

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6464087号
(P6464087)

(45) 発行日 平成31年2月6日 (2019.2.6)

(24) 登録日 平成31年1月11日 (2019.1.11)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/724 (2006.01)	A 6 1 K 31/724
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06

請求項の数 6 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2015-532848 (P2015-532848)	(73) 特許権者	504179255
(86) (22) 出願日	平成26年8月18日 (2014.8.18)		国立大学法人 東京医科歯科大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/071553		東京都文京区湯島 1-5-45
(87) 国際公開番号	W02015/025815	(74) 代理人	100106297
(87) 国際公開日	平成27年2月26日 (2015.2.26)		弁理士 伊藤 克博
審査請求日	平成29年8月16日 (2017.8.16)	(72) 発明者	田村 篤志
(31) 優先権主張番号	特願2013-172994 (P2013-172994)		東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立
(32) 優先日	平成25年8月23日 (2013.8.23)		大学法人 東京医科歯科大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	由井 伸彦
			東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立
			大学法人 東京医科歯科大学内
		審査官	原口 美和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリロタキサン、及び医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンを含有し、

前記複数の環状分子が、β-シクロデキストリンであり、

前記β-シクロデキストリンの一級ヒドロキシル基がカルバミン酸エステルを介して置換基で修飾されてなり、

前記置換基が、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシエトキシエチル基、及びN，N-ジメチルアミノエチル基から選択されるいずれかであることを特徴とするライソゾーム病の治療または予防に用いるための医薬組成物。

【請求項 2】

細胞内分解性結合が、アセタール結合、ジスルフィド結合、及びエステル結合から選択されるいずれかである請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

線状分子が、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体、ポリプロピレングリコール、及びポリエチレングリコールのいずれかである請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

ライソゾーム病が、ゴーシェ病、ニーマン・ピック病A型、ニーマン・ピック病B型、ニーマン・ピック病C型、GM1 ガングリオシドーシス、GM2 ガングリオシドーシス、

10

20

ファバー病、ウォルマン病、及びファブリー病から選択されるいずれかである請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンであって、

前記線状分子は、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールの順に重合した共重合体であり、前記複数の環状分子がβ-シクロデキストリンであり、

前記β-シクロデキストリンの一級ヒドロキシル基がカルバミン酸エステルを介して置換基で修飾されてなり、

前記置換基が、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシエトキシエチル基、及びN，N-ジメチルアミノエチル基から選択されるいずれかであることを特徴とするポリロタキサン。

【請求項6】

細胞内分解性結合が、アセタール結合、ジスルフィド結合、及びエステル結合から選択されるいずれかである請求項5に記載のポリロタキサン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリロタキサンを含有する脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患に対する医薬組成物、及び新規ポリロタキサンに関する。

【背景技術】

【0002】

リソソーム中の分解酵素、あるいは膜輸送タンパク質の遺伝的な欠損乃至変異により、リソソーム内に脂質、糖質、コレステロールなどの蓄積が起こる疾患を総称してライソゾーム病と呼ぶ。日本では約30種類のライソゾーム病が特定疾患として指定されており、有効な治療法が少ないことが知られている。

例えば、前記ライソゾーム病の1つであるニーマン・ピック病C型（以下、「NPC病」と称することがある。）は、膜タンパク質であるNPC1の変異によりリソソームにコレステロール、脂質が蓄積する。前記NPC病は、幼児期より発症し、進行性の神経障害、肝脾腫等の症状を示し、10歳前後で死亡する症例の多い難治性代謝疾患である。

【0003】

近年、前記NPC病に対する治療薬として、シクロデキストリンの利用が期待されている。シクロデキストリンは環状の糖類であり、糖の繰り返し数に応じてα-シクロデキストリン（繰り返し数6）、β-シクロデキストリン（繰り返し数7）、γ-シクロデキストリン（繰り返し数8）と命名されている。各シクロデキストリンは空洞部に様々な化合物を包接することが知られており、特にβ-シクロデキストリンはコレステロールの包接能に優れることが知られている（例えば、非特許文献1参照）。近年、ヒドロキシプロピル基で修飾されたβ-シクロデキストリン（以下、「HP-β-CD」と称することがある）をNPC病患者由来細胞に対して作用させることで細胞内コレステロール量が減少することが明らかとなっている。さらに、NPC1欠損マウス（NPC1^{-/-}マウス）に対しHP-β-CDを投与することで、各組織のコレステロール蓄積量を減少させ、生存期間を延長することが見出されている（例えば、非特許文献2参照）。以上より、β-シクロデキストリンは細胞内に蓄積したコレステロールを減少させることが可能であることから、新たなNPC病治療薬として注目されている。特に米国では人道的使用が許可されており、2012年より前記NPC病治療のフェーズI試験が開始されていることから非常に期待度の高い薬剤であると考えられる。

【0004】

一方、シクロデキストリン（以下、「CD」と称することがある）は、分子量が1,000程度の低分子であるため、血中半減期が数十分間程度と短く、投与後速やかに腎排泄

10

20

30

40

50

されてしまうという問題や、細胞膜透過性が低いという問題がある（例えば、非特許文献3参照）。このため、十分な治療効果を得るためには、高濃度のCD（前記Npc1欠損マウスに対する投与量は4,000mg/kg）を頻回投与する必要がある（例えば、非特許文献2参照）。しかしながら、高濃度のCDは、溶血活性や組織障害性を示すため、高濃度での使用は正常組織の障害といった副作用が懸念される（例えば、非特許文献4参照）。そのため、ヒトに対して非侵襲的に十分な治療効果を得ることは困難だと考えられる。

【0005】

したがって、安全性が高く、優れたコレステロール除去作用を有し、ニーマン・ピック病C型を含むライソゾーム病に対する高い治療効果又は予防効果を有する医薬組成物の速やかな開発が強く求められているのが現状である。

10

【0006】

また、前記ライソゾーム病は、脂質等の代謝異常だけではなく、細胞のタンパク質分解機能であるオートファジーに異常があることも近年明らかになりつつある（例えば、非特許文献5参照）。オートファジーは細胞内で不要となったタンパク質やミトコンドリア等のオルガネラをリソゾームで分解するが、オートファジーの機能異常は細胞内への不要タンパク質の蓄積をもたらす。オートファジーの機能障害がライソゾーム病の病態に関連しているという指摘もされている。特に、NPC病では、細胞質中にオートファゴソームの蓄積を生じることが示されている（例えば、非特許文献6参照）。このようなオートファゴソームの蓄積は、本来オートリソゾームで分解される不要タンパク質やオルガネラが細胞質中に蓄積することを示唆している。

20

また、オートファジーによるタンパク質分解に異常がある他の疾患としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患が知られている（例えば、非特許文献7参照）。

【0007】

したがって、ライソゾーム病を含む、オートファジー機能異常に起因する疾患に対する高い治療効果又は予防効果を有する医薬組成物の速やかな開発も強く求められているのが現状である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0008】

【非特許文献1】M. E. Brewster et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 59 (7), 645-666 (2007)

【非特許文献2】B. Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (7), 2377-2382 (2009)

【非特許文献3】H. W. Frijlink et al. Pharm. Res. 7 (12), 1248-1252 (1990)

【非特許文献4】T. Irie et al. J. Pharm. Sci. 86 (2), 147-162 (1997)

【非特許文献5】A. P. Lieberman et al. Autophagy 8 (5), 719-730 (2012)

40

【非特許文献6】S. Ishibashi et al. J. Clin. Neurosci. 16 (7), 954-959 (2009)

【非特許文献7】A. M. Cuervo Trends Cell Biol. 14 (2), 70-77 (2004)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、安全性が高く、優れたコレステロール除去作用及び優れたオートリソゾームの形成

50

亢進作用の少なくともいずれかを有し、脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患に対する高い治療効果又は予防効果を有する医薬組成物、及び前記医薬組成物に好適に用いることができるポリロタキサンを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記課題を解決するための手段としては、以下のとおりである。即ち、

<1> 複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンを含有することを特徴とする脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患に対する医薬組成物である。

10

<2> 複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンであって、

前記線状分子は、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールの順に重合した共重合体であり、前記複数の環状分子が β -シクロデキストリンであることを特徴とするポリロタキサンである。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、前記従来における諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、安全性が高く、優れたコレステロール除去作用及び優れたオートリソソームの形成亢進作用の少なくともいずれかを有し、脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患に対する高い治療効果又は予防効果を有する医薬組成物、及び前記医薬組成物に好適に用いることができるポリロタキサンを提供することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、製造例1で得られたポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。横軸：ppm単位。

【図2】図2は、製造例2で得られたポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。横軸：ppm単位。

30

【図3】図3は、比較製造例1で得られたポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。横軸：ppm単位。

【図4】図4は、製造例3で得られたポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。横軸：ppm単位。

【図5】図5は、製造例4で得られたポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。横軸：ppm単位。

40

【図6】図6は、製造例5で得られたポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。横軸：ppm単位。

【図7】図7は、試験例1の溶血試験の結果を示すグラフである。

【図8A】図8Aは、試験例2において、細胞としてニーマン・ピック病C型患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料を添加しなかった場合の結果を示す図である。

【図8B】図8Bは、試験例2において、細胞としてニーマン・ピック病C型患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料としてHP- β -CDを添加した場合の結果を示す図である。

【図8C】図8Cは、試験例2において、細胞としてニーマン・ピック病C型患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料としてDM- β -CDを添加した場合の結果を示す図である。

50

【図 8 D】図 8 D は、試験例 2 において、細胞としてニーマン・ピック病 C 型患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料として H E - S S - P R X を添加した場合の結果を示す図である。

【図 8 E】図 8 E は、試験例 2 において、細胞としてニーマン・ピック病 C 型患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料として H E - a c e - P R X を添加した場合の結果を示す図である。

【図 8 F】図 8 F は、試験例 2 において、細胞としてニーマン・ピック病 C 型患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料として H E - P R X を添加した場合の結果を示す図である。

【図 8 G】図 8 G は、試験例 2 において、細胞として健常者由来皮膚線維芽細胞を用い、試料を添加しなかった場合の結果を示す図である。

10

【図 9】図 9 は、試験例 2 の細胞内のコレステロールの集積量の定量結果を示すグラフである。

【図 1 0】図 1 0 は、試験例 3 の細胞毒性の評価の結果を示すグラフである。

【図 1 1 A】図 1 1 A は、試験例 4 の蛍光顕微鏡像を示す図 - 1 (左側: F I T C 標識 H P - β - C D、右側: 抗 E E A 1 抗体) である。

【図 1 1 B】図 1 1 B は、試験例 4 の蛍光顕微鏡像を示す図 - 2 (左側: F I T C 標識 H E - S S - P R X、右側: 抗 E E A 1 抗体) である。

【図 1 1 C】図 1 1 C は、試験例 4 の蛍光顕微鏡像を示す図 - 3 (左側: F I T C 標識 H P - β - C D、右側: 抗 C D 6 3 抗体) である。

【図 1 1 D】図 1 1 D は、試験例 4 の蛍光顕微鏡像を示す図 - 4 (左側: F I T C 標識 H E - S S - P R X、右側: 抗 C D 6 3 抗体) である。

20

【図 1 1 E】図 1 1 E は、試験例 4 の蛍光顕微鏡像を示す図 - 5 (左側: F I T C 標識 H P - β - C D、右側: 抗 L A M P 1 抗体) である。

【図 1 1 F】図 1 1 F は、試験例 4 の蛍光顕微鏡像を示す図 - 6 (左側: F I T C 標識 H E - S S - P R X、右側: 抗 L A M P 1 抗体) である。

【図 1 2】図 1 2 は、試験例 4 の E E A 1、C D 6 3、又は L A M P 1 陽性小胞に対する F I T C 標識 H P - β - C D、F I T C 標識 H E - P R X の共局在率を求めた結果を示すグラフである。

【図 1 3】図 1 3 は、試験例 5 のコレステロールの除去作用の結果を示すグラフである。

【図 1 4】図 1 4 は、試験例 6 のコレステロールの除去作用の結果を示すグラフである。

30

【図 1 5 A】図 1 5 A は、試験例 7 - 1 のコレステロールの除去作用の結果を示すグラフである。

【図 1 5 B】図 1 5 B は、試験例 7 - 2 のフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 1 6 A】図 1 6 A は、試験例 8 における N H D F (試料無添加) の L C 3 染色画像を示す図である。

【図 1 6 B】図 1 6 B は、試験例 8 における N P C 1 (試料無添加) の L C 3 染色画像を示す図である。

【図 1 6 C】図 1 6 C は、試験例 8 における N P C 1 (H P - β - C D 添加) の L C 3 染色画像を示す図である。

40

【図 1 6 D】図 1 6 D は、試験例 8 における N P C 1 (H E E - S S - P R X 添加) の L C 3 染色画像を示す図である。

【図 1 6 E】図 1 6 E は、試験例 8 の細胞内の L C 3 陽性小胞数を定量した結果を示すグラフである。

【図 1 7 A】図 1 7 A は、試験例 9 の N H D F 及び N P C 1 のウェスタンブロットの結果を示す図である。

【図 1 7 B】図 1 7 B は、試験例 9 の N H D F 及び N P C 1 における L C 3 - I I の相対発現量を示すグラフである。

【図 1 7 C】図 1 7 C は、試験例 9 の N H D F 及び N P C 1 における p 6 2 の相対発現量を示すグラフである。

50

【図17D】図17Dは、試験例9のNHDF、NPC2変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞、ファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞、及びGM1ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞のウェスタンブロットの結果を示す図である。

【図17E】図17Eは、試験例9のNHDF、NPC2変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞、ファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞、及びGM1ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞におけるLC3-I Iの相対発現量を示すグラフである。

【図18A】図18Aは、試験例10における各細胞の蛍光顕微鏡像を示す図である。

【図18B】図18Bは、試験例10の各細胞におけるオートファゴソーム数及びオートリソソーム数を解析した結果を示すグラフである。

【図19A】図19Aは、試験例11における各細胞の顕微鏡像を示す図である。

【図19B】図19Bは、試験例11の各細胞におけるmRFP-LC3と抗LAMP1抗体との共局在率を求めた結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

(医薬組成物)

本発明の医薬組成物は、脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患に対する医薬組成物である。

本発明の医薬組成物は、ポリロタキサンを少なくとも含み、必要に応じてさらにその他の成分を含む。

【0014】

<ポリロタキサン>

前記ポリロタキサンは、複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するものであれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記ポリロタキサンは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。

前記ポリロタキサンの数平均分子量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、2万～10万程度とすることが好ましい。

【0015】

ー線状分子ー

前記線状分子は、複数の環状分子を貫通し、両端部に細胞内分解性結合を有し、該細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基と結合する。

前記線状分子としては、複数の環状分子の空洞を貫通し、その状態を保持することができ、かつ、両端部に細胞内分解性結合を有するものであれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0016】

前記線状分子の両端部以外の構成としては、公知のポリロタキサンの構成を適宜選択することができ、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体、ポリメチルビニルエーテル、ポリエチレンイミン、ポリアミノ酸などが挙げられる。

前記線状分子の両端部以外の構成の分子量としては、特に制限はなく、目的とするポリロタキサンの分子量や、貫通させる環状分子の数に応じて適宜選択することができる。

これらは、化学合成したものをを用いてもよいし、市販品を用いてもよい。

【0017】

前記線状分子の両端部以外の構成は、後述する環状分子との組合せに応じて適宜選択することが好ましく、例えば、前記環状分子が α -シクロデキストリンの場合には、ポリエチレングリコールとすることが好ましく、前記環状分子が β -シクロデキストリンの場合には、ポリプロピレングリコール、若しくはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体とすることが好ましい。

前記ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体では、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピ

10

20

30

40

50

レングリコール、ポリエチレングリコールの順に重合した共重合体であることが好ましい。

前記ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体におけるポリエチレングリコール部分の数平均分子量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、500～10,000とすることができる。また、前記ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体におけるポリプロピレングリコール部分の数平均分子量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、500～5,000とすることができる。

前記ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体の具体例としては、プルロニック (Pluronic) などが挙げられる。

10

【0018】

—細胞内分解性結合—

前記細胞内分解性結合としては、細胞内で分解される結合であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アセタール結合、ケタール結合、ジスルフィド結合、エステル結合、オルトエステル結合、ビニルエーテル結合、ヒドラジド結合、アミド結合などが挙げられる。これらの中でも、細胞内での選択的な分解に優れる点で、アセタール結合、ケタール結合、ジスルフィド結合、エステル結合、オルトエステル結合、ビニルエーテル結合、ヒドラジド結合が好ましく、ジスルフィド結合がより好ましい。

これらは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。

20

【0019】

前記線状分子に前記細胞内分解性結合を形成する方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば、「Journal of Controlled Release 76 (2001) 11-25」、「Biomacromolecules 2003, 4, 1426-1432」、「Langmuir 2011, 27 (2), 612-617」、「Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 7300-7305」、「J. Mater. Chem. B, 2013, 1, 3535-3544」、「Biomaterials, 34, 2480-2491 (2013)」、「Scientific Reports, 3, 2252 (2013)」などに記載の方法と同様の方法が挙げられる。

30

【0020】

—環状分子—

前記環状分子としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、シクロデキストリン、クラウンエーテル、サイクロフラクタン、カリックスアレンなどが挙げられる。これらの中でも、コレステロールの包接能に優れる点で、シクロデキストリンが好ましい。

これらは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。

【0021】

前記シクロデキストリンとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンが挙げられる。これらの中でも、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリンが好ましく、コレステロールの包接能により優れる点で、 β -シクロデキストリンがより好ましい。

40

【0022】

前記ポリロタキサン1分子あたりの前記環状分子の数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、平均5個～200個が好ましい。

【0023】

前記環状分子は、置換基で修飾されていてもよいし、修飾されていなくてもよいが、前記ポリロタキサンの水溶性を高めるために、置換基で修飾されていることが好ましい。

前記修飾される位置としては、前記ポリロタキサンの水溶性を高めることができれば、

50

特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、シクロデキストリンの場合には、ヒドロキシル基が修飾されることが好ましい。

【0024】

前記置換基としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基、ヒドロキシブチル基、ヒドロキシエトキシエチル基、メチル基、N，N－ジメチルアミノエチル基（「DMAE」基と称することもある）、カルボキシル基、一級アミノ基、若しくはポリエチレングリコールなどの水溶性高分子やペプチド分子などが挙げられる。これらの中でも、ポリロタキサンの細胞内への取込み効率を高めることができる点で、DMAE基が好ましい。

前記ヒドロキシル基の修飾は、前記置換基で直接修飾されていてもよいし、リンカーを介して修飾されていてもよい。

10

前記リンカーとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、カルバミン酸エステル結合（ $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-$ ）、エステル結合（ $-\text{O}-\text{CO}-$ ）、カルボネート結合（ $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$ ）、エーテル結合（ $-\text{O}-$ ）などが挙げられる。

【0025】

前記ポリロタキサン1分子あたりの前記置換基の修飾数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、平均10個～400個が好ましい。

【0026】

前記環状分子を前記線状分子により貫通させる方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができる。

20

前記環状分子を修飾する方法としても、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができる。

【0027】

－嵩高い置換基－

前記嵩高い置換基としては、前記線状分子の両末端をキャップして前記複数の環状分子の脱離を防止することができれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アミノ酸若しくはその誘導体、オリゴペプチド、蛍光分子などが挙げられる。これらの中でも、N－トリチルグリシンが、生理条件下における加水分解耐性の点で、好ましい。

【0028】

30

前記嵩高い置換基を前記線状分子に結合させる方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができる。

【0029】

前記医薬組成物におけるポリロタキサンは、本発明のポリロタキサンであることが好ましい。

本発明のポリロタキサンは、複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンであって、前記線状分子は、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールの順に重合した共重合体であり、前記複数の環状分子がβ－シクロデキストリンである。

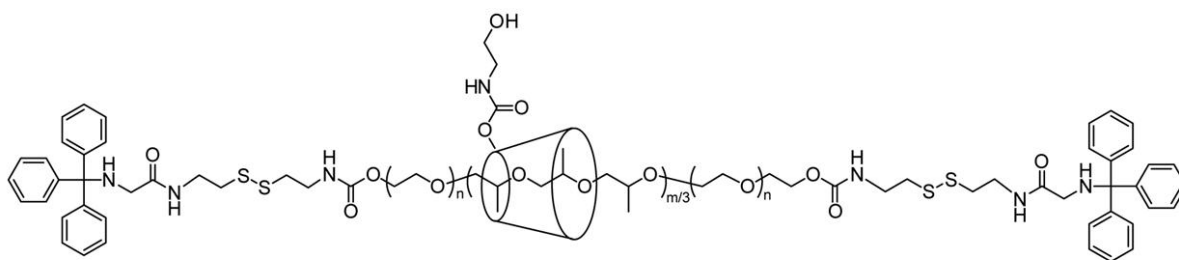
40

本発明のポリロタキサンにおける環状分子、線状分子、該線状分子における細胞内分解性結合、嵩高い置換基は、前記医薬組成物のポリロタキサンの項目の記載と同様とすることができるが、好ましい態様も同様である。

【0030】

本発明のポリロタキサンのより好ましい態様としては、下記構造式（1）で表されるポリロタキサン、下記構造式（2）で表されるポリロタキサン、下記構造式（4）で表されるポリロタキサン、下記構造式（5）で表されるポリロタキサン、下記構造式（6）で表されるポリロタキサンが挙げられる。

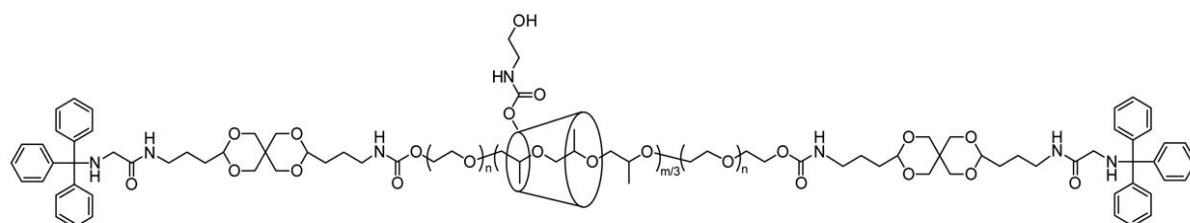
【化 1】



構造式 (1)

10

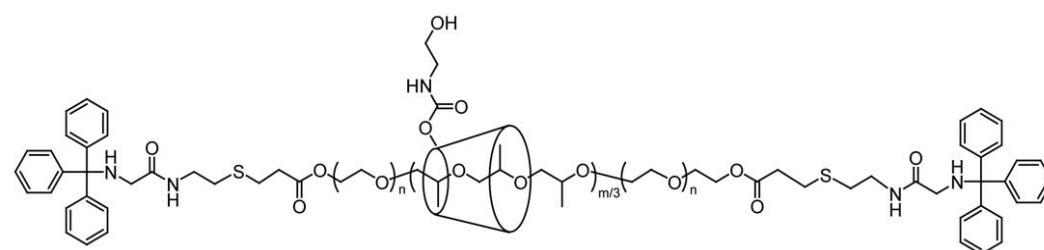
【化 2】



構造式 (2)

【化 3】

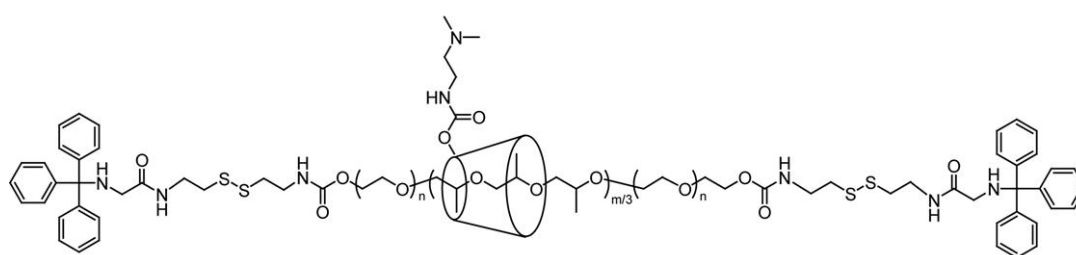
20



構造式 (4)

【化 4】

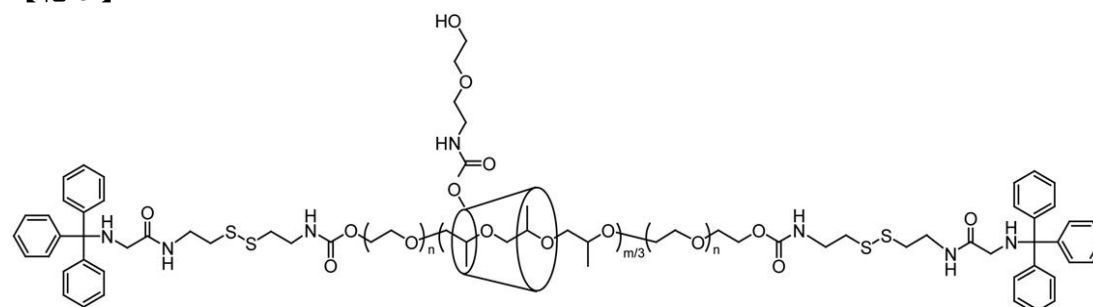
30



構造式 (5)

【化 5】

40



構造式 (6)

【0 0 3 1】

50

前記構造式(1)、(2)、(4)、(5)、又は(6)で表されるポリロタキサンの線状分子は、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールの順に重合した共重合体であり、環状分子は、 β -シクロデキストリンであり、嵩高い置換基は、N-トリチルグリシンである。

前記構造式(1)、(5)、及び(6)で表されるポリロタキサンの線状分子における細胞内分解性結合は、ジスルフィド結合であり、前記構造式(2)で表されるポリロタキサンの線状分子における細胞内分解性結合は、アセタール結合であり、前記構造式(4)で表されるポリロタキサンの線状分子における細胞内分解性結合は、エステル結合である。

10

【0032】

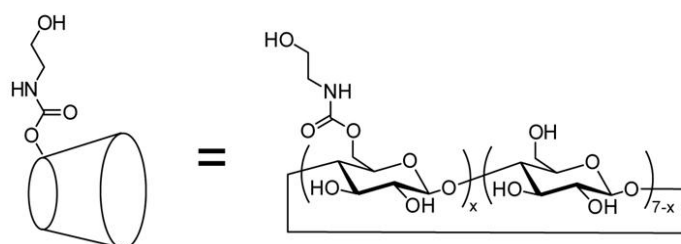
前記構造式(1)、(2)、(4)、(5)、及び(6)中、「m」はポリプロピレングリコールの繰返し単位(以下、「モノマー」と称することがある)の数を示し(構造式(1)、(2)、(4)、(5)、及び(6)では、括弧内にポリプロピレングリコールの繰返し単位を3つ記載しているため、「m/3」と記載している)、「n」はポリエチレングリコールの繰返し単位(モノマー)の数を示す。また、前記構造式(1)、(2)、及び(4)中、 β -CDは下記式(A)で表され、該構造式(1)、(2)、及び(4)中では1個のみ記載している。また、前記構造式(5)中、 β -CDは下記式(B)で表され、該構造式(5)中では1個のみ記載している。また、前記構造式(6)中、 β -CDは下記式(C)で表され、該構造式(6)中では1個のみ記載している。

20

また、下記式(A)では、 β -シクロデキストリンの一級ヒドロキシル基が、カルバミン酸エステル(—O—CO—NH—)を介してヒドロキシエチル基で修飾されており、下記式(B)では、 β -シクロデキストリンの一級ヒドロキシル基が、カルバミン酸エステル(—O—CO—NH—)を介してN,N-ジメチルアミノエチル基で修飾されており、下記式(C)では、 β -シクロデキストリンの一級ヒドロキシル基が、カルバミン酸エステル(—O—CO—NH—)を介してヒドロキシエトキシエチル基で修飾されている。なお、下記式(A)、(B)、及び(C)では、前記修飾がx個(x=1~7)の場合を示している。

【化6】

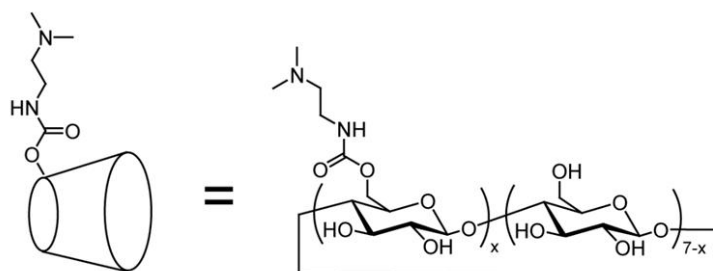
30



式 (A)

【化7】

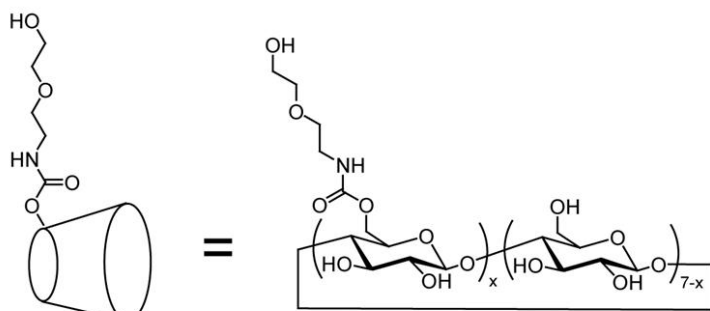
40



式 (B)

50

【化 8】



式 (C)

10

【0033】

前記構造式 (1)、(2)、(4)、(5)、及び (6) で表されるポリロタキサンにおける線状分子の数平均分子量は、ポリエチレングリコール部分が、それぞれ 1, 100 であり、ポリプロピレングリコール部分が、4, 200 である。

前記構造式 (1) で表されるポリロタキサンにおける環状分子の貫通数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 12.9 個である。

前記構造式 (2) で表されるポリロタキサンにおける環状分子の貫通数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 12.9 個である。

20

前記構造式 (4) で表されるポリロタキサンにおける環状分子の貫通数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 11.7 個である。

前記構造式 (5) で表されるポリロタキサンにおける環状分子の貫通数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 12.9 個である。

前記構造式 (6) で表されるポリロタキサンにおける環状分子の貫通数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 16.1 個である。

前記構造式 (1) で表されるポリロタキサンにおける前記ヒドロキシエチル基の修飾数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 53.4 個である。

前記構造式 (2) で表されるポリロタキサンにおける前記ヒドロキシエチル基の修飾数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 66.9 個である。

30

前記構造式 (4) で表されるポリロタキサンにおける前記ヒドロキシエチル基の修飾数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 65.9 個である。

前記構造式 (5) で表されるポリロタキサンにおける前記 N, N-ジメチルアミノエチル基の修飾数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 65.3 個である。

前記構造式 (6) で表されるポリロタキサンにおける前記ヒドロキシエトキシエチル基の修飾数は、ポリロタキサン 1 分子あたり平均 64.7 個である。

【0034】

前記構造式 (1) で表されるポリロタキサンは、後述する製造例 1 の方法で好適に製造することができ、前記構造式 (2) で表されるポリロタキサンは、後述する製造例 2 の方法で好適に製造することができ、前記構造式 (4) で表されるポリロタキサンは、後述する製造例 3 の方法で好適に製造することができ、前記構造式 (5) で表されるポリロタキサンは、後述する製造例 4 の方法で好適に製造することができ、前記構造式 (6) で表されるポリロタキサンは、後述する製造例 5 の方法で好適に製造することができる。

40

【0035】

製造されたポリロタキサンが、前記構造式 (1)、(2)、(4)、(5)、又は (6) で表される構造を有するか否かは、適宜選択した各種の分析方法により確認することができ、例えば、プロトン核磁気共鳴分光法により確認することができる。

前記構造式 (1) で表されるポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500 MHz におけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートは、図 1 に示されるとおりであり、前記構造式 (2) で表されるポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測

50

定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートは、図2に示されるとおりであり、前記構造式(4)で表されるポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートは、図4に示されるとおりであり、前記構造式(5)で表されるポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートは、図5に示されるとおりであり、前記構造式(6)で表されるポリロタキサンの重ジメチルスルホキシド中で測定した、500MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートは、図6に示されるとおりである。

なお、前記分析方法による測定値には、多少の誤差が生じることがあるが、当業者であれば、前記ポリロタキサンが前記構造式(1)、(2)、(4)、(5)、又は(6)で表される構造を有することは容易に同定することが可能である。

10

【0036】

本発明の医薬組成物における前記ポリロタキサンの含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。前記医薬組成物は、前記ポリロタキサンそのものであってもよい。

【0037】

<脂質代謝異常及びオートファジー機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患>

前記脂質代謝異常及びオートファジー機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患は、脂質代謝異常のみに起因する疾患であってもよいし、オートファジー機能異常のみに起因する疾患であってもよいし、両者に起因する疾患であってもよい。

20

【0038】

<<脂質代謝異常に起因する疾患>>

前記脂質代謝異常に起因する疾患としては、例えば、ライソゾーム病が挙げられる。なお、前記ライソゾーム病は、オートファゴソームの蓄積を生じる、オートファジー機能異常に起因する疾患でもある。

【0039】

ーライソゾーム病ー

前記ライソゾーム病の具体例としては、ゴーシェ病(Gaucher病)、ニーマン・ピック病A型(Niemann-Pick病A型)、ニーマン・ピック病B型(Niemann-Pick病B型)、ニーマン・ピック病C型(Niemann-Pick病C型)、GM1ガングリオシドーシス、GM2ガングリオシドーシス(「Tay-Sachs Sandhoff AB型」と称することもある。)、クラッベ病(Krabbe病)、異染性白質変性症、マルチプルサルタファーゼ欠損症(Multiple sulfatase欠損症)、ファーバー病(Farber病)、ムコ多糖症I型、ムコ多糖症II型(「ハンター病」と称することもある。)、ムコ多糖症III型(「サンフィリポ病」と称することもある。)、ムコ多糖症IV型、ムコ多糖症VI型(「マロトー・ラミー病」と称することもある。)、ムコ多糖症VII型(「スライ病」と称することもある。)、ムコ多糖症IX型(「Hyaluronidase欠損症」と称することもある。)、シアリドーシス、ガラクトシアリドーシス、I-cell病/ムコリピドーシスIII型、 α -マンノシドーシス、 β -マンノシドーシス、フコシドーシス、アスパルチルグルコサミン尿症、シンドラー/神崎病(Schindler/神崎病)、ウォルマン病(Wolman病)、ダノン病(Danon病)、遊離シアル酸蓄積症、セロイドリポフスチノーシス、ファブリー病が挙げられる。

30

40

【0040】

前記オートファジー機能異常に起因する疾患としては、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などが挙げられる。これらは、オートファゴソームの蓄積を生じる疾患である。

【0041】

本発明の医薬組成物は、ライソゾーム病に好適に用いることができ、中でも、ゴーシェ病、ニーマン・ピック病A型、ニーマン・ピック病B型、ニーマン・ピック病C型、GM

50

1 ガングリオシドーシス、GM2 ガングリオシドーシス、ファーマー病、ウォルマン病、ファブリー病に好適に用いることができ、ニーマン・ピック病C型により好適に用いることができる。

【0042】

<その他の成分>

前記その他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、医薬的に許容され得る担体などが挙げられる。前記担体としても、特に制限はなく、例えば、剤形等に応じて適宜選択することができる。

本発明の医薬組成物における前記その他の成分の含有量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

10

【0043】

<剤形>

本発明の医薬組成物の剤形としては、特に制限はなく、例えば、後述するような所望の投与方法に応じて適宜選択することができ、例えば、注射剤（溶液、懸濁液、用事溶解用固形剤等）、吸入散剤などが挙げられる。

【0044】

前記注射剤としては、例えば、前記ポリロタキサンに、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下用、筋肉内用、静脈内用等の注射剤を製造することができる。

前記pH調節剤及び前記緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。前記安定化剤としては、例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA、チオグリコール酸、チオ乳酸などが挙げられる。前記等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖などが挙げられる。前記局所麻酔剤としては、例えば、塩酸プロカイン、塩酸リドカインなどが挙げられる。

20

【0045】

<投与>

本発明の医薬組成物の投与方法としては、特に制限はなく、例えば、前記医薬組成物の剤形、患者の状態等に応じて、局所投与、全身投与のいずれかを選択することができる。例えば、局所投与としては、脳室内投与などが挙げられる。

【0046】

本発明の医薬組成物の投与対象としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、サル、イヌ、ネコなどが挙げられる。

30

【0047】

本発明の医薬組成物の投与量としては、特に制限はなく、投与形態や、投与対象の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて適宜選択することができる。

【0048】

本発明の医薬組成物の投与時期としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記疾患に対して、予防的に投与されてもよいし、治療的に投与されてもよい。

40

また、本発明の医薬組成物の投与回数としても、特に制限はなく、投与対象の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて、適宜選択することができる。

【0049】

本発明の医薬組成物に含まれるポリロタキサンは、細胞内で分解されるまでは、環状分子の空洞部を線状分子が占めているため、溶血や疎水性生体分子の非特異的な包接は示さないと考えられ、より安全性が高いと考えられる。

また、前記ポリロタキサンは、細胞内に到達すると、末端の細胞内分解性結合が切断され、多数の環状分子が徐々に放出されコレステロールの除去剤として作用する。そのため、コレステロールの除去作用と、該作用の持続化が期待される。

さらに、前記ポリロタキサン骨格は、数平均分子量が2万～10万程度の高分子量であ

50

るため、例えば、静脈投与後の腎排泄を受けにくく、血中半減期がシクロデキストリン単独よりも長くなると考えられる。そのため、投与量、投与回数の低減に繋がると考えられる。

また、本発明の医薬組成物に含まれるポリロタキサンは、細胞毒性が低く、また、低濃度でコレステロールを除去することができる。

また、本発明の医薬組成物に含まれるポリロタキサンは、優れたオートリソソームの形成亢進作用を有する。

【0050】

本発明の医薬組成物に含まれるポリロタキサン、及び本発明のポリロタキサンは、細胞内のコレステロール除去剤、オートリソソームの形成亢進剤としても用いることができる。

10

【0051】

(予防又は治療方法)

前記医薬組成物は、個体に投与することにより、細胞内におけるコレステロールの除去若しくはオートリソソームの形成を亢進し、脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患を予防又は治療することができる。したがって、本発明は、個体に、前記医薬組成物を投与することを特徴とする脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患を予防又は治療するための方法にも関する。

【実施例】

20

【0052】

以下に製造例及び試験例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの製造例及び試験例に何ら限定されるものではない。

【0053】

(製造例1：ポリロタキサンー1の製造)

線状分子として、プルロニック P123 (シグマアルドリッチ社製；ポリエチレングリコール (以下、「PEG」と称することがある。)) とポリプロピレングリコール (以下、「PPG」と称することがある。)) とが、PEG-PPG-PEG の順に重合した共重合体；PPG 部分の数平均分子量は、4,200、PEG 部分の数平均分子量は、1,100 $\times$ 2) を用い、以下のようにして、両末端にシスタミンを結合した。

30

前記プルロニック P123 を 20 g、1,1'-カルボニルジイミダゾール (シグマアルドリッチ社製) を 10.2 g 量り取り、ナス型フラスコへ加えた。テトラヒドロフラン (関東化学社製) を 267 mL 加え溶解し、室温で 24 時間攪拌した。反応後、分画分子量 1,000 の透析膜 (スペクトラ社製) へ加え、テトラヒドロフランに対し透析をすることで未反応物を除去した。ロータリーエバポレーターで濃縮することで両末端にカルボニルイミダゾールを有するプルロニック P123 (以下、「P123-CI」と称することがある。) を 20 g 得た。

前記 P123-CI を 9 g 量り取り、N,N-ジメチルホルムアミドを 8 mL に溶解した。脱塩したシスタミン (和光純薬社製) を 2 g 量り取りナス型フラスコへ加え、N,N-ジメチルホルムアミドを 72 mL 加え溶解した。P123-CI 溶液をナス型フラスコへ滴下して加え、室温で 24 時間攪拌した。反応後、分画分子量 1,000 の透析膜へ加え、メタノール (関東化学社製) に対し透析をすることで未反応物を除去した。ロータリーエバポレーターで濃縮することで両末端にシスタミンを有するプルロニック P123 (以下、「P123-SS-NH₂」) と称することがある。) を 4.95 g 得た。

40

【0054】

前記 P123-SS-NH₂ と、 β -シクロデキストリン (以下、「 β -CD」と称することがある。) を用い、以下のようにして、擬ポリロタキサンを調製した。

前記 β -CD を 12 g 量り取り広口瓶に加え、リン酸緩衝溶液 600 mL に溶解した。前記 P123-SS-NH₂ を 1 g 量り取り少量の超純水に溶解した。P123-SS-NH₂ 水溶液を β -CD 溶液に加え、室温で 24 時間攪拌した。反応後、得られた沈殿物

50

を遠心分離により回収した。回収した固体を凍結乾燥することで擬ポリロタキサンを得た。

【0055】

前記擬ポリロタキサンの両端部を、以下のようにしてN-トリチルグリシン（シグマ-アルドリッチ社製）でキャッピングすることにより、複数の β -CDを貫通させた線状分子の両端部に細胞内で分解されるジスルフィド結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサン（以下、「PRX」と称することがある。）を得た。

N-トリチルグリシンを1.64 g、4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride hydrate（和光純薬社製）を1.63 g量り取りスクリュウ管に加え、N,N-ジメチルホルムアミド 11.2 mL、メタノール 44.8 mLの混合溶媒に溶解した。得られた擬ポリロタキサンに対し、この溶液を加え、室温で24時間攪拌した。反応後、得られた沈殿物を遠心分離により回収した。メタノール、N,N-ジメチルホルムアミド、超純水の順で得られた沈殿物を洗浄し、未反応物を除去した。回収した固体を凍結乾燥することで末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサンを697.2 mg得た。

【0056】

前記ポリロタキサンの β -CDにヒドロキシエチル（以下、「HE」）基を以下のようにして導入し、水溶性のポリロタキサン-1（以下、「HE-SS-PRX」と称することがある。）を得た（ポリロタキサン1分子あたりの β -CDの平均貫通数は12.9個；HE基の修飾数は平均53.4個。）。

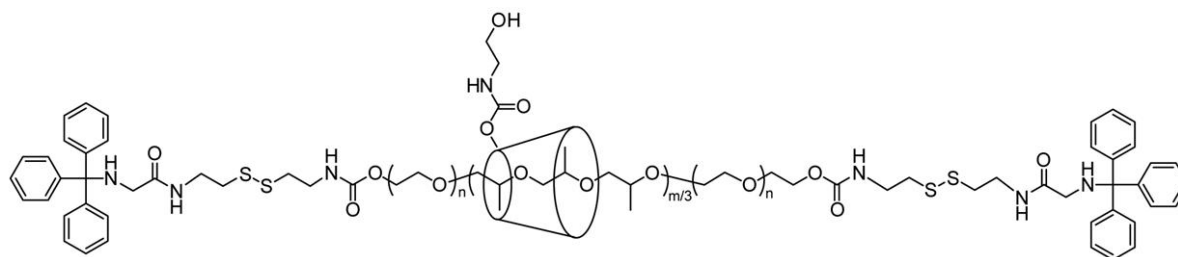
前記末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサンを250 mg量り取り、ジメチルスルホキシド10 mLに溶解した。1,1'-カルボニルジイミダゾールを235 mg加え、室温で24時間攪拌した。その後、反応溶液に2-アミノエタノールを439 μ L加え、室温でさらに24時間攪拌した。反応後、分画分子量3,500の透析膜（スペクトラ社製）へ加え、超純水に対し透析をすることで未反応物を除去した。回収した水溶液を凍結乾燥することでヒドロキシエチル基を導入した、末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサン（HE-SS-PRX）を231.5 mg得た。

【0057】

前記HE-SS-PRXについて、重ジメチルスルホキシド（シグマ-アルドリッチ社製）中で測定した、500 MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図1に示す。

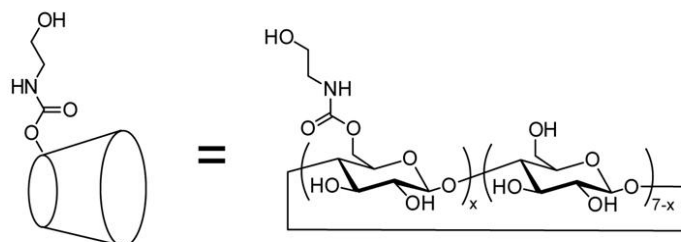
前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、HE-SS-PRXが下記構造式（1）で表される構造を有することが確認された。なお、下記構造式（1）中、「m」はポリプロピレングリコールの繰返し単位の数を示し（構造式（1）では、括弧内にポリプロピレングリコールの繰返し単位を3つ記載しているため、「m/3」と記載している）、「n」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す。また、下記構造式（1）中、 β -CDは下記式（A）で表され、該構造式（1）中では1個のみ記載している。また、下記式（A）では、前記ヒドロキシエチル基の修飾がx個（x=1~7）の場合を示している。

【化9】



構造式（1）

【化 10】



式 (A)

10

【0058】

(製造例 2：ポリロタキサン-2 の製造)

線状分子として、前記プルロニック P 1 2 3 を用い、以下のようにして、両末端にアセタール結合を形成させた。

製造例 1 と同様に合成した P 1 2 3 - C I を 8. 1 4 g 量り取り、N, N-ジメチルホルムアミドを 1 0 m L に溶解した。3, 9-ビス(3-アミノプロピル)-2, 4, 8, 10-テトラオキサスピロ[5. 5]ウンデカン(6. 8 1 g 量り取りナス型フラスコへ加え、N, N-ジメチルホルムアミドを 1 0 0 m L 加え溶解した。P 1 2 3 - C I 溶液をナス型フラスコへ滴下して加え、室温で 2 4 時間攪拌した。反応後、分画分子量 1, 0 0 0 の透析膜へ加え、メタノールに対し透析をすることで未反応物を除去した。ロータリーエバポレーターで濃縮することで両末端に環状アセタール結合を有する P 1 2 3 (以下、「P 1 2 3 - a c e - N H ₂」)と称することがある。)を 7. 0 g 得た。

20

【0059】

前記 P 1 2 3 - a c e - N H ₂ を用いた以外は、製造例 1 と同様にして、擬ポリロタキサンを調製した。

前記擬ポリロタキサンの両端部を、製造例 1 と同様にして N-トリチルグリシンでキャッピングすることにより、複数の β - C D を貫通させた線状分子の両端部に細胞内で分解されるアセタール結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンを得た。

前記ポリロタキサンの β - C D に、製造例 1 と同様にして H E 基を導入し、水溶性のポリロタキサン-2 (以下、「H E - a c e - P R X」)と称することがある。)を得た(ポリロタキサン 1 分子あたりの β - C D の貫通数は平均 1 2. 9 個、H E 基の修飾数は平均 6 6. 9 個。)。

30

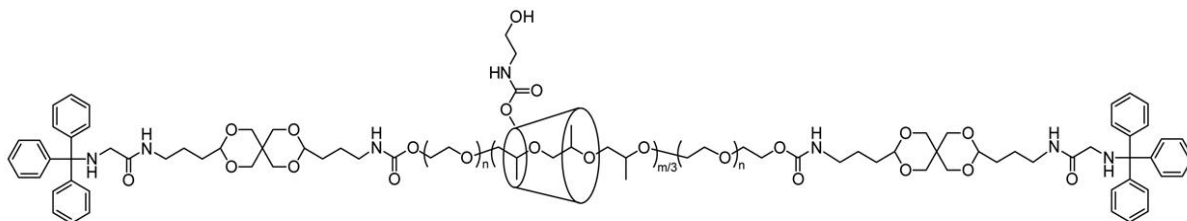
【0060】

前記 H E - a c e - P R X について、重ジメチルスルホキシド(シグマ-アルドリッチ社製)中で測定した、5 0 0 M H z におけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図 2 に示す。

前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、H E - a c e - P R X が下記構造式(2)で表される構造を有することが確認された。なお、下記構造式(2)中、「m」はポリプロピレングリコールの繰返し単位の数(構造式(2)では、括弧内にポリプロピレングリコールの繰返し単位を 3 つ記載しているため、「m/3」と記載している)、「n」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数(構造式(2)では、括弧内にポリエチレングリコールの繰返し単位を 3 つ記載しているため、「n/3」と記載している)を示す。また、下記構造式(2)中、β - C D は前記式(A)で表され、該構造式(2)中では 1 個のみ記載している。また、前記式(A)では、前記ヒドロキシエチル基の修飾が x 個(x = 1 ~ 7)の場合を示している。

40

【化 1 1】



構造式 (2)

【0061】

10

(比較製造例 1：ポリロタキサン-3 の製造)

線状分子として、前記プルロニック P 1 2 3 を用い、以下のようにして、細胞内分解性結合を有さない線状分子を調製した。

製造例 1 と同様に合成した P 1 2 3 - C I を 9 g 量り取り、N, N-ジメチルホルムアミドを 8 mL 加え溶解した。エチレンジアミン (和光純薬社製) を 1.65 g 量り取りナス型フラスコへ加え、N, N-ジメチルホルムアミドを 80 mL 加え溶解した。P 1 2 3 - C I 溶液をナス型フラスコへ滴下して加え、室温で 24 時間攪拌した。反応後、分画分子量 1,000 の透析膜へ加え、メタノールに対し透析をすることで未反応物を除去した。ロータリーエバポレーターで濃縮することで両末端に一級アミノ基を有する P 1 2 3 (以下、「P 1 2 3 - NH₂」) と称することがある。) を 5.85 g 得た。

20

【0062】

前記 P 1 2 3 - NH₂ を用いた以外は、製造例 1 と同様にして、擬ポリロタキサンを調製した。

前記擬ポリロタキサンの両端部を、製造例 1 と同様にして N-トリチルグリシンでキャッピングすることにより、複数の β-CD を貫通させた細胞内分解性結合を有さない線状分子の両端部に嵩高い置換基を有するポリロタキサンを得た。

前記ポリロタキサンの β-CD に、製造例 1 と同様にして H E 基を導入し、水溶性のポリロタキサン-3 (以下、「H E - P R X」) と称することがある。) を得た (ポリロタキサン 1 分子あたりの β-CD の貫通数は平均 11.3 個、H E 基の修飾数は平均 65.3 個。)

30

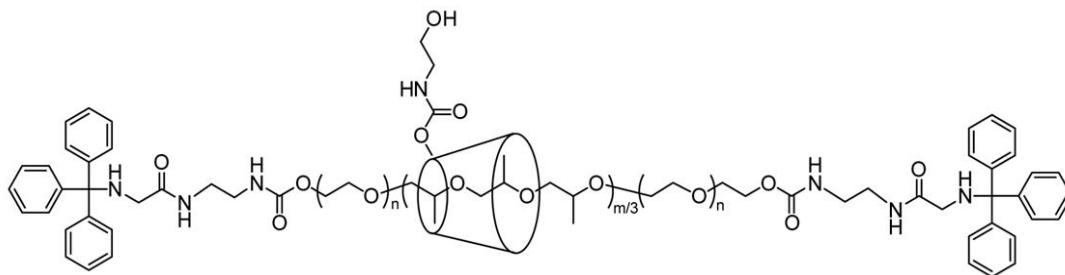
【0063】

前記 H E - P R X について、重ジメチルスルホキシド (シグマ-アルドリッチ社製) 中で測定した、500 MHz におけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図 3 に示す。

前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、H E - P R X が下記構造式 (3) で表される構造を有することが確認された。なお、下記構造式 (3) 中、「m」はポリプロピレングリコールの繰返し単位の数を示し (構造式 (3) では、カッコ内にポリプロピレングリコールの繰返し単位を 3 つ記載しているため、「m/3」と記載している)、「n」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す。また、下記構造式 (3) 中、β-CD は前記式 (A) で表され、該構造式 (3) 中では 1 個のみ記載している。また、前記式 (A) では、前記ヒドロキシエチル基の修飾が x 個 (x = 1 ~ 7) の場合を示している。

40

【化 1 2】



構造式 (3)

10

【0064】

(製造例 3：ポリロタキサン-4 の製造)

線状分子として、前記プルロニック P 1 2 3 を用い、以下のようにして、両末端にエステル結合を形成させた。

前記プルロニック P 1 2 3 を 10 g ナス型フラスコに量り取り、テトラヒドロフランを 133 mL 加え溶解した。前記溶液にトリエチルアミン (和光純薬社製) を 3.3 mL 加えた。その後、氷冷下で塩化アクリロイル (和光純薬社製) を 1.28 mL 加え、室温で 24 時間攪拌した。反応後、分画分子量 1,000 の透析膜へ加え、メタノールに対し透析をすることで未反応物を除去した。ロータリーエバポレーターで濃縮することで両末端にアクリロイル基を有するプルロニック P 1 2 3 を 6.12 g 得た。

20

前記両末端にアクリロイル基を有するプルロニック P 1 2 3 を 5.0 g、システアミン塩酸塩を 1.2 g ナス型フラスコに量り取り、N, N-ジメチルホルムアミドを 40 mL 加え溶解し、室温で 24 時間攪拌した。反応後、分画分子量 1,000 の透析膜へ加え、メタノールに対し透析をすることで未反応物を除去した。ロータリーエバポレーターで濃縮することで両末端にエステル結合を介して一級アミノ基を有するプルロニック P 1 2 3 (以下、「P 1 2 3-COO-NH₂」と称することがある。) を 2.54 g 得た。

【0065】

前記 P 1 2 3-COO-NH₂ を用いた以外は、製造例 1 と同様にして、擬ポリロタキサンを調製した。

30

前記擬ポリロタキサンの両端部を、製造例 1 と同様にして N-トリチルグリシンでキャッピングすることにより、複数の β-CD を貫通させた線状分子の両端部に細胞内で分解されるエステル結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンを得た。

前記ポリロタキサンの β-CD に、製造例 1 と同様にして HE 基を導入し、水溶性のポリロタキサン-2 (以下、「HE-COO-PRX」と称することがある。) を得た (ポリロタキサン 1 分子あたりの β-CD の貫通数は平均 11.7 個、HE 基の修飾数は平均 65.9 個)。

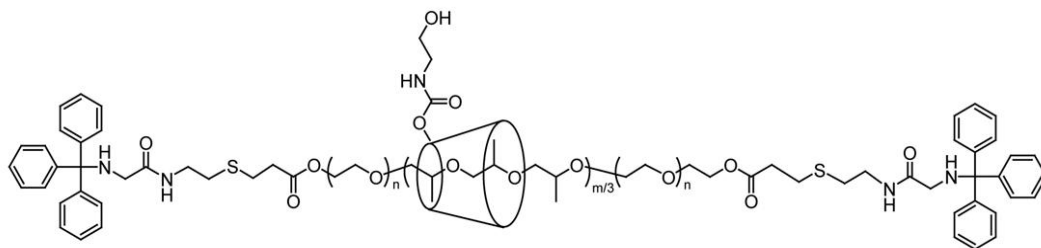
【0066】

前記 HE-COO-PRX について、重ジメチルスルホキシド (シグマ-アルドリッチ社製) 中で測定した、500 MHz におけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図 4 に示す。

40

前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、HE-COO-PRX が下記構造式 (4) で表される構造を有することが確認された。なお、下記構造式 (4) 中、「m」はポリプロピレングリコールの繰返し単位の数を示し (構造式 (4) では、括弧内にポリプロピレングリコールの繰返し単位を 3 つ記載しているため、「m/3」と記載している)、「n」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す。また、下記構造式 (4) 中、β-CD は前記式 (A) で表され、該構造式 (4) 中では 1 個のみ記載している。また、前記式 (A) では、前記ヒドロキシエチル基の修飾が x 個 (x = 1 ~ 7) の場合を示している。

【化 1 3】



構造式 (4)

【0067】

10

(製造例 4：ポリロタキサン-5 の製造)

製造例 1 と同様にして調製した、末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサンの β -CD に N, N-ジメチルアミノエチル (以下、「DMAE」) 基を以下のようにして導入し、水溶性のポリロタキサン-5 (以下、「DMAE-SS-PRX」と称することがある。) を得た (ポリロタキサン 1 分子あたりの β -CD の平均貫通数は 12.9 個; DMAE 基の修飾数は平均 65.3 個)。

前記末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサンを 125 mg 量り取り、ジメチルスルホキシド 5 mL に溶解した。1, 1'-カルボニルジイミダゾールを 117 mg 加え、室温で 24 時間攪拌した。その後、反応溶液に N, N-ジメチルアミノエチルアミン (和光純薬社製) を 237 μ L 加え、室温でさらに 24 時間攪拌した。反応後、分画分子量 3, 500 の透析膜 (スペクトラ社製) へ加え、超純水に対し透析をすることで未反応物を除去した。回収した水溶液を凍結乾燥することで N, N-ジメチルアミノエチル基を導入した、末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサン (DMAE-SS-PRX) を 104.7 mg 得た。

20

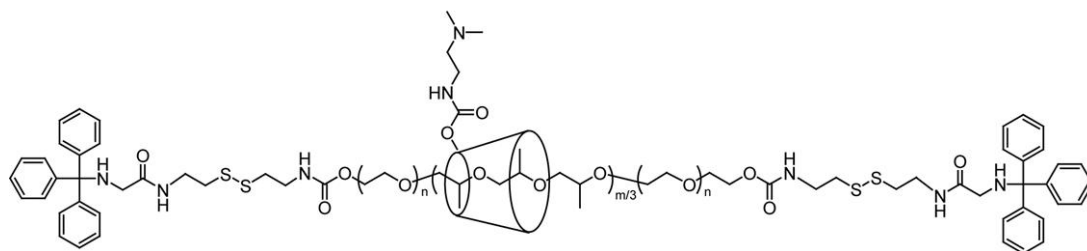
【0068】

前記 DMAE-SS-PRX について、重ジメチルスルホキシド (シグマアルドリッチ社製) 中で測定した、500 MHz におけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図 5 に示す。

前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、DMAE-SS-PRX が下記構造式 (5) で表される構造を有することが確認された。なお、下記構造式 (5) 中、「m」はポリプロピレングリコールの繰返し単位の数を示し (構造式 (5) では、括弧内にポリプロピレングリコールの繰返し単位を 3 つ記載しているため、「m/3」と記載している)、「n」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す。また、下記構造式 (5) 中、 β -CD は下記式 (B) で表され、該構造式 (5) 中では 1 個のみ記載している。また、下記式 (B) では、前記 N, N-ジメチルアミノエチル基の修飾が x 個 ($x = 1 \sim 7$) の場合を示している。

30

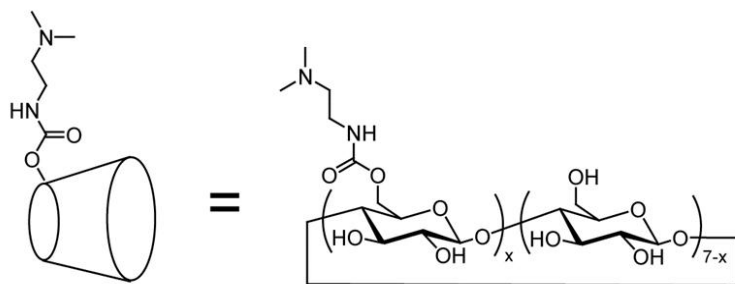
【化 1 4】



構造式 (5)

40

【化 1 5】



式 (B)

10

【0069】

(製造例 5：ポリロタキサン-6 の製造)

製造例 1 と同様にして調製した、末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサンの β -CD にヒドロキシエトキシエチル (以下、「H E E」) 基を以下のようにして導入し、水溶性のポリロタキサン-6 (以下、「H E E-S S-P R X」と称することがある。) を得た (ポリロタキサン 1 分子あたりの β -CD の平均貫通数は 16.1 個; H E E 基の修飾数は平均 64.7 個。)

前記末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサンを 200 mg 量り取り、ジメチルスルホキシド 15 mL に溶解した。1, 1'-カルボニルジイミダゾールを 203 mg 加え、室温で 24 時間攪拌した。その後、反応溶液に 2-(2-アミノエトキシ)エタノール (東京化成工業社製) を 624 μ L 加え、室温でさらに 24 時間攪拌した。反応後、分画分子量 3,500 の透析膜 (スペクトラ社製) へ加え、超純水に対し透析をすることで未反応物を除去した。回収した水溶液を凍結乾燥することでヒドロキシエトキシエチル基を導入した、末端にジスルフィド結合を有するポリロタキサン (H E E-S S-P R X) を 237.6 mg 得た。

20

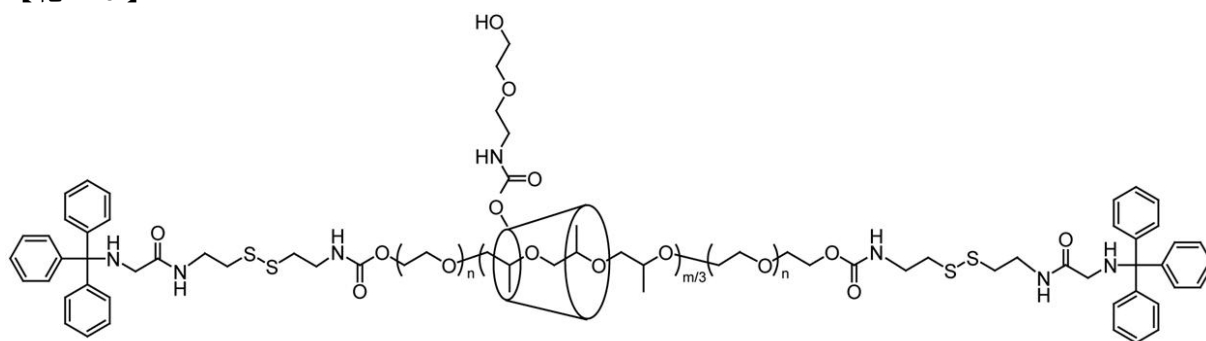
【0070】

前記 H E E-S S-P R X について、重ジメチルスルホキシド (シグマ-アルドリッチ社製) 中で測定した、500 MHz におけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図 6 に示す。

30

前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、H E E-S S-P R X が下記構造式 (6) で表される構造を有することが確認された。なお、下記構造式 (6) 中、「m」はポリプロピレングリコールの繰返し単位の数を示し (構造式 (6) では、括弧内にポリプロピレングリコールの繰返し単位を 3 つ記載しているため、「m/3」と記載している)、「n」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す。また、下記構造式 (6) 中、 β -CD は下記式 (C) で表され、該構造式 (6) 中では 1 個のみ記載している。また、下記式 (C) では、前記ヒドロキシエトキシエチル基の修飾が x 個 ($x = 1 \sim 7$) の場合を示している。

【化 1 6】

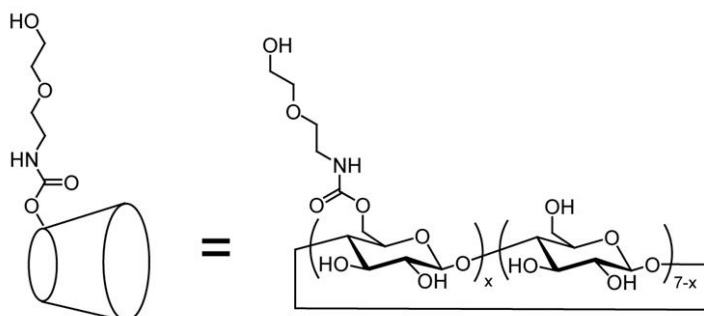


構造式 (6)

40

50

【化 17】



式 (C)

10

【0071】

(試験例 1：溶血試験)

リン酸緩衝食塩水（以下、「PBS」と称することがある。）200 μ L 中で、ラット赤血球（興人バイオより入手、細胞数 1×10^8 個）と各濃度（シクロデキストリンの濃度として）の以下の試料とを 37 $^{\circ}$ C で 2 時間接触させた。遠心分離により赤血球を沈殿させ、上清を 100 μ L 回収し、96 ウェルプレート（BD フアルコン社製）に加えた。上清の 544 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー ARVO-MX（パーキンエルマー社製）で測定した。0.1% Triton X-100（ナカライテスク社製）と接触した際の上清の吸光度を溶血率 100% として、以下のようにして溶血率 (%) を算出した。結果を図 7 に示す。

20

<試料>

(1) HE-SS-PRX（製造例 1 で作製）

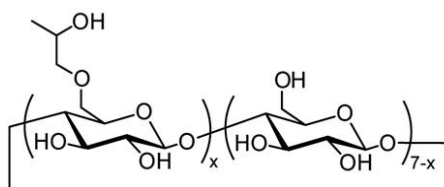
(2) HE-a ce-PRX（製造例 2 で作製）

(3) HE-PRX（比較製造例 1 で作製）

(4) ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン（以下、「HP- β -CD」と称することがある。；下記構造式 (7) で表される化合物；シグマアルドリッチ社製；製品番号 332607；構造式 (7) では、前記ヒドロキシプロピル基の修飾が x 個 ($x = 1 \sim 7$) の場合を示している。)

30

【化 18】

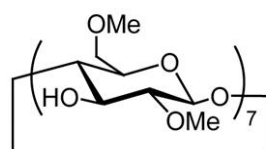


構造式 (7)

(5) 2,6-ジメチル- β -シクロデキストリン（以下、「DM- β -CD」と称することがある。；下記構造式 (8) で表される化合物；シグマアルドリッチ社製；製品番号 H0513）

40

【化 19】



構造式 (8)

50

<溶血率の算出方法>

溶血率 (%) = { (試料と接触した際の上清の吸光度) / (0.1% Triton X-100と接触した際の上清の吸光度) } × 100

【0072】

図7中、「●」は「DM-β-CD」の結果を示し、「■」は「HP-β-CD」の結果を示し、「△」は「HE-PRX」の結果を示し、「◇」は「HE-ace-PRX」の結果を示し、「▽」は「HE-SS-PRX」の結果を示す。

図7の結果から、シクロデキストリンであるHP-β-CD、及びDM-β-CDは溶血を示したのに対し、ポリロタキサンであるHE-PRX、HE-SS-PRX、及びHE-ace-PRXはいずれもシクロデキストリン濃度換算で20mMの高濃度でも溶血を示さないことが明らかとなった。

これは、ポリロタキサンでは、シクロデキストリンの空洞部をポリマー鎖が占めているため、疎水性空洞部に由来した膜障害性を示さないと推測される。

この結果から、ポリロタキサンは、溶血の観点から、シクロデキストリンよりも安全であると考えられる。

【0073】

(試験例2：コレステロールの集積)

健常者由来皮膚繊維芽細胞(以下、「NHDF」)、又は「NHDF細胞」と称する。Coriell Instituteより入手;番号GM05659)、ニーマン・ピック病C型患者由来皮膚繊維芽細胞(以下、「NPC1」、又は「NPC1細胞」と称する。Coriell Instituteより入手;番号GM03123)を用い、以下のようにして細胞内のコレステロールの集積を調べた。

前記NPC1を24ウェルプレートに播種し(細胞数: 2.5×10^4 個/ウェル)、37℃で24時間培養後、下記試料をシクロデキストリン濃度に換算して100 μM添加し、さらに37℃で24時間培養した。

前記培養後、4% パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定し、100 μg/mLに調製したフィリピン(Polysciences社製)のPBS溶液を加え45分間室温で静置した。PBSで3回洗浄した後、共焦点レーザー走査顕微鏡FluoView FV10i(オリンパス社製)でコレステロールの局在を観察した。また、細胞内のコレステロールの集積量の定量を行った。

前記細胞内のコレステロールの集積量の定量は、以下のようにして行った。

細胞溶解液を用い、前記培養後の細胞を溶解させた細胞溶解液を調製し、Amplex Red Cholesterol Assay Kit(インビトロジェン社製)でコレステロールの定量を行い、micro BCA Protein Assay Kit(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)で総タンパク質を定量した。細胞内の総コレステロール量は、総コレステロール量(nmol)/総タンパク質量(mg)で表記した。

なお、比較として、前記NHDFを用い、試料を投与しなかった場合、及び前記NPC1を用い、試料を投与しなかった場合についても同様にして試験した。

<試料>

- (1) HE-SS-PRX(製造例1で作製)
- (2) HE-ace-PRX(製造例2で作製)
- (3) HE-PRX(比較製造例1で作製)
- (4) HP-β-CD(シグマアルドリッチ社製)
- (5) DM-β-CD(シグマアルドリッチ社製)

【0074】

共焦点顕微鏡による細胞内コレステロールの観察結果を図8A~図8Gに示し、細胞内のコレステロールの集積量の定量結果を図9に示す。

図8Aは、細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合の結果を示し、図8Bは、細胞としてNPC1を用い、試料としてHP-β-CDを添加した場合の結果を示

し、図8Cは、細胞としてNPC1を用い、試料としてDM- β -CDを添加した場合の結果を示し、図8Dは、細胞としてNPC1を用い、試料としてHE-SS-PRXを添加した場合の結果を示し、図8Eは、細胞としてNPC1を用い、試料としてHE-a-ce-PRXを添加した場合の結果を示し、図8Fは、細胞としてNPC1を用い、試料としてHE-PRXを添加した場合の結果を示し、図8Gは、細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合の結果を示す。各画像において、白色で示された部分がコレステロールを表す。各試料の添加量はシクロデキストリン濃度換算で100 μ Mである。

図9では、左側から順に、「細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合（試料未添加）」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP- β -CDを添加した場合（HP- β -CD添加）」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてDM- β -CDを添加した場合（DM- β -CD添加）」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHE-SS-PRXを添加した場合（HE-SS-PRX添加）」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHE-a-se-PRXを添加した場合（HE-a-se-PRX添加）」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHE-PRXを添加した場合（HE-PRX添加）」、「細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合（試料未添加）」の結果を示す。各試料の添加量はシクロデキストリン濃度換算で100 μ Mである。

【0075】

図8A～図8Gの結果から、前記NHDF細胞に比べ、前記NPC1細胞では多量のコレステロールが細胞内に沈着している様子が認められた。

前記NPC1細胞に対し、前記DM- β -CDを作用させると蛍光強度が減少し、コレステロールの排泄が促進されたと予想される。

一方、細胞内分解性結合を有するHE-SS-PRX、及びHE-a-ce-PRXで処理した場合には、前記NHDF細胞と同程度まで蛍光強度が減少し、前記DM- β -CD、及び現在臨床試験中の前記HP- β -CDよりも非常に優れたコレステロール除去作用が示された。

なお、細胞内分解性結合を有さないHE-PRXを用いた場合の蛍光強度は、細胞内分解性結合を有するHE-SS-PRX、及びHE-a-ce-PRXで処理した場合よりも高く、コレステロール除去作用が劣っていた。

【0076】

図9の結果から、現在臨床試験中のHP- β -CDは、本試験濃度ではコレステロールの除去率は僅かであったが、既存の試薬中で最もコレステロール包接能の高いDM- β -CDではHP- β -CDよりもコレステロールを除去できたことが明らかとなった。

一方、細胞内分解性結合を有するHE-a-ce-PRX、又はDMAE-a-ce-PRXで処理したNPC1細胞では、前記HP- β -CD、及びDM- β -CDよりもコレステロールを除去することができ、また、細胞内分解性結合を有さない前記HE-PRXよりもコレステロールが除去されており、非常に高い効果を示すことが明らかとなった。

【0077】

以上の結果から、細胞内分解性結合を有するHE-SS-PRX、及びHE-a-ce-PRXで処理したNPC1細胞ではコレステロールの蓄積が大幅に減少していることが明らかとなった。これは、細胞内でのジスルフィド結合、あるいはアセタール結合の切断によりシクロデキストリンが細胞内で放出されたことで、細胞内のコレステロールが除去されたためと考えられる。

したがって、複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンは、低侵襲的かつ疾患細胞からのコレステロールの除去効果に優れ、ニーマン・ピック病C型を含むライソゾーム病の治療薬として用いることが示された。

【0078】

（試験例3：細胞毒性の評価）

NPC1を用い、以下のようにしてポリロタキサン、シクロデキストリン誘導体の細胞毒性を調べた。

前記NPC1細胞を96ウェルプレートに播種し（細胞数： 1×10^4 個/ウェル）、10%ウシ胎児血清（Gibco社製）を含むダルベッコ改変イーグル培地（Gibco社製）中で、24時間、37℃で培養した。培地を90μLのダルベッコ改変イーグル培地に交換後、下記試料をシクロデキストリン濃度に換算して0.1mMから20mMの濃度範囲で10μLずつ各ウェルに添加し、さらに37℃で24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8（同仁堂社製）を10μLずつ各ウェルに添加し、さらに37℃で1時間静置した。

Multiskan FCプレートリーダー（ThermoFisher社製）を用いて450nmの吸光度を測定した。試料の代わりにリン酸緩衝溶液を添加した細胞の吸光度を細胞生存率100%として、以下のようにして細胞生存率（%）を算出した。結果を図10に示す。

10

<試料>

- (1) HE-SS-PRX（製造例1で作製）
- (2) HE-PRX（比較製造例1で作製）
- (3) HP-β-CD（シグマアルドリッチ社製）
- (4) DM-β-CD（シグマアルドリッチ社製）

<細胞生存率の算出方法>

細胞生存率（%）＝ {（試料を添加し、培養した細胞の吸光度）／（リン酸緩衝溶液を添加し、培養した細胞の吸光度）} × 100

【0079】

20

図10中、「●」は「DM-β-CD」の結果を示し、「■」は「HP-β-CD」の結果を示し、「△」は「HE-PRX」の結果を示し、「▽」は「HE-SS-PRX」の結果を示す。

図10の結果から、シクロデキストリン誘導体であるHP-β-CD、及びDM-β-CDは細胞生存率の低下を示したのに対し、ポリロタキサンであるHE-PRX、及びHE-SS-PRXではいずれもシクロデキストリン濃度換算で20mMの高濃度でも細胞生存率の低下を示さないことが明らかとなった。

これは、ポリロタキサンでは、シクロデキストリンの空洞部をポリマー鎖が占めているため、細胞に対する膜障害性を示さないためであると推測される。

この結果から、ポリロタキサンは、細胞毒性の観点から、シクロデキストリンよりも安全であると考えられる。

30

【0080】

（試験例4：共焦点顕微鏡による局在観察）

<試料の調製>

NPC1と接触した際のポリロタキサン、シクロデキストリン誘導体の局在を明らかにするために、試料として用いるフルオレセインイソチオシアネートエチレンジアミン（FITC-EDA）で修飾したHE-SS-PRX（以下、「FITC標識HE-SS-PRX」と称する）、HP-β-CD（以下、「FITC標識HP-β-CD」と称する）を以下のようにして調製した。

【0081】

40

—FITC標識HE-SS-PRXの調製—

製造例1で調製したHE-SS-PRX 30mgを3mLのDMSOに溶解した。1, 1'-カルボニルジイミダゾールを4.83mg加え、室温で24時間攪拌した。FITC-EDA（既報に従い合成。参考文献：N. V. Nukolova et al. Biomaterials 32 (23), 5417-5426 (2011)）を2.67mg加え、室温でさらに24時間攪拌した。反応後、分画分子量3, 500の透析膜（スペクトラ社製）へ加え、超純水に対し透析をすることで未反応のFITC-EDAを除去した。回収した水溶液を凍結乾燥することでFITC標識HE-SS-PRXを13.2mg得た。FITCの修飾数は紫外-可視分光光度計を用いて494nmの吸光度より算出し、ポリロタキサン中のβ-CD 一分子に対し、0.04分子のFITCが修

50

飾されていることを確認した。

【0082】

－FITC標識HP-β-CDの調製－

HP-β-CD（シグマアルドリッチ社製）200mgを10mLのDMSOに溶解した。1, 1'-カルボニルジイミダゾールを66.6mg加え、室温で24時間攪拌した。FITC-EDAを66.6mg加え、室温でさらに24時間攪拌した。反応後、分画分子量1,000の透析膜（スペクトラ社製）へ加え、超純水に対し10日間透析をすることで未反応のFITC-EDAを除去した。回収した水溶液を凍結乾燥することでFITCを修飾したHP-β-CD（FITC-HP-β-CD）を16.9mg得た。FITCの修飾数は上記と同様に行った。未修飾HP-β-CDとFITC-HP-β-CDを混合し、HP-β-CD一分子に対するFITC修飾数が0.04分子となるよう調整した。

10

【0083】

<局在観察>

NPC1を35mmガラスボトムディッシュ（IWAKI社製）に播種し（細胞数：1×10⁴個/ディッシュ）、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地中で、24時間、37℃で培養した。培地を900μLのダルベッコ改変イーグル培地に交換後、シクロデキストリン濃度に換算して5mMに調整した前記試料を100μLずつ各ディッシュに添加し、さらに37℃で24時間培養した。

その後、リン酸緩衝溶液で細胞を2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液を1mL加え、室温で15分間静置し、細胞を固定した。

20

リン酸緩衝溶液で細胞を2回洗浄後、0.1%Triton X-100を1mL加え、室温で10分間静置し、細胞膜の透過処理を行った。

リン酸緩衝溶液で細胞を2回洗浄後、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝溶液で希釈したマウスモノクローナル抗early endosome antigen 1（EEA1）抗体（BD Bioscience社製）、マウスモノクローナル抗CD63抗体（BioLegend社製）、マウスモノクローナル抗lysosomal-associated membrane protein 1（LAMP1）抗体（Santa Cruz社製）をそれぞれのディッシュに加え、室温で1時間静置した。

その後、リン酸緩衝溶液で3回洗浄し、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝溶液で希釈したAlexa Fluor 647-conjugated goat anti-mouse IgG溶液を加え、室温で30分静置した。その後、リン酸緩衝溶液で3回洗浄した。

30

顕微鏡観察はFluoView FV10i（オリンパス社製）で行った。

【0084】

蛍光顕微鏡観察により、FITC標識HP-β-CD、FITC標識HE-PRXの局在位置を詳細に求めるため、初期エンドソーム、後期エンドソーム、及びリソソームをEEA1、CD63、及びLAMP1で免疫染色した結果を図11A～図11Fに示す。

【0085】

また、FluoView Viewer（オリンパス社製）を用い、EEA1、CD63、又はLAMP1陽性小胞に対するFITC標識HP-β-CD、FITC標識HE-PRXの共局在率を図11A～図11Fの画像より計算した結果を図12に示す。前記計算は、細胞20個に対し、EEA1、CD63、又はLAMP1陽性小胞に対する共局在率を求め、平均値と標準誤差とを計算した。

40

【0086】

図11A～図12の結果から、FITC標識HP-β-CDは、初期エンドソーム（EEA1陽性小胞）、後期エンドソーム（CD63陽性小胞）、及びリソソーム（LAMP1陽性小胞）における局在は少なく、大部分は細胞膜近傍に局在している様子が観察された。これは、β-CDの空洞部が細胞膜中の脂質、コレステロールと相互作用するためであると予想される。この結果は、β-CDが細胞膜と強く相互作用し、膜障害性、溶血を

50

示すといった上述の結果と一致する。

また、F I T C 標識 H E - P R X は、後期エンドソーム（C D 6 3 陽性小胞）、又はリソソーム（L A M P 1 陽性小胞）に局在していた。ポリロタキサンは、エンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれ、後期エンドソーム、リソソームに到達したと考えられる。ポリロタキサンは、 β -C D の空洞部が高分子鎖で占有されているため細胞膜との作用がなく、結果としてエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれると予想される。

以上の結果より、F I T C 標識 H P - β -C D と F I T C 標識 H E - S S - P R X とでは、細胞に対する局在、作用箇所が大きく異なることが明らかとなった。

【0087】

（試験例 5：コレステロール除去作用）

ポリロタキサン、シクロデキストリン誘導体による N P C 1 からのコレステロール除去作用をより詳細に検討した。

N P C 1 を 24 ウェルプレート（B D F a l c o n 社製）に播種し（細胞数： 2.5×10^4 個／ディッシュ）、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地中で、24時間、37℃で培養した。培地を 270 μ L のダルベッコ改変イーグル培地に交換後、シクロデキストリン濃度に換算して 0.01 mM ~ 100 mM に調整した下記試料を 30 μ L ずつ各ウェルに添加し、さらに 37℃で 24 時間培養した。

その後、リン酸緩衝溶液で細胞を 2 回洗浄後、0.25%トリプシン-E D T A 溶液（G i b c o 社製）を各ウェルに添加し細胞を剥離させた。細胞を 1.5 mL チューブに集め、リン酸緩衝溶液で 2 回洗浄した。その後、細胞溶解液（50 mM リン酸緩衝溶液、500 mM 塩化ナトリウム、25 mM コール酸、0.5% T r i t o n X - 100 を含む）を各チューブに加え細胞を溶解した。

各細胞溶解液に対し、A m p l e x R e d C h o l e s t e r o l A s s a y K i t （インビトロジェン社製）により総コレステロールの定量を行い、また m i c r o B C A P r o t e i n A s s a y K i t （サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）により総タンパク質量を定量した。細胞内の総コレステロール量は、総コレステロール量（nmol）／総タンパク質量（mg）で表記した。

なお、比較として、前記 N H D F を用い、試料を投与しなかった場合、及び前記 N P C 1 を用い、試料を投与しなかった場合についても同様にして試験した。

<試料>

- （1） H E - S S - P R X （製造例 1 で作製）
- （2） H E - P R X （比較製造例 1 で作製）
- （3） H P - β -C D （シグマアルドリッチ社製）
- （4） D M - β -C D （シグマアルドリッチ社製）

【0088】

結果を図 13 に示す。図 13 中、「●」は「D M - β -C D」の結果を示し、「■」は「H P - β -C D」の結果を示し、「△」は「H E - P R X」の結果を示し、「▽」は「H E - S S - P R X」の結果を示す。

コレステロール蓄積量に対する用量反応曲線より半数効果濃度（E D 50）を求めた結果、H P - β -C D、D M - β -C D、H E - S S - P R X の E D 50 は、それぞれ 2.59 mM、0.23 mM、0.024 mM であった。

以上の結果より、細胞内分解性結合を有する H E - S S - P R X は既存の β -C D 誘導体と比較して 10 分の 1 から 100 分の 1 の濃度で N P C 1 からのコレステロール除去が可能であることが明らかとなった。また、非分解性の H E - P R X は、本実験濃度域では有意なコレステロール減少は示さなかった。

本結果は、細胞内におけるポリロタキサン中の分解性結合の切断と、それに伴う β -C D の放出が低濃度でのコレステロール除去に結実したと考えられる。

【0089】

（試験例 6：コレステロール除去作用）

試料として、下記試料を用いた以外は、試験例 5 と同様にして試験を行い、ポリロタキ

10

20

30

40

50

サン中の分解性結合の種類がNPC1からのコレステロール除去作用に与える影響を検討した。

<試料>

- (1) HE-PRX (比較製造例1で作製)
- (2) HE-ace-PRX (製造例2で作製)
- (3) HE-COO-PRX (製造例3で作製)
- (4) HE-SS-PRX (製造例1で作製)

【0090】

結果を図14に示す。図14中、「△」は「HE-PRX」の結果を示し、「□」は「HE-ace-PRX」の結果を示し、「○」は「HE-COO-PRX」の結果を示し、「▽」は「HE-SS-PRX」の結果を示す。

10

コレステロール蓄積量に対する用量反応曲線よりED50を求めた結果、HE-ace-PRX、HE-COO-PRX、HE-SS-PRXのED50は、それぞれ0.13mM、0.49mM、0.024mMであった。

以上の結果より、細胞内分解性結合を有するポリロタキサンはいずれもNPC1からのコレステロール除去が可能であることが明らかとなった。特にジスルフィド結合を有するポリロタキサンはコレステロール除去作用が高いことが明らかとなった。このようなポリロタキサン中の分解性結合種によるコレステロール除去作用の差異は、細胞内における分解性結合の分解効率に関係していると考えられる。

【0091】

20

(試験例7-1: コレステロール除去作用)

試料として、下記資料を用いた以外は、試験例5と同様にして試験を行い、ポリロタキサンのシクロデキストリンに導入された官能基の種類がNPC1からのコレステロール除去作用に与える影響を検討した。

<試料>

- (1) HE-SS-PRX (製造例1で作製)
- (2) DMAE-SS-PRX (製造例4で作製)

【0092】

結果を図15Aに示す。図15A中、「▽」は「HE-SS-PRX」の結果を示し、「●」は「DMAE-SS-PRX」の結果を示す。

30

コレステロール蓄積量に対する用量反応曲線よりED50を求めた結果、HE-SS-PRX、DMAE-SS-PRXのED50は、それぞれ0.026mM、0.0028mMであった。

以上の結果より、ポリロタキサンによるNPC1からのコレステロール除去には、ポリロタキサンに修飾する官能基が影響することが明らかとなった。本結果は、細胞内へのポリロタキサンの取り込み量が増加するためであると予想される。特に静電荷を有するDMAE基を導入したポリロタキサンは細胞膜と静電的に強く相互作用し、効率的に細胞内へと取り込まれると考えられる。

【0093】

(試験例7-2: 細胞への取込み量)

40

各ポリロタキサンの細胞への取込み量を以下のようにして、フローサイトメトリーにより求めた。

【0094】

<試料の調製>

ポリロタキサンの細胞への取込み量を調べるために、試料として用いるFITC標識HE-SS-PRX、フルオレセインイソチオシアネートエチレンジアミン(FITC-EDA)で修飾したDMAE-SS-PRX(以下、「FITC標識DMAE-SS-PRX」と称する)を以下のようにして調製した。

【0095】

—FITC標識HE-SS-PRXの調製—

50

試験例4と同様にして調製した。

【0096】

－FITC標識DMAE－SS－PRXの調製－

製造例4で調製したDMAE－SS－PRX 30mgを5mLのDMSOに溶解した。1, 1'－カルボニルジイミダゾールを0.76mg加え、室温で24時間攪拌した。FITC－EDAを4.2mg加え、室温でさらに24時間攪拌した。反応後、分画分子量3,500の透析膜（スペクトラ社製）へ加え、超純水に対し透析をすることで未反応のFITC－EDAを除去した。回収した水溶液を凍結乾燥することでFITC標識DMAE－SS－PRXを27.5mg得た。FITCの修飾数は紫外－可視分光光度計を用いて494nmの吸光度より算出した。未標識DMAE－SS－PRXとFITC－DMAE－SS－PRXを混合し、DMAE－SS－PRX上のβ－CD 一分子に対するFITC修飾数が0.04分子となるよう調整した。

10

【0097】

<フローサイトメトリー>

NPC1を24ウェルプレート（BD Falcon社製）に播種し（細胞数：1×10⁵個／ディッシュ）、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地中で、24時間、37℃で培養した。培地を270μLのダルベッコ改変イーグル培地に交換後、シクロデキストリン濃度に換算して0.25mMに調整した下記試料を30μLずつ各ウェルに添加し、さらに37℃で24時間培養した。

その後、リン酸緩衝溶液で細胞を2回洗浄後、0.25%トリプシン－EDTA溶液（Gibco社製）を各ウェルに添加し細胞を剥離させた。細胞を1.5mLチューブに集め、リン酸緩衝溶液で2回洗浄した。その後、0.1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝溶液を加え、35μmセルストレーナー（BD Falcon社製）により濾過した。

20

細胞の蛍光強度をFACSCantoII（BD Bioscience社製）により求めた。細胞10,000個を数え、その平均値を図15Bに示す。

【0098】

フローサイトメトリーによりFITC標識HE－SS－PRXとFITC標識DMAE－SS－PRXとの細胞内への取込み量を比較した結果、FITC標識DMAE－SS－PRXは、FITC標識HE－SS－PRXの22.6倍高い蛍光強度を示した（図15B、図15B中、HE－SS－PRXはFITC標識HE－SS－PRXの結果を示し、DMAE－SS－PRXは、FITC標識DMAE－SS－PRXの結果を示す）。本結果より、DMAE－SS－PRXは効率的に細胞に取り込まれるため、HE－SS－PRXよりも低濃度でNPC1からのコレステロール除去が可能であると考えられる。

30

【0099】

（試験例8：免疫染色によるオートファゴソームの観察）

前記NPC1を35mmガラスボトムディッシュ（IWAKI社製）に播種し（細胞数：1.5×10⁴個／ディッシュ）、37℃、5% CO₂環境下で1日間培養後、下記試料を添加し、さらに24時間培養した。

前記培養後、4% パラホルムアルデヒド溶液（Wako社製）で10分間処理することで細胞を固定し、50μg/mL ジギトニン溶液（東京化成工業社製）で5分間処理することで細胞膜の透過処理を行い、1% BSA/PBS溶液で30分間処理することでブロッキングを行った。

40

次いで、Rabbit polyclonal anti-LC3抗体（MBL社製）を1% BSA溶液で1:200の希釈率で混合したもので、4℃で1日間処理した。細胞をPBSで洗浄後、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG（Abcam社製）（1% BSA溶液で1,000分の1に希釈）で30分間染色した。細胞をPBSで洗浄後、FluoView FV-10i（オリンパス社製）で観察を行った。

なお、比較として、前記NHDFを用い、試料を添加しなかった場合、及び前記NPC

50

1を用い、試料を添加しなかった場合についても同様にして試験した。

<試料>

(1) HEE-SS-PRX (製造例5で作製、添加量は、シクロデキストリン濃度に換算して0.01mM~1mM)

(2) HP-β-CD (シグマアルドリッチ社製、添加量は、0.1mM~10mM)

【0100】

細胞のLC3染色画像を図16A~図16Dに示し、細胞内LC3陽性小胞数の定量結果を図16Eに示す。

図16Aは、細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合の結果を示し、図16Bは、細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合の結果を示し、図16Cは、細胞としてNPC1を用い、試料としてHP-β-CDを添加(添加量:10mM)した場合の結果を示し、図16Dは、細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを添加(添加量:HEE-SS-PRX上のβ-CD濃度が1mMとなるように添加)した場合の結果を示す。

図16Eでは、左側から順に、「細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP-β-CDを添加(添加量:10mM)した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを添加(添加量:HEE-SS-PRX上のβ-CD濃度が1mMとなるように添加)した場合」の結果を示す。

【0101】

LC3染色画像より細胞内のLC3陽性小胞数を定量した結果、図16Eに示されるように、NHDF(正常細胞)と比較してNPC1では、基底状態のLC3陽性小胞数が有意に多いことが確認された。また、HP-β-CDを作用させたNPC1ではLC3陽性小胞数がさらに増加した。一方、ジスルフィド結合を有するポリロタキサン(HEE-SS-PRX)を作用させたNPC1ではLC3陽性小胞数が正常細胞と同程度まで減少することが明らかとなった。

【0102】

(試験例9:LC3及びp62の発現評価)

下記細胞におけるLC3及びp62の発現をウェスタンブロットにより、以下のようにして評価した。

<細胞>

(1) NPC1細胞

(2) NHDF細胞

(3) NPC2変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞(Coriell Instituteより入手;番号GM18455)

(4) ファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞(Coriell Instituteより入手;番号GM00107)

(5) GM1ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞(Coriell Instituteより入手;番号GM03589)

【0103】

前記細胞を12ウェルプレート(Nunc社製)に播種し(細胞数:1×10⁵個/ウェル)、37℃、5% CO₂環境下で1日間培養後、下記試料を添加し、さらに24時間培養した。

前記培養後、細胞をPBSで洗浄し、その後、1% プロテアーゼインヒビターカクテル(ナカライテスク社製)、1% ホスファターゼインヒビターカクテル(ナカライテスク社製)を含むRIPAバッファー(Wako社製)を150μL加え、30分間振盪し細胞を溶解した。前記細胞溶解液を15,000rpmで10分間遠心分離を行い、上清を回収した。

前記上清10μLと、Laemmli buffer(Biorad社製) 2.5μ

10

20

30

40

50

Lとを混合し、12%アクリルアミドゲルに加えた。その後、150Vで45分間電気泳動を行った。その後、トランスブロット Turbo ブロッキングシステム (Bio-rad社製) を用いてポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Bio-rad社製) に転写した。その後、5%スキムミルク溶液 (Wako社製) で1時間ブロッキングを行った。

ブロッキング処理の後、オートファジーの指標である抗LC3抗体 (MBL社製)、選択的オートファジー基質である抗p62/SQSTM1抗体 (MBL社製)、抗 β -actin抗体 (Sigma-Aldrich社製) を1%スキムミルク溶液で希釈したもので、PVDF膜を4℃で1日間処理した。

PBSで3回洗浄後、1%スキムミルク溶液で希釈したHRP-conjugated goat anti-rabbit IgGでPVDF膜を室温で1時間処理した。

10

PBSで3回洗浄後、Pierce Western Blotting Substrateで処理し、ImageQuant LAS 500システム (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) でPVDF膜の撮影を行った。

なお、比較として、前記NHDFを用い、試料を添加しなかった場合、前記NHDFを用い、試料の代わりにBafilomycin A1 (以下、「Baf A」と称する) を添加した場合、前記NPC1を用い、試料を添加しなかった場合、前記NPC1を用い、試料の代わりにBaf Aを添加した場合についても同様にして試験した。

<試料>

(1) HEE-SS-PRX (製造例5で作製、添加量は、HEE-SS-PRX上の β -CD濃度に換算して0.01mM~1mM)

20

(2) HP- β -CD (シグマアルドリッチ社製、添加量は、0.1mM~10mM)

【0104】

NHDF及びNPC1のウエスタンブロットの結果を図17Aに示し、NHDF及びNPC1におけるLC3-IIの相対発現量を図17Bに示し、NHDF及びNPC1におけるp62の相対発現量を図17Cに示す。

また、NHDF、NPC2変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞、ファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞、及びGM1ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞のウエスタンブロットの結果を図17Dに示し、NHDF、NPC2変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞、ファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞、及びGM1ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞におけるLC3-IIの相対発現量を図17Eに示す。

30

なお、前記各相対発現量は、ウエスタンブロットのバンド強度から求めたものである。

【0105】

図17A、図17B、及び図17Cでは、左側から順に、「細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNHDFを用い、試料の代わりにBaf Aを添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料の代わりにBaf Aを添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP- β -CDを0.1mM添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP- β -CDを1mM添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP- β -CDを10mM添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを0.01mM添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを0.1mM添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを1mM添加した場合」の結果を示す。

40

【0106】

図17D、及び図17Eでは、左側から順に、「細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC2変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC2変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料としてHP- β -CDを10mM添加した場合」、「細胞としてNPC2変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料としてHEE-SS-PRX

50

を1 mM添加した場合」、「細胞としてファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料としてHP- β -CDを10 mM添加した場合」、「細胞としてファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料としてHEE-SS-PRXを1 mM添加した場合」、「細胞としてGM1 ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてGM1 ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料としてHP- β -CDを10 mM添加した場合」、「細胞としてGM1 ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞を用い、試料としてHEE-SS-PRXを1 mM添加した場合」の結果を示す。

【0107】

10

図17A～図17Cの結果から、リソソーム内の低pHを中和しオートファジー形成不全を起こすことが知られているBaf Aを添加することにより、LC3、p62の顕著な増加が認められた。また、HP- β -CDを添加した場合には、濃度依存的にLC3-I Iの発現量が顕著に増加し、10 mMの濃度ではp62の有意な増加も認められた。

一方、HEE-SS-PRX（細胞内分解性結合を有するポリロタキサン）を添加した場合には、LC3-I I、p62の発現量の増加は起こらなかった。また、バンド強度より相対発現量を求めると、濃度依存的にLC3-I Iの発現量は減少した。

【0108】

また、図17D及び図17Eの結果から、オートリソソームの形成不全が認められているNPC2 変異型NPC病患者由来皮膚繊維芽細胞、ファブリー病患者由来皮膚繊維芽細胞、及びGM1 ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞においても、HP- β -CDの添加はLC3-I Iの増加をもたらし、HEE-SS-PRXの添加はLC3-I Iを減少させていた。

20

HP- β -CD、HEE-SS-PRXの細胞内LC3-I I量の増減に対する効果は細胞種によらず普遍的であり、HP- β -CDが細胞内にLC3-I Iの蓄積をもたらすのに対してHEE-SS-PRXはLC3-I Iの蓄積を解消していた。

【0109】

以上の結果より、HP- β -CDはオートリソソームの形成を阻害し、反対に細胞内分解性結合を有するポリロタキサンはオートリソソームの形成を促進していることが予想された。

30

【0110】

（試験例10：オートリソソーム形成の観察）

EGFPが酸性下で消光することを利用し、酸性下でも励起一蛍光が可能なmRFPを、EGFPを介してLC3と結合することで、それぞれの蛍光画像よりオートファゴソーム、オートリソソームの形成を評価した（S. Kimura et al. Autophagy 3, 452-260 (2007)）。具体的には、以下のように行った。

【0111】

前記NPC1を35 mmガラスボトムディッシュ（IWAKI社製）に播種し（細胞数：1.5 $\times$ 10⁴ 個/ディッシュ）、37℃、5% CO₂ 環境下で1日間培養した。

40

mRFP-EGFP-LC3を直列に結合したptfLC3プラスミドDNA（Addgene社より購入；番号21074）250 ngをOpti-MEM（ライフテクノロジーズ社製）で希釈し、Lipofectamine 3000（ライフテクノロジーズ社製）を加え5分間静置した。

前記プラスミド含有溶液を前記細胞培養液中に添加し、24時間培養した。培養液を交換後、下記試料を添加し、さらに24時間培養した。

前記培養後、4% パラホルムアルデヒド溶液（Wako社製）で10分間処理することで細胞を固定した。PBSで洗浄後、FluoView FV-10i（オリンパス社製）で観察を行った。

なお、比較として、前記NHDFを用い、試料を添加しなかった場合、及び前記NPC

50

1を用い、試料を添加しなかった場合についても同様にして試験した。

<試料>

(1) H E E - S S - P R X (製造例5で作製、添加量は、シクロデキストリン濃度に換算して1 mM)

(2) H P - β - C D (シグマアルドリッチ社製、添加量は、10 mM)

【0112】

各細胞中のp t f L C 3の発現を蛍光顕微鏡で観察した結果を図18Aに示し、オートファゴソーム数及びオートリソソーム数の画像解析結果を図18Bに示す。

【0113】

図18Aでは、左側から順に、「細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP- β -CDを添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを添加した場合」の結果を示し、上段は「GFP」に由来する蛍光画像を示し、下段は「mRFP」に由来する蛍光画像を示す。

【0114】

図18Bでは、左側から順に、「細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP- β -CDを添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを添加した場合」の結果を示し、各項目における左側は、オートファゴソーム数、右側は、オートリソソーム数を解析した結果を示す。

【0115】

図18A及び図18Bの結果から、未処理の正常繊維芽細胞と比較して、未処理のNPC1細胞ではオートファゴソーム数の増加とオートリソソーム数の減少が認められた。

HP- β -CDで処理したNPC1細胞では、オートリソソーム数に変化はないものの、オートファゴソーム数の増加が認められた。

一方、HEE-SS-PRXで処理したNPC1細胞では、正常細胞とほぼ同程度のオートファゴソーム、オートリソソームが観察され、細胞内分解性結合を有するポリロタキサンの添加により、NPC1細胞におけるオートリソソームの形成不全を解消できることが明らかとなった。

【0116】

(試験例11：オートファゴソームとリソソームとの融合の観察)

オートリソソームの形成をより詳細に調べるために、プラスミドDNAにより一過的に発現させたmRFP-LC3、及びリソソーム特異的膜タンパク質であるLAMP1の局在を、以下のようにして観察した。

【0117】

前記NPC1を35mmガラスボトムディッシュ(IWAKI社製)に播種し(細胞数: 1.5×10^4 個/ディッシュ)、37℃、5% CO₂環境下で1日間培養した。

mRFP-LC3発現プラスミドDNA(Addgene社より購入; 番号21075) 250 ngをOpti-MEM(ライフテクノロジーズ社製)で希釈し、Lipofectamine 3000(ライフテクノロジーズ社製)を加え5分間静置した。

前記プラスミド含有溶液を前記細胞培養液中に添加し、24時間培養した。培養液を交換後、下記試料を添加し、さらに24時間培養した。

前記培養後、4% パラホルムアルデヒド溶液(Wako社製)で10分間処理することで細胞を固定し、50 μ g/mL ジギトニン溶液(東京化成工業社製)で5分間処理することで細胞膜の透過処理を行い、1% BSA/PBS溶液で30分間処理することでブロッキングを行った。

次いで、Mouse monoclonal anti-LAMP1抗体(Santa Cruz社製)を1% BSA溶液で1:200の希釈率で混合したもので、4℃で1日間処理した。細胞をPBSで洗浄後、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG(Abcam社製)(1% BSA

10

20

30

40

50

溶液で1,000分の1に希釈)で30分間染色した。細胞をPBSで洗浄後、Fluoview FV-10i (オリンパス社製)で観察を行い、mRFP-LC3とLAMP1との共局在率を評価した。

なお、比較として、前記NHDFを用い、試料を添加しなかった場合、及び前記NPC1を用い、試料を添加しなかった場合についても同様に試験した。

<試料>

(1) HEE-SS-PRX (製造例5で作製、添加量は、シクロデキストリン濃度に換算して1mM)

(2) HP-β-CD (シグマアルドリッチ社製、添加量は、10mM)

【0118】

各細胞中のmRFP-LC3及びLAMP1の発現を観察した結果を図19Aに示し、mRFP-LC3とLAMP1との共局在率を求めた結果を図19Bに示す。

【0119】

図19Aでは、左側から順に、「細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP-β-CDを添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを添加した場合」の結果を示し、上段は「mRFP-LC3」の発現を観察した結果を示し、下段は内在性「LAMP1」の局在を観察した結果を示す。

【0120】

図19Bでは、左側から順に、「細胞としてNHDFを用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料を添加しなかった場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHP-β-CDを添加した場合」、「細胞としてNPC1を用い、試料としてHEE-SS-PRXを添加した場合」の結果を示す。図19Bにおける縦軸は、細胞におけるmRFP-LC3とLAMP1との共局在率を示す。

【0121】

図19A及び図19Bの結果から、未処理の正常繊維芽細胞と比較して、未処理のNPC1細胞ではmRFP-LC3とLAMP1との共局在率が低く、オートリソソームの形成が生じにくいことが示唆された。

また、HP-β-CDで処理したNPC1細胞では、未処理のNPC1細胞と同様にmRFP-LC3とLAMP1との共局在率が低かった。

一方、HEE-SS-PRXで処理したNPC1細胞では、mRFP-LC3とLAMP1との共局在率が正常細胞とほぼ同程度まで上昇し、オートリソソーム形成の亢進が示唆された。

【0122】

試験例8～11の結果から、複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンは、オートリソソームの形成を亢進する作用を示すことが見出された。そのため、本発明のポリロタキサンは、オートリソソームの形成不全によりオートファジー機能が阻害された疾患に対する医薬品としての応用が期待される。

【0123】

本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

<1> 複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して嵩高い置換基を有するポリロタキサンを含有することを特徴とする脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患に対する医薬組成物である。

<2> 脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患が、ライソゾーム病である前記<1>に記載の医薬組成物である。

<3> 環状分子が、シクロデキストリンである前記<1>から<2>のいずれかに記載の医薬組成物である。

<4> 細胞内分解性結合が、アセタール結合、ケタール結合、ジスルフィド結合、エ

10

20

30

40

50

ステル結合、オルトエステル結合、ビニルエーテル結合、及びヒドラジド結合から選択されるいずれかである前記<1>から<3>のいずれかに記載の医薬組成物である。

<5> 線状分子が、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体、ポリプロピレングリコール、及びポリエチレングリコールのいずれかである前記<1>から<4>のいずれかに記載の医薬組成物である。

<6> ライソゾーム病が、ゴーシェ病、ニーマン・ピック病A型、ニーマン・ピック病B型、ニーマン・ピック病C型、GM1ガングリオシドーシス、GM2ガングリオシドーシス、ファバー病、ウォルマン病、及びファブリー病から選択されるいずれかである前記<2>から<5>のいずれかに記載の医薬組成物である。

<7> ライソゾーム病が、ニーマン・ピック病C型、GM1ガングリオシドーシス、及びファブリー病から選択されるいずれかである前記<2>から<6>のいずれかに記載の医薬組成物である。

<8> 複数の環状分子を貫通させた線状分子の両端部に細胞内分解性結合を介して高い置換基を有するポリロタキサンであって、

前記線状分子は、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールの順に重合した共重合体であり、

前記複数の環状分子が β -シクロデキストリンであることを特徴とするポリロタキサンである。

<9> 細胞内分解性結合が、アセタール結合、ケタール結合、ジスルフィド結合、エステル結合、オルトエステル結合、ビニルエーテル結合、及びヒドラジド結合から選択されるいずれかである前記<8>に記載のポリロタキサンである。

<10> 脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患を予防又は治療するための方法であって、個体に、前記<1>から<7>のいずれかに記載の医薬組成物を投与することを特徴とする方法である。

<11> 前記<1>から<7>のいずれかに記載の医薬組成物の脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患を予防又は治療するための使用。

<12> 脂質代謝異常及びオートファジーの機能異常の少なくともいずれかに起因する疾患を予防又は治療するための医薬品製造のための前記<8>または<9>のポリロタキサンの使用。

【産業上の利用可能性】

【0124】

本発明の医薬組成物は、ポリロタキサン構造を有することにより、溶血を回避することができるため従来のシクロデキストリン単体より安全性が高いだけでなく、細胞内選択的にシクロデキストリンを放出することで高いコレステロール除去作用を有する。また、本発明の医薬組成物は、優れたオートリソソームの形成亢進作用を有する。これらの作用により、高い治療効果又は予防効果を有し、かつ副作用の少ない優れた医薬組成物として利用可能である。また、本発明の医薬組成物は、ポリロタキサン構造を有しており、シクロデキストリンよりも高分子量化されているため、血中半減期の延長による薬効の持続性、投与量や投与回数の低減も期待される。

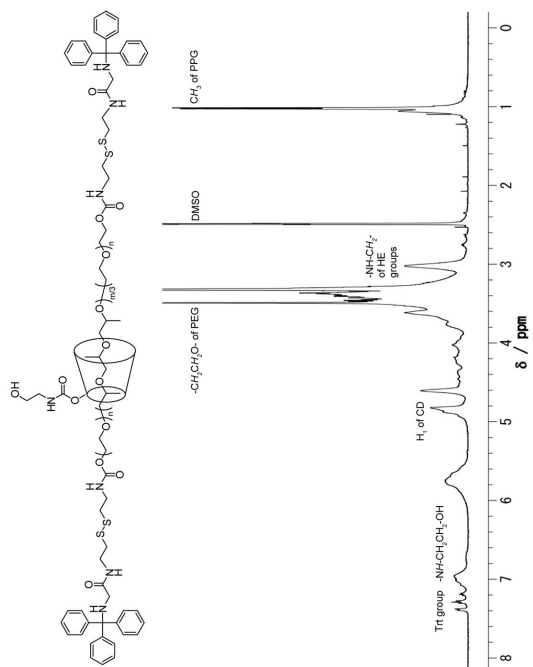
10

20

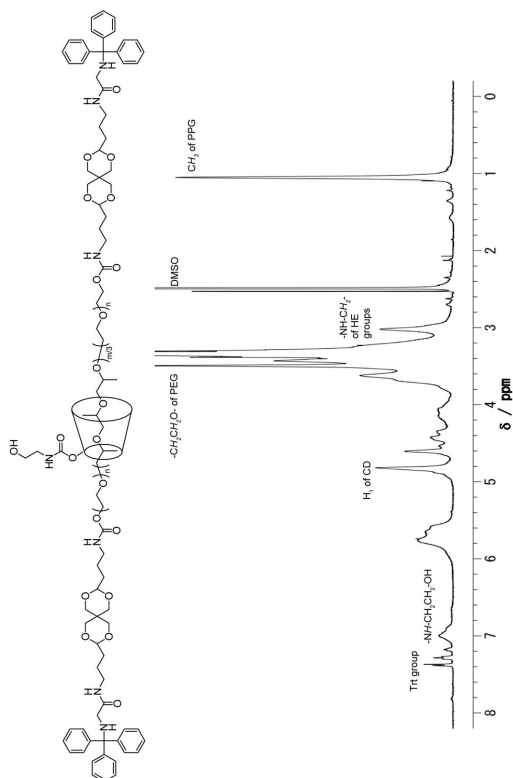
30

40

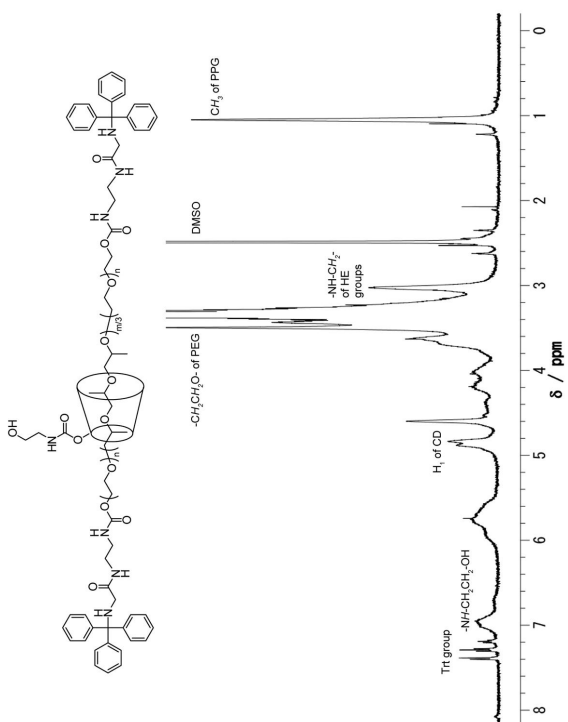
【図 1】



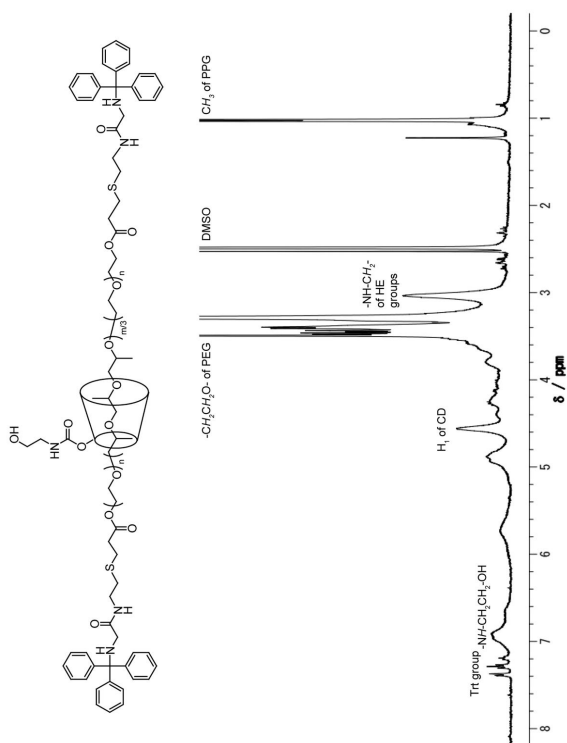
【図 2】



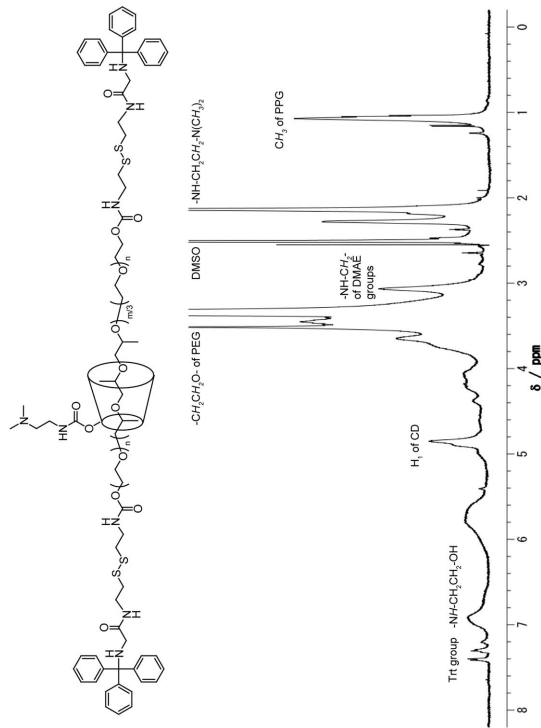
【図 3】



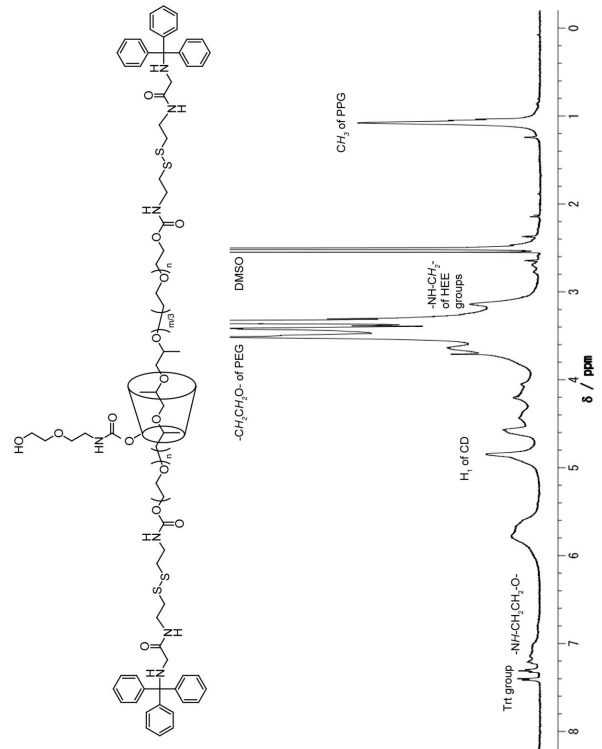
【図 4】



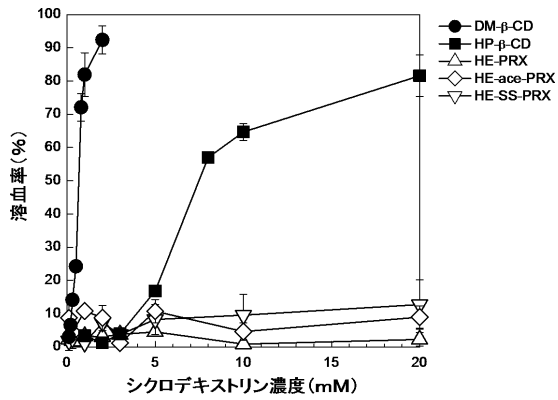
【図 5】



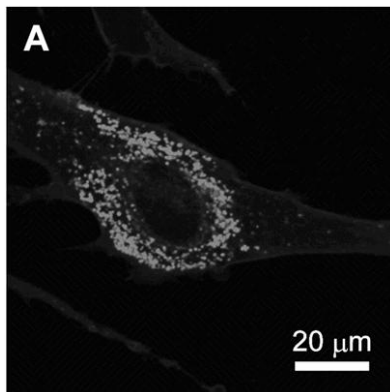
【図 6】



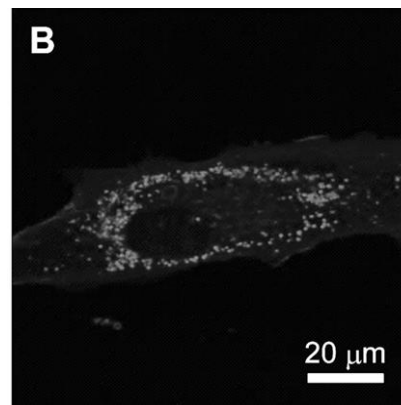
【図 7】



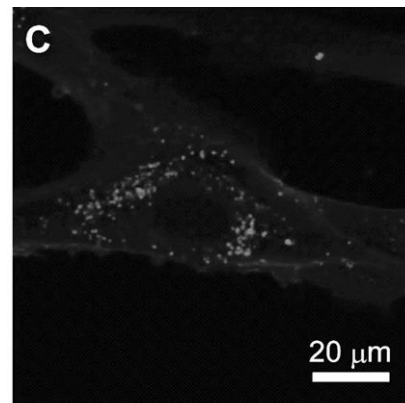
【図 8 A】



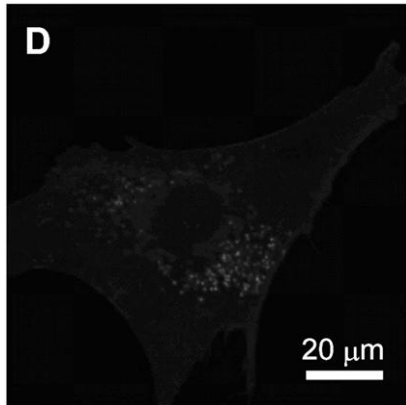
【図 8 B】



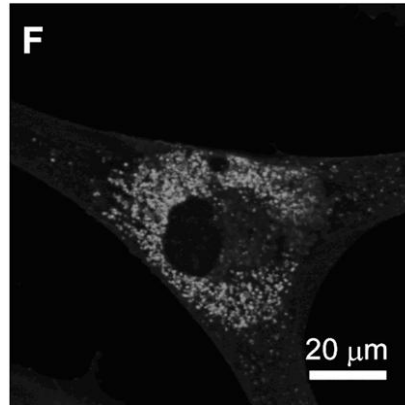
【図 8 C】



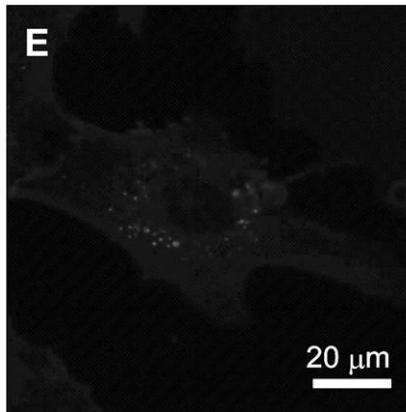
【図 8 D】



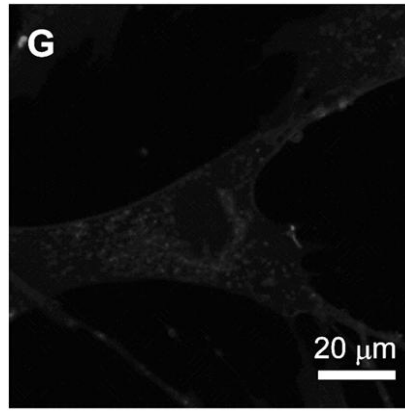
【図 8 F】



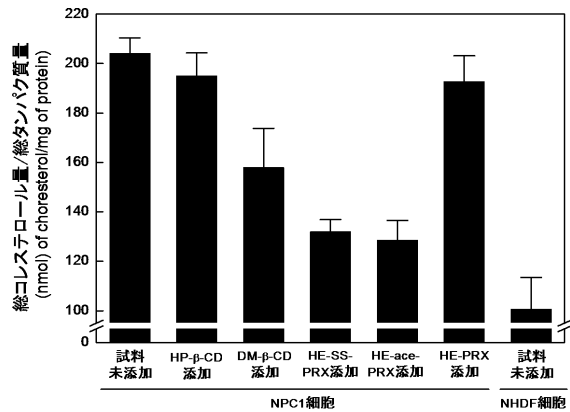
【図 8 E】



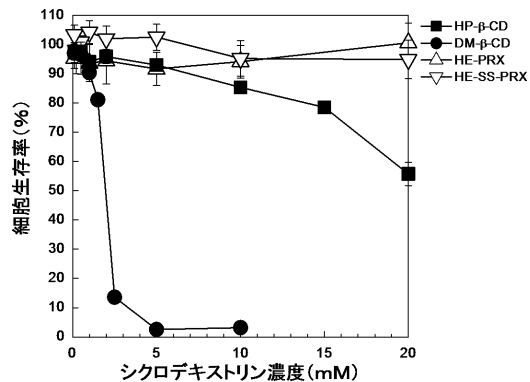
【図 8 G】



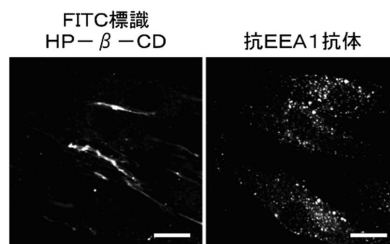
【図 9】



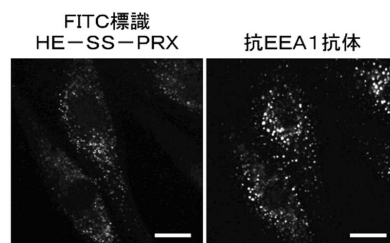
【図 10】



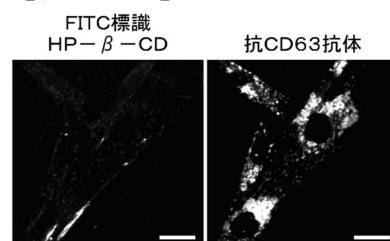
【図 11 A】



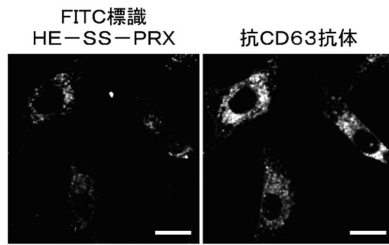
【図 11 B】



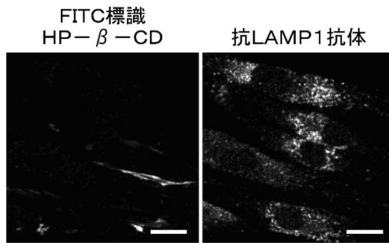
【図 11 C】



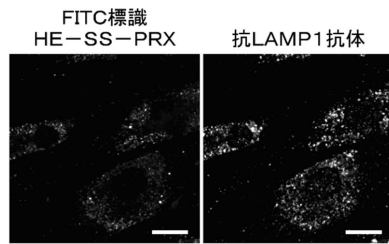
【図 1 1 D】



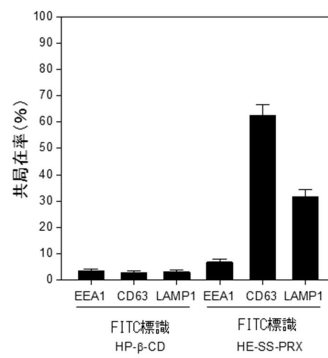
【図 1 1 E】



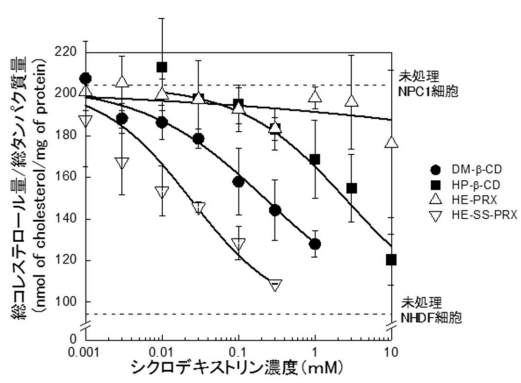
【図 1 1 F】



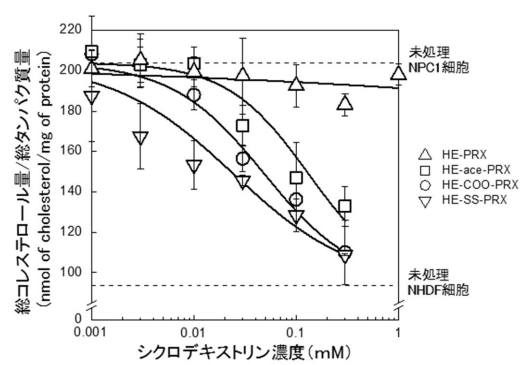
【図 1 2】



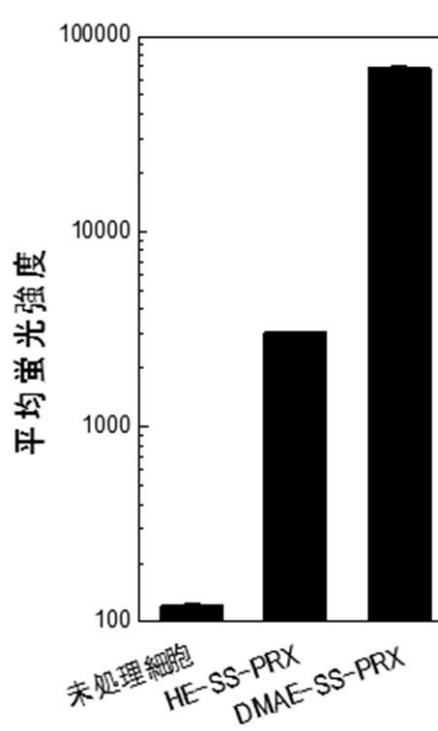
【図 1 3】



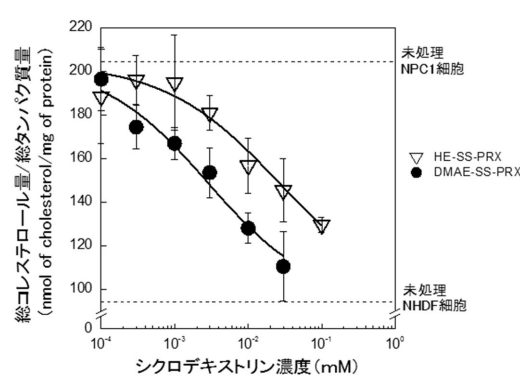
【図 1 4】



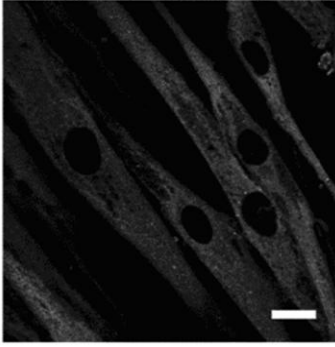
【図 1 5 B】



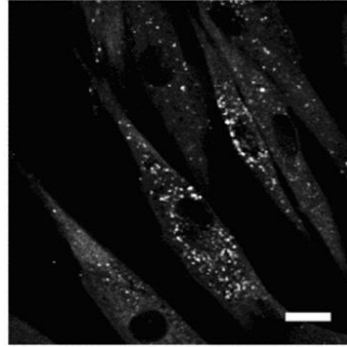
【図 1 5 A】



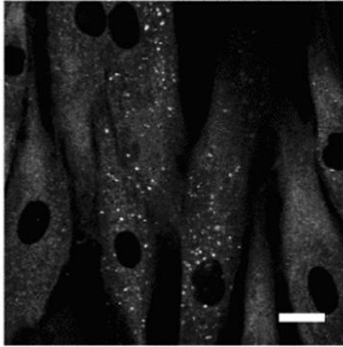
【図 1 6 A】



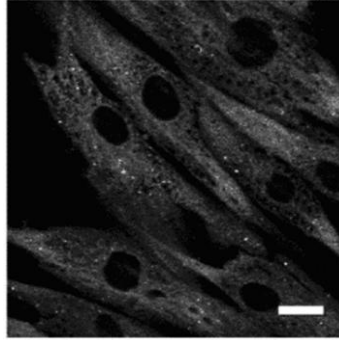
【図 1 6 C】



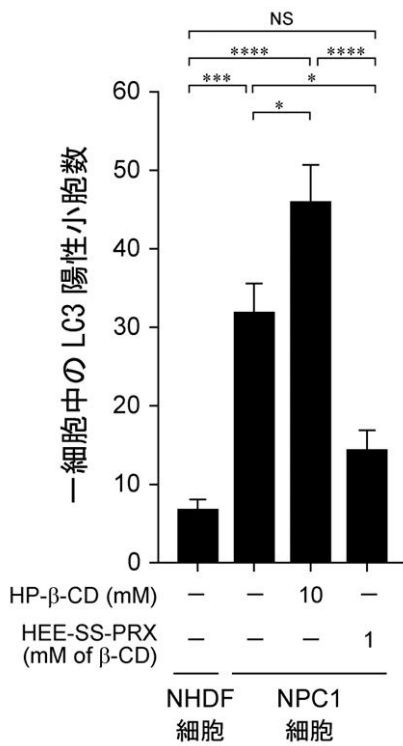
【図 1 6 B】



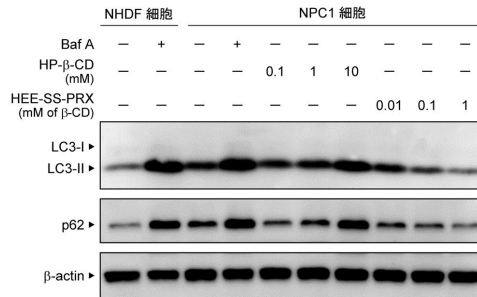
【図 1 6 D】



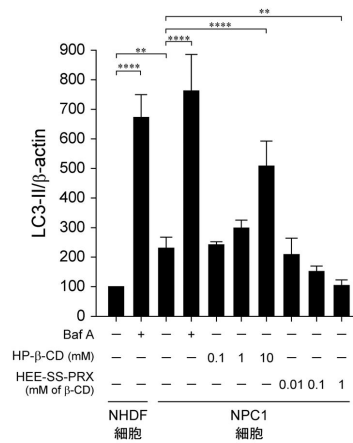
【図 1 6 E】



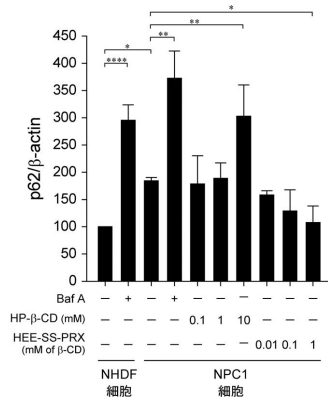
【図 1 7 A】



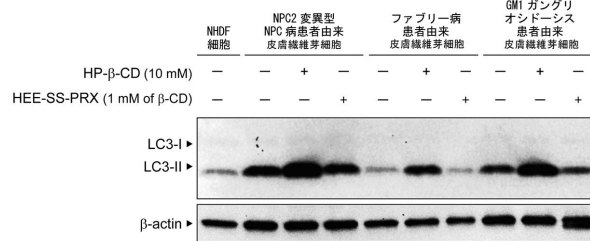
【図 1 7 B】



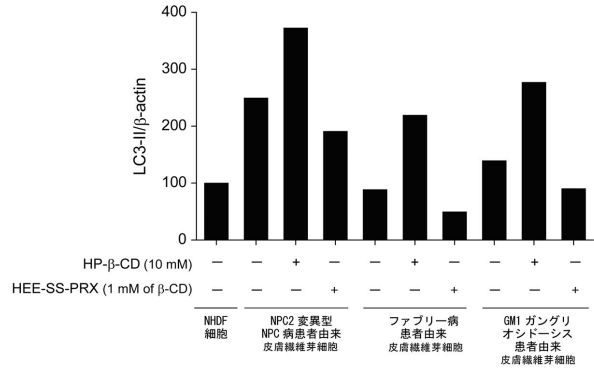
【図 17 C】



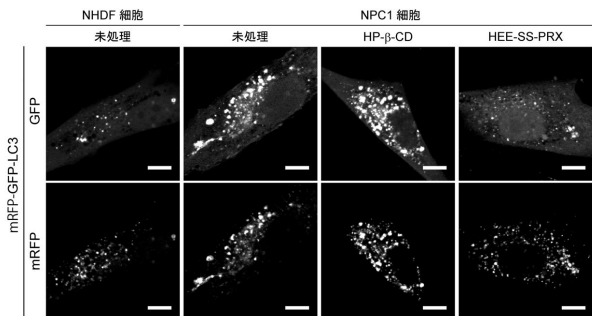
【図 17 D】



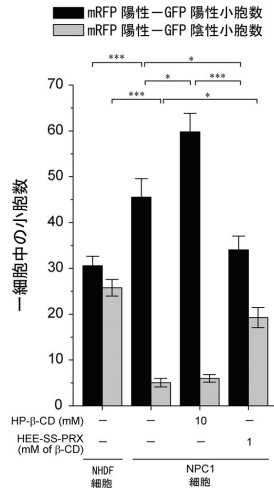
【図 17 E】



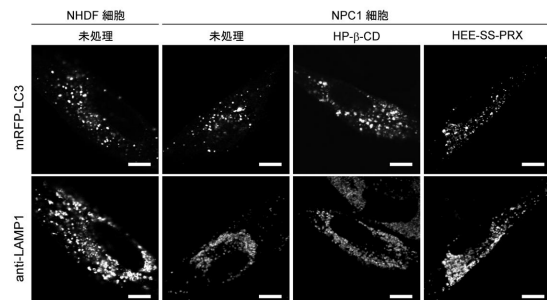
【図 18 A】



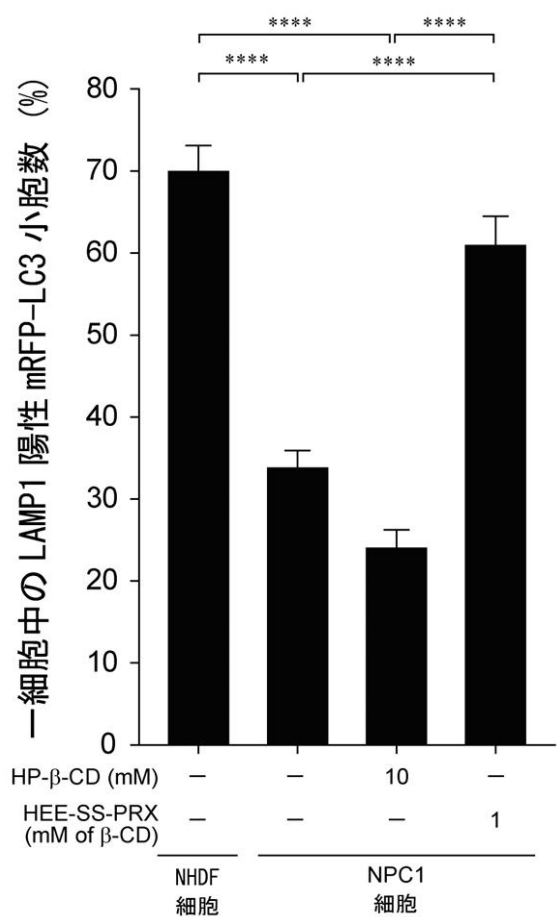
【図 18 B】



【図 19 A】



【図 19 B】



フロントページの続き

(56)参考文献 特表2009-518418 (JP, A)

特開昭62-265230 (JP, A)

Collins, C.J., Synthesis, characterization, and evaluation of pluronic-based β -cyclodextrin polyrotaxanes for mobi, Biochemistry, 2013年 4月 5日, Vol.52, No.19, pp.3242-3253, 全文

Yui, N., Functional Cyclodextrin Polyrotaxanes for Drug Delivery, Adv. Polym. Sci., 2009年, Vol.222, pp.55-77, 「5 Designing Cytocleavable Polyrotaxanes for Intracellular Gene Delivery」欄

Liu, B., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009.02.17, Vol.106, No.7, pp.2377-2382

Tamura, A., Sci Rep, 2013.07.22, Vol.3, article no.2252

Yamashita, A., J Control Release, 2008.07.17, Vol.131, pp.137-144

Ishibashi, S., J Clin Neurosci, 2009.04.01, Vol.16, pp.954-959

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/724

A61K 47/60

A61P 3/06

A61P 43/00

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII)