

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4228116号  
(P4228116)

(45) 発行日 平成21年2月25日(2009.2.25)

(24) 登録日 平成20年12月12日(2008.12.12)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/565	(2006.01)
A 61 K 31/566	(2006.01)
A 61 P 11/06	(2006.01)
A 61 P 11/02	(2006.01)
	A 61 K 31/565
	A 61 K 31/566
	A 61 P 11/06
	A 61 P 11/02

請求項の数 7 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願平9-530434
(86) (22) 出願日	平成9年5月9日(1997.5.9)
(65) 公表番号	特表2000-507923(P2000-507923A)
(43) 公表日	平成12年6月27日(2000.6.27)
(86) 国際出願番号	PCT/AU1997/000286
(87) 国際公開番号	W01997/042958
(87) 国際公開日	平成9年11月20日(1997.11.20)
審査請求日	平成16年3月25日(2004.3.25)
(31) 優先権主張番号	PN9766
(32) 優先日	平成8年5月9日(1996.5.9)
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)
(31) 優先権主張番号	PN9918
(32) 優先日	平成8年5月20日(1996.5.20)
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)

(73) 特許権者	ゼニス・オペレイションズ・プロプライエタリー・リミテッド オーストラリア 3052ビクトリア州パークビル、ポプラー・ロード45番
(74) 代理人	弁理士 青山 葉
(74) 代理人	弁理士 田村 恒生
(72) 発明者	スチュアート, アラステア・ジョージ オーストラリア 3065ビクトリア州 フィッツロイ、フィッツロイ・ストリート42番、バーナード・オブライエン・インスティテュート・オブ・マイクロサージェリー
	—

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】喘息および気道の疾患の治療

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

慢性または急性の気道炎症によって特徴付けられる疾患の治療用医薬の製造のための、2-メトキシエストラジオール、2-ヒドロキシエストラジオール、2-メトキシエストロン、2-メトキシエストラジオール-3-メチルエーテルおよび4-メトキシエストラジオールよりなる群から選択されるステロイドまたはステロイド類似体の使用。

## 【請求項 2】

該ステロイドが2-メトキシエストラジオールである請求項1に記載の使用。

## 【請求項 3】

治療すべき疾患が喘息、気道過剰応答性、気管支収縮、気腫、肺炎、アトピー性疾患および肺感染症よりなる群から選択される請求項1または2に記載の使用。

## 【請求項 4】

該疾患が喘息である請求項3に記載の使用。

## 【請求項 5】

該アトピー性疾患がアレルギー性鼻炎である請求項3に記載の使用。

## 【請求項 6】

2-メトキシエストラジオール、2-ヒドロキシエストラジオール、2-メトキシエストロン、2-メトキシエストラジオール-3-メチルエーテルおよび4-メトキシエストラジオールよりなる群から選択されるステロイドまたはステロイド類似体を製薬学的に許容し得る担体と共に含み、吸入による投与に適している組成物。

## 【請求項 7】

治療用である請求項 6 に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

本発明は喘息状態を含む慢性および急性の気道の炎症を治療する方法に関する。本発明はまた、該治療に使用されるステロイドまたはステロイド類似体およびこれらの化合物を活性成分として含む医薬組成物にも関する。好ましい態様において、該活性成分は気道壁における炎症および平滑筋細胞増殖を阻害する。また、抗血管形成、抗酸化および微小管の形成を中断させる能力から選択される他の少なくとも 1 つの活性も有する。

## 【発明の背景】

別個の 2 種類の試薬が現在喘息の治療に使用されている。サルブタモール (salbutamol) およびサルメテロール (salmeterol) などの  $\beta_2$ -アドレノセプターアゴニストを含む気管支拡張剤を用いて徴候緩和が提供される。他の気管支拡張性特性を有する薬剤にはムスカリン受容体アンタゴニスト、イプラトロピウムブロミド (ipratropium bromide) およびテオフィリンのようなホスホジエステラーゼインヒビターを含む。

第 2 の試薬の種類は予防的であり、ベクロメタゾン (beclomethasone) ジプロピオネートなどのグルココルチコイドを含む。クロモグリク酸ナトリウムおよびネドクロミルソディウム (Nedocromil sodium) もまた、たとえこれらがグルココルチコイドより効果が少ないとしても使用される。

しかしながら、これらの試薬のうち、1 つも完全には気道の過剰反応を解消せず、またはすべての患者において喘息がもたらす生命を脅かし、かつ致死的な悲劇的な出来事を妨害しない。これらの条件が普及し、かつ時にはこれらが死の原因となるという事実は、これら試薬からの利益がほぼ最適であるという事実を強調する。

喘息は現在好酸球性気管支炎によって特徴付けられた慢性の気道炎症疾患としてみなされている [ フリガス (Frigas) ら、1991]。他の慢性炎症性疾患と同様に、喘息における炎症は、組織の再構築ではなく、気道に関して死後研究にて (ダニル (Dunnill) ら、1969) および生存供与者からの気管支生検によって (ブリュスター (Brewster) ら、1990；バイ (Bai) & Pare (ペア)、1995] 明らかに記載されている。再構築には以下が含まれる；上皮の発芽；粘膜への好酸球の顕著な浸潤；粘液腺の増大；上皮の真性基底膜直下および粘膜全体にわたる傷型コラーゲンの沈殿；および筋繊維芽細胞の数の増加にかかる。さらに、喘息性の気道における血管の容積および数の増加があり、これは血管形成が再構築プロセスを伴うことを示唆している [ クワノ (Kuwano) ら、1993]。気道の全体の容量は過剰栄養および過剰可塑性応答の両方から生じる結果である気道の平滑筋の容量における増加 [ クワノら、1993] に関係して [ エビナ (Ebina) ら、1993] 増加する [ ジェームス (James) ら、1989]。

気道過剰応答性 (AHR) は、多様多大な刺激に対する喘息患者の過剰な気管支収縮応答である。気道壁肥厚がAHRの進行の中心であるという概念は近年 10 年において同意が得られている。気道の肥厚は、平滑筋短縮の所定量が計算され、数学的モデル研究によって示され、平滑筋の短縮の結果を増幅し、健常者に比較して喘息患者における気道の耐性において多大な増加を引き起こす (例えば、40% の短縮は健常者において 15 倍の増加を与えるが、喘息患者においては 290 倍である) [ ジェームズら、1989]。筋肉は 2-3 倍まで容積増加し、増加の程度は喘息の重篤度に関係する [ クワノら、1993]。変化の性質は広範囲には調査されないが、肥厚および過従属栄養の両方を含む [ エビナら、1993]。長期にわたるアレルギー性喘息によるアレルゲン回避後は、健常被験体において観察されるレベルに対し、気道の過剰応答における減少が証明され、その徴候の解消に伴うものである [ プラツツ - ミルズ (Platts-Mills) ら、1987]。このような研究は喘息性の気道における構造上の変化も可逆的であるという概念に一致する。

これらの喘息性の気道における長期にわたる変化は治療的発明のための新しい標的を提供する「スチュアート (Stewart) ら、1993]。その結果として、この気道再構築応答に関する機能同定することに相当な興味が注がれ、かつ存在する抗喘息剤の影響がこれらのプロセスに及ぼされる。多数の因子がマイクログレンとして確立され、気道の平滑筋細胞

10

20

30

40

50

が多様な種から培養され、それにはヒトも含まれる [スチュアートら、概説のため参照]。期待されるように、塩基性纖維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF<sub>aa</sub>) および上皮増殖因子 (EGF) を含む増殖因子ファミリーに属し、このファミリーは最も効果的な増殖剤である [ハースト (Hirst) ら、1992；スチュアートら、1995a]。トロンビンはまた有効な増殖因子である [トムリンソン (Tomlinson) ら、1994]、他方、気管支収縮剤、例えばエンドテリン-1 およびトロンボキサン A、模倣物、U46619 などはたった一週間しか活性がなく、ついでいくつかの他の収縮剤、例えばヒスタミンおよびニューロキニンは完全に不活性である [スチュアートら、1995a]。

ヒトの培養された気道平滑筋において、<sub>1</sub>-アドレノレセプターアンタゴニストに対する連続暴露は、トロンビン、EGF およびトロンボキサン A<sub>2</sub>類似体、U46619 を含む広範囲のマイトジエンに対する増殖応答を減少させる [トムリンソン (Tomlinson) ら、1994；1995]。さらにデキサメタゾンおよび他の抗炎症ステロイドはまた培養された気道の平滑筋に抗増殖効果を及ぼす [スチュアートら、1995b] が、阻害の重要性は最初の例において増殖を刺激するマイトジエンに阻害の程度が依存する。抗炎症性ステロイドを吸入された長期治療が、AHR を中程度しか低減しないということに対する注目は重要であり [ソトメーヤー (Sotomayor) ら、1984；ラングレン (Lungren) ら、1988]、他方 <sub>2</sub>-アゴニストは AHR に対して全く影響を及ぼさないか、または AHR を増大させると報告されている [ワヘドナ (Wahedna) ら、1993]。従って、喘息の治療に関して、2つの最も一般的に使用され有効である薬剤の分類は AHR にほぼ最大の効果を有するか、それゆえ該状態の進行および発展に貢献している気道の再構築に関連する構造の変化を調節することにおいて有効ではない。

本発明者らは、再構築の工程を阻害または調節する有効な方法を調査し、ついで驚くべきことにこの目的に適したステロイドおよびその類似体を同定した。

#### 発明の要約

2-メトキシエストラジオールは、ヒトにおいては生理学的エストロゲンである 17-エストラジオールの天然代謝物である。

2段階工程において該物質は製造され、エストロゲンを水酸化し、カテコールエストロゲンを製造し、さらにメトキシ化してチトクロム p450 経路を誘発することによって対応するメトキシエストロゲンを製造することを含む [スピンク (Spink) ら、1994]。今までそれに生物学的に不活性であると考えられ [ロスナー (Rosner) ら、1991]、細胞培養実験において、2-メトキシエストラジオールはある形質転換した細胞株の増殖を阻害する [ロッタリング (Lottering) ら、1992] および積極的に増殖または静止していない内皮細胞および纖維芽細胞の増殖を阻害することを確立した [フォトシス (Fotsis) ら、1994]。フォトシスらはまた 2-メトキシエストラジオールの投与は、2-メトキシエストラジオールが、腫瘍細胞の直接的阻害によってよりもむしろ腫瘍誘発性血管形成を抑圧することによって腫瘍の増殖を阻害することも示した。該化合物は基底膜の破壊を減少させ、従って細胞外マトリクスに細胞の移動を妨害し、かつ固形腫瘍または血管形成疾患治療のための可能な抗血管形成薬剤にすることを提供する。腫瘍血管新生の阻害はまた、クラウバー (Klauber) ら、1997 においても示された。

2-メトキシエストラジオールのウサギの大動脈からの培養された平滑筋細胞への抗増殖効果 [ニシガキ (Nisigaki) ら、1995] はまたこの化合物のアテローム性動脈硬化症の妨害および進行に有用であることを示唆しており、喘息および AHR において見られるものと異なる細胞事象によって引起される疾患を示唆している。

抗-増殖効果のメカニズムはまだ確立していない。ロッタリングら (1992) はサイクリックアデノシンーリン酸 (cAMP) の上昇は 2-メトキシエストラジオールの DNA 合成の阻害効果を説明するが、一方、有糸分裂の間の紡錘型形成間の微小管アセンブリーの阻害は細胞分裂の阻害効果を説明すると考えられている [フォトシスら、1994]。他の生物学的な 2-メトキシエストラジオールの効果は広範囲には特徴付けられていない。ブタ子宮内膜細胞培養物において、2-メトキシエストラジオールは PGF<sub>2</sub> の合成

10

20

30

40

50

を阻害する [ ザン (Zhang) およびデービス (Davis) 、 1992 ] 。 2 - メトキシエストラジオールの非ゲノム作用は微小管におけるコルチシン部位での結合を介して微小管の崩壊を含み [ ダマト (D'Amato) ら、 1994 ; アイズ - ヨコタ (Aizu-Yokota) ら、 1995 ] 、および血管平滑筋の弛緩を含む [ ゴヤチェ (Goyache) ら、 1995 ] 。

国際出願公開番号 WO 95 / 04535 において、イン・ビトロでの微小管ポリマー化を阻害することによる抗有糸分裂効果を与えるエストラジオール誘導体を開示している。該化合物は内皮細胞増殖を阻害することがイン・ビトロでの実験から推定される。

本発明は 2 - メトキシエストラジオールの効果および炎症性細胞活性化の抑制に関する。それは特に喘息などの気道の疾患の治療または妨害に関する。

上記の本発明を示唆または開示した参考の文献は全くない。例えば、平滑筋細胞増殖の抑制および気道の炎症性細胞の活性化は WO 95 / 04535 に記載のイン・ビトロの観察によって推定できず、これらの活性のメカニズムは微小管アセンブリーへの作用に関連しないようである。

2 - メトキシエストラジオールのウサギ血管平滑筋への抗増殖効果 [ ニシガキら、上記 ] はまた、気道の平滑筋に推定されることができない。というのはこれらの 2 つの異なる源からの細胞の応答性において公知の差異が存在するからである。

内皮細胞増殖を増強する薬剤、例えばヘパリンなどのうちのいくつかは、実際に気道の平滑筋細胞の増殖を阻害する。それゆえ、内皮細胞中の該 2 - メトキシエストラジオールの抗増殖効果 [ フォトシスら、 WO 95 / 04535 、上記 ] は平滑筋が同様に応答するであろうことを示唆しない。

本発明者らは、 2 - メトキシエストラジオールがヒト末梢血管から得られた多型核白血球からのミエロペルオキシダーゼの放出ならびにこれらの細胞の食細胞性活性を見出した。これらの細胞中での食細胞性活性の低下は、抗炎症性の証拠を提供する。驚くべきことにこれは、特に 2 - メトキシエストラジオールがそのグルココルチコイドまたはエストロゲン受容体にアフィニティーを有意に持つとは知られていないからである [ メリアム (Merriam) ら、 1980 ] 。

これらの特性は、 2 - メトキシエストラジオールおよびその関連化合物を喘息、慢性障害性起動疾患および炎症によって特徴付けられる他の気道疾患に限るものではないが、それらを含む病態に有利にする。本発明の方法により治療され易い他の状態は、例えば、気腫、肺炎または例えば好中球浸潤などの増殖性および炎症性病態の 1 つまたは両方、または肺感染症の徵候または耐性および炎症性細胞の活性化から引き起こされる後遺症を含む。アレルギー性鼻炎などの病状はまた治療される。というのは、本発明者らはまた、 2 - メトキシエストラジオールは巨大細胞関連細胞 RBL2H3 の分解を阻害するからである。この 2 - メトキシエストラジオールの阻害効果は、抗原刺激放出に選択的である。というのはブロテインキナーゼ C 刺激剤である PMA に対する応答およびカルシウムイオン透過担体である A23187 に対する応答は影響されないからである。従って、抗原の放出への影響は、微小管依存性顆粒噴出への非特異的な作用の結果でないようである。本結果は 2 - メトキシエストラジオールおよびこれらの活性を有する関連ステロイドが、鼻炎およびアトピー性皮膚病態に限るものではないが、これらを含むアレルギー条件を治療するのに有用であることを示している。作用の任意のメカニズムにとらわれずに、これらのデータは特定の、受容体に関わるシグナル伝達機構が気道における炎症に関与し、その阻害に貢献することを示唆している。

本発明者らはさらに、 2 - メトキシエストラジオールが FCS および bFGF を含む増殖因子の範囲で刺激された気道の平滑筋における DNA 合成および細胞分裂を阻害することを見出した。さらに、タンパク質合成速度におけるセロトニン刺激による増加は 2 - メトキシエストラジオールによって阻害され、細胞増殖の阻害に加えて抗 - 過剰栄養効果の可能性を高める。本発明者らの観察は 2 - メトキシエストラジオールの抗 - 血管形成活性とともに、これおよび関連化合物が、上記の炎症によって特徴付けられる気道の疾患の治療、特に慢性喘息の治療に、気道壁再構築におよびそれゆえ気道の過剰応答性にインパクトを与えることによって特徴付けられる。 2 - メトキシエストラジオールの類似体はまた D

10

20

30

40

50

N A 合成を阻害する能力を試験し、ついでその結果はこれらもまた治療上の価値があることを示唆している。

最初の局面において、本発明は慢性または急性の気道の炎症によって特徴付けられる疾患の治療方法を提供し、その方法には治療を必要とする哺乳類の気道の再構築を調節するための能力を有するステロイドまたはステロイド類似体を投与する工程を含む。好ましくは、該哺乳類はヒト、ネコ、ウマまたはウシであり、より好ましくはヒトである。該ステロイド 2 - メトキシエストラジオールは本発明の方法に従って使用するのに特に好ましい。本発明の方法に従って使用される投薬レベルでの有効なグルココルチコイド活性を持たないステロイドまたはその類似体が特に好ましい。

第 2 の局面において、本発明は慢性または急性気道炎症によって特徴付けられる疾患を治療する方法、該方法にはそのような治療を必要とする哺乳類にステロイドまたはステロイド類似体（該ステロイドまたはステロイド類似体は多形核白血球の食細胞活性を阻害する）を投与する工程を含む方法を提供する。好ましくは、白血球からのミエロペルオキシダーゼの放出はまた阻害される。マクロファージの活性化はまた阻害される。

一態様において、本発明による方法はさらに平滑筋細胞増殖および炎症を阻害することによって気道の再構築を調節する。再構築はさらに血管形成、オキシダントの形成および気道壁における微小管の機能からなる群から選択される 1 またはそれ以上の活性の阻害によって調節されるであろう。

特に好ましい態様において、本発明の方法は喘息、気道過剰反応性、気管支収縮、気腫、肺炎、アレルギー性鼻炎および肺感染症などのアトピー疾患からなる群から選択される疾患の治療において使用される。

第 3 の局面において、本発明は気道壁の炎症を阻害することによって再構築される気道を調節するステロイドまたはステロイド類似体を提供する。好ましくは該化合物はまた気道平滑筋細胞の増殖を阻害する能力を有し、特にマイトジエン刺激に応答する。

第 4 の局面において、本発明は食細胞活性を阻害することによって再構築される気道を調節するステロイドまたはステロイド類似体に関する。好ましい態様において、多形核白血球の食細胞活性は 2 - メトキシエストラジオールによって阻害される。他の態様において、多形核白血球からのミエロペルオキシダーゼの放出はまた抑圧される。特に好ましい態様において、ステロイドまたはステロイド類似体はグルココルチコイド活性を示さない。

第 5 の局面において、本発明は上記のステロイドまたはステロイド類似体を提供し、さらに抗 - 血管形成活性および / または抗 - オキシダント活性を有する。特に好ましい態様において、本発明のステロイドまたはステロイド類似体はまた、気道壁における微小管を破壊する能力を有する。

第 6 の局面において、本発明は上記のステロイドまたはステロイド化合物を含む組成物を提供し、ときには製薬学的に許容し得る担体および賦形剤を共に含む。そのような担体および賦形剤の例には、以下に限るものではないが、ラクトースと共に乾燥微小化粉末 (microcrystalline powder) 、または最近開発されたヒドロフルオロアルカンが含まれる。本発明の組成物は、気道疾患または喘息の治療において使用される標準的な経路のいずれか、例えば、局所、経口、鼻腔投与または吸入による投与を介しての投与のための製剤において使用されてよい。これらの製剤はカプセル、カシェ剤、錠剤、エアロゾル剤、粉末顆粒、微小化物質または溶液などの従来の形態のいずれかであってよい。時に、該ステロイドまたはステロイド類似体はシクロデキストリンで複雑化し、硫酸塩、酢酸塩、安息香酸塩などの製薬学的に許容し得る酸と形成されたエステルの形態であってよい。当業者は、標準的テキスト、例えばレミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンシズ (Remington's Pharmaceutical Sciences) 第 17 版を参照することによって製剤がいかに作成されるか、およびこれらがいかに投与されるかを決定することができる。

投与すべきステロイドまたはステロイド類似体の用量は、治療すべき状態の程度および投与の経路に依存し、担当の医師または獣医の裁量で決定する。そのような医師または獣医は適切な用量、様式および投与頻度を容易に決定できる。本発明の組成物は、喘息、気道過剰反応 (A H R ) または気管支収縮を含む慢性または急性気道炎症状態を治療するため

10

20

30

40

50

に使用されてよい。

本発明の特に好ましい態様において、喘息患者の気道壁における平滑筋細胞の炎症および増殖は、2-メトキシエストラジオールを含む組成物を投与することによって阻害される。

本発明は特定の2-メトキシエストラジオールについて記載するが、この化合物は本発明で使用されてもよい必要な生物学的活性を有する化合物の類似物であると理解されるであろう。これらには以下に限定されるものではないが、2-ヒドロキシエストラジオール、2-メトキシエストラジオール-3メチルエーテルおよび4-メトキシエストラジオールが含まれる。

多様な化合物は他の組織において抗増殖および/または抗血管形成活性を有するエストラジオール誘導体として同定されている。例えば、WO 95/04535の全開示物(参照することにより本明細書に包含する)を参照。

そのような化合物は本発明の使用に適當な候補物であってよく、ステロイド、本発明の目的のための方法内にあり、ステロイド類似体またはステロイド様化合物である。好ましい化合物はステロイド骨格の2位でメトキシ基を有する。

さらに、これまで公知でなかった化合物は本発明の範囲から逸脱しない生物学的活性を有する本発明の2-メトキシステロイドまたはステロイド様化合物に十分構造上類似である化合物が考えられる。本明細書の目的のため、「ステロイド」、「ステロイド類似体」または「ステロイド様」なる語句は、2-メトキシエストラジオール、2-ヒドロキシエストラジオール、2-メトキシエストラジオール-3-メチルエーテル、4-メトキシエストラジオールおよび本発明の目的のために使用されるであろう適切な生物活性を有するステロイド核などに基づく他の化合物を含むと理解すべきである。他の化合物は2-メトキシエストラジオールに十分構造上類似および/または電気的類似(電荷分布)であり、かつ例えばWO 95/04535などの本発明の目的のためのステロイド類似体であると考えられるような化合物であり、ステロイド核を厳密には持たない本発明の範囲内で生物学的活性を有する。そのような活性を有する化合物は、本明細書の至るところに記載される活性の型を示すことができるアッセイを用いて容易に同定することができる。一例として、気道平滑筋細胞増殖を測定することによって慢性呼吸器障害疾患への影響を試験してよく;アレルギー性鼻炎および感染性疾患への影響は、例えば鼻炎に関して巨大細胞および感染性疾患に関して好中球などの炎症性細胞活性の阻害を決定することによって試験されてよい。

当業者ならば別の試験に気づくであろうし、本発明の使用のための化合物を用意にスクリーニングすることができる。

#### 発明の詳細な説明

本発明は以下の図面を参照して例示により詳細に記載されるであろう。その図面とは以下の通りである。

図1はテトラメチルベンジジンの西洋ワサビペルオキシダーゼ媒介による酸化への2-メトキシエストラジオールが及ぼす効果の欠如を示す。

図2は培養されたヒト気道平滑筋細胞における[<sup>3</sup>H]-チミジンのマイトジエン誘発取り込みへの2-メトキシエストラジオール(0.3-10 μM、30分前処理した)が及ぼす効果を示す。試験されたマイトジエンは0.3U/mlのトロンビン、1%FCS、300pM bFGF(図2a)および10%FCS、3nM EGF(図2b)であった。図2aおよびbに記載されるものに同一に設計されたさらなる実験が行われ、この後者のデータ組み合わせは図2cに示されている。2-メトキシエストラジオール(3 μM)のトロンビン(0.3U/ml)誘発DNA合成への有効性もまた調査された(2d)。データを3つの別個の培養における3実験の平均および平均の標準偏差として示し、非前処理細胞における[<sup>3</sup>H]-チミジン取り込みのパーセンテージとして示す。

図3はマイトジエン誘発[<sup>3</sup>H]-ロイシン取り込みへの2-メトキシエストラジオール(0.3-10 μM、30分前処理した)が及ぼす効果を示す。データを3つの別個の培養における3実験の平均および平均の標準偏差として示し、非前処理細胞における[<sup>3</sup>H]

10

20

30

40

50

] - ロイシン取り込みのパーセンテージとして示す。

図4は(a) FCS(1%)または(b) bFGF(300pM)の存在下の細胞数に2-METキシエストラジオール(0.3-10μM、30分間前処理した)が及ぼす効果を示す。データを3つの別個の培養における3実験の平均および平均の標準偏差として示し、非前処理細胞における細胞数増加のパーセンテージとして示す。

図5はFCS(1%) - 誘発DNA合成の2-METキシエストラジオール(3μM)へのステロイド受容体アンタゴニストRU486(1μM)が及ぼす影響を示す。データを3つの別個の培養における3実験の平均および平均の標準偏差として示し、非前処理細胞における<sup>3</sup>H] - チミジン取り込みのパーセンテージとして示す。RU486をFCS添加の30分前に添加した2-エストラジオールの30分前に添加した。

図6はFCS(1%) - 誘発<sup>3</sup>H] - チミジンへの17-エストラジオールおよび2-ヒドロキシエストラジオール(0.3-10μM、30分前処理した)が及ぼす効果を示す。データを3つの別個の培養における3実験の平均および平均の標準偏差として示し、非前処理細胞における<sup>3</sup>H] - チミジン取り込みのパーセンテージとして示す。2-エストラジオールに関連するデータは比較を容易にするために図1から模写している。

図7はトロンビン(0.3U/ml) - 誘発<sup>3</sup>H] - チミジンへの2-METキシエストロングおよび2-METキシエストラジオール(0.3-10μM、30分前処理した)が及ぼす効果を示す。データを3つの別個の培養における3実験の平均および平均の標準偏差として示し、非前処理細胞における<sup>3</sup>H] - チミジン取り込みのパーセンテージとして示す。2-METキシエストラジオールに関連するデータは比較を容易にするために図2aから模写している。

図8はモルモット腹膜マクロファージ中に放出されたスーパーオキサイドアニオンへの2-METキシエストラジオールが及ぼす効果を示す。この化合物はチモサンへのスーパーオキサイドアニオンマクロファージの応答を完全に阻害し、fMLPに対する応答を低減した。

図9はモルモット腹膜マクロファージ中のプロスタサイクリン放出への2-METキシエストラジオールが及ぼす効果を示す。その結果はエストラジオールがfMLPに対する応答を完全に阻害する一方、PMAに対する応答は50%阻害されることを示している。

図10はオブアルブミン(DNP-OA)の多様な濃度への影響および巨大細胞(RBL2H3)分解および2-METキシエストラジオールによる阻害を示したプロットである。

図11は2-METキシエストラジオールがモルモット腹膜マクロファージからのオブアルブミン(DNP-OA) - 刺激<sup>3</sup>H] - 5HT放出を低減させるがPMAに対する応答にての放出には影響を及ぼさないことを示している。

略語：本明細書で使用する略語は以下の通りである：

AHR	気道過剰応答
bFGF	塩基性纖維芽細胞増殖因子
DNP-OA	ジニトロ-フェニル処理オブアルブミン
EGF	上皮増殖因子
fMLP	ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン
pDEP	血小板由来増殖因子
PMA	ホルボールミリステートアセテート
5HT	セロトニン

#### 一般的方法

##### 細胞培養

ヒト気管支気道平滑筋をアルフレッド・ホスピタル(Alfred Hospital)(メルボルン)によって提供された肺移植ドナーまたはレシピエントからの通常の巨視的肺切除で得た。培養物を以前に詳細に記載した通りに調製した(トムリンソンら、1994)。端的には、組織を特に、3mg/mlコラゲナーゼを含むダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(DMEM)[2mM L-グルタミン、100μg/mlのストレプトマイシンB、および0.25%w/vウシ血清アルブミン(BSA)を補う]中

10

20

30

40

50

で 37 で 30 分間、部分的に消化させ、ついで約 0.5 g の平滑筋をさらに 2 時間 0.5 mg / ml のエラスターーゼ中で 37 でインキュベートし、ついでコラゲナーゼ (3 mg / ml) 中で 37 で 18 時間インキュベートすることによって消化した。細胞懸濁液を遠心 (10 分、100 × g、25) し、補った D M E M で 3 回洗浄し、再度 10% (v / v) 熱不活性化ウシ胎児血清 (F C S) を含む 25 ml の D M E M 中に再懸濁させ、25 cm<sup>2</sup> ファルコン培養フラスコ (Falcon culture flask) に播種し、単層がコンフルエンスに達するまで 7 から 10 日間インキュベート (37、5% CO<sub>2</sub>) した。ついで細胞を一週間ごとに回収して 0.5% トリプシン、1 mM E D T A に 10 分間暴露し、ついで 75 cm<sup>2</sup> ファルコン培養フラスコに 1 : 3 スプリット割合で継代した。継代 3 から 15 での細胞を実験に使用した。

10

## 免疫化学

細胞を 8 ウエルガラス組織培養チャンバースライド (ラーブテク (Labtek)) にサブ培養し、D M E M (10% F C S) 中での 100% コンフルエンシーまで増殖させた。スライドを P B S で 3 回洗浄し、氷冷アセトン中で 20 秒間固定し、ついで染色まで 4 で 4 週間保存した。P B S / B S A (0.25%) 中で 20 分間再度脱水した後、細胞を 0.5% Triton X-100 (P B S 中) にインキュベーションすることによって透過させ、第 1 抗体を 60 分間 22 でインキュベートし、ついで細胞を 22 で少なくとも 60 分間第 2 抗体に暴露させた (西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) - コンジュゲートヤギ抗マウス; I g F (a b') 2 断片またはヤギ抗 - ウサギ I g G)。コントロールを P B S / B S A (0.25%) のための第 1 抗体を置換することによって提供した。固定した細胞の染色を光学顕微鏡 (ビデオプロ 32 イメージ分析システム (VifroPro 32 image analysis system)) に接続したオリンパス B H 2、フォールディング・イメージング、クレイトン、ビクトリア) によって分析した。培養液中の平滑筋を同定するために使用される抗体の特徴をそのままの気道壁標本上に確立した。使用された抗体を - アクチン、ミオシン、カルポニン (すべては平滑筋に特異的である)、サイトケラチン (上皮細胞) および P E C A M - 1 (C D 31、内皮細胞のマーカーである) に対して作成された。

20

平滑筋 - アクチン、ミオシンおよびカルポニンの発現を本実験で使用されたすべての培養中で観察した。これらの培養は検出可能な P E C A N - 1 染色を示さず、ついで細胞のうちの 5% より少数がサイトケラチンに対するモノクローナル抗体での染色に陽性であった。培養の産生のため使用された気道近隣のパラフィン包埋切片を気道平滑筋および血管の束の平滑筋 - アクチンおよびミオシンに関して陽性に染色した。P E C A M - 1 に対する抗体は血管内皮を染色し、一方、該抗体は上皮のみをサイトケラチンで染色し、それにより標的抗原に関するこれらの抗体の特異性を確認する。

30

## D N A およびタンパク質合成

細胞を 1 : 3 の割合で 24 ウエルプレートにサブ培養し、37 で 5% CO<sub>2</sub> 霧囲気下で 72 ~ 96 時間かけて単層コンフルエンシーに達するまで増殖させた。血清含有培地を 24 時間無血清 D M E M で置換して増殖停止とさせた。いくつかの実験において細胞を 2-メトキシエストラジオールで処理した 30 分後にマイトジエンを付加した。刺激剤 (マイトジエン) をインシュリン、トランスフェリンおよびセレニウム (Monomed A, 1% v / v) を含む補足物とともに適当なウェルに加えた。Monomed A を加えてトロンビン、上皮増殖因子 (E G F) および塩基性纖維芽細胞増殖因子 (b F G F) などの増殖因子のマイトジエン活性に不可欠である増殖因子を提供するため加えた (スチュアートら、1995a)。マイトジエンおよびインヒビターを実験の終了時まで付加時間からの細胞と接触させて、逆を示さない限り残した。細胞を 24 時間インキュベートし (37、5% CO<sub>2</sub>)、[<sup>3</sup>H] - チミジン (1 μ Ci / ml、4 時間) でパルスして本発明者らが以前に行つた研究により新規に合成された D N A に放射線標識がとり込まれるのを示す (スチュアートら、1995)。放射線の取り込みをパルスラベリング時間の終わりに濾過することによって決定した。放射線を含む培地を吸気させ、細胞を 0.1 M NaOH 200 μl を付加することによって溶解させた。その D N A をガラスファイバーフィルター (パッカード (Packerd)、標準) 上の結合ハーベスター (パッカード・フィルターメート 196 (Packerd) 50

40

Filtermate 196) 上に結合して、濾過によって固定化し、ついで 3 × 3 ml 容量の蒸留水で洗浄し、ついで 1 ml 容量の 100% エタノールで一回洗浄した。乾燥したフィルターをパッカード・トップコート液体シンチレーションカウンターで数を数えた。タンパク質合成割合を上記のような類似の計画した実験で決定したが、4 時間のパルスインキュベーションでは [<sup>3</sup>H] - チミジンのかわりに [<sup>3</sup>H] - ロイシンで置換した。さらに、タンパク質合成の割合へのマイトジエンおよび 2 - メトキシエストラジオールの及ぼす影響を決定するための実験において、マイトジエンとのインキュベーションを 48 時間行った。これらの実験の持続期間が長いほど細胞分裂が起こるのに十分な時間が必要であった。

#### 細胞数の計算

有糸分裂の間の細胞周期を通して、気道平滑筋細胞の増殖の進行を DNA 合成に使用したのと類似設計された実験（マイトジエンと一緒にインキュベートを 48 時間続けたことを除いて類似である）における細胞数の変化を測定することによって決定した。細胞をこれらの実験において使用した 6 - ウェル培養皿の各ウェルから 1 mM の EDTA を含む PBS 中の 200 μl の 0.5% トリプシンに、正確な数の計算が可能になるように培養皿から互いが完全に超音波処理されないことを確実にするために 30 - 45 分間暴露して除去した。この時間の終了時に、さらに 200 μl の PBS (20% FCS) を加えてトリプシンによる細胞の溶解を妨害し、ついで細胞を血球測定計で直接カウントした。

10

#### 統計学的分析

個々の実験の各処理を DNA およびタンパク質合成実験のために 4 回ずつ行った。各実験を少なくとも 3 つの別個の個体から得た 3 つの異なる培養において行った。細胞の計算に関して、1 回のインキュベーションを 3 つの培養において行った。結果を多数の培養からのグループ化したデータとして提示し、平均 ± n 培養の標準偏差として表した。増加程度を同じ 24 ウェルプレート上のコントロールウェルの応答によって処理されたウェルの応答を分割することによって計算した。グループ化されたデータを対数形質転換によって標準化をした後に両 t - 検定で分析した。複数の比較のためにボンフェロニ (Bonferroni) 適正を必要な場合には使用した。差異は p < 0.05 の場合に有意であると考えられた。

20

#### 材料

使用したすべての化学物質は分析用等級またはそれより高い等級のものであった。使用した化合物およびその出所は以下の通りである：2 - メトキシエストラジオール (1, 3, 5, [10] - エストリエン 2, 3, 17 - トリオール 2 - メトキシルエーテルロット 8 3H 4065) ; 17 - エストラジオール ((1, 3, 5, [10] - エストリエン - 3, 17 - ジオール、cat No. E 8876) ; 2 - メトキシエストリオール (1, 3, 5, [10] - エストリエン - 2, 3, 16, 17 - テトロール、ロット 26F40 38; 2 - メトキシエステロン、(2, 3 - ジヒドロキシ 1, 3, 5, [10] - エストリエン - 17 - オン、ロット 110F4003) ; 2 - ヒドロキシエストラジオール (1, 3, 5, [10] - エストリエン 2, 3, 17 - トリオールロット 75H0853) ; L - グルタミン、特に無脂肪酸ウシ血清アルブミンフラクション V (BSA)、トロンビン (ウシ血漿)、シグマ、USA; L - グルタミン、無ウシ血清アルブミンフラクション V 不可欠無脂肪酸 (BSA)、シグマ USA; アムフォテリシン B (ファンギゾン (Fungizone))、ヒト組換え塩基性 FGF (bFGF)、プロメガ、USA; コラゲナーゼ C L S 1 型、エラスターーゼ、ワーチトンバイオケミカル (Worthington Biochemical)、USA; ダルベッコ A リン酸緩衝食塩水 (RBS)、オキソイド、英国; トリプシン、ベルゼネ、ペニシリン - G、ストレプトマイシン、MonomedA)、CSL オーストラリア、ウシ胎児血清 (FCS)、フラウ・ラボラトリーズ、オーストラリア; ダルベッコ改変イーグル培地 (D MEM)、フラウラボラトリーズ、スコットランド。[6 - <sup>3</sup>H] - チミジン (185 GBq / mmol, 5 Ci / mmol) アマシャム、英国; ミクロシント - O シンチラント (Microscint-0 scintillant)、キャンベル - パッカード、オーストラリア。免疫化学に使用した抗体は抗 - 平滑筋 - アクチン (マウスモノクローナル) (Dako M851)、モノクローナルマウス抗 - PECAM-1 (DAKO - CD31、JC/70A) (DakoM823)、ダコ (Dako)・コーポレーション、米国; 抗 - サイトケラチン (マウスモノクローナル CY

30

40 C L S 1 型、エラスターーゼ、ワーチトンバイオケミカル (Worthington Biochemical)、USA; ダルベッコ A リン酸緩衝食塩水 (RBS)、オキソイド、英国; トリプシン、ベルゼネ、ペニシリン - G、ストレプトマイシン、MonomedA)、CSL オーストラリア、ウシ胎児血清 (FCS)、フラウ・ラボラトリーズ、オーストラリア; ダルベッコ改変イーグル培地 (D MEM)、フラウラボラトリーズ、スコットランド。[6 - <sup>3</sup>H] - チミジン (185 GBq / mmol, 5 Ci / mmol) アマシャム、英国; ミクロシント - O シンチラント (Microscint-0 scintillant)、キャンベル - パッカード、オーストラリア。免疫化学に使用した抗体は抗 - 平滑筋 - アクチン (マウスモノクローナル) (Dako M851)、モノクローナルマウス抗 - PECAM-1 (DAKO - CD31、JC/70A) (DakoM823)、ダコ (Dako)・コーポレーション、米国; 抗 - サイトケラチン (マウスモノクローナル CY

50

90、シグマ、米国)抗-マウス IgF(ab')2断片 FITC-コンジュゲート(宿主ヒツジ)、ヒツジ抗-ウサギ IgHRP-コンジュゲート(シレナス(Sileneus)DDAF)、シレナス、オーストラリアおよび抗-平滑筋ミオシン(ウサギポリクローナル)、ウェスタンオーストラリア、パース、スパロー教授(M Sparrow)により提供された。

#### 実施例 1

##### 白血球活性への2-メトキシエストラジオールの効果

白血球の活性化は喘息の病理の特徴である。チューブリンのコリチシン結合部位への2-メトキシエストラジオールの結合は食菌およびロコモーションなどの白血球機能と相互作用する可能性を高める。

2-メトキシエストラジオールの機能的な効果はヒト末梢血から得た多形核白血球(PMN)および接着性単球に関して調べた。スーパーオキシドアニオンの産生はスーパーオキシドジムスターーゼにより-チトクロムCの感作減退によって決定された(スチュアートおよびハリス(Harris)、1992)。ミエロペルオキシダーゼの放出をテトラメチル-ベンジジンの酸化によって決定した(メネガッチ(Menegazzi)ら1992)。食菌作用をチモサン粒子の放射性ヨウ素化によって決定した(シェルトン(Shelton)およびホスキング(Hosking)、1975)。

モルモット腹膜マクロファージを回収し、ついで本発明者らの以前の研究により培養した(スチュアートおよびフィリップス(Phillips)、1989)。細胞を走化性トリペプチド、ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン(fMLP、100nM)、チモサン(400μg/ml)またはホルボールミリストートアセテート(PMA、100nM)を含む刺激剤で2-メトキシエストラジオール(10μM)の存在下または不在下で30分間インキュベートした15分後に刺激剤を加えた。スーパーオキシドアニオンをチトクロムcのスーパーオキシドジムスターーゼ感受性還元により決定し(スチュアートおよびハリス、1992)、およびプロスタサイクリンの安定代謝物である6-オキソ-PFGIを放射線イムノアッセイにより測定した(スチュアートおよびフィリップス、1989)。すべての個々のインキュベーションは2回同じく行われ、かつ実験は5匹のモルモットからのマクロファージで行われた。

RBL2H3細胞を10%FCS含有RPMI1640において培養し、ついで実験のために24ウェルプレートで継代した。その細胞を48時間リンパ球細胞株分泌抗-DNPオブアルブミン抗体からの50%(w/v)で条件づけた培地とともに感作させた。このインキュベーションの最後の24時間に、[<sup>3</sup>H]-5HT(1μCi/ml)を各ウェルに加えて顆粒アミン保存物を標識した。インキュベーション時間の終了時に、その培地を吸引し、細胞をRPMI1640中で2回洗浄し、ついで15分間2-メトキシエストラジオールの存在下または存在下でRPMI1640(0.25%BSA)中でインキュベーションし、その後DNP-処理したオブアルブミン、A23187またはPMAで上清が回収されるときに30分間刺激し、遠心(1000×g、4、5分)にかけ、ついでアリコートをとり、放出された[<sup>3</sup>H]-5HTの量を決定した。すべての実験は4回行われた。

結果は、2-メトキシエストラジオール(3μM)は表1に示すようにチモサン(400μg/ml)またはfMLPのいずれかで刺激された白血球中のテトラメチル-ベンジジンの酸化を減少させることを示した。fMLPからの無細胞上清はテトラメチル-ベンジジンによって決定されるようなミエロペルオキシダーゼ活性をまた含んだ白血球を刺激するが、この活性は2-メトキシエストラジオールの最も高い濃度(10μM)によってのみ減少する。さらに、実験は精製した西洋ワサビペルオキシダーゼによるテトラメチル-ベンジジンの直接的効果があるか否かを調べるために行われた。2-メトキシエストラジオール(10μM)がこのアッセイにおいて全く無効化であった。結果を図1にまとめる。

表1：ヒト多形核白血球によるテトラメチルベンジジン酸化

	コントロール	fMLP 100nM	チモサン 400μg/ml
基礎	-0.001± 0.002	0.057± 0.021	0.26± 0.009
2-メトキシエストラジオール 3 μM	-0.004± 0.001	0.028± 0.03	0.013± 0.012

データを絶対値での変化として表す。アッセイを0.5mlのバッファー中の $2 \times 10^6$  PMNを用いて行った。

PMNにおいて、fMLP (100nM) またはチモサン (400 μg/ml) に対する応答におけるスーパーオキシドアニオンの産生は10 μMまでの2-メトキシエストラジオールの濃度により減少しなかった。PMNによる粒子を表2に示すように3および10 μMの両方で観察される有意な効果を有する2-メトキシエストラジオールによって減少させた。

表2 ヒト多形核白血球による $^{125}$ Iの取り込み

	PHSなし		PHS*	
	コントロール	チモサン	コントロール	チモサン
基礎	1.80± 0.09	2.83± 0.09	2.13± 0.24	4.33± 0.51
2-メトキシエストラジオール 3 μM	1.97± 0.44	1.97± 0.48	1.87± 0.46	3.27± 0.64
2-メトキシエストラジオール 10 μM	2.05± 0.44	1.80± 0.49	1.75± 0.45	1.65± 0.15

#### \* PHS=保存されたヒト血清

接着性単球においてホルボールミリストアセテート (1 μM) PMA またはチモサン (400 μg/ml) に対する応答中のテトラメチルベンジジンの酸化は10 μMの2-メトキシエストラジオールによって影響されなかった。さらに、PMAへの応答中で産生されるスーパーオキシドアニオンはまたこの細胞型において影響されなかった。しかしながらチモサン-刺激スーパーオキシドアニオンの産生は少なくともドナーのいくつかからの白血球における2-メトキシエストラジオール (10 μM) によって顕著に阻害されるようである。

チモサンまたはfMLPに対するモルモットのマクロファージの応答は図8に示されるように2-メトキシエストラジオールにより減少した。しかしながら、PMA (100nM) に対する応答は影響されなかった。さらに、6-オキソ-PGF1 $\alpha$ 産生におけるfMLP (100nM) - 誘発増加は2-メトキシエストラジオールによって完全に阻害される一方、PMAに対する応答は50%のみ減少し、ついでチモサンは図9に示すようにプロスタサイクリン代謝物のレベルにおいて増加を刺激しなかった。

オブアルブミン (DNP-OA) は図10に見られるように10 μMの2-メトキシエストラジオールにより減少される [ $^3$ H] - 5HTの濃度依存性放出を引き出す。しかしな

10

20

30

40

50

がら、図11に示すように [<sup>3</sup>H] - 5HTの基礎的放出およびPMA (100nM) またはカルシウムイオン透過担体A23187 (10μM) のいずれかに対する応答中の放出は2-メトキシエストラジオールによって影響されなかった。

PMNミエロペルオキシダーゼ放出および活性、食菌作用低減への2-メトキシエストラジオールの阻害効果はその化合物がイン・ビボでの抗-炎症性効果を有することを示している。チモサン-刺激スーパー・オキシドアニオン産生の選択性的阻害はこの食菌刺激に及ぼす特定の効果を示唆している。マクロファージ昨日への阻害効果を示しているこれらの観察および本発明者らの実験は喘息および他の慢性的気道疾患障害、特に証明可能なPMN関与において利益があり、抗-免疫の明らかな証拠の特性を提供している。

## 実施例 2

10

## DNA合成に及ぼす2-メトキシエストラジオールの効果

ヒト培養気道平滑筋細胞を0.3-10μMの2-メトキシエストラジオールと共に30分間インキュベートした後、マイトジエンを付加し、ついで実験のノ故意28時間中、図2aにおいて示すように、 [<sup>3</sup>H] - チミジンのトロンビン (0.3U/ml) - 刺激性取り込みの濃度依存的な減少を引起す。使用した2-メトキシエストラジオール (10μM) の最も高い濃度で、トロンビンに対する応答はコントロールレベルの約10%に減少した。この2-メトキシエストラジオールがDNA合成に及ぼす効果をトロンビンの存在に限定されなかった。というのは2-メトキシエストラジオールの類似の濃度関連阻害がウシ胎児血清 (FCS、1%v/v) または塩基性纖維芽細胞増殖因子 (bFGF、300pM) (図2aおよび2b) のいずれかで刺激された細胞中で観察された。しかしながらEGF (3nM) または10%FCSの存在下でのDNA合成をトロンビン、bFGFまたはFCSの低濃度に対する応答より有意に低い程度に阻害された (図2c)。10%FCS ( [<sup>3</sup>H] - チミジン取り込みの刺激されていないレベルより27.2±7.8倍多い) に対するDNA合成は、0.3U/mlトロンビン (8.4±3.1倍)、3nM EGF (4.5±0.7倍) または1%FCS (12.7±0.4倍) に対する応答より有意に多大である (0.05<、t-スチューデントの両検定) が、300pM bFGF (22.5±5.3倍) に対する応答とは有意に異なる。

時間経過実験もまた、マイトジエンを暴露した後、2-メトキシエストラジオールの付加がDNA合成をなお阻害するか否か決定するために行われる。トロンビン (0.3U/ml) - 刺激DNA合成は、2-メトキシエストラジオール (3μM) をトロンビン付加の2時間後に最大の阻害が見られた後のトロンビン付加の4時間後まで加えられる場合に阻害された。トロンビンの阻害が少なくなった後 (~20%) 4~14時間2-メトキシエストラジオールの添加は、18時間でまたはそれより後の添加は、図2DNAにおいて示されるように、このマイトジエンの存在下でDNA合成に全く影響を及ぼさなかった。引き続き、さらなる時点が試験され、ついでこれらの実験は2-メトキシエストラジオールが自発的またはトロンビン付加の1時間後のいずれかで添加されるがトロンビン付加 (図2d) の6時間後まで固執して有意な阻害が見られた。

## 実施例 3

20

## タンパク質合成および細胞数への2-メトキシエストラジオールの影響

DNA合成の阻害がまた、有糸分裂の細胞周期進行および阻害を停止する結果となることを決定するために、マイトジエンとのインキュベーションの48時間後にタンパク質合成および細胞数の両方を測定した。トロンビン (0.3/m1、FCS (10%v/v) ) またはbFGF (300pM) の存在下での [<sup>3</sup>H] - ロイシン取り込み阻害のための濃度閾値は、 [<sup>3</sup>H] - チミジン取り込みの阻害から生じるものと類似であった。約30%応答の最大のパーセンテージの減少はDNA合成と共に観察される値より少なく、3μMであった。10μMでは図3に示すようにトロンビンまたはbFGFの存在下での有意な抑制効果を持たなかった。2-メトキシエストラジオール単独は0.3μMで [<sup>3</sup>H] - ロイシン取り込みのわずかな刺激を引き起こした。濃度が高いほど (1および3μM) はわずかな阻害効果しか持たず、10μMでは全く効果が無かった。これらの結果は表3にまとめてある。対照的に、FCS (1%、v/v) またはbFGF (300pM) のいずれかに

30

40

50

応答した細胞数における増加は、図 4 a、4 bにおいて示されるように  $3 \mu M$  で観察している増殖であった。

表3. 刺激されていない無漂白の平滑筋細胞におけるタンパク質合成への 2-メトキシエストラジオールの及ぼす影響

2-メトキシエストラジオール ( $\mu M$ )	$[^3H]$ - ロイシン取り込み (コントロール%)
	平均 $\pm$ SEM
	100
0.3	135 $\pm$ 3 *
1.0	84 $\pm$ 4 *
3.0	77 $\pm$ 3 *
10.0	113 $\pm$ 9

10

20

30

\* 100%に比較したスチューデントの t 検定の両検定 ( $p < 0.05$ ) (前処理なし)

#### 実施例 4

平滑筋細胞中におけるセロトニン刺激された  $[^3H]$  - ロイシン取り込み  $0.1 nM \sim 10 \mu M mg / ml$  での濃度でのセロトニン (5HT) は  $[^3H]$  - チミジン取り込みに全く影響を及ぼさなかつたが、  $10 nM$  の 5HT は  $[^3H]$  - ロイシン取り込みを増加させた。  $0.3 \sim 10 \mu M$  の 2-メトキシエストラジオールでの前もってのインキュベーションは表 4 にまとめたように濃度依存性のやり方でタンパク質合成において 5HT ( $10 nM$ ) - 刺激による増加を減少させた。

表4. 5 HT-刺激平滑筋細胞におけるタンパク質合成速度への2-エストラジオールが及ぼす効果

2-メトキシエストラジオール ( $\mu$ M)	$[^3\text{H}]$ ロイシン取り込み (コントロール%)	
-	100	10
0.3	91±5	
1.0	62±2*	
3.0	56±2*	
10.0	51±6*	

\* 100%に比較したスチューデントのt検定の両検定 ( $p < 0.05$ ) (前処理なし)

#### 実施例 5

##### 2-メトキシエストラジオールの形態学的效果

通常は紡錘型をした細胞の丸い外形の発現を含む形態学上の変化は3および10  $\mu$ Mの濃度の2-メトキシエストラジオールで観察された。形の変化は相対的に開始から迅速であり、6時間以内に観察され、その変化はインキュベートが続く間中維持された。これらの形の変化はコルチシン(0.1-10  $\mu$ M)などの微小管の集合の媒体で細胞をインキュベートすることによって引き出されるものと同様である。ステロイド受容体アンタゴニスト RU 486は[スチュアートら、1995b]、コルチシンまたは2-メトキシエストラジオールのいずれかに応答する形の変化を減少させるが、2-メトキシエストラジオールによるDNA合成の阻害には全く影響を及ぼさない。これらの結果を図5に説明する。

#### 実施例 6

##### 2-メトキシエストラジオールの類似体の効果

2-メトキシエストラジオールに関連したいくつかの化合物を、親化合物である17-エストラジオールおよび直前の前駆体、2-ヒドロキシエストラジオールを含むFCS(1%, v/v)-刺激DNA合成の阻害のために調べた。これらの化合物個々の低い濃度は図6に示すようにFCS(1%)-刺激DNA合成を増強した。高濃度で、その増強は逆転し、ついで阻害がこれらの10  $\mu$ Mの化合物で観察された。2-ヒドロキシエストラジオール(10  $\mu$ M)の阻害効果を2-メトキシエストラジオール(10  $\mu$ M)に等量であった。2相効果が2-メトキシエステロンおよび2-メトキエストリオールを含む類似体とともに観察され、それは3  $\mu$ Mまでの濃度でトロンビン刺激DNA合成を増強したが、図7に示すように10  $\mu$ Mで増強のレベルが衰退した。タンパク質合成への17-エストラジオールオリゴヌクレオチドおよび2-ヒドロキシエストラジオールの効果を表5に示す。

10

20

30

40

表5. 非刺激平滑筋細胞における2-メトキシエストラジオールのタンパク質合成への効果

濃度	[ <sup>3</sup> H] - ロイシン取り込み (コントロール%)					
	17 $\beta$ -エストラジオール			2-ヒドロキソエストラジオール		
平均 $\pm$ SEM			平均 $\pm$ SEM			10
	100		100			
0.3	103	$\pm$	6	107	$\pm$	3
1.0	89	$\pm$	4	94	$\pm$	10
3.0	87	$\pm$	6	56	$\pm$	8*
10.0	100	$\pm$	9	51	$\pm$	10*

20

\* 100%に比較したスチューデントのt検定の両検定 ( $p < 0.05$ ) (前処理なし)

本発明者らは本明細書中で2-メトキシエストラジオール(以前には不活性であると考えられていた17 $\beta$ -エストラジオールの天然代謝物)が抗-炎症活性を有し、かつヒト気管支から培養された気道平滑筋細胞のDNAおよび連続した分割を阻害することを示した。

抗-炎症性特性は、例えば喘息の治療、および他の慢性の傷害性起動疾患、特にPMNに関連がなかった。

DNA合成への阻害効果は、細胞毒性の結果ではない。というのは、2-メトキシエストラジオール(10 $\mu$ M)の最高濃度および培養皿から細胞のインキュベーションにより変化せず、この濃度において、細胞培養皿からの細胞の分離は全く見られなかった。観察された利点に関する任意に提案されたメカニズムによって結合されることを望まないならば、DNA合成の阻害を最大に引き起こす細胞周期のG1相(有糸分裂2.0時間後)の初期においてステロイドが細胞を阻害することを可能にしている。2-メトキシエストラジオールの有糸分裂後の付加が抗-増殖効果を含むか否かを確立させることができたままである。2-メトキシエストラジオールはbFGF、トロンビンおよび同様の可能性を有するFCS(1%)に対する応答を阻害し、そのことはその効果は全くマイトジエンに特異的ではないことを示している。この観察は2-メトキシエストラジオールがこれらのマイトジエンの個々によって使用された初期の細胞内シグナル工程で作用することを示す。

それにもかかわらず、DNA合成に及ぼす阻害効果は、2-メトキシエストラコールで前もってインキュベートすることによってほとんど有意には阻害されないでいるFCS(10%)のいっそう高い濃度で克服可能であった。この耐性は一層高濃度のFCSに対する多大な応答によって説明され得るが、同様の議論はマイトジエンがEGF(トロンビンによって引き出されるよりも一層小さな応答を引き出す)、FCS(1%)またはbFGFである場合に阻害に対する耐性に関してなされることはできない。しかしながら、EGFおよび10%FCSの増殖効果は2-メトキシエストラジオールによって阻害されるべきである。しかし本発明者らはDNA合成の阻害を細胞増殖の阻害に結合させる証拠を全く有していない。しかしながら、後者の効果は2-メトキシエストラジオールの低濃度で観察されるという事実が、2-メトキシエストラジオールによってDNA合成以外の作用が

30

40

50

その抗 - 増殖作用にも貢献しているのである。2 - メトキシエストラジオールのいくつかの類似体は、それらが抗 - 増殖効果と共有しているか否かを決定するために調べられた。両者の親化合物 17 - エストラジオールおよび直前の前駆体、2 - ヒドロキシエストラジオールは低濃度で F C S (1 %) に対する応答で D N A 合成を増加させ、ついで 3 および 10  $\mu$  M で D N A 合成を阻害した。D N A 合成におけるこれらの変化が細胞増殖における変化に対応しているか否かはいまだ確立されていない。2 - メトキシエステロンおよび 2 - メトキシエストリオールによるトロンビン刺激 D N A 合成の増強は、高濃度での低い効果と共にベル型の濃度応答曲線を示す。集合的には本発明者らは 2 - メトキシエストラジオールが調べた類似体のうち、最も可能性のあるものであり、内皮細胞の増殖応答に関する初期の観察と一致する [ フォトシス (Fotsis) ら、1994]。

親化合物 17 - エストラジオールと活性化合物へと代謝物を誘発する薬剤を投与することも可能である。例えば、p 450 チトクロムの誘発剤およびカテコラミンメチルトランスフェラーゼの誘発剤を使用するかもしれない。アリールサルファターゼもまた考慮されるかもしれない。

2 - メトキシエストラジオールの抗 - 増殖効果およびタンパク質合成における 5 H t - 誘発増加を減少させる能力は可塑的であり抗 - 過剰栄養効果を両方示している。喘息気道において可塑性および過剰影響に関する抗い難い証拠が存在し [ エビナラ、1993]、A H R の減少の大部分を説明する [ ジェームス (James) ら、1989]。A H R における減少はいくつかの喘息における徴候の完全な解明に関係している [ プラット - ミルズ (Platts-Mills) ら、1987]。さらに、喘息におけるモデルを再構築する気道壁に示す構造上の変化のすべては気道の平滑筋における増加が最も重要であると考えられる [ ペア (Pare) およびバイ (Bai) 、1995]。従って、2 - メトキシエストラジオールなどの化合物は、気道平滑筋の増殖応答を阻害するものであり、それゆえ喘息の徴候を減少させる。さらに、2 - メトキシエストラジオールの抗 - 血管形成活性 [ フォトシスら、1994] は再構築応答を制限するようである。というのは、再構築に対する血管形成成分が存在することが確実であるからである [ クワノ (Kuwano) ら、1993]。この血管形成が増大した組織重量の代謝の必要性を指示するために必要であるようである。それゆえ、血管形成の妨害は 2 - メトキシエストラジオールの平滑筋および他の細胞型へ及ぼす直接的な任意の阻害効果と独立して再構築応答を停止させるかもしれない。

2 - メトキシエストラジオールの他の多数の特性は、喘息の治療における治療上の利益であるようなものであり、微小管の形成を破壊できるような確立した能力を含み [ ダマト (D'Amato) ら、1994]、それは巨大細胞、マクロファージおよび好中球からの炎症性媒介体の細胞外放出を減少させるかもしれない。

本発明者らのデータは 2 - メトキシエストラジオールが抗原 - 誘発巨大細胞分解を阻害することを示す。この活性は、広範囲なアレルギー状態 (アレルギー性鼻炎およびアトピー性皮膚炎状態を含む) における 2 - メトキシエストラジオールの使用を支持する。モルモット腹膜マクロファージ活性の f M P L による阻害は、f M L P が食菌作用より G - タンパク質結合受容体  $\gamma$  活性化するので、2 - メトキシエストラジオールの作用が細胞骨格と関連した事象を超えて広がるかもしれないことを示している。

さらに、2 - メトキシエストラジオールの抗 - 酸化活性はまた利益である。というのは、気道の炎症に関連する 3 つの重要な炎症性細胞型は個々に大量の酸素ラジカルを産生する能力を有し、一酸化窒素は重要な酸化の傷害を引起すかもしれない。これらの活性はまた、慢性障害性起動疾患の治療における 2 - メトキシエストラジオールの使用を支持し、酸素ラジカルの重要な役割は確立され、気道壁再構築の証拠が存在する [ クワノら、1998]。最終的に、いくつかの実験は 2 - メトキシエストラジオールオリゴヌクレオチドおよび関連化合物は平滑筋にカルシウム流入を減少させる [ ゴヤチエら、1995]、気道平滑筋が証明された場合、喘息における気管支痙攣を解消するであろう。

実施例は明瞭性および理解の目的のために幾分詳細に記載されているが、それらの例はガイドラインにすぎない。当業者は本明細書に記載されている態様に多様な変更および改変が本発明の範囲から逸脱せずにされるであろうことを認識するであろう。

10

20

30

40

50

本明細書に引用した参考文献を以下のページに挙げる。

参考文献

Aizu-Yokotta, E., Susaki, A. & Sato, Y. (1995). Natural estrogens induce modulation of microtubules in chinese hamster V79 cells in culture. *Cancer Research*, 55, 1863.

Brewster, C.E.P., Howarth, P.H., Djukanovic, R., Wilson, J., Holgate, S.T. & Roche, W.R. (1990). Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am. J. respir. Cell Mol. Biol.* 3, 507.

10

Goyache, F.M., Gutierrez, M., Hidalgo, A. & Cantabrana, B. (1995). Non-genomic effects of catecholestrogens in the *in vivo* rat uterine contraction. *General Pharmacology*, 26, 219.

20

D'Amato, R.J., Lin, C.M., Flynn, E., Folkman, J. & Hamel, E. (1994). 2-Methoxyoestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 91, 3964.

30

Dunhill, M.S., Massarella, G.R., Anderson, J.A. (1969). A comparision of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in *status asthmaticus*, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax*. 24, 176.

Ebina, M., Takahashi, T., Chiba, T., Motomiya, M. (1993). Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscle underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am. Rev. Resp. Dis.* 148, 720.

40

Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M.S., Adlecrutz, H., Montesano, R., Nawroth, P. & Schweiger, L. (1994). The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature*, 368, 237.

Frigas, E., Motojima, S. & Gleich, G.J. (1991). The eosinophilic injury to the mucosa of the airways in the pathogenesis of bronchial asthma. *Eur J Respir Dis.*, 13, 123S.

Hirst, S.J., Barnes, P.J., Twort, C.H.C. (1992). Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum and platelet-derived growth factor. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 7, 574.

James, A.L., Pare, P.D., Hogg, J.C. (1989). The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 139, 242,

Klauber, N., Panangi, S., Flynn, E., Hanel, E. & D'Amato, R.J. (1997) Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyoestradiol and taxol. *Cancer Research* 57: 81-86.

Kuwano, K., Bosken, C.H., Pase, P.D., Bai, T.R., Wiggs, B.R. & Hogg, J.C. (1993). Small airways dimensions in asthma and chronic airway obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 148, 1220.

Lottering, M.L., Haag, M. & Seegers, J.C. (1992).

Effects of 17- $\beta$ -oestradiol metabolites on cell cycle events in MCF-7 cells. *Cancer Research*, 52, 5926.

Lungren, R., Soderberg, M., Horstedt, P. and Stenling, R. (1988). Morphological studies on bronchial mucosa biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur. Respir. J.*, 1, 883.

10

Menegazzi, R., Zaborchi, G., Knowles, A., Cramer, C. and Patrarca, P. (1992). A new one-step assay on whole cell suspensions for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils. *J. Leuk-Biol.* 52:612.

20

Merriam, G.R., Machusky, N.J., Picard, M.K. & Naftolin, F. (1980) Comparative properties of the catecholestrogens, I: methylation by catechol-O-methyltransferase and binding to cytosol estrogen receptors. *Steroids*, 36: 1-11.

Nishigaki, I., Sasguri, Y. & Yagi, K. (1995). Anti-proliferative effect of 2-methoxyoestradiol on cultured smooth muscle cells from rabbit aorta. *Atherosclerosis*, 113, 167.

30

Pare, P. & Bai, T.R. (1995). The consequences of chronic allergic inflammation. *Thorax*, 50, 328.

Platts-Mills, T.A.E. & Chapman, M.D. (1987). Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 80, 755.

40

Rosner, W., Hryb, D.J., Khan, M.S., Nakhla, A.M. & Ronmas, N.A. (1991). Sex-hormone binding globulin: anatomy and physiology of a new regulatory system. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 40, 813.

Shelton, M.J and Hosking S. (1975) Neutrophil and Opsonic function in children with recurrent infections I. Neutrophil iodination. *Aust. J. Med. Tech.* 6:54.

10

Sotomayor, H., Badier, M.M Vervloet, D., Orehek, J. (1984). Seasonal increase of carbachol airway responsiveness in patients allergic to grass pollen. Reversal by corticosteroids. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 130, 56.

20

Spink, D.C., Hayes, C.L., Young, N.R., Christou, M., Sutter, T.R., Jefcoate, C.R. & Gierthy, J.F. (1994). The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of a novel 17-beta estradiol 4-hydroxylase. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 51, 251.

30

Stewart AG, and Harris T. (1992). Adenosine inhibits platelet-activating factor but not tumour necrosis factor  $\alpha$ -induced priming of human neutrophils. *Immunology* 78:152-158.

40

Stewart AG, Tomlinson PRT & Wilson JW. (1995a). Regulation of airway wall remodelling: prospects for the development of novel anti-asthma drugs. *Advances in Pharmacology* 33, 200.

Stewart AG, Fernandes DJ, & Tomlinson PRT. (1995b). Glucocorticoids inhibit mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 116, 3219.

Stewart, A.G. & Phillips, W.A. (1989) Intracellular platelet-activating factor regulates eicosanoid generation in guinea-pig peritoneal macrophages. *British Journal of Pharmacology*, 98: 141-148. 10

Stewart AG, Tomlinson PR, Fernandes DJ, Wilon J and Harris T (1995c). Tumour necrosis factor  $\alpha$  modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle. *AM. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12, 110. 20

Stewart AG, Tomlinson PRT, & Wilson, J. (1993). Airway wall remodelling in asthma: a novel target for the development of anti-asthma drugs. *Trends in Pharmacological Sciences* 14, 275.

Stewart AG, Schachte L & Tomlinson PR. (1997). Regulation of airway smooth muscle proliferation by  $\beta_2$ -adrenoceptor agonists. In: (Ed. AG Stewart) *Airway wall remodelling in the pathogenesis of asthma*. CRC Press. Boca Raton, chapter 11 pages 295-335. 30

Tomlinson PRT, Wilson J & Stewart AG. (1994). Inhibition by salbutamol of the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture. *British Journal of Pharmacology* 111, 641. 40

Tomlinson PRT, Wilson JW & Stewart AG. (1995). Salbutamol inhibits the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture: relationship to elevated cAMP levels. *Biochemical Pharmacology* 49, 1809.

Wahedna, I Wong, C.S. Wisniewski, A.F.Z., Pavord, I.D. & Tattersfield, A.E. (1993). Asthma control during and after cessation of regular  $\beta_2$ -agonist treatment. *Am Rev Respir Dis.*, 148, 707.

10

Zhang, Z & Davis, D.L. (1992). Cell-type specific responses in prostaglandin secretion by glandular and stromal cells from pig endometrium treated with catecholestrogens, methoxyestrogens and progesterone. *Prostaglandins*, 44, 53-64.

20

【図1】  
テトラメチルベンジンの西洋ワサビペルオキシダーゼ (0.035 U/ml) 阻  
塞性化  
吸収における変化 (単位/秒)

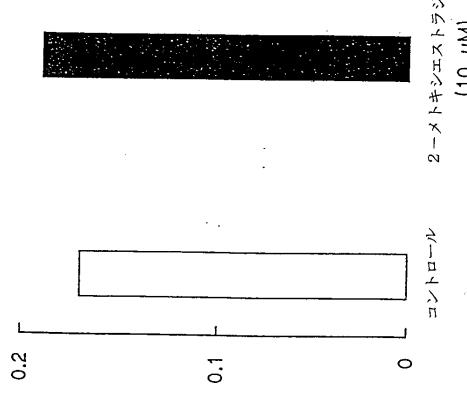


Figure 1

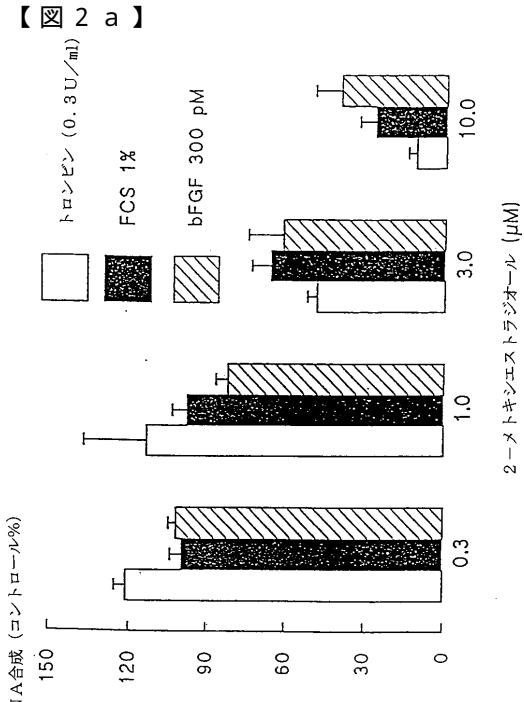


Figure 2a

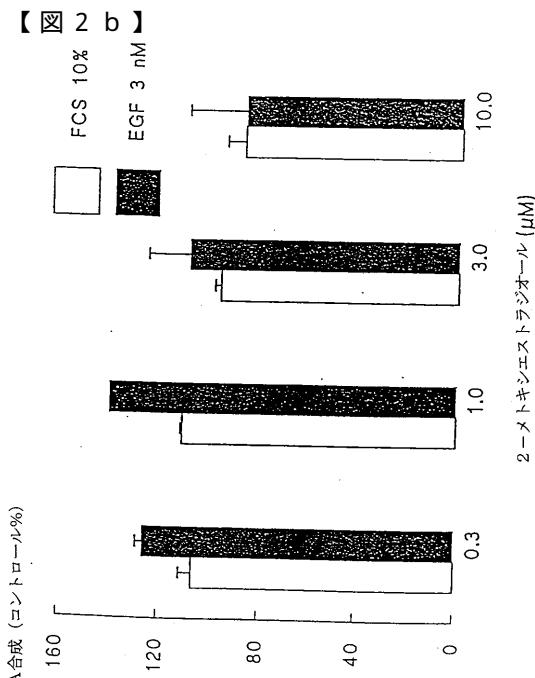


Figure 2b

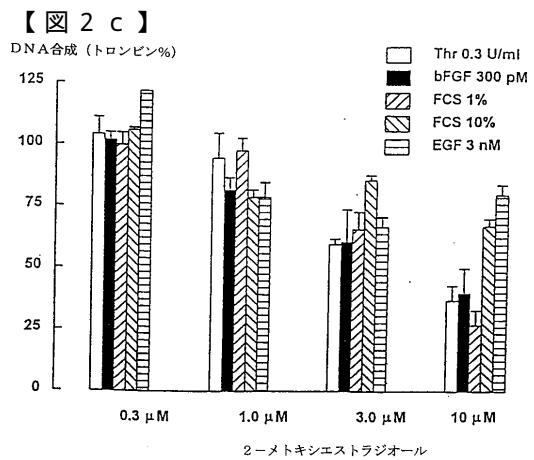


Figure 2c

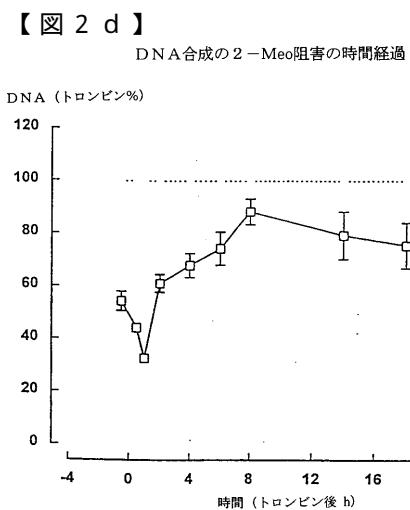


Figure 2d

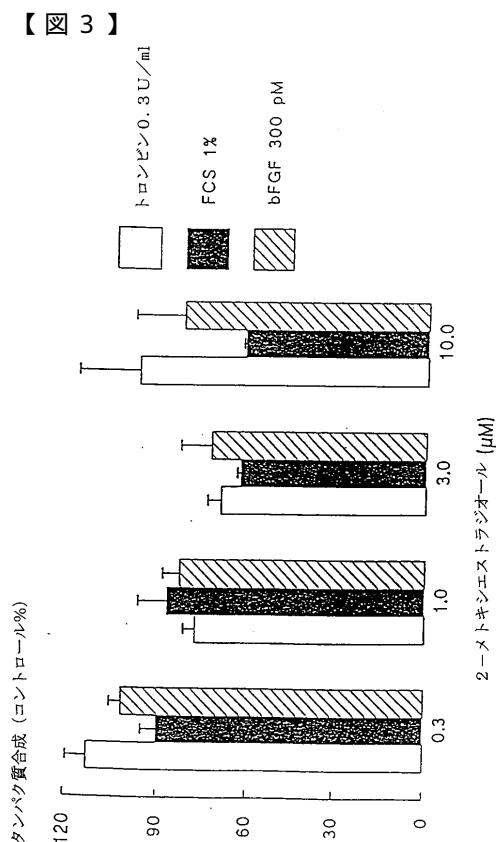


Figure 3

【図4a】

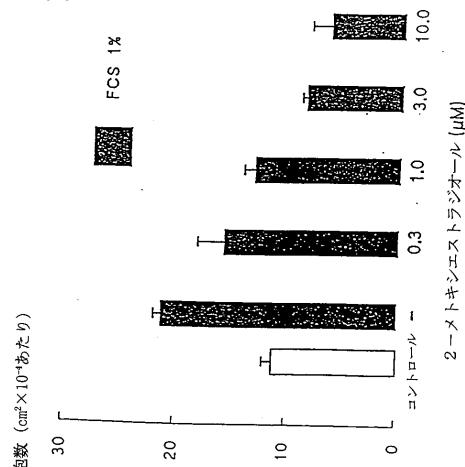


Figure 4a

【図4b】

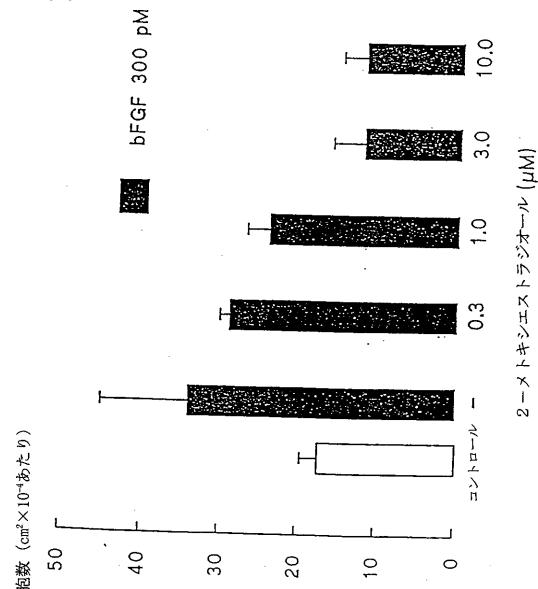


Figure 4b

【図5】

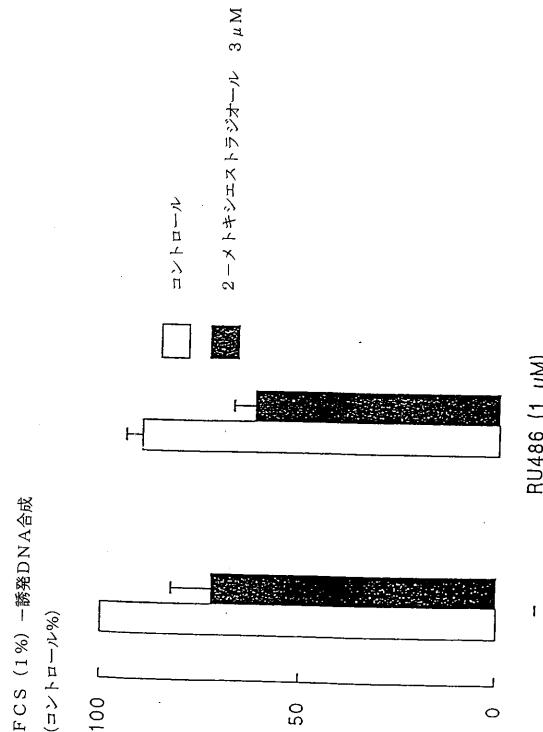


Figure 5

【図6】

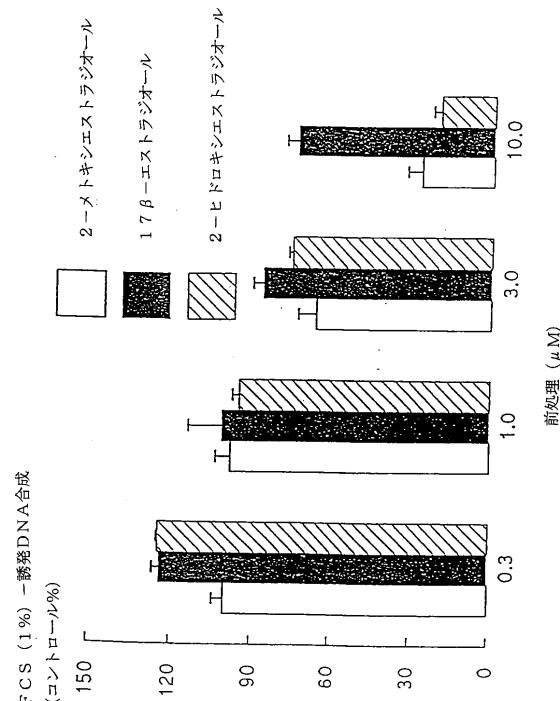


Figure 6

【図7】

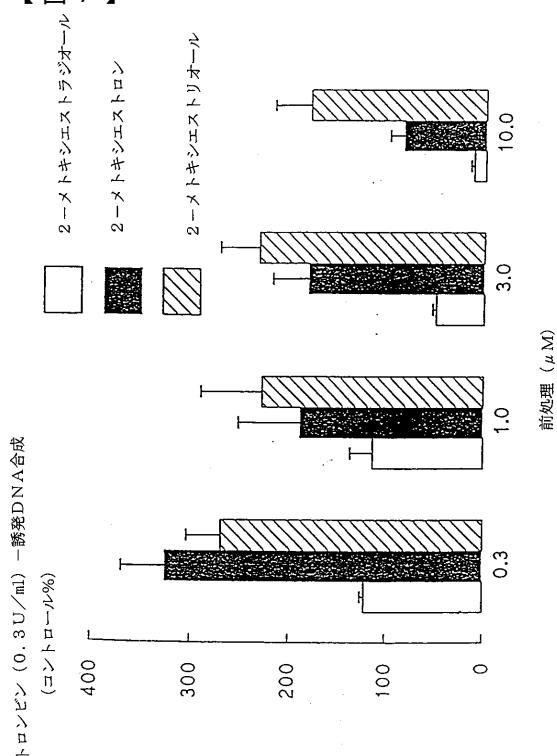


Figure 7

【図8】

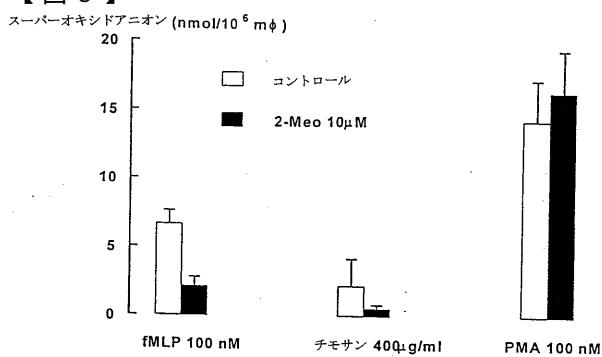


Figure 8

【図9】

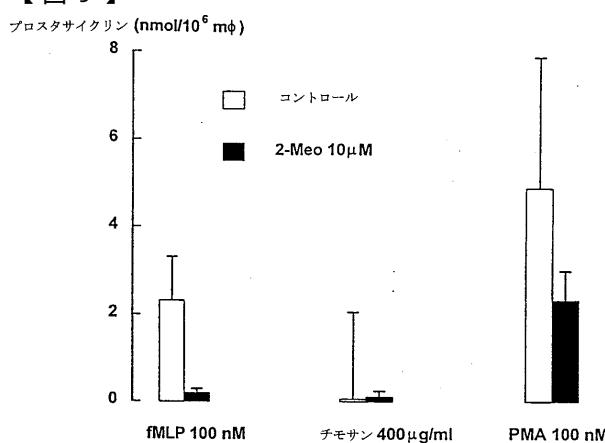


Figure 9

【図10】

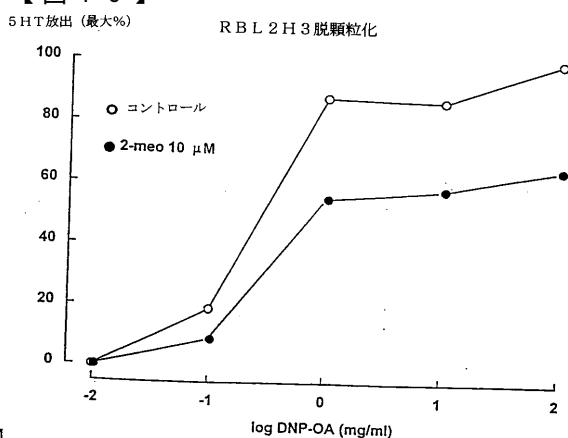


Figure 10

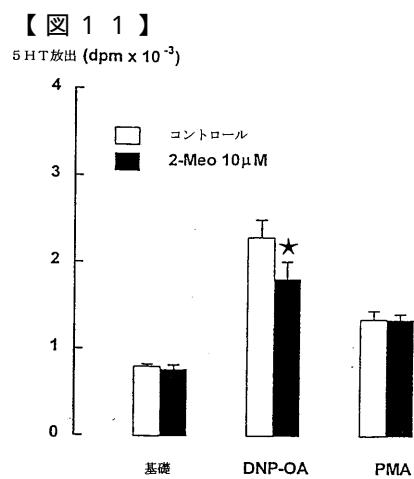


Figure 11

---

フロントページの続き

審査官 斎藤 恵

- (56)参考文献 LEE, H.J. et al, Anti-inflammatory steroids: research trends and new compounds, Drugs of Today, 1989年, Vol.25, No.9, pp.577-588  
RICHARDS, I.M. et al., Novel steroid-based inhibitors of lung inflammation, Clinical and Experimental Allergy, 1992年, Vol.22, pages 432-439  
FOTSIDIS T. et al. , The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth, NATURE, 1994年 3月17日, Vol. 368, No. 17, pages 237 - 239

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A61K 31/00 - 566  
A61P 11/00 - 06  
CAplus(STN)  
REGISTRY(STN)