

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4630661号
(P4630661)

(45) 発行日 平成23年2月9日(2011.2.9)

(24) 登録日 平成22年11月19日(2010.11.19)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

A 6 1 L 27/00

Z

A 6 1 P 1/00 (2006.01)

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 1/16 (2006.01)

A 6 1 P 1/16

請求項の数 5 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-522337 (P2004-522337)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月23日(2003.7.23)
 (65) 公表番号 特表2005-535674 (P2005-535674A)
 (43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/003159
 (87) 国際公開番号 W02004/009113
 (87) 国際公開日 平成16年1月29日(2004.1.29)
 審査請求日 平成18年6月28日(2006.6.28)
 (31) 優先権主張番号 0217136.1
 (32) 優先日 平成14年7月24日(2002.7.24)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 500588178
 レノボ・リミテッド
 RENOVO LTD.
 イギリス、エム13・9エックスエックス
 、マンチェスター、グラフトン・ストリー
 ト48番、マンチェスター・インキュベ
 ター・ビルディング
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 睦
 (74) 代理人 100138900
 弁理士 新田 昌宏
 (74) 代理人 100162684
 弁理士 呉 英燦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維症および瘢痕形成の治療におけるコンバーゼインヒビターの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

創傷の部位に局所的に適用される、皮膚の創傷治癒中の瘢痕形成を減少させるための医薬の製造におけるデカノイルーRVKR-cmkまたはヘキサアルギニンから選ばれるフェーリンインヒビターの使用。

【請求項2】

インヒビターが、脂溶性である請求項1に記載の使用。

【請求項3】

インヒビターが、水溶性である請求項1に記載の使用。

【請求項4】

創傷を治療するか、または瘢痕形成を阻害または予防するための請求項1～3のいずれか1つに記載の使用。

【請求項5】

火傷後の瘢痕形成を阻害または予防するための請求項4に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、創傷の治癒、および線維症が組織修復の主なメカニズムである状態あるいは過剰の線維症が病的障害および組織の機能不全を引き起こす状態の治療における、線維症の調節に関する。

【背景技術】

【0002】

成人における創傷治癒は、複雑な修復プロセスである。本明細書で用いる語句「創傷」は、皮膚への傷害を意味するがこれに限定されるものではない。他のタイプの創傷には、肺、腎臓、心臓、腸、腱または肝臓などの内部組織あるいは臓器への障害、損傷または外傷が含まれる。

皮膚創傷における治癒プロセスは、典型的には、皮膚血管に対する損傷によって引き起こされる止血応答から開始する。このプロセス中、血小板および血液中に存在する多くの因子が、血液のさらなる喪失を妨げる凝血塊の形成に寄与する。次いで、このプロセス中、特に血小板の脱顆粒によって放出される因子が、順に細胞外マトリックスおよび基底膜の蓄積、血管形成、選択的プロテアーゼ活性および再上皮形成に関与する種々の特殊細胞の創傷部位への補充を引き起こす。成人哺乳動物における治癒プロセスの重要な構成要素は、線維芽細胞を刺激して細胞外マトリックスを産生させることである。この細胞外マトリックスは、創傷領域の修復を進展させる結合組織の主な構成要素である。

【0003】

治癒プロセス中に形成される結合組織は、天然においてしばしば線維状であり、通例、結合組織に瘢痕が形成される（線維症として知られるプロセス）。

瘢痕は、損傷および創傷（切開、切除または外傷など）の結果として形成される異常な形態学上の構造である。瘢痕は、主として1型および3型コラーゲンならびにフィブロネクチンのマトリックスである結合組織からなる。瘢痕は、異常な組織形成にけるコラーゲン線維からなる場合もあり（皮膚の瘢痕に見られる）、あるいは結合組織の異常な蓄積である場合もある（中枢神経系の瘢痕に見られる）。大部分の瘢痕は、異常に組織されたコラーゲンおよび過剰なコラーゲンからなる。ヒトの皮膚の場合、瘢痕は皮膚表面の下に押し下げられているかまたは上に押し上げられた形状で存在する。肥大した瘢痕は、正常な瘢痕よりも深刻な形態であり、皮膚の正常な表面の上に押し上げられており、異常なパターンで配列された過剰のコラーゲンを含んでいる。ケロイドは、病的瘢痕の他の形態であり、皮膚の表面の上に押し上げられているばかりでなく、もとの損傷の境界を越えて広がる。ケロイドには、膠原性の組織の渦巻き中で主に異常な形式で組織される過剰の結合組織が存在する。肥大性瘢痕とケロイド性瘢痕の両方を形成する遺伝的素因がある。このような素因は、人種としてはアフリカーカリビアンおよびモンゴロイドに特によく見られる。

【0004】

創傷治癒の予後を考慮すると、瘢痕形成の調節が第1に重要である場合が多くある。このような状況の例は、過剰の瘢痕が、組織の機能を妨げるような場合の皮膚の瘢痕であり、特に、瘢痕拘縮が起こる場合である（たとえば、関節の柔軟性を損なうような皮膚の火傷および創傷）。美容上の考慮が重要である場合の皮膚の瘢痕の減少もまた、強く所望されている。皮膚において、肥大性またはケロイド性瘢痕は、機能的および美容的減損を引き起こすものであり、それらの発生を予防する必要がある。両ドナーサイトにおいて皮膚移植の結果生じる瘢痕および人工皮膚の適用によって生じる瘢痕もまた、問題であり、最小化あるいは予防が必要とされている。

【0005】

皮膚の瘢痕と同様に、内部瘢痕または線維症も非常に有害であり、その特定の例として以下のものが挙げられる。

(i) 中枢神経系において、グリアの瘢痕形成は、（神経外科手術または脳の穿損傷後などの）神経の再接続を妨げる。

(ii) 眼内の瘢痕形成は、有害である。角膜において、瘢痕形成は異常な混濁を引き起こし、視覚に問題を与え、盲目に至らしめることさえある。網膜において、瘢痕形成は、ゆがみあるいは網膜剥離を引き起こし、盲目に至らしめる。緑内障において眼圧を低下する手術（緑内障過術など）における創傷治癒後の瘢痕は、水性体液が排出されないことによって外科処置の失敗を引き起こし、その結果として緑内障が再発する。

(i i i) 心臓における癒痕形成（外科手術または心筋梗塞後など）は、異常な心臓機能を亢進する。

(i v) 腹部または腎盂における手術は、しばしば、内臓癒着を引き起こす。たとえば、腸と体壁の癒着が形成されると、腸のループがねじれて、虚血、壊疽が生じ、緊急処置が必要となる（処置しなければ死亡する）。腸の外傷または切開は、癒痕の形成および癒痕による拘縮を引き起こし、狭窄に至らしめ、腸の管腔閉塞が起こり、その結果再び生命が脅かされる。

(v) 卵管の領域における腎盂の癒痕形成は、不妊症を引き起こす。

(v i) 筋肉の損傷後の癒痕形成は、異常な拘縮をもたらし、筋肉の機能が減損する。

(v i i) 腱および靭帯の損傷後の癒痕形成または線維症は、重篤な機能喪失をもたらす。

10

【 0 0 0 6 】

上記に関連して、事実、過剰の線維症が病的障害および組織の機能不全を引き起こす線維性障害として知られる多数の医療的対処を必要とする体調がある。線維性障害は、組織内に異常な形式で線維性組織（主にコラーゲン）が蓄積することを特徴とする。このような線維性組織は、種々の障害プロセスから生じる。これらの障害は、必ずしも外科手術、外傷あるいは創傷によって引き起こされるとは限らない。線維性障害は通常慢性的である。線維性障害の例として、肝硬変、肝臓線維症、糸球体腎炎、肺線維症、強皮症、心筋線維症、心筋梗塞後の線維症、発作後または神経退行性障害（アルツハイマー病など）後の中枢神経系線維症、増殖性硝子体網膜症（PVR）、再狭窄（血管形成術後など）および関節炎が挙げられる。したがって、これらの線維性障害において、線維症／癒痕形成を調節する（すなわち、予防、阻止または回復させる）ことによってこのような体調の治療に用いる医薬も必要である。

20

【 0 0 0 7 】

上記考察は主としてヒトの体調、障害あるいは疾病に対して適用するものであるが、他の動物、特に愛玩動物または家畜（ウマ、ウシ、イヌ、ネコなど）においても、創傷治癒、癒痕形成および線維性障害が問題であることが理解されよう。たとえば、腱と靭帯の損傷から癒痕形成または線維症に至るために、腹部創傷または癒着は、ウマ（特に競走馬）を引退させる主な原因である。

創傷治癒、癒痕形成および線維性障害の分野において、最近幾らかの発展がなされている。これらの発展の幾つかは、一連のサイトカインおよび成長因子が組織の修復に深く関わっているという最近の知識に関連するものである。特に、トランスフォーミング成長因子 β （TGF- β ）スーパーファミリーのメンバーが、創傷治癒において重要な役割を演じることが発見されている。少なくとも25個の分子が、該TGF- β スーパーファミリーのメンバーであることがわかっている。これらには、TGF- β 1～5、DVRグループ（dppおよびVgなど）、骨形態形成因子、ノーダル、アクチビンおよびインヒビンといったような多数のサイトカインが含まれる。

30

【 0 0 0 8 】

TGF- β は、潜在性TGF- β として知られるプロタンパク質として細胞から分泌されることが多い。潜在性TGF- β は、N末端潜在性関連ペプチド（LAP: Latency Associated Peptide）およびTGF- β からなり、スモール潜在性複合体と呼ばれる。さらに、該スモール潜在性複合体は、潜在性TGF- β 結合タンパク質（LTBP）と呼ばれる種々の大きさの他のペプチド（異なる遺伝子から誘導されたもの）に結合することができ、この場合、該複合体全体はラージ潜在性TGF- β 複合体として知られている。

40

【 0 0 0 9 】

LAPから解離されたときにTGF- β は活性化される。この解離は、マンノース-6-ホスフェート／インスリン様成長因子II受容体（M6P-R）で調整することができ、プラスミンなどのプロテアーゼ、組織トランスグルタミナーゼによって細胞表面に結合されている基質が関わっている。フリーラジカルおよび活性酸素なども、LAPからの解離を引き起こすことによってTGF- β を活性化することができる。

50

TGF- β （特にTGF- β 1およびTGF- β 2）は、創傷治癒を促進するが、瘢痕形成および線維症にも関連している。事実、TGF- β の調節における臨床的対象は、瘢痕形成を軽減する（このことは、創傷治癒速度を遅くするが）ためにその活性を阻害することに関わっている。たとえば、WO 92/17206は、トランスフォーミング成長因子 β 1および β 2の活性を阻害し、瘢痕形成を軽減するのに特に有用である組成物を開示している。

【0010】

他の発展の例として、マンノース-6-ホスフェートを、細胞外マトリックスの蓄積およびトランスフォーミング成長因子 β 1または β 2の濃度上昇に関連した線維性障害の治療に使用することが挙げられる（GB-A-2265310）。マンノース-6-ホスフェートは、これらのトランスフォーミング成長因子の潜伏型から活性型への転換を妨げると考えられる。

10

これらの進歩にもかかわらず、創傷治癒、瘢痕形成および線維症を調節するのに用い得る医薬を発達させることを継続する必要性は依然として残っている。特に、効能が、創傷治癒の速度または瘢痕形成の一方または他方に偏ることのない医薬が必要である。

以下に詳述するように、本発明は、その最も広い態様において、創傷の治療のための、コンバーゼインヒビターの使用に関する。

【0011】

本発明の第1の態様は、創傷または線維性障害の部位に局所的に適用される、創傷治癒中の瘢痕形成を減少させるか、または線維性コンディションの治療における線維症を減少させるための医薬の製造におけるコンバーゼインヒビターの使用を提供する。

20

本発明の第2の態様は、治療有効量のコンバーゼインヒビターおよび医薬的に許容しうるビヒクルを含む、創傷または線維症を治療するための組成物を提供する。

本発明の第3の態様は、治療を必要とする患者に治療有効量のコンバーゼインヒビターを局所的に適用することを含む、創傷治癒中の瘢痕形成を減少させるかまたは防止するため；もしくは線維性コンディションの治療における線維症を減少させるかまたは防止するための患者の治療方法を提供する。

【0012】

コンバーゼは、他にSPC（サブチリシン様プロタンパク質コンバーゼ；Duboisら，1995，Journ. Biol. Chem.，270(18):10618-10624；Sha，X.ら，1989，Mol. Endocrinology，3：1090-1098；Chan，S.J.ら，1992，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：6678-6682；およびその参考文献を参照）として知られる、Ca²⁺依存性セリンプロテアーゼのファミリーである。本発明者らは、コンバーゼ酵素フューリン（furin）が、創傷または線維性障害部位における成熟潜在性TGF- β の活性化に特に関与することを見出している。本発明者らは、いずれの仮説に結びつけられることも望まないが、TGF- β 活性化特性で他の酵素の活性を変更することにより、コンバーゼ活性がTGF- β の活性化を間接的に刺激しうると考えている。本発明者らは、TGF- β 活性化に寄与しているコンバーゼ活性は、最初に血小板内部で細胞内に生じ、次いで、脱顆粒において血小板の内容物が放出されるので、細胞外に継続すると考える。したがって、本発明に用いるコンバーゼインヒビターが、TGF- β 活性化が減少されるように、この酵素の活性を変更すると考えられる。

30

40

【0013】

明細書の参照を目的として、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、細胞内活性も同様に、血小板などの細胞フラグメントの膜内部における活性を包含するように解釈されるべきである。

本発明者らは、TGF- β の活性化に関与するコンバーゼは、フューリン様プロタンパク質コンバーゼであると考え、フューリンは、不活性前駆体として産生される7つの膜透過性プロタンパク質コンバーゼからなるファミリーを構成する。それらは、細胞内的に活性化されなければならない、細胞表面、細胞外およびエンドソームにおけるトランスゴルジネットワークにおけるタンパク質前駆体プロセッシングに関与する。フューリンは

50

、最少部位がArg-X-X-Argであるアルギニン含有切断部位においてその効果を有する。関連する報告として、Molloyら 1999; Shapiroら 1997 (J. Histochem. Cytochem. 45:3-12) およびPearntonら 2001 (Experimental Dermatology 10:193-203)が挙げられる。

【0014】

血小板は、血小板が活性化される場合（たとえば、傷害に対する応答において）の潜在性TGF- β の循環および放出におけるTGF- β の主要源である。治癒プロセス中、種々の形態のTGF- β が創傷部位または線維性障害の部位に見出されるべきである。これらの種々の形態は、活性TGF- β （その遊離型において）、スモール潜在性複合体（TGF- β 潜在性関連ペプチド）およびラージ潜在性複合体（TGF- β 潜在性関連ペプチド-潜在性TGF- β 結合タンパク質）である。治癒プロセス中、種々の複合体が、異なる運命を経験し、種々の役割を演じる。特に、スモールおよびラージ潜在性複合体は、治癒プロセスが生じる間ずっと、活性TGF- β を放出するために切断によって活性化される。

10

【0015】

先行技術は、創傷部位におけるラージおよびスモール潜在性複合体の切断に、プラスミンが介在することを示唆する。さらに、フューリンなどのコンバーターゼは、脊髄における巨核球内部のプロTGF- β の細胞内プロセシング（血小板を生じさせる）の原因であると考えられる。このプロTGF- β のプロセシングは、成熟型を産生するためのプロタンパク質の切断および折り畳みを含む。しかしながら、産生された成熟型は、「活性」TGF- β ではなく、ラージまたはスモール潜在性複合体に関連する。したがって、以前には、コンバーターゼは、創傷または線維性障害部位での血液中の血小板からの潜在性TGF- β （スモール潜在性複合体におけるTGF- β など）の活性化において一役を演じるとは考えられていなかった。

20

【0016】

しかし、本発明者らは、驚くべきことに、フューリンなどのコンバーターゼ酵素の活性が、創傷部位におけるTGF- β の細胞外活性化をもたらすことを立証した（実施例においてさらに詳細に記載する）。創傷部位または線維性障害の部位においてコンバーターゼ酵素の活性を阻害することによって、そのような部位における活性TGF- β の量を減少させることができ、そのことによって瘢痕形成および／または線維症を減少させることができる。興味深いことに、コンバーターゼの活性は、細胞内および細胞外で生じるように見える。さらに、該活性は、転写調節に関連するか、または転写調節によって制御されるように見え（巨核球などの細胞における公知のコンバーターゼ活性とは異なって）、したがって、無核血小板において、あるいは細胞外においてさえも生じることができる。

30

【0017】

コンバーターゼ酵素がTGF- β の活性化に関与するという新たな観察は、これまでに報告されたTGF- β プロセシングおよび成熟におけるこれらの酵素の役割とは異なるものであり、前には予想され得なかった治療的可能性の範囲を広げる。

先行技術は、血小板が潜在性TGF- β を含有することを認めるが、コンバーターゼ活性を阻害することによってこのTGF- β の活性化を防げることが可能であることを示さない。

40

【0018】

対して、先行技術は、コンバーターゼのインヒビターが潜在性TGF- β を産生するプロセシングおよび成熟を阻害することができるのを示唆するのみである。コンバーターゼのこの活性は、転写的に調節される。したがって、当業者であれば、いったん潜在性TGF- β が循環する血小板に存在すれば、コンバーターゼインヒビターがその状態に影響を及ぼし得ることを認識するであろう。

創傷部位において、コンバーターゼインヒビターがこの血小板が産生する潜在性TGF- β の活性化および望ましくない影響を妨げることができるということを見ることができるのは本発明のみである。

【0019】

50

癒痕形成または線維症を減少させるコンバターゼインヒビターの効力は、血小板によって放出された潜在性TGF- β が、ほとんどすべてがTGF- β 1（スモール潜在性複合体に関連する）から構成されるという事実によって増進される。TGF- β 1が創傷治癒において主要因子であり、癒痕形成に有利なプロ線維性であることはよく知られている。創傷治癒の初期相中にプロ線維性TGF- β イソフォームが優勢であること（癒痕形成および線維症に有利である局所的条件を引き起こす）は、血小板媒介性成長因子の放出にその大部分を起因する。時間とともに、TGF- β イソフォームの比率は血小板由来TGF- β のレベルの低下として変化し、線維芽細胞に由来する抗線維性TGF- β 3のレベルが増加する。その結果、本発明にしたがって潜在性TGF- β の活性化を防止することは、創傷治癒に関連する癒痕形成の度合いを劇的に減少させることができる。

10

【0020】

コンバターゼインヒビターとして、幾つかの種類の化合物が、本発明にしたがって使用され得る。これらの化合物として、以下のものが挙げられる：

- (i)コンバターゼ酵素に結合し、その活性を阻害する化合物（たとえば、競合的インヒビターまたはアロステリックインヒビター）；
- (ii)コンバターゼ酵素の転写、翻訳または発現を妨げる化合物（たとえば、リボザイムまたはアンチセンスDNA分子）；
- (iii)コンバターゼ酵素の分解速度を増加させる化合物；
- (iv)コンバターゼ酵素と潜在性TGF- β および／またはTGF- β 活性化タンパク質との相互作用を阻害する化合物；
- (v)不活性なフューリン前駆体のタンパク質分解性活性化を阻害する化合物；および
- (vi)フューリンまたはPACE-4などのコンバターゼ酵素の、活性の細胞内部位への起こりうる細胞内トランスロケーションを阻害する化合物。

20

【0021】

本発明の1つの態様において、コンバターゼインヒビターがフューリンのインヒビターであるのが好ましい。

本発明の別の態様において、コンバターゼインヒビターは、フューリン様プロタンパク質コンバターゼのインヒビターであるのが好ましく、PACE-4のインヒビターであるのがより好ましい。

【0022】

コンバターゼインヒビターは、セリンプロテアーゼインヒビターであってもよく、チオールインヒビターであるのが好ましい。チオールインヒビターが、少なくとも1つのコンバターゼ酵素切断部位を模倣するペプチド部分を有するペプチジルクロロアルキルケトンであってもよい。コンバターゼ酵素切断部位を模倣するペプチド部分をもつペプチジルクロロアルキルケトンが、該酵素活性の特異的インヒビターであることが見出されている。好ましいインヒビターは、デカノイル-RVKR-cmkおよびその誘導体である。

30

【0023】

本発明に用いるのに適したさらなるコンバターゼインヒビターとして、以下のものが挙げられる：

- (i) α 1-アンチトリプシン(α 1 PDX)またはそれをコードする核酸；
- (ii)arg-val-pro-arg、ala-val-arg-argまたはarg-val-arg-argというアミノ酸配列を有する化合物などの α 1-アンチトリプシンの誘導体またはそれをコードする核酸；
- (iii)p-クロロメルクリ安息香酸塩；
- (iv)トシルアミド-フェニルエチルクロロメチルケトン(TPCK)；
- (v)D-ポリアルギニン（たとえば、ヘキサ-アルギニンおよびその誘導体）；
- (vi)アセチル-leu-leu-arg-アルデヒド・ヘミスルフェート；
- (vii)S-カルボキシフェニルエチル-カルバモイル-arg-val-arg-アルデヒド；
- (viii)トレオジメルカプトブタンジオール；および
- (ix)Tos-Lys-クロロメチルケトン。

40

【0024】

50

別の態様および／または追加として、コンバターゼインヒビターは、Ca²⁺隔離剤（sequester）であってもよい。さらに、Ca²⁺隔離剤（EDTAまたはEGTAなど）は、上述のインヒビターと併用してもよい。

【0025】

本発明者らは、コンバターゼ酵素が、細胞外および細胞内の両方に作用して、創傷または線維性コンディションの部位における細胞外スペースにおいて、潜在性TGF-βの活性化を引き起こすことを立証している。このことは、創傷治癒または線維症に関連する潜在性TGF-βの活性化を妨げるために、局所的に適用されたコンバターゼインヒビターを使用することが可能であることを本発明者らに気付かせた。先行技術は、フューリンなどのコンバターゼの活性が血小板を生み出す骨髄中の巨核球において生じること、およびこの活性が潜在性TGF-βを産生するプロセッシングに限られることを示唆する。したがって、先行技術は、フューリン活性の局所的な阻害が、活性TGF-βへの潜在性TGF-βの変換を阻害することを示唆する教示を含まない。さらに、先行技術は、フューリンの治療的操作が、骨髄にデリバリーされ、骨髄中においてその作用を達成しうる作用剤を必要とすること
を示唆する。

【0026】

細胞外コンバターゼ活性がTGF-βの活性化に寄与するという驚くべき発見は、水溶性コンバターゼインヒビターを用いてTGF-β活性化を低下させて瘢痕形成を減少させることができるということを本発明者らに気付かせた。細胞膜を透過することができない水溶性インヒビターは一般的に低い細胞毒性を示すので、このようなインヒビターの使用は特に有利である。水溶性コンバターゼインヒビターは、抗瘢痕形成剤を設計する場合に考慮すべき重要な事柄である炎症反応の誘発が最少である組成物に製剤することも容易にできる。本発明に使用するのに適した好ましい水溶性コンバターゼインヒビターは、L-ヘキサアルギニンである。

【0027】

コンバターゼ活性の局在化された阻害の効果は、コンバターゼインヒビターの全身投与の結果として生じるものとは非常に相異なる。当業者は、コンバターゼインヒビターの全身使用が、骨髄におけるプロTGF-βのプロセッシングを阻害することによって活性TGF-βのレベルを間接的に減少させることを示唆され、また、このようなアプローチが多くの有害な影響をもつことをも理解するであろう。このような影響の1つは、コンバターゼインヒビターの全身投与が、創傷治癒の後期において重要である抗線維性TGF-β3のレベルも減少させることである。第2の問題は、コンバターゼはTGF-β以外のタンパク質の正常なプロセッシングに関与するので、コンバターゼインヒビターの全身使用は、有害（場合により有毒）な影響をもつことである。

【0028】

本発明のコンバターゼインヒビターの局所適用には、これらの不利点のどちらもが当てはまらない。この使用において、該インヒビターの効果は、創傷の領域または線維症の部位に関するものであり、およびインヒビターの投与を、血小板から放出されたTGF-βの初期量に影響を及ぼすように調節することができる。

【0029】

上記に示したように、本発明者らは、TGF-β活性化に寄与しているコンバターゼ活性が血小板内で開始され、血小板の脱顆粒において細胞外スペースに放出されるコンバターゼの結果として細胞外コンバターゼ活性が生じると考える。結果として、本発明に用いるコンバターゼ活性のインヒビターは、細胞膜を通過して細胞内で作用することができるインヒビターである。このようなインヒビターは、脱顆粒前にコンバターゼ活性を減少させることができる。それらは、細胞内および細胞外の両方で生じるTGF-β活性化を低減化することができる。とは言うものの、TGF-β活性化に寄与しているコンバターゼ活性の大部分は、血小板脱顆粒後に細胞外で生じるように見える。このように、水溶性インヒビターを用いて効果的にTGF-β活性化を減少させることができ、したがって、瘢

痕形成および／または線維症を減少させることができる。

【0030】

本発明の好ましい態様において、コンバターゼインヒビターを含む医薬を予防的に適用することができる。このように、本発明医薬は創傷が形成されるか、または線維症が生じる可能性がある部位（たとえば、待機手術前など）に適用することができる。

本発明者らは、本発明インヒビターが、皮膚の創傷または皮膚の線維性コンディションへの局所適用に非常に適していることを見出す。

本発明に用いるコンバターゼインヒビターは、タンパク質であるか、またはペプチジル成分を有してもよい。このようなタンパク質は、容易に修飾して、フューリンなどの酵素を阻害する能力を保持する誘導体を形成することができる。したがって、天然のタンパク質の機能特性を保持する誘導体もまた、本発明の好ましいインヒビターである。このような誘導体の例には、天然のタンパク質の機能的に活性なフラグメントおよびインシトゥで活性化される天然のタンパク質の前駆体（たとえば、プロタンパク質など）までもが含まれる。

【0031】

コンバターゼインヒビターは、本発明にしたがって、次のような、瘢痕の予防または減少が必要とされる状況またはコンディションにおいて使用することができる。

(i) 皮膚の瘢痕が組織機能に対して過剰および／または有害である場合、特に、瘢痕の拘縮が起こるかまたは起こる可能性がある場合（たとえば、関節の柔軟性を損なう皮膚の火傷および創傷、特に子供の瘢痕）；

(i i) 美容上の考慮が重要である皮膚における瘢痕形成；

(i i i) 機能的および美容的減損を引き起こす、肥大性またはケロイド性瘢痕（特に、アフリカーカリビアンおよびモンゴロイドにおいて）が生じる場合；

(i v) 両方(移植部および切除部)の皮膚部位に生じる瘢痕および人工皮膚の適用によって生じる瘢痕形成；

(v) (神経外科手術または脳の穿損傷後などの)中枢神経系における瘢痕形成。たとえば、グリアの瘢痕形成は、傷んだ神経の再接続を妨げる；

(v i) 眼内、特に角膜における瘢痕形成（瘢痕形成が異常な混濁を引き起こし、視覚に問題を与え、盲目に至らしめることさえある）、網膜における瘢痕形成（ゆがみあるいは網膜剥離を引き起こし、盲目に至らしめる）、および緑内障において眼圧を低下する手術（緑内障ろ過術など）における創傷治癒後の瘢痕形成（水性体液が排出されないことによって外科処置の失敗を引き起こし、その結果として緑内障が再発する）；

(v i i) 異常な心臓機能を亢進する心臓における瘢痕形成（外科手術または心筋梗塞後など）；

(v i i i) 内臓間の癒着を引き起こす腹部または腎盂における手術後に生じる消化管の瘢痕形成（消化管の一部と体壁の癒着が形成されると、腸のループがねじれて、虚血、壊疽が生じ、緊急処置が必要となる（処置しなければ死亡する））；同様に、消化管の外傷または切開は、瘢痕形成および瘢痕の拘縮または狭窄に至らしめ、消化管の管腔閉塞が起こり、その結果再び生命が脅かされる；

(i x) 不妊症を引き起こす、卵管の領域における腎盂の瘢痕形成；

(x) 異常な拘縮をもたらす、筋肉の機能が減損する、筋肉の損傷後の瘢痕形成；

(x i) 重篤な機能損失をもたらす、腱および靱帯の損傷後の瘢痕形成または線維症。

【0032】

コンバターゼインヒビターは、線維症の治療または予防にも用いることができる。本発明化合物は、たとえば、肝硬変、肝臓線維症、糸球体腎炎、肺線維症、強皮症、心筋線維症、心筋梗塞後の線維症、発作後または神経退行性障害（アルツハイマー病）後の中枢神経系線維症、増殖性硝子体網膜症（PVR）および関節炎の治療または予防においても有用である。

コンバターゼインヒビターは、線維性疾患における線維症の減少および予防、肥大性の瘢痕またはケロイド（特に、皮膚の）として現れる線維症の形成を減少または予防に有用

10

20

30

40

50

である。

【0033】

本発明の創傷治癒組成物は、特に該組成物が用いられるべき作法に応じて多くの異なる形態をとることができる。したがって、たとえば、組成物は、液剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、ヒドロゲル剤、粉剤またはエアロゾル剤の形態であってよい。このような組成物はすべて、コンバーゼインヒビターを、治療を必要とする患者（ヒトまたは動物）へ投与する手段として好ましい投与方法である、皮膚への局所投与に適している。

コンバーゼインヒビターは、治療されるべき創傷を覆うかまたは封じるために用い得る滅菌包帯またはパッチにて適用してもよい。

本発明の好ましい組成物は、注射用液剤（たとえば、創傷または傷ついた部位の端の周囲における皮内注射など）の形態であってもよい。

【0034】

本発明組成物のビヒクルは、患者にとって十分に寛容であり、有効成分が創傷に放出されるものを使用すべきである。このようなビヒクルは、生体崩壊性、生体分解性および／または非炎症性であることが好ましい。

本発明組成物は、多くの経路で使用しうる。したがって、たとえば、創傷の治癒を調節するために、患者の創傷の内部および／または周囲に適用することができる。本発明組成物を“現存する”創傷に適用する場合、医薬的に許容し得るビヒクルは相対的に“刺激性の少ない”もの、すなわち生体適合性、生体崩壊性、生体分解性および非炎症性のビヒクルである。

【0035】

本発明組成物は、外科手術によって形成される創傷の治癒を調節するために、外科手術（特に待機手術）の前に使用することもできる。この場合、局所適用された組成物のビヒクルは、皮膚のケラチン層を透過しうるものであることが必要である。この目的に適当なビヒクルとして、ジメチルスルホキシドおよび酢酸が挙げられる。コンバーゼインヒビターの使用は、このような予防的使用が好ましい。

本発明組成物は、眼の外科手術（たとえば、角膜のレーザー手術など）に起因する治癒の促進および瘢痕形成の減少または制御に使用するのに適している。この場合、該組成物または医薬は、点眼剤の形態で使用する。

コンバーゼインヒビターは、体内創傷の治癒にも適用しうる。したがって、たとえば、該組成物を、肺の創傷治癒に用いるための吸入剤、または肺の線維症および狭窄の予防あるいは治療のための吸入剤として製剤することができる。

【0036】

創傷部位に適用される、コンバーゼインヒビターの量は、化合物の生物学的活性およびバイオアベイラビリティなどの複数の因子、さらに投与形態ならびにインヒビターの生理化学的特性に依存する。他の因子として、

A) 処置される患者におけるインヒビターの半減期；

B) 治療される特定のコンディション；

C) 患者の年齢；

が挙げられる。

また、投与頻度、特に、処置された患者の体内におけるコンバーゼの半減期が上記因子に影響を及ぼす。

一般に、該組成物を用いて存在する創傷または線維性障害を治療する場合、創傷が生じた直後、あるいは障害が診断された直後に、コンバーゼインヒビターを投与すべきである。該組成物を用いる療法は、臨床医が満足する創傷治癒結果が得られるまで、または線維性障害の場合、異常な線維組織形成の恐れあるいは原因が排除されるまで継続すべきである。

【0037】

瘢痕形成および／または線維性障害を調節する、本発明組成物もまた、創傷が形成された直後に、創傷に適用されるべきである。しかし、瘢痕および線維症は、数日あるいは数

10

20

30

40

50

週間にわたって進行することが可能である。したがって、創傷形成または障害進行（またはその診断）の数日後あるいは数週間後に該組成物が投与される場合でさえも、コンバターゼインヒビターを投与することによって、治療される患者は恩恵を受けることができる。

【0038】

予防的に使用する場合（たとえば、外科手術前あるいは線維性障害が進行する恐れのある場合）、望ましくない線維症の恐れが確認されたらすぐに、コンバターゼインヒビターを投与すべきである。たとえば、待機手術が行われる予定であり、その後の瘢痕形成を減少させたい患者の皮膚の部位に、コンバターゼインヒビターを含有するクリーム剤または軟膏剤を適用する。この場合、患者に手術前処置をしているとき、または望ましくは、外科手術の数時間前もしくは数日前に、（患者の健康状態および年齢ならびに形成される予定の創傷の大きさに応じて）組成物を適用する。

10

投与頻度は、使用するインヒビターの生物学的半減期によって決定する。典型的には、創傷部位または線維性障害に冒された組織におけるインヒビターの濃度が、治療効果を得るのに適した濃度に維持されるように、標的組織にコンバターゼインヒビターを含有するクリーム剤または軟膏剤を投与すべきである。このためには、一日一回投与または一日数回投与が必要である。

【0039】

製薬業界において通例用いられる公知の操作（インビボ実験用、臨床試験用など）を用いて、特定の組成物を配合し、厳密な（化合物の一日投与量および投与頻度について）治療養生法を行う。

20

通常、本発明組成物は、創傷部位または線維性障害の部位に投与された場合に、該部位におけるコンバターゼインヒビターの濃度が $0.01\mu\text{M}$ ～ 10mM になるように製剤すべきである。

単なる例示であるが、 $0.1\mu\text{M}$ ～ 10mM のデカノイルーRVKR-cmkを含む注射用液剤が、存在する（すなわち、「開口」）創傷への適用に適している。

【0040】

コンバターゼ活性を阻害する化合物の好適な一日投与量は、前述の因子ならびに治療される創傷の大きさまたは線維症に冒された組織の量に応じて決定する。創傷または線維性障害の治療に必要なコンバターゼインヒビターの代表的な量は、24時間当たり、 $0.01\mu\text{g}$ ～ 100mg の範囲であり、創傷の大きさまたは線維症の程度ならびに他の幾つかの因子に応じて決定する。

30

また、本発明に使用する化合物は、天然から単離しうるかまたは化学的に合成しうるということが理解されよう。

【0041】

コンバターゼインヒビターは、インビボにおける半減期が非常に短いので、コンバターゼインヒビターを当該する組織に投与する公知の方法には、たとえわずか2、3日の過程であっても、活性化化合物を創傷部位または線維症の部位へ濃度を維持したまま到達することが困難であるという不利点があることが多い。コンバターゼインヒビターの半減期は、次に述べるような理由を含む多くの理由から短くなる：

40

(i) プロテアーゼなどによる分解；

(ii) 結合タンパク質によるクリアランス($\alpha 2$ マクログロブリンなど)；

(iii) デコリンおよびフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス分子による結合および薬剤活性の阻害。

【0042】

さらに、創傷の治癒および／または瘢痕形成／線維症の治療用化合物は、適当なビヒクルとともに投与する必要がある、化合物とビヒクルを含む組成物として提供されることが多い。これまでに概略で述べたようにこのようなビヒクルは、非炎症性、生体適合性、生体吸収性であることが好ましく、活性化化合物を分解または不活性化してはならない（貯蔵中または使用中に）。しかし、特定の化合物を治療される組織へデリバリーするための満

50

足できるビヒクルを提供するのが困難であることが多い。

【0043】

これらの問題を除去するかまたは軽減することができる簡便な経路は、遺伝子療法によって、創傷部位（または線維症の部位）に、治療上有効な創傷治癒量のコンバーゼインヒビターを提供することである。

本発明の第4の態様は、遺伝子療法技術に使用するためのデリバリーシステムを提供することであり、該デリバリーシステムは、コンバーゼ活性を阻害するタンパク質をコードするDNA分子を特徴とし、該DNA分子は、転写されて該タンパク質を発現する能力をもつ。

本発明の第5の態様は、前パラグラフで定義した、創傷または線維症の治療用の医薬の製造に用いるデリバリーシステムの使用を提供する。

本発明の第6の態様は、治療を必要とする患者に、治療上有効量の、本発明の第4の態様で定義したデリバリーシステムを投与することの特徴とする、創傷または線維症を治療する方法を提供する。

【0044】

該デリバリーシステムは、大部分の慣例のデリバリーシステムと比較して、有効成分の濃度を創傷部位または線維症部位において長期にわたって維持するのに非常に適している。創傷部位または線維症部位において、本発明のDNA分子で形質転換された細胞から、タンパク質が継続的に発現される。したがって、該タンパク質が、インビボにおいて作用剤としての半減期が非常に短かったとしても、治療上有効量のタンパク質が、処置された組織から継続的に発現される。

さらに、本発明のデリバリーシステムを用いて、創傷に塗布される軟膏剤またはクリーム剤に必要であった慣例の医薬的ビヒクルを使用することなく、DNA分子（およびそれによって、有効な治療剤であるタンパク質）が提供される。

【0045】

本発明のデリバリーシステムは、DNA分子が発現して、コンバーゼ活性を阻害することによって、直接的または間接的に、創傷を治癒および／または線維症もしくは瘢痕形成を治療する活性を有するタンパク質を産生しうるものである。“直接的”とは、遺伝子発現産物それ自体が、創傷治癒および／または線維症もしくは瘢痕形成の調節に必要な活性をもつことを意味する。“間接的”とは、遺伝子発現産物が、少なくとも一つのさらなる反応を受けるかまたは媒介して（酵素など）、コンバーゼ活性を阻害することによる創傷治癒および／または線維症もしくは瘢痕形成の調節に有効な作用剤を提供することを意味する。

【0046】

該DNA分子を、適当なベクターに導入して組換えベクターを作製することができる。ベクターは、たとえば、プラスミド、コスミドまたはファージである。このような組換えベクターは、本発明のデリバリーシステムにおいて、該DNA分子で細胞を形質転換するのに非常に有用である。

組換えベクターには他の機能要素を含めることもできる。たとえば、細胞の核内で自律複製するように、組換えベクターを設計することができる。この場合、DNA複製を誘発する要素は、組換えベクター内に必要である。別法として、ベクターおよび組換えDNA分子が細胞のゲノムに組み込まれるように、組換えベクターを設計することができる。この場合、標的となる組み込み（たとえば、相同的組換えによる）に有利なDNA配列が望ましい。組換えベクターは、クローニング過程において選択可能なマーカーとして用いる遺伝子をコードするDNAを含むこともできる

組換えベクターは、さらに、遺伝子発現のコントロールに必要とされる、プロモーターまたはレギュレーターを含むこともできる。

【0047】

DNA分子は、必須ではないが、治療される患者の細胞のDNAに組み入れられてもよい。未分化細胞は、安定に形質転換されて、遺伝子的に修飾された娘細胞が産生される。

この場合、患者における発現の調節には、たとえば、特異的転写因子、遺伝子アクチベーター、あるいはより好ましくは、創傷部位に見出されるシグナルに特異的に応答して遺伝子を転写する誘発可能プロモーターが必要である。別法として、治療される患者の分化細胞の不安定または過渡的形質転換を補助するように、該デリバリーシステムを設計することができる。この場合、DNA分子の発現は、形質転換細胞が死亡するかまたはタンパク質の発現を止めた時に停止するので、発現の調節は、さほど重要ではない（理想的には、創傷、線維症もしくは瘢痕形成が治療されるかまたは予防された時点）。

【0048】

デリバリーシステムは、ベクターに組み入れることなく、患者にDNA分子を提供することができる。たとえば、DNA分子をリポソームまたはウイルス粒子に組み入れることができる。別法として、直接のエンドサイトーシスによる飲み込みなどの適当な手段により、“裸の(naked)” DNA分子を患者の細胞に挿入することができる。

10

DNA分子を、トランスフェクション、感染、マイクロインジェクション、細胞融合、原形質融合または弾道衝撃によって、治療される患者の細胞に移入することができる。たとえば、被覆金粒子を用いる弾道トランスフェクション、DNA分子を含むリポソーム、ウイルスベクター（アデノウイルスなど）および、局所適用または注射によりプラスミドDNAを直接創傷領域に適用することによる直接DNA取り込みを提供する手段（エンドサイトーシスなど）などによって、移入を行う。

【0049】

該DNA分子からタンパク質が発現すると、瘢痕形成の減少とともに創傷治癒を直接的または間接的に提供する場合、同時に瘢痕形成の増加がもたらされることもある創傷治癒進度の増進を提供する場合、あるいは線維症の調節（阻止、予防または回復）を提供する場合がある。

20

本発明の第4の態様のデリバリーシステムを、本発明の第5または6の態様において用い、これまでに述べた身体状態の治療を行いうることが理解されよう。

次に記載する実施例および図面において本発明をさらに詳しく説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0050】

活性化血小板の活性TGF- β の生成を阻害する、フューリン活性インヒビターの能力を、トロンビンによる刺激に反応して血小板の放出およびTGF- β の活性化を抑止するインヒビターの能力によって実証した。

30

1. プロトコル

ヒト血小板の採集および調製：

健常成人ボランティア（年齢21～45歳）からの末梢静脈血サンプルを20-ゲージS-モノベットに入れた。EDTAを用いてサンプルの凝固を防止した。以下のプロトコルにしたがって、分画遠心法によりヒト血小板を単離した：

血液サンプルを300gで10分間遠心分離して、多血小板血漿の上清を作成した。次いで、多血小板血漿を2,500gで15分間遠心分離して、血小板ペレットを作成した。ペレットの血小板を採集し、使用する前に再懸濁させた。

40

血小板低張溶解液(lysate)の作成：

上記のように採集した血小板を蒸留水に再懸濁させ、室温にて5分間インキュベートした。等体積の0.2%低発熱物質ウシ血清アルブミンを含む2X血清フリーDME培地を加えることにより細胞溶解を停止させた。使用前に、室温にて12,000gで10分間遠心分離することによって溶解液を清澄化した。

【0051】

2. 実験結果 1

2. 1. トロンビンにより活性化した血小板は、TGF- β を放出し、活性化させる：

上記の概略のように採集したヒト血小板は、トロンビンの添加(0.1 u/ml 37℃にて30分間)により活性化された。Abeら(鄭n assay for transforming growth factor- β usin

50

g cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct 1994, Anal. Biochem. 216: 276-284)に記載されている T G F - β 用の PAI/L バイオアッセイを用いてアッセイすると、血小板放出液 (releasate) において、この活性化は、血小板からの大量の T G F - β (総 T G F - β 60.2 ng/ml 平均) の放出を引き起こし、有意な量の活性 T G F - β の産生を始動させた (血小板が活性化中に静止状態ならば平均 159 pg/ml、血小板が活性化中に激しく攪拌されているならば平均 896 pg/ml)。総特異的中和抗 T G F - β 抗体は、活性 T G F - β が測定されることを証明する P A I / L アッセイにおいて、得られるシグナルを完全に消滅させた。血小板放出液に加えられた外因性トロンビンは潜在性 T G F - β を直接活性化することはできなかったため、潜在性 T G F - β の活性化は血小板が仲介した (データ示さず)。抗体阻害実験により、血小板が排他的に T G F - β 1 を発現したことが確認された (データ示さず)。

10

【0052】

2. 2. 血小板は細胞内活性 T G F - β を含有する：

血小板内部の活性 T G F - β の存在を免疫定位およびバイオアッセイの両方によって確認した。

ニワトリ由来活性 T G F - β 1 特異的 I g Y A F - 1 0 1 - N A (R&D Systems) および膜マーカー C D 4 1 (BD Biosciences) に特異的に反応する抗体を用いて、血小板内部の活性 T G F - β の局在化の共焦点顕微鏡免疫蛍光実験を行った。z 軸に沿った 0.5 μ m 間隔の光学的切片において、これらのタンパク質の細胞内局在化を調査した。T G F - β 1 が、細胞内に局在化して存在することが実証された (膜マーカー C D 4 1 の切片にひそんでいる)。

20

T G F - β 用の P A I / L バイオアッセイを用いて、ヒト血小板の低張溶解液 (前記と同様にして調製) 中の活性 T G F - β についてアッセイを行っている間を通して、血小板中の活性 T G F - β の存在を確認した。

静止血小板由来の溶解液において、活性 T G F - β (104 pg/ml) は有意な比率で検出されたが、存在する総 T G F - β (総 T G F - β 、34.7 ng/ml) の 99% が潜在型であった。トロンビン活性化血小板由来の溶解液において、平均総 T G F - β は 19.5 ng/ml であり、151 pg/ml が活性であった。

バイオアッセイの結果によって、血小板が活性 T G F - β を含むということを見出す免疫局在化が確認された。

30

【0053】

2. 3. フューリン活性の阻害が、トロンビン活性化血小板による T G F - β の活性化を阻害する：

比較実験において、T G F - β の周知のアクチベーター (T S P - 1、プラスミン、M 6 P / I G F - I I 受容体など) および潜在性 T G F - β の推定アクチベーター (他のセリンプロテイナーゼ、システインプロテイナーゼ、カルパイン I および I I、カスパーゼ - 3 およびフューリンなど) のインヒビターのヒト血小板における潜在性 T G F - β 活性化をブロックする能力を評価した。

ヒト血小板をインヒビター (下記) とともにプレインキュベートした後、トロンビンで刺激し (前記)、P A I / L アッセイ (前記) を用いて血小板放出液における活性および総 T G F - β レベルを決定した。結果を図 1 のパネル A ~ C に示す。

40

結果は、潜在性 T G F - β 活性化が、T S P - 1 (L S K L ペプチド)、プラスミン (中和モノクローナル抗体 P G 1 9 : Dr. Michael Kramer により提供された中和抗体) または M 6 P / I G F - I I 受容体 (M 6 P : マンノース - 6 - ホスフェート) に特異的なインヒビターの存在によって有意な影響を受けなかったことを示す (パネル A)。さらに、血小板媒介性潜在性 T G F - β 活性化に関与する、多くの他のプロテイナーゼのインヒビター (アプロチニン、ペファブロク (pefabloc)、 α 1 - アンチトリプシン、E - 6 4、ペプスタチン、ロイペプチン、カスパーゼ - 3 インヒビターおよびカルパインインヒビター) もまた無効果であることがわかった (パネル B)。

比較において、フューリン様プロタンパク質コンバーターゼ、d e c - R V K R - c m k

50

(デカノイル-Arg-Val-Lys-Arg-クロロメチルケトン (Bachem)) 膜透過性インヒビターとの血小板インキュベーションは、放出液中ならびに細胞内で、活性 TGF- β の生成を用量依存性様式で強烈に減少させた (パネル C) (細胞内測定は、低張溶解液から採集された)。本発明者らは、存在する残りの TGF- β (約 20~30%) が、インヒビターの添加前に、血小板製造中早い時期に活性化されたものと考ええる。

【0054】

2. 4. まとめ

上記結果は、驚いたことに、血小板媒介性潜在性 TGF- β 活性化が血小板活性化部位 (すなわち、創傷部位または線維症の部位) において細胞外で生じ、フューリン様コンバターゼ酵素によるタンパク質分解プロセッシングを伴うことを示す。さらに、該結果は、血小板による潜在性 TGF- β の活性化が、フューリン活性のインヒビターを局所的に適用するという血小板の処理によりうまく阻害されうること示す。

当業者であれば、これらの結果から、コンバターゼインヒビターが TGF- β 1 活性化を阻害するために使用でき、そのことによって、抗瘢痕形成または抗線維剤として有効であるというを理解するであろう。

【0055】

3. 実験結果 2

3. 1. フューリン様酵素は、血小板媒介性潜在性 TGF- β 活性化に関与する：

フューリンインヒビターの不在または存在下で血小板をトロンビンによって活性化した。血小板をヘキサアルギニンとともにプレインキュベートしたが、高濃度での血小板活性化の妨害のために、トロンビン添加の5分後に d e c - R V K R - c m k を加えた。P A I / L バイオアッセイで放出液中の活性および総 TGF- β を決定した。結果を図 2 のパネル A に示す。コントロール中の活性 TGF- β レベルは、82 pg/ml (d e c - R V K R - c m k のデータ) および 61 pg/ml (ヘキサアルギニンのデータ) であり、総 TGF- β レベルは、33.4 ng/ml (d e c - R V K R - c m k のデータ) および 39.5 ng/ml (ヘキサアルギニンのデータ) であった。

さらなる実験において、血小板フリーの放出液にフューリンインヒビターを加え、血小板の不在下で 37°C にて 30 分間活性化を継続させた。結果を図 2 のパネル B に示す。コントロール中の活性 TGF- β レベルは、77 pg/ml (d e c - R V K R - c m k のデータ) および 104 pg/ml (ヘキサアルギニンのデータ) であった。氷上でのインキュベーションは、約 56% までコントロール中の活性化を減少させた (データ示さず)。データは、3 つの別個の実験の平均値が、3 重で評価されたことを示す。

結果は、トロンビン刺激血小板を膜透過性プロテアーゼである d e c - R V K R - c m k とともにインキュベートすることにより、放出液中における活性 TGF- β の生成がかなり減少されることを明らかにする (図 2 パネル A)。d e c - R V K R - c m k は、サブチリシン / K e x 2 p - 様プロタンパク質コンバターゼの基質認識配列に基づいているペプチド配列をもつこれらの酵素の特異的で強力なインヒビターである。

このエンドプロテアーゼファミリーの最も優れている普遍的に発現されたメンバーがフューリンであり、コンセンサス配列モチーフ R-X-(K/R)-R において典型的に切断する。膜不透過性フューリンインヒビターであるヘキサ-L-アルギニンもまた、放出液中において活性 TGF- β を有意に減少させた (図 2 パネル A) が、このことは、少なくとも一部の活性化が、潜在性 TGF- β 放出に続いて細胞外で生じたことを示している。

氷上での血小板フリー放出液のインキュベーションが、37°C の場合と比較して、活性 TGF- β レベルを約 56% まで減少させたので、潜在性 TGF- β 活性化は、酵素的であり、血小板の継続的存在とは無関係であるように思われた。血小板懸濁液に観察されるように、放出液中での活性化は、フューリンインヒビターである d e c - R V K R - c m k およびヘキサ-L-アルギニンによって用量依存性様式で阻害された (図 2 B)。これは、潜在性 TGF- β 活性化に関与するフューリン様酵素が、活性化された血小板から放出されることを示す。

【0056】

3. 2. 血小板はフューリン様酵素活性を含み、放出する：

フューリン基質である $\text{p y r - R T K R - a m c}$ を用い、フューリンインヒビターであるヘキサアルギニン (200マイクロモル) または $\text{d e c - R V K R - c m k}$ (150マイクロモル) の不在または存在下で活性化血小板の放出液または低張溶解液をアッセイした。値は、基質依存性内因性蛍光 (基質なしのコントロール) ならびに自然基質加水分解 (緩衝液コントロール) に対して補正した。2 回繰り返しアッセイした 2 ~ 3 個の別の実験の平均値 $\pm$ S.E.M. を示す。

蛍光発生フューリン基質である $\text{p y r - R T K R - a m c}$ を用いて、ヒト血小板の低張溶解液および放出液の両方におけるフューリン様酵素活性を分析した。血小板溶解液は、フューリン様酵素活性を含み、その一部 (約 12%) がトロンビン刺激において放出された。細胞溶解液および放出液における酵素活性は、 $\text{d e c - R V K R - c m k}$ およびヘキサールギニンによって阻害された (図 3)。

トロンビン刺激されたヒト血小板による活性 $\text{T G F - } \beta$ の細胞外生成は、フューリン様プロタンパク質コンバーターゼのインヒビターの存在下で有意に減少した。

【0057】

3. 3. まとめ

フューリン様プロタンパク質コンバーターゼは、熟活性化可能潜在性成長因子複合体への $\text{p r o T G F - } \beta$ 前駆体の成熟を触媒する。しかしながら、我々のデータは、血小板 β 顆粒が、成熟熟活性化可能潜在性 $\text{T G F - } \beta$ を含み、放出すること、およびそのレベルがフューリンインヒビターによって影響されないことを示す。したがって、巨核細胞系列における $\text{p r o T G F - } \beta$ プロセッシングは、巨核細胞内において生じる。その結果、これらのデータから、フューリン様酵素の新規な機能、すなわち、生理的条件下における血小板ラージ潜在性 $\text{T G F - } \beta 1$ 複合体の細胞外活性化における関与が同定される。

要約すれば、本発明者らは、血小板は、潜在性 $\text{T G F - } \beta 1$ の主要な貯蔵部位であるのみならず、脱顆粒に続いてその一部の活性化も行うことを見出した。活性化のメカニズムは、十分に特性決定されたアクチベーターである T S P - 1 、 $\text{M 6 P / I G F - I I}$ 受容体またはプラスミンのいずれも必要としないが、血小板潜在性 $\text{T G F - } \beta$ 複合体は、血小板によって放出されたフューリン様コンバーターゼによる一連のイベントを介して活性化されられると思われる。インビボでの放出に続いて、この酵素は、周囲の組織 (たとえば、創傷領域) において、血小板の存在とは独立して作動を継続し、細胞外マトリックス関連潜在性 $\text{T G F - } \beta$ 複合体の活性化を達成すると思われる。したがって、この新規な活性化のメカニズムは、創傷修復、線維症、アテローム性動脈硬化およびガンなどの血小板脱顆粒を伴う病的コンディションにおける $\text{T G F - } \beta$ 活性を調節するための標的を表わす。したがって、本発明者らは、本発明にしたがって、インヒビター ($\text{d e c - R V K R - c m k}$ およびヘキサアルギニンなど) が、本発明に用いられることを見出した。

【図面の簡単な説明】

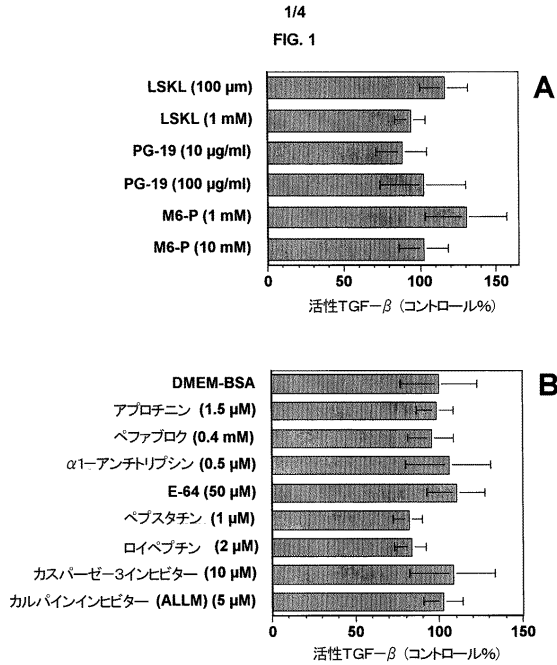
【0058】

【図 1】血小板による $\text{T G F - } \beta$ 活性化を妨げるための種々の $\text{T G F - } \beta$ 活性化のインヒビターおよび推定的インヒビターの能力の分析結果である。

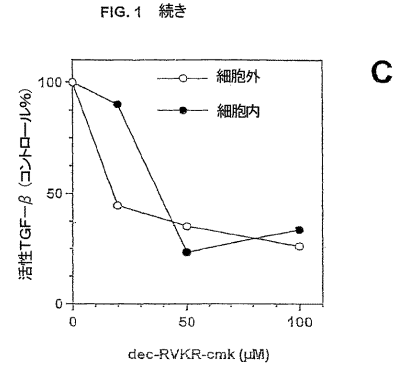
【図 2】実施例の実験結果セクション 2 に述べる、A：血小板放出液および B：血小板フリー放出液における $\text{d e c - R V K R - c m k}$ およびヘキサアルギニンの効果を示す。A において、黒四角は、活性ヘキサアルギニンを示し、白四角は、総ヘキサアルギニンを示すが、黒丸は、活性 $\text{d e c - R V K R - c m k}$ を示し、白丸は、総 $\text{d e c - R V K R - c m k}$ を示す。パネル B において、白丸は、ヘキサアルギニンを示すが、黒丸は、 $\text{d e c - R V K R - c m k}$ を示す。

【図 3】実施例の実験結果セクション 2 に述べる、コントロールサンプル (黒四角)、 $\text{d e c - R V K R - c m k}$ (網掛け四角) およびヘキサアルギニン (白四角) について、細胞溶解液および放出液中のフューリン活性におけるフューリンインヒビターの効果を示す。

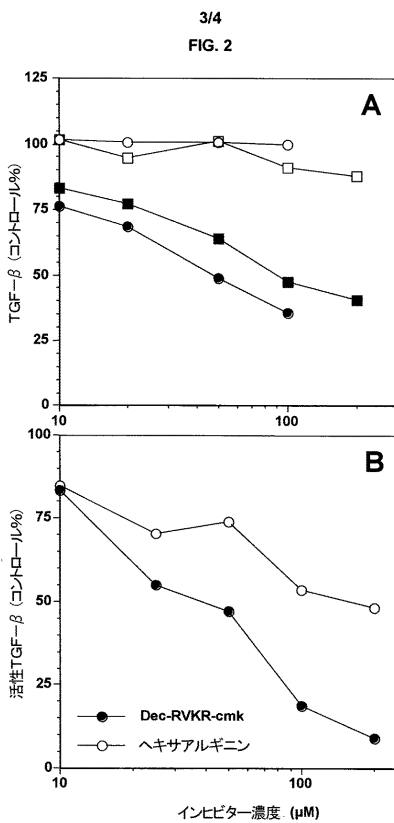
【図 1 - 1】



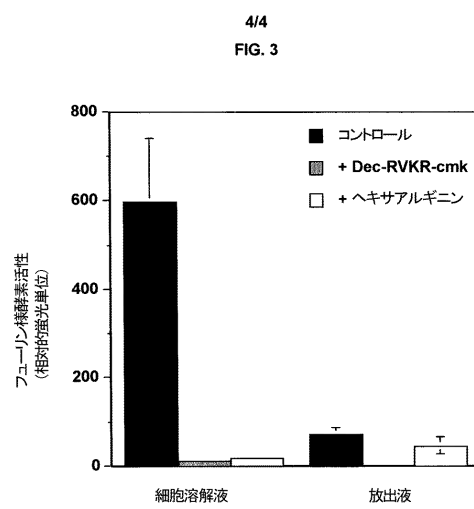
【図 1 - 2】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	19/04 (2006.01)	A 6 1 P	19/04
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1

(74)代理人 100087114

弁理士 齋藤 みの里

(72)発明者 マーク・ウィリアム・ジェイムズ・ファーガソン

英国エスケイ 2 3 ・ 7 ピーエックス、ダービーシャー、ファーネス・ベール・ハイ・ピーク、バク
ストン・ロード、バンク・エンド・バーン

(72)発明者 ゲオルク・ブルンナー

ドイツ連邦共和国デー 4 8 1 5 7 ミュンスター、ドルバウムシュトラッセ 3 0 0 番、デパートメ
ント・オブ・キャンサー・リサーチ、ファッハクリニク・ホルンハイデ

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 2 6 9 3 5 (WO, A 1)

Am. J. Pathol., 2 0 0 1 年 1 月, Vol.158, No.1, P.305-316

J. Biol. Chem., 1 9 9 9 年 1 2 月 2 4 日, Vol.274, No.52, P.37280-37284

J. Biol. Chem., 2 0 0 0 年 1 1 月 2 4 日, Vol.275, No.47, P.36741-36749

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A61K 45/00

A61K 31/7088

A61K 38/00

A61L 27/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

BIOSIS(STN)

CAPLUS(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)