

(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2011-521969

(P2011-521969A)

(43) 公表日 平成23年7月28日 (2011.7.28)

| | | |
|-------------------------------------|-----------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 31/4709 (2006.01) | A 6 1 K 31/4709 | 4 C 0 6 3 |
| A 6 1 K 31/4439 (2006.01) | A 6 1 K 31/4439 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 P 17/02 (2006.01) | A 6 1 P 17/02 | |
| A 6 1 P 27/02 (2006.01) | A 6 1 P 27/02 | |
| C 0 7 D 401/14 (2006.01) | C 0 7 D 401/14 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2011-511843 (P2011-511843) | (71) 出願人 | 510316660 |
| (86) (22) 出願日 | 平成21年5月29日 (2009.5.29) | | スムマ ヘルス システムズ エルエルシー |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成23年1月26日 (2011.1.26) | | アメリカ合衆国, オハイオ州 44304 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2009/045607 | | , アクロン, 525 イー. マーケット |
| (87) 国際公開番号 | W02009/146408 | | ストリート, オフタルモロジー リサーチ |
| (87) 国際公開日 | 平成21年12月3日 (2009.12.3) | (74) 代理人 | 100068618 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/057, 461 | | 弁理士 萼 経夫 |
| (32) 優先日 | 平成20年5月30日 (2008.5.30) | (74) 代理人 | 100104145 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 宮崎 嘉夫 |
| | | (74) 代理人 | 100104385 |
| | | | 弁理士 加藤 勉 |
| | | (74) 代理人 | 100156889 |
| | | | 弁理士 小山 京子 |
| | | 最終頁に続く | |

(54) 【発明の名称】 眼疾患を治療するための TGF- β 受容体阻害剤又はアクチビン様キナーゼ (ALK) 5 阻害剤、A-83-01 及び SB-431542 の使用方法及び創傷治療条件

(57) 【要約】

【課題】眼疾患を治療するための TGF- β 受容体阻害剤又はアクチビン様キナーゼ (ALK) 5 阻害剤、A-83-01 及び SB-431542 の使用方法及び創傷治療条件を提供する。

【解決手段】アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤の有効量を含む、緑内障手術後に生じ得る結膜癒着の防止に有用な医薬組成物。同様に開示されるものは、アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤を含む医薬組成物の一定量を適用することを含む眼科手術後に発現し得る角膜の濁り及び結膜癒着の治療方法である。

【選択図】 図 7

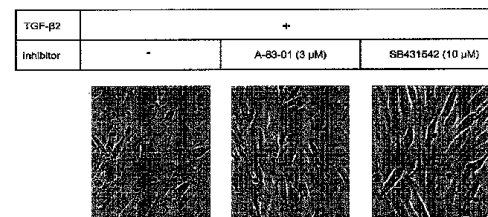
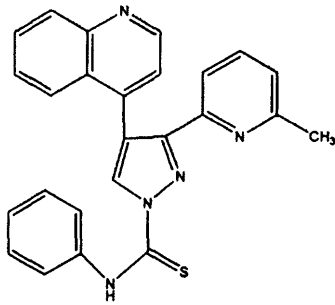


FIG. 7

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

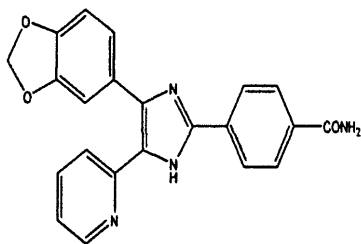
眼科手術及び／又は眼球外傷に伴う瘢痕組織の形成を減少する方法であって、
成長因子 - を形質転換するシグナル伝達経路を阻害するのに十分な量で、下記式
【化 1】



10

及び

【化 2】



20

及びそれらの組み合わせからなる群より選択されるアクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤の有効量並びにそれらの医薬的に許容可能なビヒクルを含む組成物を、手術後の部位又は外傷後の部位に適用することを含む方法。

【請求項 2】

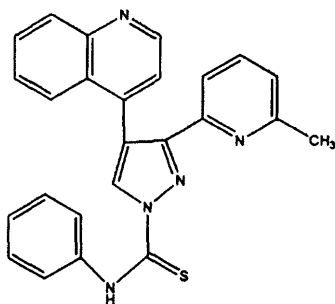
前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、約 1 . 0 ないし約 1 0 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 3】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、下記式

【化 3】



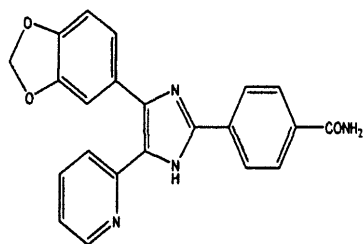
40

を表し、約 1 . 0 ないし約 3 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、下記式

【化 4】



を表し、約 1 . 0 ないし約 1 0 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 5】

前記組成物が更に、持続放出ポリマーキャリアを含む請求項 1 記載の方法。

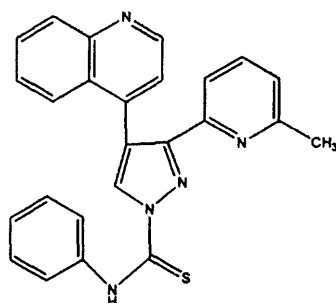
【請求項 6】

前記組成物が更に、患者の眼の手術部位への投与においてゲル形成が可能なキャリア媒体を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

眼科手術に伴う瘢痕組織の形成を減少する方法であって、
成長因子 - を形質転換するシグナル伝達経路を阻害するのに十分な量で、下記式

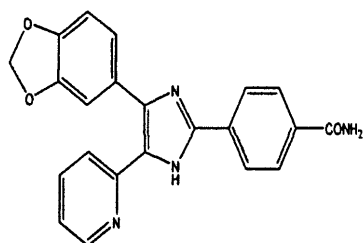
【化 5】



及び

30

【化 6】



及びそれらの組み合わせからなる群より選択されるアクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤の有効量並びにそれらの医薬的に許容可能なビヒクルを含む組成物を、手術部位に適用することを含み、前記組成物は、局所適用の形態で手術に伴う前記手術部位に適用される方法。 40

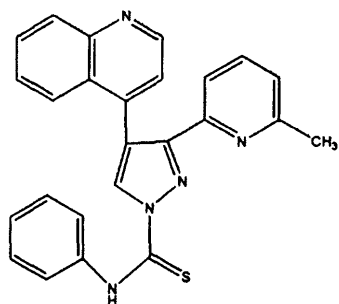
【請求項 8】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、約 1 . 0 ないし約 1 0 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、下記式

【化 7】



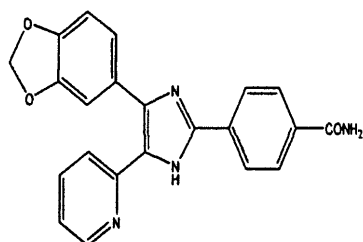
10

を表し、約 1 . 0 ないし約 3 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、

【化 8】



20

を表し、約 1 . 0 ないし約 10 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

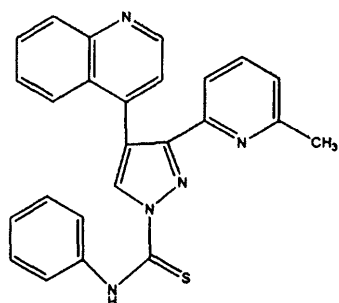
前記組成物が更に、患者の眼の手術部位へ投与してゲル形成が可能なキャリア媒体を含む請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】

医薬組成物であって、該組成物は、手術後の眼球の瘢痕化の防止に有用であり、下記式

30

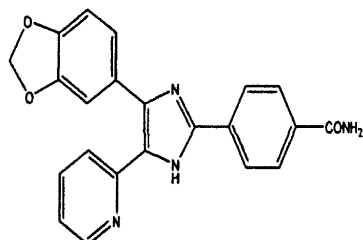
【化 9】



40

及び

【化 10】



50

及びそれらの組み合わせからなる群より選択されるアクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤の有効量を含む組成物。

【請求項 1 3】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤の医薬的に許容可能な塩を含む請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 1 4】

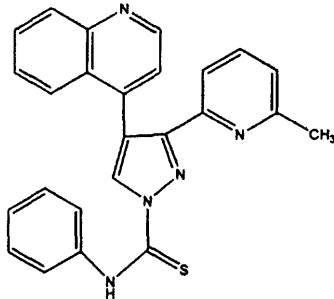
前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、約 1 . 0 ないし約 1 0 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、下記式

10

【化 1 1】



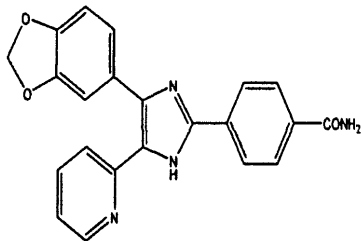
20

を表し、約 1 . 0 ないし約 3 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 5 阻害剤が、下記式

【化 1 2】



30

を表し、約 1 . 0 ないし約 1 0 . 0 μ M の量で前記組成物中に存在する請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記組成物が更に、ポリマーキャリアを含む請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記組成物が更に、患者の眼の手術部位へ投与してゲル形成が可能なキャリア媒体を含む請求項 1 2 記載の組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2008年5月30日に出願された米国仮出願特許第61/057,461号への優先権を請求する。

【0002】

この発明の進展は、米国健康支援財団 (American Health Assistance Foundation)、G2006-014 及び米国国立眼科機構 (National Eye Institute)、EY01792 からの財政的支援により支持されている。政府機関は本発明に興味を持っている。

50

【背景技術】

【0003】

背景

眼の線維傷害反応は、特に、緑内障のための外科的治療の結果として、視覚障害及び失明の主な原因である。緑内障は、米国における失明の主な原因であり、2000年に250万人のアメリカ人及び世界中で6500万人の人が該疾患に罹患した。緑内障は視神経頭への損傷並びに神経障害及び視力障害により特徴付けられる疾患である。緑内障の主な危険因子の一つは、房水流出路における異常の結果として生じる眼圧の上昇（IOP）である。緑内障の過手術（GFS）は通常、薬物治療がIOPを的確に制御することに失敗した場合に行なわれる。

10

【0004】

過度の術後瘢痕化が、しばしばGFSの失敗をもたらす。結膜の抗-瘢痕化治療として、ミトマイシン-C（MMC）及び5-フルオロウラシルのような代謝拮抗剤の使用が多く、多くの患者に利益をもたらしているものの、これらは広範な細胞死を引き起こすことによって、その利益をもたらすのであって、低眼圧黄斑症及び感染症のような重度の及び潜在的な失明合併症を伴う。そのため、他の抗-瘢痕化のアプローチが調査されてきている。特に、形質転換成長因子-（TGF-）及びその経路が、術後の抗-瘢痕化治療のための標的として浮上した。

【発明の概要】

【0005】

20

図面の簡単な説明

本明細書に組み込まれ且つ本明細書の一部を構成する、添付の図面は、本発明の観点の種々の実施例態様を説明する種々の実施例系、方法等を説明する。図中で説明される成分枠（例えば、四角形、四角形の群又は他の形状）は、枠の1例を表すものと理解され得る。当業者は、1種の要素は、多重要素として設計され得るか又は多重要素は1種の要素として設計され得ると理解し得る。別の要素の内部構成材として示される要素は、外部構成材として実施され得るが、その逆も同じである。更に、要素は、縮尺通りとは限らない。

【図面の簡単な説明】

【0006】

30

【図1】図1は、緑内障の過手術の間のヒトの目の側面図である。

【図2】図2は、ウサギの培養結膜線維芽細胞のTGF-シグナル伝達レベル上のALK-5阻害剤、A-83-01の効果を示すグラフである。

【図3】図3は、ウサギの培養結膜線維芽細胞のTGF-シグナル伝達レベル上のALK-5阻害剤、SB-431542の効果を示すグラフである。

【図4】図4は、ALK-5阻害剤、A-83-01及びSB-431542で処理されたウサギの培養結膜線維芽細胞における結合組織増殖因子（CTGF）の発現を示すウエスタンブロッティング像である。

【図5】図5は、ALK-5阻害剤、A-83-01及びSB-431542で処理されたウサギの培養結膜線維芽細胞におけるフィブロネクチン及び-平滑筋アクチン（-SMA）の発現を示すウエスタンブロッティング像である。

40

【図6】図6は、ALK-5阻害剤、A-83-01及びSB-431542で処理されたウサギの培養結膜線維芽細胞におけるCTGF、フィブロネクチン及び-SMAの発現を示す免疫細胞蛍光発光像である。

【図7】図7は、ALK-5阻害剤、A-83-01及びSB-431542で処理されたウサギの培養結膜線維芽細胞の線維芽細胞形態を示す位相差顕微鏡像である。

【発明を実施するための形態】

【0007】

詳細な説明

ここで開示されるものは、哺乳類における緑内障の過手術後の眼疾患及び眼球瘢痕化の予防及び治療方法である。好ましくは、該方法は緑内障の過手術中又はその後のヒトの

50

患者に対する治療に使用され得る。緑内障手術（GFS）において、眼からの液体の排水を容易にするために新規な排水部位が創出されると、それにより眼における眼圧が低下する。図1に示されるように、ヒトの眼は、他の構成要素中に、結膜12、小柱網14、虹彩16、角膜18、網膜24及び水晶体26を含む。

【0008】

GFSの間、眼の通常の排水部位（小柱網）14中への排水の代わりに、房水が眼の結膜12の下に創出された新規な“空間”中へ排水される。これを行うために、白眼の中に小さなフラップが作成される。その後、通路の開口部20とろ過胞と呼ばれる貯水部22の間に新規な排水路28が創出される。房水と呼ばれる、前房及び後房中の流体は、その後、新規な排水路28を介して胞22中へ排水され、眼の周囲の血管中へ吸収される。胞22及び/又は新規な排水路28は、傷跡を残し得、そして、該房水が適度に流れ出るのを防ぐ経路を閉ざしてしまうが、胞不全と呼ばれる。

10

【0009】

形質転換成長因子 - （TGF - ）は、創傷治癒反応の主要なメディエーターである。眼において、TGF - は、レーザー手術後の角膜の濁り及び緑内障手術後の結膜癒着化の誘発において関与してきた。加えて、TGF - の上方調節は、網膜剥離手術の失敗の主原因である、増殖性硝子体網膜症（PVR）に関わっている。

【0010】

アクチビン受容体様キナーゼ（ALK）5阻害剤は、TGF - のシグナル伝達経路を遮断し、よって、GFS、硝子体網膜手術、角膜外傷の治療及びLASIKを含む、眼科手術後の角膜の濁り及び癒着化を防止するために使用され得る。同様に、ALK - 5阻害剤の使用は、現行の抗 - 癒着化薬剤に付随する副作用、例えば、出血、感染、腫脹、癒着化、網膜剥離、眼瞼下垂、複視、視力低下又は失明でさえ減少し得る。最終的に、ALK - 5阻害剤のヒトの眼への局所適用は、緑内障と関連する眼圧を低下させ得る。

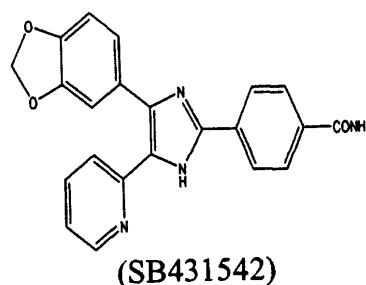
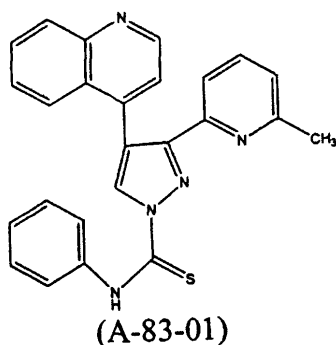
20

【0011】

一つの態様において、以下に示される化合物の1種又はそれ以上のものが使用し得る。入手可能な所で、製造業者指定のものが提供されてきている。該化合物は、ミズーリ州、セントルイス、ピー・オー・ボックス14508のシグマ（Sigma）社から入手可能である。

【化1】

30



40

【0012】

上述の組成物は、ALK - 5阻害剤及び医薬的に許容可能なその塩を含み得、それはポリマーキャリア及び投与においてゲル形成が可能なキャリアのような、眼内使用のために好適な医薬ビヒクルの種々のタイプの中に含まれることがある。ビヒクルは、好ましくは水性であり、眼組織と化学的及び物理的に相溶性となるように処方される。例えば、生体内分解性の（又は生体内崩壊性の）ゲル又はコラーゲン挿入物は、胞における阻害剤の有効濃度を保持するために使用され得る。そのようなゲル又は挿入物の使用は、手術部位で活性成分の持続放出を提供する利点を有する。

【0013】

組成物は、ALK - 5阻害剤の有効量を含み得る。好ましくは、組成物は、ALK - 5

50

阻害剤の約 0.3 ないし約 15 μ M、より好ましくは阻害剤の約 3 ないし約 10 μ M を含み得る。15 μ M を越える量を含むその組成物もまた使用し得ることは、当業者に理解されることであろう。

【0014】

当業者が理解するであろうように、上述の組成物は、無菌であるべきであり、敏感な眼内組織、特に、角膜/内皮細胞に対して毒性を示すあらゆる薬剤も含むべきでない。上述の組成物は、当業者に既知の技術に従って処方し得る。

【0015】

上述の組成物は、種々の技術の手段により手術部位へ適用し得る。例えば、該組成物は、手術の間に又は手術後直ちに、好ましくは 4 時間以内に注射の手段により、又は手術部位上又は手術部位周囲の眼中へ挿入し得る持続放出ポリマーを用いて適用され得る。該組成物は、角膜の濁りを防止又は減少するために、LASIK 後の局所処方です手術部位に適用され得る。

10

【実施例】

【0016】

阻害剤及び TGF- β 2 を用いるインビトロの細胞調製

試料の線維芽細胞は、ニュージーランド白ウサギの眼から得られた。該線維芽細胞は、対象者の眼から単離された結膜組織に由来するものであった。細胞の 3 ないし 5 代継代は、イーグル最小必須培地、10% ウシ胎児血清、5% 子牛血清、必須アミノ酸及び非必須アミノ酸及び抗生物質から構成される媒体 3 mL を用いて 25 cm^2 フラスコ中で保持された。該細胞が集まった時に、トリプシン処理され及び継代された。

20

【0017】

6 - ウェルプレート中の線維芽細胞培養物は、種々の濃度、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0 及び 10.0 μ M で、ALK-5 阻害剤を含む媒体 2 mL と一緒に 1 時間前処理され、更に、TGF- β 2 (R&D システムズ、ミネアポリス、MN) 2 ng/mL で 72 時間まで処理された。表 1 に示されるように、試料 1 - 7 は、ALK-5 阻害剤 A-83-01 を用いて及び試料 8 - 14 は、ALK-5 阻害剤 SB431542 を用いて調製された。

【0018】

試料 15 及び 16 は、対照として調製された。試料 15 は、ALK-5 阻害剤又は TGF- β 2 で処理されなかった。試料 16 は、TGF- β 2 2 ng/mL で処理されたが、ALK-5 阻害剤で処理されなかった。試料は、以下の表 1 に示されるように調製された。

30

【表 1】

表 1

| 試料# | ALK-5 阻害剤 | 阻害剤濃度 (μ M) 前処理 | TGF- β 2 (ng/mL) |
|-----|-----------|----------------------|------------------------|
| 1 | A-83-01 | 0.01 | 2.0 |
| 2 | A-83-01 | 0.03 | 2.0 |
| 3 | A-83-01 | 0.1 | 2.0 |
| 4 | A-83-01 | 0.3 | 2.0 |
| 5 | A-83-01 | 1.0 | 2.0 |
| 6 | A-83-01 | 3.0 | 2.0 |
| 7 | A-83-01 | 10.0 | 2.0 |
| 8 | SB-431542 | 0.01 | 2.0 |
| 9 | SB-431542 | 0.03 | 2.0 |
| 10 | SB-431542 | 0.1 | 2.0 |
| 11 | SB-431542 | 0.3 | 2.0 |
| 12 | SB-431542 | 1.0 | 2.0 |
| 13 | SB-431542 | 3.0 | 2.0 |
| 14 | SB-431542 | 10.0 | 2.0 |
| 15 | N/A | 0.0 | 0.0 |
| 16 | N/A | 0.0 | 2.0 |

【0019】

C T G F のウエスタンブロッティング

阻害剤及び / 又は T G F - 2 を用いた処理の後、種々の試料からの細胞は採取され、定量的な評価を提供するためにウエスタンブロッティングが行われた。結膜線維芽細胞はトリトン溶解緩衝液中で溶解された。溶解物中の総タンパク質は、ブラッドフォードタンパク質分析を用いて定量された。タンパク質の等量 (20 μ g / レーン) が 10 % ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) - ポリアクリルアミドゲルに溶解された。タンパク質はその後、ニトロセルロース膜へ転写された。

【0020】

1 % ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、該膜は、ポリクローナルヤギ抗 - C T G F (1 : 200、サンタクルーズ バイオテクノロジー、サンタクルーズ、C A、) でプローブされ、そして、H R P 標識 - ロバ抗 - ヤギ I g G (1 : 1,000 ; ジャクソン イムノリサーチ、ウエストグロブ、P A) が続いた。T G F - シグナルは、ピアス (P i e r c e) (ロックフォード、I L) 製のスーパーシグナル (S u p e r S i g n a l) を使用する高感度化学発光 (E C L) により検出された。濃度測定はその後、バンドの強度を測定することにより達成された。

【0021】

濃度測定は、低下した C T G F タンパク質のバンドの強度、即ち、1 μ M を超える濃度で試料は、37 - 38 及び 42 - 44 k D a を示し、A L K - 5 阻害剤で処理された試料における減少したタンパク質レベルを示す。膜はまた、内部標準として、ハウスキーピング遺伝子、グリセロアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼのためにもプローブされた。図 2 - 3 で示されるように、最大阻害の半分の濃度 (I C 50) が、T G F - 2 機能の阻害における各阻害剤の効果を評価するために計算された。阻害剤の濃度が増加するに従って、阻害される T G F - 2 のパーセンテージもまた増加した。該成長因子の阻害のパーセンテージが、投与された各阻害剤の特定の濃度に依存することに留意すべきである。一般的に、該成長因子は、阻害剤の少なくとも 1 μ M での細胞への適用により、ある程度阻害された。シグナル経路の阻害を提供するのに 3 μ M 程度が必要な場合があった。阻害剤無しに調製された対照試料は、T G F - シグナル経路の阻害機能を示さなかった。図 2 - 3 中、グラフの “ - 1 ” 境界線は、試料 15 が試験された場合に見られる、A L K - 5 阻害剤及び T G F - 無しの T G F - 下流タンパク質の発現パーセンテージを表し、

“ 0 ” 境界線は、各 A L K - 5 阻害剤は添加されないが、T G F - 溶液は添加されて試験される、試料 1 6 からの試験データを表す。

【 0 0 2 2 】

阻害剤の低濃度を用いて調製された試料の中には、実際に、シグナル経路の活性において増加を示したものもあったが、阻害剤を用いる効果的な治療は、使用した特定の阻害剤及び手術部位へ適用した阻害剤の濃度に依存するであろうとの結論を導く。更に、長時間に亘り、手術部位において、阻害剤の一定濃度を維持するのが望ましい。従って、局所ゲル、ポリマーインプラント等を伴うような、組成物の持続放出を提供する方法を伴って阻害剤を適用することが望ましくあり得る。

【 0 0 2 3 】

- S M A 及びフィブロネクチンのためのウエスタンブロッティング

各阻害剤での処理後の、フィブロネクチン及び - S M A タンパク質発現を試験するために、試料 1 - 1 6 において調製されたように、ウサギ結膜線維芽細胞が 4 8 ないし 7 2 時間培養された。図 5 で示されるように、A - 8 3 - 0 1 及び S B - 4 3 1 5 4 2 は T G F - B 2 により誘発されるタンパク質発現を効果的に阻害した。A - 8 3 - 0 1 及び S B - 4 3 1 5 4 2 で処理された試料における、両タンパク質のバンド強度は、阻害剤で処理されなかった試料のバンドに比べて、減少された。タンパク質レベルの減少は、阻害剤の濃度を高くするほど顕著になる。プロットはまた、均等なタンパク質負荷を制御するための - アクチンのためにもブローブされる。

【 0 0 2 4 】

表 1 中で説明されるように、A - 8 3 - 0 1 及び S B - 4 3 1 6 4 2 で処理された線維芽細胞における - S M A 及びフィブロネクチンの発現は、阻害剤が T G F - 2 シグナル経路を遮断する範囲を決定するために測定された。細胞溶解物中のタンパク質 (2 0 μ g / レーン) は、1 0 % ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) - ポリアクリルアミドゲル上で溶解された。タンパク質はニトロセルロースに転写された。1 % ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、該膜は、モノクローナルマウス抗 - - S M A (1 : 9 , 0 0 0) でブローブされ、続いて、H R P 標識 - ヤギ抗 - マウス I g G (1 : 1 5 0 , 0 0 0 ; ジャクソン) でブローブされるか又は、モノクローナルマウス抗 - フィブロネクチン (1 : 1 , 0 0 0) でブローブされ、続いて、H R P 標識 - ヤギ抗 - マウス I g G (1 : 1 0 , 0 0 0) でブローブされた。シグナルは、高感度化学発光により検出された。

【 0 0 2 5 】

免疫細胞蛍光発光顕微鏡画像化技術

別の実施例において、結膜線維芽細胞は 8 - ウェルチャンバースライド上で培養された。該試料は試料 5 - 6 及び 1 3 - 1 6 として調製され、7 2 時間培養された。阻害剤処理の後、線維芽細胞培養物は各々、4 % パラホルムアルデヒドを用いて又はアレクサフロウ (A l e x a F l u o r) のための氷冷法若しくは F I T C 染色を用いて固定された。透過化の後、細胞培養物は、ポリクローナルヤギ抗 - C T G F (1 : 5 0 , サンタクルーズ) で培養され、続いて、アレクサフロウ ロバ抗 - ヤギ I g G (1 0 μ g / m L , インビトロジェン) 、モノクローナルマウス抗 - フィブロネクチン (1 0 μ g / m L , インビトロジェン) 又はモノクローナルマウス抗 - - S M A (1 : 4 0 0 , シグマ) で培養され、続いて F I T C ヤギ抗 - マウス I g G (1 : 1 0 0 , ジャクソン イムノリサーチ) で培養された。細胞培養物は、D A P I を伴う水性マウント媒体を用いてマウントされ、蛍光顕微鏡検査法により観察された。

【 0 0 2 6 】

図 6 に示されるように、C T G F 、フィブロネクチン及び - S M A は、F I T C 又はアレクサフロウ標識 (緑) で視覚化された。核種は D A P I (青) で染色された。C T G F 、 - S M A 及びフィブロネクチンのための染色における劇的な増加が、T G F - 2 培養後に観察された。T G F - 2 - 誘導タンパク質の染色強度は、細胞が A - 8 3 - 0 1 又は S B 4 3 1 5 4 2 阻害剤と同時に処理された場合、大きく低下した。何れの阻害剤のバー 5 0 μ M で処理された試料においても、明白な細胞死は観察されなかった。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

線維芽細胞形態

別の実施例において、ウサギ線維芽細胞は、 2 ng/mL に代えて、 5 ng/mL の TGF- β 2 を試料に添加した以外は、試料 6、14、15 及び 16 と同様にして調製された。該細胞培養物の形態は、図 7 において示されるように、位相差顕微鏡法により視覚化された。TGF- β 2 で処理された細胞において、筋線維芽細胞様の外観が観察された。該 TGF- β 2 誘導形態学的変化は、A-83-01 又は SB431542 の添加により回避されるように思われた。阻害剤で処理された試料に、明白な細胞死は観察されなかった。

【 0 0 2 8 】

ALK 阻害剤、A-83-01 及び SB-431542 は、ウサギの培養結膜線維芽細胞における創傷治癒に関連する TGF- β 2 活性を効果的に遮断する。何れの阻害剤で調製された細胞培養物においても、明確な細胞毒性は観察されなかった。よって、これらの阻害剤は、特に、緑内障手術のための、眼球抗-瘢痕化剤として使用し得る。

【 0 0 2 9 】

実施例の方法及び組成物は、記載された実施例により説明され、また、該実施例はかなり詳細に述べられているが、それは、該添付の請求項の範囲を制限したり、多少なりとも、そのような詳細まで限定したりするという出願人の意図ではない。もちろん、ここに記載される、システム、方法、デバイス等を記載するという目的で、成分又は方法論の考えられる組み合わせ全てを記載することは可能でない。更なる利点及び改良は、当業者にとって容易であると考えられる。従って、本発明は、提示及び記載された、特定の細目、代表的な装置及び説明に役立つ実施例に限定されない。よって、この出願は、添付の請求項の範囲に含まれる変更、改良、変化を包含することを目的とする。更に、前述の説明は本発明の範囲を限定することを意味しない。むしろ、本発明の範囲は、添付された請求項及びそれらの等価物により決定される。

【 図 1 】

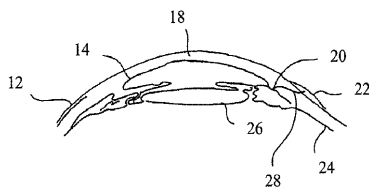


FIG. 1

【 図 2 】

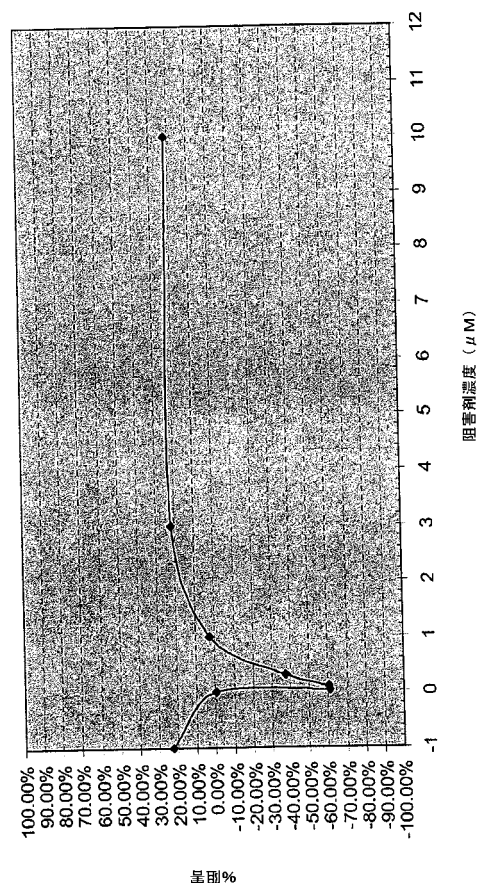


FIG. 2

【図 3】

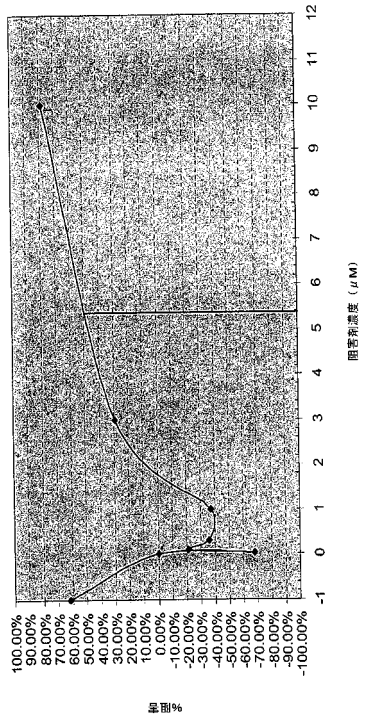


FIG. 3

【図 4】

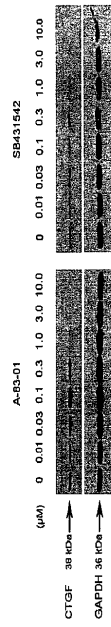


FIG. 4

【図 5】

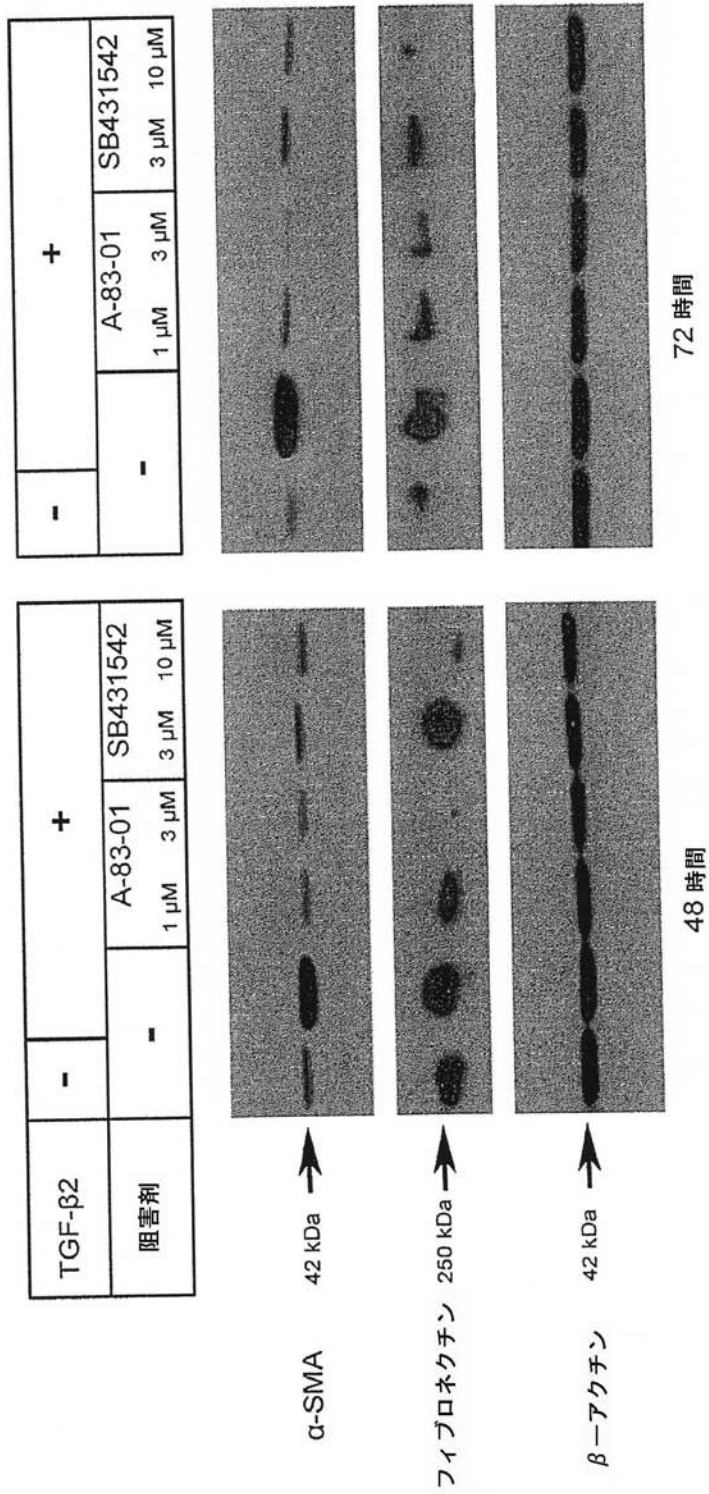


FIG. 5

【図 6】

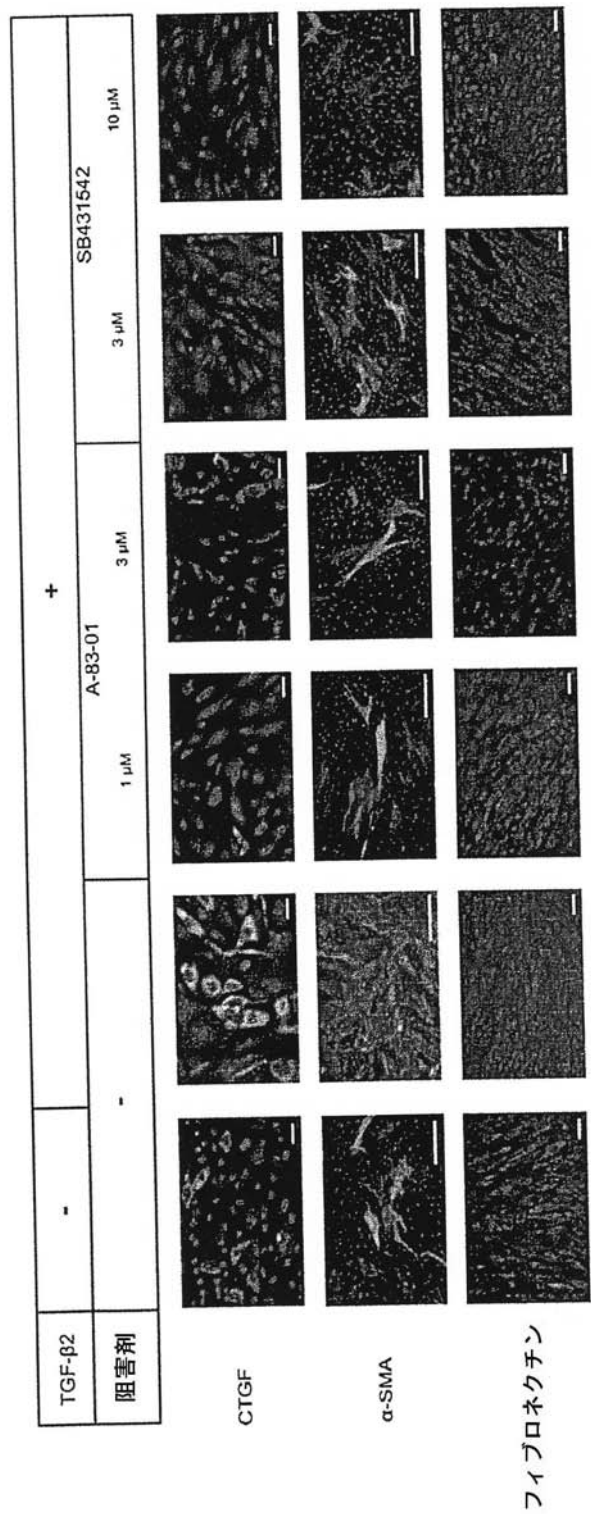


FIG. 6

【 図 7 】

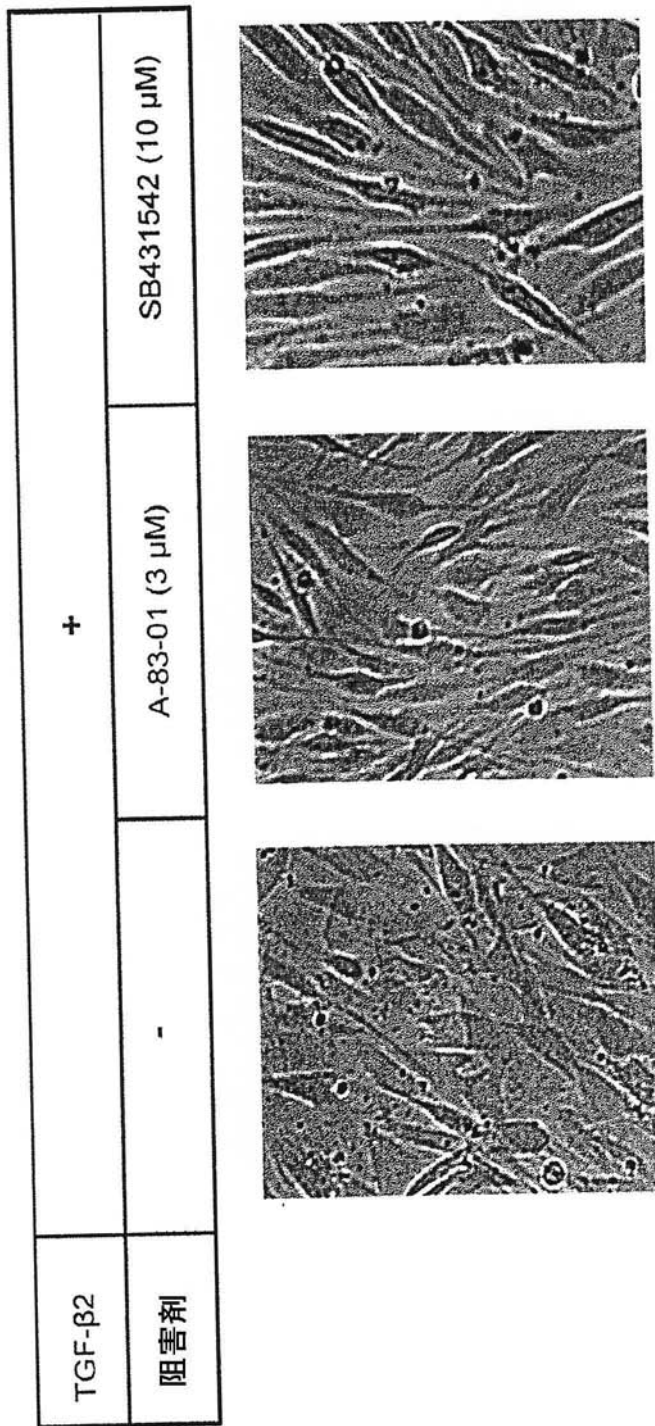


FIG. 7

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/045607

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/5377 (2009.01) USPC - 514/235.2 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) IPC(8) - A61K 31/5377, 31/506, 31/519, 31/4745, 31/4709, 31/4439, 31/444 (2009.01) USPC - 514/235.2, 249, 264.11, 275, 300, 303, 314, 332, 337, 341 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) PatBase | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X - Y Y | US 2007/0142376 A1 (FLEENOR et al) 21 June 2007 (21.06.2007) entire document The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta; TOJO et al; Cancer Science; 17 October 2005 (17.10.2005); vol. 96-no. 11; 791- 800 | 1, 5-7, 11-13, 17, 18 2-4, 8-10, 14-16 2-4, 8-10, 14-16 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * 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 10 July 2009 | | Date of mailing of the international search report 27 JUL 2009 |
| 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. 571-273-3201 | | Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 |

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 0 7 D 405/14 (2006.01) C 0 7 D 405/14

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100163360

弁理士 伴 知篤

(72)発明者 中村, 弘

アメリカ合衆国, オハイオ州 4 4 2 3 6, ハドソン, ストーンリッジ サークル 7 3 8 4

(72)発明者 ユエ, ベアトリス, ワイ., ジェイ., ティー.

アメリカ合衆国, イリノイ州 6 6 0 1 5, ディアフィールド, サミット ドライブ 8 7 0

Fターム(参考) 4C063 AA03 BB01 CC22 CC76 DD12 DD25 EE01

4C086 AA01 AA02 BC28 BC38 GA02 GA07 GA08 MA01 MA02 MA04

MA05 NA14 ZA33 ZB22