

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4050317号
(P4050317)

(45) 発行日 平成20年2月20日 (2008. 2. 20)

(24) 登録日 平成19年12月7日 (2007. 12. 7)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 17/02 (2006. 01)

A 6 1 P 17/02

請求項の数 7 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平9-508246	(73) 特許権者	レノボ・リミテッド
(86) (22) 出願日	平成8年8月8日 (1996. 8. 8)		イギリス、エム13・9エックスエックス
(65) 公表番号	特表平11-510505		、マンチェスター、グラフトン・ストリー
(43) 公表日	平成11年9月14日 (1999. 9. 14)		ト48番、マンチェスター・インキュベイ
(86) 国際出願番号	PCT/GB1996/001930		ター・ビルディング
(87) 国際公開番号	W01997/005894	(74) 代理人	弁理士 青山 稔
(87) 国際公開日	平成9年2月20日 (1997. 2. 20)		
審査請求日	平成15年7月29日 (2003. 7. 29)	(74) 代理人	弁理士 田村 恭生
(31) 優先権主張番号	9516287.1	(72) 発明者	ファーガソン, マーク・ウィリアム・ジェ
(32) 優先日	平成7年8月9日 (1995. 8. 9)		イムズ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス、エスケイ4・4ピーエル、チェ
			シャー、ストックポート、ヒートン・ムー
			ア、ピールモート・ロード13番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-10含有医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

IL-10または少なくとも1つのアミノ酸の付加、欠失または置換によりIL-10とは相異し、IL-10と少なくとも95%の相同性をもち、IL-10の抗炎症性治癒機能性を保有する、そのフラグメントもしくは一部修飾体を含む、瘢痕の減少をともなって創傷または線維性疾患の治癒を促進するための医薬組成物。

【請求項2】

さらに医薬的に許容しうる担体、希釈剤または賦形剤を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

瘢痕の減少をともなって創傷または線維性疾患の治癒を促進する別の組成物とともに用いる、上記請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

慢性の創傷の治癒を促進するための組成物とともに用いる、上記請求項1～3のいずれかひとつに記載の医薬組成物。

【請求項5】

創傷部位または線維症の部位へ適用するための請求項1～4に記載の医薬組成物。

【請求項6】

IL-10またはそのフラグメントもしくは一部修飾体を約1 μM～約10 μMの濃度で含む、請求項1～5に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

IL-10 またはそのフラグメントもしくは一部修飾体を約 2.5 μ M ~ 約 5 μ M の濃度で含む、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

本発明は、創傷または線維性疾患の治療、特に瘢痕の形成の減少をともなう創傷または線維性疾患の治療を促進するための医薬組成物に関する。

“創傷または線維性疾患”とは、結果的に瘢痕組織が形成されうる状態のいずれをも意味する。特に、皮膚創傷の治療、腱損傷の回復、挫傷の治療、角膜創傷などの眼創傷の治療、中枢神経系 (CNS) 損傷の治療、中枢神経系に瘢痕組織が形成される状態、打撃による瘢痕組織の形成、および損傷または外科手術の結果として起こる組織の癒着（これには、腱癒着および腹部狭窄および癒着などを含めてもよい）が含まれる。線維性疾患の例としては、肺線維症、糸球体腎炎、肝硬変、全身性硬化症、硬皮症および増殖性硝子体網膜症が挙げられる。

10

“瘢痕の形成の減少”とは、非処置の創傷または線維性疾患と比較した場合の瘢痕の減少のレベルを意味する。

特に、瘢痕の形成の減少をともなう創傷または線維性疾患の治療を促進するための組成物が欠如している。瘢痕組織の形成は、治療した創傷に機械的強度を与えるものではあるが、醜いものとなりえるものであり、かつ組織の機能を損なう可能性もある。

このことは、特に CNS における瘢痕組織が形成される創傷が該当し、該瘢痕組織は損傷を受けるかまたは再成長した神経末端を阻害し、その機能に非常に重大な影響を及ぼす。また、たとえば、静脈潰瘍、糖尿病性潰瘍および床ずれ（褥瘡性潰瘍）（特に高齢かつ車椅子使用患者におけるもの）といったような慢性創傷の治療および癒着を促進する組成物が欠如している。このような組成物は、創傷の治療が遅いかまたは創傷の治療過程がまだ開始していない患者において極めて有用である。このような組成物を用いて、創傷の治療を“キックスタート”させ、次いで本発明組成物と組み合わせることで用いることができる。したがって、慢性創傷が治療されるのみならず、瘢痕の形成も減少して癒着されうることになる。

20

IL-10 (インターロイキン 10) は、最初、Th2 細胞の産物として同定されたが (Fiorentino, D.F. および Modman, T.R., 1989, J. Exp. Med., 170:2081-2095)、また別に、マスト細胞の生存を延長させ、胸腺細胞の増殖を増強させる B 細胞リンパ腫の産物としても同定された (O'Garra, ら、1990, Internal Immunol., 2:821-823)。

30

Moore, K.W. ら (1990, Science, 248:1230-1234) および Vieira, P. ら (1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:1172-1176) によるヒトおよびマウスの IL-10 の分子的特徴決定により、それらのヌクレオチド配列の相同性が 80% であることが示された。グリコシル化はマウス IL-10 (mIL-10) の生物学的活性にとって必須なものではないが、mIL-10 のタンパク質は、2 つの潜在性 N-グリコシル化サイトをもつ 157 個のアミノ酸からなる。ヒト IL-10 (hIL-10) タンパク質は、使用されない (Vieira ら、1991) ひとつの N-グリコシル化サイトをもつ 160 個のアミノ酸からなる。mIL-10 および hIL-10 の両方が、それぞれ分子量 32 kDa および 39 kDa の生物学的に活性なホモダイマーを生成する 2 つの分子内ジスルフィド結合を形成する 4 つのシステイン残基を含んでおり、IL-10 の単量体が生物学的に活性であるかどうかははっきりしていない。hIL-10 と mIL-10 の間には 80% の相同性があるが、hIL-10 のみがヒトおよびマウス細胞の両方に作用し、一方、mIL-10 は、種特異的活性をもつ (Vieira ら、1991; Kim, J.M. ら、1992, J. Immunol., 148:3618-3623)。

40

IL-10 には多数の細胞源および多くの生物学的活性をもつが、それらのすべてが、創傷という微環境において何らかの役割を演じている。IL-10 が多数の刺激効果および阻害効果もつことがわかっている。van Vlasselaar ら (1994, J. Cell Biol., 124:569-577) は、IL-10 が、マウス骨髄細胞の骨原性の拘束に必要な TGF- β の合成を阻害し、結果としてマトリックスの石灰化が起こることを示した。一方、Go ら (1990, J. Exp. Med., 172:1625-1631) は、IL-10 が新規な B 細胞刺激因子であることを示した。Bodgan

50

ら (1991、Exp.Med.,174:1549-1555) によって、IL-10 がマクロファージに直接作用して、それらの活性化を阻害し、それによって、前炎症性のサイトカインの放出を阻害することも示された (Berg,D.J.ら、1995、J.Exp.Med.,182:99-10; Chernoff,A.E.ら、1995、J.Immunol.154(10):5492-5499も参照せよ)。

前述したようなサイトカインの研究にもかかわらず、本発明者らは、驚くべきことに、IL-10 を用いることにより、瘢痕の減少をとまって創傷または線維性疾患の治癒を促進しうることを見いだした。創傷部位または線維性疾患の部位の炎症を抑制することにより (特に、創傷形成 / 発症後初期の段階で)、得られるコラーゲンマトリックスに “ノックオン” 効果が生じ、その結果、構造が改善され、瘢痕が減少すると考えられる。短期的には、上皮再形成または創傷修復を阻害せず、一方、長期的には、後に形成される瘢痕の質を改善し、瘢痕の形成を減少することから、この結果は、特に驚くべきことである。

本発明にしたがって、瘢痕の形成の減少をとまって創傷または線維性疾患の治癒を促進するのに使用する IL-10 もしくはそのフラグメントまたは一部修飾体が提供される。 “フラグメントまたは一部修飾体” とは、抗炎症性治癒機能性を保有する IL-10 のフラグメントまたは一部修飾体を意味するが、もちろん、さらなる機能性を有してもよい。一部修飾としては、アミノ酸残基の付加、欠失または置換などによるものが挙げられる。たとえば、置換は、保存された置換である。したがって、一部修飾体分子は、IL-10 の相同体である。たとえば、IL-10 と少なくとも 40 % の相同性をもつことができる。たとえば、IL-10 と少なくとも 50、60、70、80、90 または 95 % の相同性をもつことができる。

IL-10 もしくはそのフラグメントまたは一部修飾体は、医薬的に許容しうる担体、希釈剤または賦形剤とともに用いることができる。

IL-10 もしくはそのフラグメントまたは一部修飾体は、瘢痕の形成の減少をとまって創傷または線維性疾患の治癒を促進するための組成物とともに用いることができる。

IL-10 もしくはそのフラグメントまたは一部修飾体は、慢性の創傷の治癒を促進するための組成物とともに用いることができる。

また本発明にしたがって、IL-10 またはそのフラグメントもしくは一部修飾体の使用を特徴とする、瘢痕の形成の減少をとまって創傷または線維性疾患の治癒を促進する方法が提供される。

IL-10 またはそのフラグメントもしくは一部修飾体は、創傷部位または線維症の部位に投与することができる。

IL-10 またはそのフラグメントもしくは一部修飾体は、約 1 μ M ~ 約 10 μ M の濃度にて投与することができる。IL-10 またはそのフラグメントもしくは一部修飾体は、約 2.5 μ M ~ 約 5 μ M の濃度にて投与することができる。

IL-10 またはそのフラグメントもしくは一部修飾体は、創傷形成の直前に投与することができるが、創傷形成後約 7 日以内に投与しても有効である。少なくとも 2 回の機会に投与することができる。

該方法は、瘢痕の形成の減少をとまって創傷または線維性疾患の治癒を促進するための方法または組成物とともに用いることができる。

該方法は、慢性の創傷の治癒を促進するための方法または組成物とともに用いることができる。

本発明を、瘢痕の形成の減少をとまって創傷または線維性疾患の治癒を促進する組成物および方法を示す、以下の実施例および数枚の図面によりさらに明らかにするが、これは例示にすぎない。

図面：

図 1 は、第 0 日に IL-10 注入処置を行った切開創傷の炎症プロフィールを示す。

図 2 は、第 0 日および第 7 日に IL-10 注入処置を行った切開創傷の炎症プロフィールを示す。

図 3 は、第 0 日に IL-10 注入処置を行った切開創傷の血管プロフィールを示す。

図 4 は、第 0 日および第 7 日に IL-10 注入処置を行った切開創傷の血管プロフィール

10

20

30

40

50

を示す。

実験例

創傷治癒における抗炎症性サイトカインの効果を分析するために、ラットに創傷を形成し、種々の組成物で処置し、次いで飼育し、創傷を分析した。その結果から、IL-10が、短期的には、上皮再形成または創傷修復を阻害せず、一方、長期的には、後に形成される瘢痕の質を改善し、瘢痕の形成を減少することが示される。

材料および方法：

成体の雄性スプラグドローラット(200~250g)に等量のハロタン、酸素および酸化窒素を用いて麻酔を施した。長さ1cm全厚直線切開(皮筋層の深さのもの)を、背面の皮膚上に、頭蓋底から5cmおよび8cmの位置に、正中線の両側1cmの部分で行った。皮内注入によって創傷に、それぞれ100μlのIL-10(2.5μg/ml)(ゲンザイム)またはコントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を処置した。実験動物を3つのグループに分けた。Aグループは、創傷形成前第0日にIL-10またはPBSを注入した。Bグループは、創傷形成前第0日および創傷形成後(pw)第7日にIL-10またはPBSを注入した。第3のグループ(C)は、Bグループと同じ注入処置を行ったが、IL-10の投与量を倍にした(5μg/ml)。創傷形成後第3日(Aグループのみ)、第7日、第14日および第84日に実験動物を屠殺した。創傷およびその周囲の正常な皮膚約0.5cmを切除し、慣例のワックス組織学および免疫細胞化学のために二等分した。

さらに別のグループとして8匹の実験動物に、第0日および第7日のみに100μlのIL-10(1.25μg/ml)を注入した。創傷形成後第7日と第84日に動物を屠殺した。肉眼で分析した後、慣例の組織学および免疫細胞化学用に創傷を切除した。8匹の実験動物からなる別のグループに同様に100μlのIL-10(2.5μg/ml)を注入し、創傷形成後第84日に屠殺した。肉眼で分析した後、前記と同様に切除して処理した。7μmの厚みのワックス切片を切り、細胞浸潤およびコラーゲン構造をそれぞれ評価するために、ヘモトキシリンおよびエオシン、マロリーズおよびマッソンのコラーゲントリクロムで染色し、エラスチン用にゴモリのアルデヒドフクシン染色を行った。7μm厚みの凍結薄片を切り出し、抗体で染色して、炎症(ED1;セロテック)、脈管形成(フォン・ヴィレブランド因子)および細胞外マトリックス付着(フィブロネクチンおよびコラーゲンI)を評価した。創傷切片は、ジョイス・ロベル造影分析によって詳細に分析した。表皮/皮膚接合部の下および皮膚/皮筋接合部の上の創傷縁内にある6つの領域を10倍の対物レンズで観察し、GENIAS 25(ジョイス・ロベル)を用いて画像を捕え、該区域内の染色された領域を得た。結果を照合し、平均と標準誤差であらわした(図1~4)。

結果：

巨視的

処置およびコントロール創傷の巨視的外観は、PC造影分析システムを用いて捕えた。正常な皮膚を0とし、悪性瘢痕を5として、0から5の間で評点をつけた。処置創傷では、90%が2点またはそれ以下であり、10%が3~4の区分であった。コントロール創傷では、90%が3点またはそれ以上であり、10%が2点またはそれ以下であった。巨視的には、IL-10で処置した創傷は、コントロールと比べて瘢痕の形成が減少していた。

組織学

ヘマトキシリンおよびエオシン染色創傷切片の定性分析から、IL-10処置が、創傷形成後第3日および第7日において創傷へ流入する炎症細胞の数を、コントロール(PBS処置)と比べて減少していることがわかった。瘢痕形成の度合は、創傷形成後第84日において創傷切片にマッソンのトリクロム染色を行って、線維のサイズ、長さおよび密度などの新真皮の特徴に段階を付け、性質的に評価する。第0日にのみIL-10(2.5μg/ml)で処置した創傷は、コントロール創傷と比べて、皮膚の構造の回復が改善される。IL-10で処置した創傷は、コラーゲン線維が小さく、密度が大きく、表皮と平衡

に走っているコントロール創傷と比べて、線維がより大きく、密度が小さく、方向性がランダム（籠の網目状）である。創傷を第0日および第7日にIL-10（ $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で処置した場合、得られる皮膚構造は正常な皮膚に類似しており、創傷内のコラーゲン線維は籠の網目構造に、より近いものとなる。瘢痕の外観は、コントロール創傷およびIL-10で第0日のみに処置した創傷よりも非常に優秀である。より高用量の $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の方が、瘢痕の外観が悪いので、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のIL-10が最大用量であると思われる。エラスチン構造は、ゴモリのアルデヒドフクシン染色法を用いて評価した。初期の段階のコントロールおよび処置創傷では、正常な皮膚と比べた場合、少ししかエラスチン染色されなかったが、第84日では、正常な皮膚と比べた場合、創傷内の線維は、より少ないけれども、コントロールと比べた場合、IL-10処置創傷ではエラスチン染色が増加していた。エラスチン線維は、瘢痕内のコラーゲン線維と関連があった。IL-10による処置は、炎症を抑制し、後で起こる瘢痕形成の質を改善するが、上皮の再形成または初期の創傷修復を阻害しない。

免疫細胞化学

コントロールと比較した場合、IL-10は、創傷内への単球およびマクロファージの浸潤を阻害する（図1および2）が、IL-10は、脈管形成に影響を与えない（図3および4）ということを示す定量的造影分析によって、定性的組織学分析に、さらに確証を与えた。フィブロネクチンの染色から、IL-10処置創傷では、コントロール創傷と比較した場合、第3日および第7日における創傷領域内のフィブロネクチンの存在が少ないことがわかった。トランスフォーミング成長因子1（ $\text{TGF-}\beta_1$ ）の免疫染色から、IL-10処置創傷では細胞数は、より少ないけれども、コントロール創傷と処置創傷の間では、細胞染色（主として単球）における差異が少ないことがわかった。

表1～4（下記）は、それぞれ図1～図4に含まれる結果を示す。結果は、染色領域（ μm^2 ） $\times 100$ として示し、括弧内に平均の標準誤差を示す（ $n=4$ ）。0として示されているものは、検出可能な染色がなかったことを表している。

表1：（図1） IL-10で処置された（第0日に注入）切開創傷

の炎症細胞プロフィール

	IL-10	コントロール
創傷形成後3日	15.269(1.578)	51.004(2.246)
創傷形成後7日	0.321(0)	71.704(3.384)

表2：（図2） IL-10で処置された（第0日および第7日に注入）

切開創傷の炎症細胞プロフィール

	IL-10	コントロール
創傷形成後7日	3.123(1.109)	71.704(3.384)
創傷形成後14日	0	5.041(0.697)

表3：(図3) IL-10で処置された(第0日に注入)切開創傷
の血管プロフィール

	IL-10	コントロール
創傷形成後3日	20.456(1.855)	18.118(1.700)
創傷形成後7日	1.355(0.719)	4.368(0.712)
創傷形成後14日	0	4.432(0.948)

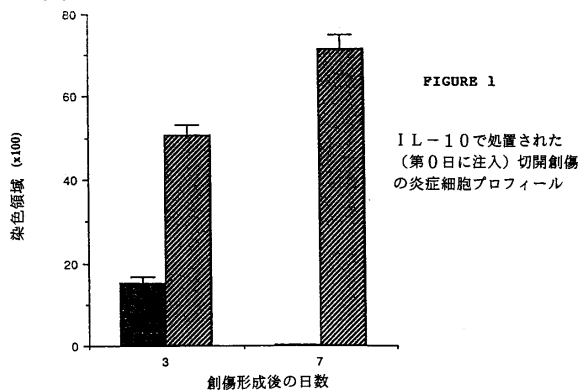
10

表4：(図4) IL-10で処置された(第0日および第7日に注入)
切開創傷の血管プロフィール

	IL-10	コントロール
創傷形成後7日	5.128(0.069)	4.368(0.712)
創傷形成後14日	0	4.732(0.948)

20

【図1】



【図2】

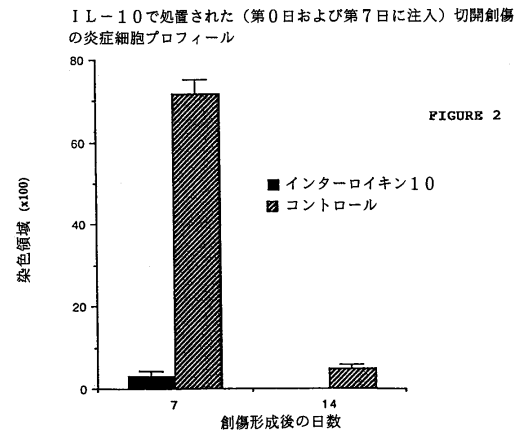
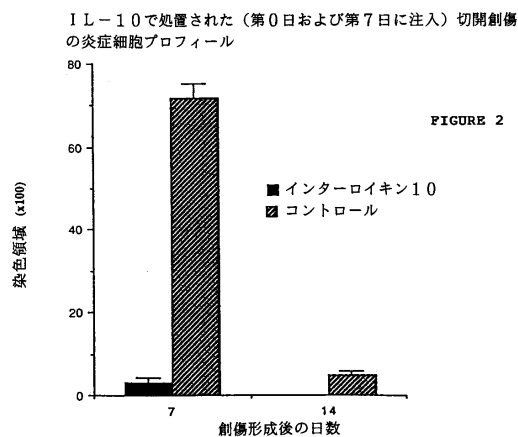
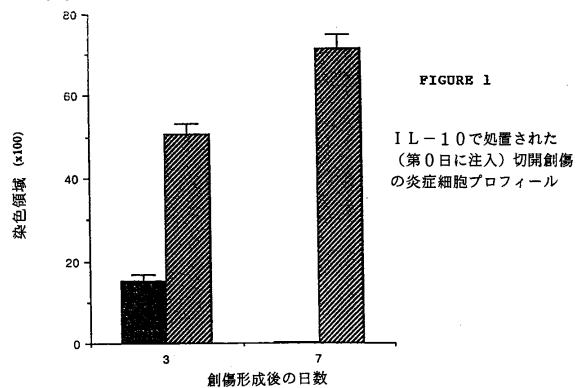
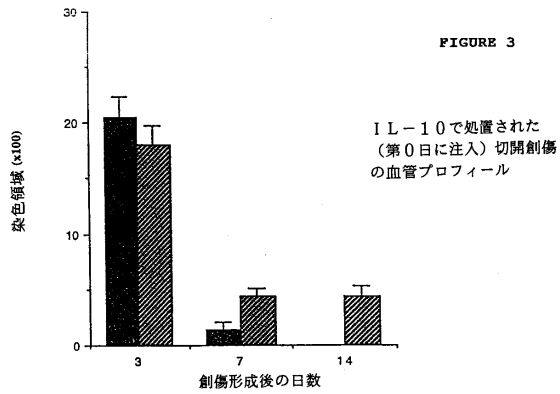


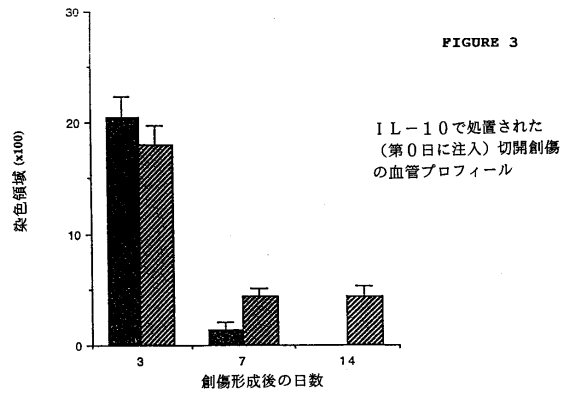
図1および図2：造像分析で評価した炎症細胞プロフィール ED1

図1および図2：造像分析で評価した炎症細胞プロフィール ED1

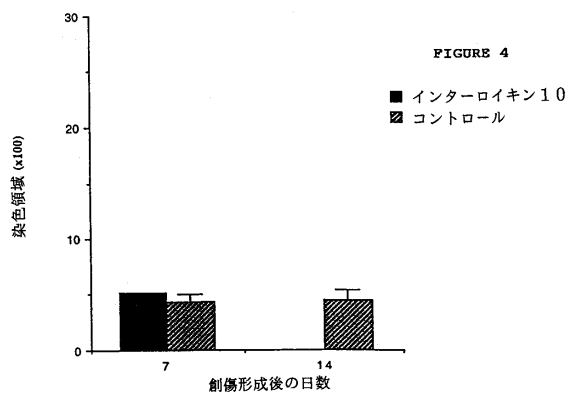
【図 3】



【図 4】



IL-10で処置された (第0日および第7日に注入) 切開創傷
の血管プロフィール



IL-10で処置された (第0日および第7日に注入) 切開創傷
の血管プロフィール

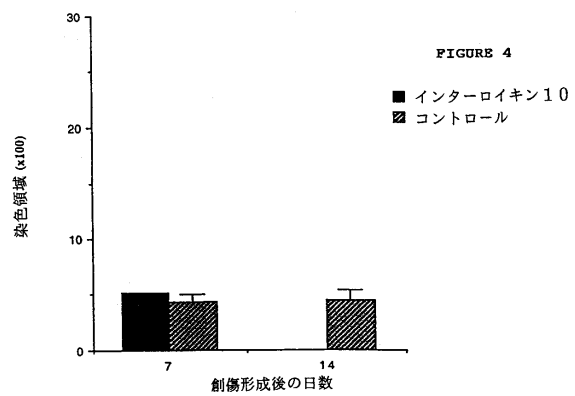


図3および図4：造像分析で評価した血管プロフィール (フォン・ヴィレブランド因子)

図3および図4：造像分析で評価した血管プロフィール (フォン・ヴィレブランド因子)

フロントページの続き

審査官 大久保 元浩

(56)参考文献 特表平09-510967(JP,A)

Kerry M. Sullivan et al., Journal of Pediatric Surgery, 1995年, Vol.30, No.2, p.198-203

P.Van Vlasselaer et al., The Journal of Cell Biology, 1994年, Vol.124, No.4, p.569-577

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00