(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年9月16日(16.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/182596 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01)　*A61P 17/00* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)　*A61P 27/02* (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2021/009965

(22) 国際出願日：　2021年3月12日(12.03.2021)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2020-044019　2020年3月13日(13.03.2020)　JP

(71) 出願人: 興和株式会社 (**KOWA COMPANY, LTD.**) [JP/JP]; 〒4608625 愛知県名古屋市中区錦三丁目６番２９号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 日景　史人 (**HIKAGE, Fumihito**); 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目 北海道公立大学法人 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 大黒 浩 (**OHGURO, Hiroshi**); 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目 北海道公立大学法人 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 井田 洋輔 (**IDA, Yosuke**); 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目 北海道公立大学法人 札幌医科大学内 Hokkaido (JP).

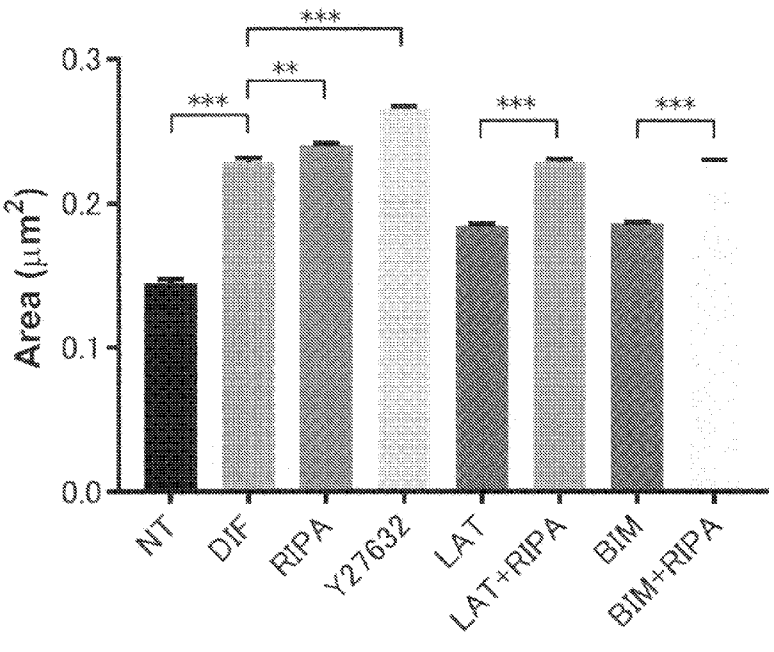
(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (**THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE**); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町１丁目３番８号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) **Title:** AMELIORATING AGENT FOR DEEPENING OF UPPER EYELID SULCUS

(54) 発明の名称： 上眼瞼溝深化改善剤

[図1]



(57) **Abstract:** Provided is a novel ameliorating agent for deepening of the upper eyelid sulcus. The present invention relates to an ameliorating agent for deepening of the upper eyelid sulcus, said ameliorating agent containing an Rho kinase inhibitor.

(57) 要約: 新規な上眼瞼溝深化改善剤を提供する。 本発明は、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する上眼瞼溝深化改善剤に関する。

［続葉有］

WO 2021/182596 A1

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 上眼瞼溝深化改善剤

技術分野

[0001] 本発明は、上眼瞼溝深化改善剤に関する。

背景技術

[0002] 緑内障の薬物治療において広く利用されているプロスタグランジン関連薬（ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ ａｎａｌｏｇｓ：ＰＧｓ）には、眼局所副作用の一つとして上眼瞼溝深化（ｄｅｅｐｅｎｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ ｕｐｐｅｒ ｅｙｅｌｉｄ ｓｕｌｃｕｓ：ＤＵＥＳ）が発生することが知られており（非特許文献１）、アドヒアランス低下の原因となりうる問題がある。ＤＵＥＳの発生には、ＰＧｓ自体による脂肪組織の萎縮作用が大きく関与していると推測されており、ＰＧｓの休薬により回復する可能性があるものの、薬剤によりＤＵＥＳを改善させる事象については知られていない。

[0003] Ｒｈｏキナーゼ（Ｒｈｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ，ｃｏｉｌｅｄ－ｃｏｉｌ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ：ＲＯＣＫ）は、分子量約１６０ｋＤａのセリンスレオニンリン酸化酵素であり、その遺伝子は線虫やショウジョウバエなどの下等動物からヒトなどまで広く保存されている。Ｒｈｏキナーゼは平滑筋細胞の収縮だけでなく、細胞の形態制御や、遊走や、遺伝子発現の制御などの生理機能に関与しており、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤は循環器疾患などの治療薬として開発が進められている。

[0004] また、近年では、緑内障の治療など眼疾患のための局所投与薬としても開発されており、緑内障・高眼圧症治療剤として、リパスジル塩酸塩水和物（４－フルオロ－５－｛［（２Ｓ）－２－メチル－１，４－ジアゼパン－１－イル］スルホニル｝イソキノリン一塩酸塩二水和物）を有効成分とする「グラナテック（登録商標）点眼液０．４％」が市販されている。

[0005] リパスジルは、緑内障・高眼圧症への治療効果の他、眼底疾患治療（特許文献１）、角膜厚調節（特許文献２）、白内障術後合併症の予防治療（特許

文献３）や角膜移植後の拒絶反応抑制（特許文献４）に有用であることが知られている。しかし、上眼瞼溝深化に対する、リパスジルをはじめとするＲｈｏキナーゼ阻害剤の作用については何ら知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第５５５７４０８号公報

特許文献2：国際公開ＷＯ２０１６／０４７６４７号パンフレット

特許文献3：特開２０１７－６１４４０号公報

特許文献4：特開２０１８－１８８４１０号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｉｎｏｕｅ　Ｋ，ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｇｌａｕｃｏｍａ，２２（８），　６２６－６３１（２０１３）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、上眼瞼溝深化改善のための新たな手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、Ｒｈｏナキーゼ阻害剤、特にリパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物が、上眼瞼溝深化を改善することを見出し、本発明を完成した。

[0010] 即ち、本発明は、以下の（１）～（１７）を提供するものである。

（１）Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する上眼瞼溝深化改善剤。

（２）Ｒｈｏキナーゼ阻害剤がリパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である前記（１）に記載の上眼瞼溝深化改善剤。

（３）リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物が、リパスジル塩酸塩水和物である前記（２）に記載の上眼瞼溝深化改善剤。

（４）リパスジル塩酸塩水和物が、リパスジル一塩酸塩二水和物である前

記（３）に記載の上眼瞼溝深化改善剤。

（５）液剤である、前記（１）から（４）のいずれかに記載の上眼瞼溝深化改善剤。

（６）点眼剤である、前記（１）から（５）のいずれかに記載の上眼瞼溝深化改善剤。

（７）リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物、及び製薬上許容される担体を混合する工程を含有してなる、前記（１）から（６）のいずれかに記載の上眼瞼溝深化改善剤の製剤を製造する方法。

（８）必要な患者に有効量のＲｈｏキナーゼ阻害剤を投与することを特徴とする上眼瞼溝深化改善方法。

（９）Ｒｈｏキナーゼ阻害剤がリパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である前記（８）に記載の方法。

（１０）リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物が、リパスジル塩酸塩水和物である前記（９）に記載の方法。

（１１）リパスジル塩酸塩水和物が、リパスジル一塩酸塩二水和物である前記（１０）に記載の方法。

（１２）液剤の投与によるものである、前記（８）から（１１）のいずれかに記載の方法。

（１３）点眼剤の投与によるものである、前記（８）から（１２）のいずれかに記載の方法。

（１４）上眼瞼溝深化を改善するためのＲｈｏキナーゼ阻害剤。

（１５）リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である前記（１４）に記載のＲｈｏキナーゼ阻害剤。

（１６）上眼瞼溝深化改善剤製造のための、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の使用。

（１７）Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である前記（１６）に記載の使用。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、上眼瞼溝深化改善剤が提供できる。

また、本発明の上眼瞼溝深化改善剤は、患者の負担が少ない点眼剤として提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、ＤＵＥＳモデルに対するＲｈｏキナーゼ阻害剤の影響（実験１）を示す図である。

[図2]図２は、ＤＵＥＳモデルに対するＲｈｏキナーゼ阻害剤の影響（実験２）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の上眼瞼溝深化改善剤に用いられるＲｈｏキナーゼ阻害剤としては、Ｒｈｏキナーゼの阻害活性を有する物質が挙げられる。このようなＲｈｏキナーゼ阻害剤としては例えば、次の一般名やコード番号で示される化合物が挙げられる。リパスジル（ｒｉｐａｓｕｄｉｌ）、ネタースジル（ｎｅｔａｒｓｕｄｉｌ）（ＡＲ－１３３２４（化学名：４－［（２Ｓ）－３－アミノ－１－（６－イソキノリニルアミノ）－１－オキソ－２－プロパニル］ベンジル　２，４－ジメチルベンゾエート））、ヴェロスジル（ｖｅｒｏｓｕｄｉｌ）（ＡＲ－１２２８６（化学名：（２ＲＳ）－２－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソ－１，２－ジヒドロイソキノリン－６－イル）－２－（チオフェン－３－イル）アセタミド））、ＡＳ１８９２８０２（化学名：Ｎ－［（１Ｓ）－２－ヒドロキシ－１－フェニルエチル］－Ｎ’－［４－（４－ピリジニル）フェニル］－尿素）、ＤＬ０８０５（化学名：５－ニトロ－１（２）Ｈ－インダゾール－３－カルボニトリル）、ＤＷ１８６５（化学名：２－（１Ｈ－インダゾール－５－イル）アミノ－４－メトキシ－６－ピペラジノ　トリアジン）、ファスジル（Ｆａｓｕｄｉｌ）（化学名：１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジン）、ＧＳＫ－２６９９６２Ａ（化学名：［Ｎ－（３－｛［２－（４－アミノ－１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）－１－エチル－１Ｈ－イミダゾ［４，　５－ｃ］ピリジン－６－イル］オキシ｝フェニル）－４－｛［２－（４－モルフォリニル）エ

チル］オキシ｝ベンズアミド］）、ＧＳＫ－４２９２８６Ａ（化学名：Ｎ－（６－フルオロ－１Ｈ－インダゾール－５－イル）－２－メチル－６－オキソ－４－［４－（トリフルオルメチル）フェニル］－１，４，５，６－テトラヒドロ－３－ピリジンカルボキサミド）、Ｈ－１１５２（化学名：５－［［（２Ｓ）－ヘキサヒドロ－２－メチル－１Ｈ－１，４－ジアゼピン－１－イル］スルホニル］－４－メチル－イソキノリン）、ＫＤ０２５（ＳＬｘ－２１１９）（化学名：２－（３－（４－（（１Ｈ－インダゾール－５－イル）アミノ）キナゾリン－２－イル）フェノキシ）－Ｎ－イソプロピルアセタミド）、ＰＴ－２６２（化学名：７－クロロ－６－ピペリジン－１－イル－キノリン－５，８－ジオン）、ＲＫＩ－１４４７（化学名：１－［（３－ヒドロキシフェニル）メチル］－３－（４－ピリジン－４－イル－１，３－チアゾール－２－イル）尿素）、ＳＡＲ４０７８９９（化学名：６－（ピペリジン－４－イルオキシ）イソキノリン－１（２Ｈ）－オン）、ＳＢ－７７２０７７Ｂ（化学名：（３Ｓ）－１－［［２－（４－アミノ－１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）－１－エチル－１Ｈ－イミダゾ［４，５－ｃ］ピリジン－７－イル］カルボニル］－３－ピロリジンアミン　ジヒドロクロリド）、ＳＮＪ－１６５６（Ｙ－３９９８３）（化学名：（Ｒ）－（＋）－Ｎ－（１Ｈ－ピロロ［２，３－ｂ］ピリジン－４－イル）－４－（１－アミノエチル）ベンズアミド）、Ｗｆ－５３６（化学名：（＋）－（Ｒ）－４－（１－アミノエチル）－Ｎ－（４－ピリジル）ベンズアミド）、Ｙ－２６７３２（Ｙ２７６３２）（化学名：（Ｒ）－（＋）－ｔｒａｎｓ－Ｎ－（４－ピリジル）－４－（１－アミノエチル）－シクロヘキサンカルボキサミド）、ＡＭＡ００７６、ＡＭＡ０４２８（３－［２－（アミノメチル）－５－［（ピリジン－４－イル）カルバモイル］フェニル］ベンゾエート）、ＢＡ－１０４９、ＢＦ－６６８５１、ＢＦ－６６８５２、ＢＦ－６６８５３、ＫＩ－２３０９５、ＡＲ－１３５０３、ＡＲ－１３５３４、ＩＮＳ－１１７５４８、ＬＸ７１０１、（１－ベンジルピロリジン－３－イル）－（１Ｈ－インダゾール－５－イル）アミン、（１－ベンジルピペリジン－４－イル）－（

１Ｈ－インダゾール－５－イル）アミン、Ｎ－［２－（４－フルオロフェニル）－６，７－ジメトキシ－４－キナゾリニル］－Ｎ－（１Ｈ－インダゾール－５－イル）アミン、Ｎ－４－（１Ｈ－インダゾール－５－イル）－６，７－ジメトキシ－Ｎ－２－ピリジン－４－イル－キナゾリン－２，４－ジアミン、４－メチル－５－（２－メチル－［１，４］ジアゼパン－１－スルホニル）イソキノリン等の化合物又はその光学異性体及びそれらの塩並びにそれらの溶媒和物などが挙げられる。さらに、次の特許文献：米国特許４６７８７８３号、特許第３４２１２１７号、国際公開第９５／２８３８７号、同第９７／２３２２２号、同第９８／０６４３３号、同第９９／２０６２０号、同第９９／６１４０３号、同第００／０９１６２号、同第０１／５６９８８号、同第０２／０７６９７６号、同第０２／０７６９７７号、同第０２／０８３１７５号、同第０２／１００８３３号、同第０３／０５９９１３号、同第０３／０６２２２５号、同第０３／０６２２２７号、同第２００４／００９５５５号、同第２００４／０２２５４１号、同第２００４／０３９７９６号、同第２００４／１０８７２４号、同第２００５／００３１０１号、同第２００５／０３４８６６号、同第２００５／０３７１９７号、同第２００５／０３７１９８号、同第２００５／０３５５０１号、同第２００５／０３５５０３号、同第２００５／０３５５０６号、同第２００５／０３９５６４号、同第２００５／０８０３９４号、同第２００５／１０３０５０号、同第２００６／０５７２７０号、同第２００７／０２６６６４号に開示された化合物又はその光学異性体及びそれらの塩並びにそれらの溶媒和物が挙げられる。また、ＲＯＣＫに対するアンチセンス核酸、ＲＮＡ干渉誘導性核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ）、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクターも挙げられる。

[0014] これらのＲｈｏキナーゼ阻害剤の中の好ましいＲｈｏキナーゼ阻害剤としては、リパスジル、ファスジル、ネタースジル、ヴェロスジル、Ｙ－３９９８３やＹ－２６７３２などが挙げられ、より好ましいＲｈｏキナーゼ阻害剤としては、リパスジルが挙げられる。

以下、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の代表的な化合物の１種であるリパスジルを例にして説明する。

[0015] リパスジルは、サブスタンスＰ拮抗作用、ロイコトリエンＤ４拮抗作用及びＲｈｏキナーゼ阻害作用を有する化合物であり、リパスジルを有効成分として含有する薬剤は、緑内障、高眼圧症の治療薬として製造・販売されている。なお、リパスジルは、公知の方法、例えば、国際公開第９９／２０６２０号に記載の方法により製造することができる。

[0016] リパスジルの塩としては、例えば塩酸、硫酸、硝酸、フッ化水素酸、臭化水素酸等の無機酸の塩、又は酢酸、酒石酸、乳酸、クエン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、カンファースルホン酸等の有機酸の塩が挙げられ、特に塩酸塩が好ましい。

[0017] リパスジル又はその塩は、非溶媒和物のみならず水和物等の溶媒和物としても存在することができる。水和物が好ましいが、本発明においては、全ての結晶型及びそれらの水和物若しくは溶媒和物を含むものである。特に好ましいリパスジルの塩は、リパスジル一塩酸塩であり、さらに好ましくはリパスジル一塩酸塩二水和物である。

[0018] 本発明において、「上眼瞼溝深化改善剤」とは、例えば、緑内障治療のためにＰＧｓを使用している患者において、副作用の一つとして発生する上眼瞼溝深化（ＤＵＥＳ）を改善する医薬である。具体的には、ＰＧｓの投与により失われた上眼瞼の脂肪組織を回復させること、あるいは、ＰＧｓの投与による上眼瞼の脂肪組織の喪失を抑制することができる。

[0019] 本発明において、「上眼瞼溝深化」とは、上述のように主にＰＧｓの投与により副作用として発生するものであり、上眼瞼のくぼみ、二重瞼になる等、上眼瞼の張りが損なわれることを特徴とする病態である。

[0020] 本発明において、「上眼瞼溝深化改善」とは、上眼瞼溝深化の状態から通常の状態に戻す、または近づけることを意味する。さらにまた、ＰＧｓと併用すること等により、ＤＵＥＳの発生を抑制することも包含される。作用機

序として、失われた脂肪組織の回復、又は、脂肪組織喪失の抑制が挙げられるが、必ずしもこれらに限られるものではない。

[0021] 本発明の「上眼瞼溝深化改善剤」は、当該分野で汎用されている通常の製剤化技術により、眼局所投与に適した剤型に製剤化される。剤型としては、例えば、点眼液、又は眼軟膏等が挙げられるが、これに限定されるものではない。好ましい製剤としては、投与の容易さから点眼剤が挙げられる。

本発明の点眼薬は、本発明の有効成分であるリパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物、及び点眼薬に許容される担体を含有するものであり、市販品である「グラナテック点眼液０．４％」をそのまま用いることもできる。

[0022] 点眼剤を調製する場合、例えば、所望な上記成分を滅菌精製水、生理食塩水等の水性溶剤、又は綿実油、大豆油、ゴマ油、落花生油等の植物油等の非水性溶剤に溶解又は懸濁させ、所定の浸透圧に調整し、濾過滅菌等の滅菌処理を施すことにより行うことができる。

なお、眼軟膏剤を調製する場合は、前記各種の成分の他に、軟膏基剤を含むことができる。前記軟膏基剤としては、特に限定されないが、ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレン等の油性基剤；油相と水相とを界面活性剤等により乳化させた乳剤性基剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール等からなる水溶性基剤等が好ましく挙げられる。

[0023] リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物を本発明の「上眼瞼溝深化改善剤」に用いる場合、その投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状、投与形態及び投与回数等によって異なるが、通常は成人に対して、リパスジルとして、１日０．０２５～１００００μｇ、好ましくは０．０２５～２０００μｇ、より好ましくは０．１～２０００μｇ、さらに０．０２５～２００μｇ、０．０２５～１００μｇの範囲が挙げられる。

[0024] 点眼剤として使用する場合には、有効成分を約０．０００１～５ｗ／ｖ％、好ましくは約０．０１～４ｗ／ｖ％の濃度で使用することができる。

[0025] また、投与回数は、特に限定されないが、１日に１回又は数回に分けて投与するのが好ましく、液体点眼剤の場合は、１回に１～数滴点眼すればよい。ＰＧｓとの配合剤の場合も同様である。

[0026] 本明細書において、ＰＧｓとは、主に緑内障あるいは高眼圧症の治療に用いられるプロスタグランジン関連薬の有効成分そのもの、あるいは該有効成分を配合した製剤のことを示し、具体的には、ラタノプロスト、トラボプロスト、ビマトプロスト、タフルプロスト、イソプロピルウノプロストン等またはそれらの製剤等が挙げられる。また、ＰＧｓと他の緑内障治療薬の有効成分、例えばβ遮断薬との配合剤も、本明細書に定義するＰＧｓに包含される。

[0027] 本発明の一実施態様として、ＰＧｓとの併用が挙げられる。併用としては、ＰＧｓ製剤と本発明の上眼瞼溝深化改善剤とをそれぞれの処方に応じて別々に投与してもよいし、両者の配合剤として投与してもよい。また、通常は同時期に投与することをもって併用と理解されるが、本発明の上眼瞼溝深化改善剤の投与時期としては、ＰＧｓに先んじて投与されてもよいし、ＰＧｓ投与の一定期間経過後、例えば、眼圧下降効果の増強のためにＰＧｓに追加する態様で投与されてもよい。

実施例

[0028] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

[0029] （実施例１）

線維芽細胞（３次元培養）の脂肪分化誘導に与えるＲｈｏキナーゼ阻害剤の影響

文献（Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １６０：２０－３５，２０１９）に記載の方法に準じて評価した。すなわち、ヒト眼窩部脂肪組織より線維芽細胞を単離し、培養液（１０％ＦＢＳ他含有ＤＭＥＭ）と共に１５０ｍｍのｄｉｓｈに播種したのち、３７℃、５％CO_2の条件下にて３～６回継代培養して実験に供した。９０％コンフルエントの細胞をＨＢＳＳで洗浄後、０．２

５％Ｔｒｉｐｓｉｎ／ＥＤＴＡで剥離し、培養液に再懸濁した。遠心後、ペレットを０．２５％　ｗ／ｖ　Ｍｅｔｈｏｃｅｌ　Ａ４Ｍ含有培養液にて約２００００ｃｅｌｌｓ／２５μＬとなるよう再懸濁させ、Ｄｒｏｐ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｐｌａｔｅの各ウェルに２５μＬずつ滴下した（オルガノイドの培養０日目）。２４時間後（培養１日目）より、以下各群の設定にてオルガノイドを培養した。なお、各ウェルは１日１回、相当する培地１４μＬの交換を行った。

[0030] 群構成：

実験１（ｎ＝１０）

ＮＴ：コントロール群

ＤＩＦ：脂肪分化誘導群（２５０ｎＭ　ｄｅｘａｍｅｔｈａｓｏｎｅ，　１０ｎＭ　Ｔ３（ｔｒｉｉｏｄｏｔｈｙｒｏｎｉｎｅ）　ａｎｄ　１０μＭ　ｔｒｏｇｌｉｔａｚｏｎｅ）

ＲＩＰＡ：ＤＩＦ＋リパスジル　１０μＭ

Ｙ２７６３２：ＤＩＦ＋Ｙ２７６３２　１０μＭ

ＬＡＴ：ＤＩＦ＋ラタノプロスト　１００ｎＭ

ＬＡＴ＋ＲＩＰＡ：ＤＩＦ＋ラタノプロスト　１００ｎＭ＋リパスジル　１０μＭ

ＢＩＭ：ＤＩＦ＋ビマトプロスト　１００ｎＭ

ＢＩＭ＋ＲＩＰＡ：ＤＩＦ＋ビマトプロスト　１００ｎＭ＋リパスジル　１０μＭ

[0031] 実験２（ｎ＝８）

ＮＴ：コントロール群

ＤＩＦ：脂肪分化誘導群（２５０ｎＭ　ｄｅｘａｍｅｔｈａｓｏｎｅ，　１０ｎＭ　Ｔ３（ｔｒｉｉｏｄｏｔｈｙｒｏｎｉｎｅ）　ａｎｄ　１０μＭ　ｔｒｏｇｌｉｔａｚｏｎｅ）

ＬＡＴ：ＤＩＦ＋ラタノプロスト　１００ｎＭ

ＬＡＴ＋Ｙ２７６３２：ＤＩＦ＋ラタノプロスト　１００ｎＭ＋Ｙ２７６３

２　１０μＭ

ＢＩＭ：ＤＩＦ＋ビマトプロスト　１００ｎＭ

ＢＩＭ＋Ｙ２７６３２：ＤＩＦ＋ビマトプロスト　１００ｎＭ＋Ｙ２７６３２　１０μＭ

[0032]　培養１０日目にオルガノイドを５００倍希釈のｂｏｒｏｎ－ｄｉｐｙｒｒｏｍｅｔｈｅｎｅ（ＢＯＤＩＰＹ）で１時間染色し、脂肪滴を評価した。

[0033]　結果を図１及び図２に示す。図１（実験１）及び図２（実験２）は、各群の脂肪サイズ（ｍｅａｎ±ＳＤ）を示す。コントロール群（ＮＴ）に比べ、脂肪分化誘導群（ＤＩＦ）では脂肪サイズが有意に増加した。また、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の添加による有意な上乗せ効果も見られた（ＲＩＰＡ、Ｙ２７６３２）。

脂肪分化誘導作用は、ＰＧｓの添加により有意に減弱し（ＬＡＴ、ＢＩＭ）、ＤＵＥＳ病態モデルの確立が見られた。ＰＧｓによる脂肪サイズの減弱は、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の添加によりレスキューされ（ＬＡＴ＋ＲＩＰＡ、ＢＩＭ＋ＲＩＰＡ、ＬＡＴ＋Ｙ２７６３２、ＢＩＭ＋Ｙ２７６３２）、その効果はいずれも有意であった。

[0034]　したがって、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤はＤＵＥＳを改善する可能性が示唆された。

請求の範囲

[請求項1] Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する上眼瞼溝深化改善剤。

[請求項2] Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である請求項１に記載の上眼瞼溝深化改善剤。

[請求項3] Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、リパスジル塩酸塩水和物である請求項１又は２に記載の上眼瞼溝深化改善剤。

[請求項4] Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、リパスジル一塩酸塩二水和物である請求項１～３のいずれか１項に記載の上眼瞼溝深化改善剤。

[請求項5] 液剤である、請求項１～４のいずれか１項に記載の上眼瞼溝深化改善剤。

[請求項6] 点眼剤である、請求項１～５のいずれか１項に記載の上眼瞼溝深化改善剤。

[請求項7] リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物、及び製薬上許容される担体を混合する工程を含有してなる、請求項１～６のいずれか１項に記載の上眼瞼溝深化改善剤の製剤を製造する方法。

[請求項8] 必要な患者に有効量のＲｈｏキナーゼ阻害剤を投与することを特徴とする上眼瞼溝深化改善方法。

[請求項9] Ｒｈｏキナーゼ阻害剤がリパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である請求項８に記載の方法。

[請求項10] リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物が、リパスジル塩酸塩水和物である請求項９に記載の方法。

[請求項11] リパスジル塩酸塩水和物が、リパスジル一塩酸塩二水和物である請求項１０に記載の方法。

[請求項12] 液剤の投与によるものである、請求項８～１１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項13] 点眼剤の投与によるものである、請求項８～１２のいずれか１項に記載の方法。

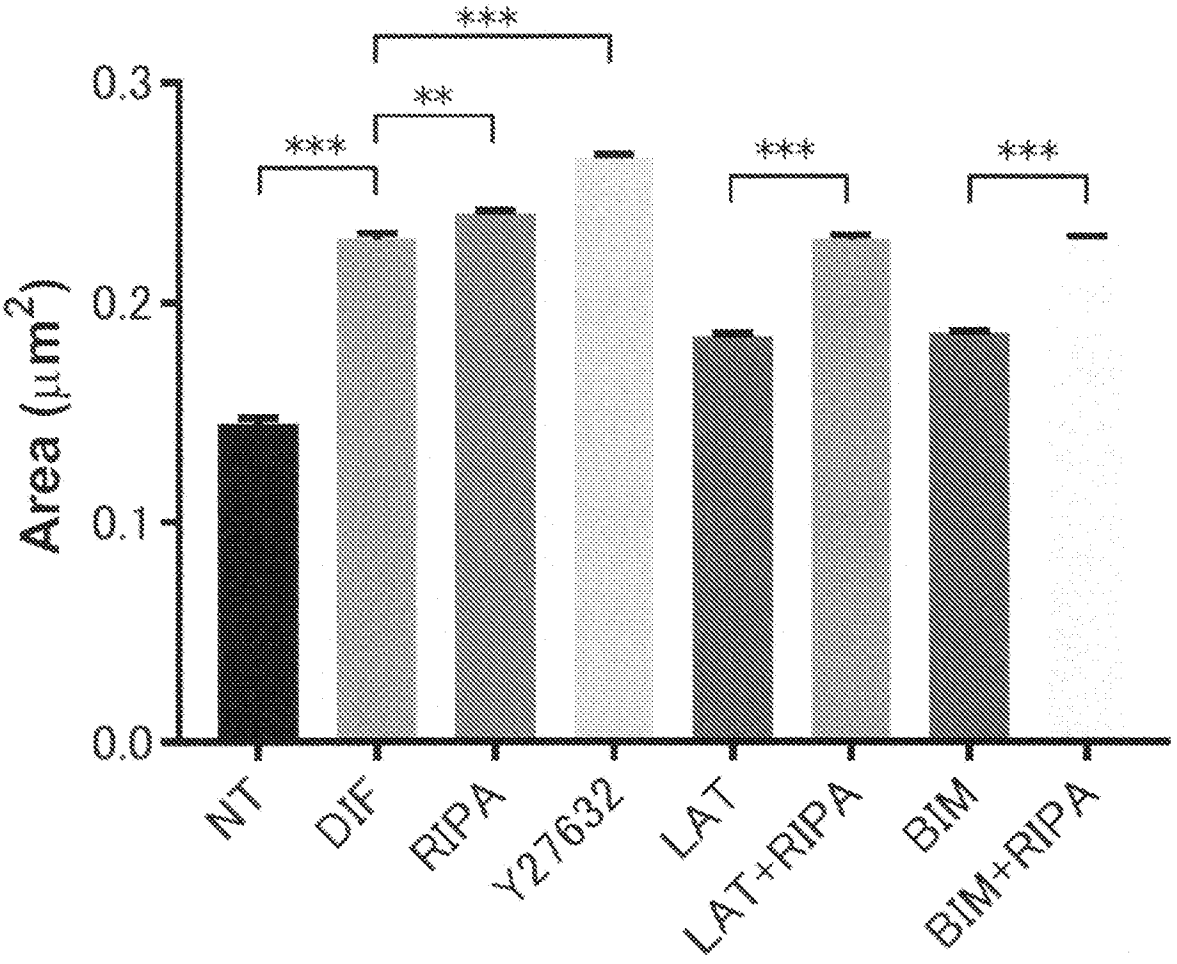
[請求項14] 上眼瞼溝深化を改善するためのＲｈｏキナーゼ阻害剤。

[請求項15] リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である、請求項１４に記載のＲｈｏキナーゼ阻害剤。

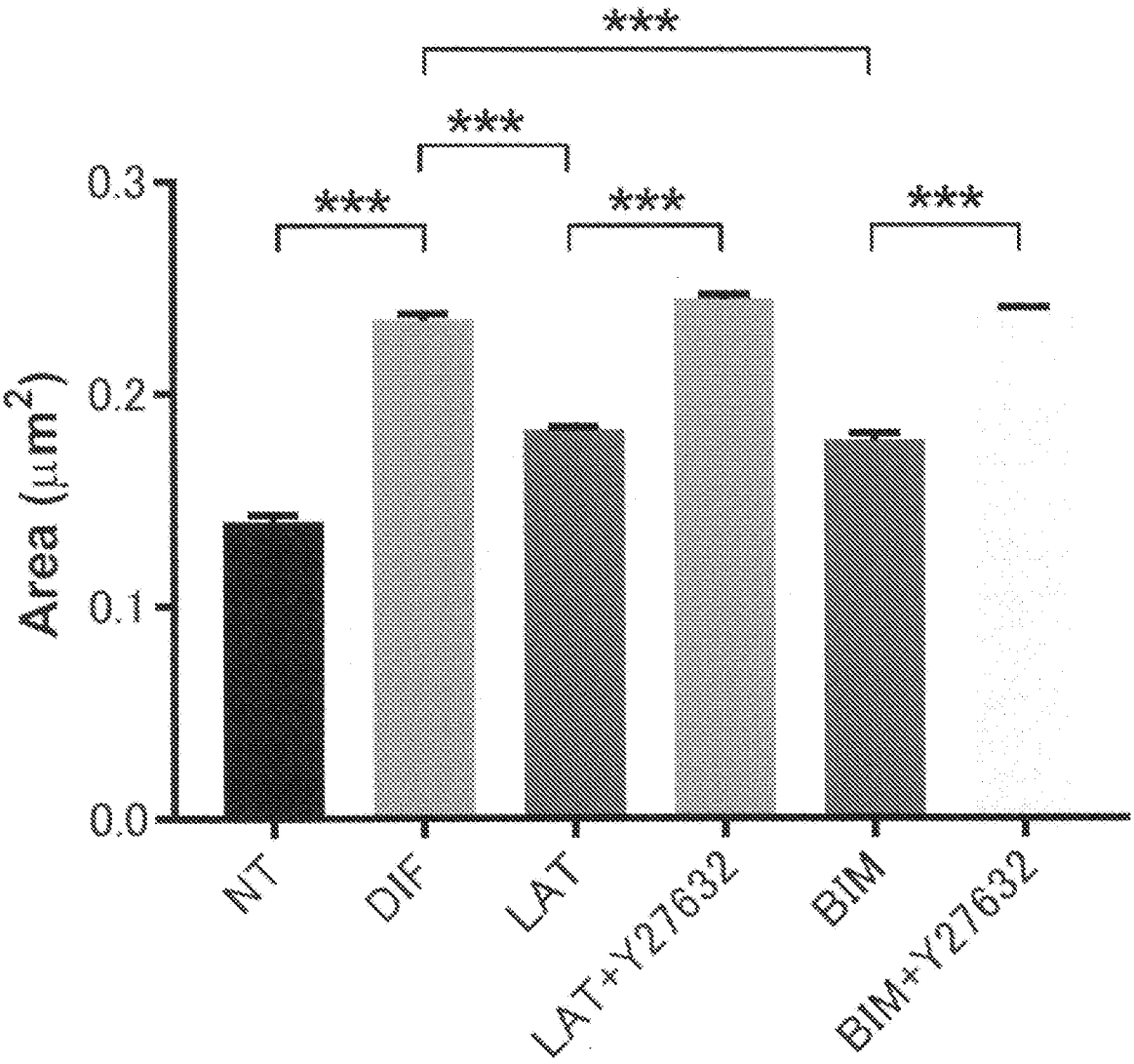
[請求項16] 上眼瞼溝深化改善剤製造のための、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の使用。

[請求項17] Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、リパスジル若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である請求項１６に記載の使用。

[図1]


***
**
***
***
***
0.3
0.2
0.1
0.0
Area (μm2)
NT
DIF
RIPA
Y27632
LAT
LAT+RIPA
BIM
BIM+RIPA

[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/009965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K 45/00(2006.01)i; A61K 9/08(2006.01)i; A61K 31/551(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i
FI: A61K45/00; A61P17/00; A61P27/02; A61K31/551; A61K9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K45/00; A61K9/08; A61K31/551; A61P17/00; A61P27/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTP1us/JMEDP1us/JST7580 (JDreamIII); CAp1us/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/019951 A1 (SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 11 March 2004 (2004-03-11) claim 1	1-17
X	WO 2012/105674 A1 (KOWA COMPANY, LTD.) 09 August 2012 (2012-08-09) claim 1	1-17
X	WO 2016/093345 A1 (KOWA COMPANY, LTD.) 16 June 2016 (2016-06-16) claim 1	1-17
Y	伊藤格他，3 次元培養法による上眼瞼溝深化 (deepening of the upper eyelid sulcus : DUES)の分子病態に関する検討，札幌医学雑誌，2019, vol. 88, pp. 37-44, p. 43, (ITO, Kaku et al., "Molecular pathological study of deepening of the upper eyelid sulcus through a three-dimension tissue culture.", The Sapporo medical journal)	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 April 2021 (20.04.2021)	27 April 2021 (27.04.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/009965

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHU, J. et al., "Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of extracellular matrix induced by CTGF or TGF-β in ARPE-19", Int. J. Ophthalmol., 2013, vol. 6, pp. 8-14, fig. 1	1-17
Y	TOH, Y. et al., "Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of type I collagen induced by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells", Exp. Eye Res., 2007, vol. 84, pp. 464-472, fig. 2	1-17
P, X	IDA, Y. et al., "ROCK inhibitors enhance the production of large lipid-enriched 3D organoids of 3T3-L1 cells", Sci. Rep., 03 September 2021, vol. 11, Article No. 5479, entire text	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/009965

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2004/019951 A1	11 Mar. 2004	US 2005/0245509 A1 claim 1 EP 1541151 A1 KR 10-2005-0057014 A CN 1684689 A	
WO 2012/105674 A1	09 Aug. 2012	US 2013/0310370 A1 claim 1 EP 2671586 A1 KR 10-2014-0010028 A CN 105902551 A	
WO 2016/093345 A1	16 Jun. 2016	US 2017/0368075 A1 claim 1 EP 3231430 A1 CN 107106569 A KR 10-2017-0093836 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/009965

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 9/08(2006.01)i; A61K 31/551(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i
FI: A61K45/00; A61P17/00; A61P27/02; A61K31/551; A61K9/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K45/00; A61K9/08; A61K31/551; A61P17/00; A61P27/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2004/019951 A1 (参天製薬株式会社) 11.03.2004 (2004-03-11) 請求項１	1-17
X	WO 2012/105674 A1 (興和株式会社) 09.08.2012 (2012-08-09) 請求項１	1-17
X	WO 2016/093345 A1 (興和株式会社) 16.06.2016 (2016-06-16) 請求項１	1-17
Y	伊藤格他, 3次元培養法による上眼瞼溝深化（deepening of the upper eyelid sulcus : DUES）の分子病態に関する検討, 札幌医学雑誌, 2019, Vol.88, pp.37-44 p.43	1-17
Y	ZHU, J.et al., Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of extracellular matrix induced by CTGF or TGF-β in ARPE-19, Int. J. Ophthalmol., 2013, Vol.6, pp.8-14 Figurel	1-17

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
20.04.2021	27.04.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
深草　亜子 4U 9548
電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	ITOH, Y.et al., Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of type I collagen induced by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells, Exp. Eye Res., 2007, Vol.84, pp.464-472 Figure2	1-17
P, X	IDA, Y.et al., ROCK inhibitors enhance the production of large lipid-enriched 3D organoids of 3T3-L1 cells, Sci. Rep., 2021.03.09, Vol.11, Article No.5479 全文	1-17

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/009965

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2004/019951 A1	11.03.2004	US 2005/0245509 A1 Claim1 EP 1541151 A1 KR 10-2005-0057014 A CN 1684689 A	
WO 2012/105674 A1	09.08.2012	US 2013/0310370 A1 Claim1 EP 2671586 A1 KR 10-2014-0010028 A CN 105902551 A	
WO 2016/093345 A1	16.06.2016	US 2017/0368075 A1 Claim1 EP 3231430 A1 CN 107106569 A KR 10-2017-0093836 A	