

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6180930号
(P6180930)

(45) 発行日 平成29年8月16日 (2017.8.16)

(24) 登録日 平成29年7月28日 (2017.7.28)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|------------------------|------------------|-----------------|--|
| A 6 1 K 45/00 | (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 K 31/585 | (2006.01) | A 6 1 K 31/585 | |
| A 6 1 K 31/7088 | (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | |
| A 6 1 P 17/02 | (2006.01) | A 6 1 P 17/02 | |

請求項の数 8 (全 21 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2013-514722 (P2013-514722) | (73) 特許権者 | 591100596 |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年6月16日 (2011.6.16) | | アンスティチュ ナショナル ドウ ラ |
| (65) 公表番号 | 特表2013-528636 (P2013-528636A) | | サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ |
| (43) 公表日 | 平成25年7月11日 (2013.7.11) | | ディカル |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2011/060039 | | フランス国、エフー75013 パリ、リ |
| (87) 国際公開番号 | W02011/157798 | | ユ・ドウ・トルビアック 101 |
| (87) 国際公開日 | 平成23年12月22日 (2011.12.22) | (73) 特許権者 | 591140123 |
| 審査請求日 | 平成26年5月14日 (2014.5.14) | | アシスタンス ピュブリクーオピトー ド |
| 審査番号 | 不服2016-9348 (P2016-9348/J1) | | ウ パリ |
| 審査請求日 | 平成28年6月23日 (2016.6.23) | | ASSISTANCE PUBLIQUE |
| (31) 優先権主張番号 | 61/359,078 | | - HOPITAUX DE PARI |
| (32) 優先日 | 平成22年6月28日 (2010.6.28) | | S |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | フランス国、75004 パリ、アベニュー |
| (31) 優先権主張番号 | 10305648.7 | | ビクトリア 3番地 |
| (32) 優先日 | 平成22年6月16日 (2010.6.16) | | |
| (33) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 創傷治癒過程における再上皮化を刺激するための方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

鉍質コルチコイド受容体アンタゴニスト又は鉍質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤を含む医薬組成物であって、

前記鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストは、エポキシステロイド系鉍質コルチコイド受容体アンタゴニスト化合物、非エポキシステロイド系鉍質コルチコイド受容体アンタゴニスト及び非ステロイド系受容体アンタゴニスト化合物からなる群より選択され、

前記鉍質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、s h R N A及びリボザイムからなる群より選択され、

必要とする被験者に前記医薬組成物の治療上有効量を皮膚の創傷治癒過程の再上皮化段階で投与することによって皮膚の創傷治癒の遅延を治療するための医薬組成物。

【請求項2】

前記皮膚の創傷治癒の遅延は、コルチコイド処置中に見られる創傷治癒の遅延、高齢者に見られる創傷治癒の遅延（加齢障害）、及び、糖尿病患者に見られる創傷治癒の遅延からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

スピロラクトン、ドロスピレノン及びエプレレノンからなる群より選択される鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストを含む、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

局所送達のための、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

20

【請求項 5】

皮膚処置のための、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

液剤、クリーム剤、軟膏、ゲル剤又は治療用包帯製剤 (formulation healing bandage) である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト又は鉱質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤と、経皮又はパッチデバイスとを含む、医薬組成物であって、

前記鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストは、エポキシステロイド系鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト化合物、非エポキシステロイド系鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト及び非ステロイド系受容体アンタゴニスト化合物からなる群より選択され、

前記鉱質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、s h R N A 及びリボザイムからなる群より選択され、

前記経皮又はパッチデバイスは、前記 M R アンタゴニスト又は鉱質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤を含み、

必要とする被験者に前記医薬組成物を皮膚の創傷治癒過程の再上皮化段階で適用することによって皮膚の創傷治癒の遅延を治療するための医薬組成物。

【請求項 8】

前記皮膚の創傷治癒の遅延は、コルチコイド処置中に見られる創傷治癒の遅延、高齢者に見られる創傷治癒の遅延 (加齢障害)、及び、糖尿病患者に見られる創傷治癒の遅延からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、創傷治癒過程において再上皮化を刺激するための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚及び角膜の主な役割は、周囲環境に対して保護層として働くことである。損傷又は病気により皮膚又は角膜部位の完全性が失われると、重大な障害を引き起こすだけでなく、死に至る可能性さえある。米国では、毎年 1 2 5 万を超える人が熱傷を受傷しており、そして、6 5 0 万人が圧迫、静脈鬱滞及び糖尿病により引き起こされる慢性皮膚潰瘍を患っている。角膜潰瘍、角膜びらん、角膜炎及びドライアイなどの様々な疾患で観察されるように、多くの角膜障害もまた角膜上皮の完全性の欠如により引き起こされる。また、薬物の局所投与及び手術状況により上皮の創傷治癒の遅延がもたらされる恐れもある。

【0003】

創傷治癒は、可溶性メディエーター、血液細胞、細胞外マトリックス及び実質細胞が関与する動的な相互作用プロセスである。創傷治癒は、経時的にオーバーラップする 3 つの段階：血管相と炎症、再上皮化を含む新しい組織の形成及び組織再構築を有する。創傷は、現在、創傷部位に応急処置を施して、自己の生物学的な回復力により創傷が自然に治癒するまで待つことにより治療される。しかし、慢性的に不完全なままの再上皮化も確認され、これは、日和見感染、回復不能な瘢痕化、そして、最終的に角膜又は皮膚障害をもたらす恐れがある。従って、創傷治癒のための既存の薬剤は、再上皮化を刺激するための十分な作用を有していないため、短期間に創傷を完全に治癒することができない問題がある。

【0004】

発明の概要

本発明は、創傷治癒過程における皮膚又は角膜の再上皮化を刺激する方法において使用するための、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト又は鉱質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤に関する。

【0005】

10

20

30

40

50

発明の詳細な説明

本発明は、創傷治癒過程における皮膚又は角膜の再上皮化を刺激する方法において使用するための、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストに関する。

【0006】

本明細書で使用される用語「創傷」は、術創ならびに事故の外傷による創傷を含むことを理解されたい。

【0007】

典型的には、皮膚創傷は、糖尿病性足潰瘍、静脈鬱滞性潰瘍、熱傷から生じうる。この用語には、また、コルチコイド処置中に見られる創傷治癒の遅延、高齢者に見られる創傷治癒の遅延（加齢障害）、ストレス、糖尿病患者に見られる創傷治癒の遅延、手術痕又は皮膚移植後の上皮化不全、寒冷暴露後に生じる指のひび割れ、治癒遅延に伴う爪の病変、長期間の徒歩又は走行により生じる足の水膨れが含まれる。

【0008】

角膜創は、角膜潰瘍、角膜びらん又は外傷、角膜炎及びドライアイなどの様々な疾患から生じうる。創傷は、また、薬物の局所投与及び手術状況、例えば、角膜移植及び角膜移植からの回復過程において生じうる。

【0009】

本明細書で使用される用語「再上皮化」は、損傷した真皮上への角化細胞（ケラチノサイト）の遊走、及び創傷を徐々に覆って、バリア機能を修復する角化細胞の増殖／成熟を指し、同じ概念を角膜上皮の修復まで拡張することができる。

【0010】

本明細書で使用される用語「鉱質コルチコイド受容体」又は「MR」は、当技術分野において一般的なその意味を有し、鉱質コルチコイドに高い親和性を有する受容体である核内受容体サブファミリー3、グループC、メンバー2（NR3C2）を指す。鉱質コルチコイド受容体は、また、アルドステロン受容体とも呼ばれる。化合物のMRアンタゴニスト又はアゴニスト活性は、J, Souque A, Wurtz JM, Moras D, Rafestin-Oblin ME. Mol Endocrinol. 2000 Aug; 14(8): 1210-21; Fagart J, Seguin C, Pinon GM, Rafestin-Oblin ME. Mol Pharmacol. 2005 May; 67(5): 1714-22 or Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A, Wurtz JM, Moras D, Rafestin-Oblin ME. Mol Endocrinol. 2000 Aug; 14(8): 1210-21に記載されるような様々な方法を用いて決定することができる。典型的には、ヒト鉱質コルチコイド受容体をルシフェラーゼ発現受容体遺伝子と共にCOS細胞へトランスフェクションすることで、候補化合物の存在下でそのトランス活性化活性を測定することができる。

【0011】

本発明の内容において、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストは、好ましくは、アンドロゲン受容体、エストロゲン受容体、糖質コルチコイド受容体、プロゲステロン受容体、甲状腺ホルモン受容体、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体、レチノイン酸受容体、ファルネソイドX受容体、プレグナンX受容体、肝臓X受容体、ビタミンD受容体、レチノイドX受容体及び構成的アンドロスタン受容体などの関連受容体と比較して、鉱質コルチコイド受容体に選択的である。「選択的」とは、鉱質コルチコイド受容体に対するアンタゴニストの親和性が、その関連受容体に対する親和性より少なくとも10倍、好ましくは、25倍、より好ましくは、100倍、さらに好ましくは、500倍高いことを意味する。

【0012】

一実施態様においては、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストは、低分子量のアンタゴニスト、例えば、小さな有機分子である。用語「小さな有機分子」は、製薬分野で一般的に使用される有機分子と同程度のサイズの分子を指す。この用語は、生体高分子（例えば、タンパク質、核酸など）を除く。好ましい小さな有機分子は、約5000Da以下、より好ましくは、2000Da以下、最も好ましくは、約1000Da以下の範囲のサイズである。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

典型的には、本発明の鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストは、一般に、スピロラクトン型ステロイド化合物である。用語「スピロラクトン型」は、ステロイド核の通常はステロイド「D」環にスピロ結合配置を介して結合しているラクトン部分を含む構造を特徴とする。スピロラクトン型鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト化合物のサブクラスは、エプレレノンなどのエポキシステロイド系鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト化合物からなる。スピロラクトン型アンタゴニスト化合物の別のサブクラスは、スピロノラクトンなどの非エポキシステロイド系鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト化合物からなる。

【 0 0 1 4 】

本発明の方法において使用されるエポキシステロイド系鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト化合物は、一般的に、エポキシ型部分で置換されたステロイド核を有する。用語「エポキシ型」部分は、2つの炭素原子間を架橋する酸素原子を有することを特徴とする任意の部分を包含することを意図する。

【 0 0 1 5 】

語句「エポキシステロイド系」で使用される用語「ステロイド系」は、従来の「A」、「B」、「C」及び「D」環を有するシクロペンテノ-フェナントレン部分により与えられる核を指す。エポキシ型部分は、シクロペンテノフェナントレン核に、任意の結合可能又は置換可能位置で結合していてもよく、すなわち、ステロイド核の環の1つに縮合しているか、又はその部分は、環系の環員上で置換されていてよい。語句「エポキシステロイド系」は、1つ又は複数のエポキシ型分子が結合したステロイド系核を包含することを意図する。

【 0 0 1 6 】

本発明の方法において使用するために適切なエポキシステロイド鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストは、ステロイド核の「C」環に縮合したエポキシ部分を有する化合物ファミリーを含む。例には、例えば、下記の9, 11-置換エポキシ部分の存在を特徴とする20-スピロキサソ化合物が含まれる：

- プレグナ-4-エン-7, 21-ジカルボン酸, 9, 11-エポキシ-17-ヒドロキシ-3-オキソ-, -ラクトン, メチルエステル(7, 11, 17)、

- プレグナ-4-エン-7, 21-ジカルボン酸, 9, 11-エポキシ-17-ヒドロキシ-3-オキソ-, ジメチルエステル(7, 11, 17)、

- 3'-H-シクロプロパ[6, 7]プレグナ-4, 6-ジエン-21-カルボン酸, 9, 11-エポキシ-6, 7-ジヒドロ-17-ヒドロキシ-3-オキソ-, -ラクトン(6, 7, 11, 17)、

- プレグナ-4-エン-7, 21-ジカルボン酸, 9, 11-エポキシ-17-ヒドロキシ-3-オキソ-, 7-(1-メチルエチル)エステル, 一カリウム塩(7, 11, 17)、

- プレグナ-4-エン-7, 21-ジカルボン酸, 9, 11-エポキシ-17-ヒドロキシ-3-オキソ-, 7-メチルエチル)エステル, 一カリウム塩(7, 11, 17)、

- 3'-H-シクロプロパ[6, 7]プレグナ-1, 4, 6-トリエン-21-カルボン酸, 9, 11-エポキシ-6, 7-ジヒドロ-17-ヒドロキシ-3-オキソ-, -ラクトン(6, 7, 11)、

- 3'-H-シクロプロパ[6, 7]プレグナ-4, 6-ジエン-21-カルボン酸, 9, 11-エポキシ-6, 7-ジヒドロ-17-ヒドロキシ-3-オキソ-, メチルエステル(6, 7, 11, 17)、

- 3'-H-シクロプロパ[6, 7]プレグナ-4, 6-ジエン-21-カルボン酸, 9, 11-エポキシ-6, 7-ジヒドロ-17-ヒドロキシ-3-オキソ-, 一カリウム塩(6, 7, 11, 17)、

- 3'-H-シクロプロパ[6, 7]プレグナ-1, 4, 6-トリエン-21-カルボ

10

20

30

40

50

ン酸， 9， 11 - エポキシ - 6， 7 - ジヒドロ - 17 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - ， -
ラクトン (6 ， 7 ， 11 ， 17)、

- プレグナ - 4 - エン - 7， 21 - ジカルボン酸， 9， 11 - エポキシ - 17 - ヒド
ロキシ - 3 - オキソ - ， - ラクトン， エチルエステル (7 ， 11 ， 17)、

- プレグナ - 4 - エン - 7， 21 - ジカルボン酸， 9， 11 - エポキシ - 17 - ヒド
ロキシ - 3 - オキソ - ， - ラクトン， 1 - メチルエチルエステル (7 ， 11 ， 17)
)。

【 0017 】

エプレレノンのような、エポキシステロイド系鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト
を使用する特定の利点は、鉱質コルチコイド受容体に対してこの鉱質コルチコイド受容体
アンタゴニストグループが高い選択性を有することにある。エプレレノンの優れた選択性
は、アンドロゲン又はプロゲステロン受容体などの関連受容体に対して非選択的結合を示
す鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストにより生じうる副作用を減少させる。

10

【 0018 】

これらのエポキシステロイドは、Grob等の米国特許第4,559,332号に記載の方法により
調製することができる。9， 11 - エポキシステロイド系化合物及びその塩を調製するた
めのさらなる方法は、Ng等のW097/21720及びNg等のW098/25948に開示されている。

【 0019 】

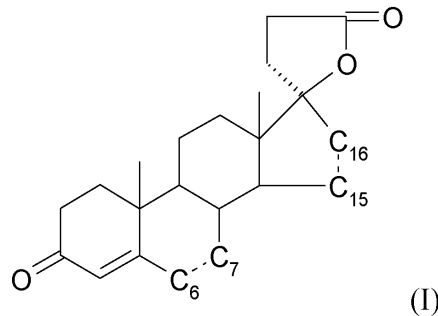
特に重要なものは、化合物エプレレノン ((プレグナ - 4 - エン - 7， 21 - ジカルボ
ン酸， 9， 11 - エポキシ - 17 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - ， - ラクトン， メチルエ
ステル (7 ， 11 ， 17)) (CAS No.107724-20-9) (エポキシメキシレノンとし
ても知られる) である。エプレレノンは鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストであり、
鉱質コルチコイド受容体に対して、例えば、スピロラクトンよりも高い選択性を有する
。本発明の方法において、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとしてのエプレレノ
ンの選択は、特異性が低い鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストを使用することにより生
じる女性化乳房などの特定の副作用を減少させるために有益であろう。

20

【 0020 】

本発明の方法において使用するために適切な非エポキシステロイド鉱質コルチコイド受
容体アンタゴニストは、式 I :

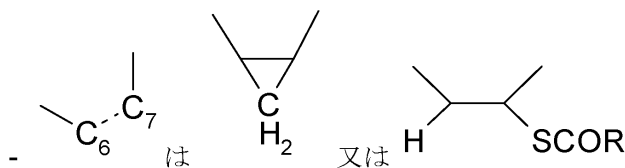
【 化 1 】



30

[式中、

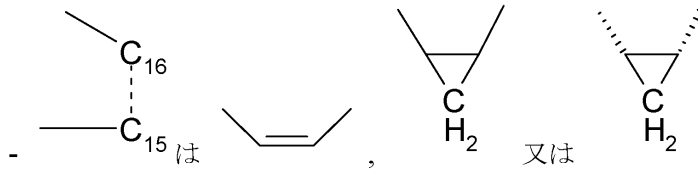
【 化 2 】



40

(R は、 5 個以下の炭素原子の低級アルキルである) であり、そして

【化3】



(低級アルキル残基は、分岐及び非分岐基、例えば、メチル、エチル及びn-プロピルを含む)である]

で定義されるスピロラクトン型化合物ファミリーを含む。

10

【0021】

特定の重要な式Iの化合物は、

- 7 - アセチルチオ - 3 - オキソ - 4 , 15 - アンドロスタジエン - [17 (- 1 ') - スピロ - 5 '] ペルヒドロフラン - 2 ' - オン ;
- 3 - オキソ - 7 - プロピオニルチオ - 4 , 15 - アンドロスタジエン - [17 ((- 1 ') - スピロ - 5 '] ペルヒドロフラン - 2 ' - オン ;
- 6 , 7 - メチレン - 3 - オキソ - 4 , 15 - アンドロスタジエン - [17 ((- 1 ') - スピロ - 5 '] ペルヒドロフラン - 2 ' - オン ;
- 15 , 16 - メチレン - 3 - オキソ - 4 , 7 - プロピオニルチオ - 4 - アンドロステン [17 (- 1 ') - スピロ - 5 '] ペルヒドロフラン - 2 ' - オン ;
- 6 , 7 , 15 , 16 - ジメチレン - 3 - オキソ - 4 - アンドロステン [17 (- 1 ') - スピロ - 5 '] - ペルヒドロフラン - 2 ' - オン ;
- 7 - アセチルチオ - 15 , 16 - メチレン - 3 - オキソ - 4 - アンドロステン - [17 (- 1 ') - スピロ - 5 '] ペルヒドロフラン - 2 ' - オン ;
- 15 , 16 - メチレン - 3 - オキソ - 7 - プロピオニルチオ - 4 - アンドロステン - [17 (- 1 ') - スピロ - 5 '] ペルヒドロフラン - 2 ' - オン ; 及び
- 6 , 7 , 15 , 16 - ジメチレン - 3 - オキソ - 4 - アンドロステン - [17 (- 1 ') - スピロ - 5 '] ペルヒドロフラン - 2 ' - オンである。

20

【0022】

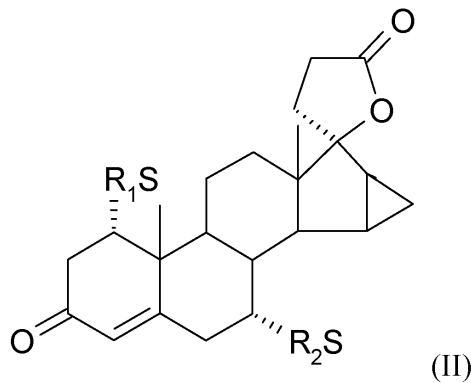
式Iの化合物を製造するための方法は、1978年12月12日に公開されたWiechart等の米国特許第4,129,564号に記載されている。

30

【0023】

別の重要な非エポキシステロイド化合物ファミリーは、式II :

【化4】



40

[式中、R₁は、C₁₋₃-アルキル又はC₁₋₃-アシルであり、R₂は、H又はC₁₋₃-アルキルである]

で定義される。

【0024】

50

特定の重要な式 I I の化合物は、

- 1 - アセチルチオ - 15 , 16 - メチレン - 7 - メチルチオ - 3 - オキソ - 17 - プレグナ - 4 - エン - 21 , 17 - カルボラクトン ; 及び
- 15 , 16 - メチレン - 1 , 7 - ジメチルチオ - 3 - オキソ - 17 - プレグナ - 4 - エン - 21 , 17 - カルボラクトンである。

【 0 0 2 5 】

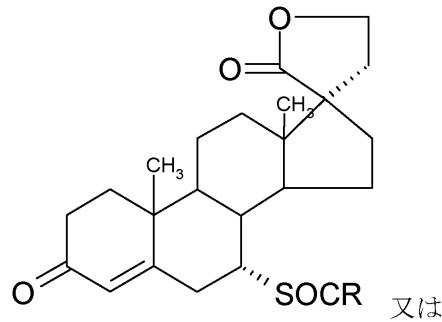
式 I I の化合物を製造するための方法は、1988年12月6日に公開されたNickisch等の米国特許第4,789,668号に記載されている。

【 0 0 2 6 】

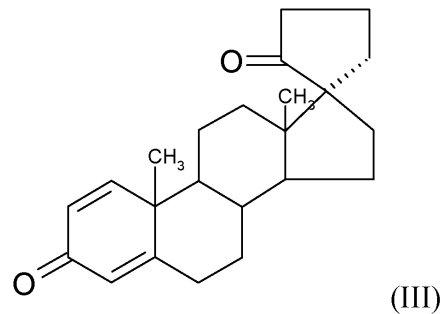
さらに別の重要な非エポキシステロイド化合物ファミリーは、式 I I I :

【 化 5 】

10



20



30

[式中、Rは、低級アルキルであり、その例には、メチル、エチル、プロピル及びブチルの低級アルキル基が含まれる]の構造により定義される。

【 0 0 2 7 】

特定の重要な化合物は、

- 3 , 21 - ジヒドロキシ - 17 - プレグナ - 5 , 15 - ジエン - 17 - カルボン酸 - ラクトン ;
- 3 , 21 - ジヒドロキシ - 17 - プレグナ - 5 , 15 - ジエン - 17 - カルボン酸 - ラクトン 3 - アセテート ;
- 3 , 21 - ジヒドロキシ - 17 - プレグナ - 5 - エン - 17 - カルボン酸 - ラクトン ;
- 3 , 21 - ジヒドロキシ - 17 - プレグナ - 5 - エン - 17 - カルボン酸 - ラクトン 3 - アセテート ;
- 21 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - 17 - プレグナ - 4 - エン - 17 - カルボン酸 - ラクトン ;
- 21 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - 17 - プレグナ - 4 , 6 - ジエン - 17 - カルボン酸 - ラクトン ;
- 21 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - 17 - プレグナ - 1 , 4 - ジエン - 17 - カルボン酸 - ラクトン ;
- 7 - アシルチオ - 21 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - 17 - プレグナ - 4 - エン

40

50

- 17 - カルボン酸 - ラクトン ; 及び
 - 7 - アセチルチオ - 21 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - 17 - プレグナ - 4 - エン - 17 - カルボン酸 - ラクトンを含む。

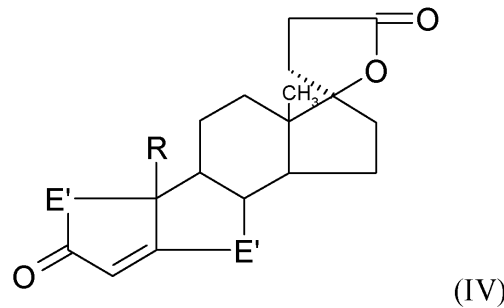
【0028】

式IIIの化合物を製造するための方法は、1966年6月21日に公開されたPatentの米国特許第3,257,390号に記載されている。

【0029】

さらに別の重要な非エポキシステロイド化合物ファミリーは、式IV :

【化6】



10

[式中、E' は、エチレン、ビニレン及び(低級アルカノイル)チオエチレン基からなる群より選択され、E'' は、エチレン、ビニレン、(低級アルカノイル)チオエチレン及び(低級アルカノイル)チオプロピレン基からなる群より選択され；Rは、E' 及びE'' が、それぞれエチレン及び(低級アルカノイル)チオエチレン基である場合を除きメチル基であり、その場合、Rは、水素及びメチル基からなる群より選択され；そして、E' 及びE'' は、少なくとも1つの(低級アルカノイル)チオ基が存在するように選択される]

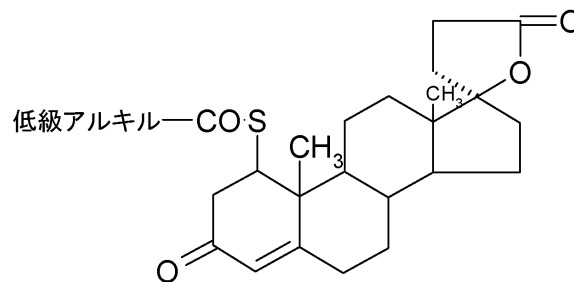
20

で表される。

【0030】

式IVの非エポキシステロイド化合物ファミリーの1つは、式V :

【化7】



30

で表される。

40

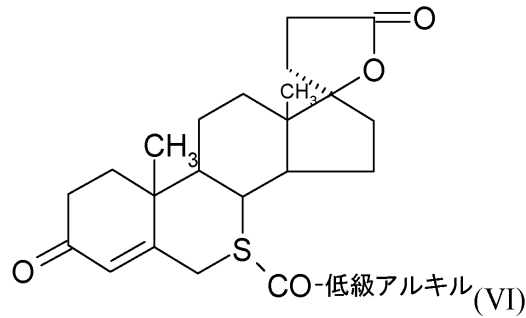
【0031】

式Vの別の化合物は、1 - アセチルチオ - 17 - (2 - カルボキシエチル) - 17 - ヒドロキシ - アンドロスタ - 4 - エン - 3 - オンラクトンである。

【0032】

別の式IVの非エポキシステロイド化合物ファミリーは、式VI :

【化 8】



10

で表される。

【0033】

式VIの例示化合物は、

- 7 - アセチルチオ - 17 - (2 - カルボキシエチル) - 17 - ヒドロキシ - アンドロスタ - 4 - エン - 3 - オンラクトン；

- 7 - アセチルチオ - 17 - (2 - カルボキシエチル) - 17 - ヒドロキシ - アンドロスタ - 4 - エン - 3 - オンラクトン；

- 1, 7 - ジアセチルチオ - 17 - (2 - カルボキシエチル) - 17 - ヒドロキシ - アンドロスタ - 4, 6 - ジエン - 3 - オンラクトン；

20

- 7 - アセチルチオ - 17 - (2 - カルボキシエチル) - 17 - ヒドロキシ - アンドロスタ - 1, 4 - ジエン - 3 - オンラクトン；

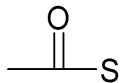
- 7 - アセチルチオ - 17 - (2 - カルボキシエチル) - 17 - ヒドロキシ - 19 - ノルアンドロスタ - 4 - エン - 3 - オンラクトン；及び

- 7 - アセチルチオ - 17 - (2 - カルボキシエチル) - 17 - ヒドロキシ - 6 - メチルアンドロスタ - 4 - エン - 3 - オンラクトンを含む。

【0034】

式IV～VIにおいて、用語「アルキル」は、1～約8個の炭素を含有する直鎖及び分岐鎖アルキル基を包含することを意図する。用語「(低級アルカノイル)チオ」は、式：

【化 9】



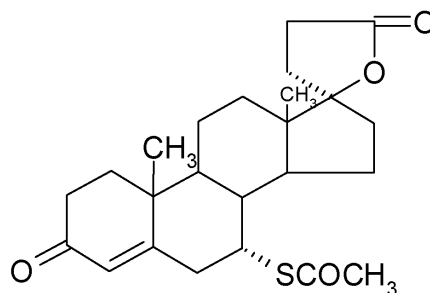
30

の低級アルキル基を包含する。

【0035】

特に重要なものは、下記の構造：

【化 10】



40

を有する化合物スピロノラクトン(17 - ヒドロキシ - 7 - メルカプト - 3 - オキシ - 17 - プレグナ - 4 - エン - 21 - カルボン酸 - ラクトンアセテート)である。

【0036】

50

式 I V ~ V I の化合物を製造するための方法は、1961年12月12日に公開された Cella等の米国特許第3,013,012号に記載されている。スピロラク톤は、G. D. Searle & Co., Skokie, Ill.により、1錠あたり25mg、50mg及び100mgの用量の錠剤の形態で「ALDACTONE」という商品名で販売されている。

【0037】

別のステロイド鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストファミリーの例は、ドロスピレノン(6R-(6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17))-1, 3', 4', 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21-ヘキサデカヒドロ-10, 13-ジメチルスピロ[17H-ジシクロプロパ(6, 7:15, 16)シクロペンタ(a)フェナントレン-17, 2'(5'H)-フラン]-3, 5'(2H)-ジオン)(CAS登録番号67392-87-4)である。ドロスピレノンを製造及び使用するための方法は、GB特許1550568 1979(優先DE 2652761 1976)に記載されている。

10

【0038】

鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストのエプレレノンについて、取り扱いが容易で、再現性のある形態であり、容易に調製される安定した非吸湿性の結晶形態が同定された。これらは、H型、L型、様々な結晶性溶媒和物及び非晶質のエプレレノンを含む。これらの形態、これらの形態を製造するための方法、ならびに組成物及び医薬の調製におけるこれらの形態の使用は、Barton等のWO 01/41535及びBarton等のWO 01/42272に開示されており、これらは共にその全体が本明細書に包含される。

20

【0039】

本発明の鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとして使用することができる小さな有機分子は、また、非ステロイド系であってもよい。例えば、非ステロイド系MRアンタゴニストのクラスは、最近数年間で現れ始めた(Meyers, Marvin J1; Hu, Xiao Expert Opinion on Therapeutic Patents, Volume 17, Number 1, January 2007, pp. 17-23(7))。最近、ジヒドロピリミジンがMR拮抗作用を発揮することが示された(Activation of Mineralocorticoid Receptors by Exogenous Glucocorticoids and the Development of Cardiovascular Inflammatory Responses in Adrenalectomized Rats. Young MJ, Morgan J, Brolin K, Fuller PJ, Funder JW. Endocrinology. 2010 Apr 21)。さらに、Arhancet等は、他のクラスの非ステロイド系MRアンタゴニストを開示している(Arhancet GB, Woodard SS, Dietz JD, Garland DJ, Wagner GM, Iyanar K, Collins JT, Blinn JR, Numann RE, Hu X, Huang HC. Stereochemical Requirements for the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Activity of Dihydropyridines. J Med Chem. 2010 Apr 21)。非ステロイド系鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストの他の例には、米国特許出願公開報 US 20090163472、WO2004052847、WO 2008053300(参照することにより本開示に包含される)に開示されるものが含まれるが、これらに限定されない。例えば、WO 06/076202(2006年7月20日公開)は、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとしてイミダゾールカルボキサミドのクラスを報告している。WO 06/012642(2006年2月2日公開)は、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとしてピロールカルボキサミドのクラスを報告している。WO 04/052847(2004年6月24日公開)は、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとしてジベンゾスベランのクラスを報告している。WO 05/066161(2005年7月21日公開)は、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとしてジベンゾスベランのクラスを報告している。WO 03/078394(2003年9月25日公開)は、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとして3, 3-ビスアリーロキシインドールのクラスを報告している。WO 05/097118(2005年10月20日公開)は、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとして4-アリール-1, 4-ジヒドロピリジンのクラスを報告している。WO 04/067529(2004年8月12日公開)は、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとして3-ベンジルインドールのクラスを報告している。WO 06/077821(2006年7月27日公開)は、鉱質コルチコイド受容体アンタゴニストとしてベンゾオキサジンチオン及びテトラヒドロキノリンのクラスを報告している。WO 06/010142(2006年1月26日

30

40

50

公開)は、鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストとしてアリアルベンゾオキサジノン/チオンのクラスを報告している。

【0040】

別のアンタゴニストの例には、カンレノ酸の塩が含まれる。カンレノ酸は体内でカンレノンに代謝されるプロドラッグである。

【0041】

あるいは、鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストは、抗体(この用語は、「抗体フラグメント」を含む)から構成されていてもよい。特に、鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストは、鉍質コルチコイド受容体を阻害するようにその受容体に対する抗体から構成されていてもよい。

10

【0042】

抗体は、公知の方法に従って、適切な抗原又はエピトープを、とりわけ、ブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ及びマウスから選択される宿主動物に投与することにより作製することができる。抗体の産生を高めるために当技術分野で公知の様々なアジュバントを使用することができる。本発明の実施において有用な抗体はポリクローナルであってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体は、連続培養細胞株により抗体分子を産生する任意の技術を用いて調製、単離することができる。産生及び単離技術には、ハイブリドーマ技術;ヒトB細胞ハイブリドーマ技術;及びEBV-ハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、単鎖抗体を産生するための記載の技術(例えば、米国特許第4,946,778号参照)を抗鉍質コルチコイド受容体単鎖抗体の産生に適合することができる。

20

【0043】

本発明の実施において有用な鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストには、また、非限定的に、インタクトな抗体分子のペプシン消化により生成しうるF(ab')₂フラグメント、及びF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成しうるFabフラグメントを含む、抗鉍質コルチコイド受容体の抗体フラグメントが含まれる。あるいは、鉍質コルチコイド受容体に対して所望の特異性を有するフラグメントの迅速な同定を可能にするために、Fab及び/又はscFv発現ライブラリーを構築することができる。

【0044】

ヒト化抗体及びその抗体フラグメントは、また、公知の技術に従って調製することができる。「ヒト化抗体」は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有する非ヒト(例えば、げっ歯類)キメラ抗体の形態である。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性及び生産能力を有するマウス、ラット、ウサギ又はヒト以外の霊長類などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域由来の残基で置換されている、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基で置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体に見られない残基を含んでいてもよい。これらの改変は抗体の性能をさらに高めるために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFRである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変領域の実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、また、場合により、免疫グロブリンの定常領域(Fc)、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。ヒト化抗体を製造するための方法は、例えば、Winter(米国特許第5,225,539号)及びBoss(Celltech、米国特許第4,816,397号)に記載されている。

30

40

【0045】

上述のように抗体を作製した後、当業者は、鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストである抗体を容易に選択することができる。

【0046】

50

別の実施態様においては、鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストは、アプタマーである。アプタマーは、分子認識に関して抗体の代わりとなる分子のクラスである。アプタマーは、高い親和性及び特異性で実質的にあらゆるクラスの標的分子を認識する能力を有するオリゴヌクレオチド又はオリゴペプチド配列である。このようなリガンドは、Tuerk C. 及びGold L. (1990年)に記載されるようなランダム配列ライブラリーの試験管内人工進化法 (SELEX) により単離することができる。ランダム配列ライブラリーは、DNAのコンビナトリアル化学合成により得ることが可能である。このライブラリーでは、それぞれのメンバーは固有配列の最終的に化学修飾された直鎖オリゴマーである。このクラスの分子の可能な改変、用途及び利点は、Jayasena S.D. (1999年)に概説されている。ペプチドアプタマーは、2種類のハイブリッド法によってコンビナトリアルライブラリーから選択される、E. coliのチオレドキシニンAなどのプラットフォームタンパク質により提示される立体構造的に制約された抗体可変領域から構成される (Colas等、1996年)。

【0047】

上述のように鉍質コルチコイド受容体に対するアプタマーを作製した後、当業者は、鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストであるアプタマーを容易に選択することができる。

【0048】

本発明のさらなる目的は、創傷治癒の間の皮膚又は角膜の再上皮化を刺激する方法において使用するための鉍質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤に関する。

【0049】

本発明において使用するための発現の阻害剤はアンチセンスオリゴヌクレオチド構築物ベースであってもよい。アンチセンスRNA分子及びアンチセンスDNA分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、鉍質コルチコイド受容体mRNAに結合することによってその翻訳を直接阻害するように、すなわちタンパク質翻訳を抑制するか、又はmRNAの分解を増加させ、これにより細胞内の鉍質コルチコイド受容体レベル、すなわち活性を低下させるように作用する。例えば、少なくとも約15塩基であり、鉍質コルチコイド受容体をコードするmRNAの転写配列の固有領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを、例えば、従来のホスホジエステル技術により合成することができ、これを、例えば、静脈内注射又は注入により投与することができる。配列が知られている遺伝子の遺伝子発現を特異的に阻害するためにアンチセンス技術を使用する方法は、当技術分野においてよく知られている (例えば、米国特許第6,566,135号; 第6,566,131号; 第6,365,354号; 第6,410,323号; 第6,107,091号; 第6,046,321号; 及び第5,981,732号参照)。

【0050】

小分子阻害性RNA (siRNA) は、また、本発明において使用するための発現の阻害剤として機能することができる。鉍質コルチコイド受容体の遺伝子発現は、対象又は細胞を小分子二本鎖RNA (dsRNA) 又は小分子二本鎖RNAの産生を引き起こすベクターもしくは構築物と接触させることにより低下させ、鉍質コルチコイド受容体の遺伝子発現を特異的に阻害することができる (即ち、RNA干渉又はRNAi)。配列が知られている遺伝子について、適切なdsRNA又はdsRNAコードベクターを選択する方法は当技術分野においてよく知られている (例えば、Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); 米国特許第6,573,099号及び第6,506,559号; ならびに国際特許公開第WO 01/36646、WO 99/32619及びWO 01/68836参照)。本発明のsiRNAのホスホジエステル結合の全て又は一部を保護することが有利である。この保護は、一般的に、当技術分野において公知の方法を使用する化学的経路により実施される。ホスホジエステル結合は、例えば、チオールもしくはアミン官能基により又はフェニル基により保護することができる。本発明のsiRNAの5'及び/又は3'末端は、また、例えば、ホスホジエステル結合を保護するための上述の技術を用いて保護するのが有利である。siRNA配列は、少なくとも12個の連続したジヌクレオチド又はその誘導体を含むことが有利である。

【0051】

本発明の核酸配列に関して、本明細書で使用される用語「s i R N A 誘導体」は、エリ
スロポエチン又はそのフラグメントと少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%
、一例として、少なくとも98%、より好ましくは、少なくとも98%の同一性パーセン
テージを有する核酸を指す。

【0052】

本明細書で使用される2つの核酸配列間の「同一性パーセンテージ」は、前記配列の最
良のアラインメントで得られる比較される2つの配列間の同一の核酸のパーセンテージを
意味し、このパーセンテージは純粹に統計的であって、これらの2つの配列間の相違は核
酸配列にランダムに分布している。本明細書で使用される「最良のアラインメント」又は
「最適なアラインメント」は、決定された同一性パーセンテージ（下記参照）が最も高い
アラインメントを意味する。2つの核酸配列間の配列比較は、通常、最良のアラインメント
に従ってアラインした後にこれらの配列を比較することによって実現される。この比較
は類似性の局所領域を同定し、比較するために比較のセグメントによって実現される。比
較を実施するために最良な配列アラインメントは、手作業で行うほかに、SMITH及びWATER
MANより開発されたグローバルホモロジーアルゴリズム（Ad. App. Math., vol.2, p:482,
1981）を用いることにより、NEDDLEMAN及びWUNSCHにより開発されたローカルホモジ
ーアルゴリズム（J. Mol. Biol., vol.48, p:443, 1970）を用いることにより、PEARSON及
びLIPMANにより開発された類似性検索法（Proc. Natl. Acd. Sci. USA, vol.85, p:2444,
1988）を用いることにより、このようなアルゴリズムを使用したコンピューターソフト
ウェア（GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA in the Wisconsin Genetics
software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI USA）を
用いることにより、MUSCLE多重アラインメントアルゴリズム（Edgar, Robert C., Nuclei
c Acids Research, vol. 32, p:1792, 2004）を用いることにより実現することができる
。ローカルアラインメントを得るために、好ましくは、BLASTソフトウェアを使用するこ
とができる。2つの核酸配列間の同一性パーセンテージは、最適にアラインしたこれらの
2つの配列を比較することによって決定され、この核酸配列は、これらの2つの配列間の
最適なアラインメントを得るために参照配列に対して付加又は欠失を含むことができる。
同一性パーセンテージは、これらの2つの配列間の同一位置の数を決定して、この数を比
較位置の総数で割り、そして得られた数値に100を掛けて、これらの2つの配列間の同
一性パーセンテージを得ることにより算出される。

【0053】

s h R N A（低分子ヘアピンRNA）もまた、本発明において使用するための発現の阻
害剤として機能することができる。

【0054】

リボザイムもまた、本発明において使用するための発現の阻害剤として機能すること
ができる。リボザイムは、RNAの特異的な開裂を触媒することが可能な酵素的RNA分子
である。リボザイムの作用機序は、リボザイム分子と相補的な標的RNAとの配列特異的
ハイブリダイゼーション、それに続くエンドヌクレアーゼ切断を包含する。従って、鉍質
コルチコイド受容体のmRNA配列のエンドヌクレアーゼ切断を特異的かつ効果的に触媒
する改変ヘアピン又はハンマーヘッドモチーフリボザイム分子は、本発明の範囲におい
て有用である。任意の可能性のあるRNA標的内の特異的なリボザイム開裂部位は、最初
に、典型的には、配列GUA、GUU及びGUCを含む標的分子のリボザイム開裂部位をス
キャンニングすることにより同定される。同定した後、開裂部位を含有する標的遺伝子の領
域に対応する約15～20リボヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチド配
列を不適合にしうる二次構造などの予測される構造的特徴について評価することができる
。

【0055】

発現の阻害剤として有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドとリボザイムの両方は、公
知の方法により調製することができる。これらは、例えば、固相ホスホアミダイト化学合
成などによる化学合成の技術を含む。あるいは、アンチセンスRNA分子は、そのRNA

分子をコードするDNA配列のin vitro又はin vivo転写により生成しうる。このようなDNA配列は、T7又はSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターを含む様々なベクターに組み込むことができる。細胞内安定性及び半減期を増加させるために、本発明のオリゴヌクレオチドに様々な改変を導入することができる。可能な改変には、その分子の5'及び/又は3'末端へのリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのフランキング配列の付加、又はオリゴヌクレオチド骨格内のホスホジエステラーゼ結合以外のホスホロチオエートもしくは2'-O-メチルの使用が含まれるが、これらに限定されない。

【0056】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA及びリボザイムは、in vivoに単独で又はベクターと組み合わせて送達してもよい。最も広い意味で、「ベクター」は、細胞、好ましくは、鉱質コルチコイド受容体を発現する細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA又はリボザイム核酸の輸送を促進することができる任意のビヒクルである。好ましくは、ベクターは、ベクターの非存在下において生じる分解度と比較して少ない分解で核酸を細胞に輸送する。一般的に、本発明において有用なベクターには、プラスミド、ファージミド、ウイルス、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA又はリボザイム核酸配列の挿入又は組み込みにより増幅したウイルス又は細菌由来の他のビヒクルが含まれるが、これらに限定されない。ウイルスベクターは好ましいベクタータイプであり、これには、下記ウイルス：モロニー Maus 白血病ウイルス、ハーベイマウス肉腫ウイルス、マウス乳癌ウイルス及びラウス肉腫ウイルスなどのレトロウイルス；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス；SV40型ウイルス；ポリオーマウイルス；エプスタイン-バーウイルス；パピローマウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；ならびにレトロウイルスなどのRNAウイルス由来の核酸配列が含まれるが、これらに限定されない。当技術分野で命名されていないが公知の他のベクターを容易に用いることができる。

【0057】

好ましいウイルスベクターは、非必須遺伝子が関心のある遺伝子で置換されている非細胞変性真核生物ウイルスをベースにしている。非細胞変性ウイルスには、ゲノムウイルスRNAのDNAへの逆転写、それに続く宿主細胞DNAへのプロウイルス組み込みを伴うライフサイクルのレトロウイルス（例えば、レンチウイルス）が含まれる。レトロウイルスは、ヒトの遺伝子治療試験に承認されている。複製欠損（即ち、所望のタンパク質を直接合成することが可能であるが、感染性粒子を産生することができない）レトロウイルスが最も有用である。このような遺伝子改変されたレトロウイルス発現ベクターは、一般的に、in vivoにおいて遺伝子の高効率形質導入に利用されている。複製欠損レトロウイルスを作製するための標準プロトコール（プラスミドへの外来性遺伝物質の組み込み、プラスミドによるパッケージング細胞株のトランスフェクション、パッケージング細胞株による組み換えレトロウイルスの産生、組織培養培地からのウイルス粒子の回収及びウイルス粒子の標的細胞への感染の工程を含む）は、Kriegler（1990年）及びMurry（1991年）により提供されている。

【0058】

特定の適用に好ましいウイルスは、既にヒトの遺伝子治療用途に承認されている二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルス及びアデノ随伴（AAV）ウイルスである。実際に、12個の異なるAAV血清型（AAV1～12）が知られており、それぞれ異なる組織親和性を備えている（Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27）。組み換えAAVは、依存性パルボウイルスAAV2から得られる（Choi, VW J Virol 2005; 79:6801-07）。アデノ随伴ウイルス1型～12型は複製欠損になるように改変することができ、様々な細胞型及び種に感染させることが可能である（Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27）。さらに、熱及び脂質溶媒安定性；造血細胞を含む多様な系統の細胞への高い形質導入頻度；及び複数の形質導入を可能にする重複感染阻害の欠如などの利点を有する。報告されているように、アデノ随伴ウイルスは、ヒトの細胞DNAに部位特異的に組み込むことができるため、レト

10

20

30

40

50

ロウイルス感染に特異的な挿入変異の可能性及び挿入された遺伝子の発現の変動を最小限にすることができる。さらに、野生型アデノ随伴ウイルスの感染は、組織培養において、選択圧が存在しない場合100回超継代されるので、このことから、アデノ随伴ウイルスのゲノムへの組み込みは比較的安定な事象であることが示唆される。アデノ随伴ウイルスは、また、染色体外において機能することができる。

【0059】

他のベクターには、プラスミドベクターが挙げられる。プラスミドベクターは当技術分野において広範に記載されており、当業者によく知られている。例えば、Sambrook等(1989年)を参照されたい。ここ数年、プラスミドベクターは、抗原コード遺伝子を *in vivo* で細胞に送達するためのDNAワクチンとして使用されている。これらには多くのウイルスベクターと同様の安全上の問題がないため、この点において特に都合がよい。しかし、宿主細胞に適合するプロモーターを有するこれらのプラスミドは、プラスミド内に操作可能にコードされた遺伝子からペプチドを発現することができる。いくつかの通常使用されるプラスミドには、pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40及びpBlueScriptが含まれる。他のプラスミドも当業者によく知られている。さらに、制限酵素及びライゲーション反応を用いて、DNAの特異的フラグメントを除去及び付加してプラスミドを特別に設計してもよい。プラスミドは、様々な非経口、粘膜及び局所経路により送達することができる。例えば、DNAプラスミドは、筋肉内、皮内、皮下又は他の経路により注射することができる。プラスミドはまた、鼻腔内スプレー又は点鼻、肛門坐剤及び経口により投与することもできる。プラスミドはまた、遺伝子銃を使用して上皮又は粘膜表面に投与することもできる。プラスミドは、水溶液で、金粒子上に乾燥させて、あるいは、非限定的に、リポソーム、デンドリマー、コクリエート及びマイクロカプセル化を含む別のDNA送達システムと組み合わせた形態で投与してもよい。

【0060】

好ましい実施態様においては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA又はリボザイム核酸配列は、異種制御領域、例えば、異種プロモーターの制御下にある。プロモーターは、ミューラーグリア細胞、ミクログリア細胞、内皮細胞、周皮細胞及び星状細胞に特異的でありうる。例えば、ミューラーグリア細胞での特異的発現は、適切なグルタミン合成酵素遺伝子のプロモーターを介して得ることができる。プロモーターは、また、例えば、CMVプロモーターなどのウイルスプロモーター又は任意の合成プロモーターであってもよい。

【0061】

本発明の活性成分(即ち、鉍質コルチコイド受容体アンタゴニスト及び鉍質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤)は、下記に記載するように医薬組成物の形態で投与してもよい。本発明の活性成分は、薬学的に許容しうる賦形剤、場合により、生物分解性ポリマーなどの徐放性マトリクスと併せて、治療組成物を作製してもよい。

【0062】

従って、本発明のさらなる態様は、創傷治癒の間の皮膚又は角膜の再上皮化を刺激する方法において使用するための、本発明の活性成分を含む医薬組成物に関する。

【0063】

用語「薬学的に」又は「薬学的に許容しうる」は、必要に応じて、哺乳動物、特にヒトに投与されたときに、副作用、アレルギー又は他の有害反応を生じない分子エンティティ及び組成物を指す。薬学的に許容しうる担体又は賦形剤は、非毒性の固体、半固体もしくは液体増量剤、希釈剤、封入材料又は任意のタイプの製剤補助剤を指す。

【0064】

本発明の医薬組成物において、本発明の活性成分は、単位投与形態で、従来の医薬支持剤との混合物として動物及びヒトに投与することができる。適切な単位投与形態には、錠剤、ゲルカプセル剤、粉剤、顆粒剤及び経口懸濁剤又は液剤などの経口投与形態、舌下及び口腔投与形態、エアロゾル、インプラント、皮下、経皮、局所、腹腔内、筋肉内、静脈内、皮下、経皮、髄腔内及び鼻腔内投与形態ならびに直腸投与形態が含まれる。

【0065】

好ましい実施態様においては、本発明の活性成分を、局所用の薬学的又は化粧品学的に許容しうる担体との混合物で投与することが望ましい。局所用の薬学的に許容しうる担体は、皮膚又は角膜表面に直接適用された場合、本発明の活性成分が、安定かつ生物学的に利用可能であり続ける、医薬の局所投与に従来有用な任意の実質的に非毒性の担体である。例えば、皮膚の角質層へ浸透させるのに効果的な当技術分野において公知の担体は、本発明の活性成分を対象の領域に送達するのに有用でありうる。このような担体には、リポソームが含まれる。本発明の活性成分は、媒体に従来の方法で分散又は乳化させて、液体調製物を作製するか、又は半固体（ゲル）又は固体担体と混合して、ペースト剤、粉末剤、軟膏、クリーム剤、ローション剤などを作製することができる。

10

【0066】

適切な局所用の薬学的に許容しうる担体には、水、緩衝生理食塩水、ペトロリアムジェリー（ワセリン）、流動パラフィン、鉱油、植物油、動物油、有機及び無機ワックス、例えば、微晶質パラフィン及びオゾケライトワックス、天然高分子、例えば、キサンタン、ゼラチン、セルロース、コラーゲン、トウモロコシデンプン又はアラビアゴム、合成高分子、アルコール、ポリオールなどが含まれる。担体は水混和性の担体組成物であってもよい。このような水混和性の局所用の薬学的に許容しうる担体組成物は、治療の初期に、1つ又は複数の適切な成分と共に製造したものを含むことができる。

【0067】

処置される皮膚疾患が目で確認することができるので、局所担体は、また、局所用の化粧品学的に許容しうる担体であってもよい。局所用の化粧品学的に許容しうる担体は、皮膚表面に直接適用された場合、本発明の活性成分が安定かつ生物学的に利用可能であり続ける、化粧品の局所投与に従来有用な任意の実質的に非毒性の担体である。適切な化粧品学的に許容しうる担体は当業者に公知であり、これには、化粧品学的に許容しうる液剤、クリーム剤、油剤、ローション剤、軟膏、ゲル又は固形剤、例えば、従来化粧品ナイトクリーム、ファンデーションクリーム、日焼け止めローション、日焼け防止薬、ハンドローション、メイクアップ及びメイクアップ基剤、マスク剤などが含まれるが、これらに限定されない。局所用の化粧品学的に許容しうる担体は、上述の局所用の薬学的に許容しうる担体と類似又は同一の性質を有していてもよい。本組成物は、香料、エストロゲン、ビタミンA、CもしくはE、 α -ヒドロキシ又は β -ケト酸、例えば、ピルビン酸、乳酸又はグリコール酸、ラノリン、ワセリン、アロエ、メチル又はプロピルパラベン、顔料などを含む化粧品分野で一般的な他の成分を含有することができる。

20

30

【0068】

創傷への本発明の活性成分の放出を制御し、そして、創傷上でそれ自体を長期間付着又は維持して、創傷上で本発明の活性成分の接触時間を増加させる送達システムを有することが望ましい。本発明の活性成分の持続放出又は遅延放出は、本発明の活性成分の投与頻度の低下及び/又は用量の減少ならびに良好な患者コンプライアンスが得られるより効率的な投与を提供する。湿潤環境において持続放出又は遅延放出するための適切な担体の例には、ゼラチン、アラビアゴム、キサンタンポリマーが含まれる。処置される領域の任意の油性、脂肪性、ワックス性又は湿潤性環境に曝される場合の、本発明の活性成分を放出することができる医薬担体には、熱可塑性樹脂、例えば、ハロゲン化ポリビニル、ポリビニルエステル、ポリハロゲン化ビニリデン及びハロゲン化ポリオレフィン、エラストマー、例えば、ブラジリエンシス、ポリジエン及びハロゲン化天然及び合成ゴムならびに可塑性の熱硬化性樹脂、例えば、ポリウレタン、エポキシ樹脂などを含む熱可塑性もしくは可塑性の熱硬化性樹脂又はエラストマーが含まれる。制御送達システムは、例えば、米国特許第5,427,778号に記載されており、これには本発明の活性成分を創傷部位へ送達するためのゲル製剤及び粘性液剤が提供されている。ゲルには、創傷を湿潤に保つための高い水分含量、創傷滲出液を吸収する能力、適用の容易さ及び洗浄による除去の容易さを有する利点がある。好ましくは、持続放出又は遅延放出担体は、ゲル、リポソーム、マイクロスポンジ又はマイクロスフェアである。

40

50

【0069】

本発明の活性成分は、また、非限定的に、抗生物質、他の創傷治癒剤及び抗酸化物質を含む他の薬学的に効果的な薬剤と組み合わせて投与することができる。

【0070】

本発明の活性成分の投与経路は、創傷の部位ならびに損傷の種類及び程度に依存する。有効量の本発明の活性成分が、再上皮化を必要とする領域に到達することができる範囲で任意の適切な適用方法を使用することができる。投与経路には、局所、経皮及び非経口が含まれるが、これらに限定されない。典型的には、本発明の成分は、局所又は経皮適用で投与される。

【0071】

皮膚を処置するための局所投与は、液剤、クリーム剤、軟膏、ゲル剤又は他の適切な治療用包帯製剤 (formulation healing bandage) を局所適用することにより達成され、これは、次に、本発明の組成物の活性成分を創傷に接触させるように創傷に適用することができる。適切な経皮デバイスの例は、例えば、米国特許第4,818,540号に記載されている。本発明の活性成分は、薬学的に許容しうるクリーム剤と混合して、創傷に適用し、そして、密封包帯で覆うことができる。あるいは、創傷領域を本発明の活性成分の溶液で洗浄又は浸漬することができる。その溶液は、1日に2～12回適用する。経皮適用の場合、本発明の活性成分は、本発明の活性成分を皮膚及び創傷部位に浸透させることが可能な組成物の形態で製剤化する。このような組成物は、直接皮膚に適用させるか、又は経皮もしくは「パッチ」デバイスなどの保護担体に含有させる。経皮投与のための本発明の活性成分の製剤は、吸収性のガーゼ包帯の繊維を被覆するように使用することができる。

【0072】

特定の実施態様においては、角膜を処置するための本発明の医薬組成物は、点眼薬又は眼軟膏である。点眼剤は、一般的に使用される任意の製剤、例えば、水性点眼液剤、水性点眼懸濁剤、粘性点眼液剤、可溶化点眼液剤などの水性点眼剤の形態で、又は非水溶性点眼液剤、非水溶性点眼懸濁剤などの非水溶性点眼剤の形態で提供される。本発明の角膜を処置するための組成物が水性点眼剤として調製される場合、好ましくは、水性点眼剤で通常使用される添加剤を含有する。このような添加剤の例には、防腐剤、等張剤、緩衝剤、安定剤、pH調整剤などが含まれる。本組成物が眼軟膏の形態で使用される場合、通常使用される任意の製剤を含む。例えば、場合により、眼軟膏基剤を加熱し、本発明の活性成分と混合することにより容易に製造することができる。本発明の活性成分は、場合により、眼軟膏基剤と混合する前に、適切な溶媒、例えば、滅菌純水、注射用蒸留水、ヒマシ油などの植物油に溶解又は懸濁してもよい。眼軟膏基剤の例には、精製ラノリン、ワセリン、プラスチックベース、液体パラフィンなどが含まれる。本発明の目的を損なわない限り、上記の防腐剤、安定剤などを場合により混合することができる。

【0073】

本発明のさらなる目的は、創傷治癒過程における皮膚又は角膜の再上皮化を刺激する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト又は鉱質コルチコイド受容体遺伝子発現の阻害剤を投与することを含む方法に関する。

【0074】

「治療有効量」とは、任意の医療に適用することができる妥当なリスク対効果比で創傷治癒の間の再上皮化を刺激するのに十分な活性成分量を意味する。

【0075】

本発明の化合物及び組成物の全一日使用量は、担当医により適切な医学的判断の範囲内で決定されることが理解される。任意の特定の対象に対する特定の治療有効用量は、処置される障害及び障害の重症度；用いられる特定の化合物の活性；用いられる特定の組成物、対象の年齢、体重、全体的な健康、性別及び食事；投与時間、投与経路及び用いられる特定の化合物の排泄速度；処置期間；用いられる特定のポリペプチドと組み合わせて又は同時に使用される薬物ならびに医学分野でよく知られている類似の要因を含む様々な要因に依存している。例えば、所望の治療効果を得るために必要な用量よりも低い化合物用量

10

20

30

40

50

で開始し、所望の治療効果が得られるまで徐々に用量を増加させることは、十分に当技術分野の範囲内である。しかし、生成物の一日用量は、成人1日当たり0.01~1,000mgの広範な範囲で変更してもよい。好ましくは、本組成物は、処置される対象に対して用量の対症調整のために、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250及び500mgの活性成分を含有する。医薬は、典型的に、約0.01mg~約500mgの活性成分、好ましくは、1mg~約100mgの活性成分を含有する。有効量の薬物は、通常、1日当たり0.0002mg/kg~約20mg/kg体重、特に、1日当たり約0.001mg/kg~7mg/kg体重の用量レベルで提供される。

【0076】

本発明は下記実施例によりさらに説明される。しかし、これらの実施例は、いかなる場合も本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

【0077】

実施例

実施例1：皮膚の創傷治癒におけるMR/アルドステロンの役割：

本発明者等は、皮膚の創傷治癒及び癒痕形成におけるMRの役割を調べた。皮膚が損傷した後の癒痕形成は、皮膚の欠損を修復するための高度に調節された相互依存的な連続的段階（炎症、増殖、組織再構築）を含む（Lau K, Paus R, Tiede S, Day P, Bayat A: Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing, *Exp Dermatol* 2009, 18:921-933）。本発明者等は、創傷治癒の後期で起こる再上皮化過程におけるMR/アルドステロン/MRの役割を検討する。この目的のために、本発明者等は、新生マウスから切除した皮膚における上皮の寄与を測定することができる創傷治癒モデルを使用した（Mazzalupo S, Wawersik MJ, Coulombe PA: An ex vivo assay to assess the potential of skin keratinocytes for wound epithelialization, *J Invest Dermatol* 2002, 118:866-870）。創傷治癒アッセイは、角化細胞が最初のパッチから遊走して増殖する（偏心成長）、皮膚移植片の器官型培養から構成されており、このアッセイは皮膚創傷の周辺における角化細胞のin vivo作用を模倣する。

【0078】

本発明者等は、基底角化細胞においてMRを過剰発現するトランスジェニックマウスモデル（K5-MRマウス）を使用して（Sainte Marie Y, Toulon A, Paus R, Maubec E, Cherfa A, Grossin M, Descamps V, Clemessy M, Gasc JM, Peuchmaur M, Glick A, Farm an N, Jaisser F: Targeted skin overexpression of the mineralocorticoid receptor in mice causes epidermal atrophy, premature skin barrier formation, eye abnormalities, and alopecia, *Am J Pathol* 2007, 171:846-860）、新生児の皮膚の創傷治癒におけるMRの影響を調べた。簡潔に述べると、新生ダブルトランスジェニックマウス及びその対照同腹子（1日齢未満、即ち、K5-MR仔（pups）の出生後早期死亡の前段階）から皮膚を切除した。皮膚片を切り取り、4mmの無菌パンチ（sterile punch）を24ウェル組織培養プレートのウェルに入れた。その後、250マイクロリッターの培地を加えて、Mazzalupo等（上記参照）に記載されるように移植片を7日間培養した。移植片培地は、100ml培地当たり、ペニシリン-ストレプトマイシン1ml、非必須アミノ酸1ml、L-グルタミン1ml、 $2 \cdot 10^{-4}$ M アデニン、5ug/mlインスリン、 $2 \cdot 10^{-9}$ M T3、5ug/mlトランスフェリン、 10^{-10} M コレラ毒素、 10^{-6} M ヒドロコルチゾン、0.5ug/mlファンギゾン、10%非働化ウシ胎仔血清、10ng/ml上皮成長因子を添加したDMEM-HamF12(2/1)とした。1週間培養した後、皮膚移植片を4%パラホルムアルデヒド（10分間）、次いでメタノール（5分間）で固定し、そして、試料のケラチン17（K17）又はK6について免疫組織化学処理を行って、角化細胞の成長領域を可視化した。角化細胞の成長の表面領域を定量した（Image J NIH software）。

【0079】

この研究の主な知見は、K5-MR仔由来の皮膚パッチにおいて角化細胞の成長が、対照動物と比較して著しく低下したことである。正常な仔の場合では、移植片が成長してい

10

20

30

40

50

る角化細胞により取り囲まれて、抗ケラチン抗体で染色される均一領域の成長を生じるが、本発明者等は、K5-MR仔から得られた角化細胞からは周縁が不規則な非常に小さな成長が生じたことを観察した。成長表面の定量化により対照とK5-MRの皮膚作用の間で大きな相違が認められた。実際、角化細胞の成長領域は、CTでは $30.6 \pm 1.31 \text{ mm}^2$ であるのに対し、K5-MRでは $17.7 \pm 1.22 \text{ mm}^2$ であった(平均値及びSEM、 $p < 0.0001$ 、10匹の異なる同腹子から得た $n = 28$ と30仔)。従って、基底角化細胞においてMRの過剰発現は、その上皮化作用を低下させる。K5-MRマウスの皮膚移植片で観察された成長の変化とMRの過剰発現との間の関連性を立証するために、MRアンタゴニストのカンレノ酸カリウムを培養培地に加え、その存在下でこのアッセイを繰り返した。皮膚パンチをカンレノ酸カリウム(0.1mM)とインキュベートした場合、K5-MR仔に由来する移植片の角化細胞の成長の低下が部分的ではあるが著しく改善したが、一方で、対照の仔由来の移植片ではアンタゴニストは効果を示さなかった。従って、マウスの皮膚で行ったこのex vivoアッセイにおいて、MRの過剰発現が創傷治癒の上皮成分を制限すると結論付けることができる。従って、鉍質コルチコイド受容体アンタゴニストは、創傷治癒の間の皮膚又は角膜の再上皮化を刺激すると考えられる。

【0080】

実施例2：皮膚の創傷治癒におけるMRの標的としての上皮ナトリウムチャンネルENaC

アルドステロン/MRの活性化は、腎臓集合管などの古典的な鉍質コルチコイド標的組織においてナトリウム輸送に關与する遺伝子を制御する(Farman N, Rafestin-Oblin ME: Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity, *Am J Physiol Renal Physiol* 2001, 280:F181-192; Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M: The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology, *Nucl Recept Signal* 2007, 5:e012)。腎臓のMRの活性化は、最終的にナトリウム輸送体又はチャンネルの活性及び数量を増大させるいくつかの遺伝子の転写(又はリプレッション)を引き起こす。腎臓集合管主細胞などのアルドステロンの典型的な上皮標的細胞において、細胞へのナトリウム流入は、経上皮ナトリウム輸送の律速段階であるアミロライド感受性の頂端側ナトリウムチャンネル(ENaC、上皮ナトリウムチャンネル)に依存している(Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E: Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors, *Annu Rev Physiol* 2002, 64:877-897)。ENaCは、ナトリウム孔を形成する3つのサブユニット(及び)から構成されている。膜へ輸送するチャンネルサブユニットを制御する生理学的メカニズム(血清及び糖質コルチコイド誘導キナーゼsgk1の重要な役割を有する)、セリンプロテアーゼ(チャンネル活性化プロテアーゼCap1及びCap3として)による活性化ならびに頂端膜からの取り込みが、ナトリウムの再吸収を制御するために特に重要である(Rossier BC, Stutts MJ: Activation of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) by Serine Proteases, *Annu Rev Physiol* 2008; Rotin D, Schild L: ENaC and its regulatory proteins as drug targets for blood pressure control, *Curr Drug Targets* 2008, 9:709-716)。

【0081】

本発明者等により、ナトリウムチャンネルENaCがまた、角化細胞により発現されること(Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N: Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation, *J Cell Sci* 1999, 112 (Pt 19):3343-3352; Roudier-Pujol C, Rochat A, Escoubet B, Eugene E, Barrandon Y, Bonvalet JP, Farman N: Differential expression of epithelial sodium channel subunit mRNAs in rat skin, *J Cell Sci* 1996, 109 (Pt 2):379-385)、さらに、上皮のサブユニットのノックアウトが表皮過形成を生じさせることが明らかとなった(Mauro T, Guitard M, Behne M, Oda Y, Crumrine D, Komuves L, Rassner U, Elias PM, Hummler E: The ENaC chan

10

20

30

40

50

nel is required for normal epidermal differentiation, J Invest Dermatol 2002, 118:589-594)。培養ヒト角化細胞の分化の間に ENaC 発現が増加することが報告された (Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N: Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation, J Cell Sci 1999, 112 (Pt 19):3343-3352)。また、ENaC 阻害剤がコンフルエントな角化細胞単層においてドームの形成を減少させたことが観察された (Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N: Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation, J Cell Sci 1999, 112 (Pt 19):3343-3352)。結果として、これらのデータから、十分に解明されていないが、ENaC が上皮においてある役割を担っている可能性があることが示唆される。上皮は、また、アルドステロン感受性上皮において ENaC 活性を変化させるシグナル伝達系に属するいくつかのセリンプロテアーゼを高レベルで発現している。マトリプターゼ (MT/SP1 又は Cap3 と呼ばれる) は、不活性型プロスタシン (Cap1 又は PRSS8) を開裂して、ENaC を活性化する活性プロテアーゼにする。興味深いことに、ENaC 活性化セリンプロテアーゼ Cap1 のノックアウトは、皮膚バリア透過性に深刻な障害をもたらし、Cap3 ノックアウトは、また、表皮バリア機能を低下させる。しかし、創傷治癒に ENaC が関与する可能性についての情報は無い。

10

【0082】

本発明者らは、ENaC の発現とその主な制御因子が MR の過剰発現により変化しうるかどうかを調べるために K5 - MR マウスモデルを用いた。対照及び K5 - MR 新生児由来の皮膚試料について、遺伝子発現のリアルタイム PCR 解析を実施した。本発明者らにより、上皮における MR の過剰発現が ENaC の3つのサブユニット全てで皮膚の mRNA 発現を増加させたが、一方で、sgk1、Cap1 及び Cap3 レベルは、対照マウスのレベルと同程度であったことが示された。この異常な発現パターンは、妊娠マウスがカンレノ酸を摂取した場合に弱まることから、K5 - MR 仔の上皮における ENaC 発現の増加が、MR 活性によるものであることが示される。

20

【0083】

実施例3：角膜の創傷治癒における MR / アルドステロンの役割：

上皮と同様に、角膜上皮は多層化したマルピーギ (malpighian) 上皮である。これはいくつかの細胞層から形成されており、最終分化プログラムに進入するとき表面へ徐々に移動する基底増殖細胞を有する。本発明者らは、最近、マウス及びラットの角膜上皮において、免疫組織化学により上皮の基底層に位置している鉍質コルチコイド受容体を同定した。また、本発明者らは、アルドステロンがラットの角膜においてイオン / 水チャネルの発現を制御することを示す予備データを持っている。皮膚との類似性から、角膜の MR が角膜上皮の創傷治癒に関与しうることを予測することができる。

30

【0084】

参考文献：

本願全体を通して、様々な参考文献により本発明が関連する最新技術が記載されている。これらの参考文献の開示は、参照することにより本開示に包含される。

40

フロントページの続き

(73)特許権者 509033033

ユニベルシテ・パリ・デカルト

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

フランス国、エフ - 7 5 2 7 0 パリ・セデックス 06、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥ
シーヌ 12

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 ファルマン, ニコレット

フランス国、エフ - 7 5 2 7 0 パリ・セデックス 06、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メディシ
ン 15、サントル・ドゥ・ルシエルシュ・ピオメディカル・デ・コルドリエ、アンセルム・ユ8
72・ティーム・1

(72)発明者 ベアール - コーエン, フランシーヌ

フランス国、エフ - 7 5 2 7 0 パリ・セデックス 06、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メディシ
ン 15、サントル・ドゥ・ルシエルシュ・ピオメディカル・デ・コルドリエ、アンセルム・ユ8
72・ティーム・1

(72)発明者 ジェセル, フレデリック

フランス国、エフ - 7 5 2 7 0 パリ・セデックス 06、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メディシ
ン 15、サントル・ドゥ・ルシエルシュ・ピオメディカル・デ・コルドリエ、アンセルム・ユ8
72・ティーム・1

合議体

審判長 關 政立

審判官 渡邊 潤也

審判官 福井 美穂

(56)参考文献 国際公開第2010/038234(WO, A1)

特表2006-507297(JP, A)

特表2003-513913(JP, A)

国際公開第00/72883(WO, A2)

特開平5-331066(JP, A)

米国特許出願公開第2009/0203628(US, A1)

特表2007-530615(JP, A)

Tissue & Cell, 1990, Vol. 22, No. 2, pp. 123 - 135

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00-31/80

A61K 41/00-45/08, 48/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/EMBASE/WPIDS(STN)

Japio-GPG/FX

ScienceDirect