

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5976010号
(P5976010)

(45) 発行日 平成28年8月23日 (2016. 8. 23)

(24) 登録日 平成28年7月29日 (2016. 7. 29)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/4188	(2006. 01)	A 6 1 K 31/4188
A 6 1 K 31/426	(2006. 01)	A 6 1 K 31/426
A 6 1 K 31/502	(2006. 01)	A 6 1 K 31/502
A 6 1 K 31/438	(2006. 01)	A 6 1 K 31/438
A 6 1 K 31/192	(2006. 01)	A 6 1 K 31/192

請求項の数 4 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-546459 (P2013-546459)
(86) (22) 出願日	平成23年12月23日 (2011. 12. 23)
(65) 公表番号	特表2014-502968 (P2014-502968A)
(43) 公表日	平成26年2月6日 (2014. 2. 6)
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/067251
(87) 国際公開番号	W02012/088525
(87) 国際公開日	平成24年6月28日 (2012. 6. 28)
審査請求日	平成26年9月16日 (2014. 9. 16)
(31) 優先権主張番号	61/426, 788
(32) 優先日	平成22年12月23日 (2010. 12. 23)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	508152917
	ザ ボード オブ リージェンツ オブ
	ザ ユニバーシティー オブ テキサス
	システム
	アメリカ合衆国 テキサス州 オースティン
	ウエスト 第七 ストリート 201
(74) 代理人	100102978
	弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118
	弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923
	弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507
	弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 COPDを処置する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フィダレストアット、エパルレストアット、ポナルレストアット、リサレストアット、イミレストアット、ゾボルレストアット、ミナルレストアット、またはトルレストアットから選ばれるアルドース還元酵素阻害剤を含む、COPDを有すると診断された対象、COPDの症状を示す対象、またはCOPDを発症するリスクを有する対象におけるCOPDを処置するための薬学的組成物。

【請求項 2】

前記アルドース還元酵素阻害剤が吸入または滴注により投与されることを特徴とする、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

前記アルドース還元酵素阻害剤が経口投与されることを特徴とする、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

前記アルドース還元酵素阻害剤がフィダレストアットである、請求項1記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

説明

本願は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、2010年12月23日出願の米国

仮出願第61/426,788号に基づく優先権を主張する。

【0002】

連邦政府によって資金提供された研究に関する記述

本発明は、American Asthma Foundationにより授与されたアワード番号08-0219の下で政府の支援を受けて作成された。Foundationは、本発明における一定の権利を有し得る。

【背景技術】

【0003】

背景

本発明の態様は、一般に、生理学および医学に関する。より具体的には、本発明は、アルドース還元酵素阻害剤 (ARI)、および慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の処置におけるその使用に関する。

【0004】

アルドース還元酵素 (AR) は、広範囲のアルデヒドの還元を触媒する (Bhatnager and Srivastava, *Biochem Med Metab Biol*.48(2):91-121,1992 (非特許文献1))。酵素の基質は、芳香族および脂肪族のアルデヒドから、グルコース、ガラクトース、およびリボースのようなアルドースにまで及ぶ。ARによるグルコースの還元は、高血糖において特に意味があり、ARを介したグルコース流の増加は、二次性糖尿病合併症の発症に病原学的に関連付けられている (非特許文献1; Yabe-Nishimura, *Pharmacol Rev*.50(1):21-33,1998 (非特許文献2))。しかしながら、ARが、脂質過酸化に由来するアルデヒドおよびそれらのグルタチオン抱合体の還元のための優れた触媒であることを示す最近の研究 (Srivastava et al., *Biochem Biophys Res Commun*.217:741-746,1995 (非特許文献3); Vander Jagt et al., *Biochim Biophys Acta*.1249(2):117-26,1995 (非特許文献4); Srivastava et al., *Biochemistry*.37(37):12909-17,1998 (非特許文献5); Srivastava et al., *Adv Exp Med Biol*.463:501-7,1999 (非特許文献6); Dixit et al., *J Biol Chem*.275:21587-21595,2000 (非特許文献7); Ramana et al., *Biochemistry*.39:12172-12180,2000 (非特許文献8)) は、糖尿病における有害な役割とは対照的に、正常グルコース濃度の下では、ARが、酸化ストレスおよび求電子ストレスからの防御に関与している可能性を示唆している。ARの抗酸化的な役割は、多様な細胞型において、過酸化水素 (Spycher et al., *FASEB J*.11(2):181-8,1997 (非特許文献9))、脂質過酸化に由来するアルデヒド (Ruef et al., *Arterioscler Thromb Vase Biol*.20(7):1745-52,2000 (非特許文献10); Rittner et al., *J Clin Invest*.103(7):1007-13,1999 (非特許文献11))、終末糖化産物 (Nakamura et al., *Free Radic Biol Med*.29(1):17-25,2000 (非特許文献12))、および一酸化窒素 (Seo et al., *J Biol Chem*.275(39):30355-62,2000 (非特許文献13)) のような酸化体により、ARがアップレギュレートされるという観察と一致している。酵素の発現は、鉄過剰 (Barisani et al., *FEBS Lett*.469(2-3):208-12,2000 (非特許文献14))、アルコール性肝疾患 (O'Connor et al., *Biochem J*.343 Pt 2:487-504,1999 (非特許文献15))、心不全 (Yang et al., *Circulation*.102(25):3046-52,2000 (非特許文献16))、心筋虚血 (Shinmura et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*.97(18):10197-202,2000 (非特許文献17))、血管炎症 (非特許文献11)、および再狭窄 (非特許文献10)、ならびに様々な型の癌のような、酸化ストレスおよび求電子ストレスの増加に関連した数種の病態の下でも増加する。

【0005】

アルドース還元酵素の阻害剤は、糖尿病合併症、心臓以外の組織に対する虚血傷害、ハンチントン病のような、いくつかの状態および疾患のために必要性が示されている。全て、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,696,407号 (特許文献1)、米国特許第6,127,367号 (特許文献2)、米国特許第6,380,200号 (特許文献3) を参照のこと。いくつかの場合において、状態または疾患に関与する機序においてアルドース還元酵素が果たす役割は、既知である。例えば、特許文献1は、アルドース還元酵素阻害剤が、線条体の毛様体神経栄養因子 (CNTF) を増加させ、ハンチントン病の処置のための派生効果を有することを示している。しかしながら、他の場合において、特定の疾患または状態に関してアルドース還元酵素またはアルドース還元酵素阻害剤が作用する方式は、未知である。

【 0 0 0 6 】

従って、これらの疾患および状態を有する患者は、新たな処置を必要とし続けているため、多数の疾患および状態におけるアルドース還元酵素の役割は、解明を必要とする。従って、アルドース還元酵素およびアルドース還元酵素阻害剤を伴う予防法および治療法が、必要とされている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 米国特許第6,696,407号

【 特許文献 2 】 米国特許第6,127,367号

10

【 特許文献 3 】 米国特許第6,380,200号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Bhatnager and Srivastava, Biochem Med Metab Biol. 48(2):91-121, 199

2

【 非特許文献 2 】 Yabe-Nishimura, Pharmacol Rev. 50(1):21-33, 1998

【 非特許文献 3 】 Srivastava et al., Biochem Biophys Res Commun. 217:741-746, 1995

【 非特許文献 4 】 Vander Jagt et al., Biochim Biophys Acta. 1249(2):117-26, 1995

【 非特許文献 5 】 Srivastava et al., Biochemistry. 37(37):12909-17, 1998

【 非特許文献 6 】 Srivastava et al., Adv Exp Med Biol. 463:501-7, 1999

20

【 非特許文献 7 】 Dixit et al., J Biol Chem. 275:21587-21595, 2000

【 非特許文献 8 】 Ramana et al., Biochemistry. 39:12172-12180, 2000

【 非特許文献 9 】 Spycher et al., FASEB J. 11(2):181-8, 1997

【 非特許文献 10 】 Ruef et al., Arterioscler Thromb Vase Biol. 20(7):1745-52, 2000

【 非特許文献 11 】 Rittner et al., J Clin Invest. 103(7):1007-13, 1999

【 非特許文献 12 】 Nakamura et al., Free Radic Biol Med. 29(1):17-25, 2000

【 非特許文献 13 】 Seo et al., J Biol Chem. 275(39):30355-62, 2000

【 非特許文献 14 】 Barisani et al., FEBS Lett. 469(2-3):208-12, 2000

【 非特許文献 15 】 O'Connor et al., Biochem J. 343 Pt 2:487-504, 1999

【 非特許文献 16 】 Yang et al., Circulation. 102(25):3046-52, 2000

30

【 非特許文献 17 】 Shinmura et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97(18):10197-202, 2000

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

本発明の態様は、治療的に有効な量のアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) を投与することにより、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を有すると診断された対象、COPDの症状を示す対象、またはCOPDを発症するリスクを有する対象において、COPDを処置する方法に関する。本明細書において使用されるように、COPDを発症する「リスク」は、対象の病歴、個人歴、および/または家族歴に基づく。特に、現在または以前の喫煙 (最も顕著には、タバコであるが、その他のニコチン製品または非ニコチン製品、例えば、マリファナ製品であってよい) が、COPDを発症するリスクを示すが、リスクファクターには、これらに限定されないが、煙またはその他の環境ハザード (例えば、鉱業または繊維工業におけるハザード、煙霧、空気汚染) への曝露、遺伝子感受性、自己免疫疾患、および気管支過感受性も含まれる。対象は、慢性咳嗽、痰生成、呼吸困難 (息切れ)、ラ音 (呼吸時の雑音)、および肺機能検査時の気道制限を含むが、これらに限定されない、COPDの1種または複数種の症状を示す者であってもよい。

40

【 0 0 1 0 】

ある種の局面において、アルドース還元酵素阻害剤は、プロドラッグとして患者へ投与される。典型的には、プロドラッグとは、インビボで活性型またはより高活性の型へ代謝されるかまたは変換される、薬物の不活性型またはより低活性の型である。

【 0 0 1 1 】

50

ARIは、経口、内視鏡、気管内、気管支内、静脈内、病巣内、筋肉内、腹腔内、経皮、または皮下を含む任意の経路によって投与され得る。ある種の局面において、ARIは、経口投与されるか、または吸入もしくは滴注により、例えば、吸入器もしくはその他のエアロゾル送達デバイスにより投与される。

【0012】

ある種の態様において、アルドース還元酵素阻害剤は、ペプチド、ペプチド模倣体、低分子、または阻害性RNAである。アルドース還元酵素阻害剤は、siRNAもしくはその他の阻害性核酸、カルボン酸、ヒダントイン、ピリダジノン、またはこれらの薬学的に許容される誘導体であり得る。特定の局面において、アルドース還元酵素阻害剤は、フィダレスタット、ソルピニル、エパルレスタット、ボナルレスタット、メトソルピニル、リサレスタット、イミレスタット、ALO-1567、ケルセチン、ゾポルレスタット、AD-5467、NZ-314、M-16209、ミナルレスタット、AS-3201、WP-921、ルテオリン、トルレスタット、EBPC、またはこれらの薬学的に許容される誘導体である。ある種の態様において、アルドース還元酵素阻害剤はフィダレスタットである。

10

【0013】

本発明のその他の態様は、本願の全体にわたって論じられる。本発明のある局面に関して論じられた任意の態様が、本発明の他の局面にも同様に当てはまり、その逆も同様である。実施例セクションにおける態様は、本発明の全ての局面に適用可能な本発明の態様であると理解される。

【0014】

20

「処置」という用語には、疾患の生理学的原因の処置、疾患に関連した状態の処置、および疾患の1種または複数種の症状の処置が含まれる。処置には、重度の低下（完全な排除までの任意の測定可能な減少を含む）、頻度の低下、1種もしくは複数種の疾患症状の進行の減速もしくは中止、1種もしくは複数種の疾患症状の発現までの時間の増加、または1種もしくは複数種の疾患症状の発現の防止が含まれる。

【0015】

「ある」または「1つの」という単語の使用は、添付の特許請求の範囲および/または本明細書において「含む」という用語と共に使用された時、「1つ」を意味し得るが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは複数」の意味とも一致する。

【0016】

30

本願の全体にわたって、「約」という用語は、値が、その値を決定するために利用されるデバイスまたは方法についての誤差の標準偏差を含むことを示すために使用される。

【0017】

添付の特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、選択肢のみをさすか、または選択肢が相互に排他的であると明示されない限り、「および/または」を意味するために使用されるが、開示が、選択肢のみおよび「および/または」をさす定義を支持する。

【0018】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されるように、「含む」、「有する」、「包含する」、および「含有する」という単語は、包括的または無制限であり、挙げられていない付加的な要素または方法の工程を排除しない。

40

【0019】

[本発明1001]

COPDを有すると診断された対象、COPDの症状を示す対象、またはCOPDを発症するリスクを有する対象へ、治療的に有効な量のアルドース還元酵素阻害剤を投与する工程を含む、対象におけるCOPDを処置する方法。

[本発明1002]

前記対象が現在喫煙者であるかまたは以前に喫煙者であった、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記アルドース還元酵素阻害剤がプロドラッグとして投与される、本発明1001の方法。

50

[本発明1004]

前記アルドース還元酵素阻害剤が吸入または滴注により投与される、本発明1001の方法。

[本発明1005]

前記アルドース還元酵素阻害剤が経口投与される、本発明1001の方法。

[本発明1006]

前記アルドース還元酵素阻害剤が特異的阻害剤である、本発明1001の方法。

[本発明1007]

前記アルドース還元酵素阻害剤が、カルボン酸、ヒダントイン、ピリダジノン、またはこれらの薬学的に許容される誘導体である、本発明1006の方法。

[本発明1008]

前記アルドース還元酵素阻害剤が、フィダレスタット、ソルビニル、エパルレスタット、ポナルレスタット、メトソルビニル、リサレスタット、イミレスタット、ALO-1567、ケルセチン、ゾボルレスタット、AD-5467、NZ-314、M-16209、ミナルレスタット、AS-3201、WP-921、ルテオリン、トルレスタット、EBPC、またはこれらの薬学的に許容される誘導体である、本発明1007の方法。

[本発明1009]

前記アルドース還元酵素阻害剤がフィダレスタットである、本発明1008の方法。

[本発明1010]

。

[本発明1011]

前記アルドース還元酵素阻害剤が1～800mg/日の用量で投与される、本発明1010の方法。

。

[本発明1012]

現在喫煙者であるかまたは以前に喫煙者であった対象へ、治療的に有効な量のアルドース還元酵素阻害剤を投与する工程を含む、喫煙に関連した健康リスクを処置する方法。

本発明のその他の目的、特色、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の本旨および範囲に含まれる様々な変化および修飾が、この詳細な説明から、当業者には明らかになるため、詳細な説明および具体例は、本発明の具体的な態様を示しているが、例示として与えられているに過ぎないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】**【0020】**

添付の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明のある種の局面をさらに証明するために含まれている。本発明は、本明細書に提示された具体的な態様の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面のうちの一つまたは複数を参照することにより、よりよく理解され得る。

【図1】ARの阻害は、小気道上皮細胞（SAEC）における、タバコ煙抽出物（CSE）により誘導される細胞死を防止する。10 μ Mフィダレスタットの非存在下および存在下で、異なる濃度のCSEと共に24時間細胞をインキュベートした後、MTTアッセイを実施した。バー（平均値 \pm SD；n = 6）は、生細胞に相当する570nmにおける吸光度を表す。

【図2】アルドース還元酵素（AR）阻害により防止された、SAECにおけるサイトカインレベルのCSEにより誘導される変化。* $p < 0.01$ 対対照；** $p < 0.05$ 対CSE 50%；## $p < 0.001$ 対対照；### $p < 0.01$ 対CSE 50%。

【図3】AR阻害により防止された、SAECにおけるケモカインおよび増殖因子のレベルのCSEにより誘導される変化。* $p < 0.01$ 対対照；** $p < 0.05$ 対CSE 50%；## $p < 0.001$ 対対照；### $p < 0.01$ 対CSE 50%。

【図4】AR阻害による酸化還元シグナル伝達の防止。ブタクサ花粉、アレルゲン、増殖因子、またはサイトカインによる刺激は、細胞内のROS生成の増加を引き起こす。ROSは、膜脂質を酸化して、4-ヒドロキシノネナール（HNE）のような脂質アルデヒドを形成させる

10

20

30

40

50

ことができ、HNEは容易にグルタチオンと反応し、GS-HNEのようなGS抱合体を形成する。ARは、GS-HNEのGS-1,4-ジヒドロキシノネン（GS-DHN）への還元を触媒する。後者は、さらなるROS形成を傍分泌的に誘導する、IL-13を含む様々な炎症マーカーを転写する、転写因子NF- κ BおよびAP-1を活性化する、PKC、PI3K、およびMAPKのような様々な下流プロテインキナーゼを活性化することが公知である。GS-DHNは、JAK-1、およびERK1/2のようなMAPKをリン酸化し、最終的に、STAT-6をリン酸化し活性化することもできる。STAT-6は、核へ移行し、 μ チン遺伝子を含む遺伝子を転写し、杯細胞化生をもたらす。連続的に形成されたGS-DHNは、PKC/NOX経路を介したROS生成の増加によりシグナル伝達ループを増幅することができる。ARの阻害は、初期および増幅ループを阻止し、ROSにより誘導される病理学的変化を防止する（Ramana et al. J Biol Chem 281:33019-33029,2006 ; Tammali et al. Cancer Res 66:9705-9713,2006）。

10

【図5】ARの阻害は、SAECにおける、IL-13により誘導される活性酸素種（ROS）生成を防止する。（A）およそ 5×10^4 個の細胞を、2チャンバースライドに播種し、フィダレスタットを含まないかまたは含む無血清基本培地において、一夜、飢餓状態にした。細胞を、 $1 \times$ HBSSにより洗浄し、37℃で30分間、 $10 \mu\text{M}$ H2DCF-DAと共にインキュベートし、再び洗浄し、IL-13（25ng/ml）により1時間処理した。細胞を、冷 $1 \times$ HBSSにより2回洗浄し、DAPIを含むflouresave封入剤を使用してマウントした。蛍光顕微鏡（Nikon）を使用して顕微鏡写真を取得した。代表的な画像が示される（ $n=4$ ）；拡大率400 \times 。（B）1ウェル当たりおよそ10,000個のSAECを96穴プレートに蒔き、フィダレスタットの非存在下または存在下で、24時間、血清飢餓状態にした。細胞を $1 \times$ HBSSにより洗浄し、37℃で30分間、 $10 \mu\text{M}$ H2DCF-DAと共にインキュベートした。細胞を過剰のH2DCF-DAを除去するために再び洗浄し、基本培地においてIL-13（25ng/ml）により1時間処理した。処理の終了後、細胞をHBSSにより2回洗浄し、485nmの励起波長および538nmの放出波長において蛍光を決定した。相対ROS生成が平均蛍光強度（MFI）（任意単位）として表される。バーは平均値 \pm SDを表す（ $n=4 \sim 6$ ）；（* $p < 0.01$ 対対照；** $p < 0.05$ 対IL-13）。

20

【図6】AR阻害は、気道上皮細胞単層における、纖毛およびチューブリンのIL-13により誘導される損失を防止する。およそ 8.5×10^4 個のSAECを、12mm直径PET透明インサートに播種し、下側および上側の両方から供給される分化培地において7日間培養した後、纖毛細胞への分化のため、11日間、ALI上で培養した。単層をAR阻害剤により一夜処理し、IL-13により48時間刺激した。膜インサート上の単層を、4℃でz-fix（10%亜鉛含有緩衝ホルマリン）で24時間固定し、パラフィン包埋し、 $5 \mu\text{M}$ 切片を切断した。（A）H&E染色切片を、光学顕微鏡下で調査した；拡大率400 \times 。挿入図は、各々の代表的な顕微鏡写真からの選択された領域の拡大図を示す（ $n=4$ ）。（B）チューブリン抗体を使用した免疫組織化学が、切片に対して実施された。単層における暗褐色染色は、纖毛軸系チューブリンに相当する。矢印は、纖毛細胞が杯細胞へ形質転換する際のチューブリンの損失を示す。代表的な顕微鏡写真が示される（ $n=4$ ）；拡大率400 \times 。

30

【図7】AR阻害は、気道上皮単層における、IL-13により誘導される杯細胞化生およびMuc5ACの発現を防止する。（A）気液界面（ALI）の高分化気道上皮細胞を、AR阻害剤フィダレスタットの非存在下または存在下で、IL-13と共に48時間インキュベートした。記載されるようにして、単層を固定し、Muc5AC抗体を使用した免疫組織化学を、切片に対して実施した。代表的な顕微鏡写真が示される（ $n=4$ ）；拡大率400 \times 。（B）棒グラフは、顕微鏡下で各切片から無作為に計数された10区域からの1視野当たりのMuc5AC陽性細胞の数を示す（ $n=4$ ）；* $p < 0.0005$ 対対照；** $p < 0.004$ 対IL-13。（C）気道上皮単層を、AR阻害剤フィダレスタットの非存在下および存在下で、基本培地の液内でIL-13と共に48時間インキュベートした。上方チャンバーから培養培地を収集し、ELISAによるMuc5ACの決定のために利用した（ $n=4$ ）、* $p < 0.005$ 対対照；** $p < 0.01$ 対IL-13。

40

【図8】AR阻害は、気道上皮細胞単層における、 μ チンおよび転写因子SPDEFのIL-13により誘導される発現を防止する。（A）ALIの気道上皮細胞単層を、フィダレスタットの非存在下または存在下で血清飢餓状態にし、IL-13と共に18時間インキュベートした。全RNAが単離し、その後、Muc5ACおよびSPDEFの発現を査定するため、RT-PCRを実施した。棒グラ

50

フは、対応するプロットの濃度測定分析を示す ($n=4$)。* $p<0.001$ 対対照；** $p<0.001$ 対IL-13；(B) ALIの纖毛気道細胞の単層を、AR阻害剤により24時間処理し、その後、IL-13と共に24時間または48時間インキュベートした。インキュベーションの終了後、細胞溶解物を調製し、Muc5AC、Muc5B、およびSPDEFに対する抗体を使用したウエスタンブロッティングに供した。等しいタンパク質負荷を示すため、膜のストリッピングおよびGAPDHに対する抗体によるリブローピングを行った。代表的なプロットが示される ($n=4$)。* $p<0.0001$ 対対照；** $p<0.001$ 対IL-13。

【図9】AR阻害は、気道上皮単層における、JAK-1、ERK1/2、およびSTAT-6のIL-13により誘導されるリン酸化を防止する。ALIの纖毛気道細胞単層を、AR阻害剤により24時間処理し、示されたような異なる期間、IL-13により刺激した。インキュベーションの終了後、細胞を溶解し、これらのシグナル伝達タンパク質の活性化を分析するため、リン酸化型および非リン酸化型のJAK-1、ERK1/2、およびSTAT-6に対する抗体を使用したウエスタンブロッティングに、細胞溶解物を供した。代表的なプロットが示される ($n=4$)。# $p<0.001$ 対対照；* $p<0.01$ および** $p<0.001$ 対IL-13。

【図10】AR阻害は、マウス肺における、IL-13のRWEにより誘導される発現を防止する。マウスを、ARの非存在下または存在下で、PBSまたはRWEにより感作しチャレンジし、16時間後、肺を採集し、全RNAを単離した ($n=4$)。各試料からの1 μ gの全RNAを、第一鎖cDNAへ転写し、IL-13特異的な順方向プライマーおよび逆方向プライマーを使用して、定量的RT-PCRを実施した。標的配列についてのRNAのレベルを融解曲線分析により決定した。ここに提示される値は、対照に対する変化倍率である (** $p<0.001$)。RWE、ブタクサ花粉抽出物；ARI、アルドース還元酵素阻害剤。

【図11】AR阻害は、マウス肺上皮における、STAT-6のリン酸化を防止する。マウスを、AR阻害剤の非存在下または存在下で、PBSまたはRWEにより感作しチャレンジし、20時間後、肺を灌流し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、5 μ Mへ切片化した。免疫蛍光二次抗体(A)、またはDABに基づくHRP結合抗体ならびにヘマトキシリンおよびエオシンによる対比染色(B)を使用して、p-STAT-6特異抗体により、切片を免疫染色した。蛍光顕微鏡検または光学顕微鏡検により顕微鏡写真を取得した。各群についての代表的な領域が示される(拡大率: 200 \times)。(A)において、挿入図は、代表的な顕微鏡写真からの選択された領域の拡大図を示す ($n=4$)。RWE、ブタクサ花粉抽出物；ARI、アルドース還元酵素阻害剤。

【図12】ARの阻害または欠損は、マウス肺における、RWEにより誘導される杯細胞化生を防止する。RWEにより感作した正常マウスおよびARヌルマウスを、RWEによりチャレンジし、72時間後、AR阻害剤の非存在下もしくは存在下で処理されたマウス(A)またはARヌルマウス(B)から肺を採集し、灌流し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した。切片をPAS染色により染色し、光学顕微鏡下で観察し、顕微鏡写真を取得した。各群からの代表的な顕微鏡写真が示される ($n=4$)。拡大率200 \times (A)；400 \times (B)。

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

本発明者らは、アルドース還元酵素(AR)が、脂質アルデヒドの解毒にとって重要であることを証明した。解毒の役割に加えて、AR活性は、炎症および様々な疾患をもたらす組織機能障害を引き起こす、細胞のアポトーシスおよび増殖を引き起こすサイトカイン、ケモカイン、内毒素、高グルコース、および増殖因子の細胞シグナル伝達のために必要であり、即ち、ARは、キナーゼのカスケードを通じた転写因子NF- κ BおよびAP1の活性化により誘導される、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、および細菌内毒素の必須メディエーターである。転写因子の活性化は、細胞傷害を引き起こす多数のサイトカイン、ケモカイン、および増殖因子の合成および放出を担う。それらは、COPDおよびアレルギー性喘息に関連している炎症全般を引き起こす原因となる(全て、参照により本明細書に組み入れられる、米国公開第2004/0047919号、米国公開第2006/0293265号、および米国公開第2010/0144748号を参照のこと)。

【 0 0 2 2 】

I. アルドース還元酵素およびCOPD

本発明のある種の局面において、アルドース還元酵素阻害剤（ARI）は、COPDを処置するために使用される。タバコ煙、有毒ガス、および/または粒子への慢性曝露に起因する慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、世界的な主要な罹患および死亡の最も一般的な理由の一つであり、World Health Organizationにより推定されるように、6億人以上の人々を苦しめている。気道の炎症が、COPDの病原において主要な役割を果たしており、それは、気道への炎症細胞の浸潤および炎症性粘膜滲出液の蓄積を含む。COPDの病原における主要なリスクファクターは、活性酸素種（ROS）を生成しプロテアーゼを放出して細胞損傷をもたらす、気道上皮細胞、マクロファージ、好中球、およびTリンパ球を含む、常在細胞を活性化することにより、気道炎症を引き起こすタバコ煙である。ROSの生成は、肺損傷を直接引き起こすか、または二次性の代謝反応種の生成を通して、多様な細胞応答を誘導することがある、タンパク質、DNA、および脂質の酸化に直接関連付けられている。本発明者らは、アルドース還元酵素（AR）の阻害が、細胞アポトーシス、ならびにサイトカイン、ケモカイン、およびその他の炎症マーカーの分泌を含む、COPDの特徴である、ヒト小気道上皮細胞（SAEC）におけるタバコ煙抽出物（CSE）により誘導される細胞変化を防止することを証明した。アルドケト還元酵素スーパーファミリーのメンバーであるアルドース還元酵素（AR）は、糖尿病合併症に関係している、高血糖状態においてグルコースのソルビトールへのNADPH依存的な還元を触媒する細胞質タンパク質である。しかしながら、ARが酸化ストレスにより誘導される分子シグナルにおいて重大であること、そしてARにより触媒された代謝産物が、糖尿病合併症、心血管疾患、喘息、COPD、癌、および感染性疾患のような様々な炎症関連病理において重要な役割を果たす酸化還元シグナル伝達の優れたメディエーターであることを示す証拠が、最近提示された。本明細書に記載された結果は、インビトロでもインビボでも、IL-13により誘導される杯細胞形成がAR阻害により防止されることを示す。これらの結果および当結果は、共に、AR阻害が、ヒト気道上皮細胞における細胞死、サイトカイン放出、および粘液形成を防止したため、COPDの防止および処置において有益であることを示唆する。

【 0 0 2 3 】

アルドケト還元酵素スーパーファミリーのメンバーであるアルドース還元酵素（AR）は、糖尿病合併症に関係している、高血糖状態におけるグルコースのソルビトールへのNADPH依存的な還元を触媒する細胞質タンパク質である。ARが酸化ストレスにより誘導される分子シグナルにおいて重大であること、そしてARにより触媒された代謝産物が、酸化還元シグナル伝達の優れたメディエーターであることを示す証拠が、最近提示された。本明細書に記載された結果は、インビトロでもインビボでも、IL-13により誘導される杯細胞形成がAR阻害により防止されることを示す。これらの結果は、AR阻害が、ヒト気道上皮細胞における細胞死、サイトカイン放出、および粘液形成を防止したため、COPDの防止および処置において有益であることを示唆する。

【 0 0 2 4 】

II. アルドース還元酵素阻害剤

アルドース還元酵素阻害剤とは、酵素アルドース還元酵素を阻害する任意の化合物である。例示的なアルドース還元酵素阻害剤は、容易に入手可能であるか、または従来の有機合成法を使用して、当業者により容易に合成され得る。これらの多くは、当業者に周知であり、フィダレスタット（SNK-860）、(2S,4S)-2-アミノホルミル-6-フルオロ-スピロ[クロマン-4,4'-イミダゾリジン]-2',5'-ジオン（CAS番号136087-85-9）；トルレスタット、N-[[6-メトキシ-5-(トリフルオロメチル)-1-ナフタレニル]チオキソメチル]-N-メチルグリシン [Wyeth-Ayerst, Princeton, N.J.；別名トルレスタチン（Tolrestatin）、CAS登録番号82964-04-3、ドラッグコード（Drug Code）AY-27,773、商標ALREDASE（Am.Home）およびLORESTAT（Recordati）]；ボナルレスタット、3-(4-プロモ-2-フルオロベンジル)-4-オキソ-3H-フタラジン-1-イル酢酸 [ICI, Macclesfield, U.K.；別名CAS登録番号72702-95-5、ICI-128,436、およびSTATIL（ICI）]；ソルビニル、(S)-6-フルオロ-2,3-ジヒドロス

ピロ[4H-1-ベンゾピラン-4,4'-イミダゾリジン]-2',5'-ジオン (Pfizer, Groton, Conn. ; C AS登録番号68367-52-2、ドラッグコードCP-45,634) ; エパルレストアット (ONO, Japan) ; メトソルビニル (METHOSORBINIL) (Eisai) ; アルコニル (ALCONIL) (Alcon) ; AL-1576 (Alcon) ; CT-112 (Takeda) ; ならびにAND-138 (Kyorin) のような多数の薬学的等級のAR阻害剤が市販されている。

【 0 0 2 5 】

その他のARIが記載されている。スポロヒダントインおよび関連構造、スピロ-イミダゾリジン-2',5'-ジオン ; ならびに複素環式アルカン酸のような、糖尿病に関して使用されるARIの概説に関しては、Humber, "Aldose Reductase Inhibition: An Approach to the Prevention of Diabetes Complications", Porte, ed., Ch.5, pp.325-353 ; Tomlinson et al., 1992を参照すること。その他のアルドース還元酵素阻害剤は、ONO-2235 ; ゴボルレストアット ; SNK-860 ; 5-3-チエニルテトラゾール-1-イル (TAT) ; WAY-121,509 ; ZENECA ZD5522 ; M16209 ; (5-(3'-インドラル (indolal))-2-チオヒダントイン ; ゼナレストアット ; ゼナレストアット1-0-アシルグルクロニド ; SPR-210 ; (2S,4S)-6-フルオロ-2',5'-ジオキソスピロ-[クロマン-4,4'-イミダゾリジン]-2-カルボキサミド (SNK-880) ; アリアルスルホニルアミノ酸 ; 2,7-ジフルオロスピロフルオレン-9,5'-イミダゾリジン-2',4'-ジオン (イミリエスタット (imiriestat)、Al11576、HOE 843) ; イソリキリチゲニン ; 3,4-ジヒドロ-4-オキソ-3-[[5-(トリフルオロメチル)-2-ベンゾチアゾリル]メチル]-1-フタラジン酢酸 ; (S)-6-フルオロスピロ[クロマン-4,4'-イミダゾリジン]-2,5'-ジオン ; N-[(5-トリフルオロメチル)-6-メトキシ-1-ナフタレニル]チオキソメチル}-N-メチルグリシン ; 3-(4-プロモ-2-フルオロベンジル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1-フタラジン酢酸 ; 5-[(Z,E)-メチルシンナミリデン]-4-オキソ-2-チオキソ-3-チアゾリデン酢酸 ; 3-(4-プロモ-2-フルオロベンジル)-7-クロロ-3,4-ジヒドロ-2,4-ジオキソ-1(2H)キナゾリン酢酸 ; 3,4-ジヒドロ-3-オキソ-4-[(4,5,7-トリフルオロ-2-ベンゾチアゾリル)メチル]-2H-1,4-ベンゾチアジン-2-酢酸 ; N-[3,5-ジメチル-4-[(ニトロメチル)スルホニル]フェニル]-2-メチルベンゼンアセトアミド ; (2S,4S)-6-フルオロ-2',5'-ジオキソスピロ(クロマン-4,4'-イミダゾリジン)-2-カルボキサミド ; 2-[(4-プロモ-2-フルオロフェニル)メチル]-6-フルオロスピロ[イソキノリン-4(1H),3'-ピロリジン]-1,2',3,5'(2H)-テトロン ; 2R,4R-6,7-ジクロロ-4-ヒドロキシ-2-メチルクロマン-4-酢酸 ; 2R,4R-6,7-ジクロロ-6-フルオロ-4-ヒドロキシ-2-メチルクロマン-4-酢酸 ; 3,4-ジヒドロ-2,8-ジイソプロピル-3-オキソ-2H-1,4-ベンゾキサジン-4-酢酸 ; d-2-メチル-6-フルオロ-スピロ(クロマン-4',4'-イミダゾリジン)-2',5'-ジオン ; 2-フルオロ-スピロ(9H-フルオレン-9,4'-イミダゾリジン)-2',5'-ジオン ; 2,7-ジフルオロ-スピロ(9H-フルオレン-9,4'-イミダゾリジン)-2',5'-ジオン ; 2,7-ジフルオロ-5-メトキシ-スピロ(9H-フルオレン-9,4'-イミダゾリジン)-2',5'-ジオン ; 7-フルオロ-スピロ(5H-インデノール[1,2-b]ピリジン-5,3'-ピロリジン)-2,5'-ジオン ; d-シス-6'-クロロ-2',3'-ジヒドロ-2'-メチル-スピロ-(イミダゾリジン-4,4'-4'H-ピラノ(2,3-b)ピリジン)-2,5'-ジオン ; スピロ[イミダゾリジン-4,5'(6H)-キノリン]-2,5'-ジオン-3'-クロロ-7,'8'-ジヒドロ-7'-メチル-(5'-シス) ; 3,4-ジヒドロ-3-(5-フルオロベンゾチアゾール-2-イル-メチル)-4-オキソフタラジン-1-イル-酢酸 ; 3-(5,7-ジフルオロベンゾチアゾール-2-イル-メチル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソフタラジン-1-イル-酢酸 ; 3-(5-クロロベンゾチアゾール-2-イル-メチル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソフタラジン-1-イル-酢酸 ; 3-(5,7-ジクロロベンゾチアゾール-2-イル-メチル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソフタラジン-1-イル-酢酸 ; 3-(5,7-ジフルオロベンゾキサゾール-2-イル-メチル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソフタラジン-1-イル-酢酸 ; 3-(5-クロロベンゾキサゾール-2-イル-メチル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソフタラジン-1-イル-酢酸 ; および3-(5,7-ジクロロベンゾキサゾール-2-イル-メチル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソフタラジン-1-イル-酢酸である。

【 0 0 2 6 】

いくつかの態様において、アルドース還元酵素阻害剤は、酵素アルドース還元酵素によ

10

20

30

40

50

り触媒されるグルコースのソルビトールへの生物変換を直接阻害する化合物である。そのようなアルドース還元酵素阻害剤は、本発明の一部として企図される直接阻害剤または特異的阻害剤である。直接阻害は、標準的なアッセイ (Malone, 1980) に従って、当業者により容易に決定される。

【 0 0 2 7 】

活性による分類に加えて、化学構造によりARIを分類することもできる。一つの態様において、ARIは、カルボン酸、ヒダントイン、ピリダジノン、またはこれらの薬学的に許容される誘導体である。いくつかの態様において、ARIは、合成化学化合物である。あるいは、ARIは、天然に由来する化合物 (例えば、アルドース還元酵素を阻害する植物抽出物または内在性抗酸化物質) である。

10

【 0 0 2 8 】

各々、参照により本明細書に完全に組み入れられる、以下の特許および特許出願は、本発明の組成物、方法、およびキットにおいて使用され得るアルドース還元酵素阻害剤を例示し、それらのアルドース還元酵素阻害剤を調製する方法に言及している：米国特許第4,251,528号；第4,600,724号；第4,464,382号、第4,791,126号、第4,831,045号；第4,734,419号；第4,883,800号；第4,883,410号；第4,883,410号；第4,771,050号；第5,252,572号；第5,270,342号；第5,430,060号；第4,130,714号；第4,540,704号；第4,438,272号；第4,436,745号、第4,438,272号；第4,436,745号、第4,438,272号；第4,436,745号、第4,438,272号；第4,980,357号；第5,066,659号；第5,447,946号；および第5,037,831号。

【 0 0 2 9 】

20

本明細書に具体的に記載されたアルドース還元酵素阻害剤に加えて、その他のアルドース還元酵素阻害剤も当業者に公知であろう。適用可能な場合には、化合物を開示している適切な特許文献の参照と共に、一般的な化学名または別名を、括弧内に示す。従って、本発明の組成物、方法、およびキットにおいて有用なアルドース還元酵素阻害剤の例には、3-(4-プロモ-2-フルオロベンジル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1-フタラジン酢酸 (ポナルレスタット、米国特許第4,251,528号)；N[(5-トリフルオロメチル)-6-メトキシ-1-ナフタレニル]チオキシメチル-N-メチルグリシン (トルレスタット、米国特許第4,600,724号)；5-[(Z,E)- -メチルシンナミリデン]-4-オキソ-2-チオキシ-3-チアゾリデン酢酸 (エバルレスタット、米国特許第4,464,382号、米国特許第4,791,126号、米国特許第4,831,045号)；3-(4-プロモ-2-フルオロベンジル)-7-クロロ-3,4-ジヒドロ-2,4-ジオキソ-1(2H)-キナゾリン酢酸 (ゼナレスタット、米国特許第4,734,419号および米国特許第4,883,800号)；2R,4R-6,7-ジクロロ-4-ヒドロキシ-2-メチルクロマン-4-酢酸 (米国特許第4,883,410号)；2R,4R-6,7-ジクロロ-6-フルオロ-4-ヒドロキシ-2-メチルクロマン-4-酢酸 (米国特許第4,883,410号)；3,4-ジヒドロ-2,8-ジイソプロピル-3-オキソ-2H-1,4-ベンゾキサジン-4-酢酸 (米国特許第4,771,050号)；3,4-ジヒドロ-3-オキソ-4-[(4,5,7-トリフルオロ-2-ベンゾチアゾリル)メチル]-2H-1,4-ベンゾチアジン-2-酢酸 (SPR-210、米国特許第5,252,572号)；N-[3,5-ジメチル-4-[(ニトロメチル)スルホニル]フェニル]-2-メチル-ベンゼンアセトアミド (ZD5522、米国特許第5,270,342号および米国特許第5,430,060号)；(S)-6-フルオロスピロ[クロマン-4,4'-イミダゾリジン]-2,5'-ジオン (ソルビニル、米国特許第4,130,714号)；d-2-メチル-6-フルオロ-スピロ(クロマン-4',4'-イミダゾリジン)-2',5'-ジオン (米国特許第4,540,704号)；2-フルオロ-スピロ(9H-フルオレン-9,4'-イミダゾリジン)-2',5'-ジオン (米国特許第4,438,272号)；2,7-ジ-フルオロ-スピロ(9H-フルオレン-9,4'-イミダゾリジン)-2',5'-ジオン (米国特許第4,436,745号、米国特許第4,438,272号)；2,7-ジ-フルオロ-5-メトキシ-スピロ(9H-フルオレン-9,4'-イミダゾリジン)-2',5'-ジオン (米国特許第4,436,745号、米国特許第4,438,272号)；7-フルオロ-スピロ(5H-インデノール[1,2-b]ピリジン-5,3'-ピロリジン)-2,5'-ジオン (米国特許第4,436,745号、米国特許第4,438,272号)；d-シス-6'-クロロ-2',3'-ジヒドロ-2'-メチル-スピロ-(イミダゾリジン-4,4'-4'H-ピラノ(2,3-b)ピリジン)-2,5'-ジオン (米国特許第4,980,357号)；スピロ[イミダゾリジン-4,5'(6H)-キノリン]-2,5'-ジオン-3'-クロロ-7,'8'-ジヒドロ-7'-メチル-(5'-シス) (米国特許第5,066,659号)；(2S,4S)-6-フルオロ-2',5'-ジオ

30

40

50

キソスピロ(クロマン-4,4'-イミダゾリジン)-2-カルボキサミド(フィダレスタット、米国特許第5,447,946号) ; ならびに2-[(4-ブromo-2-フルオロフェニル)メチル]-6-フルオロスピロ[イソキノリン-4(1H),3'-ピロリジン]-1,2',3,5'(2H)-テトロン(ミナルレスタット、米国特許第5,037,831号)が含まれるが、これらに限定されない。その他の化合物には、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,720,348号、第6,380,200号、および第5,990,111号に記載されたものが含まれる。さらに、他の態様において、これらのうちのいずれかが本発明の一部として排除され得ることが、具体的に企図される。

【0030】

III. 薬学的組成物および投与経路

本発明の薬学的組成物は、対象に対して薬学的に許容される担体に溶解または分散した1種または複数種のAR阻害剤を、有効量、含み得る。「薬学的な」または「薬理学的に許容される」という語句は、適宜、例えば、ヒトのような動物へ投与された時に、有害反応、アレルギー反応、またはその他の不都合な反応を生じない分子実体および組成物をさす。少なくとも1種のAR阻害剤または付加的な活性成分を含有している薬学的組成物の調製は、本開示を考慮すれば、そして参照により本明細書に組み入れられるRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990により例示されるように、当業者に公知であろう。さらに、動物(例えば、ヒト)への投与のため、調製物は、FDA Office of Biological Standardsにより必要とされるような無菌性、発熱性、一般的安全性、および純度の標準を満たすべきであることが理解されるであろう。

【0031】

本発明のアルドース還元酵素阻害剤の薬学的に許容される塩は、共溶媒において、遊離酸型のアルドース還元酵素阻害剤を、一般的には1当量の適切な塩基と反応させることにより容易に調製され得る。典型的な塩基は、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、水素化ナトリウム、カリウムメトキシド、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム、ベンザチン、コリン、ジエタノールアミン、ピペラジン、およびトロメタミンである。塩は、濃縮乾燥により、または非溶媒の添加により単離される。多くの場合において、塩は、好ましくは、酸の溶液を、異なるカチオンの塩(エチルヘキサン酸ナトリウムもしくはエチルヘキサン酸カリウム、オレイン酸マグネシウム)の溶液と混合し、溶媒(例えば、酢酸エチル)を利用して、そこから所望のカチオン塩を沈殿させることにより調製され、または濃縮および/もしくは非溶媒の添加により他の方法で単離されてもよい。

【0032】

本発明のアルドース還元酵素阻害剤の酸付加塩は、アルドース還元酵素阻害剤の遊離塩基型を適切な酸と反応させることにより容易に調製され得る。塩が、一塩基酸(例えば、塩酸、臭化水素酸、p-トルエンスルホン酸、酢酸)、二塩基酸の水素型(例えば、水素硫酸、コハク酸)、または三塩基酸の二水素型(例えば、リン酸二水素、クエン酸)のものである時、少なくとも1モル当量、一般的には、モル過剰の酸が利用される。しかしながら、硫酸、ヘミコハク酸、リン酸水素、またはリン酸のような塩が望まれる時には、適切かつ正確な化学当量の酸が一般に使用されるであろう。一般的には、共溶媒において、遊離塩基および酸を組み合わせ、そこから、所望の塩を沈殿させるが、濃縮および/または非溶媒の添加により他の方法で塩を単離することもできる。

【0033】

さらに、本発明に従って使用され得るアルドース還元酵素阻害剤、それらのプロドラッグ、およびそれらまたは該プロドラッグの薬学的に許容される塩は、水和物または溶媒和化合物として存在してもよい。これらの水和物および溶媒和化合物も、本発明の範囲内である。

【0034】

本発明の薬学的組成物は、固体の形態で投与されるか、液体の形態で投与されるか、またはエアロゾルの形態で投与されるかに依って、そして注射のような投与経路のため無菌である必要があるか否かに依って、異なる型の担体を含み得る。本発明の薬学的組成物は

、当業者に公知であるように、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、関節内、胸膜内、気管支内、胸膜内、鼻腔内、外用、筋肉内、腹腔内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜、心膜内、臍帯内、経口、外用、局所、吸入（例えば、エアロゾル吸入）、滴注、注射、注入、連続注入、カテーテルを介して、洗浄を介して、脂質組成物（例えば、リポソーム）で、もしくはその他の方法、またはそれらの任意の組み合わせにより投与され得る（例えば、参照により本明細書に組み入れられるRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990を参照のこと）。

【0035】

担体には、任意の全ての溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、風味剤、色素、当業者に公知であろう同様の材料、およびそれらの組み合わせが含まれる（例えば、参照により本明細書に組み入れるRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329を参照のこと）。任意の従来の担体が、活性成分と非適合性でない限り、治療用組成物または薬学的組成物において使用されることが企図される。

【0036】

対象へ投与される本発明の組成物の実際の投薬量は、体重、状態の重度、処置されている疾患の型、以前のまたは同時の治療的介入、患者の特異性、および投与経路のような、理学的因子および生理学的因子により決定され得る。投薬回数および投薬が行われる期間は、変動し得る。投与を担う実務者は、いかなる場合にも、個々の対象について、組成物中の活性成分の濃度および適切な用量ならびに投与の時間の長さを決定するであろう。アルドース還元酵素活性を阻害するために有効である量のアルドース還元酵素阻害剤が使用される。典型的には、阻害剤の有効投薬量は、単回投与または分割投与による約0.01mg/kg/日～100mg/kg/日、好ましくは、単回投与または分割投与による0.1mg/kg/日～20mg/kg/日の範囲である。約0.01、0.05、0.1、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100mg/kg/日の用量、少なくともそれらの用量、または多くともそれらの用量、またはそれらの中の任意の導出可能な範囲。典型的には、用量は、1日当たり25～1200mgであり、ある種の局面において、1日当たり100～800mgである。

【0037】

ある種の態様において、薬学的組成物は、例えば、少なくとも約0.1%の活性化化合物を含み得る。他の態様において、活性化化合物は、単位の重量の約2%～約75%、または、例えば、約25%～約60%、およびその中の任意の導出可能な範囲を構成し得る。他の非限定的な例において、用量は、1回の投与当たり約1μg/kg/体重、約5μg/kg/体重、約10μg/kg/体重、約50μg/kg/体重、約100μg/kg/体重、約200μg/kg/体重、約350μg/kg/体重、約500μg/kg/体重、約1mg/kg/体重、約5mg/kg/体重、約10mg/kg/体重、約50mg/kg/体重、約100mg/kg/体重、約200mg/kg/体重、約350mg/kg/体重、約500mg/kg/体重～約1000mg/kg/体重またはそれ以上、およびその中の任意の導出可能な範囲も含み得る。本明細書にリストされた数から導出可能な範囲の非限定的な例において、上記の数に基づき、約5mg/kg/体重～約100mg/kg/体重、約5μg/kg/体重～約500mg/kg/体重等の範囲が、投与され得る。

【0038】

いかなる場合にも、組成物は、1種または複数種の成分の酸化を遅らせるための様々な抗酸化剤を含み得る。さらに、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない、様々な抗菌剤および抗真菌剤のような保存剤によっ

て、微生物の作用を防止することができる。

【0039】

本発明のある種の局面において、AR阻害剤は、経口摂取のような経路による投与のために調製される。これらの態様において、固体組成物は、例えば、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸剤、カプセル（例えば、硬もしくは軟シェルゼラチンカプセル）、徐放性製剤、バツカル組成物、トローチ、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハー、またはそれらの組み合わせを含み得る。経口組成物は、食事の食品と共に直接取り込まれ得る。経口投与のための好ましい担体には、不活性希釈剤、同化可能食用担体、またはそれらの組み合わせが含まれる。本発明の他の局面において、経口組成物は、シロップまたはエリキシルとして調製され得る。シロップまたはエリキシルは、例えば、少なくとも1種の活性薬剤、

10

【0040】

ある種の好ましい態様において、経口組成物は、1種または複数種の結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、風味剤、およびそれらの組み合わせを含み得る。ある種の態様において、組成物は、以下のうちの1種または複数種を含み得る：例えば、トラガント、アラビアゴム、コーンスターチ、ゼラチン、もしくはそれらの組み合わせのような結合剤；例えば、第二リン酸カルシウム、マンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、もしくはそれらの組み合わせのような賦形剤；例えば、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸、もしくはそれらの組み合わせのような崩壊剤；例えば、ステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤；

20

【0041】

無菌の注射可能溶液は、上に列挙された様々な他の成分と共に、必要とされる量の活性化化合物を適切な溶媒に組み入れ、必要に応じて、その後、ろ過滅菌することにより調製される。一般に、分散物は、基本の分散媒および/またはその他の成分を含有している無菌の媒体に、様々な滅菌された活性成分を組み入れることにより調製される。無菌の注射可能な溶液、懸濁液、または乳濁液の調製のための無菌の粉末の場合、好ましい調製法は、事前に滅菌ろ過された液体媒体から、活性成分+任意の付加的な所望の成分の粉末を与える、真空乾燥または凍結乾燥の技術である。液体媒体は、必要であれば、適当な緩衝剤で処理されるべきであり、液体の希釈剤がまず等張にされた後、十分な生理食塩水またはグルコースと共に注射されるべきである。直接注射のための高度に濃縮された組成物の調製も、企図され、その場合、溶媒としてのDMSOの使用は、極めて迅速な浸透をもたらし、高濃度の活性薬剤を小さな区域へ送達すると予想される。

30

【0042】

特定の態様において、例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、またはそれらの組み合わせのような、吸収を遅延させる薬剤を組成物において使用することにより、注射可能組成物の長期的な吸収をもたらすことができる。

40

【0043】

AR阻害剤のような本発明の組成物による処置の有効性を増加させるため、それを他の治療剤と組み合わせることが望ましい場合がある。この過程は、細胞をAR阻害剤および治療剤と同時に接触させることを含んでいてもよいし、または細胞、組織、もしくは生物へのモジュレーターおよび薬剤の別々の投与が、所望の治療的利益を生ずる期間内に、細胞をAR阻害剤および治療剤と接触させることを含んでいてもよい。細胞、組織、または生物に適用された時、「接触」および「曝露」という用語は、AR阻害剤および/または治療剤が

50

、標的の細胞、組織、もしくは生物へ送達されるか、または標的の細胞、組織、もしくは生物と直接隣接するよう置かれる過程を記載するために、本明細書において使用される。細胞、組織、または生物は、AR阻害剤および1種もしくは複数種の薬剤の両方を含む単一の組成物もしくは薬理学的製剤と（例えば、投与により）接触させられてもよいし、または2個以上の別個の組成物もしくは製剤（一方の組成物はAR阻害剤を含み、他方は1種もしくは複数種の薬剤を含む）と接触させられてもよい。

【0044】

AR阻害剤は、数分～数週間の範囲の間隔で、他の薬剤に先行してもよいし、同時であってもよいし、かつ／または後続してもよい。AR阻害剤および他の薬剤が、細胞、組織、または生物へ別々に適用される態様においては、阻害剤および薬剤が、細胞、組織、または生物に対して有利に組み合わせられた効果を発揮することができるよう、各送達の時点の間に有意な期間が経過しないことが、一般に確実にされるであろう。例えば、そのような場合においては、モジュレーターとして、2種、3種、4種、またはそれ以上のモダリティと、実質的に同時に（即ち、約1分以内に）、細胞、組織、または生物を接触させることが企図される。他の局面において、1種または複数種の薬剤は、実質的に同時から、AR阻害剤の投与の約1分、約5分、約10分、約20分、約30分、約45分、約60分、約2時間、もしくはそれ以上、または約1日以上、または約4週間以上、または約3ヶ月以上、または約1年以上、およびその中の任意の導出可能な範囲だけ前および／または後までの範囲内で投与され得る。

【0045】

そのような組み合わせにおいて、AR阻害剤および他の活性薬剤は、共に投与されてもよいし、または別々に投与されてもよい。さらに、ある薬剤の投与が、他の薬剤の投与より前であってもよいし、同時であってもよいし、または後であってもよい。

【実施例】

【0046】

IV. 実施例

以下の実施例および添付の図面は、本発明の好ましい態様を証明するために含まれる。実施例または添付の図面に開示された技術は、本発明の実施においてよく機能することが本発明者らにより発見された技術を表し、従って、その実施のための好ましいモードを構成すると見なされ得ることが、当業者により認識されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示を考慮すれば、開示された具体的な態様に多くの変化を施しても、本発明の本旨および範囲から逸脱することなく、同様のまたは類似の結果を入手することが可能であることを認識するべきである。

【0047】

A. タバコ煙抽出物

1. 結果

CSEは、12.5%、25%、50%、および75%のCSEの濃度で、それぞれ、24時間で、23%、26%、37%、および40%であった、SAECにおける用量依存的な細胞死を引き起こした。フィダレスタットによるSAECの処理は、CSEにより誘導される細胞死を防止し、50% CSEで、> 85%の細胞が生存しており、12.5%では、95%を超える細胞が生存していた（図1）。SAECにおけるTNF- α により誘導される細胞死を、陽性対照として使用した。

【0048】

さらに、サイトカイン、ケモカイン、および増殖因子のレベルを、CSE（50%）処理の24時間後のSAEC培養培地において測定した（図2）。IL-1 およびIL-8のようなサイトカインのレベルは、およそ2倍増加し、およそ10倍、TNF- α は3倍増加した。全ての変化が、SAECにおけるAR阻害により、有意に（ $p < 0.05$ および0.01）防止された（図2）。同様に、G-CSF（およそ7倍）、MCP-1（およそ15倍）、GM-CSF（およそ0.75倍）、およびIP-10（30倍超）のようなケモカイン、ならびにTGF- β （3倍）およびVEGF（4倍）のような増殖因子のレベルの有意な増加が存在し、AR阻害剤による処理は、50%超、これらの変化を防止した（図2）。

【 0 0 4 9 】

2. 材料および方法

細胞の選択：アレルゲンと呼吸器との間の最初の接触点である気道上皮細胞は、COPDをもたらす、気道上皮細胞の細胞生存能、形態学、および生理学の変化をもたらす、細胞酸化還元ホメオスタシスを妨害する、環境的なガスおよび粒子、タバコ煙、ならびにその他の生体異物を含む外来粒子に対する障壁として、重要な機能を果たしている。従って、本発明者らは、初代ヒト小気道上皮細胞を選んだ。

【 0 0 5 0 】

細胞培養：Lonza (Walkersville, MD) から入手された初代ヒト小気道上皮細胞 (SAEC) は、18歳男性ドナーの遠位気腔から採集された正常ヒトSAECであった。細胞は、52 μ g/ml ウシ下垂体抽出物、0.5ng/ml ヒト組換え上皮増殖因子 (EGF)、0.5 μ g/ml エピネフリン、1 μ g/ml ヒドロコルチゾン、10 μ g/ml トランスフェリン、5 μ g/ml インスリン、0.1ng/ml レチノイン酸 (RA)、6.5ng/ml トリヨードチロニン、50 μ g/ml ゲンタマイシン / アムホテリシン B (GA-1000)、および50 μ g/ml 脂肪酸不含ウシ血清アルブミン (BSA) を含有している補助剤を含む小気道上皮基本培地 (SABM) において、95% 空気および5% CO₂ を含有している加湿雰囲気において、37 °C で、供給元の指示に従い培養された。

【 0 0 5 1 】

タバコ煙抽出物 (CSE) の調製：University of Kentucky (Lexington, KY) のKentucky Tobacco Research and Development Centerからのフィルター付き研究用タバコ (1R3F) を、CarpおよびJanoff (Am Rev Respir Dis. 1978; 118(3): 617-621) により開発された方法の変法を使用して、ドラフト内で、フィルターの0.5cm上まで燻煙した。1本のタバコからの煙を10mlの無血清培地へ1cm/分の速度で通すことにより、CSEを調製し、100%と表記した。培地で希釈することにより、様々な濃度のCSEを調製した。培地のpHを7.4に調整し、培地を0.2 μ m フィルター (Millipore) により滅菌ろ過した。CSEは、常に、実験当日に新鮮に調製された。

【 0 0 5 2 】

細胞生存能アッセイ：SAECを、96穴プレートに5000細胞/ウェルの密度で蒔き、完全培地を、フィダレスタット (20 μ M) または担体を含有している新鮮な基本培地へ交換することにより、24時間、増殖を阻止した。細胞を、フィダレスタットの存在下または非存在下で、さらに24時間、CSE (75%、50%、25%、12.5%、0%) と共にインキュベートし、その後、10 μ l のMTT (5mg/ml) を各ウェルへ添加し、さらに2時間、37 °C でインキュベートした。培地を除去し、ホルマザン顆粒を100% DMSOに溶解させた。吸光度を96穴ELISAプレートリーダーを使用して、570nmで読み取った。

【 0 0 5 3 】

細胞培養培地中のmilliplexによるサイトカインおよびケモカインの決定：細胞をコンフルエンスに増殖させ、PBSにより洗浄した後、CSEまたは媒体に曝露した。1本のタバコの喫煙を模倣するため、細胞を15分間CSEに曝露した。CSEを除去し；細胞をPBSにより洗浄し、新鮮な培地に置いた。培養培地を、収集し、2,500rpmでの5分間の遠心分離により清澄化した。分析のために使用するまで、-200 °C で上清を保管した。上清中のサイトカインおよびケモカインのレベルを、製造業者の指示 (Millipore Corporation, Billerica, MA) に従って、Milliplex MAPキットにより決定した。

【 0 0 5 4 】

統計：平均値 \pm SDおよび統計的有意性として提示されたデータは、graph pad prismソフトウェア (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) を使用して独立スチューデントt検定により決定された。P < 0.05の値を、統計的に有意と見なした。

【 0 0 5 5 】

B. プタクサ花粉抽出物

1. 結果

AR阻害はSAECにおけるIL-13により誘導されるROSレベルを防止する：サイトカインにより誘導される酸化ストレスは、気道上皮細胞の粘液細胞への分化をもたらす分子シグナル

10

20

30

40

50

伝達を媒介することが公知であるため、本発明者らは、2種の異なる方法により、SAECにおけるIL-13により誘導されるROSレベルに対するAR阻害の効果を決定した。図3Aおよび3Bに示されるように、IL-13による刺激は、対照に対するROSレベルのおよそ2倍の増加を引き起こし、フィダレスタットによる細胞の処理は、その増加を有意に（80%）防止した。これらの結果は、ARの阻害により、サイトカインにより誘導される酸化ストレスを防止し得ることを示唆する。

【0056】

AR阻害はSAECにおけるIL-13により誘導される杯細胞化生を防止する：杯細胞化生およびムチン産生の調節におけるARの役割を調査するため、本発明者らは、インピボ気道環境を模倣する気液界面培養系を使用した。最初に、本発明者らは、コラーゲン1型コーティングを有するポリエチレンテレフタレート（PET）膜インサート上で初代ヒト気道上皮細胞を培養した。コラーゲンによりコーティングされた膜インサート上の細胞は、一貫して、2~3細胞の厚さの気道細胞の層を形成した。さらに、11日間、EGF含有培地においてALI上で培養された時、単層細胞は纖毛細胞へ完全に分化し（図4A）、これらの細胞を48時間IL-13により刺激した時、チューブリン特異抗体を使用した免疫染色によっても決定されたように、纖毛細胞の数が著しく低下した。しかしながら、フィダレスタットによるAR阻害は、纖毛形態学を保存した（図4B）。単独のAR阻害剤は毒性効果を有しておらず、纖毛細胞の単層は概して完全であった。PAS染色により決定されたように、48時間、IL-13により刺激された時、多数の纖毛細胞（およそ6倍）が、粘液が充満した杯細胞へ形質転換したが、IL-13チャレンジ前にAR阻害剤フィダレスタットを培地へ添加することにより、気道細胞の杯細胞への分化が防止された（示されないデータ）。

【0057】

AR阻害は気道上皮単層におけるムチンおよびSPDEFのIL-13により誘導される発現を防止する：次に、単層細胞の切片を、Muc5ACに対する抗体により染色した。図5Aおよび5Bに示されるように、IL-13刺激は、多数のMuc5AC免疫陽性細胞をもたらした。細胞をAR阻害剤により処理し、IL-13と共にインキュベートした時、Muc5AC染色陽性細胞の数が、有意に（およそ70%）減少し、このことから、極少数の細胞しか杯細胞へ形質転換しなかったことが示唆された。次に、本発明者らは、ELISAを使用して、培養培地中の分泌されたMuc5ACのレベルを測定した。IL-13刺激後の培地にはMuc5ACの分泌の著しい増加があったが、それは、AR阻害剤による処理により、有意に（およそ80%）防止された（図5C）。これらの結果は、ARが気道上皮細胞におけるIL-13により誘導される化生および粘液生成を調節すること、そしてARの阻害がこれらのイベントを防止し得ることを示唆する。

【0058】

次に、本発明者らは、これらの細胞におけるムチンレベルが、転写または翻訳により調節されるか否かを調査した。図6A、上パネルに示されるように、IL-13により処理されたSAEC単層においては、Muc5AC特異的なRNA発現がおよそ3倍増加し、フィダレスタットはその増加を有意に防止した。SPDEFは、酸性ムチンおよび中性ムチンの両方を含む気道上皮細胞における数種の遺伝子の発現を調節し、杯細胞過形成を引き起こすことを、多数の研究が示している。従って、本発明者らは、細胞培養モデルにおいて、RT-PCRによりSPDEF mRNA発現レベルを決定し、IL-13は上皮細胞におけるSPDEFの発現を有意に増強するが、対照細胞は基底レベルの発現のみを有することを観察した。これらの細胞を、IL-13刺激の前にAR阻害剤により処理した時、SPDEF mRNAレベルは有意に減少した（図6A、下パネル）。

【0059】

次に、24時間および48時間のIL-13とのインキュベーションの後、SAEC単層において、Muc5ACタンパク質およびMuc5Bタンパク質のレベルをイムノブロットングにより測定した。Muc5AC/Bは、24時間後には検出可能でなかったが、IL-13との48時間のインキュベーションの後、タンパク質発現レベルの頑強な増加が起こり（図6B、上2枚のパネル）、それは、フィダレスタットにより処理された細胞において有意に（それぞれ、およそ75%、およそ50%）防止された。また、IL-13と共にインキュベートされた気道上皮細胞単層にお

いては、細胞内のSPDEFタンパク質のレベルも、24時間後に有意に増加し、48時間後にさらに増加し、その増加は、AR阻害剤により処理された細胞において有意に（およそ50%）防止された（図6B）。タンパク質レベルの減少は、SPDEFおよびMuc5AC/BのmRNAレベルの減少と一致し、そのことから、SPDEF遺伝子およびMuc5AC遺伝子がIL-13の存在下で誘導されること、そしてMuc5ACの発現が転写レベルでAR阻害により防止されることが示唆された。

【0060】

AR阻害はシグナル伝達中間体のIL-13により誘導されるリン酸化および活性化を防止する：ALI上の気道上皮細胞単層におけるAR阻害は、転写調節因子SPDEFの発現およびその後のムチンの発現を成功裡に防止したため、これらの喘息メディエーターの発現を調節する分子機序に対するAR阻害の効果を研究した。ALI上で増殖させた細胞を、AR阻害剤の存在下または非存在下でIL-13により刺激し、JAK1タンパク質、ERK1/2タンパク質、およびSTAT-6タンパク質のリン酸化を決定した。図7に示されるように、IL-13は、STAT-6ならびにJAK1およびERK1/2のような上流メディエーターのリン酸化の時間依存的な増加を引き起こした。これらの細胞をIL-13刺激の前にAR阻害剤により処理した時、これらのタンパク質のリン酸化は有意に減少した。さらに、AR阻害剤単独により処理された細胞においては、JAK1の基底リン酸化が減少したが、ERK1/2およびSTAT-6については減少しなかった。これらの結果は、ARが、気道纖毛上皮細胞を粘液分泌杯細胞へ形質転換させる杯細胞化生に關与する重要シグナル伝達中間体の活性化を調節することを示唆する。

【0061】

AR阻害はIL-13のRWEにより誘導される発現およびマウス肺におけるSTAT-6の活性化を防止する：Th2サイトカイン、特に、IL-13は、杯細胞化生に關与しているため、本発明者らは、RWEチャレンジ後のマウス肺におけるIL-13の発現レベルを調査し、そのレベルが対照と比較しておよそ6倍増加すること、そしてチャレンジ前のフィダレストットによる処理がこの増加を防止することを見出した（図8）。IL-13レベルの増加が、化生において主要な役割を果たすSTAT-6のリン酸化および活性化と同時発生するか否かを調査するため、RWEチャレンジの20時間後にマウスを屠殺し、ホスホSTAT-6抗体を使用した免疫蛍光研究を、肺切片に対して実施した。対照マウスの肺はバックグラウンドのみを示したが、RWEチャレンジを受けたマウス肺上皮は、ホスホSTAT-6に特異的な蛍光強度の著しい増加を示し、それが、AR阻害により防止されることが觀察された（図9A）。結果は、肺切片に対するDABに基づく免疫組織化学によっても同様に確認された（図9B）。これらの結果は、ARの阻害が、インビボで、アレルゲンにより誘導されるIL-13発現およびその後のSTAT-6の活性化を防止し得ることを示唆する。

【0062】

AR阻害/欠損はマウス肺におけるRWEにより誘導される杯細胞化生を防止する：本発明者らは、次に、RWEにより感作されチャレンジされたマウスにおける杯細胞化生に対するAR阻害の効果を調査した。チャレンジの72時間後、肺切片を入手し、PASにより染色し、気道上皮の変化を調査した。図10Aに示されるように、RWEチャレンジを受けたマウスの気道においては、PAS陽性細胞の有意な増加が存在したが、RWEチャレンジ前にフィダレストットにより処理されたマウスの肺には存在しなかった。阻害剤により処理されたマウスに類似して、RWEによりチャレンジされたARヌルマウスは、気道におけるPAS陽性細胞の欠如を示した（図10B）。これらの結果は、ARが杯細胞化生において有意な役割を果たすこと、そしてAR阻害がアレルギー性喘息における化生を防止し得ることをさらに確認する。

【0063】

2. 材料および方法

動物：全ての動物実験が、National Institutes of Health Guide for Care and Use of Experimental Animalsに従い実施され、University of Texas Medical Branch Animal Care and Use Committee（動物福祉保証番号（Animal welfare assurance No.）A3314-01）により承認された。

【0064】

試薬：小気道上皮基本培地（SABM）および小気道上皮増殖培地（SAGM（商標））bullet kit；ならびにトリプシン0.025%/EDTA 0.01%、トリプシン中和溶液、およびHEPES緩衝生理食塩水溶液を含有しているReagentpack（商標）は、Lonza Walkersville Inc.（Walkersville, MD）から購入された。ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）およびリン酸緩衝生理食塩水（PBS）は、Gibco, Invitrogen（Grand Island, NY）から購入された。AR阻害剤フィダレスタットは、Sanwa-Kayagu（South Korea）からの寄贈であった。ヒト組換えIL-13は、R&D systems（Minneapolis, MN）製であった。ジメチルスルホキシド（DMSO）は、Fischer scientific（Pittsburg, PA）から入手された。ヒトmucin5AC ELISAキットは、Cosmo Bio USA（Carlsbad, CA）製であった。STAT-6、ホスホSTAT-6、ホスホJAK1、JAK1、ERK1/2、ホスホERK1/2に対する抗体は、Cell Signaling Tech（Danvers, MA）製、ムチン5サブタイプAおよびC（Muc5AC）、Muc5B、GAPDH、ならびにアクチンに対する抗体は、Santa Cruz Biotechnology Inc.（Santa Cruz, CA）製であった。SAMポインテッドドメイン含有ETS転写因子（SAM pointed domain-containing ETS transcription factor）（SPDEF）に対する抗体は、Abcam Inc.（Cambridge MA）から購入された。1.0 μ M孔を有するポリエチレンテレフタレート透明12穴Millicell細胞培養インサートは、Millipore Corp.（Billerica, MA）から購入された。ラット尾コラーゲン1型およびオールトランスレチノイン酸は、Sigma-Aldrich（Saint Louis, MO）製であった。ウエスタンブロット分析において使用された試薬は、Sigmaから入手された。使用されたその他の試薬は、全て、分析用であった。

【0065】

細胞培養：Lonza Walkersville, Inc.（Walkersville, MD）から入手された初代ヒト小気道上皮細胞（SAEC）は、遠位気腔から採集された正常ヒトSAECであった。細胞は、52 μ g/ml ウシ下垂体抽出物、0.5ng/ml ヒト組換え上皮増殖因子（EGF）、0.5 μ g/ml エピネフリン、1 μ g/ml ヒドロコルチゾン、10 μ g/ml トランスフェリン、5 μ g/ml インスリン、0.1ng/ml レチノイン酸（RA）、6.5ng/ml トリヨードチロニン、50 μ g/ml ゲンタマイシン/アムホテリシンB（GA-1000）、および50 μ g/ml 脂肪酸不含ウシ血清アルブミン（BSA）が補足された小気道上皮基本培地（SABM）において、95%空気および5%CO₂を含有している加湿雰囲気において、37℃で、供給元の指示に従い培養され維持された。

【0066】

ROSレベル決定：およそ 5×10^4 個のSAECを2チャンバー培養スライドにトリプリケートに播種するか、または1ウェル当たり10,000個のSAECを96穴プレートに蒔いた。付着後、細胞を、フィダレスタット（10 μ M）を含まないかまたは含む、0.1%血清を含有している基本培地において、一夜、飢餓状態にした。翌日、細胞を1×HBSS緩衝液により洗浄し、37℃で30分間、10 μ M H₂DCF-DAと共にインキュベートし、過剰のH₂DCF-DAを除去するために再び洗浄し、IL-13（25ng/ml）により1時間処理した。インキュベーションの終了後、細胞を、冷1×HBSS緩衝液により2回洗浄した。培養スライド上の細胞を、DAPIを含むfluorave封入剤を使用してマウントし、その後、蛍光顕微鏡（Nikon）を使用して顕微鏡写真を撮得した。96穴プレート内の細胞について485nmの励起波長および538nmの放出波長を使用して蛍光を決定した。相対ROS生成が平均蛍光強度（MFI）（任意単位）として表される。

【0067】

気液界面培養：気液界面（ALI）培養のため、ラット尾コラーゲン1型（Sigma-Aldrich）により予めコーティングされた1.0 μ M孔を有する12mm直径PET透明インサート（12-well millicell culture insert；Millipore）に、1個当たり 8.5×10^4 細胞のSAECを播種した。Zhenら（Am J Respir Cell Mol Biol 36:244-253, 2007）により以前に記載されたようにして、細胞を、分化培地において液内増殖させた。分化培地は、DMEMと、ゲンタマイシン硫酸塩、アムホテリシンB、およびトリヨードチロニンが、1%ペニシリン/ストレプトマイシンおよび50nMオールトランスレチノイン酸に交換された以外は上記のように補足された小気道上皮増殖培地との1:1混合物を含有していた。SAECを最初の7日間は液内に維持し、その後、頂端側培地を除去し、気液界面培養を確立した。培養期間の残りは、ALIで細胞を維持した。培地を3日毎に更新し、1週間に1回、蓄積された粘液および細胞片を除

去するため、細胞の頂端側表面をPBSにより濯いだ。細胞を、加湿インキュベーター内で、95%空気および5%CO₂において37℃で維持した。ALI上の細胞を、ALIの確立後11日目に、EGFを含まない分化培地において、基底側から、一夜、AR阻害剤フィダレスタット(10 μM)により前処理し、示されたような様々な期間、組換えヒトIL-13(25ng/ml)を培地へ添加することにより、IL-13により刺激した。

【0068】

細胞固定および免疫細胞化学：IL-13とのインキュベーションの完了後、細胞の頂端側表面をPBSにより濯ぎ、細胞を10%z-fix、水性緩衝重鉛ホルマリン(Anatech Ltd; Battle Creek, MI)で4℃で24時間固定し、パラフィン包埋した。膜インサート上の上皮細胞単層の5 μMの薄い切片を、H&Eおよび過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色により染色した。染色された切片を分析し、代表的な領域を、NIKON Eclipse TE 200 UV顕微鏡にマウントされたPhotometrix CoolSNAP Fxカメラを使用して写真撮影した。チューブリンおよびMuc5ACに対する抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、および対応する対照IgGを、免疫細胞化学のために使用した。製造業者により提案された通りに、Vector LSABキット(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を使用して、抗体を検出した。

【0069】

RT-PCR：供給元の指示の通りに、RNeasyキット(Qiagen)を使用することにより、AR阻害剤の存在下または非存在下でIL-13により処理された分化SAECから、全RNAを単離した。各試料から単離されたRNAのアリコート(1.0 μg)を、30分間55℃でHotStar Taq DNA polymeraseを含むOmniscript and Sensiscript reverse transcriptase one-step RT-PCR系(Qiagen)により逆転写した後、PCR増幅した。オリゴヌクレオチドプライマー配列は以下の通りであった：

Muc5AC: 5'-

TCCGGCCTCATCTTCTCC-3' (SEQ ID NO:1) (センス) および 5'-
ACTTGGGCACTGGTGCTG-3' (SEQ ID NO:2) (アンチセンス); SPDEF: 5'-
CGAAGTGCTCAAGGACATCGAG-3' (SEQ ID NO:3) (センス) および 5'-
CGGTATTGGTGCTCTGTCCACA-3' (SEQ ID NO:4) (アンチセンス)ならびに GAPDH: 5'-
GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3' (SEQ ID NO:5) (センス) および 5'-
CATACCAGGAAATGAGCTTG-3' (SEQ ID NO:6) (アンチセンス)

。以下の条件の下で、PCR Sprintサーマルサイクラー(Thermo electron corporation, Milford, MA)においてRT-PCR反応を実施した：95℃15分の初期変性、94℃1分、60℃1分、72℃1分を35サイクル、続いて、最終伸張のための72℃10分。RT-PCR産物を、0.5 μg/ml 臭化エチジウムを含有している1.5%アガロース-1×TAEゲル上の電気泳動に供した。ゲルの濃度測定分析を、NIH image分析ソフトウェアを使用して実施した。

【0070】

ウェスタンブロット分析：インキュベーション後、細胞を冷PBSにより洗浄し、RIPA溶解緩衝液で溶解した。細胞溶解物をプールし、遠心分離により清澄化した。Bradford試薬(Biorad, Hercules, CA)を使用して、タンパク質レベルを決定した。40 μgのタンパク質を、試料緩衝液と混合し、10%SDS-PAGE上で分離した。電気泳動の後、タンパク質をニトロセルロース膜に電気的に移し、TBST中の5%脱脂乳によりブロッキングし、4℃で一夜、ホスホERK1/2、ERK1/2、ホスホSTAT-6、STAT-6、Muc5AC、Muc5B、およびSPDEFに対する抗体によるプロービングを行った。次いで、ブロットを洗浄し、HRP結合二次抗体(1:5,000希釈)に1時間曝露し、抗原抗体複合体を増強化学発光(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)により検出した。負荷対照を示すため、膜のストリッピングおよびGAPDHに対する抗体によるリプロービングを行った。Ultra Violate Products Ltd. (Cambridge, UK)製のbiospectrum 410 image systemにより、濃度測定を実施した。

【0071】

Muc5AC ELISA：培養培地中のMuc5ACレベルを、本質的に製造業者（Cosmo Bio USA；Carlsbad, CA）により記載されたようにして、市販のヒト抗Muc5AC ELISAを使用して、ELISAにより査定した。

【0072】

動物の感作およびチャレンジ：野生型のC57BL/6マウスおよびBalb/cJマウスは、Harlan Sprague-Dawley（San Diego, CA, USA）から購入され、C57BL/6バックグラウンドのARヌルマウスは、Animal resource center（UTMB, Galveston, TX）において本発明者らにより作出された。6～8週齢雌マウスを、以前に記載されたようにして（Hwang et al., FASEB J. 19:795-797, 2005）、RWEにより感作した。簡単に説明すると、0日目および4日目に、3:1比（v/v）でミョウバンアジュバント（1mg）と組み合わせた100 μ lの内毒素不含RWE（150 μ g）を、2回、腹腔内投与することにより、マウスを感作した。11日目に、マウス（n=6）を、RWE（100 μ g）により鼻腔内チャレンジした。マウスの並行群は、チャレンジの1日前から飲料水中のフィダレスタット（7mg/kg体重/日）を受容した。マウスの対照群は、等しい容量のPBSによりチャレンジされた。動物を、ケタミン（135mg/kg体重）およびキシラジン（15mg/kg体重）により、言及されたような異なる時点で安楽死させ、肺を灌流し、4%パラホルムアルデヒドにより固定し、パラフィン包埋し、5 μ mに切片化した。肺切片をPASにより染色し、代表的な領域を、NIKON Eclipse TE 200 UV顕微鏡上にマウントされたPhotometrix CoolSNAP Fxカメラにより観察し、写真撮影した。

10

【0073】

マウス肺におけるIL-13の決定：RWEチャレンジの16時間後にマウス肺を採集し、全RNAを単離した。各試料から、1 μ gの全RNAを第一鎖cDNAへ転写し、IL-13特異的な順方向プライマーおよび逆方向プライマー

20

5'AGACCAGACTCCCCTGTGCA (SEQ ID

NO:7), 3'TGGGTCCTGTAGATGGCATTG (SEQ ID NO:8)

を使用して、定量的RT-PCRを実施し；GAPDH特異的なプライマー

(5'TGTGTCCGTCGTGGATCTGA (SEQ ID NO:9),

3'CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT (SEQ ID NO:10))

を、ハウスキーピング遺伝子（HKG）対照として使用した。ABI 7000 Systemの装置およびソフトウェア（Applied Biosystems, Foster City, CA）により、データを収集し、分析した。発現レベルを査定するため、デルタデルタCt法（ $\Delta\Delta C_T$ ）を使用した。増加倍率（対照に対する比率）としての発現の値を、デルタデルタCt（ $\Delta\Delta C_T$ ）の方法による相対発現についての式： $F = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ を使用して計算した。F = 変化倍率（対照に対する比率）、 $C_T = (C_{T\text{標的}} - C_{T\text{HKG}})^{\text{Time } x} - (C_{T\text{標的}} - C_{T\text{HKG}})^{\text{Time } 0}$ 。Time xは、任意の時点である。Time 0は、HKGに対してノーマライズされた標的遺伝子の1×発現を表す。

30

【0074】

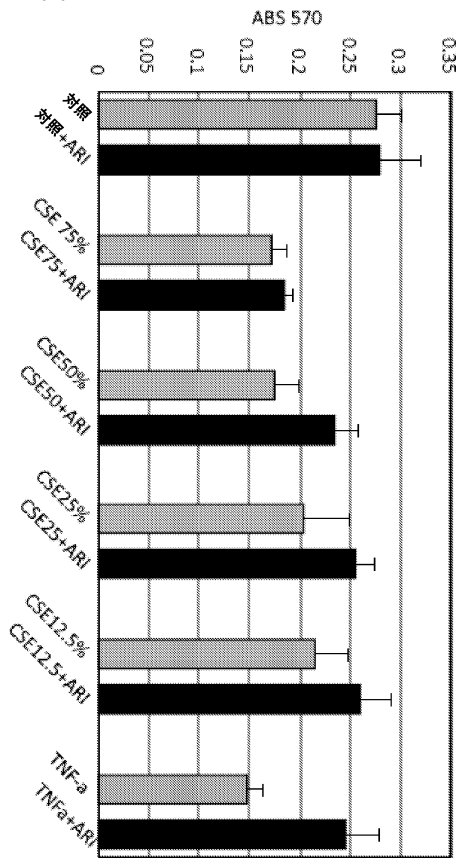
マウス肺におけるSTAT-6リン酸化の検出：RWEチャレンジのおよそ20時間後、マウスを屠殺し、肺を灌流し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、5 μ m切片を入手した。切片を、p-STAT-6特異的な一次抗体により免疫染色した後、FITC標識二次抗体によりプロービングし、DAPIを含むfluoresave媒体によりマウントするか、またはVector LSABキット（Vector Laboratories, Burlingame, CA）からのDABに基づくHRP結合抗体によりプロービングし、ヘマトキシリンおよびエオシンにより対比染色した。それぞれ、蛍光顕微鏡検または明視野顕微鏡検を使用して、NIKON Eclipse TE 200 UV顕微鏡上にマウントされたPhotometrix CoolSNAP Fxカメラにより顕微鏡写真を取得した。

40

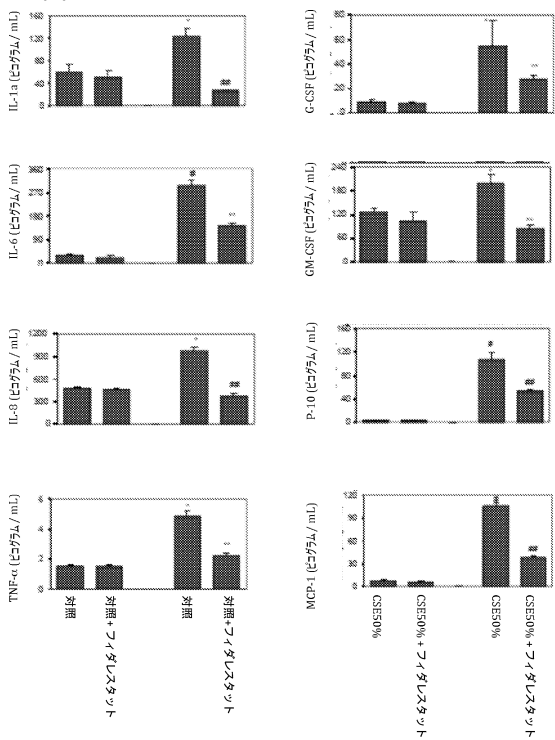
【0075】

統計：平均値 \pm SEおよび統計的有意性として提示されたデータは、graph pad prismソフトウェア（GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA）を使用して独立スチューデントt検定により決定された。P < 0.05の値を、統計的に有意と見なした。

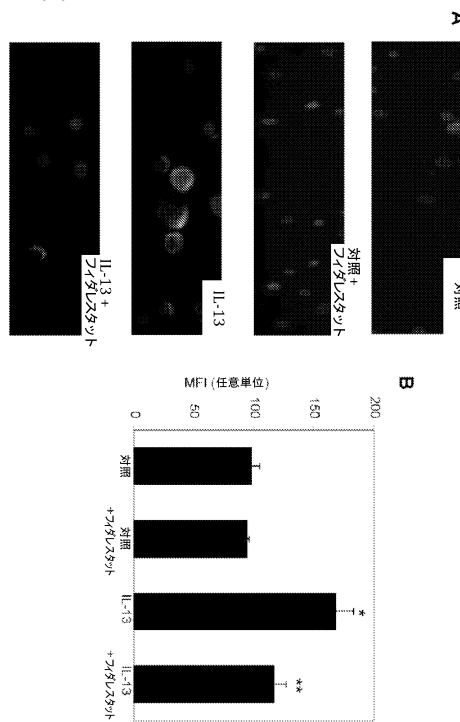
【図 1】



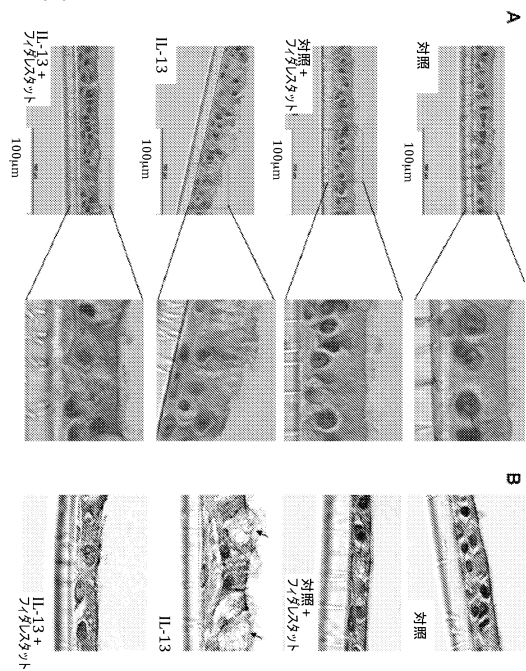
【図 2】



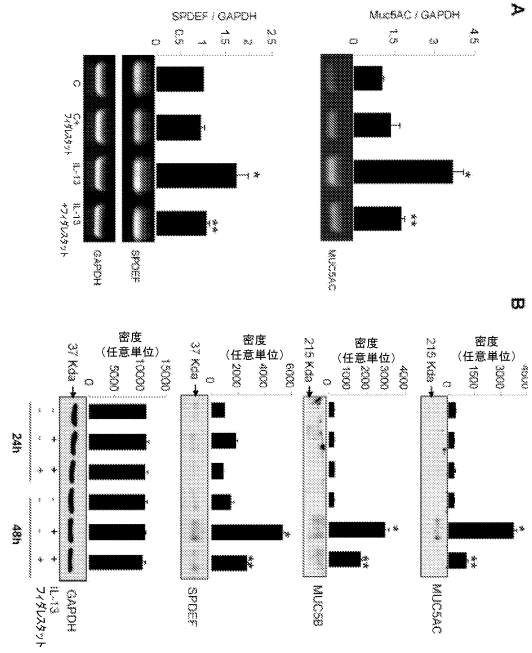
【図 3】



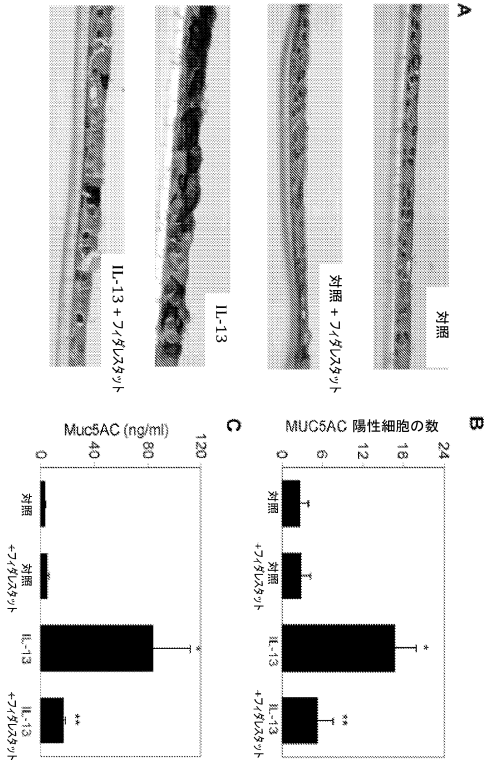
【図 4】



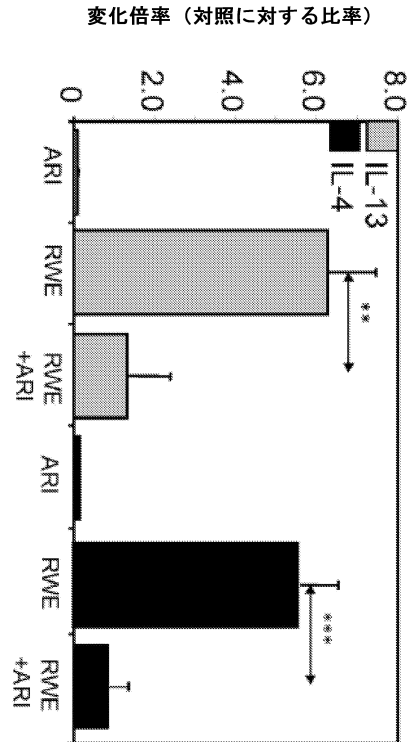
【図 6】



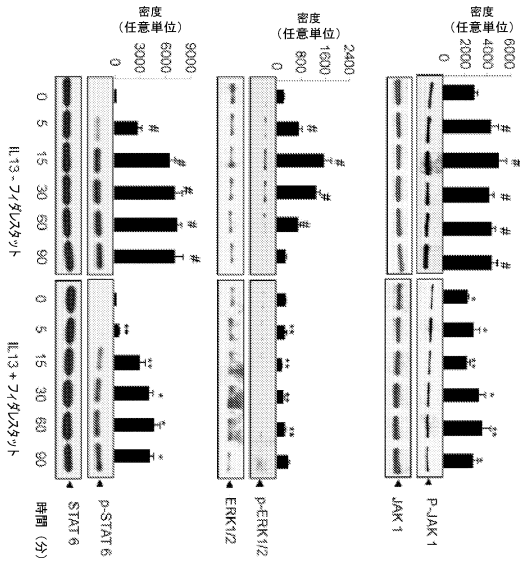
【図 5】

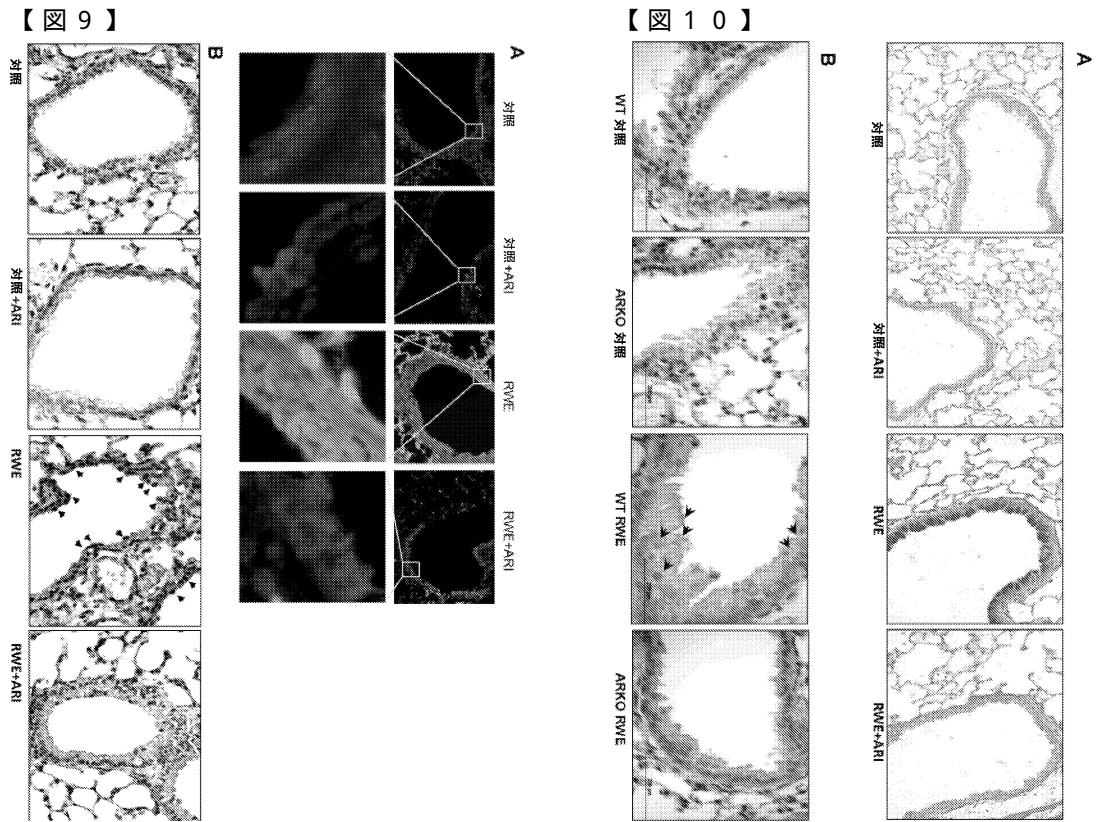


【図 8】



【図 7】





【配列表】
0005976010000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 11/00 (2006.01) A 6 1 P 11/00

(74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 スリバスタバ サティッシュ ケイ .
 アメリカ合衆国 テキサス州 ガルベストン コロニー パーク サークル 4

(72)発明者 ラマナ コタ ブイ .
 アメリカ合衆国 テキサス州 ガルベストン アザレア コート 2 5 0 6

(72)発明者 ヤダブ ウメシュ
 アメリカ合衆国 テキサス州 ガルベストン 第 6 9 ストリート 3 0 0 2 アpartment
 シー 1

審査官 長岡 真

(56)参考文献 Respiratory Research, 2010.09, vol.11, No.131, p.1-15
 The Journal of Immunology, 2009, vol.183, p.4723-4732
 Pharmacology & Therapeutics, 2006, vol.111, p.476-494

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 1 / 4 1 8 8

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 1 9 2

A 6 1 K 3 1 / 4 2 6

A 6 1 K 3 1 / 4 3 8

A 6 1 K 3 1 / 5 0 2

A 6 1 P 1 1 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)