

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5815725号  
(P5815725)

(45) 発行日 平成27年11月17日(2015.11.17)

(24) 登録日 平成27年10月2日(2015.10.2)

(51) Int.Cl.	F 1	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	Z N A
A 6 1 K 9/06 (2006.01)	A 6 1 K 9/06	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	

請求項の数 7 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-537646 (P2013-537646)	(73) 特許権者	508230226
(86) (22) 出願日	平成22年11月3日(2010.11.3)		ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
(65) 公表番号	特表2013-542954 (P2013-542954A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス サウス オリーブ ストリート 1150 스위트 2300
(43) 公表日	平成25年11月28日(2013.11.28)	(74) 代理人	110000671
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/055319		八田国際特許業務法人
(87) 国際公開番号	W02012/060832	(72) 発明者	チェン, チ ファン
(87) 国際公開日	平成24年5月10日(2012.5.10)		アメリカ合衆国, 94040 カリフォルニア州, マウンテン ビュー, デル メジ オ アベニュー 141, アpartment 124
審査請求日	平成25年10月31日(2013.10.31)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 創傷治癒組成物およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

E E K E D K E E E K E K E E K E S E D K P E I E D V G S D E E E E K K D G D K K K K K I K E K Y I D Q E E のアミノ酸配列からなる ポリペプチド化合物を含む、創傷治癒組成物。

【請求項2】

ヒト h s p 9 0 ペプチドの 236 ~ 350 番目のアミノ酸配列からなる ポリペプチド化合物を含む、創傷治癒組成物。

【請求項3】

S D E E E E K K D G D K K K K K I K E K Y I D Q E E のアミノ酸配列からなる ポリペプチド化合物を含む、創傷治癒組成物。

【請求項4】

前記ポリペプチド化合物を運ぶための薬剤媒体をさらに含み、前記薬剤媒体は水溶液、懸濁液、分散液、膏薬、軟膏、ジェル、クリーム、ローション、スプレーまたはペーストからなる群から選択される一つである、請求項1~3のいずれか1項に記載の創傷治癒組成物。

【請求項5】

前記薬剤媒体中、前記ポリペプチドが約 10 μg/ml から約 3 mg/ml の濃度を有する、請求項4に記載の創傷治癒組成物。

【請求項6】

10

20

前記薬剤媒体中、前記ポリペプチドが約30 μg/mlから約500 μg/mlの濃度を有する、請求項4に記載の創傷治癒組成物。

【請求項7】

前記組成物を6時間毎～約72時間毎に傷に塗布することを特徴とする、請求項4に記載の創傷治癒組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦支援研究に関する声明

本発明は、国立衛生研究所によって授与された契約番号GM67100とAR46538に基づく政府支援により成された。したがって、米国政府は本発明において一定の権利を有する。

10

【0002】

背景

発明の分野

本発明は、新規な創傷治癒組成物とその使用の分野に関する。特に、本発明は、すべての皮膚細胞の遊走を促進することで創傷治癒を早めるための、ポリペプチドの組成物と、これらの組成物の皮膚への局所的な塗布に関する。

【背景技術】

【0003】

創傷治癒または創傷修復は、皮膚が、創傷の後、自身を修復する複雑なプロセスである。通常の皮膚において、表皮（最も外部の層）と真皮（内部またはより深い層）は安定して定まった平衡状態で存在し、外部環境に対して保護バリアを形成する。通常の創傷治癒プロセスは、概して3つの段階（すなわち、炎症段階、増殖段階および成熟段階）に、分類することができる。炎症段階は0～2日続き、傷部分への細胞の規則正しい補充を含む。このあと、2～6日の増殖段階が続く。この増殖段階では、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞および創傷床中の他の細胞は傷を閉じるために活発な増殖を始める。組織修正の第一段階の間、細胞の遊走を伴った急性炎症反応がおこる。最初の24～48時間の間は好中球が優位であり、3日目までにはマクロファージが活性化される。好中球およびマクロファージは病的微生物と組織破片を貪食および消化する。増殖段階の後の成熟段階は、21日目にピークを迎え、最初の瘢痕組織を再構成することによって完全に治癒される。

20

30

【0004】

問題となる創傷は、先に述べたような治癒過程の間、通常のタイムテーブルに従わない。問題となる創傷の治癒ために必要とされる時間が長引くことは、仕事の生産性と全体的な生活の質（以下、QOL）の低下と同様に、治癒の遅延に関連した不要な費用や痛みを引き起こす。毎年、圧力潰瘍と診断される200万人中、900、000人は非治癒下肢潰瘍がある。65才以上の糖尿病患者の18%が慢性、非治療足潰瘍にかかっていると見積もられる。さらに、感染性下脚慢性傷により、50000人が下肢切断を余儀なくされている。非治癒足潰瘍の罹患による患者のQOLは、傷の悪臭、感染および痛みのため、大きく低下してしまう。これに加えて、これらの問題も、慢性皮膚傷患者にとって、社会的な孤立と自己像の低下につながる。財政的には、米国の年輩者において、創傷治癒の遅れを管理するための費用は、1年につき90億ドルと見積もられている。

40

【0005】

多大な時間と費用が、慢性創傷治癒の分野で利用されてきた。AKELLAらは、米国特許第7、081、240号において、創傷治療のための、タンパク質混合物の使用を開示している。その混合物は骨から分離されるか、または組み換えタンパク質（例えば骨形成タンパク質、形質転換成長因子（TRANSFORMING GROWTH FACTORS）および線維芽細胞成長因子）から作り出される。しかし、成長因子による治療の全体的な臨床結果は期待外れであり、そして、ほとんど成長因子はFDA承認を最終的に受けなかった。

【0006】

50

キシュは創傷の治療における用途として、ヒト 1 - アンチトリプシン、ヒト胎盤アルカリホスファターゼ、ヒトトランスフェリン (human transferring) および 1-酸性糖タンパク質を含む、非成長因子タンパク質の使用を検討している。しかしながら、この方法には、異なる段階で作用するいくつかの薬品の複雑な逐次適用が要求され、そのうえ各々の処置による混合物の調整が必要とされる可能性があるという問題点がある。同様に、代用皮膚への使用は、費用対効果がよくなかった。

#### 【 0 0 0 7 】

再上皮形成はヒトの皮膚の創傷治癒における重要な事象である。そこにおいて、表皮ケラチン細胞 (epidermal keratinocyte) は創傷を閉じるために側方に移動する。慢性的創傷においては、ケラチン細胞の移動は妨げられ、そして、傷は開いたままの状態になり、患者の病的状態を引き起こし、さらには死に至ることもある。

#### 【 0 0 0 8 】

人間の皮膚創傷治癒において、重要な律速段階は、傷端に存在する上皮細胞および真皮細胞の創傷床への移動の開始である。ヒトケラチン生成細胞 (HKCs) は傷を閉じるために、切れた端から創傷床を超えて、側面に沿うように移動する。この過程は、再上皮形成として知られている。真皮細胞 (皮膚線維芽細胞 (DFs) および皮膚微小血管内皮細胞 (HDMECs) を含む) はHKCの移動に続き、創傷へ移動を開始する。そこで、これらの細胞はマトリックス・タンパク質を沈着させ、新しく閉じた傷を緊縮および再構築し、血管を新生する。HKCの移動は、主にヒト血清中のTGFによって引き起こされ、ヒト血清中に共存する高濃度のTGFファミリーサイトカインによる影響を受けない。対照的に、TGFの存在は、これらの成長因子 (例えばPDGF-BBとVEGF) が認められる場合さえ、真皮細胞の移動を阻害する。したがって、HKC移動が、なぜ創傷治癒の間、DFおよびHDMECの移動より前に活性化するかは理解できるが、一方、DFsとHDMECsが大量のTGFの存在下で、創傷床へどのように移動するかは、不明であった。

#### 【 0 0 0 9 】

他の研究は、創傷治癒を促進するために、ヒートショックタンパク質の使用を試みた。例えば、シュリーヴァスタヴァら (Srivastava et al.) は、米国特許第6,475,490号において、非複合体または抗原分子と非共有結合で複合体を形成する、gp96、hsp90とhsp70を含む、ヒートショックタンパク質からなる組成物を開示している。しかし、医薬品組成物の中にこれらの大きな分子の全長を使用すること、タンパク質の単位重量当たりの効果の減少となる。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 0 0 1 0 】

##### 要約

上述の問題を解決するために、この開示では、比較的低分子のポリペプチド鎖を持つポリペプチド化合物の分類からなる創傷治癒のための組成物を特定する。一形態によれば、ポリペプチド鎖は鎖あたり5~120のアミノ酸を持つ。任意で、組成物は、ポリペプチド合成物を運ぶために、薬剤媒体 (例えば水溶液、懸濁液、分散液、膏薬、軟膏、ジェル、クリーム、ローション、スプレーまたはペースト) を含む。

#### 【 0 0 1 1 】

他の一形態によれば、ポリペプチド鎖は鎖あたり20~60のアミノ酸を有する。任意に、ポリペプチド鎖はhsp90ペプチドの236~350番目の配列 (E E K E D K E E E K E K E E K E S E D K P E I E D V G S D E E E E K K D G D K K K K K I K E K Y I D Q E E または S D E E E E K K D G D K K K K K I K E K Y I D Q E E) 由来のアミノ酸配列を含む。組成物は、任意に、5~120個のアミノ酸、20~60個のアミノ酸または上記に示した特定のアミノ酸のポリペプチド鎖の混合物を含む。

#### 【 0 0 1 2 】

この開示は、ポリペプチド鎖を有するポリペプチド化合物からなる医薬組成物の第1の有効量を皮膚創傷に接触させることを含む皮膚傷の治療方法にも及ぶ。ポリペプチド鎖は

鎖あたり5～120個のアミノ酸、鎖あたり20～60個のアミノ酸、またはhsp90ペプチドの236～350番目のアミノ酸(EEKEDKEEKEKEESEDKPEIEDVGSDEEEKKDGDKKKKKKIKKEYIDQEE、またはSDEEEKKDGDKKKKKKIKKEYIDQEE)由来のアミノ酸配列を含む。

【0013】

その使用方法は、任意に、ポリペプチド合成物を運ぶための薬剤媒体(例えば水溶液、懸濁液、分散液、膏薬、軟膏、ジェル、クリーム、ローション、スプレーまたはペースト)を有する医薬組成物を使用する。

【0014】

他の一形態によれば、ポリペプチド合成物は上述の薬剤媒体中、約10 $\mu$ g/ml～約3mg/mlの濃度で配合される。任意に、ポリペプチド合成物は上述の薬剤媒体中、約30 $\mu$ g/ml～約500 $\mu$ g/mlの濃度で配合される。

【0015】

治癒の方法に関する一形態によれば、組成物は約6時間毎から約72時間毎に傷に塗布される。任意では、組成物は約24時間毎から48時間毎に傷に適用される。

【0016】

この発明のさらなる長所および他の特徴は、後に続く説明に記載されており、および一部の後述の試験は当業者らにとって明白なものであり、または発明の実施によって理解されるかもしれない。発明の長所は、特に添付の請求項において示されているように、認識され、および、取得されるかもしれない。

【0017】

理解されているように、この発明は他の、または異なる形態が可能であり、そして、いくつかのその詳細は、発表を逸脱しないすべての範囲において、様々な明らかな点で修正が可能である。従って、図面と記述は、実際には例示的なものとしてみなされ、それに限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、コントロールのクリームと対比した、マウスの創傷治癒におけるポリペプチド化合物の効果およびそれらの影響と棒グラフである。

【図2】図2A～Fは、115個のアミノ酸から成るペプチド鎖を持つポリペプチドとコントロールのクリームを対比した、マウスの皮膚創傷治癒の結果の写真である。

【図3】図3A～3Eは、FDA認証化合物(Regranex™, PDGF-BB)とコントロールのクリームを対比したマウスの皮膚創傷治癒の結果の写真である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

理論に制限されることなく、皮膚損傷の後、パラクリンまたはオートクリンにより放出されたTGF $\beta$ がHKCにおいて膜移動と既存のhsp90タンパク質の分泌を促進すると考えられる。分泌されたhsp90は、細胞表面上のCD91/LRP-1受容体に結合することによって、上皮再形成の過程において重要な事象であるHKCの移動を活性化する。細胞外のhsp90が創傷床において、緊張を和らげ、ある濃度に達したとき、危険な状態(ATPおよびATPアーゼの活性がなく、およびTGF $\beta$ ファミリーサイトカインのような、一般的な細胞の運動性阻害剤の存在下のような状況)下であっても、切り傷の端から、創傷床へDFsおよびHDMECsの移動を誘導し始める。このように細胞外のhsp90は皮膚創傷治癒のために利用されている。しかしながら、慢性的な傷が存在する場合、皮膚は傷の治癒のためにhsp90を産生することができない。よって、そのような傷には皮膚創傷治癒を促進するための添加剤を塗布しなければならない。

【実施例】

【0020】

10

20

30

40

50

図1にみられるように、全長(野生型)のhsp90はコントロールの培地と比較して、著しい運動機能調整活性を示した。ミドルドメイン(middle domain)と荷電配列(charged sequence)をもつM-1は、野生型hsp90と同程度の活性を示した。しかしながら、ミドルドメインが荷電配列を欠くと、著しく活性を失う(M-2)。しかし、荷電配列とN末端ドメイン全体(N')では、活性を刺激することはなかった。2つのC末端ドメイン(C'-terminal domain、結果を確実にするため作成されたC'-1およびC'-2)は両方ともわずかな機能調整活性を示した。故に、hsp90は主に、hsp90内のそれらの表面と一致するミドルドメインとカルボキシドメインを通じてHKCの移動を促進する。それに応じて、hsp90のミドルドメインを含む組成物は、hsp90のみから成る組成物の創傷治癒特性と類似した特性を示す。

10

#### 【0021】

しかしながら、図1にも見られるように、hsp90の全長、または、ミドルドメインの全長およびhsp90の帯電した部分が、傷の治癒に必須なわけではない。236番目~350番目の115のアミノ酸からなるF-3、および236番目~289番目の54のアミノ酸(配列:EEKEDKEEEKKEEKESDKPEIEDVGSDEEEKKDGDKKKKKIKEKYIDQEE)からなるF-5はhsp90の全長と同等の活性(細胞移動が100%)を示した。このように、hsp90の不必要な部分は傷の治癒のための組成物に含まれる必要はない。その結果、組成物を、活性のある創傷治癒試薬の重量に対し、より効果的にすることができる。さらに、hsp90タンパク質または、hsp90タンパク質のミドルドメインと帯電部分を足したタンパク質を得るための複雑な単離方法と抽出方法に頼らずに、より短い鎖のポリペプチド鎖を得るためのより安価で一般的な合成方法を使用することが可能である。

20

#### 【0022】

115個のアミノ酸と54個のアミノ酸をもつポリペプチド合成物の有効性を証明するために、それらのポリペプチド合成物を一般的な方法によって合成した。10%カルボキシメチルセルロース(Carboxymethylcellulose)クリーム100 $\mu$ l中に100 $\mu$ gのF-3断片を含んだクリームと、何も含まないクリーム(コントロール)を5日間、毎日ヌードマウスの背中にある1cm四方の傷に局所的に塗布した。そして、2日毎に傷を分析した。代表的な実験の選択された傷の画像を図2A~2Fに示す。コントロールのクリームと比べ、F-3は顕著に4日、6日、8日、11日、13日および15日から始まる傷の閉鎖を促進することがわかる。

30

#### 【0023】

##### 実施例

実施例においては、以下の条件または方法を利用した。

#### 【0024】

10%のカルボキシメチルセルロースクリーム(滅菌)に100 $\mu$ lの薬剤を混ぜ込み、ヌードマウスの背中上の1cm四方の創傷を局所的に覆う。この処置の後、傷は2~3の抗生物質とバンディ(bandi)で覆われ、そして、そのバンディ(bandi)はコバン(COBAN)でマウスを巻くことによって固定される。それから、F-3化合物の混合物を5日間まで毎日加えられ、そして、傷を2日毎に分析する。

40

#### 【0025】

F-3の局所的な処置用のマウスを準備するために、8~10週齢のマウスの中背部の皮膚を鉗子で持ち上げて、一対のはさみで全層皮膚を切断することによって、1.0cm四方の全層切除した創傷を作った。この創傷を局所的に、300 $\mu$ lの組み換えF-3化合物を含む、または含まない(コントロール)100 $\mu$ lの10%カルボキシメチルセルロースクリームで覆った。傷域は、乾燥を防止するために、バンドエイドおよびコバン(自己粘着性のラップ)によって覆った。F-3化合物の1回分の投与量だけを傷に投与した。傷域を測定するために、傷の標準デジタル写真を、創傷後、4、6、8、11、13および15日目に撮影し、そして開いた傷域は、画像解析機(AlphaEase FC

50

バージョン4.1.0(アルファ・イノテック社、Alpha Innotech Corporation)を用いて決定した。傷域の百分率を、治療されている傷の領域を最初の傷の領域と比較することによって定義した。スチューデントt-検定を統計分析のために使用した。南カリフォルニア大学の動物使用委員会の承認を得たプロトコルを使って、すべての動物実験は行われた。

【0026】

以下の実施例は、説明のために述べられ、発明の範囲を制限することを目的としない。

【0027】

1.0 cm<sup>2</sup> (1 cm × 1 cm) の四角い全層を削除した傷を、8 ~ 10 週齢の無胸腺ヌードマウスの中背部に作成した。そして、F - 3 の医薬組成物を局所的に5日間、毎日塗布した(1群につきn = 10のマウス)。(A) 4、6、8、11、13および15日目の傷が示されている。傷のサイズはF - 3を含むクリームによって局所的に処置されたマウスにおいて顕著に小さくなっている(右パネル)が、クリームのみの場合にはそうではない(左パネル)。(B) 創傷後、4、6、8、11、13および15日目に、平均値Mean ± 標準偏差SDで傷のサイズの測定を行った。

10

【0028】

F - 3化合物の効果の比較のために、FDA認証を受けているリジェネレックス™ (Regenerex™) を使用した研究も実施した。上記の方法を使って、投与量40 μgのPDGF - BB (Regenerex™) を5日間にわたってマウスに塗布し(1群につきn = 10のマウス)、F - 3化合物と対比した。(A) 0、5、7、10および12日目の傷を図3A ~ 3Eに示す。図からわかるように、リジェネレックス™ (下のパネル) を使用した場合に対して、F - 3を含むクリームで処置したマウスでは、傷のサイズは顕著に小さくなっている(上のパネル)。

20

【0029】

この発明は、標準的な材料、方法および器材を使用することによって実施することができる。したがって、そのような材料、器材および方法の詳細は、ここでは詳細に述べない。以前の記載は、発表の完全な理解を提供するために、多数の特有の詳細が述べられていた(例えば特定の材料、構造、化学製品、プロセス、その他)。しかしながら、特記した詳細に頼らずに、この発明を実施できることが認識されるべきである。他の例においては、周知の処理の構造は、不必要にこの発明を不明瞭にしないために、詳細に記述されていない。

30

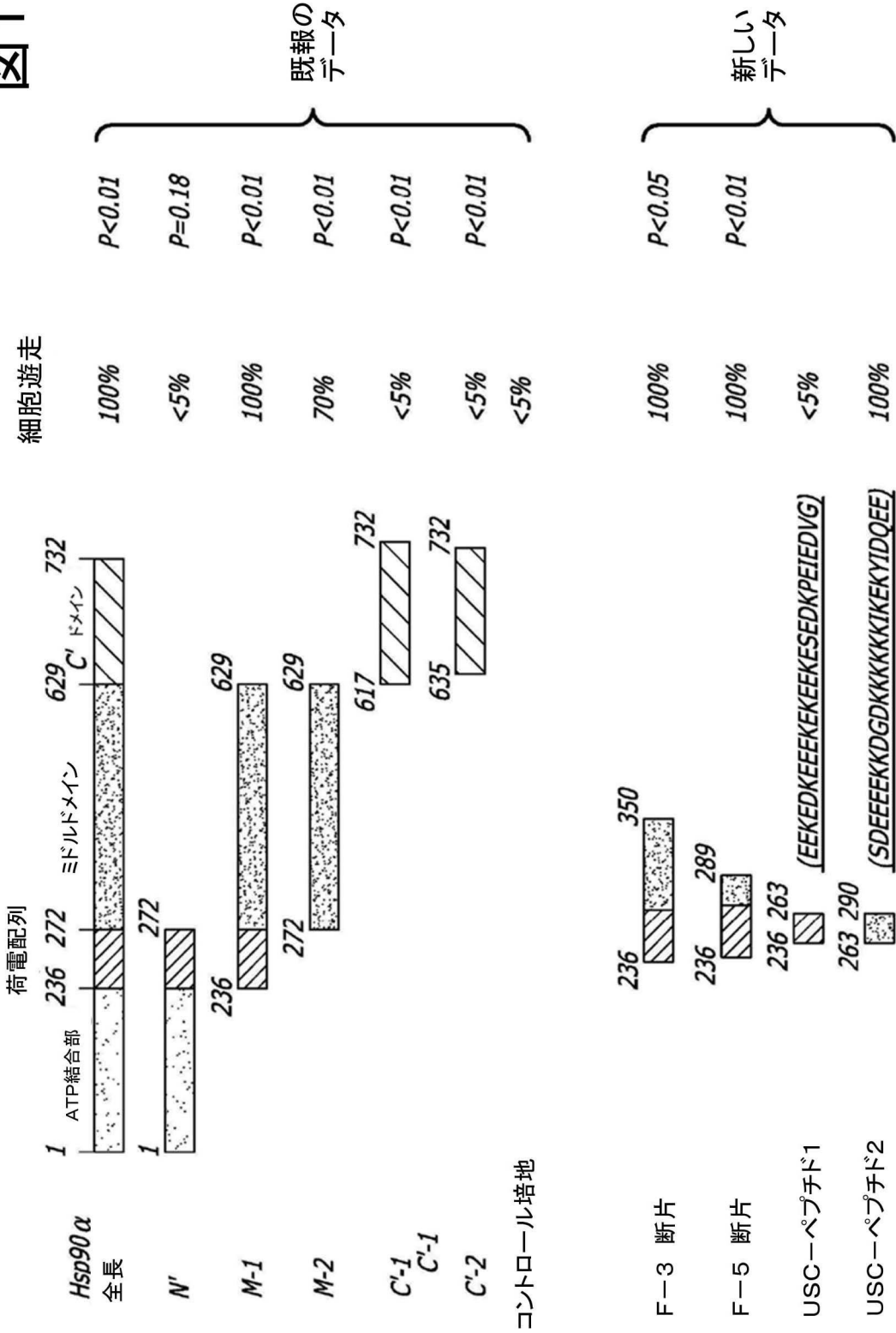
【0030】

ここには、この発明のほんのいくつかの例しか記述されていない。ここに表した通り、発明が様々な他の組み合わせ、および環境の中で使用可能であり、および発明概念の範囲内での変更または修正が可能であることが理解される。

in vitro におけるヒト皮膚細胞遊走のための組換えHSP90タンパク質／ペプチド

【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

コントロール(左)とHsp90のF-3断片(右)の比較 (1回の処置は300 $\mu$ g)



図 2A  
4日目



図 2B  
6日目



図 2C  
8日目



図 2D  
11日目



図 2E  
13日目



図 2F  
15日目





【 図 3 】

FDA承認済みのレグラネクス (Regranex、PDGF-BB、推奨40  $\mu$ g) はほとんど効果を見せなかった。

図 3A 0日目

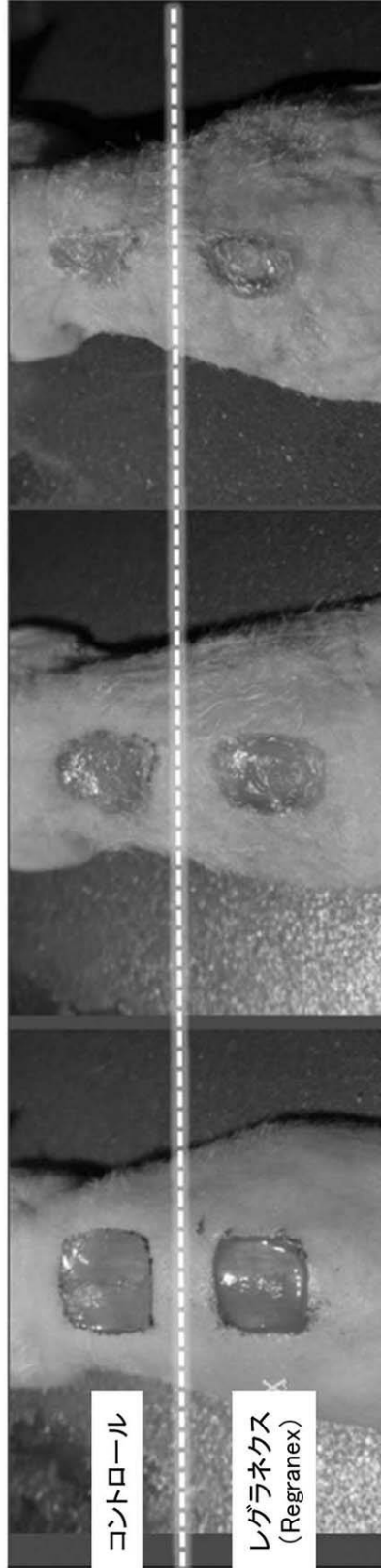


図 3B 5日目

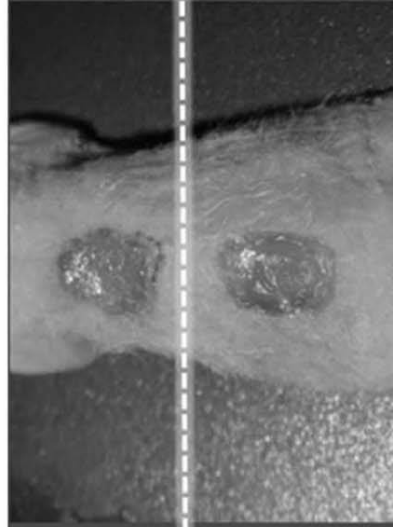


図 3C 7日目

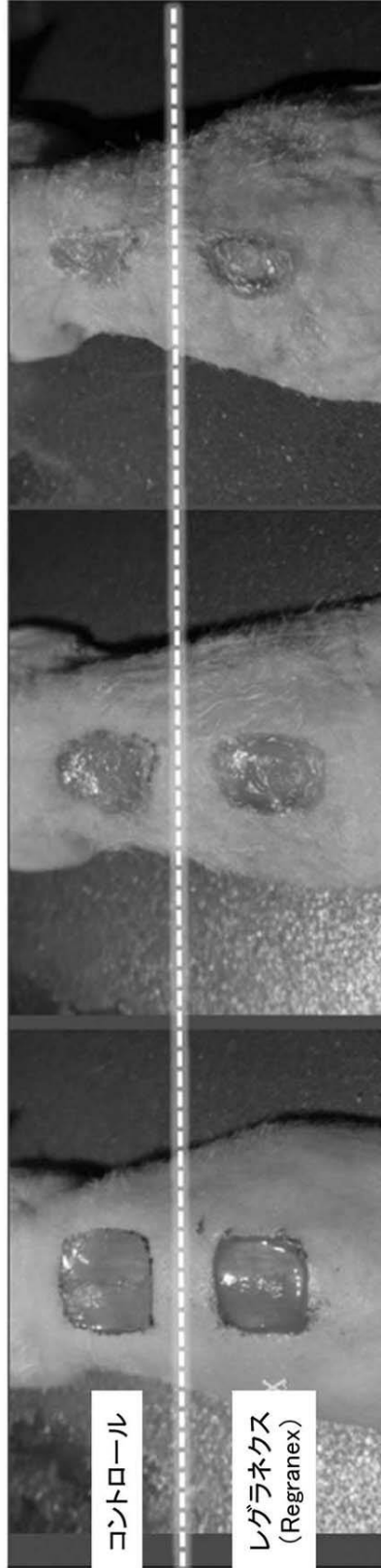


図 3D 10日目

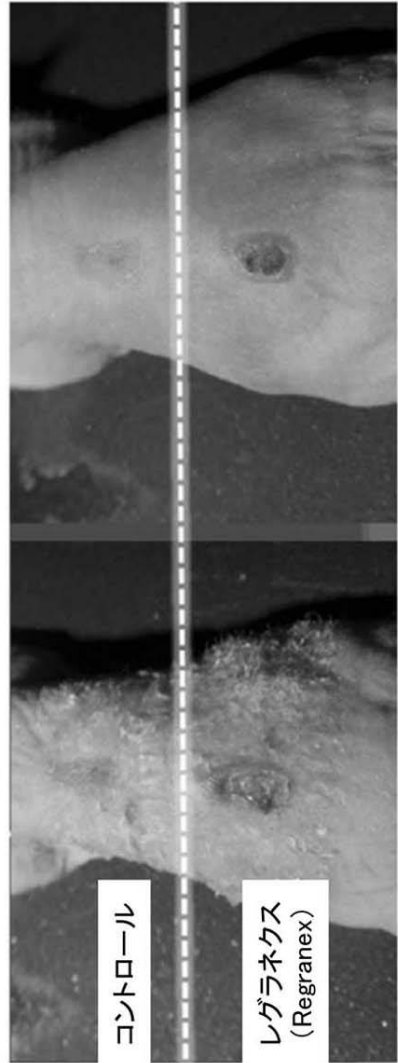
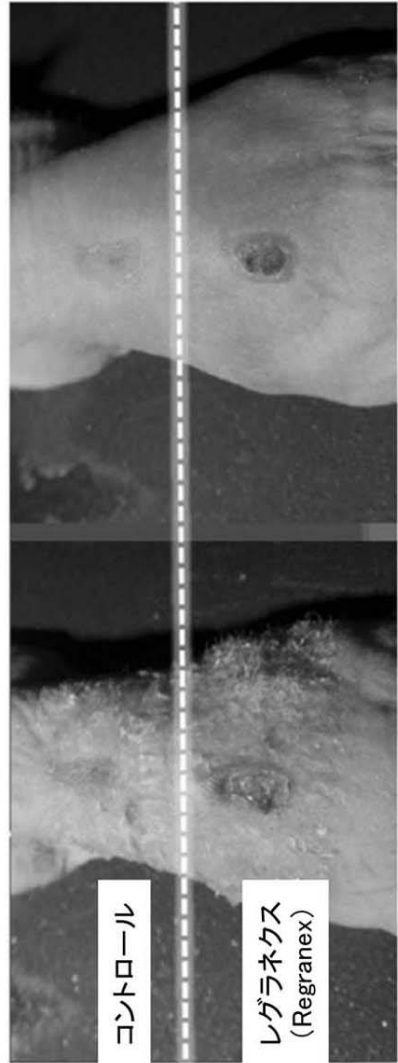


図 3E 12日目



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 17/02 (2006.01) A 6 1 P 17/02

(72)発明者 ウッドリー, デーヴィッド, ティー.  
アメリカ合衆国, 9 1 0 0 1 カリフォルニア州, アルタデナ, ウェスト ミラード キャニオン  
ロード 6 4 0

(72)発明者 チェン, メイ  
アメリカ合衆国, 9 1 0 0 1 カリフォルニア州, アルタデナ, ウェスト ハートウェル コート  
6 1 5

(72)発明者 リ, ウェイ  
アメリカ合衆国, 9 1 0 0 1 カリフォルニア州, アルタデナ, ウェスト ハートウェル コート  
6 1 5

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2002-527485(JP, A)  
国際公開第2008/086358(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 3 8 / 0 0  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q