

(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2009-517345

(P2009-517345A)

(43) 公表日 平成21年4月30日(2009.4.30)

(51) Int.Cl.

**A61K 31/22** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

F 1

A 61 K 31/22  
A 61 P 17/02  
A 61 P 43/00

テーマコード(参考)

4 C 2 O 6

1 1 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2008-541550 (P2008-541550)  
(86) (22) 出願日 平成18年11月24日 (2006.11.24)  
(85) 翻訳文提出日 平成20年7月2日 (2008.7.2)  
(86) 国際出願番号 PCT/AU2006/001781  
(87) 国際公開番号 WO2007/059584  
(87) 国際公開日 平成19年5月31日 (2007.5.31)  
(31) 優先権主張番号 2005906601  
(32) 優先日 平成17年11月25日 (2005.11.25)  
(33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 502442016  
ペプリン リサーチ プロプライエタリー  
リミティッド  
オーストラリア 4006 クイーンズラ  
ンド ニューステッド ブレックファスト  
クリーク ロード 1 ブリスベン ポ  
ータル レベル 2  
(74) 代理人 100102978  
弁理士 清水 初志  
(74) 代理人 100119507  
弁理士 刑部 俊  
(74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
(74) 代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】創傷治癒の方法

## (57) 【要約】

本発明は概して、対象における創傷治癒を促進するための方法および組成物に関する。特に、本発明は、創傷治癒におけるインゲノール化合物、特にインゲノールアンゲレートの使用、およびそのような化合物を含む創傷治癒のための組成物に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

必要としている対象において創傷治癒を促進する方法であって、創傷治癒に有効な量のインゲノール(ingenol)化合物またはその薬学的に許容される塩を該対象に投与する段階を含む、方法。

## 【請求項 2】

創傷における瘢痕組織を低減もしくは最小化するまたは美容もしくは機能転帰を改善する方法であって、それを必要としている対象の創傷に、瘢痕を低減するもしくは最小化する量または美容もしくは機能を改善する量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩を投与する段階を含む、方法。

10

## 【請求項 3】

必要としている対象において皮膚線維芽細胞および/またはケラチノサイトの表現型応答を調節する方法であって、調節に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩を該対象に投与する段階を含む、方法。

## 【請求項 4】

それを必要としている対象の創傷部位で皮膚線維芽細胞および/またはケラチノサイトの表現型応答を調節する方法であって、調節に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩を該対象に投与する段階を含む、方法。

20

## 【請求項 5】

それを必要としている対象において一つまたは複数のサイトカインの産生を調節する方法であって、調節に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩を該対象に投与する段階を含む、方法。

20

## 【請求項 6】

それを必要としている対象の創傷部位で一つまたは複数のサイトカインの産生を調節する方法であって、調節に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩を該対象に投与する段階を含む、方法。

## 【請求項 7】

一つまたは複数のサイトカインが、IL-1、IL-2、IL6、IL-8、およびTNF-からなる群より選択される、請求項5または6記載の方法。

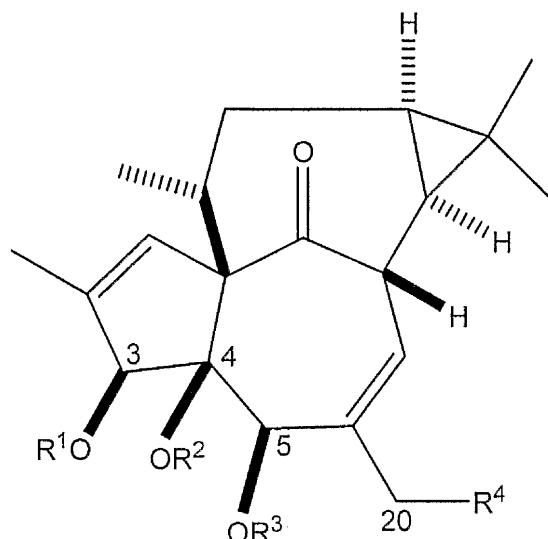
30

## 【請求項 8】

インゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩が、創傷に局所適用される、請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 9】

インゲノール化合物が下記の式を有する、請求項1~8のいずれか一項記載の方法：



40

$R^1 \sim R^3$  は、水素、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいアリールアルキル、 $S(O)_2R'$ 、 $S(O)_2OR'$ 、 $P(O)(OR')_2$  (ここで $R'$ は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル、アリール、またはアリールアルキルである)、およびグリコシルから独立に選択され； $R^4$ は、水素、ヒドロキシ、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケノキシ (alkenoxy)、置換されていてもよいアルキノキシ (alkynoxy)、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアリールアルコキシ、 $S(O)_2R'$ 、 $OS(O)_2OR'$ 、 $OP(O)(OR')_2$  (ここで $R'$ は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル、アリール、またはアリールアルキルである)、およびグリコキシ (glycoxy) から選択される。

10

【請求項 10】

化合物が、インゲノール-3-アンゲレート (angelate)、20-0-アセチル-インゲノール-3-アンゲレート、および20-デオキシ-インゲノール-3-アンゲレート、ならびにその薬学的に許容される塩から選択される、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

化合物がインゲノール-3-アンゲレートである、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

創傷が、切創および裂創、外科的切開、穿刺、擦過傷、引っ搔き傷、圧迫創、表皮剥脱、摩擦創、慢性創傷、潰瘍、熱による創傷、化学的創傷、病原体感染が原因の創傷、皮膚移植 (graft) / 移植 (transplant) 供与および受容部位、免疫応答状態、口腔創傷、胃または腸創傷、軟骨または骨の損傷、切断部位、ならびに角膜傷害からなる群より選択される、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 13】

創傷が皮膚創傷である、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

創傷が慢性創傷である、請求項12または13記載の方法。

【請求項 15】

創傷が糖尿病関連創傷である、請求項14記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は一般には、対象における創傷治癒を促進するための方法および組成物に関する。特に、本発明は、創傷治癒におけるインゲノール (ingenol) 化合物、特にインゲノールアンゲレート (angelate) の使用、およびそのような化合物を含むそのための組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

本明細書において著者が言及する出版物の文献データを説明の最後に収録する。

40

【0003】

任意の先行する出版物 (またはそれからの情報)、または任意の公知のものへの、本明細書における言及は、先行する出版物 (またはそれからの情報)、または公知のものが、本明細書が関係する努力の分野における一般的知識の一部を形成するとの自認もしくは承認または任意の示唆の形態ではなく、またそのように理解されるべきではない。

【0004】

創傷は、組織の構造上の完全性を物理的に破壊することになる、特に機械的、化学的、熱または病原性の手段により引き起こされる外部または内部損傷である。

【0005】

創傷治癒、すなわち、組織 (特に皮膚組織) の完全性の回復は、細胞成長、細胞遊走、

50

細胞分化および細胞増殖を調節する様々な成長因子およびサイトカインによって調整される (Werner and Grose, 2003 ; Bryan et al, 2005)。これは (i) 炎症、 (ii) 増殖および (iii) 成熟の三期で起こると都合よく説明することができ、これらはそれより具体的な段階に細分することができるが、これらの期はどれも正確に規定される時期に対応しておらず、ある程度重なっていると考えられる (Baum and Arpey, 2005)。損傷後の創傷治癒の複雑な過程には多くの因子が関与しており、サイトカインは全過程の調節において重要な役割を果たすと考えられる (Hubner and Werner, 1996)。

## 【0006】

## (i) 炎症期 (0~6日)

皮膚創傷などの創傷を受けた直後の第一段階は止血と呼ばれ、それによってフィブリンおよび血小板により介する血管収縮および凝固が始まり、出血を制御する。血餅はさらに、創傷に入ってくる線維芽細胞および炎症細胞に対する仮のマトリックスとして、ならびにサイトカインおよび成長因子の貯留庫としてはたらく。

## 【0007】

止血後、炎症細胞は創傷に侵入し、炎症過程を永続化させる (紅斑、熱、腫脹および疼痛により発現)。これらの最も重要なものは多核白血球 (PMN) で、これらは血小板由来成長因子 (PDGF) およびIL-8などの成長因子およびサイトカインによって誘引される。IL-8はPMNの主要な化学誘引物質で (Werner and Grose, 2003)、その迅速かつ一時的発現は炎症過程にとって重要である。PMNは細胞片、異物粒子および細菌を除去することにより創傷の清浄化を始め、創傷に比較的短期間 (1~2日) とどまる。また、PMNはIL-1、IL-1、IL-6およびTNF-などのサイトカインの主な供給源である。損傷後約3日までに、PMNは単球に取って代わられ、単球は創傷清浄物質およびIL-1、IL-1、IL-6およびTNF-のさらなる供給源として作用するマクロファージに変わるが、創傷部位に長期間とどまる傾向がある。IL-1、IL-6およびTNF-発現は炎症期に強力にアップレギュレートされ (Grellner et al, 2000 ; Grose et al, 2002、Hubner et al, 1996)、それらの協調発現は正常な修復のために重要であると思われる (Hubner et al, 1996)。線維細胞は炎症過程において重要な役割を果たし、コラーゲンおよびサイトカイン産生に特に関与し、部分的にはIL-1およびTNF-によって調節される。

## 【0008】

## (ii) 増殖期 (3日~数週間)

肉芽形成は炎症から増殖への重要な橋渡し期である。肉芽組織形成は損傷後3~4日頃から始まり、主に線維芽細胞およびマクロファージを含む。遊走線維芽細胞は永続的コラーゲン性細胞外マトリックス (ECM) を産生し、マクロファージはIL-1およびTNF-などの様々な成長因子およびサイトカインを産生し、これらは次に成長因子の産生を刺激する。

## 【0009】

線維芽細胞表現型は創傷治癒応答および臨床転帰の両方に重大な影響を有することが明らかにされている (Stephens et al, 1996, 2001, 2004)。試験により、インビオで優先的創傷治癒を示す組織 (すなわち口腔粘膜組織) からの線維芽細胞は、インビトロで明確な表現型応答を示すことが明らかにされている (al-Khateeb et al, 1997)。さらに、マトリックスメタロプロテイナーゼおよびセリンプロテイナーゼは損傷後の細胞遊走およびECMリモデリングの調節において重要な役割を果たし、ECM再編成および創傷治癒の低下 (すなわち慢性創傷) は線維芽細胞MMP産生および活性化の低下に関連することが示されている (Cook et al, 2000)。通常の皮膚線維芽細胞に比べて、口腔粘膜および胎児皮膚線維芽細胞は、ECMを通過して遊走し、インビトロで実験的創傷モデルを再生する、これらの細胞型の優れた能力に関連して、I型コラーゲン格子再編成および収縮の増大を示す (Stephens et al, 1996 ; al-Khateeb et al, 1997 ; Enoch, 2006)。これとは対照的に、慢性創傷線維芽細胞は、通常の皮膚線維芽細胞に比べて、細胞のECM遊走および創傷再生能力の遅延または障害に関連して、I型コラーゲン格子再編成および収縮の低下に関連する (Cook et al, 2000 ; Stephens et al, 2003 ; Wall, 2006)。口腔粘膜および胎児皮膚創傷部位からの線維芽細胞ではMMP-2レベルおよび活性が高まるが、慢性創傷線維芽細胞で

10

20

30

40

50

はMMP-2レベルおよび活性は低下する。

【0010】

再上皮化は創傷治癒過程における次の重要な事象で、主に遊走ケラチノサイトによって開始される。再上皮化はケラチノサイトの成長因子およびサイトカイン刺激増殖を介して達成され、ケラチノサイトは肉芽組織を通って遊走する。これらの細胞は遊走中にいくつかの表現型変化を起こして、分化中の細胞表現型に関連するタンパク質を発現すると思われる。遊走が進むにつれて、ケラチノサイトはセリンプロテイナーゼおよびMMPを産生するタンパク質分解表現型を獲得する。ケラチノサイトは完了するまで創傷部位に遊走し続け、その時点で有糸分裂活性ケラチノサイトは、上皮の分化および層形成ならびに基底膜の再形成が起こるよう、さらなる表現型変化を起こして再上皮化過程を完了する。

10

【0011】

細胞ECM接着、プロテイナーゼによるECM分解ならびにサイトカインおよび成長因子によるこれらの過程の全般的調節は、創傷リモデリングおよび治癒の他の重要な特徴であり、これらは細胞インテグリン-ECM相互作用を介しての、細胞遊走および創傷収縮などの細胞機能を協調させる。そのような相互作用は、Rhoファミリーおよびアクチン結合タンパク質を介して、細胞骨格再編成および新しいインテグリン-ECM相互作用を調節するが、プロテイナーゼは既存のインテグリン相互作用を除去して、後部脱着(rear de-adhesion)および細胞遊走を可能にする(Martin, 1997; Stephens and Thomas, 2002; Kirfel et al, 2004)。後部脱着非存在下での細胞の収縮性は、コラーゲン格子再編成/収縮によって実験的に評価して、皮膚の再編成を引き起こす。

20

【0012】

IL-6は、創傷辺縁のケラチノサイトに対するその有糸分裂効果および好中球に対するその化学誘引効果を介して、治癒過程のこの局面を「キックスタート」するために非常に重要なと考えられる(Werner & Grosse, 2003; Galluci et al, 2000)。IL-6の一時的発現は瘢痕のない創傷形成にとって重大であると考えられる(Liechty et al, 2000)。

【0013】

(iii) 成熟期(4日～数週間または数ヶ月)

創傷成熟(またはリモデリング)は数日または数週間しかかかることがあるが、完了過程は数年間続き得る。この期の収縮中に、創傷の発赤の減少、肥厚の減少、硬化の減少、および強度の増加が観察される。創傷は筋線維芽細胞の影響下で収縮し、肉芽組織におけるコラーゲン産生が低下し、血管が減少する。次いで、さらなる上皮化により創傷治癒が完了する(Werner and Grosse, 2003; Baum and Arpey, 2005)。

30

【0014】

損傷および組織の性質に応じて、組織の完全性の破壊は対象を感染、血液損失、組織機能の損失または瘢痕形成に対して敏感にすることもある。したがって、創傷の効率的かつ完全な治癒は対象の継続的健康および幸福にとって不可欠である。多くの因子が創傷治癒過程に有害な影響をおよぼし、慢性的もしくは治癒の遅い創傷、および/または瘢痕形成を引き起こすことがあり、そのような因子には損傷を受けた対象の年齢および全身の健康、栄養不足、疾患、加圧、循環障害、薬物療法(抗癌およびステロイド治療薬など)、感染、異物および壊死組織の存在、ならびに創傷の型が含まれる。

40

【0015】

さらに、いったん創傷が治癒しても、瘢痕組織が残ることが多い。瘢痕組織は機能および美容の両方の面で正常な損傷のない皮膚に劣る。この劣等性は新しい組織形成中に生じた新真皮内の膠原線維束の配列の結果であると考えられる。正常な皮膚内の膠原線維束は複雑な3次元の網目配列(しばしば「籠織り(basket-weave)」配列と呼ばれる)に配列され、これは皮膚に高レベルの弾性と損傷に対する復元性を提供する。瘢痕組織内の膠原線維束はより平面的な様式で配列され、線維束は皮膚の表面に平行に配向されている。3次元の網目がなく、膠原線維束の平行な配列で置き換えられたことにより、組織瘢痕形成部位の美容が失われると考えられる。

【0016】

50

創傷治癒の促進はいまだに集中的な調査研究の焦点であり、現在のところ、無数の受動的および能動的ドレッシングおよび包帯や、局所薬剤、ならびに壞死組織の物理的および/または化学的除去を含む、創傷を処置し、創傷治癒を促進するために利用可能な多くの方法および組成物がある。創傷治癒は非変換組織の壞死、アポトーシスおよび細胞成長の変化を含むこともある。

#### 【0017】

これにもかかわらず、結果はいくぶん矛盾があり、慢性的または治癒の遅い創傷の処置は医学界に対して重大な難題を投げかけ続けている。したがって、創傷処置および創傷治癒促進のためのさらなる薬剤および方法がいまだに必要とされている。さらに、より正常なコラーゲン構造の発生を促進するような様式で組織修復過程を調節し得る薬剤は、瘢痕組織の質を改善すると予想される。

10

#### 【0018】

植物のトウダイグサ科 (Euphorbiaceae) は、トウダイグサ属 (Euphorbia) の雑草を含む様々な植物を含む。様々なイングナン、特にイングノール化合物がこれらのトウダイグサ属の植物から単離可能であると広く報告されている。この群の一つの集中的に研究されている植物はシマニシキソウ (Euphorbia pilulifera L.) (別名 E. hirta L.、E. capitata Lam.) で、その一般名にはピルベアリング・スパージ、スネークウィード、猫の毛 (cat's hair)、クイーンズランド喘息草 (Queensland asthma weed) および花頭スパージ (flowery-headed spurge) が含まれる。この植物はインドを含む熱帯の国々、およびクイーンズランドを含む北オーストラリアに広く分布している。チャボタイゲキ (Euphorbia peplus) は、抗癌性を有するイングノールアンゲレートが単離されたもう一つのトウダイグサ属の植物である (米国特許第6,432,452号、第6,787,161号および第6,844,013号参照)。イングノール-3-アンゲレートはチャボタイゲキから抽出、精製されたイングノールアンゲレートで、特に光線性角化症および非黒色腫皮膚癌 (NMSC) の短期局所投与による処置において有用である。イングノール-3-アンゲレートの細胞毒性がインビトロで多くの細胞株に対して示されており、そのインビボでの有効性は臨床的に確立されている。

20

#### 【発明の開示】

#### 【0019】

##### 発明の概要

本明細書および添付の特許請求の範囲を通して、文脈からそうではないことが必要とされないかぎり、「含む (comprise)」という用語、ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」などの変形は、述べられた整数もしくは段階または整数群もしくは段階群の包含を意味するが、任意の他の整数もしくは段階または整数群もしくは段階群の除外を意味するものではないことが理解されると思われる。

30

#### 【0020】

創傷治癒の過程において成長因子およびサイトカインならびに線維芽細胞およびケラチノサイトによって行われる重大な役割を考慮して、それらの產生または表現型応答をそれぞれ調節し得る薬剤は、創傷治癒過程を促進、刺激、開始、増強もしくはそれ以外で進行させる、および/または瘢痕形成を低減もしくは最小化する、すなわち美容を改善することにより、創傷を処置する際に有用であり得る。現在、イングノール化合物は末梢血単核球 (PBMC) における免疫刺激活性を調節することができ、創傷治癒において役割を果たす特定のサイトカインの発現または產生をアップレギュレートし得ることが明らかにされている。また、皮膚線維芽細胞およびケラチノサイトの表現型および中心的創傷治癒応答が、そのような化合物を用いて調節し得ることも明らかにされている。そのような調節された変化は、特に皮膚創傷のための創傷治癒転帰にとって有益であり得る。好都合にも、これは瘢痕形成の少ない創傷治癒転帰をもたらし得る。本発明は、創傷治癒に関する線維芽細胞およびケラチノサイトのサイトカイン產生および表現型応答を調節するための新しい方法を提供する。したがって、PMN增加およびマクロファージ遊走などの急性炎症応答を刺激し、炎症誘発性サイトカインレベルを高めることにより、創傷治癒を促進することができる。したがって、本発明は創傷治癒および創傷処置のための方法を提供する。本

40

50

発明は、より正常なコラーゲン構造の発生を促進し、したがって治癒した創傷の瘢痕組織の質を都合よく改善する薬剤も提供する。

【0021】

したがって、第一の局面において、それを必要としている対象において一つまたは複数のサイトカインの産生を調節する方法を提供し、本方法は、調節に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグを該対象に投与する段階を含む。

【0022】

もう一つの局面において、本発明はそれを必要としている対象の創傷部位で一つまたは複数のサイトカインの産生を調節する方法を提供し、本方法は、調節に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグを該対象に投与する段階を含む。一つの態様において、投与はインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグの創傷部位への局所適用を含む。

10

【0023】

一つの態様において、調節はサイトカイン産生の増大を含む。

【0024】

もう一つの態様において、一つまたは複数のサイトカインはIL-1、IL-2、IL6、IL-8およびTNF- の群より選択される。

20

【0025】

もう一つの局面において、それを必要としている対象において皮膚線維芽細胞および/またはケラチノサイトの表現型応答を調節する方法を提供し、本方法は、調節に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグを該対象に投与する段階を含む。

【0026】

もう一つの局面において、本発明はそれを必要としている対象の創傷部位で皮膚線維芽細胞および/またはケラチノサイトの表現型応答を調節する方法を提供し、本方法は、調節に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグを該対象に投与する段階を含む。一つの態様において、投与はインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグの創傷部位への局所適用を含む。

30

【0027】

もう一つの局面において、本発明はそれを必要としている対象において創傷治癒を促進する方法を提供し、本方法は、創傷治癒に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグを、該対象に投与する段階を含む。

【0028】

さらなる局面において、本発明はそれを必要としている対象において創傷治癒を促進することにより創傷を処置する方法を提供し、本方法は、創傷治癒に有効な量のインゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグを、創傷に局所適用する段階を含む。

【0029】

一つの態様において、創傷は皮膚または表皮創傷などの皮膚創傷である。

40

【0030】

いくつかの態様において、インゲノール化合物はインゲノール-3-アンゲレート、20-O-アセチル-インゲノール-3-アンゲレートおよび20-デオキシ-インゲノール-3-アンゲレートならびにその薬学的に許容される塩およびプロドラッグから選択される。

【0031】

本発明によって企図される化合物は、望ましくは正常なコラーゲン構造を回復、発生または促進するのを助け、したがって瘢痕形成を低減または最小化する、あるいはそうではなく、創傷の強度もしくは弾性の改善、または発赤、肥厚、硬化、色素沈着低下もしくは色素沈着過剰の減少などの、美容または機能転帰を改善する方法を提供し得る。その際、化合物は、特に慢性損傷に対してこれを達成する速度の改善または加速を提供し、それに

50

より治癒を促進するための炎症応答が「キックスタート」され得る。

#### 【0032】

したがって、さらにもう一つの局面において、本発明は創傷における瘢痕組織を低減もしくは最小化する、または美容もしくは機能転帰を改善する方法を提供し、本方法は、それを必要としている対象の創傷に、瘢痕を低減するもしくは最小化する量または美容もしくは機能を改善する量のインゲノールアンゲレート化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグを投与する段階を含む。

#### 【0033】

##### 発明の詳細な説明

本発明を詳細に説明する前に、特に記載がない限り、成分の製剤、製造法、投与法などは変動し得るため、本発明は特定のそのようなものに限定されないことが理解されるべきである。同様に、本明細書において用いられる用語は特定の態様を記載するためのものにすぎず、限定を意図するものではないことも理解されるべきである。

10

#### 【0034】

単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかにそうではないことを規定しないかぎり、複数の局面を含む。したがって、例えば、「アンゲロイル(angeloyl)置換インゲナン」または「インゲノールアンゲレート」への言及は単一の化合物、ならびに適当な場合には複数の化合物を含む。

#### 【0035】

本明細書において用いられる「創傷」とは、組織構造の連続性または完全性の物理的破壊を意味する。「創傷治癒」とは、組織の完全性の回復を意味する。これは組織の完全性の部分的または完全な回復を意味し得ることが理解されると思われる。創傷の処置はしたがって創傷治癒過程に関連する一つまたは複数の段階または過程の促進、改善、進行、加速、またはその他の前進を意味する。

20

#### 【0036】

創傷は急性または慢性であり得る。褥瘡、静脈足潰瘍および糖尿病性足潰瘍を含む慢性創傷は単純に治癒不能な創傷と記載することができる。慢性創傷の正確な分子病原論は完全には理解されていないが、多因子性であると考えられている。急性損傷中の常在および遊走細胞の正常な応答が損なわれるため、これらの創傷は遷延性の炎症応答、不完全な創傷細胞外マトリックス(ECM)リモデリングおよび再上皮化の失敗によって特徴づけられる。

30

#### 【0037】

創傷は、任意の内部創傷、例えば、挫傷形成もしくは内部潰瘍などの、皮膚の外部構造の完全性が維持されているもの、または外部創傷、特に皮膚創傷である可能性があり、したがって組織は任意の内部または外部体組織であり得る。一つの態様において、組織は皮膚(ヒト皮膚など)であり、すなわち創傷は皮膚または表皮創傷などの皮膚創傷である。

#### 【0038】

ヒト皮膚は二つの異なる層、すなわち表皮および真皮からなり、その下に皮下組織がある。皮膚の主な機能は、内部臓器および組織への外部の外傷および病原体感染からの保護、感覚ならびに温度調節を提供することである。

40

#### 【0039】

皮膚の最も外側の層である表皮は、厚さ約0.04mmで、無血管性であり、4つの細胞型(ケラチノサイト、メラノサイト、ラングルハンス細胞、およびメルケル細胞)からなり、いくつかの上皮細胞層に層形成される。表皮の最も内側の上皮層は基底膜であり、これは真皮に直接接触し、表皮を真皮に固定している。皮膚で起こっているすべての上皮細胞分裂は基底膜で起こる。細胞分裂後、上皮細胞は表皮の外部表面へと遊走する。この遊走中に、細胞は角質化として知られる過程を経験し、それにより核が失われ、細胞は強靭、平坦、抵抗性の生きていない細胞へと変換される。遊走は、細胞が最も外側の表皮構造である角質層に達すると完了し、この層はその下にある組織の乾燥を防ぐ助けをする、乾燥した耐水性の扁平細胞層である。この死滅上皮細胞の層は持続的に脱落し、基底膜から表面

50

へと移動する角質化細胞によって置き換えられている。表皮上皮は無血管性であるため、基底膜はその栄養供給を真皮に依存している。

【0040】

真皮は表皮に栄養を供給する高度に血管化した組織層である。加えて、真皮は神経終末、リンパ管、コラーゲンタンパク質、および結合組織を含む。真皮は厚さ約0.5mmで、主に線維芽細胞およびマクロファージからなる。これらの細胞型は大部分は、皮膚を含むすべての動物結合組織中に見られるタンパク質、コラーゲンの産生および維持を担っている。コラーゲンは主に皮膚の復元力がある弾力性の性質を担っている。コラーゲンが豊富な真皮の下に見られる皮下組織は、皮膚の可動性、保温材、カロリー保存庫、およびその上の組織への血液を提供する。

10

【0041】

創傷は2つの一般的範疇、すなわち中間層創傷または全層創傷の1つに分類することができる。中間層創傷は表皮および真皮表面に限定され、皮膚血管への損傷はない。全層創傷は表皮の破壊を含み、より深い組織層に拡がって、皮膚血管の破壊を含む。中間層創傷の治癒は上皮組織の単純な再生によって起こる。全層創傷における創傷治癒はもっと複雑である。本発明によって企図される皮膚創傷は中間層または全層創傷のいずれでもあり得る。

20

【0042】

本発明によって企図される創傷には、切創および裂創、外科的切開および創傷、穿刺、擦過傷、引っ搔き傷、圧迫創、表皮剥脱、摩擦創（例えば、おむつによる発疹、摩擦による水疱）、褥瘡性潰瘍（例えば、加圧または床ずれ）；熱による創傷（直接または伝導、対流、もしくは放射のいずれかによる冷および熱源、ならびに電気的熱源）、化学的創傷（例えば、酸またはアルカリ熱傷）または開放性もしくは無傷のせつを含む病原体感染（例えば、ウイルス、細菌または真菌）、皮膚発疹、斑点およびアクネ、潰瘍、慢性創傷、（下肢および足潰瘍などの糖尿病関連創傷、静脈足潰瘍ならびに褥瘡を含む）、皮膚移植（graft/transplant）供与および受容部位、免疫応答状態、例えば、乾癬および湿疹、胃または腸潰瘍、口の潰瘍を含む口腔創傷、軟骨または骨の損傷、切断創および角膜傷害が含まれる。

30

【0043】

「インゲノール」への言及は、C3,C4,C5-トリオキシビシクロ[4.4.1]-ウンデカンインゲナン骨格を有する化合物を含む。そのような化合物は文献中に広く報告され、公知で、トウダイグサ科などの植物から単離することもでき、同様に化学合成することもできる（例えば、Winkler et al, 2002およびTanino et al, 2003参照）。これらの化合物は一般にトウダイグサ科の植物の抽出物中に見いだされる。したがって、抽出物は葉、幹、花、種子、樹皮または樹皮と幹との間から浸出した、またはその中に存在する、樹液または液体もしくは半液体材料を含んでもよい。最も好ましくは、抽出物は樹液からである。さらに、抽出物はトウダイグサ科の植物の樹液、葉、幹、花、樹皮または他の植物材料から抽出した画分にある液体または半液体材料を含んでもよい。例えば、植物材料を物理的操作にかけて植物纖維を破壊し、細胞外マトリックス材料ならびに組織間および組織内材料を水性環境を含む溶媒中に抽出してもよい。化学合成経路によって得た化合物を含む、化合物のそのような供給源はすべて本発明に含まれる。

40

【0044】

本明細書におけるトウダイグサ科のメンバーへの言及は下記の属の植物への言及を含む：アカリファ（Acalypha）、アシドトン（Acidoton）、アクチノステモン（Actinostemon）、アデリア（Adelia）、アデノクリン（Adenocline）、アデノクレピス（Adenocrepis）、アデノフェドラ（Adenophaedra）、アディスカ（Adisca）、アグロスチスタキス（Agrostistachys）、アルコルネア（Alchornea）、アルコルネオプシス（Alchorneopsis）、アルシネアンサス（Alcinaeanthus）、アルコセリア（Alcoceria）、アブラギリ（Aleurites）、アマノア（Amanoa）、アンドラクネ（Andrachne）、アンゴスティルス（Angostyles）、アニソフィルム（Anisophyllum）、ヤマヒハツ（Antidesma）、アフォラ（Aphora

50

）、アポロサ（Aporosa）、アポロセラ（Aporosella）、アルギサムニア（Argythamnia）、アストロコッカス（Astrococcus）、アストロギネ（Astrogyne）、バッカンレア（Baccanrea）、バリオスペルマム（Baliospermum）、ベルネルディア（Bernardia）、ベイエリオブシス（Beyeriopsis）、アカギ（Bischofia）、ブラキア（Blachia）、ブルメオドンドロン（Blumeodondron）、ボナニア（Bonania）、ブラドレイア（Bradleia）、タカサゴコバンノキ（Breynia）、ブレイニオブシス（Breyniopsis）、ブリーデリア（Briedelia）、ブラエアビア（Buraeavia）、カペロニア（Caperonia）、カリオデンドロン（Caryodendron）、セリアネラ（Celianella）、セファロクロトン（Cephalocroton）、ケノセカ（Chaenotheca）、ケトカルpus（Chaetocarpus）、カメシセ（Chamaesyce）、ケイロサ（Cheilosa）、キロペタルム（Chiroptalum）、コリオフィルム（Choriophyllum）、シッカ（Cicca）、カオキシロン（Chaoxylon）、クレイドン（Cleidon）、クレイスタンサス（Cleistanthus）、クルイチア（Cluytia）、クネスモン（Cnesmone）、クニドスコルス（Cnidoscolus）、コッコセラス（Coccoceras）、ヘンヨウボク（Codiaeum）、コエロディスカス（Coelodiscus）、コナミ（Conami）、コンセベイバ（Conceiveiba）、コンセベイバストルム（Conceiveibastrum）、コンセベイブム（Conceiveibum）、コリセア（Corythea）、クロイザチア（Croizatia）、クロトン（Croton）、クロトノブシス（Crotonopsis）、クロゾフォラ（Crozophora）、クバンサス（Cubanthus）、クヌリア（Cunuria）、ダクチロステモン（Dactylostemon）、ダレカンピア（Dalechampia）、デンドロコウシンシア（Dendrocousinsia）、ディアスペルサス（Diaspersus）、ジダイモシスタス（Didymocistus）、ディモルフォカリクス（Dimorphocalyx）、ディスコカルpus（Discocarpus）、ディタクシス（Ditaxis）、ドデカスチングマ（Dodecatingma）、ハツバキ（Drypetes）、ディスオブシス（Dysopsis）、エラテリオスペルマム（Elateriospermum）、エンダデニウム（Endadenium）、エンドスペルマム（Endospermum）、エリスマンサス（Erismanthus）、エリスロカルpus（Erythrocarpus）、エリスロキルス（Erythrocillus）、ユーメカンサス（Eumecanthus）、トウダイグサ（Euphorbia）、ユーフォルビオデンドロン（Euphorbiadendron）、セイジボク（Excoecaria）、フルエゲア（Flueggea）、カレリア（Calotropis）、ガルシア（Garcia）、ガバレチア（Gavarretia）、ゲロニウム（Gelonium）、ギアラ（Giara）、ギボチア（Givotia）、カンコノキ（Glochidion）、クロキディオノブシス（Clochidionopsis）、グリシデンドロン（Glycydendron）、ギムナンセス（Gymnanthes）、ギムノスパリア（Gymnosparia）、ヘマトスペルマム（Haematospermum）、ヘンデカンドラ（Hendecandra）、ヘペア（Hevea）、ヒエロニマ（Hieronima）、ヒエロナイマ（Hieronyma）、ヒポクレパンドラ（Hippocratea）、ホマランサス（Homalanthus）、ヒメノカルディア（Hymenocardia）、ジャニファ（Janipha）、タイワンアブラギリ（Jatropha）、ジュロクロトン（Julocroton）、ラシオクロトン（Lasiocroton）、レイオカルpus（Leiocarpus）、レオナルディア（Leonardia）、レピダンサス（Lepidanthus）、ロイコクロトン（Leucocroton）、マベア（Mabea）、オオバキ（Macaranga）、アカメガシワ（Mallotus）、イモノキ（Manihot）、マッパ（Mappa）、マプロウネア（Maprounea）、メランセサ（Melanthesa）、ヤマアイ（Mercurialis）、メッテニア（Mettenia）、ミクランドラ（Micrandra）、ミクロデスマス（Microdesmis）、ミクロエルス（Microelus）、ミクロスタキイ（Microstachys）、マオクロトン（Maocroton）、モナデニウム（Monadenium）、モジンナ（Mozinna）、ネオスコルテキニア（Neoscortechinia）、オマランサス（Omalanthus）、オムファレア（Omphalea）、オフェランサ（Ophellantha）、オルビクラリア（Orbicularia）、オストデス（Ostodes）、オキシデクテス（Oxydectes）、パレンガ（Palenga）、パンタデニア（Pantadenia）、パラドリペプテス（Paradrypetes）、パウサンドラ（Pausandra）、ペディランサス（Pedilanthus）、ペラ（Pera）、ペリディウム（Peridium）、ペタロスチグマ（Petalostigma）、コミカンソウ（Phyllanthus）、ピクロデンドロ（Picrodendro）、ピエラルディア（Pierardia）、ピリノフィツム（Piliophyllum）、ピメレオデンドロン（Pimeleodendron）、ピランヘア（Piranhea）、プラティギナ（Platygyna）、プルケネチア（Plukenetia）、ポドカリクス（Podocalyx）、ポインセチア（Poinsettia）、ポラレシア（Poraresia）、プロサルテマ（Prosartema

10

20

30

40

50

)、プセウドアンサス (*Pseudanthus*)、ピクノコマ (*Pycnocoma*)、クアドラシア (*Quadrasia*)、レベルコニア (*Reverchonia*)、リケリア (*Richeria*)、リケリエラ (*Richeriella*)、リシネラ (*Ricinella*)、リシノカルпус (*Ricinocarpus*)、ロットレラ (*Rottlera*)、サゴチア (*Sagotia*)、サンウィシア (*Sanwithia*)、シラキ (*Sapium*)、サビア (*Savia*)、スクレロクロトン (*Sclerocroton*)、セバスチアナ (*Sebastiania*)、ヒツバハギ (*Securinega*)、セネフェルデラ (*Senefeldera*)、セネフィルデロプシス (*Senefilderopsis*)、セロフィトン (*Serophyton*)、シフォニア (*Siphonia*)、スパシオステモン (*Spathiostemon*)、スピクシア (*Spixia*)、スチリンギア (*Stillingia*)、ストロフィオブラキア (*Strophioblachia*)、シナデニウム (*Synadenium*)、テトラコッカス (*Tetracoccus*)、テトラプランドラ (*Tetraplandra*)、テトロルキディウム (*Tetrorchidium*)、シルサンセラ (*Thyrsanthera*)、チシマルス (*Tithymalus*)、トラゲイア (*Trageia*)、トレウイア (*Trewia*)、トリゴノステモン (*Trigonostemon*)、ティリア (*Tyria*) およびキシロフィラ (*Xylophylla*)。

## 【0045】

好ましい属で、本発明の実施のために特に適しているのは、トウダイグサ属である。この属の特に有用な植物には下記が含まれる：ユーフォルビア アアロン-ロッシ (*Euphorbia aaron-rossii*)、ユーフォルビア アブレビアタ (*Euphorbia abbreviata*)、ユーフォルビア アクタ (*Euphorbia acuta*)、ユーフォルビア アラトカウリス (*Euphorbia alato-caulis*)、ユーフォルビア アルビカウリス (*Euphorbia albicaulis*)、ユーフォルビア アルゴマルギナタ (*Euphorbia algomarginata*)、ユーフォルビア アリセエ (*Euphorbia aliseae*)、ユーフォルビア アルタ (*Euphorbia alta*)、ユーフォルビア アナカンプセロス (*Euphorbia anacampseros*)、ユーフォルビア アンドロメデ (*Euphorbia andromeda*)、ユーフォルビア アングスタ (*Euphorbia angusta*)、ユーフォルビア アンソニイ (*Euphorbia anthonyi*)、ユーフォルビア アンチグエンシス (*Euphorbia antiguensis*)、ユーフォルビア アポキニフォリア (*Euphorbia apocynifolia*)、ユーフォルビア アラビカ (*Euphorbia arabica*)、ユーフォルビア アリエンシス (*Euphorbia ariensis*)、ユーフォルビア アリゾニカ (*Euphorbia arizonica*)、ユーフォルビア アルカンサンナ (*Euphorbia arkansana*)、ユーフォルビア アルテアゲ (*Euphorbia arteagae*)、ユーフォルビア アルンデラナ (*Euphorbia arundelana*)、ユーフォルビア アストロイテス (*Euphorbia astroites*)、ユーフォルビア アトロコッカ (*Euphorbia atrococca*)、ユーフォルビア バセリシス (*Euphorbia baselica*)、ユーフォルビア バタバネンシス (*Euphorbia batabanensis*)、ユーフォルビア ベルゲリ (*Euphorbia bergeri*)、ユーフォルビア ベルムディアナ (*Euphorbia bermudiana*)、ユーフォルビア ビカラー (*Euphorbia bicolor*)、ユーフォルビア ビフォルミス (*Euphorbia biforis*)、ユーフォルビア ビフルカタ (*Euphorbia bifurcata*)、ユーフォルビア ビロバタ (*Euphorbia bilobata*)、ユーフォルビア ビラメンシス (*Euphorbia biramensis*)、ユーフォルビア ビウンシアリス (*Euphorbia biuncialis*)、ユーフォルビア ブレファロスチプラ (*Euphorbia blepharostipula*)、ユーフォルビア ブロドゲッティ (*Euphorbia blodgettii*)、ユーフォルビア ブールハービオイデス (*Euphorbia boerhaaviaoides*)、ユーフォルビア ボリビアナ (*Euphorbia boliviiana*)、ユーフォルビア ブラセイ (*Euphorbia bracei*)、ユーフォルビア ブラキータ (*Euphorbia brachiata*)、ユーフォルビア ブラキセラ (*Euphorbia brachycera*)、ユーフォルビア ブランデギー (*Euphorbia brandegeei*)、ユーフォルビア ブリットニイ (*Euphorbia brittonii*)、ユーフォルビア セシア (*Euphorbia caesia*)、ユーフォルビア カルシコラ (*Euphorbia calcicola*)、ユーフォルビア カンペストリス (*Euphorbia canepustulis*)、ユーフォルビア カンデラブルム (*Euphorbia candelabrum*)、ユーフォルビア カピテラタ (*Euphorbia capitellata*)、ユーフォルビア カルメネンシス (*Euphorbia carmenensis*)、ユーフォルビア カルンクラタ (*Euphorbia carunculata*)、ユーフォルビア カイエンシス (*Euphorbia cayensis*)、ユーフォルビア セラストロイデス (*Euphorbia celastroides*)、ユーフォルビア カリコフィラ (*Euphorbia chalicophila*)、ユーフォルビア カメロードス (*Euphorbia chamaerhodos*)、ユーフォルビア カメスラ (*Eupho*

10

20

30

40

50

*rbia chamaesula*)、ユーフォルビア キアベンシス (*Euphorbia chiapensis*)、ユーフォルビア キオゲノイデス (*Euphorbia chiogenoides*)、ユーフォルビア シネラセンス (*Euphorbia cinerascens*)、ユーフォルビア クラリオネンシス (*Euphorbia clarionensis*)、ユーフォルビア コリメ (*Euphorbia colimae*)、ユーフォルビア コロラタ (*Euphorbia colorata*)、ユーフォルビア コミュタタ (*Euphorbia commutata*)、ユーフォルビア コンソクイトレ (*Euphorbia consoquitiae*)、ユーフォルビア コンボルブロイデス (*Euphorbia convolvuloides*)、ユーフォルビア コラリフェラ (*Euphorbia corallifera*)、ユーフォルビア クレベリマ (*Euphorbia creberrima*)、ユーフォルビア クレヌラタ (*Euphorbia crenulata*)、ユーフォルビア クベンシス (*Euphorbia cubensis*)、ユーフォルビア クスピダタ (*Euphorbia cuspidata*)、ユーフォルビア シンビフォルミス (*Euphorbia cymbiformis*)、ユーフォルビア ダルリングトニイ (*Euphorbia darlingtonii*)、ユーフォルビア デフォリアタ (*Euphorbia defoliata*)、ユーフォルビア デゲネリ (*Euphorbia degeneri*)、ユーフォルビア デルトイデア (*Euphorbia deltoidea*)、ユーフォルビア デンタタ (*Euphorbia dentata*)、ユーフォルビア デプレッサ (*Euphorbia depressa*)、ユーフォルビア ディクティオスペルマ (*Euphorbia dictyosperma*)、ユーフォルビア ディクティオスペルマ (*Euphorbia dictyosperma*)、ユーフォルビア ディオエカ (*Euphorbia dioeca*)、ユーフォルビア ディスクオイダリス (*Euphorbia discoidalis*)、ユーフォルビア ドルシベントラリス (*Euphorbia dorsiventralis*)、ユーフォルビア ドルモンディイ (*Euphorbia drumondii*)、ユーフォルビア ドウクロウクシイ (*Euphorbia duclouxii*)、ユーフォルビア ドゥッシイ (*Euphorbia dussii*)、ユーフォルビア エアノフィラ (*Euphorbia eanophylla*)、ユーフォルビア エッゲルシイ (*Euphorbia eggersii*)、ユーフォルビア エグランドウロサ (*Euphorbia eglandulosa*)、ユーフォルビア エラタ (*Euphorbia elata*)、ユーフォルビア エナラ (*Euphorbia enalla*)、ユーフォルビア エリオゴノイデス (*Euphorbia eriogonoides*)、ユーフォルビア エリオフィラ (*Euphorbia eriophylla*)、ユーフォルビア エスクレフォルミス (*Euphorbia esculaeformis*)、ユーフォルビア エスピリツエンシス (*Euphorbia espirituensis*)、ユーフォルビア エスラ (*Euphorbia esula*)、ユーフォルビア エクシサ (*Euphorbia excisa*)、ユーフォルビア エクスクルサ (*Euphorbia exclusa*)、ユーフォルビア エクスチピタタ (*Euphorbia exstipitata*)、ユーフォルビア エクスチプラタ (*Euphorbia exstipulata*)、ユーフォルビア フェンドレリ (*Euphorbia fendleri*)、ユーフォルビア フィリカウリス (*Euphorbia filicaulis*)、ユーフォルビア フィリフォルミス (*Euphorbia filiformis*)、ユーフォルビア フロリダ (*Euphorbia florida*)、ユーフォルビア フルチクロサ (*Euphorbia fruticulosa*)、ユーフォルビア ガルバー (*Euphorbia garberi*)、ユーフォルビア ガムネリイ (*Euphorbia gamnerii*)、ユーフォルビア ゲラルディアナ (*Euphorbia gerardiana*)、ユーフォルビア ゲイエリ (*Euphorbia geyeri*)、ユーフォルビア グリプトスペルマ (*Euphorbia glyptosperma*)、ユーフォルビア ゴルゴニス (*Euphorbia gorgonis*)、ユーフォルビア グラシリオル (*Euphorbia gracilior*)、ユーフォルビア グラシリマ (*Euphorbia gracillima*)、ユーフォルビア グラディイ (*Euphorbia gradiyi*)、ユーフォルビア グラミネア (*Euphorbia graminea*)、ユーフォルビア グラミネア (*Euphorbia graminea*)、ユーフォルビア グリセア (*Euphorbia grisea*)、ユーフォルビア グアダラジャラナ (*Euphorbia guadalajarana*)、ユーフォルビア グアナレンシス (*Euphorbia guanicensis*)、ユーフォルビア ギムナデニア (*Euphorbia gymadenia*)、ユーフォルビア ヘマタンサ (*Euphorbia haematantha*)、ユーフォルビア ヘディオトイデス (*Euphorbia hedysyrtoides*)、ユーフォルビア デルドリチイ (*Euphorbia heldrichii*)、ユーフォルビア ヘレネ (*Euphorbia heleneae*)、ユーフォルビア ヘレリ (*Euphorbia helleri*)、ユーフォルビア ヘルウィギイ (*Euphorbia helwigii*)、ユーフォルビア ヘンリクソニイ (*Euphorbia henriksonii*)、ユーフォルビア ヘテロフィラ (*Euphorbia heterophylla*)、ユーフォルビア ヘキサゴナ (*Euphorbia hexagona*)、ユーフォルビア ヘキサゴノイデス (*Euphorbia hexagonoides*)、ユーフォルビア ヒンクレイオルム (*Euphorbia hinkleyorum*)、ユーフォルビア ヒントニイ (*Euphorbia hintonii*)、ユーフォルビア ヒルツラ (*Euphorbia hilzera*)

phorbia hirtula)、ユーフォルビア ヒルタ (Euphorbia hirta)、ユーフォルビア フウベリ (Euphorbia hooveri)、ユーフォルビア フミステラタ (Euphorbia humistrata)、ユーフォルビア ヒペリシフォリア (Euphorbia hypericifolia)、ユーフォルビア イヌンダタ (Euphorbia inundata)、ユーフォルビア インボルタ (Euphorbia involuta)、ユーフォルビア ジャリセンシス (Euphorbia jalicensis)、ユーフォルビア ジェジュナ (Euphorbia jejuna)、ユーフォルビア ジョンストン (Euphorbia Johnston)、ユーフォルビア ジュッテ (Euphorbia juttae)、ユーフォルビア ヌッシイ (Euphorbia knut hii)、ユーフォルビア ラシオカルパ (Euphorbia laiocarpa)、ユーフォルビア ラタ (Euphorbia lata)、ユーフォルビア ラタジ (Euphorbia latazi)、ユーフォルビア ラテリカラー (Euphorbia latericolor)、ユーフォルビア ラクシフロラ (Euphorbia laxi flora) ユーフォルビア レキオイデス (Euphorbia lecheoides)、ユーフォルビア レディエニイ (Euphorbia ledienii)、ユーフォルビア ロイコフィラ (Euphorbia leucophyl la)、ユーフォルビア リネアタ (Euphorbia lineata)、ユーフォルビア リングイフオルミス (Euphorbia linguiformis)、ユーフォルビア ロンゲコルヌタ (Euphorbia longe cornuta)、ユーフォルビア ロンゲペチオラタ (Euphorbia longepetiolata)、ユーフォルビア ロンゲラモサ (Euphorbia longeramosa)、ユーフォルビア ロンギンスリコラ (Euphorbia longinsulicola)、ユーフォルビア ロンギピラ (Euphorbia longipila)、ユーフォルビア ルプリナ (Euphorbia lupulina)、ユーフォルビア ルリダ (Euphorbia lu rida)、ユーフォルビア リシオイデス (Euphorbia lycioides)、ユーフォルビア マクロボドイデス (Euphorbia macropodoides)、マクバウギアナ (macvaughiana)、ユーフォルビア マンカ (Euphorbia manca)、ユーフォルビア マンドニアナ (Euphorbia mando niana)、ユーフォルビア マングレチ (Euphorbia mangleti)、ユーフォルビア マンゴ (Euphorbia mango)、ユーフォルビア マリランディカ (Euphorbia marylandica)、ユーフォルビア マヤナ (Euphorbia mayana)、ユーフォルビア メラナデニア (Euphorbia melanadenia)、ユーフォルビア メラノカルパ (Euphorbia melanocarpa)、ユーフォルビア メリデンシス (Euphorbia meridensis)、ユーフォルビア メルトニイ (Euphorbia mertonii)、ユーフォルビア メクシエ (Euphorbia mexiae)、ユーフォルビア ミクロセ ファラ (Euphorbia microcephala)、ユーフォルビア ミクロクラダ (Euphorbia microcl ada)、ユーフォルビア ミクロメラ (Euphorbia micromera)、ユーフォルビア ミセラ (Euphorbia misella)、ユーフォルビア ミッスリカ (Euphorbia missurica)、ユーフォルビア モンタナ (Euphorbia montana)、ユーフォルビア モンテレヤナ (Euphorbia mon tereyana)、ユーフォルビア ムルチカウリス (Euphorbia multicaulis)、ユーフォルビア ムルチフォルミス (Euphorbia multiformis)、ユーフォルビア ムルチノディス (Eup horbia multinodis)、ユーフォルビア ムルチセタ (Euphorbia multiseta)、ユーフォルビア ムスシコラ (Euphorbia muscicola)、ユーフォルビア ネオメキシカナ (Euphorbia neomexicana)、ユーフォルビア ネフラデニア (Euphorbia nephraenia)、ユーフォルビア ニケロアナ (Euphorbia niqueroana)、ユーフォルビア オアクサカナ (Euphorbi a oaxacana)、ユーフォルビア オクシデンタリス (Euphorbia occidentalis)、ユーフォルビア オドントデニア (Euphorbia odontadenia)、ユーフォルビア オリバセア (Eup horbia olivacea)、ユーフォルビア オロワルアナ (Euphorbia olowaluana)、ユーフォルビア オプサルミカ (Euphorbia opthalmica)、ユーフォルビア オバタ (Euphorbia ov ata)、ユーフォルビア パキポダ (Euphorbia pachypoda)、ユーフォルビア パキリザ (Euphorbia pachyrhiza)、ユーフォルビア パ  
ディオリア (Euphorbia padifolia)、ユーフォルビア パルメリ (Euphorbia palmeri)、ユーフォルビア パルディコラ (Euphorbia paludicola)、ユーフォルビア パルシフ ロラ (Euphorbia parciflora)、ユーフォルビア パリシイ (Euphorbia parishii)、ユーフォルビア パリイ (Euphorbia parryi)、ユーフォルビア パキシアナ (Euphorbia pa xiana)、ユーフォルビア ペディクリフェラ (Euphorbia pediculifera)、ユーフォルビア ペプリディオン (Euphorbia peplidion)、ユーフォルビア ペプロイデス (Euphorbia peploides)、チャボタイゲキ (Euphorbia peplus)、ユーフォルビア ペルガメナ (Eup 10  
20  
30  
40  
50

horbia pergamenta)、ユーフォルビア ペルリグネア (Euphorbia perligneae)、ユーフォルビア ペタロイデア (Euphorbia petaloidea)、ユーフォルビア ペタロイデア (Euphorbia petaloidea)、ユーフォルビア ペトリナ (Euphorbia petrina)、ユーフォルビア ピカケンシス (Euphorbia picachensis)、ユーフォルビア ピロスラ (Euphorbia pilosula)、ユーフォルビア ピルリフェラ (Euphorbia pilulifera)、ユーフォルビア ピナリオナ (Euphorbia pinariona)、ユーフォルビア ピネトルム (Euphorbia pinetorum)、ユーフォルビア ピオノスペルマ (Euphorbia pionosperma)、ユーフォルビア プラティスペルマ (Euphorbia platysperma)、ユーフォルビア プリカタ (Euphorbia plicata)、ユーフォルビア ポエッピギイ (Euphorbia poeppigii)、ユーフォルビア ポリオスペルマ (Euphorbia poliosperma)、ユーフォルビア ポリカルパ (Euphorbia polycarpa)、ユーフォルビア ポリクネモイデス (Euphorbia polycnemoides)、ユーフォルビア ポリフィラ (Euphorbia polyphylla)、ユーフォルビア ポルトリセンシス (Euphorbia porticensis)、ユーフォルビア ポルツラコイデス (Euphorbia portulacoides) ユーフォルビア プルツラナ (Euphorbia portulana)、ユーフォルビア プレスリイ (Euphorbia preslii)、ユーフォルビア プロストラタ (Euphorbia prostrata)、ユーフォルビア プテロネウラ (Euphorbia pteroneura)、ユーフォルビア ピクナンセマ (Euphorbia pycnanthemum)、ユーフォルビア ラモサ (Euphorbia ramosa)、ユーフォルビア ラプルム (Euphorbia rapulum)、ユーフォルビア レミイ (Euphorbia remyi)、ユーフォルビア レトロスカブラ (Euphorbia retroscabra)、ユーフォルビア レボルラ (Euphorbia revoluta)、ユーフォルビア リブライス (Euphorbia rivularis)、ユーフォルビア ロブスタ (Euphorbia robusta)、ユーフォルビア ロモサ (Euphorbia romosa)、ユーフォルビア ルビダ (Euphorbia rubida)、ユーフォルビア ルブロスペルマ (Euphorbia rubrosperma)、ユーフォルビア ルピコラ (Euphorbia rupicola)、ユーフォルビア サンマルテンシス (Euphorbia sanmartensis)、ユーフォルビア サキサチリス M. Bieb (Euphorbia saxatilis M. Bieb)、ユーフォルビア スキゾロバ (Euphorbia schizoloba)、ユーフォルビア スクレロシアシウム (Euphorbia sclerocyathium)、ユーフォルビア スコプロルム (Euphorbia scopulorum)、ユーフォルビア セニリス (Euphorbia senilis)、ユーフォルビア セルピリフォリア (Euphorbia serpyllifolia)、ユーフォルビア セルラ (Euphorbia serrula)、ユーフォルビア セチロバ エンゲルム (Euphorbia setiloba Engelm)、ユーフォルビア ソノレ (Euphorbia sonorae)、ユーフォルビア スウビイ (Euphorbia soubyi)、ユーフォルビア スパルシフロラ (Euphorbia sparsiflora)、ユーフォルビア スフェロスペルマ (Euphorbia sphaerosperma)、ユーフォルビア シフィリチカ (Euphorbia syphilitica)、ユーフォルビア スプルセアナ (Euphorbia spruceana)、ユーフォルビア スブコエルレ (Euphorbia subcoerulea)、ユーフォルビア ステラタ (Euphorbia stellata)、ユーフォルビア サブマンミラリス (Euphorbia submammillaris)、ユーフォルビア サブペルタタ (Euphorbia subpeltata)、ユーフォルビア サブpubens (Euphorbia subpubens)、ユーフォルビア サブレニフォルメ (Euphorbia subreniforme)、ユーフォルビア サブトリフオリニア (Euphorbia subtrifoliata)、ユーフォルビア サクセダネア (Euphorbia succedanea)、ユーフォルビア タマウリパサナ (Euphorbia tamalipasana)、ユーフォルビア テレフィオイデス (Euphorbia telephioides)、ユーフォルビア テヌイッシマ (Euphorbia tenuissima)、ユーフォルビア テトラポラ (Euphorbia tetrapora)、ユーフォルビア チルカリイ (Euphorbia tirucalli)、ユーフォルビア トメンテラ (Euphorbia tomentella)、ユーフォルビア トメントサ (Euphorbia tomentosa)、ユーフォルビア トラルバシイ (Euphorbia torralbasii)、ユーフォルビア トバリエンシス (Euphorbia tovariensis)、ユーフォルビア トラキスペルマ (Euphorbia trachysperma)、ユーフォルビア トリカラー (Euphorbia tricolor)、ユーフォルビア トロヤナ (Euphorbia troyana)、ユーフォルビア ツエルクヘイミイ (Euphorbia tuerckheimii)、ユーフォルビア ツルクザニノウイイ (Euphorbia turczaninowii)、ユーフォルビア ウンベルラタ (Euphorbia umbellulata)、ユーフォルビア ウンドウラタ (Euphorbia undulata)、ユーフォルビア ベルミフォルミス (Euphorbia vermiformis)、ユーフ

オルビア ベルシカラ (Euphorbia versicolor)、ユーフォルビア ビリフェラ (Euphorbia vilifera)、ユーフォルビア ビオラセア (Euphorbia violacea)、ユーフォルビア ホワイティ (Euphorbia whitei)、ユーフォルビア キサンチ エンゲルム (Euphorbia x anti Engelm.)、ユーフォルビア キシロポダ Greenm. (Euphorbia xylopoada Greenm.)、ユーフォルビア ヤヤレシア Urb. (Euphorbia yayalesia Urb.)、ユーフォルビア ヤンガセンシス (Euphorbia yungasensis)、ユーフォルビア ゼラブスチャニカ (Euphorbia zeravschanica) およびユーフォルビア ジンニイフロラ (Euphorbia zinniiflora)。

## 【0046】

シナデニウム属の特に好ましい植物には、シナデニウム グランチイ (Synadenium granii) およびシナデニウム コンパクトム (Synadenium compactum) が含まれる。

10

## 【0047】

モナデニウム属の特に好ましい植物には、モナデニウム ルガルデ (Monadenium lugardae) およびモナデニウム ゲンテリ (Monadenium guentheri) が含まれる。

## 【0048】

エンダデニウム属の好ましい植物はエンダデニウム ゴスウェイレニ (Endadenium gossweilensis) である。

## 【0049】

チャボタイゲキは、イングノールアンゲレートの供給源を提供することに関し、本発明の実施において特に有用である。本明細書における「チャボタイゲキ」またはその略語「E. peplus」への言及は、この植物の様々な変種、株、系統、ハイブリッドまたは派生物ならびにその植物学または園芸学的関連物を含む。さらに、本発明はトウダイグサ科植物全体あるいは樹液もしくは種子または他の繁殖材料を含むその部分を用いて実施してもよい。一般に、用いる種子または繁殖材料のために、植物または小植物をまず繁殖させる必要がある。

20

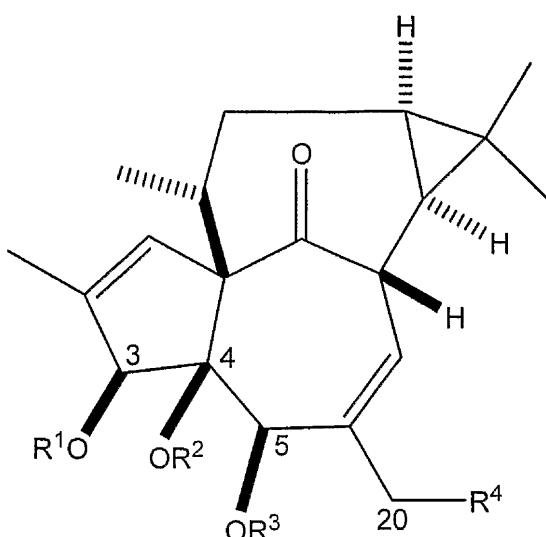
## 【0050】

本明細書におけるトウダイグサ科の植物、トウダイグサ属の植物またはチャボタイゲキへの言及は、遺伝的に改変された植物をさらに含む。遺伝的に改変された植物は、形質転換植物、あるいは形質が除去されたか、または内因性遺伝子配列がダウンレギュレートされた、突然変異した、もしくは特定の遺伝子に調節効果を示す遺伝材料の変更もしくは導入を含む、それ以外の変更を受けた植物を含む。したがって、トウダイグサ科の植物またはトウダイグサ属の植物またはチャボタイゲキに天然に存在する性質を示す植物は、それにもかかわらず、本発明に含まれ、前述の用語の範囲内に含まれる。

30

## 【0051】

本発明の一つの態様において、イングノール化合物は下記の式を有する：



40

$R^1 \sim R^3$  は水素、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいアリールアルキル、 $S(O)_2R'$ 、 $S(O)_2OR'$ 、 $P(O)(OR')_2$  (ここで $R'$ は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル、アリール、またはアリールアルキルである) およびグリコシリルから独立に選択され； $R^4$  は水素、ヒドロキシ、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケノキシ (alkenoxy)、置換されていてもよいアルキノキシ (alkynoxy)、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアリールアルコキシ、 $OS(O)_2R'$ 、 $OS(O)_2OR'$ 、 $OP(O)(OR')_2$  (ここで $R'$ は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル、アリール、またはアリールアルキルである)、およびグリコキシ (glycoxy) から選択される。

10

## 【0052】

本発明の一つの態様において、 $R^1 \sim R^4$  の少なくとも一つは水素ではない。その好ましい形態において、 $R^1$  は水素ではない。

## 【0053】

本発明の一つの特定の態様において、 $R^1$  は置換されていてもよいアシル基  $C(O)-R$  である。そのさらなる態様において、 $R$  は置換されていてもよいアルキル、アルケニルまたはアルキニルである。そのより好ましい態様において、 $R$  は直鎖でも分枝でもよく、6個まで、または10個までの炭素原子を有していてもよい。その一つの態様において、 $R$  は分枝である。

20

## 【0054】

本発明の特定の態様において、 $R^1 \sim R^3$  の一つは下記の式で示すアンゲロイル基であるか、または $R^4$  はO-アンゲロイル基である。そのような化合物は本明細書においてインゲノールアンゲレートと呼ぶ。本発明の特に好ましい態様において、 $R^1$  はアンゲロイル基である。

30

## 【0055】

本発明の特定の態様において、 $R^2$  および $R^3$  の一つまたは両方は水素である。 $R^2$  および $R^3$  はメチレンまたはエチレンジオキシ基を形成してもよい。

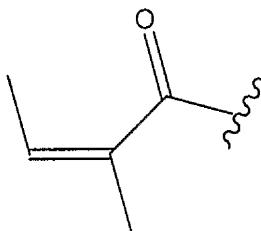
## 【0056】

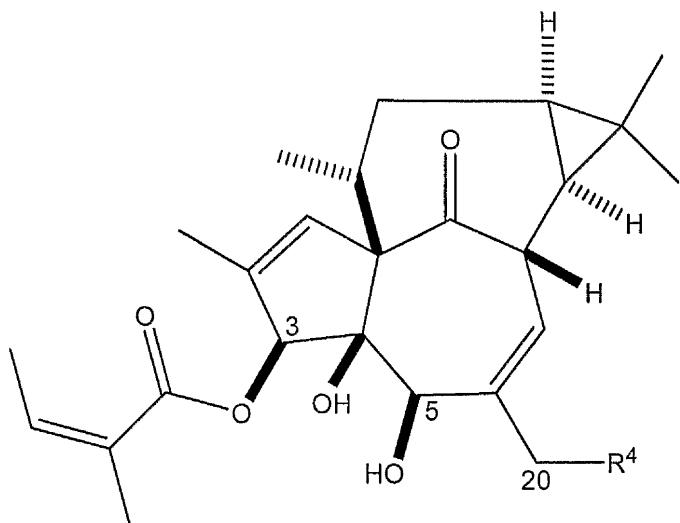
本発明の特定の態様において、 $R^4$  は水素、ヒドロキシまたはアセトキシなどのアシルオキシである。

## 【0057】

本発明の特定の態様において、記載の方法において用いるための化合物はインゲノール-3-アンゲレート、20-O-アセチル-インゲノール-3-アンゲレートおよび20-デオキシ-インゲノール-3-アンゲレート、ならびにその薬学的に許容される塩およびプロドラッグである。

40





10

$R^4 = OH$ 、インゲノール-3-アンジェレート

$R^4 = OAc$ 、20-O-アセチル-インゲノール-3-アンジェレート

$R^4 = H$ 、20-デオキシ-インゲノール-3-アンジェレート

【 0 0 5 8 】

本発明の特定の態様において、化合物はインゲノール-3-アンジェレート（本明細書において「PEP005」とも呼ぶ）である。本明細書における「インゲノール-3-アンジェレート」または「PEP005」への言及は、天然ならびに化学合成体を含む。

20

【 0 0 5 9 】

アルキル化、アルケニル化、アルキニル化、アリールアルキル化またはアシル化をインゲノール化合物に、遊離ヒドロキシ基をアルキル化、アルケニル化、アルキニル化、アリールアルキル化またはアシル化するための合成化学の分野において公知の方法を用いて実施することができる（例えば、Greene and Wutz, 1999; March, 5<sup>th</sup> Edition; Larock, 1999を参照されたく、その全内容は参照により本明細書に組み入れられる）。例えば、ヒドロキシ基をヨウ化メチル（または臭化ベンジル）などのハロゲン化アルキル（またはアリールアルキル）、または硫酸ジメチルもしくはジエチルなどの硫酸ジアルキルを用いて、アルキル化（またはアリールアルキル化）することができる。アシル化は、塩基またはカップリング剤存在下、適当なカルボン酸、酸ハロゲン化物および酸無水物で処理して行うことができる。グリコシド形成は化学的に、例えば、インゲノール化合物を保護糖化合物（ヒドロキシルまたはカルボキシル基とのカップリングのためにC-1がハロゲン化により活性化されており、糖ヒドロキシル基が保護基でブロックされている）と反応させることにより行ってもよい。または、グリコシド形成は、UDP-ガラクトース依存的ガラクトシルトランスフェラーゼおよびUDP-グルコース依存的グリコトランスフェラーゼなどの適当なグリコシルトランスフェラーゼを用いて酵素的に行ってもよい。好ましいC-1連結糖は、糖のC-1（通常の番号づけ）を通じてインゲノールアンジェレート構造に連結してアセチル結合を形成している、フラノースまたはピラノース糖（糖類）置換基である。例示的糖基には、それぞれインゲノール化合物の酸素原子に連結している、グルコース、リボース、アラビノース、キシロース、マンノースおよびガラクトースなどの還元糖が含まれる。

30

【 0 0 6 0 】

硫酸、スルホン酸およびリン酸基は当技術分野において公知の方法により調製することができる。R'の例には水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、フェニルおよびベンジルが含まれる。

40

【 0 0 6 1 】

本明細書において用いられる「アルキル」という用語は、直鎖、分枝または環式アルキル、好ましくはC<sub>1-20</sub>アルキル、例えばC<sub>1-10</sub>またはC<sub>1-6</sub>を意味する。直鎖および分枝アルキルの例には、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、t-

50

ブチル、n-ペンチル、1,2-ジメチルプロピル、1,1-ジメチル-プロピル、ヘキシル、4-メチルベンチル、1-メチルベンチル、2-メチルベンチル、3-メチルベンチル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、1,2,2,-トリメチルプロピル、1,1,2-トリメチルプロピル、ヘプチル、5-メチルヘキシル、1-メチルヘキシル、2,2-ジメチルベンチル、3,3-ジメチルベンチル、4,4-ジメチルベンチル、1,2-ジメチルベンチル、1,3-ジメチルベンチル、1,4-ジメチル-ベンチル、1,2,3-トリメチルブチル、1,1,2-トリメチルブチル、1,1,3-トリメチルブチル、オクチル、6-メチルヘプチル、1-メチルヘプチル、1,1,3,3-テトラメチルブチル、ノニル、1-、2-、3-、4-、5-、6-または7-メチル-オクチル、1-、2-、3-、4-または5-エチルヘプチル、1-、2-または3-プロピルヘキシル、デシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-および8-メチルノニル、1-、2-、3-、4-、5-または6-エチルオクチル、1-、2-、3-または4-プロピルヘプチル、ウンデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-または9-メチルデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-または7-エチルノニル、1-、2-、3-、4-または5-プロピルオクチル、1-、2-または3-ブチルヘプチル、1-ペンチルヘキシル、ドデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-または10-メチルウンデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-または8-エチルデシル、1-、2-、3-、4-、5-または6-プロピルノニル、1-、2-、3-または4-ブチルオクチル、1-2-ペンチルヘプチルなどが含まれる。環式アルキル（「シクロアルキル」とも呼ぶ）の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロベンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシルなどの単環式または多環式アルキル基が含まれる。アルキル基が一般に「プロピル」、「ブチル」などと呼ばれる場合、これは適当な場合には直鎖、分枝および環式異性体のいずれをも意味し得ることが理解されると思われる。アルキル基は本明細書において定義される一つまたは複数の任意の置換基で置換されていてもよい。

## 【0062】

本明細書において用いられる「アルケニル」という用語は、エチレン性 (ethylenically) 一価 (mono)、二価 (di)、または多価不飽和の前述の定義のアルキルまたはシクロアルキル基を含む、少なくとも一つの炭素-炭素二重結合を含む直鎖、分枝または環式炭化水素残基から形成される基、好ましくはC<sub>2-20</sub>アルケニル（例えばC<sub>2-10</sub>またはC<sub>2-6</sub>）を意味する。アルケニルの例には、ビニル、アリル、1-メチルビニル、ブテニル、イソ-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-ペンテニル、シクロベンテニル、1-メチル-シクロペンテニル、1-ヘキセニル、3-ヘキセニル、シクロヘキセニル、1-ヘプテニル、3-ヘプテニル、1-オクテニル、シクロオクテニル、1-ノネニル、2-ノネニル、3-ノネニル、1-デセニル、3-デセニル、1,3-ブタジエニル、1-4,ペンタジエニル、1,3-シクロペンタジエニル、1,3-ヘキサジエニル、1,4-ヘキサジエニル、1,3-シクロヘキサジエニル、1,4-シクロヘキサジエニル、1,3-シクロヘプタジエニル、1,3,5-シクロヘプタトリエニルおよび1,3,5,7-シクロオクタテトラエニルが含まれる。アルケニル基は本明細書において定義される一つまたは複数の任意の置換基で置換されていてもよい。

## 【0063】

本明細書において用いられる「アルキニル」という用語は、エチニ性 (ethynically) 一価、二価、または多価不飽和の前述の定義のアルキルまたはシクロアルキル基を含む、少なくとも一つの炭素-炭素三重結合を含む直鎖、分枝または環式炭化水素残基から形成される基を意味する。炭素原子の数が指定されていないかぎり、この用語は好ましくはC<sub>2-20</sub>アルキニル（例えばC<sub>2-10</sub>またはC<sub>2-6</sub>）を意味する。例には、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、およびブチニル異性体、ならびにペンチニル異性体が含まれる。アルキニル基は本明細書において定義される一つまたは複数の任意の置換基で置換されていてもよい。

## 【0064】

「アリール」という用語は、芳香族炭化水素環系の任意の单一、多核、共役および縮合残基を意味する。アリールの例にはフェニル、ビフェニル、テルフェニル、クアテルフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、アンスラセニル、ジヒドロアンスラセニル、ベ

10

20

30

40

50

ンズアンスラセニル、ジベンズアンスラセニル、フェナンスレニル、フルオレニル、ピレニル、イデニル、アズレニル、クリセニルが含まれる。好ましいアリールにはフェニルおよびナフチルが含まれる。アリール基は本明細書において定義される一つまたは複数の任意の置換基で置換されていてもよい。

【0065】

「アシル」という用語は、基C(O)-R(ここでRは水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキルまたはアリール残基である)を意味する。アシルの例には、ホルミル；アセチル、プロパノイル、ブタノイル、2-メチルプロパノイル、ペントノイル、2,2-ジメチルプロパノイル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイル、ノナノイル、デカノイル、ウンデカノイル、ドデカノイル、トリデカノイル、テトラデカノイル、ペントデカノイル、ヘキサデカノイル、ヘプタデカノイル、オクタデカノイル、ノナデカノイルおよびイコサノイルなどの直鎖または分枝アルカノイル(例えば、C<sub>1-20</sub>)；シクロプロピルカルボニル、シクロブチルカルボニル、シクロペンチルカルボニルおよびシクロヘキシルカルボニルなどのシクロアルキルカルボニル；アンゲノイルなどの直鎖または分枝アルケノイル(例えば、C<sub>2-20</sub>)；ならびにベンゾイル、トルオイルおよびナフトイルなどのアロイルが含まれる。R残基は本明細書に記載のとおりに置換されていてもよい。

【0066】

アリールアルキル基は、本明細書において定義されるアリール基で置換されている、本明細書において定義されるアルキル基である。一つの態様において、アルキル基はアリール基で末端置換されている。アリールアルキルの例には、ベンジル、フェニルエチル、フェニルプロピル、フェニルブチル、フェニルペンチルおよびフェニルヘキシルなどのフェニルC<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキルが含まれる。アルキルおよびアリール基の一方または両方は、本明細書に記載の一つまたは複数の任意の置換基で独立に置換されていてもよい。

【0067】

アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、アリール、およびしたがってアシルの任意の置換基には下記が含まれる：ハロ(クロロ、ブロモ、ヨードおよびフルオロ)、ヒドロキシ、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、C<sub>1-6</sub>アルキル、フェニル、ニトロ、ハロメチル(例えば、トリブロモメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル)、ハロメトキシ(例えば、トリフルオロメトキシ、トリブロモメトキシ)、C(O)C<sub>1-6</sub>アルキル、アミノ(NH<sub>2</sub>)、C<sub>1-6</sub>アルキルアミノ、(例えば、メチルアミノ、エチルアミノおよびプロピルアミノ)ジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ(例えば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノおよびジプロピルアミノ)、CO<sub>2</sub>H、CO<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>アルキル、チオ(SH)およびC<sub>1-6</sub>アルキルチオ。任意の置換基はカルボニル(C=O)基によるCH<sub>2</sub>基の置換も含み、またはメチレンもしくはエチレンジオキシ基でもよい。

【0068】

本発明によって企図されるインゲノール化合物調製のための合成または半合成法の間に、着手した反応または変換条件に対して反応性または感受性であり得る他の官能基を保護することが必要または望ましい可能性があることが理解されると思われる。そのような官能基に適した保護基は当技術分野において公知で、標準の業務に従って用いてもよい。本明細書において用いられる「保護基」という用語は、特定の官能基を一時的に不活性にする、導入された官能基を意味する。そのような保護基ならびにそれらの導入法および後の適当な段階での除去法は周知である(Greene and Wutz, 1999)。

【0069】

本発明はインゲノール化合物のプロドラッグにも関する。インゲノール化合物のプロドラッグである任意の化合物は本発明の目的および精神の範囲内である。「プロドラッグ」という用語はその最も広い意味で用いられ、インビボで酵素または加水分解のいずれかにより本発明の化合物に変換される誘導体を含む。そのような誘導体は当業者には容易に思い起こされ、例えば、遊離ヒドロキシ基がエステルまたは無水物に変換される化合物が含まれる。例えば、エステルプロドラッグを調製するために本発明の化合物をアシル化する方法は、当技術分野において周知で、適当な触媒または塩基存在下、適当なカルボン酸、

10

20

30

40

50

無水物または塩化物での化合物の処理を含んでいてもよい。適当なプロドラッグを選択および調製するための他の通常の方法は当技術分野において公知で、例えば、国際公開公報第00/23419号、Design of Prodrugs, Hans Bundgaard, Ed., Elsevier Science Publishers, 1985、およびThe Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Chapter 8, pp352-401, Academic press, Inc., 1992に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0070】

化合物の適当な薬学的に許容される塩には、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、炭酸、ホウ酸、スルファミン酸、および臭化水素酸などの薬学的に許容される無機酸の塩、または酢酸、プロピオン酸、酪酸、酒石酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フマル酸、マレイン酸、クエン酸、乳酸、粘液酸、グルコン酸、安息香酸、コハク酸、シュウ酸、フェニル酢酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、サリチル酸、スルファニル酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、エデト酸、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、バントテン酸、タンニン酸、アスコルビン酸および吉草酸などの薬学的に許容される有機酸の塩が含まれるが、それらに限定されるわけではない。塩基塩には、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムおよびアルキルアンモニウムなどの薬学的に許容されるカチオンと形成されるものが含まれるが、それらに限定されるわけではない。塩基性窒素含有基は、塩化、臭化およびヨウ化メチル、エチル、プロピル、およびブチルなどのハロゲン化低級アルキル；硫酸ジメチルおよびジエチルなどの硫酸ジアルキルなどの物質により四級化されていてもよい。

10

20

【0071】

本発明の化合物は遊離化合物または溶媒和物（例えば、水の溶媒和物、すなわち水和物、またはアルコールなどの一般的有機溶媒の溶媒和物）のいずれかとしての結晶型であってもよく、いずれの型も本発明の範囲内であることが意図される。溶媒和の方法は当技術分野において一般に公知である。

【0072】

本発明の一つまたは複数の態様において、創傷治癒におけるインゲノール化合物の使用は、一つまたは複数の治癒相の速度、程度、範囲またはかかる時間を都合よく促進または改善し得る。インゲノール化合物は、創傷を治癒することによる美容的転帰の改善、例えば、改善がなければ創傷の治癒に伴うと考えられる瘢痕形成、発赤、皮膚紋理、または色素沈着（色素沈着過剰または低下）のレベルまたは範囲の軽減を得る上でも有用であり得る。特定の態様において、インゲノール化合物は予防的意味、例えば、抗しわ処置として有用であり得る。

30

【0073】

本発明に従って処置し得る対象には、哺乳動物対象：ヒト、靈長類、家畜（ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタおよびヤギを含む）、コンパニオンアニマル（イヌ、ネコ、ウサギ、モルモットを含む）、および捕獲野生動物が含まれる。ウサギ、マウス、ラット、モルモットおよびハムスターなどの実験動物も、都合のよい試験系を提供し得るため、企図される。トリ、両生類、および魚などの非哺乳動物種も、本発明の特定の態様において企図され得る。対象は本明細書において個体、患者、動物またはレシピエントと呼ぶこともある。

40

【0074】

本明細書において用いられる「調節」とは、サイトカイン産生に関して用いる場合、適宜、サイトカイン産生の増大または低減を意味する。好ましい態様において、これはサイトカイン発現または産生の増大、アップレギュレーションまたは増強に関する。皮膚線維芽細胞および/またはケラチノサイトに関して用いる場合、「調節」とは細胞の生存度および増殖、細胞マトリックス結合、ECM再編成、MMP産生、線維芽細胞分化、細胞形態および細胞遊走などの一つまたは複数の表現型応答における変化（適宜、増大または低減）を意味する。

【0075】

調節に有効な量は、望ましい投与法に従って適用または投与した場合に、サイトカイン

50

の產生を所望のレベルまで調節、好ましくはアップレギュレートするのに十分な量である。

【0076】

インゲノール化合物の創傷治癒、美容または機能転帰の改善に有効な量は、望ましい投与法に従って投与または適用した場合に、創傷治癒のための一つもしくは複数の段階もしくは過程を所望の程度まで開始、刺激、増強、強化、加速もしくはそれ以外に促進する、または所望の美容効果もしくは機能転帰を得るのに十分な量である。創傷の処置とは、所望の転帰を得るために、創傷治癒のための一つまたは複数の段階または過程の開始、刺激、増強、強化、加速または促進を行うことを意味する。

【0077】

適當な有効量（用量）および投与法は主治医が決定することができ、処置中の特定の組織型および創傷、創傷の性質および重症度、すなわち、中間層または全層、慢性または急性のいずれか、ならびに対象の全般的年齢、および健康に依存し得る。インゲノール化合物は創傷治癒過程において適當と思われる時点で投与してもよい。したがって、インゲノール化合物は、治癒を促進し、および/または瘢痕形成を低減し、および/または美容を改善するために、創傷が起こった直後もしくはすぐ後、および/または創傷治癒過程の任意のその後の段階で投与してもよい。化合物は、特に瘢痕形成、発赤、肥厚および/または色素沈着過剰もしくは低下を最小化または低減するために、既存の瘢痕組織に投与してもよい。

【0078】

活性成分を1回用量で、または一連の用量で投与してもよい。活性成分を単独で投与することも可能であるが、組成物として、好ましくは一つまたは複数の薬学的に許容される補助剤との薬学的組成物として提供することが好ましい。したがって、本発明は、インゲノール化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグの、サイトカイン産生を調節する、皮膚線維芽細胞および/もしくはケラチノサイトの表現型応答を調節する、創傷治癒を促進する、あるいは創傷における瘢痕組織を低減もしくは最小化する、または美容もしくは機能転帰を改善するための薬剤の製造における使用にも関する。

【0079】

創傷治癒薬剤または組成物はインゲノールアンゲレート化合物を約0.0001重量%から10重量%の量で含み得る。好ましい態様において、組成物はインゲノール化合物を約0.001重量%から約10重量%、例えば、約0.0005、0.001、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.125、0.15、0.2、0.25または0.5%から約0.5、1.0、2.5または5.0%の量で含む。本発明の一つの態様において、インゲノール化合物は約0.001から約1%の量で含まれるインゲノール-3-アンゲレートである。

【0080】

インゲノール化合物は任意の適當な剤形、局所、例えば創傷への局所適用もしくは創傷への注入により、または経口、非経口（皮下、筋肉内、静脈内または皮内を含む）、鼻内、吸入、直腸もしくは腔投与などの全身のいずれかで投与してもよい。

【0081】

本発明の好ましい態様において、インゲノール化合物を投与、すなわち創傷の部位、および任意にその周囲に局所適用する。インゲノール化合物は、液剤、乳剤（水中油、油中水、エアロゾルまたはフォーム）、軟膏、ペースト、ローション、散剤、ゲル、ヒドロゲル、親水コロイドおよびクリームを含む任意の適當な剤形で局所適用してもよい。適當な担体または添加剤には、鉛油、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン、乳化ワックス、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、シクロデキストリン、イソプロピルアルコール、エタノール、ベンジルアルコールおよび水が含まれる。または、インゲノール化合物を活性閉鎖包帯剤の形で、すなわちインゲノール化合物が包帯、ガーゼ、テープ、ネット、絆創膏、フィルム、膜またはパッチなどの包帯剤に含浸またはコーティングされている形で提供してもよい。

10

20

30

40

50

**【 0 0 8 2 】**

本発明の一つの態様において、インゲノール化合物をイソプロピルアルコール系ゲルの形で局所適用する。

**【 0 0 8 3 】**

本明細書において企図される組成物および包帯剤の製剤は当業者には周知で、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing, 1990を参照されたい。組成物は任意の適当な担体、希釈剤または賦形剤を含んでいてもよい。これらにはすべての通常の溶媒、分散媒、充填剤、固体担体、コーティング、抗真菌および抗菌剤、皮膚浸透剤、界面活性剤、等張および吸収剤などが含まれる。本発明によって企図される組成物のための担体は、組成物の他の成分と適合性であり、対象に対して有害でないという意味で、薬学的に許容されなければならない。組成物は単位用量剤形で都合よく提供してもよく、薬学の分野において周知の任意の方法で調製してもよい。そのような方法は、活性成分を一つまたは複数の補助成分を構成する担体と混合する段階を含む。一般に、組成物は活性成分を液体担体もしくは微粒子固体担体または両方と均質かつ密接に混合し、次いで必要があれば生成物を成形することにより調製する。

**【 0 0 8 4 】**

本発明は他の補助的な生物学的または生理的活性物質の使用と共に実施し得ることが理解されると思われる。したがって、本明細書に記載の方法および組成物は、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤、A、C、DおよびEなどのビタミンやそのエステル、ならびに/または本明細書に記載のものなどの成長因子およびサイトカインを含む追加の創傷治癒剤などの、他の生物学的または生理的活性物質と共に用いてもよい。これらの追加物質は、インゲノール化合物と共に組成物もしくは包帯剤に製剤してもよく、または別々に投与してもよい。

**【 0 0 8 5 】**

インゲノール化合物は、生物適合性ポリマーコーティング、含浸またはそれ以外で担持するインゲノール化合物を含む埋込物として提供してもよい。

**【 0 0 8 6 】**

インゲノール化合物は持続（すなわち制御）放出または徐放性の剤形で投与してもよい。持続放出製剤は、活性成分が投与後、対象の体内にゆっくり放出され、所望の薬物濃度を最小限の期間維持するものである。持続放出製剤の調製は当業者には十分に理解されている。

**【 0 0 8 7 】**

経口投与に適した本発明の組成物は、それぞれあらかじめ決められた量の活性成分を含む、カプセル剤、サシェ剤または錠剤などの孤立単位として；散剤または顆粒剤として；水性または非水性の液体中の液剤または懸濁剤（例えば、洗口剤）として；ゲル、軟膏または水中油液体乳剤もしくは油中水液体乳剤として提供してもよい。

**【 0 0 8 8 】**

錠剤は、任意に一つまたは複数の補助成分と共に、圧縮または成形により製造してもよい。圧縮錠は、適当な機械で、粉末または顆粒などの流動性の形の活性成分を、任意に結合剤（例えば、不活性希釈剤）、保存剤崩壊剤（例えば、デンブングリコール酸ナトリウム、架橋ポリビニルピロリドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）界面活性または分散剤と混合して、圧縮することにより調製してもよい。成形錠は、適当な機械で、不活性液体希釈剤で加湿した粉末化合物の混合物を成形することにより調製してもよい。錠剤は任意にコーティングするか、または刻み目を入れてもよく、所望の放出特性を提供するために様々な比率の、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いて、活性成分の徐放または制御放出を提供するために製剤してもよい。錠剤は任意に、胃ではなく腸の一部で放出するために、腸溶コーティングして提供してもよい。

**【 0 0 8 9 】**

直腸投与用の組成物は、例えば、カカオ脂、グリセリン、ゼラチンまたはポリエチレングリコールを含む適当な基剤と共に坐剤として提供してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0090】

腔投与に適した組成物は、活性成分に加えて、当技術分野において適当であることが公知であるような担体を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたは噴霧製剤として提供してもよい。

## 【0091】

非経口投与に適した組成物には、組成物を意図するレシピエントの血液と等張にする、抗酸化剤、緩衝剤、殺菌剤および溶質を含んでいてもよい、水性および非水性等張滅菌注射液；ならびに懸濁化剤および増粘剤を含んでいてもよい、水性および非水性滅菌懸濁剤が含まれる。組成物は単位用量または複数用量の密封容器、例えば、アンプルおよびバイアルで提供してもよく、使用直前に注射用の滅菌液体担体、例えば、水の添加だけを必要とする、凍結乾燥(freeze-dried) (凍結乾燥(Iyophilised))状態で保存してもよい。即時注射液剤および懸濁剤は、前述の種類の滅菌散剤、顆粒剤および錠剤から調製してもよい。

10

## 【0092】

好ましい単位用量組成物は、活性成分の本明細書において前述した1日用量もしくは単位、1日用量以下、またはその適当な画分を含むものである。

## 【0093】

特に前述した活性成分に加えて、本発明の組成物は件の組成物の型に関連する当技術分野において通常の他の物質、例えば、結合剤、甘味料、増粘剤、着香剤崩壊剤、コーティング剤、保存剤、滑沢剤、緩衝剤、抗酸化剤および/または時間遅延剤を含み得ることが理解されるべきである。

20

## 【0094】

本発明の化合物は、獣医学的組成物において用いるために提供してもよい。これらは当技術分野において公知の任意の適当な手段で調製してもよい。そのような組成物の例には下記のために適合させたものが含まれる：

20

(a) 経口投与、外部適用(例えば、水性および非水性液剤または懸濁剤を含む水薬)、飼料と混合するための錠剤、巨丸剤、散剤、顆粒剤、ペレット、舌に塗布するためのペースト；

(b) 非経口投与、例えば、滅菌液剤または懸濁剤としての皮下、筋肉内または静脈内注射；

30

(c) 局所適用、例えば、前述のクリーム、軟膏、ゲル、ローションなど。

## 【0095】

本発明を以下の実施例に関連して記載するが、これらは本発明の特定の態様を例示するために提供するものであって、本明細書において前述した概論を限定する意図はない。

## 【0096】

## 実施例

実施例1：サイトカイン産生に対するPEP005の効果

## 実施例1.1

PEP005処理したヒト細胞によるサイトカイン産生

Me10538細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞および好中球のコンフルエントな培養物をPEP005(1~100ng/ml)非存在下または存在下で6時間インキュベートした。上清を回収し、多重検出キット(Biosource International, Nivelles, Belgium)を用いて、以下のサイトカインの存在について分析した；TNF- $\alpha$ 、IL-6およびIL-8。結果を表1に示す。検出したタンパク質の単位はpg/mlである。

40

## 【0097】

(表1.1)インビトロでのヒト細胞における炎症誘発性サイトカインの誘導

PEP005 ng/ml	ケラチノサイト				角錐芽細胞				黑色腫				好中球
	IL-8	TNF $\alpha$	IL-6	IL-8	TNF $\alpha$	IL-6	IL-8	TNF $\alpha$	IL-6	IL-8	TNF $\alpha$	IL-6	
0	995±48	8±1	ND	20±1	ND	76±6	4±0.3	ND	ND	644±271	ND	ND	ND
1	3910±148	510±26	ND	79±3	ND	81±4	<2	ND	ND	7089±1293	ND	ND	ND
5	4775±178	847±37	ND	160±14	ND	85±4	210±6	ND	ND	nt	ND	ND	ND
10	3895±198	498±29	ND	215±12	ND	141±6	737±26	ND	ND	2241±684	ND	ND	ND
100	2950±108	335±21	ND	239±9	ND	205±5	390±18	ND	ND	617±52	ND	ND	ND

細胞を表示の濃度のPEP005と共に6時間インキュベートし、上清を表示のサイトカインについて分析した。（ND-検出不可。nt-未試験）。検出したタンパク質の単位はpg/mlであ

る。

【 0 0 9 8 】

実施例1.2

0.05%PEP005を含むイソプロピルアルコールゲルまたはプラシーボゲルを、光線性角化症傷害を有する患者に局所適用した。ゲル（活性またはプラシーボ）適用の前と3ヶ月後に、患者の皮膚のきめを臨床的に評価した。ゲル（活性またはプラシーボ）適用の3ヶ月後、患者の皮膚紋理、皮膚の組織沈着過剰および皮膚の組織沈着低下を臨床的に評価した。結果を表1.2および1.3に示し、これらは皮膚のきめの改善、悪化もしくは無変化、または皮膚紋理、色素沈着過剰もしくは色素沈着低下の有無を示す患者の数またはパーセンテージを示す。データから、0.05%PEP005ゲル（プラシーボに比べて）の適用により、皮膚のきめが改善されることが判明した。データから、0.05%PEP005ゲル（プラシーボに比べて）の適用により、薬物適用の3ヶ月後に皮膚紋理を有する患者数が減ることも明らかとなった。さらに、データから、0.05%PEP005ゲル（プラシーボに比べて）の適用により、薬物適用の3ヶ月後に皮膚の色素沈着過剰または色素沈着低下を引き起こさないことが明らかとなった。

【 0 0 9 9 】

（表1.2）光線性角化症の第IIa相臨床試験における0.05%PEP005局所ゲルの創傷治癒および美容効果（患者数）

		皮膚のきめ		皮膚紋理		瘢痕		色素沈着低下		色素沈着過剰	
		改善	悪化	無変化	無	有	無	有	無	有	無
プラシードゲル	5	0	7	1	11	0	12	0	12	0	0
0.05%PEP005局所ゲル	10	0	5	6	9	0	15	0	13	0	15

【 0 1 0 0 】

(表1.3) 光線性角化症の第IIa相臨床試験における0.05%PEP005局所ゲルの創傷治癒および美容効果(患者パーセント)

10

20

30

40

	皮膚のきめ		皮膚紋理		瘢痕		色素沈着低下		色素沈着過剰		
	改善	悪化	無変化	無	有	無	有	無	有	無	
プラシーボゲル	41.7%	0.0%	58.3%	8.3%	91.7%	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%
0.05%PEP005局所ゲル	66.7%	0.0%	33.3%	40.0%	60.0%	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%

【 0 1 0 1 】

実施例1.3

材料と方法

化合物

PEP005は乾燥粉末として提供された。23.55mMの保存溶液をDMSO中で調製し、一定量を - 50

10

20

30

40

20 で保存した。保存溶液の一定量を使用当日に解凍し、投与前および投与中は室温で保存した。中間希釈段階をDMEM細胞培養培地を用いて行った。

#### 【0102】

##### PBMCの単離

PBMCの単離のために、新しく採取し、抗凝固剤としてLi-ヘパリン処理したヒト血液を用いた。細胞を3倍量のCliniMACS PBS/EDTA Buffer (Miltenyi, Bergisch Gladbach) で希釈し、コニカルチューブ内のFicollPaque (Amersham Biosciences, Freiburg) 上に注意深く重層し、水平ローター内、20 、400×gで40分間、ブレーキなしで遠心分離した。界面の単核球層を乱さずに上層を吸引した。界面の細胞（リンパ球、単球および血小板）を新しいコニカルチューブに注意深く移した。コニカルチューブにCliniMACS PBS/EDTA Bufferを満たし、20 、300×gで10分間遠心分離した。上清を完全に除去した。血小板除去のために、細胞ペレットを緩衝液（50ml）に再懸濁し、20 、200×gで10分間遠心分離した。上清を完全に除去し、最後の洗浄段階を繰り返した。細胞をDMEMMedium (Invitrogen, Karlsruhe) に再懸濁し、Neubauer血球計数器で計数した。

#### 【0103】

##### PBMCの刺激

PBMCの刺激のために、96穴プレートでウェル毎に250.000細胞を播種した。3名の異なる健常ドナーのPBMCを、3つの異なる濃度（1、10および100nM）のPEP005またはLPS 1 μg/ml (Linaris, Wertheim-Bettingen)、PMA 10ng/ml (Sigma, Deisenhofen) およびイオノマイシン1 μg/ml (Sigma, Deisenhofen) でそれぞれ刺激した。細胞を加湿雰囲気、37 および5%CO<sup>2</sup>で24時間インキュベートした。

#### 【0104】

##### ビーズ懸濁液アッセイ

典型的ビーズ懸濁液アッセイにおいて、サイトカインをビーズ結合抗体で上清から捕捉する。サンドイッチ免疫アッセイを完了するために、サイトカインを二次抗体で定量する。サイトカイン濃度を各サイトカインの標準曲線を用いて算出する。

#### 【0105】

BioRad BioPlex Systemを製造者の指示に従って用い、PBMCの上清中でサイトカインIL-1 、IL-2、IL-6、IL-8およびTNF- を定量した。すべての試料を二重に測定した。検出したタンパク質の単位はすべてpg/mlである。

#### 【0106】

##### PBMCの生存度の検証

サイトカインを含む上清を除去した後、PBMCをフローサイトメトリーで生存度について試験した。ヨウ化プロピジウム染色溶液（0,1 μg/1×10<sup>6</sup>細胞の試験）を用いて死滅細胞の量をもとめた。非刺激PBMCを陰性対照に用いた。

#### 【0107】

##### 結果

##### サイトカイン産生

PEP005の免疫刺激効果を調べるために、3名の異なる健常ドナーからのPBMCを1、10および100nMの濃度のPEP005に24時間曝露した。IL-1 、IL-2、IL-6、IL-8およびTNF- の上清中への分泌を、ビーズ懸濁液アッセイによりフローサイトメトリーで定量した。結果を表1.4～1.8に示す。

#### 【0108】

（表1.4）1、10および100nMの濃度のPEP005と24時間インキュベートした後のドナーGK、AWおよびHLからのPBMCによるIL-1 産生

	媒体対照	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
ドナー: GK	0	94.49	61.62	0
ドナー: AW	0	314.73	173.33	10.92
ドナー: HL	0	125.17	98.04	11.76

検出したIL-1の単位はpg/mlである。

【0109】

10

(表1.5) 1、10および100nMの濃度のPEP005Bと24時間インキュベートした後のドナーGK、AWおよびHLからのPBMCによるIL-2産生

	媒体対照	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
ドナー: GK	0	82.68	60.3	10.56
ドナー: AW	0	54.61	31.53	2
ドナー: HL	0	17.86	19.47	12.84

検出したIL-2の単位はpg/mlである。

1nM PEP005で、3名のドナーからのPBMC上清中、約20から80倍（平均：約50倍）のIL-2レベル上昇が観察された。

【0110】

20

(表1.6) 1、10および100nMの濃度のPEP005Bと24時間インキュベートした後のドナーGK、AWおよびHLからのPBMCによるIL-6産生

	媒体対照	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
ドナー: GK	68.69	320.61	216.09	0
ドナー: AW	30.71	131.46	61.66	0
ドナー: HL	11.88	69.48	73.97	95.43

検出したIL-6の単位はpg/mlである。

1nMのPEP005はPBMC上清中、約4から6倍のIL-6レベル上昇を引き起こした（PBMC上清中、ほぼ9倍のIL-6レベル上昇）。

【0111】

30

(表1.7) 1、10および100nMの濃度のPEP005と24時間インキュベートした後のドナーGK、AWおよびHLからのPBMCによるIL-8産生

40

	媒体対照	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
ドナー: GK	4834.48	13652.6	9418.94	52.77
ドナー: AW	7642.56	28029.68	11438.34	205.36
ドナー: HL	2535.39	12148.42	18220.74	217.52

検出したIL-8の単位はpg/mlである。

PBMC上清中のIL-8レベルは、1nMのPEP005に曝露後、3から5倍上昇した。多くの異なる細

50

胞（例えば、単球/マクロファージ、T細胞、好中球、線維芽細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、肝細胞、星状細胞および軟骨細胞）がIL-8産生可能である。

【0112】

（表1.8）1、10および100nMの濃度のPEP005と24時間インキュベートした後のドナーGK、AWおよびHLからのPBMCによるTNF- $\alpha$ 産生

	媒体対照	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
ドナー: GK	0	148.42	76.14	19.44
ドナー: AW	0	130.99	73.48	12.93
ドナー: HL	0	90.72	71.6	35.75

検出したIL-1 $\alpha$ の単位はpg/mlである。

PEP005とのインキュベーション後に、高レベルのサイトカインTNF- $\alpha$ が3名のドナー全員のPBMC上清中で検出された。TNF- $\alpha$ レベルは約120nM (1nMのPEP005で刺激) から70nM (10nMのPEP005)、20nM (100nMのPEP005)までの範囲であった。媒体のみに曝露したPBMC上清中では有意なTNF- $\alpha$ レベルは検出されなかった。

【0113】

実施例2：皮膚線維芽細胞およびケラチノサイトの表現型および創傷治癒応答の調節に対するPEP005の効果

材料と方法

皮膚線維芽細胞培養

Oral Surgery Clinic, School of Dentistry, Wales College of Medicine, Cardiffに来院した個人から、正常な成人の皮膚生検 (6mm) を告知に基づく同意の下に得た (n=1)。局所麻酔薬適用後、皮膚生検を採取し、試料の酵素分解後に、成人皮膚線維芽細胞培養物を単一細胞懸濁技術により樹立した。この技術は以前から、インビトロで口腔および皮膚の両方の線維芽細胞の生存一次培養物を樹立するために確実に用いられてきた (Cook et al, 2000; Stephens et al, 2001; 2003)。皮膚線維芽細胞を、L-グルタミン (2mM) 、抗生物質 (ペニシリンGナトリウム100U/ml、硫酸ストレプトマイシン100mg/mlおよびアンホテリシンB 0.25  $\mu$ g/ml) および10%ウシ胎仔血清 (すべてInvitrogen Ltd., Paisley, U.K. から購入) を補足したダルベッコ変形イーグル培地 (DMEM) を含む線維芽細胞-血清含有培地の中で培養した。皮膚線維芽細胞培養物を37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、2~3日毎に培地を交換して維持した。すべての実験で、皮膚線維芽細胞を継代培養7~17回の間に用いた。

【0114】

ケラチノサイト細胞培養

ヒト成人表皮ケラチノサイトをCascade Biologies Inc., Nottinghamshire, U.K.から凍結保存状態で購入した。これらの細胞 (500,000生存細胞/バイアル) は試験により>70%生存で、少なくとも16回集団倍加する増殖能力を有していた。表皮ケラチノサイトを、抗生物質 (ペニシリンGナトリウム100U/ml、硫酸ストレプトマイシン100mg/mlおよびアンホテリシンB 0.25  $\mu$ g/ml) およびEpiLife(登録商標) Defined Growth Supplement (EDG S、精製ウシ血清アルブミン、精製ウシ転移、ヒドロコルチゾン、組換えヒトインスリン様成長因子-1、プロスタグランジンE2および組換えヒト表皮成長因子からなる、Cascade Biologies Inc.) を補足した無血清のEpiLife(登録商標) Medium (Cascade Biologies Inc.) 中で培養した。表皮ケラチノサイト培養物を37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、2~3日毎に培地を交換して維持した。すべての実験で、表皮ケラチノサイトを継代培養4~6回の間に用いた。

【0115】

PEP005の調製

10

20

30

40

50

PEP005はPeplin Limited, Brisbane, Australiaから20mgバッチで提供を受け、4で保存した。必要がある場合には、PEP005をジメチルスルホキシド(DMSO、>99.9%、Sigma Chemical Co., Dorset, U.K.)に10mg/mlの濃度で可溶化した。溶液を5分間または溶液が澄明になるまで混合し、PEP005/DMSO保存溶液を4で保存し、この条件で数ヶ月間安定であった。

#### 【0116】

使用前に、PEP005/DMSO保存溶液を4の保存庫から取り出し、室温に戻した。必要な量のPEP005/DMSOをポリ-プロピレン容器に分注し、線維芽細胞-血清含有培地(皮膚線維芽細胞培養物)または無血清のEpiLife(登録商標)Medium(表皮ケラチノサイト培養物)中でPEP005/DMSOを必要な濃度に希釈した(典型的には0.01μg/ml、0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/mlおよび100μg/ml)が、溶液の安定性のために、新鮮PEP005/培地溶液を、前述の様々な濃度で毎日調製した。PEP005/培地溶液を廃棄する前に、少なくとも二倍量の95%エタノール/5%メタノール(いずれもFisher Scientific, Leicestershire, U.K.から)中の0.1%水酸化ナトリウム(Sigma Chemical Co.)を各溶液に加えて除染した。

10

#### 【0117】

##### 皮膚線維芽細胞/ケラチノサイトの生存度および増殖の評価

皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト細胞生存度および増殖の評価のために、Cook et al (2000)に従ってMTT[臭化3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム]色素還元アッセイを用いた。トリプシン処理後、皮膚線維芽細胞または表皮ケラチノサイトを96穴マイクロタイタープレート(VWR International Ltd., Leicestershire, U.K.)に、それぞれ細胞密度 $2.5 \times 10^3$ 細胞/ウェルおよび $5 \times 10^3$ 細胞/ウェルで播種した。それぞれ細胞播種24時間および48時間後、皮膚線維芽細胞または表皮ケラチノサイト培地を、0、0.01μg/ml、0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/mlまたは100μg/mlPEP005を含む培地(100μl/ウェル)で置き換えた(PEP005の濃度ごとに6つの培養ウェル)。皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト培養物を37、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、それぞれ7および3日まで、それぞれのPEP005含有培地を2日おきに交換して維持した。下記を含む様々な対照(対照ごとに6つの培養ウェル)も、96穴マイクロタイタープレート中、各時点で樹立した:(i)皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト培地単独(無細胞)、(ii)1%DMSOを含む培地中の皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト、(iii)0.1%DMSOを含む培地中の皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト、(iv)0.01%DMSOを含む培地中の皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト、および(v)0.001%DMSOを含む培地中の皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト。

20

30

30

#### 【0118】

第1、3、5および7日に、滅菌MTT(PBS中5mg/mlのMTT溶液25μl、Sigma Chemical Co.)を各ウェル内の対応する培地に加え、96穴マイクロタイタープレートを37、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、4時間維持した。0.5M N,N-ジメチルホルムアミド(Sigma Chemical Co.)中の10%ドデシル硫酸ナトリウム( SDS、Sigma Chemical Co.)からなる抽出緩衝液(100μl)を各ウェルに加え、96穴マイクロタイタープレートを37、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、4時間維持した。各ウェルの吸光度の値を、Bio-Tek Instruments Microplate Autoreader EL311(Fisher Scientific)を用い、540nmで分光光度的に読み取った。各実験は3つ別々に行った。

40

#### 【0119】

##### 皮膚線維芽細胞/ケラチノサイトの細胞外マトリックス接着の評価

I型コラーゲンおよびフィブロネクチンへの皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイトの細胞接着を、Cook et al (2000)およびStephens et al (2004)に従って実施した。96穴マイクロタイタープレートのウェルに40μg/mlのラット尾腱I型コラーゲン(Sigma Chemical Co.)または40μg/mlの血漿フィブロネクチン(Sigma Chemical Co.)を加え、4で終夜インキュベートした。非特異的結合を、1%ウシ血清アルブミン(Sigma Chemical Co.)と共に4で4時間インキュベートすることによりブロックした。トリプシン処理後、0、0.01μg/ml、0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/mlまたは100μg/mlPEP005を含む無血清培地

50

中の皮膚線維芽細胞または表皮ケラチノサイトの細胞懸濁液 (100  $\mu$ l) を、いずれも96穴マイクロタイタープレートのウェルに、細胞密度 $2.5 \times 10^4$ 細胞/ウェルで播種した (PEP005の濃度ごとに6つの培養ウェル)。96穴マイクロタイタープレートを37℃、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、1時間または3時間維持した後、接着していない細胞を吸引により除去した。残った接着皮膚線維芽細胞または表皮ケラチノサイトをPBS (100  $\mu$ l) で洗浄し (×2)、70%エタノール (100  $\mu$ l、Fisher Scientific) 中で15分間固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液 (Sigma Chemical Co.) で25分間染色した。過剰のクリスタルバイオレットを二回蒸留水で洗浄 (×5) して除去し、残った染料を0.2%トリトンX-100溶液 (25  $\mu$ l、Sigma Chemical Co.) 中に可溶化した。下記を含む様々な対照 (対照ごとに6つの培養ウェル) も、96穴マイクロタイタープレート中、各時点で樹立した：(i) I型コラーゲンまたはフィブロネクチン存在下、皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト培地単独 (無細胞)、(ii) ウシ血清アルブミン存在下、皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト培地単独 (無細胞)、(iii) I型コラーゲン/ウシ血清アルブミンまたはフィブロネクチン/ウシ血清アルブミン存在下、皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト培地単独 (無細胞)、(iv) ウシ血清アルブミン存在下、培地中の皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト、(v) I型コラーゲンまたはフィブロネクチン存在下および非存在下、1%DMSOを含む培地中の皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト、および(vi) I型コラーゲンまたはフィブロネクチン存在下および非存在下、0.1%DMSOを含む培地中の皮膚線維芽細胞および表皮ケラチノサイト。各ウェルの吸光度の値を、Bio-Tek Instruments Microplate Autoreader EL311を用い、540nmで分光光度的に読み取った。各実験は3つ別々を行い、得られた吸光度は各試料群の平均で表している。

#### 【0120】

皮膚線維芽細胞の細胞外マトリックス再編成およびマトリックスメタロプロテイナーゼ産生の評価

線維芽細胞がPEP005存在下でそのECM環境をリモデル/再編成する能力を、Cook et al (2000)に従って線維芽細胞保持コラーゲン格子 (FPCL) により調べた。トリプシン処理後、皮膚線維芽細胞を10%無ゼラチナーゼウシ胎仔血清 (ゼラチン-Aセファロースカラム、GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, U.K.を用いて調製) を含む線維芽細胞-血清含有培地中に懸濁し、内因性MMP-2およびMMP-9活性を除去した。皮膚線維芽細胞 (5 × 10<sup>5</sup>細胞 /750  $\mu$ l無ゼラチナーゼ線維芽細胞-血清含有培地中) を、3mlの2 × DMEM、無ゼラチナーゼウシ胎仔血清 (750  $\mu$ l)、0.1M水酸化ナトリウム (750  $\mu$ l)、1.7mg/mlラット尾腱I型コラーゲン (225.0  $\mu$ l、Rowling et al, 1990に従って調製) およびPEP005 (0、0.01  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/mlまたは100  $\mu$ g/ml PEP005) を全量7.5mlで含む、53mm微生物研究用培養皿 (VWR International Ltd.) に加えた (PEP005の濃度ごとに3つのFPCL)。下記を含む様々な対照 (対照ごとに3つのFPCL) も樹立した：(i) 線維芽細胞-血清含有培地単独 (無細胞)、および(ii) 1%DMSOを含む線維芽細胞-血清含有培地中の細胞。コラーゲンの重合が起こるように、FPCLを37℃、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、1時間維持し、次いでFPCLをプレートの端からはがし、10%無ゼラチナーゼウシ胎仔血清を含む、無PEP005線維芽細胞-血清含有培地2mlに再懸濁した。FPCLを37℃、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、14日間、培地を毎日交換して維持した。ECM再編成/格子収縮の程度を、最初の作成後1、2、3、4、5、6、7、10および14日の時点で3つの重複試料それぞれについて実施した3つの別々の格子直径測定値から定量した。これらの時点でのMMP産生および活性を分析するために、0、0.01  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/mlまたは100  $\mu$ g/ml PEP005存在下、個々のFPCLそれぞれから格子周辺のFPCL馴化培地も回収した。

#### 【0121】

FPLC系で細胞により産生された前駆体および活性MMP種の相対量を定量するために、ゼラチン酵素電気泳動法をCook et al (2000)に従って用いた。等しい量 (15  $\mu$ l) のFPLC馴化培地を、Mini-Protean 3 Gel Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories Ltd.) に組み込んだ成型済みの10%ゼラチン酵素電気泳動ゲル (Ready Gel 10% Gelatin Zymogram Gels, Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire, U.K.) 上、15mAで4~5時間の

10

20

30

40

50

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけた。SDSを、2.5%トリトンX-100溶液 (Sigma Chemical Co.) に室温で1時間浸漬することにより除去した。MMPを、5mM塩化カルシウム (Sigma Chemical Co.) 、25mM塩化ナトリウム (Fisher Scientific) および5%Brij 35 (Sigma Chemical Co.) を含む25mMトリス-HCl緩衝液 (pH7.6) 中、37℃で終夜インキュベートすることにより活性化した。ゲルをクーマシープルー (0.05%クーマシープルー、Sigma Chemical Co./12%酢酸および54%メタノール、いずれもFisher Scientific) で染色し、7.5%酢酸および5%メタノール中で脱染し、ゲル画像をGS-690 Imaging DensitometerおよびImage Analysis Software (Bio-Rad Laboratories Ltd.) を用いて取り込んだ。MMP同定をMMP-2標準 (Cook et al, 2000) に匹敵する分子量の明確なバンド出現により確認した。

10

#### 【0122】

各実験を2つ別々に行い、得られた格子収縮の低下%およびMMP濃度測定値を各試料群の平均で表している。

#### 【0123】

##### 皮膚線維芽細胞分化の評価

皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に対するPEP005の効果を、TGF- $\beta$ で刺激した後、分化中の皮膚線維芽細胞による $\alpha$ -平滑筋アクチン発現の程度により調べた。トリプシン処理後、皮膚線維芽細胞を10%ウシ胎仔血清を含む線維芽細胞-血清含有培地に細胞密度 $2.5 \times 10^4$ 細胞/mlで再懸濁した。一定量 (250  $\mu$ l/ウェル) の皮膚線維芽細胞懸濁液を8穴チャンバースライド (VWR International Ltd.) に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、約30~40%コンフルエントになるまで維持した。この段階で、線維芽細胞-血清含有培地を、10ng/ml TGF- $\beta$ 1および0、0.01  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/mlまたは100  $\mu$ g/ml PEP005を含む培地 (250  $\mu$ l/ウェル) に置き換えた (PEP005の濃度ごとに3つのチャンバースライドウェル)。下記を含む様々な対照 (対照ごとに3つのチャンバースライド) も樹立した：(i) 線維芽細胞-血清含有培地単独、(ii) 線維芽細胞-血清含有培地中の細胞 (サイトケラチンまたはビメンチン1°Ab対照)、(iii) 10ng/ml TGF- $\beta$ および1%DMSOを含む線維芽細胞-血清含有培地中の細胞、および(iv) 1%DMSOを含む線維芽細胞-血清含有培地中の細胞。

20

#### 【0124】

チャンバースライドを37℃、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気下で、3日間維持し、その時点までに細胞は約75%コンフルエンスに達した。チャンバースライドを1:1氷冷アセトン:メタノール (300  $\mu$ l/ウェル) 中で20分間固定し、PBS中1%BSAにより、4℃で1時間ブロックした。チャンバースライドをPBS中0.1%BSAで洗浄 ( $\times 2$ ) し、以下の一次抗体の一つと共にインキュベートした：(i) モノクローナル、マウス抗ヒト $\alpha$ -平滑筋アクチン一次抗体 (洗浄緩衝液中1:30、250  $\mu$ l/ウェル、Sigma Chemical Co.)、(ii) モノクローナル、マウス抗ヒトサイトケラチンIgG1一次抗体 (洗浄緩衝液中1:30、250  $\mu$ l/ウェル、DakoCytomation Ltd., Cambridgeshire, U.K.)、または(iii) モノクローナル、マウス抗ヒトビメンチンIgG1一次抗体 (洗浄緩衝液中1:30、250  $\mu$ l/ウェル、DakoCytomation Ltd.)。チャンバースライドを一次抗体中、室温で2時間インキュベートし、PBS中0.1%BSAで洗浄 ( $\times 3$ ) し、FITC結合したポリクローナル、ウサギ抗マウスIgG二次抗体 (洗浄緩衝液中1:50、250  $\mu$ l/ウェル、DakoCytomation Ltd.) と共に、室温で遮光下、1時間インキュベートした。チャンバースライドをPBS中0.1%BSAで洗浄 ( $\times 3$ ) し、チャンバーを取り除いてスライドをVectashield(登録商標) Mounting Medium (Vector Laboratories Ltd., Cambridgeshire, U.K.) で封入し、蛍光顕微鏡 (Leica Leitz Dialux 20EB蛍光顕微鏡、Leica Microsystems U.K. Ltd., Buckinghamshire, U.K.) によりデジタル画像を $\times 250$ の倍率で取り込んで評価した。各実験を2つ別々に行った。

40

#### 【0125】

##### 結果

##### 皮膚線維芽細胞/ケラチノサイトの生存度および増殖の評価

皮膚線維芽細胞の無能/増殖について得られた平均値より、PEP005は未処理線維芽細胞

50

対照に比べて100 μg/mlの濃度で皮膚線維芽細胞ケラチノサイトに対する細胞毒性効果を有することが判明した。

#### 【0126】

しかし、10 μg/mlの濃度では、PEP005は第1、3および5日に刺激効果を有すると思われた。加えて、第7日までに、0.01 μg/mlおよび0.1 μg/ml濃度は細胞の生存度および増殖を刺激すると思われた。

#### 【0127】

皮膚線維芽細胞/ケラチノサイトの細胞外マトリックス接着の評価

I型コラーゲンおよび血漿フィブロネクチンへの表皮ケラチノサイト接着により、PEP05は0.01～10 μg/ml濃度でI型コラーゲンへの細胞接着の有意な用量依存的刺激を示すことが判明した。血漿フィブロネクチンへの表皮ケラチノサイト接着の刺激の可能性に対する同様の傾向も1～10 μg/mlで明らかであった。

10

#### 【0128】

皮膚線維芽細胞の細胞外マトリックス再編成およびマトリックスメタロプロテイナーゼ産生の評価

I型コラーゲン格子収縮は0.1 μg/ml PEP005で有意に増大した。前駆体および活性MMP-2レベルは0.01～0.1 μg/mlのPEP005濃度で上昇が観察された。

#### 【0129】

皮膚線維芽細胞分化の評価

皮膚線維芽細胞は、TGF-1非存在下であるが、1 μg/mlおよび10 μg/ml PEP005存在下で、検出可能な-平滑筋アクチン微小纖維を示した。

20

#### 【0130】

実施例3：創傷治癒パラメーターに対するPEP005の影響の評価

#### 材料と方法

##### PEP005の調製

PEP005はPeplin Limited, Brisbane, AustraliaからDMSO/イソプロパノールゲル中の0.01% (100 μg/ml)、0.028% (280 μg/ml) および0.05% (500 μg/ml) 製剤として提供を受けた。PEP005を含まないDMSO/イソプロパノール担体ゲルも媒体対照として用いるために供給を受けた。PEP005および媒体ゲルを4℃で保存し、この条件で数ヶ月間安定であった。

30

#### 【0131】

##### ラット切創治癒モデル

最小限の新組織生成を含む、急性(外科的)切創の修復に対するPEP005の効果を調べるために、ラット全層切創治癒モデルを用いた。

#### 【0132】

##### 動物管理

約8～10週齢で体重250～300gの成獣雄Sprague Dawleyラット(Harlan U.K. Ltd., Oxfordshire, U.K.)を本試験で用いた。動物を最初は1ケージ(ケージ寸法40×25×20cm、おがくず床敷き、1週間に2回交換)に4匹までの群で、23℃の周囲温度、12時間明暗周期で維持する環境下、英国内務省の法律に従って飼育した。動物には飼料(標準齧歯類飼料)および水を適宜提供した。実験前に、動物をその周囲環境に馴化させるために少なくとも1週間、床敷きを新しくし、飼料および水を補充提供する以外は、妨害なしに飼育した。創傷後、動物を個別飼育条件下で、処置から完全に回復するまでモニターした。次いで、動物を2週間(すなわち、創傷が完全に再上皮化するまで)個別に維持した。この最初の2週間の後、試験の残り期間は動物を4匹までの群で維持した。すべての動物処置は、英国内務省ライセンス(PPL: 40/2650; PIL: 70/4934およびPIL: 60/7661)の下、内務省認可施設で実施した。

40

#### 【0133】

##### 全層切創の作成

以前の抗瘢痕形成試験(サイトカイン阻害剤およびサイトカインに対する中和抗体を試

50

験)は、1匹の動物の複数の(切開)創傷を用い、それぞれの創傷に異なる処置を施与する傾向にあった。過去に用いられ、認められているため、全層切創治癒に対するPEP005の効果を評価するために、この多切創モデルを最良のモデルとして選択し、齧歯類で公知の尾頭差を許容するため、動物間で処置を交替した。

【0134】

動物をハロタンおよび空気を用いて麻酔し、各ラットの背を剪毛し、殺菌剤、グルコン酸クロルヘキシジン(0.05%水溶液)で洗浄した。4つの全層切創(長さ1cm、皮筋層および皮下組織を含む)を各動物の背に作成した。創傷は、創傷内に肉芽組織の形成を可能にするため、未縫合のまま(開いたまま)にした。創傷(第0日)後、4つのPEP005濃度(PEP005なし、DMSO/イソプロパノール媒体、0.01%、0.028%または0.05%PEP005)の一つを各創傷に適用し、一方で未処置創傷対照は処置しないままであった。各動物群を表2.1に従い、それぞれの実験/収集期間を通して維持した。

10

【0135】

(表2.1)4週間および12週間樹立した実験群(創傷引っ張り強度分析および瘢痕組織の質評価)

20

群	処置	群名	複製創傷の数	
			第4週	第12週
1	PEP005-ナイーブ、媒体処置	N-V	10	12
2	PEP005-ナイーブ、処置なし	N-NT	10	12
3	PEP005-曝露、媒体処置	媒体	10	10
4	PEP005 [0.01%]	PEP-0.01	10	10
5	PEP005 [0.028%]	PEP-0.028	10	10
6	PEP005 [0.05%]	PEP-0.05	10	10

30

【0136】

切創部位へのPEP005および媒体の適用

損傷の直後、0.01%、0.028%PEP005、またはDMSO/イソプロパノール媒体ゲルの1回処置を10μl/100mm<sup>2</sup>(それぞれ1μg/10μl、2.8μg/10μlおよび5μg/10μlPEP005)の量で各創傷周囲の辺縁部皮膚に適用し、処置を行う辺縁部皮膚の全面積は600mm<sup>2</sup>となった。ゲルをポジティブディスプレイメント式ピペットを用いて適用し、創傷内に製剤を直接入れないよう注意しながら、滅菌スパチュラを用いて処置領域全体に均等に拡げた。適用後、ゲルを10分間乾燥させた。動物がその創傷に触るのを防ぐために、各創傷を乾燥滅菌ガーゼ(Release(登録商標), Johnson & Johnson Wound Management Ltd., North Yorkshire, U.K.)を用いて覆い、Millipore(登録商標)テープ(3M UK plc, Berkshire, U.K.)で固定した。各動物がガーゼを取らないよう、エリザベスカラーも装着した。ガーゼを創傷後3日間付けたままにした。ラットをそれぞれの実験群で1、4および12週間維持し、その時点で各群の動物を安樂死させ、創傷および創傷周囲組織の状態(生存度、紅斑、浮腫などについて)を表2.1に従い、すべての評価点でモニターした。試験期間を通して動物の秤量も行い、PEP005曝露が実験動物の全身の健康/状態に有害作用を有するかどうかを調べた。

40

【0137】

50

## 安楽死、組織/試料収集および処理 収集(第4および第12週)

創傷組織および正常な辺縁部皮膚を摘出し、創傷/瘢痕を含む3mmの細片1つを二枚刃器具を用いて各創傷から切り出した。次いで、張力測定分析まで、組織片を食塩水で湿らせた外科用ガーゼ(Topper(登録商標), Johnson & Johnson Wound Management)中、4で保存した。残りの創傷組織を10%ホルマリン中で固定し、処理してパラフィンワックスに包埋した。横断切片(6μm)を取り、ヘマトキシリン-エオシン(通常の組織学的評価用)およびマロリー染色(マトリックス配向分析用)の両方で染色した。

### 【0138】

#### 創傷強度の張力測定評価(第4および第12週)

創傷強度は損傷後の時間に伴って増大し、したがって創傷成熟の尺度である。創傷破壊強度を、第4週創傷の張力測定分析のためには5.0キログラム重(kgf)および第12週創傷の張力測定分析のためには50.0キログラム重(kgf)の最大読み値となるようあらかじめ較正したInstron Tensiometer(Instron Ltd., Buckinghamshire, U.K.)を用いて定量した。0.01%、0.028%、0.05%PEP005、DMSO/イソプロパノール媒体ゲルおよび未処置創傷対照群それからの組織片(3mm)を、張力測定器のグリップに留め付け、創傷の辺縁部を50mm/分の「クロスヘッド速度」で引き離すよう設定した。破壊強度を創傷辺縁部の分離を起こすのに要する最大の力として測定した。

### 【0139】

#### 瘢痕組織の質評価(第4および第12週)

マトリックス配向を0.01%、0.028%、0.05%PEP005、DMSO/イソプロパノール媒体ゲルおよび未処置創傷対照群それからの組織試料で、切片を顕微鏡ステージ上に置き、切片を皮膚の表面に平行に顕微鏡写真が撮れるように配向/回転させることにより調べた。各瘢痕のデジタル画像を上および中瘢痕区域に捕捉した。各瘢痕の区域内の興味対象となる代表的領域を選択し、各領域内のマトリックス成分の配向を、組織試料画像内の膠原線維束の方向性(directionality)を示すデータを生成し、12×15°セグメントの配向の記載を出力する、個別の描画画像配向ソフトウェア(CICA-MOS, Version 1.0)を用いて測定した。典型的には、正常な皮膚組織では水平の方向性は限られており、約45°および105°に方向性のピークがあると考えられる。これに対して、瘢痕組織は水平に近く配向された膠原線維束の比率がかなり高く、0~180°(すなわち、平面的で、皮膚の表面に平行)に非常に高レベルの方向性を有するが、45および120°の間の方向性は非常に小さいと思われる。重症度の低い瘢痕組織では、0~180°以外の方向に配向された膠原線維束が多いと考えられる。

### 【0140】

本試験は二つのレベルの組織配向性を調査した。すなわち(i)0.01%、0.028%、0.05%PEP005、DMSO/イソプロパノール媒体ゲルおよび未処置創傷対照群それからの瘢痕組織を水平±7.5°に平行に配向されたマトリックスの量に関して比較し、(ii)画像捕捉前の切片配向における誤差の可能性、局所皮膚小器官(例えば、毛包)の影響の可能性、および皮膚表面の起伏/凹凸を許容するために、各群の瘢痕組織を水平から±22.5°まで平行に配向されたマトリックスの量に関して比較した。最終的に、膠原線維束の平面的/水平の方向性が大きいほど瘢痕形成の重症度が高かった。

### 【0141】

#### 結果

##### 創傷強度の張力測定評価

0.01%、0.028%、0.05%PEP005、DMSO/イソプロパノール媒体ゲルおよび未処置創傷対照群それからの組織片(3mm)について、4週間および12週間で得られた張力測定による平均引っ張り強度値を図1に示す。第4週で得られた平均引っ張り強度値(図1A)は用量依存的傾向を示し、PEP005曝露により引っ張り強度は増大した。

### 【0142】

第12週で得られた平均引っ張り強度値(図1B)は第4週に比べて、すべての実験群で引

10

20

30

40

50

つ張り強度値の増大を示し、PEP005処置後には二相性の傾向があり、0.01%で増大し、0.028%で対照レベルまで低下し、その後0.05%PEP005濃度で再度増大した。

【0143】

瘢痕組織の質評価

0.028%PEP005での局所処置により、3つの対照群に比べて $\pm 7.5^\circ$ または $\pm 22.5^\circ$ に配列する膠原線維束のパーセンテージは低下した。

【0144】

下記の表3.1は、創傷中央部の平均の瘢痕マトリックス配向分析データを提供するもので、急性（外科的）ラット全層切創において、12週間の時点でDMSO/イソプロパノール媒体（対照）および未処置創傷対照群に比べて0.028%PEP005適用後の、水平 $\pm 7.5^\circ$ 、および水平 $\pm 22.5^\circ$ の方向データを示している。N-NT = PEP005-「ナイープ」、未処置、N-V = PEP005 = 「ナイープ」、媒体処置；V = PEP005-曝露、媒体処置。

10

【0145】

（表3.1）

	N-NT	N-V	V	0.028% PEP005
$\pm 7.5^\circ$	10.55%	946%	9.01%	6.99%
$\pm 22.5^\circ$	30.32%	26.84%	26.03%	21.81%

【0146】

20

参考文献一覧

al-Khateeb, T, Stephens, P, Shepherd, JP, Thomas, DW. An investigation of preferential fibroblast wound repopulation using a novel *in vitro* wound model. *J Periodontol* 1997; 68: 1063-1069.

Baum, C. L., Arpey, C. J., Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events, *Dermatol Surg* 31:674-686 (2005).

10

Bryan, D., Walker, K. B., Ferguson, M., Thorpe, R., Cytokine gene expression in a murine wound healing model, *Cytokine* 31:429-438 (2005).

Cook H, Stephens P, Davies J, Harding, KG, Thomas, DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 225-33.

20

De Felici, M, Dolci, S. *In vitro* adhesion of mouse fetal germ cells to extracellular matrix components. *Cell Differ Dev* 1989; 26: 87-96.

Enoch, S. Phenotypic and genotypic characterisation of oral mucosal and patient-matched skin fibroblasts. *PhD Thesis* 2006; Wound Biology Group, Dept. Oral Surgery, Medicine & Pathology, Cardiff University.

30

Greene, T. W., and Wutz, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley InterScience, New York (1999).

Grellner, W., Georg, T., Wilske, J., Quantitative analysis of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds, *Forensic Sci Int* 113:251-264 (2000).

Grose, R., Werner S., Kessler, D., Tuckermann, J., Durka, S., Huggel, K., Reichardt, H., Werner, S. A role for endogenous glucocorticoids in wound repair, *EMBO Reports* 3:575-582 (2002).

40

Hübner, G., Brauchle, M., Smola, H., Madlener, M., Fassler, R., Werner, S., Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice, *Cytokine* 8:548-556 (1996).

Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., Herzog, V., Cell migration: Mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks, *Eur J Cell Biol* 2004; 83: 717-724.

10

Larock, R. E., *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1999).

Liechty, K. W., Adzick, N. S. and Crombleholme, T. M., Diminished interleukin 6(IL-6) production during scarless human fetal wound repair, *Cytokine* 12:671-676 (2000).

March, J., *Advanced Organic Chemistry*, 5th Edition, Wiley InterScience, New York.

20

Martin, P., Wound healing - aiming for perfect skin regeneration, *Science* 1997; 276: 75-81.

Puschel, HU, Chang, J, Muller PK, Brinckmann, J., Attachment of intrinsically and extrinsically aged fibroblasts on collagen and fibronectin, *J Photochem Photobiol* 1995; 27: 39-46.

Stephens, P, Cook, H, Hilton, J, Jones, CJ, Haughton, MF, Wyllie, FS, Skinner, JW, Harding, KG, Kipling, D, Thomas, DW., An analysis of replicative senescence in dermal fibroblasts derived from chronic leg wounds predicts that telomerase therapy would fail to reverse their disease specific cellular and proteolytic phenotype, *Exp Cell Res* 2003; 283: 22-35.

30

Stephens, P, Davies, KJ, al-Khateeb, T, Shepherd, JP, Thomas, DW., A comparison of the ability of intra-oral and extra-oral fibroblasts to stimulate extracellular matrix reorganization in a model of wound contraction, *J Dent Res* 1996; 75: 1358-1364.

40

Stephens, P, Davies, KJ, Occleston, N, Pleass, RD, Kon, C, Daniels, J, Khaw, PT, Thomas, DW., Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity, *Br J Dermatol* 2001; 144: 229-237.

Stephens, P, Grenard, P, Aeschlimann, P, Langley, M, Blain, E, Errington, R, Kipling, D, Thomas, DW, Aeschlimann, D., Crosslinking and G-protein functions of transglutaminase 2 contribute differentially to fibroblast wound healing responses, *J Cell Sci* 2004; 117: 3389-3403. 10

Stephens P, Thomas DW., The cellular proliferative phase of wound healing, *J Wound Care* 2002; 11: 253-261.

Wall, IB., A cellular and molecular analysis of chronic wound and normal dermal fibroblasts, *PhD Thesis* 2006; Wound Biology Group, Dept. Oral Surgery, Medicine & Pathology, Cardiff University. 20

Werner, S., Grose, R., Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines, *Physiol Rev* 83:835-870 (2003).

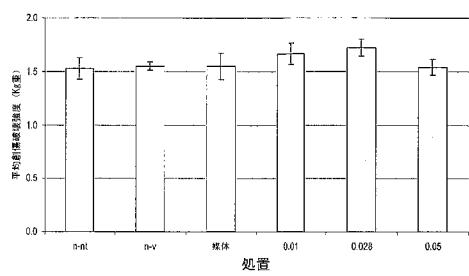
【図面の簡単な説明】

【0 1 4 7】

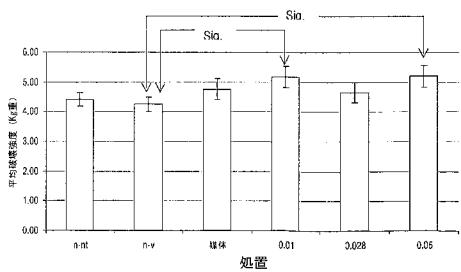
【図1】図1は、急性（外科的）ラット全層切創において、0.01%、0.028%、0.05%PEP05の適用後、(A)4週間および(B)12週間で得られた平均張力測定データを、DMSO/イソプロパノール媒体（対照）および未処置創傷対照群と比較して示すグラフである。N-NT = PEP05-「ナイーブ」、未処置；N-V = PEP005-「ナイーブ」、媒体処置；V = PEP005-曝露、媒体処置。 30

【図1】

A



B



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2006/001781															
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <i>A61K 36/47 (2006.01) A61K 31/22 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)</i>																	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> <i>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</i>																	
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) DWPI, MEDLINE: ingenane, ingenol, ingenol-3-angelate, euphorbia, wound, cuts, lacerations, abrasions, ulcers, scratches, surgical incisions, sores																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Category*</td> <td style="width: 80%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</td> <td style="width: 10%;">Relevant to claim No.</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2005/065696 A1 (PANACEA BOITEC LTD) 21 July 2005. See whole document.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Derwent Abstract Accession No. 1992-260104/32, Class B04 C03, DE 4102054 A (TAMAS S) 30 July 1992. See whole abstract.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Biswas T K et al, PLANT MEDICINES OF INDIAN ORIGIN FOR WOUND HEALING ACTIVITY: A REVIEW, Lower Extremity Wounds (2003) 2(1) 25-39. See whole document.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Natrajan D et al, ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF EUPHORBIA FUSIFORMIS-A RARE MEDICINAL HERB, Journal of Ethnopharmacology (2005 September) 102, 123-126. See whole document.</td> <td>1-15</td> </tr> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 2005/065696 A1 (PANACEA BOITEC LTD) 21 July 2005. See whole document.	1-15	A	Derwent Abstract Accession No. 1992-260104/32, Class B04 C03, DE 4102054 A (TAMAS S) 30 July 1992. See whole abstract.	1-15	A	Biswas T K et al, PLANT MEDICINES OF INDIAN ORIGIN FOR WOUND HEALING ACTIVITY: A REVIEW, Lower Extremity Wounds (2003) 2(1) 25-39. See whole document.	1-15	A	Natrajan D et al, ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF EUPHORBIA FUSIFORMIS-A RARE MEDICINAL HERB, Journal of Ethnopharmacology (2005 September) 102, 123-126. See whole document.	1-15
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
A	WO 2005/065696 A1 (PANACEA BOITEC LTD) 21 July 2005. See whole document.	1-15															
A	Derwent Abstract Accession No. 1992-260104/32, Class B04 C03, DE 4102054 A (TAMAS S) 30 July 1992. See whole abstract.	1-15															
A	Biswas T K et al, PLANT MEDICINES OF INDIAN ORIGIN FOR WOUND HEALING ACTIVITY: A REVIEW, Lower Extremity Wounds (2003) 2(1) 25-39. See whole document.	1-15															
A	Natrajan D et al, ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF EUPHORBIA FUSIFORMIS-A RARE MEDICINAL HERB, Journal of Ethnopharmacology (2005 September) 102, 123-126. See whole document.	1-15															
<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 "B" 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																	
Date of the actual completion of the international search 16 January 2007	Date of mailing of the international search report 23 JAN 2007																
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No: (02) 6283 3929	Authorized officer <b>SHUBHRA CHANDRA</b> Telephone No: (02) 6283 2264																

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2006/001781
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Betancur-Galvis LA et al, CYTOTOXIC AND ANTIVIRAL ACTIVITIES OF COLOMBIAN MEDICINAL PLANT EXTRACTS OF THE EUPHORBIA GENUS, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz (2002) 97 (4) 541-6. See whole document.	1-15
A	Guarrera Paolo Maria, TRADITIONAL PHYTOTHERAPY IN CENTRAL ITALY, Fitoterapia (2005) 76(1) 1-25. See whole document.	1-15
A	Tropical Plant Database, Database File for AVELOZ (Euphorbia tirucalli) <a href="http://web.archive.org/web/20041030080015/http://www.rain-tree.com/aveloz.htm">http://web.archive.org/web/20041030080015/http://www.rain-tree.com/aveloz.htm</a> See whole document.	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2006/001781

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO	2005065696	AU	2004312445	CA	2552411
		US	2006198905		EP 1628673

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

---

フロントページの続き

(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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,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,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,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,L,A,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 オグボーン スティーブン マーティン

オーストラリア連邦 クイーンズランド州 ブンヤ リトリート コート 24

(72)発明者 トーマス デイビッド

イギリス国 サウスウェールズ州 カーディフ ニューポート ロード 30 - 36 カーディフ  
ユニバーシティ

(72)発明者 モーズリー リアン

イギリス国 サウスウェールズ州 マエステグ シーダブリュアールティー コエド パルク 3  
3

F ターム(参考) 4C206 AA01 AA02 DB03 DB56 MA01 MA04 NA14 ZA89 ZC41