

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6475733号  
(P6475733)

(45) 発行日 平成31年2月27日(2019.2.27)

(24) 登録日 平成31年2月8日(2019.2.8)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>A 6 1 K 31/13</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	31/13
<b>A 6 1 P 25/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	25/00

請求項の数 12 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2016-540464 (P2016-540464)	(73) 特許権者	500212295
(86) (22) 出願日	平成26年9月8日(2014.9.8)		ザ ユニバーシティー オブ モンタナ
(65) 公表番号	特表2016-529320 (P2016-529320A)		アメリカ合衆国 モンタナ州 ミズーラ
(43) 公表日	平成28年9月23日(2016.9.23)		ユニバーシティー ホール 116
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/054569	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開番号	W02015/035308		弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開日	平成27年3月12日(2015.3.12)	(74) 代理人	100075270
審査請求日	平成29年8月28日(2017.8.28)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	61/874,865	(74) 代理人	100101373
(32) 優先日	平成25年9月6日(2013.9.6)		弁理士 竹内 茂雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハロアルキルアミンを用いた神経細胞死の低減方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態を伴う被験体を処置するための医薬組成物であって、ハロアルキルアミンを有効成分として含み、ここで前記ハロアルキルアミンは、フェノキシベンザミンおよびその塩からなる群から選択されるものであり、前記ハロアルキルアミンは一過性低酸素および/または虚血状態の発生後24時間以内に投与されるものであり、前記中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態は外傷性脳損傷(TBI)により引き起こされるものである、前記医薬組成物。

【請求項 2】

被験体における神経脳細胞死の発生を低減する、請求項1に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3】

その必要がある被験体の中枢神経系における神経細胞死の発生を低減するための医薬組成物であって、ハロアルキルアミンを有効成分として含み、ここでハロアルキルアミンは、フェノキシベンザミンおよびその塩からなる群から選択されるものであり、前記ハロアルキルアミンは一過性低酸素および/または虚血状態の発生後24時間以内に投与されるものであり、前記神経細胞死の発生は外傷性脳損傷(TBI)事象により引き起こされるものである、前記医薬組成物。

【請求項 4】

TBI事象がむち打ち、爆風衝撃、および鈍器外傷からなる群から選択され、そのTBI事象が神経細胞の損傷または死を引き起こすのに十分な力のものである、請求項3に記載

20

載の医薬組成物。

【請求項 5】

被験体の海馬または皮質における神経脳細胞死の発生を低減する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

ハロアルキルアミンが 40 mg の単位投与量である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

さらに医薬的に許容できるキャリアーを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 8】

持続放出配合物である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

単回量で投与される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

TBI の発生後 16 時間以内に投与される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

被験体に単回量で、TBI の発生後 16 時間以内に投与される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 12】

単回量で、TBI の発生後 8 時間以内に投与される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引照

本出願は、U.S. Provisional Patent Application No. 61/874,865, 2013年9月6日出願に基づく優先権を主張し、その出願の開示内容を本明細書に援用する。

【0002】

30

技術分野

本出願は、外傷性脳損傷 (TBI) および / または中枢神経系における一過性低酸素 / 虚血状態を伴う被験体を処置するための、ハロアルキルアミン、たとえばフェノキシベンザミンを含む医薬組成物に関する。そのような状態は、神経細胞に酸化的損傷、アポトーシスまたはネクローシスを生じる可能性がある。開示する医薬組成物および方法は、これらの状態から生じる神経細胞の損傷または死の発生を低減する。

【背景技術】

【0003】

脳卒中は、臨床的には、局所性の脳機能喪失に現われる急速に発現する血管起源の症候群と定義される。より重篤な状況では脳機能喪失は全体的である。脳卒中は 2 つの広いタイプ、“虚血性脳卒中” (約 87%) と “出血性脳卒中” (約 10%) に分類できる。虚血性脳卒中は、脳への血液供給が突然中断された際に起きる。出血性脳卒中は、脳またはその周辺にある血管が破裂して脳組織内に直接に血液の漏出および蓄積が生じた際に起きる。さらに、患者は一過性虚血発作を経験する場合があります、それは将来のより重篤なエピソードの発現に対する高リスクの指標となる。脳卒中にはクモ膜下出血 (約 3%) も含まれる。脳卒中の症状にはしばしば下記のものが含まれる：しびれ感または脱力感、特に身体の片側；突然の錯乱状態または構語もしくは会話理解の障害；突然の片眼または両眼の視覚障害；突然の歩行障害；めまい；あるいは平衡感覚または協調運動の喪失。脳卒中の機序の理解が最近進歩したにもかかわらず、脳卒中管理はまだ最適ではない。

40

【0004】

50

脳卒中は世界中で心疾患および癌のみに次ぐ第3の主要な死因である。米国だけで毎年約780,000人が脳卒中を経験する。米国における脳卒中の経費は、直接経費と間接経費の両方を含めて430億米ドルを超える。直接経費は総額の約60%を占め、入院、医師の報酬、およびリハビリテーションを含む。これらの経費は普通は最初の3か月で15,000米ドル/患者に達する；しかし、約10%の症例で、この経費は35,000米ドルを超える。間接経費は残りの部分を占め、脳卒中被害者の生産性損失、介護者である家族構成員の生産性損失を含む(National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health,メリーランド州ベテスダ)。

#### 【0005】

脳卒中のリスクは年齢と共に増大する。55歳以降は10歳ごとに脳卒中を伴うリスクが倍増し、80代の個体の約40%が脳卒中を伴う。同様に、2回目の脳卒中を伴うリスクも経時的に増大する。2回目の脳卒中を伴うリスクは、1回目の5年後に25~40%である。ベビーブーム世代が高齢化するのに伴って、脳卒中発生の総数は実質的に増加すると予想されている。また、ベビーブーム世代が老齢期に達するにつれて集団の65歳以上の部分が増加するのに伴って、脳卒中関連療法の市場の規模は実質的に拡大するであろう。同様に、効果的治療に対する要求も劇的に高まるであろう。

#### 【0006】

外傷性脳損傷(TBI)はスポーツ関連またはレクリエーション関連の傷害により引き起こされる頻度が高く、それは米国における国民保健上の関心事である。CDCおよび米国病院救急部の統計に基づけば、年間で推定110万人がTBIのために病院に行く(CDC: MMWR Weekly. Nonfatal Traumatic Brain Injuries from Sports and Recreation Activities, Jul. 27, 2007; 56(29); 733-737)。最も高い割合のスポーツ関連またはレクリエーション関連TBI損傷は10~14歳の年齢の男女に関連する。TBIは軍隊境遇においても一般的であり、その場合はたとえば直接衝撃、弾丸や榴散弾などの穿通物体、および爆発により起きた爆風から脳損傷が生じる可能性がある。

#### 【0007】

急性脳炎はTBIと関係があるとされる場合が最も多く、その大部分のTBIは軽度と分類される。しかし、軽度のTBIですらその者が学校や職場に戻る能力に影響を及ぼし、長期的な認知その他の問題を生じる可能性がある。さらに、反復性および/または重篤なTBIは身体、認知、行動または情動問題を生じ、健康に対するさまざまな長期的な負の影響、たとえば記憶喪失、行動変化、およびうつ病のリスク増大をもたらす可能性がある。その結果、TBIの予防措置が望ましい。特に問題なのは、TBIにより誘発される一次または二次の神経病態を低減するのに有効な処置が無いことである。

#### 【0008】

TBIはヘテロロガスな損傷であるので新規な神経保護薬の開発は困難であることが証明されている。脳卒中とTBIには著しい相異があるのは明らかであるが、神経障害を生じる機序においては類似性がある。両損傷とも炎症、反応性酸素種(ROS)、反応性窒素種(RNS)、興奮毒性(excitotoxicity)、カルシウム調節異常、およびアポトーシスの発現を誘発する。TBIは血管切断をも生じて血流障害および虚血をもたらす。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0009】

【非特許文献1】CDC: MMWR Weekly. Nonfatal Traumatic Brain Injuries from Sports and Recreation Activities, Jul. 27, 2007; 56(29); 733-737

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

一過性低酸素および/または虚血状態の発生後に神経損傷が起きる前にそれを予防して実際に神経保護を提供する処置に対する緊急のニーズがある。回復を促進するために損傷を後で治療するのではなく、神経細胞における損傷および死が起きる前にそれを阻害また

10

20

30

40

50

は低減する予防的な方法および医薬組成物を本明細書に開示する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態をハロアルキルアミンで処置することに関する。1態様において、本発明は中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態を処置する方法であって、その必要がある被験体に療法有効量のハロアルキルアミン、たとえばフェノキシベンザミン(phenoxybenzamine)またはジベナミン(dibenamine)を投与することを含む方法を提供する。1観点において、ハロアルキルアミンの投与は、一過性低酸素および/または虚血状態あるいはTBI事象により引き起こされる被験体の線条体、海馬、または皮質における神経細胞死の発生を低減する。他の態様において、本発明は中枢神経系における神経細胞死の発生を低減する方法を提供する。本方法は一般に、その必要がある被験体に、療法有効量のハロアルキルアミンを有効成分のうちの少なくとも1種類として含む医薬組成物を投与することからなる。

10

【0012】

一過性低酸素および/または虚血状態は、低血圧、失血、心臓発作、外傷性脳損傷(TBI)、脊髄損傷(SCI)、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、気道閉塞、または新生児の低酸素もしくは虚血によってしばしば引き起こされる。しかし、この状態は多数の状態により引き起こされる可能性があり、それらはより全般的に、神経細胞に到達する酸素および/またはグルコースの一時的な欠如のため中枢神経系において神経細胞の損傷または死を引き起こす状態として分類することができる。

20

【0013】

他の態様において、本発明は、TBI事象により引き起こされる中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態を処置する方法であって、その必要がある被験体に療法有効量のハロアルキルアミンを投与することを含む方法に関する。TBI事象には、たとえばむち打ち(whiplash)、爆風(blast wave)衝撃、および鈍器(blunt force)外傷が含まれ、その際、それらの事象は神経細胞の損傷または死を引き起こすのに十分な力のものである。

【0014】

1態様において、有効成分としてのハロアルキルアミンを医薬的に許容できるキャリアーと共に投与する。ハロアルキルアミンを1種類以上の追加の有効成分と共に投与することができる。ハロアルキルアミンは持続放出配合物中であってもよい。

30

【0015】

本発明方法の1観点において、ハロアルキルアミンは約0.5mg/kg(体重)~約5、10または20mg/kg(体重)の単位投与量である。他の観点において、ハロアルキルアミンは、一過性低酸素および/または虚血状態の発生後、あるいはその状態の原因の発生、たとえば低血圧、失血、心臓発作、TBI事象、SCI事象、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、気道閉塞、または新生児の低酸素もしくは虚血の発生後、24、18、16、14、12、10、8、6、4または2時間以内に投与される。ハロアルキルアミンは静脈内注射により投与できる。

【0016】

特定の態様において、本発明は、中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態を処置するための医薬組成物であって、ハロアルキルアミンを有効成分として含む組成物に関する。1観点において、医薬組成物は、TBI事象により引き起こされる中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態を処置するためのものである。他の観点において、医薬組成物は被験体における神経細胞死の発生を低減する。たとえば、医薬組成物は、被験体の線条体、海馬、または皮質の神経細胞における神経細胞死の発生を低減する。他の態様において、本発明は、中枢神経系における神経細胞死の発生を低減するための医薬組成物に関する。1観点において、神経細胞死は一過性低酸素および/または虚血状態により引き起こされる。他の観点において、神経細胞死はTBI事象により引き起こされる。

40

50

## 【0017】

特定の1態様において、ハロアルキルアミンはフェノキシベンザミン、ジベナミン、またはその組合わせである。医薬組成物は、ハロアルキルアミン、たとえばフェノキシベンザミンを、約0.5mg/kg(体重)~約5、10、15または20mg/kg(体重)の単位投与量で含むことができる。医薬組成物はさらに、医薬的に許容できるキャリアーを含むことができる。それは持続放出配合物中であってもよい。

## 【0018】

好ましい態様において、医薬組成物は、一過性低酸素および/または虚血状態の発生後、あるいはその状態の原因の発生、たとえば低血圧、失血、心臓発作、TBI事象、SCI事象、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、気道閉塞、または新生児の低酸素もしくは虚血の発生後、24、18、16、14、12、10、8、6、4または2時間以内に投与される。医薬組成物は、好ましくは非経口または経口経路により投与されるが、他の経路も考慮され、状況に応じて使用できる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0019】

【図1】図1は、フェノキシベンザミンが海馬切片培養において酸素グルコース枯渇(OGD)からの有意の神経保護を与えることを示す。OGDに曝露しなかった対照切片培養物(図1A)、あるいはOGDに曝露し、次いで0.1μM(図1B)、10μM(図1C)、100μM(図1D)、1mM(図1E)の量のフェノキシベンザミンで処理した培養物、または処理しなかった培養物(図1F)の代表的蛍光イメージを示す。図1Gは、CA1(黒色棒)、CA3(白色棒)および歯状回(dentate gyrus)(DG-灰色棒)内のヨウ化プロピジウムの相対蛍光強度として提示された神経細胞喪失を示す。OGD=酸素グルコース枯渇(oxygen glucose deprivation)曝露した培養物;非OGD=OGD曝露しなかった対照培養物;\*\*\*はOGD曝露培養物に対比した $p < 0.001$ を表わす。

【図2】図2は、フェノキシベンザミンがOGDの16時間後までに送達された場合に有意の神経保護を与えることを示す。OGDに曝露しなかった対照切片培養物(図2A)、あるいはOGDに曝露し、次いでフェノキシベンザミンで2時間目(図2B)、4時間目(図2C)、8時間目(図2D)もしくは16時間目(図2E)に処理した培養物、または薬物処理を受けなかった培養物(図2F)の代表的蛍光イメージを示す。図2Gは、CA1(黒色棒)、CA3(白色棒)および歯状回(DG-灰色棒)内のヨウ化プロピジウムの相対蛍光強度として提示された神経細胞喪失を示す。OGD=酸素グルコース枯渇曝露した培養物;非OGD=OGD曝露しなかった対照培養物;\*\*\*はOGD曝露培養物に対比した $p < 0.001$ を表わす。

【図3】図3は、フェノキシベンザミンが行動機能を有意に改善したことを示す。図3Aは神経学的重症度スコア(neurological severity score)(NSS)を示し、図3BはTBI後30日間にわたるフットフォールト(foot fault)査定を示す。点線は非損傷動物を表わし、菱形アクセント付き線は生理食塩水処理した対照を表わし、丸アクセント付き線は1mg/kg(体重)のフェノキシベンザミンで処理した動物を表わす。\*は $p < 0.05$ を表わし、\*\*は $p < 0.01$ を表わし、\*\*\*は $p < 0.001$ を表わす;すべて生理食塩水対照に対比したもの。

【図4】図4は、フェノキシベンザミンが重篤なTBI後に学習能力および記憶力を有意に改善したことを示す。図4Aはラットについてのモーリス水迷路(Morris water maze)における遅延時間を示し、図4Bは目標の四分円内で取り除かれた脱出プラットフォームを探して過ごした平均時間を示す。損傷を受けた生理食塩水処理ラットを四角アクセント付き破線により表わす。損傷を受けたフェノキシベンザミン処理ラットを丸アクセント付き点線により表わす。偽対照を菱形アクセント付き実線により表わす。\*は $p < 0.05$ を表わし、\*\*は $p < 0.01$ を表わし、\*\*\*は $p < 0.001$ を表わす;すべて生理食塩水対照に対比したもの。

## 【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 0 】

本明細書中で用いるように、本明細書および特許請求の範囲で用いる動詞“含む(comprise)”およびその活用形は、その非限定的なセンスで、その語に続く項目が含まれるけれども具体的に述べられていない項目が除外されるわけではないことを意味するために用いられる。さらに、不定冠詞“a”または“an”によるある要素の表記は、その要素が1つあることおよび1つだけあることが状況から明らかに要求されない限り、その要素が1より多く存在する可能性を除外しない。したがって、不定冠詞“a”または“an”は“少なくとも1(at least one)”を意味する。

## 【 0 0 2 1 】

本明細書中で用いる用語“被験体”または“患者”は、いずれかの脊椎動物を表わし、それには、限定ではなく、ヒトおよび他の霊長類(たとえば、チンパンジーその他の類人猿、およびサル類)、家畜(たとえば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ)、飼育動物(たとえば、イヌおよびネコ)、実験動物(たとえば、げっ歯類、たとえばマウス、ラット、およびモルモット)、ならびに鳥類(たとえば、家禽、野鳥および狩猟鳥、たとえばニワトリ、シチメンチョウその他の地上で育つ大型の鳥(gallinaceous bird)、アヒル、ガンなど)が含まれる。ある実施形態において、被験体は哺乳動物であってもよい。他の実施形態において、被験体はヒトであってもよい。

10

## 【 0 0 2 2 】

用語“ハロアルキルアミン”は、本明細書中でハロアルキルアミン系の アドレナリン作動性効果遮断薬を意味するために用いられ、それにはたとえばフェノキシベンザミン、ジベナミン、および関連ハロアルキルアミン、ならびにその塩類が含まれる。

20

## 【 0 0 2 3 】

本明細書中で用いる用語“関連ハロアルキルアミン”には、フェノキシベンザミンに類似する構造をもち、かつフェノキシベンザミンの何らかのアドレナリン作動性関連効果を共有する化合物が含まれるが、これらに限定されない。そのような化合物は当業者に知られており、たとえばIversenらはフェノキシベンザミンを含めた合計21種類のハロアルキルアミン誘導体をアドレナリン作動性関連効果について試験した(Iversen L.L. et al., Inhibition of catecholamine uptake in the isolated heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine, Br. J. Pharmac, (1972) 46:647-657;たとえば pp. 650 - 651の表1および2を参照)。フェノキシベンザミンまたは他のハロアルキルアミンを溶液中加入した際に自然に形成される化学的環化生成物も本発明の範囲に含まれる(たとえば、Adams and Kostenbauder, Phenoxybenzamine stability in aqueous ethanolic solutions. II. Solvent effects on kinetics, International J of Pharmaceutics, (1985) 25:313-327を参照)。上記2刊行物中の化合物およびそれらの構造式の開示を本明細書に援用する。

30

## 【 0 0 2 4 】

本明細書中で用いる用語“神経細胞死”には、神経細胞、たとえば神経脳細胞または中枢神経系の他の神経細胞の死を生じるいずれかの経路または機序が含まれる。神経細胞死の経路または機序の限定ではない例には、アポトーシス、ネクローシス、ネクロトーシス(necroptosis)、および興奮毒性が含まれる。ある観点において、ハロアルキルアミンは神経細胞の損傷または死の発生を阻止することにより神経保護効果を及ぼし、それには中枢神経系の神経細胞、たとえば神経脳細胞における酸化的損傷、アポトーシス、および/またはネクローシスの発生を低減することが含まれる。

40

## 【 0 0 2 5 】

“塩”は、当技術分野で周知の多様な有機および無機の対イオンから誘導された塩類を表わし、例示にすぎないがナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、およびテトラアルキルアンモニウムを含む。分子が塩基性官能基を含む場合、その塩はたとえば下記の有機酸または無機酸の酸性塩類の付加により調製される：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など；あるいはたとえば下記の有機酸により形成される：酢酸、プロピオン酸、ヘキサン酸、シクロペンタンプロピオン酸、グリコール酸、ピルビ

50

ン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、3-(4-ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1,2-エタン-ジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-クロロベンゼンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、シュウ酸、4-トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、メタンスルホン酸、4-メチルピシクロ[2.2.2]-オクタ-2-エン-1-カルボン酸、グルコヘプトン酸、3-フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、tert-ブチル酢酸、ラウリル硫酸、グルコン酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフトエ酸、サリチル酸、ステアリン酸、ムコン酸など。塩類は、親化合物中に存在する酸性プロトンが金属イオン、たとえばアルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、またはアルミニウムイオンで置き換えられた場合；あるいは有機塩基、たとえばエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トリメチルアミン、N-メチルグルカミンなどとコーディネートした場合にも形成できる。塩類は被験体に投与するのに適切であり、望ましい薬理学的特性を備えている。適切な塩類には、さらにP. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.), Hand book of Pharmaceutical Salts Properties, Selection, and Use; 2002に記載されたものが含まれる。

10

## 【0026】

本明細書中で用いる用語“非ステロイド系抗炎症薬”および“NSAID”には、シクロオキシゲナーゼ、すなわちプロスタグランジンの生合成に関与する酵素を阻害する薬剤、およびある種のオートコイド(autocoid)阻害薬が含まれ、それにはシクロオキシゲナーゼの種々のイソ酵素(シクロオキシゲナーゼ-1および-2、別名COX-1およびCOX-2が含まれるが、これらに限定されない)の阻害薬、たとえば下記のものが含まれるが、それらに限定されない：市販のNSAIDであるアセクロフェナク(aceclofenac)、アセメタシン(acemetacin)、アセトアミノフェン(acetaminophen)、アセトアミノサロール(acetaminosalol)、アセチル-サリチル酸(アスピリン)、アセチル-サリチル-2-アミノ-4-ピコリン酸、5-アミノアセチルサリチル酸、アルクロフェナク(alclofenac)、アミノプロフェン(aminoprofen)、アムフェナク(amfenac)、アンピロン(ampyrone)、アンピロキシカム(ampiroxicam)、アニレリジン(anileridine)、ベンダザック(bendazac)、ベノキサプロフェン(benoxaprofen)、ベルモプロフェン(bermoprofen)、-ビスボロール(-bisabolol)、ブロムフェナク(bromfenac)、5-プロモサリチル酸アセテート、プロモサリゲニン(bromosaligenin)、ブクロキシ酸(bucloxic acid)、ブチブフェン(butibufen)、カルプロフェン(carprofen)、セレコキシブ(celecoxib)、クロモグリケート(chromoglycate)、シンメタシン(cinmetacin)、クリンダナク(clindanac)、クロピラク(clopirac)、ジクロフェナクナトリウム(sodium diclofenac)、ジフルニサル(diflunisal)、ジタゾール(ditazol)、ドロキシカム(droxicam)、エフェナム酸(enfenamic acid)、エトドラク(etodolac)、エトフェナメート(etofenamate)、フェルビナク(felbinac)、フェンブフェン(fenbufen)、フェンクロジック酸(fenclozic acid)、フェンドサル(fendosal)、フェノプロフェン(fenoprofen)、フェンチアザク(fentiazac)、フェブラジノール(fepradinol)、フルフェナク(flufenac)、フルフェナム酸(flufenamic acid)、フルニキシシ(flunixin)、フルノキサプロフェン(flunoxaprofen)、フルルビプロフェン(flurbiprofen)、グルタメタシン(glutametacin)、サリチル酸グリコール、イブフェナク(ibufenac)、イブプロフェン(ibuprofen)、イブプロキサム(ibuproxam)、インドメタシン(indomethacin)、インドプロフェン(indoprofen)、イソフェゾラク(isofezolac)、イソキセパク(isoxepac)、イソキシカム(isoxicam)、ケトプロフェン(ketoprofen)、ケトロラク(ketorolac)、ロモキシカム(lomoxicam)、ロキソプロフェン(loxoprofen)、メクロフェナム酸(meclofenamic acid)、メフェナム酸(mefenamic acid)、メロキシカム(meloxicam)、メサラミン(mesalamine)、メチアジン酸(metiazinic acid)、モフェゾラク(mofezolac)、モンテルカスト(montelukast)、ミコフェノール酸(mycophenolic acid)、ナブメトン(nabumetone)、ナプロキセン(naproxen)、ニフルム酸(niflumic acid)、ニメスリド(nimesulide)、オルサラジン(olsalazine)、オキサセプロル(oxaceprol)、オキサプロジン(oxaprozin)、オキシフェ

20

30

40

50

ンブタゾン(oxyphenbutazone)、パラセタモール(paracetamol)、パルサルミド(parsalmid e)、ペリソキサール(perisoxal)、アセチル - サリチル酸フェニル、フェニルブタゾン(ph enylbutazone)、サリチル酸フェニル、ピラゾラク(pyrazolac)、ピロキシカム(piroxicam )、ピルプロフェン(pirprofen)、プラノプロフェン(pranoprofen)、プロチジン酸(protiz inic acid)、レスベラトロール(resveratrol)、サラセタミド(salacetamide)、サリチル アミド、サリチルアミド - O - アセチル酸、サリチル硫酸(salicylsulphuric acid)、サ リシン(salicin)、サリチルアミド、サルサレート(salsalate)、スリンダク(sulindac)、 スプロフェン(suprofen)、スキシブタゾン(suxibutazone)、タモキシフェン(tamoxifen )、テノキシカム(tenoxicam)、テオフィリン(theophylline)、チアプロフェン酸(tiaprofe nic acid)、チアラミド(tiaramide)、チクロプリジン(ticlopridine)、チノリジン(tinor idine)、トルフェナム酸(tolfenamic acid)、トルメチン(tolmetin)、トロペシン(tropes in)、キセンブシン(xenbucin)、キシモプロフェン(ximoprofen)、ザルトプロフェン(zalt oprofen)、ゾメピラク(zomepirac)、トモキシプロール(tomoxiprol)、ザフィルルカスト( zafirlukast)、ロフェコキシブ(rofecoxib)およびサイクロスポリン(cyclosporine)。さ らに、The Merck Manual, 16th Edition, Merck Research Laboratories (1990) pp 1308 -1309、およびThe Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edition, Macmillan P ublishing Co., 1996, pp 617-655には周知のNSAIDの例が提示されている。

10

## 【0027】

本発明は、ハロアルキルアミン、たとえばフェノキシベンザミンを用いて中枢神経系に おける一過性低酸素/虚血状態を処置できるという知見に関する。この処置により、一過 性低酸素/虚血状態から生じる神経細胞の損傷または死の発生が低減する。ハロアルキル アミンは特異な アドレナリン受容体遮断薬である；それらは アドレナリン受容体 と共有(不可逆的)結合を形成し、それによって、処置した組織または臓器の脈管へのア ドレナリン性伝達を持続的に遮断する。伝達は脈管において受容体が再合成されるまで遮 断され、それは数日間、1週間、またはそれ以上かかると思われる。現在入手できる他の

20

アドレナリン受容体アンタゴニストはいずれもこの特性をもたない。それらは受容体 との可逆的相互作用により作用する。その結果、それらの効果は薬物が全身循環により消 失するのに伴って漸減する(24時間の半減期)。ハロアルキルアミンの限定ではない 例は、フェノキシベンザミンおよびジベナミンである。

## 【0028】

薬理的に、フェノキシベンザミン(Dibenzylamine; Wellspring Pharmaceutica l)は - 1および - 2両方のアドレナリン受容体を遮 断するハロアルキルアミンであるが、 - 1受容体に対して、より高い親和性をもつ。静 脈内投与後、受容体拮抗は約1時間目にピーク効果に達する。フェノキシベンザミンは脳 において約24時間の半減期をもつ持続的効果を及ぼす。先の研究で、フェノキシベンザ ミンの効果の反転は新たな受容体の合成に依存し、その薬物の半減期に依存するのではな いことが示された。Hamiltonらは、フェノキシベンザミンの単回投与の8日後に50%の - 1受容体が回復したにすぎないことを証明した(J Cardiovasc Pharmacol (1983) 5(5 ):868-873)。有利なことに、フェノキシベンザミンの副作用はきわめて小さい：鼻詰まり 、軽度の傾眠、かすみ目、および胃のむかつき。

30

40

## 【0029】

1態様において、本発明はその必要がある被験体に療法有効量のハロアルキルアミンを 投与することにより中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態を処置する 方法に関する。ハロアルキルアミンはフェノキシベンザミン、ジベナミン、または関連ハ ロアルキルアミンであってよい。化合物フェノキシベンザミンはハロアルキルアミン系の アドレナリン作動性効果遮断薬として知られているクラスの化合物の1つであるので 、中枢神経系(CNS)における一過性低酸素および/または虚血状態の処置のために他 のハロアルキルアミン系の アドレナリン作動性効果遮断薬を使用することも本発明の 範囲に含まれる。

## 【0030】

50

特定の態様において、本発明は、そのような処置を必要とする被験体に療法有効量の本明細書に開示する有効薬剤のうちの1つを投与することにより、一過性低酸素および/または虚血状態により引き起こされる神経細胞の損傷または死の発生を低減する方法に関する。さらに他の態様において、本発明は、そのような処置を必要とする被験体に療法有効量の本明細書に開示する有効薬剤のうちの1つを投与することにより、一過性グルコース枯渇により引き起こされる神経細胞の損傷または死の発生を低減する方法に関する。そのようなグルコース枯渇は、糖尿病、内分泌物欠乏症、インスリン過剰産生状態、または特定の医薬の摂取のため低血糖を伴っている被験体に起きる可能性がある。そのようなグルコース枯渇は、局所的に、たとえば虚血状態の臓器および/または細胞に起きる可能性もある。

10

#### 【0031】

神経細胞と認知には関係があるため、本発明は他の態様において、そのような処置を必要とする被験体に療法有効量の本明細書に開示する有効薬剤のうちの1つを投与することにより、認知機能を改善する方法に関する。本明細書中で用いる“認知機能”は、脳機能のいずれかの精神的構成要素を表わす。たとえば、認知機能には注意力、集中力(concentration)、学習能力、記憶力、およびフォーカス(focus)が含まれるが、これらに限定されない。認知機能には運動協調性(motor coordination)も含まれる。

#### 【0032】

本発明により処置される低酸素および/または虚血状態は、低血圧、失血、心臓発作、外傷性脳損傷(TBI)、脊髄損傷(SCI)、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、気道閉塞、または新生児の低酸素もしくは虚血のうちいずれか1以上により引き起こされる可能性がある。1態様において、本発明はTBI事象により引き起こされる中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態を処置する方法を提供する。そのような処置は、TBIを伴う被験体において神経細胞の損傷または死の発生を低減できる。他の態様において、本発明はSCI事象により引き起こされる中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態を処置する方法を提供する。そのような処置は、SCIを伴う被験体において神経細胞の損傷または死の発生を低減できる。

20

#### 【0033】

本明細書において定義するTBIは、有意量の物理的な力または捻転が個体の上胸部、頸部または頭部に付与された何らかの出来事、すなわちTBI事象から生じ、その力は、脳に神経細胞の損傷または死、たとえば脳細胞死を引き起こす効力をもつ一過性低酸素および/または虚血状態を引き起こすのに十分なものである。TBI事象の限定ではない例には下記のものが含まれる：頭部の限局的な閉鎖性の物理的接触；振盪性爆風(concussive blast wave)エネルギー（爆発に直接または間接的に曝露されたことから生じる脳外傷）；むち打ち事象（頭部が突然、強制的に方向および速度を転換した衝撃事象）；ならびに頭骨および硬膜に異物が侵入する開放創脳損傷。TBI事象はさらに、個体の正常な活動レベル（基礎機能性）が衝撃事象によって妨げられたいずれかの事象と定義することができる。TBIは、種々の衝撃事象、たとえば爆発、毎時30マイルでの車の衝突などについての衝撃力を示すチャートまたはデバイスにより同定できる。衝撃力を測定するためのデバイスの例は、兵士が装着するデバイス（たとえば、ヘルメット取付け可能なもの）または爆風もしくは鈍器衝撃により起きた圧力差を測定できる車両部品である；たとえば、U.S. patent application Ser. No. 12/154,166, タイトル“Soft tissue impact assessment device and system,”を参照；これを本明細書に援用する。

30

40

#### 【0034】

本発明によれば、被験体がTBIを伴うことを見出すために意識喪失は要求されない。TBI分野の多くの研究が、被験体がTBIを受けた際に意識を喪失しなかった場合ですらTBIは神経細胞の損傷または死を引き起こす可能性があることを明瞭に立証している。物理的な力または捻転の発生源によっては、被験体は身体的な神経症状提示が立証されずにTBIを伴っていることが見出される可能性がある。たとえば、戦場で振盪性爆風エネルギーを受けやすい兵士を直ちに同定して低用量の八口アルキルアミンを投与する

50

ことが好ましい。上胸部、頸部または頭部に著しい量の物理的な力または捻転を受けたいずれの個体にも、神経細胞の損傷または死の発生を低減するのに十分な量の八口アルキルアミンを投与することが好ましい。

#### 【0035】

本明細書中で用いる“脊髄損傷”または“SCI”は、脊髄の軸索または神経線維が離断する損傷を意味する。離断(interruption)は外傷性の力により引き起こされる可能性があり、その外傷性の力は1以上の椎骨を破断、脱臼、破壊または圧迫する。椎骨の破断(fracture)は、転位した骨片、または損傷を受けた血管、または露出した神経根の挫創(contusion)による損傷の振盪作用から、脊髄に損傷を及ぼす可能性がある。脱臼はしばしば椎間板の断裂(rupture)の結果であり、それは脊髄の部分的または完全な断絶(severance)を生じる可能性がある。穿通創も、脊髄の断絶または部分的断絶を引き起こす場合には脊髄損傷の原因となる可能性がある。外傷性の力が脊髄に間接的に損傷を与える可能性もある；たとえば、頭部への殴打または足への落下物により誘発された損傷。外からの物理的な力による破断は別として、外傷性の力による損傷に続く脊髄およびその周辺における出血、腫脹、炎症は、脊髄の軸索または神経線維の離断を継続させる可能性がある。たとえば、硬膜外出血および脊髄硬膜下血腫は脊髄圧迫のため進行性不全対麻痺を生じる可能性がある。

10

#### 【0036】

脊髄損傷は外傷性の力なしでも引き起こされる可能性がある。たとえば、脊髄の関節炎、癌、炎症、感染症、または椎間板変性は脊髄の軸索および神経線維の破断を生じる。脊髄内損傷は、脊髄の直接圧迫、または圧迫波の脊髄穿通、骨による脊髄の裂傷(laceration)、または圧迫波が脊髄を穿通する際の脊髄内への出血を伴う血管断裂の結果である可能性がある。脊髄内の出血および血腫形成は脆弱化した血管の断裂により引き起こされる可能性もある。虚血性損傷は、前脊髄動脈の圧迫、吻合動脈への圧力、または大血管の損傷の後に起きる可能性がある(Gilroy, Basic Neurology, McGraw-Hill, Inc. New York, N.Y. (1990)。したがって、SCI事象の限定ではない例は、外傷性の力、脊髄の関節炎、癌、炎症、感染症、または椎間板変性、脊髄内損傷、脊髄内出血、または血腫形成である。

20

#### 【0037】

脊髄損傷は2つのカテゴリー、完全損傷および不完全損傷に分類できる。回復途中で損傷の分類が変化する可能性がある。完全脊髄損傷は通常は感覚および運動能力の喪失を特徴とし、一般に打撲傷(bruising)、脊髄への失血、または脊髄への圧力により引き起こされる脊髄損傷に付随する。脊髄の完全切断(cut and severed spinal cord)は稀である。一般に、完全脊髄損傷は、損傷部位より下の感覚および運動能力の完全喪失を生じる。

30

#### 【0038】

不完全脊髄損傷は一般に、損傷部位より下の運動能力および感覚の完全喪失を生じることはない。そのような損傷を分類するために多様なパターンがある：たとえば、前脊髄症候群(anterior cord syndrome)、中心性脊髄症候群(central cord syndrome)、ブラウン-セカール症候群(Brown-Sequard syndrome)、個々の神経細胞に対する損傷、および脊髄挫創。前脊髄症候群は、脊髄の前部における運動経路および感覚経路に対する損傷から生じる。影響には運動能力および感覚全般の喪失が含まれるが、なお無傷の経路を経由して伝わる若干の感覚は感じられる可能性がある。中心性脊髄症候群は、頸髄領域の中心に対する損傷から生じる。この損傷は、運動を制御するための脳と脊髄の間の信号伝達に關与する皮質脊髄路に影響を及ぼす。中心性脊髄症候群に罹患している患者は腕の脱力感または麻痺を経験し、若干の感覚受容喪失をも経験する。強度および感覚の喪失は腕より脚の方がはるかに少ない。中心性脊髄症候群を伴う患者の多くは運動機能が自然に回復し、他は損傷後の最初の6週間でかなりの回復を経験する。ブラウン-セカール症候群は、脊髄の右側または左側に対する損傷から生じる。損傷が起きた側の身体では、損傷部位より下方で運動能力および感覚が喪失する。損傷の反対側では温度感覚および痛覚が喪失する；これらの経路は脊髄内で交差しているためである。個々の神経細胞に対する損傷は、損

40

50

傷を受けた神経根が対応する身体領域の感覚機能および運動機能の喪失を生じる。したがって、これらの損傷からの症状は影響を受けた神経根の位置および機能に応じて変動する。脊髄挫創は最も一般的なタイプの脊髄損傷である。脊髄挫創では、脊髄が打撲傷を受けているけれども切断されてはいないので、一次結果は損傷部付近の炎症および血管からの出血である。脊髄挫創は一時的な（通常は1～2日間）不完全または完全な衰弱（debilitation）を生じる可能性があり、あるいは脊髄の不完全衰弱または完全衰弱は脊髄の永続的な不完全衰弱または完全衰弱を含めてより長期間になる可能性がある。

#### 【0039】

特定の態様において、開示する方法はさらに、低血圧、失血、心臓発作、TBI、SCI、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、気道閉塞、または新生児の低酸素もしくは虚血を伴った結果として処置を必要とする被験体の同定を含む。本方法は、被験体が一過性低酸素および/または虚血状態あるいはTBI事象を伴うと同定し、そしてその状態の発生の24時間、16時間、12時間、8時間、6時間、4時間、または2時間以内に、一過性低酸素および/または虚血状態あるいはTBIを処置するのに十分な量でハロアルキルアミンを被験体に投与する工程を含むことができる。ある態様において、本方法は、被験体が一過性低酸素および/または虚血状態を伴うと同定し、そして低血圧、失血、心臓発作、TBI事象、SCI事象、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、または気道閉塞の発生の24時間、22時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間、2時間、または1時間以内に、一過性低酸素および/または虚血状態を処置するのに十分な量でハロアルキルアミンを被験体に投与する工程を含むことができる。

#### 【0040】

有利には、ハロアルキルアミンはTBI事象またはSCI事象の後に、神経細胞の損傷または死の神経症状が身体発現する前にすら投与することができる。軽度ないし中等度のTBI事象は、身体症状として発現するのに数か月かかる可能性がある神経損傷を誘発することすら示された。したがって、1態様において、ハロアルキルアミンをTBI事象またはSCI事象の後に可能な限り速やかに被験体に投与する。たとえば、本方法はTBIまたはSCIを受けた被験体を同定し、そして損傷を受けて24時間、22時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間、2時間、または1時間以内に、一過性低酸素および/または虚血状態を処置するのに（たとえば、TBIまたはSCIにより引き起こされる神経細胞の損傷または死の発生を低減するのに）十分な量でハロアルキルアミンを被験体に投与する工程を含むことができる。

#### 【0041】

本明細書に開示する投与計画は、好ましくはこの特定のTBIおよびSCI態様にも使用できる。たとえば、TBI事象またはSCI事象を伴う被験体にハロアルキルアミンを投与する工程は、ハロアルキルアミンの1回以上の静脈内注射を含むことが好ましい。投与はその状態または事象の後、可能な限り速やかに開始することも好ましい。

#### 【0042】

本発明の方法は、有利には一般に脳の海馬、線条体、または皮質における神経細胞損傷の発生を低減する。ある観点において、ハロアルキルアミンは炎症の軽減、 $\alpha$ -1および $\alpha$ -2 アドレナリン受容体の拮抗、ならびにノルエピネフリンシグナル伝達の遮断、および/またはカルモジュリン（CaM）/CaMKII活性の阻害により、神経細胞に対する神経保護効果を及ぼす。実施例4を参照。ある観点において、本発明の方法は神経機能障害および認知機能障害を有意に低減する。

#### 【0043】

特定の態様において、ハロアルキルアミンを1種類以上の追加の $\alpha$ -遮断薬と一緒に投与する。本明細書中で用いる“ $\alpha$ -遮断薬”は、 $\alpha$ -アドレナリン受容体の受容体アンタゴニストとして作用する薬剤である。 $\alpha_1$ -遮断薬は $\alpha_1$ -アドレナリン受容体に対して

10

20

30

40

50

作用し、 $\alpha_2$ -遮断薬は $\alpha_2$ -アドレナリン受容体に対して作用する。ある観点において、ハロアルキルアミンを非選択的 $\alpha$ -遮断薬（たとえば、フェントラミン(phentolamine)、トラゾリン(tolazoline)、トラゾドン(trazodone)、 $\alpha_1$ -遮断薬（たとえば、アルフゾシン(alfuzosin)、プラゾシン(prazosin)、ドキサゾシン(doxazosin)、タムスロシン(tamsulosin)、テラゾシン(terazosin)、シロドシン(silodosin)）、および/または $\alpha_2$ -遮断薬（アチパメゾール(atipamezole)、イダゾキサソ(idazoxan)、ヨヒンビン(yohimbine)）と共に投与する。

【0044】

ある態様において、ハロアルキルアミンを1種類以上の抗炎症薬、たとえば非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)と共に投与する。そのような組み合わせは、CNSにおける一過性低酸素および/または虚血状態を伴う被験体に投与した場合、相乗的神経保護効果を生じる可能性がある。1態様において、ハロアルキルアミンをCOX-2阻害薬と共に投与する。COX-2阻害薬は、ロフェコキシブ(rofecoxib)、セレコキシブ(celecoxib)、シミコキシブ(cimicoxib)、バルデコキシブ(valdecoxib)、エトリコキシブ(etoricoxib)、パレコキシブ(parecoxib)、ルミラコキシブ(lumiracoxib)、またはジクロフェナク(diclofenac)であってもよい。

10

【0045】

本発明はまた、ハロアルキルアミンを中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態の処置のための有効成分として含む医薬組成物に関する。一過性低酸素および/または虚血状態は、低血圧、失血、心臓発作、TBI、SCI、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、気道閉塞、または新生児の低酸素もしくは虚血のうち1以上による引き起こされる可能性がある。特定の態様において、医薬組成物はハロアルキルアミン、NSAID、および医薬的に許容できるキャリアーを含む。NSAIDはCOX-2阻害薬、たとえばロフェコキシブ、セレコキシブ、シミコキシブ、バルデコキシブ、エトリコキシブ、パレコキシブ、ルミラコキシブ、またはジクロフェナクであってもよい。

20

【0046】

本発明の他の医薬組成物は、ハロアルキルアミンを中枢神経系における神経細胞死の発生を低減するための有効成分として含む。神経細胞死の発生は、一過性低酸素および/または虚血状態により引き起こされる可能性がある。神経細胞死の発生は、低血圧、失血、心臓発作、TBI事象、SCI事象、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、気道閉塞、または新生児の低酸素もしくは虚血のうち1以上による引き起こされる可能性もある。特定の態様において、医薬組成物はハロアルキルアミン、NSAID、および医薬的に許容できるキャリアーを含む。NSAIDはCOX-2阻害薬、たとえばロフェコキシブ、セレコキシブ、シミコキシブ、バルデコキシブ、エトリコキシブ、パレコキシブ、ルミラコキシブ、またはジクロフェナクであってもよい。

30

【0047】

フェノキシベンザミンおよび/または関連ハロアルキルアミンの医薬的に許容できる誘導体ならびにその塩類、ならびに本明細書に記載する方法におけるそれらの使用も、本発明の範囲に含まれる。そのような塩類は医薬技術分野における知識を用いて調製できる。医薬組成物は個別剤形で調製できる。したがって、本発明の医薬組成物および剤形は、本明細書に開示する有効成分を含む。“医薬”または“神経保護薬”という表記は、明細書に記載する発明の化合物またはその塩類を意味する。本発明の医薬組成物および剤形は、さらに医薬的に許容できるキャリアーを含むことができる。

40

【0048】

1態様において、用語“医薬的に許容できる”は、動物、より特別にヒトに使用するために国または州政府の規制当局が承認していること、あるいは米国薬局方その他の一般に認識されている薬局方に列記されていることを意味する。用語“キャリアー”は、それと共に有効成分が投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、またはビヒクルを表わす。そのような医薬用キャリアーは、液体、たとえば水、および石油、動物、植物または合成に由来す

50

るものを含む油類、たとえばラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などであってもよい。医薬用キャリアーは、塩類溶液、アラビアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素などであってもよい。さらに、他の賦形剤も使用できる。

【0049】

単一単位剤形の本発明は、患者に経口、粘膜（たとえば、鼻、舌下、膣、口腔、または直腸）、非経口（たとえば、皮下、静脈内、ボラス注射、筋肉内、または動脈内）、または経皮投与するのに適切である。剤形の例には下記のものが含まれるが、それらに限定されない：錠剤；カプレット剤；カプセル剤、たとえばソフト軟ゼラチンカプセル剤；カシエ剤；トローチ剤；ロゼンジ；分散液剤；坐剤；軟膏剤；パップ剤（湿布）；パスタ剤；散剤；包帯剤；クリーム剤；硬膏剤；液剤；パッチ剤；エアゾール剤（たとえば、鼻スプレーまたは吸入器）；ゲル剤；患者への経口または粘膜投与に適した液体剤形：懸濁液剤（たとえば、水性もしくは非水性の懸濁液剤、水中油型乳剤、または油中水型乳剤）、液剤、およびエリキシル剤が含まれる；患者への非経口投与に適した液体剤形；ならびに再構成して患者への非経口投与に適した液体剤形にすることができる無菌固体（たとえば、結晶質または非晶質の固体）。本発明は好ましくは非経口経路または経口経路により投与されるが、本明細書に詳細に考察するように他の経路も考慮され、それらは被験体の状態に大きく依存する。

10

【0050】

ある観点において、有効成分は約0.1 mg/kg（体重）～約20 mg/kg（体重）の単位投与量で投与できる；たとえば約0.1 mg/kg（体重）～約5、10、15、または20 mg/kg（体重）内のいずれかの範囲、たとえば0.2 mg/kg（体重）～約5、10、または15 mg/kg（体重）、約0.5 mg/kg（体重）～約7.5または10 mg/kg（体重）、約0.5 mg/kg（体重）～約5 mg/kg（体重）、約1 mg/kg（体重）～約5 mg/kg（体重）、約2.5 mg/kg（体重）～約5 mg/kg（体重）など。1態様において、有効成分は約0.5 mg/kg（体重）～約5 mg/kg（体重）の単位投与量で投与される。

20

【0051】

他の観点において、有効成分は約20、15、または10 mg/kg（体重）未満、約9 mg/kg（体重）未満、約8 mg/kg（体重）未満、約7 mg/kg（体重）未満、約6 mg/kg（体重）未満、約5 mg/kg（体重）未満、約4 mg/kg（体重）未満、約3 mg/kg（体重）未満、約2 mg/kg（体重）未満、または約1 mg/kg（体重）の単位投与量で投与できる。1実施形態において、有効成分は約5 mg/kg（体重）未満の単位投与量で投与される。さらに他の観点において、有効成分は約1 mg、約2 mg、約3 mg、約4 mg、約5 mg、約6 mg、約7 mg、約8 mg、約9 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、約25 mg、約30 mg、約35 mg、約40 mg、約45 mg、約50 mg、約60 mg、約70 mg、約80 mg、約90 mg、または約100 mgの単位投与量で投与できる。これらの単位投与量を1日1回、2回、または3回投与できる。

30

【0052】

特定の態様において、有効成分は、中枢神経系における一過性低酸素および/または虚血状態の発生の24時間、22時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間、2時間、または1時間以内に投与される。ある態様において、有効成分は、低血圧、失血、心臓発作、TBI事象、SCI事象、窒息、外科処置、脳卒中、脊髄梗塞、虚血性視神経障害、気道閉塞の発生の24時間、22時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間、2時間、または1時間以内に投与される。ある観点において、有効成分は連続的に、たとえば連続IV注入により投与される。

40

【0053】

50

1 態様において、有効成分（たとえば、ハロアルキルアミン）は医薬的に許容できるキャリアーを含む医薬組成物中において投与される。医薬組成物は、状態および再発可能性に応じて即時放出または持続放出配合物であってよい。たとえば、一過性低酸素状態を処置するための医薬組成物は、一過性虚血状態を処置するためのものと異なる可能性がある。さらに、一過性低酸素および/または虚血状態を処置するための医薬組成物は、その状態の原因に基づいて変動する可能性もある；たとえば、その状態が脳卒中により引き起こされた場合と比較してその状態が窒息により引き起こされた場合。

【0054】

本発明の剤形の組成、形状、およびタイプは、一般に投与経路および処置される被験体に応じて変動するであろう。たとえば、非経口剤形は、それが含む1種類以上の有効成分を、同じ疾患を処置するために用いる経口剤形より少量含有することができる。本発明に含まれる具体的な剤形が互いに変動するこれらおよび他の方式は当業者に容易に認識されるであろう。たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton Pa. (1990)を参照。

10

【0055】

一般的な医薬組成物および剤形は1種類以上の賦形剤を含む。適切な賦形剤は医薬分野の専門家に周知であり、適切な賦形剤の限定ではない例を本明細書に示す。特定の賦形剤が医薬組成物または剤形に含有させるのに適切であるかどうかは当技術分野で周知の多様な要因に依存し、それにはその剤形を患者に投与する方法が含まれるが、これに限定されない。たとえば、錠剤などの経口剤形は非経口剤形に用いるには適切でない賦形剤を含有

20

【0056】

本発明はさらに、有効成分が分解する速度を低下させる1種類以上の化合物を含む医薬組成物および剤形を包含する。本明細書中で“安定剤”と呼ばれるそのような化合物には抗酸化剤、たとえばアスコルビン酸、pH緩衝剤、または緩衝塩類溶液が含まれるが、これらに限定されない。

【0057】

特定の状態または処置方法について、投与量は既知の方法を用いて経験的に決定され、使用する特定の化合物の生物活性、投与の手段、ホストの年齢、健康状態および体重；症状の性質および程度；処置の頻度；他の療法の適用、ならびに目的とする効果などの要因に依存するであろう。以下に種々の可能な投与量および投与方法を記載するが、下記は説明のためのものにすぎないと解釈すべきである。実際の投与量および投与方法または送達方法は当業者が決定できる。投与の頻度は、使用する化合物、および持続放出配合物を使用するかどうかによっても変動する可能性がある。しかし、大部分の障害について、単回投与が好ましい。

30

【0058】

経口投与に適した本発明の医薬組成物は、個別剤形、たとえば錠剤（たとえば、咀嚼錠）、カプレット剤、カプセル剤、および液剤（たとえば、フレーバーシロップ）として提供できるが、これらに限定されない。そのような剤形は前決定量の有効成分を含有し、当業者に周知の方法により調製できる。全般的に、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton Pa. (1990)を参照。

40

【0059】

本発明の代表的な経口剤形は、一般的な医薬配合法に従って有効成分を少なくとも1種類の賦形剤と組み合わせることで密な混合物にすることにより調製される。賦形剤は、投与のために希望する製剤の形態に応じて広範な形態をとることができる。たとえば、経口服液剤またはエアゾール剤形に用いるのに適切な賦形剤には、水、グリコール類、油類、アルコール類、矯味矯臭剤、保存剤、および着色剤が含まれるが、これらに限定されない。固体経口剤形（たとえば、散剤、錠剤、カプセル剤、およびカプレット剤）に用いるのに適切な

50

賦形剤の例には、デンプン類、糖類、微結晶性セルロース、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、および崩壊剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0060】

錠剤およびカプセル剤はそれらの投与しやすさのため最も有利な経口単位剤形であり、その場合は固体賦形剤が用いられる。所望により、錠剤を標準的な水性または非水性の手法によりコーティングすることができる。そのような剤形はいずれかの医薬製法により調製できる。一般に医薬組成物および剤形は、有効成分を液体キャリアー、微細な固体キャリアーまたは両者と均一かつ密に混合し、必要であれば次いで調製物を希望する形状に付形することにより製造される。

【0061】

たとえば、錠剤は圧縮または成形により製造できる。圧縮錠は、場合により賦形剤と混合したさらさらした形態の有効成分、たとえば粉末または顆粒を、適切な機械で圧縮することにより製造できる。成形錠は、不活性液体希釈剤で湿潤させた粉末状化合物の混合物を適切な機械で成形することにより製造できる。

【0062】

本発明の経口剤形中に使用できる賦形剤の例には、結合剤、増量剤、崩壊剤、および滑沢剤が含まれるが、これらに限定されない。医薬組成物および剤形中に使用するのに適切な結合剤には、トウモロコシデンプン、パレイショデンプン、または他のデンプン、ゼラチン、天然ゴムおよび合成ゴム、たとえばアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸、他のアルギン酸塩、粉末状トラガント、グアーゴム、セルロースおよびその誘導体（たとえば、エチルセルロース、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム）、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、化デンプン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（たとえば、No. 2208、2906、2910）、微結晶性セルロース、およびその混合物が含まれるが、これらに限定されない。

【0063】

適切な形態の微結晶性セルロースには、AVICEL-PH-101、AVICEL-PH-103、AVICEL RC-581、AVICEL-PH-105として販売されている材料（FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Salesから入手できる、ペンシルベニア州マーカスフック）、およびその混合物が含まれるが、これらに限定されない。具体的な結合剤は、AVICEL RC-581として販売されている微結晶性セルロースとカルボキシメチルセルロースナトリウムの混合物である。適切な無水または低水分の賦形剤または添加剤には、AVICEL-PH-103およびStarch 1500 LMが含まれる。

【0064】

本明細書に開示する医薬組成物および剤形中に使用するのに適切な形態の増量剤の例には、タルク、炭酸カルシウム（たとえば、顆粒または粉末）、微結晶性セルロース、粉末セルロース、デキストレート(dextrate)類、カオリン、マンニトール、ケイ酸、ソルビトール、デンプン、化デンプン、およびその混合物が含まれるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物中の結合剤または増量剤は、一般に医薬組成物または剤形の約50重量%から約99重量%までの量で存在する。

【0065】

崩壊剤は、水性環境に曝露された際に崩壊する錠剤を得るために本発明の組成物中に用いられる。多すぎる崩壊剤を含有する錠剤は貯蔵中に崩壊する可能性があり、一方、少なすぎる崩壊剤を含有する錠剤は希望する速度または希望する条件下で崩壊しない可能性がある。したがって、有効成分の放出を不都合に変化させるほど多すぎもせず少なすぎもしない十分量の崩壊剤を用いて本発明の固体経口剤形を形成すべきである。崩壊剤の使用量は配合物のタイプに基づいて変動し、当業者に容易に認識できる。一般的な医薬組成物は約0.5重量%から約15重量%までの崩壊剤、好ましくは約1重量%から約5重量%までの崩壊剤を含む。

10

20

30

40

50

## 【0066】

本発明の医薬組成物および剤形中に使用できる崩壊剤には、寒天、アルギン酸、炭酸カルシウム、微結晶性セルロース、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、ポラクリリンカリウム(polacrilin potassium)、デンプングリコール酸ナトリウム、バレイショまたはタピオカのデンプン、他のデンプン類、化デンプン、他のデンプン類、クレー、他のアルギン類、他のセルロース類、ゴム類、およびその混合物が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0067】

本発明の医薬組成物および剤形中に使用できる滑沢剤には、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、鉱油、軽油、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、ポリエチレングリコール、他のグリコール類、ステアリン酸、ラウリル硫酸ナトリウム、タルク、硬化植物油（たとえば、ラッカセイ油、綿実油、ヒマワリ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、およびダイズ油）、ステアリン酸亜鉛、オレイン酸エチル、ラウリン酸エチル(sodium laurate)、寒天、およびその混合物が含まれるが、これらに限定されない。さらに他の滑沢剤には、たとえばsyloidシリカゲル(AEROSIL 200, W. R. Grace Co.により製造, メリーランド州ボルチモア)、合成シリカ(Degussa Co.により販売, テキサス州プラノ)の凝固エアロゾル、CAB-O-SIL(Cabot Co.により販売されている焼成二酸化ケイ素製品, マサチューセッツ州ボストン)、およびその混合物が含まれる。使用するときにも、滑沢剤は一般にそれらを含む医薬組成物または剤形の約1重量%未満の量で用いられる。

## 【0068】

本発明の好ましい固体経口剤形は、有効成分、無水乳糖、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸、コロイド状無水シリカ、およびゼラチンを含む。

非経口剤形は、皮下、静脈内、ボーラス注射、筋肉内、および動脈内を含めた（これらに限定されない）種々の経路により患者に投与できる。好ましくは、非経口剤形は静脈内送達に適切である。本発明の非経口剤形は好ましくは無菌であるか、あるいは患者に投与する前に殺菌することができる。非経口剤形の例には、注射できる状態の液剤、医薬的に許容できる注射用ビヒクルに溶解または懸濁できる状態の乾燥製剤、注射できる状態の懸濁液剤、および乳剤が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0069】

本発明の非経口剤形を提供するために使用できる適切なビヒクルは当業者に周知である。例には下記のものが含まれるが、それらに限定されない：注射用水USP；水性ビヒクル、たとえば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、ならびに乳酸リンゲル注射液（これらに限定されない）；水混和性ビヒクル、たとえばエチルアルコール、ポリエチレングリコール、およびポリプロピレングリコール（これらに限定されない）；ならびに非水性ビヒクル、たとえばトウモロコシ油、綿実油、ラッカセイ油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、および安息香酸ベンジル（これらに限定されない）。

## 【0070】

本発明をさらに以下の実施例により説明するが、それらを限定と解釈すべきではない。本出願全体を通して引用するすべての参考文献、特許および公開特許出願の内容ならびに図面を全体としてあらゆる目的で本明細書に援用する。

## 【実施例】

## 【0071】

以下に提示するすべての例について、すべてのデータはPrizmソフトウェアを用いて解析された。ガウス（正規）分布を決定するために、すべてのデータセットについてコルモゴロフ-スミルノフ検定(Kolmogorof-Smirnov test)を実施した。2グループを含むデータセットについては、対応のない片側T検定(unpaired, one-tailed T-test)を用いて適宜なパラメトリック解析を実施した(CI = 95%)。2より多いグループを含むデータセットについての解析は、1元ANOVAをテューキーの事後検定(Tukey's post-h

oc)と共に用いてグループ間の統計学的有意性を決定した。  $p < 0.05$  以下を有意とみなした。

【0072】

TBIを必要とする実験にはラットモデルを用いた。雄Wistarラット(350~500g)をCharles River Laboratories(マサチューセッツ州ウィルミントン)から入手し、12時間の明/暗サイクルで収容し、飼料および水を適宜摂取させた。先に記載された横方向流体パーカッション(lateral fluid percussion)(LFP)法(Rau et al., 2012, J Trauma and Acute Care Surgery 73:S165)を用いて重篤なTBIを誘発した。簡単に述べると、ラムダ(lambda)およびブレグマ(bregma)から等距離の右脳半球上に5mmの頭蓋開口(trephination)を作成した。動物の脳に1.9~2.3気圧の圧力の流体パルス(20ミリ秒間与えた。すべての動物が無呼吸を経験し、正常呼吸が起きるまで用手呼吸を行なった。動物は平均立直り時間が24分であり、25%の死亡率がみられた。TBI後8時間目にランダム選択したラットの尾静脈内にフェノキシベンザミン(1mg/kg)を注射した。生理食塩水処理した動物は予熱した生理食塩水のみを投与する同じ尾静脈注射処理を受けた。偽手術した動物には頭蓋開口術を施したが、TBIを投与しなかった。

10

【0073】

実施例1. フェノキシベンザミンはラット海馬切片培養 - 酸素グルコース枯渇実験で神経細胞死を阻止する

海馬切片培養:

20

すべての実験動物操作は、米国国立衛生研究所、実験動物の管理と使用に関する指針(National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals)(NIH Publications No. 8023)に従ってモンタナ大学動物実験委員会(University of Montana Institutional Animal Care and Use Committee)により承認された。先の記載に従って7日齢Sprague-Dawley仔ラットの脳から海馬切片培養物を調製した(Selkirk et al., 2005, Eur J Neur 21:2291)。培養7日後に、切片を酸素 - グルコース枯渇(OGD)曝露した。120mM NaCl、5mM KCl、1.25mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、2mM  $\text{MgSO}_4$ 、2mM  $\text{CaCl}_2$ 、25mM  $\text{NaHCO}_3$ 、20mM HEPES、25mMスクロースからなる無グルコース緩衝塩類溶液(BSS); pH 7.3に、5%  $\text{CO}_2$  / 95%  $\text{N}_2$ を10L/時で1時間吹き込んだ。切片を脱酸素SBS中(0.1%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、94.4%窒素のガスレベルを維持した37のフィードバックセンサー付きチャンパー(Pro-Ox)に60分間入れた。OGD後に、切片を直ちに正常酸素条件下の予熱したNeurobasal培地(B27を含有、抗酸化剤を含まない)へ戻した。用量応答試験においてフェノキシベンザミンで処理した切片は、OGD直後に、0.1 $\mu\text{M}$ ~1mMのフェノキシベンザミンを含有する予熱したNeurobasal培地中に置かれた。タイムコース試験については、OGD後2、4、8、または16時間目に100 $\mu\text{M}$ フェノキシベンザミンを添加した。神経損傷は、切片をヨウ化プロピジウム(PI; Molecular Probes, オレゴン州ユージーン)で染色し、ImagePro Plusソフトウェア(Media Cybernetics, メリーランド州シルバースプリングズ)を用いて相対蛍光強度(励起540/発光630)を定量することにより判定された。ヨウ化プロピジウム(PI)は、2 $\mu\text{M}$ の濃度で(Norberg et al., 1999, Brain Research Protocols 3:278)、OGDの4時間前に培地に添加された。ベースライン蛍光を設定するためにOGD前に海馬切片のイメージを撮影した。OGD後に、2 $\mu\text{M}$ のPIを含有する普通培地中に切片を置き、OGD後24時間目にオリンパスIMT-2顕微鏡および浜松カメラによる蛍光光度法を用いて再びイメージ撮影した。ImagePro Plusソフトウェア(Media Cybernetics, メリーランド州シルバースプリングズ)を用いて各切片の総蛍光強度を決定し、すべての数値をOGD曝露した非処理切片からの変化率パーセントとして表わした。

30

40

【0074】

50

## 結果

ラット海馬切片培養 (R H S C) - O G D モデルにおける本発明者らの試験は、フェノキシベンザミンを有効な神経保護薬候補化合物として同定した。本発明者らはさらにフェノキシベンザミンを R H S C - O G D モデルにおいて用量応答試験の実施により試験した。フェノキシベンザミンは C A 1、C A 3 および歯状回内の一次神経細胞を保存し、広い用量範囲にわたって (0.1  $\mu$ M ~ 1 mM の最終培地濃度) 強い神経保護効果を生じた (図 1)。神経保護化合物は臨床関連時点で投与した際に有効でなければならず、それは脳卒中または外傷性脳損傷の症例では損傷の多数時間後である可能性がある。したがって、本発明者らはフェノキシベンザミンの有効療法ウインドウを R H S C - O G D モデルにおいて調べた。中間用量 (100  $\mu$ M) を選択し、O G D 後 2、4、8、または 16 時間目に培地に添加した。本発明者らは、O G D 後 2、4、および 8 時間目に送達した場合にフェノキシベンザミンが海馬の全領域で O G D から神経細胞死を阻止することを見出した。O G D 後 16 時間目に送達した場合、フェノキシベンザミンは海馬の C A 1 領域においてのみ神経細胞死を阻止した (図 2)。これらのデータは、フェノキシベンザミンが有効な神経保護薬として作用する可能性があることを強く示唆した。

10

## 【0075】

実施例 2 . フェノキシベンザミン処理 T B I ラットにおける神経学的重症度スコアおよびフットフォールト査定は非処理対照におけるより有意に良好である

神経学的重症度スコアリング :

神経学的重症度スコアリング (N S S) を先の記載に従って実施した (Rau et al., 2011, Neuropharmacology 61:677; Rau et al., 2012 J Trauma and Acute Care Surgery 73:S165)。査定は 1、7、14、21、および 30 日目に盲検観察者により行なわれた。動物を 0 から 16 までスコアリングし、0 は障害なしを示し、16 は最大障害を示す。重篤な T B I についてのスコアリング基準は 16 ~ 10 であり、中等度の T B I は 9 ~ 5 であり、軽度の T B I は 4 ~ 1 であった。1 日目に 9 以下の N S S とスコアリングされた動物を中等度 / 軽度の損傷を伴うと同定し、除外した。

20

## 【0076】

フットフォールト査定 :

フットフォールト査定を先の記載に従って実施した (Rau et al., 2011, Neuropharmacology 61:677; Rau et al., 2012 J Trauma and Acute Care Surgery 73:S165)。簡単に述べると、ラットを高い位置にあるグリッドに置いた。体重がかかる歩行毎にワイヤグリッドから足が落ちるかまたは滑り落ちる可能性がある。左前足 (右脳半球に対する損傷の影響を受けている) をワイヤラックに置き損なう毎に、それをフットフォールトとして記録した。ラットがグリッドを渡るのに使った総歩数 (各前足の移動) を計数し、かつ各前足についてのフットフォールトの総数を記録した。

30

## 【0077】

## 結果

フェノキシベンザミンの療法効力を試験するために、本発明者らはラット横方向流体パーカッション損傷 (L F P) を重篤な T B I の *in vivo* モデルとして選択した。本発明者らは現在の F D A 承認レベルに基づいてフェノキシベンザミンの試験用量を選択した。フェノキシベンザミンは通常は最大 40 mg で 1 日 3 回 (合計 120 mg) 投与される。一般的成人の体重を 70 kg と仮定すると、これは 1.7 mg / kg (体重) になる。したがって、本発明者らはこれよりわずかに低い 1 mg / kg (体重) の静脈内単回量を選択した。この用量を重篤な T B I 後 8 時間目の臨床関連時点で投与した。行動転帰および認知転帰に基づいて療法有効性を判定した。

40

## 【0078】

神経学的重症度スコア (N S S) およびフットフォールト査定を用いて、フェノキシベンザミン処理が行動転帰を改善できるという仮説を試験した。動物を損傷の 24 時間後、そして再び T B I 後 7、14、21、および 30 日目に査定した。本発明者らは、24 時間目または T B I 後 7 日目の生理食塩水処理動物とフェノキシベンザミン処理動物の間に

50

有意差を見出さなかった。これらのデータは、両方の処理グループのすべての動物が類似の重症度の損傷を経験したことを示す。しかし、14、21、および30日目のNSSおよびフットフォールトスコアリングでは、フェノキシベンザミン処理動物は有意の改善を示した(図3)。フェノキシベンザミン処理ラットが試験21および30日目に非損傷ラットと類似のフットフォールト値であったことは注目に値する。

【0079】

実施例3. フェノキシベンザミン処理TBIラットにおける認知機能は非処理対照より有意に良好である

認知機能の査定:

モーリス水迷路(MWM)を用いて、フェノキシベンザミンがTBI後の認知機能(学習能力および記憶力)に及ぼす影響を査定した。この査定法は先に公表されたものに従って実施された(Rau et al., 2011, Neuropharmacology 61:677; Rau et al., 2012 J Trauma and Acute Care Surgery 73:S165)。予備順化(pre-acclimation)をTBI後24日目に開始した。トレーニング期を損傷後25日目に開始し、探査試験(probe trial)を損傷後30日目に開始した。

【0080】

結果

モーリス水迷路(MWM)を用い、損傷後25日目に開始して認知機能を査定した。TBIの8時間後のフェノキシベンザミン投与は、トレーニング期の2、3、4、および5日目に学習能力の有意の改善を生じた(図4A)。驚くべきことに、フェノキシベンザミン処理動物はいずれのトレーニング日においても非損傷偽対照動物と有意差がなかった。これらのデータは、重篤なTBI後にフェノキシベンザミンが学習能力を劇的に改善することを示唆する。学習能力のほかに、探査試験を実施して空間記憶機能を査定した。探査試験に際して、フェノキシベンザミン処理動物は生理食塩水処理対照より有意に大きな空間記憶容量を示した(図4B)。10%の時間だけ目標の四分円内にいた生理食塩水処理対照と比較して、フェノキシベンザミン処理動物はそれらの探査時間の約28%を、取り除かれた脱出プラットフォームを求めて目標の四分円内で過ごした。トレーニング期のように、フェノキシベンザミン処理したTBI損傷動物は、同様にそれらの探索時間の約25%を目標の四分円内で過ごした非損傷偽対照と差がなかった(図4B)。

【0081】

実施例4. 遺伝子アレイ解析はフェノキシベンザミンが皮質組織における炎症性シグナル伝達タンパク質の発現を誘発することを示す

フェノキシベンザミン仲介による神経保護に関与する可能性のある神経保護機序を明らかにするために、本発明者らは損傷の32時間後の動物から採取した皮質組織の遺伝子アレイ解析を実施した(処理まで8時間の遅れ+処理後24時間)。二次損傷の発生に影響を及ぼすと思われる遺伝子変化を検出するためにこの時点を選択した。本発明者らは重篤なTBI後に炎症性シグナル伝達タンパク質の発現における有意の増大を検出した: CCL2(11倍,  $p = 0.004$ )、IL1(4.6倍,  $p = 0.005$ )およびMyD88(3倍,  $p = 0.0001$ )。対照的に、重篤なTBI後にフェノキシベンザミンで処理したラットはこれらのタンパク質の発現に有意の増大がなかった。これらのデータは、フェノキシベンザミンが神経炎症反応を調節することにより神経保護を仲介する可能性があることを示唆する。

【0082】

現在の試験で、TBIの8時間後に送達したフェノキシベンザミンの単回静脈内投与が行動障害と認知障害の両方を有意に低減したことが立証された。これは新規知見である; フェノキシベンザミンが神経保護効果を及ぼすことを示すこれまでの試験はない。現在、フェノキシベンザミンは副腎腫瘍(クロム親和性細胞腫)に関連する高血圧症および過剰発汗を処置するために用いられている。フェノキシベンザミンは有効な $\alpha$ -1アドレナリン作動性アンタゴニスト(二次的な $\alpha$ -2拮抗を伴う)として作用し、したがってエピネフリンおよびノルエピネフリンの効果遮断する。エピネフリンおよびノルエピネフリ

10

20

30

40

50

ンの効果の遮断はTBI患者に対して有意の有益性をもつ可能性があることを示唆する証拠がある。重篤なTBIは交感神経系の活性を高め、その結果、エピネフリンおよびノルエピネフリンが過剰放出される(Tran et al., 2008)。先の研究は、TBIの重症度、血漿エピネフリンおよびノルエピネフリンのレベルと、回復率との直接相関性を示唆する(Tran et al., 2008)。持続的昏睡状態にある患者はエピネフリンおよびノルエピネフリンの血漿レベルが対照より数倍高い。さらに、これらのカテコールアミンのレベルは昏睡状態の期間中、高いままである。逆に、初期カテコールアミンレベルの上昇が軽度であるTBI患者はTBI後1週目に11より大きなグラスゴー・コーマ・スケール(Glasgow Coma Scale)(GCS)値にまで一貫して改善することが見出された。多系統の外傷およびTBIを伴う患者において損傷後48時間目の血漿ノルエピネフリンレベルは1週目のGCS、患者生存率、呼吸器装着日数、および入院期間を予測するが、TBIを伴わない場合はこれらの関係は存在しなかった(Woolf 1987, Hamill 1987) (Woolf 1988)。

#### 【0083】

これらの試験に基づけば、フェノキシベンザミンの神経保護効果は脳におけるノルエピネフリンシグナル伝達の二次効果を遮断する - 1 および - 2 拮抗の直接的結果である可能性がある。 - 1 アドレナリン受容体はヘテロトリマーGタンパク質であるGqにカップリングし、それによりホスホリパーゼC(PLC)を活性化する(Strosberg, 1993)。PLCはIP3およびカルシウムの増加を生じ、それが次にプロテインキナーゼC(PKC)を活性化する(Strosberg, 1993)。TBIにおける先の試験は、損傷の結果としてPKCが急速に増大することを立証した(Yang 1993)。フェノキシベンザミンに関連する可能性のある他の機序は、カルモジュリン(CaM)/CaMKII活性の低下である。フェノキシベンザミンはCaM/CaMKII活性の有効な阻害薬である(Cimino and Weiss, 1988)。基礎状態下ではCaMKIIはグルタミン酸シグナル伝達の主要なメディエーターであるが、急性損傷状態下ではCaM/CaMKIIはNMDA受容体のNR2Bサブユニットと相互作用して興奮毒死をもたらす(Vest et al., 2010)。急性損傷に際してCaM/CaMKIIが細胞表面へのAMPA受容体のトラフィック(trafficking)を増大させて、より大きな興奮毒死をもたらすという証拠がある。CaMKIIに関する神経破壊的役割を支持するものとして、ZhangらはTBIがCaMKIIの発現を増大させることを見出した。ラットをTBI前にCaMKII阻害薬で前処理すると、病変部体積の有意の低減および神経運動機能の有意の増大が生じた。Zhangらはさらに、CaMKIIがアポトーシス促進タンパク質(pro-apoptotic protein)BAXを増加させ、続いてカスパーゼ3を活性化することによる、神経細胞においてアポトーシスを能動的に促進する機序を明らかにした(Zhang et al., 2012)。

#### 【0084】

遺伝子アレイ試験から、本発明者らはフェノキシベンザミンがTBI後に起きる重大な遺伝子変化を遮断すると思われることを見出した。炎症に関与する遺伝子、たとえばCC12、IL-1、およびMyD88はすべてTBI動物において有意に増加したが、フェノキシベンザミン処理動物は非損傷対照と差がなかった。炎症は浮腫、神経細胞喪失に関与し、患者回復に負の影響を及ぼすので、これは重要な所見である。脳炎症の鍵となる要素は、神経細胞に対して有毒な好中球および単球の動員である(Semple et al., 2010)。脳内への単球の動員は主に、アストロサイト、マクロファージ、および反応性ミクログリアが発現する単球走化性タンパク質1(monocyte chemotactic protein 1)(MCP-1)、あるいはCC12として知られるものにより制御される。TBI後に、CC12は単球を脳損傷領域へ能動的に動員して、炎症、浮腫および神経損傷をもたらす(Ziebell and Morganti-Kossmann, 2012)。Rhodes et al (2009)は、重篤なTBI後のヒト脊髄液中にCC12が急速に増加することを見出した。さらに、CC12レベルは損傷後に最大10日間は有意に上昇したままであった。Rhodes et al., (2009)は、上昇したCC12レベルはTBI後に死亡した患者の血清においても検出されたことも報告した。

#### 【0085】

上皮細胞は、炎症性サイトカインであるインターロイキン-1(IL-1)に応答

10

20

30

40

50

して能動的に C C 1 2 を合成する (Prodjosudjadi et al, 1995)。本発明者らの遺伝子アレイ解析から、生理食塩水処理動物は T B I 後に I L - 1 が有意に増加し、これに対しフェノキシベンザミン処理動物は有意の増加がないことを見出した。T B I に関して、I L - 1 はミクログリアの主要アクチベーターであり、炎症の誘発に直接関与する。I L - 1 はさらに、N M D A 受容体および腫瘍壊死因子アルファ ( T N F - アルファ ) の感受性を増大させて脳の炎症および興奮毒性を増大させることにより、免疫興奮毒性に寄与する (Arand et al., 2001; Block et al., 2007; Brown and Neher, 2010)。

#### 【 0 0 8 6 】

フェノキシベンザミンはさらに、ミエロイド系分化一次応答タンパク質 8 8 (myeloid differentiation primary response protein 88) ( M y d 8 8 ) の発現を低減することにより外傷後炎症を低減できる。M y d 8 8 は、T o l l 様受容体および炎症性サイトカインシグナル伝達に係る鍵アダプタータンパク質である (Li et al., 2011; Ling et al., 2013)。生理食塩水処理 T B I 動物において、M y d 8 8 は非損傷対照より有意にアップレギュレートされていた。しかし、T B I 後にフェノキシベンザミン処理したラットでは、M y d 8 8 発現レベルは非損傷対照と同等であった。機序的に、M y d 8 8 は T o l l 様受容体、サイトカイン、および核内因子カッパ B ( N F - B ) に対する鍵アダプタータンパク質である (Li et al., 2011; Janssens and Beyaert, 2002)。先の研究は、T o l l 様受容体の活性化は、結果的に M y d 8 8 の動員およびそれに続く N F - B 活性化を生じ、次いでそれが腫瘍壊死因子 a ( T N F - a )、I L - 1 、インターロイキン - 6 ( I L - 6 )、および細胞接着分子 1 (intracellular adhesion molecule-1) ( I C A M - 1 ) を含めた炎症性分子の急速な発現を誘発して炎症反応をもたらすことを示唆する (Janssens and Beyaert, 2002; Kenny and O' Neill, 2008)。

#### 【 0 0 8 7 】

別に定義しない限り、本明細書中のすべ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専門家が一般に理解しているものと同じ意味をもつ。本明細書に記載したものと同様または均等な方法および材料はいずれも本発明の実施または試験に使用できるが、好ましい方法および材料を本明細書に記載する。引用したすべての刊行物、特許、および公開特許の全体をあらゆる目的で本明細書に援用する。

#### 【 0 0 8 8 】

本明細書中で考察した刊行物は本出願の出願日以前の開示内容についてのみ提示される。本明細書中のいずれも、先の発明により本発明がそのような刊行物に先立つ権利がないことを認めるものと解釈すべきではない。

#### 【 0 0 8 9 】

本発明をその特定の態様に関して記載したが、さらなる改変が可能であることは理解されるであろう；本出願は、一般に本発明の原理に従った本発明の変更、使用、または適合をいずれも包含し、本開示からの逸脱であって本発明が関係する技術分野の既知または一般的慣習の範囲内に属するもの、また以上に述べた、および特許請求の範囲に従う本質的特徴に適用できるものを含むものとする。

#### 【 0 0 9 0 】

##### 参考文献

- Arand M, Melzner H, Kinzl L, Bruckner UB, Gebhard F. Early inflammatory mediator response following isolated traumatic brain injury and other major trauma in humans. *Langenbecks Arch Surg.* 2001;386:241-248
- Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8:57-69
- Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol.* 2010; 41:242-247
- Cimino M, Weiss B. Characteristics of the binding of phenoxybenzamine to calmodulin. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:2739-2745
- Hamill RW, Woolf PD, McDonald JV, Lee LA, Kelly M. Catecholamines predict outcom

10

20

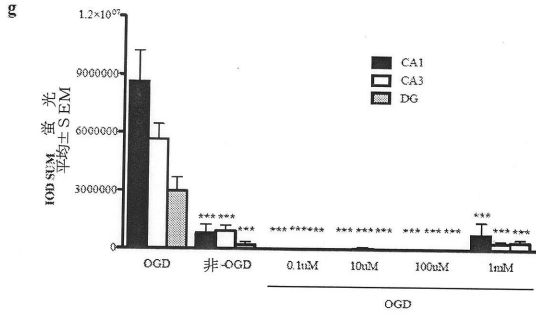
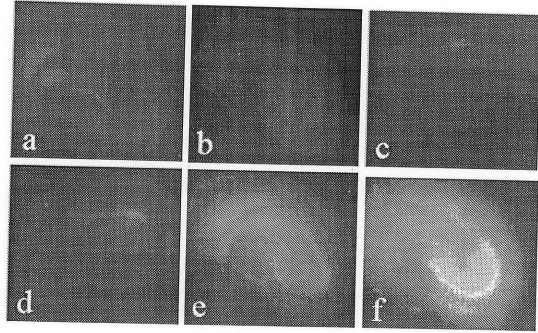
30

40

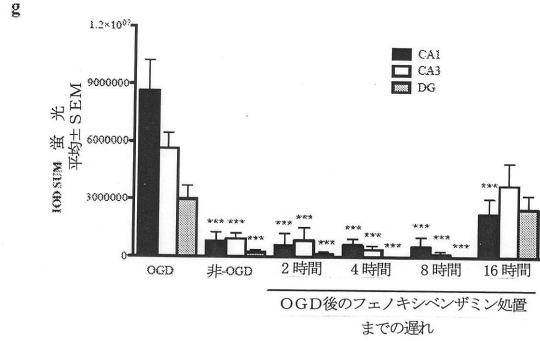
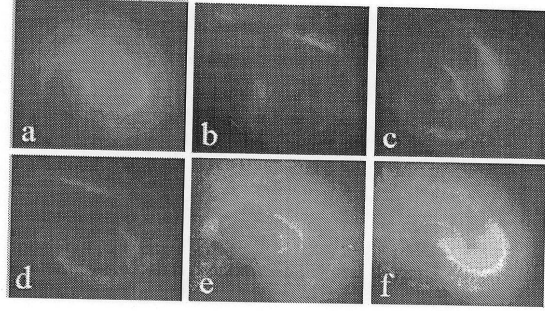
50

- e in traumatic brain injury. *Ann Neurol.* 1987;21:438-443
- Janssens S, Beyaert R. A universal role for myd88 in tlr/il-1r-mediated signaling. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27:474-482
- Kenny EF, O'Neill LA. Signalling adaptors used by toll-like receptors: An update. *Cytokine.* 2008; 43:342-349
- Li GZ, Zhang Y, Zhao JB, Wu GJ, Su XF, Hang CH. Expression of myeloid differentiation primary response protein 88 (myd88) in the cerebral cortex after experimental traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* 2011; 1396:96-104
- Ling HP, Li W, Zhou ML, Tang Y, Chen ZR, Hang CH. Expression of intestinal myeloid differentiation primary response protein 88 (myd88) following experimental traumatic brain injury in a mouse model. *J Surg Res.* 2013; 179:e227-234 10
- Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, Klar-Mohamad N, Gerritsen AF, Bruijn JA, Daha MR, van Es LA. Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 1995;48:1477-1486
- Rhodes JK, Sharkey J, Andrews PJ. The temporal expression, cellular localization, and inhibition of the chemokines mip-2 and mcp-1 after traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma.* 2009;26:507-525
- Semple BD, Bye N, Rancan M, Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Role of ccl2 (mcp-1) in traumatic brain injury (tbi): Evidence from severe tbi patients and ccl2-/- mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30:769-782 20
- Strosberg AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci.* 1993;2:1198-1209
- Tran TY, Dunne IE, German JW. Beta blockers exposure and traumatic brain injury: A literature review. *Neurosurg Focus.* 2008;25:E8
- Vest RS, O'Leary H, Coultrap SJ, Kindy MS, Bayer KU. Effective post-insult neuroprotection by a novel ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase ii (camkii) inhibitor. *J Biol Chem.* 2010; 285:20675-20682
- Wolf PD, Hamill RW, Lee LA, Cox C, McDonald JV. The predictive value of catecholamines in assessing outcome in traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 1987;66:875-882 30
- Wolf PD, Hamill RW, Lee LA, McDonald JV. Free and total catecholamines in critical illness. *Am J Physiol.* 1988;254:E287-291
- Yang K, Taft WC, Dixon CE, Todaro CA, Yu RK, Hayes RL. Alterations of protein kinase c in rat hippocampus following traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 1993; 10:287-295
- Zhang M, Shan H, Gu Z, Wang D, Wang T, Wang Z, Tao L. Increased expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type ii subunit delta after rat traumatic brain injury. *J Mol Neurosci.* 2012; 46:631-643
- Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.* 2012; 7:22-30 40

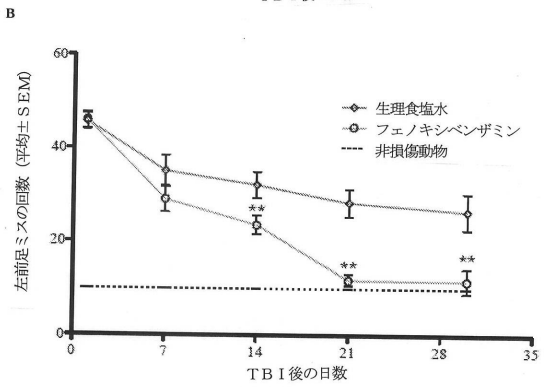
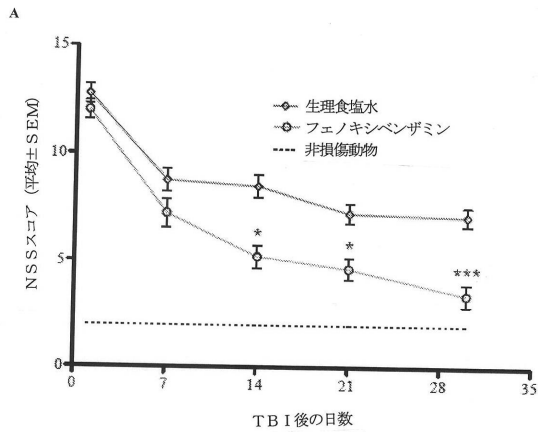
【 図 1 】



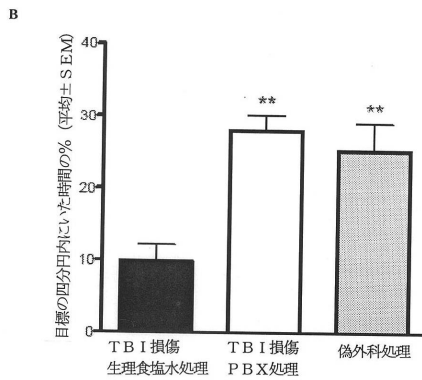
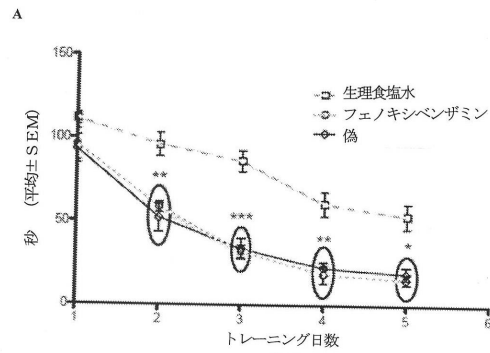
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 ポールセン, デーヴィッド・ジェイ  
アメリカ合衆国ニューヨーク州14203, バッファロー, エリコット・ストリート 875, ジ  
エイコプス・インスティテュート

(72)発明者 ラウ, トーマス・フレデリック  
アメリカ合衆国モンタナ州59870, スティーヴンスヴィル, パーク・プレース 110

審査官 伊藤 清子

(56)参考文献 Circ. Shock, 1986, Vol.20, No.2, pp.151-159

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/13

A61P 25/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )