(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2004 年7 月22 日 (22.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/060385 A1

(51) 国際特許分類[7]: A61K 38/00, 9/08, A61P 27/02, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016514

(22) 国際出願日: 2003 年12 月24 日 (24.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-381131
2002 年12 月27 日 (27.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 日本点眼薬研究所 (NIHON TENGANYAKU KENKYUSHO CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒457-0039 愛知県 名古屋市 南区西桜町７６ Aichi (JP).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 西田 輝夫 (NISHIDA,Teruo) [JP/JP]; 〒755-0152 山口県 宇部市 あすとぴあ６－８－４ Yamaguchi (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 上竹 順久 (UE-TAKE,Yorihisa) [JP/JP]; 〒457-0039 愛知県 名古屋市 南区西桜町７６番地 株式会社日本点眼薬研究所 内 Aichi (JP). 岩田 浩明 (IWATA,Hiroaki) [JP/JP]; 〒486-0846 愛知県 春日井市 朝宮町３－３－１０ シャルマン朝宮Ｂ－１０１ Aichi (JP).

(74) 代理人: 小林 洋平 (KOBAYASHI,Youhei); 〒511-0821 三重県 桑名市 矢田２６１番地６号 Mie (JP).

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

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: OPHTHALMIC THERAPEUTIC COMPOSITION

(54) 発明の名称: 眼科用治療組成物

(57) Abstract: It is intended to find out the minimum activity expression site of fibronectin, clarify the function of the minimum unit in the ophthalmic field and provide an ophthalmic therapeutic composition containing the same as the active ingredient. Namely, an ophthalmic therapeutic composition, in particular, a remedy for corneal injury which contains as the active ingredient a peptide PHSRN (Pro-His-Ser-Arg-Asn), its derivative Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2 or a pharmaceutically acceptable salt thereof. A preferred dosage form of the composition is an ophthalmic solution.

(57) 要約:

フィブロネクチンの最小活性発現部位を見い出し、その最小単位の眼科領域についての作用を解明し、これを有効成分とする眼科用治療組成物を提供することを目的とする。本発明は、ペプチドＰＨＳＲＮ（Pro-His-Ser-Arg-Asn)、及びその誘導体である Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2、または、その医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用治療組成物、特に角膜障害治療剤である。また、好ましい剤型は点眼剤である。

WO 2004/060385 A1

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明　細　書

眼科用治療組成物

技術分野

本発明は、眼科用治療組成物に関するものである。

背景技術

本発明は、フィブロネクチンの活性発現部位であるプロリンーヒスチジンーセリンーアルギニンーアスパラギン、及びこのアミノ酸配列の両末端を修飾した化学物質（以下、ＰＨＳＲＮ又はAc-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2とする）に関するものである。また、この物質についての医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用治療組成物、または／及び予防組成物に関するものである。この組成物は、特に角膜上皮の創傷治癒促進作用を有する角膜障害の予防剤、または／及び治療剤に関するものである。

角膜は、厚さ０．５２mm～１．０mmの薄い組織である。角膜は、眼球の最前線に位置しており、外界からの光を網膜における受容体へ導くために透過性と適切な屈折力を有する高度に分化した組織である。また、角膜は、生理学上極めて重要な機能を有している。角膜の構造は、比較的単純ではある。すなわち、角膜は、上皮層、ボーマン膜、角膜実質層、デスメ膜及び内皮細胞層からなる非常に規則正しく微細な５重構造を有している。

フィブロネクチンは、細胞の接着や伸展に関与する分子量約４４万の糖蛋白であり、創傷治癒作用に加えて、形態形成や発生など生物現象で重要な役割を演じている。このフィブロネクチンは、分子量２２万～２５万のサブユニットが２個結合したダイマー（２量体）である。フィブロネクチンはドメイン構造を備えている。フィブロネクチンは、特異的に種々の細胞外基質と結合し、細胞表面のフィブロネクチン受容体（インテグリン）との橋渡しをすることにより細胞の接着

に関与している。

角膜障害は、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の種々の疾患により引き起こされる。この障害は、混合感染の併発がない場合には、自然に修復する。その修復原理としては、①角膜が障害を受けると、上皮欠損部の露出した角膜実質部にフィブロネクチンが出現する、②このフィブロネクチンがマトリックスに接着する、③このマトリックスに上皮細胞が伸展・移動する、というものである。角膜が治癒していくにつれて、フィブロネクチンは角膜障害部から消失していく。

何らかの理由で修復が遅延したり、あるいは修復が行われずに上皮欠損が遷延化することがある。すると、上皮の正常な構築に悪影響を与えることに加え、実質・内皮の構造や機能まで害される。従来の治療法は、外界の刺激から角膜表面を保護することにより、自然に上皮が伸展して欠損部の再被覆をはかるという受動的なものである。近年、細胞生物学の発展に伴い、細胞の分裂・移動・接着・伸展等に関与する因子が解明されてきている。角膜上皮欠損の修復には、角膜上皮の伸展を促進する化合物が重要視されてきている。

角膜上皮創傷の治療剤として知られているものとして、フィブロネクチン、ＥＧＦ（Epidermal Growth Factor)、ヒアルロン酸等の成分がある。人の血漿中に存在するフィブロネクチンを精製して、点眼用の血液製剤として用いることができる。この点眼剤により、角膜上皮欠損の再被覆が促進され、上皮創傷治癒が促進されることが知られている。

しかしながら現在のところ、フィブロネクチンは、患者自身の血漿を用いて、特殊な精製キットを用いて精製しなければならない。このため、フィブロネクチンを得るには、非常に手間がかかり、患者にとっては大きな負担となっている。この理由により、フィブロネクチンは臨床的には有効であるものの、充分には活用されるに至っていない。

ＥＧＦ（Epidermal Growth Factor）は、分子量６０００のポリペプチドであり、

角膜上皮分裂増殖因子としての作用が知られている。上皮の分裂を抑制する因子が存在している場合は、ＥＧＦの効果が発揮し難いことが知られている。加えて、炎症を伴う例や糖尿病性角膜症では、ＥＧＦの副作用として、血管新生が発生するという問題点を有している。

ヒアルロン酸は、N-アセチル-D-グルコサミンとＤ－グルクロン酸を構成糖とする分子量数百万のグルコサミノグリカンである。ヒアルロン酸は、ドライアイの治療剤として顕著な治療効果を示すことが知られている。ヒアルロン酸の作用は、主として、上皮細胞の接着・進展・移動に働くものであり、上皮細胞の増殖効果は弱い。ヒアルロン酸は、高濃度となると粘度が増すため、点眼剤としては使用しにくいという欠点がある。

ところで、ペプチドＰＨＳＲＮは、国際公開公報ＷＯ９８／２２６１７号、及び The Journal of Clinical Investigation, 105(11), p1537-1545, 2000, The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice に開示されているペンタペプチドである。これらの先行技術文献中には、ペプチドＰＨＳＲＮが、外傷治癒及びがん細胞浸潤・増殖抑制効果を有すると記載されている。しかし、ペプチドＰＨＳＲＮについての眼科領域に関する報告は知られていない。

このように、角膜障害治療組成物として、満足できるものは知られておらず、更に優れた組成物が強く望まれていた。

前述のように、フィブロネクチンは、眼科領域において臨床的には有効であると認識されている。しかし、フィブロネクチンは、血液製剤に特有の問題（例えば、衛生面の問題、患者自身が血液を採取するという負担の大きさ、及び血漿からフィブロネクチンを精製するという煩雑さ等）を有しているために、広く使用されるには至っていない。加えて、フィブロネクチンの活性部位は、充分には明らかにされていないことから、フィブロネクチンを角膜障害治療剤の有効成分として用いるには、更なる研究開発の余地が残されていた。

本発明は、以上のような事情の下でなされたものであり、一つの目的は、フィブロネクチンの活性発現部位を見いだすことであり、他の目的は、フィブロネクチンの活性発現部位を眼科用治療薬または／及び予防薬として使用できる組成物を提供することである。

発明の開示

以上のような目的を達成すべく、本発明者らは、フィブロネクチンに含まれるペプチドに着目し、角膜障害に対する作用を検討した。その結果、本発明者らは、フィブロネクチンの活性発現部位であるＰＨＳＲＮが、角膜上皮の創傷治癒を促進することを見い出した。

すなわち、本発明者らは、①ＰＨＳＲＮの眼科用治療組成物としての新しい用途を見い出し、②角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の予防剤または／及び治療剤として、ＰＨＳＲＮ、またはその医薬として許容される塩類を用いる組成物が有用であることを見い出し、基本的には本発明を完成した。

こうして、本発明は、角膜障害に対して、少量で強い治療効果を示し、かつ低分子で安全性に優れる新規な眼科治療用組成物を提供するものである。

より具体的には、本発明においては以下のようなものを提供する。

（１）ペプチドＰＨＳＲＮ、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分として含有する眼科用治療組成物。

（２）ペプチドＰＨＳＲＮ、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分とする角膜障害予防剤または／及び治療剤。

（３）角膜障害が角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイである（２）記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。

（４）剤型が点眼剤である（３）記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。

（５）ペプチドＰＨＳＲＮまたはこのペプチドについての医薬として許容され

る塩類を有効成分とする角膜上皮伸展促進剤。

（６）剤型が点眼剤である（５）記載の角膜上皮伸展促進剤。

（７）有効量のペプチドＰＨＳＲＮまたはこのペプチドについての医薬として許容される塩類の使用及びこれらによる角膜障害治療方法。

なお、本明細書中において、アミノ酸残基については、次のような省略記号を用いる。つまり、アスパラギンはAsnまたはＮを、アルギニンはArgまたはＲを、ヒスチジンはHisまたはＨを、プロリンはProまたはＰを、セリンはSerまたはＳを意味する。また、Acはアセチル基を、NH_2はアミノ基を意味する。

ペプチドＰＨＳＲＮは、フィブロネクチンの活性部位であるペンタペプチド、Pro-His-Ser-Arg-Asn の構造を有するものである。上記アミノ酸は多数の鏡像異性体を生じ得る場合、これらすべての鏡像体及びそれらの混合物はすべて本発明に含まれるものである。ペプチドＰＨＳＲＮをモチーフとして形成された組成物については、均等の範囲として本発明の権利範囲に解釈されるべきである。また、ペプチドＰＨＳＲＮにおいて、Ｎ末端側をアセチル化し、Ｃ末端側をアミド化した物質、つまりAc-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2が好ましい。

本発明でいう予防または／及び治療とは、ヒトを含む動物に投与することにより、疾病の発生を未然に防ぐこと（予防）または、疾病に罹った患者を治すこと（治療）を意味している。

本発明でいう角膜障害とは、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等をいう。

ペプチドＰＨＳＲＮについての医薬として許容される塩類としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等が挙げられる。

ペプチドＰＨＳＲＮ、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類は、経口的、または非経口的に投与することができる。投与剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、注射剤、点眼剤等が挙げられる。このうち、特

に点眼液、眼軟膏等の点眼剤が好ましい。これらは汎用されている技術を用いて製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の経口剤であれば、乳糖、結晶セルロース、デンプン、植物油等の賦形剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の崩壊剤、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴール、シリコン樹脂等のコーティング剤、ゼラチン皮膜等の皮膜剤などを必要に応じて加えればよい。また、点眼液であれば、塩化ナトリウム等の等張化剤、リン酸ナトリウム等の緩衝化剤、塩化ベンザルコニウム等の防腐剤等を用いて製剤化することができる。これらの医薬のｐＨは、眼科製剤に許容される範囲内にあればよいが、４～８の範囲が好ましい。眼軟膏であれば、白色ワセリン、流動パラフィン等の汎用される基剤を用いて調製することができる。

また、本発明の角膜障害治療剤は、局所投与、特に点眼剤として投与することが好ましい。点眼剤におけるペプチドＰＨＳＲＮの濃度は、症状、年令等に応じて設定すれば良く、特に限定する必要はないが、0.00001％～1％が好ましい。投与量としては、点眼液を例にとると、１回１滴～数滴、１日１回～数回投与することができる。点眼剤としては、通常の点眼液のほか、用時溶解型の点眼液や眼軟膏としてもよい。製剤化については通常の技術、すなわち塩化ナトリウム、塩化カリウム等の等張化剤、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等の緩衝剤、エデト酸ナトリウム等の安定化剤、エチルパラベン、ブチルパラベン、塩化ベンザルコニウム等の防腐剤、水酸化ナトリウム、希塩酸等のｐＨ調整剤、白色ワセリン、流動パラフィン等の眼軟膏用基剤等の添加物を必要に応じて加え、常法により製剤化することができる。

本発明に係るペプチドＰＨＳＲＮは、例えば不溶性の高分子担体上でペプチド鎖をＣ末端から伸長していく固相法、または担体を用いない液相法などの通常のペプチド合成で用いられる方法によって容易かつ安価に製造することができる。

本発明の眼科用剤を工業的に生産するために、本発明に係るペプチドＰＨＳＲＮを使用すること、及びこれを用いて患者に投与する治療方法も本発明の適用範囲に含まれる。

図面の簡単な説明

第１図は、ペプチドＰＨＳＲＮの角膜上皮細胞の伸展に与える効果を示すグラフである。横軸は、ペプチドＰＨＳＲＮの濃度（０（コントロール)、５１．２ｎＭ、１０２．５ｎＭ、１５３．７ｎＭ、２５６．２ｎＭ、５１２．３ｎＭ）を示し、縦軸は、角膜上皮の伸展長（μｍ）を示した。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、ペプチドＰＨＳＲＮの有用性を調べるために、角膜障害に対するペプチドＰＨＳＲＮの影響を検討した。詳細は、後述の薬理試験の項で示した。本発明者らは、ペプチドＰＨＳＲＮの点眼が、①角膜片の組織培養系における角膜上皮の伸展効果、及び②角膜上皮剥離後の創傷治癒を促進する効果を有することを見出した。このことから、ペプチドＰＨＳＲＮは、角膜障害（すなわち、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等、特に角膜上皮剥離)、及びドライアイの治療に有用であることが明らかとなった。

次に、本発明の製剤例および薬理試験の結果を説明するが、本発明の技術的範囲は、下記の実施形態によって限定されるものではなく、その要旨を変更することなく、様々に改変して実施することができる。また、本発明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及ぶものである。

１．製剤例

1) 点眼液

処方１として、全量 100ml 中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2 を 0.01g、塩化

ナトリウムを0.9g、及び滅菌精製水を適量含む点眼液を調整する。また、処方1と同様にして、全量100ml中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2が、各々0.00001g, 0.00003g, 0.0001g, 0.0005g, 0.001g, 0.005g, 0.05g, 0.1g含まれる点眼液を調製することができる。

処方2として、全量100ml中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2を0.1g、塩化ナトリウムを0.8g、リン酸水素ナトリウムを0.1g、リン酸二水素ナトリウムを適量、及び滅菌精製水を適量含む点眼液を調整する。また、処方2と同様にして、全量100ml中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2が、各々0.00001g, 0.00003g, 0.0001g, 0.0005g, 0.001g, 0.005g, 0.05g, 0.1g含まれる点眼液を調製することができる。

2) 眼軟膏

処方3として、全量100g中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2を0.05g、白色ワセリンを90g、及び流動パラフィンを適量含む眼軟膏を調整することができる。また、処方3と同様にして、全量100g中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2が、各々0.00001g, 0.00003g, 0.0001g, 0.0005g, 0.001g, 0.005g, 0.05g, 0.1g含まれる眼軟膏を調製することができる。

2. 実施例

固相法により Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2を合成した。この化合物を用いて、①in vitroにおける角膜上皮伸展作用、及び②in vivoにおける角膜創傷治癒促進作用を検討した。詳細なデータは薬理試験の項に記載した。

Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2を加えた群では、コントロール群と比較すると、明らかに角膜上皮細胞層が伸展し、また角膜の創傷が早く治癒した。このことから、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2が、角膜障害の治療剤として有用であることが立証された。

3. 薬理試験

①角膜上皮伸展に対する作用 (in vitro)

雄性日本白色ウサギの角膜を用い、Nishidaらの方法 (J.Cell.Biol., 97, 1653

－1657（1983））に準じ、角膜片の組織培養系での角膜上皮伸展長を指標にして角膜上皮伸展に対する影響を検討した。

（実験方法）

ウサギ角膜片より角膜ブロック（1群3個）を切り出した。この角膜ブロックを被験化合物を含む培養液（Medium－199）中、37℃、5% CO_2の条件下で、20時間培養した。培養後、角膜ブロックをエタノール-氷酢酸（容積比95：5）混合液中で固定し、パラフィンで包埋して切片を作製した。切片を脱パラフィンした後、ヘマトキシリン-エオジン染色し、顕微鏡で上皮細胞層の伸展長を測定した。コントロールとして、被験化合物を含まない培養液で同様に培養したものを用いた。

（結果）

図1に示すように、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2を含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展に対して顕著な促進が認められた。

②角膜創傷治癒促進作用（1）（in vivo）

雄性日本白色ウサギを用い、Cintronらの方法（Ophthalmic Res., 11, 90-96（1979））に準じて角膜上皮剥離を起こさせ、角膜に直径約6mmの創傷を作成した。創傷面積は、フルオレセイン染色面積を指標として測定した。被験化合物の角膜創傷治癒に対する影響を検討した。

（実験方法）

角膜上皮剥離を起こさせた後、0、3、6、9、12、18、24、27、30、33、36、42及び48時間後に各濃度の被験化合物を含む点眼液を点眼（30μL／回）した。創傷面積を測定する際に、フルオレセイン染色を行い角膜の写真を測定した。撮影した角膜のフルオレセイン染色面積は、画像解析処理システムを用いて算出した。コントロールとして、被験化合物を含まない基剤（PBS）を点眼したウサギを用いた。

（結果）

下記表1及び表2は、ウサギ角膜損傷モデルにおける

Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2（ＰＨＳＲＮ）に対する治癒後効果を治癒率で示したものである。表１及び表２に示す通り、ペプチドＰＨＳＲＮの点眼は、創傷治癒に対して顕著な促進を示すことが認められた。

表１及び表２において、各値は平均値±標準偏差を示す（ｎ＝6)。統計解析は、PBS に対する Dunnett の多重比較を用い、角膜上皮剥離直後（0 時間）の角膜損傷部位の面積を 100％とした（*ｐ＜0.05、**ｐ＜0.01 ；v.s.コントロール)。

表1

＜ウサギ角膜損傷モデルに対するＰＨＳＲＮに対する治癒後効果（治癒率）＞

治癒率（%）	0hr	6hr	12hr	24hr
PBS	0	4.96±3.28	19.14±5.04	54.36±9.00
2μM PHSRN	0	9.66±2.21*	26.71±2.62**	61.91±3.08
20μM PHSRN	0	10.73±3.21**	28.01±1.92**	64.07±3.98*
200μM PHSRN	0	11.06±3.50**	28.69±4.10**	67.70±5.37**
2000μM PHSRN	0	11.15±1.25**	28.99±2.65**	69.49±3.17**
5μM EGF	0	14.49±3.42**	31.63±1.29**	70.78±6.91**

表2

<ウサギ角膜 損傷モデルに対するPHSRNに対する治癒後効果（治癒率）>

治癒率（%）	36hr		48hr
PBS	84.49±11.60		97.09±5.98
2μM PHSRN	88.08± 4.03		99.14±1.90
20μM PHSRN	89.09±6.42		99.15±1.52
200μM PHSRN	94.97±4.63	*	100.00±0.00
2000μM PHSRN	95.39±3.06	*	100.00±0.00
5μM EGF	96.41± 3.97	*	99.58±1.03

③角膜創傷治癒促進作用（2）（in vivo）

上記②と同様の方法を用いて、日本白色ウサギを用い角膜上皮剥離を起こさせ、角膜に直径約8mmの創傷を作成した。創傷面積をフルオレセイン染色面積を指標

として測定し、角膜創傷治癒に対する影響を検討した。

（実験方法）

角膜上皮剥離を起こさせた後、0、6、12、18、24、30、36、42、48及び54時間後に各濃度の被験化合物を含む点眼液を点眼（25μL／回）した。創傷面積を測定する際に、フルオレセイン染色を行い角膜の写真を測定した。撮影した角膜のフルオレセイン染色面積は、画像解析処理システムを用いて算出した。コントロールとして、被験化合物を含まない基剤（生理食塩水）を点眼したウサギを用いた。

（結果）

下記表3及び表4は、ウサギ角膜損傷モデルにおけるAc-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH_2（ＰＨＳＲＮ）に対する治癒後効果を治癒率で示したものである。表3及び表4に示す通り、ペプチドＰＨＳＲＮの点眼は、創傷治癒に対して顕著な促進を示すことが認められた。

表3及び表4において、各値は平均値±標準偏差を示す（ｎ＝6）。統計解析は、生理食塩水に対するDunnettの多重比較を用い、角膜上皮剥離直後（0時間）の角膜損傷部位の面積を100%とした（*ｐ＜0.05、**ｐ＜0.01 ；v.s.コントロール）。

表3

＜ウサギ角膜損傷モデルにおけるＰＨＳＲＮに対する治癒後効果　（治癒率）　＞

治癒率　（%）	0hr	12hr	18hr	24hr	30hr
生理食塩水	0	8.27±3.38	23.12±4.05	52.71±5.36	52.71±5.36
0.3% ヒアルロン酸	0	13.98±4.88*	28.45±3.37*	60.78±8.07**	60.78±8.07*
0.04%　PHSRN	0	13.57±3.74*	29.45±3.29**	58.71±6.32**	58.71±6.32**

表４

＜ウサギ角膜損傷モデルにおけるＰＨＳＲＮに対する治癒後効果（治癒率）＞

治癒率 （%）	36hr	48hr	54hr	72hr
生理食塩水	65.63±6.69	87.06±7.72	94.46±6.50	99.72±0.80
0.3% ヒアルロン酸	71.62±11.02	90.19±9.51	95.35±6.44	99.92±0.22
0.04% PHSRN	70.29±8.38	88.27±8.74	94.24±6.62	98.93±2.16

発明の効果

上記の薬理試験から、フィブロネクチンの最小活性発現部位であるペプチドＰＨＳＲＮが、角膜上皮の創傷治癒促進作用を有していること、及び種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の予防剤または／及び治療剤として有用であること、が見い出された。

請 求 の 範 囲

1． ペプチドＰＨＳＲＮ、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用治療組成物。

2． ペプチドＰＨＳＲＮ、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分とする角膜障害予防剤または／及び治療剤。

3． 角膜障害が角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイである請求項２記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。

4． 剤型が点眼剤である請求項２記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。

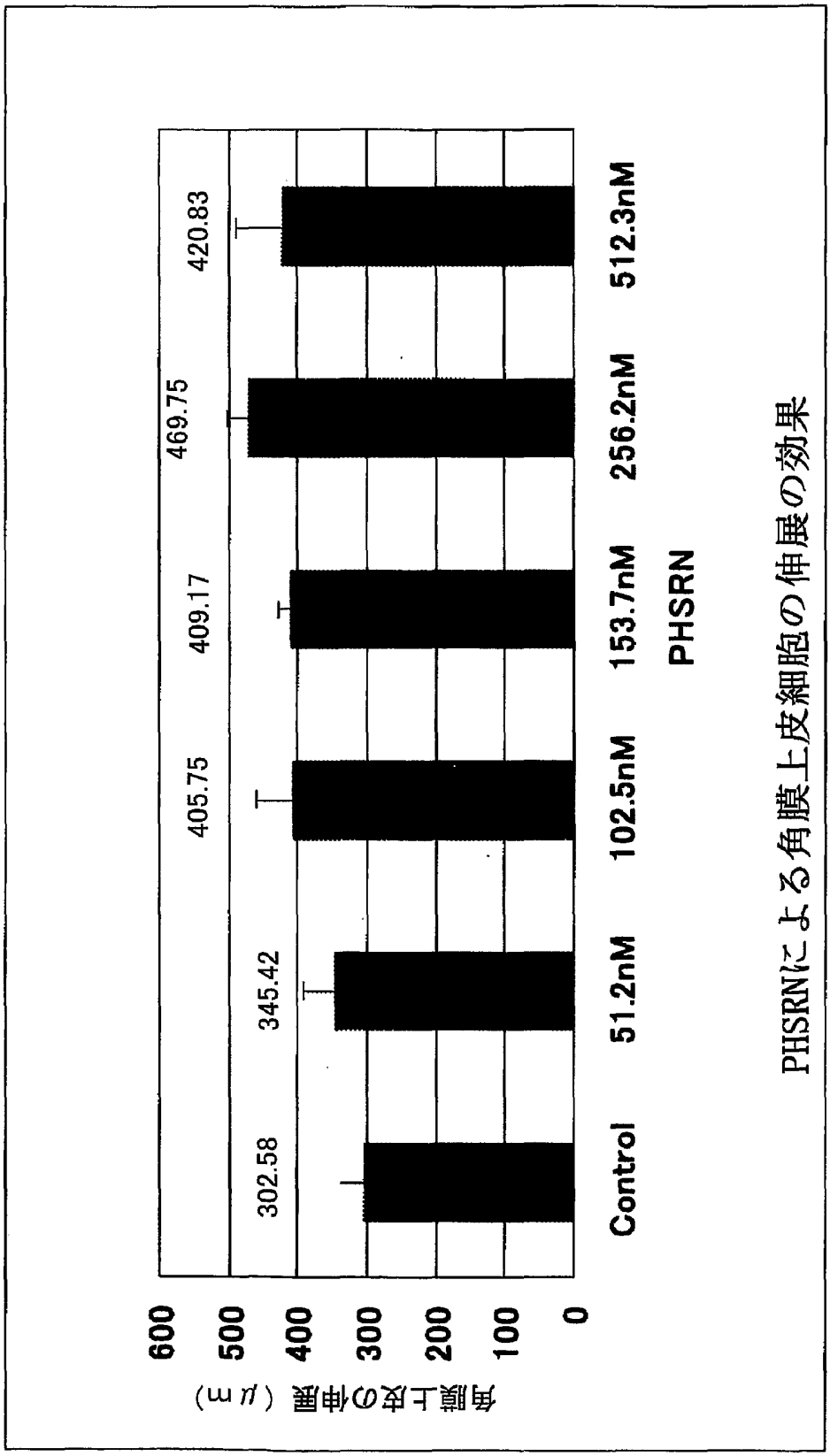
5． 剤型が点眼剤である請求項３記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。

6． ペプチドＰＨＳＲＮ、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分とする角膜上皮伸展促進剤。

7． 剤型が点眼剤である請求項6記載の角膜上皮伸展促進剤。

8． 有効量のペプチドＰＨＳＲＮ、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類の使用及びこれらによる角膜障害治療方法。

第１図


PHSRNによる角膜上皮細胞の伸展の効果
角膜上皮の伸展（μm）
600
500
400
300
200
100
0
302.58
345.42
405.75
409.17
469.75
420.83
Control
51.2nM
102.5nM
153.7nM
256.2nM
512.3nM
PHSRN

SEQUENCE LISTING

<110> NIHON TENGANYAKU KENKYUSHO CO.,Ltd.

<120> Ophthalmological composition

<130> JP0305NIT

<150> JP2002-381131

<151> 2002-12-27

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> partial sequence in Fibronectin

<400> 1

Pro His Ser Arg Asn

1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/16514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K38/00, 9/08, A61P27/02, 43/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] A61K38/00, 9/08, A61P27/02, 43/00

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)
CAPLUS(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Aucoin, L. et al., Interactions of corneal epithelial cells and surfaces modified with cell adhesion peptide combinations, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2002, Vol.13, No.4, pages 447 to 462	1-7
A	Livant D.L. et al., The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice, Journal of Clinical Investigation, 2000, Vol.115, No.11, pages 1537 to 1545	1-7
A	US 6025150 A (The Regents of the University of Michigan), 15 February, 2000 (15.02.00), & US 5840514 A & US 5989850 A & US 6140068 A & US 2002/0068047 A1	1-7

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 March, 2004 (29.03.04)	13 April, 2004 (13.04.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/16514

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/49419 A1 (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.), 31 December, 1997 (31.12.97), & EP 914827 A1 & JP 10-017489 A & US 6221846 B1	1-7
A	WO 00/41729 A1 (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 July, 2000 (20.07.00), & EP 1142585 A1 & JP 2000-264847 A	1-7
A	WO 01/91795 A1 (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 December, 2001 (06.12.01), & JP 2002-053492 A	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/16514

Box I 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. [X] Claims Nos.: 8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 8 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

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 II 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:

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／１６５１４

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ３８／００，９／０８，Ａ６１Ｐ２７／０２，４３／００

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ３８／００，９／０８，Ａ６１Ｐ２７／０２，４３／００

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

ＣＡＰＬＵＳ（ＳＴＮ），ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ），ＭＥＤＬＩＮＥ（ＳＴＮ），ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Aucoin, L. et al., Interactions of corneal epithelial cells and surfaces modified with cell adhesion peptide combinations, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2002, Vol.13, No.4, p.447-462	1－7
A	Livant D. L. et al., The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice, Journal of Clinical Investigation, 2000, Vol.115, No.11, p.1537-1545	1－7

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２９．０３．２００４	13.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｃ　９４５４
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	上條　のぶよ 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５１	

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ａ	ＵＳ　６０２５１５０　Ａ（ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバシティー　オブ　ミシガン），２０００．０２．１５　＆　ＵＳ　５８４０５１４　Ａ　＆　ＵＳ　５９８９８５０　Ａ　＆　ＵＳ　６１４００６８　Ａ　＆　ＵＳ　２００２／００６８０４７　Ａ１	１－７
Ａ	ＷＯ　９７／４９４１９　Ａ１（参天製薬株式会社），１９９７．１２．３１　＆　ＥＰ　９１４８２７　Ａ１　＆　ＪＰ　１０－０１７４８９　Ａ　＆　ＵＳ　６２２１８４６　Ｂ１	１－７
Ａ	ＷＯ　００／４１７２９　Ａ１（参天製薬株式会社），２０００．０７．２０　＆　ＥＰ　１１４２５８５　Ａ１　＆　ＪＰ　２０００－２６４８４７　Ａ	１－７
Ａ	ＷＯ　０１／９１７９５　Ａ１（参天製薬株式会社），２００１．１２．０６　＆　ＪＰ　２００２－０５３４９２　Ａ	１－７

国際調査報告

国際出願番号ＰＣＴ／ＪＰ０３／１６５１４

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☒ 請求の範囲 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲８は、治療による人体の処置方法に関するものであって、ＰＣＴ１７条（２）（ａ）（ｉ）及びＰＣＴ規則３９．１（ｉｖ）の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2．☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。