

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4044366号
(P4044366)

(45) 発行日 平成20年2月6日 (2008.2.6)

(24) 登録日 平成19年11月22日 (2007.11.22)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 9/50 (2006.01)
A 6 1 K 47/34 (2006.01)
A 6 1 K 31/137 (2006.01)
A 6 1 K 31/197 (2006.01)
A 6 1 K 31/4045 (2006.01)

A 6 1 K 9/50
A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 31/137
A 6 1 K 31/197
A 6 1 K 31/4045

請求項の数 3 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-140490 (P2002-140490)
(22) 出願日 平成14年5月15日 (2002.5.15)
(62) 分割の表示 特願平3-510428の分割
原出願日 平成3年5月14日 (1991.5.14)
(65) 公開番号 特開2003-12506 (P2003-12506A)
(43) 公開日 平成15年1月15日 (2003.1.15)
審査請求日 平成14年6月14日 (2002.6.14)
(31) 優先権主張番号 525, 383
(32) 優先日 平成2年5月16日 (1990.5.16)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501029489
サザン・リサーチ・インスティテュート
アメリカ合衆国 アラバマ州 35205
バーミングハム ナインス アベニュー
サウス 2000番
(74) 代理人 100077517
弁理士 石田 敬
(74) 代理人 100092624
弁理士 鶴田 準一
(74) 代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74) 代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(74) 代理人 100081330
弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経線維成長を刺激するための医薬品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中枢神経系内の神経線維の成長を誘導するための、重合体内にカプセル化した神経活性分子を含むマイクロ小球を含む医薬品であって、ここで、前記神経活性分子がドーパミン前駆体類、セロトニン、サブスタンス P、ソマトスタチン、神経成長因子、アンジオテンシンII、ガンマー・アミノ酪酸又は神経栄養因子を含み、上記マイクロ小球の重合体が（1）前記神経活性分子に対し透過性であり、（2）中枢神経系の組織に適合可能であり、且つ（3）前記神経活性分子が制御された速度で予め指定した期間重合体を通して透過するように操作できる生物学的減成動力学を有するポリ（ラクタイド-コ-グリコライド）共重合体又はポリラクタイドもしくはポリグリコライドホモ重合体である、医薬品。

【請求項 2】

前記医薬品が前記マイクロ小球および医薬的に許容される注射用担体を含む注射用製剤である、請求項 1 記載の医薬品。

【請求項 3】

前記マイクロ小球が中枢神経系の組織の中で、毒性の減成副産物を何ら産生しないで生物学的に減成される重合体を含む、請求項 2 記載の医薬品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

中枢神経系内での薬物の治療作用部位への送達は、このような送達を成功させるために克服すべき化学的および物理学的関門が多いため、非常に困難な仕事になるというこ

とが昔から知られている。中枢神経系薬物送達に対するこれらの関門のうちのいくつかを克服するための多くの方法、例えば血液脳関門を通過するためにリポソームを使用するといった方法が考え出されている。しかしながらリポソーム薬物送達の欠点には、薬物負荷が低い、作用時間が短い、薬物放出速度を操作する方法に限度がある、貯蔵安定性が悪い、および定率増加に問題がある、といったことが含まれ、このような方法の使用が妨げられてきた。中枢神経系薬物送達の関門のいくつかを打破する別の方法では、活性な薬物をいわゆるプロドラッグの形態に化学的に修飾する、すなわち血液脳関門を通過でき、そして一度この関門を通過すると、プロドラッグが活性体に転換する。このようなプロドラッグ薬物送達方法の1つの事例として、脂溶性ビタミンのナイアシンから誘導した分子マスクに付着した神経伝達物質ドーパミンがある。修飾したドーパミンは脳内に取り込まれ、そこで次にプロドラッグマスクをゆっくりとはがされ、ドーパミンを遊離する。

10

【0002】

中枢神経系への薬物送達を妨げる物理的関門のいくつかを通過するための最も一般的な方法には、ポンプ使用によるものがある。種々のポンプは外部に取り付けられた貯蔵庫から小さな管を通して中枢神経系へ薬物を送達するように設計してある。このようなポンプ送達方法はある程度外部から制御できるが、中枢神経系に直接的に感染する可能性が大きく、中枢神経系内の正確な薬物作用部位はほとんど調整できない。

【0003】

中枢神経系内の薬物送達を成功させるためには、これでは不十分である。薬物は必要な投与速度で、および適切な治療用量で、意図する作用部位に送達しなければならない。市販されているものでは、アルゼット・オスモチック・ミニ・ポンプが入手可能になり、非常に有用で、中枢神経系内で制御され速度および用量でより長時間薬物送達できる成功した手段である。しかしながら、この装置を望ましい薬物を分離性脳核 (discrete brain nuclei) に送達するための装着には、例えばカニューレを直接指示された脳の部位に埋め込むといった、非常に大きな困難がある。

20

【0004】

中枢神経系に神経活性物質、例えば神経伝達物質を送達するために開発されたさらに別の技術は、神経移植を用いたものである。生育可能なニューロン組織は直接分離性脳核内に移植できる。移植した組織からの物質送達時間は、問題にならない。なぜならば、移植した組織は宿主の中枢神経系内で長時間生存できるからである。この技術は上記に引用した多くの障害を乗り越えるが、胎児ドーパミン細胞からのニューロン断片が、無傷のドーパミンニューロン系に通常的に見出される自動制御フィードバック特性のいくつかを呈するという主張にかかわらず、これらの作用部位で神経伝達物質が神経移植片から送達される正確な速度が予測できない。

30

【0005】

1817年、ジェームズ・パーキンソンは、彼が「振せん麻痺」と称した病気を報告した。この症状は現在パーキンソン病として知られ、中年および老年の人に起こる。発病は潜行性で、しばしば一方の手の震えで始まり、次に運動緩徐および硬直が強くなってくるが、これは徐々に進行し、数年後には不能になる。特発性パーキンソン病では、通常黒質、青斑およびその他の色素沈着性ニューロンにおいて細胞が損失し、および一般に黒質線条体経路と称される黒質から尾状核および被殻へ突出した細胞の軸索末端中のドーパミン含量が減少する。

40

【0006】

パーキンソン病の症状には、L-3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン (レボドーパすなわちL-ドーパ) の投与により処置できるものである。L-ドーパはドーパミンの代謝前駆体であり、ドーパミン自体は血液脳関門を通過しないので置換療法として用いられる。しかしながら、薬物の多くが脳内の作用部位に到達するまでに代謝されるので、3-15 g/日といった多量を投与しなければならない。また別に、これはしばしば、血液脳関門を通過するまでL-ドーパの代謝を防御するドーパデカルボキシラーゼ阻害剤、例えばカルビドーパと組み合わせて投与する。これは運動緩徐の症状に非常に有効である。処置

50

約5年後、副作用が発展し、処置は薬物用量を増加しても徐々に効果が低下するようになる。これらの問題は、中枢神経系内で治療作用部位への薬物を送達する別の手段で、損失したドーパミンを置換することができるかどうかという疑問を提起している。

【0007】

これらのアプローチが、実験動物モデルでうまく立証されているが、ニューロン変性疾患、例えばパーキンソン病の治療に用いるには、実際のおよび倫理的な考慮すべき事柄が多くある。これはヒトの堕胎した胎児組織を用いるだけでなく、この技術が複雑な外科処置の過程を含むということも議論すべき問題である。さらに、パーキンソン病患者に副腎および胎児の組織を移植する臨床試験が行われているが、神経系内の移植組織の機構および長期間の効果についてはまだ明白になっておらず、いまだに医学的な論点となっている。このような中枢神経系病理学の処置に関する最も理論的なアプローチは、今だに中枢神経系の損傷部位に、生物学的に活性な物質を送達するものである。

10

【0008】

多くの種々の方法が提唱され、現在中枢神経系への医薬的に活性な化合物の送達に利用されているが、中枢神経系へ生物学的に活性な物質を送達する必要性がまだある各々の方法には、多くの欠点がある。本発明は、この必要性を独特の方法で対処する。

【0009】

ラットにおける黒質線条体経路の神経毒素6-ヒドロキシドーパミンによる片側性損傷が運動および体位の非対照性を生み出すという発見により、パーキンソン病の動物モデルを作り出した。この非対照性の運動は、ドーパミン神経伝達を妨害する薬物、例えばアポモルフィンにより誘起される回転行動を測定するために開発されたロートメーターモデルで行う。特徴的なアポモルフィン誘起の回転行動は、線条のドーパミン量が95%低下した動物にのみ観察され、胎児ドーパミン産生細胞または副腎髄質組織の移植によるこの組織中のドーパミン回復が、結果的にアポモルフィン誘起の回転行動を著明に低下させる。

20

【0010】

広義では、本発明は、一つには、適合し、生物学的減成が可能な重合体中に生物学的に活性な物質を含有する注射可能な薬物送達方法として開発されたマイクロ小球に関する。本発明で用いるマイクロ小球なる用語は、マイクロカプセル、ナノカプセルおよびナノ小球を含む。

30

【0011】

マイクロカプセルおよびマイクロ小球は、通常直径が2ミリメートルまたはそれ未満、ふつう直径500ミクロンまたはそれ未満の球形粒子から成る、自由流動性粉末である。1ミクロンより小さい粒子を通常ナノカプセルまたはナノ小球と称する。たいいていの場合、マイクロカプセルおよびナノカプセル、またはマイクロ小球およびナノ小球の間の相違は大きさである；一般に二者間の内部構造の相違はあるにしてもわずかである。

【0012】

本発明で用いるマイクロカプセルまたはナノカプセルは、独特の膜の中央に存在するそのカプセル化物質（本発明では、これは生物学的に活性な物質すなわち薬物である）を有する。この膜は壁形成重合体素材と称することができる。これらの内部構造のために、放出制御適用するために設計した透過性マイクロカプセルは、これらの物質を一定速度（「ゼロオーダー」放出速度と称する）で放出する。すなわち、本発明に用いるマイクロカプセルは、一般に重合体膜で取り囲まれた中心部分を包含するマイクロ粒子を含む。

40

【0013】

さらに、マイクロ小球は、生物学的活性物質が粒子中に分散している「単一結石性（monolithic）」および類似の粒子を包含する；すなわち、内部構造は生物学的活性物質および重合体賦形剤のマトリックスである。通常このような粒子は速度を低下させながら、（「1次」放出速度）生物学的活性物質を放出するが、このような粒子は、ゼロ次速度に近い速度で、マトリックス内で内部物質を放出するように設計できる。従って、本発明で用いるマイクロ小球もまた、一般に生物学的活性物質および重合体賦形剤のマトリックスを包

50

含する内部構造を有するマイクロ粒子をも含む。

【0014】

本発明で用いる特殊な重合体、ポリ（ラクタイドーコグリコライド）には、本発明の方法に独自性を付与する多くの利点がある。この重合体の利点は、これが現在再吸収される縫合用の糸の製造に用いられている素材に類似している点である。もう1つの利点は、この素材が中枢神経系の組織に生物学的に適合する素材であるという点である。さらにもう1つの利点は、この素材が中枢神経系の組織中で、毒性の減成副産物を何ら產生しないで生物学的に減成され得る点である。この素材のさらなる利点は、重合体の生物学的減成動力学を操作することにより、すなわち重合体のラクタイドおよびグリコライドの比率を変化させることにより、薬物放出時間を改変できることである；これは、神経活性分子を脳の特定の部位に、予め決定した時間、制御された速度で送達する能力があるためにとりわけ重要であり、現在の投与方法よりも効果的で望ましい治療法である。この重合体で製造したマイクロ小球は2つの機能を呈する：これらは薬物が減成するのを保護し、薬物を予め希望する時間制御された速度で放出する。重合体は薬物のマイクロカプセル化における使用に関して以前に報告されているが、本発明による中枢神経系の埋め込み技術に用いるための、神経活性分子のマイクロカプセル化重合体の物理学的、化学的および医学的パラメーターは限られている；既に薬物のカプセル化に用いられた重合体を、本発明による中枢神経系への薬物送達のために神経活性分子をカプセル化するために用いられる重合体に自由に代替し得るという一般的な均等性は重合体間にはない。利用する部位が中枢神経である場合、これはとりわけ真実である。本発明により具体的に挙げられた重合体は中枢神経系内の埋め込みに必要な基準に合致するが、ポリ（ラクタイドーコグリコライド）のこれらの示された利点に類似した利点を有する、その他の生物学的に適合する生物学的に減成可能な重合体および共重合体で代替してよい。

【0015】

多くの研究から得られた結果より、神経活性物質を含有するマイクロ小球を植え込むことにより、神経活性物質を中枢神経系に長時間放出するための実現可能な方法が提供されることが示される。さらに、カプセル化する物質としてドーパミンを用いる研究から得られた測定結果により、ドーパミンマイクロ小球製剤は、マイクロカプセル化したドーパミンを直接的に中枢神経系に、予め決定した時間、制御された速度で拡散させる伝達物質の置換の源として用いられる可能性があり、これは機能的な重要性を保証し、同時に依然中枢神経系組織に適合することが示される。しかしながら、最も驚くべきことは、測定結果が、脳の特定部位に注射したマイクロカプセル化ドーパミンがこれまで報告されていない、神経線維の成長を誘起する能力を有することを示すことである。すなわち、本発明の1つの態様に従って製造したマイクロカプセル化神経活性物質を入れる方法には、中枢神経系内で内因性ドーパミンを産生するのに必要なこれらの神経要素の成長を促進する能力がある。一度成長し、神経線維要素が成熟し、これらの環境内で安定化すると、中枢神経系内のドーパミンの産生および放出が続き、それにより初めてパーキンソン病の治療が可能になるであろう。

【0016】

本発明に準じてマイクロカプセル化でき、用いることができる神経活性分子または物質には、神経伝達物質、神経ペプチドおよび神経栄養因子があり、例えばノルエピネフリン、エピネフリン、セロトニン、ドーパミン、サブスタンスP、ソマトスタチン、神経成長因子、アンジオテンシンIIおよびガンマー・アミノブチル酸などの物質を含む。

【0017】

中枢神経系の組織内に直接入れる、マイクロカプセル神経活性分子で処置できる神経学的疾病には、パーキンソン病、ハンティングトン舞蹈病、アルツハイマー病、てんかんおよび晩期口部ジスキネジーがある。処置すべき疾病に応じて、多くのマイクロカプセル化神経伝達物質、神経ペプチドおよび神経栄養因子を中枢神経系に供することができるという利点がある。例えばドーパミン、コレシストキニン並びに表皮および基底の線維芽細胞成長因子は全てパーキンソン病に関与するので、究極的には、疾病を有する患者に与える場

合、2, 3または4つ全ての神経活性物質を含有するマイクロカプセル化混合物を中枢神経に供することができるという利点がある。

【0018】

本発明の種々の様相をより完全に説明し、より理解を深めるために、以下の実施例が参考になる。

【0019】

実施例1

ドーパミンマイクロ小球の製造

重量%重合体溶液は、50:50ポリ(DL-ラクタイド-コ-グリコライド)(DL-PLG) 2gをジクロロメタン198gに溶解して調製した(DL-PLGの固有粘度は1.27dL/gである)。ドーパミン(塩酸3-ヒドロキシチラミン) 2gを重合体溶液中ホモジナイゼーションにより懸濁した。次にドーパミン懸濁液を300mlの樹脂製のかまに注ぎ、1.5インチのテフロン製羽根車(インペラー)を用いて3500rpmで攪拌した。シリコン油(350cs)を2ml/分の速度で樹脂性のかまにポンプで入れた。約50mlの油を加えた後、樹脂製のかまの内容物をヘプタン3.5lに注入した。ヘプタンを2.5インチのステンレス鋼製羽根車(インペラー)を用いて900rpmで攪拌した。攪拌の0.5時間後、ドーパミンマイクロ小球懸濁液を、開口部分が45μmのステンレス鋼ふるいをとおして、直径が45μmより大きいマイクロ小球を取り除いた。直径45μm未満のマイクロ小球をフリットガラスフィルターロートで回収し、室温で減圧オープン中48時間乾燥した。次にドーパミンマイクロ小球をタールド(tared)ガラスシンチレーションバイアルに回収し、4℃で乾燥剤を用いて貯蔵した。

【0020】

ドーパミンを実施例1に準じて製造した2つの型の共重合体賦形剤にカプセル化した。1つの共重合体はグリコライドに対するラクタイドのモル比が50:50であり、もう1つの共重合体のモル比は65:35の共重合体のラクタイド含量が高いことをかんがみて、この共重合体50:50共重合体よりも生物学的減成が長くなるであろう。従って、65:35の共重合体の送達時間は、50:50の共重合体の送達時間より長くできる。共重合体および共重合体の形態学におけるラクタイドおよびグリコライドの実際の特性をさらに改変したものを製造することができ、神経活性分子を中枢神経系に放出する速度および量を多少調整する。

【0021】

最終的なマイクロ小球は、直径が約5-45μmの球状粒子から成る自由流動性粉末である。これらのマイクロ小球は容易に水性賦形剤に懸濁でき、通常の皮下用の針で注射できる。各マイクロ小球中に含まれるドーパミン量は変化してよいが、約40(重量)%ドーパミンおよび約60(重量)%ポリ(DL-ラクタイド-コ-グリコライド)から成るマイクロ小球を製造し、以下の実施例で用いた。治療用として用いる場合、マイクロ小球は約10%-80%(重量)ドーパミンを含有できる。これらのマイクロ小球のイン・ビトロ拡散試験では、30分以内にドーパミンのほとんどが脱イオン化水に放出した。注射する前に、マイクロ小球を、好ましくはガンマー線照射で滅菌する。

【0022】

実施例2

マイクロ小球の投与

マイクロカプセル化したドーパミンを製造し(50μl生理食塩水中50:50マイクロカプセル化ドーパミン15mgまたは50μl生理食塩水中65:35マイクロカプセル化ドーパミン30mg)、予め処置したラットモデルへの埋め込み用とした。

【0023】

雄スプラッグ・ダウレイ・ラットは、神経毒素6-ヒドロキシドーパミンを用いて、モノアミンニューロンの上行の内側前脳束に片側性の損傷を与えた。2週間後、動物をアポモルフィン(0.1mg/kg SC)を投与し、回転反応をコンピューター化したロートメータ装置で監視した。ドーパミン神経除去が成功したラットのみが、アポモルフィンの投与

に対して強力な対側性の回転を示すであろう。従って、試験の最初の2週間で、60分あたり400回以下の対側性回転でアポモルフィンに反応する動物は研究から排除した。陽性の反応性を示したものは、次にアポモルフィンを用いて週単位で試験を続けた。

【0024】

動物がドーパミンアゴニスト投与に対して回転が安定した基底値に達すれば、軽エーテル麻酔下、ドーパミンマイクロ小球の懸濁液を定位脳手術的に注射した。ドーパミン/50:50DL-PLGマイクロ小球(15mgマイクロ小球/生理食塩水50 μ l)を線条に3 μ lの埋め込みとして注射した。ドーパミン/65:35DL-DPGマイクロ小球は線条に同じように埋め込んだ(30mgマイクロ小球/生理食塩水50 μ l)。経験に基づいて、65:35DL-PLGマイクロ小球は約12週で完全に生理学的減成し、50:50DL-PLGマイクロ小球は約6週間でそうなるであろうと推測した。従って、類似の用量のドーパミンが単位時間あたりに放出されることを確実にするために、50:50DL-PLGマイクロ小球のドーパミン量を65:35DL-PLGマイクロ小球のドーパミン量の半分にした。対照ラットにはドーパミン不含マイクロ小球を同様に埋め込んだ。ステンレス鋼注射用カニューレにポリエチレン管で標準ハミルトンシリンジ(50 μ l)を連結したものを注射に用いた。注射を完了したとき、カニューレはさらに60秒間もとの位置に放置し、その後ゆっくり撤去し、皮膚を閉じた。ドーパミンマイクロ小球の埋め込み後1-3日後に開始して、動物は8週間にわたって種々の間隔で、ドーパミンアゴニスト誘起回転試験をくり返した。

【0025】

マイクロカプセル化ドーパミンを線条内に埋め込んでから30-40分後、ドーパミン/50:50DL-PLGマイクロ小球を埋め込んだラットは、以前の試験用量のアポモルフィンの振幅と類似の振幅で対側性回転を呈したが、期間は長かった。ドーパミン/65:35DL-PLGマイクロ小球を埋め込んだラットは、埋め込みに対していく分、より保護された反応性を示したが、一度開始すると、これらの動物は、ドーパミン/50:50DL-PLGマイクロ小球を投与した動物の振幅と類似の回転振幅のピークがある。空のマイクロ小球の対照充填物を投与したラットは、回転行動を示さなかった。動物を培養して行った組織学的評価により、本発明によるマイクロ小球の懸濁液のラット脳への注射は、中枢神経系へのドーパミン送達の許容され得る手段であることが示される；組織周辺に極わずかの損傷とわずかなグリア反応が注射後に認められた。従って、ドーパミンが標

【0026】

従って、我々は本発明による特別な重合体マイクロ小球が、中枢神経系に神経活性分子を導入する独特なそして許容され得る手段を提供するという、我々の本来の意見を確認した。

【0027】

本発明の方法およびマイクロ小球を利用してドーパミンを中枢神経系に送達した場合の最も顕著な結果は、ドーパミンマイクロ小球に向かって成長するドーパミン免疫反応性線維が存在することを見出したことである。これは対照(ドーパミン不含)マイクロ小球の埋め込みでは認められない。本発明に準じて製造し、埋め込んだ、埋め込みドーパミンマイクロ小球の、ニューロン新芽化を誘起する能力は、神経学的な衰弱化疾病、例えばパーキンソン病を処置するだけでなく、同様に治療する。

【0028】

神経活性分子の脳への直接的な送達に関して進行した研究の一部として、ELISA試験法に利用する場合、その他の神経伝達系(例えば、ノルエピネフリン、セロトニンまたはガンマーアミノブチル酸)と交叉反応性を示さないドーパミンの抗体を開発した。この抗体は、ELISAおよび免疫細胞化学的試験方法の両方で、ドーパミンを認識することが示され、以下の実施例で記載するように、ラット脳での線維の伸長を表す信頼できる手段である。

【0029】

実施例 3 線維形成

ドーパミンに対する抗体を得るための免疫源複合体を、ハプテンをグルタルアルデヒド (G) およびウシ血清アルブミン (BSA) に結合させて調製する。次にウサギをこの免疫源で免疫する。直接ドーパミンに対する抗体は、10日間隔で4回注射する免疫スケジュールの50日後に検出した。BSA-Gに対して産生した抗体を排除するために、ドーパミン抗体を親和クロマトグラフィーで吸収した。脳組織内でドーパミンを可視化するために、ラットをグルタルアルデヒドで灌流し、それによりドーパミンおよび組織タンパクを固定した。従って、抗体はドーパミン-グルタルアルデヒドおよびタンパクに対するものであるから、抗体は脳内のこの複合体を認識するであろう。ラットをペントバルビタールナトリウムで深麻酔し、脳組織からの急速なドーパミン放出を防御するために5%グルタルアルデヒドおよび抗酸化剤から成る混合物で大動脈を灌流した。ラットを混合物で灌流した後、脳を除去し、10%ショ糖溶液中一晩平衡にした。次に脳を凍結し、切断し、細片を抗ドーパミン抗血清と共に24時間恒温培養した。翌日、細片をウサギで産生した抗血清を認識するヤギ抗ウサギビオチン IgG で反応させた。これに続いて分画を、固定化ビオチン分子を認識するアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼと共に恒温培養した。次にペルオキシダーゼをこの反応形式の古典的な色素源 (chromatogen) である 3, 3'-ジアミノベンジジンと反応させ、この反応を硫酸アンモニウムニッケルを添加して増強し、抗体反応に紫色の染色をほどこした。このように、脳組織内のドーパミンの存在を組織内の紫色の沈着物として可視化した；ドーパミンが組織内に存在しない場合、組織は未染色のままである。

【0030】

前に記載したように、対照マイクロ小球の埋め込みはラットにおけるアポモルフィン誘起の回転反応を変化させず、中枢神経系で少なくとも95%のドーパミンの減少が示された。実施例3に準じて染色した後、組織を顕微鏡観察し、対照マイクロ小球を投与したラットの線条にはドーパミンが存在しない、すなわち脳組織が未染色のままであることを確認した。しかしながら、ドーパミンマイクロ小球を投与し、アポモルフィン回転行動の持続的な減少を示した動物では、顕微鏡観察により、ドーパミンがマイクロカプセルと組織の両方に存在することが示された。前に記載したように、非常に多くの微細な線維の伸長が埋め込んだマイクロ小球に向かって成長しているのが認められ、これらの線維にはドーパミンが存在した。これらの知見は、ドーパミン神経線維が宿主動物の中枢神経系内で成長したことを示しており、これは現在のところ未報告の現象である。埋め込んだドーパミン含有マイクロ小球は、明らかに脳の基底からマイクロ小球に向かって神経線維を成長させる能力がある。マイクロ小球からのドーパミンの放出および宿主の中枢神経内のドーパミン線維の成長に帰因すると思われるアポモルフィン誘起の回転の数の持続的な減少を示す全ての動物に、これらの線維が存在した。同様の観察は、50:50DL-PLGおよび65:35DL-PLGの両方のドーパミンマイクロ小球で示された。

【0031】

ドーパミンマイクロ小球の解剖学的な配置は、線維の成長および機能的な回復の両方に重要なようである。1つのラット線条は幅約3mm、深さ約4mmである。脳の基底部からのドーパミン線維の成長は、この核の極端に外側の部分に比較して、主に線条のより中間的な腹側の部分に主に存在する。ドーパミンマイクロ小球を脳の基底部に置くことにより、これらの特定の線維の成長が刺激される。この場所に置かれたこれらのマイクロ小球からのドーパミンの拡散がこれらの線維に到達し、線維がマイクロ小球に向かって成長するようである。それ故に、ドーパミン含有マイクロ小球を外側に設置すると、離れすぎてマイクロ小球から拡散したドーパミンがこれらの線維に影響を及ぼすことができないようである。

【0032】

線維を成長させる系に関与するタンパクである成長関連タンパクに対する抗体を用いた免疫細胞化学的研究により、成長線維はこのタンパクに対して反応性があることが示され、

10

20

30

40

50

このことは神経線維が線維成長させることを示している。ドーパミンマイクロ小球を埋め込んだ2週間後に神経除去した線条にフッ化金を注射すると、腹側の中脳被蓋部位内でニューロンの退行性標識化が示され、このことはドーパミンマイクロ小球がドーパミン線維の成長の引き金であることを示唆している。

【0033】

さらにマイクロ小球を遺伝的マウスモデルの線条に埋め込んだ時の線維の成長を観察した。ウィーバーマウス系は、常染色体劣性変異を有し、研究者に、ドーパミンが「自然」に枯渇した脳の部位にドーパミンマイクロ小球を埋め込んだ後の線維の成長を研究する手段を提供する。これらの遺伝的に異常なマウスは脳ドーパミンが重篤に枯渇している。この異常はとりわけ黒質線条体のドーパミン部分には顕著であるが、メゾリンビク (mesolimbic) ドーパミンニューロンにはあまり影響がないようだ。ドーパミンマイクロ小球をこのマウスモデルの線条に埋め込むと、線条で恐らく遺伝的に影響を受けていないドーパミン系から生じるドーパミン誘起の線維の成長を同等に刺激する。

10

【0034】

ドーパミンに加えて、我々は最近上記のとおり製造したがノルエピネフリンを加えたマイクロ小球を神経除去したラット線条に埋め込んだ。これらの研究はまだ予備的なものであるが、対側性の回転行動が4週間で46%低下するのが観察された。この低下はドーパミンを含有するマイクロ小球を埋め込んだラットで見られた低下に匹敵する。ノルエピネフリンマイクロ小球の埋め込み後の組織化学的な有用な観察はまだなされていないが、2つの化合物が類似の構造 (ドーパミンはノルエピネフリンの前駆体) であるため、このような結果を引き起こすことができるようである。

20

【0035】

従って、我々は本発明の好ましい態様を説明し、記載したが、本発明を変更および改変できることが理解され、従って前掲の厳密な用語に限定することを希望または意図しないが、本発明を種々の用途および条件に適合させるために行うことができるこのような変化および改変を利用することは希望および意図する。従って、このような変化および改変は、同等の全範囲内で、従って以下の請求の範囲内であることを正確に意図する。前述の明細書で用いた用語および表現は説明の用語として用い、限定するものではなく、従ってこのような用語および表現の使用において、示され、記載された様相と同等のものまたはその一部を排除することは意図しない；本発明の範囲は以下の請求項によってのみ定義され

30

【0036】

本発明並びに本発明を十分な、明確な、厳密なおよび正確な用語で製造し、使用方法および過程を報告したが、これによりこれが関連する、またはこれが最も近い関係にある当業者のだれもが、同一のものを製造し使用することが可能になる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 38/22	(2006.01)	A 6 1 K 37/24
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/08
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28

(72)発明者 タイス, トーマス・アール
 アメリカ合衆国, 3 5 2 4 4アラバマ州, バーミングラム, フォレスト・リバー・コート 1 9 1 5
 番

(72)発明者 ディロン, デボラー・エル
 アメリカ合衆国, 3 5 0 8 0アラバマ州, ヘレナ, オコンナー・コート 3 0 2 7番

(72)発明者 メースン, デイヴィッド・ダブリュー
 アメリカ合衆国, 3 5 2 1 5アラバマ州, バーミングラム, イーストウィック・サークル 1 7 2 4
 番

審査官 ▲高▼岡 裕美

(56)参考文献 米国特許第0 4 8 3 2 6 8 6 (U S, A)
 Neuroscience Letters, 92, pp.303-309, (1988)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A61K 9/00-9/72
 A61K 47/00-47/48
 BIOSIS(STN)
 Caplus(STN)
 EMBASE(STN)
 MEDLINE(STN)
 JMEDPlus(JDream2)
 JST7580(JDream2)
 JSTPlus(JDream2)