

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4307561号
(P4307561)

(45) 発行日 平成21年8月5日(2009.8.5)

(24) 登録日 平成21年5月15日(2009.5.15)

(51) Int.Cl. F I
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
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 12 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平10-535441	(73) 特許権者	500588178
(86) (22) 出願日	平成10年2月13日(1998.2.13)		レノボ・リミテッド
(65) 公表番号	特表2001-511797(P2001-511797A)		RENOVO LTD.
(43) 公表日	平成13年8月14日(2001.8.14)		イギリス、エム13・9エックスエックス
(86) 国際出願番号	PCT/GB1998/000316		、マンチェスター、グラフトン・ストリー
(87) 国際公開番号	W01998/035695		ト48番、マンチェスター・インキュベ
(87) 国際公開日	平成10年8月20日(1998.8.20)		ター・ビルディング
審査請求日	平成17年1月21日(2005.1.21)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	9702943.3		弁理士 青山 稔
(32) 優先日	平成9年2月13日(1997.2.13)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 田村 恭生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 創傷の治癒

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トランスフォーミング成長因子 の共投与以外の、創傷治癒速度を増加する医薬の製造のためのトランスフォーミング成長因子 を潜在状態に維持する能力を有する潜在性関連ペプチドの使用。

【請求項 2】

潜在性関連ペプチドが、トランスフォーミング成長因子 1 およびトランスフォーミング成長因子 2 の少なくとも1つを潜在状態に維持する能力を有する請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

医薬が、急性創傷の治癒速度を増加するためのものである請求項 1 または 2 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4】

急性創傷が、刺し傷、火傷、外科手術の結果生じる神経損傷または内臓の創傷のいずれか一つである、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

医薬が慢性創傷の治癒速度を増加するためのものである請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 6】

慢性創傷が、糖尿病性潰瘍形成、静脈潰瘍形成および床ずれ潰瘍形成のいずれか一つである、請求項 5 に記載の使用。

10

20

【請求項 7】

医薬が、治癒が困難となっている個体の創傷治癒速度を増加するためのものである前記請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項 8】

治癒が困難となっている個体が、老年のヒトまたは動物である請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

液剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、ヒドロゲル剤、粉剤、エアロゾル剤またはインプラントの形体である前記請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項 10】

局所適用のための前記請求項のいずれかに記載の使用。

10

【請求項 11】

医薬が、潜在性関連ペプチドを $1 \text{ ng} \sim 10 \text{ mg}$ 含有する前記請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項 12】

潜在性関連ペプチドが使用され、該ペプチドが、トランスフォーミング成長因子 発現組織、培養物中で成長したトランスフォーミング成長因子 発現細胞、潜在性関連ペプチドを発現するように遺伝子工作された細胞あるいは該ペプチドを発現するように遺伝子工作されたトランスジェニック動物から得られる前記請求項のいずれかに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

本発明は、創傷の治癒に関する。

20

成人における創傷治癒は、複雑な修復プロセスである。たとえば、皮膚の治癒プロセスは、創傷部位における種々の特殊細胞の漸増、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を含んでいる。

創傷の治癒を促進する医薬を提供する必要がある。たとえば、急性創傷（刺し傷、火傷、待機的外科手術の結果生じる神経損傷または創傷など）、慢性創傷（糖尿病性潰瘍形成、静脈潰瘍形成および床ずれ潰瘍形成など）または一般に治癒が困難となっている個体（老年者など）の場合、治癒進度の増進を所望されることが多い。これらの例において、創傷は、生命の状況に重大な影響を及ぼし、死に至らしめることさえもあるので、臨床的に可能な限り、治癒進度の増進が必要とされる。

本明細書で用いる語句「創傷」は、皮膚への損傷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。

30

創傷治癒、瘢痕形成および線維性障害の分野において、最近幾つかの発展が見られる。これらの発展の幾つかは、成長因子が組織の修復に深くかか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（ TGF- ）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- 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、 $\text{TGF-} 1 \sim 5$ 、 DVR グループ（ dpp および Vg など）、骨形態形成因子、ノードル、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。

40

TGF- （および該スーパーファミリーの他のメンバー）は、潜在性 TGF- 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。該プロタンパク質は、 N 末端潜在性関連ペプチド（ LAP : Latency Associated Peptide）および TGF- 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- 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- 複合体として知られている。

プロタンパク質が細胞外環境に分泌されると、 TGF- から LAP （および LTBP ）がタンパク質分解的に分割される。 LAP から解離されたときに TGF- 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（ M

50

6 P - 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、L A P からの解離を引き起こすことによってT G F - を活性化することができる。

T G F - (特にT G F - 1 およびT G F - 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、T G F - 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、W O 9 2 / 1 7 2 0 6 は、トランスフォーミング成長因子1 および 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。

10

当該技術分野における他の発展として、マンノース - 6 - ホスフェートを、T G F - 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(G B 2 2 6 5 3 1 0)。マンノース - 6 - ホスフェートは、M 6 P - R におけるL A P からのT G F - の解離を競合的に妨げることによって、T G F - の活性化を阻害し、線維症および瘢痕形成を予防すると考えられる。

W O 9 1 / 0 8 2 9 1 およびW O 9 4 / 0 9 8 1 2 は、T G F - 活性の調節におけるL A P の役割に関するものであり、L A P およびラージ潜在性T G F - それぞれの製造方法について開示している。これらの文献は、T G F - に結合し、T G F - を潜在状態にもどすことによってT G F - の活性をアンタゴナイズまたは中和するためのL A P の使用も提供する。この拮抗作用によって創傷形成後の瘢痕形成が軽減されることが主張されている。

20

本発明の第1の態様は、創傷治癒速度を増加するための医薬の製造に潜在性関連ペプチド、またはその機能的類縁体を使用することである。

本発明の第2の態様は、創傷部位に治療上有効量の潜在性関連ペプチドまたはその機能的類縁体を適用することの特徴とする、創傷治癒速度を増加する方法である。

本発明で用いる潜在性関連ペプチド(L A P) は、少なくとも1つのT G F - スーパーファミリーのメンバーを潜在状態に維持する能力を有する、T G F - スーパーファミリーの分子のプロタンパク質のN末端領域である。L A P は、T G F - を潜在状態に維持する能力を有するものが好ましく、T G F - 1 および / またはT G F - 2 を潜在状態に維持しうるものが最も好ましい。

30

本発明にしたがって、発明者らは、創傷治癒速度を増加するためにL A P を使用しうることを確立した。我々は、たとえば皮膚において、L A P またはその類縁体が、皮膚の治癒速度を増加すること(すなわち、L A P を創傷に適用すると、開口した創傷が、より速く閉じること)を見出した。この治癒速度の増加は、創傷部位における種々の特殊細胞(線維芽細胞、白血球など)の漸増、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のいずれかによって、さらに特徴付けることができる。

一般に受容されている、上述のT G F - とL A P との相互作用から見ると、これは驚くべき発展である。先行技術の教示にしたがって、L A P が、T G F - の効果をアンタゴナイズするかまたは中和し、瘢痕形成および / または線維症を軽減することが予測される。常套的に、このような効果によって創傷治癒速度が低下すること(たとえば、皮膚の切開創傷が閉じるのが遅くなること)もまた予測される。

40

本発明は、予想に反してL A P が創傷治癒速度を増加することを明らかにした本発明者らの実験に基づいている。これらの発見から、L A P が、実際にT G F - (および関連分子)の創傷治癒効果を促進し、少なくとも創傷治癒に関しては、W O 9 1 / 0 8 2 9 1 に示唆されたようにT G F - をアンタゴナイズまたは中和しないことが理解されるにいたる。

発明者らはいずれの仮説による強要も望まないけれども、L A P が創傷治癒速度の増加において効果的であるためのメカニズムが、L A P がT G F - に結合し、タンパク質分解的崩壊から保護されることによるものである可能性があると考えている。このことから、

50

通常は創傷治癒の間に存在する活性TGF- β （特に、TGF- β 1およびTGF- β 2）が一次的に抑制されているという結果が導かれる。この一次的に抑制されたTGF- β は、次いで、創傷内へ放出されてTGF- β が治癒を促進する時間をとおして、その半減期を効果的に増加する蓄えとなる。

我々は、創傷治癒速度を増加するために、LAPを投与することによって外来性のTGF- β の使用よりも優れた利点が見出された。TGF- β は創傷治癒速度を増加し、瘢痕形成または線維症を誘発するので、外来性のTGF- β を投与すると、受諾しがたい瘢痕形成または線維症を引き起こしうる、TGF- β の濃度の不適切な局所的増大が起こる。LAPまたはその機能的類縁体の投与は、このような逆効果をもたらすことなく、内因性のTGF- β の活性を調節するのみである。したがって、LAPまたはその機能的類縁体は、不適切な瘢痕形成または線維症を引き起こすことなく創傷治癒速度を増加することにおいて特に有用である。

10

我々は、LAPおよびその機能的類縁体が、急性創傷（刺し傷、火傷、待機的外科手術の結果生じる神経損傷または創傷など）を含む種々の創傷の治癒速度を増加しうることを見出した。しかし、LAPは慢性創傷の治癒に用いられることが好ましい。このような慢性創傷の例として、糖尿病性潰瘍形成、静脈潰瘍形成および床ずれ潰瘍形成などが挙げられる。LAPの好ましい使用は、一般に治癒が困難となっている個体（老年者など）に対してである。

内因的に発現されたLAPのアミノ酸を、LAPペプチドの機能的特性を無効にすることなく、容易に修飾、置換または欠失しうるということが理解されよう。したがって、LAPの機能的類縁体は本発明において簡便に使用することができる。これらの類縁体は、一般に、TGF- β スーパーファミリーのメンバーに結合すると、該メンバーを潜在状態に戻し、TGF- β をタンパク質分解的崩壊および/またはクリアランスから保護する。このような類縁体の例は、内因性LAPまたは内因性LAPの化学的修飾体のTGF- β 結合特性を保持する、遺伝子的に修飾されたLAPの変異体である。他の類縁体は、TGF- β スーパーファミリーのメンバーに対してLAPと同様の結合親和性をもつ、化学的に合成された化合物である。本明細書における機能的類縁体には、TGF- β スーパーファミリーのメンバーに対してLAPの結合親和性を保持するLAPフラグメントも包含される。

20

TGF- β スーパーファミリーの異なるメンバーから誘導されたLAPは、アミノ酸配列においては種々の変化を呈するが、TGF- β スーパーファミリーのメンバーに対して結合し、該メンバーを潜在状態に戻すことができるという機能的特徴を依然として保持することもまた理解されよう。

30

本発明に用いるLAPまたはそのタンパク質類縁体は、TGF- β スーパーファミリーの少なくとも1つのメンバーを発現する組織または培養細胞から得られる。組織または細胞が、TGF- β を発現するのが好ましく、TGF- β 1またはTGF- β 2を発現するのが最も好ましい。

別法として、LAPまたはそのタンパク質類縁体は、遺伝子工作されてLAPまたはそのタンパク質類縁体を発現する細胞から（たとえばWO 91/08291に開示されているように）、あるいは遺伝子工作されてLAPまたはそのタンパク質類縁体を発現するトランスジェニック動物から得ることができる。トランスジェニック動物がLAPまたはそのタンパク質類縁体を分泌するのが理想的である。たとえば、トランスジェニック哺乳動物は、その乳にLAPまたはそのタンパク質類縁体を分泌する。

40

治療用途のために十分な量のLAPを産生源から簡便に産生することができるので、遺伝子工作された細胞由来の組換えLAPを本発明に使用するのが好ましい。この組換えLAPは内因性LAPと同じアミノ酸配列をもつことができる。別法として、LAPを必要に応じて修飾してもよい。たとえば、LAPのCys 33を変異させてセリン残基にして望ましくないジスルフィド結合の形成を防止することができる。

本発明組成物は、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、エアロゾル剤またはインプラント可能なデバイス（バイオポリマー（コ

50

ラーゲンまたはプロテオグリカン) スポンジに複合させたものなど) の形態であってよい。

局所適用用医薬が好ましい。該医薬は、皮膚または創傷への局所適用に用いるのに最も適している。

医薬のビヒクルは、患者にとって十分に寛容であり、LAPまたはその機能的類縁体を創傷へ放出するものであるべきであることが理解されよう。該ビヒクルを滅菌し、賦形剤および/または安定化剤ならびにLAPおよびその機能的類縁体と組み合わせて医薬を形成するのが理想的である。このようなビヒクルは、生体崩壊性、生体分解性、生体吸収性および/または非炎症性であることが好ましい。

本発明組成物は、多くの経路で使用する。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炎症応答を引き起こさないような、あるいは組織に対する毒性がないような“刺激性の少ない”ものである。本発明の医薬は、治療される創傷を覆うかまたは包むのに用いる滅菌包帯またはパッチ剤として提供してもよい。

本発明の医薬は、該医薬をよく放出する植え込み可能なデバイスとして提供することもできる。たとえば、該医薬は、デバイスの生理的溶解または崩壊によって放出される。別法として、超音波などの外部刺激によって植え込み体からLAPまたはその機能的類縁体を放出させることができる。該医薬は、(たとえば適当なリンカーを用いるデバイスの結合によって) 活性を現状に維持するような植え込みデバイスに配合してもよい。

本発明組成物は、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として製剤するか、または体内創傷の治癒を促進するために臓器(肝臓または腸など)に適用することができる。

本発明医薬は、予防剤としても使用する。たとえば、本発明医薬は、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、外科手術の前に使用することができる。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。また、本発明医薬は、皮内注射によって創傷形成前に予防的に投与することもできる。LAPまたはその機能的類縁体がLAPそれ自身または他のタンパク質類縁体である場合、注射による投与が特に好適である。

創傷治癒の速度を増加するのに必要なLAPまたはその機能的類縁体の量は、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LAPまたはその機能的類縁体の生理化学的特性に依存することが理解されよう。他の因子として、

- A) 治療される特定の容体;
- B) 容体の重篤度
- C) 迅速治癒または瘢痕形成軽減のいずれを所望するか;
- D) 患者の年齢;
- E) 処置される患者における化合物の半減期;

が挙げられる。

また、投与頻度は、上記因子、特に、処置された患者の体内における化合物の半減期によって影響される。

一般に、治療される患者は、創傷形成後3日以内、好ましくは48時間以内、さらに好ましくは24時間以内、なおさらに好ましくは12時間以内に投与される場合に、LAPまたはその機能的類縁体の適用によって恩恵を受ける。組成物を存在する創傷に用いる場合、LAPまたはその機能的類縁体は、創傷が生じた直後に投与すべきである。LAPまたはその機能的類縁体を用いる療法は、臨床医が満足する創傷治癒結果が得られるまで継続すべきである。

急性の創傷および回復しやすい患者(若者など)の創傷に対しては、LAPまたはその機能的類縁体は、創傷形成時、好ましくは、創傷形成後12時間以内、遅くとも2、3日以

10

20

30

40

50

内に適用するのが理想的である。慢性創傷または回復しにくい創傷（老年者など）に対しては、できるだけ早くに投与を行うべきであるが、これらの創傷は長期間存在しているので、LAPを数週間後に使用しても、患者は恩恵を受けることができる。

予防的に使用する場合（たとえば、外科手術前）、LAPまたはその機能的類縁体は、創傷形成が確認されたらできるだけ早くに、特に創傷治癒の進度が遅いというリスクがある場合（老年者の患者の場合など）すぐに、投与すべきである。たとえば、待機的外科手術が行われる予定であり、その後の創傷治癒の速度を増加したい患者の皮膚の部位に、LAPまたはその機能的類縁体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、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

のが望ましい。

投与頻度は、使用する化合物の生物学的半減期によって決定する。典型的には、創傷部位における化合物の濃度が、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LAPまたはその機能的類縁体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。

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、臨床施療用など）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。

通常、本発明医薬を使用する場合、LAP 1 ng ~ 10 mg、より好ましくは1 μ g ~ 1 mgを含む医薬を、直線創傷1センチメートルに対し、適用する。単に例として挙げるに過ぎないが、直線切開創傷1センチメートル当たり、5 μ gのLAPを含有する医薬を適用するのが好適である。急性創傷よりも慢性創傷の治癒を促進する場合に、投与量を多くすることが必要である。

20

医薬、特に慢性創傷に適用するために製剤された医薬の効能は、プロテアーゼインヒビター（ガラドリンなど）と組み合わせた場合に強化される。プロテアーゼインヒビターは、創傷、特に慢性創傷中に高濃度で見られるプロテアーゼによる適用したLAPまたはその機能的類縁体の分解を予防または阻止する。プロテアーゼインヒビターは、広範囲に適用可能なプロテアーゼインヒビターが好ましい。

LAPを他の創傷治癒剤または他の作用剤（瘢痕形成予防剤など）と組み合わせて用いることが可能であることが理解されよう。

30

LAPのタンパク質またはペプチドを使用するための好ましい方法は、遺伝子療法の手段によって創傷中に該化合物をもたらすことである。したがって、本発明の第3の態様は、遺伝子療法技術で用いるデリバリーシステムを提供するものであり、該システムは、創傷治癒を調節するLAPまたはその機能的ペプチド類縁体をコードするDNA分子を特徴とし、該DNA分子は、転写されてLAPまたはその機能的ペプチド類縁体を発現しうるものである。

本発明の第4の態様は、前パラグラフで定義した、創傷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5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を特徴とする、創傷治癒速度を増加する方法を提供する。

40

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、LAPまたはその機能的ペプチド類縁体の濃度を創傷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。創傷部位において、本発明の第3の態様におけるDNA分子で形質転換された細胞から、LAPまたはその機能的ペプチド類縁体が継続的に発現される。したがって、LAPまたはその機能的ペプチド類縁体が、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LAPまたはその機能的ペプチド類縁体）が提供される。創

50

傷治癒に使用する化合物用の満足できるびビヒクル（非炎症性、生体適合性、生体吸収性であることが必要であり、保管中あるいは使用中に有効成分を分解または不活性化してはならない）を提供するのが難しいことが多いので、このことは特に利点である。

本発明のデリバリーシステムは、DNA分子が発現して（該デリバリーシステムが患者に投与された場合に）、創傷治癒活性をもつLAPまたはその機能的ペプチド類縁体を産生しうるものである。

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。

10

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（相同的組換えなど）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。

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、特異的転写因子または遺伝子アクチベ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）。

20

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分子をリボ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。

30

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分子を含むリボソーム、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。

上記考察は、ヒトの創傷に主として適用されるものではあるが、他の動物（特に、ウシ、ウマ、イヌ、ネコなどの家畜や愛玩動物など）においても創傷の治癒というものは問題の多いものであることが理解されよう。たとえば、腹部の創傷または癒着は、ウマを安楽死させねばならない主な理由である。上記医薬およびデリバリーシステムは、このような動物に対して使用するのにも適している。

40

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、もちろんこれらに限定されるものではない。

実施例

1. 方法

以下に記載する実験操作の全詳細は、すべて慣例の方法であり、Shahらの（1994）J. Cell Sci. 107 p 1137 - 1157に開示されている。実験操作について簡単に述べる。

体重225～250gの成体の雄性スプライング・ドーリーラットにハロタン、二酸化窒素

50

および酸素で麻酔処理をした。動物の背部に、皮筋層に達する長さ1cmの全厚直線切開を4箇所行った。切開は正中線から等距離かつ四肢に隣接した位置で行った。

創傷のうち1つは、コントロールとして何も処置を行わなかった。2つの創傷に組換えLAP(0.04μg、0.4μgまたは4.0μg)を含むリン酸緩衝食塩水100μl(各創傷の縁では50μlに下げた)を皮内注入した。4番目の創傷には、偽コントロールとして、LAPを溶解した等量のビヒクル(リン酸緩衝食塩水)(100μl-50μl:創傷の縁)を皮内注入した。動物への注射は、創傷形成直後、24時間後および48時間後に行った。

創傷形成後2時間後、3時間後、12時間後、4日後、7日後、40日後および80日後に屠殺し、創傷を採取した。各時点において、1つの処置をしたマウスを少なくとも4匹処理した(すなわち、LAPの各用量あたり、n=少なくとも4である)。

創傷に対し、通例の組織学的処理、すなわち、固定、ワックス包埋、切片作製および染色を行った。これとは別に、免疫細胞化学的処理、すなわち、OCT化合物に包埋し、液体窒素中で凍結し、凍結切片を作製し、次いで、TGF-1、TGF-2、TGF-3、II型のTGF-受容体、フィブロネクチン、コラーゲン、単球およびマクロファージなどを検出するための種々の抗体による免疫染色を行った。

組織学的および免疫細胞学的調製物について、創傷治癒におけるLAPの効果(特に先行技術から予測される抗瘢痕形成効果)を綿密に研究した。創傷部位に蓄積されたコラーゲンの組織形成と配向性ならびに細胞外マトリックス分子については特に注意を払った。

2. 結果

抗瘢痕形成効果は、どの処置においても認められなかった。創傷形成後80日および40日において、コントロールとLAP処置創傷の間には、瘢痕の質および量に関して差異はなかった。

しかし、驚いたことに、創傷形成後の早い時点では、LAP処置創傷は、コントロールおよび偽コントロール創傷に対して多くの差異を示した。すべてのケースにおいて、これらの応答は用量依存性であり、0.04μgのLAPにおいて最小の効果がみられ、4μgのLAPにおいて最大の効果がみられた。

LAP処置創傷においては、炎症細胞(単球およびマクロファージ)の用量依存性増加があった。同様に、早期創傷(すなわち、創傷形成後14日まで)のフィブロネクチン染色およびコラーゲン蓄積において用量依存性増加がみられた。LAP処置創傷は、コントロール創傷と比較して、フィブロネクチンおよびコラーゲン蓄積ならびに炎症細胞の増加も示した。興味深いことには、創傷形成後3時間から14日後では、LAP処置創傷は、I型およびII型TGF-受容体染色において用量依存性増加を示した。このTGF-受容体染色の増加は、コントロールおよび偽コントロールの創傷とは異なっている。PBS処置偽コントロール創傷では、I型TGF-受容体染色は創傷形成後3時間目で増加したが、24時間以内に減少した。非処置創傷では、創傷部位におけるTGF-受容体の早期増加はなかった。それに対して、LAP処置創傷は、TGF-受容体染色の用量依存性増加を示し、創傷形成後14日間増加したままであった。

LAP処置創傷は、創傷部位においてTGF-3染色の用量依存性減少も示した。このTGF-3染色の減少は、コントロールおよび偽コントロール創傷と比較した場合、創傷形成後24時間および4日の時点で最も著しかった。

LAPの外來性添加によるこれらの効果(上述したもの)、すなわち炎症細胞、特に単球およびマクロファージの増加、細胞外マトリックス、たとえばフィブロネクチンおよびコラーゲンなどの蓄積の減少、TGF-受容体染色の増加は、外來性TGF-1を創傷に加えた場合にみられた効果と同じである。

さらに、LAP処置創傷においては、創傷の治癒は、多数のパラメーター(上皮形成の完了、肉芽形成組織の成熟またはコラーゲンの早期蓄積など)において用量依存的様式で促進された。したがって、LAPの外來性添加は、創傷の治癒において、TGF-の外來性添加について報告された効果と同様の効果を有するといえる。

これらの発見は、外來性LAPがTGF-1を中和し、それによって抗瘢痕形成活性を

10

20

30

40

50

もつことが期待されるということを教示する先行技術から予測可能なものではまったくない。L A Pの外來性添加は、T G F - 1の外來性添加と同様に作用して創傷治癒速度を増加するけれども、抗癒痕形成活性をもたない。

したがってL A Pの外來性添加は、創傷治癒を刺激することにおいて有用である。L A Pは、慢性創傷（静脈潰瘍、糖尿病性潰瘍、床ずれ潰瘍など）および急性外科切開に対して特に有用である。

フロントページの続き

(72)発明者 ファーガソン, マーク・ウィリアム・ジェイムズ
イギリス、エスケイ 23・7 ピーエックス、ダービーシャー、ハイ・ピーク、ファーネス・ペイル
、バクストン・ロード、バンク・エンド・バーン

審査官 荒木 英則

(56)参考文献 特表平 05 - 503003 (JP, A)
国際公開第 94 / 009812 (WO, A1)
特表平 06 - 506205 (JP, A)
SHAH, M., et al., J. Cell Sci., 108, pp.985-1002 (1995)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 38/00 - 38/42
A61P 1/00 - 43/00
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)