

(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2020-526497

(P2020-526497A)

(43) 公表日 令和2年8月31日 (2020.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/06 Z N A	4 C O 7 6
<b>C07K 7/08 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/08	4 C O 8 6
<b>C07K 14/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/00	4 H O 4 5
<b>A61P 9/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/00	
<b>A61P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 O 5	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-572176 (P2019-572176)	(71) 出願人	517359152 サイミック アイビー, エルエルシー アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 08, エメリービル, ホートン スト リート 5980, スイート 600
(86) (22) 出願日	平成30年7月9日 (2018.7.9)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	令和2年2月21日 (2020.2.21)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/041259	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 国際公開番号	W02019/010484	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 国際公開日	平成31年1月10日 (2019.1.10)	(74) 代理人	230113332 弁護士 山本 健策
(31) 優先権主張番号	62/530,047		
(32) 優先日	平成29年7月7日 (2017.7.7)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

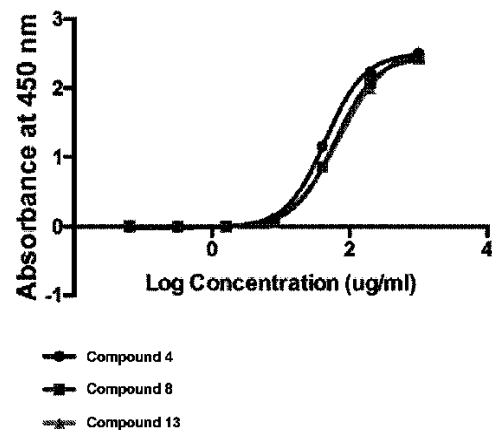
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成バイオコンジュゲート

## (57) 【要約】

本明細書では、主鎖、およびスペーサーを介してそれに共有結合により結合している少なくとも1つのコラーゲン結合単位を有する少なくとも1つの分岐または非分岐ペプチドを含むバイオコンジュゲート、ならびにその使用方法が提供される。本開示の一実施形態は、外科的バイパス術の成功率を改善し、かつ/またはその失敗を低減するための方法および関連組成物を提供する。バイパスグラフトは、冠動脈疾患 (CAD) および末梢動脈疾患 (PAD) の両方における動脈閉塞の処置の一形態として使用される。

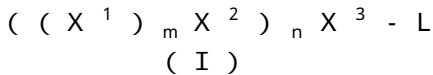
FIG. 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

グリカンおよびそれに共有結合により結合している、式 (I) :



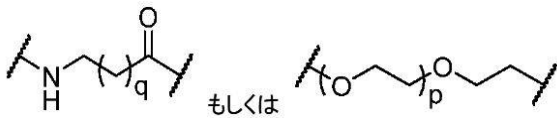
[ 式中、

$X^1$  は、コラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列であり、

$X^2$  および  $X^3$  は、独立に、存在しないか、1 ~ 15 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列であるか、または部分

## 【化 17】

10

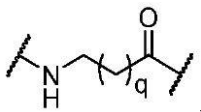


( 式中、p および q は、それぞれ独立に、1 ~ 10 の整数である ) であり、

L は、グリシン ( G )、セリン ( S )、アルギニン ( R ) およびリシン ( K ) からなる群から選択される 5 ~ 20 個のアミノ酸のスペーサー、または部分

## 【化 18】

20



であり、

ただし、L は、前記グリカンから最初の 5 個のアミノ酸の中に少なくとも 2 つのアルギニン ( R ) を含み、L は、前記ペプチドを前記グリカンに共有結合により結合する、必要に応じた連結部分をさらに含み、

m は、1 または 2 であり、

n は、1 または 2 である ]

の少なくとも 1 つの結合単位を含むバイオコンジュゲート。

## 【請求項 2】

30

L が、G S G R R ( 配列番号 : )、G S G S G R R ( 配列番号 : )、G S G S G S R R ( 配列番号 : )、G S G S G S G R R ( 配列番号 : )、G S G S G S G S R R ( 配列番号 : )、G S G S G S G S G S R R ( 配列番号 : )、G S G S G S G S G S G S R R ( 配列番号 : )、G S G S G S G S G S G S G S R R ( 配列番号 : )、G S G R R G S ( 配列番号 : )、G S G R R G S G ( 配列番号 : )、G S G R R R G S G ( 配列番号 : )、G S G R R R R ( 配列番号 : )、G S G S G S R R R R ( 配列番号 : )、G S G S G S R R R R R ( 配列番号 : )、G S G S G S R R R R R R ( 配列番号 : )、および G S G S G S G S R R R R ( 配列番号 : ) からなる群から選択される、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 3】

40

グリカンおよびそれに共有結合により結合している、式 (I) の 1 ~ 約 10 個の結合単位を含む、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 4】

グリカンおよびそれに共有結合により結合している、式 (I) の 2 ~ 約 8 個の結合単位を含む、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 5】

グリカンおよびそれに共有結合により結合している、式 (I) の約 5 個の結合単位を含む、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 6】

$X^2$  が、G S G を含むアミノ酸配列であり、

$X^3$  が、X R R を含むアミノ酸配列であり、X が、存在しないか、またはアミド結合を形

50

成することができる側鎖を有する天然もしくは非天然アミノ酸である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 7】

X<sup>2</sup> が、G S G を含むアミノ酸配列であり、  
X<sup>3</sup> が、R R または K R R を含むアミノ酸配列である、  
請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 8】

式 (I) の前記結合単位が、X<sup>1</sup> - G S G S G S R R - である、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 9】

X<sup>1</sup> が、3 ~ 約 20 個のアミノ酸を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 10】

X<sup>1</sup> が、3 ~ 約 10 個のアミノ酸を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 11】

X<sup>1</sup> が、アミノ酸配列 G Q L Y K S I L Y (配列番号: ) を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 12】

X<sup>1</sup> が、アミノ酸配列 R R A N A A L K A G E L Y K S I L Y (配列番号: ) を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 13】

X<sup>1</sup> が、アミノ酸配列 G E L Y K S I L Y (配列番号: ) を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 14】

X<sup>1</sup> が、アミノ酸配列 R R A N A A L K A G Q L Y K S I L Y (配列番号: ) を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 15】

X<sup>2</sup> が、3 ~ 5 個のアミノ酸を含み、X<sup>3</sup> が、2 ~ 4 個のアミノ酸を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 16】

前記グリカンが、約 1 ~ 約 50 % の機能化、または約 5 ~ 約 30 % の機能化、または約 25 % の機能化を含み、機能化パーセント (%) が、式 (I) の前記結合単位で機能化されている前記グリカン上の二糖単位のパーセントによって決定される、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 17】

前記グリカンが、約 2 ~ 5 % の機能化、または約 5 % の機能化、または約 8 % の機能化、または約 10 % の機能化、または約 16 % の機能化、または約 32 % の機能化を含み、機能化パーセント (%) が、式 (I) の前記結合単位で機能化されている前記グリカン上の二糖単位のパーセントによって決定される、請求項 16 に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 18】

前記グリカンが、ヘパリンまたはその誘導体である、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 19】

共有結合によりそれに結合している、式 (I) の約 8 個の結合単位を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 20】

共有結合によりそれに結合している、式 (I) の約 5 個の結合単位を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

10

20

30

40

50

## 【請求項 21】

前記結合単位が、RRANAALKAGELYKSILYGS GSGSRR - NHNH - (配列番号：)である、請求項1に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 22】

前記結合単位が、RRANAALKAGQLYKSILYGS GSGSRR - NHNH - (配列番号：)である、請求項1に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 23】

前記結合単位が、GQLYKSILYGS GSGSRR - NHNH - (配列番号：)である、請求項1に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 24】

前記結合単位が、(GQLYKSILYGS G)<sub>2</sub> - KSGSRR - NHNH - である、請求項1に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 25】

GQLYKSILYGS GRRGSG (配列番号：)に、1：8の比でコンジュゲートされたヘパリンを含むバイオコンジュゲート。

## 【請求項 26】

GQLYKSILYGS GRRGSG (配列番号：)に1：5の比でコンジュゲートされたヘパリンを含むバイオコンジュゲート。

## 【請求項 27】

ヘパリンが、C末端グリシンを介して前記ペプチドのそれぞれにコンジュゲートされている、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 28】

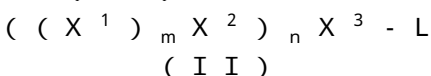
約40 μg/mL未満または約20 μg/mL未満のEC<sub>50</sub>で、I型コラーゲンに結合する、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 29】

前記連結部分が、ヒドラジド部分(-NHNH-)を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 30】

式(II)：

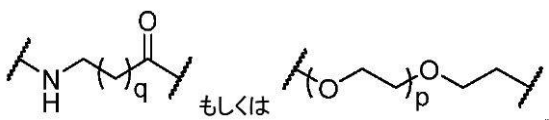


[式中、

X<sup>1</sup>は、コラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列であり、

X<sup>2</sup>およびX<sup>3</sup>は、独立に、存在しないか、1～15個のアミノ酸を有するアミノ酸配列であるか、または部分

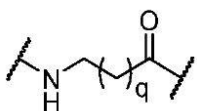
## 【化19】



(式中、pおよびqは、それぞれ独立に、1～10の整数である)であり、

Lは、グリシン(G)、セリン(S)、アルギニン(R)およびリシン(K)からなる群から選択される5～20個のアミノ酸のスペーサー、または部分

## 【化20】



であり、

ただし、Lは、末端から最初の5個のアミノ酸の中に少なくとも2つのアルギニン(R)

10

20

30

40

50

を含み、Lは、必要に応じた連結部分をさらに含み、

mは、1または2であり、

nは、1または2であり、

ただし前記結合単位は、RRRK K I Q G R S K R (配列番号：)でもRRGG R K W G S F E G (配列番号：)でもない]

の結合単位。

【請求項31】

X<sup>2</sup>が、グリシン(G)およびセリン(S)を含むアミノ酸配列であり、

X<sup>3</sup>が、グリシン(G)およびセリン(S)を含むアミノ酸配列である、

請求項30に記載の結合単位。

10

【請求項32】

X<sup>2</sup>が、G S Gを含むアミノ酸配列であり、

X<sup>3</sup>が、RR、K R R、G S G、またはK G S G (配列番号：)を含むアミノ酸配列である、

請求項30に記載の結合単位。

【請求項33】

X<sup>1</sup>が、3～約20個のアミノ酸を含む、請求項30～32のいずれか一項に記載の結合単位。

【請求項34】

X<sup>1</sup>が、3～約10個のアミノ酸を含む、請求項30～32のいずれか一項に記載の結合単位。

20

【請求項35】

X<sup>1</sup>が、アミノ酸配列G Q L Y K S I L Y (配列番号：)を含む、請求項30～32のいずれか一項に記載の結合単位。

【請求項36】

X<sup>1</sup>が、アミノ酸配列R R A N A A L K A G E L Y K S I L Y (配列番号：)を含む、請求項30～32のいずれか一項に記載の結合単位。

【請求項37】

X<sup>1</sup>が、5～10個のアミノ酸を含み、X<sup>2</sup>が、2～5個のアミノ酸を含み、X<sup>3</sup>が、3～5個のアミノ酸を含む、請求項30～32のいずれか一項に記載の結合単位。

30

【請求項38】

アミノ酸配列R R A N A A L K A G E L Y K S I L Y G S G S G S R R (配列番号：)またはR R A N A A L K A G E L Y K S I L Y G S G S G S R R - N H N H<sub>2</sub> (配列番号：)を有するペプチド。

【請求項39】

アミノ酸配列R R A N A A L K A G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R (配列番号：)またはR R A N A A L K A G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R - N H N H<sub>2</sub> (配列番号：)を有するペプチド。

【請求項40】

アミノ酸配列G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R (配列番号：)またはG Q L Y K S I L Y G S G S G S R R - N H N H<sub>2</sub> (配列番号：)を有するペプチド。

40

【請求項41】

アミノ酸配列(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>2</sub> - K S G S R Rまたは(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>2</sub> - K S G S R R - N H N H<sub>2</sub>を有するペプチド。

【請求項42】

アミノ酸配列G Q L Y K S I L Y G S G R R G S G (配列番号：)を有するペプチド。

【請求項43】

末梢動脈疾患を処置することを必要とする患者の末梢動脈疾患を処置するための方法であって、有効量の請求項1～29のいずれか一項に記載のバイオコンジュゲートを投与することを含む、方法。

50

## 【請求項 44】

線維症を処置することを必要とする患者の線維症を処置するための方法であって、有効量の請求項 1 ～ 29 のいずれか一項に記載のバイオコンジュゲートを投与することを含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本願は、その開示全体が参照によって本明細書に組み込まれる、2017年7月7日出願の米国仮特許出願第62/530,047号の利益を35 U.S.C. § 119(e)の下で主張する。

10

## 【0002】

本明細書では、主鎖、およびスペーサーを介してそれに共有結合により結合している少なくとも1つのコラーゲン結合単位を有する少なくとも1つの分岐または非分岐ペプチドを含むバイオコンジュゲートが提供される。

## 【背景技術】

## 【0003】

組織内で、細胞は、バイオコンジュゲート、コラーゲン、ヒアルロン酸、ラミニン、フィブロネクチンなどのような様々な巨大分子を含有する細胞外マトリックス (ECM) によって取り囲まれている。哺乳動物では、バイオコンジュゲートは、細胞外マトリックスの主な構成成分であり、その場でバイオコンジュゲートは、他のバイオコンジュゲート、ヒアルロン酸、および線維マトリックスタンパク質 (例えばコラーゲン) と大きい複合体を形成する。哺乳動物が加齢し、ある疾患状態にあると、身体のある特定のエリアにおける (例えば、滑膜関節、硝子体液、脊椎円板、皮膚などにおける) 細胞外マトリックスが劣化して、例えば、様々な形態の関節炎、失明などの望ましくない症状を引き起こすおそれがある。さらに、一部の組織傷害、例えば血管傷害、角膜傷害および皮膚創傷によって、細胞外マトリックスおよび / またはコラーゲンを含めたその構成成分が露出する。

20

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

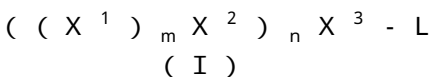
## 【0004】

驚くべきことに、グリカンとペプチドの間にある特定の連結を有するバイオコンジュゲートは、ある特定のペプチドのそれらの標的への結合の増加をもたらすことが見出された。分岐ペプチドを有することによって、結合が改善されることも見出された。具体的には、ある特定のスペーサーを有するバイオコンジュゲートによって、コラーゲン結合活性が増強された。

30

## 【0005】

本開示は、グリカンおよびそれに共有結合により結合している、式 (I) :



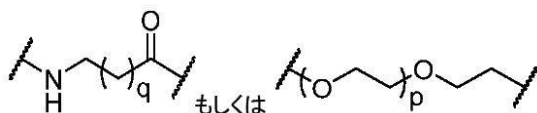
[式中、

$X^1$  は、コラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列であり、

$X^2$  および  $X^3$  は、独立に、存在しないか、1 ~ 15 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列であるか、または部分

40

## 【化 1】



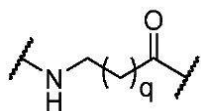
(式中、p および q は、それぞれ独立に、1 ~ 10 の整数である) であり、

L は、グリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R) およびリシン (K) からなる群

50

から選択される 5 ~ 20 個のアミノ酸のスペーサー、または部分

【化 2】



であり、

ただし、L は、グリカンから最初の 5 個のアミノ酸の中に少なくとも 2 つのアルギニン (R) を含み、L は、ペプチドをグリカンに共有結合により結合する、必要に応じた連結部分をさらに含み、

m は、1 または 2 であり、

n は、1 または 2 である ]

の少なくとも 1 つの結合単位を含むバイオコンジュゲートを提供する。

【0006】

一実施形態では、L は、G S G K R R G S G (配列番号：) ではない。

【0007】

一実施形態では、 $X^1$  は、ペプチドの N 末端であり、 $X^3$  は、ペプチドの C 末端にある。

【0008】

一実施形態では、式 (I) は、R R R K K I Q G R S K R (配列番号：) でも R R G G R K W G S F E G (配列番号：) でもない。

【0009】

一実施形態では、連結部分は、- N H N H - である。

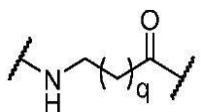
【0010】

一実施形態では、式：

L - N H N H<sub>2</sub>

[ 式中、L は、グリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R) およびリシン (K) からなる群から選択される 5 ~ 20 個のアミノ酸のスペーサー、または部分

【化 3】



であり、

ただし、L は、- N H N H<sub>2</sub> 部分から最初の 5 個のアミノ酸の中に少なくとも 2 つのアルギニン (R) を含む ]

の機能化ペプチドが提供される。

【0011】

一実施形態では、L は、- G S G S G S R R - N H N H - (配列番号：) である。また、G S G S G S R R (配列番号：) を含むペプチドが提供される。

【0012】

本開示はまた、式 (II)：

$((X^1)_m X^2)_n X^3 - L$   
(II)

[ 式中、

$X^1$  は、コラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列であり、

$X^2$  および  $X^3$  は、独立に、存在しないか、1 ~ 15 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列であるか、または部分

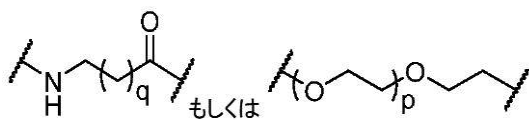
10

20

30

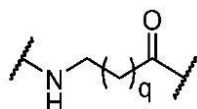
40

## 【化 4】



(式中、p および q は、それぞれ独立に、1 ~ 10 の整数である) であり、  
L は、グリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R) および リシン (K) からなる群  
から選択される 5 ~ 20 個のアミノ酸のスペーサー、または部分

## 【化 5】



10

であり、

ただし、L は、末端から最初の 5 個のアミノ酸の中に少なくとも 2 つのアルギニン (R)  
を含み、L は、必要に応じた連結部分をさらに含み、

m は、1 または 2 であり、

n は、1 または 2 であり、

ただし式 (II) は、RRRK K I Q G R S K R (配列番号: ) でも R R G G R K W G S  
F E G (配列番号: ) でもない]

20

の結合単位を提供する。

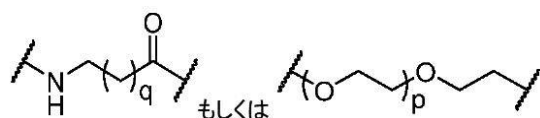
## 【0013】

ある特定の実施形態では、m は 1 であり、n は 2 である。ある特定の実施形態では、m  
は 2 であり、n は 1 である。ある特定の実施形態では、m は 2 であり、n は 2 である。

## 【0014】

ある特定の実施形態では、X<sup>2</sup> および X<sup>3</sup> は、独立に、存在しないか、グリシン (G)  
、セリン (S)、アルギニン (R) および リシン (K) からなる群から選択される 1 ~ 1  
5 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列であるか、または部分

## 【化 6】



30

(式中、p および q は、それぞれ独立に、1 ~ 10 の整数である) である。ある特定の実  
施形態では、X<sup>2</sup> および X<sup>3</sup> は、独立に、存在しないか、またはグリシン (G)、セリン  
(S)、アルギニン (R) および リシン (K) からなる群から選択される 1 ~ 15 個のア  
ミノ酸を有するアミノ酸配列である。

## 【0015】

ある特定の実施形態では、m および / または n が 1 以外である場合、X<sup>2</sup> および X<sup>3</sup> の  
うちの少なくとも 1 つは、少なくとも 1 つのアルギニン (R) または リシン (K) を含む  
。ある特定の実施形態では、m および / または n が 1 以外である場合、X<sup>2</sup> および X<sup>3</sup> は  
、アルギニン (R) も リシン (K) も含まない。

40

## 【0016】

ある特定の実施形態では、L は、ヒドラジドを含む。

## 【0017】

本開示のある特定の態様は、添付の図によって図示され得る。それらの図には、以下が  
含まれる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0018】

【図 1】図 1 は、バイオコンジュゲートである化合物 4、化合物 8、および化合物 13 に

50



ついでのコラーゲン結合の比較を示す。

【0019】

【図2】図2は、バイオコンジュゲートである化合物4および化合物12についてのコラーゲン結合の比較を示す。

【0020】

【図3】図3は、バイオコンジュゲートである化合物4および化合物14についてのコラーゲン結合の比較を示す。

【0021】

【図4】図4は、バイオコンジュゲートである化合物4、化合物8、および化合物11についてのコラーゲン結合の比較を示す。

10

【0022】

【図5】図5は、バイオコンジュゲートである化合物4、化合物9、および化合物10についてのコラーゲン結合の比較を示す。

【0023】

【図6】図6は、図1～図5のバイオコンジュゲートの一部についてのコラーゲン結合の比較を示す。

【図7】図7は、対応するEC<sub>50</sub>値を比較する棒グラフを示す。

【0024】

【図8】図8は、バイオコンジュゲートである化合物4および化合物11についてのコラーゲン結合の比較を示す。

20

【0025】

【図9】図9は、化合物16、化合物17、および化合物18についてのコラーゲン結合の比較を示す。

【0026】

【図10】図10は、バイオコンジュゲートである化合物18および化合物19についてのコラーゲン結合の比較を示す。

【0027】

【図11】図11は、化合物20、化合物4、化合物5、および化合物3についてのコラーゲン結合の比較を示す。

【0028】

30

【図12】図12のパネルAおよびBは、コラーゲンへの血小板結合に対する、化合物1（パネルA）と比較した化合物10（パネルB）の効果を示す。

【0029】

【図13】図13は、シリウスレッドによって組織学的に測定される、ビヒクルおよびテルミサルタンと比較した化合物10の肝臓内コラーゲン含量を示す。

【0030】

【図14】図14は、腎臓および膀胱内の蛍光標識分子の分布を示すIVIS画像化を示す。上の画像は、IV注射の5分後に撮影し、下の画像は、注射の1時間後に撮影した。左の画像は、マウスの腹側であり、右の画像は、背側である。

【0031】

40

【図15】図15は、コラーゲン結合配列GQLYKSLY（配列番号：）に対する、グリカン（GAG）から最初のアルギニン残基の配置の効果を示す。

【0032】

【図16】図16は、GQLYKSLY（配列番号：）コラーゲン結合ドメインに結合させた場合の、コラーゲン結合に対するスペーサー長の効果を示す。

【0033】

【図17】図17は、GQLYKSLY（配列番号：）コラーゲン結合ドメインにおけるコラーゲン結合に対するアミノ酸配列変化の効果を示す。（A）は、アルギニン残基のリシンまたはD-アルギニンでの置き換えの効果を示す。（B）は、GQLYKSLYGS GSGSGSR（配列番号：）と比較した、GS GSGSGSR（配列番号：）スペーサ

50

ーのコラーゲン結合親和性を示す。(C)は、スパーサー内に特異的配列または化学物質を挿入する効果を示す。P A P A P R R (配列番号: )は、プロリン - アラニン - プロリン - アラニン - プロリン - アルギニン - アルギニンであり、A h x R Rは、6 - アミノヘキササン酸 - アルギニン - アルギニンであり、P E G 6 R Rは、(ポリエチレングリコール)<sub>6</sub> - アルギニン - アルギニンであり、a h x R R A h xは、6 - アミノヘキササン酸 - アルギニン - アルギニン - 6 - アミノヘキササン酸である。

【0034】

【図18】図18は、スパーサーがない結合配列および対照としてのスパーサー配列と比較した、最適化スパーサー配列を有するG Q L Y K S I L Y (配列番号: )結合配列の第2のコラーゲン結合アッセイを示す。

10

【0035】

【図19】図19は、G S G S G S R R (配列番号: )スパーサー配列を、コラーゲン結合ドメインW R E P S F S A L S (配列番号: )、v W F - 2 xに付加する効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本開示は、記載される特定の実施形態に限定されず、したがって当然のことながら変わり得ることを理解されたい。また、本開示の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ制限されるので、本明細書で使用される専門用語は、単に特定の実施形態を説明することを目的とし、制限することを意図しないことを理解されたい。

20

1. 定義

【0037】

別段定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。単数形「a」、「an」、および「the」は、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、状況によって別段明示されない限り複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば「1つのペプチド」への言及は、複数のペプチドを含む。

【0038】

本明細書で使用される場合、以下の用語および略語は、以下の意味を有する。

【表 3 - 1】

BMPH	N- $\beta$ -マレイミドプロピオン酸ヒドラジド
DCC	N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
DIC	N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド
EDC	1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド
BMC	N-t-ブチル-N-メチルカルボジイミド
BEC	N-t-ブチル-N-エチルカルボジイミド
BDDC	1,3-ビス(2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4-イルメチル)カルボジイミド
HFA	ヘキサフルオロアセトン
CDI	カルボニルジイミダゾール
HOBT	ヒドロキシベンゾトリアゾール
PyBOP	ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート
HOAt	1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール
TBTU	O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート
HOSu	N-ヒドロキシスクシンイミド
Hep	ヘパリン
DNA	デオキシリボ核酸
EDTA	エチレンジアミン四酢酸

10

20

30

【表 3 - 2】

ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
FGF	線維芽細胞成長因子
HEPES	2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]エタンスルホン酸
HLB	親水性/親油性/バランス
ITC	等温滴定型熱量計
kDa	キロダルトン
GAG	グリコサミノグリカン
MES	2-エタンスルホン酸
ESRD	末期腎疾患
$K_d$	解離定数
vWF	フォンビルブランド因子
MMP	マトリックスメタロプロテイナーゼ酵素
CVs	カラム体積
TMP	リン酸トリメチル
PF-4	血小板因子 4
BSA	ウシ血清アルブミン
DG	脱イオン水
PEGDA	ポリエチレングリコールジアクリレート
MOPS	3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸
PBS	リン酸緩衝食塩水
PIPES	ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)
SPR	表面プラズモン共鳴法
TAPS	3-[[1,3-ジヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-2-イル]アミノ]プロパン-1-スルホン酸
TES	2-[[1,3-ジヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)

10

20

30

40

【表 3 - 3】

	プロパン-2-イル]アミノ]エタンスルホン酸
Tris	2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1,3-ジオール
w/w	重量/重量
w/v	重量/体積
EC50	最大半量応答を誘発するのに必要な濃度

10

## 【0039】

本明細書で使用される場合、用語「含む (comprising)」または「含む (comprises)」は、組成物および方法が、列挙されている要素を含むが、他を除外しないことを意味することが意図される。「から本質的になる」は、組成物および方法を定義するために使用される場合、記載される目的のために組合せにとって本質的に少しでも重要な他の要素を除外することを意味するものとする。したがって、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、特許請求される基本的かつ新規な特徴 (複数可) に実質的に影響を及ぼさない他の材料またはステップを除外しないはずである。「からなる」は、他の成分の微量な要素よりも多くをおよび実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これらの移行句のそれぞれによって定義された実施形態は、本開示の範囲内である。

20

## 【0040】

用語「約」は、範囲を含めた数値表示、例えば、温度、時間、量、および濃度の前に使用される場合、(+) または (-) 10%、5% または 1% 変わり得る近似を示す。

## 【0041】

本明細書で使用される場合、用語「バイオコンジュゲート」、「ペプチドグリカン」および「プロテオグリカン」および「合成プロテオグリカン」は、交換可能に使用され、グリカンおよびそれに共有結合により結合している 1 つまたは複数のペプチドを含む合成コンジュゲートを指す。グリカン部分は、合成により作製され得るか、または動物源に由来し得る。ペプチドは、ある特定の実施形態では、ヒドラジド - カルボニル連結 (すなわち、 $-C(O)-NH-NH-C(O)-$ ) を介してグリカンに共有結合により結合する。ある特定の実施形態では、ヒドラジド - カルボニル連結は、ペプチド上の末端ヒドラジド基と、グリカン上のカルボニル基との間にある。他の実施形態では、ヒドラジド - カルボニル連結は、ペプチド上の末端カルボニル基と、グリカン上のヒドラジド基との間にある。一部の実施形態では、バイオコンジュゲートという用語には、ペプチドグリカンが含まれる。

30

## 【0042】

本明細書で使用される場合、用語「グリカン」は、グリコシドにより連結した多数の単糖を有する化合物を指す。ある特定の実施形態では、グリカンは、ウロン酸と交互に連結した 2 - アミノ糖を含むグリコサミノグリカン (GAG) であり、それには、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、ケラチン、およびデルマタンなどのポリマーが含まれる。したがって、本明細書に記載される実施形態において使用され得るグリカンの非限定的な例として、アルギネート、アガロース、デキストラン、デキストラン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマタン、デルマタン硫酸 (DS)、ヘパラン硫酸、ヘパリン (Hep)、ケラチン、ケラタン硫酸、およびヒアルロン酸 (HA) (それらの誘導体を含む) が挙げられる。別の実施形態では、グリカンの分子量は、バイオコンジュゲートの効果を調整するために変えられる (例えば、Radek, K. A., et al., Wound Repair Regen., 2009, 17: 118-126 および Taylor, K. R., et al., J. Biol. Chem., 2005, 280:5300-5306 を参照されたい)。一実施形態では、グリカン

40

50

は、酸化およびアルカリ脱離によって分解されて（例えば、Fransson, L. A., et al., Eur. J. Biochem., 1980, 106 :59-69を参照されたい）、より低い分子量（例えば、約10 kDa～約50 kDa）を有する分解されたグリカンを生じる。一部の実施形態では、グリカンは、修飾されていない。ある特定の実施形態では、グリカンは、酸化的に切断されたサッカリド環を含有しておらず、したがって、アルデヒド官能基を含有しておらず、また含有してもいなかった。ある特定の実施形態では、グリカンは、誘導体化される。

#### 【0043】

本明細書で使用される場合、用語「誘導体化グリカン」は、グリカンの誘導体を含むことが意図される。例えば、誘導体化グリカンには、それらに限定されるものではないが、部分的にN-脱硫酸化された誘導体、部分的にO-脱硫酸化された誘導体、および/または部分的にO-カルボキシメチル化された誘導体などの1つまたは複数の化学的誘導体化が含まれ得る。例えば、本明細書で使用される場合、用語「ヘパリン」は、ヘパリンおよびその誘導体、例えばそれらに限定されるものではないが、部分的にN-および/もしくは部分的にO-脱硫酸化されたヘパリン誘導体、部分的にO-カルボキシメチル化されたヘパリン誘導体、またはそれらの組合せを含むことが意図される。ある特定の実施形態では、ヘパリンは、非酸化ヘパリンであり（すなわち、酸化的に切断されたサッカリド環を含有していない）、アルデヒド官能基を含有していない。

#### 【0044】

本明細書で使用される場合、用語「結合した」および「共有結合により結合した」は、交換可能に使用することができ、2つの原子による一つまたは複数の電子対の共有を指す。

#### 【0045】

一実施形態では、本開示のバイオコンジュゲートは、コラーゲンに直接的または間接的かのいずれかで結合する。用語「結合(binding)」または「結合する」は、本明細書で使用される場合、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、表面プラズモン共鳴法、ELISA、競合的結合アッセイ、等温滴定熱量測定法、ファージディスプレイ、アフィニティークロマトグラフィー、レオロジーまたは免疫組織化学的検査を使用して検出することができる、分子間の相互作用を含むことを意味する。用語はまた、分子間の「結合」相互作用を含むことを意味する。結合は、「直接的」または「間接的」であり得る。「直接的」結合は、分子間の直接的な物理的接触を含む。分子間の「間接的」結合は、1つまたは複数の分子との直接的な物理的接触を同時に有する分子を含む。この結合は、相互作用分子を含む「複合体」の形成をもたらし得る。「複合体」は、共有結合性または非共有結合性の結合、相互作用または力によって一緒に保持された2つまたはそれよりも多い分子の結合を指す。

#### 【0046】

本明細書で使用される場合、用語「組成物」は、少なくとも1つの薬学的に活性な成分を含有する、治療目的のために所期の患者への投与に適した調製物であって、その任意の固体形態を含めた、調製物を指す。組成物は、化合物の改善された製剤を提供するための少なくとも1つの薬学的に許容される構成成分、例えば適切な担体を含むことができる。ある特定の実施形態では、組成物は、フィルム剤、ゲル剤、パッチ剤、または液体液剤(liquid solution)として製剤化される。本明細書で使用される場合、用語「局所的に」は、処置される組織および/または器官(内部、またはある場合には外部)の表面に、局部的効果のために組成物を非全身的に投与することを指す。

#### 【0047】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される」は、合理的に慎重な医師が、使用される量および/または処置される疾患もしくは状態およびそれぞれの投与経路を考慮して患者への投与を回避する理由となる特性を、指示された材料が有していないことを示す。典型的な薬学的に許容される材料は、本質的に無菌である。本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」は、ある器官もしくは身体のある一部から、別の

器官もしくは身体の別の一部に任意の補助成分もしくは組成物、もしくはその構成成分を運ぶもしくは輸送するのに関与するか、または静脈の内表面に薬剤を送達するための、薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクル、例えば液体または固体充填剤、賦形剤、添加剤、溶媒または被包材料を指す。

【0048】

本明細書で使用される場合、用語「液剤」は、当技術分野で周知の液剤、懸濁剤、エマルジョン、点滴剤、軟膏剤、液体洗浄剤、スプレー剤、およびリボソーム剤を指す。一部の実施形態では、液体液剤は、少量の酸または塩基が添加されるとpHの変化に抵抗する水性pH緩衝剤を含有する。ある特定の実施形態では、液体液剤は、潤滑増強剤を含有する。

10

【0049】

本明細書で使用される場合、用語「ポリマー」、「ポリマーマトリックス」または「ポリマー性剤」は、生体適合性ポリマー材料を指す。本明細書に記載されるポリマー材料は、例えば、糖（例えばマンニトール）、ペプチド、タンパク質、ラミニン、コラーゲン、ヒアルロン酸、イオン性および非イオン性水溶性ポリマー；アクリル酸ポリマー；親水性ポリマー、例えばポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー、およびポリビニルアルコール；セルロースポリマーおよびセルロースポリマー誘導体、例えばヒドロキシプロピルセルロース、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メチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロース；ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、乳酸およびグリコール酸のコポリマー、または天然および合成の両方の他のポリマー性剤を含むことができる。

20

【0050】

ある特定の実施形態では、ポリマー性マトリックスは、吸収可能なもの、例えばコラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリジオキサノン、およびカプロラクトンなどである。本明細書で使用される場合、用語「吸収可能」は、材料が体内に吸収される能力を指す。他の実施形態では、ポリマーは、吸収可能でないもの、例えばポリプロピレン、ポリエステルまたはナイロンなどである。

【0051】

本明細書で使用される場合、用語「pH緩衝剤」は、それに少量の酸または塩基が添加されるとpHの変化に抵抗する水性緩衝溶液を指す。pH緩衝溶液は、典型的に、弱酸およびその共役塩基の混合物を含み、またはその逆も同じである。例えば、pH緩衝溶液は、リン酸塩、例えばリン酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム二水和物、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸カリウム、リン酸二水素カリウムおよびリン酸水素二カリウム；ホウ酸およびホウ酸塩、例えばホウ酸ナトリウムおよびホウ酸カリウム；クエン酸およびクエン酸塩、例えばクエン酸ナトリウムおよびクエン酸二ナトリウム；酢酸塩、例えば酢酸ナトリウムおよび酢酸カリウム；炭酸塩、例えば炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムなどを含むことができる。pH調整剤は、例えば、塩酸、乳酸、クエン酸、リン酸および酢酸などの酸、ならびに水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムなどのアルカリ塩基などを含むことができる。一部の実施形態では、pH緩衝剤は、リン酸緩衝食塩水（PBS）溶液（すなわち、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウムを、一部の製剤では、塩化カリウムおよびリン酸カリウムを含有する）である。

30

40

【0052】

本明細書で使用される場合、用語「ペプチド」および「ペプチド配列」は、ペプチド（またはアミド）結合によって連結したアミノ酸の直鎖または分岐鎖を指すことが意図される。一実施形態では、ペプチドは、約3～約120個のアミノ酸、または約3～約110個のアミノ酸、または約3～約100個のアミノ酸、または約3～約90個のアミノ酸、または約3～約80個のアミノ酸、または約3～約70個のアミノ酸、または約3～約60個のアミノ酸、または約3～約50個のアミノ酸、または約3～約40個のアミノ酸、

50

または約 5 ～ 約 120 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 100 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 90 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 80 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 70 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 60 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 50 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 40 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 30 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 20 個のアミノ酸、または約 5 ～ 約 10 個のアミノ酸を含む。

【0053】

本明細書に記載される様々な実施形態では、ペプチドは、結合単位に 1 つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含めることによって修飾され得る。当業者に周知の通り、ペプチドの重要ではない任意のアミノ酸を保存的置換によって変えても、置き換えるアミノ酸の側鎖が、置き換えられたアミノ酸の側鎖と類似の結合および接触を形成することができるはずであるので、そのペプチドの活性は有意には変わらないはずである。非保存的置換も、ペプチドの結合活性に実質的に影響を及ぼさないという条件で可能であり得る。

10

【0054】

本明細書で使用される場合、用語「配列同一性」は、2 個のペプチド間または 2 個の核酸分子間のアミノ酸残基またはヌクレオチド同一性のレベルを指す。比較される配列における位置が、同じ塩基またはアミノ酸によって占められている場合には、分子は、その位置において同一である。ペプチド（またはポリペプチドまたはペプチド領域）は、別の配列に対してある特定のパーセンテージ（例えば、少なくとも約 60 %、または少なくとも約 65 %、または少なくとも約 70 %、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 80 %、または少なくとも約 83 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 %）の「配列同一性」を有し、そのことは、そのパーセンテージの塩基（またはアミノ酸）が、整列した場合には 2 つの配列の比較において同じであることを意味する。本開示に開示される任意の配列（「参照配列」）では、参照配列に対して少なくとも約 60 %、または少なくとも約 65 %、または少なくとも約 70 %、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 80 %、または少なくとも約 83 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % 配列同一性を有する配列も、本開示に含まれることが注目される。同様に、本開示はまた、参照配列と比較して、アミノ酸残基またはヌクレオチドの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つの置換、欠失または付加を有する配列を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で特定される配列の任意の 1 つまたは複数において、配列は、それからそれぞれ 1 つ、2 つ、または 3 つのアミノ付加、欠失および / または置換を有することによって修飾され得る。

20

30

【0055】

当技術分野で周知の通り、アミノ酸の「保存的置換」またはペプチドの「保存的置換変異体」は、1) ペプチドの二次構造、2) アミノ酸の電荷もしくは疎水性、および 3) 側鎖の嵩高さ、またはこれらの特徴の任意の 1 つもしくは複数を維持するアミノ酸置換を指す。例示的に、周知の専門用語である「親水性の残基」は、セリンまたはトレオニンに関する。「疎水性の残基」は、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリンまたはアラニンなどに関する。「正電荷の残基」は、リシン、アルギニン、オルニチン、またはヒスチジンに関する。「負電荷の残基」は、アスパラギン酸またはグルタミン酸を指す。「嵩高い側鎖」を有する残基は、フェニルアラニン、トリプトファンまたはチロシンなどを指す。例示的な保存的アミノ酸置換の一覧を、表 1 に示す。

40



【表 1】

表 1

アミノ酸について	以下で置き換える
アラニン	D-Ala, Gly, Aib, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn, D-Orn
アスパラギン	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
グルタミン	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, $\beta$ -Ala
イソロイシン	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
リシン	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
メチオニン	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
プロリン	D-Pro
セリン	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
トレオニン	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
チロシン	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
バリン	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

10

20

30

40

## 【 0 0 5 6 】

一部の実施形態では、本明細書に記載される配列を修飾して、1つもしくは複数のグルタミン酸残基をグルタミンで、および/または1つもしくは複数のアスパラギン酸残基をアスパラギンで置き換えることができる。

コラーゲン結合単位

## 【 0 0 5 7 】

本明細書で使用される場合、用語「コラーゲン結合単位」は、コラーゲンに結合するペプチドの中のアミノ酸配列を指すことが意図される。「コラーゲン結合」は、化合物がコ

50

ラーゲンと好都合に結合、または相互作用するように、疎水性、イオン性（荷電）、および/またはファンデルワールス相互作用を含み得る、コラーゲンとの相互作用を示す。この結合（または相互作用）は、共有結合性の結合および一般的官能基との非特異的相互作用とは区別されることが意図され、したがってペプチドは、コラーゲン上でペプチドが結合するその官能基を含有する任意の種と相互作用できる。ペプチドは、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、コラーゲンへの結合について試験、および評価することができる。例えば、Li, Y., et al., *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17: 968-975、Hermes, B.A., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 11683-11685、およびPetsalaki, E., et al., *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(3): e1000335を参照されたい。一実施形態では、ペプチド、またはペプチドのコラーゲン結合単位は、約1 mM未満、または約900  $\mu$ M未満、または約800  $\mu$ M未満、または約700  $\mu$ M未満、または約600  $\mu$ M未満、または約500  $\mu$ M未満、または約400  $\mu$ M未満、または約300  $\mu$ M未満、または約200  $\mu$ M未満、または約100  $\mu$ M未満の解離定数（ $K_d$ ）でコラーゲンに結合する。ある特定の実施形態では、コラーゲン結合単位は、最大約120個のアミノ酸を含む。

#### 【0058】

ペプチドは、コラーゲン原線維形成に通常関与するか、または通常関与しないタンパク質の一部と、アミノ酸相同性を有することができる。一部の実施形態では、これらのペプチドは、小さいロイシンが豊富なバイオコンジュゲートのアミノ酸配列、血小板受容体配列、またはコラーゲン原線維形成を制御するタンパク質に対して相同性または配列同一性を有する。様々な実施形態では、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSI LY（配列番号：）、GELYKSI LY（配列番号：）、RRANAALKAGELYKCI LY（配列番号：）、GELYKCI LY（配列番号：）、RRANAALKAGQLYKSI LY（配列番号：）、GQLYKSI LY（配列番号：）、RRANAALKAGQLYKCI LY（配列番号：）、GQLYKCI LY（配列番号：）、RLDGNELKR（配列番号：）、AHEEISTTNEGV M（配列番号：）、NGVFKYRPRYFLYKHAYFY PPLKRF PVQ（配列番号：）、CQDSETRTFY（配列番号：）、TKKTLRT（配列番号：）、GLRSKSKKFRRPDIQYPDATDEDITSHM（配列番号：）、SQNPVQP（配列番号：）、SYIRIADTNIT（配列番号：）、KELNLVYT（配列番号：）、GSIT（配列番号：）、GSITTI DV PWNV（配列番号：）、GQLYKSI LY（配列番号：）、RRANAALKAGQLYKSI LY（配列番号：）、RVMHGLHLGDDE（「GPVI」）（配列番号：）、CRVMHGLHLGDDE C（環式RVMHGLHLGDDEまたは「cGPVI」）（配列番号：）、または配列がコラーゲンに結合することができるという条件で、それらに対して少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約83%配列同一性、もしくは少なくとも約85%配列同一性、もしくは少なくとも約90%配列同一性、もしくは少なくとも約95%配列同一性、もしくは少なくとも約98%配列同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0059】

ある特定の実施形態では、ペプチドは、それぞれ参照によって本明細書に組み込まれるChiang, T.M., et al. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 34896-34901、Huizinga, E.G. et al., *Structure*, 1997, 5: 1147-1156、Romijn, R.A., et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 15035-15039、およびChiang, et al., *Cardio. & Haemato. Disorders-Drug Targets*, 2007, 7: 71-75に記載されている通り、フォンビルブランド因子（vWF）または血小板コラーゲン受容体のコラーゲン結合ドメイン（複数可）と、少なくとも約80%、または少なくとも約83%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%、または少なくとも約100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。非限定的な例は、vWFから得られたWREPSFCALS（配列番号：）である。

#### 【0060】

コラーゲン結合親和性（またはコラーゲン結合ドメイン／単位）についてペプチド配列をスクリーニングするための様々な方法が、当技術分野で日常的である。本明細書に開示されるバイオコンジュゲートおよび方法において使用され得る、コラーゲン結合親和性（またはコラーゲン結合単位）を有することが示されている他のペプチド配列には、それらに限定されるものではないが、A W H C T T K F P H H Y C L Y B i p（配列番号：）、A H K C P W H L Y T T H Y C F T B i p（配列番号：）、A H K C P W H L Y T H Y C F T（配列番号：）など（式中、B i pは、ピフェニルアラニンであり、Aは、ベータ - アラニンである）（Abd-Elgaliel, W.R., et al., Biopolymers, 2013, 100(2), 167-173を参照されたい）、G R O G E R（配列番号：）、G M O G E R（配列番号：）、G L O G E N（配列番号：）、G L O G E R（配列番号：）、G L K G E N（配列番号：）、G F O G E R G V E G P O G P A（配列番号：）など（式中、Oは、4 - ヒドロキシプロリンである）（Raynal, N., et al., J. Biol. Chem., 2006, 281(7), 3821-3831を参照されたい）、H V W M Q A P G G G K（配列番号：）（Helms, B.A., et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11683-11685を参照されたい）、W R E P S F C A L S（配列番号：）（Takagi, J., et al., Biochemistry, 1992, 31, 8530-8534を参照されたい）、W Y R G R L（配列番号：）など（Rothenfluh D.A., et al., Nat Mater. 2008, 7(3), 248-54を参照されたい）、W T C S G D E Y T W H C（配列番号：）、W T C V G D H K T W K C（配列番号：）、Q W H C T T R F P H H Y C L Y G（配列番号：）など（U S 2 0 0 7 / 0 2 9 3 6 5 6を参照されたい）、S T W T W N G S A W T W N E G G K（配列番号：）、S T W T W N G T N W T R N D G G K（配列番号：）など（W O / 2 0 1 4 / 0 5 9 5 3 0を参照されたい）、C V W L W E Q C（配列番号：）環式C V W L W E N C（配列番号：）、環式C V W L W E Q C（配列番号：）（Depraetere H., et al., Blood. 1998, 92, 4207-4211、およびDuncan R., Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(5), 347-360を参照されたい）、C M T S P W R C（配列番号：）など（Vanhoorelbeke, K., et al., J. Biol. Chem., 2003, 278, 37815-37821を参照されたい）、C P G R V M H G L H L G D D E G P C（配列番号：）（Muzzard, J., et al., PLoS one. 4 (e 5585) 1- 10を参照されたい）、K L W L L P K（配列番号：）（Chan, J. M., et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2010, 107, 2213- 2218を参照されたい）、およびC Q D S E T R T F Y（配列番号：）など（U S 2 0 1 3 / 0 2 4 3 7 0 0を参照されたい）、H - V - F / W - Q / M - Q - P / A - P / K（Helms, B.A., et al., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131(33), 11683-11685）が含まれ、それぞれ、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 0 6 1 】

本明細書に開示されるバイオコンジュゲートおよび方法において使用され得る、コラーゲン結合親和性（またはコラーゲン結合単位）を有することが示されているさらなるペプチド配列には、それらに限定されるものではないが、L S E L R L H E N（配列番号：）、L T E L H L D N N（配列番号：）、L S E L R L H N N（配列番号：）、L S E L R L H A N（配列番号：）、およびL R E L H L N N N（配列番号：）（Fredrico, S., Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 37, 10980-10984を参照されたい）が含まれる。

#### 【 0 0 6 2 】

ある特定の実施形態では、ペプチドは、R V M H G L H L G D D E（配列番号：）、D - アミノ酸E D D G L H L G H M V R（配列番号：）、R V M H G L H L G N N Q（配列番号：）、D - アミノ酸Q N N G L H L G H M V R（配列番号：）、R V M H G L H L G N N Q（配列番号：）、G Q L Y K S I L Y G S G - 4 K 2 K（配列番号：）（4分岐ペプチド）、G S G Q L Y K S I L Y（配列番号：）、G S G G Q L Y K S I L Y（配列番号：）、K Q L N L V Y T（配列番号：）、C V W L W Q Q C（配列番号：）、W R E P S F S A L S（配列番号：）、G H R P L D K K R E E A P S L R P A P P P I S G G G Y R（配列番号：）、およびG H R P L N K K R Q Q A P S L R P A P P P I S G G G Y R（配列番号：）からなる群から選択される1つまたは複数の配列を含む。

## 【 0 0 6 3 】

コラーゲン結合単位についても同様に、コラーゲンについて選択されたファージディスプレイライブラリーから得られたペプチド配列を生成することができる。ペプチドは、コラーゲンへの結合について S P R、E L I S A、I T C、アフィニティークロマトグラフィー、または当技術分野で公知の他の技術などの技術のいずれかによって合成、および評価することができる。一例は、固定化コラーゲンを含有するマイクロプレートでインキュベートされるビオチン修飾ペプチド配列（例えば、S I L Y<sub>b i o t i n</sub>）であり得る。コラーゲンに結合するペプチドの能力を決定するために、ストレプトアビジン発色団を使用して、用量応答結合曲線を生成することができる。

## 【 0 0 6 4 】

一実施形態では、ペプチドは、コラーゲン I、I I、I I I、I V、V、V I、V I I、V I I I、I X、X、X I、X I I、X I I I、または X I V 型のいずれか 1 つまたは複数に結合する 1 つまたは複数のコラーゲン結合単位を含む。一実施形態では、ペプチドは、約 1 m M 未満、または約 9 0 0  $\mu$  M 未満、または約 8 0 0  $\mu$  M 未満、または約 7 0 0  $\mu$  M 未満、または約 6 0 0  $\mu$  M 未満、または約 5 0 0  $\mu$  M 未満、または約 4 0 0  $\mu$  M 未満、または約 3 0 0  $\mu$  M 未満、または約 2 0 0  $\mu$  M 未満、または約 1 0 0  $\mu$  M 未満の解離定数 ( $K_d$ ) で I 型コラーゲンに結合する。一実施形態では、ペプチドは、約 1 m M 未満、または約 9 0 0  $\mu$  M 未満、または約 8 0 0  $\mu$  M 未満、または約 7 0 0  $\mu$  M 未満、または約 6 0 0  $\mu$  M 未満、または約 5 0 0  $\mu$  M 未満、または約 4 0 0  $\mu$  M 未満、または約 3 0 0  $\mu$  M 未満、または約 2 0 0  $\mu$  M 未満、または約 1 0 0  $\mu$  M 未満の解離定数 ( $K_d$ ) で I I 型コラーゲンに結合する。一実施形態では、ペプチドは、約 1 m M 未満、または約 9 0 0  $\mu$  M 未満、または約 8 0 0  $\mu$  M 未満、または約 7 0 0  $\mu$  M 未満、または約 6 0 0  $\mu$  M 未満、または約 5 0 0  $\mu$  M 未満、または約 4 0 0  $\mu$  M 未満、または約 3 0 0  $\mu$  M 未満、または約 2 0 0  $\mu$  M 未満、または約 1 0 0  $\mu$  M 未満の解離定数 ( $K_d$ ) で I I I 型コラーゲンに結合する。一実施形態では、ペプチドは、約 1 m M 未満、または約 9 0 0  $\mu$  M 未満、または約 8 0 0  $\mu$  M 未満、または約 7 0 0  $\mu$  M 未満、または約 6 0 0  $\mu$  M 未満、または約 5 0 0  $\mu$  M 未満、または約 4 0 0  $\mu$  M 未満、または約 3 0 0  $\mu$  M 未満、または約 2 0 0  $\mu$  M 未満、または約 1 0 0  $\mu$  M 未満の解離定数 ( $K_d$ ) で I V 型コラーゲンに結合する。

## 【 0 0 6 5 】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される任意の配列は、任意の 1 つまたは複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4 または 5 個のアミノ酸）がそれから付加され、それから欠失され、またはそれから置換されるように修飾することができる。一部の実施形態では、配列は、任意の 1 つまたは複数のアミノ酸がアラニンによって置き換えられるように修飾される。一部の実施形態では、配列は、任意の 1 つまたは複数の L - アミノ酸が、対応する d - アミノ酸スキャンによって置き換えられる（is replaced the corresponding d-amino acid scan）ように修飾される。一部の実施形態では、配列は、任意の 1 つもしくは複数のバリンがロイシンによって置き換えられる、任意の 1 つもしくは複数のグルタミン酸がグルタミンによって置き換えられる、任意の 1 つもしくは複数のアスパラギン酸がアスパラギンによって置き換えられる、および / または任意の 1 つもしくは複数のアルギニンがグルタミンによって置き換えられるように修飾される。

## 【 0 0 6 6 】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、コラーゲン結合単位を有するペプチドは、先行する段落に記載される任意のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して少なくとも約 8 0 %、もしくは少なくとも約 8 3 %、もしくは少なくとも約 8 5 %、もしくは少なくとも約 9 0 %、もしくは少なくとも約 9 5 %、もしくは少なくとも約 9 8 %、もしくは少なくとも約 1 0 0 % 相同性を有するアミノ酸配列を含む。様々な実施形態では、本明細書に記載される合成バイオコンジュゲートのペプチド構成成分は、1 つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含めることによって修飾され得る。当業者に周知の通り、ペプチドの重要ではない任意のアミノ酸を保存的置換によって変えても、置き換えるアミノ酸の側鎖が、置き換えられたアミノ酸の側鎖と類似の結合および接触を形成す

10

20

30

40

50

ることができるはずであるので、そのペプチドの活性は有意には変わらないはずである。

【0067】

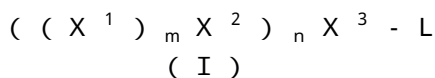
ペプチドは、コラーゲンへの結合についてポジティブ選択を利用するファージディスプレイによって選択することもできる。コラーゲン結合単位は、コラーゲンとのその相互作用によって決定する、ならびに分子相互作用を評価するために使用される技術のいずれか（例えば表面プラズモン共鳴法、ELISA、競合的結合アッセイ、等温滴定熱量測定法、アフィニティークロマトグラフィー、レオロジーおよび/または免疫組織化学的検査）によって測定することができる。「コラーゲン結合性」とみなされるペプチドは、コラーゲンまたはコラーゲン含有組織と相互作用することができ、したがって相互作用は、公知の化学的反応基に起因しない。相互作用は、ペプチドにおけるアミノ酸残基から生じる疎水性の電荷相互作用に起因し得る。相互作用は、マイクロプレート上にコラーゲンを固定し、コラーゲン結合単位と共にインキュベートした後、発色団を使用するビオチン-アビジンなどの検出技術によって測定することができる。相互作用は、コラーゲン結合単位と共に、またはコラーゲン結合単位（単数または複数）を含有するバイオコンジュゲートと共にインキュベートされた、コラーゲン含有流体、ゲル、または組織への機械的影響によって測定することもできる。

10

バイオコンジュゲート

【0068】

本明細書では、グリカンおよびそれに共有結合により結合している、式（I）：



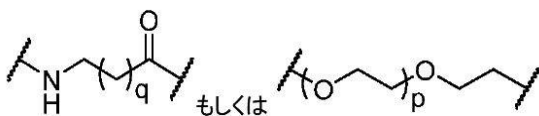
20

[ 式中、

$X^1$  は、コラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列であり、

$X^2$  および  $X^3$  は、独立に、存在しないか、1～15個のアミノ酸を有するアミノ酸配列であるか、または部分

【化7】

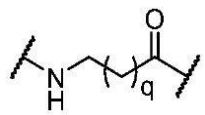


30

( 式中、p および q は、それぞれ独立に、1～10の整数である ) であり、

L は、グリシン ( G )、セリン ( S )、アルギニン ( R ) およびリシン ( K ) からなる群から選択される3～20個のアミノ酸のスペーサー、または部分

【化8】



であり、

ただし、L は、グリカンから最初の5個のアミノ酸の中に少なくとも2つのアルギニン ( R ) を含み、L は、ペプチドをグリカンに共有結合により結合する、必要に応じた連結部分をさらに含み、

40

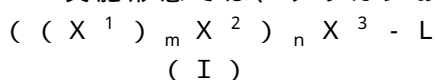
m は、1または2であり、

n は、1または2である ]

の少なくとも1つの結合単位を含むバイオコンジュゲートが提供される。

【0069】

一実施形態では、グリカンおよびそれに共有結合により結合している、式（I）：

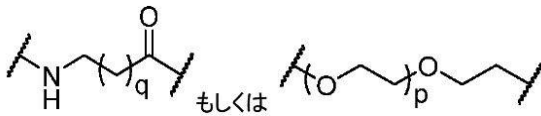


[ 式中、

50

$X^1$  は、コラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列であり、  
 $X^2$  および  $X^3$  は、独立に、存在しないか、1 ~ 15 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列であるか、または部分

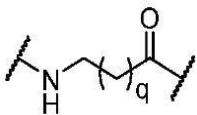
【化 9】



(式中、p および q は、それぞれ独立に、1 ~ 10 の整数である) であり、  
 L は、グリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R) および リシン (K) からなる群から選択される 3 ~ 20 個のアミノ酸のスペーサー、または部分

10

【化 10】



であり、  
 ただし、L は、グリカンから最初の 5 個のアミノ酸の中に少なくとも 2 つのアルギニン (R) を含み、L は、ペプチドをグリカンに共有結合により結合する、必要に応じた連結部分をさらに含み、

20

m は、1 または 2 であり、

n は、1 または 2 である]

の少なくとも 1 つの結合単位を含むバイオコンジュゲートが提供される。

【0070】

一実施形態では、 $X^1$  は、ペプチドの N 末端にあり、 $X^3$  は、ペプチドの C 末端にある。

【0071】

一実施形態では、式 (I) は、RRRK K I Q G R S K R (配列番号: ) でも R R G G R K W G S F E G (配列番号: ) でもない。

【0072】

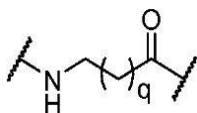
30

ある特定の実施形態では、m は 1 であり、n は 2 である。ある特定の実施形態では、m は 2 であり、n は 1 である。ある特定の実施形態では、m は 2 であり、n は 2 である。

【0073】

ある特定の実施形態では、L は、グリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R) および リシン (K) からなる群から選択される 3 ~ 20 個のアミノ酸のスペーサー、または部分

【化 11】



40

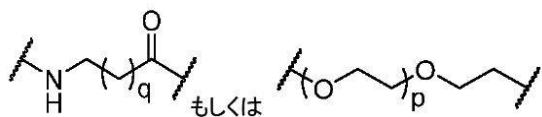
であってよく、

ただし、L は、末端から最初の 3 個のアミノ酸の中に少なくとも 2 つのアルギニン (R) を含み、L は、必要に応じた連結部分をさらに含むことが企図される。

【0074】

ある特定の実施形態では、 $X^2$  および  $X^3$  は、独立に、存在しないか、グリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R) および リシン (K) からなる群から選択される 1 ~ 15 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列であるか、または部分

## 【化 1 2】



(式中、 $p$  および  $q$  は、それぞれ独立に、 $1 \sim 10$  の整数である) である。ある特定の実施形態では、 $X^2$  および  $X^3$  は、独立に、存在しないか、またはグリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R) および リシン (K) からなる群から選択される  $1 \sim 15$  個のアミノ酸を有するアミノ酸配列である。

## 【0075】

ある特定の実施形態では、 $m$  および  $n$  が  $1$  以外である場合、 $X^2$  および  $X^3$  のうちの少なくとも  $1$  つは、少なくとも  $1$  つのアルギニン (R) または リシン (K) を含む。ある特定の実施形態では、 $m$  および  $n$  が  $1$  以外である場合、 $X^2$  および  $X^3$  は、アルギニン (R) も リシン (K) も含まない。

## 【0076】

一部の実施形態では、 $X^2$ 、 $X^3$ 、および  $L$  はまとめて、 $2$  つを超えるアルギニンを含む。一部の実施形態では、 $X^3$  は、 $2$  つまたはそれよりも多いアルギニンを含む。一部の実施形態では、 $L$  は、 $2$  つを超えるまたはそれよりも多いアルギニンを含む。

## 【0077】

一部の実施形態では、 $X^2$  は、 $2 \sim 5$  個のアミノ酸の長さであり、各アミノ酸は、グリシンおよび/またはセリンから選択される。一部の実施形態では、 $X^3$  は、 $2 \sim 5$  個のアミノ酸の長さであり、少なくとも  $2$  つのアミノ酸は、独立に、アルギニン、リシン、および/またはアミド結合を形成することができる側鎖を有する天然もしくは非天然アミノ酸から選択される。

## 【0078】

一部の実施形態では、 $X^2$  は、 $2 \sim 5$  個のアミノ酸であり、各アミノ酸は、グリシンおよび/またはセリンから選択される。一部の実施形態では、 $X^3$  は、 $2 \sim 5$  個のアミノ酸であり、各アミノ酸は、グリシンおよび/またはセリンから選択される。

## 【0079】

一部の実施形態では、 $X^2$ 、 $X^3$ 、および/または  $L$  におけるアミノ酸残基の総数は、 $6$  個またはそれよりも多い。一部の実施形態では、 $X^2$ 、 $X^3$ 、および/または  $L$  におけるアミノ酸残基の総数は、 $8$  個またはそれよりも多い。一部の実施形態では、 $X^2$ 、 $X^3$ 、および/または  $L$  におけるアミノ酸残基の総数は、 $6 \sim 15$  個である。

## 【0080】

一部の実施形態では、 $L$  は、アミノ酸配列 G S G S G S R R (配列番号: ) を含む。したがって、ある特定の実施形態では、アミノ酸配列 G S G S G S R R (配列番号: ) を含むアミノ酸が提供される。

## 【0081】

一部の実施形態では、 $L$  は、アミノ酸配列 G S G S R R G S (配列番号: ) を含む。したがって、ある特定の実施形態では、アミノ酸配列 G S G S R R G S (配列番号: ) を含むアミノ酸が提供される。

## 【0082】

一部の実施形態では、 $L$  は、G S G R R (配列番号: )、G S G S G R R (配列番号: )、G S G S G S R R (配列番号: )、G S G S G S G R R (配列番号: )、G S G S G S G S R R (配列番号: )、G S G S G S G S G S G R R (配列番号: )、G S G S G S G S G S G S G R R (配列番号: )、G S R R G S (配列番号: )、G S G R R G S G (配列番号: )、G S G R R R G S G (配列番号: )、G S G R R R (配列番号: )、G S G R R R R (配列番号: )、G S G S G S R R R R (配列番号: )、G S G S G S R R R R R (配列番号: )、および G S G S G S G S

10

20

30

40

50

R R R (配列番号: )を含む群から選択されるアミノ酸配列である。

【0083】

また本明細書では、グリカンおよび式  $X^1 - GSGSGSRR$  (式中、 $X^1$  は、それに共有結合により結合しているコラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列である) の少なくとも1つの結合単位を含むバイオコンジュゲートが提供される。

【0084】

また本明細書では、グリカンおよび式  $X^1 - GSGSGSRR - NHNH -$  (式中、 $X^1$  は、それに共有結合により結合しているコラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列である) の少なくとも1つの結合単位を含むバイオコンジュゲートが提供される。

【0085】

また本明細書では、グリカンおよび式  $X^1 - GSGSGSRR$  (式中、 $X^1$  は、それに共有結合により結合しているコラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列である) の少なくとも1つの結合単位を含むバイオコンジュゲートが提供される。

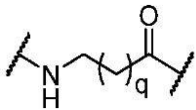
【0086】

また本明細書では、グリカンおよび式  $X^1 - GSGSGSRR - NHNH -$  (式中、 $X^1$  は、それに共有結合により結合しているコラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列である) の少なくとも1つの結合単位を含むバイオコンジュゲートが提供される。

【0087】

また本明細書では、本明細書に記載される通り、グリカンおよびコラーゲン結合単位を含むバイオコンジュゲートが提供され、L は、グリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R) およびリシン (K) からなる群から選択される5~20個のアミノ酸のスペーサー、部分

【化13】



または正電荷の部分であり、ただしLは、グリカンから最初の5個のアミノ酸の中に少なくとも2つの正電荷の部分を含み、Lは、ペプチドをグリカンに共有結合により結合する、必要に応じた連結部分をさらに含む。

【0088】

ある特定の実施形態では、ペプチドは、コラーゲン結合単位を含むアミノ酸配列  $X^1$ 、ならびにペプチド (例えば、直鎖または分岐である) の中の結合単位の数および配置、ならびにグリカンへのコンジュゲーションのための各結合単位とアミノ酸の間の距離を調節するための、 $X^2$ 、 $X^3$ 、およびLのうちの少なくとも1つを含む。

【0089】

ある特定の実施形態では、式 (I) は、グリカンへの  $-C(O) - NH - NH - C(O) -$  (すなわちヒドラジド - カルボニル) 連結を含む。ある特定の実施形態では、Lは、ヒドラジドを含む。  $-C(O) - NH - NH - C(O) -$  は、Lのアミノ酸由来のカルボニル  $-C(O) -$  基および/またはグリカン由来のカルボニル  $-C(O) -$  基を含むことができる。

【0090】

ある特定の実施形態では、グリカン上にアルデヒド結合部位を提供するために、酸化化学反応を利用してグリカン主鎖内のサッカリド環の1つまたは複数を切断することによって、ペプチドをデルマタン硫酸などのグリカンに結合させる。次に、アルデヒド結合部位を使用して、ペプチドをコンジュゲートした (例えば、 $-C(O) - NH - N = C$  結合を介して)。

【0091】

ある特定の実施形態では、ペプチドは、ヒドラジド - カルボニル連結を介してグリカンに結合され、ヒドラジド - カルボニルのカルボニル基は、グリカン上に存在する環外カル

10

20

30

40

50



ボニル基である。環外カルボニル基は、ネイティブなグリカン上に存在することができ、または、あるいはグリカンは、このような官能基を含むように修飾され得る。このような方法は、以下にさらに詳説される。このように結合したバイオコンジュゲートによって示された有益な効果（例えば、結合親和性の増加）は、酸化的に切断されたサッカリド環を含有していないグリカンに、少なくとも部分的に起因することが企図される。

#### 【0092】

ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、任意の単一またはモノマー単位の組合せから構成されたポリマー主鎖（例えば、グリカン以外の生体適合性ポリマー）を含むことができ、ただし、本明細書に記載されるペプチド（複数可）がポリマー主鎖に共有結合により結合できるように、その上に少なくとも1つの、ある場合には1～約50個の間の、適切な官能基が存在する。ポリマーは、直鎖、分岐であってよく、または側鎖（例えば、1～50個のペプチド以外の）を含有することができる。ポリマーは、中性、カチオン性、アニオン性、または双性イオン性であってよい。ある特定の実施形態では、ポリマーは、糖ポリマーである。ポリマーは、例えば式A-B-Aのブロックコポリマーを含むコポリマーであってよい。このようなポリマーを提供するための方法は、当技術分野で公知であり、それには、例えばリビング重合が含まれる。一実施形態では、ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）（PEG）である。別の実施形態では、ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）（PEG）ではない。ある特定の実施形態では、ポリマーは、グリカンでもナノ粒子でもない。ある特定の実施形態では、ポリマーはグリカンである。

10

20

#### 【0093】

本明細書に記載されるバイオコンジュゲートのある特定の実施形態では、グリカンは、アルギネート、コンドロイチン、デルマタン、デルマタン硫酸、ヘパラン、ヘパラン硫酸、ヘパリン、デキストラン、デキストラン硫酸、またはヒアルロナンであってよい。一実施形態では、グリカンは、デルマタン硫酸である。一実施形態では、グリカンは、デルマタン硫酸ではない。別の実施形態では、グリカンは、コンドロイチン硫酸である。別の実施形態では、グリカンは、ヘパリンである。本明細書に記載されるバイオコンジュゲートでは、例えば約650～700Daの単一の二糖単位から約50kDaのグリカンまでの様々な分子量のヘパリンを使用することができる。一部の実施形態では、ヘパリンは、約10～約20kDaである。一部の実施形態では、ヘパリンは、最大約15、または約16、または約17、または約18、または約19、または約20kDaである。

30

40

#### 【0094】

一実施形態では、バイオコンジュゲートは、コラーゲンI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、またはXIV型の1つまたは複数に結合するコラーゲン結合単位を有するペプチドを含む。一実施形態では、コラーゲン結合単位は、コラーゲンに結合すると、原線維形成を促進または阻害する。一実施形態では、コラーゲン結合単位は、コラーゲンに結合すると、原線維形成を促進も阻害もしない。一部の実施形態では、ペプチドは、I型コラーゲンに結合する。他の実施形態では、ペプチドは、IV型コラーゲンに結合する。ある特定の実施形態では、コラーゲンに対して特定の結合親和性を有する1つまたは複数のペプチドを、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートにおいて使用することができる。例えば、合成バイオコンジュゲートは、I型コラーゲンに結合親和性を有する少なくとも1つのペプチド、およびIV型コラーゲンに結合親和性を有する少なくとも1つのペプチドを含むことができる。別の実施形態では、ペプチドは、I型コラーゲンに結合親和性を有する。別の実施形態では、ペプチドは、IV型コラーゲンに結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、ペプチドは、II型コラーゲンに結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、ペプチドは、III型コラーゲンに結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、ペプチドは、1つよりも多い型のコラーゲンに結合し、各コラーゲン型への相対的親和性は、変わり得る。一実施形態では、コラーゲン結合単位は、約1mM未満、または約900μM未満、または約800μM未満、または約700μM未満、または約600μM未満、または約500μM未満、または約400μM未満、または約300μM未満、または約200μM未満、ま

50

たは約 100  $\mu$ M 未満の解離定数 ( $K_d$ ) でコラーゲンに結合する。

【0095】

グリカンに結合する結合単位の総数は、バイオコンジュゲートの所望の特性に応じて変わり得る。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートに存在する結合単位の総数は、約 1 ~ 約 50、または約 1 ~ 約 40、または約 1 ~ 約 30、または約 1 ~ 約 25、または約 2 ~ 約 30、または約 2 ~ 約 25、または約 3 ~ 約 25、または約 4 ~ 約 25、または約 5 ~ 約 25、または約 5 ~ 約 30、または約 1 ~ 約 25、または約 2 ~ 約 25、または約 11 ~ 約 14、または約 1 ~ 約 8、または約 1 ~ 約 5、または約 1、または約 2、または約 3、または約 4、または約 5、または約 6、または約 7、または約 8 個の結合単位である。一部の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 10 ~ 約 40 個の結合単位を含む。他の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 5 ~ 約 30 個の結合単位を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 20 個未満の結合単位を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 18 個未満の結合単位を含む。様々な実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 4 ~ 約 18 個の結合単位を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 15 個未満の結合単位を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 10 個未満の結合単位を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 30 個未満の結合単位を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 25 個の結合単位を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 5 ~ 約 40、または約 10 ~ 約 40、または約 5 ~ 約 20、または約 4 ~ 約 18、または約 10、または約 11、または約 18、または約 20 個の結合単位、または約 25 個の結合単位、または約 30 個の結合単位、または約 40 個の結合単位、または約 50 個の結合単位を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 2 個の結合単位、約 4 個の結合単位、または約 8 個の結合単位を含む。

10

20

【0096】

本明細書に記載される結合単位は、グリカンへのコンジュゲーションのためのヒドラジド部分をさらに含むことができる。ヒドラジド基は、例えば C 末端、N 末端などの任意の適切な結合点において、またはアミノ酸上の側鎖を介して結合単位に結合することができる。例えば、結合単位が、結合単位のアミノ酸の側鎖を介してグリカンに結合する場合、側鎖は、グルタミン酸またはアスパラギン酸である。ヒドラジドは、ペプチド配列のアミノ酸上に存在するカルボニル基（例えば、C 末端カルボニル基）に結合したヒドラジン（ $-NHNH_2$ ）の間で形成され得る。

30

【0097】

ある特定の実施形態では、式 (I)

$$\left( (X^1)_m X^2 \right)_n X^3 - L$$

(I)

[ 式中、 $X^1$  および L は、本明細書で定義される通りである ] の結合単位に共有結合により結合しているグリカンを含むバイオコンジュゲートは、グリシン (G)、セリン (S)、アルギニン (R)、リシン (K)、およびアミド結合を形成することができる側鎖を有する天然または非天然アミノ酸からなる群から選択される 2 ~ 約 5 個のアミノ酸を含むアミノ酸配列  $X^2$  および / または  $X^3$  を含む。例えば、 $X^2$  および / または  $X^3$  は、GS (配列番号: )、GSG (配列番号: )、GSGS (配列番号: )、RG (配列番号: )、RGS (配列番号: )、RGS G、RGS GS (配列番号: )、RR (配列番号: )、RRG (配列番号: )、RRS (配列番号: )、RRGS (配列番号: )、RRGS G (配列番号: )、RRGS GS (配列番号: )、RGR (配列番号: )、RSR (配列番号: )、RRR (配列番号: ) などのようなアミノ酸配列を含むことができる。

40

【0098】

ある特定の実施形態では、 $X^2$  および / または  $X^3$  は、1 つよりも多い結合部位を含むアミノ酸配列であり（直鎖であっても分岐であってもよい）、したがって 1 つよりも多いペプチド配列がそれに結合し、したがって分岐構築物を作り出すことができる。さらに、ペプチドは、末端または非末端アミノ酸部分を介してグリカンに結合することができるの

50

で、非末端アミノ酸部分を介してグリカンに結合した場合には分岐となる。結合部位は、同じでも異なってもよく、アミンまたはカルボン酸部分などの任意の適切な結合部位であってよく、したがって、所望のペプチド配列がそれに結合することができる（例えばアミド結合を介して）。したがって、ある特定の実施形態では、 $X^2$  および / または  $X^3$  のうちの少なくとも1つは、1つまたは複数のリシン、グルタミン酸またはアスパラギン酸残基を含有する。例えば、 $X^2$  および / または  $X^3$  は、それぞれ2、3、または4つの結合部位を提供する K G S G（配列番号：）、K K G S G（配列番号：）、または K K K G S G（配列番号：）などのアミノ酸配列である。

【0099】

ある特定の実施形態では、 $X^2$  および / または  $X^3$  は、追加のペプチドまたはコラーゲン結合単位を連結することができる側鎖を含有する1つまたは複数のアミノ酸を含む。このようなスペーサー中に含めるための例示的なアミノ酸として、それらに限定されるものではないが、リシン、グルタミン酸、アスパラギン酸などが挙げられる。ある特定の実施形態では、 $X^2$  および / または  $X^3$  は、式  $K X X$ （式中、各  $X$  は、独立に、天然または非天然アミノ酸である）の1つまたは複数のアミノ酸配列を含む。分岐構築物を作製するために単独でまたは組み合わせて使用され得るアミノ酸配列の具体例として、それらに限定されるものではないが、K R R、K K K、 $(K)_n$  G S G、および  $(K R R)_n - K G S G$ （式中、 $n$  は、0～5、または1、2、3、4もしくは5である）が挙げられる。

【0100】

$X^2$  および / または  $X^3$  の模式図を、以下の表に示す。

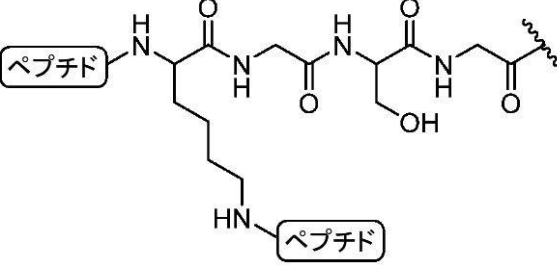
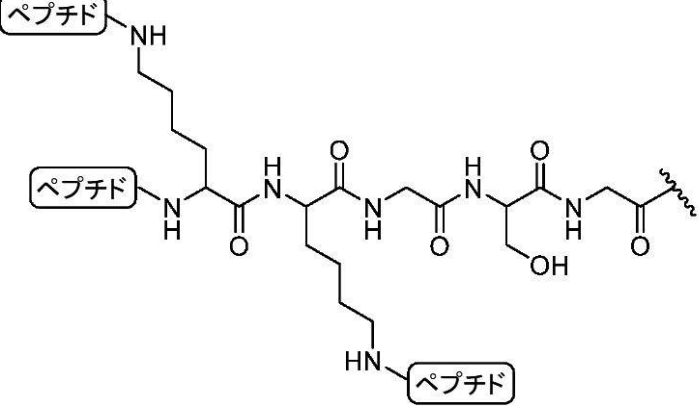
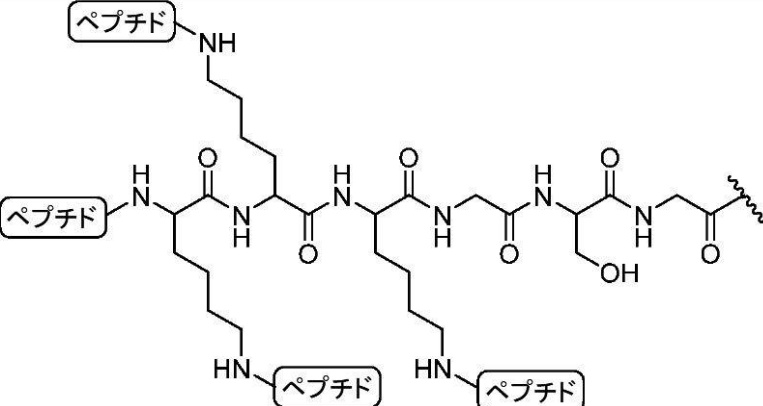
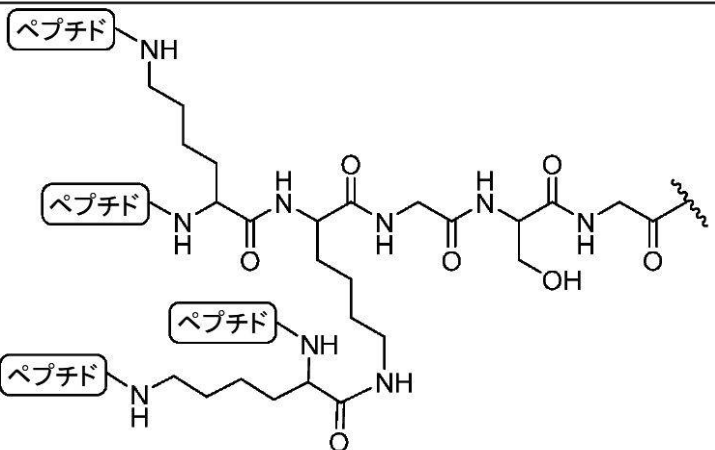
【表4-1】

アミノ酸配列	ペプチド (すなわち、 結合部位) の数	アミノ酸配列の構造
--------	-------------------------------	-----------

10

20

【表 4 - 2】

KGSG	2	
KKGSG	3	
KKKSGS	4	
K <sub>2</sub> KGSG	4	

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

ある特定の実施形態では、ヒドラジド基は、ペプチド（複数可）のN末端に結合している。ある特定の実施形態では、ヒドラジド基は、ペプチド（複数可）のC末端に結合して

50

いる。ある特定の実施形態では、ヒドラジド基は、グルタミン酸および/またはアスパラギン酸などのペプチド(複数可)のアミノ酸の側鎖に結合している。

#### 【0102】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、グリカン1個当たりのペプチドの数は平均であり、組成物におけるある特定のバイオコンジュゲートは、グリカン1個当たりより多くのペプチドを有することができ、ある特定のバイオコンジュゲートは、グリカン1個当たりより少ないペプチドを有する。したがって、ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるペプチドの数は、バイオコンジュゲートの組成物における平均である。例えば、ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、グリカン1個当たりのペプチドの平均数が約5である組成物である。他の実施形態では、グリカン1個当たりのペプチドの平均数は、約6、または約7、または約8、または約9、または約10、または約11、または約12、または約13、または約14、または約15、または約16、または約17、または約18、または約19、または約20、または約25、または約30である。

10

#### 【0103】

ある特定の実施形態では、グリカン1個当たりのペプチドの数は、ペプチドで機能化されている、グリカン主鎖上の二糖単位のパーセントに基づく「機能化(functionalization)パーセント(%)」として記載することができる。例えば、グリカン上に存在する利用可能な二糖単位の総数は、グリカンの分子量(または平均分子量)(例えば、約25 kDa~最大約70 kDa、またはさらには約100 kDa)を、単一の二糖単位の分子量(例えば、約550~800 Da、または約650~750 Da)で割ることによって算出することができる。グリカンが従来の「二糖単位」を含有していない実施形態(例えば、アルギン酸)では、本明細書で提示される算出において使用されるグリカン上に存在する利用可能な二糖単位の総数は、グリカンの分子量(または平均分子量)を、単一サッカリド単位の分子量で割り、2を掛けることによって算出することができる。

20

#### 【0104】

一部の実施形態では、グリカン上に存在する利用可能な二糖単位の数は、約10~約80、または約10~約70、または約15~約70、または約20~約70、または約30~約70、または約35~約70、または約40~約70、または約10~約75、または約15~約75、または約20~約75、または約30~約75、または約35~約75、または約40~約75、または約10~約50、または約20~約50、または約25~約50、または約10~約35、または約15~約35、または約20~約35、または約10~約30、または約15~約30、または約20~約30、または約15、または約20、または約25、または約30、または約35、または約40、または約45、または約50、または約55、または約60、または約65、または約70である。

30

#### 【0105】

したがって、ある特定の実施形態では、グリカンは、約1~約50、または約5~約40%の機能化、または約5~約30%の機能化、または約1~約15%の機能化、または約1~約5%の機能化、または約5~約15%の機能化、または約10~約25%の機能化、または約25~約40%の機能化、または約32%の機能化、または約25%の機能化、または約16%の機能化、または約10%の機能化、または約8%の機能化、または約5%の機能化、または約2.5%の機能化を含み、機能化パーセント(%)は、ペプチドで機能化されている、グリカン上の二糖単位のパーセントによって決定される。一部の実施形態では、グリカンの機能化パーセント(%)は、約1%~約50%、または約3%~約40%、または約5%~約30%、または約10%~約20%、または約1%、または約2%、または約5%、または約10%、または約15%、または約20%、または約25%、または約30%、または約35%、または約40%、または約45%、または約50%、または約55%、または約60%、または約65%、または約70%、または約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%、または約100%である。

40

50

## 【0106】

ある特定の実施形態では、グリカンは、分岐ペプチドで機能化されている。一部の実施形態では、ペプチドは、2～4個の分岐を有する。したがって、ある特定の実施形態では、グリカンは、約1～約50%の機能化、または約5～約40%の機能化、または約5～約30%の機能化、または約1～約15%の機能化、または約1～約5%の機能化、または約5～約15%の機能化、または約10～約25%の機能化、または約25～約40%の機能化、または約2.5%の機能化、または約5%の機能化、または約8%の機能化、または約10%の機能化、または約16%の機能化、または約32%の機能化を含み、機能化パーセント(%)は、ペプチドで機能化されている、グリカン上の二糖単位のパーセントによって決定される。

10

## 【0107】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートおよびペプチドを含む組成物であって、ペプチドがバイオコンジュゲートに密接に会合している(例えば、イオン結合を介して)組成物が提供される。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲート凝集体は、それによって形成され得る。バイオコンジュゲート凝集体(バイオコンジュゲートおよび非共有結合により結合したペプチドを含む)は、1%～200%の機能化(ペプチドで機能化されている、グリカン上の二糖単位のパーセントによって決定される)を含み得ることが企図される。一部の実施形態では、バイオコンジュゲートの機能化パーセント(%)は、約1%～約50%、または約3%～約40%、または約5%～約30%、または約10%～約20%、または約1%、または約2%、または約5%、または約10%、または約15%、または約20%、または約25%、または約30%、または約35%、または約40%、または約45%、または約50%、または約55%、または約60%、または約65%、または約70%、または約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%、または約100%である。

20

## 【0108】

それらに限定されるものではないが、アルギネート、アガロース、デキストラン、デキストラン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸(CS)、デルマタン、デルマタン硫酸(DS)、ヘパラン硫酸、ヘパリン(He p)、ケラチン、ケラタン硫酸、およびヒアルロン酸(HA)を含む任意のグリカンが、本明細書に記載される様々な実施形態において利用され得ることが企図される。グリカンは、天然に存在するものであっても、化学的に誘導されたもの、例えばそれらに限定されるものではないが、部分的にN-脱硫酸化された誘導体、部分的にO-脱硫酸化された誘導体、および/または部分的にO-カルボキシメチル化された誘導体であってもよい。

30

## 【0109】

一部の実施形態では、グリカンは、修飾されていない。ある特定の実施形態では、グリカンは、酸化的に切断されたサッカリド環を含有しておらず、したがってアルデヒド官能基を含有していない。本明細書に開示されるバイオコンジュゲートによって示された有益な効果は、酸化的に切断されたサッカリド環を含有していないグリカンに少なくとも部分的に起因し得ることが企図される。

40

## 【0110】

このような連結は、ペプチド上のヒドラジド基およびグリカン上のカルボニル基(例えば、カルボン酸基、またはその活性化誘導体)、または、あるいはグリカン上のヒドラジド基およびペプチド上のカルボニル基(例えば、カルボン酸基、またはその活性化誘導体)をカップリングすることによって生じ得る。ある特定の実施形態では、ヒドラジド-カルボニル連結は、ペプチド(複数可)上の末端ヒドラジド基とグリカン上のカルボニル基との間にある。

## 【0111】

一実施形態では、グリカンは、ヘパリンであり、ヘパリンには、ヘパリン誘導体、例えばそれらに限定されるものではないが、部分的にN-および/もしくは部分的にO-脱硫酸化されたヘパリン誘導体、部分的にO-カルボキシメチル化されたヘパリン誘導体、ま

50

たはそれらの組合せが含まれ得る。ある特定の実施形態では、ヘパリンは、非酸化ヘパリンであり（すなわち、酸化的に切断されたサッカリド環を含有していない）、アルデヒド官能基を含有していない。ヘパリン誘導体、ならびに／または部分的にN-脱硫酸化されたヘパリンおよび／もしくは部分的にO-脱硫酸化されたヘパリン（すなわち、2-Oおよび／または6-O-脱硫酸化ヘパリン）などのヘパリン誘導体を提供するための方法は、当技術分野で公知である（例えば、Kariya et al., J. Biol. Chem., 2000, 275:25949-5958; Lapierre, et al. Glycobiology, 1996, 6(3):355-366を参照されたい）。Preswichら（US 2012/0142907; US 2010/0330143）に従って調製され得るものなどの部分的にO-カルボキシメチル化されたヘパリン（または任意のグリカン）誘導体が、本明細書に開示されるバイオコンジュゲートを提供するために使用され得ることも企図される。

10

#### 【0112】

ある特定の実施形態では、グリカンの分子量は、バイオコンジュゲートの効果を調整するために変えられる（例えば、Radek, K. A., et al., Wound Repair Regen., 2009, 17: 118-126; およびTaylor, K. R., et al., J. Biol. Chem., 2005, 280:5300-5306を参照されたい）。別の実施形態では、グリカンは、酸化およびアルカリ脱離によって分解されて（例えば、Fransson, L. A., et al., Eur. J. Biochem., 1980, 106:59-69を参照されたい）、より低い分子量（例えば、約10 kDa ~ 約50 kDa）を有する分解されたグリカンを生じる。

#### 【0113】

一実施形態では、グリカンは、デルマタン硫酸（DS）である。DSの生物学的機能は幅広く、それには、内皮細胞およびケラチノサイトの増殖および遊走を促進する成長因子FGF-2、FGF-7、およびFGF-10の結合および活性化が含まれる。一部の実施形態では、デルマタン硫酸の重量範囲は、約10 kDa ~ 約70 kDaである。一実施形態では、デルマタン硫酸の分子量は、約46 kDaである。別の実施形態では、デルマタン硫酸は、酸化およびアルカリ脱離によって分解されて（例えば、Fransson, L. A., et al., Eur. J. Biochem., 1980, 106:59-69を参照されたい）、低分子量（例えば、約10 kDa）を有する分解されたデルマタン硫酸を生じる。

20

#### 【0114】

別の実施形態では、グリカンは、ヘパリンである。本明細書に記載されるバイオコンジュゲートでは、約650 ~ 700 Daから約50 kDaの単一の二糖単位などの様々な分子量のヘパリンを使用することができる。一部の実施形態では、ヘパリンは、約10 ~ 約20 kDaである。一部の実施形態では、ヘパリンは、最大約15、または約16、または約17、または約18、または約19、または約20 kDaである。ある特定の実施形態では、ヘパリンは、サッカリド環の1つまたは複数を切断しない条件下で酸化され得る（例えば、Wang, et al. Biomacromolecules 2013, 14(7):2427-2432を参照されたい）。

30

#### 【0115】

一実施形態では、バイオコンジュゲートは、グリカンおよび約5 ~ 約10個、または約5個の結合単位を含み、結合単位は、RRANAALKAGELYKSI LY（配列番号：）またはRRANAALKAGELYKSI LYGS G（配列番号：）の少なくとも1つの配列を含み、ヒドラジド-カルボニル連結を介してグリカンに結合している。結合単位は、同じペプチド内であっても異なるペプチド内であってもよい。ある特定の実施形態では、ヒドラジド-カルボニル連結は、ペプチド上の末端ヒドラジド基と、グリカン上のカルボニル基との間にある。一実施形態では、グリカンは、ヘパリンである。ある特定の実施形態では、ヘパリンは、酸化的に切断されたサッカリド環を含有しておらず、したがってアルデヒド官能基を含有していない。

40

#### 【0116】

一実施形態では、バイオコンジュゲートは、グリカンおよび約5 ~ 約10個、または約8個、または約5個の結合単位を含み、結合単位は、GQLYKSI LY（配列番号：）

50

の少なくとも1つの配列を含み、ヒドラジド - カルボニル連結を介してグリカンに結合している。一実施形態では、バイオコンジュゲートは、グリカンおよび約5～約10個、または約8個、または約5個の結合単位を含み、結合単位は、GQLYKSI L YGS GSGSR R (配列番号: ) の少なくとも1つの配列を含み、ヒドラジド - カルボニル連結を介してグリカンに結合している。一実施形態では、バイオコンジュゲートは、グリカンおよび約5～約10個、または約8個、または約5個の結合単位を含み、結合単位は、GQLYKSI L YGS GSGSR R - NHNH - (配列番号: ) の少なくとも1つの配列を含み、ヒドラジド - カルボニル連結を介してグリカンに結合している。ある特定の実施形態では、ヒドラジド - カルボニル連結は、結合単位上の末端ヒドラジド基と、グリカン上のカルボニル基との間にある。一実施形態では、グリカンは、ヘパリンである。ある特定の  
10 実施形態では、ヘパリンは、酸化的に切断されたサッカリド環を含有しておらず、したがってアルデヒド官能基を含有していない。

#### 【0117】

コラーゲン結合単位GQLYKSI L YのC末端へのアミノ酸の付加は、結合親和性の増加と正に相関することが判明した(図17)。グリカンと結合部位との間の距離が大きくなると、結合複合体の領域間の立体障害が低減し得ることが企図される。スペーサーが、結合複合体の領域間の立体反発を低減するのに十分な長さに達すると、スペーサーをさらに増加させることの効果は減少し得る。この閾値を超えてスペーサー長を増加させると、アビディティも低下し得る。

#### 【0118】

図15によって示される通り、スペーサー配列におけるアルギニン残基の配置も、結合親和性に影響を及ぼす。グリカン主鎖のより近くに最初のアルギニンを置くと、結合親和性が増加する。このことは、結合部位を負電荷の主鎖から遮蔽する正電荷に起因し得る。

#### 【0119】

一部の実施形態では、コラーゲン結合単位は、配列GQLYKSI L Y (配列番号: ) を含み、1つのアミノ酸は、合成のまたは天然に存在するD - またはL - アミノ酸残基によって置換される。一部の実施形態では、コラーゲン結合単位は、配列XQLYKSI L Y (配列番号: ) ; GXLYKSI L Y (配列番号: ) ; GQXYKSI L Y (配列番号: ) ; GQLXKSI L Y ; GQLYXS I L Y ; GQLYKXI L Y (配列番号: ) ; GQLYKSXL Y (配列番号: ) ; GQLYKSI XY (配列番号: ) ; またはGQLYKSI L X (配列番号: ) を含み、Xは、任意のアミノ酸残基、DまたはLであり得る。これらの配列のそれぞれの後に、本明細書に列挙される任意の実施形態のスペーサーが続くことができる。一部の実施形態では、Xは、L - アラニンである。一部の実施形態では、スペーサーは、GSGSGSR R (配列番号: ) である。

#### 【0120】

一部の実施形態では、結合単位およびスペーサーは、配列LKAGQLYKSI L YHHLHS GSGSGSGSR R (配列番号: )、KAGQLYKSI L YHHLHSYGSGSGSR R (配列番号: )、GQLYKSI L YHHLHSYQNSKPGSGSGSR R (配列番号: ) を含む。

#### 【0121】

一部の実施形態では、結合単位およびスペーサーは、配列GQLYKSI L YGQLYKSI L YGS GSGSGSR R (配列番号: )、GQLYKSI L YGS GQLYKSI L YGS GSGSGSR R (配列番号: )、GQLYKSI L Y - Ahx - GQLYKSI L YGS GSGSGSR R (配列番号: )、または(GQLYKSI L Y)<sub>2</sub>KGSGSGSGSR R (配列番号: ) を含む。

### 2. バイオコンジュゲートの合成

#### 【0122】

本明細書で使用されるペプチドは、商業的供給源から購入することができ、または当技術分野で周知の方法(例えば、化学的および/または生物工学的的方法)を使用して部分的もしくは完全に合成することができる。ある特定の実施形態では、ペプチドは、当技術分  
50



野で周知の固相ペプチド合成プロトコールに従って合成される。別の実施形態では、ペプチドは、周知の Fmoc プロトコールに従って固体支持体上で合成され、トリフルオロ酢酸を用いて支持体から切断され、クロマトグラフィーによって当業者に公知の方法に従って精製される。他の実施形態では、ペプチドは、当業者に周知のバイオテクノロジーの方法を利用して合成される。一実施形態では、所望のペプチドのためのアミノ酸配列情報をコードする DNA 配列を、当業者に公知の組換え DNA 技術によって発現プラスミド（例えば、ペプチドの親和性精製のために親和性タグを組み込むプラスミド）にライゲーションし、プラスミドを、発現のための宿主生物にトランスフェクトし、次にペプチドを、例えば、親和性精製によって宿主生物または成長培地から単離する。組換え DNA 技術方法は、参照によって本明細書に組み込まれる Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) に記載されており、当業者に周知である。

10

#### 【0123】

スキーム 1 に示される通り、本明細書に記載されるペプチドは、本明細書に開示される通りカルボン酸部分を介してグリカン（例えば、ヘパリン）1A に共有結合により結合して、バイオコンジュゲート 1B を提供することができる。ペプチドカップリング反応において典型的である通り、活性化剤を使用して、反応を容易にすることができる。適切なカップリング剤（または活性化剤）は当技術分野で公知であり、それには、例えば、カルボジイミド（例えば、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、N, N'-ジシクロペンチルカルボジイミド、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）、N-t-ブチル-N-メチルカルボジイミド（BMC）、N-t-ブチル-N-エチルカルボジイミド（BEC）、1,3-ビス(2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イルメチル)カルボジイミド（BDDC）など）、無水物（例えば、対称型、混合型、または環式無水物）、活性化エステル（例えば、フェニル活性化エステル誘導体、p-ヒドロキサム酸活性化エステル、ヘキサフルオロアセトン（HFA）など）、アシルアゾール（CDI を使用するアシルイミダゾール、アシルベンゾトリアゾールなど）、アシルアジド、酸ハロゲン化物、ホスホニウム塩（HOBt、PyBOP、HOAt など）、アミニウム/ウロニウム塩（例えば、テトラメチルアミニウム塩、ビスピロリジノアミニウム塩、ビスピペリジノアミニウム塩、イミダゾリウムウロニウム塩、ピリジニウムウロニウム塩、N, N, N'-トリメチル-N'-フェニル尿素から得られたウロニウム塩、モルホリノベースのアミニウム/ウロニウムカップリング試薬、アンチモン酸ウロニウム塩など）、有機リン試薬（例えば、ホスフィン酸およびリン酸誘導体）、有機硫黄試薬（例えば、スルホン酸誘導体）、トリアジンカップリング試薬（例えば、2-クロロ-4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4メチルモルホリニウム塩化物、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4メチルモルホリニウムテトラフルオロボレートなど）、ピリジニウムカップリング試薬（例えば、向山試薬、ピリジニウムテトラフルオロボレートカップリング試薬など）、ポリマー支持試薬（例えば、ポリマー結合カルボジイミド、ポリマー結合 TBTU、ポリマー結合 2,4,6-トリクロロ-1,3,5-トリアジン、ポリマー結合 HOBt、ポリマー結合 HOSu、ポリマー結合 IIDQ、ポリマー結合 EEDQ など）など（例えば、El-Faham, et al. Chem. Rev., 2011, 111(11): 6557-6602; Han, et al. Tetrahedron, 2004, 60:2447-2467 を参照されたい）が含まれる。

20

30

40

#### 【0124】

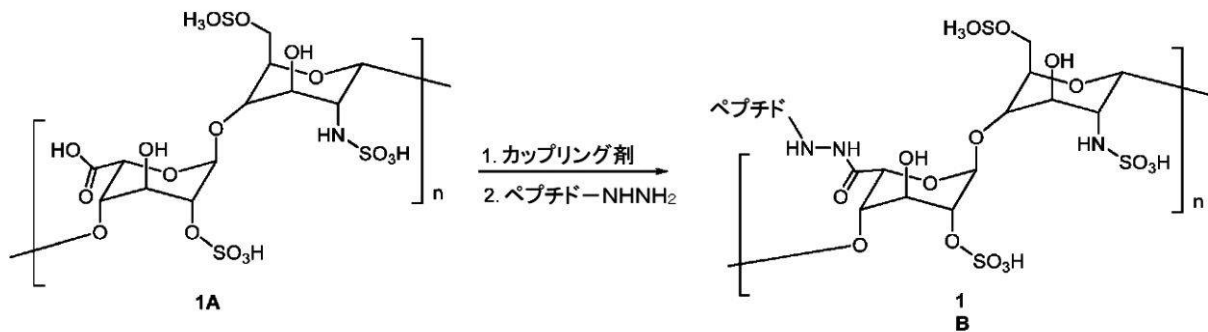
一実施形態では、ペプチドカップリング反応は、活性化グリカン中間体を介して、グリカンのカルボン酸部分をカップリング剤（例えば、カルボジイミド試薬、例えばそれらに限定されるものではないが、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）など）と反応させて、O-アシルイソ尿素中間

50

体を形成することによって進行する。このようなカルボジイミド化学反応は、当技術分野で周知であり、適切なカップリング剤は、商業的供給源から購入することができる。O-アシルイソ尿素中間体を、所望のペプチドと接触させると、バイオコンジュゲートが得られる。グリカン、ペプチドが存在する前にまたはペプチドの存在下で活性化剤と接触させることができる。一部の実施形態では、反応は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)またはその誘導体の存在下で行われる。ある特定の実施形態では、ペプチド配列は、グリカン、またはそのO-アシルイソ尿素中間体とのカップリング反応を助けるために、反応性部分(例えば、ヒドラジド官能基)を含むように修飾することができる。さらに、ペプチドの1つまたは複数のアミノ酸が反応性官能基(例えば、カルボン酸側鎖)を含有する、ある特定の場合には、1つまたは複数の側鎖を保護してカップリング反応を容易にするために、標準保護基化学を使用することができる。さらに、非アミノ酸スペーサーを、単独で、またはアミノ酸スペーサー(例えば、アミノヘキサン酸)と組み合わせて用いることもできる。

【化14】

### スキーム1. バイオコンジュゲートの合成



【0125】

ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、修飾グリカン誘導体(例えば、ヘパリン)から得られる(スキーム2)。本明細書に記載されるバイオコンジュゲートにおいて使用するのに適した様々なグリカン誘導体、例えば部分的にN-脱硫酸化されたヘパリンおよび部分的にO-脱硫酸化されたヘパリン(すなわち、2-Oおよび/または6-O-脱硫酸化ヘパリン、例えば、Kariya et al., J. Biol. Chem., 2000, 275:25949-5958; Lapierre, et al. Glycobiology, 1996, 6(3):355-366を参照されたい)は、当技術分野で公知である。例示的な方法は、以下のスキーム2に示されている。スキーム2に示される通り、グリカン(例えば、ヘパリン)1Aを、適切な脱硫酸化剤、例えば塩基(例えば、NaOH)またはシリル化試薬(例えば、N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(BTSA)、N-メチル-N-(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(MTSTFA)など)などと反応させて、1つまたは複数の脱硫酸化グリカン誘導体2Aを提供することができる。当業者に明らかである通り、グリカン誘導体2Aは、部分的な、完全なまたは混合物の脱硫酸化グリカン誘導体2Aを得ることができるように、用いる試薬および反応条件に応じて調整され得る。次に、脱硫酸化グリカン誘導体2Aを、スキーム1について上記の通り、必要に応じてカップリング剤の存在下で、典型的なペプチドカップリング反応条件下でペプチドと反応させて、バイオコンジュゲート2Bを提供することができる。さらに、スキーム2に示される通り、少なくとも1つのヒドロキシ基を有するグリカン誘導体(例えば、6-O-脱硫酸化ヘパリン)を、O-カルボキシメチル化グリカン誘導体(例えば、6-O-カルボキシメチル化ヘパリン)2Cに変換させることができる(例えば、Prestwichら、US 2012/0142907およびUS 2010/0330143を参照されたい)。スキーム1について上記の通り、必要に応じてカップリング剤の存在下で、典型的なペプチドカップリング反応条件下でペプチドとの2Cの反応により、バイオコンジュゲート2Dおよび/または2Eを提供することができる。

10

20

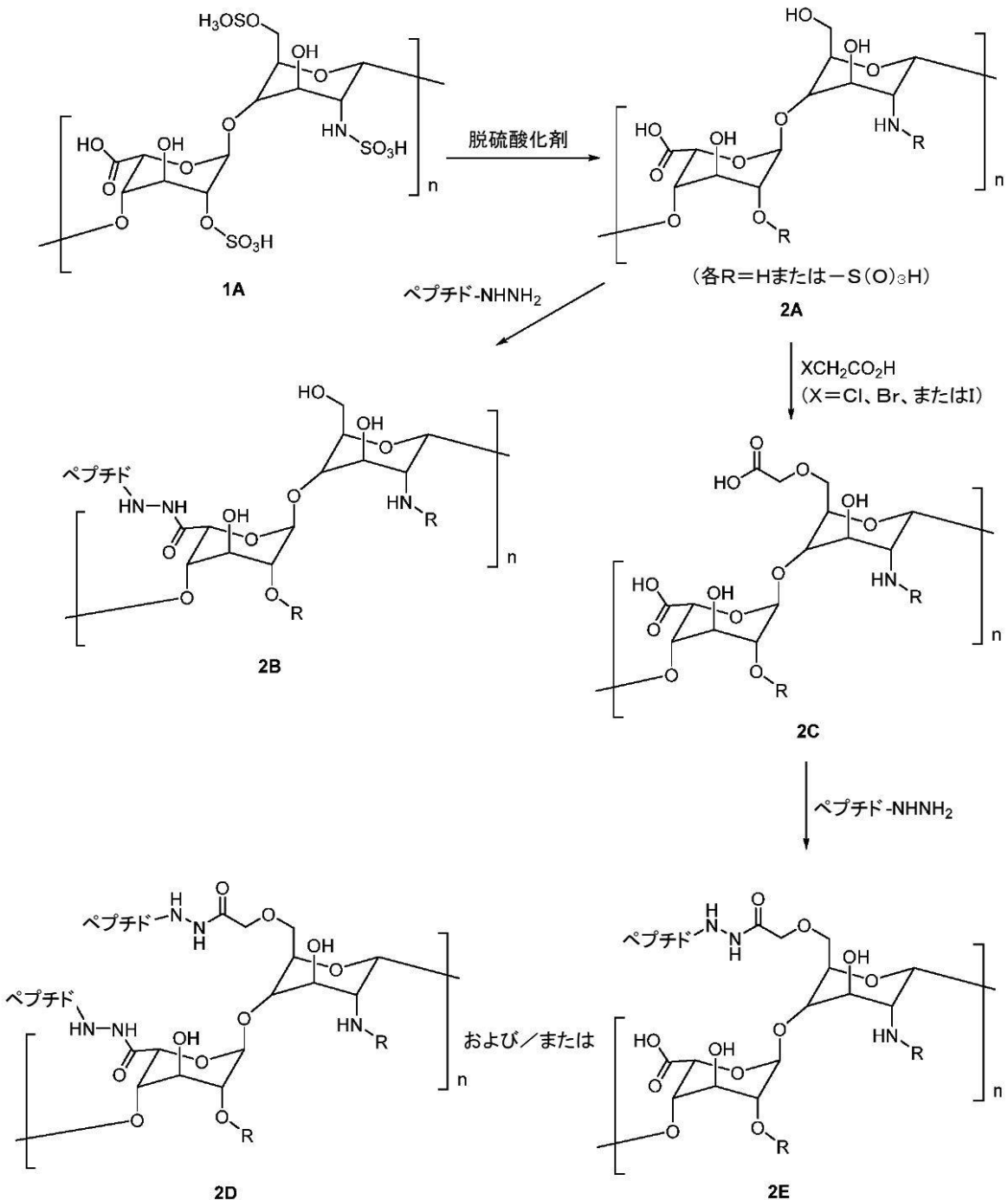
30

40

50

## 【化 1 5】

## スキーム2. バイオコンジュゲートの代替合成



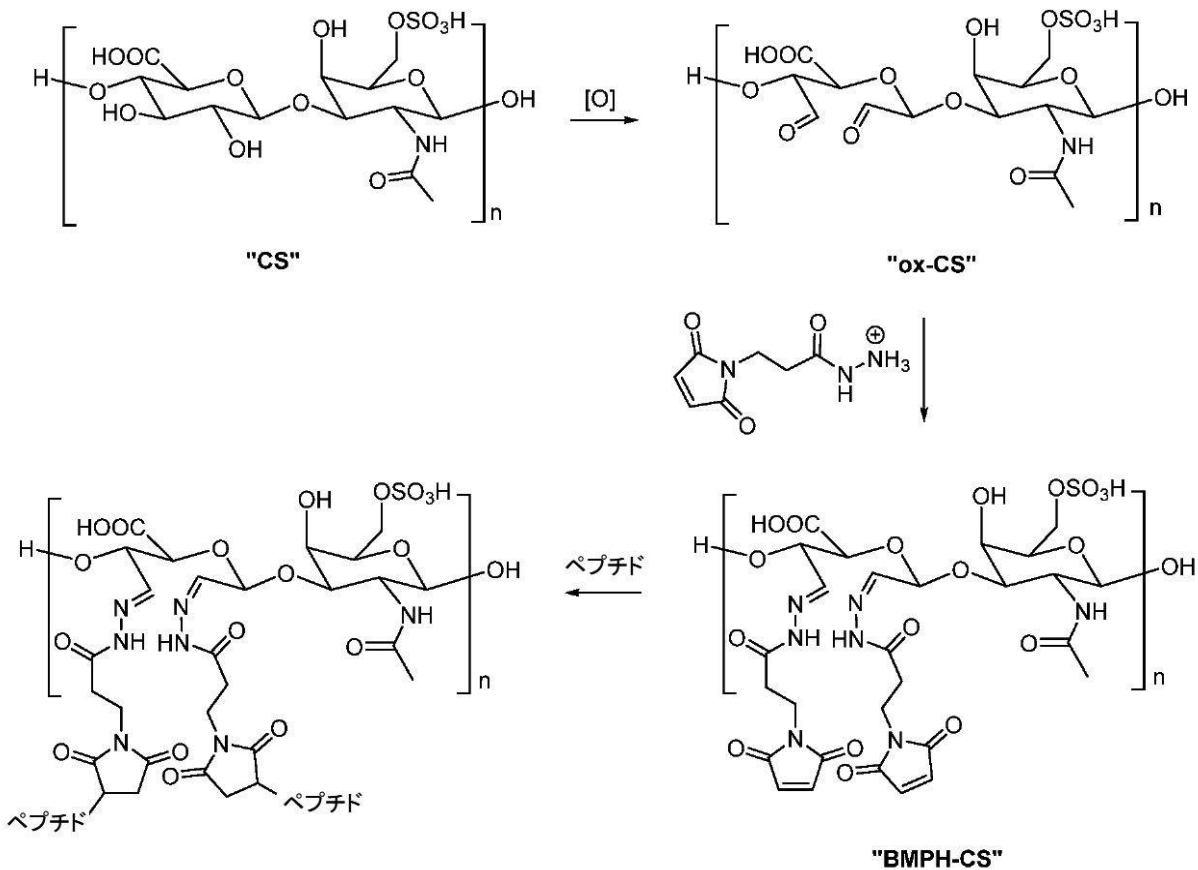
## 【0126】

ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、スキーム3に従って調製することができる。スキーム3に示される通り、グリカン（例えば、コンドロイチン硫酸「CS」）を、過ヨウ素酸試薬、例えば過ヨウ素酸ナトリウムを使用して酸化して、ペプチドをグリカンに共有結合により結合するためにアルデヒド官能基をグリカン上に提供する（例えば、「ox-CS」）。次に、酸化グリカン（例えば、「ox-CS」）のアルデヒド官能基を、N-[マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPH）と反応させて、グリカン中間体（例えば、「BMPH-CS」）を形成し、グリカン中間体を、少なくとも1つの遊離チオール基（すなわち、-SH基）を含有するペプチドとさらに反応させて合成ペプチドグリカンを得ることによって、ペプチドを、グリカン（例えば、コンドロイチン

ン硫酸「CS」)に共有結合により結合させる。

【化16】

### スキーム3. CS-BMPH-ペプチド<sub>n</sub>の合成



### 3. 使用方法

#### 3.1 グラフト不全

【0127】

本開示の一実施形態は、外科的バイパス術の成功率を改善し、かつ/またはその失敗を低減するための方法および関連組成物を提供する。バイパスグラフトは、冠動脈疾患(CAD)および末梢動脈疾患(PAD)の両方における動脈閉塞の処置の一形態として使用される。本明細書で使用される場合、用語「処置すること」は、疾患または障害の1つまたは複数の臨床症状を防止、治癒、逆転、減弱、軽減、最小化、阻害、抑制および/または停止することを指す。米国では、年間およそ500,000件の冠動脈バイパスグラフト(CABG)術および70,000件を超える末梢バイパスグラフト術が実施されている。最も一般的には、伏在静脈から自家血管グラフトが採取されることが多い。

【0128】

血流を回復するために自家静脈グラフトを用いる外科的バイパスの普及にもかかわらず、CADおよびPADの両方で多数の静脈グラフト不全(VGF)がある。末梢だけでは、静脈グラフト不全率は、5年以内に50%不全レベルに達する。静脈グラフトの5%~10%が、技術的因子および急性血栓症に起因して移植直後に不全を生じるが、別の20%~30%の症例において、中期の不全(3~24カ月)が生じるおそれがあり、調査監視、再介入術および切断に費用がかかる場合がある。ブリガムアンドウィメンズ病院(the Brigham and Women's Hospital)での20年の経験中、CLI患者(n=1219)における静脈グラフト不全の12カ月間の発生率は、29%であった。静脈グラフト不全の結果は、再発性虚血症状、衰弱させる手術および四肢喪失を含めて、患者にとって多くの場合重症となっている。現在まで、薬物療法および技術革新は、静脈グラフト不全

を低減することに対してほとんど影響を及ぼしていない。

【 0 1 2 9 】

脆弱な内皮層への静脈グラフト管による傷害は、それが、静脈グラフト採取、保存媒体、バイパスのための過度の準備操作、または虚血および再かん流傷害によって引き起こされたものかにかかわらず、移植後の血管壁内に血小板媒介性の炎症応答をもたらすことが企図される。このような内皮傷害および E C M - 血小板活性化カスケードは、急性炎症および血栓症による初期の V G F、または新生内膜過形成による遅発性 V G F をもたらすおそれがある。したがって、移植後の循環血小板への静脈グラフト内皮下マトリックスの曝露を制限することは、急性血管壁炎症を低減し、再上皮形成を改善し、血管閉塞および V G F をもたらし得る過度の新生内膜過形成を制限する一助となり得る。本明細書に記載されるバイオコンジュゲートは、自家静脈グラフトを用いる外科的バイパスを受ける、心血管疾患を有する患者のための静脈グラフト保存溶液として使用することができる。本明細書に記載されるバイオコンジュゲートおよびバイオコンジュゲートを含む組成物は、冠動脈疾患および / または末梢動脈疾患を処置および / または防止することを必要とする患者の冠動脈疾患および / または末梢動脈疾患を処置および / または防止するために使用することができる。

10

【 0 1 3 0 】

したがって、本開示の一実施形態によれば、血管の切片の内壁を、本開示の合成バイオコンジュゲートを含有する溶液と接触させることによって、血管グラフト（例えば、静脈グラフト）を調製するための方法が提供される。接触を実施する一つの方法は、その切片を溶液に浸漬させることである。この接触のための条件は変わり得るが、適量の合成バイオコンジュゲートが内壁に結合するように、合成バイオコンジュゲートの濃度および血管の特徴に応じて容易に決定することができる。このような方法で調製された血管グラフトも、本開示の範囲内である。

20

【 0 1 3 1 】

グラフトが調製されると、移植することを必要とする患者に移植することができる。外科的バイパス術は、医療専門家によって容易に行われ得る。グラフト（grant）の内壁に結合した合成バイオコンジュゲートは、移植されると、急性血管壁炎症を低減し、グラフトの再上皮形成を改善し、グラフトの過度の新生内膜過形成を制限する一助になり、グラフト不全を低減することができる。

30

【 0 1 3 2 】

一実施形態では、グラフトを、バイパス術の間または後に上記の通り合成バイオコンジュゲートで処置した場合、合成バイオコンジュゲートがグラフトの内壁に結合するように、合成バイオコンジュゲートの溶液をグラフトの内腔に注射することができる。一態様では、注射は、血流がグラフトを通して回復または開始される前に行われる。別の態様では、注射は、血流が回復または開始された直後（例えば、10分以内、5分以内、または1分以内）に行われる。

【 0 1 3 3 】

一部の実施形態では、方法は、血管の負の再構築を阻害するのに有効である。虚血または冠状動脈性心疾患としても公知の冠動脈疾患は、冠動脈（心筋に血液を供給する動脈）の内側の平坦な弾性内膜の一部がアテローム性動脈硬化症を発症させ、心臓への血流を事実上制限する場合に生じる。アテローム性動脈硬化症または動脈硬化としても公知の末梢動脈疾患は、循環系の動脈内で生じる障害である。負の再構築には、血管径および内腔径の低減をもたらす刺激に対する、血管の生理的または病理学的応答が含まれる。このような刺激は、例えば、血流変化または血管形成術によってもたらされるおそれがある。一部の実施形態では、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートおよびバイオコンジュゲートを含む組成物の注射により、注射なしの血管径と比較して、約10%、20%、30%、40%、60%、70%、80%、95%のいずれか、またはそれを超えて血管径が増加する。負の再構築は、例えば、病変部位（または疾患部位）における狭窄径パーセントとして血管造影的に（angiographically）定量することができる。再構築の度合いを決定

40

50

する別の方法には、血管内超音波（I V U S）を使用する病変内の外弾性板面積を測定することが含まれる。I V U Sは、外弾性板ならびに血管内腔を画像化することができる技術である。一部の実施形態では、負の再構築は、血管介入術、例えば血管形成術、ステント留置、または粥腫切除術と関連する。したがって、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートおよびバイオコンジュゲートを含む組成物は、血管介入術の前、間および／または後に注射することができる。ある特定の実施形態では、大腿膝窩動脈内の狭窄または閉塞を処置することを必要とする患者の大腿膝窩動脈内の狭窄または閉塞を処置する方法であって、バルーン血管形成術の前、間および／または後に溶液を内腔の内壁に適用することを含み、溶液が、有効量の本明細書に記載されるバイオコンジュゲートまたはバイオコンジュゲートを含む組成物を含む、方法が提供される。

10

#### 【0134】

したがって本開示は、血管（例えば、動脈）の負の再構築を阻害することを必要とする個体の血管（例えば、動脈）の負の再構築を阻害する方法であって、血管壁または血管壁を取り囲む組織に、有効量の本明細書に記載されるバイオコンジュゲートまたはバイオコンジュゲートを含む組成物を注射することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、バイオコンジュゲートまたは組成物は、潜在的なまたは実際の負の再構築の部位にまたはそれに隣接して（例えば、部位から約2、1、または0.5cm以上離さずに）注射される。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物は、潜在的なまたは実際の負の再構築の部位から離して（例えば、部位から少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10cmのいずれか離して）注射される。一部の実施形態では、注射は、針を備えたカテーテルを介して行われる。一部の実施形態では、部位は、冠動脈または末梢動脈である。一部の実施形態では、動脈は、腎臓動脈、大脳動脈、肺動脈、および脚の動脈からなる群から選択される。一部の実施形態では、動脈は、バルーン傷害を受けた動脈である。さらなる例として、それらに限定されるものではないが、腹部大動脈、前脛骨動脈、大動脈弓、弓状動脈、腋窩動脈、上腕動脈、頸動脈、腹腔動脈、腓骨回旋動脈、総肝動脈、総腸骨動脈、深大腿動脈、深掌動脈弓、背側指動脈、背側中足動脈、外頸動脈、外腸骨動脈、顔面動脈、大腿動脈、下腸間膜動脈、内部腸骨動脈、腸管動脈、外側下膝動脈、外側上膝動脈、掌側指動脈、腓骨動脈、膝窩動脈、後脛骨動脈、大腿深動脈、肺動脈、橈骨動脈、腎臓動脈、脾臓動脈、鎖骨下動脈、浅掌動脈弓、上腸間膜動脈、上尺側側副動脈、および／または尺骨動脈が挙げられる。ある特定の実施形態では、動脈は、冠血管系の一部である。

20

30

#### 【0135】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、ヘパリンおよび約5～約10個、または約5個のペプチドを含み、ペプチドは、G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）の少なくとも1つの配列を含む。一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、ヘパリンおよび約5～約10個、または約5個のペプチドを含み、ペプチドは、G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）の少なくとも1つの配列を含み、ヒドラジド-カルボニル連結を介してヘパリンに結合している。

40

### 3.2 線維症

#### 【0136】

本明細書の一実施形態では、線維症を防止および／または処置するためのバイオコンジュゲートおよび方法が提供される。線維症は、炎症細胞が組織および器官に遊走して、瘢痕化をもたらす細胞の応答を生じる炎症性疾患である。線維症は、典型的に炎症または損傷の結果として、体内の多くの組織において生じ得る。炎症細胞の血管外遊出を防止することによって、線維症を減弱または防止することができる。

#### 【0137】

一実施形態では、本明細書で提供されるバイオコンジュゲートおよび方法は、肺線維症を防止および／または処置するために使用することができる。肺の線維症の種類には、嚢胞性線維症および特発性肺線維症などの肺線維症が含まれる。肺線維症は、肺組織内に癒

50

痕が形成されて重篤な呼吸問題が生じる呼吸器疾患である。瘢痕の形成により、壁が肥厚し、血中への酸素供給が減少する。結果として、患者は永続的息切れに苦しむ。

#### 【0138】

一実施形態では、本明細書で提供されるバイオコンジュゲートおよび方法は、肝線維症を処置するために使用することができる。肝線維症は、慢性アルコール曝露、B型肝炎ウイルス(HBV)感染、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、C型肝炎ウイルス(HCV)感染、ウィルソン病、アルファ-1-アンチトリプシン欠乏、ヘモクロマトーシス、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、および自己免疫性肝炎を含めた多種多様な状態から生じ得る。慢性HCVは、慢性肝疾患の主な寄与因子であり、肝臓は、肝臓での繊維組織の形成および瘢痕化によって特徴付けられる持続的な炎症性線維症(inflammatory and fibrosis)を誘発する。NAFLDおよびNASHも、肝臓に炎症および線維症を引き起こす。

10

#### 【0139】

肝硬変は、長期間の損傷に起因して肝臓が適切に機能しなくなっている肝臓の線維症である。典型的に、疾患は、数カ月または数年にわたってゆっくり進展する。初期には、症状がないことが多い。疾患が悪化するにつれて、人は、疲れ、衰弱、そう痒を感じ、下肢にむくみが生じ、皮膚が黄変し、容易にあざができ、腹部に体液が蓄積し、または皮膚にクモ状血管が生じる場合がある。腹部への体液の蓄積は、自然発生的に感染を受けるおそれがある。他の合併症には、肝性脳症、食道の拡張静脈または拡張胃静脈からの出血、および肝臓がんが含まれる。肝性脳症は、錯乱を、場合により意識不明をもたらす。肝硬変は、肝機能不全をもたらすおそれがある。以下の症状または特色は、肝機能不全の直接的な結果であり、したがって、本開示の組成物および方法によって処置または軽快させることもできる。

20

#### 【0140】

肝星細胞(HSC)と腫瘍細胞との直接的な相互作用は、複数の機序を介して腫瘍成長を促進することが示されている。したがって、HSCの腫瘍を支える役割を低減または排除するためにHSCを標的化することは、肝細胞癌(HCC)を防止、阻害または処置するための潜在的な治療戦略をもたらす。ある特定の実施形態では、肝細胞癌(HCC)の発症を防止または阻害することを必要とする患者の肝細胞癌(HCC)の発症を防止または阻害する方法であって、患者に、有効量の本明細書に記載されるバイオコンジュゲートを投与することを含む、方法が提供される。ある特定の実施形態では、肝細胞癌(HCC)の発症は、肝硬変の結果である。ある特定の実施形態では、方法は、肝星細胞増殖および/または線維化表現型遷移を阻害することを含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、肝動脈化学塞栓(TACE)術中などに肝臓に局部投与される。

30

#### 【0141】

クモ状血管腫またはクモ状母斑は、多くのより小さい血管によって取り囲まれた中心細動脈からなる血管病変であり、エストラジオールの増加に起因して生じる。手掌紅斑は、やはりエストロゲンの増加の結果として生じる、手掌の母指球および小指球の発赤である。男性の癌性ではない女性化乳房症または乳腺の大きさの増加は、エストラジオールの増加によって引き起こされ、最大患者の3分の2に生じ得る。性ホルモンの低下である性腺機能低下症は、性交不能症、不妊、性衝動の喪失、および精巣萎縮として現れ、原発性性腺傷害または視床下部/下垂体機能の抑制から生じ得る。性腺機能低下症は、アルコール依存症およびヘモクロマトーシスに起因する肝硬変と関連する。肝臓の大きさは、肝硬変を有するヒトでは肥大している、正常、または縮小している場合がある。

40

#### 【0142】

一実施形態では、本明細書で提供されるバイオコンジュゲートおよび方法は、腎線維症を防止および/または処置するために使用することができる。腎線維症は、腎臓への急性または持続性傷害から生じ得る。傷害は、細胞外マトリックスの過度の沈着をもたらすおそれがある。経時的に、これは腎不全をもたらす、患者が透析または腎臓移植を受ける必要が生じ得る。

50

## 【 0 1 4 3 】

腹膜腔に体液が蓄積する腹水症は、脇腹の鈍麻を生じる。これは、腹囲の増加として目に見える場合がある。肝性口臭は、ジメチルスルフィドの増加から生じる、かび臭い口臭である。黄疸は、ビリルビンの増加に起因する皮膚および粘膜の黄変である。さらに、肝硬変は、血流に対する抵抗性を増大させ、門脈静脈系においてより高い圧力をかけて、門脈圧亢進症を生じる。

## 【 0 1 4 4 】

一実施形態では、本明細書で提供されるバイオコンジュゲートおよび方法は、心臓の線維症を防止および／または処置するために使用することができる。心臓の線維症は、心房線維症、心内膜心筋線維症、または心筋梗塞の形態で存在する。神経膠瘢痕は、脳内の線維症である。他の種類の線維症には、限定することなく、関節線維症（膝、肩、他の関節）、クローン病（腸）、デュピュイトラン拘縮（手、指）、ケロイド（皮膚）、縦隔線維症（縦隔の軟組織）、骨髄線維症（骨髄）、ペロニー病（陰茎）、腎性全身性線維症（皮膚）、進行性塊状線維症（肺）、後腹膜線維症（後腹膜の軟組織）、強皮症／全身性硬化症（皮膚、肺）、および癒着性関節包炎（肩）の一部の形態が含まれる。

10

## 【 0 1 4 5 】

本開示の組成物および方法は、これらの疾患、またはこれらの疾患と関連する症状もしくはは特色のいずれかを防止および／または処置するのに適していることが企図される。線維症の発症は、コラーゲンおよびグリコサミノグリカンを含めた結合組織を敷く刺激細胞が関与する。本開示のバイオコンジュゲートは、コラーゲンまたはグリコサミノグリカンと相互作用し、したがってこのような過度の結合組織の形成を破壊することができる。バイオコンジュゲートは、内皮バリアを保護することもできる。これは、微小血管傷害に起因して露出した細胞外マトリックスと相互作用することによってであり得る。内皮バリアを保護することにより、炎症細胞が、組織に溢出して（extravating）線維化組織をもたらす過度のECM沈着を引き起こすのを防止する。したがって、バイオコンジュゲートは、線維症を防止し、阻害し、遅延させ、かつ／または逆行させることができる。

20

## 【 0 1 4 6 】

ある特定の実施形態では、線維症は、虚血後、感染後、または特発性である（例えば、腎臓、肝臓、心臓、肺）。例えば、Guerrot, D., et al. Fibrogenesis & tissue repair 5.Suppl 1 (2012): S15、および Yamaguchi, I., et al. Nephron Experimental Nephrology 120.1 (2012): e20-e31を参照されたい。ある特定の実施形態では、線維症は、後腹膜線維症である。ある特定の実施形態では、線維症は、皮膚線維症である（例えば、強皮症）。例えば、Maurer, B., et al. Annals of the rheumatic diseases (2013): annrheumdis-2013を参照されたい。

30

## 【 0 1 4 7 】

一実施形態では、疾患は、急性尿細管壊死、糖尿病性慢性腎不全、狼瘡腎炎、腎線維症、でも急性糸球体腎炎でもない。一実施形態では、疾患は、特発性肺線維症（IPF）、慢性閉塞性肺疾患、喘息、でも気腫でもない。

## 【 0 1 4 8 】

ある特定の実施形態では、線維症は、それらに限定されるものではないが、ファブリ病、ゴーシェ病、ニーマン・ピック病、およびハンター症候群（ムコ多糖症）を含めたリソソーム蓄積障害によって引き起こされるか、またはそうでなければそれらに関する。したがって、本明細書のある特定の実施形態では、リソソーム蓄積障害によって引き起こされたか、またはそうでなければそれらに関する線維症を防止することを必要とする患者のリソソーム蓄積障害によって引き起こされたか、またはそうでなければそれらに関する線維症を防止するための方法が提供される。

40

## 【 0 1 4 9 】

本明細書の一実施形態では、線維症の防止または処置のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。本明細書の一実施形態では、線維症の防止または処置のための医薬の調製のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート

50



ト（複数可）の使用が提供される。本明細書の一実施形態では、肝線維症の防止または処置のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。本明細書の一実施形態では、肺線維症の防止または処置のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、ヘパリンおよび約 5 ～ 約 10 個、または約 5 個のペプチドを含み、ペプチドは、G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）の少なくとも 1 つの配列、またはそれからそれぞれ 1 つ、2 つ、または 3 つのアミノの付加、欠失および / または置換を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、ヘパリンおよび約 5 ～ 約 10 個、または約 5 個のペプチドを含み、ペプチドは、G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）の少なくとも 1 つの配列を含む。一実施形態では、ペプチド（複数可）は、ヒドラジド - カルボニル連結を介してヘパリンまたは他のグリカンに結合している。

10

20

30

40

50

#### 【0150】

本明細書の一実施形態では、肝線維症または肺線維症を防止または処置することを必要とする患者の肝線維症または肺線維症を防止または処置するための方法であって、患者に、ヘパリンおよび約 5 ～ 約 10 個、または約 5 個のペプチドを含む有効量のバイオコンジュゲートを投与することを含み、ペプチドは、G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）の少なくとも 1 つの配列を含む、方法が提供される。本明細書の一実施形態では、肝線維症または肺線維症の防止または処置を必要とする患者の肝線維症または肺線維症の防止または処置のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。一実施形態では、有効量のバイオコンジュゲートが投与される。

#### 【0151】

また本明細書では、血管炎を防止および / または処置するための方法が提供される。血管炎は、血管壁の炎症によって定義され、個々の疾患実体の多様な群の病理学的基礎を形成する。血管炎は、自己免疫疾患において一般に観測される難治性病態の 1 つであり、その多くの症例は、ステロイドおよび免疫抑制剤などの従来使用されている治療方法に対して難治性である。血管炎症候群では、炎症は、様々な大きさの動脈に生じ、発熱、筋肉および関節の疼痛、血管閉塞、皮膚潰瘍、ならびに多発性単神経炎が生じるおそれがある。方法は、大型血管の血管炎（L V V）、中型血管の血管炎（M V V）、小型血管の血管炎（S V V）、多様な（variable）血管の血管炎（V V V）、単一器官血管炎（S O V）、全身性疾患と関連する血管炎、および / または可能性が高い病因と関連する血管炎を処置するために使用することができる。大型血管の血管炎（L V V）の非限定的な例として、高安動脈炎（T A K）および巨細胞動脈炎（G C A）が挙げられる。中型血管の血管炎（M V V）の非限定的な例として、結節性多発動脈炎（P A N）および川崎病（K D）が挙げられる。小型血管の血管炎（S V V）の非限定的な例として、抗好中球細胞質抗体（A N C A）関連血管炎（A A V）、顕微鏡的多発血管炎（M P A）、多発血管炎性肉芽腫症（ウェゲナー）（G P A）、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（チャージ - ストラウス）（E G P A）、免疫複合体 S V V、抗糸球体基底膜（抗 G B M）疾患、クリオグロブリン血症性（cryoglobulinemic）血管炎（C V）、I g A 血管炎（ヘノッホ - シェーンライン）（I g A V）、および低補体血症性蕁麻疹様血管炎（H U V）（抗 C 1 q 血管炎）が挙げられる。多様な血管の血管炎（V V V）の非限定的な例として、ベーチェット病（B D）およびコーガン症候群（C S）が挙げられる。単一器官血管炎（S O V）の非限定的な例として、皮膚白血球破壊性血管炎、皮膚動脈炎、原発性中枢神経系血管炎、および孤立性大動脈炎が挙げられる。全身性疾患と関連する血管炎の非限定的な例として、狼瘡血管炎、リウマチ性血管炎、およびサルコイド血管炎が挙げられる。可能性が高い病因と関連する血管炎の非限定的な例として、C 型肝炎ウイルス関連クリオグロブリン血症性血管炎、B 型肝炎ウイルス関連血管炎、梅毒関連大動脈炎、薬物関連免疫複合体血管炎、薬物関連 A N C A 関連血管炎、およびがん関連血管炎が挙げられる。血管炎の他の例として、抗リン脂質症候群、バージャー病（閉塞性血栓性血管炎）、クリオグロブリン血症、クリオピリン関連自己炎症性症候群（C A P S）（若年性）、グッドパスチャー、限局性強皮症（

若年性)、リウマチ性多発筋痛、レイノー現象、強皮症、シェーグレン症候群、および全身性エリテマトーデスが挙げられる。本明細書に開示されるバイオコンジュゲートおよび方法は、血管炎を阻害および/または処置するために使用することができることが企図される。

#### 【0152】

本明細書の一実施形態では、血管炎を防止および/または処置するための方法が提供される。本明細書の一実施形態では、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、多発血管炎性肉芽腫症(ウェゲナー)(GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(チャージ-ストラウス)(EGPA)、免疫複合体SVV、抗糸球体基底膜(抗GBM)疾患、クリオグロブリン血症性血管炎(CV)、IgA血管炎(ヘノッホ-シェーンライン)(IgAV)、および/または低補体血症性蕁麻疹様血管炎(HUV)(抗C1q血管炎)を含めた、小型血管の血管炎を防止および/または処置するための方法が提供される。このような疾患は、小血管(例えば、非常に小さい動脈、細動脈、毛細血管、および小静脈)に影響を及ぼす。

組合せ治療

#### 【0153】

一部の実施形態では、本開示の組成物は、線維症を防止または処置するのに有用な第2の薬剤と組み合わせて使用することができる。したがって、一実施形態では、本開示の任意の組成物および1つまたは複数のこのような第2の薬剤を含む、組合せ、組成物、パッケージまたはキットが提供される。一実施形態では、本開示の任意の処置方法は、1つまたは複数のこのような第2の薬剤の投与をさらに含む。

#### 【0154】

第2の薬剤は、線維症の症状を防止、処置するか、または代わりに軽快させるのに有用な任意の薬学的または生物学的薬剤であってよい。非限定的な例として、ステロイド、例えばプレドニン、還元剤、例えばN-アセチルシステイン、抗線維化薬物、例えばビルフェニドンおよびニンテダニブ、免疫抑制薬、例えばコルチコステロイド、シクロホスファミド、アザチオプリン、メトトレキサート、ペニシラミン、ならびにシクロスポリンAおよびFK506、ならびにコルヒチン、IFN- およびミコフェノール酸モフェチルのような他の薬剤が挙げられる。

#### 【0155】

一部の実施形態では、本開示の組成物は、血管炎を防止または処置するのに有用な第2の薬剤と組み合わせて使用することができる。したがって、一実施形態では、本開示の任意の組成物および1つまたは複数のこのような第2の薬剤を含む、組合せ、組成物、パッケージまたはキットが提供される。一実施形態では、本開示の任意の処置方法は、1つまたは複数のこのような第2の薬剤の投与をさらに含む。

#### 【0156】

第2の薬剤は、血管炎の症状を防止、処置するか、または代わりに軽快させるのに有用な任意の薬学的または生物学的薬剤であってよい。非限定的な例として、プレドニゾン、シクロホスファミド(Cytosan)、メチルプレドニゾン、メトトレキサートナトリウム、Medrol(Pak)、Medrol、デキサメタゾン、プレドニゾン、DexPak、Deltasone、コルチゾン、Prednisone Intensol、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム、Orapred ODT、Trexall、Rheumatrex、メトトレキサートナトリウム(PF)、Veripred 20、Dexamethasone Intensol、プレドニゾンリン酸エステルナトリウム、Pediapred、Millipred、Rayos、Millipred、およびDoubleDexが挙げられる。

#### 4. 組成物

#### 【0157】

一実施形態では、バイオコンジュゲートは、組成物で投与される。本開示は、バイオコンジュゲートおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。水または食塩水を

含めた当業者に公知の薬学的に許容される担体が使用され得る。当技術分野で公知の通り、構成成分ならびにそれらの相対量は、所期の使用および送達方法によって決定される。組成物において用いられる賦形剤または担体は、バイオコンジュゲートの所望の効果を低減しないように選択され得る。適切な組成物の例として、水溶液、例えば等張食塩水、5%グルコース中溶液が挙げられる。アルコール、グリコール、エステルおよびアミドなどの他の周知の薬学的に許容される液体担体を用いることができる。ある特定の実施形態では、組成物は、1つまたは複数の添加剤、例えばそれらに限定されるものではないが、イオン強度改変剤、溶解増強剤、糖、例えばマンニトールもしくはソルビトール、pH緩衝剤、界面活性剤、安定化ポリマー、防腐剤、および/または共溶媒をさらに含む。

#### 【0158】

ある特定の実施形態では、組成物は、水溶液である。水溶液は、製剤化の容易さ、ならびに溶液の点滴注入によってこのような組成物を容易に投与する能力に基づいて、組成物製剤で使用するのに適している。ある特定の実施形態では、組成物は、懸濁液、粘性もしくは半粘性ゲル、または他の種類の固体もしくは半固体組成物である。一部の実施形態では、組成物は、当技術分野で十分周知のフォーム、軟膏、液体洗浄液、ゲル、スプレーおよびリポソームの形態である。あるいは、局所投与は、ポンプ-カテーテル系、連続的もしくは選択的放出デバイス、または接着バリアから選択されるデバイスを介する、提供されたバイオコンジュゲートの処置部位への注入である。ある特定の実施形態では、組成物は、静脈または動脈の内壁に直接的に適用されるか、または接触する溶液である。一部の実施形態では、組成物は、ポリマーマトリックスを含む。他の実施形態では、組成物は、吸収可能である。ある特定の実施形態では、組成物は、pH緩衝剤を含む。一部の実施形態では、組成物は、潤滑増強剤を含有する。

#### 【0159】

ある特定の実施形態では、組成物のための薬学的に許容される担体または支持体として、ポリマーマトリックスまたはポリマー材料が用いられる。本明細書に記載されるポリマー材料は、天然または非天然ポリマー、例えば、糖、ペプチド、タンパク質、ラミニン、コラーゲン、ヒアルロン酸、イオン性および非イオン性水溶性ポリマーなど；アクリル酸ポリマー；親水性ポリマー、例えばポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー、およびポリビニルアルコール；セルロースポリマーおよびセルロースポリマー誘導体、例えばヒドロキシプロピルセルロース、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メチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロース；ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、乳酸およびグリコール酸のコポリマー、または天然および合成の両方の他のポリマー性剤を含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、フィルム剤、ゲル剤、フォーム剤、またはおよび他の剤形として製剤化される。

#### 【0160】

適切なイオン強度改変剤には、例えば、グリセリン、プロピレングリコール、マンニトール、グルコース、デキストロース、ソルビトール、塩化ナトリウム、塩化カリウム、および他の電解質が含まれる。

#### 【0161】

ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートの溶解度を増強する必要がある。このような場合には、溶解度は、適切な製剤化技術の使用、例えば、マンニトール、エタノール、グリセリン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ポロキサマー、および当技術分野で公知の他のものなどの溶解度増強組成物の組込みによって増加させることができる。

#### 【0162】

ある特定の実施形態では、組成物は、潤滑増強剤を含有する。本明細書で使用される場合、潤滑増強剤は、薬学的に許容される担体の粘度を改変することができる1つまたは複数の薬学的に許容されるポリマー材料を指す。適切なポリマー材料には、それらに限定さ

10

20

30

40

50

れるものではないが、イオン性および非イオン性水溶性ポリマー；ヒアルロン酸およびその塩、コンドロイチン硫酸およびその塩、デキストラン、ゼラチン、キトサン、ジェラン、他のバイオコンジュゲートもしくは多糖類、またはそれらの任意の組合せ；セルロースポリマーおよびセルロースポリマー誘導体、例えばヒドロキシプロピルセルロース、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メチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロース；コラーゲンおよび改変コラーゲン；ガラクトマンナン、例えばグアーガム、ローカストビーンガムおよびタラガム、ならびに上記の天然ガムおよび構造的な主構成成分としてマンノースおよび／またはガラクトース部分を含有する類似の天然または合成ガム（例えば、ヒドロキシプロピルグアー）から得られた多糖類；トラガントガムおよびキサンタンガムなどのガム；ジェランガム；アルギネートおよびアルギン酸ナトリウム；キトサン；ビニルポリマー；親水性ポリマー、例えばポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー、およびポリビニルアルコール；カルボキシビニルポリマーまたは架橋アクリル酸ポリマー、例えばポリマーの「カルボマー」ファミリー、例えば、商標Carbopol（商標）で商業的に得ることができるカルボキシポリアルキレン；ならびに他の様々な粘性または粘弾性（viscoelastomeric）物質が含まれる。一実施形態では、潤滑増強剤は、ヒアルロン酸、デルマトン、コンドロイチン、ヘパリン、ヘパラン、ケラチン、デキストラン、キトサン、アルギネート、アガロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、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メチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、カルボマー941、カルボマー940、カルボマー971P、カルボマー974P、または薬学的に許容されるその塩からなる群から選択される。一実施形態では、潤滑増強剤は、バイオコンジュゲートと並行して適用される。あるいは、一実施形態では、潤滑増強剤は、バイオコンジュゲートに対して逐次的に適用される。一実施形態では、潤滑増強剤は、コンドロイチン硫酸である。一実施形態では、潤滑増強剤は、ヒアルロン酸である。潤滑増強剤は、組成物の粘度を変化させることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0163】

上記の潤滑増強剤の構造、化学的特性および物理的特性に関するさらなる詳細については、例えば、US5,409,904、US4,861,760（ジェランガム）、US4,255,415、US4,271,143（カルボキシビニルポリマー）、WO94/10976（ポリビニルアルコール）、WO99/51273（キサンタンガム）、およびWO99/06023（ガラクトマンナン）を参照されたい。典型的に、製剤の所望のpHを容易に達成するために、非酸性潤滑増強剤、例えば中性または塩基性剤が用いられる。

#### 【0164】

一部の実施形態では、バイオコンジュゲートは、ミネラル、アミノ酸、糖、ペプチド、タンパク質、ビタミン（例えばアスコルビン酸）、またはラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、フィブリン、エラスチン、またはアグリカン、または成長因子、例えば上皮成長因子、血小板由来成長因子、形質転換成長因子ベータ、または線維芽細胞成長因子、およびグルココルチコイド、例えばデキサメタゾンまたは粘弾性修正剤、例えばイオン性および非イオン性水溶性ポリマー；アクリル酸ポリマー；親水性ポリマー、例えばポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー、およびポリビニルアルコール；セルロースポリマーおよびセルロースポリマー誘導体、例えばヒドロキシプロピルセルロース、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メチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロース；ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、乳酸およびグリコール酸のコポリマー、または天然および合成の両方の他のポリマー性剤と組み合わせることができる。

## 【0165】

本明細書の組成物において使用するのに適したpH緩衝剤には、例えば、酢酸、ホウ酸、炭酸、クエン酸、およびリン酸緩衝液、ならびに塩酸、水酸化ナトリウム、酸化マグネシウム、リン酸一カリウム、炭酸水素塩、アンモニア、炭酸、塩酸、クエン酸ナトリウム、クエン酸、酢酸、リン酸水素二ナトリウム、ホウ砂、ホウ酸、水酸化ナトリウム、ジエチルバルビツール酸、およびタンパク質、ならびに様々な生物学的緩衝液、例えば、TAPS、Bicine、Tris、Tricine、HEPES、TES、MOPS、PIPES、カコジル酸塩、またはMESが含まれる。ある特定の実施形態では、保存条件下でpHドリフトを防止するために、適切な緩衝系（例えば、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウムまたはホウ酸）が組成物に添加される。一部の実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝食塩水（PBS）溶液である（すなわち、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウムを、一部の製剤では、塩化カリウムおよびリン酸カリウムを含有する）。用いられる剤に応じて、特定の濃度は変わる。ある特定の実施形態では、pHを約pH4～約pH8、または約pH5～約pH8、または約pH6～約pH8、または約pH7～約pH8の範囲内に維持するために、pH緩衝系（例えば、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウムまたはホウ酸）が添加される。一部の実施形態では、緩衝液は、pHを約pH4～約pH8の範囲内に維持するように選択される。一部の実施形態では、pHは、約pH5～約pH8である。一部の実施形態では、緩衝液は、食塩水緩衝液である。ある特定の実施形態では、pHは、約pH4～約pH8、または約pH3～約pH8、または約pH4～約pH7である。一部の実施形態では、組成物は、ポリマー性マトリックス、pH緩衝剤、潤滑増強剤およびバイオコンジュゲートを含む、フィルム剤、ゲル剤、パッチ剤、または液体液剤の形態であり、組成物は、必要に応じて防腐剤を含有し、前記組成物のpHは、約pH4～約pH8の範囲内である。

10

20

## 【0166】

より高濃度のバイオコンジュゲートを送達するために、組成物に界面活性剤が用いられる。界面活性剤は、阻害剤を可溶化し、コロイド分散液、例えばミセル溶液、マイクロエマルジョン、エマルジョンおよび懸濁液を安定化するように機能する。適切な界面活性剤は、ポリソルベート、ポロキサマー、ポリオシル40ステアレート、ポリオキシシルヒマシ油、チロキサポール、トリトン、およびソルビタンモノラウレートを含む。一実施形態では、Triton X114およびチロキサポールなどの界面活性剤は、12.4～13.2の範囲の親水性/親油性/バランス（HLB）を有しており、眼科使用に許容される。

30

## 【0167】

ある特定の実施形態では、安定化ポリマー、すなわち粘滑剤が組成物に添加される。安定化ポリマーは、イオン性/荷電性の一例、より具体的には、物理的安定性のために（-）10～50mVのゼータ電位を示すことができる負電荷を表面上に担持し、水中分散液を作製することができる（すなわち水溶性の）ポリマーであるべきである。一実施形態では、安定化ポリマーは、約0.1%～約0.5%w/wの範囲のカルボマーおよびPemulen（登録商標）、具体的にはCarbomer 974p（ポリアクリル酸）などの架橋ポリアクリレートのファミリー由来の1つの高分子電解質または1つを超える場合には複数の高分子電解質を含む。

40

## 【0168】

一実施形態では、組成物は、血管の細胞外マトリックスへのバイオコンジュゲートの透過性を増加させる剤を含む。好ましくは、透過性を増加させる剤は、塩化ベンザルコニウム、サポニン、脂肪酸、ポリオキシエチレン脂肪エーテル、脂肪酸のアルキルエステル、ピロリドン、ポリビニルピロリドン、ビルビン酸、ピログルタミン酸またはそれらの混合物から選択される。

## 【0169】

バイオコンジュゲートは、それらに限定されるものではないが、エンドトキシンおよび感染病原体を含めた望ましくない汚染物質を除去するために、滅菌することができる。バ

50

イオコンジュゲートの構造および生物向性 (biotropic) 特性に有害な影響を及ぼさない滅菌技術を使用することができる。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、プロピレンオキシドまたはエチレンオキシド処置、滅菌濾過、ガスプラズマ滅菌、ガンマ放射線、電子線、および / または過酢酸などの過酸を用いる滅菌を含めた従来の滅菌技術を使用して消毒および / または滅菌することができる。一実施形態では、バイオコンジュゲートは、1 つまたは複数の滅菌過程に供することができる。あるいは、バイオコンジュゲートは、プラスチックラップまたはホイルラップを含めた任意の種類の容器で包むことができ、さらに滅菌することができる。

#### 【0170】

一部の実施形態では、使用中の微生物汚染を防止するために、防腐剤が組成物に添加される。組成物に添加される適切な防腐剤は、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、アルキルパラベン、安息香酸アルキル、クロロブタノール、クロロクレゾール、セチルアルコール、脂肪アルコール、例えばヘキサデシルアルコール、水銀の有機金属化合物、例えば酢酸塩、硝酸フェニル水銀またはホウ酸フェニル水銀、ジアゾリジニル尿素、アジピン酸ジイソプロピル、ジメチルポリシロキサン、EDTA の塩、ビタミン E およびそれらの混合物を含む。ある特定の実施形態では、防腐剤は、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、ベンゾドデシニウム臭化物、メチルパラベン、プロピルパラベン、フェニルエチルアルコール、エデト酸 (edentate) ニナトリウム、ソルビン酸、またはポリクオタニウム - 1 から選択される。ある特定の実施形態では、組成物は、防腐剤を含む。一部の実施形態では、防腐剤は、約 0.001 w/v % ~ 約 1.0 w/v % のレベルで用いられる。ある特定の実施形態では、組成物は、防腐剤を含有せず、「防腐剤不使用」と呼ばれる。一部の実施形態では、単位用量組成物は無菌であるが、防腐剤不使用である。

10

20

#### 【0171】

一部の実施形態では、バイオコンジュゲートおよび他の薬剤の別個のまたは逐次的な投与が、組成物の送達を容易にするのに必要である。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートおよび他の薬剤は、異なる投薬頻度または間隔で投与することができる。例えば、バイオコンジュゲートは、毎日投与することができ、一方他の薬剤は、より低い頻度で投与することができる。さらに、当業者に明らかになる通り、バイオコンジュゲートおよび他の薬剤は、同じ投与経路または異なる投与経路を使用して投与することができる。

30

#### 【0172】

バイオコンジュゲートを投与するための任意の有効なレジメンを使用することができる。例えば、バイオコンジュゲートは、単回用量として、または毎日複数回用量のレジメンとして投与することができる。さらに、毎日の処置の代替として、時間をずらしたレジメン、例えば週 1 ~ 5 日を使用することができる。

40

#### 【0173】

様々な実施形態では、バイオコンジュゲートは、フィルム剤、ゲル剤、パッチ剤、または液体液剤などによって局所投与することができる。実施形態の一部では、提供される組成物は、緩衝された滅菌水溶液で存在する。ある特定の実施形態では、溶液は、約 1 ~ 約 100 センチポアズ (cP)、または約 1 ~ 約 200 cP、または約 1 ~ 約 300 cP、または約 1 ~ 約 400 cP の粘度を有する。一部の実施形態では、溶液は、約 1 ~ 約 100 cP の粘度を有する。ある特定の実施形態では、溶液は、約 1 ~ 約 200 cP の粘度を有する。ある特定の実施形態では、溶液は、約 1 ~ 約 300 cP の粘度を有する。ある特定の実施形態では、溶液は、約 1 ~ 約 400 cP の粘度を有する。ある特定の実施形態では、溶液は、注射可能な液体液剤の形態である。他の実施形態では、組成物は、粘性液体、すなわち数百 ~ 数千 cP の粘度のゲル剤または軟膏剤として製剤化される。これらの実施形態では、バイオコンジュゲートは、適切な薬学的に許容される担体に分散または溶解される。

40

#### 【0174】

カテーテルベースの送達のためにバイオコンジュゲートと共に使用するための例示的な組成物は、a) 本明細書に記載される合成バイオコンジュゲート、b) 薬学的に許容され

50

る担体、c)ポリマーマトリックス、d)約pH4～約pH8の範囲のpHを提供するためのpH緩衝剤、およびe)全製剤重量の約0.25%～約10%の濃度範囲の水溶性潤滑増強剤、または任意の個々の構成成分a)、b)、c)、d)もしくはe)、またはa)、b)、c)、d)もしくはe)の任意の組合せを含むことができる。

【0175】

例示的な製剤は、a)本明細書に記載されるバイオコンジュゲート、b)薬学的に許容される担体、c)ポリマーマトリックス、およびd)約pH4～約pH8の範囲のpHを提供するためのpH緩衝剤を含むことができ、前記溶液は、液体溶液に関して約3～約30cPの粘度を有する。

【0176】

本開示によって企図される例示的な組成物は、注射による投与のためのものであってもよく、それには、ゴマ油、トウモロコシ油、綿実油もしくはピーナッツ油、ならびにエリキシル、マンニトール、デキストロース、または滅菌水溶液、および類似の薬学的ビヒクルを伴う水性もしくは油性懸濁液、またはエマルジョンが含まれる。食塩水の水溶液も、注射のために従来使用されているが、本開示の文脈ではあまり好ましくない。エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど（および適切なそれらの混合物）、シクロデキストリン誘導体、および植物油を用いることもできる。例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散剤の場合には必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。微生物作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらすことができる。

【0177】

注入可能な滅菌液剤は、必要量の構成成分を、必要な場合、上に列挙される他の様々な成分と共に適切な溶媒に組み込み、その後滅菌濾過することによって調製される。一般に、分散液剤は、塩基性分散媒および上に列挙されるものから必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクルに、様々な滅菌活性成分を組み込むことによって調製される。注入可能な滅菌液剤の調製のための滅菌粉剤・散剤（powder）の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、それらは、活性成分の粉末と任意の追加の所望の成分を、予め滅菌濾過したその溶液から生成する技術である。

【0178】

本明細書に記載されるバイオコンジュゲートを含む医薬組成物の作製では、活性成分は、通常、添加剤もしくは担体によって希釈される、および/またはカプセル、サシェ、紙もしくは他の容器の形態であり得るこのような担体に封入される。添加剤は、賦形剤として働く場合、固体、半固体、または液体の材料（上記の通り）であってよく、活性成分のためのビヒクル、担体または媒体として作用する。したがって、組成物は、例えば最大10重量%の活性化合物を含有する、フィルム剤、ゲル剤、パッチ剤、粉剤・散剤、ロゼンジ剤、サシェ剤、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁剤、エマルジョン、液剤、シロップ剤、エアロゾル剤（固体としてまたは液体媒体中の）、軟膏剤の形態、軟質および硬質ゼラチンフィルム剤、ゲル剤、パッチ剤、注入可能な滅菌液剤、ならびに無菌パッケージ粉剤・散剤であり得る。

【0179】

適切な添加剤の一部の例として、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアガム、リン酸カルシウム、アルギネート、トラガント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、滅菌水、シロップ、およびメチルセルロースが挙げられる。製剤は、滑沢剤、例えばタルク、ステアリン酸マグネシウムおよび鉱油；湿潤剤；乳化剤および懸濁化剤；保存剤、例えばヒドロキシ安息香酸メチルおよびヒドロキシ安息香酸プロピル；甘味剤；ならびに香味剤をさらに含むことができる。

【0180】

薬物送達のために使用されるフィルムは、当技術分野で周知であり、浸出性不純物を含

10

20

30

40

50

まない非毒性の非刺激性ポリマー、例えば多糖類（例えば、セルロース、マルトデキストリンなど）を含む。一部の実施形態では、ポリマーは、親水性である。他の実施形態では、ポリマーは、疎水性である。フィルムは、それが適用される組織に接着し、約1週間にわたって体内でゆっくり吸収される。本明細書に記載される薄フィルム剤形において使用されるポリマーは、吸収可能であり、当技術分野で周知の通り十分な剥離、せん断および引張強度を示す。一部の実施形態では、フィルムは、注射可能である。ある特定の実施形態では、フィルムは、外科的介入の前、間または後に患者に投与される。

#### 【0181】

本明細書で使用されるゲルは、軟質で弱いものから硬質で丈夫なものまでの範囲の特性を有することができる、固体のゼリー様の材料を指す。当技術分野で周知の通り、ゲルは、流体によってその全体積中に拡張される、非流体のコロイド性網目構造またはポリマー網目構造である。ヒドロゲルは、水が分散媒であるコロイド性ゲルとして時として見出される、親水性のポリマー鎖の網目構造を含む種類のゲルである。ヒドロゲルは、高度に吸収性であり、例えば90%を超える水などの高い度合いの水を含有することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載されるゲルは、天然または合成ポリマー網目構造を含む。一部の実施形態では、ゲルは、親水性ポリマーマトリックスを含む。他の実施形態では、ゲルは、疎水性ポリマーマトリックスを含む。一部の実施形態では、ゲルは、天然の組織に非常に類似している度合いの可撓性を有する。ある特定の実施形態では、ゲルは、生体適合性であり吸収可能である。ある特定の実施形態では、ゲルは、外科的介入の前、間または後に患者に投与される。

10

20

#### 【0182】

本明細書で使用される液体液剤は、当技術分野で周知の液剤、懸濁剤、エマルジョン剤、点滴剤、軟膏剤、液体洗浄剤、スプレー剤、リポソーム剤を指す。一部の実施形態では、液体液剤は、少量の酸または塩基が添加されるとpHの変化に抵抗する水性pH緩衝剤を含有する。ある特定の実施形態では、液体液剤は、外科的介入の前、間または後に患者に投与される。

#### 【0183】

例示的な製剤は、a) 本明細書に記載される1つまたは複数のバイオコンジュゲート、b) 薬学的に許容される担体、およびc) マトリックス網目構造としての親水性ポリマーを含むことができ、前記組成物は、粘性液体、すなわち数百~数千cPの粘度のゲル剤または軟膏剤として製剤化される。これらの実施形態では、バイオコンジュゲートは、適切な薬学的に許容される担体に分散または溶解される。

30

#### 【0184】

ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートまたはバイオコンジュゲートを含む組成物は、製剤化の前、間または後に凍結乾燥される。したがって本明細書では、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートまたはバイオコンジュゲートを含む組成物を含む凍結乾燥組成物も提供される。

### 5. 投薬

#### 【0185】

バイオコンジュゲートの適切な投薬量は、標準の方法によって、例えば実験動物モデルでまたは臨床試験で用量応答曲線を確立することによって決定することができ、患者の状態、処置されている疾患状況、投与経路および組織分布、ならびに他の治療的処置の併用の可能性に応じて著しく変わり得る。患者に投与される有効量は、体表面積、患者の体重または質量、および医師による患者状態の評価に基づく。様々な例示的な実施形態では、用量は、約0.01  $\mu\text{g}$  ~ 約10 gの範囲である。例えば、全身送達のために、用量は、約10 g、または約5 g、または約1 gであってよい。他の例示的な実施形態では、有効用量は、1用量当たり約100  $\mu\text{g}$  ~ 約10 g、または1用量当たり約100  $\mu\text{g}$  ~ 約1 g、または1用量当たり約100  $\mu\text{g}$  ~ 約500 mg、1用量当たり約0.01  $\mu\text{g}$  ~ 約100 mg、または1用量当たり約100  $\mu\text{g}$  ~ 約50 mg、または1用量当たり約500  $\mu\text{g}$  ~ 約10 mg、または1用量当たり約1 mg ~ 10 mg、または1用量当たり約1

40

50



～約100mg、または1用量当たり約1mg～500mg、または1用量当たり約1mg～200mg、または1用量当たり約10mg～100mg、または1用量当たり約10mg～75mg、または1用量当たり約10mg～50mg、または1用量当たり約10mg、または1用量当たり約20mg、または1用量当たり約30mg、または1用量当たり約40mg、または1用量当たり約50mg、または1用量当たり約60mg、または1用量当たり約70mg、または1用量当たり約80mg、または1用量当たり約90mg、または1用量当たり約100mgの範囲である。本明細書に記載される様々な実施形態のいずれにおいても、有効用量は、1用量当たり約0.01μg～約1000mg、1用量当たり1μg～約100mg、1用量当たり約100μg～約1.0mg、約50μg～約600μg、約50μg～約700μg、約100μg～約200μg、約1000μg～約600μg、約100μg～約500μg、約200μg～約600μg、または約100μg～約50mg、または1用量当たり約500μg～約10mgまたは1用量当たり約1mg～約10mgの範囲である。

10

20

30

40

50

#### 【0186】

一部の実施形態では、組成物は、複数回用量の形態でパッケージされる。したがって、使用中の微生物汚染を防止するために、防腐剤が必要とされる。ある特定の実施形態では、上記の通り、適切な防腐剤を組成物に添加することができる。一部の実施形態では、組成物は、防腐剤を含有する。ある特定の実施形態では、防腐剤は、約0.001w/v%～約1.0w/v%のレベルで用いられる。一部の実施形態では、単位用量組成物は無菌であるが、防腐剤不使用である。

#### 【実施例】

#### 【0187】

##### (実施例1)

#### バイオコンジュゲートの合成

バイオコンジュゲートは、以下のプロトコールに従って調製することができる。適切な反応緩衝液（例えば、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)を、適切な濃度のカオトロピック剤、例えばブタノール、エタノール、塩化グアニジウム、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、塩化マグネシウム、フェノール、プロパノール、ドデシル硫酸ナトリウム、チオ尿素、または尿素（例えば、約5M～約10M尿素）を用いて調製する。最終pHを、1NのHClを用いて約4.5～約6のpHに調整する。

#### 【0188】

ヒドラジド機能化ペプチド（例えば、表2のペプチド1～20）を、反応緩衝液に溶解して3mg/mLにした。ペプチド溶液を、カップリング反応の前に新しく調製した。対応するビオチン化ペプチドを、反応緩衝液に溶解して3mg/mLにした。得られたビオチン標識ペプチド溶液を、カップリング反応の前に新しく調製した。グリカン（例えば、ヘパリン(MW<sub>avg</sub> = 16kDa)）を、反応緩衝液に溶解して20mg/mLにし、-20℃で保存するか、またはカップリング反応の前に新しく調製する。EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)を、反応緩衝液に溶解して75mg/mLにした直後に、グリカンに添加する。あるいは、バイオコンジュゲートを、非標識ペプチドだけを使用して合成し、必要に応じてビオチンヒドラジドを使用して標識することができる。

#### 【0189】

ヘパリンを、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)(59.3mgまたは水に75mg/mLで溶解させた0.79mL)を50モル過剰でヘパリンに添加することによって活性化した。出発材料を、室温で約5分間反応させた。次に、ビオチン標識ペプチドを、活性化ヘパリンに1:1モル比（ヘパリン:標識ペプチド）(15.3mgまたは反応緩衝液中3mg/mLの5.1mL)で添加した。次に、反応混合物を室温で約5分間振とうした。振とうしながら、非標識ペプチドを所与のモル比（ヘパリン:ペプチド、詳細については表2を参照されたい）で反応緩衝液に添加した。次に、構成成分を、振とうしながら室温で約2時間反応させた。割り当てられた時

間後、振とうしながら室温で約30分間、0.5MのNaOH（およそ4.5mL）を用いてpHを8に上昇させることによって、反応をクエンチした。

【0190】

得られたバイオコンジュゲートを、ダイアフィルター（Spectrum-Midi Kross mPES 10K中空管フィルター）を介して5カラム体積（CV）の反応緩衝液（およそ250mL）を使用した後、10CVの水（およそ500mL）を流速35mL/分でTMPと共におよそ15psiで使用して精製した。次に、最終生成物である残余分（retentate）を、-80℃で凍結させた。必要に応じて、最終生成物を凍結乾燥により乾燥させる。約5個のペプチドを、上に概説される手順を使用してグリカンにコンジュゲートした。

10

【0191】

以下のバイオコンジュゲートを、上記のヘパリンおよび表（表2）に示されるヒドラジド機能化ペプチドから調製した。

【表2-1】

表 2

化合物	ヒドラジド機能化ペプチド
化合物 1 (1:8, グリカン対ペプチド)	RRANAALKAGELYKSILYGSG-NH <sub>2</sub> (ペプチド1)
化合物 2 (1:8, グリカン対ペプチド)	RRANAALKAGELYKSILYGSGRRGSG-NH <sub>2</sub> (ペプチド2)
化合物 3 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGSG-NH <sub>2</sub> (ペプチド3)
化合物 4 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGSGRRGSG-NH <sub>2</sub> (ペプチド4)
化合物 5 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGSGSGSGS-NH <sub>2</sub> (ペプチド5)
化合物 6 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGSRRGSG-NH <sub>2</sub> (ペプチド6)
化合物 7 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGRSGRGSG-NH <sub>2</sub> (ペプチド7)
化合物 8 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGSRGSG-NH <sub>2</sub> (ペプチド8)
化合物 9 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYRRGSGSGS-NH <sub>2</sub> (ペプチド9)

20

30

40

50

【表 2 - 2】

化合物	ヒドラジド機能化ペプチド
化合物 10 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGS GSGSRR-NHNH <sub>2</sub> (ペプチド 10)
化合物 11 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGSRRGS-NHNH <sub>2</sub> (ペプチド 11)
化合物 12 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGSRRRGSG-NHNH <sub>2</sub> (ペプチド 12)
化合物 13 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGSGRGSGSGSG-NHNH <sub>2</sub> (ペプチド 13)
化合物 14 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYGS GKKGSG (ペプチド 14)
化合物 15 (1:8, グリカン対ペプチド)	GQLYKSILYAhxRRAhx-NHNH <sub>2</sub> (ペプチド 15)*
化合物 16 (1:8, グリカン対ペプチド)	RVMHGLHLGDDEGSGNHNH <sub>2</sub> (ペプチド 16)
化合物 17 (1:8, グリカン対ペプチド)	CPGRVMHGLHLGDDEGPCGSG-NHNH <sub>2</sub> (ペプチド 17)
化合物 18 (1:8 または 1:12, グリカン対ペプチド)	CPGRVMHGLHLGDDEGPCSGRRGSG-NHNH <sub>2</sub> (ペプチド 18)
化合物 19 (1:4, グリカン対ペプチド)	(RVMHGLHLGDDEGSG) <sub>2</sub> -KRRGSG-NHNH <sub>2</sub> (ペプチド 19)
化合物 20 (1:6, グリカン対ペプチド)	H <sub>2</sub> NNH- コハク酸-GSGGQLYKSILY (ペプチド 20)

\* Ahx = 6-アミノヘキサン酸

## 【0192】

化合物 1 ~ 17 および 20 を、グリカン 1 個当たりのペプチドが約 1 : 8、または約 1 : 6 の比でペプチドを反応させることによって合成したが、グリカンにコンジュゲートされたペプチドの平均数は、グリカン 1 個当たりペプチド約 5 個であることが企図され、これは約 22 % のペプチド機能化に相当する。化合物 18 は、グリカン 1 個当たりのペプチドが約 1 : 8、または約 1 : 9、または約 1 : 12 の比でペプチドを反応させることによ

10

20

30

40

50

って合成したが、グリカンにコンジュゲートされたペプチドの平均数は、グリカン 1 個当たりペプチド約 8 個であることが企図され、これは約 33% のペプチド機能化に相当する。化合物 19 は、グリカン 1 個当たりのペプチドが約 1 : 4、または約 1 : 3 の比でペプチドを反応させることによって合成したが、グリカンにコンジュゲートされたペプチドの平均数は、グリカン 1 個当たりペプチド約 3 個であることが企図され、これは約 11% のペプチド機能化に相当する。

(実施例 2)

コラーゲン結合プレートアッセイ

【0193】

以下の方法を使用して、コラーゲンに対する本明細書に開示されるバイオコンジュゲートの結合親和性を評価する。

【0194】

バイオコンジュゲート変異体のコラーゲン結合は、コラーゲンを 96 ウェルプレートにコーティングするプレートアッセイによって比較する。コラーゲンを、高結合プレートにおいて、0.02 N 酢酸中 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で室温において 1 時間コーティングする。非結合コラーゲンを、1  $\times$  PBS、pH 7.4 ですすぐ。次に、プレートを、1  $\times$  PBS 溶液中 1% ミルクで室温において 1 時間ブロッキングする。

【0195】

ビオチン化 (biotinlyated) ペプチドを含有するバイオコンジュゲート変異体を、1  $\times$  PBS、pH 7.4 中 1% ミルクで最終濃度 1  $\text{mg}/\text{mL}$  に溶解する。この溶液から 10 倍連続希釈を実施する。次に、分子を、ブロッキングしたコラーゲンコーティングプレート上でインキュベートし、室温で 15 分間インキュベートする。次に、プレートを、1% BSA および 0.2% Tween 20 を含む 1  $\times$  PBS で 3 回すすぐ。

【0196】

結合した分子を、1% BSA および 0.2% Tween 20 を含む 1  $\times$  PBS に 1 : 500 希釈し、200  $\mu\text{L}$  / ウェルで室温において 20 分間インキュベートしたストレプトアビジン - HRP によって検出する。ストレプトアビジン溶液を、0.2% Tween 20 を含む 1  $\times$  PBS でプレートから 3 回すすぐ。次に、TMB 基質溶液を、各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  / ウェル添加し室温で 15 分間おき、色の進展を、硫酸溶液 100  $\mu\text{L}$  (0.16 M) で停止させた。次に、ウェル中の吸光度を、450 nm において測定し、結合親和性を吸光度対濃度による用量応答でプロットする。

【0197】

この方法を使用して、 $\text{EC}_{50}$  値を比較することによって様々なコラーゲン結合バイオコンジュゲートのコラーゲン結合親和性を比較した。より具体的には、バイオコンジュゲートごとの  $\text{EC}_{50}$  値を、化合物 4 の  $\text{EC}_{50}$  と比較した。

【0198】

図 1 は、バイオコンジュゲートである化合物 4、化合物 8、および化合物 13 についてのコラーゲン結合の比較を示す。図 1 は、アルギニンの数が減少すると、 $\text{EC}_{50}$  が増加することを示す。

【0199】

図 2 は、バイオコンジュゲートである化合物 4 および化合物 12 についてのコラーゲン結合の比較を示す。図 2 は、アルギニンの数が増加すると、 $\text{EC}_{50}$  が減少することを示す。

【0200】

図 3 は、バイオコンジュゲートである化合物 4 および化合物 14 についてのコラーゲン結合の比較を示す。図 3 は、アルギニンを別の正電荷のアミノ酸 (具体的には、リシン) で置換しても、結合  $\text{EC}_{50}$  に影響を及ぼさないことを示す。

【0201】

図 4 は、バイオコンジュゲートである化合物 4、化合物 8、および化合物 11 についてのコラーゲン結合の比較を示す。図 4 は、アミノ酸の数が減少すると、 $\text{EC}_{50}$  がわずか

10

20

30

40

50

に増加することを示す。

【0202】

図5は、バイオコンジュゲートである化合物4、化合物9、および化合物10についてのコラーゲン結合の比較を示す。図5は、グリカンのより近くにアルギニン残基を置くと、 $EC_{50}$ が減少することを示す。

【0203】

図1～図5は、バイオコンジュゲートのペプチド部分における正電荷のアミノ酸残基の量および位置（グリカンに対する）に相関があることを示している。

【0204】

図6は、図1～図5のバイオコンジュゲートである化合物4（バッチ2つ）、化合物6、化合物7、化合物8、および化合物10についてのコラーゲン結合の比較を示し、図7は、対応するそれらの $EC_{50}$ 値を比較する棒グラフを示す。

【0205】

図8は、バイオコンジュゲートである化合物4および化合物15についてのコラーゲン結合の比較を示す。図8は、GSGを6-アミノ-1-ヘキサン酸で置換しても、 $EC_{50}$ に有意に影響を及ぼさないことを示しており、このことは、結合が、特定の配列ではなくペプチドのこの領域における長さに依存することを示している。

【0206】

図9は、直鎖バイオコンジュゲート（化合物16）、環式バイオコンジュゲート（化合物17）、および化合物18についてのコラーゲン結合の比較を示す。化合物18は、コラーゲン結合親和性の有意な増加（より低い $EC_{50}$ ）を示した。

【0207】

図10は、バイオコンジュゲートである化合物18および化合物19についてのコラーゲン結合の比較を示す。化合物19は、コラーゲン結合親和性の増加（より低い $EC_{50}$ ）を示す。

【0208】

図11は、化合物4、化合物5（バッチ2つ）、および化合物3についてのコラーゲン結合の比較を示す。化合物4は、化合物5および化合物3と比較して、コラーゲン結合親和性の有意な増加（より低い $K_d$ ）を示した。

（実施例3）

血小板凝集

【0209】

I型線維性コラーゲンを、2～8 での一晚のインキュベーションによってIbidi  $\mu$ スライドに吸着させた。Ibidi  $\mu$ スライドを、リン酸緩衝食塩水（PBS）ですすぎ、次に1×PBS中1%BSAでブロッキングした。化合物10（図12Bに示される）および2mg/mLの化合物1（12Aに示される）を、Ibidi  $\mu$ スライドに適用し、静置してインキュベートした。1時間後、過剰のコンジュゲートを1×PBSですすいで流した。新しく採血したヒト全血を、カルセインAM（蛍光性生細胞マーカー）で予め染色した。血液を、シリンジポンプを使用して1000s<sup>-1</sup>のせん断速度（shear rate）で10分間、チャンネルを横切ってポンプ注入した。血液がIbidi  $\mu$ スライドを横断して流れる間、蛍光顕微鏡を使用して、凝集した蛍光標識血小板を撮影した。図12は、化合物10（パネル12B）が、I型線維性コラーゲンへの血小板結合を阻害することを示す。

（実施例4）新生内膜過形成または末梢動脈疾患（PAD）の処置または防止のためのバイオコンジュゲート

【0210】

新生内膜過形成を、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートを送達するウサギ血管形成術モデルで評価する。複数（例えば、6羽）のウサギが研究に登録される。各動物の右および左腸骨動脈の両方に、バルーン血管形成術媒介性傷害をおこさせる。動物を、試験群（ヘパリン-SILY）またはビヒクル対照（1×PBS）に分ける。各群において

10

20

30

40

50

、両方の腸骨動脈に傷害を施し、バルーン傷害直後に試験物品または対照で処置する。

#### 【0211】

損傷後の所与の時間（例えば、28日）の後、動物を安楽死させ、動脈セグメントを組織学的に評価する。各血管から最も重症の新生内膜応答を有するいくつかの（例えば、3つの）組織学的切片を、典型的に形態計測のために選択する。外弾性板（extranal elastic lamina）（EEL）、内弾性板（IEL）および内腔の断面積を、Movat染色スライドからデジタル形態計測（IPLabソフトウェア、Rockville、MD）を用いて測定する。新生内膜の厚さを、最小および最大部位においてIELから内腔までの距離として測定し、次に平均する。断面積を使用して、以下を算出する。

- ・内側面積 = EEL面積 - IEL面積
- ・新生内膜面積 = IEL面積 - 内腔面積
- ・内側 - 内膜面積 = EEL面積 - 内腔面積
- ・狭窄% =  $[1 - (\text{内腔面積} / \text{IEL面積})] \times 100$

#### 【0212】

変数の平均を、分散分析（ANOVA）を使用して比較する。0.05未満のp値は、典型的に統計的に有意とみなす。

#### 【0213】

本明細書に記載されるバイオコンジュゲートは、新生内膜過形成を阻害するのに有効であり、したがって末梢動脈疾患（PAD）を処置または防止するために使用することができることが企図される。

（実施例5）

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）モデル

#### 【0214】

肝線維症に影響を及ぼす化合物の能力を、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）のマウスモデルで試験した。C57BL/6マウスに、出生後にストレプトゾトシン200μgの単回皮下注射をした。4週齢に始めて、動物に高脂肪食を与えた。動物に、5週目から初めて9週目までの4週間継続的に、食塩水または化合物10を用いて3回/週で静脈内処置をした。別個の群の動物には、同じ期間中、テルミサルタンの毎日経口投与をした。9週齢目に動物を屠殺し、組織学および生化学的分析のために肝臓を収集した。

#### 【0215】

コラーゲン含量に関する肝臓の組織学的分析を、シリウスレッド染色を使用して実施した。染色を定量し、図13に提示した。テルミサルタンまたは化合物10を用いる処置では、ビヒクルで処置した群と比較して、肝臓におけるコラーゲンレベルが低下した。

in vivo画像化系による分布

#### 【0216】

化合物を、蛍光標識を用いて合成した。具体的には、CF633を、1:1の色素対主鎖の合成モル比で、ヒドラジドを介して主鎖に連結した。その分子を10mg/kgでヌードマウスに静脈内投薬し、in vivo画像化系（IVIS）を使用して画像化した。異なる時点において、動物を麻酔し、IVISを使用して画像化して、標識化合物の体内分布を決定した。図14は、注射の5または60分後の化合物の局在を示す。化合物は、腎臓および膀胱に局在しているように見えた。

（実施例6）

コラーゲン結合アッセイ2

#### 【0217】

GQLYKSLILYGSGSGSR（配列番号：）（化合物10）を、スパーサーなしのGQLYKSLILYGSG（配列番号：）（ペプチドX）結合ドメイン、およびスパーサー配列単独のGSGSGSR（配列番号：）（スパーサーA）に対する結合親和性について評価し、結果を図18に示した。スパーサーを付加すると、結合ドメインまたは分離したスパーサーよりも高い結合親和性が得られた。

#### 【0218】

コラーゲン上のフォンビルブランド (von Willebrand) 結合部位に結合すること起因して vWF - 2x としても公知の W R E P S F S A L S (配列番号: ) を、G S G S G S R R (配列番号: ) スペースを伴う場合および伴わない場合の結合親和性について評価した。W R E P S F S A L S G S G S G S R R (配列番号: ) W R E P S F S A L S (配列番号: ) および G S G S G S R R (配列番号: ) は、図 19 の右上に示されている。コラーゲン結合アッセイでは、スペース配列を付加すると、結合親和性の増加が示された。

#### 【0219】

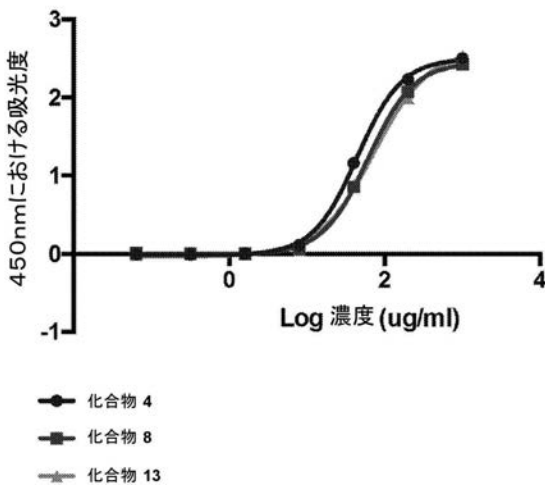
50  $\mu$ g/ml のコラーゲン I 型を、一晚インキュベートすることによって高結合プレートに吸着させた。次に、プレートを PBS で洗浄し、PBS 中 1% 脱脂乳を使用して 1 時間ブロッキングした。分子希釈物を、PBS 中 1% BSA で調製し、次に 25 で 1 時間インキュベートした。次に、プレートを、0.05% Tween 20 を含有する PBS で洗浄した。1% BSA PBS によるストレプトアビジン - HRP の 1:500 希釈物を調製し、20 分間プレートに添加した。次に、プレートを PBS で洗浄し、発色のために TMB 溶液を添加し 10 分間おいた。0.16 M 硫酸を使用して発色を停止させ、プレートリーダーを使用して 450 nm における吸光度を測定した。化合物 10 を、すべての EC<sub>50</sub> 結果について参照基準として使用した。

#### 【0220】

スペース長および化学構造は、全分子のコラーゲン結合親和性に影響を及ぼす。スペースは、一般に、主にグリシンおよびセリンと一部のアルギニン残基とのペプチド配列から構成される。グリシンおよびセリン配列である G S G は、アミノヘキサン酸 (A h x) で置き換えることができる。アルギニン残基の位置は、結合親和性において重要な役割を果たす。G A G のより近くにアルギニン残基を置くと、コラーゲン結合が改善される (図 15)。さらに、複数のアルギニン残基を有することによって、コラーゲン結合親和性が増加する。スペース長は、より高い結合親和性にポジティブに対応する (図 16)。

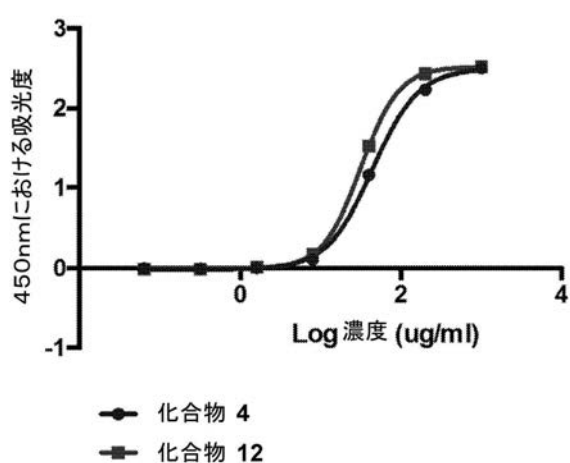
#### 【図 1】

FIG. 1



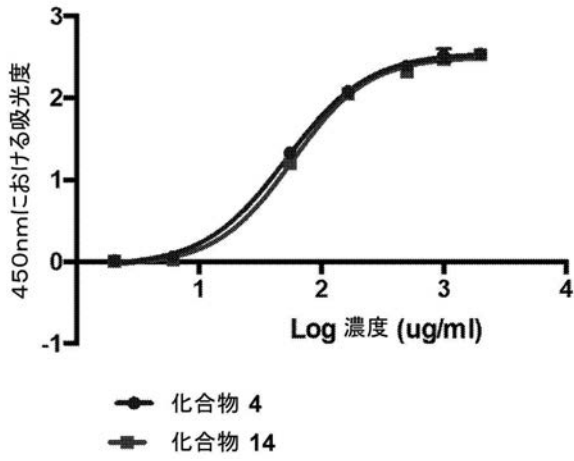
#### 【図 2】

FIG. 2



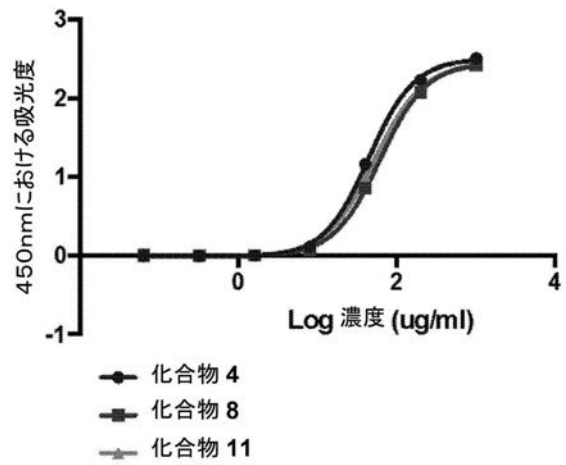
【 図 3 】

FIG. 3



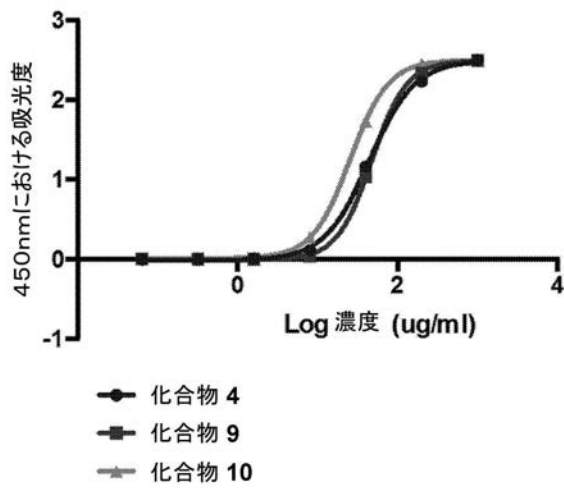
【 図 4 】

FIG. 4



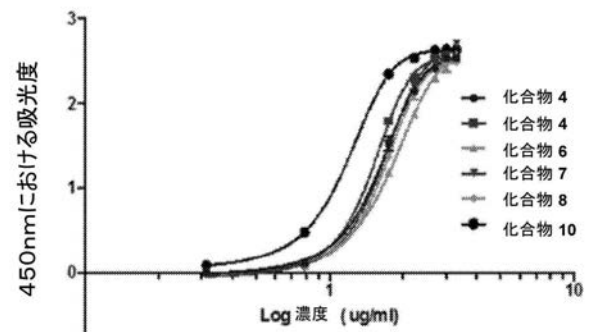
【 図 5 】

FIG. 5



【 図 6 】

FIG. 6

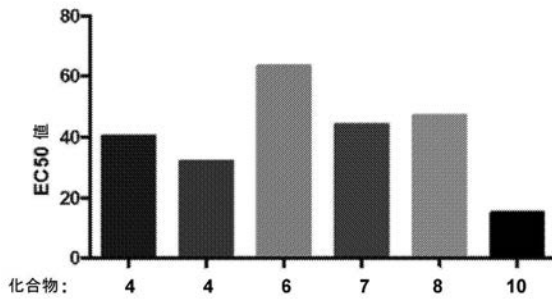


	EC50
化合物 4	40.37
化合物 4	32.06
化合物 6	63.34
化合物 7	44.17
化合物 8	47.15
化合物 10	15.04



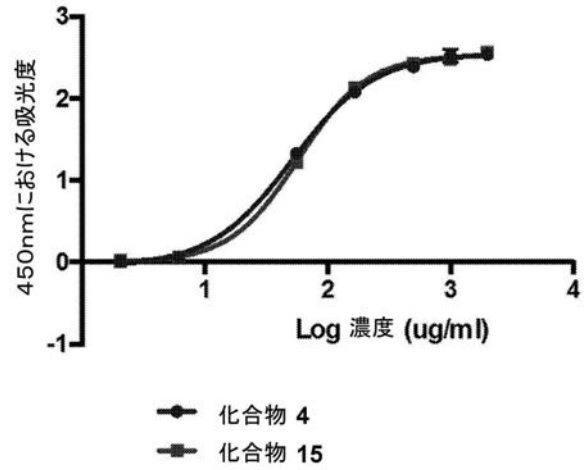
【 図 7 】

FIG. 7



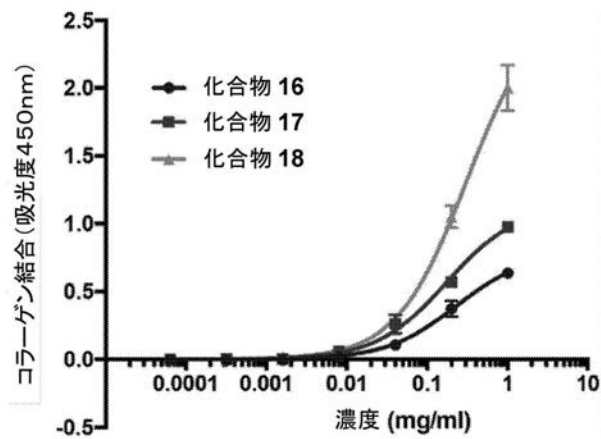
【 図 8 】

FIG. 8



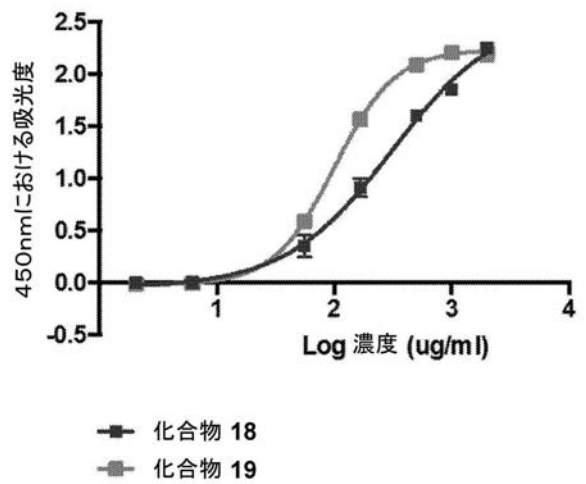
【 図 9 】

FIG. 9



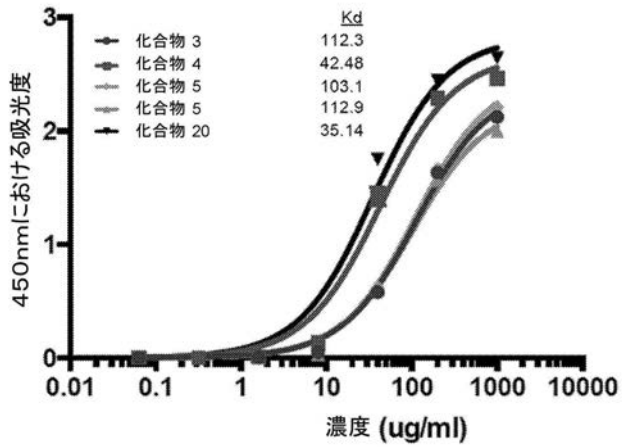
【 図 10 】

FIG. 10

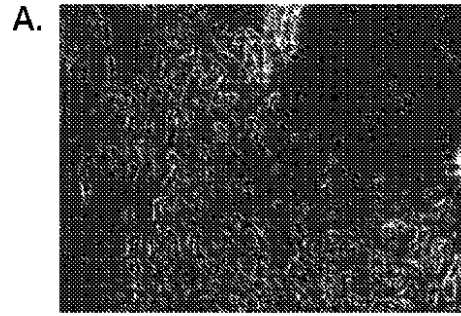


【図 1 1】

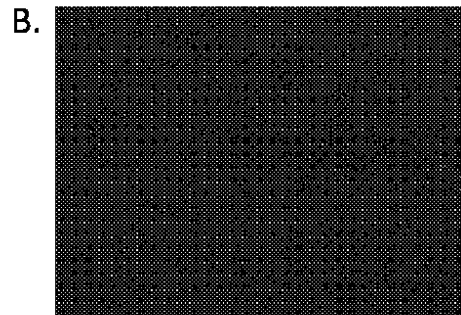
FIG. 11



【図 1 2 A】

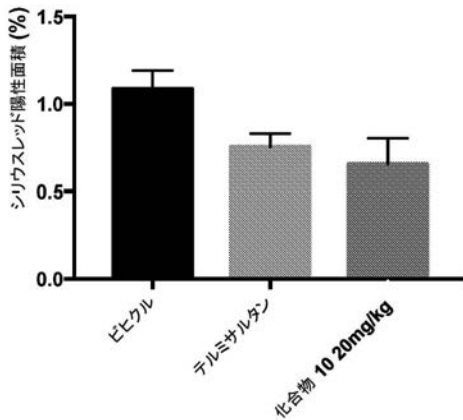


【図 1 2 B】



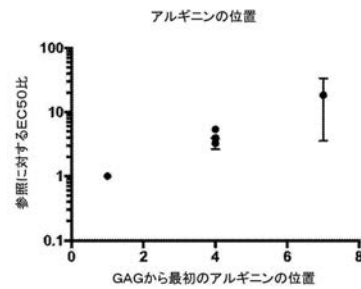
【図 1 3】

FIG. 13



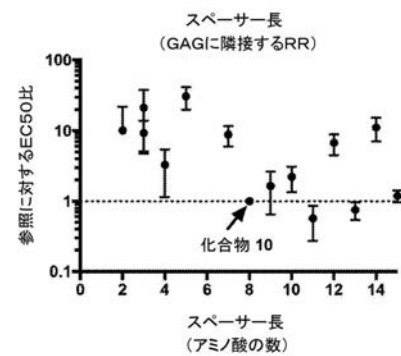
【図 1 5】

FIG. 15



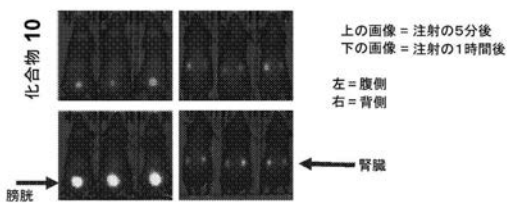
【図 1 6】

FIG. 16



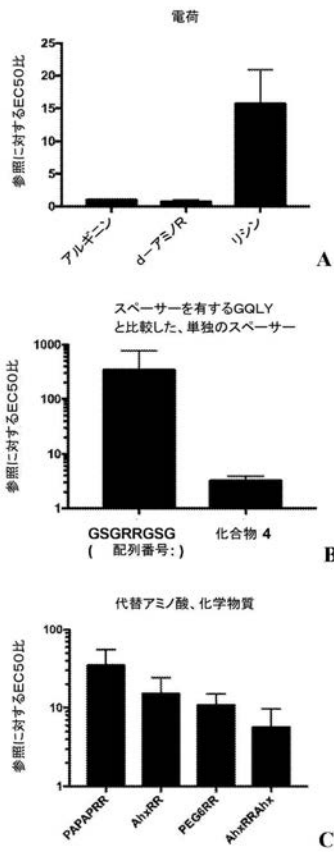
【図 1 4】

FIG. 14



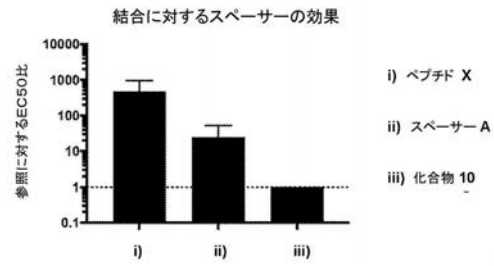
【 図 17 】

FIG. 17



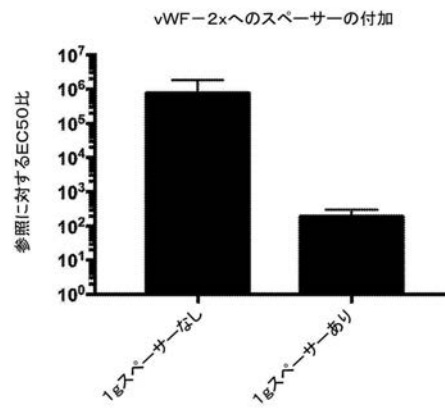
【 図 18 】

FIG. 18



【 図 19 】

FIG. 19



【 配列表 】

2020526497000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2018/041259

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 31/715; A61K 31/727; A61K 31/728; A61K 31/737; A61K 38/00; A61K 38/08 (2018.01) CPC - A61K 9/0019; A61K 31/727; A61K 31/728; A61K 31/737; A61K 38/14; A61K 38/16; A61K 47/61; A61K 47/62; A61K 47/64; A61K 47/65; A61L 2300/232; A61L 2300/252; C07K 14/75 (2018.08)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/273; 435/69.7; 514/1.8 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0229895 A1 (SYMIC IP, LLC) 11 August 2016 (11.08.2016) entire document	1-5, 23, 30, 33-35, 40
A	WO 2016/161333 A2 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 06 October 2016 (06.10.2016) entire document	1-5, 23, 30, 33-35, 40
A	JIN et al. "Collagen mimetic peptide engineered M13 bacteriophage for collagen targeting and imaging in cancer," Biomaterials, 10 August 2014 (10.08.2014), Vol. 35, Pgs. 9236-9245. entire document	1-5, 23, 30, 33-35, 40
A	MIYAZAKI et al. "A Collagen-Binding Mimetic of Neural Cell Adhesion Molecule," Bioconjugate Chemistry, 14 May 2008 (14.05.2008), Vol. 19, No. 6, Pgs. 1119-1123. entire document	1-5, 23, 30, 33-35, 40
A	US 2004/0127416 A1 (MASSIA et al) 01 July 2004 (01.07.2004) entire document	1-5, 23, 30, 33-35, 40
A	WO 2017/066349 A1 (SYMIC IP, LLC) 20 April 2017 (20.04.2017) entire document	1-5, 23, 30, 33-35, 40
A	WO 2009/120995 A2 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION et al) 01 October 2009 (01.10.2009) entire document	1-5, 23, 30, 33-35, 40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "E" 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 "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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 December 2018		Date of mailing of the international search report <b>17 JAN 2019</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/041259

## Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 4, 5, and 111 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/041259

**Box No. II 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. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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.: 7-20, 27-29, 43, 44  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III 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:  
See extra sheet(s).

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:  
1-5, 23, 30, 33-35, and 40 to the extent that they read on a bioconjugate comprising a glycan and a binding unit of formula (I)  $((X1)mX2)nX3-L$  (I), where (I) X2 and X3 are absent; L is GSGRR (SEQ ID NO:111); m is 1; n is 1; and X1 is GQLYKSILY (SEQ ID NO:5); or (II) X2 and X3 are absent; L is GSGSGSRR (SEQ ID NO:4); m is 1; n is 1; and X1 is GQLYKSILY (SEQ ID NO:5).
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/041259

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-6, 21-26, and 30-42 are drawn to bioconjugates, each bioconjugate comprising covalently bonded thereto a glycan and at least one binding unit of Formula (I) or Formula (II).

The first invention of Group I+ is restricted to a bioconjugate comprising covalently bonded thereto a glycan and a binding unit of Formula (I), wherein the binding unit is selected to be  $((X1)mX2)nX3-L$ , where X2 and X3 are absent; L is GSGRR (SEQ ID NO:111); m is 1; n is 1; and X1 is GQLYKSILY (SEQ ID NO:5). It is believed that claims 1-3, 30, and 33-35 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on a bioconjugate comprising a glycan and a binding unit of SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:111.

Applicant is invited to elect additional bioconjugates, each with specified chemical structure and/or SEQ ID NO for each X1, X2, X3, or L for each binding unit, to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. An exemplary election would be a bioconjugate comprising covalently bonded thereto a glycan and a binding unit of Formula (I), wherein the binding unit is selected to be  $((X1)mX2)nX3-L$ , where X2 and X3 are absent; L is GSGSGRR (SEQ ID NO:112); m is 1; and X1 is RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:5). Additional bioconjugates will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for treating peripheral artery disease and/or for treating fibrosis, requiring the selection of alternatives for the structure of the binding unit for each bioconjugate, where "at least one binding unit (s) of formula (I) covalently bonded thereto:  $((X1)mX2)nX3-L$  (I), wherein: X is an amino acid sequence comprising a collagen-binding unit; X2 and X are independently absent, an amino acid sequence having from 1 to 15 amino acids; or a moiety  $-NH-CH2-(CH2)q-C(O)-$  or  $-(OCH2CH2)p-OCH2CH2-$ , where p and q are each independently an integer from 1 to 10; L is a spacer of from 5 to 20 amino acids selected from the group consisting glycine (G), serine (S), arginine (R), and lysine (K), or a moiety  $-NH-CH2CH2)q-C(O)-$ , provided L comprises at least two arginines (R) within the first five amino acids from the glycan, and wherein L further comprises an optional linking moiety which covalently bonds the peptide to the glycan; m is 1 or 2; and n is 1 or 2".

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features a bioconjugate comprising a glycan and at least one binding unit(s) of formula (I)  $((X1)mX2)nX3-L$  (I), wherein: X is an amino acid sequence comprising a collagen-binding unit; X2 and X are independently absent, an amino acid sequence having from 1 to 15 amino acids; or a moiety  $-NH-CH2-(CH2)q-C(O)-$  or  $-(OCH2CH2)p-OCH2CH2-$ , where p and q are each independently an integer from 1 to 10; L is a spacer of from 5 to 20 amino acids selected from the group consisting glycine (G), serine (S), arginine (R), and lysine (K), or a moiety  $-NH-CH2CH2)q-C(O)-$ , provided L comprises at least two arginines (R) within the first five amino acids from the glycan, and wherein L further comprises an optional linking moiety which covalently bonds the peptide to the glycan; m is 1 or 2; and n is 1 or 2; a binding unit of formula (II)  $((X1)mX2)nX3-L$  (II), wherein: X is an amino acid sequence comprising a collagen-binding unit; X2 and X are independently absent, an amino acid sequence having from 1 to 15 amino acids; or a moiety  $-NH-CH2-(CH2)q-C(O)-$  or  $-(OCH2CH2)p-OCH2CH2-$ , where p and q are each independently an integer from 1 to 10; L is a spacer of from 5 to 20 amino acids selected from the group consisting glycine (G), serine (S), arginine (R), and lysine (K), or a moiety  $-NH-CH2CH2)q-C(O)-$ , provided L comprises at least two arginines (R) within the first five amino acids from the glycan, and wherein L further comprises an optional linking moiety which covalently bonds the peptide to the glycan; m is 1 or 2; and n is 1 or 2; provided that the binding unit is not RRRKKIQGRSKR or RRGGRKWGSFEG; a bioconjugate comprising heparin conjugated; a peptide having the amino acid sequence; these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2016/0229895 A1 to Symic IP LLC discloses a bioconjugate (This invention relates to collagen-binding synthetic peptidoglycans, Abstract; conjugate, Para. [0163]) comprising a glycan and a binding unit(s) of formula (I) and/or formula (II)  $((X1)mX2)nX3-L$ , where X2 is absent; X3 is absent, m is 1 ((PnL)x-G, Para. [0024]; where n is 1, X is 1; P is a synthetic peptide of about 5 to about 40 amino acids comprising a sequence of a collagen-binding domain, Para. [0026]; wherein L is a linker, Para. [0027]; wherein G is a glycan, Para. [0028]; the peptide component of the peptidoglycan comprises an amino acid sequence of RRANAALKAGELYKSILYGC (SEQ ID NO: 1), Para. [0053]; amino acids may be included in the linker, Para. [0269]) covalently bonded thereto (a glycan-linker conjugate, Para. [0267]; The conjugate is typically formed by covalent bonding of the peptide to the glycan, Para. [0268]); a bioconjugate comprising heparin conjugated (This invention relates to collagen-binding synthetic peptidoglycans, Abstract; conjugate, Para. [0163]; Hep-SILY, heparin-SILY conjugate, Para. [0188]); a peptide having the amino acid sequence (the synthetic peptide comprises an amino acid sequence, Para. [0218]).

Further, US 2016/0129076 A1 to Symic Biomedical, Inc. discloses a bioconjugate (synthetic peptidoglycans comprised of one or more synthetic peptides conjugated to a glycan, Abstract) comprising covalently bonded thereto a glycan and a binding unit(s) of formula (X1) m-L (synthetic peptidoglycan comprising a glycan; from about 1 to 80 collagen binding peptide(s) ...wherein the collagen binding peptide (s) ...are covalently bonded to the glycan, Para. [0009]; the peptides are covalently bonded to the glycan via a linker. ...the sequence of the peptide may be modified to include a glycine-cysteine segment to provide an attachment point for a glycan, Para. [0037]; amino acids may be included in the linker, Para. [0061]; peptides which have an Arg-Arg (R-R) motif, Para. [0027]); a bioconjugate comprising heparin conjugated (the synthetic peptidoglycan can comprise any glycan, including ...heparin, Para. [0008]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 47/65 (2017.01)</b>		<b>A 6 1 P 43/00</b>	<b>1 1 1</b>	
<b>A 6 1 K 47/64 (2017.01)</b>		<b>A 6 1 K 47/65</b>		
<b>A 6 1 P 1/16 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 K 47/64</b>		
<b>A 6 1 P 7/02 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 1/16</b>		
<b>A 6 1 K 31/728 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 7/02</b>		
<b>A 6 1 K 31/715 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 K 31/728</b>		
		<b>A 6 1 K 31/715</b>		

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. T r i t o n

- (72)発明者 バデリ, ジョン エリック  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エメリービル, ホートン ストリート 5 9  
8 0, スイート 6 0 0, サイミック バイオ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 チェン, ジュリア  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エメリービル, ホートン ストリート 5 9  
8 0, スイート 6 0 0, サイミック バイオ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 サハ, シャルミスタ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エメリービル, ホートン ストリート 5 9  
8 0, スイート 6 0 0, サイミック バイオ, インコーポレイテッド 気付

F ターム(参考) 4C076 AA09 AA11 AA17 AA19 AA22 AA24 AA72 AA95 BB11 BB13  
BB16 BB24 BB31 CC11 CC14 CC16 CC26 EE41 EE59 FF02  
FF04 FF09 FF12 FF16 FF35 FF43 FF61  
4C086 AA01 AA02 EA20 EA25 MA01 MA04 MA13 MA17 MA22 MA23  
MA24 MA28 MA32 MA58 MA63 MA66 NA05 NA13 ZA36 ZA54  
ZA75 ZB21 ZC41  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA40  
BA53 BA57 CA40 EA20 EA50 FA10 FA20 FA30