

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6896641号
(P6896641)

(45) 発行日 令和3年6月30日(2021.6.30)

(24) 登録日 令和3年6月11日(2021.6.11)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	38/10	(2006.01)	A 6 1 K	38/10
A 6 1 K	38/08	(2019.01)	A 6 1 K	38/08
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	47/54
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00

請求項の数 10 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-546208 (P2017-546208)
(86) (22) 出願日	平成28年3月2日(2016.3.2)
(65) 公表番号	特表2018-508528 (P2018-508528A)
(43) 公表日	平成30年3月29日(2018.3.29)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/020443
(87) 國際公開番号	W02016/141053
(87) 國際公開日	平成28年9月9日(2016.9.9)
審査請求日	平成31年3月1日(2019.3.1)
(31) 優先権主張番号	62/126,968
(32) 優先日	平成27年3月2日(2015.3.2)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	503060525 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ イリノイ アメリカ合衆国イリノイ州 61801 アーバナ サウス ライト ストリート 506 ヘンリー アドミニストレーショ ン ビルディング 352
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者	コマロバ, ユリア エー. アメリカ合衆国 イリノイ 60611, シカゴ, エヌ. ワバッシュ アベニ ュー 405, ナンバー211

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】血管新生阻害ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

必要性のある患者における血管新生の阻害のための薬剤の製造での単離ペプチドの使用であって、前記ペプチドが、K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、またはF T E I P T I (配列番号3)のアミノ酸配列を含んでなり、前記ペプチドが末端結合タンパク質3 (E B 3)とイノシトール1, 4, 5-トリスリン酸受容体3型 (I P₃ R₃)の間の相互作用を低減させ、ここで、前記患者が、視力障害または視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性 (AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオシス、血管新生線内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、あるいは角膜移植血管新生に罹患している、前記使用。

【請求項 2】

V E G F 誘発血管透過性に関連する障害の治療用の薬剤の製造での単離ペプチドの使用であって、前記単離ペプチドが、K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、またはF T E I P T I (配列番号3)のアミノ酸配列を含んでなり、前記ペプチドが末端結合タンパク質3 (E B 3)とイノシトール1, 4, 5-トリスリン酸受容体3型 (I P₃ R₃)の間の相互作用を低減させ、ここで、前記障害が、視力障害または視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性 (AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網

10

20

膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生線内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、あるいは角膜移植血管新生である、前記使用。

【請求項 3】

前記ペプチドがキャリアペプチドと結合している、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 4】

前記キャリアペプチドが、アンテナペディアペプチド (A P) 、アンテナペディアペプチド、ペネトラチンペプチド、T A T 、 t r a n p o r t a n 、またはポリアルギニンである、請求項 3 に記載の使用。 10

【請求項 5】

前記ペプチドが脂肪酸と結合している、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

前記ペプチドがミリストイル化されている、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記薬剤は、1つ以上の V E G F 阻害剤との併用で投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。 20

【請求項 8】

前記薬剤は、眼病のレーザー治療との併用で投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。 20

【請求項 9】

前記薬剤は、ステロイドとの併用で投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 10】

前記薬剤、V E G F 阻害剤、またはステロイドは、硝子体内注射により、または局所的に送達される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年3月2日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 1 2 6 , 9 6 8 号の優先権を主張し、その全体を参照により本明細書に援用する。 30

【0002】

本発明は、血管新生阻害ペプチドに関する。本発明は、血管新生を阻害する方法、および本発明のペプチドを使用して V E G F 誘発血管透過性に関連する障害を治療する方法にも関する。

【背景技術】

【0003】

微小管 (M T) 細胞骨格は、内皮バリアー制御の重要な制御点を与えるが、この重要な細胞骨格要素の役割は、よく研究されていなかった。 M T 安定化薬剤タキソールは、肺炎症のマウスモデルにおける内皮血管漏出を減じることが示されており、これは、M T が、肺血管透過性の上昇の媒介において重要であり得ることを示唆する。しかしながら、タキソールは、一般毒性を示し、そのため、医師およびその患者にとって不都合な薬剤となっている。 40

【0004】

微小管末端結合タンパク質は、高度に保存された、伸長している微小管 (M T) に結合する微小管プラス端追跡補助要素であり、M T の破局的イベントを抑制する。2つのこのような末端結合タンパク質、E B 1 および E B 3 は、内皮細胞骨格の動態および細胞形態の変化の制御において役割を果たし、内皮バリアーの透過性の一次決定因子である。

【0005】

C a ²⁺ は、内皮透過性および血管のホメオスタシスを制御する非常に万能なセカンド

50

メッセンジャーである。炎症促進性メディエータの下流でのホスホリパーゼC (PLC) の活性化は、ホスファチジルイノシトールニリン酸 (PIP2) のイノシトール1, 4, 5 - トリスリン酸 (IP3) およびジアシルグリセロール (DAG) への加水分解を促進する。IP3は、IP3感受性細胞内ストア、すなわち小胞体 (ER) からのCa²⁺の放出を刺激する。ERストアからのCa²⁺の枯渇は、ER膜上のIP3Rの活性化により媒介され、細胞内Ca²⁺の一過性の増加をもたらす。Ca²⁺の流入または「流れ込み」は、Ca²⁺およびMg²⁺を含む様々な陽イオンを透過させる一過性受容体電位標準的 (canonical) (TRPC) チャネルにより媒介される。TRPC1および4は、ERの枯渇によって活性化される内皮肺微小血管細胞内のストア感受性Ca²⁺チャネル (SOC) である。

10

【0006】

Ca²⁺の細胞内濃度の増加は、タンパク質キナーゼC (PKC) の活性をアップレギュレートする。PKCは、血管内皮増殖因子 (VEGF) を含む複数のメディエータに対する内皮透過性応答の主要制御因子である。PKCは、p120-カテニンをリン酸化し、VE-カドヘリンからのその解離を媒介し、それにより、VEカドヘリンの内在化をもたらし、PKCは、p115RhodefおよびGDI-1をリン酸化することにより、RhodAの活性化の上流でも作用する。次に、RhodAは、Rhodキナーゼ (ROCK) を活性化することにより、ミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) のリン酸化によって誘起される阻害を促進する。MLCPの阻害は、MLCのリン酸化を引き起こし、トロンビンおよびヒスタミンなどの炎症促進性メディエータならびに増殖因子に応答してアクトミオシン収縮を引き起こすMLCKのCa²⁺/カルモジュリン依存性活性化に付随して起こる。

20

【0007】

MT細胞骨格の完全性は、ERストアからのIP3誘発性のCa²⁺放出に必要である。MT不安定化剤またはMT安定化剤のノコダゾール、コルヒチン、およびタキソールによるMT動態の変化は、Ca²⁺のIP3ゲート放出を阻害し、MT動態が、IP3Rの完全な活性化に必要であることを示唆する。MT細胞骨格は、ERの再構成に関与し、それにより、外部刺激に対する応答においてCa²⁺波の構築および伝播を確保する。ERは、EB1およびEB3の間質相互作用分子1 (STIM1)との直接相互作用により、MT伸長端と結合し共に伸長する。HeLa (HeLa細胞はEB3を発現していない)におけるEB1の枯渇は、ERの突出イベントを減ずるが、タブシガルジンによるSOCの活性化を阻害せず、いくつかの他の機構が、SOCの活性化および上皮細胞におけるカルシウムシグナリングの伝播に関与することを示唆する。内皮細胞において、小胞におけるIP3Rの局在化は、ER Ca²⁺ストア枯渇およびSOC活性化の両方に重要である。このことは、IP3Rの活性化および/またはIP3へのその応答性が、カルシウムシグナリングの重要な要素であることを示す。これまでの発見と一致して、我々は、MT細胞骨格が、IP3に応答してIP3Rの活性化を正に調節し、それにより、細胞全体に細胞外シグナルを伝え、生理応答を誘発するということを発見した。EB1ではなくEB3は、IP3Rと直接相互作用し、この相互作用は、内皮細胞におけるカルシウムシグナルの構築のための重要な制御点を与える。

30

【0008】

血管内皮増殖因子 (VEGF) は、直接的および非直接的方法により血管新生に寄与することが分かっている。VEGFは、微小血管内皮細胞を超透過性にし、それにより血漿タンパク質を血管外スペースに流出させ、フィブリングルの堆積と共に溢出したfibrinの凝固を引き起こすことが分かって売る。血管外フィブリンは、新しい血管、および成熟し血管化した間質を生む他の間葉細胞の内方成長を支持するマトリックスとしての役割を果たす。したがって、VEGF誘発血管透過性の阻害は、血管新生の阻害をもたらすことになる。VEGF誘発血管透過性を予防し、血管新生を阻害するために、新規の治療法が必要である。

40

【0009】

50

血管の腫瘍のネットワークの形成、すなわち血管新生は、腫瘍が成長し転移するよう促すことにより、腫瘍成長全体に亘って重要な役割を果たす。腫瘍病巣の直径が数ミリメートルを超えると、低酸素および栄養枯渇が、「血管新生スイッチ」を始動する。腫瘍細胞は、内皮細胞の発芽および増殖を刺激する、血管内皮増殖因子（VEGF）を放出する。いくつかの増殖受容体を標的とする、VEGF-Aに対するヒト化機能性遮断抗体断片であるAvastin（ベバシズマブ）、およびチロシンキナーゼ阻害剤であるソラフェニブおよびスニチニブを含む、いくつかの抗血管新生療法が、癌についてFDAにより現在認可されている。したがって、腫瘍関連血管新生を制御する治療法は、癌の進行および転移を制限する有望な方法である。

【0010】

10

内側内皮血液網膜閑門の損失ならびに結果として起きる黄斑浮腫および損傷は、高齢世代における眼障害および失明の主な原因である。現在、加齢性黄斑変性（AMD）としても知られるこれらの状態は、不治である。また、AMDの血管新生の形態は、ブルック膜を貫通して網膜下領域に達する、脈絡膜からの血管の成長により特徴づけられる。血管新生AMDの共通の根底にある原因を抑えるいくつかの有効な治療法は、脈絡膜に生じる新しい血管を破壊することによって、視力喪失を阻止する目的で制限されている。コルチコステロイドおよび抗VEGF剤の硝子体内注射での現在の治療は眼疾患の進行を遅らせるのに有効であるが、これらは、失明のリスクを完全には取り除かない。したがって、眼障害を治療し視力喪失を予防するための新規のより強力な治療法または併用療法のアプローチが必要である。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

単離ペプチドが本明細書で与えられる。ペプチドは、K F A R L W T E I P T A I T（配列番号1）、F T E I P T I（配列番号3）、これらの断片、またはこれらの変異体を含んでなり得る。ペプチドは、K F A R L W T E I P T A I T（配列番号1）、F T E I P T I（配列番号3）、これらの断片、またはこれらの変異体からなり得ることもあり得る。変異体は、保存的置換を含んでなり得る。変異体は、最小EB結合コンセンサスモチーフ配列であるSer/Thr-x-Ile-Pro配列（配列番号5）を含む、任意のペプチド配列を含んでなり得る。ペプチドは、脂肪酸と結合している、すなわちミリストイル化されている、またはキャリアペプチドと結合していることがあり得る。キャリアペプチドは、アンテナペディアペプチド（AP）、アンテナペディアペプチド、ペネトラチンペプチド、TAT、transportan、またはポリアルギニンであり得る。ペプチドは、薬剤的に許容できる賦形剤を含んでなり得る医薬製剤の一部であり得る。

30

【0012】

本発明は、K F A R L W T E I P T A I T（配列番号1）、F T E I P T I（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチドを必要性のある患者に投与することを含んでなる血管新生の阻害方法を与える。方法は、血管新生を阻害するのに有効な量などの治療有効量の本発明のペプチドを投与することを含む。また、方法は、治療有効量の本発明のペプチドを含んでなる医薬組成物を投与することを含む。本発明は、癌、または視力障害もしくは視力喪失（失明）、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性（AMD）、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生などのVEGF誘発透過性に関連する障害に罹患している必要性のある患者における治疗方法を与える。

40

【0013】

本発明は、K F A R L W T E I P T A I T（配列番号1）、F T E I P T I（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチドを必要性のある患者

50

に投与することを含んでなる、V E G F 誘発血管透過性に関連する障害を治療する方法も与える。方法は、V E G F 誘発血管透過性を阻害するのに有効な量などの治療有効量の本発明のペプチドを投与することを含む。また、方法は、治療有効量の本発明のペプチドを含んでなる医薬組成物を投与することを含む。本発明は、癌、または視力障害もしくは視力喪失（失明）、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性（A M D）、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生線内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生などのV E G F 誘発透過性に関連する障害に罹患している必要性のある患者における治疗方法を与える。

10

【 0 0 1 4 】

上記の方法のいずれかにおいて、投与するペプチドは、アンテナペディアペプチド（A P）、アンテナペディアペプチド、ペネトラチンペプチド、T A T、t r a n p o r t a n、またはポリアルギニンなどのキャリアペプチドと結合していることがあり得る。また、上記の方法のいずれかにおいて、投与するペプチドは、脂肪酸と結合している、例えばミリストイル化されていることがあり得る。

【 0 0 1 5 】

上記の方法のいずれかにおいて、K F A R L W T E I P T A I T（配列番号1）、F T E I P T I（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる单離ペプチドを、1つ以上のV E G F 阻害剤との併用で投与し、ここで、「V E G F 阻害剤」は、抗V E G F 抗体およびそれらの断片、抗V E G F 受容体（抗V E G F R）抗体およびそれらの断片、アンタゴニストペプチド、ならびにV E G F および／またはV E G F R の活性またはシグナル経路を阻害する小分子を表す。V E G F 阻害剤の例として、ベバシズマブ（Avastin）、ラニビズマブ（Lucentis）、ペガブタニブ（Macugen）、アフリベルセプト（Eylea）、ソラフェニブ（Nexvar）、スニチニブ（Sutent）、パゾパニブ（Votrient）、アキシチニブ（Inlyta）、P T K 7 8 7 / Z K 2 2 2 5 8 4、Z D - 6 4 7 4、S U 6 6 6 8、P D - 5 4 7 , 6 3 2、V E G F - T r a p、C E P - 7 0 5 5、N M - 3、またはS U 1 1 2 4 8 が挙げられる。

20

【 0 0 1 6 】

本発明の上記の方法のいずれかにおいて、K F A R L W T E I P T A I T（配列番号1）、F T E I P T I（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる单離ペプチドを、癌疾患に対するレーザー治療との併用で投与し得、ここで、「眼疾患」は、視力障害または視力喪失（失明）、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性（A M D）、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生線内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生を表す。

30

【 0 0 1 7 】

本発明の上記の方法のいずれかにおいて、K F A R L W T E I P T A I T（配列番号1）、F T E I P T I（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる单離ペプチドを、ステロイドまたは癌疾患に対する任意の現在の治療法との併用で投与し得る。

40

【 0 0 1 8 】

また、本発明の方法のいずれかにおいて、本発明の单離ペプチド、V E G F 阻害剤、ステロイド、または任意の他の治療薬を、硝子体内注射により、または点眼薬の形態などで局所的に、投与し得る。

【 0 0 1 9 】

本発明は、必要性のある患者における血管新生の阻害のための薬剤の製造での单離ペプチドの使用であって、前記ペプチドが、K F A R L W T E I P T A I T（配列番号1）、F T E I P T I（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる、前記

50

使用も与える。本発明の使用には、血管新生を阻害するのに有効な量などの治療有効量の本発明のペプチドを含んでなる薬剤の製造に本発明の単離ペプチドを使用することが含まれる。また、本発明は、治療有効量の本発明のペプチドを含んでなる組成物を含んでなる薬剤の製造のための本発明の単離ペプチドの使用を与える。本発明は、癌、または視力障害もしくは視力喪失（失明）、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性（AMD）、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生線内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生などのVEGF誘発透過性に関連する障害の罹患者に投与する薬剤の製造のための本発明の単離ペプチドの使用を与える。

【0020】

本発明は、VEGF誘発血管障害の治療用の薬剤の製造のための単離ペプチドの使用であって、前記ペプチドが、KFARLWTEIPTAIT（配列番号1）、FTEIPTI（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる、前記使用も与える。本発明の使用には、VEGF誘発血管透過性を阻害するのに有効な量などの治療有効量の本発明のペプチドを含んでなる薬剤の製造に本発明の単離ペプチドを使用することが含まれる。また、本発明は、治療有効量の本発明のペプチドを含んでなる組成物を含んでなる薬剤の製造のための本発明の単離ペプチドの使用を与える。本発明は、癌、または視力障害もしくは視力喪失（失明）、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性（AMD）、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生線内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生などのVEGF誘発透過性に関連する障害に罹患している対象に投与する薬剤の製造のための本発明のペプチドの使用を与える。

【0021】

本発明の上記の使用のいずれかにおいて、投与する単離ペプチドは、アンテナペディアペプチド（AP）、アンテナペディアペプチド、ペネトラチンペプチド、TAT、transportan、またはポリアルギニンなどのキャリアペプチドと結合していることがあり得る。また、上記の方法のいずれかにおいて、投与する単離ペプチドは、脂肪酸と結合している、例えばミリストイル化されていることがあり得る。

【0022】

上記の使用のいずれかにおいて、KFARLWTEIPTAIT（配列番号1）、FTEIPTI（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチドを、1つ以上のVEGF阻害剤との併用で投与し、ここで、「VEGF阻害剤」は、抗VEGF抗体およびそれらの断片、抗VEGFR抗体およびそれらの断片、アンタゴニストペプチド、ならびにVEGFまたはVEGFRの活性またはシグナル経路を阻害する小分子を表す。VEGF阻害剤の例として、ベバシズマブ（Avastin）、ラニビズマブ（Luentis）、ペガブタニブ（Macugen）、アフリベルセプト（Eylea）、ソラフェニブ（Nexavar）、スニチニブ（Sutent）、パゾパニブ（Votrient）、アキシチニブ（Inlyta）、PTK787/ZK222584、ZD-6474、SU6668、PD-547，632、VEGF-Trap、CEP-7055、NM-3、またはSU11248が挙げられる。

【0023】

本発明の上記の使用のいずれかにおいて、KFARLWTEIPTAIT（配列番号1）、FTEIPTI（配列番号3）、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる薬剤を、癌疾患に対するレーザー治療との併用で投与し得、ここで、「眼疾患」は、視力障害または視力喪失（失明）、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性（AMD）、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内

10

20

30

40

50

血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生を表す。

【0024】

本発明の上記の使用のいずれかにおいて、ステロイドまたは癌疾患に対する任意の現在の治療法との併用で薬剤を投与し得る。

【0025】

また、本発明の使用のいずれかにおいて、薬剤を、硝子体内注射により、または点眼薬の形態などで局所的に、投与し得る。

【0026】

本発明は、血管新生の阻害のための単離ペプチドあって、K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、F T E I P T I (配列番号3)、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる、前記単離ペプチドを与える。

【0027】

本発明は、血管新生の阻害のための治療有効量の本発明のペプチドを含んでなる組成物も与える。本発明は、癌、または視力障害もしくは視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性(AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生などのVEGF誘発透過性に関連する障害に罹患している対象における血管新生の阻害のための単離ペプチド、または治療有効量の前記ペプチドを含んでなる組成物を与える。

【0028】

本発明は、VEGF誘発血管透過性に関連する障害に罹患している患者における血管新生の阻害に使用するための単離ペプチドであって、K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、F T E I P T I (配列番号3)、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる、前記単離ペプチドも与える。

【0029】

本発明は、VEGF誘発血管透過性の阻害のための治療有効量の本発明の単離ペプチドを含んでなる組成物も与える。本発明は、癌、または視力障害もしくは視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性(AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生などのVEGF誘発透過性に関連する障害に罹患している対象におけるVEGF誘発透過性の阻害のための単離ペプチド、または治療有効量の前記ペプチドを含んでなる組成物を与える。

【0030】

本発明は、VEGF誘発血管透過性に関連する障害の治療のための単離ペプチドも与える。例えば、VEGF関連血管障害は、視力障害または視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性(AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生である。

【0031】

血管新生を阻害するため、またはVEGF誘発血管透過性に関連する障害を治療するために使用する本発明のペプチドのいずれかは、アンテナペディアペプチド(AP)、アンテナペディアペプチド、ペネトラチンペプチド、TAT、transportan、または

10

20

30

40

50

ポリアルギニンなどのキャリアペプチドと結合していることがあり得る。また、血管新生を阻害するため、またはVEGF誘発血管透過性に関連する障害を治療するために使用する本発明の単離ペプチドのいずれかは、脂肪酸と結合している、例えばミリストイル化されていることがあり得る。

【0032】

本発明の単離ペプチドまたは組成物のいずれかを、1種以上のVEGF阻害剤との併用で投与し得、ここで、「VEGF阻害剤」は、抗VEGF抗体およびそれらの断片、抗VEGFR抗体およびそれらの断片、アンタゴニストペプチド、ならびにVEGFまたはVEGFRの活性またはシグナル経路を阻害する小分子を表す。VEGF阻害剤の例として、ベバシズマブ(Avastin)、ラニビズマブ(Luentis)、ペガプタニブ(Macugen)、アフリベルセプト(Eylea)、ソラフェニブ(Nexvar)、スニチニブ(Sutent)、パゾパニブ(Votrient)、アキシチニブ(Inlyta)、PTK787/ZK222584、ZD-6474、SU6668、PD-547,632、VEGF-Trap、CEP-7055、NM-3、またはSU11248が挙げられる。また、ペプチドまたはVEGFRを、硝子体内注射により、または点眼薬の形態などで局所的に、投与する。

10

【0033】

本発明の単離ペプチドまたは組成物のいずれかを、癌疾患に対するレーザー治療との併用で投与し得、ここで、「眼疾患」は、視力障害または視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性(AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生を表す。

20

【0034】

本発明の単離ペプチドまたは組成物を、ステロイドまたは癌疾患に対する任意の現在の治療法との併用で投与し得る。

【0035】

また、本発明の単離ペプチドまたは組成物を、硝子体内注射により、または点眼薬の形態などで局所的に、投与し得る。

30

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、F T E I P T I (配列番号3)、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチドを必要性のある患者に投与することを含んでなる血管新生の阻害方法。

(項目2)

前記患者がVEGF誘発透過性に関連する障害または癌に罹患している、項目1に記載の方法。

(項目3)

K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、F T E I P T I (配列番号3)、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチドを必要性のある患者に投与することを含んでなる、VEGF誘発血管透過性に関連する障害を治療する方法。

40

(項目4)

前記VEGF誘発血管透過性に関連する障害が、機能障害、視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性(AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生である、項目2または3に記載の方法。

(項目5)

前記ペプチドがキャリアペプチドと結合している、項目1～4のいずれか一項に記載の

50

方法。

(項目6)

前記キャリアペプチドが、アンテナペディアペプチド(AP)、アンテナペディアペプチド、ペネトラチンペプチド、TAT、transportan、またはポリアルギニンである、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記ペプチドが脂肪酸と結合している、項目1～6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記ペプチドがミリストイル化されている、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記単離ペプチドまたはその断片を、1つ以上のVEGF阻害剤との併用で投与する、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目10)

前記単離ペプチドまたはその断片を、眼病のレーザー治療との併用で投与する、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記単離ペプチドまたはその断片を、ステロイドとの併用で投与する、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記単離ペプチド、VEGF阻害剤、またはステロイドを、硝子体内注射により、または局所的に送達する、項目1～11のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目13)

必要性のある患者における血管新生の阻害のための薬剤の製造での単離ペプチドの使用であって、前記ペプチドが、KFARLWTEIPTAIT(配列番号1)、FTEIPTI(配列番号3)、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる、前記使用。

(項目14)

前記患者がVEGF誘発透過性に関連する障害または癌に罹患している、項目13に記載の使用。

(項目15)

VEGF誘発透過性に関連する障害の治療用の薬剤の製造での単離ペプチドの使用であって、前記単離ペプチドが、KFARLWTEIPTAIT(配列番号1)、FTEIPTI(配列番号3)、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる、前記使用。

30

(項目16)

前記VEGF関連欠陥障害が、視力障害または視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性(AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生である、項目15に記載の使用。

(項目17)

40

前記ペプチドがキャリアペプチドと結合している、項目13～16のいずれか一項に記載の使用。

(項目18)

前記キャリアペプチドが、アンテナペディアペプチド(AP)、アンテナペディアペプチド、ペネトラチンペプチド、TAT、transportan、またはポリアルギニンである、項目17に記載の使用。

(項目19)

前記ペプチドが脂肪酸と結合している、項目13～18のいずれか一項に記載の使用。

(項目20)

前記ペプチドがミリストイル化されている、項目19に記載の使用。

50

(項目 21)

前記単離ペプチドまたはその断片を、1つ以上のVEGF阻害剤との併用で投与する、項目13～20のいずれか一項に記載の使用。

(項目 22)

前記単離ペプチドまたはその断片を、眼病のレーザー治療との併用で投与する、項目13～20のいずれか一項に記載の使用。

(項目 23)

前記単離ペプチドまたはその断片を、ステロイドとの併用で投与する、項目13～20のいずれか一項に記載の使用。

(項目 24)

前記単離ペプチド、VEGF阻害剤、またはステロイドを、硝子体内注射により、または局所的に送達する、項目13～23のいずれか一項に記載の使用。

10

(項目 25)

血管新生の阻害のための単離ペプチドあって、前記ペプチドが、K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、F T E I P T I (配列番号3)、またはこれらの断片のアミノ酸配列を含んでなる、前記単離ペプチド。

(項目 26)

VEGF誘発血管透過性に関連する障害に罹患している患者における血管新生の阻害に使用するための項目25に記載のペプチド。

(項目 27)

VEGF誘発血管透過性に関連する障害の治療のための単離ペプチド。

20

(項目 28)

前記VEGF誘発血管透過性に関連する障害が、視力障害または視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性(AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生である、項目26または27に記載のペプチド。

(項目 29)

前記ペプチドがキャリアペプチドと結合している、項目25～28のいずれか一項に記載のペプチド。

30

(項目 30)

前記キャリアペプチドが、アンテナペディアペプチド(AP)、ペネトラチンペプチド、TAT、transportan、またはポリアルギニンである、項目29に記載のペプチド。

(項目 31)

前記ペプチドが脂肪酸と結合している、項目25～30のいずれか一項に記載のペプチド。

(項目 32)

前記ペプチドがミリストイル化されている、項目31に記載のペプチド。

40

(項目 33)

前記単離ペプチドまたはその断片を、1つ以上のVEGF阻害剤との併用で投与する、項目25～32のいずれか一項に記載のペプチド。

(項目 34)

前記単離ペプチドまたはその断片を、眼病のレーザー治療との併用で投与する、項目25～33のいずれか一項に記載のペプチド。

(項目 35)

前記単離ペプチドまたはその断片を、ステロイドとの併用で投与する、項目25～33のいずれか一項に記載のペプチド。

(項目 36)

50

前記単離ペプチド、VEGF阻害剤、またはステロイドを、硝子体内注射により、または局所的に投与する、項目25～35のいずれか一項に記載のペプチド。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】内皮バリアーの炎症誘発性超透過性におけるEB3の役割を示す。EB3は、炎症の間、伸長しているMT末端とIP₃R₃との一過性相互作用を確立し、IP₃R₃の感受性を高め、ストアからのCa²⁺の放出とSOC依存性Ca²⁺の流入の両方を正に調節する。このことは、Ca²⁺のシグナリングの増幅、ならびにp120-カテニンのPKC媒介リン酸化およびアクトミオシン収縮性による透過性の上昇をもたらす。

【図2】ヒトIP₃受容体(IP₃R₃タイプ3の794～814aa)の(強調表示された)EB結合モチーフでの配列比較を示す。IP₃R₃ペプチド(配列番号1)は、配列比較の下に示されている。

【図3】EB3構造(マゼンタ)およびEB3のEB3疎水性結合溝にドッキングされたIP₃R₃由来ペプチド(配列番号1)のリボン表示を示し、180回転したものが示されている。IP₃R₃由来ペプチドを、Discovery Studio 3.0ソフトウェアと共にZ-Dockプログラムを使用して、ドッキングした。ペプチドとEB3との結合エネルギーは、-68.882 kcal/molと計算された。

【図4】IP₃R₃ペプチド(配列番号1)が、PAR-1活性化に応答したERからのCa²⁺放出を阻害することを示す。A. APが結合したIP₃R₃ペプチドまたはコントロール(AP)ペプチドで予め治療したHMVECに、Fura 2-AMを添加し、細胞外Ca²⁺の非存在下および存在下でトロンビン(50nM)で細胞を刺激した後、340/380比を計算した。矢印はトロンビンの添加時を示す。B. プロットは、基底値を超える最大増加として計算されたトロンビン誘発性Ca²⁺放出および流入についての平均±SDを示す。増加は、同じ実験(n=4)からのコントロール未治療細胞に標準化した。

【図5】EBIN(配列番号3)およびIP₃R₃ペプチド(配列番号1)との複合体におけるEB3のリボン表示を示す。計算された結合エネルギーは、IPRとEBINについて、それぞれ、-68.882と-60.251である。

【図6】パネルAは、VEGFの皮内注射により誘発された、アルブミン結合Evans Blue Dyeの皮下血管漏出を示し、パネルBは、620nmで分光測定された血管漏出を数値で表す。

【図7】パネルAは、EBINがマトリゲル被覆壁における管形成を阻害したことを示す(スケールバーは200μm)。パネルBは、面積当りの分枝の数を示し、UT=未治療、Contr=コントロールペプチド、**はp<0.001である(群当たりn=3壁)。パネルCは、インビボマトリゲルプラグのヘマトキシリン(hematoxylin)およびエオシン(HE)染色を示す。群1は、コントロールペプチドで治療され、群3は、Myr-EBINで0、36、および60時間で治療され、群2は、36および60時間の治療のみを受けた。パネルDは、1mm²当りの血管数を示し、***は、p<0.001である(群当たりn=15)。スケールバーは200μmである。

【図8】腫瘍増殖曲線および血管新生でのEBIN治療の効果を示す。パネルAは、異種移植モデルにおける腫瘍増殖曲線をプロットしており、平均が示されており、群当たりn=8マウスである。プロットBは、腫瘍の外側で数えられた面積当りの血管数をプロットしており、n=25視野/マウスであり、N=5マウスであり、*はp<0.05であり、**はp<0.01である。

【図9】脈絡膜血管新生(CNV)誘発に関する動物モデルの概要を示す。(a)レーザービームの焦点を網膜色素上皮に合わせてブルック膜のレーザー熱傷および破裂を引き起こすことを示す眼の断面図、(b)ブルック膜の破裂が、脈絡膜で血管の増殖を引き起こし、網膜へとCNV病変を引き起こす。

【図10】(表4に提示された)群1～3に関するレーザー誘発性CNV、眼干渉断層撮影(OCT)、眼底蛍光血管造影、治療、および組織収集についてのスケジュールの概要

10

20

30

40

50

を示す。

【図11】CNVへのEBIN治療の効果を示す。コントロールペプチド(Myr-FAEIPTI)、EBIN(Myr-FTEIPTI)、およびマウス抗VEGF抗体(LEAF^{T M})の硝子体内注射により治療したマウスにおける血管漏出(a)および病変(b~c)の相関分析。レーザー光凝固術後15日目での眼底蛍光血管造影(a)および対応する光干渉断層撮影(b)の代表画像であり、黄色の数は、対応するCNV病変を示す。漏出面積は、病変サイズと相關する。(c)CNV病変を、網膜色素上皮/脈絡膜/強膜のフラットマウントを使用してイソレクチンB4で染色することにより、検出する。(a)および(c)で示されている画像を使用したフルオレセイン漏出(d)および病変(e)の面積の数値化、群当りn=6~9マウスであり、**はp<0.01である。(a)および(c)において、それぞれ、スケールバーは200μmおよび100μmを示す。群間の比較をANOVAを使用して実施した。抗VEGF治療は、損傷した領域の創傷治癒/瘢痕化を有意に変えたが、EBINでの治療は、治癒過程に影響を与えたなかった。
10

【図12】EBINに関する7日間の急性毒性研究の効果を示す。EBIN(1μg/眼)の硝子体内治療の8日目での眼底蛍光血管造影(a)および対応する光干渉断層撮影(b)の代表画像。注、EBINは様々な体液内に小さい結晶/沈殿物を形成し、網膜血管系および網膜色素上皮、脈絡膜、強膜で目に見える変化は検出されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0037】

詳細な説明

20

本発明者は、イノシトール1,4,5-トリスリン酸(IP₃)3型受容体(IP₃R₃)のEB3相互作用ドメイン由来のペプチドが、末端結合タンパク質3(EB3)とIP₃R₃との間の相互作用を低減し、VEGF誘発血管透過性またはVEGF誘発微小血管漏出を阻害するという驚くべき発見をした。本発明のペプチドは、様々な炎症性疾患においてバリアー保護特性を呈し、インピトロおよびインピボで抗血管新生特性を呈す。

【0038】

先行研究は、ERストアからのCa²⁺のIP₃ゲート放出の制御におけるMT細胞骨格の役割およびEB3が、ER-Ca²⁺枯渇に必要であることを示唆した。IP₃R₃は、EB結合コンセンサスモチーフであるSer/Thr-x-Ile-Pro(SxIP)(配列番号5)を含む。IP₃R₃配列(KFARLWTEIPTAIT--配列番号1)をベースとする短ペプチドは、EB3に対して高い結合活性を示す(実施例1を参照)。これらの研究は、IP₃R₃とEB3との間の相互作用がIP₃R₃活性化の機構において重大な意味を持つことを示す。
30

【0039】

内皮バリアーの炎症誘発性超透過性におけるEB3の役割は、伸長しているMT末端のIP₃R₃との一過性相互作用を確立するEB3の能力を中心とする。結果として、EB3は、IP₃R₃のIP₃に対する感受性を高め、小胞体(ER)からのCa²⁺の放出を正に調節する。このことは、SOC依存性のCa²⁺の流入およびCa²⁺シグナリングの増幅をもたらす。細胞質Ca²⁺の濃度の上昇は、VE-カドヘリン接着分子の分解をもたらすp120-カテニンのPKC媒介リン酸化を誘発する。細胞質Ca²⁺の濃度の上昇は、細胞形状の変化をもたらすRhoA依存性のアクミオシン収縮性も促進する。図1を参照されたい。この研究は、国際出願第PCT/US2012/042118号および米国特許第8,912,139号に詳細に記載されており、これらの全体を参照により本明細書に援用する。
40

【0040】

以下に記載の方法および材料は、VEGF誘発微小血管透過性を予防または阻害し、そのため、血管新生の阻害、ならびに障害、数例を挙げると、黄斑変性、糖尿病性網膜症、癌、網膜中心静脈閉塞症、および網膜静脈分枝閉塞の治療に有用である。

定義

【0041】

50

本明細書で使用される専門用語は、ただ特定の実施形態を記載するためのものであり、限定的なものではない。明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」および「the」は、文脈が明らかに別段の規定をしていない限り、複数の言及を含む。

【0042】

本明細書における数の範囲の記載では、同じ精度を有する数の範囲の間にある各々の間の数が、明確に考慮される。例えば、6～9の範囲では、数7および8が、6および9に加えて考慮され、6.0～7.0の範囲では、数6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、および7.0が明確に考慮される。

【0043】

「血管新生」は、本明細書で使用される場合、新しい血管が既存の血管から形成されるプロセスを表す。例えば、サイトカインおよび細胞外マトリックスプロテアーゼは、既存の血管から内皮細胞が移動して新しい血管を形成するための準備において、組織再構築を誘発する。

【0044】

「断片」は、本明細書で使用される場合、言及されているペプチドまたはポリペプチドまたは塩基配列の部分を意味し得る。

【0045】

「同一」または「同一性」は、2つ以上のポリペプチドまたは塩基配列との関連で本明細書で使用される場合、配列が、特定領域に亘って同一である特定のパーセンテージの残基またはヌクレオチドを有することを意味し得る。パーセンテージは、2つの配列を最適にアライメントし、特定領域に亘って2つの配列を比較し、両方の配列で同一の残基が生じている位置の数を求めて、一致位置の数を得、一致位置の数を特定領域中の位置の総数で割り、結果に100をかけて配列同一性のパーセンテージを得ることによって、計算され得る。2つの配列が異なる長さであり、またはアライメントが1つ以上のずれた末端を生み、比較の特定領域が单一の配列しか含まない場合、单一配列の残基は、計算の分母に含まれるが、分子には含まれない。

【0046】

「ペプチド」または「ポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、アミノ酸の結合配列を表し得、天然型、合成型、もしくは修飾型、または天然型および合成型の組み合わせであり得る。

【0047】

「実質的に同一」は、本明細書で使用される場合、第1および第2のタンパク質または塩基配列が、6～100以上のアミノ酸ヌクレオチドの領域に亘って少なくとも50%～99%同一であることを意味し得る。

【0048】

「治療（Treating）」、「治療（treatment）」、または「治療（to treat）」は、それぞれ、状態または障害の症候、臨床徵候、または基礎病理の出現を、一時的または持続的に、軽減する、抑止する、抑圧する、除去する、予防する、または遅くすることを意味し得る。状態または障害の予防は、疾患の発症の前に対象に本発明の薬剤を投与することを含む。状態または障害の抑止は、状態または障害の誘発後であるが臨床的出現の前に、対象に本発明の薬剤を投与することを含む。状態または障害の抑圧は、疾患の臨床的出現の後に対象に本発明の薬剤を投与することを含む。

【0049】

用語「治療有効」は、対象の状態および投与する特定の化合物に依存する。用語は、所望の臨床効果を達成するのに有効な量を表す。治療有効量は、治療される状態の性質、活性が望まれる時間の長さ、ならびに対象の年齢および状態で変わり、最終的に、医療提供者により決められる。一態様において、ペプチドまたは組成物の治療有効量は、VEGF誘発血管透過性および/または血管新生を阻害、軽減、または予防するのに有効な量である。

10

20

30

40

50

【0050】

「変異体」は、アミノ酸の挿入、欠失、または保存的置換によりアミノ酸配列が異なるが、1つ以上の生物活性を保持するペプチドまたはポリペプチドを意味する。「生物活性」の代表例には、末端結合タンパク質であるトール様受容体（TLR）に結合し、特異抗体に結合される能力が含まれる。変異体は、1つ以上の生物活性を保持するアミノ酸配列を有する被参照タンパク質と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質も意味し得る。アミノ酸の保存的置換、すなわち特性（例えば、親水性、荷電領域の程度および分布）が類似している異なるアミノ酸でアミノ酸を置換することは、当業において、通常マイナーチェンジを伴うものとして認識されている。これらのマイナーチェンジは、当業で分かっているように、アミノ酸の疎水性親水性指標を考察することによって、ある程度、特定され得る。Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). アミノ酸の疎水性親水性指標は、疎水性および電荷の考察をベースとする。疎水性親水性指標が類似したアミノ酸は置換され、タンパク質の機能を保持できることが、当業で知られている。一態様において、±2の疎水性親水性指標を有するアミノ酸を置換する。生物学的機能を保持するタンパク質をもたらし得る置換を明らかにするために、アミノ酸の親水性を使用することもできる。ペプチドとの関連でアミノ酸の親水性を考察することにより、抗原性および免疫原性とよく相關することが報告されている有用な尺度である、ペプチドの最大の局所平均親水性の計算が可能になる。米国特許第4,554,101号は、参照により本明細書に完全に援用される。類似した親水性値を有するアミノ酸の置換は、当業で分かっているように、生物活性、例えば免疫原性を保持するペプチドをもたらすことができる。置換を、互いの±2以内の親水性値を有するアミノ酸で実施し得る。アミノ酸の疎水性指標および親水性値の両方とも、アミノ酸の特定の側鎖により影響を受ける。この観察と一致して、生物学的機能に互換性があるアミノ酸の置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズ、およびその他の特性によって明らかになる、アミノ酸、特にアミノ酸の側鎖の相対的な類似性に依存することが分かっている。10

【0051】

アミノ酸配列 K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、K F A R L W A E I P T A I T (配列番号2) (本明細書で I P₃ R₃ ペプチドとも呼ばれる)、F T E I P T I (配列番号3) (本明細書で末端結合阻害ペプチドもしくは「EBIN」とも呼ばれる)、本明細書の表1に開示されているペプチド、それらの断片、またはそれらの変異体を含んでなり得るペプチドが、本明細書で与えられる。変異体は、保存的置換を含んでなり得る。ペプチドは、I P₃ R₃ のEB結合コンセンサス配列などのEB結合コンセンサスモチーフ配列、またはその断片を含み得る。I P₃ R₃ のEB結合コンセンサス配列は、Ser / Thr - x - Ile - Pro (配列番号5) であり得る。ペプチドは、K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、K F A R L W A E I P T A I T (配列番号2)、F T E I P T I (配列番号3)、Ser / Thr - x - Ile - Pro (配列番号5) を含んでなるコンセンサス配列、本明細書の表1に開示されているペプチド、前述の断片、または前述の保存的変異体からなり得る。変異体は、最小EB結合コンセンサスモチーフ配列であるSer / Thr - x - Ile - Pro配列 (配列番号5) を含む、任意のペプチド配列を含んでなり得る。30

【0052】

ペプチドは、K F A R L W T E I P T A I T (配列番号1)、K F A R L W A E I P T A I T (配列番号2) (本明細書で I P₃ R₃ ペプチドとも呼ばれる)、F T E I P T I (配列番号3) (本明細書で末端結合阻害ペプチドもしくは「EBIN」とも呼ばれる)、本明細書の表1に開示されているペプチド、それらの断片、またはそれらの変異体のアミノ酸配列を含んでなり得、前記ペプチドまたは前記ペプチドを含んでなるポリペプチドは、7アミノ酸残基、8アミノ酸残基、9、アミノ酸残基、10、アミノ酸残基、11、アミノ酸残基、12アミノ酸残基、13アミノ酸残基、14アミノ酸残基、15アミノ酸残基、16アミノ酸残基、17アミノ酸残基、18アミノ酸残基、19、アミノ酸残基、20アミノ酸残基、21アミノ酸残基、22アミノ酸残基、23アミノ酸残基、24アミ40
50

ノ酸残基、25アミノ酸残基、26アミノ酸残基、27アミノ酸残基、28アミノ酸残基、29アミノ酸残基、30アミノ酸残基、35アミノ酸残基、40アミノ酸残基、45アミノ酸残基、50アミノ酸残基、55アミノ酸残基、60アミノ酸残基、65アミノ酸残基、70アミノ酸残基、75アミノ酸残基、80アミノ酸残基、85アミノ酸残基、90アミノ酸残基、95アミノ酸残基、または100アミノ酸残基である。

【0053】

ペプチドは、アミノ酸配列が1つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシ末端切断、またはアミノ末端切断を有するという修飾がなされていることがあり得る。

【0054】

ペプチドは、グリコシル化、リン酸化、硫酸化、グリコシル化、アニメ化、カルボキシル化、アセチル化されていることもあり得る。例えば、C末端は、アミド化、ペプチドアルコールおよびアルデヒドの付加、エステルの付加、p-ニトロアニリンおよびチオエ斯特ルの付加、ならびに多抗原ペプチドで修飾されていることがあり得る。N末端および側鎖は、ペグ化、アセチル化、ホルミル化、脂肪酸の付加、ベンゾイルの付加、プロモアセチルの付加、ピログルタミルの付加、スクシニル化、テトラブトキシカルボニルの付加および3-メルカプトプロピルの付加、アシル化（例えば、リポペプチド）、ビオチン化、リン酸化、硫酸化、グリコシル化、マレイミド基、キレート化部分、発色団、および発蛍光団の導入により修飾されていることがあり得る。

【0055】

ペプチドは、脂肪酸と結合していることがあり得、例えばペプチドはミリストイル化されている。例えば、脂肪酸がペプチドのN末端に結合していることがあり得、このような脂肪酸には、カプリル酸（C8）、カプリン酸（C10）、ラウリン酸（C12）、ミリスチン酸（C14）、パルミチン酸（C16）、またはステアリン酸（C18）などが含まれる。さらにペプチド中のシステインは、パルミトイ化されていることができる。

【0056】

ペプチドは、キャリアペプチドなどの別のペプチドと結合または連結していることがあり得る。アンテナペディアペプチド、ペネトラチンペプチド、TAT、transport an、またはポリアルギニンなどのキャリアペプチドは、細胞透過を促進し得る。

【0057】

ペプチドは、環状であり得る。本明細書で開示されるペプチドは、1つまたは複数のジスルフィド架橋を付加すること、N末端とC末端との間に1つまたは複数のアミド結合を付加すること、加熱して末端を環化すること、側鎖環化（例えば、ラクタム架橋、チオエ斯特ル）、炭化水素安定化ペプチドにより環化していることがあり得る。

【0058】

ペプチドは、重同位体標識、例えば、¹⁵N、¹³C、FITC、キャリアタンパク質へのコンジュゲーション、造影剤へのコンジュゲーション、発蛍光団／クエンチャーペアを有するFRET基質、ペプチド-DNAコンジュゲーション、ペプチド-RNAコンジュゲーション、およびペプチド-酵素標識で標識されていることがあり得る。

【0059】

ペプチドは、オリゴマー形成を促進するポリペプチドまたはペプチドと融合した融合タンパク質内、例えばロイシンジッパー領域内、安定性を高める、または半減期を延ばすポリペプチドまたはペプチド内、例えば免疫グロブリン定常領域内、およびペプチドまたは本発明、化学療法剤、組織特異的標的化のための抗体またはタンパク質とは異なる治療活性を有するポリペプチド内にあり得る。

【0060】

融合は、ポリペプチドのアミノ末端、またはカルボキシ末端のいずれかでなされていることができる。融合タンパク質は、リンカーまたはアダプター分子なく直接的であるか、またはリンカーまたはアダプター分子を用いて非直接的であり得る。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基、通常最大約20～約50のアミノ酸残基であり

10

20

30

40

50

得る。リンカーまたはアダプター分子は、融合部分の分離を可能とするように、プロテアーゼの切断部位を有するように設計されていることもあり得る。例えば、ペプチドは、ペプチドの半減期を延ばすように、ヒト Ig G の Fc 領域の 1 つ以上のドメインに融合されていること、またはペプチドの半減期を短くするように Fab 可変ドメインが付加されていることがあり得る。

治療方法

【 0 0 6 1 】

血管新生を阻害、予防、または低減する方法が、本明細書に与えられる。血管新生は、数例を挙げると、腫瘍の増殖、癌の進行および転移、失明および黄斑変性、糖尿病性網膜症と関係がある。

10

【 0 0 6 2 】

本発明は、腫瘍の増殖、癌の進行および転移に関係する血管新生を阻害する方法を与える。本発明は、腫瘍増殖および癌、例えば、脳腫瘍（髄膜腫、多形性グリア芽細胞腫、退形成星状細胞腫、小脳星状細胞腫、他の高悪性度もしくは低悪性度の星状細胞腫、脳幹神経膠腫、乏突起膠細胞系神経膠腫、混合性神経膠腫、他の神経膠腫、大脳神経芽腫、頭蓋咽頭腫、間脳神経膠腫、胚細胞腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢腫瘍、松果体実質腫瘍、神経節膠腫、神経上皮腫瘍、ニューロンもしくは混合ニューロン神経膠腫を含む）、肺腫瘍（小細胞癌、類表皮癌、腺癌、大細胞癌、カルチノイド腫瘍、気管支腺腫瘍、中皮腫、肉腫、もしくは混合腫瘍を含む）、前立腺癌（腺癌、扁平上皮細胞癌、移行上皮癌、前立腺小室癌、もしくは癌肉腫を含む）、乳癌（腺癌もしくはカルチノイド腫瘍を含む）、または胃、腸、もしくは結腸の癌（腺癌、侵襲性腺管癌、浸潤性もしくは侵襲性の小葉癌、髄様癌、非浸潤性腺管癌、非浸潤性小葉癌、膠様癌、もしくは乳頭のパジェット病を含む）、皮膚癌（メラノーマ、扁平上皮細胞癌、ヒト皮膚ケラチノサイトの腫瘍進行、基底細胞癌、血管周囲細胞腫、およびカポジ肉腫を含む）、リンパ腫（ホジキン病および非ホジキンリンパ腫を含む）、肉腫（骨肉腫、軟骨肉腫、および線維肉腫を含む）などを治療、阻害、および予防する方法、ならびに神経系障害の治療も与える。

20

【 0 0 6 3 】

本発明のペプチドの投与は、他の癌療法、抗腫瘍剤、および化学療法剤、例えば、アロマターゼ阻害剤、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、ゴナドレリンアゴニスト、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、微小管活性剤、アルキル化剤、レチノイド、カロテノイド、トコフェロール、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、MMP 阻害剤、mTOR 阻害剤、代謝拮抗剤、白金化合物、メチオニニアミノペプチダーゼ阻害剤、ビスホスホネート、抗増殖性抗体、ヘパラナーーゼ阻害剤、Ras 発癌性アイソフォームの阻害剤、テロメラーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、血液悪性腫瘍の治療に用いられる化合物、Flt-3 阻害剤、Hsp90 阻害剤、キネシン紡錘形タンパク質阻害剤、MEK 阻害剤、抗腫瘍抗生物質、ニトロソ尿素、タンパク質または脂質キナーゼ活性を標的とする／低下させる化合物、タンパク質または脂質ホスファターゼ活性を標的とする／低下させる化合物、あらゆるその他の抗血管新生化合物、およびこれらの組み合わせと併用され得る。抗腫瘍剤の具体例として、限定はされないが、アザシチジン、アザチオプリン、ベバシズマブ、ブレオマイシン、カペシタビン、カルボプラチン、クロラブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビルシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビルシン、エピルビルシン、エトポシド、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ハーセブチン、イダルビルシン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトレキセート、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、タフルポシド、テニポシド、チオグアニン、レチノイン酸、バルルビルシン、ピンプラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ビノレルビルシン、受容体チロシンキナーゼ阻害剤、およびこれらの組み合わせが挙げられる。抗腫瘍剤または化学療法剤の他の例が、当業で知られている。

30

【 0 0 6 4 】

本発明は、本発明のペプチドの投与を含んでなる、湿性および乾性黄斑変性を含む黄斑変性の治療方法を与える。湿性黄斑変性は、異常な血管が黄斑の裏で成長するときに起こ

40

50

る。これらの血管は、もろく、体液および血液を漏出でき、黄斑の瘢痕化をもたらし、急速で深刻な損傷の可能性を高める。ブルック膜が壊れ、通常ドルーゼンの近くに堆積する。これは、新しい血管が成長する、または血管新生が起こる場所である。中心視は、短期間、時には数日内に、歪むようになり得る、または完全に失われ得る。

【0065】

黄斑変性の治療方法では、本発明のペプチドの眼内投与が考慮される。また、ペプチドの投与は、他の抗血管新生薬などの他の治療薬、例えば、ベバシズマブ(Avastin)、ラニビズマブ(Luentis)、ペガブタニブ(Macugen)、アフリベルセプト(Eylea)、ロダミン(TNP-470のポリマー製剤)、ベルテポルフィン(Visudyne)(光力学療法もしくはPDT)、オリゴヌクレオチド療法、Dr5に対する抗体、c-Metを標的とする小分子キナーゼモジュレーター、キノロン誘導体、縮合二環式ピリジンおよびピラジン誘導体、またはCDK4/6の阻害剤としてのピロロピリミジン化合物と併用され得る。他の治療薬が、当業で知られている。また、黄斑変性を治療するための本発明のペプチドの投与は、埋め込み型テレスコープ、レーザー光凝固、および黄斑移動手術などの他の処置と併用され得る。

【0066】

VEGF誘発血管透過性に関連する障害を治療する方法が本明細書で与えられる。例えば、本発明は、視力障害または視力喪失(失明)、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞増殖性糖尿病性網膜症、血管新生加齢性黄斑変性(AMD)、未熟児網膜症、虚血性網膜症、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性網膜虚血、糖尿病性網膜浮腫、および糖尿病性増殖性網膜症、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、網膜芽腫、ブドウ膜炎、ならびに角膜移植血管新生を治療する方法を与える。

対象

【0067】

対象は、哺乳類であり得、人であり得る。診断に先立ち、対象は、1つ以上のリスク因子に晒されたために、癌のリスクがあり得るか、または癌を発症する遺伝的リスクを有し得る。1つ以上のリスク因子には、例えば、対象が癌の家族歴を有すること、年齢、喫煙、日光暴露、アルコール飲料の摂取、身体活動の欠如、肥満、および/または食事障害が含まれ得る。

【0068】

診断に先立ち、対象は、1つ以上のリスク因子に晒されたために、黄斑変性を発症するリスクがあり得るか、または黄斑変性を発症する遺伝的リスクを有し得る。1つ以上のリスク因子には、例えば、対象が黄斑変性の家族歴を有すること、年齢、喫煙、長い日光暴露、高脂肪食、食事障害、高血圧、肥満、および/または眼の色が明るいことが含まれ得る。

投与

【0069】

生理的に許容できる組成物、例えば本明細書に記載の化合物および/またはミセルを含んでなる医薬組成物を投与する好適な方法は、当業でよく知られている。1つ以上の経路を使用してペプチドを投与できるが、特定の経路が、他の経路よりもより即時でより有効な反応を与えることができる。状況に応じて、ペプチドを含んでなる医薬組成物は、体腔に投与もしくは注入される、皮膚もしくは粘膜を通じて吸収される、摂取される、吸入される、および/または循環系へ導入される。例えば、特定の状況においては、医薬組成物を、経口で、静脈内、腫瘍内、腹腔内、大脳内(実質内)、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、病巣内、髄内、くも膜下腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、経腸、局所、舌下、尿道、膀胱もしくは直腸の手段により注射または注入によって、制御された、遅延された、持続された、もしくは調整された放出システムによって、または埋め込み装置によって、送達することが望ましいであろう。一態様において、薬剤の暴露を、時間が経過しても一定の薬剤の血漿中濃度を維持することによって、最適化することができ

10

20

30

40

50

る。このような定常状態は、一般的に、薬剤クリアランスおよび持続させる血漿中濃度に応じた用量での連続的な薬剤注入による臨床セッティングで達成される。必要に応じて、組成物を、腫瘍内投与、くも膜下腔内投与、大脳内（実質内）投与、脳室内投与、または関心領域を標的とする動脈内もしくは静脈内投与により、局所的に投与する。あるいは、ペプチドを、マトリックス、膜、スポンジ、または所望の化合物が吸収もしくはカプセル化された他の適切な材料の埋め込みにより、局所的に投与する。埋め込み装置を使用する場合、装置を、一態様において、任意の好適な組織または臓器に埋め込み、例えば、拡散、持続放出型ポーラス、または連続投与により、所望の化合物を送達する。

【0070】

ペプチドの眼内投与を、眼内インプラント、硝子体内注射、全身投与、局所適用、ナノ粒子、微粒子、点眼薬、生体接着性ゲルまたはフィブリンシーラント、上皮細胞バリアー複合体の透過性を調節する多糖類、角膜薬物送達を増強するペプチド、バイオベクターポリマーを使用する投与などの粘膜投与、水性眼科用スプレー、および動電型眼用スプレー治療を使用して、実施し得る。一つの特定の実施形態において、ペプチドを、硝子体内注射により、または点眼薬の形態などで局所的に、投与し得る。

【0071】

ペプチドを、単独療法として、または手術もしくは腫瘍の除去であり得る他の治療と同時に、もしくはメトロノミックに、投与し得る。用語「同時（simultaneous）」または「同時に（simultaneously）」は、本明細書で使用される場合、ペプチドおよび他の治療を、互いの48時間以内、好ましくは24時間以内、より好ましくは12時間以内、さらにより好ましくは6時間以内、最も好ましくは3時間以内に投与することを、意味する。用語「メトロノミックに」は、本明細書で使用される場合、他の治療と異なる時点で、反復投与に対して特定の頻度でペプチドを投与することを意味する。例えば、本発明のペプチドを、1種以上のVEGF阻害剤と共に投与し得る。例えば、本発明のペプチドを、1種以上のVEGF阻害剤と共に、または視力喪失に対するレーザー治療との併用で投与し得る。

【0072】

ペプチドを、約120時間、118時間、116時間、114時間、112時間、110時間、108時間、106時間、104時間、102時間、100時間、98時間、96時間、94時間、92時間、90時間、88時間、86時間、84時間、82時間、80時間、78時間、76時間、74時間、72時間、70時間、68時間、66時間、64時間、62時間、60時間、58時間、56時間、54時間、52時間、50時間、48時間、46時間、44時間、42時間、40時間、38時間、36時間、34時間、32時間、30時間、28時間、26時間、24時間、22時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、8時間、6時間、4時間、3時間、2時間、1時間、55分、50分、45分、40分、35分、30分、25分、20分、15分、10分、9分、8分、7分、6分、5分、4分、3分、2分、および1分を含む他の治療の前の任意の時点で、投与し得る。ペプチドを、約120時間、118時間、116時間、114時間、112時間、110時間、108時間、106時間、104時間、102時間、100時間、98時間、96時間、94時間、92時間、90時間、88時間、86時間、84時間、82時間、80時間、78時間、76時間、74時間、72時間、70時間、68時間、66時間、64時間、62時間、60時間、58時間、56時間、54時間、52時間、50時間、48時間、46時間、44時間、42時間、40時間、38時間、36時間、34時間、32時間、30時間、28時間、26時間、24時間、22時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、8時間、6時間、4時間、3時間、2時間、1時間、55分、50分、45分、40分、35分、30分、25分、20分、15分、10分、9分、8分、7分、6分、5分、4分、3分、2分、および1分を含むペプチドの第2の治療の前の任意の時点で、投与し得る。

【0073】

ペプチドを、約1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、15分、20分、25分、30分、35分、40分、45分、50分、55分、1時間、2

10

20

30

40

50

時間、3時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、1
8時間、20時間、22時間、24時間、26時間、28時間、30時間、32時間、3
4時間、36時間、38時間、40時間、42時間、44時間、46時間、48時間、5
0時間、52時間、54時間、56時間、58時間、60時間、62時間、64時間、6
6時間、68時間、70時間、72時間、74時間、76時間、78時間、80時間、8
2時間、84時間、86時間、88時間、90時間、92時間、94時間、96時間、9
8時間、100時間、102時間、104時間、106時間、108時間、110時間、
112時間、114時間、116時間、および120時間を含む他の治療の
後の任意の時点で、投与し得る。ペプチドを、約120時間、118時間、116時間、
114時間、112時間、110時間、108時間、106時間、104時間、102時間、
100時間、98時間、96時間、94時間、92時間、90時間、88時間、86
時間、84時間、82時間、80時間、78時間、76時間、74時間、72時間、70
時間、68時間、66時間、64時間、62時間、60時間、58時間、56時間、54
時間、52時間、50時間、48時間、46時間、44時間、42時間、40時間、38
時間、36時間、34時間、32時間、30時間、28時間、26時間、24時間、22
時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、8時間、6時間
、4時間、3時間、2時間、1時間、55分、50分、45分、40分、35分、30分
、25分、20分、15分、10分、9分、8分、7分、6分、5分、4分、3分、2分
、および1分を含むペプチドの第2の治療の後の任意の時点で、投与し得る。
10

製剤

20

【0074】

方法は、ペプチドを投与することを含んでなり得る。本明細書に与えられるペプチドは
、従来の方法で製剤化された錠剤またはロゼンジの形態であり得る。例えば、経口投与用
錠剤およびカプセルは、結合剤、增量剤、潤滑剤、崩壊剤、および湿潤剤であり得る従来
の賦形剤を含み得る。結合剤には、限定はされないが、シロップ、アラビアゴム、ゼラチ
ン、ソルビトール、トラガント、デンプンおよびポリビニルピロリドンの漿剤が含まれ
る。増量剤は、ラクトース、砂糖、微結晶セルロース、トウモロコシデンプン、リン酸カル
シウム、およびソルビトールであり得る。潤滑剤には、限定はされないが、ステアリン酸
マグネシウム、ステアリン酸、タルク、ポリエチレングリコール、およびシリカが含まれ
る。崩壊剤は、ジャガイモデンプン、およびデンブングリコール酸ナトリウムであり得る
。湿潤剤は、ラウリル硫酸ナトリウムであり得る。錠剤を、当業でよく知られている方法
に従ってコーティングし得る。
30

【0075】

本明細書に与えられるペプチドは、水性または油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロ
ップ、およびエリキシルなどの液体製剤でもあり得る。ペプチドを、使用前に水または他の
好適な賦形剤と構成するための乾燥製品としても製剤化し得る。このような液体製剤は
、懸濁剤、乳化剤、非水性賦形剤、および保存剤などの添加剤を含み得る。懸濁剤は、ソ
ルビトールシロップ、メチルセルロース、グルコース／シュガーシロップ、ゼラチン、ヒ
ドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲ
ル、および水素化食用脂であり得る。乳化剤は、レシチン、モノオレイン酸ソルビタン、
およびアラビアゴムであり得る。非水性賦形剤は、食用油、アーモンド油、分留ヤシ油、
油性エステル、プロピレングリコール、およびエチルアルコールであり得る。保存剤は、
p-ヒドロキシ安息香酸メチルまたはプロピル、およびソルビン酸であり得る。特に、本
発明のペプチドは、点眼薬の形態など、局所的投与用の水性製剤であり得る。
40

【0076】

本明細書に与えられるペプチドは、カカオ脂またはグリセリドなどの坐剤基剤を含み得
る坐剤としても製剤化され得る。本明細書に与えられるペプチドは、吸入用にも製剤化さ
れ得、乾燥粉末として、またはジクロロジフルオロメタンもしくはトリクロロフルオロメ
タンなどの噴射剤を使用してエアロゾルの形態で投与し得る液体、懸濁液、またはエマル
ジョンなどの形態であり得る。本明細書に与えられるペプチドは、クリーム、軟膏、ロー
50

ション、ペースト、薬用石膏、パッチ、または膜などの水性または非水性賦形剤を含んでなる経皮製剤としても製剤化され得る。本明細書に与えられるペプチドは、注射、腫瘍内注射、または連続注入などの非経口投与用にも製剤化され得る。注射用製剤は、油性または水性賦形剤中の懸濁液、溶液、またはエマルジョンの形態であり得、製剤化剤を含み得、製剤化剤には、限定はされないが、懸濁剤、安定化剤、および分散剤が含まれる。ペプチドは、好適な賦形剤と再構成するための粉末形態でも与えられ得、好適な賦形剤には、限定はされないが、無菌の発熱物質を含まない水が含まれる。

【0077】

本明細書に与えられるペプチドは、埋め込みにより、または筋肉内注射により投与され得る、デポー製剤としても製剤化され得る。ペプチドは、好適なポリマー材料もしくは疎水性材料（例えば、許容できる油中のエマルジョンとして）、イオン交換樹脂、またはやや難溶性の誘導体（例えば、やや難溶性の塩として）を用いて製剤化され得る。10

用量

【0078】

方法は、治療有効量のペプチドを必要性のある患者に投与することを含んでなり得る。治療に使用するために必要とされる治療有効量は、治療する状態の性質、TLR活性を活性化するために求められる時間の長さ、および患者の年齢／状態で変わる。しかしながら、通常、成人のヒトの治療に適用される用量は、一般的に、一日当たり0.001mg/kg～約200mg/kgの範囲内にある。用量は、一日当たり約0.05mg/kg～約10g/kgであり得る。所望の用量を、単回投与、または適切な間隔で投与される複数回投与として、例えば、1日当たり2、3、4、またはそれ以上の副投与として、都合よく投与し得る。複数回投与が、望ましいか、または必要であり得る。20

【0079】

用量は、約0.05μg/kg、0.06μg/kg、0.07μg/kg、0.08μg/kg、0.09μg/kg、0.1μg/kg、0.2μg/kg、0.3μg/kg、0.4μg/kg、0.5μg/kg、0.6μg/kg、0.7μg/kg、0.8μg/kg、0.9μg/kg、1μg/kg、1.5μg/kg、2μg/kg、3μg/kg、4μg/kg、5μg/kg、10μg/kg、15μg/kg、20μg/kg、25μg/kg、50μg/kg、75μg/kg、100μg/kg、125μg/kg、150μg/kg、175μg/kg、200μg/kg、225μg/kg、250μg/kg、275μg/kg、300μg/kg、325μg/kg、350μg/kg、375μg/kg、400μg/kg、425μg/kg、450μg/kg、475μg/kg、500μg/kg、525μg/kg、550μg/kg、575μg/kg、600μg/kg、625μg/kg、650μg/kg、675μg/kg、700μg/kg、725μg/kg、750μg/kg、775μg/kg、800μg/kg、825μg/kg、850μg/kg、875μg/kg、900μg/kg、925μg/kg、950μg/kg、975μg/kgなどの任意の用量であり得る。30

【0080】

用量は、約0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、2.5mg/kg、5.0mg/kg、7.5mg/kg、10.0mg/kg、12.5mg/kg、15.0mg/kg、17.5mg/kg、20.0mg/kg、22.5mg/kg、25.0mg/kg、27.5mg/kg、30.0mg/kg、32.5mg/kg、35.0mg/kg、37.5mg/kg、40.0mg/kg、42.5mg/kg、45.0mg/kg、47.5mg/kg、50.0mg/kg、52.5mg/kg、55.0mg/kg、57.5mg/kg、60.0mg/kg、62.5mg/kg、65.0mg/kg、67.5mg/kg、70.0mg/kg、72.5mg/kg、75.0mg/kg、77.5mg/kg、80.0mg/kg、82.5mg/kg、85.0mg/kg、87.5mg/kg、90.0mg/kg、92.5mg/kg、95.0mg/kg、97.5mg/kgなどの任意の用量であり得る。40

0 mg / kg、875 mg / kg、900 mg / kg、925 mg / kg、950 mg / kg、975 mg / kg、1 g / kg、2 g / kg、3 g / kg、4 g / kg、5 g / kg、6 g / kg、7 g / kg、8 g / kg、9 g / kg、または10 g / kgなどの任意の用量であり得る。

キット

【0081】

V E G F 誘発血管透過性または血管新生に関連する障害を治療するために使用され得るキットが本明細書で与えられる。キットは、1つ以上のペプチドを含んでなり得る。ペプチドは、医薬組成物の一部であり得る。キットは、キットを使用し、ペプチドまたは製剤の投与を実施するための指示書をさらに含んでなり得る。

10

【0082】

キットは、1つ以上の容器、例えば、バイアルまたはボトルも含んでなり得、それぞれの容器は、別の試薬を含む。キットは、本明細書に記載の方法を実施または解釈する方法を記載し得る書面での指示をさらに含んでなり得る。

【実施例】

【0083】

実施例 1

C a 2 + の I P 3 ゲート放出の機構における E B 3 と I P 3 R との相互作用の役割

本発明のペプチド（配列番号1および配列番号3）を用いたE B 3 機能のアロステリック調節がV E G F 誘発血管漏出および血管新生を阻害の両方を阻害するかどうかを測定した。マウスで、マトリゲルの皮下注射、腫瘍細胞、またはブルック膜のレーザー熱傷により、V E G F または血管新生を誘発した。

20

【0084】

I P₃ R₅ は、E B 結合コンセンサスモチーフである S e r / T h r - x - I l e - P r o (S x I P) (配列番号5) を含む。I P . s u b . 3 R . s u b . 3 配列 (K F A R L W T E I P T A I T - - 配列番号1) (図2) をベースとする短ペプチドは、自由エネルギー結合が - 68 . 882 k c a l / m o l であり、E B 3 に対して高い結合活性を示す(図3)。E B 3 と I P₃ R₃ との間の相互作用の役割は、Geyer et al., Cell Rep 12(1):79-89; 2015により最近記載された。細胞浸透性アンテナペディアペプチド (A P) のC末端に結合された I P₃ R₃ 配列で 10 n M で細胞を前治療することは、トロンビンに応答したストアからの C a 2 + の放出を著しく減少させ(図4 A)、このことは、I P . s u b . 3 R . s u b . 3 と E B 3 との間の相互作用が、I P₃ R₃ の活性化の機構において、重大な意味を持つことを示唆する。I P₃ R₃ ペプチドおよびタキソールの効果を、C a²⁺ の放出の制御において比較した。トロンビンの刺激の前に細胞を 5 μ g / m l のタキソールで 20 分間前治療することは、I P₃ R₃ ペプチドと同程度、E R からの C a²⁺ の放出を阻害する(図4 B)。

30

実施例 2

末端結合阻害ペプチド (E B I N) の構造に基づく設計

【0085】

末端結合阻害ペプチド、すなわち E B I N を、シリコアラニンスキャニング (silico alanine-scanning) および I P R ペプチドの E B 結合ポケットへの完全にフレキシブルなドッキングのコンピューター解析に基づいて設計した(表2および3)。結合自由エネルギー (G) を使用して、ペプチドと E B タンパク質の相互作用の安定化における各残基の寄与を求めた。

40

【0086】

以下の基準を使用した。 G 値 1 = 安定化残基 G 値 - 1 = 不安定化残基 G 値 < - 1 ~ 0 ~ < 1 = 中間残基 アラニンスキャニングは、安定化(正の結合エネルギーが 0 . 50 K j / モル以上；黒色で示されている)および不安定化(負の結合エネルギーが - 1 , 青色で示されている)残基を明らかにする。

表1 : I P₃ R₃ の T h r - x - P r o モチーフを取り囲むアミノ酸残基の切断後の結合

50

自由エネルギーの計算された変化

【表1】

ペプチド配列	自由エネルギー結合(- kcal/モル)	配列番号
KFARLWTEIPTAIT (IP ₃ R ₃ ペプチド)	-68.882	1
FARLWTEIPTAIT	-68.809	6
RLWTEIPTAIT	-46.571	7
LWTEIPTAIT	-54.443	8
WTEIPTAIT	-42.886	9
TEIPTAIT	-37.16	10
TEIPTAI	-39.337	11
TEIPTA	-41.234	12
TEIPT	-34.5	13
FARLWTEIPTAI	-51.42	14
TEIP	-45.071	15
RTEIPTI	-49.74	16
FRTEIPTI	-40.728	17
FTKIPTI	-55.469	18
KFARTKIPPTAIT	-57.32	19
FARTEIPTAI	-33.415	20
KFARTEIPTAIT	-55.736	21

10

20

30

表2 : アラニンについて IP₃R₃ の各アミノ酸残基を変異させた後の結合自由エネルギーの計算された変化 : K₁ F₂ A₃ R₄ L₅ W₆ T₇ E₈ I₉ P₁₀ T₁₁ A₁₂ I₁₃ T₁₄

【表2】

アミノ酸	ΔG
K1	0.25
F2	0.52
R4	0.01
L5	-1.03
W6	-1.08
T11	0.91
I13	1.33
T14	0.40

40

50

表3：アラニンについてE B I Nの各アミノ酸残基を変異させた後の結合自由エネルギーの計算された変化

【表3】

アミノ酸	ΔG
F1	1.64
T2	1.07
E3	0.02
I4	0.68
T11	0.98
I7	0.94

10

【0087】

結果として、14アミノ酸I P Rペプチドは、7アミノ酸末端結合阻害ペプチド(E B I N、F T E I P T I(配列番号3))に減らされた。図5は、E B 3とE B I Nとの間の相互作用を示す。(図5で黄色の棒で示されている) I P₃ R₃と同様に、E B I Nは、E B 酸性末端とコイルドコイルドメインとの間の疎水性の溝に結合する。E B I NのE B 3との計算されたエネルギー結合は、-60.251 k c a l / m o l であり、I P RとE B 3との間のエネルギー結合と類似している。E B I Nの位置2でのトレオニンは、E B 3境界面との結合において重要な役割を果たし、これは、この残基のアラニンへの変異が、結合を完全に消失させるからである。したがって、単一のアミノ酸変異T AのペプチドであるF A E I P T I(配列番号4)を結合欠損コントロールとして使用した。

20

実施例6

E B I NはV E G F誘発微小血管漏出を予防した

【0088】

30

V E - カドヘリンは、内皮細胞を架橋して連続的な单層にして、タンパク質を豊富に含む体液に対する血管壁の制限的バリアーを維持する、内皮内接合部の主要な接着タンパク質である。V E G FおよびA n g 2の両方が、V E - カドヘリンのチロシンリン酸化を誘発し、V E - カドヘリンを内在化および分解の標的とすることにより直接的に、または細胞内の力への応答によるV E - カドヘリン接着の破壊という方法により非直接的に、V E - カドヘリン接着を不安定化する。

【0089】

V E - カドヘリン接着と微小管細胞骨格との間の重要な相互作用は、最近記載された(Komarova et al. Molecular Cell 48(6): 914-25; 2012.)。カルシウム依存性ホスファターゼであるカルシニューリンは、E B 3を脱リン酸化し、M T 細胞骨格のE B 3依存性の再編成を促進し、それによりV E - カドヘリン接着を破壊するフィードフォワード機構を与えるので、この相互作用において主要なシグナル因子であることが分かった。

40

【0090】

E B I Nの注射が血管内皮増殖因子(V E G F)誘発微小管漏出を予防するかどうかを調査する研究を実施した。B a l b / c Jマウスを、E B I Nペプチド(1 μ M / k g)またはコントロールペプチド(2 T Aの変異)で前治療し、次に、ヒトV E G F(50 n g / k g 体重)を皮内に注射して、アルブミン結合エバンスブルーの血管漏出を誘発した(図6 A参照)。また、ホルムアミドで抽出したエバンスブルーを、620 nmの分光測定で定量し、ヘモグロビン(740 nm)および皮膚重量に対して補正した(図6 B参照)。図6に与えられているデータは、E B I Nペプチドでの動物の治療が、ヒトV E G

50

Fの皮内の注射により誘発される皮下の血管漏出を有意に阻害したことを示し、したがって、E B I Nが、血管新生の阻害のため、およびV E G F誘発血管透過性に関連する障害の治療のための新規の強力な療法に相当し得ることを完全に支持する。

実施例 7

E B I Nは、血管新生のモデルにおいて血管増殖を消失させた

【 0 0 9 1 】

インビトロの管形成およびインビボの血管新生に対するE B I Nの効果をマトリゲルモデルを使用して調査した。ヒト臍静脈内皮細胞の単細胞懸濁液を、 $1 \mu M$ のE B I Nまたはコントロールペプチドの存在下でマトリゲルをコーティングしたウェルの上に蒔き、管形成を16時間後評価した。図7 Aおよび7 Bに示されているように、E B I Nは、このインビトロの2Dマトリゲルモデルにおいて、管の形成を有意に消失した。
10

【 0 0 9 2 】

異所性マトリゲル血管新生のインビボモデルにおける血管の内方成長に対するE B I Nの効果も調査した。グロースマトリゲル中の血管をヘパリンおよびV E G Fとプレミックスし、内皮細胞とはプレミックスせず、マウスの下腹部に腹腔内注射した。マウス当り2つの $400 \mu L$ のプラグがあった。コントロールペプチドで治療したマウスにおいて（群1）、新しく形成された血管は、マトリゲルへと成長した（図7 C , 1）。これらの血管は、機能性であり、血管内の赤血球の存在から明らかであるように、血液がかん流していた。また、マウスを、マトリゲル注射時（図7 C , 2 ; 群2）、またはマトリゲルから36時間後（図7 C , 3 ; 群3）に、E B I Nで治療した。マトリゲルプラグを96時間で除去し、固定し、H Eで染色して、血管形成を評価した。血管の数が顕著に減少し、99%の信頼区間で血管の内方成長における有意な減少を示した。治療後の処置が治療と同程度に効果があり、抗V E G F療法およびタキソールと同様に、E B I Nが血管の退縮を引き起こすことができることを示すことに留意されたい。しかしながら、E B I Nは、内皮細胞死または細胞周期停止を誘発しなかった（データは示さず）。
20

実施例 8

E B I Nは、腫瘍細胞の増殖を阻害した

【 0 0 9 3 】

異種移植モデルを使用するトリプルネガティブ（エストロゲン受容体 [E R] 、プロゲステロン受容体 [P R] 、およびヒト上皮増殖因子受容体2 [H E R - 2] は、この細胞株では発現されない）ヒト乳癌細胞の増殖速度に対するE B I Nの効果を、調査した。又ードマウス（群当りn = 8マウス）に、 3×10^6 のMDA-MB-231ヒト乳癌細胞を左上乳房脂肪体に注射した。全てのマウスが、13日目までに腫瘍を発症した。その時点で、マウスをランダム化し、5群に分け、各群は、治療を受けた。腫瘍が 2000 mm^3 の大きさに達した24日目に、研究を終了した。コントロールペプチドおよびE B I Nでの治療を、7日間毎日実施した。E B I Nおよびコントロールペプチドを、尾静脈注射により送達した。コントロールペプチドを $5 \mu M / k g$ 体重で注射した。E B I Nを $1 \mu M / k g$ 体重および $5 \mu M / k g$ 体重で注射した。
30

【 0 0 9 4 】

タキソールでの治療を、4日間、 $10 \mu M / k g$ 体重での腹腔内注射により実施した。腫瘍サイズを1週間に3回測定した。図8 Aに示されているように、タキソール群において腫瘍増殖に有意な遅延が観察され、E B I N治療群において腫瘍サイズの減少が4回の治療後に観察された。この効果はどちらかといえば一過性であるが、E B I N治療群における腫瘍のサイズは、コントロール未治療群と比較して、有意に小さかった。 $1 \mu M / k g$ のE B I Nで治療したマウスは、未治療マウスと同じ速度で腫瘍を発症し、低い用量は情動的でないことを示唆した。
40

【 0 0 9 5 】

E B I N治療の効果と腫瘍血管新生とを相關させるために、腫瘍組織を収集し、固定し、ヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）で染色した。腫瘍塊の外側の細胞数を記録し、面積当りで標準化した。腫瘍増殖曲線と一致して、腫瘍の外側の血管数は、タキソール
50

およびE B I N (5 μ M / k g) - 治療群でのみ有意に減少した。E B I Nは、タキソールと比較して優れた効果を示した(図8B参照)。全ての他の群は、未治療群と比較して差異を示さなかった。これらのデータは、E B I Nが抗血管新生特性を示し、病的血管新生の治療にE B I Nを使用できることを示唆する。タキソールおよび5 μ M / k g 体重のE B I Nでの治療だけが、腫瘍の外側の血管数を有意に減少させた。

実施例 9

レーザー誘発脈絡膜血管新生(CNV)のインビボモデルにおける治療に対するE B I Nの有効性の測定

【0096】

血管新生AMDは、ブルック膜を貫通して網膜下領域に達する、脈絡膜からの血管の成長により特徴づけられる。レーザー誘発脈絡膜血管新生(CNV)のマウスモデルは、AMDの滲出性形態の充分に確立されたモデルである。レーザービームによるブルック膜の破壊は、新しい脈絡膜血管の網膜への成長を促進し、それによりAMDの病的状態と似た状態を引き起こす(図9)。このモデルは、血管新生AMDに対するVEGF療法の臨床的有効性の推定に成功裏に使用してきた。

【0097】

E B I Nのバリアー保護活性および抗血管新生活性を評価するために、E B I NをCNVのマウスモデルで試験する。E B I Nでの治療に加えて、LEAFTM抗体(マウスVEGF-Aに対するモノクローナルラット抗体)およびコントロールペプチド(MyristylFAEIPTI)を、ポジティブおよびネガティブ実験コントロールとして謹んで使用した。

【0098】

C57BL6マウス(6~8週齢)を、Charles River Laboratoryから購入し、認可されている手順に従って使用した。マウスをケタミン/キシラジン(100mg/5mg/kg IP)の混合物で麻酔し、その瞳孔をCyclomydril(テキサス州フォートワースのAlcon Laboratories)の局所適用で散大させた。眼底を撮像カメラで観察し、レーザー光凝固を画像誘導レーザーシステム(Micron IV, Phoenix Research Laboratories, カリフォルニア州のプレザントン)を使用して誘発した。波長が532nm、一定径が50 μ m、持続時間が70ms、パワーレベルが210~250mWの緑色アルゴンレーザーパルスにより、視神経から等しい距離にある4つのレーザー熱傷を右目に1つずつ誘発した。レーザースポットでの気泡の出現または小さい網膜下出血(直径<1mm)は、ブルック膜の破裂を示すことに役立ち、レーザー誘発CNVの確認としての役割を果たす。この手順を、各マウスの右目だけで実施した。レーザー誘発光凝固のスケジュールおよび治療手順は、図10に示されている。コントロールおよびE B I Nペプチド(1 μ g/眼)、およびマウスVEGF-Aに対する抗体(2 μ g/眼; LEAFTM; 低エンドトキシン、アジドフリー)での治療を、レーザー光凝固後に、硝子体内注射(2 μ l)により右目に1回適用した。眼を無菌食塩水で穏やかに洗浄して潤滑点眼薬を除去し、抗生物質軟膏であるエリスロマイシン(ニューヨーク州メルヴィルのFougera)で治療した。次に、マウスを、レーザー治療の後、目覚めるまで、35°の予め温めた加温板上に置いた。8および15日目に、E B I Nの抗血管新生の有効性を眼干渉断層撮影(OCT)により評価し、15日目にだけ、血管造影を実施した(図10)。患者に臨床的に日常的に使用される手順と同様に、網膜血管系を撮像するために、蛍光血管造影およびOCTを実施した。これを、マウスの尾静脈を通して、10 μ lの0.2%のフルオレセイン色素の静脈内注射により、実施した。治療群当たり10マウスのサンプルサイズが、Gong et al., PLoS One 2015, 10(7): e 0132643で決められたパラメーターをベースとして、血管漏出(レッサン.lesson領域)の仮定した10%の差異を検出するのに充分な検出力を与える。

【0099】

表4は、10の治療群(治療群当たりn=10 CNVマウス、合計で30マウス)、薬剤レジメン、および治療への応答を測定するための予定エンドポイントをリストしている。群1のマウスは、MyristylFAEIPTIを受け、群2のマウスは、MyristylFAE 50

I Nで治療され、群3のマウスは、ポジティブコントロールとしてのLEAFTMで治療された。全ての治療を、図10に概説しているように、硝子体内経路を介して、CNVの時点で単回注射として送達した。

【0100】

表4：治療群、薬剤レジメン、およびマウスにおけるCNVの治療への応答を測定するためのエンドポイントアッセイ

【表4】

群	N	薬剤	レジメン	エンドポイントアッセイ
1	10	Myr-コントロールペプチド(1 μg/眼)	1μg /眼の1ulを硝子体内注射; 1日目(CNVの時点)	1.15日目に蛍光血管造影、8および15日にOCT
2	10	Myr-EBIN 硝子体内(1 μg /眼)	1μg /眼の1ulを硝子体内注射; 1日目(CNVの時点)	2.15日目に病理組織学的試験のために眼の収集
3	10	LEAF TM 抗体	2μg /眼の1ulを硝子体内注射 (ヒトにおける2.5 mgの用量に相当); 1日目(CNVの時点)	
合計	30			

10

20

30

【0101】

図11aおよび11bは、EBIN、抗VEGF抗体、またはコントロールペプチドで治療したCNVマウスについての、レーザー光凝固術後15日目での眼底蛍光血管造影(a)、および対応する光干渉断層撮影(b)の画像(数は、対応するCNV病変を示す)を示す。EBINは、抗VEGF治療と同様にCNV病変を減少させ、それ故、黄斑変性などの眼疾患の現在の治療の有力な代替物を与える。実験を15日目に終了し、この時点で、動物をケタミン/キシラジン(100mg/5mg/kg IP)でと殺し、次いで頸椎脱臼をし、眼組織を免疫蛍光染色および病理解析のために収集した。網膜/脈絡膜/強膜のフラットマウント標本を、CNV領域の死後分析のためのBandeiraea simplicifoliaからのAlexa594標識レクチン(B4)を用いた染色(図11c)に使用した。

【0102】

データ分析を、これまでの研究(Gong et al., PLoS One 2015, 10(7): e 0132643)で確立された除外基準を用いて実施した。激しい出血、例えばブルック膜だけでなく脈絡膜および網膜色素上皮も損傷する過度のレーザー熱傷の場合、同じ実験条件下での病変の平均の5倍よりも大きい病変である融合した病変を除外した。血管漏出およびCNVの面積を、蛍光血管造影画像および、MetaMorphソフトウェアを用いるレクチンB4でのCNV染色の共焦点画像を使用して定量した。データをSigma Plotソフトウェアを用いてプロットし(図11dおよび11e)、Prism 6(カリフォルニア州サンディエゴのGraphPad)を用いて、1元配置ANOVAにより分析した。

40

さらなる研究

【0103】

マウスのEBINでの治療は、コントロールペプチドで治療したマウスと比べて、血管漏出およびCNV病変の両方を有意に低減した(図11)。EBINの効果は、LEAFTM治療と類似しており、EBINが、ベバシズマブおよびアフリベルセプトなどのAMDの現在利用可能な抗VEGF治療のコスト効率のよい有効な代替物を与え得ることを示唆する。

50

【 0 1 0 4 】

あるいは、E B I Nを点眼経路により送達する。この場合、治療は、レーザー光凝固の1日前に開始し、マウスを、レーザー光凝固後15日目まで、1日に2回治療する。治療および観察の期間は、15日間である。また、E B I NをLEAF^{T M}抗体との併用で、硝子体内注射により、および/または点眼経路により送達する。全ての場合において、LEAF^{T M}抗体を硝子体内注射により投与する。上述したように、E B I Nの抗血管新生の有効性を、レーザー誘発C N V後8および15日目に、蛍光血管造影および眼干渉断層撮影(O C T)により評価する。また、眼組織を15日目に収集する。

【 0 1 0 5 】

表5は、10の治療群(治療群当たりn=10C N Vマウス、合計で100マウス)、薬剤レジメン、および将来の研究のための治療への応答を測定するための予定エンドポイントアッセイをリストしている。群1のマウスは、ポジティブコントロールとしてのLEAF^{T M}抗体で治療され、群2のマウスは、群1に対するコントロールとしてのアイソトープコントロールであるLEAF^{T M}精製ラットIgG2aを受ける。群3および4は、それぞれ、マウスV E G Fに対するデコイ受容体(ポジティブコントロール2)またはネガティブMyr-コントロールペプチドで治療される。LEAF^{T M}抗体、デコイ受容体、およびコントロールペプチドは、全て、硝子体内経路を介して、C N Vの時点で単回注射として送達される。群5および6は、硝子体内経路を介して、それぞれ、0.1μg/眼または1μg/眼のMyr-E B I Nを受ける。群7および8は、それぞれ、1日2回、点眼により、0.5μg/眼または5μg/眼のMyr-E B I Nを受ける。群9のマウスは、LEAF^{T M}抗体との併用でMyr-E B I N(0.1μg/眼)で治療され、両方とも硝子体内経路を介して送達される。群10は、硝子体内経路を介して、LEAF^{T M}抗体との併用でMyr-E B I N点眼薬(0.5μg/眼)で治療される。

【 0 1 0 6 】

表5: 将来の治療群、薬剤レジメン、およびマウスにおけるC N Vの治療への応答を測定するためのエンドポイントアッセイ

10

20

【表5】

群	N	薬剤	レジメン	エンドポイントアッセイ
1	10	LEAF™ 抗体	2μg /眼の1ulを硝子体内注射 (ヒトにおける2.5 mgの用量に相当); 1日目(CNVの時点)	1. 15日目に蛍光血管造影、8および15日目にOCT 2. 15日目に病理組織学的試験のために眼の収集
2	10	LEAF™精製ラットIg G2a, κアイソトープコントロール	2μg /眼の1ulを硝子体内注射 (ヒトにおける2.5 mgの用量に相当); 1日目(CNVの時点)	
3	10	マウスVEGFに対するデコイ受容体	2μg /眼の1ulを硝子体内注射 (ヒトにおける2.5 mgの用量に相当); 1日目(CNVの時点)	
4	10	Myr-コントロールペプチド (1 μg/眼)	1μg /眼の1ulを硝子体内注射; 1日目(CNVの時点)	
5	10	Myr-EBIN 硝子体内 (0.1 μg/眼)	0.1μg /眼の1ulを硝子体内注射; 1日目(CNVの時点)	
6	10	Myr-EBIN 硝子体内 (1 μg /眼)	1μg /眼の1ulを硝子体内注射; 1日目(CNVの時点)	
7	10	Myr-EBIN 点眼(0.5 μg /眼)	点眼, 0.5 μg /眼; 1日に2回	
8	10	Myr-EBIN 点眼 (5 μg /眼)	点眼, 5 μg /眼; 1日に2回	
9	10	Myr-EBIN 硝子体内 (0.1 μg /眼) + LEAF™抗体 硝子体内	群 #5との併用での群 #1	
10	10	Myr-EBIN 点眼 (0.5 μg /眼) + LEAF™抗体 硝子体内	群 #7との併用での群 #1	
合計	100			

10

20

30

40

実施例10

インビボでのE B I N の急性毒性試験

【0107】

短期間の研究を設計して、インビボでの投与の安全性を評価する。C57BL/6マウス (n = 10, 群当たり5マウス / 治療経路) をランダム化し、2つの群に分ける。第1の群は、右目に、1日に2回送達される点眼薬により、眼当たり5 μg (10 μl) で、E B I N で治療され、第2の群は、初日に眼当たり1 μg (2 μl) の最大用量で、右目に、E B I N の硝子体内注射で治療される。硝子体内注射をケタミン / キシラジン (100 mg / 5 mg / kg) 麻酔下で実施する。両方の群を、毎日、体重を含む一般的健康状態、な

50

らびに混濁、眼球突出、眼球陷入、結膜炎、異常分泌または痂皮、および角膜潰瘍を含む何らかの眼の異常について、8日間の期間モニタリングする。動物を、蛍光血管造影およびOCT撮像に続いて付す。EBINでの治療後、CNV誘発がある場合、またはない場合で、毒性は観察されなかった(図12)。

【図1】

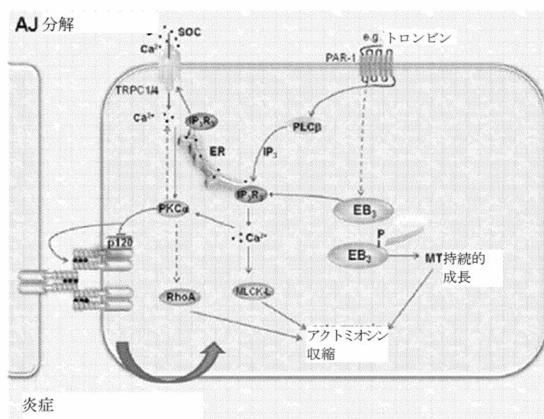


図1

【図2】

IP ₃ R ₁ アイソフォーム1	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP ₃ R ₁ アイソフォーム2	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP ₃ R ₂	VVPVRYARLWTEIPTKITIHE
IP ₃ R ₃	VTPVKFARLWTEIPTAITIKD
E B結合	-----S/TxIP-----
配列番号: 1 IP ₃ R ₃ ペプチド	KFARLWTEIPTAIT

図2

【図3】

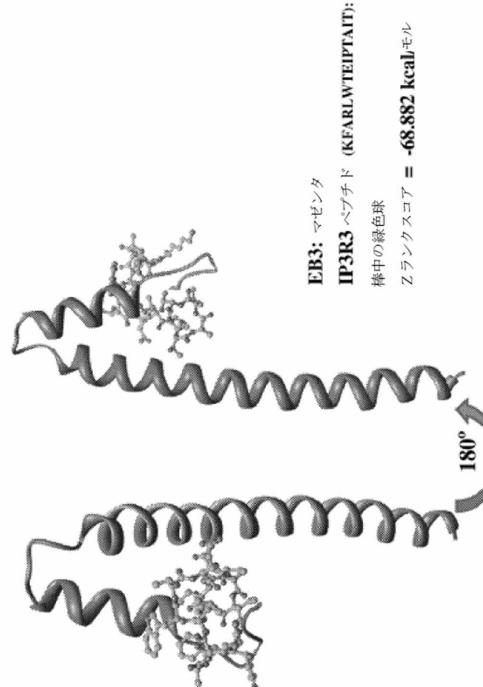


図3

【図4】

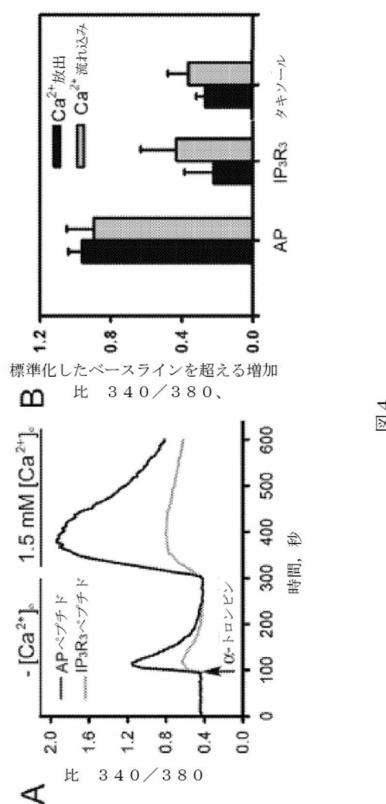


図4

【図5】

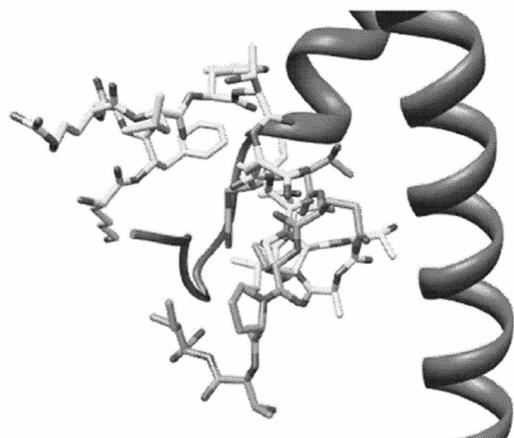


図5

【図6】

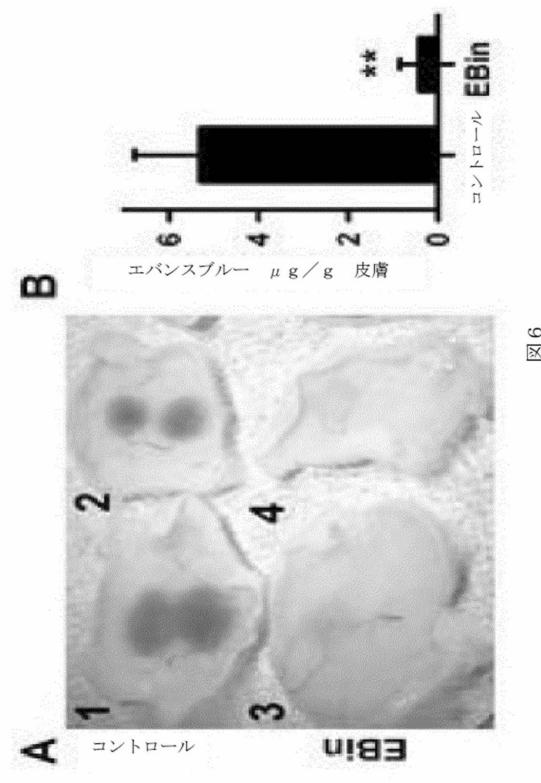


図6

【図7】

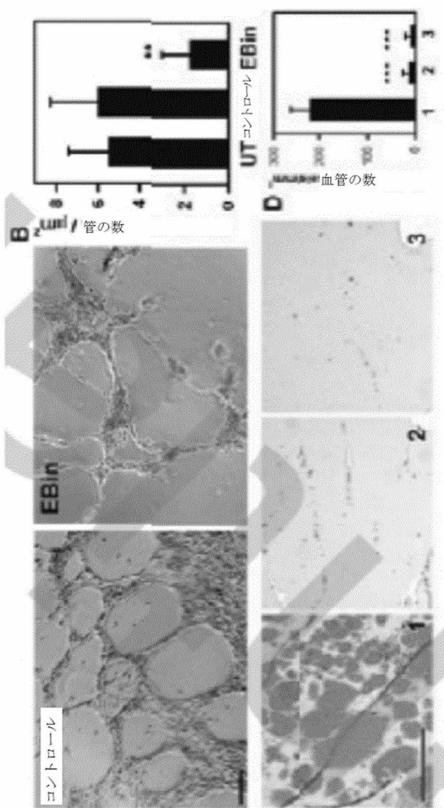


図7

【図 8】

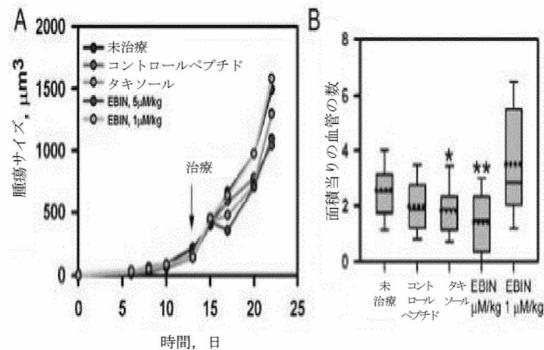


図 8

【図 9】

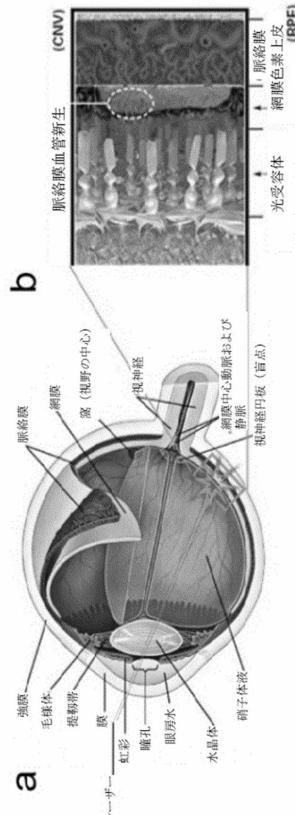
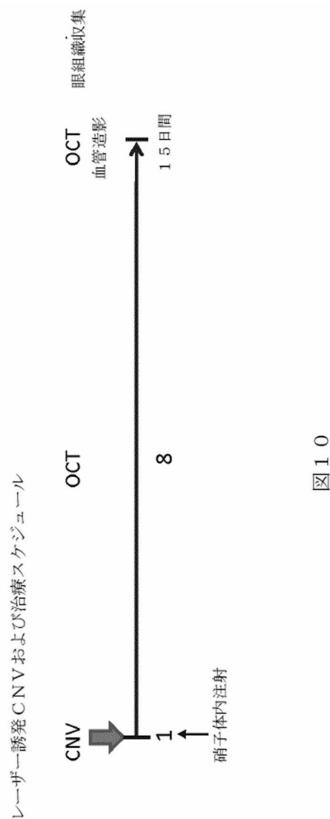


図 9

【図 10】



【図 11】

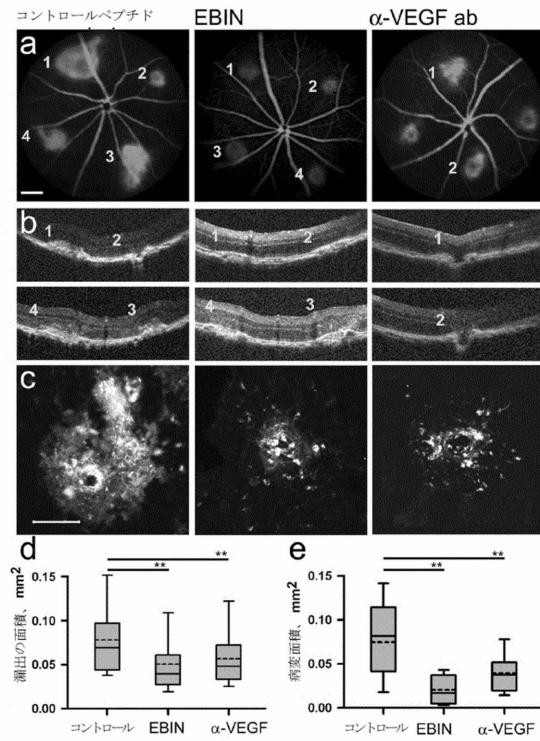


図 11

【図 1 2】

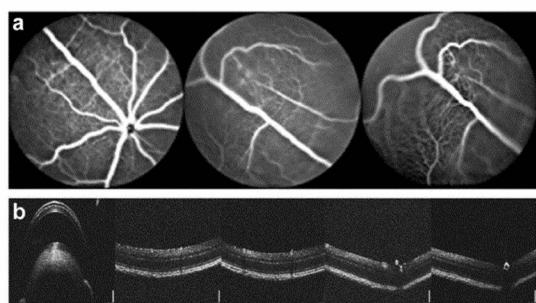


図 1 2

【配列表】

0006896641000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06
C 0 7 K 14/475 (2006.01)	C 0 7 K 14/475 Z N A

(72)発明者 ローゼンブラット, マーク
アメリカ合衆国 イリノイ 60611, シカゴ, エヌ. ワバッシュ アベニュー 474
, アパートメント 1103

(72)発明者 マリック, アスラー ピー.
アメリカ合衆国 イリノイ 60521, ヒンズデール, メリル ウッズ 821

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 特表2014-518211(JP,A)
特表2011-518178(JP,A)
特表2007-509984(JP,A)
Nature,2005,437(7058),p.497-504
Angiogenesis,2008,11(2),p.109-119

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)