

(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2017-529397

(P2017-529397A)

(43) 公表日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 43/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 25/28 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 45/06 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 25/28	4 C 2 0 6
<b>A 6 1 K 31/436 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 45/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-535134 (P2017-535134)  
 (86) (22) 出願日 平成27年9月21日 (2015. 9. 21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年4月26日 (2017. 4. 26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/071563  
 (87) 国際公開番号 W02016/042166  
 (87) 国際公開日 平成28年3月24日 (2016. 3. 24)  
 (31) 優先権主張番号 14382353. 2  
 (32) 優先日 平成26年9月19日 (2014. 9. 19)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 517098952  
 ファンダシオン デ ラ コミュニダッド  
 バレンシアナ セントロ デ インヴェ  
 スティガシオン プリンシペ フェリペ  
 FUNDACION DE LA COM  
 UNIDAD VALENCIANA C  
 ENTRO DE INVESTIGAC  
 ION PRINCIPE FELIPE  
 スペイン国 エー46012 バレンシア  
 、エデュアルド プリモ ジェフェラ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 X連鎖性副腎白質ジストロフィーの治療における特異的mTOR阻害剤

## (57) 【要約】

本発明は、特にX連鎖性副腎白質ジストロフィー (X - A L D) を治療するための、特異的mTOR阻害剤の薬剤としての新規使用に関する。本発明はまた、X - A L Dの治療および/または予防に潜在的に有用な化合物を同定するための方法にも関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体における X - 副腎白質ジストロフィー ( X - A L D ) の治療および / または予防に用いられる、特異的 m T O R 阻害剤。

**【請求項 2】**

前記特異的 m T O R 阻害剤がラパマイシン誘導体である、請求項 1 に記載の用途のための特異的 m T O R 阻害剤。

**【請求項 3】**

ラパマイシン誘導体がテムシロリムスである、請求項 2 に記載の用途のための特異的 m T O R 阻害剤。

10

**【請求項 4】**

X - A L D が、副腎脊髄ニューロパチー ( A M N )、大脳副腎脊髄ニューロパチー ( c A M N ) および小児副腎白質ジストロフィー ( c A L D ) から選択される、請求項 1 または 2 に記載の用途のための特異的 m T O R 阻害剤。

**【請求項 5】**

特異的 m T O R 阻害剤と、m T O R 非依存性のオートファジー誘発剤、抗酸化剤、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、ミトコンドリア転移細孔開口の阻害剤、抗炎症剤、P P A R アゴニスト、R X R アゴニスト、サーチュイン 1 アゴニストおよび抗高脂血症薬からなる群から選択される化合物とを含む組成物。

**【請求項 6】**

20

前記特異的 m T O R 阻害剤がラパマイシン誘導体である、請求項 5 に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記ラパマイシン誘導体がテムシロリムスである、請求項 6 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記 m T O R 非依存性のオートファジー誘発剤が、トレハロース、ラニチジン、スperlミジン、レスベラトロール、ベラパミル、ロペラミド、アミオダロン、トリフロペラジン、ミノキシジル、2 ' 5 ' - ジデオキシアデノシン、タモキシフェン、フマル酸ジメチル、チアゾリジンジオン、9 - c i s - レチノイン酸、ベキサロテン、フルスピリレン、トリフロペラジン、ペニトレム A、ピモジド、プロブラノロール、ビタミン E、 - リボ酸、N - アセチルシステイン、リチウムおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

30

**【請求項 9】**

医薬として用いられる、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 10】**

被験体における X - 副腎白質ジストロフィー ( X - A L D ) の治療および / または予防に用いられる、請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 11】**

X - A L D が、副腎脊髄ニューロパチー ( A M N )、大脳副腎脊髄ニューロパチー ( c A M N ) および小児副腎白質ジストロフィー ( c A L D ) から選択される、請求項 10 に記載の使用のための組成物。

40

**【請求項 12】**

請求項 5 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物と、薬剤的に許容される賦形剤とを含んでなる、医薬組成物。

**【請求項 13】**

X - A L D の治療および / または予防に潜在的に有用な化合物を同定するための方法であって、

a ) X - A L D 細胞と候補化合物を接触させること、および

b ) 前記候補化合物の存在下で

( i ) m T O R の活性レベル、および

( i i ) オートファゴソームマーカーの発現レベル

50

からなる群から選択されるマーカーを分析することを含んでなり、

ここで前記候補化合物が、mTORの活性を阻害する、および/またはオートファゴソームマーカーの発現を変化させる場合に、前記候補化合物はX - ALDの治療および/または予防に有用であるとする、方法。

【請求項14】

X - ALDが、副腎脊髄ニューロパチー (AMN)、大脳副腎脊髄ニューロパチー (cAMN) および小児副腎白質ジストロフィー (cALD) から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

mTOR活性が、リン酸化p70S6Kのレベルを測定することによって決定される、および/または、オートファゴソームマーカーが、LC3 - II、p62、またはそれらの組み合わせである、請求項13または14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特にX連鎖性副腎白質ジストロフィー (X - ALD) を治療するための、特異的mTOR阻害剤の薬剤としての新規用途に関する。本発明はまた、X - ALDの治療および/または予防に潜在的に有用な化合物を同定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

X連鎖性副腎白質ジストロフィー (X - ALD) は、ペルオキシソーム輸送体ABDC1の機能喪失による超長鎖脂肪酸 (VLCFA) の蓄積によって特徴付けられる、代謝性神経疾患である。X - ALDは、単一遺伝子によって遺伝する最もよく知られた脱髄疾患であり、男性の最小発生率は1 : 17, 000である。臨床的に、X - ALDは、脳、副腎、末梢神経系に起こる進行性の損傷、および最終的な死によって特徴付けられる。

【0003】

X - ALDは、脊髄の軸索障害を伴う成人副腎脊髄ニューロパチー (AMN)、脳の脱髄を伴う大脳副腎脊髄ニューロパチー (cAMN)、および重篤な脳の脱髄によって特徴付けられる小児期の変異形の、3つの主な表現型を呈する。脳組織内でのVLCFAのレベルが減少しないため、X - ALDの治療には幾つかの食事性治療、例えば、リセリルトリオレアート、トリオレイン酸グリセロールとエルカ酸トリグリセリドとの混合物であるロレンツォ油と、超長鎖飽和脂肪酸の少ない食事との組み合わせが用いられているが、成功例は限られている。

【0004】

同種間の骨髄移植によるX - ALDの治療は、移植が疾病の発症前に行われた場合には成功する。しかしながら前記治療は、HLAが適合したドナーが得られたときのみに実行可能であり、死亡のリスクも高いため、幾つかの制限を有する。

【0005】

別の治療戦略は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害物質である4 - フェニル酪酸およびバルプロ酸の使用に基づいたものである (スペイン特許第2303441 - B1号)。

【0006】

N - アセチルシステインとアルファリポ酸の組み合わせの使用が、X - ALDを治療するための抗酸化剤療法として開示されている。前記治療は、過剰なVLCFAによる酸化的損傷を是正するために有効である。そうは言っても、X - ALDにおける酸化ストレスの悪化は疾病が進行する間の細胞損傷に付随するのだが、そのことがX - ALDの発生自体の原因となるわけではない (スペイン特許第2377381 - B1号)。

【0007】

上記に鑑みて、前記病理を引き起こす分子標的に向けられた、X - ALDを治療するための新規な治療法が求められている。

10

20

30

40

50

## 【発明の概要】

## 【0008】

本発明は、第1の態様によれば、被験体におけるX - 副腎白質ジストロフィー (X - ALD) の治療および / または予防に用いられる、特異的mTOR阻害剤に関する。

## 【0009】

第2の態様によれば、本発明は、特異的mTOR阻害剤と、mTOR非依存性のオートファジー誘発剤、抗酸化剤、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、ミトコンドリア転移細孔開口の阻害剤、抗炎症剤、PPARアゴニスト、RXRアゴニスト、サーチニン1アゴニストおよび抗高脂血症薬からなる群から選択される化合物とを含んでなる組成物に関する。

10

## 【0010】

第3の態様によれば、本発明は、医薬として用いられる、本発明の第2の態様で定義された組成物に関する。

## 【0011】

第4の態様によれば、本発明は、被験体におけるX - 副腎白質ジストロフィー (X - ALD) の治療および / または予防に用いられる、本発明の第2の態様で定義された組成物に関する。

## 【0012】

第5の態様によれば、本発明は、本発明の第3の態様で定義された組成物と、薬剂的に許容される賦形剤とを含んでなる医薬組成物に関する。

20

## 【0013】

第6の態様によれば、本発明は、X - ALDの治療および / または予防に潜在的に有用な化合物を同定するための方法に関し、該方法は、

a) X - ALD細胞と候補化合物を接触させること、および

b) 前記候補化合物の存在下で

(i) mTORの活性レベル、および

(ii) オートファゴソームマーカーの発現レベル

からなる群から選択されるマーカーを分析することを含んでなり、

ここで前記候補化合物が、mTORの活性を阻害する、および / またはオートファゴソームマーカーの発現を変化させる場合に、前記候補化合物はX - ALDの治療および / または予防に有用であるとする特徴とする。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0014】

【図1A】対照個体 (Ctrl) と、cCALD (A) ならびにcAMN (B) 患者における非発症 (NA) および発症 (A) 脳領域と、3および12か月齢の野生型 (WT) ならびにAbcd1 - / - マウス (C) の脊髄における、p62およびLC3 - IIのレベルの免疫プロット分析。LC3 - IおよびLC3 - IIのバンドの位置をLC3ウェスタンプロットの左側に示し、負荷対照として - チューブリン (tub) を用いた。ヒストグラムは、tubのレベルを参照したLC3 - IIのバンドの定量化、およびそれぞれの対照に比較したp62のレベルを示す。すべてのX - ALDモデルにおいて、LC3 - IIタンパク質のレベルは減少していたが、p62のレベルは増大していた。データは、4 ~ 5回 (AおよびB) および6回 (C) の独立した実験の平均 ± SDを示す。\*  $p < 0.05$  および\*\*  $p < 0.01$ 。

40

【図1B】図1A参照。

【図1C】図1A参照。

【図2】20か月齢のWTおよびAbcd1 - / - Abcd2 - / - マウスの脊髄から得たサンプル中のリソソーム数の測定。1  $\mu\text{m}^2$  組織あたりのリソソームの数を、1遺伝子型あたり3匹の別々のマウスの平均 ± SDによって示し、これをWTの値に比較して表した。\*\*  $p < 0.01$ 。

【図3A】(A) タンパク質分解が高いか (H) または低い (L) 条件下でインキュベ

50

トした、対照 ( C t r l ) および患者 ( A L D ) の線維芽細胞から抽出した L C 3 および p 6 2 の代表的なウェスタンブロット。( B ) L C 3 のレベルを、同条件下であるが、リソソーム阻害剤であるパフィロマイシン A 1 の存在下においても調べた。L C 3 ウェスタンブロットにおいて、L C 3 - I および L C 3 - I I のバンドの位置を左側に示し、負荷対照として - チューブリン ( t u b ) を用いた。ヒストグラムは、 t u b のレベルを参照した L C 3 - I I のバンドの定量化 ( A および B ) および高タンパク質分解条件下での C t r l に比較した p 6 2 のレベルを示す ( A )。すべてのデータは、4 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。( C ) 対照 ( C t r l ) および患者 ( A L D ) の線維芽細胞に E G F P - L C 3 をトランスフェクトしてから 4 8 時間後に、高タンパク質分解培地中で 2 時間 3 7 インキュベートした後の、代表的な蛍光イメージを定量化した図である。ヒストグラムは、トランスフェクトした細胞 1 個あたりの蛍光ドット数を、3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D として示す ( トランスフェクトされた細胞を、1 実験あたり、少なくとも 5 0 個計数した )。A L D 線維芽細胞では、蛍光ドットの数が増加していた。\* p < 0 . 0 5、\*\* p < 0 . 0 1 および \*\*\* p < 0 . 0 0 1。

10

【図 3 B C】図 3 A 参照。

【図 4】( A ) 3 および 1 2 か月齢の W T ならびに A b c d 1 - / - マウスの脊髄における、B E C L I N - 1 ならびに総 p 7 0 S 6 K およびそのリン酸化型 ( P - p 7 0 S 6 K ) の代表的なウェスタンブロット。負荷対照として - チューブリン ( t u b ) を用いた。( B ) p 7 0 S 6 K のリン酸化についても、対照個体 ( C t r l ) および患者 ( A L D ) から得られた線維芽細胞において調べた。高 ( H ) および低 ( L ) タンパク質分解培地中で細胞をインキュベートした。ヒストグラムは、B E C L I N - 1 のレベル ( A ) および P - p 7 0 s 6 K / p 7 0 S 6 K の比 ( A および B ) を示す。データを 3 か月齢の W T マウス ( A ) および C t r l 線維芽細胞 ( B ) に比較して表し、6 回 ( A ) または 4 回 ( B ) の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。\* p < 0 . 0 5 および \*\* \* p < 0 . 0 0 1。

20

【図 5】( A ) ビヒクル ( v e h . ) 処置 ( 陰性対照 ) または V L C F A 処置 ( C 2 6 : 0、5 0  $\mu$  M 2 4 時間 ) した対照 ( C t r l ) および患者 ( A L D ) の線維芽細胞を、高タンパク質分解培地中で [ <sup>3</sup> H ] パリンによって標識した後、長寿命タンパク質の総分解およびリソソーム分解を測定した。結果を、1 . 5 時間の間に分解した標識タンパク質のパーセンテージとして表し、4 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。( B ) V L C F A によって処置したか ( + ) またはしていない ( -、v e h . 処置 ) C t r l ならびに A L D 線維芽細胞における、L C 3 および p 6 2 の代表的なウェスタンブロット。L C 3 - I および L C 3 - I I のバンドの位置を L C 3 ウェスタンブロットの左側に示し、負荷対照として - チューブリン ( t u b ) を用いた。ヒストグラムは、 t u b のレベルを参照した L C 3 - I I の定量化、および C t r l 線維芽細胞における t u b のレベルに比較した p 6 2 のレベルを示す。データは、4 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。\* \* p < 0 . 0 1 および \* \* \* p < 0 . 0 0 1。

30

【図 6】( A ) 特異的な抗体を用いたウェスタンブロットによって示すように、W T マウス、および抗酸化剤混合物 ( A o x、ビタミン E、- リボ酸および N - アセチルシステイン ) によって 4 か月間処置したかまたは処置していない A b c d 1 - / - マウスでは、A b c d 1 - / - マウス脊髄における L C 3 - I I のレベルが増大し、p 6 2 の蓄積が部分的に阻止される。L C 3 - I および L C 3 - I I のバンドの位置を L C 3 ウェスタンブロットの左側に示し、負荷対照として - チューブリン ( t u b ) を用いた。( B ) m T O R の活性に対する、A に示した抗酸化剤処置 ( A o x ) の効果を、1 2 か月齢の A b c d 1 - / - マウスの脊髄においても調べた。特異的な抗体を用いた、W T マウス、および抗酸化剤によって処置したかまたは処置していない A b c d 1 - / - マウスにおける総 p 7 0 S 6 K およびそのリン酸化型 ( P - p 7 0 S 6 K ) のレベルの代表的なウェスタンブロット。A および B において、ヒストグラムは、 t u b のレベルを参照した L C 3 - I I の定量化、ならびに W T ( A ) および P - p 7 0 s 6 K / p 7 0 S 6 K の比 ( B ) に比較した p 6 2 のレベルを示す。データは、6 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。\*

40

50

$p < 0.05$  および  $** p < 0.01$ 。

【図 7 A B】(A) ~ (C) : 特異的な抗体を用いた代表的なウェスタンブロット分析。テムシロリムス (Tem s) によって処置された (+) かまたはされていない (-、ビヒクル、veh.)、14 か月齢の WT マウスおよび A b c d 1 - / - マウスの脊髄における、p 7 0 S 6 K のリン酸化 (A)、L C 3 - I I および p 6 2 のレベル (B)、ならびに抗 D N P 抗体を用いて検出した酸化型のタンパク質 (C)。負荷対照として、総 p 7 0 S 6 K (A) および  $\alpha$ -チューブリン ( $\alpha$ -tub) (B および C) を用い、L C 3 - I および L C 3 - I I のバンドの位置を (B) の L C 3 ウェスタンブロットの左側に示した。ヒストグラムは、WT (A) に比較した P - p 7 0 s 6 K / p 7 0 S 6 K の比、 $\alpha$ -tub のレベルを参照した L C 3 - I I の定量化、WT (B) に比較した p 6 2 のレベル、および WT (C) に比較した酸化型タンパク質 (O x タンパク質) の比を示す。すべてのデータは、6 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。(D) : 上記のように処置した WT マウスおよび A b c d 1 - / - マウスの脊髄の A T P レベルの測定。データは WT に比較して表し、6 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。(E) および (F) : A T P の存在下または非存在下 (それぞれ + A T P および - A T P) で測定したキモトリブシン様 (C T L) プロテアソームの活性 (E)、および表示する 2 0 S および i - 2 0 S サブユニットに対する特異的なプライマーを用いた R T - P C R (F) を、上記のように未処置の (veh.)、またはテムシロリムス (Tem s) によって処置した野生型マウス (WT) および A b c d 1 - / - マウスの脊髄ライセートにおいて決定した。データは WT に比較して表し、1 遺伝子型あたり 4 匹の別々のマウスの平均  $\pm$  S D を示す。A ~ F において、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$  および  $*** p < 0.001$ 。

【図 7 C D】図 7 A B 参照。

【図 7 E F】図 7 A B 参照。

【図 8】WT、A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - および A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - + Tem s マウスの軸索の腫脹におけるシナプトフィジンおよび A P P 蓄積の定量化。データは 1 遺伝子型および条件あたり 5 ~ 6 匹のマウスの平均  $\pm$  S D を示す。 $* p < 0.01$  および  $*** p < 0.001$ 。

【図 9】20 か月齢の、ビヒクル処置した (veh.) WT もしくは A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - マウスまたはテムシロリムス処置した (+ Tem s) A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - マウスに対して、トレッドミル実験 (A) およびバークロス試験 (B) を行った。 $** p < 0.01$  および  $*** p < 0.001$ 。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明者らは、意外なことに、オートファジーの機能障害を引き起こす m T O R の異常なシグナル伝達が X - A L D の病因の機構的な構成要素であり、マウス X - A L D モデルにおける X - A L D の症状は、m T O R 阻害剤の投与によって是正可能であることを見出した。

【0016】

特異的 m T O R 阻害剤の医学的用途

第 1 の態様によれば、本発明は、被験体における X - 副腎白質ジストロフィー (X - A L D) の治療および / または予防に用いられる、特異的 m T O R 阻害剤に関する。

【0017】

本明細書で用いられる用語「m T O R」は、F K 5 0 6 結合タンパク質または 1 2 - ラパマイシン関連タンパク質 1 としても知られる、哺乳類におけるラパマイシンの標的を指す。m T O R は、細胞の生長、細胞の増殖、細胞の運動性、細胞の生存、タンパク質の合成および転写を調節するセリン / スレオニンタンパク質キナーゼである。ヒト m T O R は、m T O R 遺伝子 (2014 年 5 月 25 日時点での N C B I データベースの受託番号 N M \_ 0 0 4 9 5 8) によってコードされる。m T O R は、構造的および機能的に異なる 2 つの複合体、m T O R 複合体 1 (m T O R C 1) および m T O R 複合体 2 (m T O R C 2) のコア触媒成分として機能する。好ましい実施形態によれば、本発明の用語「m T O R」

は、mTORC1複合体中に組み込まれるmTORタンパク質を意味する。mTORC1複合体は、mTOR、mTORの調節性 - 関連タンパク質 (regulatory-associated protein of mTOR) すなわちRaptor、哺乳類致死性SEC13タンパク質8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8: MLST8)、PRAS40タンパク質およびDEPTORタンパク質から構成される。増殖因子のシグナル伝達阻害剤または栄養素の除去によってmTOR活性が抑制されると、オートファジーが誘導される。これとは反対に、mTORのポジティブ調節によってオートファジーは阻害される。

#### 【0018】

本明細書で用いられる用語「特異的mTOR阻害剤」は、その標的 (例えばmTOR) に対する高い特異性を有する化合物を指す。特定の阻害剤の特異性は、特定の阻害剤の対象となる標的の、別の標的に対するIC50値の比として定義される。例えば、特異的mTOR阻害剤の、mTORに対するIC50値は、その他の標的に対するIC50値よりも低い。例えば、mTORに対するIC50値は、同じ阻害剤のその他の標的に対するIC50値よりも、少なくとも10倍低い。別の例では、mTORに対するIC50値は、100倍低いか、またはその他の例では1000倍低い。さらに別の例では、mTORに対するIC50値は、同じ阻害剤のその他の標的に対するIC50値よりも10,000倍低い。

#### 【0019】

本発明の特異的mTOR阻害剤には、mTOR遺伝子の発現を阻止する化合物、mTORのmRNAまたはタンパク質のレベルを減少させる化合物、およびmTORの活性を阻害する化合物が含まれる。

#### 【0020】

本明細書で用いられる用語「mTORの活性」は、ホルモン、増殖因子および栄養素に応答したタンパク質合成、細胞の運動性、生存、オートファジーおよび代謝のような、幾つかの細胞の工程に関わる、mTORによって調節される細胞の伝達シグナルを指す。好ましい実施形態によれば、特異的mTOR阻害剤は、mTORによるオートファジーの抑制を阻害する、つまりオートファジーを活性化させる、化合物もしくはリガンド、またはその薬剤的に許容される塩を指す。

#### 【0021】

本明細書で用いられる用語「薬剤的に許容される塩」は、特定の化合物の遊離酸および塩基の生物学的有効性を保持し、生物学的にも、または他の点でも、望ましくないものではない塩を指す。薬剤的に許容される塩には、本明細書に記載する化合物とミネラルまたは有機酸との反応によって調製された塩が含まれ、このような塩としては、酢酸塩、アクリル酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、亜硫酸水素塩、臭化物、酪酸塩、ブチン-1,4-ジオエート (butyn-1,4-dioate)、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩 (camphorsulfonate)、カブロン酸塩、カプリル酸塩、クロロ安息香酸塩、塩化物、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、デカン酸塩、ジグルコン酸塩、リン酸二水素、ジニトロ安息香酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘブタン酸塩、グリセロリン酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘブタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヘキシン-1,6-ジオエート、ヒドロキシ安息香酸、ヒドロキシ酪酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ヨウ化物、イソ酪酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、マンデル酸塩、メタリン酸塩、メタンスルホン酸塩、メトキシ安息香酸塩、安息香酸メチル、リン酸一水素、1-ナフタレンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ピロ硫酸塩、ピロリン酸塩、プロピオル酸塩、フタル酸塩、フェニル酢酸塩、フェニル酪酸、プロパンスルホン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、亜硫酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、スルホン酸塩、酒石

10

20

30

40

50

酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩およびキシレンスルホン酸塩が挙げられる。

【0022】

本明細書で用いられる用語「オートファジー」は、不必要な、または機能不全である細胞成分、例えば細胞内タンパク質、タンパク質凝集体、細胞小器官、細胞膜、細胞小器官膜およびその他の細胞成分の、リソソームの作用を介した、細胞による分解に関わる、細胞の異化機構を指す。オートファジー機構は、(i)細胞の標的領域周辺の膜形成、これによって内容を残りの細胞質から分離する、(ii)得られた小胞と、リソソームまたはエンドソームとの融合、およびそれに続く小胞の内容の分解を含んでよい。オートファジーとの用語はまた、それによって飢餓状態の細胞が栄養素を必要性の低い工程からさらに重要な工程へ再配分する機構のうちの1つを指してもよい。

10

【0023】

一つの実施形態によれば、特異的mTOR阻害剤は、mTORのタンパク質またはmRNAのレベルを減少させる化合物である。

【0024】

特定の実施形態によれば、mTOR特異的な阻害剤は、mTOR特異的な阻害性抗体である。本明細書で用いられる用語「阻害性抗体」は、mTORへ特異的に結合して、mTORの生物学的活性を少なくとも部分的に阻害できる抗体に関する。抗体を得るための方法は、当業者に公知である。これらの方法に用いられる抗体は、例えば、ポリクローナル血清、ハイブリドーマ上清またはモノクローナル抗体、抗体断片、Fv、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>、ScFv、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディおよびヒト化抗体であってよい。

20

【0025】

特定の実施形態によれば、本発明に従って用いられる特異的mTOR阻害剤は、mTORまたはmTORの機能に必要ないずれかの遺伝子の発現をノックダウンできる、mTOR特異的なRNA干渉(RNAi)である。本発明との関連では、mTOR特異的なRNAiは、アデノウイルスのような安定化ウイルスベクターシステムに含まれてよい。

【0026】

特定の実施形態によれば、本発明に従って用いられる特異的mTOR阻害剤は、mTOR特異的な低分子干渉RNA(sRNA)である。

30

【0027】

特定の実施形態によれば、本発明に従って用いられる特異的mTOR阻害剤は、mTOR特異的なマイクロRNAである。マイクロRNAは、RNAの特異的な切断を触媒できる酵素RNA分子である。マイクロRNAの作用機構には、標的RNAに相補的なマイクロRNA分子の配列特異的なハイブリダイゼーションと、それに続くヌクレオチド鎖の切断現象が含まれる。マイクロRNA分子の組成には、好ましくは標的mRNAに相補的な1つ以上の配列、mRNAの切断に関与する既知の触媒配列または機能的に等価な配列が含まれる。

【0028】

特定の実施形態によれば、本発明に従って用いられる特異的mTOR阻害剤は、mTOR核酸の転写および/または翻訳を阻害する、mTOR特異的なアンチセンス核酸である。本発明のmTOR阻害性アンチセンス核酸には、開示するようなヒトmTORアンチセンス化合物が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0029】

特定の実施形態によれば、本発明に従って用いられる特異的mTOR阻害剤は、mTOR特異的なDNA酵素である。DNA酵素には、アンチセンスおよびマイクロRNA技術の両方の機構的特色が幾つか組み入れられている。DNA酵素は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによく似て、特定の標的核酸配列を認識するが、マイクロRNAにもよく似て、標的核酸を触媒的および特異的に切断するように設計される。

【0030】

50



タンパク質または核酸の発現は、そのレベルが、参照値に対して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%（すなわち存在しない）減少した際に、低下したとみなされる。

#### 【0031】

参照値は、特異的な疾病を患っていない被験体であってよい、対照被験体におけるmRNAまたはタンパク質のレベルを指す。したがって本発明との関連では、参照値は、X - ALDを患っていない被験体である対照被験体におけるmTORのタンパク質またはmRNAのレベルを指す。参照値はまた、対照被験体におけるmTORの発現レベル（すなわちmRNAまたはタンパク質のレベル）も含む。

10

#### 【0032】

mTOR特異的な阻害剤が、mTOR mRNAのレベルを減少させられるか否かを決定するために適した方法としては、qPCR、RT-PCR、RNAプロテクション分析、ノーザンブロット、RNAドットブロット、in situハイブリダイゼーション、マイクロアレイ技術のような、mRNAの発現レベルを決定するための標準的なアッセイ、タグベースの方法、例えばLongSAGEおよびSuperSAGEのような変異形を含む遺伝子発現連鎖解析（SAGE）、マイクロアレイ、Flow-FISH、qFISHおよび二重融合FISH（D-FISH）のような変異形を含む蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0033】

阻害剤が、mTORタンパク質のレベルを減少させることによって作用するか否かを決定するために適した方法としては、従来の方法、例えば、mTOR遺伝子によってコードされるタンパク質への特異的な結合能をもつ抗体（または抗原決定基を含むその断片）を用いた定量化、およびそれに続く、得られた抗体-抗原複合体の定量化が挙げられる。非標識抗体（一次抗体）および標識抗体（二次抗体）を用いる、本発明で用いてもよい様々な公知のアッセイがあり、このような技術としては、ウェスタンブロットまたはウェスタントランスファー、ELISA（酵素結合免疫吸着測定法）、RIA（放射性免疫測定法）、競合EIA（酵素免疫測定法）、DAS-ELISA（二重抗体サンドイッチELISA）、免疫細胞化学および免疫組織化学技術、特異的な抗体を含むバイオチップまたはタンパク質マイクロアレイに基づいた技術、またはディップ・スティックのような形式のコロイド沈殿に基づいたアッセイが挙げられる。対象タンパク質のレベルを検出し、定量するための他の方法としては、アフィニティークロマトグラフィー、リガンド結合アッセイなどの技術が挙げられる。

30

#### 【0034】

別の実施形態によれば、特異的mTOR阻害剤は、mTOR活性を阻害することによって作用する。本発明において用いられる特異的mTOR阻害剤は、mTOR活性を少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、または少なくとも90%特異的に阻害してよく、すべての範囲は5%ないし100%である。阻害剤が、mTOR活性を減少させることによって作用するか否かを決定するために適した方法としては、mTORによってリン酸化されるいずれかの基質、例えばp70S6K、EIF4EBP1およびULK1タンパク質のリン酸化レベルの決定によって行われるような、mTOR活性レベルの決定を可能にするいずれかの方法が挙げられる。酵素活性を決定するためのアッセイは当業者に公知であり、初速度分析法、進行曲線アッセイ（progress curve assay）、一過性動態アッセイ（transient kinetics assay）および減衰アッセイ（relaxation assay）が挙げられるが、これらに限定されない。酵素活性の連続的アッセイとしては、分光光度アッセイ、蛍光定量アッセイ、熱量測定アッセイ、化学発光アッセイ、光散乱アッセイおよびマイクロスケールの熱拡散アッセイが挙げられるが、これらに限定され

40

50

ない。酵素活性の非連続アッセイとしては、放射測定アッセイおよびクロマトグラフィーアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、酵素活性に影響を与え得る因子が、塩濃度、温度、pHおよび基質濃度を含むことを理解する。

【0035】

本明細書で用いられる用語「EIF4EBP1」は、2014年6月11日時点でのUniProtデータベースの受託番号Q13541によって示される、真核生物の翻訳開始因子4E結合タンパク質を指す。EIF4BP1は、EIF4F複合体へのEIF4Eの集合を阻止することによって、EIF4E活性を調節する。EIF4EBP1のリン酸化型は、mTORC1複合体との関連でmTORによって調節され、翻訳を活性化する。

【0036】

本明細書で用いられる用語「P-p70S6K」または「リン酸化p70S6K」は、2014年5月14日時点でのUniProtデータベースの受託番号P23433によって示される、70kDaセリン/スレオニンタンパク質S6キナーゼのリン酸化型を指す。これは、PI3キナーゼ経路のPI3およびホスホイノシチド依存性キナーゼ1の下流で作用する。この標的基質はS6リボソームタンパク質である。S6のリン酸化によって、リボソームでのタンパク質合成が誘導される。p70S6KはmTORによってリン酸化され、これによって該タンパク質の活性化型であるP-p70S6Kが誘導され、増殖因子および栄養素に応答したmTORシグナル伝達の下流で作用して、細胞増殖および細胞周期進行を促進する。

【0037】

本明細書で用いられる用語「ULK1」は、2014年7月9日時点でのUniProtデータベースの受託番号O75385によって示される、真核生物のセリン/スレオニンキナーゼを指す。これはホスファチジルイノシトール3キナーゼPIK3C3の上流で作用し、ファゴフォアの形成を調節する。前記タンパク質は、mTORによってリン酸化される。

【0038】

本発明の好ましい実施形態によれば、mTORの生物学的活性に対する阻害能の決定は、p70S6キナーゼまたはその他のmTOR基質のリン酸化型（P-p70S6、P-EIF4EBP1、P-ULK1）の発現レベルの測定に基づいたin vitroアッセイによって検出できる。当該技術分野では、タンパク質のリン酸化型を決定できる複数のアッセイが知られている。前記方法としては、特異的なキナーゼ（すなわちmTOR）、該キナーゼの基質（すなわちp70S6）およびATPの存在下でのリン酸化基質（例えばリン酸化p70S6）の測定に基づいた、キナーゼ活性アッセイが挙げられる。一般にリン酸化基質の検出は、比色、放射性または蛍光検出を含む幾つかのレポーターシステムによって行われる。リン酸化タンパク質を検出できるその他のアッセイとしては、タンパク質のレベルを決定するために適した方法、例えばウェスタンブロット、ELISA、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、免疫組織化学およびマスマススペクトロメトリーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

あるいは、リン酸化タンパク質の測定は、対象リンタンパク質を特異的に認識するリン特異的な抗体の使用によって行うことができる。この技術を用いる際には、リンタンパク質のレベルを、前記タンパク質の総レベルに対して標準化することが推奨される。例えば、P-p70S6タンパク質のレベルを測定することによってmTORの活性を決定する際、p70S6タンパク質のレベルを決定することによって、結果は標準化される。

【0040】

mTORの活性は、mTORによってリン酸化される基質（p70S6K、EIF4EBP1またはULK1）のレベルが、参照値に対して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少な

10

20

30

40

50

くとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%（すなわち検出されない）減少した際に、低下したとみなされる。

【0041】

あるいは、mTORの生物学的活性に対する阻害能の決定は、オートファジーのような、mTORによって調節される細胞工程に関するマーカーの発現レベルの測定に基づいた*in vitro*アッセイによって検出できる。

【0042】

したがって本発明の好ましい実施形態によれば、特異的mTOR阻害剤が、mTOR活性を減少させられるか否かを決定するために適した方法は、少なくとも1つのオートファゴソームマーカーの発現レベルを決定することを含む。本明細書で用いられる用語「オートファゴソームマーカー」または「オートファジックマーカー」は、オートファジーにおいて差次的に発現する、タンパク質またはそれらをコードする遺伝子を指す。本発明の第1の態様に従って、mTORの活性を決定するために有用なオートファゴソームマーカーの具体例としては、LC3-IIおよびp62が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態によれば、前記オートファジーマーカーの発現レベルは、基本的なオートファジック条件下で決定される。本明細書で用いられる表現「基本的なオートファジック条件」は、サイトソル成分の恒常的な代謝回転に関わる細胞機構の一部として、恒常的なオートファジーが低レベルで起こる条件を指す。そのため、基本的なオートファジック条件は細胞の生長を可能にする。別の好ましい実施形態によれば、前記オートファジックマーカーの発現レベルは、オートファジーを刺激する条件下で決定される。本明細書で用いられる表現「オートファジーを刺激する条件」は、オートファジーによって細胞の分解が誘導される条件を指す。オートファジーを刺激する条件には、栄養不足、ホルモン治療およびストレスが含まれる。オートファジーの最も典型的な誘因は栄養不足である。多くのタイプの細胞において、ホルモンおよび増殖因子の欠乏もまた、オートファジー誘導の一因になると考えられる。典型的には、細胞培養においてオートファジーを誘導する条件は、栄養素または血清が欠乏した培地中で細胞を生長させることを含む。

【0043】

本明細書で用いられる用語「LC3-II」は、2014年5月14日時点でのUniProtデータベースの受託番号Q9H492によって示される、オートファジー関連タンパク質LC3または微小管関連タンパク質1A/1Bを指す。これはオートファゴソームの液胞形成に関連している。LC3-IIは、LC3-Iタンパク質の脂質化によって得られる。

【0044】

本明細書で用いられる用語「p62」は、2014年5月14日時点でのUniProtデータベースの受託番号Q13501によって示され、セクエストソーム1としても知られる62kDaユビキチン結合タンパク質p62の、Lck SH2ドメインに対するホスホチロシン非依存性リガンドを指す。これは、ポリユビキチン含有体の形成およびオートファジック分解の両方に必要とされる。

【0045】

mTORの活性は、1つ以上のオートファゴソームマーカー（例えばp62）のレベルが、参照値に対して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%（すなわち検出されない）減少した際に、低下したとみなされる。加えて、mTORの活性は、1つ以上のオートファゴソームマーカー（例えばLC3-II）のレベルが、参照値に対して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少な

くとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%増大した際に、低下したとみなされる。

【0046】

具体的には、本発明の特異的mTOR阻害剤の阻害能の決定は、本特許出願の実施例6に示すように、mTORの特異的阻害剤によって処理した細胞におけるオートファジックな流れの活性化を決定することによって実行できる。mTOR特異的な阻害剤によって治療しているX-ALD患者から得た細胞では、P-p70S6Kおよびp62タンパク質のレベルが、前記阻害剤による治療を行っていないX-ALD患者から得た細胞において決定した前記タンパク質のレベルと比較して、減少していた。さらに、X-ALD患者から得た細胞におけるLC3-IITタンパク質のレベルは、治療されていない前記患者から得た細胞における前記マーカーのレベルと比較して、増大していた。

10

【0047】

当業者は、前記オートファゴソームマーカーの発現レベルが、そのmRNAのレベルまたはタンパク質のレベルを決定することによって、決定できることを理解する。mRNAのレベルまたはタンパク質のレベルを決定するために適した方法については、上に詳述した。好ましい実施形態によれば、前記マーカーの発現レベルは、それらのタンパク質レベルを決定することによって、決定される。特異的なマーカーのタンパク質レベルを決定するために適した方法については、既に詳述した。本発明のさらに好ましい実施形態によれば、前記オートファゴソームマーカーのタンパク質レベルは、ウェスタンブロットによって決定される。

20

【0048】

酸化ストレス機構は、X-ALDを進行させる一因となる。X-ALD患者の脊髄における酸化ストレスの徴候には、タンパク質に対する酸化的、糖酸化的および脂質酸化的損傷、ならびに酵素による酸化防御の変化が含まれる。本発明者らは、特異的mTOR阻害剤により治療されているX-ALD患者から得た細胞において、酸化型タンパク質のレベルが減少していることを示した。したがって、本発明の好ましい実施形態によれば、特異的mTOR阻害剤が、mTOR活性を減少させられるか否かの決定は、少なくとも1つの酸化的損傷マーカーの発現レベルを決定することをさらに含む。「酸化的損傷マーカー」との用語は、酸化ストレス過程の間に差次的に発現する、タンパク質またはそれをコードする遺伝子のような、いずれかのマーカーを指す。本明細書で用いられる用語「酸化ストレス過程」は、活性酸素種による全身症状と、生体系が反応性の中間体を容易に解毒するかまたは結果としての損傷を修復する能力との間の不均衡を指す。本発明のこの態様に従ってmTORの活性を決定するために用いることのできる酸化マーカーの具体例としては、酸化型タンパク質の発現レベル、免疫プロテアソームサブユニット1i/LMP2および5i/LMP7の発現レベル、プロテアソームのキモトリプシン様活性およびATPのレベルが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0049】

本明細書で用いられる用語「酸化型タンパク質」は、活性酸素種によって直接、または酸化ストレスの二次産物との反応によって間接的に誘導された、タンパク質の共有結合性の修飾を指す。生体試料中にみられる、タンパク質酸化による最も一般的な産物は、Pro、Arg、LysおよびThrのカルボニル誘導体のタンパク質である。これらの誘導体は化学的に安定であり、活性酸素種のほとんどのタイプに対する酸化ストレスのマーカーとして役立つ。酸化型タンパク質を決定するために適した方法は、ジスルフィド、硫黄ラジカル、グルタチオン付加、メチオニンスルホキシド基、カルボニル基などのような、化学的修飾の検出に基づいたものである。前記方法としては、-メルカプトエタノールを含まないSDSゲル電気泳動、電子スピン共鳴分光法による検出、質量分析法、臭化シアンによる切断とそれに続くアミノ酸分析、ジニトロフェニルヒドラジン共役アッセイ、ウェスタンブロット、ELISA、免疫アッセイなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0050】

50

本明細書で用いられる用語「 $1i/LMP2$ 」または「免疫プロテアソームサブユニット $LMP2$ 」は、2014年5月14日時点でのUniProtデータベースの受託番号P28065によって示されるタンパク質を指す。本明細書で用いられる用語「 $5i/LMP7$ 」または「免疫プロテアソームサブユニット $LMP7$ 」は、2014年5月14日時点でのUniProtデータベースの受託番号P28062によって示されるタンパク質を指す。 $1i/LMP2$ および/または $5i/LMP7$ の発現レベルは、タンパク質レベルまたはmRNAレベルを決定できる、当該技術分野において公知の、いずれかの適した方法によって決定できる。

#### 【0051】

本明細書で用いられる用語「プロテアソームのキモトリプシン様活性」は、プロテアソームのサブユニット $5$ によって調節される、プロテアソームのタンパク質分解活性を指す。プロテアソームのキモトリプシン様活性を決定するための方法は当業者に公知であり、これには比色、発光および蛍光アッセイが含まれる。具体的には、プロテアソームのキモトリプシン様活性の決定は、プロテアソーム抽出物と、キモトリプシン様プロテアーゼに特異的な基質、例えばAMCのような蛍光タグによって好ましく修飾されたSuc-LLVY基質とをインキュベートすることによって分析できる。次に、蛍光リーダーを用いて遊離のAMC蛍光を測定することにより、タンパク質分解活性を決定する。

#### 【0052】

本明細書で用いられる用語「ATP」または「アデノシン三リン酸」は、細胞内で補酵素として用いられるアデノシンヌクレオシド三リン酸を指す。ATPは、細胞内における代謝のための化学エネルギーを輸送する。ATPのレベルを決定するための方法は当業者に公知であり、これには比色、発光および蛍光アッセイが含まれる。ATPのレベルを決定するために有用な市販のキットとしては、PerkinElmerから入手可能なATP-lite 1 stepが挙げられるが、これは添加したルシフェラーゼおよびD-ルシフェリンとATPとの反応によって起こる光の発生に基づくものである。

#### 【0053】

mTORの活性は、1つ以上の酸化損傷のマーカー（例えば酸化型タンパク質、 $1i/LMP2$ またはATP）のレベルが、参照値に対して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%（すなわち検出されない）減少した際に、低下したとみなされる。

#### 【0054】

本出願の実施例7に、酸化損傷マーカーのレベルに対する、特異的mTOR阻害剤について示す。特異的mTOR阻害剤によって治療しているX-ALD患者から得た細胞の酸化型タンパク質のレベルは、前記治療を行っていないX-ALD患者から得た細胞よりも低い。前記治療はまた、X-ALD患者から得た細胞において、酸化ストレスに付随する生体エネルギー不全を阻止してATPのレベルを正常化すると共に、プロテアソームのキモトリプシン様活性の誘導を阻止して、免疫プロテアソームサブユニット $1i/LMP2$ および $5i/LMP7$ を安定させる。

#### 【0055】

本発明者らはまた、X-ALDの発生に付随する軸索変性が、特異的mTOR阻害剤を用いた治療によって予防できることも示した。したがって、本発明の別の好ましい実施形態によれば、特異的mTOR阻害剤がmTOR活性を減少させられるか否かを決定するために適した方法は、少なくとも1つの軸索損傷マーカーの発現レベルを決定することをさらに含む。本明細書で用いられる用語「軸索損傷マーカー」は、軸索損傷において差次的に発現する、タンパク質またはそれらをコードする遺伝子を指す。本明細書で用いられる用語「軸索損傷」は、脱髄性の過程を暗示する、軸索の傷害を指す。使用可能な軸索損傷の具体的なマーカーとしては、Iba-1、GFAP、シナプトフィジン、APPおよび

10

20

30

40

50

8 - オキソ - 7 , 8 - ジヒドロ - 2 ' - デオキシグアノシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 6 】

本明細書で用いられる用語「 I b a - 1 」または「 A I F - 1 」は、 2 0 1 4 年 5 月 1 4 日時点での U n i p r o t データベースの受託番号 P 5 5 0 0 8 によって示される、イオン化カルシウム結合アダプター分子 1 またはアログラフト炎症因子 1 を指す。

【 0 0 5 7 】

本明細書で用いられる用語「 G F A P 」は、 2 0 1 4 年 5 月 1 4 日時点での U n i p r o t データベースの受託番号 P 1 4 1 3 6 によって示される、グリア線維性酸性タンパク質を指す。

10

【 0 0 5 8 】

本明細書で用いられる用語「シナプトフィジン」または「主要シナプス小胞タンパク質 p 3 8 」は、 2 0 1 4 年 5 月 1 4 日時点での U n i p r o t データベースの受託番号 P 0 8 2 4 7 によって示されるタンパク質を指す。

【 0 0 5 9 】

本明細書で用いられる用語「 A P P 」または「アミロイドベータ A 4 タンパク質」は、 2 0 1 4 年 5 月 1 4 日時点での U n i p r o t データベースの受託番号 P 0 5 0 6 7 によって示されるタンパク質を指す。

【 0 0 6 0 】

本明細書で用いられる用語「 8 - オキソ - 7 , 8 - ジヒドロ - 2 ' - デオキシグアノシン」または「 8 - o x o d G 」は、酸化型のプリンヌクレオシドを指す。前記マーカーは、DNA の病変部を示すものである。

20

【 0 0 6 1 】

m T O R の活性は、 1 つ以上の軸索損傷のマーカー（例えば I b a - 1 、 G F A P 、シナプトフィジン、 A P P または 8 - オキソ - 7 , 8 - ジヒドロ - 2 ' - デオキシグアノシン）のレベルが、参照値に対して少なくとも 5 % 、少なくとも 1 0 % 、少なくとも 1 5 % 、少なくとも 2 0 % 、少なくとも 2 5 % 、少なくとも 3 0 % 、少なくとも 3 5 % 、少なくとも 4 0 % 、少なくとも 4 5 % 、少なくとも 5 0 % 、少なくとも 5 5 % 、少なくとも 6 0 % 、少なくとも 6 5 % 、少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 1 0 0 % （すなわち検出されない）減少した際に、低下したとみなされる。

30

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態によれば、前記特異的 m T O R 阻害剤はラパマイシン誘導体である。

【 0 0 6 3 】

本明細書で用いられる用語「ラパマイシン誘導体」は、化学的に修飾されたラパマイシンを指す。ラパマイシンは、ストレプトマイセスヒグロスコピクスに ( S t r e p t o m y c e s h y g r o s c o p i c u s ) よって産生された、マクロライド系トリエン抗生物質である。前記ラパマイシン誘導体化合物としては、テムシロリムス、デフォロリムス、(リダフォロリムス、 A P 2 3 5 7 3 および M K - 8 6 6 9 ) 、エベロリムス ( R A D 0 0 1 ) 、 A Z D 8 0 5 5 、 O S I - 0 2 7 、 B E Z 2 3 5 ( N V P - B E Z 2 3 5 ) 、 I N K - 1 2 8 、 X L 3 8 8 、 P 2 2 8 1 、 P 5 2 9 、 G S K 2 1 2 6 4 5 8 、 K U - 0 0 6 3 7 9 4 、 W A Y - 0 0 1 、 W A Y - 6 0 0 、 W Y E - 6 8 7 、 W y e t h - B M C L - 2 0 0 0 9 1 0 0 7 5 - 9 b 、 W y e t h - B M C L - 2 0 0 9 1 0 0 9 6 - 2 7 、 K U - B M C L - 2 0 0 9 0 8 0 6 9 - 5 、 K U - B M C L - 2 0 0 9 0 8 0 6 9 - I 、 P I - 1 0 3 、 W Y E - 3 5 4 、 トリン 1 、 P P 2 4 2 、 P P 3 0 、 P P 4 8 7 、 P P 1 2 1 および X L 7 6 5 ラパマイシン、 1 6 - O 置換ラパマイシン、 4 0 - O 置換ラパマイシン、ラパマイシンのモノおよびジエステル誘導体、ラパマイシンの 2 7 - オキシム、ラパマイシンの 4 2 - オキソ類似体、二環式ラパマイシン、ラパマイシン二量体、ラパマイシンのシリルエーテルならびにラパマイシンアリアルスルホン酸塩およびスルファミン酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

40

50

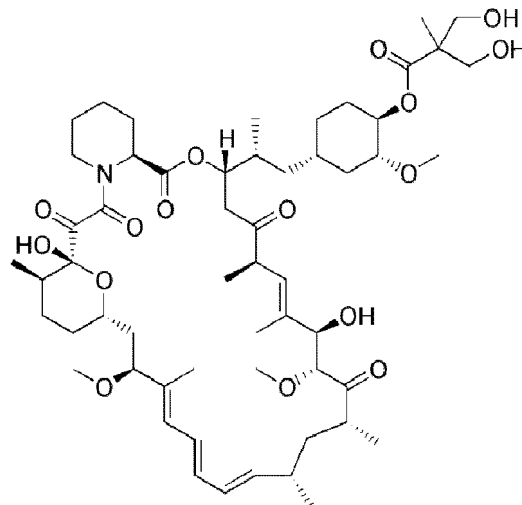
## 【 0 0 6 4 】

さらなる特定の好ましい実施形態によれば、前記特異的 m T O R 阻害剤はテムシロリムスである。

## 【 0 0 6 5 】

本明細書で用いられる用語「テムシロリムス」は、ラパマイシンの 4 2 位のヒドロキシルエステルを指す。テムシロリムスの化学名は ( 3 S , 6 R , 7 E , 9 R , 1 0 R , 1 2 R , 1 4 S , 1 5 E , 1 7 E , 1 9 E , 2 1 S , 2 3 S , 2 6 R , 2 7 R , 3 4 a S ) - 9 , 1 0 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 2 1 , 2 2 , 2 3 , 2 4 , 2 5 , 2 6 , 2 7 , 3 2 , 3 3 , 3 4 , 3 4 a - ヘキサデカヒドロ - 9 , 2 7 - ジヒドロキシ - 3 - [ ( 1 R ) - 2 - [ 1 S , 3 R , 4 R ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシシクロヘキシル ] - 1 0 , 2 1 - ジメトキシ - 6 , 8 , 1 2 , 1 4 , 2 0 , 2 6 - ヘキサメト 3 H - ピリド [ 2 , 1 - ] [ 1 , 4 ] オキサアザクロヘントリアコンチン - 1 1 , 5 , 1 1 , 2 8 , 2 9 ( 4 H , 6 H , 3 1 H ) - ペントン 4 ' - [ 2 , 2 - ビス ( ヒドロキシメチル ) プロピオン酸塩 ] ; またはラパマイシン、 4 3 - [ 3 - ヒドロキシ - 2 - ( ヒドロキシメチル ) - 2 - メチルプロパノエート ] である。この化合物は、腎癌の治療に広く用いられている。テムシロリムスとの用語は、そのプロドラッグ、誘導体または類似体も包含する。テムシロリムスの化学構造は、以下の式によって表される。

## 【 化 1 】



## 【 0 0 6 6 】

テムシロリムスは、限定はされないが、米国特許第 8 5 , 3 6 2 , 7 1 8 B 1 号または米国特許第 8 2 5 8 2 9 9 B 2 号に記載されている方法を含む、当該技術分野において公知の方法を当業者が用いることによって得ることのできる化合物である。テムシロリムスはまた、P f i z e r から市販されている ( T o r i s e l ( 登録商標 ) ) 。

## 【 0 0 6 7 】

本明細書で用いられる用語「被験体」は、哺乳類に分類されるすべての動物を指し、家畜、霊長類およびヒト、例えば人間、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、またはげっ歯類が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、被験体はいずれかの年齢または人種の、男性または女性のヒトである。

## 【 0 0 6 8 】

本明細書で用いられる用語「副腎白質ジストロフィー、X連鎖性副腎白質ジストロフィーまたは X - A L D」は、脳、副腎、末梢神経系に起こる進行性の損傷、および最終的には死を導く、まれな遺伝性の白質ジストロフィーを指す。特定の実施形態によれば、副腎白質ジストロフィーは、脊髄における軸索障害を伴う成人副腎脊髄ニューロパチー ( A M N ) 、脳の脱髄を伴う大脳の副腎脊髄ニューロパチー ( c A M N ) および重篤な大脳の脱髄によって特徴付けられる小児期の変異形 ( c A L D ) からなる群から選択される。さらに好ましい実施形態によれば、副腎白質ジストロフィーは、副腎脊髄ニューロパチー ( A

MN) (すなわち脊髄における軸索障害を伴う成人副腎脊髄ニューロパチー)である。

【0069】

本明細書で用いられる用語「副腎脊髄ニューロパチー (AMN)」は、X - ALDの変異形である、脊髄における軸索障害を伴う成人副腎脊髄ニューロパチーを指す。前記疾病は、徐々に起こる、進行性の脚の脱力および硬直、筋動作を協調させる能力の喪失、体重減少、過剰な筋緊張、歩行困難、視覚異常、言葉の明瞭な発音の困難、行動の変化、副腎不全、けいれん、性的機能不全 / インポテンス、膀胱機能障害、軽度の末梢神経障害および悪心を含む、幾つかの症状によって特徴付けられる。

【0070】

本明細書で用いられる用語「治療」は、本明細書に記載するように、臨床症状への感受性を終結、予防、寛解、および / または減少させることを目的とした、いずれかのタイプの治療法を含む。好ましい実施形態によれば、治療との用語は予防的治療 (すなわち本明細書で定義する臨床症状、疾患または状態への感受性を減少させるための治療法) に関する。このように、本明細書で用いられる用語「治療」、「治療する」などは、ヒトを含む哺乳類における病理学的状態または疾患のいずれかの治療をカバーする、望ましい薬理学的および / または生理学的効果を指す。該効果は、疾患もしくはその症状を完全または部分的に予防する点で予防的であってよく、および / または、疾患および / または疾患に起因する有害作用を部分的または完全に治癒させる点で治療的であってよい。すなわち「治療」には、(1) 被験体における疾患の発生または再発を予防すること、(2) 例えば疾患の発生を抑止するように、疾患を妨げること、(3) 例えば、失われ、欠損したか、もしくは欠陥のある機能を回復させるかまたは修復することによって、または非効率的な過程を刺激することによって疾患またはその症状を後退させることで、ホストがもはや疾患またはその症状を患うことのないように、疾患もしくは少なくともそれに付随する症状を停止または終結させること、または(4) 疾患もしくはそれに付随する症状を、軽減、緩和、または寛解することが含まれ、ここで、寛解する、とは、少なくとも炎症、疼痛、および / または免疫不全のようなパラメータの規模を縮小させることを指す、広い意味で用いられる。

【0071】

当業者が認識するように、X - ALDの治療法における特異的mTOR阻害剤の有効性は、症状の改善によって示される。

【0072】

あるいは、本発明は、X - ALDを予防および / または治療する薬剤を製造するための、特異的mTOR阻害剤の用途に関する。

【0073】

「特異的mTOR阻害剤」との用語については、これまでに記載されており、その詳細は参考によって本明細書に取り込まれる。一実施形態によれば、前記特異的mTOR阻害剤はラパマイシン誘導体である。さらに特定の実施形態によれば、前記特異的mTOR阻害剤はテムシロリムスである。

【0074】

「X - ALD」との用語については、これまでに記載されており、その詳細は参考によって本明細書に取り込まれる。特定の実施形態によれば、前記X - ALDは、成人副腎脊髄ニューロパチー (AMN)、大脳副腎脊髄ニューロパチー (cAMN) および副腎白質ジストロフィーの小児期の変異形 (cALD) からなる群から選択される。さらに特定の実施形態によれば、X - ALDは成人副腎脊髄ニューロパチー (AMN) である。

【0075】

本発明による組成物

別の態様によれば、本発明は、特異的mTOR阻害剤と、オートファジー誘発剤、抗酸化剤、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、ミトコンドリア転移細孔開口の阻害剤、抗炎症剤、PPARアゴニスト、RXRアゴニスト、サーチュイン1アゴニストおよび抗高脂血症薬からなる群から選択される化合物とを含んで



なる組成物に関する。

【0076】

「特異的mTOR阻害剤」との用語は、本発明の第1の態様との関連において定義されており、この定義は本発明の第2の態様にも同等に適用される。特定の実施形態によれば、前記特異的mTOR阻害剤はラパマイシン誘導体である。さらに特定の実施形態によれば、前記ラパマイシン誘導体はテムシロリムスである。「ラパマイシン誘導体」および「テムシロリムス」との用語については既に定義した。

【0077】

本発明の組成物中に含まれる特異的mTOR阻害剤、好ましくはテムシロリムスの量は、広範囲に変動し得る。しかしながら特定の実施形態によれば、特異的mTOR阻害剤、好ましくはテムシロリムスの重量パーセンテージは、本発明の総組成物に対して、少なくとも0.10%、0.50%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または少なくとも95%である。

10

【0078】

本発明の組成物中の阻害剤と、該組成物の少なくとも第2の成分との重量比は、広範囲に変動し得る。しかしながら一般にこの比は、本発明の組成物を投与される被験体の治療条件、年齢、性別、体重などのような因子を考慮して選択される。好ましくは、本発明の特異的mTOR阻害剤、好ましくはテムシロリムスと、本発明の第2の成分、すなわちオートファジー誘発剤、抗酸化剤、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、ミトコンドリア転移細孔開口の阻害剤、抗炎症剤、PPARアゴニスト、RXRアゴニスト、サーチュイン1アゴニストおよび抗高脂血症薬からなる群から選択される化合物との前記重量比は、有益な効果、特に、各成分の用量が少なくても同じ効果が得られることで、本発明の組成物を投与される被験体における副作用が減少するように、本発明の組成物の、その各成分に比較した治療効果の増大がもたらされる重量比である。

20

【0079】

本明細書で用いられる用語「mTOR非依存性のオートファジー誘発剤」または「mTOR非依存性のオートファジー賦活剤」は、オートファジーを誘導するmTOR経路とは異なるいずれかの経路によって、細胞内のオートファジーを増大させるかまたは刺激することができる、いずれかの薬剤を指す。幾つかの実施形態によれば、オートファジー誘発剤は、オートファゴソームの形成を増大させられる。

30

【0080】

特定の実施形態によれば、前記mTOR非依存性のオートファジー誘発剤は、トレハロース、ラニチジン、スベルミジン、レスベラトロール、ベラパミル、ロペラミド、アミオダロン、トリフロペラジン、ミノキシジル、2'-5'-ジデオキシアデノシン、タモキシフェン、フマル酸ジメチル、チアゾリジンジオン、9-cis-レチノイン酸、ベキサロテン、フルスピリレン、トリフロペラジン、ベニトレムA、ピモジド、プロプラノロール、ビタミンE、-リボ酸、N-アセチルシステイン、リチウムおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

40

【0081】

本明細書で用いられる用語「抗酸化剤」は、例えば、活性酸素種の形成を阻止するか、または活性酸素種がいずれかの損傷をもたらす前にそれらを除去する、活性酸素種のレベルを減少させる物質を指す。抗酸化剤の例としては、アルファリポ酸およびN-アセチルシステインが挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

本明細書で用いられる用語「ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤」は、*in vivo*でミトコンドリア内に選択的に濃縮される、これらの抗酸化剤を指す。ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤の例としては、ミトキノン(MitroQ)および[2-(3,4-ジヒドロ-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチル-2H-1-ベンゾピラン

50

- 2 - イル) エチル] トリフェニルホスホニウムブロミド ( M i t o V i t E ) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 3 】

本明細書で用いられる用語「ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤」は、ヒストン脱アセチル化酵素の機能に干渉する物質を指す。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の例としては、ポリノスタット、ロミデプシン、パノビノスタット、バルプロ酸、ベリノスタット、モセチノスタット、P C I - 2 4 7 8 1、エンチノスタット、S B 9 3 9、レスミノスタット、ギビノスタット、C U D C - 1 0 1、A R - 4 2、C H R - 2 8 4 5、C H R - 3 9 9 6、4 S C - 2 0 2、C G 2 0 0 7 4 5、A C Y - 1 2 1 5、スルホラファンおよびケベトリン ( k e v e t r i n ) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 8 4 】

本明細書で用いられる用語「ミトコンドリア転移細孔開口の阻害剤」は、内膜チャネルの開口によって引き起こされる、ミトコンドリア内膜の透過性の非特異的な増大を遮断する物質を指す。ミトコンドリア転移細孔開口の阻害剤の例としては、シクロスポリン A およびその誘導体、N I M 8 1 1、ジフェニルボリン酸 2 - アミノエチルならびにボンクレキン酸が挙げられるが、これらに限定されない

【 0 0 8 5 】

本明細書で用いられる用語「抗炎症剤」は、炎症を減少させる物質を指す。抗炎症剤の例としては、サリチル酸塩、例えばアセチルサリチル酸、ジフルニサルおよびサルサラート；プロピオン酸誘導体、例えばイブプロフェン、ナプロキセン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、デクスケトプロフェン、フルルビプロフェン、オキサプロジン、ロキソプロフェン；酢酸誘導体、例えばインドメタシン、スリンダク、エトドラク、ケトロラク、ジクロフェナク、ナブメトン；エノール酸誘導体、例えばピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、ドロキシカム、ロルノキシカムおよびイソキシカム；フェナム酸誘導体、例えばメフェナム酸、メクロフェナム酸、フルフェナム酸およびトルフェナム酸；選択的 C O X - 2 阻害剤、例えばセレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、バレコキシブ、ルミラコキシブ、エトリコキシブおよびフィロコキシブ；スルホンアニリド類、例えばニメスリド；およびその他の化合物、例えばリコフェロンが挙げられるが、これらに限定されない

20

【 0 0 8 6 】

本明細書で用いられる用語「P P A R アゴニスト」は、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体を刺激する物質を指す。P P A R アゴニストの例としては、G W - 9 6 6 2、チアゾリジンジオン類、例えばロシグリタゾン；フィブラート類、例えばベザフィブラート、シプロフィブラート、クロフィブラート、ジェムフィプロジルおよびフェノフィブラート；ならびにグリタザール類、例えばムラグリタザール、テサグリタザールおよびアレグリタザールが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 8 7 】

本明細書で用いられる用語「R X R アゴニスト」は、レチノイド X 受容体を刺激する物質を指す。R X R アゴニストの例としては、C D 3 2 5 4、ドコサヘキサエン酸、フルオロベキサロテン、ベキサロテン、レチノイン酸および S R 1 1 2 3 7 が挙げられるが、これらに限定されない

40

【 0 0 8 8 】

本明細書で用いられる用語「サーチュイン 1 アゴニスト」は、サーチュイン 1 酵素を刺激する物質を指す。サーチュイン 1 アゴニストの例としては、レスベラトロールおよび S R T - 1 7 2 0 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 9 】

本明細書で用いられる用語「抗高脂血症剤」は、血中の脂質や低密度リポタンパク質 ( L D L ) を低下させ、および / または高密度リポタンパク質 ( H D L ) を増加させる、P P A R アゴニストおよびフィブラート類以外の物質を指す。抗高脂血症剤の例としては、スタチン類、例えばアトルバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン

50

、メバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンおよびシンバスタチン；ナイアシン；胆汁酸捕捉剤、例えばコレステラミン、コレセベラムおよびコレステポール；その他の化合物、例えばフィステロール類、エゼチミブ、オルリスタットおよびナイアシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0090】

別の態様によれば、本発明は、医薬として用いられる本発明の組成物に関する。あるいは本発明は、薬剤の製造のための、本発明の組成物の用途に関する。

【0091】

さらなる態様によれば、本発明は、被験体の X - A L D の予防および / または治療における用途のための本発明の組成物に関する。

【0092】

さらに別の態様によれば、本発明は、被験体の必要に応じた X - A L D の予防および / または治療のための方法に関し、該方法は、治療上有効な量の本発明の組成物を、前記被験体に投与することを含む。

【0093】

「X - A L D」との用語については、これまでに記載されており、その詳細は参考によって本明細書に取り込まれる。特定の実施形態によれば、X - A L D は、成人副腎脊髄ニューロパチー ( A M N )、大脳副腎脊髄ニューロパチー ( c A M N ) および副腎白質ジストロフィーの小児期の変異形 ( c A L D ) からなる群から選択される。さらに特定の実施形態によれば、X - A L D は成人副腎脊髄ニューロパチー ( A M N ) である。

【0094】

医薬組成物

本発明の第 2 の態様で定義された特異的 m T O R 阻害剤を含む組成物の医学的用途のために、それらの組成物は医薬組成物中に見出されてよい。

【0095】

したがって別の態様によれば、本発明は、特異的 m T O R 阻害剤と、m T O R 非依存性のオートファジー誘発剤、抗酸化剤、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、ミトコンドリア転移細孔開口の阻害剤、抗炎症剤、P P A R アゴニスト、R X R アゴニスト、サーチュイン 1 アゴニストおよび抗高脂血症薬からなる群から選択される化合物と、薬剤的に許容される賦形剤または担体とを含んでなる組成物の治療上有効な量を含む医薬組成物に関する。「m T O R 非依存性のオートファジー誘発剤」、「抗酸化剤」、「ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤」、「ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤」、「ミトコンドリア転移細孔開口の阻害剤」、「抗炎症剤」、「P P A R アゴニスト」、「R X R アゴニスト」、「サーチュイン 1 アゴニスト」および「抗高脂血症薬」との用語、およびそれらの詳細についてはこれまでに記載されており、それらはここでも参照される。

【0096】

本明細書で用いられる用語「医薬組成物」は、本発明の特異的 m T O R 阻害剤および少なくとも 1 つの薬剤的に許容される賦形剤または担体を含む組成物の、治療上有効な量を含む組成物を指す。

【0097】

本明細書で用いられる用語「治療上有効な量」は、本発明の薬剤に関連して、または本発明の医薬組成物を構成する薬剤、賦形剤および / または担体に関連して、望ましい効果を提供するため、すなわち疾病に由来する 1 つ以上の症状の明らかな予防、治癒、遅延、重症度の低下または寛解を達成するための、前記薬剤、賦形剤および / または担体の十分な量に関し、これは一般に、特に薬剤自体の特性および達成されるべき治療効果によって決定される。これはまた、治療される被験体、前記被験体の疾病の重症度、選択した剤形などに依存する。この理由から、本発明で言及される用量は、当業者に対する指針としてのみ考慮されるべきであり、当業者はこの用量を、前述の変量に応じて調整しなければならない。一実施形態によれば、有効量は、治療される疾病の 1 つ以上の症状を寛解させる

10

20

30

40

50

。

## 【0098】

本発明の医薬組成物の化合物の組み合わせは、単離剤形の、もしくはさらなる有効薬剤と組み合わせた、プロドラッグ、塩、溶媒和物またはクラスレートとして見出されてよい。

。

## 【0099】

「薬剤的に許容される賦形剤」または「薬剤的に許容される担体」との用語は、無毒の固体、半固体、または液体の注入剤、希釈剤、カプセル用材料、または従来のいずれかの製剤補助剤を指す。薬剤的に許容される担体は、レシipientに対して用いられる投与量および濃度においては本質的に無毒であり、製剤のその他の成分に適合性である。適切な担体としては、水、デキストロース、グリセロール、生理食塩水、エタノール、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。担体には、製剤の有効性を増強する、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、または補助剤のような追加の薬剤を含有させることができる。補助剤は、無菌の液体、例えば水、およびピーナッツ油、大豆油、ミネラルオイル、胡麻油などのような、石油、動物、野菜、または合成に由来するものを含む油からなる群から選択されてよい。水または生理食塩水ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液が、特に注射用溶液のために、ビヒクルとして好ましく用いられる。適切な医薬品用ビヒクルについては、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」22th Edition、2012に記載されている。

10

20

## 【0100】

本発明の好ましい実施形態によれば、本発明の医薬組成物の化合物は、人間およびその他の哺乳類への送達投与に適応させた医薬組成物としての標準的な手順に従って処方される。典型的には、静脈内または脳室内に投与するための医薬組成物は、無菌等張水性緩衝液中の溶液である。

## 【0101】

必要に応じて、本発明の医薬組成物には、可溶化剤、および注射部位のいずれかの疼痛を寛解させるための局所麻酔薬も含まれる。一般に成分は、別々に、または単位剤形中に混合されて、例えば、有効薬剤の量が表示されている、アンプルまたは小袋のような気密密封されたコンテナ内の、凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。医薬組成物が点滴投与される場合には、無菌の、医薬品グレードの水または生理食塩水を含む点滴瓶を用いて投与することができる。医薬組成物が注射投与される場合には、投与前に成分が混合され得るように、注射用の無菌水または生理食塩水のアンプルを提供できる。

30

## 【0102】

静脈内投与以外の場合には、医薬組成物は、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでもよい。医薬組成物は、溶液、懸濁液、エマルション、ゲル、ポリマー、または徐放性製剤であってよい。医薬組成物は、当該技術分野において公知であるように、伝統的な結合剤および担体と共に処方できる。製剤には、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカライド(sodium saccharide)、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような、標準的な担体、医薬品の製造における機能性が十分に確立されている不活性の担体が含まれてよい。リボソーム、微粒子、マイクロカプセル、ナノ粒子、ナノカプセルなどへの被包を含む、様々な送達系が知られており、本発明の治療剤の投与に用いることができる。

40

## 【0103】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明の医薬組成物を含む治療剤は、中性または塩の形態として処方できる。薬剤的に許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来する遊離アミノ基によって形成されたもの、および水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、またはプロ

50

カインなどに由来する遊離カルボキシル基によって形成されたものが含まれる。

【0104】

本発明に用いられる好ましい賦形剤としては、糖類、デンプン、セルロース、ゴムおよびタンパク質が挙げられる。特定の実施形態によれば、本発明の医薬組成物は、固体医薬剤形（例えば錠剤、カプセル、コートされた錠剤、顆粒、坐薬、再構成して液体の形態にできる無菌の結晶性または非晶質の固体など）、液体剤形（例えば溶液、懸濁液、エマルション、エリキシル剤、ローション、軟膏など）または半固体剤形（ゲル、ボマード、クリームなど）として処方される。薬剤的に許容される担体の例は先行技術において知られており、リン酸緩衝食塩水溶液、水、油／水エマルションのようなエマルション、異なるタイプの保湿剤、無菌溶液などが挙げられる。

10

【0105】

本発明の化合物を含有する医薬組成物は、選択された投与経路、例えば全身、経口、非経口または局所に適しているとみなされる投与に対する、いずれかの医薬品の形態であってよく、そのために、所望の投与方法の処方に必要な薬剤的に許容される賦形剤が含まれる。

【0106】

本発明の化合物の有効量は広範囲に変動し得るが、一般には、応用の特定の条件、曝露される時間およびその他の事柄に依存して変動する。

【0107】

経口投与のための固体剤形としては、従来のカプセル、徐放性カプセル、従来の錠剤、徐放性錠剤、咀嚼錠、舌下錠、発泡錠、丸剤、懸濁液、散剤、顆粒およびゲルが挙げられ得る。これらの固体剤形において、有効化合物は、少なくとも1つの不活性な賦形剤、例えばスクロース、ラクトースまたはデンプンと共に混合できる。このような剤形はまた、通常の実行時に、不活性な希釈剤以外のさらなる物質、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤も含んでよい。カプセル、錠剤、発泡錠および丸剤の場合、剤形は緩衝剤もまた含んでよい。錠剤および丸剤は、腸溶コーティングを用いて調製できる。

20

【0108】

経口投与のための液体剤形としては、この技術で通常用いられる、薬剤的に許容される不活性な希釈剤、例えば水を含む、エマルション、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキシル剤が挙げられ得る。これらの組成物はまた、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤のような補助剤、ならびに甘味料、香味料および香料もまた含んでよい。

30

【0109】

注射用の調製品、例えば無菌、注射用の水性または油性の懸濁液が、適切な分散剤、湿潤剤および／または懸濁剤を用いて、公知の技術に従って処方されてよい。許容されるビヒクルおよび溶媒のうち、使用可能なものは、水、リンゲル液および生理食塩水である。無菌油もまた、溶媒または懸濁用液として従来から用いられている。

【0110】

局所投与のために、本発明の医薬組成物は、クリーム、ゲル、ローション、液体、ボマード、スプレー溶液、分散剤、固形バー、エマルション、マイクロエマルションなどとして処方可能であり、これらは、適切な賦形剤、例えば乳化剤、界面活性剤、増粘剤、着色料およびそれらの2つ以上の組み合わせを用いる従来の方法に従って処方されてよい。

40

【0111】

加えて、本発明の医薬組成物は、経皮パッチまたはイオン導入装置の形態において投与されてもよい。一実施形態によれば、本発明の化合物は、経皮パッチ、例えば徐放性経皮パッチの形態において投与される。適切な経皮パッチは、例えば、米国特許第5262165号、米国特許第5948433号、米国特許第6010715号および米国特許第6071531号に、さらに詳細に記載されている。

【0112】

本発明の医薬組成物は、従来の賦形剤、すなわち、有効化合物と反応してダメージを与えることのない、非経口投与に適した、薬剤的に許容される担体をさらに含むことができ

50

る。適切な、薬剂的に許容されるビヒクルとしては、例えば、水、塩溶液、アルコール、植物油、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、界面活性剤、ケイ酸、粘性パラフィン、芳香油、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリド、脂肪酸エステル、石油、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

【0113】

幾つかの薬物送達系が知られており、本発明の化合物または組成物を投与するために用いることができる。これらは例えば、リポソーム、マイクロバブル、エマルション、微粒子、マイクロカプセル、ナノ粒子、ナノカプセルなどへの被包が挙げられる。必要とされる投与量は、単一の単位として、または徐放性の形態によって投与できる。

10

【0114】

持続可能な放出形態およびそれらの調製に適切な材料と方法は、当該技術分野において公知である。本発明の一実施形態によれば、本発明の医薬組成物の経口的に投与可能な形態は、少なくとも1つのコーティングまたはマトリックスをさらに含む、徐放性の形態である。コーティングまたは徐放性マトリックスとしては、天然ポリマー、半合成または合成の非水溶性で改変された、ワックス、脂質、脂肪アルコール、脂肪酸、天然半合成または合成の可塑剤、またはそれらのうち2つ以上の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0115】

腸溶コーティングは、当業者に公知の従来の方法を用いて塗布されてよい。

20

【0116】

本発明によるスクリーニング法

別の態様によれば、本発明は、X - A L Dの治療および/または予防に潜在的に有用な化合物を同定するための方法であって、以下「本発明の方法」と称される方法に関し、該方法は、

a) X - A L D細胞と候補化合物を接触させること、および

b) 前記候補化合物の存在下で

(i) m T O Rの活性レベル、および

(i i) オートファゴソームマーカーの発現レベル

からなる群から選択されるマーカーを分析することを含んでなり、

30

ここで前記候補化合物が、m T O Rの活性を阻害する、および/またはオートファゴソームマーカーの発現を変化させる場合に、前記候補化合物はX - A L Dの治療および/または予防に有用であるものとすることを特徴とする。

【0117】

「m T O R」、「治療」、「予防」および「X - A L D」との用語は、本発明の第1の態様との関連において既に定義されており、これらの定義は、本発明のスクリーニング法との関連においても同様に適用される。

【0118】

本発明の方法によれば、第1工程は、X - A L D細胞と候補化合物を接触させることを含む。

40

【0119】

本明細書で用いられる表現「X - A L D細胞」は、m T O Rが過剰発現して、m T O R経路の活性化が増大している、X - A L D患者に由来する単一の細胞または1個もしくは複数の細胞（培養細胞として）、または器官型培養のような3 D（三次元）構造を形成する一部、のいずれかを指す。

【0120】

本明細書で用いられる用語「m T O R経路の活性化増大」は、m T O Rの活性および/または発現が参照のレベルに比較して増大している細胞を指し、ここで前記参照のレベルとは、m T O R経路の活性化を示さないか、またはm T O R経路を活性化できる薬剤によって刺激されていない細胞における発現および/または活性である。本明細書で用いられ

50

る用語「mTOR経路」は、PI3K/AKT/mTOR経路としても知られ、余分な細胞シグナル伝達分子が、細胞表面または細胞内部に位置する特異的受容体を活性化させる際に起こる、細胞におけるタンパク質（PI3K、AKTおよびmTOR）の連鎖を指す。

#### 【0121】

本発明のスクリーニング法において、X-ALD細胞のmTORの発現レベルまたは活性レベルは、参照の発現レベルまたは参照の活性レベルに対して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%またはそれを超えて増大している。mTORの発現レベルまたはmTOR活性を決定するための方法は、本発明の第1の態様との関連において既に定義されており、これらはここでも参照される。

10

#### 【0122】

特定の実施形態によれば、本発明のスクリーニング法の細胞は、mTORを過剰発現するようにトランスフェクションされたか、または遺伝的に改変されたものである。別の特定の実施形態によれば、本発明のスクリーニング法の細胞は、X-ALD患者から得られる。

#### 【0123】

ポリヌクレオチドが、いずれかの適切な人工的操作によって細胞内に移入されたか、または細胞が、最初に該ポリヌクレオチドを受け継いだ改変細胞の子孫である場合、その細胞は「遺伝的に改変された」、「トランスフェクトされた」、または「遺伝的に形質変換された」と言われる。ポリヌクレオチド、すなわちmTOR配列を含むポリヌクレオチドは、しばしば対象タンパク質（すなわちmTOR）をコードする転写可能な配列を含み、この配列によって、細胞は該タンパク質を高レベルで発現できる。遺伝的变化は、改変細胞の子孫が同じ変化を有する場合、「遺伝可能」とであると言われる。「形質変換された細胞」は、その細胞に（またはその先祖もしくは祖先に）、例えば組換えDNA技術またはウイルスによって、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子が導入された細胞を意味する。「核酸」または「核酸分子」は、一重もしくは二重鎖型のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを指し、他に制限がない限り、これは、天然ヌクレオチドと同様に機能できる、天然ヌクレオチドの公知の類似体を包含できる。本明細書では、「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」の用語は互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工的化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーに適用される。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様の様式で機能する化学化合物を指す。

20

30

#### 【0124】

本発明の方法に用いることのできる細胞の例としては、脳、脊髄、骨髄、皮膚、血液などの多様な組織から得た初代培養；線維芽細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、単球および幹細胞などの初代培養から得た不死化細胞；人工多能性幹細胞などの初代細胞から得た改変細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態によれば、使用される細胞は線維芽細胞、さらに好ましくはヒト線維芽細胞である。さらになお好ましい実施形態によれば、本発明の方法において使用される細胞は、X-ALD患者から得たヒト線維芽細胞である。

40

#### 【0125】

細胞培養は、前記培養における細胞の生存を許容する条件にて維持される。前記条件としては特に、適切な湿度、温度、ガス濃度、栄養素（培地）などが挙げられる。前記条件を達成するために、当業者に公知の特別なインキュベーターを使用できる。培養条件は、特定の培養それぞれに対して定義され得る。

#### 【0126】

具体的には、X-ALD患者から得た初代ヒト線維芽細胞は、10% ウシ胎仔血清、

50

100 U/ml ペニシリンおよび100 μg ストレプトマイシンを加えたダルベッコ変法イーグル培地中で、37℃、5% CO<sub>2</sub>にて培養される。

【0127】

「X-ALD細胞と候補化合物を接触させる」との表現は、単数または複数の細胞を、評価される候補化合物と接触させるいずれかの方法を指し、細胞外で前記化合物と接触させるいずれかの可能な*in vitro*法、または前記化合物を細胞に導入するいずれかの方法が含まれる。したがって、候補化合物が低分子量の分子である場合には、前記分子を培地に添加することで十分である。候補化合物が高分子量の分子（例えば、核酸またはタンパク質のような生体高分子）である場合には、この分子が細胞内部にアクセスできるような手段の提供が必要となる。候補分子が核酸である場合には、DNAコンストラクトの導入について既に記載されたように、従来のトランスフェクション手段が使用できる。候補化合物がタンパク質である場合には、細胞はタンパク質と直接接触させられるか、またはタンパク質をコードする核酸と、その転写/翻訳を可能にするエレメントとの組み合わせを細胞内へいったん入れることで接触させられる。この目的のため、組み合わせを細胞内へ入れることが可能な、前述のいずれかの方法を用いることができる。あるいは、HIV-1 TATタンパク質由来のTatペプチド、キロショウジョウバエ由来のアンテナペディアホメオドメインタンパク質の第3ヘリックス、または単純ヘルペスウイルスのVP22タンパク質、およびアルギニンオリゴマーのような、細胞内部へのタンパク質の移行を促進できるペプチドによって修飾された、対象タンパク質の変異形と、細胞とを接触させることが可能である。

10

20

【0128】

分析される化合物は、好ましくは単離されておらず、天然源由来の複合混合物の一部を形成するか、または化合物ライブラリーの一部を形成する。本発明の方法に従って分析できる化合物ライブラリーの例としては、ペプチド、および、D-アミノ酸または非ペプチド結合を含むペプチドを含む、ペプチド類似体の両方を含むペプチドライブラリー、ホスホロチオエート型非リン酸ジエステル結合を有する核酸またはペプチド核酸を含む核酸ライブラリー、抗体、炭水化物、低分子量化合物、好ましくは有機分子、ペプチド模倣物のライブラリーなどが挙げられるが、これらに限定されない。低分子量化合物のライブラリーを用いる場合、該ライブラリーは、細胞内部へさらに容易にアクセス可能な化合物を含むように、予め選択可能である。このように、化合物は、大きさ、親油性、親水性、水素結合の形成能のような特定のパラメータに基づいて選択できる。

30

【0129】

分析される化合物は、代わりに、天然源から得た抽出物の一部を形成できる。天然源は、土壌、空気中、海洋生物などからの抽出物を含むが、これらに限定されない、いずれかの環境から得られる動物、植物源であってよい。

【0130】

試験化合物のインキュベーションは、異なる濃度およびインキュベーション時間によって行われる。陰性および陽性対照の使用が、強く推奨される。

【0131】

本発明のスクリーニング法の第2工程は、前記候補化合物の存在下でmTORの活性を分析することを含んでなり、ここでマーカーは、

40

(i) mTORの活性レベル、および

(ii) オートファゴソームマーカーの発現レベル

からなる群から選択される。

【0132】

したがって特定の実施形態によれば、本発明の方法の第2工程は、mTORの活性レベルを決定することによって、前記候補化合物の存在下でmTORの活性を分析することを含んでなる。したがって本発明の方法のこの実施形態によれば、X-ALDの治療および/または予防に潜在的に有用な化合物を同定するための方法の第2工程は、mTORによってリン酸化されるいずれかの基質、例えばEIF4EBP1、ULK1またはリン酸化

50



p 7 0 S 6 K タンパク質の発現レベルを決定することを含む。「E I F 4 E B P 1」、「U L K 1」および「リン酸化 p 7 0 S 6 K」との用語、ならびに前記マーカーを決定するために適切な方法については、最初に本発明との関連において定義されており、これらの定義は、本発明のこの態様にも同等に適用される。

【 0 1 3 3 】

本発明の方法によれば、前記候補化合物が m T O R の活性を阻害する場合、その候補化合物は、X - A L D の治療および / または予防に有用である。

【 0 1 3 4 】

本発明の特定かつ好ましい実施形態によれば、m T O R の活性は、P - p 7 0 S 6 K のレベルを決定することによって決定される。好ましい実施形態によれば、リン酸化 p 7 0 S 6 K のレベルは、ウェスタンブロットによって決定される。

10

【 0 1 3 5 】

一般に、細胞を候補化合物によって処理した後、分析された前記細胞における P - p 7 0 S 6 K のレベルが処置前よりも低い場合に、該化合物は X - A L D の治療に有用な可能性があるとみなされる。

【 0 1 3 6 】

別の特定の実施形態によれば、本発明の方法の第 2 工程は、細胞が線維芽細胞の場合には、少なくとも 1 つのオートファゴソームマーカーの発現レベルを決定することを含む。「オートファゴソームマーカー」または「オートファジックマーカー」との用語は、本発明の第 1 の実施形態との関連において既に説明されている。

20

【 0 1 3 7 】

本明細書で用いられる用語「発現を変化させる」は、化合物が、オートファゴソームマーカーの発現を、陰性対照、例えば前記化合物によって処理されていない細胞に対し、1 倍を超えて、1 . 5 倍を超えて、2 倍を超えて、または 2 . 5 倍を超えて誘導することを意味する。前記の用語はまた、前記化合物が、オートファゴソームマーカーの発現を、陰性対照、例えば前記化合物によって処理されていない細胞に対し、1 倍を超えて、1 . 5 倍を超えて、2 倍を超えて、または 2 . 5 倍を超えて減少させることも意味する。

【 0 1 3 8 】

上で説明したように、本発明の特異的 m T O R 阻害剤はオートファジーを誘導する。特定の実施形態によれば、本発明の方法は、L C 3 - I I、p 6 2 またはそれらの組み合わせから選択されたオートファゴソームマーカーの発現レベルを決定することによって、m T O R の活性を決定することを含む。「L C 3 - I I」および「p 6 2」との用語、ならびに前記マーカーを決定するために適した方法については、最初に本発明との関連において定義されており、これらの定義は、本発明のこの態様にも同等に適用される。

30

【 0 1 3 9 】

一般に、化合物が、L C 3 - I I および p 6 2 のレベルを、前記化合物によって処理されていない細胞において測定された前記レベルに対して変化させる場合に、該化合物は X - A L D の治療に有用な可能性があるとみなされる。したがって、細胞を候補化合物によって処理した後、分析された前記細胞における p 6 2 のレベルが処置前よりも低い場合、および / または、細胞を候補化合物によって処理した後、分析された前記細胞における L C 3 - I I のレベルが処置前よりも高い場合に、該化合物は X - A L D の治療に有用な可能性があるとみなすことができる。

40

【 0 1 4 0 】

必要に応じて、本発明のスクリーニング法は、酸化マーカー、例えば酸化型タンパク質、プロテアソームのキモトリプシン様活性、免疫プロテアソームサブユニット 1 i / L M P 2 および 5 i / L M P 7 の発現レベルならびに A T P のレベルを決定することを、さらに含む。上で説明したように、特異的 m T O R 阻害剤は、酸化型タンパク質の蓄積を阻止して細胞のエネルギーレベルを回復させる。したがって本発明の方法によれば、化合物が、m T O R の活性を阻害することおよび / またはオートファゴソームマーカーの発現を変化させることに加え、細胞を候補化合物によって処理した後、分析された前記細胞に

50

おける酸化型タンパク質のレベル、プロテアソームのキモトリプシン様活性ならびに／または免疫プロテアソームサブユニット 1 i / L M P 2 および 5 i / L M P 7 の発現レベルが処置前よりも低い場合、および／または、細胞を候補化合物によって処理した後、分析された前記細胞における A T P のレベルが処置前よりも高い場合に、該化合物は X - A L D の治療に有用な可能性があると考えられる。「酸化マーカー」、「酸化型タンパク」、「プロテアソームのキモトリプシン様活性」、「免疫プロテアソームサブユニット 1 i / L M P 2」、「免疫プロテアソームサブユニット 5 i / L M P 7」、「A T P」との用語、およびそれらを決定するための方法については、本発明の第 1 の方法との関連において既に詳述した。

#### 【0141】

特異的 m T O R 阻害剤を用いた m T O R 活性の阻害によって、軸索変性が阻止される。したがって必要に応じ、本発明のスクリーニング法によって脳に由来する細胞のタイプを分析する場合には、前記方法の第 2 工程は、I b a - 1、G F A P、シナプトフィジン、A P P、8 - o x o d G またはそれらの組み合わせから選択される少なくとも 1 つの軸索損傷マーカーの発現レベルを決定することをさらに含む。本方法によれば、候補化合物が m T O R の活性を阻害し、かつ細胞を候補化合物によって処理した後、分析された前記細胞における I b a - 1、G F A P、シナプトフィジン、および／または A P P のレベルが処置前よりも低い場合に、該化合物は X - A L D の治療に有用な可能性があると考えられる。8 - o x o d G のレベル決定については、候補化合物が m T O R の活性を阻害し、かつ細胞を候補化合物によって処理した後、分析された前記細胞における 8 - o x o d G のレベルが処置前よりも低い場合に、該化合物は X - A L D の治療に有用な可能性があると考えられる。

#### 【0142】

本発明の特定の実施形態によれば、X - A L D は、成人副腎脊髄ニューロパチー ( A M N )、大脳副腎脊髄ニューロパチー ( c A M N ) および副腎白質ジストロフィーの小児期の変異形 ( c A L D ) からなる群から選択される。さらに特定の実施形態によれば、X - A L D は成人副腎脊髄ニューロパチー ( A M N ) である。

#### 【0143】

以下の実施例によって本発明を詳述するが、これらの実施例は単に例示であり、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0144】

##### 材料および方法

##### 抗体および試薬

以下の抗体をウェスタンブロットに使用した：ガンマチューブリンおよび D N P ( 2 , 4 - ジニトロフェニルヒドラゾン ) ( S i g m a ) ; L C 3 ( N a n o t o o l s )、抗リン p 7 0 S 6 キナーゼ ( T h r 3 8 9 )、p 7 0 S 6 キナーゼ ( C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y ) ; アミロイド前駆体タンパク質 ( B o e h r i n g e r ) ; p 6 2 および 8 - o x o d G ( A b c a m )、G F A P、シナプトフィジン、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗ウサギおよび抗マウス I g G ( D a k o C y t o m a t i o n )。蛍光ペプチド：S u c - L e u - L e u - V a l - T y r - 7 - アミド - 4 - メチルクマリン ( S u c - L L V T - A M C ) および 7 - アミノ - 4 - メチルクマリン ( A M C ) は C a l b i o c h e m から入手した。ヘキサコサン酸 ( C 2 6 : 0 ) およびパフィロマイシン A 1 は S i g m a から購入した。

#### 【0145】

##### ヒト脳サンプル

大脳副腎脊髄ニューロパチーの患者および同年齢の健常男性対照被験体に由来する脳組織は、ボルチモアにあるメリーランド大学の、発達障害に対する脳および組織バンク ( B r a i n a n d T i s s u e B a n k f o r D e v e l o p m e n t a l D i s o r d e r s ) から得た。すべての患者または患者の法定代理人から書面でのインフ

フォームドコンセントを取得し、現地の倫理委員会はすべての試験を承認した。

#### 【0146】

##### マウスおよび行動試験

本試験に用いたすべての方法は、米国国立衛生研究所から出版された、実験動物の管理と使用に関する指針 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (NIH刊行物 No. 85-23、1996年改訂) ならびに I D I B E L L および カタルーニャ自治政府の倫理委員会に従った。A b c d 1 欠損マウスの作出と遺伝子型同定については、既に記載した。実験に用いたマウスは、純系の C 5 7 B L / 6 J バックグラウンドであった。A b c d 1 欠損マウスおよび野生型マウスを、対照群と処置群に分けた。テムシロリムス (L C l a b o r a t o r i e s) を、腹腔内注射によって、1週間に3回、20mg/kgの用量にて3か月間投与し、各月の処置の間には、3週間の休止期間を交互に設定した。対照マウスには、緩衝液のみを含むプラセボを同頻度で注射した。トレッドミル試験を、既述に正確に従って行った (L o p e z - E r a u s k i n J , e t a l , 2011, Ann Neurol 70, 84-92)。ベルトから落ちる潜在時間 (秒単位でのショック時間) および受けたショックの回数を記録した。パークロス試験を、既に記載されたように行った (L o p e z - E r a u s k i n J , e t a l , 2011, Ann Neurol 70, 84-92)。プラセボおよび薬物によって処置されたそれぞれの同腹マウスについて、トレッドミルにおける試験を同時に行い、試験時は、処置の状態に関連した同定を行わなかった。

10

20

#### 【0147】

##### 細胞の培養および処理

皮膚生検により調製された線維芽細胞を、関連する人物または彼らの代理人からのインフォームドコンセントを含む、サンプリングのための施設の指針に従って集めた。初代ヒト線維芽細胞を、D M E M (10% ウシ胎仔血清、100 U/ml ペニシリンおよび100 μg ストレプトマイシンを含む) 中で、37℃の加湿された5% CO<sub>2</sub>/95% 空気中で培養した。他に記載のない限り、実験は80% コンフルエントの細胞を用いて行った。欠乏条件 (高タンパク質分解培地、H) のため、細胞を洗浄後に完全増殖培地 (上記参照、低タンパク質分解培地、L) から、10 mM H e p e s を含むクレブス - ヘンゼライト培地 (118.4 mM NaCl、4.75 mM KCl、1.19 mM K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、2.54 mM M g S O<sub>4</sub>、2.44 mM C a C l<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub> O、28.6 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM グルコース)、pH 7.4 (高タンパク質分解培地、H) へ移し、37℃にて4時間以下インキュベートした。

30

40

#### 【0148】

##### 培養細胞におけるオートファジーの分析

パルスチェイス実験のため、ヒト対照および X - A L D 患者の線維芽細胞を、1 μCi/ml [<sup>3</sup>H] バリン (H a r t m a n n A n a l y t i c G m b h) を添加した新鮮な完全培地中で48時間インキュベートした後、10 mM L - バリンを含む新鮮な完全培地中で24時間追跡を行い、短命なタンパク質を分解させた。次に、すべての培養を、10 mM バリンおよび表示する添加物を含む、クレブス - ヘンゼライト培地、10 mM H e p e s、pH 7.4 中で、表示する時間インキュベートした。タンパク質分解の分析は、様々な添加物の効果が最大であることを確実にするため1時間後に行い、二次的効果の可能性を避けるため3時間のみ行った。タンパク質分解は、1.5時間の2回の間隔において、標識細胞から培地中に放出されたトリクロロ酢酸可溶性の放射活性の正味放出量を測定することによって算出し、タンパク質分解のパーセンテージとして表した。総タンパク質分解に対するリソソームによる分解の寄与を、20 mM N H<sub>4</sub> C l (S i g m a - A l d r i c h) と100 μM ロイペプチン (P e p t i d e I n s t i t u t e) とを用いて、既に記載されたように算出した (F u e r t e s G , e t a l , 2003, Biochem J 375, 75-86)。

50

#### 【0149】

4 時間後に、400 nM パフィロマイシン A 1 の存在下で、 $\alpha$ -チューブリンのレベルに対する内在性 LC3 - I I のレベルを、特異的な抗体を用いて測定することによって、オートファジックな流れを評価した。オートファジーはまた、既に記載されるように、ヒト線維芽細胞に pEGFP - LC3 をトランスフェクトして、48 時間後に、トランスフェクトした細胞あたりの蛍光ドットの数に蛍光顕微鏡を用いて計数することによっても評価した。

#### 【0150】

##### 逆転写 (RT) - PCR 分析

RNeasy ミニキット (Qiagen) を製造者の指示に従って用いて、均質化した脊髄から全 RNA を分離した。実験には、RNA インテグリティナンバー (RIN) が 8 を超え、28S / 18S の比が 1 よりも高い RNA サンプルを用いた。次に、SuperScript II 逆転写酵素 (Invitrogen) およびランダムプライマーを用い、各 RNA サンプルに対してファーストストランド cDNA を合成した。候補プロテアソーム遺伝子の発現を、TaqMan (登録商標) 遺伝子発現アッセイ (Applied Biosystems) を用いた RQ - PCR によって分析した。

10

#### 【0151】

tubb5 RNA を内在性の対照とした「デルタ - デルタ Ct」(  $\Delta\Delta$  Ct ) 法を用いて、相対的な定量を行った。転写物の定量化は、各サンプルに対して二重に行った。

#### 【0152】

##### 免疫組織化学

20 か月齢のマウス (野生型、Abcd1 - / - / Abcd2 - / - およびテムシロリムスによって処置した Abcd1 - / - / Abcd2 - / - ) から脊髄を採取し、4 % パラホルムアルデヒドを用いて灌流した後、記載されるように免疫組織化学のために調製を行い、インキュベートした (Lopez - Erauskin J, et al, 2011 . Ann Neurol 70, 84 - 92) 。

20

#### 【0153】

##### 電子顕微鏡

マウス脊髄の L1 ~ L2 部分を、リン酸緩衝液 (100 mM リン酸緩衝液、pH 7.4) 中の 3 % グルタルアルデヒド / 4 % PFA 中で、4 にて 24 時間固定した。ピラトーム切片 (厚さ 50 ~ 100  $\mu$ m) を 1 % 四酸化オスミウム中で後固定した後、2 % (w / v) 酢酸ウラニル水溶液中に 1 時間浮遊させた。蒸留水を用いて洗浄を 3 回行い、30、50、70、90 および 100 % の段階的なアセトン系列を通して脱水した後、標準的な手順によって Durcupan ACM (Electron Microscopy Sciences) 中に包埋した。対象領域を選択するため、最初にダイヤモンドナイフを用いて半薄切片 (1.5  $\mu$ m) を作製し、1 % トルイジンブルーによって染色した。次に超薄切片を切り出し、クエン酸鉛によって染色した後、Philips CM - 10 電子顕微鏡を用いて 60 kV にて観察した。4 匹の異なるマウスから無作為に撮影した 30 を超える電子顕微鏡写真 (最終倍率は  $\times 7,000$ ) を用いて、1 遺伝子型あたりのリソソームを計数した。

30

#### 【0154】

##### 電気泳動およびウェスタンブロット

安楽死させたマウスから組織を取り出し、液体窒素を用いて急速冷凍した。凍結組織およびヒト線維芽細胞サンプルを RIPA 緩衝液 (Cell Signaling Technology) 中で、モーター駆動性のグライNDER (Sigma - Aldrich) を用いて均質化した後、超音波処理装置 UP50H (Hielscher - Ultrason Technology) を用いて、2 分間 4 にて超音波処理を行った。サンプルを、ポリアクリルアミド (10 % アクリルアミド) ゲル電気泳動に、60 分間 120 mV にて供した。分離されたタンパク質をニトロセルロース膜上に転写して、タンパク質を ECL ウェスタンブロット分析システムによって検出した後、CL - XPosure フィルム (Thermo Scientific) に曝露した。GS800 デンシトメーター

40

50

(Bio-Rad)を用いて、オートグラフを走査し、定量した。

#### 【0155】

##### その他の手順

ATPのレベルは、既に記載されたように測定した(Galino J, et al 2011, Antioxid Redox Signal 15, 2095-2107)。プロテアソーム活性アッセイのため、組織を、氷冷した緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM ジチオスレイトール、0.25 M スクロース、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM EDTAおよび2 mM ATP)中でテフロン(登録商標)-ガラスホモジナイザーを用いて均質化した後、12,000×gにて10分間遠心分離した。Suc-LLVY-AMCを基質として用い、プロテアソームのキモトリプシン様活性を、記載されたように行った(Launay N, et al, 2013 Brain 136, 891-904)。同量の抽出物を、基質(100 μM)と共に100 μlのプロテアソーム活性アッセイ緩衝液(0.5 mM Tris-HCl、pH 7.8、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ジチオスレイトール、および5 mM ATPを含むかまたは含まない)中で、30分間37℃にてインキュベートした。0.9 mlの冷エタノールを加えて、反応を停止させた。蛍光マルチプレートFLUOstar OPTIMA FLリーダー(BMG)を、励起および発光波長それぞれ380および460 nmにて用いて、遊離のAMC蛍光を定量した。アッセイの特異性を確実にするため、ラクタシスチン(5 μM、2時間)を用いた。すべての反応は二重に行い、読み取りはフルオロフォアの標準溶液を用いて校正した。

#### 【0156】

##### 統計解析

2つの群を比較する際には、常にスチューデントt検定を用いて統計的有意性を評価した。複数の群を解析する際には、ANOVAおよびチューキーの事後検定を用いて統計的有意性を決定した。データは平均±SDとして表した。p<0.05を有意であるとみなした(\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001)。

#### 【0157】

実施例1：X-ALD患者およびX-ALDマウスモデルでは、オートファジーが損なわれている

大脳型のX-ALD、cCALDおよびAMNの患者における、オートファジーの2つの分子指標の発現について調べた。マクロオートファジーが活性化される間、サイトゾルのタンパク質であるLC3-Iは脂質化によってLC3-IIに変換され、オートファゴソームを形成する限界膜の両側へ特異的に結合する。LC3-IIは他の細胞小器官には結合せず、リソソーム内でオートファジー依存的に分解される。cCALDならびにcAMN患者のサンプル由来の脳の非発症領域および発症領域、および対照サンプルにおけるLC3-IIのレベルを評価すると(図1AおよびB)、患者の脳の非発症領域および発症領域の両方で、LC3-IIのレベルは一貫して低かった。リソソーム阻害剤の非存在下で、LC3-IIのレベルはオートファゴソームの形成率およびオートリソソームへの変換率の両方に依存することから、この低下は、オートファジーの機能障害またはオートファゴソーム-エンドソーム/リソソーム融合の増大のいずれかを示している可能性がある。したがって、オートファジーによって分解され得るアグリソーム形成に関わるタンパク質である、多機能タンパク質p62(SQSTM1とも呼ばれる)のレベルもまた測定した。p62の発現レベルはcCALDおよびcAMN患者両方の非患部で上昇しており、発症部位ではさらに顕著であった(図1AおよびB)。これらの結果はすべて、X-ALD患者ではオートファジーが損なわれていることを支持するものである。

#### 【0158】

X-ALDマウスモデルの、疾病の異なる段階において、両方のオートファジーマーカーを分析した。X-ALDのマウスモデルは、ABCD1遺伝子(Abcd1欠損)の古典的ノックアウトであり、脊髄における遅発性の軸索障害を示すが、明らかな炎症性の特色または脱髄を示さないことから、ヒトの成人が発症する副腎脊髄ニューロパチーに類似

している。A b c d 1 欠損マウスは、20 ~ 22 か月齢で明らかな運動障害および神経病理的表現型を示すが、酸化損傷が現れるのは非常に早く、3 か月齢あたりである。12 か月齢の A b c d 1 欠損マウスの脊髄ではオートファジーの障害が見出され、このことは野生型マウスと比較した LC3 - II のレベルの低下と p 62 のレベルの上昇によって証明された (図 1 C)。これらの違いは、3 か月齢の A b c d 1 欠損マウスでは、野生型と比較して有意ではなかった (図 1 C)。

#### 【0159】

ダブルノックアウト (A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / -) マウスは、16 か月齢で明らかな神経病理的表現型を示し、A b c d 1 欠損マウスの真の代用として用いられる (L o p e z - E r a u s k i n J , e t a l . , 2011, Ann Neurol 70, 84 - 92)。A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - マウスの脊髄では、はっきりとしたリソソームの減少 (約 50%) がみられ (図 2)、この結果は、オートファジーの低下が観察されたことと一致している。

#### 【0160】

実施例 2 : X - A L D 患者の線維芽細胞では、オートファジーが損なわれている

X - A L D 線維芽細胞におけるオートファジーを評価するため、既に記載されたように、細胞を培養した (F u e r t e s G , e t a l , 2003, Biochem J 375, 75 - 86)。培養は、十分な記載が為されている欠乏応答を介してオートファジーを刺激するための、血清およびアミノ酸を含まない培地 (クレブス - ヘンゼライト培地) (H : 高タンパク質分解)、または基本的なオートファジーを評価するための完全培地 (L : 低タンパク質分解) 中で行った。結果は、X - A L D 患者由来の線維芽細胞では、対照と比較して p 62 のレベルが上昇し、LC3 - II のレベルは低下していることを示しており、特に後者は高タンパク質分解 (H) 培地において観察される (図 3 A)。図 3 A および図 1 でも観察された LC3 - II のレベルの変動は、タンパク質の合成または分解による可能性があり、LC3 - II の分解を遮断するためにヒト線維芽細胞をリソソーム阻害剤のパフィロマイシン A 1 によって処理した。これらの条件下で、LC3 - II のレベルは、細胞内のオートファゴソームの数と相関した。パフィロマイシン A 1 の存在下で、X - A L D 患者由来の線維芽細胞の LC3 - II のレベルは、完全 (L) および欠乏 (H) 培地の両方で、対照線維芽細胞と比較して、再び低かった (図 3 B)。オートファゴソームの低下は、EGFP - LC3 を一過性に発現させた X - A L D 線維芽細胞における蛍光点の数が減少していることによって (対照線維芽細胞と比較して約 50%) 確認された (図 3 C)。

#### 【0161】

したがって、全体的にこれらの結果は、X - A L D 患者由来の線維芽細胞のオートファジックな流れに機能障害があることを支持している。

#### 【0162】

実施例 3 : A b c d 1 - / - マウスでは m T O R 活性が増大している

X - A L D が進行する間の、オートファジー機能障害の機構について調べた。クラス I I I P I 3 キナーゼ複合体には B E C L I N - 1 が含まれ、プレオートファゴソーム構造の生成を制御している。B E C L I N - 1 の発現低下は、オートファジック液胞形成の減少に付随することが示されてきたことから、X - A L D マウスモデルにおける B E C L I N - 1 のレベルを最初に分析した。3 または 12 か月齢の A b c d 1 - / - マウスの脊髄と野生型マウスとの比較に有意差はみられなかった (図 4 A)。m T O R の活性化状態、マクロオートファジーの主要な負の制御因子についても調べた。このキナーゼは、栄養素が豊富な条件下でオートファジーを阻害する。十分に確立された m T O R 基質である p 70 S 6 K の分析により、12 か月齢の A b c d 1 - / - マウスの脊髄における該タンパク質のリン酸化は、対照マウスと比較して増大していたが、3 か月齢ではそうではなかったことが示されたことは (図 4 A)、図 1 C に示した結果とよく一致している。同様に、X - A L D 線維芽細胞における p 70 S 6 K リン酸化の分析では、基本条件下 (低タンパク質分解培地、L) で、対照線維芽細胞と比較した有意な増大が示された (図 4 B)。予

想したように、欠乏条件下（高タンパク質分解培地、H）で、線維芽細胞にmTORの活性は検出されなかった。

【0163】

したがって、mTORはオートファジーを阻害することから、これらの結果はX-ALDにおいて観察されるオートファジーの欠陥がmTOR依存性であることを強く示唆している。

【0164】

実施例4：VLCFAは、ヒト線維芽細胞におけるオートファジーを損なう

X-ALDでは、VLCFAが蓄積される。対照およびX-ALD患者から分離した線維芽細胞への、過剰なヘキサコサン酸添加の効果について調べた。

10

【0165】

最初に、パルスチェイス実験において、欠乏条件下での長寿命タンパク質の分解を分析することにより、細胞内タンパク質の分解を分析して、過剰なVLCFAの添加によって対照およびX-ALD線維芽細胞に変化が見られたか否かを決定した。既に記載された手順により（Fuertes G, et al, 2003, Biochem J 375, 75-86）、総タンパク質分解と、それとは別にリソソームのタンパク質分解も推定した。図5Aに示すように、X-ALD線維芽細胞では、対照線維芽細胞に比較して、長寿命タンパク質の総分解が減少した（約35%）。

【0166】

同様に、このような高タンパク質分解条件下では主にマクロオートファジーに相当する（Fuertes G, et al, 2003 Biochem J 375, 75-86）リソソームの分解は、X-ALD線維芽細胞の基本レベルに対して顕著に低下した（約50%）。これらの結果により、上でその他の手順を用いて検出された、X-ALDにおけるオートファジーの機能障害が確認された。過剰なVLCFAの添加により、対照線維芽細胞における総分解およびリソソームでの分解は、それぞれ約15%および40%阻害されたが、X-ALD線維芽細胞において有意な阻害は観察されなかった（図5A）。

20

【0167】

次に、VLCFAによって処置したかまたはしていない、対照およびX-ALD線維芽細胞から得た細胞抽出物におけるLC3-I Iおよびp62のレベルを、免疫ブロット分析によって決定した。対照線維芽細胞において、過剰なVLCFAは明らかにLC3-I Iのレベルを低下させ、かつp62のレベルを上昇させたが、既にLC3-I Iとp62のレベルが変化したX-ALD線維芽細胞にVLCFAを過剰に添加しても、有意差は観察されなかった（図5B）。

30

【0168】

これらの結果はパルスチェイス実験と一致していることから、X-ALDにみられるVLCFAの増加は、疾病に観察されるオートファジーの機能障害に寄与していることが示唆される。

【0169】

実施例5：抗酸化剤による処置は、Abcd1-/-マウスにおけるオートファジーを部分的に回復させる

40

Abcd1欠損マウスは、約15か月齢から運動障害および神経病理的徴候を呈するが、酸化損傷が現れるのは非常に早く、約3か月齢である（Fourcade S et al, 2008, Hum Mol Genet 17, 1762-1773）。ビタミンE、-リボ酸およびN-アセチルシステイン（NAC）の組み合わせは、in vitroでの活性酸素種（ROS）産生を効率的に減少させ、X-ALDマウスにおける脊髄のタンパク質およびDNAの酸化損傷を逆転させ、軸索変性および運動障害を抑止する（Lopez-Erauskin J, et al, 2011, Ann Neurol 70, 84-92）。

【0170】

50

この抗酸化剤カクテルを用いて、マウスを4か月にわたって処置することにより、A b c d 1 - / - マウスの脊髄におけるL C 3 - I Iおよびp 6 2のレベルは、それぞれ有意に上昇および低下した(図6 A)。これにより、抗酸化剤は、A b c d 1 - / - マウスにおけるオートファジーの低下調節を、少なくとも部分的に阻止することが示される。また、m T O R活性に対する抗酸化剤処置の効果についても調べた。図6 Bに示すように、12か月齢のA b c d 1 - / - マウスに観察されたp 7 0 S 6 Kのリン酸化の増大(図4 Aも参照)は、抗酸化剤処置によってわずかに減少したが、効果は有意ではなかった。このことは、X - A L Dにおいて、オートファジーはm T O R非依存性の機構によって誘導され得ることを強調しており、一般的なオートファジー活性化因子(m T O R阻害剤を含む)は、副腎白質ジストロフィーの治療に有用なツールである可能性を示唆している。

10

#### 【0171】

実施例6：テムシロリムスは、A b c d 1 - / - マウスにおけるオートファジーを促進する

m T O R阻害剤であるラパマイシンは公知のオートファジー誘発剤であることから、本発明者らは、X - A L Dの病因に対するその治療効果の可能性を*in vivo*にて試験した。ラパマイシンは難水溶性で、水溶液中での安定性に乏しいため、ラパマイシンエステルであるテムシロリムスを用いた。

#### 【0172】

10か月齢のA b c d 1 欠損マウスを、既に記載されたような腹腔内注射により、テムシロリムスまたはビヒクル(対照)を投与することによって処置した。マウスの身体応答をチェックするための用量試験を最初に行った。3か月間にわたってテムシロリムスを継続投与することにより、重篤な体重減少が誘導された(データ未提示)。したがって副作用を阻止するために、他の処置条件、すなわち、3か月間のテムシロリムスの腹腔内注射の各月の処置の間に、3週間の休止期間を交互に設定することを試した。このような条件下で、マウスには、有意な体重減少を伴わない、より良い自発運動動作が観察されたことから、この処置がさらに適していることが示される。

20

#### 【0173】

X - A L Dにおけるテムシロリムスの効果を評価するため、最初に、処置マウスの脊髄におけるm T O R経路の阻害を確認した。予想されたように、テムシロリムスによって処置したマウスではp 7 0 S 6 Kのリン酸化が低下していたが、総p 7 0 S 6 Kに対する免疫活性は変化していなかった(図7 A)。

30

#### 【0174】

L C 3 - I Iおよびp 6 2のレベルをウェスタンブロットを用いて測定することによってオートファジーも評価した。m T O Rの阻害から予想されたように、A b c d 1 - / - マウスの脊髄において、テムシロリムスはL C 3 - I Iおよびp 6 2をそれぞれ上昇および低下調節することが示された(図7 B)。

#### 【0175】

実施例7：テムシロリムスは、A b c d 1 - / - マウスにおける酸化型タンパク質の蓄積、エネルギー不全およびプロテアソームの変化を阻止する

酸化ストレスはX - A L Dの進行に寄与する。X - A L Dマウスモデルの脊髄およびX - A L D患者の線維芽細胞には、タンパク質に対する直接の酸化的、糖酸化的および脂質酸化的損傷、ならびに酵素による抗酸化防御の変化による、酸化的損傷の徴候が見られる(Fourcade S, et al, 2008. Hum Mol Genet 17, 1762 - 1773)。

40

#### 【0176】

加えて、酸化的損傷はA T Pレベルに対して特異的に影響を及ぼし、A T PレベルはA b c d 1 欠損マウス、およびX - A L D患者の線維芽細胞において有意に減少していることから、V L C F Aによって引き起こされた酸化ストレスは、エネルギー代謝の機能障害をもたらすことが暗示される(Galino J, et al, 2011, Antioxid Redox Signal 15, 2095 - 2107)。ここで、テムシロリム

50



スによる処置は、A b c d 1 - / - マウスの脊髄における酸化型タンパク質のレベルを大幅に減少させ（図 7 C）、かつ生体エネルギー不全を阻止して A T P のレベルを正常化したことが示される（図 7 D）。

#### 【 0 1 7 7 】

最後に、X - A L D 発病の間には、酸化ストレスに応答して、ユビキチン - プロテアソーム系および免疫プロテアソーム誘導の機能不全が起こる（L a u n a y N e t a l . , 2 0 1 3 , B r a i n 1 3 6 , 8 9 1 - 9 0 4 ）。ここで、テムシロリムスによる処置が、キモトリプシン様プロテアソーム活性を正常化させ（図 7 E）、免疫プロテアソームサブユニット 1 i / L M P 2 および 5 i / L M P 7 の誘導を阻害する（図 7 F）ことが観察された。

10

#### 【 0 1 7 8 】

実施例 8：テムシロリムスは、A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - マウスにおける軸索変性を阻止する

A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - マウスは、( i ) 運動神経細胞における酸化的な D N A 損傷のマーカーである、8 - オキソ - 7 , 8 - ジヒドロ - 2 ' - デオキシグアノシン ( 8 - o x o d G ) による標識化の増大；( i i ) I b a - 1 およびグリア線維性酸性タンパク質 ( G F A P ) 染色それぞれによって明らかになる、小膠細胞症および星状細胞増多症；( i i i ) 軸索腫脹におけるアミロイド前駆体タンパク質 ( A P P ) およびシナプトフィジンの蓄積によって示される軸索損傷；および( i v ) スダンブラック染色によって証明される、散乱したミエリン片によって特徴付けられる、神経病理的表現型を有する { L o p e z - E r a u s k i n J , e t a l . , 2 0 1 1 , A n n N e u r o l 7 0 , 8 4 - 9 2 } 。

20

#### 【 0 1 7 9 】

図 8 に示すように、A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - の処置によって、軸索損傷のマーカー（シナプトフィジンおよび A P P ）の蓄積および D N A の酸化は減少し、反応性の星状膠細胞および反応性の小膠細胞の数は対照のレベルよりも減少した（データ未提示）。同様に、テムシロリムスによって、X A L D マウス由来の脊髄における運動神経細胞の健康が改善された。

#### 【 0 1 8 0 】

実施例 9：テムシロリムスは、A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - マウスにおける自発運動の欠陥の進行を停止させる

30

A b c d 1 - / - / A b c d 2 - / - マウスにおける自発運動の欠陥を、テムシロリムスによる処置後に、トレッドミル試験およびバークロス試験を行って評価した。トレッドミル試験では、ダブルノックアウトマウスが、野生型マウスに比較して、自発運動障害を反映するショック時間の長さとしょく数との間の比の増加を示した。興味深いことに、テムシロリムスによる処置は、この比を正常化した（図 9 A ）。

#### 【 0 1 8 1 】

バークロス実験では、ダブルノックアウト変異体はしばしばバランスを維持できず、またバーから滑り落ちる傾向が非常に強く、バーの反対側の台に達するまでの潜伏時間も長かった（L o p e z - E r a u s k i n J , e t a l . , 2 0 1 1 . A n n N e u r o l 7 0 , 8 4 - 9 2 ）。テムシロリムスによる処置後、滑り落ちの回数と、バーを渡るために必要な時間とは正常化した（図 9 B ）。

40

#### 【 0 1 8 2 】

全体的に、これらのデータは、テムシロリムスによる処置が、X - A L D マウスにおける自発運動の欠陥の進行を停止させることを示している。

【図 1 A】

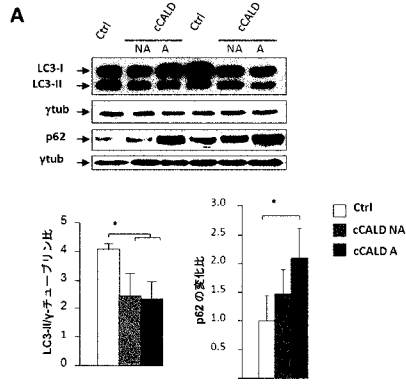


Fig. 1

【図 1 B】

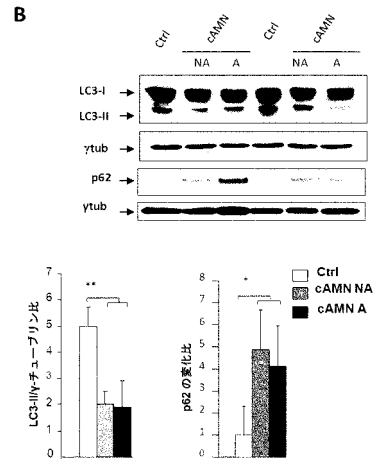


Fig. 1 (cont.)

【図 1 C】

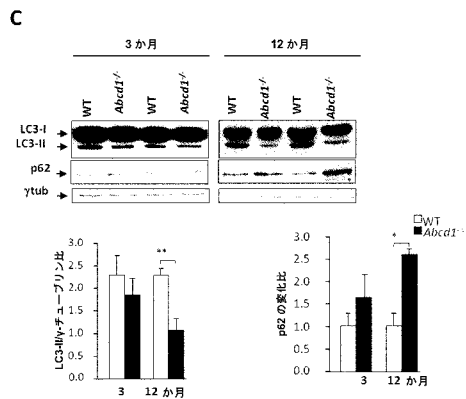


Fig. 1 (cont.)

【図 3 A】

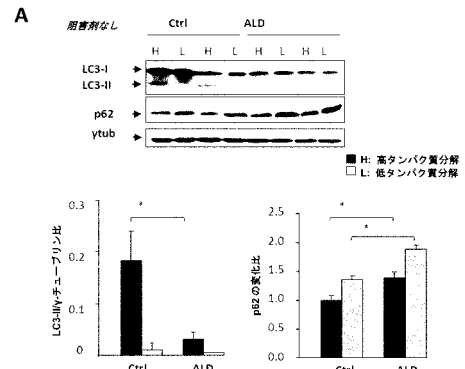


Fig. 3

【図 2】

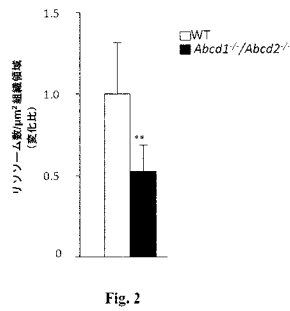


Fig. 2

【図 3 B C】

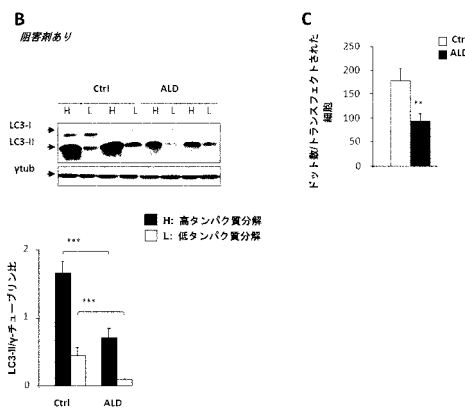


Fig. 3

【 図 4 】

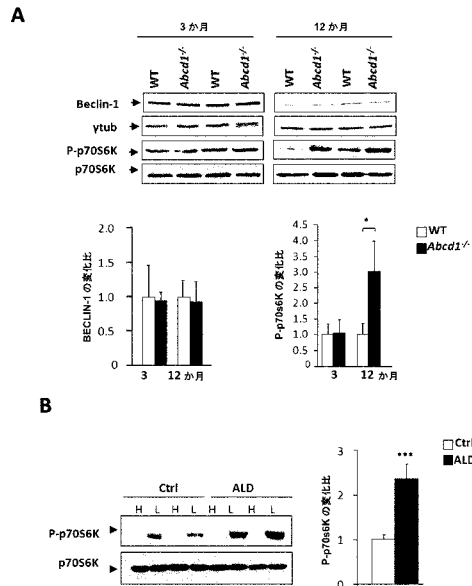


Fig. 4

【 図 5 】

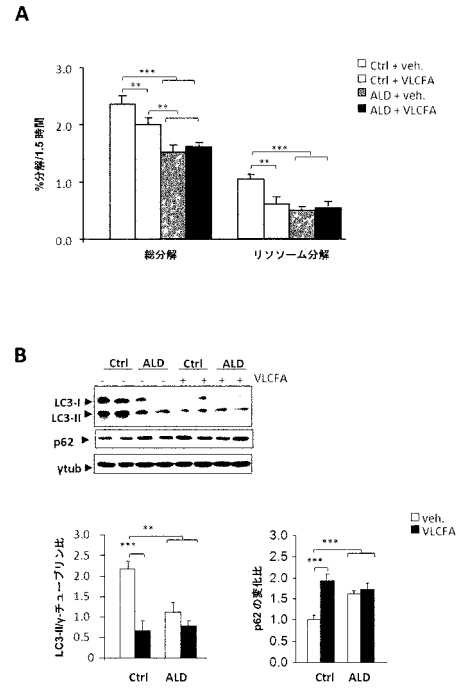


Fig. 5

【 図 6 】

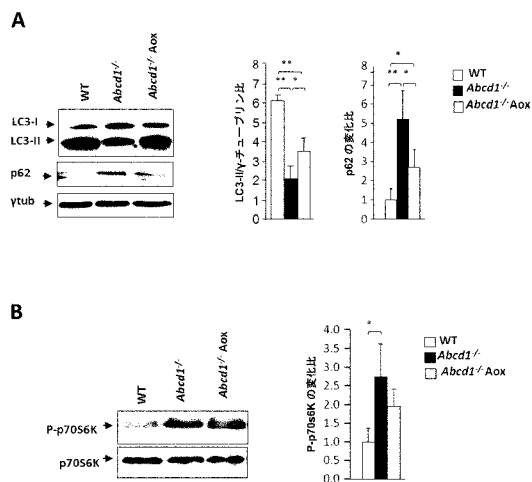


Fig. 6

【 図 7 A B 】

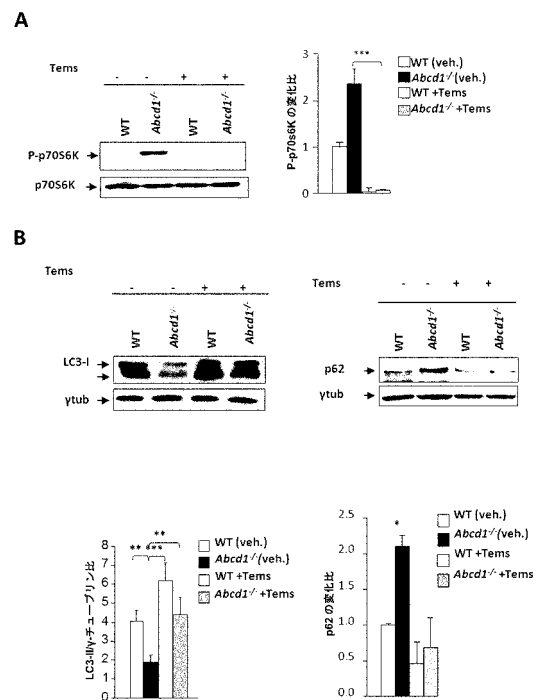


Fig. 7

## 【図 7 C D】

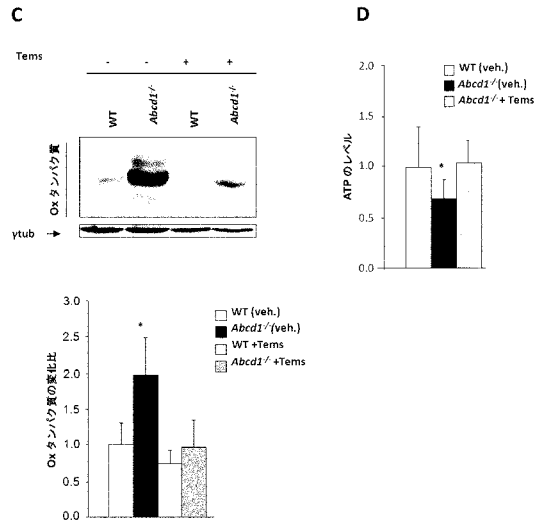


Fig. 7 (cont.)

## 【図 7 E F】

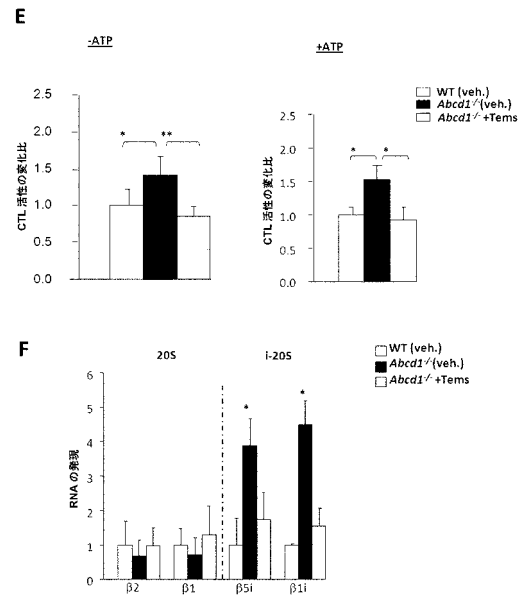


Fig. 7 (cont.)

## 【図 8】

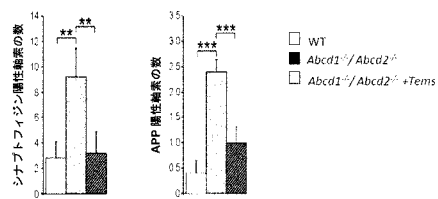


Fig. 8

## 【図 9】

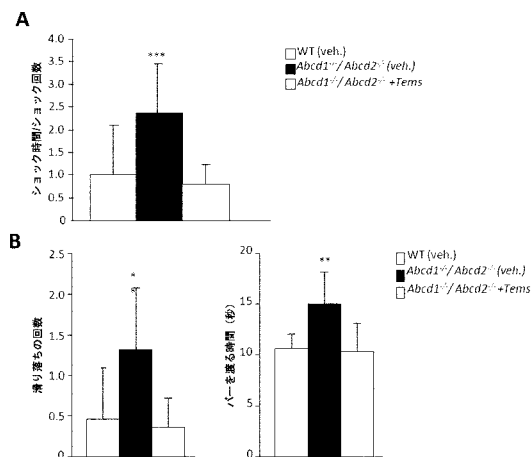


Fig. 9

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2015/071563

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K45/06 A61K31/436 A61K31/05 A61K31/132 A61K31/138  
A61K31/194 A61K31/277 A61K31/341 A61K31/343 A61K31/451  
A61K31/506 A61K31/5415

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)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/066430 A2 (UNIV DUKE [US]; YAO TSO-PANG [US]) 3 June 2011 (2011-06-03) paragraphs [0044], [0047], [0048] -----	5-9, 12
X	WO 2013/071247 A1 (US OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY DEPT OF HEALTH AND HUMAN) 16 May 2013 (2013-05-16) page 60, line 34 - line 37; claim 1 -----	5-7, 9, 12
X	WO 01/87372 A1 (CORDIS CORP [US]) 22 November 2001 (2001-11-22) example 6 -----	5, 6, 9, 12
A	WO 2011/144777 A1 (FUNDACIO INST D INVESTIGACIO BIOMEDICA DE BELLVITGE IDIBELL [ES]; FUND) 24 November 2011 (2011-11-24) the whole document ----- -/-	1-15

☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2015

Date of mailing of the international search report

05/11/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Allnutt, Sarah

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/071563

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SEMLER A ET AL: "Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy", EXPERT REVIEW OF NEUROTHERAPEUTICS, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 8, no. 9, 1 January 2008 (2008-01-01) , pages 1367-1379, XP009150422, ISSN: 1473-7175, DOI: 10.1586/14737175.8.9.1367 the whole document -----</p>	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/071563

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011066430	A2	03-06-2011	NONE
WO 2013071247	A1	16-05-2013	CA 2854665 A1 16-05-2013 US 2014357660 A1 04-12-2014 WO 2013071247 A1 16-05-2013
WO 0187372	A1	22-11-2001	AT 298592 T 15-07-2005 AU 6158101 A 26-11-2001 AU 6295701 A 26-11-2001 AU 2001262957 B2 02-12-2004 BR 0110778 A 08-05-2007 CA 2408606 A1 22-11-2001 DE 60111743 D1 04-08-2005 DE 60111743 T2 15-12-2005 EP 1289576 A1 12-03-2003 ES 2244622 T3 16-12-2005 JP 2003533493 A 11-11-2003 MX PA02011099 A 19-08-2004 MX PA02011186 A 09-09-2004 PT 1289576 E 31-10-2005 US 8029561 B1 04-10-2011 US 2012029475 A1 02-02-2012 WO 0187372 A1 22-11-2001
WO 2011144777	A1	24-11-2011	ES 2377381 A1 27-03-2012 WO 2011144777 A1 24-11-2011

## 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 K 31/7016 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 31/341 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	
A 6 1 K 31/451 (2006.01)	A 6 1 K 31/7016	
A 6 1 K 31/343 (2006.01)	A 6 1 K 31/341	
A 6 1 K 31/5415 (2006.01)	A 6 1 K 31/451	
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/343	
A 6 1 K 31/7076 (2006.01)	A 6 1 K 31/5415	
A 6 1 K 31/426 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/438 (2006.01)	A 6 1 K 31/7076	
A 6 1 K 31/35 (2006.01)	A 6 1 K 31/426	
A 6 1 K 31/454 (2006.01)	A 6 1 K 31/438	
A 6 1 K 31/355 (2006.01)	A 6 1 K 31/35	
A 6 1 K 31/385 (2006.01)	A 6 1 K 31/454	
A 6 1 K 31/132 (2006.01)	A 6 1 K 31/355	
A 6 1 K 31/05 (2006.01)	A 6 1 K 31/385	
A 6 1 K 31/277 (2006.01)	A 6 1 K 31/132	
A 6 1 K 31/138 (2006.01)	A 6 1 K 31/05	
A 6 1 K 31/203 (2006.01)	A 6 1 K 31/277	
A 6 1 K 31/192 (2006.01)	A 6 1 K 31/138	
A 6 1 K 31/225 (2006.01)	A 6 1 K 31/203	
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/192	
A 6 1 K 33/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/225	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	A 6 1 K 33/00	
	A 6 1 P 25/00	
	C 1 2 N 5/071	

(81)指定国 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 514012753

インスティトゥト、ディンベスティガシオ、ピオメディカ、デ、ベイビッジエ(イディベル)  
 INSTITUT D' INVESTIGACIO BIOMEDICA DE BELLVITGE (IDIBELL)  
 スペイン国オスピタレト、デ、リョブレガット、199、グラン、ピア、デ、ルオスピタレト、オスピタル、デュラン、イ、レイナルス、テルセラ、プランタ

(71)出願人 515202852

セントロ、デ、インベスティガシオン、バイオメディカ、エン、レッド (セイベエエレ)  
 CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA EN RED (CIBER)  
 スペイン国マドリード、カリエ、モンフォルテ、デ、レモス、3 - 5、パベリオン、11、インスティチュート、デ、サルド、カルロス、テルセロ



(74)代理人 100094640  
弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100103447  
弁理士 井波 実

(74)代理人 100111730  
弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100180873  
弁理士 田村 慶政

(72)発明者 プホル オノフレ、アウロラ  
スペイン国 エ - 0 8 0 1 5 バルセロナ、マルケス デ カンポ サグラド、3、2、2ア

(72)発明者 クネヒト ロベルト、エルウィン  
スペイン国 エ - 4 6 0 1 2 バレンシア、マエストロ エステバン カタラ 2 - 2 9

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC20 CA44 CA46  
4C084 AA17 AA19 AA20 NA05 NA06 NA14 ZA021 ZA022 ZB112 ZB211  
ZB212 ZC202 ZC212 ZC332 ZC412 ZC422 ZC751  
4C086 AA01 AA02 BA03 BA06 BA09 BB04 BC21 BC39 BC42 BC82  
BC88 CA02 CB05 CB22 EA01 EA18 GA07 GA10 GA12 GA16  
HA02 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 NA05 NA06 NA14 ZA02  
ZB21 ZC42 ZC75  
4C206 AA01 AA02 CA20 DA12 DA17 DB29 DB43 FA01 FA19 FA23  
GA02 GA37 HA13 KA01 KA04 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05  
NA05 NA06 NA14 ZA02 ZB21 ZC42 ZC75