

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-530291

(P2016-530291A)

(43) 公表日 平成28年9月29日 (2016.9.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/4415 (2006.01)	A 6 1 K 31/4415	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2016-539645 (P2016-539645) (86) (22) 出願日 平成26年9月9日 (2014.9.9) (85) 翻訳文提出日 平成28年5月9日 (2016.5.9) (86) 国際出願番号 PCT/IB2014/002398 (87) 国際公開番号 W02015/033224 (87) 国際公開日 平成27年3月12日 (2015.3.12) (31) 優先権主張番号 61/991, 351 (32) 優先日 平成26年5月9日 (2014.5.9) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 14/038, 258 (32) 優先日 平成25年9月26日 (2013.9.26) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 61/875, 384 (32) 優先日 平成25年9月9日 (2013.9.9) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 510004918 アルコブラ、リミテッド ALCOBRA LTD. イスラエル国テル、アビブ、ロスチャイルド、ブルバード、65 (74) 代理人 100091982 弁理士 永井 浩之 (74) 代理人 100091487 弁理士 中村 行孝 (74) 代理人 100082991 弁理士 佐藤 泰和 (74) 代理人 100105153 弁理士 朝倉 悟 (74) 代理人 100120617 弁理士 浅野 真理
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脆弱 X 症候群および関連障害の処置方法

(57) 【要約】

本発明は、脆弱 X 症候群、および自閉症スペクトラム障害などの関連障害の徴候または症状を緩和する方法を提供する。

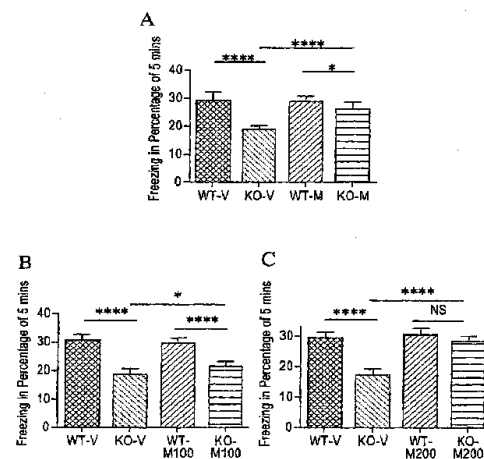


Fig.1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

脆弱 X 症候群または関連障害の症状を処置または緩和する方法であって、それを必要とする対象者にメタドキシンを含んでなる組成物を投与することを含んでなる、方法。

【請求項 2】

100 ~ 3000 mg の間の総一日用量のメタドキシンを投与することを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記メタドキシンが毎日、1 日おきに、または毎週投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記メタドキシンが 1 日当たり 1、2、または 3 種類の剤形で投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記メタドキシンが持続放出経口剤形で投与され、前記メタドキシンが徐放形態と即時放出形態の組合せとして処方される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

(a) 徐放形態が少なくとも 8 時間の前記メタドキシンの持続放出を提供し、かつ、

(b) 徐放メタドキシンと即時放出メタドキシンの相対比が約 60 : 40 ~ 80 : 20 の間である、
請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記徐放メタドキシンと前記即時放出メタドキシンの相対比が約 65 : 35 である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記症状が学習障害または社会的行動障害である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象者が脆弱 X 症候群または自閉症スペクトラム障害を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記関連障害が自閉症スペクトラム障害である、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願**

本出願は、2013 年 9 月 9 日出願の仮出願第 US N 61 / 875, 384 号、2013 年 9 月 26 日出願の第 US N 14 / 038258 号、および 2014 年 5 月 9 日出願の仮出願第 US N 61 / 991, 351 号の優先権および利益を主張するものであり、これらの内容はそれぞれそれらの全内容が引用することにより本明細書の一部とされる。

【0002】**発明の分野**

本発明は一般に、脆弱 X 症候群および関連障害の症状を処置または緩和する方法に関する。

【背景技術】**【0003】**

脆弱 X 症候群 (fragile X Syndrome) (FXS) は、その名称が意味するように、マップ位置 Xq 27.3 で中期染色体の同腕染色分体ギャップとして表される脆弱部位に関連する。脆弱 X 症候群は、X 染色体上に位置する脆弱 X 精神遅滞 1 (FMR1) 遺伝子の 5' 非翻訳領域の突然変異によって引き起こされる遺伝的な障害である。FXS を引き起こ

10

20

30

40

50

突然変異は、脆弱 X 精神遅滞遺伝子 FMR1 中の CGG リピートに関連する。ほとんどの健常者では、CGG リピートの総数は 10 未満 ~ 40 の範囲であり、平均は約 29 である。脆弱 X 症候群では、この CGG 配列が 200 ~ 1,000 回を超えて繰り返される。対象者が約 200 を超える CGG リピートを有する場合、その脆弱 X 遺伝子は過剰にメチル化されるようになり、遺伝子は沈黙する (silences)。結果として、脆弱 X 精神遅滞タンパク質 (FMRP) が産生されないか、または低レベルでしか産生されず、対象者は FXS の兆候を示す。

【0004】

FMR1 遺伝子の前変異拡大 (55 ~ 200 CGG リピート) は一般集団で頻繁に見られ、推定保有率は女性 259 人に 1 人、男性 812 人に 1 人である。前変異の保有者は、不安などの感情問題が共通しているが、一般に正常な IQ を有する。高齢男性の前変異保有者 (50 歳以上) は、進行性の企図振戦および運動失調を発症する。これらの運動障害は、多くの場合、記憶喪失、不安、および実行機能の欠陥、引きこもりまたは過敏性行動、および認知症を含む進行性の認知・行動問題を伴う。この障害は脆弱 X 関連振戦 / 運動失調症候群 (FXTAS) と呼ばれている。FXTAS を有する対象者の磁気共鳴画像法から、中小脳脚および隣接する小脳白質における T2 強調シグナル強度の増強が明らかである。

10

【0005】

FXS は、浸透率の低い X 連鎖優性障害として分離している。いずれの性別でも、脆弱 X 突然変異を有する場合には知的障害を示し得るが、重篤度は様々である。FXS を有する小児および成人は、自閉症様の特徴および傾向を含む、様々な程度の知的障害または学習障害および行動・感情問題を有する。FXS を有する幼児は、座り方、歩き方および話し方の学習などの発達のマイルストーンに遅れを有するケースが多い。罹患小児は頻繁なかんしゃく、注意欠陥、頻繁な発作 (例えば、側頭葉発作) を有するケースがあり、多くの場合、高い不安を示し、打ちのめされやすく、感覚過覚醒障害、消化管障害を示すことがあり、会話障害および手をひらひらさせる、手を噛むなどの異常行動を示す場合がある。

20

【0006】

FXS は、被験者由来のサンプル (例えば、血液サンプル、口内サンプル) に対して行われる確立された遺伝子検査によって診断することができる。この検査は、CGG リピートの数に基づき被験者の FMR1 遺伝子に突然変異または前変異が存在するかどうかを判定する。

30

【0007】

FXS を有する対象者は自閉症も有する場合がある。自閉症と診断された全小児の約 5 % が FMR1 遺伝子に突然変異を有し、脆弱 X 症候群 (FXS) も有する。自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、FXS を有する男性のおよそ 30 %、女性の 20 % に見られ、FXS 者のさらに 30 % が、ASD 診断を持たずに自閉症症状を示す。知的障害が FXS の顕著な特徴であるが、FXS 者は、軽度症例では内気、目を合わさない、および社交不安から、重度罹患では手をひらひらさせる、手を噛むおよび保続的会話までにわたる自閉症的特徴を示すケースが多い。FXS 者は、注意欠陥および多動、発作、感覚刺激に対する過敏性、強迫性行動および消化管機能の変化などの自閉症に関連する他の症状も示す。FMR1 突然変異は、単一のタンパク質 (FMRP) の発現を抑制するか、または大幅に低下させる。FMRP の不在下での脳発達は、FXS の主な症状を生じさせると思われる。

40

【0008】

中核症状に加え、FXS を有する小児は、易刺激性、攻撃および自傷行為などの重篤な行動障害を有するケースが多い。FXS を有する男性 (8 ~ 24 歳) の最近の研究では、2 か月の観察期間での自傷行為は被験者の 79 %、攻撃行動は 75 % と報告された。

【0009】

FXS を有するヒトに対する現在利用可能な治療計画としては、例えば、行動修正ならびに抗鬱薬および抗精神病薬を含む一定範囲の投薬 (FXS の治療としては FDA により承認されていない) による処置が含まれる。認知行動療法は、FXS および自閉症者にお

50

いて言語および社会化を改善するために使用されている。近年では、非定型抗精神病薬リスペリドンによる薬理学的処置が、自閉症者の治療において非薬理学的アプローチを増強するために一般に使用されている。自閉症小児におけるリスペリドンの作為化プラセボ対照試験では、異常行動チェックリストおよび臨床全般印象改善の易刺激性サブスケールに有意な改善が示された(McCracken, J. T., et al., N. Engl. J. Med. 347:314-321 (2002))。しかしながら、有害事象は、体重増加、食欲増加、疲労、傾眠、目眩、および流涎を含んだ。社会的孤立およびコミュニケーションはリスペリドンの投与により改善されず、錐体外路系症状およびジスキネジアなどの有害な副作用は自閉症の小児においてリスペリドンと関連付けられた。現行の治療計画は有効でない場合が多いか、または特に抗精神病薬の場合には、長期使用により望ましくない副作用を生じるおそれがあるので、新たな治療の必要がある。

10

【発明の概要】

【0010】

種々の面において、本発明は、必要とする対象者にメタドキシンを含んでなる組成物を投与することにより脆弱X症候群または関連障害の症状を治療または緩和する方法を提供する。症状は例えば、学習障害または社会的行動障害である。対象者は脆弱X症候群または自閉症スペクトラム障害を有する。関連障害は自閉症スペクトラム障害である。

【0011】

いくつかの面では、100～3000mgの間の総一日用量のメタドキシンが投与され、メタドキシンは毎日、1日おきに、または毎週(weekly)投与される。

20

【0012】

場合により、メタドキシンは、1日当たり1、2、または3種類の剤形(one, two, or three dosage forms)で投与される。いくつかの実施態様では、メタドキシンは、持続放出経口剤形(a sustained release oral dosage form)で投与され、この場合、メタドキシンは徐放形態と即時放出形態の組合せ(a combination of slow release and immediate release forms)として処方される。

【0013】

例えば、徐放形態は、少なくとも8時間のメタドキシンの持続放出を提供する。徐放メタドキシンと即時放出メタドキシンの相対比(the relative proportion of the slow release metadoxine to the immediate release metadoxine)は、約60:40～80:20の間である。好ましくは、徐放メタドキシンと即時放出メタドキシンの相対比は約65:35である。

30

【0014】

そうではないことが定義されない限り、本明細書で使用される総ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の熟練者が一般に理解しているものと同じ意味を有する。本発明の実施には本明細書に記載されているものと類似または等価な方法および材料が使用可能であるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書に記載されている総ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全内容が明示的に引用することにより本明細書の一部とされる。矛盾があれば、定義を含む本明細書が優先する。加えて、本明細書に記載の材料、方法、および例は単に例示であり、限定することを意図するものではない。

40

【0015】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになり、それらに包含される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、2か月齢のFmr1ノックアウト(KO)または野生型(WT)マウスにおける文脈的恐怖条件付け(contextual fear conditioning)に対するビヒクル(V)またはメタドキシン(M)(100、150、または200mg/kg)の1日1回、7日の腹腔内(ip)投与の効果を示す。具体的には、パネルAは、ビヒクルまたは150m

50

g / k g のメタドキシンの効果を示す。パネル B は、ビヒクルまたは 1 0 0 m g / k g のメタドキシンの効果を示す。パネル C は、ビヒクルまたは 2 0 0 m g / k g のメタドキシンの効果を示す。示されているデータは平均 ± 平均の標準誤差 (s e m)、1 群につきマウス N = 1 0 である。* p < 0 . 0 5、* * * p < 0 . 0 0 0 1、および N S = 有意でない。

【図 2】図 2 は、2 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける社会的接近行動に対するビヒクル (V) または 1 5 0 m g / k g メタドキシンの (M) の 1 日 1 回、7 日の腹腔内投与の効果を示す。示されているデータは平均 ± s e m、1 群につきマウス N = 1 0 である。* p < 0 . 0 5 および * * * p < 0 . 0 0 0 1。

【図 3】図 3 は、2 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける Y 迷路自発的交替行動 (パネル A)、Y 迷路報酬交替行動 (パネル B) または Y 迷路水迷路空間弁別 (パネル C) に対するビヒクル (V) または 1 5 0 m g / k g メタドキシンの (M) の 1 日 1 回、7 日の腹腔内投与の効果を示す。示されているデータは平均 ± s e m、1 群につきマウス N = 1 0 である。* * * p < 0 . 0 0 1、* * * * p < 0 . 0 0 0 1、および N S = 有意でない。

【図 4】図 4 は、2 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける T 迷路報酬交替行動に対するビヒクル (V) または 1 5 0 m g / k g メタドキシンの (M) の 1 日 1 回、7 日の腹腔内投与の効果を示す。示されているデータは平均 ± s e m、1 群につきマウス N = 1 0 である。* * * * p < 0 . 0 0 0 1。

【図 5】N = 1 0 野生型 (W T) または F m r 1 ノックアウト (K O) 2 か月齢マウス群における連続小路課題 (successive alleys task) での行動に対するビヒクル (V) または 1 5 0 m g / k g メタドキシンの (M) による 1 日 1 回、7 日処置の効果を示す。この装置の連続小路は探索マウスに段階的に不安を増す環境を提供した。従って、小路から降りた場合に不安と評価される。加えて、総合的な活動レベルもこの装置で定量することができた。

【図 6】図 6 は、2 か月齢 F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける E R K (E R K 活性の指標) (パネル A) および A k t (A k t 活性の指標) (パネル B) の全脳リン酸化レベルに対するビヒクル (V) または 1 5 0 m g / k g メタドキシンの (M) の 1 日 1 回、7 日の腹腔内投与の効果を示す。示されているデータは平均 ± s e m、1 群につきマウス N = 1 0 である。* * p < 0 . 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1、* * * * p < 0 . 0 0 0 1、および N S = 有意でない。

【図 7】図 7 は、6 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける文脈的恐怖条件付けに対するビヒクル (V) または 1 5 0 m g / k g メタドキシンの (M) の 1 日 1 回、7 日間の i p 投与の効果を示す。示されているデータは平均 ± s e m、1 群につきマウス N = 1 0 である。* * * * p < 0 . 0 0 0 1 および n s = 有意でない。

【図 8】図 8 は、匂いの嗅ぎ合い (sniffing bouts) の回数または匂い嗅ぎの持続時間により測定される、6 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける社会的接近行動 (パネル A および C) および社会的記憶行動 (パネル B および D) に対するビヒクル (V) または 1 5 0 m g / k g メタドキシンの (M) の 1 日 1 回、7 日間の i p 投与の効果を示す。示されているデータは平均 ± s e m、1 群につきマウス N = 1 0 である。* p < 0 . 0 5、* * * * p < 0 . 0 0 0 1、および n s = 有意でない。

【図 9】図 9 は、6 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける E R K (パネル A) および A k t (パネル B) の全脳リン酸化レベルに対するビヒクル (V) または 1 5 0 m g / k g メタドキシンの (M) の 1 日 1 回、7 日間の i p 投与の効果を示す。示されているデータは平均 ± s e m、1 群につきマウス N = 1 0 である。* p < 0 . 0 5、* * p < 0 . 0 1、* * * * p < 0 . 0 0 0 1、および n s = 有意でない。

【図 1 0】図 1 0 は、2 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける文脈的恐怖条件付けに対する 7 日間の 1 5 0 m g / k g でのメタドキシンの (

10

20

30

40

50

M) の 1 日 1 回 i p 投与またはビヒクル (V) もしくは 150 および 300 mg / kg メタドキシンの経口投与 (p o) の効果を示す。示されているデータは平均 \pm s e m、1 群につきマウス N = 10 である。具体的には、パネル A は、F m r 1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスにおけるビヒクルによる i p および経口処置を示す。パネル B は、野生型マウスにおけるメタドキシンの i p および経口処置を示す。パネル C は、F m r 1 ノックアウトマウスにおけるメタドキシンの i p および経口処置を示す。* * p < 0 . 0 1、* * * * p < 0 . 0 0 0 1、および n s = 有意でない。

【図 1 1】図 1 1 は、2 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスにおける社会的接近 (パネル A) および社会的記憶 (パネル B) に対する 7 日間のビヒクル (V) 150 もしくは 300 mg / kg でのメタドキシンの (M) の 1 日 1 回、i p 投与または経口投与 (p o) の効果を示す。示されているデータは平均 \pm s e m、1 群につきマウス N = 10 である。* * p < 0 . 0 1、* * * * p < 0 . 0 0 0 1、および n s = 有意でない。

【図 1 2】図 1 2 は、2 か月齢の F m r 1 ノックアウト (K O) および野生型 (W T) マウスにおける、フローサイトメトリーを用いて評価されるリンパ球バイオマーカーに対する 7 日間のビヒクル (V) または 150 もしくは 300 mg / kg でのメタドキシンの (M) の 1 日 1 回、i p 投与または経口投与 (p o) の効果を示す。示されているバイオマーカーは、F m r 1 ノックアウトマウスまたは野生型マウスにおける p A k t (パネル A) および p E R K (パネル B) である。示されているデータは平均 \pm s e m、1 群につきマウス N = 10 である。* * * * p < 0 . 0 0 0 1 および n s = 有意でない。

【図 1 3】図 1 3 は、2 か月齢の野生型 (W T) および F m r 1 ノックアウト (K O) マウスの脳領域における p E R K レベルに対する 7 日間のビヒクル (V) または 150 mg / kg メタドキシンの (M) の 1 日 1 回 i p 投与の効果を示す。分析領域は、F m r 1 ノックアウトマウスまたは野生型マウスにおける海馬 (パネル A)、前頭前皮質 (パネル B)、および線条体 (パネル C) であった。示されているデータは平均 \pm s e m、1 群につきマウス N = 10 である。* * * * p < 0 . 0 0 0 1 および n s = 有意でない。

【図 1 4】図 1 4 は、2 か月齢の野生型 (W T) および F m r 1 ノックアウト (K O) マウスの脳領域における p A k t レベルに対する 7 日間のビヒクル (V) または 150 mg / kg メタドキシンの (M) の 1 日 1 回 i p 投与の効果を示す。分析領域は、F m r 1 ノックアウトマウスまたは野生型マウスにおける海馬 (パネル A)、前頭前皮質 (パネル B)、および線条体 (パネル C) であった。示されているデータは平均 \pm s e m、1 群につきマウス N = 10 である。* * * * p < 0 . 0 0 0 1 および n s = 有意でない。

【図 1 5】図 1 5 は、F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウス由来のニューロン海馬培養物における糸状仮足密度 (パネル A)、長さ (パネル B)、および幅 (パネル C) に対するビヒクル (V) または 300 μ M メタドキシンの (M) による 5 時間の i n v i t r o 処理の効果を示す。示されているデータは平均 \pm s e m である (野生型、N = 20 ニューロンおよび F m r 1 ノックアウトマウス、N = 20 ニューロン)。* * p < 0 . 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1、および n s = 有意でない。

【図 1 6】図 1 6 は、F m r 1 ノックアウト (K O) または野生型 (W T) マウスの 400 μ M 海馬切片における基底 d e n o v o タンパク質合成に対するビヒクル (V) または 300 μ M メタドキシンの (M) による i n v i t r o 処理の効果を示す。示されているデータは平均 \pm s e m、1 群につき切片 N = 6 である。* p < 0 . 0 0 1 および * * * * p < 0 . 0 0 0 1。

【発明の具体的説明】

【0017】

本発明は、メタドキシンは脆弱 X 症候群の検証済み動物モデルにおいて認知および社会機能を有意に改善するという発見に関する。

【0018】

具体的には、メタドキシンは、文脈的恐怖パラダイム (contextual fear paradigm) の際の記憶および学習を用量依存的に有意に改善し、2 種類の最高用量レベル (150 および

10

20

30

40

50

200 mg / kg) は、Fmr1 KOマウスの学習および記憶欠陥をWTマウスレベルと同等の程度まで完全に救済した。さらに、150 mg / kgのメタドキシンで処置したFmr1 KOマウスにおいて記憶の有意な改善がT迷路などの挙動試験で認められ、認知結果の有意な改善を示した。これらの所見は、150 mg / kgのメタドキシンで処置したKOマウスの社会的相互作用の改善により補足された。重要なことには、検証済み脆弱Xマウスモデルにおけるメタドキシン処置後の認知実行機能、作業記憶および社会的相互作用の改善は、ニューロンシグナル伝達経路および酸化ストレスを反映する生化学的マーカー正常化と相関している。

【0019】

脆弱X症候群は、自閉症の最も広まっている一遺伝子性の原因であり、少年間の精神遅滞の遺伝性の原因である。FMR1遺伝子突然変異を有する人は子供に受け渡す可能性がある。疾病管理予防センター(CDC)によれば、男性では4,000人に、女性では8,000人におよそ1人が脆弱X症候群を有する。この突然変異を有する総ての人が脆弱Xの徴候または症状を示すわけではなく、障害は軽度から重度にわたり、長い顔、大きなまたは突出した耳、大きな精巣(巨精巣症)などの身体的特徴と、常同性運動(例えば、手をひらひらさせる)および社交不安などの行動的特徴を伴う。脆弱Xは、X染色体に見られる脆弱X精神遅滞1(Fragile X Mental Retardation 1)(FMR1)遺伝子の変化または突然変異を原因とする。この遺伝子は通常、脆弱X精神遅滞タンパク質またはFMRPと呼ばれるタンパク質を生成する。このタンパク質は脳および神経系の細胞間の接続を作り出し、維持するために重要である。この突然変異は身体にこのタンパク質の小片しか作らせず、またはタンパク質を全く作らせず、多くの場合で脆弱Xの症状をもたらす。

【0020】

脆弱X症候群(FXS)は、自閉症スペクトラム障害などの他の病態を併存する場合が多い。自閉症スペクトラム障害(ASD)は、重大な社会的、コミュニケーションおよび行動的問題を引き起こし得る一群の発達障害である。ASDを有する人々は、脳での情報の取り扱いが他の人々と異なる。

【0021】

ASDは「スペクトラム障害」である。これは、ASDが人によって異なる影響を及ぼし、ごく軽度から重度までの範囲に及び得ることを意味する。ASDを有する人々は、社会的相互作用に伴う問題など、いくつかの類似症状を共通に持つ。しかし、症状がいつ始まるか、どの程度重篤か、および症状の厳密な性質には違いがある。ASDは、自閉症性障害(「古典的」自閉症とも呼ばれる)、アスペルガー症候群および広汎性発達障害を含む。

【0022】

現在のところ、食品医薬品局(FDA)は、脆弱Xまたはその症状の治療に対して薬物は特に承認していない。脆弱X症候群の特定の症状を処置するために適応外で使用される薬物はあるが、結果は患者によって大きく異なり、これらの薬物のいくつかは重大なリスクを持ち、最初は症状を悪化させた場合や効果が出るまでに数週間かかる場合がある。本発明は、脆弱Xまたはその症状を治療するための薬物の、まだ対処されていない需要を提示する。

【0023】

よって、本発明は、対象者にメタドキシンを含んでなる組成物を投与することにより脆弱X症候群および/または自閉症スペクトラム障害の徴候または症状を治療、予防または緩和する方法を提供する。

【0024】

一般に、脆弱Xの徴候および症状は、5つのカテゴリーに入り、例えば、知能および学習; 一般に脆弱Xに伴うまたは特徴を共通に持つ身体障害、社会障害および感情障害、会話障害および言語障害および感覚障害を含む。脆弱Xを有する個人は、知的機能障害、社交不安、言語障害および特定の感覚に対する感受性を有する。メタドキシンによる処置は学習を改善し、脆弱X症候群を有する対象者において社会性を増強する。

【 0 0 2 5 】

自閉症スペクトラム障害は、脆弱 X 症候群を有する個人に一般に随伴する。自閉症の徴候および症状としては、顕著な言語遅滞、社会性およびコミュニケーションの問題、ならびに異常な行動および関心が含まれる。自閉症性障害を有する多くの人が知的障害も有する。アスペルガー症候群を有する個人は通常、自閉症性障害の何らかの軽度症状を有する。例えば、これらの人は社会的問題ならびに異常な行動および関心を有する場合がある。広汎性発達障害 (P D D - N O S) を有する個人は、自閉症性障害またはアスペルガー症候群の判定基準の、総てではないがいくつかを満たし、 P D D - N O S と診断される場合がある。 P D D - N O S を有する人々は通常、自閉症性障害を有する人々よりも症状が少なくかつ軽度である。これらの症状は、社会的およびコミュニケーションの問題のみを引き起こす場合がある。メタドキシンによる処置は、自閉症の症状を改善する。

10

【 0 0 2 6 】

メタドキシンは、カルボン酸ピロリドン (P C A) とピリドキシン (ビタミン B 6) の間のイオン対であり、これら 2 つの化合物が塩化により単一の生成物として連結されている。 P C A との対合は、ピリドキシンの薬理活性を相乗的に増強する (例えば、米国特許第 4 , 3 1 3 , 9 5 2 号参照) 。メタドキシンは水および胃液に制限なく可溶である。この薬物の経口吸収は速く、高いバイオアベイラビリティ (6 0 ~ 8 0 %) を持つ。ヒト血清中でのメタドキシンの半減期は短く (4 0 ~ 6 0 分) 、経口投与と静脈内投与の間に目に見える違いはない (Addolorato et al. , 前掲 ; Lu Yuan et al. , Chin. Med. 1 2 0 0 7 1 2 0 (2) 1 6 0 - 1 6 8) 。

20

【 0 0 2 7 】

メタドキシンは、数カ国で、 5 0 0 m g 錠剤および 3 0 0 m g 注射剤の形態での処方薬として上市している。錠剤は、 5 0 0 m g のメタドキシン、微晶質セルロースおよびステアリン酸マグネシウムを含有する。アンプルは、 3 0 0 m g のメタドキシン、メタ重亜硫酸ナトリウム、 E D T A ナトリウム、メチル - p - ヒドロキシベンゾエートおよび水を含む。

【 0 0 2 8 】

特定の実施態様では、例えば完全にまたは部分的に持続放出または制御放出用に処方された本発明のメタドキシン組成物は、脆弱 X 症候群および自閉症スペクトラム障害などのその関連の病態 / 障害の徴候または症状の治療、予防および / または緩和においてメタドキシンのより効率的な使用を可能とする。

30

【 0 0 2 9 】

本発明の上記方法のあるものにおいて、メタドキシンまたはその許容可能な誘導体は、対象者への投与時に即時放出するように処方してもよい。本発明の上記方法のあるものにおいて、メタドキシンまたはその許容可能な誘導体は、持続放出および / または制御制御用に処方してもよく、また場合によって、対象者への投与時に即時放出特徴と持続放出および / または制御放出特徴の両方を持つように処方してもよい。特定の実施態様では、メタドキシンまたはその生理学的に許容可能な誘導体は、非慢性投与用に処方される。本発明の方法に有用なメタドキシン製剤 (formulation) を以下にさらに詳細に記載する。

【 0 0 3 0 】

特定の実施態様では、本発明は、脆弱 X 症候群および / または自閉症スペクトラム障害などのその関連の病態 / 障害の徴候または症状の改善、治療、予防および / または緩和のための、対象者に投与した際に持続放出および / または制御放出されるように処方された、メタドキシンまたはその誘導体を含んでなる組成物を提供する。

40

【 0 0 3 1 】

特定の実施態様では、本発明は、メタドキシンまたはその誘導体を含んでなり、メタドキシンまたは誘導体の一部が対象者に投与された際に持続放出および / または制御放出するように処方され、また、メタドキシンまたは誘導体の一部が即時放出するように処方されている、脆弱 X 症候群および / または自閉症スペクトラム障害などのその関連の病態 / 障害の徴候または症状の改善、治療、予防および / または緩和のための組成物を提供する

50

。

【0032】

特定の実施態様では、有効成分の有効血清レベルは、メタドキシンまたはメタドキシン誘導体の投与後、約10分～約20分または30分または40分または50分または60分、90分、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間以内に達成される。特定の実施態様では、前記対象者における有効成分の有効血清レベルは、メタドキシンまたはメタドキシン誘導体の投与後、約5分～約20分または30分または40分または50分または60分、90分、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間以内に達成される。特定の実施態様では、有効成分の有効血清レベルは、メタドキシンまたはメタドキシン誘導体の投与後、約20分～約20分または30分または40分または50分または60分、90分、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間以内に達成される。特定の実施態様では、有効成分の有効血清レベルは、約5分、10分、15分、20分、30分、40分、50分または60分、90分、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間以内に達成される。

10

20

30

40

50

【0033】

本発明者らは、腸内経路（消化管を介する）および/または非経口経路（消化管以外の経路）に基づくメタドキシンまたはメタドキシン誘導体の投与のための革新的アプローチを開発した（W02009/004629、その内容は引用することによりその全体が本明細書の一部とされる）。これらのアプローチは、対象とする送達系のための担体、例えば、適当な界面活性剤/補助界面活性剤組成物または有効成分を封入するマイクロ/ナノ粒子（例えば、リポソームもしくはナノリポソーム）、または他の添加剤もしくは賦形剤の細心の選択に基づく、所望の特性を有する送達系の合理的設計を提供する。腸内送達系は、経口投与（錠剤、サシェ剤、トローチ剤、カプセル剤、ゲルキャップ、滴剤、もしくは他の味のよい(palatable)形態）または直腸投与（坐剤もしくは（ミニ）浣腸形態）用に設計してもよい。加えて、対象とする送達系は、液体形態、例えば、滴剤溶液、シロップであってもよい。さらに、対象とする送達系は、飲料または食品の形態であってもよい。よって、本発明により使用される有効成分は、飲料、特に、ジュース、ネクター、水、炭酸水および他の炭酸飲料、シェイク、ミルクシェイクおよび他のミルク系飲料などのようなソフトドリンク中に含まれてよい。液体製剤はまた、水または炭酸水で希釈するための濃縮シロップの形態であってもよい。あるいは、有効成分は、スナックバー、ヘルスバー、ビスケット、クッキー、スイーツ、菓子製品、アイスクリーム、アイスキャンディーなどの食品中に含まれてもよい。

【0034】

さらにまた、送達系は、生理学的に活性なピリドキシン誘導体、特に、ピリドキソールL, 2-ピロリドン-5カルボキシレート（メタドキシン）を含んでなる食品または飲料製品であってもよい。特定の実施態様では、本発明の食品または飲料製品の摂取は、その摂取後約10分から約40～60分以内に有効成分の血清レベルの達成をもたらし得る。例としては、スイーツ、チョコレート、キャンディーおよびキャンディーバー、エネルギーバー、アイスクリーム、ペーストリー製品などが挙げられる。

【0035】

投与の非経口経路としては、皮下、転移(transferal)（無傷な皮膚を経た拡散）、経粘膜（粘膜を経た拡散）、舌下、口内（歯肉線近傍の頬を経た吸収）投与、または吸入による投与が含まれる。特定の実施態様では、本発明により使用される組成物は、侵襲的処置様式では投与されない（すなわち、非侵襲的である）。特定の実施態様では、メタドキシンまたはメタドキシン誘導体組成物は、静注によっては投与されない。

【0036】

特定の実施態様では、本発明により使用される組成物は、噴霧に好適な微晶質粉末または溶液として；腔内または直腸内投与のために、腔坐剤、坐剤、クリームまたはフォームとして送達される。好ましい製剤は、経口投与用製剤である。別の好ましい製剤は、局所

投与用のものである。別の好ましい製剤は、経粘膜投与、舌下、口内（歯肉線近傍の頬を経た吸収）投与、吸入による投与または眼内投与、例えば、点眼剤用のものである。

【0037】

医学的用途のためのメタドキシシムまたはメタドキシシム誘導体の投与は、安全かつ効率的な送達系を必要とする。本発明は、特殊な物理化学的特徴、特に、非侵襲的手段による直接吸収、および結果としての副作用の回避による種々の物質の安全な送達のための送達系を提供する。本送達系は、対象者に生物学的に活性な形態で送達される物質の濃度または量の低減を可能とするそのユニークな物理化学的特徴に基づき、メタドキシシムまたはメタドキシシム誘導体の吸収の効率および質を有意に高める。本発明の送達系は、組織への有効物質の直接的接近を提供し、従って、処置対象に対してメタドキシシムまたはメタドキシシム誘導体の即時的または即時的に近い効果を与える。よって、特定の実施態様では、本発明は、生理学的に活性なピリドキシシム、特に、ピリドキシソールL，2-ピロリドン-5カルボキシレート（メタドキシシム）、またはその生理学的に許容可能な誘導体の改善された投与のための、好適な担体中に有効成分として前記生理学的に活性なピリドキシシムを含んでなる非侵襲的医薬送達系を使用する。特定の実施態様では、有効成分の血清レベルは、投与後約10分から約40分～60分以内に達成される。別の実施態様では、本発明は、必要とする対象者における認知行動の改善に使用することを目的とした、生理学的に活性なピリドキシシム誘導体、特に、ピリドキシソールL，2-ピロリドン-5カルボキシレート（メタドキシシム）の改善された投与のための、好適な担体中に有効成分として前記ピリドキシシム誘導体を含んでなる非侵襲的医薬送達系を使用する。特定の実施態様では、前記有効成分の血清レベルは、投与後約10分から約40分～60分以内に達成される。

【0038】

特定の実施態様では、本発明により使用される薬物送達系は、経口、経鼻、眼内、直腸、皮下、転移(transferral)、経粘膜、舌下、口内または吸入投与用に設計することができる。薬物送達系は、有効物質を制御放出様式で提供し得る。特定の実施態様では、本発明の薬物送達系は、少なくとも1種類の付加的な薬学的に活性な薬剤をさらに含んでなり得る。本発明により使用される送達系は、一般に、緩衝剤、その浸透圧を調整する薬剤、および場合により、1種類以上の当技術分野で公知の薬学上許容可能な担体、賦形剤および/または添加剤を含んでなり得る。補助的な薬学上許容可能な有効成分も本組成物に配合可能である。担体は、例えば、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）、それらの好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用により、分散物の場合には必要な粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。本明細書で使用する場合、「薬学上許容可能な担体」は、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤などのいずれかおよび総てを含む。薬学的に有効な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は当技術分野で周知である。従来媒体または薬剤が有効成分と不適合である場合を除き、治療用組成物中でのその使用が企図される。有効性薬剤はいずれの薬学上許容可能な経路によりおよびいずれの薬学上許容可能な剤形でも送達可能であると考えられる。経口形としては、限定されるものではないが、錠剤、カプセル剤、丸剤、サシェ剤、トローチ剤、滴剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ、懸濁液、シロップ、およびエマルションが含まれる。また、経口急速放出、制御放出、および遅延放出医薬剤形も含まれる。有効薬物成分は単一の剤形で投与することもできるし、または一緒にしくは独立に投与される別個の剤形で投与することもできる。有効薬物成分は、好適な医薬希釈剤、賦形剤または担体（本明細書では「担体」と総称する）との混合物として投与することができ、材料は意図される投与形態に対して適宜選択される。送達系が経口投与用であって、錠剤またはカプセル剤などの形態である場合、有効薬物成分は、ラクトース、デンプン、スクロース、グルコース、修飾糖、加工デンプン、メチルセルロースおよびその誘導体、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、マンニトール、ソルビトール、および他の還元および非還元糖、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、フマル酸ステアリルナトリウム、ペヘン酸

グリセリル、ステアリン酸カルシウムなどの非毒性の薬学上許容可能な不活性担体と組み合わせることができる。液体形態の経口投与では、有効薬物成分は、エタノール、グリセロール、水などの非毒性の薬学上許容可能な不活性担体と組み合わせることができる。所望により、または必要であれば、好適な結合剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤および香味剤を本混合物に配合することができる。抗酸化剤、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウム、クエン酸、メタ重亜硫酸カルシウム、ヒドロキノン、および7-ヒドロキシクマリンなどの分解防止剤も、本剤形を安定化させるために添加することができる。他の好適な化合物としては、ゼラチン、甘味剤、アラビアガム、トラガカントガム、またはアルギネートなどの天然および合成ガム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレン、グリコール、ワックスなどを含み得る。

10

【0039】

これらの医薬組成物に使用可能な、さらなる好適な薬学上許容可能な担体としては、限定されるものではないが、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、ステアリン酸マグネシウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、バッファ物質、例えば、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂が含まれる。

いくつかの実施態様では、薬学上許容可能な担体は、ステアリン酸マグネシウムである。一般に認知され使用されているさらなる医薬賦形剤は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., ed., Mack Pub., 1990)に見られる。

20

【0040】

非経口投与の目的で、ゴマ油もしくは落花生油などの好適な油中または水性プロピレングリコール中の溶液、ならびに対応する水溶性塩の無菌水溶液を使用することができる。このような水溶液は必要に応じて適宜緩衝させてもよく、液体希釈剤はまず十分な生理食塩水またはグルコースで等張としてもよい。これらの水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内注射の目的で特に好適である。これに関して、使用される無菌水性媒体は総て、当業者に周知の標準技術によって容易に得ることができる。一定量の有効成分を含む種々の医薬組成物を調製する方法は既知であるか、または当業者には本開示に鑑みれば自明である。ヒト血清中でのメタドキシンの半減期は極めて短い。Lu Yuan et al. (Chin. Med. J 2007 120(2) 160-168)は、平均半減期が約0.8時間であると示している。活性部分の血清レベルを延長する1つの方法は、材料を持続放出製剤として投与することによるものである。メタドキシンは水および種々の体液に制限無く可溶であることから、その放出を持続させ、その吸収時間を延長することは困難である。従って、持続放出が達成できるとは予想されなかった。メタドキシンまたはメタドキシン誘導体の制御放出剤形は、長期間にわたって血漿レベルの小さな変動で持続的作用をもたらす、体液中への有効成分の所定の徐放出に基づくものであり得る。

30

【0041】

特定の実施態様では、本発明により使用される送達系は、制御放出製剤で投与することができる。特定の実施態様では、投与方法は対象者の病態および必要の評価の後に担当の医師またはその他の当業者によって決定される。本発明の方法の実施態様は、本明細書に記載の治療用化合物を持続放出形で投与することである。Langer, Science 249(4976):1527-33 (1990)に記載されているものなど、当業者に既知の制御放出法または持続放出法はいずれも本発明の組成物および方法とともに使用可能である。このような方法は、持続放出組成物、坐剤、またはコーティングされた埋め込み可能な医療装置を、治療上有効な用量の本発明の組成物がこのような方法の対象に継続的に送達されるように投与することを含んでなる。持続放出はまた、この目的で設計および処方されたパッチを用いて達成してもよい。本発明の組成物は、一定期間にわたって薬剤の持続放出を可能とするカプセルに

40

50

よって送達してもよい。制御放出または持続放出組成物としては、親油性デポー（例えば、脂肪酸、ワックス、油類）中の製剤が含まれる。また、ポリマー（例えば、ポロキサマーまたはポロキサミン）でコーティングされた粒状組成物も本発明により包含される。持続放出製剤もしくは装置、または任意の局所用製剤は、その組成物を安定化させるため、または皮膚もしくは粘膜などの生理学的障壁を透過するためにさらに組成物を含んでもよい。付加的成分の例としては、任意の生理学的に許容可能な洗剤、または例えばジメチルスルホキシド（DMSO）などの溶媒を含み得る。

【0042】

本発明の総ての実施態様において、本発明の方法および使用は、単一の用量として処方された本発明により定義される塩付加物を含んでなる組成物を用い得る。前記単一の製剤は、当業者に公知の即時放出製剤、パースト製剤、長期放出製剤、持続放出製剤またはその他の制御放出製剤であり得る。

【0043】

本発明の方法および使用の他の実施態様では、本発明により定義される塩付加物を含んでなる組成物は、異なるタイプの製剤が、すなわち、単一用量でまたは個別に、付随して (concomitantly) もしくは逐次に与えられる個別用量で与えられる当業者に公知の即時放出製剤、パースト製剤、長期放出製剤、持続放出製剤または他の任意の制御放出製剤の任意の組合せが、対象者に投与される組合せ投与製剤であってよく、ここで、個別用量の投与間の時間間隔は、対象者の疾患もしくは障害の状態および重篤度または前記対象者の身体の状態に基づいて定義される。

【0044】

いくつかの実施態様では、本発明の方法により使用される組成物は組合せ剤形として処方され、ここで、本発明により定義される塩付加物 (salt adduct) の少なくとも1つの剤形は即時放出形態であり、本発明により定義される塩付加物の少なくとも1つの剤形（即時放出製剤で処方された塩付加物と同じまたは異なる）は、制御（緩徐および/または持続）放出製剤として処方される。他の実施態様では、前記少なくとも1つの即時放出製剤および少なくとも1つの制御放出製剤中に含まれる本発明により定義される塩付加物の重量比は、1:1、1:2、2:1、3:2、2:3、1:3、3:1、4:1、1:4、5:2、2:5、1:5、5:1であり得る。本発明の方法または使用においてこのような組合せ剤形を使用する場合、上記で定義される塩付加物の前記少なくとも1つの即時放出形態および少なくとも1つの制御放出形態は、個別に、付随し、逐次に、同時に (concurrently)、連続してなどで対象者に投与してよい。いくつかの実施態様では、前記少なくとも1つの即時放出形態が最初に投与される。他の実施態様では、前記少なくとも1つの制御放出製剤が最初に投与される。

【0045】

特定の実施態様では、本発明の組成物中のメタドキシシンまたはメタドキシシン誘導体は、少なくとも0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12時間の期間にわたる持続放出または制御放出用に処方することができる。特定の実施態様では、本発明により使用される組成物中のメタドキシシンまたはメタドキシシン誘導体は、約0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12時間の期間にわたる持続放出または制御放出用に処方することができる。特定の実施態様では、本発明により使用される組成物中のメタドキシシンまたはメタドキシシン誘導体は、約0.5または1または2または3または4時間～および約5、6、7、8、9、10、11または12時間の間の期間にわたる持続放出または制御放出用に処方することができる。特定の実施態様では、本発明により使用される組成物中のメタドキシシンまたはメタドキシシン誘導体は、約5または6または7または8時間～約9、10、11または12時間の間の期間にわたる持続放出または制御放出用に処方することができる。

【0046】

特定の実施態様では、本発明により使用される組成物中のメタドキシシンまたはメタドキシシン誘導体は、即時放出形態、急速放出形態またはパースト放出形態 (immediate, fast o

10

20

30

40

50

f burst release form)であり得る。

【0047】

特定の実施態様では、本発明により使用される組成物中のメタドキシンまたはメタドキシン誘導体は、約0.5、1、2、3、4、5、6、7または8時間で総メタドキシンまたはメタドキシン誘導体の5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99、99.5または100%までを放出するように処方することができる。特定の実施態様では、本発明により使用される組成物中のメタドキシンまたはメタドキシン誘導体は、約0.5、1、2、3、4、5、6、7または8時間で総メタドキシンまたはメタドキシン誘導体の5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99、99.5または100%以上を放出するように処方することができる。

10

【0048】

特定の実施態様では、本発明により使用される組成物中のメタドキシンまたはメタドキシン誘導体は、持続放出形態または徐放形態および即時放出形態または急速放出形態の組合せであり得る。特定の実施態様では、持続放出または徐放メタドキシンまたはメタドキシン誘導体と即時放出または急速放出メタドキシンまたはメタドキシン誘導体の相対比は、例えば、1対99、5対95、10対90、15対85、20対80、25対75、30対70、35対65、40対60、45対55、50対50、55対45、60対40、65対35、70対30、75対25、80対20、85対15、90対10、95対5、または99対1である。

20

【0049】

特定の実施態様では、メタドキシンまたはメタドキシン誘導体の放出を持続させるまたは制御するためにポリマー材料が使用される。特定の実施態様では、ポリマー材料のタイプおよびその使用量は、本発明の生成物からのメタドキシンまたはメタドキシン誘導体の放出速度に強い影響を持つ。ポリマーの例としては、疎水性および親水性双方のポリマーが含まれる。疎水性ポリマーの例としては、限定されるものではないが、エチルセルロースおよび他のセルロース誘導体、グリセロールパルミトステレート、密蝟、グリコワックス、キャストワックス、カルナウバワックス、グリセロールモノステレートまたはステアリルアルコールなどの脂肪類、疎水性ポリアクリルアミド誘導体および疎水性メタクリル酸誘導体、ならびにこれらのポリマーの混合物が含まれる。親水性ポリマーとしては、限定されるものではないが、親水性セルロース誘導体、例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびヒドロキシエチルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、エチレン酢酸ビニルコポリマー、ポリアクリレート、ポリ-ウレタン、ポリビニルピロリドン、ポリメチルメタクリレート、ポリ酢酸ビニル、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ならびにこれらのポリマーの混合物が含まれる。さらに、1以上の疎水性ポリマーと1以上の親水性ポリマーの任意の混合物が場合により使用可能である。

30

40

【0050】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物中に使用されるポリマー材料は、FMC BioPolymer'sにより製造された「Avicel PH 101」などの微晶質セルロースである。

【0051】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物中に使用されるポリマー材料は、Shin-Etsu Chemical Coにより生産される「Metholose」などのヒドロキシプロピルメチルセルロースである。

【0052】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物中に使用される

50

ポリマー材料は、The Dow Chemical Companyにより製造される「Ethocel（商標）」などのエチルセルロースである。

【0053】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物中に使用されるポリマー材料は、Roehm GmbHにより生産される「Eudragit RS（商標）」などのアクリル系ポリマーである。

【0054】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物中に使用されるポリマー材料は、Degussaにより製造される「Aerosil（商標）」などのコロイド状二酸化ケイ素である。

10

【0055】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物中に使用されるポリマー材料は、BASFにより製造される「Kollidcoat SR」などのポリ（酢酸ビニル）である。

【0056】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物中に使用されるポリマー材料は、Delasco Dermatologic Lab & Supply、Inc.により製造される「Duro-Tak」などの酢酸エチルおよび酢酸ビニル溶液である。

【0057】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物は、約50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、または900mg～約1000、1500、2000、2500または3000mgのメタドキシンまたはメタドキシン誘導体を含んでなるか、またはから本質的になる。特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物は、約5、100、500、または1000mg～約2000、4000、10,000、15,000、または20,000mgのAvicel PH 101（商標）を含んでなるか、またはから本質的になる。特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物は、約25、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550または600mg～約650、700、750、800、850、900、950、1000、5000、10,000、15,000または20,000mgのポリマー材料を含んでなるか、またはから本質的になる。特定の実施態様では、ポリマー材料は、Metholose、Ethocel E10（商標）またはEudragit RS（商標）である。特定の実施態様では、Metholoseは、製剤の1～90%の間、好ましくは5～70%の間で含んでなるか、またはから本質的になる。特定の実施態様では、Ethocel（商標）は、製剤の1～30%の間、好ましくは2～20%の間で含んでなるか、またはから本質的になる。特定の実施態様では、Eudragit（商標）は、製剤の1～90%の間、好ましくは5～70%の間で含んでなるか、またはから本質的になる。

20

30

【0058】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される送達系は、送達デバイスを含んでなる。特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物は、浸透圧ポンプによるなどの制御された速度での浸透圧のプロセスにより送達される。この系は、浸透圧活性剤を速度制御半透膜でコーティングすることにより構築することができる。この膜は、薬剤が送達される臨界サイズのオリフィスを含み得る。この剤形は、水性流体と接触するようになった後、膜の流体透過性とおよびコア製剤の浸透圧によって決定される速度で水を吸収する。この水の浸透性の吸収は、コア内で活性材料の飽和溶液の形成をもたらす、これは膜中の送達オリフィスから制御された速度で分配される。

40

【0059】

特定の実施態様では、本発明の、または本発明により使用される組成物は、生分解性微

50

粒子を用いて送達される。特定の実施態様では、微粒子を調製するための系は、揮発性溶媒と溶解しているポリマーから構成される有機相および水相中に乳化され、封入される材料からなる。特定の実施態様では、微粒子マトリックスに使用可能な生分解性ポリマーは、ポリ乳酸（PLA）または乳酸とグリコール酸のコポリマー（PLAGA）を含んでなる。PLAGAポリマーは、加水分解により経時的にそのモノマー成分に分解し、これらは自然代謝により身体から容易に除去される。

【0060】

本発明の、または本発明により使用される製剤はまた、吸収促進剤および他の任意選択の成分を含有してよい。吸収促進剤の例としては、限定されるものではないが、シクロデキストリン、リン脂質、キトサン、DMSO、Tween、Brij、グリココール酸塩、サポニン、フシジン酸塩およびエネルギーに基づく吸収促進装置が含まれる。

10

【0061】

剤形中に存在する任意選択の成分としては、限定されるものではないが、希釈剤、結合剤、滑沢剤、界面活性剤、着色剤、香味剤、緩衝剤、保存剤、分解防止剤などが含まれる。

【0062】

「増量剤」とも呼ばれる希釈剤としては、例えば、リン酸ニカルシウム二水和物、硫酸カルシウム、ラクトース、セルロース、カオリン、マンニトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、加水分解デンプン、二酸化ケイ素、コロイドシリカ、酸化チタン、アルミナ、タルク、微晶質セルロース、および粉末糖が含まれる。液体形態での投与に関して、希釈剤としては、例えば、エタノール、ソルビトール、グリセロール、水などが含まれる。

20

【0063】

結合剤は、製剤に凝集性の品質を付与するために使用される。好適な結合剤材料としては、限定されるものではないが、デンプン（コーンスターチおよびアルファ化デンプンを含む）、ゼラチン、糖類（スクロース、グルコース、デキストロース、ラクトースおよびソルビトールを含む）、ポリエチレングリコール、ワックス、天然および合成ガム、例えば、アラビアガム、トラガカントガム、アルギン酸ナトリウム、セルロース、およびビーガム、ならびにポリメタクリレートおよびポリビニルピロリドンなどの合成ポリマーが含まれる。

【0064】

滑沢剤は、製造を容易にするために使用される；好適な滑沢剤の例としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル、およびポリエチレングリコールが含まれる。

30

【0065】

界面活性剤は、陰イオン性、陽イオン性、両性または非イオン性界面活性剤であり得、陰イオン性界面活性剤が好ましい。好適な陰イオン性界面活性剤としては、限定されるものではないが、ナトリウムイオン、カリウムイオンおよびアンモニウムイオンなどの陽イオンと会合される、カルボン酸イオン、スルホン酸イオンおよび硫酸イオンを含有するものが含まれる。特に好ましい界面活性剤としては、限定されるものではないが、長鎖アルキルスルホネートおよびアルキルアリアルスルホネート、例えば、ナトリウムドデシルベンゼンスルホネート；ジアルキルナトリウムスルホスクシネート、例えば、ナトリウムビス-（2-エチルヘキシル）-スルホスクシネート；および硫酸アルキル、例えば、ラウリル硫酸ナトリウムが含まれる。

40

【0066】

抗酸化剤などの分解防止剤としては、限定されるものではないが、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウム、クエン酸、メタ重亜硫酸カルシウム、ヒドロキノン、および7-ヒドロキシクマリンが含まれる。

【0067】

所望により、本発明の、または本発明により使用される組成物はまた、湿潤剤または乳化剤、保存剤など、微量の非毒性補助物質も含有してよい。

50

【0068】

本発明の、または本発明により使用される組成物はいずれも単独でまたは認知行動の改善のための1以上の付加的治療薬と組み合わせて使用可能である。付加的治療薬の例は、アンフェタミン、メチルフェニデートHCl、塩酸デクスメチルフェニデート、アトモキセチン、レボキセチン、フルオキサチン(fluoxetine)、セルトラリン、パロキセチン、フルオロキサミン、シタロプラム、ベンラファキシン、ブプロピオン、ネファゾドンおよびミルタザピンである。

【0069】

単一の剤形を作製するために担体材料と組み合わせ得る化合物と付加的治療薬両方の量は、処置される宿主および特定の投与様式によって異なる。好ましくは、本発明の組成物は、0.1~1g/kg体重/日、好ましくは、0.1~300mg/kg体重の間の用量が投与可能なように処方されるべきである。化合物の用量は、患者の状態および疾病、ならびに所望の一日用量によって異なる。ヒトの療法では、経口一日用量は、10~3000mg、または好ましくは100~3000mgである。例えば、一日用量は、10、25、50、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、または3000mgである。これらの用量は単位剤形で投与され、単一の一日用量で投与してもよいし、または特定の場合には各日2~3回の少用量に分割してもよい。

【0070】

特定の実施態様では、本発明の組成物は、互いに組み合わせて相乗作用を示す場合があり、また、付加的治療薬の存在下でさらに相乗作用を示す場合がある。従って、このような組成物中の1または複数の化合物および1または複数の付加的治療薬の量は、その治療薬のみを使用する単剤療法で必要とされる量よりも少なくなる。このような組成物では、0.1~1g/kg体重/日の間の用量の付加的治療薬が投与可能である。

【0071】

定義

便宜のため、本明細書、実施例、および付属の実施態様で使用される特定の用語をここにまとめる。そうではないことが定義されない限り、本明細書で使用される総ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の熟練者(ordinary skilled in the art)が一般に理解しているものと同じ意味を有する。

【0072】

冠詞「a」および「an」は、本明細書では、その冠詞の文法上の目的語の1以上(すなわち、少なくとも1つの)を指して用いられる。例として、「一要素(an element)」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0073】

用語「含む」は、本明細書では、「限定されるものではないが含む」という句を意味して使用され、その句と互換的に使用される。

【0074】

用語「または」は、本明細書では、文脈がそうではないことを明示しない限り、「および/または」という用語を意味して使用され、それと互換的に使用される。

【0075】

用語「などの」は、本明細書では、「限定されるものではないがなどの」という句を意味して使用され、それと互換的に使用される。

【0076】

用語「予防的」または「治療的」処置は、対象者に1以上の本発明の組成物を投与することを意味する。望ましくない病態(例えば、宿主動物の臨床状態または他の望ましくない状態)の臨床発現の前に投与される場合には、その処置は予防的であり、すなわち、それは望ましくない病態の発症に対する予防、すなわち、対象の保護に寄与し、一方、望ま

しくない病態の発現の後に投与される場合には、その処置は治療的である（すなわち、望ましくない病態の進行またはそれからの副作用を消散、改善または回避することが意図される）。

【0077】

用語「治療効果」は、薬理学的に有効な1または複数の物質により引き起こされる動物、特に、哺乳動物、より詳しくは、ヒトにおける局所性または全身性の効果を意味する。従って、この用語は、疾患の診断、治療、緩和、治療もしくは予防、または動物もしくはヒトにおける望ましい身体もしくは精神発達および状態の増進における使用を意図したいずれの物質も意味する。用語「治療上有効な量」は、いずれの処置にも適用可能な妥当な利益/リスク比で何らかの所望の局所性または全身性の効果をもたらす、このような物質の量を意味する。特定の実施態様では、化合物または組成物の治療上有効な量はその治療係数、溶解度などによって異なる。例えば、本発明の特定のメタドキシシンまたはメタドキシシン誘導体制剤は、当業者により決定され得るように、選択された処置に適用可能な妥当な利益/リスク比を生じるのに十分な量で投与してよい。

10

【0078】

用語「有効量」は、適当な用量および投与計画で対象者に投与した際に少なくとも1つの所望の結果を生じる治療用試薬の量を意味する。

【0079】

本発明の方法により処置される「対象者」または「患者」は、ヒトまたは非ヒト動物のいずれか、好ましくは、哺乳動物を指し得る。用語「対象者」は、本明細書で使用する場合、健康な個体または脆弱X症候群もしくは自閉症スペクトラム障害に罹患している対象者を指し得る。別の実施態様では、用語「対象者」および「健康な対象者」および「必要とする対象者」および「必要とする患者」は、本明細書で使用する場合、どんな形であれアルコール摂取後にアルコールの影響下にある対象者、アルコール中毒者（アルコール嗜癖者）、および禁酒中のアルコール中毒者を除く。

20

【0080】

本明細書で使用する場合、用語「塩付加物」は、2つ以上の異なるイオンの直接的付加の塩生成物を包含するものとし、この場合、この塩付加物の全体的な電荷はゼロである。特定の実施態様では、塩付加物は、単一の正電荷官能基を有する1つの正電荷部分（すなわち、この正電荷部分は+1の正味電荷を有する）と、単一の負電荷官能基を有する1つの負電荷部分（すなわち、この負電荷部分は-1の正味電荷を有する）を含んでなる。特定の実施態様では、塩付加物は、同じであっても異なってもよい2つの正電荷官能基を有する1つの正電荷部分（すなわち、この正電荷部分は+2正味電荷を有する）と、同じであっても異なってもよく、それぞれ単一の負電荷官能基を有する2つの負電荷部分（すなわち、各負電荷部分は-1の正味電荷を有する）を含んでなる。特定の実施態様では、塩付加物は、同じであっても異なってもよく、それぞれ1つの正電荷官能基を有する2つの正電荷部分（すなわち、各正電荷部分は+1の正味電荷を有する）と、同じまたは異なる2つの負電荷官能基を有する1つの負電荷部分（すなわち、この負電荷部分は-2の正味電荷を有する）を含んでなる。特定の実施態様では、塩付加物は、+nの正味電荷（同じであっても異なってもよい1以上の正電荷官能基に起源する）を有する正電荷部分と-nの正味電荷（同じであっても異なってもよい1以上の負電荷官能基の起源する）を有する負電荷部分を含んでなり、ここで、nは1、2、3、4、5または6に相当し得る整数である。

30

40

【0081】

本明細書で使用する場合、本発明の「塩付加物の正電荷部分」は、ピリドキシシンの対応する酸、またはその任意の誘導体である。特定の実施態様では、正電荷部分の正電荷は、ピリドキシシンのプロトン化塩基性窒素原子に由来するか（例えば、化合物（2）の場合）、またはその任意の誘導体に由来する（例えば、式（I）の化合物）。特定の実施態様では、正電荷ピリドキシシン誘導体は、例えば、 $-NH_3^+$ 、 $-CH_2NH_3^+$ 、 NH_2R^+ 、 $-NHR_2^+$ （ここで、各Rは独立に $C_1 - C_6$ アルキルであり）などの正電荷官能基

50

で置換され、これは、いくつかの実施態様で、ピリジン環内の正電荷プロトン化塩基性芳香族窒素原子に加えて存在する。

【0082】

本発明の塩付加物の部分はそれぞれ少なくとも1つのキラル中心を含む場合があり、従って、エナンチオマー、ジアステレオマー、または限定されるものではないがラセミ混合物を含むその任意の混合物を含むその任意の立体異性体として存在し、また単離される場合があると理解されるべきである。本発明は、本発明の塩付加物の各部分のいずれかの任意の存在し得る立体異性体（例えば、エナンチオマー、ジアステレオマー）、限定されるものではないがラセミ混合物を含むその任意の混合物を含む。本発明の塩付加物の部分のそれぞれの調製のための本明細書に記載のプロセスが立体異性体の混合物を生成する場合、これらの異性体は、分取クロマトグラフィーなどの従来技術によって分離することができる。本発明の塩付加物の部分は、限定されるものではないが、そのラセミ混合物を含む、存在し得るその立体異性体のいずれの混合物でも、それぞれ製造可能であり、または個々の立体異性体（例えば、エナンチオマー、ジアステレオマー）は、エナンチオ特異的合成により、またはラセミ化合物のキラルクロマトグラフィー分離により調製可能である。アミノ酸という場合にはいつも、本発明は、天然および非天然アミノ酸またはその任意の誘導体を包含するものと理解されるべきである。

10

【0083】

本明細書を通じて、「を含んでなる(comprise)」という語または「を含んでなる(comprises)」または「を含んでなる(comprising)」などの変形形態は、記載の整数または整数群の包含を意味するが、他の任意の整数または整数群の排除を意味しないと理解される。

20

【0084】

用語「バイオアベイラブル」は、特定の化合物の少なくとも一部の量が体循環中に存在することを意味する。経口バイオアベイラビリティの形式的計算はF値に関して記載されている("Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics," John G. Wegner, Drug Intelligence Publications; Hamilton, Ill. 1975)。F値は、静脈内投与後の体循環（例えば、血漿）中の親薬物の濃度と非静脈経路（例えば、経口）による投与後の体循環中の親薬物の濃度の比から導き出される。従って、本発明の範囲内の経口バイオアベイラビリティは、静脈内投与と比較した経口投与後の血漿中に検出可能な親薬物の量の比またはF値を企図する。

30

【0085】

用語「処置する(treating)」または「処置(treatment)」は、ヒトなどの哺乳動物における、少なくとも、病態、疾患もしくは障害の症状に対する鎮静、改善、軽減もしくは緩和、または病態、疾患もしくは障害に関連する確認できる測定値の改善を意味する。処置は、本明細書で使用する場合、健康な個人におけるものも包含する。

【0086】

メタドキシンまたはメタドキシン誘導体に関して用語「許容可能な誘導体」は、対象者に投与した際に（直接的または間接的に）メタドキシンまたはその代謝産物もしくは機能的残渣、または測定可能なメタドキシン活性を提供し得る、メタドキシンの任意の塩、コンジュゲート、エステル、複合体もしくは他の化学誘導体、または前記を含んでなる部分のいずれかを意味する。用語「生理学的に適合するメタドキシン誘導体」は、本明細書において、用語「許容可能な誘導体」と互換的に使用でき、メタドキシンの機能的で活性な薬学上許容可能な誘導体を意味する。

40

【0087】

用語「賦形剤」は、製剤中で有効成分の担体として使用される不活性物質を意味する。

【0088】

用語「制御放出」は、制御された速度で長時間薬剤を送達し、所望の薬剤レベルプロファイルを達成するように設計されたいずれの製剤をも意味する。

【0089】

用語「持続放出(sustained release)」は、その従来の意味で、長時間にわたって活性

50

材料の漸進放出を提供する、特定の実施態様では、長時間にわたって実質的に一定の血液レベル、すなわち、制御放出もさらにもたらし得る製剤を意味して使用される。

【0090】

用語「即時放出」は、その従来の意味で、投与時に活性材料の非遅延または制御放出を提供する製剤を意味して使用される。

【0091】

物質の「半減期」という用語は、ある物質がその薬理的、生理学的、またはその他の活性の半分を失うのに要する時間である。生体半減期は、重要な薬物動態パラメーターであり、通常、省略形 $t_{1/2}$ で表される。

【0092】

用語「非侵襲的」は、皮膚を穿刺しない処置様式を意味する。

【0093】

用語「非慢性投与」は、本明細書では、用語「急性投与」と互換的に使用でき、不規則な方法で対象者に測定または非測定量または部分の薬剤を与えることを意味する。非慢性投与は、単回用量処置であってもまたは複数用量処置であってもよく、場合により経時的に (over time) 与えてもよい。常にではないが一般に、非慢性投与は非慢性病態を治療または予防するために与えられる。特定の慢性病態が、本明細書に記載のメタドキシンまたはメタドキシン誘導体組成物の非慢性投与からも利益を受け得る。

【0094】

用語「慢性投与」は、対象者に規則的な方法で測定量の薬剤を与えることを意味する。いくつかの実施態様では、慢性投与は、1以上の慢性病態、障害または疾患の治療または予防を目的とする。慢性疾患は、以下の特徴のうち1以上を有する：慢性疾患は永続的である、後遺障害を残す、不可逆的病理変化によって生じる、リハビリテーションに患者の特別な訓練を必要とする、または長期の指導、観察、またはケアを必要とすると思われる。

【0095】

用語「単回用量処置」は、一度に摂取される測定量の薬剤を与えることを意味する。これは、個人の必要に応じて、規則的な方法で非慢性病態を治療するために与えられる。

【0096】

用語「 t_{max} 」は、濃度がピークに達する時間を意味する。単回用量投与後に最大濃度が生じる時間の計算は下式に従って実行される。

【数1】

$$t_{max} = \frac{2.303}{\lambda_a - \lambda_z} \log \frac{\lambda_a}{\lambda_z}$$

【0097】

式中、 λ_a および λ_z は、それぞれ見掛けの吸収および排出速度定数である。

【実施例】

【0098】

実施例1：一般法

本明細書に記載の実施例は一般に下記の試薬および方法を用いて実施した。

【0099】

試験動物

まず、ノックアウトマウス (KO2) マウス (The Dutch - Belgium Frafgil X Consortium, 1994) を Jackson Laboratory から入手し、野生型 (WT) 同腹子を C57BL/6J バックグラウンドで作成し、8世代を超えて C57BL/6J バックグラウンドに対して繰り返し戻し交配した。Fmr1 ノックアウトマウスを、12時間明暗周期 (午前7時から午後7時まで点灯；試験は明期に行った) の温度および湿度制御室で同じ遺伝子型の群内で飼育した。食餌お

10

20

30

40

50

よび水を自由摂取させつつ、飼育室内で室温および湿度を継続的に記録した。試験は、行動試験中2または6か月齢の健康なFmr1ノックアウトマウスおよびそれらの野生型同腹子（処置群当たりマウスN = 10）で行った。マウスは市販のプラスチックケージで飼育し、試験はUK Animals (Scientific Procedures) Act、1986の要件に従って行った。総ての試験は、遺伝子型および薬物処置に対して盲検として行った。動物には実験を行う前に1週間の最小環境順化期間を設けた。環境順化期間には予防または治療処置は投与しなかった。

【0100】

薬物

試験1（実施例2）では、メタドキシンを生理食塩水に溶かし、7日間、100、150、または200mg/kg/1日1回の用量で腹腔内投与した。試験2（実施例3）のin vivo試験では、メタドキシンを生理食塩水に溶かし、7日間、1日1回、150mg/kg/日の腹腔内用量または150または300mg/kg/日（容量0.1ml）の経口用量で投与した。試験2のin vitro試験では、メタドキシンを5時間、300μMの濃度で投与した。総ての場合で、生理食塩水をビヒクル（対照）として使用した。

【0101】

行動試験

社会的相互作用および社会的認知記憶：マウスは、接近、追跡、匂い嗅ぎ、グルーミング、攻撃的遭遇、交尾、養育行動、ネスティング、および身を寄せ合って群れで眠るなどの、容易にスコア化される社会的行動を営む社会的な種である。マウスにおける社会的接近は、初見マウスに対する匂い嗅ぎの時間によって評価した。

【0102】

マウスを、新鮮な木材チップを床に敷いた、成体のホームケージと同桁のサイズの試験アリーナ/ケージ（40×23×12cmケージ、マウスの観察を助けるためにパースペックスの蓋を持つ）に置いた。試験前に数匹の試験に用いないマウスをこの装置に置くことで、バックグラウンドのマウスの匂いをつけた。マウスは試験の10～15分前にこの試験室に移した。試験対象および若年個体をこの試験ケージに同時に置いた。試験マウスによる刺激若年個体の匂い嗅ぎおよび近接追跡（尾から<2cm）として定義される社会調査の対面の総時間および回数を3分間評価した。30分後、同じ刺激若年個体を用いて試験を繰り返した。収集したデータパラメーターは習得および認知のための匂い嗅ぎの対面の総時間および総数であった。トライアル2/トライアル1+2と定義される社会的記憶比を導いた。従って、記憶なし（例えば、20/(20+20)=0.5および記憶あり（例えば、10/(20+10)=0.5）。

【0103】

Y迷路交替行動：2つの課題を実施した。1つ目は、アーム選択間の自発的交替行動のアンラーニングアセスメントであった。2つ目は空間参照記憶課題であり、ここでは、動物は2つのアームのうちどちらに食餌報酬があったかを学習しなければならなかった。この訓練の開始の前日に、マウスにこの迷路を5分間自由に探索させた。次に、これらのマウスは、餌が左のアームに置かれていたものと、餌が右のアームに置かれていたものの2つのトライアルを受けた。この手順により、これらのアームのうち一方の偏好が生じるのを防いだ。

【0104】

Y水迷路：透明なパースペックスY迷路に20の水を2cmまで入れた。これはマウスを一方のアームの遠位端の出口チューブまでパドリングした後に迷路を離れるよう誘導した。この迷路を顕著な視覚的刺激に取り囲まれた部屋の中央に置いた。

【0105】

報酬付きT迷路交替行動：高架または壁のあるT字型の装置（水平に配置）を用いた。マウスをTの基部に置き、このステムの他端に隣接するゴールアームの一方を選択させる。2回のトライアルを迅速に連続して行い、2回目のトライアルは、最初の選択の記憶を

反映してマウスにそれまでにいなかったアームを選択するように要求した（自発的交替行動）。この傾向はマウスを空腹にさせ、マウスが交替行動を起こせば好みの餌の報酬を与えることによって強化された。具体的には、このT迷路に対する4日間の順化期間の後に、マウスを、アーム選択を変えて甘いコンデンスミルクを報酬として受けるよう訓練した。

【0106】

連続小路： この装置は、4つの連続する直線上に配置された、塗装木材製の不安を増す小路（各連続する小路は薄い色を塗り、低い壁を備え、かつノまたは手前の小路よりも狭くなっていた）からなっていた。各セクションまたは小路は25cmの長さであった。小路1は、高さ25cmの壁を備え、8.5cm幅であり、黒に塗られていた。0.5cm下がって小路2となり、これはまた8.5cm幅であるが、高さ1.3cmの壁を備え、灰色であった。1.0cm下がって小路3となり、これは3.5cm幅であり、高さ0.8cmの壁を備え、白色であった。0.4cm下がって小路4となり、これはまた白色であったが、1.2cm幅であり、高さ0.2cmの壁であった。この装置は、小路1の裏を50cmの高さでスタンドに固定することによって高架とした。マウスが落ちた場合にアーム3と4の下にパディングを設けた。各マウスを小路1の閉鎖末端に壁に向けて置いた。タイマーをスタートし、1)試験の全長(5分)+各アームに入る潜時、および2)小路1で過ごす時間を測定した。マウスが4本の脚を総て次の小路に置いた場合に、その小路に入ったと見なした。各小路で過ごす総時間(4本の脚総て)を記録した。

10

【0107】

文脈的恐怖条件付け： 文脈的恐怖条件付け試験では、マウスを新規な環境（暗チャンバー）に置き、および合図と電気フットショック（0.2mA 1秒（試験1）または0.7mA 0.5秒（試験2））の対を与えた。次に、初期トレーニングとして試験した際に、マウスは不動反応(freezing)(Blanchard, 1969)または文脈的恐怖条件付けと呼ばれる自然の防御応答を示した。不動反応時間は、マウスが呼吸をせずに不動挙動で過ごした時間として定義された。このデータは試験期間に対するパーセンテージとして表した。トレーニングセッションの24時間後に、マウスを5分間、ショック提供のないトレーニングチャンバーで試験し、不動反応挙動を観察した。

20

【0108】

統計学： 多変量分散分析を用いて、データの群の差異を評価した。行動データについて反復測定ANOVAを行った。各ANOVAにおける統計学的に有意な効果を、ニューマン-コイルス検定（試験1）またはチューキー検定（試験2）を用い、事後比較で追跡した。0.05未満のp値を有意と見なした。

30

【0109】

生化学試験

リン酸化ERKおよびAkt： Ras-Mek-ERKおよびPI3K-Akt-mTORシグナル伝達経路は、シナプスの可塑性の変化の基礎にある遺伝子転写に依存する活性の媒介に関与する(Klann and Dever, 2004)。リン酸化ERKおよびAktタンパク質の発現は、Lopez Verrilli (Lopez Verrilli et al., 2009)により従前に記載されているようにウエスタンブロット解析によって測定した。用いた抗体は、Akt(1/1000)およびキナーゼ(ERK)1/2(1/2000)に対する抗リン酸特異的抗体であった(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)。ホスホ-ERKに対する抗体は、ホスホ-ERK1/2(Thr202/Tyr204)におけるリン酸化を検出し、ホスホ-Aktに対する抗体は、ホスホ-Akt(Thr308)におけるリン酸化を検出する。総AktおよびERK1/2タンパク質含量およびリン酸化ERK およびAktは、抗ホスホ-Akt抗体(1/1000)および抗ホスホ-ERK抗体(1/2000)(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)で膜をブロットすることにより評価した。AktまたはERKのリン酸化は、同じサンプル中のタンパク質含量に対して正規化し、基底レベルを100%として、基底状態に対する変化の%として表した。タンパク質付加量は、膜を剥離し、-アクチン抗体(1/1000)(Sigma-Aldrich, St. Louis,

40

50

MO, USA)で再プロットすることによって評価した。血液リンパ球でのリン酸化ERKおよびAktタンパク質の発現は、フローサイトメトリーにより測定した。リンパ球のバイオマーカーの決定のために、FACSstar plus (Becton Dickinson)を488nmに合わせた励起レーザーとともに用い、FITCからの緑色蛍光(GST)を、515~545nmバンドパスフィルターを通して採取した。平均FITC蛍光強度を参照細胞の蛍光に対して計算した。平均細胞蛍光強度(MFI)は、細胞当たりに結合したAb分子の平均数に正比例する。

【0110】

ニューロンの形態：海馬細胞培養物を、妊娠胎生17.5日目(E17.5)の野生型およびFmr1 KO胎児マウスから調製した。マウスを頸椎脱臼により殺し、摘出した海馬細胞を15mmマルチウェルバイアル(Falcon Primaria)に播種した。in vitroで5日後、薬物処置後の樹状突起棘形態形成のモニタリングを助けるために緑色蛍光タンパク質(GFP)をトランスフェクトした(Ethell and Yamaguchi, 1999; Ethell et al., 2001, Henkemeyer et al., 2003)。樹状突起棘はin vitro 16日目(DIV)前後に見られた。in vitro 17日目に培養物を300 μM濃度のメタドキシンで5時間処理した。

10

【0111】

GFPトランスフェクトニューロンの糸状仮足密度を、スタックトZeiss共焦点で生成した画像(40×対物レンズ、20×0.2 μmのスタック)のSholl分析を行うことによって定量した。Metamorphソフトウェアを用い、同心円の均等間隔の円(総て20 μm)を各ニューロンの細胞体の前後に描き、次に、糸状仮足の量を円ごとに計数した。計数値の平均を対応のない両側スチューデントのT検定を用いて比較した。

20

【0112】

GFPトランスフェクトニューロンの突起棘の成熟度を、Metamorphソフトウェア(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて解析した。突起棘形態測定分析のため、各ニューロンについて70~100 μmの2か所の遠位樹状セグメントを選択した。各突起棘に関して、長さと幅を測定した。長さは突起の基部から先端までの距離と定義され、幅は突起棘の長軸に対して垂直の最大距離として定義された。測定値は対応のない両側スチューデントのT検定を用いて比較し、多重比較のためのANOVA補正を行った。

30

【0113】

de novo海馬タンパク質合成：海馬横断面切片(400 μm)を6週齢のFmr1ノックアウトおよびWTマウスから得た。タンパク質合成アッセイは、個々の哺乳動物細胞で、またヘテロ細胞集団でグローバルなタンパク質合成のモニタリングおよび定量を可能とする非放射性的蛍光活性化細胞選別に基づくアッセイであるsurface sensing of translation(SUNSET)法(Hoeffler, 2011)を用いて従前に記載されたように行った。この試験で用いたメタドキシンの濃度は300 μMであった。

30

【0114】

実施例2：脆弱X症候群のFmr1ノックアウトマウスモデルにおける学習および記憶欠陥ならびに生化学的異常に対するメタドキシン(100~200 mg/kg)処置の効果(試験1)

40

行動分析

文脈的恐怖条件付け：最初の試験では、N=10のWTおよびFmr1ノックアウトマウス群における文脈的恐怖条件付けに対するビヒクルまたは150 mg/kgメタドキシン1日1回、7日間の腹腔内投与の効果を調べた。ビヒクル処置Fmr1ノックアウトマウスは、試験セッション中の不動反応の減少に反映される文脈的恐怖条件付けパラダイムにおいて学習の欠損を示した(図1、パネルA(p<0.0001))。メタドキシン投与は、Fmr1ノックアウトマウスにおける学習欠損効果を逆転させ、メタドキシン処置マウスはメタドキシン処置WTマウスとは異なっていたので(p<0.05)、この逆転は部分的なものであった。この試験を繰り返し、N=10のWTおよびFmr1ノックア

50

ウトマウス群における文脈的恐怖条件付けに対するビヒクル、100または200 mg / kg メタドキシリン 1 日 1 回、7 日間の腹腔内投与の用量依存効果を検討した（図 1、パネル B および C）。この試験において、ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスは、ビヒクル処置 WT マウスに比べて学習欠損を示し（ $p < 0.0001$ ）、最初の試験の再現となった。100 mg / kg メタドキシリンは、Fmr1 ノックアウトマウスの欠損の逆転をもたしたが（ $P < 0.05$ ）、メタドキシリン処置 Fmr1 ノックアウトマウスはメタドキシリン処置野生型マウスとは異なっていたことから（ $p < 0.0001$ ）、これは部分的な逆転であった。Fmr1 ノックアウトマウスで見られた学習欠損は、200 mg / kg i.p. メタドキシリンによる処置の後に完全に逆転された（処置された Fmr1 マウスはビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスとは異なっていたが（ $P < 0.0001$ ）、メタドキシリン処置 WT マウスとは異ならなかった）。メタドキシリン処置は、どちらの試験でも WT マウスに対して効果はなかった（図 1、パネル A ~ C）。

10

【0115】

社会的接近： ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスは、匂いの嗅ぎ合いにより示される社会的接近の低さを示した（図 2（ $p < 0.0001$ ））。7 日間の 1 日 1 回、150 mg / kg メタドキシリンでの腹腔内処置は、Fmr1 ノックアウトマウスの社会的接近を増やした（ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスと比べて $p < 0.0001$ ）。メタドキシリンで処置された Fmr1 ノックアウトマウスは、WT マウスの効果に近づく傾向はあったものの、メタドキシリン処置 WT マウスとは異なっていた（ $p < 0.05$ ）。メタドキシリン処置は WT マウスに効果はなかった。

20

【0116】

Y 迷路自発的交替行動： $N = 10$ の WT または Fmr1 ノックアウトマウス群における自発的交替行動に対する 7 日間の 1 日 1 回、ビヒクルまたは 150 mg / kg メタドキシリンによる処置の効果を図 3 パネル A に示す。ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスは、ビヒクル処置 WT マウスよりも低い自発的交替行動を示した（ $p < 0.0001$ ）。メタドキシリン処置は、Fmr1 ノックアウトマウスにおけるビヒクル処置に比べて自発的交替行動を増やしたが（ $p < 0.0001$ ）、メタドキシリン処置 Fmr1 ノックアウトマウスはメタドキシリン処置 WT マウスに比べて欠損を示した（ $p < 0.01$ ）。従って、メタドキシリンは、Fmr1 ノックアウトマウスに見られる欠損の部分的逆転をもたらした。

30

【0117】

Y 迷路参照記憶課題： $N = 10$ の WT または Fmr1 ノックアウトマウス群における報酬付き参照記憶学習に対する 7 日間の 1 日 1 回、ビヒクルまたは 150 mg / kg メタドキシリンによる処置の効果を図 3 パネル B に示す。ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスは、ビヒクル処置 WT マウスよりも低い適当なアーム選択を行った（ $p < 0.0001$ ）。メタドキシリン処置 Fmr1 ノックアウトマウスはメタドキシリン処置 WT マウスとは異ならなかったもので、メタドキシリン処置は、ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスに比べてこの欠損を軽減していた（ $p < 0.0001$ ）。メタドキシリン処置は WT マウスに効果はなかった。

【0118】

Y 水迷路左右弁別： $N = 10$ の WT または Fmr1 ノックアウトマウス群における嫌悪的動機付け空間弁別学習に対する 7 日間の 1 日 1 回、ビヒクルまたは 150 mg / kg メタドキシリンによる処置の効果を図 3 パネル C に示す。ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスは、ビヒクル処置 WT マウスよりも不適切なアーム選択の回数が多いことを示した。この欠損はメタドキシリン処置により軽減された。

40

【0119】

T 迷路報酬付き交替行動課題： $N = 10$ の WT または Fmr1 ノックアウトマウス群における報酬交替行動作業記憶に対する 7 日間の 1 日 1 回、ビヒクルまたは 150 mg / kg メタドキシリンによる処置の効果を図 4 に示す。ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスは、ビヒクル処置 WT マウスに比べて正しいアームに到達する潜時間が長いことを示した（ $p < 0.0001$ ）。メタドキシリン処置は、Fmr1 ノックアウトマウスにおけるビヒ

50

クル処置に比べてこの欠損を軽減し ($p < 0.0001$)、メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトマウスは WT マウスよりも応答が遅かったことから ($p < 0.0001$) この逆転は部分的なものであった。

【0120】

連続小路： N = 10 の WT または Fmr1 ノックアウトマウス群における連続小路課題での行動に対する 7 日間の 1 日 1 回、ビヒクルまたは 150 mg/kg メタドキシンによる処置の効果を図 5 に示し、以下にさらに記載する。

【0121】

連続小路試験は、不安（小路 1 進入潜時）および活動過多（小路 2 ~ 4）を効果的に測定した。小路 1 から連続小路 2、3、および 4 への進行は、ますます低くなる壁と狭くなり、より露出度の高くなる開放的アームを有するますます明るい色になる環境に曝されることを伴う。開放的アームで費やす時間および開放的アームへの進入は不安の指標となり；逆に、より開放的なアームで費やす時間が増えることは、活動過多を表した。これらの因子は、活動過多を伴う一定範囲の不安様行動を一括して取り扱う高感度試験を可能とした。

10

【0122】

小路 1： Fmr1 ノックアウトマウスは WT マウスよりも大きい不安を示した ($p < 0.001$)。完全な正常化が見られたので、メタドキシンで処置した Fmr1 ノックアウトマウスは、ビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスに比べて不安の改善を示した ($p < 0.001$)。メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトとメタドキシン処置 WT マウスの間に差異は無かった。また、メタドキシン処置は WT マウスに効果は無かった。

20

【0123】

小路 2： WT マウスは、Fmr1 ノックアウトマウスと比べた場合、小路 2 で低い活性を示した ($p < 0.0001$)。メタドキシン処置は Fmr1 ノックアウトマウスの活動過多を軽減したが ($p < 0.001$)、メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトと WT マウスは異なっていたことから ($p < 0.001$)、この活動過多の逆転は部分的なものであった。メタドキシン処置は WT マウスに対して効果はなかった。

【0124】

小路 3： Fmr1 ノックアウトマウスは、WT マウスに比べて活動過多を示した ($p < 0.0001$)。メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトマウスはビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスとは異なっていなかったことから、この活動過多はメタドキシンにより逆転されたものではなかった。メタドキシン処置は WT マウスに対して効果はなかった。

30

【0125】

小路 4： Fmr1 ノックアウトマウスは、WT マウスに比べて活動過多を示した ($p < 0.01$)。メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトマウスはビヒクル処置 Fmr1 ノックアウトマウスよりも低い活動を示したことから ($p < 0.01$)、メタドキシン処置はこの活動過多を逆転していた。メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトマウスはメタドキシン処置 WT マウスと異ならなかったことから、この効果は正常化を表した。メタドキシン処置は WT マウスに対して効果はなかった。

40

【0126】

全体的に見れば、特定の理論に縛られることを望むものではないが、連続小路試験は、Fmr1 ノックアウトマウスは WT マウスに比べて不安および活動過多の増大を呈するというを示したと考えられる。メタドキシン処置は、Fmr1 ノックアウトマウスにおけるこの不安および活動過多を軽減したが、WT マウスは影響を受けないままであった。

【0127】

生化学的分析

ERK および Akt のリン酸化： N = 5 の Fmr1 ノックアウトまたは WT マウスにおける、脳の ERK または Akt の全脳リン酸化に対する 7 日間の 1 日 1 回、ビヒクルまたは 150 mg/kg メタドキシンいずれかの腹腔内処置の効果を図 6 に示す。リン酸化レ

50

ベルは全 E R K に対するリン酸化物の比として評価した。この比の増大は E R K の活性化を示した。E R K のリン酸化は、ビヒクル対照に比べてビヒクル処置 F m r 1 ノックアウトマウスで増大したが ($p < 0.001$)、この効果は脆弱 X 症候群を有するヒト対象で見られる E R K の異常な活性化を再現した (Wang et al., 2012)。メタドキシシン処置 W T マウスと比べた場合に差異は見られなかったため、この効果はメタドキシシン処置により低減された ($p < 0.01$)。メタドキシシンは、W T マウスの E R K のリン酸化またはいずれのマウスにおいても総 E R K レベルに対して効果は無かった。総 A k t に対するリン酸化 A k t の比はまた、ビヒクル処置 W T マウスに比べてビヒクル処置 F m r 1 ノックアウトマウスで増大した ($p < 0.0001$)。F m r 1 ノックアウトマウスは対照と差異が無かったため、メタドキシシン処置は、F m r 1 ノックアウトマウスにおけるリン酸化 A k t の相対レベルを低減した ($p < 0.01$)。メタドキシシン処置は W T マウスに対して、またはいずれのマウスにおいても総 A k t レベルに対して効果は無かった。

【0128】

実施例 3 : F m r 1 ノックアウト脆弱 X マウスモデルにおけるメタドキシシンの評価 (試験 2)

6 か月齢 F m r 1 ノックアウトマウスにおけるメタドキシシンの行動効果

文脈的恐怖条件付け : 最初の試験では、 $N = 10$ の 6 か月齢 W T および F m r 1 ノックアウトマウス群における文脈的恐怖条件付けに対するビヒクルまたは 150 mg/kg メタドキシシン 1 日 1 回、7 日間の腹腔内投与の効果を調べた。ビヒクル処置 F m r 1 ノックアウトマウス (K O - V) は、試験セッション中の不動反応の減少に反映される、ビヒクル処置 W T マウス (W T - V) と比べた場合の文脈的恐怖条件付けパラダイムにおける学習欠損を示した (図 7 ($p < 0.0001$))。メタドキシシン投与は、F m r 1 ノックアウトマウスにおける学習欠損効果を逆転させた ($p < 0.0001$ K O - M - 150 対 K O - V)。メタドキシシン処置 K O マウスはメタドキシシン処置 W T マウスと異ならなかったため、これは完全な逆転であった。

【0129】

社会的接近および社会的記憶 : 社会的接近データ (最初のトライアル 1) を図 8 パネル A (匂いの嗅ぎ合いの回数) およびパネル C (匂い嗅ぎの持続時間) に示す。匂いの嗅ぎ合い社会的記憶データ (トライアル 2、トライアル 1 の 24 時間後) を図 8 パネル B (匂いの嗅ぎ合いの回数) およびパネル D (匂い嗅ぎの持続時間) に示す。これらの結果を以下にさらに考察する。

【0130】

トライアル 1 では、F m r 1 ノックアウトマウスは、W T マウスに比べ、匂いの嗅ぎ合いの回数は多く ($p < 0.0001$) (図 8 パネル A 参照)、匂い嗅ぎの持続時間は少なかった ($p < 0.0001$) (図 8 パネル C)。これらの社会的相互作用欠損は、他の研究者らにより F m r 1 ノックアウトマウスで報告されているものに一致する (Thomas et al., 2011)。対面の回数および匂い嗅ぎの持続時間の両方に関して、メタドキシシン処置 F m r 1 ノックアウトマウスは匂いの嗅ぎ合いの回数の測定値に関してメタドキシシン処置 W T マウスと異ならなかったため、メタドキシシン処置は、F m r 1 ノックアウトマウスにおける異常の逆転をもたらした ($p < 0.0001$ それぞれ K O - M - 150 対 K O - V)。匂い嗅ぎの持続時間の測定値に関して救済が示されたものの、F m r 1 ノックアウトマウスはメタドキシシン処置の W T マウスに比べて差異があるままであったため ($p < 0.05$)、この効果は部分的なものであった。メタドキシシンは、W T マウスに対して効果は無かった。これらのデータは、F m r 1 ノックアウトマウスにおける異常な社会的接近行動がメタドキシシンにより救済されたことを示した。

【0131】

トライアル 2 では、F m r 1 ノックアウトマウスは、野生型マウスに比べて匂いの嗅ぎ合いの回数の増加と匂い嗅ぎの持続時間の増加の両方を示した (各測定に関して $p < 0.0001$ 、それぞれ図 8 パネル B および D)。これは順化の失敗、従って、社会的記憶の欠損を反映した。メタドキシシン処置は、これらの差異を軽減した ($p < 0.0001$ K

O - M - 150 対 KO - V)。メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトマウスとメタドキシン処置 WT マウスの間の差異が維持されたことから ($p < 0.05$)、この匂いの嗅ぎ合いの回数の逆転は部分的なものであった。メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトとメタドキシン処置 WT マウスの間に差異は見られなかったことから、このメタドキシンによる逆転は、匂い嗅ぎの持続時間に関しては完全なものであった。メタドキシン処置は、WT マウスに対して効果は無かった。これらのデータは、メタドキシンが Fmr1 ノックアウトマウスにおける社会的記憶障害を軽減したことを示した。この社会的記憶欠損の軽減を、社会的記憶比 (実施例 1 に記載) の計算により以下に示す。

【0132】

社会的記憶比は、匂いの嗅ぎ合いの持続時間：トライアル 2 / トライアル 1 + 2 として定義された。従って、記憶無しの例は、例えば、 $20 / (20 + 20) = 0.5$ であり、記憶有りの例は、例えば、 $10 / (20 + 10) = 0.33$ である。

【0133】

計算された社会的記憶比は次の通りであった。

WT - V トライアル 2 / トライアル 1 + トライアル 2 : $12.4 / 12.4 + 26.8 = 0.3$ 、 < 0.5 記憶有り

KO - V トライアル 2 / トライアル 1 + トライアル 2 : $32.5 / 32.5 + 24.1 = 0.9$ 、記憶無し

WT - M トライアル 2 / トライアル 1 + トライアル 2 : $12.5 / 38.5 + 12.5 = 0.2$ 、 < 0.5 記憶有り

KO - M トライアル 2 / トライアル 1 + トライアル 2 : $12.7 / 28.4 + 12.7 = 0.3$ 、 < 0.5 記憶有り

【0134】

6 か月齢 Fmr1 ノックアウトマウスにおけるメタドキシンの生化学的效果

N = 10 の Fmr1 ノックアウトまたは WT マウスにおける全脳 pERK に対する 7 日間の 1 日 1 回、ビヒクルまたは 150 mg / kg メタドキシンいずれかの ip 処置の効果 (図 9 パネル A) および上記挙動試験後の脳の pAkt (図 9、パネル B) を図 9 に示す。具体的には、図 9 パネル A は、従前の試験で見られたように WT マウスに比べて Fmr1 ノックアウトマウスで増加した pAkt の脳レベルを示す ($P < 0.0001$)。メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトマウスはメタドキシン処置 WT マウスと異ならなかった (図 9 パネル A) ので、メタドキシン処置は、脳の pAkt におけるこの増加を逆転していた ($p < 0.0001$ KO - M - 150 対 KO - V)。図 9 パネル B は、従前の試験で見られたように WT マウスに比べて Fmr1 ノックアウトマウスで増加した pERK の脳レベルを示す ($p < 0.0001$ KO - M - 150 対 KO - V)。メタドキシン処置 Fmr1 ノックアウトマウスはメタドキシン処置 WT マウスと異ならなかった (図 9 パネル B) ので、この増加はメタドキシン処置により逆転されていた ($p < 0.0001$)。

【0135】

2 か月齢マウスの行動に対する腹腔内または経口投与後のメタドキシンの効果

図 10 は、2 か月齢の Fmr1 ノックアウトおよび WT マウスにおける文脈的恐怖条件付けに対する 7 日間の 1 日 1 回、 150 mg / kg ip 用量または 150 および 300 mg / kg 経口用量でのメタドキシン投与の効果を示す。具体的には、図 10 パネル A は、ビヒクルの ip および経口処置後の Fmr1 ノックアウトおよび WT マウスから得られた文脈的恐怖条件付けデータを示す。ビヒクルの投与経路に関する差異は無かった。Fmr1 ノックアウトマウスは、ip および経口経路を介したビヒクル処置後、WT マウスに比べて不動反応行動の減少を示した (各場合で $p < 0.0001$)。図 10 パネル B は、WT マウスにおける両投与経路によるメタドキシン処置の効果を示す。効果は見られなかった。図 10 パネル C は、Fmr1 ノックアウトマウスにおける ip 150 mg / kg および経口 150 および 300 mg / kg メタドキシン処置が Fmr1 ノックアウトマウスに見られる不動反応行動の減少を逆転したことを示す ($p < 0.01$ 、 $p < 0.0001$ 、および $p < 0.0001$ 、それぞれ KO - M - ip、KO - M - po 150、および

KO-M-po 300対KO-V-ipおよびKO-V po)。150mg poメタドキシンの投与効果は、300mg/kg poメタドキシンの投与効果と異ならなかった。Fmr1ノックアウトマウスにおける150および300mg/kg経口メタドキシンの効果は、150mg/kg ipメタドキシンの効果と異ならなかった。各場合において、メタドキシンの処置Fmr1ノックアウトマウスはメタドキシンの処置WTマウスと異ならなかったため、この逆転は完全なものであった。

【0136】

図11は、Fmr1ノックアウトおよびWTマウスにおける社会的接近および社会的記憶に対する7日間の1日1回、150mg/kg ipまたは150および300mg/kg経口用量でのメタドキシンの投与の効果を示す。具体的には、図11パネルAは、Fmr1ノックアウトまたはWTマウスにおける社会的接近行動に対するビヒクルまたは150mg/kg ipまたは150および300mg/kg経口でのメタドキシンの効果を示す。ビヒクルによるipまたは経口処置後、Fmr1ノックアウトマウスの匂い嗅ぎ行動の持続時間は、WTマウスに比べて減少した（各場合で $p < 0.0001$ ）。メタドキシンの処置はいずれの用量でもWTマウスに効果は無かった。しかしながら、150mg/kg ip、150mg/kg、および300mg/kg経口でのメタドキシンの処置は、Fmr1ノックアウトマウスに見られる社会的接近の欠損の逆転をもたらした（ $p < 0.0001$ それぞれKO-M-po150およびKO-M-po300対KO-V po）。経口メタドキシンのこの効果は、150～300mg/kgの間では用量依存的でなかった。メタドキシンの処置Fmr1ノックアウトマウスはメタドキシンの処置WTマウスと異ならなかったため、この逆転は完全なものであった。Fmr1ノックアウトマウスにおける150mg/kg ipメタドキシンの効果は、150mg/kg経口または300mg/kg経口メタドキシンの効果と異ならなかった。図11パネルBは、Fmr1ノックアウトまたはWTマウスにおける社会的記憶に対する150mg/kg ipまたは150および300mg/kg経口でのビヒクルまたはメタドキシンの効果を示す。ビヒクルによるipまたは経口処置後、Fmr1ノックアウトマウスの匂い嗅ぎ行動の持続時間は、WTマウスに比べて増加した（各場合で $p < 0.0001$ ）。メタドキシンの処置はいずれの用量でもWTマウスに効果は無かった。しかしながら、150mg/kg ip、150mg/kg経口、および300mg/kg経口でのメタドキシンの処置は、Fmr1ノックアウトマウスに見られる社会的接近の欠損の逆転をもたらした（ $p < 0.0001$ 、 $p < 0.05$ 、および $p < 0.01$ それぞれKO-M-ip150、KO-M-po150、およびKO-M-po300対KO-V-ipおよびKO-V po）。メタドキシンの処置Fmr1ノックアウトマウスはメタドキシンの処置WTマウスと異ならなかったため、この逆転は完全なものであった。Fmr1ノックアウトマウスにおける150mg/kg ipメタドキシンの効果は、150mg/kg経口または300mg/kg経口メタドキシンの効果と異ならなかった。また、150mg/kg～300mg/kgの間ではこれらの経口メタドキシンの処置の効果に用量依存性は無かった。

【0137】

2か月齢マウスにおける腹腔内または経口投与後の生化学マーカーに対するメタドキシンの効果

末梢リンパ球： 図12は、2か月齢のFmr1ノックアウトおよびWTマウスにおけるフローサイトメトリーにより決定された、リンパ球pAkt（図12パネルA）およびpERK（図12パネルB）に対する7日間の1日1回、150mg/kg ipまたは150mg/kgおよび300mg/kg経口用量でのメタドキシンの投与の効果を示す。具体的には、図12パネルAは、ビヒクル処置Fmr1ノックアウトマウスが、同等のビヒクル処置を受けたWTマウスに比べてリンパ球Aktのリン酸化の増大を呈したことを示す（ip投与および経口投与の両方に関して $p < 0.0001$ ）。Aktレベルは、同じ処置を受けたメタドキシンの処置Fmr1ノックアウトマウスおよびWTマウスの間で異ならなかったため、7日間の1日1回、150mg/kg ipまたは150mg/kgまたは300mg/kg経口用量でのメタドキシンの処置は、過剰に活性化されたAktを

正常化した。図12パネルBは、ビヒクル処置Fmr1ノックアウトマウスが同等のビヒクル処置を受けたWTマウスに比べてリンパ球ERKのリン酸化の増大を示したことを示す(ip投与および経口投与の両方に関して $p < 0.0001$)。pERKレベルは、同じ処置を受けたメタドキシン処置Fmr1ノックアウトマウスとWTマウスの間で異ならなかった。7日間の1日1回、150mg/kg ipまたは150mg/kgまたは300mg/kg経口用量でのメタドキシン処置は、過剰に活性化されたERKを正常化した。

【0138】

脳領域： 図13は、海馬、前頭前皮質、および線条体のpERKレベルに対する7日間の150mg/kgメタドキシン投与の効果を示す。pERKレベルは、3つの脳領域の総てでWTマウスに比べてFmr1ノックアウトマウスで増加していた(総ての場合で $p < 0.0001$)。pERKレベルは、ビヒクル処置Fmr1ノックアウトマウスに比べてメタドキシン処置Fmr1ノックアウトマウスにおいて低下した(総ての場合で $p < 0.0001$)。KO-M群とWT-M群の間で海馬および線条体に差異は無く、ERKの活性化の完全な逆転を示す。前頭前皮質における効果は部分的なものであり、KO-V群とKO-M群には差異があるままであった($p < 0.05$)。メタドキシンはWTマウスに対して効果は無かった。

10

【0139】

図14は、海馬、前頭前皮質および線条体のpAktレベルに対する7日間の150mg/kgメタドキシン投与の効果を示す。pAktレベルは、3つの脳領域の総てでWTマウスに比べてFmr1ノックアウトマウスで増加していた(総ての場合で $p < 0.0001$)。pAktレベルは、3つの脳領域の総てでビヒクル処置Fmr1ノックアウトマウスに比べてメタドキシン処置Fmr1ノックアウトマウスにおいて低下した(総ての場合で $p < 0.0001$)。総ての場合で、KO-M群とWT-M群の間で差異は無く、Aktの活性化の完全な逆転を示す。メタドキシンはWTマウスに対して効果は無かった。脳および血液で上昇したリン酸化ERKおよびAktレベルの減少はFmr1ノックアウトマウスの行動結果の改善と相関しており、このことは、リン酸化レベルがメタドキシン処置応答のバイオマーカーであることを示唆する。

20

【0140】

in vitroにおけるFmr1ノックアウトマウス由来の樹状突起系状仮足密度および初代海馬ニューロンの成熟に対するメタドキシンの効果

30

図15(パネルA~C)は、300μMメタドキシンによる5時間の処置の効果を示す。樹状突起は、それぞれ神経細胞体からの距離に基づいて10μmの10セグメントに分けた(左から右へ近位から遠位)。突起棘密度は、セグメント3では、WTマウス由来ニューロンに比べてFmr1ノックアウトマウス由来ニューロンで増加していた。具体的には、図15パネルAは、ニューロンの系状仮足密度を示す。Fmr1ノックアウトマウス由来の初代海馬ニューロンは、系状仮足密度の増加を示した($p < 0.001$)。300μMメタドキシンによる処置は、Fmr1ノックアウトマウスにおけるニューロンの系状仮足密度の異常な増加を軽減した($p < 0.001$)。Fmr1ノックアウトマウス由来ニューロンは、未熟な特徴を有し、より長く(図15パネルB($p < 0.01$))、かつ幅の狭い(図15パネルC($p < 0.01$))系状仮足を示した。メタドキシン処置は、この系状仮足長の増大を逆転させ(図15パネルB($p < 0.01$))、幅の増加を逆転させた(図15パネルC($p < 0.001$))。

40

【0141】

in vitroでのFmr1ノックアウトマウスにおけるde novo海馬タンパク質合成に対するメタドキシンの効果

図16は、Fmr1ノックアウトまたはWTマウス由来400μM海馬切片における基底de novoタンパク質合成に対するビヒクルまたは300μMメタドキシンのいずれかによる処置の効果を示す。タンパク質合成は、ビヒクル処置WT対照海馬よりもビヒクル処置Fmr1ノックアウトマウス由来海馬で高かった($p < 0.0001$)。メタド

50

キシン処置は、F m r 1 ノックアウトマウス海馬におけるタンパク質合成速度を低下させた。F m r 1 ノックアウトマウス由来海馬はメタドキシン処置 W T マウス由来海馬よりも高いタンパク質合成速度を維持していたことから ($p < 0.001$)、この効果は部分的なものであった。

【 0 1 4 2 】

【表 1】

表 1: 脆弱 X 症候群のマウスモデルにおけるメタドキシン (150mg/kg) の効果の概要

試験	経路/	fmr1 KO マウスにおける異常(Y/N)	欠損の軽減(Y/N)	従前試験の再現
6 か月齢マウスにおける行動効果				
文脈的恐怖条件付け	150mg/kg	欠損	Y	Y
社会的接近	150mg/kg	Y	Y	Y
社会的記憶	150mg/kg	Y	Y	検討されず
6 か月齢マウスにおける生化学的效果				
脳 Akt のリン酸化	150mg/kg	fmr1 KO マウスで増加	Y	Y
脳 ERK のリン酸化	150mg/kg	fmr1 KO マウスで増加	Y	Y
脳 GSK3β のリン酸化 (tyr219/tyr279)	150mg/kg i.p.	fmr1 KO マウスで増加	N	検討されず
脳 GST レベル	150mg/kg	fmr1 KO マウスで減少	Y	Y
2 か月齢マウスにおける腹腔内または経口投与後のメタドキシンの行動効果				
文脈的恐怖条件付け	150mg/kg ip	Y	Y	Y
社会的接近行動	150mg/kg ip	Y	Y	Y
社会的記憶	150mg/kg ip	Y	Y	検討されず
文脈的恐怖条件付け	150mg/kg po	Y	Y	検討されず
社会的接近行動	150mg/kg po	Y	Y	検討されず
社会的記憶	150mg/kg po	Y	Y	検討されず
文脈的恐怖条件付け	300mg/kg po	Y	Y	検討されず
社会的接近行動	300mg/kg po	Y	Y	検討されず
社会的記憶	300mg/kg po	Y	Y	検討されず
2 か月齢マウスにおける腹腔内または経口投与後のメタドキシンの生化学的效果				
リンパ球 pAkt および pERK	150mg/kg ip	増加	Y	検討されず
リンパ球 pGSK3β (tyr219/tyr279)	150mg/kg ip	増加	N	検討されず
リンパ球 GST	150mg/kg ip	減少	N	検討されず
リンパ球 pAkt および pERK	150mg/kg po	増加	Y	検討されず
リンパ球 pGSK3β (tyr219/tyr279)	150mg/kg po	増加	N	検討されず
リンパ球 GST	150mg/kg po	減少	N	検討されず
リンパ球 pAkt および pERK	300mg/kg po	増加	Y	検討されず
リンパ球 pGSK3β (tyr219/tyr279)	300mg/kg po	増加	N	検討されず
リンパ球 GST	300mg/kg po	減少	N	検討されず
海馬 pERK	150mg/kg ip	増加	Y	検討されず

前頭前皮質 pERK	150m g /kg ip	増加	Y	検討されず
線条体 pERK	150m g /kg ip	増加	Y	検討されず
海馬 pAkt	150m g /kg ip	増加	Y	検討されず
前頭前皮質 pAkt	150m g /kg ip	増加	Y	検討されず
線条体 pAkt	150m g /kg ip	増加	Y	検討されず
試験	経路/	fmr1 KO マウスにおける異常(Y/N)	欠損の軽減 (Y/N)	従前試験の再現
海馬 pGSK3β(ser9)	150m g /kg ip	通常レベル	NA	検討されず
前頭前皮質 pGSK3β(ser9)	150m g /kg ip	減少	N	検討されず
線条体 pGSK3β(ser9)	150m g /kg ip	減少	Y	検討されず
海馬 GST	150m g /kg ip	減少	N	検討されず
前頭前皮質 GST	150m g /kg ip	減少	N	検討されず
線条体 GST	150m g /kg ip	減少	Y	検討されず
海馬 pS6K1(ser235/236)	150m g /kg ip	増加	N	検討されず
前頭前皮質 pS6K1(ser235/236)	150m g /kg ip	増加	N	検討されず
線条体 pS6K1(ser235/236)	150m g /kg ip	増加	N	検討されず
海馬 pS6K1(ser240/244)	150m g /kg ip	増加	N	検討されず
前頭前皮質 pS6K1(ser240/244)	150m g /kg ip	増加	N	検討されず
線条体 pS6K1(ser240/244)	150m g /kg ip	増加	N	検討されず
in vitro における fmr1 ノックアウトマウス由来のニューロンの糸状仮足密度および成熟に対するメタドキシンの効果				
ニューロン糸状仮足密度	300 μM	増加	Y	検討されず
ニューロン糸状仮足長	300 μM	増加	Y	検討されず
ニューロン糸状仮足幅	300 μM	減少	Y	検討されず
in vitro での fmr1 ノックアウトマウスにおける de novo 海馬タンパク質合成に対するメタドキシンの効果				
De novo 海馬タンパク質合成速度	300 μM	増加	Y	検討されず

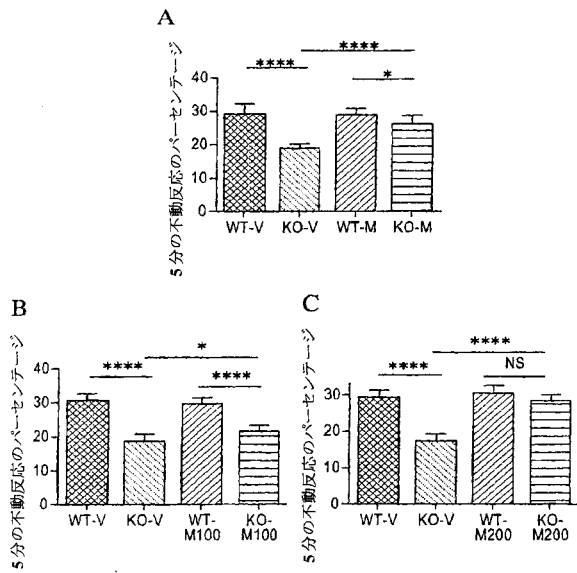
10

20

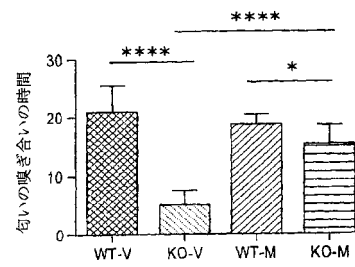
30

40

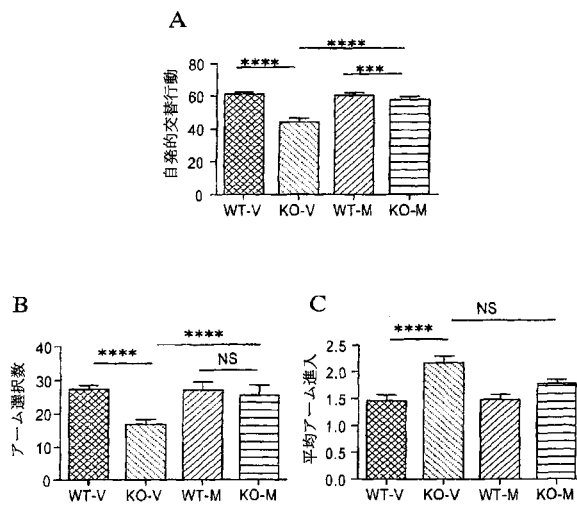
【 図 1 】



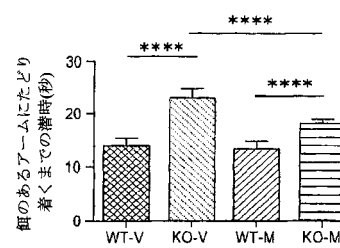
【 図 2 】



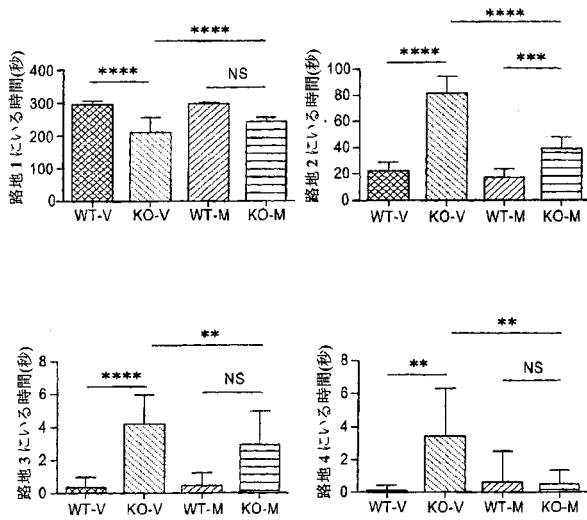
【 図 3 】



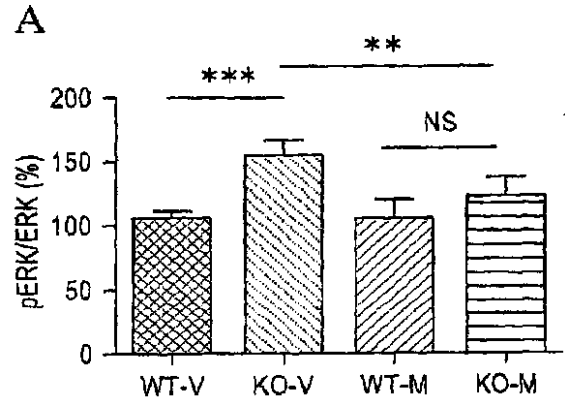
【 図 4 】



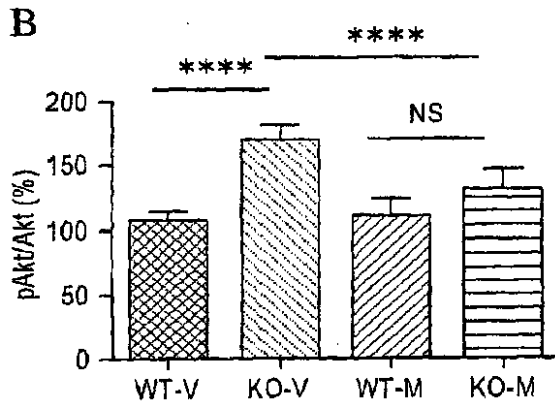
【図 5】



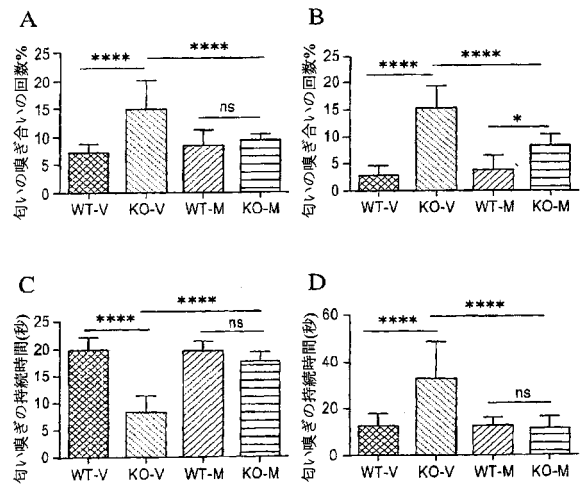
【図 6 A】



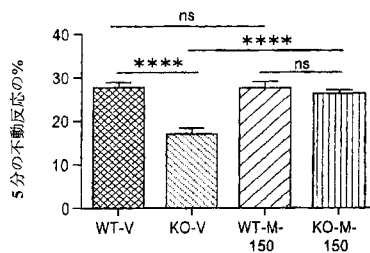
【図 6 B】



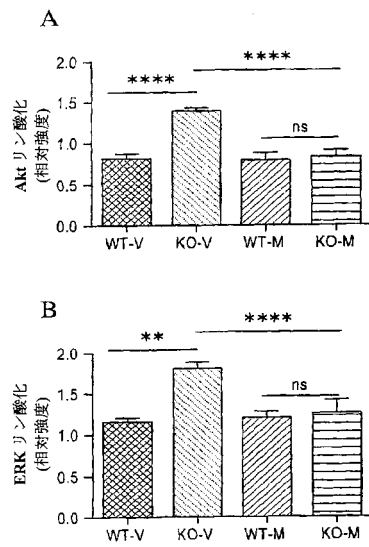
【図 8】



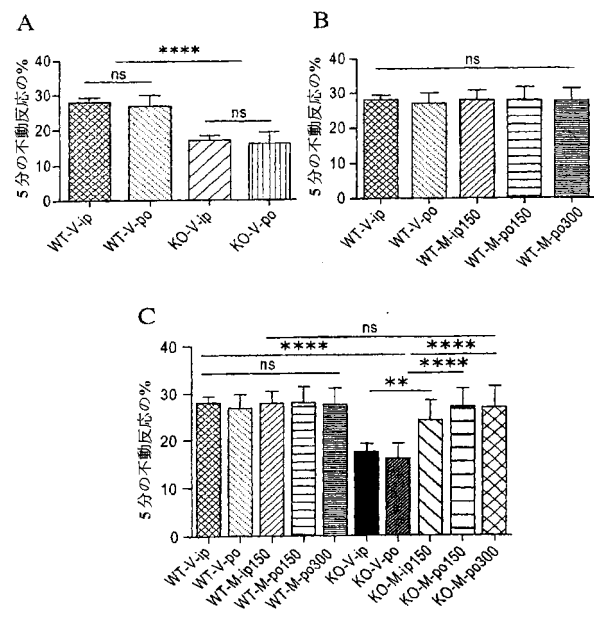
【図 7】



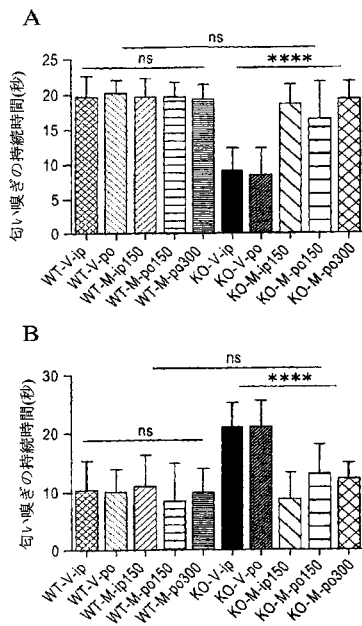
【図 9】



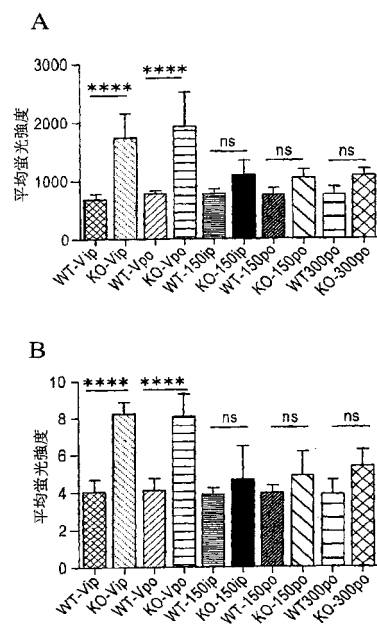
【図 10】



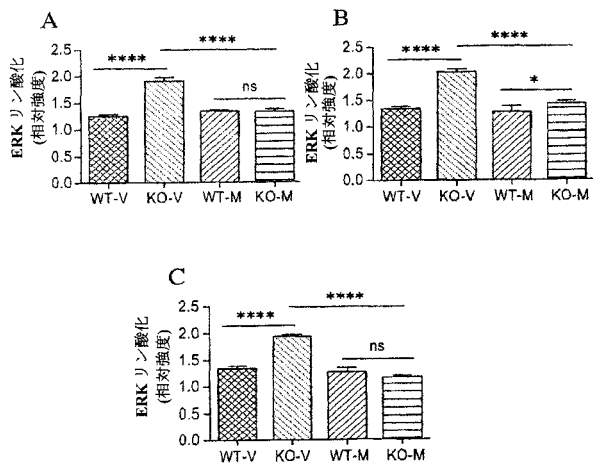
【図 11】



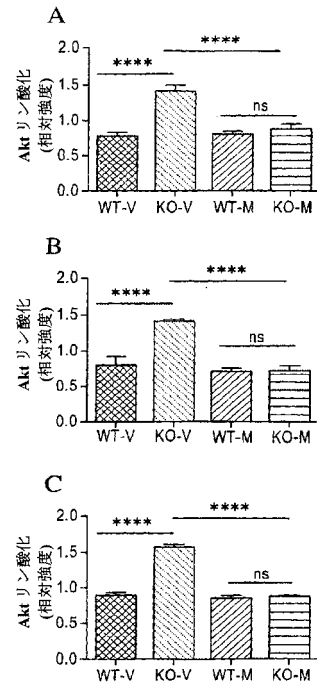
【図 12】



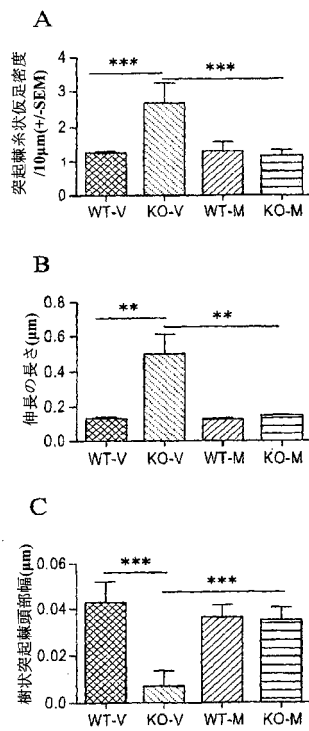
【図 13】



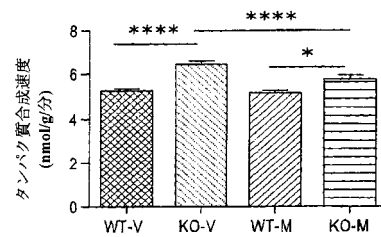
【図 14】



【図 15】



【図 16】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/002398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/4015 A61K31/4415
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/150261 A1 (ALCOBRA LTD [IL]; YAMIN RINA [IL]; MEGIDDO DALIA [IL]; ILAN YARON [IL]) 29 December 2010 (2010-12-29) cited in the application	1-8
A	examples 2-9	9,10
	claims 7,11,13-15	

A	WO 02/43507 A2 (HEALTH RES INST [US]; WALSH WILLIAM JOHN [US]; USMAN ANJUM IONA [US]) 6 June 2002 (2002-06-06) claims 1,3	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 March 2015

Date of mailing of the international search report

18/03/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schwachtgen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2014/002398

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010150261 A1	29-12-2010	AU 2010264074 A1 CA 2766107 A1 CN 102481291 A EA 201270068 A1 EP 2445498 A1 JP 2012531402 A NZ 597319 A US 2012264781 A1 US 2013012549 A1 WO 2010150261 A1	19-01-2012 29-12-2010 30-05-2012 30-07-2012 02-05-2012 10-12-2012 27-06-2014 18-10-2012 10-01-2013 29-12-2010
WO 0243507 A2	06-06-2002	AU 3652702 A US 2002155170 A1 US 2007020343 A1 US 2007224290 A1 WO 0243507 A2	11-06-2002 24-10-2002 25-01-2007 27-09-2007 06-06-2002

フロントページの続き

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

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74)代理人 100188651

弁理士 遠藤 広介

(72)発明者 ヤーロン、ダニエリ

イスラエル国テルアビブ、ロスチャイルド、アベニユ、65

(72)発明者 ダリア、メギド

イスラエル国ナタフ、エム・ピー・ユデアン、ヒルズ

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC18 MA01 MA04 NA12 NA13 NA14 ZA02 ZA05
ZA06 ZA12 ZC54