

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7355335号

(P7355335)

(45)発行日 令和5年10月3日(2023.10.3)

(24)登録日 令和5年9月25日(2023.9.25)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/7048(2006.01)	A 6 1 K	31/7048
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	9/72 (2006.01)	A 6 1 K	9/72
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28

請求項の数 18 (全61頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-517886(P2020-517886)

(86)(22)出願日 平成30年10月11日(2018.10.11)

(65)公表番号 特表2020-536859(P2020-536859 A)

(43)公表日 令和2年12月17日(2020.12.17)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/055435

(87)国際公開番号 WO2019/075214

(87)国際公開日 平成31年4月18日(2019.4.18)

審査請求日 令和3年10月4日(2021.10.4)

(31)優先権主張番号 62/570,795

(32)優先日 平成29年10月11日(2017.10.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 513016884

ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
ザ ユニヴァーシティ オブ イリノイ
THE BOARD OF TRUSTE
ES OF THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 0 1
アーバナ エス ライト ストリート 5 0
6 ヘンリー アドミニストレーション
ビルディング 3 5 2

(73)特許権者 515346639

ユニヴァーシティ オブ アイオワ リサ
ーチ ファウンデーション
University of Iowa
Research Foundation
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 小分子重炭酸イオンチャネルを用いた嚢胞性線維症の遺伝子型非依存性救済

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

必要とする患者における嚢胞性線維症を治療するための組み合わせ医薬であって、治療的有効量の (i) アムホテリシン B (A m B) またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および (i i) コレステロール を含み、

前記 A m B および前記コレステロールがエアロゾルとして患者の気道に投与され、

前記患者は C T F R 陰イオンチャネルに 2 つの変異を有し、C F T R 遺伝子の各コピーが前記 2 つの変異の 1 つを含み、前記 2 つの変異がそれぞれ独立して次の表から選択される、組み合わせ医薬。

【表 1 - 1】

R75X	663delT	1525-1G->A	1924del7
CFTRdele1	G178R	1525-2A->G	2055del9->A
M1V	675del4	S466X	2105- 2117del13insAGAAA
Q2X	E193X	L467P	2118del4
S4X	711+1G->T	1548delG	2143delT
182delT	711+3A->G	S489X	G673X
CFTRdele2	711+5G->A	S492F	2183AA->G または 2183delAA->G
CFTRdele2-4	712-1G->T	1609delCA	2184insA
185+1G->T	H199Y	Q493X	2184delA
CFTRdele2,3	P205S	W496X	2185insC
W19X	L206W	I507del	Q685X
R75X	W216X	F508del	R709X
Q39X	Q220X	1677delTA	K710X
A46D	L227R	V520F	Q715X
296+1G->A	849delG	C524X	2307insA
296+1G->T	852del22	Q525X	L732X
CFTRdele3-10,14b-16	CFTRdup6b-10	CFTRdele11	2347delG
297-1G->A	935delA	1717-1G->A	2372del8
E56K	Y275X	1717-8G->A	R764X
W57X	C276X	G542X	R785X
306insA	991del5	S549R	R792X
306delTAGA	1078delT	S549N	2556insAT
E60X	1119delA	G550X	2585delT
P67L	G330X	1782delA	2594delGT
R75X	R334W	G551S	E822X
365-366insT	1138insG	G551D	2622+1G->A
G85E	I336K	Q552X	E831X
394delTT	T338I	R553X	W846X
L88X	S341P	A559T	Y849X
CFTRdele4-7	1154insTC	1811+1634A->G または 1811+1.6kbA->G	R851X
CFTRdele4-11	1161delC	1811+1G->C	2711delT
CFTR50kdel	R347H	R560K	2721del11

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

405+1G->A	R347P	R560T	2732insA
405+3A->C	R352Q	1811+1G->A	CFTRdele14b-17b
406-1G->A	1213delT	1811+1643G->T	W882X
E92K	1248+1G->A	1812-1G->A	2789+5G->A
E92X	1249-1G->A	R560S	2790-1G->C
Q98X	1259insA	A561E	Q890X
442delA	1288insTA	V562I	S912X
444delA	W401X	1824delA	2869insG
457TAT->G	1341+1G->A	1833delT	Y913X
D110H	1343delG	Y569D	2896insAG
R117C	Q414X	E585X	L927P
R117H;5T	D443Y	1898+1G->A	2942insT
541delC	1461ins4	1898+1G->C	2957delT
574delA	1471delA	CFTRdele13,14a	S945L
602del14	A455E	1898+3A->G	2991del32
621+1G->T	1497delGG	1898+5G->T	3007delG
3120G->A	3132delTG	H1054D	3028delA
CFTRdele17a,17b	3171delC	G1061R	G970R
CFTRdele17a-18	3171insC	L1065P	CFTRdele16-17b
3120+1G->A	Q1042X	R1066C	L1077P
3121-1G->A	3271delGG	R1066H	W1089X
3121-2A->G	3272-26A->G	3600G->A	Y1092X
3121-977_3499+248del2515	3600G->A	CFTRdele19	W1098X
3349insT	CFTRdele19	CFTRdele19-21	M1101K
3659delC	CFTRdele19-21	3600+2insT	R1102X
3667ins4	3600+2insT	3600+5G->A	E1104X
S1196X	3600+5G->A	R1158X	3500-2A->G
3737delA	R1158X	R1162X	W1145X
W1204X	R1162X	W1282X	CFTRdele22-24
3791delC	3849G->A	4005+1G->A	CFTRdele22,23
Y122X	3849+4A->G	CFTRdele21	Q1330X
3821delT	3849+40A->G	4005+2T->C	G1349D
I1234V	3849+10kbC->T	4010del4	4209TGTT->AA

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

4326delTC	3850-1G->A	4015delA	4218insT
Q1411X	3850-3T->G	4016insT	E1371X
Q1412X	G1244E	4022insT	4259del5
4374+1G->T	3876delA	4021dupT	Q1382X
4374+1G->A	3878delG	4040delA	4279insA
4382delA	S1251N	N1303K	S1255P
4428insGA	L1254X	Q1313X	S1255X
3905insT	D259G		

10

【請求項 2】

嚢胞性線維症の患者の気道表面液の pH を高めるため、または嚢胞性線維症の患者の気道表面液の粘度を低下させるため、または嚢胞性線維症の患者の気道表面液の抗菌活性を高めるための組み合わせ医薬であって、治療有効量の (i) アムホテリシン B (A m B) またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および (i i) コレステロールを含み、前記 A m B および前記コレステロールがエアロゾルとして患者の気道に投与され、

前記患者は C T F R 陰イオンチャネルに 2 つの変異を有し、C F T R 遺伝子の各コピーが前記 2 つの変異の 1 つを含み、前記 2 つの変異がそれぞれ独立して次の表から選択される、組み合わせ医薬。

20

30

40

50

【表 2 - 1】

R75X	663delT	1525-1G->A	1924del7
CFTRdele1	G178R	1525-2A->G	2055del9->A
M1V	675del4	S466X	2105- 2117del13insAGAAA
Q2X	E193X	L467P	2118del4
S4X	711+1G->T	1548delG	2143delT
182delT	711+3A->G	S489X	G673X
CFTRdele2	711+5G->A	S492F	2183AA->G または 2183delAA->G
CFTRdele2-4	712-1G->T	1609delCA	2184insA
185+1G->T	H199Y	Q493X	2184delA
CFTRdele2,3	P205S	W496X	2185insC
W19X	L206W	I507del	Q685X
R75X	W216X	F508del	R709X
Q39X	Q220X	1677delTA	K710X
A46D	L227R	V520F	Q715X
296+1G->A	849delG	C524X	2307insA
296+1G->T	852del22	Q525X	L732X
CFTRdele3-10,14b-16	CFTRdup6b-10	CFTRdele11	2347delG
297-1G->A	935delA	1717-1G->A	2372del8
E56K	Y275X	1717-8G->A	R764X
W57X	C276X	G542X	R785X
306insA	991del5	S549R	R792X
306delTAGA	1078delT	S549N	2556insAT
E60X	1119delA	G550X	2585delT
P67L	G330X	1782delA	2594delGT
R75X	R334W	G551S	E822X
365-366insT	1138insG	G551D	2622+1G->A
G85E	I336K	Q552X	E831X
394delTT	T338I	R553X	W846X
L88X	S341P	A559T	Y849X
CFTRdele4-7	1154insTC	1811+1634A->G または 1811+1.6kbA->G	R851X
CFTRdele4-11	1161delC	1811+1G->C	2711delT
CFTR50kbdel	R347H	R560K	2721del11

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

405+1G->A	R347P	R560T	2732insA
405+3A->C	R352Q	1811+1G->A	CFTRdele14b-17b
406-1G->A	1213delT	1811+1643G->T	W882X
E92K	1248+1G->A	1812-1G->A	2789+5G->A
E92X	1249-1G->A	R560S	2790-1G->C
Q98X	1259insA	A561E	Q890X
442delA	1288insTA	V562I	S912X
444delA	W401X	1824delA	2869insG
457TAT->G	1341+1G->A	1833delT	Y913X
D110H	1343delG	Y569D	2896insAG
R117C	Q414X	E585X	L927P
R117H;5T	D443Y	1898+1G->A	2942insT
541delC	1461ins4	1898+1G->C	2957delT
574delA	1471delA	CFTRdele13,14a	S945L
602del14	A455E	1898+3A->G	2991del32
621+1G->T	1497delGG	1898+5G->T	3007delG
3120G->A	3132delTG	H1054D	3028delA
CFTRdele17a,17b	3171delC	G1061R	G970R
CFTRdele17a-18	3171insC	L1065P	CFTRdele16-17b
3120+1G->A	Q1042X	R1066C	L1077P
3121-1G->A	3271delGG	R1066H	W1089X
3121-2A->G	3272-26A->G	3600G->A	Y1092X
3121-977_3499+248del2515	3600G->A	CFTRdele19	W1098X
3349insT	CFTRdele19	CFTRdele19-21	M1101K
3659delC	CFTRdele19-21	3600+2insT	R1102X
3667ins4	3600+2insT	3600+5G->A	E1104X
S1196X	3600+5G->A	R1158X	3500-2A->G
3737delA	R1158X	R1162X	W1145X
W1204X	R1162X	W1282X	CFTRdele22-24
3791delC	3849G->A	4005+1G->A	CFTRdele22,23
Y122X	3849+4A->G	CFTRdele21	Q1330X
3821delT	3849+40A->G	4005+2T->C	G1349D
I1234V	3849+10kbC->T	4010del4	4209TGTT->AA

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

4326delTC	3850-1G->A	4015delA	4218insT
Q1411X	3850-3T->G	4016insT	E1371X
Q1412X	G1244E	4022insT	4259del5
4374+1G->T	3876delA	4021dupT	Q1382X
4374+1G->A	3878delG	4040delA	4279insA
4382delA	S1251N	N1303K	S1255P
4428insGA	L1254X	Q1313X	S1255X
3905insT	D259G		

10

【請求項 3】

前記 A m B と前記 コレステロール が約 1 : 1 ~ 約 1 : 2 . 5 の範囲のモル比で投与される、請求項 1 または 2 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 4】

前記 A m B と前記 コレステロール が約 1 : 2 . 5 のモル比で投与される、請求項 3 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 5】

前記 A m B と前記 コレステロール が、水と、A m B と、水素添加大豆ホスファチジルコリン、コレステロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール、 α -トコフェロール、スクロースおよびコハク酸二ナトリウム六水和物からなるリポソーム膜とから本質的になる組成物の形態で一緒に投与される、請求項 4 に記載の組み合わせ医薬。

20

【請求項 6】

前記 A m B と前記 コレステロール が別個の医薬組成物として投与される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 7】

前記 A m B と前記 コレステロール が同時に投与される、請求項 6 に記載の組み合わせ医薬。

30

【請求項 8】

前記 コレステロール が、前記 A m B の前または後の約 5 分以内 ~ 約 1 6 8 時間以内に投与される、請求項 6 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 9】

前記 A m B と前記 コレステロール が単一の医薬組成物で投与される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 10】

前記 A m B と前記 コレステロール が複合体として存在する、請求項 9 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 11】

前記 2 つの変異が、それぞれ独立して、2 1 8 4 d e l A、F 5 0 8 d e l、V 5 2 0 F、1 7 1 7 - 1 G - > A、E 6 0 X、G 5 5 1 D、R 5 5 3 X、および D 2 5 9 G から選択される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬。

40

【請求項 12】

前記患者が、F 5 0 8 d e l / F 5 0 8 d e l、G 5 5 1 D / F 5 0 8 d e l、R 5 5 3 X / E 6 0 X、F 5 0 8 d e l / 1 7 1 7 - 1 G - > A、F 5 0 8 d e l / 2 1 8 4 d e l A、および D 2 5 9 G / V 5 2 0 F から選択される一対の C T F R 変異を有する、請求項 1 1 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 13】

前記患者が、F 5 0 8 d e l / F 5 0 8 d e l、R 5 5 3 X / E 6 0 X、F 5 0 8 d e

50

1 / 1 7 1 7 - 1 G - > A、F 5 0 8 d e l / 2 1 8 4 d e l A、および D 2 5 9 G / V 5 2 0 F から選択される一対の C F T R 変異を有する、請求項 1 1 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 1 4】

前記嚢胞性線維症がイバカフトールによる治療に不応性である、請求項 1 3 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 1 5】

治療有効量の抗生物質と併用される、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 1 6】

前記患者がヒトである、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 1 7】

前記ヒトが 1 2 歳未満である、請求項 1 6 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 1 8】

前記ヒトが少なくとも 1 2 歳である、請求項 1 6 に記載の組み合わせ医薬。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 1 7 年 1 0 月 1 1 日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 5 7 0 , 7 9 5 号に対する優先権の利益を主張し、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【政府の支援】

【0 0 0 2】

本発明は、米国国立衛生研究所によって承認された認可番号第 G M 1 1 8 1 8 5 のもとで政府の支援を受けて行われた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

嚢胞性線維症は、罹患者の寿命を大幅に短縮する常染色体劣性遺伝子疾患である。この疾患は、出生数 3 , 0 0 0 人に対して 1 人の割合で発症し、脊椎動物における膜発現陰イオンチャンネルタンパク質である嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) をコードする C F T R 遺伝子における突然変異を原因とする。この疾患は、ほとんどの場合、慢性的で致命的な呼吸器感染症を特徴とし、嚢胞性線維症のほとんどの患者では、対症療法のみ利用可能である。患者の生存期間の中央値は僅か 3 3 年である。

【0 0 0 4】

C F T R は、上皮細胞膜を横断してクロライドイオンと重炭酸イオンを伝導する A B C 輸送体 (トランスポーター) クラスのイオンチャンネルである。クロライドおよび重炭酸イオンチャンネルの機能に影響を及ぼす C F T R 遺伝子の突然変異は、気道表面液 (A S L) の p H、ならびに肺、膵臓およびその他の臓器の上皮の流体輸送の調節異常を引き起こし、結果的に嚢胞性線維症を生じる。合併症には、A S L の p H の低下、A S L 粘度の上昇、A S L 抗菌活性の低下、頻繁な呼吸器感染を伴う肺の粘稠な粘液、ならびに栄養失調および糖尿病を生じさせる膵機能不全が含まれる。これらの状態は、慢性障害をもたらし、また平均余命を短くする。男性患者では、異常な管腔内分泌に起因して、発達中の精管および精巣上体の進行性の閉塞および破壊が生じると思われ、精管の先天性無形成および男性不妊を引き起こす。

【0 0 0 5】

C F T R は、c A M P 活性化 A T P 依存性陰イオンチャンネルとしての役割を担い、特定の陰イオン (例えば C l⁻ や重炭酸イオン) がそれらの電気化学的勾配に従って流れるようにコンダクタンスを高める。C F T R における A T P 駆動性の構造変化は、ゲートを開閉して、電気化学的勾配に従う陰イオンの膜透過の流れを可能にする。この機能は、A T P 駆動性の構造変化によって細胞膜を横断する上り方向の基質輸送が刺激される他の A B C タンパク質とは対照的である。本質的に、C F T R は、開構造のときに漏れる「破損」

10

20

30

40

50

したABC輸送体として進化したイオンチャネルである。

【0006】

陰イオンチャネル機能に影響を及ぼすCFTR遺伝子の突然変異は、肺において、上皮のイオンおよび流体輸送の調節異常、粘稠な粘液、および頻繁な呼吸器感染を引き起こし、主として嚢胞性線維症に関連する寿命短縮病態生理を引き起こす。CFTRは、肺、肝臓、膵臓、消化管、生殖器官、および皮膚などの多くの臓器の上皮細胞に見られる。肺では、タンパク質イオンチャネルは、重炭酸イオンおよびクロライドイオンを上皮細胞内から頂端気道表面液(ASL)に移動させる。これは、適切なASLのpH、粘度、およびpH感受性抗菌性タンパク質の活性を維持する。CFTR機能障害によるASLの変化は、細菌のクリアランスおよび殺菌を損なわせ、病的状態および死亡への主要な牽引となる慢性気道感染症に患者をかかりやすくする。

10

【0007】

CF患者には約2000のCFTR変異が見られ、そのうちの数百が機能喪失の少なくとも5つの異なるメカニズムを介して疾患を引き起こすことが確認されている(特許文献1)(1)。遺伝子型特異的小分子薬は、CFTRの特定の変異型の活性を高めることができる。しかしながら、ほとんどのCF患者は、現在利用可能な治療法に不応性であるかまたは最小応答性の変異を有する(非特許文献2)(2)。CFの遺伝子治療を開発するための広範な努力は、まだ実質的な臨床的影響をもたらしていない(1)。したがって、CFTR変異の遺伝子型に依存しない(非依存性の)嚢胞性線維症の有効な治療に対する切実な必要性が存在する。

20

【0008】

特定の変異を有するCFTRチャネルを介した陰イオン分泌を回復すると、CF患者の気道宿主防御および肺機能が改善される(非特許文献1、3および4)(1、27、38)。しかしながら、すべてのCFTR変異が、欠陥タンパク質を標的とする薬剤に適しているわけではない(非特許文献5)(39)。陰イオンの分泌を促進する小分子イオンチャネルは、これらの制限を回避することができる。多数の研究により、ペプチドまたは小分子イオンチャネル、輸送体、またはキャリアが、CFTR欠損細胞におけるクロライド輸送および/またはCFTR欠損上皮における短絡電流または電位の変化を促進できることが示されている(非特許文献6~10)(37、11-13、40)。しかしながら、このアプローチが気道の宿主防御を回復できるかどうかは不明のままであった。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【文献】F. Ratjen et al., Cystic fibrosis. Nature Reviews Disease Primers 1, 15010 (2015)

B. P. Trivedi, Cystic fibrosis foundation opens drug discovery lab. Science 353, 1194-1195 (2016)

B. W. Ramsey et al., A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. New England Journal of Medicine 365, 1663-1672 (2011)

Wainwright, C. E. et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. New England Journal of Medicine 373, 220-231, doi:doi:10.1056/NEJMoa1409547 (2015)

40

Oliver, K. E., Han, S. T., Sorscher, E. J. & Cutting, G. R. Transformative therapies for rare CFTR missense alleles. Curr Opin Pharmacol 34, 76-82, doi:10.1016/j.coph.2017.09.018 (2017)

Wallace, D. P. et al. A synthetic channel-forming peptide induces Cl(-) secretion: modulation by Ca(2+)-dependent K(+) channels. Biochim Biophys Acta 1464, 69-82 (2000)

B. Shen, et al., A synthetic chloride channel restores chloride conductance in human cystic fibrosis epithelial cells. PLoS One 7, e34694 (2012).

50

A. V. Koulov et al., Chloride transport across vesicle and cell membranes by steroid-based receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 4931-4933 (2003).

C. Jiang et al., Partial correction of defective Cl(-) secretion in cystic fibrosis epithelial cells by an analog of squalamine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1164-1172 (2001).

Poulsen, J. H., Fischer, H., Illek, B. & Machen, T. E. Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5340-5344 (1994)

【発明の概要】

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

ある態様では、本発明は、嚢胞性線維症を治療する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の (i) アムホテリシン B (AmB) またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および (ii) ステロールまたはその薬学的に許容される塩を併せて (conjointly) 投与し、それにより嚢胞性線維症を治療することを含む方法を提供する。

【0011】

また本明細書では、嚢胞性線維症の患者の気道表面液の pH を高める方法であって、嚢胞性線維症の患者に、治療有効量の (i) アムホテリシン B (AmB) またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および (ii) ステロールまたはその薬学的に許容される塩を投与し、それにより嚢胞性線維症の患者の気道表面液の pH を高めることを含む方法も提供する。

20

【0012】

本明細書ではさらに、嚢胞性線維症の患者の気道表面液の粘度を低下させる方法であって、嚢胞性線維症を有する患者に、治療有効量の (i) アムホテリシン B (AmB) またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および (ii) ステロールまたはその薬学的に許容される塩を投与し、それにより嚢胞性線維症の患者の気道表面液の粘度を低下させることを含む方法を提供する。

【0013】

本明細書ではさらに、嚢胞性線維症の患者の気道表面液の抗菌活性を高める方法であって、嚢胞性線維症の患者に、治療有効量の (i) アムホテリシン B (AmB) またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および (ii) ステロールまたはその薬学的に許容される塩を投与し、それにより嚢胞性線維症の患者の気道表面液の抗菌活性を高めることを含む方法を提供する。

30

【0014】

本明細書で提供される方法のある実施形態では、AmB とステロールの併用投与 (cojoint administration) は、医薬品アムビゾーム (AmBisome (登録商標)) (すなわち、水と、AmB と、水素添加大豆ホスファチジルコリン、コレステロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール、 α -トコフェロール、スクロースおよびコハク酸二ナトリウム六水和物からなるリポソーム膜とから本質的になる組成物) の投与により達成される。

40

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1 - 1】図1はパネルA ~ F からなり、一般に、CF の遺伝子型非依存性救済 (genotype-agnostic rescue) のためのモデルおよび小分子プローブを示す。パネルAは、正常な気道上皮細胞における経上皮重炭酸イオン輸送の概略図を示す。赤い球は重炭酸イオンを表す。緑と紫の球はそれぞれ、ナトリウムイオンとカリウムイオンを表す。パネルBでは、重炭酸イオンの大きな経頂端膜勾配がCFTR重炭酸イオンチャンネルを欠くCF上皮で予測されている。パネルCは、小分子ベースのチャネルがこの経頂端膜勾配を利用してASLへの重炭酸イオンの分泌を促進し、それによりCF肺上皮の生理機能を回復す

50

ることが予測されることを示す。

【図1-2】図1-1の続き。パネルDは、アムホテリシンB (AmB) およびチャネル不活性化誘導体 C35 - デオキシアムホテリシンB (C35 de OAmB) の構造を示す。パネルEおよびFは、 $H^{13}CO_3$ を搭載した POPC / 10% コレステロールリポソームの ^{13}C - NMR スペクトルを示し、AmB の添加後に外部溶液中に重炭酸イオン ^{13}C 共鳴の出現を示すが、C35 de OAmB または DMSO 対照では出現せず、AmB が経膜重炭酸イオン流出を促進できることを実証する。パネルFでは、少なくとも3つの独立した実験からの代表的なグラフを示す。

【図2】図2はパネルA~Fからなり、一般に、AmB が嚢胞性線維症の培養気道上皮におけるASLのpHを高めることを示す。パネルAでは、正常培養気道上皮 (NuLi) と比較して、CF培養気道上皮 (CuFi-1) において細胞内pHが上昇している ($n = 12$)。パネルBは、正常培養気道上皮 (NuLi) と比較して、CF培養気道上皮 (CuFi-1) でASLのpHが低下していることを示す ($n = 8 \sim 31$)。パネルCは、AmB (2μ) が、未処理のCuFi-1対照と比較して、2時間にわたりASLのpHを高め、少なくとも48時間持続することを示す ($n = 6 \sim 28$) グラフである。パネルDは、C35 de OAmB (2μ)、AmB ($2 \mu M$) の側底添加 (側底AmB)、またはイバカフトール (ivacafitor) / フォルスコリン (forskolin) (Iva / Fsk) ($10 \mu M$) で処理したCuFi-1単層では、ASLのpHの上昇は観察されなかったことを示す ($n = 6 \sim 14$)。パネルEは、AmB が低濃度ではCuFi-1単層におけるASLのpHを高めるが、高濃度では高めないことを示す。AmBとコレステロールとの複合体形成により、有効範囲が少なくとも $100 \mu M$ まで拡大する ($n = 9 \sim 31$)。パネルFは、AmB (2μ) とイバカフトール / フォルスコリン (10μ) の両方がCuFi-4 (G551D / F508) 単層におけるASLのpHを高めることを示す。パネルA~Fにおいて、グラフは平均 \pm SEMを示す; NSは有意ではない; * $P = 0.05$; ** $P = 0.01$; *** $P = 0.0001$ 。

【図3】図3は、パネルA~Eからなり、一般に、ASLのpHのAmB媒介性上昇が重炭酸イオン依存性でありかつ $Na^+ / K^+ ATPase$ 依存性であることを示す。パネルAでは、NuLiおよびCuFi-1単層でのpHスタット滴定により、側底側に重炭酸イオンが存在する場合はAmB処理によるASLのpHの用量依存的な上昇が示されたが、側底側に重炭酸イオンが不在の場合は示されなかった ($n = 4 \sim 23$)。パネルBは、CuFi-1単層における $H^{14}CO_3^-$ の側底側から頂端側への輸送の定量化を示し、AmB ($2 \mu M$) は正常な重炭酸イオン輸送を回復したが、C35 de OAmB (2μ)、AmBの側底添加 (2μ)、またはイバカフトール / フォルスコリン (Iva / Fsk) (10μ) は回復しなかったことを示す ($n = 4 \sim 38$)。パネルCは、AmB (2μ) とイバカフトール / フォルスコリン (10μ) の両方が、CuFi-4 (G551D / F508) 上皮における $H^{14}CO_3^-$ の経上皮輸送を増加させることを示す ($n = 10 \sim 16$)。パネルDおよびEのグラフは、経上皮重炭酸イオン輸送およびASLのpHのAmB媒介性の上昇が、ウアバイン (ouabain) ($10 mM$) による $Na^+ / K^+ ATPase$ の化学的ブロックによって無効になることを示す ($n = 6$)。パネルA~Eにおいて、グラフは平均 \pm SEMを示す; NSは有意ではない; * $P = 0.01$; ** $P = 0.001$; *** $P = 0.0001$ 。

【図4】図4はパネルA~Eからなり、一般に、AmB が、広範なCFTR遺伝子型のCF患者に由来する初代培養ヒト肺上皮のASLの生理機能を回復させることを示す。パネルA~Eは、AmB がCFの遺伝的に多様なヒトに由来する初代培養気道上皮における宿主防御を改善したことを一般的に示す。パネルAは、患者ドナーの遺伝子型と変異クラスを列挙した表である。AmBの頂端添加 (2μ ; 48時間) 処理ありまたはなしで、広範囲のCFTR変異を有する9名のCFのヒト由来の初代培養気道上皮において、広範囲のCFTR遺伝子型にわたりASLのpHの上昇を観察した ($n = 9$)。パネルBは、平均して、AmB (2μ) はASLのpHを高めたが、C35 de OAmB (2μ) および側底側へのAmB (2μ) の添加はASLのpHを高めなかったことを示すグラフ

である ($n = 3 \sim 9$)。パネル C は、AmB (2μ) の頂端添加による ASL の pH の平均差を時間の関数として示す ($n = 3 \sim 9$)。パネル D は拡散による FITC - デキストランの蛍光回復により測定された ASL 粘度 ($ASL /$ 生理食塩水) ($n = 6$) を示す。パネル E は、ASL への曝露後に死んだ黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の割合 (%) により測定した ASL の抗菌活性を示す ($n = 8$)。パネル E は、AmB の頂端添加 ($2 \mu M$ 、48 時間) がある場合とない場合の初代 CF 上皮を示す。すべての化合物は FC - 72 中において投与された。パネル A、C および E では、各データポイントまたはデータポイントのペアは、異なるヒトの上皮の平均 ($n = 1 \sim 3$) を表し、黒いバーは平均 \pm SEM を示す。すべてのパネルで、統計的有意性を評価するのに適切な場合は、ウェルチ補正ありまたはなしの両側の対応のないスチューデントの t 検定を使用した。パネル 3 b において、* はビヒクル対照と比較した統計的な差を示す; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。パネル A、D、および E では、測定値は別個のサンプルから取得した。パネル C では、各ドナーの同じサンプルを経時的に繰り返し測定した。

【図 5】図 5 は、AmB isome (登録商標) の投与による気道表面液の pH の用量依存的な変化を示すグラフである (NS は有意ではない; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)。

【図 6】図 6 は、AmB isome (登録商標) の投与後の経時的な気道表面液の pH の変化を示すグラフである (NS は有意ではない; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)。

【図 7】図 7 A ~ 7 I は、一般に、AmB が、培養 CF 気道上皮における $H^{14}CO_3^-$ 分泌を増加させ、さらに ASL の pH を高めたことを示す。パネル A ~ I は、イバカフトール / フォルスコリン (Iva / Fsk) ($10 \mu M$ 、2 時間) および頂端への AmB ($2 \mu M$; 48 時間) 添加の効果を示す。図 7 A は、CuFi - 4 (G551D / F508) 上皮における ASL の pH を示すグラフである ($n = 10 \sim 16$)。図 7 B は、ビヒクル処理された CuFi - 4 上皮に対して正規化された 10 分間にわたる側底側から頂端側への $H^{14}CO_3^-$ 分泌の比率を示すグラフである ($n = 10 \sim 16$)。図 7 C は、ビヒクル (FC - 72)、イバカフトール / フォルスコリン (10μ ; 2 時間)、C35 de OAmB ($2 \mu M$; 48 時間) の添加、または AmB の側底添加 ($2 \mu M$; 48 時間) の 48 時間後の NuLi (CFTR^{+/+}) 上皮または CuFi - 1 (F508 / F508) 上皮における ASL の pH を示すグラフである ($n = 6 \sim 14$)。図 7 D は、ビヒクル (FC - 72)、イバカフトール / フォルスコリン ($10 \mu M$ 、2 時間)、C35 de OAmB ($2 \mu M$; 48 時間) の頂端添加、または AmB の側底添加 ($2 \mu M$; 48 時間) の後の NuLi 上皮または CuFi - 1 上皮における 10 分間にわたる $H^{14}CO_3^-$ 分泌の比率を示すグラフである ($n = 4 \sim 38$)。値は、ビヒクル処理された CuFi - 1 上皮に対して正規化した。図 7 E は、NuLi (CFTR^{+/+}) 上皮における ASL の pH に対する AmB ($2 \mu M$; 48 時間) の効果を示すグラフである ($n = 6 \sim 14$)。図 7 F は、AmB ($2 \mu M$) の頂端添加ありとなしでの CuFi - 1 上皮における ASL の pH の差を時間の関数として示すグラフである ($n = 6 \sim 28$)。図 7 G は、AmB または C35 de OAmB ($0.5 \mu M$; 48 時間) の頂端添加後あるいはブメタニド (500μ) の側底添加後の NuLi (CFTR^{+/+}) 上皮または CuFi - 1 上皮における共焦点顕微鏡で定量化した ASL の高さを示すグラフである ($n = 6 \sim 21$)。図 7 H は、ASL の pH および $H^{14}CO_3^-$ 分泌を示すグラフである。図 7 I は、ビヒクル (FC - 72) の添加、AmB の頂端添加 ($2 \mu M$; 48 時間)、または AmB の頂端添加 ($2 \mu M$ 、48 時間) およびウアバイン ($10 mM$) の側底添加後の CuFi - 1 上皮を示すグラフである ($n = 6$)。すべての化合物は FC - 72 中において投与した。すべての図において、測定値は別個のサンプルから取得し、グラフは平均 \pm SEM を示す。ウェルチ補正ありまたはなしの両側の対応のないスチューデントの t 検定および ANOVA を使用して、統計的有意性を評価した。パネル 2 d において、* はビヒクル対照と比較した統計的差異を示す; NS は有意ではない; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

10

20

30

40

50

【図 8】図 8 A ~ 8 D は、一般に、AmB isome（登録商標）が、培養 CF 気道上皮および CFTR^{-/-}ブタにおいて、ASL の pH を高めたことを示す。図 8 A は、CuFi-1（F508 / F508）上皮の ASL の pH に対する AmB または事前に形成された AmB : コレステロール複合体の濃度依存的効果を示すグラフである（ $n = 9 \sim 31$ ）。図 8 B は CuFi-1（F508 / F508）の ASL の pH に対する AmB isome（登録商標）（FC-72 中 1 mg / mL）の効果を時間の関数として示すグラフである（ $n = 9$ ）。図 8 C は、2 時間後の $H^{14}CO_3^-$ 分泌を示すグラフである（ $n = 20$ ）。図 8 D は、AmB isome（登録商標）（FC-72 中 1 mg / mL）で少なくとも 1 時間処置した CFTR^{-/-}ブタの ASL の pH をベースラインと比較して示すグラフである（ $n = 4$ ）。すべての図で、グラフは平均 \pm SEM を示し、両側の対応のない 10
 スチューデントの t 検定を使用して統計的有意性を評価した。図 8 A において、* は、AmB 処理上皮と AmB : コレステロール処理上皮との間の有意差を示す。図 8 C において、* は、ビヒクル対照と比較した統計的差異を示す。* $P = 0.05$; ** $P = 0.01$; *** $p = 0.001$ 。図 8 A ~ 8 C では、測定値は別個のサンプルから得た。図 8 D では、同じブタを繰り返し測定した。

【図 9】図 9 A ~ 9 I は、一般に、AmB が、脂質膜を通過してカリウム、ナトリウム、クロライド、プロトンおよび HCO_3^- を輸送できることを示す。トレースは、Triton-X 添加後の最大イオン流出に対するパーセントを示す。図 9 A は、1 : 1000 の AmB : 脂質に相当する [AmB] または DMSO ビヒクルの添加後の、カリウム勾配の存在下での POPC / 10 % コレステロールリポソームからのカリウム流出を示すグラフ 20
 である。図 9 B は、1 : 1000 の AmB : 脂質に相当する [AmB] または DMSO ビヒクルの添加後の、ナトリウム勾配の存在下での POPC / 10 % コレステロールリポソームからのナトリウム流出を示すグラフである。図 9 C は、1 : 1000 の AmB : 脂質に相当する [AmB] または DMSO ビヒクルの添加後の、クロライド勾配の存在下での POPC / 10 % コレステロールリポソームからのクロライド流出を示すグラフである。図 9 D は、1 : 1000 の AmB : 脂質に相当する [AmB] または DMSO ビヒクルの添加後の、pH 勾配の存在下での POPC / 10 % コレステロールリポソームからのプロトン流出を示すグラフである。図 9 E は ^{13}C -NMR 実験の概略図である。図 9 F は、AmB、C35 de O AmB、または DMSO で処理した $H^{13}CO_3^-$ 装 30
 填 POPC / 10 % コレステロールリポソームの ^{13}C -NMR スペクトルを示すグラフである。Na $H^{13}CO_3^-$ はリポソーム内部に装填され、小胞内溶液は pH 7.5 に緩衝され、一方小胞外溶液は pH 7.3 に緩衝された。この pH の違いにより、小胞内 HCO_3^- は、小胞外 HCO_3^- と比べてより低磁場の化学シフトを示す。AmB（1 : 1, 000 の AmB : POPC）の添加により小胞外 HCO_3^- に対応する高磁場側の ^{13}C 信号が生成されるが、C35 de O AmB または DMSO ビヒクルの添加では生成されず、AmB が HCO_3^- の流出を促進できることを実証する。図 9 G は、高磁場信号が小胞外 HCO_3^- に対応することを確認するスペクトルであり、 HCO_3^- に結合して常磁性緩和促進（PRE）を介して観測 ^{13}C 信号をクエンチする Mn^{2+} を小胞外溶液に添加した。 Mn^{2+} は、POPC 二重層に不透過性であるため、 Mn^{2+} はリポソーム外部の HCO_3^- に対応する信号のみに影響を及ぼすことができる。 Mn^{2+} の添加は、AmB の添加により生 40
 成された高磁場信号を消滅させたが、小胞内 HCO_3^- に対応する信号は消滅させず、AmB が HCO_3^- の流出を引き起こすことを確認した。図 9 H は、広い低磁場信号が小胞内 HCO_3^- に対応することの確認を示すスペクトルであり、実験の終わりに、POPC リポソームをトリトン X で溶解させた。図 9 I は、AmB 媒介性の HCO_3^- 流出の代表的な時間経過を示すスペクトルである。各実行のデータを、0 ~ 100 % の全イオン放出に対するパーセントに正規化した。リポソーム懸濁液の溶解後、 ^{13}C グルコース標準の積分と比較した小胞外 HCO_3^- に対応する信号の積分を、100 % 流出に対応するようにスケールした。AmB を添加した各実験の実行に関して、小胞外 HCO_3^- に対応する信号を、各 FID の ^{13}C グルコース標準と比較して積分し、パーセント流出を時間の関数としてプロットした。図 9 A ~ 9 I では、少なくとも 3 つの独立した実験からの代 50

表的なスペクトルまたはグラフを示す。すべての図面において、測定値は別個のサンプルから取得した。

【図10】図10A～10Eは、一般に、AmB媒介性のpH変化が HCO_3^- 依存性であり、ASLにおける主要陽イオン濃度を変化させないことを示す。図10Aは、pHスタット滴定によって測定した、[AmB]を高めて急性添加した後20分間にわたるCuFi-1 (F508 / F508) 上皮における塩基分泌および酸吸収速度を示すグラフである ($n = 5 \sim 23$)。頂端側のpHを6.0の目的pHに滴定した。スチューデントのt検定を使用して統計的有意性を評価した。図10Bは、ICP-MSにより測定した、CuFi-1 (F508 / F508) のASLの Na^+ 濃度に対するAmB (2 μM) またはFC-72ピヒクルの48時間後の効果を示すグラフである ($n = 16$)。図10Cは、ICP-MSで測定した、CuFi-1 (F508 / F508) のASLの K^+ 濃度に対するAmB (2 μM) またはFC-72ピヒクルの48時間後の効果を示すグラフである ($n = 16$)。図10Dは、ICP-MSで測定した、CuFi-1 (F508 / F508) のASLの $^{24}\text{Mg}^{2+}$ 濃度に対するAmB (2 μM) またはFC-72ピヒクルの48時間後の効果を示すグラフである ($n = 16$)。図10Eは、ICP-MSで測定した、CuFi-1 (F508 / F508) のASLの Ca^{2+} 濃度に対するAmB (2 μM) またはFC-72ピヒクルの48時間後の効果を示すグラフである ($n = 16$)。統計的有意性を評価するのに適切な場合は、ウェルチ補正ありまたはなしの両側の対応のないスチューデントのt検定およびANOVAを使用した。グラフは平均 \pm SEMを示す。NSは有意ではない；*** $p < 0.0001$ 。すべての図面において、測定値は別個のサンプルから取得した。

【図11】11A～11Kは、一般に、AmB処理が持続し、野生型には効果がなく、CFTR活性の増大によるものではなく、膜の完全性を妨げず、かつ無毒性であることを示すグラフである。図11Aは、FC-72ピヒクル添加に対して正規化された、放射性標識添加後10分間にわたる $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ の側底側緩衝液からASLへの移動に対する、CuFi-1 (F508 / F508) 上皮の表面上に7日間放置されたAmB (2 μM) またはFC-72ピヒクルの効果を示すグラフである ($n = 6 \sim 9$)。図11Bは、FC-72ピヒクル添加に対して正規化された、放射性標識添加後10分間にわたる $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ の側底側緩衝液からASLへの移動に対する、CuFi-1 (F508 / F508) 上皮の表面上に14日間放置されたAmB (2 μM) またはFC-72ピヒクルの効果を示すグラフである ($n = 6 \sim 9$)。図11Cは、FC-72ピヒクル添加に対して正規化された、放射性標識添加後10分間にわたる $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ の側底側緩衝液からASLへの移動に対する、CuFi-1 (F508 / F508) 上皮の表面上に28日間放置されたAmB (2 μM) またはFC-72ピヒクルの効果を示すグラフである ($n = 6 \sim 9$)。図11Dと11Gは、NuLi (CFTR $^{+}/^{+}$) 上皮において、10 μM フォルスコリン / 100 μM IBMX (FI) で処理してCFTRを活性化し、さらに1 μM のCFTR $_{inh}$ -172で処理してCFTRを阻害した後の短絡電流 (I_{sc}) の変化を示すグラフとスペクトルである ($n = 6$)。図11Eと11Hは、CuFi-1 (F508 / F508) 上皮において、10 μM フォルスコリン / 100 μM IBMX (FI) でCFTRを活性化し、さらに1 μM のCFTR $_{inh}$ -172でCFTRを阻害した後の短絡電流 (I_{sc}) の変化を示すグラフとスペクトルである ($n = 6$)。図11Fと11Iは、AmB (2 μM ; 48時間) で処理したCuFi-1上皮において、10 μM フォルスコリン / 100 μM IBMX (FI) でCFTRを活性化し、さらに1 μM のCFTR $_{inh}$ -172で処理してCFTRを阻害した後の短絡電流 (I_{sc}) の変化を示すグラフとスペクトルである ($n = 6$)。図11Jは、CuFi-1上皮における経上皮電気抵抗 (R_t) が、ピヒクルでの処理または用量を高めたAmBでの処理の間で、単回処理の後の増加期間にわたり相違しなかったことを示すグラフである ($n = 9$)。図11Kは、単回のAmBまたはピヒクルでの処理後の増加期間にわたりCuFi-1上皮におけるラクターゼデヒドロゲナーゼの検出によって測定した細胞毒性を示すグラフであり、Triton Xによる全細胞溶解に対するパーセントとして表される。ピヒクルと

比較して、AmB処理は細胞毒性を高めなかった ($n = 9 \sim 12$)。図11A~11Cでは、両側の対応のないスチューデントのt検定を使用して統計的有意性を評価した。図11H~11Jでは、少なくとも3つの独立した実験からの代表的なグラフを示す。図11A~11F、11Jおよび11Kは、平均 \pm SEMを表わす。NSは有意ではない；***ピヒクル対照に対して $p = 0.001$ 。すべての図面において、測定値は別個のサンプルから取得した。

【図12】図12A~12Eは、一般に、AmBがASLの高さを高めることを示す。図12Aは、NuLi (CFTR^{+/+}) 上皮における、共焦点顕微鏡によって画像化されたASLの高さを示す画像である。図12Bは、CuFi-1上皮における、共焦点顕微鏡によって画像化されたASLの高さを示す画像である。図12Cは、AmBを頂端添加したCuFi-1上皮における、共焦点顕微鏡によって画像化されたASLの高さを示す画像である。図12Dは、ブメタニド (500 μ M) を側底添加したNuLi上皮における、共焦点顕微鏡によって画像化されたASLの高さを示す画像である。図12Eは、ブメタニド (500 μ M) を側底添加したAmB処理CuFi-1上皮における、共焦点顕微鏡により画像化されたASLの高さを示す画像である。少なくとも8つの独立した実験からの代表的な画像を示す。すべての図面において、測定値は別個のサンプルから取得した。スケールバーは10 μ mを表す。

【図13】図13A~13Gは、一般に、AmBが、CFのドナーからの初代ヒト気道上皮のASLのpHおよび抗菌活性を回復することを示す。図13Aは、ASLのpHアッセイにおける、患者ドナーの遺伝子型とpH測定値を示す表である。図13Bは、異なるCFTR変異を有するCFのヒトに由来する初代培養気道上皮のASLの平均pHに対する、AmB (2 μ M ; 48時間)、C35deOAmB (2 μ M ; 48時間)、およびAmB (2 μ M ; 48時間) の側底添加の効果を示すグラフである ($n = 3 \sim 9$)。図13Cは、非CF上皮のASLのpHに対するAmB (2 μ M ; 48時間) の効果を示すグラフである ($n = 7$)。図13Dは、ASLの粘度アッセイにおける患者ドナーの遺伝子型を示す表である。図13Eは、ASLの抗菌活性アッセイにおける患者ドナーの遺伝子型を示す表である。図13Fは、広範囲のCFTR変異を有するCFのヒト由来の初代培養気道上皮の平均ASL抗菌活性に対するAmB (2 μ M ; 48時間) およびC35deOAmB (2 μ M ; 48時間) の効果を示すグラフである ($n = 5 \sim 8$)。抗菌活性は、ASLへの曝露後に殺された黄色ブドウ球菌の割合 (%) によって測定する。図13Gは、生理食塩水と比較して、AmB (2 μ M) 単独で黄色ブドウ球菌を殺す能力を示すグラフである ($n = 36$)。図13B、13C、13Fおよび13Gにおいて、ウェルチ補正ありまたはなしの両側の対応のないスチューデントのt検定およびANOVAを使用して、統計的有意性を評価した。グラフは平均 \pm SEMを示す。NSは有意ではない；* $P = 0.05$ ；** $P = 0.01$ 。すべての図面において、測定値は別個のサンプルから取得した。

【図14】図14A~14Cは、一般に、AmB isome (登録商標) が、経上皮H¹⁴CO₃⁻分泌およびASLのpHを時間および用量依存的に高めることを示す。図14Aは、POPC/10%コレステロール脂質膜を横断するH¹³CO₃⁻輸送に対する、AmB isome (登録商標) (1:1000のAmB:脂質比)、AmB:Chol (DM SO中1:1000のAmB:脂質比)、および滅菌水またはDM SOピヒクルの効果を示すグラフである。図14Bは、FC-72ピヒクル添加に対して正規化された、CuFi-1 (F508/F508) における、放射性標識添加後10分間にわたるH¹⁴CO₃⁻の側底側緩衝液からASLへの移動に対する、AmB isome (登録商標) (1 mg/mL ; 48時間) またはFC-72ピヒクルの効果を示すグラフである ($n = 16$)。図14Cは、ピヒクル対照と比較した、CuFi-1上皮のASLのpHに対する、AmB isome (登録商標) (1 mg/mL ; 48時間) の濃度増加の効果を示すグラフである ($n = 6 \sim 9$)。図14Aでは、少なくとも3つの独立した実験からの代表的なグラフを示す。図14Bおよび14Cにおいて、両側の対応のないスチューデントのt検定およびANOVAを使用して統計的有意性を評価した。グラフは平均 \pm SEMを示す

10

20

30

40

50

。ビヒクル対照に対して、NSは有意ではない；* P 0.05；*** P 0.001；**** P 0.0001。図14Cでは、および統計は、FC-72ビヒクル対照と比較する。図14B～14Cにおいて、測定値は別個のサンプルから取得した。図14Aでは、各実験について同じサンプルを経時的に繰り返し測定した。

【発明を実施するための形態】

【0016】

気道表面液(ASL)のpHの維持は、肺の生理学的機能に不可欠であり、非胃型H⁺/K⁺アデノシントリホスファターゼATP12Aを介したプロトン排出とCFTRを介した重炭酸イオン分泌とのバランスを必要とする(3、4)。緑膿菌などの呼吸器病原体も、モノカルボン酸乳酸-H⁺共輸送体を介してプロトンを分泌することにより、ASLの酸性化に寄与することができ、そのプロセスは、正常な気道では重炭酸イオン分泌によって相殺されるがCFではそうではない(5)。したがって、CFTRの損失は、pHの低下を引き起こし、それによってASL粘度が上昇し、pH感受性抗菌タンパク質の活性が低下し(3、6)、CF患者の罹患率と死亡率の原因となる慢性気道感染症に寄与する(4、7)。エアロゾル化した重炭酸イオンまたは緩衝液をCF上皮に投与すると、ASLをアルカリ化し、粘度および抗菌活性を正常化することができる。しかしながら、これらの効果は一時的であり、pHは1時間以内にベースライン値に戻る(3、8)。

【0017】

Na⁺/K⁺ATPaseを含む側底膜上のポンプおよびチャネルの堅牢なネットワークは、通常、経上皮重炭酸イオン輸送を駆動します(図1、パネルA)。CFTRが存在しない場合、重炭酸イオンは側底膜を通して細胞内に送り込まれ続けるが、頂端放出は低減され、アルカリ化された細胞内pHをもたらす(9、10)。これにより、頂端膜を挟んで大きなpH勾配が生じる(図1、パネルB)。本発明者らは、驚くべきことに、重炭酸イオンに対する頂端膜の小分子媒介性の透過化が、CF上皮のASLのpHを高めることを発見した。さらに、本発明者らは、この透過化が、経上皮重炭酸イオン輸送を駆動および調節する堅牢なタンパク質ネットワークと機能的に統合され、それによってCFTRの無秩序で比較的非選択的な代替物によるASLの生理機能の実質的な回復を可能にすることを特定した(図1、パネルC)。

【0018】

したがって、一部の実施形態では、CF上皮に導入された小分子イオンチャネルは、プロトン吸収、重炭酸イオン分泌、またはその両方を介して、CF肺上皮のASLの生理学的特徴を回復することができる。このような分子補綴アプローチは、CF遺伝子型に依存せず、すなわちCFにおけるCFTR発現の低下またはCFTR機能の低下の根底にある遺伝子変異の正確な性質とは無関係である。

【0019】

アムホテリシンB(AmB)は、酵母細胞などの真核細胞をカリウムや他のイオンに対して透過性にすることができる。Ermishkin LN et al. (1977) Biochim Biophys Acta 470(3): 357-367。AmBは酵母に対して非常に毒性でもあり、この毒性はその膜透過化と密接に関連していると考えられていた。しかしながら、C35の単一酸素原子を欠くAmBの合成誘導体(C35 de O AmB)はイオンチャネルを形成せず、それでも強力な抗真菌活性を維持することが分かった。Gray KC et al. (2012) Proc Natl Acad Sci USA 109(7): 2234-2239。さらなる研究により、AmBが主にステロールに結合してそれを膜から抜き取ることで酵母を殺し、AmBの量がエルゴステロールの量を越えた場合にのみ細胞毒性を示すことが明らかになった。Anderson TM et al. (2014) Nat Chem Biol 10(5): 400-406。チャネル形成は必要とされない。これにより、低用量での投与および/またはステロールとの事前の複合体化(pre-complexation)により、AmBのイオンチャネル活性をその殺細胞活性と分離することが可能となった。AmBは、タンパク質イオンチャネル欠損酵母の成長を回復させることができる。成長の救済が観察される用量範囲は、AmBを、酵母の主要なステロールであるエルゴステロールと事前に複合体化させた場合に、1桁以上拡大させることができる。非チャネル形成バリエーションC35 d

e O A m B は、試験したいずれの濃度でも酵母の成長を救済できなかった。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、A m B およびステロールでの処置は、C F 由来の初代肺上皮において A S L の pH、粘度、および抗菌活性のうちの 1 つ以上を救済する。

【 0 0 2 1 】

ここで詳細に説明するように、ヒト気道において経上皮重炭酸イオン輸送を駆動する細胞メカニズムは、C F T R の不完全な模倣物を、遺伝子型非依存的な様式で A S L の生理機能の重要な側面を回復させるのに十分なものにすることができる。小分子チャネルは、この堅牢なタンパク質ベースの重炭酸イオン輸送経路に機能的に統合され、A m B チャネルと $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$ との特定の交差は、欠損タンパク質の小分子代替物が真核細胞における堅牢な自己調節メカニズムと連携できる例の増大するリストを増やす (2 0、2 3)。本明細書に記載の実験は、他のイオン輸送体の調節 (3 4、3 5) を含めて、A m B によって複製されない C F T R の代替活性が、A S L の pH、粘度、および抗菌特性の維持に必要とされないことを示す。この結果は、これらの代替活性が重要である可能性が高いことを示す以前の報告 (3 4、3 5) に照らして、驚くべきことである。総合的に、これらの結果は、頂端膜の重炭酸イオン透過化を促進する小分子を使用して、C F の遺伝子型非依存性の救済のロードマップを示唆する。A m B がエアロゾル化形態で肺に安全に送達される臨床的に承認された薬物であること (3 2)、A m B i s o m e が、アムホテリシン、コレステロール、および他の脂質と塩を含む臨床的に承認された混合物であること、そしてその天然物の合成誘導体化が対応イオンチャネルのコンダクタンスおよび選択性を変更することが最近示されたこと (3 3) は注目に値する。

【 0 0 2 2 】

したがって、ある実施形態では、A m B とステロールと一緒に、例えば A m B とステロールとで事前に形成された複合体は、C F 患者の肺における A S L の pH を高め、それによりこれら患者の気道抗菌活性および気道防御を改善するのに有効である。ある実施形態では、A m B : ステロールのモル比は、1 : 1 ~ 約 1 : 1 5 の範囲である。

【 0 0 2 3 】

ある実施形態において、本発明の方法は、A m B の点滴静注用の滅菌凍結乾燥製剤である注射用 A m B i s o m e (登録商標) (A s t e l l a s P h a r m a U S , I n c . , N o r t h b r o o k , I L) を利用する。各バイアルは、およそ 2 1 3 m g の水素添加大豆ホスファチジルコリン ; 5 2 m g のコレステロール、8 4 m g のジステアロイルホスファチジルグリセロール ; 0 . 6 4 m g の α -トコフェロールからなるリポソーム膜中に挿入された 5 0 m g のアムホテリシン B を、9 0 0 m g のスクロース、および緩衝剤としての 2 7 m g のコハク酸二ナトリウム六水和物と共に含む。この製品における A m B のコレステロールに対するモル比は約 1 : 2 . 5 である。

【 0 0 2 4 】

発明の方法

一態様では、嚢胞性線維症を治療する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の (i) アムホテリシン B (A m B) またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および (i i) ステロールまたはその薬学的に許容される塩を併せて投与し、それにより嚢胞性線維症を治療することを含む方法を本明細書で提供する。

【 0 0 2 5 】

本明細書で用いられる場合、用語「治療する」および「治療」とは、(a) 状態または疾患を発症するリスクを有するまたは状態または疾患に罹患する素因を有するがまだ状態または疾患に罹患していない対象において、状態または疾患が生じることを予防する ; (b) 例えばその発症を遅延または停止させるなど、状態または疾患を抑制する ; または、(c) 例えば状態または疾患の退縮を生じるなど、状態または疾患を軽減または改善する ; といった結果をもたらす介入を行うことを指す。一実施形態では、用語「治療する」および「治療」は、(a) 例えばその発症を遅延または停止させるなど、状態または疾患を抑制する ; または、(b) 例えば状態または疾患の退縮を生じるなど

、状態または疾患を軽減または改善する；といった結果をもたらす介入を行うことを指す。

【0026】

本明細書で用いられる場合、「患者」とは、生きた哺乳動物を指す。さまざまな実施形態において、患者は非ヒト哺乳動物であり、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウマ、ウシ、または非ヒト霊長類を含むがそれらに限定はされない。ある実施形態では、患者はヒトである。

【0027】

本明細書で用いられる場合、語句「有効量」は、所望の生物学的効果を達成するのに十分な任意の量を意味する。

【0028】

本明細書で用いられる場合、語句「治療有効量」は、例えば、嚢胞性線維症を治療するなど、所望の治療効果を達成するのに十分な任意の量を意味する。

【0029】

ある実施形態では、ステロールは、コレステロール、カンペステロール、 Δ^5 -シトステロール、 Δ^4 -イソプロピルコレステロール、ニカステロール、ラノステロール、 Δ^7 -デヒドロコレステロール、デスモステロール、 Δ^4 -メチルコレスタン-8(14)， Δ^2 -ジエン-3 β -オール、ゴルゴステロール、ジノステロール、 Δ^2 5-ヒドロキシコレステロール、 Δ^5 -コレスタン-ヘキサオール、シクロアルテノール、スチグマステロール、フコステロール、エルゴステロール、アントロステロール、サリンゴステロール、シトステロール、コプロスタノール、アベナステロール、ジヒドロコレステロール、スチグマスタノール、カンペスタノール、ブラシカステロール、およびルペオールからなる群より選択される。

【0030】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、AmBとステロールは、約1:1～約1:15の範囲のモル比で投与される。

【0031】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、AmBとステロールは、約1:1～約1:12の範囲のモル比で投与される。ある実施形態では、AmBとステロールは、約1:1～約1:10の範囲のモル比で投与される。

【0032】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、AmBとステロールのモル比は約1:1～約1:14である。このようなある実施形態では、モル比は約1:1～約1:13である。このようなある実施形態では、モル比は約1:1～約1:11である。このようなある実施形態では、モル比は約1:1～約1:9である。このようなある実施形態では、モル比は約1:1～約1:8である。このようなある実施形態では、モル比は約1:1～約1:7である。このようなある実施形態では、モル比は約1:1～約1:6である。このようなある実施形態では、モル比は約1:1～約1:5である。ステロールがコレステロールではないある実施形態では、モル比は約1:2～約1:12である。このようなある実施形態では、モル比は約1:2～約1:10である。このようなある実施形態では、モル比は約1:2～約1:9である。このようなある実施形態では、モル比は約1:2～約1:8である。このようなある実施形態では、モル比は約1:2～約1:7である。このようなある実施形態では、モル比は約1:2～約1:6である。そのようなある実施形態では、モル比は約1:2～約1:5である。

【0033】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、AmBとステロールは、約1:1～約1:5の範囲のモル比で投与される。このようなある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、AmBとステロールは、約1:3～約1:5の範囲のモル比で投与される。

【0034】

あるいは、他の実施形態では、ステロールはコレステロールである。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

ステロールがコレステロールであるいくつかの実施形態では、A m B とステロールは、約 1 : 1 ~ 約 1 : 2 . 5 の範囲のモル比、好ましくは約 1 : 2 . 5 のモル比で投与される。

【 0 0 3 6 】

ある実施形態では、ステロールはエルゴステロールではない。

【 0 0 3 7 】

ステロールがエルゴステロールであるいくつかの実施形態では、A m B とステロールは、約 1 : 1 ~ 約 1 : 2 . 5 の範囲のモル比で投与され、好ましくは、モル比は約 1 : 2 . 5 である。

【 0 0 3 8 】

ある実施形態では、A m B とステロールは、別個の医薬組成物として投与される。

【 0 0 3 9 】

A m B とステロールの別個の医薬組成物は同時に投与してもよい。

【 0 0 4 0 】

あるいは、A m B とステロールの別個の医薬組成物は異なる時に投与してもよい。例えば、一部の実施形態では、ステロールは、A m B の前または後の約 5 分以内 ~ 約 1 6 8 時間以内に投与される。

【 0 0 4 1 】

他の実施形態では、A m B とステロールは、単一の医薬組成物で投与され、すなわち、A m B とステロールは単一の医薬組成物中に処方される。

【 0 0 4 2 】

ある実施形態では、A m B とステロールは複合体として存在する。

【 0 0 4 3 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは全身投与される。

【 0 0 4 4 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは静脈内投与される。

【 0 0 4 5 】

ある実施形態では、組成物は対象の気道に投与される。例えば、気管支肺胞洗浄 (B A L) によってまたはエアロゾルによって、組成物を対象の気道に投与することができる。本明細書で用いられる場合、「対象の気道」とは、以下の肺構造のいずれかまたはすべてを指す：気管、気管支、細気管支、肺胞。ある実施形態では、対象の気道は、いわゆる誘導気道 (conducting airway) 、すなわち以下の肺構造のいずれかまたはすべてを指す：気管、気管支、および細気管支。

【 0 0 4 6 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは、対象の気道にエアロゾルとして投与される。

【 0 0 4 7 】

C F 患者において 1 9 0 0 を超える異なる C F T R 変異が見いだされ、そのうち数百は、少なくとも 5 つの異なる機能損失メカニズムを介して疾患を引き起こすことが確認されている。C F T R の特定の変異型に結合しそれによってその活性を高める遺伝子型特異的小分子薬剤の開発に最近重要な進歩があった。しかしながら、全 C F 患者のほぼ半数は、現在の小分子治療に応答しない C F T R 遺伝子型を有する。これらには、機能的 C F T R タンパク質の完全な欠如をもたらす主要なトランケーション、および機能欠損の機構的基礎が不明である非常に稀な変異が含まれる。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の任意の方法は、クラス I 、 I I 、 I I I 、 I V 、 V 、 V I 、 U 、およびそれらの組合せからなる群より選択される嚢胞性線維症の変異クラスを治療する。一部の実施形態では、変異クラスは、I / I 、 I I / I I 、 I I / U 、および U / I I I からなる群より選択される。

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは遺伝子型に依存しない治療である。

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される場合、「遺伝子型に依存しない (genotype-independent)」または「遺伝子型非依存性 (genotype-agnostic)」という語句は、C F における C F T R 発現の低下または C F T R 機能の低下の根底にある遺伝的変異の正確な性質とは無関係の任意の治療を指す。

【 0 0 5 1 】

ある実施形態では、患者は、C T F R 陰イオンチャネルに 2 つの変異を有し、その 2 つの変異は、それぞれ独立して表 1 から選択される。

【表 1 - 1】

表1. CFTR変異

R75X	663delT	1525-1G->A	1924del7
CFTRdele1	G178R	1525-2A->G	2055del9->A
M1V	675del4	S466X	2105- 2117del13insAGAAA
Q2X	E193X	L467P	2118del4
S4X	711+1G->T	1548delG	2143delT
182delT	711+3A->G	S489X	G673X
CFTRdele2	711+5G->A	S492F	2183AA->G または 2183delAA->G
CFTRdele2-4	712-1G->T	1609delCA	2184insA
185+1G->T	H199Y	Q493X	2184delA
CFTRdele2,3	P205S	W496X	2185insC
W19X	L206W	I507del	Q685X
R75X	W216X	F508del	R709X
Q39X	Q220X	1677delTA	K710X
A46D	L227R	V520F	Q715X
296+1G->A	849delG	C524X	2307insA
296+1G->T	852del22	Q525X	L732X
CFTRdele3-10,14b-16	CFTRdup6b-10	CFTRdele11	2347delG
297-1G->A	935delA	1717-1G->A	2372del8

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

E56K	Y275X	1717-8G->A	R764X
W57X	C276X	G542X	R785X
306insA	991del5	S549R	R792X
306delTAGA	1078delT	S549N	2556insAT
E60X	1119delA	G550X	2585delT
P67L	G330X	1782delA	2594delGT
R75X	R334W	G551S	E822X
365-366insT	1138insG	G551D	2622+1G->A
G85E	I336K	Q552X	E831X
394delTT	T338I	R553X	W846X
L88X	S341P	A559T	Y849X
CFTRdele4-7	1154insTC	1811+1634A->G または 1811+1.6kbA->G	R851X
CFTRdele4-11	1161delC	1811+1G->C	2711delT
CFTR50kbdel	R347H	R560K	2721del11
405+1G->A	R347P	R560T	2732insA
405+3A->C	R352Q	1811+1G->A	CFTRdele14b-17b
406-1G->A	1213delT	1811+1643G->T	W882X
E92K	1248+1G->A	1812-1G->A	2789+5G->A
E92X	1249-1G->A	R560S	2790-1G->C
Q98X	1259insA	A561E	Q890X
442delA	1288insTA	V562I	S912X
444delA	W401X	1824delA	2869insG
457TAT->G	1341+1G->A	1833delT	Y913X
D110H	1343delG	Y569D	2896insAG
R117C	Q414X	E585X	L927P
R117H;5T	D443Y	1898+1G->A	2942insT
541delC	1461ins4	1898+1G->C	2957delT
574delA	1471delA	CFTRdele13,14a	S945L
602del14	A455E	1898+3A->G	2991del32
621+1G->T	1497delGG	1898+5G->T	3007delG
3120G->A	3132delTG	H1054D	3028delA
CFTRdele17a,17b	3171delC	G1061R	G970R
CFTRdele17a-18	3171insC	L1065P	CFTRdele16-17b

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

3120+1G->A	Q1042X	R1066C	L1077P
3121-1G->A	3271delGG	R1066H	W1089X
3121-2A->G	3272-26A->G	3600G->A	Y1092X
3121-977_3499+248del2515	3600G->A	CFTRdele19	W1098X
3349insT	CFTRdele19	CFTRdele19-21	M1101K
3659delC	CFTRdele19-21	3600+2insT	R1102X
3667ins4	3600+2insT	3600+5G->A	E1104X
S1196X	3600+5G->A	R1158X	3500-2A->G
3737delA	R1158X	R1162X	W1145X
W1204X	R1162X	W1282X	CFTRdele22-24
3791delC	3849G->A	4005+1G->A	CFTRdele22,23
Y122X	3849+4A->G	CFTRdele21	Q1330X
3821delT	3849+40A->G	4005+2T->C	G1349D
I1234V	3849+10kbC->T	4010del4	4209TGTT->AA
4326delTC	3850-1G->A	4015delA	4218insT
Q1411X	3850-3T->G	4016insT	E1371X
Q1412X	G1244E	4022insT	4259del5
4374+1G->T	3876delA	4021dupT	Q1382X
4374+1G->A	3878delG	4040delA	4279insA
4382delA	S1251N	N1303K	S1255P
4428insGA	L1254X	Q1313X	S1255X
3905insT	D259G		

10

20

30

【0052】

ある実施形態では、患者は、CTFR陰イオンチャネルに2つの変異を有し、その2つの変異は、それぞれ独立して、2184delA、F508del、V520F、1717-1G->A、E60X、G551D、R553X、およびD259Gから選択される。

【0053】

ある実施形態では、患者は、F508del / F508del、G551D / F508del、R553X / E60X、F508del / 1717-1G->A、F508del / 2184delA、およびD259G / V520Fから選択される一対のCTFR変異を有する。

【0054】

ある実施形態では、患者は、F508del / F508del、R553X / E60X、F508del / 1717-1G->A、F508del / 2184delA、およびD259G / V520Fから選択される一対のCTFR変異を有する。

【0055】

ある実施形態では、本発明の方法は、従来のCF治療薬による治療に対して典型的に不応答性(non-responsive)または最小応答性(minimally-responsive)である様々なCF遺伝子型の治療において有用である。例えば、CTFR変異のD259G / V520Fペアを有する患者のV520F対立遺伝子は、イバカフトールによる治療に不応性(refractory)である。

【0056】

40

50

したがって、ある実施形態では、本明細書に記載の嚢胞性線維症を治療する方法は、C F 遺伝子型にとらわれない。

【0057】

一部の実施形態において、本明細書に記載の方法のいずれかは、不応性または抵抗性の嚢胞性線維症を治療する。一部の実施形態では、嚢胞性線維症は、1つ以上の嚢胞性線維症治療に対して不応性または抵抗性である。

【0058】

ある実施形態では、嚢胞性線維症はイバカフトールによる治療に不応性である。

【0059】

一部の実施形態では、嚢胞性線維症を治療する方法は、治療有効量の抗生物質を患者に投与することをさらに含む。

10

【0060】

ある態様では、嚢胞性線維症の患者の気道表面液のpHを高める方法であって、嚢胞性線維症の患者に、治療有効量の(i)アムホテリシンB(AMB)またはその薬学的に許容される塩もしくはその水和物、および(ii)ステロールまたはその薬学的に許容される塩を投与し、それにより嚢胞性線維症の患者の気道表面液のpHを高めることを含む方法を本明細書において提供する。

【0061】

対象における気道表面液(ASL)のpHは、当業者に知られている任意の技術を用いて測定することができる。例えば、気道pHは、気管表面に平面pH感受性プローブを設置することによって測定することができる。Pezzulo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113。

20

【0062】

対象におけるASLのpHは、非処置対象のASLのpHよりも測定可能な程度高い場合に高められたという。一実施形態では、対象におけるASLのpHは、本発明の方法による処置の前または処置から一定期間において測定された同じ対象のASLのpHよりも測定可能な程度高い場合に高められたという。

【0063】

気道表面液のpHを高めるそのような方法は実施例2に記載されている。驚くべきことに、ASLのpHの救済は、広範囲のAMB:ステロール濃度で観察される。したがって、本明細書に記載のASLのpHを高める方法は、臨床応用に重要な意義を有する。

30

【0064】

ある実施形態では、pHの上昇は0.01pH単位~2.0pH単位であってよい。ある実施形態では、pHの上昇は0.01pH単位~1.0pH単位であってよい。ある実施形態では、pHの上昇は0.01pH単位~0.5pH単位であってよい。ある実施形態では、pHの上昇は0.01pH単位~0.4pH単位であってよい。ある実施形態では、pHの上昇は0.01pH単位~0.3pH単位であってよい。ある実施形態では、pHの上昇は0.01pH単位~0.2pH単位であってよい。ある実施形態では、pHの上昇は0.01pH単位~0.1pH単位であってよい。

【0065】

40

一部の実施形態では、pHの上昇は、本明細書に記載の組成物のいずれか1つの頂端添加による。

【0066】

一部の実施形態では、ASLのpHの上昇は、頂端溶液のアルカリ化に相関する。一部の実施形態では、頂端溶液のアルカリ化は重炭酸イオン依存性である。一部の実施形態では、頂端チャンバのアルカリ化の増進は、側底の重炭酸イオンの存在下で生じる。

【0067】

一部の実施形態では、ASLのpHの上昇は、CFTR活性/表面へのトラフィッキング(輸送)を高めるまたは膜の完全性を破壊することによるものではない。

【0068】

50

ある実施形態では、ステロールは、コレステロール、カンペステロール、 Δ^5 -シトステロール、 24 -イソプロピルコレステロール、ニカステロール、ラノステロール、 7 -デヒドロコレステロール、デスモステロール、 4 -メチルコレスタン- $8(14)$, 24 -ジエン- 3 -オール、ゴルゴステロール、ジノステロール、 $24S$ -ヒドロキシコレステロール、 5 -コレスタン-ヘキサオール、シクロアルテノール、スチグマステロール、フコステロール、エルゴステロール、アントロステロール、サリンゴステロール、シトステロール、コプロスタノール、アベナステロール、ジヒドロコレステロール、スチグマスタノール、カンペスタノール、ブラシカステロール、およびルペオールからなる群より選択される。

【0069】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールは約 $1:1$ ~ 約 $1:15$ の範囲のモル比で投与される。

【0070】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールは約 $1:1$ ~ 約 $1:12$ の範囲のモル比で投与される。ある実施形態では、A m B とステロールは約 $1:1$ ~ 約 $1:10$ の範囲のモル比で投与される。

【0071】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールのモル比は約 $1:1$ ~ 約 $1:14$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:1$ ~ 約 $1:13$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:1$ ~ 約 $1:11$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:1$ ~ 約 $1:9$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:1$ ~ 約 $1:8$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:1$ ~ 約 $1:7$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:1$ ~ 約 $1:6$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:1$ ~ 約 $1:5$ である。ステロールがコレステロールではないある実施形態では、モル比は約 $1:2$ ~ 約 $1:12$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:2$ ~ 約 $1:10$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:2$ ~ 約 $1:9$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:2$ ~ 約 $1:8$ である。そのようなある実施形態では、モル比は約 $1:2$ ~ 約 $1:7$ である。このようなある実施形態では、モル比は約 $1:2$ ~ 約 $1:6$ である。そのようなある実施形態では、モル比は約 $1:2$ ~ 約 $1:5$ である。

【0072】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールは、約 $1:1$ ~ 約 $1:5$ の範囲のモル比で投与される。このようなある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールは、約 $1:3$ ~ 約 $1:5$ の範囲のモル比で投与される。

【0073】

あるいは、他の実施形態では、ステロールはコレステロールである。

【0074】

ステロールがコレステロールであるいくつかの実施形態では、A m B とステロールは、約 $1:1$ ~ 約 $1:2.5$ の範囲のモル比、好ましくは約 $1:2.5$ のモル比で投与される。

【0075】

ある実施形態では、ステロールはエルゴステロールではない。

【0076】

ステロールがエルゴステロールであるいくつかの実施形態では、A m B とステロールは、約 $1:1$ ~ 約 $1:2.5$ の範囲のモル比、好ましくは約 $1:2.5$ のモル比で投与される。

【0077】

ある実施形態では、A m B とステロールは、別個の医薬組成物として投与される。

【0078】

A m B とステロールの別個の医薬組成物は同時に投与してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 9 】

あるいは、A m B とステロールの別個の医薬組成物は異なる時に投与してもよい。例えば、一部の実施形態では、ステロールは、A m B の前または後の約 5 分以内～約 1 6 8 時間以内に投与される。

【 0 0 8 0 】

他の実施形態では、A m B とステロールは、単一の医薬組成物で投与される、すなわち、A m B とステロールは単一の医薬組成物中に処方される。

【 0 0 8 1 】

ある実施形態では、A m B とステロールは複合体として存在する。

【 0 0 8 2 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは全身投与される。

【 0 0 8 3 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは静脈内投与される。

【 0 0 8 4 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは対象の気道に投与される。例えば、気管支肺胞洗浄 (B A L) によってまたはエアロゾルによって、対象の気道に組成物を投与することができる。本明細書で使用される場合、「対象の気道」とは、以下の肺構造のいずれかまたはすべてを指す：気管、気管支、細気管支、肺胞。ある実施形態では、対象の気道は、いわゆる誘導気道、すなわち、以下の肺構造のいずれかまたはすべてを指す：気管、気管支、および細気管支。

【 0 0 8 5 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは、対象の気道にエアロゾルとして投与される。

【 0 0 8 6 】

ある実施形態では、患者は、C T F R 陰イオンチャネルに 2 つの変異を有し、2 つの変異は、それぞれ独立して上記の表 1 から選択される。

【 0 0 8 7 】

ある実施形態では、患者は、C T F R 陰イオンチャネルに 2 つの変異を有し、その 2 つの変異は、それぞれ独立して、2 1 8 4 d e l A、F 5 0 8 d e l、V 5 2 0 F、1 7 1 7 - 1 G - > A、E 6 0 X、G 5 5 1 D、R 5 5 3 X、および D 2 5 9 G から選択される。

【 0 0 8 8 】

ある実施形態では、患者は、F 5 0 8 d e l / F 5 0 8 d e l、G 5 5 1 D / F 5 0 8 d e l、R 5 5 3 X / E 6 0 X、F 5 0 8 d e l / 1 7 1 7 - 1 G - > A、F 5 0 8 d e l / 2 1 8 4 d e l A、および D 2 5 9 G / V 5 2 0 F から選択される一対の C T F R 変異を有する。

【 0 0 8 9 】

ある実施形態では、患者は、F 5 0 8 d e l / F 5 0 8 d e l、R 5 5 3 X / E 6 0 X、F 5 0 8 d e l / 1 7 1 7 - 1 G - > A、F 5 0 8 d e l / 2 1 8 4 d e l A、および D 2 5 9 G / V 5 2 0 F から選択される一対の C T F R 変異を有する。

【 0 0 9 0 】

ある実施形態では、本発明の方法は、従来の C F 治療薬による治療に対して典型的に不応答性または最小応答性である様々な C F 遺伝子型のいずれか 1 つを有する患者の気道表面液の pH を高めるのに有用である。

【 0 0 9 1 】

したがって、ある実施形態では、本明細書に記載の A S L の pH を高める方法は、患者の C F 遺伝子型にとらわれない。

【 0 0 9 2 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、不応性または抵抗性の嚢胞性線維症の患者の A S L の pH を高める。一部の実施形態では、嚢胞性線維症は、イバカフトールなどの 1 つまたは複数の嚢胞性線維症治療薬に対して不応性または抵抗性である。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 3 】

一部の実施形態では、その方法は、治療有効量の抗生物質を患者に投与することをさらに含む。

【 0 0 9 4 】

ある態様では、嚢胞性線維症の患者の気道表面液の粘度を低下させる方法であって、嚢胞性線維症の患者に、治療有効量の (i) アムホテリシン B (A m B) またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および (i i) ステロールまたはその薬学的に許容される塩を投与し、それにより嚢胞性線維症の患者の気道表面液の粘度を低下させることを含む方法を本明細書で提供する。

【 0 0 9 5 】

ある実施形態では、ステロールは、コレステロール、カンペステロール、 Δ^5 -シトステロール、 Δ^4 -イソプロピルコレステロール、ニカステロール、ラノステロール、 Δ^7 -デヒドロコレステロール、デスモステロール、 Δ^4 -メチルコレスタン-8(14), $\Delta^2,4$ -ジエン-3-オール、ゴルゴステロール、ジノステロール、 $\Delta^2,4$ S-ヒドロキシコレステロール、 Δ^5 -コレスタン-ヘキサオール、シクロアルテノール、スチグマステロール、フコステロール、エルゴステロール、アントロステロール、サリンゴステロール、シトステロール、コプロスタノール、アベナステロール、ジヒドロコレステロール、スチグマスタノール、カンペスタノール、ブラシカステロール、およびルペオールからなる群より選択される。

【 0 0 9 6 】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールは、約 1 : 1 ~ 約 1 : 1 5 の範囲のモル比で投与される。

【 0 0 9 7 】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールは約 1 : 1 ~ 約 1 : 1 2 の範囲のモル比で投与される。ある実施形態では、A m B とステロールは約 1 : 1 ~ 約 1 : 1 0 の範囲のモル比で投与される。

【 0 0 9 8 】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールのモル比は約 1 : 1 ~ 約 1 : 1 4 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 1 ~ 約 1 : 1 3 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 1 ~ 約 1 : 1 1 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 1 ~ 約 1 : 9 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 1 ~ 約 1 : 8 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 1 ~ 約 1 : 7 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 1 ~ 約 1 : 6 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 1 ~ 約 1 : 5 である。ステロールがコレステロールではないある実施形態では、モル比は約 1 : 2 ~ 約 1 : 1 2 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 2 ~ 約 1 : 1 0 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 2 ~ 約 1 : 9 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 2 ~ 約 1 : 8 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 2 ~ 約 1 : 7 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 2 ~ 約 1 : 6 である。このようなある実施形態では、モル比は約 1 : 2 ~ 約 1 : 5 である。

【 0 0 9 9 】

ある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールは、約 1 : 1 ~ 約 1 : 5 の範囲のモル比で投与される。このようなある実施形態では、ステロールはコレステロールではなく、A m B とステロールは約 1 : 3 ~ 約 1 : 5 の範囲のモル比で投与される。

【 0 1 0 0 】

あるいは、他の実施形態では、ステロールはコレステロールである。

【 0 1 0 1 】

ステロールがコレステロールであるいくつかの実施形態では、A m B とステロールは、約 1 : 1 ~ 約 1 : 2 . 5 の範囲のモル比、好ましくは約 1 : 2 . 5 のモル比で投与される。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

ある実施形態では、ステロールはエルゴステロールではない。

【 0 1 0 3 】

ステロールがエルゴステロールであるいくつかの実施形態では、A m B とステロールは、約 1 : 1 ~ 約 1 : 2 . 5 の範囲のモル比、好ましくは約 1 : 2 . 5 のモル比で投与される。

【 0 1 0 4 】

ある実施形態では、A m B とステロールは、別個の医薬組成物として投与される。

【 0 1 0 5 】

A m B とステロールの別個の医薬組成物は同時に投与してもよい。

10

【 0 1 0 6 】

あるいは、A m B とステロールの別個の医薬組成物は、異なる時に投与してもよい。例えば、一部の実施形態では、ステロールは、A m B の前または後の約 5 分以内 ~ 約 1 6 8 時間以内に投与される。

【 0 1 0 7 】

他の実施形態では、A m B とステロールは、単一の医薬組成物で投与され、すなわち、A m B とステロールは単一の医薬組成物中に処方される。

【 0 1 0 8 】

ある実施形態では、A m B とステロールは複合体として存在する。

【 0 1 0 9 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは全身投与される。

20

【 0 1 1 0 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは静脈内投与される。

【 0 1 1 1 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは対象の気道に投与される。例えば、気管支肺胞洗浄 (B A L) によってまたはエアロゾルによって、組成物を対象の気道に投与することができる。本明細書で使用される場合、「対象の気道」とは、以下の肺構造のいずれかまたはすべてを指す：気管、気管支、細気管支、肺胞。ある実施形態では、対象の気道は、いわゆる誘導気道、すなわち、以下の肺構造のいずれかまたはすべてを指す：気管、気管支、および細気管支。

30

【 0 1 1 2 】

ある実施形態では、A m B およびステロールは、対象の気道にエアロゾルとして投与される。

【 0 1 1 3 】

ある実施形態では、患者は、C T F R 陰イオンチャネルに 2 つの変異を有し、その 2 つの変異は、それぞれ独立して上記の表 1 から選択される。

【 0 1 1 4 】

ある実施形態では、患者は、C T F R 陰イオンチャネルに 2 つの変異を有し、その 2 つの変異は、それぞれ独立して、2 1 8 4 d e l A、F 5 0 8 d e l、V 5 2 0 F、1 7 1 7 - 1 G - > A、E 6 0 X、G 5 5 1 D、R 5 5 3 X、および D 2 5 9 G から選択される。

40

【 0 1 1 5 】

ある実施形態では、患者は、F 5 0 8 d e l / F 5 0 8 d e l、G 5 5 1 D / F 5 0 8 d e l、R 5 5 3 X / E 6 0 X、F 5 0 8 d e l / 1 7 1 7 - 1 G - > A、F 5 0 8 d e l / 2 1 8 4 d e l A、および D 2 5 9 G / V 5 2 0 F F から選択される一対の C T F R 変異を有する。

【 0 1 1 6 】

ある実施形態では、患者は、F 5 0 8 d e l / F 5 0 8 d e l、R 5 5 3 X / E 6 0 X、F 5 0 8 d e l / 1 7 1 7 - 1 G - > A、F 5 0 8 d e l / 2 1 8 4 d e l A、および D 2 5 9 G / V 5 2 0 F から選択される一対の C T F R 変異を有する。

【 0 1 1 7 】

50

ある実施形態では、本発明の方法は、従来のＣＦ治療薬による治療に対して典型的に不応性または最小応答性である様々なＣＦ遺伝子型のいずれか１つを有する患者の気道表面液の粘度を低下させるのに有用である。

【０１１８】

したがって、ある実施形態では、本明細書に記載のＡＳＬ粘度を低下させる方法は、患者のＣＦ遺伝子型にとらわれない。

【０１１９】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、不応性または抵抗性の嚢胞性線維症の患者のＡＳＬ粘度を低下させる。一部の実施形態では、嚢胞性線維症は、イバカフトールなどの１つまたは複数の嚢胞性線維症治療薬に対して不応性または抵抗性である。

10

【０１２０】

一部の実施形態では、その方法は、治療有効量の抗生物質を患者に投与することをさらに含む。

【０１２１】

前述の各実施形態によれば、ある実施形態では、患者はヒトである。

【０１２２】

前述の各実施形態によれば、ある実施形態では、患者は１２歳未満である。

【０１２３】

前述の各実施形態によれば、ある実施形態では、患者は１２歳以上である。例えば、ある実施形態では、患者は少なくとも１２歳～約１６歳である。ある他の実施形態では、患者は約１６歳～約２４歳である。ある他の実施形態では、患者は約２４歳～約３０歳である。ある他の実施形態では、患者は約３０歳～約４０歳である。他のある実施形態では、患者は約４０歳～約５０歳である。ある他の実施形態では、患者は約５０歳～約６０歳である。ある他の実施形態では、患者は約６０～約７０歳である。ある他の実施形態では、患者は約７０歳～約８０歳である。

20

【０１２４】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、頂端膜を透過性にする。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、プロトンに対して頂端膜を透過性にする。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、重炭酸陰イオンに対して頂端膜を透過性にする。

30

【０１２５】

製剤

本発明で使用される製剤は、薬学的に許容される濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合性のある担体、アジュバント、および任意選択で他の治療成分を通常含みうる薬学的に許容される溶液中において投与してよい。

【０１２６】

アムホテリシンＢは、デオキシコール酸ベースの製剤や脂質ベース（リポソームを含む）の製剤など、多くの製剤で市販されている。本発明の目的のために、ＡｍＢは、ステロールと共に製剤化される。ある実施形態では、そのような製剤は、ＡｍＢとステロールとの間で形成された複合体を含む。

40

【０１２７】

治療での使用に関して、有効量の本発明の活性化合物または組成物を、所望の場所または表面に化合物または組成物を送達する任意の用法で対象に投与することができる。本発明の医薬組成物の投与は、当業者に知られている任意の手段によって達成することができる。投与経路には、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、直接注入（例えば、腫瘍または膿瘍内）、粘膜、吸入、および局所が含まれるが、これらに限定されない。

【０１２８】

ある好ましい実施形態では、化合物または組成物は全身投与される。ある好ましい実施形態では、化合物または組成物は静脈内投与される。

50

【 0 1 2 9 】

ある好ましい実施形態では、化合物または組成物は気道に投与される。ある好ましい実施形態では、化合物または組成物はエアロゾルとして気道に投与される。

【 0 1 3 0 】

凍結乾燥製剤は、通常、投与の直前に、例えば滅菌水または生理食塩水などの適切な水溶液中に再構成される。

【 0 1 3 1 】

経口投与の場合、活性化化合物を当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって、化合物（すなわち、本発明の化合物、および他の治療剤）を容易に製剤化することができる。そのような担体は、本発明の化合物を、治療対象による経口摂取のために、錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤化することを可能にする。経口用途のための医薬調製物は、固体の賦形剤として得ることができ、任意選択で、必要に応じて適切な助剤を加えた後、得られた混合物を粉碎し、顆粒の混合物を加工して、錠剤または糖衣錠のコアを得る。適切な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む糖類などの充填剤；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）などのセルロース調製物などである。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（例えばアルギン酸ナトリウム）などの崩壊剤を加えてもよい。任意選択で、経口製剤は、生理食塩水、または例えば内部の酸性状態を中和するためのEDTAなどの緩衝液中に製剤化してよく、あるいはいずれの担体も使用せずに投与してもよい。

【 0 1 3 2 】

上記の1つ以上の成分の経口剤形も具体的に企図されている。1つ以上の成分を、誘導体の経口送達が有効になるように化学的に修飾してもよい。一般に、考えられる化学的修飾は、成分分子自体への少なくとも1つの部分の付加であり、その部分は、（a）酸加水分解の阻害；および（b）胃または腸から血流への取り込みを可能にする。1つ以上の成分の全体的な安定性の向上、および体内における循環時間の増加もまた所望される。このような部分の例には、ポリエチレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびポリプロリンなどが含まれる。Abuchowski and Davis, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", In: Enzymes as Drugs, Hoenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, N.Y., pp. 367-383 (1981); Newmark et al., J Appl Biochem 4:185-9 (1982)。使用可能な他のポリマーは、ポリ-1,3-ジオキソランおよびポリ-1,3,6-チオキソカンである。上記のように、医薬用途に好ましいものはポリエチレンである。

【 0 1 3 3 】

成分（または誘導体）について、放出場所は、胃、小腸（十二指腸、空腸、または回腸）、または大腸であってよい。当業者は、胃内では溶解しないで、十二指腸または腸の他の場所において物質を放出する利用可能な製剤を有する。好ましくは、放出は、本発明の化合物（または誘導体）の保護によるか、あるいは例えば腸におけるなど胃内環境を過ぎてからの生物活性物質の放出によるかのいずれかにより、胃内環境の有害な影響を回避する。

【 0 1 3 4 】

十分な胃耐性を確保するためには、少なくともpH5.0に対して非浸透性のコーティングが不可欠である。腸溶性コーティングとして用いられるより一般的な不活性成分の例は、セルロースアセテートトリメリテート（CAT）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート（HPMCP）、HPMCP 50、HPMCP 55、ポリビニルアセテートフタレート（PVAP）、オイラギット（Eudragit）L30D、アクアテリ

ック (Aquateric)、セルロースアセテートフタレート (CAP)、オイラギット L、オイラギット S、およびシェラックである。これらのコーティングは、混合膜として使用してもよい。

【0135】

コーティングまたはコーティング混合物は、胃からの保護を目的としていない錠剤でも使用できる。このコーティングには、糖衣、あるいは錠剤を飲み込み易くするコーティングが含まれていてもよい。カプセルは、乾燥治療薬（例えば粉末）の送達用の硬質シェル（ゼラチンなど）で構成されていてもよい；液体形態では、軟質ゼラチンシェルを使用してもよい。カシエ剤のシェル材料は、濃デンプンまたは他の食用紙であってよい。丸薬、トローチ剤、成形錠剤または粉薬錠剤については、湿式塊化法 (moist massing techniques) を使用することができる。

10

【0136】

治療薬は、粒径約 1 mm の顆粒またはペレットの形態の細かい多微粒子として、製剤中に含めてもよい。カプセル投与用の材料の製剤は、粉末、軽度に圧縮されたプラグ (lightly compressed plugs)、または錠剤であってよい。治療薬は圧縮によって調製することができる。

【0137】

着色剤および香味剤はすべて含めてよい。例えば、本発明の化合物（または誘導体）を（リポソームまたはマイクロスフェアのカプセル化などにより）製剤化し、次いで、着色剤および香味剤を含有する冷蔵飲料などの可食製品内にさらに含めてよい。

20

【0138】

不活性物質を用いて、治療薬を希釈しまたはその容積を増加させてもよい。これらの希釈剤には、特に、マンニトール、- ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、改質デキストランおよびデンプンなどの炭水化物が含まれる。例えば三リン酸カルシウム、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムなどを含む、特定の無機塩を充填剤として使用してもよい。幾つかの市販の希釈剤としては、ファスト-フロ (Fast-Fro)、エムデックス (Emdex)、STA-Rx 1500、エンコンプレス (Emcompress) およびアビセル (Avicell) がある。

【0139】

治療薬を固体剤形に製剤化する際に崩壊剤を含めてもよい。崩壊剤として使用される材料には、限定はされないが、デンプンベースの市販の崩壊剤であるエキスプロタブ (ExploTab) などのデンプンが含まれる。デンプングリコール酸ナトリウム、アンバーライト (Amberlite)、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸型カルボキシメチルセルロース、天然のスポンジ、およびベントナイトをすべて使用できる。崩壊剤の別の形態は、不溶性陽イオン交換樹脂である。粉末状ガムは、崩壊剤としておよび結合剤として使用することができ、寒天、カラヤまたはトラガカントなどの粉末状ガムが含まれる。アルギン酸およびそのナトリウム塩も崩壊剤として有用である。

30

【0140】

治療剤と一緒に保持して硬質の錠剤を形成するために結合剤を使用してもよく、結合剤には、アカシア、トラガカント、デンプンおよびゼラチンなどの天然物由来の材料が含まれる。他には、メチルセルロース (MC)、エチルセルロース (EC)、およびカルボキシメチルセルロース (CMC) などが含まれる。ポリビニルピロリドン (PVP) およびヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) は両方とも、治療薬を粒状にするためにアルコール溶液中において使用することができる。

40

【0141】

減摩剤 (anti-frictional agent) は、製剤プロセス中の粘着を防止するために治療薬の製剤中に含めてよい。潤滑剤は、治療薬とダイ壁との間の層として使用してよく、これらには、ステアリン酸ならびにそのマグネシウムおよびカルシウム塩、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、流動パラフィン、植物油およびワックスが含まれるが、これらに

50

限定はされない。ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、さまざまな分子量のポリエチレングリコール、Carbowax 4000および6000などの可溶性潤滑剤も使用してよい。

【0142】

製剤化中の薬物の流動特性を改善し、圧縮中の再配置を補助しうる流動促進剤(glidant)を添加してもよい。流動促進剤には、デンプン、タルク、焼成シリカおよびケイ酸アルミニウム水和物(hydrated silicoaluminate)が含まれる。

【0143】

水性環境中への治療薬の溶解を補助するために、サーファクタントを湿潤剤として添加してもよい。サーファクタントには、ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウムおよびスルホン酸ジオクチルナトリウムなどの陰イオン性界面活性剤が含まれる。使用可能な陽イオン性界面活性剤としては、塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムが挙げられる。製剤にサーファクタントとして含まれるうる非イオン性界面活性剤としては、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50および60、モノステアリン酸グリセリル、ポリソルベート40、60、65および80、ショ糖脂肪酸エステル、メチルセルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースが挙げられる。これらのサーファクタントは、本発明の化合物または誘導体の製剤中に、単独でまたはさまざまな比率の混合物として存在することができる。

【0144】

経口で用いることができる医薬製剤には、ゼラチンで作られた押し込み式(push-fit)カプセル、ならびにゼラチン、およびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤で作られた軟質の密封カプセルが含まれる。押し込み式カプセルは、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、および/または、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、ならびに任意選択で安定剤と混合して、活性成分を含むことができる。軟質カプセルでは、活性化化合物は、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体に溶解または懸濁させることができる。さらに、安定剤を添加してもよい。経口投与用に製剤化されたマイクロスフェアも使用してよい。このようなマイクロスフェアは、当技術分野で十分に定義されている。経口投与用のすべての製剤は、そのような投与に適した用量である。

【0145】

口腔内投与用に、組成物は、従来のやり方で製剤化された錠剤またはトローチ剤の形態をとることもできる。

【0146】

吸入による投与の場合、本発明に従う使用のための化合物および組成物は、例えば、ジクロロジフルオロメタン、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の適切な噴射剤を使用して、加圧バックまたはネブライザーから、エアロゾルスプレーの形態で都合よく送達させることができる。加圧エアロゾルの場合には、投薬単位は、定量を送達するためのバルブを設けることによって決定することができる。吸入器または吹送器(insufflator)で使用するための例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物とラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤との粉末混合物を含めて作成することができる。

【0147】

本発明の化合物(またはその誘導体)の肺送達も本明細書において企図されている。本発明の化合物(または誘導体)は、吸入中に哺乳動物の肺に送達され、肺上皮の内膜を横切って血流へと移動する。吸入分子の他の報告として、Adjei et al., Pharm Res 7:565-569(1990); Adjei et al., Int J Pharmaceutics 63:135-144(1990)(酢酸リュープロリド); Braquet et al., J Cardiovasc Pharmacol 13(suppl. 5):143-146(1989)(エンドセリン-1); Hubbard et al., Annal Int Med 3:206-212(1989)(1-アンチトリプシン); Smith et al., 1989, J Clin Invest 84:1145-1146(a-1-プ

10

20

30

40

50

ロテイナーゼ) ; Oswein et al., 1990, "Aerazolization of proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March (組換えヒト成長ホルモン) ; Debs et al., 1988, J Immunol 140:3482-3488 (インターフェロン - および腫瘍壊死因子) 、および、Platzらの米国特許第5, 284, 656号(顆粒球コロニー刺激因子)が挙げられる。全身作用のための薬物の肺送達の方法および組成物は、1995年9月19日に発行されたWongらの米国特許第5, 451, 569号(参照により取り込まれる)に記載されている。

【0148】

ネブライザー、定量吸入器、および粉末吸入器を含むがこれらに限定されない、治療薬品の肺送達用に設計された広範な機械装置が、本発明の実施での使用に企図されており、それらのすべてが当業者によく知られている。

10

【0149】

本発明の実施に適した市販の装置の幾つかの具体例としては、米国ミズーリ州セントルイス所在のMallinckrodt, Inc.のUltraventネブライザー; 米国コロラド州エングルウッド所在のMarquest Medical ProductsのAcorn IIネブライザー; 米国ノースカロライナ州リサーチ・トライアングル・パーク所在のGlaxo Inc.のVentolin定量吸入器; および、米国マサチューセッツ州ベッドフォード所在のFisons Corp.のSpinhaler粉末吸入器がある。

【0150】

20

このような装置はすべて、本発明の化合物(または誘導体)の投薬に適した製剤の使用を必要とする。典型的には、各製剤は、用いられる装置の種類に固有であり、治療に有用な通常の希釈剤、アジュバント、および/または担体に加えて、適切な噴射剤物質の使用も含んでいてよい。また、リポソーム、マイクロカプセルまたはマイクロスフェア、包接複合体、または他の種類の担体の使用も企図されている。化学修飾された本発明の化合物もまた、化学修飾の種類または用いられる装置の種類に応じて、さまざまな製剤に調製することができる。

【0151】

ジェット式または超音波式のネブライザーとともに使用するのに適した製剤は、典型的には、溶液1mLあたり約0.1~25mgの生物学的に活性な本発明の化合物の濃度で水に溶解した本発明の化合物(または誘導体)を含む。製剤はまた、緩衝剤および単糖も含んでいてよい(例えば本発明の化合物の安定化および浸透圧の調節のため)。ネブライザー製剤はまた、エアロゾルを形成する際に溶液の噴霧化により生じる本発明の化合物の表面誘導性凝集を低減または防ぐために、サーファクタントを含んでいてよい。

30

【0152】

定量吸入デバイスで使用する製剤は、一般に、サーファクタントの助けを借りて噴射剤に懸濁された本発明の化合物(または誘導体)を含む微細化粉末を含む。噴射剤は、クロロフルオロカーボン、ハイドロクロロフルオロカーボン、ハイドロフルオロカーボン、もしくは、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、および1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン、またはそれらの組合せを含む炭化水素など、この目的に用いられる通常の方法であってよい。適切なサーファクタントには、ソルビタントリオレートおよび大豆レシチンが含まれる。オレイン酸もまた、サーファクタントとして有用である。

40

【0153】

粉末吸入器から投薬するための製剤は、本発明の化合物(または誘導体)を含む微細化乾燥粉末を含み、ラクトース、ソルビトール、スクロース、またはマンニトールなどの増量剤も、例えば製剤の50~90質量%など、装置からの粉末の分散を促進する量で含んでいてよい。本発明の化合物(または誘導体)は、有利には、肺深部への最も効果的な送達のために、10マイクロメートル(μm)未満、最も好ましくは0.5~5 μm の平均粒径を有する微粒子形態に調製される。

50

【0154】

本発明の医薬組成物の経鼻送達も企図されている。経鼻送達は、肺に薬品を堆積させる必要なしに、鼻への治療薬品の投与後直接、血流への本発明の医薬組成物の通過を可能にする。経鼻送達用の製剤には、デキストランまたはシクロデキストランを用いたものが含まれる。

【0155】

経鼻投与の場合、有用な装置は、定量噴霧器が取り付けられた小さい硬質のボトルである。一実施形態では、溶液中の本発明の医薬組成物を規定容量のチャンバ内に引き込むことによって定量が送達され、このチャンバは、チャンバ内の液体が圧縮されたときにスプレーを形成することによってエアロゾル製剤をエアロゾル化するように寸法設定された開口部を有する。チャンバは圧縮されて本発明の医薬組成物を投与する。特定の実施形態では、チャンバはピストン構成である。このような装置は市販されている。

10

【0156】

あるいは、スクイズされたときにスプレーを形成することによってエアロゾル製剤をエアロゾル化するように寸法設定された開口部または開口を備えたプラスチック製のスクイズボトルが用いられる。開口部は、通常、ボトルの上端部に設けられ、この上端部は、エアロゾル製剤の効率的な投与のために、鼻道に部分的に適合するように略テーパー状になっている。好ましくは、鼻吸入器は、薬物の定量投与のために、計量された量のエアロゾル製剤を供給する。

【0157】

20

化合物は、全身送達が望ましい場合には、例えばボーラス注射または持続注入などの注入による非経口投与用に製剤化してもよい。注入用製剤は、例えば、保存剤が添加された、アンプルまたは多回投与用容器などの単位投薬形態で提供してもよい。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルションなどの形態であってよく、懸濁剤、安定剤および/または分散剤などの製剤化剤 (formulatory agents) を含んでいてもよい。

【0158】

非経口投与用の医薬製剤には、水溶性形態の活性化合物の水溶液が含まれる。加えて、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射用懸濁液として調製してもよい。適切な親油性溶媒またはビヒクルには、ゴマ油などの脂肪油、あるいはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、あるいはリポソームが含まれる。水性注射用懸濁液は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランなどの、懸濁液の粘性を高める物質も含んでいてよい。任意選択で、懸濁液は、化合物の溶解性を高めて高濃縮溶液の調製を可能にする適切な安定剤または薬剤も含んでいてもよい。

30

【0159】

あるいは、活性化合物は、使用前に、例えば滅菌した発熱物質を含まない水などの適切なビヒクルで再構成するための粉末の形態であってもよい。

【0160】

化合物はまた、例えばカカオバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を含む、坐剤または停留浣腸などの直腸または腔用組成物に製剤化してもよい。

40

【0161】

上記の製剤に加えて、化合物はデポー製剤として製剤化してもよい。このような長時間作用型の製剤は、適切なポリマー性または疎水性材料 (例えば、許容される油中のエマルションとして) またはイオン交換樹脂を用いて、あるいは例えば難溶性塩などの難溶性誘導体として、製剤化することができる。

【0162】

医薬組成物はまた、適切な固体またはゲル相担体または賦形剤も含んでいてよい。このような担体または賦形剤の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、さまざまな糖類、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどのポリマーが含まれるが、これらに限定されない。

50

【0163】

適切な液体または固体の医薬製剤の形態は、例えば、吸入用の水溶液または生理食塩水、マイクロカプセル化形態、渦巻形内包化 (encochleated) 形態、微細な金粒子上に被覆された形態、リポソームに内包された形態、霧化形態、エアロゾル、皮膚への移植用ペレット、または皮膚を引っ掻くための鋭器上の乾燥形態などである。医薬組成物には、顆粒、粉末、錠剤、コーティング錠、(マイクロ)カプセル、坐剤、シロップ、エマルジョン、懸濁液、クリーム、点滴剤、または、活性化合物が持続放出される製剤も含まれ、これら製剤において、賦形剤および添加剤、および/または、例えば崩壊剤、結合剤、コーティング剤、膨潤剤、潤滑剤、香味剤、甘味剤または可溶化剤などの助剤が、上述したように慣用的に用いられる。医薬組成物は、さまざまな薬物送達システムにおける使用に適している。薬物送達のための方法の簡単なレビューについては、参照によってこの中に組み込まれる Langer R, Science 249:1527-33(1990)を参照されたい。

10

【0164】

本発明の化合物および任意選択で他の治療薬は、それ自体(そのまま)で、または薬学的に許容される塩の形態で投与することができる。医薬に用いられる場合、塩は薬学的に許容されるものであるが、薬学的に許容されない塩は、それらの薬学的に許容される塩の調製に都合よく使用することができる。このような塩には、以下の酸から調製されるものが含まれるが、これらに限られない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸。また、このような塩は、カルボン酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩など、アルカリ金属またはアルカリ土類塩として調製することもできる。

20

【0165】

適切な緩衝剤には、酢酸および塩(1~2% w/v)；クエン酸および塩(1~3% w/v)；ホウ酸および塩(0.5~2.5% w/v)；ならびにリン酸および塩(0.8~2% w/v)が含まれる。適切な保存剤には、塩化ベンザルコニウム(0.003~0.03% w/v)；クロロブタノール(0.3~0.9% w/v)；パラベン(0.01~0.25% w/v)およびチメロサル(0.004~0.02% w/v)が含まれる。

【0166】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体中に含まれる、有効量の本発明の化合物、および任意選択で他の治療剤を含む。用語「薬学的に許容される担体」とは、ヒトまたは他の脊椎動物への投与に適した1つまたは複数の適合性のある固体または液体の充填剤、希釈剤または封入剤を意味する。用語「担体」は、適用を容易にするために活性成分と組み合わせられる天然または合成の有機または無機の成分を意味する。医薬組成物の成分はまた、本発明の化合物と、および互いに、実質的に所望の薬剤効率を損なうような相互作用がない態様で混合可能である。

30

【0167】

特に本発明の化合物を含むがそれに限定されない治療剤を粒子で提供してもよい。本明細書で用いられる粒子は、ナノ粒子またはマイクロ粒子(または、場合によっては、より大きい粒子)を意味し、該粒子は、その全部または一部が本明細書に記載の本発明の化合物または他の治療剤で構成されていてよい。粒子は、コーティングによって取り囲まれたコア内に治療剤を含んでいてよく、そのようなコーティングには腸溶性コーティングが含まれるがそれらに限定されない。治療剤は粒子全体に分散されていてよい。治療剤はまた、粒子に吸着されていてよい。粒子は、ゼロ次放出、一次放出、二次放出、遅延放出、持続放出(徐放)、即時放出、およびそれらの任意の組合せ等を含む、任意の次数の放出速度論を示しうる。粒子は、治療剤に加えて、薬学および医学の分野で日常的に使用される材料のいずれも含んでいてよく、そのような材料には、浸食性(erodible)、非浸食性、生分解性、または非生分解性の材料またはそれらの組合せが含まれるがそれらに限定されない。粒子は、本発明の化合物を溶液または半固体状態で含むマイクロカプセルであってもよい。粒子は、実質的に任意の形状であってよい。

40

50

【 0 1 6 8 】

非生分解性および生分解性の両方のポリマー材料を、治療剤の送達のための粒子の製造に使用することができる。このようなポリマーは、天然のポリマーであっても合成のポリマーであってもよい。ポリマーは、望ましい放出期間に基づいて選択される。特に注目される生体接着性ポリマーとして、Sawhney H S et al. (1993) Macromolecules 26:581-7に記載される生体内分解性のハイドロゲルが挙げられ、その教示が本明細書に組み込まれる。これらには、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸塩、キトサン、ポリ(メタクリル酸メチル)、ポリ(メタクリル酸エチル)、ポリ(メタクリル酸ブチル)、ポリ(メタクリル酸イソブチル)、ポリ(メタクリル酸ヘキシル)、ポリ(メタクリル酸イソデシル)、ポリ(メタクリル酸ラウリル)、ポリ(メタクリル酸フェニル)、ポリ(アクリル酸メチル)、ポリ(アクリル酸イソプロピル)、ポリ(アクリル酸イソブチル)、およびポリ(アクリル酸オクタデシル)が含まれる。

10

【 0 1 6 9 】

治療剤は、制御放出システム内に含まれていてもよい。用語「制御放出」は、製剤からの薬物放出の態様およびプロファイルが制御された、任意の薬物含有製剤を指すことが意図されている。これは、即時放出製剤および非即時放出製剤を指し、非即時放出製剤には、徐放性製剤および遅延放出製剤が含まれるが、これらに限定されない。用語「徐放性」(「持続放出」とも称される)は、通常の意味で用いられ、長期間にわたり薬物の逐次放出をもたらす、好ましくは、必ずというわけではないが、長期間にわたり薬物の実質的に一定の血中レベルをもたらす薬物製剤を指す。用語「遅延放出」は、通常の意味で用いられ、製剤の投与と製剤からの薬物の放出との間に時間的遅延が存在する薬物製剤を指す。「遅延放出」は、長期間にわたる薬物の逐次放出を含んでも含まなくてもよく、したがって、「徐放性」であってもなくてもよい。

20

【 0 1 7 0 】

長期徐放性インプラントの使用は、慢性的な状態の治療に特に適するであろう。「長期」放出は、本明細書で用いられる場合、インプラントが、少なくとも7日間、好ましくは30~60日間、治療レベルの活性成分を送達するように構成および配置されることを意味する。長期徐放性インプラントは、当業者に広く知られており、上記の放出システムのいくつかを含む。

30

【 0 1 7 1 】

投薬 (Dosing)

上記のように、「有効量」とは、所望の生物学的効果を達成するのに十分な任意の量を指す。本明細書で提供される教示とあわせて、さまざまな活性化合物の中から選択し、さらに効力、相対的バイオアベイラビリティ、患者の体重、有害な副作用の重症度、および、好ましい投与方式などの因子に重み付けすることによって、有効な予防的または治療的治療レジメンを、実質的に望ましくない毒性を生じさせずになお特定の対象を治療するのに有効となるように計画することができる。特定の適用のための有効量は、治療される疾患または状態、投与される本発明の特定化合物、対象のサイズ、あるいは疾患または状態の重症度などの因子に応じて変動する。当業者は、本発明の特定化合物および/または他の治療剤の有効量を、過度の実験を必要とすることなく、経験的に決定することができる。一般的に、最大用量、すなわち何らかの医学的判断に従った最高安全用量が用いられることが好ましい。化合物の適切な全身レベルを達成するために、1日当たり複数回の投与が予定されてもよい。適切な全身レベルは、例えば、患者における薬物のピークまたは持続血漿レベルの測定によって決定することができる。「用量」および「投薬量」は本明細書において交換可能に用いられる。

40

【 0 1 7 2 】

一般に、AmBについて測定した1日用量は、ヒト対象について、1日当たり約0.01 mg/kg~1日当たり1000 mg/kgになる。1日当たり1回または数回の投与で、0.5~50 mg/kgの範囲の経口用量が所望の結果をもたらすと期待される。投

50

薬量は、投与形態に応じて、局所または全身の所望の薬物濃度を達成するように適切に調整することができる。例えば、静脈内投与は、1桁から数桁少ない1日当たりの用量であることが予想される。このような用量で対象における応答が不十分な場合には、さらに高い用量（または、異なるより局所的な送達経路による、有効なより高い用量）を、患者の耐容性が許容する程度まで用いてもよい。化合物の適切な全身濃度を達成するために、1日当たり複数回の投与も企図される。

【0173】

一実施形態において、本発明の組成物の静脈内投与は、典型的には、AmBについて測定して、 $0.1\text{ mg/kg/day} \sim 20\text{ mg/kg/day}$ となりうる。従って、静脈内投与量は、AmBの最大耐量と同様であるか、または有利にはAmBの最大耐量を超えてもよい。

10

【0174】

本明細書に記載の任意の化合物または組成物に関して、治療有効量は、最初に動物モデルから特定することができる。治療有効用量はまた、ヒトで試験された本発明の化合物についてのヒトデータ、および他の関連活性薬剤などの同様の薬理学的活性を示すことが知られている化合物についてのヒトデータから決定してもよい。非経口投与には、より高い用量が必要とされるであろう。適用される用量は、投与される化合物の相対的バイオアベイラビリティおよび効力に基づいて調整することができる。上記の方法および当技術分野で周知の他の方法に基づき最大効果を達成するように用量を調整することは、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0175】

20

本明細書に記載の組成物および方法に対する他の適切な変更および適合は、当業者に既知の情報を考慮して、本明細書に含まれる本発明の説明から容易に明らかとなり、さらに本発明またはその任意の実施形態の範囲を逸脱することなく行うことができることは関連分野の当業者に理解されるであろう。

【実施例】

【0176】

本発明を詳細に説明したが、これは、以下の実施例を参照することにより、より明確に理解されるであろう。これらの実施例は、例示のみを目的としてここに含まれ、本発明を限定することを意図しない。

【0177】

30

細胞株および成長条件

NuLi、CuFi-1、およびCuFi-4細胞(15)(アイオワ大学、Welsh研究室)は、最初に凍結ストックから、それぞれ 1.5×10^4 細胞/cm²、 1×10^3 細胞/cm²、および 1×10^4 細胞/cm²で播種して、Thermo Scientific BioLite Cell Culture Treated 75 cm² フラスコで成長させた。これらのフラスコは、事前に3 mLの60 µg/mLのヒト胎盤VI型コラーゲン(Sigma-Aldrich)を用いて室温で最低18時間コーティングし、PBSで2回すすいだ後、播種前に乾燥させた。細胞は、12 mLの気管支上皮細胞増殖培地(BEGM) Bullet Kit (Lonza CC-3170)で培養し、その培地には、基本培地と8つのSingle Quotsのサブプリメント(BPE、2 mL; ヒドロコルチゾン、0.5 mL; hEGF、0.5 mL; エピネフリン、0.5 mL; トランスフェリン、0.5 mL; インスリン、0.5 mL; レチノイン酸、0.5 mL; トリヨードサイロニン、0.5 mL)が含まれる。ゲンタマイシン-アムホテリシンBアリコートは捨てて、代わりに培地に50 µg/mL ペニシリン-ストレプトマイシン(Corning Cellgro)、50 µg/mL ゲンタマイシン(Sigma-Aldrich G1397)、および2 µg/mL のフルコナゾール(Sigma-Aldrich)を補足した。

40

【0178】

2日ごとに培地を交換して37℃、5% CO₂で細胞を90%コンフルエンスまで増殖させた後、1 mM EDTAを含む4 mLの標準0.25%トリプシン(Gibco 25

50

200-056)でトリプシン処理した。1%仔ウシ血清を添加した10mLのHEPES緩衝生理食塩水(Lonza CC-5024)でトリプシンを不活化した。Eppendorf Centrifuge 5430 Rにおいて1500rpmで5分間遠心して細胞を沈降させ、継代のためにBEGM培地に再懸濁させた。

【0179】

分化のために膜支持体上で培養するために、遠心分離後に細胞をUltraser G培地に再懸濁させた。この培地は、1:1の比率のDMEM:2%V/VのUltraser G(Crescent Chemical)を補足したHam F-12で構成される。使用した膜支持体は、候補イオノフォアのウッシング(Ussing)チャンバ研究用のMillicell 0.4µm PCFインサート(0.6cm²)(Millicore PIHP01250)、pHスタット研究用の6ウェルコンパニオンプレート(Fisher 08-771-24)内に0.4µmの透明PETメンブレン(4.67cm²)(Fisher 08-771)を有する6ウェルプレート用のFalcon(登録商標)パーミアブルサポート、および他のすべての研究用のCorning Costar 0.4µm 24ウェルプレート トランズウェルクリアーポリエステルメンブレンインサート(0.33cm²)(Corning 3470)である。これらの膜を上

述したフラスコと同じ方法でコラーゲンによりコーティングした。Millicellインサートにはそれぞれ200,000細胞を播種し、Falconインサートにはそれぞれ500,000細胞を播種し、またトランズウェルインサートにはそれぞれ115,000細胞を播種した。Ultraser G培地を1日おきに交換して、これらの膜を最

低14日間気液界面で成熟させて完全な分化に到達させた(75、52)。完全に成熟すると、培地を7日ごとに交換した。共変量対照(covariate control)について、実験で使用した膜は年齢および成熟度が可能な限り近いものであった。

【0180】

気道上皮の初代培養

気道上皮細胞は、死後標本として、または移植に適さないと見なされた組織から、アイオワドナーネットワーク(Iowa Donor Network)から得られたCFおよび非CF標本のヒト気管および気管支から得た。研究は、アイオワ大学の治験審査委員会によって承認された。プロナーゼ酵素消化後、コラーゲンコーティング半透膜(0.33~1.12cm²、Corning 3470ポリエステル、3460ポリエステル、3413ポリカーボネート)に細胞を播種し、気液界面で成長させた(52)。気道上皮細胞培養物は、それらが分化した後でかつ播種後少なくとも14日後に分析した。

【0181】

統計

除外されたデータはない。データはすべて、最低6生物学的反復での平均値±SEMを表す。ダゴスティノ・ピアソン(DAgostino & Pearson)正規性検定を使用して、データの正規分布を確認した。統計分析は、必要に応じて、一元配置分散分析(one-way ANOVA)、あるいは両側の対応のないまたは対応のあるスチューデントのt検定から得られた、P値を表す。比較群間で分散が均一でない場合は、分散の違いを明らかにするために、ウェルチ補正を使用したパラメトリックt検定を行った。NSは有意ではない。特に明記しない限り、*P 0.05、**P 0.01、***p 0.001、****P 0.0001である。パイロット実験に基づき、群間の結果の違いを検出するために、各実験を適切に強化するサンプルサイズを選択した。サンプルサイズを事前に決定するのに統計的手法は使用しなかった。上皮サンプルを無作為に各実験の対照群と実験群に手動で割り当てた。動物はそれら自身の対照となる。

【0182】

実施例1. 分化ヒト肺上皮の頂端膜を重炭酸イオンに対して透過性にする小分子の発見

リポソーム、細胞、および/またはマウスの鼻上皮を陰イオンに対して透過性にすることが以前報告されている一連の天然物および合成化合物(11-14)を、Ussingチャンバ、および最も一般的な F508 / F508 遺伝子型(CuFi-1)のCF

患者からの不死化気道上皮細胞株に由来する気道上皮の分化培養物（15）を使用して試験した。臨床的に承認された抗真菌天然物アムホテリシンB（AmB）（図1、パネルD）（16）は、短絡電流の変化を引き起こすのに非常に効果的であった。試験した他の化合物のいずれを用いても、これら同じ上皮の透過化はほとんどまたはまったく観察されなかった。それら化合物には、AmBの単原子欠損合成誘導体（C35deOAmB）が含まれ、それはイオンチャネル活性を欠くことが以前示されており（17）、したがってこの誘導体は優れた陰性対照になる。AmBおよびC35deOAmBがコレステロール含有POPCリボソームを横断して重炭酸イオンを輸送する能力を、適応させた ^{13}C MM Rベースアッセイ（18）を使用して試験した。AmBで処理したリボソームから ^{13}C 標識重炭酸イオンの強力かつ迅速な放出が観察されたが、C35deOAmBで処理したものからは観察されなかった（図1、パネルE、F）。

10

【0183】

AmBは真核細胞に毒性となる可能性があり、長い間この毒性は主に膜透過化に起因するとされてきた。このモデルに反して、最近、AmBは単にステロールに結合することによって主に細胞を殺し；チャネル形成は必要ないことが特定された（77、19）。これにより、低用量での投与および／またはステロールとの事前の複合体化により、AmBのイオンチャネル活性をその殺細胞効果から分離することができた。これらアプローチの両方を利用して、最近、AmBがタンパク質イオンチャネル欠損酵母の成長を回復できることが分かった（19、20）。非チャネル形成バリエーションC35deOAmBは、試験したどの濃度でも酵母の成長を救済することができなかった（77、20）。また、AmBがエルゴステロールと事前に複合体化されている場合、酵母の成長の救済が観察される用量の範囲を1桁以上拡大できることも分かった（19、20）。

20

【0184】

実施例2．ASLのpHの変化の検査

この有望な小分子プローブのペアを用いて、正常な肺上皮と比較してCF肺上皮において頂端膜をはさんだpH勾配の利用可能な増大があるという予測（図1、パネルA、B）について試験した。蛍光pH色素（3、4、21）により、正常個体に由来する分化上皮単層（Nuli）（15）と比較して、CuFi-1上皮が細胞内pHの上昇（図2、パネルA）およびASLのpHの低下（図2、パネルB）を有することが確認された。CuFi-1上皮の頂端膜に低濃度のAmB（2 μM ）を添加すると、2時間にわたりpHの漸進的な上昇が生じた（図2、パネルC）。驚くべきことに、その後、同じpH上昇が少なくとも48時間持続した。これは、エアロゾル化された重炭酸緩衝液によって引き起こされるASLのpHへの一時的効果（3、8）とは大きく異なる。非チャネル形成バリエーションC35deOAmBの頂端添加またはAmBの側底膜への添加（側底添加）では、pHの上昇は全く見られなかった（図2、パネルD）。AmBで処理したCuFi-1単層は、フォルスコリン／IBMXに応答した短絡電流の増加を示さず、ASLのpHのAmB媒介性の上昇は、CFTR活性／表面へのトラフィックを高めることによるものではないことを示す。AmBの添加は、膜の完全性も破壊しなかった。

30

【0185】

CuFi-1上皮におけるASLのpHのAmB媒介性の上昇は、2 μM で最大に達し、それより高い濃度では低下する（図2、パネルE）。高濃度でのこの活性の喪失は有毒なコレステロール結合活性によるものであり得ると推測し（17、19）、この濃度依存性実験では、事前に形成したAmB：コレステロール複合体を利用した。ASLのpHの同様の上昇が観察され、その後、非常に高濃度のAmB（100 μM ）まで持続した（図2、パネルE）。同じパターンが、以前にCFTRタンパク質発現を漸進的に増加させたときに観察された（22-24）。次に、臨床的に承認されたりボソーム製剤AmBisomeをこの同じアッセイで試験した。AmBisomeは、AmBとコレステロールを1：2.5（AmB：コレステロール）の比率で含む。100 μM まで維持されたASLのpHの優れた回復が観察された（図5および6）。無毒化チャネルの濃度を増々高めてもこのASLのpHが不変であったこと（図2、パネルE）、およびASLのpHのAm

40

50

B 媒介性の上昇が長時間維持されたこと（図 2、パネル C）は合わせて、この小分子が A S L の pH を制御する堅牢な自己調節ネットワーク（robust auto-regulatory network）と連動（interface）している可能性を示唆する。

【 0 1 8 6 】

実施例 3 . 異なる C F 遺伝子型の調査

この A S L の pH の A m B 媒介性の上昇が遺伝子型非依存性であるかどうかを調べるために、A m B を使用した結果を、遺伝子型特異的な治療薬であるイバカフトールと比較した。イバカフトールは、ゲーティング欠損を引き起こしかつ C F 患者の 2 ~ 4 % に存在する特定の変異（G 5 5 1 D）を有する C F T R の活性を増強する、臨床的に承認された小分子である。G 5 5 1 D 変異を有する患者由来の初代副鼻腔上皮において、イバカフトールは、未処理の対照と比較して、A S L の pH を 0 . 2 0 単位上昇させ、粘度を約 1 . 5 単位低下させた（2 5）。少なくとも 1 つの G 5 5 1 D 対立遺伝子を持つ C F 患者での大規模な臨床試験では、イバカフトールは実質的なプラス効果をもたらし、努力呼気量（forced expiratory volume）が 1 0 % 増加し、体重、生活の質、および肺増悪の発生率が大幅に改善された（2、2 6、2 7）。この化合物は、G 5 5 1 D または類似の対立遺伝子を欠く C F 上皮では恩恵を示さない。

【 0 1 8 7 】

予想通り、C u F i - 1 上皮（F 5 0 8 / F 5 0 8）をイバカフトールで処理しても、A S L の pH の上昇を示さなかった（図 2、パネル D）。前述の臨床データ（2、2 6、2 7）（2 5）と一致して、C u F i - 4 上皮（G 5 5 1 D / F 5 0 8）（2 5）をイバカフトールで処理すると、A S L の pH が 0 . 2 単位上昇した（図 2、パネル F）。これらの遺伝子型特異的な結果とは対照的に、A m B での処理は、C u F i - 1 上皮（図 2、パネル B）および C u F i - 4 上皮（図 2、パネル F）の両方で A S L の pH を高めた。直接比較して、C F T R の薬理的活性化と A m B チャネルの頂端膜への添加（頂端添加）が、同じ ~ 0 . 2 単位の A S L の pH の上昇をもたらしたことは注目に値する（図 2、パネル F）。C u F i - 1 における A S L の pH の A m B 媒介性の上昇は同様の大きさであった（図 2、パネル B）。これはさらに、小分子チャネルが、C F T R と連動して最高の A S L の pH 値を規定する同じ内因性自己調節ネットワークと連動し得ることを示唆する。

【 0 1 8 8 】

実施例 4 . 重炭酸イオンの膜流出の促進における A m B の役割

本発明者らは、A m B が、頂端膜を横切る重炭酸イオンの流出を促進することにより、この A S L の pH の上昇を媒介すると仮定した。A m B はプロトン（H⁺）に対しても透過性であり（2 0）、したがってプロトン吸収の促進は代替的または補完的なメカニズムの可能性を示した。

【 0 1 8 9 】

これを調べるために、重炭酸イオンを含むまたは重炭酸イオンを含まない側底溶液の存在下で、大きな N u L i および C u F i - 1 上皮単層において pH スタット実験を行った（図 3、パネル A）（2 8）。予想通り、N u L i 上皮と比較して C u F i - 1 においてアルカリ化の速度の低下が観察された。A m B の添加は、側底の重炭酸イオン（2 5 m M）の存在下では、用量依存的に C u F i - 1 上皮の頂端チャンバのアルカリ化の速度を高めた（図 3、パネル A）。対照的に、重炭酸イオンを含まない側底緩衝液の存在下では、試験したいずれの濃度の A m B でも、頂端アルカリ化の速度に変化は見られなかった（図 3、パネル A）。これらの結果は、プロトンの流入ではなく重炭酸イオンの流出が A S L の pH の A m B 媒介性の上昇の根底にあることに合致する。

【 0 1 9 0 】

A m B が重炭酸イオンの搬出を促進するかどうかをさらに調査するために、側底緩衝液に¹⁴C 重炭酸イオンを添加し、1 0 分間で A S L に到達する放射性標識の量を定量化した。予想通り、N u L i と比較して、C u F i - 1 上皮では¹⁴C 重炭酸イオンの輸送が大幅に減少する（図 3、パネル B）。A m B の頂端添加により、¹⁴C 重炭酸イオンの割

合が増加し、N u L i 上皮で観察されたものと一致した（図 3、パネル B）。チャンネル不活化誘導体 C 3 5 d e O A m B、および A m B の側底添加は、A S L の ^{14}C 重炭酸イオンの増加をもたらさなかった（図 3、パネル B）。

【 0 1 9 1 】

この重炭酸イオン流出の A m B 媒介性の増加が遺伝子型非依存性であるかどうかを確認するために実験を行った。予想通り、イバカフトールは、C u F i - 4 では重炭酸イオンの流出速度を高めた（図 3、パネル C）が、C u F i - 1 単層では高めなかった（図 3、パネル B）。対照的に、A m B は両方の遺伝子型で有効であった（図 3、パネル B および C）。A S L の pH の結果（図 2、パネル F）と一致して、C F T R の薬理学的活性化と A m B は、C u F i - 4 上皮において、重炭酸イオンの流出速度の同様の上昇をもたらした（図 3、パネル C）。これらの結果は合わせて、重炭酸の輸送が A S L の pH の A m B 媒介性の上昇の根底にあることを支持し、さらに、小分子チャンネルが、通常 C F T R を含む同じ自己調節ネットワークと連動することを示唆する。

【 0 1 9 2 】

このような自己調節の 1 つの潜在的なメカニズムは、 $Na^+ / K^+ A T P a s e$ によって作られるナトリウム勾配により主に駆動される、側底膜を介した重炭酸イオンの取込みの速度である。 $Na^+ / K^+ A T P a s e$ の組織特異的活性は、F X Y D ファミリーのタンパク質によって主に制御されており、生理学的刺激に基づいて調節される（29）。以前の研究は、非 C F 上皮細胞と比較して、C F 上皮細胞において、F X Y D 5 は 3 倍に増加し、 $Na^+ / K^+ A T P a s e$ 活性は 2 倍に上昇することを示した（29、30）。T r k 輸送体を介した酵母へのカリウムの流入は、同様に V - A T P a s e および P m a l によって作られるプロトン勾配により駆動され、T r k 欠損酵母における A m B 媒介性の成長救済は、V - A T P a s e または P m a l の化学的阻害に高感受性である（20）。本発明者らは、C F 上皮における A S L の pH の A m B 媒介性の救済が、 $Na^+ / K^+ A T P a s e$ を化学的に遮断することにより低減されることを特定した。C u F i - 1 上皮の側底緩衝液にウアバインを添加すると、実際に A m B 媒介性の側底側から頂端側への ^{14}C 重炭酸イオンの輸送速度の上昇および A S L の pH の上昇がなくなった（図 3、パネル D、E）。

【 0 1 9 3 】

実施例 5．初代ヒト気道上皮への適用

A m B が遺伝子型非依存的な様式で A S L の pH を回復する能力が、初代ヒト気道上皮に転化できるかどうかを確認するために、広範囲の異なる C F T R 変異を表す 9 人の C F 患者ドナーからサンプルを得た。これらには、最も一般的な F 5 0 8 / F 5 0 8 遺伝子型、C F T R タンパク質が実質的に生成されないダブルヌル遺伝子型（R 5 5 3 X / E 6 0 X、患者 6）、まれなスプライス部位対立遺伝子（F 5 0 8 / 1 7 1 7 - 1 G - > A、患者 7）、およびいくつかのまれな未分類の対立遺伝子（F 5 0 8 / c . 2 0 5 2 d u p A、患者 8、および D 2 5 9 G / V 5 2 0 F、患者 9）（37）を有する多様な患者が含まれる。患者 9 における V 5 2 0 F 対立遺伝子は、G 5 5 1 D と同じ機能カテゴリにあるが、イバカフトールによる治療に不応性である（26）。

【 0 1 9 4 】

A m B は広範囲の異なる遺伝子型にわたって A S L の pH の上昇を引き起こした（図 4、パネル A）。平均して、A m B は A S L の pH を 0 . 2 pH 単位高め、C u F i - 1 および C u F i - 4 上皮における我々の結果（図 2）と一致し、また G 5 5 1 D 対立遺伝子を有する C F 患者からの生検気道上皮をイバカフトールで処理した際に観察されたデータ（25）と一致した。C 3 5 d e O A m B、および A m B の側底添加は、A S L の pH を上昇させなかった。A m B 処理は、非 C F 初代培養上皮の pH には影響を及ぼさず、C F T R および関連する pH 勾配の不在下での選択作用と一致した。この A m B 媒介性の A S L の pH の上昇は少なくとも 48 時間持続し（図 4、パネル C）、重炭酸イオン輸送および pH の自己調節が、これらの A m B 処理した C F 患者由来初代肺上皮で維持されている可能性が高いことを示唆する。

【 0 1 9 5 】

遺伝的に多様な初代培養ヒトCF上皮を試験して、AmBでの単回処理が48時間の時点でASLの粘度低下をもたらすかどうかを確認した。AmBは、幅広い患者遺伝子型にわたってASLの粘度を低下させた(図4、パネルD)。粘度低下の平均の大きさ(～1.5単位)は、G551D対立遺伝子を持つCF患者由来のイバカフトール処理された初代副鼻腔上皮で以前に観察されたもの(25)と一致する。

【 0 1 9 6 】

同じ48時間の時点で、遺伝的に多様な初代CF上皮のASLの殺菌能力を、AmB処理なしまたはありで試験した。これは、AmBによる直接的な殺菌に非感受性であることが確認された黄色ブドウ球菌でコーティングした金のグリッドでASLに短時間触れた後、殺された細菌の割合(%)を測定することによって行われた(3)。AmBでの処理は、最も一般的なF508/F508遺伝子型、ダブルヌル変異(R553X/E60X)、およびいくつかのまれな未分類の対立遺伝子(F508/c.2052dupAおよびD259G/V520F)を含む、さまざまな患者遺伝子型について抗菌活性を高めた。平均して、AmB処理はASLの殺菌をほぼ倍増させた(図4、パネルE)が、一方、C35deOAmBは全く効果がなかった。

【 0 1 9 7 】

次に、AmBがヒト気道上皮の分化初代培養物において気道宿主防御の重要な特徴を回復できるかどうかを試験した。CFTRを生じさせないいくつかのものを含めて、異なるCFTR変異を表すCFの9名のドナーからの上皮を調べた(図4、パネルA、図13、パネルA)。頂端のAmBは、ASLのpHを～0.2pH単位高め(図4、パネルA)、この効果は少なくとも48時間持続した(図4、パネルC)。C35deOAmB、および側底のAmBは、ASLのpHを高めなかった(図13、パネルB)。

【 0 1 9 8 】

CF気道上皮の培養物では、ASL粘度が上昇し、抗菌活性が低下した(4、7、48)。非CF肺上皮は、生理食塩水の2.5倍の粘度を有することが示されている(4)。遺伝的に多様なCF上皮の初代培養物のパネルへのAmBの頂端添加は、初代CFTR-G551D副鼻腔上皮においてイバカフトールを用いて観察されたもの(25)と一致する程度まで、ASL粘度を低下させた(図4、パネルD、図13、パネルD)。非CF肺上皮は、暴露された細菌の45%を殺すことが示されている(4)。AmBの添加は、ASLによる殺菌もほぼ2倍に高めた(図4、パネルE、図13、パネルE)が、C35deOAmBは全く効果がなかった(図13、パネルF)。AmB自体は、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を有していない(図13、パネルG)。

【 0 1 9 9 】

実施例6．AmBは培養CF気道上皮における $\text{H}^+ \text{CO}_3^-$ 分泌およびASLのpHを高めた

研究により、 HCO_3^- 分泌は、ASLのpHを高め(3、4)、ASLの粘度を低下させ(4、7、25)、抗菌因子の活性を高め(4)、ASL体積のホメオスタシスを維持し(41)、緑膿菌による局所環境の酸性化に対抗し(5)、さらにグラム陽性菌およびグラム陰性菌におけるプロトン推進力を消散させる(42)ことにより、気道の宿主防御を増強することができることが示されている(4、36、40)。頂端膜を横切る電気化学的勾配は HCO_3^- 分泌を促進する； HCO_3^- は、 $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$ (30)、 $\text{H}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$ (4)、 K^+ チャネル、 $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ 輸送体(NBC)、および Na^+ / H^+ 対向輸送体(アンチポーター)、ならびに炭酸脱水酵素(43)の統合された活動を通して細胞内に蓄積される。したがって、CFTRが開くと、 HCO_3^- はASLに流れ込み、ASLのpHが上昇する。CFTRがない場合、細胞内 $[\text{HCO}_3^-]$ が保持され(44)、 HCO_3^- 出口のこの勾配が持続し、さらにASLにおける HCO_3^- の減少によりASLのpHが低下するため増加さえする。CFのヒトの上皮における結果として生じる HCO_3^- 勾配の部位選択的および方向選択的な構築が、比較的非選択的な小分子 HCO_3^- 輸送体でさえ、側底側から頂端側への HCO_3^- の流れを回

10

20

30

40

50

復させ、したがってCFTR欠損上皮における気道宿主防御を回復させることを可能にすると推論された。最近、非選択的小分子鉄輸送体が、鉄輸送タンパク質を欠く細胞や動物においてヘモグロビン合成(hemoglobinization)を回復するのに十分であることが判明し、この選択性欠如に対する許容性は、欠損タンパク質を通常は提供している膜での部位選択的および方向選択的な鉄勾配の構築に機構的に関連付けられた(23)。

【0200】

AmBは、陰イオンと陽イオンに対して非選択的な一価イオンチャネルを形成する低分子天然物質である。それは抗真菌剤として処方されるが、ヒトにかなりの毒性がある(16)。最近、その細胞毒性が主に膜からのステロール抽出によるものであり、チャネル形成によるものではないことが判明した(17、19)。脂質二重層の存在下で、AmBは主に、おそらく少量(<5%)の膜挿入イオンチャネルと動的平衡にある、ステロールを抽出する大きな膜外凝集体を形成する。細胞毒性は、AmBのモル比が膜ステロールのモル比を超えた場合にのみ生じる(17、19)。これらメカニズムの洞察は、イオンチャネルを形成するが有意な量のステロールを抽出しない低濃度のAmBを使用するか、あるいはAmBをステロールと事前に複合体化させることにより、チャネル活性を細胞毒性から合理的に分離することを可能にした(17、19、20)。AmBは陽イオンと陰イオンの両方に透過性であるイオンチャネルを形成するが、カリウム輸送を回復し、したがってカリウム選択的Trk輸送体を欠く酵母の成長を回復する(20)。対照的に、イオンチャネル活性を欠く合成単原子欠損誘導体(C35deOAmB)はそれらを回復させなかった(17、20)。膜横断HCO₃⁻分泌のための好ましい電気化学勾配、および陽イオンの輸送に対抗するための選択的ポンプおよびチャネルの堅牢なネットワークの代替的な文脈で、頂端のAmBチャネルは、CF上皮にHCO₃⁻分泌を回復させ、したがってASL宿主防御を回復させると仮定された。

【0201】

AmBは一価の陰イオンと陽イオンを輸送することが知られている(図9、パネルA~D)が、HCO₃⁻に対する透過性は試験されていない。AmBはコレステロール含有POPCリポソームを横切るH¹³CO₃⁻流出を生じさせたが、C35deOAmBはそれを生じさせないことが分かった(図9、パネルE~H)。

【0202】

低濃度のAmBは、CuFi-4(G551D/F508)CF気道上皮においてASLのpHおよびH¹⁴CO₃⁻分泌を高めた(図7、パネルA、B)。pHスタット実験は、プロトン吸収ではなく、HCO₃⁻分泌が主にASLのpHのAmB媒介性上昇の根底にあることを示した(図10、パネルA)。比較のためにイバカフトールを試験し、これはCFTRの開状態の確率を高め(47)、G551Dまたは類似の残存機能変異を有するCF患者においてFEV₁を改善した(27)。ASLのpHおよびH¹⁴CO₃⁻分泌に対するイバカフトールの定量的効果は、AmBの効果と類似していた(図7、パネルA、B)。AmBは陰イオンと陽イオンの両方を輸送することができるが、カリウムおよびナトリウムのASL中の濃度は、ビヒクル処理対照と比較して変わらなかった(図10、パネルB~E)。これは、気道上皮における陽イオンポンプとチャネルの堅牢なネットワークの補償作用による可能性がある。

【0203】

イバカフトールは非膜局在化F508-CFTR欠陥を補正せず(47)、CuFi-1(F508/F508)上皮におけるASLのpHまたはH¹⁴CO₃⁻分泌を高めることができなかった(図7、パネルC、D)。対照的に、CFTRタンパク質とは無関係に作用するAmBはそれらの両方を高めた(図7、パネルC、D)。非CF(NuLi)上皮へのAmBの頂端添加によりASLのpHの上昇は観察されず(図7、パネルE)、これは病態生理学的電気化学勾配の存在への依存を示唆する。本明細書におけるすべての実験について、実験の期間中AmBは上皮上に残された。AmBは2時間かけてASLのpHを漸進的に高め、これらin vitro実験においてその効果は少なくとも48時間持続した(図7、パネルF)。CuFi-1上皮におけるH¹⁴CO₃⁻分泌のAm

B 媒介性の上昇は、少なくとも 7 日間持続する (図 1 1、パネル A ~ C)。これらの結果は、エアロゾル化された NaHCO_3 によって生じる pH の一時的上昇 (~ 1 5 分) (8) と対照的である。C 3 5 d e O A m B、および A m B の側底添加は、A S L の pH を上昇させず、また $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ 分泌も高めず、この効果が頂端に局在する A m B チャネルに特異的であることを示唆する (図 7、パネル C、D)。

【 0 2 0 4 】

A m B で処理した C u F i - 1 上皮は、C F T R の化学的活性化に応答しなかったことから、A m B は、F 5 0 8 C F T R の頂端膜へのトラフィックを促進しなかったことが示唆される (図 1 1、パネル D - I)。ビヒクル、低用量 (2 μM) または高用量 (5 0 μM) の A m B のいずれかで長期間にわたり処理した C u F i - 1 上皮の間で経上皮電気抵抗 (R_t) に差はなく (図 1 1、パネル J)、A m B を添加しても膜の完全性は損なわれなかった。

10

【 0 2 0 5 】

C F の別のモデルは、A S L の高さを病理に関連付ける (4 1)。ベースラインにおいて、C u F i - 1 上皮は N u L i 上皮と比較して A S L の高さが減少していることが観察された (図 7、パネル G)。A m B の頂端添加により、C u F i - 1 上皮の A S L の高さが増加し、N u L i 上皮の高さに一致した (図 7、パネル G)。ビヒクル、C 3 5 d e O A m B、および側底の A m B は、A S L の高さを増加させなかった (図 7、パネル G)。これらの結果は、A m B ベースのチャネルが、そのイオン選択性の欠如にもかかわらず、A S L 体積のホメオスタシスを回復させることを示唆する。

20

【 0 2 0 6 】

頂端チャネルを介したイオンの分泌は、電気化学的勾配に依存し、その勾配は大部分が側底膜の輸送タンパク質によって作られる。T r k 欠損酵母における A m B 媒介性の成長救済は、二次的 K^+ 流入を駆動する H^+ A T P a s e の化学的阻害によって減弱されることが示された (2 0)。ある研究では、T 8 4 細胞単層の頂端膜のペプチドチャネルを介したクロライドイオンの分泌が、側底膜上のカリウムチャネルを遮断することにより低減されることが示された (3 7)。C F 気道上皮における側底輸送を阻害すると、A m B 媒介性の陰イオン分泌も同様に防止できることが予測された。ウアバインで側底の Na^+ / K^+ A T P a s e を阻害すると、A S L の pH および $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ 分泌の A m B 媒介性の上昇が無効になった (図 7、パネル H、I)。さらに、ブメタニドで側底の $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2 \text{Cl}^-$ 輸送体を阻害すると、N u L i 上皮の A S L の高さが減少し、また C u F i - 1 上皮で観察された A S L の高さの A m B 媒介性の増加が無効になった (図 7 パネル G、図 1 2)。これらの結果は、頂端膜の A m B チャネルが、陰イオン分泌を駆動する内因性の側底膜タンパク質と機能的に連動することを示す。なぜなら A m B 媒介性の現象がそれらの活動に依存しているからである。

30

【 0 2 0 7 】

実施例 7 . A m B i s o m e (登録商標) は培養 C F 気道上皮および C F T R $^- / ^-$ プタの A S L の pH を高めた

C u F i - 1 上皮において、A m B の濃度の漸進的增加に伴い、A S L の pH が上昇し、その後低下することが観察された (図 8、パネル A)。酵母での研究 (1 7、1 9、2 0) に基づき、事前に形成された A m B : コレステロール複合体が、A m B の高濃度での有効性の低下に寄与し得る潜在的なステロール結合媒介性の影響を低減すると仮定した。結果的に、事前に形成された A m B : コレステロール (1 : 5) 複合体は、試験した A m B の最高濃度 (1 0 0 μ) まで、A S L の pH を高めたことが分かった (図 8、パネル A)。

40

【 0 2 0 8 】

A m B を *i n v i v o* で試験することを目的に、A m B とコレステロールを 1 : 2 . 5 の比率で含む F D A 承認のリボソーム製剤である A m B i s o m e (登録商標) (4 9) を評価した。A m B i s o m e (登録商標) は、リボソームにおける $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ の流出を増やし (図 1 4、パネル A)、また添加の 2 時間後および 4 8 時間後に測定した C u

50

Fi-1 上皮における ASL の pH および $H^{14}CO_3^-$ 分泌を高めた (図 8、パネル B、C、図 14、パネル B、C)。さらに、AmBisome (登録商標) は、 $0.25 \sim 100 \mu M$ の AmB に相当する $6 \sim 2450 \mu g/mL$ の広範囲の AmBisome (登録商標) の濃度にわたり ASL の pH を高めた (図 14、パネル C)。

【0209】

AmBisome (登録商標) が *in vivo* で ASL の pH を回復させる能力を評価するために、CF のブタモデルを使用した (8)。CFTR^{-/-} ブタの ASL の pH は、エアロゾル化した HCO_3^- またはトロメタミン緩衝液の介入なしでは上昇せず (8)、非 CF ブタの ASL の pH は約 7.25 (4) であることが示されている。 $60 \mu L$ の $1 mg/mL$ の AmBisome (登録商標) 溶液を気管窓から気道の表面 $1 cm^2$ に投与すると、CFTR^{-/-} ブタの ASL の pH が上昇した (図 8、パネル D)。

【0210】

これらの結果は、小分子イオンチャネルが、CF 気道上皮の頂端膜を HCO_3^- に対して透過性にすることができ、さらに気道宿主防御の重要な要素である ASL の pH、粘度、および抗菌活性を回復させることができることを示す。CFTR は陰イオンを選択的に導くが、AmB チャネルは一価の陰イオンと陽イオンの両方を導く。したがって、AmB は CFTR 陰イオンチャネルの不完全な代用物である。しかしながら、陰イオン分泌の電気化学的駆動力を作り出す堅牢なメカニズムは、非選択的チャネルが、CF 気道上皮における基本的な欠陥である陰イオン分泌を支援するのに十分となる設定を確立する。陰イオン交換輸送体および他の頂端膜タンパク質陰イオンチャネルによる AmB 媒介性クロライド分泌の HCO_3^- 分泌への連結 (50) など、他のメカニズムも、経上皮 HCO_3^- 輸送の観察された AmB 媒介性の増加に寄与する可能性がある。これらの結果は、CFTR をほとんどまたはまったく生成しないナンセンスコドンおよび未成熟終止コドンを有する CF 患者を含めて、CF 患者を治療するための、CFTR に依存しない、したがって遺伝子型に依存しないアプローチを明らかにする。このメカニズムは他と異なるため、CFTR モジュレーターとの相加効果の可能性もある (27、47)。さらに、AmB はすでに臨床的に承認された薬物であり、CF の患者に有益となることができ、さらに AmBisome (登録商標) は肺に安全に送達され、重大な全身曝露を引き起こすことなく肺の真菌感染症を治療する (49、51)。

【0211】

したがって、非選択的イオンチャネル形成小分子であるアムホテリシン B (AmB) の頂端添加は、培養ヒト CF 気道上皮における HCO_3^- 分泌を回復させ、ASL の pH を高めた。これらの効果は、側底の $Na^+/K^+ ATPase$ を必要とし、これは頂端の AmB チャネルがこの陰イオン分泌のドライバースと機能的に連動したことを示す。AmB はまた、CFTR を生成しない変異を含めて、さまざまな変異により引き起こされる CF の人々からの気道上皮の初代培養物における ASL の pH、粘度、および抗菌活性を回復させ、さらに *in vivo* で CFTR ヌルのブタの ASL の pH を高めた。したがって、非選択的小分子イオンチャネルは、CFTR に依存しない、したがって遺伝子型に依存しないメカニズムを介して、CF 気道宿主防御を回復することができる。

【0212】

実施例 8 . POPC リポソームからの Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- および $H^{13}CO_3^-$ の流出の検討 (図 9、パネル A ~ D ; 図 13、パネル A)

一般情報 : パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC) は、 $CHCl_3$ 中の $25 mg/mL$ 溶液として Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) から入手し、乾燥アルゴン雰囲気下において $-20^\circ C$ で保存し、3 か月以内に使用した。コレステロール (Sigma Aldrich) はエタノールからの再結晶により精製した。 $NaH^{13}CO_3$ は、Sigma Aldrich から白色固体として得た。ナトリウム、カリウムおよびクロライドイオンの測定は、ファラデーケージ内に適切なイオン選択性プローブを備えた Denver Instruments (Denver, CO) Model 225 pH メーターを使用して取得した。ナトリウム選択性測定は

、Orionマイクロナトリウム電極 (Thermo 9811BN) を使用して取得した。カリウム選択性測定は、防水BNCコネクタを備えたOrionカリウムシユアフロー複合電極 (Thermo 9719BNWP) を用いて取得した。クロライド選択性測定は、Orionクロライド複合型電極 (Thermo 9617BNWP) を使用して取得した。ナトリウム流出実験では、23 でインキュベートした7 mLバイアル中の磁気攪拌した1.5 mL溶液において測定を行った。クロライドおよびカリウムの流出実験では、23 でインキュベートした20 mLバイアル中の磁気攪拌した4 mL溶液において測定を行った。ナトリウム、カリウム、およびクロライドの流出実験に関して、流出実験の過程全体を通して、各イオンの濃度を10秒ごとにサンプリングした。 HCO_3^- 流出実験のための ^{13}C NMRスペクトルは、Varian 5mm broadband autoxプローブを備えたVarian Inova 600MHz NMR分光計で取得した。 ^{13}C 周波数は150.83 MHzに設定し、スペクトル幅は37037 Hzであった。機器を D_2O でロックした。実験条件は次のとおりである：取得時間、0.93秒；30°パルス幅、3.3 μ 秒；緩和遅延、0.2秒；スキャン数、256；温度23。インバースゲート ^{13}C スペクトルを収集した。

10

【0213】

リボソームの調製：脂質フィルムを調製する前に、この溶液を周囲温度に温めて、凝縮による溶液の汚染および脂質フィルムの劣化を防止した。42 mgの固体コレステロールを20 mLのシンチレーションバイアル (Fisher Scientific) に加え、続いて14 mLのPOPC溶液を加えた。穏やかな窒素流で溶媒を除去し、使用前に、得られた脂質フィルムを最低12時間高真空下で保管した。ナトリウム流出実験では、フィルムを2 mLの250 mM NaHCO_3 、40 mM HEPES緩衝液、pH 7.5で再水和し、約3分間激しくボルテックスして多層小胞 (MLV) の懸濁液を形成した。カリウム流出実験の場合、フィルムを2 mLの250 mM KHCO_3 、40 mM HEPES緩衝液、pH 7.5で再水和した。クロライド流出実験の場合、フィルムを2 mLの250 mM NaCl 、40 mM HEPES緩衝液、pH 7.5で再水和した。 HCO_3^- 流出実験の場合、フィルムを2 mLの250 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 、40 mM HEPES緩衝液、pH 7.5 (D_2O) で再水和した。十分な量の大きな単層小胞 (LUV) を得るために、少なくとも2つの独立した脂質フィルム調製物を後続のLUV形成のために一緒にプールした。次に、脂質懸濁液を、 $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ リボソームについて前述したように15回の凍結融解サイクルにかけた。透析およびその後の流出実験のために、複数の1 mL調製物を一緒にプールした。新たに形成されたLUVは、Pierce (Rockford, IL) Slide-A-Lyzer MWCO 3,500透析カセット、15 mL容量を使用して透析した。LUV懸濁液を62.5 mM MgSO_4 、40 mM HEPES緩衝液 (pH 7.3) 600 mLに対して3回透析した。最初の2回の透析は2時間であったが、最後の透析は一晩行った。

20

30

【0214】

全リンの測定を適応させた(53)。LUV溶液を、40 mM HEPES緩衝液、pH 7.3 (D_2O) 中の87 mM Na_2SO_4 で40倍に希釈した。希釈したLUV懸濁液の3つの10 μ Lサンプルを3つの別個の7 mLバイアルに添加した。続いて、溶媒を N_2 流で除去した。450 μ Lの8.9 M H_2SO_4 を、ブランクとして用いた脂質を含まない第4のバイアルを含めて、各乾燥LUVフィルムに添加した。4つのサンプルを225 のアルミニウムヒーティングブロックにおいて周囲雰囲気に開放して25分間インキュベートし、その後で23 に移し、室温で5分間冷却した。冷却後、各サンプルに150 μ Lの30% w/v過酸化水素水溶液を添加し、バイアルを225 のヒーティングブロックに30分間戻した。次にサンプルを23 に移し、室温で5分間冷却した後、3.9 mLの水を添加した。次いで、500 μ Lの2.5% w/vモリブデン酸アンモニウムを各バイアルに添加し、得られた混合物を5回短時間激しくボルテックスした。続いて、500 μ Lの10% w/vアスコルビン酸を各バイアルに添加し、得られた混合物を5回短時間激しくボルテックスした。バイアルをPTFEライニングキャップで封をして、

40

50

100 のアルミニウムヒーティングブロックに7分間置いた。サンプルを23に移し、室温で約15分間冷却して、UV/VIS分光法による分析の前に23にした。全リンは、820nmでの吸光度を測定し、この値をこの方法および既知濃度の標準リン溶液で得られた標準曲線と比較することにより決定した。

【0215】

LUVからの流出：ナトリウム、カリウムおよびクロライドの流出実験では、プールされたLUV懸濁液を、62.5mM MgSO₄、40mM HEPES緩衝液、pH7.3で70mMに希釈した。LUV懸濁液（ナトリウムの場合は1.5mL、クロライドとカリウムの場合は4mL）を7mLまたは20mLのバイアルに加え、穏やかに攪拌した。適切なプローブを挿入し、AmBの添加前に1分間データを収集した。ナトリウム流出実験では、15μLのビヒクルまたはAmB（70μMの最終濃度、DMSO中の100倍ストック溶液）を1.5mLのLUV懸濁液に加え、データを10分間収集した。完全なイオン放出を行うために、Triton X-100の30%v/v溶液15μLを添加し、さらに5分間データを収集した。クロライドおよびカリウムの流出実験では、40μLのビヒクルまたはAmB（最終濃度70μM、DMSO中の100倍ストック溶液）を4mLのLUV懸濁液に加え、データを10分間収集した。完全なイオン放出を行うために、Triton X-100の30%v/v溶液40μLを添加し、さらに5分間データを収集した。HCO₃⁻流出実験では、5μLのDMSOまたは滅菌水ビヒクル、AmB:Chol、またはAmBisome（登録商標）（70μM AmB、DMSOまたは滅菌水中の100倍ストック）を、New Era（Vineland, NJ）の5mm NMRサンプルチューブ中の500μLのプールされたLUV懸濁液に添加し、60分間連続してFIDを取得した。Triton X-100の30%v/v溶液5μLを添加して、完全なイオン放出を行った。

【0216】

各実行からの流出データを、0~100%の総イオン放出に対するパーセントに正規化した。HCO₃⁻流出実験では、リポソーム懸濁液の溶解後、¹³Cグルコース標準の積分と比較した小胞外HCO₃⁻に対応する信号の積分を、100%流出に対応するようにスケールリングした。AmBを添加した各実験の実行について、小胞外HCO₃⁻に対応する信号を、各FIDの¹³C内部標準と比較して積分した。スケールリング係数Sは、次の関係式を用いて各実験について計算した。

【数1】

$$\left[\frac{[\text{イオン}]_{\text{最終}}}{[\text{イオン}]_{\text{最初}}} - 1 \right] \cdot S = 100$$

次に、各データポイントにSを掛けてから、時間の関数としてプロットした。

【0217】

実施例9. POPCリポソームからのH⁺流出の検討（図9、パネルD）

POPC/10%コレステロールリポソームからのプロトン流出を上記のように決定した（33）。

【0218】

実施例10. POPCリポソームからのH¹³CO₃⁻流出の¹³C NMRでの検討（図9、パネルE~H）

コレステロール含有POPC脂質フィルムを上記のように調製し、使用前に最低12時間高真空下で保管した。次に、フィルムを、40mM HEPES緩衝液、pH7.5（D₂O）中の250mM NaH¹³CO₃2mLで水和し、約3分間激しくボルテックスして、多層小胞（MLV）の懸濁液を形成した。次に、脂質懸濁液を15回の凍結融解サイ

クル（懸濁液を交互に、液体窒素浴で凍結させ、その後50℃の水浴で解凍させる）にかけた。得られた脂質懸濁液をHamilton（Reno, NV）の1 mLの気密シリンジに引き込み、シリンジをアバンティポーラーリピッド社のミニ押出機（Avanti Polar Lipids Mini-Extruder）に入れた。次に、脂質溶液を5.00 µmのMilipore（Billerica, MA）ポリカーボネートフィルターに35回通し、新たに形成されたLUV懸濁液を、MLVの元の懸濁液を含まないシリンジに収集して、MLVがLUV溶液に入り込むのを防いだ。十分な量のLUVを得るために、2つの独立した1 mLの調製物を一緒にプールして透析およびその後の流出実験に使用した。新たに形成されたLUVを、Pierce（Rockford, IL）Slide-A-Lyzer MWCO 3,500透析カセット（3 mL容量）を使用して透析した。LUV懸濁液を、攪拌しながら、40 mM HEPES緩衝液、pH 7.3（H₂O）中の87 mM Na₂SO₄溶液300 mLに対して10回透析した。最初の透析は4時間であったが、その後の9回の透析は1時間行った。リン含有量の決定は上記のように行った。

【0219】

プールしたLUV溶液を、87 mM Na₂SO₄、40 mM HEPES緩衝液、pH 7.3（D₂O）で70 mMに希釈し、さらに0.025%（w/v）¹³C-D-グルコース（1-¹³C）（Sigma Aldrich）を内部標準として添加した。¹³C NMRスペクトルは、5 mm BBFO CryoProbeを搭載したBruker Avance III HD 500 MHz NMR分光計で取得した。¹³C周波数は125.83 MHzに設定し、スペクトル幅は31,512 Hzであった。機器をD₂Oでロックした。実験条件は次のとおりである：取得時間、0.93秒；30°パルス幅、3.3 µ秒；

緩和遅延、0.2秒；スキャン数、256；温度23℃。

【0220】

各実験で、1.4 µLのビヒクル、AmB、またはC35 de OAmB（最終濃度17.5 µM、ストック溶液はDMSO中100倍濃縮）を140 µLのリボソーム懸濁液に添加した。リボソーム懸濁液を直ちにNew Era（Vineland, NJ）のマイクロNMRサンプルチューブ（3 mm下部/5 mm上部）に移し、8つの連続した自由誘導減衰（FID）を上記のように取得した。MnCl₂を使用した実験では、AmBの添加後に5 µLの50 mM MnCl₂溶液を添加した。完全なイオン放出を行うために、Triton X-100（Sigma Aldrich）の30%（v/v）溶液10 µLをリボソーム懸濁液に添加した後にデータを取得した（15、54-56）。

【0221】

実施例11．細胞株および気道上皮の初代培養物におけるASLのpHの測定（図7、パネルA、C、E、G；図4、パネルA、C、E；図8、パネルA、B；図11、パネルD；図13、パネルC；図14、パネルB、C）

この実験には、小径のNuLi、CuFi、および初代培養上皮を使用した（0.33 cm²）。レシオメトリックpHインジケータ-SNARF結合デキストラン（Molecular Probes）を使用してASLのpHを測定した。SNARF粉末を、超音波処理を介してパーフルオロカーボン（FC-72、Sigma）中に懸濁させ、頂端表面に分配させた。ASLのpHを2時間後に測定した（3、4、25）。細胞株培養物については、40倍水浸レンズでZeiss LSM 800顕微鏡を使用し、また初代培養物についてはZeiss LSM 510顕微鏡を使用して、SNARFを488 nmで励起し、580 nmおよび640 nmで発光を記録した。pH測定の標準曲線を作成するために、SNARFを無色のpH標準物に溶解し、蛍光比をpHに変換した。

【0222】

このアッセイで試験する薬剤は、最初に粉末に凍結乾燥し、次いで適切な体積のパーフルオロカーボン（FC-72、Sigma）中に懸濁し、1分間超音波処理して懸濁させた。AmB isomeは超音波処理すべきではない；代わりに、微粉末をボルテックスで

10

20

30

40

50

懸濁させた。この懸濁液 20 μL を、懸濁液中の以下のおおよその濃度で培養気道上皮 (0.33 cm^2) の表面に投与した:

アムホテリシン B: 0.25 ~ 100 μ

アムホテリシン B - コレステロール複合体: 0.5 ~ 100 μ

C35 de OAmB: 2 μ (17)

10 mM ウアバイン (Na^+ / K^+ ATPase の障害) (9)

10 μ フォルスコリン / 10 μ イバカフトール (25)

AmBisome: 0.25 ~ 2450 $\mu\text{g} / \text{mL}$

【0223】

すべての実験において、化合物で処理した上皮の A S L の pH を測定し、結果をビヒクルで処理した上皮と比較した。

10

【0224】

頂端 AmB 投与では、培養気道上皮を 37 で 30 分 ~ 48 時間インキュベートした後、A S L の pH を測定した。AmB - コレステロール複合体および C35 de OAmB 投与では、培養気道上皮を 37 で 48 時間培養した後、A S L の pH を測定した。 Na^+ / K^+ ATPase 障害の効果を試験するために、AmB を投与した 47 時間後に 10 mM ウアバインを添加し、培養気道上皮を 37 でさらに 1 時間インキュベートした後、A S L の pH を測定した。10 μM イバカフトール / 10 μM フォルスコリンの投与の場合、培養気道上皮を 37 で 2 時間インキュベートした後、A S L の pH を測定した (25)。側底 AmB 投与では、DMSO 中の 2 mM の AmB ストックを U S G 培地で最終濃度 2 μM まで 1000 倍に希釈した。培養気道上皮の側底側の培地を AmB 含有 U S G 培地で置き換え、37 で 48 時間インキュベートした後、A S L の pH を測定した。

20

【0225】

実施例 12. NuLi および CuFi 単層の pH スタット滴定 (図 4、パネル A)

この実験には、大径の NuLi および CuFi - 1 培養上皮を使用した (4.67 cm^2)。これらの培養物を、トランスウェルアダプター用の培養カップインサート、24 mm (U9924T - 24) を使用して、デュアルチャネル U s s i n g チャンバ (Warner U2500) に取り付けた。頂端側には緩衝剤を含まない溶液 (140 mM NaCl、2 mM KCl、2 mM CaCl_2 、および 1 mM MgCl_2 、15 mM デキストロース、空気でガス処理) を用い、側底側には HCO_3^- 緩衝液 (120 mM NaCl、25 mM NaHCO_3 、5 mM KCl、2 mM CaCl_2 、1.2 mM MgCl_2 、13.75 mM NaH_2PO_4 、5.6 mM デキストロース、pH を 7.0 に調整) または HCO_3^- を含まない緩衝液 (140 mM NaCl、2 mM KCl、2 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 、10 mM HEPES、5 mM デキストロース、pH 7.0 に調整) を用いて、37 で膜を浸した。微小径の pH 電極 (89231 - 590) および温度プローブ (Radiometer Analytical T201 Temperature Sensor, E51M001)、および Hach I 856 NB pH/EP/Stat pH - STAT Titrator (R41T028) に取り付けられた滴定ピュレットを頂端チャンバに挿入した。ガス交換を防ぐために、側底チャンバをチャンバの蓋で覆った。次に、既知の pH 溶液 (Hach, S11M002、S11M004、S11M007) を使用して、pH 電極を校正した。

30

40

【0226】

1 mM HCl を滴定剤として使用して、頂端 pH を目標の pH 6.0 に滴定した (最小速度 0.25 mL / 分、最大速度 0.35 mL / 分) (28、57 - 59)。酸滴定を 20 分かけて測定し、培養上皮のベースライン値を確立した (最大速度 2 mL / 分)。次に、頂端側と側底側の両方の浴溶液を取り除いた。DMSO 中の AmB のストック溶液を 0.5、1 または 2 μM の最終濃度まで、緩衝剤を含まない溶液のアリコートに加え、頂端チャンバに添加し、側底チャンバは新鮮な HCO_3^- 緩衝液または HCO_3^- を含まない緩衝液で置き換えた。滴定剤として 1 mM HCl を使用して、頂端側の pH を目標の pH 6.0 に再度滴定した。次に、酸滴定をさらに 20 分かけて測定して、頂端溶液におけ

50

るAmB媒介性のpH変化を評価した。

【0227】

データを1分あたりのH⁺滴定のnモルとしてプロットし、この曲線の勾配を培養物の面積(4.67cm²)で割って、酸滴定の速度(nモルH⁺/分/cm²)を得た。

【0228】

実施例13.CuFi-1単層におけるASLのNa⁺、K⁺、Mg²⁺およびCa²⁺の濃度の測定(図10、パネルB~E)

この実験には、小径のCuFi-1培養上皮を使用した(0.33cm²)。実験の開始の24時間前に、すべての培養上皮の頂端側を200μLの温かいPBSで3回すすいで過剰な粘液を除去した。新鮮なUSG培地を側底膜に添加した。CuFi-1上皮を、パーフルオロカーボン(FC-72)ビヒクル、またはFC-72中に懸濁した2μMのAmBのいずれかで処理し、37℃で48時間インキュベートした。0.1μL容量のマикроキャピラリーチューブ(Drummond Scientific NC1453214)を200μLのピペットチップ(Denville Scientific P1122)に入れた。AmB添加の48時間後、毛細管現象によってASLで完全に満たされるまで、マイクロキャピラリーチューブを各上皮培養インサートの頂端膜の端の周りにそっと触れさせた。0.1μLのASLを収集した後、p200ピペットを使用して、サンプル全体を15μLの分子生物学用グレードの水(Corning 46-000-CM)に押し込んだ。次に、サンプルを、50μLの分子生物学用グレードの水で3回洗浄することにより、15mL容量の円錐バイアルに定量的に移した。

【0229】

ナトリウム、マグネシウム、カリウム、カルシウムの定量は、酸性化サンプルの誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)を使用して行った。各サンプルを、再蒸留水中の1.0% HNO₃(v/v)で5mLの最終体積に希釈した。定量標準は、混合した各元素100μg/mLのNa、Mg、K、およびCaの標準(Inorganic Ventures, Christiansburg, VA, USA)を使用して作成し、これらを組み合わせて1.0%の硝酸(v/v)中の100ng/mLの混合元素標準を作成した。

【0230】

ICP-MSは、KEDモードで動作し、ESI SC-2DX PrepFASTオートサンプラー(Omaha, NE, USA)を備えたコンピューター制御(QTEGRAソフトウェア)Thermo iCapQ ICP-MS(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で実行した。内部標準は、prepFASTシステムを使用してインラインで添加され、Bi、In、⁶Li、Sc、Tb、Yを含む1ng/mLの混合元素溶液(Inorganic VenturesのIV-ICPMS-71D)からなる。オンライン希釈もprepFASTシステムによって行われ、5000、1000、500、100、および50ng/mLのNa、Mg、K、Caで構成される検量線の作成に使用した。各サンプルは、1回の調査実行(10掃引)と3回のメイン(ピークジャンプ)実行(40掃引)を使用して取得した。分析のために選択された同位体は、²³Na、²⁴Mg、³⁹K、⁴⁴Caおよび⁸⁹Y(データ補間および機械安定性のための内部標準として選択された)であった。機器の性能は、自動チューニングとそれに続く性能レポートによる検証(製造元の仕様に合格)によって毎日最適化する。

【0231】

実施例14.NuLiおよびCuFi単層を横切るH¹⁴CO₃⁻輸送(図7、パネルB、D、H;図4、パネルD;図11、パネルA~C;図13、パネルB)

この実験には、小径のNuLiおよびCuFi培養上皮を使用した(0.33cm²)。¹⁴C標識されたHCO₃⁻ナトリウムは、無菌の35.7mM水溶液、pH9.5(MP Biomedicals 0117441H)として得た。すべての実験を、播種後2か月未満で実行した。実験の前に、新鮮なUSG培地を側底側に添加した。頂端膜を、パーフルオロカーボン72(Sigma Aldrich)中の懸濁液として20μLのビ

ヒクル、AmBまたはイバカフトール/フォルスコリンで処理し、培養上皮を5%CO₂雰囲気中、37℃で48時間、7日、14日または28日間インキュベートした。治療期間の終了後、USG培地中の1.4mM H¹⁴CO₃⁻ストック溶液5μLを側底側の培地に加えた。次に、培養上皮を37℃で10分間インキュベートした。10分後、培養上皮の頂端膜を直ちに200μLのPBSで洗浄した。ASL洗浄液と200μLの側底培地のアリコートをしンチレーションカクテルで希釈し、液体しンチレーションカウンティングで分析した(23)。

【0232】

実施例15．NuLiおよびCuFi単層のUssingチャンバでの検討(図11、パネルE~G)

膜発現CFTRの存在を評価するために、Corning Costar 0.4μm² 4ウェルプレート トランズウェルクリアーポリエステルメンブレンインサート上で成長させたNuLiおよびCuFi-1上皮の分化培養物を使用した。NuLiおよびCuFi-1上皮を、20μLのパーフルオロカーボン(FC-72、Sigma)ピヒクル、または超音波処理してFC-72中に懸濁させた2μLのアムホテリシンB(AmB)で処理した。48時間のインキュベーション後、トランズウェルアダプター用の培養カップインサート6.5mm(Warner U9924T-06)を使用して、上皮をデュアルチャンネルUssingチャンバ(Warner U2500)に取り付け、頂端側と側底側の両方を、37℃のHCO₃⁻溶液(120mM NaCl、25mM NaHCO₃、5mM KCl、2mM CaCl₂、1.2mM MgCl₂、13.75mM NaH₂PO₄、pH7.0)に浸し、圧縮空気ですガス処理した。デキストロースを実験の直前にこの溶液に加えて、最終濃度を5.6mMにした。上皮のナトリウムチャンネル(ENaC)とカルシウム活性化クロライドチャンネル(CaCC)をそれぞれ1μMのアミロライドと1μMのDIDS(4,4'-ジイソチオシアノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸)の頂端添加により阻害して、透過化(permeabilization)のベースラインを樹立した。頂端に添加した10μMフォルスコリン/100μM IBMX(3-イソブチル-1-メチルキサンチン)を使用してCFTRを活性化し、1μM CFTR_{inh}-172を使用してCFTRを阻害した。試薬を連続して添加するたびに、次の試薬を添加する前に約10分間平衡化させた(15)。

【0233】

実施例16．経上皮電気抵抗(R_t)の測定(図11、パネルH)

この実験には、小径のCuFi-1培養上皮を使用した(0.33cm²)。培養上皮を、FC-72ピヒクル、パーフルオロカーボン(FC-72、Sigma)中の2および50μMのAmBで48時間、7日または28日間処理した。200μLの新鮮なUSG培地を上皮の頂端側に置いた。次に、Millicell(登録商標)ERS-2電圧計を使用して、生物学的複製ごとに2つの技術的複製について蛇行パターンで上皮の頂端側と側底側を横切る経上皮電気抵抗(R_t)を測定した。

【0234】

実施例17．乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイ(図11、パネルI)

この実験には、小径のCuFi-1培養上皮を使用した(0.33cm²)。LDH細胞毒性アッセイキット(Cayman Chemical)を使用して、AmBがCuFi-1気道上皮に毒性があるかどうかを確認した。処理前に、上皮の側底側から培地を除去し、500μLの新鮮なUSG培地と交換した。次に、培養上皮を、FC-72ピヒクル、パーフルオロカーボン(FC-72、Sigma)中の2および50μMのAmBで48時間、7日または28日間処理した。各実験時間枠の終了の48時間前に、側底側の培地を再度交換し、20μLの10%Triton X-100溶液を頂端表面に添加して、最大の放出を引き出した。実験当日、キットの指示に従ってアッセイ試薬を調製し、バックグラウンド対照用に500μLのUSG培地を24ウェルプレートの3つの空のウェルに添加した。培養インサートをウェルから取り外し、250μLのLDH反応溶液を各ウェルに添加した。次に、プレートをオービタルシェーカーで30分間、37℃で穏や

10

20

30

40

50

かに振盪した。プレートリーダーを使用して、490 nmで吸光度を読み取った。細胞毒性%は次のように計算した：

【数 2】

試験サンプルの細胞毒性%＝

$$\left[\frac{(\text{実験値 A490}) - (\text{バックグラウンド値 A490})}{(\text{最大値 A490}) - (\text{バックグラウンド値 A490})} \right] \cdot 100$$

10

【0235】

実施例18．気道表面液（ASL）の高さのアッセイ（図7、パネルF、図12）

ASLの高さは、確立された蛍光色素アッセイ（60、61）を使用して検討した。この実験には、小径のNuLiおよびCuFi-1培養上皮を使用した（0.33 cm²）。実験開始の24時間前に、すべての培養上皮の頂端側を温かいPBSで3回すすいで、過剰な粘液を除去した。NuLi上皮は、パーフルオロカーボン（FC-72）ビヒクル、または側底側の培地に添加したDMSOビヒクル中の500 μMのブメタニドで処理し、CuFi上皮は、側底側の培地に添加したDMSOビヒクル中の500 μMのブメタニドありまたはなしで、20 μLのビヒクル、パーフルオロカーボン（FC-72、Sigma）中に懸濁させた0.005、0.5または50 μMのAmB、あるいは0.5 μMのC35 de OAmBで処理し、37℃で24時間インキュベートした。24時間後、PBS中の2 mg/mLの70 kDa Texas Red-デキストランコンジュゲート（Molecular Probes）溶液2.5 μLを上皮の頂端側に添加し、続いて蒸発を防ぐために100 μLのFC-770を添加した。次に、イメージング用の10 mmガラスボトムFluorodish（World Precision Instruments）上の100 μLのPBSの上に培養支持体を置いた。上皮を色素添加直後と24時間後に再度画像化して、色素吸収を調べた。メンブレンごとに3つのZスタック画像をZeiss LSM700共焦点顕微鏡で40倍の油浸で撮影した。ImageJ（62）を使用してこれらの画像を解析して、各画像の中央の1300ピクセルの平均ASL高さを決定した。画像を平滑化し、8ビットに変換し、赤い領域を最も正確に表すために閾値処理した。Analyze Particlesのパラメータは、サイズが1～無限大μm²で、真円度が0%～100%の粒子であった。高さは、ピクセル単位の出力領域を既知の1300ピクセル幅で割って決定し、既知の倍率（scaling factor）0.49 μm/ピクセルを使用してマイクロメートルに変換した。

20

30

【0236】

実施例19．AmBで処理した気道上皮初代培養物の粘度（図8、パネルC）

気道上皮培養物のASLの粘度を測定した（7、25）。この実験には、小直径の初代培養上皮を使用した（0.33 cm²）。頂端表面は、研究前少なくとも2週間洗浄しなかった。培養上皮を、パーフルオロカーボン（FC-72、Sigma）中において投与した2 μMのAmBで48時間処理した。次に、粘度の測定の2時間前に、FITC-デキストラン（70 kD、Sigma）を乾燥粉末として上皮の頂端表面に投与した。FRAPは、Zeiss LSM 510 MET顕微鏡を使用して、37℃の加湿チャンバ内でアッセイした。最大の回復に達するまで画像を取得した。各培養物の異なる場所から少なくとも6つの回復曲線を取得して平均化し、1つの上皮培養物のデータを得た。時定数（生理食塩水）は、蛍光回復曲線から回帰分析によって計算した。粘度は、生理食塩水の時定数に対する相対値として表した（ASL / 生理食塩水）。

40

【0237】

実施例20．AmBで処理した気道上皮初代培養物の抗菌活性（図8、パネルD、図14、パネルF～G）

50

黄色ブドウ球菌でコーティングされた金グリッドを使用して、気道上皮培養物の抗菌活性を測定した(3、4)。この実験には、小径の初代培養上皮を使用した(0.33 cm²)。パーフルオロカーボン(FC-72、Sigma)、2 μMのAmB、または2 μMのC35 de OAmBでの48時間の処理後、気道上皮の頂端表面に、細菌でコーティングされた金TEMグリッドを1分間置いた。対照として、細菌でコーティングされたグリッドを、生理食塩水または生理食塩水の上に置いたFC-72中のAmBに入れて、投与方法を1分間模倣した。除去後、Live/Dead BacLight Bacterial Viability アッセイ(In vitrogen)を使用してグリッド上の細菌の生存率を評価した。4~6領域で生存率を決定して、死んだ細菌のパーセンテージを決定した。

10

【0238】

実施例21. 研究用の動物(図4、パネルE)

CFTFTR遺伝子CFTFTR^{-/-}の標的破壊を有する雌および雄の新生ブタが研究され、CFTFTR^{+/+}ブタの交配から作製された。ブタはExemplar Geneticsから入手した。アイオワ大学の動物管理使用委員会はすべての動物実験を承認した。

【0239】

実施例22. CFTFTR^{-/-}ブタのASLのpHの測定(図4、パネルE)

ASLのpHをブタにおいてin vivoで測定した(3、8)。AmBisomeをブタの気管に投与するために、ブタを最初にケタミン(Ketaject、Phoenix、20 mg/kg、筋肉内注射)で鎮静させ、プロポフォール(Diprivan、Fresenius Kabi、2 mg/kg、静脈内注射)を使用して麻酔した。気管を外科的に露出させ、前方からアクセスし、気管軟骨輪を切開して小さな前方窓を開けた。生理的状态を模倣するために、100%加湿チャンバ内で37 °Cおよび一定の5% CO₂でデータを取得した。

20

【0240】

第1のCFTFTR^{-/-}ブタでは、ベースラインのASLのpH測定を約8分間行った後、FC-72中の100 μg/mLのAmBisome(登録商標)60 μLを気管窓に投与した。ASLのpHは60分間継続的に測定した。次に、60 μLの1 mg/mLのAmBisome(登録商標)を気管窓に投与し、pHをさらに60分間継続的に測定した。第2のCFTFTR^{-/-}ブタでは、ベースラインのASLのpH測定を約8分間行った後、内部対照として60 μLのFC-72ピヒクルを気管窓に投与した。ASLのpHをさらに30分間継続的に測定した。次に、60 μLの1 mg/mLのAmBisome(登録商標)を気管窓に投与し、その後連続測定を106分間行った。第3と第4のCFTFTR^{-/-}ブタでは、ベースラインASLのpH測定を約10分間行った。その後、FC-72中の1 mg/mLのAmBisome(登録商標)60 μLを気管窓に投与し、連続測定を120分間行った。

30

【参考文献】

【0241】

1. F. Ratjen et al., Cystic fibrosis. Nature Reviews Disease Primers 1, 15010 (2015).
2. B. P. Trivedi, Cystic fibrosis foundation opens drug discovery lab. Science 353, 1194-1195 (2016).
3. A. A. Pezzulo et al., Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. Nature 487, 109-113 (2012).
4. V. S. Shah et al., Airway acidification initiates host defense abnormalities in cystic fibrosis mice. Science 351, 503-507 (2016).
5. J. P. Garnett et al., Hyperglycaemia and Pseudomonas aeruginosa acidify cystic fibrosis airway surface liquid by elevating epithelial monocarboxylate transporter 2 dependent lactate-H⁺ secretion. Sci Rep 6, 37955 (2016).
6. M. H. Abou Alaiwa et al., pH modulates the activity and synergism of th

40

50

e airway surface liquid antimicrobials beta-defensin-3 and LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 18703-18708 (2014).

7. X. X. Tang et al., Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 126, 879-891 (2016).

8. M. H. Abou Alaiwa et al., Repurposing tromethamine as inhaled therapy to treat CF airway disease. *JCI Insight* 1, (2016).

9. D. C. Devor et al., Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells. *J Gen Physiol* 113, 743-760 (1999).

10. N. M. Walker et al., Cellular chloride and bicarbonate retention alters intracellular pH regulation in Cftr KO crypt epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310, G70-80 (2016).

11. B. Shen, et al., A synthetic chloride channel restores chloride conductance in human cystic fibrosis epithelial cells. *PLoS One* 7, e34694 (2012).

12. A. V. Koulov et al., Chloride transport across vesicle and cell membranes by steroid-based receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 4931-4933 (2003).

13. C. Jiang et al., Partial correction of defective Cl(-) secretion in cystic fibrosis epithelial cells by an analog of squalamine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1164-1172 (2001).

14. M. El-Etri, J. Cuppoletti, Metalloporphyrin chloride ionophores: induction of increased anion permeability in lung epithelial cells. *Am J Physiol* 270, L386-392 (1996).

15. J. Zabner et al., Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L844-854 (2003).

16. L. N. Ermishkin, et al., Properties of amphotericin B channels in a lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* 470, 357-367 (1977).

17. K. C. Gray et al., Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2234-2239 (2012).

18. J. T. Davis et al., Using small molecules to facilitate exchange of bicarbonate and chloride anions across liposomal membranes. *Nat Chem* 1, 138-144 (2009).

19. T. M. Anderson et al., Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol* 10, 400-406 (2014).

20. A. G. Cioffi, et al., Restored Physiology in Protein-Deficient Yeast by a Small Molecule Channel. *J Am Chem Soc* 137, 10096-10099 (2015).

21. H. Kawase et al., A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates hypertensive cardiac remodeling via angiotensin-II/sodium-proton pump exchanger-1 axis. *J Mol Cell Cardiol* 98, 37-47 (2016).

22. V. S. Shah et al., Relationships among CFTR expression, HCO₃(-) secretion, and host defense may inform gene- and cell-based cystic fibrosis therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5382-5387 (2016).

23. A. S. Grillo, et al., Restored iron transport by a small molecule promotes gut absorption and hemoglobinization. *Science*, (2017) in press.

24. E. Gouaux, R. Mackinnon, Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310, 1461-1465 (2005).

25. E. H. Chang et al., Medical reversal of chronic sinusitis in a cystic fibrosis patient with ivacaftor. *Int Forum Allergy Rhinol* 5, 178-181 (2015).

26. F. Van Goor, et al., Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *Journal of Cystic Fibrosis* 13, 29-36 (2014).

27. B. W. Ramsey et al., A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis

and the G551D Mutation. *New England Journal of Medicine* 365, 1663-1672 (2011).

28. D. Y. Cho, et al., Acid and base secretion in freshly excised nasal tissue from cystic fibrosis patients with Delt F 5 0 8 mutation. *Int Forum Allergy Rhinol* 1, 123-127 (2011).

29. T. J. Miller, P. B. Davis, FXDY5 modulates Na⁺ absorption and is increased in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L654-664 (2008).

30. D. Peckham, et al., Na⁺/K⁺ ATPase in lower airway epithelium from cystic fibrosis and non-cystic-fibrosis lung. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 464-468 (1997).

10

31. J. Hull, S. Shackleton, A. Harris, Abnormal mRNA splicing resulting from three different mutations in the CFTR gene. *Hum Mol Genet* 2, 689-692 (1993).

32. D. Xia et al., Aerosolized amphotericin B as prophylaxis for invasive pulmonary aspergillosis: a meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases* 30, 78-84 (2015).

33. S. A. Davis et al., C3-OH of Amphotericin B Plays an Important Role in Ion Conductance. *J Am Chem Soc* 137, 15102-15104 (2015).

34. W. B. Guggino, The Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Forms Macromolecular Complexes with PDZ Domain Scaffold Proteins. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1, 28-32 (2004).

20

35. B. K. Berdiev, Y. J. Qadri, D. J. Benos, Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst* 5, 123-127 (2009).

36. Quinton, P. M. The neglected ion: HCO₃⁻. *Nature medicine* 7, 292-293 (2001).

37. Wallace, D. P. et al. A synthetic channel-forming peptide induces Cl⁻ secretion: modulation by Ca(2+)-dependent K(+) channels. *Biochim Biophys Acta* 1464, 69-82 (2000).

38. Wainwright, C. E. et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine* 373, 220-231, doi:doi:10.1056/NEJMoa1409547 (2015).

30

39. Oliver, K. E., Han, S. T., Sorscher, E. J. & Cutting, G. R. Transformative therapies for rare CFTR missense alleles. *Curr Opin Pharmacol* 34, 76-82, doi:10.1016/j.coph.2017.09.018 (2017).

40. Poulsen, J. H., Fischer, H., Illek, B. & Machen, T. E. Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 5340-5344 (1994).

41. Garland, A. L. et al. Molecular basis for pH-dependent mucosal dehydration in cystic fibrosis airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 15973-15978 (2013).

40

42. Farha, M. A., French, S., Stokes, J. & Brown, E. D. Bicarbonate alters bacterial susceptibility to antibiotics by targeting the proton motive force. *ACS infectious diseases* (2017).

43. Lee, M. G., Ohana, E., Park, H. W., Yang, D. & Muallem, S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃ secretion. *Physiol Rev* 92, 39-74, doi:10.1152/physrev.00011.2011 (2012).

44. Widdicombe, J., Welsh, M. & Finkbeiner, W. Cystic fibrosis decreases the apical membrane chloride permeability of monolayers cultured from cells of tracheal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82,

50

6167-6171 (1985).

45. Rogers, C. S. et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 321, 1837-1841, doi:10.1126/science.1163600 (2008).

46. Stoltz, D. A. et al. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med* 2, 29ra31, doi:10.1126/scitranslmed.3000928 (2010).

47. Van Goor, F. et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 18825-18830, doi:10.1073/pnas.0904709106 (2009).

48. Derichs, N., Jin, B.-J., Song, Y., Finkbeiner, W. E. & Verkman, A. Hyperviscous airway periciliary and mucous liquid layers in cystic fibrosis measured by confocal fluorescence photobleaching. *The FASEB Journal* 25, 2325-2332 (2011).

49. Monforte, V. et al. Nebulized liposomal amphotericin B prophylaxis for *Aspergillus* infection in lung transplantation: pharmacokinetics and safety. *J Heart Lung Transplant* 28, 170-175, doi:10.1016/j.healun.2008.11.004 (2009).

50. Saint-Criq, V. & Gray, M. A. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci* 74, 93-115, doi:10.1007/s00018-016-2391-y (2017).

51. Rijnders, B. J. et al. Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial. *Clinical infectious diseases* 46, 1401-1408 (2008).

52. Karp, P. H. et al. An in vitro model of differentiated human airway epithelia. Methods for establishing primary cultures. *Methods Mol Biol* 188, 115-137, doi:10.1385/1-59259-185-x:115 (2002).

53. Chen, P. S., Toribara, T. Y. & Warner, H. Microdetermination of Phosphorus. *Analytical Chemistry* 28, 1756-1758, doi:10.1021/ac60119a033 (1956).

54. Andrews, N. J. et al. Structurally simple lipid bilayer transport agents for chloride and bicarbonate. *Chemical Science* 2, 256-260, doi:10.1039/C0SC00503G (2011).

55. Busschaert, N. et al. Tripodal transmembrane transporters for bicarbonate. *Chem Commun (Camb)* 46, 6252-6254, doi:10.1039/c0cc01684e (2010).

56. Busschaert, N. et al. Synthetic transporters for sulfate: a new method for the direct detection of lipid bilayer sulfate transport. *Chemical Science* 5, 1118-1127, doi:10.1039/C3SC52006D (2014).

57. Cho, D. Y., Hajighasemi, M., Hwang, P. H., Illek, B. & Fischer, H. Proton secretion in freshly excised sinonasal mucosa from asthma and sinusitis patients. *Am J Rhinol Allergy* 23, e10-13, doi:10.2500/ajra.2009.23.3389 (2009).

58. Fischer, H. & Widdicombe, J. H. Mechanisms of Acid and Base Secretion by the Airway Epithelium. *The Journal of membrane biology* 211, 139-150, doi:10.1007/s00232-006-0861-0 (2006).

59. Fischer, H. Function of Proton Channels in Lung Epithelia. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 1, 247-258, doi:10.1002/wmts.17 (2012).

60. Myerburg, M. M. et al. AMPK agonists ameliorate sodium and fluid transport and inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 676-684, doi:10.1165/2009-0147oc (2010).

61. Worthington, E. N. & Tarran, R. Methods for ASL measurements and mucus transport rates in cell cultures. *Methods Mol Biol* 742, 77-92, doi:10.1007/978-1-61779-120-8_5 (2011).

10

20

30

40

50

62. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature methods 9, 671 (2012).

【 0 2 4 2 】

参照による組み込み

上記の説明で言及されたすべての特許および公開特許出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 2 4 3 】

等価物

理解を明確にするために、例証および例を通して本発明をある程度詳細に説明したが、本発明の範囲またはそれらのいずれかの具体的な実施形態に影響を与えることなく、条件、配合および他のパラメータの広いおよび同等の範囲内で本発明を修正または変更することによっても本発明を実施でき、またこのような修正および変更が添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されていることは当業者に明らかであろう。

10

20

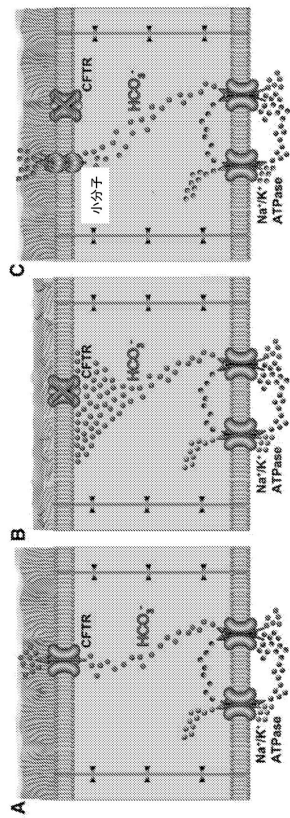
30

40

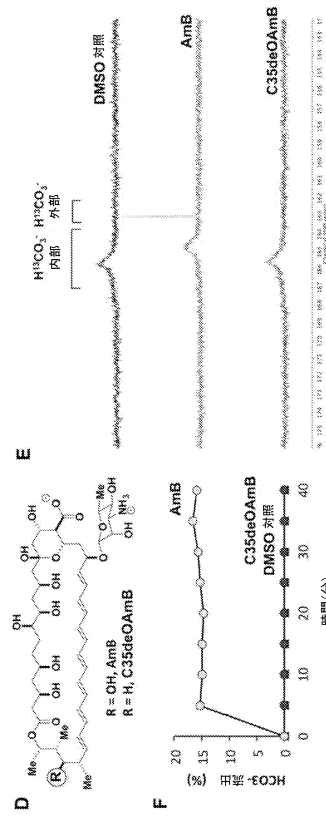
50

【図面】

【図 1 - 1】



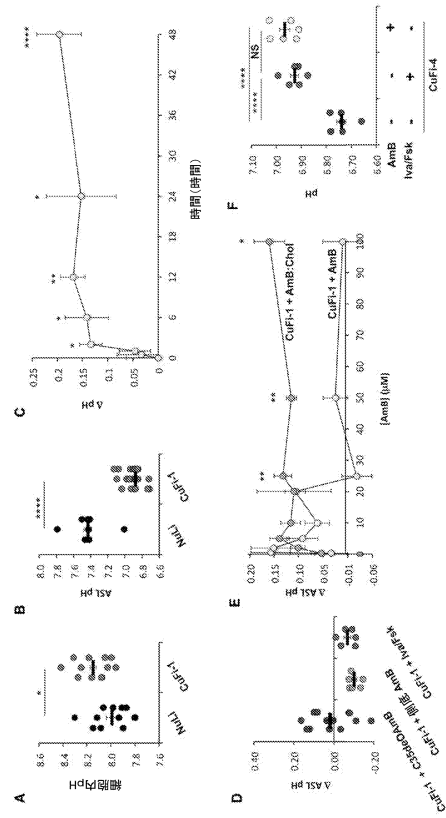
【図 1 - 2】



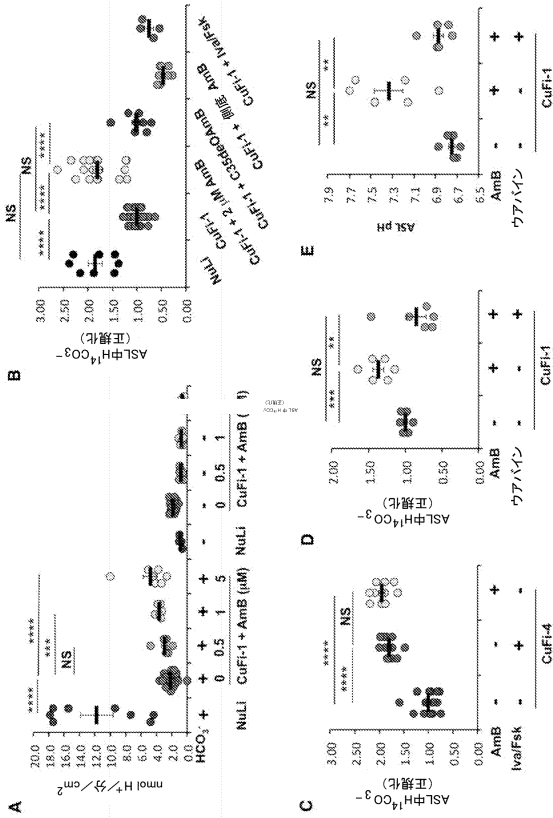
10

20

【図 2】



【図 3】

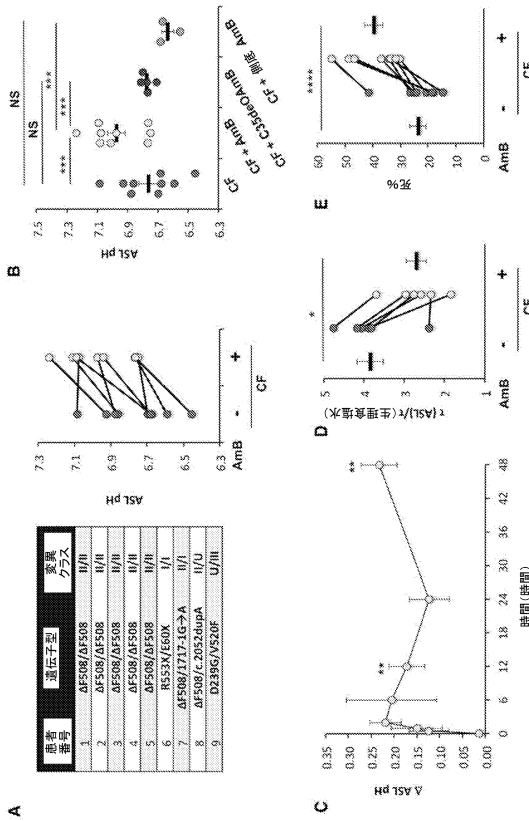


30

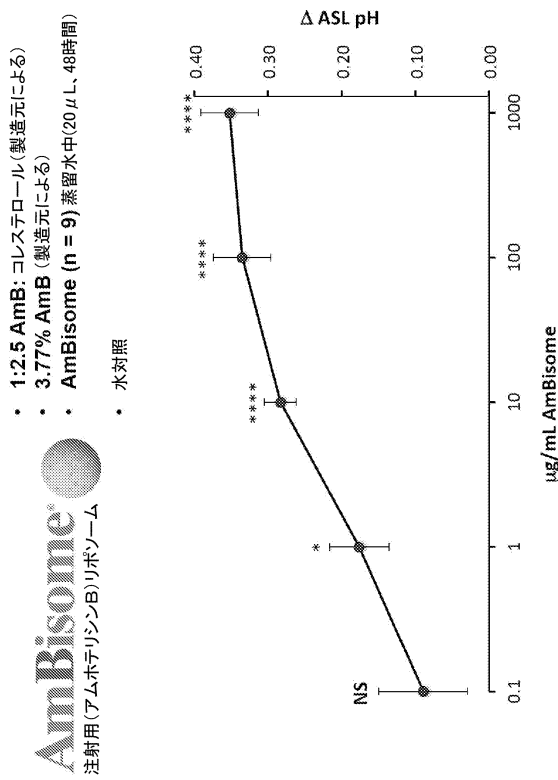
40

50

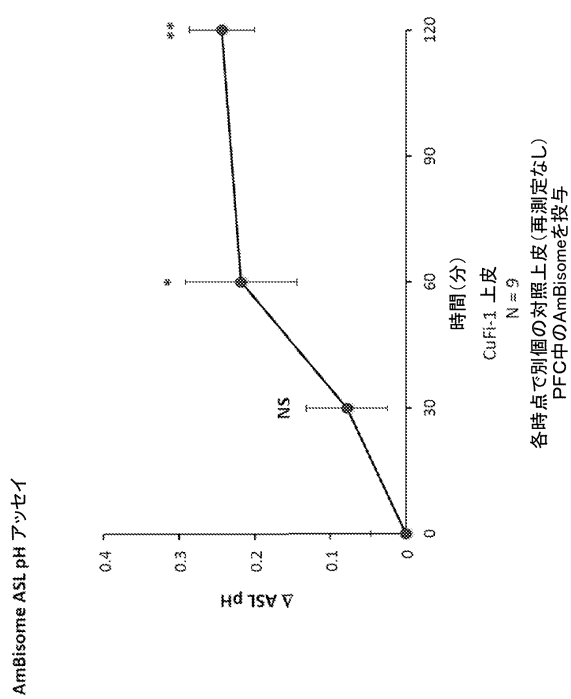
【図 4】



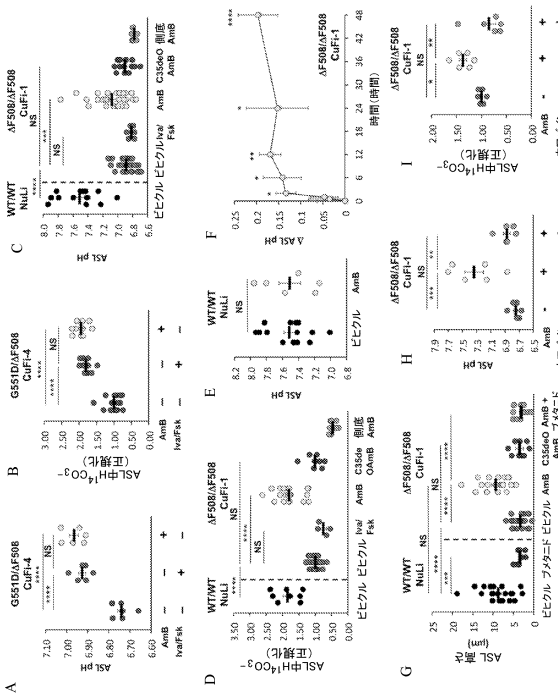
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 1/18 (2006.01)

A 6 1 P 1/18

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 43/00 1 2 1

アメリカ合衆国 アイオワ州 5 2 2 4 2 - 5 5 0 0 , アイオワシティ , ノースキャピタルストリート 1 1 2 , ギルモアホール 6

(74)代理人 100139723

弁理士 樋口 洋

(72)発明者 バーク , マーティン ディー

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 2 1 シャンペーン オールド ファーム ロード 1 4 0 3

(72)発明者 ムラリア , カトリーナ エー

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 2 0 シャンペーン ブリーン ドライヴ 6 0 6

(72)発明者 コールガード , ラジーヴ エス

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 2 2 シャンペーン クレイトン ブールヴァード 2 8 0 5

(72)発明者 ウェルシュ , マイケル ジェイ

アメリカ合衆国 アイオワ州 5 2 2 4 2 アイオワ シティ サウス キャピトル ストリート 2 0 0 ユニヴァーシティ キャピトル センター 2 6 6 0

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 0 7 3 4 6 2 (W O , A 1)

特開平 0 1 - 1 6 0 9 1 5 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 0 1 7 8 2 (J P , A)

特許第 7 0 4 1 9 6 1 (J P , B 2)

Journal of Chemotherapy , 2015年 , Vol.27 , pp.307-311

International Journal of Pediatrics , 2010年 , Article ID 376287 , DOI: 10.1155/2010/376287

Eur. Respi.r J. , 2014年 , Vol.44 , pp.1308-1318

Medical Mycology , 2016年 , Vol.54 , pp.223-231

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)