

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6910072号
(P6910072)

(45) 発行日 令和3年7月28日 (2021.7.28)

(24) 登録日 令和3年7月8日 (2021.7.8)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19 Z N A
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02

請求項の数 6 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2018-503784 (P2018-503784)	(73) 特許権者	517143274
(86) (22) 出願日	平成28年8月12日 (2016.8.12)		ジー・トゥリー・ビーエヌティ・カンパニ
(65) 公表番号	特表2018-523648 (P2018-523648A)		ー・リミテッド
(43) 公表日	平成30年8月23日 (2018.8.23)		G-TREEBNT CO., LTD.
(86) 国際出願番号	PCT/KR2016/008924		大韓民国13554キョンギド、ソンナム
(87) 国際公開番号	W02017/030328		シ、プンダング、チョンジャイルロ248
(87) 国際公開日	平成29年2月23日 (2017.2.23)		番、22エフ
審査請求日	令和1年8月6日 (2019.8.6)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	10-2015-0116089		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成27年8月18日 (2015.8.18)	(74) 代理人	100138911
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		弁理士 櫻井 陽子
前置審査		(74) 代理人	100150500
			弁理士 森本 靖
		(74) 代理人	100176474
			弁理士 秋山 信彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チモシンベータ4およびクエン酸を活性成分として含む角膜損傷予防／治療用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

有効成分としてチモシン 4およびクエン酸またはその塩を含有し、さらに、酢酸、アスコルビン酸およびそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1つの有機酸を含有し、前記クエン酸またはその塩の含有量はチモシン 4の1重量部当たり10～120重量部であり、前記有機酸の含有量は前記クエン酸またはその塩100重量部当たり15～70重量部である、角膜損傷の予防または治療用組成物。

【請求項2】

クエン酸の塩が、クエン酸ナトリウムである、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

有機酸が、酢酸またはその塩である、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

組成物の総体積に基づいて、0.05～0.5% (w/v) の量でチモシン 4を含み、0.08～2.0ml の1日総投与量で投与される、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

組成物の総体積に基づいて、1.0% (w/v) ～10.0% (w/v) の量でクエン酸またはその塩を含み、0.1～4.0ml の1日総投与量で投与される、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

【請求項6】

請求項1～5のいずれかに記載の組成物を含む、角膜損傷の予防または治療用眼科用製

剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、有効成分としてチモシン 4およびクエン酸を含有する角膜損傷の予防または治療用医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

角膜は、しばしば目の暗い部分と呼ばれる眼球の前面に血管がない透明な組織である。さらに詳しくは、角膜は、外的条件から目を保護し、物体を視認するために光を屈折させ、伝達する重要な役割を果たす。角膜は、異物に敏感に反応する神経繊維がよく発達している。角膜は、角膜上皮、ボーマン膜、角膜実質、デスメ膜および角膜内皮を含む5つの層からなる。

10

【0003】

角膜の表面は、直接外部に露出されており、創傷または傷に脆弱である。したがって、ドライアイ症候群などの眼疾患を患っている患者では、涙の不足が涙の眼球保護機能を劇的に悪化させるため、角膜の損傷が頻繁に生じる。角膜の傷害は、刺激(stimulus)の感覚、刺激(irritation)または乾燥の感覚などの症状を引き起こす可能性があり、悪化すると角膜炎をもたらすことがある。したがって、眼球を健康に保ち、視力を保持するためには、角膜の損傷を防ぎ、角膜の傷害がより悪化するのを防ぎ、または損傷した角膜を治療する必要がある。

20

【0004】

一方、角膜が、特にアルカリ熱傷によって損傷されると、多形核白血球(PMN)の浸潤が広範囲に起こることはよく知られている(Invest. Ophthalmology & Vis. Sci., 1987, 28, pp. 295-304)。そのようなPMN浸潤は、組織損傷と関連する一般的な炎症反応の一部である。しかしながら、角膜の化学的熱傷の場合、PMN浸潤は、主要な炎症応答であるだけでなく、潰瘍をもたらすか、または角膜穿孔を引き起こすことさえある(Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol., 1970, 74, pp. 375-383, Invest. Ophthalmology & Vis. Sci., 1979, 18, pp. 570-587)。実際、PMNは、角膜のコラーゲン組織を破壊するコラゲナーゼを活性化する主な原因として知られている。したがって、PMNの浸潤を予防することは、病変の拡大を止める可能性があり、角膜損傷の潰瘍への進行は、PMN代謝を阻害することによって遅延される可能性がある。クエン酸が、PMNの浸潤を減少させるのに有効であるとの多くの研究が報告されている(Exp. Eye. Res., 1984, 39, pp. 701-708)。

30

【0005】

一方、チモシン 4は、1981年に胸腺で発見されたタンパク質であり、41~43個のアミノ酸を含み、等電点が5.1である。1991年に、チモシン 4は、Liva et al.によって動物細胞からアクチンを隔離する分子として使用され、その後、免疫調節および神経内分泌系に関与することが判明した。最近、韓国特許公開公報第10-2008-33939号は、増量剤、緩衝剤及びpH調節剤をさらに含む、チモシン 4およびアミノ酸安定剤を含む点眼剤を開示している。しかし、この刊行物は、チモシン 4の有効性を最適化または増強するための個々の成分の所望の組み合わせおよび内容を記載していない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

チモシン 4の有効性を最適化することができる成分の組み合わせおよび成分の含量を見出すための広範な努力の結果として、本発明者らは、特定の有機酸がチモシン 4の活性に影響を及ぼす可能性があり、特定の有機酸を含む組成物を角膜損傷の治療に用いることができることを見出し、本発明を完成させた。

【0007】

本発明の目的は、チモシン 4および有機酸を含む、角膜損傷の予防または治療用組成

50

物；該組成物を含む眼科用製剤；および該組成物を投与することを含む、角膜損傷の治療方法；を提供することである。

【0008】

本発明の別の目的は、角膜損傷の予防または治療用医薬の製造のための組成物の使用を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の1つの態様によれば、有効成分としてチモシン 4およびクエン酸またはその塩を含有する角膜損傷の予防または治療用組成物が提供される。

【0010】

本発明のもう1つの態様によれば、該組成物を含む眼科用製剤が提供される。

【0011】

本発明のさらにもう1つの態様によれば、該組成物を対象に投与することを含む、角膜損傷の治療方法が提供される。

【0012】

本発明のさらに別の態様によれば、角膜損傷を予防または治療するための医薬の製造のための該組成物の使用が提供される。

【発明の効果】

【0013】

発明の有利な効果

本発明の組成物は、チモシン 4およびクエン酸またはその塩を含み、チモシン 4単独の使用と比較して、角膜損傷の回復を促進するように、角膜上皮細胞の移動および増殖を促進し、損傷した角膜におけるPMN浸潤を阻害する。さらに、チモシン 4、クエン酸および酢酸の同時使用は、細胞移動および増殖の点でチモシン 4単独の使用よりも優れた効果をもたらし、PMN浸潤に関して成分の個々の使用よりも優れた効果をもたらす。したがって、本発明の組成物は、チモシン 4の効果を増強することによって、角膜損傷の予防または治療に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】チモシン 4および有機酸を含む組成物で細胞を処置した後の細胞移動の結果を示す。

【図2】チモシン 4および有機酸を含む組成物で細胞を処置した後の細胞移動の結果を示す。

【図3】チモシン 4および有機酸を含む組成物で細胞を処置した後の細胞移動の結果を示す。

【図4】チモシン 4および有機酸を含む組成物で処置された細胞における細胞増殖の程度を示す。

【図5】PMN浸潤に対するチモシン 4および有機酸を含む本発明組成物の阻害効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

【0016】

本発明は、有効成分としてチモシン 4およびクエン酸またはその塩を含む、角膜損傷の予防または治療用組成物を提供する。

【0017】

本明細書で使用される用語「チモシン 4」は、最初に胸腺から単離され、次いで、さまざまな組織から同定された、チモシンベータ-4またはT 4と呼ばれることもある、4.9kDaを有する43アミノ酸からなるポリペプチドを示す。このタンパク質は、インビトロでの

10

20

30

40

50

内皮細胞の移動および分化の間にアップレギュレートされる。多くのチモシン 4アイソタイプが同定されている。

【0018】

本発明のチモシン 4は、チモシン 4の既知のアミノ酸配列と約70%以上、約75%以上、または約80%以上の相同性を有しうる。本発明のチモシン 4は、野生型チモシン 4のN末端変異体またはC末端変異体であってもよい。具体的には、本発明のチモシン 4は、配列番号：1のアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

【0019】

本明細書で使用されるクエン酸は、式 $C_6H_8O_7$ で表される化合物である。本発明においては、これをクエン酸塩の形態で使用することもできる。クエン酸塩は、クエン酸ナトリウムおよびクエン酸三ナトリウムなどのクエン酸の誘導体を示す。

10

【0020】

クエン酸およびその塩は、一般に、pH変化を減少させるための緩衝剤として使用されるが、本発明は、当業界で一般的に使用されるよりもかなり多くのクエン酸またはその塩を必要とする。本発明において、クエン酸またはその塩は、組成物の総体積に基づいて、1% (w/v) ~ 15% (w/v) の量で含まれてもよい。特に、クエン酸またはその塩は、組成物の全体積に基づいて、5% (w/v) ~ 12% (w/v)、または10% (w/v) の量で含まれる。

【0021】

組成物は、クエン酸またはその塩を、チモシン 4の1重量部に基づいて、10~120重量部の量で含むことができる。具体的には、組成物は、クエン酸またはその塩を、チモシン 4の1重量部に基づいて、10~100重量部の量で含むことができる。より具体的には、組成物は、チモシン 4の1重量部に基づいて、15~100重量部の量のクエン酸またはその塩を含むことができる。さらに具体的には、組成物は、クエン酸またはその塩を、チモシン 4の1重量部に対して50~100重量部の量で含むことができる。

20

【0022】

本明細書で使用される用語「角膜損傷」とは、眼球の表面である角膜上の創傷を意味し、外部からの衝撃だけでなく体内のあらゆる要因に起因するものであってもよい。このような創傷は、角膜上皮、ボーマン膜、角膜実質、デスメ膜および/または角膜内皮に生じうる。

【0023】

本明細書で使用される用語「重量/体積パーセント」または「% (w/v)」という用語は、溶液の体積に対する溶質の質量に基づいて計算される、溶液中の溶質の質量パーセントを示す。たとえば、1% (w/v) 溶液は、1gの溶質が100mlの溶液に溶解されている溶液を意味する。

30

【0024】

本発明による組成物は、酢酸、アスコルビン酸およびそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1つの有機酸をさらに含むことができる。

【0025】

ここで用いられる酢酸は、式： CH_3COOH で表される弱酸である。本発明において、これは酢酸塩の形で使用されてもよい。酢酸塩の1つの実施態様は、酢酸ナトリウムであってもよい。

40

【0026】

本明細書で使用されるアスコルビン酸は、ビタミンCと呼ばれることが多い、式： $C_6H_8O_6$ で表される弱酸である。本発明においては、これは、アスコルビン酸塩の形態で使用されてもよい。アスコルビン酸塩の1つの実施態様は、アスコルビン酸ナトリウムであってもよい。

【0027】

有機酸は、一般に、pH変化を減少させるための緩衝剤として、または酸化防止剤として使用されるが、本発明は、当業界で一般的に使用されている有機酸よりもかなり多くの有機酸を必要とする。本発明において、有機酸は、組成物の総体積に基づいて、0.5% (w/v)

50

～8% (w/v)、または1.0% (w/v)～5% (w/v)の量で含まれてもよい。具体的には、有機酸は、組成物の総体積に基づいて、1.5% (w/v)～5% (w/v)の量で含まれてもよい。

【0028】

有機酸は、クエン酸またはその塩100重量部に基づいて、15～400重量部の量で含まれてもよい。具体的には、有機酸は、クエン酸またはその塩100重量部に基づいて、15～350重量部、15～100重量部、15～70重量部または30～100重量部の量で含まれる。より具体的には、有機酸は、クエン酸またはその塩100重量部に基づいて、40～60重量部の量で含まれてもよい。

【0029】

本発明は、該組成物を含む眼科用製剤を提供する。

10

【0030】

製剤として、たとえば、溶液、ローション、プラスター、ゲル、クリーム、ペースト、スプレー、懸濁液、分散液、ヒドロゲル、軟膏、油または発泡剤などが挙げられる。

【0031】

1つの実施態様では、組成物は、任意の薬学的に許容される、特に眼科的に許容される非毒性の賦形剤または担体と混合することによって製剤化されてもよい。たとえば、担体、安定化剤、可溶化剤、緩衝性物質、防腐剤、増粘剤、等張化剤および/または以下に記載するものなどのその他の賦形剤を使用することができる。さらに、それぞれの製剤を所望のpH値に調整することができる。

【0032】

20

本発明において使用される担体は、典型的には、局所的または全身的投与に適切でありえ、そして、たとえば、以下のものを含み得る：水；水と水混和性溶媒の混合物[例示的な水混和性溶媒として、 $C_1 \sim C_7$ アルカノール、植物油または鉱油(たとえば、0.5～5重量%のヒドロキシエチルセルロース、オレイン酸エチル、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなど)、アクリレート(たとえば、ポリアクリレートの塩またはエチルアクリレート)、メタクリレート、ポリアクリルアミド、天然産物(たとえば、ゼラチン、アルギン酸塩、ペクチン、トラガカント、カラヤガム、キサンタンガム、カラギーナン、寒天、アカシア、デンプン誘導体(たとえば、酢酸デンプンおよびヒドロキシプロピルデンプン))；眼科用の他の非毒性の水溶性ポリマー(たとえば、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースのアルカリ金属塩などのセルロース誘導体)；および他の合成産物(たとえば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリエチレンオキシド、中性カルボポールなどの架橋ポリアクリル酸)；または上記ポリマーの混合物。具体的には、担体として、水、セルロース誘導体(たとえば、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびヒドロキシプロピルセルロースのアルカリ金属塩)、中性カルボポール、またはそれらの混合物が挙げられる。

30

【0033】

安定剤として、たとえば、チロキサポール、脂肪族グリセロールポリ低級アルキレングリコールエステル、脂肪族ポリ低級アルキレングリコールエステル、ポリエチレングリコール、グリセロールエーテルまたはこれらの化合物の混合物が挙げられる。典型的には、それらは、組成物、すなわち活性成分を溶解するのに十分な量で添加される。

40

【0034】

緩衝液は、ホウ酸塩、炭化水素/炭酸塩、グルコン酸塩、リン酸塩、プロピオン酸塩およびトロメタミン(TRIS)緩衝液からなる群から選択される。具体的には、緩衝液は、トロメタミンまたはホウ酸緩衝液であってもよい。緩衝液は、たとえば、生理的に許容されるpH範囲を確実に維持する量で添加される。このようなpHは、典型的には、pH5～9、好ましくはpH6～8.2、より好ましくはpH6.8～8.1の範囲でありうる。

【0035】

50

防腐剤として、第四級アンモニウム塩(たとえば、セトリミド、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゾオキソニウム);チオサリチル酸のアルキル-水銀塩(たとえば、チメロサル、硝酸フェニル水銀、酢酸フェニル水銀またはホウ酸フェニル水銀)、パラベン(たとえば、フェニルパラベンまたはプロピルパラベン)、アルコール(たとえば、クロロブタノール、ベンジルアルコールまたはフェニルエタノール)、グアニジン誘導体(たとえば、クロロヘキシジンまたはポリヘキサメチレンピグアニド)またはソルビン酸が挙げられる。具体的には、防腐剤として、第4級アンモニウム塩またはパラベンが挙げられる。防腐剤は、使用中に細菌および真菌によって引き起こされる二次汚染を防止するのに十分な量で添加されうる。

【0036】

10

等張性(たとえば、0.9%生理食塩水)近くに組成物を調整するために等張化剤を使用することができる。等張化剤の量は、添加されるべき活性剤の種類に応じて変化する。たとえば、本発明の組成物は、最終組成物が眼用に許容される浸透圧、すなわち、好ましくは150~450mOsmの範囲内、特に250~350mOsmの範囲内の浸透圧を有することを可能にするために、その中に等張化剤を含むことができる。具体的には、等張化剤は、ナトリウム塩またはカリウム塩を含みうる。より具体的には、等張化剤は、塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含みうる。たとえば、等張化剤は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、デキストロースおよびマンニトールからなる群から選択されうる。より具体的には、等張化剤は塩化ナトリウムを含むことができる。

【0037】

20

さらに、眼科用製剤中の適切な粘度を維持するために、限定的ではないが、以下の製剤でありうる:(a)モノマーポリオール(たとえば、チロキサポール、グリセロール、プロピレングリコール、エチレングリコール);(b)高分子ポリオール(たとえば、ポリエチレングリコール(たとえば、PEG300、PEG400));(c)セルロース誘導体(セルロース系ポリマー)(たとえば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒプロメロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース);(d)デキストラン(たとえば、デキストラン70);(e)水溶性タンパク質(たとえば、ゼラチン);(f)ビニルポリマー(たとえば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリジン);(g)他のポリオール(たとえば、ポリソルベート80、ポビドン);(h)カルボマー(たとえば、カルボマー934P、カルボマー941、カルボマー940およびカルボマー974P);および(i)多糖類/グリコサミノグリカン(たとえば、ヒアルロナン(ヒアルロン酸/ヒアルロン酸塩)、硫酸コンドロイチン)。

【0038】

添加される賦形剤の量およびタイプは、特定の要件に応じて変化するが、賦形剤は、眼科用製剤の総量に基づいて、約0.0001~約90重量%の範囲、および眼科用分野で一般的に使用される範囲内で使用されうる。

【0039】

眼科用製剤のpH値は、pH3.5~9の範囲であり、具体的にはpH4.5~8の範囲であり、より具体的にはpH5.5~7.8の範囲であり、さらにより具体的には約pH7.0である。

【0040】

40

本発明の別の態様では、組成物を対象に投与することを含む、角膜損傷の予防または治療方法が提供される。

【0041】

本発明は、眼組織を有効成分としてチモシン 4およびクエン酸を含有する組成物の有効量に接触させることを含む、角膜損傷の治療方法を提供することができる。投与の例として、たとえば、本明細書に記載の組成物を含有する溶液、ローション、プラスター、ゲル、クリーム、ペースト、スプレー、懸濁液、分散液、ヒドロゲル、軟膏、油または発泡剤を対象に直接適用することによって、組織と接触させることが挙げられる。

【0042】

さらに、チモシン 4、およびクエン酸またはその塩は、適切に分割された用量で、1日

50

に数回、同時にまたは連続して投与されうる。しかしながら、チモシン 4、およびクエン酸またはその塩の同時投与が最も好ましい。

【0043】

組成物は、組成物の総体積に基づいて、0.05～0.5% (w/v) のチモシン 4を含むことができ、0.08～2.0mlの1日総投与量で投与されうる。組成物は、1日総投与量0.04～10mgのチモシン 4で投与されうる。具体的には、組成物は、組成物の総体積に基づいて、0.1～0.4% (w/v) のチモシン 4を含むことができる。さらに、チモシン 4を含む組成物は、1日1回または1日数回に分けて投与されうる。具体的には、組成物は、1日2回から5回投与されうる。

【0044】

さらに、クエン酸またはその塩は、組成物の総体積に基づいて、1.0% (w/v) ～10% (w/v) の量で含まれてもよく、これは、0.1～4.0mlの1日総投与量で投与されうる。クエン酸またはその塩を1～400mgの1日総投与量で投与することができる。さらに、クエン酸またはその塩を含む組成物は、1日1回または1日数回に分けて投与されうる。具体的には、組成物は、1日2回から5回投与されうる。

【0045】

さらに、酢酸、アスコルビン酸またはその塩は、チモシン 4、およびクエン酸またはその塩と共に、同時または逐次的に投与されうる。具体的には、酢酸、アスコルビン酸またはその塩は、チモシン 4およびクエン酸またはその塩と同時に投与される。さらに、酢酸、アスコルビン酸またはその塩は、組成物の総体積に基づいて、0.5% (w/v) ～8% (w/v) または1.0% (w/v) ～5% (w/v) の量で含まれてもよく、これは、0.1～4.0mlの1日総投与量で投与されうる。酢酸、アスコルビン酸または塩を1～400mgの1日総投与量で投与することができる。さらに、酢酸、アスコルビン酸またはその塩を含む組成物は、1日1回または1日数回に分けて投与されうる。具体的には、組成物は、1日2回から5回投与されうる。

【0046】

本発明の角膜損傷の予防または治療用組成物は、経皮投与(たとえば、局所投与)されることが好ましく、たとえば、非経口または鼻腔内(たとえば、吸入)経路または粘膜などを介して投与されうるが 特にこれらに限定されるものではない。

【0047】

治療方法を、角膜損傷の予防または治療を必要とする対象に適用することができ、ここで、該対象は哺乳類、より具体的にはヒトでありうる。

【0048】

さらに、本発明は、角膜損傷を予防または治療するための医薬の製造のためのチモシン 4およびクエン酸またはその塩を含む組成物の使用を提供する。組成物は、クエン酸、酢酸またはその塩をさらに含み得る。

【0049】

本発明の態様を、以下、さらに記載する：

[項 1]

有効成分としてチモシン 4およびクエン酸またはその塩を含有する、角膜損傷の予防または治療用組成物。

[項 2]

クエン酸の塩が、クエン酸ナトリウムである、上記項 1 に記載の組成物。

[項 3]

クエン酸またはその塩を、チモシン 4の1重量部当たり、10～120重量部の量で含む、上記項 1 に記載の組成物。

[項 4]

酢酸、アスコルビン酸およびそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1つの有機酸をさらに含む、上記項 1 に記載の組成物。

[項 5]

有機酸が、酢酸またはその塩である、上記項 4 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

[項 6]

有機酸を、クエン酸またはその塩100重量部当たり、15～70重量部の量で含む、上記項5に記載の組成物。

[項 7]

上記項1～6のいずれか1つに記載の組成物を含む眼科用製剤。

[項 8]

上記項1～6のいずれか1つに記載の組成物を対象に投与することを含む、角膜損傷の治療方法。

[項 9]

組成物が、組成物の総体積に基づいて、0.05～0.5% (w/v) の量でチモシン 4を含み、0.08～2.0mlの1日総投与量で投与される、上記項8に記載の方法。

10

[項 10]

組成物が、組成物の総体積に基づいて、1.0% (w/v) ～10.0% (w/v) の量でクエン酸またはその塩を含み、0.1～4.0mlの1日総投与量で投与される、上記項8に記載の方法。

[項 11]

角膜損傷を予防または治療するための医薬の製造のための、上記項1～6のいずれか1つに記載の組成物の使用。

発明の形態

以下、本発明をより明確に理解するために、以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。しかしながら、本発明の実施例は、さまざまな変形または変更を含むことができ、本発明の範囲は以下の実施例の範囲内に限定されると解釈されるものではない。

20

【実施例】【0050】実施例1：チモシン 4を含む組成物の製造

組成物の総体積に基づいて、滅菌精製水に、クエン酸ナトリウムを1.5% (w/v) の量で加え、混合して完全に溶解させた。次いで、0.1% (w/v) のチモシン 4(Bachem.、US、配列番号：1)を混合物に加え、完全に溶解するまで混合した。得られる溶液のpHを、水酸化ナトリウムおよび塩酸を用いてpH7.0に調節した。その後、0.2μmのフィルターでろ過した、次いで、ろ過した混合物を低密度ポリエチレン容器に充填し、密封した。

30

【0051】実施例2～11および比較例1～6：チモシン 4を含む組成物の製造

以下の第1表に示す組成物を、実施例1に記載したものと同一手順にしたがって製造した。他に示さない限り、第1表の数値は、組成物の総体積に基づいて、% (w/v) の単位を有する。

【0052】第1表

【表 1】

	チモシン β 4	クエン 酸ナト リウム	酢酸ナト リウム	アスコル ビン酸ナ トリウム	塩酸	水酸化ナトリ ウム	滅菌純水
コントロ ール	0.1	—	—	—	pH 7.0に調整 するために必 要ならば添加	pH 7.0に調整 するために必 要ならば添加	100%(w/v) にするた めに必要 な量
実施例2	0.1	5.0	—	—			
実施例3	0.1	10.0	—	—			
比較例1	0.1	—	0.5	—			
比較例2	0.1	—	1.5	—			
比較例3	0.1	—	5.0	—			
比較例4	0.1	—	—	0.5			
比較例5	0.1	—	—	1.5			
比較例6	0.1	—	—	5.0			

10

【0053】

さらに、以下の第2表に示す組成物を、実施例1に記載したものと同一手順にしたがって製造した。他に示さない限り、第2表の数値は、組成物の総体積に基づいて、%(w/v)の単位を有する。

20

【0054】

第2表

【表 2】

	チモシ ン β 4	クエン酸 ナトリウ ム	酢酸ナト リウム	アスコル ビン酸ナ トリウム	塩酸	水酸化ナトリ ウム	滅菌純水
実施例4	0.1	10.0	5.0	—	pH 7.0に調整 するために必 要ならば添加	pH 7.0に調整 するために必 要ならば添加	100%(w/v)に するた めに必 要な量
実施例5	0.1	10.0	1.5	—			
実施例6	0.1	10.0	—	5.0			
実施例7	0.1	10.0	—	1.5			
実施例8	0.1	1.5	5.0	—			
実施例9	0.1	1.5	1.5	—			
実施例10	0.1	1.5	—	5.0			
実施例11	0.1	1.5	—	1.5			

30

【0055】

実験例1：細胞移動実験

初代ヒト角膜上皮細胞(HCEC)(ATCC、米国)を、6ウェルプレート(Thermo, Ltd.)に 3×10^5 細胞/ウェルで播種することにより、単一細胞層を形成した。次いで、1mlの滅菌ピペットチップを使用して、各ウェルの中央に同じような大きさの引っかき傷を形成した。培養液でウェルを洗浄して細胞破片を除去した後、上記実施例1～11および比較例1～6で製造したチモシン 4を含む組成物を、ウェルに添加した。

40

【0056】

0時間、6時間、12時間および24時間後、デジタルカメラと組み合わせた倒立顕微鏡で、各ウェルを撮影した。引っかき傷の大きさは細胞移動によって縮小され、これが、角膜傷の治療効果を示すことが判明した。

【0057】

図1～図3に示されるように、本実験の結果は、チモシン 4のみを有効成分として含有する組成物と比較して、チモシン 4と共にクエン酸を含む組成物が、細胞移動を促進す

50

ることを実証する。さらに、チモシン 4、クエン酸および酢酸を含む組成物は、角膜上皮細胞の移動を最も顕著に促進することが分かった。

【0058】

実験例2：細胞増殖実験

チモシン 4を含む組成物が、初代ヒト角膜上皮細胞の増殖を促進するかどうかを確認するために、細胞をCCK-8キット(Dojindo、Japan)を用いて染色した。96ウェルプレート(Thermo, Ltd.)の各ウェル上に100 μ l中の 3×10^3 個の細胞を播種した後、コントロール、実施例1、実施例3、実施例4および比較例3にしたがってチモシン 4を含む組成物をウェルに添加した。

【0059】

チモシン 4を含む組成物を投与した12時間後、24時間後および48時間後に、10 μ lのCCK-8試薬をプレートに加え、37℃で2時間インキュベートした。450nmでの光学密度(OD₄₅₀)を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。結果として、チモシン 4のみを含む組成物と比較して、チモシン 4およびクエン酸を含む組成物、ならびにチモシン 4、クエン酸および酢酸を含む組成物は、細胞増殖を顕著に促進した(図4参照)。

【0060】

実験例3：動物モデルにおけるチモシン 4、クエン酸およびその混合物の治療効果の決定

3.1. 化学的熱傷の動物モデルの作製

創傷治療効果の実験のために、6～8週齢のマウス(BALB/c)をエーテルで麻酔し、次いで、1N NaOH中に浸した丸型濾紙(直径2mm)を、角膜の中心に30秒間接触させて、角膜上皮に損傷を誘発する。損傷部分を0.9%生理食塩水で5秒間洗浄した後、角膜損傷を誘導後5分の時点で、0.9%生理食塩水、および実施例3、実施例4およびコントロールの組成物を、それぞれ眼に滴下した。0.9%生理食塩水で角膜損傷誘発後5分で実施例3、実施例4及び対照の組成物をそれぞれ眼に滴下した。その後、上記組成物および0.9%生理食塩水をそれぞれ1日4回(20ml/回)眼に滴下した。

【0061】

3.2. ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性の検討

Exp. Eye Res., 1984, 39, 261-265に記載されている方法にしたがって、PMNを定量するために、上記組成物(0.9%生理食塩水、実施例3、実施例10およびコントロール)をそれぞれ投与された角膜においてミエロペルオキシダーゼ活性分析を行った。MPOの活性は、PMNの数に比例する。

【0062】

角膜損傷後1、7および14日目に、各組成物(n=3/グループ、毎回)を投与したマウスから角膜を除去し、0.5%ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド(HTAB)を含む50mMリン酸緩衝液(pH6.0)1mlを含有するバイアル中で小片に細断し、ポリトロンホモジナイザーを用いて氷上でホモジナイズした。ホモジナイズ後、ホモジナイザーをHTAB溶液で洗浄した。HTAB溶液を加えて1ml当たり100mgの組織を有するようにホモジネートを調節し、10秒間超音波処理し、3回凍結融解し、4℃および14,000rpmにて遠心分離した。0.1mlの上清を、0.167mg/mlのo-ジアニジン二塩酸塩および0.0005%の過酸化水素を含有する2.9mlの50mMリン酸緩衝液(pH6.0)と混合した。460nmにおける吸光度の変化を、UV分光計を用いて25℃にて5分間測定した。1単位のMPO活性は、25℃にて1分間あたり1 μ molの過酸化物の分解を示した。

【0063】

測定の結果として、生理食塩水またはチモシン 4のみを含む組成物と比較して、チモシン 4とクエン酸を含む組成物、ならびにチモシン 4、クエン酸および酢酸を含む組成物は、PMN浸潤を有意に阻害することが確認された(図5参照)。

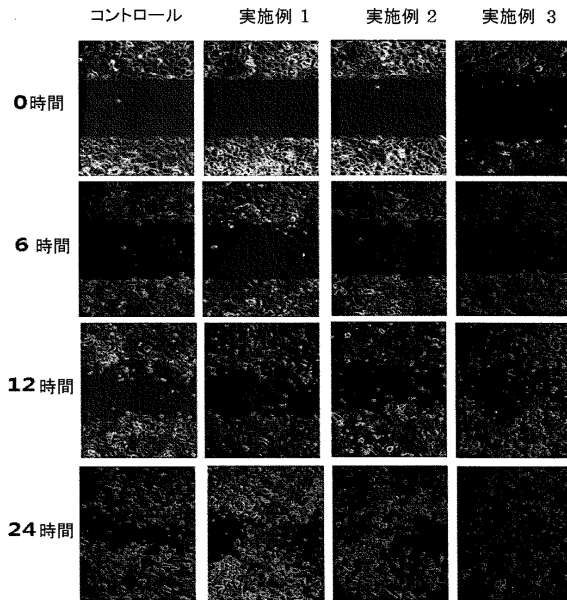
10

20

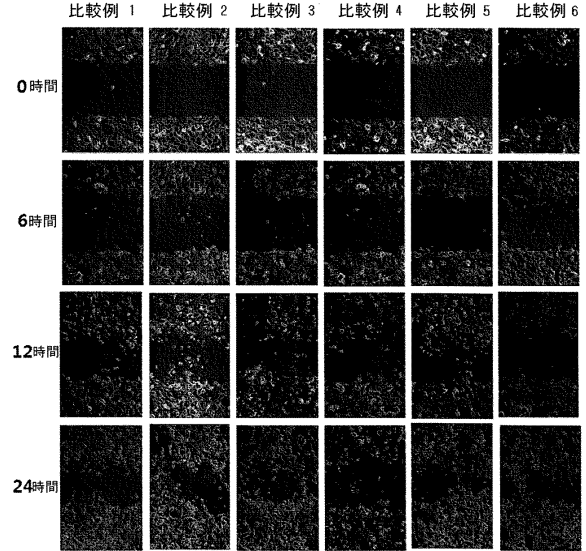
30

40

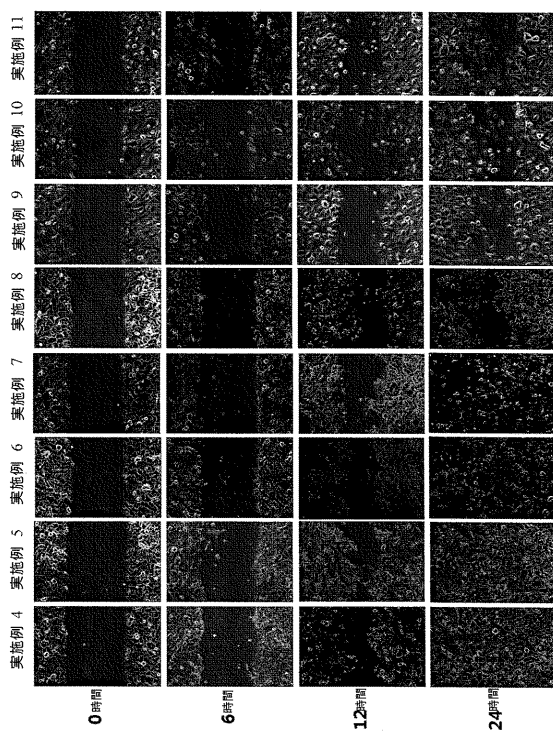
【図 1】



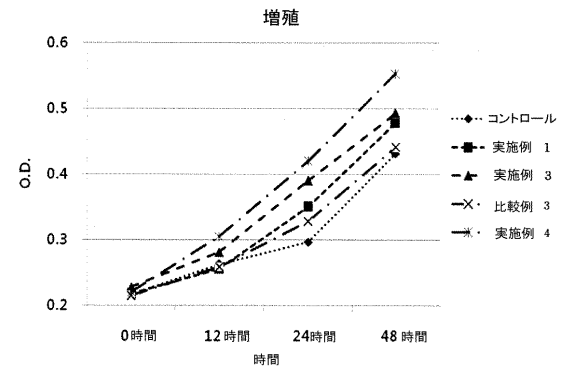
【図 2】



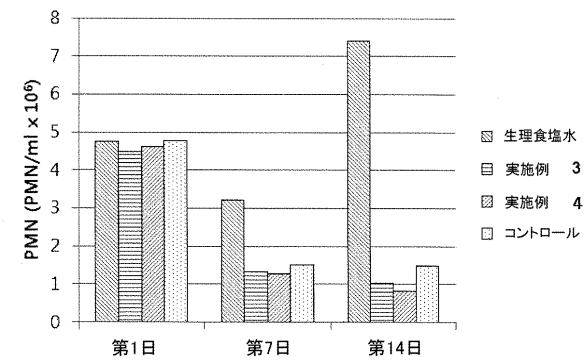
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0006910072000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 カン・シヌク

大韓民国13532キョンギド、ソンナムシ、ブンダング、パンギョヨクロ100、602-902

(72)発明者 キム・ギョンスン

大韓民国48050プサン、ヘウンデグ、セントウムチュンアンロ142、204-1202

(72)発明者 ソン・ジヘ

大韓民国07295ソウル、ヨンドンボグ、ムルレロ20ギル14、1-1017

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 国際公開第2008/108927(WO, A1)

特表2008-543878(JP, A)

特許第6634451(JP, B2)

Clinical Ophthalmology, 2007, 1(3), pp.201-207

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/19

A61K 47/12

A61K 47/22

A61P 27/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)