

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6280129号  
(P6280129)

(45) 発行日 平成30年2月14日(2018.2.14)

(24) 登録日 平成30年1月26日(2018.1.26)

(51) Int.Cl.

F I

<b>A 6 1 K 31/05</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/05
<b>A 6 1 K 31/365</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/365
<b>A 6 1 K 31/407</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/407
<b>A 6 1 K 31/341</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/341
<b>A 6 1 K 31/423</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/423

請求項の数 8 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-542037 (P2015-542037)  
 (86) (22) 出願日 平成25年11月13日(2013.11.13)  
 (65) 公表番号 特表2015-537000 (P2015-537000A)  
 (43) 公表日 平成27年12月24日(2015.12.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/069939  
 (87) 国際公開番号 W02014/078447  
 (87) 国際公開日 平成26年5月22日(2014.5.22)  
 審査請求日 平成28年10月17日(2016.10.17)  
 (31) 優先権主張番号 61/725,881  
 (32) 優先日 平成24年11月13日(2012.11.13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513253467  
 ナント ホールディングス アイビー, エ  
 ルエルシー  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 90  
 232, カルバー シティ, 9920 ジ  
 ユファースン ブルバード  
 (74) 代理人 100114775  
 弁理士 高岡 亮一  
 (74) 代理人 100121511  
 弁理士 小田 直  
 (74) 代理人 100191086  
 弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルシウムフラックスアゴニスト及びその方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細菌性病原体に感染した皮膚を処置する医薬組成物であって、前記医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体中にカルシウムフラックスアゴニストを含有し、

前記医薬組成物は損傷皮膚または感染皮膚への局所適用薬であり、

前記損傷皮膚または感染皮膚へ医薬を適用する場合に、パターン認識受容体のリガンドに対して前記損傷皮膚または感染皮膚中の免疫担当細胞の免疫応答を亢進させる量の前記カルシウムフラックスアゴニストが存在し、かつ前記量は、前記リガンドの非存在下における前記免疫応答と比して、前記リガンドの存在下で前記免疫応答を相乗的に亢進し、かつ

亢進された免疫応答は、IL-8分泌が少なくとも2倍となり、前記カルシウムフラックスアゴニストは、2,5-ジ-tert-ブチルヒドロキノン(DBHQ)、タブシガルギン、シクロピアゾン酸、イオノマイシンまたはA23187のうちの少なくともいずれか1つであり、かつ

前記パターン認識受容体は、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、NOD1およびNOD2のうちの少なくともいずれか1つである、

医薬組成物。

【請求項 2】

前記カルシウムフラックスアゴニストは、タブシガルギン、イオノマイシンまたはA23187のうちの少なくともいずれか1つである、請求項1に記載の医薬組成物。

10

20

## 【請求項 3】

亢進された前記免疫応答は、IL - 8 分泌において少なくとも 8 倍増加する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

亢進された前記免疫応答は、IL - 8 分泌において少なくとも 15 倍増加する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

前記医薬組成物は、前記損傷皮膚または感染皮膚へ適用する固形の担体を介して前記損傷皮膚または感染皮膚へ適用する局所適用薬である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

前記カルシウムフラックスアゴニストは、タブシガルギンである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

前記皮膚は、TLR 受容体または NOD 受容体のリガンドを含有する細菌性病原体に感染することを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

前記リガンドの非存在下における前記免疫応答での前記カルシウムフラックスアゴニストの最大効果に関して、前記カルシウムフラックスアゴニストの量は、準最適である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2012 年 11 月 13 日に出願されたわれわれの係属中の出願番号 61 / 725881 の仮出願の優先権を主張する。そして、当仮出願は、ここで参照することにより取り込まれる。

## 【0002】

本発明は、組成物ならびに医薬化合物の方法に関するものであり、特に、局所適用されるカルシウムフラックスアゴニストに関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

さまざまなカルシウムフラックスアゴニストが、当該技術分野において知られており、またこれらは非常に異なった由来を有する。例えば、ある化合物はイオノフォアとして作用して、カルシウムイオンを細胞の内部に取り込むことによって細胞内カルシウムレベルを一般的に上昇させるが、他の化合物は、小胞体やミトコンドリアのような細胞内ストアからのカルシウム分泌を増加させることによって細胞内カルシウムレベルを上昇させる。

## 【0004】

その他の既知のさまざまなイオノフォアの中で、カルシマイシン (A23187) およびイオノマイシンは天然産物 (それぞれ、グラム陽性菌 *Streptomyces chartreusensis* および *Streptomyces conglobatus* 由来) であり、これらはもともと、数十年前には抗生物質とされていた。より具体的には、A23187 およびイオノマイシンの両者は、US3960667 および US3873693 に報告されているように、さまざまな潜在的な微生物病原体に対して直接的な抗生物質活性を示す。細胞壁の合成や細菌のリボソーム機能などの微生物の増殖に特有な生化学的経路を阻害する古典的な抗生物質 (例えば、ペニシリンやテトラサイクリン) とは異なり、A23187 およびイオノマイシンは抗生物質化合物の別個のクラスに分類され、該抗生物質化合物は基質として二価カチオンを比較的高い特異性で結合する。例えば、A23187 の結合親和性は  $Mn^{2+} > Ca^{2+} = Mg^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$  で特徴付けられ、イオノマイシンは  $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+}$  で特徴付けられる。

10

20

30

40

50

## 【0005】

一方、タブシガルギンは典型的なER分泌促進剤であり、セスキテルペンラクトンとして特徴付けることができる。タブシガルギンは植物(タブシア ガルガニカ)から単離され、さまざまな筋小胞体カルシウムATPアーゼ(sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases、SERCA)の非競合阻害剤として作用する。タブシガルギン:SERCA結合は、低いピコモル濃度の範囲の親和定数を示し、分裂細胞および非分裂細胞のいずれに対しても毒性を持つ。動物においては、タブシガルギとのわずかな皮膚接触が炎症をもたらす可能性があり、また、強力なDNA損傷剤と併用した場合、慢性的、反復的な局所暴露は非悪性の乳頭腫の形成をもたらし得る。タブシガルギン(およびタブシガルギシンなどのような構造類似体)に加えて、他のSERCA阻害剤はシクロピアゾン酸(CPA)および2,5-ジ-tert-ブチルヒドロキノン(DBHQ)を包含する。

10

## 【0006】

増加の一途をたどる慢性皮膚潰瘍を患う糖尿病患者の数、抗生物質耐性の微生物叢(例えば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌あるいはMRSA)の存在、ならびに増加する壊死性筋膜炎(あるいは「人食いバクテリア感染症」)の発生頻度、を含むいくつかの理由から、治療困難な皮膚感染症は、新たな公衆衛生上の懸念を象徴している。細菌に加えて、多くの真菌類およびウイルス類もまた、重大な皮膚の感染症を引き起こし得る。抗生物質は依然として、これらの多くの疾患に対する最善の治療選択肢ではあるが、患者自身の細胞およびそれらに関連した機能を刺激して進行中の感染症からの患者の回復をさらに向上させることが望ましいと考えられ、また、可能ならば有害な有機体に対する長期免疫を刺激してその後の遭遇時の発症を抑制することも望ましいであろう。

20

## 【0007】

高等生物においては、皮膚を含む上皮組織は、病原体に起因する損傷、化学的損傷、および物理的損傷に対する重要なバリアとして機能する。皮膚の表皮層は、ケラチノサイト、ランゲルハンス細胞およびCD8陽性T細胞などの免疫細胞、メルケル細胞ならびにメラニン細胞から成る。疾病監視を担う樹状細胞(DC)の亜型であるランゲルハンス細胞に加えて、ケラチノサイト(表皮を形成する細胞全体の~95%を占める)もまた、トール様受容体(TLR)タンパク質のメンバー、C型レクチン受容体(CLR)、インフラマソームなどの、さまざまなパターン認識受容体を発現させることを通して、免疫番兵として機能する。

30

## 【0008】

ケラチノサイトにおける、同種リガンドによるこれらの受容体の活性化は、インターロイキン-8(IL-8)、CCL2、およびCCL20などの他の免疫細胞を招集するためのケモカイン、ならびにTGF- およびIL-10などの免疫調節サイトカインの両者の放出をもたらす。表皮の下真皮は、CD4<sup>+</sup>(Th1、Th2、Th17など)および非古典的(例えば、NK-、など)T細胞のさまざまなサブセット、さまざまな抗原提示細胞(例えば、マクロファージならびに真皮樹状細胞および形質細胞様樹状細胞)、マスト細胞ならびに線維芽細胞を含む、多種多様の細胞型から成り、これらの細胞型の多くは、上述したさまざまなパターン認識タンパク質を発現する。したがって、表皮細胞および真皮細胞は協働して、微生物の侵入あるいは深刻な疾患を引き起こす他の物理的な損傷を阻止する。

40

## 【0009】

TLRタンパク質(ヒトにおけるTLR1-10)は、疾患ならびに組織の恒常性に関連するリガンドの特定クラスに対するパターン認識受容体(PRR)として機能する、I型膜タンパク質であり、そのようなものとして、さまざまな免疫細胞および非免疫細胞において同様に発現する。全ての受容体と同様に、TLRシグナル伝達はリガンド結合によって引き起こされ、リガンド類は病原体関連分子パターン(あるいはPAMP)および疾患関連分子パターン(DAMP)に分類できる。

## 【0010】

50

T L Rに認識されるP A M Pは細菌性リポタンパク質/リポペプチド、リポサッカリド、フラジェリン、および非メチル化C p G D N A、真菌細胞壁成分(例えば、サイモサン)、およびウイルス核酸(d s R N A、s s R N A、およびC p G D N A)を含み、一方D A M P sは宿主に直接由来し、感染なしで発生し得るものであり、かつ主にわずかに2種類のT L Rファミリータンパク質(T L R 2および/またはT L R 4)によって認識される。

#### 【0011】

適切なリガンドによって活性化されるとすぐに、T L Rはシグナル伝達カスケードを開始するが、該カスケードは感染/疾患の程度を抑制し、かつ組織修復を誘発するという両方の役割を果たす。後者に関し、T L Rのリガンド認識は、抗菌活性のアップレギュレーションをもたらし、かつさまざまな免疫学的プレーヤーの活性化/成熟をもたらして、侵入病原体の殲滅を完了させる。例えば、T L Rの活性化は、活性酸素種(R O S)、抗菌ペプチドの放出、ならびに、マクロファージ、好中球、ケラチノサイトなどの固有の細胞(i n n a t e c e l l s)中の食細胞機能のアップレギュレーションをもたらし得る。疾患に対抗する役割に加えて、T L Rはまた、さまざまな組織損傷モデル(化学的損傷、放射線損傷、外科的損傷、および感染性損傷によって誘導されるものを含む)において実証されているように、組織修復および再生にも関与している。

#### 【0012】

パターン認識受容体のさらに別のクラスは、N O D様受容体タンパク質ファミリーによって形成され、もっとも重要なメンバーとしてN O D 1およびN O D 2を包含する。N O D 1およびN O D 2は細胞内パターン認識受容体であり、構造面で植物の抵抗タンパク質に似ており、かつD - グルタミル - メソ - ジアミノピメリン酸およびムラミールジペプチドをそれぞれ含む細菌分子を認識することによって、自然免疫および獲得免疫を媒介する。それぞれのリガンドによる刺激に続いて、両N O Dタンパク質はそれぞれの認識ドメインを通してR I P K 2と相互作用し、これにより最終的に転写因子N F - Bの活性化がもたらされる。

#### 【0013】

シグナル伝達の小分子アゴニスト(プロテインキナーゼCアゴニストT P A / P M A、あるいはA 2 3 1 8 7、イオノマイシンまたはタブシガルギンのような持続的カルシウムフラックスアゴニスト)の局所適用に対する無損傷皮膚の応答の特性を明らかにしようとするこれまでの試みは、さまざまな下流の結果を示した。例えば、ホルボールエステルT P Aの局所適用は、血管の拡張、毛細血管透過性の変化、炎症細胞の動員、およびさまざまな細胞型からの炎症誘発因子の放出を引き起こした。P K Cアゴニストとは対照的に、持続的カルシウムフラックスアゴニスト(S C F A)による局所処理は、皮膚の炎症および過剰増殖を引き起こした。一方、比較的高い量のカルシウムイオノフォア(イオノマイシン)存在下におけるT L Rリガンド(L P S)への細胞の暴露は、測定可能ないかなる免疫活性化作用をももたらさなかった(P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 2 0 1 2 J u l 1 0 ; 1 0 9 ( 2 8 ) : 1 1 2 8 2 - 7)。U S 2 0 1 2 / 0 2 7 2 7 0 0 A 1およびU S 2 0 1 3 / 0 1 8 3 3 4 3 A 1で議論されているように、カルシウムイオノフォアおよびT L Rリガンドは比較的高い用量で個別に適用した場合、分化を刺激し、あるいは樹状細胞を活性化することが知られている。

#### 【0014】

したがって、多数の組成物ならびにT L R / N O Dに関するカルシウムフラックスアゴニストおよび/またはリガンドの使用は当該技術分野において既知であるが、改善された免疫調節活性を提供する組成物および方法を提供する必要性が依然として存在する。

#### 【発明の概要】

#### 【0015】

本発明の主題は、カルシウムフラックスアゴニストのさまざまな組成物および方法に関し、該組成物および方法においては、これらの化合物は、T L R - またはN O D - 媒介イベントに対する免疫応答を調節するために用いられ、特にT L Rおよび/またはN

10

20

30

40

50

ODリガンド結合に対する相乗的に増加する応答を調節するために用いられる。とりわけ、免疫刺激に関する相乗効果は、準最適濃度のカルシウムフラックスアゴニスト存在下で観察される。

【0016】

異なる観点から見ると、本発明者らは、細胞内 $Ca^{2+}$ 依存性のTLR/NODシグナル伝達を増強させるためのカルシウムフラックスアゴニストの使用を企図する。したがって、またその他の適切な使用の中で、特に企図される使用は、TLR/NOD依存性刺激（例えば、感染または損傷）に対する亢進された応答を可能にするための組織の前条件付け、および/または細胞内 $Ca^{2+}$ 依存性TLR/NODシグナル伝達を増強するための、表皮の局所的感染またはそれ以外の感染のカルシウムフラックスアゴニストによる処理を包含する。したがって、本発明者らはまた、創傷の治癒を促し、および/または瘢痕を縮小させるための、皮膚感染症およびその他の状態（例えば、糖尿病性の潰瘍）の予防および/または治療用の局所医薬組成物および化粧品組成物も企図する。

10

【0017】

本発明の主題のひとつの態様において、本発明者らは、パターン認識受容体のリガンドに対する免疫担当細胞の免疫応答を亢進させるための、カルシウムフラックスアゴニストの使用を企図する。例えば、カルシウムフラックスアゴニストがカルシウムイオノフォアである場合、好ましいアゴニストはイノマイシン、カルシマイシン、ボーベリシン（beauvericin）、カルシウムイオノフォアII、カルシウムイオノフォアIV、カルシウムイオノフォアV、およびカルシウムイオノフォアVIを包含し、アゴニストがSERCA阻害剤である場合、好ましいSERCA阻害剤はDBHQ（2,5-ジ-tert-ブチルヒドロキノン）、タブシガルギン、ルテニウムレッド、ジンゲロール（gingerol）、パキシリン（paxilline）、およびシクロピアゾン酸を包含する。その他の観察可能な現象のうち、亢進された免疫応答は、増加したIL-8分泌および/またはNF- $\kappa$ Bシグナル伝達の増強された活性化によって一般的に裏づけられ、かつ免疫応答がリガンドの存在下で、特にカルシウムフラックスアゴニストが準最適濃度（リガンドの非存在下におけるカルシウムフラックスアゴニストの最大効果に関して）で用いられる場合、カルシウムフラックスアゴニストによって相乗的に亢進されることが好ましい。

20

【0018】

好適な細胞に関しては、細胞が免疫担当細胞であることが一般的に企図され、該免疫担当細胞は、好ましくは皮膚の表皮層または真皮層に存在する。さらに、免疫担当細胞は一般的に、TLR受容体および/またはNOD受容体をパターン認識受容体として発現する。ゆえに、リガンドは通常、PAMPリガンドおよびDAMPリガンドを包含する。

30

【0019】

それゆえに、本発明者らは、皮膚における免疫応答を亢進させるための局所適用薬の製造におけるカルシウムフラックスアゴニストの使用もまた企図する。このような使用において、免疫応答は一般的に、免疫担当細胞における（PAMPまたはDAMP）リガンドのパターン認識受容体への結合と関連しており、かつパターン認識受容体は、もっとも一般的にはTLR受容体またはNOD受容体である。上述したように、好ましいカルシウムフラックスアゴニストは、カルシウムイオノフォア（例えば、イオノマイシン、カルシマイシン、カルシウムイオノフォアII、カルシウムイオノフォアIV、カルシウムイオノフォアV、またはカルシウムイオノフォアVI）、およびSERCA阻害剤（例えば、2,5-ジ-tert-ブチルヒドロキノン、タブシガルギン、ルテニウムレッド、ジンゲロール、パキシリン、またはシクロピアゾン酸など）を包含し、および/またはカルシウムフラックスアゴニストは、アゴニストがリガンドの存在下で準最適濃度で細胞中に存在するような濃度で、医薬品中に存在する。

40

【0020】

したがって、また異なる観点から見ると、本発明者らは、皮膚の創傷治癒を促進するための局所適用薬の製造におけるカルシウムフラックスアゴニストの使用もまた企図する。

50

このような使用において、カルシウムフラックスアゴニストは一般的に、創傷中の細胞のNF- $\kappa$ Bシグナル伝達を活性化するのに効果的な量で存在する。このような使用は、創傷が細菌性病原体（一般的にTLR受容体および/またはNOD受容体に対するリガンドを発現または産出している）に感染している場合に特に効果的である。

#### 【0021】

さらに別の本発明の主題の態様において、本発明者らは、カルシウムフラックスアゴニスト（例えば、カルシウムイオノフォアまたはSERCA阻害剤）を薬学的に許容される担体中に含有する医薬組成物もまた企図する。ここで、該医薬組成物は損傷したまたは感染した皮膚への局所適用のために製剤化され、かつカルシウムフラックスアゴニストは、損傷皮膚または感染皮膚への製剤の適用時に、パターン認識受容体（例えば、TLR受容体またはNOD受容体）のリガンドに対する損傷皮膚または感染皮膚中の免疫担当細胞の免疫応答を亢進させる量で存在する。このような医薬組成物は、例えば、液剤、スプレー剤、またはゲル剤として製剤化されてよいが、医薬組成物が、損傷皮膚または感染皮膚へ適用される固形担体を通じた損傷皮膚または感染皮膚への局所適用のために製剤化されること（例えば、医薬組成物を含浸させた創傷包帯またはバンドエイド）もまた企図される。例えば、皮膚は、TLR受容体またはNOD受容体に対するリガンドを含有する病原体（例えば、細菌性病原体）に感染してよい。

10

#### 【0022】

特に好ましい医薬組成物において、カルシウムフラックスアゴニスト（例えば、イオノマイシン、カルシマイシン、またはタプシガルギン）の量は、リガンドの非存在下における免疫応答と比較して、リガンドの存在下において相乗的に免疫応答を亢進させる。

20

#### 【0023】

したがって、本発明者らは、パターン認識受容体（例えば、TLR受容体またはNOD受容体）を発現している細胞の、パターン認識受容体のリガンド（例えば、PAMP）に対する免疫応答を亢進する方法もまた企図する。ここで該方法は、細胞をリガンドの存在下で、免疫応答を亢進させる量のカルシウムフラックスアゴニスト（例えば、SERCA阻害剤またはカルシウムイオノフォア）に暴露する工程を含む。

#### 【0024】

もっとも一般的には、免疫応答は増加したIL-8の分泌および/または増強されたNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性化によって裏づけられ、かつリガンドとカルシウムフラックスアゴニストが相乗作用を示す量で存在することが特に好ましい。発明の主題に限定しないが、細胞が皮膚（例えば、損傷皮膚または感染皮膚）の真皮層または表皮層に存在していることがさらに好ましい。

30

#### 【0025】

異なる観点から見ると、本発明者らは、したがって、損傷皮膚または感染皮膚の治療方法もまた企図する。該方法においては、ひとつの工程において損傷皮膚または感染皮膚は、免疫応答（例えば、増加したIL-8分泌または増強されたNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性化）を亢進させかつ創傷治癒を向上させる量のカルシウムフラックスアゴニスト（例えば、カルシウムイオノフォアまたはSERCA阻害剤）と接触させられる。

#### 【0026】

40

それゆえ、本発明者らは、組織（例えば、上皮組織）または細胞におけるTLR-またはNOD-媒介刺激に対する免疫応答を調節する方法もまた企図する。該方法においては、ひとつの工程において組織または細胞は、カルシウムフラックスアゴニスト非存在下における細胞内カルシウム濃度と比較して細胞内カルシウム濃度を増加させるのに効果的な濃度のカルシウムフラックスアゴニストと、接触（例えば、局所適用）させられる。もっとも一般的には、カルシウムフラックスアゴニスト（例えば、カルシウムイオノフォアまたはSERCA阻害剤）の濃度は、TLR-媒介刺激に対する免疫応答を調節するのに効果的である。発明の主題のいくつかの態様において、TLR-またはNOD-媒介刺激は細菌性、ウイルス性、または真菌性の感染であり、他の態様においては、TLR-またはNOD-媒介刺激は組織損傷である。

50

## 【 0 0 2 7 】

本発明の主題のさまざまな対象、特徴、態様および利点は、後述する好ましい実施態様の詳細な説明、ならびに、同様の数字が同様の成分を表している付随の図面によって、さらに明らかになるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 2 8 】

【図 1】図 1 A ~ 1 C は、NF - B シグナル伝達および IL - 8 産生の強さに関する、さまざまなカルシウムフラックスアゴニスト ( 1 A は A 2 3 1 8 7 ; 1 B はイオノマイシン ; 1 C はタブシガルギン ) の用量反応曲線を表す図である。

【図 2】図 2 は、さまざまなカルシウムフラックスアゴニストと代表的な TLR リガンド ( Pam 2 C Y S ) との相乗効果を表す例示的なグラフである。

10

【図 3 A】図 3 A ~ 3 E は、代表的なカルシウムフラックスアゴニスト ( 図 3 A は A 2 3 1 8 7 ; 図 3 B はイオノマイシン ; 図 3 C はシクロピアゾン酸 ; 図 3 D は D B H Q ; 図 3 E はタブシガルギン ) と、それぞれの TLR および NOD 受容体に対する代表的な TLR および NOD リガンドとの、IL - 8 産生の強さに関する相乗効果を説明するさまざまなグラフを示す。

【図 3 B】図 3 A ~ 3 E は、代表的なカルシウムフラックスアゴニスト ( 図 3 A は A 2 3 1 8 7 ; 図 3 B はイオノマイシン ; 図 3 C はシクロピアゾン酸 ; 図 3 D は D B H Q ; 図 3 E はタブシガルギン ) と、それぞれの TLR および NOD 受容体に対する代表的な TLR および NOD リガンドとの、IL - 8 産生の強さに関する相乗効果を説明するさまざまな

20

【図 3 C】図 3 A ~ 3 E は、代表的なカルシウムフラックスアゴニスト ( 図 3 A は A 2 3 1 8 7 ; 図 3 B はイオノマイシン ; 図 3 C はシクロピアゾン酸 ; 図 3 D は D B H Q ; 図 3 E はタブシガルギン ) と、それぞれの TLR および NOD 受容体に対する代表的な TLR および NOD リガンドとの、IL - 8 産生の強さに関する相乗効果を説明するさまざまな

【図 3 D】図 3 A ~ 3 E は、代表的なカルシウムフラックスアゴニスト ( 図 3 A は A 2 3 1 8 7 ; 図 3 B はイオノマイシン ; 図 3 C はシクロピアゾン酸 ; 図 3 D は D B H Q ; 図 3 E はタブシガルギン ) と、それぞれの TLR および NOD 受容体に対する代表的な TLR および NOD リガンドとの、IL - 8 産生の強さに関する相乗効果を説明するさまざまな

30

【図 3 E】図 3 A ~ 3 E は、代表的なカルシウムフラックスアゴニスト ( 図 3 A は A 2 3 1 8 7 ; 図 3 B はイオノマイシン ; 図 3 C はシクロピアゾン酸 ; 図 3 D は D B H Q ; 図 3 E はタブシガルギン ) と、それぞれの TLR および NOD 受容体に対する代表的な TLR および NOD リガンドとの、IL - 8 産生の強さに関する相乗効果を説明するさまざまな

【図 4】図 4 は、NF - B の活性化に関する相乗作用における、異なる  $Ca^{2+}$  調節化合物の影響を説明するグラフを示す。

【図 5 A】図 5 A ~ 5 E は、生菌増殖の、B - LUC THP - 1 レポーター細胞 ( 図 5 A ) 、タブシガルギンによる NF - B 応答の増強 ( 図 5 B ) に及ぼす影響、およびカルシウムフラックスアゴニストシグナル増幅のための  $Ca^{2+}$  の細胞外必要性 ( 図 5 C ~ 5 E ) を表すグラフを示す。

40

【図 5 B】図 5 A ~ 5 E は、生菌増殖の、B - LUC THP - 1 レポーター細胞 ( 図 5 A ) 、タブシガルギンによる NF - B 応答の増強 ( 図 5 B ) に及ぼす影響、およびカルシウムフラックスアゴニストシグナル増幅のための  $Ca^{2+}$  の細胞外必要性 ( 図 5 C ~ 5 E ) を表すグラフを示す。

【図 5 C】図 5 A ~ 5 E は、生菌増殖の、B - LUC THP - 1 レポーター細胞 ( 図 5 A ) 、タブシガルギンによる NF - B 応答の増強 ( 図 5 B ) に及ぼす影響、およびカルシウムフラックスアゴニストシグナル増幅のための  $Ca^{2+}$  の細胞外必要性 ( 図 5 C ~ 5 E ) を表すグラフを示す。

50

【図5D】図5A～5Eは、生菌増殖の、B-LUC THP-1レポーター細胞（図5A）、タブシガルギンによるNF- $\kappa$ B応答の増強（図5B）に及ぼす影響、およびカルシウムフラックスアゴニストシグナル増幅のための $Ca^{2+}$ の細胞外必要性（図5C～5E）を表すグラフを示す。

【図5E】図5A～5Eは、生菌増殖の、B-LUC THP-1レポーター細胞（図5A）、タブシガルギンによるNF- $\kappa$ B応答の増強（図5B）に及ぼす影響、およびカルシウムフラックスアゴニストシグナル増幅のための $Ca^{2+}$ の細胞外必要性（図5C～5E）を表すグラフを示す。

【図6】図6は、貪食された黄色ブドウ球菌の至適殺菌のための、ヒト初代単球および顆粒球の細胞外 $Ca^{2+}$ の必要性を説明するグラフを示す。

【図7】図7は、選択されたカルシウムフラックスアゴニストを用いた創傷治癒の写真を示す。

【図8】図8は、コントロールおよび選択されたカルシウムフラックスアゴニストによる創傷治療後の、創傷の大きさおよび細菌負荷（bacterial burden）を表すグラフを示す。

【図9A】図9A～9Cは、A23187、イオノマイシン、およびCPAそれぞれに対する、黄色ブドウ球菌の抗生物質感受性を表すグラフを示す。

【図9B】図9A～9Cは、A23187、イオノマイシン、およびCPAそれぞれに対する、黄色ブドウ球菌の抗生物質感受性を表すグラフを示す。

【図9C】図9A～9Cは、A23187、イオノマイシン、およびCPAそれぞれに対する、黄色ブドウ球菌の抗生物質感受性を表すグラフを示す。

【図10】図10は、タブシガルギンの、黄色ブドウ球菌に対する直接的な抗生物質効果の欠如を表すグラフである。

【図11】図11は、タブシガルギン処理細胞による、改善された細胞内黄色ブドウ球菌殺傷を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明者らは、細胞内フリー $Ca^{2+}$ 濃度を増加させるカルシウムフラックスアゴニスト（特に、カルシウムイオノフォアおよびSERCA阻害剤）が、TLR-またはNOD-媒介イベントに対する宿主の免疫応答を、調節および/または亢進するために効果的に使用され得ることを見出した。特に注目すべき態様において、カルシウムフラックスアゴニストは、カルシウムフラックスアゴニストが実質的な準最適濃度で存在する場合、TLRおよび/またはNODリガンド結合に対する宿主応答を相乗的に増加させた。

【0030】

以下でさらに詳述されるように、本発明者らは実際に、自然免疫細胞が、 $Ca^{2+}$ 依存的に黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）またはそれらが放出した産出物（および、他の病原体および病原体のフラグメント）を認識して活性化されることによって感染制御を補助し、その後それが、影響を受けた細胞（罹患細胞）の準最適用量の $Ca^{2+}$ フラックスアゴニストへの暴露によって効果的に増強されることを見出した。多くの一般的な病原体（例えば、黄色ブドウ球菌）の産出物はほとんどがTLRおよびNOD受容体によって認識されるため、本発明者らは、病原体産出物が確かに活性化させていること、ならびに、そのような活性化がさらに顕著に向上され得ることを、多数の $Ca^{2+}$ フラックスアゴニスト（それらはカルシウムキレート剤によって無効化または著しく減少させられ得る）を用いて調査し、立証した。さらに、本発明者らはまた、 $Ca^{2+}$ が、貪食された細菌の効果的な殺傷のためにヒト単球および顆粒球（特に好中球）において重要な因子であることも実証した。このような知見は、皮膚感染ならびに生菌感染後の創傷治癒の哺乳類（マウス）モデルにも直接転換された。

【0031】

本発明の主題のひとつの態様において、本発明者らは、それゆえ、（主に局所的な）治療および/または予防のためのさまざまな組成物および方法を企図する。該組成物および方

10

20

30

40

50



法は、宿主細胞の病原体に対する免疫応答能の刺激に効果的であり、ならびに瘢痕形成の減少および局所的創傷の閉鎖までの期間 (time - to - closure) の減少に効果的であり、特に、創傷が、TLRおよび/またはNODに対するリガンドを発現するまたは発現しなくとも含有している1種以上の病原体に感染している場合に効果的である。例えば、本発明者らは、表在性皮膚感染 (例えば、細菌感染) を防止または治療するための、SERCA阻害剤 (例えば、タプシガルギン) および/またはイオノフォア (例えば、イオノマイシンおよび/またはA23187 (カルシマイシン)) の局所適用を企図する。

#### 【0032】

そのような中で、本発明者らは、SERCA阻害剤および/またはイオノフォアの局所適用が、感染症生動物モデルにおける創傷治癒動態を同時に向上させながら、表在性皮膚感染 (例えば、黄色ブドウ球菌) における細菌負荷 (bacterial burden) を顕著に減少させたことを見出した。驚くべきことに、カルシウムフラックスアゴニストが病原体に対するバイオサイドとして作用した場合、抗菌作用は直接的な抗菌作用に起因していたわけではなく (SERCA阻害剤のタプシガルギンの場合)、あるいは完全に起因していたわけではなく (イオノフォアの場合)、むしろカルシウムフラックスアゴニストの免疫学的アジュバンドとしての役割に起因していた。いかなる理論や仮説によって制限されるものではないが、本発明者らは、該抗菌作用は、TLRまたはNODリガンドの存在下でカルシウムフラックスアゴニストを添加したときの、相乗的なサイトカイン放出の活性化および核内因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) シグナル伝達経路の活性化に起因し得ると考える。

#### 【0033】

さらにより驚くべきことに、TLRおよび/またはNOD活性とカルシウムフラックスアゴニスト (イオノフォア/SERCA阻害剤) との間に、IL-8産生およびNF- $\kappa$ Bシグナル伝達の活性化に関して、非常に強い相乗効果が観察された。例えば、準最適用量のTLR2リガンドPam2CSK4の存在下または非存在下でヒト前単球THP-1細胞をインキュベートし、同様に処理をして準最適用量のイオノフォア (ここでは、A23187およびイオノマイシン) も添加した細胞と比較した。興味深いことに、また詳細を後述するように、本発明者らは、両アゴニストが、個別の応答を累積した場合に産生されると考えられる水準を超えて、IL-8産生量を顕著に増加させたことを見出し、したがってこれが真の相乗効果であると示唆される。別の実施例では、準最適用量のTLR2リガンドPam2CSK4の存在下または非存在下でB-LUC THP-1細胞 (NF- $\kappa$ B駆動ルシフェラーゼ発現カセットを有するTHP-1由来の形質転換株) を培養し、同様に処理をして準最適用量のさまざまなSERCA阻害剤も添加した細胞と比較した。注目すべきことに、また詳細を後述するように、本発明者らは、試験された全てのアゴニスト (ここでは、タプシガルギン、シクロピアゾン酸) が、個別の反応を累積した場合産生されると考えられる水準を超えてルシフェラーゼ産生量を顕著に増加させたことを見出し、ゆえにまた相乗効果を示唆する。

#### 【0034】

これに関連して、NF- $\kappa$ Bは細胞活性化の媒介、炎症性サイトカインの分泌、増殖、および生存への関与を通して獲得免疫に強い影響を与え、一方でIL-8は、抗菌および抗真菌において重要な自然免疫細胞型である、好中球のような免疫細胞に対する、強力な化学誘引物質である、ということに注目されたい。興味深いことに、 $Ca^{2+}$ フラックス誘導剤イオノマイシンの存在下でのTLR4のリガンド活性化は、マウス貪食細胞株におけるアラキドン酸由来エイコサノイド脂質の相乗的な産生をもたらし、防止的および治療的作用を示すために $Ca^{2+}$ フラックス誘導剤がTLRリガンドと結合している可能性を示唆している。

#### 【0035】

本発明者らは、したがって、本発明の主題のひとつの態様において、イオノフォア (例えば、A23187および/またはイオノマイシン) が、感染/疾患関連TLRおよび/

10

20

30

40

50

またはNODリガンドと共に、イン・ピボにおいて相乗効果をもたらして、イン・サイチュでの免疫細胞応答および修復プロセスを変化させるであろうと考える。このような効果は、本発明者らが以下に詳細を示したように、細菌負荷および創傷サイズを予防および/または治療奏功の指標として用い、さまざまなイオノフォアを含有する局所適用製剤を使用して表在性皮膚感染、例えば黄色ブドウ球菌によって誘発される感染をモデル系として、の経路を変化させることによって、容易に確かめられる。

#### 【0036】

同様に、本発明者らはまた、本発明の主題の別の態様において、タブシガルギン（およびさまざまな他のS E R C A阻害剤）が、感染/疾患関連T L Rおよび/またはNODリガンドと共に、イン・ピボにおける相乗効果をもたらして、イン・サイチュでの免疫細胞およびイン・ピボでの修復プロセスを変化させると考える。上述したように、このような効果は、本発明者らが以下に詳細を示したように、細菌負荷および創傷サイズを予防および/または治療奏功の指標として用い、さまざまなS E R C A阻害剤（特に、タブシガルギン）を含有する局所適用製剤を使用して表在性皮膚感染、例えば黄色ブドウ球菌によって誘導される感染をモデル系として、の経路を変化させることによって容易に確認できる。

#### 【0037】

したがって、本発明者らが、パターン認識受容体リガンドに対する1種以上の免疫担当細胞の免疫応答を亢進させるために、カルシウムフラックスアゴニストの使用を特に企図する、ということが理解されるべきであろう。もっとも一般的には、好適な免疫担当細胞は、細胞免疫系の一部である細胞であり（例えば、B細胞、T細胞、抗原提示細胞または自然番兵細胞、および特に樹状細胞、マクロファージ、マスト細胞、単球など）、一般的には、このような免疫担当細胞は皮膚の真皮層または表皮層に存在していることが好ましい。ゆえに、本発明者らはまた、皮膚における免疫応答および/または創傷治癒を亢進させる（例えば、閉鎖までの期間の短縮）ための局所適用薬を製造するための、カルシウムフラックスアゴニストの使用も企図する。このような使用において、免疫応答は、免疫担当細胞でのパターン認識受容体へのリガンドの結合と関連していることが、一般的に企図される。その他のパターン認識受容体のうち、特に好適なパターン認識受容体はT L RおよびNODファミリーの受容体を包含し、特にT L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 10、T L R 11、T L R 12、およびT L R 13、ならびにNOD 1、NOD 2、NOD 3、NOD 4、NOD 5、およびC I I T Aを包含する。それゆえに、リガンドが大きく異なり得ること、ならびに企図されるリガンドが、T L RおよびNOD受容体と結合することが知られている全てのリガンドを包含し、かつもっとも好ましくは病原体関連分子パターンリガンド（PAMP）および損傷/疾患関連分子パターンリガンド（DAMP）を包含する、ということが理解されるべきであろう。したがって、好適なPAMPリガンドは、さまざまなリポペプチド、糖脂質、リポタイコ酸、熱ショックタンパク質、ベータグルカン、フィブリノゲン、ヘパリン硫酸フラグメント、ヒアルロン酸フラグメント、RNA（特に、ssRNA）、DNA（特に、CpG配列）、プロファイリングなどを包含するであろう。同様に、好適なDAMPは、さまざまな核タンパク質および/またはサイトゾルタンパク質を包含し、かつ特に熱ショックタンパク質、HMGB1、DNA、RNA、および細胞外マトリックス由来タンパク質のフラグメントを包含するだろう。

#### 【0038】

本願発明の主題のさらに別の主題において、本発明者らはまた、パターン認識受容体のリガンドに対する、細胞（1種以上の上記パターン認識受容体を発現する）の免疫応答の亢進方法も企図する。上述したように、リガンドの性質は主に受容体のタイプに依存し、また全ての受容体およびリガンドは上で議論したように、企図する方法に好適である。特に好ましい方法において、細胞はリガンドの存在下で、免疫応答を亢進させる量のカルシウムフラックスアゴニストに暴露される。当然ながら、リガンドは治療計画の一環として送達されてもよい（例えば、カルシウムフラックスアゴニストと共に）ということに注意

10

20

30

40

50

すべきである。しかしながら、もっとも一般的には、リガンドは、細胞の中または周辺に存在する病原体によって提供されるか、またはDAMPとして宿主によって提供されるであろう。発明の主題に限定されるものではないが、亢進された免疫応答は、増加したIL-8産生および増強されたNF- $\kappa$ Bシグナル伝達の少なくともひとつによって一般的に特徴付けられる（例えば、カルシウムフラックスアゴニストの非存在下での同じ遺伝子の発現と比較した場合の、カルシウムフラックスアゴニスト存在下におけるNF- $\kappa$ Bの制御下での増加した遺伝子発現）。後述する実験の詳細から容易に明らかであるように、亢進された免疫応答は、一般的に相乗的増大である。

#### 【0039】

したがって、本発明者らはまた、詳細をさらに後述するように、損傷皮膚または感染皮膚を、免疫応答を亢進および損傷治癒を向上させる量のカルシウムフラックスアゴニストと接触させることによる、損傷皮膚または感染皮膚の（予防的）治療方法も企図する。異なる観点から見ると、細胞または組織におけるTLR-またはNOD-媒介刺激への免疫応答を調節するために、1種以上のカルシウムフラックスアゴニストを採用できることが、理解されるべきであろう。

#### 【0040】

企図されるカルシウムフラックスアゴニスト

#### 【0041】

ここでの使用のための、好適であると企図される化合物は、さまざまな感染症および外傷、特に皮膚または他の表皮の感染症を伴うもの、の予防または治療において一般的に有用であると考えられ、とりわけ宿主の疾患および/または外傷に対する応答がTLRまたはNOD反応経路に関連する場合に有用であると考えられる。したがって、発明の主題に従った化合物が、カルシウムフラックス媒介物質（特に、アゴニスト）であり、細胞内カルシウムの少なくとも一時的な、より典型的には持続的な増加をもたらすことが、一般的に好ましい。

#### 【0042】

したがって、特に好ましい化合物は、当技術分野においてよく知られているイオノフォアおよびSERCA阻害剤を包含する。もっとも好ましくは、好適なイオノフォアはカルシウムイオノフォアであり、特にイオノマイシン、カルシマイシン、カルシウムイオノフォアII、カルシウムイオノフォアIV、カルシウムイオノフォアV、またはカルシウムイオノフォアVIであり、一方、特に好ましいSERCA阻害剤は2,5-ジ-tert-ブチルヒドロキノン(DBHQ)、タブシガルギン、ルテニウムレッド、ジングロール、パキシリン、またはシクロピアゾン酸を包含する。上記は好ましい化合物のリストであるが、該リストは完全なものではなく、各化合物は2種以上のカルシウムフラックスアゴニストと混合物を形成するように組み合わせられてよく（例えば、細胞外および細胞内アゴニストを提供するため）、および/またはさらに化合物が加えられてもよい、ということもまた留意されたい。

#### 【0043】

当然ながら、企図される化合物は（必要に応じて）、異性体、互変異性、またはその他立体的アイソフォーム（例えば、R-および/またはS-配置、E/Z配置、互変異性アイソフォーム、エナンチオマー、ジアステレオマーなど）を生じさせ得る、1種以上の不斉中心あるいは不斉基を有してよく、かつそのような型およびそれらの混合物のそれぞれが、明確にここで企図されるということも理解されたい。加えて、企図されるカルシウムフラックスアゴニストは、所望の物理化学的パラメーター（例えば、水性溶媒への溶解度、膜透過性、Ca<sup>2+</sup>への選択性など）を実現するために化学修飾されてもよいことも理解されたい。したがって、好適なカルシウムフラックスアゴニストは、完全な合成物、半合成物であってよく、またこのようなイオノフォアを産生する宿主株から単離されてもよい。

#### 【0044】

さらに、企図される化合物はまた、送達を増加させるためおよび/または影響を受けた

10

20

30

40

50

組織や器官に対する標的特異性を向上させるために、プロドラッグに変換されてもよい。ここで使用される「プロドラッグ」という用語は、企図される化合物を修飾したものをいう。ここで、修飾された化合物はより低い薬理活性を示し（修飾されていない化合物と比較して）、かつ修飾された化合物は標的細胞または標的器官中で修飾されていない形態へと再変換される。例えば、企図される化合物のプロドラッグへの変換は、安全な全身投与に供するには薬理活性物質の毒性が強すぎる場合、あるいは企図される化合物が消化管から吸収されにくい場合、もしくは身体が企図される化合物をその標的に到達する前に分解してしまう場合に、有用であり得る。数多くのプロドラッグ調製方法が当技術分野で知られており、これらすべてがここで企図される。例えば、好適なプロドラッグへのアプローチは、Kenneth B. Sloanによる「Prodrugs (Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs)」(ISBNコード: 0824786297)、またはBernard Testaによる「Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology」(ISBNコード: 390639025X)に記載されており、これらの2文献は、ここで参照することにより適切な範囲において組み込まれる。

10

#### 【0045】

同様に、企図される化合物はまた、ここに記載するような形態においてより低活性であり、かつイン・ビボにおいて形成される1種以上の代謝産物としてより高活性であってよい、ということに留意されたい。例えば、企図される化合物は、フェーズIおよび/またはフェーズIIの肝酵素系により、あるいは胃液酸度、腸内微生物環境、またはその他の生化学的プロセスによって変換されてよい。ゆえに、好適な化合物は、酸化、ヒドロキシル化、糖質に連結、などされてよい。

20

#### 【0046】

企図される組成物

#### 【0047】

企図されるカルシウムフラックスアゴニストが、細胞または組織への送達に好適な組成物の形態で提供されることが、一般的に企図される。したがって、好適な組成物は液体組成物、ゲル、固形組成物を包含し、これらのすべては担体に付随または結合してよく、あるいは細胞や組織に直接適用されてよい。もっとも一般的には、このような組成物は、水性溶媒あるいはそうでない場合は薬学的に許容される担体を、1種以上のカルシウムフラックスアゴニストと共に包含するであろう。本発明の主題の特に好ましい態様において、医薬組成物は損傷組織または感染組織への局所適用のために製剤化され、より好ましくは上皮組織、もっとも好ましくは皮膚への局所適用のために製剤化される。さらに、カルシウムフラックスアゴニストは、細胞または組織への製剤の適用時に、1種以上のパターン認識受容体（典型的にはTLRおよび/またはNOD受容体）リガンドに対する損傷または感染した細胞または組織の免疫担当細胞の免疫応答を亢進させる量で存在することが、一般的に好ましい。カルシウムフラックスアゴニストは、リガンドの非存在下における免疫応答と比べてリガンド存在下において免疫応答を相乗的に亢進させる量で存在することがさらに好ましい。

30

40

#### 【0048】

したがって、本発明の主題に従う組成物は、局所的経路、経鼻的経路、吸入による経路、経口的経路、非経口的経路などを含むさまざまな経路を利用して投与されてよいことが理解されるべきである。なお、ここで使用される「非経口的」という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、髄腔内、肝臓内、病巣内、および頭蓋内投与（一般的には、注射または点滴）を包含する。しかしながら、もっとも好ましくは、組成物は、液、ゲル、または固形の形態で局所的に投与される。

#### 【0049】

例えば、本発明の医薬組成物は、局所適用によって容易に到達できる領域または器官へ

50

局所的に投与されてよく、このような領域または器官は、目、皮膚、下部消化管、または外科的処置の間に露出される領域を包含する。多数の局所製剤が当技術分野で知られており、そのような製剤のすべてがここでの使用に好適であると考えられる。

#### 【0050】

例えば、企図される組成物は、1種以上の担体に懸濁または溶解された活性成分を含有している好適な軟膏に、製剤化されてよい。本発明組成物の局所投与のための担体は、鉱油、流動パラフィン (liquid petrolatum)、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化剤および水を包含する。あるいは、医薬組成物は、1種以上の薬学的に許容される担体に懸濁または溶解された活性成分を含有している好適なローション剤またはクリーム剤に製剤化することもできる。好適な担体は、鉱油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水を包含する。少なくともいくつかの活性化合物が高疎水性であることから、製剤は比較的低い溶解性を考慮し、したがってエマルジョンとして、ナノベシクル粒子として調製されるか、あるいは遮閉下で疎水性基材の形態で投与されることが、企図される。

10

#### 【0051】

もしくは、企図される製剤は、皮膚または他の投与部位に注入されてよい。もっとも好ましくは、企図される化合物の無菌注射剤の形態は、エマルジョン、水溶液、または油性懸濁液を包含するであろう。これらの懸濁液は、当技術分野で知られている技術に従って、好適な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて製剤化されてよい。無菌注射剤の調製はまた、無毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中で無菌の注射溶液または注射懸濁液として調製してよく、例えば、1, 3-ブタンジオール中の溶液として調製してよい。その他の許容されるビヒクルおよび溶媒、特に企図される液体は、水、リンゲル溶液、および生理食塩水を包含する。さらに、無菌の、不揮発性油を共溶媒または懸濁剤として採用してよい (例えば、天然または合成のモノ-またはジグリセライド)。脂肪酸もまた使用されてよく、好適な脂肪酸は、オレイン酸およびそのグリセリド誘導体、オリーブ油、ひまし油、特にこれらのポリオキシエチレン化体を包含する。そのような油性溶液または懸濁液は、長鎖アルコール希釈剤または分散剤をさらに含んでもよい。

20

#### 【0052】

その他の例においては、企図される化合物は、カプセル剤、錠剤、水性懸濁剤、または溶液剤を含む、経口的に許容される任意の剤形によって経口投与されてもよい。経口用の錠剤の場合、すべての薬学的に許容される担体 (例えば、ラクトース、コーンスターチなど) が好適であると考えられる。同様に、さまざまな潤滑剤を加えてもよい (例えば、ステアリン酸マグネシウム)。カプセル剤の形態での経口投与において、有用な希釈剤はラクトースおよび乾燥コーンスターチを包含する。

30

#### 【0053】

組成物における企図される化合物の量に関して、特定の量は、具体的な製剤、有効成分、および望ましい目的に一般的に依拠すると認識されるべきである。したがって、企図される化合物の量は、著しく異なるであろうことが認識されるべきである。しかしながら、化合物がイン・ビトロおよび/またはイン・ビボにおいて予防的および/または治療的効果を奏するのに有効な最小限の量で存在することが、一般的に好ましい。別の観点から見ると、カルシウムフラックスアゴニストは、一般的に、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達を活性化させるのに効果的な量、および/またはイン・ビトロにおける、あるいは創傷または罹患した (例えば、感染した) 組織における細胞のIL-8産生を増加させるのに効果的な量で存在する。

40

#### 【0054】

さらに、アゴニストがリガンド非存在下でのカルシウムフラックスアゴニストの最大効果に関する準最適濃度で細胞中に存在する (TLRまたはNODリガンドの存在下で) ように、カルシウムフラックスアゴニストが細胞または組織に提供されることが、一般的に

50

好ましい。これに関連して、カルシウムフラックスアゴニストの準最適濃度は、該カルシウムフラックスアゴニストによって得られる最大の応答（NF - Bおよび/またはIL - 8産生に関して）を十分に下回る濃度であることに、注意すべきである。したがって、カルシウムフラックスアゴニストの準最適濃度は、最大効果（NF - Bおよび/またはIL - 8産生に関しての）を提供するカルシウムフラックスアゴニストの用量の80%以下、70%以下、60%以下、20~60%、または10~50%を提供する濃度であろう。例えば、後記する実施例のデータから分かるように、タブシガルギンの代表的な準最適濃度は10~50 nM（例えば、約20 nM）であり、この数値範囲は、図1Cから分かるように、タブシガルギンの最大効果が得られる値を十分に下回る。同様に、A23187の代表的な準最適濃度は100 nM~500 nM（例えば、約316 nM）であり、この数値範囲は、図1Aから分かるように、A23187の最大効果が得られる値を十分に下回る。また、イオノマイシンの代表的な準最適濃度は300 nM~5 μM（例えば、約1 μM）であり、この数値範囲は、図1Bから分かるように、イオノマイシンの最大効果が得られる値を十分に下回る。別の視点から見ると、準最適濃度は、したがって、カルシウムフラックスアゴニストに暴露された細胞または組織において急性毒作用が観察され得る濃度よりも低い濃度として特徴付けられるであろう。

#### 【0055】

さらなる詳細を以下に示すように、最大応答および準最適濃度は、IL - 8 ELISA試験および/または発光試験を使って容易に決定できる。本発明の主題の好ましい態様において、準最適濃度は、最大応答の70%以下の応答となる濃度、より一般的には最大応答の50%以下、およびもっとも一般的には最大応答の30%以下の応答となる濃度であるだろう。したがって、準最適濃度は、最大応答の1~20%、最大応答の20~40%、最大応答の40~60%、最大応答の60~80%、または最大応答の80~95%の範囲であるだろう。同様に、リガンドもまた準最適濃度で存在していてよく、該準最適濃度は、リガンドに対する応答が、リガンドのみに対する応答における最大応答の70%以下となる濃度、より一般的には最大応答の50%以下、およびもっとも一般的には最大応答の30%以下となる濃度となるであろうことに留意されたい。したがって、準最適濃度は、リガンドのみに対する応答における最大応答の1~20%から1~40%、最大応答の20~40%から20~80%、最大応答の30~70%、最大応答の40~80%、または最大応答の50~95%の範囲であるだろう。

#### 【0056】

それゆえに、少なくともいくつかの実施態様において、企図される化合物は、約0.1 ng/mL~約100 mg/mLの間の量で、より一般的には約10 ng/mL~約100 mg/mLの間の量で、およびもっとも一般的には約1 μg/mL~約100 μg/mLの間の量で存在する。製剤が固形またはゲルであるとき、企図される化合物は、約0.1 ng/g~約100 mg/gの間の量で、より一般的には約10 ng/g~約10 mg/gの間の量で、およびもっとも一般的には約1 μg/g~約100 μg/gの間の量で、存在するであろう。別の観点から見ると、カルシウムフラックスアゴニストは一般的には、0.1 μM~10 μMの間、10 μM~100 μMの間、100 μM~1 mMの間、1 mM~10 mMの間、または10 mM~100 mMの間の濃度で、製剤中に存在するであろう。さらに、細胞または組織におけるカルシウムフラックスアゴニストの濃度（「有効暴露濃度」）に関して、有効暴露濃度が1 pM~1 mMの間であることが一般的に好ましく、もっとも好ましくは各カルシウムフラックスアゴニストの準最適濃度にあることである。したがって、タブシガルギンは、一般的に1 nM~1 μMの間、より一般的には1 nM~500 nMの間、およびもっとも一般的には1 nM~50 nMの間に、有効暴露濃度を有するであろう。一方、DBHQおよびCPAは、一般的に100 nM~500 μMの間、より一般的には500 nM~100 μMの間、およびもっとも一般的には1 μM~50 μMの間に、有効暴露濃度を有するであろう。他方、イオノマイシンおよびA23187は、一般的には10 nM~100 μMの間、より一般的には100 nM~50 μMの間、およびもっとも一般的には200 nM~10 μMの間に、有効暴露濃度を有するであろう。

## 【 0 0 5 7 】

したがって、企図される化合物の好適な量は 単位用量あたり  $0.1 \mu\text{g}$  ~ 単位用量あたり約  $0.5$  グラムの範囲、より一般的には単位用量あたり  $10 \mu\text{g}$  ~ 単位用量あたり約  $0.05$  グラムの間、およびもっとも一般的には単位用量あたり  $50 \mu\text{g}$  ~ 単位用量あたり約  $100 \text{mg}$  の間となるであろう。ゆえに、好適な用量は 約  $0.01 \mu\text{g} / \text{kg}$  ~  $100 \text{mg} / \text{kg}$  の範囲、より一般的には  $1 \mu\text{g} / \text{kg}$  ~  $50 \text{mg} / \text{kg}$  の間、およびもっとも一般的には  $10 \mu\text{g} / \text{kg}$  ~  $10 \text{mg} / \text{kg}$  の間となるであろう。

## 【 0 0 5 8 】

単位用量に関し、単位用量は、単位用量が所望の治療的および/または予防的効果を奏するのに有効であるようになることが一般的に企図される。異なる観点から見ると、単位用量は、IL - 8 産生および/または NF - B シグナル伝達を (好ましくは相乗的に) 増強させるために十分な量のカルシウムフラックスアゴニストを好ましくは含有するであろう。

10

## 【 0 0 5 9 】

企図される化合物および組成物は局所的に適用されてよく、あるいは医薬組成物 (例えば、クリーム、軟膏など) 中に適用されてもよいが、罹患組織への適用のための多数の代替法もまた好適であると考えられることを、さらに理解されたい。例えば、企図される化合物は、担体に結合されるかまたは組み込まれてよく、該担体は直接および可逆的に治療部位へ適用され、あるいは移植され、もしくはそうでなければ治療部位に近接または接触して設置される。例えば、企図される化合物および組成物は、局所的に適用されおよび取り外し可能な担体 (例えば、包帯、ガーゼなど) の 1 部分以上の部分に取り込まれてよく、あるいは分解または摩滅してもしなくてもよい保護フィルムに取り込まれてもよい (例えば、生分解性薬剤溶出ポリマーを通して)。代替の担体は移植されるビーズまたは生分解性薬剤溶出ポリマーを包含し、ここで、企図される化合物および組成物は、移植されたデバイスの表面の一部であってよく、またはそのようなデバイスを被覆してよい。

20

## 【 0 0 6 0 】

カルシウムフラックスアゴニストの用量応答

## 【 0 0 6 1 】

本発明者らは、免疫応答のさまざまな構成要素に対するカルシウムフラックスアゴニストの影響を特定するためにいくつかの研究を行い、特に IL - 8 産生および NF - B シグナル伝達の活性化に対するカルシウムフラックスアゴニストの影響について研究を実施した。図 1 A ~ 1 C から容易に読み取れるように、イオノフォアと SERCA 阻害剤の両者は、IL - 8 産生および NF - B シグナル伝達活性化の顕著な増強をもたらした。用量応答は、イオノフォア (例えば、A23187 およびイオノマイシン) に関しては比較的広範囲の用量にわたって観察され、SERCA 阻害剤 (例えば、タプシガルギン) に関しては少なくとも 2 桁の範囲にわたって観察される。

30

## 【 0 0 6 2 】

より具体的には、外添 TLR または NOD リガンドの非存在下で処理に供される単球由来細胞株ならびに A23187 およびイオノマイシンを用いた、NF - B および IL - 8 に対するイオノフォアの用量応答を、図 1 A ~ 1 B に示す。安定的にインテグレートされた NF - B ノルシフェラーゼレポーターカセットを有するヒト単球細胞株 (THP - 1) トランスフェクタントを、濃度の増加する A23187 およびイオノマイシンで処理した。NF - B レポーターに基づく応答は発光測定法を用いて観察し (RUL = 発光量、黒丸)、一方、ヒト IL - 8 (hIL - 8) 放出はサンドイッチ ELISA 法を用いて定量した (白丸)。図 1 C は、NF - B および IL - 8 に関するタプシガルギンに対する用量応答を表している。ここでは、安定的にインテグレートされた NF - B ノルシフェラーゼ受容体カセットを有するヒト単球細胞株 (THP - 1) トランスフェクタントを、濃度の増加するタプシガルギンで処理した。NF - B レポーターに基づく応答は発光測定法を用いて観察し (RLU = 発光量、黒丸)、一方、ヒト IL - 8 (hIL - 8) 放出はサンドイッチ ELISA 法を用いて定量した (白丸)。フラックスアゴニストの両グ

40

50

ループから読み取れるように、用量応答はNF - BおよびIL - 8 応答を顕著に増加させながら、数桁の大きさにわたって増加している。

#### 【0063】

ヒトIL - 8 活性：タブシガルギン (A . G . S c i e n t i f i c 社、サンディエゴ、カルフォルニア)、イオノマイシン (シグマ - アルドリッチ社、セントルイス、ミズーリ)、およびカルシウムイオノフォア A 2 3 1 8 7 (シグマ - アルドリッチ社) のタイトレーションを、10% FBS (Thermo HyClone 社、ウォルサム マサチューセッツ) および1% ペニシリン - ストレプトマイシン - ファンギゾン (Thermo HyClone 社) を補充したRPMI 1640 (Cellgro 社、ハーダン バージニア) 中で培養された150,000個のTHP - 1細胞 (ATCC TIB - 202) を播種した96ウェルプレート (Thermo Matrix、ウォルサム マサチューセッツ) に添加した。添加の24時間後、上澄み液25  $\mu$ Lを採取し、メソスケールディスクバリーヒトIL - 8 組織培養キット (MSD社、ロックビル、メリーランド) を用いて生産者のプロトコルに従い、ヒトIL - 8 を定量した。結果はメソスケールディスクバリーSECTOR Imager 2400を用いて解析し、ならびに、MSDキットによって供給されるヒトIL - 8 のタイトレーションに正規化した。

10

#### 【0064】

NF - B 活性：タブシガルギン (A . G . S c i e n t i f i c 社)、イオノマイシン、およびカルシウムイオノフォア A 2 3 1 8 7 のタイトレーションを、10% FBS (Thermo HyClone 社) および1% ペニシリン - ストレプトマイシン - ファンギゾン (Thermo HyClone 社) を補充したRPMI 1640 (Cellgro 社、ハーダン バージニア) 中で培養された150,000個のTHP - 1 B - LUC THP - 1 ' s (NF - B ルシフェラーゼレポーターの安定的インテグレーションを含有するTHP - 1細胞) を播種した96 - ウェルプレート (Thermo Matrix) に添加した。添加の24時間後、25  $\mu$ LのBright - Gloルシフェラーゼ定量システム (プロメガ社、マディソン ウィスコンシン) を各ウェルに添加し、ルシフェラーゼ活性をパーキンエルマーTopCount NXT (パーキンエルマー社、ウォルサム マサチューセッツ) を用いて解析した。

20

#### 【0065】

パターン認識受容体との相乗作用剤としてのカルシウムフラックスアゴニスト

30

#### 【0066】

初期の一連の実験において、TLR2受容体リガンドPam2CYSをさまざまな濃度のカルシウムフラックスアゴニストの存在下で試験し、本発明者らは、予想外にも、準最適でかつ比較的低い濃度の多様なカルシウムフラックスアゴニストが、TLRリガンドの存在下において顕著な相乗的応答をもたらしたことを見出した。

#### 【0067】

例えば、図2は、選択されたカルシウムフラックスアゴニストと代表的なTLRリガンドとの典型的な相乗効果を表しているグラフである。ここで、イオノフォア A 2 3 1 8 7 およびイオノマイシン、ならびにSERCA阻害剤タブシガルギンは、ヒトTHP - 1前単球性白血病細胞株から放出されたサイトカインの活性化において、TLR2リガンド (Pam2CYS) との相乗作用を示した。TLR2リガンド単独では約5 ng/mLのIL - 8 応答を提供したのに対して、準最適用量のカルシウムフラックスアゴニストの添加 (例えば、タブシガルギンの場合は20 nM、A 2 3 1 8 7 の場合は316 nM、およびイオノマイシンの場合は1  $\mu$ M) は、細胞において10倍を超える量のIL - 8 産生をもたらしたことは、特に注目すべきである。

40

#### 【0068】

この試験結果が他のパターン認識受容体、特に、TLRおよびNOD受容体ならびにその他のリガンドにも当てはまるか否かを調べるために、本発明者らは、多数のTLRおよびNOD受容体ならびにさまざまなリガンド類を試験した。とりわけ、図3A ~ 3Eからも明らかなように、顕著な相乗効果が幅広いタイプおよびクラスのカルシウムフラックス

50



アゴニスト、ならびにさまざまなTLRおよびNOD受容体とリガンド類にわたって確認された。これによって、TLR - およびNOD - 媒介シグナルは、準最適用量のカルシウムフラックスアゴニストで（一般には相乗的に）亢進され得ることが立証される。

#### 【0069】

より具体的には、図3Aは、トール様受容体（TLR）ファミリーメンバー（TLR2、TLR4、TLR5、TLR9）、およびNODファミリーメンバー（NOD1、NOD2）に関する細胞応答を上昇させる、準最適用量のA23187の相乗効果を表すグラフを示す。図3Bは、トール様受容体（TLR）ファミリーメンバー（TLR2、TLR4、TLR5、TLR9）、およびNODファミリーメンバー（NOD1、NOD2）に関する細胞応答を上昇させる、準最適用量のイオノマイシンの相乗効果を表すグラフを示す。図3Cは、トール様受容体（TLR）ファミリーメンバー（TLR2、TLR4、TLR5）、およびNODファミリーメンバー（NOD1、NOD2）に関する細胞応答を上昇させる、準最適用量のシクロピアゾン酸の相乗効果を表すグラフを示す。図3Dは、トール様受容体（TLR）ファミリーメンバー（TLR2、TLR4、TLR5）、およびNODファミリーメンバー（NOD1、NOD2）に関する細胞応答を上昇させる、準最適用量の2,5-ジ(tert-ブチル)ヒドロキノン（DBHQ）の相乗効果を表すグラフを示す。図3Eは、トール様受容体（TLR）ファミリーメンバー（TLR2、TLR4、TLR5、TLR9）、およびNODファミリーメンバー（NOD1、NOD2）に関する細胞応答を上昇させる、準最適用量のタブシガルギンの相乗効果を表すグラフを示す。この実験で使用した用量は、タブシガルギンが20 nM、A23187が316 nM、イオノマイシンが1 μM、シクロピアゾン酸が10 μM、およびDBHQが31.6 μMであった。

#### 【0070】

容易に理解できるように、試験した全てのTLRおよびNODファミリーメンバーならびに好適なリガンド類においてIL-8産生に関する相乗効果が観察され、一方、試験した全てのカルシウムフラックスアゴニストは準最適濃度で用いられた。ゆえに、免疫応答がTLR - またはNOD - 媒介イベントと関連している場合には、免疫応答における、特にIL-8産生およびNF- $\kappa$ Bシグナル伝達におけるカルシウムフラックスアゴニストの明確なアジュバンド活性様式は、明らかである。

#### 【0071】

カルシウムフラックスの性質

#### 【0072】

本発明者らは、増加した細胞内カルシウムの由来が異なる場合に、カルシウムフラックスの性質が重要であるかどうかをさらに調べた。その趣旨で、本発明者らはさまざまなカルシウムシグナル伝達モジュレータを用いてカルシウムフラックスアゴニストの性質および寄与を調べた。示されたデータから容易に読み取れるように、細胞外カルシウムの細胞内へのフラックスは、カルシウムシグナル伝達の相乗的な増強に関して重大な意味を持っていた。より具体的には、図4は、異なるCa<sup>2+</sup>調節化合物がNF- $\kappa$ B活性化に関する相乗効果に与える影響を表す。EGTAは細胞外キレート剤であること、また、KN-62はキレート効果のないCaMキナーゼII（T細胞の活性化に重要である）の阻害剤であることに留意されたい。図4から容易に理解されるように、細胞外Ca<sup>2+</sup>スカベンジャーEGTAは、相乗的なシグナルを、TLRリガンド単独で達成される程度のレベルまで減少させるが、一方でCaMキナーゼII阻害剤KN-62による処理は、レポーター遺伝子の発現レベルを変化させない。

#### 【0073】

以前に、哺乳動物細胞による黄色ブドウ球菌感染の感知および制御において、TLR2およびNOD2が重要な役割を果たすということが実証された。THP-1由来B-LUC THP-1細胞が、一般的なTLR2およびNOD2リガンドであるPam2CysおよびMDPによってそれぞれ活性化され、および、この活性化がカルシウムフラックスアゴニストの添加によってさらに増強され得た（図3A～3E）ことから、これらの細

胞が真正の黄色ブドウ球菌由来産出物を認識する能力を、以下のようにして測定した。手短に述べると、対数的に分裂する黄色ブドウ球菌の培養物をRPMI 1640 (Cellgro社)で3回洗浄した。同時に、10% FBS (Thermo HyClone社、ウォルサム マサチューセッツ)および1% ペニシリン - ストレプトマイシン - ファンギゾン (Thermo HyClone社)を補充したRPMI 1640 (Cellgro社)で培養されたTHP-1 B-LUC THP-1's (NF-Bルシフェラーゼレポーター遺伝子の安定的インテグレーションを含有するTHP-1細胞)を、RPMI 1640 (Cellgro社)で3回洗浄し、24ウェル0.4  $\mu$ mカットオフトランスウェルプレート (コーニング社)の底のコンパートメントに120万/mLの濃度で移した。洗浄した黄色ブドウ球菌培養物の希釈液を、その後、所定の初期感染多重度(MOI)でトランスウェルシステムのトップチャンバーに添加した。該細胞を37℃で18時間インキュベートし、その時点で60,000細胞を含有する所定分量を384-ウェル白色ボトムプレート (Thermo社)のウェルに移した。ルシフェラーゼ遺伝子発現を評価するために、Bright-Gloルシフェラーゼアッセイ試薬 (プロメガ社)を各ウェルに添加し、パーキンエルマーTopCount NXTシステム (パーキンエルマー社)を用いて、ルシフェラーゼ活性についてプレートを解析した。先の結果と一致して、B-LUC THP-1レポーター細胞は、細菌産物の受動拡散は可能であるが黄色ブドウ球菌全体とB-LUC THP-1レポーター細胞との間の直接的な接触を妨げる培養システムで生菌と共培養した場合、レポーター活性においてMOI-依存的増加を示す(図5A)。

10

20

#### 【0074】

黄色ブドウ球菌産出物の認識がカルシウムフラックスの調節を通してさらに増強され得るかを決定するため、B-LUC THP-1レポーター細胞を、細菌フィルターでろ過した黄色ブドウ球菌条件(すなわち使用済み)培地の1:100(V/V)希釈液または未使用の滅菌培地の存在下でインキュベートし、上述したように準最適用量(20 nM)のタブシガルギンまたはジメチルスルホキシド(DMSO)ビヒクルコントロールで処理した。簡単に説明すると、10%ウシ胎児血清添加RPMI培地で黄色ブドウ球菌を振とうインキュベータにて一晩37℃で培養し、その後遠心分離によって細菌を沈殿させて上澄み液を0.2  $\mu$ mフィルター(VWR社、ラドナー ペンシルバニア)でフィルター滅菌することにより、条件培地を作製した。B-LUC THP-1細胞を、上述したルシフェラーゼアッセイに先立ち、条件/使用済み培地の存在下で18時間インキュベートした。興味深いことに、B-LUC THP-1レポーター細胞の条件/ならし細菌培養液への応答は、タブシガルギンの存在下で顕著に増強された(図5B)。

30

#### 【0075】

観察された、細菌産出物によるB-LUC THP-1細胞の活性化における、準最適なタブシガルギン処理がもたらした亢進が、カルシウムイオノフォアA23187およびイオノマイシンにも当てはまるか否かを決定するため、これらのイオノフォアを準最適用量316 nMおよび1  $\mu$ Mでそれぞれ使用して、実験を繰り返した。三つの例すべてにおいて、黄色ブドウ球菌条件/使用済み培地の認識は、いずれのカルシウムフラックスアゴニストの存在下でも顕著に亢進した(図5C~5E)。おそらく同じくらい興味深いことに、図から容易に理解できるように、カルシウムフラックスが誘導した相乗効果は、細胞外キレート剤EGTA(1 mM)添加によって抑制され得るだろう。

40

#### 【0076】

ヒト細胞における細胞外カルシウムの役割

#### 【0077】

ヒト細胞における応答がカルシウムフラックスの性質に影響を受けるか否かを調べるために、本発明者らは、黄色ブドウ球菌に感染させた初代ヒト単球および顆粒球を試験した。図6中のデータから分かるように、ヒト初代単球および顆粒球は、貪食された黄色ブドウ球菌の至適殺菌のために細胞外Ca<sup>2+</sup>を必要とすることは明確である。簡単に述べると、初代ヒト単球を、市販の末梢血単核細胞製剤(ヒトバフィーコート白血球(Huma

50

n Buffy Coat Leukocytes)、Innovation Research社、ノバイ ミシガン)から、Dynabeads Untouched ヒト単球キット(ライフ・テクノロジーズ社、グランドアイランド、ニューヨーク)を用いて製造者の示唆に基づいて精製した。初代ヒト顆粒球を、製造者の指示に従ったFicoll-Paque密度遠心法(GEヘルスケア・ライフサイエンス社、ピスカタウェイ、ニュージャージー)により、健常ドナー血液を二つの画分に分離することによって精製した。その後、末梢血単核細胞画分を廃棄し、赤血球/顆粒球画分を製造者のプロトコルに従った赤血球溶解バッファー処理(Biolegend社、サンディエゴ カリフォルニア)に供し、続いて、ハンクス緩衝塩類溶液(Cellgro社)中で2回洗浄して溶解剤および細胞片を除去した。次に、黄色ブドウ球菌の培養を、トリブチックソイブロス(Cellgro社)中で一晩行った。得られた培養物を新しい培地の植菌に用いて、実験の開始に先立って対数増殖期を確保した。培養菌を沈殿させ(2000×gで10分間)、ハンクス緩衝塩類溶液(Cellgro社)で3回洗浄した。上記のようにして調製した初代単球/顆粒球に、その後、10%ヒト血清(Innovative Research社、ノバイ ミシガン)および該当する場合は1mM EDTA(シグマアルドリッチ社、セントルイス ミズーリ)を補充し、氷上で30分間冷却した。30分後、黄色ブドウ球菌(MOIは3.33)を添加し、結合を同期させるため、該混合物を氷上でさらに20分間インキュベートした。その後、チューブを37で20分間インキュベートした。20分後、非内在化黄色ブドウ球菌を除去するために10U/mLのリゾスタフィン(シグマアルドリッチ社)を各チューブに加えた。所望の時点(20、30、60分間)で、20μLずつ試料を採取し、10mLの水で希釈した。該希釈液のチューブをボルテックスにかけ、初代細胞の適切な溶解を確保するために室温にて10分間静置した。10分後、希釈液チューブを10分間2000×gで遠心分離し、残存黄色ブドウ球菌を20倍に濃縮した。黄色ブドウ球菌含有試料は、その後、3連でトリブチック寒天培地(Cellgro社)に播種し、翌日にコロニーを計数できるように、37で一晩インキュベートした。

【0078】

感染および損傷治癒のイン・ビボモデル

【0079】

すでに上記で述べたように、カルシウムフラックスアゴニストはTLRおよびNODリガンドと、免疫活性化に関連する経路の活性化において相乗効果を示す。感染および損傷におけるTLRおよびNODリガンドの分布を考えれば、本発明者はゆえに、そのような状況におけるカルシウムフラックスアゴニストの導入によって、疾患期間が大幅に短縮され、および/または修復機能が亢進されるだろうと予期する。そのようなモデルを実証するために、さまざまなカルシウムフラックスアゴニストを、損傷治癒動態を変化させる能力および細菌排除に影響を与える能力について、感染前処置実験で試験した。

【0080】

A23187およびイオノマイシンあるいはSERCAポンプ阻害剤タプシガルギンのようなカルシウムフラックスアゴニストが細菌感染の前処置として使用可能か否かを決定するために、本発明者らは、6~8週齢のオスC57BL/6マウスの剃毛背面皮膚を、ビヒクルのみ、もしくはA23187、イオノマイシンまたはタプシガルギンを2mM含有する製剤で処理した。1日後、本発明者らは、5匹のマウスからなる各グループの背面皮膚に、 $2 \times 10^6$  CFUの黄色ブドウ球菌を表面的に感染させ、細菌負荷(bacterial burden)および損傷サイズを翌週にわたって評価した。このモデルを用いて、本発明者らは図7に示したように、カルシウムフラックスアゴニストが創傷治癒(サイズで評価)において有益な効果を有するか否かを調査した。興味深いことに、イオノフォアもしくはタプシガルギンのいずれかで処置された動物は、コントロール処置の動物と比較し、感染3、5および7日後において有意に小さい損傷サイズを示した( $p < 0.01$ 、スチューデントのt検定により評価)。さらに、イオノフォアまたはタプシガルギンのいずれかを含有する製剤による前処置を受けた動物は、ビヒクルコントロールと比較

し、第7日の感染部位における保持細菌が有意に少なかった(図8)。

【0081】

局所送達：A23187およびイオノマイシンならびにタブシガルギンを、無水エタノール(Spectrum Chemicals社、ガーデナ カルフォルニア)中で、続いて実施する製剤に適切な濃度へ再構成した。イン・ビボ試験の前感染において、局所製剤は75%が無水エタノール(Spectrum Chemicals社)、22%がシクロヘキサン(シグマアルドリッチ社)、および3%がジメチルスルホキシド(シグマアルドリッチ社)で構成されていた。各局所製剤は、直径1.0センチメートルのワットマン紙(ワットマン社、GEヘルスケアの一部門)の円形小片に含浸させ、前記円形小片を各受容動物の皮膚に5分間適用することによって送達された。

10

【0082】

皮膚への植菌のための黄色ブドウ球菌の調製：簡単に説明すると、対数期の最中の黄色ブドウ球菌を2回洗浄し、無菌食塩水(0.9%)中に記載の濃度で再懸濁した。マウス：6~8週齢、C57BL/6を遺伝的背景とするオスのマウスを全ての実験で使用した(ジャクソン研究所、バー・ハーバー、メイン)。

【0083】

黄色ブドウ球菌の皮膚損傷感染のマウスモデル：損傷感染用の動物を用意するため、マウスの後部上背および首の皮膚を、#40クリッパーを使用して剃毛した。次に、3つの並行する8mm長の全層性のメス切創(no.11ブレード)を真皮に作成した。得られた損傷に、マイクロピペッターで10μLの黄色ブドウ球菌( $2 \times 10^8$  CFU/mL)を植菌した。総外傷サイズ( $\text{cm}^2$ )の測定は、撮影した動物の写真から、ミリメートルルーラーを参考にして総画素数を計測することによって定量化した。

20

【0084】

イン・ビボにおける黄色ブドウ球菌負荷の定量：イン・ビボにおける細菌負荷を測定するため、感染および外傷組織を外科的に採取した後、感染マウスを7日目に殺処分した。採取した組織をホモジナイズして、適切な固形増殖培地にプレーティングした後細菌数を計測した。

【0085】

抗菌作用

【0086】

それらが本来有している黄色ブドウ球菌に対する抗生物質活性に関するこれらのおよび先の結果と一致して、本発明者らは、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)に対する直接的な抗生物質活性に関する両イオノフォアの直接的な抗生物質活性を確認した。予期していたように、両イオノフォアは液体培養試験においてMSSAに対して有効であり、A23187がより活性の高い化合物であった。興味深いことに、両化合物は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)株に対する顕著な抗生物質活性を示した。

30

【0087】

例えば、図9Aおよび9Bは、A23187およびイオノマイシンに対する黄色ブドウ球菌の抗生物質感受性をそれぞれ示すグラフであり、図9CはCPAに対する黄色ブドウ球菌の抗生物質感受性を示す。グラフから読み取れるように、両イオノフォアは直接的な抗生物質効果をいくらか有するが、その効果はカナマイシンを直接的な抗生物質として使用したコントロールよりも実質的に低かった。対照的に、図10は、黄色ブドウ球菌に対するSERC A阻害剤タブシガルギンの直接的な抗生物質効果は、高濃度においても欠如していることを表すグラフである。黄色ブドウ球菌の抗生物質感受性を決定するために、培養をトリブチックソイブロス(Cellgro社)中で一晩行った。得られた培養物を新しい培地の植菌に用いて、実験の開始に先立って対数増殖期を確保した。細菌が対数期に達したら直ちに、細菌を適切なOD<sub>600</sub>~0.05へと希釈し、24-ウェルプレートに移した。対象の化合物を添加し、プレートを振とうインキュベータ中37℃でインキュベートした。さまざまな時点で所定分量の試料を採取し、それぞれのOD<sub>600</sub>をBioTek Synergy 2マイクロプレートリーダー(BioTek社、ウィヌースキ

40

50

ー、バーモント)を用いて測定した。対象化合物の添加によって濁度が影響を受けるウェルについては、所定分量の試料を採取してトリブチックソイ寒天培地(Cellgro社)に播種し、37℃で一晩インキュベートし、翌日菌数を計測した。ゆえに、カルシウムフラックスアゴニストは間接的効果を介して抗菌処理において有効であり、もっとも高い可能性としては亢進されたIL-8の産生および増強されたNF- $\kappa$ B駆動性転写によることが、理解されるべきである。

#### 【0088】

さらに、本発明者らはまた、間接的な抗生物質効果は、予防的な方法で利用し得ることも見出した。例えば、本発明者らは、タブシガルギンで処理した前単球THP-1細胞が、タブシガルギン未処理の同様に成熟させた細胞よりも高い抗菌活性を示すことを実証した(図11)。簡単に述べると、対数的に分裂する黄色ブドウ球菌を沈殿させ(2000×gで10分間)、ハックス緩衝塩類溶液(Cellgro社)で3回洗浄した。平行して、THP-1細胞を2日間分化させ(1 $\mu$ Mのレンチノイン酸および1 $\mu$ Mコレカルシフェロール(シグマアルドリッチ社)を用いて)、続いて20nMのタブシガルギンまたはビヒクルで1日間処理して回収し、ハックス緩衝塩類溶液中で洗浄した。分化させた細胞に10%ヒト血清(Innovative Research社)を補充し、氷上で30分間冷やした。30分後、黄色ブドウ球菌(MOIは10)を添加し、結合を同期させるため、氷上でさらに20分間インキュベートした。その後、チューブを37℃で20分間インキュベートした。20分後、非内在化細菌を除去するために10U/mLのリゾスタフィン(シグマアルドリッチ社)を添加した。所望の時点(20、30、60分)で20 $\mu$ Lの分量の試料を採取し、10mLの水中に希釈した。希釈液チューブをボルテックスにかけ、初代細胞の適切な溶解を確保するために室温で10分間静置した。10分後、希釈液チューブを2000×gで10分間遠心分離して残存黄色ブドウ球菌を20倍に濃縮し、3連でトリブチックソイ寒天培地(Cellgro社)に播種し、コロニー計測に先立って37℃で一晩インキュベートした。

#### 【0089】

したがって、1種以上のイオノフォアを、皮膚感染の処置および/または損傷治癒の向上のための、局所的予防剤および/または治療剤として採用し得ることが理解されるべきである。特に重要なのは、直接的な抗生物質様式でよりもむしろ、免疫賦活的な様式でのそのような組成物および方法の使用であり、これらは、他の抗生物質治療によって確立される耐性に関連する問題を、有利に回避するだろう。当然ながら、多数の他の病原体もまたここで企図されること、および全ての現在知られている皮膚の病原体(細菌性、ウイルス性、寄生性、および真菌性)が実際に包含されることが、理解されるべきである。

#### 【0090】

さらにまた、企図される化合物での処置の間中、顕著な相乗効果が観察されたことも理解されるべきである。ここで、相乗効果は、免疫細胞の活性化におけるイオノフォアとTLRリガンドとの間のものである。このような相乗効果は、免疫応答の調節をすでに対象としている治療法(例えば、アルダラを用いた薬物療法)あるいは疾患と闘うための他の免疫賦活療法に関して、特に興味深いものとなり得るだろう。したがって、本発明者らは、イオノフォアが、表皮感染に対抗するために発症前もしくは発症後に、治療目的で使  
用できると考える。さらに、二重の物理的バリアおよび皮膚の免疫学的機能、ならびに免疫細胞におけるイオノフォアの活性化/調節作用を示す膨大なイン・ビトロデータを考えれば、本発明者らはまた、イオノフォアを含有する局所製剤が、急性(例えば、損傷からの)または慢性的(例えば、糖尿病性潰瘍などに観察されるような)表在性創傷、やけど、ならびに他の炎症性/自己免疫皮膚疾患(例えば、乾癬、湿疹など)に関する治療を必要としている患者にとって、治療上有益であると予期する。

#### 【0091】

皮膚に加えて、上皮組織は消化管(消化腔を含む)、気道および尿生殖路を覆っている細胞を包含する。後者は別として、残りの組織は微生物ならびに花粉や人工環境汚染物質のようなその他の因子に常に晒されており、これらは局所炎症および/または損傷形成を

引き起こしたはそうでなければ悪化させ得る。T L R 受容体を活性化させる微生物の消化管（口を含む）全体にわたる分布のため、イオノフォアを口腔膿瘍および場合によっては炎症性腸疾患の治療において活用することもまた企図される。

【 0 0 9 2 】

したがって、局所的に適用されるタブシガルギンは、治療剤として使用されて免疫細胞の活性化においてT L R リガンドと相乗効果をもたらし得ることが理解されるべきである。中でも注目すべきことに、本発明者らは、感染に先立ってタブシガルギンまたは他のカルシウムフラックスアゴニストで処置された皮膚が生菌を一掃し、かつコントロール処置の皮膚よりも速く治癒することを見出した。同様に重要なことに、本発明者らは、イン・ピボで観察される相違は、タブシガルギンが本来有する抗菌性に起因するものではなさそうだということを示した。結果として、本発明者らは、タブシガルギンまたは他のカルシウムフラックスアゴニストを治療的に使用して、T L R / N O D リガンドを産生または含有する病原体（例えば、黄色ブドウ球菌）によって引き起こされる表皮感染にその発症後に対抗し得ると予期する。皮膚の二重の物理的バリアおよび免疫学的機能、ならびに免疫細胞におけるタブシガルギンまたは他のカルシウムフラックスアゴニストの活性化／調節作用を示す膨大なイン・ピトロデータを考えれば、本発明者らは、タブシガルギンを含む局所製剤は、急性（例えば、損傷からの）または慢性的（例えば、糖尿病性潰瘍などで観察されるような）表在性損傷、やけど、ならびに他の炎症性／自己免疫皮膚疾患（例えば、乾癬、湿疹など）に関する治療を必要としている患者にとって、治療上有用であると予期する。

【 0 0 9 3 】

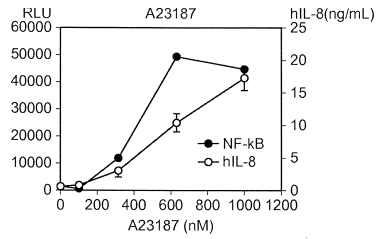
このように、カルシウムフラックスアゴニストの具体的な実施形態および適用が開示された。しかしながら、当業者にとって、すでに記載したものに加えてさらに多くの改変が、本発明の本明細書に示した構想から逸脱することなく可能であることが、明らかとなるべきであろう。本発明の主題は、ゆえに、添付した特許請求の範囲の趣旨以外に制限されるものではない。さらに、本明細書および特許請求の範囲の両方の解釈において、全ての用語は、文脈と整合性が取れる可能な限り広い意味で解釈されるべきである。特に、「含有する」および「含む」という用語は、要素、成分、または工程を非排他的に指すと解釈されるべきであり、言及された要素、成分、または工程は、存在していてもよく、または利用されていてもよく、あるいは、言及されていない他の要素、成分または工程と組み合わせられていてもよいことを意味する。

10

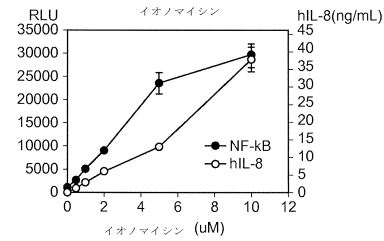
20

30

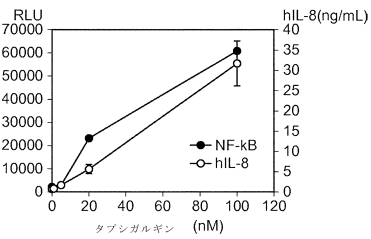
【図 1】



A

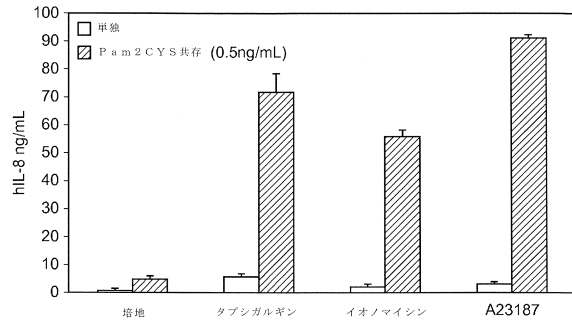


B

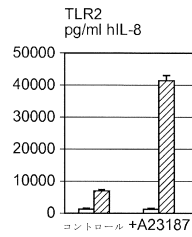


C

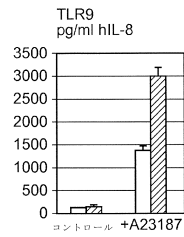
【図 2】



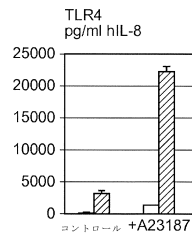
【図 3 A】



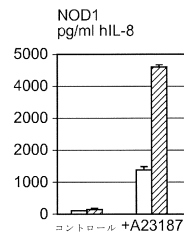
□ PAM2 1 ng/mL 非存在下  
 ▨ PAM2 1 ng/mL 存在下



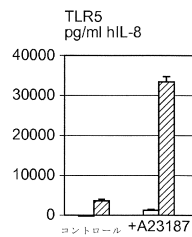
□ ODN 2006 31.6 μg/mL 非存在下  
 ▨ ODN 2006 31.6 μg/mL 存在下



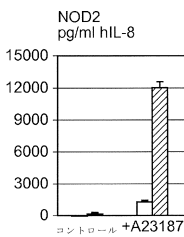
□ LPS 10 μg/mL 非存在下  
 ▨ LPS 10 μg/mL 存在下



□ C12iE-DAP 100 ng/mL 非存在下  
 ▨ C12iE-DAP 100 ng/mL 存在下

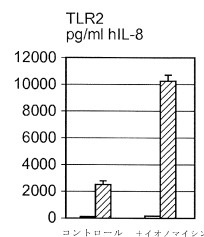


□ FLA 1 μg/mL 非存在下  
 ▨ FLA 1 μg/mL 存在下

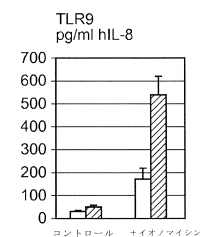


□ L18-MDP 10 ng/mL 非存在下  
 ▨ L18-MDP 10 ng/mL 存在下

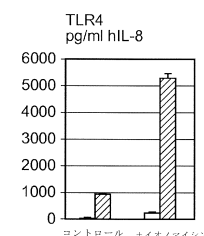
【図 3 B】



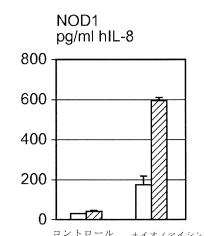
□ PAM2 1 ng/mL 非存在下  
 ▨ PAM2 1 ng/mL 存在下



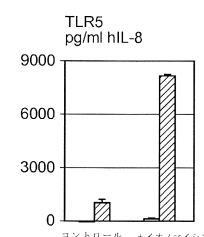
□ ODN 2006 31.6 μg/mL 非存在下  
 ▨ ODN 2006 31.6 μg/mL 存在下



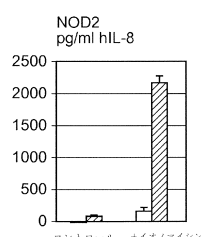
□ LPS 10 μg/mL 非存在下  
 ▨ LPS 10 μg/mL 存在下



□ C12iE-DAP 100 ng/mL 非存在下  
 ▨ C12iE-DAP 100 ng/mL 存在下

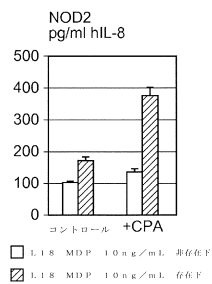
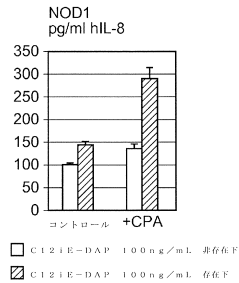
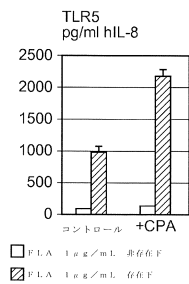
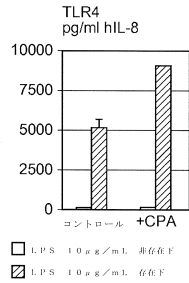
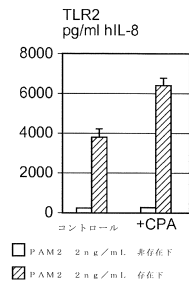


□ FLA 1 μg/mL 非存在下  
 ▨ FLA 1 μg/mL 存在下

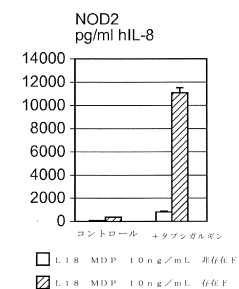
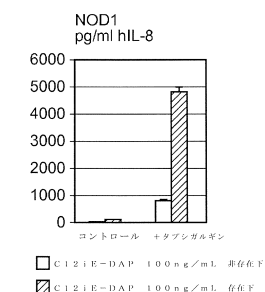
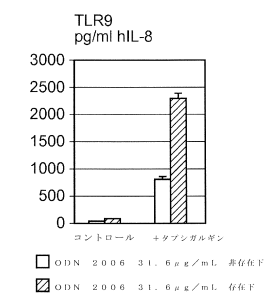
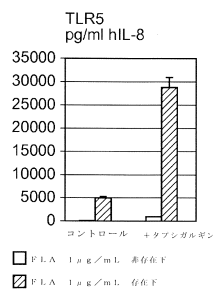
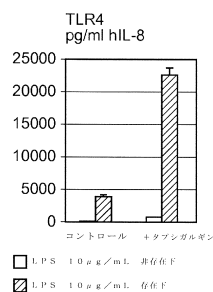
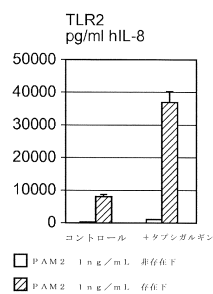


□ L18-MDP 10 ng/mL 非存在下  
 ▨ L18-MDP 10 ng/mL 存在下

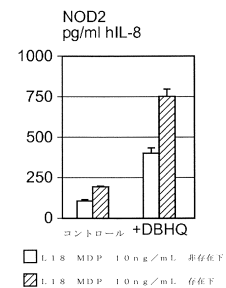
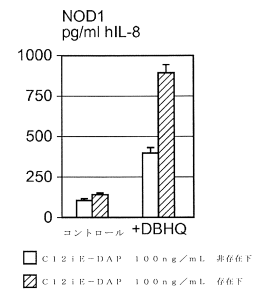
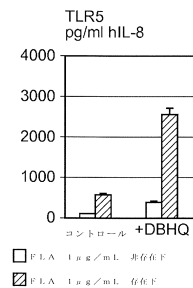
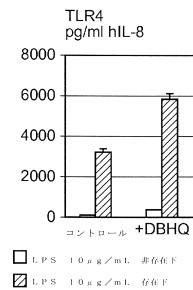
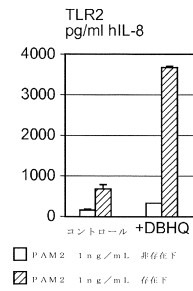
【図 3 C】



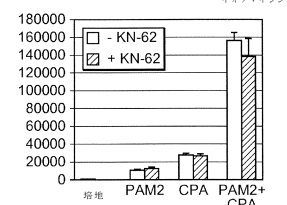
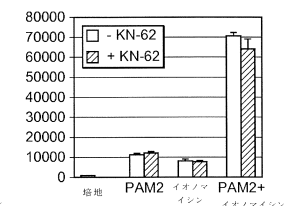
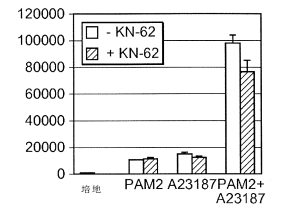
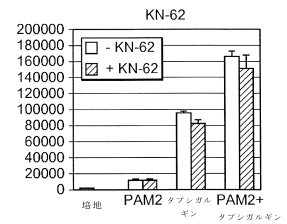
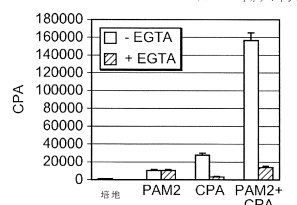
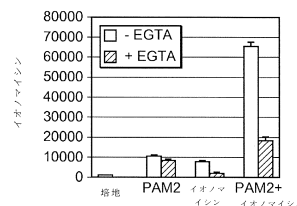
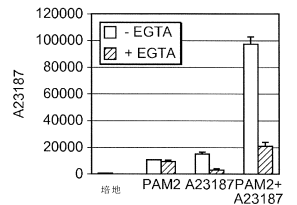
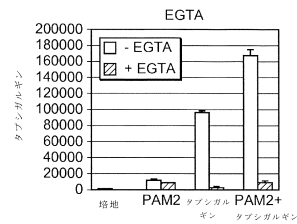
【図 3 E】



【図 3 D】

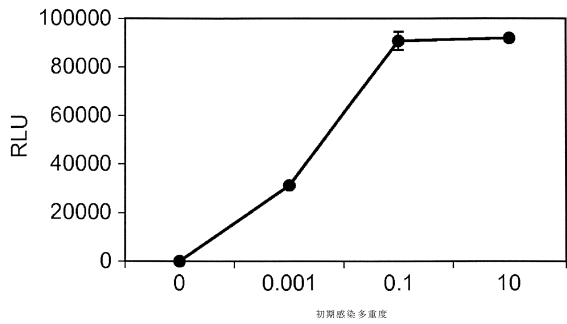


【図 4】

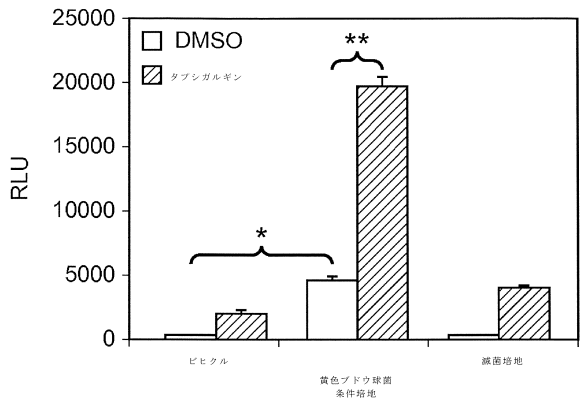




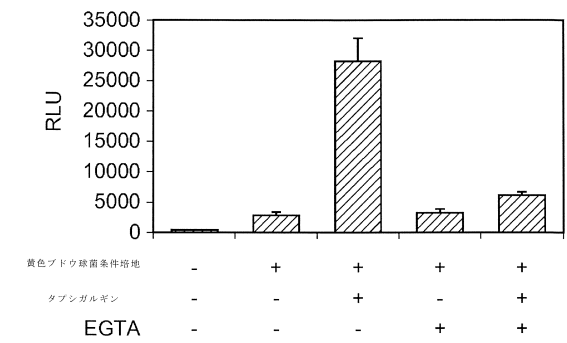
【図 5 A】



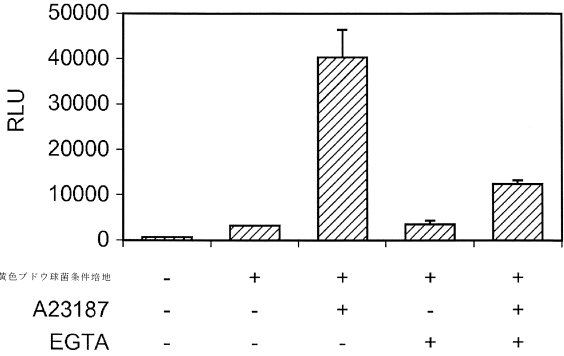
【図 5 B】



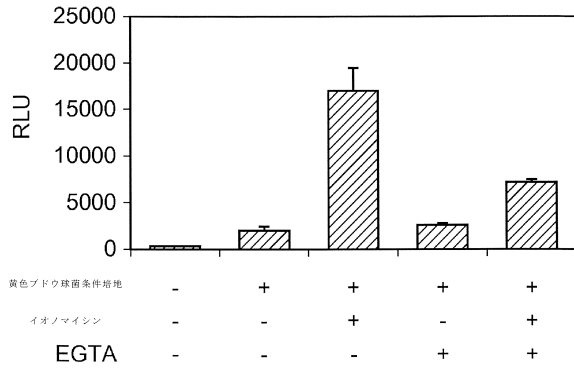
【図 5 C】



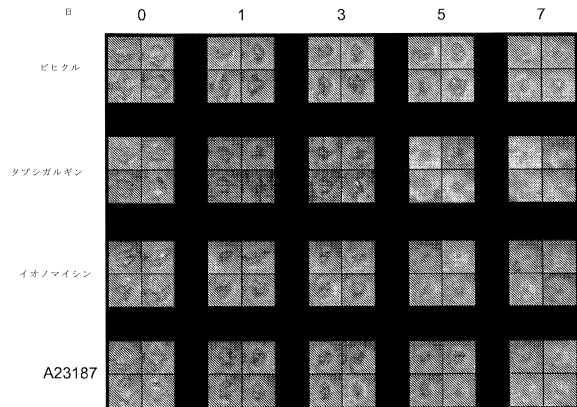
【図 5 D】



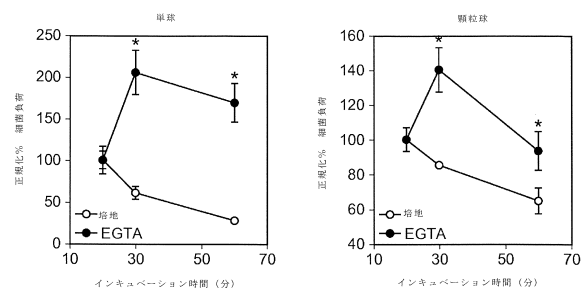
【図 5 E】



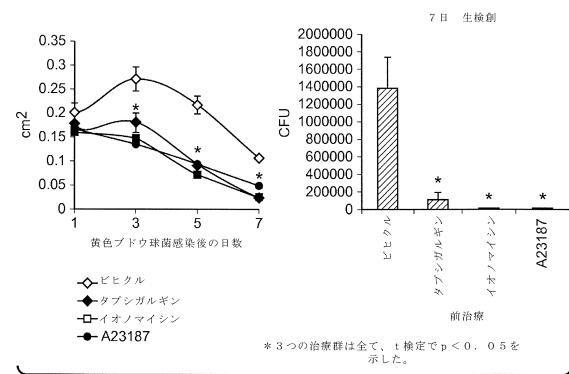
【図 7】



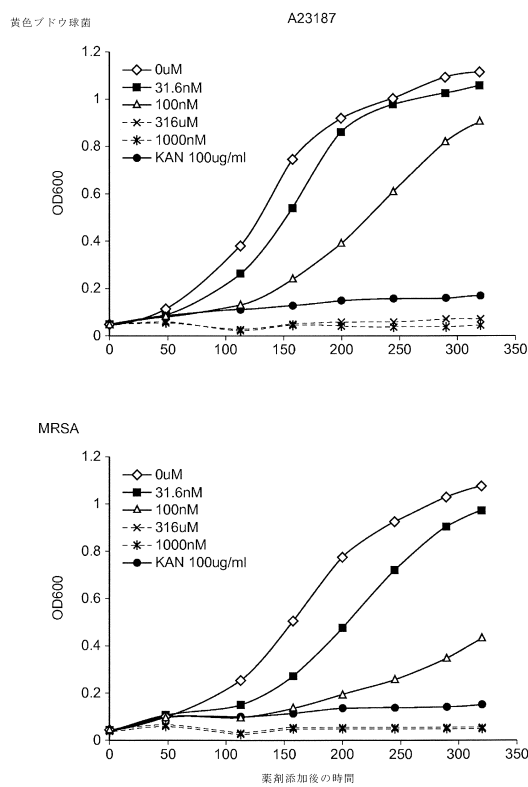
【図 6】



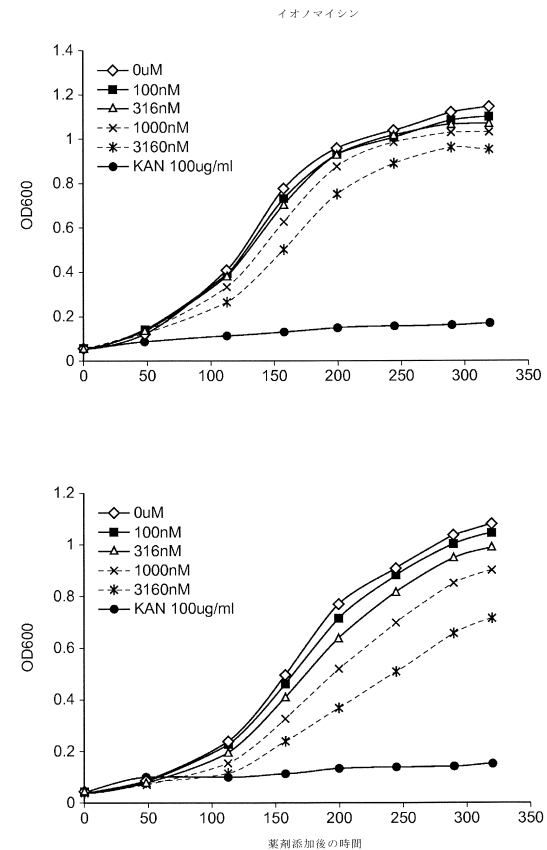
【図 8】



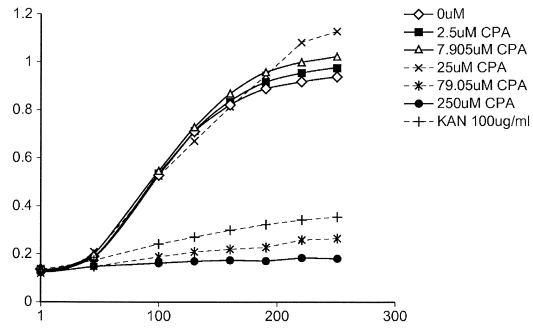
【図 9 A】



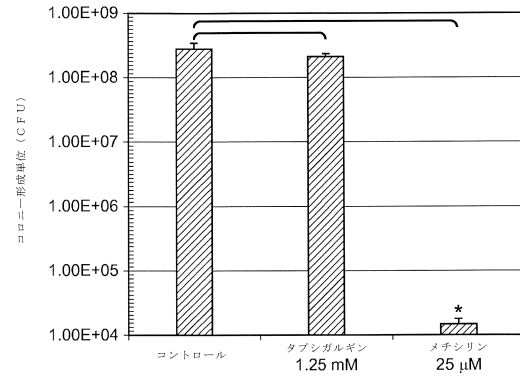
【図 9 B】



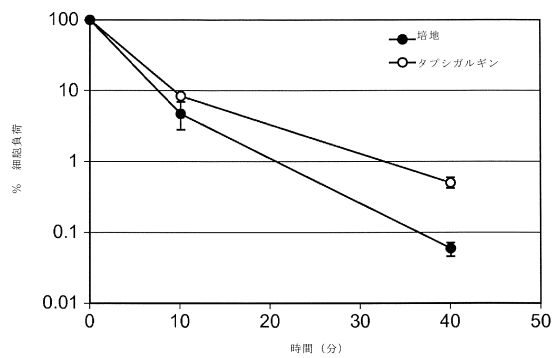
【図 9 C】



【図 10】



【図 11】



p < 0.05, t 検定

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00 1 0 1

- (72)発明者 ニアジ, ケイバン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 4 3 6, エンシーノ, 1 7 0 4 1 エスカロン ドライブ
- (72)発明者 ラビザデー, シャルーズ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 7 7, ロス アンジェルズ, 2 8 1 6 アンジェロドライブ
- (72)発明者 ゴロヴァト, ジャスティン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 2 5, ロス アンジェルズ, 1 3 3 1 アマーフトアベニュー アpartment 3 0 6
- (72)発明者 スン シオン, パトリック  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソンブルバード
- (72)発明者 レニー, アン ローラ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 0 3 0, サウス パサディナ, 2 0 1 6 ミラン アベニュー
- (72)発明者 ブズコ, オレクサンドル  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 2 4, ロス アンジェルズ, 1 0 9 5 9 ロチェスター アベニュー アpartment 5 1 1

審査官 馬場 亮人

- (56)参考文献 特表平07-505863(JP, A)  
FASEB Journal, 2005年, vol.19, no.5, Suppl. S, Part2, p.A1514-A1515, Abstract No.859.16  
Journal of Leukocyte Biology, 2006年, vol.79, no.6, p.1268-1270  
Biochemical Journal, 2005年, vol.387, no.2, p.355-365  
Journal of Leukocyte Biology, 2009年, vol.86, no.2, p.389-399  
FASEB Journal, 2007年, vol.21, no.7, p.1575-1585  
Journal of Immunology, 2000年, vol.165, no.7, p.3541-3544  
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010年, vol.402, no.2, p.235-240  
PLoS ONE, 2011年, vol.6, no.9, e25249  
International Immunology, 2005年, vol.17, no.11, p.1367-1378  
Journal of Immunology, 2000年, vol.165, p.3647-3655  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004年, vol.286, p.L887-L892  
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012年, vol.419, no.4, p.735-740  
Journal of Endotoxin Research, 2003年, vol.9, no.3, p.181-186

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 5  
A 6 1 K 3 1 / 3 4 1

A 6 1 K 3 1 / 3 6 5

A 6 1 K 3 1 / 4 0 7

A 6 1 K 3 1 / 4 2 3

A 6 1 P 1 7 / 0 0

A 6 1 P 1 7 / 0 2

A 6 1 P 3 1 / 0 4

A 6 1 P 3 7 / 0 4

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 )