

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-552450

(P2023-552450A)

(43)公表日 令和5年12月15日(2023.12.15)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/232 (2006.01)	A 6 1 K 31/232	4 C 0 7 6
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 C 2 0 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 9/107(2006.01)	A 6 1 K 9/107	
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全41頁) 最終頁に続く		

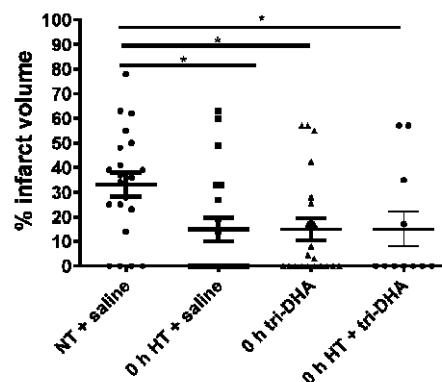
(21)出願番号	特願2023-534312(P2023-534312)	(71)出願人	306018457
(86)(22)出願日	令和3年12月7日(2021.12.7)		ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア
(85)翻訳文提出日	令和5年8月4日(2023.8.4)		・ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・
(86)国際出願番号	PCT/US2021/062102		オブ・ニューヨーク
(87)国際公開番号	WO2022/125484		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0
(87)国際公開日	令和4年6月16日(2022.6.16)		0 2 7、ニューヨーク、ウエスト 1 1
(31)優先権主張番号	63/122,198		6 番 ストリート 5 3 5、ロー メモリ
(32)優先日	令和2年12月7日(2020.12.7)		アル ライブラリ 4 1 2
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	110000796
(81)指定国・地域	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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	弁理士法人三枝国際特許事務所
			デッケルバウム リチャード ジェイ.
			アメリカ合衆国 1 0 7 0 6 ニューヨー
			ク ヘイスティングス オン ハドソン ハ
			ーバード レーン 8
		(72)発明者	ジルポリ ヒュルデ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新生児低酸素性虚血性脳症における神経保護のための組成物及び方法

(57)【要約】

本開示の様々な態様及び実施形態では、本発明は、低酸素性虚血性脳症（H I E）に関連する脳損傷から保護するための医薬組成物及び方法を提供する。この組成物及び方法は、オメガー3脂肪酸（ $n-3$ F A）ジグリセリド（D G）及び／またはトリグリセリド（T G）エマルジョンを使用し、単独または治療的低体温療法（H T）と組み合わせて使用してもよい。

FIG. 1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）に関連する脳損傷から保護するための方法であって、オメガ 3 脂肪酸（FA）ジグリセリド（DG）エマルジョン及び／またはオメガー 3 FA トリグリセリド（TG）エマルジョンを必要とする対象に、オメガ 3 脂肪酸（FA）ジグリセリド（DG）エマルジョン及び／またはオメガー 3 FA トリグリセリド（TG）エマルジョンを投与することを含む前記方法。

【請求項 2】

前記対象が HIE の危険性がある出生前対象であり、前記 DG 及び／または前記 TG エマルジョンが妊娠中の母親に投与される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記対象が分娩中であり、前記 DG または前記 TG エマルジョンが、分娩開始前または分娩開始後に母親に静脈内または経鼻胃管によって投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記エマルジョンが、1 回以上のボラス注射として、もしくは連続注入により、または 1 回以上のボラス負荷用量とそれに続く 1 回以上の追加の静脈内用量の注入の組み合わせとして静脈内投与される、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記対象が新生児であり、前記 DG 及び／または前記 TG エマルジョンが分娩の約 12 時間以内に前記新生児に最初に投与される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記新生児が早産児または正期新生児である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記エマルジョンの少なくとも第 1 用量が、分娩の約 6 時間以内、または分娩の約 4 時間以内、分娩の約 2 時間以内に投与される、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記エマルジョンが、1 回以上のボラス注射及び／または持続注入として、経鼻胃（NG）チューブを介して、または静脈内に投与される、請求項 5～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記新生児が治療的低体温療法（HT）で処置される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記エマルジョンが、HT の前、最中、または後に最初に投与される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 HT が分娩の約 12 時間以内に開始される、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 HT が分娩の約 10 時間以内に開始される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 HT が分娩の約 8 時間以内に開始される、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記 HT が分娩の約 6 時間以内に開始される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 HT が、分娩の約 6 時間後、または分娩の約 8 時間後、または分娩の約 10 時間後、または分娩の約 12 時間後に開始される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

オメガー 3 FA TG エマルジョンが投与される、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

50

オメガー 3 F A D G エマルジョンが投与される、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 F A が、前記脂肪酸の少なくとも約 5 0 重量 % のエイコサペンタエン酸 (E P A) 及び／またはドコサヘキサエン酸 (D H A) を含む、請求項 1 6 または 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記脂肪酸が少なくとも約 6 0 重量 % の E P A 及び／または D H A を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記脂肪酸が少なくとも約 7 0 重量 % の E P A 及び／または D H A を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記脂肪酸が E P A 及び D H A の両方を含む、請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

E P A : D H A の比が約 4 : 1 ～約 1 : 4 である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

E P A : D H A の比が約 2 : 1 ～約 1 : 2 であり、任意選択で約 1 : 1 である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 F A がドコサペンタエン酸 (D P A) をさらに含む、請求項 1 6 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 F A がアラキドン酸 (A R A) をさらに含む、請求項 1 5 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 F A が約 1 ～約 4 0 重量 % の A R A を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 D G もしくは前記 T G 、またはそれらのエマルジョンが、1 つ以上の特殊な分解促進メディエーター (S P M) をさらに含む、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 S P M (複数可) が、1 つ以上のリポキシン、(ニューロ) プロテクチン、レゾルビン、及びマレシンを含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記エマルジョンが、遊離 F A として、または T G 及び／または D G としてエステル化された中鎖脂肪酸 (M C F A) をさらに含む、請求項 1 5 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 M C F A が、前記 T G 及び／または前記 D G エマルジョン中の前記脂肪酸の約 1 % ～約 2 0 % である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記エマルジョンが、組成物の約 1 0 重量 % ～約 3 0 重量 % の T G 及び／または D G を含む、請求項 1 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記エマルジョンが、前記組成物の約 1 5 重量 % ～約 2 5 重量 % の D G を含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記エマルジョンの平均粒径が 2 0 0 n m 以下である、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか 1 項

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 34】

前記エマルジョンが、約 -40 mV 以上のマイナスのゼータ電位を有する、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記対象が、前記エマルジョンの単回投与を受ける、請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

前記対象が少なくとも 2 回、最大 6 回まで前記エマルジョンの投与を受ける、請求項 1～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記エマルジョンが、12 時間ごとに約 1 回以下の頻度で投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記エマルジョンが約 1 日～約 1 週間にわたって投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記エマルジョンがほぼ毎日投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

各投与が、体重 1 kg 当たり約 $0.05\sim 5\text{ g}$ という乳化 DG または乳化 TG の用量である、請求項 1～39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

各投与が体重 1 kg 当たり約 $0.5\sim 4\text{ g}$ という前記乳化 DG または前記乳化 TG である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

新生児における低酸素性虚血性脳症 (HIE) に関連する脳損傷から保護するための方法であって、HIE の危険性がある子供を抱えている妊娠中の母親に、出生前または分娩中にオメガ 3 FA DG または TG エマルジョンの静脈内注射を投与することと、任意選択で、治療的低体温療法 (HT) レジメン及び／またはオメガ-3 FA DG もしくは TG エマルジョン療法で分娩後の前記新生児を治療することを含む、前記方法。

【請求項 43】

前記 DG または前記 TG エマルジョンが、分娩開始後に前記母親に静脈内投与される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

出産が正期産または早産である、請求項 42 または請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記エマルジョンが、ボラスとして、もしくは連続注入により、または 1 回以上のボラス負荷用量とそれに続く 1 回以上の追加の静脈内用量の注入の組み合わせとして静脈内投与される、請求項 42～44 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 46】

$n-3\text{ FA DG}$ エマルジョンが分娩の約 12 時間以内に前記新生児に投与される、請求項 42～45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

前記 $n-3\text{ FA DG}$ エマルジョンが、分娩の約 6 時間以内、または分娩の約 4 時間以内、分娩の約 2 時間以内に投与される、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記 $n-3\text{ FA DG}$ または前記 TG エマルジョンが、ボラス及び／または持続注入として、前記新生児に NG チューブを介してまたは静脈内に投与される、請求項 46 または 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記新生児が治療的低体温療法（H T）で処置される、請求項 4 2～4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 H T が分娩の約 1 2 時間以内に開始される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 H T が分娩の約 1 0 時間以内に開始される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 H T が分娩の約 8 時間以内に開始される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 H T が分娩の約 6 時間以内に開始される、請求項 4 9 に記載の方法。

10

【請求項 5 4】

前記 H T が、分娩の約 6 時間後、または分娩の約 8 時間後、または分娩の約 1 0 時間後、または分娩の約 1 2 時間後に開始される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 5】

脂肪酸が少なくとも約 5 0 重量%の E P A 及び／または D H A を含む、請求項 4 2～5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記脂肪酸が少なくとも約 6 0 重量%の E P A 及び／または D H A を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記脂肪酸が少なくとも約 7 0 重量%の E P A 及び／または D H A を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

20

【請求項 5 8】

前記脂肪酸が E P A 及び D H A の両方を含む、請求項 5 5～5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 9】

E P A：D H A の比が約 4：1～約 1：4 である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

E P A：D H A の比が約 2：1～約 1：2 であり、任意選択で約 1：1 である、請求項 5 9 に記載の方法。

30

【請求項 6 1】

前記脂肪酸が D P A をさらに含む、請求項 5 5～6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記脂肪酸が A R A をさらに含む、請求項 5 5～6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記脂肪酸が約 1 重量%～約 4 0 重量%の A R A を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記 D G もしくは前記 T G、またはそれらのエマルジョンが、1 つ以上の S P M をさらに含む、請求項 4 2～6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 S P M（複数可）が、1 つ以上のリポキシン、（ニューロ）プロテクチン、レゾルビン、及びマレシンを含む、請求項 6 4 に記載の方法。

40

【請求項 6 6】

前記エマルジョンが、遊離脂肪酸として、またはジグリセリドとしてエステル化された中鎖脂肪酸（M C F A）をさらに含む、請求項 4 2～6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記 M C F A が、前記エマルジョン中の前記脂肪酸の約 1 重量%～約 2 0 重量%である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記エマルジョンが、組成物の約 1 0 重量%～約 2 0 重量%の D G オイルを含む、請求

50

項 4 2 ～ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記エマルジョンが、前記組成物の約 1 5 重量 % ～ 約 2 5 重量 % の D G または T G オイルを含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記エマルジョンの平均粒径が 2 0 0 n m 以下である、請求項 4 2 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記エマルジョンが、約 -40 m V 以上のマイナスのゼータ電位を有する、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記新生児が、前記エマルジョンの単回ボラス注射または連続注入を受ける、請求項 4 2 ～ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記新生児が、少なくとも 2 回、及び最大 6 回の前記エマルジョンのボラス注射またはボラス注入を受ける、請求項 4 2 ～ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記ボラス注射または前記ボラス注入が、1 2 時間ごとに約 1 回以下の頻度で投与される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

注射が約 1 日～約 1 週間にわたって投与される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記注射がほぼ毎日投与される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記ボラス投与が、体重 1 k g 当たり約 0 . 0 5 ～ 約 5 g の乳化 D G もしくは乳化 T G である、請求項 4 2 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記ボラス投与が体重 1 k g 当たり約 0 . 5 ～ 約 4 g の前記乳化 D G または前記乳化 T G である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

低酸素性虚血性脳症 (H I E) に関連する脳損傷から保護するための方法であって、必要とする新生児対象に、分娩から約 1 2 時間以内にオメガー 3 F A D G または T G エマルジョンを投与することと、治療的低体温 (H T) レジメンで前記対象を処置することを含む前記方法。

【請求項 8 0】

前記新生児対象が、H T の前、最中、または後に前記エマルジョンで最初に処置される、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記新生児対象が早産児または正期産新生児である、請求項 7 9 または 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

D G または T G エマルジョンの少なくとも第 1 用量が、分娩の約 6 時間以内、または分娩の約 4 時間以内、分娩の約 2 時間以内に投与される、請求項 7 9 ～ 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記 D G または前記 T G エマルジョンが、ボラス及び／または持続注入として、N G チューブを介して、または静脈内に投与される、請求項 7 9 ～ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記 H T が分娩の約 1 2 時間以内に開始される、請求項 7 9 ～ 8 3 のいずれか 1 項に記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 85】

前記 D G または前記 T G エマルジョンの用量が分娩の約 4 時間以内に送達され、前記 H T が分娩の約 10 時間以内に開始される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 86】

前記 D G または前記 T G エマルジョンの用量が分娩の約 4 時間以内に送達され、前記 H T が分娩の約 8 時間以内に開始される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 87】

前記 D G エマルジョンの用量が分娩の約 4 時間以内に送達され、前記 H T が分娩の約 6 時間以内に開始される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 88】

前記 D G エマルジョンの用量が分娩の約 2 時間以内に送達され、前記 H T が分娩の約 6 時間後、または分娩の約 8 時間後、または分娩の約 10 時間後、または分娩の約 12 時間後に開始される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 89】

前記 D G または前記 T G エマルジョンが、ボーラスとして、もしくは連続注入により、またはボーラス負荷用量とそれに続く 1 回以上の追加の用量の注入の組み合わせとして静脈内投与される、請求項 80～88 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 90】

脂肪酸が少なくとも約 50 重量%の EPA 及び／または DHA を含む、請求項 80～89 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 91】

前記脂肪酸が少なくとも約 60 重量%の EPA 及び／または DHA を含む、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記脂肪酸が少なくとも約 70 重量%の EPA 及び／または DHA を含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記脂肪酸が EPA 及び DHA の両方を含む、請求項 90～92 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 94】

EPA : DHA の比が約 4 : 1～約 1 : 4 である、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

EPA : DHA の比が約 2 : 1～約 1 : 2 であり、任意選択で約 1 : 1 である、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 96】

前記脂肪酸が DPA をさらに含む、請求項 90～95 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 97】

前記脂肪酸が ARA をさらに含む、請求項 90～96 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 98】

前記脂肪酸が約 1 重量%～約 40 重量%の ARA を含む、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 99】

前記 D G もしくは前記 T G、またはそれらのエマルジョンが、1 つ以上の SPM をさらに含む、請求項 90～98 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 100】

前記 SPM（複数可）が、1 つ以上のリポキシン、（ニューロ）プロテクチン、レゾルビン、及びマレシンを含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記エマルジョンが、遊離 FA として、または D G もしくは T G としてエステル化された MCF A をさらに含む、請求項 90～100 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 102】

前記 M C F A が、前記 D G もしくは前記 T G エマルジョン中の前記脂肪酸の約 1 重量%～約 20 重量%である、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

前記エマルジョンが、約 10 重量%～約 30 重量%の D G オイルまたは T G オイルを含む、請求項 79～102 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 104】

前記エマルジョンが、約 15 重量%～約 25 重量%の D G または T G オイルを含む、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

前記エマルジョンの平均粒径が 200 nm 以下である、請求項 79～104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 106】

前記エマルジョンが、約 -40 mV 以上のマイナスのゼータ電位を有する、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 107】

前記対象が、前記エマルジョンの単回ボーラス注射または注入を受ける、請求項 79～106 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 108】

前記対象が、少なくとも 2 回、及び最大 6 回の前記エマルジョンのボーラス注射またはボーラス注入を受ける、請求項 79～106 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

前記ボーラス注射または前記ボーラス注入が、12 時間ごとに約 1 回以下の頻度で投与される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記ボーラス注射または前記ボーラス注入が、約 1 日～約 1 週間の経過にわたって投与される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 111】

前記ボーラス注射または前記ボーラス注入がほぼ毎日投与される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 112】

単回投与が体重 1 kg 当たり約 0.05～約 5 g の乳化 D G または乳化 T G を含む、請求項 79～111 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 113】

単回投与が体重 1 kg 当たり約 2 g～約 4 g の前記乳化 D G または前記乳化 T G を含む、請求項 112 に記載の方法。

【請求項 114】

1 つ以上の乳化剤で乳化された有効量のオメガ-3 D G または T G オイルを含む医薬組成物であって、前記 D G または前記 T G オイルが、少なくとも約 50 重量%の E P A 及び D H A、及び 1 重量%～約 30 重量%の A R A であるエステル化 F A を含む、前記医薬組成物。

【請求項 115】

前記 F A が少なくとも約 60 重量%の E P A 及び D H A を含む、請求項 114 に記載の医薬組成物。

【請求項 116】

前記 F A が少なくとも約 70 重量%の E P A 及び D H A を含む、請求項 114 に記載の医薬組成物。

【請求項 117】

E P A : D H A の比が約 4 : 1～約 1 : 4 である、請求項 114～116 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 118】

EPA : DHA の比が約 2 : 1 ~ 約 1 : 2 であり、任意選択で約 1 : 1 である、請求項 117 に記載の医薬組成物。

【請求項 119】

前記 FA が DPA をさらに含む、請求項 114 ~ 118 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 120】

前記 DG もしくは前記 TG、またはそれらのエマルジョンが、1 つ以上の SPM をさらに含む、請求項 114 ~ 119 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 121】

前記 SPM (複数可) が、1 つ以上のリポキシン、(ニューロ) プロテクチン、レゾルビン、及びマレシンを含む、請求項 120 に記載の方法。

【請求項 122】

前記エマルジョンが、遊離 FA として、または DG もしくは TG 中でエステル化された MCF A をさらに含む、請求項 114 ~ 121 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 123】

前記 MCF A が、前記エマルジョン中の前記 FA の約 1 重量% ~ 約 20 重量% である、請求項 122 に記載の医薬組成物。

【請求項 124】

前記エマルジョンが、約 10 重量% ~ 約 30 重量% の DG または TG オイルを含む、請求項 114 ~ 123 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 125】

前記エマルジョンが約 15 重量% ~ 約 25 重量% の DG または TG オイルを含む、請求項 124 に記載の医薬組成物。

【請求項 126】

前記エマルジョンの平均粒径が 200 nm 以下である、請求項 114 ~ 125 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 127】

前記エマルジョンが、約 -40 mV 以上のマイナスのゼータ電位を有する、請求項 126 に記載の医薬組成物。

【請求項 128】

前記乳化剤が、リン脂質乳化剤、ホスホグリセリド乳化剤、ならびに中鎖及び／または長鎖 FA 乳化剤のうちの 1 つ以上を含む、請求項 114 ~ 127 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 129】

前記乳化剤が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジイノシトール、ホスファチジルセリン、及びホスファチジン酸から選択される少なくとも 1 つを含む、請求項 128 に記載の医薬組成物。

【請求項 130】

前記乳化剤が、1 つ以上の中鎖または長鎖 FA をさらに含む、請求項 128 に記載の医薬組成物。

【請求項 131】

前記乳化剤が、任意選択でラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、及びステアリン酸から選択される飽和 FA を含む；ならびに／または任意選択でオレイン酸もしくはリノレン酸から選択される不飽和 FA を含む、請求項 130 に記載の医薬組成物。

【請求項 132】

前記乳化剤がホスファチジルコリン及びオレイン酸ナトリウムを含む、請求項 131 に記載の医薬組成物。

【請求項 133】

前記組成物がヒトの血液とほぼ等張であり、任意選択でグリセロール、ソルビトール、

10

20

30

40

50

キシリトール、及び／またはグルコースなどの１つ以上のポリオールを含む、請求項１１４～１３２のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項１３４】

αートコフェロール、βートコフェロール、γートコフェロール、及びアスコルビルエステルのうちの１つ以上など、１つ以上の抗酸化剤を含む、請求項１１４～１３３のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項１３５】

任意選択でＥＤＴＡまたはＥＧＴＡである金属キレート剤をさらに含む、請求項１１４～１３４のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項１３６】

本質的にＤＧオイル、水、グリセロール、ＥＤＴＡまたはＥＧＴＡ、ホスファチジルコリン、及びオレイン酸ナトリウムからなる、請求項１３５に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

低酸素性虚血性脳症（ＨＩＥ）は、新生児に発生する重篤な疾患であり、死亡または脳性麻痺などの長期にわたる重大な発達障害及び神経障害を引き起こすことがよくある。ＨＩＥは、出生前、出生中、出生後など、新生児の脳に酸素欠乏をもたらすさまざまな状態によって引き起こされる。現在、ＨＩＥに対して確立された唯一の治療法は治療的低体温療法（ＨＴ）である。ＨＴでは、新生児の全身または脳を７２時間、約３３～３４℃に冷却することを含む。前臨床研究及び小規模臨床試験では、ＨＴが神経損傷の程度を軽減し、死亡率を低下させ、神経機能の回復を改善し得ることが示されている。

【０００２】

しかし、ＨＴは少数のＨＩＥ患者（約８人に１人）の長期的な神経障害の軽減にしか成功しておらず、その使用は一般に三次医療施設に限定されている。したがって、ＨＴでは新生児の搬送が必要となり、重要な時期に処置が遅れる場合がある。ＨＴは通常、虚血事象から６時間以内に開始する必要がある。

【背景技術】

【０００３】

したがって、ＨＩＥを経験している新生児、またはＨＩＥの危険性がある新生児に神経保護を提供する組成物及び方法が喫緊に必要とされている。

【発明の概要】

【０００４】

様々な態様及び実施形態では、本発明は、低酸素性虚血性脳症（ＨＩＥ）に関連する脳損傷から保護するための医薬組成物及び方法を提供する。この組成物及び方法は、エマルジョンに配合可能であるオメガー３脂肪酸（ $n-3$ F A）ジグリセリド（ＤＧ）及び／またはトリグリセリド（ＴＧ）を使用する。様々な態様及び実施形態に従って、本開示は、出生前、分娩中、または出生後の期間中の酸素欠乏及び／または血流制限によって引き起こされる乳児の脳損傷を予防または軽減するための組成物及び方法を提供する。

【０００５】

様々な実施形態では、赤ん坊は出生前または分娩中であり、ＨＩＥの危険性があり、 $n-3$ F A ＤＧまたはＴＧエマルジョンが妊娠中の母親に静脈内投与される。例えば、いくつかの実施形態では、ＨＩＥを誘発する可能性のある虚血性事象が予測または検出される場合、例えば、子癇前症またはＨＩＥリスクに関連する他の妊娠状態の検出時に、 $n-3$ F A ＤＧまたはＴＧエマルジョンが母親に静脈内投与される。いくつかの実施形態では、エマルジョンは、長期分娩を含む分娩中、または臍帯圧迫により新生児がＨＩＥの危険にさらされていると判断された場合、または胎盤早期剥離など胎盤への血流が障害されている場合に投与される。

【０００６】

他の実施形態では、投与対象は、ＨＩＥが疑われる新生児（すなわち、新生児）である

10

20

30

40

50

。n-3 F A D GまたはT Gエマルジョンは、分娩の約12時間以内、または分娩の約10時間以内、または分娩の約8時間以内、または分娩の約6時間以内、または分娩の約4時間以内、または分娩の約2時間以内に新生児に投与される。新生児への送達の場合、エマルジョンは経鼻胃（N G）チューブを介して投与されても、または静脈内に投与されてもよい。

【0007】

様々な実施形態では、新生児は、n-3 F A T GまたはD Gエマルジョンでの処置の前、処置の間、または処置後のいずれかに、H Tでさらに処置される。H Tは通常、分娩の約6時間以内など、できるだけ早く開始する必要がある。しかし、いくつかの実施形態では、H Tは、分娩の約12時間以内、または分娩の約10時間以内、または分娩の約8時間以内に開始される。いくつかの実施形態では、出生直後のT GまたはD Gエマルジョンの投与によって、H Tが脳損傷ならびに長期及び／または生涯にわたるH I Eの合併症を回避するために利益をもたらす範囲が拡大され得る。

【0008】

本発明によれば、D GまたはT Gの脂肪酸は主にn-3 F Aである。いくつかの実施形態では、n-3 F Aは、ドコサヘキサエン酸（D H A）、エイコサペンタエン酸（E P A）、及びドコサペンタエン酸（D P A）のうちの1つ以上を含む長鎖n-3 F Aである。いくつかの実施形態では、n-3 F Aは、D H A及びE P Aを含む。E P A及びD H Aは、任意選択で、約4：1～約1：4（例えば、約1：1）の比で存在してもよい。さらに他の実施形態では、F Aは、アラキドン酸（A R A）または中鎖脂肪酸（M C F A）をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、D GまたはT G（またはエマルジョン）は、主にA A、E P A、D P A、及びD H Aに由来する酸素化代謝産物である、1つ以上の特殊な分解促進メディエーター（S P M）をさらに含む。それらとしては、リポキシン、（ニューロ）プロテクチン、レゾルビン、及びマレシンが含まれ、ナノモルからピコモルの範囲の濃度で強力な抗アポトーシス効果、抗炎症効果、及び免疫調節効果を有し得る。

【0009】

様々な実施形態では、エマルジョンは、1つ以上の乳化剤とともに、組成物全体の約10重量%～約30重量%のT Gオイル及び／またはD Gオイルを含む。例えば、エマルジョンは、1つ以上の乳化剤とともに、全組成物の約15重量%～約30重量%のD Gオイル、または約15重量%～約25重量%のD Gオイル（例えば、約20%のD Gオイル）を含んでもよい。

【0010】

様々な実施形態では、対象（例えば、H I Eを経験しているまたはH I Eの危険性がある新生児対象など）は、エマルジョンの1回以上のボーラス注射もしくは注入、または経鼻胃（N G）チューブを介して受ける。いくつかの実施形態では、対象は少なくとも2回、最大6回のエマルジョンの投与を受けてもよい。様々な実施形態では、エマルジョンは、1日～約1週間にわたって投与され、1日1回以上（例えば、ほぼ毎日）投与されてもよい。

【0011】

例示的な実施形態として、本開示は、新生児におけるH I Eに関連する脳損傷に対して防御するための方法を提供し、この方法は、H I Eの危険性がある子供を抱えている妊娠中の母親に、出生前または分娩中に、n-3 F A D GまたはT Gエマルジョンの静脈内注射を投与することを含む。分娩後、新生児は任意選択で、H T療法及び／またはD GもしくはT Gエマルジョン療法でさらに処置されてもよい。いくつかの実施形態では、一旦、H I Eが予想されるか、または重大な危険性がある場合、D GまたはT Gエマルジョンは、分娩前または分娩中に母親に静脈内投与される。

【0012】

他の例示的な実施形態では、神経保護のための方法は、必要とする新生児対象に、分娩の約12時間以内、または分娩の約10時間以内、または分娩の約8時間もしくは6時間

10

20

30

40

50

以内（またはそれ未満）以内に $n-3$ F A D G エマルジョンを投与すること、及び H T レジメンで新生児対象を処置することを含む。エマルジョンは、H T レジメンの前、最中、及び／または後に投与してもよい。例えば、エマルジョンの少なくとも最初の用量は、分娩の約 6 時間以内、または分娩の約 4 時間以内、分娩の約 2 時間以内に投与されてもよく、それによって新生児が H T を開始するために輸送されている間に神経保護を提供し得る。このエマルジョンは、経鼻胃（N G）チューブまたは静脈内に投与される。これらの実施形態によれば、H T は、一般に望まれるよりも遅く開始されてもよく、それでも予想外の治療効果を提供し得る。さらに他の実施形態では、H T が最初に開始され、続いて $n-3$ F A T G または D G エマルジョンが投与される。

【0013】

他の態様では、本開示は、本明細書に記載の様々な方法に使用され得る医薬組成物を提供する。様々な実施形態では、医薬組成物は、有効量の $n-3$ F A D G エマルジョンを含み、ここで、D G は、少なくとも約 50 % の E P A 及び D H A を含み、（重量による総 F A 含量に対して）1 % ～約 40 % のアラキドン酸（A R A）及び／または中鎖脂肪酸（M C F A）、ならびに 1 つ以上の乳化剤を含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、エマルジョンは、約 10 重量 % ～約 30 重量 % のジグリセリドオイルを含む。いくつかの実施形態では、エマルジョンは、約 15 重量 % ～約 25 重量 % のジグリセリドオイルを含む。組成物は、所望の物理的特性を得るために、1 つ以上の乳化剤をさらに含む。様々な実施形態では、乳化剤には、リン脂質乳化剤、ホスホグリセリド乳化剤、及び中鎖及び／または長鎖脂肪酸乳化剤のうちの 1 つ以上を含んでもよい。ホスホグリセリド乳化剤は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、及びホスファチジン酸から選択され得る。共乳化剤としての中鎖または長鎖 F A は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、及びリノレン酸から選択され得る。例示的な共乳化剤はオレイン酸ナトリウムである。

【0015】

様々な実施形態では、組成物は、任意選択で、グリセロールなどの 1 つ以上のポリオールを含む。例えば、組成物は、組成物の約 2 重量 % ～約 10 重量 % のグリセロールを含んでもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、及びアスコルビルエステルのうちの 1 つ以上など、1 つ以上の抗酸化剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物は、任意選択で E D T A または E G T A である金属キレート剤をさらに含む。

【0016】

本開示のさらなる態様及び実施形態は、以下の詳細な説明によってここに記載される。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1 A】 梗塞容積に対する低体温（H T）及び $t r i-D H A$ の影響：低酸素虚血（H I）損傷直後（0 時間）から開始する正常体温（N T）＋生理食塩水（ $n=21$ ）、H T ＋生理食塩水（ $n=20$ ）、 $t r i-D H A$ （ $n=21$ ）または H T ＋ $t r i-D H A$ （ $n=11$ ）で処置したマウスの梗塞容積（A）及び代表的な T T C 染色大脳切片（B）（梗塞容積 %：N T ＋生理食塩水 -33.2 ± 4.8 、H T ＋生理食塩水 -14.9 ± 4.8 、0 時間 $t r i-D H A -14.9 \pm 4.5$ 、0 時間 H T ＋ $t r i-D H A -15.0 \pm 7.0$ ）；H I 損傷直後（0 時間）から開始して N T ＋生理食塩水、H T ＋生理食塩水または H T ＋ $t r i-D H A$ で処置したマウスの代表的なニッスル染色大脳冠状切片（C）。値は平均値 $\pm$ S E M である。 $* p < 0.05$ 、N T ＋生理食塩水群と比較。

【図 1 B】 梗塞容積に対する低体温（H T）及び $t r i-D H A$ の影響：低酸素虚血（H I）損傷直後（0 時間）から開始する正常体温（N T）＋生理食塩水（ $n=21$ ）、H T ＋生理食塩水（ $n=20$ ）、 $t r i-D H A$ （ $n=21$ ）または H T ＋ $t r i-D H A$ （ $n=11$ ）で処置したマウスの梗塞容積（A）及び代表的な T T C 染色大脳切片（B）（

10

20

30

40

50

梗塞容積%：NT+生理食塩水-33.2±4.8、HT+生理食塩水-14.9±4.8、0時間tri-DHA-14.9±4.5、0時間HT+tri-DHA-15.0±7.0)；HI損傷直後(0時間)から開始してNT+生理食塩水、HT+生理食塩水またはHT+tri-DHAで処置したマウスの代表的なニッスル染色大脳冠状切片(C)。値は平均値±SEMである。* $p<0.05$ 、NT+生理食塩水群と比較。

【図1C】梗塞容積に対する低体温(HT)及びtri-DHAの影響：低酸素虚血(HI)損傷直後(0時間)から開始する正常体温(NT)+生理食塩水($n=21$)、HT+生理食塩水($n=20$)、tri-DHA($n=21$)またはHT+tri-DHA($n=11$)で処置したマウスの梗塞容積(A)及び代表的なTTC染色大脳切片(B)(梗塞容積%：NT+生理食塩水-33.2±4.8、HT+生理食塩水-14.9±4.8、0時間tri-DHA-14.9±4.5、0時間HT+tri-DHA-15.0±7.0)；HI損傷直後(0時間)から開始してNT+生理食塩水、HT+生理食塩水またはHT+tri-DHAで処置したマウスの代表的なニッスル染色大脳冠状切片(C)。値は平均値±SEMである。* $p<0.05$ 、NT+生理食塩水群と比較。

【図2A】低体温(HT)及びtri-DHAの治療範囲：低酸素虚血(HI)損傷の2時間後から開始した、正常体温(NT)+生理食塩水($n=22$)、HT+生理食塩水($n=22$)またはHT+tri-DHA($n=21$)で処置したマウスの梗塞容積(A)及び代表的なTTC染色大脳切片(B)(梗塞容積%：NT+生理食塩水-31.4±4.1、2時間遅延HT+生理食塩水-18.8±4.6、2時間遅延HT+tri-DHA-12.7±4.0)；低酸素虚血(HI)傷害の4時間後に開始して正常体温(NT)+生理食塩水($n=19$)、HT+生理食塩水($n=23$)またはHT+tri-DHA($n=10$)で処置したマウスの梗塞容積(C)及び代表的なTTC染色大脳切片(D)(梗塞容積%：NT+生理食塩水-30.7±5.0、4時間遅延HT+生理食塩水-31.3±5.6、4時間遅延HT+tri-DHA-41.3±5.5)。値は平均値±SEMである。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、NT+生理食塩水群と比較。

【図2B】低体温(HT)及びtri-DHAの治療範囲：低酸素虚血(HI)損傷の2時間後から開始した、正常体温(NT)+生理食塩水($n=22$)、HT+生理食塩水($n=22$)またはHT+tri-DHA($n=21$)で処置したマウスの梗塞容積(A)及び代表的なTTC染色大脳切片(B)(梗塞容積%：NT+生理食塩水-31.4±4.1、2時間遅延HT+生理食塩水-18.8±4.6、2時間遅延HT+tri-DHA-12.7±4.0)；低酸素虚血(HI)傷害の4時間後に開始して正常体温(NT)+生理食塩水($n=19$)、HT+生理食塩水($n=23$)またはHT+tri-DHA($n=10$)で処置したマウスの梗塞容積(C)及び代表的なTTC染色大脳切片(D)(梗塞容積%：NT+生理食塩水-30.7±5.0、4時間遅延HT+生理食塩水-31.3±5.6、4時間遅延HT+tri-DHA-41.3±5.5)。値は平均値±SEMである。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、NT+生理食塩水群と比較。

【図2C】低体温(HT)及びtri-DHAの治療範囲：低酸素虚血(HI)損傷の2時間後から開始した、正常体温(NT)+生理食塩水($n=22$)、HT+生理食塩水($n=22$)またはHT+tri-DHA($n=21$)で処置したマウスの梗塞容積(A)及び代表的なTTC染色大脳切片(B)(梗塞容積%：NT+生理食塩水-31.4±4.1、2時間遅延HT+生理食塩水-18.8±4.6、2時間遅延HT+tri-DHA-12.7±4.0)；低酸素虚血(HI)傷害の4時間後に開始して正常体温(NT)+生理食塩水($n=19$)、HT+生理食塩水($n=23$)またはHT+tri-DHA($n=10$)で処置したマウスの梗塞容積(C)及び代表的なTTC染色大脳切片(D)(梗塞容積%：NT+生理食塩水-30.7±5.0、4時間遅延HT+生理食塩水-31.3±5.6、4時間遅延HT+tri-DHA-41.3±5.5)。値は平均値±SEMである。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、NT+生理食塩水群と比較。

【図2D】低体温(HT)及びtri-DHAの治療範囲：低酸素虚血(HI)損傷の2時間後から開始した、正常体温(NT)+生理食塩水($n=22$)、HT+生理食塩水($n=22$)またはHT+tri-DHA($n=21$)で処置したマウスの梗塞容積(A)

及び代表的な T T C 染色大脳切片 (B) (梗塞容積 % : N T + 生理食塩水 - 31.4 ± 4.1 、2 時間遅延 H T + 生理食塩水 - 18.8 ± 4.6 、2 時間遅延 H T + t r i - D H A - 12.7 ± 4.0) ; 低酸素虚血 (H I) 傷害の 4 時間後に開始して正常体温 (N T) + 生理食塩水 (n = 19)、H T + 生理食塩水 (n = 23) または H T + t r i - D H A (n = 10) で処置したマウスの梗塞容積 (C) 及び代表的な T T C 染色大脳切片 (D) (梗塞容積 % : N T + 生理食塩水 - 30.7 ± 5.0 、4 時間遅延 H T + 生理食塩水 - 31.3 ± 5.6 、4 時間遅延 H T + t r i - D H A - 41.3 ± 5.5)。値は平均値 $\pm$ S E M である。* p < 0.05、** p < 0.01、N T + 生理食塩水群と比較。

【図 3】低酸素性虚血 (H I) 損傷を受け、ビヒクルとして生理食塩水、n - 3 トリグリセリド (T G)、n - 3 ジグリセリド (D G) エマルジョンで処置された新生仔マウス (10 日齢) の梗塞容積。n = 15 ~ 17。値は S D 付きの平均値である。用量 = 0.375 mg / g (体重)。

【図 4】低酸素性虚血 (H I) 損傷を与え、ビヒクルとして生理食塩水、または 1 匹あたり 10 もしくは 20 ng の濃度の D H A (P D 1) 由来のニューロプロテクチン と、比較した 1 匹あたり 10 ng の D P A 由来のニューロプロテクチン (P D 1 n - 3 D P A) で処置した新生仔マウス (生後 10 日) の梗塞容積 (n = 15 - 17)。値は S D 付きの平均値である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

様々な態様及び実施形態では、本発明は、低酸素性虚血性脳症 (H I E) に関連する脳損傷から保護するための医薬組成物及び方法を提供する。この組成物及び方法は、エマルジョンに配合されるオメガ - 3 脂肪酸 (n - 3 F A) ジグリセリド (D G) 及び／またはトリグリセリド (T G) を使用する。

【0019】

様々な態様及び実施形態に従って、本開示は、出産前、分娩中、または出生後の期間中の酸素欠乏及び／または血流制限によって引き起こされる脳損傷を予防または軽減するための組成物及び方法を提供する。このような状態は、臨床的には (新生児) 低酸素性虚血性脳症 (H I E) として説明される場合が多く、これには新生児脳症出生時仮死、分娩中仮死及び周産期仮死が挙げられる。H I E はさまざまな種類の組織損傷を引き起こす可能性があり、とりわけ脳性麻痺、認知障害、てんかん、聴覚障害、及び視覚障害などの長期障害を引き起こし得る。

【0020】

妊娠中の H I E の原因 (すなわち、新生児が H I E のリスクにさらされる) としては、子癇前症、子癇、妊娠糖尿病、及び感染症が挙げられる。新生児が H I E のリスクにさらされる妊娠中または分娩中のその他の状態としては、常位胎盤早期剥離、前置胎盤、胎盤機能不全、子宮破裂、及び臍帯合併症が挙げられる。臍帯合併症には臍帯の圧迫が含まれ、これは、例えば長時間の分娩中に発生し得る。分娩前の胎児心拍数または子宮頻収縮の変化は、H I E の予測因子であり得る。新生児期の未熟児は肺が未発達である場合があるので、特に H I E のリスクが高い。一般に、新生児における H I E のリスクを示す症状には、呼吸困難、黄疸、及び新生児低血糖が挙げられる。H I E の兆候としては、呼吸障害、摂食障害、反射神経の欠如、発作、及び意識レベルの低下が挙げられる。

【0021】

新生児の H I E または H I E のリスクは、アプガースコアを使用して診断または評価され得る。A p g a r スコアで評価される 5 つの基準は次のとおりである: (1) 外観 (すなわち、肌の色 / 色合い); (2) パルス; (3) しかめっ面 (すなわち、刺激に対する反応); (4) 活動 (すなわち、筋緊張 / 活動レベル)、及び (5) 呼吸。一般に、5 つの基準はそれぞれ 0、1、または 2 (2 つが最高) としてスコア付けされ、合計スコアは 5 の値を加算することによって計算される。0 ~ 3 のスコアは、特に正期産または正期産間近に生まれた赤ちゃんでは重要とみなされる。特に 5 分後のスコアが 4 ~ 6 の場合は、正常以下とみなされ、H I E のリスクを示す場合があり、医療介入が必要になる場合があ

10

20

30

40

50

る。7+のスコアは正常とみなされる。

【0022】

あるいは、またはさらに、HIEのリスクは、出生直後に臍帯血を採取することによって評価され得る。血液のpH及び塩基欠損(BD)は、虚血性事象が発生したか否かを評価するための公知の手段である。HIEの他の予測因子としては、脳特異的クレアチンキナーゼ(CK-BB)、プロテイン S-100B、ニューロン特異的エンドラーゼ、及び他の炎症性マーカー、例えば、インターロイキンなどの脳損傷の公知の血清マーカーが挙げられる。Nagdyman N., et al. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res*. 2001 Apr; 49(4): 502-6。他の画像検査及び神経生理学的検査も、早期リスク評価を決定し、長期予後を提供するために使用可能であり、これらとしては、振幅積分脳波(Amplitude-integrated EEG)、T1強調MRI(T1-weighted MRI)及びT2強調MRI(T2-weighted MRI)、視床磁気共鳴分光法(Thalamic Magnetic Resonance Spectroscopy)(MRS)、及び深部灰白質乳酸塩/N-アセチルアスパラギン酸(Lac/NAA)ピーク/面積比が挙げられる。Pang R., et al., Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Lactate/N-Acetylaspartate within 48 h Predicts Cell Death Following Varied Neuroprotective Interventions in a Piglet Model of Hypoxia-Ischemia With and Without Inflammation-Sensitization. *Front Neuro* 2020; 11: 883.

【0023】

いくつかの実施形態における本開示は、急性治療のための安定なオメガ3 DGまたはTG水中油型エマルジョンを使用する医薬組成物及び方法を提供する。様々な実施形態におけるDGまたはTGエマルジョンは、DHA及びEPA、及び任意選択でDPAを含む、約50%~約100%のオメガ3脂肪酸(脂肪酸の総重量に対して)を含む。いくつかの実施形態では、総脂肪酸には、ARAまたはMCPAがさらに含まれる。DGエマルジョンは、静脈内(iv)経路などの非経口送達に適しており、DG及びTGエマルジョンの物理的特性により、損傷した脳組織へのオメガ3脂肪酸の迅速な送達が促進される。いくつかの実施形態では、DGまたはTGエマルジョンは、一般に、組成物の約10重量%~約30重量%である。すなわち、100mLのエマルジョン当たり約10~約30gのDGオイルまたはTGオイルが存在する。エマルジョンの例示的な組成物は、本明細書の他の箇所に記載されている。

【0024】

本明細書に記載のエマルジョン(例えば、n-3 FA DGエマルジョン)の投与は、治療的低体温療法(HT)との相乗的保護を提供し得るか、またはHTの代替として作用し得る。HTは現在HIEの治療法として受け入れられている。HTは、HIEに関連する損傷プロセスを遅らせるために使用される手順である。HTには、赤ん坊を約33.5~34.5℃に約72時間冷却することが含まれる。理想的には、出生後または酸素欠乏事象の約6時間以内に開始される。HTでは、脳を選択的に冷却するために冷却キャップを使用してもよく、全身を冷却するために冷却ブランケットを使用してもよい。処置中は、呼吸、酸素化、心拍数、及び脳波活動などのバイタルサインが監視される。HTの後、身体は1時間あたり約0.5℃の速度でゆっくりと(少なくとも4時間かけて)再加温される。

【0025】

本開示は、新生児マウスモデルにおいて、HT及びトリグリセリド-DHA(tri-DHA)による同時治療が、HI損傷から脳を保護する際に相乗効果を達成するか否かを

調査する。HI損傷直後に開始したHTは、tri-DHA処置と同様に脳梗塞容積を減少させた（約50%）ことが観察された。これらの結果、HTがtri-DHA処置と比較して、HI損傷に対して同程度の神経保護を提供することが示される。HTは三次医療センターでのみ提供可能であり、徹底したモニタリングが必要であり、悪影響を及ぼし得る。対照的に、tri-DHA処置は、HI損傷直後の新生児に実行可能かつ効果的な代替戦略を提供するのに有利であり得、新生児を病院から専門施設に搬送する必要がない。したがって、いくつかの実施形態では、対象はHT療法を受けず、TGまたはDGエマルジョンが代替療法として提供される。他の実施形態では、TGまたはDGエマルジョンは、HTの前、例えばHTの準備中、またはHTを実施できる専門施設への対象の搬送前もしくは搬送中に対象に提供される。DGエマルジョンは、TGよりも驚くほど効果的な処置を提供し、その高レベルの有効性を考慮すれば、HTと比較して改善された効果、またはHTとの相乗効果をもたらす。他の実施形態では、TGまたはDGエマルジョンは、HT中またはHT後に最初に投与される。

10

【0026】

HIEの機構的経路の一部は成人の脳卒中と類似しているが、HIE損傷の病理生物学は成人の脳卒中の病理生物学とは異なると考えられている。実際、成人の脳損傷を改善するように設計された治療法は、おそらくアポトーシスを促進することにより、新生児の転帰を悪化させる場合がある。

【0027】

例えば、新生児の脳では髄鞘形成がまだ起こっており、新生児の脳の水分含有量が成熟した脳の水分含有量よりも多いので、新生児の脳では損傷の外観及び時間経過が成人の脳とは異なる。細胞死の機構は、成人の脳と比較して発達中の脳では異なることが示されている（Zhu C, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.* 2005, 12, 162-176）。ミトコンドリアの透過化の機構は年齢に依存しており、成人の脳ではシクロフィリンDが重要であるが、未熟な脳ではBax関連の機構が支配的である（Wang X, et al. Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury). *J. Neurosci.* 2009, 29, 2588-2596）。成人と比較して、未熟な脳では多くのアポトーシス促進タンパク質（Bax、カスパーゼ-2、-3、-8、及び-9を含む）の発現が高く、アポトーシスがミトコンドリア外膜透過化（MOMP）後に起こる。アポトーシス誘導因子（AIF）に依存する経路（Zhu C, et al. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J. Neurochem.* 2003, 86, 306-317）、及びカスパーゼは成人の脳よりも未熟な脳でより強く活性化されるようであり（Hu BR, et al. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000, 20, 1294-1300）、ミトコンドリアの透過性化は、未熟な脳の低酸素性虚血性損傷における復帰不能点を知らせると提唱されている（Hagberg H. Mitochondrial impairment in the developing brain after hypoxia-ischemia, *J. Bioenerg. Biomembr.* 2004, 36, 369-373）。未熟な脳では、シクロフィリンD遺伝子欠損は、成体マウスと比較して低酸素性-虚血性損傷を軽減するどころか悪化させる（Wang et al., 2009; Schinzel AC, et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability

20

30

40

50

y transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005, 102, 12005-12010)。代わりに、BAX阻害ペプチド (Wang X. et al. Neuroprotective effect of Bax-inhibiting peptide on neonatal Brain injury. 2010, *Stroke* 41, 2050-2055) 及びBAX欠損症 (Gibson ME, et al. BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways. *Mol. Med.* 2001, 7, 644-655) は、新生児マウスの未熟な脳を実質的に保護する。

10

【0028】

さらに、脳卒中は成人と新生児の両方の脳で強力な炎症反応を引き起こす。成人モデルからの実験的証拠によって、脳損傷によりミクログリアが急速に活性化され、食食活動の増加ならびにサイトカイン及び活性酸素代謝物の産生の変化を引き起こすことが示されており (Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. 2002, *Glia* 40, 140-155)、これは、新生児の低酸素性虚血 (HI) 損傷でもよく記録されている特徴である (Hedtjarn M, et al. Inflammatory gene profiling in the developing mouse brain after hypoxia-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004, 24, 1333-1351。しかし、成人と比較して、新生児におけるミクログリアの活性化は、虚血性損傷後の方がはるかに急速である。成人の脳では、脳卒中損傷後の脳への末梢免疫細胞の浸潤も大きく寄与している (Iadecola C and Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. 2011, *Nat. Med.* 17, 796-808)。対照的に、新生児脳卒中後の急性では末梢細胞の浸潤はほとんど見られない (Denker SP, et al. Macrophages are comprised of resident brain microglia not infiltrating peripheral monocytes acutely after neonatal stroke. *J. Neurochem.* 2007, 100, 893-904)。したがって、これらの発見は、損傷に対する新生児と成人の中枢神経系免疫反応の違いを示唆している。

20

30

【0029】

さらに、急性虚血性脳損傷後の新生児の血液脳関門は、成体動物よりも著しくインタクトであるが、その理由の一部は、基底層及び密着結合タンパク質の示差的発現及び好中球の挙動によるものである (Fernandez-Lopez D, et al. Blood-brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat. *J Neurosci.* 2012 7 11; 32 (28): 9588-600)。

40

【0030】

したがって、様々な実施形態では、対象は出生前または分娩中であり、HIEの危険性があり (すなわち、HIEが予想される)、n-3 FA DGまたはTGエマルジョンを妊娠中の母親に、例えば静脈内に投与する。例えば、n-3 FA DGまたはTGエマルジョンは、子癇前症またはHIEリスクに関連する他の妊娠状態の検出時に母親に静脈内投与され得る (既に記載したように)。いくつかの実施形態では、エマルジョンは、長時間の分娩を含む分娩前もしくは分娩中、または臍帯圧迫により新生児がHIEの危険にさらされていると判断される場合に投与される。本明細書でより詳細に記載されるように、エマルジョンは、1回以上のボラス用量として、もしくは連続注入によって、または

50

1 回以上のボーラス負荷用量とその後の 1 回以上の追加用量の注入の組み合わせとして静脈内投与されてもよい。例えば、静脈内投与される用量（複数可）は、ボーラスとして（0～60 分間にわたって）、もしくは注入によって（60 分～24 時間にわたって）、または 1 つ以上のボーラス負荷用量とそれに続く 1 つ以上の追加用量の注入の組み合わせとして投与され得る。あるいは、エマルジョンは NG チューブによって投与してもよい。

【0031】

他の実施形態では、対象は新生児（neonate）（すなわち、新生児（newborn））であり、HIE が疑われる。様々な実施形態では、新生児は早産児または正期産である。n-3 FA DG または TG エマルジョンは、分娩の約 12 時間以内、または分娩の約 10 時間以内、または分娩の約 8 時間以内、または分娩の約 6 時間以内、または分娩の約 4 時間以内、または分娩の約 2 時間以内に新生児に投与される。新生児への送達の場合、エマルジョンは NG チューブを介して投与してもよいし、またはボーラス投与量及び／もしくは持続注入として静脈内投与してもよい。

10

【0032】

様々な実施形態では、新生児は、n-3 FA DG または TG の投与前、投与中、または投与後のいずれかに、HT でさらに治療される。HT は一般に、分娩の約 6 時間以内、または分娩の約 4 時間以内など、できるだけ早く開始されるべきである。しかし、いくつかの実施形態では、HT は、分娩の約 12 時間以内、または分娩の約 10 時間以内、または分娩の約 8 時間以内に開始される。いくつかの実施形態では、特に DG または TG エマルジョンの投与によって、HT が脳損傷ならびに長期及び／または生涯にわたる HIE の合併症を回避するために利益をもたらす範囲が拡大され得る。したがって、そのような実施形態では、HT は、分娩の約 6 時間後、または分娩の約 8 時間後、または分娩の約 10 時間後、または分娩の約 12 時間後に開始されるが、これは、HIE の検出、または病院から HT 用の設備を備えた三次医療施設への新生児の搬送の遅れに起因する場合がある。

20

【0033】

様々な実施形態では、DG もしくは TG エマルジョン及び／または HT による処置後、新生児患者は、オメガ 3 FA を含む非経口栄養でさらに処置され得る。これらとしては、約 1 g / kg / 日の TG エマルジョンの注入が含まれ得、これは約 10 % の魚油（例えば、約 25 %～約 60 % の EPA 及び DHA）から調製され得る。このようなエマルジョンは、オメガベン（Omegaven）という名前で市販されている。オメガベンは、非経口栄養関連胆汁うっ滞、すなわち PNAC の小児患者にカロリーと抗炎症効果のある脂肪酸を提供する静脈内脂質エマルジョンである。このような非経口栄養は、数週間から数ヶ月、例えば 2 週間～約 20 週間、または約 4 週間～約 16 週間提供してもよい。

30

【0034】

様々な実施形態では、本発明は、n-3 FA を安定な DG または TG エマルジョンとして細胞に送達する。「n-3 FA」という用語は、炭素-炭素二重結合の 1 つが炭化水素鎖の遠位端から 3 番目と 4 番目の炭素原子の間にある多価不飽和 FA を意味する。n-3 FA の例としては、 α -リノレン酸（18:3 n-3; α -ALA; $\Delta^{3,6,9}$ ）、エイコサペンタエン酸（20:5 n-3; EPA; $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ）、ドコサヘキサエン酸（22:6 n-3; DHA; $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ ）及びドコサペンタエン酸（22:5 n-3; DPA; $\Delta^{7,10,13,16,19}$ ）が挙げられる。少なくとも 20 個の炭素原子を有する n-3 FA は、「長鎖 n-3 FA」と呼ばれる。n-3 FA の供給源は、魚油、藻類油及び他の油などの任意の適切な供給源に由来する場合があり、または合成してもよい。

40

【0035】

DG は、三価アルコールグリセロールにエステル化された 2 つの FA で構成される。DG 分子の合成方法の例は、n-3 長鎖 FA を用いたリパーゼ触媒グリセロール分解（すなわち、エステル交換）によるものである。DG オイルを調製するための例示的なプロセスは、国際公開第 2019/234057 号に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で使用する場合、DG オイルとは、グリセリドの少なくとも

50

も約75%がジアシルグリセリドであるオイルを指す。しかし、いくつかの実施形態では、グリセリドの少なくとも約80%、または少なくとも約90%（例えば、約100%）がジアシルグリセリドである。同様に、TGエマルジョンが使用される場合、TGオイルとは、グリセリドの少なくとも約75%がトリアシルグリセリドであるオイルを指す。しかし、いくつかの実施形態では、グリセリドの少なくとも約80%、または少なくとも約90%（例えば、約100%）がトリアシルグリセリドである。

【0036】

本発明によれば、DGまたはTGのFAは主にn-3 FAであり得る。様々な実施形態では、DGまたはTGは、少なくとも約50%のn-3 FA（総脂肪酸の重量で）、または少なくとも約75%のn-3 FA、または少なくとも約90%のn-3 FA、または約100%のn-3 FAを含む。いくつかの実施形態では、n-3 FAは、DHA、EPA、及びDPAのうちの1つ以上を含む長鎖n-3 FAである。興味深いことに、DPA由来の神経保護D1は、DHA由来の神経保護D1よりも低い濃度で神経保護的である（低酸素性虚血性脳損傷後の梗塞サイズの減少によって測定される）（図4）。

10

【0037】

様々な実施形態では、n-3 FAはDHAを含む。いくつかの実施形態では、n-3 FAは、少なくとも約50%のDHA、または少なくとも約60%のDHA、または少なくとも約75%のDHA、または少なくとも約90%のDHAである。いくつかの実施形態では、n-3 FAは、EPAを含む。例えば、n-3 FAは、少なくとも約50%のEPA、または少なくとも約60%のEPA、または少なくとも約75%のEPA、または少なくとも約90%のEPAであり得る。いくつかの実施形態では、n-3 FAはDHA及びEPAを含む。例えば、FAは、少なくとも約50%のEPA及びDHA、または少なくとも約60%のEPA及びDHA、または少なくとも約70%のEPA及びDHA、または少なくとも約80%のEPA及びDHA、または少なくとも約90%のEPA及びDHAを含んでもよい。EPA及びDHAは、任意選択で、約4:1~約1:4、例えば、約3:1~約1:3、または約2:1~約1:2（例えば、約1:1）の比で存在してもよい。様々な実施形態では、DG分子は、1, 2-DGまたは1, 3-DGのうちの1つ以上である。いくつかの実施形態では、DGは主に1, 3-DGである。

20

【0038】

さらに他の実施形態では、脂肪酸は、ARA、例えば、約1%~約40%のARA（グリセリド中の全脂肪酸の重量基準）、またはいくつかの実施形態では、約1%~約30%、または約5%~約25%、または約5%~約20%、または約10%~約20%のARAをさらに含む。ARAは、乳児の脳の成長に重要な肝要なn-6脂肪酸である。これらまたは他の実施形態では、エマルジョンは、遊離FAとして、またはTG及び／もしくはDGとしてエステル化されたMCF Aをさらに含む。MCF Aが豊富なTGは、細胞膜へのオメガ3脂肪酸の効率を高める。いくつかの実施形態では、MCF Aは、TG及び／またはDGエマルジョン中の脂肪酸の約1重量%~約20重量%の範囲で存在する。いくつかの実施形態では、組成物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9, 675, 572号に記載されている中鎖トリグリセリド（MCT）を含む。

30

40

【0039】

いくつかの実施形態では、DGまたはTG（またはそれらのエマルジョン）は、1つ以上のSPMを含む。SPMは、主にAA、EPA、DPA、及びDHAに由来する酸化代謝産物である。それらとしては、リポキシン、（ニューロ）プロテクチン、レゾルビン、及びマレシンが挙げられ、ナノモルからピコモルの範囲の濃度で強力な抗アポトーシス効果、抗炎症効果、及び免疫調節効果を有し得る。SPMは、n-3 FA及びn-6 FA前駆体からの二酸素依存性酸化によって生成される。SPMとしては、特定のAA由来リポキシン（LXA4及びLXB4）、EPA由来Eシリーズレゾルビン（RvE1~3）、DHA由来Dシリーズレゾルビン（RvD1~6）、プロテクチン／ニューロプロテクチン（PD1／NPD1及びPDX）、マレシン（MaR1及びMaR2）、及びD

50

P A 由来 1 3 シリーズレゾルビン (R v T 1 ~ 4) が挙げられる。S P M は免疫溶媒として機能し得る。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態では、D G または T G (またはそのエマルジョン) は、レゾルビン E 1、レゾルビン E 2、及びレゾルビン E 3 などの E P A 由来の少なくとも 1 つの S P M を含む。いくつかの実施形態では、D G または T G (またはそのエマルジョン) は、D H A 由来の少なくとも 1 つの S P M、例えば、レゾルビン D 1、レゾルビン D 2、レゾルビン D 3、レゾルビン D 4、レゾルビン D 5、レゾルビン D 6、またはそれらの立体異性体を含む。いくつかの実施形態では、D G または T G (またはそのエマルジョン) は、レゾルビン T 1、レゾルビン T 2、レゾルビン T 3、レゾルビン T 4、レゾルビン 1 n - 3 D P A、レゾルビン 2 n - 3 D P A、レゾルビン 5 n - 3 D P A、プロテクチン 1 n - 3 D P A、プロテクチン 2 n - 3 D P A、マレシン 1 n - 3 D P A、マレシン 2 n - 3 D P A、及びマレシン 3 n - 3 D P A などの D P A に由来する少なくとも 1 つの S P M を含む。いくつかの実施形態では、D G または T G (またはそのエマルジョン) は、リポキシン A 4、リポキシン B 4、またはそれらの立体異性体などのアラキドン酸 (A A) に由来する少なくとも 1 つの生理活性脂質を含む。

10

【 0 0 4 1 】

様々な実施形態では、エマルジョンは、組成物全体の重量あたり約 1 0 重量 % ~ 約 3 0 重量 % の T G オイル及び / または D G オイルを含む。例えば、エマルジョンは、全組成物の約 1 5 重量 % ~ 約 2 5 重量 % (例えば、約 1 5 重量 %、約 2 0 重量 %、または約 2 5 重量 %) の D G オイルを含んでもよい。エマルジョンの他の成分 (例えば、乳化剤) は、本明細書の他の箇所に記載されている。

20

【 0 0 4 2 】

様々な実施形態では、対象 (例えば、H I E を経験しているまたは H I E の危険性がある新生児対象など) は、エマルジョンの単回ボーラス注射もしくは注入、または N G を介して投与される。例えば、対象は、エマルジョンのボーラス注射または注入を少なくとも 2 回、及び最大 6 回 (例えば、2 回から 4 回) 受けてもよい。様々な実施形態では、ボーラス注射または注入は、1 2 時間ごとに約 1 回以下の頻度で投与される。しかし、様々な実施形態では、投与は、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 6 時間、約 1 2 時間、または約 2 4 時間から独立して選択される間隔で行うことができる。様々な実施形態では、エマルジョンは、1 日 ~ 約 1 週間にわたって投与され、ほぼ毎日投与されてもよい。様々な実施形態では、ボーラス投与は、体重 1 k g 当たり約 0 . 0 5 g ~ 約 5 g の乳化 D G もしくは T G、または体重 1 k g 当たり約 0 . 5 ~ 約 5 g である。例えば、ボーラス投与は、体重 1 k g 当たり約 2 g ~ 約 4 g の乳化 D G または T G であり得る。

30

【 0 0 4 3 】

例示的な実施形態として、本開示は、新生児における低酸素性虚血性脳症 (H I E) に関連する脳損傷に対して防御するための方法を提供し、この方法は、H I E の危険性がある子供を抱えている妊娠中の母親に、出生前または分娩時に、n - 3 F A D G または T G エマルジョンの静脈内注射を投与することを含む。分娩後、新生児は任意選択で、H T 療法及び / または D G もしくは T G 療法でさらに処置されてもよい。いくつかの実施形態では、一旦、H I E が予想されるか、または重大な危険性がある場合、エマルジョンは、分娩前または分娩中に母親に静脈内投与される。投与及びエマルジョンの組成は、本明細書の他の箇所に記載されている通りである。新生児は早産児であっても正期産新生児であってもよい。

40

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態では、出生後、分娩 (すなわち出生) の約 1 2 時間以内もしくは約 1 0 時間以内、または分娩の約 6 時間以内もしくは約 8 時間以内、または分娩の約 4 時間以内、分娩の約 2 時間以内に、さらなる n - 3 D G または T G エマルジョン用量が新生児に投与される。分娩後の H T のタイミングは、一般にできるだけ早く、既に述べた通りである。様々な実施形態では、新生児は、エマルジョンの単回ボーラス注射または注入を受

50

ける（またはNG経路による）。しかし、いくつかの実施形態では、新生児は、少なくとも2回、最大6回（例えば、2～4回）のエマルジョンのボラス注射または注入を受ける。これらは一般に約1週間にわたって投与され、静脈内及び／またはNG経路によりほぼ毎日投与されてもよい。

【0045】

他の例示的な実施形態では、神経保護のための方法は、必要とする新生児対象に、分娩から約10時間以内にn-3 DGまたはTGエマルジョンを投与すること、及び新生児対象をHTレジメンで処置することを含む。n-3 DGまたはTGエマルジョンは、HTの前、最中、または後に最初に投与される。例えば、エマルジョンの少なくとも最初の用量は、分娩の約6時間以内、または分娩の約4時間以内、分娩の約2時間以内に投与され、それによって新生児がHTを開始するため専門施設に輸送されている間に神経保護を提供し得る。DGまたはTGエマルジョンは、既に記載したように、ボラス及び／または持続注入として、経鼻胃（NG）チューブを介して、または静脈内に投与される。

10

【0046】

これらの実施形態によれば、HTは、一般に望まれるよりも遅く開始してもよく、それでも予想外の治療効果を提供し得る。例えば、いくつかの実施形態では、DGまたはTGエマルジョンの用量は分娩の約4時間以内に投与され、HTは分娩の約10時間以内に開始される。いくつかの実施形態では、DGまたはTGエマルジョンの用量は分娩の約4時間以内に投与され、HTは分娩の約8時間以内または分娩の約6時間以内に開始される。

20

【0047】

さらに他の実施形態では、DGまたはTGエマルジョンの用量は、分娩の約2時間以内（または分娩の約1時間以内）に投与され、HTは、分娩の約6時間後、または分娩の約8時間後、または分娩の約10時間後、または分娩の約12時間後に開始される。様々な実施形態では、対象は、エマルジョンの単回のボラス注射または注入を受けるが、他の実施形態では、対象は、エマルジョンの少なくとも2回及び最大6回（例えば、2～4回）のボラス注射または注入を受ける。これらは一般に、約1日～1週間にわたって、例えばほぼ毎日投与されてもよい。

【0048】

他の態様では、本開示は、本明細書に記載の様々な方法に使用できる医薬組成物を提供する。様々な実施形態では、医薬組成物は、有効量のn-3 DGまたはTGエマルジョンを含み、ここで、DGまたはTGは、少なくとも約50%のEPA及びDHA、ならびに1%～約40%、または1%～約30%、または1%～約20%、または1%～約10%のARA（重量による総FA含量に対して）、及び1つ以上の乳化剤を含む。いくつかの実施形態では、DGまたはTGは、FAの約5重量%～約25重量%、または約5重量%～約20重量%、または約10重量%～約20重量%のARAを含む。いくつかの実施形態では、FAは、少なくとも約60%のEPA及びDHA、または少なくとも約70%のEPA及びDHA、または少なくとも約80%のEPA及びDHAを含む。いくつかの実施形態では、EPA：DHAの比は、約4：1～約1：4、または約3：1～約1：3、または約2：1～約1：2、及び任意選択で約1：1である。一般に、組成物は、モノアシルグリセリド、ジアシルグリセリド、及びトリアシルグリセリドの合計に対して、少なくとも約75%のDGまたはTGを含む。

30

40

【0049】

いくつかの実施形態では、脂肪酸は、遊離FAとして、またはDGもしくはTGとしてエステル化された、DPA及び／またはMCF Aをさらに含む。様々な実施形態では、MCF Aは、ジグリセリドエマルジョン中の脂肪酸の約1%～約20%（総FA重量に対して）である。いくつかの実施形態では、エマルジョンは、約10重量%～約30重量%のDGまたはTGオイルを含む。いくつかの実施形態では、エマルジョンは、約15重量%～約25重量%（例えば、約15%、約20%、または約25%）のDGまたはTGオイルを含む。

【0050】

50

本明細書に記載の組成物及び方法によれば、組成物は、緊急時に使用するために安定な形態で保存できる安定なエマルジョンである。本明細書に記載されるエマルジョンは、4℃で少なくとも6ヶ月間、または少なくとも1年間、実質的に安定である。様々な実施形態では、このエマルジョンは、4℃で、またはいくつかの実施形態では、室温（すなわち、約22℃）で、約1年を超えて（例えば、約18ヶ月または約2年）安定である。この組成物は、静脈内または動脈内送達などの非経口送達経路、またはNG経路を介するのに適している。さらに、いくつかの実施形態では、エマルジョンの物理的特性は、脳組織へのn-3 F Aの送達及び／または脳組織による取り込みを促進する。

【0051】

エマルジョンは本質的に不安定であるため、自然には形成されない。エマルジョンを形成するには、例えば、振盪、攪拌、均質化などによるエネルギーの投入が必要である。時間が経つと、エマルジョンはエマルジョンを構成する相の安定した状態に戻る傾向がある。ただし、ナノエマルジョンは速度論的に安定している場合がある。

【0052】

エマルジョンの液滴のサイズ及び分散が、所望の期間（少なくとも約6ヶ月など）にわたって実質的にまたは顕著に変化しない場合、エマルジョンは安定であると言われる。すなわち、エマルジョンの安定性とは、時間の経過に伴う特性の変化に耐えるエマルジョンの能力を指す。エマルジョンの不安定性は、例えば、凝集、クリーミング／沈降、及び合体として観察され得る。凝集は、液滴間に引力があり、凝集を形成するときに発生する。合体は、液滴が結合してより大きな液滴を形成するときに発生し、その結果、時間の経過とともに平均液滴サイズが増加する。エマルジョンは、たとえば浮力の影響で、液滴がエマルジョンの上部に上昇するクリーミングも受ける場合がある。沈降はクリーミングの逆の現象であり、油中水型エマルジョンで通常観察される。沈降は、分散相が連続相よりも密度が高く、重力によって密度の高い小球がエマルジョンの底部に向かって引っ張られるときに発生する。クリーミングと同様に、沈降はストークスの法則に従う。安定性に関するその他の指標としては、エマルジョン中の遊離F A量または酸化生成物の増加がないこと、または長期間（たとえば、6～24か月）にわたりトコフェロール濃度の減少がないことが含まれる。

【0053】

乳化剤とは、エマルジョンの動力学的安定性を高めることによりエマルジョンを安定化させる物質である。乳化剤には、表面活性剤またはサーファクタントが挙げられる。サーファクタントは、液滴のサイズが時間の経過とともに有意に変化しないように、エマルジョンの速度論的安定性を高め得る。エマルジョンの安定性は、液滴または粒子間の反発力を示すゼータ電位の観点から評価され得る。乳化剤とは、通常、極性または親水性（すなわち、水溶性）部分と、非極性（すなわち、疎水性または親油性）部分とを有する化合物である。界面活性剤は乳化剤の一種であり、油と水の両方と物理的に相互作用し、懸濁液中の油と水の液滴間の界面を安定化させる。

【0054】

様々な実施形態では、エマルジョンは、200nm以下の平均粒径、及び約-40mV以上のマイナスのゼータ電位を有する。いくつかの実施形態では、エマルジョンの平均粒子サイズは、約180nm以下、または約150nm以下、または約120nm以下、または約100nm以下、または約90nm以下、または約80nm以下である。いくつかの実施形態では、平均粒径は約120nm、または約110nm、または約100nmであり、多分散指数は約0.3未満または約0.2未満である。様々な実施形態では、エマルジョンのゼータ電位は、少なくとも約-45mVと同じくらいマイナス、または少なくとも約-50mVと同じくらいマイナス、または少なくとも約-55mVと同じくらいマイナス、または少なくとも約-60mVと同じくらいマイナスである。これらの実施形態によるエマルジョンは安定であり、これは、これらのパラメータが少なくとも6か月間、またはいくつかの実施形態では少なくとも1年間維持されることを意味する。この開示によれば、安定性は、約5℃または室温（すなわち、約25℃）での保存により測定される

。

【0055】

安定したエマルジョンは、例えば、 $n-3$ FAを脳に迅速に送達するための静脈内投与に適している。脂質相は一般に、組成物の約10重量%～約50重量%である。いくつかの実施形態では、脂質相は、組成物の約10重量%～約40重量%、または組成物の約15重量%～約40重量%、または約15重量%～約30重量%、または約15重量%～約25重量%、または約20重量%～約25重量%である。例えば、脂質相は、組成物の約20重量%、または組成物の約25重量%、または組成物の約30重量%であり得る。いくつかの実施形態では、脂質相の少なくとも約10重量%がDGもしくはTGであるか、または脂質相の少なくとも約15重量%がDGもしくはTGであるか、または脂質相の少なくとも約20重量%がDGもしくはTGであるか、または脂質相の約30重量%がDGもしくはTGであるか、または脂質相の少なくとも約40重量%がDGもしくはTGであるか、または脂質相の少なくとも約50%がDGもしくはTGである。いくつかの実施形態では、DG自体が乳化特性を提供するため、TGエマルジョンと比較して必要な乳化剤が少なくなる。例えば、いくつかの実施形態では、乳化剤は、組成物の約0.5～約2重量%、例えば、組成物の約1.2重量%、または組成物の約1重量%、または約0.8%、または約0.6重量%である。

10

【0056】

多分散指数(PDI)は、所定のサンプル内の粒子サイズ分布の尺度である。PDIの数値の範囲は、0.0(完全に均一な粒子サイズ分布を有するサンプルの場合)から1.0(複数の粒子サイズ集団を有する高度に多分散のサンプルの場合)におよぶ。エマルジョンなどの脂質ベースの担体では、0.3のPDIが望ましく、これは十分に均一な粒径分布を示している。いくつかの実施形態では、エマルジョンのPDIは約0.3未満、例えば約0.2以下、または約0.1以下である。

20

【0057】

組成物は、所望の物理的特性を得るために、1つ以上の乳化剤をさらに含む。様々な実施形態では、乳化剤には、リン脂質乳化剤、ホスホグリセリド乳化剤、ならびに中鎖及び／または長鎖脂肪酸乳化剤のうちの1つ以上が含まれ得る。様々な実施形態では、組成物は、約0.6重量%～約10重量%の乳化剤、及び任意選択で約0.6重量%～約7重量%の乳化剤、及び任意選択で約0.6重量%～約5重量%の乳化剤、及び任意選択で約0.6重量%～約3重量%の乳化剤を含む。

30

【0058】

いくつかの実施形態では、エマルジョンは、1つ以上のリン脂質乳化剤及び／または1つ以上のホスホグリセリド乳化剤を含む。ホスホグリセリド乳化剤は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリノシトール、ホスファチジルセリン、及びホスファチジン酸から選択され得る。いくつかの実施形態では、組成物はホスファチジルコリン乳化剤を含む。

【0059】

様々な実施形態では、リン脂質及び／またはホスホグリセリド乳化剤対DGまたはTGの比は、約1:4～約1:12であり、いくつかの実施形態では、約1:10以下である。いくつかの実施形態では、乳化剤は少なくとも約70%のホスファチジルコリンを含むか、または少なくとも約80%のホスファチジルコリンを含む。例えば、乳化剤(任意の共乳化剤を含む)は、約60%～約80%のホスファチジルコリンを含み得る。

40

【0060】

この組成物はさらに、共乳化剤として1つ以上の中鎖または長鎖FAを含んでもよい。例えば、組成物は、任意選択でC16～C24 FAから選択され、任意選択でC18 FAである長鎖FAを含んでもよい。いくつかの実施形態では、共乳化剤は、任意選択でラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、及びステアリン酸から選択される飽和FAを含む。いくつかの実施形態では、共乳化剤は、任意選択でオレイン酸またはリノレン酸から選択される不飽和FAを含む。この共乳化剤は、任意選択でオレイン酸ナトリウムを含

50

むアルカリ金属塩として添加されてもよい。例示的な実施形態では、共乳化剤は、組成物の総重量の約0.01%~5%で存在する。例えば、共乳化剤は、組成物の総重量の約0.01~2重量%、または組成物の総重量の約0.01重量%~約1重量%、または組成物の約0.01重量%~約0.05重量%で存在し得る。

【0061】

様々な実施形態では、組成物はヒトの血液とほぼ等張であり、任意選択でグリセロール、ソルビトール、キシリトール、及び／またはグルコースなどの1つ以上のポリオールを含む。例えば、組成物は、組成物の約2重量%~約10重量%、または組成物の約2重量%~約7重量%のグリセロールを含んでもよい。

【0062】

いくつかの実施形態では、この組成物は、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、及びアスコルビルエステルのうちの1つ以上など、1つ以上の抗酸化剤を含む。例示的な実施形態では、抗酸化剤は、 α -トコフェロール及び／またはアスコルビルエステルを含み、これは任意選択でパルミチン酸アスコルビルである。

【0063】

いくつかの実施形態では、この組成物は、任意選択でEDTAまたはEGTAである金属キレート剤を含む。例えば、エマルジョンは、約0.1mM~約5mM、または約0.1mM~約1mMのEDTAまたはEGTAを含んでもよい。例えば、いくつかの実施形態では、エマルジョンは約0.25mMのEDTAを含む。

【0064】

様々な実施形態では、安定なエマルジョンは、以下を含むプロセスに従って調製され得る：(1) 約50℃~約80℃(例えば、約60℃)の温度を有する水、グリセロール、及びEDTAの混合物を調製すること；(2) ホスファチジルコリン乳化剤(例えば、卵黄レシチンに由来し得る少なくとも約75%のPC)、共乳化剤(例えばオレイン酸ナトリウム)、及びDGまたはTGオイルを添加する；(3) 約50℃~約80℃(例えば、約60℃)の温度で均質化する；(4) マイクロフルイダイザーによるプロセス。このプロセス中に適用される圧力は、300~2000バールの範囲であり得、いくつかの実施形態では、約600~約900バールなど、約500~約1000バールの範囲であり得る。例えば、混合物は、約60℃で約800バールの圧力でマイクロフルイダイザーを通して処理され得る。エマルジョンは、目標の粒子サイズを満たすために必要な時間の長さ及び条件下で処理され得る。

【0065】

様々な実施形態では、組成物のpHは、約6~約9、及び任意選択で約6.5~約8.5、及び任意選択で約7~約8である。

【0066】

様々な実施形態では、組成物は、約500mL以下の容積、または約300mL以下の容積、または約50mL以下の容積、または約25mL以下の容積を有する。様々な実施形態では、組成物は、必要に応じて約1mL~約50mLの注射用容積を有する、プレフィルドシリンジ内に含まれる。

【0067】

組成物は一般に、静脈内または動脈内などの非経口的に送達される。いくつかの実施形態では、組成物は鼻腔内に投与され、脳への迅速な送達を可能にする。

【0068】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、関連数値の $\pm 10\%$ を意味する。

【0069】

例示的な実施形態を以下の実施例によって説明する。

【実施例】

【0070】

実施例1：オメガ3トリグリセリドエマルジョンの急性注射は、新生児マウスモデルにおける脳低酸素性虚血性損傷に対する低体温療法と同様の神経保護を提供する

10

20

30

40

50

低酸素性虚血性（H I）脳損傷は、新生児と成人の両方において、頻繁に死亡または長期にわたる重大な神経学的障害を引き起こす重篤な出来事である（1－3）。現在、治療的低体温療法（H T）は、H I脳症の新生児に対する唯一確立された処置である（4）。前臨床研究及び小規模臨床試験では、H Tが神経損傷の程度を軽減し、死亡率を低下させ、神経機能の回復を改善し得ることが示されている（7、8）。

【0071】

H Tの影響を受ける主な分子機構としては、フリーラジカル生成の減少、血液脳関門破壊の制限、興奮性アミノ酸放出の減少、及び脳虚血に対する細胞媒介炎症反応の減弱が挙げられる（9、10）。さらに、H Tは、ミトコンドリアに基づく内因性経路と受容体媒介外因性経路の両方を介してニューロンのアポトーシスの阻害を誘導する（11）。しかし、H Tは厳密なモニタリングが必要であり、三次医療センターでのみ利用できるため、依然として複雑な医療アプローチである（12）。脳卒中におけるH Tに関するパイロット研究では、成人患者は新生児よりも冷却に対する耐性が低く、H Tは震え、免疫抑制、及び肺炎などの好ましくない全身作用も誘発し得ることが示されている（13、14）。H Tを他の処置と組み合わせることで、H Tによる悪影響を軽減するだけでなく、H I傷害の状況において複数の分子標的に到達して、治療時間範囲の増加及び長期回復における修復の強化を図ることが目的となり得る（15）。

【0072】

脳内の主要なオメガ3多価不飽和F Aの1つとして、D H Aは、脳の発達及び機能に不可欠である（16）。D H Aは、H I損傷のさまざまな動物モデルにおいて、炎症、興奮毒性を軽減し、脳容積の減少を防ぐことが示されている（17～19）。この実施例は、H T及びトリグリセリドD H A（「t r i－D H A」）エマルジョンによる同時処置が、H I損傷から脳を保護する際に相乗効果を達成するか否かを調査する。この実施例では、t r i－D H Aとは、T G脂肪酸の>98%がD H Aであるトリグリセリドオイルである。本発明者らは、以前に記載された新生児モデルにおけるH I損傷に対するH Tの神経保護効果を確認した（20、22）。これらの結果によって、t r i－D H AがH Tと同程度の神経保護を提供し、H Tとt r i－D H Aエマルジョンを組み合わせても H I損傷に追加の治療効果が得られないことが示されている。

【0073】

材料及び方法

D H A T Gオイルは、N u－C h e k P r e p , I n c .（E l y s i a n , M N）から購入した。卵黄ホスファチジルコリンは、A v a n t i P o l a r－L i p i d s , I n c .（A l a b a s t e r , A L）から入手した。放射性標識〔³H〕－コレステリルヘキサデシルエーテルは、P e r k i n E l m e r（B o s t o n , M A）から購入した（〔³H〕C E t）（N E T 85900）。

【0074】

t r i－D H Aエマルジョン（T G重量で10g／エマルジョン100mL）は、D H A T Gオイルと卵黄リン脂質（P L）を用いて、以前に詳述したように超音波処理によって作成した（20）。市販のキット（W a k o C h e m i c a l s U S A , I n c . , R i c h m o n d , V A）を使用して、エマルジョンのT G及びP Lの量を分析した。T G：P L質量比は5.0±1.0で、V L D Lサイズの粒子と同様であった。放射性標識エマルジョンを調製するために、超音波処理の前に〔³H〕C E tをT G－P L混合物に添加した（22）。

【0075】

生後3日のC57BL／6J新生仔マウスを、生みの母とともにJ a c k s o n L a b o r a t o r i e s（B a r H a r b o r）から購入した。雄マウスと雌マウスの両方を実験に使用した。本発明者らは、以前に記載されているように（20）、生後10日（p10）マウスの軽度のH I脳損傷というR i c e－V a n n u c i法を使用した。簡単に言うと、H I脳損傷は、右総頸動脈の永久結紮によって誘発した。1.5時間の回復後、マウスを37±0.3℃で15分間、低酸素傷害（加湿8%O₂／92%N₂、

10

20

30

40

50

Tech Air Inc., NY) に曝露した。

【0076】

H I 損傷の直後、子犬を H T または正常体温 (N T) の温度制御室で 4 時間飼育し、直腸温はそれぞれ 31 ~ 32 °C または 37 °C に達した (23)。27 °C に設定された循環空気室に入れられた子犬は、目標の直腸温を 31 ~ 32 °C に維持していることが観察された。N T 群の場合、以前の研究 (20、21) のプロトコルに基づいて、子犬を 32 °C に設定したチャンバーに入れた。新生マウスの H I 脳損傷は、内因性の中核体温の低下と関連している (23)。したがって、低酸素状態の間に 37 °C に保たれた子犬は低体温には供されていない。新生仔げっ歯類の中核体温は母犬からの距離によって影響を受ける可能性がある (24)、4 時間の H T または N T 処置期間中、子犬は母犬から離して保管した。低酸素状態 (0 時間) の直後、続いて H T 中の 1、2、3 及び 4 時間に連続的な温度測定を取得した (プローブタイプ: R E T - 4; P h y s i t e m p I n s t r u m e n t s, C l i f t o n, N J)。t r i - D H A 処置 (0.375 g t r i - D H A / k g 体重、腹腔内 (i. p.)、1 時間間隔で 2 回の注射) は以前のプロトコルに基づいていた (20、21)。

10

【0077】

t r i - D H A エマルジョンによる H T の併用治療が H I 障害における神経保護を強化するか否かを調べるために、H T を受けた動物に、H T の開始時と H T 開始 1 時間後に t r i - D H A エマルジョン (0.375 g t r i - D H A / k g 体重、2 回注射、腹腔内) を投与した。N T または H T 対照動物には生理食塩水を注射した。4 時間の N T 後、対照群の子犬を母犬に戻した。H T 群の子犬は、直腸温が 37 °C に達するまで部屋の温度を 1 分あたり 0.1 ~ 0.2 °C の速度で上昇させることによってゆっくりと再加温を受け、その後母犬に戻された。

20

【0078】

放射性標識した t r i - D H A エマルジョンを使用して、H T が腹腔内注射後のエマルジョン粒子の吸収及び分布に影響を与えるか否かを決定した。放射性標識 t r i - D H A エマルジョン (0.375 g t r i - D H A / k g 体重、腹腔内、単回注射) を注射したナイブ新生仔マウスを、直ちに H T (n = 3) または N T (n = 7) のいずれかに 4 時間供した。エマルジョンの分布を研究するための単回ボーラス注射の使用は、以前に確立されたプロトコルに基づいていた (22、25)。4 時間の H T または N T 後に動物を殺し、腹水、血液、器官及び組織中の放射能を ^3H C E t のレベルを測定することによって評価した。

30

【0079】

組織及び器官は、P o l y t r o n T i s s u e D i s r u p t o r (O m n i T H, K e n n e s w a, G A) を使用して均質化し、放射能を液体シンチレーション分光法で測定した (26)。サンプルをシンチレーション流体 (U l t i m a G o l d シンチレーション流体、P e r k i n E l m e r, B o s t o n, M A) に懸濁し、混合し、P e r k i n E l m e r T r i - C a r b 液体シンチレーション分光計 5110 T R で 3 H d p m アッセイした。組織取り込みは、分析したすべての臓器について、臓器あたりの総回収量のパーセントとして表した。

40

【0080】

本発明者らは、マウスにおける H I 損傷後の H T の治療範囲を決定した: (1) 2 時間遅延 H T - H I 後 2 時間母犬と一緒に置かれ、その後 H T を受けた子犬; (2) 4 時間遅延 H T - H I 後 4 時間母犬と一緒に置かれ、その後 H T を受けた子犬。t r i - D H A エマルジョンによる H T の併用治療が H I 損傷の治療範囲を延長するか否かを調べるために、H T を行った動物 (H I 後 2 時間または 4 時間遅らせる) に、H T の開始時及び H T 開始の 1 時間後に t r i - D H A エマルジョン (0.375 g t r i - D H A / k g 体重、2 回注射、腹腔内) を投与した。N T または H T 対照動物には生理食塩水を投与した。処置期間後、N T または H T 群の子犬を上記のように母犬に戻した。

【0081】

50

H I 傷害の 24 時間後、動物を 殺し、脳を採取した。ブレインスライサーマトリックスを使用して、1 mm の冠状スライスを切断した。スライスを 2 % 塩化トリフェニルテトラゾリウム (TTC) を含む PBS 溶液に 37 °C で 25 分間浸漬した。TTC は生きたミトコンドリアに取り込まれ、赤色に変わる。白く見える非染色領域は梗塞領域として定義され、一方、生存領域は赤く見える。Adobe Photoshop 及び NIH Image J イメージングアプリケーションを使用して、連続切片上の梗塞の平面領域を合計して、梗塞組織の容積 (mm³) を求めた。梗塞面積は、同側半球の総面積の % として表した (21)。H I 直後に HT または HT + tri-DHA で処置したマウスの別のコホートでは、H I 損傷後 7 日目に脳萎縮がニッスル染色によって検出された。脳全体を 200 µm ごとに切断し、各冠状スライスの厚さは 50 µm であった。次に、切片を 0.1 % のクレシルバイオレット (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) の溶液中で 7 分間インキュベートした。H₂O で素早くすすいだ後、スライドを数滴の酢酸を含む 70 % (v/v) エタノールで分化し、続いて段階的エタノールで脱水し、キシレンを 2 回交換した。次に、切片を Fisher Chemical (商標) Permount (商標) Mounting Media でマウントした。結果は、対側半球と比較した同側半球容積 (脳残存組織) の % として表した (27)。

10

【0082】

値は平均値 ± SEM である。一元配置 ANOVA に続いて事後 Newman-Keuls 多重比較検定を適用して、群間の相違を評価した。

20

【0083】

結果

NT または HT プロトコルを受けた動物には死亡はなかった。表 1 は、HT 動物の連続的な体温測定の結果をまとめたものである。放射性標識実験では、腹腔内注射後 4 時間で、注射されたエマルジョンの約 96 % が NT マウスと HT マウスの両方で腹腔から出たことが示された。さらに、NT 対 HT マウスにおける tri-DHA エマルジョン粒子の器官分布に有意差は観察されなかった。NT マウスと HT マウスの両方において、エマルジョン粒子の最も高い取り込みは肝臓 (放射性標識エマルジョンの回収用量の 44 ~ 47 %) で、次いで筋肉 (20 ~ 23 %) と心臓 (8 ~ 9 %) であった。エマルジョン粒子の取り込みが最も低かったのは、NT 動物と HT 動物の両方で脳であった (回収用量の 0.3 % 未満)。

30

【0084】

本発明者らは、H I 損傷直後から開始する HT + tri-DHA 処置の神経保護効果を評価した。HT または tri-DHA は、生理食塩水で処置した NT 動物と比較して、脳梗塞容積の有意な減少 (約 50 %) を示した (図 1 A 及び 1 B)。H I 損傷直後の HT 及び tri-DHA による処置の併用は、HT 処置療単独と比較して追加の利点をもたらさなかった。

【0085】

H I 損傷直後に開始した HT + tri-DHA の投与による神経保護は、虚血性傷害後 7 日目でも維持された。ニッスル染色は、対照群と比較して、HT または HT + tri-DHA 処置マウスにおける同側半球のより良好な保存を示した。しかし、この併用は、HT 治療単独と比較して治療上の利点を提供しなかった。代表的なニッスル染色切片を図 1 C に示す。

40

【0086】

この実施例では、虚血性損傷後の神経保護の治療範囲を決定するために、遅延型 HT 処置プロトコルを実行した。H I 後 2 時間遅延した HT は、NT 動物と比較して脳梗塞容積の減少を示した。さらに、HT + tri-DHA 処置は、H I 損傷の 2 時間後から始まる HT 単独によって提供される保護よりも有意な追加の保護を提供しなかったが、梗塞サイズがわずかにさらに減少する傾向であった (梗塞容積 % : 31.4 ± 4.1 NT + 生理食塩水対 18.8 ± 4.6 HT + 生理食塩水対 12.7 ± 4.0 HT + tri-DHA) (図 2 A 及び 2 B)。H I 傷害後 4 時間後に HT 処置を遅らせても、虚血性損傷に対する保

50

護は得られなかった。HI損傷後4時間遅れてHTとtri-DHA処置とを組み合わせても、HTの治療範囲は拡張されなかった。4時間遅延HT+tri-DHAの組み合わせで処置した動物では梗塞容積の増加が観察されたが、その差はNTまたはHT単独と比較して有意ではなかった(図2C及び2D)。したがって、本発明者らの結果によって、tri-DHAエマルジョンとHTとの併用処置は、虚血性損傷における神経保護において追加の有意な利点をもたらさないことが示される。

【0087】

考察

この研究では、HT投与がtri-DHAと同程度の神経保護を発揮するという結果が示されている。さらに、tri-DHAエマルジョンとHTの併用処置では、追加の神経保護は得られない。

10

【0088】

治療的HTは、心停止後の酸素欠乏性脳症及び周産期仮死などの急性虚血性脳損傷の管理において十分に確立された神経保護手段である(28)。無作為化試験では、HTが外傷性脳損傷患者の神経学的転帰の改善にも有効であることが示されている(29)。虚血性脳卒中後の全身性HTの神経保護の利点が臨床試験で報告されている(7)。しかし、急性脳卒中処置におけるHTの使用には依然として議論の余地があり、ロジスティックな課題によって制限されている(7、30)。

【0089】

HI傷害の直後に開始されるHTには神経保護作用があり、神経保護の程度は冷却開始の遅れに伴って直線的に減少する(31、32)。HI損傷の新生児マウスモデルでは、HIの0時間後または2時間後に始まるHTが神経保護を提供し(23)、一方で、マウスで2時間を超えて遅れた場合のHTの効果を評価した研究はなかった。ここで示した結果によって、HTはHI損傷後2時間までは神経保護作用があり、処置が4時間遅れると保護が失われることが示される。新生児ラットモデルでは、Sabir et al. (32)によって、HI傷害後最大6時間遅延HTは、神経保護を提供することが示された。これは、マウス対ラットにおける虚血性損傷の進行及び神経保護の経路の違い、ならびに／または代謝率の違いに関連している場合がある(33)。本発明者らは、HI損傷後2時間までにtri-DHAを投与すると脳梗塞容積が有意に(約50%)減少したが、HI損傷後4時間遅れて投与したtri-DHAでは予防効果が認められなかったことを報告した(20)。これらの本発明の結果によって、HTがtri-DHA処置と非常によく似た治療範囲を提供することが示唆される。HI脳症の新生児では、冷却キャップを使用した選択的頭部冷却、または受動冷却(放射加温器／保育器をオフにする)による全身冷却、クールバック及び／または市販の冷却ブランケットが処置に使用される(34、35)。新生児HI脳症の治療範囲は6時間未満であることが示唆されている。(36、37)。しかし、出生後6～24時間以内に開始されたHTには効果がある可能性があるが、その有効性には不確実性がある(38)。体重1kgあたりの基礎代謝率はマウスではヒトの7倍であり(39)、これがHI損傷に対するヒトのHTの処置範囲を長くする上で重要な役割を果たしている場合がある。したがって、マウスにおける本発明者らのプロトコルにおける2時間遅延処置による神経保護は、ヒトにおけるHTではより長い時間範囲に変換され得る。

20

30

40

【0090】

本発明者らは、HI損傷後のHTの有効性を高めるための補助療法として、DHAがより優れた神経保護を追加する可能性があるか否かを試験した。本発明者らの結果によって、HTとtri-DHAとを組み合わせても、神経保護を強化することもなく、HI損傷後の処置の治療範囲を拡大することもないことが示唆される。これは、HI損傷の新生児子豚モデルの研究で得られた最近の発見と同様であり、HTとDHAとの併用処置は、HI傷害後の脳損傷及び炎症マーカーの減少において、個別の処置よりも追加の利点がないことが示された(40)。しかし、HI損傷の新生児ラットモデルを用いた別の研究では、HT+DHAが相乗的に脳梗塞容積を減少させ、行動能力を改善することが示された(

50

41)。興味深いことに、本発明者らの放射性標識実験で実証されたように、HT+tri-DHA処置によって神経保護を顕著に強化できないのは、tri-DHAエマルジョン粒子の吸収及び分布の減少に起因するものではなかった。さらに、脳内でのtri-DHAエマルジョン粒子の取り込みが低いことは、HI神経保護を提供する際のtri-DHAの有効性を説明するものではなかった。最近のデータでは、注射されたtri-DHAエマルジョンが肝臓に取り込まれ、代謝されてリゾホスファチジルコリンと非エステル化脂肪酸の血漿プールに分泌され、DHAの脳輸送が促進されることが示されている(22)。

【0091】

DHAとHTとは両方とも、HI損傷に対する神経保護の共通の経路を共有している。DHAとHTは、アポトーシス促進性B細胞リンパ腫2(BCL-2)関連X(BAX)を下方制御し、抗アポトーシスBCL-2を上方制御し、その結果、シトクロムc放出の減少及びカパーゼ活性化の減少をもたらす(17、42)。さらに、DHAとHTは、細胞増殖を刺激するAKTの活性化を促進する(43、44)。さらに、実験的な脳卒中において、DHA及びHT処置はミクログリアの活性化、ならびにインターロイキン1β(IL-1β)、IL-6、及び腫瘍壊死因子α(TNF-α)などの炎症促進性サイトカインを減少し得ることが報告されている(45、46)。さらに、両方の処置とも、多くの炎症性シグナル伝達経路を活性化する転写因子である核因子カッパB(NF-κB)を阻害する(47、48)。さらに、DHA及びHTは、グルタミン酸などの興奮毒性アミノ酸の蓄積または放出を防ぐことも示されている(49、50)。DHAとHTは両方とも、ミトコンドリアROS放出の再灌流による加速を制限し、ミトコンドリア膜の透過性を防ぐ(21、51)。したがって、HT及びDHAは同様の神経保護経路を通じて作用しており、併用処置が脳損傷をさらに軽減する効果が無効にし得ると考えられる。

【0092】

現在、HTは乳児の中等度から重度の脳症に対して確立された唯一の処置であり(52)、成人の脳卒中治療に関してはまだ研究中の有望な戦略である(53)。脳卒中に対するHTの臨床応用を成功させるには、発症時間、持続時間、HTの深さ、復温速度などのHT治療のさまざまな主要パラメータを制御する必要がある(11)。患者の冷却は概念としては単純であるが、HTで発生し得る管理上の問題への備えとともに、特別な訓練を受けた医療スタッフによる取り組みの調整が必要となる複雑な医療処置である(12、54)。脳卒中の処置としてHTを使用するには、通常、三次医療病院での治療が必要であり、高額な経済的コストを伴う(55)。本発明者らの知見は、HTまたはtri-DHAエマルジョンの注射が梗塞容積を減少させ、神経保護の程度が両方の治療で同等であることを示している。オメガ3脂肪酸は安全であり、重大な副作用もなくヒトに十分に許容される(56-58)。静脈注射は一般的な実行可能な手順であり、プライマリケアの現場で簡単に実行され得る。

【0093】

実施例2：オメガ3ジグリセリドエマルジョンの急性注射は、オメガ3トリグリセリドエマルジョンよりも新生児マウスモデルにおける脳の低酸素性虚血性損傷に対して優れた保護を提供する。

EPAとDHAの両方を含むトリグリセリド脂質エマルジョン、またはDHA単独(tri-DHA)による急性処置は、再灌流の最初の数分/時間以内に作用することにより、低酸素性虚血性脳損傷後の神経保護を提供する。tri-DHA及びその生理活性メディエーターによって影響を受ける生物学的機構としては、(i)ミトコンドリア活性酸素種(ROS)の生成の減少；(ii)Ca²⁺取り込み及び恒常性の維持によって実証されるミトコンドリア機能の保存；(iii)再灌流後30分以内の脳ミトコンドリアにおけるフリーラジカル生成の遮断、及び(iv)ミトコンドリア関連のアポトーシス経路の阻害、が挙げられると考えられる。tri-DHAの急性投与によってもたらされる神経保護は、脳ミトコンドリア内のDHA含有量の増大、及び脳組織内のニューロプロテクチンD1(NPD1)及びDシリーズレゾルビンなどのDHA由来の生理活性メディエータ

一の含有量の増大とも関連していた。したがって、低酸素性虚血性傷害後のNPD1の直接投与によってもたらされる神経保護作用をさらに調査した。本発明者らは、NPD1処置が対照群と比較して脳梗塞容積の有意な減少を誘導し、これがミトコンドリアCa²⁺緩衝能の維持とミトコンドリア関連細胞死経路の減少との両方に関連していることを観察した。

【0094】

データによってさらに、DGエマルジョン（総脂肪酸の90%を超えるEPA及びDHAを含む）に含まれるオメガ-3 FAで治療された新生児マウスは、脳梗塞容積の有意な減少を示し、新生児HIモデルにおいてオメガ-3 DGエマルジョンがオメガ-3 TGエマルジョンよりもはるかに効果的であることが示される。図3。

10

【0095】

本発明者らは、DGエマルジョンに含まれるオメガ-3 FAの化学物理的特性を特徴付け、それらをTGエマルジョンと比較した。本発明者らは、NMR分光法によりDGと細胞膜の*in vitro*モデルとの相互作用を評価した。本発明者らは、(i) DGは膜構造に悪影響を及ぼさず、(ii) TGよりも効率的に生体膜系に取り込まれることを観察した。急速な加水分解がジグリセリドエマルジョンのクリアランスを促進するか否かを確立するために、リポタンパク質リパーゼ(LpL)媒介加水分解による脂肪酸放出を評価することにより、インビトロ脂肪分解研究を実施した。オメガ-3 DGエマルジョンは、オメガ-3 TGと比較してより効率的に加水分解されることを本発明者らは、観察した。これは、虚血性脳損傷におけるDGのより速い取り込み及び迅速な神経保護を説明する／寄与する場合がある。これらの知見によって、乳児を含む低酸素性虚血性脳損傷における強力な神経保護剤として、脂質エマルジョン中で送達されるオメガ-3 FAの可能性が強調される。

20

【0096】

さらなる研究では、図4に示すように、低酸素性虚血性(HI)損傷を与え、動物1匹あたり5、10、または20 ngの濃度のビヒクルとして生理食塩水またはPD1 n-3 DPAで処理した新生児マウス（生後10日）の梗塞容積を測定した(n=15-17)。値はSD付きの平均値である。梗塞容積の減少は用量依存性であった。

【0097】

参考文献

30

1. Wu YW, et al. Placental pathology and neonatal brain MRI in a randomized trial of erythropoietin for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Res* (2020) 87:879-884.
2. Huang L, Zhang L. Neural stem cell therapies and hypoxic-ischemic brain injury. *Prog Neurobiol* (2019) 173:1-17.
3. Ye X, et al. Purinergic 2X7 receptor/NLRP3 pathway triggers neuronal apoptosis after ischemic stroke in the mouse. *Exp Neurol* (2017) 292:46-55.
4. Aker K, et al. Thomas N. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy in India (THIN study): a randomised controlled trial. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* (2020) 105:405-411.
5. Zhao Y, et al. Pharmacological hypothermia induced neurovascular protection after severe stroke of transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Exp Neurol*

40

50

(2020) 325:113133.

6. Zgavc T, et al. Experimental and clinical use of therapeutic hypothermia for ischemic stroke: opportunities and limitations. *Stroke Res Treat* (2011) 2011:689290.
7. Duan Y, et al. New endovascular approach for hypothermia with intrajugular cooling and neuroprotective effect in ischemic stroke. *Stroke* (2020) 51:628–636.
8. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* (2012) 13:267–278. 10
9. Jiang J, Yu M, Zhu C. Effect of long-term mild hypothermia therapy in patients with severe traumatic brain injury: 1-year follow-up review of 87 cases. *J Neurosurg* (2000) 93:546–549.
10. Berger C, et al. Hypothermia and brain-derived neurotrophic factor reduce glutamate synergistically in acute stroke. *Exp Neurol* (2004) 185:305–312. 20
11. Wu L, et al. Hypothermic neuroprotection against acute ischemic stroke: The 2019 update. *J Cereb Blood Flow Metab* (2020) 40:461–481.
12. Lampe JW, Becker LB. State of the art in therapeutic hypothermia. *Annu Rev Med* (2011) 62:79–93.
13. Kurisu K, et al. Therapeutic hypothermia and neuroprotection in acute neurological disease. *Curr Med Chem* (2019) 26:5430–5455. 30
14. Yenari M, et al. Metabolic downregulation. *Stroke J Cereb Circ* (2008) 39:2910–2917.
15. Cilio MR, Ferriero DM. Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia. *Semin Fetal Neonatal Med* (2010) 15:293–298.
16. Takeyama E, et al. Dietary intake of green nut oil or DHA ameliorates DHA distribution in the brain of a mouse model of dementia accompanied by memory recovery. *Nutrients* (2019) 11:2371. 40
17. Mayurasakorn K, et al. Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2011) 14:158–167.
18. Eady TN, et al. Docosahexaenoic acid complexed to albumin provides neuroprotection after experimental stroke in aged ra 50

ts. *Neurobiol Dis* (2014) 62:1–7.

19. Jiang X, et al. A post-stroke therapeutic regimen with omega-3 polyunsaturated fatty acids that promotes white matter integrity and beneficial microglial responses after cerebral ischemia. *Transl Stroke Res* (2016) 7:548–561.

20. Williams JJ, et al. N-3 fatty acid rich triglyceride emulsions are neuroprotective after cerebral hypoxic-ischemic injury in neonatal mice. *PLoS ONE* (2013) 8:e56233.

21. Mayurasakorn K, et al. DHA but not EPA emulsions preserve neurological and mitochondrial function after brain hypoxia-ischemia in neonatal mice. *PloS One* (2016) 11:e0160870.

22. Manual Kollareth DJ, et al. Acute injection of a DHA triglyceride emulsion after hypoxic-ischemic brain injury in mice increases both DHA and EPA levels in blood and brain. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2020) 162:102176.

23. Reinboth BS, et al. Endogenous hypothermic response to hypoxia reduces brain injury: Implications for modeling hypoxic-ischemic encephalopathy and therapeutic hypothermia in neonatal mice. *Exp Neurol* (2016) 283:264–275.

24. Galinsky R, et al. In the era of therapeutic hypothermia, how well do studies of perinatal neuroprotection control temperature? *Dev Neurosci* (2017) 39:7–22.

25. Qi K, et al. Effects of particle size on blood clearance and tissue uptake of lipid emulsions with different triglyceride compositions. *J Parenter Enter Nutr* (2003) 27:58–64.

26. Manual Kollareth DJ, et al. Radiolabeled cholesteryl ethers: A need to analyze for biological stability before use. *Biochem Biophys Rep* (2018) 13:1–6.

27. Zirpoli H, et al. NPD1 rapidly targets mitochondria-mediated apoptosis after acute injection protecting brain against ischemic injury. *Exp Neurol* (2020) 113495.

28. van der Worp HB, et al. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? *J Cereb Blood Flow Metab* (2010) 30:1079–1093.

29. Dietrich WD, Bramlett HM. Therapeutic h

ypothermia and targeted temperature management for traumatic brain injury: Experimental and clinical experience. *Brain Circ* (2017) 3:186–198.

30. Zhao H, Steinberg G. Limited therapeutic time windows of mild-to-moderate hypothermia in a focal ischemia model in rat. *Stroke Res Treat* (2011) 2011: doi:10.4061/2011/131834

31. Gunn AJ. Cerebral hypothermia for prevention of brain injury following perinatal asphyxia. *Curr Opin Pediatr* (2000) 12:111–115.

32. Sabir H, et al. Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke* (2012) 43:3364–3370.

33. Du Y, et al. Differential subnetwork of chemokines/cytokines in human, mouse, and rat brain cells after oxygen-glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* (2017) 37:1425–1434.

34. Akula VP, et al. A randomized clinical trial of therapeutic hypothermia mode during transport for neonatal encephalopathy. *J Pediatr* (2015) 166:856–861. e2.

35. Peliowski-Davidovich A. Hypothermia for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Paediatr Child Health* (2012) 17:41–43.

36. Kendall GS, et al. Cooling on retrieval study group. Passive cooling for initiation of therapeutic hypothermia in neonatal encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (2010) 95:F408–412.

37. Gunn AJ, Groenendaal F. Delayed neuroprotection in the era of hypothermia: What can we add? *J Clin Neonatol* (2016) 5:3.

38. Laptook AR, et al. Effect of therapeutic hypothermia initiated after 6 hours of age on death or disability among newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *JAMA* (2017) 318:1550–1560.

39. Demetrius L. Of mice and men. *EMBO Rep* (2005) 6:S39–S44.

40. Huun MU, et al. DHA and therapeutic hypothermia in a short-term follow-up piglet model of hypoxia-ischemia: Effects on

10

20

30

40

50

- H+MRS biomarkers. *PloS One* (2018) 13:e0201895.
41. Berman DR, et al. Docosahexaenoic acid augments hypothermic neuroprotection in a neonatal rat asphyxia model. *Neonatology* (2013) 104:71–78.
42. An H, et al. Phenothiazines enhance mild hypothermia-induced neuroprotection via PI3K/Akt regulation in experimental stroke. *Sci Rep* (2017) 7:7469. 10
43. Eady TN, et al. Docosahexaenoic acid signaling modulates cell survival in experimental ischemic stroke penumbra and initiates long-term repair in young and aged rats. *PloS One* (2012) 7:e46151.
44. Zhao H, et al. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* (2005) 25:9794–9806.
45. Cai W, et al. Post-stroke DHA Treatment Protects Against Acute Ischemic Brain Injury by Skewing Macrophage Polarity Toward the M2 Phenotype. *Transl Stroke Res* (2018) 9:669–680. 20
46. Lee JH, et al. Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice. *Neurobiol Dis* (2016) 96:248–260.
47. Zhang W, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation confers long-term neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury through anti-inflammatory actions. *Stroke* (2010) 41:2341–2347. 30
48. Yenari MA, Han HS. Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB). *Neurochem Int* (2006) 49:164–169.
49. Moreira JD, et al. Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. *J Nutr Biochem* (2010) 21:351–356. 40
50. Zhang H, et al. Therapeutic effect of post-ischemic hypothermia duration on cerebral ischemic injury. *Neurol Res* (2008) 30:332–336.
51. Gong P, et al. Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a 50

swine model of cardiac arrest. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab (2013) 33:928–934.

52. Oorschot DE, et al. Treatment of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy with erythropoietin alone, and erythropoietin combined with hypothermia: history, current status, and future research. Int J Mol Sci (2020) 21:1487.

53. Chen J, et al. Endovascular hypothermia in acute ischemic stroke: pilot study of selective intra-arterial cold saline infusion. Stroke (2016) 47:1933–1935.

54. Li L, et al. Combination treatment with methylene blue and hypothermia in global cerebral ischemia. Mol Neurobiol (2018) 55:2042–2055.

55. Kim JJ, et al. Cost-effective therapeutic hypothermia treatment device for hypoxic ischemic encephalopathy. Med Devices (2013) 6:1–10.

56. Zhang M–M, et al. The efficacy and safety of omega-3 fatty acids on depressive symptoms in perinatal women: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. Transl Psychiatry (2020) 10: doi:10.1038/s41398-020-00886-3.

57. Defilippis AP, et al. Omega-3 Fatty acids for cardiovascular disease prevention. Curr Treat Options Cardiovasc Med (2010) 12:365–380.

58. Calder PC, Deckelbaum RJ. Intravenous fish oil in hospitalized adult patients: reviewing the reviews. Curr Opin Clin Nutr Metab Care (2013) 16:119–123.

10

20

30

40

50

【表 1】

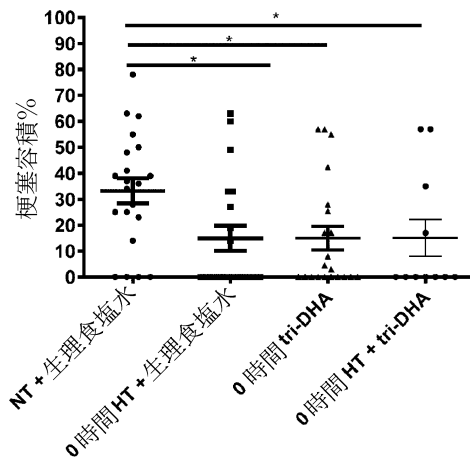
表 1：低酸素虚血（HI）傷害を受けた新生児マウスにおける、低酸素直後（0 時間）及び低体温（HT）中の 1、2、3、及び 4 時間の直腸温度測定

	HT	HT+tri-DHA
低酸素状態の終了(0 時間)	35.2±0.48	35.6±0.41
HI から 1 時間後	32.0±0.16	32.2±0.25
HI から 2 時間後	31.4±0.24	32.0±0.17
HI から 3 時間後	31.0±0.19	32.1±0.15
HI から 4 時間後	31.6±0.26	31.8±0.28

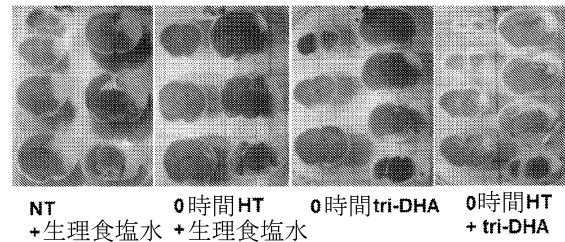
温度（℃）は平均値±SEMとして表される。n = 7 – 9

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

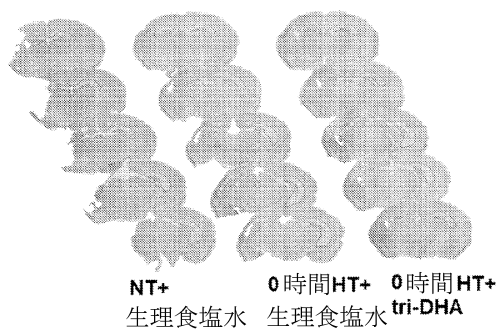
20

30

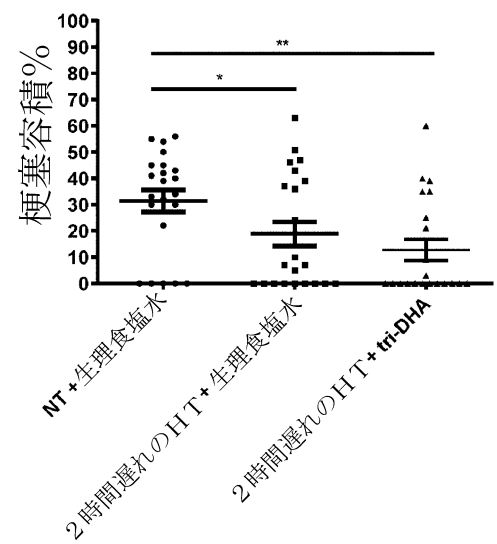
40

50

【図 1 C】

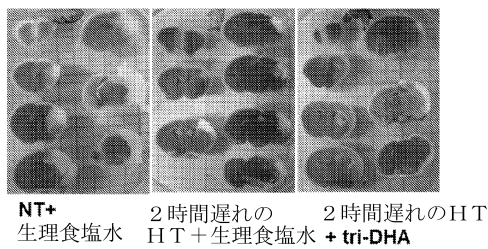


【図 2 A】

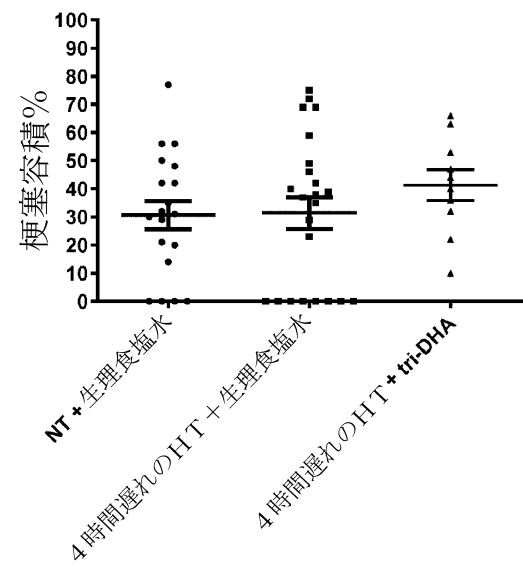


10

【図 2 B】



【図 2 C】



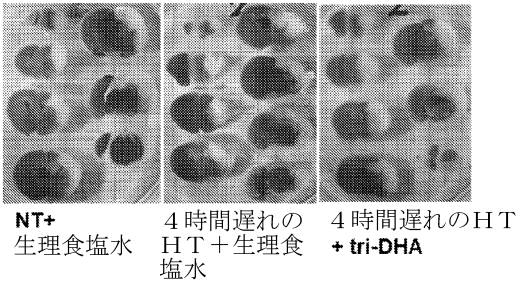
20

30

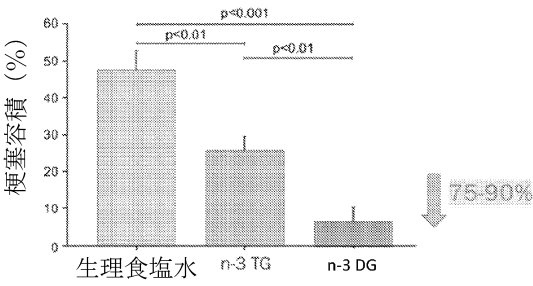
40

50

【図 2 D】

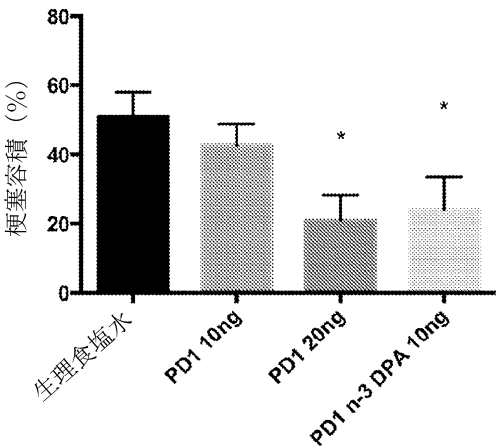


【図 3】



10

【図 4】



20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 21/62102
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 38/04; A61K 45/06; A61P 37/02 (2022.01) CPC - A61K 38/10; A61P 37/02		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2018/0279095 A1 (Abbott Laboratories) 29 September 2016 (29.09.2016) para [0020], [0038], [0052], [0057], [0077]-[0078], [0089]	1-2, 5-7 3-4, 42-44, 79-81
X --- Y	US 2015/0011515 A1 (B. Braun Melsungen AS) 08 January 2015 (08.01.2015) para [0057], [0059], [0091], [0196], [0111], [0245], [0231]	114-118 3-4, 42-44
Y	Chiang et al. Therapeutic hypothermia for neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. Pediatrics and Neonatology 2017, 58, 475-483, abstract	79-81
Y	US 2005/0027004 A1 (Martek Biosciences Corporation) 3 February 2005 (03.02.2005) abstract	1-7
X/E	WO 2021/0211796 A1 (The Trustees of Columbia University in the city of New York) 21 October 2021 (21.10.2021) abstract	1-7, 42-44, 79-81, 114-118
X/P	Kollareth et al. Acute Injection of Omega-3 Triglyceride Emulsion Provides Vary Similar Protection as Hypothermia in a Neonatal Mouse Model of Hypoxic-Ischemic Brain Injury. Frontiers in Neurology, Vol. 11, January 2021, entire document	1-7
X	Mayurasakorn et al. DHA but Not EPA Emulsions Preserve Neurological and Mitochondrial Function after Brain Hypoxia-Ischemia in Neonatal Mice. Plos One, August 11 2016	1
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 15 February 2022		Date of mailing of the international search report MAR 10 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-6300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/62102

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-41, 45-78, 82-113, 119-136
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/14	(2017.01)	A 6 1 K	47/14
A 6 1 K	47/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/10	(2017.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22

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,N
E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 1 1 1 0 1 ニューヨーク ロング アイランド シティ 4 5 ストリート 3 4 -
0 6 アpartment ナンバー 2 エー

(72)発明者

ダール ソーレン ヴェイス

アメリカ合衆国 1 0 0 2 3 ニューヨーク ニューヨーク ウェスト 7 1 ストリート 3 0 9 ア
partment ナンバー 4 エー

(72)発明者

テン ヴァディム エス.

アメリカ合衆国 1 0 3 0 8 ニューヨーク スタテン アイランド ウィットマン アベニュー 7 7

F ターム (参考)

4C076 AA17 BB13 BB25 CC01 CC11 DD38D DD41 DD41F DD43 DD46
DD49 DD59S DD63F DD67D FF14 FF16 FF51
4C206 AA01 AA02 DB09 DB47 DB48 MA01 MA04 MA42 MA79 MA86
NA14 ZA02 ZA36