、20 mM の NaGcA の適用によって即座に停止された ($n = 10$ 、3 バッチから)。NaGcA 適用の前、その間および後の拡大グラフが、下に示される。図 1 B：培養されたニューロンにおける CTZ 誘導性のロバストなバースト活動 (上)。これは、10 mM の NaGcA によって完全に遮断された (下)。図 1 C：CTZ 誘導性バースト活動に対する NaGcA の用量依存的阻害。黒色の棒は、バースト周波数を示し、灰色の棒は、バースト持続時間を示す ($n = 4$ バッチから 11、対応のあるスチューデント t 検定)。図 1 D：カイニン酸 (2 時間にわたって 1 μ M) 誘導性のロバストなバースト活動の代表的なトレース (上)。これもまた、10 mM の NaGcA によって劇的に抑制された (下)。図 1 E：NaGcA に対する KA 誘導性バースト活動の用量依存的応答 ($n = 3$ つのバスから 12、対応のあるスチューデント t 検定)。図 1 F：4-AP (2 時間にわたって 50 μ M) 誘導性のロバストな活動の典型的なトレース (上) もまた、10 mM の NaGcA によって明らかに抑制された (下)。図 1 G：NaGcA に対する 4-AP 誘導性バースト活動の用量依存的応答 ($n = 3$ つのバスから 9、対応のあるスチューデント t 検定)。図 1 H：10 μ M の CTZ によって誘導された典型的な再発性てんかん様バースト (上)、ならびに CTZ および NaGcA (10 mM) の共適用におけるバースト活動の欠如を示す、代表的なトレース。図 1 I (a~c)：パネル h の定量化されたデータは、5 mM および 10 mM の両方の NaGcA による慢性共処理を示しており、これは、バースト活動 (図 1 I (a)、 χ^2 検定)、バースト周波数 (図 1 I (b)、一元配置 ANOVA) およびバースト持続時間 (図 1 I (c) および図 1 I (b)、一元配置 ANOVA) を示すニューロンの比率を有意に低減させた。CTZ について $n = 22$ 、CTZ + 5 mM の NaGcA について $n = 16$ 、CTZ + 10 mM の NaGcA について $n = 17$ 。全てのデータは、5 バッチから得た。対応のあるスチューデント t 検定。図 1 J：生/死アッセイ画像は、異なる群におけるカルセイン-AM (生について緑色) およびエチジウムホモダイマー-1 (死について赤色) を示した。スケールバー、100 μ m。図 1 K：細胞生/死アッセイの定量化。結果は、NaGcA が、カイニン酸誘導性ニューロン興奮毒性に対するニューロン保護機能を有し、それ自体では、ニューロン生存に対するいずれの副作用も有さないことを明らかにした。

【図 1-2】同上。

【図 1-3】同上。

【図 1-4】同上。

【図 1-5】同上。

【図 2-1】図 2 は、グルコネートが培養された皮質ニューロンにおいてクロライド電流を阻害するという例示的なデータを示す。データは、平均 $\pm$ s. e. m. として示される。(a~f) NaGcA (10 mM) は、Na⁺ 電流 (a、b) に対しても K⁺ 電流 (c、d) に対しても Ca²⁺ 電流 (e、f) に対しても効果を有さなかった。(g) 10 mM の NaGcA 適用の前 (黒色) および後 (緑色) に記録された典型的な Cl⁻ 電流。(h) Cl⁻ 電流に対する有意な NaGcA 阻害を示す I-V 曲線 ($n = 3$ バッチの培養物からの 7、対応のあるスチューデント t 検定)。(i、j) 古典的 Cl⁻ チャネル遮断剤である NPPB (100 μ M) は、培養された皮質ニューロンにおいて Cl⁻ 電流を阻害した。(k、l) 培養された皮質ニューロンにおける Cl⁻ 電流に対する、別の一般的な Cl⁻ チャネル遮断剤 DIDS (100 μ M) の阻害効果。DIDS の洗い流

し後のC l-電流に対するD I D Sの持続性の阻害に留意されたい。(m、n) N P P B (m) およびD I D S (n) は共に、C T Zによって誘導されたてんかん様活動を強力に阻害し、これは、C l-チャネルがてんかん発生に関与することを支持している。

【図2-2】同上。

【図2-3】同上。

【図3】図3は、海馬スライスにおけるてんかん活動に対するグルコネートの年齢依存的効果を示す例示的なデータを示す。データは、平均±s.e.m.として示される。(a) 新生仔(P7)マウスの海馬スライス中のCA3錐体細胞層における細胞外フィールド電位記録。てんかん事象は、Mg²⁺なしのaCSFによって誘導され、Mg²⁺なしのaCSF中20mMのNaGcAの存在下で阻害された。NaGcAの適用の前、その間およびその後の拡大されたトレースが、下に示される。(b) NaGcA適用の前、その間およびその後の、5分間の時間ウィンドウにおけるてんかん活動のパワースペクトル。パワーの振幅(スペクトルトレースの下積面積)は、NaGcA適用後に劇的に抑制された。(c、d) NaGcAの抗てんかん様活性の匹敵する有効性を、P12海馬スライスにおいて試験した。(e) NaGcAは、新生仔スライスと比較して、P26海馬スライスにおいて中程度の抗てんかん放電効果を有する。下は、NaGcA灌流の前、その間およびその後の拡大トレースを示した。(f) パワー振幅は、NaGcA適用の間にわずかに減少し、NaGcAを洗い流した後にほとんど回復した。(g) てんかん活動の標準化されたパワーを、NaGcA適用の前、その間およびその後の、連続した5分間ウィンドウにおいて、0 Mg²⁺+aCSFによって誘導した。NaGcAは、P6~8およびP10~12群ではてんかん活動のパワーを劇的に低減させたが、P21~33群に対してはあまり効果がなく、対照群データは、追加の20mMのNaClを80分の細胞外フィールド電位記録の間に0 Mg²⁺+aCSF中に添加した後に、有意な変化が存在しなかったことを示した。

【図4】図4は、NaGcAの抗てんかん活性を異なる新生仔スライス発作モデルにおいて試験したことを示す例示的なデータを示す。データは、平均±s.e.m.として示される。(a) CA3錐体細胞層における細胞外フィールド電位記録。てんかん活動を、50μMの4-APによって誘導した。NaGcAは、50μMの4-APに応答した発作様放電を減弱させた。それぞれのトレースを、下で拡大した。(b) NaGcA適用の前、その間およびその後の、5分間ウィンドウにおけるてんかん活動のパワースペクトル。パワースペクトルの振幅は、NaGcA適用後に顕著に抑制された。(c) 4-APによって誘導されたてんかん活動の平均パワーは、NaGcAの灌流によって明らかに低減された。(d) NaGcAは、新生仔高K⁺モデルにおいてバースト活動を際立って抑制した。下は、NaGcA灌流の前、その間およびその後の拡大図を示した。(e) パワースペクトル振幅は、NaGcA適用の間に顕著に低減された。(f) てんかん活動の標準化されたパワーが、NaGcA適用の前、その間およびその後の、連続した5分間ウィンドウにおいて、高K⁺+aCSFによって誘導された。NaGcAは、高K⁺誘導性てんかん活動のパワーを劇的に減少させた。

【図5-1】図5は、CA3錐体ニューロンにおけるCLC-3チャネル媒介性C l-電流がグルコネートによって阻害されたことを示す例示的なデータを示す。値は、平均±s.e.m.である。(a) CA3錐体ニューロンにおける代表的なC l-電流。C l-電流は、20mMのNaGcAの適用によって、際立って阻害された(緑色)。(b) I-V曲線は、0mVに近い逆転電位で、有意な外向き整流をプロットした。C l-電流は、NaGcAの存在下で劇的に低減された(緑色)。(c) 正常CsClピペット溶液(左赤色)、抗CLC-3抗体(中央オレンジ色)または対照ウサギIgG(右黒色)による細胞内透析(10分間)を使用する、CA3錐体ニューロンから得たC l-電流トレースの例。(d) I-Vプロットは、抗CLC-3抗体透析後に際立つ低減を示したが(オレンジ色)、対照IgG透析後には有意な変化を示さなかった(黒色)。(e) eGFP(左の列)またはCLC-3-eGFP融合タンパク質プラスミド(右の列)のいずれかをトランスフェクトされたHEK293T細胞の免疫染色画像。CLC-3免疫

反応性（赤色）は、C l C-3-e G F Pトランスフェクトされた細胞では強く検出されたが（矢印）、非トランスフェクト細胞またはe G F Pトランスフェクトされた細胞では検出されなかった。スケールバー、40 μ m。 (f) e G F P（上）またはC l C-3-e G F Pプラスミド（下）のいずれかをトランスフェクトされたH E K細胞における典型的なC l-電流、および20 mMのN a G c Aに対する応答（中央緑色）。 (g) C l C-3-e G F P（右、n=2バッチからの7）感染細胞についての、N a G c Aの前、その間および洗い流しのI-V関係。C l C-3媒介性電流は、N a G c Aによって有意に阻害された。

【図5-2】同上。

【図5-3】同上。

【図5-4】同上。

【図6】図6は、C l C-3が新生仔てんかんスライスにおいて上方調節されたことを示す例示的なデータを示す。データは、平均 $\pm$ s. e. m.として示される。*** $P < 0.001$ 。(a) 海馬C A 3上のC l C-3の比較できる発現レベル。C l C-3免疫反応性は、0 M g 2+a C S F中で1時間のスライスインキュベーション後に増加した。アスタリスクは、C A 3領域における位相と重ねたC l C-3免疫シグナル（赤色）を有する拡大された典型的なニューロンを示した。スケールバー=20 μ m（拡大画像中では5 μ m）。(b) C l C-3免疫反応性強度の定量化されたデータは、0 M g 2+a C S F中で1時間のスライスインキュベーション後に、有意な増加を示した（n=対照について、4匹の仔からの10個のスライス、n=0 M g 2+について、4匹の仔からの11個のスライス、スチューデントt検定）。(c) 対照および0 M g 2+a C S F（1時間）処理したスライス由来の海馬C l C-3タンパク質のウェスタンブロット。(d) 定量化されたデータは、0 M g 2+a C S Fで海馬スライスを処理した後の、C l C-3タンパク質の有意な増加を示した（n=群の各々について6匹の仔、スチューデントt検定）。(e) 対照、1時間のM g 2+インキュベーション、および次いで20 mMのN a G c Aにおいて記録した1時間のM g 2+インキュベーションの代表的なC l-電流トレース。(f) C l-電流の平均I-Vプロットは、0 M g 2+群における有意な増加を示し、これはまた、N a G c Aによって際立って阻害された。

【図7-1】図7 A~Gは、グルコネートがK A誘導性新生仔発作のための有効な治療であることを示す例示的なデータを示す。図7 (a) K A注射（2 mg/kg、i. p.）の10分後に食塩水（0.1 ml/10 g、i. p.）を注射したP 12ラットからの代表的なE E Gトレースは、再発性てんかんバースト放電を示した。図7 (b) 典型的な発作間、発作-強直性および発作-間代性のトレースを示す、図7 a中の囲み枠bからの、単一のクラスター様てんかん放電の拡大図。図7 (c) スパイク活動における増加を示すが、ロバストなバースト放電は示さない、K A注射（2 mg/kg、i. p.）の10分後にN a G c A（2 g/kg、i. p.）を注射したP 12ラットの例E E Gが、N a G c A投与後に発生した。図7 aと同じスケールバー。図7 (d) 図7 c中の囲み枠dの拡大された領域。図7 bと同じスケールバー。単一のスパイク放電が、2つの隣接するベースライントレースと比較して、拡大されたトレースにおいて観察された。図7 cと同じスケールバー。図7 (e) パネルa（黒色）およびd（緑色）の1分間の時間ウィンドウにおける個々のE E Gパワー。図7 (f) 食塩水（黒色、P 10~12、n=11）およびN a G c A投与（緑色、P 10~12、n=11）の1分間の時間ウィンドウにおける群平均E E Gパワー。黒色の矢頭は、K A注射の時点を示し、赤色の矢頭は、食塩水またはN a G c Aのいずれかの注射の時点を示す。K A注射によって誘導されたてんかん活動の平均パワーは、N a G c Aの存在下で70%低かった。図7 (g) 本発明者らの研究の作業モデル。クロライドチャネルを介したC l-流入は、同期されたネットワーク活動を促進する（左）。しかし、このプロセスは、クロライドチャネルに対するその阻害に起因して、グルコン酸（G A）によって抑制される（右）。

【図7-2】同上。

【図7-3】同上。

【図 8】図 8 は、成体てんかんに対するグルコネートの効果を示す例示的なデータを示す。(a~c) 食塩水 (a)、1 g/kg の NaGcA (b)、または 2 g/kg の NaGcA (c) が後に続く、ペンチレンテトラゾール (PTZ) (50 mg/kg、i.p.) の注射によって誘導されたてんかん様活動を示す代表的な EEG 記録。白抜きの三角形は、最初のスパイクを示し、黒色の小さい矢印は、最初のバーストを示す。(d、e) PTZ (50 mg/kg、i.p.) によって誘導されたてんかん様スパイク (d) またはてんかん様バースト (e) の潜時を延長させることにおける、NaGcA の用量依存的効果を示す棒グラフ。(f) PTZ (50 mg/kg、i.p.) によって誘導された行動発作スコアに対する NaGcA の軽度の阻害効果を示す棒グラフ。(g) NaGcA が発作行動 (Racine スコア 3 およびそれよりも上) の潜時を用量依存的に延長させたことを示す棒グラフ。

10

【図 9】図 9 は、以下の種々のクロライドイオンチャネル阻害剤の効果を示す例示的なデータを示す：(a) ニフルミン酸 (NFA) (100 μ M) (b) フルフェナム酸 (100 μ M) (c) DIDS (100 μ M) (d) NPPB (100 μ M)。

【図 10】図 10 は、新生仔海馬スライスにおけるてんかん活動に対する、以下の種々のクロライドイオンチャネル阻害剤の効果を示す例示的なデータを示す：(a) グルコン酸ナトリウム (20 mM) (NaGcA) (b) NFA (100 μ M) (c) NPPB (100 μ M)

【図 11-1】図 11 は、CLC-3 チャネル媒介性 Cl⁻ 電流の発生的変化を示す例示的なデータを示す。図 11 A：異なる齢の動物において取得したマウス海馬スライス由来の CA3 錐体ニューロンにおいて記録された代表的な Cl⁻ 電流 (上の列、黒色トレース)。中央の列の緑色のトレースは、20 mM の NaGcA による阻害後の Cl⁻ 電流を示す。下の列は、異なる齢のマウスにおける、対照中および NaGcA 処理後の Cl⁻ 電流の I-V 曲線を示す。図 11 B：対照中 (黒色) または NaGcA 処理後 (緑色) の定量化された Cl⁻ 電流密度 (HP = +90 mV)。成体動物における Cl⁻ 電流密度の有意な減少に留意のこと。*** $P < 0.001$ 。図 11 C：Cl⁻ 電流に対する NaGcA 阻害の用量応答曲線。図 11 D：対照 (黒色)、抗 CLC-3 抗体 (オレンジ色) または事前吸収させた対照抗体 (灰色) 下で記録した典型的な Cl⁻ 電流トレース。抗 CLC-3 抗体透析後の Cl⁻ 電流の際立つ低減を示す I-V 曲線 (オレンジ色)。図 11 E：CLC-3 ノックアウトマウスにおける CLC-3 シグナルの欠如を確認する免疫染色。スケールバー、10 μ m。図 11 F：電位依存的外向き整流 Cl⁻ 電流は、CLC-3 KO マウスではほとんど存在せず、これは、CLC-3 チャネルが Cl⁻ 電流を媒介することを支持している。図 11 G：CLC-3 KO マウスにおける残存する小さい Cl⁻ 電流に対する NaGcA の阻害がほとんどないことを示す I-V 曲線。これは、NaGcA が CLC-3 チャネルの阻害剤であることを支持している。図 11 H：HEK293T 細胞における CLC-3 Cl⁻ チャネルの発現。スケールバー、40 μ m。図 11 I：CLC-3 チャネルを発現する HEK293T 細胞から記録された大きい Cl⁻ 電流 (下の列)。20 mM の NaGcA の適用は、CLC-3 チャネル媒介性 Cl⁻ 電流 (緑色トレース) を顕著に阻害した。図 11 J：CLC-3 チャネル媒介性 Cl⁻ 電流の NaGcA 阻害を示す I-V 曲線 (CLC-3、 925 ± 124 pA、 $n = 7$ ；CLC-3 + NaGcA、 544 ± 59 pA、 $n = 7$ ； $P < 0.004$ 、対応のある t 検定；HP = +90 mV)。値は、平均 $\pm$ s.e.m. である。

20

30

40

【図 11-2】同上。

【図 11-3】同上。

【図 11-4】同上。

【図 11-5】同上。

【図 11-6】同上。

【図 12-1】図 12 は、CLC-3 クロライドチャネルと新生仔てんかん発生との間の関連性を示す例示的なデータを示す。図 12 A：0 Mg^{2+} 人工脳脊髄液 (aCSF) 中でのてんかん様活動の誘導 (1 時間) 後の海馬 CA3 ニューロンにおける CLC-3 チ

50

ヤネル発現（赤色）の上方調節。スケールバー＝5 μm 。 図12B：対照および0 Mg^{2+} aCSFにおける定量化されたCLC-3免疫強度（対照、 $n=4$ 匹の仔からの10個のスライス；0 Mg^{2+} 、 $n=4$ 匹の仔からの11個のスライス； $p<0.05$ 、スチューデントt検定）。 図12Cおよび12D：ウエスタンブロット解析もまた、0 Mg^{2+} aCSFによる処理後の海馬におけるCLC-3タンパク質レベルの有意な増加を示した（ $n=$ 両方の群について6匹の仔、 $p<0.001$ 、スチューデントt検定）。 図12E：対照、0 Mg^{2+} （1時間）および0 $\text{Mg}^{2+}+20\text{mM}$ のNaGcA（1時間）条件における代表的な電位依存的Cl⁻電流トレース。 図12F：0 Mg^{2+} aCSF群における外向き整流Cl⁻電流の有意な増加（赤色）およびNaGcAによる際立つ阻害（緑色）を示すI-V曲線。 図12G：新生仔マウス（出生後7日、P7）の海馬スライス中のCA3錐体層における、0 Mg^{2+} aCSFによって誘導されたてんかん様活動、および20mMのNaGcAによるその強い阻害を示す細胞外フィールド電位記録。 図12H：NaGcA適用の前（赤色）、その間（緑色）およびその後（黒色）のてんかん様活動（5分間の時間ウインドウ）のパワースペクトル。パワーの振幅（パワースペクトルトレース下の積分面積）は、NaGcA適用後に顕著に低減された。 図12Iおよび12J：NaGcAは、P12海馬スライスにおいても、抗てんかん様活性の強い有効性を示した。 図12Kおよび12L：しかし、P26海馬スライスでは、NaGcAは、てんかん様活動に対する中程度の効果のみを示した。 図12M：0 Mg^{2+} aCSFによって誘導されたてんかん様活動に対するNaGcA阻害の時間経過を示す標準化されたパワー。NaGcAは、P6～8およびP10～12群においててんかん様活動のパワーを劇的に低減させたが、P21～33群ではかなり低い阻害を有した。対照として、灰色の線は、新生仔（P8～12）てんかん様活動に対する20mMのNaClの効果を示す。 図12Nおよび12O：WT、WT+20mMのNaGcA、およびCLC-3 KOマウス（全てP8～12で）由来の海馬スライスにおける、0 Mg^{2+} aCSFによって誘導されたてんかん様活動の代表的なトレース。てんかん様活動は、CLC-3 KOマウスでは長期にわたっては持続しなかったことに留意されたい。 図12P：WT、WT+20mMのNaGcA、およびCLC-3 KOマウス由来の海馬スライスにおける、0 Mg^{2+} aCSFによって誘導されたバースト潜時（左パネル）およびバースト周波数（右パネル）を示すまとめられたデータ。データは、平均±s.e.m.である。
* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。

【図12-2】同上。

【図12-3】同上。

【図12-4】同上。

【図12-5】同上。

【図12-6】同上。

【図12-7】同上。

【図12-8】同上。

【図13-1】図13は、新生仔海馬スライスにおける種々のてんかんモデルにおけるNaGcAの広い抗てんかん効果を示す例示的なデータを示す。 図13A：新生仔海馬スライスのCA3錐体細胞層における、50 μM の4-APによって誘導されたてんかん活動、およびNaGcA（20mM）によるその阻害を示す、細胞外フィールド電位記録。 図13B：NaGcA適用の前（赤色）、その間（緑色）およびその後（黒色）の、5分間の時間ウインドウにおけるてんかん活動のパワースペクトル。NaGcA（緑色）は、パワー振幅を顕著に低減させたことに留意されたい。 図13C：4-APによって誘導されたてんかん活動に対するNaGcAの阻害の時間経過を示す標準化されたパワー。 図13D：NaGcA（20mM）は、新生仔海馬スライスにおける高K⁺てんかんモデルにおいて、てんかん様活動を際立って抑制した。 図13E：NaGcA適用の間のてんかん活動の顕著な低減を示すパワースペクトル。 図13F：高K⁺ aCSFによって誘導されたてんかん活動に対するNaGcA阻害の時間経過を示す標準化されたパワー。 図13Cおよび13F中の灰色の線は、新生仔（P8～12）てんかん様活動に対する2

0 mMのNaCl対照の効果を示す。データは、平均±s.e.m.として示される。

【図13-2】同上。

【図13-3】同上。

【図14-1】図14は、CLC-3チャネル遮断剤グルコネートが新生仔発作活動を*in vivo*で強力に阻害することを示す例示的なデータを示す。図14A：10分間隔での食塩水注射（0.1 ml/10 g、i.p.）が後に続くKA注射（2 mg/kg、i.p.）後の、P12ラットからの再発性てんかんバースト放電を示す代表的なEEGトレース。図14B：図14A中の囲み枠からのてんかんバースト放電の拡大図。図14Cおよび14D：KA注射（2 mg/kg、i.p.）の10分後のNaGcA注射（2 g/kg、i.p.）が、てんかんバースト放電を顕著に阻害したことを示す代表的なEEGトレース（P12ラット）。図14Eおよび14F：新生仔ラット（P12）におけるてんかんバースト活動に対するフェノバルビタール（25 mg/kg、i.p.）の中程度の効果を示す代表的なEEGトレース。図14Gおよび14H：新生仔ラット（P12）におけるてんかんバースト活動に対するブメタニド（2 mg/kg、i.p.）の効果を示す代表的なEEGトレース。図14I、14J、14Kおよび14L：成体マウスでも、KA注射（10 mg/kg、i.p.）は、EEG記録に示されるように、ロバストなてんかんバースト活動を誘導したが（14Iおよび14J）、NaGcA（2 g/kg、i.p.）は、KA誘導性てんかんバースト活動に対して中程度の効果のみを示した（14Kおよび14L）。図14M：食塩水（黒色）、NaGcA（緑色）、フェノバルビタール（マゼンタ色）またはブメタニド（青色）の注射が後に続く、KA注射の前および後の、平均EEGパワー（5分間の時間ウインドウ）を示す、新生仔動物におけるまとめられたデータ。NaGcAがKAによって誘導されたEEG増加のパワーを強力に阻害したことに留意されたい。図14N：成体動物では、NaGcA（緑色）は、KAによって誘導されたEEGのパワーを中程度に阻害した。図14Mおよび14Nの両方において、黒色の矢頭は、KA注射を示し、赤色の矢頭は、薬物注射を示す。データは、平均±s.e.m.である。

【図14-2】同上。

【図14-3】同上。

【図15-1】図15は、新生仔ラットにおけるKA誘導性てんかん活動に対するNaGcAの急性効果を示す例示的なデータを示す。図15A：i.p.注射を介してKAによって誘導された典型的なてんかんEEG活動。安定なてんかん活動が記録された後（約1時間）、NaGcA（2 g/kg、i.p.）をラットに投与した（緑色）。てんかん活動がNaGcA注射後に徐々に低減されたことに留意されたい。図15B：ロバストなてんかんバースト活動を示す、図15A中のひと区分からの拡大されたトレース。図15C：図15A中のNaGcA注射後のEEG記録の拡大図。図15D：再発性バースト活動を示す、図15B中のひと区分からのさらなる拡大図。図15E：NaGcAによるてんかん活動の顕著な阻害を示す、図15C中のNaGcA注射後のEEGのさらなる拡大図。図15F：NaGcA適用（2 g/kg i.p.、n=6、P10~12ラット、緑色）によって有意に低減されたてんかんバースト活動のパワーを示す、まとめられたデータ。データは、平均±s.e.m.である。

【図15-2】同上。

【図16-1】図16は、CLC-3チャネルの活性化が発生中のニューロンにおいて細胞内Cl⁻恒常性を変更することを示す例示的なデータを示す。図16A：新生仔CA3錐体ニューロンにおいて0 Mg²⁺ aCSFによって誘導されたてんかん様バースト活動は、長期持続性の膜脱分極を示した。図16B：てんかん様バースト活動に似た長期持続性の膜脱分極パルス（40 mV、10秒）は、グラミシジン穿孔ホールセル記録下で、GABAA-Rアゴニストイソグバシン（100 μM）によって誘導されたGABAA-R電流を顕著に増強した。かかる脱分極誘導性増強は、CLC-3 KOマウスには存在せず、CLC-3チャネル遮断剤NaGcA（20 mM）によって強く阻害された。

図16C：WT、CLC-3 KOおよびWT+NaGcA群におけるGABAA-R電

流に対する膜脱分極の効果の、まとめられたデータ。 図16D：グラミシジン穿孔記録は、 0 Mg^{2+} aCSF中でのてんかん様活動の誘導後の、CA3ニューロンにおけるGABA_A-R逆転電位（EGABA）における正のシフトを明らかにした。 図16E：NKCC1阻害剤ブメタニドのバス適用は、正常aCSF中でのEGABAにおける負のシフトを誘導したが、 0 Mg^{2+} aCSFによって誘導されたEGABAの正のシフトを無効にできなかった。 図16F：KCC2阻害剤VU0240551は、正常aCSF下ではEGABAに対して効果を有さず、 0 Mg^{2+} aCSFによって誘導された正のシフトに対して効果を示さなかった。 図16G：NaGcAは、 0 Mg^{2+} aCSFによって誘導された正のEGABAシフトを完全に無効にする。グルコネート自体は、正常aCSFにおいてEGABAに全く影響を与えなかった。 図16H：CLC-3 KOマウスでは、EGABAは、 0 Mg^{2+} aCSFで処理した場合にも変化しなかった。 図16I：新生仔CA3錐体ニューロン（例えば、P8～9）における種々の条件下でのEGABA変化を示す、定量化されたデータ。 図16J：成体CA3錐体ニューロンにおけるEGABA変化を示す棒グラフ。NaGcA（20mM）が成体動物においてEGABAシフトを変化させなかったことに留意されたい。 図16K：新生仔動物（例えば、P8～9）における異なる群においてイソグバシン（10 μ M、30秒）によって誘導されたスパイク活動を示すセルアタッチ記録の典型的なトレース。 図16L：イソグバシンによって興奮させられたニューロンのパーセンテージを示す、まとめられたデータ。NaGcAが、 0 Mg^{2+} aCSFにおけるGABA興奮性活動を本質的に無効にしたことに留意されたい。データは、平均 $\pm$ s. e. m. として示される。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図16-2】同上。

【図16-3】同上。

【図16-4】同上。

【図16-5】同上。

【図17】図17は、種々の対イオンと錯体化したグルコン酸が、P8～12新生仔マウスにおいてCl⁻電流を阻害することを示す例示的なデータを示す。データは、平均 $\pm$ s. e. m. として示される。 図17A：新生仔CA3錐体ニューロンにおける外向き整流Cl⁻電流の代表的なトレース（黒色、n=12）。 図17B：20mMのNaGcAの存在下でのCl⁻電流の典型的なトレース（緑色、n=7）。 図17C：10mMのMg（GcA）₂の存在下でのCl⁻電流の典型的なトレース。 図17D：20mMのグルコン酸の存在下でのCl⁻電流の典型的なトレース（青色、n=6）。 図17E：I-Vプロットは、グルコン酸およびその塩のバス適用後のCl⁻電流密度の際立つ低減を示した。

【図18】図18は、新生仔海馬スライスにおけるてんかん様活動がグルコースオキシダーゼによって強く阻害されることを示す例示的なデータを示す。 図18A： 0 Mg^{2+} aCSF（人工脳脊髄液、20mMのグルコースを伴う）によって誘導されたてんかん様活動に対するグルコースオキシダーゼ（GOx）の用量依存的急性効果。てんかん活動は、1U/mlを超えるGOxの急性適用によって有効に阻害されたことに留意されたい。 図18B：高K⁺によって誘導されたてんかん様活動も、1U/mlのGOxによって抑制された。

【図19】図19は、aCSFにおける延長されたインキュベーション後のてんかん様活動に対するグルコースオキシダーゼの増強された阻害を示す例示的なデータを示す。 図19A：てんかん様活動を、4mMのグルコースと共に 0 Mg^{2+} aCSFによって誘導した。 0 Mg^{2+} aCSF（4mMのグルコース）中に1U/mlのGOxを添加し、室温で90分間事前インキュベートした後、てんかん活動は、際立って阻害された。 図19B： 0 Mg^{2+} aCSF（20mMのグルコース）中で90分間事前インキュベートした0.1U/mlのGOxであっても、てんかん様活動がまた阻害された。

【図20-1】図20は、グルコースオキシダーゼがてんかん様活動を阻害する例示的なデータを示す。 図20A：海馬スライスにおけるてんかん様活動に対するGOxの急性

効果を試験するための実験設定。フィールド電位記録を、CA3錐体細胞層中に配置し、てんかん様活動を、 $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ によって誘導した。安定なてんかん様活動を誘導した後、GOxを、 $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ 中に添加した。図20B： $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ 誘導性てんかん様活動に対する 0.1 U/ml のGOxの急性効果。図20C： $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ 誘導性てんかん様活動に対する 0.3 U/ml のGOxの急性効果。図20D： $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ 誘導性てんかん様活動に対する 1 U/ml のGOxの急性効果。図20E：0グルコース； $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ 誘導性てんかん様活動に対する 1 U/ml のGOxの急性効果。グルコースを、 5 mM ラクテートおよび 3 mM ピルベートによって置き換えた。図20F： 0.1 U/ml のGOxを、 $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ 中に添加し、室温で1時間を超えてインキュベートし、次いで、誘導されたてんかん様活動について評価した。図20G：異なる条件下でのフィールド電位パワーの相対的变化。グルコースをバスから除去した場合、てんかん様活動に対する 1 U/ml のGOxの阻害効果は、ほとんど排除されたことに留意されたい。データは、平均 $\pm\text{ s.e.m.}$ として示される。

【図20-2】同上。

【図20-3】同上。

【図21】図21は、グルコースオキシダーゼが、i) 高 $\text{K} + \text{aCSF}$ ；またはii) 4-アミノピリジン (4-AP) + Mg^{2+} なしの aCSF のいずれかによって誘導した場合のてんかん様活動を阻害することを示す例示的なデータを示す。図21A：高 K^+ (8.5 mM) aCSF によって誘導されたてんかん様活動は、 1 U/ml のGOxによって抑制された。図21B： 1 U/ml のGOxは、4-AP ($50\text{ }\mu\text{M}$) + $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ 誘導性てんかん様活動を阻害した。図21C： 1 U/ml のGOxの適用の前、その間およびその後の、高 $\text{K}^+ \text{aCSF}$ (紫色) または4-AP ($50\text{ }\mu\text{M}$) + $0\text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ (青色) によって誘導された標準化されたてんかん様活動パワー。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明は、神経学的障害の分野に関する。特に、筋強直間代性痙攣、てんかん、ジャクソン障害および／または不随意振戦が含まれるがこれらに限定されない痙攣性障害の予防および処置である。例えば、一部の実施形態は、新生児および／または乳児において痙攣性障害を処置および予防することに関する。グルコネート組成物は、新生児および／または乳児において痙攣性障害を処置および／または予防するのに選択的に有効であることが見出されている。

【0042】

新生仔発作は、成体てんかんと比較して処置が困難である。一実施形態では、本発明は、CLC-3 C₁ーチャネルを標的化することによって新生仔てんかんを強力に抑制する抗てんかん薬、グルコネートの使用を企図する。

【0043】

グルコン酸は、グルコン酸マグネシウム、グルコン酸カルシウムまたはグルコン酸カリウムなどの塩形態で食品または薬物添加物としてしばしば使用される大きい有機アニオンであり、ここで、グルコネートは、イオンを送達するために使用された。しかし、グルコネート自体の機能的役割は、過去にはほとんど無視された。本明細書に提示されるデータは、グルコン酸自体がC₁ーチャネル遮断剤として作用し、てんかん様活動を直接阻害することを示している。さらに、グルコネートは、新生仔発作を抑制するのに特に有効であり、その潜在力は、他の現在利用可能な抗てんかん薬よりも優れていることが示される。グルコネートは、ヒトの食物摂取に安全であるので、この化合物は、新生仔てんかんの処置のための新たなプラットフォームを提示する。

【0044】

グルコネートは、多くの医学的に使用される薬物においてアニオンとして広く使用されているが、不活性成分として表示される場合が多い。関連の研究文献では、グルコネート自体は、てんかんに直接関連付けられたことが決してなかったが、それは、これらの研究

の具体的な目的が、カチオン、例えば、 Ca^{2+} および Mg^{2+} に焦点を当てていたからである。例えば、1つの症例研究は、てんかん患者をグルコン酸 Ca で処置したところ、引き続いて、てんかん引き付けが弱まったことを報告した。Boulenguez et al., “Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury” *Nature Medicine* 16:302-307 (2010)。この解析は、グルコネートの可能な役割に全く言及せずに、軽快効果を Ca^{2+} に帰した。グルコン酸マグネシウムが抗てんかん効果を有し得るという他の観察は、 Mg^{2+} の機能に起因すると示唆されてきた。

【0045】

本明細書に提示されるデータは、これらの抗てんかん組成物中の活性成分が、二価カチオンではなくグルコネートである可能性がより高いことを示唆している。グルコネートは、グルコースの酸化から生成され得、従って、果実および蜂蜜などの天然食品製品中に豊富であり得る。Anastassiadis et al., “Gluconic acid production” *Recent Patents On Biotechnology* 1:167-180 (2007)。一実施形態では、本発明は、グルコネートが抗てんかん効果を有し、てんかんのためのある特定の伝統的な食餌処置を支持し得ることを企図する。

【0046】

CLC-3チャネルは、CLCスーパーファミリーに属する電位開口型外向き整流CL-チャネルである。以前の研究は、CLC-3チャネルが、エンドソーム酸性化、シナプス前性神経伝達物質蓄積、インスリン分泌およびグリオーマ細胞増殖の調節にとって重要であることを示している。Hara-Chikuma et al., “CLC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation” *The Journal Of Biological Chemistry* 280:1241-1247 (2005); Riazanski et al., “Presynaptic CLC-3 determines quantal size of inhibitory transmission in the hippocampus” *Nature Neuroscience* 14:487-494 (2011); Deriy et al., “The granular chloride channel CLC-3 is permissive for insulin secretion” *Cell Metabolism* 10:316-323 (2009); Li et al., “Suppression of sulfonyl urea- and glucose-induced insulin secretion in vitro and in vivo in mice lacking the chloride transport protein CLC-3” *Cell Metabolism* 10:309-315 (2009); Cuddapah et al., “Bradykinin-induced chemotaxis of human gliomas requires the activation of KCa3.1 and CLC-3” *The Journal Of Neuroscience : The official journal of the Society for Neuroscience* 33:1427-1440 (2013); および Habela et al., “CLC3 is a critical regulator of the cell cycle in normal and malignant glial cells” *The Journal Of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 28:9205-9217 (2008)。

【0047】

発明の機構を理解することは必要ではないが、CLC-3 CL-チャネルは、初期出生後脳では突出するが成体脳ではほとんど消失する、大きい外向き整流CL-電流を媒介すると考えられる。結果的に、グルコネートは、新生仔てんかんの処置のためのより強力な抗てんかん薬である。てんかん発生の間のCLC-3 CL-チャネルの活性化は、細胞内CL-恒常性を変更させ、GABA機能をより興奮性にとさらに考えられる。さらに、本明細書に提示されるデータは、CLC-3 CL-チャネルが、新生仔てんかんにおいて、以前に考えられたCL-トランスポーターよりも大きい役割を果たし得ることを示している。実際、CL-チャネルおよびCL-トランスポーターは、電位依存性におけるそれらの差異に起因して、細胞内CL-恒常性を制御する際に異なる役割を果たし得る。例えば、静止条件では、電位感受性CLC-3 CL-チャネルは不活性であり、従って、CL-トランスポーター、例えばNKCC1は、発生中のニューロンにおいて細胞内CL-恒常性を維持する主要なプレーヤーである。Ben-Ari, Y., “Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture” *Nature Re*

10

20

30

40

50

views. Neuroscience 3:728-739 (2002); Kaila et al., “Cation-chloride co transporters in neuronal development, plasticity and disease” Nature Reviews. Neuroscience 15:637-654 (2014); および Blaesse et al., “Cation-chloride cotransporters and neuronal function” Neuron 61:820-838 (2009)。【0048】

しかし、てんかん発生の間、CLC-3 クローチャネルは活性化され、大きいクロー流入 $[Cl^-]_i$ が顕著に増加し、増強された興奮性GABA作動性伝達および悪化したてんかん活動を生じる。一部の実施形態では、本発明は、CLC-3チャネルをグルコネートで遮断することで、この正のループを破壊し、発生中の脳における新生仔てんかんを阻害することを企図する。さらに、CLC-3ノックアウトマウスは、大きい外向き整流クロー電流を有さず、結果的に、再発性バースト活動は、顕著に弱められる。

10

【0049】

グルコネートを他の潜在的な抗てんかん薬(AED)と比較することによって、本明細書に提示されるデータは、グルコネートが、新生仔てんかんを抑制するにあたりフェノバルビタールまたはブメタニドよりも強力であることを示している。グルコネートは、静止条件下でNKCC1を遮断しEGABAに影響を与えるブメタニドとは異なる形で作用するが、その一方で、グルコネートは、生理的条件下では、正常なEGABAに影響を与えないが、てんかん発生の間のCLC-3チャネル活性化を遮断する。

【0050】

グルコネートは天然の有機酸であるので、最小の副作用で食品および薬物添加物として既に使用されている。一実施形態では、本発明は、グルコネート組成物が、二価カチオンの非存在下で、多くの現在の抗痙攣薬に対して抵抗性である新生仔てんかんの処置のために使用され得る治療薬であることを企図する。

20

【0051】

I. 痙攣性障害

痙攣という用語は、発作と相互交換可能に使用される場合が多い。痙攣は、人の身体が迅速にかつ制御されずに震える際に生じる。痙攣の間、人の筋肉は、反復して収縮および弛緩する。多くの異なる型の発作が存在する。一部は、震えを伴わない軽度の症状を有する。一部の発作は、人に意識障害(staring spells)を有させるだけである。これらは、気づかれないままの場合がある。痙攣の具体的な症状は、脳のどの部分が関与するかに依存し得る。症状は通常、突然生じ、これには、以下が含まれ得るがこれらに限定されない：短時間のブラックアウトとその後の錯乱の期間(この人は、短時間記憶していることができない)；行動における変化、例えば、人の服をいじる；よだれを垂らすまたは口から泡を吹く；眼の動き；唸り声をあげるおよび鼻を鳴らす；膀胱または腸の制御の喪失；気分の変化、例えば、突然の怒り、説明のつかない恐れ、パニック、歓喜または笑い；全身の震え；突然の転倒、苦味または金属風味の感覚；歯の食いしばり；呼吸における一時的な停止、ならびに／またはピクピクするおよび引き付けを起こす四肢を伴う制御不能な筋肉けいれん。症状は、数秒もしくは数分後に停止し得る、または最大で15分間にわたって継続し得るが、まれに、より長く継続し得る。

30

【0052】

てんかん発作は、脳回路の過剰興奮によって引き起こされる場合が多く、これは、成体脳における主要な阻害性受容体ファミリーであるGABA_A受容体(GABA_A-R)をブーストさせることによって阻害され得る。従って、成人患者に対して広く標的化されるベンゾジアゼピンおよびバルビツレート薬物などの抗てんかん薬(AED)が、GABA_A-R機能を増加させるためにしばしば開発される。Bialer et al., “Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Nature reviews. Drug discovery 9, 68-82 (2010)。しかし、GABA_A-Rは、成体脳では主に阻害性であるが、GABA_A-Rは、新生児および／または乳児の発生中の脳では主に興奮性である。Chen et al., “Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones” The Journal Of Physiology 494(Pt 2):451-46

40

50

4 (1996); および Ben-Ari Y., “Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture” *Nature Reviews Neuroscience* 3:728-739 (2002)。発生中の脳における興奮性 GABA 作動性伝達は、新生仔発作を制御するのに GABA アゴニストがしばしば無効であり、ときおり新生仔発作活動を悪化させることさえあり得る理由もまた説明する。Farwell et al., “Phenobarbital for febrile seizures--effects on intelligence and on seizure recurrence” *The New England Journal Of Medicine* 322:364-369 (1990)。従って、一部の AED は、発生中の脳における興奮性 GABA_A - R 機能を増強することによって、新生仔発作を潜在的に悪化させ得る。

【0053】

古典的に、発生中のニューロンにおける GABA_A - R の興奮性機能は、クロライドイオン (Cl⁻) トランスポーター NKCC1 および KCC2 による調節に帰せられてきた。Ben-Ari et al., “GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations” *Physiol Rev* 87:1215-1284 (2007); Kahle et al., “Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease” *Nat Clin Pract Neurol* 4:490-503 (2008); および Kaila et al., “Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease” *Nature Reviews. Neuroscience* 15:637-654 (2014)。以前の研究は、NKCC1 が、げっ歯類動物において新生仔発作を促進し得ることを見出した。Dzhala et al., “NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain” *Nature Medicine* 11:1205-1213 (2005)。しかし、乳児における最近の臨床試験は、NKCC1 遮断剤ブメタニドの重症な副作用、および新生仔発作を処置するのに非常に限定的な有効性を見出した。Pressler et al., “Bumetanide for the treatment of seizures in newborn babies with hypoxic ischaemic encephalopathy (NEMO): an open-label, dose finding, and feasibility phase 1/2 trial” *Lancet Neurol* 14:469-477 (2015)。興奮性 GABA 作動性伝達は、多くの神経発生プロセスにおいて基礎的な役割を果たすので、NKCC1 を遮断することは、生理的条件下で GABA 機能を顕著に変更させ得、正常な脳発生を破壊する潜在的なリスクを生じ得る。Ben-Ari, Y., “Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture” *Nature reviews. Neuroscience* 3:728-739 (2002); Kaila et al., “Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease” *Nature reviews. Neuroscience* 15:637-654 (2014); Wang et al., “Blocking early GABA depolarization with bumetanide results in permanent alterations in cortical circuits and sensorimotor gating deficits” *Cerebral cortex* 21:574-587 (2011); および Deidda et al., “Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex” *Nature neuroscience* 18:87-96 (2015)。より最近の研究は、Cl⁻ コトランスポーター以外の因子、例えば、不透過アニオン、電位開口型内向き整流クロライドチャネル CLC-2 および電位開口型外向き整流クロライドチャネル CLC-3 もまた、Cl⁻ 恒常性に寄与し得ることを示唆している。Glykys et al., “Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration” *Science* 343:670-675 (2014); Foldy et al., “Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel CLC-2” *Nature neuroscience* 13:1047-1049 (2010); Rinke et al., “CLC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30:4776-4786 (2010); Kawasaki et al., “Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells” *Neuron* 12:597-604 (1994); および Wang et al., “CLC-3 channels modulate excitatory synaptic transmission

10

20

30

40

50

in hippocampal neurons” *Neuron* 52:321-333 (2006)。

【0054】

最近の研究は、Cl⁻チャネル、例えばCLC-3チャネルもまた、細胞内Cl⁻濃度 ([Cl⁻]_i) の変化に寄与し得ることを示唆している。Zhou et al., “Regulation of intracellular Cl⁻ concentration through volume-regulated CLC-3 chloride channels in A10 vascular smooth muscle cells” *The Journal Of Biological Chemistry* 280:7301-7308 (2005)。CLC-3チャネルは、電位依存的外向き整流Cl⁻チャネルのサブファミリーに属する。Jentsch T. J., “Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters” *The Journal of Physiology* 578:633-640 (2007); Graves et al., “The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes” *Nature* 453:788-792 (2008); Picollo et al., “Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5” *Nature* 436:420-423 (2005); Scheel et al., “Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins” *Nature* 436:424-427 (2005); およびHara-Chikuma et al., “CLC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation” *The Journal Of Biological Chemistry* 280:1241-1247 (2005)。CLC-3チャネルは、海馬および小脳における高い発現レベルを伴って、脳の至る所で普遍的に発現される。Duran et al., “Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable” *Annual Review Of Physiology* 72:95-121 (2010); Verkman et al., “Chloride channels as drug targets” *Nature Reviews. Drug discovery* 8:153-171 (2009); およびKawasaki et al., “Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells” *Neuron* 12:597-604 (1994)。例えば、CLC-3ノックアウトマウスは、海馬において選択的な出生後神経変性を示す。Stobrawa et al., “Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus” *Neuron* 29:185-196 (2001); およびDickerson et al., “Altered GABAergic function accompanies hippocampal degeneration in mice lacking ClC-3 voltage-gated chloride channels” *Brain Research* 958:227-250 (2002)。しかし、てんかん発生の間の電位依存性Cl⁻チャネルの正確な役割は、ほとんど未知である。

【0055】

新生仔発作は、成体てんかんと比較して処置が困難である。新生仔発作は、成体発作とは異なり、成体において有効な多くの抗てんかん薬 (AED) が、新生仔発作を処置することにしばしば失敗する。例えば、本明細書に提示されるデータは、発生中の初期脳には存在するが成体脳には存在しないCLC-3 Cl⁻チャネルによって媒介される大きい電位依存性外向き整流Cl⁻電流を示している。発明の機構を理解することは必要ではないが、天然に存在する有機酸であるグルコネートは、CLC-3クロライドチャネルを遮断することによって、新生仔発作を強力に阻害すると考えられる。

【0056】

興味深いことに、CLC-3 Cl⁻チャネルは、てんかん発生の間に上方調節され得、グルコネートによるCLC-3 Cl⁻チャネルの阻害は、他のAEDと比較して顕著に改善された潜在力で、新生仔発作活動を本質的に無効にする。この結果は、CLC-3ノックアウトマウスが発生中の脳において外向き整流Cl⁻電流を有さず、低減された再発性てんかん様活動を示すという観察によって、説明され得ると考えられる。発明の機構を理解することは必要ではないが、てんかん発生の間のCLC-3 Cl⁻チャネルの活性化は、細胞内Cl⁻恒常性を顕著に変更し、GABA興奮性機能を増強すると考えられ、これは、他のCl⁻モジュレーターでも観察された効果である。本明細書に提示されるデータは、グルコネートを、CLC-3 Cl⁻チャネルを阻害することを介して新生仔

発作を処置する強力な抗てんかん薬として同定している。本明細書に記載される一部の実施形態では、新生児発作を抑制するにあたり特に強力な抗てんかん薬であるグルコン酸が同定される。

【0057】

II. 二価カチオンベースの痙攣性治療

低カルシウム血症に関連する痙攣を有する4～7日齢の乳児への、グルコン酸カルシウム、硫酸マグネシウムまたはフェノバルビトン (phenobarbitone) の投与が報告されている。3つ全ての組成物が、痙攣の率を低減させるようであり、処置内比較は、硫酸マグネシウムが、グルコン酸カルシウムまたはフェノバルビトンのいずれよりも有効であったことを示した。しかし、参考文献は、カチオンベースの治療を必要としない乳児におけるグルコネート組成物の有効性に関して、いずれの開示も提供していない。Turner, T., "Comparisons of phenobarbitone, magnesium sulphate, and calcium gluconate in treatment of neonatal hypocalcaemic convulsions" Paediatric Research Society Abstracts, pg 244.

10

【0058】

痙攣の管理のための、20日未満の乳児へのグルコン酸カルシウムの投与が報告されている。この処置に引き続いて、左脚は、腫脹を受け、炎症、骨外 (extraosseus) 石灰化および血清カルシウムレベルは、正常範囲内であると決定された。これらの症状は、医原性皮膚石灰沈着症の診断によるグルコン酸カルシウム処置の休止後に軽減された。しかし、参考文献は、二価カチオンベースの治療、例えばカルシウムを必要としない乳児におけるグルコネート組成物の有効性に関して、いずれの開示も提供していない。Arora et al., "Iatrogenic calcinosis cutis-a rare differential diagnosis of soft-tissue infection in a neonate: A case report" Journal of Orthopaedic Surgery 13(2):195-198 (2005).

20

【0059】

発作障害および／またはてんかんを処置するための植物抽出物の投与が報告されている。例えば、植物抽出物は、グルコネートの種々の製剤、例えば、グルコン酸カリウム、グルコン酸亜鉛および／またはグルコン酸銅と組み合わせられ、公知のマウス電気ショッククロノスモデルを使用して抗痙攣活性についてスクリーニングされている。さらに、市販の製品 Nutri i V e d a (商標) が、発作および／またはてんかんを低減させるために、4.5歳～37歳の間の年齢範囲のヒト患者に投与された。しかし、Nutri i V e d a (商標) の詳細な組成解析は開示されておらず、従って、この製品中のグルコネートの正確な量および二価カチオンとのその関連性は未知であることに留意すべきである。しかし、参考文献は、二価カチオンベースの治療、例えば、カルシウムまたは亜鉛を必要としない乳児におけるグルコネート組成物の有効性に関して、いずれの開示も提供していない。Geng L., "Methods For Treating Neurological Disorders Using Nutrient Compositions", 米国特許第8,962,042号 (参照により本明細書に組み込まれる)。

30

【0060】

低カルシウム血症、高リン血症および上昇した副甲状腺ホルモンに関連する早期発症型発作を有した新生児の症例が提示された。この乳児は、偽性副甲状腺機能低下症のいずれの標徴も有さなかった。低カルシウム血症は最初、カルシウム治療に対して抵抗性であったが、ビタミンDアナログ治療に対して応答した。「新生児偽性副甲状腺機能低下症」の診断が受け入れられた；この乳児は、3カ月間および8カ月間の追跡の間、正常な血清生化学で、安定で発作なしのままであった。Narang et al., "Neonatal pseudohypoparathyroidism" Indian J Pediatr. 73(1):97-98 (2006)；およびManzar et al., "Transient pseudohypoparathyroidism and neonatal seizure" J Trop Pediatr. 47(2):113-114 (2001)。

40

【0061】

カルシウムベースの痙攣治療の失敗は、9歳の時に全般性強直間代性発作を発症した患

50

者に関して報告されており、これらは、低カルシウム血症に関連した。カルシウムによる処置にもかかわらず、発作は持続し、患者は、抗てんかん薬物療法を必要とした。彼女は、オクスカルバゼピンによって最終的に制御された。頭部のMRIは正常であった。EEGは、独立したスパイクならびに左側頭領域および右前頭領域から発する波放電 (wave discharge) を示した。EEG上の限局的知見の存在、カルシウム治療に対する完全奏効の欠如、および抗てんかん薬治療の必要性は、これらの患者の一部が、てんかんを固有に発症しやすい可能性があることを示している。Gonzalez et al., “Seizures and EEG findings in an adult patient with DiGeorge syndrome: a case report and review of the literature” *Seizure* 18(9):648-651 (2009)。
【0062】

10

低カルシウム血症は、比較的珍しいが、乳児および小児における左心室機能不全の可逆的な原因である。特発性低カルシウム血症を有する30日齢の男児は、うっ血性心不全および痙攣性発作を呈した。彼は、根底にある心疾患の証拠は有さなかった。心不全は、カルシウム治療に応答した。低カルシウム血症は、乳児における左心室機能不全の可能な原因とみなされるべきであることが示唆される。Karademir et al., “Left ventricular dysfunction due to hypocalcemia in a neonate” *JPN Heart J.* 34(3):355-359 (1993)。

【0063】

上記のような報告は、グルコン酸二価カチオン治療を投与することの目的が、痙攣性障害を管理するための有効成分として二価カチオン（例えば、カルシウム、マグネシウム、亜鉛など）を提供することであることを、当業者に教示している。例えば、「低カルシウム血症」の状態は、痙攣状態の先行状態として記載されている。他方、カルシウム過剰は、痙攣処置の間に、グルコン酸カルシウムの処置に引き続いて経験される重篤な副作用を生じた。このように、これらの観察は、グルコン酸二価カチオン錯体を新生児に投与することの目的が、二価カチオン補充が痙攣管理のために必要とされ、グルコネートが単に適切な対イオンであったと考えられたからであることを教示している。結果的に、本発明は、グルコン酸二価カチオン組成物が、驚くべきことに、痙攣状態を処置するのにより有効であることを実証している。

20

【0064】

III. グルコネートベースの痙攣性治療

30

一実施形態では、本発明は、電位依存的CLC-3 Cl⁻チャンネルが、特に新生仔てんかんの間に、細胞内Cl⁻濃度 ([Cl⁻]_i) を制御する際に役割を果たし得ることを企図する。例えば、CLC-3チャンネルは、成体脳ではなく新生仔脳において大きい電位依存的外向き整流Cl⁻電流を媒介し得るが、これは、グルコン酸によって阻害することができる。例えば、データは、グルコネートが、新生仔てんかん活動を強力に抑制し、成体動物では効果がより少なかったことを示している。さらに、CLC-3ノックアウトマウスは、新生仔脳における電位依存的外向き整流Cl⁻電流の非存在、および低減された再発性てんかん活動を示した。EEG記録もまた、グルコネートが、成体動物ではより有効性が低い、新生仔動物において発作バースト活動を阻害するのにより有効であったことを確認した。最後に、新生仔てんかんの間に観察されたCLC-3チャンネル活性化は、[Cl⁻]_iを顕著に増加させたが、グルコネートを使用してCLC-3チャンネルを遮断することは、[Cl⁻]_i蓄積を阻害した。一実施形態では、本発明は、グルコネート（天然の有機化学物質）が、有効なCLC-3 Cl⁻チャンネル遮断剤であり、新生仔てんかんを処置するための抗痙攣薬として有効であり得ることを企図する。

40

【0065】

グルコン酸は、グルコン酸マグネシウム、グルコン酸カルシウムまたはグルコン酸カリウムなどの塩形態で食品または薬物添加物としてしばしば使用される大きい有機アニオンであり、ここで、グルコネートは、カルシウムまたはマグネシウムまたはカリウムを送達することを助けるために使用された。しかし、グルコネート自体の機能的役割は、過去にはほとんど無視された。本明細書に提示されるデータは、グルコン酸自体がCl⁻チャネ

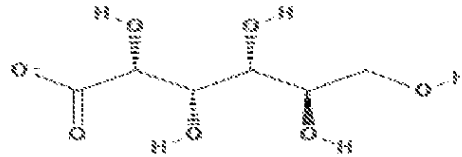
50

ル遮断剤として作用し、てんかん様活動を直接阻害することを実証している。一部の実施形態では、本発明は、グルコネートが、新生仔発作を抑制するのに特に有効であり、それによって、新生仔てんかんの処置のための選択的治療を提供することを提供する。

【0066】

グルコネートは、以下の構造を有するアルカノイル有機化合物である：

【化1】



10

【0067】

種々のヒドロキシル基およびカルボン酸基が、官能化および／または誘導体化が可能な反応性の種を提供することに留意されたい。かかる反応性基は、置換または非置換のアリールまたはヘテロアリール、非置換または置換のC1～C6-アルキル基、置換または非置換の5～6員の飽和または不飽和の縮合環、置換または非置換の5～6員の飽和または不飽和の環、天然アミノ酸残基または合成アミノ酸残基、トリハロメチル、置換または非置換のC1～C6-アルコキシ、NH₂、SH、チオアルキル、アミノアシル、アミノカルボニル、置換または非置換のC1～C6-アルコキシカルボニル、アリール、ヘテロアリール、1～3個のヘテロ原子を必要に応じて含む置換または非置換の4～8員の環式アルキル、カルボキシル、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アセトキシ、アミノアシル、スルホキシ、スルホニル、C1～C6-チオアルコキシ、C1～C6-脂肪族アルキル、1～3個のヘテロ原子を必要に応じて含み、アリールまたはヘテロアリールと必要に応じて縮合される置換または非置換の飽和環式C4～C8-アルキル；置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール（ここで、前記アリールまたはヘテロアリール基は、置換または非置換のC1～C6-アルキル、例えばトリハロメチル、置換または非置換のC1～C6-アルコキシ、置換または非置換のC2～C6-アルケニル、置換または非置換のC2～C6-アルキニル、アミノ、アミノアシル、アミノカルボニル、置換または非置換のC1～C6-アルコキシカルボニル、アリール、カルボキシル、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アセトキシ、アミノアシル、スルホキシ、スルホニル、C1～C6-チオアルコキシで必要に応じて置換されている）が含まれるがこれらに限定されない部分で置換され得る；あるいはR5およびR6は、一緒になって、置換または非置換の4～8員の飽和環式アルキルまたはヘテロアルキル基を形成していてもよい。これらの企図されるグルコネート誘導体のうち少なくとも1つまたは複数は、伝統的に使用される二価カチオン治療のものよりも優れた抗痙攣効果を有すると期待される。

20

30

【0068】

グルコネートは、多くの医学的に使用される薬物においてアニオンとして広く使用されており、通常は不活性成分として表示される。対イオンとしてグルコネートを有する抗痙攣化合物を報告する当業者は、グルコネートがいずれの抗てんかん効果に関連付けられることもこれまで示唆したことがない。その代わり、上で議論したように、以前の研究は、抗痙攣効果を媒介するとして、二価カチオン、例えば、Ca²⁺およびMg²⁺に主に焦点を当てている。例えば、1つの症例研究は、てんかん患者をグルコン酸Caで処置したところ、てんかん引き付けが弱まったことを報告した。Boulenguez et al., “Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury” Nature Medicine 16:302-307 (2010)。著者らは、グルコネートが何らかの役割を果たし得るかどうかに関する疑問を完全に無視して、この効果をCa²⁺に帰している。同様に、マグネシウム関連抗痙攣製品、例えばグルコン酸マグネシウムが抗てんかん効果を有し得ることは当該分野で一般に受容されているが、抗痙攣効果はまたも、Mg²⁺の機能に起因すると考えられている。これらの一

40

50

般に抱かれている考えとは対照的に、本明細書に提示されるデータは、グルコネートが、二価カチオン単独と同程度に有効またはそれよりも有効であり得ることを実証している。

【0069】

グルコネートは、グルコースの酸化から生成され得、従って、果実および蜂蜜などの天然食品製品中に豊富に見出される。Anastassiadis et al., “Gluconic acid product ion” Recent Patents On Biotechnology 1:167-180 (2007)。結果的に、グルコネートの食餌供給源もまた、抗てんかん治療に寄与し得る。グルコネートは天然の有機酸であり、最小の副作用で食品および薬物添加物として既に使用されているので、グルコネート誘導体は、新生仔てんかんの処置のための新世代の治療薬をもたらし得る。

【0070】

一実施形態では、本発明は、グルコン酸（例えば、グルコネート）が、ニューロン培養物だけでなく海馬スライスにおいて、てんかん様バースト活動を強力に阻害したことを企図する。さらに、海馬スライスにおけるフィールド電位記録は、グルコン酸ナトリウムが、新生仔てんかん活動を強力に抑制し、年かさの動物では効果がより少なかったことを明らかにした。脳波（EEG）記録は、グルコン酸ナトリウムが、成体動物ではより有効性が低い、新生仔動物においててんかん発作を阻害するのにより有効であったことを確認した。ホールセルパッチクランプ記録は、グルコン酸ナトリウムが、海馬錐体ニューロンにおいて、CLC-3チャンネルによって主に媒介される電位依存的Cl⁻電流を顕著に阻害したことを実証した。本明細書に提示されるデータは、天然の有機化学物質、グルコン酸およびその誘導体を、以前は未知であり、新生仔てんかんのための有効な抗痙攣薬として同定している。

【0071】

A. てんかん様活動の阻害

てんかん発生の間のCl⁻の機能的役割を、バス溶液中の細胞外Cl⁻（すなわち、例えば、137mMのCl⁻）を、グルコン酸などの大きいアニオンで置き換えることによって調査した。驚くべきことに、バス溶液中のおよそ5~20mMの間の濃度のグルコン酸ナトリウム（NaGcA）が、培養された皮質ニューロンにおいて、自発的てんかん様活動を阻害した。図1Aを参照のこと。バス溶液中に117mMを超えるCl⁻がなおも存在したので、低濃度のNaGcAによるてんかん様活動のかかる強力な阻害は、Cl⁻濃度変化によって単純に説明することはできなかった。NaGcAがてんかん様活動を直接阻害し得るかどうかを決定するために、シクロチアジド（CTZ）を使用して、ニューロン培養物においてロバストなてんかん様バースト活動を惹起した。Qi et al., “Cyclothiazide induces robust epileptiform activity in rat hippocampal neurons both in vitro and in vivo” The Journal Of Physiology 571:605-618 (2006)。データは、CTZ誘導性てんかん様活動が、10mMのNaGcAによって完全に遮断され、阻害が用量依存的であったことを実証した。それぞれ、図1Bおよび図1Cを参照のこと。バースト活動は、NaGcAを洗い流した後に、対照レベルまで回復したので、NaGcAの効果は可逆的であった。図1Aおよび図1Cを参照のこと。これらのデータは、NaGcAが、培養されたニューロンにおけるてんかん様バースト活動に対して強力な阻害効果を発揮することを示している。

【0072】

NaGcAのかかる阻害効果がCTZてんかんモデルに限定されなかったことを確実にするために、NaGcAを、2つのさらなるてんかんモデルにおいてさらに試験した。第1に、皮質ニューロンを、強力な神経毒であるカイニン酸（KA）1μMで2時間処理して、てんかんバースト活動を誘導した。ホールセルパッチクランプ記録は、10mMのNaGcAが、KAによって誘導されたてんかん様バースト活動を大きく抑制したことを示した。図1Dおよび図1Eを参照のこと。第2に、皮質ニューロンを、これもまた長期持続性のてんかん様バースト活動を誘導する、4-アミノピリジン（4-AP）50μM中で2時間インキュベートした。同様に、10mMのNaGcAの適用は、4-AP誘導性てんかん様活動を完全に遮断した。図1Fおよび図1Gを参照のこと。併せて考えると

、これらの結果は、NaGcAが、培養されたニューロンにおけるてんかん様活動に対する強力かつ一般的な阻害剤であることを実証している。

【0073】

次いで、NaGcAがてんかん活動の誘導を阻害できるかどうかを決定した。この目的のために、NaGcAおよびCTZの組合せを、誘導期間の間に添加した。CTZ単独によって処理したニューロンは、ロバストなてんかん様活動を示した；しかし、10mMのNaGcAと一緒に10μMのCTZで処理したニューロンは、てんかん様活動の大きい低減を示した。上部分を下部分と比較して、図1Hを参照のこと。対照ニューロンのほぼ90%（例えば、22個のニューロンのうちおよそ19個）は、CTZ処理後にてんかん様活動を示したが、10mMのNaGcAで共処理したニューロンの18%のみ（例えば、17個のニューロンのうちおよそ3個、 $p < 0.001$ 、 χ^2 検定）が、てんかん様活動を示した。図1I（a）を参照のこと。てんかん様バーストの平均周波数および持続時間もまた、NaGcAで共処理したニューロンにおいて有意に低減された。図1I（b）および図1I（c）を参照のこと。併せて考えると、これらのデータは、急性および慢性の両方のNaGcA適用が、培養されたニューロンにおいててんかん様活動を抑制できることを実証している。

【0074】

B. カイニン酸誘導性細胞死保護

ニューロン死は、てんかんの重篤な副作用である。Sagar et al., “Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions” *Annals of Neurology* 22:334-340 (1987)；およびSass et al., “Verbal memory impairment resulting from hippocampal neuron loss among epileptic patients with structural lesions” *Neurology* 45:2154-2158 (1995)。本明細書に提示されるデータは、グルコネートが、抗てんかん効果を有するだけでなく、KA誘導性ニューロン死に対する神経保護効果を発揮することを実証している。

【0075】

てんかん活動は、てんかん患者および動物モデルの両方において、細胞死を誘導し得る。Chen et al., “Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis” *The Journal Of Neuroscience* : the official journal of the Society for Neuroscience 27:542-552 (2007)；およびNaseer et al., “Maternal epileptic seizure induced by pentylenetetrazol: apoptotic neurodegeneration and decreased GABAB1 receptor expression in prenatal rat brain” *Molecular Brain* 2:20 (2009)。NaGcAの抗てんかん効果が神経保護的であり得るかどうかを評価するために、カイニン酸（KA）誘導性細胞死モデルを、LIVE/DEAD（登録商標）Viability/Cytotoxicity Assay Kit（L3224、Life Technologies, Inc.）と併せて使用して、ニューロン生存率を解析した。Wu et al., “Protective effect of resveratrol against kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats” *Neurochemical Research* 34:1393-1400 (2009)。対照群では、ほとんどのニューロンは、形態学において健康に見え、カルセイン（緑色、生）によって染色されたが、エチジウムホモダイマー-1（EthD-1、赤色、死）によっては染色されなかった。図1J、左を参照のこと。10μMのKAへの24時間の曝露後に、ほとんどのニューロンは、EthD-1染色によって示されるように死んでいた。図1J、中央左を参照のこと。興味深いことに、KA誘導性ニューロン死は、20mMのNaGcAの共適用によって無効にされた。図1J、中央右を参照のこと。20mMのNaGcA単独に曝露されたニューロンは、その生存率に対して副作用を有さなかった。図1J、右を参照のこと。定量的データは、NaGcAの神経保護効果が用量依存的でもあったことを示した。図1Kを参照のこと。これらの実験は、グルコネートがてんかん様活動を阻害するだけでなく、神経保護効果を発揮することを示唆している。

【0076】

C. クロライドイオン電流阻害

本明細書に提示される研究は、グルコン酸がCl⁻チャネルを遮断することを実証している。発明の機構を理解することは必要ではないが、グルコン酸は、負の荷電を有する大きい有機化合物であるので、これらのチャネルを遮断すると考えられる。例えば、大きいアニオンとして、グルコン酸は、Cl⁻イオン自体と同様に容易にはCl⁻チャネルを通過しない可能性があると考えられる。Cl⁻チャネルは、ヒトてんかん患者に関連付けられてきた。CLC-1チャネルにおける突然変異は、多くの特発性てんかん患者において同定されている。Chen et al., "Novel brain expression of CLC-1 chloride channels and enrichment of CLCN1 variants in epilepsy" *Neurology* 80:1078-1085 (2013)。CLC-2チャネル突然変異もまたヒト患者において見出されているが、一部の研究は、突然変異がてんかに寄与しない可能性があることを示唆している。Haug et al., "Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies" *Nat Genet* 33:527-532 (2003); Kleefuss-Lie et al., "CLCN2 variants in idiopathic generalized epilepsy" *Nat Genet* 41:954-955 (2009); およびNiemyer et al., "No evidence for a role of CLCN2 variants in idiopathic generalized epilepsy" *Nat Genet* 42:3 (2010)。CLC-3チャネルは、異なる脳領域において広く発現され、海馬は、最も高い発現領域のうち1つである。Duran et al., "Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable" *Annual Review Of Physiology* 72:95-121 (2010); Verkman et al., "Chloride channels as drug targets" *Nature Reviews. Drug Discovery* 8:153-171 (2009); およびKawasaki et al., "Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells" *Neuron* 12:597-604 (1994)。

【0077】

実験を、何がグルコネートの分子標的であるかという疑問に回答するために設計した。イオンチャネル調節を最初に調査し、ナトリウム、カリウムまたはカルシウムチャネルに対するNaGcAの比較を行った。データは、NaGcA処理後にNa⁺、K⁺およびCa²⁺電流において有意な変化が存在しなかったことを示している。図2A～2Fを参照のこと。発明の機構を理解することは必要ではないが、グルコン酸は有機アニオンであるので、ニューロンのアニオンチャネルに影響を与え得ると考えられる。

【0078】

本明細書に提示されるデータは、培養された皮質ニューロンにおけるCl⁻電流が、外向き整流性であり、10mMのNaGcAの存在下で有意に低減されたことを示している。図2G、Hを参照のこと；対照、913±171pA；NaGcA、499±89pA；n=7；P<0.007、対応のあるt検定；+90mVにおいて記録。従って、NaGcAの1つの標的は、Cl⁻チャネルであり得る。Cl⁻チャネルとてんかん発生との間の密接な関連を固めるために、以下の2つの古典的Cl⁻チャネル遮断剤の効果を試験した；5-ニトロ-2-(3-フェニルプロピルアミノ)安息香酸(NPPB)および4,4'-ジイソチオシアナト-2,2'-ビスチルベンジスルホン酸二ナトリウム塩(DIDS)。NPPB(100μM)またはDIDS(100μM)の適用は、培養されたニューロンにおいてCl⁻電流を有意に抑制した。図2I、Lを参照のこと。NPPB(100μM)およびDIDS(100μM)が共に、CTZ(10μM、24時間)によって誘導されたてんかん様活動を顕著に阻害したこともまた実証された。図2M、Nを参照のこと；n=9。併せて考えると、これらの結果は、NaGcAが、てんかん発生に関与するCl⁻チャネルを阻害できることを示唆している。

【0079】

D. 新生仔海馬スライスてんかん様活動阻害

培養されたニューロンに対するグルコネートの上記効果がアーチファクトであった可能

性、NaGcAの抗てんかん活性を、比較的インタクトなニューロン回路を有する海馬スライスにおいて試験した。フィールド電位を、CA3錐体層において記録し、 Mg^{2+} なしの人工脳脊髄液(aCSF)中でてんかんバースト活動を誘導した。安定なてんかんバースト活動の誘導後(約30分)、20mMのNaGcAを、 Mg^{2+} なしのaCSF中に適用して、てんかん活動に対するその影響を試験した。データは、NaGcAが、P6~P12の新生仔動物由来の脳スライスにおいて抗てんかん効果を発揮したが(図2Aおよび2c)、およそ1カ月年かさの動物では、中程度の効果を発揮したことを示している。図3Eと比較して図3Aおよび3Cを参照のこと。次いで、フィールド電位のパワースペクトルを、NaGcA適用の前、その間およびその後に解析した。パワーの振幅は、新生仔動物ではNaGcAの適用後に顕著に低減されたが、年かさの動物(例えば、P26)ではわずかにのみ低減された。図3Fと比較して図3Bおよび3Dを参照のこと。定量的に、NaGcAは、新生仔動物においててんかん活動の平均パワーの60%を阻害したが(P6~8、 $59.6 \pm 4.3\%$ 、 $n=5$ 匹の仔からの10個のスライス; P10~12、 $62.1 \pm 3.8\%$ 、 $n=5$ 匹の仔からの10個のスライス; $P<0.001$ 、対応のあるt検定)、年かさの動物では20%だけ低減させた(P21~33、 $23.8 \pm 4.1\%$ 、 $n=4$ 匹の仔からの7個のスライス; $p<0.005$ 、対応のあるt検定)。図3Gを参照のこと。これらの結果は、NaGcAが、新生仔脳において強力な抗てんかん活性を有し得ることを示唆している。

【0080】

てんかん活動に対するNaGcAの効果が、P6~P12新生仔動物における0 Mg^{2+} モデルに加えて、他のてんかんモデルに一般に適用可能であるかどうかを、さらに決定した。例えば、4-APモデルは、 K^+ チャネル遮断剤4-AP(50 μM)のバス適用が、CA3錐体層において口バーストなてんかんバースト活動を誘導した使用であった。4-AP含有バス溶液への20mMのNaGcAのさらなる添加は、てんかん活動を顕著に低減させたが、これは、NaGcAの洗い流し後に可逆的であった。図4Aを参照のこと。パワーの振幅もまた、NaGcAの存在下で有意な低減を示し、まとめられたデータは、NaGcAによるパワー振幅の平均 $70.2 \pm 5.3\%$ の低減を示した($n=4$ 匹の仔からの9個のスライス; $P<0.001$ 、対応のあるt検定)。それぞれ図4Bおよび図4Cを参照のこと。上昇した細胞外 K^+ (+8.5mM)がCA3錐体層においててんかんバースト活動を惹起した、高 K^+ モデルもまた使用した。図4Dを参照のこと。同様に、高 K^+ aCSFにおける20mMのNaGcAの添加もまた、てんかんバースト活動を遮断し、パワー振幅を低減させた。図4D、Eを参照のこと。統計的解析は、NaGcAが、高 K^+ モデルにおいて、パワーの振幅を $70.8 \pm 4.9\%$ 、有意に低減させたことを明らかにした($n=2$ 匹の仔からの5個のスライス; $P<0.001$ 、対応のあるt検定)。図4Fを参照のこと。まとめると、これらの結果は、NaGcAが、種々のてんかんモデルにおいて新生仔てんかんを強力に抑制できることを実証している。

【0081】

E. CLC-3クロライドイオンチャネル阻害

上で議論したように、NaGcAは、培養されたニューロンにおいて Cl^- 電流を阻害した。図2を参照のこと。以前の研究は、海馬の培養されたニューロンが、電位依存的CLC-3 Cl^- チャネルを有したことを報告した。Wang et al., "CLC-3 channels modulate excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons" *Neuron* 52:321-333 (2006)。本明細書に示されるように、グルコネートは、CLC-3チャネルによって媒介される外向き整流 Cl^- 電流に対する強い阻害効果を有する。CLC-3チャネルを介したシナプス後 Cl^- 流入は、NMDA受容体媒介性興奮性電流を強化することができ、NMDA受容体の過剰活性化は、発作誘導性ニューロン細胞死に関与する。従って、グルコネートの神経保護効果は、NMDA受容体機能の間接的抑制を介してであり得る。

【0082】

海馬の形成は、げっ歯類脳における最も高頻度のてんかん原性構造の1つであることが

公知であるが、今までのところ、CLC-3ノックアウトマウスがPTZ誘導性てんかんに対する顕著な抵抗性を示したという報告以外、CLC-3チャネルとてんかんの間の関連性を直接調査している研究はほとんど存在しない。Dickerson et al., “Altered GABAergic function accompanies hippocampal degeneration in mice lacking ClC-3 voltage-gated chloride channels” *Brain Research* 958:227-250 (2002)。本明細書に提示される電気生理学的研究は、CLC-3チャネルが、海馬CA3錐体ニューロンにおいてCl⁻電流を媒介し、グルコン酸ナトリウムが、CLC-3チャネルを強く阻害することを見出した。さらに、データは、てんかん活動の誘導後に、CLC-3チャネルが、新生仔海馬スライスにおいて上方調節され、グルコン酸ナトリウムが、増加したクロライド電流を無効にすることができることもまた示している。

10

【0083】

従って、CLC-3チャネルは、新生仔てんかん発生に関与しているようである。これらの観察を支持することには、CLC-3チャネルは、ヒトグリオーマ細胞において高度に発現されることが見出されており、グルコネートによって遮断することができる。Olse n et al., “Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells” *The Journal Of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23:5572-5582 (2003)。さらに、高い発生率がグリオーマとてんかんの間で明らかであり、Cl⁻恒常性の誤調節がグリオーマ関連てんかんに関与することが報告されている。Buckingham et al., “Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity” *Nature Medicine* 17:1269-1274 (2011); および Pallud et al., “Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma” *Sci Transl Med* 6:244ra289 (2014)。併せて考えると、これらの知見は、Cl⁻チャネルと新生仔てんかん発生との間の潜在的な関連性を示唆している。CLC-3チャネルの強力な阻害剤として、グルコネートは、新生仔てんかんの処置のための以前には知られていなかった抗てんかん薬であり得る。

20

【0084】

一貫して、本明細書に提示されるデータは、海馬スライス中のCA3錐体ニューロンにおける電位依存的外向き整流Cl⁻電流を示す。図5A、左を参照のこと。例えば、Cl⁻電流は、NaGcA (20mM) の適用後に劇的に低減された。図5A、右を参照のこと。NaGcAの前および後のCl⁻電流のI-V曲線の定量的データ解析。図5Bを参照のこと。電位感受性Cl⁻電流がCLC-3 Cl⁻チャネルによって媒介されたかどうかを直接試験するために、CLC-3特異的抗体を、ピペット溶液中に導入して、CLC-3チャネルを遮断した。Wang et al., “Functional effects of novel anti-ClC-3 antibodies on native volume-sensitive osmolyte and anion channels in cardiac and smooth muscle cells” *American Journal Of Physiology. Heart and circulatory physiology* 285: H1453-1463 (2003); および Duan et al., “Functional inhibition of native volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in muscle cells and *Xenopus* oocytes by anti-ClC-3 antibody” *The Journal Of Physiology* 531:437-444 (2001)。

30

40

【0085】

実際、外向き整流Cl⁻電流は、CLC-3抗体 (1:100) の10分間の透析後に大きく低減されたが、対照IgG透析されたニューロンでは、明らかな変化は観察されなかった。図5Cを参照のこと。定量的に、対照条件におけるCl⁻電流密度は、90mVにおいて $36.2 \pm 1.4 \text{ pA/pF}$ ($n=4$ 匹の仔からの10個の細胞) であり、IgG群において $33.5 \pm 2.3 \text{ pA/pF}$ ($n=3$ 匹の仔からの10個の細胞) であったが、CLC-3抗体群では $13.7 \pm 2.3 \text{ pA/pF}$ まで減少した ($n=4$ 匹の仔からの11個の細胞; $P<0.001$ 、Tukey事後検定と共に一元配置ANOVA)。図5Dを参照のこと。従って、CA3錐体ニューロンにおけるCl⁻電流は、CLC-3-海馬ニューロンにおける以前の知見と一致して、CLC-3チャネルによって主に媒

50

介される。

【0086】

NaGcAを、この化合物がCLC-3チャネルを特異的に阻害できるかどうかを決定するためにも試験した。HEK293T細胞に、CLC-3-EGFPプラスミドをトランスフェクトし、CLC-3チャネルの発現を、CLC-3特異的抗体を用いて確認した。図5EおよびMatsuda et al., “Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent” American Journal Of Physiology. Cell physiology 294:C251-262 (2008)を参照のこと。ホールセル記録は、CLC-3トランスフェクトされたHEK293T細胞における大きい外向き整流電流もまた明らかにしたが（対照、+90mVにおいて 1012 ± 123 pA、 $n=2$ バッチの培養物からの7個の細胞）、EGFPトランスフェクトされた対照細胞では電流は観察されなかった。図5Fを参照のこと。さらに、20mMのNaGcAの適用は、CLC-3媒介性Cl⁻電流を有意に低減させたが（NaGcA、+90mVにおいて 544 ± 59 pA、 $n=2$ バッチからの7個の細胞；対照と比較して $P<0.004$ 、対応のあるt検定）、これもまた、NaGcAの洗い流し後に可逆的であった（+90mVにおいて 925 ± 124 pA、 $n=2$ バッチからの7個の細胞；対照と比較して $P>0.4$ 、対応のあるt検定）。図5F、Gを参照のこと。併せて考えると、これらのデータは、NaGcAが、CA3錐体ニューロンにおいて主要な外向き整流Cl⁻電流を媒介するCLC-3 Cl⁻チャネルの強力な阻害剤であることを実証している。

【0087】

F. CLC-3チャネルのてんかん原性上方調節

CLC-3チャネルがてんかん発生に関与するかどうかを決定するために、CLC-3発現レベルを、P8～P12新生仔脳スライスにおいててんかん活動の誘導の前および後に決定した。海馬スライスを、Mg²⁺なしのaCSF中で1時間インキュベートして、てんかん活動を誘導し、次いで、CLC-3免疫染色を実施して、CLC-3発現レベルを試験した。対照スライスは、それに応じて正常aCSF中で1時間インキュベートした。興味深いことに、海馬CA3錐体層におけるCLC-3免疫反応性は、対照と比較して、0 Mg²⁺処理したスライスにおいて有意な増加を示した。図6A、Bを参照のこと；対照、 11.2 ± 1.5 a.u.、 $n=4$ 匹の仔からの10個のスライス；0 Mg²⁺、 20.4 ± 2.8 a.u.、 $n=4$ 匹の仔からの11個のスライス； $P<0.02$ 、スチューデントt検定。かかる上昇した発現レベルのCLC-3を、ウエスタンブロットによってさらに確認した。図6C、Dを参照のこと。従って、CLC-3チャネルは、新生仔てんかんスライスにおいて上方調節される。

【0088】

さらに、パッチークランプ記録が、対照および0 Mg²⁺処理したスライス中のCA3錐体ニューロンのCl⁻電流を直接測定した。免疫染色およびウエスタンブロットの結果と一致して、ホールセル記録もまた、0 Mg²⁺処理したニューロンにおけるCl⁻電流の有意な増加を明らかにした。図6E、Fを参照のこと；対照、+90mVにおいて 31.2 ± 1.8 pA/pF、 $n=3$ 匹の仔からの15個の細胞；0 Mg²⁺、 42.2 ± 2.4 pA/pF、 $n=3$ 匹の仔からの15個の細胞； $P<0.001$ 、Tukey事後検定と共に一元配置ANOVA。さらに、0 Mg²⁺処理後のCl⁻電流の大部分は、NaGcAによって有意に阻害された。図6E、Fを参照のこと；NaGcA、 7.3 ± 0.6 pA/pF、 $n=2$ 匹の仔からの11個の細胞； $P<0.001$ 、Tukey事後検定と共に一元配置ANOVA。これらの結果は、CLC-3チャネルが、新生仔てんかん発生の間に役割を果たし得ることを示唆している。

【0089】

G. 新生仔発作阻害

新生仔発作を誘導するために、一般に使用されるKAモデルを使用した。P10～P12新生仔マウス中へのKAの注射（2mg/kg、i.p.）は、in vivo EEG記録によって明らかのように、ロバストなてんかん発作バーストを惹起した。図7A、B

を参照のこと。NaGcA (2 g/kg、i.p.) をKA注射の10分後に注射した場合、てんかん発作活動は、本質的に無効にされた。図7C、Dを参照のこと。パワー解析は、パワーの振幅が、NaGcA注射によって顕著に阻害されたことを確認した。図7E、Fを参照のこと。これらのデータは、NaGcAが強力なin vivo抗新生仔発作薬物であることを示している。

【0090】

H. 成体発作阻害

NaGcAを、この化合物が成体てんかんを処置するためにも使用することができるかどうかに関して決定した。予備データは、KA痙攣モデルが高い死亡率を有することを示した。しかし、類似のPTZモデルは、成体マウスにおいて信頼性のあるてんかん発作を生じた。図8Aを参照のこと。データは、NaGcAが、PTZによって誘導されたてんかん発作バーストの潜時を延長させたが、新生仔動物において見られるものと同様に有効には、てんかんバースト活動を抑制しなかったことを示している。図8を参照のこと。従って、NaGcAは、新生仔発作を処置するにあたり、成体てんかんについてよりも強力な独自の抗てんかん薬であり得る。

【0091】

I. クロライドイオンチャネル遮断剤ホールセル阻害

関連の疑問は、新生仔発作をこれもまた阻害する他のCl⁻チャネル遮断剤、例えば、NPPBおよびNFAもまた、Cl⁻イオンチャネル関連活動を遮断するということである。図9および図10を参照のこと。一実施形態では、本発明は、グルコネート、NPPB、ニフルミン酸、DIDS、フルフェナム酸が含まれるがこれらに限定されない化合物が、新生仔発作を阻害するにあたり同様に作用し得ることを企図する。発明の機構を理解することは必要ではないが、新生仔発作阻害は、クロライドイオンチャネル阻害によって生じ得ると考えられる。

【0092】

IV. グルコースオキシダーゼベースの痙攣性治療

一実施形態では、本発明は、グルコースオキシダーゼが、発作活動を阻害するための抗痙攣薬として使用され得ることを企図する。発明の機構を理解することは必要ではないが、グルコースオキシダーゼは、グルコースを、てんかん様活動を低減させることが本明細書で示されたグルコネート（上記）に変換すると考えられる。本明細書に提示されるデータは、グルコン酸が、おそらくはCLC-3 Cl⁻チャネルを遮断することによって、発生中の脳における発作活動に対して強い阻害効果を有することを実証している。データは、グルコースをグルコン酸へと酸化する酵素であるグルコースオキシダーゼ（GOx）もまた、新生仔マウス由来の海馬スライスにおいて抗てんかん様活性を有することもまた示している。

【0093】

世界の人口のおよそ1%が、てんかんに罹患する。てんかん患者における多くの発作は、薬物によって部分的に制御することができ、てんかん患者の約3分の1は、抗てんかん薬に対して抵抗性である。Sada et al., “Epilepsy treatment. Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy” *Science* 347:1362-1367 (2015); およびJuge et al., “Metabolic control of vesicular glutamate transport and release” *Neuron* 68:99-112 (2010)。幸いなことに、いくつかの新たな抗てんかん薬が過去数年間にわたって開発され、薬物抵抗性患者においていくらかのさらなる効果を示している。Bialer et al., “Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs” *Nature Reviews: Drug Discovery* 9:68-82 (2010)。残念ながら、新生仔発作の抑制のために特に開発された新たな薬物は存在しない。

【0094】

例えば、GABA受容体のアゴニストであるフェノバルビタールは、1912年に発見され、最も古いが今もなお新生仔てんかんを処置するための第1選択薬であるが、わずか

10

20

30

40

50

50%の有効性に制限され、いくつかの副作用を示す。Chamberlain et al., “Lorazepam vs diazepam for pediatric status epilepticus: a randomized clinical trial” JAMA 311:1652-1660 (2014); Painter et al., “Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures” The New England Journal Of Medicine 341:485-489 (1999); および Khanna et al., “Limitations of Current GABA Agonists in Neonatal Seizures: Toward GABA Modulation Via the Targeting of Neuronal $Cl^{(-)}$ Transport” Front Neurol 4:78 (2013)。ビデオ-EEG研究は、フェノバルビタールが、臨床的外見上の痙攣よりも低い有効性で、EEGてんかん様活動を抑制することを示している。臨床症状と電子写真記録との間の差異は、「電気臨床的解離」と呼ばれ、これは、抗痙攣薬処置後の新生児において80%に達し得る。Glykys et al., “Differences in cortical versus subcortical GABAergic signaling: a candidate mechanism of electroclinical uncoupling of neonatal seizures” Neuron 63:657-672 (2009)。

【0095】

従って、一部の研究は、フェノバルビタールが、発生中の脳における対応する根底にある異常なてんかん様活動を修正することなしに、鎮静に起因して発作の臨床症状を解決し得、これが、フェノバルビタールの真の有効性の過大評価をもたらし得ることを示唆している。Boylan et al., “Phenobarbitone, neonatal seizures, and video-EEG” Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 86:F165-170 (2002)。あるいは、絶食およびケトン食治療が、発作を処置するために長く使用されており、小児において難治性てんかんを処置するためになおも主に使用されている。しかし、絶食／ケトン食効果の機構は、完全には理解されていない。Zupec-Kania et al., “An overview of the ketogenic diet for pediatric epilepsy” Nutr Clin Pract 23:589-596 (2008)。

【0096】

絶食またはケトン食治療は、身体に、炭水化物よりむしろ脂肪を燃焼させると一般に考えられている。通常、炭水化物（例えば、グルコース）は、特に脳において、アデノシン三リン酸（ATP）の身体の主要な燃料源を生成するための主要なエネルギー物質である。しかし、炭水化物を欠く場合、脂肪は、肝臓においてケトン体に変換されると考えられ、ここで、ケトン体は、脳に入り、エネルギー源としてのグルコースを置き換える。これらのケトン体もまた、脳てんかん様活動を抑制し得ることが報告されている。Lima et al., “Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy” Clinics (Sao Paulo) 69:699-705 (2014)。てんかんを有するほとんどの患者について、ケトン食は、いくつかの有害効果をもたらすことが示唆されている。Wheless J.W., “The ketogenic diet: an effective medical therapy with side effects” Journal Of Child Neurology 16:633-635 (2001); および Neal et al., “The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial” Lancet Neurol 7:500-506 (2008)。従って、小児科てんかんを処置するための代替的治療アプローチを開発する必要がある。

【0097】

ケトン食は、患者の食餌構成要素を強制的に変化させることによっててんかんの制御を達成するようであり、本明細書のデータは、グルコースが、*in vitro*および*in vivo*の両方で新生仔てんかん様活動に対する強い阻害効果を有することを示しているので、1つの可能な機構は、グルコネートが、グルコースオキシダーゼによってグルコースを酸化することを介して局所的に生成され得ることである。グルコースオキシダーゼは、いくつかの種の真菌および昆虫において一般に見出される酵素の型であることが公知であり、食品添加物として広く使用される。グルコースオキシダーゼ（GOx）は、グルコースが過酸化水素およびグルコノラクトンを産生する反応を触媒し、グルコノラクトンは、グルコン酸へと加水分解し得る。本明細書のデータは、グルコン酸（例えば、グルコネート）がてんかん様活動を抑制することを示している。

【0098】

新生仔てんかん様活動に対するGOxの効果を試験するために、ベースラインフィールド電位を、海馬スライス(P10~12)の水平切片中のCA3において記録し、次いで、GOxを、少なくとも20分間にわたる0 Mg²⁺による安定なてんかん様活動の誘導後に、バス中に添加した。図20A。このデータは、てんかん様活動が、0.3 U/mlのGOxおよび1 U/mlのGOxによって有意に阻害されたが、0.1 U/mlのGOxによっては阻害されなかったことを示している(n=8、p<0.001)。図20B~20D。

【0099】

グルコースがこのGOx媒介性阻害に関与することを確認するために、グルコースを、ラクテート(5 mM)およびビルベート(3 mM)で置き換え、次いで、0 Mg²⁺ a C S F中でインキュベートしたところ、GOxが新生仔てんかん様活動に対して効果を有さなかったことが観察された。図20E。

【0100】

細胞外溶液中のグルコースから生成されたグルコン酸の利用可能な濃度は、酵素活性および反応時間の両方に依存すると一般に考えられる。従って、低用量のGOx(例えば、0.1 U/ml)の存在下で反応時間を増加させることで、発生中の脳におけるてんかん様活動を抑制するのに十分な用量のグルコン酸を生成し得る。例えば、0.1 U/mlのGOxを、0 Mg²⁺ a C S F中で1時間を超えてインキュベートした。図2F; 95%のO₂/5%のCO₂で泡立てた。これらのデータは、1時間のインキュベーション後に、0.1 U/mlのGOxが、新生仔マウス由来の脳スライスにおけるてんかん様活動に対して強い阻害効果を示したことを示した。図20F; 図20Bと比較。これらの種々のGOx濃度は、平均パワーを、それぞれ64.3±8.2%(0.3 U/ml、n=9、p<0.001)、83.3±2.2%(1 U/ml、n=6、p<0.001)および81.4±2.0%(1時間インキュベートした0.1 U/ml、n=5、p<0.001)低減させたことに留意すべきである。図20G。

【0101】

0 Mg²⁺ a C S F誘導性てんかん様活動に対するGOxの効果を評価することに加えて、GOx(1 U/ml)が、i) 高K⁺; またはii) 4-アミノピリジン(4-AP)+0 Mg²⁺ a C S Fによって誘導される新生仔てんかん様活動を阻害することができかどうかについてさらに決定した。データは、1 U/mlのGOxがまた、発生中の脳(P10~12)由来の海馬スライスにおいて高K⁺ a C S Fまたは4-AP+0 Mg²⁺ a C S Fのいずれによって誘導されたてんかん様活動に対しても強力な阻害を示したことを確認した。図21A~21C。従って、これらのデータは、GOxが、新生仔てんかん様活動を強く抑制する活性を有することを実証している。

【0102】

V. C L C-3 C l-チャネルは、発生中のニューロンにおいて大きい外向き整流電流を媒介する

GABA機能の変更は、てんかんと密接に関連している。GABA機能は、細胞内C l-濃度([C l-]_i)によって決定され得るが、それは、GABA A受容体(GABA A-R)が、リガンド開口型C l-チャネルであると考えられるからである。例えば、以前の研究は、[C l-]_iおよび従ってGABA機能を調節する際の、C l-トランスポーター、例えば、KCC2およびNKCC1の役割を大々的に調査した。しかし、他のC l-チャネルがどのように[C l-]_iおよびGABA機能に影響を与え得るかは、十分には理解されていない。

【0103】

本明細書に提示されるデータは、電位依存的C l-チャネルが[C l-]_i恒常性に寄与するかどうかおよび/またはGABA機能を調節するかどうかを調査している。以前、新生仔マウス(例えば、P8~12)由来の海馬スライスのCA3錐体ニューロンにおける大きい外向き整流C l-電流(3.3±0.3 nA)を明らかにした電位依存的C l-電流が記録された。図11A、左上パネル。驚くべきことに、かかる電位依存的外向き整

10

20

30

40

50

流 Cl^- 電流は、成体脳（例えば、P60～62）において有意に減少した。図11Aおよび11B。これらのデータは、脳発生の中の Cl^- チャネルの発生的変化を示唆した。本発明者らがCA3錐体ニューロンから記録した Cl^- 電流は、培養された海馬ニューロンにおいて以前に報告された電位依存的 $ClC-3$ Cl^- 電流と似ていた。Wang et al., “CLC-3 channels modulate excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons” *Neuron* 52:321-333 (2006); およびHuang et al., “Calcium-activated chloride channels (CaCCs) regulate action potential and synaptic response in hippocampal neurons” *Neuron* 74:179-192 (2012)。

【0104】

$ClC-3$ Cl^- チャネルが新生仔CA3ニューロンにおいて Cl^- 電流を媒介したかどうかを試験するために、 $ClC-3$ 特異的抗体を、 $ClC-3$ チャネルの遮断について試験した。Wang et al., “Functional effects of novel anti-CLC-3 antibodies on native volume-sensitive osmolyte and anion channels in cardiac and smooth muscle cells” *American Journal Of Physiology. Heart And Circulatory Physiology* 285:H1453-1463 (2003); およびDuan et al., “Functional inhibition of native volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in muscle cells and *Xenopus* oocytes by anti-CLC-3 antibody” *The Journal Of Physiology* 531:437-444 (2001)。実際、外向き整流 Cl^- 電流は、 $ClC-3$ 抗体（1：100）による10分間の透析後に大きく低減されたが、事前吸収させた対照抗体で透析した場合、明らかな変化は存在しなかった。図11D。

【0105】

さらに、 Cl^- 電流を、 $ClC-3$ ノックアウトマウスにおいて直接試験した。Huang et al., “CLC-3 deficiency protects preadipocytes against apoptosis induced by palmitate in vitro and in type 2 diabetes mice” *Apoptosis: An International Journal On Programmed Cell Death* 19:1559-1570 (2014); Liu et al., “CLC-3 deficiency prevents apoptosis induced by angiotensin II in endothelial progenitor cells via inhibition of NADPH oxidase” *Apoptosis: An International Journal On Programmed Cell Death* 18:1262-1273 (2013); およびZheng et al., “Deficiency of volume-regulated $ClC-3$ chloride channel attenuates cerebrovascular remodeling in DOCA-salt hypertension” *Cardiovascular Research* 100:134-142 (2013)。免疫染色は、 $ClC-3$ KOマウスのCA3領域における $ClC-3$ シグナルの非存在を確認した。図11E。従って、外向き整流 Cl^- 電流は、 $ClC-3$ KOマウスのCA3ニューロンにおいてもほとんど存在しなかった（WT、 33.1 ± 1.3 pA/pF、 $n=10$; $ClC-3$ KO、 9.0 ± 1.6 pA/pF、 $n=6$ ）。図11Fおよび11G。併せて考えると、これらの結果は、 $ClC-3$ Cl^- チャネルが、新生仔脳では大きい外向き整流 Cl^- 電流を媒介するが、かかる Cl^- 電流が、成体脳では顕著に弱まったことを示している。

【0106】

さらなる試験は、新生仔脳における Cl^- 電流を遮断するための強力な阻害剤として、グルコン酸ナトリウム（NaGcA）を見出した。図11A～C；緑色のトレーシング。成体脳または $ClC-3$ KOマウスでは、NaGcAは、 Cl^- 電流に対して効果を有さなかった。図11A、11Bおよび11G。これらのデータは、NaGcAが $ClC-3$ チャネルの阻害剤であり得ることを示唆している。Olsen et al., “Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells” *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience* 23:5572-5582 (2003)。

【0107】

この考えを直接試験するために、 $ClC-3$ チャネルを、HEK293T細胞において過剰発現させ、発現を、 $ClC-3$ 特異的抗体結合を用いて確認した。図11HおよびMa

10

20

30

40

50

tsuda et al., "Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent" American Journal Of Physiology. Cell Physiology 294:C251-262 (2008)。ホールセル記録は、CLC-3トランスフェクトされたHEK293T細胞における大きい外向き整流C_l-電流を明らかにしたが(1012±123 pA, n=7)、EGFPトランスフェクトされた対照細胞ではなかった。図11I。さらに、20mMのNaGcAの適用は、CLC-3チャネル媒介性C_l-電流を有意に低減させた。図11Iおよび11J。従って、本明細書のデータは、NaGcAをCLC-3 C_l-チャネルの強力な阻害剤として同定している。

【0108】

グルコネートは、二価カチオン（例えば、カルシウムまたはマグネシウム）の存在下または非存在下でC_l-電流を阻害できることもまた見出された。本明細書に提示されるデータは、グルコン酸ナトリウム、グルコン酸マグネシウムおよびグルコン酸の間で、C_l-電流阻害の有効性を比較している。このデータは、等価なC_l-電流阻害が3つ全ての対イオンで観察されることを実証している。図17A~E。従って、これらのデータは、それが保持するカチオンではなくグルコン酸が、有効な構成要素であることを示している。グルコネート塩を使用する以前の研究は、臨床効果を、それが保持するカチオンにしばしば帰しており、グルコン酸は、重要なエフェクターではなく単なる食品／薬物添加物と考えられた。データは、技術水準がこの解釈において間違っていたこと、より具体的には、二価カチオンが、グルコネートが抗てんかん有効性を有するのに必要な構成要素ではないことを示している。

【0109】

VI. CLC-3チャネルおよび新生仔てんかん

新生仔てんかんにおけるCLC-3チャネルの機能的役割を理解するために、CLC-3チャネル発現レベルを、新生仔脳スライスを0 Mg²⁺人工脳脊髄液(aCSF)で処理することによるてんかん様活動の誘導後に決定した。

【0110】

Mg²⁺なしのaCSF誘導性てんかん活動は、新生仔脳スライス（例えば、P8~P12）におけるCLC-3チャネル発現を有意に上方調節した。図12Aおよび12B；対照：11.2±1.5人工単位(n=10)；0 Mg²⁺：20.4±2.8人工単位(n=11)；P<0.02、スチューデントt検定。てんかん様活動に引き続くCLC-3チャネル発現のこの上方調節を、ウエスタンブロットによってさらに確認した。図12Cおよび12D。さらに、パッチークランプ記録は、てんかん様活動の誘導後の外向き整流C_l-電流の顕著な増加もまた明らかにし、NaGcAの適用は、C_l-電流を顕著に遮断した。図12Eおよび12F；対照：31.2±1.8 pA/pF(n=15)；0 Mg²⁺：42.2±2.4 pA/pF(n=15)；NaGcA：7.3±0.6 pA/pF(n=11)；P<0.001、Tukey事後検定と共に一元配置ANOVA。これらの結果は、CLC-3チャネルが、新生仔てんかんの間に役割を果たし得ることを示唆している。

【0111】

この仮説を直接試験するために、CLC-3チャネルを、NaGcAで阻害し、てんかん活動に対する効果について試験した。際立つことに、データは、NaGcAが若い出生後動物(P6~12)由来の脳スライスにおいて強力な抗てんかん効果を発揮したことを示した。図12G、12H、12Iおよび12J。しかし、NaGcAの抗てんかん効果は、年かきの動物、例えば、およそ1月齢（例えば、P26）の動物では、かなり小さくなった。図12Kおよび12L。定量的に、NaGcAは、初期出生後動物においててんかん様活動の平均パワーの60%を阻害した(P6~8：59.6±4.3%(n=10)；P10~12：62.1±3.8%(n=10)；P<0.001、対応のあるt検定)。しかし、年かきの動物では、パワーは、離乳後に20%だけ低減された(P21~33：23.8±4.1%(n=7)；p<0.005、対応のあるt検定)。図12M。新生児動物と成体動物との間のてんかん活動のNaGcA阻害におけるかかる劇的な差

異は、異なる齢の動物におけるCLC-3 C L-電流に対するNaGcAの相対的阻害と一致しており、これは、CLC-3チャンネルが、新生仔てんかんにおいて役割を果たし得ることを示唆している。

【0112】

てんかん様活動におけるCLC-3チャンネルの機能的役割をさらに調査するために、てんかん様バースト活動を、CLC-3 KOマウス海馬スライスにおいて Mg^{2+} なしのaCSFによって誘導することができたが、WTマウスと比較した場合、かなり短い期間にわたってであった。興味深いことに、WTマウス由来の海馬スライスをNaGcAで事前処理してCLC-3チャンネルを遮断した場合、てんかん様活動はまた、CLC-3 KOマウスにおいて観察されたものと似て、非常に長くは持続しなかった。図12Nおよび12O。定量化されたデータは、CLC-3チャンネルを阻害またはロックアウトした場合、バースト潜時は有意に延長され、総バースト活動は有意に低減されたことを示した。図12P。併せて考えると、これらのデータは、CLC-3 C L-チャンネルが、発生中の初期脳におけるてんかん発生の間に役割を果たし得ることを示唆している。

【0113】

新生仔てんかん活動に対するNaGcAの効果が、0 Mg^{2+} モデルを超えて他のてんかんモデルに一般に適用可能であり得るかどうかにもまた試験した。例えば、K⁺チャンネル遮断剤4-AP (50 μM) をバス溶液中に添加して、浸漬された海馬スライスにおいてロバストなてんかんバースト活動を誘導した。図13A。4-AP溶液への20mMのNaGcAの添加は、てんかん活動を有意に低減させ、これは、NaGcAの洗い流し後に可逆的であった。図13A、13Bおよび13C。NaGcAによる、パワー振幅の $70.2 \pm 5.3\%$ の低減 ($n=9$)。 ($P<0.001$ 、対応のあるt検定)。上昇した細胞外K⁺ (8.5mM) もまた使用して、てんかんバースト活動を惹起した。図13D。同様に、高K⁺ aCSF中の20mMのNaGcAの添加もまた、てんかんバースト活動を劇的に低減させた。図13D、13Eおよび13F。NaGcAは、パワー振幅を $70.8 \pm 4.9\%$ 低減させた ($n=5$)。 ($P<0.001$ 、対応のあるt検定)。まとめると、これらの結果は、NaGcAが、種々のてんかんモデルにおいて新生仔てんかんを強力に抑制できることを実証している。

【0114】

VII. グルコネートは、新生仔てんかんを阻害する

一実施形態では、本発明は、新生仔てんかんをグルコネート化合物で処置するステップを含む方法を企図する。一実施形態では、グルコネート化合物は、全身投与される。

【0115】

例えば、新生仔ラットにグルコネートを投与して、新生仔動物および成体動物におけるin vivo てんかん発作に対する効果を決定した。発作を誘導するために、神経毒カイニン酸 (KA) (2mg/kg, i.p.) を新生仔ラット (P10~12) 中に注射して、in vivo EEG記録によって明らかにされるような、ロバストな発作活動を惹起した。図14Aおよび14B; Dzhalal et al., "NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain" Nature Medicine 11:1205-1213 (2005)。さらに、NaGcA (2g/kg, i.p.) をKA注射の10分後に注射した場合、てんかん発作活動は、新生仔動物では本質的に無効にされた。図14Cおよび14D。

【0116】

グルコネートの抗てんかん効果を、新生仔動物において、以前に報告された抗てんかん薬、例えば、フェノバルビタールおよびブメタニドとも比較した。フェノバルビタールは現在、わずか約50%の有効性および潜在的な負の神経発生結果にもかかわらず、新生仔発作を処置するための第1選択の薬物である。Slaughter et al., "Pharmacological treatment of neonatal seizures: a systematic review" Journal Of Child Neurology 28:351-364 (2013)。ブメタニドは、現在有望な抗てんかん薬としての評価段階にある、強力なループ利尿薬である。Loscher et al., "Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic

and antiepileptogenic treatments” *Neuropharmacology* 69:62-74 (2013)。フェノバルビタールおよびブメタニドは共に、新生仔動物においてある程度までてんかん活動を阻害したが、それらの阻害は、グルコネートほど強力ではなかった。図14Cおよび14Dと共に図14E～14Hを参照のこと。定量的に、EEGパワーを、KA注射後2時間の記録期間の間の最後の30分間において計算した場合、相対的パワーは、NaGcA群では72.3%、フェノバルビタール群では35.5%、ブメタニド群では54.3%、それぞれ低減された。図14M。従って、グルコネートは、新生仔発作の処置のための強力な抗てんかん薬であるようである。

【0117】

グルコネートの抗てんかん効果を、成体動物においても比較した。新生仔発作の強い阻害とは異なり、グルコネートは、成体発作活動に対してより少ない阻害を示した。図14I～14Lおよび14N。これらのデータは、脳スライス記録結果と一致している。図14G～14M。さらに、新生仔動物を、KAによって誘導される安定なてんかん活動に対するNaGcAの効果に関して試験したところ、NaGcAが、KA注射の1時間後に発作活動をなおも抑制したことが見出された。図15。従って、これらのデータは、NaGcAが新生仔発作を処置するための有効な薬物であるという結論を可能にする。

【0118】

VIII. CLC-3チャンネルは、てんかん発生の間Cl⁻恒常性を調節する

発明の機構を理解することは必要ではないが、CLC-3チャンネルは電位依存的外向き整流Cl⁻チャンネルであるので、[Cl⁻]_iにおける変化は、新生仔てんかんにおけるCLC-3チャンネルの少なくとも1つの分子機構を代表し得ると考えられる。例えば、てんかんバースト活動は、10秒よりも長く持続する場合が多かった。図16A。

【0119】

GABA機能に対するかかる長期持続性てんかん様バーストの効果を調査するために、グラミシジン穿孔ホールセル記録を実施して、新生仔動物において細胞内Cl⁻をインタクトに維持した。てんかん様バースト活動を模倣する、膜脱分極シフト（10秒間にわたって40mV）の前および後の受容体アゴニストイソグバシン（100μM、50ミリ秒）によって誘導されるGABA受容体（GABA_A-R）電流。興味深いことに、GABA_A-R電流は、WTでは膜脱分極シフト後に有意に増加したが、CLC-3 KOニューロンでもCLC-3チャンネル遮断剤NaGcAの存在下でも、増加しなかった。図16Bおよび16C。これらのデータは、CLC-3チャンネルが、新生仔動物においててんかん発生の間にGABA機能を調節し得ることを示唆している。

【0120】

この考えをさらに試験するために、GABAの興奮性機能対阻害性機能を支配するGABA_A-R逆転電位（EGABA）を、新生仔マウス脳スライス（例えば、P8～P9）においてグラミシジン穿孔ホールセル記録を使用して直接測定した。予想通り、てんかん様活動は、海馬スライスを0 Mg²⁺ aCSFで1時間処理した後に、EGABAにおける大きい脱分極シフトを誘導した（aCSF：-59.2±2.0mV、n=13；0 Mg²⁺：-48.2±1.1mV、n=10）。図16D。低濃度でのNKCC1の特異的遮断剤ブメタニド（Bum、10μM）による処理は、対照EGABA（破線）と比較して、EGABA（青色の線）において過分極シフトを誘導した。図16E。これらの結果は、NKCC1がCl⁻をニューロン細胞中にインポートするという報告と一致している。Kaila et al., “Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease” *Nature Reviews. Neuroscience* 15:637-654 (2014); Dzhalal et al., “NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain” *Nature Medicine* 11:1205-1213 (2005); およびLoscher et al., “Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments” *Neuropharmacology* 69:62-74 (2013)。しかし、ブメタニドの存在下で、てんかん様活動は、EGABAの脱分極シフトをなおも引き起こし、これは、NKCC1以外の因子が、てんか

10

20

30

40

50

ん発生の際にEGABAを調節していることを示唆している。図16E、黄色の線；Bum、 $-68.0 \pm 1.7 \text{ mV}$ ($n=9$)； $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{Bum}$ 、 $-50.2 \pm 1.4 \text{ mV}$ ($n=9$)；($p < 0.002$)。

【0121】

KCC2遮断剤VU0240551 ($10 \mu\text{M}$) による処理は、新生仔動物においてEGABAに影響を与えなかった。図16F、紫色の線； $-60.8 \pm 1.9 \text{ mV}$ ($n=6$)。これらのデータはおそらく、この初期時点でのKCC2の低い発現レベルに起因すると説明され得る。てんかん活動は、EGABAにおける正のシフトも惹起した。図16F、オレンジ色の線； $-48.9 \pm 1.3 \text{ mV}$ ($n=8$)。従って、てんかん様活動誘導性EGABAシフトは、新生仔動物では、NKCC1によってもKCC2によっても制御されない。

10

【0122】

他方、CLC-3 Cl⁻チャンネルをNaGcA (20 mM) で阻害した場合、 $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ に曝露された場合、EGABAは、さらには変更されなかった。図16G； $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{NaGcA}$ ： $-59.3 \pm 1.7 \text{ mV}$ ($n=6$)。さらに、CLC-3 KOマウスでは、EGABAは、 $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ においても変化しなかった。図16H；CLC-3 KO + 0 Mg^{2+} ： $-55.6 \pm 2.1 \text{ mV}$ ($n=10$)。さらに、CLC-3 KOマウスにおけるNaGcAの適用は、 $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ ではEGABAに対してそれ以上影響を有さなかった ($-56.6 \pm 2.4 \text{ mV}$ 、 $n=5$)。NaGcAによるCLC-3チャンネルの阻害またはロックアウトCLC-3は、正常条件では正常EGABAを変化させなかった。図16G；NaGcA： $-60.3 \pm 0.9 \text{ mV}$ ($n=5$)；CLC-3 KO： $-55.4 \pm 2.9 \text{ mV}$ ($n=9$)。

20

【0123】

従って、これらの結果は、CLC-3 Cl⁻チャンネルが、新生仔動物においててんかん発生の際にEGABAを制御する際に役割を果たすことを示唆している。しかし、年かさの動物（例えば、P30~90）では、 $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{aCSF}$ は、NaGcAの存在下で、EGABAにおける大きい脱分極シフトをなおも誘導した。図16J。これらのデータは、CLC-3チャンネル媒介性外向き整流Cl⁻電流が成体動物において実質的に減少されるという観察と一致している。図16A。

【0124】

EGABAに加えて、てんかん発生の際のGABA誘導性ニューロン活動に対する異なる薬物の効果を、新生仔動物（例えば、P8~9）において調査した。GABA誘導性ニューロン活動を正確に測定するために、細胞接着記録が、GABA A-Rアゴニストイソグバシン ($10 \mu\text{M}$ 、30秒) の局所適用によって惹起されるスパイク発火をモニタリングした。Tyzio et al., “Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery” Science 314:1788-1792 (2006)。静止CA3錐体ニューロンの大部分は、イソグバシンにตอบสนองしなかった。図16K、対照 ($n=32$)。しかし、 0 Mg^{2+} 処理後、ニューロンの68%は、イソグバシン適用の際にスパイク活動を示した。図16K、 0 Mg^{2+} ($n=19$)。ブメタニドでNKCC1を遮断することまたはVU0240551でKCC2を遮断することは、イソグバシンによって惹起されるスパイク活動を変化させなかった。図16K； $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{Bum}$ ($n=19$)；および $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{VU}$ ($n=21$)。対照的に、CLC-3 Cl⁻チャンネルを阻害するためのNaGcAの適用は、 0 Mg^{2+} 処理後に、イソグバシンによって誘導されるスパイク活動を本質的に無効にした。図16K； $0 \text{ Mg}^{2+} + \text{NaGcA}$ ($n=18$)。これらの観察についての定量化されたデータは、図4Lに示される。

30

40

【0125】

これらのデータは、新生仔動物におけるCLC-3 Cl⁻チャンネルの活性化が、てんかん発生の際のGABA興奮性活動を増強すること、およびCLC-3チャンネルを遮断することが、興奮性GABA活動を低減させることを介して新生仔発作を阻害するための有

50

効な方法であることを示している。

【0126】

IX. 医薬製剤および／または組成物

本発明は、医薬組成物（例えば、上記化合物を含む）をさらに提供する。本発明の医薬組成物は、局所処置が所望されるか全身処置が所望されるか、および処置される領域に依存して、いくつかの方法で投与され得る。投与は、外用（点眼、ならびに膣および直腸送達を含む粘膜へのものを含む）、肺（例えば、ネブライザーによるものを含む、粉末またはエアロゾルの吸入または吹き入れによる；気管内、鼻腔内、表皮および経皮）、経口または非経口であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射もしくは注入；または頭蓋内、例えば、くも膜下腔内もしくは脳室内投与が含まれる。特に、グルコン酸ナトリウムの筋肉内注射および／または静脈内注射は、無菌食塩水溶液中で、1～100mMのグルコネートのおおよその濃度範囲で送達され得る。発明の機構を理解することは必要ではないが、これらの濃度範囲は、グルコン酸ナトリウムが高度に水溶性であるために達成可能であると考えられる。

【0127】

外用投与のための医薬組成物および製剤には、経皮パッチ剤、軟膏、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、ドロップ剤、坐剤、スプレー剤、液体剤および散剤が含まれ得る。従来の医薬担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが、必要であり得るまたは望まれ得る。

【0128】

経口投与のための組成物および製剤には、散剤もしくは粒剤、水もしくは非水性媒体中の懸濁物もしくは液剤、カプセル剤、サシェ剤または錠剤が含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤またはバインダーが望まれ得る。

【0129】

非経口、くも膜下腔内または脳室内投与のための組成物および製剤には、緩衝剤、希釈剤、ならびに例えば浸透増強剤、担体化合物および他の薬学的に許容される担体または賦形剤であるがこれらに限定されない他の適切な添加物もまた含み得る無菌水溶液が含まれ得る。

【0130】

本発明の医薬組成物には、液剤、エマルジョン剤およびリボソーム含有製剤が含まれるがこれらに限定されない。これらの組成物は、事前に作られた液体、自己乳化性固体および自己乳化性半固体が含まれるがこれらに限定されない種々の構成要素から生成され得る。

【0131】

単位剤形で簡便に提示され得る本発明の医薬製剤は、医薬品産業において周知の従来の技術に従って調製され得る。かかる技術は、活性成分を医薬担体または賦形剤と会合させるステップを含む。一般に、製剤は、活性成分を、液体担体もしくは微細に分割された固体担体またはその両方と、均一かつ緊密に会合させ、次いで、必要に応じて、製品を成形することによって、調製される。

【0132】

本発明の組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、液体シロップ剤、軟質ゲル剤、坐剤および浣腸であるがこれらに限定されない多くの可能な剤形のいずれかへと製剤化され得る。本発明の組成物は、水性、非水性または混合媒体中の懸濁物としても製剤化され得る。水性懸濁物は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストランを含む、懸濁物の粘度を増加させる物質をさらに含み得る。懸濁物は、安定剤もまた含み得る。

【0133】

本発明の一実施形態では、医薬組成物は、発泡体として製剤化および使用され得る。医薬発泡体には、例えば、エマルジョン剤、マイクロエマルジョン剤、クリーム剤、ゼリー剤およびリボソーム剤であるがこれらに限定されない製剤が含まれる。性質は基本的に類似しているが、これらの製剤は、最終製品の構成要素および稠性が異なる。

【0134】

細胞レベルでのオリゴヌクレオチドの取り込みを増強する薬剤もまた、本発明の医薬組成物および他の組成物に添加され得る。例えば、カチオン性脂質、例えば、リポフェクチン（米国特許第5,705,188号）、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリカチオン性分子、例えば、ポリリシン（WO97/30731）もまた、オリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強する。

【0135】

本発明の組成物は、医薬組成物において従来から見出される他の補助的構成要素をさらにも含み得る。従って、例えば、組成物は、さらなる適合性の薬学的に活性な材料、例えば、鎮痒薬、収斂薬、局所麻酔薬もしくは抗炎症剤などを含み得、または本発明の組成物の種々の剤形を物理的に製剤化する際に有用なさらなる材料、例えば、色素、香味剤、防腐剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤および安定剤を含み得る。しかし、かかる材料は、添加された場合に、本発明の組成物の構成要素の生物活性を過度に妨害すべきではない。製剤は、無菌化され得、所望に応じて、製剤の核酸と有害に相互作用しない補助剤、例えば、滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝剤、着色物質、香味物質および／または芳香物質などと混合され得る。

【0136】

投薬は、処置される疾患状態の重症度および応答性に依存し、処置の過程は、数日間～数カ月間持続する、または治癒がもたらされるまで、もしくは疾患状態の減少が達成されるまで持続する。最適な投薬スケジュールは、患者の身体における薬物蓄積の測定値から計算され得る。投与する医師は、最適な投薬量、投薬方法論および反復率を容易に決定することができる。最適な投薬量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的潜在力に依存して変動し得、*in vitro*および*in vivo*動物モデルにおいて有効であることが見出されたEC₅₀に基づいて、または本明細書に記載される例に基づいて、一般に推定され得る。一般に、投薬量は、体重1kg当たり0.01μg～100gであり、毎日、毎週、毎月または毎年1回または複数回与えられ得る。処置する医師は、体液または組織中の薬物の測定された滞留時間および濃度に基づいて、投薬のための反復率を推定できる。首尾よい処置の後、疾患状態の再発を予防するために、対象に維持治療を受けさせることが望まれ得、化合物は、体重1kg当たり0.01μg～100gの範囲の維持用量で、毎日1回または複数回～20年毎に1回、投与される。

【0137】

X. 薬物送達系

本発明は、大まかに均一な分布を提供するいくつかの薬物送達系が、制御可能な速度の放出を有することを企図する。薬物送達系を創出する際に有用な種々の異なる媒体が、以下に記載される。いずれか1つの媒体または担体が発明を限定することは意図しない。任意の媒体または担体が、別の媒体または担体と組み合わせられ得ることに留意されたい；例えば、一実施形態では、化合物に結合されたポリマーマイクロ粒子担体は、ゲル媒体と組み合わせられ得る。

【0138】

本発明によって企図される担体または媒体は、ゼラチン、コラーゲン、セルロースエステル、デキストラン硫酸、ペントサンポリ硫酸、キチン、サッカライド、アルブミン、フィブリンシーラント、合成ポリビニルピロリドン、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、ポリエチレンオキシドおよびポリプロピレンオキシドのブロックポリマー、ポリエチレングリコール、アクリレート、アクリルアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレートが含まれるがこれに限定されないメタクリレート、ポリ（オルトエステル）、シアノアクリレート、ゼラチン-レゾルシン-アルデヒド型生体接着剤、ポリアクリル酸ならびにそれらのコポリマーおよびブロックコポリマーを含む群から選択される材料を含む。

【0139】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載される治療剤を含む薬物送達系を企図する。マイクロ粒子

【0140】

本発明の一実施形態は、ミクロ粒子を含む媒体を企図する。好ましくは、ミクロ粒子は、リポソーム、ナノ粒子、ミクロスフェア、ナノスフェア、マイクロカプセルおよびナノカプセルを含む。好ましくは、本発明によって企図される一部のミクロ粒子は、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）、ポリ-グリコール酸およびポリ-乳酸が含まれるがこれらに限定されない脂肪族ポリエステル、ヒアルロン酸、改変多糖、キトサン、セルロース、デキストラン、ポリウレタン、ポリアクリル酸、シュド-ポリ（アミノ酸）（psuedo-poly(amino acids)）、ポリヒドロキシ酪酸（polyhydroxybutrate）関連コポリマー、ポリ酸無水物、ポリメチルメタクリレート、ポリ（エチレンオキシド）、レシチンならびにリン脂質を含む。

10

【0141】

リポソーム

本発明の一実施形態は、本明細書に記載される治療剤を結合および放出することが可能なリポソームを企図する。リポソームは、リン脂質などの両親媒性分子でできた、水性コアを囲む微視的球状脂質二重層である。例えば、リポソームは、リン脂質ミセルの疎水性テイル間に治療剤を捕捉し得る。水溶性薬剤は、コア中に捕捉され得、脂溶性薬剤は、シェル様二重層中に溶解され得る。リポソームは、水溶性化学物質および水不溶性化学物質が界面活性剤の使用も他の乳化剤の使用もなしに媒体中で一緒に使用されるのを可能にするという点で、特別な特徴を有する。リポソームは、リン脂質（phospholipid）を水性媒体中に力強く混合することによって、自発的に形成し得る。水溶性化合物は、リン脂質を水和させることが可能な水溶液中に溶解される。従って、リポソームの形成の際に、これらの化合物は、水性リポソーム中心内に捕捉される。リン脂質膜であるリポソーム壁は、油などの脂溶性材料を保持する。リポソームは、組み込まれた化合物の制御放出を提供する。さらに、リポソームは、薬物動態学的半減期を増加させるために、ポリエチレングリコールなどの水溶性ポリマーでコーティングされ得る。本発明の一実施形態は、リポソーム産生を洗練するための超高せん断テクノロジーを企図し、具体的に設計された構造的な特徴を有する安定な単層（単一層）リポソームを生じる。リポソームのこれらの独自の特性は、通常は不混和性の化合物の同時貯蔵、およびそれらの制御放出の能力を可能にする。

20

【0142】

一部の実施形態では、本発明は、カチオン性およびアニオン性リポソーム、ならびに中性脂質を有するリポソームを企図する。好ましくは、カチオン性リポソームは、材料および脂肪酸リポソーム構成要素を混合し、それらを荷電関連させることによって、負に荷電した材料を含む。明らかに、カチオン性リポソームまたはアニオン性リポソームの選択は、最終リポソーム混合物の所望のpHに依存する。カチオン性リポソームの例には、リポフェクチン、リポフェクタミンおよびlipofectaceが含まれる。

30

【0143】

本発明の一実施形態は、少なくとも1つの治療剤の制御放出を提供するリポソームを含む媒体を企図する。好ましくは、制御放出が可能なリポソームは、以下である：i) 生分解性かつ非毒性である；ii) 水溶性化合物および油溶性化合物の両方を運搬する；iii) 扱いにくい（recalcitrant）化合物を可溶化する；iv) 化合物の酸化を防止する；v) タンパク質安定化を促進する；vi) 水和を制御する；vii) 例えば、脂肪酸鎖長、脂肪酸脂質組成、飽和および不飽和脂肪酸の相対的な量、ならびに物理的配置であるがこれらに限定されない、二重層組成におけるバリエーションによって、化合物の放出を制御する；viii) 溶媒依存性を有する；iv) pH依存性を有する、ならびにv) 温度依存性を有する。

40

【0144】

リポソームの組成物は、2つの分類へと広くカテゴライズされる。従来のリポソームは一般に、糖脂質を含んでも含まなくてもよい合成の同一鎖リン脂質を含み得る安定化された天然レシチン（PC）の混合物である。

【0145】

50

特別なリポソームは、以下を含み得る：i) 両極性脂肪酸；ii) 組織標的化治療のために抗体を結合する能力；iii) 例えば、リポタンパク質および炭水化物であるがこれらに限定されない材料でコーティングされる；iv) 多重カプセル化、ならびにv) エマルジョン適合性。

【0146】

リポソームは、例えば、超音波処理および振動であるがこれらに限定されない方法によって、実験室で容易に作製され得る。あるいは、化合物送達リポソームは、市販される。例えば、Collaborative Laboratories, Inc. は、具体的な送達要件のためのカスタム設計されたリポソームを製造していることが公知である。

【0147】

ミクロスフェア、ミクロ粒子およびマイクロカプセル剤

ミクロスフェアおよびマイクロカプセル剤は、一般に均一な分布を維持するそれらの能力に起因して有用であり、安定な制御された化合物放出を提供し、産生および調剤するのに経済的である。好ましくは、関連した送達ゲルもしくは化合物含浸ゲルは、透明であり、またはあるいは、前記ゲルは、医療関係者による容易な視覚化のために着色される。

【0148】

ミクロスフェアは、商業的に取得可能である (Prolease (登録商標)、Alkermes: Cambridge, Mass.)。例えば、少なくとも1つの治療剤を含むフリーズドライされた媒体が、20~90 μmの範囲のミクロスフェアを製造するために、適切な溶媒中にホモジナイズされ、噴霧される。次いで、精製、カプセル化および貯蔵の局面の間に持続放出の完全性を維持する技術に従う。Scott et al., Improving Protein Therapeutics With Sustained Release Formulations, Nature Biotechnology, Volume 16:153-157 (1998)。

【0149】

生分解性ポリマーの使用によるミクロスフェア組成物の改変は、治療剤放出の速度を制御する能力を提供し得る。Miller et al., Degradation Rates of Oral Resorbable Implants {Polylactates and Polyglycolates: Rate Modification and Changes in PLA/PGA Copolymer Ratios, J. Biomed. Mater. Res., Vol. 11:711-719 (1977)}。

【0150】

あるいは、持続放出または制御放出ミクロスフェア調製物は、水中乾燥法 (in-water drying method) を使用して調製され、生分解性ポリマー金属塩の有機溶媒溶液が、最初に調製される。引き続き、治療剤の溶解または分散された媒体が、生分解性ポリマー金属塩溶液に添加される。治療剤の生分解性ポリマー金属塩に対する重量比は、例えば、約1:100000~約1:1、好ましくは約1:20000~約1:500、より好ましくは約1:10000~約1:500であり得る。次に、生分解性ポリマー金属塩および治療剤を含む有機溶媒溶液が、油/水エマルジョン剤を調製するために、水相中に注がれる。次いで、油相中の溶媒が、ミクロスフェアを提供するために、蒸発により除かれる。最後に、これらのミクロスフェアは次いで、回収、洗浄および凍結乾燥される。その後、ミクロスフェアは、残余の水および有機溶媒を除去するために、減圧下で加熱され得る。

【0151】

生分解性ポリマー金属塩および治療剤混合物と適合性のミクロスフェアを産生する際に有用な他の方法は、以下である：i) コアセルベート化剤の段階的添加の間の相分離；ii) 水中乾燥法または相分離法、抗凝集剤が、粒子凝集を防止するために添加される、ならびにiii) 噴霧乾燥法による。

【0152】

一実施形態では、本発明は、およそ1日から6カ月の間の持続時間にわたって治療剤の制御放出を送達することが可能なミクロスフェアまたはマイクロカプセルを含む媒体を企図する。一実施形態では、ミクロスフェアまたはミクロ粒子は、医師が、それが調剤され

10

20

30

40

50

る際に媒体を明瞭に見ることができるようにするために、着色され得る。別の実施形態では、ミクロスフェアまたはマイクロカプセルは、透明であり得る。別の実施形態では、ミクロスフェアまたはマイクロ粒子には、放射線不透過性蛍光透視鏡色素が含浸される。

【0153】

制御放出マイクロカプセルは、公知のカプセル化技術、例えば、遠心押出、パンコーティングおよび空気懸濁 (air suspension) を使用することによって產生され得る。かかるミクロスフェアおよび／またはマイクロカプセルは、所望の放出速度を達成するために操作され得る。例えば、Oliosphere (登録商標) (Macromed) は、制御放出ミクロスフェア系である。これらの特定のミクロスフェアは、5 μm ~ 500 μm の間の範囲の均一なサイズで利用可能であり、生体適合性ポリマーおよび生分解性ポリマーから構成される。ミクロスフェアの特定のポリマー組成は、バースト効果の有効な管理を含む、カスタム設計されたミクロスフェアが可能ないように、治療剤放出速度を制御することができる。ProMaxx (登録商標) (Epic Therapeutics, Inc.) は、タンパク質-マトリックス送達系である。この系は、性質が水性であり、標準的な医薬品送達モデルに適応可能である。特に、ProMaxx (登録商標) は、小分子薬物および高分子薬物の両方を送達する生体腐食性 (bioerodible) タンパク質ミクロスフェアであり、ミクロスフェアのサイズおよび所望の放出特徴の両方に関してカスタマイズされ得る。

【0154】

一実施形態では、ミクロスフェアまたはマイクロ粒子は、内部腸間膜の pH よりも低い pH において安定な pH 感受性カプセル化材料を含む。内部腸間膜における典型的な範囲は、pH 7.6 ~ pH 7.2 である。結果的に、マイクロカプセルは、7 未満の pH で維持すべきである。しかし、pH 変動性が予測される場合、pH 感受性材料は、マイクロカプセルの溶解に必要な異なる pH 基準に基づいて選択され得る。従って、カプセル化された化合物は、溶解が所望される pH 環境のために選択され、安定性を維持するために事前選択された pH で貯蔵される。カプセル化物質として有用な pH 感受性材料の例は、Eudragit (登録商標) L-100 または S-100 (Rohm GMBH)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、ポリビニルアセテートフタレート、セルロースアセテートフタレートおよびセルロースアセテートトリメリテート (cellulose acetate trimellitate) である。一実施形態では、脂質が、マイクロカプセルの内部コーティングを構成する。これらの組成物では、これらの脂質は、脂肪酸の部分エステルおよびヘキシトール無水物、ならびに食用脂肪、例えば、トリグリセリドであり得るが、これらに限定されない。Lew C. W.、Controlled-Release pH Sensitive Capsule And Adhesive System And Method。米国特許第 5, 364, 634 号 (参照により本明細書に組み込まれる)。

【0155】

一実施形態では、本発明は、ゼラチン、またはゼラチンと類似の電荷密度を有する他のポリマー性カチオン (即ち、ポリ-L-リシン) を含むマイクロ粒子を企図し、一次マイクロ粒子を形成するための複合体として使用される。一次マイクロ粒子は、以下の組成の混合物として產生される: i) ゼラチン (60 ブルーム、ブタ皮膚由来の A 型)、ii) コンドロイチン-4-硫酸 (0.005% ~ 0.1%)、iii) グルタルアルデヒド (25%、グレート 1)、ならびに iv) 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC 塩酸塩)、および超高純度スクロース (Sigma Chemical Co.、St. Louis、Mo.)。ゼラチンの供給源は、重要とは考えられていない; ゼラチンは、ウシ、ブタ、ヒトまたは他の動物供給源由来であり得る。典型的には、ポリマー性カチオンは、19,000 ダルトン ~ 30,000 ダルトンの間である。次いで、コンドロイチン硫酸が、コアセルベーション剤としての硫酸ナトリウムまたはエタノールとの複合体に添加される。

【0156】

マイクロ粒子の形成後、治療剤は、マイクロ粒子の表面に直接結合される、または「架橋」もしくは「スペーサー」を使用して間接的に結合される。ゼラチンのリシン基のアミノ基は、化合物の直接的カップリングのための部位を提供するために、容易に誘導体化される。あるいは、スペーサー（すなわち、連結分子、および標的化リガンド上の誘導体化部分）、例えば、アビジン-ビオチンもまた、標的化リガンドをマイクロ粒子に間接的にカップリングするために有用である。マイクロ粒子の安定性は、EDC塩酸塩によって誘導されるグルタルアルデヒド-スペーサー架橋結合の量によって制御される。制御放出媒体もまた、グルタルアルデヒド-スペーサー架橋結合の最終密度によって、実験的に決定される。

【0157】

一実施形態では、本発明は、治療剤と共にフィブリノーゲンまたはトロンビンを含む組成物を噴霧乾燥させることによって形成されるマイクロ粒子を企図する。好ましくは、これらのマイクロ粒子は、可溶性であり、選択されたタンパク質（すなわち、フィブリノーゲンまたはトロンビン）は、マイクロ粒子の壁を創出する。結果的に、治療剤は、マイクロ粒子のタンパク質壁内に、およびそれらの間に組み込まれる。Heathら、*Micro particles And Their Use In Wound Therapy*。米国特許第6,113,948号（参照により本明細書に組み込まれる）。生組織へのマイクロ粒子の適用後、フィブリノーゲンとトロンビンとの間の引き続く反応が、組織シーラントを創出し、それによって、組み込まれた化合物を、すぐ周囲の領域中に放出する。

【0158】

当業者は、ミクロスフェアの形状が正確に球状である必要がないことを理解する；非常に小さい粒子のみが、手術部位（すなわち、開放または閉鎖のいずれか）中またはその上に、噴霧されるまたは広げられることが可能だからである。一実施形態では、マイクロ粒子は、ポリラクチド、ポリグリコリド、およびラクチド／グリコリドのコポリマー（PLGA）、ヒアルロン酸、改変多糖ならびに任意の他の周知の材料からなる群から選択される生体適合性および／または生分解性材料から構成される。

【0159】

実験

細胞培養および脳スライスのための動物プロトコールは、National Institutes of Health Guide for the Care and use of Laboratory Animalsに従って、Pennsylvania State University IACUCによって承認された。成体マウスまたは新生仔ラットに対するin vivo実験について、全ての手順は、動物研究のための倫理ガイドラインに従って、それぞれ、Fudan UniversityまたはSouth China Normal UniversityのCommittee of Animal Use for Research and Educationによって承認された。動物部屋は、12時間の明／暗サイクルで自動的に制御し、水および食物は、自由に利用可能にした。

【実施例】

【0160】

（実施例I）

細胞培養およびトランスフェクション

マウス皮質ニューロンを、以前に記載されたように、新生C57BL/6マウスから調製した。Qi et al., "Cyclothiazide induces robust epileptiform activity in rat hippocampal neurons both in vitro and in vivo" *The Journal Of Physiology* 571:605-618 (2006)。簡潔に述べると、新生マウス大脳皮質を、氷冷HEPES緩衝食塩水溶液中でばらばらにし、洗浄し、0.05%のトリプシン-EDTAで37℃で20分間消化した。血清含有培地によるトリプシンの非活性化後、細胞を遠心分離し、再懸濁し、24ウェルプレート中に、10,000細胞/cm²の密度で、皮質アストロサイトの単層上に播種した。ニューロン培養培地は、MEM（500ml、Invitrogen）、5%の胎仔ウシ血清（Atlanta Biologicals）

、10mlのB-27サプリメント (Invitrogen)、100mgのNaHCO₃、2mMのGlutamax (Invitrogen) ならびに25単位/mlのペニシリンおよびストレプトマイシンを含有した。AraC (4 μM、Sigma) を添加して、アストロサイトの過剰な増殖を阻害した。細胞培養物を、5%CO₂加湿インキュベーター中で37℃で14~21日間維持した。

【0161】

ヒト胎児由来腎臓 (HEK) 293T細胞を、10%のFBSおよび25単位/mlのペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM中で維持した。PEIキット (分子量25,000、Polysciences, Inc.) を、HEK細胞トランスフェクションのために適用した。簡潔に述べると、1 μgのDNAを、50 μlのOptiMEM (Invitrogen) 中に希釈し、次いで、4 μlのPEI (1 μg/μl) と混合し、5分間インキュベートし、500 μlの培地を含有する培養ウェルに一滴ずつ添加した。5時間のインキュベーション後、トランスフェクション試薬を、新たな培養培地で洗い流した。トランスフェクションの2日後、HEK293T細胞を、電気生理学的研究に使用した。eGFPプラスミドに融合させたラットCLC-3の短い転写物 (pCLC3sGFP) を、Addgeneから購入した (プラスミド番号52423)。Li et al., "The CLC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells" American Journal Of Physiology Cell Physiology 282:C1483-1491 (2002)。

【0162】

(実施例II)

細胞生存度アッセイ

エチジウムホモダイマー-1およびカルセイン-AMを含有するLIVE/DEAD (登録商標) Viability/Cytotoxicity Assay Kit (L3224、Life Technologies) を使用して、細胞生存度を試験した。エチジウムホモダイマー-1は、細胞DNAに結合し、典型的には、死細胞を赤色蛍光で標識するが、カルセイン-AMは、生細胞中のエステラーゼによって切断されて、強い緑色蛍光を生じ得る。薬物処理後、ニューロンを、1 μMのカルセイン-AMおよび4 μMのエチジウムホモダイマー-1を含有するバス溶液中で、室温で40分間インキュベートした。細胞の生存および死の比率を、それぞれ、緑色蛍光細胞および赤色蛍光細胞のパーセンテージを定量化することによって測定した。各群について、各カバーガラスの少なくとも5つの視野を、データ解析のためにイメージングした。

【0163】

(実施例III)

マウス脳スライス調製

脳スライスを、C57BL/6マウス (雄性および雌性) から調製した。動物を、Avertin (トリブロモエタノール、250mg/kg) で麻酔し、断頭した。海馬水平切片 (400 μm) を、以下の冰冷人工脳脊髄液 (aCSF) 中で、Leica VT1200Sビブラトームによって調製した (mMで) : 125 NaCl、26 NaHCO₃、10 グルコース、2.5 KCl、2.5 CaCl₂、1.25 NaH₂PO₄ および1.3 MgSO₄、モル浸透圧濃度290~300mOsm、95%のO₂/5%のCO₂を通気。次いで、スライスを、カルボゲン (95%のO₂/5%のCO₂) で飽和させた正常aCSFを含有するインキュベーションチャンバーに33℃で30分間移し、その後、使用前に室温で1時間回復させた。個々のスライスを、浸された記録チャンバーに移し、これらを、95%のO₂/5%のCO₂で飽和させたaCSFで31~33℃ (TC-324B、Warner instruments Inc) で持続的に灌流した (2~3ml/分)。スライスを、DICオプティックを備えたOlympus顕微鏡を使用して、赤外線光学で可視化した。

【0164】

(実施例IV)

電気生理学

細胞培養

培養されたニューロンを、以下からなるバス溶液の連続的灌流を伴って、記録チャンバー中に配置した (mM) : 128 NaCl、10 グルコース、25 HEPES、5 KCl、2 CaCl₂、1 MgSO₄、NaOHでpH7.3に調整、モル浸透圧濃度約300mOsm。電流クランプモード下で自発的発火を記録するために、ピペットに、以下を含有する内部溶液を満たした (mMで) : 125 K-グルコネート、5 Na-ホスホクレアチン、5 EGTA、10 KCl、10 HEPES、4 Mg-ATP、0.3 Na-GTP、280~290mOsm、KOHでpH7.3に調整。培養されたニューロンにおけるてんかん様活動を、10 μ MのCTZで24時間、または1 μ MのKAで2時間、または50 μ Mの4-APで2時間、誘導した。バースト活動は、以前に記載されたように定義した。Qi et al., "Cyclothiazide induces robust epileptiform activity in rat hippocampal neurons both in vitro and in vivo" The Journal Of Physiology 571:605-618 (2006)。簡潔に述べると、大きい脱分極シフト (≥ 10 mVの脱分極、持続時間 ≥ 300 ミリ秒)の上を覆う少なくとも5つの連続した作用電位。

【0165】

Cl⁻電流記録のために、0 Ca²⁺ピペット溶液は、以下を含有した (mM) : 125 CsCl、5 Na-ホスホクレアチン、10 HEPES、5 EGTA、5 TEACl、4 MgATP (CsOHでpH7.3に調整、280~290mOsm)。

【0166】

Cl⁻電流を単離するために：(1)細胞外Na⁺を、NMDG⁺によって置き換え、電位依存的Na⁺チャネルを、テトロドトキシン(TTX)によって遮断した；(2)K⁺およびCa²⁺を、バス溶液から除去した；(3)K⁺チャネルを、ピペット溶液中のCs⁺およびテトラエチルアンモニウム(tetraethylammonium)(TEA)、ならびにバス溶液中の4-APで遮断した；(4)CdCl₂をバス溶液中に添加して、Ca²⁺チャネルを遮断した；(5)ピクロトキシン(50 μ M)もまた含めて、GABAA受容体を遮断した。従って、外部溶液は、以下を含有した (mMで) : 135 NMDG-Cl、20 HEPES、20 グルコース、5 4-APおよび2 MgSO₄、1 μ MのTTX、200 μ MのCdCl₂および50 μ Mのピクロトキシンを補充、モル浸透圧濃度約300mOsm、95%のO₂/5%のCO₂を通気後にpH7.3~7.4。-80mVから+90mVまでの電位ステップ(10mV増分)を、0mVの保持電位(ECl⁻約0mV)から適用した。データを、MultiClamp 700A増幅器およびpCLAMP9ソフトウェア(Molecular Devices)を用いて収集した。

【0167】

脳スライス記録

フィールド電位記録を、外部溶液を満たしたガラス電極(2~4M Ω の先端抵抗)を用いて実施した。ガラス電極を、CA3錐体層中に配置した。電流クランプ(I=0)記録のために、増幅器を、0.1~5kHzのバンドパスフィルターと共に、100 $\times$ に設定した。全ての記録を、31~33 $^{\circ}$ Cで実施した。てんかん活動を、Mg²⁺なしのaCSFによって、またはaCSF中50 μ Mの4-APもしくは8.5mMのK⁺の添加によって惹起した。

【0168】

ハミング窓関数を、パワースペクトル解析の前に適用した。パワーを、薬物適用の前、その間およびその後に、順次的な5分間の時間ウィンドウにおいて、0.1~1000Hzの周波数バンドにおけるシグナルの二乗平均平方根値を積分することによって計算した。スライス毎の電極接触変動性を回避するために、パワー値を、各スライスについて薬物適用の前の対照条件に対して標準化し、次いで、統計解析のために異なるスライスにわたって平均した。

【0169】

(実施例 V)

免疫染色およびウエスタンブロット

脳スライスを、免疫染色のために $200\text{ }\mu\text{m}$ の厚さ、ウエスタンブロットのために $400\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで、上記電気生理学プロトコールに従って調製した。一般に、スライスを、室温で1時間回復させ、次いで、2つの群にランダムに分割した。スライスの1つの群を、正常 aCSF 中で 33°C で1時間インキュベートした。スライスの別の群を、 $0\text{ }\text{Mg}^{2+}$ aCSF 中で 33°C で1時間インキュベートした。次いで、スライスを、4%の PFA によって 4°C で一晩固定した。

【0170】

免疫染色

CLC-3 染色のために、スライスを、ブロッキング溶液 (0.1 M の PBS 中、 0.3% の Triton-X ならびに 5% の正常口バおよびヤギ血清) で2時間事前処理し、次いで、CLC-3 一次抗体 (ウサギ、 $1:200$ 、Alomone、ACL-001) と共に72時間インキュベートした。一部のスライスを、対照としてウサギ IgG と共にインキュベートした。 0.01% の Triton-X を有する PBS 中で3回洗浄した後、脳切片を、Cy3 にコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ二次抗体 ($1:500$ 、Jackson ImmunoResearch) と共に、室温で2時間インキュベートした。脳切片を、退色防止マウント溶液 (Invitrogen) と共に、ガラススライド上にマウントした。蛍光画像を、Olympus 共焦点顕微鏡システム (FV1000) で獲得した。各スライスについて、CA3 の少なくとも $2\sim 3$ 個の視野をイメージングした。CA3 錐体層における CLC3 蛍光強度を定量化するために、共焦点画像を、NIH Image J ソフトウェアを使用して解析した。

ウエスタンブロット

【0171】

$400\text{ }\mu\text{m}$ の厚さの海馬スライスを、室温で1時間回復させた後に、2つの群にランダムに分割したが、これらは、免疫染色について上記したものと同じであった。海馬を、氷冷 aCSF 中でばらばらにした。タンパク質を、RIPA 溶解緩衝液 ($1:100$ のフッ化フェニルメチルスルホニルおよび $1:200$ のプロテアーゼ阻害剤を含有) で抽出した。次いで、 $1\times$ ローディング色素緩衝液 (NuPAGE LDS 試料緩衝液 ($4\times$)) および 1% のベーター-ME をタンパク質試料中に添加し、完全に混合する。タンパク質抽出物 ($2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、1レーン当たり $15\text{ }\mu\text{l}$) を、 55°C で20分間煮沸し、 10% ゲル上にロードし、室温でドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を使用して分離した (70 V で50分間、次いで、 90 V に切り替えて2時間)。次いで、ゲルを、PVDF 膜上にブロットした。ブロットを、Tris-緩衝溶液 ($1\times$ TBS) 中 1% の Tween-20 中、 5% のミルクの溶液を使用して、室温で1時間ブロッキングした。CLC3 に対する一次抗体 (ウサギ、 $1:300$ 、Alomone、ACL-001) および GAPDH に対する一次抗体 (ウサギ、 $1:20000$ 、Sigma、G9545) を、 $1\times$ TBS 中に 5% のミルクおよび 1% の Tween-20 を含有するブロッキング溶液中で、 4°C でローテータ上で一晩適用した。次いで、ブロットを、 $1:20000$ 希釈の抗ウサギ二次抗体と共に室温で1.5時間インキュベートし、 $1\times$ TBS を使用して3回洗浄し、次いで、Odyssey スキャナシステム (Li-Cor Biosciences) を用いてシグナルをイメージングした。

【0172】

(実施例 VI)

脳波 (EEG) 記録

新生仔および成体げっ歯類におけるグルコネートの in vivo 抗てんかん効果を試験するために、P8~12 の Sprague-Dawley ラットまたは2月齢の雄性 C57BL/6 マウスを、ペントバルビタールナトリウム (新生仔ラットに対して 50 mg/kg 、成体マウスに対して 100 mg/kg 、腹腔内注射) で深く麻酔した。2つのステンレス鋼スクリュー (直径 1 mm) を、EEG 記録電極として、皮質の上の頭蓋骨中に

挿入し、1つの接地電極ならびに1つの参照電極を、十字縫合の+1.8 mm前、正中線に対して±0.5 mm側方、および皮質表面の下1 mmに位置づけた。全ての電極を、マイクロコネクタに取り付け、歯科用セメントで頭蓋骨上に固定した。手術後に、新生仔ラットを母親の元に戻し、引き続くEEG記録の前に2日間にわたって回復させた。成体マウスを、移植した電極の損傷を予防するために1匹で収容し、EEG記録の前に少なくとも5日間回復させた。

【0173】

EEGのベースラインを、0.5～1時間記録して、動物を環境に順応させた。カイニン酸(2 mg/kg)を、新生仔てんかん誘導のために腹腔内(i.p.)投与した。D-グルコン酸ナトリウム塩(2 g/kg)または0.9%食塩水を、KA投与の10分後にi.p.注射した。ペンチレンテトラゾール(PTZ)を、成体マウスにおいて安定なてんかんバースト活動を誘導するために腹腔内投与し、D-グルコン酸ナトリウム塩(1 g/kgおよび2 g/kg)または0.9%食塩水を、PTZ投与の10分前にi.p.注射した。てんかん様活動を、PTZ注射後1時間にわたってモニタリングした。Qian et al., "Epileptiform response of CA1 neurones to convulsant stimulation by cyclothiazide, kainic acid and pentylenetetrazol in anaesthetized rats" *Seizure* 20:312-319 (2011)。実験後、動物にジアゼパムを注射して、動物を再発性てんかんから保護した。

【0174】

電気生理学的シグナルを、NeuroLog System (Digitimer Ltd、Hearts、UK)を使用することによって、増幅(1000×)およびフィルタリングし(0～500 Hz)、D-Aコンバーター、CED 1401 micro (Cambridge Electronic Design、Cambridge、UK)を介して可視化し、PC中に保存した。

EEGの解析

【0175】

新生仔EEGシグナルにおける異なる周波数構成要素のパワーレベルを、パワースペクトル解析によって明らかにした。パワーを、1～100 Hzの支配的な周波数バンド(EEGバンド)のパワーを積分することによって、1分の時間ウインドウにおいて計算した。

【0176】

成体EEGシグナルを、spike 2ソフトウェア(CED 1401のための解析プログラム、Cambridge、UK)によって解析した。EEGスパイクは、ベースライン振幅の2倍を上回ると定義し、EEGバーストは、高い周波数(>1 Hz)および10秒よりも長く持続する高い振幅の複数のスパイクを有すると定義した。スパイクまたはバーストの潜時は、PTZ注射から最初のスパイクまたは最初のバーストのいずれかまでの時間として定義した。

【0177】

(実施例VII)

発作行動試験

雄性マウスを、以下の3つの群に分割した：ビヒクル対照群(食塩水、n=9)、1 g/kgのD-グルコン酸ナトリウム群(n=10)、および2 g/kgのD-グルコン酸ナトリウム群(n=11)。PTZ(50 mg/kg)を、薬物処置の1時間後に腹腔内投与した。PTZ注射後、行動を、1時間にわたってモニタリングおよび観察した。発作行動を、Racineスコアに従って分類した：ステージ0、応答なし；ステージ1、顔面のピクつき；ステージ2、うなずき；ステージ3、前肢間代性、直立した尾；ステージ4、前肢間代性を伴って立ち上がる；ステージ5、立ち上がりおよび転倒、ジャンプ、全般間代性発作、全般間代性および強直性発作または死。Racine et al., "Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms" *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:295-299 (1972)。

【0178】

(実施例 V I I I)

データ解析

データを、平均 $\pm$ s . e . m . として示した。スチューデント t 検定（対応のあるまたは対応のない）を、2 群比較のために実施し、 χ^2 検定を使用して、2 つの群間のパーセンテージの差異を比較した。複数の群中での比較のために、事後検定と共に一元配置 A N O V A を使用した。統計的有意性を、 $P < 0 . 0 5$ に設定した。

【0179】

(実施例 I X)

グルコースオキシダーゼによるてんかん様活動の低減

この実施例は、グルコースオキシダーゼがてんかん様活動を有効に阻害することができることを実証する予備データを示している。

【0180】

海馬スライスを、新生仔マウスから調製した。てんかん様活動を、 Mg^{2+} なしの a C S F（人工脳脊髄液）または高 K^+ （8 . 5 m M）a C S F によって惹起した。グルコースオキシダーゼ（G O x）を、スライスに急性適用したか、またはスライスへの適用前に a C S F 中で 9 0 分間にわたって事前インキュベートした。

【0181】

データは、グルコースオキシダーゼが、0 Mg^{2+} + a C S F によって誘導されたてんかん様活動を用量依存的に阻害したことを示している。図 1 8 A。グルコースオキシダーゼは、高 K^+ によって誘導されたてんかん様活動もまた阻害することが見出された。図 1 8 B。

【0182】

4 m M から 2 0 m M までの範囲の異なるグルコース濃度もまた試験した。1 単位のグルコースオキシダーゼ / m l を提供した場合に、てんかん様活動の阻害が観察された。図 1 9 A。対照的に、0 . 1 単位グルコースオキシダーゼ / m l の急性適用は、顕著な効果を有さなかった。図 1 8 A、上の列。しかし、9 0 分間の事前インキュベーション後、0 . 1 U / m l のグルコースオキシダーゼもまた、てんかん様活動を阻害した。図 1 9 B。

【0183】

これらの結果は、グルコースオキシダーゼが、抗てんかん薬として有用であり得ることを示唆した。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 - 1】

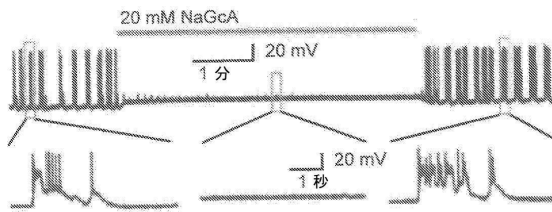


FIG. 1A

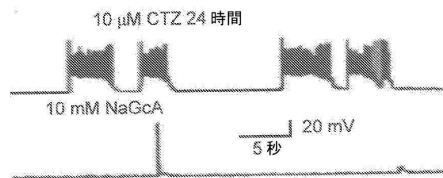


FIG. 1B

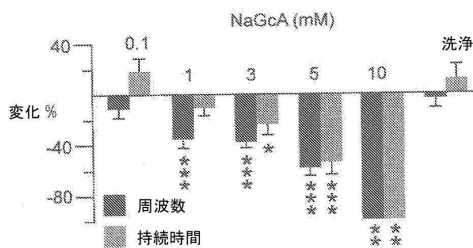


FIG. 1C

【図 1 - 2】

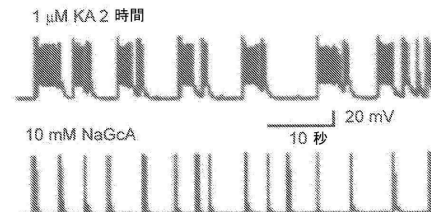


FIG. 1D

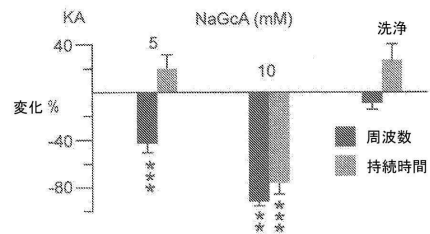


FIG. 1E

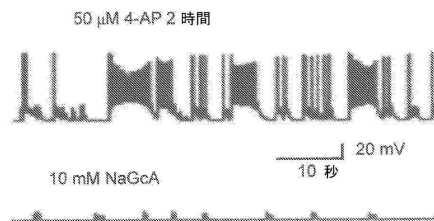


FIG. 1F

【図 1 - 3】

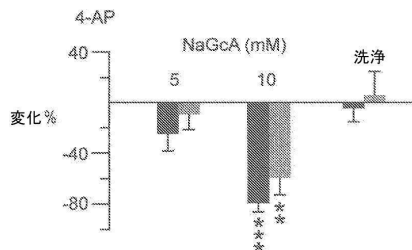


FIG. 1G

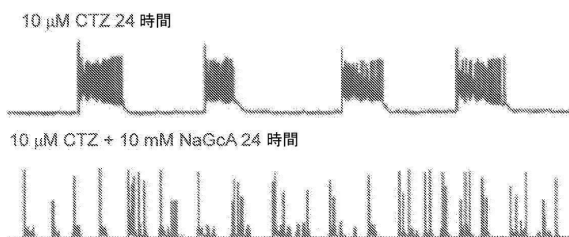


FIG. 1H

【図 1 - 4】

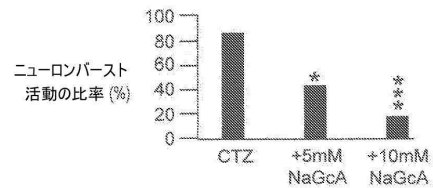


FIG. 1I(a)

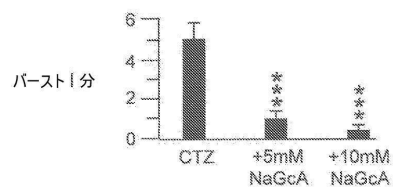


FIG. 1I(b)

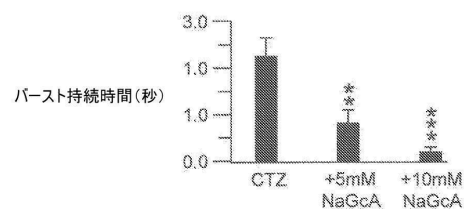


FIG. 1I(c)

10

20

30

40

50

【図 1 - 5】

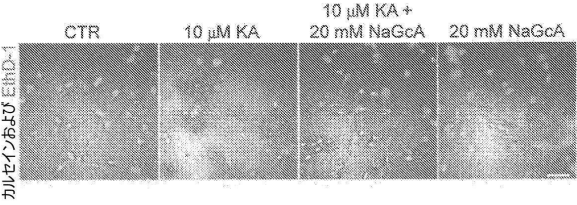


FIG. 1J

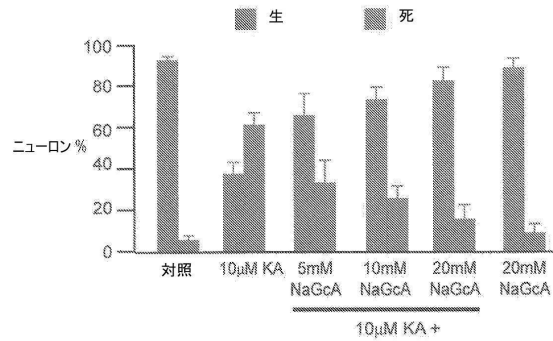
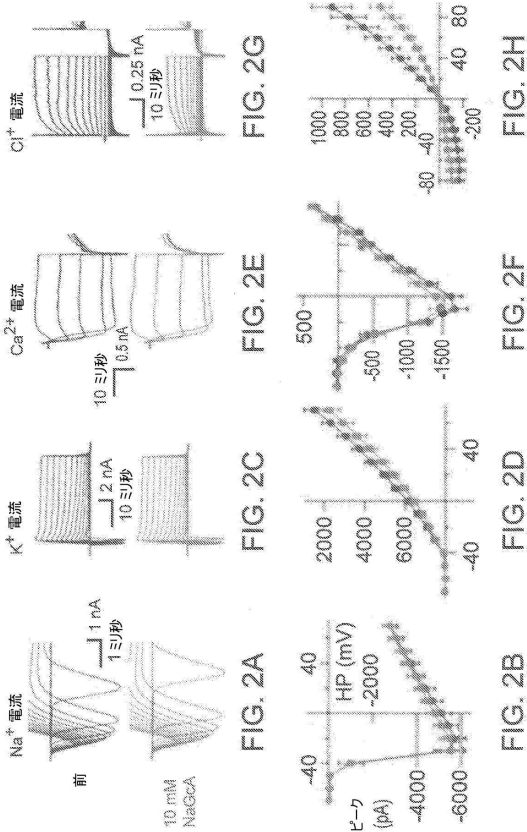


FIG. 1K

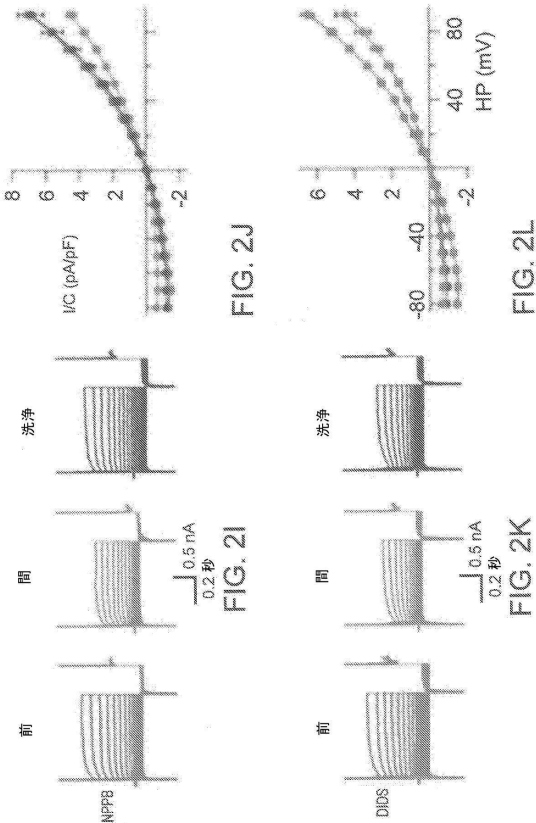
【図 2 - 1】



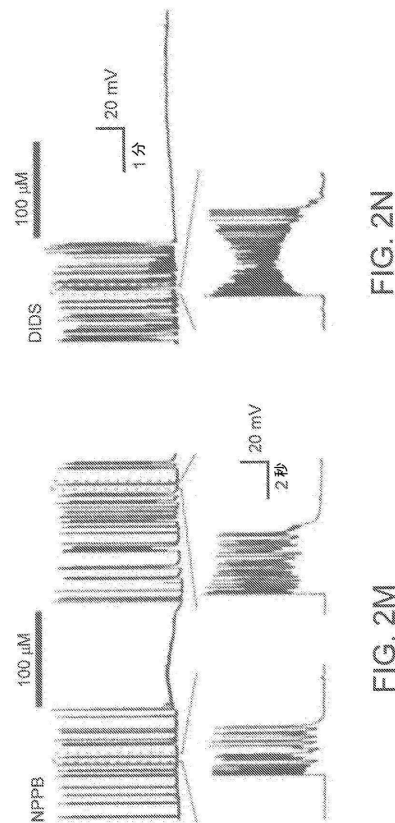
10

20

【図 2 - 2】



【図 2 - 3】

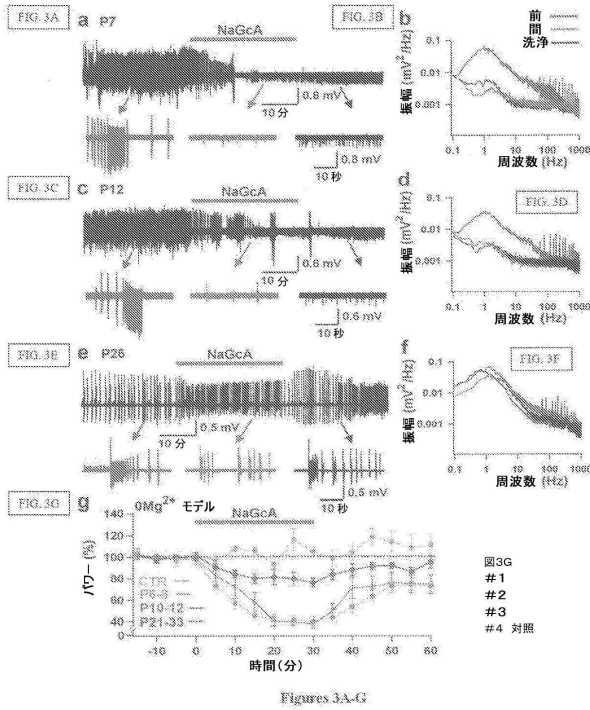


30

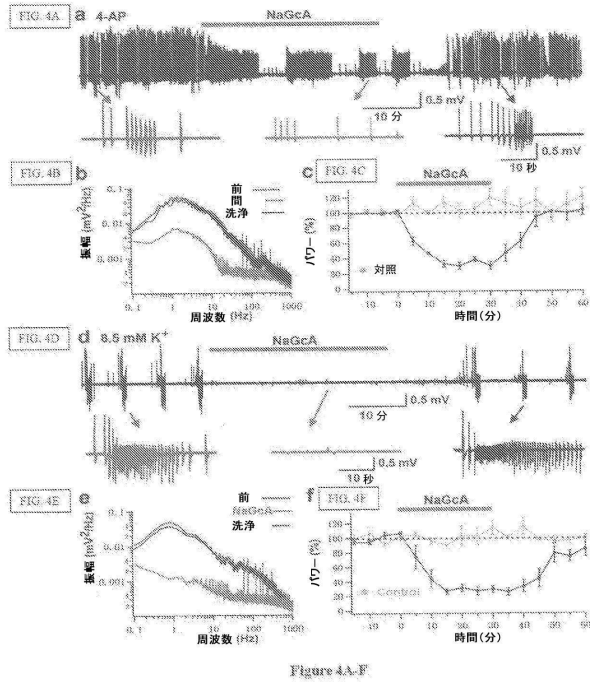
40

50

【図 3】



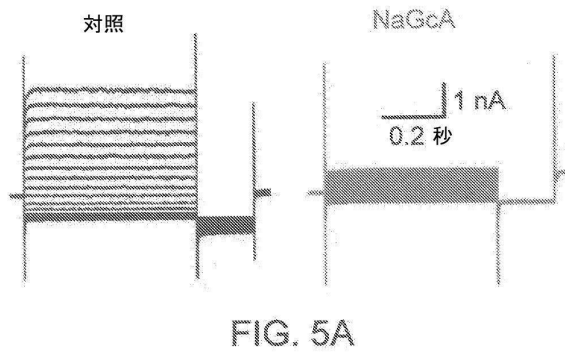
【図 4】



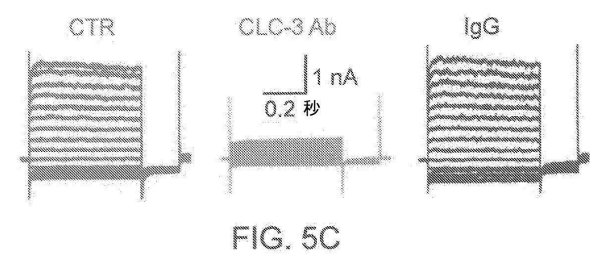
10

20

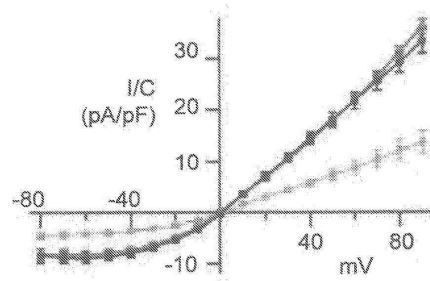
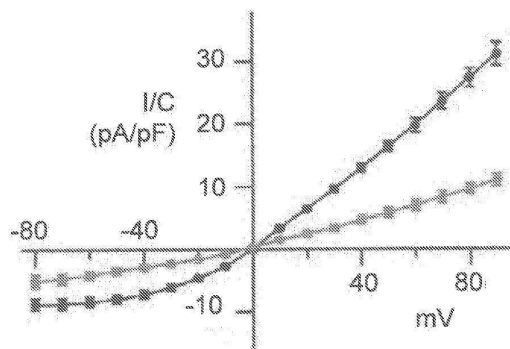
【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



30



40

FIG. 5B

FIG. 5D

50

【図 5 - 3】

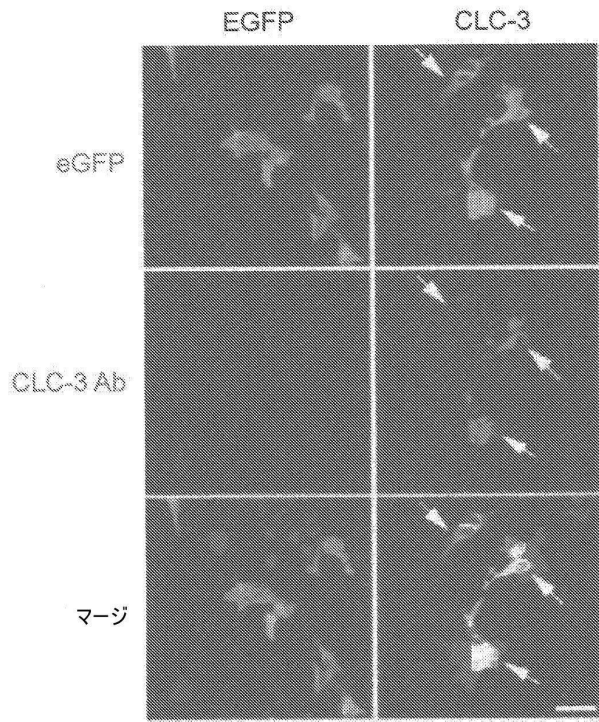


FIG. 5E

【図 5 - 4】

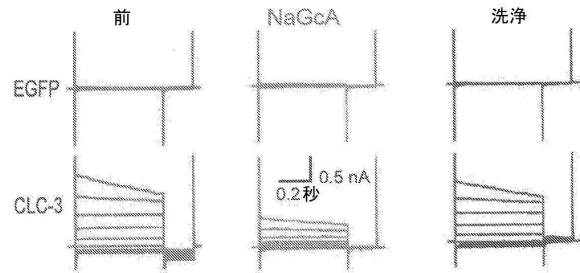


FIG. 5F

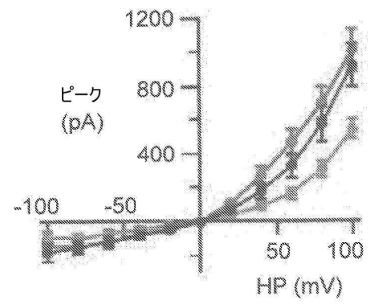
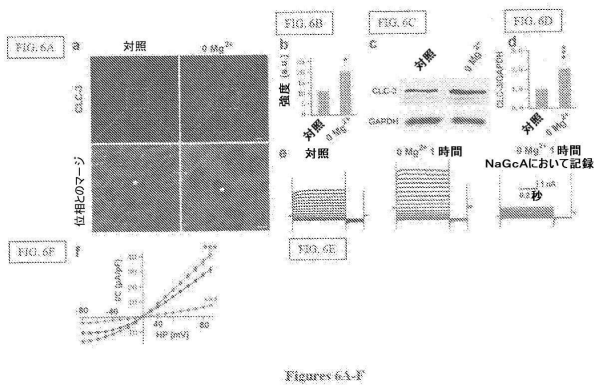


FIG. 5G

【図 6】



Figures 6A-F

【図 7 - 1】

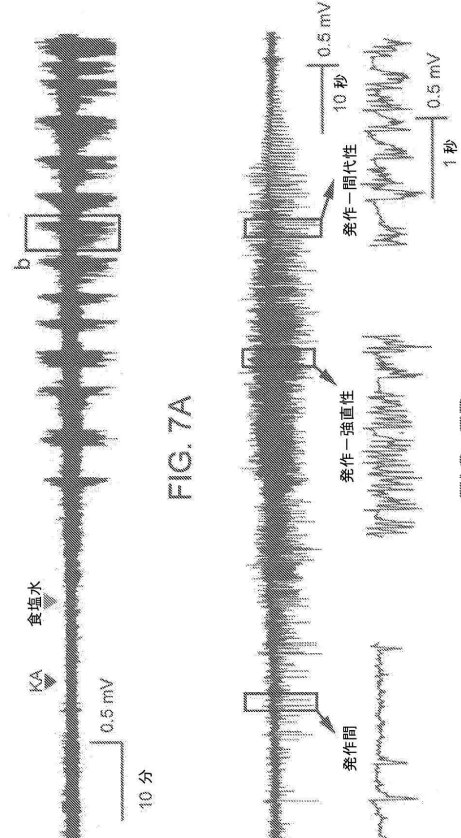


FIG. 7A

FIG. 7B

10

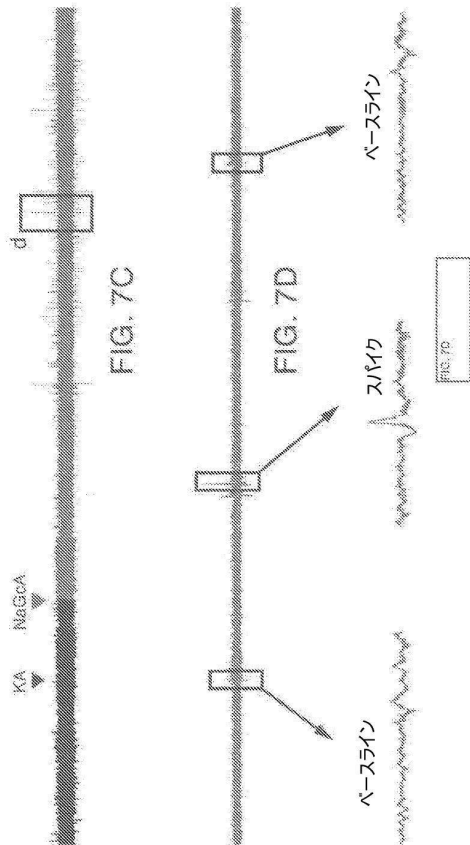
20

30

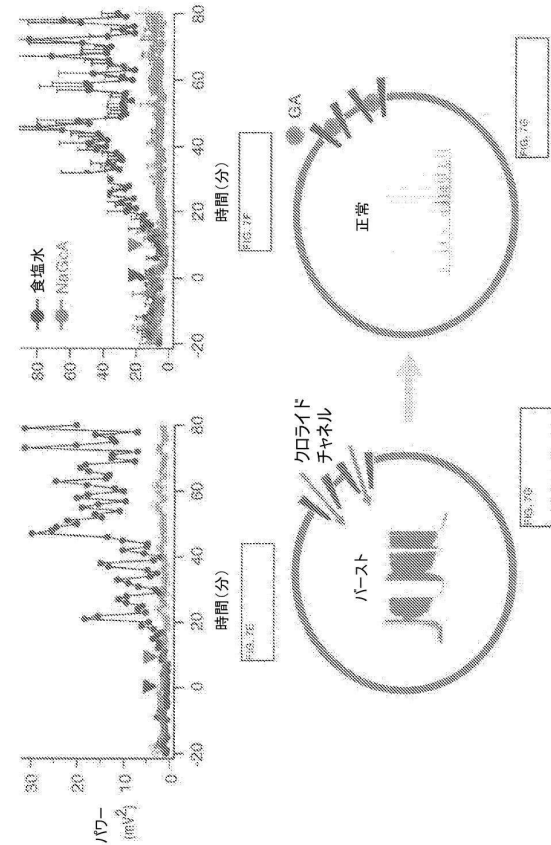
40

50

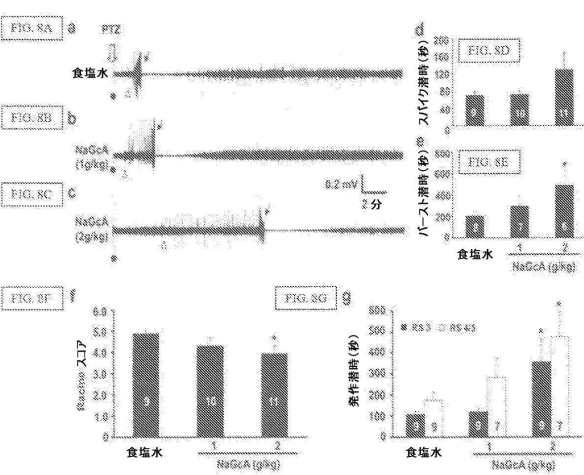
【図 7-2】



【図 7-3】



【図 8】



【図 9】

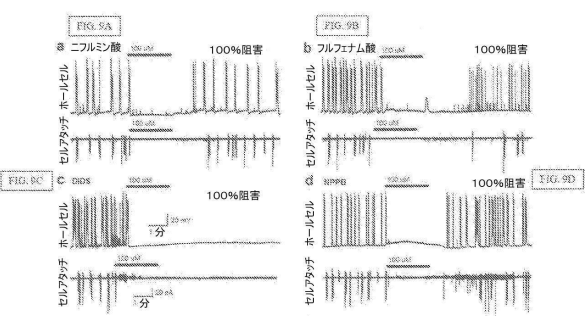


Figure 9A-D

Figures 8A-G

10

20

30

40

50

【図10A-10C】

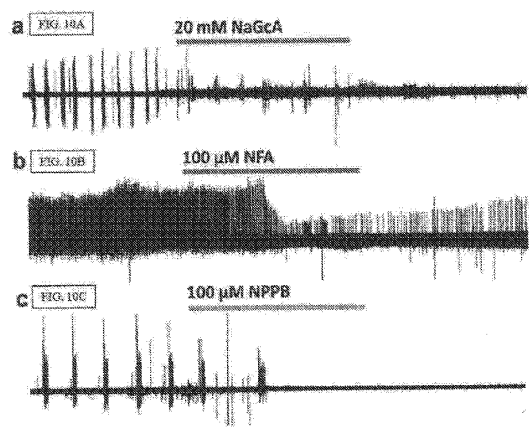


Figure 10A-10C

【図11-1】

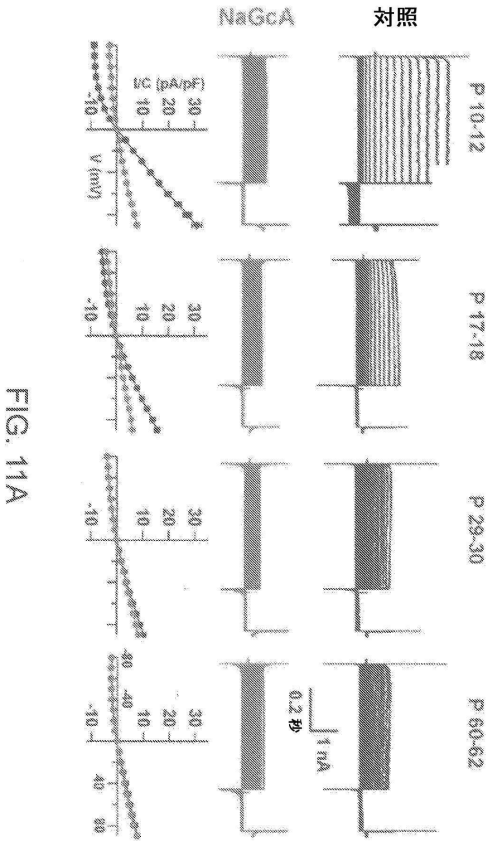


FIG. 11A

【図11-2】

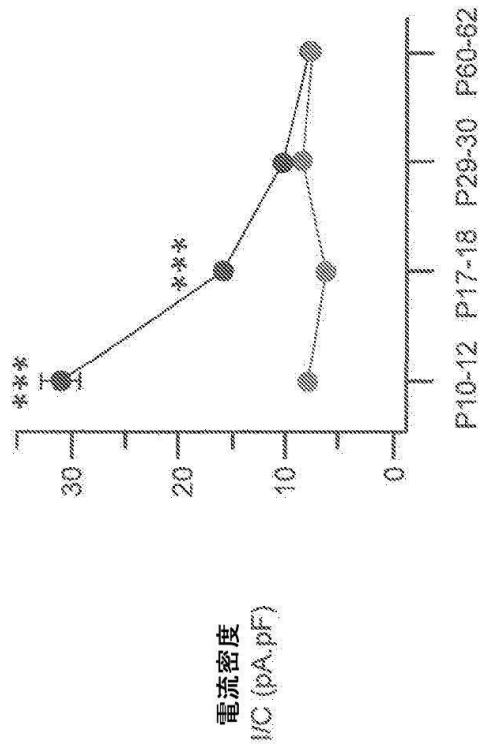


FIG. 11B

【図11-3】

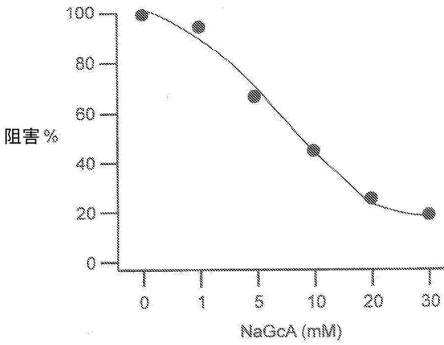


FIG. 11C

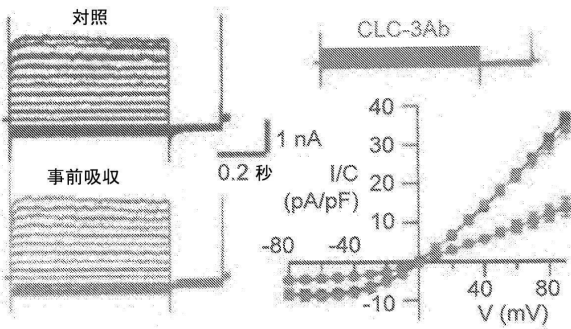


FIG. 11D

10

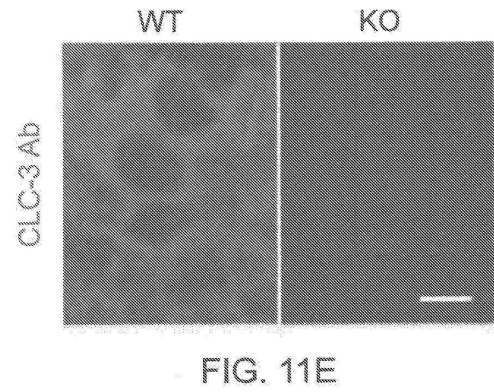
20

30

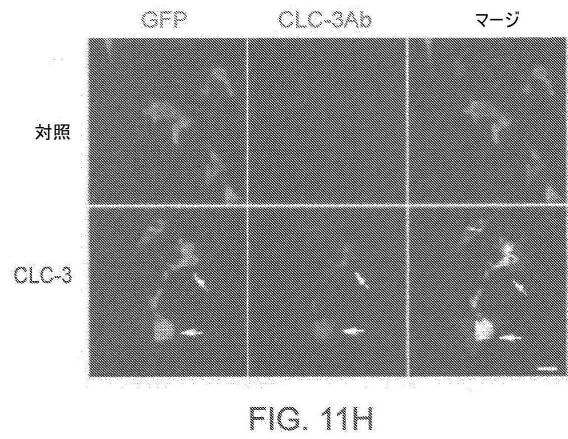
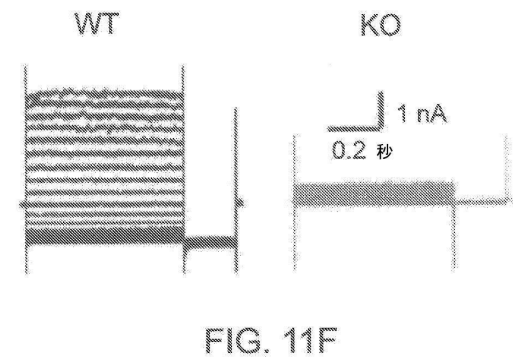
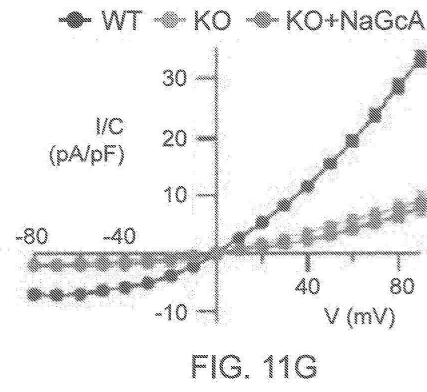
40

50

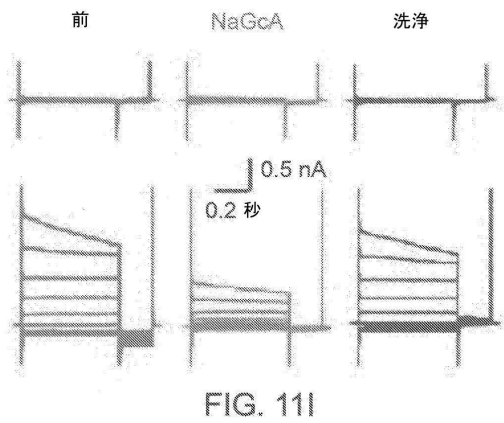
【図 1 1 - 4】



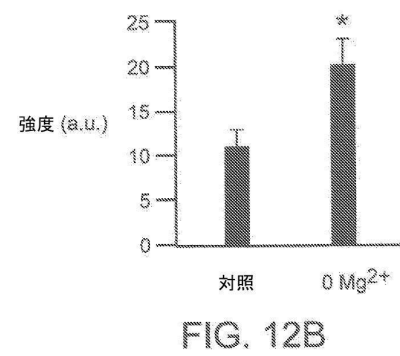
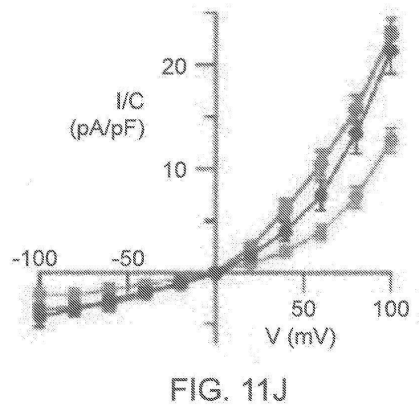
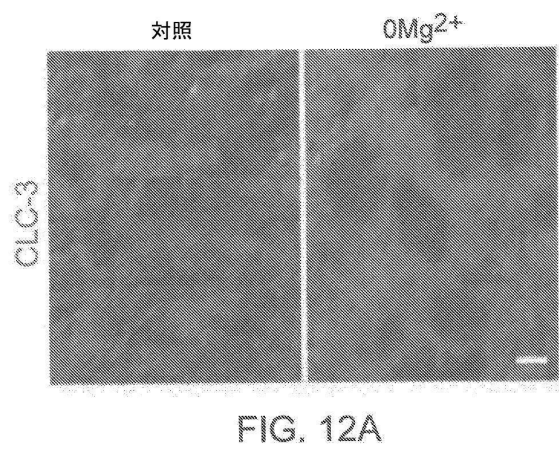
【図 1 1 - 5】



【図 1 1 - 6】



【図 1 2 - 1】



10

20

30

40

50

【図 1 2 - 2】

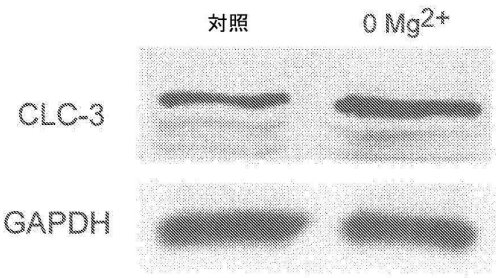


FIG. 12C

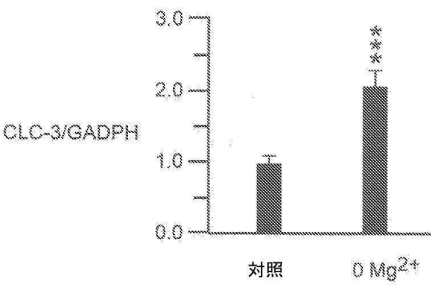


FIG. 12D

【図 1 2 - 3】

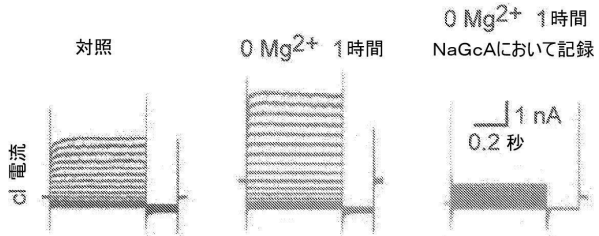


FIG. 12E

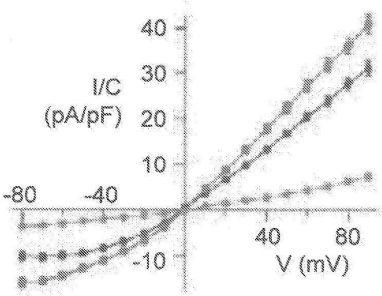


FIG. 12F

【図 1 2 - 4】

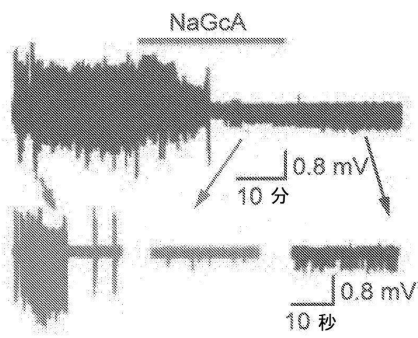


FIG. 12G

【図 1 2 - 5】

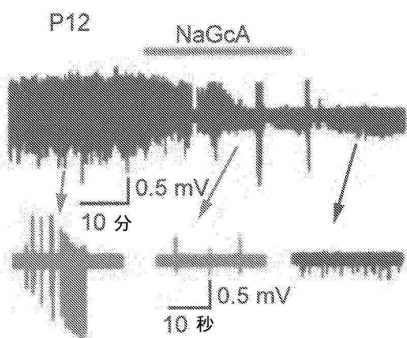


FIG. 12I

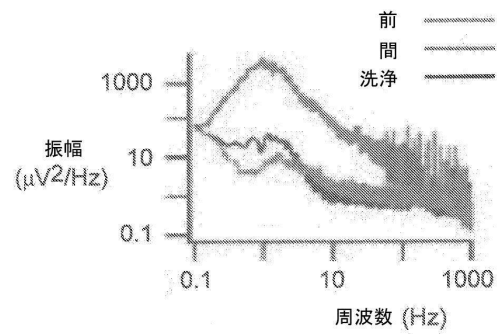


FIG. 12H

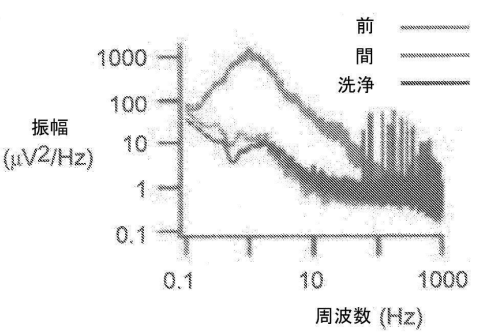


FIG. 12J

10

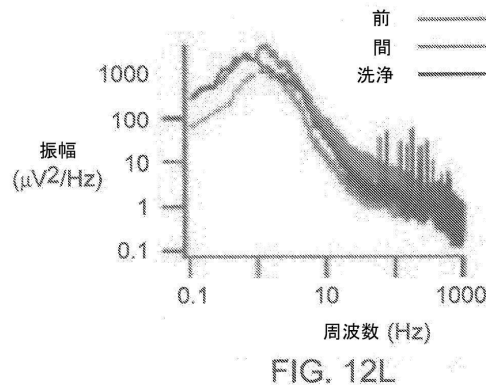
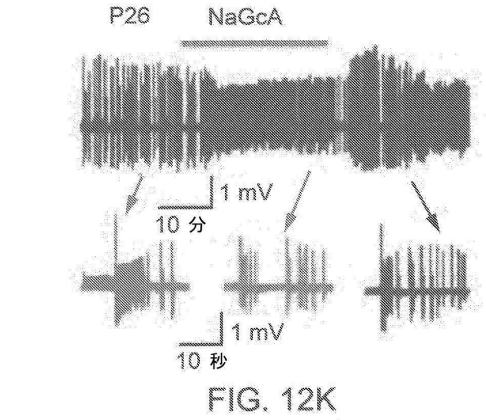
20

30

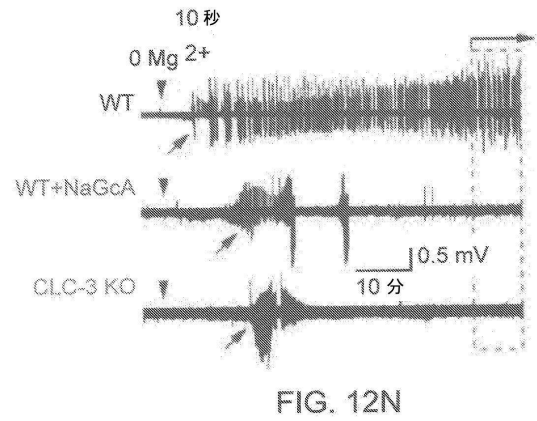
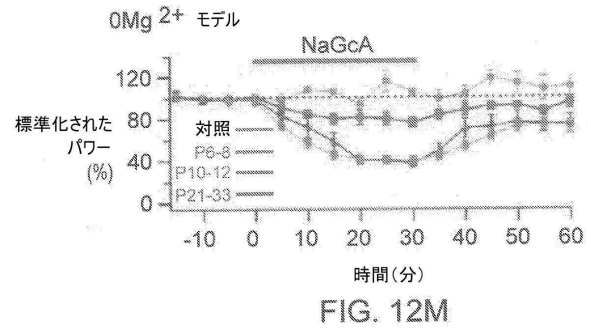
40

50

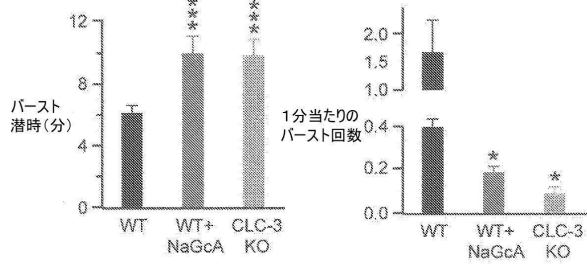
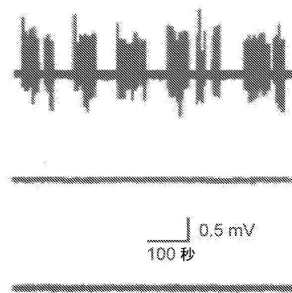
【図 1 2 - 6】



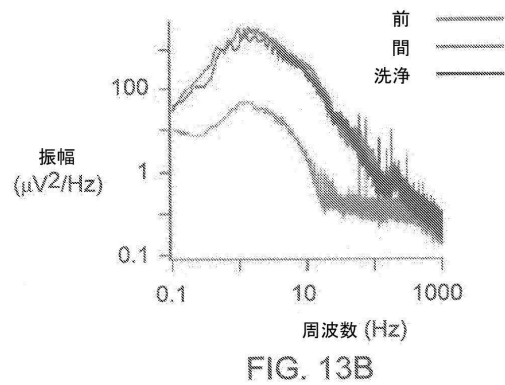
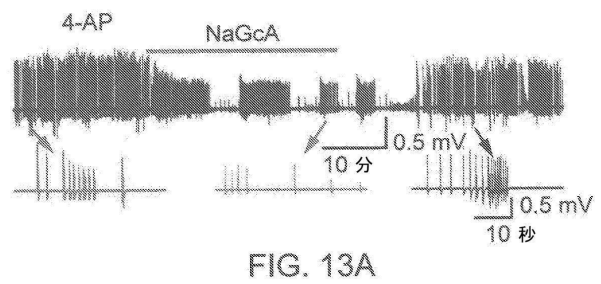
【図 1 2 - 7】



【図 1 2 - 8】



【図 1 3 - 1】



10

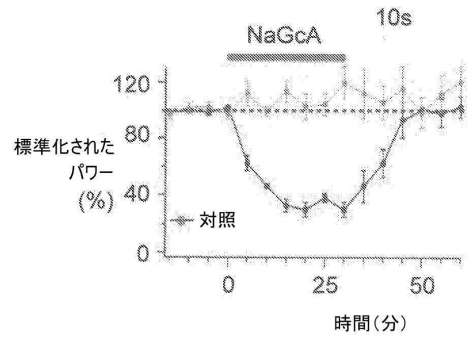
20

30

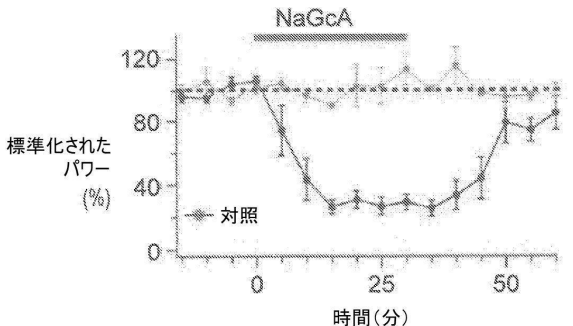
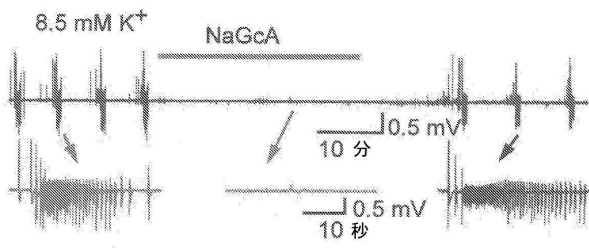
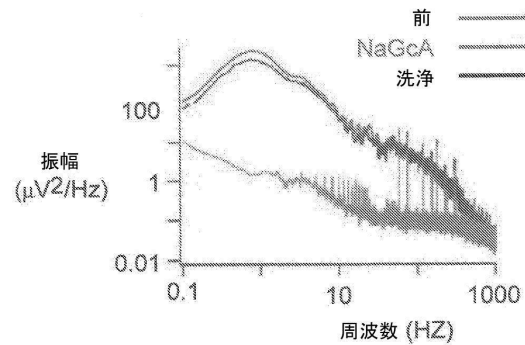
40

50

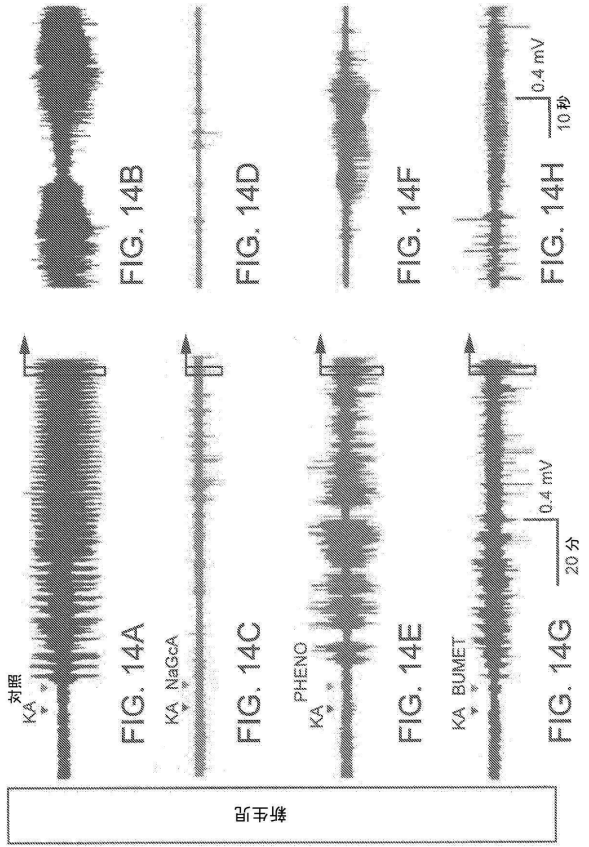
【図 13 - 2】



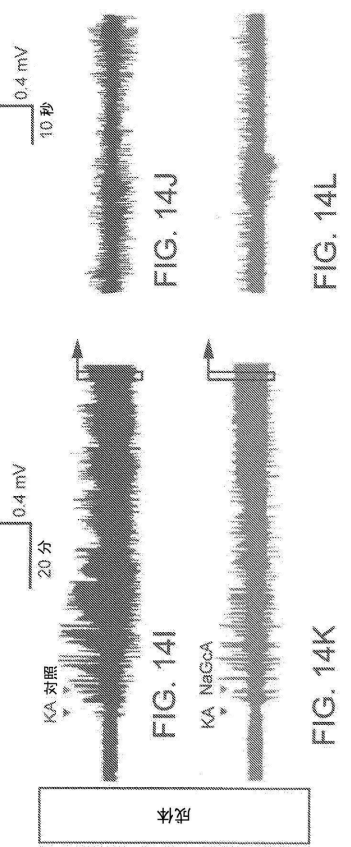
【図 13 - 3】



【図 14 - 1】



【図 14 - 2】



10

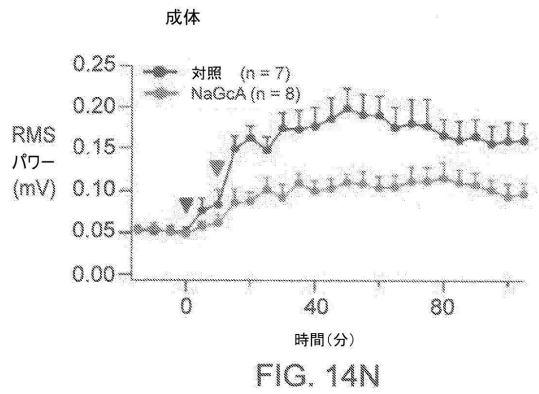
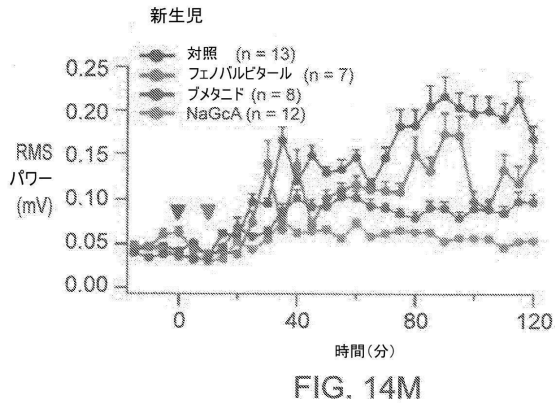
20

30

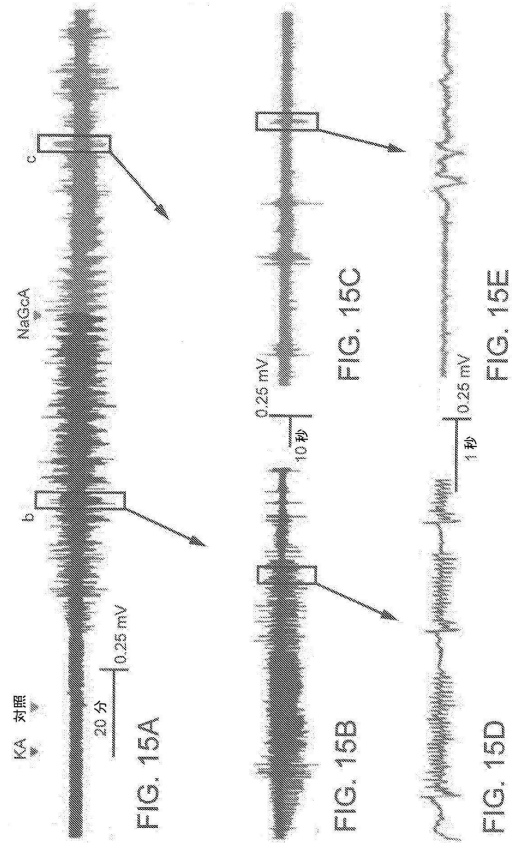
40

50

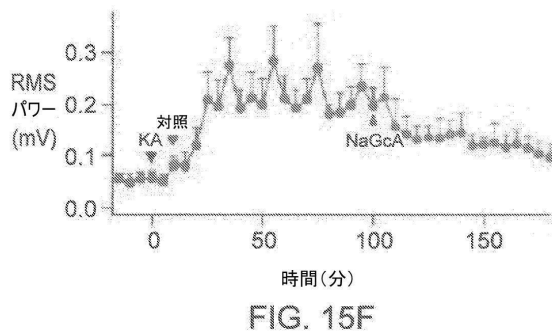
【図 14-3】



【図 15-1】



【図 15-2】



【図 16-1】

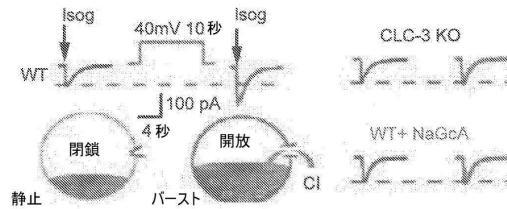
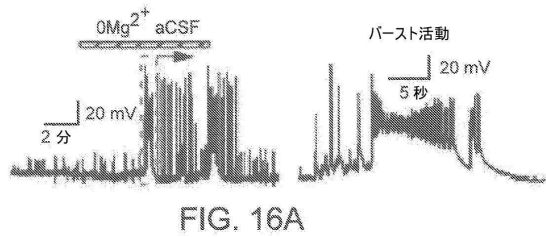


FIG. 16B

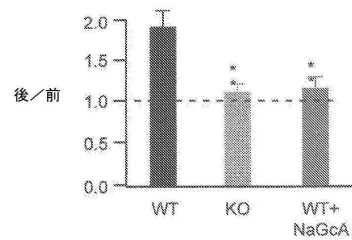


FIG. 16C

【図 16-2】

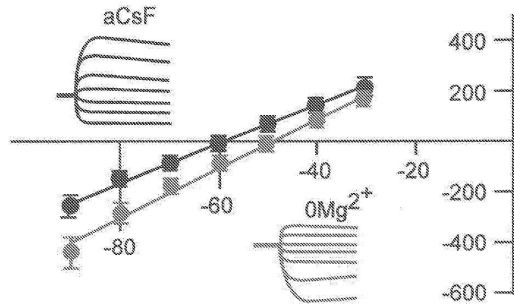


FIG. 16D

【図 16-3】

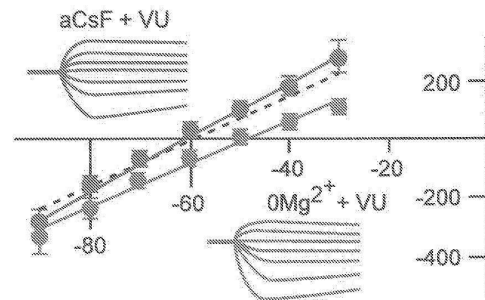


FIG. 16F

10

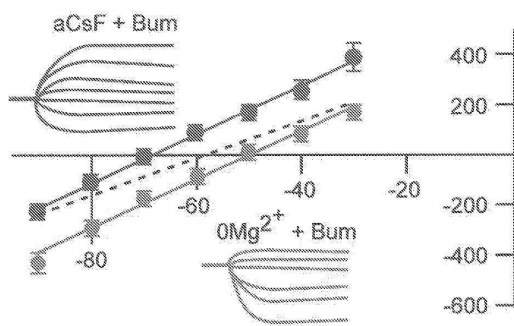


FIG. 16E

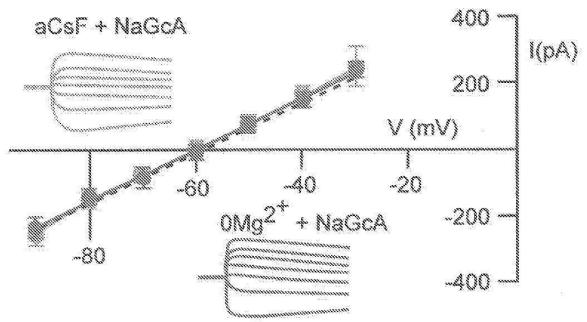


FIG. 16G

20

【図 16-4】

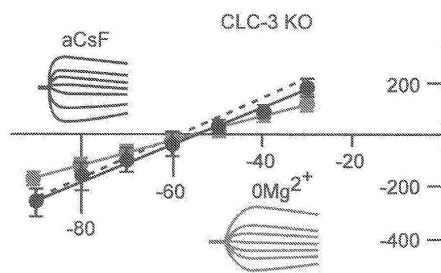


FIG. 16H

【図 16-5】

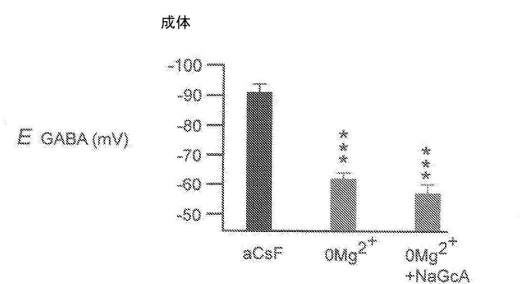


FIG. 16J

30

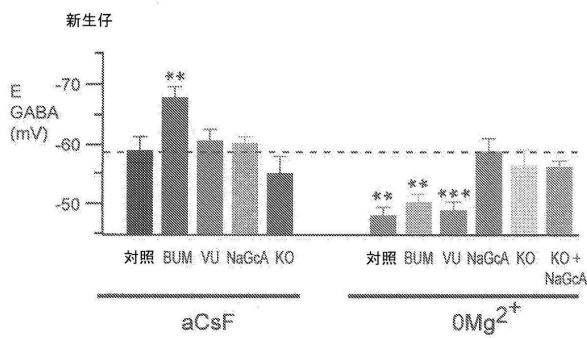


FIG. 16I



FIG. 16K

40

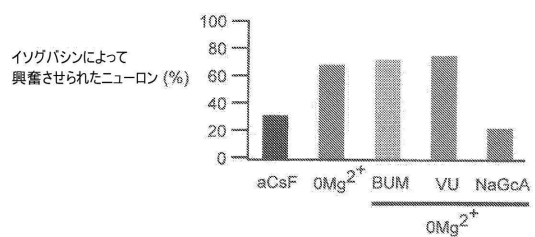
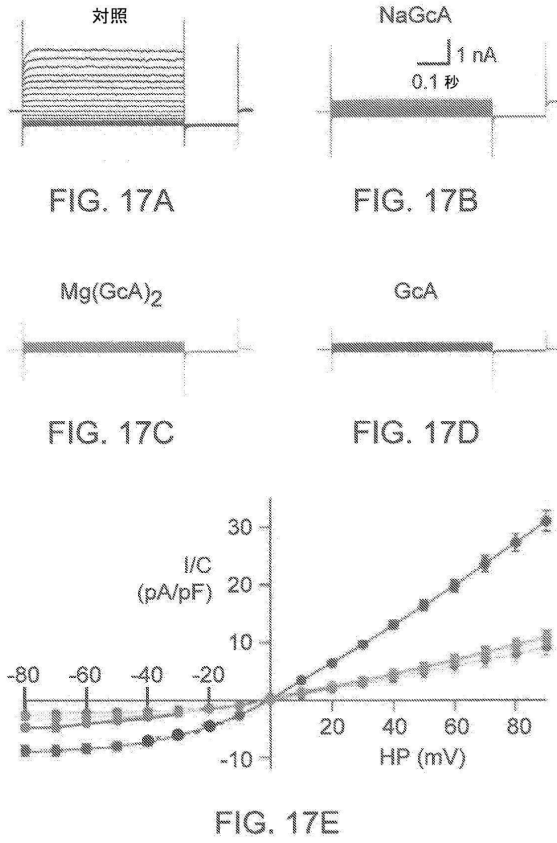


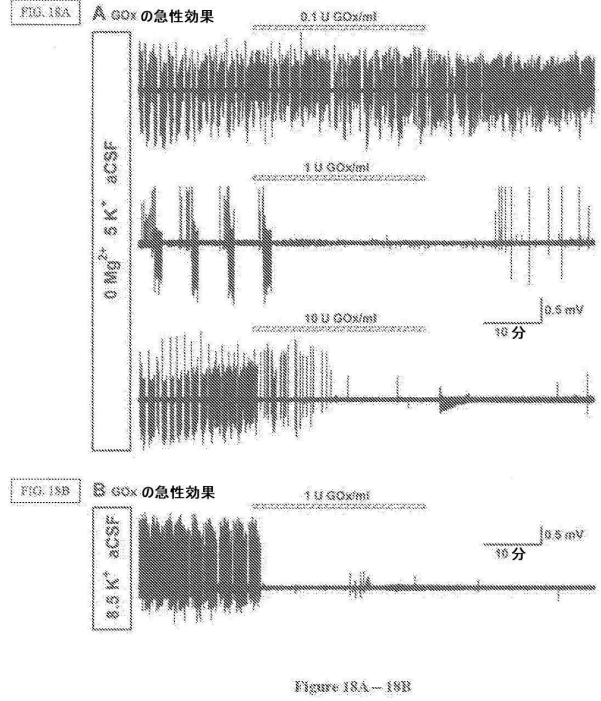
FIG. 16L

50

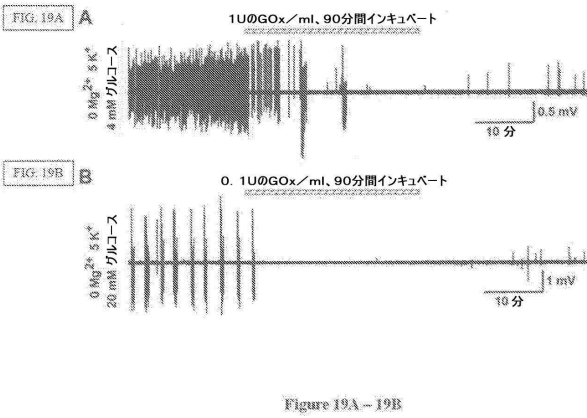
【図 17】



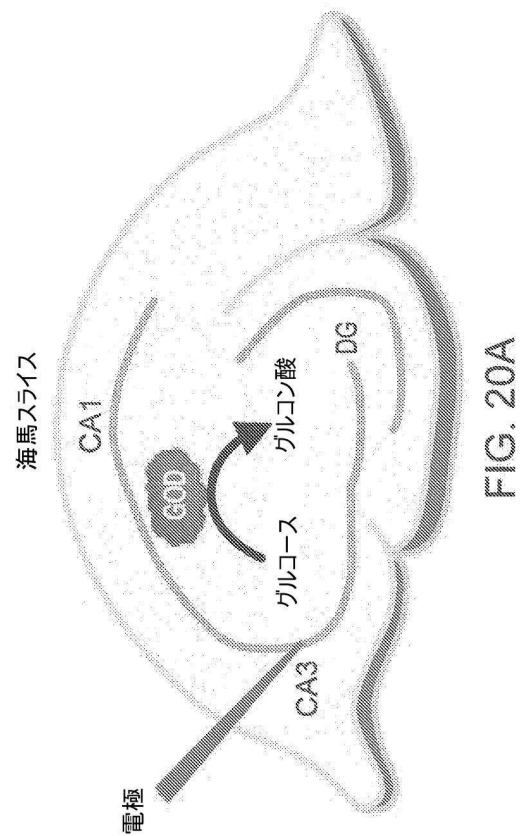
【図 18】



【図 19】



【図 20 - 1】



10

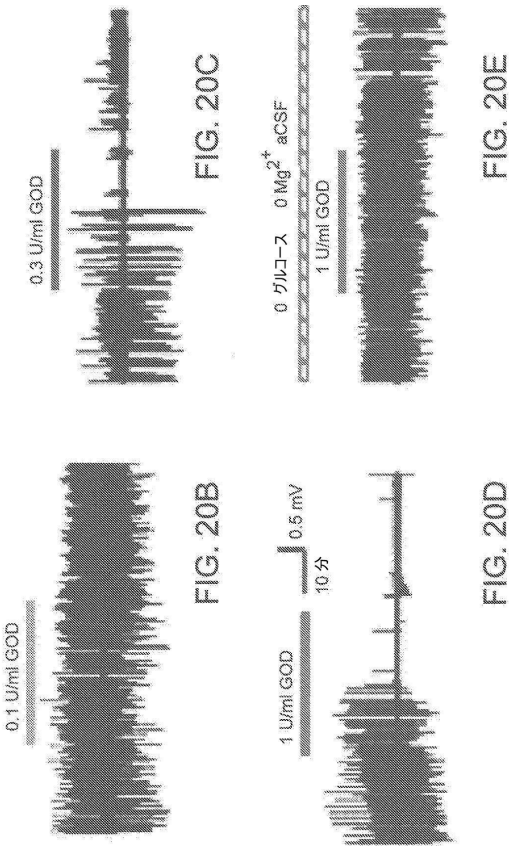
20

30

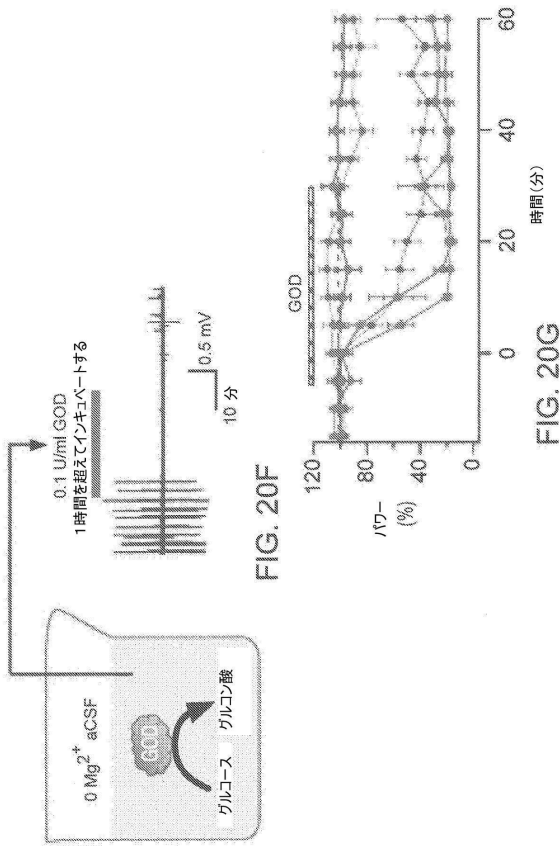
40

50

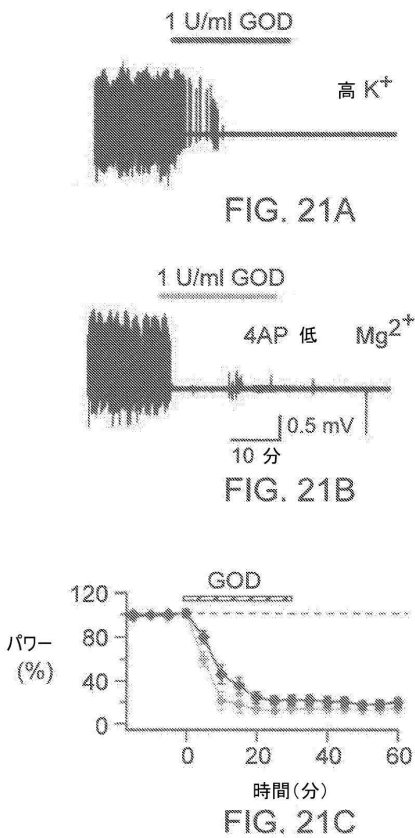
【図 20-2】



【図 20-3】



【図 21】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 チェン, ゴン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 16801, ステート カレッジ, オータムウッド ドライブ
2354
(72)発明者 ウー, ジェン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 16803, ステート カレッジ, ダブリュー. アーロン ド
ライブ 950, アpartment ディー4
審査官 深草 亜子
(56)参考文献 米国特許出願公開第2016/0338980 (US, A1)
特表2016-517885 (JP, A)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K 38/00-38/58
A61K 45/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)