

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-523928

(P2005-523928A)

(43) 公表日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(51) Int.Cl.⁷

F 1

テーマコード(参考)

A61K 45/00

A 61 K 45/00

4 C 08 4

A61F 9/007

A 61 P 27/02

A61P 27/02

A 61 P 27/06

A61P 27/06

A 61 F 9/00 550

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2004-500769 (P2004-500769)
 (86) (22) 出願日 平成15年4月18日 (2003.4.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月27日 (2004.10.27)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2003/012521
 (87) 國際公開番号 WO2003/092584
 (87) 國際公開日 平成15年11月13日 (2003.11.13)
 (31) 優先権主張番号 60/376,606
 (32) 優先日 平成14年4月30日 (2002.4.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 399054697
 アルコン, インコーポレイテッド
 スイス ツェーハー-6331 ヒューネ
 ンペルク ベッシュ 69 ピー. オー.
 ボックス 62
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 フリーノア, デブラ エル.
 アメリカ国 テキサス 76108 フォ
 ート ワース, バーナ トレイル ノー
 ス, 608

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】眼内圧の低下および緑内障性網膜症／眼神経障害の処置の両方のための独特的手段としての、結合組織増殖因子(C T G F)の活性および／または発現を調節するか、阻害するか、または調整

(57) 【要約】

本発明は、結合組織増殖因子(C T G F)の発現および／またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の少なくとも1つの非ヌクレオチド薬剤または非タンパク質薬剤を投与することにより、眼内圧を低下させて神経保護を提供することを必要とする患者に、眼内圧を低下させ、そして神経保護を提供するための方法を提供する。眼内圧の低下を必要とする患者において眼内圧を低下させるための方法もまた提供され、この方法は、結合組織増殖因子(C T G F)の発現、シグナル伝達、または生物学的機能を阻害する少なくとも1つの非ヌクレオチド薬剤または非タンパク質薬剤、ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含む治療有効量の組成物を投与する工程を包含する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

眼内圧の低下および神経保護を必要とする患者の眼内圧を低下させて該患者に神経保護を提供するための方法であって、該方法は、結合組織増殖因子（CTGF）の発現、シグナル伝達または生物学的機能を阻害する少なくとも1つの非ヌクレオチド薬剤または非タンパク質薬剤、ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含む治療有効量の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

前記投与する工程が、局所適用、眼房内または移植片を介してである、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記組成物中の前記CTGFインヒビターの総濃度が、0.01%～2%である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記患者が、緑内障または高眼圧症に罹患している、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記緑内障が、正常眼圧緑内障である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

眼内圧の低下を必要とする患者において眼内圧を低下させるための方法であって、該方法は、結合組織増殖因子（CTGF）の発現、シグナル伝達、または生物学的機能を阻害する少なくとも1つの非ヌクレオチド薬剤または非タンパク質薬剤、ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含む治療有効量の組成物を投与する工程を包含する、方法。 20

【請求項 7】

前記投与する工程が、局所適用、眼房内または移植片を介してである、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記組成物中の前記CTGFインヒビターの総濃度が、0.01%～2%である、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

前記患者が、緑内障または高眼圧症に罹患している、請求項6に記載の方法。 30

【請求項 10】

前記緑内障が、正常眼圧緑内障である、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

原発性開放性緑内障（POAG）に関連した視野欠損を予防するための方法であって、該方法は、それを必要とする患者に、結合組織増殖因子（CTGF）の発現を調整する非ヌクレオチド薬剤または非タンパク質薬剤を含む組成物を投与し、それにより、眼内圧が制御され、そして網膜神経節細胞または視神経乳頭に対する保護が提供される工程を包含する、方法。

【請求項 12】

眼内圧の低下および神経保護を必要とする患者の眼内圧を低下させて該患者に神経保護を提供するための組成物であって、該組成物は、結合組織増殖因子（CTGF）の発現、シグナル伝達、または生物学的機能を阻害する少なくとも1つの薬剤、ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。 40

【請求項 13】

前記組成物中の前記CTGFインヒビターの総濃度が、0.01%～2%である、請求項12に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

（発明の背景）

10

20

30

40

50

(1. 発明の分野)

本発明は、神経変性および／または上昇した眼内圧を含む眼の状態の分野に関する。より詳細には、本発明は、眼内圧を低下させ、そして眼神経保護を提供する組成物を提供する。

【背景技術】

【0002】

(2. 関連技術の記載)

視神経乳頭への損傷、眼組織の変性、および／または上昇した眼内圧によって引き起こされるかまたは増悪される多数の眼の状態が存在する。例えば、「緑内障」は、米国および他の先進国における不可逆的な失明の主な原因である一群の消耗性眼疾患である。原発性開放性緑内障（「POAG」）は、最も一般的な形態の緑内障である。この疾患は、眼房水が虹彩と角膜との間の空間の閉鎖（例えば、「隅角」）を伴うことなく眼を離れる正常な能力の障害をもたらす、小柱網の変性によって特徴付けられる（Vaughan, D. ら, (1992)）。これらの疾患におけるこのような障害の特徴は、適切に時宣を得た様式で処置されなければ進行性の視力喪失および失明をもたらす、上昇した眼内圧（「IOP」）である。この疾患は、40歳を超える全ての成人のうちの0.4%と3.3%との間に罹患していると推定される（Leske, M. C. ら(1986); Bengtsson, B. (1989); Strong, N. P. (1992)）。さらに、この疾患の有病率は、年齢とともに上昇し、75歳以上の人々では6%を超える（Strong, N. P. , (1992)）。

10

20

30

40

50

【0003】

緑内障は、眼における3つの別個の組織に罹患する。POAGに関連した上昇したIOPは、角膜と虹彩との間の隅角に位置する組織である小柱網（TM）における形態学的变化および生化学的变化に起因する。栄養のある眼房水の大部分は、TMを通って眼の前方部分を出る。TM細胞の進行性喪失および緑内障眼のTMにおける細胞外破片の増加は、水性流出抵抗の増大をもたらし、それにより、IOPを上昇させる。上昇したIOP、ならびに他の要因（例えば、虚血）は、視神経乳頭（ONH）における変性変化を引き起こし、ONHの進行性「杯形成」ならびに網膜神経節細胞および軸索の喪失をもたらす。TM、ONH、および網膜神経節細胞に対する緑内障損傷の原因の詳細な分子機構は、未知である。

【0004】

20年前、視神経乳頭の高眼圧症、虚血および機械的ひずみの相互作用が、緑内障における視野欠損の進行を引き起こす主な原因として激しく議論された。それ以来、興奮毒性、一酸化窒素、有効な神経栄養因子の不存在、異常な神経膠／ニューロン相互作用およびゲノミクスを含む他の要因が、変性疾患プロセスにおいて関連付けられている。ゲノミクスの考慮は、細胞死の機構を最終的に規定し得、そして種々の形態の緑内障の識別を提供し得る限り、何らかの考察に値する。過去8年以内に、15を超える異なる緑内障遺伝子がマッピングされており、そして7個の緑内障遺伝子が同定されている。これは、原発性開放性緑内障についてのマッピングされた6つの遺伝子（GLC1A - GLC1F）および同定された2つの遺伝子（MYOCおよびOPTN）、先天性（congenital）緑内障についての同定されたマッピングされた2つの遺伝子（GLC3A - GLC3B）および同定された1つの遺伝子（CYPIB1）、色素分散／色素性緑内障についてのマッピングされた2つの遺伝子、ならびに発達形態または症候性形態の緑内障についての多数の遺伝子（FOXC1、PITX2、LMX1B、PAX6）を含む。

【0005】

従って、各形態の緑内障は、独特的の病理を有し得、従ってこの疾患の管理に対する異なる治療アプローチが必要とされ得る。例えば、視神経乳頭の細胞外マトリクスを分解する酵素の発現をもたらす薬物は、興奮毒性または神経栄養因子不足によって引き起こされるRGC死を防止しないようである。緑内障では、RGC死は、アポトーシス（プログラムされた細胞死）と呼ばれるプロセスによって生じる。死を引き起こし得る異なる型の傷害

もまた、いくつかの共通の経路において変換することにより、そうし得ることが推測されている。共通の経路での下流を標的化することは、薬物の有用性を広め得、かつ異なる型の疾患の管理においてこれが有用性を有し得る可能性を高め得るストラテジーである。しかし、複数の代謝経路に影響を与える (effect) 薬物は、望ましくない副作用を生じる可能性がより高い。特定の形態の緑内障を同定するための遺伝子ベースの診断キットの出現により、選択的神経保護薬剤が、測定された応答についてのバリエーションの程度を低下させる目的で試験され得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

現行の緑内障治療は、緑内障の発症および進行についての主な危険因子である IOP を低下させることに関する。これらの治療は IOP を低下させるが、これらは病原機構に直接的に取り組むわけではなく、そしてこの疾患は進行し続ける。従って、必要とされるのは、IOP を低下させ、そして / または病原経路を介して視神経乳頭および / もしくは網膜神経節細胞への神経保護を提供するための治疗方法である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、結合組織増殖因子 (CTGF) の発現および / またはシグナル伝達を阻害する少なくとも 1 つの非ヌクレオチド薬剤または非タンパク質薬剤、ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含む治療有効量の組成物を投与することによる、眼内圧の低下および神経保護を必要とする患者に、眼内圧を低下させて神経保護を提供するための方法を提供することにより、先行技術のこれらおよび他の欠点を克服する。別の局面では、本発明は、CTGF の発現および / またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤を患者に投与することによる、眼内圧を低下させるための方法を提供する。好ましくは、本発明の方法において使用するための組成物は、CTGF または CTGF シグナル伝達の生成物の発現の増加に起因した上昇した眼内圧を低下させる。

【0008】

好ましい実施形態では、本発明の組成物は、局所適用により、眼房内に、または移植片を介して、投与され得る。代表的に、本発明の組成物中の CTGF インヒビターの総濃度は、0.01% ~ 2% である。一般に、本発明の処置方法は、緑内障 (例えば、正常眼圧緑内障) または高眼圧症を罹患している患者に最も有用である。

【0009】

本発明は、CTGF の発現および / またはシグナル伝達を調整する非ヌクレオチド薬剤または非タンパク質薬剤を含む組成物を視野欠損の予防を必要とする患者に投与し、それにより、眼内圧が制御され、そして網膜神経節細胞または視神経乳頭に対する保護が提供されることによる、POAG に関連した視野欠損を予防するための方法をさらに提供する。

【0010】

別の実施形態では、本発明は、眼内圧の低下および神経保護を必要とする患者において眼内圧を低下させて神経保護を提供するための組成物を提供する。一般に、本発明の組成物は、結合組織増殖因子 (CTGF) の発現および / またはシグナル伝達を阻害する少なくとも 1 つの薬剤、ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含む。本発明の組成物中の CTGF の総濃度は、好ましくは、0.01% ~ 2% である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本発明の特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書中に提示される特定の実施形態の詳細な説明に関連してこれらの図面のうちの 1 以上を参照することにより、より良好に理解され得る。

【0012】

10

20

30

40

50

(好ましい実施形態の詳細な説明)

緑内障は、特定の臨床特徴を共有する、不均質な群の眼神経障害である。緑内障における視覚欠損は、視野における特徴的变化、神経線維層の欠損、およびO N Hの進行性杯形成によって臨床的に診断される、神経網膜中の網膜神経節細胞の選択的死に起因する。緑内障の発症の主な危険因子の1つは、高眼圧症（上昇した眼内圧、I O P）の存在である。I O Pはまた、しばしば正常なI O Pであると考えられるものを患者が有する正常眼圧緑内障の病因に関与するようである。緑内障に関連した上昇したI O Pは、前眼房の虹彩-角膜隅角に位置する小さな特化組織である小柱網（T M）における上昇した眼房水流出抵抗に起因する。T Mに対する緑内障性変化としては、T M細胞の損失、ならびに斑様物質を含め、細胞外破片の沈着および蓄積が挙げられる。さらに、緑内障性視神経乳頭中に生じる変化もまた存在する。緑内障性眼では、O N H神経膠細胞における形態学的变化および移動度変化が存在する。上昇したI O Pおよび/または一過性の虚血傷害に応答して、O N H細胞外マトリクスの組成の変化、ならびに神経膠細胞および網膜神経節細胞の軸索の形態の変化が存在する。

10

【0013】

T Mに対する緑内障性変化は、線維症とは異なる。線維症は、創傷治癒応答に関連し、そして一般に、炎症およびその後の筋線維芽細胞の増殖に関与する。組織傷害は、炎症系によって認識され、炎症系は、線維芽細胞および血管新生を刺激することにより、創傷修復プロセスを開始する。死んだ組織／細胞または死につつある組織／細胞は、最初にフィブリンからなり、続いて過剰量の細胞外マトリクス物質（特に、コラーゲン）によって置換される瘢痕組織によって置き換えられる。

20

【0014】

C T G Fは、（主に、コラーゲンIの沈着増加およびフィブロネクチンの沈着増加を介して）細胞外マトリクス（E C M）産生を増大させることが公知である分泌型サイトカインである。C T G Fの過剰発現は、E C M成分の過剰蓄積が存在する、強皮症、線維増殖性疾患、瘢痕形成などのような状態に主な原因因子として以前に関係付けられている。小柱網（T M）の領域における細胞外マトリクス物質の過剰蓄積はまた、多くの形態の緑内障の顕著な特徴である；このような増加は、水性流出抵抗の増大、それゆえ、上昇した眼内圧をもたらすと考えられる。本発明者らは、ヒトT Mから単離された組織および確立された細胞株においてC T G F遺伝子産物の存在を見出した。従って、C T G FがT MによるE C M産生において役割を果たすと考えられる。C T G Fの遺伝子発現、タンパク質産生、またはC T G F活性化の下流での効果をダウンレギュレートする薬剤は、I O Pを低下させるための新規の手段を表す。

30

【0015】

C T G F発現は、とりわけ以下を包含する広範囲の種々の因子によって誘導され得る：T G F - 、V E G F、トロンビン、高次グリケーション最終産物（A G E）、機械的応力、およびリゾホスファチジン酸（L P A）。C T G Fおよびシグナル伝達経路の特異的インデューサーは、刺激される特定の細胞型に依存して変化し得る。いくつかの細胞型におけるS m a d s、P L C、P K C、およびチロシンキナーゼを含むC T G FのT G F - 誘導の報告が存在するが、R h o A、P K A、および細胞骨格は、他の細胞型に関連するようである。線維芽細胞の機械的応力は、プロテインキナーゼおよびチロシンホスファターゼの関与を介してC T G F発現を誘導する。

40

【0016】

C T G Fの作用機構は、充分には理解されていない。C T G Fは、P D G Fレセプター、インテグリン、およびL D Lレセプター関連タンパク質（L R P）に結合するようであり、これらの各々は、C T G Fについてのシグナル伝達細胞表面レセプターとして作用し得る。いくつかの細胞型では、P D G Fレセプターを通してのC T G Fシグナル伝達は、M A P KおよびP I 3 Kを含むようである。軟骨細胞におけるC T G Fシグナル伝達は、細胞増殖のためのE R Kシグナル伝達および細胞分化のためのp 3 8 M A P Kシグナル伝達を含む。C T G Fによって用いられる特異的細胞表面レセプターおよびシグナル伝達経

50

路は、研究される特定の細胞型に依存するようである。

【0017】

米国特許第5,585,270号は、CTGFをコードするポリヌクレオチドを開示する。CTGFは、マイトジエン活性、すなわち、標的細胞を刺激して増殖させる能力を有するといわれる。これはまた、走化性活性、すなわち、特定の分子との相互作用の結果として化学的に誘導された細胞運動を有するといわれる。このタンパク質は、ヒト組織の正常な発生、増殖および修復において役割を果たすと考えられる。この特許はまた、精製されたCTGFを含む有効量の組成物を創傷に適用することにより、被験体における創傷治癒を促進するための方法を記載する。このポリペプチドは、皮膚の創傷の不完全な治癒が存在する場合、または正常な治癒機構を増強する必要がある場合（例えば、熱傷）、有用であるといわれる。この特許は、緑内障についても眼の障害についても何の議論も含んでいない。

【0018】

米国特許第6,069,006号（この明細書は、上記で考察した米国特許第5,585,270号の一部係属出願である）は、CTGF調節核酸配列を記載する。この特許は、線維性疾患を処置するための方法および線維性疾患の処置のための薬剤を同定するための方法をさらに記載する。CTGFの核酸配列またはポリペプチド以外の特定の薬剤は記載されていない。眼組織の神経保護は記載されていない。

【0019】

米国特許第6,358,741号は、細胞中でのCTGFの発現を阻害するために有用であるといわれる、CTGF由来の多数の核酸配列を記載する。この特許は、緑内障についても、眼組織の神経保護についても、CTGF発現を阻害するための非核酸もしくは非ポリペプチドの配列についても考察しない。

【0020】

CTGFは、中枢神経系の星状反応性星状細胞の細胞質において高濃度で生じるようである。これは、反応性星状細胞増加に関連した機構（例えば、神経膠症（神経膠の過剰増殖）および神経膠瘢痕形成（すなわち、神経の修復および増殖を妨害することが公知のプロセスにおける））に原因因子として関連付けられている（Schwabら, 2000; Schwabら, 2001）。このようなプロセスはまた、緑内障に関連した、網膜ニューロンの喪失および／または視神経軸索の修復不能に関与すると考えられている。本発明者らは、CTGFのダウンレギュレーションが、網膜および視神経／神経頭部の両方の保護手段を提供することを見出した。

【0021】

従って、1つの局面では、本発明は、非ヌクレオチドCTGFインヒビターまたは非ペプチジルCTGFインヒビターを含む組成物を投与することにより、IOPを低下させ、そして網膜神経節細胞に対する神経保護を提供するための方法を提供する。この組成物が、CTGFをアップレギュレートする薬剤を阻害する化合物を含み得ることがさらに意図される。例えば、過酸化水素(H₂O₂)は、CTGF遺伝子発現のインデューサーであることが示されている。TGF-、デキサメタゾンおよびセロトニンもまた、CTGF発現を誘導することが見出されている（Parkら, 2001）。

【0022】

緑内障の処置のための治療薬剤は、好ましくは、CTGF経路の1以上の局面に影響を与える低分子薬物様分子である。好ましい治療薬剤は、以下である薬剤である：(1) CTGFのインヒビター；(2) CTGF作用の下流に作用する薬剤のインヒビター（すなわち、CTGFシグナル伝達のインヒビター）および／または(3) CTGFの遺伝子もしくはタンパク質の発現をアップレギュレートする薬剤のインヒビター。

【0023】

本発明者らは、いくつかの異なる化合物のクラスを、CTGF QPCRアッセイにおいて、培養ヒト正常TM細胞または緑内障TM細胞中の基底CTGF遺伝子発現およびTGF-2誘導性CTGF遺伝子発現の阻害に関して試験した。低分子インヒビターを、G

10

20

30

40

50

S K - 3、CDK、N A A L A D a s e、プロテインキナーゼC、M E K、p 3 8 M A P K、R O C K、V E G F、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼおよびA G Eの阻害において標的とした。P P A R、5 - H T、およびP 2 X 7 の低分子アゴニストをまた、活性について試験した。細胞外シグナル制御キナーゼ1または2 (E R K 1 またはE R K 2) を標的とする化合物もまた、基底C T G F 遺伝子発現またはT G F 2 誘導性C T G F 遺伝子発現において役割を果たし得る。多くのG S K - 3 インヒビターおよびCDKインヒビターの顕著な交叉反応性が存在し、そして他の標的（例えば、E R K ファミリー、プロテインキナーゼC ファミリー、またはS T A T ファミリー）を阻害する化合物がT M 細胞中での基底C T G F またはT G F 2 刺激C T G F の阻害において有益であると証明され得ることが可能である。

10

【 0 0 2 4 】

2つの一般的化合物のクラス (G S K - 3 インヒビターおよびCDKインヒビター) は、ヒトT M 細胞において基底C T G F 発現およびT G F 2 誘導性C T G F 発現の両方を阻害することが見出されている。グリコーゲンシンターゼキナーゼ (G S K - 3) は、2つの遺伝子に由来する2つの細胞型 (G S K - 3 およびG S K - 3) として存在するセリン/トレオニンプロテインキナーゼである。G S K - 3 およびG S K - 3 は95%同一であり、そして低分子アンタゴニストによるそれらの差のある阻害は、容易には区別できない。G S K - 3 は、グリコーゲン合成における律速酵素であるが、グリコーゲンシンターゼ、-カテーテン、e I F 2 B 、および を含め、リン酸化の多くの細胞標的を有する ((C o h e n および F r a m e 2 0 0 1) ならびに (W o o d g e t t 2 0 0 1) において概説される) 。C T G F の発現およびシグナル伝達におけるG S K - 3 の直接的関与は、文献では前例がない。

20

【 0 0 2 5 】

サイクリン依存性キナーゼ (C D K) は、細胞分裂周期、アポトーシス、転写、ニューロン機能、および分化の調節を含め、複数の細胞機能を有する。C D K のいくつかの公知のA T P 競合インヒビターが同定されている (K n o c k a e r t , G r e e n g a r d ら , 2 0 0 2) 。C D K 阻害は、癌、アルツハイマー、A L S 、発作、心臓血管疾患などの処置における使用について探求される。C T G F は、サイクリンA - c d k 2 のアップレギュレーションによる線維芽細胞増殖におけるT G F の下流のメディエーターであることが示されている (K o t h a p a l l i および G r o t e n d o r s t 2 0 0 0) 。

30

【 0 0 2 6 】

G S K - 3 クラスの化合物において、1つの化合物S B - 2 1 6 7 6 3 (C o g h l a n , C u l b e r t ら , 2 0 0 0) は、正常ヒトT M 細胞および緑内障ヒトT M 細胞における基底C T G F レベルおよびT G F 2 誘導性C T G F レベルの両方を阻害することが見いだされた (図3) 。S B - 2 1 6 7 6 3 は、0 . 0 1 m M A T P の存在下でG S K - 3 およびG S K - 3 に対して3 4 n M のI C ₅₀ を有し、そして9 n M のK _i を有するマレイミド誘導体である (C o g h l a n , C u l b e r t ら , 2 0 0 0) 。試験されてT M 細胞における基底C T G F 遺伝子発現およびいくつかの場合にはT G F 2 誘導性C T G F 遺伝子発現を阻害することが見出された、G S K - 3 クラスのインヒビターの他の化合物は、パウロン (p a u l l o n e) (例えば、アルスター・パウロン (a l s t e r p a u l l o n e) 、9 - シアノパウロン (9 - c y a n o p a u l l o n e) およびケンパウロン (k e n p a u l l o n e)) を含んでいた (Z a h a r e v i t z , G u s s i o ら , 1 9 9 9 ; L e o s t , S c h u l t z ら , 2 0 0 0 ; B a i n , M c L a u c h l a n ら , 2 0 0 3) 。

40

【 0 0 2 7 】

C D K クラスの化合物において、比較的選択性的なC D K 2 インヒビターであるG W - 8 5 1 0 (D a v i s , B e n s o n ら , 2 0 0 1) は、正常ヒトT M 細胞および緑内障ヒトT M 細胞において基底C T G F レベルおよびT G F 2 誘導性C T G F レベルの両方を阻害することが見出された (図4) 。G W - 8 5 1 0 は、1 0 n M のI C ₅₀ を有する、

50

CDK2の強力かつ比較的選択性のインヒビターである。GW-8510はまた、CDK1およびCDK4を阻害するが、より低いIC₅₀値(110nMおよび130nM)を有する(Davis, Bensonら, 2001)。試験して阻害活性を有することが示された他のCDKクラスのインヒビターは、プルバラノールA(purvalanol A)およびロスコビチン(roscovitine)を含んでいた(Hardcastle, Goldingら, 2002)。

【0028】

CTGF QPCRアッセイにおいて試験され、そしてTM細胞における基底CTGF遺伝子発現およびいくつかの場合にはTGF-2誘導性CTGF遺伝子発現を阻害することが見いだされた他のクラスの化合物は、PPARアゴニスト(例えば、トログリタゾン、シグリタゾン(Wilson, Brownら, 2000)および15(S)HETEを含んでいた。

【0029】

本発明の薬剤は、眼への(例えば、局所的、眼房内、または移植片を介した)送達のための種々の型の眼用処方物に組み込まれ得る。この薬剤は好ましくは、眼への送達のために、局所眼用処方物中に組み込まれる。この薬剤は、眼科学的に受容可能な保存剤、界面活性剤、粘度増強剤、浸透増強剤、緩衝剤、塩化ナトリウム、および水性滅菌眼科用懸濁剤または水性滅菌眼科用液剤を形成するための水と組み合わされ得る。眼用液剤処方物は、薬剤を生理学的に受容可能な等張の水性緩衝液中に溶解することにより調製され得る。さらに、この眼用液剤は、この薬剤を溶解することを補助するために、眼科学的に受容可能な界面活性剤を含み得る。さらに、この眼用液剤は、結膜囊中でのこの処方物の保持を改善するために、粘度を上昇させるための薬剤(例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなど)を含み得る。ゲル化剤(ジェランガムおよびキサンタンガムを含むがこれらに限定されない)もまた用いられ得る。無菌眼用軟膏処方物を調製するために、活性成分は、保存剤と、適切なビヒクル(例えば、鉛油、液体ラノリンまたは白色ワセリン)中で組み合わされる。無菌の眼用ゲル処方物は、薬剤を、例えば、類似の眼用調製物について公開された処方に従ってカルボポール-974(carbopol-974)などの組み合わせから調製された親水性基剤中に懸濁することにより調製され得;保存剤および張度剤が組み込まれ得る。

【0030】

この薬剤は好ましくは、約4~8のpHを有する、局所眼用懸濁剤または局所眼用液剤として処方される。各個体への特定の投与レジメンの確立は、臨床医の自由裁量に任される。この薬剤は通常、これらの処方物中に、0.01重量%~5重量%の量で含まれるが、好ましくは、0.05重量%~2重量%の量で、最も好ましくは0.1重量%~1.0重量%の量で含まれる。投与形態は、液剤、懸濁剤、微小乳濁剤であり得る。従って、局所提示のために、1~2滴のこれらの処方物が、熟練した臨床医の自由裁量に従って、1日1~4回、眼の表面へ送達される。

【0031】

これらの薬剤はまた、緑内障を処置するための他の薬剤(例えば、-ブロッカー、プロスタグランジンアナログ、カルボニックアンヒドラーゼインヒビター、₂アゴニスト、縮瞳剤、および神経保護剤であるがこれらに限定されない)と組み合わせて用いられ得る。

【0032】

この薬剤はまた、当業者に周知の技術を用いて、眼に直接的に(例えば:局所眼用点眼剤または局所眼用軟膏;盲囊中の、または強膜に隣接してもしくは眼内に移植された徐放デバイス;眼周囲注射、結膜注射、テノン囊下(sub-Tenon)注射、眼房内注射、もしくは硝子体内注射)、または非経口的に(例えば:経口注射;静脈内注射、皮下注射もしくは筋肉内注射;皮膚送達など)送達され得る。以下は、本発明によって具体化される可能な処方物の例である。

10

20

30

40

50

【0033】

【表1】

(a) 局所眼用処方物	<u>wt. %</u>	
CTGF インヒビター	0.005 – 5.0	
チロキサポール	0.01-0.05	
HPMC	0.5	
塩化ベンザルコニウム (Benalkonium chloride)	0.01	
塩化ナトリウム	0.8	
エデト酸二ナトリウム	0.01	
NaOH/HCl	pH 7.4になるように	
精製水	100 mLになるように	10

【0034】

本発明の化合物が、眼内挿入片デバイス中に処方され得ることがさらに意図される。

【0035】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例において開示される技術が、本発明者らによって本発明の実施において良好に機能することが見出された技術を表し、従って、その実施のための好ましい形態を構成するとみなされ得ることが当業者によって認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示を考慮して、開示される特定の実施形態において多くの変更がなされ得、そして本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、同様または類似の結果が依然として得られ得ることを認識すべきである。 20

【実施例】

【0036】

(実施例1：非縁内障TMと比較した、縁内障TMにおけるCTGFの発現)

(マイクロアレイスクリーニング)

CTGFについてのmRNA転写産物を、GeneFilter(登録商標)(Research Genetics)スクリーニングによって、正常TM細胞と比較して、縁内障TM細胞において上昇していると同定した。

【0037】

500 ngの総RNAを、プールした(各々6の)正常TM細胞株または縁内障TM細胞株から、記載(Sheppardら, IOVS 2001, 42: 3173)の通りに単離し(TRIZol Reagent; Invitrogen)、そして300単位のSuperscript II RNase H-逆転写酵素(Invitrogen)、100 μCi [-³P]dCTP(10 mCi/ml、3,000 Ci/mmol; Amersham)、0.33 mM dATP、dTTP、dCTP(Promega)、3.3 mM DTT、1×First Strand Buffer(Invitrogen)、および2 μgオリゴ-dTの存在下で、37にて90分間、別個に逆転写した。放射性標識したcDNAを、続いて、Chromato-Spin 100 Columns(Clontech)を製造業者の指示に従って用いて精製した。約4,000個の既知の遺伝子をスポットした1枚のGeneFilter(登録商標)(GF211; Research Genetics)を、放射性標識したプローブを製造業者の指示に従って用いたハイブリダイゼーションのために用いた。この膜を、0.5% SDS中で5分間煮沸することにより、最初に前処理した。この膜のプレハイブリダイゼーションを、5 μgのポリ-dA(Research Genetics)および5 μgの煮沸Cot 1 DNA(Invitrogen)をプロッキング試薬として含む5 ml Micro Hybrid(Research Genetics)を含むローラーボトル中で42にて30分間行った。放射性標識したプローブ全体を煮沸し、そしてプレハイブリダイゼーション混合物中に42にて16時間添加した。ハイブリダイゼーション後、この膜を、2×SSC/1% SDS中で20分間を2回、次いで0.5×SSC/1% SDS中で15分間を1回洗浄した。この膜を、湿ったWhatmann 3MM紙上に配置し、そし 30
40
40
50

て Saran Wrap 中に包んだ。画像を、 Storm Phosphor imager (Molecular Dynamics)において、最大解像度を用いて得た。一旦画像が獲得されたら、このプロットを煮沸した 0.5% SDS 中で直ちにストリッピングし、そして反対のプローブを用いる別のハイブリダイゼーション（例えば、正常な TM、続いて緑内障 TM）に供した。重複したプロービングから得た画像を、 Pathways (Research Genetics) および MS Excel (Microsoft) ソフトウェアを用いて分析した。G F 2 1 1 Gene Filter (登録商標) 上の 4 3 0 0 個の遺伝子のうち、 C T G F (GenBank 登録番号 AA598794) は、2 倍よりも高い G T M : N T M 比を示した 7 個の遺伝子のうちの 1 つであった。

【0038】

10

(cDNA サブトラクションスクリーニング)

C T G F を、正常 TM 細胞と比較して緑内障 TM 細胞において差があつて発現される mRNA 転写産物のスクリーニングのために用いられるカスタム PCR - SelectTM cDNA Subtraction スクリーニング (Clontech) において独立して同定した。

【0039】

20

7 0 0 μg の総 RNA を、プールした（各々 7 個の）正常 TM 細胞株または緑内障 TM 細胞株から記載 (Shepardら 2001) の通りに単離した (TRIzol Reagent; Invitrogen)。テスター（緑内障）ポリ A + RNA およびドライバー（正常）ポリ A + RNA を、 Nucleotrap mRNA Midi Kit (Clontech) を用いたオリゴ-dT ラテックスビーズでの 2 回のポリ A + 選択により単離した。全てのその後の PCR - SelectTM cDNA サブトラクション工程を、 Clontech キット（カタログ番号 K1804-1）の方法論に従って行った。

【0040】

30

得られた cDNA サブトラクションライブラリーのディファレンシャルスクリーニングを、 PCR - SelectTM Differential Screening Kit (Clontech カタログ番号 K1808-1) における指示に本質的に従って行った。選り抜きの数の差があつて発現された cDNA クローンをまた、仮想 (virtual) ノーザン分析により確認した。サブトラクションされた TM 細胞の cDNA ライブラリープローブを用いて同定された、差があつて発現された全ての候補クローンのリストを、 Clontech で作成した。C T G F についての転写産物 (GenBank 登録番号 XM_037055.1) は、このリストの中にあり、そして緑内障 cDNA ライブラリーにおいて富化された。

【0041】

30

（実施例 2：RNA 単離および第 1 鎖 cDNA 調製）

総 RNA を、 Tri zol (登録商標) 試薬を製造業者 (Life Technologies) の指示に従って用いて TM 細胞から単離した。第 1 鎖 cDNA を、 1 μg の総 RNA から、ランダムヘキサマーおよび TaqMan (登録商標) Reverse Transcription 試薬を製造業者 (PE Biosystems, Foster City, CA) の指示に従って用いて生成した。 100 μl の反応物を、続いて 20 倍希釈して、 0.5 ng / μl の有効な cDNA 濃度を達成した。

40

【0042】

（定量的 PCR）

C T G F の差のある発現を、本質的に記載 (Shepardら, IOVS 2001, 42:3173) の通りに ABI Prism (登録商標) 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて、定量的リアルタイム RT - PCR (QPCR) によって確認した。C T G F 増幅のためのプライマー (CAGCTCTGACATTCTGATT CGAA, nt 1667 ~ 1689 および TGCACAAAGCTGTCCAGTCT, nt 1723 ~ 1742) を、 Primer Express ソフトウェア (Applied Biosystems) 50

を用い、Genbank登録番号NM_001901.1の隣接エキソンにアニーリングし、そして76bpのアンブリコンを生成するように設計した。CTGFの増幅を、69bpのアンブリコンを生成する、18S rRNA遺伝子(GenBank登録番号X03205)に対して設計されたプライマー：GTCCTGCCCTTTGTACACA C、nt1680~1700およびCGATCCGAGGGCCTCACTA、nt1730~1749)を用いて18SリボソームRNA発現に対して正規化した。SYBR(登録商標)Green I二本鎖DNA結合色素化学(Applied Biosystems)を用いてCTGF cDNAまたは18S cDNAを増幅した。CTGFプライマー対および18Sプライマー対の特異性を、DNA配列決定、アガロースゲル分析およびABI Prism 770 SDS Dissociation Curveソフトウェア(Applied Biosystems)を用いた解離曲線分析の組み合わせにより、PCR産物から評価した。CTGF rRNA反応物または18S rRNA反応物は、50μlの最終容積において、1×SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)、50nMプライマー濃度および2.5ng cDNAからなっていた。サーマルサイクリング条件は、50 2分間、95 10分間、続いて95 15秒間、60 1分間を40サイクルからなっていた。相対的RNA濃度の定量を、PE Biosystems User Bulletin #2(<http://docs.appliedbiosystems.com/pebio/docs/04303859.pdf>)に記載されるとおりの相対標準曲線法を行った。データ分析を、SDSソフトウェアバージョン1.9.1(Applied Biosystems)およびMS Excel 97(Microsoft)を用いて行った。CTGFまたは18Sについての標的配列を含むプラスミドDNAを、標準曲線を作成するために用いた。QPCRデータを、平均±SDとして提示する。

【0043】

本明細書中に開示され特許請求される組成物および/または方法の全ては、本発明の開示を考慮して、過度の実験を伴わずに作製および実行され得る。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態に関して記載してきたが、組成物および/または方法、ならびに本明細書中に記載される方法の工程または工程の順序に対して、本発明の趣旨、精神および範囲から逸脱することなく、バリエーションが適用され得ることが当業者に明らかである。より詳細には、化学的および構造的の両方で関連する特定の薬剤で、類似の結果を達成するために、本明細書中に記載の薬剤を置換し得ることが明らかである。当業者に明らかな全てのこのような置換および改変は、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神、範囲および趣旨の範囲内であるとみなされる。

【0044】

(参考文献)

以下の参考文献は、本明細書中に示される手順を捕捉する例示的な手順の詳細または他の詳細を提供する程度まで、本明細書中に具体的に参考として援用される。

【0045】

(米国特許)

6,069,006;
6,358,741。

40

【0046】

(書籍)

(他の刊行物)

【0047】

【表2】

Bain, J., H. McLauchlanら , “*The specificities of protein kinase inhibitors: an update*”

BIOCHEM J 371(Pt 1):199-204 (2003).

Coghlan, M. P. ら , “*Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3*

modulate glycogen metabolism and gene transcription” CHEM BIOL 7(10):793-803

(2000).

Cohen, P.およびFrame, S.“*The renaissance of GSK3*” NAT REV MOL CELL BIOL 2(10):769-

776 (2001).

Davis, S. T. ら , “*Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK*

inhibitors” SCIENCE 291(5501):134-137 (2001).

Hardcastle, I. R. ら , “*Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases*” ANNU REV

PHARMACOL TOXICOL 42:325-348 (2002).

Knockaert, M. ら , “*Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases*” TRENDS

PHARMACOL SCI 23(9):417-425 (2002).

Kothapalli, D.およびGrotendorst, G.R., “*CTGF modulates cell cycle progression in cAMP-*

arrested NRK fibroblasts” J CELL PHYSIOL 182(1):119-126 (2000).

Leost, M. ら , “*Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and*

cyclin-dependent kinase 5/p25” EUR J BIOCHEM 267(19):5983-5994 (2000).

【表3】

Park, S. K., Kim, J., Seomun, Y., Choi, J., Kim, D. H., Han, I. O., Lee, E. H., Chung, S. K.,

Joo, C. K., "Hydrogen Peroxide is a Novel Inducer of Connective Tissue Growth Factor," BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 284(4):966-971 (2001).

Schwab, J. M., Postler, E., Nguyen, T. D., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Schluesener, H.

J., "Connective Tissue Growth Factor is Expressed by a Subset of Reactive Astrocytes in Human Cerebral Infarction," NEUROPATHOL. APPL. NEUROBIOL. 26(5):434-440 (2000).

10

Schwab, J. M., Beschorner, R., Nguyen, T. D., Meyermann, R., Schluesener, H. J., "Differential Cellular Accumulation of Connective Tissue Growth Factor Defines a Subset of Reactive Astrocytes, Invading Fibroblasts, and Endothelial Cells Following Central Nervous System Injury in Rats and Humans," J. NEUROTRAUMA 18(4):377-388 (2001).

20

Shepard ら , IOVS 42:3173 (2001).

Wang ら , Mol. Vis. 7:89-94 (2001).

Willson, T. M. ら , "The PPARs: from orphan receptors to drug discovery" J MED CHEM 43(4):527-550 (2000).

Woodgett, J. R., "Judging a protein by more than its name: GSK-3" Sci STKE

30

2001(100):RE12 (2001).

Zaharevitz, D. W. ら , "Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases" CANCER RES 59(11):2566-2569 (1999).

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】CTGF遺伝子発現は、縫内障TM組織において、正常TM組織と比較して上昇している。マイクロアレイおよびcDNAサブトラクションの結果を確認するために、CTGF mRNA発現を、縫内障TM組織cDNAに対して比較した正常TM組織cDNAのQPCR分析により決定した。各サンプルの下の数字は、各サンプルに割り当てられたcDNA識別番号をいう。ヒトドナー組織および総RNAを、記載(Wangら2001)の通りに得た。「Average.」は、正常TMレベルまたは縫内障TMレベルの平均を表す。

40

【図2】CTGF遺伝子発現は、正常TM細胞株と比較して、縫内障TM細胞株において上昇する。マイクロアレイおよびcDNAサブトラクションの結果を確認するために、CTGF mRNA発現を、縫内障TM細胞株cDNAに対して比較した正常TM細胞株cDNAのQPCR分析により決定した。各サンプルの下の数字は、細胞株識別番号をいう。ヒトTM細胞株および総RNAを、記載(Shepardら2001)の通りに得た。「NTM pool」と「GTM pool」とは、プールしたNTM cDNAまたはプー

50

ルした G T M c D N A からの增幅レベルをいう。

【図3】緑内障TM細胞におけるCTGF遺伝子発現に対するGSK-3阻害の影響。CTGF遺伝子発現に対するGSK-3阻害の影響を決定するために、本発明者らは、QPCR分析を用いて、緑内障TM細胞株（SGTM2697）における基底CTGF mRNA発現およびTGF-2刺激CTGF mRNA発現の両方に対する既知のGSK-3インヒビタ－SB-216763（Coghlan,ら2000）の影響を決定した。

【図4】緑内障TM細胞におけるCTGF遺伝子発現に対するCDK2阻害の影響。CTGF遺伝子発現に対するCDK阻害の影響を決定するために、本発明者らは、QPCR分析を用いて、緑内障TM細胞株(SGTM2697)における基底CTGF mRNA発現およびTGF-2刺激CTGF mRNA発現の両方に対する既知のCDK2インヒビターGW-8510(Davids,ら2001)の影響を決定した。

〔 义 1 〕

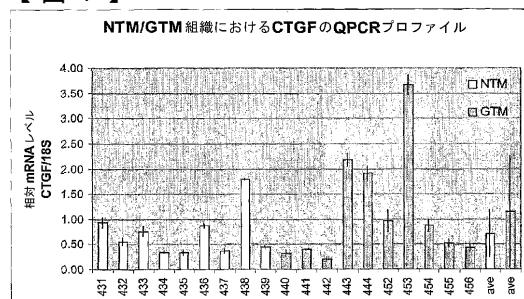


FIG. I

【 図 2 】

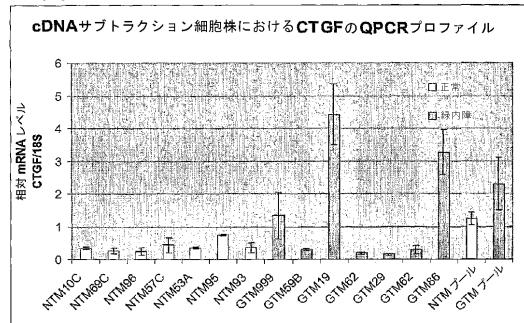


FIG. 2

(3)

SGTM2697 細胞における 基底 CTGF 遺伝子発現および TGF β 2 刺激 CTGF 遺伝子発現 に対する SB-216763 の影響

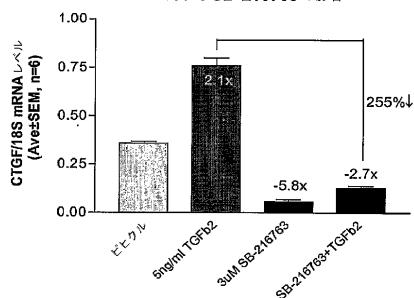


FIG. 3

【図4】
SGTM2697細胞における
基底CTGF遺伝子発現およびTGF β 2刺激CTGF遺伝子発現
に対するGW-8510の影響

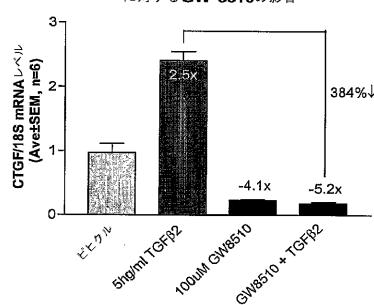


FIG. 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/12521
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12N 9/99 US CL : 424/78.04 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) U.S. : 424/78.04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 03/027275 A1 (Alcon, Inc.) 03 April 2003 (03.04.2003), entire document	1 - 11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "B" earlier application or patent 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		
Date of the actual completion of the international search 10 April 2004 (10.04.2004)	Date of mailing of the international search report 20 MAY 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Ruth A. Davis <i>Janie Floyd</i> Telephone No. 703-308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/12521

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, STN-CAS

search terms: intraocular pressure, GSK, CDK inhibitor, CTGF, glaucoma, troglitazone, ciglitazone

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シェパード, アラン

アメリカ国 テキサス 76132 フォート ワース, ハイ ブルック ドライブ 6404

(72)発明者 ジェイコブソン, ナスリーン

アメリカ国 テキサス 76132 フォート ワース, トリニティ ランディング ドライブ
エヌ., 6813

(72)発明者 パン, イオク - ホウ

アメリカ国 テキサス 75052 グランド ブレイリー, スターブリッジ レーン, 12
5

(72)発明者 クラーク, アボット エフ.

アメリカ国 テキサス 76017 アーリントン レイチェル コート 5603

F ターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA33

(54)【発明の名称】眼内圧の低下および緑内障性網膜症 / 眼神経障害の処置の両方のための独特的手段としての、結合組織増殖因子 (CTGF) の活性および / または発現を調節するか、阻害するか、または調整する薬剤