

(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2017-524655  
(P2017-524655A)

(43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 M 35/00 (2006.01)	A 6 1 M 35/00 Z	4 C 0 8 4
A 6 1 F 5/445 (2006.01)	A 6 1 F 5/445	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/728 (2006.01)	A 6 1 K 31/728	4 C 0 9 8
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	4 C 1 6 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-569410 (P2016-569410)  
 (86) (22) 出願日 平成27年5月26日 (2015. 5. 26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月12日 (2017. 1. 12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/061598  
 (87) 国際公開番号 W02015/177379  
 (87) 国際公開日 平成27年11月26日 (2015. 11. 26)  
 (31) 優先権主張番号 PA201470300  
 (32) 優先日 平成26年5月23日 (2014. 5. 23)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 516235554  
 レボネックス・ファーマシューティカルズ  
 ・エービーエス  
 デンマーク・ディーケー-2970・ヘル  
 スホルム・スロツマルケン・12・1・  
 ティホ  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉  
 (74) 代理人 100133400  
 弁理士 阿部 達彦  
 (72) 発明者 ラース・ヘスレット  
 デンマーク・2820・ゲントフテ・パル  
 コヴスヴァイ・20

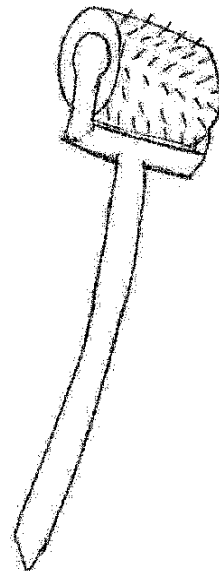
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 創傷の治癒を促進するための組成物

(57) 【要約】

本発明は、身体の皮膚又は粘膜に対する潰瘍、創傷、及び他の傷害を処置、先制処置、又は予防するための、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、スクロスオクタスルフェート又はスクラルファート、及びヒアルロン酸を含む組成物を提供する。本発明の他の態様は、記載する組成物を用いて処置又は防止する方法、及び提供する方法に用いるための適用装置である。

Figure 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a) 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)又はそのフラグメント若しくはバリエーション、並びに

b) スクロースオクタスルフェート(SOS)又はその塩、例えばスクラルファート、及びヒアルロン酸(HA)

を含む組成物。

## 【請求項 2】

医薬として用いるための、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 3】

身体の皮膚、粘膜又は結合組織の創傷、潰瘍、瘢痕又は他の病変等の炎症箇所又は病変の処置、防止又は緩和に用いるための、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 4】

創傷及び/又は潰瘍の処置、防止又は緩和に用いるための、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

創傷及び/又は潰瘍が難治性である、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

創傷及び/又は潰瘍が急性である、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 7】

潰瘍が、難治性の潰瘍性皮膚病変である、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

創傷及び/又は潰瘍が、真菌、ウイルス、及び/又は細菌の感染等の感染症に関連する、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

創傷及び/又は潰瘍が糖尿病に関連する、請求項1から8のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 10】

創傷及び/又は潰瘍が、静脈性下肢潰瘍、静脈性足部潰瘍、動脈性下肢潰瘍、動脈性足部潰瘍、又は褥瘡性潰瘍等、血液循環の低下に関連する、請求項1から9のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 11】

散剤、パスタ剤、ペイント剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、クリーム剤、塗布剤、乳剤、懸濁剤、液剤、噴霧剤、スポンジ、ストリップ、硬膏剤、パッド、包帯剤として調合されるか、又はオストミープレートで調合される、請求項1から10のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 12】

組成物がゲル剤として調合される、請求項1から11のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 13】

GM-CSFが、リポソーム又はミセルの、マイクロカプセル又はナノ粒子製剤中にある、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 14】

GM-CSFバリエーションが、配列番号1又は配列番号2に少なくとも70%同一である、請求項1から13のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 15】

GM-CSFフラグメントが、配列番号1又は配列番号2のいずれか1つの、少なくとも50個の隣接するアミノ酸残基を含む、請求項1から14のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 16】

フラグメントが、重複の範囲において配列番号1又は配列番号2に少なくとも70%同一で

10

20

30

40

50

ある、請求項14に記載の組成物。

【請求項 17】

1 µg/gから1000 µg/gの濃度のGM-CSFを含む、請求項1から16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

10 µg/gから300 µg/gの濃度のGM-CSFを含む、請求項1から17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

0.01mg/gから650mg/gの濃度のヒアルロン酸を含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

100 µg/gから100mg/gの濃度のヒアルロン酸を含む、請求項1から19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

スクロースオクタスルフェートの形態がスクラルファートである、請求項1から20のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

50mg/gから200mg/gの濃度のスクロースオクタスルフェート又はスクラルファートを含む、請求項1から21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

80mg/gから1500mg/gの濃度のスクロースオクタスルフェート又はスクラルファートを含む、請求項1から22のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

5w/w%から20w/w%の濃度のスクロースオクタスルフェート又はスクラルファートの懸濁液を含む、請求項1から23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

8w/w%から15w/w%の濃度のスクロースオクタスルフェート又はスクラルファートの懸濁液を含む、請求項1から24のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 26】

0.01w/w%から35w/w%の濃度のヒアルロン酸の水溶液を、8w/w%から15w/w%の濃度のスクロースオクタスルフェート、及び1 µg/gから1000 µg/gの濃度のGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体とともに含む、請求項1から25のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

0.1w/w%から10w/w%の濃度のヒアルロン酸の水溶液を、10w/w%の濃度のスクロースオクタスルフェート、及び20 µg/gから300 µg/gの濃度のGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体とともに含む、請求項1から26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 28】

ビタミンA及び/又は抗酸化剤を更に含む、請求項1から27のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 29】

GM-CSFが、GM-CSFの半減期を延長することができるコンジュゲートの形態のGM-CSFバリエーションを含む、請求項1から28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 30】

有効成分の半減期を延長することができるコンジュゲートが、アルブミン又は脂肪酸である、請求項29に記載の組成物。

【請求項 31】

3から10の間、例えば4から9の間、例えば4から8の間、例えば5から8の間、例えば6から8の間、好ましくは6.5から7.5の間、例えば約7のpHを有する、請求項1から30のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

請求項1から31のいずれか一項に記載の組成物を投与するためのローラーツールであって、

長さ及び内部を有する実質的に円柱状のローラー本体であって、前記ローラー本体は、対向して配置された2つの円形端部表面及びエンドレスな表面を含み、前記円形端部表面は各々、その中心に開口部を規定し、前記エンドレスな表面はその上にランダムな間隔の突出部を取り込んでいる、ローラー本体、

実質的にU型のフレームであって、前記フレームは2つの端部フランジで終結し、前記端部フランジは前記ローラー本体の前記円形端部表面に回転可能に連結し、前記フランジは各々、フランジ開口部を規定し、フランジ開口部は、前記円形端部表面によって規定される前記開口部に近接している、フレーム、

前記端部フランジを前記ローラー本体の前記円形端部表面に取り外し可能に固定するための手段、

メス型のソケット部材であって、前記ソケット部材は、前記ローラー本体の反対側上、前記U型フレームの中央で一体的に接続し、それによって前記ソケット部材は別々のポールハンドルを受けて前記ローラー本体の遠隔操作を容易にする、ソケット部材を含む、ローラーツール。

【請求項33】

突出部がピンである、請求項32に記載のローラーツール。

【請求項34】

ピンの長さが0.1mmから3.0mm、好ましくは0.70mmから1.20mmである、請求項33に記載のローラーツール。

【請求項35】

前記U型のハンドルに接続されている、実質的に半円柱のスリーブを更に含む、請求項32から34のいずれか一項に記載のローラーツール。

【請求項36】

突出部が、組成物をローラー本体の内部から円柱状のローラー本体の外側表面まで通過させる中空の皮下注射針の性質を持つ、請求項32から35のいずれか一項に記載のローラーツール。

【請求項37】

外部リザーバ系を更に含み、前記外部リザーバ系は、ハンドルに付着していてもよく、組成物を円柱の内部に送達する導管に接続している出口ホースによって接続する出口を有する、医薬組成物のために密封されている外部リザーバ系を含み、それによって前記リザーバ内に貯蔵されている医薬組成物が前記ホースを介して投与部材に流れ、導管を介して医薬組成物をローラー本体に連続的に提供し、それによって医薬組成物の一様な分布が効果的にもたらされる、請求項32から36に記載のローラーツール。

【請求項38】

円柱状のローラー本体内に、医薬組成物のための内部リザーバ系を更に含む、請求項32から37に記載のローラーツール。

【請求項39】

組成物が、請求項1から31のいずれか一項に記載の組成物である、請求項32から38のいずれか一項に記載のローラーツール。

【請求項40】

請求項1から31に記載の組成物の有効量を対象に投与することを含む、対象の身体の皮膚、粘膜、若しくは結合組織の創傷、潰瘍、瘢痕又は他の病変等の、炎症箇所又は病変を処置、防止又は緩和するための方法。

【請求項41】

組成物が局所投与によって投与される、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

10

20

30

40

50

組成物が、マッサージ、注射、噴霧、及び/又はブラッシングにより局所投与される、請求項40及び41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

組成物が外科手術の間又は後に投与される、請求項40から42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

組成物が水溶液で適用される、請求項40から43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

組成物が注射によって投与される、請求項40から44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

投与が、請求項32から39のいずれか一項に記載のローラーツールによって行われる、請求項40から45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

処置を必要とする組織を局所麻酔薬で処置する工程を更に含む、請求項40から46のいずれか一項に記載の方法。

【請求項48】

対象が哺乳動物である、請求項40から47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

対象がヒトである、請求項40から48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

ヒトが15歳未満の小児である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

ヒトが15歳以上の成人である、請求項49に記載の方法。

【請求項52】

ヒトが50歳以上の成人である、請求項49に記載の方法。

【請求項53】

殺菌薬及び/又は抗真菌薬を投与する工程を更に含む、請求項40から52に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、身体の皮膚又は粘膜に対する潰瘍、創傷、及び他の傷害を処置、先制治療、又は予防するための、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、スクロースオクタスルフェート(SOS)、又はその塩基性アルミニウム塩であるスクラルファート、及びヒアルロン酸を含む組成物を提供する。本発明の他の態様は、本明細書に記載する組成物を用いて処置又は防止する方法、及び本明細書に提供する方法に用いるための適用装置である。

【背景技術】

【0002】

ヒトの身体における正常な生物学的過程である創傷治癒は、細胞及び細胞外マトリックスに關与する動的な、双方向性の過程によって実現するものであり、内部及び外部両方の因子に依存するものである。治癒過程は、止血、炎症、増殖、及び組織修復である、正確且つ高度にプログラム化されている4相からなると歴史的に説明されている。創傷が最適に治癒するには、4相全てが適切な順序及び時間枠で生じなければならない。多くの因子がこの過程に影響を及ぼし、異常な、又は障害された創傷治癒を引き起こし得、いわゆる「難治性の創傷」をもたらす。これら難治性の創傷は一般的に、治癒の正常の段階によって進行することができないものであった。このような創傷は、治癒過程の延長、不完全、又は非協調のため、しばしば病理学的炎症の状態に入る。慢性創傷の殆どは、静脈うっ血、糖尿病、虚血、又は圧迫に關連する潰瘍である。難治性の創傷は、先進国の1%を超える人口が罹患している。米国単独では、難治性の創傷は最高600万人に罹患し、65歳以上の者がこれらの症例の85%を占める。難治性の創傷は莫大な医療費をもたらし、総費用は1年

10

20

30

40

50

あたり30億ドルを超えると推定される。

【0003】

発生率は、高齢化とともに、また糖尿病を有する個体数が増加するとともに上昇すると予想される。慢性の潰瘍は、患者の生活の質及び生産性に負の影響を及ぼし、医療制度に対して増大する財政負担を課す。

【0004】

下肢の潰瘍、特に糖尿病、静脈疾患、又は動脈疾患に起因するものは、実質的な比率の慢性潰瘍を含む。糖尿病を有する個体のおよそ15~25%が生涯のある時点で足部の潰瘍を発症し、これらの患者のうち推定12%が下肢切断術を必要とする。糖尿病性神経障害によって治癒は複雑になり、感染に対する感受性は、糖尿病性足潰瘍患者において4倍増大する。静脈疾患は、慢性下肢潰瘍の大半を占める。多様な病因の静脈性高血圧が血管壁に損傷を与えて、最終的に皮膚の崩壊を引き起こす可能性がある。動脈性潰瘍はそれほど一般的ではなく、治癒を損なう循環障害に起因する。

10

【0005】

全ての難治性の創傷及び潰瘍に対する標準的な処置には、壊死組織のデブリードマン、感染のコントロール、及び局所の創傷ケアが含まれる。難治性創傷の各カテゴリーに対して、特殊化された処置様式を使用しなければならない。糖尿病性足潰瘍には、機械的免荷(off-loading)、血中グルコースレベルのマネージメント、及びフットケアについての教育にも注目しなければならない。静脈性潰瘍の処置は、機械的圧迫の使用、及び組織の浮腫を逆行させ、静脈血流を改善するための四肢の挙上を含むのが典型的であった。動脈不全によって引き起こされる潰瘍に対するケアは、血流の再建、及び組織内還流の更なる喪失の最小化に集中している。褥瘡性潰瘍では、免荷の方法又は装置が処置のゴールドスタンダードである。

20

【0006】

標準的な処置で潰瘍が十分に治癒しない場合、付加的な処置様式を必要とすることがあるが、これらはしばしば「高度創傷ケア治療」と呼ばれる。下肢の潰瘍は病因学的に、糖尿病性、静脈性、動脈性、又は圧力関連と頻りに分類されるが、重複が存在し得る。処置様式及び創傷ケア治療はしばしば、潰瘍の特徴、並びに患者の因子、過去の処置、及び提供者の好みに基づいて選択される。多数の増加しつつある様々な構成要素及び適応の高度創傷ケア治療が開発されている。かなりの数のこれらの治療に対して、効力、相対的有効性、及び有害効果は十分に確立されておらず、有効性を示し証拠は弱い。したがって、創傷処置の分野では広範囲の調査がなされているが、特に高齢の、又は疾患を有する患者では、創傷及び潰瘍の治癒の促進は依然として複雑な課題である。

30

【0007】

US6689351は、創傷を処置するためのGM-CSFの局所適用を開示している。この出願は、創傷を処置するために皮下又は皮内適用するための、GM-CSF、スクロースオクタスルフェート、及びヒアルロン酸を含む組成物は開示していない。

【0008】

Makkonenら(2000年)は、GM-CSF及びスクラルファートの併用を開示している。GM-CSFは皮下投与し、スクラルファートは含嗽剤として投与された。この論文は、ヒアルロン酸を含む組成物は開示していない。

40

【0009】

Saarilahtiら(2002年)は、放射線誘発性粘膜炎を処置するためのGM-CSF又はスクラルファートの使用を開示している。この論文は、GM-CSF、スクラルファート、及びヒアルロン酸を含む組成物は開示していない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】US6689351

【特許文献2】米国特許第5,229,496号

50

【特許文献3】米国特許第5,391,485号

【特許文献4】米国特許第5,393,870号

【特許文献5】米国特許第4,235,871号

【特許文献6】米国特許第4,501,728号

【特許文献7】米国特許第4,837,028号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Martindale、The Complete Drug Reference、第34版、2005年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0012】

本発明は、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)又はそのフラグメント若しくはバリエーション、スクロースオクタスルフェート(SOS)又はスクラルファート、及びヒアルロン酸を含む組成物を提供する。このような組成物は、身体の皮膚、又は粘膜又は結合組織に対する潰瘍、創傷、及び他の傷害の予防、先制治療、及び処置に、並びに異常な癒痕化(角化性癒痕及びケロイド形成)の処置に有用である。本発明者らは、本発明の組成物は、以前に記載された他のタイプの創傷処置に比べて特に有用であることを見出した。

【0013】

本発明の一態様は、本発明による組成物を創傷領域に適用するためのローラーツールを提供する。このようなローラーツールは、本発明に記載する組成物を、皮膚の皮内又は皮下の層中に浸透させる突出部を含むことができる。

20

【0014】

本発明のさらなる一態様は、対象の身体の皮膚、粘膜又は結合組織の創傷、慢性皮膚病変、癒痕又は他の病変等、炎症箇所又は病変を処置、防止又は緩和するための方法を提供し、方法は、本発明による組成物の有効量を対象に投与することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の組成物を投与するためのローラーツールを示す図である。スパイクのあるローラーの使用は「ヘッジホギング(hedge-hogging)」と呼ばれる。ローラーツールは、対向して配置された2つの円形端部表面及びエンドレスな表面を有する、長さ及び内部を有する円柱状のローラー本体を含む。円形端部表面は各々、その中心に開口部を有し、エンドレスな表面はランダムな間隔のスパイク又は突出部を取り込んでいる。ローラー本体は、ローラー本体の円形端部表面を回転可能に連結する2つの端部フランジで終結する、U型のフレームにより保持される。フランジは各々、端部フランジをローラー本体の円形端部表面に取り外し可能に固定することができるように、ローラー本体の円形端部表面における開口部に近接するフランジ開口部を規定する。ハンドルがU型のフレームの中央に付着されて、ローラー本体の操作を促進する。

30

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)又はそのフラグメント若しくはバリエーション、スクロースオクタスルフェート(SOS)又はその誘導体若しくは塩、例えばスクラルファート、及びヒアルロン酸(HA)を含む組成物を提供する。このような組成物は、身体の皮膚、又は粘膜又は結合組織の潰瘍、創傷、及び他の傷害の処置、先制治療、及び予防に有用であり、様々な技術によって適用することができる。したがって、本発明は、本発明の組成物を使用するための方法、並びに皮膚又は粘膜の創傷、慢性皮膚病変、及び/又は他の傷害を処置するための適用装置を更に提供する。

40

【0017】

皮膚又は粘膜における病変の治癒の正常の過程は、別個の連続した4つの段階又は相、即ち止血、炎症、増殖、及び再構築又は成熟により進行するのが典型的である。

【0018】

50

止血は、侵襲の直後に生じる血管の応答段階であり、ヒトでは通常、最高数時間続く。創傷は最初に出血することがあるが、血液凝固が、血管収縮と共に止血を再建し、細胞が遊走するための一時的な細胞外マトリックスが提供される。

#### 【0019】

炎症は通常、傷害時に始まり、正常の治癒では3~4日以内に終了する。炎症相は、古典的特徴である熱、発赤、浮腫、及び疼痛によって臨床的に認められる。創傷は、死細胞片を除去するように働く液体が浸出し始め、プロテアーゼが創傷領域中に放出される。白血球及びマクロファージが病変地帯に集合し始め、白血球は死細胞片を一掃し、マクロファージは食作用のために、成長因子を放出して線維芽細胞を刺激する。この相の間に細胞外マトリックスが構築される。

10

#### 【0020】

増殖相は通常、炎症相を続け、線維芽細胞の増殖及び遊走、並びに結合組織の生成を特徴とする。増殖相は、組織外傷後約4日目に始まり、閉鎖性創傷の場合は外傷後2~3週間続く。この相は、重症の組織損傷のある開放性創傷の場合は大幅に延長し得、このとき、完全な閉鎖には大量の結合組織の生成が必要とされる。増殖相の間、肉芽組織の形成、新血管形成、上皮化、創傷の収縮、及びコラーゲンの固着が生じる。

#### 【0021】

成熟相はときに再構築、軽減、又は瘢痕形成相と呼ばれ、閉塞性創傷では傷害の2~3週後に始まるが、開放性創傷では創傷が治癒する前に始まることはない。成熟相は、その後数週、数か月、又は更に数年続くのが典型的である。成熟は、創傷の収縮、肉芽組織を覆う新たな上皮組織の成長、及びおそらくは瘢痕形成を伴う。この相の間、筋線維芽細胞が線維芽細胞から発生し、コラーゲン線維が徐々に成熟し、比較的より組織化されるようになる。

20

#### 【0022】

創傷が最適に治癒するには、4相全てが適切な順番及び時間枠で生じなければならない。多くの因子が、この過程の1つ又は複数の相に影響を及ぼすことができ、異常な、又は損なわれた創傷治癒を引き起こし得、このような創傷は、正常な段階の治癒を介した進行の失敗を引き起こすことにより、「難治性」創傷と呼ばれる。

#### 【0023】

異なる部分の創傷は、異なる速度で治癒し得、そのため正常な創傷のうちある部分が、他よりも進行した段階の治癒となる。

30

#### 【0024】

本発明の組成物

本発明による組成物は、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)又はそのフラグメント若しくはバリエーション、スクロースオクタスルフェート(SOS)又はそのアルミニウム塩であるスクラルファート、及びヒアルロン酸(HA)を含む。

#### 【0025】

顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)

GM-CSFはコロニー刺激因子(CSF)のファミリーのメンバーであり、コロニー刺激因子は、造血前駆細胞の成長を刺激し、成熟エフェクター細胞の機能的活性を増強する糖タンパク質である。簡潔に言うと、前駆細胞生成の初期段階では、CSFはスタミナのプールの自己複製を保証し、造血分化の第1段階を活性化し、中間段階では、細胞増殖が、成熟細胞の特徴の進行性の獲得に関連する場合、CSFは分化する細胞の数を莫大に増強し、最終段階では、CSFは成熟細胞の循環及び活性化を制御する。

40

#### 【0026】

GM-CSFは、創傷の収縮を促進することにより、創傷治癒に対してプラスの効果があり、炎症細胞の局所動員を引き起こし、ケラチノサイトの増殖を誘発することが示されている。GM-CSFはまた、単核の貪食細胞を活性化し、上皮細胞の遊走を促進し、治癒過程におけるサイトカイン生成を更に調節する。

#### 【0027】

50

成熟GM-CSFは、潜在的なグリコシル化部位をいくつか有する、アミノ酸残基127個のモノマータンパク質鎖を有する。グリコシル化の度合いが変動するため、分子量は14kDaから35kDaの間の範囲となる。非グリコシル化のGM-CSF及びグリコシル化されたGM-CSFは、*in vitro*で同様の活性を示す(Cebonら、1990年)。GM-CSFの結晶解析により、短いアルファヘリックス4本から構成される樽型(barrel-shaped)構造が明らかになった(Diederichsら、1991年)。GM-CSFには公知の配列パリアントが2つある。GM-CSFタンパク質の活性型は、*in vivo*ではホモ二量体として細胞外で見出される。

#### 【0028】

GM-CSFは、その受容体に結合することによって生物学的活性を発揮する。GM-CSF受容体(GM-CSF-R)が発現される最も重要な部位は、マクロファージI型及びII型、上皮細胞、及び内皮細胞等、脊髄細胞の細胞表面上であるが、リンパ球はGM-CSF-R陰性である。天然の受容体は、少なくとも2つのサブユニットであるアルファ及びベータから構成される。アルファサブユニットはリガンド特異性を付与し、ナノモルの親和性でGM-CSFに結合する(Gearingら、1989年; Gassonら、1986年)。ベータサブユニットはインターロイキン-3及びインターロイキン-5受容体複合体の一部でもあり、GM-CSF受容体アルファサブユニット及びGM-CSFと会合して、ピコモルの結合親和性を有する複合体を形成する(Hayashidaら、1990年)。GM-CSF上の受容体に対する結合ドメインはマッピングされており、GM-CSFはその受容体のベータサブユニットと、GM-CSFの第1のアルファヘリックスにおける非常に制限された領域によって相互作用する(Shanafeltら、1991a; Shanafeltら、1991b; Lopezら、1991年)。アルファサブユニットに対する結合は、第3のアルファヘリックスであるヘリックスC、ヘリックスC及びDを繋げるループの最初の残基、及びGM-CSFのカルボキシ末端テイルに対して、マッピングすることができる(Brownら、1994年)。

#### 【0029】

GM-CSFの3量体受容体複合体の形成により、JAK/STATファミリー、She、Ras、Raf、MAPキナーゼ、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ、及びNF- $\kappa$ Bの分子に關与する複合シグナリングカスケードの活性化がもたらされ、最終的にc-myc、c-fos、及びc-junの転写がもたらされる。活性化は主に、受容体のベータサブユニットにより誘導される(Hayashidaら、1990年; Kitamuraら、1991年; Satoら、1993年)。共有されるベータサブユニットは、IL-3、IL-5、及びGM-CSFによって発揮される重複性の機能も担う(概説には、de Grootら、1998年を参照されたい)。

#### 【0030】

GM-CSFの機能は、造血系の成長及び分化刺激活性とは別に、特に炎症誘発性サイトカインとして機能する。マクロファージ、例えば、I型及びII型のマクロファージ、並びに単球、並びに好中球及び好酸球はGM-CSFによって活性化され、他のサイトカイン及びケモカイン、マトリックス分解性プロテアーゼの放出、HLA発現の増大、並びにCC-ケモカインに対する細胞接着分子又は受容体の発現の増大をもたらす、ひいては炎症細胞の炎症組織中への化学走性の増大をもたらす。

#### 【0031】

マクロファージは、創傷に見出される場合、トランスフォーミング成長因子(TGF- $\beta$ )及び血小板由来成長因子(PDGF)等、単球及び線維芽細胞の両方に対する化学誘引物質として働く、様々な生物学的活性物質を放出することが知られている。活性化されたマクロファージは、失活したコラーゲン及びフィブリン凝塊を消化する。血餅の溶解により、創傷部位に肉芽組織が形成し、第2の創傷治癒相である。

#### 【0032】

外来のGM-CSFは、創傷治癒の遅延のある糖尿病動物モデルにおいて、インターロイキン6(IL-6)及びPECAM-1のレベルを回復することが示されている。外来のGM-CSFは、化学誘引物質タンパク質MCP-1のレベルも上昇させ、それによってこのようなモデルにおける好中球及び単核細胞を動員し、再上皮化を改善し、都合の悪いコラーゲン堆積を低下させる。

#### 【0033】

Wongら(1985年)及びKaushanskyら(1986年)は、哺乳動物細胞における組換えGM-CSFの生

成を記載している。Burgessら(1987年)は、大腸菌(*Escherichia coli*)において生成される組換えGM-CSFの精製を記載している。

【0034】

GM-CSFの機能的相同体

GM-CSFの機能的相同体は、GM-CSFの公知で天然に存在する配列に少なくとも50%の配列同一性を有するポリペプチドであり、1つ又は複数のGM-CSFの機能を有し、例えば、顆粒球、マクロファージ、好酸球、及び赤血球を含めた様々な系統からの造血前駆細胞の成長及び分化の刺激等、又は創傷の収縮を促進し、炎症細胞の局所動員を引き起こす、例えば、好中球の動員を改善し、ケラチノサイトの増殖を誘発し、単核貪食細胞を活性化し、上皮細胞の遊走を促進し、治癒過程におけるサイトカイン生成を更に制御する。本発明の一実施形態において、GM-CSFのパリアント、機能的相同体、又は類似体は、ヒト骨髓アッセイにおいて生物学的活性を表す。

10

【0035】

配列アラインメントによって評価されるもの等、様々な近縁種のGM-CSFのタンパク質鎖間の進化的保存性を用いて、個々の残基に対する進化圧の度合いを正確に特定することができる。GM-CSFの配列を、GM-CSFの機能が保存されている種(非限定的な例として、齧歯動物及び霊長動物を含めた哺乳動物がある)の間で比較するのが好ましい。種間で不変であるアミノ酸残基は、種間で変化する残基ほど容易に置換され得ない本質的なアミノ酸残基を代表する可能性が高い。上記より、ヒトGM-CSF配列の、妥当な数の修飾又は改変が、本発明によるGM-CSF分子の活性を妨害しないことは明白である。このようなGM-CSF分子を、本明細書ではヒトGM-CSFの機能的同等物と呼び、以下に記載する天然ヒトGM-CSFのパリアント及びフラグメント等であり得る。

20

【0036】

本明細書で用いる「GM-CSFパリアント」の語は、ヒトGM-CSFであるのが適切であるが、配列内の1つ又は複数のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基によって置換されている点で指標の配列と異なる、指標のタンパク質に相同であるポリペプチド又はタンパク質を意味する。アミノ酸置換は、アミノ酸が、大ざっぱに同様の性質を有する異なるアミノ酸で置き換えられている場合、「保存的」と考えることができる。非保存的置換は、異なるタイプのアミノ酸の置き換えを意味する。大ざっぱに言うと、ポリペプチド又はタンパク質の生物学的活性を改変せずには、非保存的置換は殆ど可能ではない。したがって、本発明の一実施形態において、GM-CSFは、配列番号2に記載するアミノ酸配列を有するヒトGM-CSFのパリアントである。このような場合、配列番号2に記載するアミノ酸配列は指標の配列(親とも呼ばれる)であり、これから1つ又は複数のアミノ酸置換(又は挿入/欠失)によってパリアントが得られる。

30

【0037】

当業者であれば、1つのアミノ酸が、化学的特徴及び/又は物理的特徴を1つ又は複数共有する別のアミノ酸によって置換される場合の、「保存的な」アミノ酸置換を作成し、評価する方法を知っている。保存的なアミノ酸置換は、タンパク質の機能に影響を及ぼす可能性が低い。アミノ酸を、共有する特徴にしたがって分類してもよい。保存的なアミノ酸置換は、アミノ酸の予め決定されたグループ内の1つのアミノ酸の同じグループ内の、別のアミノ酸に対する置換であり、この場合、予め決定されたグループ内のアミノ酸は、同様の、又は実質的に同様の特徴を表す。本明細書に適用する「保存的なアミノ酸置換」の語の意味内では、1つのアミノ酸が、以下を有することによって特徴付けられるアミノ酸のグループ内の別のアミノ酸に対して置換され得る：

40

- i) 極性側鎖(Asp、Glu、Lys、Arg、His、Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr、及びCys)
- ii) 非極性側鎖(Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Pro、及びMet)
- iii) 脂肪族側鎖(Gly、Ala、Val、Leu、Ile)
- iv) 環状側鎖(Phe、Tyr、Trp、His、Pro)
- v) 芳香族側鎖(Phe、Tyr、Trp)
- vi) 酸性側鎖(Asp、Glu)

50

vii) 塩基性側鎖 (Lys、Arg、His)

viii) アミド側鎖 (Asn、Gln)

ix) ヒドロキシ側鎖 (Ser、Thr)

x) 含硫側鎖 (Cys、Met)、及び/又は

xi) モノアミノ-ジカルボン酸構造又はモノアミノ-モノカルボン酸-モノアミドカルボン酸構造 (Asp、Glu、Asn、Gln)。

【0038】

本発明の範囲内のヒトGM-CSFの機能的相同体又はバリエーションは、ヒトGM-CSFと少なくとも50%の配列同一性、例えば、ヒトGM-CSFと少なくとも60%の配列同一性、例えば少なくとも70%の配列同一性、例えば少なくとも75%の配列同一性、例えば少なくとも80%の配列同一性、例えば少なくとも85%の配列同一性、例えば少なくとも90%の配列同一性、例えば少なくとも91%の配列同一性、例えば少なくとも92%の配列同一性、例えば少なくとも93%の配列同一性、例えば少なくとも94%の配列同一性、例えば少なくとも95%の配列同一性、例えば少なくとも96%の配列同一性、例えば少なくとも97%の配列同一性、例えば少なくとも98%の配列同一性、例えば少なくとも99%の配列同一性を表し、上記に規定したGM-CSFの1つ又は複数の機能的性質を保持するポリペプチドである。

10

【0039】

配列同一性は、数々の周知のアルゴリズムを用い、数々の異なるギャップペナルティを適用して算出することができる。あらゆる配列アラインメントアルゴリズム、例えば、それだけには限定されないが、FASTA、BLAST、又はGETSEQを、相同体を検索し、配列同一性を算出するのに用いてもよい。更に、適切であれば、あらゆる一般的に公知である置換マトリックス、例えば、それだけには限定されないが、PAM、BLOSSUM、又はPSSMマトリックスを、検索アルゴリズムと適用してもよい。例えば、PSSM(位置特異的スコア付けマトリックス(position-specific scoring matrix))を、PSI-BLASTプログラムによって適用してもよい。更に、配列アラインメントを、ギャップオープニング及びギャップ伸長に対するある範囲のペナルティを用いて行ってもよい。例えば、BLASTアルゴリズムを、5~12の範囲のギャップオープニングペナルティ、及び1~2の範囲のギャップ伸長ペナルティと用いてもよい。

20

【0040】

したがって、本発明によるバリエーション又はそのフラグメントは、配列若しくはそのフラグメントの同じバリエーション内に、又は配列若しくはそのフラグメントの異なるバリエーション間に、1つ又は複数の置換、例えば、相互に独立に導入される複数の置換を含むことができる。

30

【0041】

上記の概要より、同じバリエーション又はそのフラグメントは、本明細書上記に規定した1つを超える保存的なアミノ酸のグループから、1つを超える保存的なアミノ酸置換を含み得るのが明らかである。

【0042】

20個の標準のアミノ酸、並びに2個の特別なアミノ酸であるセレノシステイン及びピロリシンとは別に、*in vivo*でタンパク質に組み入れられない、膨大な数の「非標準的アミノ酸」が存在する。非標準的アミノ酸の例として、含硫のタウリン及び神経伝達物質のGABA及び神経伝達前駆物質のDOPAが含まれる。他の例として、ランチオニン、2-アミノイソ酪酸、及びデヒドロアラニンがある。更なる非標準的アミノ酸には、オルニチン及びシトルリンがある。

40

【0043】

非標準的アミノ酸は通常、標準のアミノ酸の修飾によって形成される。例えば、タウリンはシステインの脱炭酸によって形成され得、DOPAはチロシンから合成され、ヒドロキシプロリンはプロリンの転写後修飾によって作成される(コラーゲンに一般的である)。非天然のアミノ酸の例には、全て参照によって本明細書に援用される連邦規則法典第37巻第1部822(b)(4)等に列挙されるものがある。

50

## 【0044】

本明細書に記載する標準のアミノ酸及び非標準的アミノ酸両方の残基は、「D」又は「L」異性体であってよい。

## 【0045】

本発明による機能的相同体又はバリエーションは、非標準的アミノ酸を含めたあらゆるアミノ酸を含むことができることが企図される。好ましい実施形態において、機能的相同体又はバリエーションは、標準のアミノ酸だけを含む。

## 【0046】

標準のアミノ酸及び/又は非標準的アミノ酸は、ペプチド結合により、又は非ペプチド結合により連結されていてもよい。ペプチドの語は、当技術分野では公知である、化学反応又は酵素触媒反応によって導入される転写後修飾も包含する。このような転写後修飾は、所望により、分割前に導入することができる。本明細書に特定するアミノ酸は、優先的にL-立体異性体である。アミノ酸類似体を、20個の天然に存在するアミノ酸の代わりに使用することができる。フルオロフェニルアラニン、ノルロイシン、アゼチジン-2-カルボン酸、2-アミノエチルシステイン、4-メチルトリプトファン等を含めて、このような類似体のいくつかは公知である。

10

## 【0047】

本発明の一実施形態において、GM-CSFのバリエーションは、例えば、アルブミン又は脂肪酸等、有効成分の半減期を延長することができるコンジュゲートを含む。

## 【0048】

適切には、バリエーションは、ヒトGM-CSFの予め決定された配列に、少なくとも60%同一、好ましくは少なくとも70%同一であり、したがってバリエーションは、好ましくは少なくとも75%の配列同一性、例えば少なくとも80%の配列同一性、例えば少なくとも85%の配列同一性、例えば少なくとも90%の配列同一性、例えば少なくとも91%の配列同一性、例えば少なくとも92%の配列同一性、例えば少なくとも93%の配列同一性、例えば少なくとも94%の配列同一性、例えば少なくとも95%の配列同一性、例えば少なくとも96%の配列同一性、例えば少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、例えば少なくとも99%の配列同一性を有する。

20

## 【0049】

機能的相同体又はバリエーションは、ユビキチン化、標識化(例えば、放射性核種、様々な酵素等での)、ペグ化(ポリエチレングリコールでの誘導体化)、又はオルニチン等のアミノ酸の挿入(若しくは化学合成による置換)等の化学的修飾を更にも含むことができ、これらは通常、ヒトのタンパク質では生じない。

30

## 【0050】

本明細書に記載するペプチジル化合物に加えて、立体的に同様の化合物を、ペプチド構造の主要な部分を擬するように考案してもよく、このような化合物は、本発明のペプチドと同じ様式においても用いることができる。これは、当業者には公知である、モデリング及び化学デザインの技術によって実現することができる。例えば、エステル化及び他のアルキル化を用いて、ジアルギニンペプチドバックボーン等のアミノ末端を修飾して、テトラペプチド構造を擬してもよい。このような立体的に同様の構築物は全て、本発明の範囲内にあることが理解されよう。

40

## 【0051】

N末端のアルキル化及びC末端のエステル化又はアミド化を有するペプチドも、本発明内に包含される。機能的相同体又はバリエーションは、ダイマー又は非関連の化学モイエティを含めて、同じ分子で形成される、グリコシル化された、及び共有結合性の、又は集合性のコンジュゲートも含む。このような機能的相同体又はバリエーションは、当技術分野では公知の手段によって、N末端及びC末端の一方又は両方を含めたフラグメントに見出される基に対して、機能的領域を連結することにより調製される。

## 【0052】

「そのフラグメント」の語は、所与のアミノ酸配列のあらゆる部分を意味し得る。フラ

50

グメントは、一緒に繋がられた、全長のタンパク質内から1つを超える部分を含むことができる。適切なフラグメントは、欠失又は付加の変異体であってよい。少なくとも1つのアミノ酸の付加は、好ましくは2個から250個のアミノ酸、例えば10個から20個のアミノ酸、例えば20個から30個のアミノ酸、例えば40個から50個のアミノ酸の付加であってよい。フラグメントは、タンパク質からの小領域、又はこれらの組合せを含むことができる。

【0053】

適切なフラグメントは、欠失又は付加の変異体であってよい。少なくとも1つのアミノ酸の付加又は欠失は、好ましくは2個から250個のアミノ酸、例えば10個から20個のアミノ酸、例えば20個から30個のアミノ酸、例えば40個から50個のアミノ酸の付加又は欠失であってよい。欠失及び/又は付加は、相互に独立に、配列内及び/又は配列の終端の欠失及び/又は付加であってよい。

10

【0054】

欠失変異体は、長さ少なくとも20個又は40個の連続したアミノ酸、より好ましくは少なくとも80個又は100個の連続したアミノ酸を含むのが適切である。したがって、このようなフラグメントは、少なくとも20個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも30個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも40個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも50個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも60個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも70個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも80個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも90個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも95個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも100個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも105個のアミノ酸、例えば少なくとも110個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも115個の連続したアミノ酸、例えば少なくとも120個の連続したアミノ酸を含むヒトGM-CSFの配列からのより短い配列であってよく、この場合、好ましくは、前記欠失変異体は、ヒトGM-CSFと少なくとも75%の配列同一性、例えば少なくとも80%の配列同一性、例えば少なくとも85%の配列同一性、例えば少なくとも90%の配列同一性、例えば少なくとも91%の配列同一性、例えば少なくとも92%の配列同一性、例えば少なくとも93%の配列同一性、例えば少なくとも94%の配列同一性、例えば少なくとも95%の配列同一性、例えば少なくとも96%の配列同一性、例えば少なくとも97%の配列同一性、例えば少なくとも98%の配列同一性、例えば少なくとも99%の配列同一性を有する。

20

【0055】

GM-CSFの機能的相同体が、最大500個、より好ましくは最大400個、更により好ましくは最大300個、またより好ましくは最大200個、例えば最大175個、例えば最大160個、例えば最大150個のアミノ酸、例えば最大144個のアミノ酸を含むのが好ましい。

30

【0056】

ヒトGM-CSFの公知で天然に存在するバリエーションには、バリエーション1におけるT115I置換及びバリエーション2におけるI117T置換の2つが存在する。したがって、本発明の一実施形態において、GM-CSFの機能的相同体は、ヒトGM-CSF(配列番号1)又はあらゆる天然に存在するバリエーションに配列同一性が高い配列を含む。

【0057】

GM-CSFの類似体は、例えば、米国特許第5,229,496号、第5,391,485号、及び第5,393,870号に記載されている。このような類似体は、本発明内に含まれる機能的同等物でもある。

40

【0058】

一実施形態において、GM-CSFは、本発明にしたがって、ホモマー又はヘテロマーの形態において用いられる。GM-CSFのホモマー及びヘテロマーの形態は、本明細書上記に規定した1つ又は複数のGM-CSFのモノマー又はGM-CSFの機能的相同体を含むことができる。ホモマー及びヘテロマーには、ダイマー、トリマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、ヘプタマー、オクタマー、ノナマー、及びデカマーが含まれる。

【0059】

一実施形態において、GM-CSFのホモダイマー、トリマー、又はテトラマーが用いられる。

50

## 【 0 0 6 0 】

ホモサピエンスのGM-CSFの前駆体(シグナルペプチドを含む)形態のアミノ酸配列(配列番号1)は以下の通りである:

MWLQSLLLL LG TVAC SISAPA RSPSPSTQPW EHVNAIQEAR RLLNLSRDTA  
AEMNETVEVI SEMFDLQEPT CLQTRLELYK QGLRGS LTKL KGPLTMMASH  
YKQHCPPTPE TSCATQIITF ESFKENLKDF LLVIPFDCWE PVQE.

## 【 0 0 6 1 】

対応する成熟タンパク質のアミノ酸配列(配列番号2)は以下の通りである:

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNETV EWISEMFDLQ  
EPTCLQTRLE LYKQGLRGS LTKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI  
ITFESFKENL KDFLLVIPFD C WEPVQE

10

## 【 0 0 6 2 】

本発明によるGM-CSFは、商業的に入手することもでき、例えば、サルグラモスチム(酵母菌で発現されるヒト組換えGM-CSF、例えば、sanofi-aventis, U.S. LLC社、Bridgewater, NJ、USA社により生成されるLeukine(登録商標))等である。

## 【 0 0 6 3 】

GM-CSFの組換え生成

GM-CSF及びその機能的バリエーション又は相同体は、例えば、ヒト若しくは動物の血清からの、又は原核細胞、酵母菌細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の細胞における、若しくは細胞フリーの系における発現からの単離等、様々な方法で生成することができる。

20

## 【 0 0 6 4 】

本発明の一実施形態において、GM-CSFは、宿主細胞によって組換え生成される。したがって、本発明の一態様において、GM-CSFは、前記宿主細胞における発現を指示することができる第2の核酸に作動可能に関連しているGM-CSFをコードする第1の核酸配列を含む宿主細胞によって生成される。したがって、第2の核酸配列は、前記細胞において対象のタンパク質の発現を指示するプロモーターを含み、又はプロモーターからなることがある。当業者であれば、所与の宿主細胞において用いるのに有用な第2の核酸配列を容易に同定することができる。

30

## 【 0 0 6 5 】

組換えGM-CSFを生成するプロセスは一般的に、以下の工程からなる:

- 宿主細胞を提供する工程、
- 宿主細胞において前記対象のタンパク質の発現を指示することができる第2の核酸に作動可能に連結しているGM-CSFをコードする第1の核酸を含む遺伝子発現構築物を調製する工程、
- 宿主細胞を構築物で形質転換する工程、
- 宿主細胞を培養し、それによってGM-CSFの発現を得る工程。

## 【 0 0 6 6 】

このように生成した組換えGM-CSFを、本明細書以下に記載するタンパク質単離のためのあらゆる方法等、あらゆる慣例的な方法により単離することができる。当業者であれば、GM-CSFを精製するのに適するタンパク質単離工程を同定することができる。

40

## 【 0 0 6 7 】

本発明の一実施形態において、組換え生成したGM-CSFは、宿主細胞によって排出される。GM-CSFが排出される場合、対象の組換えタンパク質を生成するプロセスは、以下の工程を含むことができる:

- 宿主細胞を提供する工程、
- 前記宿主細胞において前記対象のタンパク質の発現を指示することができる第2の核酸に作動可能に連結しているGM-CSFをコードする第1の核酸を含む遺伝子発現構築物を調製

50

する工程、

- 前記宿主細胞を構築物で形質転換する工程、
- 宿主細胞を培養し、それによってGM-CSFの発現及びGM-CSFの培養培地中への分泌を得る工程
- それによりGM-CSFを含む培養培地を得る工程。

【0068】

したがって、GM-CSF及び核酸を含む組成物は、本発明のこの実施形態において、培養培地又は培養培地から調製される組成物であり得る。

【0069】

本発明の別の実施形態において、前記組成物は、動物、その部分若しくは細胞から調製される抽出物、又はこのような抽出物の単離された分画である。

10

【0070】

本発明の実施形態において、GM-CSFは、宿主細胞においてin vitroで組換え生成され、細胞可溶化物、細胞抽出物、又は組織培養上清から単離される。より好ましい実施形態において、GM-CSFは、宿主細胞が関連のサイトカインを発現するような方法で修飾されている宿主細胞によって生成される。本発明の更により好ましい実施形態において、前記宿主細胞は、関連のGM-CSFを生成し、排出するように形質転換されている。

【0071】

本発明による組成物は、GM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体を1 µg/gから1000 µg/g、より好ましくはGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体を10 µg/gから300 µg/g含むことができる。

20

【0072】

スクロースオクタスルフェート(SOS)及びスクラルファート

本発明の組成物は、SOS又はその誘導体、例えば、スクラルファート等を含む。SOSはスクロースの一形態であり、8個の利用可能なヒドロキシル基全てが硫酸化されて酸性化合物を形成している。以下の記載ではSOSに言及するが、この語はまた、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、又はCa<sup>2+</sup>塩、及び更にAl<sub>2</sub>(OH)<sup>5+</sup>の塩等、ヒト又は動物の身体に通常存在する酸の塩も意味することが理解される。

【0073】

スクラルファートは、硫酸化された陰イオンが各々Al<sub>2</sub>(OH)<sup>5+</sup>イオンで塩処理されている、一形態のSOSである。化学式は、3,4,5,6-テトラ-(ポリヒドロキシア루미늄)-アルファ-D-グルコピラノシルスルフェート-2,3,4,5,-テトラ-(ポリヒドロキシア루미늄)-ベータ-D-フルクトフラノシドスルフェートである。スクラルファートは、治療使用において公知の化合物であり(例えば、「Merck Index」を参照されたい)、例えば、ドイツの会社であるBK GIULINI GmbH社によって市販されている。スクラルファートは長い間、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、急性胃炎、症候性慢性胃炎、NSAID胃疾患、逆流性食道炎の防止及び処置において用いられており、この治療使用のための組成物は、様々な商品名で市販されている(Martindale, The Complete Drug Reference, 第34版, 2005年)。スクラルファートは、ムコタンパク質に接着し、創傷部位で保護バリアを形成する、細胞保護剤として機能することができる。経口形態において、スクラルファートは、潰瘍の薬物療法として、及び局所調製物として用いられ、様々な創傷を処置するのに用いられる。本発明の好ましい実施形態において、本発明の医薬組成物はスクラルファートを含む。

30

40

【0074】

スクラルファートを含めた、SOS及びその塩は、Sigma-Aldrich社及びSanta Cruz biotechnology社等の商業的な供給源から入手可能である。

【0075】

理論に縛られることはないが、SOSは、FGFに結合し、安定化することによって線維芽細胞成長因子(FGF)シグナル伝達を刺激すると考えられている。SOSは、FGF受容体のFGF依存的二量体化(FGFR)を誘発することが示されている(Yehら、2002年)。加えて、SOSは創傷におけるコラーゲンの量を増大させ、細胞保護的なバリアを形成し、粘膜組織における粘膜

50

放出を増大し、イオン輸送を変化させ、プロスタグランジンの放出を増大するのを助けることができる。更に、SOSは、炎症反応自体によって引き起こされるマトリックスの分解に対抗することができ、又は創傷コラーゲンの含有物を刺激することによって細菌のコロニー形成若しくは感染に関係づけられる。創傷におけるコラーゲンの刺激は、治癒に関連する瘢痕を低減し、又は防止するのに有用であり得る。

【0076】

本発明は、したがって、SOS又はその誘導体若しくは塩の水中懸濁液5w/w%から20w/w%を含む組成物、例えば、再蒸留水、緩衝食塩水溶液、滅菌生理学的電解質溶液、又は注射用水中の懸濁液、或いはSOS又はその誘導体若しくは塩の、本明細書に記載するHAヒドロゲル中の懸濁液に関する。本発明によるこのような懸濁液は、20w/w%を超えない濃度の、好ましくは8~15w/w%の、例えば8w/w%、又は9w/w%、又は10w/w%、又は11w/w%、又は12w/w%、又は15w/w%の濃度の、SOS又はその誘導体を含む。

10

【0077】

本発明のより好ましい一実施形態において、組成物は、本質的に10w/w%の濃度のSOSゲル懸濁液を含み、更により好ましくは、組成物は、本質的に10w/w%の濃度のスクラルファートを含む。

【0078】

本発明による組成物は、GM-CSF又はその機能的パリアント若しくは相同体、SOS又はスクラルファート、及びヒアルロン酸(HA)を含む。これらの化合物を、本発明にしたがって様々な比率で混合してもよい。本発明による典型的な組成物は、例えば、HAの水溶液0.01w/w%から35w/w%を、8w/w%から15w/w%のSOS、及び1µg/gから1000µg/gのGM-CSF又はその機能的パリアント若しくは相同体と、例えば、HAの水溶液0.1w/w%から10w/w%を、10w/w%のSOS、及びGM-CSF又はその機能的パリアント若しくは相同体100µg/gと含むことができる。

20

【0079】

ヒアルロン酸(HA)

本発明の組成物は、HA又はその誘導体を含む。以下の記載ではHAに言及するが、この語は、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、又はCa<sup>2+</sup>塩等、ヒト又は動物の身体に通常存在する酸の塩も意味することが理解される。

【0080】

HAは、D-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミンを含む構造単位の繰り返しに由来する、ヘテログリカンポリマーに対する一般名である。HAは、ヒアルロナン又はヒアルロネートとしても知られている。HAは、多くの動物組織に天然に存在する形態において、約5000Daから約2000万Daの範囲の分子量(MW)を有し得、特定の試料の化合物の性質は、実際のMWに応じて変動し得る。HAは、公知の生分解性及び生体再吸収性(bioreabsorbable)の、極めて親水性のポリマーであり、細胞外マトリックス(ECM)の基本的な構成要素である。HAは、結合組織又は上皮組織等の多数の身体組織に不可欠であり、内耳リンパ液に、眼の硝子体液に、及び関節の滑液にも存在する。

30

【0081】

創傷治癒(特に皮膚の創傷治癒)は複雑な過程であり、止血、及び血小板由来因子の放出によって開始する、多くの相互作用性の過程を含む。炎症、肉芽組織形成、再上皮化、及び再構築の段階が後に続く。HAは、これらの細胞及びマトリックスのイベントの媒介において、多面的な役割を果たす。

40

【0082】

創傷修復の初期の炎症相における創傷組織は、おそらく合成の増大を反映して、HAに富んでいる。当技術分野において、HAが初期の炎症のプロモーターとして働くことは公知であり、これは皮膚の創傷治癒過程全体に極めて重大である。加えて、HAは、炎症応答を変調することができ、炎症応答の変調は肉芽組織のマトリックスの安定化に寄与し得る。例えば、HAは、カラゲナン/IL-1誘発性炎症のマウス空気嚢モデルにおいて、細胞浸潤を増強することが観察されている。他の試験では、CD44媒介性のメカニズムによって、ヒト子

50

宮線維芽細胞による、炎症誘発性サイトカインであるTNF- $\alpha$ 及びIL-8生成の、HA用量依存性の増大が実証されている。内皮細胞は、TNF- $\alpha$ 及び細菌のリポ多糖等の炎症性サイトカインに応答して、やはりHAを合成し、このHAは層流及び静的な流動の条件下でCD44のHA結合性バリエーションを発現する、サイトカイン活性化リンパ球の一次性癒着を促進することが示されている。

#### 【0083】

肉芽組織は、創傷の治癒においてフィブリン凝塊を置き換える、分散された線維性結合組織である。肉芽組織は典型的に、創傷の基部から成長し、殆どあらゆるサイズの創傷を充填することができる。HAは肉芽組織のマトリックス中に豊富にあり、肉芽組織マトリックスでは、この一時的な創傷マトリックス中へ細胞が遊走するための伝導性の環境を生成するのを助ける。

10

#### 【0084】

炎症は、肉芽組織形成の不可欠な部分であるが、炎症は、正常組織の修復が進行するように引き続き変調されなければならない。形成される最初の肉芽組織は極めて炎症性であり、高率の組織の代謝回転が、マトリックス分解酵素、及び炎症細胞により生成される反応性酸素代謝産物によって媒介される。肉芽組織マトリックスの安定化は、炎症を変調することによって実現され得る。HAは、上記に記載した通り、炎症刺激における最初の役割とは対照的に、この点で重要なモデレータとして機能する。指示される遊走、及び細胞運動メカニズムの制御は、HAと細胞表面HA受容体との間の特異的な細胞の相互作用によって媒介される。

20

#### 【0085】

HAに対する主要な3つの細胞表面受容体は、CD44、RHAMM、及びICAM-1である。CD44は、HAに対する主な細胞表面受容体である。CD44はHAとの細胞の相互作用を媒介し、HAの結合は、細胞の凝集、遊走、増殖、及び活性化、細胞-細胞及び細胞-基質の接着、並びにHA及びプロテオグリカンからの細胞周囲マトリックスの集合等、多様な生理学的イベントにおいて重要な部分を演じる。HAのエンドサイトーシスにより、マクロファージにおけるHAの分解がもたらされる。RHAMMは細胞の遊走に関係があり、細胞の運動に関連するタンパク質キナーゼのいくつか、例えば、細胞外シグナル調節タンパク質キナーゼ(ERK)、p125fak、及びpp60c-srcと連結を形成する。

#### 【0086】

更に、HAはTSG-6(TNF刺激性遺伝子6タンパク質)に結合し、血清プロテイナーゼインヒビター1 (インターインヒビター)との安定な複合体の形成に寄与することによって、治癒の進行とともに炎症を変調し、肉芽組織を安定化し得る。炎症の阻害により、炎症組織を損傷するマトリックスメタロプロテイナーゼ及び他のプロテイナーゼの、タンパク質分解性カスケードのプラスミン活性化が低下する。

30

#### 【0087】

HAには、再上皮化過程における極めて重大な機能もある。HAは、表皮の主な構成要素である、基底のケラチノサイトの細胞外マトリックスの不可欠な部分として役立つ。HAは、フリーラジカル捕捉機能、並びにケラチノサイトの増殖及び遊走における役割も有する。

#### 【0088】

正常な皮膚では、HAは、増殖性のケラチノサイトが見出される表皮の基底層に、比較的高濃度で見出される。ここでHAには、細胞外空間を維持し、栄養素が通過するための開かれた、水和されている構造を提供する機能がある。

40

#### 【0089】

HAは極めて親水性のポリマーであり、水に容易に溶けてヒドロゲルを形成する。

#### 【0090】

上記に言及したHAの治癒過程における機能に加えて、HAヒドロゲルの有益な機能は、処置の部位に対する組成物の接着を促進し、それによって処置組織の、組成物の化合物に対する暴露時間を増大することである。

#### 【0091】

50

本発明の組成物がこのようなヒドロゲルを含むのが好ましく、ヒドロゲルは、例えば、HAの塩を水中に溶解することによって形成することができ、水は、結果として得られるヒドロゲル中のHAの濃度が、0.001w/w%(重量)から65w/w%の間、例えば、0.01w/w%から35w/w%の間、又は例えば0.1w/w%から10w/w%の間であるような量の、再蒸留水、緩衝食塩水溶液、滅菌生理学的電解質溶液、又は注射用水であってよい。これらのヒドロゲルは長期間安定であり、周囲温度でもその性質、特にその粘度を改変せずに少なくとも6か月間貯蔵することができる。

【0092】

HAは、Sigma-Aldrich社、Novozymes社、及びHyalogic社等、数々の商業的な供給源から入手できる。

10

【0093】

一実施形態において、本発明による組成物は、HAを1 $\mu$ g/mLから650mg/mL、例えば10 $\mu$ g/mLから350mg/mL、例えば5 $\mu$ g/mLから500 $\mu$ g/mL、又は例えば100 $\mu$ g/mLから100mg/mL含む。

【0094】

組成物の更なる成分

ビタミンA及び抗酸化剤には、創傷治癒に対する刺激効果が更にあり得る。本発明の一実施形態において、本明細書に規定する組成物は、ビタミンA及び/又は抗酸化剤を更に含む。

20

【0095】

医療適用

本発明の一態様は、急性でも、又は慢性でもよい、身体の皮膚、粘膜又は結合組織の創傷、慢性皮膚病変、及び他の病変等、炎症箇所又は病変の処置、防止又は緩和に用いるための、GM-CSF又はその機能的パリアント若しくは相同体、SOS又はスクラルファート、及びHAを含む組成物を提供することである。このような病変は、広域のイベントによって引き起こされ得、且つ/又は他の疾患に関連し得る。本発明の一実施形態において、本明細書に規定する方法によって処置又は防止しようとする病変には、切開、裂傷、擦過傷、水疱、血腫、穿刺、穿通、射撃、電気、照射、化学的、外傷、挫滅、咬みつき、火傷、凍傷、外科手術(例えば、非粘膜組織における、例えば、頭皮上の神経外科、腹膜手術、移植手術、整形手術、及び/又は歯肉、泌尿器、膀胱、若しくは肛門手術等の粘膜組織における外科手術)、原発癌若しくは転移、良性腫瘍、挫創、感染症、例えば、真菌(例えば、様々な形態のカンジダ(Candida))、ウイルス(例えば、様々な形態のヘルペス)、及び/又は細菌感染、或いは他の感染状態、例えば、骨髄炎、ブドウ球菌感染(例えば、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*))での)、ベータ溶血性溶血連鎖球菌での感染、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)での感染に関連する病変、血液循環の低下に関連する病変、例えば、静脈弁機能の低下に関連する静脈性下肢潰瘍、静脈性足部潰瘍、動脈性下肢潰瘍、動脈性足部潰瘍、褥瘡、圧迫病変、又は床ずれ、糖尿病に関連する病変、局所中毒に関連する病変、並びに胃内容の肺中への吸引、肺吸引、及び/又は食道炎に関連する病変が含まれる。

30

【0096】

慢性、即ち「難治性」の創傷、病変、又は潰瘍は、創傷が一般的に、好適な時宜を得た治癒過程にしたがって通常の、持続的且つ安定な、治癒組織の解剖的及び機能的な一体性を実現することができない場合に生じる。一般的に言うと、少なくとも約3か月の期間内に治癒に向かって少なくとも実質的に進行することができなかつた皮膚病変、又は約3か月を超えて部分的に治癒した状態で安定となった皮膚病変、又は少なくとも約6か月後に難治性である皮膚病変が、慢性即ち難治性の創傷と分類される。

40

【0097】

悪性又は前悪性の難治性の潰瘍性皮膚病変は、皮膚の原発癌に関連して、又は局所腫瘍からの、若しくは遠位部位の腫瘍からの皮膚への転移に関連して生じ得る。これらは排出性でも、又は非排出性でもよい。これらは、例えば、空洞、皮膚の表面上の開放領域、皮

50

膚結節、又は皮膚の表面から伸長する結節性の成長の形態をとり得る。

【0098】

良性の難治性の潰瘍性皮膚病変は癌に関連せず、静脈性下肢潰瘍、静脈性足部潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍、糖尿病性足部潰瘍、動脈性下肢潰瘍、動脈性足部潰瘍、褥瘡(例えば、褥瘡、床ずれ)、手術後潰瘍性病変、及び慢性火傷病変を含む。これらは、例えば、空洞、皮膚の表面上の開放領域、皮膚結節、又は皮膚の表面から伸長する結節性の成長の形態をとり得る。これらは皮膚の表面上に開放肉芽性領域を含むのが典型的である。

【0099】

本発明の一実施形態において、本発明の組成物及び方法を、難治性の潰瘍性皮膚病変に発達する初期徴候を示す病変の処置又は先制治療に用いる。

10

【0100】

浸出液のマネージメントは、慢性潰瘍性病変に罹患している患者の世話をする介護専門家にとって難しい課題であり得る。浸出液を除去して患者の生活の質をできるだけ高いレベルに維持したいという願望と、病変が乾燥しすぎ、又は湿りすぎるのを防ぐのに好適な体液のレベルの維持との間でバランスをとる必要がある。本発明の一実施形態において、組成物は、治癒過程を促進するために、HA、SOS又はスクラルファート、及びGM-CSFの組合せを含み、それによって治癒性の創傷、潰瘍、又は他のタイプの皮膚病変に湿り気を提供するヒドロゲルである。

【0101】

防止は、身体の皮膚、粘膜又は結合組織の炎症箇所又は病変に関連する症状を発症するリスクの減少、例えば、炎症、増殖、及び治癒過程の成熟相の症状、並びに/又は慢性の潰瘍性皮膚病変の症状のリスクの減少に等しくてもよい。

20

【0102】

病変、例えば、皮膚、粘膜又は結合組織の創傷、潰瘍、及び他の病変は、皮膚又は粘膜の保護バリアが破壊されているため、細菌、真菌、又はウイルスによる感染を受けやすいことがある。これは更なる組織損傷という結果になり、更なる炎症の促進により創傷治癒を延長し得る。感染の症状は、疼痛の増大若しくは持続、発赤若しくは腫脹、排膿、悪臭、又は創傷の非治癒である。創傷の感染を引き起こす最も一般的な細菌は、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)及び他の群のブドウ球菌、ベータ溶血性連鎖球菌、及び緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)である。身体の他の部分からの汚染も創傷感染を引き起こし得る。本発明の一実施形態において、本明細書に規定する組成物を、免疫応答を変調することによって、感染に関連する病変若しくは創傷、及び/又は感染によって引き起こされる炎症を、防止し、処置し、又は緩和するのに用いる。このような感染、及び/又は感染によって引き起こされる炎症には、上記に特定した、真菌、ウイルス、及び/又は細菌の感染が含まれ得る。

30

【0103】

GM-CSFは、単独で用いる場合、糖尿病性創傷の治癒におけるいくらかの有効性を示している。本発明の好ましい一実施形態において、GM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体、HA、及びSOS又はスクラルファートを含む組成物を、1型糖尿病に罹患していても、又は2型糖尿病に罹患していても、糖尿病の対象における炎症箇所、病変、及び創傷の先制処置、徴候及び症状の緩和、又は処置に用いることができる。

40

【0104】

糖尿病性の慢性皮膚病変は、正常の治癒過程の不全とは別に、他の徴候及び症状を伴う。難治性の潰瘍性皮膚病変の典型的な随伴症状には、疼痛、浸出液、悪臭、表皮剥脱、創傷の拡大、組織壊死、炎症箇所、及び角質増殖の1つ又は複数の特徴が含まれる。このような特徴は患者にとってとりわけ衰弱性で厄介であり得、患者の生活の質をひどく害し得る。重症の場合には、これらは四肢切断、又は死さえもまねき得る。本発明の組成物及び方法は、これらの特徴を伴う難治性の潰瘍を処置及び防止するのに有用である。

【0105】

本発明の組成物の使用によって得られる臨床徴候及び症状の先制処置及び/又は緩和は

50

、治癒時間の短縮、治癒過程の様々な相の期間の改変、サイズの減少、形状の改変、深さの減少、並びに創傷の縁及び基底の改変、肉芽組織の量及び質、並びに/又は処置組織の流出のタイプ、細胞外マトリックスの増大、コラーゲン含量の増大、血管新生の増大、並びに/又は免疫組織化学検査、監視培養、及び炎症の全身マーカー、特異的又は非特異的抗体、並びに $T_H2$ 及び/若しくは $T_H1$ 免疫応答の代理マーカー、又はサイトカインの発現における変化等の変数に由来する生検等、創傷又は病変の治癒を記述する因子におけるポジティブな変化を測定することによって評価することができる。

【0106】

本発明の一実施形態において、本発明の組成物で処置する対象は哺乳動物である。更なる一実施形態において、哺乳動物はヒトである。

10

【0107】

一実施形態において、ヒトは15歳未満の小児である。一実施形態において、ヒトは15歳以上の成人である。

【0108】

年齢が皮膚及び粘膜の治癒能力を低下させる因子であることは公知である。本発明の一実施形態において、本明細書に提供する組成物及び方法は、例えば、50歳以上のヒト成人における、病変及び創傷の年齢に係る治癒の障害を処置及び防止するためのものである。

【0109】

他の処置

20

本発明の一実施形態において、組成物は、ケロイド瘢痕、火傷後の瘢痕、外傷後の瘢痕組織、及び外科手術後の瘢痕等、瘢痕の処置に、又は瘢痕形成の防止に用いられる。

【0110】

製剤

本発明に用いるための医薬組成物又は製剤には、GM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体、HA、及びSOSが含まれる。このような組成物又は製剤は、薬学的に許容される担体、好ましくは水性担体又は希釈剤中に溶解され得るのが好ましい。それだけには限定されないが、0.9%食塩水、緩衝食塩水、生理学的に適合性のバッファー等を含めた、様々な水性担体を用いることができる。組成物は、当業者には周知の慣例的な技術によって滅菌され得る。得られた水溶液は、使用のために包装しても、又は無菌条件下で濾過し、凍結乾燥してもよく、凍結乾燥した調製物は、投与前に滅菌水溶液中に溶解される。一実施形態において、GM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体、HA、及びSOSを含む凍結乾燥した調製物を、例えば単一用量単位等において、予包装してもよい。

30

【0111】

本発明の組成物は、散剤、パスタ剤、ペイント剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、クリーム剤、塗布剤(salve)、乳剤、懸濁剤、液剤、噴霧剤、スポンジ、ストリップ、硬膏剤、パッド、包帯剤の形態でも、又はオストミープレート(ostomy plate)で調合されてもよい。このような製剤は、水、グリセリンベースの非接着性架橋ポリマー、グリセリン、コポリマー、プロピレングリコール、湿潤剤、アルギン酸のカルシウム及び/又はナトリウム塩、繊維の不織性複合体、銀、ビタミンA及び/又は他の抗酸化剤、並びにハチミツからなる群から選択されるもの等、創傷処置製剤において一般的に用いられる1つ又は複数の成分を更に含むことができる。

40

【0112】

GM-CSFの白血球標的、即ちマクロファージ及び/又は顆粒球は、細胞性の局所の宿主防御エフェクターを代表するので、これらの細胞に到達させるために、本発明による組成物は、有効成分が上皮性又は経粘膜性のバリアを通過するように調合される。このような適用のために、本発明による組成物を、経粘膜性のバリア又は表皮を横切った通過を改善するように調合してもよい。

【0113】

前記バリアを超える通過の改善は、例えば、ゲル剤、パスタ剤、軟膏剤、ローション剤

50

、クリーム剤、又は塗布剤等、粘膜、表皮、又は創傷表面に接着することができる製剤によって得てもよい。

【0114】

組成物は、これらに限定されないが、pH調節剤及び緩衝化剤、及び/又は等張化剤、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等を含めた、薬学的に許容される補助物質又はアジュバントを含むことができる。

【0115】

本発明による組成物は、有効物質が溶解している水相のコアを有する、外側の脂肪層を有するリポソーム中に調合されている、GM-CSF又はそのフラグメント若しくはバリエーションを含むことができる。このような製剤の脂肪成分は、表皮及び粘膜の浸透バリアを克服する。

10

【0116】

製剤は、微粒子、リポソーム、マイクロカプセル、ナノ粒子等を含めて、薬学的に許容される担体及び賦形剤を含むことができる。慣例的なりポソームは、リン脂質(中性若しくは負に荷電している)及び/又はコレステロールから構成されるのが典型的である。リポソームは、水性コンパートメントを取り囲む脂質二重層をベースとする小胞構造である。これらは、サイズ、脂質組成、表面の荷電、並びにリン脂質二重層の数及び流動性等の物理化学的性質が変動し得る。リポソーム形成に最も頻繁に用いられる脂質は、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DLPC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DMPE)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(一ナトリウム塩)(DMPA)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(一ナトリウム塩)(DPPA)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(一ナトリウム塩)(DOPA)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](ナトリウム塩)(DMPG)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](ナトリウム塩)(DPPG)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](ナトリウム塩)(DOPG)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-1-セリン](ナトリウム塩)(DMPS)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-1-セリン](ナトリウム塩)(DPPS)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-1-セリン](ナトリウム塩)(DOPS)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-n-(グルタリル)(ナトリウム塩)、及び1,1',2,2'-テトラミリストイルカルジオリピン(アンモニウム塩)である。コレステロール及び/又はホスファチジルコリンとの組合せ等、他の脂質又はリポソームの修飾因子との組合せのDPPCから構成される製剤が好ましい。

20

30

【0117】

リポソームを生成する有用な方法は、親水性ポリマーであるポリエチレングリコール(PEG)を、リポソームの外側表面に共有結合性に付着させることである。好ましい脂質のいくつかは、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-n-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](アンモニウム塩)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-n-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-5000](アンモニウム塩)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(塩化物塩)(DOTAP)である。

40

【0118】

リポソームの生成に適用できる可能な脂質は、Avanti社、Polar Lipids社、Alabaster, AL社等によって供給される。加えて、リポソーム懸濁液は、貯蔵時にフリーラジカル及び脂質過酸化の損傷から脂質を保護する、脂質保護剤を含むことができる。アルファートコフェロール等の親油性フリーラジカルクエンチャー、及びフェリオキサミン等の水溶性鉄特異的キレーターが好ましい。

【0119】

50

例えば、全て参照によって本明細書に援用される、Szokaら(1980年)、及び米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、及び第4,837,028号によって記載される様々な方法が、リポソームの調製に利用可能である。別の方法では、不均一なサイズの多層状の小胞が生成される。本方法では、小胞形成性の脂質を、適切な有機溶媒又は溶媒系に溶解し、真空下又は不活性ガス中で乾燥させて脂質の薄いフィルムを形成させる。所望により、フィルムを、三級ブタノール等の適切な溶媒に再溶解し、次いで凍結乾燥して、より容易に水和されている粉末様形態である、より均一な脂質混合物を形成してもよい。このフィルムを薬物及びその標的成分の水溶液で覆い、攪拌しながら典型的に15~60分の時間にわたって水和させる。得られる多層状小胞の粒度分布を、より激しい攪拌条件下で脂質を水和することによって、又はデオキシコール酸等の可溶化洗剤を加えることによって、より小型のサイズに移行させることができる。

#### 【0120】

水溶液中の界面活性剤(疎水性部分、及び1つ若しくは複数のイオン性の、又は他の点で強力な親水性の基を含む分子)によってミセルが形成される。

#### 【0121】

当業者には周知である一般的な界面活性剤を、本発明のミセルにおいて用いることができる。適切な界面活性剤には、ラウリン酸ナトリウム(sodium laurate)、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オクタオキシエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクトキシノール9(octoxynol 9)、及びPLURONIC F-127 (Wyandotte Chemicals社)が含まれる。好ましい界面活性剤として、非イオン性ポリオキシエチレン、及びTween 80、PLURONIC F-68、n-オクチル-ベータ-D-グルコピラノシド等、静脈内注射に適合性のポリオキシプロピレン洗剤がある。加えて、リポソームの生成において用いるために記載したもの等のリン脂質も、ミセルの形成に用いることができる。

#### 【0122】

本発明による組成物及び製剤のpH値を、3から10の間のpH、例えば4から9の間、例えば4から8の間、例えば5から8の間、例えば6から8の間、好ましくは6.5から7.5の間に調整してもよく、例えば、前記組成物のpHは約7である。

#### 【0123】

一実施形態において、本発明による組成物の凍結乾燥調製物を、単一用量単位等において予包装してもよい。更により好ましい一実施形態において、単一用量単位は第1の組成物であり、第1の組成物は、例えば、HAのヒドロゲル、SOS、及び水(再蒸留水、緩衝溶液、又は生理学的溶液として加えられる)、及びGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体を含む1つ又は複数の他の組成物、及び/又は他の有効成分を含む、HA及びSOSの調製物であってよい。

#### 【0124】

組成物をキットとして用いる場合、HAのヒドロゲル及びSOSをGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体と所望の比率で混合することによって、生理活性のヒドロゲルを使用直前に生成し、その調製直後に処置を必要とする組織に混合物を適用してもよい。

#### 【0125】

投与

本発明の組成物及び方法は、身体の皮膚又は粘膜の創傷、潰瘍、瘢痕、及び他の病変の処置又は防止に有用であり、身体の腔の内壁を含めた、個々の動物又はヒトの皮膚又は粘膜に調製物を局所適用するのに当技術分野で慣例的に用いられる投与方法によって適用することができる。「局所投与」は、創傷、病変、又は瘢痕、及び隣接する組織の表面への治療薬剤の送達と規定される。このような局所投与には、例えば、パッチ剤、散剤、ペースト剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、クリーム剤、塗布剤、乳剤、懸濁剤、液剤、スポンジ、ストリップ、硬膏剤、パッド、包帯剤、若しくはオストミープレートの適用、又は局所投与に通常用いられる他の方法の、マッサージ、注射、噴霧、ブラッシングによる組成物の局所適用が含まれ得る。

#### 【0126】

10

20

30

40

50

表皮はときに、本発明の構成要素又は組成物が、皮膚の皮内及び皮下の層に到達し、そこでその効果を発揮するのを妨げるバリアを表す。処置に用いられる有効薬剤が、例えば表皮の基礎をなす組織等、基礎をなす組織に対して、再現性よく、より効率的に送達され得れば、多くの創傷、潰瘍、及び/又は瘢痕が、より効果的に、且つ有害作用が殆どなく処置され得る。治療薬剤が深部組織中に浸透する効率には、粘膜、皮膚、又は壊死組織のバリアを迂回する浸透技術が必要とされ得る。このような浸透技術は、皮膚の角質層又は表皮の下に、例えば皮膚の皮内又は皮下の層中に本発明の組成物を沈着させるのに有用であり、このような浸透技術は本発明の組成物の皮膚の異なる層における分布を改善し、それによって皮膚表面から皮下組織への前記組成物の構成要素の濃度勾配を低下させるのに有用であり得る。

10

## 【0127】

本発明の一態様は、言及した組織のバリアを迂回し、それによって本発明の組成物の有効成分又は構成要素の、例えば、表皮表面のバリアの基礎となる深部皮膚組織等、処置する組織の様々なゾーンへの局所輸送を促進する浸透技術を提供することである。本発明の一実施形態において、本発明の組成物は、真皮等の表皮下の皮膚層、又は皮下組織を構成する皮下層に沈着する。

## 【0128】

本発明による組成物は、本明細書に記載する経粘膜投与又は経表皮投与のためのローラーツール等、このような適用に有用である装置を用いることによって適用することができる。ローラーツールは、図1に示す通り、スパイクのあるローラーから本質的になる。円柱状の構成要素の長さは2~5cmであり、直径は2~3cmである。ローラーは、それに対して任意選択の延長部を付着することができる、取り外し可能なU型のハンドルによって押し出され得る。ローラー本体及びハンドルは、高圧滅菌又は化学的手段による滅菌に耐える材料、例えば、ステンレス鋼、外科用チタン合金、ポリプロピレン、又はポリカーボネートから作られる。病変に接触するローラー表面には、表皮又は粘膜を貫通することができる、基礎直径300~400 $\mu$ mの、堅く付着されている鋭利なスパイク又はピンが装着されている。これらのピン又はスパイクの密度は、ローラーの接触表面1cm<sup>2</sup>あたりおよそ25個である。個々のローラー本体におけるスパイクは同一の長さである。スパイクの長さが異なるローラー本体を、ハンドル上で交換することができる。スパイクは、滅菌に耐えるステンレス鋼から作られている。スパイクの長さは0.1mmから3mm、好ましくは0.70mmから1.2mmであってよい。理論に縛られることはないが、スパイクの長さは、本発明の組成物の、皮膚の様々な層における適用を保証し得、この方法で処置の有益な効果を提供すると考えられている。Table 1(表1)は、スパイクの長さの概要及び処置のそれぞれの効果を示す。

20

30

## 【0129】

## 【表1】

Table 1:スパイクの長さ及び免疫-炎症に対する効果		
スパイクの長さ	薬物沈着の目標	炎症に対する効果
0.1~0.5mm	皮内(i.c.)	T <sub>H</sub> 1
0.7~1.0mm	皮下(s.c.)	T <sub>H</sub> 1 及び T <sub>H</sub> 2 の混合

NB: T<sub>H</sub>1:1 型ヘルパーT細胞; T<sub>H</sub>2:2 型ヘルパーT細胞。これらは異なる免疫-炎症応答に関与する。スパイクは、顔等皮膚の薄い領域における沈着には短くてもよく、又は手のひら及び足の裏等皮膚の厚い領域における沈着には長くてもよい。

40

## 【0130】

本発明の一実施形態において、ローラーツールは、U型のハンドルに接続されている、本質的に半円柱のスリーブを更にも含むことができる。

## 【0131】

ローラーツールは、本発明による医薬組成物を投与するためのリザーバー系を含むことが

50

できる。このような一実施形態において、円柱状のローラー本体のスパイクは、医薬組成物を、ローラー本体の内側から中空のスパイクを介して通過させて組織に送達させようとする、中空の皮下注射針の性質を持つ。

【0132】

本発明による医薬組成物のためのリザーバー系の一例は、ハンドルに付着されていてもよく、円柱の内部に組成物を送達する導管に接続している出口ホースによって接続する出口を有する、医薬組成物のための密封されている外部リザーバーを含む。

【0133】

医薬組成物のためのリザーバー系の別の一例は、円柱状のローラー本体内の医薬組成物のための内部リザーバー系である。

10

【0134】

一実施形態において、本明細書に記載するローリングツールを、本発明の組成物をインタクトな皮膚又は癒痕組織上に適用するのに用いるのが好ましい。

【0135】

レーザー穿孔は、それによって創傷表面又は表皮を、例えば1cm<sup>2</sup>あたり穴約4000個等、多数の小さい穴によって穿孔することができる、別の方法である。レーザー穿孔を、例えば、本発明の組成物を、皮膚の癌等における限られた領域に限局的に投与するのに用いてもよく、皮膚の癌は、有棘細胞癌又は基底細胞癌であってよい。本発明の一実施形態において、本発明の組成物を、レーザー穿孔と組み合わせ、本発明に規定する局所投与によって投与する。

20

【0136】

一実施形態において、本発明の組成物の投与は、注射により、又は本明細書に規定するレーザー穿孔若しくはローラーツール等、表面を介して貫通させるための他の方法と組み合わせ、本発明に言及する局所投与による。この技術、及び先に記載した穿孔技術は、本発明の組成物を局所投与する前、間、又は後に用いることができる。

【0137】

最後に、本発明の組成物の有効成分の経皮輸送を増強するための方法は、SOS、HA、及びGM-CSFの3つの構成要素の各々に対する経皮の抵抗性を低減する、植物抽出物等の皮膚軟膏剤の適用である。

【0138】

用量

本発明の組成物の「有効量」は、それを必要とする対象に投与する場合、身体の皮膚、粘膜又は結合組織の創傷、潰瘍、及び他の病変、又は癒痕等の炎症箇所又は病変の処置、防止又は緩和における有益な生物学的効果を有する濃度を実現する用量を意味する。このような有効量は、患者の担当医又は罹患している動物の獣医によって決定され得、当業者によって容易に確認される。治療有効量が何であるかに影響を及ぼす因子には、用いられる治療薬剤の具体的な活性、病変のタイプ(機械的又は熱的、完全又は部分的な厚さ等)、病変のサイズ、病変の深さ(完全な厚さの場合)、感染の非存在又は存在、傷害を受けてから経過した時間、並びに患者の年齢、生理的状态、疾患状態、及び栄養状態が含まれる。加えて、患者が受けている可能性がある他の薬物療法は、投与しようとする組成物の治療有効量の決定に影響を及ぼす。

30

40

【0139】

1cm<sup>2</sup>あたり10µgから100µgの間等、処置しようとする創傷面積のcm<sup>2</sup>に関して決定される有効量のGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体を、投与してもよい。

【0140】

実質的に、本発明の医薬組成物は、1µg/gから1000µg/gの範囲、例えば、5µg/gから500µg/gの範囲、又は例えば10µg/gから300µg/gの範囲の濃度の、GM-CSF又はそのフラグメント若しくはバリエーションを含む。

【0141】

各用量を、1日1回、1日2回、1日3回、1日4回、1日5回、又は1日6回投与することができ

50

る。

【0142】

投薬期間は、典型的に、1日から約4か月の範囲、例えば1日から2日の範囲、例えば2日から3日、例えば3から4日の範囲、例えば4～5日、例えば5～6日、例えば6～7日、例えば7～14日、例えば1週間から2週間、例えば2週間から4週間、例えば1か月から2か月、例えば2から4か月、又は病変が難治性であり続ける限りである。

【0143】

マクロファージをGM-CSFとin vitroでインキュベートした後、静止しているマクロファージが完全な免疫適格性の樹状細胞に形質転換するのにおよそ10日かかる。一実施形態において、用量の持続時間は、前記形質転換を可能にする長さである。したがって、期間は7～14日、例えば8～12日、例えば8日、又は例えば9日、又は例えば10日、又は例えば11日、又は例えば12日であり得る。

10

【0144】

用量レジメンは、本発明による組成物を投与する期間と、投与のない期間(処置の休止期)との間の交替であってよい。このような用量レジメンにおける処置の休止期のある期間は、5～10日、例えば5日、又は例えば6日、又は例えば7日、又は例えば8日、又は例えば9日、又は例えば10日若しくはそれを超えて、例えば1か月から4か月続いてよい。

【0145】

用量レジメンの例には、本発明による組成物で処置10日、及び処置の休止期7日のサイクルを含むことができる。

20

【0146】

静止するマクロファージ(MF)の樹状(DC)細胞への変換は、用量レジメンを繰り返すことにより増強され得る。したがって、効果的な処置を得るために、用量レジメンを、1回、2回、3回、4回、5回、又はそれを超えて繰り返すことができる。

【0147】

一実施形態において、用量レジメンは、例えば、1回、2回、3回以上等繰り返し、例えば、必要とする対象の残りの寿命の間繰り返す。

【0148】

別の一実施形態において、患者を、本発明による組成物で10日の用量レジメンで処置した後、前記処置の7日の休止期が続き、引き続き用量レジメンを2～3回又はそれを超えて繰り返す。

30

【0149】

組成物がSOSを含む実施形態において、先のあらゆる1つの実施形態による組成物は、50 mg/gから200mg/gの濃度のSOSを含むことができる。

【0150】

先のあらゆる1つの実施形態による組成物は、8w/w%から15w/w%のSOS又はスクラルファートの懸濁液を含むことができる。

【0151】

先のあらゆる1つの実施形態による組成物は、0.01w/w%から35w/w%の濃度のHAの水溶液を、8w/w%から15w/w%の濃度のSOS、及び1 µg/gから1000 µg/gの濃度のGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体とともに含むことができる。

40

【0152】

先のあらゆる1つの実施形態による組成物は、0.01w/w%から35w/w%の濃度のHAの水溶液を、8w/w%から12w/w%の濃度のSOS、及び5 µg/gから500 µg/gの濃度のGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体とともに含むことができる。

【0153】

先のあらゆる1つの実施形態による組成物は、0.1w/w%から10w/w%の濃度のHAの水溶液を、10w/w%の濃度のSOS、及び20 µg/gから300 µg/gの濃度のGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体とともに含むことができる。

【0154】

50

## 処置の方法

本発明は、GM-CSF又はそのフラグメント若しくはバリエーション、及びHAを含む本発明による組成物の有効量を対象に投与する少なくとも1つの工程を含む、身体の皮膚、粘膜又は結合組織の創傷、潰瘍、及び他の病変等の炎症箇所又は病変を処置、防止又は緩和するための方法を提供する。

### 【0155】

本発明による処置の一方法において、化合物GM-CSF、SOS又はスクラルファート、及びHAを、本明細書に規定する局所投与のための方法によって、逐次的又は同時に対象に投与してもよい。

### 【0156】

本発明の一実施形態において、本明細書に規定する組成物を、本明細書に提供するローラーツールによって適用する。

### 【0157】

本発明による、身体の皮膚、粘膜又は結合組織の創傷、潰瘍、及び他の病変等の炎症箇所又は病変を処置、防止又は緩和するための方法は、外科手術の間又は後に、本明細書に規定する組成物を投与することを含むことができる。

### 【0158】

本発明の一実施形態において、本発明の防止、緩和、及び/又は処置のための方法は、例えばリドカイン等、局所麻酔薬での処置を必要とする組織を処置する工程を含む。

### 【0159】

本発明の方法において、本明細書に規定する組成物での処置を、例えば、デブリードマン、外科的な創傷の再建、局所陰圧処置(TNPT)、創傷の包帯の頻繁な交換、糖尿病のコントロール、及び/又は浮腫を低減するための免荷等、創傷、潰瘍、瘢痕又は他の病変の処置において通常用いられる他のタイプの処置又は手順と組み合わせてもよい。

### 【0160】

殺菌薬又は抗真菌薬の同時投与は、創傷、潰瘍、又は他の傷害部位における感染を防止又は処置することによって、本発明による処置を更に促進し得る。本発明の一実施形態において、組成物を、1つ又は複数の殺菌薬及び/又は抗真菌薬と同時投与する。このような殺菌薬及び/又は抗真菌薬は、全身投与しても、又は局所投与してもよい。GM-CSFの投与は局所の宿主防御を増強するため、このような同時処置は、本発明の組成物を用いた処置を妨害しない。

### 【0161】

監視培養(感染を検出するための)は、微生物による創傷の汚染を同定するのに大いに推奨される。

### 【0162】

## 実施形態

1. a) 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)又はそのフラグメント若しくはバリエーション、及び

b) スクロースオクタスルフェート(SOS)又はその塩、例えばスクラルファート、及び

c) ヒアルロン酸(HA)

を含む組成物。

2. 医薬として用いるための、実施形態1に記載の組成物。

3. 身体の皮膚、粘膜、若しくは結合組織の創傷、潰瘍、瘢痕又は他の病変等の炎症箇所又は病変の処置、防止又は緩和に用いるための、実施形態1に記載の組成物。

4. 創傷及び/又は潰瘍の処置、防止又は緩和のための、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。

5. 創傷及び/又は潰瘍が難治性である、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。

6. 創傷及び/又は潰瘍が急性である、実施形態1から3に記載の組成物。

7. 潰瘍が、難治性の潰瘍性皮膚病変である、実施形態1から4のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

8. 創傷及び/又は潰瘍が、真菌、ウイルス、及び/又は細菌の感染等の感染症に関連する、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
9. 創傷及び/又は潰瘍が糖尿病に関連する、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
10. 創傷及び/又は潰瘍が、静脈性下肢潰瘍、静脈性足部潰瘍、動脈性下肢潰瘍、動脈性足部潰瘍、又は褥瘡性潰瘍等、血液の循環の低下に関連する、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
11. 創傷及び/又は潰瘍が、切開、裂傷、擦過傷、水疱、血腫、穿刺、穿通、射撃、電気、照射、化学的、外傷、挫滅、咬みつき、火傷、凍傷、外科手術(例えば、非粘膜組織における、例えば、頭皮上の神経外科、腹膜手術、移植手術、整形手術、及び/又は歯肉、泌尿器、膀胱、若しくは肛門手術等、粘膜組織における外科手術)、原発癌若しくは転移、良性腫瘍、挫創、感染症、例えば、真菌(例えば、様々な形態のカンジダ)、ウイルス(例えば、様々な形態のヘルペス)、及び/又は細菌感染、或いは他の感染状態、例えば、骨髄炎、ブドウ球菌感染(例えば、黄色ブドウ球菌)、ベータ溶血性溶血連鎖球菌での感染、緑膿菌での感染、血液循環の低下に関連する病変、例えば、静脈弁機能低下に関連する静脈性下肢潰瘍、静脈性足部潰瘍、動脈性下肢潰瘍、動脈性足部潰瘍、褥瘡、圧迫病変、又は床ずれ、糖尿病に関連する病変、局所中毒に関連する病変、及び胃内容の肺中への吸引、肺吸引、及び/又は食道炎に関連する病変に関連する、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。 10
12. 前記組成物が、散剤、パスタ剤、ペイント剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、クリーム剤、塗布剤、乳剤、懸濁剤、液剤、噴霧剤、スポンジ、ストリップ、硬膏剤、パッド、包帯剤として調合されるか、又はオストミープレートで調合される、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。 20
13. 組成物がゲル剤として調合される、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
14. GM-CSFが、リポソーム又はミセルの、マイクロカプセル又はナノ粒子製剤中にある、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
15. GM-CSFバリエーションが、配列番号1又は配列番号2に少なくとも70%同一である、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
16. 前記GM-CSFのアミノ酸配列が、配列番号2に記載するアミノ酸配列、又は配列番号2に記載する配列に少なくとも70%同一であるアミノ酸配列、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも85%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも90%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも95%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも97%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも98%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。 30
17. 前記GM-CSFのアミノ酸配列が、配列番号2に記載するアミノ酸配列、又は配列番号2に記載する配列に少なくとも70%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも85%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも90%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも95%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも97%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも98%同一である、例えば配列番号2に記載する配列に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列からなる、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。 40
18. 前記GM-CSFが天然ヒトGM-CSFの機能的相同体又は類似体であり、(a)前記GM-CSFに生じる隣接する一対のアルギニンアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が非塩基性アミノ酸で置換されており、(b)天然ヒトGM-CSFの前記機能的相同体又は類似体が、ヒト骨髄アッセイにおいて生物学的活性を表す、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
19. 前記GM-CSFが記載するアミノ酸配列のバリエーションであり、(a)前記GM-CSFに生じる隣接する一対のアルギニンアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が非塩基性アミノ酸で置換されており、(b)天然ヒトGM-CSFの前記機能的相同体又は類似体が、ヒト骨髄アッセイにおいて生物学的活性を表す、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。 50

20. 前記GM-CSFが、配列番号2に記載する配列を有する天然ヒトGM-CSFの機能的類似体であり、98位(配列番号1の115位に相当する)のThrがIleで置換されている、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
21. 前記GM-CSFが、配列番号2に記載する配列を有する天然ヒトGM-CSFの機能的類似体であり、100位(配列番号1の117位に相当する)のIleがThrで置換されている、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
22. GM-CSFのフラグメントが、配列番号1又は配列番号2のいずれか1つの少なくとも50個の隣接するアミノ酸残基、例えば、配列番号1又は配列番号2のいずれか1つの少なくとも100個の隣接するアミノ酸残基を含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
23. フラグメントが、重複の範囲において配列番号1又は配列番号2に少なくとも70%同一である、実施形態22に記載の組成物。 10
24.  $1\mu\text{g/g}$ から $1000\mu\text{g/g}$ の濃度のGM-CSFを含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
25.  $10\mu\text{g/g}$ から $300\mu\text{g/g}$ の濃度のGM-CSFを含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
26.  $0.01\text{mg/g}$ から $650\text{mg/g}$ の濃度のヒアルロン酸を含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
27.  $100\mu\text{g/g}$ から $100\text{mg/g}$ の濃度のヒアルロン酸を含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
28. スクロースオクタスルフェートの形態がスクラルファートである、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。 20
29.  $50\text{mg/g}$ から $200\text{mg/g}$ の濃度のスクロースオクタスルフェート又はスクラルファートを含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
30.  $80\text{mg/g}$ から $1500\text{mg/g}$ の濃度のスクロースオクタスルフェート又はスクラルファートを含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
31.  $5\text{w/w}\%$ から $20\text{w/w}\%$ の濃度のスクロースオクタスルフェート又はスクラルファートの懸濁液を含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
32.  $8\text{w/w}\%$ から $15\text{w/w}\%$ の濃度のスクロースオクタスルフェート又はスクラルファートの懸濁液を含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
33.  $0.01\text{w/w}\%$ から $35\text{w/w}\%$ の濃度のヒアルロン酸の水溶液を、 $8\text{w/w}\%$ から $15\text{w/w}\%$ の濃度のスクロースオクタスルフェート、及び $1\mu\text{g/g}$ から $1000\mu\text{g/g}$ の濃度のGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体とともに含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。 30
34.  $0.1\text{w/w}\%$ から $10\text{w/w}\%$ の濃度のヒアルロン酸の水溶液を、 $10\text{w/w}\%$ の濃度のスクロースオクタスルフェート、及び $20\mu\text{g/g}$ から $300\mu\text{g/g}$ の濃度のGM-CSF又はその機能的バリエーション若しくは相同体とともに含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
35. ビタミンA及び/又は抗酸化剤を更に含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
36. GM-CSFが、GM-CSFの半減期を延長することができるコンジュゲートの形態のGM-CSFバリエーションを含む、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。
37. 有効成分の半減期を延長することができるコンジュゲートが、アルブミン又は脂肪酸である、実施形態28に記載の組成物。 40
38. 3から10の間、例えば4から9の間、例えば4から8の間、例えば4から8の間、例えば5から8の間、例えば6から8の間、好ましくは6.5から7.5の間、例えば約7のpHを有する、先の実施形態のいずれか一項に記載の組成物。

## 【実施例】

## 【0163】

以下の非限定的な実施例により本発明を更に説明する。

## 【0164】

(実施例1)

配列

配列番号1 ヒトブレ-GM-CSF

>sp|P04141|CSF2ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子

OS=ホモサピエンス

MWLQSLLLLGTVACISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDAAEMNETV  
EVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS  
CA  
TQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE

配列番号2 成熟ヒトGM-CSF

>sp|P04141|18-144

10

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQ  
TRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS  
CATQIITFESFKENLKDFLLV  
IPFDCWEPVQE

【0165】

(実施例2)

組成物の慢性創傷に対する試験のためのプロトコール

1. 死細胞片及び壊死組織を除去する、創傷の外科的清浄。最終的な結果が清浄な創傷であり、患者に感染の徴候がなければ、全身及び/又は局所の抗生物質(AB)を省略する。例えば、培養監視により検出される、又は熱及び炎症のマーカー(C反応性タンパク質(CRP)及びプロカルシトニン(PCT))によりモニタリングされる、感染の徴候及び症状が存在する場合、患者は局所又は全身AB処置の候補である。

20

【0166】

2. 本発明の組成物の投与。表皮は、標的組織に到達する有効成分に対するバリアであり、標的組織は皮膚の皮内及び皮下層であるのが最適である。

a) 薬物の適用

最初に、皮膚浸透手技の少なくとも1時間前に適用する、閉塞性のバンドエイドを用いてリドカインの0.9%水溶液又はEMLAクリーム等の局所麻酔軟膏を適用する。

b) 本発明の組成物を皮内又は皮下の組織に投与するために、スパイクの長さが0.1mmから1mmの間であるスパイクのあるローラー等を用いて、表皮のバリアを「ヘッジホギング」手技によって貫通させる必要がある。

30

c) 適用、用量、及び治療の長さ(LOT)。

d) 最も頻繁な適用形態は、ゲル形態の本発明の組成物である。これを、皮膚の領域に穿孔して適用する。

e) 対象領域(AOI)が5cm<sup>2</sup>未満であれば、組成物1mLで十分である。AOIがそれより大きい場合、完全に覆われた領域を得るために2mL以上を適用する。少なくとも厚さ最低1mmの本発明の組成物をAOIに適用するのが望ましい。

f) 組成物で覆われている領域を、次いで、閉塞性バンドエイド(Coloplast等)で覆う。構成要素の皮内又は皮下の最大の沈着を保証するために、バンドエイドを領域上に少なくとも4時間放置する。

40

g) 創傷の辺縁(縁)及び創傷床の両方が、本方法によって浸透される。

h) 以下の効果: i) 免疫炎症性効果(TH2からTH1へのサブセット変換)、及びii) 樹状細胞の形成の増強を実現するために、上記に言及した手順を少なくとも10日間、毎日維持する。

【0167】

3. 効果の評価

a) 主要評価項目は創傷のサイズである(サイズの減少を評価するため)。

b) 代理変数: フローサイトメトリーを行って全血中のPCT及び/又はCRP及び/又は白血球百分率数を測定するための、処置前及び後の皮膚生検及び血液試料。好酸球の計数。

【0168】

(実施例3)

50

## 本発明の組成物での処置

比較できるタイプの創傷を有する患者を3処置群に分け、第1群をGM-CSF100 µg/g、HA(ヒアルロン酸ナトリウム)1w/w%、スクラルファート10w/w%の水溶液を含む組成物で処置し;第2群をHA(1w/w%)及びスクラルファート(10w/w%)のみを含む組成物で処置し;第3群をGM-CSF(100 µg/g)及びスクラルファート(10w/w%)のみを含む組成物で処置する。

### 【0169】

5mLから10mLの量の組成物を、創傷の縁及び基部に沿って表面上及び皮下に手操作で適用する。異なる組成物で処置した各群の患者において、処置患者のうち半数を、組成物を局所適用した後、0.8mmの突出部のあるローラーツールで更に処置する。10日の期間の間1日1回処置を施し、最低6週間、毎週患者を追跡する。

10

### 【0170】

GM-CSF、スクラルファート、及びヒアルロン酸を含む医薬組成物での処置は、他の処置よりも速やかな創傷の治癒を誘発するのに、より効果的であることが予想される。

### 【0171】

手操作のみで適用する組成物で処置した患者の群と、ローラーツールを使用して適用する組成物で処置した患者の群とを比較することにより、ローラーツールでの処置がより効果的であることが観察されると予想される。

### 【0172】

#### (実施例4)

#### 薬物嗜癖者における静脈性下肢潰瘍の処置

20

患者A:薬物嗜癖の病歴のある者。患者は、3年間、右下腿内側領域に位置する難治性の創傷に罹患している。静脈内注射後に潰瘍が発症し得、潰瘍は、感染し、膿瘍に発症する病変を生成した。

### 【0173】

患者の状態は悪化し、創傷に位置する重症の疼痛と動き回るときの重篤な疼痛の激化のために、患者は入院を勧められる。診察時、患者は、悪臭があり、浸出液がひどく、周囲侵食性の潰瘍を表している。

### 【0174】

患者は、右下肢静脈潰瘍化のデブリードマン及び処置を受ける。

### 【0175】

静脈の検査には、動脈血及び末梢足指の血圧の反復モニタリングが含まれるが、これらは全て正常である。

30

### 【0176】

患者を、抗生物質の全身投与と併用して、様々なタイプのデブリードマン、及び創傷に対する毎日実施例3の第1の組成物の適用で処置する。

### 【0177】

数か月後、創傷は殆ど治癒し、サイズが大幅に減少し、浸出液がないことが予想される。

### 【0178】

#### (実施例5)

40

#### 糖尿病患者における難治性の創傷の処置

患者は、足首上の難治性の創傷の処置のため、整形外科により外来診療所に紹介され得る。患者は数年前、2型糖尿病と診断されている。骨折をまねいた傷害の後、患者は外科手術を受けている。

### 【0179】

手術創は、移動度の低下、持続性の疼痛、及び睡眠遮断を伴う難治性の創傷に発症し、その結果、タバコ及びアルコールの消費が増大し、食事は観察されていない。

### 【0180】

糖尿病のコントロール、炎症、及び感染症を評価するために血液検査を受ける。骨髄炎の局所徴候はなく、創傷の感染又は汚染を同定するための局所監視培養は陰性である。

50

## 【0181】

創傷の処置:創傷を、デブリードマン、創傷包帯の頻繁な交換と組み合わせて、実施例3の第1の組成物の創傷の領域への適用、局所陰圧処置(TNPT)、及び予防的な抗生物質の経口投与で局所的に処置する。

## 【0182】

6か月後、創傷は治癒を開始する。創傷の底部に骨(第1中足骨)との接触が存在する。患者の全身的な病状は良好ではなく、不十分な感染コントロールと共に感染の拡大をもたらす。最終結果は、前-内側/中央足底領域における膿瘍である。

## 【0183】

感染コントロールの欠如により、第1及び第2中足骨頭と共に第1及び第2足指を除去することによる広範囲の外科的な創傷の再建に至る。

10

## 【0184】

翌年、患者を外来診療所において系統的にモニタリングし、糖尿病の厳重なコントロール及び創傷の免荷に加え、下肢を持ち上げて浮腫を減少させると共に頻繁なデブリードマン手順を行う。

## 【0185】

全ての足指及び中足骨頭の除去、局所陰圧処置(TNPT)、噴霧剤として調合した実施例3の第1の組成物の毎日の適用、包帯の頻繁な交換、厳密な糖尿病コントロール、及び抗生物質の使用と組み合わせた、外科的及び内科的介入によって、創傷は治癒する。1.5年後、足は殆ど治癒している。

20

(参考文献)

Brown CB, Pihl CE, Kaushansky K (1994) Mapping of human granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor domains interacting with the human granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor-receptor alpha-subunit. *Eur J Biochem* 225:873-880.

Burgess AW, Begley CG, Johnson GR, Lopez AF, Williamson DJ, Mermoud JJ, Simpson RJ, Schmitz A, DeLamarter JF (1987) Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 69:43-51.

10

Cebon J, Nicola N, Ward M, Gardner I, Dempsey P, Layton J, Dührsen U, Burgess AW, Nice E, Morstyn G (1990) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *J Biol Chem* 265:4483-4491.

de Groot RP, Coffey PJ, Koenderman L (1998) Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal* 10:619-628.

20

Diederichs K, Jacques S, Boone T, Karplus PA (1991) Low-resolution structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Mol Biol* 221:55-60.

Gasson JC, Kaufman SE, Weisbart RH, Tomonaga M, Golde DW (1986) High-affinity binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to normal and leukemic human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:669-673.

30

Gearing DP, King JA, Gough NM, Nicola NA (1989) Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J* 8:3667-3676.

Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T, Miyajima A (1990) Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9655-9659.

40

Kaushansky K, O'Hara PJ, Berkner K, Segal GM, Hagen FS, Adamson JW (1986) Genomic cloning, characterization, and multilineage growth-promoting activity of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3101-3105.

Kitamura T, Hayashida K, Sakamaki K, Yokota T, Arai K, Miyajima A (1991) Reconstitution of functional receptors for human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): evidence that the protein encoded by the AIC2B cDNA is a subunit of the murine GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5082-5086.

10

Lopez AF, Vadas MA, Woodcock JM, Milton SE, Lewis A, Elliott MJ, Gillis D, Ireland R, Olwell E, Park LS (1991) Interleukin-5, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J Biol Chem* 266:24741-24747.

20

Makkonen TA, Minn H, Jekunen A, Vilja P, Tuominen J, Joensuu H (2000) Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and sucralfate in prevention of radiation-induced mucositis: a prospective randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46:525-534.

Martindale: The Complete Drug Reference, 34<sup>th</sup> edition ed. by Sweetman SC. ISBN: 0853695504/0-85369-550-4. Pharmaceutical Press, London, 2005.

30

Saarilahti K, Kajanti M, Joensuu T, Kouri M, Joensuu H (2002) Comparison of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and sucralfate mouthwashes in the prevention of radiation-induced mucositis: a double-blind prospective randomized phase III study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54:479-485.

Sato N, Sakamaki K, Terada N, Arai K, Miyajima A (1993) Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *EMBO J* 12:4181-4189.

40

Shanafelt AB, Miyajima A, Kitamura T, Kastelein RA (1991a) The amino-terminal helix of GM-CSF and IL-5 governs high affinity binding to their receptors. *EMBO J* 10:4105-4112.

Shanafelt AB, Johnson KE, Kastelein RA (1991b) Identification of critical amino acid residues in human and mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and their involvement in species specificity. *J Biol Chem* 266:13804-13810.

10

Szoka F Jr, Papahadjopoulos D (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng* 9:467-508.

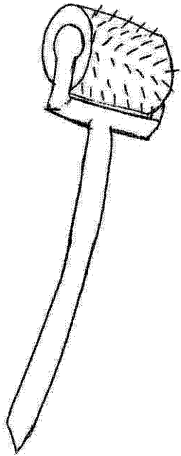
Wong GG, Witek JS, Temple PA, Wilkens KM, Leary AC, Luxenberg DP, Jones SS, Brown EL, Kay RM, Orr EC, et al. (1985) Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 228:810-815.

20

Yeh BK, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Green D, Pinnell J, Polat T, Gritli-Linde A, Linhardt RJ, Mohammadi M (2002) Structural basis for activation of fibroblast growth factor signaling by sucrose octasulfate. *Mol Cell Biol* 22:7184-7192.

【 図 1 】

Figure 1



【 配列表 】

2017524655000001.app

【 国際調査報告 】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2015/061598

**Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2015/061598**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-31, 40-53

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/061598

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. A61K38/19 A61K31/728 A61K31/70 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2014/128173 A1 (TRIFOILIUM APS [DK]) 28 August 2014 (2014-08-28)  pages 5,14-15; claim 12 -----	1-6,8,9, 11-31, 40-53
Y	WO 92/14480 A1 (AMGEN INC [US]) 3 September 1992 (1992-09-03) page 20, lines 3-20; claims 1,14 -----	1-31, 40-53
Y	WO 2008/116116 A2 (BREM HAROLD [US]; TOMIC MARJANA [US]) 25 September 2008 (2008-09-25) page 4, lines 2-17; claims 1,17,18; example 2 -----	1-31, 40-53
Y	CA 2 020 200 A1 (BUKH MEDITEC [DK]) 30 December 1991 (1991-12-30) claims 1-2; examples 7, 12 -----	1-31, 40-53
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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		*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
*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
*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)		*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
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
*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  23 July 2015		Date of mailing of the international search report  16/12/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bochelen, Damien

3

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2015/061598

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/007960 A1 (URGO LAB [FR]; DEV ET DE RECH IND SOC D [FR]; BOUSCHBÄCHER MARIELLE [F] 17 January 2013 (2013-01-17) page 4, lines 14-23 page 10, lines 4-10 page 11, line 12 -----	1-31, 40-53

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/061598

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014128173 A1	28-08-2014	EP 2958582 A1 WO 2014128173 A1	30-12-2015 28-08-2014
WO 9214480 A1	03-09-1992	AU 1462392 A CA 2081104 A1 EP 0526630 A1 FI 924778 A IE 920560 A1 JP H05506673 A NO 924073 A PT 100152 A US 6689351 B1 WO 9214480 A1	15-09-1992 23-08-1992 10-02-1993 21-10-1992 26-08-1992 30-09-1993 21-10-1992 31-05-1993 10-02-2004 03-09-1992
WO 2008116116 A2	25-09-2008	EP 2139447 A2 US 2009191156 A1 WO 2008116116 A2	06-01-2010 30-07-2009 25-09-2008
CA 2020200 A1	30-12-1991	NONE	
WO 2013007960 A1	17-01-2013	AU 2012282275 A1 CA 2839760 A1 CN 103732209 A EP 2731584 A1 FR 2977798 A1 JP 2014520837 A US 2014141058 A1 WO 2013007960 A1	30-01-2014 17-01-2013 16-04-2014 21-05-2014 18-01-2013 25-08-2014 22-05-2014 17-01-2013

International Application No. PCT/ EP2015/ 061598

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-31, 40-53

A composition comprising a) granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) or a fragment or variant thereof, and b) sucrose octasulfate (SOS) or a salt thereof, such as sucralfate, and hyaluronic acid (HA) and method of treatment of of irritation or lesions.

---

2. claims: 32-39

A roller tool for administration of the composition according to any one of the preceding claims, said roller tool comprising a substantially cylindrical roller body having a length and an interior, said roller body comprising two opposingly disposed circular end surfaces and an endless surface, said circular end surfaces each defining an aperture in the center thereof, and said endless surface incorporating randomly spaced protrusions.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	9/107 (2006.01)	A 6 1 K	9/107	
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	9/12 (2006.01)	A 6 1 K	9/12	
A 6 1 K	9/127 (2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	47/62	
A 6 1 K	47/10 (2006.01)	A 6 1 K	47/10	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4C076 DD37 DD41 EE41 EE59 FF63 FF68  
 4C084 AA02 AA03 AA22 BA21 BA44 CA53 DA19 MA13 MA17 MA22  
 MA23 MA24 MA28 MA32 MA38 MA43 MA56 MA63 NA05 ZA89  
 ZC75  
 4C086 AA01 AA02 EA03 EA25 MA02 MA04 MA17 MA22 MA23 MA24  
 MA28 MA32 MA38 MA43 MA63 NA05 NA10 ZA89 ZC75  
 4C098 AA09 CE14 DD30  
 4C167 AA64 AA65 BB18 BB39 BB40 CC01 CC05 GG16