

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-535235

(P2020-535235A)

(43) 公表日 令和2年12月3日 (2020. 12. 3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/724 (2006. 01)	A 6 1 K 31/724	4 C 0 7 6
A 6 1 P 11/06 (2006. 01)	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00 (2006. 01)	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/02 (2006. 01)	A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/16 (2006. 01)	A 6 1 P 1/16	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 176 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-539678 (P2020-539678)	(71) 出願人	520108039
(86) (22) 出願日	平成30年9月18日 (2018. 9. 18)		アスデラ エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	令和2年5月12日 (2020. 5. 12)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/051604		1, ニューヨーク, イー, 7 0 ティ
(87) 国際公開番号	W02019/067269		ーエイチ ストリート 2 2 0, ナンバ
(87) 国際公開日	平成31年4月4日 (2019. 4. 4)		ー5 シー
(31) 優先権主張番号	62/643, 694	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成30年3月15日 (2018. 3. 15)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関		(74) 代理人	100113413
	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	62/679, 912	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成30年6月3日 (2018. 6. 3)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国・地域又は機関		(74) 代理人	100181641
	米国 (US)		弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 リン脂質の調節異常が関与する疾患および障害におけるシクロデキストリンの使用

(57) 【要約】

一部の実施形態では、本開示は、例えば癌、アルツハイマー病およびパーキンソン病、多発性硬化症、パジェット病、または例えばアテローム性動脈硬化症もしくは2型糖尿病などの加齢の他の態様などの、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の治療および／または予防に有用であり得る特定の組成物および方法を提供する。そうした一部の実施形態では、例えばアルファシクロデキストリン、またはそのアナログもしくは誘導体などの少なくとも1つのシクロデキストリン活性剤を含有する組成物が提供される。一部の実施形態では、組成物は、ヒドロキシプロピルアルファシクロデキストリンとカプリン酸ナトリウムのクラスレートである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本明細書に記載されるシクロデキストリン分子、またはその塩、および／もしくはそのクラスレートのいずれか 1 つまたは複数を含む組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物、および薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項 3】

悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の治療のための治療用化合物をさらに含む、請求項 2 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 4】

前記シクロデキストリン分子が、前記シクロデキストリン分子、その塩もしくはクラスレートに融合された、または共有結合された化学部分を含む、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を治療または予防する方法であって、その必要のある対象に、請求項 1 ～ 4 に記載の組成物のうちの 1 つまたは複数の治療有効量を投与することを含む、方法。

20

【請求項 6】

前記心血管疾患が、アテローム性動脈硬化症である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記自己免疫性疾患が、喘息、多発性硬化症、全身性エリテマトーデスのうちの 1 つまたは複数である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記代謝性疾患が、脂肪肝疾患、NASH、嚢胞性線維症、I I 型糖尿病のうちの 1 つまたは複数から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

リン脂質を減少させる必要のある対象において血清リン脂質レベルを低下させる方法であって、その必要のある対象に、請求項 1 ～ 4 に記載の組成物のうちの 1 つまたは複数の治療有効量を投与することを含む、方法。

30

【請求項 10】

その必要のある対象の腸管において治療用化合物の吸収を増加させる方法であって、前記対象に、前記治療用化合物の前、後、または同時に、請求項 1 ～ 4 に記載の組成物のうちの 1 つまたは複数の治療有効量を投与することを含む、方法。

【請求項 11】

機能障害状態のリソソームまたはPIサイクルを呈する細胞により特徴づけられる癌、心血管疾患、代謝性疾患もしくはウイルス感染を治療および／または予防する方法であって、前記その必要のある対象に、請求項 1 ～ 4 に記載の組成物のうちの 1 つまたは複数の治療有効量を投与することを含む、方法。

40

【請求項 12】

前記その必要のある対象に、請求項 1 ～ 4 に記載の組成物のうちの 1 つまたは複数の治療有効量を投与する工程が、前記治療用化合物の前、後、または同時に発生する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

その必要のある対象に、リソソームの疾患もしくは障害を予防または治療する方法であって、前記対象に、シクロデキストリンの有効量を投与することを含む、方法。

【請求項 14】

前記シクロデキストリンが、2-ヒドロキシプロピル（HP）-シクロデキストリンを含む、請求項 13 に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記シクロデキストリンが、H P- α -シクロデキストリンおよびH P- β -シクロデキストリンのうち少なくとも1つを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記H P-シクロデキストリンが、直接的に、または架橋剤を使用して第一の活性剤に結合される、請求項14に記載の方法。

【請求項 17】

前記リソソーム疾患が、多発性硬化症であり、前記第一の活性剤が、インターフェロンベーター1 a、インターフェロンベーター1 b、酢酸ガラティラメル、インターフェロンベーター1 b、ペグインターフェロンベーター1 a、インターフェロンベーター1 a、およびダクリズマブからなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記リソソーム疾患が、多発性硬化症であり、前記第一の活性剤が、テリフルノミド、フィンゴリモド、およびフマル酸ジメチルからなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項 19】

前記リソソーム疾患が、多発性硬化症であり、前記第一の活性剤が、アレムツズマブ、ミトキサントロン、オクレリズマブおよびナタリズマブからなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項 20】

前記H P-シクロデキストリンが、第二のシクロデキストリンおよび第二の活性剤のうち少なくとも1つをさらに含む、請求項16～19のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記第二の活性剤が、前記第一の活性剤とは異なる、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

前記リソソーム疾患が、パジェット病であり、前記活性剤が、アレンドロン酸塩、イバンドロン酸塩、パミドロン酸塩、リセドロン酸塩、およびゾレドロン酸のうち少なくとも1つを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項 23】

前記H P-シクロデキストリンが、担体と連結される、請求項16～22のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記担体が、金ナノ粒子である、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

前記担体が、炭水化物である、請求項23に記載の方法。

【請求項 26】

その必要のある対象においてアラキドン酸を下方制御する方法であって、前記対象に、 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体の有効量を投与することを含む、方法。

【請求項 27】

前記 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体の有効量が、リン脂質を優先的に排除し、前記リン脂質が、少なくともPCを含む、請求項26に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体の有効量は、リゾリン脂質も排除する、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体の有効量は、リゾリン脂質を優先的に排除する、請求項26に記載の方法。

【請求項 30】

50

前記 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体の有効量は、前記 α -シクロデキストリン誘導体を含み、前記 α -シクロデキストリン誘導体は、ヒドロキシプロピル- α -シクロデキストリンである、請求項 26～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

その必要のある対象においてアラキドン酸分泌の障害を治療および／または予防する方法であって、前記対象に、 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体の有効量を投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 32】

その必要のある対象においてアラキドン酸を下方制御する方法であって、前記対象に、その塩の α -シクロデキストリン誘導体の有効量を投与する工程を含む、方法。

10

【請求項 33】

前記 α -シクロデキストリン誘導体は、中鎖脂肪酸、および α -シクロデキストリン、HP- α -シクロデキストリンまたはその塩を含む α -シクロデキストリン誘導体のクラスレートである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

その必要のある対象において ALS、MS、アルツハイマー病、ハンチントン病またはパーキンソン病を治療および／または予防する方法であって、前記対象に、 α -シクロデキストリンまたはその α -シクロデキストリン誘導体もしくは塩を含む医薬組成物の有効量を投与する工程を含む、前記方法。

20

【請求項 35】

前記医薬組成物が、脂肪酸をさらに含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記医薬組成物が、中鎖脂肪酸をさらに含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

前記医薬組成物が、中鎖脂肪酸、および α -シクロデキストリン、HP- α -シクロデキストリンまたはその塩のクラスレートをさらに含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 38】

その必要のある対象においてリン脂質レベルを低下させる方法であって、前記対象に、(i) α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体またはその塩；(ii) 薬学的に許容可能な担体；および脂肪酸を含む医薬組成物の有効量を投与する工程を含む、前記方法。

30

【請求項 39】

前記 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体またはその塩；および脂肪酸は、前記 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン誘導体またはその塩、および脂肪酸がクラスレートを形成する濃度である、請求項 38 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

40

本出願は、2018年6月3日に提出された米国仮特許出願第62/679,912号明細書、2018年3月15日に提出された米国仮特許出願第62/643,694号明細書、2017年11月15日に提出された米国仮特許出願第62/586,826号明細書、2017年10月17日に提出された米国仮特許出願第62/573,658号明細書、および2017年9月28日に提出された米国仮特許出願第62/565,053号明細書に対する優先権の利益を主張する。前述の出願の全内容が、その全体で参照により組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

ヒトの集団は年を重ねるにつれ、限定されないが、癌および神経変性疾患をはじめとす

50

る加齢に伴う状態の有病率が増加する。しかしこれら状態の予防または治療するための介入は存在しないか、または望ましくない副作用がある。現在、約500万人の米国人がアルツハイマー病を有し、約100万人がパーキンソン病を有する。平均余命が長くなるにつれ、神経変性疾患または神経変性障害の有病率も増加する。65歳以上の10%、および75歳以上の15%がアルツハイマー病を有する。アルツハイマー病は女性が多く罹患し、アルツハイマー病に罹患するアメリカ人の3分の2を構成する。またアルツハイマー病は白人よりもアフリカ系米国人およびヒスパニック系が罹患する可能性が高い。アルツハイマー病の患者に治療の選択肢はほとんどない。最近、BACE1阻害剤のいくつかの第III相試験が失敗に終わっている。同様にパーキンソン病の患者も、初期には運動症状の治療で利益を得られるが（レボドパ）、時間が経つにつれて非反応性となる。

10

乳癌（BCa）は、女性において最も多くみられる非皮膚悪性腫瘍である。2016年には、246,660人の米国人女性が新たに診断され、3,100,000人の米国人女性が乳癌と共生している。1990年から肺癌が30%減少した後、乳癌は2番目に死亡者の多い癌であり、2015年には40,290人が死亡し、そのうち17,010人が65歳未満であった（ほとんどが骨、肺および脳への転移が原因である）。乳癌の家族歴がある女性は、乳癌を発症するリスクが2倍であるため、（American Cancer Society（2015））乳癌リスクのかなりの部分が遺伝性であると予測されている。しかし「癌成長遺伝子」であるPIK3CA/PTENならびにDNA損傷修復遺伝子のBRCA1/BRCA2/PALB2およびMRE11A/RAD50/NBN/RINT1の公知の複合体は、発生率のたった10%にしか寄与しない。

20

【0003】

悪性の疾患または障害の治療も限定的であり、多くの欠点がある。一般的に治療には局所療法（例えば乳癌の放射線治療を伴う、または伴わない外科手術、前立腺癌の外科手術または放射線治療）、および拡散する可能性のある癌細胞に対する補助的全身療法（ホルモン療法、化学療法および生物作用剤）が含まれる。放射線治療と化学療法はしばしば限定されないが悪心および脱毛をはじめとする深刻な副作用を生じさせる。前立腺癌のホルモン療法には、抗アンドロゲン剤が含まれる。乳癌のいくつかのホルモン受容体陽性型に対しては、例えばタモキシフェンおよびラロキシフェンなどの選択的エストロゲン受容体調節剤（SERM: selective estrogen receptor modulator）、ならびに例えばエキセメスタンおよびアナストロゾールなどのアロマターゼ阻害剤が、疾患進行に干渉し得る。例えばトラスツズマブおよびペルツズマブなどのモノクローナル抗体は、HER2陽性癌の治療に承認されている。トリプルネガティブの乳癌患者に対しては（エストロゲン、プロゲステロンおよびHer2/neu受容体が無い）、治療選択肢は限定的である。

30

【0004】

神経変性障害および悪性腫瘍の間で共通する特徴は、リソソーム機能障害である。リソソーム機能障害は、遺伝性疾患を含む広範な障害および疾患に関与している。一部の例では、悪性腫瘍および神経変性プロセスの根底にある病因の多面的因子として高レベルのエンドサイトーシスが示されており、限定されないが、癌におけるエンドサイトーシスの役割、およびアルツハイマー病における「混乱した」エンドサイトーシスなどが挙げられている。アルツハイマー病ではエンドサイトーシス経路の異常がAβ沈着に先行しており、エンドサイトーシスの阻害によって、アミロイド前駆体タンパク質（APP）の内部移行が減少し、すぐさまインビボでのAβレベルが低下する。

40

【0005】

若年期では十分なレベルのエンドサイトーシスが必要である一方で、加齢に伴い高レベルのエンドサイトーシスは有害となる場合がある。アテローム性動脈硬化症、脂肪性肝炎および嚢胞性線維症においてマクロファージの拡張が特定されており、高レベルのエンドサイトーシスは、マクロファージ中の脂質蓄積を増加させ得る。早期エンドサイトーシス経路の活性化は、自己免疫性疾患、例えば全身性エリテマトーデス（SLE: systemic lupus erythematosus）、炎症性大腸炎（IBD: infl

50

ammatory bowel disease) および関節炎において観察されている。ホスホイノシチド (PIP: phosphoinositide) はエンドサイトーシス経路を制御しており、これが減衰することで、自己免疫性疾患が抑えられる。ホスホイノシチドはさらに、いくつかの遺伝性疾患とも関連づけられている。リン脂質 (PL: phospholipid) 排出が正常に機能しないと、マクロファージ (MΦ) 中の脂質蓄積が増加する。アテローム性動脈硬化症、脂肪性肝炎および嚢胞性線維症 (CF: cystic fibrosis) において拡張したマクロファージが特定されている。ホスホイノシチド-3キナーゼ (PI3K: phosphoinositide-3 kinase) のシグナル伝達阻害は、炎症および自己免疫性疾患ならびに悪性血液疾患にとって有益であることが示されている。特定のホスファターゼまたはキナーゼを調節する試みがいくつか行われているが、治療成功には結びついていない。ゆえに、これらすべての疾患においてエンドサイトーシス/ピノサイトーシスの関与、およびホスホイノシチドの関与に関する強力な証拠があるにもかかわらず、エンドサイトーシスの有効な調節物質はない。

10

【0006】

早期エンドサイトーシス経路の活性化はマクロファージ中の脂質蓄積を生じさせる場合があり、アテローム性動脈硬化症、脂肪性肝炎および嚢胞性線維症において拡張されたマクロファージが特定されている。早期エンドサイトーシス経路の活性化は、自己免疫性疾患、例えば全身性エリテマトーデス (SLE)、炎症性大腸炎および関節炎において観察されている。ホスホイノシチドの減衰は、自己免疫性疾患を抑える。広範に作用する [サイクリン依存性キナーゼ (CDK: cycline-dependent kinase)] 阻害物質の多くは期待外れの結果に終わり、少数の患者が、ホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K) 阻害物質から利益を得るのみである。全体として、リン脂質の制御異常は、加齢に伴う生活の質の低下と関連づけられている。

20

【0007】

エンドサイトーシスの過活動状態は癌、神経変性疾患および他の病的状態と関連づけられており、癌において転移を防ぐ治療法と同じ治療法が、アテローム性動脈硬化症におけるマクロピノサイトーシスを介した泡沫細胞の形成を含む、神経変性疾患および多くの他の加齢関連状態における非分解性高分子の蓄積も予防する可能性がある。しかしエンドサイトーシスを制御する有効な治療法はない。ゆえに、エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、ピノサイトーシスおよびリソソーム経路を含む機能障害が関与する障害および疾患の症状に対する有効な治療法に対するニーズが存在する。

30

【0008】

脂質担体分子のβ-シクロデキストリン (β-CD) は、食品添加物として「一般的に安全とみなされている」(GRAS: generally recognized as safe)。より水溶性が高い誘導体の2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP-β-CD、HPβCD) は頻繁に賦形剤として使用されており、脂溶性薬剤に水溶性化合物を形成させる。インビトロおよび動物モデルにおいて、HP-β-CDは、リソソームの機能障害を減少させる (LYD: reducing lysosomal dysfunction) こと、および加齢関連状態の病因において別の共通因子であるオートファジー (AΦ) を改善することによりその効果の一部を発揮することが示されている。ヒトにおいては、HP-β-CDは、ニーマンピック病C型 (NPC: Niemann-Pick disease type C) の治療に使用されており、その機能は、リソソーム中の脂質分子、コレステロールの凝集を減少させることである (LY)。この場合もその作用機序は不明である。しかしHP-β-CDの臨床応用は限定されており、その理由は耳の外有毛細胞からコレステロールを奪うため、永続的な難聴を引き起こす可能性があるためである。

40

【0009】

より低分子のα-シクロデキストリン (α-CD、αCD) の誘導体、およびその誘導体、例えばヒドロキシプロピル-α-シクロデキストリン (HP-α-CD、HPαCD

50

）は、小さすぎてコレステロールには適合しないため、例えばベーターシクロデキストリンにより引き起こされる難聴といった望ましくない副作用を伴うことなく悪性腫瘍および神経変性障害を効果的に治療する可能性があるとは未だ認識されていない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

全ゲノム関連解析（GWAS：genome-wide association studies）のデータに対する、コンピューターによる生物統計学的手法および決定戦略を通して、本発明者らは、機能的に関連のある遺伝子コレクションを特定し、PIサイクルにより生成されるものを含むホスホイノシチド（PIP：phosphoinositide）により制御されるエンドサイトーシスが、例えば乳癌または前立腺癌などの特定のタイプの癌の転移プロセスに関与していることを決定付けた。これについて、本発明者らは、乳癌リスクは、DNA損傷修復遺伝子、例えばBRCA1／2などの（稀な）変動だけでなく、より多くはPIサイクルの全般的な調節異常に起因すること、そしてPIサイクルにより制御されることが知られているエンドサイトーシスが、癌細胞の局所的な拡がり、移動および浸潤の重要な要素であることを見出した。例えば、実施例1を参照のこと。ゆえに1つの態様において、本明細書は、対象においてリソソーム経路の機能障害および／またはエンドサイトーシス、ファゴサイトーシスもしくはピノサイトーシスの上昇を引き起こす疾患または状態を治療する手段として、PIサイクルを標的とする方法を提供するものであり、当該疾患または状態は、例えば本明細書に記載される新規GWAS法により特定される遺伝子または遺伝子の組み合わせの異常な発現により生じ得る（例えば実施例1を参照のこと）。そうした疾患または状態としては、例えば、乳癌（BCa：breast cancer）、アルツハイマー病（AD：Alzheimer's disease）、パーキンソン病（PD：Parkinson's disease）、ハンチントン病（HD：Huntington's disease）、多発性硬化症（MS：multiple sclerosis）、筋萎縮性側索硬化症（ALS：amyotrophic lateral sclerosis）、冠動脈疾患（CAD：coronary artery disease）およびニーマンピック病C型（NPC：Niemann-Pick type C disease）が挙げられる。例えば、実施例2、3、6および7を参照のこと。

【0011】

癌、神経変性疾患、および他のいくつかの加齢関連疾患の動物モデルに対し効果を有することが知られている治療剤は、ベーターシクロデキストリンである。ベーターシクロデキストリンとしては、例えばメチルーβ-シクロデキストリン（M-β-CD）およびHP-β-CDが挙げられる。例えば、J Membr Biol. 2011 May, 241（1）：1-10；The Journal of Experimental Medicine, 209（13），2501-13、および実施例5に記載される検討を参照のこと。従来、ベーターシクロデキストリンは、細胞膜および／または細胞小器官からコレステロール（Chol：cholesterol）を除去および抽出すると考えられていた。例えばコレステロールの排除および／またはAβもしくはα-シヌクレインへの直接的な結合が、ADおよびPDにおけるβ-CDの作用機序であると考えられていた。The Journal of Experimental Medicine, 209（13），2501-13を参照のこと。β-CDは、治療剤としての可能性を有しているが、耳毒性がある。すなわち、永続的な難聴を生じさせ得る耳への損傷をもたらす。J Assoc Res Otolaryngol, 16（5），599-611を参照のこと。

【0012】

本明細書において、リソソーム機能に関して、PIサイクルへのリン脂質供給が関与することを初めて特定したことで（実施例1を参照のこと）、もはやコレステロールの排除は、例えばβ-CDなどのシクロデキストリンが機能する主要メカニズムとはみなされ得

ない。例えば、実施例 1 を参照のこと。むしろ本発明者らのデータからは、シクロデキストリンは、リン脂質の排除に作用し、それによってエンドサイトーシスを制御し、リソソームストレスを低下させ、オートファジーを改善することが示される。例えば本発明者らは、 α -CD が、乳癌において「脱線した」と言われるエンドサイトーシス、AD において「錯乱した」と言われるエンドサイトーシス、そして PD において「欠陥のある」エンドサイトーシスを修復することも見出した。例えば、実施例 4 を参照のこと。本発明者らはまた、リン脂質の可溶化において α -CD が β -CD よりも効果的であることを記載する（実施例 8 を参照）。ゆえに 1 つの態様において、本明細書は、リソソーム機能障害が関与する疾患、障害または状態を有する対象を治療するための α -シクロデキストリン（例えば α -CD、または HP- α -CD）の使用方法を提供する。そうした疾患および障害が本明細書に記載されており、例えば、乳癌（BCa: breast cancer）、アルツハイマー病（AD: Alzheimer's disease）、パーキンソン病（PD: Parkinson's disease）、ハンチントン病（HD: Huntington's disease）、多発性硬化症（MS: multiple sclerosis）、筋萎縮性側索硬化症（ALS: amyotrophic lateral sclerosis）、冠動脈疾患（CAD: coronary artery disease）およびニーマンピック病 C 型（NPC: Niemann-Pick type C disease）が挙げられる。

10

【0013】

上記の研究結果に加えて、本発明者らはさらに、腸管からのアルファ-シクロデキストリン（例えば HP- α -CD）の吸収が、脂肪酸との錯体形成により改善され得ることを見出した。例えば本発明者らは、HP- α -CD および中鎖脂肪酸のクラスレートを含む組成物が、吸収を著しく改善したことを示す。したがって 1 つの態様において、本明細書は、アルファ-シクロデキストリン（例えば HP- α -CD）および中鎖脂肪酸（例えばカプリン酸）を含む医薬組成物、ならびにリソソーム機能障害およびオートファジーが関与する疾患または障害を治療するためのその使用を提供する。そうした疾患および障害が本明細書に記載されており、例えば、乳癌（BCa: breast cancer）、アルツハイマー病（AD: Alzheimer's disease）、パーキンソン病（PD: Parkinson's disease）、ハンチントン病（HD: Huntington's disease）、多発性硬化症（MS: multiple sclerosis）、筋萎縮性側索硬化症（ALS: amyotrophic lateral sclerosis）、冠動脈疾患（CAD: coronary artery disease）およびニーマンピック病 C 型（NPC: Niemann-Pick type C disease）が挙げられる。

20

30

【0014】

さらに別の態様において、本発明者らは、アルファ-シクロデキストリン（例えば HP- α -CD）および中鎖脂肪酸（例えばカプリン酸）を含む医薬組成物が、炎症が関与する疾患の治療に使用され得ることを見出した。例えば、実施例 16 を参照のこと。ゆえに 1 つの態様において、本明細書は、炎症性疾患の治療における使用のための、アルファ-シクロデキストリン（例えば HP- α -CD）および中鎖脂肪酸（例えばカプリン酸）を含む医薬組成物を提供する。

40

【0015】

追加の態様は、以下に、および本出願の詳細な説明と実施例においてさらに記載される。本特許出願の各セクションにおける記載は、他のセクションと併せて読まれることを意図している。さらに本特許出願の各セクションに記載される様々な実施形態は、様々な別の方法で組み合わせることができ、そしてそうした組み合わせのすべてが、本開示の範囲内にあることが意図される。

【0016】

1 つの態様において、本開示は、対象において、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患

50

、障害または状態を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、当該対象に、環状オリゴ糖（例えば α -シクロデキストリン（ α -CD））またはそのアナログもしくは誘導体（例えばHP- α -CD）の有効量を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。別の態様では、本開示は、上皮性癌（癌腫）の治療またはパーキンソン病、アルツハイマー病もしくはハンチントン病の治療における使用のための、 α -CDまたはそのアナログもしくは誘導体（例えば、HP- α -CD）を含む組成物を提供する。1つの態様では、HP- α -CDを含む組成物はさらに、中鎖脂肪酸（MCFA: medium-length chain fatty acid）、例えば6~12個の炭素原子の脂肪族末端を有する脂肪酸などを含む。1つの態様では、組成物中でHP- α -CDおよび中鎖脂肪酸（MCFA）は、クラスレートを形成する。そうしたクラスレートにおいて、MCFAは、HP- α -CDのゲストである。組成物中のMCFAの1つは、カプリン酸塩またはカプリル酸塩であり、または例えばカプリン酸ナトリウムなどのその塩である。

10

【0017】

1つの態様では、本開示は、対象における悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の1つまたは複数の指標または症状を改善する方法を提供するものであり、当該方法は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の1つまたは複数の指標または症状を呈する対象に、 α -CDまたはそのアナログもしくは誘導体（例えばHP- α -CD）の有効量を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。適切な指標としては、限定されないが、血液検査の結果（限定されないが、循環腫瘍DNAおよび／または前立腺特異抗原を含む）、X線評価、身体検査の結果（限定されないが、触知可能な腫瘍を含む）、精神鑑定、または組織生検による組織学的評価および／もしくはホルモン受容体状態の決定が挙げられる。1つの態様では、症状または指標は、生存期間、無病生存期間、無遠隔転移期間、血液検査の結果（限定されないが、循環腫瘍DNAおよび前立腺特異抗原を含む）、X線評価、身体検査の結果（限定されないが、触知可能な腫瘍を含む）、または組織生検による組織学的評価からなる群から選択される。1つの実施形態では、「改善すること」は、1つもしくは複数の指標または症状の測定値における少なくとも1%の増加を含む。別の態様では、本開示は、上皮性癌（癌腫）の治療、またはパーキンソン病、アルツハイマー病もしくはハンチントン病の治療における使用のための、 α -CD、またはそのアナログもしくは誘導体（例えば、HP- α -CD）を含む組成物を提供する。1つの態様では、HP- α -CDを含む組成物はさらに、中鎖脂肪酸（MCFA: medium-length chain fatty acid）、例えば6~12個の炭素原子の脂肪族末端を有する脂肪酸などを含む。1つの態様では、組成物中でHP- α -CDおよび中鎖脂肪酸（MCFA）は、クラスレートを形成する。そうしたクラスレートにおいて、MCFAは、HP- α -CDのゲストである。組成物中のMCFAの1つは、カプリン酸塩またはカプリン酸ナトリウムなどのその塩である。

20

30

【0018】

一部の実施形態では、本開示は、その必要のある対象においてスフィンゴミエリンの合成を修復する方法に関するものであり、当該方法は、シクロデキストリン（例えば α -CD）、またはそのアナログもしくは誘導体（例えばHP- α -CD）を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。1つの態様では、本開示は、その必要のある対象における悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の1つまたは複数の指標または症状を改善する方法を提供するものであり、当該方法は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の1つまたは複数の指標または症状を呈する対象に、 α -CDまたはその塩、アナログもしくは誘導体（例えばHP

40

50

α-CD)の有効量を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。適切な指標としては、限定されないが、血液検査の結果(限定されないが、循環腫瘍DNAおよび/または前立腺特異抗原を含む)、X線評価、身体検査の結果(限定されないが、触知可能な腫瘍を含む)、精神鑑定、または組織生検による組織学的評価および/もしくはホルモン受容体状態の決定が挙げられる。1つの態様では、症状または指標は、生存期間、無病生存期間、無遠隔転移期間、血液検査の結果(限定されないが、循環腫瘍DNAおよび前立腺特異抗原を含む)、X線評価、身体検査の結果(限定されないが、触知可能な腫瘍を含む)、または組織生検による組織学的評価からなる群から選択される。1つの実施形態では、「改善すること」には、1つもしくは複数の指標または症状の測定値における少なくとも1%の増加が含まれる。

10

【0019】

1つの態様では、本開示は、その必要のある対象において巣状分節状糸球体硬化症(FSGS:focal segmental glomerulosclerosis)およびネフローゼ腫脹を治療および/または予防する方法を提供するものであり、当該方法は、対象に、α-CDまたはその塩、アナログもしくは誘導体(例えばHP-α-CD)の有効量を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。一部の実施形態では、本開示は、その必要のある対象において過剰な、または機能障害性のスフィンゴ脂質異化により引き起こされる腎障害を治療および/または予防する方法に関するものであり、当該方法は、α-CDまたはその塩、アナログもしくは誘導体(例えばHP-α-CD)の有効量を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。一部の実施形態では、本開示は、その必要のある対象においてスフィンゴミエリンの合成を修復する方法に関するものであり、当該方法は、α-CDまたはそのアナログもしくは誘導体(例えばHP-α-CDまたはその塩)を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。

20

【0020】

他の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、当分野に公知の吸収強化剤を含み、当該剤としては、限定されないが、胆汁塩(グリココール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、フシジン酸ナトリウム、グリコデオキシコール酸ナトリウム、タウロジヒドロフシジン酸ナトリウム)、界面活性剤(ラウリル硫酸ナトリウム、リゾホスファチジルコリン(LPC)、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム、laurenth-9、ポリソルベート、ポリエチレングリコール-8-ラウリン酸塩、モノラウリン酸グリセリル、モノカプリル酸/カプリン酸グリセリル、ジカプリル酸/カプリン酸グリセリル、サポニン)、脂肪酸および誘導体(ラウリン酸ソルビタン、カプリン酸ナトリウム、パルミチン酸スクロース、ラウロイルコリン、ミリスチン酸ナトリウム、パルミトイルカルニチン)、グリセリド(リン脂質、モノヘキサノイン、中鎖グリセリド)、キレート剤(エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、二ナトリウムEDTA)、サリチル酸塩(サリチル酸、メトキシサリチル酸ナトリウム、アセチルサリチル酸)、ポリマーまたは多糖類(キトサンおよびキトサン誘導体、デキストラン、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリカーボフィル、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびその誘導体、イヌリン、ペクチン、硫酸コンドロイチン)、その他物質(アゾン、塩化ベンズアルコニウム、フェノチアジン、硝酸ドナー、メントール)、新規物質(閉鎖毒素(zonula occluding toxin)、ポリ-L-アルギニン、大豆誘導体グルコシド、シチコリン(citicholine)、アミノ酸ペプチド)が挙げられる。(Deli MA(2009) Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes 1788:892-910; Renukuntla J, Vadlapudi AD, et al. (2013) Int J Pharm 447:75-93; Shaikh I, Derle ND, et al. (2012) J Appl Pharmacol Sci 2:34-9)を参照のこと。

30

40

一部の実施形態では、シクロデキストリンは、約2500mg/kg α-CDの投与

50

量で1週間に2回、対象に投与される（約700mg/kg/日）。同じ投与量がHP- β -シクロデキストリンに対して2名のNPCの小児に使用され、「0.1～1.0mMの標的濃度」に対し、「1年にわたり、識別可能な副作用はなかった」。（INDs 104, 114および104, 116、承認日：2009-04-13）。他の実施形態では、投与量は、患者において腎臓の有害事象または溶血を生じさせない最も高い投与量まで経時的に調整される。一部の実施形態では、例えば α -CDなどのシクロデキストリンは、少なくとも約100mg、少なくとも約200mg、少なくとも約500mg、少なくとも約1000mg、少なくとも約2000mg、少なくとも約5000mgまたは少なくとも約10,000mgの投与量で対象に投与される。一部の実施形態では、例えば α -CDなどのシクロデキストリンは、1日当たり約1～約10,000mg、約1～約7,500mg、約1～約5,000mg、約1～約2,500mg、約1～約1,000mg、約1～約500mg、約1～約200mg、約200～約10,000mg、約200～約4,000mg、約200mg～約2,000mg、約200～約1,000mg、または約200～約500mgの範囲の投与量で対象に投与される。そうした一部の実施形態では、上述の各用量は、mg/kg/日である。使用され得る追加の用量は、本特許出願の詳細な説明のセクションにおいて提示される。

【0021】

一部の実施形態では、本開示は、その必要のある対象において、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症を治療および／または予防する方法を提供するものであり、当該方法は、当該対象に、 α -CDまたはそのアナログもしくは誘導体（例えばHP- α -CD）の有効量を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。一部の実施形態では、本開示は、リスクのある亜群に属する対象の指標を除き、疾患特異的な指標または症状を呈していない対象において、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を治療および／または予防する方法を提供する。一部の実施形態では、指標は、年齢である。一部の実施形態では、指標は、30、40、50または60歳よりも高い年齢である。

【0022】

一部の実施形態では、本開示は、その必要のある対象において、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を治療または予防する方法を提供するものであり、当該方法は、当該対象に、細胞外リン脂質を減少させる薬剤の有効量を投与する工程を含む。一部の実施形態では、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態は、上皮性癌（癌腫）である。一部の実施形態では、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態は、乳癌である。別の実施形態では、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病である。一部の実施形態では、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態は、ハンチントン病である。一部の実施形態では、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態は、非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD：non-alcoholic fatty liver disease）である。

【0023】

一部の実施形態では、本開示は、医薬組成物を含む様々な治療の組み合わせを提供する。一部の実施形態では、シクロデキストリンは、細胞障害剤介入、受容体アンタゴニスト

、モノクローナル抗体、放射線治療、腫瘍組織除去などを含む、確立された薬学的、放射線学的、または外科的介入と組み合わせられて使用される。

【0024】

1つの実施形態では、対象は、ヒトである。別の実施形態では、対象は、成人のヒトである。一部の実施形態では、対象は、リソソーム機能障害に起因する1つまたは複数の細胞的欠陥から生じる疾患または障害の治療の必要がある、および／または当該疾患または障害を発現するリスクを有するとして特定されている。一部の実施形態では、本開示は、HP- α -CDと例えばカプリン酸ナトリウムなどの塩のクラスレートの有効量を含む組成物に関する。一部の実施形態では、HP- α -CDと脂肪酸のモル比は、約0.5～約5である。一部の実施形態では、HP- α -CDと脂肪酸のモル比は、約2.0～約1.0である。一部の実施形態では、HP- α -CDと脂肪酸のモル比は、約1.5～約1.0である。一部の実施形態では、HP- α -CDと脂肪酸のモル比は、約1.0～約1.0である。

10

【0025】

一部の実施形態では、本開示は、HP- α -CDと例えばカプリン酸ナトリウムなどの塩のクラスレートの有効量を含む医薬組成物に関し、当該組成物は、ベータ-シクロデキストリンおよび／または α -CDを含まない、または実質的に含まない。一部の実施形態では、本開示は、(i) α -シクロデキストリン、その誘導体もしくはその塩のうちの1つまたは複数、および(ii) 脂肪酸分子、を含む医薬組成物の有効量を投与することにより、本明細書に開示される任意の障害を治療する方法に関し、(i) および(ii) のそれぞれは、 α -シクロデキストリン、その誘導体もしくはその塩のうちの1つまたは複数のクラスレートを形成する重量である。一部の実施形態では、クラスレートは、約80～90重量%の α -シクロデキストリン、その誘導体もしくはその塩のうちの1つまたは複数、および約10～20重量%の脂肪酸である。一部の実施形態では、クラスレートは、約85重量%の α -シクロデキストリン、その誘導体もしくはその塩のうちの1つまたは複数、および約15重量%の脂肪酸である。一部の実施形態では、脂肪酸は、カプリン酸またはその塩である。

20

【0026】

本開示は、その必要のある対象において、アルツハイマー病を治療および／または予防する方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。本開示は、その必要のある対象において、パーキンソン病を治療および／または予防する方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。本開示は、その必要のある対象において、ハンチントン病を治療および／または予防する方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。本開示は、その必要のある対象において、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を治療および／または予防する方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。本開示は、その必要のある対象において、多発性硬化症(MS)を治療および／または予防する方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。本開示方法のいずれか、一部の実施形態では、医薬組成物は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩のうちの1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせのクラスレートの有効量を含み、当該クラスレートは、中鎖脂肪酸またはその塩、および α -シクロデキストリン、その誘導体もしくはその塩のうちの1つまたは複数、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩のうちの1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせ、お

30

40

50

よび脂肪酸は、クラスレートにおいて、約15重量%の脂肪酸、および約85重量%の α -シクロデキストリン、その誘導体、もしくは塩のうちの1つまたは複数、またはそれらの組み合わせの重量/重量比である。一部の実施形態では、脂肪酸と α -シクロデキストリンの重量：重量比は、血中への吸収に充分である。

【0027】

本開示は、その必要のある対象において、炎症を治療および/または予防する方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。本開示はまた、エンドサイトーシスと関連していると本開示において特定される任意の遺伝子の機能障害または欠陥性により生じるエンドサイトーシスの機能障害または欠陥を特徴とする乳癌または前立腺癌の局所転移を治療および/または予防する方法に関する。本開示はまたその必要のある対象において、リソソーム機能と関連していると本開示において特定される任意の遺伝子の機能障害または欠陥性により生じるリソソーム機能の機能障害または欠陥を特徴とする乳癌または前立腺癌の局所転移を治療および/または予防する方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。

【0028】

一部の実施形態では、本開示は、対象の血中のリン脂質レベルを低下させる方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。一部の実施形態では、血中のリン脂質を低下させる方法は、リゾリン脂質を排除することなく遂行される。本開示はまた、オートファジーを活性化する方法に関するものであり、当該方法は、 α -シクロデキストリン、その誘導体、塩の内の1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む医薬組成物の有効量を、当該対象に投与する工程を含む。一部の実施形態では、オートファジーを改善または活性化する方法は、リソソームの機能障害を生じさせることなく遂行される。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】ヒドロキシプロピルシクロデキストリンを含む、シクロデキストリン 最大で $n \times 3$ 次の置換が認識されており、数多くの位置異性体および部位異性体が可能である。R に対する置換としては、限定されないが、H（親）、メチル（ランダムなメチル化を含む）、ブチル、2-ヒドロキシプロピル（HP）（示される）、アセチル、スクシニル、グルコシル、マルトースイル、カルボキシメチルエーテル、リン酸エステル、単純ポリマー、またはカルボキシメチルが挙げられる。典型的なシクロデキストリンは、6（ α -CD）、7（ β -CD）または8（ γ -CD）個のD-グルコース単量体を環中に含有し、ゲスト分子を自身の疎水性空洞に収容することができる円錐形を生成する。

【0030】

【図2】 α -CDおよびHP- β -CDとのコレステロール相互作用に関するクラスター解析。軌道の最後の25nsを提示する。CD分子は、固体表面提示法（solid surface representation method）を使用して表されており、プローブ半径は0.4 Å、密度等位置（density isovalue）は0.7、および格子間隔は0.5を用いて、結合空洞を可視化する。水素原子は、明白性のために省いた。（Shityakov S, Salmas RE, et al. (2016) J Toxicol Sci 41:175-84）からの改変である。

【0031】

【図3】脂質放出の特異性 I。元の赤血球（3B）、またはシクロデキストリンで処理されたゴースト赤血球（3Aおよび3C）からのリン脂質（3A）、コレステロール（3B）およびタンパク質（3C）の放出。白丸： α -CD；黒丸： β -CD；白三角： γ -CD。（Ohtani Y, Irie T, et al. (1989) European

10

20

30

40

50

Journal of Biochemistry 186:17-22)からの改変である。

【0032】

【図4】脂質放出の特異性 I I。4A) 様々な濃度の α および β -CDの存在下で2時間インキュベーションを行った後、脳毛細血管内皮細胞(BCEC: brain capillary endothelial cell)からコレステロールが放出された。結果は、BCECから放出されたコレステロールの百分率として、対照との比較で表されている。各百分率は、3個の別のフィルターの平均であり、2回の一連の独立した実験を表す。(4B) ホスファチジルコリン(PC)(明円柱)およびスフィンゴミエリン(SM、暗円柱)は、それぞれ0.5、5および50mMの α ならびに β -CDの存在下で2時間インキュベーションされた後にBCECから放出された。結果は、BCECから放出されたリン脂質の百分率として、対照との比較で表されている。各百分率は、3個の別のフィルターの平均であり、2回の一連の独立した実験を表す。(Monnaert V, Tilloy S, et al. (2004) Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 310:745-51)からの改変である。

10

【0033】

【図5】 α CDではなく、M β CDが、酸化からA2Eを防御する。ビスレチノイド(bisretinoid)A2Eは、目のリポフスチンの抽出物中で特定された最初の化合物である。酸化からのA2Eの防御は、5 μ M A2E溶液のUV可視吸収スペクトルにおける変化でモニタリングされた。(5A) 指定されるシクロデキストリン(12mM)の存在下での青色光照射の前(黒丸)および後(白丸)のA2Eの酸化状態。(5B) シクロデキストリンの存在下での、暗室、室温でインキュベーションした0時点(黒丸)および1日後(白丸)のA2Eの酸化状態。(Nociari MM, Lehmann GL, et al. (2014) Proceedings of the National Academy of Sciences 111:E1402-E8)の改変である。

20

【0034】

【図6】CGEMに対するssGWAS結果のQRプロット。個々の染色体に対する、凸射影のエンドポイント間のメジアンでの「ヌル」射影(水平)端。垂直線の右の遺伝子は、試験特異的な全ゲノム有意性に対するカットオフを上回る。カットオフより下の領域(左側)は、説明目的のためのみに提示している。

30

【0035】

【図7】CGEMに対するmuGWAS結果のQRプロット(説明に関しては図6を参照)。

【0036】

【図8】EPICに対するssGWAS結果のQRプロット(説明に関しては図6を参照)。

【0037】

【図9】EPICに対するmuGWAS結果のQRプロット(説明に関しては図6を参照)。

40

【0038】

【図10】PBCSに対するssGWAS結果のQRプロット(説明に関しては図6を参照)。

【0039】

【図11】PBCSに対するmuGWAS結果のQRプロット(説明に関しては図6を参照)。

【0040】

【図12】ホスファチジル-イノシトール(PI)サイクル。ホスファチジル-イノシトール(PI)は、myo-イノシトール(HMITより輸入)と、ホスファチジン酸(P

50

A) (CDP-DAGを介して) から合成される。PAはリゾホスファチジン酸 (lyso-PA (LPA)、PC、または (細胞質) ホスファチジルセリンPS) から合成されることができ、またはIP₃およびDAGからサルベージされることが出来る。また1-アシルGPIからも合成されることが出来る。矢印: PIサイクル内において、ホスホイノシチドは、PI-キナーゼにより3位、4位または5位でリン酸化され (左から右)、そして多量のホスファターゼにより加水分解される (右から左)。このGWASにおいて乳癌と関連する遺伝子は、白黒逆転で強調されている (太字: aGWS)。中心の幅のある矢印は、EECに關与するホスホイノシチド (六角形として示される) の配列を示す。六角形: PI/ホスホイノシチド、PM: 細胞膜、CCV: クラスリン被覆小胞、UCV: 脱被覆小胞、EE: 早期エンドソーム、LE: 後期エンドソーム、LY: リソソーム。白黒逆転の遺伝子名は、ホスファチジルイノシトールシグナル伝達および/またはエンドサイトーシスに關連する遺伝子を示す。太い矢印は、エンドサイトーシスと關連するホスホイノシチドを示す。

10

【0041】

【図13A】エンドサイトーシス機能 (13A) およびエキソサイトーシス/リソソーム機能 (13B) のプロセス中のステージと、muGWASに連座する遺伝子の公知の關連性。ボックス: エンドサイトーシス/エキソサイトーシスのステージにより本開示において特定された遺伝子。クラスリン被覆小胞 (CCV: clathrin-coated vesicles) の形成およびE3ユビキチン化、活性インテグリン (緩慢リサイクル) からの不活性インテグリン (迅速リサイクル) の分離、分泌経路およびリソソーム経路および (緩慢) リサイクル経路間のソーティング、ならびにリソソーム分解。下線の遺伝子はそれぞれ、公知の乳癌プロモーターおよびサプレッサーである。クラスリン介在エンドサイトーシス (CME: clathrin-mediated endocytosis) は、ヘテロ四量体クラスリンアダプター複合体AP-2と、PI (4, 5) P₂-リッチな細胞膜 (PM: plasma membrane) 部位のクラスリンの共アセンブリから始まる。オープン構造のAP-2は、クラスリンと、追加的なエンドサイトーシスタンパク質をリクルートする。それらの大部分も、PI (4, 5) P₂に結合する。クラスリン被覆凹部分 (CCP: clathrin-coated pit) の成熟は、SHIP-2-介在性のPI (4, 5) P₂のPI (4) Pへの脱リン酸化が付随し得る。PI (3, 4) P₂の合成には、収縮したCCPでのPX-BARDメインタンパク質SNX9のアセンブリが必要であり、シナプトジャニンを経たPI (4) PへのPI (4, 5) P₂加水分解と並行して発生し得る。それにより、クラスII PI3-キナーゼであるPI3KC2αのクラスリン依存性のリクルートと活性化による、オーキシリン依存性小胞脱被覆が促進される。PI (3, 4) P₂は最終的に、PI (3) Pへと転換され、エンドソームGTPase Rab5のエフェクターである4-ホスファターゼINPP4A/Bによりエンドソームへと配送される。 (Posor Y, Eichhorn-Grünig M, et al. (2015) Biochim Biophys Acta 1851: 794-804) から適用。早期エンドソーム (EE) において、β1インテグリンがソーティングされる。不活性インテグリンは、迅速「短ループ」リサイクルを経る。活性インテグリンは後期エンドソーム (LE: late endosome) / 多小胞体 (MVB: multivesicular body) へ向かい、緩慢「長ループ」リサイクル (RAB11) され、リソソーム分解 (RAB25/CLIC3によりレスキューされない限り) され、またはRAB9に介在されるトランスゴルジネットワーク (TGN: trans-Golgi-network) を介して分泌される。上皮成長因子受容体の迅速リサイクルは増殖を促進する。ゆえに13Aにおいて変異が特定されると、PIサイクルへのリン脂質の流入が増加することが予測される。リソソーム小胞およびシナプス小胞のエキソサイトーシスは、多くの類似性を共有している。エンドリソソーム局在ホスホイノシチドは、リソソーム輸送を制御する可能性がある (Samie MA, Xu H (2014) J Lipid Res 55: 995-1009) (一部はKegg経路のhsa04144およびhsa04721に由来する)。 (Schmid

20

30

40

50

SL, Mettlen M (2013) Nature 499:161-2; Bohdanowicz M, Grinstein S (2013) Physiol Rev 93:69-106; Hesketh GG, Perez-Dorado I, et al. (2014) Dev Cell 29:591-606; Mosesson Y, Mills GB, et al. (2008) Nat Rev Cancer 8:835-50) から適用。

【図13B】同上。

【0042】

【図14】腫瘍細胞の移動および組織バリアを通過する浸潤の根底にあるエンドサイトーシス機序。図は、運動性細胞を示しており、その高度な葉状仮足は指向的に移動する（矢印）。接着斑（FA: focal adhesion）が図示されており、インテグリンヘテロ二量体がこれらに存在している。細胞移動は、分極したエンドサイトーシス、およびFA複合体の輸送を必要とする。インテグリンの内部移行は、ダイナミン（dynamin）により制御される。ダイナミンは微小管（示さず）、ならびに例えばFAKおよびタンパク質キナーゼCα（PKCα）などのタンパク質キナーゼにより活性化される。細胞膜のクラスリンおよびカベオリン1（CAV-1: caveolin 1）被覆ドメインの両方ともが、インテグリンの内部移行に関与する。早期エンドソーム（EE: early endosome）内に入った時点で、インテグリンはリソソーム（LY: lysosome）での分解にソーティングされるか、RAB4-依存性経路を介して細胞膜へリサイクルされるか、または核周囲のリサイクルコンパートメント（PNRC: perinuclear recycling compartment）へと輸送される。PNRCからのリサイクルには、例えばRAB25などのRab11ファミリーを必要とし、一部のインテグリンヘテロ二量体に関しては、タンパク質キナーゼB（PKB: protein kinase B）-GSK3β（グリコーゲン合成キナーゼβ）軸、ARF6または特定のPKC異性体も必要とする。ヒトの腫瘍はRAB25を異常発現することが多く、成長因子誘導性のインテグリンヘテロ二量体の固有レパートリーを呈するか、または異常に安定化した微小管を提示し、これによりインテグリンの輸送が促進される。FAK、インテグリン、RAB25およびPKBは、腫瘍形成と関連する機能を有しており、および／またはヒト腫瘍において異常発現を呈する（Mosesson Y, Mills GB, et al. (2008) Nat Rev Cancer 8:835-50から改変）。

【0043】

【図15】アルツハイマー病（AD）におけるEEC。APPは、小胞体（ER: endoplasmic reticulum）で合成され、TGNへと輸送されて、分泌小胞を介して細胞膜内に挿入される。細胞表面APPは、エンドソームに内部移行することができ、そこから細胞表面へと戻りリサイクルされるか、またはリソソームに送達されて分解されることができる。EE内では、酸性環境がアミロイドベータの産生に有利に働くが、これはカテプシンによりリソソーム中で分解されるか、EE中に蓄積されるか、またはエキソサイトーシスを介して細胞外空間へと放出されることができる（Chen X, Hui L, et al. (2014) J Parkinsons Dis Alzheimers Dis 1から改変）。

【0044】

【図16】パーキンソン病（PD）におけるEEC。エンドサイトーシスに入った後、カーゴは、早期エンドソームへと輸送される。ここからカーゴは直接、またはリサイクルエンドソームを介して細胞膜へと戻りリサイクルされることができる。あるいはカーゴは、EE中に保持されることもでき、これがLE/MVBを形成し、リソソームと融合して分解される。並行してカーゴは、EEとトランスゴルジネットワーク（TGN）の間を輸送される。これらプロセスの変化により、リソソーム機能障害と、細胞に毒性のある未分解高分子の蓄積が生じる（Schreij AM, Fon EA, et al. (2015) Cell Mol Life Sciから適用）。

10

20

30

40

50

【0045】

【図17】アテローム性動脈硬化症（CAD）におけるマクロピノサイトーシス。エンドサイトーシスにエントリー後、低密度リポタンパク質（LDL）はリソソームに輸送され、分解される。リソソームプロセスに欠損があるとLDLの蓄積が生じ、マクロファージが泡沫細胞へと変化して蓄積し、アテローム斑を形成する。

【0046】

【図18A】癌（18A）、AD/PD（18B）およびCAD（18C）におけるリソソーム機能障害。公表されている結果から、様々な疾患にわたり、リソソームクリアランスの低下につながる（横向に向かい合う黒三角）、および癌ではリソソームからのインテグリン回収の増加につながる（下向き矢印）、リソソーム機能障害の重複遺伝子リスク因子が示されている。

10

【図18B】同上。

【図18C】同上。

【0047】

【図19】エンドサイトーシスを「ハイジャック」するウイルス。ウイルス粒子は、細胞内への侵入をクラスリン介在性エンドサイトーシスに依存している。CCV：クラスリン被覆小胞。（Blaising J, Polyak SJ, et al. (2014) Antiviral research 107:84-94）の図2から改変。

【0048】

【図20】ADマウス細胞におけるMβCD。MβCD（M-β-CD）は、αセクレターゼ切断産物C83のレベル上昇をもたらす（A）、そして細胞内APPsβレベルの低下をもたらす（AおよびB）。APPsαレベルは、M-β-CD処置細胞からの培地中で増加しており、一方でAPPsβレベルは変化しなかった（CおよびD）（Cole SL, Grudzien A, et al. (2005) J Biol Chem 280:18755-70）から適用）。

20

【0049】

【図21】a-SynのHP-β-CDクリアランス。HP-β-CD介在性のa-syn凝集体のクリアランスは、HP-β-CDのコレステロールレベルを変える能力には依存しない。HP-β-CD（1mM）またはHP-β-CD-コレステロール複合体（1mM）で24時間処理された、または処理されていないH4/a-syn-GFP細胞。代表的な画像を示す。21A）FLAG特異抗体を使用したTFEB細胞内局在性の免疫蛍光顕微鏡分析。スケールバーは、10μmを示す。21B）a-syn-GFPの免疫蛍光顕微鏡分析。スケールバーは、20μmを示す。（Kilpatrick K, Zeng Y, et al. (2015) PLoS One 10:e0120819）の図6を改変。

30

【0050】

【図22】マウス脳におけるコレステロールの蓄積。様々なCDで処理された3週齢のマウスの脳細胞における非エステル化コレステロール（UC: unesterified cholesterol）蓄積。UCを検出するフィリピンで染色された未処置マウスの背部新皮質の蛍光サンプル顕微鏡写真。皮層は、ローマ数字で印をつけている。事実上、未処置Npc1^{-/-}マウスのすべてのニューロンがUCの細胞質染色に陽性を示しており（白いスポット）、Wtマウスでは陰性であった。HP-β-CDは、UC蓄積において非常に効果的な減少を示している。HP-α-CDのUC蓄積は、明白に減少しているが、著者らによると「肉眼観察では未処置マウスと同等」と報告されている。（Davison CD, Fishman YI, et al. (2016) Ann Clin Transl Neurol 3:366-80）の図1から改変。

40

【0051】

【図23】リソソーム蓄積疾患におけるCD。ML111線維芽細胞中の拡張されたリソソームを示すlysotracker赤色染色を使用したシクロデキストリンの効果。ウォルマン（LAL）、TSD、ファブリー（GLA）、ファバー（AC）、MPSII

50

IB：ムコ多糖症II型B（NAGLU）、NPA：ニーマンピックA型（ASM）、HBCD：HP- β -CD（Kleptose）。本発明者らによると、「他のシクロデキストリンは、強い効果を有していなかった」（McKew J, Zheng WEI, et al. (2014)）。しかしながら6mMの α -CD（M- β -CD投与量の1/5）の効果は、8mMのHP- β -CDの効果よりも強かったことが見落とされていた。（McKew J, Zheng WEI, et al. (2014)）から改変。

【0052】

【図24】ピノサイトーシス／ファゴサイトーシス／エンドサイトーシス：マクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシスおよびエンドサイトーシスは、PIサイクルにより同じように制御されており、3つすべてのプロセス経路においてリソソームの機能障害は、排出されるべき望ましくない機能を有した基質を生じさせる（（Sole-Domenec h S, Cruz DL, et al. (2016) Ageing Res Rev 32:89-103）の図1から改変）。

10

【0053】

【図25】HP β CDはオートファジーを活性化する。HP- β -CDの投与により、転写因子のEB-TFEBの活性化が生じる。細胞質から核へとその位置が変わると、TFEBは、リソソームとオートファゴソームの生合成および融合に関与する遺伝子の発現を制御する。結果として、HP- β -CDの投与により、オートファジーの基質であるセロイド脂肪色素のクリアランスが増強される。しかしHP- β -CDがTFEBの活性化を改善するメカニズムは判明していない（（Song W, Wang F, et al. (2014) J Biol Chem 289:10211-22）から適用）。

20

【0054】

【図26】HP β CDによるTFEBの活性化：HP- β -CDは、転写因子EB（TFEB: transcription factor EB）を活性化することが示されているが、その作用機序は不明である（図25）。尿検査結果（実施例16）から確認される予想外の遺伝的結果（実施例2）からは、HP- β -CDの作用機序は、（a）血清リン脂質の低下、（b）PI-サイクル活性の低下、（c）エンドサイトーシスの低下、（d）リソソームストレスの予防、（e）MTORC1活性化の予防、（f）継続的なTFEBの脱リン酸化および移動、（g）継続的なオートファジーの活性化であることが示された。（Kim S, Choi KJ, et al. (2016) Sci Rep 6:24933; Medina DL, Ballabio A (2015) Autophagy 11:970-1）から適用。

30

【0055】

【図27】図27：多発性硬化症（MS）におけるファゴサイトーシス／エンドサイトーシス。MSの病因において、悪質なサイクルは、健康なミエリン鞘からのミエリンプロブをミクログリアがファゴサイトーシスすることから始まる。リソソーム（LY）が、これらプロブのすべてを破棄させる能力を失った場合、それらの一部は抗原としてT細胞とB細胞に提示される。その後、それらは脳血液関門（BBB: blood brain barrier）を通過し、末梢マクロファージを活性化する。その後、それらマクロファージはCNSに浸潤し、ミエリンをエンドサイトーシスして、破壊する。（Salter MW, Stevens B (2017) Nat Med 23:1018-27; Luo C, Jian C, et al. (2017) Neuropsychiatr Dis Treat 13:1661-7）から改変。同じ機序が、アルツハイマー病およびレット症候群においても関与している（Prinz M, Priller J (2014) Nat Rev Neurosci 15:300-12）。

40

【0056】

【図28】M β CDは表面張力を修復する。「[ウシ脂質抽出物サーファクタント] BLES（Bovine Lipid Extract Surfactant）を用いた動的循環20回の間の最小表面張力。27mg/ml BLESの対照CBS緩衝溶液（チェックのバー）、50% w/w FFA（オレイン酸[, OA]）もしくはLPC（水平

50

バー)の対照CBS緩衝溶液、または40mg/ml M-β-CDを含有する緩衝液(黒色のバー)を含む(** p≤0.01、*** p≤0.001)。FFAまたはLPCを含むBLESは、著しい機能障害を示したが、M-β-CDの存在下で正常な機能性にまで回復した。コレステロールはこれらの実験において非常に低い濃度(約2.1%)で存在した。」(Gunasekara L, Al-Saiedy M, et al. (2017) Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society)の補足図S6から改変。

【0057】

【図29】HaCaT増幅。自然発生的に不死化された異数性ヒト(HaCaT)角化細胞の増殖に対するシクロデキストリンの影響。48時間のインキュベーション後の少なくとも6回の独立した測定値の平均値は、対照に対して正規化された。上:ATP-アッセイ、下:PicoGreen-アッセイ)。W6:α-CD、W7:β-CD、W7 HP:HP-β-CD。(Hipler UC, Schonfelder U, et al. (2007) J Biomed Mater Res A 83:70-9)から改変。

10

【0058】

【図30】HaCaTカスパーゼ3/7活性。HaCaT角化細胞のカスパーゼ3/7活性に対するシクロデキストリンの影響。インキュベーション(24時間)後の少なくとも6回の独立した測定値の平均値は、対照およびタンパク質含有量に対して正規化された。W6:α-CD、W6:β-CD、W7 HP:HP-β-CD。(Hipler UC, Schonfelder U, et al. (2007) J Biomed Mater Res A 83:70-9)から改変。

20

【0059】

【図31】HaCaTラクトースデヒドロゲナーゼ。HaCaT角化細胞のラクトースデヒドロゲナーゼ(LDH)に対するシクロデキストリンの影響。インキュベーション(48時間)後の少なくとも6回の独立した測定値の平均値は、対照およびタンパク質含有量に対して正規化された。W6:α-CD、W6:β-CD、W7 HP:HP-β-CD。(Hipler UC, Schonfelder U, et al. (2007) J Biomed Mater Res A 83:70-9)から改変。

30

【0060】

【図32】ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン(HP-CD)による可溶性の強化。HP-シクロデキストリンによる脂質の見掛け可溶性の強化。「0」と示されるバーは、等張リン酸緩衝生理食塩水における見掛け可溶度を表す。α、βおよびγと示されているバーは、同じ生理食塩水であるが、5%(w/w)濃度の各HP-シクロデキストリンが補充されている場合の可溶度を表す。MW:分子量。(Irie T, Fukunaga K, et al. (1992) J Pharm Sci 81:524-8)、図1から改変。

【0061】

【図33】α-CDおよびβ-CDの腎毒性。ラットにおけるα-CDおよびβ-CDの非経口投与と関連した同様のリスクに関するEMA(および数人の他の著者ら)による2017年の評価は、単一の研究(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)に基づいている。

40

【0062】

【図34】CDの耳毒性。12週齢での聴性脳幹反応(ABR:auditory brainstem response)の記録により評価された様々なCDの耳毒性。個々のマウスに対する聴覚閾値のプロットから、特定のCDで処理されたマウス全体で微小な変動が明らかとなった。ただし聴覚閾値の変動がより高かったHPγCDは除く。(Davidson CD, Fishman YI, et al. (2016) Ann Clin Transl Neurol 3:366-80)の図5Bから改変。

50

【0063】

【図35】乳癌細胞株におけるシクロデキストリンによる創傷治癒。破線の水平線は、それぞれ1 mMおよび4 mMのHP α CDにおける創傷治癒阻害を示す。（固定された）ブロックとして、MCF-7およびMDA-MB-231を用いた、HP α CDとHP β CDを比較したANOVAのP値が示されている。1 mM HP α CDと1 mM HP β CDの比較。p = .0001 1 mM HP α CDと2 mM HP β CDの比較。p = .025 2 mM HP α CDと4 mM HP β CDの比較。p = .0442 (Wittkowski KM, Dadurian C, et al. (2018) PLoS One 13:e0199012) から改変された。

【0064】

【図36】創傷治癒アッセイ：Cell Bio Labs社のAssay CBA-120から改変された。

【0065】

【図37】PL選択性の影響：（図12の上部左側の角、解説については図12を参照）HP- α -CDは、PC（および潜在的にPI）のみを排除し、限定されないが、sPLA2の上流であるLPCおよびLPAを含むリゾリン脂質は排除しなかった。これによりPCはLPCとアラキドン酸（AA：arachidonic acid）へと分割される。

【0066】

【図38A】処置によるBCaの体重（A）および腫瘍体積（B）。個々の曲線とメジアンを示す。A：底部の「†」および曲線中の「+」は、未確認の理由による死亡を示す。B：HP- α -CDおよびHP- β -CDの両方ともが効果的である（全体的な治療効果 日*治療（D*T）<.001、無作為因子としてマウスを用いたANOC A）。HP- α -CDは、HP- β -CDよりも効果が高い（ペアワイズ治療効果 日*治療（D*T | a:b）= 0.0258、無作為因子としてマウスを用いたANOC A）。

【図38B】同上。

【0067】

【図39】BCaの肺および肝臓転移。多変量データに対する、u-統計量を介した二変数（肺/肝臓）データのペアワイズ比較からのP値（Wittkowski KM, Lee E, et al. (2004) Stat Med 23:1579-92）。

【0068】

【図40】BCa血漿サイトカイン。個々のP値は、2サンプルのt検定p（b）から導かれている：HP- β -CDとビヒクルの比較、p（a）：HP- α -CDとビヒクルの比較、p（a:b）：HP- α -CDとHP- β -CDの比較。6種すべてのサイトカインに対する全体的なP値は、多変量データに対するu-統計量を介して算出される（Wittkowski KM, Lee E, et al. (2004) Stat Med 23:1579-92）。

【0069】

【図41】HTTマウス：体重。推定値は、平均±SDであり、全体的な治療*日相互作用に対する（P（T*D））、性別によるP値（F：メス、M：オス）は、無作為因子としてマウスを用いた混合モデルANOVAから導かれている。

【0070】

【図42】SOD1マウス：体重。推定値は、平均±SDであり、全体的な治療*日相互作用に対する（P（T*D））、性別によるP値（F：メス、M：オス）は、無作為因子としてマウスを用いた混合効果ANOVAから導かれている。

【0071】

【図43】使用されるFPLCカラムのタイプに対するFPLC標準曲線。43A）HP- α -CD（HP α CD、1180 Da）は、大部分が分画2（名目上の1060-1267 Da）で測定されることが確認される。43B）ホスファチジルコリン（PC）は、殆どが分画5（名目上の734-795 Da）で測定されることが確認される。

10

20

30

40

50

【0072】

【図44】HP α CD、FA混合物（&）とクラスレートの比較。活性物質としてそれぞれ15gのHP α CD、ならびに様々な型の浸透強化剤を含有する様々なHP α CD調製物を摂取した8時間後の朝の尿のFPLC。HP α CD：HP α CDのみ（n=5）。HP α CD&FA：（Tuvia S, Pelled D, et al. (2014) *Pharmaceutical Research* 31:2010-21）において提唱されるHP α CDと10%w/wのカプリン酸ナトリウム、ならびに浸透強化油性懸濁液（PE）の混合物（n=5）。HP α CD/FA：HP α CD/FAクラスレート（n=5）。HP α CD/FA&PE（n=4）：クラスレートは、上述の浸透強化剤と混合された。軸：図43にあるとおり。Y軸は以下の添加されたラベルを含む：aCD、PCおよびLPCは、HP α CD 分画2（1060-1267 Da）、ホスファチジルコリン分画5（724-795 Da）、およびリゾーホスファチジルコリン分画9と10（450-534 Da）において特定された基質のメジアン量を示す。y軸で言及されている分画は、x軸上で同じラベルにより示される。上向きの白抜きの矢印はそれぞれ、HP α CDに対応するメジアン（水平線）と、4つの混合物および／またはクラスレートの各々に対するメジアン（短い水平の点線）の間の差異を示す。

10

【0073】

【図45】 β CDの臨床有効性に関するインビボでの証拠。乳癌、パーキンソン病、アルツハイマー病、CAD、全身性エリテマトーデス／ALS／MS、嚢胞性線維症／IPF、NAFLD／NAH、およびT2DMの動物モデルにおける β CDの有効性は一貫して、コレステロールを排除する β CDの能力に起因していた（Chol、破線の矢印）。これが現在よく知られているコレステロール介在性の耳毒性のリスクを担っている。しかしコレステロールの枯渇が様々な表現型を改善し得るメカニズムは殆ど説明されていない。臨床結果からは、これら疾患のうちのいくつかにおけるリン脂質の上方制御も示されている。しかしながら β CDも、リン脂質（リン脂質）を排除し、PIサイクル（真ん中）を下方制御する。このことが直接、様々な疾患の表現型に利益をもたらす（黒い矢印）。

20

【0074】

【図46】HP α CDが、LY機能を修復する：（図26の更新）。HP β CDは、転写因子EB（TFEB）を活性化することが示されているが、その作用機序は不明である（Kilpatrick K, Zeng Y, et al. (2015) *PLoS One* 10:e0120819; Song W, Wang F, et al. (2014) *J Biol Chem* 289:10211-22; Sardielli M (2016) *Ann N Y Acad Sci* 1371:3-14; Moors TE, Hoozemans JJ, et al. (2017) *Mol Neurodegener* 12:11）。尿分析結果（実施例16）により確認された予想外の遺伝的結果（実施例2）が、その機序を特定した。TFEBの核への移動活性化は直接的な活性化ではなく、リン脂質の排除がオートファジーを減少させ、過充填リソソームが、抗加齢薬剤であるレスベラトロールとラパマイシンの標的であるMTORC1を活性化してしまうことを予防し、それによってTFEBの移動の障害を予防している。結果として、アルツハイマー病ではアミロイドベータおよびタウ、パーキンソン病では α -シヌクレイン、CADではLDL、脊髄小脳失調（SCA：spinocerebellar ataxia）ではアタキシン（Ataxins）、MSではミエリン、ALSではSOD1における様々なタンパク質の凝集が予防される。（Kim S, Choi KJ, et al. (2016) *Sci Rep* 6:24933; Medina DL, Ballabio A (2015) *Autophagy* 11:970-1; Sardielli M (2016) *Ann N Y Acad Sci* 1371:3-14; Moors TE, Hoozemans JJ, et al. (2017) *Mol Neurodegener* 12:11; Martini-Stoica H, Xu Y, et al. (2016) *Trends Neurosci* 39:221-34）から適用。

30

40

50

【0075】

【図47】HP- α -CDが炎症を減少させる：アラキドン酸（AA）に対する、およびアラキドン酸の下流の類似効果を有する公知の薬剤に対する α -CDの作用。 α -CDの作用は、sPLA2の阻害ではなくPCを拘束することであり、コルチコステロイドの作用よりも忍容性良好である。イブプロフェンとクロモリンの併用は、乾燥粉末吸入剤ALZT-OP1（Elmaleh D（2017））として検証されている。これとは対照的に α -CDは3つすべての経路を下方制御するものであり、ASA、NSAIDsまたはLOX阻害剤の標的ではない経路で認められる代償性活性化を予防する。さらに α -CDとは対照的に、エンドサイトーシスに対する作用は予測されていない。ゆえにオートファジーの改善をしても相乗的な抗炎症作用もないと予測される（http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/introduction_to_eicosanoidsから改変）。

10

【0076】

【図48】 α -CD／ペメトレキセド化合物：化合物を、葉酸受容体を有する癌細胞近傍に標的化するために、 α -CD（または例えばヒドロキシプロピルを伴うHP- α -CDの誘導体）は、非限定的な例として、ジスルフィドリンカーを用いてペメトレキセドに結合されることができる。このリンカーは、エステルを介して α -CDとペメトレキセドの両方に結合される。ジスルフィドリンカーは、システインまたは3-メルカプトプロピオン酸のいずれかと、2-メルカプト-エタノールにより形成され得る。エステルまたはジスルフィド結合（破線のボックス）は、すでに確立されている方法により形成することができ、例えば（Michel D, Chitanda JM, et al. (2012) Eur J Pharm Biopharm 81:548-56）および（Hunter R, Stellenboom N, et al. (2008) Synlett 252-4）（1つのH₂Oを除去し、各々が、2個のOHからOを形成する）、ならびに（Butt AM, Mohd Amin MC, et al. (2015) Int J Nanomedicine 10:1321-34）（H₂を除去し、2つのSHからS-Sを形成する）に記載される方法が挙げられる。

20

【0077】

【図49A】遺伝的解析：表4（図49A～49C）は、muGWAS／ssGWASにおいて、IPV6／IPV1：-log₁₀（p値）を介して実施された遺伝的解析を示す。

30

【図49B】同上。

【図49C】同上。

【発明を実施するための形態】

【0078】

本開示は、乳癌遺伝子データの3つの独立したセットの再解析に基づいた、特定の疾患関連コレクションの研究結果に部分的に基づいている。乳癌遺伝子データは、National Institutes of Health's dbGaP collectionから分析用に利用可能である。この再解析は初期の解析とは異なっており、新規のコンピューター生物統計学的手法を使用している。この手法は、遺伝学に関する知識を、方法自体に取り込んでいる。（Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354）実施例に詳述されるように、本方法は、同じデータで従来のバイオインフォマティクス法を使用した過去の解析では検討し損ねた以下の4点に対処するものである：（i）リスクアレルと発生率の間の非加算的関連性、（ii）スーエピスタシス相互作用、（iii）有意性と、マイナーアレル頻度または「MAF」の間の相関、および（iv）非無作為化バイアス。さらに、ディプロタイプ長、つまり広域座位を使用する方法から生じる問題に対する多重度の調整にも対処する。これらの点に対処することにより、過去に2つの新規な自閉症特異的な遺伝子コレクションを特定した同じ戦略で、今度はエンドサイトーシスとリソソーム機能に関連した別の新規の遺伝子コレクションが特定された。（Wittkowski

40

50

ki KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)

【0079】

本明細書において提示される1つの遺伝子コレクション(図12、上部左側の角)は、8個の遺伝子(AGPAT3/4 ATP8A1/B1、ABCA1、ANO4、LPPR1、DGKQ)を含み、その役割には、ホスファチジルイノシトール(PI)サイクルにその基質であるPIを提供することが含まれる。アルツハイマー病では、「PIは、症例の90%もの多くにおいて、認知症の症状が発生する2年前に記憶障害を正確に予想し得るたった10個の血清脂質のうちの1つである」(Waugh MG(2015) Biochim Biophys Acta 1851:1066-82)。2つ目の遺伝子クラスターは、ホスホイノシチドにより制御されるプロセスであるエンドサイトーシスと直接関連する遺伝子を含む(表4、PI/ECカラム)。その段階としては、限定されないが、CCVおよびEEの陥入と形成が含まれる(図13)。この発見に基づき、本開示は部分的には、癌治療の焦点を、高齢の対象であっても多くの生命機能に関与するプロセスである細胞増殖の制御から、出生前および出生後早期の発育の間に主に関連するプロセスである細胞の拡散、移動および浸潤の制御へとシフトさせることを提示するものである。これらの研究結果に基づき、本明細書において詳述されるように、本開示は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を、PIサイクルとその活性を調節することにより治療するための組成物および方法を提供する。本開示において驚くべき結果のうちの1つは、同じ介入によって、加齢に関連した慢性的炎症(炎症性老化)も減少させたことである。さらに一部の実施形態では、本開示は、神経細胞の成長をはじめとする細胞の移動はほとんど停止している一方で、例えば毛髪、皮膚などの増殖といった細胞の増殖は継続し、他の細胞メカニズムは加齢に伴い減少し得る、例えば成人期などの期間に、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の治療に有用であり得る組成物および方法を提供する。

【0080】

別の部分では、本開示は、腎毒性は主に β -CDに対して示されているにも関わらず、 α -CDも β -CDと同様に腎毒性があると普遍的に考えられている、公開されている研究結果の解釈の再評価に基づいている。 β -CDは、 α -CDよりも水溶性がかなり低く、ゆえにラットの腎臓で認められている長期的な細胞質の結晶形成のリスクが高くなる(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)。例えばHaCaT細胞増殖(図29)、カスパーゼ活性(図30)およびラクトースデヒドロゲナーゼ(図31)において、通常は安全なHP- β -CDレベルで、 β -CDと比較した α -CDの毒性の低さが示されている。

【0081】

要約すると、「[Joint Expert] Committee [on Food Additives (JECFA)] (FAO/WHO合同食品添加物専門家会議)は、動物における当該化合物の相対的な毒性の低さと、ベーターシクロデキストリンよりも毒性が低かったという事実により、ヒトの忍容性試験は可能であったと再確認した。」(Prakash AS, Abbott PJ (2001) WHO/JECFA Food Additive Series 48:1030)

【0082】

2014年に、CHMPは、1日最大摂取許容量(PDE: Permitted Daily Exposure)の閾値を提唱しており、これを超えると有害事象が発生し得る。 α -CDおよびHP- β -CDの非経口投与は、0.02および10mg/kg/日である(Committee for Human Medicinal Products (CHMP) (2017) European Medicines Agency EMA/CHMP/333892/2013)。2017年10月9日に、これらの閾値が見

直され、それぞれ200mg/kg/日となった(Committee for Human Medicinal Products (CHMP) (2017) European Medicines Agency EMA/CHMP/333892/2013)。そしてシクロデキストリンが、応用処置に関するガイドライン(guidelines on expedient)に含められた(European Medicines Agency (2017) EMA/CHMP/302620/2017/EN)(表1)。

表1：賦形剤および添付文書の情報。

【表1】

名称	更新日	投与経路	閾値	添付文書の情報	コメント
シクロデキストリン 例えば： Alfadex Betadex (E 459) γ-シクロデキストリン スルホブチオール-エーテル-β-シクロデキストリン(SBE-β-CD) ヒドロキシプロピルベータデクス 無作為メチル化β-シクロデキストリン(RM-β-CD)	09/10/2017	経口	200 mg/kg/日	シクロデキストリンは、例えば下痢など消化管に害を及ぼす場合がある。	高投与量でシクロデキストリンは、動物において可逆的な下痢および盲腸拡張を引き起こし得る。
シクロデキストリン 例えば： Alfadex Betadex (E 459) γ-シクロデキストリン スルホブチオール-エーテル-β-シクロデキストリン(SBE-β-CD) ヒドロキシプロピルベータデクス 無作為メチル化β-シクロデキストリン(RM-β-CD)	09/10/2017	非経口	200mg/kg/日、および2週間を超える使用	腎疾患がある場合には、服用する前にかかりつけ医に相談する。	2歳未満の小児には、糸球体機能の低さにより腎毒性から保護され得るが、シクロデキストリンの血液レベルが高くなり得る。 中程度から重度の腎機能障害を有する患者では、シクロデキストリンの蓄積が発生する場合がある。

出典：(European Medicines Agency (2017) EMA/CHMP/302620/2017/EN)

【0083】

別の実施形態では、送達率を減少させることにより腎毒性はさらに低下する。当該方法は、1日当たりの反復投与を含む工程、蠕動ポンプを介して数時間にわたり薬剤を投与する工程、または移植薬剤送達システムを介して継続的に薬剤を投与する工程を含む。

【0084】

本開示の主な実施形態の一部は、本明細書の上述の要約、ならびに実施例、図面および請求の範囲に記載されている。発明を実施するための形態のセクションは、本開示の組成

物および方法に関する追加の説明を提供するものであり、本特許出願の要約、実施例、図面および請求の範囲を含む、本特許出願の他のすべてのセクションと併せて読み取られることが意図されている。

I. 略語と定義

【0085】

「A β 」および「A β 」という略語は、アミロイドベータを指す。

【0086】

「aCD」、「 α CD」および「 α -CD」という略語は、アルファシクロデキストリンを指す。

【0087】

「AD」という略語は、アルツハイマー病を指す。

【0088】

「AKT」という略語は、タンパク質キナーゼBを指す。

【0089】

「ALS」という略語は、筋萎縮性側索硬化症を指す。

【0090】

「A Φ 」という略語は、オートファジーを指す。

【0091】

「APP」という略語は、アミロイド前駆体タンパク質を指す。

【0092】

「 α -syn」および「a syn」という略語は、アルファシヌクレインを指す。

【0093】

「BCa」という略語は、乳癌を指す。

【0094】

「bCD」、「 β CD」および「 β -CD」という略語は、ベーターシクロデキストリンを指す。

【0095】

「Ca」という略語は、カルシウムを指す。

【0096】

「CAD」という略語は、冠動脈疾患を指す。

【0097】

「CD」という略語は、シクロデキストリンを指す。

【0098】

「CDK」という略語は、サイクリン依存性キナーゼを指す。

【0099】

「CF」という略語は、嚢胞性線維症を指す。

【0100】

「CGEM」という略語は、感受性に関する癌遺伝子マーカー (Cancer Genetic Markers of Susceptibility) を指す。

【0101】

「Chr」という略語は、染色体を指す。

【0102】

「dbGaP」という略語は、遺伝子型および表現型のデータベースを指す。

【0103】

「DNA」という略語は、デオキシリボ核酸を指す。

【0104】

「EC」という略語は、エンドサイトーシスを指す。

【0105】

「EE」という略語は、早期エンドソームを指す。

【0106】

10

20

30

40

50

「e. g.」という略語は、ラテン語での例示（例えば）を指す。

【0107】

「EPIC」という略語は、癌に関する欧州前向きコホート研究（European Prospective Investigation into Cancer）を指す。

【0108】

「ER」という略語は、小胞体を指す。

【0109】

「FAK」という略語は、焦点接着キナーゼを指す。

【0110】

「Fc」という略語は、結晶化可能な断片を指す。

【0111】

「FDA」という略語は、米国食品医薬品局を指す。

【0112】

「FSGS」という略語は、巣状分節状糸球体硬化症を指す。

【0113】

「gCD」および「γCD」という略語は、ガンマーシクロデキストリンを指す。

【0114】

「GPCR」という略語は、Gタンパク質共益受容体を指す。

【0115】

「GRAS」という略語は、一般的に安全とみなされる（generally recognized as safe）、を指す。

【0116】

「GWAS」という略語は、全ゲノム関連解析を指す。

【0117】

「GRAS」という略語は、一般的に安全とみなされる（generally recognized as safe）、を指す。

【0118】

「HA」という略語は、ヒアルロン酸を指す。

【0119】

「HER2/neu」という略語は、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2を指す。

【0120】

「HLA」という略語は、ヒト白血球抗原を指す。

【0121】

「HP」という略語は、ヒドロキシプロピルを指す。

【0122】

「HPαCD」、「HP-α-CD」および「HPαCD」という略語は、2-ヒドロキシプロピル-アルファシクロデキストリンを指す。

【0123】

「HPβCD」、「HP-β-CD」および「HPβCD」という略語は、ヒドロキシプロピル-ベータシクロデキストリンを指す。

【0124】

「IND」という略語は、治験薬を指す。

【0125】

「IPV」という略語は、逆P値（inverse p-value）を指す。

【0126】

「i. v.」という略語は、静脈内を指す。

【0127】

「LD」という略語は、連鎖不均衡を指す。

10

20

30

40

50

- 【0128】
「LD₅₀」という略語は、半数致死量を指す。
- 【0129】
「LE」という略語は、後期エンドソームを指す。
- 【0130】
「LPC」という略語は、リゾホスファチジルコリンを指す。
- 【0131】
「LY」という略語は、リソソームを指す。
- 【0132】
「LYD」という略語は、リソソーム機能障害を指す。 10
- 【0133】
「MAF」という略語は、マイナーアレル頻度を指す。
- 【0134】
「MAP」という略語は、マイトジェン活性化タンパク質を指す。
- 【0135】
「M-β-CD」、「MβCD」および「MbCD」という略語は、メチルーβ-シクロデキストリンを指す。
- 【0136】
「MΦ」という略語は、マクロファージを指す。
- 【0137】
「MS」という略語は、多発性硬化症を指す。 20
- 【0138】
「mTOR」という略語は、ラパマイシンの機構的標的を指す。
- 【0139】
「muGWA S」という略語は、多変量U-統計量GWA Sを指す。
- 【0140】
「MVB」という略語は、多小胞体を指す。
- 【0141】
「No.」という略語は、数値を指す。
- 【0142】
「NIH」という略語は、国立衛生研究所を指す。 30
- 【0143】
「NPC」という略語は、ニューマンピック病C型を指す。
- 【0144】
「PBCS」という略語は、ポーランド人の乳癌症例対照研究（Polish Breast Cancer Case-Control Study）を指す。
- 【0145】
「PC」とは、ホスファチジルコリンを指す。
- 【0146】
「PCa」という略語は、前立腺癌を指す。 40
- 【0147】
「PD」という略語は、パーキンソン病を指す。
- 【0148】
「PI」という略語は、ホスファチジルイノシトールを指す。
- 【0149】
「PI3R」という略語は、ホスホイノシチド-3キナーゼを指す。
- 【0150】
「PIP」という略語は、ホスホイノシチドを指す。
- 【0151】
「PIP1」という略語は、PI（4）Pを指す。 50

【0152】

「PI P₂」という略語は、PI (4, 5) P₂を指す。

【0153】

「PI P₃」という略語は、PI (3, 4, 5) P₃を指す。

【0154】

「PM」という略語は、細胞膜を指す。

【0155】

「PKB」という略語は、タンパク質キナーゼBを指す。

【0156】

「PKC」という略語は、タンパク質キナーゼCを指す。

10

【0157】

「PL」という略語は、リン脂質を指す。

【0158】

「QQ」という略語は、「分位数－分位数」(quantile-quantile)を指す。

【0159】

「QR」という略語は、「分位数－順位」(quantile-rank)を指す。

【0160】

「RTK」という略語は、受容体チロシンキナーゼを指す。

【0161】

20

「s. c.」という略語は、皮下を指す。

【0162】

「SLE」という略語は、全身性エリテマトーデスを指す。

【0163】

「SNP」という略語は、一塩基多形を指す。

【0164】

「ssGWAS」という略語は、単一-SNP (single-SNP) 全ゲノム関連解析を指す。

【0165】

「TFEB」という略語は、転写因子EBを指す。

30

【0166】

「TSC」という略語は、結節性硬化症を指す。

【0167】

「U. S.」という略語は、米国を指す。

【0168】

本明細書および請求の範囲において使用される場合、「a」および「an」という不定冠詞は、逆であることが明白に示唆されない限り、「少なくとも1つ」を意味するものと理解されたい。

【0169】

本明細書および請求の範囲において使用される場合、「および／または」という文言は、そう併せられる要素の「いずれか、または両方」を意味するものと理解されたい。すなわち、要素は、一部の例では、接続して存在し、別の例では分離して存在する。「および／または」の文言で具体的に特定される要素以外の他の要素も、逆であることが明白に示唆されない限り、具体的に特定される要素に関連、または非関連であろうと、任意で存在し得る。ゆえに非限定的な例として、「Aおよび／またはB」という言及は、例えば「含む」といったオープンエンドな言語と併せて使用される場合、1つの実施形態では、Bを伴わないAを指し（任意でB以外の要素を含む）、別の実施形態では、Aを伴わないBを指し（任意でA以外の要素を含む）、さらに別の実施形態では、AとBの両方を指す（任意で他の要素を含む）。

40

【0170】

50

明細書および請求の範囲において使用される場合、「または」は、上記に規定される「および／または」と同じ意味を有すると理解されたい。例えばリストにおいて項目を分けるとき、「または」または「および／または」は、包含であると解釈されるべきである。すなわち、要素の数またはリストのうちの少なくとも1つの包含であるが、複数も含み、そして任意で追加のリストにない項目も含む。例えば「ただ1つの01」または「～のうちの厳密に1つ」、または請求の範囲において使用されるとき「～からなる」は、要素の数またはリストのうちの、厳密に1つの要素の包含を指す。概して、本明細書において使用される場合、「または」という用語は、排他性の条件が先行する場合、排他的な代替物（すなわち「1つまたは他方であるが、両方ではない」）を示すものとして解釈される。「いずれか」、「～のうちの1つ」、「～のうちの1つのみ」、または「～のうちの厳密に1つ」、「～から本質的になる」は、請求の範囲において使用される場合、特許法分野において使用される通常の意味を有するものとする。

10

【0171】

例えば量、時間的な期間などの計測可能な値に言及する場合、本明細書において、「約」という用語は、特定される値から±20%、±10%、±5%、±1%、±0.9%、±0.8%、±0.7%、±0.6%、±0.5%、±0.4%、±0.3%、±0.2%または±0.1%の変動を、そうした変動が本開示方法の実施に適しているときに、包含することを意味する。

【0172】

本明細書において使用される場合、「担体」という用語は、化合物とともに投与される希釈剤、アジュバント、または賦形剤を意味する。薬学的な担体は、例えば水および油などの液体であってもよく、石油、動物、植物または合成を起源とするものが挙げられ、例えばピーナツ油、大豆油、鉱油、ごま油などがある。薬学的な担体は、生理食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、滑石、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素などであってもよい。さらに補助剤、安定剤、増粘剤、潤滑剤、および着色剤が使用されてもよい。

20

【0173】

本明細書において使用される場合、「含むこと」（および例えば「含む」および「含まれる」などの含むことの任意の形態）、「有すること」（および例えば「有する」などの有することの任意の形態）、「含有すること」（および例えば「含有する」などの含有することの任意の形態）または「包含すること」（および例えば「包含する」などの包含することの任意の形態）という文言は、包括的またはオープンエンドであり、追加の列挙されていない要素または方法の工程を除外しない。

30

【0174】

本明細書において使用される場合、「その必要のある」という文言は、動物または哺乳動物が、特定の方法または治療の必要を有していると識別されたことを意味する。一部の実施形態では、当該識別は、任意の診断手段によるものであってもよい。本明細書に開示される方法および治療のいずれかにおいて、動物または哺乳動物は、その必要があってもよい。一部の実施形態では、動物または哺乳動物は、特定の疾患、障害または状態が流行している環境中にいる、またはそうした環境に旅行するものであってもよい。

40

【0175】

本明細書において使用される場合、「治療する」、「治療すること」および「治療」という用語は、臨床転帰における望ましい変化を目的とする様々な活動を包含する。例えば本明細書において使用される場合、「治療する」という用語は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態、例えば限定されないが、乳癌および前立腺癌などの癌腫、または例えば限定されないがパーキンソン病およびアルツハイマー病などの神経変性疾患、または例えば限定されないがアテローム性動脈硬化症、CADおよび脳卒中などの冠動脈疾患、または例えば限定されないがT2DMなどの消化器系障害の1つもしくは複数の臨床指標または症状における任意の検出可能な改善を包含する。例えばそうした用語は

50

、少なくとも1つの臨床指標もしくは症状を軽減、減弱、改善、緩和、低下、阻害または減速させること、または追加的な臨床指標もしくは症状を予防すること、1つもしくは複数の臨床指標または症状の進行を減少または減速させること、1つもしくは複数の臨床指標または症状の退行を生じさせること、疾患もしくは障害を原因とする状態を緩和すること、を包含する。治療的処置の場合において、本明細書に提示される方法および組成物は、例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態などの疾患または障害の臨床指標または症状を1つまたは複数、すでに呈している対象において使用されてもよい。悪性もしくは神経変性の疾患または障害の場合において、様々な臨床指標または症状が医師および当業者に公知である。

10

【0176】

本明細書において使用される場合、「予防する」または「予防すること」という用語は、疾患、障害もしくは症状の始まりを止めること、ならびに疾患もしくは障害の進行または悪化を減少または減速させること、を包含する。例えば、乳癌または前立腺癌を「予防すること」は、限定されないが、癌性細胞の形成、腫瘍増殖、癌の局所的播種の阻害、または悪性増殖物転移の阻害、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ALSおよび／またはMSの症状発生の予防が挙げられる。予防的処置の場合には、本明細書に提示される方法および組成物は、疾患もしくは障害の任意の明白な、または検出可能な臨床指標または症状をまだ呈していないが、例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態などの疾患または障害を発症するリスクがあると考えられる対象において、症状進行を予防するために、または臨床症状を呈することを予防するために使用されてもよい。

20

【0177】

「悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態」という用語は、本明細書において当分野の通常の使用法に従い使用され、限定されないが、例えば癌腫、乳癌、前立腺癌などの悪性障害、胸部悪性腫瘍および前立腺悪性腫瘍、ならびに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、および脳の過成長症候群[および]シャルコー・マリー・トゥース病を含む広範な障害などの神経変性疾患が挙げられる(Waugh MG (2015) Biochim Biophys Acta 1851:1066-82)。

30

【0178】

本明細書において使用される場合、「癌」または「過増殖性疾患」という用語は、細胞の過増殖を特徴とする疾患および障害を指すことが意図される。過増殖性疾患の例としては、癌、乾癬、新生物および過形成のすべての形態が挙げられる。

【0179】

「対象」、「個体」および「患者」という用語は本明細書において相互交換可能に使用され、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指す。哺乳動物としては、限定されないが、マウス科、サル、ヒト、家畜、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、イヌ、スポーツ動物およびペットが挙げられる。インビボで取得された、またはインビトロで培養された組織、細胞およびその子孫物も、対象という用語の定義に包含される。「対象」という用語はさらに、本明細書全体を通じて使用され、一部の実施形態では、細胞サンプルが採取された動物、または開示される細胞もしくは核酸配列が投与された動物を記載するためにも使用される。一部の実施形態では、動物は、ヒトである。特定の対象、例えばヒトに特異的な状態の治療に関しては、「患者」という用語が、相互交換可能に使用され得る。本開示の記載内容の一部の例において、「患者」という用語は、特定の疾患または障害に罹患するヒト患者を指す。一部の実施形態では、対象は、内皮細胞サンプルが単離される、または提供される非ヒト動物であってもよい。「哺乳動物」という用語は、ヒトと非ヒトの両方を包含し、限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ科、ネコ科、マ

40

50

ウス科、ウシ属、ウマ科、ヤギおよびブタを含む。

【0180】

本明細書において使用される場合、「有効量」または「治療有効量」という用語は、例えば上述の「治療」において記載される望ましい臨床転帰の1つまたは複数を実現する、または実現に寄与するために充分である本明細書に記載の活性剤の量を指す。任意の個体症例における適切な「有効」量は、例えば用量漸増試験などの当分野に公知の標準的な方法を使用して決定されてもよい。一部の実施形態では、本明細書において使用される場合、「治療有効量」という用語は、症状を改善する、遅延させる、もしくは予防する、腫瘍サイズを縮小させる、非転移性癌から転移性癌へと癌が進行するのを予防する、または癌もしくは神経変性疾患の治療を受けている患者の生存期間を延長させるために有効な活性剤、または剤の組み合わせの量を指すことが意図される。治療有効量の決定は、特に本明細書に詳細に開示される内容を考慮することで、当業者の能力の範囲内にある。

10

【0181】

一部の実施形態では、シクロデキストリンまたはその誘導体またはその薬学的に許容可能な塩は、他の治療剤と共投与されてもよく、および／または放射線治療を含む治療レジメンの一部と共投与されてもよい。

【0182】

治療剤の共投与は、いずれか順序で連続的であってもよく、または同時であってもよい。一部の実施形態では、シクロデキストリンまたはその誘導体、またはその薬学的に許容可能な塩は、複数の追加の治療剤と共投与される。化学療法剤の例としては、普遍的な細胞障害剤または細胞増殖抑制剤が挙げられ、例えばメトトレキサート（アメトプテリン）、ドキソルビシン（アドリマイシン）、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5-フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシルおよび他のナイトロジェンマスタード（例えばシクロホスファミド）、シスプラチン、ビンデシン（および他のビンカルカロイド）、マイトマイシン、ならびにブレオマイシンが挙げられる。他の化学療法剤としては、プロチオニン（大麦粉オリゴペプチド）、マクロモマイシン、1,4-ベンゾキノ誘導体およびトレニモンが挙げられる。抗癌抗体、例えばハーセプチン、および毒素も、他の追加的治療剤の例である。

20

【0183】

治療レジメンには、シクロデキストリンまたはその誘導体またはその薬学的に許容可能な塩の連続的投与と、いずれか順序または同時の放射線照射治療の開始が含まれてもよい。当業者であれば、適切な放射線治療レジメンを容易に考案することができる。Carlos A Perez & Luther W Brady: Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co, Phila, 1992。当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれ、本開示に使用され得る放射線治療プロトコールおよびパラメーターを記載する。

30

【0184】

併用療法の一部として使用される場合、阻害剤の治療有効量は、他の治療手段を伴わずに使用される場合に有効であるために必要とされる用量よりも当該量が少なくなるように調整されてもよい。

40

【0185】

一部の実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物を用いた治療に、外科的介入が先行する。

【0186】

本開示はさらに、癌細胞中のエキソーム数を、当該癌細胞とシクロデキストリンの治療有効量を接触させることにより減少させる方法に関する。

【0187】

本明細書において使用される場合、「医薬組成物」という用語は、本明細書に記載の活性剤（例えば α -CD）を少なくとも1つ、および例えば担体、安定剤、希釈剤、分散剤

50

、懸濁剤、増粘剤、賦形剤などの薬物送達における使用に適した他の構成要素を1つまたは複数、含有する組成物を指す。本開示は、本明細書に開示される任意のアルファードキストリンまたはその誘導体もしくは塩と、薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物に関する。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に開示されるいずれか1つもしくは複数の脂肪酸分子またはその塩を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、ベータシクロデキストリンまたはガンマシクロデキストリンを含まない。

【0188】

本明細書において使用される場合、「活性剤」という用語は、本明細書に記載の組成物および方法において使用されることが意図される分子、および例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を治療する目的に対し、生物学的に活性であることが意図される分子を指す。「活性剤」という用語は、生物学的に活性な形態であるか、またはそうした形態へと転換され得る分子を含むことが意図される。例えば「活性剤」という用語は、プロドラッグ、および／または不活性もしくは意図される生物活性がないが、活性な形態もしくは意図される生物活性を有する形態へと転換され得る分子を含む。

【0189】

本明細書において使用される場合、「サンプル」という用語は概して、限定された量の何らかの物質を指し、より大量の当該物質と類似している、またはより大量の当該物質を表すものであることが意図される。本開示において、サンプルは、コレクション、スワブ、擦過物、剥離物、生検、採取組織または外科的切除物であり、疾患または障害の臨床指標に対して検査される。一部の実施形態では、サンプルは、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を有すると考えられる患者または対象から採取される。一部の実施形態では、例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態などの疾患または障害の臨床指標を含有すると考えられるサンプルは、例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態などの疾患または障害の臨床指標のうちの1つまたは複数を含むことが知られている対照サンプルに対して比較される。一部の実施形態では、例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態などの疾患または障害の臨床指標を含有しないことが知られている対照サンプルに対して比較される。一部の実施形態では、例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態などの疾患または障害の臨床指標を含有すると考えられるサンプルは、例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態などの疾患または障害の臨床指標を含有しないことが知られている対照サンプルに対して比較される。

【0190】

本明細書において使用される場合、「排除する」という用語は、取り込み、または化学的に混合され、限定されないが、排出のために腎臓に輸送されることを意味する。

【0191】

「塩」という用語は、無機酸および／または有機酸で形成される酸性塩、ならびに無機塩基および／または有機塩基で形成される塩基性塩を指す。これらの酸および塩基の例は、当業者に公知である。そうした酸付加塩は通常、薬学的に許容可能であるが、非薬学的に許容可能な酸の塩も、対象の化合物の調製および精製において有用である場合がある。本実施形態の塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、ピルビン酸、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、メタンスルホン酸およびベンゼンスルホ

ン酸から形成されるものが含まれる。

【0192】

一部の実施形態では、1つまたは複数を含む組成物の塩は、遊離塩基またはその塩、エナンチオマーもしくはラセミ体と、適切な酸の1もしくは複数当量を反応させることにより形成されてもよい。一部の実施形態では、本開示の薬学的に許容可能な塩とは、少なくとも1つの塩基性基または少なくとも1つの塩基性ラジカルを有するアミノ酸を指す。一部の実施形態では、本開示の薬学的に許容可能な塩は、酸付加塩を形成する遊離アミノ基、遊離グアニジノ基、ピラジニルラジカル、またはピリジルラジカルを含む。一部の実施形態では、本開示の薬学的に許容可能な塩とは、対象化合物と（例えば）塩酸、硫酸またはリン酸などの無機酸との酸付加塩、または適切な有機カルボン酸もしくはスルホン酸、例えば脂肪族モノカルボン酸もしくはジカルボン酸、例えばトリフルオロ酢酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、ヒドロキシマレイン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸もしくはシュウ酸との酸付加塩であるアミノ酸、または例えばアルギニンもしくはリシンなどのアミノ酸、芳香族カルボン酸、例えば安息香酸、2-フェノキシ安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、芳香脂肪族（aromatic aliphatic）カルボン酸、例えばマンデル酸もしくは桂皮酸、ヘテロ芳香族カルボン酸、例えばニコチン酸もしくはイソニコチン酸、脂肪族スルホン酸、例えばメタンスルホン酸、エタンスルホン酸もしくは2-ヒドロキシエタンスルホン酸、または芳香族スルホン酸、例えばベンゼンスルホン酸、p-トルエン酸、ナフタレンスルホン酸との酸付加塩であるアミノ酸を指す。いくつかの塩基性基が存在する場合、モノ酸付加塩またはポリ酸付加塩が形成されてもよい。反応は、塩が不溶性である溶媒または培地中で実施されてもよく、または塩が可溶性である溶媒中で実施されてもよく、例えば水、ジオキサン、エタノール、テトラヒドロフランまたはジエチルエーテル、または溶媒混合物などがあり、それらは真空除去もしくは凍結乾燥により除去され得る。反応は、複分解プロセスであってもよく、またはイオン交換樹脂で実施されてもよい。一部の実施形態では、塩は、患者にとって生理学的に忍容なものであってもよい。本開示による塩は、無水形態で存在してもよく、または水和結晶形態（すなわち、1つまたは複数分子の水とともに錯体化または結晶化）として存在してもよい。

【0193】

「可溶」または「水溶」という用語は、1/100, 000 (mg/ml) よりも高い溶解度を指す。物質または溶質の溶解度は、例えば水などの特定の溶媒質量に完全に溶解され得る物質の最大質量である。他方で「事実上の不溶」または「不溶」とは、1/10, 000 (mg/ml) 以下の水溶解度を指す。水溶物質または可溶物質としては、例えばポリエチレングリコールが挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、ポリエチレングリコールに結合されて、当該ペプチドを含有する組成物をさらに可溶化させてもよい。

【0194】

本明細書において使用される場合、「相同性」または「配列同一性」の百分率は、独立型で実行可能なBLASTエンジンプログラムを使用して2配列をブラスト (blast) することにより決定される (blastseq)。このプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のftpサイトからデフォルトパラメーターを使用して検索可能である (Tatusova TA, Madden TL (1999) FEMS microbiology letters 174: 247-50。当該論文はその全体で参照により本明細書に組み込まれる)。

【0195】

一リン酸、二リン酸もしくは三リン酸の基または部分を含有するリン酸塩に適用される場合の「誘導体」という用語は、当該基の化学的改変を指し、この場合において当該改変は、一リン酸、二リン酸もしくは三リン酸の基または部分を含有するリン酸塩の1つまたは複数の原子の付加、除去または置換を含んでもよい。複数の実施形態において、そうし

た誘導体は、一リン酸、二リン酸もしくは三リン酸の基または部分を含有するリン酸塩のプロドラッグであり、それらは対象、患者、細胞、生物サンプルへの投与後、または対象、患者、細胞、生物サンプルもしくはタンパク質（例えば酵素）との接触後に、当該誘導体から、一リン酸、二リン酸もしくは三リン酸の基または部分を含有するリン酸塩へと転換される。ある実施形態では、三リン酸塩誘導体は、ガンマーチオ三リン酸塩である。ある実施形態では、誘導体は、ホスホロアミデートである。複数の実施形態では、一リン酸、二リン酸もしくは三リン酸の基または部分を含有するリン酸塩の誘導体は、Murakami et al. J. Med. Chem., 2011, 54, 5902; Sofia et al., J. Med. Chem. 2010, 53, 7202; Lam et al. ACC, 2010, 54, 3187; Chang et al., ACS Med Chem Lett., 2011, 2, 130; Furman et al., Antiviral Res., 2011, 91, 120; Vernachio et al., ACC, 2011, 55, 1843; Zhou et al., AAC, 2011, 44, 76; Reddy et al., BMC L, 2010, 20, 7376; Lam et al., J. Virol., 2011, 85, 12334; Sofia et al., J. Med. Chem., 2012, 55, 2481, Hecker et al., J. Med. Chem., 2008, 51, 2328; または Rautio et al., Nature Rev. Drug Discov., 2008, 7, 255 に記載されている誘導体である。これら全文献が、すべての目的に対し、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

【0196】

追加の定義および略語は、本特許明細書において別段で提示されるか、または当分野に公知である。

追加説明

【0197】

悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、ウイルス性もしくは加齢関連の疾患、障害または他の状態は、それらが共通経路にそって多くの遺伝子が関与するという意味で複雑な状態である。例えば、限定されないがアテローム性動脈硬化症、CAD および脳卒中をはじめとする心血管疾患（CVD）と神経変性疾患は、T2DM の併存疾患であることが知られている。ホスホイノシチドのPI（3, 4, 5）P₃ およびPI（3, 4）P₂ が悪性腫瘍と神経変性疾患において上方制御されていること（Wagh M G (2015) Biochim Biophys Acta 1851:1066-82）、およびAkt シグナル伝達を活性化すること（Ooms Lisa M, Binge Lauren C, et al. (2015) Cancer cell 28:155-69; Ma K, Cheung SM, et al. (2008) Cell Signal 20:684-94; Majerus PW, York JD (2009) Journal of Lipid Research 50:S249-S54; Bridges D, Saltiel AR (2015) Biochim Biophys Acta 1851:857-66）という研究結果に部分的に基づくと、PI シグナル伝達は、広範な加齢関連疾患に関与していると広く考えられている。INPP4B は、一部の癌のサプレッサーとして知られているが、限定されないが、乳癌または前立腺癌を含む他の癌に対してはリスク因子としても知られている（Woolley JF, Dzenladze I, et al. (2015) Trends Mol Med 21:530-2; Chew CL, Chen M, et al. (2016) Oncotarget 7:5-6）。PI3K シグナル伝達も、加齢、認知低下およびアルツハイマー病において示唆されている（O'Neill C (2013) Experimental gerontology 48:647-53）。さらに「単剤のPI3K 阻害剤を用いた臨床結果は、今までのところわずかなものであった」（Mayer IA, Arteaga CL (2016) Annu Rev Med 67:11-28）。これは部分的には、従来のGWA Sでは、PI シグナル伝達が癌および神経変性疾患などの複雑な状態に寄与す

30

40

50

る正確なメカニズムを解明することがほとんどできなかったことが原因である。

【0198】

本明細書において提示される結果からは、限定されないが乳癌および前立腺癌ならびにアルツハイマー病およびパーキンソン病、アテローム性動脈硬化症、ならびに2型糖尿病をはじめとするこれらすべての状態が、ホスファチジルイノシトール（PI）サイクルの過活性により特徴づけられる。一部の態様において、本開示は、乳癌および前立腺癌、心血管疾患、代謝疾患、ならびにパーキンソン病またはアルツハイマー病の治療方法を提供するものであり、当該方法は、対象に、PIサイクルを下方制御してエンドサイトーシス／エキソサイトーシスの変化を惹起させ、細胞の移動および浸潤を減衰もしくは低下させ、または限定されないがLDL、APP、タウ、ミエリン、SOD1、HTTおよびα-シヌクレインをはじめとするタンパク質の処理をもたらす1つまたは複数の活性剤の治療有効量を投与する工程を含む。さらにそうした活性剤は、例えば他の適応症に対してヒトにおいてすでに安全に使用されており、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の治療における使用のために別用途に使用され得る薬剤または薬剤化合物であり得る。

10

【0199】

他の提唱される用途は、上述の加齢関連疾患と同じメカニズムが関与する広範な疾患における用途であり、限定されないが、神経セロイドリポフスチン症（NCL）（Song W, Wang F, et al. (2014) J Biol Chem 289:10211-22）、パーキンソン病、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症（FTD）およびハンチントン病（HD）、脳卒中（Vecsernyes M, Fenyvesi F, et al. (2014) Arch Med Res 45:711-29; Rivers JR, Maggo SD, et al. (2012) Neuroreport 23:134-8）、アテローム性動脈硬化症（Irie T, Fukunaga K, et al. (1992) J Pharm Sci 81:524-8; Zimmer S, Grebe A, et al. (2016) Sci Transl Med 8:333ra50）、非アルコール性脂肪肝症（NAFLD）（Walzenbergh SM, Houben T, et al. (2015) Int J Mol Sci 16:21056-69）、限定されないが嚢胞性線維症、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）を含む呼吸器および肺の疾患（Gunasekara L, Al-Saiedy M, et al. (2017) Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society; Dos Santos AG, Bayiha JC, et al. (2017) Biochim Biophys Acta 1859:1930-40; Cataldo D, Evrard B, et al. (2015) US 9034846 B2）、2型糖尿病（T2DM）およびインスリン抵抗性（Llanos P, Contreras-Ferrat A, et al. (2015) American journal of physiology Endocrinology and metabolism 308:E294-305）、プリオン病（Prior M, Lehmann S, et al. (2007) Journal of virology 81:11195-207）、ならびに限定されないがウイルス（インフルエンザ、HIV-1、ポリオ、HTLV-1、ニューカッスル、水痘帯状ヘルペス、B型肝炎、ブルータングおよびHSV）の細胞侵入をはじめとするウイルス、真菌または細菌感染からの防御（Danthi P, Chow M (2004) Journal of virology 78:33-41; Balla T (2013) Physiological Reviews 93:1019-137; Shishido TK, Jokela J, et al. (2015) Proc Natl Acad Sci U S A 112:13669-74）が挙げられる。

20

30

40

【0200】

50

スフィンゴ脂質とセラミドも、糸球体上皮細胞の機能障害（限定されないが、ファブリー病、テイ・サックス病、アルポート症候群、微小変化型疾患、糖尿病性腎疾患、巣状関節糸球体硬化症、末期腎疾患、腎不全、糸球体上皮細胞減少症（podocytopenia）、高ホモシステイン血症、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群を含む）ならびに癌、血管新生、アテローム性動脈硬化症、炎症およびインスリン抵抗性に関連している（Abou Daher A, El Jalkh T, et al. (2017) Int J Mol Sci 18）。

【0201】

ホスホイノシチドは、エンドサイトーシスを制御しており（Posor Y, Eichhorn-Grünig M, et al. (2015) Biochim Biophys Acta 1851:794-804）、限定されないが、筋肉および角膜のジストロフィーまたは筋細管ニューロパチーを含む遺伝性疾患、限定されないが白血病（ALL、AML、CML）およびリンパ腫（NHL）を含む癌、てんかんならびに血栓症における薬剤標的として挙げられている（Viaud J, Mansour R, et al. (2016) Biochimie 125:250-8）。ホスホイノシチドの制御異常に関連した神経疾患としては、限定されないが、フリードライヒ失調症、シャルコー・マリー・トゥース（CMT）変性性ニューロパチー、腎尿細管障害（レーベの眼脳腎症候群、デント病）、アンデルセン・タウィル症候群、ムコリピドーシス、多発性硬化症（MS）、ユニスーバロン（Yunis-Varon）症候群、ALS、FTLDおよび纖毛病が挙げられる（Waugh MG (2015) Biochim Biophys Acta 1851:1066-82）。ホスホイノシチドの制御異常に関連した追加疾患は、骨粗しょう症、癌（限定されないが、子宮頸癌、平滑筋肉腫、胃癌、腺癌、肺癌を含む）、心臓肥大および自己免疫性疾患（限定されないが、リウマチ性関節炎（RA）および全身性エリテマトーデスを含む）、ならびに限定されないが双極性障害および統合失調症を含む神経疾患である（Falasca M (2012) Current topics in microbiology and immunology）。

【0202】

多くの他の疾患も、リソソームに影響を与える機能喪失型変異に関連することが知られている。リソソームにおいて、ピノエンドサイトーシス／エンドサイトーシスされた細胞外物質およびオートファゴサイトーシスされた細胞内物質の多くが分解されなければならない（Wang C, Telpoukhovskaia MA, et al. (2017) Curr Opin Neurobiol 48:52-8）。すべての症例において、疾患表現型は、分解されなければならないピノサイトーシス／エンドサイトーシスされた物質の量を減少させることにより改善されるであろう（MPS：ムコ多糖、MLD：異染性白質ジストロフィー）：

【0203】

ABCA1：腎疾患；ABCA2：聴神経腫；ABCB9：急性骨髄性白血病（AML）；ACP2：酸ホスファターゼ欠損症、円すい角膜、筋萎縮性側索硬化症、無毛症、アメーバ症；ACP5：脊椎内軟骨異形成（spondyloenchondrodysplasia）、骨巨細胞腫、ヘアリー細胞白血病、歯吸収；AGA：アルパルチルグルコサミン尿症、フコシドーシス；AP3B1：ハーマンスキー・パドラック症候群（HPS）、眼皮膚白皮症、血小板プール症；AP3B2：神経学的腫瘍随伴障害；ARSA：MLD、アリールスルファターゼa欠損症、多重スルファターゼ欠損症、ムコスルファチドーシス；ARSB：MPS VI、アリールスルファターゼb欠損症、ムコスルファチドーシス；ASAH1：ファーバー脂肪肉芽腫症、（クーゲルベルグ・ウェランダー）脊髄性筋萎縮症、（エルドハイム・チェスター病）脂肪肉芽腫症；ATP13A2／PARK9：NCL 12、クフォー・ラケブ症候群、痙性対麻痺78、若年発症パーキンソン病；ATP6AP2（Perrett 2015）：精神遅滞、痙縮を伴うパーキンソン病、リンパ球性脈絡髄膜炎；ATP6V0A1：下壁心筋梗塞；ATP6V0A2：老人皮膚症候群（wrinkly skin syndrome）、皮膚弛緩症、骨髄障害性貧

血；ATP6V0A4：尿細管性アシドーシス、海綿腎；CD164：常染色体優性難聴、花粉アレルギー、前立腺癌；CLC7：大理石骨病；CLN1/PPT1：NCL、バッテン病、乳児型神経セロイドリポフスチン症（Santavuori-Haltia）；CLN11/GRN：NCL、前頭側頭型認知症、原発性進行性失語症；CLN3：NCL、二次性角膜浮腫、シュピールマイヤー・フォクト・シェーグレン・バッテン病（Spielmeier-Vogt-Sjogren-Batten disease）；CLN4/DNAJC5：NCL、CLN4病；CLN5：NCL；CLN5：NCL、フィンランド人後期乳児期；CLN6：NCL、クッフス病、CLN7：NCL、黄斑変性、神経症性障害、抑鬱神経症；CLN8：北風てんかん（North epilepsy）、精神遅滞を伴う進行性／トルコ人後期乳児期；CTNS：腎性シスチン蓄積症（nephropathic cystinosis）、ファンコーニ症候群；CTSA：ガラクトシアリドーシス、糖タンパク代謝異常症（glycoproteinosi s）、淋菌性卵管炎、トリオースリン酸イソメラーゼ欠損症、アルパルチルグルコサミン尿症；CTSB：胆嚢閉鎖、回腸癌、膵炎、角質溶解性冬季紅斑（keratolytic winter erythema）、乳癌、アルツハイマー病；CTSC：パピヨン・ルフェブル症候群、ハイム・ムンク症候群、歯周炎、掌蹠角化症、光線性角化症；CTSD：NCL、骨軟骨肉腫、子宮内膜明細胞腺癌、乳癌、パーキンソン病、（Parnetti 2017）；CTSE：胃腺癌、ロサイ・ドルフマン病、組織球増殖症；CTSF：NCL、クッフス病、無動無言症、覚醒昏睡、肝吸虫症、東洋肝吸虫症；CTSG：パピヨン・ルフェブル症候群、皮膚肥満細胞症、化膿性根尖性歯周炎、血管炎、ウェゲナー肉芽腫症；CTSH：甲状腺クリーゼ、間欠性爆発性障害、ナルコレプシー、線維性髄膜腫、筋萎縮性側索硬化症；CTSK：濃化異骨症、過敏性肺炎、骨硬化症、骨髄炎、骨巨細胞腫瘍；CTSL：外陰部基底細胞癌、エクリン先端汗腺腫、肥大吸虫症、気管癌、直腸S状結腸移行部新生物；CTSO：乳癌；CTSS：下顎癌、非化膿性中耳炎、セルカリア皮膚炎、上皮下粘液性角膜ジストロフィー、顎癌；CTSW：自己免疫性萎縮性胃炎；CTS Z：涙腺炎；DNA SE 2：石灰沈着性腱炎、リウマチ性関節炎；FUCA1：フコシドーシス、角化血管腫、ムコリピドーシスIII、喉頭気管炎；GAA：III型糖原病（ポンベ病）、酸性マルターゼ欠損症、ダノン病、 $\alpha-1$, 4-グルコシダーゼ欠損症；GALC：クラッペ病、大脳白質萎縮症；GALNS：MPS IV、軟骨-骨形成異常症、シャイエ症候群、クナIST異形成症；GBA：ゴーシェ病（GD）、偽ゴーシェ病、GBA-関連パーキンソン病；GLA：ファブリー病、線維束性収縮症候群、角化血管腫、MPS VII；GLB1：gm1-ガングリオシドーシス、MPS IVb；GM2A：GM2-ガングリオシドーシス、テイ・サックス病（TSD）、サンドホフ病、ムコリピドーシスII α/β 、I-細胞病；GNPTAB：ムコリピドーシス2、ムコリピドーシス3、MPS 3a；GNPTG：ムコリピドーシスIII、偽ハーラー多発性ジストロフィー、構音障害；GNS：MPS III、多重スルファターゼ欠損症、ムコスルファチドーシス；GUSB：MPS VII、胎児水腫、壊死性潰瘍性歯肉炎、総胆管結石症；GUSB：スライ症候群、MSP VII、胎児水腫、壊死性潰瘍性歯肉炎、総胆管結石症；HEXA：テイ・サックス病、gm2ガングリオシドーシス；HEXB：サンドホフ病、ムコリピドーシスIV、スフィンゴリピドーシス；HGSNAT：MPS IIIc、MPS IIIb、網膜色素変性症、クリューバー・ビューシー症候群；HYAL1：MPS IX、膀胱癌、前立腺癌；IDS：MPS II、ハンター症候群；IDUA：MPS I、シャイエ症候群、フルラー症候群；IGF2R：肝細胞癌、ムコリピドーシスII、アイセル（inclusion-cell）病、結腸直腸癌；LAAT1/PQLC2：シスチン蓄積症；LAMP1：サラ病、ヘルマンスキー・パドラック症候群、リソソーム酸ホスファターゼ欠損症、血球貪食症候群；LAMP2：ダノン病、心筋ミオパチー、心房停止、III型糖原病、リソソーム酸ホスファターゼ欠損症；LAMP3/CD63：ハーマンスキー・パドラック症候群、メラノーマ、ケベック血小板障害、肥満細胞病、シュワルツマン現象；LAMP4/CD68/SCARD1：（胸部）顆粒細胞腫瘍、濾胞樹状細胞肉腫、細菌性食道炎、腋窩脂肪腫；LAPTM4A：疼痛

障害；L A P T M 4 B：肝細胞癌；L G M N：住血吸虫症；L I M P 2 / S C A R B 2：進行性ミオクローススてんかん、ウンフェルリヒト・ルントボルグ病、手足口病、ミオクロースス；L I P A：ウォルマン病、コレステロールエステル蓄積症、脾膿瘍、家族性高コレステロール血症；L I T A F：シャルコー・マリー・トゥース遺伝性ニューロパチー；L M B R D 1：メチルマロン酸性尿症およびホモシスチン尿症、c b l f 型、肝炎、トランスコバラミン I I 欠損症；L Y P L A 3 / P L A 2 G 1 5：；L Y S T：チェディアック・東症候群、落屑症候群、ハーマンスキー・パドラック症候群、色素沈着不全対側性；M 6 P R：M P S I I I a、ムコリピドーシス I I、N C L、ニーマンピック病；M A N B：マンノシドーシス (α / β)；M C O L N 1：ムコリピドーシス I V、運動失調性脳性麻痺、スフィンゴリピドーシス、斜視、ムコリピンー 1 欠損症；N A G A：神崎病、シンドラー病、神経軸索ジストロフィー、角化血管腫；N A G L U：M P S I I I、シャルコー・マリー・トゥース病、急性腎盂腎炎；N A G P A：家族性持続性吃音、構音障害、M P S I I I b、スピーチ障害、糖尿病性腎症；N A P S A：卵巣明細胞腺線維腫、クルーケンベルグ／肺アデノ (B i s h o p D V (2010) P L o S O n e 5 : e 1 5 1 1 2) / 卵巣明細胞／癌、悪性線維性中皮腫；N E U 1：シアリドーシス、胎児水腫、パラインフルエンザウイルス 3 型；N P C 1 / 2：ニーマンピック病 C 1 / 2；P S A P：非定型ゴーシェ病、混合型サボシン欠損症、M L D、クラッペ病；P S E N 1 (L e e 2015, S a t o 2017)：前頭側頭型認知症、アルツハイマー病 3、家族性反対型ざ瘡、拡張型心筋症；R A B 2 7 A：グリセリ症候群、血球貪食性リンパ組織症、チェディアック・東症候群；R A B 7 (P e r r e t t 2015)：シャルコー・マリー・トゥース病 2 b、先天性脈絡膜欠如、脊髄癆、N C L；S G S H：M P S I I I、クリューヴァ・ビュシイ症候群、サンフィリポ症候群；S L C 1 1 A 1：ブルーリ潰瘍、結核、腸チフス；S L C 1 1 A 2：小球性貧血、ヘモジデリン沈着症、貧血；S L C 1 7 A 5 / S I A L I N：サラ病、シアル酸蓄積障害、シアル酸尿症、肝臓ジストマ症；S M P D 1：ニーマンピック病、酸スフィンゴミエリナーゼ欠損症、自己愛性パーソナリティ障害；S O R T 1：アイセル病 (i n c l u s i o n - c e l l d i s e a s e)、Iーセル病、心筋梗塞；S Q S T M 1：A L S；S U M F 1：多重スルファターゼ欠損症、M L D、脊髄小脳失調、M P S V I；T M E M 1 0 6 B：筋萎縮性側索硬化症 (A L S) / 前頭側頭葉変性症 (F T L D)。(S u l l i v a n P M, Z h o u X, e t a l. (2017) L y s o s o m e s - A s s o c i a t e d D i s e a s e s a n d M e t h o d s t o S t u d y T h e i r F u n c t i o n 6 3 - 9 1) T P P 1：N C L、脊髄小脳失調、ビールショスキー・ヤンスキー病。

【0204】

加齢に関連した不十分なリソソーム機能が関与する他の状態は、心臓疾患および脳血管疾患であり、限定されないが、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、不整脈、心不全、高血圧、起立性低血圧症、心筋梗塞、狭心症、心不全、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、腎動脈疾患または狭窄症、末梢血管疾患、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、腎不全を伴う慢性腎疾患、および心疾患が挙げられる。炎症性の疾患および状態の例としては、例えばリウマチ性関節炎などの関節炎が挙げられる。加齢に関連した疾患および障害の追加例は、潰瘍、大理石骨病、プロジェリア、衰弱、難聴および 2 型糖尿病である。「加齢に関連した」とは、加齢と頻繁に関連する疾患を指すが、所与の患者は必ずしも高齢ではなく、むしろ本発明方法および組成物は、患者の年齢にかかわらず使用され得る。

A) 活性剤

【0205】

本明細書の実施例および他のセクションにおいて詳述されるように、本発明方法で使用され得る剤は、限定されないが、神経細胞、マクロファージ、ミクログリアおよび腫瘍細胞を含む細胞が利用可能なリン脂質の濃度を低下させ得る。一部の実施形態では、剤は、環状オリゴ糖である。一部の実施形態では、環状オリゴ糖は、約 1 ～ 約 20 個以上の炭素長のアルキル基により任意で改変される α -C D である。一部の実施形態では、シクロデ

キストリンは、約1～約20個以上の炭素長のヒドロキシルーアルキル基により任意で改変される α -CDである。さらに別の実施形態では、剤は、ヒドロキシプロピルー（HP-） α -CDである。一部の実施形態では、剤は、 α -CDのクラスレートである。一部の実施形態では、剤は、 α -CDと脂肪酸のクラスレートである。本明細書において使用される場合、「脂肪酸」とは、飽和または不飽和いずれかの脂肪族長鎖を有するカルボン酸を意味する。一部の実施形態では、脂肪族鎖は、約3～約70炭素長である。一部の実施形態では、脂肪族鎖は、8～約30炭素長である。一部の実施形態では、脂肪酸は、1つもしくは複数の置換基を伴う分枝または非分枝の1つまたは複数の脂肪族鎖を有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、約6～約22個の炭素原子をその脂肪族鎖中に含む。一部の実施形態では、各炭素原子の間の結合のうちの任意の1つは、シス構造またはトランス構造であってもよい。

10

【0206】

シクロデキストリンは、セルロースのバクテリア消化の間に形成される天然化合物である。シクロデキストリンは、普遍的な哺乳動物のアミラーゼにより加水分解されないが、腸管微生物叢により発酵され得る。通常の状態ではほとんど再吸収されず、細胞または組織と相互作用しない。2004年12月22日に、 α -CDはFDAにより、「食肉を除く選択的な食物における、繊維質補充、香味用の担体または安定剤（香味アジュバント）、着色、ビタミンおよび脂肪酸用の担体または安定剤、ならびに飲料の口当たりの改善を目的とした使用」に関して、GRASと宣言された（GRN No. 155。GRN 678として2016年11月に更新され、420mg/kgまたは70kgで約30g/日の摂取に対して予測90パーセントを反映）。 α -CDのモノグラフはU. S. Pharmacopeia/National Formulary（USP/NF25）、European Pharmacopoeia（EP 6.0）、およびHandbook of Pharmaceutical Excipientsに掲載されている。シクロデキストリンは、様々な食物商品で使用される際の連邦規則第40号180.950の許容範囲の要件から免除されている。（FR 70 128 28780 2005-07-06）。2017年10月9日に、シクロデキストリンは、「ヒトの使用に対する医薬品のラベルおよび添付文書における措置」に対するEuropean Commissionガイドラインに対する添付書類に掲載された。

20

【0207】

普遍的なシクロデキストリンは、脂溶性の内部および親水性の外表面を含む環状体（円すい体）で、共に結合される6（ α -CD）、7（ β -CD）または8（ γ -CD）個のD-グルコース分子から構成されている（図1）。この特性の組み合わせにより、シクロデキストリンは、脂溶性薬剤を可溶化する手段として適している。「化学的改変を〔シクロデキストリン〕に行い、その親水性活性を増加させた。これにより可溶度が改善され、〔ラットにおいて〕腎毒性がなくなることが期待される」（Irie T, Uekama K（1997）J Pharm Sci 86:147-62）。ヒドロキシル基のいずれかの置換は、例えば疎水性部分による置換であっても、水可溶度の劇的な上昇をもたらす。この可溶度強化の主な理由は、化学的操作によりシクロデキストリン結晶はしばしば異性誘導体の非晶質混合物へと転換されるためである。例えば β -シクロデキストリンの水可溶度は、メチル化度の増加で上昇する。最も高い可溶度は、約3分の2のヒドロキシル基（すなわち21個中、14個）がメチル化されたときに得られる。HP- β -CDは、 β -CDよりもかなり水可溶度が改善されている（表2、さらに表8も参照）。

30

40

表2：選択されたシクロデキストリンの物理化学的性質

【表 2】

	α -CD	HP- α -CD	β -CD	HP- β -CD
グルコース単位数	6	6	7	7
内部直径	4.5~5.2	4.7~5.3	6.0~6.5	6.0~6.5
水可溶度[g/l]	145	>500	18.5	>600

【0208】

環状体の縁（へり）のR基の置換により取得される普遍的なシクロデキストリン（図1、（Brewster ME, Loftsson T (2007) Advanced Drug Delivery Reviews 59:645-66））としては、限定されないが、メチル（無作為メチル化を含む）CH₃、2-ヒドロキシプロピル（HP）：CH₂CHOHCH₃、スルホブチルエーテル（CH₂）₄SO₃Na⁺、アセチル、スクシニル、グルコシル、マルトシル、カルボキシメチルエーテル、リン酸エステル、単一ポリマーまたはカルボキシメチルが挙げられる。置換数およびその位置の両方ともがシクロデキストリン分子の物理化学的性質、例えば水可溶度および錯化能に影響を与えるため、列記される各誘導体は、近縁なシクロデキストリン誘導体の一群とみなされるものとする。

【0209】

特に β -CDのように溶解度が低いと、多くの場合、固体シクロデキストリン錯体の沈殿が生じる。例えば β -CDは、二級OH基の間に分子内水素結合を形成し、これが周囲の水分子との水素結合形成を減少させ、水溶解度が低くなる（Loftsson T, Brewster ME (1996) J Pharm Sci 85:1017-25）。

B) 細胞毒性／溶血

【0210】

非経口送達では、「ラット、ウサギ、イヌおよびヒトにおける β -CDの定常状態分配量は、各種の細胞外液量と良く対応している。このことから、深部コンパートメントまたはプール蓄積は関与していないことが示唆される。[...] α および β -[シクロデキストリン]は、ほぼ完全にそのままの状態尿中に排泄される」（Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62）。それでもシクロデキストリンは、非経口送達で2つのタイプの有害事象を生じさせる可能性がある。1つ目は、腎細胞に蓄積し、腎毒性を生じさせ得ること。2つ目は、脂溶性薬剤が送達された後、「新たな脂質含有コンパートメント（またはプール）が水相に形成され、その中に[細胞脂質]化合物が抽出される」ことである（Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62）。これにより溶血が生じる可能性がある。

【0211】

リン脂質とコレステロールは細胞膜の主要構成要素であり、すべて脂質である。ゆえにシクロデキストリンが、その親油性の空洞を満たされることなく非経口で投与されたとき（または脂溶性薬剤が送達された後）、潜在的に細胞膜から脂質（シクロデキストリンのタイプに応じてリン脂質およびコレステロール）を抽出する可能性がある。「いくつかのシクロデキストリンは、様々な細胞型において細胞溶解を引き起こすことが示されている。このことから、その効果は細胞型特異的ではないことが示唆される[（Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62）]」（Stella VJ, He Q (2008) Toxicol Pathol 36:30-42）。特にシクロデキストリンは、赤血球上の細胞膜陥入の形状変化を誘導し、高濃度では、 β -CD> α -CD> γ -シクロデキストリンの順序で赤血球溶血を誘導することが知られている（Irie T, Otagiri M, et al. (1982) J P

harmacobiodyn 5:741-4)。すなわち α -CDの溶血活性は、 β -CDおよびHP- β -CDの両方よりも低い(Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62, Figure 6)。それに加えて、 α -CDおよびHP- β -CDではなく、 β -CDが、細胞膜コレステロールを枯渇させることで角化細胞にカスパーゼ依存性のアポトーシス細胞死を誘導する(Stella VJ, He Q (2008) Toxicol Pathol 36:30-42)。HP- α -CDは、異種ヒト上皮結腸直腸腺癌(Caco-2)細胞に対し、 α -CDよりも細胞毒性が低いことが判明している(Roka E, Ujhelyi Z, et al. (2015) Molecules 20:20269-85; Ono N, Arima H, et al. (2001) Biol Pharm Bull 24:395-402)。これらの結果から、HP-シクロデキストリンは腎毒性が低いだけでなく、細胞毒性および溶血毒性も低い。

10

【0212】

HP- β -CDは、神経ステロイドのアロプレグナノロール(allopregnanolol)をはじめとする多くの脂溶性薬剤の賦形剤/溶媒として使用されている。 α -CDは、勃起不全の治療において海綿体内注射用のアルプロスタジル(プロスタグランジン)の賦形剤として承認され、使用されている。

【0213】

それでも、全体としての細胞毒性の低さがすなわちヒトの使用に対する安全性を意味するものではない。2010年の研究で、HP- β -CDが4~8 g/kgの投与量でネコに永続的な難聴を引き起こすことが示された(Ward S, O'Donnell P, et al. (2010) Pediatr Res 68:52-6)。14名のNPC1患者に関する最近の研究では、中頻度~高頻度の治療用補聴器を必要とする難聴がある(Ory DS, Ottinger EA, et al. (2017) Lancet 390:1758-68)。これらの結果から、賦形剤(少投与量)ではなく、活性成分(高投与量)としての β -シクロデキストリンの使用に関する懸念が生じた。

20

【0214】

2014年に、ニーマンピック病C型(NPC)疾患における、神経ステロイドのアロプレグナノロールの報告されている利益が、実際には賦形剤であるHP- β -CDによるものであったことが判明した。(Vance JE, Karten B (2014) Journal of Lipid Research 55:1609-21; Liu B, Turley SD, et al. (2009) Proc Natl Acad Sci U S A 106:2377-82)。治療投与量での β -シクロデキストリンは、過去に考えられていたような細胞膜からのコレステロールの抽出ではなく、細胞成分中のコレステロールを低下させることが示されている。2015年の9月には、HP- β -CDに関する第IIb/III相試験がNPC1疾患の神経兆候を有する患者で開始された。(NIH (2015) ClinicalTrials.gov NCT02534844)。疑問点は、NPC治療の利益を保持しつつ、耳毒性のリスクを回避できるかどうか、であった(死か聴覚障害か?)。

30

【0215】

いくつかのシクロデキストリンの溶血活性と、コレステロールを可溶化するその能力の間には正の相関があった(Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62)。このことから、耳毒性は、外有毛細胞からのコレステロールの抽出と直接関連している可能性が示唆される。

40

【0216】

本明細書に報告される遺伝的研究の結果から、転移を含む乳癌の進行は、部分的には、血清グリセロリン脂質(LPC、PC)がPIへ過剰転換されることにより生じることが示される。PIはPIサイクルの基質であり、ホスホイノシチドを介してエンドサイトーシスを制御する。注目すべきは、LPCも嚢胞性線維症においてサーファクタント阻害に関与していることである。「LPCまたはFFAが介在するサーファクタント阻害は、

50

コレステロールが相対的に存在していなくても $M-\beta-CD$ により逆転される。[これはおそらく] $M-\beta-CD$ がコレステロールに加えて非ステロイド性の脂質も隔離する能力を反映している。](Gunasekara L, Al-Saiedy M, et al. (2017) Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society)

【0217】

すべてのシクロデキストリンが、リン脂質を排除する能力を有している。 $\beta-CD$ (7糖)は、 $\alpha-CD$ (6糖、図1)よりも多く選択されている。これはより多く (より大きな) 薬剤の賦形剤として使用され得るためである。小さな $\alpha-CD$ は、小さなリン脂質に高い特異性を有していることが知られている (Ohtani Y, Irie T, et al. (1989) European Journal of Biochemistry 186:17-22; Vance JE, Karten B (2014) Journal of Lipid Research 55:1609-21)。ステロイド、および限定されないがコレステロールを含むステロール (Zarzycki PK, Ohta H, et al. (2008) Anal Bioanal Chem 391:2793-801)は、その小さな空洞に適合しない (図2)。リン脂質、コレステロールおよびタンパク質の抽出特異性を、図3に示す。(Ohtani Y, Irie T, et al. (1989) European Journal of Biochemistry 186:17-22)。リン脂質の中で、 $\alpha-CD$ は、 $\beta-CD$ よりもさらに特異的に例えばPCなどのグリセロ脂質、そしてスフィンゴ脂質を排除することが知られている (図4)。特に $\alpha-CD$ は、PIのイノシトール頭部またはsn-2鎖の両方の周囲で錯体を形成することが知られている。(Fauvel F, Debouzy JC, et al. (1997) J Pharm Sci 86:935-43)。ゆえに $\alpha-CD$ は、PIサイクルの基質を下方制御し、それにより $\beta-CD$ よりも高い特異性でエンドサイトーシスを下方制御することが予測される (Cai W, Du A, et al. (2013) J Immunol 191:6093-100)。HP- $\alpha-CD$ は、コレステロールよりもリン脂質を優先する $\alpha-CD$ の優先性を保持している (Huang Z, London E (2013) Langmuir 29:14631-8)。本開示における驚くべき結果の1つ (実施例16を参照)は、血清中のHP- $\alpha-CD$ は、予測よりもさらに高い特異性で、PCを排除するが、リゾリン脂質もPSも排除しなかったことである。

【0218】

β -シクロデキストリンの耳毒性は、 β -シクロデキストリンが、プレスチン (prestine) から、外有毛細胞で機能するために必要なコレステロールを奪うことにより生じることが示されている (Takahashi S, Homma K, et al. (2016) Sci Rep 6:21973; Kamar RI, Organ-Darling LE, et al. (2012) Biophysical Journal 103:1627-36)。 $\alpha-CD$ の空洞がコレステロールには小さすぎるという事実が、 $\alpha-CD$ および限定されないがHP- $\alpha-CD$ をはじめとするその誘導体に耳毒性がないことを説明する。

【0219】

HP- $\beta-CD$ の長期的な非経口投与 (200mg/kg)は、骨ミネラル濃度 (BMD)を減少させることが報告されており、これは骨吸収の増加と関連している (Kantner I, Erben RG (2012) Toxicol Pathol 40:742-50)。一方でCD-ビスホスホン酸結合体のアレンドロン酸- $\beta-CD$ (ALN- $\beta-CD$)は、骨同化作用的であることが示されている (Liu X-M, Wiswall AT, et al. (2008) Biomaterials 29:1686-92)。

10

20

30

40

50

C) シクロデキストリン特異的な活性

【0220】

表2の様々な物理化学的性質に関連する部分のみで、 α -CD、 β -CDおよび γ -CDのシクロデキストリンは、劇的に異なる生化学的機能を有しており、それゆえに異なる用途を有する。

● γ -CDのみが、膵アミラーゼと唾液による加水分解を受けることができ、急速に代謝されて小腸で吸収される。

● β -CDおよび γ -CDは、ほぼ1:1のモル比で脂質に結合することができるが、 α -CDは、その重量の9倍の脂肪に結合することができる。

● 分子に対する空洞のサイズは、シクロデキストリンの用途に対する重要な決定因子である。 β -CD（および γ -CD、比較的程度は小さい）がステロール（コレステロールを含む）およびステロイドに結合できるが、 α -CDは結合できない。その理由は、これら分子は、 α -CDの小さな空洞に適合するには大きすぎるからである。

● メチル化 β -CDは、細胞膜の普遍的な構成物質に対して高いアフィニティを有し、それゆえに極度の溶血作用も有する。一方で α -CDは、ヒト赤血球に対して非常に弱い作用を有している。

● 神経筋遮断薬のロクロニウムの効果は、特有の設計をされた γ -CD誘導体のスガマデクス（オクタキスー（6-デオキシ-6-S-メルカプトプロピオニル- γ -シクロデキストリンナトリウム塩）により無効化され、後遺症の麻痺が予防される（Booij LH (2009) Anaesthesia 64 Suppl 1:31-7）。

● シクロスポリンAについては、 α -CDと γ -CDの混合物を使用して、眼刺激性を生じさせることなく薬剤の可溶度が強化される。

● 鼻内インスリンについては、DM β -CDおよび α -CDは強力なエンハンサーであるが、 γ -CD、 β -CDおよびHP β -CDは違う（Merkus FW, Verhoeff JC, et al. (1991) Pharm Res 8:588-92; Shao Z, Krishnamoorthy R, et al. (1992) Pharmaceutical Research 9:1157-63）。

● β -CDではなく、 α -CDの補充が、apoE-KOマウスの大動脈においてアテローム性動脈硬化病変を減少させた。一方で、消化管脂質吸収は、 α -CDではなく β -CDの補充が減少させる（Sakurai T, Sakurai A, et al. (2017) Mol Nutr Food Res 61）。

α -CDのみが、環境的に優しい共沈殿法を介した金抽出を使用することができる（Liu ZC, Samanta A, et al. (2016) Journal of the American Chemical Society 138:11643-53）。

【0221】

シクロデキストリン間の差異に関するこの「不完全な」リストからは、あるシクロデキストリンにみられる効果が、他のシクロデキストリンには当てはまらないことが示される。実際に、複数のシクロデキストリンを同じアプリケーションに使用できるのは、ほんの数例である。

【0222】

HP- β -CDは、例えば、以下に使用される。

● Febreze（登録商標）の活性成分として；小さな α -CDでは悪臭成分を少ししか捉えられない。

● 全卵、ミルクからコレステロールを除去するには、小さな α -CDは、コレステロールに適合しない。

【0223】

α -CDは、以下に使用される。

● カゼイン酸ナトリウムの置き換えとして、ビーガンココナツミルク粉末（UK）をベースとした食物中。

10

20

30

40

50

- 粉末化アルコール中。
- 必須アルファリノール酸との複合体を形成するために、コエンザイムQ10／L-カルニチンサプリメント中。

【0224】

治療用途も高度に特異的である。1つの加齢関連アプリケーションにおいて (Nocciari MM, Lehmann GL, et al. (2014) Proceedings of the National Academy of Sciences 111: E1402-E8)、HP- β -CDはリポフスチン構成要素であるA2Eに結合することができたが、 α -CDはできなかったことが示されている (図5)。

【0225】

同じタイプの基質と使用される数種のシクロデキストリンは仮にあったとしても稀で、糖の環を含むにもかかわらず、それらの機能は高度に特異的であるという事実が真である。最も重要な差異の1つは、これら糖の数である：「シクロデキストリン-脂質複合体：サイズは重要である」(Szente L, Fenyvesi E (2017) Structural Chemistry 28: 479-92)。一部の実施形態では、 α -CDは、ヒドロキシプロピル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシメチル、ヒドロキシブチル、ヒドロキシペンチル- α -CD、またはその塩もしくは誘導体である。一部の実施形態では、本開示の医薬組成物は、ヒドロキシプロピル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシメチル、ヒドロキシブチル、ヒドロキシペンチル- α -CD、またはその塩もしくは誘導体を含むが、アルファシクロデキストリンまたはベータシクロデキストリンは含まない。一部の実施形態では、医薬組成物は、ベータもしくはガンマシクロデキストリン、および、またはその塩の誘導体は含まない。

D) α -CDまたはその誘導体もしくは塩を用いた癌患者の治療

【0226】

本開示のいくつかの実施形態は、 α -CDおよび／またはその誘導体もしくは薬学的に許容可能な塩を含む。

【0227】

本開示の実施形態は、異常に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシスを有する、または一部の実施形態では、PIサイクルまたはリソソームの機能障害を有する、1つまたは複数の細胞を有すると特定された癌を有する個体の治療に特に有用である。一部の実施形態では、癌を有する対象を治療する方法は、最初に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシスを有する、または一部の実施形態では異常制御状態のPIサイクルを有する癌を特定する工程、次いでそうした対象に α -CDの治療有効量を投与する工程を含む。一部の好ましい実施形態では、高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシスを有する、または一部の実施形態では機能障害状態のPIサイクルを有する癌の特定は、PET画像解析により、好ましくは表5bのアミノ酸配列または表5bのアミノ酸配列に対して少なくとも約70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%相同なアミノ酸配列中の変異を特定する蛍光タグ、抗体、または他の剤を使用して行われる。一部の実施形態では、 α -CD、またはその誘導体もしくは塩は、4mM、3mM、2mMまたは1mM未満の濃度で、インビトロ移動アッセイにおいて、約50%超の細胞におけるリン脂質の排除に有効である。一部の実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩は、約1mMの濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、約50%超の細胞における細胞移動の阻害に効果的である。一部の実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩もしくはクラスレートは、約0.5mM～約1.5mMの濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、50%超の細胞における細胞移動の低下に効果的である。

【0228】

本開示の一部の実施形態では、癌を有すると特定された個体を治療する方法は、そうした個体に、1mM未満の濃度で、インビトロ移動アッセイにおいて、50%超の細胞にお

ける細胞移動の阻害に効果的であることが知られている α -CDまたはその誘導体もしくは塩の治療有効量を投与する工程を含む。一部の好ましい実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩は、約1.5 mM未満の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、50%超の細胞における細胞移動の阻害に効果的である。一部の好ましい実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩は、約1 mMの濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、約50%、60%、70%、80%または90%の細胞における細胞移動の阻害に効果的である。一部の好ましい実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩の投与の前に、癌は、異常に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシスにより特徴づけられる、または一部の実施形態では、機能障害状態のPIサイクルまたはリソソームにより特徴づけられる1つまたは複数の細胞を含む癌であると確認される。その確認の好ましい方法は、PET画像解析、例えば生検などのサンプルのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。

10

【0229】

たとえ部分的であっても、癌細胞の転移を阻害する方法が提供される。当該方法は、細胞の細胞移動を阻害するのに効果的な量の、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩を、癌細胞に送達する工程を含む。使用される α -CDまたはその誘導体もしくは塩は、約2 mMまたは約1.5 mM未満の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、50%超の細胞における癌細胞移動の減速に効果的である。一部の実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩は、1.5 mM未満の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、50%超の細胞における細胞移動の阻害に効果的である。一部の好ましい実施形態では、シクロデキストリンまたはその誘導体もしくは塩は、約1.0 mM以下の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、50%超の細胞における細胞移動の阻害に効果的である。一部の実施形態では、当該治療は同時に、治療に関する耳毒性を低下させる。

20

【0230】

本開示の実施形態は、異常に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシスを有する、または一部の実施形態では、機能障害状態のPIサイクルを有する癌細胞を含む癌を有する患者の治療に特に有用である。そうした癌には、大部分の癌が含まれ、一般的には例えば肝癌、および脂肪細胞を含む癌などの脂質産生と関連した組織から生じる癌を除外する。異常に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシスを有する癌細胞、または一部の実施形態では、機能障害状態のPIサイクルを有する癌細胞は、一般的に上皮細胞由来の癌細胞に限定される。一部の実施形態では、癌は、胸部、結腸、肺または前立腺の上皮細胞由来である。ゆえに本発明の一部の方法は、異常に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシスを有する、または一部の実施形態では、機能障害状態のPIサイクルを有する癌を有する癌患者を治療する方法に関し、この場合において当該方法は、そうした患者または対象に、シクロデキストリンの治療有効量を投与する工程を含む。好ましい実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩は、2 mM未満の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、50%超の細胞における細胞移動の減速に効果的であることが知られている。一部の好ましい実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは塩は、1.5 mM未満の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、約50%、60%、70%、80%または90%超の細胞におけるアポトーシスの誘導に効果的である。異常に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシスを有する、または一部の実施形態では、機能障害状態のPIサイクルを有する癌細胞は、概して、表5bの酵素の機能障害を有し、ならびに／またはその微小環境周囲で高レベルのリン脂質を代謝し、および／もしくは取り込む。一部の好ましい実施形態では、 α -CDまたはその誘導体もしくは薬学的に許容可能な塩の投与の前に、癌は、異常に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシス、または一部の実施形態では、機能障害状態のPIサイクルにより特徴づけられる癌であると確認される。その確認の好ましい方法は、PET画像解析、PCR、またはサンプルの免疫組織化学法である。

30

40

【0231】

異常に高率のエンドサイトーシスまたはエキソサイトーシス、または一部の実施形態で

50

は、機能障害状態の P I サイクルにより特徴づけられる癌細胞の転移率を予防または阻害する方法が提供される。当該方法は、 α -CD またはその誘導体もしくは薬学的に許容可能な塩の、当該細胞の細胞移動を低下させるのに有効な量を当該癌細胞に送達する工程を含む。使用される α -CD またはその誘導体もしくは薬学的に許容可能な塩は、1.5 mM 未満の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、約 50%、60%、70%、80% または 90% 超の細胞における細胞移動の阻害または速度の低下に効果的である。一部の好ましい実施形態では、本明細書に開示される治療は、1.1 mM 未満の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、約 50%、60%、70%、80% または 90% 超の細胞における細胞移動の阻害または速度の低下に効果的である。一部の好ましい実施形態では、本明細書に開示される治療は、約 1.0 mM 未満の濃度で、インビトロ細胞移動アッセイにおいて、約 50%、60%、70%、80% または 90% 超の細胞における細胞移動の阻害または速度の低下に効果的である。

10

【0232】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法のいずれかは、対象への投与時にコレステロールを排除するシクロデキストリンの投与工程を含まない。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法のいずれかは、ベータ-シクロデキストリン (β -CD、 β CD) またはヒドロキシーアルキルベータシクロデキストリンの投与工程を含まない。

【0233】

α -CD の作製は比較的シンプルであり、容易に入手可能な酵素のセットを用いた通常のデンプン処置を含む。普遍的に、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ (CGTase) は、 α -アミラーゼとともに採用される。加熱処置または α -アミラーゼ使用のいずれかにより最初にデンプンは液化され、その後 CGTase を加えて酵素転換される。CGTase は、すべての形態のシクロデキストリンを合成することができる。ゆえに転換産物は、3つの主要タイプの環状分子の混合物を生じさせ、その比率は、使用される酵素に厳密に依存する：各 CGTase は、自身の特性である α : β : γ 合成比率を有する。3タイプのシクロデキストリンの精製は、分子の水溶解度の違いを活用する： β -CD は水溶性が非常に乏しい (18.5 g/l または 16.3 mM) (25°C)。より溶解性が高い α -CD および γ -CD (それぞれ 145 および 232 g/l) は通常、クロマトグラフィー法により精製され、一方で β -CD は結晶化を介して容易に回収され得る。代替的な「錯化剤」を酵素転換工程の間に添加することもできる。かかる剤 (通常、トルエン、アセトンまたはエタノールといった有機溶媒) は、所望のシクロデキストリンと錯体を形成し、その後沈殿する。錯体形成は、デンプン転換を沈殿シクロデキストリンの合成へと向かわせ、最終混合産物中でのその含有量を富化させる。Wacker Chemie AG は、 α -、 β -または γ -シクロデキストリンを特異的に作製し得る専用酵素を使用する。 α -シクロデキストリンおよび γ -シクロデキストリンのみが日常摂取制限なく消費され得るため、食品業界に対しては特に非常に価値が高い。

20

30

E) 医薬組成物および投与経路

【0234】

一部の実施形態では、本開示は、例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の治療における使用のための、本明細書に記載される1つまたは複数の活性物を、単独または組み合わせのいずれかで含む組成物を提供する。例えば一部の実施形態では、本開示は、例えば乳癌または前立腺癌の治療における使用のための、 α -CD またはそのアナログもしくは誘導体を含む組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、例えば乳癌または前立腺癌の治療における使用のための、 α -CD またはそのアナログもしくは誘導体を含む組成物を提供する。

40

【0235】

本開示に提供される医薬組成物は、活性成分 (例えば実施形態または実施例を含む本明細書に記載の化合物) は、治療有効量、すなわち意図される目的の実現に有効な量で含有

50

される。特定のアプリケーションに有効な実際の量は特に、治療される状態に依存する。疾患の治療方法において投与される場合、当該組成物は、所望の結果、例えば標的分子（例えばPIP1、PIP2、PIP3）の活性調節、および／または疾患症状（例えば悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態、例えばアルツハイマー病またはパーキンソン病などの症状）の進行の低下、停止、または減速の実現に有効な活性成分の量を含有する。本開示化合物の治療有効量の決定は、特に本明細書に詳述される内容を考慮することで、当業者の能力の範囲内にある。

【0236】

医薬組成物は、選択される投与様式に応じて、選択される組成物で、当分野の通常
10
の技能を有する者により製剤化されてもよい。適切な薬学的担体は、当該分野の標準的な参考文献であるRemington's Pharmaceutical Sciences, A. 0501の最新版に記載される。

【0237】

医薬組成物の投与は、当業者に公知の様々な方法のいずれかを使用して実行または実施
され得る。全身用製剤としては、注射、例えば皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、髄腔
内注射または腹腔内注射による投与用に設計された製剤、ならびに経皮投与、経粘膜投与
、経口投与または肺投与用に設計された製剤が挙げられる。一部の実施形態では、本明細
書に開示される医薬組成物の有効量の投与は、任意の特定の送達システムに限定されず、
20
限定されないが、非経口（皮下、静脈内（注射または点滴を介する）、髄内、関節内、筋
肉内または腹腔内注射を含む）、直腸、局所、経皮、粘膜または経口（例えばカプセル、
懸濁液または錠剤中）の投与が含まれる。一部の実施形態では、その必要のある対象への
投与は、単回投与または反復投与で行われ、および様々な生理学的に許容可能な塩の形態
のいずれかで、または医薬組成物の一部としての許容可能な薬学的担体もしくは添加剤と
ともに行われる。一部の実施形態では、任意の適切な、および生理学的に許容可能な塩の
形態、または標準的な薬学的製剤法、用量および賦形剤が利用される。一部の実施形態で
は、投与工程は、組成物または医薬組成物を、静脈内、筋肉内、局所、皮内、粘膜内、皮
下、舌下、経口、腔内、海綿体内、眼内、鼻内、直腸内、消化管内、導管内、髄腔内、硬
膜下、硬膜外、脳室内、肺内、膿瘍内、関節内、滑液包内、心膜下、腋窩、子宮内、胸膜
腔内、腹腔内、経粘膜または経皮で投与する工程を含む。
30

【0238】

本発明の医薬組成物は、口、頬側、舌下、直腸、経皮、皮下、静脈内注射、静脈内点滴
、筋肉内、髄腔内、腹腔内および鼻内を含む様々な経路により投与されてもよい。目的の
送達経路が経口か非経口かに応じて、活性剤は、例えば注射用、局所用または経口用の組
成物として製剤化され得る。液状の組成物は、緩衝剤、懸濁剤および分散剤、着色料、香
味料ならびに他の当分野に公知の適切な成分とともに、適切な水性または非水性のビクル
を含んでもよい。固体の組成物は、例えば結合剤、賦形剤、潤滑剤、着色剤、香味剤、
および当分野に公知の他の適切な成分を含んでもよい。本明細書に記載の活性剤および医
薬組成物は、徐放形態で投与されてもよく、または当分野に公知の持続的放出型の薬剤送
達システムから投与されてもよい。
40

【0239】

医薬組成物は、疾患または状態に依存し、そして投与が、その疾患もしくは状態の予防
目的か、または治療目的かに依存する。例えば限定されないが癌をはじめとするいくつか
の疾患または状態の予防のための投与は、浸透強化剤を伴わずに経口で、および低用量で
あってもよい。例えばトリプルネガティブのリンパ節陽性乳癌などの癌の症状を示す対象
に対する投与は、非経口、位置選択的、および高用量であってもよい。標的化の方法とし
ては限定されないが、葉酸または抗葉酸物質（メトトレキサート、ペメトレキセド）との
併用が挙げられる。組み合わせとしては、限定されないが、リンカーを伴う、または伴わ
ないエステル化が挙げられる。好ましい実施形態では、リンカーは、エステルを介してα
-CDとペメトレキセドを結合させるジスルフィドリンカー（限定されないが、システイ
50

ン、3-メルカプトプロピオン酸、または2-メルカプトエタノールを含むリンカーが挙げられる)である。別の好ましい実施形態では、 α -CD/ペメトレキセド化合物は、葉酸と共投与される。神経変性疾患の症状を示す対象への投与は、浸透強化剤と、標的化用の改変を伴わない髄腔内投与であってもよい。

【0240】

一部の実施形態では、本開示の組成物は、本明細書に記載の1つまたは複数の活性剤を、例えば担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、賦形剤などの薬学送達における使用に適した、従来的に採用される1つまたは複数の成分とともに含む医薬組成物であり、医薬製剤の形態へと変えられてもよい。そうした製剤の非限定的な例としては、溶液、クリーム、ゲル、ゲルエマルジョン、ゼリー、ペースト、ローション、軟膏(salve)、スプレー、軟膏(ointment)、粉末、固体混和物、エアロゾル、エマルジョン(例えば油中水または水中油)、ゲル水溶液、水溶液、懸濁液、塗布薬、チンキ剤、および局所投与に適したパッチが挙げられる。本明細書に記載の医薬組成物および製剤は、適切な場合には、個別の単位剤型で簡便であってもよく、および調剤分野で公知の任意の方法により調製されてもよい。そうした方法には、活性剤と、液状担体、固形マトリクス、半固形担体、微粉化固形担体またはそれらの組み合わせを会合させる工程、次いで必要な場合には製品を所望の送達システムへと成形する工程を含む。医薬組成物または製剤の単位剤型は、所望の治療効果を生じさせるよう算出された活性剤および他の成分の規定量、例えば治療有効量の有効量などを含有することが好ましい。典型的な単位剤型としては、例えば前充填され、前もって測定された液状組成物のアンプルもしくはシリンジ、または固形組成物に対しては丸薬、錠剤、カプセルなどが挙げられる。

【0241】

非経口投与に関しては、シクロデキストリンまたはその誘導体は、例えば溶液、懸濁液、エマルジョンまたは薬学的許容可能な非経口ビヒクルもしくは薬学的に許容可能な担体と関連付けられた凍結乾燥粉末として製剤化され得る。そうしたビヒクルまたは担体の例は、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、5%ヒト血清アルブミン、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、および固定油、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、レシチン(グリセロリン脂質)、落花生油、またはゴマ油である。リボソーム、および例えば固定油などの非水性ビヒクルを使用してもよい。ビヒクル、または凍結乾燥粉末は、等張性(例えば、塩化ナトリウム、マンニトール)および化学安定性(例えば、緩衝剤および保存剤)を維持する添加剤を含んでもよい。製剤は、普遍的に使用されている技術により滅菌される。非経口剤型は、水または別の滅菌担体を使用して調製されてもよい。例えば注射による投与に適した非経口組成物は、1.5重量%の活性成分を、0.9%塩化ナトリウム溶液中に溶解させることにより調製される。あるいは溶液は凍結乾燥され、その後、投与直前に適切な溶媒で再構成されてもよい。

【0242】

薬学的に許容可能な担体は当業者に公知であり、限定されないが、約0.01~約0.1M、または約0.05Mのリン酸緩衝液、または約0.8%生理食塩水が挙げられる。静脈内担体としては、液体および栄養の補給物質、電解質補給物質、例えばリンゲルデキストロースに基づくものなどが挙げられる。さらにそうした薬学的に許容可能な担体は、水性または非水性の溶液、懸濁液およびエマルジョンであってもよい。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、例えばオリーブオイルなどの植物油、および例えばオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体としては、水、エタノール、アルコール/水性溶液、グリセロール、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられ、生理食塩水および緩衝培地が挙げられる。

【0243】

医薬組成物は、従来の薬学的賦形剤、および配合技術を使用して調製されてもよい。経口剤型は、治療される患者による経口摂取用のエリキシル、シロップ、錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などであってもよい。典型的な

固形担体は、例えばラクトース、デンプン、グルコース、セルロース調製物、例えばトウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および／またはポリビニルピロリドン（PVP）；造粒剤；結合剤、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウム、マンニトールなどであってもよい。カプセルの形態の組成物は、日常的なカプセル化方法を使用して調製され得る。例えば活性成分を含有するペレットは、標準的な担体を使用して調製され、次いで硬ゼラチンカプセルへと充填される。あるいは分散液または懸濁液が、任意の適切な薬学的担体、例えば水性ガム、セルロース、ケイ酸塩または油などを使用して調製され、その後、柔ゼラチンカプセルへと分散液または懸濁液が充填される。典型的な液状経口賦形剤としては、エタノール、グリセロール、グリセリン、非水性溶媒、例えば懸濁剤、保存剤、香味剤もしくは着色剤等を含むポリエチレングリコール、油、または水が挙げられる。すべての賦形剤は必要に応じて調剤分野の当業者に公知の従来の技術を使用して崩壊剤、希釈剤、潤滑剤などと混合されてもよい。所望の場合には、例えば架橋ポリビニルピロリドン、アガーもしくはアルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤が加えられてもよい。所望の場合には、固形剤型は、糖衣錠であってもよく、または限定されないが、キトサンの使用を含む標準的な技術を使用してコーティングされ、消化管の特定領域を標的としてもよい。例えば、懸濁液、エリキシルおよび溶液などの経口液状調製物に関しては、適切な担体、賦形剤または希釈剤としては、水、グリコール、油、アルコールが挙げられる。さらに香味剤、保存剤、着色剤などが添加されてもよい。

10

20

【0244】

口腔投与に関しては、本開示組成物は、従来の方法で製剤化される錠剤、トローチ剤などの形態をとってもよい。さらに化合物は、例えば座薬または浣腸などの直腸または腔用組成物で製剤化されてもよい。典型的な座薬製剤は、例えば重合グリコール、グリセリド、ゼラチンもしくはココアバターなどの結合剤および／または潤滑剤、または他の低融点の植物性もしくは合成のワックスまたは脂肪を含む。吸入投与に関しては、本開示に従う用途のための化合物は、適切な推進剤、例えばジ-またはトリ-クロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスなどを使用した加圧パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で簡便に送達される。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、定量を送達するバルブを提供することにより決定されてもよい。例えば吸入または吸入器における使用のためのゼラチンなどのカプセルおよびカートリッジは、化合物と、例えばラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末ベースの粉末混合物を含有して製剤化されてもよい。大きなβCDでさえ、吸入に適していると認識されている（Vecsernyes M, Fenyvesi F, et al. (2014) Arch Med Res 45:711-29）。

30

【0245】

製剤はまた、デポ製剤であってもよく、移植（例えば皮下または筋肉内）または筋肉内注射により投与され得る。そうした実施形態では、化合物は、適切な重合物質または疎水性物質（例えば適切な油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂を用いて、または例えば難溶性塩などの難溶性誘導体として製剤化されてもよい。

40

【0246】

あるいは他の薬剤送達システムを採用してもよい。リポソームおよびエマルジョンは、使用され得る、公知の送達ビヒクルの例である。例えばジメチルスルホキシドなどの特定の有機溶媒を採用してもよいが、通常、毒性が高いという代償がある。さらに化合物は、徐放システム、例えば治療剤を含有する固形ポリマーの半透過性マトリクスなどを使用して送達されてもよい。様々な徐放物質が確立されており、当業者に公知である。徐放カプセルは、その化学的性質に応じて、数週間から最大で100日以上にわたり化合物を放出し得る。治療薬の化学的性質および生物安定性に応じて、タンパク質安定化の追加戦略が採用されてもよい。

【0247】

50

本明細書に記載の化合物は、ボーラス注射または連続点滴による非経口投与用に製剤化されてもよく、および例えばアンプル、バイアル、少量点滴もしくは前充填シリンジ、または保存剤添加された複数用量容器などの単位投与形態であってもよい。

【0248】

例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤が存在してもよい。すべての担体は、必要に応じて崩壊剤、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤などと、当分野に公知の従来的な技術を使用して混合され得る。

F) 用量

【0249】

本明細書に記載の活性剤の投与量は、ヒトまたは他の哺乳動物において、当該活性剤の有効性および／または有効量を決定するために実施された試験に基づき算出されてもよい（セクションE、以下の臨床転帰を参照）。投与量、および投与頻度または投与のタイミングは、当分野に公知の方法により決定されてもよく、および例えば活性剤の剤型、投与経路、年齢、体重または薬剤代謝に影響を与える任意の医学的状态の存在を含む患者の特性などの因子に依存してもよい。

【0250】

1つの実施形態では、投与量は、単回投与で投与されてもよい。別の実施形態では、投与量は、ある期間にわたる複数回投与として、例えば毎日、週2回、毎週、毎月など、特定の間隔で投与されてもよい。別の実施形態では、投与量は、700mg/kg/日である（表3、2010-04-15）。別の実施形態では、投与量は、腎毒性または細胞毒性の早期兆候が観察されるまで、経時的に増加される。観察された場合、投与レベルは、過去の忍容性良好のレベルにまで減少される。

【0251】

一部の実施形態では、活性剤の投与量は、およそ少なくとも10mg、少なくとも20mg、少なくとも30mg、少なくとも40mg、少なくとも50mg、少なくとも75mg、少なくとも100mg、少なくとも125mg、少なくとも150mg、少なくとも175mg、少なくとも200mg、少なくとも225mg、少なくとも250mg、少なくとも275mg、少なくとも300mg、少なくとも325mg、少なくとも350mg、少なくとも375mg、少なくとも400mg、少なくとも425mg、少なくとも450mg、少なくとも475mg、少なくとも500mg、少なくとも550mg、少なくとも600mg、少なくとも650mg、少なくとも700mg、少なくとも750mg、少なくとも800mg、少なくとも850mg、少なくとも900mg、少なくとも950mg、少なくとも1000mg、少なくとも1200mg、少なくとも1500mg、少なくとも2000mg、少なくとも2500mg、少なくとも3000mg、少なくとも4000mg、少なくとも5000mg、少なくとも7500mg、少なくとも10,000mg、少なくとも15,000mg、少なくとも20,000mg、または少なくとも25,000mgである。そうした一部の実施形態では、上記の用量は、mg/日またはmg/kg/日である。別の実施形態では、活性剤の投与量は、1~10000mg、1~7500mg、1~5000mg、1~2500mg、1~1000mg、1~500mg、1~250mg、250~10000mg、250~5000mg、250~1000mg、250~500mg、500~10000mg、500~5000mg、500~1000mgの範囲である。一部の実施形態では、上記の用量は、mg/日またはmg/kg/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約1~約20グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約10~約20グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約15グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約20グラム/日

である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約25グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約30グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約35グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約40グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約45グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約50グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約55グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約10グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約15グラム/日である。一部の実施形態では、クラスレート、または α -シクロデキストリン、その誘導体もしくは塩の投与量は、約60グラム/日である。一部の実施形態では、投与量は、1日当たり、約5グラムを3回である。

10

【0252】

一部の実施形態では、単回投与量が投与されてもよい。別の実施形態では、複数投与量がある期間にわたり、例えば1日当たり4回、1日当たり3回、1日当たり2回、1日当たり1回、毎週、毎月、14日に4回、21日に2回、月に2回、21日に4回、月に4回、または月に、21日に、14日に、もしくは週に5、6、7、8、9、10、11、12回以上などの特定の間隔で投与されてもよい。

20

【0253】

1つの実施形態では、静脈内または髄腔内投与される投与量は、週に5600mg/kg、または週に400mgであってもよい（表3）。

表3 Hempelの双子の投与量調整

【表 3】

日付	説明	
2004-01	誕生	
2008-08-14	NPC 確定診断	
2009-02-22	HP-β-CD 治療プラン	
	初期点滴：4 日間の連続的 i. v.、80mg/kg/日を 20ml/時の速さで。	
	次：毎週 8 時間の点滴、160mg/kg/日で開始し、毎週点滴量を増やす。	
	次：320mg/kg/日	
	次：400mg/kg/日	10
2009-04-13	i. v. 点滴の承認 (INDs 104, 114 および 104, 116)	
2009-07-07	プロトコール拡張	
	400mg/kg/日、毎週 8 時間の点滴として投与される	
2009-07-16	投与頻度を上げる (2 回/週)、用量漸増速度 (100mg/kg/点滴)	
	1 週目：500mg/kg/日; 8 時間 x1 + 3~4 日 600mg/kg/日; 8 時間 x1	
	2 週目：700mg/kg/日; 8 時間 x1 + 3~4 日 800mg/kg/日; 8 時間 x1	
	3 週目：900mg/kg/日; 8 時間 x1 + 3~4 日 1000mg/kg/日; 8 時間 x1	
	初期点滴：8 時間にわたり 500mg/kg/日を 20ml/時の速さで。	20
2009-10-08	肺クリニック来院	
	8 時間にわたり、週 2 回、2800mg/kg (800mg/kg/日)	
2010-03-07	「HP β CD は、... ネコにおいて聴覚閾値を上昇させる」 (Ward S, O'Donnell P, et al. (2010) Pediatr Res 68:52-6)	
2010-04-15	1 年を超えて週 2 回、2.5g/kg の定常状態の IV 投与を受けたにもかかわらず、聴覚は影響を受けなかった ((5g/kg/週≒700mg/kg/日)	
2010-05-17	オーファンドラッグ指定を受けた	
2010-08-13	髄腔内送達 of 要請を提出	
	200mg の HP-β-CD 髄腔内、週 2 回 (≒60mg/kg/日)	
	(Maarup TJ, Chen AH, et al. (2015) Mol Genet Metab 116:75-9)	30
Hastings C (2009-02-22) Addi and Cassi Hydroxy-Propyl-Beta-Cyclodextrin Plan から。例外的使用の臨床試験。治療プラン バージョン # 2、 http://addiandcassi.com/wordpress/wp-content/uploads/2009/09/FDA-Submission-for-Addi-and-Cassi-Cyclodextrin-Treatment-Plan.pdf		
NPC: http://www.nnpdf.org/cyclodextrin.html		

G) 対象

【0254】

本明細書に記載の方法および組成物は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を、かかる治療の必要のある任意の対象において治療または予防するために使用されてもよい。1つの実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、治療される対象は、閉経後の女性であり、他の実施形態では、本明細書に記載の治療方法は、そうした対象に限定することは意図していないことを留意されたい。むしろ一部の実施形態では、対象は、新生児から高齢者にわたる任意の年齢の対象であり得る。一部の実施形態では、若い対象、例えば特に、家族歴または遺伝子検査から、当該対象が悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を発症するリスクがあることが示唆されている年少乳児を治療することが望ましい場合がある。同様に一部の実施形態では、特に、かかる

対象が、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の指標または症状を呈し始めている高齢の対象を治療することが望ましい場合がある。

【0255】

本明細書に記載の方法および組成物は、予防的処置または治療的処置として採用されてもよい。予防的処置に関しては、本明細書に提供される方法および組成物は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の明白な、または検出可能な任意の臨床指標または症状をまだ呈していないが、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態、例えばMS、前立腺癌もしくは乳癌、または機能障害状態のリソソームにより特徴づけられる疾患を発症するリスクがあると考えられる対象において予防的に使用されてもよい。 α -CDの予防的処置を受ける対象は、例えばMS、前立腺癌もしくは乳癌、または機能障害状態のリソソームにより特徴づけられる疾患の任意の臨床指標または症状を呈していなくてもよい。治療的処置の場合、本明細書に提供される方法および組成物は、例えばMS、前立腺癌もしくは乳癌、または機能障害状態のリソソームにより特徴づけられる疾患などの疾患または障害の1つもしくは複数の臨床指標または症状をすでに呈している対象において使用され得る。MS、前立腺癌もしくは乳癌、または機能障害状態のリソソームにより特徴づけられる疾患に対する治療的処置を受ける対象は、例えば、MS、前立腺癌もしくは乳癌、または機能障害状態のリソソームにより特徴づけられる疾患の臨床診断を受けていてもよく、または別段により、MS、前立腺癌もしくは乳癌、または機能障害状態のリソソームにより特徴づけられる疾患の1つもしくは複数の臨床指標または症状を呈しているてもよい。一部の実施形態では、本開示は、図面または明細書において特定される遺伝子のいずれかにおいて、欠損または実質的に欠損し、それによりそれら遺伝子は限定的に発現し、または発現が欠落し、リソソーム機能障害が生じている細胞を含む癌を治療する方法に関する。

【0256】

1つの実施形態では、対象は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態を発症するリスクがあると特定されてもよい。1つの実施形態では、対象は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態の家族歴を有する。1つの実施形態では、対象は、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態と関連する遺伝的リスク因子、例えばPIサイクル機能と関連した遺伝子における遺伝子変異などを1つまたは複数、有する。

H) 臨床転帰

【0257】

一部の実施形態では、本明細書に提供される治療方法（例えば本開示に従う組成物の有効量を対象に投与する工程を含む方法）は、加齢関連疾患の1つまたは複数の臨床指標または症状における検出可能な改善を生じさせる、または改善の実現を目的とする。

【0258】

癌を背景とする場合、例えば臨床指標または症状としては、限定されないが、増殖、移動または浸潤の変化が挙げられる。本開示の一部の実施形態では、症状または指標の改善は、生存期間、無病生存期間、無遠隔転移期間、血液検査の結果（限定されないが、循環腫瘍DNAおよび前立腺特異抗原、 β -ガラクトシダーゼ/ β -ヘキソサミニダーゼ（Tiribuzi R, Orlacchio A, et al. (2011) J Alzheimers Dis 24:785-97）、ならびにリゾチームおよび/またはカテプシンS（Haldar K, Alam S (2017)）、X線評価、身体検査の結果（限定されないが、触知可能な腫瘍を含む）、または組織生検による組織学的評価を含む

群から選択される。

【0259】

個体における最も高い耐用用量を決定するために、全血球計算および血清化学検査を集め、分析する。血清化学検査には、限定されないが、電解質、重炭酸塩、グルコース、BUN、クレアチニン、マグネシウム、リン酸塩、肝酵素（ASTおよびALT）、総タンパク質、アルブミン、ビリルビンおよびアルカリホスファターゼの評価を含んでもよい。さらに完全脂質パネルを取得してもよく、赤血球の形状を顕微鏡で評価してもよい。骨密度を測定して、骨粗しょう症の早期兆候を特定してもよい。

【0260】

本明細書に記載の組成物および方法は、解説のためのみであり、限定する意図はない。当業者であれば、上述の具体的な組成物および方法の様々な組み合わせおよび改変を行うことができ、本明細書に記載の組成物および方法のそうした組み合わせならびに改変のすべてが、本開示の実施に使用され得ることを認識するであろう。さらに本開示の特定の実施形態を、以下の非限定的な実施例において、さらには以下の請求の範囲において詳述する。

10

【0261】

特許出願、雑誌記事を含むすべての公表文献は、その全体で参照により組み込まれる。

【実施例】

【0262】

実施例1：PIーサイクルは、乳癌の転移に対する薬剤標的である

20

実施例1に提示される結果を取得するために使用された方法は、(Wittkowski KM (2014) US2016/0206581A1) に詳述されている。当該文献は、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる。

【0263】

ヒトゲノムプロジェクトの完了からほぼ10年、全ゲノム関連解析(GWAS)から期待された科学および医学の進展はいまだ実現されていない。サンプルサイズを何万人もの対象へと拡げることでデータ収集の期間とコストが大幅に上がり、そして非無作為試験では、幾分逆説的であるが偽陽性のリスクが増大する可能性がある。本実施例は、新規のコンピューター生物統計法と、GWASの探索的性質に適合させた決定戦略を組み合わせることについて記載する。これら方法論が進展するにつれ、数百の狭義の症例のみの研究から、疾患と関連する機能性遺伝子クラスターが提唱され得るようになった。

30

【0264】

乳癌および前立腺癌のリスク因子として知られている家族性乳癌の既往は、遺伝可能性を高度に裏付けるものであるが、一般集団における乳癌および前立腺癌の遺伝リスク因子はいまだほとんど判明していない。250,000人の女性のデータを含む、乳癌の単一SNP GWAS (ssGWAS) は、検証可能な仮説を生み出さなかった (Michailidou K, Lindstrom S, et al. (2017) Nature 551:92-4)。本明細書に記載されるように、本試験の3つの独立した亜群のデータ (NIHのdbGaPから入手可能) を、遺伝的に構造化された広域座位データに対するU-統計量を使用して分析し (muGWAS)、エピスタシスを調査した。(非無作為化) GWASにおける、系統的な、しかし疾患に非関連の差異を考慮するために、および重複遺伝子領域において複数の検定を実施するために、新規の試験特異的な「適応全ゲノム有意性 (aGWS)」基準を適用した (Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)。PIサイクルへのリン脂質の流入およびリソソーム機能に関連した遺伝子を用いた、3つすべての試験の結果のエンリッチメントにより、高レベルのエンドサイトーシスと、加齢依存性のリソソーム機能衰退の間の不均衡が、乳癌の転移誘導に関与しているという仮説が確認される。

40

対象

【0265】

50

本試験は、適切であると承認された。非ヒトの被験者が、本調査に含められた。本明細書に記載される結果は、米国および欧州の乳癌に関する3つの試験に基づいている。これらの試験には、Cancer Genetic Markers of Susceptibility (CGEM) 乳癌GWASのデータが含まれ、当該データには1145の症例／1142の対照が含まれた (Hunter DJ, Kraft P, et al. (2007) Nature Genet 39:870-4) (dbGaP: phs000147. v3. p1)。また、Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium内のエストロゲン受容体ネガティブ (ER-) 乳癌に関する、入れ子構造の症例対照試験および1つの症例対照試験の2つの副次試験のデータが含まれ、当該両データは、(Garcia-Closas M, Couch FJ, et al. (2013) Nat Genet 45:392-8, 8e1-2) に含まれ：European Prospective Investigation into Cancer (EPIC) の511のER-症例と500の対照、およびPolish Breast Cancer Case-Control Study (PBCS) の543のER-症例 (229のトリプルネガティブ) と511の対照が含まれた (dbGaP: phs000812. v1. p1)。

方法

【0266】

ssGWAS：参考にならない、または低クオリティのSNPを除いた後、一変量データに対するu-統計量を使用した従来のssGWASを実施した (マン・ホイットニー検定 (Mann HB, Whitney DR (1947) Ann Math Stat 18:50-60) としても知られる。この検定は、ウィルコクソンの順位和検定 (Wilcoxon F (1954) Biometrics 1:80-3) と同等である)。構成により、本解析の結果は、従来のコ克蘭・アーミテッジの傾向検定 (Armitage P (1955) Biometrics 11:375-86) で取得される結果と非常に近くなる。

【0267】

アノテーション：入手可能なアノテーションファイルは、関与するSNPまたは領域に関連している可能性があるには離れすぎている、または十分に近い遺伝子 (または遺伝子のスプライスバリエント) を適切に識別するには不十分であることが証明されている。他方で、ディプロタイプは、遺伝子またはその制御領域の外側の連鎖不均衡 (LD) ブロックに及んでいる場合があり、この場合、変動の機能的関連性が特定できる可能性は低い。また遺伝子機能を決定するために利用可能な十分な情報が存在しない場合があり、その場合、そのファンディング (funding) は、機能的に関連する遺伝子コレクションの特定には有用ではないだろう。ゆえにグリッド／クラウド基盤から戻された結果はいまだ手動でレビューし、アノテーションに関する不明確性を解消させる必要がある。

【0268】

広域座位アプローチ。共通疾患に適用された際に過去のssGWASのアプリケーションで見られた欠点のいくつかを克服するために、分析プロセスの様々な段階でいくつかの戦略を組み合わせた。最大で6個の隣接SNPがある広域座位が一次結果として対象とされた。過去の小児期欠伸てんかん (Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2013) Pharmacogenomics 14:391-401)、および自閉症の試験 (Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354) のように、遺伝子型構造 (muGWAS) を用いた構造化多変量データに対するu-統計量に基づき、同じ非パラメトリックGWAS法が適用された (Hoeffding W (1948) Ann Math Stat 19:293-325)。誤った結果を避けるために、公知の機能を有する遺伝子を含むLDブロックの外側の座位、またはその5'末端に隣接する座位は除外された。単一SNPにのみ強く影響を受けた座位も除外された。ただし当該SNPが複数の試験に関与している場合、または過去の試験に関与していた場合を除く。

【0269】

情報量：従来の回帰法とは対照的に、 μ GWASは、「情報量」の固有評価基準を提供する。これを使用して、有意性は高いが情報量が低い領域は、アーチファクトの可能性があると強調され得る。以下のマンハッタンプロットにおいて、低情報量で有意性が高い結果は赤で強調され、除外される（白色で取り消される）。ただし例えば過去に乳癌または別の癌と関連すると報告された隣接SNPなど、他の裏付けとなる証拠がある場合を除く。低情報量の一部の領域は、単一SNPが多数を占め、または遺伝子もしくはその制御領域の内ではないLDブロックに及ぶディプロタイプを含む。1つのSNPによるウィンドウの移動が、有意性に大きな（100倍超）変化をもたらす場合にも、ディプロタイプは除外され得る。注目すべきは、これらの手動の介入が、偽陽性結果をもたらし得ないことである。この調査は、これらの規則をより方式化させ、解釈を容易にして、偽陰性結果を回避することを目的としている。

10

【0270】

MAF-有意性相関：何らかの有限なサンプルサイズでは、 u -検定または順位検定の有意性は限定的である。ゆえに有意性の高い結果は、十分に高いMAFを有するSNPに対してのみ取得され得る。2,500,000個の置き換え済み表現型を用いてssGWASシミュレーションを実施し、様々なMAFに対して等しいサイズの2つの群を比較する。 $1-10^{-5}$ 分位の順列分布は、規定通りに $MAF > .33$ を満たす、予測された $s = -\log_{10} p = 5.26$ カットオフから、0.05のMAFに対する4.9 ($n=1000$ 対象)、4.7 ($n=500$) および4.5 ($n=300$) にまで低下する。7.5のレベルに対しては、バイアスはさらに大きくなると予測される。このMAF-有意性相関により、「SNPなしは、形質と関連する」(Pearson TA, Manolio TA (2008) JAMA 299:1335-44) というヌル仮説の下でのssGWAS QQプロットで予測される対角線(diagonal)は、末端に向かって対角線より下がると予測される曲線へと変わる。(Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)

20

【0271】

$>10^8$ の順列から予測される s 値($-\log_{10}(p)$)の分布を推定して、 $1-10^{-7.5}$ 分位数の安定的な推定値を取得することは実用的ではなく、そして限られた検証に対してバイアスのかかったSNP選択を回避するにも充分ではない。このMAF-有意性相関があるために、観察された表現型を比較したときに「有意」な任意のSNPが、無作為な表現型順列でも「有意」となる可能性も高い。(Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)

30

【0272】

非無作為化バイアス：この屈曲がしばしば認識されない理由は、GWASの対象が（臨床試験のように）無作為に介入に割り当てられるのではなく、その結果（非言語と言語の比較など）に基づいて決定論的に分類されるためである。しかし決定論的に分類された母集団は、対象の状態や共通の祖先因子にも関連しない態様においては、系統的に異なることが予測される（階層化を介して説明され得る可能性もある）。限定的な検証を使用することによる下降傾向と、確定的選択による上昇バイアスが類似している場合、「真の関連性」を示唆する座位を除き、 S 値は対角線に沿っていると見える場合がある(Pearson TA, Manolio TA (2008) JAMA 299:1335-44)。

40

【0273】

ディプロタイプ長に対する多重度調整：重複するディプロタイプの多変量検定に関し、推定される分位数順位(QR)曲線は、同じSNPに関して実施される複数の検定を考慮するために対角線全体より上に上昇する必要がある。これら検定のほとんどは依存度が高く、そのため推定QQ曲線(図6～図11)と比較して推定QR曲線の上昇は限られている。しかし距離は疾患や集団によって変化する可能性がある。(Wittkowski

50

KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)

【0274】

投影されるQR曲線：従来のQQプロット対角線は、最も「有意な」データを含むいずれのデータにも依存しない。SNPの大部分は疾患に関連しないことが予測されるため、s値はほとんどの部分で対角線に適合することが予想される（最も有意な結果を除く）（Pearson TA, Manolio TA (2008) JAMA 299:1335-44）。直接的な類似性では、多変量検定のQR曲線は「滑らか」でなければならず、疾患関連か否かに関係なく上向きの偏差は「真の関連性」を示す。上記の理論的根拠と上述のシミュレーション結果に基づいて、各染色体に関して投影されるQR曲線の最高点（頂点）は、投影が単調増加するのに必要なだけ多くの最高値を、限定的な検定である非ポジティブの二次導関数については控えめに最高値を切り捨てた後、s値の滑らかな投影から推定され得る。データに適合させることで、集団階層化の影響も減少する（Pearson TA, Manolio TA (2008) JAMA 299:1335-44）。（コンピューター計算での便宜のために、局所的に重み付けされた多項式回帰（Cleveland WS, Devlin SJ (1988) J Am Statist Assoc 83:596-610）が、「ロエス・滑らか（smooth）（... 度合=2、ファミリー=「ガウス分布」）としてS+（TIBCO Software Inc.）に実装されるように選択された。）

【0275】

推定全ゲノムQR頂点：関連および非関連リスク因子の内容に関して染色体で異なっている場合があるが（例えば、自己免疫性疾患のHLA領域を参照）、確率的誤差は、全染色体にわたり同じ分布を有すると予測される。ゆえに予測WG頂点は、染色体間の（ウインザライズされた）投影頂点のメジアンとして推定され得、投影からのs値の最も小さい偏差を伴う。（本明細書において、10個の染色体が、最大ノルム、およびロバスト性に関するメジアンに基づき選択された。しかし「最適性」に対する基準を含む、最適数を決定するための戦略は未定である）（Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)

【0276】

推定QR曲線：次に各染色体に対する推定曲線を、当該染色体のs値のロエス（loess）投影として算出する（Cleveland WS, Devlin SJ (1988) J Am Statist Assoc 83:596-610）。曲線の頂点があるレベル以下になるまで、最高値の多くが推定WG頂点に置き換えられる。WG投影（QRプロット、下部の右側）に適用することで、この手順により推定WG曲線が得られる。シミュレーション結果は、表現型順列からの推定値の分散の低さ、およびそれらのメジアン頂点と、観測されたs値から推定されたウインザライズ化メジアン頂点の類似性を示す。（Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)

【0277】

試験特異的な全ゲノム有意性：表現型と関連した個々のSNPの確認を目的とした試験に関し、「確認」パラダイム（Tukey JW (1980) American Statistician 34:23-5）は多重度の調整を必要とする。GWASに適用される場合、そうした調整は典型的には、試験サイズ、またはII型エラーに対するI型エラーの相対リスクに関わらず「慣習的に」固定された0.05レベル（（Fisher RA (1956), p. 358）を参照のこと。考察については（Gigerenzer G (2004) Psychol Sci 15:286-7）を参照のこと）、およびチップ密度に関係なく1,000,000個の独立したSNPという仮定（Pearson TA, Manolio TA (2008) JAMA 299:1335-44）に基づいている。個々のSNPから重複ディプロタイプに移動すると、生物学的妥当性が疑わしい仮定に対する何らかの正当な多重度調整の依存性が増加する（Wittkowski

KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)。

【0278】

ただしほとんどのGWASと同様に、本実施例に記載される試験は、特定のSNPに関する仮説の確認を目的とはしていない。その代わりに本明細書に記載の試験は、その相対的重要度とエピスタシス相互作用が不明な40,000個を超える（偽）遺伝子から可能性のある候補を取り上げることを目的としている。画像的な手順はこうした「探索的」試験に特に有用であるため（Tukey JW (1977)）、QRプロットが選択され、解釈を導き出した。推定曲線からのs値の偏差に対する正確なカットオフは不明である。

「知識[が]最良近似である」とき[、]的確な質問に対するおおよその回答は多くの場合曖昧であるが、悪い質問に対する正確な回答よりは「ずっとまし」であり、いつでも正確にすることができる」（Tukey JW (1962) Ann Math Stat 33:1-67）。ゆえに特定のエラー率を定量化するための典型的な試行ではなく、より少ない非現実的な仮定に依存するヒューリスティックな方法が提示される。（Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)

【0279】

予測されるWG曲線を推定する必要がある、s値は複雑な依存構造を有する。そして所与のサンプルサイズに対する適切な有意水準(α)は不明である。ゆえに、脆弱な仮定のみに基づく、ヒューリスティックな決定規則が提唱される。長期的には、頂点を超えるほとんどのs値は、任意の $\alpha > 0$ （無矛盾性）で有意であり、最も強い関連性を持つ領域が含まれる確率が最も高い（不偏性）と予測される。特定の α に関し、カットオフを下げることはできるが、頂点推定における分散を考慮するためには上げなければならないだろう。妥協として、推定WG頂点は、試験特異的GWSのカットオフとして提唱される（Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354）。

【0280】

分位順序（Quantile-rank (QR)）プロット：選択手順での慣例として、p値は主に座位の順位付けの目的で使用された。特定の座位に関する特定の仮説が確認されなかったため、決定基準としての「QQプロット」の特性を探索する従来法が改変され、形式化された。重複ディプロタイプの多変量検定の場合、1つのSNPに対し多くの検定が行われるため、単変量WG順列仮説の下で従来の「QQプロット」で予想される直線は、曲線になる。実施される検定数は大幅に増加するが、QQ線と比較してQR曲線中に示されるs値の増加（図7と図6、図9と図8、図11と図10）は限定的である。その理由は、ほとんどの検定が高度に依存性であるためである（Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354）。

【0281】

全ゲノム順列バイアス：s値の予測分布を推定するために、無作為表現型順列を用いた反復試験の結果の平均値を求めてもよい。各 μ GWAS分析は、GPU起動ノードでグリッド／クラウドに対し $> 100,000$ 時間を必要とする場合があるため、 $1 \sim 10^{-7} \cdot 5$ 分位の推定に > 108 回の反復を必要とするシミュレーションは実用的ではない。WG順列（計算効率の良い近似値を含む）からの推定は、介入（臨床試験の場合）に無作為に割り当てられることよりも、対象がその転帰に基づき分類されていることによるバイアス（例えば非言語に対する言語）に影響を受ける。そのため、その集団は、対象の状態や共通の祖先要因のいずれにも関連しない態様において、系統的に異なることが予測される。バイナリな結果の場合、少数の「外れ値」だけで有意な結果が引き出されることもないため、有意性は高いMAF（ssGWAS）、または低い歪度スコア（ μ GWAS）と相関する。ゆえに観察された表現型の間で有意な対立形質の差異を有する領域は、無作為な表現型順列間で有意となる機会も多くなる。（Wittkowski KM, Sona

k y a V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4 : e 3 5 4)

【0282】

選択的染色体順列：選択される染色体順列法を提唱されるように使用することで、このバイアスが減少する。疾患に関連する、および非関連のリスク因子の内容に関して染色体は異なっている場合があるが、確率的誤差は、全染色体にわたり同じ分布を有すると予測される。ゆえに上述のバイアスは、順列分布を決定したときに高い有意性の領域を含む染色体を除外することで減少される。特に各染色体に対する予測分布のエンドポイントは、単調増加と非ポジティブの二次導関数を確実にするための切り捨てを行った後のp値に対するロエス投影から推定され得る。同様に予測分布のエンドポイントは、例えばロエス投影から最も低い最大偏差のs値分布を有する10個の染色体などの限定されたセットのメジアンから推定される。(Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4 : e 3 5 4)

10

【0283】

偏差に対する形式的QRカットオフ：次に、初期ロエス適合がすでに当該標的レベル未満に維持されている場合を除き、曲線が当該レベルに削減されるまで予測エンドポイントと置き換えられた、十分な数の高エンドの結果を有する個々の染色体データのロエス適合として、各染色体に対する予測分布の推定を算出する。WGデータに適用されるときも同じ手順で、WG分布の推定が得られる。シミュレーション結果は、表現型の無作為順列に基づく低分散の推定値を示し、そのメジアンが、観察されたデータから取得された分布の推定値と非常に類似していることを示す。(Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4 : e 3 5 4)

20

結果

【0284】

過去に判明したCGEMの結果：従来、GWASは1試験当たり少数のSNPのみを特定することが多かった。CGEMSデータの過去のssGWAS解析(Hunter DJ, Kraft P, et al. (2007) Nature Genet 39 : 870-4)は、傾向分析において2つの座位を暗示している：

chr10:124,992,475 rs10510126: 6.15 BUB3、(特定された長EST nt 5)

30

chr10:123336180 rs1219648: 5.49 FGFR2
123341314 rs2420946 5.46 FGFR2

【0285】

ssGWAS結果：単一SNP GWASは、それぞれ6.20および5.57という本質的に同等のレベルでこれらの研究結果を確認した。他の多くの結果は、過去の公開されている解析において排除されていた。その理由は、p値が、従来の「固定全ゲノム有意性」水準(典型的には7.5)に届かなかったためである。ssGWAS QRプロットから(CGEM:図6、EPIC:図8、およびPBCS:図10)、試験特異的全ゲノム有意性に対するカットオフを上回る遺伝子の多くが、膜でのシグナル伝達(GPCR、Fc受容体、成長因子受容体、イオンチャンネル)、または核でのプロセス(細胞サイクル制御、転写、スプライシング)に関与するというパラダイムに適合した(表4、MbrnとNclsの列を参照)。

40

【0286】

muGWAS結果：muGWASにおいて(CGEM:図7、EPIC:図9、およびPBCS:図11)、膜シグナル伝達および核プロセスに関連する遺伝子の割合は、ssGWASよりもさらに高い。さらにPIサイクル(図12)またはエンドサイトーシス(図8A)のいずれかで役割を果たすことが知られている遺伝子集団が突出している。

表4：試験により特定された遺伝子。試験；muGWAS/ssGWASにおける、IP

50

V6/IPV1: $-\log_{10}(\text{p-value})$; Mbrn: 膜関連遺伝子 (GPCR、Fc受容体、HA、RTK、イオンチャネル)、PI/EC: PIシグナル伝達/エンドサイトーシス、MPK: MAPキナーゼ、Ncls: 核 (細胞サイクル制御、転写、スプライシング)。各試験内の列の上端のブロック: muGWASにおいてaGWASを上回るディプロタイプを有する遺伝子 (CGEM: 5.29、図7; EPIC: 5.71、図9; PBCS: 5.13、図11); 各試験内の列の中心のブロック: muGWASにおいて上位41個のディプロタイプを有する他の遺伝子; 各試験内の列の下端のブロック: ssGWASにおいて、試験特異的全ゲノム有意水準を上回るSNPを有する遺伝子 (CGEM: 4.03、図6; EPIC: 4.00、図8; PBCS: 3.84、図10); muGWASにおいても関与していた遺伝子のssGWASの結果を、muGWASの結果の横に示す; 黒四角: 公知の乳癌遺伝子 (<http://www.genecards.org>); ボックス内の遺伝子名は、同じ遺伝子の複製 (太字、PRKCQ、MEGF11) または同じファミリーに属する近縁遺伝子の複製 (ATP8A1/ATP8B1, AGPAT3/AGPAT4, BMP7/BMPR1B) を示す (図49A~49Cを参照)。

【0287】

バリデーション (同じ遺伝子内領域): PRKCQ (chr10) は、CGEMにおいてmuGWASにより (mu: 6.70、ss: 3.47、" は試験特異的な全ゲノム有意性を示す) およびEPICにおいてssGWASにより (mu: 5.26、ss: 3.87*)、有意であった。両集団で同じ領域 (chr10: 6,540,724-6,573,883) が関与していた。PBCSにおいては対照的に、この領域における関連性はなく (< 2.00)、乳癌に関し、異なる集団では、異なるリスク因子という概念と一致する。

【0288】

バリデーション (同じ遺伝子): MEGF11は、CGEMとPBCSの両方で関与していた。MEGF11は、EPICにおいてさらに上昇していた (3.31)。単一SNPは、いずれの集団でも影響力が高かったが、同じSNPではなかった (CGEM: rs189155、PBCS: rs12903880、EPIC: rs333554)。3つすべてのSNPがコード領域に位置しているが、LDではない。MEGF11 (rs1477798) において、他の1つのSNPが、結腸直腸癌に関与していた (Cicek MS, Cunningham JM, et al. (2012) PLoS One 7: e38175)。

【0289】

バリデーション (類似機能): 複合的な疾患では、集団は、各集団に存在するリスク因子に関し異なっている場合がある。特に、類似機能を有する別の遺伝子により与えられるリスク割合が異なっている場合があり、さらにはたとえ同じ遺伝子が関与していても、リスクは別のSNPと関連している場合がある。

【0290】

ssGWASでは、機能的に関連する1組の遺伝子のみが、突出している (表4): BMPR1B (CGEM) - BMP7 (EPIC)

【0291】

muGWASの結果の中では (表4)、機能的に関連する遺伝子はさらに3組ある: ATP8B1 (CGEM) - ATP8A1 (EPIC)
MEGF11 (CGEM、PBCS)
AGPAT4 (CGEM) - AGPAT3 (EPIC)

【0292】

PI3K、PTENおよびSYNJ2における変異は、乳癌と関連することが知られている。

【0293】

関与すると普遍的に考えられているメカニズムは、PI (3, 4, 5) P₃ およびPI

(3, 4) P_2 の下流の AKT / TSC / mTOR 増殖経路の制御異常である。この分析の結果は、PI サイクルが関与する追加的な 3 つのポイントを指摘している (図 12) :

1. PI (4, 5) P_2 (SCARB2, UNC13C, STXB1, SDCBP2, MEGF11, SYT17, N4BP3, VAV3) および
2. PI (3) P (NLRP4, EEA1, RAB32) ならびに
3. PI (ATP8A1, ATP8B1, SLC5A3, AGPAT3, AGPAT4, ANXA4) の全体的な活性化

【0294】

CHMP7、RAPGEF4 および EEA1 を除き、これらすべての遺伝子が、過去に乳癌と関連していることが示されている (<http://www.genecards.org>)。 10

【0295】

新たな研究結果は、乳癌リスクは、

【0296】

癌に感受性をもたらす核プロセスに関与する遺伝子、および

【0297】

増殖シグナルを出す膜プロセスに関与する遺伝子における様々な変動

【0298】

ならびに

【0299】

PI (3, 4, 5) P_3 (PTEN における機能消失、PI3K における機能獲得)、 20

【0300】

PI (3, 4) P_2 (SYNJ1 / 2 または INPPL1 における機能獲得)、または

【0301】

PI (3) P (INPP4B における機能獲得) を増加させることにより当該 2 つを結び付ける少数の特定の変動、によりもたらされるだけでなく、

【0302】

PI サイクルの全般的な制御異常であって、

【0303】

ホスファチジルイノシトール (PI) (AGPAT3, AGPAT4 および SLC5A3 を含む) のエントリー、および 30

【0304】

ホスファチジルセリン / ホスファチジルコリン (PS / PC) (ATP8A1, ATP8B1 および ANXA4 を含む) のエントリー、

【0305】

ならびに移動および浸潤の重要な構成要素としてのエンドサイトーシスをはじめとする、PI サイクルの全般的な制御異常によってももたらされること、である。エンドサイトーシスは、PI シグナル伝達により制御されることが知られており、以下で提示される結果において特定された遺伝子とも一致している：

【0306】

細胞膜ステージ (PM、8 個の遺伝子)、 40

【0307】

早期エンドソームステージ (EE、4 個の遺伝子)、および

【0308】

後期エンドソームステージ (LE、2 個の遺伝子)。

【0309】

一部の実施形態では、対象は、上記に開示される遺伝子のいずれか 1 つまたは組み合わせの不完全な発現による機能障害状態のリソソーム経路により特徴づけられる疾患または障害を有する。

考察

【0310】

本明細書において使用された方法は、使用された統計法および決定戦略の両方において、従来のGWASとは異なっている。GWAS固有の統計的手法の課題に対処するために、新規の方法は、(a)特定の優先度に関する仮定の設定を回避する、(b)疾患座位に隣接するSNPの両方が、組み換えホットスポットにより分離されている場合を除いて、LD中にあるはずであるという事実を選択する、(c)同じタグセットに属するSNPを識別することができるが、染色体でのその順序は異なり得る、(d)類似した効果を有する同じ領域内の様々な疾患座位を考慮し、および(高い有意性を有する領域内でいくつかのSNPを探索する目視検査を介してではなく)統計的方法内で複合的なヘテロ接合性を考慮する、および(e)結果の優先順位付けに使用できる追加情報(情報量)を提供する。

10

【0311】

(a)非無作為化されたGWAS、(b)遺伝子は全く影響しないという仮説を検定するのではなく、いくつかは影響するはずと認識して、遺伝子セットを選択することを目的とする、(c)p値の予測分布推定においてMAFの差異を考慮する、および(d)関連する重複ディプロタイプの検定に対する調整、を考慮する決定規則の使用。

【0312】

小児期欠伸てんかんにおける μ GWASのバリデーション(Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2013) Pharmacogenomics 14:391-401)は、公知の疾患経路を調節する遺伝子を特定する μ GWASの能力を示している。従来のssGWASは、単一SNP(偽遺伝子における)のみを特定していた。自閉症の無言症に対する、その後の応用(Wittkowski KM, Sonakya V, et al. (2014) Transl Psychiatry 4:e354)から、2つの独立した集団において同じ生物機能に関連する遺伝子クラスターを特定する μ GWASの能力が確認された。

20

【0313】

従来の単一SNP GWASとともに、この新規決定規則を単独で使用するにより、本明細書で検討される3つの試験のそれぞれに対し、「有意な」遺伝子数がゼロから20超に上昇した。新規決定規則を使用したssGWASにおいて確認された遺伝子セットには、新規PIPサイクル経路と関連する遺伝子の半分が含まれた。次いで、新規のノンパラメトリック広域座位法により、PIサイクルの制御および機能に關与する遺伝子の残り半分が加えられた。

30

【0314】

PIサイクルは真核細胞の多くの細胞機能にとって重要であり、例えば卵成熟、受精、胚発生などの発生機能だけでなく、細胞増殖、細胞骨格動態、膜輸送および核事象も含まれる(Shulga YV, Myers DS, et al. (2010) Biochemistry 49:312-7; Busa WB (1988) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 320:415-26)。ゆえにPIサイクルが強固に制御されていることは何ら驚くべきことではない。特にPI(4,5)P₂、PI(4)P、PI(3,4)P₂およびPI(3)Pは、3つのキナーゼと3群のホスファターゼの両方により強固に制御されている(Waugh MG (2015) Biochim Biophys Acta 1851:1066-82)。ホスファターゼの様々なサブセット(図12、ボックス)がキナーゼの作用に対抗するため、特定のホスファターゼ中の何らかの変動が全体としてシステムに与える影響はさらに低下する。ゆえにこの強固に制御されたシステムの状態を特定の介入が改変しても、持続的な影響を与えるには不十分となるであろう。

40

【0315】

「Pt dIns(3,4,5)P₃およびPt dIns(3,4)P₂の両方が、細胞が悪性状態となること、およびその持続に必要である可能性がある」ということが、「2PIP仮説」(Kerr WG (2011) Ann N Y Acad Sci 121

50

7 : 1 - 17) として定式化されている。本明細書に提示される結果は、PI (3) P だけではなく、全体としてPI サイクルにさらに焦点を移すことが必要であることを示唆している。この新たな焦点は、薬剤開発に直接的な影響を及ぼす。

【0316】

線形 (PI - PIP1 - PIP2 - PIP3) PI システムのモデルは、AKT / TSC / mTOR の増殖経路に沿った活性を減少させる戦略としてのPI 3K の阻害を提唱していた。しかしごく一部の患者のみが、PI 3K を阻害することでこの線形経路を中断し、利益を得られる (Bosch A, Li Z, et al. (2015) Sci Transl Med 7 : 283ra51 - ra51)。ウォルトマンニンおよび他のPI 3K 阻害剤の限定的な成果は、本来ある状態だけではなく、特定のポイントでの薬剤による攪乱状態に対してもPI サイクルが代償してしまう能力と一致している。

10

【0317】

高レベルのPI (3, 4, 5) P3、PI (3, 4) P2 およびPI (3) P はすべて、癌の負の転帰と相関していることが知られている。「ホスファチジルイノシチド (PIP) 量の変化が癌の特徴である。様々なPIP が、正常細胞および悪性細胞における多様な膜のアイデンティティのマークとなる」 (Sengelaub CA, Navrazhina K, et al. (2015) The EMBO Journal)。PI (4, 5) P2 - PI (4) P - PI (3, 4) P₂ - PI (3) P 経路周辺の強固に制御されたPI サイクルモデルにより、キナーゼまたはホスファターゼを個々に、またはペアで阻害するよりも成功率の高い戦略としてPI サイクル活性を全体的に下方制御し、PI サイクルを含む過度な活性化を正すことが提唱されている。

20

【0318】

乳癌も前立腺癌もそれ自体は致死적ではない。他の臓器へと拡がる転移が、癌関連死をもたらすのである。細胞障害剤を含む治療で見られるように、細胞増殖の抑制は概して副作用 (悪心、脱毛など) を生じさせ、転移リスクは必ずしも下がるとは限らない。その理由は、増殖と転移は、別の経路で制御され得るからである。

【0319】

腫瘍細胞は、転移するために「運動性と浸潤性の表現型を発現させなければならず」、細胞移動にはエンドサイトーシスが必要であることが知られている (Mellman I, Yarden Y (2013) Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5)。「増殖因子受容体の欠陥のある小胞輸送、ならびにインテグリンおよびカドヘリンをベースとした接着複合体の不均衡なリサイクルが、過去5年間で癌の多面的な特徴として浮上した」ため、「脱線したエンドサイトーシス」を是正することが、癌転移の予防戦略として提唱されている (Mosesson Y, Mills GB, et al. (2008) Nat Rev Cancer 8 : 835 - 50)。「エンドサイトーシス輸送に関連するシグナル伝達経路の活性化 (図14) は、腫瘍細胞の移動に重要である。ゆえに、エンドサイトーシス輸送とシグナル伝達の選択的標的化により、転移を予防する新規癌治療剤の開発が可能となり得る」 (Chew CL, Chen M, et al. (2016) Oncotarget 7 : 5 - 6)。

30

40

実施例2 : PI サイクル、およびエンドサイトーシス経路からの遺伝的リスク因子は、乳癌における「脱線したエンドサイトーシス」、およびパーキンソン病 / アルツハイマー病における「欠陥 / 錯乱したエンドサイトーシス」の共通したリスク因子として知られている。

【0320】

アルツハイマー病およびパーキンソン病は、以下のリスク因子を共有することが知られている : Aβ およびα - シヌクレインは相互作用すると仮定されており (Crews L, Tsigelny I, et al. (2009) Neurotox Res 16 : 306 - 17 ; Tsigelny IF, Crews L, et al. (2008) P

50

LoS One 3:e3135)、およびADとPDの「中程度の関連性」が、1986～2010年に実施された14の試験のメタ解析において見出されている(Feldman AL, Johansson AL, et al. (2014) Neuroepidemiology 42:69-80)。しかし各々7, 815KのSNPが割り振られた2セットのADおよびPD GWASからの単一SNPの要約統計量のメタ解析では、「PDおよびADの両方のリスクを上昇させる[SNP]座位に関する有意な証拠はなかった」(Moskvina V, Harold D, et al. (2013) JAMA Neurology 70:1268-76)。近年、これらの試験においてパーキンソン病またはアルツハイマー病のいずれかとして診断されるルイス体(DLB)を伴う疾患は、潜在的な交絡因子として特定された(Guerreiro R, Escott-Price V, et al. (2016) Neurobiol Aging 38:214 e7-10; Bras J, Guerreiro R, et al. (2014a) Hum Mol Genet 23:6139-46)。そして上述の結果から、上記の「有意な証拠」の欠落の理由は、シス-エピスタシスな効果に関して、muGWASよりもssGWASのパワーが低いためである可能性が示唆される。

【0321】

乳癌およびアルツハイマー病／パーキンソン病の疫学および病因の重複：乳癌は、パーキンソン病と高い共起性を有する(Disse M, Reich H, et al. (2016) Dermatol Surg 42:141-6)。癌がアルツハイマー病のリスクを低下させるという早期の報告では、競合リスク(Hanson HA, Horn KP, et al. (2016) J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci)および／または癌治療剤の治療効果(Malkki H (2016) Nat Rev Neurol 12:126-)を考慮しない統計モデルに関連付けられていた。乳癌とアルツハイマー病の限定的な関連性に対する別の理由は、変異が逆の作用を有している可能性、例えば乳癌(およびパーキンソン病)では機能獲得、アルツハイマー病では機能喪失という可能性がある。遺伝的リスク因子の重複が既に報告されていた。パーキンソン病遺伝子のPSEN2の変異が、乳癌およびパーキンソン病でも発見された(Cai R, Hao Z, et al. (2015) Bioinformatics 31:1701-7)。パーキンソン病の微小管関連タンパク質であるタウ(tau)をコードするMAPTにおける変異は、乳癌(Rouzier R, Rajan R, et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:8315-20)およびパーキンソン病(Lopez Gonzalez I, Garcia-Esparcia P, et al. (2016) Int J Mol Sci 17:206)でも存在していた。DJ-1は、上昇しているとみられ(Kawate T, Iwaya K, et al. (2015) Cancer Sci 106:938-43)、エンドソームLRRK2のG₂₀₁₉S変異(Rivero-Rios P, Gomez-Suaga P, et al. (2015) Biochem Soc Trans 43:390-5)はリスクを上昇させる(Agalliu I, San Luciano M, et al. (2015) JAMA Neurol 72:58-65)。さらに、「このリンクの病因は、理解し難いままである」(Disse M, Reich H, et al. (2016) Dermatol Surg 42:141-6)。

【0322】

乳癌(上記および公表されている結果)とアルツハイマー病／パーキンソン病(公表されている結果)に対する遺伝的リスク因子の重複：乳癌のmuGWASで特定されたPIサイクルに関連する遺伝子とEEC遺伝子の大部分(表4、PI/EC列)はすでに、過去の機能性研究と、乳癌およびアルツハイマー病／パーキンソン病の両方の遺伝子発現研究で特定されている(表5および表6)。

表5：乳癌、PDおよびADのPI-サイクル重複。遺伝子：乳癌GWASで特定された遺伝子。EEC機能：PIサイクルおよび／またはEECにおける公知の機能。KEGG：KEGG経路(<http://www.genome.jp/kegg/pathwa>)

y. html)、EC：上皮癌（癌腫）。ND：神経変性疾患。

【表5-1】

遺伝子PI-サイクル	KEGG	EC ND 参考文献	
ATP8A1 細胞外PEおよびPS ATP8B1の減少は、エンド サイトーシス、 LY、移動を強化す る		(Farge E, Ojcius DM, et al. (1999) Am J Physiol 276 :C725-33; Levano K, Sobocki T, et al. (2009) Glycoconj J 26 :739-48; Levano K, Punia V, et al. (2012) J Neurochem 120 :302-13; Andersen JP, Vestergaard AL, et al. (2016) Front Physiol 7 :275)	10
	BC	(da Costa A, Lenze D, et al. (2012) J Comp Pathol 146 :143-51; Sjoblom T, Jones S, et al. (2006) Science 314 :268-74)	
	PC	(Lee BH, Taylor MG, et al. (2013) Cancer Res 73 :1211-8; Sekine Y, Demosky SJ, et al. (2010) Mol Cancer Res 8 :1284-94; Trasino SE, Kim YS, et al. (2009) Mol Cancer Ther 8 :1934-45)	
	PD	(Levano K, Punia V, et al. (2012) J Neurochem 120 :302-13)	20
ANO4 Ca ⁺ dep. PL スク ランブラーゼ		ATP8A2: (Zhu X, Libby RT, et al. (2012) PLOS Genetics 8 :e1002853)	
	AD	(Soderberg M, Edlund C, et al. (1992) J Neurochem 59 :1646-53)	
		ATP8B4: (Li H, Wetten S, et al. (2008) Arch Neurol 65 :45-53)	
		(Picollo A, Malvezzi M, et al. (2015) J Mol Biol 427 :94-105)	
ABCA1 細胞脂質流出を制 御する ; MEGF10 と相互作用 する	SC	(Weber GF (2015) Sarcoma 2015 :839182)	30
	AD	(Sherva R, Tripodis Y, et al. (2014) Alzheimers Dement 10 :45-52)	
		(Hamon Y, Trompier D, et al. (2006) PLoS One 1 :e120)	
	BC	(Zhao W, Prijic S, et al. (2016) Cancer Res 76 :2037-49; Schimanski S, Wild PJ, et al. (2010) Horm Metab Res 42 :102-9)	
	PC	(Lee BH, Taylor MG, et al. (2013) Cancer Res 73 :1211-8; Sekine Y, Demosky SJ, et al. (2010) Mol Cancer Res 8 :1284-94)	40

【表 5 - 2】

			PD (Dong Y, Gou Y, et al. (2015) Elife 4 ; Pinho R, Guedes LC, et al. (2016) PLoS One 11 :e0157852; Dong X, Liu T, et al. (2016) Genes & Genomics 38 :243-50; Loane DJ, Washington PM, et al. (2011) J Neurotrauma 28 :225-36)	
			AD (Koldamova R, Fitz NF, et al. (2014) Neurobiol Dis 72 Pt A :13-21; Pahnke J, Langer O, et al. (2014) Neurobiol Dis 72 Pt A :54-60; Boehm-Cagan A, Bar R, et al. (2016) PLoS One 11 :e0166195; Nordestgaard LT, Tybjaerg-Hansen A, et al. (2015) Alzheimers & Dementia 11 :1430-8)	10
			HD (Valenza M, Marullo M, et al. (2015) Cell Death Differ 22 :690-702)	
<i>AGPAT3</i> リゾーPI (LPI) を	hsa00564		(Bradley RM, Marvyn PM, et al. (2015) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1851 :1566-76)	20
<i>AGPAT4</i> ホスファチジルイ ノシトール (PI) に変換する			BC (Sahay D, Leblanc R, et al. (2015) Oncotarget 6 :20604-20; Hopkins MM, Zhang Z, et al. (2016) J Clin Med 5)	
			PC <i>AGPAT6</i> : (Gatto F, Miess H, et al. (2015) Sci Rep 5 :10738)	
			PD (Cheng D, Jenner AM, et al. (2011) PLoS One 6 :e17299)	30
			AD (Sherva R, Baldwin CT, et al. (2011) J Alzheimers Dis 23 :349-59)	
<i>DGKQ</i> PA を	hsa00564,		(Sakane F, Kanoh H (1997) Int J Biochem Cell Biol 29 :1139-43)	
ジアシルグリセロ	hsa04070	BC	(Filigheddu N, Cutrupi S, et al. (2007) Anticancer Res 27 :1489-92)	
ール (DAG) から再 生させる			PC <i>AGK</i> : (Bektas M, Payne SG, et al. (2005) J Cell Biol 169 :801-11)	40
			PD (Lill CM, Roehr JT, et al. (2012) PLoS Genet 8 :e1002548; Nalls MA, Pankratz N, et al. (2014) Nat Genet 46 :989-93)	

【表 5 - 3】

<i>LPPR1</i>	LPPR3/4/5 と複合体 化し、 <i>PIS</i> (<i>CDIPT</i>) を制御する	hsa04070	AD (Zhu XC, Cao L, et al. (2016) Mol Neurobiol)	
			<i>LPPR4</i> : (Yu P, Agbaegbu C, et al. (2015) Journal of Cell Science 128:3210-22)	
<i>SYNJ2</i>	初期クラスリン被 覆凹部分へとリク ルートされる	hsa04070	PD (Moran LB, Duke DC, et al. (2006) Neurogenetics 7:1-11)	
			(Schmid SL, Mettlen M (2013) Nature 499:161-2)	10
<i>PTENP1</i>	PI3K/PTEN および PI (3, 4, 5)P3 は、 エンドサイトーシ ス/癌に関与する	hsa04070	BC (Ben-Chetrit N, Chetrit D, et al. (2015) Sci Signal 8:ra7)	
			PC (Rossi MR, Hawthorn L, et al. (2005) Cancer Genet Cytogenet 161:97-103)	
<i>PTENP1</i>	PI3K/PTEN および PI (3, 4, 5)P3 は、 エンドサイトーシ ス/癌に関与する	hsa04070	PD SYNJ1 = PARK20	
			AD <i>SYNJ1</i> : (Cao J, Gaamouch FE, et al. (2017) Sci Rep 7:11372)	20
<i>PTENP1</i>	PI3K/PTEN および PI (3, 4, 5)P3 は、 エンドサイトーシ ス/癌に関与する	hsa04070	(Koran ME, Hohman TJ, et al. (2014) J Alzheimers Dis 38:145-54)	
			PTEN: (Erneux C, Ghosh S, et al. (2016) Curr Pharm Des 22:2309-14)	
<i>PTENP1</i>	PI3K/PTEN および PI (3, 4, 5)P3 は、 エンドサイトーシ ス/癌に関与する	hsa04070	BC (Zhang H-Y, Liang F, et al. (2013) Oncology Letters 6:161-8)	
			PC (Pourmand G, Ziaee AA, et al. (2007) Urology journal 4:95-100)	
<i>PTENP1</i>	PI3K/PTEN および PI (3, 4, 5)P3 は、 エンドサイトーシ ス/癌に関与する	hsa04070	PD PINK1: (Choubey V, Cagalinec M, et al. (2014) Autophagy 10:1105-19)	30
			AD (Frere S, Slutsky I (2016) Nat Neurosci 19:416-8)	
<i>PTENP1</i>	PI3K/PTEN および PI (3, 4, 5)P3 は、 エンドサイトーシ ス/癌に関与する	hsa04070	HD PINK1: (Khalil B, El Fissi N, et al. (2015) Cell Death Dis 6:e1617)	

表 5 (続き): 表 5 a の遺伝子の配列。

名称 E n t r e z アクセション

ATP8A1 10396 AF067820

1 mptmrvtvse irsraegyek tddvsektsl adqeevrtif inqpqltkfc nnhvstakyn
61 iitflprfly sqfrraansf flfiallqqi pdvsptgryt tlvplllfila vaaikieied
121 ikrhkadnav nkkqtqvlrn gaweivhwek vavgeivkvt ngehlpadli slsssepqam
181 cyietsnldg etnlkirqgl patsdikvdv slmrsgrie cespnrhlyd fvgnirldgh
241 gtvplgadqi llrgaqlrnt qwvhgivyty ghdtklmqns tspplklsnv eritnvqili
301 lfciliamsl vcsvgsaiwn rrrhsgkdwyf nlnyggasnf glnfltfiil fnnlipisll

【表 5 - 4】

361 vtlevvkftq ayfinwdldm hyeptdtaam artsnlneel gqvkyifsdg tgtltcnvmq
 421 fkkctiagva yghvpepedy gcsdpewqns qfgdektfsd ssllenlqnn hptapiicef
 481 ltmavchta vperegdkii yqaaspdega lvraakqlnf vftgrtpdsv iidslgqeer
 541 yellnvleft sarkrmsviv rtpsgklrly ckgadtviyd rlaetskyke itlkhleqfa
 601 teglrtlcfv vaeisesdfq ewravyqras tsvqnrlkl eesyeliekn lqllgataie
 661 dklqdqvpqet ietlmkadik iwiltgdkqe tainighsck llkknmgmiv inegsldgtr
 721 etlsrhcttl gdalrkendf aliidgkltk yaltfgvrqy fldlalscka viccrvsplq
 781 ksevvemvkk qkvvtlaig dgandvsmiq tahvgvgisg neglqaanss dysiaqfkyk
 841 knllmihgaw nynrvskcil ycfyknivly iieiwfafvn gfsgqilfer wciglynvmf
 901 tamppltlgi ferscrkenm lkypelykts qnaldfntkv fvwchlnglf hsvilfwfpl
 961 kalqygtafg ngktsdylll gnfvytfvvi tvclkgaglet sywtwfschia iwgsialwv
 1021 ffgiysslpw aipmapdmsg eaamlfssgv fwmglfipv asllldvvyk
 vikrtafktl
 1081 vdevqeleak sqdpgavvlk kslteraqlk knvfknkhnv lyrseslqqn
 llhgyafsqd
 1141 engivsqsev iraydttkqr pdew

10

ATP8B1 5205 AF038007

1 msterdsett fdedsqpnde vvpysddete delddqgsav epeqnrnvre aeenrepfrk
 61 ectwqvkanr rkyheqphfm ntkflcikes kyannaikty kynafthfipm nlfeqfkraa
 121 nlyflallil qavpqistla wyttlvpllv vlgvtaikdl vddvarhkmd keinnrtcev
 181 ikdgrfkvak wkeiqvgdvi rlkknfdvpa dilllssep nslycvetae ldgetnlkfk
 241 msleitdql qredtlatfd gfieeepnn rldkftgtlf wrntsfplda dkillrgcvi
 301 rntdfchglv ifagadtkim kmsgktrfkr tkidylmnm vytfvvlil lsaglaigha
 361 yweaqvgns wylygeddt psyrgflifw gyiivlntmv pislyvsvev irlgqshfin
 421 wdlqmyaek dtpakarttt lneqlgqihy ifsdktgtlt qnimtfkkcc ingqiygdhr
 481 dasqnhnki eqvdfswnty adgklafydh ylieqiqsgk epevrqfffl lavchtvmvd
 541 rtdgqlnyqa aspdegaln aarnfgafal artqntitis elgtertynv laildfnsdr
 601 krmsiivrt egniklyckg adtviyerlh rmnptkqetq daldifanet lrtlcleyke
 661 ieekeftewn kkfmaasvas tnrdealdkv yeeiekdlil lgataiedkl qdgvpetisk
 721 lakadikiwv ltgdkketae nigfacellt edtticyged insllharme nqrnrggvya
 781 kfappvqesf fppggnrali itgswlneil lekktkrnki lklkfprtee errmrtqskr
 841 rleakkeqrq knfvdlacec saviccrvtp kqkamvdlv krykkaitla igdgandvnm
 901 iktahigvgi sgqegmqavm ssdysfaqr ylrlllvhg rwsyirmckf lryffykna
 961 ftlvhfwysf fngysaqtay edwfitlynv lytslpvllm glldqdvsk lslrfpglyi
 1021 vgqrdllfny krffvslhlg vltsmilffi plgaylqtvg qdgeapsdyq
 sfavtiasal
 1081 vitvnfqigl dtsywtfvna fsifgsialy fgimfdfhsa gihvlfpsaf
 qftgtasnal
 1141 rqqyiwltii lavavcllpv vairflsmti wpsedkiqk hrklrkaeeq
 wqrrqqvfr
 1201 gvstrrsaya fshqrgyadl issgrsirkk rspldaivad gtaeyrrtgd s

20

30

40

AN04 121601 AK091540

【表 5 - 5】

```

1  aaaaactcca  ttcgaaccca  tggagcagaa  aaccaccgac  atctactcta  tgagtgtctg
61  gcctcctggg  gcgtgtggta  taaataccaa  cttttggatc  ttgtaaggcg  gtacttttga
121  gagaagattg  gggttatatt  tgcctggttg  ggctggtaca  ccggcatgct  ctcccagct
181  gccttcattg  gattgtttgt  ctttttgtat  ggctgcacca  ctctggatca  cagccaagtc
241  agtaaagaag  tctgccaagc  tacagatata  atcatgtgtc  ctgtgtgtga  taaatactgt
301  ccattcatga  ggctgtcaga  cagctgtgta  tatgccaagg  taaccacact  ttttgacaat
361  ggagccactg  tcttctttgc  tgttttcatg  gcagtctggg  caacagtttt  cctggagttt
421  tggaaaagac  ggcgagcagt  aattgcttat  gactgggatt  tgatagactg  ggaagaagag
481  gaggaagaaa  tacgacccca  gtttgaagcc  aagtattcca  agaaagagcg  gatgaatcca
541  atttctggaa  agccagaacc  ttatcaagca  ttacagata  aatgcagcag  acttatcggt
601  tctgcactcg  gaatatTTTT  tatgatctgc  gtggtgattg  ctgccgtgtt  cgggatcgtc
661  atttaccggg  tggtgactgt  cagcactttc  gctgccttta  agtgggctgt  aatcaggaat
721  aactctcagg  ttgcaaccac  agggactgct  gtgtgcatca  acttctgtat  cattatgttg
781  ctgaatgtgc  tctatgaaaa  agttgcctcg  cttctgacga  attagaaca  gcctcgaca
841  gagtctgagt  gggagaacag  cttcaccctg  aaaatgtttc  ttttccagtt  tgtcaatctg
901  aacagctcca  cattttacat  cgcattcttc  ctcggaagat  ttacaggaca  cccagggtgc
961  tacttgaggc  tgataaacag  gtggagacta  gaagagtgcc  accctagtgg  atgccttatt
1021  gatctgtgta  tgcaaatggg  tattataatg  gtgctaaagc  agacctggaa
    taatttcatg
1081  gaacttggct  acccgtaaat  tcagaattgg  tggactagaa  gaaaagtacg
    acaagaacat
1141  ggacctgaaa  ggaaaataag  tttcccacaa  tgggaaaagg  actataacct
    tcagccgatg
1201  aatgcctatg  gactcttcga  tgaatactta  gaaatgattc  ttcagtttgg
    attcacaact
1261  atctttgtgg  cagcttttcc  cctagcacca  cttctggcct  tactgaataa
    cataattgaa
1321  attcgacttg  atgcttaca  atttgtcaca  cagtggagga  gaccttttagc
    ttcaagggcc
1381  aaagacatag  gaatttggta  tggaattctt  gaaggcattg  gaattctctc
    tgttatcaca
1441  aatgcatttg  tcatagcgat  aacatctgac  tttatccctc  gcttggtgta
    tgettataag
1501  tatggacctt  gtgcaggcca  aggagaagct  gggcaaaagt  gcatggttgg
    ctatgtgaat
1561  gccagcttgt  ctgtatttcg  aatttctgac  tttgagaacc  gatctgagcc
    tgaatctgat
1621  ggcagtgagt  tctcggggac  tcctcttaag  tactgcagat  accgggacta
    ccgtgaccgg
1681  cctcattcac  tgggtgccct  tggctacaca  ctgcagtttt  ggcatgtcct
    agctgctcga
1741  ttagctttta  tcattgtctt  tgagcacctc  gtgttttgta  taaagcaact
    catttcgtat
1801  ctgatcccag  acctcccaaa  agacctaaag  gatcgaatga  gaagagagaa

```

10

20

30

40

【表 5 - 6】

gtacttgatt
 1861 caggagatga tgtatgaagc agaactggaa cgtctccaga aggaacgaaa
 ggagaggaag
 1921 aagaatggaa aagcacacca caacgagtgg ccgtgacat aaaatagtc
 cttccaggc
 1981 caaggacctg aattctgttt acttcttctg gctgtgcaaa agcacactca
 agtgaatgac
 2041 taaaaatgca accacagtgc atgttgacaga taccggcggc cgcaggagg
 gcagcatcca
 2101 gtagaggact ggcgttgag tcacactgct gtgaaatcac gttgcagtc
 agcgacaat
 2161 tgctatctat ccatagacca ttcttgacca agcaagcatg cacattatgg
 gcagttacat
 2221 tctcaagttt ttaaaatcaa ggggaacttg tatactgggc ctgtttttca
 gcctgtttgc
 2281 tacctttttt gcattctatc ccatgtgaat ttacagaca ctgggctaaa
 aagggtatc
 2341 agacacatgg acacacattc ctagaatgtc atcatatggt cctaattcca
 tgcaccaag
 2401 aacacagaca agacctgtt tacaactttt tctttccttt ttttaattt
 tagacctttc
 2461 tgagaagatt attatatatg acatatctat agctatgtgt atggccatag
 atgtatttct
 2521 gtgtgtacat atgtatagtc atgtattcct gcatatgtac atacaaatac
 agagatatat
 2581 aaagtacata gaaattcctt acttgtaa atgccccaaag tactgacatg
 agtgaatttt
 2641 cacatttaaa tagtcatcaa tatgaagcca tgattaatgc ttgtataatg
 tgatgaata
 2701 aaatttaaaa taaatttctg cacatggaat attttc

10

20

30

ABCA1 19 AAF86276

1 macwpqlrll lwknltrrr qtcqllleva wplfiflili svrlsyppye qhechfpnka
 61 mpsagtlpwv qgiicnannp cfryptpgea pgvvgfnks ivarlfdsar rlllysqkdt
 121 smkdmrkvrl tlqqikksss nlklqdfldv netfsgflyh nlsipkstvd kmlradvilh
 181 kvflqgyqlh ltslcnsgks eemiqlgdqe vselcglpre klaaaervlr snmdilkpil
 241 rtlntspfp skelaeatkt llhslgtlaq elfsmrswsd mrqevmfltn vnsssstqi
 301 yqavsrivcg hpegglkik slnwyedny kalfgngte edaetfydns ttpycndlmk
 361 nlessplsri iwkalkpllv gkilytpdtp atrqvmaevn ktfqelavfh dlegmweels
 421 pkiwtfmens qemdlvrml dsrdndhfwe qqlldgldwta qdivaflakh pedvqssngs
 481 vytwreafne tnqairtiser fmecvnlkl epiatevwli nksmellder kfwagivftg
 541 itpgsielph hvkykirmi dnvertnkik dgywdpgpra dpfedmryvw ggfaylqdv
 601 eqaiirvltg tekktgvymq qmpypcyvdd iflrmsrsm plfmlawiy svaviikgiv
 661 yekearlket mrimglndsi lwfswfissl ipllvsgll vvilklgnll pysdpsvfv

40

【表 5 - 7】

721	flsvfavvti	lqcflistlf	sranaaaacg	giyftlylp	yvlcvawqdy	vgftlkifax
781	llspvafgfg	ceyfalfeeq	gigvqwdnlf	espveedgfn	lttsvsmmlf	dtflygvmtw
841	yieavfpgqy	giprpwyfpc	tksywfgees	dekshpgsnq	kriseicmee	epthklgvs
901	iqnlvkvyrd	gmkvavdgla	lnfyegqits	flghngagkt	ttmsiltglf	pptsstayil
961	gkdirsemst	irqnlgvcpq	hnvlfdmltv	eehiwfyarl	kglsekhvka	emeqmaldivg
1021	lpssklkskt	sqlsggmqrk	lsvalafvgg	skvvildept	agvdpysrrg	
	iwelllkyrq					
1081	grtiilsthh	mdeadvlgr	iaiishgklc	cvgsslflkn	qlgtgyyltl	
	vkddvessls					
1141	scrnsstsvs	ylkkedsvsq	sssdaglgd	hesdtltidv	saisnlirkh	
	vsearlvdi					
1201	gheltyvlp	eaakegafve	lfheiddrls	dlgissygis	ettleeiflk	
	vaeesgvdae					
1261	tsdgtlparr	nrrafgdkqs	clrpftedda	adpndsdi	esretdllsg	
	mdgkgsyqvk					
1321	gwklrtqqfv	allwkrllia	rrsrkgffaq	ivlpavfvc	alvfslivpp	
	fgkypslql					
1381	pwmneqytf	vsndapedtg	tlellnaltk	dpgfgtrcme	gnpipdtpcq	
	ageewttap					
1441	vpqtimdlf	ngnwtmqnps	pacqcssdki	kkmlpvcppg	agglpppqrk	
	qntadilqdl					
1501	tgrnisdylv	ktyvqiaks	lknkiwnef	ryggfslgvs	ntqalppsqs	
	vndaxkqmkk					
1561	hlklakdssa	drflnslgrf	mtgldtrnnv	kvwfnkngh	aissflnvin	
	nailranlqk					
1621	genpshygit	afnhplnlk	qqlsevoxmt	tsvdlvsic	vifamsfvpa	
	sfvvfliqr					
1681	vskakhlqfi	sgvkpviwl	snfvwdmcny	vvpatlvi	ficfqqksyv	
	sstnlplal					
1741	llllygwsit	plmypoasfv	kipstayvvl	tsvnlfigin	gsvatfvlel	
	ftdnklenn					
1801	dilksvflif	phfclgrgli	dmvknqamad	alerfgenrf	vsplswdlvg	
	rnlfamaveg					
1861	vvfflitvli	qyrffirprp	vnaklsplnd	ededvrrerq	rildgggqnd	
	ileikeltki					
1921	yrkrkpvavd	ricvgippge	cfllgvnga	gksstfkmlt	gdtvtvrgda	
	flnxnsilsn					
1981	ihevhnqmg	cpqfdaitel	ltgrehveff	allrgvpeke	vgkvgewair	
	klglvkygek					
2041	yagnysggnk	rklstamali	ggppvvflde	pttgmdpkar	rflwncalsv	
	vkegrsvlt					
2101	shsmeeceal	ctrmainvng	rfrclgsvqh	lknrfgdgyt	ivvriagsnp	
	dlkpvdffg					
2161	lafpgsvxke	khnmlyqql	psslslari	fsilsqskkr	lhiedysvsq	

10

20

30

40

【表 5 - 8】

ttldqvfvnf

2221 akdqsdhhl kdslhknqt vvdvavltsf lqdekvkesy v

AGPAT3 56894 AF156774

1 tctatgaaac caacatacat ggcgtttgca tcacagttgg agtcagatgt gagccccgag
 61 ggcaggtgtc tggtttgtcc acccggaagc cctgagggca gctgttccca ctggctctgc
 121 tgaccttgtg ccttggaagg ctgtcctcag cgaggggccc tgcacccgct cctgagcagc
 181 gccatgggcc tgctggcctt cctgaagacc cagtctgtgc tgcacctgct ggctggcttt
 241 gtcttcgtgg tgagtggctt ggctcatcaac ttcgtccagc tgtgcacgct ggcgctctgg
 301 ccggtcagca agcagctcta ccgcgcctc aactgcgcgc tcgcatactc actctggagc
 361 caactgggtc tgctgctgga gtgggtgtcc tgcacggagt gtacactgtt cacggaccag
 421 gccacggtag agcgcttttg gaaggagcac gcagtcacac tcctcaacca caacttcgag
 481 atcgacttcc tctgtgggtg gacctgtgtg gacgcttcg gagtgtctgg gagctccaag
 541 gtctctgcta agaaggagct gctctacgtg cccctcatcg gctggacgtg gtactttctg
 601 gagatttgtg tctgcaagcg gaagtgggag gaggaccggg acaccgtggt cgaagggtg
 661 aggcgcctgt cggactaccc cgagtacatg tggtttctcc tgtactgcga ggggacgcgc
 721 ttacaggaga ccaagcaccg cgtttagcat gaggtggcgg ctgctaaggg gcttctctgc
 781 ctcaagtacc acctgtgcc gcggaccaag ggcttcacca ccgcagtcaa gtgcctccgg
 841 gggacagtcg cagctgtcta tgatgtaacc ctgaacttca gaggaaacaa gaaccgtcc
 901 ctgctgggga tcctctacgg gaagaagtac gaggcggaca tgtgcgtgag gagatttctt
 961 ctggaagaca tcccgtgga tgaaaaggaa gcagctcagt ggcttcataa actgtaccag
 1021 gagaaggacg cgctccagga gatataaat cagaagggca tgtttccagg
 ggagcagttt
 1081 aagcctgccc ggaggcctg gaccctctg aacttctgt cctgggccac
 cattctctg
 1141 tctcccctct tcagttttgt cttgggcgtc tttgccagcg gatcacctct
 cctgatcctg
 1201 actttcttgg ggtttgtggg agcagcttcc tttggagtgc gcagactgat
 aggagtaact
 1261 gagatagaaa aaggctccag ctacggaaac caagagtta agaaaaagga
 ataattaatg
 1321 gctgtgactg aacacacgcg gccctgacgg tggatatccag ttaactcaaa
 accaacacac
 1381 agagtgcagg aaaagacaat tagaaactat ttttcttatt aactggtgac
 taatattaac
 1441 aaaacttgag ccaagagtaa agaattcaga aggcctgtca ggtgaagtct
 tcagcctccc
 1501 acagcgcagg gtcccagcat ctccacgcgc gcccggtgga ggtgggtccg
 gccggagagg
 1561 cctcccgcgg acgcgctctc tccagaactc cgcttccaag agggaccttt
 ggctgcttcc
 1621 tctccttaaa cttagatcaa attttaaaaa aaaaaaaaaa

AGPAT4 56895 AF156776

【表 5 - 9】

```

1  tgaacccagc  cggtccatc  tcagcttctg  gtttctaagt  ccatgtgcca  aaggctgcca
61  ggaaggagac  gccttcctga  gtcctggatc  tttcttcctt  ctggaaatct  ttgactgtgg
121  gtagttatit  atttctgaat  aagagcgtcc  acgcatcatg  gacctcggg  gactgctgaa
181  gtctcagttc  ctgtgccacc  tggctctctg  ctacgtcttt  attgcctcag  ggctaatcat
241  caacaccatt  cagctcttca  ctctcctcct  ctggcccatt  aacaagcagc  tcttcggaa
301  gatcaactgc  agactgtcct  attgcctcct  aagccagctg  gtgatgctgc  tggagtgggtg
361  gtcgggacag  gaatgcacca  tcttcacgga  cccgcgcgcc  tacctcaagt  atgggaagga
421  aaatgccatc  gtggttctca  accacaagtt  tgaaattgac  tttctgtgtg  gctggagcct
481  gtccgaacgc  tttgggctgt  taggggctc  caaggtcctg  gccaaagaa  agctggccta
541  tgtcccaatt  atcggttgga  tgtgttactt  caccgagatg  gtcttctgtt  cgcgcaagtg
601  ggagcaggat  cgcaagacgg  ttgccaccag  tttgcagcac  ctccgggact  accccgagaa
661  gtattttttc  ctgattcact  gtgaggcac  acggttcacg  gagaagaagc  atgagatcag
721  catgcagggt  gcccgggcca  aggggctgcc  tcgctcaag  catcacctgt  tgccacgaac
781  caagggttc  gccatcacg  tgaggagctt  gagaaatgta  gtttcagctg  tatatgactg
841  tacactcaat  ttcagaaata  atgaaaatcc  aacactgctg  ggagtcctaa  acggaaagaa
901  ataccatgca  gatttgtatg  ttaggaggat  cccactggaa  gacatccctg  aagacgatga
961  cgagtgtctg  gcctggtgc  acaagctcta  ccaggagaag  gatgcctttc  aggaggagta
1021  ctacaggacg  ggcaccttcc  cagagacgcc  catggtgccc  ccccggeggc
cctggaccct
1081  cgtgaactgg  ctgttttggg  cctcgtggt  gctctaccct  ttcttccagt
tcttggtcag
1141  catgatcagg  agcgggtctt  ccctgacgct  ggccagcttc  atcctcgtct
tctttgtggc
1201  ctccgtggga  gttcgatgga  tgattggtgt  gacggaaatt  gacaagggt
ctgcctacgg
1261  caactctgac  agcaagcaga  aactgaatga  ctgactcagg  gagtggtcac
catccgaagg
1321  gaaccttggg  gaactggtgg  cctctgcata  tcctccttag  tgggacacgg
tgacaaagc
1381  tgggtgagcc  cctgctgggc  acggcggaag  tcacgacctc  tccagccagg
gagtctggtc
1441  tcaaggccgg  atggggagga  agatgttttg  taatcttttt  ttcccatgt
gctttagtgg
1501  gctttggttt  tctttttgtg  cgagtgtgtg  tgagaatggc  tgtgtggtga
gtgtgaactt
1561  tgttctgtga  tcatagaaag  ggtatttttag  gctgcagggg  agggcagggc
tggggaccga
1621  aggggacaag  ttcccccttc  atcctttggt  gctgagtttt  ctgtaaccct
tggttgccag
1681  agataaagtg  aaaagtgtt  taggtgagat  gactaaatta  tgcctccaag
aaaaaaaaat
1741  taaagtgtct  ttctgggtca  aaaaaaaaaa  aaaa

```

10

20

30

40

DGKQ 1609 L38707

【表 5 - 1 0】

1	gggcggacct	aaaggggctc	gggcccgtcg	ggccgggaat	ggcggcggcg	gccgagcccc
61	gggcccgcgc	ctggctgggc	ggcggtccc	cgcgccccgg	cagcccggcc	tgcagccccg
121	tgttgggctc	aggaggccgc	gcgcgcccgg	ggccggggcc	ggggccggga	cgngaccgag
181	cggcgcgctg	cagagccccg	gcccgtgccg	cgcggggaca	cagcttcggg	aaggtgacgc
241	tcaccaagcc	caccttctgc	cacctctgct	ccgacttcat	ctgggggctg	gccggcttcc
301	tgtgcgacgt	ctgcaatttc	atgtctcatg	agaagtgcct	gaagcacgtg	aggatcccgt
361	gcacgagtgt	ggcaccacgc	ctggctcggg	ttcctgtagc	ccactgcttc	ggcccccggg
421	ggctccacaa	gcgcaagtgc	tgtgtgtgtc	gccgcaaggt	cctggaggca	ccggcgctcc
481	actgcgaagt	gtgtgagctg	cacctccacc	cagactgtgt	gcccttcgcc	tgcagtgaact
541	gccgccagtg	ccaccaggat	gggcaccagg	atcacgacac	ccatcaccac	cactggcggg
601	aggggaacct	gccctcgga	gcgcgtcg	aggtctgcag	gaagacgtgc	ggctcctctg
661	acgtgtggc	cggcggtgcg	tgcgagtggg	gcgggggtcca	ggcgcaactc	ctctgtctcg
721	cggcactggc	tcccagtggt	ggcttcgggc	gtctgcgctc	cctgggtcctg	cctcccgcgt
781	gcgtgcgcct	tctgcccggc	ggcttcagca	agacgcagag	cttcgcgcatc	gtggaggccg
841	cggagccggg	cgaggggggc	gacggcgccg	acgggagcgc	tgcctgtggg	ccaggcagag
901	agacacaggc	aactccggag	tccgggaagc	aaacgctgaa	gatctttgat	ggcgacgacg
961	cgttgagaag	aagccagtgc	cgcctcgtca	cgtgttccc	cctggccggg	gccgaggagg
1021	tgtgtggaggc	cgcactgcgg	gccaccacaa	tcccagagga	ccctggccac	
	ctggagctgt					
1081	gccggctgcc	cccttctctc	caggcctgtg	acgcctgggc	tgggggcaag	
	gctgggagtg					
1141	ctgtgatctc	ggaggagggc	agaagccccg	ggtccggcga	ggccacgcca	
	gaggcctggg					
1201	tcattccgggc	tctgcccggg	gcccaggagg	tcctgaagat	ctaccctggc	
	tggctcaagg					
1261	tgggcgtggc	ctacgtgtcc	gtgcgagtga	cccctaagag	cacggctcgc	
	tctgtggtgc					
1321	tggaggtcct	gccgctgctc	ggccgccagg	ccgagagtcc	cgagagcttc	
	cagctggtgg					
1381	aggtggcgat	gggctgcagg	cacgtccagc	ggacgatgct	gatggacgaa	
	cagcccctgc					
1441	tggaccggct	acaggacatc	cggcagatgt	ctgtgcggca	ggtgagccag	
	acgcggttct					
1501	acgtggcaga	gagcagggat	gtagccccgc	acgtctccct	gtttgttggc	
	ggcctgcctc					
1561	ccggcctgtc	tcccaggagg	tacagcagcc	tgctgcatga	ggccggggct	
	accaaagcca					
1621	ccgtggtgtc	cgtgagtcac	atctactcct	ccaaggcgc	ggtagtgttg	
	gacgttgctc					
1681	gctttgcgga	ggccgagcgg	ctgtacatgc	tgctgaagga	catggctgtg	
	cggggccggc					
1741	tgtcactgc	cctgggtgctc	cccgaactgc	tgcacgcgaa	gctgccccca	
	gacagctgtc					
1801	ccctccttgt	gttcgtgaac	ccaagagtgc	gaggcctcaa	gggccgagac	

10

20

30

40

【表 5 - 1 1】

ctgctctgca
 1861 gcttccggaa gctactgaac cctcatcagg tcttcgacct gaccaacgga
 ggtcctcttc
 1921 ccgggctcca cctgttctcc caggtgccct gcttccgggt gctgggtgtg
 ggtggcgatg
 1981 gcactgtggg ctgggtgctt ggcgccctgg aggagacacg gtaccgactg
 gcctgcccgg
 2041 agccttctgt ggccatcctg cccctgggca cagggaatga ccttggctga
 gtccctccgt
 2101 gggggggcggg ctacagcggc gaggaccctg tctccgtact gctgtctgtg
 gacgaggccg
 2161 acgccgtgct catggaccgc tggaccatcc tgcctggatgc ccacgaagct
 ggcatgtcag
 2221 agaacgacac ggcagacgca gagcccccca agatcgtgca gatgagtaac
 tactgtggca
 2281 ttggcatcga cgcgagctg agcctggact tccaccaggc acgggaagag
 gagcctggca
 2341 agttcacaag caggtgcac aacaagggtg tgtacgtgcg ggtggggctg
 cagaagatca
 2401 gtcactctcg gagcctgcac aagcagatcc ggctgcaggt ggagcggcag
 gaggtggagc
 2461 tgcccagtat tgaaggcctc atcttcatca acatccccag ctggggctcg
 ggggccgacc
 2521 tgtggggctc cgacagcgac accaggtttg agaagccacg catggacgac
 ggctgtctgg
 2581 aggttgtggg cgtgacgggc gtcgtgcaca tgggccaggt ccagggtggg
 ctgcgtccg
 2641 gaatccggat tgcccagggt tctacttcc gagtcacgct cctcaaggcc
 accccgggtg
 2701 aggtggacgg ggagccctgg gtccaggccc cggggcacat gatcatctca
 gctgctggcc
 2761 ctaaggtgca catgctgagg aaggccaagc agaagccgag gagggccggg
 accaccaggg
 2821 atgcccgggc ggatcgtgcg cctgcccctg agagcgatcc taggtagggg
 tggtggggc
 2881 agcccaaggg ctcgagccat ctctgctccc gccagccttg ttttcaggtg
 gtctggaggc
 2941 agctccacgt cacacagtgg ctgtcatata ttgaagttac cttcccactg
 gaaaaaaaaat

10

20

30

40

LPPR1 54886 AY304515

1 gtggctcgga ccgcccctg aatgtacctc gctcccggga gccggacggc ccagtagggc
 61 gcactggagg acgtccgct gcgggagcct ggacagtttt tgacggtgca gtcttgcctat
 121 atggtgtgag aaatggctgt aggaacaac actcaacgaa gttattccat catcccgtgt

【表 5 - 1 2】

181	tttatatttg	ttgagcttgt	catcatggct	gggacagtgc	tgettgccta	ctacttcgaa
241	tgcactgaca	cttttcaggt	gcataatccaa	ggattcttct	gtcaggacgg	agacttaatg
301	aagccttacc	cagggacaga	ggaagaaaagc	ttcatcaccc	ctctgggtgct	ctatttgttg
361	ctggctgcca	ccccaactgc	tattatTTTT	attggtgaga	tatccatgta	tttcataaaa
421	tcaacaagag	aatccctgat	tgtcaggag	aaaacaattc	tgaccggaga	atgctgttac
481	ctgaaccct	tacttcgaag	gatcataaga	ttcacagggg	tgtttgcatt	tggactTTTT
541	gctactgaca	TTTTgtaaa	cgccggacaa	gtggtcactg	ggcacttaac	gccatacttc
601	ctgactgtgt	gcaagccaaa	ctacaccagt	gcagactgcc	aagcgcacca	ccagtttata
661	aacaatggga	acatttgtac	tggggacctg	gaagtgatag	aaaaggctcg	gagatccttt
721	ccctccaaac	acgtctctct	gagcatTTac	tccgccttat	atgccacgat	gtatattaca
781	agcacaatca	agacgaagag	cagtcgactg	gccaaagcgg	tgtctgtcct	cggaactctc
841	tgcacagcct	tcctgacagg	cctcaaccgg	gtctctgagt	atcggaacca	ctgctcggac
901	gtgattgctg	gtttcatcct	gggcactgca	gtggccctgt	ttctgggaat	gtgtgtggtt
961	cataacttta	aaggaacgca	aggatctcct	tccaaacceca	agcctgagga	tccccgtgga
1021	gtacccttaa	tggctttccc	aaggatagaa	agccctctgg	aaaccttaag	
	tgcacagaat					
1081	cactctgegt	ccatgaccga	agttacctga	gacgactgat	gtgtcacaag	
	ctgtttttta					
1141	aaatcatctt	ccaattctat	acttcaaaac	acacagttgc	tcaatgtcaa	
	actgtgatga					
1201	caaataattac	gtttatctag	ttagaagcta	atgttttgta	cattttttgt	
	atgaggaagt					
1261	gatgtagctt	gccctgattt	TTTTTTTTT	ttttggtcag	ctttaatata	
	tttatgccag					
1321	aatttttaaaa	ccaacaaaat	tttcttgttc	aagcgtgcat	tgaagaacca	
	cattttattca					
1381	atggttgacg	ttgttttggt	atatttgtac	acaaattttc	ttttctcagt	
	tttataaaca					
1441	cagaagtaaa	tataacaatt	cacttttaac	ttttattacc	acagttgctg	
	cctcctccag					
1501	aatttttgaa	ttttaataaa	aggcaaacctt	ttgagctgca	ggaaggacaa	
	tgttggttaa					
1561	taataaatct	caaagtcaat	tgtagaaaaa	aaattgtctt	caaaaagaat	
	gttgcaactct					
1621	gatctcttaa	caaattgtta	cgttcaaagt	ttaaagtgat	atattaacaa	
	agtcacctag					
1681	ttatacaaac	aattgtcaga	gaattctgga	tttgagggtt	attggggtta	
	tatgattctt					
1741	tcttagataa	tggcctctac	taaataactc	aagatctttc	tggaatgtct	
	tctggcagge					
1801	aggtgccact	gtcagctttt	ctccaaaaag	cagccaacat	cagcctcccc	
	tgtcaactca					
1861	acagttttgt	atctcatatt	atatggactt	tatatgaaaa	tgaatatttt	
	acagtttgca					

10

20

30

40

【表 5 - 1 3】

```

1921  cagtattatt  ttacagaaaa  ggaatcagag  aatctacaac  atagggcccc
agaacaacag
1981  ttccactttg  tggtttttaa  ttattctaga  attttaactg  catctcattt
ttctagcatg
2041  gtgagaacta  atatgtaact  cctttgattg  aaggagctct  ttgtccgta
cctatcagaa
2101  tgtttttctg  acacttccat  gttggctctt  ctcagctttt  ttgtacata
tttttttttt
2161  ctaaagagaa  gaaaaagtta  tcacaaaatg  taaaaaaaga  aaaaaaaaaa  aaaaa

```

10

表 6 : 乳癌と P D / A D 間の E E C 重複 (解説については表 5 を参照)

【表 6 - 1】

遺伝子	EEC 機能	KEGG	ECND 参照文献
<i>ASTN2</i>	早期クラスリン依存性エンドサイトーシスの間の ASTN1 の輸送を制御する ; AP-2z に結合する	hsa04144	(Wilson PM, Fryer RH, et al. (2010) The Journal of Neuroscience 30 :8529-40; Solecki DJ (2012) Curr Opin Neurobiol 22 :791-8) BC (Kawauchi T (2012) Int J Mol Sci 13 :4564-90) AD (Wang KS, Tonarelli S, et al. (2015) J Neural Transm (Vienna) 122 :701-8) ID <i>ASTN1</i> : (Anazi S, Maddirevula S, et al. (2016) Mol Psychiatry) (Rainero E, Howe JD, et al. (2015) Cell Rep 10 :398-413; McCleverty CJ, Lin DC, et al. (2007) Protein Science : A Publication of the Protein Society 16 :1223-9; Burghel GJ, Lin W-Y, et al. (2013) PLoS One 8 :e83859) BC (Hall EH, Daugherty AE, et al. (2009) J Biol Chem 284 :34713-22)
<i>TNS1</i>	細胞の極性化、移動および浸潤を制御する エンドサイトーシスの間に α5β1 インテグリンに結合する		
<i>MEGF11</i>	<i>C. エレガンス (C. elegans)</i> において、DYN-1 (<i>DNMI</i>) は、CED-1 (<i>MEGF10/11</i>) の機能に依存する	hsa04144 hsa04721	CED-1: (Shen Q, He B, et al. (2013) Development 140 :3230-43)

20

30

40

【表 6 - 2】

遺伝子	EEC 機能	KEGG	ECND 参照文献
			AD <i>MEGF10</i> : (Sherva R, Tripodis Y, et al. (2014) <i>Alzheimers Dement</i> 10 :45-52; Singh TD, Park SY, et al. (2010) <i>FEBS Lett</i> 584 :3936-42)
<i>SDCBP2</i>	シンデカンは PI(4,5)P ₂ に結合し、エンドサイトーシスとエキソサイトーシスの両方に関与する。		(Baietti MF, Zhang Z, et al. (2012) <i>Nat Cell Biol</i> 14 :677-85; Hurley JH, Odorizzi G (2012) <i>Nat Cell Biol</i> 14 :654-5)
		BC	(Yang Y, Hong Q, et al. (2013) <i>Breast Cancer Res</i> 15 :R50)
			PD (Tomlinson PR, Zheng Y, et al. (2015) <i>Ann Clin Transl Neurol</i> 2 :353-61)
			AD (Leonova EI, Galzitskaya OV (2015) <i>Adv Exp Med Biol</i> 855 :241-58)
<i>N4BP3</i>	<u>NEDD4</u> は、成長因子受容体のエンドサイトーシスを制御する (<i>NEDD9</i> 発現は、BC 転移に関与する)	hsa04144	(Persaud A, Alberts P, et al. (2011) <i>EMBO J</i> 30 :3259-73; Jung S, Li C, et al. (2013) <i>Int J Oncol</i> 43 :1587-95)
		BC	(Jung S, Li C, et al. (2013) <i>Int J Oncol</i> 43 :1587-95; Minn AJ, Gupta GP, et al. (2005) <i>Nature</i> 436 :518-24; Liao CJ, Chi HC, et al. (2015) <i>Oncotarget</i> 6 :9341-54)
			PD (Perrett RM, Alexopoulou Z, et al. (2015) <i>Mol Cell Neurosci</i> 66 :21-8)
			AD (Rodrigues EM, Scudder SL, et al. (2016) <i>J Neurosci</i> 36 :1590-5; Salminen A, Kaarniranta K, et al. (2013) <i>Prog Neurobiol</i> 106-107 :33-54)
<i>SYNJ2</i>	初期クラスリン被覆凹部分にリクルートされる	hsa04070	BC PD (表 5) を参照のこと

10

20

30

40

【表 6 - 3】

遺伝子	EEC 機能	KEGG	ECND 参照文献	
<i>NLRP4</i>	および <i>NLRP3</i> は、小胞輸送を介在する PI3K 複合体の構成要素である、BECN1 と会合する		(Jounai N, Kobiyama K, et al. (2011) J Immunol 186 :1646-55; Zhang Y, Sauler M, et al. (2014) The Journal of Immunology 192 :5296-304; Rohatgi RA, Shaw LM (2016) Mol Cell Oncol 3) BC (Zhiyu W, Wang N, et al. (2016) Oncotarget 7 :50766) PD (Choubey V, Cagalinec M, et al. (2014) Autophagy 10 :1105-19; Wang JD, Cao YL, et al. (2015) Autophagy 11 :2057-73) AD (Antonell A, Llado A, et al. (2015) Mol Neurobiol ; Swaminathan G, Zhu W, et al. (2016) Autophagy 12 :2404-19)	10
<i>PTENP1</i>	PI3K/ <i>PTEN</i> および PI(3,4,5)P3 は、エンドサイトーシスと癌に関与する	hsa04070	(表 5) を参照のこと	20
<i>VAV3</i>	<i>VAV</i> ... BCR エンドサイトーシスを促進する	hsa04666	(Inabe K, Ishiai M, et al. (2002) J Exp Med 195 :189-200; Malhotra S, Kovats S, et al. (2009) The Journal of Biological Chemistry 284 :36202-12) BC (Chen XIN, Chen SI, et al. (2015) Oncology Letters 9 :2143-8) PD (Moran LB, Duke DC, et al. (2006) Neurogenetics 7 :1-11) AD (Wilkinson BL, Cramer PE, et al. (2012) Neurobiology of Aging 33 :197. e21-. e32)	30
<i>PDE4D*</i>	<i>ARRB2</i> に結合する (迅速リサイクル)	hsa04144	(Haddad SA, Ruiz-Narvaez EA, et al. (2016) Carcinogenesis) BC (Lin D-C, Xu L, et al. (2013) Proc Natl Acad Sci USA 110 :6109-14) PD (Yang L, Calingasan NY, et al. (2008) Exp Neurol 211 :311-4)	40

【表 6 - 4】

遺伝子	EEC 機能	KEGG	ECND 参照文献	
			AD (Gurney ME, D'Amato EC, et al. (2015) Neurotherapeutics 12 :49-56)	
<i>EEA1</i>	Rab5 および PI(3)P 依存性の様式で早期エンドソームに結合する	hsa04144	(Pfeffer SR (1999) Nat Cell Biol 1 :E145-E7)	10
			PD (Walter J, Fluhrer R, et al. (2001) J Biol Chem 276 :14634-41)	
			AD (Armstrong A, Mattsson N, et al. (2014) Neuromolecular Med 16 :150-60)	
<i>RAB32</i>	RAB32/RAB38 は、AP-3 および、 <u>LRRK2</u> (<i>PARK8</i>) と相互作用する	hsa05012	(Hesketh GG, Perez-Dorado I, et al. (2014) Dev Cell 29 :591-606; Waschbusch D, Michels H, et al. (2014) PLoS One 9 :e111632; Bultema JJ, Ambrosio AL, et al. (2012) J Biol Chem 287 :19550-63)	20
			BC (Agalliu I, San Luciano M, et al. (2015) JAMA Neurol 72 :58-65)	
			PD (Fukuda M (2016) Traffic 17 :709-19)	
			AD (Fukuda M (2016) Traffic 17 :709-19)	
<i>SNX32*</i>	ソーティングネキシン (Sorting Nexin) (後期エンドソーム)、他の Vps17 オルソログの SNX5/ <u>SNX6</u> を有する SNX-BAR レトロマーは、 <u>VPS35</u> と相互作用する。	hsa04144	(Wang X, Huang T, et al. (2014) Molecular Neurodegeneration 9 :1-9; van Weering JR, Verkade P, et al. (2012) Traffic 13 :94-107; Zhang QY, Tan MS, et al. (2015) Mol Neurobiol)	30
			BC (Rivera J, Megias D, et al. (2010) J Cell Biochem 111 :1464-72)	
			PD (Small SA, Petsko GA (2015) Nat Rev Neurosci 16 :126-32)	
			AD (Reitz C (2012) Future Neurol 7 :423-31)	
<i>SCARB2</i>	境界膜に位置するエンドソームおよびリソソームの維持に必要とされる	hsa04142	(Gonzalez A, Valeiras M, et al. (2014) Mol Genet Metab 111 :84-91)	40

【表 6 - 5】

遺伝子	KEGG EEC 機能	ECND 参照文献	
		BC (Nishimura Y, Yoshioka K, et al. (2006) Histochem Cell Biol 126 :627-38; Nishimura Y, Itoh K, et al. (2003) Pathol Oncol Res 9 :83-95)	
		PD (Alcalay RN, Levy OA, et al. (2016) NPJ Parkinsons Dis 2)	10
		AD (Shimizu E, Kawahara K, et al. (2008) J Immunol 181 :6503-13; Bras J, Guerreiro R, et al. (2014b) Hum Mol Genet 23 :6139-46)	
<i>GLB1</i>	ガレクチン 3(<i>LGALS3</i>)に関連したガラクトシダーゼベータ	(Ahmed H, AlSadek DM (2015) Clin Med Insights Oncol 9 :113-21)	
		BC (O'Reilly EA, Gubbins L, et al. (2015) BBA Clin 3 :257-75)	20
		PD (van Dijk KD, Persichetti E, et al. (2013) Mov Disord 28 :747-54)	
		AD (Tiribuzi R, Orlacchio A, et al. (2011) J Alzheimers Dis 24 :785-97)	
<i>RAPGEF4</i>	RAB1A/1B/2A に対する GEF;RIMS2 を介したエキソサイトosis に関与	(Parnell E, Palmer TM, et al. (2015) Trends Pharmacol Sci 36 :203-14; Almahariq M, Tsalkova T, et al. (2013) Mol Pharmacol 83 :122-8)	30
		BC (Jiang HL, Sun HF, et al. (2015) Oncotarget 6 :16352-65)	
		PD (Winslow AR, Chen CW, et al. (2010) J Cell Biol 190 :1023-37)	
		AD (Puthiyedth N, Riveros C, et al. (2016) PLoS One 11 :e0152342; Bereczki E, Francis PT, et al. (2016) Alzheimers Dement)	40

【表 6 - 6】

遺伝子	EEC 機能	KEGG	ECND 参照文献
<i>UNC13C</i>	互いに、および PI(4,5)P2		(Betz A, Okamoto M, et al. (1997) J Biol Chem 272 :2520-6; Martin TF (2015) Biochim Biophys Acta 1851 :785-93)
<i>STXBP1</i>	と相互作用する。エキソ	hsa04721	
<i>(MUNC18)</i>	サイトーシスにおけるドッキング/プライミングに 関与する		BC (Fernandez-Nogueira P, Bragado P, et al. (2016) Oncotarget 7 :5313-26) PD (Keogh MJ, Daud D, et al. (2015) Neurogenetics 16 :65-7; Campbell IM, Yatsenko SA, et al. (2012) Genet Med 14 :868-76) AD (Leonova EI, Galzitskaya OV (2015) Adv Exp Med Biol 855 :241-58; Miller JA, Woltjer RL, et al. (2013) Genome Med 5 :48; Takahashi M, Iseki E, et al. (2000) J Neurol Sci 172 :63-9; Law C, Schaan Profes M, et al. (2016) J Neurosci 36 :561-76)
<i>STXBP4*</i>	<i>STX4</i> と <i>VAMP2</i> の間の相互 作用を阻害する	hsa04130, hsa04721	(Zhang QY, Tan MS, et al. (2015) Mol Neurobiol) BC (Antoniou AC, Beesley J, et al. (2010) Cancer Res 70 :9742-54; Day P, Riggs KA, et al. (2011) Int J Oncol 39 :863-71) PD (Diao J, Burre J, et al. (2013) Elife 2 :e00592) AD (Russell CL, Semerdjieva S, et al. (2012) PLoS One 7 :e43201)
<i>ANXA4</i>	<i>SYT1</i> および <i>RAB3A</i> エフェクター <i>RPH3A</i> とのエキソサイトーシス複合体を形成する	hsa04721	(Lizarbe MA, Barrasa JI, et al. (2013) Int J Mol Sci 14 :2652-83; Willshaw A, Grant K, et al. (2004) FEBS Lett 559 :13-21)

10

20

30

40

【表 6 - 7】

遺伝子	EEC 機能	KEGG	ECND 参照文献	
			BC (Wei B, Guo C, et al. (2015) Clin Chim Acta 447 :72-8; Yao H, Sun C, et al. (2016) Front Biosci (Landmark Ed) 21 :949-57)	
			PD (Matigian N, Abrahamsen G, et al. (2010) Disease Models & Mechanisms 3 :785-98)	10
			AD (Kuzuya A, Zoltowska KM, et al. (2016) BMC Biol 14 :25; Tan MG, Lee C, et al. (2014) Neurochem Int 64 :29-36)	
			HD <i>SYT1</i> : (Valencia A, Sapp E, et al. (2013) Journal of Huntington's disease 2 :459-75)	
<i>SYT17</i>	「B/K タンパク質は、エキソサイトーシスにおいて役割を果たす可能性がある」		(Chin H, Choi SH, et al. (2006) Exp Mol Med 38 :144-52; Fukuda M (2013) Madame Curie 管理データベース[インターネット])	20
			BC (Weng L, Ziliak D, et al. (2013) Annals of Oncology)	
			AD (Gautam V, D'Avanzo C, et al. (2015) Mol Neurodegener 10 :31)	
<i>PARK2</i>	「パーキンの消失は、... CAV1 の蓄積によるエンドサイトーシスを促進する」; <i>PARK2</i> は、アレクチンを介して AP-2 に結合する	hsa04141	(Cha SH, Choi YR, et al. (2015) Mol Neurodegener 10 :63; Ahmed MR, Zhan X, et al. (2011) Biochemistry 50 :3749-63)	30
			BC (Wang H, Liu B, et al. (2009) J Pathol 218 :76-85)	
			PD (Feng DD, Cai W, et al. (2015) Transl Neurodegener 4 :20; Kitada T, Asakawa S, et al. (1998) Nature 392 :605-8)	40
			AD (Martin-Maestro P, Gargini R, et al. (2016) Hum Mol Genet 25 :792-806)	

【表 6－8】

遺伝子	EEC 機能	KEGG	ECND 参照文献
<i>DNAJC1</i> *	ER 膜タンパク質。 <i>DNAJC</i> (Hsp40)は、 <i>HSPA5</i> (BiP、 <i>GRP78</i>)を介したタンパク質放出を制御する; <i>DNAJC13</i> は SNX-BAR と相互作用する	hsa04141	BC (Michailidou K, Hall P, et al. (2013) Nat Genet 45 :353-61, 61e1-2; Chen C-L, Hou W-H, et al. (2009) Journal of Cell Science 122 :1863-71) PDDNAJC6/13: (Seaman M, Freeman CL (2014) Commun Integr Biol 7 :e29483; Vilarino-Guell C, Rajput A, et al. (2014) Hum Mol Genet 23 :1794-801) AD (Hsu WC, Wang HK, et al. (2008) J Neural Transm (Vienna) 115 :1537-43)

*:過去のGWASより。下線：文献中で特定された、機能的に関連した遺伝子。

10

20

30

40

50

実施例 3：リソソーム機能の加齢に関連した衰退と結び付けられたエンドサイトーシスの上昇は、加齢関連疾患における共通のエピスタシスなリスク因子である。

【0323】

エンドサイトーシスは、多くの加齢関連疾患の病因の公知の構成要素である。癌 (Moseson Y, Mills GB, et al. (2008) Nat Rev Cancer **8**:835-50)、アルツハイマー病 (Schreij AM, Fon EA, et al. (2015) Cell Mol Life Sci; Wang X, Huang T, et al. (2014) Molecular Neurodegeneration **9**:1-9; Kim S, Sato Y, et al. (2016) Mol Psychiatry **21**:707-16)、および PD (Rivero-Rios P, Gomez-Suaga P, et al. (2015) Biochem Soc Trans **43**:390-5)において、それぞれβ1-インテグリン (図14)、APP (図15) およびα-シヌクレイン (SNCA、図16) のエンドサイトーシスは、プラーク形成につながる病因の重要な早期ステップであることが知られている。「脱線したエンドサイトーシス」および「錯乱したエンドサイトーシス」という用語は、癌 (Moseson Y, Mills GB, et al. (2008) Nat Rev Cancer **8**:835-50)、アルツハイマー病 (Van Dooren T, Princen K, et al. (2014) Biomed Res Int **2014**:167024)、および他の「病的状態」 (Di Fiore PP, von Zastrow M (2014) Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **6**) の病因の重要な構成要素を特徴づけるために使用されている。「エンドサイトーシスに影響を与える遺伝子は、アルツハイマー病のリスク因子として過剰に象徴されており、エンドサイトーシス関連遺伝子は、アルツハイマー病において最も早く知られた疾患特異的なニューロン反応である。それらは、APPの余剰コピーに関連付けられる早発型アルツハイマー病の原因であるダウン症候群において早期に発現する (Kim S, Sato Y, et al. (2016) Mol Psychiatry **21**:707-16)

atry 21:707-16)。

【0324】

「新たな報告では、[パーキンソン病] および [アルツハイマー病] (Colacurcio DJ, Nixon RA (2016) Ageing Res Rev) のみならず、アテローム性動脈硬化症の形態も含む、細胞の加齢、寿命、ならびに成人発症型の神経変性疾患において、[液胞H⁺] - ATPase 活性の変化とリソソームのpHの制御異常が示唆されている。図15、図16、および図17を参照のこと。パーキンソン病において、「機能性エンドソームの加齢に関連した病的枯渇」は、同じ経路での確率論的な分子的欠陥に対する感受性を増大させる可能性があり、これが一部の個体では、悪循環を誘発し得る。[...] 疾患を引き起こす変異は、[エンドソーム] 経路内でクラスター化し、受容体リサイクルを変化させ、および/またはα-シヌクレイン分解を変化させる。次にα-シヌクレインの蓄積[...] は、エンドソームのソーティングまたは融合に関与する機序を損ない、エンドソームプロセスの欠陥を悪化させる。」(Perrett RM, Alexopoulou Z, et al. (2015) Mol Cell Neurosci 66:21-8)。アルツハイマー病において、「エンドサイトーシスの加速は、拡張した[LE] 内にエンドサイトーシスのカーゴを蓄積させ、リソソーム機能を損なう。[...] 病的なエンドサイトーシス[...] は、複数の可能性のある標的で、治療により調節され得る。」(Kim S, Sato Y, et al. (2016) Mol Psychiatry 21:707-16)。「[アルツハイマー病およびパーキンソン病] の根底にある分子メカニズムは未だあまり解明されていないが、エンドサイトーシスの膜輸送の機能障害が再び脚光を浴びており、これが神経変性プロセスを説明する可能性がある」(Schreij AM, Fon EA, et al. (2015) Cell Mol Life Sci)。

【0325】

過去のGWASでは、機能的に関連した遺伝子コレクションと、共通疾患の病因に関する新たな見識を特定できていなかったことを鑑みると、新たなGWAS法に基づく驚くべき結果(実施例1)は、乳癌のみならず、アルツハイマー病およびパーキンソン病(実施例2)における過去の結果と概して一致し、そしてとくにリソソーム機能に関与する遺伝子とも一致していた(リソソーム遺伝子リスク因子における重複について、図18Aおよび図18B)。

【0326】

エンドサイトーシスは、ウイルス感染でも重要な役割を果たし、関与していた。例えばB型肝炎ウイルス(HBV)は、「細胞プロセス、特にエンドサイトーシス機序をハイジャック」することが示されており(Schroeder B, McNiven MA (2014) Compr Physiol 4:1403-17)、そして「HBV」カプシド様コア粒子は、クラスリン介在エンドサイトーシスを通して内部移行される」(Cooper A, Shaul Y (2006) J Biol Chem 281:16563-9)。実際に、クラスリン介在性エンドサイトーシスを損なうウミフェノビル(Arbidol) (Pecheur EI, Borisevich V, et al. (2016) Journal of virology 90:3086-92)は、肝炎ウイルスに対する活性を含む広範なアンチウイルス活性を有している(Blaissing J, Polyak SJ, et al. (2014) Antiviral research 107:84-94) (図19)。

実施例4: βCDは、コレステロール依存性機序を通して、「脱線した」、「錯乱した」または「欠陥のある」エンドサイトーシスに対する効果を発揮する。

【0327】

本開示は、α-CDまたはHP-α-CD、ならびにそれらのアナログおよび誘導体を、限定されないが、神経発達疾患でも認められる「癌の特徴」(Mitra S, Cheng KW, et al. (2012) Biochem Soc Trans 40:1

404-8)である、「脱線したエンドサイトーシス」が関与する状態を含む加齢に関連した状態の治療に有用であり得る化合物の非限定的な例として提供するものである。(Rivero-Rios P, Gomez-Suaga P, et al. (2015) Biochem Soc Trans 43:390-5; Van Dooren T, Princen K, et al. (2014) Biomed Res Int 2014:167024)。本開示の一部の実施形態では、 α -CDは、例えば癌(限定されないが前立腺癌および乳癌を含む)および神経変性疾患(限定されないが、PDまたはADを含む)などの加齢に関連した状態の治療に使用される。CDは、その分布に直接干渉することなく、利用可能なPIPの量を減少させる。

【0328】

癌、ADおよびPDにおいて、多くの試験が、インビトロでの β CDの効果を調査している。

【0329】

癌:M- β -CDは、3種のH7ルイス肺癌細胞株、および多くの β 1インテグリンを有する高度に転移性の細胞株における浸潤活性を抑制した(Zhang Q, Furukawa K, et al. (2006) J Biol Chem 281:18145-55)。そして乳癌および前立腺癌の細胞株は、M- β -CD誘導型細胞死に対して、その正常型のカウンターパートよりも感受性が高かった(Li YC, Park MJ, et al. (2006) Am J Pathol 168:1107-18; quiz 404-5)。特に、M- β -CD治療は、乳癌抵抗性タンパク質(BCRP)の活性に大幅な減少(40%)を誘導した(Storch CH, Ehehalt R, et al. (2007) J Pharmacol Exp Ther 323:257-64)。BCRPは、PC(私を食べてシグナル)とPCアナログを輸送する(Daleke DL (2007) J Biol Chem 282:821-5)。その後の機能性試験において、M- β -CDは、MDA-MB-241およびZR751乳癌細胞のスフェロイド移動と浸潤を阻害し(Raghu H, Sodadasu PK, et al. (2010) BMC Cancer 10:647)、そしてMCF7乳癌細胞のエンドサイトーシス(Palaniyandi K, Pockaj BA, et al. (2012) Journal of cancer science & therapy 4:214-22)および移動(Guerra FS, Sampaio Lds, et al. (2016) Translational Medicine Communications 1:3)も阻害した。M- β -CDは、非浸潤性よりも浸潤性の尿路上皮癌細胞に対して毒性が高く(Resnik N, Repnik U, et al. (2015) PLoS One 10:e0137878)、HeLa細胞においてRTK-[PIP2]-PI3K-[PIP3]-AKTシグナル伝達に干渉し(Yamaguchi R, Perkins G, et al. (2015) FEBS Lett 589:4097-105)、そして白血病細胞株において増殖を阻害した(Yokoo M, Kubota Y, et al. (2015) PLoS One 10:e0141946)。

【0330】

AD:M- β -CDは、APPを担持する組み換えセムリキ森林熱ウイルス(SFV)に感染したラットの海馬ニューロンからのアミロイドベータの分泌を阻害し(Simons M, Kelller P, et al. (1998) Proc Natl Acad Sci U S A 95:6460-4)、非アミロジェニック(amylogenic)な α -セクレターゼ経路を促進し(Kojro E, Gimpl G, et al. (2001) Proc Natl Acad Sci U S A 98:5815-20)、そして β -セクレターゼの活性を低下させながら、 α -セクレターゼの活性を上昇させ、細胞関連APPs β のレベルを低下させた(図20)。「APPの内部移行を損なうことで、[...]、M β CDによる急性コレステロール枯渇後の α -セクレターゼ開裂を増加させる」(Cole SL, Grudzien A, et al. (2005) J Biol Chem 280:18755-70)。細胞膜コレステロールの蓄積

10

20

30

40

50

が、Swedish変異APP (SwN2a)を過剰発現するN2a細胞において検出された。膜コレステロールのレベルは、HP- α -CD処置により低下した。これによりSwN2a細胞中のA β 42のレベルが劇的に低下し、その効果は使用中止後、24時間持続した。(Yao J, Ho D, et al. (2012) J Exp Med 209:2501-13)

【0331】

PD: α -シヌクレインをトランスフェクトされたHeLa細胞において、 α -シヌクレインは、脂質ラフトと共局在することが示された。20mMのM- β -CDと1時間インキュベートすることで、この α -シヌクレインと細胞膜の共局在が劇的に低下した。(Fortin DL, Troyer MD, et al. (2004) J Neurosci 24:6715-23)。

10

【0332】

上述のインビトロでの試験結果の関連性は、いくつかのインビボ試験で確認された。

【0333】

Ca: M- β -CDは、他の細胞(腎細胞および肝細胞を除く)よりも腫瘍細胞で濃度が高く、乳癌のマウスモデルで有効であり(Grosse PY, Bressolle F, et al. (1998) Br J Cancer 78:1165-9)、H7-オリス肺癌細胞を移植されたマウスにおいて肺転移数を低下させ(Zhang Q, Furukawa K, et al. (2006) J Biol Chem 281:18145-55)、マウスにおいて原発性浸出液リンパ腫(PEL)の増殖を阻害した(Gotoh K, Kariya R, et al. (2014) Biochem Biophys Res Commun 455:285-9)。(M-) β -CDは、例えば肺癌マウスモデルにおいてクルクミンなどの抗腫瘍薬剤の有効性を増加させることが判明しており(Rocks N, Bekaert S, et al. (2012) Br J Cancer 107:1083-92)、化学的に誘導された腫瘍マウスモデルにおいてラロキシフェンの有効性を増加させることが判明している(Agardan NB, Degim Z, et al. (2015) AAPS PharmSciTech)。HP- β -CDは、腎細胞株を移植されたマウスの腫瘍退縮に対する3剤併用治療において必須であり(Yamaguchi R, Perkins G, et al. (2015) F EBS Lett 589:4097-105)、白血病マウスモデルにおいて生存期間を延長させた(Yokoo M, Kubota Y, et al. (2015) PLoS One 10:e0141946)。

20

30

【0334】

AD: コレステロールの排除、および/またはアミロイド- β または α -シヌクレインへの直接的な結合も、アルツハイマー病およびパーキンソン病における β -CDの作用機序であると考えられていた。「コレステロールおよびPLの両方のプールを減少させるHP β CD」は、クリアランス機序を強化することに[より]、トランスジェニックADモデルマウス[...]において神経保護的作用を有していた」。4か月間のHP β CDの皮下投与によって、Tg19959マウスにおいて空間学習と記憶障害が大幅に改善され、アミロイド- β プラーク沈着が減少し、そしてタウ免疫反応性変性神経突起(DN: dystrophic neurites)が減少した。Tg19959マウスは、ヒトアルツハイマー病と関連するアミロイド前駆タンパク質(APP)遺伝子中に2個の変異を有するトランスジェニックマウスであり、有益な効果はコレステロールの減少によるものであった(Yao J, Ho D, et al. (2012) J Exp Med 209:2501-13)。「ラットにおいて、A β 1-40/42の毒性は、海馬内への[β -CDの]定位的注入を介して減少した」(Jameson LP, Smith NW, et al. (2012) ACS Chem Neurosci 3:807-19)。

40

【0335】

PD: 「M β CDを用いてマウスを処置することで、神経細胞体およびシナプスにおけ

50

る α -シヌクレイン蓄積の減少がもたらされた」(Bar-On P, Rockenstein E, et al. (2006) J Neurochem 98:1032-45)。この「M β CDの転写効果の可能性」(Bar-On P, Rockenstein E, et al. (2006) J Neurochem 98:1032-45)は、生体外で、直接的な相互作用を介して β -CDが α -シヌクレインの凝集を阻害したことに関連していると考えられた。(Gautam S, Karmakar S, et al. (2014) Biochemistry 53:4081-3)。本開示の結果はむしろ、シクロデキストリンは、病因の共通構成要素としてエンドサイトーシスを制御することにより作用し、同じ加齢関連機序が、癌においてもシクロデキストリンにより制御されていることを提唱する。

10

臨床／疫学

【0336】

アテローム性動脈硬化症およびADは併発するが(Song Y, Stampfer MJ, et al. (2004) Ann Intern Med 141:137-47)、Framinghamのコホート分析でも、コレステロールレベルとADの間の関連性は見いだせていない(Tan ZS, Seshadri S, et al. (2003) Archives of internal medicine 163:1053-7)。HP- β -CDは、動物モデルの腫瘍に対して効果があり、大部分の末梢および中心臓器系で忍容性良好である(Cronin S, Lin A, et al. (2015) J Assoc Res Otolaryngol 16:599-611)。しかしマウス(Crumling MA, Liu L, et al. (2012) PLoS One 7:e53280)、ネコ(Ward S, O'Donnell P, et al. (2010) Pediatr Res 68:52-6; Vite CH, Bagel JH, et al. (2015) Sci Transl Med 7:276ra26)およびヒト(Maarup TJ, Chen AH, et al. (2015) Mol Genet Metab 116:75-9)において永続的な難聴を引き起こすリスクがあることが示されている。この耳毒性は、外有毛細胞のプレスチン(prestin)(SLC26A5)からコレステロールを枯渇させることが原因と考えられている(Takahashi S, Homma K, et al. (2016) Sci Rep 6:21973; Kamar RI, Organ-Darling LE, et al. (2012) Biophysical Journal 103:1627-36; Yamashita T, Hakizimana P, et al. (2015) PLoS Genet 11:e1005500)。

20

30

HP- β -CDのメカニズムはコレステロール非依存性である

【0337】

シクロデキストリンの直接的な作用は、膜および血清からの脂質(コレステロールおよびリン脂質)の抽出である。非経口適用した後、脂質は尿中に排泄される。NPCにおける β -CDのメカニズム、および乳癌を含む数種の癌で見られるコレステロールレベルの上昇から(Yokoo M, Kubota Y, et al. (2015) PLoS One 10:e0141946)、 β -CDは、コレステロールレベルを低下させることで癌の増殖を低下させると考えられている。アルツハイマー病において、HP- β -CDは、アミロイド- β とといった別の大型脂質の疎水性残基に作用すると考えられている。

40

【0338】

HP- β -CDは、上位の大型脂質に直接結合することではその作用を発揮しないという初期の証拠は、乳癌の発生に重要な役割を果たすエキソームに関する研究から浮上した(Lowry MC, Gallagher WM, et al. (2015) Clin Chem 61:1457-65; Peinado H, Lavotshkin S, et al. (2011) Semin Cancer Biol 21:139-46)。M- β -CDを用いてMDA-MB-231乳癌細胞を処置することで、インテグリンを

50

含有するエキソームの内部移行が阻害された (Hoshino A, Costa-Silva B, et al. (2015) Nature 527:329-35) が、コレステロール非依存性に作用した (Koumangoye RB, Sakwe AM, et al. (2011) PLoS One 6:e24234)。

【0339】

実際に、コレステロールは関与しないことの多くの証拠が提唱されている。CADおよびアルツハイマー病は併発するが (Song Y, Stampfer MJ, et al. (2004) Ann Intern Med 141:137-47)、Framinghamのコホート分析は、コレステロールレベルとアルツハイマー病の間の関連性を見出せなかった (Tan ZS, Seshadri S, et al. (2003) Archives of internal medicine 163:1053-7)。パーキンソン病において、 α -synのクリアランスに対するHP- β -CDの効果は、コレステロールに非依存性である (Kilpatrick K, Zeng Y, et al. (2015) PLoS One 10:e0120819) (図21)。

【0340】

近年の研究で、M- β -CDで治療された16名の嚢胞性線維症の患者と、9名の健常対照の気管支洗浄液 (BLF) におけるサーファクタントの表面活性が比較された。リソソーム脂質の過積載の結果として、肺胞マクロファージが拡張されていた。例えばアラキドン酸、オレイン酸、LPCおよびリゾホスファチン (lysophosphatic) 酸 (LPA) などのFFAの放出により、PC、LPCおよびFFAの加水分解産物が、サーファクタント機能を阻害したと結論付けられた。この機能障害は、コレステロールが相対的に存在しない場合であっても、M β CDにより逆転された (図28)。さらにM- β -CDは、これら産物の炎症作用を低下させた (Gunasekara L, Al-Saiedy M, et al. (2017) Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society; Strandvik B (2010) Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 83:121-9)。AAおよびLPCの共通した関与は、公知の併存疾患である線維症およびCADと一致している (Skolnik K, Levy RD, et al. (2016) Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society 15:e70-e1)。

【0341】

コレステロールが後期エンドソームとリソソームに蓄積することが認められるNPCであっても、その作用機序は不明確であり、分子標的は不明である (Dai S, Dulcey AE, et al. (2017) Autophagy 13:1435-51)。ただし、HP- β -CDは、コレステロールに対するNPC1およびNPC2の作用の機能に非依存性の様式で、機能発揮することが示されている (Liu B, Li H, et al. (2008) J Lipid Res 49:663-9)。さらに機序に関する研究から、コレステロールに適合するには小さすぎる α -CDでも、 β -CDの効果の一部が確認されることが示されている (Shvartsman DE, Gutman O, et al. (2006) Traffic 7:917-26)。Npc1aマウスにおいては例えば、HP- α -CDは、HP- β -CDほどではないが、コレステロール蓄積を効果的に低下させる (図22)。

【0342】

US 2015/0216895 A1 (McKew J, Zheng WEI, et al. (2014)) において、M- β -CDは、様々なLYD疾患に対し、最も効果的なシクロデキストリンであった (図23)。そして10 μ Mのデルタトキソフェロール (ビタミンE) との組み合わせが提唱され、これにより必要となる濃度が低下し、それに伴い耳毒性および腎毒性のリスクも低下した (リスクの消滅ではない)。 α -CD (お

よびH P- β -C D)は、M- β -C Dよりも効果が低い。一方で α -C D(コレステロールと適合できない)はH P- β -C D(コレステロールと適合できる)と似た効果があるという事実は認識されておらず、この事実からは、当該効果がコレステロールの排除によるものではない可能性が示唆される。

【0343】

本発明者らの驚くべき遺伝的結果は初めて、加齢関連疾患でみられる β -C Dの効果は、コレステロールに介在されるものではなく、リン脂質により介在されるものであるため、加齢関連の疾患、障害および状態の治療ならびに予防に対し、さらにはL Y D疾患の治療に対しても、毒性の高いH P- β -C DおよびM- β -C Dよりも毒性の低い α -C Dが好ましいことを提唱する。

実施例5：H P β C Dは、血清リン脂質の減少が関与する機序を介してオートファゴリソソームの形成を活性化する

【0344】

「リソソーム遺伝子における遺伝的多様性は、散発性A Dの疾患経過を改変する」(W h y t e L S, L a u A A, e t a l. (2017) J N e u r o c h e m 140:703-17)。オートファジーは、限定されないが、「根尖病変、歯周病および口腔カンジダ症」をはじめとするヒトの口腔疾患に関連付けられている。(T a n Y Q, Z h a n g J, e t a l. (2017) A u t o p h a g y 13:225-36)「A L Sの発症機序において[オートファジー]と他の細胞ストレスの間のクロストークが示唆されており、A L Sにおける[オートファジー]を制御する治療法が示唆される。」オートファジーの制御因子であるA T G 1 6 L 1は一貫して、炎症性大腸疾患(限定されないが、クローン病および潰瘍性大腸炎を含む)と関連している。(P u g a z h e n d h i S, B a s k a r a n K, e t a l. (2017) P L o S O n e 12:e0178291)。オートファジーは、「中枢神経系(C N S)の加齢および神経変性のコア制御因子として浮上し、局所貧血/脳卒中、アルツハイマー病、パーキンソン病およびハンチントン病ならびに多発性硬化症を含む[疾患に影響を与え]、[...]アポトーシス細胞、アミロイド β ベータ(A β)、シナプス物質およびミエリン残渣のミクログリアファゴサイトーシスを含み、加齢に関連した神経変性疾患の進行を制御する」(P l a z a - Z a b a l a A, S i e r r a - T o r r e V, e t a l. (2017) I n t J M o l S c i 18)。

【0345】

パーキンソン病(M o o r s T E, H o o z e m a n s J J, e t a l. (2017) M o l N e u r o d e g e n e r 12:11)、アルツハイマー病、ハンチントン病およびA L S(M o l o u d i z a r g a r i M, A s g h a r i M H, e t a l. (2017) A g e i n g R e s R e v 40:64-74)において、オートファジーの活性化は望ましいものと考えられている。しかし、利用可能な有効薬剤はまだない。「m T O Rは、重要な制御因子であることが示されているが、その詳細なメカニズムは充分には解明されていない」(C h e n Y, Y u L (2017) T r a f f i c 18:358-61)(図24)。

【0346】

転写因子E B (T F E B: t r a n s c r i p t i o n f a c t o r E B)は、C o o r d i n a t e d L y s o s o m a l E x p r e s s i o n a n d R e g u l a t i o n (C L E A R) ネットワークに属する遺伝子の発現、およびオートファジーに関与する遺伝子の発現を制御する。T F E Bの過剰発現は、ハンチントン病のラット細胞モデルにおいてハンチンチン凝集体の蓄積を減少させることが見いだされており(S e t t e m b r e C, D i M a l t a C, e t a l. (2011) S c i e n c e 332:1429-33)、さらにパーキンソン病のインビトロモデルおよびインビボモデルにおいて、リソソームレベルを回復させ、オートファジークリアランスを増加させることにより神経変性を低下させることも見いだされている(D e c r e s s a c M, M a t t s s o n B, e t a l. (2013) P r o c N a t l A c a d S c

i U S A 110: E1817-26; Dehay B, Bove J, et al. (2010) J Neurosci 30). ” (Kilpatrick K, Zeng Y, et al. (2015) PLoS One 10: e0120819)。

【0347】

HP- β -CDでHeLa/TFEB細胞を処置することで、オートファジー小胞形成に必須である微小管関連タンパク質の1A/1B-軽鎖3 (LC3)、カーゴ認識に必須のSQSTM1/p62、およびオートファゴソームの形成に必要なBECN1が上方制御された。後期小児神経セロイドリポフスチン症 (LINCL) の線維芽細胞はTPP1を欠いており、この細胞においてHP- β -CD処置を行うことで、用量依存性および時間依存性に、セロイド脂肪色素がクリアランスされた。HP- β -CD処置によって、検証されたすべての常染色体性 (LC3、SQSTM1、BECN1) リソソーム遺伝子 (GBA、HEXA、LAMP1) が、TFEBの活性化を介して転写が上方制御された。HP- β -CD処置によって、リソソーム生合成およびオートファジーの協調的な上方制御が生じ、そしてオートファジー系のTFEB誘導型活性化を介した、オートファジークリアランスが強化される。しかしオートファジーフラックスの下流工程の阻害 (例えばATG7発現の阻害) によって、セロイド脂肪色素のクリアランスが阻害される。HP- β -CDは、生存促進性のオートファジー経路を活性化するが、アポトーシスは活性化しない。オートファジーの機能障害または制御異常は、神経変性疾患から癌にわたる多くのヒト疾患の発症と進行に関連付けられている。不十分なオートファジークリアランスと、貯蔵物質の蓄積を特徴とする疾患の治療にHP- β -CDの使用が提唱されている。しかしHP- β -CDの作用機序はいまだ不明である (図25) (Song W, Wang F, et al. (2014) J Biol Chem 289: 10211-22)。

【0348】

「HPbCDは、TFEBの核転座、CLEARネットワークの上方制御、およびオートファジークリアランスの増加を誘導することが示されている」 (Song W, Wang F, et al. (2014) J Biol Chem 289: 10211-22)。特にHP- β -CDを用いた神経グリオーマ細胞におけるTFEBの活性化は、オートファジーを介した α -syn凝集体 (パーキンソン病) のクリアランスを促進した (Kilpatrick K, Zeng Y, et al. (2015) PLoS One 10: e0120819)。M- β -CDは、[インビトロおよびインビボで] α -synの蓄積も低下させた。 (Bar-On P, Rockenstein E, et al. (2006) J Neurochem 98: 1032-45)

【0349】

しかしオートファジーに対するM- β -CDおよびHP- β -CDの作用の根底にある分子メカニズムはそれぞれ、「解明されていない」 (Kilpatrick K, Zeng Y, et al. (2015) PLoS One 10: e0120819) または「いまだ解明する必要がある」 (Sardiello M (2016) Ann NY Acad Sci 1371: 3-14)。しかし、コレステロールを介した介在ではないことは判明している。「我々は、HPbCD-コレステロール封入複合体で処置された細胞におけるTFEBの活性化と α -syn凝集体の蓄積を検証した。... 共焦点顕微鏡... により、TFEBの核転座の程度 (図21A) [および] α -syn凝集体のクリアランス (図21B) の [両方とも] [が]、HPbCDがコレステロールを枯渇させる能力には依存しないことが明らかとなった」 (Kilpatrick K, Zeng Y, et al. (2015) PLoS One 10: e0120819)

【0350】

実施例1の驚くべき遺伝子の結果が、この回答を提示する。PIサイクルの機能に干渉するPI3K阻害剤 (図12) が、TFEBの核転座を促進することが既に知られている (Cheng J, Ohsaki Y, et al. (2006) Biochem Biophys Res Commun 351: 246-52)。HP- β -CDは、リン脂質を排除することで、PIサイクル全体の活性を低下させ、それによりPI3K阻害剤

(主にPI3K/mTOR/TFEB経路を介して作用する)よりも一貫した様式でTFEBの核転座を促進するが、PIサイクル内の不均衡は生じさせない(図26)。

【0351】

この新たな研究結果は、他の証拠でもサポートされる。ペオニフロリンは、シクロデキストリンの共通の作用機序である、血清脂質を低下させることで作用することが知られている(Yang HO, Ko WK, et al. (2004) *Fitoterapia* 75:45-9)。ペオニフロリンは、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)を有するマウスの疾患表現型を軽減させる。この疾患は、脊髄のオートファジーが減退している。ペオニフロリンは、LPC誘導型炎症の動物モデルにおける検証で有効であり(Li JZ, Wu JH, et al. (2013) *Int J Mol Med* 31:493-7)、NAFLD(Ma Z, Chu L, et al. (2017) *Sci Rep* 7:44819)、インスリン抵抗性(Ma Z, Liu H, et al. (2017) *Biomed Pharmacother* 90:361-7)およびアテローム性動脈硬化症(Li H, Jiao Y, et al. (2017) *Inflammation* 40:2042-51)のシクロデキストリンも同様であった。

10

実施例6：リソソーム機能障害と結びついたファゴサイトーシスの上昇は、多発性硬化症(MS)の病因における公知の構成要素である。

【0352】

1970年代のMSに関する初期の研究で、 β -グリコリダーゼ活性の上昇をはじめとする「リソソーム反応が上昇している」にもかかわらず、「リソソーム中のミエリン様物質」および「疾患グリア細胞による異常ミエリンの合成」が報告されており(Cuzner ML, Davison AN (1973) *J Neurol Sci* 19:29-36)、「疾患の基礎メカニズムとしてのグリア細胞の早期変化が示唆される」。「ウイルス感染のようないくつかの獲得外因性因子が、疾患および免疫病理を誘発する基盤的な原因である」と仮定された。(Riekkinen PJ, Rinne UK, et al. (1972) *Zeitschrift für Neurologie* 203:91-104)

20

【0353】

1977年に、N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ(MGEA4、HEXCとしても知られる)、 β -ガラクトシダーゼ(GLB1)およびカタプシンD(CTSD)の3種のリソソーム酵素が上方制御されており、プラーク領域で最も高い活性があることが判明した(McKeown SR, Allen IV (1977) *Biochem Soc Trans* 5:1416-8; (1979) *Neuropathol Appl Neurobiol* 5:405-15)。血清およびCSFにおける酵素レベルは、MSでは概して上昇していなかった(Hultberg B, Olsson JE (1978) *Acta Neurol Scand* 57:201-15; (1979) *Acta Neurol Scand* 59:23-30)。

30

【0354】

1980年に、「[マクロファージ]が刺激され、リソソーム酵素活性が上昇し、これはMS特異的抗原を原因とするTリンパ球刺激により始まったこと」が示唆された(Rastogi SC, Clausen J (1980) *Clin Exp Immunol* 42:50-6)。しかし「ミクログリアの構成要素」が関与しているらしいことを除き、そうした抗原は特定されなかった(Allen IV (1981) *Neuropathol Appl Neurobiol* 7:169-82)。

40

【0355】

1983年に、「2ステップの脱髄」仮説が提唱された：(1)毒素がミエリン内に侵入し、その分解によって抗原が生じる。(2)抗原活性化マクロファージが定着し、ミエリンを消化する(Schwytzer RU, Henzi H (1983) *Med Hypotheses* 12:129-42)。しかし毒素はいまだ捉えられていない(Tul

50

pule K, Dringen R (2013) Journal of Neurochemistry 127:7-21)。

【0356】

1996年にもまだ「プラーク発生の早期ステージにおける「活性化」マクロファージの源に関しては殆ど分かっていない。．．．MSの発症機序の理解における重要な課題は、ミエリン分解が可能で、脱髄発生時に自己抗原のT細胞への提示が可能な貪食細胞の信頼性のある特定である。[しかし]結果からは、脱髄の早期ステージにおいてファゴサイトーシスの主要な集団はミクログリアであることが示唆されている」(Li H, Cuzner ML, et al. (1996) Neuropathol Appl Neurobiol 22:207-15)

10

【0357】

リスク因子としてHLA-DRB1*15:01が確認されたことは別として、近年の7125症例の「メタ解析」(George MF, Briggs FB, et al. (2016) Neurology Genetics 2:e87)は、実行可能な見識を何も提供しなかった。

【0358】

ミクログリアは、マクロファージに「似たトランスクリプトームパターン」を有している。ミクログリアの機能は、「数時間にわたり、脳の全量をスキャンすること」である。ゆえに、ミクログリア機能の制御異常がCNS障害の原因であり、「制御異常状態のメカニズムを標的とすることで、ミクログリアが役割を果たしている神経発達障害および神経変性障害を停止または逆転させ得るのではないかと提唱されている」(Salter MW, Stevens B (2017) Nat Med 23:1018-27)。脳のスキャンプロセスの間に、ミクログリアは、基質を標的としてリソソーム分解するか、または病原体の場合には抗原提示のためにそれを処理する。「エンドサイトーシス、ソーティング、輸送、コンパートメント酸性化および分解．．．は、加齢とともに変化し得る」。(Sole-Domenech S, Cruz DL, et al. (2016) Ageing Res Rev 32:89-103)

20

【0359】

本発明は、アテローム性動脈硬化症とファブリー病における2つの近年の研究結果を、MSの病因に結び付けるものである。泡沫マクロファージは、ミエリン分解産物を含有しており、活性MS病変部位に豊富に存在する(Bogie JF, Jorissen W, et al. (2013) Acta Neuropathol Commun 1:43)。ファブリー病は、リソソームアルファガラクトシダーゼA (GLA) の欠損症であり、しばしばMSと誤診される(Germain DP (2010) Orphanet journal of rare diseases 5:30; Bottcher T, Rolfs A, et al. (2013) PLoS One 8:e71894)。そして両疾患とも、家族性の併発を呈する(Camarata G, Fatuzzo P, et al. (2015) Biomed Res Int 2015:504784)。アテローム性動脈硬化症(リソソームが処理できる以上のLDL摂取、図17)およびファブリー病(リソソームのガラクトシダーゼ活性が無い)において泡沫マクロファージを生じさせるメカニズムをさらに理解することで、「毒素」の性質が明白となる。実際に、このプロセスはミクログリアとともに開始される。(Riekkinen PJ, Rinne UK, et al. (1972) Zeitschrift fur Neurologie 203:91-104)。ミクログリアのリソソームが、脳全体のスキャンの間に貪食されたミエリンすべてを分解できないとき、分解されなかったミエリンは、「MS特異的抗原」として、ミクログリアから、抗原を待つT細胞へと偶然に提示されてしまう(Rastogi SC, Clausen J (1980) Clin Exp Immunol 42:50-6)。その後、T細胞は循環系に移動し、ミエリンを攻撃するマクロファージを活性化させる。活性化したマクロファージはCNSに戻り、そこで間違っ

30

40

50

【0360】

アルツハイマー病、パーキンソン病およびCADでもプロセスは同じであるため、解決法も同じである：加齢ミクログリアによりミエリンの貪食が減速することで、リソソームが「溢れる」ことが予防され、そしてミエリンが、「MS特異的抗原」としてマクロファージに提示されることが予防される。マクロファージによるミエリンのエンドサイトーシスが減速することでも、すべての「MS特異的抗原」が予防され得ない場合の、脱髄が減少する。

【0361】

共有リスク因子の裏付けとして、MSと血管性疾患は併発する。「疾患経過のいずれかポイントで2型糖尿病、高血圧、脂質異常症または末梢血管疾患が発症することは、身体障害の大きな進行と関連し得る。．．．しかし、MSにおける介入としてのスタチンに関する公表済みの臨床試験の結果は矛盾していた」(Tettey P, Simpson S, Jr., et al. (2014) J Neurol Sci 347:23-33)。

10

【0362】

M-β-CDによるCD30脱落の強化が、例えばMSおよびRAなどのTh1介在性疾患で示唆されている(von Tresckow B, Kalten KJ, et al. (2004) Journal of Immunology 172:4324-31)。

実施例7：薬剤標的としてのリン脂質

20

【0363】

本発明は、薬剤標的としてのPIサイクルに入るリン脂質を提供し(実施例1)、そしてアルツハイマー病、パーキンソン病およびCADのモデル、ならびに他のリソソーム機能疾患(限定されないが、NPCを含む)のヒトにおいて有効であることが示されている薬剤(β-CD)のより安全性が高い薬剤としてのα-CDを提供する。

【0364】

本明細書において提示される結果から、様々な患者全体でエンドサイトーシスに關与する遺伝子の組み合わせ数は多すぎて、選択されたホスファターゼもしくはキナーゼ(表5)、またはPIサイクルにより制御される遺伝子(表6)を標的化することによる「エンドサイトーシス標的化」の目的が実現される可能性は低いことが示される。上記で検討されるように、PIサイクルは、個々のキナーゼまたはホスファターゼの制御異常を代償するように設計されている。DGKQまたはPLDを標的とするsiRNA、ならびに数種の阻害剤(ウォルトマンニンを含む)ならびに「PIP1および／またはPIP2の細胞内レベル増加」を目的とした活性剤の使用による「PAのレベル減少」が、線形PI-PIP1-PIP2-PIP3モデルと、PAおよびホスホイノシチドに対するアミロイドーベータの作用に基づき提唱されている(Kim TW, Di Paolo G, et al. (2012) US 8 288 378)(米国特許第8, 288, 378号)。

30

【0365】

しかしPIサイクル全体の下方制御で、エンドサイトーシス低下の目的を実現し得る。PIサイクルへのPIとPCのエントリーに關与する遺伝子の広大さから、別の戦略がより効果的であるとして提唱されている。血清リン脂質の減少は、リガンド結合(PI(4, 5)P2)、凹部形成(PI(4)P)、小胞形成(PI(3, 4)P2)、早期エンドソームへの融合(PI(3)P)、およびリソソームを含む細胞小器官へのソーティング(PI(3, 5)P2)の間のエンドサイトーシスを制御することが知られているホスホイノシチドの細胞内濃度を低下させる。「エンドサイトーシス輸送に關与するシグナル伝達経路の活性化は、腫瘍の移動[およびパーキンソン病／アルツハイマー病における疾患進行]に重要である」。結果として、[．．．]エンドサイトーシス輸送とシグナル伝達を標的とすることで、転移を予防する新規癌治療剤[およびパーキンソン病とアルツハイマー病を予防する抗加齢治療剤]の開発が可能となり得る(Chew CL, Chen M, et al. (2016) Oncotarget 7:5-6)

40

50

【0366】

例えばFAK（インテグリン介在接着斑キナーゼ）が腫瘍において過剰発現および活性化されているが、変異は稀である（Alanko J, Ivaska J (2016) Trends Cell Biol 26:391-8）。FAK阻害剤は、腫瘍の増殖、転移および血管新生が低下することがマウス、ならびに限定されないが膀胱癌、肺癌、中皮腫および卵巣癌をはじめとする非血液癌に対する早期臨床試験において示されており、結果は混在している（clinicaltrials.gov）。インテグリンのエンドサイトーシスを制御することで、単独または免疫療法との併用で、FAKの活性を低下させる別の戦略が提供される（Symeonides SN, Anderston SM, et al. (2017) Journal for immunotherapy of cancer 5:17）。

実施例8：リン脂質の可溶化において、 β -CDよりも α -CDの有効性が高い。

【0367】

本開示の一部の実施形態では、 α -CDは、例えば癌（限定されないが前立腺癌および乳癌を含む）および神経変性疾患（限定されないが、パーキンソン病またはアルツハイマー病を含む）などの加齢に関連した状態の治療に使用される。シクロデキストリンは、その分布に直接干渉することなく、利用可能なホスホイノシチドの量を減少させる。

【0368】

（大型の β -CD、七糖分子）により大型コレステロール分子を排除するのではなく、エンドサイトーシスを制御するリン脂質を（ α -CD、六糖分子により）さらに特異的に排除することで、コレステロール介在性の耳毒性を含む副作用を回避する。（Cronin S, Lin A, et al. (2015) J Assoc Res Otolaryngol 16:599-611）。「リン脂質のアクリル鎖は、最も小さな α -CDの疎水性空洞に緊密に適合し、 β -CDおよび γ -CDの大きな内部空間には緩く適合する。一方でコレステロールの側鎖は、 β -CDの空洞に優先的に含有される」（Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62）。「シクロデキストリンは、 $\alpha > \beta \gg \gamma$ の有効性で、...リン脂質を部分的に除去した。コレステロール...は、 $[\beta$ -CD]により最も効果的に...抽出された。一方で、 $[\alpha$ -CD]の「効果」は、溶血濃度であってもごくわずかであった。（Ohtani Y, Irie T, et al. (1989) European Journal of Biochemistry 186:17-22）。「 β -CDも赤血球膜からタンパク質を除去する」（Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62）（図3）。

【0369】

10mMでは、 α -および β -シクロデキストリンは、それぞれ20%および80%までトランスフェリンエンドサイトーシスを低下させる。20%までの低下は、 α -シクロデキストリンは「何らかの顕著な効果」を有していないと解釈された（Rodal SK, Skretting G, et al. (1999) Molecular Biology of the Cell 10:961-74）。しかし本明細書において提示される結果から、これらの結果は、コレステロールの極端な95%の減少ではなく、リン脂質のより生理的な30%の低下と一致していることが示される（図3）（Ohtani Y, Irie T, et al. (1989) European Journal of Biochemistry 186:17-22）。さらに、10mMを超えて α -シクロデキストリンの濃度を増加させても、重要な機能を混乱させる可能性があるリン脂質の放出は増加しない。一方で、 β -シクロデキストリンの濃度増加は、大規模なタンパク質放出増加を生じさせる（図3）。ゆえに、 β -シクロデキストリンが利用可能なコレステロールを限定して重要な細胞機能に干渉するレベルと同レベルで、 α -シクロデキストリンは単に、制御性リン脂質を低下させてエンドサイトーシスを正常範囲にまで低下させている。（Ohtani Y, Irie T, et al. (1989) European Journal of Biochemistry 186:17-22）。

【0370】

「PIPは、平均余命が増加するにつれて多くなった例えば[アルツハイマー病]などの普遍的な[神経変性疾患]に[も]関与する(Waugh MG (2015) Biochim Biophys Acta 1851:1066-82)」。β-セクレターゼの膜アンカー型阻害剤は、APPのエンドサイトーシスを予防するための戦略として仮想されている(Rajendran L, Knolker H-J, et al. (2010) Nat Rev Drug Discov 9:29-42)。本明細書において提示される結果から、APPよりもニューレグリンに対するアフィニティが高いβ-セクレターゼの阻害に対する代替的手段としてのα-CDを介したPIレベルの減衰により、エンドサイトーシス全体の低下がもたらされる(図4)(Ben Halima S, Mishra S, et al. (2016) Cell Rep 14:2127-41)。

10

【0371】

シクロデキストリンは、静脈内および髄腔内にうまく適用されるため、様々な投与経路を使用して、グリア芽腫に対する骨および肺の転移、ならびに神経変性疾患を予防することができる。

【0372】

材料：α-、β-、およびγ-HP-CDの置換度は、それぞれ5.3、5.1および5.4であった。サンプル調製において、5% (w/w) NaOHを、シクロデキストリンとエポキシドの縮合反応における溶媒および触媒として使用した。放射性脂質は、NE N Research Products社(マサチューセッツ州ボストン)から購入し、非放射性脂質は、Sigma Chemical Company(ミズーリ州セントルイス)から購入した。(Irie T, Fukunaga K, et al. (1992) J Pharm Sci 81:524-8)

20

【0373】

方法：脂質測定は、臨床診断キット(Sigma and Wako Chemicals社、テキサス州ダラス)を用いて実施された。脂質の溶解度は、(リン酸緩衝等張生理食塩水pH7.4中；アルゴン雰囲気下の密閉管において)過剰量の放射性サンプルの懸濁液の短時間ソニケーションと、振とう(コレステロールについては、振とう時間は1週間。オレイン酸コレステロール、L-α-ジバルミトイルホスファチジルコリンおよびトリオレインについては振とう時間は3日であった)による平衡化の後に測定された。その後、懸濁液を膜フィルター(Millex; SLGS, 0.25; OS, 0.22 μm)を通してろ過し、ろ過物中の放射活性を液体シンチレーション計数により測定した。振とう時間が1日であった点と、リン脂質測定用の臨床キットを使用した点を除き、同じプロセスをスフィンゴミエリンに対して使用した。これらの方法は、緩衝液中の表面活性化合物の溶解度を、いくらか高い値で出す傾向がある。その理由は、空気緩衝インターフェースで形成される表面活性化合物の単層により、ろ過物が富化されているためである。しかしこれらの方法は、HP-CD溶液中の脂質の溶解度の測定に向いている。この事実は、上述のろ過方法で得られた結果と、溶解のエンドポイントが視覚的に決定される、HP-CD溶液を用いた脂質サンプルの滴定を使用する方法の結果を比較することにより確立された。同じ滴定方法を使用して、コレステロールとコステリルメチルエーテルが、HP-β-CD溶液中におよそ同じ程度まで溶解することを確認した(Irie T, Fukunaga K, et al. (1992) J Pharm Sci 81:524-8)。

30

40

【0374】

結果：5種の代表的な純脂質に対する、α-、β-およびγ-HP-シクロデキストリンの様々な効果を図32に示す。HP-β-CDは、コレステロールを優先的に可溶化し、一方でリン脂質は、HP-α-CDで最も可溶化された。

実施例9：様々なリソソーム蓄積性疾患の細胞株における、リソソーム機能障害の予防には、α-CDは、HP-β-CDと少なくとも同じくらい効果的である。

【0375】

50

実施例 9 の結果は、US 2015/0216895 A1、図 5、(McKew J, Zheng WEI, et al. (2014)) の結果と一致しており、「 $[\alpha\text{CD}、\beta\text{CD}$ および $\gamma\text{CD}]$ は、コレステロール蓄積を低下させ得ること、および MBCD $[\text{M}\beta\text{CD}]$ が最も強力であったこと」を見出した。特に著者らは、3 種すべての CD が、「NPC 細胞においてコレステロール蓄積を低下させ得たこと、 $[\text{および}]$ これら CD は細胞内 Ca^{2+} を増加させ、エキソサイトーシスを強化させた」ことを記載している。

【0376】

コレステロール蓄積性疾患に対する $\alpha\text{-CD}$ の効果は、 $\alpha\text{-CD}$ はコレステロールに適合せず、ゆえにコレステロール排除によるものではあり得ないことが、認識されていない。本発明者らの新たな遺伝子結果は、その効果は代わりにリン脂質により介在されること、ゆえに、リソソーム蓄積の低下において、なぜ約 6 mM の $\alpha\text{-CD}$ が、約 8 mM の $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ よりも効果が高かったのかを初めて説明するものである (図 23)。

【0377】

この結果はさらに、シクロデキストリンもコレステロールも、血液脳関門 (BBB) を通過できないにもかかわらず、なぜ静脈内 $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ が NPC において有効であるのかも説明する。この驚くべき試験結果は、 $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ の髄腔内使用と静脈内使用に関する現在の「戦い」を終わらせる可能性もある (Wadman M (2016) Science 354:18-9)。リン脂質は BBB を簡単に通過するため、 $\text{HP-}\alpha\text{-CD}$ の経口 (腸管から吸収される) 型は、髄腔内ポンプを移植する必要性、または腎臓の尿管中に細胞質結晶が形成されるのを防ぐために、数時間かけて静脈内点滴として $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ を投与する必要性のいずれも無くし得る (Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)。

実施例 10: $\alpha\text{-CD}$ は、徐放型アプリケーションにおいて、 $\beta\text{-CD}$ よりも腎毒性が低い。

【0378】

インビトロでのリン脂質プロファイルの差異 (実施例 8) にもかかわらず、インビボの結果は一般的に、 $\alpha\text{-CD}$ が少なくとも $\beta\text{-CD}$ と同じくらい腎毒性があることを示すと解釈される。

1. 「シクロデキストリンは、かなり毒性があることが判明し、高用量が 非経口 投与されると必ず腎臓にダメージが及ぶ (Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)」。 (Pitha J (1981) Life Sci 29:307-11)
2. 「Frank らの研究 [(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)] およびその他の研究 [(Perrin JH, Field FP, et al. (1978) Research communications in chemical pathology and pharmacology 19:373-6)] は、非改変のシクロデキストリンに関する腎毒性を示しており、これにより、... 非経口 経路に関する元のシクロデキストリンに対する詳細研究が限定されてしまった」 (Rajewski RA, Stella VJ (1996) J Pharm Sci 85:1142-69)。
3. 「初期の研究は、元のシクロデキストリンの腎毒性を示しており [(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)]、投与経路が、... 非経口 経路... に限定された。p147 (Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62) を参照のこと。
4. 「毒性試験も元の α -および β -[シクロデキストリン]... が、非経口 投与に適していないことを示している。... [(Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62)]」 (Del Valle EMM (2004) Process Biochemistry 39:1033-46)
5. 非経口 投与後の $\alpha\text{-CD}$ および $\beta\text{-CD}$ の腎毒性 [(Frank DW, Gray

JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)] .
... は、詳細に記載されている [(Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62) ; Thompson 1997 (レビューのみ) ; Gould and Scott 2005 (β -CDのみ)]] 。 (Stella VJ, He Q (2008) Toxicol Pathol 36:30-42) の 31 ページを参照のこと。

6. 「天然シクロデキストリンの 2 つ [α -および β -シクロデキストリン] は、腎毒性作用により非経口では安全ではないことが知られている [(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)]] (Bilensoy E, Hincal AA (2009) Expert Opin Drug Deliv 6:1161-73) 10

7 「非経口投与後の CD の毒性の特徴の 1 つは、腎毒性である... [(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)]] (Kantner I, Erben RG (2012) Toxicol Pathol 40:742-50)

8. 「非経口投与された場合、[天然シクロデキストリン] は腎毒性を引き起こす... [(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)]] (Liu B (2012) Clinical Lipidology 7:289-301) 20

9. 「溶解度が低い元の α -および β -CD を投与した後 [、] リソソーム中に目立つ微結晶が観察される [(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)]] (De Schaepdrijver L, Marien D, et al. (2015) Reproductive toxicology (Elmsford, NY) 56:87-96)

【0379】

これらの知見は、2017 European Medicines Agency report (Committee for Human Medicinal Products (CHMP) (2017) European Medicines Agency EMA/CHMP/333892/2013) に要約されている：

「 α -CD および β -CD の両方が、非経口投与後に腎毒性を示した... 200mg/kg/日を超えるシクロデキストリンは理論上、非経口的に投与された場合に軽度の腎毒性を生じさせ得る。」 30

【0380】

シクロデキストリンの腎毒性に関する文献レビューの驚くべき結果は、図 33、 α -CD と β -CD に毒性に関する臨床安全性に関する 2017 年の要約を含む上述に概略があるように、すべて同じ 1976 年公開文献のデータに基づいている (Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol 83:367-82)。この文献の要約は、「... α -および β -[シクロデキストリン] の腎毒性がみられる」と記載し、考察では：「高用量の [シクロデキストリン] の反復投与は、[用量依存性の様式で] 封入微結晶により歪められた多数の巨大な [近位尿細管] リソソームを生じさせ... [シクロデキストリン] のネフローゼは明白に不可逆的な損傷を呈し... [シクロデキストリン] ... のリポソーム内の濃度は、細胞に対し毒性の損傷を与える」、と記載している。注目すべきは、要約でも考察でも、結果で報告されているシクロデキストリン間の差異については言及していないことである。 40

【0381】

薬剤は非経口的に投与され、例えば静脈内 (単回注射) ボーラス (秒または分以内に) として全身濃度に到達することができ、または例えば静脈内 (反復注射または点滴)、皮下もしくは腹腔内投与で数時間かけて拡散されることができる。前者のタイプの非経口適用は、高いピークレベルをもたらす、後者のタイプの適用は、低く、長期的なレベルをもたらす。投与頻度増加の効果が記載されている：「[腎臓への] 過負荷... を回避する 50

1つの方法は、血中のシクロデキストリン濃度のスパイクを下げることであり、非経口的に適用されたシクロデキストリンの反復投与は、単回の累積投与よりも毒性が低かった（1976）Am J Pathol 83：367-82）。．．．蠕動ポンプを使用して、溶液をゆっくりと注射し、それにより「スパイク」は6～8時間に広がった。この技術を使用することで、1g/kgの投与量では動物に死をもたらず、対照と比較し、若い動物の成長にも影響を与えなかった。」（Pitha J, Szente L（1981）Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins 457-66）。ニーマンピック病の治療における（Hastings C（2010）FDA-Filing 2010）

10

【0382】

後者の結果と一致して、「ヒトにおいてシクロデキストリンに起因する腎損傷の症例はない」（Committee for Human Medicinal Products（CHMP）（2017）European Medicines Agency EMA/CHMP/333892/2013）。表3も参照のこと。

【0383】

公表されたデータ（Frank DW, Gray JE, et al.（1976）Am J Pathol 83：367-82）の再評価による驚くべき結果は、 α -CDおよび β -CDは、静脈内ボラス注射でのみ、1g/kgという類似したLD₅₀を有し、 α -CDは、毎日の皮下注射では β -CDよりも腎毒性が低かった。最大で7回の1g/kgの α -CDの毎日投与を受けた群では1匹のラットのみが死亡し（2日後）、一方で、低投与量の0.900g/kg/日の β -CDを投与された群では4日以内にすべてのラットが死亡した（表7を参照、 $p=0.0285$ ）。」

20

表7：ラットにおけるシクロデキストリンの毒性（Frank DW, Gray JE, et al.（1976）Am J Pathol 83：367-82に準じる）。

【表 7】

	α -CD [g/kg]	β -CD [g/kg]
静脈内単回投与 (LD ₅₀)	0.788/1.008 *	0.788/1.008 *
皮下単回投与		
ネフローゼ (光学顕微鏡)、0.100 変化なし	---	---
---	---	0.225 変化なし
---	---	0.450 変化なし
---	---	EM において期間依存性の変化
---	---	0.670 変化が認められた
1.000 変化が認められた	1.000 変化が認められた	1.000 変化が認められた
1、2、3、4 または 7 回の毎日の皮下投与		
ネフローゼ/死亡	0.100 ネフローゼなし	---
---	---	0.225 4 日後、1 匹でネフローゼ
---	---	0.450 重度のネフローゼ
1.000 全匹が重度のネフローゼ、	0.900 4 日以内に全匹が死亡	
1 匹が死亡 (2 日後)		

解説：

“---” 報告なし

“*” 文献は、どの薬剤がどのLD₅₀をもたらしたかについて不明瞭

【0384】

H P 基を付加することで、天然型 C D の毒性が低下することが知られている (表 8) 。ヒトにおいて、H P - β - C D は、最大 16 g までのボラス静脈内注射が承認されている (イトラコナゾールの賦形剤として) (100 mg / kg) 。12 g を 1 日 2 回、15 日間非経口投与した後、副作用は観察されなかった。S B E β - C D (V f e n d、P f i z e r 社、14 g 静脈内) の薬物動態は、H P - β - C D の薬物動態に非常に似ている (S t e l l a V J, H e Q (2008) T o x i c o l P a t h o l 36:30-42)

表 8：選択されたシクロデキストリンの薬理学的、および毒性学的特徴

10

20

30

【表 8】

	α -CD	HP- α -CD	β -CD	HP- β -CD
水における溶解度[g/l]	145 ¹⁾	>500 ²⁾	18.5	>600 ²⁾
ラットにおける経口吸収 ¹⁾	2-3%		1-2%	≤3%
ラットにおける静脈内投与後の半減期($t_{1/2}$)[分]25			20	20
1)				
静脈内投与後に変化なく尿中に排出	約 90%		約 90%	約 90%
溶血 IC ₅₀ [mM] ⁸⁾	16	>100		
全血 TD ₅₀ [mM/L] ⁹⁾	11	360	3.6	9
静脈内 毒性、毎日 1g/kg ⁴⁾	1 匹死亡@2		全匹死亡≤4兆候なし	
	日		日 ⁶⁾	
静脈内 毒性、500mg/kg			腎障害	障害なし
マウス/ラットにおける LD ₅₀ 静脈内/腹腔内0.5-1.0			0.8/1.0 ⁴⁾	10
[g/kg] ⁷⁾				
BBB 破綻[mM] ⁵⁾	1	2.5	2.5	2.5
BBB を通過する輸送 [%、2 時間] ⁵⁾	21.5 (0.5mM)	16.5	26.7 (1mM)	6.6 (1mM)
		(1mM)		

¹⁾(Brewster ME, Loftsson T (2007) Advanced Drug Delivery Reviews **59**:645-66) ²⁾(Loftsson T, Brewster ME (2010) J Pharm Pharmacol **62**:1607-21) ³⁾(Loftsson T, Moya-Ortega MD, et al. (2016) J Pharm Pharmacol **68**:544-55) ⁴⁾(Frank DW, Gray JE, et al. (1976) Am J Pathol **83**:367-82) ⁵⁾(Monnaert V, Tilloy S, et al. (2004) Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **310**:745-51) ⁶⁾(Gould S, Scott RC (2005) Food Chem Toxicol **43**:1451-9) ⁷⁾(Riebeck WM (1990a) TNO-CIV Institute **V90**; (1990b) TNO-CIV Institute **V90**; Prinsen MK (1991) TNO-CIV Institute **V91**) ⁸⁾(Roka E, Ujhelyi Z, et al. (2015) Molecules **20**:20269-85) ⁹⁾(Leroy-Lechat F, Wouessidjewe D, et al. (1994) International Journal of Pharmaceutics **101**:97-103) ¹⁰⁾(Frijlink HW, Eissens AC, et al. (1991) Pharm Res **8**:9-16) より。

【0385】

非近交系げっ歯類の4つの試験において(Riebeck 1990a/b/c、Prinsen 1991a、WHOの<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je10.htm>に引用される)、死亡動物および生存動物の顕微鏡検査では、「治療に関連した変化」(Riebeck 1990a/b/c)か、または単なる「淡い腎皮質」(Prinsen 1991a)なのかを明らかにされなかった。

実施例11： α -CDは、血液脳関門(BBB)の通過において、 β -CDよりも効果が高い。

【0386】

リン脂質は容易にBBBを通過することができるため、効果を発揮するために α -CDがBBBを通過する必要はないが、その有効性は増大する。公開されたデータでは、 α -CDは、インビトロでBBBの通過において β -CDよりも一貫して2倍効率的であるこ

とが示されている。2時間のインキュベーション後、16.5-43.0%（対して、6.6-26.7%）が、BBBを通過して輸送された（カフェインまたはニコチンの96%と比較）。Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 310（2）, 745-51を参照のこと。これらの結果は、 β CDの独立した試験で確認された（Binkowski-Machutt C, Hapiot F, et al.（2006）Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16:1784-7）。

【0387】

α -CDの毒性はより高かったが、HP- α -CD、 β -CD、 β -CDおよびHP- β -CDは同じように安全であった（表8：選択されたシクロデキストリンの薬物動態および毒性の特徴）。（Monnaert V, Tilloy S, et al.（2004）Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 310:745-51）

実施例12： α -CDは β -CDよりも安全で、インビトロにおいてヒト腫瘍細胞の移動阻害に効果が高い。

イントロダクション

【0388】

公開された結果から、 β -CDは、ヒトMDA-MB 231細胞の移動を阻害することが示されている（Guerra FS, Sampaio LDS, et al.（2016）Translational Medicine Communications 1:3）。この阻害は、 β -CDの、「コレステロールを枯渇させる」能力に起因した。しかし β -CDは、リン脂質も枯渇させる。移動阻害が、一般に推測されるように β -CDによるコレステロール枯渇に起因するかどうか、または本開示の結果に示唆されるように β -CDによるリン脂質枯渇に起因するかどうかを決定するために、MDA-MB 231（CRM-HTB-26、ER-）およびMCF-7（ATCC HTB-2、ER+）ヒト胸部上皮細胞株の両方において、創傷治癒実験を反復し、HP- β -CD（Sigma社、389145-5G）およびHP- α -CD（Sigma社、390690-5G）の両方と、対照を比較した。

方法

【0389】

24ウェルの培養プレート（Cytoselect CBA-120、0.9mm創傷治癒／溝閉鎖移動アッセイ）において24時間、創傷治癒インサートを適切に置いて細胞を培養した。次いで細胞を2時間、HP- β -CD、HP- α -CDまたは対照で処置した。

【0390】

プロトコール：0.9mm Cytoselect Wound Healing Insertsとともに24ウェルプレート（CBA-120、Cell BioLabs Inc.）を室温で10分間温める。滅菌鉗子を使用して、プレートウェル中で、所望のインサート数と、同じ方向に並べられた「創傷フィールド」の方向を合わせる。0.5～1.0x10⁶細胞/mlを、10%ウシ胎児血清（FBS）を含有する培地中に含有する細胞懸濁液を作製する。インサート上部の開放末端を通してピペットチップを注意深く挿入することで、各ウェルに500 μ Lの細胞懸濁液を加える。最適な細胞分散を得るために、インサート上部の開放末端の両側に、250 μ Lの細胞懸濁液を加える。12～24時間、細胞培養インキュベーター中で細胞をインキュベートする。注意深くインサートをウェルから取り出し、創傷治癒アッセイを開始する。滅菌鉗子を使用してインサートをつまみ、プレートウェルからゆっくりと持ち上げる。培地をウェルからゆっくりと吸引し、廃棄する。培地でウェルを洗浄し、死細胞と残渣を取り除く。最後に、培地をウェルに加えて、細胞を水和状態に維持する。ウェルにまだ残渣または非接着細胞がある場合には、洗浄を繰り返す。洗浄が完了したら、FBSおよび／または化合物を含む培地を加え、細胞培養と創傷治癒プロセスを継続する。細胞移動を阻害または刺激する剤をウェルに

直接添加してもよい。細胞培養インキュベーター中で細胞をインキュベートし（2時間）、その後、PBSで細胞を洗浄し、次いで化合物を含まない新しい培地を加える。12～24時間インキュベートし、その後洗浄して、固定する。固定溶液を取り除き、400 μ LのCell Stain Solutionを各ウェルに加える。細胞とともに室温で15分間、染色液をインキュベートする。溶液を吸引し、廃棄する。各染色ウェルを注意深く脱イオン水で3回洗浄する。洗浄液を廃棄し、細胞を室温で乾燥させる。創傷エリアに移動した細胞、または創傷境界から飛び出した細胞を可視化し、倒立顕微鏡の下で写真撮影する。規定の創傷エリアの表面積を決定する：総表面積＝0.9 mm x 長さ。創傷エリア内に細胞が移動した表面積を決定する：移動細胞表面積＝細胞移動の長さ（mm）x 2 x 長さ。閉鎖割合（%）＝移動細胞表面積／総表面積 x 100（図36を参照）。

10

【0391】

細胞系スクラッチアッセイ。24ウェルの培養プレート中、細胞を24時間、90～100%コンフルエンスになるまで培養した。200 μ lの黄色マイクロピペットチップにより、培養細胞の上にスクラッチされた創傷線が作製された。培養培地を取り除いた後、スクラッチされた細胞をPBSで洗浄した。2 mMのM β CDとともに2時間、細胞を培養し、培養培地を取り除いた後、細胞をさらに2、8、12または24時間培養した。すべての細胞系スクラッチアッセイは、10⁻⁵ Mの最終濃度の抗有糸分裂試薬のシトシンアラビノシド（Sigma社）の存在下で実施され、細胞増殖を阻害し、細胞移動のみを分析した。創傷エリアは、Axiovert 100 microscope（Carl Zeiss社、ドイツ）を用いて取得された画像から、Image J program（NIH、米国）により、各創傷エリアの溝から3つの異なる部位で測定された。3つの独立した実験が実施された。

20

【0392】

使用した他の方法は、（Guerra FS, Sampaio LdS, et al. (2016) Translational Medicine Communications 1:3; Okada SS, Kuo A, et al. (1995) J Pharmacol Exp Ther 273:948-54）に記載されており、それら各文献は参照によりその全体で本明細書に組み込まれる。

結果

【0393】

結果を図35に示す。シクロデキストリンの非存在下では、80%を超える創傷が閉鎖されている。シクロデキストリンの存在下では、創傷閉鎖は、リン脂質依存性の様式で阻害されている。コレステロール抽出は、創傷閉鎖を阻害したようには見えないが、副作用が生じることが示されている（耳毒性）。結果は高度に一致している：すべての場合で、移動は、HP- α -CDまたはHP- β -CDの濃度が高くなるにつれて減少した。HP- α -CDは、HP- β -CDよりも移動に対する効果が強かった（1 mMのHP- α -CDでの阻害は、2 mMのHP- β -CDでの阻害に勝っていた）。

30

考察

【0394】

ヒトの結果において、2種のヒト腫瘍癌細胞株から、細胞移動に対する β -CDの主な効果は、コレステロール排除によるのではなく、リン脂質排除によるという仮説が確認される。本開示は、癌、神経変性疾患および他の加齢関連状態における「脱線した」、「錯乱した」、および「欠陥のある」エンドサイトーシスが、PCをはじめとする糖リン脂質のPIサイクルへの過剰な流入を生じさせる遺伝的リスク因子に起因することを示す（図12）。 β -CDを用いた過去の研究は、コレステロールに関連した耳毒性のリスクが原因で臨床試験にまで進まなかった。コレステロール除去が回避され、 β -CDにおいてみられたリン脂質関連の効果が増加した後では、再び進展し得る。

40

【0395】

HP- β -CDの耳毒性のリスクを有さない（図34）ことに加えて、HP- α -CDは、HP- β -CDよりも毒性が低い（実施例10）。にもかかわらず概してリン脂質排

50

除の効果が約2倍高く、PC排除においてはさらに効果が高いMonnaert V, Tilly S, et al. (2004) Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 310:745-51)。NPCの小児において(表3)、最大1000mg/kg/日のHP-β-CDの投与量は忍容性良好であった。NPCの非経口治療において、700mg/kg/日のHP-β-CDは安全と証明されたため、最大700mg/kg/日のHP-β-CDの投与量を使用してヒト試験が継続されたが、β-CDがコレステロール関連の耳毒性があることが示されたときに中止された。

実施例13. ヒトMDA-MB-231乳癌細胞を移されたNSGマウスにおいて、HP-α-CDは、腫瘍の増殖、転移および炎症の低下においてHP-β-CDよりも効果が

10

高い。
イントロダクション: HP-β-CDは、乳癌(実施例4)の数種の動物モデルにおいて有効であることが示されているが、HP-β-CDに関するさらなる効果は、耳の外有毛細胞が必要とするコレステロールを枯渇させることで永続的な難聴を生じさせたと確認されたことで停止された。実施例1の遺伝的結果は、HP-β-CDがコレステロールではなくリン脂質の排除を介して作用すること、ゆえにコレステロールに適合するには小さすぎるが、リン脂質は排除するHP-α-CDが安全な代替物となるという新たな仮説を導いた。実施例12のインビトロの結果は、HP-α-CDが、HP-β-CDよりもインビトロで効果が高いことを示している。

20

方法: NSGマウス(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ、系統#005557(10週齢))を、Jackson Laboratories社(メイン州バーハーバー)から取得し、隔離区画で飼育し、オートクレーブ滅菌された水と食物を与えた。

【0396】

MDA-MB-231細胞株を取得し(ATCC)、液体窒素中で凍結保存した。培養開始時に細胞を溶解させ(37℃の水に1.5分)、5%FBS、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウムおよび0.02mM非必須アミノ酸を補充したDMEM/F-12に移した。細胞は60mmディッシュ中、数百万個まで増殖させ70~80%コンフルエンスとした。注射の前に、細胞をPBSで2回、次いでVersene(EDTA、Invitrogen社)で簡単にリンスし、過剰量のリン酸緩衝生理食塩水およびフェノールレッドを含まないマトリゲル基底膜抽出物とともに氷上に置き、約15mg/mLのマトリゲルの濃度とした。100μLの細胞混合液(20,000個の細胞または生理食塩水のみ)を、短時間のイソフルラン麻酔の下で、3番目または4番目の乳腺の乳管内に注入した。各々15匹のマウス群に、1週当たり800mg/kgのHP-α-CD、HP-β-CD(4日にわたり、月、火、木、金)または生理食塩水(対照)を6週間、IP注射した。原発腫瘍のサイズを毎週測定した。

30

【0397】

胸部組織を触診し、1mmの精密さで計る高精度分析デバイスを用いて週に2回測定した。デジタル計(0.1gの精密さ)で毎週マウスを体重測定した。

40

【0398】

試験期間の終了時にマウスをイソフルランで安楽死させ、1xリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、その後、4%ホルムアルデヒドのPBS溶液を用いた。肺および肝臓から組織を採取し、顕微鏡検査用にホルマリン固定した。組織をパラフィン包埋し、免疫組織化学法および組織染色(H&E)で切片作製することで転移を可視化し、計数して、抗HLA抗体で免疫染色した。BSA(5%、frac V)で1時間ブロッキングした後、抗HLAを4℃で一晩インキュベートし、PBSで1時間洗浄し、その後、ビオチニル化抗マウスIgGで1時間、室温でインキュベートした。PBSで洗浄した後、Envisio

50

n (Dakco社) を使用してスライド上で転移を検出した。

【0399】

血液採取の後、全血サンプルを遠心 ($10,000\text{ m/s}^2$ で15分間、その後 $100,000\text{ m/s}^2$ で10分間) し、血漿を単離させた。分析を行うまで -80°C でサンプルを保存した。

【0400】

分析の前に (30分)、サンプルおよびアッセイ試薬を室温まで平衡化させた。サンプルは1:4希釈で処理され、Luminex Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories社) でIL-1 β 、IL-18、IL-6、IL-8、IL-17AおよびGM-CSF (Bio-Plex Pro assays、Bio-Rad Laboratories社) の定量用のマルチプレックスマウスパネルを使用して二重で定量された。

結果：マウスは典型的な速度で成長し (図38A)、死亡したビヒクル群およびHP- β -CD群のそれぞれ2匹、およびHP- α -CD群の1匹のマウス (下部の「+」)。成長曲線最後の「+」) を除き、健康に見えた。ビヒクル群でより大きく成長した。これはより大きく腫瘍が増殖したため (図38B)、または消化管から吸収される脂肪量を減らすシクロデキストリンの公知の作用により低成長であったためであろう。シクロデキストリン群よりもビヒクル群で腫瘍増殖は速かった (525 mm^3 のメジアンまで) (図38B))。HP- β -CD (378 mm^3 、 $p=0.0258$) よりもHP- α -CD (356 mm^3) の効果が高かった。

【0401】

すべてのマウスが肺転移および/または肝臓転移を発症した (図39) が、ビヒクル群の1匹のマウス、HP- β -CD群の3匹のマウス、およびHP- α -CD群の5匹のマウスは肺転移を発症しなかった。多変量データのu-統計量 (Wittkowski KM, Lee E, et al. (2004) Stat Med 23:1579-92) により、両方のシクロデキストリンとも全体的な転移減少に有効であり ($P < 0.001$)、データは、HP- α -CDがより効果的であることと一致している ($P < 0.098$)。

すべての血漿サイトカインが、両方のシクロデキストリンでレベル低下を示したが、HP- β -CDでのIL17-Aは除く (図40)。慣習的な、0.5レベルで、HP- β -CDは、4つの他のマーカー (IL-8ではない) において有意であり、一方で、HP- α -CDは、IL-6のみで有意ではなかった。多変量データに対するu-統計量 (Wittkowski KM, Lee E, et al. (2004) Stat Med 23:1579-92) を介した、6つすべてのマーカーの包括的解析から、HP- α -CDが、HP- β -CDよりも効果が高いことが示される ($p(a:b) = 0.0417$)。

結論：インビボの結果から、HP- α -CDは、HP- β -CDよりも、乳癌腫瘍の増殖 (図38、 $P = 0.0258$) および転移 (図39、 $P = 0.098$) の予防において効果が高いというインビトロの結果 (実施例12) が裏付けられる。炎症も、癌の病因の構成要素として知られている。図40の驚くべき結果 (GM-CSF、IL-18、IL17-A、IL-4およびIL1-bの各々に対し、 $P < 0.02$) から、 α -CDは、炎症性COX-1、COX-2およびLOXの前駆体であるアラキドン酸をsPLA2が産生する活性を低下させることで炎症も低下させること、およびHP- α -CDは、コレステロールにその脂質担持能力の一部を費やさないことで、HP- β -CDよりも効果が高い、という仮説が裏付けられる。

実施例14. HP- α -CDは、ALSおよびHDのマウスモデルにおいて、疾患表現型

を減少させる。

【0402】

イントロダクション：アルツハイマー病およびパーキンソン病をはじめとする多くの神経変性疾患は高次認知機能に影響を与え、多くが未知の複雑な遺伝的リスク因子を含んでいる。ゆえに関連性の高い疾患病因の態様を呈することが知られている動物モデルは殆ど存在しない。アミロイドーベータ、タウおよびアルファシヌクレインの凝集は、アルツハイマー病およびパーキンソン病と関連性があるが、凝集体が原因なのか、それとも単なる結果なのかは未だ不明である。例えばアルツハイマー病では、アミロイドーベータの凝集低下を目的とした大部分の薬剤が失敗している。現在の治療は症状軽減をもたらすものであるが、疾患進行を止める、または減速させるための利用可能な治療法はない。

10

【0403】

実施例2に示される遺伝的結果は、転移および神経変性疾患における「脱線した」、「錯乱した」、および「欠陥のある」エンドサイトーシスの根底にある共通の遺伝的リスク因子に関する新たな洞察をもたらし、アルツハイマー病、パーキンソン病、ALSおよびハンチントン病で過去に観察された正常に機能しないオートファジー (Guo F, Liu X, et al. (2018) Brain Pathol 28:3-13) に関し、根底にある機序を説明する。

【0404】

最も普遍的な疾患型が「特発性」（遺伝的原因が未知）であり、ゆえに関連動物モデルを特定することが困難なアルツハイマー病およびパーキンソン病とは対照的に、ALSおよびハンチントン病の遺伝的リスク因子は良く解明されている。

20

【0405】

ハンチントン病は、HTT遺伝子のエクソン1が40超のCGA反復まで拡張することが原因である（変異型HTT、mHTT）。およそ120個のCAGリピートを有するトランスジェニックマウスは、mHTTとユビキチンタンパク質の両方を含有する神経細胞封入体を発現する。マウスは、単一遺伝子性疾患に典型的な、ヒトハンチントン病を厳密に模倣する進行性の運動障害と体重減少をはじめとする神経的表現型を呈する。

【0406】

SOD1変異は家族性ALSの10~20%、散発性ALSの1~2%を占めるため、SOD1凝集体はこれらの患者において日常的に発見され、SOD1-ALS患者は、低レベルのオートファジー転写因子TFEBを有する。sod1変異を有するマウスは、ヒトALSを高度に似せたマウスモデルである。SOD1はまた、パーキンソン病、アルツハイマー病およびダウン症候群とも関連している。FUS (fused in sarcoma) は、ハンチントン病において罹患したニューロン中の主要タンパク質凝集体であり、ALSとも関連している。

30

【0407】

神経変性疾患の間の併発状態、オートファジーに関連した病変および遺伝的重複を考慮し、ハンチントン病およびALSのマウスモデルを使用して、神経変性（および他のオートファジー関連）疾患に対する、HP- α -CDの活性を評価する。

【0408】

方法：ALSマウスのSOD1 G93A系統 (B6SJL-Tg (SOD1*G93A) 1Gur/J系統#002726、10週齢、およびHTTマウス (B6CBA-Tg (HDexon1) 62Gpb/3J；系統#006494HTT:R6/2、8週齢) は、Jackson Laboratories社 (メイン州バーハーバー) から取得し、周囲条件が制御された標準的な飼育方法で飼育され、不断給餌された。

40

【0409】

結果：8週齢のHTTマウスでは、HP- α -CDを用いた治療で、5週にわたり体重減少が低下した (9週齢7日目から開始、 $P(T*D) < .0001$)。メスマウス ($P(T*D|M) = .0394$) よりもオスマウス ($P(T*D|M) < .0001$) で、効果は著しかった。

50

【0410】

未処置のSOD1マウスは観察から21日目以降(11週齢)で体重が減少し始め、一方でHP- α -CDで処置されたマウスは、少なくともさらに2週間成長し続けた。両方の性別で似た効果が認められた(図42、 $p < .0001$)。

【0411】

結論：転移、神経変性および他の加齢関連の疾患ならびに状態の公知の併発状態と一致して、これらの結果から、HP- α -CDは、HP- β -CDよりも効果が高いことが示されている癌(実施例13)のみならず、限定されないが、ハンチントン病およびALS、さらにこれら疾患の延長線上で考えると、パーキンソン病およびアルツハイマー病、ならびにHP- β -CDが動物モデルで有効であることが示されている他の疾患を含む神経変性疾患でも有効であることの証拠が提供される。

10

実施例15：経口薬剤としてのHP α CDとカプリン酸ナトリウム(C-10)のクラスレートは、尿中にリン脂質を抽出し、そうすることで、それら成分の混合物よりも有効性が高い。

【0412】

経口 β -CDは、哺乳動物では滅多に吸収されない(約1%)。小さな α -CDでは、1.6%(Van Ommen B, De Bie AT, et al. (2004) Regul Toxicol Pharmacol 39 Suppl 1:57-66) および2.0%(Irie T, Uekama K (1997) J Pharm Sci 86:147-62)が、経口投与後6~8時間以内に尿中に排出される。ラットでは、経口投与された β -CD単独の1%の代わりに、トリグリセリドを含有する座薬(Witepsol H5)中で直腸内投与されたときに、最大5%の β -CDが直腸から吸収された。直腸吸収は、 β -CDがより水溶性のHP- β -CDに置き換えられたときに、5%から26%に増加した。(Duchene D, Wouessidjewe D (1990) Drug Dev Ind Pharm 16:2487-99)。経口HP- α -CDの吸収は研究されていない。

20

【0413】

背景：LDL受容体ノックアウトマウスに「Western diet (21%乳脂肪)」を与えた公表結果において、「2.1%の「非吸収性」 α -CD(食品脂肪含有量の10%)」を加えたところ、血漿リン脂質が17.5%まで低下したことが示されている(Wagner EM, Jen KL, et al. (2008) Metabolism 57:1046-51)。しかしその作用機序は特定されていない。上記の遺伝的およびインビトロの結果から、確認された血漿リン脂質の低下は、消化管における「脂肪吸収の飽和」が原因ではなく(またはこれだけが原因ではなく)、著者らにより推測されているように、乳脂肪酸の存在下で消化管から吸収された α -CDによるリン脂質の排除を介した「糞便中への排泄」も原因であった。乳脂肪酸の役割は、離乳前のラットにおけるHP- β -CDの高い吸収と一致している(De Schaepdrijver L, Marien D, et al. (2015) Reproductive toxicology (Elmsford, NY) 56:87-96)。

30

40

【0414】

シクロデキストリンは吸収強化剤として広く使用されている(Shaikh I, Derle ND, et al. (2012) J Appl Pharmacol Sci 2:34-9)。一方で、本開示は、活性成分としてシクロデキストリン、およびシクロデキストリンの吸収強化剤としてカプリン酸ナトリウムを利用した。特に、小さな α -CDを利用し、 β -CDの吸収を強化することが過去に示されているHP誘導体化を適用し、消化管送達のための効率的な吸収強化剤としてトリグリセリドの脂肪酸成分のナトリウム塩を使用する(Yoshitomi H, Nishihata T, et al. (1987) J Pharm Pharmacol 39:887-91)。この新たな仮説は、ヒトPK/PD試験において検証された。

50

【0415】

試験デザイン：無作為化 n-o-f-1 投与量漸増試験を実施して、HP- α -CD とカプリン酸ナトリウム（C-10 脂肪酸、カプリン酸、デカン酸）のクラスレートの、血清から尿中へのリン脂質の抽出における活性を評価した。カプリン酸は、Ca-co-2 単層中のタイトジャンクションの傍細胞透過性を制御すること、およびラットとヒトの腸管セグメントにおいてラウリン酸（C12）またはカプリル酸（C8）よりも効果が高いことが知られていることから選択された。

【0416】

方法：尿サンプル（5～10 mL）を培養管へとピペティングし、その後30分間凍結させた。次いでサンプルを48～72時間、凍結乾燥させ、密封して-80℃で保存した。リン脂質はクロロホルム（CHCl₃）およびメタノール（3：1）で再構成した後尿サンプルから抽出され、ガラスウールを通してろ過された。溶出物は、0.01%のアジ化ナトリウムを含む1MのKClで洗浄された。洗浄液を3000gで30分間遠心分離し、CHCl₃層を新しい管に移して、窒素雰囲気下、60℃で蒸発させた。リン脂質抽出物と標準物を、0.16 Ca(NO₃)₂ および30% H₂O₂を含む10M H₂SO₄中で消化させ、180℃で25分間加熱した。サンプルを冷却し、H₂O/(NH₄)₆Mo₇O₂₄ および0.65% (N₂H₅)HSO₄を用いて平衡化させた。これらをボルテックスし、30分間、35℃で加熱した。すべてのサンプルは三重で分析された。

【0417】

リン酸塩含有量は、Molecular Dynamics Lambda 5 分析器を使用し、lambda-820で測定された。タンデムなUV-vis 波長検出器（203 nm）を備えたWaters（マサチューセッツ州ミルフォード）高速クロマトグラフィーシステムを尿分析と、対象分子の分離強化に採用した。これとBeckman Ultra S1カラムを結び付け、RT、1.0 mL/分の流速で、アセトニトリル-メタノール-リン酸溶媒（100：10：1.8）の移動相に沿った定組成溶離を使用した。凍結乾燥サンプルをヘキサノープロパノールフェノールフタレインミックス（3：1：0.1）中に再懸濁し、注入した。

【0418】

テクニカル対照を製剤化し、同じ再懸濁緩衝液中、0.125 mg ホスファチジルコリン（PC）および0.6 g HP- α -CDの最終量で注入した。標準曲線（図43）は、.65～32 μ Mリン酸塩等価の範囲でDiPalmitoyl-PCを使用して作製した。単離効率の百分率は、量が判明している合成PLでスパイクされた正常な尿からの総リン酸塩の抽出物回収の比較を介して決定され、並行してPLサンプルが消化され、抽出無しでアッセイされた。

【0419】

本開示は、経口投与されたHP- α -CDの吸収強化に対する、様々な戦略の吸収と活性に関する驚くべき結果を報告する。図44に示される結果から、悪性、神経変性、血管性、代謝性、炎症性、自己免疫性、肺性、線維性、肝臓性、リソソーム蓄積性もしくはウイルス性の疾患、障害または状態においてエンドサイトーシスを低下させる、新規で進歩性のある薬理化合物であるHP- α -CD/カプリン酸ナトリウムのクラスレートが、臨床的に意義のある量で血清ホスファチジルコリンを低下させ得る介入を提供することが裏付けられる。特に図44に提示される結果は、以下の試験結果を示す：第一に、 α -CDを用いた過去の実験結果が、HP- α -CDにも適用されることが裏付けられる：

【0420】

ヒトの成人において、経口HP- α -CDは、吸収されない（治療有効量で）。検証された混合物および/またはクラスレートの中で、HP- α -CDは、HP- α -CDの分画2（「 α CD」とラベリング）におけるメジアン値が、分画1よりも低い唯一の製剤であった。

【0421】

天然型HP- α -CDが吸収されず、それゆえ活性でもないことが確認された後で、図44に提示される結果は、いくつかの予想外で驚くべき試験結果を示している：

【0422】

提唱される経口HP- α -CD／カプリン酸のクラスレートは、ヒトの成人で吸収される最初の経口シクロデキストリンである。天然型HP- α -CD（HPaCD）とは対照的に、クラスレート（HPaCD／FA、HPaCD／FA&PE）の経口投与後、8時間で、尿中に多量のHP- α -CDが、分子量1180のHP- α -CDに対して予測される分画で存在していた（任意の吸収単位スケールで約2まで増加）（Sigma-Aldrich社、390690）（HPaCD：HPaCD／FA、分画2：P_{u-test} = 0.0079）。

10

【0423】

HP- α -CDの吸収の増加は、PCの排出の増加と相関する。天然型HP- α -CDを超える尿中へのPCの排出増加（P = 0.0367）は、製剤とは独立している（P = 0.4523）が、しかし製剤がHP- α -CD吸収で異なっているため、低吸収の製剤（HPaCD&FA、HPaCD&PE）に対しては低くなり、高吸収の製剤（HPaCD／FA、HPaCD／FA&PE）に対しては高くなる。

【0424】

クラスレートは、混合物よりも効果が高い。血清中に非常に低濃度で存在する単体リン脂質の治療有効量を抽出するためには、混合物（HPaCD&FA）を用いるよりも、クラスレート（HPaCD／FA）を用いたほうが、実質的に多くのPCが抽出される（分（分画5 | HPaCD／FA） = 5.78、最大（分画5 | HPaCD&FA） = 5.75、P_{u-test} = 0.0079）。

20

【0425】

過去に提唱されたFA含有油性懸濁液は、FA単独よりも効果が高くない。クラスレートと、同量のHP- α -CDとC-10および追加の浸透強化剤を含有する油性懸濁液（Tuvia S, Pelled D, et al. (2014) Pharmaceutical Research 31:2010-21）（HPaCD&PE）の摂取の比較からは、脂肪酸とHP- α -CDの混合物（HPaCD&FA）を超える利益は示されなかった。クラスレート（HPaCD／FA&PE）の懸濁液は、クラスレート単独（HPaCD／FA）を超える利益を示さなかった。

30

【0426】

クラスレートは、リゾリン脂質を抽出しない。アルファシクロデキストリンは、リゾリン脂質を含む広範な脂質を排除すると普遍的に考えられている。HPaCDの分画9と10（LPCとラベリング）の平均メジアン値は、すべての他の群よりも高い。この予想外の驚くべき結果は、広範にわたる影響を与える（以下の実施例16を参照のこと）。

実施例16：PAおよびLPLを超える、選択されるPCに対するHPaCD／カプリン酸ナトリウムクラスレートの選択性は、抗炎症剤（NSAIDs）と匹敵する効果を発揮する。

【0427】

sPLA2の炎症活性は、MSの患者の大部分で、活性または安定、治療内容にかかわらず進行する。ラットにおいて、EAEの症状は、sPLA2の阻害で減弱化された。（Cunningham TJ, Yao L, et al. (2006) J Neuroinflammation 3:26）。sPLA2活性の上昇は、アルツハイマー病患者の脳脊髄液で観察されており（Chalbot S, Zetterberg H, et al. (2011) J Alzheimers Dis 25:505-15）、BBB透過性の増加のマーカーとして役立つ可能性がある（Chalbot S, Zetterberg H, et al. (2011) J Alzheimers Dis 25:505-15）。アルツハイマー病ADと軽度認知障害を有する患者は、異常なPLA2活性を有していた（Klavins K, Koal T, et al. (2015) Alz

40

50

heimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands) 1:295-302)。

【0428】

(図43Aおよび43B:) 血清リン脂質PC (mW 780Da) の排出は、予測されるように、クラスレートにより大幅に増加する。しかし予想外なことに、PA (675) およびSM (650) は低下せず、リゾリン脂質 (460~550) も低下しない。

【0429】

クラスレートのPCに対する予想外の高い特異性は、このクラスレートがPIサイクルの活性を低下させるだけでなく、炎症も低下させることを示唆する。その理由は、PCはsPLA2によりLPC (ATXによりLPAへと形質転換される) および炎症促進性アラキドン酸 (AA) へと分割されるからである。図37。「リゾPCは、血漿分泌型PLA2酵素 (sPLA2s) の非競合的生成物阻害剤として作用する」ことがよく知られている」。(Cunningham TJ, Yao L, et al. (2008) Journal of inflammation (London, England) 5:17) ゆえにPCではなく、主にリゾリン脂質 (LPC、LPA) を排除することで、sPLA2が活性化され、炎症が増加するはずである (図47)。代わりにPCのみを排除することでLPC/PC比率が増加し、sPLA2活性は低下する。そしてその基質の利用効率が低下する間はsPLA2の阻害が維持される。

【0430】

sPLA2-IIaは、HER2とHER3を活性化し、肺癌、乳癌、膵癌、皮膚癌、肝臓癌および前立腺癌で過剰発現されている (Dong Z, Meller J, et al. (2014) Int J Oncol 45:978-84)。そしてMCF7ヒトBC癌細胞においてEGFRを活性化し (Hernandez M, Martin R, et al. (2010) Neuro-oncology 12:1014-23)、転移マーカーである。

【0431】

「研究者らは、PLA2sが、下流酵素のシクロオキシゲナーゼおよびリポキシゲナーゼよりも優れた治療標的となり得るかを「いまだ」検討している」(Yarlan S, Bishayee A, et al. (2016) Curr Drug Targets 17:1940-62)。ヒトPLA2sは、エイコサン合成、マクロファージによるファゴサイトーシス、気道過敏性、炎症、腫瘍形成 (V) およびアレルギー誘導性喘息、心筋虚血/再灌流障害、AA代謝、炎症性腫瘍形成、アテローム性動脈硬化症 (X) に関与している。(Yarlan S, Bishayee A, et al. (2016) Curr Drug Targets 17:1940-62)

【0432】

炎症性アラキドン酸の予想外の低下は、コルチコステロイド (sPLA2阻害)、NSAIDs (COX阻害) および喘息薬 (LOXおよびロイコトリエン阻害) と類似した効果を発揮する。図6を参照のこと。ゆえに α -CDは、次の「ベビーアスピリン」となり得るはずである。

【0433】

PLA2sの最も良く知られた機能は、PC、PEおよびPSをはじめとするリン脂質の加水分解である。(Mallat Z, Lambeau G, et al. (2010) Circulation 122:2183-200)。sPLA2はリン脂質に作用するのみならず、インテグリン (avb3、a4b1およびa5b1) も活性化し (Sagusa J, Akakura N, et al. (2008) J Biol Chem 283:26107-15; Fujita M, Zhu K, et al. (2015) J Biol Chem 290:259-71)、血管新生を阻害する。ゆえに、有効性の欠如と、有害可能性のために、汎sPLA2阻害剤であるバレスプラジブ (varespladib) の最初の第III相試験 (NCT01130246) が終了したこと (Nicholls SJ, Kastelein JJ, et al. (2014) J

10

20

30

40

50

AMA 311:252-62)は、いくつかのsPLA2を含む他の経路の混乱、または他の経路に対する未知のバレスプラジブの効果により生じたのであろう。ゆえに「飢餓模倣体」としての α -CDの利点の1つは、ヒトは、ホスファチジルコリン（卵黄または大豆レシチン）をはじめとする栄養素の欠乏に耐えるよう進化してきたという事実にある。

実施例17：ホスファチジルコリン（PC、レシチン）を用いた治療は、アルツハイマー病を悪化させる可能性がある

【0434】

血中のPCレベルの低下は、インビボで神経変性疾患を改善するという予想外の発見は、Sandoz Clinical Assessment—高齢者のスコアは、食事にPCが補充されていたアルツハイマー病の患者において、さらに悪化していることを示す過去の試験結果により裏付けられる。

【0435】

コリン摂取は、アセチルコリン（ACh）生合成における潜在的な律速段階とみなされており、経口レシチン（90～95%PC）は、治療とみなされていた。中程度の重症度のアルツハイマー病の外来患者で、レシチンの二重盲検プラセボ対照のクロスオーバー試験を完了させた。各患者は、3か月間、プラセボ10gを毎日3回、投与された。血漿コリンレベルは3倍上昇し、レシチン投与期間中、そのレベルで維持された。新しいことを学習する能力の検査に対し、平均基準スコアと治療スコアの間の有意差が見いだされた。これは、これら試験における実際の効果を示している。しかし心理テスト測定のいずれに対しても平均プラセボスコアと、レシチンスコアの間の有意差は無かった（Etienne P, Dastoor D, et al. (1981) Neurology 31:1552-4）。

【0436】

21名のアルツハイマー病患者で、毎日のレシチン25gに対する二重盲検試験を完了させた。レシチン群とプラセボ群の両方において、同等の改善が記録された。レシチンの血清レベルは、投与後12～14時間で測定され、対照患者のレベルと比較して増加していなかった（Fisman M, Merskey H, et al. (1981) Canadian journal of psychiatry Revue canadienne de psychiatrie 26:426-8）。

【0437】

65～85歳の原発性変性認知症（DSM-III）の10名の患者における無作為化二重盲検のクロスオーバー試験にて、それぞれ1週間、プラセボと3つのレシチン投与量（4、12および20g/日）を比較した。「血漿...コリンレベルの増加にもかかわらず、記憶テストの成績には何も改善がなかった」（Brinkman SD, Pomara N, et al. (1982) J Clin Psychopharmacol 2:281-5）。

【0438】

54～78歳の10名のアルツハイマー病患者における二重盲検クロスオーバー試験は、プラセボと3つのレシチン投与量（15.0、22.5、30.0g/日）をそれぞれ1週間比較した。「レシチンは、認知機能において何らかの臨床的に重要な改善を生じさせなかった」（Dysken MW, Fovall P, et al. (1982) Neurology 32:1203-4）。実際には、10名の外来患者と5名の入院患者のオリジナルデータの新たな解析から、「全体的印象」（SCAG-G）は二分化の後に悪化しただけでなく「3.0の統合オッズ比推定値（0.9～9.8の95%信頼区間（CI））を生じさせたが、これはプラセボを支持する有意ではないただの試験結果である」ことが示された（Higgins JP, Flicker L (2003) Cochrane Database Syst Rev CD001015）。しかし、PCの投与量が増加するにつれて減少した（表9）。ただしこの低下は、本開示の一部として実施された再解析では「有意」ではなかった（ $P_{ANOVA} = 0.2467$ ）。

10

20

30

40

50

表 9：血清ホスファチジルコリンレベルの増加は、アルツハイマー病を悪化させる。S C A G-G 結果（高値は、様々なレベルのレシチンを 2 週間投与されたアルツハイマー病患者において、値が高いほど良い。一部の患者において、評価が繰り返された。値が高いほど悪化する。（H a r r i s C M (1981) Ph D : 140, T a b l e X X I）に由来する。

【表 9】

SCAG-G	プラセボ		平均	低	平均	中	平均	高	平均
G4	5.4		(5.40)	6.6	(6.60)	6.6	(6.60)	5.5	(5.50)
G5	5.5		(5.50)	6.5	(6.50)	6.5	(6.50)	5.6	(5.60)
G12	6.6	6.6	(6.60)	5.6	(5.60)	6.6	6.6 (6.60)	6.5	(6.50)
G15	5.5	5.5	(5.50)	5.5	(5.50)	5.5	(5.50)	5.5	5.5 (5.50)
G16	2.1	2.2	(2.15)	3.3	(3.30)	2.2	2.2 (2.20)	2.2	(2.20)
G20	4.3		(4.30)	4.4	(4.40)	4.4	(4.40)	4.4	(4.40)
G21	3.1		(3.10)	2.2	(2.20)	3.3	(3.30)	2.3	(2.30)
G22	5.5		(5.50)	5.5	(5.50)	4.6	(4.60)	5.5	(5.50)
G23	5.6		(5.60)	4.6	(4.60)	5.4	(5.40)	4.4	(4.40)
G24	2.3		(2.30)	2.3	(2.30)	2.3	(2.30)	3.2	(3.20)
G25	2.3	2.2	(2.25)	2.2	(2.20)	3.2	3.3 (3.25)	2.2	(2.20)
G26	4.4	4.3	(4.35)	3.3	4.4 (3.85)	3.4	(3.40)	4.4	(4.40)
G27	6.6	6.6	(6.60)	6.5	(6.50)	6.6	5.5 (6.05)	6.6	(6.60)
G28	6.4		(6.40)	5.5	(5.50)	4.4	(4.40)	4.4	(4.40)
G29	4.4	3.3	(3.85)	3.4	(3.40)	3.3	(3.30)	3.3	3.3 (3.30)
Avg	4.67		(4.63)	4.49	(4.53)	4.55	(4.52)	4.40	(4.40)

【0439】

アルツハイマー病患者における長期間の無作為化二重盲検試験で、少なくとも 6 カ月の追跡期間を伴う 6 カ月間の 20～25 g/日のレシチンとプラセボ（それぞれ 18 名および 17 名の対象でデータ完了）が比較された。レシチン治療は、血漿コリン値を上昇させた（コンプライアンスに依存する）。「全体として、レシチン群と対照群の間に有意差はなかった。．．．[何かがあるとすれば] 最善を尽くした承諾者が比較的少なかった」（L i t t l e A, L e v y R, e t a l. (1985) J N e u r o l N e u r o s u r g P s y c h i a t r y 48:736-42）。

【0440】

全体として、レシチン（ホスファチジルコリン）補充は、アルツハイマー病患者に利益をもたらすという証拠はない。対照的に、2つの試験により、たとえば比較的短い試験期間にのみ投与されたとしても、P C はアルツハイマー病を悪化させるという仮説と一致する結果が提示されている。

【0441】

本開示の予想外の試験結果は、食事への P C 補充により認知症に何らかの改善があることを示すいくつかの試験と、その他のネガティブな効果を示す試験との矛盾する結果を説明する。全体的な P C の低下は、実際には有害である可能性がある。しかし「非常に低い濃度」（W i l t o n D C (2005) E u r o p e a n J o u r n a l o f L i p i d S c i e n c e a n d T e c h n o l o g y 107:193-205）のみで存在する単量体 P C の低下は、利益をもたらす。

実施例 18：様々な動物モデルにおける、シクロデキストリンの有益な結果は、炎症およびオートファジーに対する相乗効果の結果である。

【0442】

H P- β -C D は、多くの疾患の動物モデルにおいて有効であることが示されているが、推定される作用機序であるコレステロール排除は、永続的な難聴のリスクを有する。実施例 1 および実施例 2 の驚くべき遺伝的結果から、H P- β -C D の作用機序は、コレステロール排除によるものではなく、リン脂質の排除によるものであったという仮説が導かれた（図 45）。ゆえに、H P- α -C D が、より安全な（そしてより効果的な）代替物として浮上してきた。図 40 で確認される実施例 16 の驚くべき結果から、H P- α -C

Dが、オートファジーの改善に加えて全身性の炎症を低下させることが示された。

【0443】

要約すると、 α -CDは、若年期の間には必須であるが、50歳を超えるといくつか問題を引き起こし得る以下のいくつかのプロセスを減速させる：(1) 出生前(組織)および出生後の早期(神経)発達のための細胞の移動、(2) 成長期間中の栄養素の細胞取り込み、ならびに(3) まだ免疫システムに認識されていない病原体に対する防御としての自然免疫(炎症)。HP- α -CDは、(a) エンドサイトーシスを低下させ、それによりリソソームストレスを低減させる(図46)および(b) 「炎症性老化」とも呼ばれる炎症の低減(図47)によりこれを実現する。さらなる利益は、炎症を低下させることでオートファジーが改善され、翻って、改善したオートファジーが炎症を低下させることである。ゆえに上方制御された炎症および下方制御されたオートファジーが関与する加齢関連状態に対するHP- α -CDの効果は、高度に相乗的であることが期待される。

10

実施例19：アルツハイマー病の細胞およびマウスのモデルにおける、アルファおよびベータシクロデキストリンによる神経保護に関する研究の試験デザイン

【0444】

要約 コレステロールと膜脂質が、アルツハイマー病(AD)の発症機序において重要な役割を果たすという数々の証拠がある。シクロデキストリン(CD)は、環状オリゴ糖化合物であり、ヒドロキシプロピル- β -CD(HP- β -CD)は、コレステロールを結合するために広く使用されている。CDは、ADと神経病理的な特徴を共有するニーマンピック病C型において顕著に有益な効果を発揮することから、HP- β -CDの効果は、ADの細胞およびマウスのモデルにおいて検証された。細胞膜コレステロールの蓄積が、Swedish変異型APP(SwN2a)を過剰発現するN2a細胞において検出され、膜コレステロールのレベルは、HP- β -CDの処置により低下した。HP- β -CDは、SwN2a細胞においてA β 42のレベルを劇的に低下させ、その効果は使用中止後24時間持続した。4か月間のHP- β -CDの皮下投与が、Tg19959マウスにおいて空間学習と記憶障害を大幅に改善し、A β プラーク沈着を減少させ、そしてタウ免疫反応性変性神経突起(DN)を減少させた。これらは、ヒトADと関連しているAPP遺伝子に2つの変異を有するトランスジェニックマウスであり、有益な効果は、コレステロールの低下が原因であった。近年、新たなGWA解析が使用され、転移性乳癌のリン脂質経路遺伝子と、ADコホートで見られるリン脂質経路遺伝子の重複が示された。HP- α -CDも、HP- β -CDと同様にリン脂質に結合するが、コレステロールには結合しない。HP- α -CDは、乳癌細胞の移動の減速において、HP- β -CDの2倍効果的である。ゆえに、HP- β -CDの有効性は、コレステロールに対する効果によるものではなく、むしろリン脂質によるものである可能性がある。これらの可能性を見分ける1つの方法が、インビトロ、およびAPP変異を有するトランスジェニックマウス(Tg19959)の両方においてHP- α -CDの有効性を検証することである。本明細書において、本発明者らは、HP- α -CDが、コレステロールレベルと膜コレステロールに対して、等しく効果的か、またはより効果的か、効果を有さないかを、フィリピン染色および質量分析を使用して決定することを目的とする。本発明者らはさらに、その効果が、N2a細胞、ならびにTg19959トランスジェニックマウスでのインビボの両方において、ペーターアミロイド産生に用量反応性であるかを決定する。ゆえにこれらの試験は、AD患者の臨床試験でさらに本戦略を遂行するための草分け的な仕事であり、科学的論拠を提供するであろう。

20

30

40

【0445】

重要なサポートデータの要約。過去に、HP- β -CDの効果は、ADの細胞モデルおよびマウスモデルにおいて検証された。HP- β -CDは、SwN2a細胞においてA β 42のレベルを劇的に低下させ、その効果は使用中止後24時間持続した。4か月間のHP- β -CDの皮下投与が、Tg19959マウスにおいて空間学習と記憶障害を大幅に改善し、A β プラーク沈着を減少させ、そしてタウ免疫反応性変性神経突起(DN)を減

50

少させた。(Sim I, Carini S, et al. (2012) AMIA Annu Symp Proc 2012: 856-65)を参照のこと。HP- β -CDは、APPタンパク質の β -開裂を低下させることで部分的にA β 42のレベルを低下させ、さらにコレステロール輸送とA β クリアランスに関与する遺伝子の発現も上方制御した。本試験は、ADのトランスジェニックマウスモデルにおける、A β 産生の減少とクリアランス機序の強化の両方による、HP- β -CDの神経保護的作用を初めて示したものであり、ADにおける疾患改変の新規治療戦略となる可能性を提唱する。上方制御された遺伝子のなかには、コレステロールとリン脂質を輸出し、AD治療用のアゴニストペプチドの標的とみなされている膜トランスポーターであるABCA1があった(Bielicki JK (2016) Current opinion in lipidology 27: 40-6)。

10

【0446】

近年の結果(Wittkowski KM, Dadurian C, et al. (2018) PLoS One 13: e0199012)により、乳癌の「脱線したエンドサイトーシス」に関与するいくつかの遺伝子が特定された。それらの大部分(ABCA1を含む)はすでに、以下をはじめとするADの機能的および遺伝子発現の研究において示唆されている

【0447】

ATP8A1/ATP8B1(Arch Neurol, 65(1), 45-53; Internat J Mol Sci, 14(4), 7897-922; PLoS Genetics, 8(8), e1002853.)

20

【0448】

ANO4(Alzheimers Dement, 10(1), 45-52.)

【0449】

ABCA1(PLoS One, 11(11), e0166195; Neurobiol Dis, 72 Pt A, 13-21; Alzheimers & Dementia, 11(12), 1430-38; Neurobiol Dis, 72 Pt A, 54-60.)

【0450】

AGPAT3/AGPAT4(J Alzheimers Dis, 23(2), 349-59.)(Sherva R, Baldwin CT, et al. (2011) J Alzheimers Dis 23: 349-59)

【0451】

DGKQ(Zhu, X.C., et al. (2016), Association of Parkinson's Disease GWAS-Linked Loci with Alzheimer's Disease in Han Chinese, Mol Neurobiol)

30

【0452】

これら遺伝子はすべて、リン脂質の輸送と代謝に関与している。一方で、コレステロール輸送に関与しているのはごく少数であることから、上記のAD動物モデルにおいて認められた効果は、コレステロールではなくリン脂質の低下の結果であろうことが示唆される。

【0453】

この仮説は、2種のヒト乳癌細胞株MDA-MB-231(トリプルネガティブ)およびMCF-7(エストロゲン受容体ポジティブ)におけるインビトロ実験によりサポートされ、ER-およびER+の両方の腫瘍細胞の移動に対し、2mMのHP β CDよりも、1mMのHP α CDのほうが効果が高かったことが示された($p = .0252$)。(Wittkowski KM, Dadurian C, et al. (2018) PLoS One 13: e0199012)を参照のこと。

40

II. 目的1(主要): ヒト変異型APPを過剰発現するTg19959マウスにおける空間学習と記憶障害に対する、等モルのHP α CDとHP β CD(2, 000および4, 000mg/kg)および対照の有効性を検証すること。

【0454】

イノベーション: HP β CDは、コレステロールを排除することで、ADのマウスモデルにおける活性をはじめとする、その活性を発揮すると広く考えられている。(Yao J, Ho D, et al. (2012) J Exp Med 209: 2501-13

50

）を参照のこと。インビトロ試験で確認された本発明者らのGWASの結果（Wittkowski KM, Dadurian C, et al. (2018) PLoS One 13:e0199012）から、BC（Nat Rev Cancer, 8(11), 835-50）において脱線したエンドサイトーシスに関与するとして、ならびに散发性および家族性[AD]で発症機序を誘導するとして、機能性および発現研究において既に認められた遺伝子との関連性が示された。Biomed Res Int, 2014, 167024。ゆえに過去のインビトロ研究（Raghu H, Sodadasu PK, et al. (2010) BMC Cancer 10:647）で認められているHPβCDの効果は、コレステロールではなくPLの排除が正しい可能性があった。ADにおける「脱線した／錯乱したシグナル伝達と、関連のエンドサイトーシス」。（Van Dooren T, Princen K, et al. (2014) Biomed Res Int 2014:167024）。ADのインビトロモデルにおいて類似した結果が認められた場合、コレステロールではなくPLを標的とした新規の治療法が探索され得るだろう。

【0455】

有意性：マウスにおけるADに対する初期のポジティブなインビボ結果は、臨床試験では継続されなかった。これは主に、HPβCDが、外有毛細胞からコレステロールを枯渇させることで永続的な難聴を生じさせるリスクを有することが示されたためである。The Journal of Experimental Medicine, 209(13), 2501-13; (Takahashi S, Homma K, et al. (2016) Sci Rep 6:21973)を参照のこと。近年のGWASの結果は、コレステロールからPLへと焦点を移させるものである。次に、これはADに対し、HPβCDよりも効果が高く、一方でコレステロール排除に由来する永続的な難聴のリスクを回避し得るHPαCDをはじめとする新たな治療選択を開くものである。HPαCDは、インビトロにおいてHPβCDよりも毒性も低い。International Journal of Pharmaceutics, 101(1-2), 97-103を参照のこと。

【0456】

アプローチ：本発明者らは、APPの開裂、コレステロールと脂質の輸送遺伝子の発現、およびAβクリアランス、ならびにコレステロールとリン脂質のレベルに対する効果を検証する。本発明者らは、HPαCDとHPβCDの両方について、2つの濃度を検証することにより、効果が用量反応性であるか、そしてカテプシンD免疫染色によりリボソームに対する効果を決定する。本発明者らは、これらの検証を、各々20匹のマウスの5つの群（対照、HPβCD 2g、HPβCD 4g、HPαCD 2g、HPαCD 4g）において実施する。

【0457】

潜在的な危険性と代替：HPβCDで過去に認められたすべての効果がHPαCDで再現されるのではなく、異なる効果によって、病因に関する新たな知見がもたらされるであろう。しかしHPαCDで再現され得るHPβCDの効果が少なすぎる場合、HPαCDがADに対するより安全な治療法となり得るという仮説はこれ以上追及されないだろう。それでも目的2の結果は、可能性のある代替物につながる新たな知見をもたらし得る。

III. 目的2：AD病変に対する、PLとコレステロールの両方の排除（HPβCD）と、PLのみ（HPαCD）を排除する相対的な活性を調査すること . . . 目的2a: . . . Swedish APP変異を発現するN2a細胞において（膜コレステロール、Aβ産生）目的2b: . . . ヒト変異型APPを過剰発現するTg19959マウスにおいて（Aβ沈着、ミクログリオーシス（microgliosis）、アミロジェネシス（amylogenesi s）、タウおよびリソソームの異常、遺伝子発現）

【0458】

イノベーション：Aβおよびタウの病変を改善することにより、HPαCD 空間学習および記憶があったとしても、ADの病因におけるコレステロールに対するPLの役割は

まだ解明されていない。

【0459】

有意性：単剤が、ADの万能薬となる可能性はない。メカニズム研究は、コレステロールをより特異的に標的とする薬剤を導き得る試験を設計するための知見を提供する。

【0460】

アプローチ：本発明者らは、Swedish APP変異を発現するN2a細胞において、A β 産生を低下させることに成功したHP β CDのインビトロ研究を、今回は、HP β CDの代わりにHP α CDを使用して再現することを目的とする。作用機序をさらに解明するために、本発明者らはフィリピン染色を使用して、膜コレステロールに対するPL排除の作用を評価する。

10

【0461】

潜在的な危険性と代替：ADにおけるコレステロールの役割が推定されているが、不明である。ゆえに膜コレステロールとA β 産生に対するHP α CDの効果に関するポジティブおよびネガティブの両方の結果は、ADにおけるCDの役割の理解の改善の助けとなり、さらなる薬剤開発に有益な知見をもたらす。

【0462】

実験デザインおよび方法

【0463】

4, 000 mg/kgのHP β CDが、インビトロで有効であることを示す過去の結果、およびEECの制御においてHP α CDが、HP α CDの少なくとも2倍有効であることを示すインビトロ結果に基づき、本発明者らは、HP α CD__2 gとHP β CD__4 gを比較し、さらにHP α CD__2 gとHP β CD__2 g、HP α CD__4 gとHP β CD__4 g、HP α CD__4 gとHP α CD__2 g、およびHP α CD__4 gとHP α CD__2 gも比較する。The Journal of Experimental Medicine, 209 (13), 2501-13を参照のこと。陽性対照として、本発明者らは、対照とHP β CD__4 gを比較する過去の結果も再現する。

20

【0464】

目的1において、平均への回帰（勝者の呪い）を防ぎ、多重度を考慮する（5つの独立した比較）ために、そして探索的目的2の否定的な結果を意味のある形で解釈できるようにするために、本発明者らは、サンプルサイズを過去の2群試験での1群当たり10（ $\alpha = 0.05$ 、パワー=0.80、 $\delta = 1.3$ ）から、今回の5群試験での1群あたり20へと増加させる（ $\alpha = 0.01$ 、パワー=0.90）。The Journal of Experimental Medicine, 209 (13), 2501-13を参照のこと。

30

【0465】

実験動物。Tg19959マウスは、Dr. George Carlson (McLaughlin Research Institute、モンタナ州グレートフォールズ)から取得した。Tg19959マウスは、FVB $\times$ 129S6 F1胚に、ハムスターPrPプロモーターの制御下にある2つの家族性AD変異（KM670/671NLとV717F）を含むヒトAPP695を含有するコスミドインサートを注入することにより構築された。すべての実験は、Weill-Cornell Medical CollegeのInstitutional Animal Care and Use Committeeにより承認される。

40

【0466】

細胞株：マウスN2a神経芽腫細胞は、670/671 Swedish変異（SwN2a）を担持するヒトAPP695を安定的にトランスフェクトされており、過去に記載されるように増殖される（Yao J, Hennessey T, et al. (2010) PLoS One 5:e15546）。

【0467】

細胞におけるHP- α -CD/HP- β -CD（HP-CD）処置。10 mMのHP-

50

C Dストック溶液を、1 x P B S中で作製する。S w N 2 a細胞とN 2 a細胞を、様々なインキュベーション時間で、無血清培地中でH P - C D (5 m M)で処置する。A β レベルを測定するために、S w N 2 a細胞を、H P - C D処置の5時間後または24時間後に無血清培地中に回収する。

【0468】

フィリピン染色および解析。フィリピンをD M S O (50 m g / m l) 中で調製し、-20℃で保存する。細胞を30分間、4% P F A中で固定する。フィリピン染色のために別に細胞を透過処理することは必要なく、フィリピン自身が細胞に透過する。ストック溶液をP B S中で希釈する(1:100~1:500)。細胞を室温で15分間インキュベートし、次いでP B Sで3回、5分間洗浄する。抗減衰試薬(F l u o r o m o u n t - G、S o u t h e r n B i o t e c h社)を包埋培地で使用する。フィリピンは、 $\lambda_{ex}=360\text{nm}$ および $\lambda_{em}=460\text{nm}$ を使用して検出される。C C Dカメラに繋がれた蛍光顕微鏡を使用して、M e t a m o r p h (M o l e c u l a r D e v i c e s社)を使用して画像撮影する。画像解析のために、本発明者らは、I m a g e J (N I H)を使用して、画像上に70%閾値を適用し、C D処置の有無でのS w N 2 a細胞のフィリピン強度の変化を定量する。N a t N e u r o s c i, 9 (10), 1265-73を参照のこと。

【0469】

S w N 2 a細胞からのコレステロール抽出。6ウェルプレートのS w N 2 a細胞に、15分間、C Dを用いて、またはC Dを用いずに処置する。細胞を3回、ハックス緩衝液で洗浄し、その後、 β -シトステロール(国際標準、1ウェル当たり5 μ gの β -シトステロール)を含有する800 μ lのヘキサン/イソプロパノール(3/2 v/v)を加える。室温でゆっくりと振とうしながら30分間、脂質を抽出する。脂質抽出物を12 x 75 mmのホウケイ酸ガラス培養管にうつし、アルゴン雰囲気下で乾燥させる。抽出を再度繰り返し、チューブ1本あたり50 μ lのヘキサンを加え、ボルテックスし、その後、分離用のガラスバイアルに移し、G C - M a s s S p e cで解析する。コレステロール/タンパク質m gのレベルを算出し、プロットする。

【0470】

マウスへのシクロデキストリン投与。週に2回の皮下注射で、H P - α - C DまたはH P - β - C D (H P - C D、2000または4000 m g / k g)によりマウスを処置した。H P - C Dは、等張生理食塩水中、20% (w/v) 溶液として投与され、対照として等張生理食塩水単独を用いた。マウスでのH P - C Dの注射は、P7で開始され、処置期間は4カ月である。20匹のマウスを各群で試験する。

【0471】

モリス水迷路。空間学習と記憶は、モリス水迷路を使用して分析される。L e a r n i n g a n d M o t i v a t i o n, 12 (2), 239-60を参照のこと。馴らすために、行動検査の1週間前に開始して毎日マウスに触れる。取得期間中、視覚刺激物を室内に配置する。北西(NW)の四半部の真ん中に、隠しプラットフォームを配置する。毎日、マウスを4つのスタート位置：北、東、南および西で、盤の壁の隣に置き、壁に向い合わせる。それら4点が、1日当たり4回の連続的な試験に相当する。試験時間は60秒であり、試験の間の間隔は60分である。マウスが60秒以内にプラットフォームに到達しなかったときは、実験者により10秒間、プラットフォーム上にマウスを置く。プラットフォームに到達するまでの時間を5日間記録し、分析する。

【0472】

プローブ試験は、取得期間の最後の試験の24時間後、プールからプラットフォームを取り出して、評価する。マウスは1回の試験での60秒間、北側にリリースされ、その間にプラットフォームのエリアで過ごした時間が測定される。速度も測定される。

【0473】

可視プラットフォームの試験は、1日当たり4回の試験で、2日にわたり実施される。この刺激検査では、プラットフォーム上にボールが足され、その位置は各試験間で変えた

10

20

30

40

50

。試験期間は60秒であり、試験の間の間隔は60分である。プラットフォームに到達するまでの時間を記録し、平均化する。

【0474】

脳および細胞からのサンプル調製。マウスは、腹腔内ペントバルビタールナトリウムで深麻酔され、氷冷生理食塩水で経心臓でかん流される。脳を取り出し、氷上で解剖する。1つの半球を組織学的解析に使用し、他方の半球をその後のタンパク質抽出またはTrizol RNA抽出 (Invitrogen社) に使用する。脳組織は、1% SDS + 0.5% NP-40と、プロテアーゼ阻害剤 (Roche社) を含む溶解緩衝液中でホモジナイズし、ウェスタンブロッティング解析を行う。細胞は、RNA抽出用にはTrizol中でホモジナイズと調製を行い、タンパク質抽出用にはRIPA緩衝液または1% TritonのPBS溶液中でホモジナイズと調製を行う。タンパク質濃度は、BCAタンパク質アッセイ (Thermo Scientific社) により決定される。

【0475】

ウェスタンブロッティング解析。等量のタンパク質を含むサンプルを、Tricine-SDSゲル電気泳動により分離させ、iBlotドライブロッティングシステム (Invitrogen社) を使用してPVDF膜にトランスファーする。膜を、5%ミルク/0.1% Tween 20のTBS溶液で1時間、室温でブロッキングし、その後、一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートする。シグナルは、HRP結合二次抗体を使用して検出され、化学発光を強化する (Thermo Scientific社)。プロットは、600dpiでスキャンされ、濃度測定は、ImageJ (NIH) を使用して実施される。本発明者らは、以下の抗体を使用する：マウスモノクローナル抗チューブリン (Sigma社、1:10000)、マウス抗Aβ1-16 (6E10) モノクローナル抗体 (Covance社、1:1000)、ウサギ抗APP C-末端抗体 (Calbiochem社)、HRP-結合ヤギ抗マウスIgG (1:2000) およびヤギ抗ウサギIgG (1:3000) (KPL社)。

【0476】

酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)。Aβ42のレベルは、市販のELISAキット (Invitrogen社、KHB3441) を使用して定量される。メーカーのプロトコールに従い、細胞抽出物、SwN2a細胞からの培地およびマウスからの脳抽出物のAβレベルを測定する。SwN2a細胞からの培地は、希釈液中、1:1に希釈され、脳抽出物は、希釈液中、1:10に希釈され、その後、解析用のプレートにロードされる。各サンプルは二重で検討され、実験は少なくとも2回反復される。

【0477】

免疫組織法。行動評価されるマウスは、腹腔内ペントバルビタールナトリウムで深麻酔され、氷冷生理食塩水で経心臓でかん流される。脳は4%パラホルムアルデヒドのPBS溶液中で少なくとも24時間、後固定 (post-fixed) される。脳組織は35μmの切片に切り出され、アビジン-ビオチン複合ペルオキシダーゼ法を使用して免疫染色され、5分間のDAB (ジアミノベンジン) インキュベーションの後に可視化される (Vector社、米国カリフォルニア州バーリングヘム)。各動物に対し、5枚の切片を分析する。アミロイド沈着については、脳切片を抗Aβ42ウサギポリクローナル抗体AB5078P (1:1000、Chemicon社) で標識する。ミクログリア活性化については、隣接切片を、抗CD-11bラットモノクローナル抗体 (1:100、Serotec社) でさらに標識する。リン酸化タウについては、AT8抗体 (1:500、Thermo Scientific社) で切片を標識する。カテプシンDについては、RU4抗体 (Dr. Ralph Nixon、New York University School of Medicine/Nathan Kline Instituteから授受) で標識する。NIH Image1.63ソフトウェア (National Institutes of Health、米国メリーランド州ベセスダ) を使用して、0.75 mm² 当たりのAB5078P免疫反応性アミロイドプラークにより占められる面積割合と、CD-11b免疫反応性ミクログリアにより占められる割合を算出す

る。

【0478】

チオフラビン-S染色。Tg19959からのフローティング切片を洗浄し、15分間、1% Triton-PBS中でインキュベートする。PBSで洗浄し、0.05%チオフラビンS (ThS)の50%エタノール溶液で5分間染色する。最後に切片を50%エタノールで洗浄し、その後は水中で洗浄する。ThSの蛍光は、蛍光顕微鏡で $\lambda_{ex} = 488\text{nm}$ を使用して検出する。ThS蛍光面積は、Image Jを使用して決定され、総面積の割合として表される。

【0479】

RT-PCRによる遺伝子の定量。RNAは、4カ月齢のマウスの脳から、Trizol 10
プロトコル (Invitrogen社) を使用して抽出される。次いでHigh Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems社、米国) を使用し、ヌクレアーゼフリーの脱イオン水を加えて、総RNA (1 μg) をcDNAへ逆転写する。逆転写は、メーカーのプロトコルに従い実施される。トータルで30ngのcDNAを、PCRプレートの各ウェルにロードする。cDNAは、ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems社、米国) を使用したリアルタイム定量PCRにより二重で分析され、Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems社、米国) で検出される。プライマー配列は、過去の公表文献から取得される。Biochim Biophys Acta, 1801 (8), 831-8; Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (7), 2377-82を参照のこと。

ABCA1 (Fwd: 5' - CGTTTCCGGGAAGTGTCCTA - 3' ; Rev: 5' - GCTAGAGATGACAAAGGAGGATGGA - 3')、
ABCA2 (Fwd: 5' - AGTGCTCAGCCTTCGTACAG - 3' , Rev: 5' - AGGCGCGTACAGGATTTTGG - 3')、
ABCG1 (Fwd: 5' - TTTGAGGGAATTTGGGTCTGAAC - 3' , Rev: 5' - CCCCTTTTAATCGTTTGTCTGCT - 3')、
NPC1 (Fwd: 5' - GGGATGCCCCTGCGCTGCAAT - 3' ; Rev: 5' - CTGGCAGCTACATGGCCCCG - 3')。 30

【0480】

各サンプルに対し、蛍光閾値に達するサイクル数Ctは、各mRNAおよびアクチンに対して二重で決定される。Tg19959マウスと野生型マウスのmRNAの相対量を決定するために、データは、2^{-AACT}法 (Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Methods 25:402-8) を使用して表される。

【0481】

統計法。群間の独立2群比較は、シェッフェの多重比較検定を含む一般化フリードマン/クルスカル-ウォリスの順位検定を使用し実施される。(Wittkowski KM (1988) J Am Statist Assoc 83:1163-70, 87:258)。算出は、R (<http://www.cran.r-project.org/>) およびmuStatパッケージ (<https://cran.r-project.org/package=muStat>) を使用して実施される。 40

【0482】

目的1の主要結果は、以下を含む集成uスコアである。

- 5日目に隠しプラットフォームに到達するまでに過ごした総時間、および
- プラットフォームエリアで過ごした総時間。

【0483】

解釈においてアーチファクト (外れ値、傾斜分布) を抑えるために (目的2を含む)、本発明者らは、結果を、箱髭図としてプロットする。(Tukey JW (1977) Exploratory data analysis Reading, Mass.: A 50

ddison-Wesley)を参照のこと。

実施例20：パーキンソン病の細胞およびマウスのモデルにおける、アルファおよびベータシクロデキストリンによる神経保護に関する研究の試験デザイン

【0484】

α -シヌクレイン (α -syn) の凝集は、例えばレビー小体認知症およびパーキンソン病などの障害の発症機序において重要な役割を果たすと考えられている。過去の研究 (Bar-On P, Rockenstein E, et al. (2006) J Neurochem 98:1032-45) の主要な目的は、メチル- β -シクロデキストリン ($M-\beta-CD$) が、シヌクレイン症のモデルにおいて α -syn の蓄積に干渉するかを決定することであった。J Neurochem, 98 (4), 1032-45 を参照のこと。著者らは、トランスフェクトされた神経細胞株およびトランスジェニックマウスにおける α -syn の蓄積に対する $M-\beta-CD$ の効果を研究した。イムノブロット解析は、 $M-\beta-CD$ が、トランスフェクト細胞の膜分画および界面活性剤不溶性分画において α -syn のレベルを低下させたことを示している。インビトロ研究と同じく、 $M-\beta-CD$ を用いたマウス処置により、膜分画における α -syn のレベル低下と、神経細胞体およびシナプスにおける α -syn の蓄積低下がもたらされた。まとめると、これらの結果は、 $M-\beta-CD$ を使用したコレステロールおよび脂質組成の変化は、シヌクレイン症の治療となり得ることを示唆していると解釈された。しかし上記の実施例の結果からは、主に「コレステロール低下剤」として確認された $M-\beta-CD$ による効果は、実際には主に $M-\beta-CD$ のリン脂質排除によるものであったことが示唆される。本実施例において、本試験は、 $M-\beta-CD$ ではなく今回は $HP-\alpha-CD$ を使用して反復される。

【0485】

非トランスジェニックマウスおよび α -syn トランスジェニックマウスの脳における、 α -syn レベルに対する $M-\beta-CD$ の効果。非トランスジェニック (tg) マウスと、 ha -syn トランスジェニックマウスを、1週間、 $M-\beta-CD$ (10mM) で処置して、ウェスタンブロッティングおよび免疫細胞化学法により解析する。

実施例21：乳癌におけるシクロデキストリンの有効性検証のための試験デザイン

【0486】

乳癌切除後の女性は確定診断を受けているため、「脱線したエンドサイトーシス」に対する $HP-\alpha-CD$ の臨床試験をこの集団において開始することとする。非限定的な例として、乳癌の転移予防に関する $HP-\alpha-CD$ のシームレスな第2b/3相臨床試験が、● トリプルネガティブ乳癌 (タモキシフェンおよびハーセプチンがこの集団ではあまり作用しない) および

● 腋窩リンパ節転移 (転移発生の傾向が確立された患者) の女性集団において実施され得た。

【0487】

シームレス設計の第2b相部分は、転帰として遠隔転移するまでの時間である主要エンドポイントに貢献し得るよう、最初の80名の患者が少なくとも2年間観察され、非盲検とすることなく治療が継続された後の転帰としては無益となるであろう。再発率は最初の3年間のみ高いため、データは最大5年間集められる。J Breast Cancer, 18 (4), 371-7 を参照のこと。後にリクルートされた患者の一部は、最後の患者が2年間観察されたときに管理者によって打ち切られる。ゲーハン検定を使用して、治療患者とプラセボ患者を比較する。Biometrika, 52, 203-23 を参照のこと。

【0488】

1群当たり125名の患者で、3年間の有効メジアン観察時間で女性の30%が遠隔再発を有すると予測され、5%レベルでの標準的な80%の検出力で、50% (~15%) までの発生率の低下が検出され得た。プラセボ対照治療は、標準治療 (化学療法、放射線、...) に加えて投与された。

10

20

30

40

50

長期間のHP- β -CD (200mg/kg) の経口投与により、ラットにおいて骨ミネラル密度 (BMD) の低下が報告されたため (Toxicol Pathol, 40 (5), 742-50)、本試験は注意深く監視するものとする。

● 骨密度。

【0489】

ヒト赤血球は、 β -CDよりも α -CDのほうが忍容性良好である。WHO/JECFA Food Additive Series, 48, 1030を参照のこと。ヒトよりもシクロデキストリンに対する忍容性が低い動物試験から、投与量規制因子はおそらく以下である。

● 腎毒性および

● 溶血。

【0490】

動物試験において、 α -CDは耳毒性を示さなかった (Ann Clin Transl Neurol, 3 (5), 366-80) が、投与量設定試験は注意深く

● 耳毒性をスクリーニングするものとする。

実施例22：FSGSにおけるシクロデキストリンの有効性検証のための試験デザイン

【0491】

1つの態様では、本開示は、その必要のある対象において巣状分節状糸球体硬化症 (FSGS: focal segmental glomerulosclerosis) および／またはネフローゼ腫脹を治療および／または予防する方法を提供するものであり、当該方法は、対象に、 α -CDまたはそのアナログもしくは誘導体の有効量を、単独で、または1つもしくは複数の追加の活性剤と組み合わせて投与する工程を含む。一部の実施形態では、組成物は、HP- α -CDとカプリン酸ナトリウムまたはカプリル酸塩のクラスレートである。

【0492】

クラスレートを伴う、および伴わないHP- α -CDが、Fogo, Semin Nephrol. 2003 Mar; 23 (2): 161-71に記載されるモデルを使用してラットに経口投与される試験が実施される。当該文献は、その全体で参照により組み込まれる。HP- α -CDを含む、および含まない他の経口製剤が、HP- α -CDとともに検証され、有効性を測定される。

【0493】

他の経口製剤としては、WO2016105465, ORAL COMPOSITIONS FOR INSOLUBLE COMPOUNDSに記載される製剤が挙げられる。当該文献は、その全体で参照により組み込まれる。

本発明者らは、HP- α -CDまたはそのアナログもしくは誘導体が、哺乳動物においてFSGSを効果的に治療し、および／または発症を予防し、ならびにベーターシクロデキストリンの公知の副作用を伴わずに他の実験化合物と同様に良好またはより良好に、治療および／または発症を予防することを予期する。

引用参考文献

米国特許出願

US 6890549 B2 2003/07/29 Artiss JD, Jen C (優先権: US 40436602 P 2002-08-19) Compositions Comprising Dietary Fat Complexer And Methods For Their Use.

消費可能な脂肪含有食品中の脂肪の生体利用効率を低下させる方法であって、消費可能な脂肪含有食品中の脂肪量を決定する工程、および α -シクロデキストリンと、当該消費可能な脂肪含有食品を混合させ、当該消費可能な脂肪含有食品に、約1:20～約1:3w

10

20

30

40

50

／wの α -シクロデキストリンと脂肪の比率を含ませる工程を含み、当該 α -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン複合体が、消費前に当該食品から除去されない、方法。

他の公表文献

【0494】

American Cancer Society (2015) Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society

【0495】

Deli MA (2009) Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788: 892-910 10

【0496】

Renukuntla J, Vadlapudi AD, Patel A, Boddu SHS, Mitra AK (2013) Approaches for Enhancing Oral Bioavailability of Peptides and Proteins. *Int J Pharm* 447: 75-93

【0497】

Shaikh I, Derle ND, Bhamber R, PDF] D (2012) Permeability Enhancement Techniques for Poorly Permeable Drugs: A Review. *J Appl Pharmacol Sci* 2: 34-9 20

【0498】

Shityakov S, Salmas RE, Salvador E, Roewer N, Broscheit J et al. (2016) Evaluation of the potential toxicity of unmodified and modified cyclodextrins on murine blood-brain barrier endothelial cells. *J Toxicol Sci* 41: 175-84

【0499】

Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J (1989) Differential effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on human erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* 186: 17-22 30

【0500】

Monnaert V, Tilloy S, Bricout H, Fenart L, Cecchelli R et al. (2004) Behavior of α -, β -, and γ -Cyclodextrins and Their Derivatives on an in Vitro Model of Blood-Brain Barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 310: 745-51

【0501】

Nociari MM, Lehmann GL, Perez Bay AE, Radu RA, Jiang Z et al. (2014) Beta cyclodextrins bind, stabilize, and remove lipofuscin bisretinoids from retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: E1402-E8 40

【0502】

Posor Y, Eichhorn-Grunig M, Haucke V (2015) Phosphoinositides in endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1851: 794-804

【0503】

Samie MA, Xu H (2014) Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders. *J Lipid Res* 55: 995-1009

【0504】

Schmid SL, Mettlen M (2013) Cell biology: Lipid switches and traffic control. *Nature* 499: 161-2

【0505】

50

- Bohdanowicz M, Grinstein S (2013) Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol Rev* 93: 69-106
 【0506】
- Hesketh GG, Perez-Dorado I, Jackson LP, Wartosch L, Schafer IB et al. (2014) VARP is recruited on to endosomes by direct interaction with retromer, where together they function in export to the cell surface. *Dev Cell* 29: 591-606
 【0507】
- Mosesson Y, Mills GB, Yarden Y (2008) Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 835-50
 【0508】 10
- Chen X, Hui L, Soliman ML, Geiger JD (2014) Altered Cholesterol Intracellular Trafficking and the Development of Pathological Hallmarks of Sporadic AD. *J Parkinsons Dis Alzheimers Dis* 1
 【0509】
- Schreij AM, Fon EA, McPherson PS (2015) Endocytic membrane trafficking and neurodegenerative disease. *Cell Mol Life Sci*
 【0510】
- Blaising J, Polyak SJ, Pecheur EI (2014) Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral research* 107: 84-94
 【0511】 20
- Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H et al. (2005) Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloid beta-peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol Chem* 280: 18755-70
 【0512】
- Kilpatrick K, Zeng Y, Hancock T, Segatori L (2015) Genetic and chemical activation of TFEB mediates clearance of aggregated alpha-synuclein. *PLoS One* 10: e0120819
 【0513】 30
- Davidson CD, Fishman YI, Puskas I, Szeman J, Sohajda T et al. (2016) Efficacy and ototoxicity of different cyclodextrins in Niemann-Pick C disease. *Ann Clin Transl Neurol* 3: 366-80
 【0514】
- McKew J, Zheng WEI, Xu M, Swaroop M, Marugan Juan J (2014). Cyclodextrin For The Treatment Of Lysosomal Storage Diseases. WO Patent No: W0 2014/022841 A1
 【0515】
- Sole-Domenech S, Cruz DL, Capetillo-Zarate E, Maxfield FR (2016) The endocytic pathway in microglia during health, aging and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 32: 89-103
 【0516】 40
- Song W, Wang F, Lotfi P, Sardiello M, Segatori L (2014) 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin promotes transcription factor EB-mediated activation of autophagy: implications for therapy. *J Biol Chem* 289: 10211-22
 【0517】
- Kim S, Choi KJ, Cho SJ, Yun SM, Jeon JP et al. (2016) Fisetin stimulates autophagic degradation of phosphorylated tau via the activation of TFEB and Nrf2 transcription factors. *Sci Rep* 6: 24933
 【0518】 50

- Medina DL, Ballabio A (2015) Lysosomal calcium regulates autophagy. *Autophagy* 11: 970-1
【0519】
- Salter MW, Stevens B (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23: 1018-27
【0520】
- Luo C, Jian C, Liao Y, Huang Q, Wu Y et al. (2017) The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13: 1661-7
【0521】
- Prinz M, Priller J (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 15: 300-12
【0522】
- Gunasekara L, Al-Saiedy M, Green F, Pratt R, Bjornson C et al. (2017) Pulmonary surfactant dysfunction in pediatric cystic fibrosis: Mechanisms and reversal with a lipid-sequestering drug. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*
【0523】
- Hipler UC, Schonfelder U, Hipler C, Elsner P (2007) Influence of cyclodextrins on the proliferation of HaCaT keratinocytes in vitro. *J Biomed Mater Res A* 83: 70-9
【0524】
- Irie T, Fukunaga K, Garwood MK, Carpenter TO, Pitha J (1992) Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. II: Effects on transport and disposition of lipids in rabbit and humans. *J Pharm Sci* 81: 524-8
【0525】
- Frank DW, Gray JE, Weaver RN (1976) Cyclodextrin nephrosis in the rat. *Am J Pathol* 83: 367-82
【0526】
- Wittkowski KM, Dadurian C, Seybold MP, Kim HS, Hoshino A et al. (2018) Complex polymorphisms in endocytosis genes suggest alpha-cyclodextrin as a treatment for breast cancer. *PLoS One* 13: e0199012
【0527】
- Wittkowski KM, Lee E, Nussbaum R, Chamian FN, Krueger JG (2004) Combining several ordinal measures in clinical studies. *Stat Med* 23: 1579-92
【0528】
- Tuvia S, Pelled D, Marom K, Salama P, Levin-Arama M et al. (2014) A Novel Suspension Formulation Enhances Intestinal Absorption of Macromolecules Via Transient and Reversible Transport Mechanisms. *Pharmaceutical Research* 31: 2010-21
【0529】
- Sardiello M (2016) Transcription factor EB: from master coordinator of lysosomal pathways to candidate therapeutic target in degenerative storage diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1371: 3-14
【0530】
- Moors TE, Hoozemans JJ, Ingrassia A, Beccari T, Parnetti L et al. (2017) Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 12: 11
【0531】

- Martini-Stoica H, Xu Y, Ballabio A, Zheng H (2016) The Autophagy-Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective. *Trends Neurosci* 39: 221-34
 【0532】
- Elmaleh D (2017). Methods For Treating Alzheimer's Disease And Related Disorders. WO Patent No: WO 2017/087962 A1
 【0533】
- Michel D, Chitanda JM, Balogh R, Yang P, Singh J et al. (2012) Design and evaluation of cyclodextrin-based delivery systems to incorporate poorly soluble curcumin analogs for the treatment of melanoma. *Eur J Pharm Biopharm* 81: 548-56
 【0534】
- Hunter R, Stellenboom N, Caira MR (2008) Efficient one-pot synthesis of unsymmetrical cysteine disulfides. *Synlett*: 252-4
 【0535】
- Butt AM, Mohd Amin MC, Katas H (2015) Synergistic effect of pH-responsive folate-functionalized poloxamer 407-TPGS-mixed micelles on targeted delivery of anticancer drugs. *Int J Nanomedicine* 10: 1321-34
 【0536】
- Wittkowski KM, Sonakya V, Bigio B, Tonn MK, Shic F et al. (2014) A novel computational biostatistics approach implies impaired dephosphorylation of growth factor receptors as associated with severity of autism. *Transl Psychiatry* 4: e354
 【0537】
- Waugh MG (2015) PIPs in neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 1851: 1066-82
 【0538】
- Prakash AS, Abbott PJ (2001) Safety evaluation of certain food additives and contaminants: alpha-cyclodextrin. WHO/JECFA Food Additive Series 48: 1030
 【0539】
- Committee for Human Medicinal Products (CHMP) (2017) Cyclodextrins used as excipients. European Medicines Agency: EMA/CHMP/333892/2013
 【0540】
- European Medicines Agency (2017) Annex to the European Commission guideline on 'Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use'. EMA/CHMP/302620/2017/EN
 【0541】
- Tatusova TA, Madden TL (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS microbiology letters* 174: 247-50
 【0542】
- Ooms Lisa M, Binge Lauren C, Davies Elizabeth M, Rahman P, Conway James RW et al. (2015) The Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase PIPP Regulates AKT1-Dependent Breast Cancer Growth and Metastasis. *Cancer cell* 28: 155-69
 【0543】
- Ma K, Cheung SM, Marshall AJ, Duronio V (2008) PI(3,4,5)P3 and PI(3,4)P2 levels correlate with PKB/akt phosphorylation at Thr308 and Ser473, respectively; PI(3,4)P2 levels determine PKB activity. *Cell Signal* 20: 50

684-94

【 0 5 4 4 】

Majerus PW, York JD (2009) Phosphoinositide phosphatases and disease. *Journal of Lipid Research* 50: S249-S54

【 0 5 4 5 】

Bridges D, Saltiel AR (2015) Phosphoinositides: Key modulators of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1851: 857-66

【 0 5 4 6 】

Woolley JF, Dzenladze I, Salmena L (2015) Phosphoinositide signaling in cancer: INPP4B Akt(s) out. *Trends Mol Med* 21: 530-2

10

【 0 5 4 7 】

Chew CL, Chen M, Pandolfi PP (2016) Endosome and INPP4B. *Oncotarget* 7: 5-6

【 0 5 4 8 】

O'Neill C (2013) PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. *Experimental gerontology* 48: 647-53

【 0 5 4 9 】

Mayer IA, Arteaga CL (2016) The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu Rev Med* 67: 11-28

20

【 0 5 5 0 】

Vecsernyes M, Fenyvesi F, Bacsakay I, Deli MA, Szente L et al. (2014) Cyclodextrins, blood-brain barrier, and treatment of neurological diseases. *Arch Med Res* 45: 711-29

【 0 5 5 1 】

Rivers JR, Maggo SD, Ashton JC (2012) Neuroprotective effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in hypoxia-ischemia. *Neuroreport* 23: 134-8

【 0 5 5 2 】

Zimmer S, Grebe A, Bakke SS, Bode N, Halvorsen B et al. (2016) Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming. *Sci Transl Med* 8: 333ra50

30

【 0 5 5 3 】

Walenbergh SM, Houben T, Hendriks T, Jeurissen ML, van Gorp PJ et al. (2015) Weekly treatment of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin improves intracellular cholesterol levels in LDL receptor knockout mice. *Int J Mol Sci* 16: 21056-69

【 0 5 5 4 】

Dos Santos AG, Bayiha JC, Dufour G, Cataldo D, Evrard B et al. (2017) Changes in membrane biophysical properties induced by the Budesonide/Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Biochim Biophys Acta* 1859: 1930-40

40

【 0 5 5 5 】

Cataldo D, Evrard B, Noel A, Foldart J-M (2015). Use Of Cyclodextrin For Treatment And Prevention Of Bronchial Inflammatory Diseases. US Patent No: US 9034846 B2, US 9034846 B2:

【 0 5 5 6 】

Llanos P, Contreras-Ferrat A, Georgiev T, Osorio-Fuentealba C, Espinosa A et al. (2015) The cholesterol-lowering agent methyl-beta-cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *American journal of physiology Endo*

50

crinology and metabolism 308: E294-305

【 0 5 5 7 】

Prior M, Lehmann S, Sy MS, Molloy B, McMahon HE (2007) Cyclodextrins inhibit replication of scrapie prion protein in cell culture. *Journal of virology* 81: 11195-207

【 0 5 5 8 】

Danthi P, Chow M (2004) Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry. *Journal of virology* 78: 33-41

【 0 5 5 9 】

Balla T (2013) Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiological Reviews* 93: 1019-137 10

【 0 5 6 0 】

Shishido TK, Jokela J, Kolehmainen CT, Fewer DP, Wahlsten M et al. (2015) Antifungal activity improved by coproduction of cyclodextrins and anabaenolysins in *Cyanobacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 13669-74

【 0 5 6 1 】

Abou Daher A, El Jalkh T, Eid AA, Fornoni A, Marples B et al. (2017) Translational Aspects of Sphingolipid Metabolism in Renal Disorders. *Int J Mol Sci* 18 20

【 0 5 6 2 】

Viaud J, Mansour R, Antkowiak A, Mujalli A, Valet C et al. (2016) Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie* 125: 250-8

【 0 5 6 3 】

Falasca M (2012, ed)^(2012, eds) *Phosphoinositides and Disease*. (Vogt, PK (ed) *Current topics in microbiology and immunology*) Dordrecht: Springer, Pages

【 0 5 6 4 】

Wang C, Telpoukhovskaia MA, Bahr BA, Chen X, Gan L (2017) Endo-lysosomal dysfunction: a converging mechanism in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol* 48: 52-8 30

【 0 5 6 5 】

Bishop DV (2010) Which neurodevelopmental disorders get researched and why? *PLoS One* 5: e15112

【 0 5 6 6 】

Sullivan PM, Zhou X, Hu F (2017) Autophagy-Lysosome Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Lobar Degeneration. In: Sharma, PD (ed) *Lysosomes - Associated Diseases and Methods to Study Their Function*. Rijeka: InTech, 63-91 40

【 0 5 6 7 】

Irie T, Uekama K (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. II. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* 86: 147-62

【 0 5 6 8 】

Brewster ME, Loftsson T (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 645-66

【 0 5 6 9 】

Loftsson T, Brewster ME (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci* 85: 1017-25

【 0 5 7 0 】

- Stella VJ, He Q (2008) Cyclodextrins. *Toxicol Pathol* 36: 30-42
 【0571】
- Irie T, Otagiri M, Sunada M, Uekama K, Ohtani Y et al. (1982) Cyclo dextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vi tro. *J Pharmacobiodyn* 5: 741-4
 【0572】
- Roka E, Ujhelyi Z, Deli M, Bocsik A, Fenyvesi E et al. (2015) Evalu ation of the Cytotoxicity of alpha-Cyclodextrin Derivatives on the Caco -2 Cell Line and Human Erythrocytes. *Molecules* 20: 20269-85
 【0573】 10
- Ono N, Arima H, Hirayama F, Uekama K (2001) A moderate interaction o f maltosyl-alpha-cyclodextrin with Caco-2 cells in comparison with the parent cyclodextrin. *Biol Pharm Bull* 24: 395-402
 【0574】
- Ward S, O'Donnell P, Fernandez S, Vite CH (2010) 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with Niemann-Pick type C disease. *Pediatr Res* 68: 52-6
 【0575】
- Ory DS, Ottinger EA, Farhat NY, King KA, Jiang X et al. (2017) Intr athecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin decreases neurological disease pr ogression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label , phase 1-2 trial. *Lancet* 390: 1758-68
 【0576】 20
- Vance JE, Karten B (2014) Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *Journal of Lipid Research* 55: 1609-21
 【0577】
- Liu B, Turley SD, Burns DK, Miller AM, Repa JJ et al. (2009) Revers al of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver d ysfunction and neurodegeneration in the npc1-/- mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2377-82
 【0578】 30
- NIH (2015) Study of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (VTS-270) to Treat N iemann-Pick Type C1 (NPC1) Disease. *ClinicalTrials.gov*: NCT02534844
 【0579】
- Zarzycki PK, Ohta H, Saito Y, Jinno K (2008) Interaction of native a lpha-cyclodextrin, beta-cyclodextrin and gamma-cyclodextrin and their hydr oxypropyl derivatives with selected organic low molecular mass compounds at elevated and subambient temperature under RP-HPLC conditions. *Anal Bioanal Chem* 391: 2793-801
 【0580】 40
- Fauvelle F, Debouzy JC, Crouzy S, Goschl M, Chapron Y (1997) Mechanis m of alpha-cyclodextrin-induced hemolysis. 1. The two-step extraction of phosphatidylinositol from the membrane. *J Pharm Sci* 86: 935-43
 【0581】
- Cai W, Du A, Feng K, Zhao X, Qian L et al. (2013) Adenylyl cyclase 6 activation negatively regulates TLR4 signaling through lipid raft-me diated endocytosis. *J Immunol* 191: 6093-100
 【0582】
- Huang Z, London E (2013) Effect of cyclodextrin and membrane lipid st 50

structure upon cyclodextrin-lipid interaction. *Langmuir* 29: 14631-8

【0583】

Takahashi S, Homma K, Zhou Y, Nishimura S, Duan C et al. (2016) Susceptibility of outer hair cells to cholesterol chelator 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin is prestin-dependent. *Sci Rep* 6: 21973

【0584】

Kamar RI, Organ-Darling LE, Raphael RM (2012) Membrane Cholesterol Strongly Influences Confined Diffusion of Prestin. *Biophysical Journal* 103: 1627-36

【0585】

Kantner I, Erben RG (2012) Long-term parenteral administration of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin causes bone loss. *Toxicol Pathol* 40: 742-50

【0586】

Liu X-M, Wiswall AT, Rutledge JE, Akhter MP, Cullen DM et al. (2008) Osteotropic β -cyclodextrin for local bone regeneration. *Biomaterials* 29: 1686-92

【0587】

Booij LH (2009) Cyclodextrins and the emergence of sugammadex. *Anaesthesia* 64 Suppl 1: 31-7

【0588】

Merkus FW, Verhoef JC, Romeijn SG, Schipper NG (1991) Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats. *Pharm Res* 8: 588-92

【0589】

Shao Z, Krishnamoorthy R, Mitra AK (1992) CYCLODEXTRINS AS NASAL ABSORPTION PROMOTERS OF INSULIN - MECHANISTIC EVALUATIONS. *Pharmaceutical Research* 9: 1157-63

【0590】

Sakurai T, Sakurai A, Chen Y, Vaisman BL, Amar MJ et al. (2017) Dietary alpha-cyclodextrin reduces atherosclerosis and modifies gut flora in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Nutr Food Res* 61

【0591】

Liu ZC, Samanta A, Lei JY, Sun JL, Wang YP et al. (2016) Cation-Dependent Gold Recovery with α -Cyclodextrin Facilitated by Second-Sphere Coordination. *Journal of the American Chemical Society* 138: 11643-53

【0592】

Szente L, Fenyvesi E (2017) Cyclodextrin-Lipid Complexes: Cavity Size Matters. *Structural Chemistry* 28: 479-92

【0593】

Maarup TJ, Chen AH, Porter FD, Farhat NY, Ory DS et al. (2015) Intrathecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in a single patient with Niemann-Pick C1. *Mol Genet Metab* 116: 75-9

【0594】

Tiribuzi R, Orlacchio A, Crispoltoni L, Maiotti M, Zampolini M et al. (2011) Lysosomal beta-galactosidase and beta-hexosaminidase activities correlate with clinical stages of dementia associated with Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *J Alzheimers Dis* 24: 785-97

【0595】

Halder K, Alam S (2017). Methods For Detection And Treatment Of Neurodegenerative Diseases. US Patent No: US 2017/0044590 A1

10

20

30

40

50

【 0 5 9 6 】

Kim T-W, Di Paolo G, Kang Min SUK, Berman D, McIntire Laura Beth J (2012). Phosphoinositide Modulation For The Treatment Of Neurodegenerative Diseases. US Patent No: US 8288378 B2, US 8,288,378:

【 0 5 9 7 】

Wittkowski KM (2014). Treatment and prevention of autism and autism spectrum disorders. U.S., US 2016/0206581 A1:

【 0 5 9 8 】

Michailidou K, Lindstrom S, Dennis J, Beesley J, Hui S et al. (2017) Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature* 551: 92-4 10

【 0 5 9 9 】

Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M et al. (2007) A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nature Genet* 39: 870-4

【 0 6 0 0 】

Garcia-Closas M, Couch FJ, Lindstrom S, Michailidou K, Schmidt MK et al. (2013) Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nat Genet* 45: 392-8, 8e1-2 20

【 0 6 0 1 】

Mann HB, Whitney DR (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat* 18: 50-60

【 0 6 0 2 】

Wilcoxon F (1954) Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics* 1: 80-3

【 0 6 0 3 】

Armitage P (1955) Tests for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics* 11: 375-86

【 0 6 0 4 】

Hoeffding W (1948) A class of statistics with asymptotically normal distribution. *Ann Math Stat* 19: 293-325 30

【 0 6 0 5 】

Wittkowski KM, Sonakya V, Song T, Seybold MP, Keddache M et al. (2013) From single-SNP to wide-locus: genome-wide association studies identifying functionally related genes and intragenic regions in small sample studies. *Pharmacogenomics* 14: 391-401

【 0 6 0 6 】

Pearson TA, Manolio TA (2008) How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 299: 1335-44 40

【 0 6 0 7 】

Cleveland WS, Devlin SJ (1988) Locally Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting. *J Am Statist Assoc* 83: 596-610

【 0 6 0 8 】

Tukey JW (1980) We Need Both Exploratory and Confirmatory. *American Statistician* 34: 23-5

【 0 6 0 9 】

Fisher RA (1956) *Statistical Methods and Scientific Inference*. New York: Hafner 50

【 0 6 1 0 】

Gigerenzer G (2004) Dread risk, September 11, and fatal traffic accidents. *Psychol Sci* 15: 286-7

【 0 6 1 1 】

Tukey JW (1977) *Exploratory data analysis*. Reading, Mass.: Addison-Wesley

【 0 6 1 2 】

Tukey JW (1962) The future of data-analysis. *Ann Math Stat* 33: 1-67

【 0 6 1 3 】

Cicek MS, Cunningham JM, Fridley BL, Serie DJ, Bamlet WR et al. (2012) Colorectal cancer linkage on chromosomes 4q21, 8q13, 12q24, and 15q22. *PLoS One* 7: e38175 10

【 0 6 1 4 】

Shulga YV, Myers DS, Ivanova PT, Milne SB, Brown HA et al. (2010) Molecular species of phosphatidylinositol-cycle intermediates in the endoplasmic reticulum and plasma membrane. *Biochemistry* 49: 312-7

【 0 6 1 5 】

Busa WB (1988) Roles for the phosphatidylinositol cycle in early development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 320: 415-26

【 0 6 1 6 】

Kerr WG (2011) Inhibitor and activator: dual functions for SHIP in immunity and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1217: 1-17 20

【 0 6 1 7 】

Bosch A, Li Z, Bergamaschi A, Ellis H, Toska E et al. (2015) PI3K inhibition results in enhanced estrogen receptor function and dependence in hormone receptor-positive breast cancer. *Sci Transl Med* 7: 283ra51-ra51

【 0 6 1 8 】

Sengelaub CA, Navrazhina K, Ross JB, Halberg N, Tavazoie SF (2015) PTN2 and PLC β 1 promote metastatic breast cancer cell migration through PI(4,5)P₂-dependent actin remodeling. *The EMBO Journal* 30

【 0 6 1 9 】

Mellman I, Yarden Y (2013) *Endocytosis and Cancer*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5

【 0 6 2 0 】

Crews L, Tsigelny I, Hashimoto M, Masliah E (2009) Role of synucleins in Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 16: 306-17

【 0 6 2 1 】

Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y et al. (2008) Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PLoS One* 3: e3135 40

【 0 6 2 2 】

Feldman AL, Johansson AL, Lambert PC, Sieurin J, Yang F et al. (2014) Familial coaggregation of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 42: 69-80

【 0 6 2 3 】

Moskvina V, Harold D, Russo G, et al. (2013) Analysis of genome-wide association studies of alzheimer disease and of parkinson disease to determine if these 2 diseases share a common genetic risk. *JAMA Neurology* 70: 1268-76 50

【 0 6 2 4 】

Guerreiro R, Escott-Price V, Darwent L, Parkkinen L, Ansorge O et al. (2016) Genome-wide analysis of genetic correlation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Aging* 38: 214 e7-10

【 0 6 2 5 】

Bras J, Guerreiro R, Darwent L, Parkkinen L, Ansorge O et al. (2014a) Genetic analysis implicates APOE, SNCA and suggests lysosomal dysfunction in the etiology of dementia with Lewy bodies. *Hum Mol Genet* 23: 6139-46

10

【 0 6 2 6 】

Disse M, Reich H, Lee PK, Schram SS (2016) A Review of the Association Between Parkinson Disease and Malignant Melanoma. *Dermatol Surg* 42: 141-6

【 0 6 2 7 】

Hanson HA, Horn KP, Rasmussen KM, Hoffman JM, Smith KR (2016) Is Cancer Protective for Subsequent Alzheimer's Disease Risk? Evidence From the Utah Population Database. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*

【 0 6 2 8 】

Malkki H (2016) Alzheimer disease: Cancer immunotherapy drug reduces symptoms of Alzheimer disease in mice. *Nat Rev Neurol* 12: 126-

20

【 0 6 2 9 】

Cai R, Hao Z, Winslett M, Xiao X, Yang Y et al. (2015) Deterministic identification of specific individuals from GWAS results. *Bioinformatics* 31: 1701-7

【 0 6 3 0 】

Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL et al. (2005) Microtubule-associated protein tau: A marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8315-20

【 0 6 3 1 】

Lopez Gonzalez I, Garcia-Esparcia P, Llorens F, Ferrer I (2016) Genetic and Transcriptomic Profiles of Inflammation in Neurodegenerative Diseases: Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob and Tauopathies. *Int J Mol Sci* 17: 206

30

【 0 6 3 2 】

Kawate T, Iwaya K, Koshikawa K, Moriya T, Yamasaki T et al. (2015) High levels of DJ-1 protein and isoelectric point 6.3 isoform in sera of breast cancer patients. *Cancer Sci* 106: 938-43

【 0 6 3 3 】

Rivero-Rios P, Gomez-Suaga P, Fernandez B, Madero-Perez J, Schwab AJ et al. (2015) Alterations in late endocytic trafficking related to the pathobiology of LRRK2-linked Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans* 43: 390-5

40

【 0 6 3 4 】

Agalliu I, San Luciano M, Mirelman A, Giladi N, Waro B et al. (2015) Higher frequency of certain cancers in LRRK2 G2019S mutation carriers with Parkinson disease: a pooled analysis. *JAMA Neurol* 72: 58-65

【 0 6 3 5 】

Farge E, Ojcius DM, Subtil A, Dautry-Varsat A (1999) Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane

50

of living cells. *Am J Physiol* 276: C725-33

【0636】

Levano K, Sobocki T, Jayman F, Debata PR, Sobocka MB et al. (2009) A genetic strategy involving a glycosyltransferase promoter and a lipid translocating enzyme to eliminate cancer cells. *Glycoconj J* 26: 739-48

【0637】

Levano K, Punia V, Raghunath M, Debata PR, Curcio GM et al. (2012) Atp8a1 deficiency is associated with phosphatidylserine externalization in hippocampus and delayed hippocampus-dependent learning. *J Neurochem* 120: 302-13

【0638】

Andersen JP, Vestergaard AL, Mikkelsen SA, Mogensen LS, Chalat M et al. (2016) P4-ATPases as Phospholipid Flippases-Structure, Function, and Enigmas. *Front Physiol* 7: 275

【0639】

da Costa A, Lenze D, Hummel M, Kohn B, Gruber AD et al. (2012) Identification of six potential markers for the detection of circulating canine mammary tumour cells in the peripheral blood identified by microarray analysis. *J Comp Pathol* 146: 143-51

【0640】

Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J et al. (2006) The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* 314: 268-74

【0641】

Lee BH, Taylor MG, Robinet P, Smith JD, Schweitzer J et al. (2013) Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. *Cancer Res* 73: 1211-8

【0642】

Sekine Y, Demosky SJ, Stonik JA, Furuya Y, Koike H et al. (2010) High-density lipoprotein induces proliferation and migration of human prostate androgen-independent cancer cells by an ABCA1-dependent mechanism. *Mol Cancer Res* 8: 1284-94

【0643】

Trasino SE, Kim YS, Wang TT (2009) Ligand, receptor, and cell type-dependent regulation of ABCA1 and ABCG1 mRNA in prostate cancer epithelial cells. *Mol Cancer Ther* 8: 1934-45

【0644】

Zhu X, Libby RT, de Vries WN, Smith RS, Wright DL et al. (2012) Mutations in a P-Type ATPase Gene Cause Axonal Degeneration. *PLoS Genetics* 8: e1002853

【0645】

Soderberg M, Edlund C, Alafuzoff I, Kristensson K, Dallner G (1992) Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J Neurochem* 59: 1646-53

【0646】

Li H, Wetten S, Li L, St Jean PL, Upmanyu R et al. (2008) Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 65: 45-53

【0647】

- Piccollo A, Malvezzi M, Accardi A (2015) TMEM16 proteins: unknown structure and confusing functions. *J Mol Biol* 427: 94-105
 【0648】
- Weber GF (2015) Molecular Analysis of a Recurrent Sarcoma Identifies a Mutation in FAF1. *Sarcoma* 2015: 839182
 【0649】
- Sherva R, Tripodis Y, Bennett DA, Chibnik LB, Crane PK et al. (2014) Genome-wide association study of the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10: 45-52
 【0650】 10
- Hamon Y, Trompier D, Ma Z, Venegas V, Pophillat M et al. (2006) Cooperation between Engulfment Receptors: The Case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS One* 1: e120
 【0651】
- Zhao W, Prijic S, Urban BC, Tisza MJ, Zuo Y et al. (2016) Candidate Antimetastasis Drugs Suppress the Metastatic Capacity of Breast Cancer Cells by Reducing Membrane Fluidity. *Cancer Res* 76: 2037-49
 【0652】
- Schimanski S, Wild PJ, Treeck O, Horn F, Sigrüener A et al. (2010) Expression of the lipid transporters ABCA3 and ABCA1 is diminished in human breast cancer tissue. *Horm Metab Res* 42: 102-9
 【0653】 20
- Dong Y, Gou Y, Li Y, Liu Y, Bai J (2015) Synaptojanin cooperates in vivo with endophilin through an unexpected mechanism. *Elife* 4
 【0654】
- Pinho R, Guedes LC, Soreq L, Lobo PP, Mestre T et al. (2016) Gene Expression Differences in Peripheral Blood of Parkinson's Disease Patients with Distinct Progression Profiles. *PLoS One* 11: e0157852
 【0655】
- Dong X, Liu T, Xu S, Zhu L, Zhang P et al. (2016) The relevance of ABCA1 R219K polymorphisms and serum ABCA1 protein concentration to Parkinson's disease pathogenesis and classification: a case-control study. *Genes & Genomics* 38: 243-50
 【0656】 30
- Loane DJ, Washington PM, Vardanian L, Pocivavsek A, Hoe HS et al. (2011) Modulation of ABCA1 by an LXR agonist reduces beta-amyloid levels and improves outcome after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 28: 225-36
 【0657】
- Koldamova R, Fitz NF, Lefterov I (2014) ATP-binding cassette transporter ABCA1: from metabolism to neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 72 Pt A: 13-21
 【0658】 40
- Pahnke J, Langer O, Krohn M (2014) Alzheimer's and ABC transporters--new opportunities for diagnostics and treatment. *Neurobiol Dis* 72 Pt A: 54-60
 【0659】
- Boehm-Cagan A, Bar R, Harats D, Shaish A, Levkovitz H et al. (2016) Differential Effects of apoE4 and Activation of ABCA1 on Brain and Plasma Lipoproteins. *PLoS One* 11: e0166195 50

【 0 6 6 0 】

Nordestgaard LT, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R (2015) Loss-of-function mutation in ABCA1 and risk of Alzheimer's disease and cerebrovascular disease. *Alzheimers & Dementia* 11: 1430-8

【 0 6 6 1 】

Valenza M, Marullo M, Di Paolo E, Cesana E, Zuccato C et al. (2015) Disruption of astrocyte-neuron cholesterol cross talk affects neuronal function in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 22: 690-702

【 0 6 6 2 】

Bradley RM, Marvyn PM, Aristizabal Henao JJ, Mardian EB, George S et al. (2015) Acylglycerophosphate acyltransferase 4 (AGPAT4) is a mitochondrial lysophosphatidic acid acyltransferase that regulates brain phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylinositol levels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851: 1566-76 10

【 0 6 6 3 】

Sahay D, Leblanc R, Grunewald TG, Ambatipudi S, Ribeiro J et al. (2015) The LPA1/ZEB1/miR-21-activation pathway regulates metastasis in basal breast cancer. *Oncotarget* 6: 20604-20 20

【 0 6 6 4 】

Hopkins MM, Zhang Z, Liu Z, Meier KE (2016) Eicosapentanoic Acid and Other Free Fatty Acid Receptor Agonists Inhibit Lysophosphatidic Acid- and Epidermal Growth Factor-Induced Proliferation of Human Breast Cancer Cells. *J Clin Med* 5

【 0 6 6 5 】

Gatto F, Miess H, Schulze A, Nielsen J (2015) Flux balance analysis predicts essential genes in clear cell renal cell carcinoma metabolism. *Sci Rep* 5: 10738

【 0 6 6 6 】

Cheng D, Jenner AM, Shui G, Cheong WF, Mitchell TW et al. (2011) Lipid Pathway Alterations in Parkinson's Disease Primary Visual Cortex. *PLoS One* 6: e17299 30

【 0 6 6 7 】

Sherva R, Baldwin CT, Inzelberg R, Vardarajan B, Cupples LA et al. (2011) Identification of novel candidate genes for Alzheimer's disease by autozygosity mapping using genome wide SNP data. *J Alzheimers Dis* 23: 349-59

【 0 6 6 8 】

Sakane F, Kanoh H (1997) Molecules in focus: diacylglycerol kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1139-43 40

【 0 6 6 9 】

Filigheddu N, Cutrupi S, Porporato PE, Riboni F, Baldanzi G et al. (2007) Diacylglycerol kinase is required for HGF-induced invasiveness and anchorage-independent growth of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Res* 27: 1489-92

【 0 6 7 0 】

Bektas M, Payne SG, Liu H, Goparaju S, Milstien S et al. (2005) A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *J Cell Biol* 169: 801-11 50

【 0 6 7 1 】

Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, Kavvoura FK, Bagade S et al. (2012) Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet* 8: e1002548

【 0 6 7 2 】

Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG et al. (2014) Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet* 46: 989-93

【 0 6 7 3 】

Zhu XC, Cao L, Tan MS, Jiang T, Wang HF et al. (2016) Association of Parkinson's Disease GWAS-Linked Loci with Alzheimer's Disease in Han Chinese. *Mol Neurobiol*

10

【 0 6 7 4 】

Yu P, Agbaegbu C, Malide DA, Wu X, Katagiri Y et al. (2015) Cooperative interactions of LPPR family members in membrane localization and alteration of cellular morphology. *Journal of Cell Science* 128: 3210-22

【 0 6 7 5 】

Moran LB, Duke DC, Deprez M, Dexter DT, Pearce RK et al. (2006) Whole genome expression profiling of the medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurogenetics* 7: 1-11

20

【 0 6 7 6 】

Ben-Chetrit N, Chetrit D, Russell R, Korner C, Mancini M et al. (2015) Synaptojanin 2 is a druggable mediator of metastasis and the gene is overexpressed and amplified in breast cancer. *Sci Signal* 8: ra7

【 0 6 7 7 】

Rossi MR, Hawthorn L, Platt J, Burkhardt T, Cowell JK et al. (2005) Identification of inactivating mutations in the JAK1, SYNJ2, and CLPTM1 genes in prostate cancer cells using inhibition of nonsense-mediated decay and microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 161: 97-103

【 0 6 7 8 】

Cao J, Gaamouch FE, Meabon JS, Meeker KD, Zhu L et al. (2017) ApoE4-associated phospholipid dysregulation contributes to development of Tau hyper-phosphorylation after traumatic brain injury. *Sci Rep* 7: 11372

30

【 0 6 7 9 】

Koran ME, Hohman TJ, Meda SA, Thornton-Wells TA (2014) Genetic interactions within inositol-related pathways are associated with longitudinal changes in ventricle size. *J Alzheimers Dis* 38: 145-54

【 0 6 8 0 】

Erneux C, Ghosh S, Ramos AR, Edimo WE (2016) New Functions of the Inositol Polyphosphate 5-Phosphatases in Cancer. *Curr Pharm Des* 22: 2309-14

40

【 0 6 8 1 】

Zhang H-Y, Liang F, Jia Z-L, Song S-T, Jiang Z-F (2013) PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncology Letters* 6: 161-8

【 0 6 8 2 】

Pourmand G, Ziaee AA, Abedi AR, Mehraei A, Alavi HA et al. (2007) Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urology journal* 4: 95-100

【 0 6 8 3 】

50

- Choubey V, Cagalinec M, Liiv J, Safiulina D, Hickey MA et al. (2014) BECN1 is involved in the initiation of mitophagy: it facilitates PAR K2 translocation to mitochondria. *Autophagy* 10: 1105-19
 【0684】
- Frere S, Slutsky I (2016) Targeting PTEN interactions for Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 19: 416-8
 【0685】
- Khalil B, El Fissi N, Aouane A, Cabirol-Pol MJ, Rival T et al. (2015) PINK1-induced mitophagy promotes neuroprotection in Huntington's disease. *Cell Death Dis* 6: e1617
 【0686】
- Wilson PM, Fryer RH, Fang Y, Hatten ME (2010) Astn2, A Novel Member of the Astrotactin Gene Family, Regulates the Trafficking of ASTN1 during Glial-Guided Neuronal Migration. *The Journal of Neuroscience* 30: 8529-40
 【0687】
- Solecki DJ (2012) Sticky situations: recent advances in control of cell adhesion during neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* 22: 791-8
 【0688】
- Kawauchi T (2012) Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. *Int J Mol Sci* 13: 4564-90
 【0689】
- Wang KS, Tonarelli S, Luo X, Wang L, Su B et al. (2015) Polymorphisms within ASTN2 gene are associated with age at onset of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 122: 701-8
 【0690】
- Anazi S, Maddirevula S, Fageih E, Alsedairy H, Alzahrani F et al. (2016) Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. *Mol Psychiatry*
 【0691】
- Rainero E, Howe JD, Caswell PT, Jamieson NB, Anderson K et al. (2015) Ligand-Occupied Integrin Internalization Links Nutrient Signaling to Invasive Migration. *Cell Rep* 10: 398-413
 【0692】
- McCleverty CJ, Lin DC, Liddington RC (2007) Structure of the PTB domain of tensin1 and a model for its recruitment to fibrillar adhesions. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 16: 1223-9
 【0693】
- Burghel GJ, Lin W-Y, Whitehouse H, Brock I, Hammond D et al. (2013) Identification of Candidate Driver Genes in Common Focal Chromosomal Aberrations of Microsatellite Stable Colorectal Cancer. *PLoS One* 8: e83859
 【0694】
- Hall EH, Daugherty AE, Choi CK, Horwitz AF, Brautigan DL (2009) Tensin1 requires protein phosphatase-1alpha in addition to RhoGAP DLC-1 to control cell polarization, migration, and invasion. *J Biol Chem* 284: 34713-22
 【0695】
- Shen Q, He B, Lu N, Conradt B, Grant BD et al. (2013) Phagocytic r

ceptor signaling regulates clathrin and epsin-mediated cytoskeletal remodeling during apoptotic cell engulfment in *C. elegans*. *Development* 140: 3230-43

【0696】

Singh TD, Park SY, Bae JS, Yun Y, Bae YC et al. (2010) MEGF10 functions as a receptor for the uptake of amyloid-beta. *FEBS Lett* 584: 3936-42

【0697】

Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G et al. (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14: 677-85 10

【0698】

Hurley JH, Odorizzi G (2012) Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* 14: 654-5

【0699】

Yang Y, Hong Q, Shi P, Liu Z, Luo J et al. (2013) Elevated expression of syntenin in breast cancer is correlated with lymph node metastasis and poor patient survival. *Breast Cancer Res* 15: R50

【0700】

Tomlinson PR, Zheng Y, Fischer R, Heidasch R, Gardiner C et al. (2015) Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol* 2: 353-61 20

【0701】

Leonova EI, Galzitskaya OV (2015) Role of Syndecans in Lipid Metabolism and Human Diseases. *Adv Exp Med Biol* 855: 241-58

【0702】

Persaud A, Alberts P, Hayes M, Guettler S, Clarke I et al. (2011) Nedd4-1 binds and ubiquitylates activated FGFR1 to control its endocytosis and function. *EMBO J* 30: 3259-73

【0703】

Jung S, Li C, Jeong D, Lee S, Ohk J et al. (2013) Oncogenic function of p34^{SEI-1} via NEDD4-mediated PTEN ubiquitination/degradation and activation of the PI3K/AKT pathway. *Int J Oncol* 43: 1587-95 30

【0704】

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W et al. (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436: 518-24

【0705】

Liao CJ, Chi HC, Tsai CY, Chen CD, Wu SM et al. (2015) A novel small-form NEDD4 regulates cell invasiveness and apoptosis to promote tumor metastasis. *Oncotarget* 6: 9341-54 40

【0706】

Perrett RM, Alexopoulou Z, Tofaris GK (2015) The endosomal pathway in Parkinson's disease. *Mol Cell Neurosci* 66: 21-8

【0707】

Rodrigues EM, Scudder SL, Goo MS, Patrick GN (2016) Abeta-Induced Synaptic Alterations Require the E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1. *J Neurosci* 36: 1590-5

【0708】

Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A, Ojala J, Haapasalo A et al. (2013) Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The 50

e potential role of Beclin 1 interactome. *Prog Neurobiol* 106-107: 33-54

【0709】

Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, Ogata K, Ishii KJ et al. (2011) NLR P4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1. *J Immunol* 186: 1646-55

【0710】

Zhang Y, Sauler M, Shinn AS, Gong H, Haslip M et al. (2014) Endothelial PINK1 Mediates the Protective Effects of NLRP3 Deficiency during Lethal Oxidant Injury. *The Journal of Immunology* 192: 5296-304

10

【0711】

Rohatgi RA, Shaw LM (2016) An autophagy-independent function for Beclin 1 in cancer. *Mol Cell Oncol* 3

【0712】

Zhiyu W, Wang N, Wang Q, Peng C, Zhang J et al. (2016) The inflammasome: an emerging therapeutic oncotarget for cancer prevention. *Oncotarget* 7: 50766

【0713】

Wang JD, Cao YL, Li Q, Yang YP, Jin M et al. (2015) A pivotal role of FOS-mediated BECN1/Beclin 1 upregulation in dopamine D2 and D3 receptor agonist-induced autophagy activation. *Autophagy* 11: 2057-73

20

【0714】

Antonelli A, Llado A, Sanchez-Valle R, Sanfeliu C, Casserras T et al. (2015) Altered Blood Gene Expression of Tumor-Related Genes (PRKCB, BECN1, and CDKN2A) in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*

【0715】

Swaminathan G, Zhu W, Plowey ED (2016) BECN1/Beclin 1 sorts cell-surface APP/amyloid beta precursor protein for lysosomal degradation. *Autophagy* 12: 2404-19

【0716】

Inabe K, Ishiai M, Scharenberg AM, Freshney N, Downward J et al. (2002) Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J Exp Med* 195: 189-200

30

【0717】

Malhotra S, Kovats S, Zhang W, Coggeshall KM (2009) Vav and Rac Activation in B Cell Antigen Receptor Endocytosis Involves Vav Recruitment to the Adapter Protein LAB. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 36202-12

【0718】

Chen XIN, Chen SI, Liu X-A, Zhou W-B, Ma R-R et al. (2015) Vav3 onco gene is upregulated and a poor prognostic factor in breast cancer patients. *Oncology Letters* 9: 2143-8

40

【0719】

Wilkinson BL, Cramer PE, Varvel NH, Reed-Geaghan E, Jiang Q et al. (2012) Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging* 33: 197.e21-.e32

【0720】

Haddad SA, Ruiz-Narvaez EA, Haiman CA, Sucheston-Campbell LE, Bensen JT et al. (2016) An exome-wide analysis of low frequency and rare variants in relation to risk of breast cancer in African American Women:

50

the AMBER Consortium. Carcinogenesis

【 0 7 2 1 】

Lin D-C, Xu L, Ding L-W, Sharma A, Liu L-Z et al. (2013) Genomic and functional characterizations of phosphodiesterase subtype 4D in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 6109-14

【 0 7 2 2 】

Yang L, Calingasan NY, Lorenzo BJ, Beal MF (2008) Attenuation of MPTP neurotoxicity by rolipram, a specific inhibitor of phosphodiesterase I V. *Exp Neurol* 211: 311-4

【 0 7 2 3 】

Gurney ME, D'Amato EC, Burgin AB (2015) Phosphodiesterase-4 (PDE4) molecular pharmacology and Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 12: 49-56

【 0 7 2 4 】

Pfeffer SR (1999) Motivating endosome motility. *Nat Cell Biol* 1: E145-E7

【 0 7 2 5 】

Walter J, Fluhner R, Hartung B, Willem M, Kaether C et al. (2001) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 276: 14634-41

【 0 7 2 6 】

Armstrong A, Mattsson N, Appelqvist H, Janefjord C, Sandin L et al. (2014) Lysosomal network proteins as potential novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 16: 150-60

【 0 7 2 7 】

Waschbusch D, Michels H, Strassheim S, Ossendorf E, Kessler D et al. (2014) LRRK2 transport is regulated by its novel interacting partner Rab32. *PLoS One* 9: e111632

【 0 7 2 8 】

Bultema JJ, Ambrosio AL, Burek CL, Di Pietro SM (2012) BLOC-2, AP-3, and AP-1 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles. *J Biol Chem* 287: 19550-63

【 0 7 2 9 】

Fukuda M (2016) Multiple Roles of VARP in Endosomal Trafficking: Rabs, Retromer Components and R-SNARE VAMP7 Meet on VARP. *Traffic* 17: 709-19

【 0 7 3 0 】

Wang X, Huang T, Bu G, Xu H (2014) Dysregulation of protein trafficking in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration* 9: 1-9

【 0 7 3 1 】

van Weering JR, Verkade P, Cullen PJ (2012) SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic* 13: 94-107

【 0 7 3 2 】

Zhang QY, Tan MS, Yu JT, Tan L (2015) The Role of Retromer in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*

【 0 7 3 3 】

Rivera J, Megias D, Bravo J (2010) Sorting nexin 6 interacts with breast cancer metastasis suppressor-1 and promotes transcriptional repression. *J Cell Biochem* 111: 1464-72

【 0 7 3 4 】

10

20

30

40

50

- Small SA, Petsko GA (2015) Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat Rev Neurosci* 16: 126-32
【0735】
- Reitz C (2012) The role of intracellular trafficking and the VPS10 domain receptors in Alzheimer's disease. *Future Neurol* 7: 423-31
【0736】
- Gonzalez A, Valeiras M, Sidransky E, Tayebi N (2014) Lysosomal integral membrane protein-2: a new player in lysosome-related pathology. *Mol Genet Metab* 111: 84-91
【0737】 10
- Nishimura Y, Yoshioka K, Bernard O, Bereczky B, Itoh K (2006) A role of LIM kinase 1/cofilin pathway in regulating endocytic trafficking of EGF receptor in human breast cancer cells. *Histochem Cell Biol* 126: 627-38
【0738】
- Nishimura Y, Itoh K, Yoshioka K, Tokuda K, Himeno M (2003) Overexpression of ROCK in human breast cancer cells: evidence that ROCK activity mediates intracellular membrane traffic of lysosomes. *Pathol Oncol Res* 9: 83-95
【0739】 20
- Alcalay RN, Levy OA, Wolf P, Oliva P, Zhang XK et al. (2016) SCARB2 variants and glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis* 2
【0740】
- Shimizu E, Kawahara K, Kajizono M, Sawada M, Nakayama H (2008) IL-4-induced selective clearance of oligomeric beta-amyloid peptide(1-42) by rat primary type 2 microglia. *J Immunol* 181: 6503-13
【0741】
- Bras J, Guerreiro R, Darwent L, Parkkinen L, Ansorge O et al. (2014b) Genetic analysis implicates APOE, SNCA and suggests lysosomal dysfunction in the etiology of dementia with Lewy bodies. *Hum Mol Genet* 23: 6139-46
【0742】 30
- Ahmed H, AlSadek DM (2015) Galectin-3 as a Potential Target to Prevent Cancer Metastasis. *Clin Med Insights Oncol* 9: 113-21
【0743】
- O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, Tully R, Guang MH et al. (2015) The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BB A Clin* 3: 257-75
【0744】 40
- van Dijk KD, Persichetti E, Chiasserini D, Eusebi P, Beccari T et al. (2013) Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 28: 747-54
【0745】
- Parnell E, Palmer TM, Yarwood SJ (2015) The future of EPAC-targeted therapies: agonism versus antagonism. *Trends Pharmacol Sci* 36: 203-14
【0746】
- Almahariq M, Tsalkova T, Mei FC, Chen H, Zhou J et al. (2013) A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. *Mol Pharmacol* 83: 122-8 50

【 0 7 4 7 】

Jiang HL, Sun HF, Gao SP, Li LD, Hu X et al. (2015) Loss of RAB1B promotes triple-negative breast cancer metastasis by activating TGF-beta/SMAD signaling. *Oncotarget* 6: 16352-65

【 0 7 4 8 】

Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE et al. (2010) alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol* 190: 1023-37

【 0 7 4 9 】

Puthiyedth N, Riveros C, Berretta R, Moscato P (2016) Identification of Differentially Expressed Genes through Integrated Study of Alzheimer's Disease Affected Brain Regions. *PLoS One* 11: e0152342

10

【 0 7 5 0 】

Bereczki E, Francis PT, Howlett D, Pereira JB, Hoglund K et al. (2016) Synaptic proteins predict cognitive decline in Alzheimer's disease and Lewy body dementia. *Alzheimers Dement*

【 0 7 5 1 】

Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem* 272: 2520-6

20

【 0 7 5 2 】

Martin TF (2015) PI(4,5)P(2)-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1851: 785-93

【 0 7 5 3 】

Fernandez-Nogueira P, Bragado P, Almendro V, Ametller E, Rios J et al. (2016) Differential expression of neurogenes among breast cancer subtypes identifies high risk patients. *Oncotarget* 7: 5313-26

【 0 7 5 4 】

Keogh MJ, Daud D, Pyle A, Duff J, Griffin H et al. (2015) A novel de novo STXBPL mutation is associated with mitochondrial complex I deficiency and late-onset juvenile-onset parkinsonism. *Neurogenetics* 16: 65-7

30

【 0 7 5 5 】

Campbell IM, Yatsenko SA, Hixson P, Reimschisel T, Thomas M et al. (2012) Novel 9q34.11 gene deletions encompassing combinations of four Mendelian disease genes: STXBPL, SPTAN1, ENG, and TOR1A. *Genet Med* 14: 868-76

【 0 7 5 6 】

Miller JA, Woltjer RL, Goodenbour JM, Horvath S, Geschwind DH (2013) Genes and pathways underlying regional and cell type changes in Alzheimer's disease. *Genome Med* 5: 48

40

【 0 7 5 7 】

Takahashi M, Iseki E, Kosaka K (2000) Cdk5 and munc-18/p67 co-localization in early stage neurofibrillary tangles-bearing neurons in Alzheimer type dementia brains. *J Neurol Sci* 172: 63-9

【 0 7 5 8 】

Law C, Schaan Profes M, Levesque M, Kaltschmidt JA, Verhage M et al. (2016) Normal Molecular Specification and Neurodegenerative Disease-Like Death of Spinal Neurons Lacking the SNARE-Associated Synaptic Protein Munc18-1. *J Neurosci* 36: 561-76

50

【 0 7 5 9 】

Antoniou AC, Beesley J, McGuffog L, Sinilnikova OM, Healey S et al. (2010) Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Res* 70: 9742-54

【 0 7 6 0 】

Day P, Riggs KA, Hasan N, Corbin D, Humphrey D et al. (2011) Syntaxins 3 and 4 mediate vesicular trafficking of alpha5beta1 and alpha3beta1 integrins and cancer cell migration. *Int J Oncol* 39: 863-71

【 0 7 6 1 】

Diao J, Burre J, Vivona S, Cipriano DJ, Sharma M et al. (2013) Native alpha-synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *Elife* 2: e00592

【 0 7 6 2 】

Russell CL, Semerdjieva S, Empson RM, Austen BM, Beesley PW et al. (2012) Amyloid-beta acts as a regulator of neurotransmitter release disrupting the interaction between synaptophysin and VAMP2. *PLoS One* 7: e43201

【 0 7 6 3 】

Lizarbe MA, Barrasa JI, Olmo N, Gavilanes F, Turnay J (2013) Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *Int J Mol Sci* 14: 2652-83

【 0 7 6 4 】

Willshaw A, Grant K, Yan J, Rockliffe N, Ambavarapu S et al. (2004) Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS Lett* 559: 13-21

【 0 7 6 5 】

Wei B, Guo C, Liu S, Sun MZ (2015) Annexin A4 and cancer. *Clin Chim Acta* 447: 72-8

【 0 7 6 6 】

Yao H, Sun C, Hu Z, Wang W (2016) The role of annexin A4 in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* 21: 949-57

【 0 7 6 7 】

Matigian N, Abrahamsen G, Sutharsan R, Cook AL, Vitale AM et al. (2010) Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *Disease Models & Mechanisms* 3: 785-98

【 0 7 6 8 】

Kuzuya A, Zoltowska KM, Post KL, Arimon M, Li X et al. (2016) Identification of the novel activity-driven interaction between synaptotagmin 1 and presenilin 1 links calcium, synapse, and amyloid beta. *BMC Biol* 14: 25

【 0 7 6 9 】

Tan MG, Lee C, Lee JH, Francis PT, Williams RJ et al. (2014) Decreased rabphilin 3A immunoreactivity in Alzheimer's disease is associated with Abeta burden. *Neurochem Int* 64: 29-36

【 0 7 7 0 】

Valencia A, Sapp E, Kimm JS, McClory H, Ansong KA et al. (2013) Striatal synaptosomes from Hdhl40Q/140Q knock-in mice have altered protein levels, novel sites of methionine oxidation, and excess glutamate release after stimulation. *Journal of Huntington's disease* 2: 459-75

10

20

30

40

50

【0771】

Chin H, Choi SH, Jang YS, Cho SM, Kim HS et al. (2006) Protein kinase A-dependent phosphorylation of B/K protein. *Exp Mol Med* 38: 144-52

【0772】

Fukuda M (2013) The role of synaptotagmin and synaptotagmin-like protein (Slp) in regulated exocytosis. *Madame Curie Regulated Database* [Internet]

【0773】

Weng L, Ziliak D, Im HK, Gamazon ER, Philips S et al. (2013) Genome-wide discovery of genetic variants affecting tamoxifen sensitivity and their clinical and functional validation. *Annals of Oncology*

10

【0774】

Gautam V, D'Avanzo C, Berezovska O, Tanzi RE, Kovacs DM (2015) Synaptotagmins interact with APP and promote Abeta generation. *Mol Neurodegener* 10: 31

【0775】

Cha SH, Choi YR, Heo CH, Kang SJ, Joe EH et al. (2015) Loss of parkin promotes lipid rafts-dependent endocytosis through accumulating caveolin-1: implications for Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 10: 63

【0776】

Ahmed MR, Zhan X, Song X, Kook S, Gurevich VV et al. (2011) Ubiquitin ligase parkin promotes Mdm2-arrestin interaction but inhibits arrestin ubiquitination. *Biochemistry* 50: 3749-63

20

【0777】

Wang H, Liu B, Zhang C, Peng G, Liu M et al. (2009) Parkin regulates paclitaxel sensitivity in breast cancer via a microtubule-dependent mechanism. *J Pathol* 218: 76-85

【0778】

Feng DD, Cai W, Chen X (2015) The associations between Parkinson's disease and cancer: the plot thickens. *Transl Neurodegener* 4: 20

30

【0779】

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y et al. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-8

【0780】

Martin-Maestro P, Gargini R, Perry G, Avila J, Garcia-Escudero V (2016) PARK2 enhancement is able to compensate mitophagy alterations found in sporadic Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 25: 792-806

【0781】

Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J et al. (2013) Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet* 45: 353-61, 61e1-2

40

【0782】

Chen C-L, Hou W-H, Liu I-H, Hsiao G, Huang SS et al. (2009) Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGF β signaling and responses. *Journal of Cell Science* 122: 1863-71

【0783】

Seaman M, Freeman CL (2014) Analysis of the Retromer complex-WASH complex interaction illuminates new avenues to explore in Parkinson disease. *Commun Integr Biol* 7: e29483

50

【 0 7 8 4 】

Vilarino-Guell C, Rajput A, Milnerwood AJ, Shah B, Szu-Tu C et al. (2014) DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet* 23: 1794-801

【 0 7 8 5 】

Hsu WC, Wang HK, Lee LC, Fung HC, Lin JC et al. (2008) Promoter polymorphisms modulating HSPA5 expression may increase susceptibility to Taiwanese Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 115: 1537-43

【 0 7 8 6 】

Kim S, Sato Y, Mohan PS, Peterhoff C, Pensalfini A et al. (2016) Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP-betaCTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 21: 707-16 10

【 0 7 8 7 】

Van Dooren T, Princen K, De Witte K, Griffioen G (2014) Derailed intraneuronal signalling drives pathogenesis in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014: 167024

【 0 7 8 8 】

Di Fiore PP, von Zastrow M (2014) Endocytosis, Signaling, and Beyond. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 20

【 0 7 8 9 】

Colacurcio DJ, Nixon RA (2016) Disorders of lysosomal acidification-The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease. *Ageing Res Rev*

【 0 7 9 0 】

Schroeder B, McNiven MA (2014) Importance of endocytic pathways in liver function and disease. *Compr Physiol* 4: 1403-17

【 0 7 9 1 】

Cooper A, Shaul Y (2006) Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. *J Biol Chem* 281: 16563-9 30

【 0 7 9 2 】

Pecheur EI, Borisevich V, Halfmann P, Morrey JD, Smee DF et al. (2016) The Synthetic Antiviral Drug Arbidol Inhibits Globally Prevalent Pathogenic Viruses. *Journal of virology* 90: 3086-92

【 0 7 9 3 】

Mitra S, Cheng KW, Mills GB (2012) Rab25 in cancer: a brief update. *Biochem Soc Trans* 40: 1404-8

【 0 7 9 4 】

Zhang Q, Furukawa K, Chen HH, Sakakibara T, Urano T (2006) Metastatic potential of mouse Lewis lung cancer cells is regulated via ganglioside GM1 by modulating the matrix metalloprotease-9 localization in lipid rafts. *J Biol Chem* 281: 18145-55 40

【 0 7 9 5 】

Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW, Kim YN (2006) Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* 168: 1107-18; quiz 404-5

【 0 7 9 6 】

Storch CH, Eehalt R, Haefeli WE, Weiss J (2007) Localization of the 50

human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 257-64

【0797】

Daleke DL (2007) Phospholipid flippases. *J Biol Chem* 282: 821-5

【0798】

Raghu H, Sodadasu PK, Malla RR, Gondi CS, Estes N et al. (2010) Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells. *BMC Cancer* 10: 647

【0799】

Palaniyandi K, Pockaj BA, Gendler SJ, Chang X-B (2012) Human Breast Cancer Stem Cells Have Significantly Higher Rate of Clathrin-Independent and Caveolin-Independent Endocytosis than the Differentiated Breast Cancer Cells. *Journal of cancer science & therapy* 4: 214-22

【0800】

Guerra FS, Sampaio LdS, Konig S, Bonamino M, Rossi MID et al. (2016) Membrane cholesterol depletion reduces breast tumor cell migration by a mechanism that involves non-canonical Wnt signaling and IL-10 secretion. *Translational Medicine Communications* 1: 3

【0801】

Resnik N, Repnik U, Kreft ME, Sepcic K, Macek P et al. (2015) Highly Selective Anti-Cancer Activity of Cholesterol-Interacting Agents Methyl-beta-Cyclodextrin and Ostreolysin A/Pleurotolysin B Protein Complex on Urothelial Cancer Cells. *PLoS One* 10: e0137878

【0802】

Yamaguchi R, Perkins G, Hirota K (2015) Targeting cholesterol with beta-cyclodextrin sensitizes cancer cells for apoptosis. *FEBS Lett* 589: 4097-105

【0803】

Yokoo M, Kubota Y, Motoyama K, Higashi T, Taniyoshi M et al. (2015) 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. *PLoS One* 10: e0141946

【0804】

Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG et al. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6460-4

【0805】

Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5815-20

【0806】

Yao J, Ho D, Calingasan NY, Pipalia NH, Lin MT et al. (2012) Neuroprotection by cyclodextrin in cell and mouse models of Alzheimer disease. *J Exp Med* 209: 2501-13

【0807】

Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD et al. (2004) Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci* 24: 6715-23

【0808】

Grosse PY, Bressolle F, Pinguet F (1998) Antiproliferative effect of methyl-beta-cyclodextrin in vitro and in human tumour xenografted athymic nude mice. *Br J Cancer* 78: 1165-9

【0809】

Gotoh K, Kariya R, Alam MM, Matsuda K, Hattori S et al. (2014) The antitumor effects of methyl-beta-cyclodextrin against primary effusion lymphoma via the depletion of cholesterol from lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun* 455: 285-9

【0810】

Rocks N, Bekaert S, Coia I, Paulissen G, Gueders M et al. (2012) Curcumin-cyclodextrin complexes potentiate gemcitabine effects in an orthotopic mouse model of lung cancer. *Br J Cancer* 107: 1083-92

【0811】

Agardan NB, Degim Z, Yilmaz S, Altintas L, Topal T (2015) The Effectiveness of Raloxifene-Loaded Liposomes and Cochleates in Breast Cancer Therapy. *AAPS PharmSciTech*

【0812】

Jameson LP, Smith NW, Dzyuba SV (2012) Dye-binding assays for evaluation of the effects of small molecule inhibitors on amyloid (abeta) self-assembly. *ACS Chem Neurosci* 3: 807-19

【0813】

Bar-On P, Rockenstein E, Adame A, Ho G, Hashimoto M et al. (2006) Effects of the cholesterol-lowering compound methyl-beta-cyclodextrin in models of alpha-synucleinopathy. *J Neurochem* 98: 1032-45

【0814】

Gautam S, Karmakar S, Bose A, Chowdhury PK (2014) beta-cyclodextrin and curcumin, a potent cocktail for disaggregating and/or inhibiting amyloids: a case study with alpha-synuclein. *Biochemistry* 53: 4081-3

【0815】

Song Y, Stampfer MJ, Liu S (2004) Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 141: 137-47

【0816】

Tan ZS, Seshadri S, Beiser A, Wilson PW, Kiel DP et al. (2003) Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. *Archives of internal medicine* 163: 1053-7

【0817】

Cronin S, Lin A, Thompson K, Hoenerhoff M, Duncan RK (2015) Hearing Loss and Otopathology Following Systemic and Intracerebroventricular Delivery of 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. *J Assoc Res Otolaryngol* 16: 599-611

【0818】

Crumling MA, Liu L, Thomas PV, Benson J, Kanicki A et al. (2012) Hearing loss and hair cell death in mice given the cholesterol-chelating agent hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *PLoS One* 7: e53280

【0819】

Vite CH, Bagel JH, Swain GP, Prociuk M, Sikora TU et al. (2015) Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. *Sci Transl Med* 7: 276ra26

【0820】

10

20

30

40

50

Yamashita T, Hakizimana P, Wu S, Hassan A, Jacob S et al. (2015) Outer Hair Cell Lateral Wall Structure Constrains the Mobility of Plasma Membrane Proteins. *PLoS Genet* 11: e1005500

【0821】

Lowry MC, Gallagher WM, O'Driscoll L (2015) The Role of Exosomes in Breast Cancer. *Clin Chem* 61: 1457-65

【0822】

Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D (2011) The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Stem Cell Res* 16: 139-46

10

【0823】

Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A et al. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527: 329-35

【0824】

Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J (2011) Detachment of Breast Tumor Cells Induces Rapid Secretion of Exosomes Which Subsequently Mediate Cellular Adhesion and Spreading. *PLoS One* 6: e24234

【0825】

20

Strandvik B (2010) Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 83: 121-9

【0826】

Skolnik K, Levy RD, Wilcox PG, Quon BS (2016) Coronary artery disease in cystic fibrosis: An emerging concern? *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 15: e70-e1

【0827】

Dai S, Dulcey AE, Hu X, Wassif CA, Porter FD et al. (2017) Methyl-beta-cyclodextrin restores impaired autophagy flux in Niemann-Pick C1-deficient cells through activation of AMPK. *Autophagy* 13: 1435-51

30

【0828】

Liu B, Li H, Repa JJ, Turley SD, Dietschy JM (2008) Genetic variations and treatments that affect the lifespan of the NPC1 mouse. *J Lipid Res* 49: 663-9

【0829】

Shvartsman DE, Gutman O, Tietz A, Henis YI (2006) Cyclodextrins but not compactin inhibit the lateral diffusion of membrane proteins independent of cholesterol. *Traffic* 7: 917-26

【0830】

Whyte LS, Lau AA, Hemsley KM, Hopwood JJ, Sargeant TJ (2017) Endosomal and autophagic dysfunction: a driving factor in Alzheimer's disease? *J Neurochem* 140: 703-17

40

【0831】

Tan YQ, Zhang J, Zhou G (2017) Autophagy and its implication in human oral diseases. *Autophagy* 13: 225-36

【0832】

Pugazhendhi S, Baskaran K, Santhanam S, Ramakrishna BS (2017) Association of ATG16L1 gene haplotype with inflammatory bowel disease in Indians. *PLoS One* 12: e0178291

【0833】

50

- Plaza-Zabala A, Sierra-Torre V, Sierra A (2017) Autophagy and Microglia : Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *Int J Mol Sci* 18
【0834】
- Moloudizargari M, Asghari MH, Ghobadi E, Fallah M, Rasouli S et al. (2017) Autophagy, its mechanisms and regulation: Implications in neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* 40: 64-74
【0835】
- Chen Y, Yu L (2017) Recent progress in autophagic lysosome reformation . *Traffic* 18: 358-61
【0836】 10
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F et al. (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332: 1429-33
【0837】
- Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J et al. (2013) TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E1817-26
【0838】
- Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A et al. (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci* 30
0
【0839】 20
- Cheng J, Ohsaki Y, Tauchi-Sato K, Fujita A, Fujimoto T (2006) Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 246-52
【0840】
- Yang HO, Ko WK, Kim JY, Ro HS (2004) Paeoniflorin: an antihyperlipidemic agent from *Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia* 75: 45-9
【0841】
- Li JZ, Wu JH, Yu SY, Shao QR, Dong XM (2013) Inhibitory effects of paeoniflorin on lysophosphatidylcholine-induced inflammatory factor production in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med* 31: 493-7
【0842】 30
- Ma Z, Chu L, Liu H, Wang W, Li J et al. (2017) Beneficial effects of paeoniflorin on non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Sci Rep* 7: 44819
【0843】
- Ma Z, Liu H, Wang W, Guan S, Yi J et al. (2017) Paeoniflorin suppresses lipid accumulation and alleviates insulin resistance by regulating the Rho kinase/IRS-1 pathway in palmitate-induced HepG2Cells. *Biomed Pharmacother* 90: 361-7
【0844】 40
- Li H, Jiao Y, Xie M (2017) Paeoniflorin Ameliorates Atherosclerosis by Suppressing TLR4-Mediated NF-kappaB Activation. *Inflammation* 40: 2042-51
【0845】
- Cuzner ML, Davison AN (1973) Changes in cerebral lysosomal enzyme activity and lipids in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 19: 29-36
【0846】
- Riekkinen PJ, Rinne UK, Arstila AU (1972) Neurochemical and morphologic 50

- al studies on demyelination in multiple sclerosis with special reference to etiological aspects. *Zeitschrift fur Neurologie* 203: 91-104
 【0847】
- McKeown SR, Allen IV (1977) Lysosomal involvement in the pathogenesis of multiple sclerosis [proceedings]. *Biochem Soc Trans* 5: 1416-8
 【0848】
- McKeown SR, Allen IV (1979) The fragility of cerebral lysosomes in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 5: 405-15
 【0849】
- Hultberg B, Olsson JE (1978) Diagnostic value of determinations of lysosomal hydrolases in CSF of patients with neurological diseases. *Acta Neurol Scand* 57: 201-15 10
 【0850】
- Hultberg B, Olsson JE (1979) Lysosomal hydrolases in CSF of patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 59: 23-30
 【0851】
- Rastogi SC, Clausen J (1980) Loss of lysosomal neutral proteinase from leucocytes induced by the action of multiple sclerosis-specific brain antigens. *Clin Exp Immunol* 42: 50-6
 【0852】 20
- Allen IV (1981) The pathology of multiple sclerosis--fact, fiction and hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 7: 169-82
 【0853】
- Schwytzer RU, Henzi H (1983) Multiple sclerosis: plaques caused by 2-step demyelination? *Med Hypotheses* 12: 129-42
 【0854】
- Tulpule K, Dringen R (2013) Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry* 127: 7-21
 【0855】
- Li H, Cuzner ML, Newcombe J (1996) Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22: 207-15 30
 【0856】
- George MF, Briggs FB, Shao X, Gianfrancesco MA, Kockum I et al. (2016) Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10 studies. *Neurology Genetics* 2: e87
 【0857】
- Bogie JF, Jorissen W, Mailleux J, Nijland PG, Zelcer N et al. (2013) Myelin alters the inflammatory phenotype of macrophages by activating PPARs. *Acta Neuropathol Commun* 1: 43
 【0858】 40
- Germain DP (2010) Fabry disease. *Orphanet journal of rare diseases* 5: 30
 【0859】
- Bottcher T, Rolfs A, Tanislav C, Bitsch A, Kohler W et al. (2013) Fabry disease - underestimated in the differential diagnosis of multiple sclerosis? *PLoS One* 8: e71894
 【0860】
- Cammarata G, Fatuzzo P, Rodolico MS, Colomba P, Sicurella L et al. (2015) High variability of Fabry disease manifestations in an extended Italian family. *Biomed Res Int* 2015: 504784 50

【 0 8 6 1 】

Tettey P, Simpson S, Jr., Taylor BV, van der Mei IA (2014) Vascular comorbidities in the onset and progression of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 347: 23-33

【 0 8 6 2 】

von Tresckow B, Kallen KJ, von Strandmann EP, Borchmann P, Lange H et al. (2004) Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30. *Journal of Immunology* 172: 4324-31

【 0 8 6 3 】

Kim TW, Di Paolo G, Kang MS, Berman D, McIntire LBJ (2012). Phosphoinositide modulation for the treatment of neurodegenerative diseases. 10

【 0 8 6 4 】

Alanko J, Ivaska J (2016) Endosomes: Emerging Platforms for Integrin-Mediated FAK Signalling. *Trends Cell Biol* 26: 391-8

【 0 8 6 5 】

Symeonides SN, Anderton SM, Serrels A (2017) FAK-inhibition opens the door to checkpoint immunotherapy in Pancreatic Cancer. *Journal for immunotherapy of cancer* 5: 17

【 0 8 6 6 】

Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B et al. (1999) Extraction of Cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles. *Molecular Biology of the Cell* 10: 961-74 20

【 0 8 6 7 】

Rajendran L, Knolker H-J, Simons K (2010) Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat Rev Drug Discov* 9: 29-42

【 0 8 6 8 】

Ben Halima S, Mishra S, Raja KM, Willem M, Baici A et al. (2016) Specific Inhibition of beta-Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein. *Cell Rep* 14: 2127-41 30

【 0 8 6 9 】

Wadman M (2016) Battle over rare disease drug ensnares NIH. *Science* 354: 18-9

【 0 8 7 0 】

Pitha J (1981) Enhanced water solubility of vitamins A, D, E, and K by substituted cycloamyloses. *Life Sci* 29: 307-11

【 0 8 7 1 】

Perrin JH, Field FP, Hansen DA, Mufson RA, Torosian G (1978) beta-Cyclodextrin as an aid to peritoneal dialysis. Renal toxicity of beta-cyclodextrin in the rat. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 19: 373-6 40

【 0 8 7 2 】

Rajewski RA, Stella VJ (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sci* 85: 1142-69

【 0 8 7 3 】

Del Valle EMM (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 39: 1033-46

【 0 8 7 4 】

Bilensoy E, Hincal AA (2009) Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv* 6: 1161 50

-73

【0875】

Liu B (2012) Therapeutic potential of cyclodextrins in the treatment of Niemann-Pick type C disease. *Clinical lipidology* 7: 289-301

【0876】

De Schaepdrijver L, Marien D, Rhimi C, Voets M, van Heerden M et al. (2015) Juvenile animal testing of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in support of pediatric drug development. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY) 56: 87-96

【0877】

Pitha J, Szente L (1981) Cyclodextrins and Congeners in Parenteral Applications. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins*. Springer Netherlands, 457-66

【0878】

Hastings C (2010) Request for intrathecal delivery of HPbCD for Niemann-Pick type C patients. FDA-Filing 2010

【0879】

Loftsson T, Brewster ME (2010) Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol* 62: 1607-21

【0880】

Loftsson T, Moya-Ortega MD, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A (2016) Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. *J Pharm Pharmacol* 68: 544-55

【0881】

Gould S, Scott RC (2005) 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food Chem Toxicol* 43: 1451-9

【0882】

Riebeek WM (1990a) Determination of the acute intravenous toxicity of alphacyclodextrin in mice. TNO-CIV Institute V90

【0883】

Riebeek WM (1990b) Determination of the acute intravenous toxicity of alphacyclodextrin in rats. TNO-CIV Institute V90

【0884】

Prinsen MK (1991) Acute intraperitoneal toxicity studies with alpha-cyclodextrin in rats. TNO-CIV Institute V91

【0885】

Leroy-Lechat F, Wouessidjewe D, Andreux JP, Puisieux F, Duchene D (1994) Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. *International Journal of Pharmaceutics* 101: 97-103

【0886】

Frijlink HW, Eissens AC, Hefting NR, Poelstra K, Lerk CF et al. (1991) The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat. *Pharm Res* 8: 9-16

【0887】

Binkowski-Machut C, Hapiot F, Martin P, Cecchelli R, Monflier E (2006) How cyclodextrins can mask their toxic effect on the blood-brain barrier. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16: 1784-7

【0888】

Okada SS, Kuo A, Muttreja MR, Hozakowska E, Weisz PB et al. (1995)

10

20

30

40

50

Inhibition of human vascular smooth muscle cell migration and proliferation by beta-cyclodextrin tetradecasulfate. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 948-54

【0889】

Guo F, Liu X, Cai H, Le W (2018) Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain Pathol* 28: 3-13

【0890】

Van Ommen B, De Bie AT, Bar A (2004) Disposition of ¹⁴C-alpha-cyclodextrin in germ-free and conventional rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 39 Suppl 1: 57-66

10

【0891】

Duchene D, Wouessidjewe D (1990) Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. *Drug Dev Ind Pharm* 16: 2487-99

【0892】

Wagner EM, Jen KL, Artiss JD, Remaley AT (2008) Dietary alpha-cyclodextrin lowers low-density lipoprotein cholesterol and alters plasma fatty acid profile in low-density lipoprotein receptor knockout mice on a high-fat diet. *Metabolism* 57: 1046-51

【0893】

Yoshitomi H, Nishihata T, Frederick G, Dillsaver M, Higuchi T (1987) Effect of triglyceride on small intestinal absorption of cefoxitin in rats. *J Pharm Pharmacol* 39: 887-91

20

【0894】

Cunningham TJ, Yao L, Oettinger M, Cort L, Blankenhorn EP et al. (2006) Secreted phospholipase A2 activity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 3: 26

【0895】

Chalbot S, Zetterberg H, Blennow K, Fladby T, Andreassen N et al. (2011) Blood-cerebrospinal fluid barrier permeability in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 25: 505-15

30

【0896】

Klavins K, Koal T, Dallmann G, Marksteiner J, Kemmler G et al. (2015) The ratio of phosphatidylcholines to lysophosphatidylcholines in plasma differentiates healthy controls from patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)* 1: 295-302

【0897】

Cunningham TJ, Yao L, Lucena A (2008) Product inhibition of secreted phospholipase A2 may explain lysophosphatidylcholines' unexpected therapeutic properties. *Journal of inflammation (London, England)* 5: 17

40

【0898】

Dong Z, Meller J, Succop P, Wang J, Wikenheiser-Brokamp K et al. (2014) Secretory phospholipase A2-IIa upregulates HER/HER2-elicited signaling in lung cancer cells. *Int J Oncol* 45: 978-84

【0899】

Hernandez M, Martin R, Garcia-Cubillas MD, Maeso-Hernandez P, Nieto ML (2010) Secreted PLA2 induces proliferation in astrocytoma through the EGF receptor: another inflammation-cancer link. *Neuro-oncology* 12: 1014-23

【0900】

50

- Yarla NS, Bishayee A, Vadlakonda L, Chintala R, Duddukuri GR et al. (2016) Phospholipase A2 Isoforms as Novel Targets for Prevention and Treatment of Inflammatory and Oncologic Diseases. *Curr Drug Targets* 17: 1940-62
 【0901】
- Mallat Z, Lambeau G, Tedgui A (2010) Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A(2) in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation* 122: 2183-200
 【0902】
- Saegusa J, Akakura N, Wu CY, Hoogland C, Ma Z et al. (2008) Pro-inflammatory secretory phospholipase A2 type IIA binds to integrins α v β 3 and α 4 β 1 and induces proliferation of monocytic cells in an integrin-dependent manner. *J Biol Chem* 283: 26107-15
 【0903】
- Fujita M, Zhu K, Fujita CK, Zhao M, Lam KS et al. (2015) Proinflammatory secreted phospholipase A2 type IIA (sPLA-IIA) induces integrin activation through direct binding to a newly identified binding site (site 2) in integrins α v β 3, α 4 β 1, and α 5 β 1. *J Biol Chem* 290: 259-71
 【0904】
- Nicholls SJ, Kastelein JJ, Schwartz GG, Bash D, Rosenson RS et al. (2014) Varespladib and cardiovascular events in patients with an acute coronary syndrome: the VISTA-16 randomized clinical trial. *JAMA* 311: 252-62
 【0905】
- Etienne P, Dastoor D, Gauthier S, Ludwick R, Collier B (1981) Alzheimer disease: lack of effect of lecithin treatment for 3 months. *Neurology* 31: 1552-4
 【0906】
- Fisman M, Merskey H, Helmes E, McCready J, Colhoun EH et al. (1981) Double blind study of lecithin in patients with Alzheimer's disease. *Canadian journal of psychiatry Revue canadienne de psychiatrie* 26: 426-8
 【0907】
- Brinkman SD, Pomara N, Goodnick PJ, Barnett N, Domino EF (1982) A dose-ranging study of lecithin in the treatment of primary degenerative dementia (Alzheimer disease). *J Clin Psychopharmacol* 2: 281-5
 【0908】
- Dysken MW, Fovall P, Harris CM, Davis JM, Noronha A (1982) Lecithin administration in Alzheimer dementia. *Neurology* 32: 1203-4
 【0909】
- Higgins JP, Flicker L (2003) Lecithin for dementia and cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001015
 【0910】
- Harris CM (1981) Test of the memory-enhancing effect of phosphatidylcholine in humans. Chicago, IL: University of Illinois, 140
 【0911】
- Little A, Levy R, Chuaqui-Kidd P, Hand D (1985) A double-blind, placebo controlled trial of high-dose lecithin in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48: 736-42

【 0 9 1 2 】

Wilton DC (2005) Phospholipases A2: structure and function. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107: 193-205

【 0 9 1 3 】

Sim I, Carini S, Tu SW, Detwiler LT, Brinkley J et al. (2012) Ontology-based federated data access to human studies information. *AMIA Annual Symp Proc* 2012: 856-65

【 0 9 1 4 】

Bielicki JK (2016) ABCA1 agonist peptides for the treatment of disease. *Current opinion in lipidology* 27: 40-6

10

【 0 9 1 5 】

Yao J, Hennessey T, Flynt A, Lai E, Beal MF et al. (2010) MicroRNA-related cofilin abnormality in Alzheimer's disease. *PLoS One* 5: e15546

【 0 9 1 6 】

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-8

【 0 9 1 7 】

Wittkowski KM (1988) Friedman-type statistics and consistent multiple comparisons for unbalanced designs. *J Am Statist Assoc* 83: 1163-70, 87:258

20

【 0 9 1 8 】

Gaspar JT, Mathieu J, Alvarez PJJ, De Grey A (2016). Cyclodextrin Compounds For The Prevention And Treatment Of Aging. WO Patent No: WO 2016/168772 A1

【 0 9 1 9 】

Gaspar J, Mathieu J, Alvarez P (2017) 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPβCD) reduces age-related lipofuscin accumulation through a cholesterol-associated pathway. *Scientific Reports* 7: 2197

【 0 9 2 0 】

Mohammad N, Malvi P, Meena AS, Singh SV, Chaube B et al. (2014) Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin augments tamoxifen induced cell death by enhancing its uptake in melanoma. *Mol Cancer* 13: 204

30

【 0 9 2 1 】

Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lerida I, Lazcano JJ, Samaniego R et al. (2011) Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 146: 148-63

【 0 9 2 2 】

Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y et al. (2009) Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res* 69: 8594-602

40

【 0 9 2 3 】

Antalis CJ, Uchida A, Buhman KK, Siddiqui RA (2011) Migration of MDA-MB-231 breast cancer cells depends on the availability of exogenous lipids and cholesterol esterification. *Clin Exp Metastasis* 28: 733-41

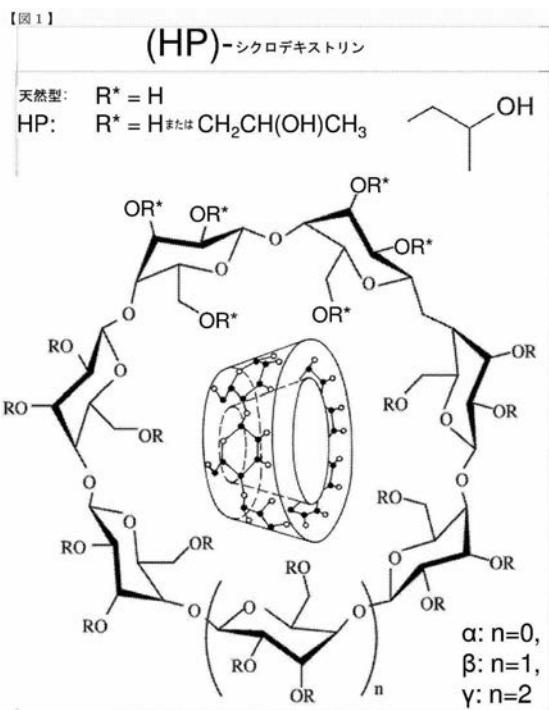
【 0 9 2 4 】

Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A et al. (2016) Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat Commun* 7: 10656

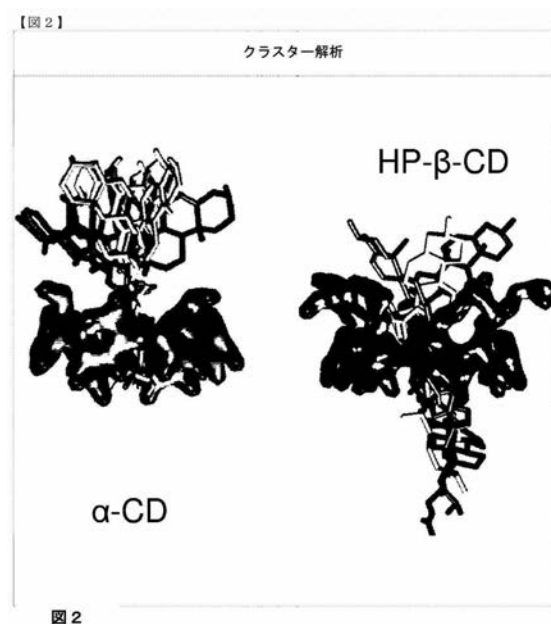
50

本発明はさらに、以下の請求の範囲により記載される。

【図 1】

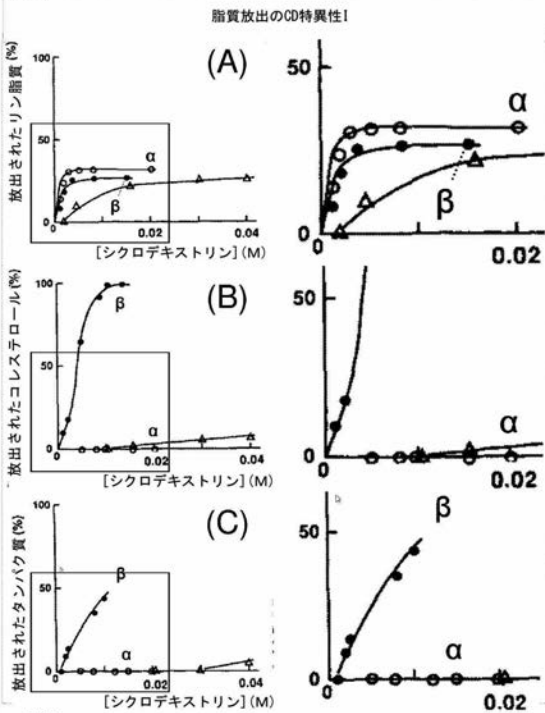


【図 2】



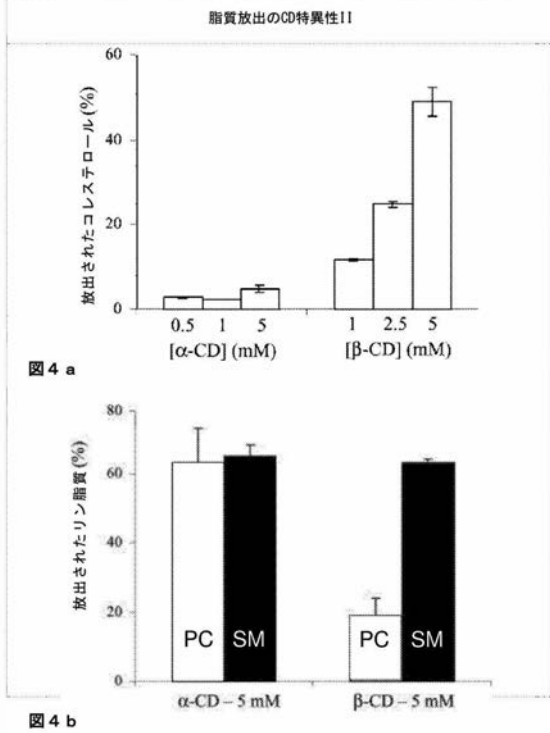
【図 3】

【図 3】



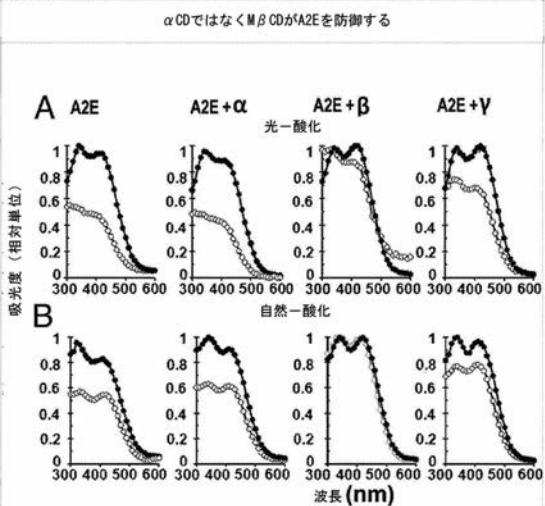
【図 4】

【図 4】



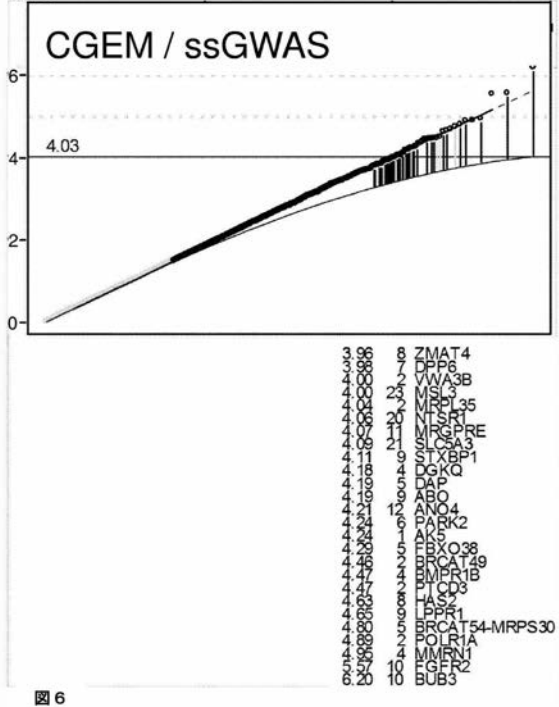
【図 5】

【図 5】

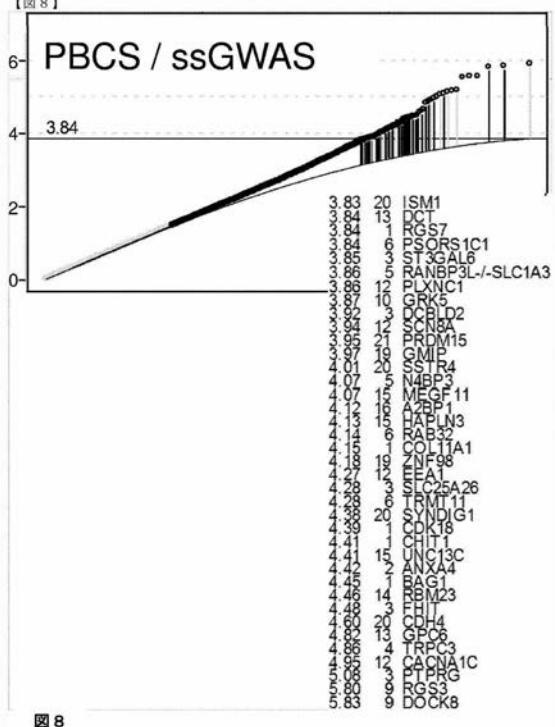


【図 6】

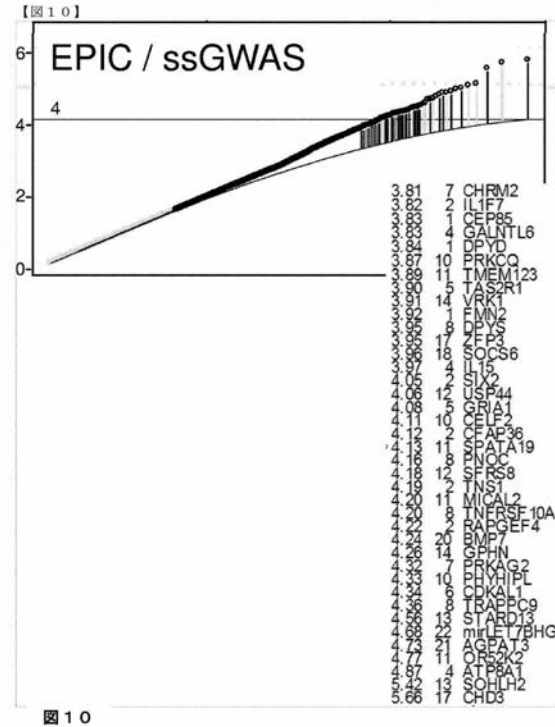
【図 6】



【図 8】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

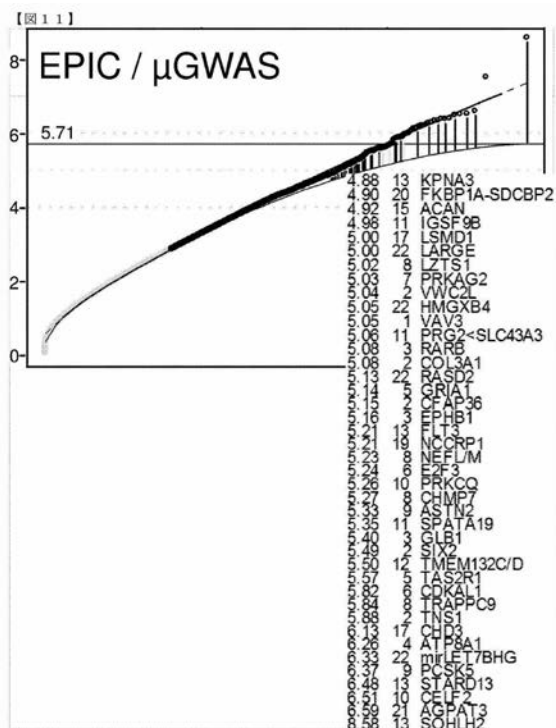


图 1-1

【图 1 2】

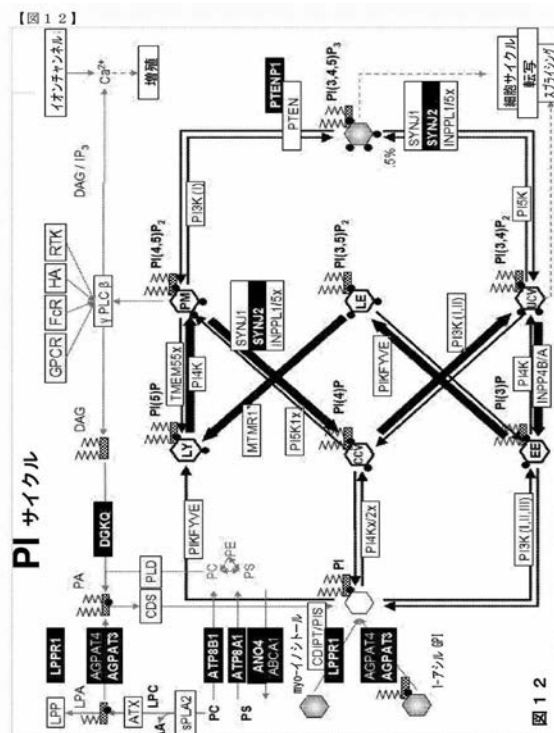


图 12

【图 13 A】

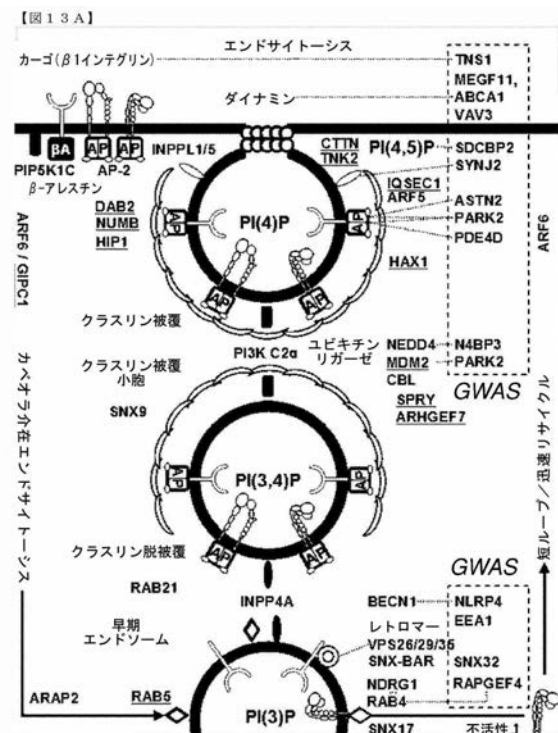


图 13A

【图 13 B】

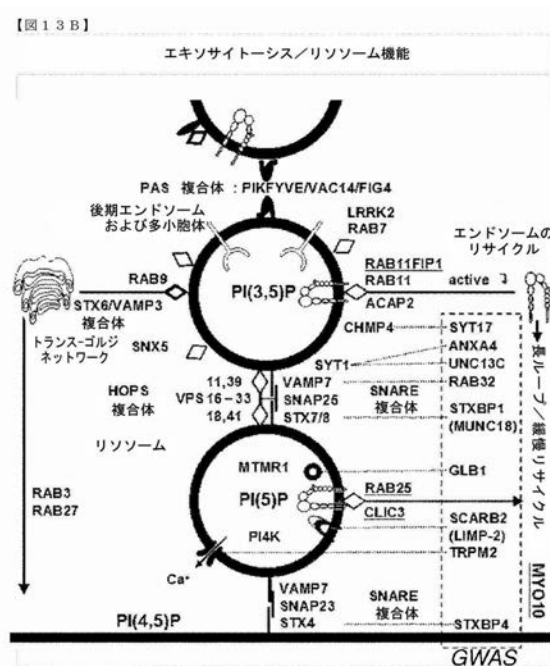
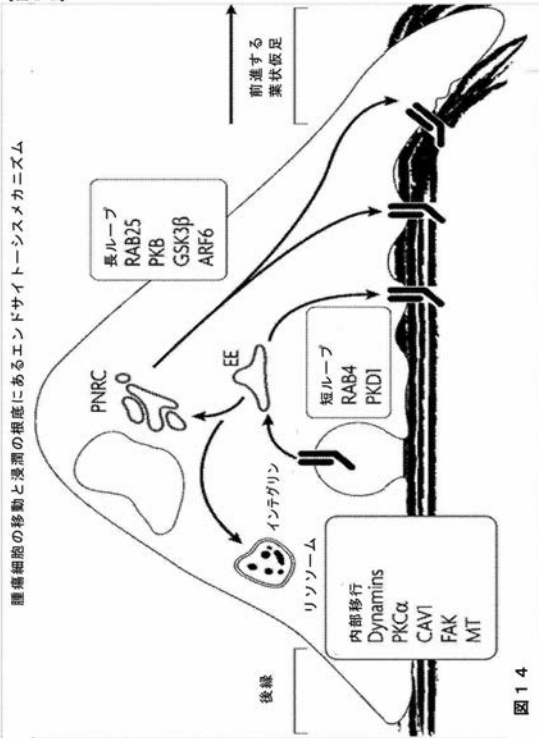


图 13B

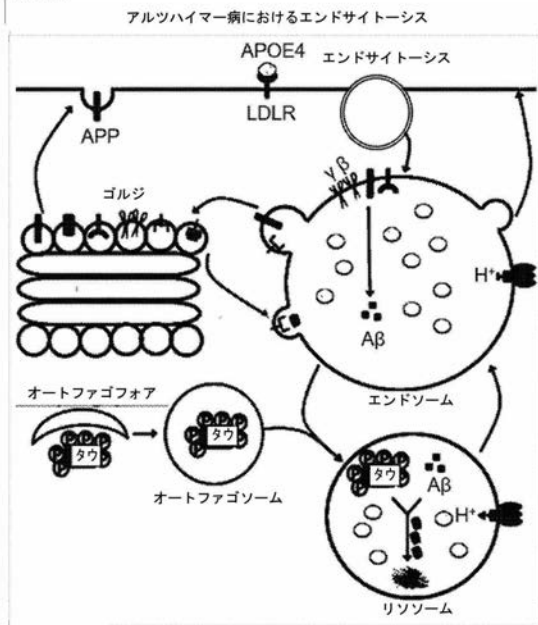
【図 14】

【図 14】



【図 15】

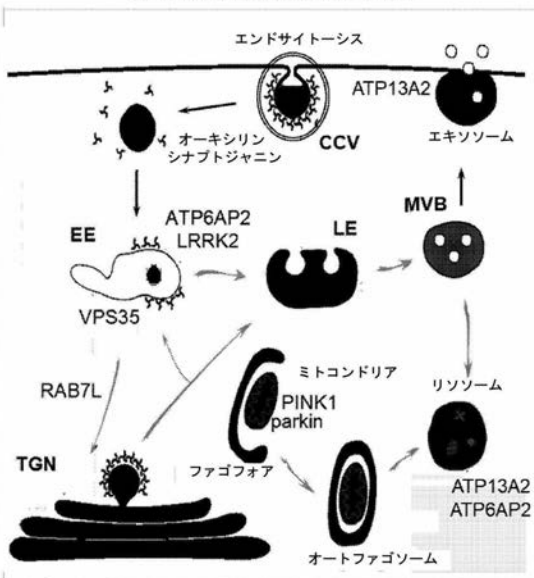
【図 15】



【図 16】

【図 16】

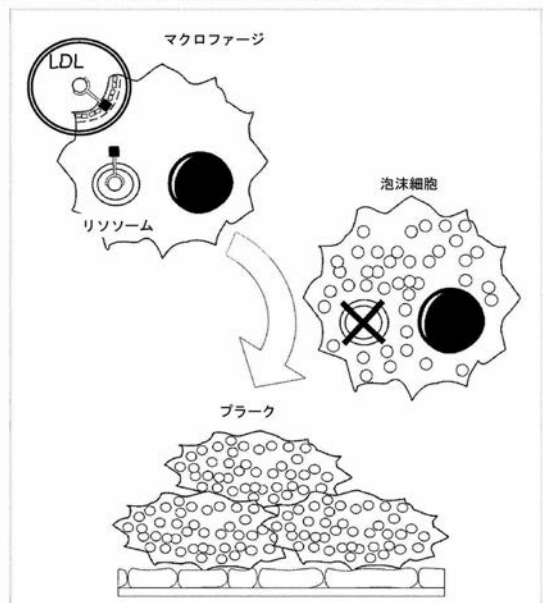
パーキンソン病におけるエンドサイトーシス



【図 17】

【図 17】

アテローム性動脈硬化症におけるマクロフィノサイトーシス



【図 20】

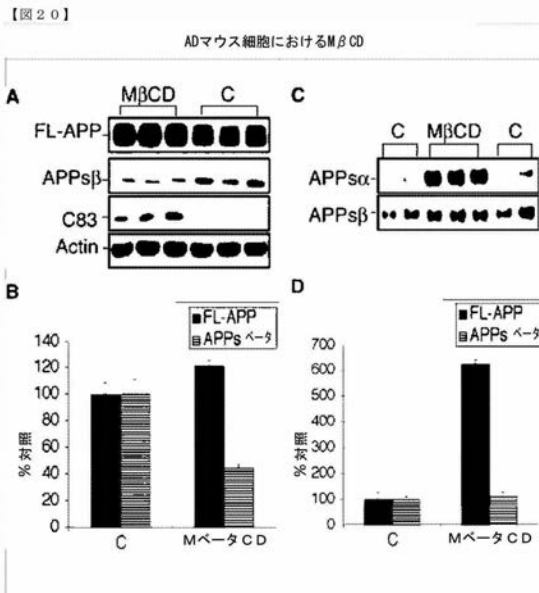


図 20

【図 21】

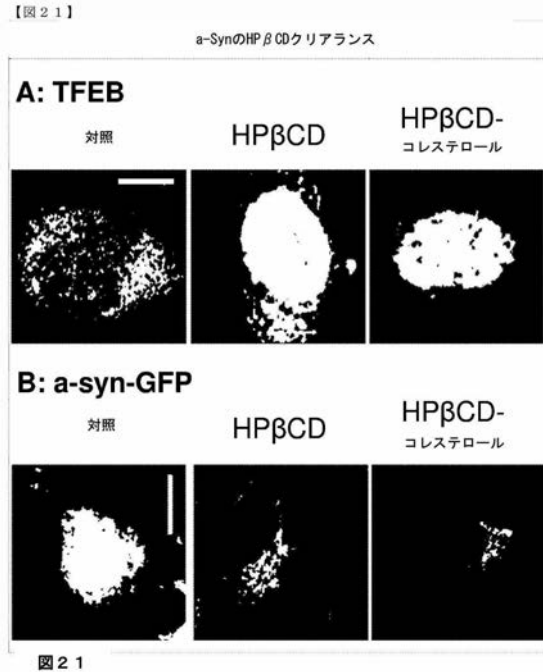


図 21

【図 22】

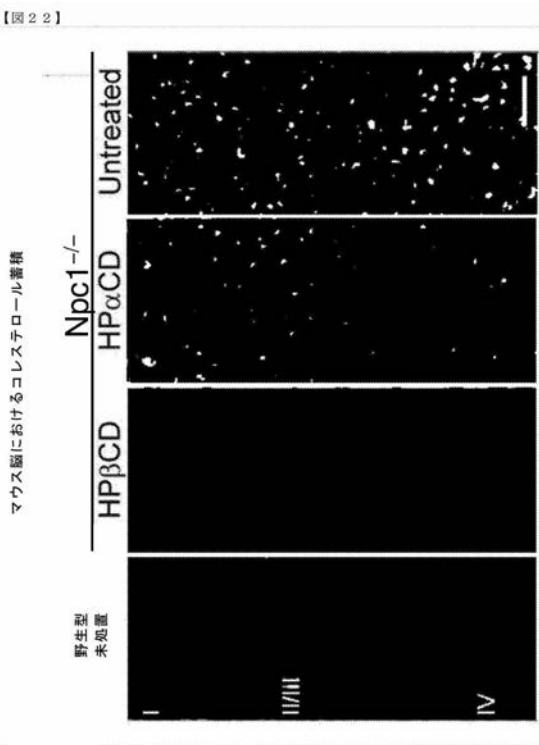


図 22

【図 23】

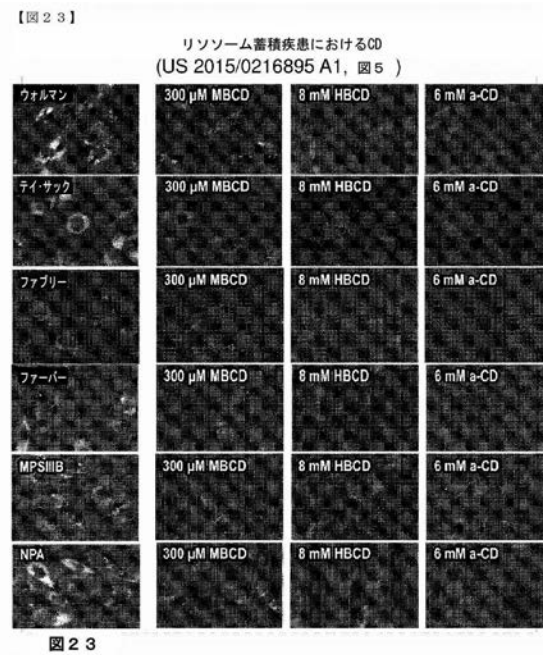


図 23

【図 2 4】

【図 2 4】

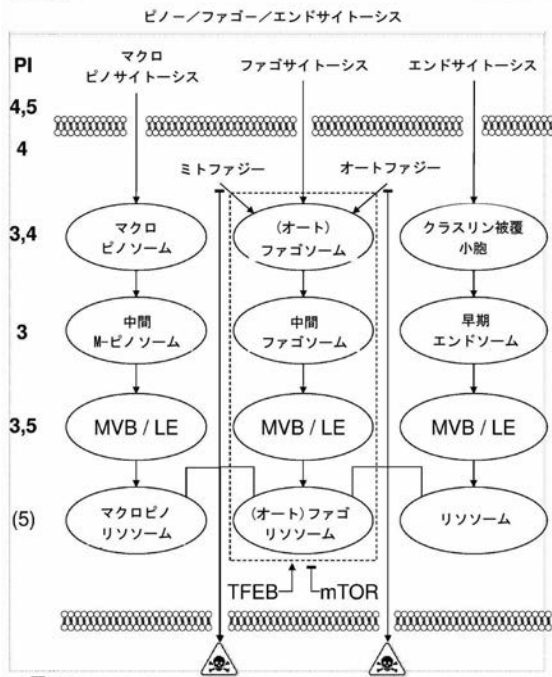


図 2 4

【図 2 5】

【図 2 5】

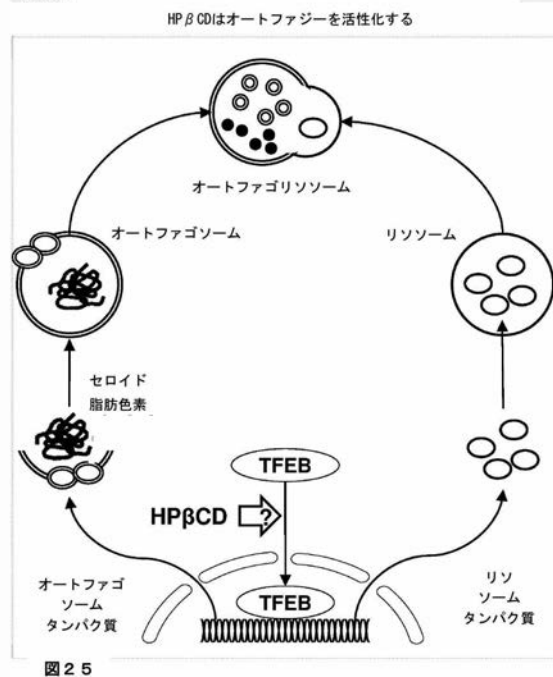


図 2 5

【図 2 6】

【図 2 6】

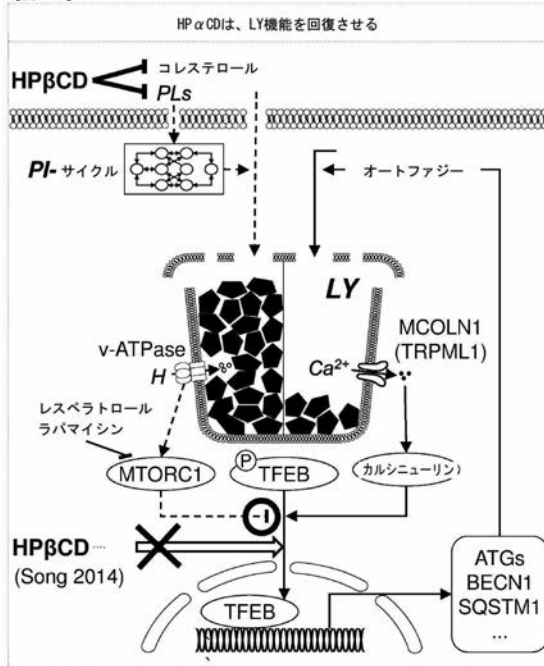


図 2 6

【図 2 7】

【図 2 7】

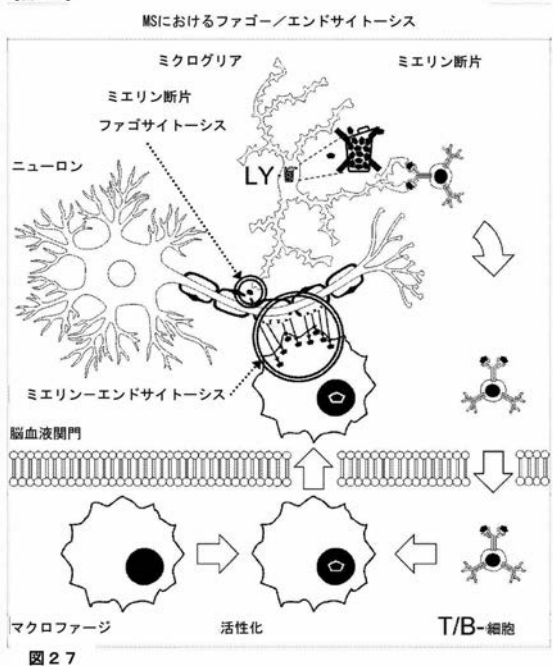


図 2 7

【図 28】

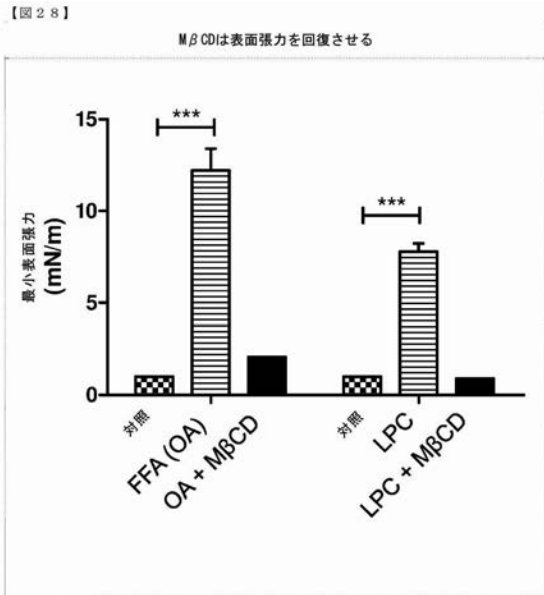


図 28

【図 29】

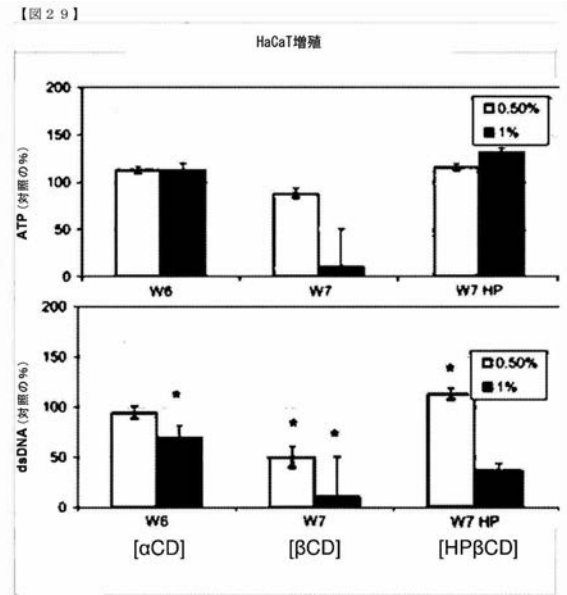


図 29

【図 30】

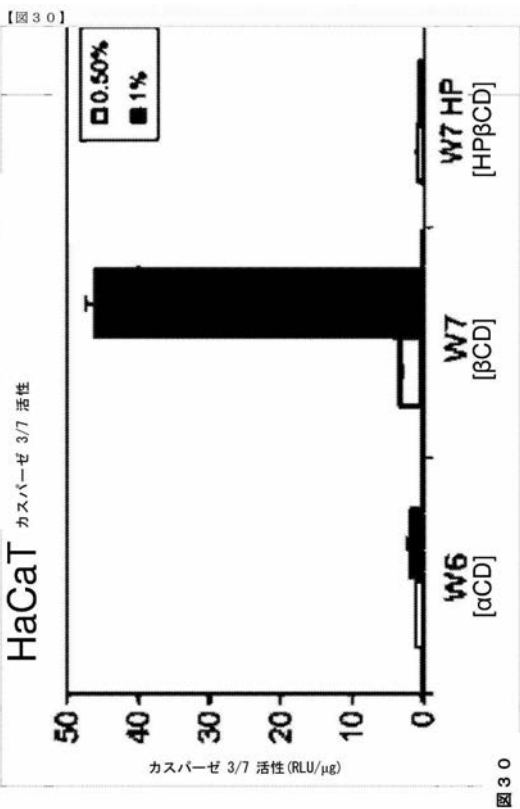


図 30

【図 31】

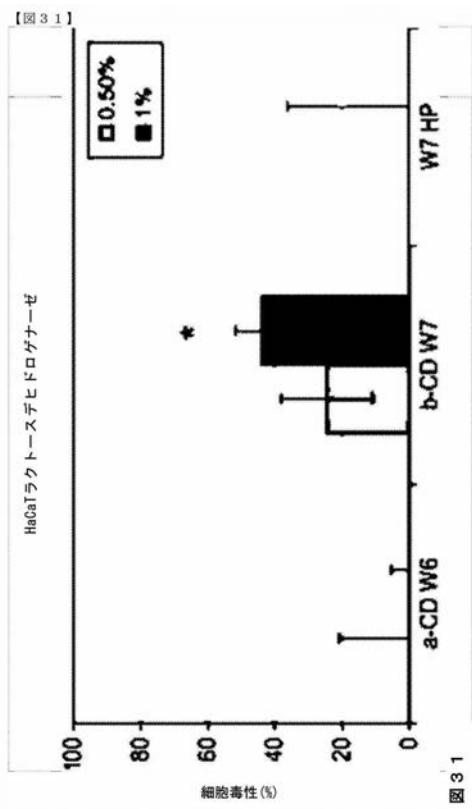
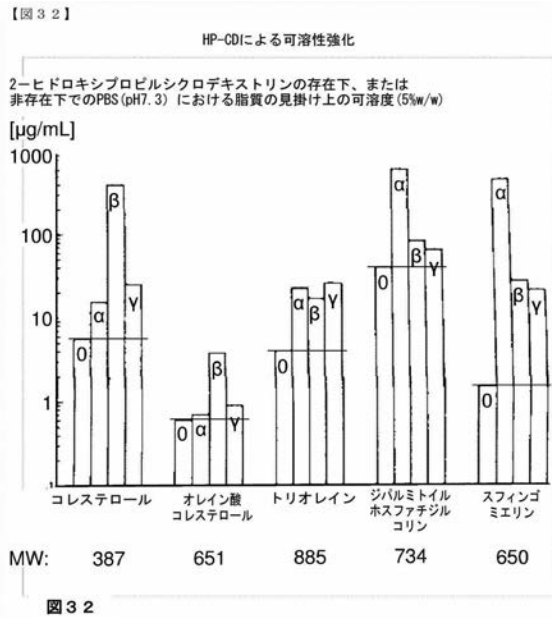
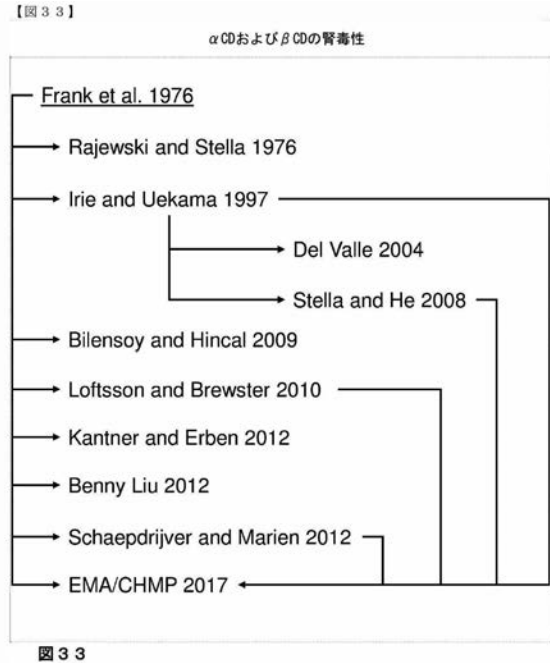


図 31

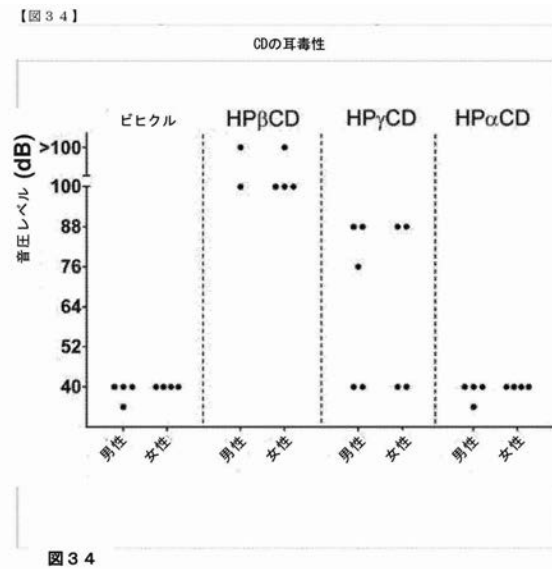
【図 3 2】



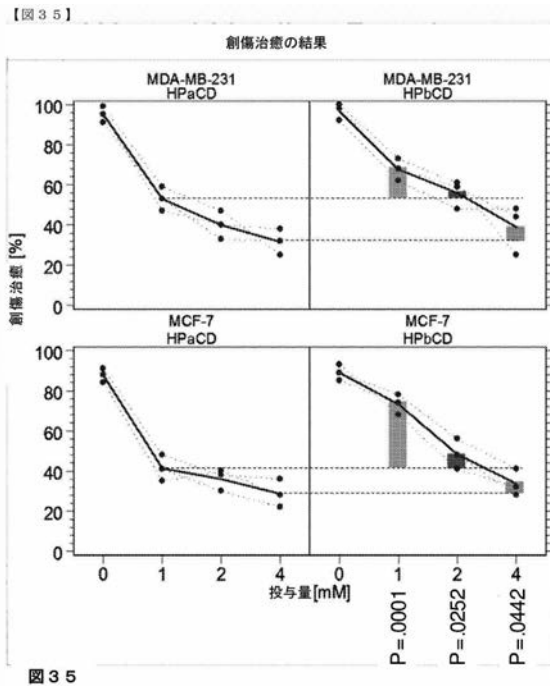
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



【 図 3 6 】

【圖 3 6】

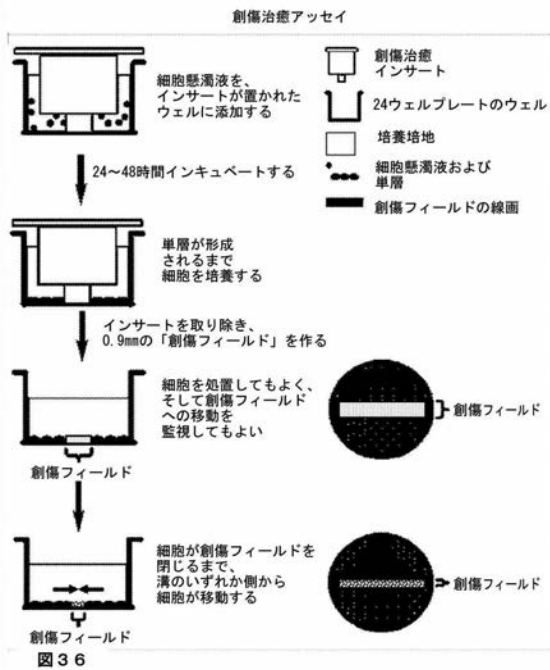


圖 3 6

【図 3 7】

【圖 3 7】

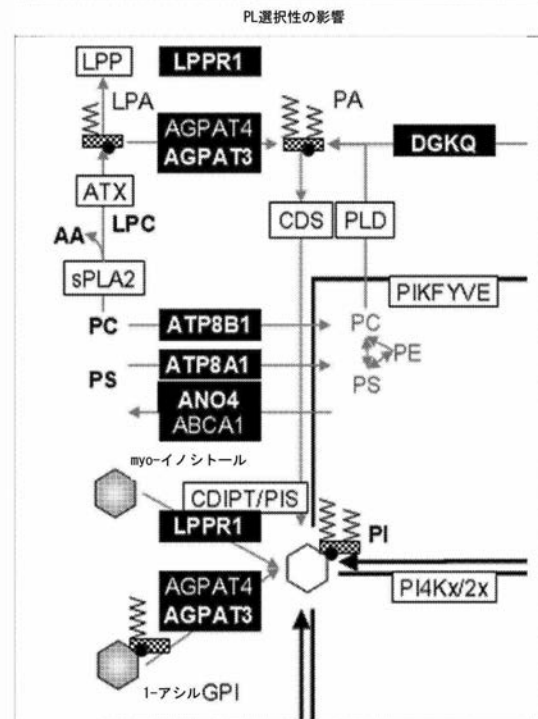


图 3-7

【図 3 8 A】

【圖 38 a】

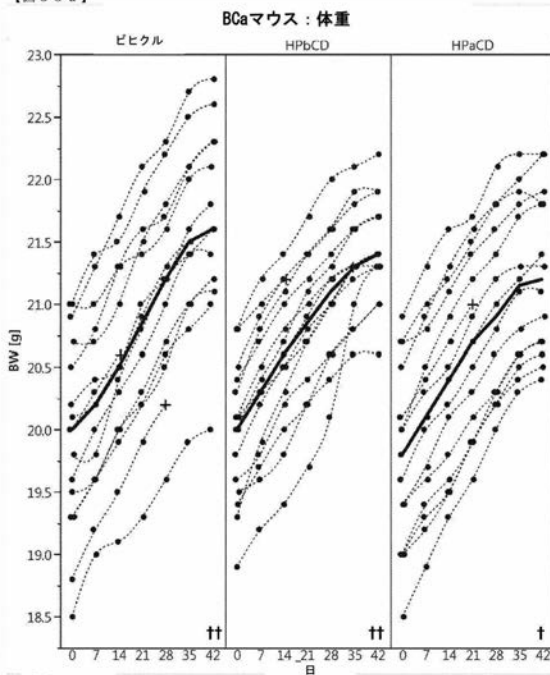


图 38 a

【図 3 8 B】

【圖 38 b】

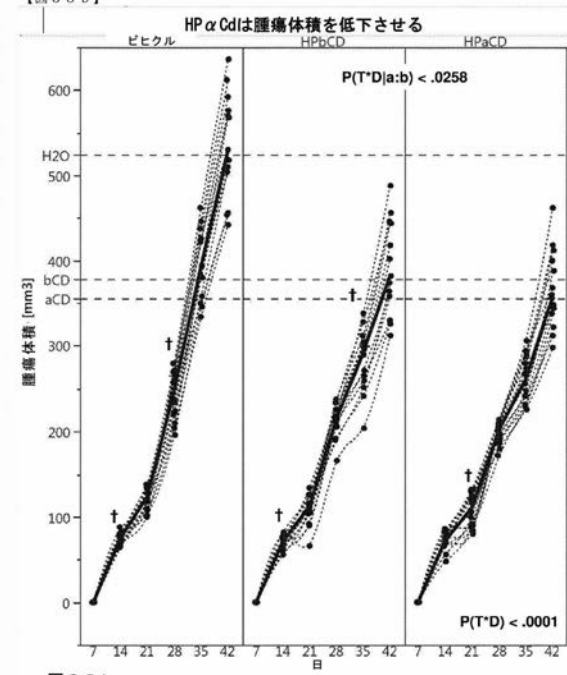


图 38b

【図 39】

【図 39】

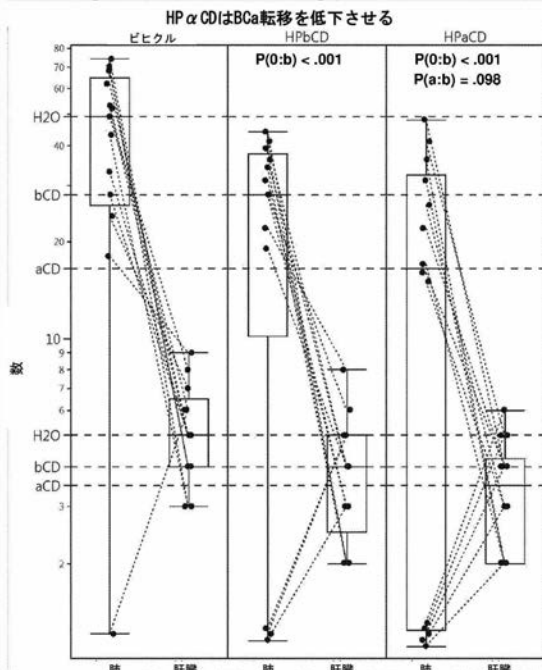


図 39

【図 40】

【図 40】

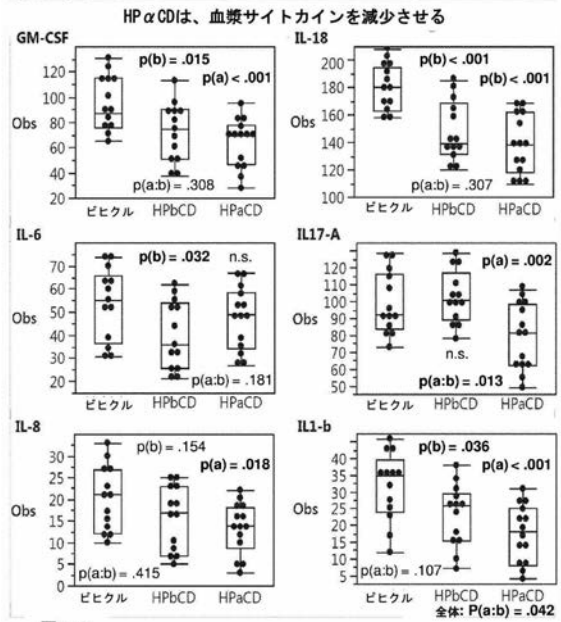


図 40

【図 41】

【図 41】

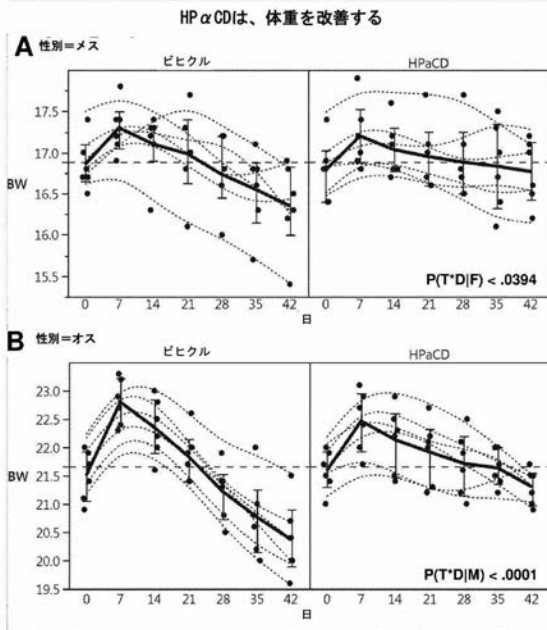


図 41

【図 42】

【図 42】

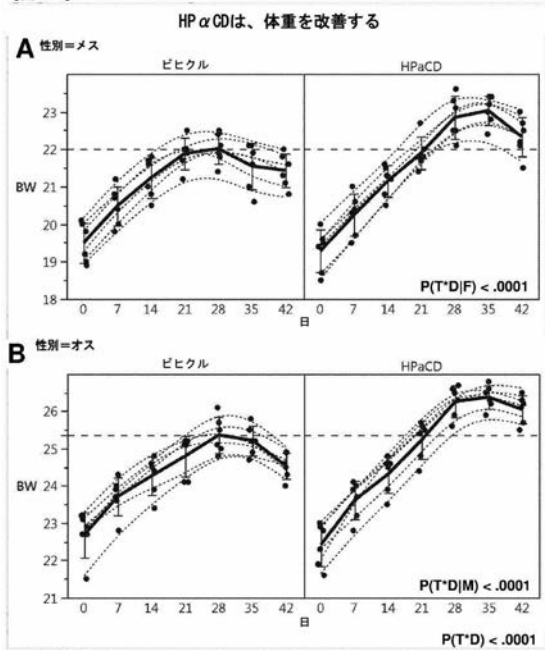


図 42

【図 4 3】

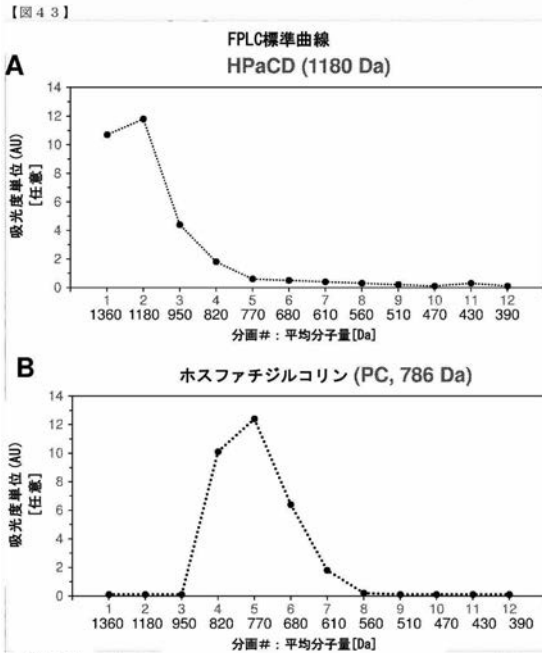


図 4 3

【図 4 4】

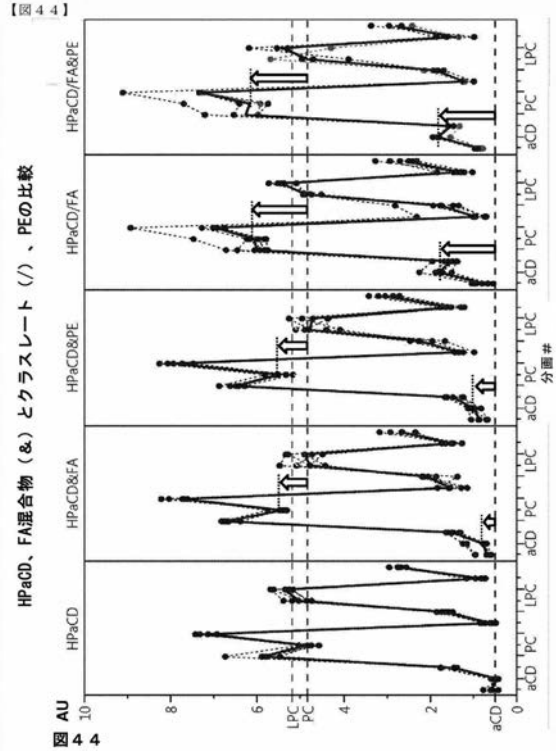


図 4 4

【図 4 5】

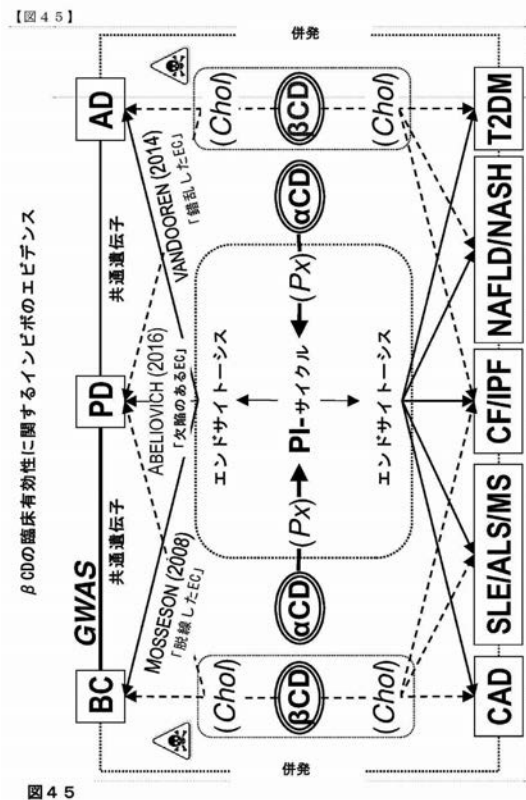


図 4 5

【図 4 6】

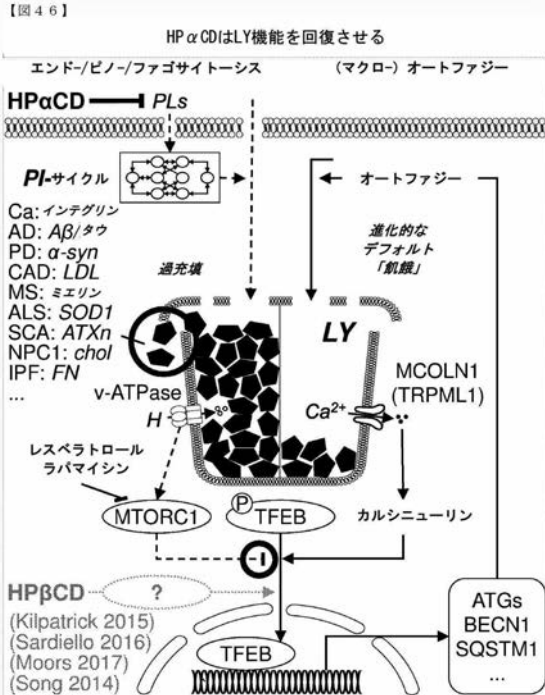


図 4 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/51604A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 31/724, A61K 45/06 (2019.01)
CPC - A61K 31/724, A61K 45/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History DocumentElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	WO 2016/050806 A1 (The Provost, Fellows, Foundation Scholars, And The Other Members Of Board, Of The College Of The Holy And Undivided Trinity Of Queen Elizabeth, Near Dublin) 7 April 2016 (07.04.2016) pg 1, ln 22-28; pg 2, ln 1-15; pg 3, ln 5-6; pg 18, ln 32-37	13 14-21
X ---	US 2007/0015736 A1 (Glausch et al.) 18 January 2007 (18.01.2007) para [0010]; [0013]; [0032]; [0074]	13 14, 16, 22
X	US 2008/0194690 A1 (Bastin et al.) 14 August 2008 (14.08.2008) para [0021]; [0423]-[0426]; [0431]; [0434]; [0439]-[0442]; [0445]; [0599]-[0606]	34-37
Y	Monnaert et al. "Behaviour of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood brain barrier" JPET 2004; 310(2):745-751 (doi: 10.1124/jpet.104.067512) pg 745, col 1, para 1, col 2, para 1; pg 747, col 1, para 2	14-22
A	Allen et al. "A histological, histochemical and biochemical study of the macroscopically normal white matter in multiple sclerosis" J Neurol Sci. 1979; 41(1):81-91 (doi: 10.1016/0022-510X(79)90142-4) abstract	13-21
A	Mizushima et al. "Autophagy: Renovation of Cells and Tissues" Cell, 2011; 147(4):728-741 (doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026) pg 728, col 1, para 4; pg 736, col 1, para 4	13-14, 16, 22
A	US 4,438,106 A (Wagu et al.) 20 May 1984 (20.05.1984) col 2, ln 15-24	37
A	Coisne et al. "Cyclodextrins as Emerging Therapeutic Tools in the Treatment of Cholesterol-Associated Vascular and Neurodegenerative Diseases" Molecules 2016; 21(12):1748 (doi: 10.3390/molecules21121748) whole document	13-22, 34-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2019

Date of mailing of the international search report

09 APR 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT O&P: 571-272-7774

International application No.
PCT/US 18/51604

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0104634 A1 (Kalantri et al.) 29 April 2010 (29.04.2010) whole document	13-22, 34-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/51604

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-12
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
because they are omnibus claims not drafted in accordance with Rule 6.2(a).
3. ☒ Claims Nos.: 23-25
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
--- See extra sheet ---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
13-22, 34-37

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/51604

— Box III, Lack of Unity of Invention —

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 13-22, 34-37 drawn towards a method of preventing or treating a lysosomal disease or disorder, or treating and/or preventing ALS, MS, Alzheimer's, Huntington's or Parkinson's disease in a subject in need thereof comprising administering an effective amount of alpha-cyclodextrin or a derivative thereof to the subject.

Group II: Claims 26-33 drawn towards a method of downregulating arachidonic acid or treating and/or preventing a disorder of arachidonic acid secretion in a subject in need thereof comprising administering to the subject an effective amount of an α -cyclodextrin or an α -cyclodextrin derivative.

Group III: Claims 38-39 drawn towards a method of reducing phospholipid levels in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject an effective amount of a pharmaceutical composition comprising (i) α -cyclodextrin or an α -cyclodextrin derivative or salt thereof; (ii) a pharmaceutically acceptable carrier; and a fatty acid.

The group of inventions listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I requires a method of preventing or treating a lysosomal disease or disorder, such as breast ALS, MS, Alzheimer's, Huntington's or Parkinson's disease, which is not required by Groups II-III.

Group II requires downregulating arachidonic acid in a subject or treating and/or preventing a disorder of arachidonic acid secretion in a subject, which is not required by Groups I, III.

Group III requires reducing phospholipid levels in a subject in need thereof, which is not required by Groups I-II.

Shared Technical Features:

Groups I-III share the technical features of a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of α -cyclodextrin or 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrin, or a salt thereof. However, this shared technical feature does not provide a contribution over the prior art, as being anticipated by US 2008/0194690 A1 to Bastin et al. (hereafter, Bastin) which teaches a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of α -cyclodextrin or 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrin (para [0021]; One aspect of the invention pertains to pharmaceutical compositions comprising: (a) a HDACi (as defined herein), and (b) one or more of: cyclodextrin, arginine, and meglumine; para [0445]; Without wishing to be bound to any particular theory, the inventors believe that the terminal phenyl group of PXD-101 (or the optionally substituted terminal phenyl group of analogs of PXD-101) forms a complex with cyclodextrin; para [0431]; The term "cyclodextrin", as used herein (e.g., in connection with component (b)), relates to both cyclodextrins per se, and cyclodextrin derivatives, including, for example, the cyclodextrin derivatives described herein; para [0434]; In one embodiment, the cyclodextrin is selected from ... (hydroxy-C1-4alkyl)- α -cyclodextrin; para [0439]-[0442]; The following cyclodextrins and cyclodextrin derivatives may be obtained, for example, from Wacker-Chemie GmbH, Munich, Germany: Hydroxypropyl- α -cyclodextrin (Cavasol W6 HP TL)).

As said features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the inventions of Groups I-III. The inventions of Group I-III thus lack unity under PCT Rule 13.

Note:

Claims 1-12 are determined unsearchable because they are omnibus claims not drafted in accordance with Rule 6.2(a).

Claims 23-25 are determined unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 K	38/21
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	31/277	(2006.01)	A 6 1 K	31/277
A 6 1 K	31/137	(2006.01)	A 6 1 K	31/137
A 6 1 K	31/136	(2006.01)	A 6 1 K	31/136
A 6 1 K	31/663	(2006.01)	A 6 1 K	31/663
A 6 1 K	31/675	(2006.01)	A 6 1 K	31/675
A 6 1 K	47/52	(2017.01)	A 6 1 K	47/52
A 6 1 K	47/61	(2017.01)	A 6 1 K	47/61
A 6 1 K	47/69	(2017.01)	A 6 1 K	47/69
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
				1 2 1
				N
				1 0 1

(31)優先権主張番号 62/565,053

(32)優先日 平成29年9月28日(2017.9.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/573,658

(32)優先日 平成29年10月17日(2017.10.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/586,826

(32)優先日 平成29年11月15日(2017.11.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

2. TWEEN

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウィットコウスキー, クヌート エム.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニューヨーク, イー. 70ティールエイチ ス
トリート 220, ナンバー5シー

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC01 CC11 CC27 CC35 CC47 EE39A EE59 FF34
4C084 AA19 BA04 BA08 BA23 BA44 DA23 NA05 ZA02 ZA45 ZA59
ZA75 ZB07 ZB26 ZB33 ZC35 ZC75
4C085 AA14 BB11 CC23
4C086 AA01 AA02 DA34 DA38 EA20 MA02 MA03 MA04 MA05 NA05
ZA02 ZA45 ZA59 ZA75 ZB07 ZB26 ZB33 ZC35 ZC75
4C206 AA01 AA02 FA10 FA31 HA12 KA01 MA02 MA03 MA04 MA05
NA05 ZA02 ZA45 ZA59 ZA75 ZB07 ZB26 ZB33 ZC35 ZC75