



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116507314 A

(43) 申请公布日 2023.07.28

(21) 申请号 202180075908.7

(22) 申请日 2021.09.17

(30) 优先权数据

2020-156458 2020.09.17 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/034243 2021.09.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/059767 JA 2022.03.24

(71) 申请人 株式会社力森诺科

地址 日本东京都

(72) 发明人 中上夕子

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 曾祯 段承恩

(51) Int.Cl.

A61K 8/55 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

(54) 发明名称

自噬激活剂

(57) 摘要

含有生育酚磷酸酯或其盐作为有效成分的自噬激活剂。含有所述自噬激活剂和药学上可接受的载体的自噬激活用组合物。

1. 自噬激活剂, 含有生育酚磷酸酯或其盐作为有效成分。
2. 根据权利要求1所述的自噬激活剂, 所述生育酚磷酸酯或其盐是选自 α -生育酚磷酸酯和 γ -生育酚磷酸酯中的至少一种生育酚磷酸酯或其盐。
3. 根据权利要求1或2所述的自噬激活剂, 含有所述生育酚磷酸酯的盐作为有效成分, 所述生育酚磷酸酯的盐是生育酚磷酸酯的钠盐。
4. 根据权利要求1~3的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂促进LC3基因的表达。
5. 根据权利要求1~4的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂促进ATG5基因的表达。
6. 根据权利要求1~5的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂促进ATG7基因的表达。
7. 根据权利要求1~6的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂促进Beclin 1基因的表达。
8. 根据权利要求1~7的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂抑制mTOR基因的表达。
9. 根据权利要求1~8的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂用于阿尔茨海默病的预防或治疗。
10. 自噬激活用组合物, 含有权利要求1~9的任一项所述的自噬激活剂和药学上可接受的载体。
11. 根据权利要求10所述的自噬激活用组合物, 所述生育酚磷酸酯或其盐的合计含量相对于自噬激活用组合物的总量为0.01~10质量%。

自噬激活剂

技术领域

[0001] 本发明涉及自噬激活剂和自噬激活用组合物。

[0002] 本申请基于2020年9月17日在日本提出了申请的日本特愿2020-156458号主张优先权,将其内容引用到本说明书中。

背景技术

[0003] 自噬 (autophagy) 是应答饥饿、生长因子缺乏、和病原体感染等细胞外或细胞内的胁迫和信号,通过分解老化或受到损伤的细胞内物质和细胞器,从而进行能量的再生产和损伤物质的除去的机制,对于正常细胞的稳态维持是重要的。由过去的研究报告了,老化越进展则细胞内的自噬活性越急剧减少(非专利文献1)。另外,在抑制了自噬的情况下,老化线粒体、错误折叠的蛋白质等在细胞内过度蓄积,细胞内的氧化胁迫增加,从而细胞死亡被诱导,作为结果细胞衰老。

[0004] 因此,通过激活分解细胞内的老化的物质和细胞器、再循环其分解产物的自噬,能够通过迅速除去细胞内的废弃物而提高细胞的稳态。

[0005] 另一方面,作为老化对自噬的影响,已知在人脑中随着年龄增长而ATG5基因、ATG7基因、和Beclin 1基因的表达量降低。另外,认为在阿尔茨海默病等神经变性疾病中自噬的活性降低。因此,已知自噬的激活有助于阿尔茨海默病、以及亨廷顿病、帕金森病等神经变性疾病的治疗和预防(非专利文献2、3)。特别是在阿尔茨海默病中自噬的功能被阻碍,因而被称为 β -淀粉样蛋白的凝集蛋白质在生物体内蓄积,据说这与发病相关(非专利文献4)。另外,据说自噬相关基因、参与选择性自噬的基因的突变对于作为伴随着脑的黑质和苍白球中的铁沉积和大脑萎缩的神经变性疾病的SENDA病 (SENDA:static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (儿童期静态性脑病成年期神经变性))、作为在消化道引起严重的炎症或溃疡的炎症性肠疾病的克罗恩病、和癌也有影响(非专利文献6)。

[0006] 自噬的过程被在酵母和哺乳类的双方中进行了研究,最大36种蛋白质被利用。其中从自噬体的形成到其内容物的分化被由自噬相关基因(ATG)编码的Atg蛋白质控制,可以分为包含Atg12-Atg5结合系统、LC3-Phosphatidyl Ethanolamine (LC3-磷脂酰乙醇胺, PE)结合系统在内的6组,分别在各过程中阶段性地发挥作用。

[0007] 另一方面,自噬在稳定状态下被抑制在低水平,但在饥饿等胁迫下被激活。已知mTOR(哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, mammalian target of rapamycin)在由酵母到哺乳类中作为自噬的主要抑制因子发挥作用,但在饥饿条件下, mTOR被钝化而自噬被诱导(非专利文献5)。

[0008] 作为自噬激活剂,报告了增加了作为自噬的活性状态的标志物的LC3相关的因子而激活自噬的化合物、和促进自噬通量(包括自噬体向溶酶体的融合)的化合物(专利文献1~4)。

[0009] 专利文献

- [0010] 专利文献1:国际公开第2018/173653号
- [0011] 专利文献2:日本特开2018-80204号公报
- [0012] 专利文献3:日本特表2018-510902号公报
- [0013] 专利文献4:日本特表2019-529514号公报
- [0014] 非专利文献
- [0015] 非专利文献1:Yogendra S.Rajawat et al., Aging: Central role for autophagy and the lysosomal degradative system. Ageing Research Reviews 8 (2009) 199-213.
- [0016] 非专利文献2:Aaron Barnett et al., Autophagy in Aging and Alzheimer's Disease: Pathologic or Protective?. J Alzheimers Dis. 2011; 25(3): 385-394.
- [0017] 非专利文献3:Marta M.Lipinski et al., Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2010, 107, 14164-14169.
- [0018] 非专利文献4:Xiangqing Li et al., Cubeben induces autophagy via PI3K-AKT-mTOR pathway to protect primary neurons against amyloid beta in Alzheimer's disease. Cytotechnology (2019) 71: 679-686.
- [0019] 非专利文献5:猪俣等, “オートファジーと老化の関連性(自噬与衰老的相关性)”, 岐歯学誌, 2018年, 第45卷, 第1号, 1-7
- [0020] 非专利文献6:荫山等, “オートファジーと疾患(自噬与疾病)”, 領域融合レビュー(領域融合综述), 2014年, 3, e006

发明内容

- [0021] 发明要解决的课题
- [0022] 如上所述, 已知在阿尔茨海默病等各种疾病中自噬功能降低, 要求能够有效地激活自噬的药剂。然而, 可以说现有已知的药剂其效果尚不充分。
- [0023] 因此, 本发明的目的是提供能够有效地激活自噬的自噬激活剂、和含有所述自噬激活剂的自噬激活用组合物。
- [0024] 用于解决课题的手段
- [0025] 本发明包含以下方案。
- [0026] [1] 自噬激活剂, 含有生育酚磷酸酯或其盐作为有效成分。
- [0027] [2] 根据[1]所述的自噬激活剂, 所述生育酚磷酸酯或其盐是选自 α -生育酚磷酸酯和 γ -生育酚磷酸酯中的至少一种生育酚磷酸酯或其盐。
- [0028] [3] 根据[1]或[2]所述的自噬激活剂, 含有所述生育酚磷酸酯的盐作为有效成分, 所述生育酚磷酸酯的盐是生育酚磷酸酯的钠盐。
- [0029] [4] 根据[1]~[3]的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂促进LC3基因的表达。
- [0030] [5] 根据[1]~[4]的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂促进ATG5基因的表达。
- [0031] [6] 根据[1]~[5]的任一项所述的自噬激活剂, 该自噬激活剂促进ATG7基因的表达。

达。

[0032] [7]根据[1]~[6]的任一项所述的自噬激活剂,该自噬激活剂促进Beclin 1基因的表达。

[0033] [8]根据[1]~[7]的任一项所述的自噬激活剂,该自噬激活剂抑制mTOR基因的表达。

[0034] [9]根据[1]~[8]的任一项所述的自噬激活剂,该自噬激活剂用于阿尔茨海默病的预防或治疗。

[0035] [10]自噬激活用组合物,含有[1]~[9]的任一项所述的自噬激活剂和药学上可接受的载体。

[0036] [11]根据[10]所述的自噬激活用组合物,所述生育酚磷酸酯或其盐的合计含量相对于自噬激活用组合物的总量为0.01~10质量%。

[0037] 发明的效果

[0038] 根据本发明,可以提供能够有效地激活自噬的自噬激活剂、和含有所述自噬激活剂的自噬激活用组合物。

具体实施方式

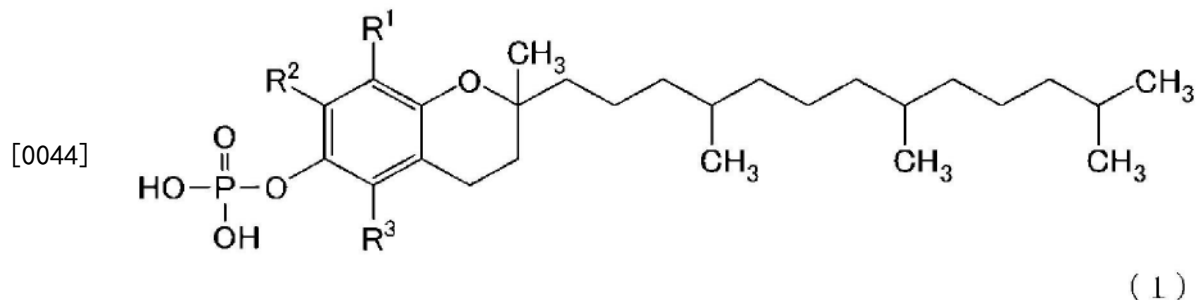
[0039] (自噬激活剂)

[0040] 在一个实施方式中,本发明提供含有生育酚磷酸酯或其盐作为有效成分的自噬激活剂。

[0041] 这里所谓“自噬 (autophagy)”,是通过分解老化或受到损伤的细胞内物质和细胞器而进行能量的再生产和损伤物质的除去的机制。

[0042] 本实施方式的自噬激活剂能够促进作为自噬标志物的LC3基因、以及自噬体所包含的ATG5基因、ATG7基因、和Beclin 1基因的表达,能够激活自噬。另外,通过抑制作为自噬的抑制因子发挥作用的mTOR基因的表达,能够激活自噬。

[0043] 本实施方式的自噬激活剂只要包含生育酚磷酸酯或其盐作为有效成分就不特别限定。作为在本实施方式的自噬激活剂中使用的生育酚磷酸酯,可列举下述通式(1)所示的化合物。



[0045] [式中, R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地表示氢原子或甲基。]

[0046] 生育酚磷酸酯根据上述通式(1)中的 R^1 、 R^2 、 R^3 不同,存在 α -生育酚磷酸酯(R^1 、 R^2 、 $R^3 = CH_3$)、 β -生育酚磷酸酯(R^1 、 $R^3 = CH_3$ 、 $R^2 = H$)、 γ -生育酚磷酸酯(R^1 、 $R^2 = CH_3$ 、 $R^3 = H$)、 δ -生育酚磷酸酯($R^1 = CH_3$ 、 R^2 、 $R^3 = H$)、 ζ_2 -生育酚磷酸酯(R^2 、 $R^3 = CH_3$ 、 $R^1 = H$)、 η -生育酚磷酸酯($R^2 = CH_3$ 、 R^1 、 $R^3 = H$)等。

[0047] 生育酚磷酸酯不特别限定,可以是这些生育酚磷酸酯的任意种。其中,优选 α -生育酚磷酸酯和 γ -生育酚磷酸酯,更优选 α -生育酚磷酸酯。

[0048] 上述通式(1)所示的化合物由于在2,3-二氢苯并吡喃环的2位具有手性碳原子,因此存在d-型异构体和l-型异构体的立体异构体、以及d1-体。生育酚磷酸酯可以是这些立体异构体的任意种,但优选d1-体。

[0049] 在上述之中,作为生育酚磷酸酯,优选d1- α -生育酚磷酸酯和d1- γ -生育酚磷酸酯,更优选d1- α -生育酚磷酸酯。

[0050] 生育酚磷酸酯的盐不特别限定,可列举例如,与无机碱的盐、与有机碱的盐等。

[0051] 作为与无机碱的盐,可列举例如,钠盐、钾盐等碱金属盐;钙盐、镁盐等碱土金属盐;铝盐;铵盐;锌盐等。

[0052] 作为与有机碱的盐,可列举例如,烷基铵盐、与碱性氨基酸的盐等。

[0053] 在上述之中,作为生育酚磷酸酯的盐,优选碱金属盐,更优选钠盐。生育酚磷酸酯的碱金属盐、特别是钠盐具有对水的溶解性高、另外性状为粉末因而操作容易这样的优点。

[0054] 作为生育酚磷酸酯的优选形态,可列举上述通式(1)所示的化合物的碱金属盐(例如,钠盐)、 α -生育酚磷酸酯的碱金属盐(例如,钠盐)、 γ -生育酚磷酸酯的碱金属盐(例如,钠盐)、d1- α -生育酚磷酸酯的碱金属盐(例如,钠盐)、d1- γ -生育酚磷酸酯的碱金属盐(例如,钠盐)等。

[0055] 在生育酚磷酸酯的碱金属盐之中,优选 α -生育酚磷酸酯的钠盐和 γ -生育酚磷酸酯的钠盐,更优选 α -生育酚磷酸酯的钠盐。

[0056] d1- α -生育酚磷酸酯的钠盐以TPNa(注册商标)(标示名称:生育酚磷酸Na)的制品名由昭和电工市售。所述TPNa作为生育酚磷酸酯的优选例例示。

[0057] 本实施方式的自噬激活剂可以单独使用选自生育酚磷酸酯和其盐的1种,也可以联合使用2种以上。本实施方式的自噬激活剂优选包含生育酚磷酸酯的盐,更优选单独使用生育酚磷酸酯的碱金属盐(例如,钠盐)。

[0058] 生育酚磷酸酯或其盐可以通过公知的制造方法制造。生育酚磷酸酯或其盐可以通过例如日本特开昭59-44375号公报、国际公开公报第97/14705号等所记载的方法制造。

[0059] 例如,可以使三氯氧磷等磷酸化剂作用于溶解在溶剂中的生育酚,在反应结束之后通过适当纯化而获得生育酚磷酸酯。进而,通过将所得的生育酚磷酸酯用氧化镁等金属氧化物、氢氧化钠等金属氢氧化物、或氢氧化铵、氢氧化烷基铵等中和,从而获得生育酚磷酸酯的盐。生育酚磷酸酯或其盐的制造方法不限于上述方法。

[0060] 以下,有时将生育酚磷酸酯和其盐归纳记载为“生育酚磷酸酯等”。

[0061] 本实施方式的自噬激活剂可以以阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病等神经变性疾病的治疗为目的,将其自身对患者施与而使用。另外,本实施方式的自噬激活剂也可以以激活自噬为目的混配到药品、化妆品中而使用。另外,可以混配到后述的自噬激活用组合物中而使用。

[0062] 本实施方式的自噬激活剂能够通过促进LC3基因的表达而有效地激活自噬。

[0063] 本实施方式的自噬激活剂能够通过促进ATG5基因的表达而有效地激活自噬。

[0064] 本实施方式的自噬激活剂能够通过促进ATG7基因的表达而有效地激活自噬。

[0065] 本实施方式的自噬激活剂能够通过促进Beclin 1基因的表达而有效地激活自噬。

- [0066] 本实施方式的自噬激活剂能够通过抑制mTOR基因的表达而有效地激活自噬。
- [0067] 因为本实施方式的自噬激活剂能够有效地激活自噬,所以能够在阿尔茨海默病的预防或治疗中使用。
- [0068] 已知 β -淀粉样蛋白引起神经细胞中的自噬的降低。另外,已知 β -淀粉样蛋白诱导自噬的降低并由此诱导神经细胞的被称为细胞凋亡的细胞死亡。
- [0069] 本实施方式的自噬激活剂能够促进 β -淀粉样蛋白存在下的LC3基因表达。
- [0070] 本实施方式的自噬激活剂能够促进 β -淀粉样蛋白存在下的ATG5基因表达。
- [0071] 本实施方式的自噬激活剂能够促进 β -淀粉样蛋白存在下的ATG7基因表达。
- [0072] 本实施方式的自噬激活剂能够抑制 β -淀粉样蛋白存在下的细胞凋亡。
- [0073] 本实施方式的自噬激活剂特别是能够在神经细胞中促进 β -淀粉样蛋白存在下的选自LC3基因、ATG5基因、和ATG7基因中的至少1种基因的表达。另外,本实施方式的自噬激活剂特别是能够在神经细胞中抑制 β -淀粉样蛋白存在下的细胞凋亡。
- [0074] 所谓在 β -淀粉样蛋白存在下促进LC3基因表达,是指在 β -淀粉样蛋白存在下,通过施与本实施方式的自噬激活剂,从而与不施与所述自噬激活剂的情况相比,LC3基因的表达量上升。对于ATG5基因和ATG7基因也是同样的。
- [0075] 所谓在 β -淀粉样蛋白存在下抑制细胞凋亡,是指在 β -淀粉样蛋白存在下,通过施与本实施方式的自噬激活剂,从而与不施与所述自噬激活剂的情况相比,细胞凋亡被抑制。
- [0076] LC3(microtubule associated protein 1 light chain 3 α) (微管关联蛋白1轻链3 α):NCBI Gene ID:84557) 在自噬的信号传导上游被添加磷脂酰乙醇胺,被转换为能被自噬体膜引诱的LC3-II,与自噬体膜结合。LC3被作为自噬体的标志物使用。作为人LC3基因的碱基序列,可列举例如,NCBI Reference Sequence数据库中登记的NM_032514.4、和NM_181509.3等。
- [0077] ATG5 (autophagy related 5 (自噬相关蛋白5):NCBI Gene ID:9474) 与ATG12结合,在泛素样共轭系统中作为E1样激活酶发挥功能。作为人ATG5基因的碱基序列,可列举例如,NCBI Reference Sequence数据库中登记的NM_001286106.1、NM_001286107.1、NM_001286108.1、NM_001286111.1、和NM_004849.4等。
- [0078] ATG7 (autophagy related 7 (自噬相关蛋白7):NCBI Gene ID:10533) 作为ATP依赖地激活LC3和ATG12的E1样激活酶发挥功能。作为人ATG7基因的碱基序列,可列举例如,NCBI Reference Sequence数据库中登记的NM_001136031.3、NM_001144912.2、NM_001349232.2、NM_001349233.2、NM_001349234.2等。
- [0079] Beclin 1 (NCBI Gene ID:8678) 与ATG14L、Vps34mp150一起形成Class III PI3K复合物,作为自噬体形成的正调控因子发挥功能。作为人Beclin 1基因的碱基序列,可列举例如,NCBI Reference Sequence数据库中登记的NM_001313998.2、NM_001313999.1、NM_001314000.1、和NM_003766.4等。
- [0080] mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase (哺乳动物雷帕霉素激酶靶蛋白):NCBI Gene ID:2475) 是磷脂酰肌醇激酶相关激酶的1种,介导对DNA损伤和营养缺乏等胁迫的细胞应答。mTOR作为自噬的抑制因子发挥功能。作为人mTOR基因的碱基序列,可列举例如,NCBI Reference Sequence数据库中登记的NM_004958.4等。
- [0081] 本实施方式的自噬激活剂可以施与阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病等神经变

性疾病的发病风险高的患者,为了预防阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病等神经变性疾病而使用。另外,本实施方式的自噬激活剂可以施与发病了阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病等神经变性疾病的患者,为了抑制神经变性疾病的进展、恶化而使用。

[0082] 本实施方式的自噬激活剂可以通过与后述的自噬激活用组合物同样的方法施与患者,既可以经口地施与,也可以非经口地施与,也可以施与静脉内、动脉内、肌肉内、皮内、皮下、腹腔内等,也可以制成栓剂进行直肠内施与,也可以制成皮肤外用剂施与皮肤。

[0083] (自噬激活用组合物)

[0084] 在一个实施方式中,本发明提供含有上述的自噬激活剂和药学上可接受的载体的自噬激活用组合物。

[0085] 本实施方式的自噬激活用组合物可以按照常规方法(例如,日本药局方记载的方法),通过将上述的自噬激活剂、药学上可接受的载体、和根据情况的其他成分混合而制剂化,从而制造。

[0086] 本说明书中,所谓“药学上可接受的载体”,是指不阻碍有效成分的生理活性、且对其施与对象不显示实质的毒性的载体。其中,所谓“不显示实质的毒性”是指该成分在通常使用的施与量下,对施与对象不显示毒性。作为药学上可接受的载体,不特别限制,可以列举赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、乳化剂、稳定剂、稀释剂、注射剂用溶剂、油性基剂、保湿剂、触感提高剂、表面活性剂、高分子、增稠/胶凝剂、溶剂、喷射剂、抗氧化剂、还原剂、氧化剂、螯合剂、酸、碱、粉体、无机盐、水、含金属化合物、不饱和单体、多元醇、高分子添加剂、辅助剂、湿润剂、增稠剂、增稠物质、油性原料、液态基质、脂溶性物质、高分子羧酸盐等。

[0087] 作为这些成分的具体例,可列举例如,国际公开公报第2016/076310号所记载的成分等。进而,作为高分子/增稠/胶凝剂的具体例,可列举甲基丙烯酸酐氧乙基磷酸胆碱、甲基丙烯酸丁酯或它们的聚合物等。药学上可接受的载体可以单独使用1种,也可以2种以上联合使用。

[0088] 另外,作为其他成分,不特别限制,可列举防腐剂、抗菌剂、紫外线吸收剂、美白剂、消炎剂、抗炎症剂、育发用药剂、血液循环促进剂、刺激剂、激素类、抗皱剂、抗老化剂、绷紧剂、冷感剂、温感剂、创伤治愈促进剂、刺激缓和剂、镇痛剂、细胞赋活剂、植物/动物/微生物提取物、种子油、镇痒剂、角质剥离/溶解剂、止汗剂、清凉剂、收敛剂、酶、核酸、香料、色素、着色剂、染料、颜料、消炎镇痛剂、抗真菌剂、抗组胺剂、催眠镇静剂、精神稳定剂、抗高血压剂、降压利尿剂、抗生素、麻醉剂、抗菌性物质、抗癫痫剂、冠状动脉扩张剂、生药、止痒剂、角质软化剥离剂、紫外线阻挡剂、防腐杀菌剂、抗氧化物质、pH调节剂、添加剂、金属皂等。作为这些成分的具体例,可列举例如,国际公开公报第2016/076310号所记载的成分等。进而,作为植物/动物/微生物提取物的具体例,可列举多肋稻槎菜花/叶/茎、茶叶等。作为种子油的具体例,可列举辣木种子油。作为香料的具体例,可列举紫苏醛。其他成分可以单独使用1种,也可以2种以上联合使用。

[0089] 本实施方式的自噬激活用组合物可以含有治疗有效量的所述自噬激活剂。所谓“治疗有效量”是指为了患者的疾病的治疗或预防而有效的药剂的量。治疗有效量可以根据施与对象的疾病的状态、年龄、性别、和体重等而变动。

[0090] 在本实施方式的自噬激活用组合物中,上述的自噬激活剂的治疗有效量可以是生育酚磷酸酯等能够激活自噬的量。另外,上述自噬激活剂的治疗有效量可以是生育酚磷酸

酯等能够促进选自LC3基因、ATG5基因、ATG7基因、和Beclin 1基因中的至少1种基因的表达的量。或者,可以是生育酚磷酸酯等能够抑制作为自噬抑制因子的mTOR基因的表达的量。另外,上述自噬激活剂的治疗有效量可以是生育酚磷酸酯等能够在 β -淀粉样蛋白存在下抑制细胞凋亡的量。关于本实施方式的自噬激活用组合物中的所述自噬激活剂的治疗有效量,生育酚磷酸酯或其盐的合计含量相对于自噬激活用组合物的总量可以为例如0.01~10质量%,也可以为例如0.1~10质量%,也可以为例如0.1~5质量%,也可以为例如0.1~3质量%,也可以为例如0.1~2质量%,也可以为例如0.3~2质量%,也可以为例如0.6~1.5质量%。

[0091] 上述的生育酚磷酸酯等在自噬激活用组合物中的含量,在单独使用1种生育酚磷酸酯等的情况下是指该化合物的含量,在组合使用2种以上生育酚磷酸酯等的情况下是指这些化合物的合计含量。

[0092] 本实施方式的自噬激活用组合物既可以是药物组合物,也可以是化妆料。

[0093] (药物组合物)

[0094] 在一个实施方式中,本发明提供含有上述的自噬激活剂和药学上可接受的载体的自噬激活用药物组合物。

[0095] 在本实施方式的药物组合物中,作为药学上可接受的载体,没有特别限制,除了上述举出的以外还可以使用一般使用于药品的载体。例如,可以使用日本药局方、日本药局方外医药品规格、医药品添加物规格2013(药事日报社,2013年)、医药品添加物辞典2016(日本医药品添加剂协会编,药事日报社,2016年)、Handbook of Pharmaceutical Excipients第7版(Pharmaceutical Press,2012年)等所记载的一般原料。药学上可接受的载体可以单独使用1种,也可以2种以上联合使用。

[0096] 本实施方式的药物组合物除了所述自噬激活剂和药学上可接受的载体以外,还可以含有其他成分。作为其他成分,没有特别限制,可以使用一般的药品添加物。另外,作为其他成分,也可以使用除上述的自噬激活剂以外的活性成分。作为其他成分即药品添加物和活性成分,除了上述举出的成分以外,还可以使用例如,日本药局方、日本药局方外医药品规格、医药品添加物规格2013(药事日报社,2013年)、医药品添加物辞典2016(日本医药品添加剂协会编,药事日报社,2016年)、Handbook of Pharmaceutical Excipients第7版(Pharmaceutical Press,2012年)等所记载的一般原料。其他成分可以单独使用1种,也可以2种以上联合使用。

[0097] 作为本实施方式的药物组合物的剂型,没有特别限制,可以为作为药品制剂而一般使用的剂型。可举出例如,片剂、包衣片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、水溶剂、悬浮剂、乳剂等经口施与的剂型;和注射剂、栓剂、皮肤外用剂等非经口施与的剂型等。这些剂型的药物组合物可以按照通用方法(例如,日本药局方记载的方法)进行制剂化。

[0098] 本实施方式的药物组合物的施与方法没有特别限制,可以通过作为药品的施与方法而一般使用的方法施与。例如,可以作为片剂、包衣片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、水溶剂、悬浮剂、乳剂等而经口施与,也可以作为注射剂、输液制剂等单独或与葡萄糖液、林格液等一般的输液混合向静脉内、动脉内、肌肉内、皮内、皮下、腹腔内等施与,可以作为栓剂进行直肠内施与,也可以作为皮肤外用剂向皮肤施与。

[0099] 本实施方式的药物组合物的施与量可以为治疗有效量。治疗有效量只要根据患者

的症状、体重、年龄、和性别等、以及药物组合物的剂型、和施与方法等而适当决定即可。例如,关于本实施方式的药物组合物的施与量,可以例示在经口施与的情况下作为生育酚磷酸酯等每施与单位形态为0.01~500mg,在注射剂的情况下作为生育酚磷酸酯等每施与单位形态为0.02~250mg,在栓剂的情况下作为生育酚磷酸酯等每施与单位形态为0.01~500mg等。另外,在皮肤外用剂的情况下,可以例示例如,作为生育酚磷酸酯等每施与单位形态为0.15~500mg,可以为例如0.15~300mg,可以为例如0.15~200mg,可以为例如0.2~100mg。

[0100] 本实施方式的药物组合物的施与间隔只要根据患者的症状、体重、年龄、和性别等、以及药物组合物的剂型、和施与方法等而适当决定即可。例如,可以为1天1次或2~3次左右等。

[0101] 本实施方式的药物组合物可以用于由自噬活性的降低引起的疾病的治疗或预防。作为这样的疾病,可列举例如,阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、SENDA病等神经变性疾病;克罗恩病等炎症性肠疾病;和癌等。

[0102] 本实施方式的药物组合物例如,可以对阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、SENDA病等神经变性疾病;克罗恩病等炎症性肠疾病;或癌的患者施与,用于抑制神经变性疾病、炎症性肠疾病、或癌的进展。另外,本实施方式的药物组合物可以对阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、SENDA病等神经变性疾病;克罗恩病等炎症性肠疾病;或癌的患者施与,用于治疗神经变性疾病、炎症性肠疾病、或癌。另外,本实施方式的药物组合物可以用于治疗由 β -淀粉样蛋白引起的疾病。另外,本实施方式的药物组合物可以用于治疗由LC3基因、ATG5基因、ATG7基因、或Beclin1基因的表达量降低引起的疾病。另外,本实施方式的药物组合物可以用于治疗由mTOR的表达量上升引起的疾病。

[0103] 本实施方式的药物组合物在上述之中,特别适合用于治疗阿尔茨海默病。

[0104] 本实施方式的药物组合物可以对阿尔茨海默病、以及亨廷顿病、帕金森病、SENDA病等神经变性疾病的发病风险高的患者施与,用于预防神经变性疾病。另外,本实施方式的药物组合物也可以对克罗恩病等炎症性肠疾病的发病风险高的患者施与,用于预防炎症性肠疾病。另外,本实施方式的药物组合物也可以对癌的发病风险高的患者施与,用于预防癌。

[0105] (化妆料)

[0106] 在一个实施方式中,本发明提供含有上述的自噬激活剂和药学上可接受的载体的用于自噬激活的化妆料。

[0107] 在本实施方式的化妆料中,作为药学上可接受的载体,没有特别限制,除了上述举出的以外,还可以使用一般使用于化妆料的载体。可以使用例如,化妆品原料基准第二版注解(日本公定书协会编,药事日报社,1984年)、化妆品原料基准外成分规格(厚生省药务局审查课监修,药事日报社,1993年)、化妆品原料基准外成分规格追补(厚生省药务局审查课监修,药事日报社,1993年)、化妆品种别许可基准(厚生省药务局审查课监修,药事日报社,1993年)、化妆品原料辞典(日光ケミカルズ社,平成3年)、CTFA的International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook 2002第9版Vol.1~4等所记载的一般原料。药学上可接受的载体可以单独使用1种,也可以2种以上联合使用。

[0108] 本实施方式的化妆料除了自噬激活剂和药学上可接受的载体以外,还可以含有其

他成分。作为其他成分,没有特别限制,可以使用一般的化妆品添加物。另外,作为其他成分,也可以使用除上述的自噬激活剂以外的活性成分。作为其他成分即化妆品添加物和活性成分,除了上述举出的以外,还可以使用例如,化妆品原料基准第二版注解(日本公定书协会编,药事日报社,1984年)、化妆品原料基准外成分规格(厚生省药务局审查课监修,药事日报社,1993年)、化妆品原料基准外成分规格追补(厚生省药务局审查课监修,药事日报社,1993年)、化妆品种别许可基准(厚生省药务局审查课监修,药事日报社,1993年)、化妆品原料辞典(日光ケミカルズ社,平成3年)、CTFA的International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook 2002第9版Vol.1~4等所记载的一般原料。其他成分可以单独使用1种,也可以2种以上联合使用。

[0109] 作为本实施方式的化妆料的形态,没有特别限制,可以为作为化妆料而一般使用的形态。可举出例如,香波、护发素、整发剂等毛发用化妆料;洗面奶、清洁剂、化妆水、乳液、洗剂、霜、凝胶、防晒剂、面膜(pack)、面膜(mask)、美容液等基础化妆料;粉底类、隔离霜、口红类、唇膏、腮红类等彩妆化妆料;身体洗涤剂、爽身粉、除臭化妆料等身体化妆料等。这些化妆料可以按照通用方法制造。

[0110] 另外,作为本实施方式的化妆料的剂型,没有特别限制,可举出例如,水包油(O/W)型、油包水(W/O)型、W/O/W型、O/W/O型等乳化型、乳化高分子型、油性、固体、液状、膏状、棒状、挥发性油型、粉状、冻状、凝胶状、糊状、乳霜状、片状、膜状、雾状、喷射型、气溶胶状、多层状、泡状、薄片(flake)状等。

[0111] 本实施方式的化妆料的使用量不特别限制,可以为为了激活自噬而有效的量。例如,本实施方式的化妆料的使用量可以例示作为生育酚磷酸酯等的量每1次使用0.15~500mg,可以为例如0.15~300mg,可以为例如0.15~200mg,可以为例如0.2~100mg。

[0112] 本实施方式的化妆料的使用间隔不特别限制,例如可以为1天1次或2~3次左右等。

[0113] 本实施方式的化妆料可以用于缓和由自噬活性的降低引起的症状。或者,可以为了预防由自噬活性的降低引起的症状的发病,而对这些症状的发病风险高的受检者在更加日常的护肤、化妆中使用。

[0114] [其他实施方式]

[0115] 在一个实施方式中,本发明提供激活自噬的方法,包括将生育酚磷酸酯或其盐施与对象的工序。

[0116] 在一个实施方式中,本发明提供促进LC3基因、ATG5基因、ATG7基因、或Beclin 1基因的表达的方法,包括将生育酚磷酸酯或其盐施与对象的工序。

[0117] 在一个实施方式中,本发明提供抑制mTOR基因的表达的方法,包括将生育酚磷酸酯或其盐施与对象的工序。

[0118] 在一个实施方式中,本发明提供抑制 β -淀粉样蛋白存在下的细胞凋亡的方法,包括将生育酚磷酸酯或其盐施与对象的工序。

[0119] 在一个实施方式中,本发明提供用于激活自噬的生育酚磷酸酯或其盐。

[0120] 在一个实施方式中,本发明提供用于促进LC3基因、ATG5基因、ATG7基因、或Beclin 1基因的表达的生育酚磷酸酯或其盐。

[0121] 在一个实施方式中,本发明提供用于抑制mTOR基因的表达的生育酚磷酸酯或其

盐。

[0122] 在一个实施方式中,本发明提供用于抑制 β -淀粉样蛋白存在下的细胞凋亡的生育酚磷酸酯或其盐。

[0123] 在一个实施方式中,本发明提供用于预防或治疗阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、SENDA病、克罗恩病、或癌的生育酚磷酸酯或其盐。

[0124] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐的用于制造自噬激活剂的用途。

[0125] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造LC3基因、ATG5基因、ATG7基因、或Beclin 1基因表达的促进剂的用途。

[0126] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造mTOR基因表达的抑制剂的用途。

[0127] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造 β -淀粉样蛋白存在下的LC3基因、ATG5基因、或ATG7基因表达的促进剂的用途。

[0128] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造 β -淀粉样蛋白存在下的细胞凋亡的抑制剂的用途。

[0129] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造自噬激活用组合物的用途。

[0130] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造LC3基因、ATG5基因、ATG7基因、或Beclin 1基因表达的促进用组合物的用途。

[0131] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造mTOR基因表达的抑制用组合物的用途。

[0132] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造 β -淀粉样蛋白存在下的LC3基因、ATG5基因、或ATG7基因表达的促进用组合物的用途。

[0133] 在一个实施方式中,本发明提供生育酚磷酸酯或其盐用于制造 β -淀粉样蛋白存在下的细胞凋亡的抑制用组合物的用途。

[0134] 实施例

[0135] 以下,基于实施例更具体地说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0136] [生育酚类]

[0137] 在以下的实施例和处方例中,使用下述的生育酚磷酸酯的钠盐。

[0138] α -TPNa:d1- α -生育酚磷酸钠(表示名称:生育酚磷酸Na、制品名:TPNa(注册商标)、昭和电工社制)

[0139] γ -TPNa:d1- γ -生育酚磷酸钠(昭和电工社制)

[0140] α -TPNa溶液:将 α -TPNa溶解于0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0141] γ -TPNa溶液:将 γ -TPNa溶解于0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0142] 在以下的比较例中,使用下述的生育酚类。

[0143] 醋酸生育酚:エーザイ株式会社制

[0144] α -生育酚:Sigma-Aldrich社制

[0145] γ -生育酚:Sigma-Aldrich社制

[0146] 醋酸生育酚溶液:将醋酸生育酚溶解于0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0147] α -生育酚溶液:将 α -生育酚溶解于0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0148] γ -生育酚溶液:将 γ -生育酚溶解于0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0149] <人老化成纤维细胞中的LC3基因、ATG5基因、ATG7基因、Beclin1基因的表达促进效果的评价>

[0150] 为了制作人工地诱发了老化的细胞,使用成纤维细胞进行了试验。老化成纤维细胞通过以下的步骤制作。

[0151] (老化成纤维细胞的制作)

[0152] 在添加了10%胎牛血清(MP Biomedicals社制)的D-MEM培养基(Sigma-Aldrich社制)中,将人正常成纤维细胞(NB1RGB;RIKEN BRCセルバンク制)培养至汇合。然后,用250 μ M过氧化氢水处理2小时,用添加了新的10%胎牛血清的D-MEM培养基培养24小时。将该利用过氧化氢水的处理和细胞培养的操作重复3次,将所得的成纤维细胞作为老化成纤维细胞。

[0153] (基因的表达促进效果的评价)

[0154] 将所制作的老化成纤维细胞以10000个/cm²的接种密度准备,用添加了10%胎牛血清(MP Biomedicals社制)的D-MEM培养基(Sigma-Aldrich社制)培养24小时。接着,在实施例1中,以 α -TPNa的终浓度为1 μ M的方式,在培养基中添加 α -TPNa溶液。在实施例2中,以 α -TPNa的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 α -TPNa溶液。在实施例3中,以 γ -TPNa的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 γ -TPNa溶液。在比较例2中,以醋酸生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加醋酸生育酚溶液。在比较例3中,以 α -生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 α -生育酚溶液。在比较例4中,以 γ -生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 γ -生育酚溶液。

[0155] 另外,在比较例1中,在培养基中仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0156] 接着,将各个培养基在24小时、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下进行培养。

[0157] 作为参考例1,将上述人正常成纤维细胞以10000个/cm²的接种密度准备,用添加了10%胎牛血清(MP Biomedicals社制)的D-MEM培养基(Sigma-Aldrich社制)培养24小时,在该培养基中仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液。接着,24小时、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下进行培养。

[0158] 然后,使用Nucleospin(注册商标)RNA试剂盒(タカラバイオ社制),从各例的老化成纤维细胞、或人正常成纤维细胞提取RNA,由所得的RNA合成cDNA。接着,以该cDNA为模板,通过实时定量PCR,分别使用对LC3基因、ATG5基因、ATG7基因和Beclin 1基因特异的引物(タカラバイオ社制),将各基因的表达量进行定量。

[0159] 作为内标基因,将通过化合物添加而表达观察不到变动的持家基因的GAPDH(引物;タカラバイオ社制)的表达量进行定量,通过其值将各基因的表达量标准化。关于上述各例中的基因表达量,求出以比较例1中的各基因的表达量分别作为1.00时的相对基因表达量。将其结果示于表1。

	自噬激活剂或乙醇水溶液	细胞	相对基因表达量			
			LC3	ATG5	ATG7	Beclin1
[0160] 参考例1	0.05% (V/V) 乙醇水溶液	正常成纤维细胞	8.13	1.12	1.29	0.93
比较例1	0.05% (V/V) 乙醇水溶液	老化成纤维细胞	1.00	1.00	1.00	1.00
实施例1	1 μ M α -TPNa		1658.65	2.04	1.10	1.08
实施例2	10 μ M α -TPNa		1044.58	1.58	1.23	1.28
实施例3	10 μ M γ -TPNa		1274.13	1.55	1.76	1.01
比较例2	10 μ M 醋酸生育酚		0.06	1.68	0.68	1.01
比较例3	10 μ M α -生育酚		0.12	1.54	0.34	0.89
比较例4	10 μ M γ -生育酚		2.51	0.99	1.13	0.26

[0161] 如表1所示,在参考例1和比较例1中,在分别仅添加了0.05% (V/V) 乙醇水溶液而培养了的人正常成纤维细胞和老化成纤维细胞之间,比较例1的老化成纤维细胞的LC3基因、ATG5基因、ATG7基因、和Beclin 1基因的表达量降低,或者基本不变。

[0162] 另外,实施例1和2的添加 α -TPNa而培养了的老化成纤维细胞、以及实施例3的添加 γ -TPNa而培养了的老化成纤维细胞,相比于比较例1,能够确认LC3基因、ATG5基因、ATG7基因和Beclin 1基因的表达促进效果。进而与添加现有利用的比较例2的醋酸生育酚而培养了的老化成纤维细胞相比也能够确认高的表达促进效果。

[0163] 与参考例1的人正常成纤维细胞相比,比较例1的老化成纤维细胞中能够观察到LC3基因的表达降低,但实施例1~3的添加生育酚磷酸酯盐而培养了的老化成纤维细胞与参考例1的正常成纤维细胞相比LC3基因的表达量增加,能够确认LC3基因的优异的表达促进效果。另一方面,比较例2~3的添加醋酸生育酚或 α -生育酚而培养了的老化成纤维细胞中观察不到LC3基因的表达促进效果,比较例4的添加 γ -生育酚而培养了的老化成纤维细胞中LC3基因的表达促进效果微小。

[0164] 另外,与参考例1的人正常成纤维细胞相比,比较例1的老化成纤维细胞中ATG5基因和ATG7基因的表达量降低,但实施例1~3的添加生育酚磷酸酯盐而培养了的老化成纤维细胞中,与比较例1的老化成纤维细胞相比ATG5基因和ATG7基因的表达被促进。进而,在实施例1~3的添加生育酚磷酸酯盐而培养了的老化成纤维细胞中,也能够确认Beclin 1基因的表达促进效果。

[0165] 即,实施例1~3的添加作为自噬激活剂的生育酚磷酸酯盐而培养了的老化成纤维细胞中,能够确认LC3基因、ATG5基因、ATG7基因和Beclin1基因的表达促进效果。

[0166] <人老化成纤维细胞中的mTOR基因的表达抑制效果的评价>

[0167] 将上述制作的老化成纤维细胞以10000个/cm²的接种密度准备,用添加了10%胎牛血清(MP Biomedicals社制)的D-MEM培养基(Sigma-Aldrich社制)培养24小时。接着,在实施例4中,以 α -TPNa的终浓度为1 μ M的方式,在培养基中添加 α -TPNa溶液。在实施例5中,以 α -TPNa的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 α -TPNa溶液。在实施例6中,以 γ -TPNa的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 γ -TPNa溶液。在比较例6中,以醋酸生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加醋酸生育酚溶液。在比较例7中,以 α -生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 α -生育酚溶液。在比较例8中,以 γ -生育酚的终浓度为10 μ M的方

式,在培养基中添加 γ -生育酚溶液。

[0168] 另外,比较例5中,在培养基中仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0169] 接着,将各个培养基在24小时、37°C、5%CO₂下进行培养。

[0170] 作为参考例2,将上述人正常成纤维细胞以10000个/cm²的接种密度准备,用添加了10%胎牛血清(MP Biomedicals社制)的D-MEM培养基(Sigma-Aldrich社制)培养24小时,在该培养基中仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液。接着,在24小时、37°C、5%CO₂下进行培养。

[0171] 然后,使用Nucleospin(注册商标)RNA试剂盒(タカラバイオ社制),从各例的老化成纤维细胞、或人正常成纤维细胞提取RNA,由所得的RNA合成cDNA。接着,以该cDNA为模板通过实时定量PCR,使用对mTOR基因特异的引物(タカラバイオ社制),将mTOR基因的表达量进行定量。

[0172] 作为内标基因,将通过化合物添加而基因表达观察不到变动的持家基因的GAPDH(引物;タカラバイオ社制)的表达量进行定量,通过其值将各基因的表达量标准化。关于上述各例中的基因表达量,求出以比较例5中的mTOR基因的表达量作为1.00时的相对基因表达量。将其结果示于表2。

[0173] 表2

	自噬激活剂或乙醇水溶液	细胞	相对基因表达量
			mTOR
参考例2	0.05% (V/V) 乙醇水溶液	正常成纤维细胞	0.96
比较例5	0.05% (V/V) 乙醇水溶液	老化成纤维细胞	1.00
实施例4	1 μ M α -TPNa		0.83
实施例5	10 μ M α -TPNa		0.55
实施例6	10 μ M γ -TPNa		0.74
比较例6	10 μ M 醋酸生育酚		1.06
比较例7	10 μ M α -生育酚	1.76	
比较例8	10 μ M γ -生育酚	1.92	

[0174] 如表2所示,在参考例2和比较例5中,在分别仅添加了0.05% (V/V) 乙醇水溶液的而培养了的人正常成纤维细胞和老化成纤维细胞之间,与参考例2的人正常成纤维细胞相比,比较例5的老化成纤维细胞观察到mTOR基因的表达增强。在实施例4和5的添加 α -TPNa而培养了的老化成纤维细胞、以及实施例6的添加 γ -TPNa而培养了的老化成纤维细胞中,与参考例2的正常成纤维细胞相比,mTOR基因的表达降低,能够确认mTOR基因的表达抑制效果。

[0175] 另一方面,比较例6的添加醋酸生育酚而培养了的老化成纤维细胞、比较例7的添加 α -生育酚而培养了的老化成纤维细胞、和比较例8的添加 γ -生育酚而培养了的老化成纤维细胞中,mTOR基因的表达量均与比较例5相比为同等以上,不能确认mTOR基因的表达抑制效果。

[0176] <人神经母细胞瘤中的LC3基因、ATG5基因和ATG7基因的表达促进效果的评价>

[0177] 通过以下的试验方法测定人神经母细胞瘤(SH-SY5Y;由ATCC获得)中的LC3基因、ATG5基因和ATG7基因的表达量,评价由生育酚磷酸酯盐产生的LC3基因、ATG5基因和ATG7基因的表达促进效果。

[0179] 在以下的实施例和比较例中,在各培养基中添加已知引起神经细胞中的自噬的降低的 β -淀粉样蛋白进行试验。

[0180] 将SH-SY5Y细胞以10000个/cm²的接种密度准备,用添加了10%胎牛血清(MP Biomedicals社制)的D-MEM/Ham's F-12培养基(Sigma-Aldrich社制)培养24小时。接着,在实施例7中,以 α -TPNa的终浓度为1 μ M的方式,在培养基中添加 α -TPNa溶液。在实施例8中,以 α -TPNa的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 α -TPNa溶液。在实施例9中,以 γ -TPNa的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 γ -TPNa溶液。

[0181] 在比较例10中,以醋酸生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加醋酸生育酚溶液。在比较例11中,以 α -生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 α -生育酚溶液。在比较例12中,以 γ -生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 γ -生育酚溶液。

[0182] 另外,在比较例9中,在培养基中仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0183] 接着,调制将 β -淀粉样蛋白(Sigma-Aldrich社制)溶解于0.01% (V/V) DMSO水溶液而得的 β -淀粉样蛋白溶液,以各培养基中的 β -淀粉样蛋白的终浓度为20 μ M的方式,在各培养基中添加该 β -淀粉样蛋白溶液。

[0184] 此外,在参考例3中仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液,不添加 β -淀粉样蛋白溶液。

[0185] 接着,将各个培养基在48小时、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下进行培养。

[0186] 然后,使用Nucleospin(注册商标)RNA试剂盒(タカラバイオ社制),由各例的SH-SY5Y细胞提取RNA,由所得的RNA合成cDNA。接着,以该cDNA为模板,通过实时定量PCR,分别使用对LC3基因、ATG5基因、和ATG7基因特异的引物(タカラバイオ社制),将各基因的表达量进行定量。

[0187] 作为内标基因,将通过化合物添加而基因表达观察不到变动的持家基因的GAPDH(引物;タカラバイオ社制)的表达量进行定量,通过其值将各基因的表达量标准化。关于上述各例中的基因表达量,求出以参考例3中的各基因的表达量分别作为1.00时的相对基因表达量。将其结果示于表3。

[0188] 表3

	自噬激活剂或乙醇水溶液	β -淀粉样蛋白	相对基因表达量		
			LC3	ATG5	ATG7
参考例3	0.05% (V/V)乙醇水溶液	无	1.00	1.00	1.00
比较例9	0.05% (V/V)乙醇水溶液	有	0.56	0.45	0.76
实施例7	1 μ M α -TPNa		0.98	1.24	1.08
实施例8	10 μ M α -TPNa		1.32	2.56	3.29
实施例9	10 μ M γ -TPNa		1.41	1.36	1.01
比较例10	10 μ M 醋酸生育酚		0.67	0.48	0.68
比较例11	10 μ M α -生育酚		0.47	0.23	0.55
比较例12	10 μ M γ -生育酚		0.71	0.79	0.61

[0190] 如表3所示,在参考例3和比较例9中,与仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液、未添加 β -淀粉样蛋白的参考例3的SH-SY5Y细胞相比,在进一步添加 β -淀粉样蛋白而培养了的比较例9的SH-SY5Y细胞中,观察到LC3基因的表达降低。在实施例7~9的添加作为自噬激活剂的生育酚磷酸酯盐而培养了的SH-SY5Y细胞中,与比较例9的SH-SY5Y细胞相比,LC3基因的表达量高,确认了由生育酚磷酸酯盐产生的LC3基因的表达促进效果。另一方面,比较例10~12

的添加醋酸生育酚、 α -生育酚、或 γ -生育酚而培养了的SH-SY5Y细胞中,与比较例9相比,不能确认LC3基因表达的显著增加。

[0191] 另外,与未添加 β -淀粉样蛋白的参考例3的SH-SY5Y细胞相比,进一步添加 β -淀粉样蛋白而培养了的比较例9的SH-SY5Y细胞中,观察到ATG5基因和ATG7基因的表达降低。在实施例7~9的添加作为自噬激活剂的生育酚磷酸酯盐而培养了的SH-SY5Y细胞中,与比较例9的SH-SY5Y细胞相比,ATG5基因和ATG7基因的表达量均增加,确认了生育酚磷酸酯盐的ATG5基因和ATG7基因的表达促进效果。另一方面,比较例10~12的添加醋酸生育酚、 α -生育酚、或 γ -生育酚而培养了的SH-SY5Y细胞中,与比较例9相比,不能确认ATG5基因和ATG7基因的表达量的显著增加。

[0192] <人神经母细胞瘤中的由 β -淀粉样蛋白引起的细胞凋亡的抑制作用的评价>

[0193] 通过下述的试验方法测定生育酚磷酸酯盐存在下的人神经母细胞瘤(SH-SY5Y;从ATCC获得)中的凋亡细胞的比例,评价由生育酚磷酸酯盐产生的细胞凋亡的抑制作用。

[0194] 以下的实施例和比较例中,各培养基中添加已知诱发自噬的降低和由此引起的神经细胞的被称为细胞凋亡的细胞死亡的 β -淀粉样蛋白进行试验。

[0195] 将SH-SY5Y细胞以50000个/cm²的接种密度准备,用添加了10%胎牛血清(MP Biomedicals社制)的D-MEM/Ham's F-12培养基(Sigma-Aldrich社制)培养24小时。接着,在实施例10中,以 α -TPNa的终浓度为1 μ M的方式,在培养基中添加 α -TPNa溶液。在实施例11中,以 α -TPNa的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 α -TPNa溶液。在实施例12中,以 γ -TPNa的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 γ -TPNa溶液。

[0196] 在比较例14中,以醋酸生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加醋酸生育酚溶液。在比较例15中,以 α -生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 α -生育酚溶液。在比较例16中,以 γ -生育酚的终浓度为10 μ M的方式,在培养基中添加 γ -生育酚溶液。

[0197] 另外,比较例13中,在培养基中仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液。

[0198] 接着,调制将 β -淀粉样蛋白(Sigma-Aldrich社制)溶解于0.01% (V/V) DMSO水溶液而得的 β -淀粉样蛋白溶液,以各培养基中的 β -淀粉样蛋白的终浓度为30 μ M的方式,在各培养基中添加该 β -淀粉样蛋白溶液。

[0199] 此外,在参考例4中仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液,不添加 β -淀粉样蛋白溶液。

[0200] 接着,将各个培养基在48小时、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下进行培养。

[0201] 然后,在除去了培养基的各SH-SY5Y细胞中添加10 μ M Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich社制)水溶液,在室温(25 $^{\circ}$ C)静置10分钟。除去溶液之后,将各SH-SY5Y细胞用磷酸缓冲液(PBS、和光纯药社制)洗涤,在荧光显微镜下测量由染色质凝聚引起的细胞凋亡样强的观察到Hoechst荧光的细胞数(Hoechst(+)细胞)。在为独立试验的4个实验中,测量各视野5000细胞以上,将该4个实验中的Hoechst(+)细胞的比例的平均值作为引起了细胞凋亡的细胞的比例。对于各例,计算出以参考例4中的凋亡细胞的比例作为1.00时的相对值,将其结果示于表4。

[0202] 表4

	自噬激活剂或乙醇水溶液	β -淀粉样蛋白	凋亡细胞的比例
[0203] 参考例4	0.05% (V/V) 乙醇水溶液	无	1.00
比较例13	0.05% (V/V) 乙醇水溶液	有	3.78
实施例10	1 μ M α -TPNa		2.54
实施例11	10 μ M α -TPNa		1.22
实施例12	10 μ M γ -TPNa		1.46
比较例14	10 μ M 醋酸生育酚		3.89
比较例15	10 μ M α -生育酚		4.09
比较例16	10 μ M γ -生育酚		3.76

[0204] 如表4所示,在参考例4和比较例13中,与仅添加0.05% (V/V) 乙醇水溶液、不添加 β -淀粉样蛋白的参考例4的SH-SY5Y细胞相比,进一步添加 β -淀粉样蛋白而培养了的比较例13的SH-SY5Y细胞中,能够确认凋亡细胞的比例增加。

[0205] 比较例14~16的添加醋酸生育酚、 α -生育酚、或 γ -生育酚而培养了的SH-SY5Y细胞中,与比较例13的SH-SY5Y细胞相比,能够确认凋亡细胞的比例的降低。

[0206] 另一方面,实施例10~12的添加作为自噬激活剂的生育酚磷酸酯盐而培养了的SH-SY5Y细胞中,与比较例13的SH-SY5Y细胞相比,能够确认凋亡细胞的比例降低。

[0207] [处方例]

[0208] 作为自噬激活用组合物,将外用剂的处方例1和2示于表5。

[0209] 表5

材料	处方例1 (质量%)	处方例2 (质量%)
α -TPNa	2.0	-
γ -TPNa	-	0.5
甘油	4.0	4.0
PG(丙二醇)	6.0	6.0
乙醇	3.0	3.0
苯氧乙醇	0.1	0.1
磷酸氢二钾	3.5	3.5
EDTA4Na	0.2	0.2
PEG(50) 氢化蓖麻油	0.5	0.5
水	80.7	82.2
合计	100.0	100.0

[0211] 以上说明了本发明的优选实施例,但本发明不限于这些实施例。在不脱离本发明的宗旨的范围内,可以进行构成的添加、省略、替换、和其他变更。本发明不受前述的说明限定,仅受权利要求的范围限定。

[0212] 产业可利用性

[0213] 通过本发明,提供能够有效地激活自噬的自噬激活剂、和含有所述自噬激活剂的自噬激活用组合物。