

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6181188号
(P6181188)

(45) 発行日 平成29年8月16日 (2017. 8. 16)

(24) 登録日 平成29年7月28日 (2017. 7. 28)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/724 (2006. 01)	A 6 1 K 31/724
A 6 1 P 11/00 (2006. 01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 11/06 (2006. 01)	A 6 1 P 11/06

請求項の数 24 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2015-533384 (P2015-533384)	(73) 特許権者	515081279
(86) (22) 出願日	平成24年9月27日 (2012. 9. 27)		ソールエアロメッド インク.
(65) 公表番号	特表2015-531352 (P2015-531352A)		カナダ国、ティー2エル 2ケイ8 アル
(43) 公表日	平成27年11月2日 (2015. 11. 2)		バータ、カルガリー、3535 リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2012/050680		ロード ノースウェスト、ユニバーシテ
(87) 国際公開番号	W02014/047715		ィ リサーチ センター、ユニット 11
(87) 国際公開日	平成26年4月3日 (2014. 4. 3)	(74) 代理人	100104411
審査請求日	平成27年9月24日 (2015. 9. 24)		弁理士 矢口 太郎
		(72) 発明者	アムレイン、マティアス ダブリュー.
			カナダ国、ティー3エイチ 1エイチ5
			アルバータ、カルガリー、15 ストラン
			レアー プレイス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コレステロール捕捉シクロデキストリンを用いた肺表面活性物質機能障害の治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肺表面活性物質への酸化的損傷に起因する肺表面活性物質機能障害を有する患者を治療するための薬学的組成物であって、表面活性物質保護量のシクロデキストリンまたはその誘導体を有する、薬学的組成物。

【請求項 2】

請求項 1 記載の薬学的組成物において、前記患者は、ショック性、細菌性、ウイルス性および院内性の肺炎、人工呼吸器により誘発された肺損傷 (V I L I)、誤嚥、全身性炎症反応症候群 (S I R S)、または毒性ガス、蒸気、煙霧および微粒子の吸入を含む原因による急性肺損傷 (A L I) または急性呼吸窮迫症候群 (A R D S) を患っている薬学的組成物。

【請求項 3】

請求項 1 記載の薬学的組成物において、前記患者は、喘息、嚢胞性線維症 (C F)、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、または毒性ガス、蒸気、煙霧および微粒子の吸入、治療に対し反応を示さない乳児呼吸窮迫症候群 (I R D S)、またはニーマンピック病を含む気道損傷を患っている薬学的組成物。

【請求項 4】

請求項 1 記載の薬学的組成物において、前記シクロデキストリンはメチルーβ-シクロデキストリン (MβCD) またはその誘導体である薬学的組成物。

【請求項 5】

請求項1記載の薬学的組成物において、前記シクロデキストリンは2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンまたはその誘導体である薬学的組成物。

【請求項6】

請求項1記載の薬学的組成物において、前記酸化的損傷は活性酸素種（ROS）またはそれら誘導体の存在に起因するものである薬学的組成物。

【請求項7】

請求項6記載の薬学的組成物において、前記ROSは過酸化物質またはヒドロキシルラジカルである薬学的組成物。

【請求項8】

請求項6記載の薬学的組成物において、前記ROSの誘導体はペルオキシ亜硝酸である薬学的組成物。

10

【請求項9】

肺表面活性物質への酸化的損傷に起因する肺表面活性物質機能障害を有する患者を治療するための薬学的組成物であって、表面活性物質および表面活性物質保護量のシクロデキストリンまたはその誘導体を有する、薬学的組成物。

【請求項10】

請求項9記載の薬学的組成物において、前記シクロデキストリンはメチル-β-シクロデキストリン（MβCD）またはその誘導体である薬学的組成物。

【請求項11】

請求項9記載の薬学的組成物において、前記シクロデキストリンは2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンまたはその誘導体である薬学的組成物。

20

【請求項12】

肺表面活性物質への酸化的損傷に起因する肺表面活性物質機能障害を有する患者を治療するための薬学的組成物であって、表面活性物質およびシクロデキストリンまたはその誘導体を有し、前記シクロデキストリンまたはその誘導体は、患者に投与される場合に前記表面活性物質の能力が強化されるように、コレステロールを捕捉するように構成される、薬学的組成物。

【請求項13】

請求項12記載の薬学的組成物において、前記表面活性物質は、酸化の影響から当該表面活性物質を保護することで強化されるものである薬学的組成物。

30

【請求項14】

請求項12記載の薬学的組成物において、前記表面活性物質は不飽和リン脂質を有し、前記表面活性物質は酸化の影響から前記不飽和リン脂質を保護することで強化されるものである薬学的組成物。

【請求項15】

請求項12記載の薬学的組成物において、前記シクロデキストリンはメチルβ-シクロデキストリン（MβCD）またはその誘導体である薬学的組成物。

【請求項16】

請求項12記載の薬学的組成物において、前記シクロデキストリンは2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンまたはその誘導体である薬学的組成物。

40

【請求項17】

請求項12記載の薬学的組成物において、前記表面活性物質の表面張力は、前記シクロデキストリンまたはその誘導体と結合する前の当該表面活性物質と比較して、前記シクロデキストリンまたはその誘導体と結合した場合に減少するものである薬学的組成物。

【請求項18】

請求項12記載の薬学的組成物において、前記シクロデキストリンまたはその誘導体は脂質またはコレステロールを水溶液に溶解するものである薬学的組成物。

【請求項19】

多価不飽和リン脂質と、肺表面活性物質における多価不飽和リン脂質の酸化の効果を軽減させるシクロデキストリンまたはその誘導体とを有する治療的に有効な量の肺表面活性

50

物質を有する、呼吸窮迫症候群を有する患者を治療するための薬学的組成物を製造するための、多価不飽和リン脂質と、肺表面活性物質における多価不飽和リン脂質の酸化の効果を軽減させるシクロデキストリンまたはその誘導体とを有する治療的に有効な量の肺表面活性物質の使用。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 記載の使用において、前記シクロデキストリンはメチル β -シクロデキストリン (M β C D) またはその誘導体である使用。

【請求項 2 1】

請求項 1 9 記載の使用において、前記シクロデキストリンは 2 -ヒドロキシプロピル β -シクロデキストリンまたはその誘導体である使用。

10

【請求項 2 2】

請求項 1 記載の薬学的組成物において、前記薬学的組成物はエアロゾル形態である薬学的組成物。

【請求項 2 3】

請求項 1 9 記載の使用において、前記患者は、ショック性、細菌性、ウイルス性および院内性の肺炎、人工呼吸器により誘発された肺損傷 (V I L I)、誤嚥、全身性炎症反応症候群 (S I R S)、または毒性ガス、蒸気、煙霧および微粒子の吸入を含む原因による急性肺損傷 (A L I) または急性呼吸窮迫症候群 (A R D S) を患っている使用。

【請求項 2 4】

請求項 1 9 記載の使用において、前記患者は、喘息、嚢胞性線維症 (C F)、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、または毒性ガス、蒸気、煙霧および微粒子の吸入、治療に対し反応を示さない乳児呼吸窮迫症候群 (I R D S)、またはニーマンピック病を含む気道損傷を患っている使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、表面活性物質、特に肺表面活性物質を強化する方法、ならびに表面活性物質強化剤、特に肺表面活性物質強化剤を生産する方法に関するものである。本発明はまた、表面活性物質強化剤および表面活性物質、特に肺表面活性物質を強化するための強化剤の使用に関するものである。さらに、本発明は、シクロデキストリンのようなコレステロール捕捉剤を添加することにより肺表面活性物質への酸化的損傷を軽減する方法に関するものである。最後に、酸化的分解反応の悪影響から表面活性物質を保護するために表面活性物質保護量のコレステロール捕捉剤を投与することにより肺表面活性物質への酸化的損傷に起因する表面活性物質機能障害を有する患者を治療するための方法を提供する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

肺表面活性物質は肺の呼吸器系の内側を覆っている表面活性物質であることが知られている。I I 型肺胞上皮細胞は表面活性物質を産生し、層状体としてそれを保存し、肺胞液相で最後にそれを発現する。そこから、それは空気/水境界面上の分子薄膜として拡散する。それは、呼吸周期において、境界面の表面張力を境界面のその時点での張力に動的に順応することにより、その影響を示す。

40

【0 0 0 3】

肺表面活性物質は呼気終末に肺胞虚脱および肺胞洪水を予防し、抹消気道の開存性を提供し、呼吸に要する労力を軽減する。肺表面活性物質は、不飽和化されるジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C) を多く含んだ (~ 3 0 ~ 4 5 %)、8 0 ~ 9 0 (重量) % のリン脂質から成る。表面活性物質はまた、全リン脂質の多価不飽和種が 1 0 % 以上である報告されたレベルで、5 0 ~ 6 0 % の不飽和リン脂質を含む。表面活性物質はまた 4 つの表面活性物質関連のタンパク質 - S P - A、B、C、および D を含む。肺表面活性物質の極めて高い界面活性状態は、大きな凝集体画分を指し、疎水性タンパク質 S P B および S P C に富む。中性脂肪、主にコレステロールは、表面活性物質の残りの 2 ~ 1 0 %

50

を作り出す。

【0004】

1959年に、早産児の肺における肺表面活性物質の欠乏が呼吸窮迫症候群（RDS）の原因となることが示され、当時は早産児の最も多い死因であった。過去約15年間、ウシまたはブタの肺からの抽出物が、RDSを治療する薬剤として用いられてきた。動物製剤は高価であり、感染症を伝播する危険性を伴う。

【0005】

表面活性物質は、グリセロリン脂質、特定のタンパク質、中性脂肪およびコレステロールから成る。表面活性物質は肺胞表面を覆い、表面張力を減少させ、そのため、生後、肺胞は呼気の間、人体において虚脱することはない。

10

【0006】

表面活性物質の不十分な機能は呼吸不全の原因となる可能性があり、早産児および新生児における乳児呼吸窮迫症候群（IRDS）として、または成人における成人呼吸窮迫症候群（ARDS）として知られている。これらの肺の疾患は表面活性物質欠乏の結果であり、肺胞の虚脱後の肺の拡張不全（無気肺）を引き起こす。

【0007】

肺表面活性物質は、90%の脂質および10%のタンパク質から成る。表面活性物質特異的タンパク質と脂質との間の協調が完全な機能的呼吸プロセスに必要なものであるが、脂質は極めて重要な表面張力の減少に不可欠である。

【0008】

肺表面活性物質の機能および肺感染症および肺疾患によるそれらの阻害された機能は、多数の出版物において記述された。これに関する参照は出版物によってなされる。

20

【0009】

T. R. Martin, Cytokines and the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): a question of balance, Nat. Med. 3 (1997), pp. 272.

Artigas, G. R. Bernard, J. Cadet, D. Dreyfuss, L. Gattinoni, The American-European consensus conference on ARDS, part 2: ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157 (Pt1) (1998), pp. 1332.

30

G. R. Bernard, A. Artigas, K. L. Brigham, J. Carlet, K. Falke, The American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 149 (1994), pp. 818.

40

A. B. Montgomery, M. A. Stager, C. J. Carrico, E. D. Hudson, Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome, Am. Rev. Respir. Dis. 132 (1985), pp. 485.

G. Karagiorga, G. Nakos, E. Galitsou, M. E. Lekka, Biochemical parameters of bronchoalveolar lavage fluid in fat embolism, Intensive Care Medicine 32 (2006), pp. 116-123.

L. D. Hudson, K. P. Steinberg, Epidemiology o

50

f acute lung injury and ARDS, Chest 116 (1999), pp. 74S.

G. Devendra, R. G. Spragg, Lung surfactant in subacute pulmonary disease, Respir. Res. 3 (2002), pp. 19.

M. Griese, R. Essl, R. Schmidt, E. Rietschel, F. Ratjen, M. Ballmann, K. Paul, Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis, American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine 170 (2004), pp. 1000-1005. 10

M. Griese, L. Felber, K. Reiter, R. Strong, K. Reid, B. H. Belohradsky, G. Jager, T. Nicolai, Airway inflammation in children with tracheostomy, Pediatr. Pulmonol. 37 (2004), pp. 356-361

Bachofen H & Schtirch S (2001) Alveolar surface forces and lung architecture. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology 129:183-193. 20

Clements J (1962) Surface phenomena in relation to pulmonary function. Physiologist 5:11.

Yu S, Harding PG, Smith N & Possmayer F (1983) Bovine pulmonary surfactant: Chemical composition and physical properties. Lipids 18:522-9.

Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S & Possmayer F (1998) The role of lipids in pulmonary surfactant. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 1408:90-108. 30

Yu S, Harding PGR, Smith N & Possmayer F (1983) Bovine pulmonary surfactant: Chemical composition and physical properties. Lipids 18:522-529.

Postle AD, Heeley EL & Wilton DC (2001) A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology 129:65-73. 40

Possmayer F, Nag K, Rodriguez K, Qanbar R & Schurch S (2001) Surface activity in vitro: Role of surfactant proteins. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 129:209-20.

【0010】

肺表面活性物質は錯体膜を形成し、水和した空気／肺界面で気道における表面張力の減 50

少において重要な役割に關与する、または役割を果たす。炎症性肺疾患では、肺胞および気道における肺表面活性物質の分子プロファイルは変化し、従って肺表面活性物質膜が表面張力を減少するために極めて効果的でないまたは効果がなくなり、それはガス交換のため利用可能な面積の著しい減少を伴う。

【0011】

さらにまた、表面活性物質中の高濃度のコレステロールが表面活性物質機能障害の主な原因であることが知られている。これに関する参照はまた下記の出版物によってなされる。

【0012】

L. Gunasekara, S. Schurch, W. M. Schoel, K. Nag, Z. Leonenko, M. Haufs, M. Amiein, Pulmonary surfactant function is abolished by an elevated proportion of cholesterol, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1737 (2005), 27-35.

10

【0013】

さらにまた、活性化白血球からの反応酸素種（ROS）の放出、またはそれに続く環境汚染物質への曝露が、肺の内部で高度に酸化している環境をもたらす可能性があることが示された。反応酸素種およびそれらの副産物の増加した濃度は、数ある他の病態の中でも特に、ARDS、喘息、CF、人工呼吸器により誘発された肺損傷（VILI）または慢性閉塞性肺疾患（COPD）を患った患者から集められる気管支肺胞洗浄液から検出された。いくつかの研究は様々な肺表面活性物質の酸化が、インビトロおよびインビボでの機能を非常に阻害することを示し、SP-BおよびSP-Cにおいて、これまで主に感受性残留物の酸化変化によるものとされたのに対して、リン脂質の過酸化および加水分解はさほど需要ではないものと考えられた。これに関する参照はまた下記の出版物によってなされる。

20

【0014】

K. Rodriguez-Capote, D. Manzanares, T. Haines, F. Possmayer, Reactive oxygen species in activation of surfactant involves structural and functional alterations to surfactant proteins SP-B and SP-C, *Biophysical Journal* 90 (2006), 2808.

30

S. Andersson, A. Kheiter, T. A. Merritt, Oxidative inactivation of surfactants, *Lung* 177 (1999), 179.

L. Mark, E. P. Ingenito, Surfactant function and composition after free radical exposure generated by transition metals, *Am. J. Physiol. - lung Cell. Mol. Physiol.* 276 (1999), L491.

40

N. Gilliard, G. P. Heldt, J. Lored, H. Gasser, H. Redl, T. A. Merritt, R. G. Spragg, Exposure of the hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties, *Journal Of Clinical Investigation* 93 (1994), 2608.

Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ & Matalon S (2002) Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury*. *Chest* 122:314S-320S.

50

Cienciewicki J, Trivedi S & Kleeberger SR (2008) Oxidants and the pathogenesis of lung diseases, *J Allergy Clin Immunol* 122:456–468.

Lamb NJ, Gutteridge J, Baker C, Evans TW & Quinlan GJ (1999) Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: Evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med* 27:1738.

Andersson S, Kheiter A & Merritt T (1999) Oxidative inactivation of surfactants. *Lung* 177:179–189.

Bailey TC, et al (2006) Physiological effects of oxidized exogenous surfactant in vivo: Effects of high tidal volume and surfactant protein A. *American Journal of Physiology–Lung Cellular and Molecular Physiology* 291:L703–L709.

Gilliard N, et al (1994) Exposure of the hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. *J Clin Invest* 93:2608.

Haddad IY, et al (1993) Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *American Journal of Physiology–Lung Cellular and Molecular Physiology* 265:L555–L564.

Mark L & Ingenito E (1999) Surfactant function and composition after free radical exposure generated by transition metals. *American Journal of Physiology–Lung Cellular and Molecular Physiology* 276:L491–L500.

Stenger PC, et al (2009) Environmental tobacco smoke effects on lung surfactant film organization. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes* 1788:358–370.

Rodriguez-Capote K, Manzanares D, Haines T & Possmayer F (2006) Reactive oxygen species inactivation of surfactant involves structural and functional alterations to surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biophys J* 90:2808–2821.

Manzanares D, et al (2007) Modification of tryptophan and methionine residues is implicated in the oxidative inactivation of surfactant protein B. *Biochemistry* 46:

10

20

30

40

50

5604-5615.

Keating E, et al (2007) Effect of cholesterol on the biophysical and physiological properties of a clinical pulmonary surfactant. Biophys J 93:1391-1401.

【0015】

本発明は、酸化誘導の表面活性物質機能障害に対するコレステロールの寄与に関して、これまで取り組まれていない問題について述べる。特に、本発明まで不明であった、表面活性物質に対する酸化変化が、表面活性物質の機能に悪影響を及ぼすことにコレステロールの正常または増加した濃度と相互作用するかどうかという問題である。

10

この出願の発明に関連する先行技術文献情報としては、以下のものがある（国際出願日以降国際段階で引用された文献及び他国に国内移行した際に引用された文献を含む）。

（先行技術文献）

（特許文献）

（特許文献1） 米国特許出願公開第2010/0173869号明細書

（非特許文献）

（非特許文献1） GUNASEKARA, L. C. ET AL. "Methyl- β -cyclodextrin restores the structure and function of pulmonary surfactant films impaired by cholesterol" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* (2010), 1798:986-994

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の1態様は、単純な方法で表面活性物質、例えばコレステロールにより阻害される機能障害を示す、特に肺表面活性物質を強化することに関するものであり、特に阻害された表面活性物質の表面張力は治療により改善する。

【0017】

より詳しくは、表面活性物質を強化する方法が提供され、特に肺表面活性物質で、表面活性物質がコレステロール捕捉表面活性物質強化剤で強化されるという点で、さらに確立され、そこで投与される、コレステロールの表面活性物質に対する影響が減少または回復し、このようにまた表面活性物質の機能障害がコレステロールにより引き起こされるような、特に表面活性物質のコレステロールは表面活性物質強化剤により選択的に捕捉される。

30

【0018】

別の態様において、活性酸素種（ROS）およびそれらの誘導体への曝露に起因する表面活性物質機能障害を有する患者を治療する方法が、ROSによる酸化的損傷の悪影響から表面活性物質を保護するために表面活性物質保護量のコレステロール捕捉剤を患者に投与する工程を有し、提供される。ROSの例は、これに限定されるものではないが過酸化

40

【0019】

またさらなる態様において、シクロデキストリンのようなコレステロール捕捉剤を添加することにより肺表面活性物質への酸化的損傷を軽減する方法が提供される。1実施態様において、多価不飽和リン脂質の酸化に起因する遊離基の損傷から表面活性物質を保護する工程が、表面活性物質保護量のコレステロール捕捉剤を表面活性物質に添加する工程を

50

有し、提供される。

【0020】

本明細書で用いたコレステロール捕捉剤の濃度で、酸化したコレステロール劣化表面活性物質は界面活性においてほとんど異常を示さなかったということが発見された。しかしながら、そのような表面活性物質が生理的濃度のコレステロールを含む場合、圧縮時に低い表面張力に達する能力、膨張と同時に再度広がる効果的な膜、および迅速な界面膜形成に関して重度の機能障害が観察される。表面活性物質酸化の多くの生化学影響の中で、脂質過酸化は、機能障害のために必要不可欠であった。ROSは、多くの炎症性肺疾患の一部である。これらのほとんどの場合、コレステロール値は増加しないまたは実質的に増加しない。したがって、ROSによるコレステロール依存的な表面活性物質機能障害の治療は、表面活性物質コレステロールの上昇の治療より非常に幅広い患者集団に適用可能である。

10

【0021】

例えば、これに限定されるものではないが、本発明は、ショック性、細菌性、ウイルス性および院内性の肺炎、人工呼吸器により誘発された肺損傷(VILI)、誤嚥、全身性炎症反応症候群(SIRS)または毒性ガス、蒸気、煙霧および微粒子の吸入を含む原因からの急性肺損傷(ALI)または急性呼吸窮迫症候群(ARDS)に苦しむ患者を治療するのに有用である可能性がある。また、本発明は、喘息、嚢胞性線維症(CF)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)または毒性ガス、蒸気、煙霧および微粒子の吸入を含む気道損傷に苦しむ患者または治療に対し反応を示さない乳児呼吸窮迫症候群(IRDS)またはニーマンピック病患者において有用である。

20

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1Aは、0% (白色)、5% (灰色)、または10% (黒色)のコレステロールを有する酸化BLEのサイクルにおいて、最小の表面張力を示す。このモデルシステムは、コレステロール非存在下において、酸化が通常の表面活性物質の機能に影響を及ぼさないことを示す。コレステロール存在下において機能は失われ、酸化表面活性物質により表面張力は高くなる。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。図1Bは、oxBLE + 10% w/wコレステロールコントロールバッファー (白色) または30mMのMβCDを含むバッファー (黒色) の動的な圧縮拡張サイクルにおける最小 (円) および最大 (三角形) 表面張力を示す。このように、酸化コレステロールを含有する表面活性物質はインビトロで機能不全であり、その機能はコレステロール捕捉剤により回復させることが可能である。

30

【図2】図2Aは、CF患者のBAL溶液の肺胞マクロファージの光学マイクロ写真である (棒線 = 10 μm)。多数の脂質を含むリソソームが細胞質の中に存在する。図2Bは、表面活性物質の過剰な鬱滞が非運動性マクロファージおよび最終的に原形質膜の破裂を誘導すること示す。図2Cは、表面活性物質テストを示す。CFサンプルは機能的なコントロールと対比して高い表面張力 (機能障害) を示す (結果はCBSの連続的な拡張-圧縮サイクルの間に達する最小の表面張力で示される)。図2Dは、MβCDがインビトロでCF患者の表面活性物質機能を回復させることを示す。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。

40

【図3】図3Aは、損傷したマウスでエラストランスが増加し、酸素供給が減少したことを示す。図3Bは、表面活性物質は無治療の損傷したマウスでは機能不全 (最小表面張力 $>10\text{ mN/m}$) であるが、損傷したマウスがMβCD-エアゾールで治療がなされた場合は正常 (最小張力 $<10\text{ mN/m}$) となること示す。図3Cは、表面活性物質コレステロールが損傷したマウスで上昇しないこと示す。図3Dは、損傷における好中球の顕著な流入を示す組織学的肺切片を示す。図3Eは、損傷によりII型肺胞上皮細胞で増加した表面活性物質 (膜包接) を示すEM顕微鏡写真を示す。従って、図3A~Eは、ALIの動物モデルの表面活性物質機能障害およびインビボでエアゾールとして投与されるコレステロール捕捉剤によるその回復を示す。

50

10

【 0 0 2 3 】

20

30

30

40

50

【0028】

さらに、シクロデキストリンを含んでいる表面活性物質強化剤を用い、または作用において、シクロデキストリンを含有する表面活性物質強化薬剤またはシクロデキストリンの活性クラスと一致する表面活性物質強化剤を用いて、表面活性物質が強化されるという点で、方法は区別される。

【0029】

さらにまた、実施形態は想定され、そこで表面活性物質強化剤の活性物質、メチルーβ-シクロデキストリン(MβCD)またはシクロデキストリン、特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリン、または特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリンを有するシクロデキストリン誘導体、またはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)または前記の物質または言及した物質の混合物に対応する誘導体または少なくとも脂質選択性および脂質非活性化物質または少なくとも脂質捕捉物質が用いられる。

10

【0030】

特に、表面活性物質の表面張力は、非強化の表面活性物質と比較して、または強化する前の表面活性物質と比較して、表面活性物質強化剤により減少する。

【0031】

それに加えて、実施形態において、表面活性物質のコレステロールが溶液、特に水溶液中で表面活性物質強化剤により溶解および／または不動態化されることが想定される。このように、表面活性物質のコレステロールの阻害効果は、例えばその界面活性において、それに応じて治療される。それ故に、表面活性および／または表面活性物質の表面張力は、測定することが可能であり、強化の後で容易に診断することが可能である。

20

【0032】

さらに、1実施形態では、表面活性物質強化剤が表面活性物質の特性、特に非強化表面活性物質に影響、特に阻害の影響を及ぼす、またはその特性を制限する表面活性物質のコレステロールを捕捉すると想定される。

【0033】

それに加えて、対象物を表面活性物質強化剤、特に肺表面活性物質強化剤を生産する方法により溶解し、少なくとも一部の少なくともコレステロール選択性および少なくともコレステロールを捕捉する物質が表面活性物質強化剤と混合される可能性があるまたは混合されるという点においてさらに開発される。

30

【0034】

望ましくは、少なくとも1つの物質が、表面活性物質の応用によって、表面活性物質強化剤と混合される可能性があるまたは混合され、望ましくは内在性表面活性物質、表面活性物質の特性において影響を及ぼすコレステロール、特に阻害するもの、特に非強化表面活性物質、またはその特性を制限するものが捕捉される。

【0035】

さらにまた、本発明に従って、表面活性物質強化剤は、メチルーβ-シクロデキストリン(MβCD)またはシクロデキストリン、特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリンにより構成される活性物質、または特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリンを有するシクロデキストリン誘導体、またはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)または前記の物質または言及した物質の混合物に対応する誘導体または少なくともコレステロール選択性およびコレステロール非活性化物質または少なくともコレステロール捕捉物質と混合される。

40

【0036】

それに加えて、表面活性物質強化剤はまた、捕捉物質の前記の作用を失わずに他の材料および／または活性物質を含有することが可能であり、すなわち、この捕捉物質の影響は維持される可能性があるまたは維持される。例えば、薬剤または医薬品としての投与において、別の表面活性物質、例えば外因的に働く表面活性物質を、表面活性物質強化剤に添加することが可能である。

【0037】

50

さらにまた、対象物は表面活性物質強化剤により溶解され、少なくとも脂質選択性および脂質非活性化物質または少なくとも脂質を捕捉物質またはコレステロール捕捉物質が表面活性物質強化剤と混合される可能性または混合されるという少なくとも一部の点において、それはさらに開発される。

【0038】

さらにまた、表面活性物質強化剤の使用、すなわち表面活性物質を強化する場合、その使用という点において、表面活性物質強化剤は区別され、活性物質としてメチルーβ-シクロデキストリン (MβCD) またはシクロデキストリン、特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリン、または特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリンを有するシクロデキストリン誘導体、またはジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) または前記の物質または言及した物質の混合物に対応する誘導体または少なくともコレステロール選択性およびコレステロール非活性化物質または少なくともコレステロール捕捉物質を有する表面活性物質強化剤を用い、表面活性物質が強化される可能性があるまたは強化される。

10

【0039】

特に、表面活性物質の表面張力は、非強化表面活性物質と比較して、または強化前の表面活性物質と比較して、表面活性物質強化剤の使用により減少する可能性があるまたは減少する。

【0040】

望ましくは、表面活性物質のコレステロールは、溶液中、特に水溶液中で、表面活性物質強化剤により溶解および／または不動態化される。

20

【0041】

それに加えて、表面活性物質強化剤を用い、表面活性物質、特に非強化表面活性物質の特性に影響、特に阻害の影響を及ぼす、またはその特性を制限する、特に内在性表面活性物質のコレステロールが表面活性物質強化剤により捕捉される可能性があるまたは捕捉されるものと想定される。

【0042】

さらに、本発明は表面活性物質、特に内在性表面活性物質、特に肺表面活性物質を強化するための強化剤の使用により溶解され、それにおいて、強化剤は上述の工程に従って作られる可能性があるまたは作られる、またはそれにおいて、表面活性物質強化剤は上述の成分から作られる。この目的のために、繰り返しを避けるため、上記の情報について明確に述べる。

30

【0043】

好都合なことに、強化剤が、生物、特にヒトにおける肺の疾患を治療するための治療剤または医薬品として用いられるという点で、応用は区別される。例えば、強化剤は、噴気性投与のための粉末形態の、または気管内または気管支内投与のための液体状態の医薬品として示される可能性がある。その上、さらなる開発において、強化剤がエアゾールの形態で患者に用いられる可能性がある。望ましくは溶液または懸濁液の気管内点滴により、または噴霧化した溶液または懸濁液の形態で、または粉末剤の噴霧化により、投与は、専門家に既知の方法で後に続いてなされる。

40

【0044】

さらにまた、ヒトにおける肺疾患、特に急性肺疾患の治療または早期治療のための、特に薬剤の生産のため、メチルーβ-シクロデキストリン (MβCD) またはシクロデキストリン、特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリン、または特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリンを有するシクロデキストリン誘導体、またはジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) または前記の物質または言及した物質の混合物に対応する誘導体または少なくともコレステロール選択性およびコレステロール非活性化物質または少なくともコレステロール捕捉物質を用い対象物を溶解し、それにより表面活性物質のコレステロールを捕捉する。

【0045】

50

さらにまた、表面活性物質、特に肺表面活性物質の特に研究、特に診断のため、メチルーβ-シクロデキストリン(MβCD)またはシクロデキストリン、特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリン、または特に2-ヒドロキシプロピルーβ-シクロデキストリンを有するシクロデキストリン誘導体、またはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)または前記の物質または言及した物質の混合物に対応する誘導体または少なくともコレステロール選択性およびコレステロール非活性化物質または少なくともコレステロール捕捉物質を用い対象物を溶解し、それにより表面活性物質のコレステロールを捕捉する。

【0046】

本発明において、さらに、表面活性物質強化剤の捕捉効果により、表面活性物質、特に
10 内在性表面活性物質の表面張力に関して機能障害が減少する可能性があり、それにより表面活性物質の一致する強化の後、表面活性物質におけるコレステロールまたは脂質の濃度の増加による機能障害は減少またはなくなる可能性がある。

【0047】

本発明は、コレステロールによりもたらされたまたは誘導された表面活性物質の阻害の
診断または測定のみならず、前述した症状を有する患者または人々、またはコレステロールによりもたらされたまたは誘導された表面活性物質の阻害を有するそれらの方々において、コレステロールによりもたらされたまたは誘導された表面活性物質の阻害の治療することを可能にする薬剤として、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を含むシクロデキストリンの活性クラスまたは活性物質クラスにおけるメチルーβ-シクロデキ
20 ストリン(MβCD)または他のシクロデキストリンまたは他のコレステロール捕捉物質の使用、およびビタミンEを含む他の方法によりコレステロールの影響を逆にするまたは無くするシクロデキストリンの活性クラスに一致する物質を使用するという考えに基づく。

【0048】

記述される症状の強化のため、物質または活性物質は、エアゾールの形態で肺に送達すること、または少なくとも1つの外因性のもの、すなわち外部から作用する表面活性物質とともに物質として肺に注入すること、または別の方法で肺に送達することが可能である。

【0049】

診断の手段として、本発明の物質は患者からの表面活性物質のサンプルと混合させることが可能であり、その機能は表面平衡でその後確認される。あるいは、物質は、表面活性物質の機能を測定するために、水溶液または表面平衡の水相に添加することが可能である。

【0050】

これらの結果および知見は、モデル表面活性物質のシステムおよびCF患者およびARDS患者の肺表面活性物質に基づき得られた。それらは、2つの実施例に基づき、以下で説明する。

【0051】

別の態様において、本応用は、酸化による表面活性物質の深刻な阻害がコレステロール
40 依存的であることを示す。理論の束縛を受けることなく、インビトロで本明細書において示される表面活性物質機能障害の機序が病気に関連すると考えられる。酸化表面活性物質を様々な動物モデルに注入する研究は、インビトロの成績とインビボ活性との間の十分な関連性を示した(Bailey TC, et al (2006) Physiological effects of oxidized exogenous surfactant in vivo: Effects of high tidal volume and surfactant protein A. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 291:L703-L709; Gilliard N, et al (1994) Exposure of the hydrophobic
50

components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. J Clin Invest 93:2608)。

【0052】

さらに、複数の呼吸病理学におけるインビトロで見られる機能障害の条件は満たされる。肺胞酸化的ストレスは、他の疾患の中でも特に、ARDS、喘息、CF、およびCOPDの病因と関係している(Cienciewicki J, Trivedi S & Kleeberger SR (2008) Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. J Allergy Clin Immunol 122:456-468)。これらの疾患において、ROSは活性化された免疫細胞および／または環境要因におそらくかなりの程度由来する(Cienciewicki J, Trivedi S & Kleeberger SR (2008) Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. J Allergy Clin Immunol 122:456-468; Lamb NJ, Gutteridge J, Baker C, Evans TW & Quinlan GJ (1999) Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: Evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. Crit Care Med 27:1738)。その上、炎症性肺疾患におけるコレステロールの減少の報告はない。それとは反対に、表面活性物質の中のコレステロールがARDS (Panda A, K., et al (2004) Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 30:641-650; Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU & Tammi M (1988) Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. J Invest Dermatol 90:412-414) およびCF (我々の未発表の結果)において増加する。これらの病理学において、コレステロールの増加した濃度はそれ自体で機能障害を説明することさえ可能である(Gunasekara LC, et al (2010) Methyl- β -cyclodextrin restores the structure and function of pulmonary surfactant films impaired by cholesterol. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1798:986-994; Vockeroth D, et al (2010) Role of cholesterol in the biophysical dysfunction of surfactant in ventilator-induced lung injury. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 298:L117-L125)。

【0053】

病態への関連を確認するために、表面活性物質濃度、圧縮拡張の率、表面活性物質組成、および酸化剤酸化体曝露のレベルを既知の生理的または病理学的パラメータと一致させ、下記の実施例において、試みがなされた。しかしながら、脂質抽出した表面活性物質を用いて、我々はこれらを酸化に対しさらに耐性を示す可能性のある天然表面活性物質に存在する水溶性内在性酸化防止剤分子を除去した(Haddad IY, et al (19

93) Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 265:L555-L564)。例えば、肺胞液の中のヒアルロン酸は遊離基を除去する特性を有する (Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU & Tammi M (1988) Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. J Invest Dermatol 90:412-414)。他方で、炎症を起こした肺の中の表面活性物質は、十分に界面活性でない小さな凝集体への肺胞性浮腫およびLA物質の変換により希釈の物質となる可能性があり (Zuo YY, Veldhuizen RAW, Neumann AW, Petersen NO & Possmayer F (2008) Current perspectives in pulmonary surfactant-inhibition, enhancement and evaluation. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1778:1947-1977; Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU & Tammi M (1988) Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. J Invest Dermatol 90:412-414においてレビューされている)、酸化性機能障害を強化する可能性がある。活性酸素種はまたインビボで認められる反応窒素種の反応性を強化する可能性があり、さらに有害な表面活性物質脂質およびタンパク質にダメージを与えることが可能である (Haddad IY, et al (1993) Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 265:L555-L564; Haddad IY, et al (1994) Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 267:L242-L249)。

【実施例1】

【0054】

モデル研究において、どのようにその誘導体を機能不全にするかという例として、通常の(生理的な)量のコレステロールでも、ROSに曝露した表面活性物質を与え、0、5および10重量パーセントのコレステロールをROS曝露したウシ脂質表面活性物質抽出物に添加した。表面活性物質モデルの機能は、キャプティブ気泡サーファクトメーター(CBS)で測定した。

【0055】

メチルーβ-シクロデキストリン(MβCD)非存在下において(図1A)、すなわち非強化表面活性物質で、表面張力は、深刻な表面活性物質が機能障害であることを示す23mN/mで平衡の近くでほぼ変化のないままであった。

【0056】

メチルーβ-シクロデキストリン(MβCD)(20mmol)存在下において(図1B)、すなわち強化表面活性物質で、水相において、表面活性物質はその通常の機能を回復し、表面張力はほぼ0まで減少した。

【実施例2】

【0057】

小児CF表面活性物質サンプル（ $n=10$ 、図2A～D）による本研究において、我々は高レベルの表面活性物質機能障害を見出した。気管支肺胞洗浄BALのコレステロールは、健常肺コントロールサンプル（ 5.5 ± 0.9 重量%； $n=5$ ）と比較して 17.6 ± 6.2 重量%に増加し、また正常の表面活性物質機能を示した（図2C）。CF表面活性物質を、 $M\beta CD$ 存在下において再テストした場合、サンプルの大多数（ $8/10$ ）が今度は機能回復を示し（図2D）、コレステロールが機能障害の原因となったことを示唆する。高いコレステロールは、CFに特有のコレステロール恒常性の欠陥により説明される（White, N. M. et al. Altered cholesterol homeostasis in cultured and in vivo models of cystic fibrosis. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L476-L486 (2007)）。他方で、小児の非CF細気管支炎表面活性物質の5つのサンプルはまた機能不全であり、それら機能はまた通常のコレステロール値（ 5.6 ± 0.5 重量%）にもかかわらず $M\beta CD$ により回復した。後者は我々の発明、すなわち、正常レベルのコレステロール存在下においてさえ、表面活性物質を機能不全にする活性酸素種（ROS）によるその劣化により説明がなされる可能性がある。ROSは主に好中球により炎症を起こした肺で産生される（Chabot, F., Mitchell, J., Gutteridge, J. & Evans, T. Reactive oxygen species in acute lung injury. *European Respiratory Journal* 11, 745-757 (1998)）。表面活性物質機能障害における好中球の役割と一致し、機能障害のあるCFおよび非CF細気管支炎症例はそれらのBAL溶液において増加した好中球を有した。我々は炎症性の環境が主に非CF細気管支炎表面活性物質に影響を及ぼすものと結論づける。対照的にCFにおいては炎症性のものに加えて遺伝的要素であるように思われる。我々の予備データによれば、両方の種類の異常はコレステロール結合性剤 $M\beta CD$ で修正することが可能である。

【実施例3】

【0058】

本研究において、ARDSの最も初期段階である、急性肺損傷（ALI）のマウスモデルは、発表された方法（Allen, G. B. et al. Neither fibrin nor plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects lung function in a mouse model of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 296, L277-L285 (2009)）に従い肺の酸損傷により作製し、肺機能、酸素供給、肺組織学、肺超微細構造、表面活性物質機能および組成に関して解析した（図3A～E）。ALI/ARDSにおける肺機能を評価するために、エラスタンス（またはその逆、適合性）および圧容量曲線は一般的に用いられる（Johnson, B. et al. Pressure-volume curves and compliance in acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 159, 1172-1178 (1999)）。ヒトの非CF細気管支炎症例と同様で、炎症の酸化環境に曝露された表面活性物質がコレステロール存在下で機能しなくなるメカニズムをさらに支持して、コレステロールは生理的に正常な濃度（であり、さもないと通常の脂質プロファイル）であるにもかかわらず、このモデルを用いた我々の最初のデータはコレステロール依存的な表面活性物質の機能障害を示す。重要なことに、我々は $M\beta CD$ がエアゾールとして投与される場合、肺においてインビトロでのみならずインビボでも表面活性物質機能を回復させることが可能であること示す（図3B）。

【実施例4】

【0059】

この実施例において、コレステロール依存的な表面活性物質機能障害の誘発における酸化多価不飽和リン脂質の役割が研究された。フェントン様反応による、または炎症を起こした肺におけるROS存在下での、表面活性物質の酸化は、主要目標である多価不飽和リン脂質を有する脂質-過酸化物の形成をもたらす。さもないと不変であるが、脂質過酸化物はそれらの脂肪族末端においてヒドロペルオキシド基を有する。元は疎水性であった領域における親水基のこの誘導は、脂質充填を阻害する。20%のw/w oxPLPCまたはoxCLのBLES+10%コレステロールへの添加は、表面活性の実質的な劣化を引き起こした(図4A)。oxPLPCまたはoxCL単独では天然のBLESの表面活性を阻害しなかったため、この影響はコレステロール依存的であった。コレステロールおよびPLPCまたはCLの一方のみを含むBLESは、最初は阻害しなかったが、おそらく外気への曝露による自然酸化の結果として数時間後に機能不全になった。これはコレステロールと共に機能障害を引き起こしている表面活性物質において存在する過酸化物PLPC、CLおよび他の多価不飽和リン脂質と一致する。これらの結果は肺炎を伴う表面活性物質機能障害においてCLの重要な役割の発見が得られる、さらなる関心である。この解釈の支持で、酸化にさらされた非多価不飽和リン脂質種の添加により生じる阻害はなく、BLES+10%のコレステロールへのoxDPPC、oxDPPGまたはoxPOPCの添加は、コントロールと比較して動的な界面活性に悪影響を及ぼさなかった。脂質の過酸化は脂肪族末端で複数の二重結合に依存し、したがって、DPPC、DPPGまたはPOPCはこの分子改変のターゲットではない。

10

20

【0060】

過酸化物を形成することに加え、多価不飽和リン脂質種はまた、酸化剤開始の加水分解に非常に影響を受けやすい。コントロールとして、oxPLPCまたはoxCLを含んでいるBLES+10%のコレステロールからの(先述したように)リン脂質加水分解産物の除去は、界面活性を改善せず(図示せず)、それにより、阻害が多量のリゾリン脂質およびFFAの生成および取り込みに起因したという可能性を排除した。要約すると、コレステロールと併用した、最も可能性が高い有害な分子種である酸化多価不飽和リン脂質は、影響を受けた脂質のそれぞれの過酸化物で表面活性物質を機能不全にする。

【実施例5】

【0061】

30

表面活性物質膜の構造における酸化の影響はまた研究された。低い表面張力は、空気-バッファー界面で圧縮不可能な膜を形成している表面活性物質から生じる。力学的類似性において、表面張力はプレートを圧縮している外側部の圧力に等しく、界面の分子膜は連続体プレートである。機能的である場合、膜は側部の圧力に屈せず、このように表面張力を相殺しない。機能不全である場合、膜は流体膜のため界面からバッファーに流れ去ることにより虚脱する。延性のある場合は座屈または脆性のある場合は亀裂により、柔軟性に欠ける機能不全の膜は圧力に影響を受ける。

【0062】

ラングミュア-ブロッジェットの膜(空気-バッファー界面で形成され、それから固体支持体に移動する膜)の顕微鏡解析は、肺表面活性物質がその機能を果たす方法およびそれが機能しなくなる方法の重要な態様を明らかにする。原子間力顕微鏡(AFM)において、oxBLES膜は、単分子層領域および脂質二分子層領域のパターンを示す(図4B、右)。図4B、中央はAFM-領域を線画した膜の蛍光光学マイクロ写真である。比較から、明るい領域が脂質二分子層である。我々および他のグループはこのパターンが機能的な膜の特徴であり、圧縮において単分子層-二分子層転換に起因するものであることをこれまでに見出した(Leonenko, Z. et al. An elevated level of cholesterol impairs self-assembly of pulmonary surfactant into a functional film. Biophys. J. 93, 674-683 (2007); Baoukina, S., Monticelli, L., Risselada, H. J., Marr

40

50

ink, S. J. & Tieleman, D. P. The molecular mechanism of lipid monolayer collapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10803 (2008); Serrano, A. G., Cruz, A., Rodriguez-Capote, K., Possmayer, F. & Perez-Gil, J. Intrinsic structural and functional determinants within the amino acid sequence of mature pulmonary surfactant protein SP-B. *Biochemistry* 44, 417-430 (2005); Nahmen von, A., Schenk, M., Sieber, M. & Amrein, M. The Structure of a Model Pulmonary surfactant as Revealed by Scanning Force Microscopy. *Biophys. J.* 72, 463-469 (1997)。二分子層領域は液体に必要な物を供給し、別の面では不飽和脂質は低い表面張力と不適合である。従って単分子層は、高密度パッキングおよび低表面張力を生じる飽和脂質（大部分は DPPC）の領域において豊富となる。

【0063】

二分子層スタックは表面活性物質タンパク質BおよびCにより単分子層とクロスリンクされる。膜の座屈または亀裂を阻害している力学的再強化としてのこれらの作用を我々は以前に提案した (Leonenko, Z. et al. An elevated level of cholesterol impairs self-assembly of pulmonary surfactant into a functional film. *Biophys. J.* 93, 674-683 (2007))。oxBLE Sは、無処理のBLE Sと対照的に、マイクロメートル以下の寸法のさらなる多量の球状押出を示し、おそらく、その全体的な能力を損なうことなく活性膜から絞り出された不完全脂質のミセルを示す。

【0064】

図4B、左は、膜の面積-表面圧等温線であり、35~40 mN/mにおいて膜圧で肩形状を示し、その後、高い表面圧への増加が続いた。ここで留意すべきは、ラングミュアトラフについて、膜圧 Π がCBSと対照的に記録される点であり、そこで表面張力 γ を測定した。2つの存在は、 $=70 \text{ mN/m}$ の自由な空気-水界面の表面張力である γ_0 と $\Pi = \gamma_0 - \gamma$ として相関する。単分子層-二分子層転換に起因している肩形状を有する等温線もまた機能的な表面活性物質に特有である (Leonenko, Z. et al. An elevated level of cholesterol impairs self-assembly of pulmonary surfactant into a functional film. *Biophys. J.* 93, 674-683 (2007))。未酸化の膜では認められない約50 mN/m (矢印) の不安定な領域は、AFMトポグラフィーで小さな突起として見られる損害を受けた脂質の放出を示す可能性がある。コレステロールを含むoxBLE Sにおいてはまた、二分子層領域は、常に、この機能不全の膜の虚脱構造であるマイクロメートルサイズの球状物質と関与する (図4C)。蛍光画像は二分子層により覆われた界面のはるかに狭い面積を示す。50 mN/mでの連続的な虚脱プラトーの等温線は膜の機能障害を示す。

【0065】

要約すると、コレステロール非存在下において、酸化表面活性物質は、脂質二分子層に富む領域で、脂質単分子層の機能的な構造を維持する。AFMは酸化表面活性物質におけるコレステロールが最も顕著に二分子層のアセンブリに影響を及ぼすことを示し、この領域で大きな球状虚脱構造をもたらす。この知見は、二分子層領域は力学的に膜を再強化することはできないが、むしろ、脂質が水相に失われる部位であるため注目の対象となることと一致する。

【実施例6】

【0066】

方法および実験の手順

材料-BLESは、BLES Biochemicals Inc. (カナダオンタリオ州London) より贈与された。1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (POPC)、1-パルミトイル-2-リノレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (PLPC)、およびウシ心臓カルジオリピン (CL、主に1', 3'-ビス [1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロール-3-リン酸] -sn-グリセロール) はAvanti Polar Lipids Inc. (米国アラバマ州Alabaster) より購入した。他の全ての化学製品はシグマアルドリッチ (Sigma-Aldrich) (米国ミズーリ州St, Louis) より購入した。Haagsmanらにより記述されるように (Haagsman HP, et al (1989) Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 257:L421-L429)、ヒトSP-A (hSP-A) はブタノール抽出を用い肺胞性蛋白症患者の全肺洗浄から単離した。この調製物の純度はポリアクリルアミドゲル電気泳動後のクマシー青染色によって評価した。すべての脂質は-20℃窒素下にて保存した。表面活性物質混合物は4℃窒素下にて保存し、調製後3日中に使用した。HEPESを含んでいるバッファーはH2O2を不注意に産生するのを避けるため4℃で暗所にて保存した (Haddad IY, et al (1993) Mechanism of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 265:L555-L564)。

【0067】

インビトロの酸化- (Rodriguez-Capoteらにより記述されるように、Rodriguez-Capote K, Manzanares D, Haines T & Possmayer F (2006) Reactive oxygen species inactivation of surfactant involves structural and functional alterations to surfactant proteins SP-B and SP-C. Biophys J 90:2808-2821; およびCapote KR, McCormack FX & Possmayer F (2003) Pulmonary surfactant protein-A (SP-A) restores the surface properties of surfactant after oxidation by a mechanism that requires the Cys6 interchain disulfide bond and the phospholipid binding domain. J Biol Chem 278:20461) 酸化BLES (oxBLES) を産生するため24時間フェントン様の化学反応から発生するヒドロキシルラジカルにBLESを曝露した。DPPC、POPC、PLPC、DPPGおよびCLは1.5mMのCaCl₂を含んだ生理食塩水中に懸濁し、同一の酸化条件に曝露し、酸化性条件への曝露のみを示すためにoxDPPC、oxPOPC、oxPLPC、oxDPPGおよびoxCLとして示した。1.0mg/mLのoxBLES (BIOXYTECH LPO-586, Oxis Research, 米国カリフォルニア州Burlingame) で脂質過酸化の副産物であるマロンジアルデヒド (MDA) および4-ヒドロキシアルケナール (4-HAE) の形成を測定することにより、表面活性物質リン脂質の酸化を確認した。oxBLESはコントロールBLESと比較して有意に多くのMDAおよび4-HAEを含有し (それぞれ6.69±1.16および2.69±0.63nmolのMDAおよび4-HAE/mgリン脂質、n=6、p=0.

10

20

30

40

50

014)、このフェントン反応様の酸化を用いたこれまでの研究と一致した。

【0068】

表面活性物質の調製—正確な混合を確実に行うため、さらに脂質を有機溶液としてBLE SまたはoxBLE Sの脂質抽出に添加した。それから、混合物を窒素下で乾燥させ、濃度27mg/mLのリン脂質に、CBSバッファー(140mM NaCl、10mM HEPES、2.5mM CaCl₂、pH6.9)で再懸濁した。リン脂質濃度は、遊離リン酸基の遊離の後、リン酸塩分析法(Gentaur Molecular Products、ベルギーKampenhout)を用い評価した(Duck-Chong CG(1979) A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorus involving digestion with magnesium nitrate. *Lipids* 14:492-497)。総リン脂質濃度は、脂質抽出後96.8±6.8%(n=6)および酸化後98.6±11.1%(n=12)であった。コレステロールの酵素的分析(Amplex Redコレステロールアッセイ、インビトロゲン(Invitrogen)、米国オレゴン州Eugene)を用いた測定によると、BLE Sは2.60%のコレステロール(w/wリン脂質)を含んだ。最終濃度が5%(w/wリン脂質)を示したとき、hSP-Aを乾燥膜に添加した。実験の一部において、リン脂質加水分解の水溶性産物(Gilliard N, et al(1994) Exposure of the hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. *J Clin Invest* 93:2608; Arnhold J, Osipov AN, Spalteholz H, Panasencko OM & Schiller J(2002) Formation of lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines under the influence of hypochlorous acid. *Biochimica Et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects* 1572:91-100)を、低濃度の表面活性物質混合物の高速遠心分離(40000g×30分×4℃)により除去した。上清液を捨て、ペレットを最初の量の濃縮表面活性物質に再懸濁した。高速遠心分離の後、oxBLE Sのリン脂質の濃度は、処理したBLE Sと同様に61.9±9.7%であった(n=3, p=0.034)。

【0069】

生理的濃度のコレステロールを含む表面活性物質を得るために、カルガリー健康科学センター大学の無菌の動物管理施設に飼育される5匹の雌、12週齢のC57BL6マウス(ジャクソン研究所、米国メイン州Bar Harbour)を、過量の腹腔内のナトリウムペントバルビタールで人道的に安楽死させた。気管カニューレを外科的に取り付け、一定分量の通常の生理食塩水0.5mLを3度、気管支肺胞洗浄(BAL)に用いた。BAL溶液は細胞残屑を除去するためにすぐに遠心分離し(400g×10分×4℃)、その後、大きな凝集体画分は先述したように高速遠心分離により上清から分離した。これらの画分をプールし、マウス脂質抽出物表面活性物質(MLE S)を得るために脂質を抽出した。乾燥後、このプールした画分をリン脂質の最終濃度が10mg/mLになるよう1.5mMのCaCl₂を含む生理食塩水に再懸濁し、先述したように、oxMLE Sを得るために、その後酸化に曝露した。MLE Sは7.3±1.6%のコレステロール(w/wリン脂質)を含んだ。

【0070】

表面活性評価—表面活性物質の界面活性は、2つの重要な変更を加え、Gunasekaraら(Gunasekara L, Schoel WM, Schiirch S & Amrein MW(2008) A comparative study of mechanisms of surfactant inhibition. *BBA-Biomembranes* 1778:433-444)により詳細に記述されるようにコ

ンピュータ制御のキャプティブ気泡サーファクトメーター (CBS) を用い測定した。1) 空気-バッファー界面の近位に 27 mg/mL の表面活性物質 $\sim 1.0 \mu\text{L}$ のボラースをデポジットするのに透明な毛細管を用いた。表面活性物質の量および濃度は、不十分な表面活性物質またはバルク相吸着に起因する影響を最小にするよう選択した。この量の天然 BLES を、機能的な予備容量および総肺気量 (それぞれ $< 1 \text{ mN/m}$ および $\sim 30 \text{ mN/m}$) で *in situ* 測定し、最小および最大の表面張力を正確に再現させる (Bachofen H & Schiirch S (2001) Alveolar surface forces and lung architecture. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology 129:183-193)。実験の一部において、濃度に起因する表面活性物質機能の相違を評価するために 0.5 mg/mL の表面活性物質 $54.0 \mu\text{L}$ をデポジットするのに透明な毛細管を用いた。2) 調整の工程は、以降の圧縮-拡張サイクルに一貫性のある表面活性を保証するために行った。気泡は、最初に準静的に最大量の $\sim 20\%$ まで圧縮し、その後最小量および最大量を設定するため拡張した。その後、気泡の量を、膜を調整するために、 20 サイクル/分の率で、同じ量範囲で動的に循環させた。その後、4 回の準静的サイクルおよび第 2 セット目の動的なサイクルを行った。表面張力および表面面積の測定は、この第 2 の一連のサイクルで行った。 20 mN/m (C_{20}) の圧縮率は、以下の式を用いて計算した。 $C_{20} = (\delta A / \delta \gamma) / A$ 、そこで A = 面積および γ = 表面張力。

【0071】

$M\beta CD$ の影響を評価するために、粉末状の $M\beta CD$ (シグマアルドリッチ (Sigma Aldrich)、カタログ N r. C4555) を、最終濃度 30 mM にまでバッファーに溶解し、表面活性物質の追加の前に、CBS チャンバーに添加した。カルシウムを含まない実験は、カルシウムを添加せず、 15 mM の EDTA を添加した CBS バッファーを用いた。これらの実験で用いた表面活性物質は、使用の前に EDTA を含むバッファーで一晩インキュベートした。

【0072】

等温線および膜蒸着-原子間力および蛍光顕微鏡検査により演繹されるように、ウシ脂質抽出物表面活性物質 (BLES) の懸濁をラングミュアトラフおよび表面活性物質構造における表面活性に関して比較した。a) *oxBLES*、b) $10\% \text{ w/w}$ コレステロールを含む *oxBLES*、および c) $10\% \text{ w/w}$ コレステロールおよび *hSP-A* を含む *oxBLES* のサンプルは、先述したように調製した。蛍光脂質の類似体 (ローダミン-DHPE、インビトロゲン (Invitrogen)、米国オレゴン州 Eugene) を、水性懸濁液より前に $0.1\% \text{ mol/mol}$ DPPC の濃度にまで添加した。

【0073】

表面活性物質懸濁液を、界面で (27 mg/mL の濃度で) およそ $10 \mu\text{L}$ の滴下を静置することにより、 37°C でラングミュアトラフ (Nima Technology、英国 Coventry) の空気-バッファー界面 (750 cm^2) で、膜に拡散させた。膜面積を 600 cm^2 から 100 cm^2 まで 100 cm^2 / 分の率で減少させ、再び広げた。その後、このサイクルを 2 度繰り返した。表面張力を連続的にモニターし、面積-表面張力等温線を記録した。次に、表面圧が 45 mN/m に達するまで、面積を再度減少させた。この時点で、顕微鏡検査のための膜を、ラングミュア-プロジェクト技術により、丸い (25 mm) 顕微鏡カバーガラス上に付着させた。蒸着において、表面張力が一定にされる間、すでに浸したカバースリップは 25 mm / 分の速度で空気-バッファー界面全体で垂直に移動した。

【0074】

顕微鏡検査-AFM トポグラフィー画像を、 $21 \sim 78 \text{ N/m}$ の典型的なバネ定数および $260 \sim 460 \text{ kHz}$ の共振周波数で、ノンコンタクトモードシリコンカンチレバー NCH-20 (Nano World, スイス Neuchatel) を用い、Nano Wizard II AFM (JPK Instruments、ドイツ Berlin) で

、断続的な接触モードにて空気中で収集した。AFMをZeiss Axio Observer (Zeiss、ドイツJena)に取り付けた。光学蛍光画像をZeiss 40x Apoplan油浸対物レンズ(開口数:1.4)およびAndor iXon EMC CDカメラ(Andor、アイルランドBelfast)を用いAFM走査領域を含むサンプル領域を捕捉した。光学画像は(AFMソフトウェアの「光学オーバーレイ」の特性を用い)基準点を確立するため、AFMスキャナを利用することにより正確に調整し光学的ひずみおよび倍率を補正した。これにより2つの画像モードの正確なオーバーレイを可能にした。

【0075】

統計解析—すべてのCBS実験は、平均±SEM ($n=4\sim7$)として報告される。各々のユニークな脂質混合物を、少なくとも2回独立して準備した。2つのグループ間の分散分析(SPSS 19.0)の後に、有意性のための基準として用いられる $p<0.05$ で、多重比較のためにテューキーのHSDを続け行った。図中における同じ文字およびケースによる平均値は、そのサイクルにおいて統計的に相違でない。

10

【0076】

要約すると、コレステロール非存在下において、酸化表面活性物質は、脂質二分子層に富む領域で、脂質単分子層の機能的な構造を維持する。AFMは酸化表面活性物質におけるコレステロールが最も顕著に二分子層のアセンブリに影響を及ぼすことを示し、この領域で大きな球状虚脱構造をもたらす。この知見は、二分子層領域は力学的に膜を再強化することはできないが、むしろ、脂質が水相に失われる部位であるため注目の対象となることと一致する。

20

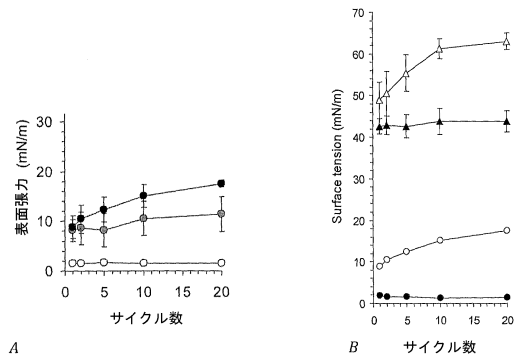
【0077】

理論の束縛を受けることなく、表面活性物質機能障害は酸化およびコレステロールの組合せに起因するものと考えられている。我々は、ROSが表面活性物質膜の二分子層領域において不安定性を引き起こすためにコレステロールと相互作用する脂質過酸化物を誘導することを初めて示す。図および等温線(図4)のプラトーにおいて認められる虚脱構造は、二分子層領域が高い膜圧で表面活性物質原料を連続的に放出することを示唆する。酸化はまた不飽和リン脂質の表面活性物質を減少させ、コレステロールの凝縮の影響により、十分に変形可能でない膜をもたらす。このことは、等温線(図4)において、機能的な膜の 40 mN/m とは対照的に、 50 mN/m を上回る膜圧で単分子層—二分子層転換プラトーが始まることから明らかである。この点で、膜は脆性である可能性があり破壊の傾向がある可能性があり、続く圧縮サイクルで低い表面張力に達することが不可能となる進行性の原因の一つとなる。

30

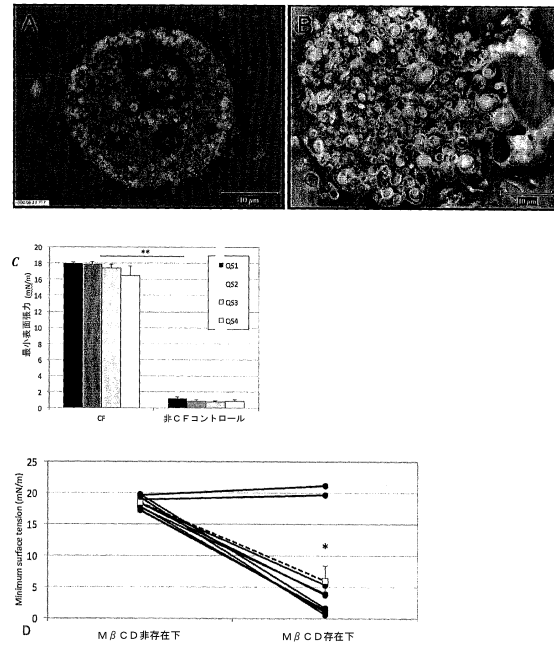
【図 1】

FIGS. 1A and B



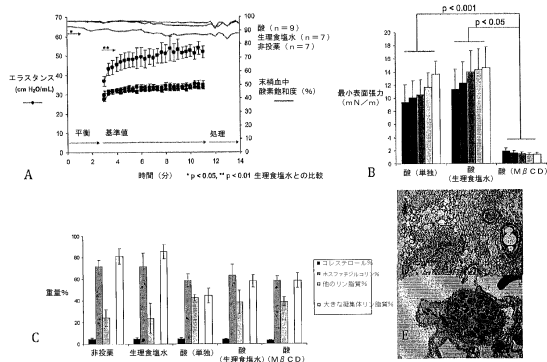
【図 2】

FIGS. 2A, B, C and D



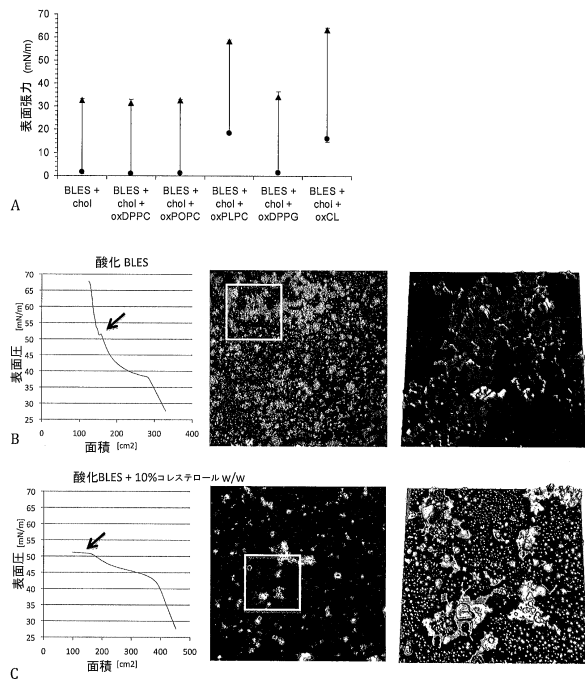
【図 3】

FIGS 3A, B, C, D and E



【図 4】

FIGS. 4A, B and C



フロントページの続き

- (72)発明者 ガナセカラ、ラサンサ シー、
カナダ国、ティー3エー 5シー5 アルバータ、カルガリー、104 ヒドゥン ベール プレ
イス ノースウエスト
- (72)発明者 プラット、ライアン
カナダ国、エル5エル 1ジェイ7 オンタリオ、ミシサガ、3349 ミシサガ ロード、17
9B マグラス バリー

審査官 小堀 麻子

- (56)参考文献 特表2008-515847 (JP, A)
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010年, Vol.298, L117-L125
Biochimica et Biophysica Acta, 2008年, Vol.1778, p.433-444
ICUとCCU, 1999年, Vol.23, No.5, p.323-331
日本界面医学雑誌, 1999年, Vol.30, p.20-28
Am Respir Cell Mol Biol, 2006年, Vol.34, p.677-687

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 31/00
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)