

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3919212号

(P3919212)

(45) 発行日 平成19年5月23日(2007.5.23)

(24) 登録日 平成19年2月23日(2007.2.23)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5

請求項の数 9 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平5-517193	(73) 特許権者	500588178
(86) (22) 出願日	平成5年3月22日(1993.3.22)		レノボ・リミテッド
(65) 公表番号	特表平7-505378		RENOVO LTD.
(43) 公表日	平成7年6月15日(1995.6.15)		イギリス、エム13・9エックスエックス
(86) 国際出願番号	PCT/GB1993/000586		、マンチェスター、グラフトン・ストリー
(87) 国際公開番号	W01993/019769		ト48番、マンチェスター・インキュペイ
(87) 国際公開日	平成5年10月14日(1993.10.14)		ター・ビルディング
審査請求日	平成12年3月17日(2000.3.17)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	9206861.8		弁理士 青山 稔
(32) 優先日	平成4年3月28日(1992.3.28)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100087114
			弁理士 齋藤 みの里

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維障害の創傷治療処置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T G F β - 3 を含む、創傷治癒過程における瘢痕形成を減少させるための医薬組成物。

【請求項 2】

薬学的に許容できるキャリア内に入っている請求項 1 に記載の記載の医薬組成物。

【請求項 3】

キャリアが局所適用のための中性滅菌クリーム、ゲル、エアロゾルまたはパウダーを包含することを特徴とする請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

キャリアが創傷を局所的に覆うためのパッチまたは滅菌繃帯または吸収性繃帯を包含することを特徴とする請求項 2 に記載の医薬組成物。 10

【請求項 5】

キャリアが洗浄、注入あるいは吸入のための滅菌溶液を包含することを特徴とする請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

キャリアが腸内投与のための錠剤またはカプセルを包含することを特徴とする請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

キャリアが、創傷または線維性切開部あるいはこれら両方と接触するかあるいはそこに移植してゆっくりとあるいは急速に活性剤を放出し、その場で活性とするための、コラーゲ 20

ン、ヒアルロン酸から選ばれるバイオポリマーまたはPVCポリマーを包含することを特徴とする請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項8】

局所適用のためのTGFβ-3を、クリーム、ゲル、パウダー、エアロゾル、パッチまたは繃帯、バイオポリマーまたはPVCポリマー移植、遅延または緩徐放出システム、洗浄、注入あるいは吸入のための溶液、もしくは、腸内投与のための錠剤あるいはカプセルの形で組み込むことを特徴とする、請求項1-7に記載の医薬組成物の製造方法。

【請求項9】

創傷の治癒過程における線維症を抑制するための請求項1に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本発明は線維形成が主要な組織修復メカニズムであるかあるいは過剰な線維形成が組織の異常な変位および機能不全を招く創傷その他の状態の治療に関する。本発明は、特に、過剰な線維形成を招くことなく動物の組織の修復、治癒を容易にし、また、疾病および線維形成状態を防止したり、処置したりするための薬剤および技術に関する。

線維形成は、創傷の治癒の際に組織の瘢痕化を生じさせるという点で大きな問題である。組織の瘢痕化は見た目に見苦しいばかりでなく、組織の成長、機能、運動などに関しても問題を生じさせる。このことは、子供の創傷治癒後や大やけど治癒後に特に当てはまる。さらに、線維形成は、多くの疾患、創傷治癒の他に肝硬変、糸球体腎炎、肺線維症、全身性線維形成、リウマチ性関節炎を含む疾患において異常あるいは過剰な線維組織の沈着が生じるという点で医学上の大問題でもある。

20

線維形成のメカニズムはまだ十分にわかっていないが、創傷治癒は、通常、サイトカインの白血球浸潤および蓄積との炎症反応として開始する。サイトカインは線維芽細胞の増殖および細胞外基質蛋白質（コラーゲンおよびフィブロネクチンを含む）の沈着に反応する。細胞外基質蛋白質は組織構造に蓄積し、組織の構造および機能を永久的に変えることになる。

調節性サイトカインの例としては、腫瘍壊死因子（TNF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、血小板由来成長因子（PDGF）および形質転換成長因子β（TGFβ）がある（これまでに、TGFβ-1からTGFβ-5までがわかっている。（これらサイトカイン族のうち2つ、TGFβとPDGFは線維形成誘導性が高いと報告されており、抗TGFβ-1、抗TGFβ-2および抗PDGF抗体を用いてTGFβおよびPDGFの活動を禁止すると、組織創傷における線維形成を低減できることがわかった（Shah et al, The Lancet, 339, 213-214, 1992; WO 91/04748）。

30

本発明は創傷および線維性疾患の処置に有用であり、線維形成を防止、抑止あるいは逆行させ得る新規な組成物を提供する。

本発明は薬理的に許容できるキャリアと組み合わせて少なくとも1種類の非線維性成長因子を含む治療組成物を包含する。

この組成物は非線維性成長因子としてTGFβ-3を含み、組織へのこの組成物の適用時に非線維性成長因子がその自然に生じるレベルよりも高いレベルで存在するようにすることができる。

40

この組成物は非線維性成長因子として酸性あるいは塩基性のFGFを含んでいてもよい。この場合にも、自然に存在するよりも高いレベルの非線維性成長因子が生じる。

この組成物は抗線維性剤、たとえば、TGFβ-1、TGFβ-2およびPDGFに対する抗体である線維性成長因子中和剤；TGFβ-1、TGFβ-2およびPDGFが成長因子それ自体に結合することによってそれらのリセプターへの結合を阻止する結合蛋白質（たとえば、Decorin、Biglycan）あるいはリセプターへ結合することによってリセプターへの結合を阻止する結合蛋白質、たとえば、成長因子リセプターおよびこれらリセプターの成長因子結合ドメインのリセプター結合部位シーケンス形態または可溶形態を含むペプチド；および線維性成長因子mRNAトランスレクションを阻止するように作用する非転写オリゴヌクレオチドまたはリボシムを含み得る。

50

この組成物は非線維性成長因子、たとえば、 $TGF\beta - 3$ と、抗線維性剤、たとえば、抗 $TGF\beta - 1$ および抗 $TGF\beta - 2$ との組み合わせを含んでいてもよい。

非線維性成長因子または抗線維剤あるいはこれら両方は活性、非活性のいずれの組み合わせ形態でも存在し得る。非活性化は、種々のメカニズムのうちの任意のもの、たとえば、カプセル化によって行える。カプセルはなんらかの外部刺激によって劣化するので、必要に応じて活性形態に解放できる。外部刺激としては、紫外線、超音波、生体内酵素、熱がある。

しかしながら、非活性化は結合分子の添加によっても行える。結合分子は、必要に応じて、紫外線、超音波、生体内酵素、熱のような外部刺激によって分離できる。

非線維性成長因子は、非活性形態で、たとえば、前駆物質として存在してもよいし、前駆物質をその活性形態に変換するのに必要な中性分割酵素を含む組織と接触した際に活性化されてもよい。

キャリアとしては、局所適用の中性滅菌クリーム、ゲル、エアロゾル、パウダーがあり、あるいは、パッチ、殺菌繃帯あるいは被吸収性繃帯の形をしていてもよい。また、キャリアとしては、コラーゲン、ヒアルロン酸を含むグループから選ばれるバイオポリマーまたはPVCのポリマーがあり、これに抗線維剤または非線維剤を取り付けて、キャリアが創傷または線維性病巣のいずれかと接触しているかあるいはそれに移植されたときにその作用または放出あるいはこれら両方を容易にする。キャリアとしては、さらに、洗浄、局所的または系統的注入または吸入のための滅菌溶液であってもよいし、あるいは、腸内注入用の錠剤、カプセルなどの形をしていてもよい。

本発明は、また、局所適用のための少なくとも1つの非線維性成長因子を含む薬剤治療組成物または抗線維組成物をクリーム、ゲル、エアロゾル、パウダー、パッチ、繃帯、バイオポリマーまたはポリマー移植、遅延または緩徐放出システムとして、または、洗浄、注入あるいは吸入のための溶液として、もしくは、脳内投与のための錠剤またはカプセルとして製造する方法も提供する。

本発明は、また、創傷その他の線維性状態および疾患、たとえば、潰瘍の治癒中の線維形成を防止する方法であって、組織創傷その他の線維性状態および疾患を患っているホストに少なくとも1つの非線維性成長因子を投与することからなる方法も提供する。

本発明は、また、上記のような線維性状態および疾患において線維形成を逆行させる方法であって、このような線維性状態および疾患のあるホストに少なくとも1つの非線維性成長因子、たとえば、 $TGF\beta - 3$ または少なくとも1つの抗線維剤、たとえば、抗 $TGF\beta - 1$ / $TGF\beta - 2$ あるいはこれら両方を投与することからなる方法も提供する。

上述したように、2つのサイトカインは、線維形成に伴われるものとして、すなわち、PDGFおよび $TGF\beta$ として識別されていた。これら2つのうち、 $TGF\beta$ は主要な役割を果たすものと思われる。たとえば、瘢痕形成なしに治癒した組織、たとえば、炎症反応の低下ならびにサイトカインプロファイルの変化がある胎児創傷においては、特に、 $TGF\beta$ のレベルがかなり低下する。

$TGF\beta$ 是一群の分子からなり、重要な哺乳動物メンバが $TGF\beta - 1$ 、 $TGF\beta - 2$ 、 $TGF\beta - 3$ である (Roberts and Sporn, The Transforming Growth Factor- β s, In: Peptide Growth Factors and their Receptors, Springer Verlag, Berlin, 1990, p418-472)。これらの $TGF\beta$ は、異なる表現パターンを有するが、70%を超えるペプチド同族関係を共有し、類似した機能を持ち、互換性を持って作用すると考えられる。したがって、創傷治癒では、 $TGF\beta - 3$ は $TGF\beta - 2$ 、 $TGF\beta - 3$ と同様に作用して細胞外基質生産、脈管形成および炎症反応を高めることが予想される。

上述したように、線維性疾患は主要な医学上の問題である。このような疾患では、線維組織の異常なまたは過剰な沈着がある。このような疾患としては、肝硬変、糸球体腎炎、肺線維症、全身性線維症、リウマチ性関節炎がある。これらの疾患では、 $TGF\beta$ の使用は避けられていた。これは、 $TGF\beta$ が線維組織の沈着量を増大させると考えられているからである。驚くべきことには、現在、線維組織の沈着を促進することなく治癒を促進するという点で予想と異なる効果を奏することが発見されている。

10

20

30

40

50

本発明は線維性疾患の処置のための医薬品を製造するのにTGFβ-3を使用する。

本発明は、また、必要に応じて患者に薬学的に効果のある量のTGFβ-3を投与することによって線維性疾患を処置する方法も提供する。

本発明は、また、活性成分としてTGFβ-3からなる線維性疾患処置用薬剤も提供する。

本発明は、また、自然に産生するTGFβ内の相対割合に比べて、TGFβ-3のTGFβ-1またはTGFβ-2に対する割合が高く、薬学的に許容できるキャリアを包含する薬学組成物も提供する。

E0 0 433 225が、TGFβ、すなわち、TGFβ-1、TGFβ-2、TGFβ-3の生物学的活性を、ラットの創傷移植片およびその周囲の繊維性顆粒状組織の形成を高める能力を含むものとして定義しており（第5頁、17-19行）、US 4,810,691およびUS 4,774,228が結合組織沈着を促進するためにTGFβを使用することを記載している。

以下に述べる実施例は、TGFβ-3がTGFβ-1、TGFβ-2と同じ要領で作用して創傷治癒部位における線維形成を高めるという従来の観点とは異なり、実際に逆の効果を奏し、線維形成および瘢痕形成を低下させながら創傷治癒を促進することを示している。

【0002】

実施例

これらの実施例では、TGFβ-1、TGFβ-2、TGFβ-3の外来注入を行っている。また、TGFβ-1またはTGFβ-2（あるいは、抗TGFβ-1およびTGFβ-2の組み合わせ）に中性化抗体の注入も行った。TGFβ-3への中性化抗体はまだ人手できない。実験プロトコルはShah et al, The Lancet, 339, 213-214, 1992に記載されたものである。

これらの実施例では非常に興味深く、予想もしなかった結果を得た。まず、TGFβ-1に対する中性化抗体は、瘢痕形成を減じた。すなわち、細胞外基質の量を減じ、脈管形成を減じ、創傷部でのマクロファージ、単核細胞の数を減じた。また、治癒創傷部でのコラーゲン線維の向きも改善した。TGFβ-2に対する中性化抗体は、それ自体では非常に効果は少なかったが、瘢痕形成をやや改善した。組合わせた場合、TGFβ-1、TGFβ-2に対する中性化抗体は、創傷治療で著しい敗者を示した（これはShah et al, The Lancet, 339, 213-214, 1992に記載されている結果と同じである）。すなわち、細胞外基質の沈着量を減じ（フィブロネクチンおよびコラーゲンを減じ）、脈管形成を減じ、創傷部でのマクロファージおよび単核細胞を減じ、創傷部内でのコラーゲンおよびフィブロネクチンの向きを良好にした。TGFβ-1またはTGFβ-2の外来添加での結果は予想通りであった。すなわち、細胞外基質沈着および脈管形成の増大があった。しかしながら、TGFβ-3の外来添加ではこの効果はなく、むしろ、TGFβ-1およびTGFβ-2に対する中性化抗体で観察された効果と同様の効果を奏した。すなわち、沈着した細胞外基質量の減少、マクロファージおよび単核細胞の減少および引き続く癩病形成での著しい改善があった。

TGFβ-3の効果を示す実施例の特別の詳細は次の通りである。

成熟した雄のSprague-Dawleyラット（重量200-250グラム）にハロタン亜酸化窒素で麻酔をかけ、酸素吸入を行った。正中線からの距離、前肢、後肢間の距離が等しい部位で背側皮膚に10ミリメートルの長さでparniculous carnosusの深さまで2つの切開部を形成した。これらの創傷は二次的な意図によって治癒まで縫合せず、そのまま放置した結果、最大量の肉芽組織を生じ、瘢痕を形成した。各動物で、1つの創傷（対照）はなんら手を加えなかった。別の動物では、他方の創傷に、a) 形質転換因子ベータ1（TGFβ-1）の注入を行うか（一回の注入で20ng）あるいはb) TGFβ-2の注入を行うか（一回の注入で20ng）あるいはc) TGFβ-3の注入を行った（一回の注入で20ng）。一回で20ngの注入が最適な投与量であることは投与反応実験で予め決定しておいた。注入は燐酸緩衝生理食塩水100マイクロリットであり、0日、1日、2日毎に局所浸潤によって創傷の縁に導入した。液体は創傷の尾部に向かって末端側0.5cm

10

20

30

40

50

の単一の進入点を通して各創傷縁の全長にわたって浸潤した。少なくとも4匹の個体が創傷形成後7日、14日、42日でクロロフォルムの過剰投与により死んだ。特にMalloryまたはMassonのトリクロムのような結合組織ステインを用いて創傷を処理して普通の組織学的検査を行った。また、抗体を用いて免疫細胞化学用の処理を行い、フィブロネクチン（早期創傷修復のマーカーとして、また、細胞外基質分子の向きを示すものとして）検出し、マクロファージおよび単核細胞を（炎症反応の指標として）検出し、ラミニン（たとえば、新しく形成された血管の基底膜を示す）を検出し、そして、創傷内の結合組織沈着および瘢痕形成を示すコラーゲンタイプI、IIIを検出した。

結果の概要

7日目、14日目で、対照創傷と比較すると、TGFβ-3処置した創傷はフィブロネクチンが少なく、フィブロネクチン線維が良好な向きとなっていた。6週目までには、すべての創傷のフィブロネクチンの量は周囲の正常な皮膚のそれと同じになった。しかしながら、TGFβ-3処置創傷の向きは他の創傷の向きよりもかなり良好であった。これらの結果はTGFβ-1、TGFβ-2に対する中性化抗体で得た結果とほとんど区別できなかった。比較すると、TGFβ-1、TGFβ-2で処置した創傷は7日目の創傷においてフィブロネクチンの量の非常な増大を示し、このフィブロネクチンの向きは周囲組織に比べて異常であった。同じことが14日目にも当てはまったが、6週目までにはTGFβ-1あるいはTGFβ-2で処置した創傷と対照との、フィブロネクチン存在量の差は小さくなった。

7日目で、TGFβ-1、TGFβ-2で処置した創傷と対照の創傷のマクロファージ、単核細胞浸潤の分布は同じとなった（たとえば、セクションあたり対照は159、TGFβ-1は149、対照は117、TGFβ-2は112）。しかしながら、TGFβ-3処置創傷では、マクロファージプラス単核細胞の浸潤分布は低かった（セクションあたり対照は130、TGFβ-3は91）。

7日目で、TGFβ-1、TGFβ-2で処置した創傷では、その下半分におけるマクロファージ分布は、対照創傷の同様の領域と比べて高くなった（セクションあたり対照は50でTGFβ-1は80、対照は45でTGFβ-2は59）。しかしながら、創傷の上半分では、マクロファージ浸潤はTGFβ-1処置創傷、対照創傷で同じであり、一方、TGFβ-2処置創傷での分布はより低くなった（対照は34、TGFβ-2は19）。対照的に、TGFβ-3処置した創傷では、全体を通じてマクロファージ分布は、対照創傷に比べて低かった（セクションあたり上半分で対照は41、TGFβ-3は16、下半分で対照は72、TGFβ-3は28）。

ラミニン染色を用いて新血管新生のマーカーとした。7日目で、TGFβ-1処置した創傷は、特にその基部で、血倍数の増大を示した。TGFβ-2で処置した創傷は対照創傷と同様に見えた。しかしながら、TGFβ-3処置した創傷は、対照創傷、TGFβ-1処置した創傷あるいはTGFβ-2処置した創傷のいずれと比較しても、血管は多くなっていた。これが非常に著しい効果であった。

14日目までに、TGFβ-1、TGFβ-2、TGFβ-3のいずれで処置した創傷でも対照と比べて血管数に若干の差異が生じた。しかしながら、TGFβ-3で処置した創傷の血管数が多い傾向があった。

創傷内のコラーゲン沈着の点で、Mallory染色または免疫細胞化学で分析すると、TGFβ-1またはTGFβ-2での創傷の処置は創傷形成後7日目、14日目で創傷内のコラーゲンの量を増大させた。さらに、このコラーゲンは、周囲真皮に比べて、向きが異常であり、垂直方向に向いた線維のパーセンテージがかなり高くなっていた。6週目で、対照創傷、TGFβ-1処置創傷、TGFβ-2処置創傷は瘢痕形成が目で見え、創傷領域内に異常な向きのコラーゲンが異常に蓄積していた。対照的に、TGFβ-3で処置した創傷では、創傷形成後7日目、14日目のコラーゲン沈着はやや少なかった。さらに、沈着したコラーゲンの網様パターンは周囲真皮のそれ同様であった。その結果、創傷形成後6週目で、TGFβ-3で処置した創傷は、対照創傷、TGFβ-1処置創傷、TGFβ-2処置創傷のいずれと比較しても、周囲の正常な皮膚のそれに、より類似した皮膚構造

10

20

30

40

50

を持っていた。TGFβ - 3でのこの結果は、TGFβ - 1、TGFβ - 2に対する中性化抗体で得た結果に非常に類似したものである。

したがって、要約すると、TGFβ - 3による創傷の処置は、創傷早期に沈着した細胞外基質の量を減らし、この基質の向きを瘢痕の異常パターンと比べて真皮の正常な網様パターンにし、マクロファージおよび単核細胞の数、それ故、創傷への炎症性浸潤を減らす、早期治癒創傷における血管の数はかなり増大させた。これらの効果は、血管の数の増大を除いて、TGFβ - 1、TGFβ - 2に対する中性化抗体で観察される効果とほとんど同じである。TGFβ - 1、TGFβ - 2に対する中性化抗体による創傷の処置は沈着する細胞外基質の量を減らし、この基質の向きを変えてより正常なアラインメントとし、マクロファージおよび単核細胞の炎症性湿潤を減らす（TGFβ - 3と同じ）が、血管の数は減らず（血管の数を増大させるTGFβ - 3での処置と異なる）。

10

したがって、TGFβ - 3は瘢痕形成防止剤（抗線維剤）として作用する。これがTGFβ族内のイソフォームの特殊な効果であることは非常に明瞭である。

したがって、TGFβ - 3は抗線維剤または瘢痕形成防止剤としてターゲットとなる。また、これを生物学的に改質して抗線維効果を高めたり、これらの効果に反応する分子の部分をより注意深く定めることができる。また、このような分析に基づいて、TGFβ - 3の構造を抗線維剤として最適化することもできる。この点についてのTGFβ - 3の効果は文献からは予測できないものであり、興味深いことには、特に脈管形成の増大において中性化抗体実験とは異なるものでうある。このことは、実際、或る種の創傷治癒、たとえば、血管補給量を高めて治癒を刺激するが、引き続く瘢痕形成を抑えたい下肢静脈性潰瘍のような慢性創傷にとって有益である。

20

線維形成に関連して、TGFβ - 3または抗TGFβ - 1 / TGFβ - 2剤の効果は線維形成の更なる増大を防ぐことに限らない。TGFβ - 1 / TGFβ - 2は、新しい細胞外基質分子の合成を刺激し、現存の基質分子の除去量を減らす（すなわち、組織のターンオーバーを禁止する）ことによって細胞外基質分子の蓄積を増大させるように作用する（Roberts and Sporn, the transforming growth factor - βs, In: Peptide growth factors and their receptors, Springer Verlag, Berlin, 1990, p418-472）。したがって、TGFβ - 1 / TGFβ - 2に拮抗したり、中性化したり、無効にしたりする薬剤は細胞外基質合成を低下させるばかりでなく、模様替えも向上させる。抗線維剤として、TGFβ - 3または抗TGFβ - 1 / 抗TGFβ - 2 / 抗PDGF（あるいはこれらの或る種の組み合わせ）は、或る種の線維性疾患、たとえば、糸球体腎炎、肺線維症において、組織に既に存在する線維性瘢痕組織の蓄積を逆行させることがある。

30

ここで、本発明を上記の実施例にのみ限定する意図はなく、添付の請求の範囲に定義したような発明の範囲から逸脱することなく当業者が容易に実行できる多くの変形も可能であることは明らかである。

したがって、たとえば、TGFβ - 3のみを含む薬剤を創傷に施す場合の他に、特定のタイプの創傷を瘢痕形成なしに治癒させながらこのような創傷に必要な量の血管新生を得ることのできる比率で線維性成長因子中性化剤、たとえば、抗TGFβ - 1または抗TGFβ - 2または抗PDGF抗体あるいはこれら全部と組み合わせ投与することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 ファーガソン マーク ウィリアム ジェームス
イギリス国 チェシャー エスケー4 4ピーエル ストックポート ヒートン ムーア ピール
モート ロード 13

(72)発明者 シャー マムタ
イギリス国 マンチェスター エム20 9エヌエックス ウィジントン ラトム ロード 12

審査官 大久保 元浩

(56)参考文献 国際公開第90/003810(WO, A1)
LANCET, 1992年 1月, 339(8787), 213-214

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00
A61K 38/22
CAplus(STN)
BIOSIS(STN)
MEDLINE(STN)
EMBASE(STN)
WPIDS(STN)