

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6134050号
(P6134050)

(45) 発行日 平成29年5月24日(2017.5.24)

(24) 登録日 平成29年4月28日(2017.4.28)

(51) Int.Cl.	F 1
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 47/42	(2017.01)
A61K 45/00	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)
A 61 K	39/395
A 61 K	47/42
A 61 K	45/00
C 07 K	7/06
C 07 K	7/08

請求項の数 25 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-502519 (P2016-502519)
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)
(65) 公表番号	特表2016-515136 (P2016-515136A)
(43) 公表日	平成28年5月26日 (2016.5.26)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/027693
(87) 國際公開番号	W02014/152751
(87) 國際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)
審査請求日	平成27年11月6日 (2015.11.6)
(31) 優先権主張番号	61/782,791
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	596060697 マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア ヴェニュー・77
(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(72) 発明者	コウツオポウロス, ソティリオス アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 114 ボストン, ユニット 206, ボ ードイン ストリート 10

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト抗体の長期間持続放出のための多層注射可能自己組織化ペプチドスキャホールドヒドロゲル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 自己組織化第1ペプチドおよび治療抗体を含むゲルコア、ここで、前記自己組織化第1ペプチドは、Ac-(RADA)₂-CONH₂(配列番号:1)、Ac-(RADA)₃-CONH₂(配列番号:2)、Ac-(RAD A)₄-CONH₂(配列番号:3)およびAc-(RADA)₅-CONH₂(配列番号:4)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、ならびに

(ii) 前記ゲルコアを封入する第1の層、ここで、前記第1の層は、自己組織化第2ペプチドを含み、前記自己組織化第2ペプチドは、Ac-(KLDL)₃-CONH₂(配列番号:7)、Ac-(KLDL)₄-CONH₂(配列番号:8)およびAc-(KLDL)₅-CONH₂(配列番号:9)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、前記第2ペプチドの濃度は、0.6 %w/vより高く5.0 %w/vまでである、

10
を含む持続放出製剤。

【請求項 2】

前記製剤が、少なくとも約4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間またはそれ以上の前記抗体の持続放出をもたらす、請求項1記載の製剤。

【請求項 3】

前記第1の層を封入するゲルの1つ以上の層をさらに含む、請求項1記載の製剤。

【請求項 4】

前記自己組織化第1ペプチドが、Ac-(RADA)₄-CONH₂(配列番号:3)のアミノ酸配列を有する、請求項1～3いずれか記載の製剤。

【請求項 5】

前記自己組織化第2ペプチドが、Ac-(KLDL)₃-CONH₂(配列番号:7)のアミノ酸配列を有する、請求項1～4いずれか記載の製剤。

【請求項6】

前記治療抗体が、少なくとも4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間またはそれ以上の間、投与被験体の血漿中に存在する、請求項1～5いずれか記載の製剤。

【請求項7】

該治療抗体が、IgD、IgA、IgM、IgEまたはIgGイムノグロブリンである、請求項1～6いずれか記載の製剤。

【請求項8】

前記治療抗体が、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、IgM1およびIgM2、ならびにIgA1およびIgA2抗体からなる群より選択される抗体である、請求項1～7いずれか記載の製剤。

【請求項9】

前記治療抗体が、完全抗体または単鎖Fv抗体断片またはFab抗体断片である、請求項1～8いずれか記載の製剤。

【請求項10】

前記治療抗体が、リツキシマブ、インフリキシマブ、トラスツズマブ、アブシキシマブ、パリビズマブ、ムロモナブ-CD3 (Murumonab-CD3)、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、バシリキシマブ、ダクリズマブ、エタネルセプトおよびイブリツモマブチウキセタンから選択される、請求項1～9いずれか記載の製剤。

【請求項11】

前記治療抗体が、抗TNF抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗CD25抗体、抗CD33抗体、抗CD40抗体、抗HER2抗体、抗HBV抗体、抗HAV抗体、抗HCV抗体、抗GPIIb/IIIa受容体抗体、抗RSV抗体、抗HIV抗体、抗HSV抗体および抗EBV抗体からなる群より選択される、請求項1～10いずれか記載の製剤。

【請求項12】

a. 自己組織化第1ペプチドおよび抗体または抗体断片を含む第1の溶液を調製する工程、ここで、前記自己組織化第1ペプチドは、Ac-(RADA)₂-CONH₂(配列番号:1)、Ac-(RADA)₃-CONH₂(配列番号:2)、Ac-(RADA)₄-CONH₂(配列番号:3)およびAc-(RADA)₅-CONH₂(配列番号:4)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、

b. 前記第1の溶液を用いてゲルコアを形成する工程、

c. 前記ゲルコアを、自己組織化第2ペプチド溶液で被覆する工程、ここで、前記自己組織化第2ペプチドは、Ac-(KLDL)₃-CONH₂(配列番号:7)、Ac-(KLDL)₄-CONH₂(配列番号:8)およびAc-(KLDL)₅-CONH₂(配列番号:9)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、前記第2ペプチドの濃度は、0.6 %w/vより高く5.0 %w/vまでである、ならびに

d. 前記ゲルコアを封入する層を形成する工程

を含む、制御放出製剤を調製するための方法。

【請求項13】

前記制御放出製剤が、ゲル形成ペプチドを含むコーティングの1つ以上の層を形成する工程をさらに含む、請求項12記載の方法。

【請求項14】

前記自己組織化第1ペプチドが、Ac-(RADA)₄-CONH₂(配列番号:3)である、請求項12または13記載の方法。

【請求項15】

前記自己組織化第2ペプチドが、Ac-(KLDL)₃-CONH₂(配列番号:7)である、請求項12～14いずれか記載の方法。

【請求項16】

前記1つ以上の層が、Ac-(KLDL)₃-CONH₂(配列番号:7)、Ac-(KLDL)₄-CONH₂(配列番号:8)およびAc-(KLDL)₅-CONH₂(配列番号:9)から選択される自己組織化ペプチドを含む、請求項13記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

該抗体が、IgD、IgA、IgM、IgEまたはIgGイムノグロブリンである、請求項12～16いずれか記載の方法。

【請求項 18】

前記抗体が、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、IgM1およびIgM2、ならびにIgA1およびIgA2抗体からなる群より選択される、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

a. 自己組織化第1ペプチドおよび治療剤を含む第1の溶液を調製する工程、ここで、前記自己組織化第1ペプチドは、Ac-(RADA)₂-CONH₂(配列番号:1)、Ac-(RADA)₃-CONH₂(配列番号:2)、Ac-(RADA)₄-CONH₂(配列番号:3)およびAc-(RADA)₅-CONH₂(配列番号:4)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、

10

b. 自己組織化ゲルコアを形成する工程、

c. 前記ゲルコアを、自己組織化第2ペプチドで被覆する工程、ここで、前記第2ペプチドは、Ac-(KLDL)₃-CONH₂(配列番号:7)、Ac-(KLDL)₄-CONH₂(配列番号:8)およびAc-(KLDL)₅-CONH₂(配列番号:9)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、前記第2ペプチドの濃度は、0.6 %w/vより高く5.0 %w/vまでである、ならびに

d. 前記ゲルコアを封入する層を形成する工程を含む、制御放出製剤を調製するための方法。

【請求項 20】

前記制御放出製剤が、ゲル形成ペプチドを含むコーティングの1つ以上の層を形成する工程をさらに含む、請求項19記載の方法。

20

【請求項 21】

前記自己組織化第1ペプチドが、Ac-(RADA)₄-CONH₂(配列番号:3)である、請求項19または20記載の方法。

【請求項 22】

前記第2ペプチドが、Ac-(KLDL)₃-CONH₂(配列番号:7)である、請求項19または20記載の方法。

【請求項 23】

前記治療剤がタンパク質である、請求項19～22いずれか記載の方法。

【請求項 24】

30

前記治療剤が、エリトロポイエチン(EPO)、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、成長ホルモン、成長ホルモン放出因子、神経成長因子(NGF)、顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージ-コロニー刺激因子(M-CSF)、血液凝固因子、インスリン、オキシトシン、バソプレシン、副腎皮質刺激ホルモン、上皮成長因子、血小板由来成長因子(PDGF)、プロラクチン、ルリベリン、黄体化ホルモン放出ホルモン(LHRH)、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、ソマトスタチン、グルカゴン、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-11(IL-11)、ガストリン、テトラガストリン、ペントガストリン、ウロガストロン、セクレチン、カルシトニン、エンケファリン、エンドルフィン、アンギオテンシン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、腫瘍壞死因子(TNF)、腫瘍壞死因子関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)、ヘパリナーゼ、骨形態形成蛋白(BMP)、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド(hANP)、グルカゴン様ペプチド(GLP-1)、レニン、プラジキニン、バシトラシン、ポリミキシン、コリスチン、チロシジン、グラミシジン、シクロスボリン、小干渉RNA(siRNA)、プラスミドDNAおよびアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)から選択される、請求項19～22いずれか記載の方法。

40

【請求項 25】

前記自己組織化第1ペプチドは、Ac-(RADA)₄-CONH₂(配列番号:3)のアミノ酸配列を有し、前記自己組織化第2ペプチドは、Ac-(KLDL)₃-CONH₂(配列番号:7)のアミノ酸配列を有する、請求項1記載の製剤。

50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願**

この出願は、2013年3月14日に出願された米国仮特許出願第61/782,791号の利益を主張する。上記出願の全教示は、参照により明細書に援用される。

【背景技術】**【0002】****発明の背景**

薬物送達担体としてのヒドロゲルの使用は、ポリマーヒドロゲルおよび動物由来生体材料に最初に焦点があてられた1960年代の制御放出の開始以来研究されている。しかしながら、合成ポリマーからなるヒドロゲルは、(i)構成要素および分解産物の毒性(例えば多くのポリマーは、グルタルアルデヒドなどの毒性架橋リンカーおよび生命の脅威を与える他の化学物質の使用を必要とし、ポリグリコール-ポリ乳酸およびそのアナログなどの他のものは分解の際に局所的に酸を放出する)、(ii)ゲル化後のポリマーの膨潤は、しばしば宿主に苦痛をもたらす、(iii)ポリマーネットワークの大きな孔による短期間での活性化合物の放出のために、生物医学的適用について理想的な系ではない。さらに、コラーゲン、ゼラチン、フィブリンおよびラミニンなどの動物抽出生体ポリマー^[1, 2, 3, 4]は、それらの起源、ならびにドナー組織に存在し得るウイルス、細菌および未知の物質由来の炎症性宿主応答の危険性のために、ヒトを含む現実的な臨床適用において考慮されない。生体適合性薬物放出系の必要性に応じて、生体分解性合成ポリマーが開発された^[5, 6, 7, 8]。新規のヒドロゲル系の広範囲の研究および一定の開発にもかかわらず、これらの課題は依然、完全には解決されていない。

10

20

30

40

【0003】

これまでに、自己組織化ペプチドac-(RADA)₄-CONH₂(式中、Rは、アルギニンであり、Aは、アラニンであり、Dは、アスパラギン酸である)からなるナノ線維ヒドロゲルが、小さなモデル薬物分子の制御された放出について研究された^[9]。最近の研究において、種々の分子量および等電点を有するタンパク質は、ac-(RADA)₄-CONH₂ペプチドヒドロゲルを介してゆっくり放出されることが示され、該放出速度が3ヶ月にわたり研究された^[10]。自己組織化ペプチドヒドロゲルは、ペプチド溶液と生物学的液の相互作用の際に体内で形成され得るので、注射可能である。電解液に導入される場合、自己組織化ペプチドは、10nm～20nmの直径を有するナノ線維を形成し、これはさらに組織化されて、約99.5%(w/v)までの水を含むスキャホールド(scaffold)ヒドロゲルを形成し、直径5nm～200nmのサイズの孔を形成する^[11]。ペプチドゲル化は、ゾル-ゲル変移を開始するために、毒性架橋リンカーなどの有害物質を必要とせず、該ヒドロゲルの分解産物は、天然のアミノ酸であり、体内で代謝および再利用され得る。生理学的条件でゾル-ゲル変移が起こるという事実は、組織内で薬物送達ビヒクルを形成するような該ペプチド溶液と生体活性分子の混合および組織特異的様式での共注入を容易にする。ペプチドスキャホールドヒドロゲルは生体適合性であり、分子設計に供しやすく(amenable)、骨および軟骨の再構築、神経および心臓組織再生、創傷治癒、脈管形成および止血などのいくつかの組織工学適用において使用されている^[12, 13]。自己組織化ペプチドヒドロゲルは、該ヒドロゲル内の細胞移動を容易にするので、広範囲の生体ナノ医学適用について該ヒドロゲルを理想的にする基盤を提供する。さらに、該ヒドロゲルは、無毒性、非免疫原性、非血栓形成性(non-thrombogenic)、生体分解性であり、注射による特定の組織への局所治療に適用可能である^[14, 15]。

【0004】

抗体などの大きなタンパク質は、複雑な三次元構造に加えて複数の官能基が存在するために、従来の有機および無機薬物よりも大きくかつ複雑であり、持続放出のための調製は、困難な課題を提示する。抗体を生物学的に活性なままで維持するために、該製剤は、治療の持続のための抗体の機能的特性を守らなければならない。持続放出の間に、三次元構造の消失または化学的不安定性のために、抗体が分解する複数の経路がある。これらの課

50

題は、治療の長さにより弱まる。治療特性を有する機能的抗体の提示は、持続送達生物学的適用のために重要である。このように、抗体などの治療的に有用な大きなタンパク質の長期間の送達を提供し得る生体分解性ペプチドに基づいた持続放出系を開発する必要がある。

【表1】

- 1 F.A. Kincl, L.A. Ciaccio, S.B. Henderson, Sustained Release Preparations, XVI. Collagen as a Drug Carrier, Archiv. der Pharmazie 317 (1984) 657-661.
- 2 K.H. Stenzel, T. Miyata, A.L. Rubin, Collagen as a biomaterial, Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 3 (1974) 231-253.
- 3 A.L. Rubin, K.H. Stenzel, T. Miyata, M.J. White, M. Dunn, Collagen as a vehicle for drug delivery, J. Clin. Pharmacol. 13 (1973) 309-312.
- 4 F. Greco, L. Depalma, N. Spagnolo, A. Rossi, N. Specchia, A. Gigante, Fibrin antibiotic mixtures - an invitro study assessing the possibility of using a biologic carrier for local-drug delivery, J. Biomed. Mater. Res. 25 (1991) 39-51.
- 5 J. Folkman, D.M. Long, The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy, J. Surg. Res. 4 (1964) 139-142.
- 6 S.J. Desai, A.P. Simonelli, W.I. Higuchi, Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrices, J. Pharm. Sci. 54 (1965) 1459-1464.

10

【表2】

- 7 B.K. Davis, Control of diabetes with polyacrylamide implants containing insulin, Experientia 28 (1972) 348.
- 8 R. Langer, J. Folkman, Polymers for sustained-release of proteins and other macromolecules, Nature 263 (1976) 797-800.
- 9 Y. Nagai, L.D. Unsworth, S. Koutsopoulos, S. Zhang Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold, J. Control. Rel. 115 (2006) 18-25.
- 10 S. Koutsopoulos, L.D. Unsworth, Y. Nagai, S. Zhang, Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (2009) 4623-4628.
- 11 S.G. Zhang, T. Holmes, C. Lockshin, A. Rich, Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993) 3334-3338.
- 12 S. Koutsopoulos, S. Zhang, Three-dimensional neural tissue cultures in biomimetic hydrogel scaffolds consisting of self-assembling peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2012) (submitted).

20

【表3】

- 13 J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang, A.J. Grodzinsky, Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (2002) 9996-10001.
- 14 M.E. Davis, J.P.M. Motion, D.A. Narmoneva, T. Takahashi, D. Hakuno, R.D. Kamm, S. Zhang, R.T. Lee, Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells, Circulation 111 (2005) 442-450.
- 15 R.G. Ellis-Behnke, Y.-X. Liang, S.-W. You, D.K.C. Tay, S. Zhang, K.-F. So, G.E. Schneider, Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006) 5054-5059.

30

40

【発明の概要】

【0005】

発明の概要

発明は、治療剤、好ましくはタンパク質、ポリペプチド、抗体または抗体断片の持続送達のための、1つ以上のゲル形成ペプチドを含む医薬製剤に関し、該製剤は、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間ま

50

たはそれ以上の間、持続送達を発揮する。一態様において、発明は、生物学的液および塩などの電解液の存在下でゾル-ゲル変移を経験する(undergo)自己組織化ペプチドを含む製剤に関する。該製剤は、抗体および抗体断片、特にIgGの持続放出を提供し得る。ヒドロゲルナノ線維の密度を上げ、放出速度を調節する手段を提供することにより、抗体拡散率は低下し得る。

【0006】

発明はさらに、相補的かつ構造的に適合性なペプチド、例えばac-(RADA)₄-CONH₂コアおよびac-(KLDL)₃-CONH₂シェルの実質的に同一中心球体を含む多層ヒドロゲル構造に関する。該治療剤は、相補的なペプチドが使用される場合に形成され得る「タマネギ様」構造を介して分散され得る。一態様において、発明の持続放出製剤は、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間またはそれ以上、機能的に完全な抗体の放出を提供し得る。好ましい態様において、該製剤は、少なくとも約2か月～約3か月の間、機能的に完全な抗体、例えばIgGの持続的放出を提供する。

10

【0007】

一態様において、発明は、放出される抗体、例えばIgGの二次および三次構造分析ならびに生物学的アッセイにおいて、封入および放出が該抗体の立体構造およびその生物学的活性に、ヒドロゲル中で2か月または3か月後であっても影響しなかった製剤に関する。ポリクローナルヒトIgGの機能は、IgG封入および放出後のホスホコリン抗原への親和性によって決定され得る。抗原に対する結合親和性は、封入後の機能的適合度を決定するために使用され得る。発明は、十分に生体適合性でかつ注射可能なペプチドヒドロゲル系が治療抗体の担体として制御放出適用に使用される製剤に関する。

20

【0008】

好ましい態様において、発明は、-ac-(RADA)₄-CONH₂およびac-(KLDL)₃-CONH₂自己組織化ペプチドヒドロゲルを含むヒトイムノグロブリン(pI 7.1、MW 146kDa)の約3か月間を超えた持続放出製剤に関する。好ましい態様において、該抗体をペプチドヒドロゲルと一体化し、該ペプチドヒドロゲルから放出することに関する方法は、円偏光二色性分光分析(CD)、蛍光分光分析およびイムノアッセイを使用した放出された抗体の分析に基づく抗体の立体構造および機能に、実質的に影響しない。IgGの生物学的活性は、一分子蛍光相關分光分析(fluorescence correlation spectroscopy)(FCS)および水晶振動子マイクロバランス(quartz crystal microbalance)(QCM)バイオセンサー技術を使用してモニタリングされ得る。

30

【0009】

発明はさらに、局所送達により患者に対して毒性のより低い副作用をもたらす、特定の組織へと治療を効率的に方向づけ得る持続性薬物送達系に関する。生理学的条件下でゲル化する注射可能自己組織化ペプチドスキャホールド系は、長期間にわたり特定の組織において活性な抗体を局所的に放出するための免疫療法を含む持続放出適用に使用され得る。好ましい態様において、ヒト抗体は、ac-(RADA)₄-CONH₂またはac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチドヒドロゲルを介して、約3か月にわたりゆっくり放出される。放出速度は、ヒドロゲルを形成する自己組織化ペプチドのアミノ酸配列および該ヒドロゲル中のペプチドナノ線維の密度により変化し得る。さらに、制御放出系は、ヒドロゲルにより放出された抗体の二次および三次構造ならびにその生物学的活性が、ヒドロゲルへの封入およびヒドロゲルを介した放出により実質的に影響を受けなかった生物学的に活性なタンパク質を提示し得る。ペプチド配列のプログラム可能性は特有であり、生体分子拡散および放出速度を変化し得るナノ線維の性能を分子レベルで制御する手段を可能にする。

40

【図面の簡単な説明】

【0010】

発明の前述および他の目的、特徴および利点は、添付の図面に図示されるように、発明の好ましい態様の以下のより具体的な記載から明らかであろう。該図面において、同様の参照記号は異なる図面を通じて同じ部分を言及する。図面は必ずしも一定の縮尺ではなく、かわりに発明の原理の説明に重点が置かれる。

50

【図1】図1は、(A) ac-(RADA)₄-CONH₂ペプチドモノマーおよびペプチドナノ線維、(B) IgG分子の図示的表示、(C)ペプチドナノ線維の電子顕微鏡画像、ならびに(D)スキャホールドヒドロゲルの巨視的画像である。IgGおよびペプチドについての色スキーム：正電荷(青色)、負電荷(赤色)および疎水性(灰色)。

【図2】図2は、(A)多層ヒドロゲルの概略表示である。(B)多層ヒドロゲルの光学顕微鏡および(C-D)蛍光顕微鏡による検査。可視化のために、シェル(自己組織化したac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチド)はAlexa-488フルオロフォアで負荷され(C)、コア(自己組織化したac-(RADA)₄-CONH₂ペプチド)はCY3で負荷される(D)。

【図3】図3は、(A)異なるペプチドおよび異なるペプチドナノ線維密度のヒドロゲルを介したIgGについての(A)3か月全体および(B)最初の12日間の放出プロフィールである。ヒドロゲルは、自己組織化ペプチド(i) 0.5%w/v(薄い青色、)、1.0%w/v(青色、)および1.5%w/v(濃い青色、)の濃度のac-(RADA)₄-CONH₂、ならびに(ii) 0.3%w/v(赤色、)および0.6%w/v(マゼンタ、)の濃度のac-(KLDL)₃-CONH₂からなった。PBS、pH7.4中、室温で放出実験を行った。データ点は、12%未満の計算した標準偏差での5試料の平均を表す。(C)二相拡散機構(biphasic diffusion mechanism)を示す時間の平方根の関数としてプロットしたIgG放出。プロットの最初の直線部分は、ペプチドヒドロゲルを介したIgGの単純な拡散を表し、これを用いてフィックの原理(式1)に基づく拡散係数を計算する。

【図4】図4は、1.0%w/v(青色、)の濃度のac-(RADA)₄-CONH₂、0.6%w/v(マゼンタ、)の濃度のac-(KLDL)₃-CONH₂、ならびに1.0%w/v ac-(RADA)₄-CONH₂(コア)および0.6%w/v ac-(KLDL)₃-CONH₂(シェル)で構成される多層二成分ヒドロゲル(黄色、)からなるヒドロゲルを介したIgGについての(A)3か月全体および(B)最初の12日間の放出プロフィールである。PBS、pH7.4中室温で放出実験を行った。データ点は、12%未満の計算した標準偏差を有する5試料の平均を表す。(C)二相拡散機構を示す時間の平方根の関数としてプロットしたIgG放出。プロットの最初の直線部分は、ペプチドヒドロゲルを介したIgGの単純な拡散を表し、これを用いてフィックの原理(式1)に基づいた拡散係数を計算する。

【図5】図5は、PBS、pH7.4中のヒトIgGの分光分析検査である。(A)天然のIgG(実線)およびヒドロゲル放出ペプチド(破線)IgGの遠紫外CDスペクトル。(B)天然のIgG(実線)およびペプチドヒドロゲルを介して放出されたIgG(破線)の標準化された蛍光放射スペクトル；励起波長は300nmであった。室温で2か月後の放出試料のスペクトルを記録した。

【図6】図6は、ac-(RADA)₄-CONH₂ペプチドヒドロゲルを介した放出の前後でのPC-BSA抗原の非存在下および存在下での遊離IgG分子の移行拡散時間である。FCSデータは、IgGと抗原の相互作用により、3つの異なる種：IgG単独、それと同様の拡散時間を有した遊離IgG分子および1つまたは2つの抗原分子に結合するIgGが得られたことを示した。これらの種の相対濃度は、IgGの放出の前後で同様であった。標準偏差は5~12%である。

【図7】図7は、(A)天然のIgGおよび(B)ヒドロゲル放出ポリクローナルヒトIgGの、固定化されたPC-BSA(抗原)への結合(association)(結合(binding))および解離時のQCM時間依存性頻度変化、-dFである。時間0は、フローチャンネル中のIgGの注射、その後の結合期を表す。バイオセンサー信号(黒色線)は、IgG注射および固定された抗原へのIgGの結合時に増加し、結合したIgGの解離を生じるバッファの注射(矢印)時に低下する。計算した速度定数の類似性および天然のIgGヒドロゲル放出IgGの間の親和性定数の類似性は、IgGの機能的特性が、ペプチドヒドロゲルとの一体化およびペプチドヒドロゲルからの放出時に影響を受けなかったことを示唆する。データ適合は赤色線で表す。

【図8】図8は、ストークス-アインシュタインの方程式を使用した溶液中のヒトイムノグロブリン(IgG、MW 146kDa、流体力学半径(hydrodynamic radius) $r_h = 5.3\text{nm}$ 、等電点pI 7.1)の拡散定数およびフィックの原理を使用したペプチドヒドロゲルを介した放出時の拡散定数。誤差伝播(error propagation)を使用して標準偏差を計算した(n=8)。

【発明を実施するための形態】

【0011】

発明の詳細な説明

発明は、1つ以上のゲル形成ペプチドを含む、抗体または抗体断片の持続送達のための

10

20

30

40

50

医薬製剤に関し、該製剤は、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間またはそれ以上、持続送達を発揮する。一態様において、発明は、生物学的液および塩などの電解液の存在下でゾル-ゲル変移を経験する自己組織化ペプチドを含む製剤に関する。該製剤は、抗体および抗体断片、特にIgGの持続放出をもたらし得る。ヒドロゲルナノ線維の密度を増加し、放出速度(release kinetic s)を制御する手段を提供することにより抗体拡散率は低下し得る。

【0012】

発明はさらに、相補的かつ構造的に適合性のペプチド、例えばac-(RADA)₄-CONH₂コアおよびac-(KLDL)₃-CONH₂シェルの同一中心球体を含む多層ヒドロゲル構造に関する。該抗体は、相補的なペプチドを使用する場合に形成され得る「タマネギ様」構造を介して拡散され得る。発明の持続放出製剤は、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間またはそれ以上、機能的に完全な抗体放出を提供し得る。好ましい態様において、該製剤は、機能的に完全な抗体、例えばIgGの、少なくとも約2か月～約3か月の間の持続放出を提供する。

10

【0013】

発明はさらに、多層ゲル製剤を調製するための方法に関し、ここで治療剤を含む第1のコアゲルが形成され、該コアゲルを封入するような1つ以上の層のゲルがさらに形成される。コアゲルの製剤は、適切な水溶液中でのゲル形成ペプチドの混合およびゲルの形成の待機の際に起こり得る。一態様において、ゲル形成ペプチドはバッファ液に添加され、混合される。一態様において、シリンジ針の先端で液滴を形成し、ゲル化させることにより液滴状のゲルが形成され得る。

20

【0014】

一態様において、発明は、放出される抗体、例えばIgGの二次および三次構造分析ならびに生物学的アッセイにおいて、封入および放出が該抗体の立体構造およびその生物学的活性に、ヒドロゲル内で2か月または3か月後であっても影響しなかった製剤に関する。ポリクローナルヒトIgGの機能は、IgG封入および放出後のホスホコリン抗原への親和性によって決定され得る。抗原への結合効率は、封入後の機能的適合度(functional fidelity)を決定するために使用され得る。発明は、十分に生体適合性でかつ注射可能なペプチドヒドロゲル系が、治療抗体の担体として制御放出適用に使用される製剤に関する。

【0015】

30

ac-(RADA)₄-CONH₂およびac-(KLDL)₃-CONH₂自己組織化ペプチドからなるナノ線維スキヤホールドヒドロゲルの透過性構造を介したヒトイムノグロブリン(IgG)の放出速度は、3か月間にわたり試験された。自己組織化ペプチドは、生物学的液および塩などの電解液の存在下でゾル-ゲル変移を経験する刺激応答性材料の部類である。IgG拡散率は、ヒドロゲルナノ線維の密度を上げることで低下し、放出速度を制御する手段を提供した。ac-(RADA)₄-CONH₂コアおよびac-(KLDL)₃-CONH₂シェルの同一中心球体からなる多層ヒドロゲル構造も作製した。「タマネギ様」構造を介した抗体拡散プロフィールを決定した。放出されるIgGの二次および三次構造分析ならびに生物学的アッセイにより、封入および放出は、ヒドロゲルの内部で、3か月後であっても、抗体の立体構造およびその生物学的活性に影響しないことが示された。ホスホコリン抗原に対するポリクローナルヒトIgGの機能を決定して、IgG封入および放出が抗原への抗体結合効率に影響しないことを示した。発明者らの結果により、この充分に生体適合性でかつ注射可能なペプチドヒドロゲル系は、治療抗体の担体として、制御放出適用に使用され得ることが示される。

40

【0016】

発明はさらに、局所送達により患者に対してより低い毒性の副作用を生じる、特定の組織へと治療を効率的に方向づけ得る持続的薬物送達系に関する。生理学的条件下でゲル化する注射可能自己組織化ペプチドスキヤホールド系は、長期間にわたり特定の組織において活性な抗体を局所的に放出するための免疫療法などの持続的放出適用に使用され得る。好ましい態様において、ヒト抗体は、ac-(RADA)₄-CONH₂またはac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチドヒドロゲルを介して、約3か月間にわたりゆっくりと放出される。放出速度は、ヒドロゲ

50

ルを形成する自己組織化ペプチドのアミノ酸配列および該ヒドロゲル内のペプチドナノ線維の密度により変化し得る。さらに、該制御放出系は、ヒドロゲル放出抗体の二次および三次構造ならびにその生物学的活性が、ヒドロゲルへの封入およびヒドロゲルを介した放出により実質的に影響を受けなかった生物学的に活性なタンパク質を提示し得る。ペプチド配列のプログラム可能性は特有であり、ナノ線維特性を分子レベルで制御する手段を可能にし、これは次いで、生体分子の拡散および放出速度を変化させ得る。

【0017】

一態様において、発明は、第1のペプチドモノマーおよび抗体を含むコアに関し、前記コアは、第2のペプチドを形成する層で被覆される。好ましい態様において、該コアは、Ac-(RADA)₃-CONH₂、Ac-(RADA)₄-CONH₂、Ac-(RADA)₅-CONH₂から選択される第1のペプチドを含み、前記ペプチドは、Ac-(KLDL)₃-CONH₂、Ac-(KLDL)₄-CONH₂、Ac-(KLDL)₅-CONH₂から選択され、前記抗体はIgG抗体である。多層ヒドロゲル構造は、2段階ゲル化方法において調製され得る。例えば、ac-(RADA)₄-CONH₂ペプチド溶液(約0.2～約5.0%w/v、好ましくは約0.4～約2.0%w/v、好ましくは約0.5～約1.5%w/v)と、IgG(約1μM～約20μM、好ましくは約2μM～約10μM、4μM～約8μM)を含むバッファ溶液(PBSまたはゲル形成に適切な別のバッファ)を混合した際に、IgGを含むゲルは形成され得る。該ゲルは、所望の物理的形状に形成され得る。例えば、針の先端で液滴を形成するシリングを使用して、ゲル化を可能にするのに十分な時間待機させることにより実質的に球形のコア構造を生じ得る。自己組織化方法は、シリングの針の先端に引っかかる実質的に球形の幾何学を有するヒドロゲルを生じ得る。形成された第1のゲルは、自己組織化ペプチドの第2の層で被覆され、層が重ねられた生成物を生じ得る。例えば、第2のシリングを使用して、別の自己組織化ペプチドac-(KLDL)₃-CONH₂の層をコアの外表面に適用し得る。ac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチド溶液は、約0.1～約5.0%w/v、好ましくは約0.2～約2.0%w/v、好ましくは約0.3～約1.5%w/v、またはより好ましくは約0.6%w/vであり得る。最終段階において、ゲル化が起こる前にac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチド溶液の液滴を接触させて、先に形成されたac-(RADA)₄-CONH₂ペプチドヒドロゲルを封入することにより、「タマネギ様」の多層ヒドロゲル構造を生じ得る。IgG抗体を有するコアおよび自己組織化ペプチドを形成する前記の工程後に、第2のペプチドで被覆することが複数回反復されて多層のタマネギ様構造を生じ得る。例えば、ac-(KLDL)₃-CONH₂で被覆されたac-(RADA)₄-CONH₂/IgGコアを含む上述の生成物を、所望の放出プロファイルに基づいて、ac-(RADA)₄-CONH₂/IgGの層、次いでac-(KLDL)₃-CONH₂の別のコーティングでさらに被覆し得る。

【0018】

他の自己組織化ペプチドも、製剤の1つ以上の層またはコアを形成するために使用され得る。かかるペプチドの例としては、K27、27アミノ酸 シート形成ペプチド(KLEALYIIMVLGFFGFFILGIMLSYIR)；K24、24アミノ酸 シート形成ペプチド(KLEALYVLGFFGFFILGIMLSYIR)；またはBodenら(米国特許出願公開20020132974)に記載されるSER-1；またはLockwoodら(Biomacromolecules, 2002, 3 (6), pp 1225-1232)に記載されるPF4₂₄₋₄₆が挙げられる。

【0019】

ヒアルロン酸、コラーゲン、架橋ポリマー、グリコサミノグリカン、ケラチン、フィブロネクチン、ビトロネクチンまたはラミニンなどの他のゲル形成またはコーティング剤を使用して、明細書に記載の製剤のコアを封入する1つ以上の層を形成し得る。

【0020】

発明は、1つ以上の治療剤を含む製剤に関する。好ましい態様において、該治療剤は、抗体、IgG抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体断片およびポリクローナル断片から選択され、該治療剤は、少なくとも約1か月、または2か月または3か月の期間にわたり放出される。

【0021】

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、具体的にはモノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体(例えば、二重特異的抗体)および所望の生物学的活性を発揮する限りは抗体断片をカバーする。

10

20

30

40

50

【0022】

「抗体断片」は、全長抗体の一部、一般的にその抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片；ダイアボディ；直鎖抗体；单鎖抗体分子；および抗体断片で形成される多重特異的抗体が挙げられる。

【0023】

用語「モノクローナル抗体」は、明細書で使用する場合、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体をいい、すなわち該集団を含む個々の抗体が、少量で存在し得る起こり得る天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、单一の抗原部位に対して方向づけられる。典型的に異なる抗原決定基(エピトープ)に対して方向づけられた異なる抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物に対して、それぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の1つの決定因子に対して方向づけられる。改変体「モノクローナル」は、実質的に均一の抗体の集団から得られるような抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の產生を必要とするとは解釈されない。例えば、本発明により使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975)に最初に記載されたハイブリドーマ法により作製され得るか、または組み換えDNA法(例えば米国特許4,816,567参照)により作製され得る。「モノクローナル抗体」はまた、例えばClackson et al., *Nature* 352:624-626 (1991)およびMarks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)に記載される技術を使用してファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

【0024】

好みの態様において、抗体は、IgD、IgA、IgM、IgEまたはIgGイムノグロブリンから選択される。より好みの態様において、抗体はIgGである。好みの態様において、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、IgM1およびIgM2、ならびにIgA1およびIgA2抗体からなる群より選択される。一態様において、抗体は、完全抗体(whole antibody)または单鎖Fv抗体断片またはFab抗体断片である。好みの態様において、抗体は、リツキシマブ、インフリキシマブ、トラスツズマブ、アブシキシマブ、パリビズマブ、ムロモナブ-CD3(Murumonab-CD3)、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、バシリキシマブ、ダクリズマブ、エタネルセプトおよびイブリツモマブチウキセタンから選択される。一態様において、抗体は、抗TNF抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗CD25抗体、抗CD33抗体、抗CD40抗体、抗HER2抗体、抗HBV抗体、抗HAV抗体、抗HCV抗体、抗GPIIb/IIIa受容体抗体、抗RSV抗体、抗HIV抗体、抗HSV抗体および抗EBV抗体から選択される。

【0025】

非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化」形態は、非ヒトイムノグロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。最大の部分について、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト靈長類などの非ヒト種(ドナー抗体)の所望の特異性、親和性および収容力を有する超可変領域由来の残基で置き換誤差れたヒトイムノグロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの例において、ヒトイムノグロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基で置き換誤差れる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能のさらなる向上のためになされる。一般的に、該ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、該可変ドメイン中で、全てまたは実質的に全ての超可変領域は、非ヒトイムノグロブリンの超可変ドメインに対応し、全てまたは実質的に全てのFR領域は、ヒトイムノグロブリン配列のFR領域である。任意に、ヒト化抗体はまた、イムノグロブリン、典型的にはヒトイムノグロブリンの定常領域(Fc)の少なくとも一部を含む。さらなる詳細について、Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)参照。

【0026】

「单鎖Fv」または「sFv」抗体断片は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは、单一ポリペプチド鎖中に存在する。一般的に、Fvポリペプチドはさらに、V_HドメインとV_Lドメインの間に、sFvが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能に

するポリペプチドリンカーを含む。sFvの概要について、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994) 参照。

【0027】

IgGは、血液中に最も豊富な抗体の種類である(血清濃度は13mg/ml)。IgGの4つのサブクラスがあり、それらは全て単量体であり、通常抗原に対して非常に高い親和性を有する。産生される抗体IgGのサブクラスは、サイトカインの存在(特に、IL-4およびIL-2)に依存的であり、それぞれのクラスはそれら自身の特定の活性を有する。IgGは、血液および組織中の毒素(例えば細菌感染由来)の中和にも重要な役割を果たす。

【0028】

所定の時間での抗体の生物学的活性の変化が、例えば抗原結合アッセイにおいて決定されるように医薬製剤を調製した時点で発揮される生物学的活性の約20%以内(アッセイの誤差範囲内)である場合、抗体は、医薬製剤中で「その生物学的活性を保持する」。

【0029】

タンパク質、ポリペプチド、微小RNAおよび他の生体ポリマーなどの種々の治療剤も、持続放出のために製剤内に一体化され得る。一態様において、治療剤は、エリトロポイエチン(EPO)、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、成長ホルモン、成長ホルモン放出因子、神経成長因子(NGF)、顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージ-コロニー刺激因子(M-CSF)、血液凝固因子、インスリン、オキシトシン、バソプレシン、副腎皮質刺激ホルモン、上皮成長因子、血小板由来成長因子(PDGF)、プロラクチン、ルリベリン、黄体化ホルモン放出ホルモン(LHRH)、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、ソマトスタチン、グルカゴン、インターロイキン2(IL-2)、インターロイキン11(IL-11)、ガストリン、テトラガストリン、ペントガストリン、ウロガストロン、セクレチン、カルシトニン、エンケファリン、エンドルフィン、アンギオテンシン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、腫瘍壊死因子(TNF)、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)、ヘパリナーゼ、骨形態形成蛋白(BMP)、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド(hANP)、グルカゴン様ペプチド(GLP-1)、レニン、プラジキニン、バシトラシン、ポリミキシン、コリスチン、チロシン、グラミシジン、シクロスボリン、小干渉RNA(siRNA)、プラスミドDNAおよびアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)から選択される。

【0030】

抗アレルギー剤、抗不安薬、喘息治療薬、抗癌剤、高脂血症治療薬(hypolipemic agent)、ホルモン性避妊薬、抗鬱薬、抗糖尿病剤、鎮痛薬、抗無力症剤(antiasthetics)、抗高血圧薬、抗菌剤、抗生物質、睡眠薬、ホルモン治療薬、抗偏頭痛剤、過剰な体重を治療するために使用される薬物、抗パーキンソン症候群剤、精神遮断薬、非ステロイド性抗炎症剤、排卵誘発剤、粘液溶解剤、咳止め、勃起誘発剤および抗潰瘍剤として使用される治療剤が、持続送達のための明細書の製剤のコア構造に一体化され得る。好ましい態様において、発明は、インスリン、ロイプロリド、ゴナドレリン、ソマトスタチン、オクトレオチド、エンフビルチド(enfuviride)、カルシトニンおよびネシリチドから選択される治療剤を含む製剤に関する。

【0031】

別の態様において、治療剤は、アンクロド、アニストレプラーゼ、乳酸ビソルビン(bisobrin lactate)、ブリノラーゼ、ハーゲマン因子(例えば、第XII因子)断片、モルシドミン、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)、ウロキナーゼ、TFPI、プラスミンおよびプラスミノゲンなどのプラスミノゲン活性化因子、ならびに凝固因子IIa、Va、VIIa、VIIla、IXa、Xa、XIIaおよびXIIlaの阻害剤から選択される血栓溶解剤である。

【0032】

別の態様において、治療剤は、サイトカイン、増殖因子、インターロイキン、-インターフェロン、-インターフェロン、トランスホーミング増殖因子、好中球活性化ペ

10

20

30

40

50

プチド2およびそのアナログ、マクロファージ炎症タンパク質およびそのアナログ、および血小板第4因子およびトランスホーミング増殖因子、ならびにそれらの組合せから選択される細胞シグナル伝達分子である。

【0033】

別の態様において、治療剤は、アルクロフェナク、アルクロメタゾンジプロピオネート、アルゲストンアセトニド、アミラーゼ、アムシナファル(amcinafal)、アムシナファイド(amcinafide)、アンフェナクナトリウム、塩酸アミプリローズ(amiprilose hydrochloride)、アナキンラ、アニロラク(anirolac)、アニトラザフェン、アパゾン、アスピリン、バルサラジドニナトリウム、ベンダザック、ベノキサプロフェン、塩酸ベンジダミン、ブロメライン(bromelain)、ブロペラモール、ブデソニド、カルプロフェン、シクロプロフェン、シントゾン、クリプロフェン、プロピオン酸クロベタゾール、酪酸クロベタゾン、クロピラック、プロピオン酸クロチカゾン、酢酸クロメタゾン、コルトドキソン(cortodoxone)、デフラザコート、デソニド、デソキシメタゾン(desoximetasone)、デキサメタゾンジプロピオネート、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、二酢酸ジフロラゾン、ジフルミドンナトリウム、ジフルニサル、ジフルプレドナート、ジフタロン、ジメチルスルホキシド、ドロシノニド、エンドリソン(endrysone)、エンリモマブ(enlimomab)、エノリカム(enolicam)ナトリウム、エピリゾール(epirizole)、エトドラック、エトフェナマート、フェルビナク、フェナモール(fenamole)、フェンブフェン、フェンクロフェナク、フェンクロラック、フェンドサール(fendosal)、フェンピバロン、フェンチアザク、フラザロン(flazalone)、フルアザコート(fluazacort)、フルフェナム酸、フルミゾール、酢酸フルニソリド、フルニキシン、フルニキシンメグルミン、フロコルチンブチル、酢酸フルオロメトロン、フルクアゾン、フルビプロフェン、フルレトフェン、プロピオン酸フルチカゾン、フラプロフェン(furaprofen)、フロブフェン、ハルシノニド、ハロベタゾールプロピオナート、酢酸ハロプレドン、イブフェナック、イブプロフェン、イブプロフェンアルミニウム、イブプロフェンピコノール、イロニダップ、インドメタシン、インドメタシンナトリウム、インドプロフェン、インドキソール(indoxole)、イントラゾール、イソフルプレドンアセタート、イソキセパック、イソキシカム、ケトプロフェン、塩酸ロフェミゾール、ロモキシカム(lomoxicam)、ロテブレドノールエタボナート、メクロフェナム酸ナトリウム、メクロフェナム酸、メクロリソングチラート、メフェナム酸、メサラミン、メセクラゾン、メチルブレドニゾロンスプレタナート、モルニフルマート、ナブメトン、ナブロキセン、ナブロキセンナトリウム、ナブロキソール(naproxol)、ニマゾン、オルサラジンナトリウム、オルゴテイン(orgotein)、オルパノキシン、オキサブロジン、オキシフェンブタゾン、塩酸パラニリン、ペントサンポリ硫酸ナトリウム、フェンブタゾンナトリウムグリセラート、ピルフェニドン、ピロキシカム、桂皮酸ピロキシカム、ピロキシカムオラミン(piroxican olamine)、ピルプロフェン、ブレドナザート(prednazate)、プリフェロン(prifelone)、プロドール酸、プロクアゾン、プロキサゾール、クエン酸プロキサゾール、リメキソロン、ロマザリット、サルコレックス(salcolex)、サルナセジン(salnacedin)、サルサラート、サリチラート、サンギナリウムクロライド、セクラゾン、セルメタシン(sermetacin)、スドキシカム、スリンダク、スプロフェン、タルメタシン、タルニフルマート、タロサラート、テブフェロン、テニダップ、テニダップナトリウム、テノキシカム、テシカム、テシミド、テトリダミン、チオピナック、チキソコルトールピバラート、トルメチン、トルメチンナトリウム、トリクロニド、トリフルミダート、ジドメタシン、グルココルチコイドおよびゾメピラックナトリウムから選択される抗炎症剤である。

【0034】

別の態様において、治療剤は、クロピドグレル、チクロピジン、プラスグレル、スルフィンピラゾン、AZD6140、AZD6933およびAR-C69931から選択されるADP受容体アンタゴニスト；アブシキシマブ、フラダフィバン、ラミフィバン、ロトラフィバン(lotrafiban)、オルボフィバン、ロキシフィバン、シプラフィバン、チロフィバンおよびキセミロフィバンから選択される糖タンパク質IIb/IIIa受容体阻害剤である。

10

20

30

40

50

【0035】

別の態様において、治療剤は、ビタミンKアンタゴニスト、クマリンおよびクマリン誘導体、ワルファリンナトリウム；ヘパリン；アルデパリンナトリウム；ビバリルディン；プロミンジオン；クマリンダルテパリンナトリウム；デシリジン；ジクマロール；リアボラートナトリウム；メシリ酸ナファモスタッフ；フェンプロクモンスルファチド；およびチンザパリンナトリウムから選択される抗凝固剤である。

【0036】

別の態様において、治療剤は、ベザフィブラーート、シプロフィブラーート、クロフィブラーート、エトフィブラーート、フェノフィブラーート、ゲムフィブロジル、ロニフィブラーートおよびシンフィブラーート；スタチン、アトルバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンおよびシンバスタチン；ナイアシンまたはアシピモックス、ニコチン酸アルミニウム、ニセリトール(ペントエリスリトールテトラニコチン酸)、ニコフラノースおよびニコチニルアルコールを含むナイアシン誘導体；コレセベラム、コレスチラミン、コレスチポールおよびコレキストランを含む胆汁酸捕捉剤；アナセトラピブなどのCETP阻害剤；ベンフルオレックス；コレスチラミン；デキストロチロキシン；エゼチミブ；ラロピプラント；メグルトール；3トリグリセリド；ポリコサノール；プロブコール；ならびにチアデノールから選択される脂肪低下剤である。

【0037】

別の態様において、治療剤は、アスピリン、セレコキシブ、ルミラコキシブおよびエトトリコキシブから選択されるシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)阻害剤である。

【0038】

別の態様において、治療剤は、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、アンギオテンシンIIの異化作用を活性化する薬剤、およびアンギオテンシンIIが最終的に誘導されるアンギオテンシンIの合成を防ぐ薬剤から選択されるアンギオテンシン系阻害剤；ベナゼブリル、カブトブリル、シラザブリル、デラブリル、エナラブリル、ホシノブリル、イミダブリル、リシノブリル、モエキシブリル、ペリンドブリル、キナブリル、ラミブリル、スピラブリル、テモカブリル、トランドラブリルおよびゾフェノブリルから選択されるACE阻害剤；アジルサルタン、カンデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、オルメサルタン、タソサルタン、テルミサルタンおよびバルサルタンから選択されるアンギオテンシンII受容体アンタゴニスト；ブスルファン、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、ドキソルビシン、エストラムスチン、ヘプスルファン(hepsulfan)、ヒドロキシカルバミド、イホスファミド、ロムスチン、メルファラン、メトトレキサート、ピボプロマンおよびチオテバから選択される化学療法抗癌薬である。

【0039】

別の態様において、治療剤は、アスピリン、塩酸-[4-(2-カルボキシ-1-プロペニル)ベンジル]ピリジン(OKY-1555)および1-カルボキシヘキシル-、1-カルボキシヘプチルおよび1-カルボキシ-オクチル-イミダゾール、4(Z)-6-[(4RS,5SR)-4-(2-ヒドロキシフェニル)-1,3-ジオキサン-5-イル]-4-ヘキセン酸、BM-573、カモナグレル、CGS-12970、ダルトロバン(daltroban)、ダズメグレル(dazmegrel)、DTTX30、E-6700、FCE-27262、イミトロダスト(CS-518)、イスボグレル(isbogrel)(CV-4151)、ケトコナゾール、KK-505、KY-063、ナファグレル(DP-1904)、オザグレル(OKY-046)、ピコタミド、ピルマグレル(pirmagrel)(CGS-13080)、リドグレル、SQ29548、ロラファグレル(rolafagrel)(FCE-22178)、サチグレル(satigrel)(E-5510)、スロトロバン(sulotroban)、テルボグレルおよびUK 38485から選択されるトロンボキサンシンテターゼ阻害剤である。

【0040】

別の態様において、治療剤は、AT9283、VX-680、MK0457、TG101209、INCB018424、LS104、XL019、TG101348、ボリノスタッフ、4-アリール-2-アミノ-ピリジンおよび4-アリール-2-アミノアルキル-ピリジンから選択されるJAK-2阻害剤である。

10

20

30

40

50

【0041】

治療剤の「治療有効量」は、抗体が効果的な治療について、疾患または障害の予防または治療に有効な量をいう。「疾患または障害」は、抗体を用いた治療から利益を被る任意の状態である。これは、慢性および急性の障害または疾患、例えば哺乳動物が、問題の該障害にかかり易くなるこれらの病理学的状態を含む。

【0042】

ペプチド配列は、アミノ末端がアセチル基でキャップされるように示される。しかしながら、アミノ末端キャップを有さないペプチドも使用され得る。C末端にカルバモイル基を有するペプチド配列が合成される。しかしながら、カルボン酸C末端を有するペプチド配列も使用され得る。

10

【実施例】

【0043】

実施例

材料および方法

化学物質および試薬。ac-(RADA)₄-CONH₂およびac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチドは、CPC Scientific (Sunnyvale, CA, USA)から粉末形態で入手し、MIT Biopolymers Lab (Cambridge, MA, USA)で特徴付けを行った。ヒトポリクローナルIgGは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入した。ヒトIgGのpI 7.1は、IPGストリップおよびタンパク質標準(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)ならびにIPGphor系(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を使用して、PhastSystem中、等電点焦点(isoelectric focusing)ゲル電気泳動により決定した。

20

【0044】

IgG放出実験。良く確立されたプロトコル[9,10,11,12,13]を使用して、ペプチドヒドロゲルを形成した。簡潔に、ac-(RADA)₄-CONH₂およびac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチドを、脱イオン水に溶解して、探査超音波処理器を使用して、使用前に30分間超音波処理した。ペプチド水溶液を、5 μMの終濃度のIgGを含むリン酸緩衝化食塩水(PBS、pH=7.4)と混合した。40 μlの混合物を200 μlポリプロピレンチューブに移して、約10分ゲル化させた。次いで、70 μlのPBSを40 μlのヒドロゲルにゆっくり添加した。完全なシンク条件(sink conditions)を満たして、タンパク質放出プロフィールの決定を可能にするために、40 μlの上清を、等容量の新しいPBSで、頻繁な時点で交換した。一連の測定の間にヒドロゲルの体積は変化しなかったので、IgG放出は、ヒドロゲル分解または膨潤が原因とはなり得なかった。実験は、ポリプロピレンチューブの表面に検出可能なIgGの吸着が何らないことを示した。

30

【0045】

多層ヒドロゲル構造の形成は、2工程のゲル化方法を含んだ。ac-(RADA)₄-CONH₂ペプチド溶液(1.0%w/v)と、5 μM IgGを含んだPBS溶液の混合の際に、発明者らは、針の先端に液滴を形成するようにシリンジを使用し、10分間待機させてゲル化させた。自己組織化処理により、シリンジ針の先端に引っかかる球形の幾何学を有するヒドロゲルが生じた。次いで、異なるシリンジを使用して、発明者らは、ac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチド水溶液と、PBSを混合して、0.6%w/vのペプチド終濃度を有する溶液を得た。最終工程において、ゲル化が起こる前に、発明者らは慎重に、ac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチド溶液の液滴を接触させ、予め形成したac-(RADA)₄-CONH₂ペプチドヒドロゲルを封入し、「タマネギ様」多層ヒドロゲル構造(図2)を作製した。多層ヒドロゲルをポリプロピレンチューブの底におき、先の段落に記載されるように拡散実験を行った(図2A)。

40

【0046】

自己組織化ペプチドナノ線維スキャホールドヒドロゲルからのIgG放出実験は、室温で行った。上清中の放出されたIgGの濃度は、280nmで分光測光法的に決定した(NanoDrop ND-1000 UV-Vis, NanoDrop Technologies, Delaware, USA)。全てのデータ点は4試料の平均を表す。計算したパラメーターの不確実性は、共通誤差伝播技術により推定し、すなわち関数 $y = g(x_1, x_2)$ について、計算した値中の誤差は、式

50

【数1】

$$\sigma_y^2 = (\partial g / \partial x_1)^2 \sigma_{x_1}^2 + (\partial g / \partial x_2)^2 \sigma_{x_2}^2$$

を使用して決定した。

【0047】

多層二成分ヒドロゲル系の顕微鏡可視化。多層ヒドロゲルの可視化の前に、発明者らは、ac-(KLDL)₃-CONH₂およびac-(RADA)₄-CONH₂ペプチド溶液と、Alexa-488(緑色)およびCY3(赤色)蛍光色素溶液をそれぞれ混合した。多層ヒドロゲルは、1.0%w/v ac-(RADA)₄-CONH₂(コア)および0.6%w/v ac-(KLDL)₃-CONH₂(シェル)の組成を有する2つの同一中心球体からなる。蛍光顕微鏡(Hamamatsu cameraおよびOpenlab画像取得ソフトウェアを備えたNikon TE300)を用いて可視化を行った。 10

【0048】

放出されたIgG濃度からの拡散率の決定。分子的に分散した拡散剤を含むヒドロゲルマトリクスについて、見かけの分散係数は、拡散のフィックの第2原理の1次元不安定状態形式(1-D unsteady-state form)を使用して、計算し得、これは、小さな時間(t)の値について[21,22]:

【数2】

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \left(\frac{16 D_{app.} t}{\pi H^2} \right)^{0.5} \quad (1)$$

20

により表され、式中、D_{app.}は、見かけの拡散率であり、M_tおよびM_∞は、tおよび無限の時間(∞)のそれぞれの後にヒドロゲルから放出される拡散化合物の累積質量である。ウェルの内側のヒドロゲルマトリクスの厚さ(H)は、ペプチドIgG溶液の体積(すなわち、40 μl)およびポリプロピレンチューブのウェルの寸法から計算した。D_{app.}は、M_t/M_∞対 t^{0.5}、0 < M_t/M_∞ < 0.6のデータを適合する直線の傾斜から得られ得る。

【0049】

円偏光二色性分光分析(CD)。190nm～260nmの遠紫外線CDスペクトルを室温で記録した(A viv 62DS分光器)。2か月後のヒドロゲルから放出されたIgGのCDスペクトルを、同じ濃度で新たに調製したIgG溶液のCDスペクトルと比較した。スペクトルは1nmの段差で記録し、2秒間にわたり平均した。全ての測定は、PBS、pH7.4中1mm石英キュベット中で行った。4つのスキャンの蓄積および平均からスペクトルが得られた。同じ条件下で得られたIgGなしのバッファのプランクスペクトルを引いた。 30

【0050】

蛍光放射分光分析。放出されたIgGおよび天然のIgGの蛍光放射は、Perkin-Elmer LS-50B分光器を使用して、1cmの経路長さの石英キュベットを使用して室温で測定した。300nmの励起で、310nm～400nmの放射スペクトルを記録した。励起および放射スリットの幅は、それぞれ5.0nmおよび2.5nmに設定した。試料の状態は、CD測定について記載されたものと同じであった。

【0051】

IgGのFCS機能アッセイ。抗体-抗原結合のFCS特徴付けは、Fluoropoint-分子検出系(Olympus, Tokyo, Japan)を使用して、室温で行った。タンパク質の蛍光シグナルは、発明者らが使用した一分子分析計による検出には小さいので、発明者らは、標準タンパク質標識キット(Molecular Probes Inc., Eugene, OR)を使用して、ヒトIgGを、強力なフルオロフオアAlexa-647で標識した。共焦点フェムトリットル体積と交差するAlexa-647蛍光標識IgG分子を、He-Neレーザーを用いて633nmで励起させ、これを測定して(単位時間当たりの計測)、異なる濃度でのそれぞれの蛍光標識IgGの較正曲線を使用して、濃度に変換した。 40

【0052】

共焦点体積中の蛍光強度の変動は、時間の関数として記録して、自己相関関数g(τ)は、蛍光分子および局所環境における拡散力学の特性により影響される[^{16,17}]。溶液中の単分散粒子の変則3次元拡散(anomalous 3-D diffusion)の場合の自己相関関数を規定する

50

ために[16, ¹⁸, ¹⁹]、Fluoropoint系では式2:

【数3】

$$g(\tau) = 1 + \left(\frac{1 - F_{trip} + F_{trip} e^{-\tau/\tau_{trip}}}{N} \right) \left(\frac{1}{1 + (\tau/\tau_D)} \right) \left(\frac{1}{1 + (1/s^2)(\tau/\tau_D)} \right)^{0.5} \quad (2)$$

を使用した(式中、 $g(\tau)$ は、3重状態の画分集団(F_{trip})および減衰時間(τ_{trip})の関数であり、 N は、試料体積中の分子の数であり、 τ_D は、変移拡散時間であり、 s は、円柱形検出体積を説明する因子であり、かつ円柱の規定面の半径(r_0)をその高さ(r_1)の2分の1で割った比に等しい)。十分に異方性の溶液中、拡散分子を共焦点体積よりも有意に小さくすると、分子(例えばIgG)の拡散係数Dは、

【数4】

$$D = \omega_0^2 / 4\tau_D$$

と等しくなる。自己相関プロフィールは、単一および複数の変移拡散時間を使用して適合された。全てのデータ点は、4または8試料の平均を表す。

【表4】

16 R. Rigler, E.S. Elson, *Fluorescence correlation spectroscopy: Theory and applications*, Springer, NY, 2001.

17 W.W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy: inception, biophysical experimentations, and prospectus*, *Appl. Opt.* 40 (2001) 3969–3983.

10

20

【表5】

18 M.J. Saxton, *Anomalous diffusion due to obstacles: a Monte Carlo study*, *Biophys. J.* 66 (1994) 394-401.

19 O. Krichevsky, G. Bonnet, *Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications*, *Rep. Prog. Phys.* 65 (2002) 251-297.

【0053】

PBS中のAlexa-647標識IgGを、室温で1時間、10倍過剰のPC-BSA抗原(Athera Biotechnologies AB, Sweden)と相互作用させた。IgGと抗原の間の任意の相互作用は、分子量(およびサイズ)複雑さの増加をもたらし、これは遊離IgGと比較して、より遅い変移拡散時間(τ_D)を特徴とした。IgGの抗原への非特異的結合の影響は、異なる濃度のTween界面活性剤の存在下で結合親和性を測定することにより評価され、0.5% Tweenでは、非特異的結合は最小であったので、全てのIgG-抗原結合試験は、このTween濃度で行った。上述のようにFCSアルゴリズムを使用してデータを分析し、1つおよび複数の成分を使用して自己相関関数を適合させた。

30

【0054】

IgGのQCM機能性アッセイ。天然のIgGおよびヒドロゲルから放出されたヒトIgGの生物学的活性も、QCM(Attana A200, Stockholm, Sweden)により評価した。構成は、両側に電極を有する薄い圧電性石英板からなる。振動電流に連結した場合、石英結晶は、物質が結晶の表面に吸着した際に記録される周波数が変化するように、結晶質量に感受性の共鳴周波数で振動する。天然のヒトIgGとヒドロゲルから放出されたヒトIgGの結合特性を比較するために、PC-BSA抗原を、アミンカップリングキットを使用してチャンネルAおよびBに共有結合的に固定した。予備実験により、非特異的な結合は、0.05% Tween界面活性剤中で最小であることが示されたので、全てのIgG-抗原結合試験は、このTween濃度で行った。

40

【0055】

35 μLの20 μg/mLヒトIgGを、84秒間、20 μL/分の流速で、QCM表面に固定化されたPC-BSAに注射して、PC-BSAに対するIgGの結合のための表面の質量増加を測定することにより、室温での動力学的データを得た。陰性対照について、(i) BSAが固定された表面に対するヒトポリクローナルIgG、(ii) PC-BSAが固定された表面に対するモノクローナル抗Hisタ

50

グ抗体、および(iii) PC-BSAが固定された表面に対する抗ロドプシン抗体の注射の際に観察された信号からなる動力学的データを修正した。抗体と抗原の間の結合反応事象について単純な1:1結合モデルを使用して、Attache Evaluationソフトウェアを用いてデータを分析した。分析から、結合 k_a および解離 k_d の速度定数を計算し、抗原についての天然のIgGおよび放出されたIgGの、 $K_D = k_d / k_a$ で規定される結合親和性定数を計算した。 χ^2 値および0に近い残差に基づいて適合度を評価した。

【0056】

結果および考察

ペプチドスキャホールドヒドロゲルを介したヒトIgG放出。図3Aに見られるように、IgGの最初の早い放出は、第1の時間(first hour)内に観察された(バースト効果)。これは、溶媒/ヒドロゲル界面にあるかまたは近くにあり、上清溶液に急速に移動(escape)したIgG分子のためである可能性が高い。以前の研究により、このペプチドヒドロゲルを介したタンパク質の放出は、タンパク質のサイズに依存することが示された[10]。小さいタンパク質はより早く放出されるが、大きなタンパク質(約150kD)であるIgGはゆっくり放出された。ここで、IgG放出は3日後には完了しなかったことが示された。ここで、発明者らは、ペプチドスキャホールドヒドロゲルを介したIgGの放出は、3か月後でも漸近的にプラトー値に達しなかったことを示す。ヒドロゲル系においてタンパク質放出がほとんど100%に達しない理由は、拡散物(diffusant)の自由な移動を可能にしない高度にもつれたヒドロゲルのナノ線維ドメイン中にタンパク質分子が物理的にトラップされるためである。しかしながら、自己組織化ペプチドヒドロゲルは生分解性であるので、生きた生物に導入する際に、ヒドロゲルは一ペプチドモノマー、その後アミノ酸に分解される。このプロセスは、宿主組織に放出されるスキャホールドヒドロゲル中の全成分の負荷を可能にする。

【0057】

ヒトIgGの拡散に対するペプチドスキャホールドヒドロゲル密度の効果。IgGの放出プロフィールに対するヒドロゲル密度の影響を調べるために、自己組織化ペプチド濃度を変えた。ペプチド濃度を上げることにより、より高い密度のナノ線維のネットワークが生じ、IgGの放出が妨げられた。図3Aは、0.5%w/v (99.5%水)、1.0%w/v (99%水)および1.5%w/v (98.5%水)のペプチド濃度を有するac-(RADA)₄-CONH₂ペプチドヒドロゲルならびに0.3%w/v (99.7%水)および0.6%w/v (99.4%水)の濃度を有するac-(KLDL)₃-CONH₂ペプチドヒドロゲルを用いたヒドロゲルからのIgGの放出速度を示す。より高い密度のac-(KLDL)₃-CONH₂ヒドロゲルは、試料の取り扱いを困難にする硬さの増加を特徴とするので、試験しなかった。結果は、該ヒドロゲルからのIgG放出は、ペプチドナノ線維密度を変えることにより制御され得ることを示す。

【0058】

薬物放出のための複雑な多層ペプチドヒドロゲル構造の構築。二層ヒドロゲル系は、2つの画分からなる。図2Aおよび2B～Dは、二成分のそれぞれに色素が付加されて可視化が容易になる二成分ペプチドヒドロゲルの構造を示す。コア中のヒドロゲル球体は、ac-(RADA)₄-CONH₂ペプチドの自己組織化により形成され、CY3色素(赤色)を含み、封入第2球体は、ac-(KLDL)₃-CONH₂で構成され、Alexa-488(緑色)フルオロフォアを含む。明視野顕微鏡検査および蛍光顕微鏡検査により、それぞれのヒドロゲルの外形を示す(図2B～D)。色素の拡散は、結果的にac-(KLDL)₃-CONH₂およびac-(RADA)₄-CONH₂ヒドロゲルそれぞれへのCY3およびAlexa-488の拡散を生じるが、二成分ペプチドヒドロゲル系全体を介した均一な拡散が予想され、色素の最初の分散は、それぞれのヒドロゲル球体の形状および寸法を明確に規定する。

【0059】

抗体放出実験において、1.0% ac-(RADA)₄-CONH₂ペプチドのゲル化により形成されるコアには抗体が充填され、第2層(シェル)は、ac-(KLDL)₃-CONH₂ヒドロゲルからなり、抗体を含まず、コアを封入する。多層ヒドロゲルの形成により、最初のタンパク質バースト放出が、一成分ヒドロゲルにおいて観察されるものと比べて有意に小さくなる系が生じた(図3Aおよび4A)。そのため、多層ヒドロゲルを介したIgG拡散は見かけ上0に近い次数の拡

10

20

30

40

50

散プロフィールを生じる(図4Aおよび4B)。

【0060】

多層自己組織化ペプチドヒドロゲル技術は、例えば同心円の針を有する2画分(two-compartment)シリングを使用して、2つのペプチド溶液を同時に注入することにより、ベンチからベッドのかたわらへと容易に移動可能である。ペプチド溶液と生物学的液の相互作用の際にゲル化が起こり、活性化合物の放出は、長時間継続し得る。

【0061】

ヒドロゲルスキャホールドからのIgG拡散率。20 で、無限希釈条件の水中的IgGの拡散係数は、ストークス-AINシュタインの方程式

【数5】

$$D_{S-E} = k_B T / 6\pi\eta r_h$$

(式中、 k_B は、ボルツマン定数であり、Tは、培地の絶対温度であり、 η は、溶媒の動的粘度(1.002cPとする)であり、 r_h は、IgGの流体力学的半径である^[20])を使用して、 $0.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ であると計算された。しかしながら、この試験においてマイクロモルのIgG濃度を使用する場合、一分子分析により、ストークス-AINシュタインの方程式が溶液中のIgG拡散率を10~20%まで過大評価する^[10]ことが示されることに注意すべきである。ストークス-AINシュタインの方程式は無限希釈された分子のために開発され、これにはブラウン運動が続くので、マイクロモル濃度での分子の密集(crowding)は、分子の移動を遅くすることにより拡散に影響を及ぼし得る。

【表6】

²⁰ J.K. Armstrong, R.B. Wenby, H.J. Meiselman, T.C. Fisher, The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation, *Biophys. J.* 87 (2004) 4259-4270.

【0062】

ペプチドヒドロゲルを介した放出の間のIgGの拡散係数を計算するために、発明者らは、図3に示される放出プロフィールを使用した。式1に記載される一般的に使用されるフィックのモデルの適用は、ストークス-AINシュタインの方程式を使用した溶液中のIgGについて決定されたものとは有意に異なる(すなわち50%~80%)ヒドロゲル内の見かけのIgG拡散係数を生じる。フィックの原理を使用した拡散係数の計算のモデルは、低分子、拡散物の無限希釈およびヒドロゲルを介した分子の拡散がブラウン運動のみに依存することを推定して開発された。式1は、これらの条件が適用されない場合であっても見かけの拡散係数を決定するために一般的に使用される。そのようにする理由は、拡散率を決定するための他の容易に移動可能な方法がない場合、系の考察を容易にすることである。ヒドロゲル系において、これらの推定はほとんど満足されない。時間の平方根の関数としての放出データをプロットすること(図3C)は、拡散機構が二相性であることを示した。それぞれのプロットの最初の直線部分は、拡散が制御されたペプチドヒドロゲルを介したIgGの放出を示し、これを用いてフィックの原理(式1)に基づいて拡散係数を計算する^[21, 22]。より長い時間での直線からのずれは、フィックの原理に基づかない変則的な拡散に関連し得る。小さなサイズのヒドロゲル孔および/または拡散IgG分子とヒドロゲルのペプチドナノ線維の間の特異的な相互作用による拡散の阻害も、フィックの原理からのずれの原因であり得る。

【0063】

放出されるIgGの立体構造的特性。タンパク質不活性化を生じるタンパク質凝集事象およびタンパク質-ペプチド相互作用は、ペプチド溶液中のIgG残留の間、自己組織化およびナノ線維形成の間、または放出プロセスの間に起こり得る。封入の2か月後のペプチドヒドロゲルから放出されるIgGの立体構造状態についての洞察を得るために、遠UV CDおよび蛍光分光分析を使用して、二次構造および三次構造の特性のそれぞれを調べた。

【0064】

天然のIgGのCDスペクトルは、IgGについての論文に報告されたもの^[23]と同じであった

10

20

30

40

50

。図5Aに見られ得るように、ヒドロゲルから放出されるIgGのCDスペクトルは、新たに調製したIgG溶液のスペクトルと非常に似ていた。ダイオードまたはHT(すなわち、全吸収)レベルが高い200nm未満の波長でのいくつかのスペクトルにおいて、小さなずれが観察された。スキヤホールドから解離したナノ線維の可能性のある存在と合わせて、比較的低い濃度の放出IgGは、スペクトルのこの領域で観察された低い信号対雑音比のためであり得た。しかしながら、218nmの横円率からわかるIgGのシート含有率は、放出プロセスの間に影響を受けなかった。

【0065】

トリプトファンを励起する300nmの励起で蛍光放射スペクトルを記録した。放射は、タンパク質の3D構造内のトリプトファンの微小環境に感受性があるので、蛍光放射を使用して、ヒドロゲルを介して放出されるIgGの三次構造変化を検出し得る。最大放射の波長における赤色のシフトは、トリプトファンが極性溶媒に曝露される結果タンパク質が折りたたまれないことを示す。IgGの蛍光放射スペクトルは、文献の報告^[24]と同様であった。図5Bの洞察により、同じIgG濃度で、放出されたIgGの放射スペクトルは、放射最大および蛍光強度の両方に関して天然のIgGのものと同様であることが示され、これは、IgGの封入および放出は、三次構造の変化を誘導しなかったことを示す。

【表7】

- 21 J. Crank, G.S. Park, *Diffusion in polymers*, Academic Press, NY, 1968.
- 22 T. Higuchi, Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 1145-1149.
- 23 K. Ikeda, K. Hamaguchi, S. Migita, Circular dichroism of Bence-Jones proteins and immunoglobulins G, *J. Biochem.* 63 (1968) 654-660.
- 24 Y. Nishiyama, Y. Mitsuda, H. Taguchi, S. Planque, M. Hara, S. Karle, C.V. Hanson, T. Uda, S. Paul, Broadly distributed nucleophilic reactivity of proteins coordinated with specific ligand binding activity, *J Mol. Recognit.* 18 (2005) 295-306.

【0066】

放出されたヒトIgGの機能性アッセイ。ヒトIgGの下位集団は、肺炎連鎖球菌を含む多くのヒト感染微生物に存在する一般的な抗原であるホスホリルコリン(PC)に結合することが知られているので^[25, 26, 27, 28]、PC-コンジュゲートBSA (PC-BSA)抗原を使用して、天然のIgGおよびヒドロゲルから放出されたIgGの機能性を調べた。この試験に使用したPC-BSA試料は、1BSAあたり約17個のPC分子を含む。一分子FCS検出系を使用してヒトIgGとPC-BSA抗原の相互作用を調べた。一成分および複数成分を使用して自己相関関数を適合させることによりFCSデータ分析を行った。それぞれのデータセットについての適合度は、²パラメーターの値および0の周囲に均一に分布された残渣の洞察により判断した。全てのケースにおいて最も単純なモデルを選択した。より少ない独立成分を有するモデルについての実験データの試みの適合により、高い²値が得られた。(i)バッファ溶液、(ii)抗原存在下の標識なしIgG分子、(iii)PC-BSA抗原存在下の熱変性標識IgG、および(iv)BSA(PCハブテンなし)存在下の標識IgGの対照実験も行って、測定可能な相互作用は見られなかった。

【表8】

- 25 M.A. Leon, N.M. Young, Specificity for phosphorylcholine of six murine myeloma proteins reactive with pneumococcus C polysaccharide and B-lipoprotein, *Biochemistry* 10 (1971) 1424-1429.
- 26 L.G. Bennett, C.T. Bishop, Structure of the type XXVII *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcal) capsular polysaccharide, *Can. J. Chem.* 55 (1977) 8-16.
- 27 C.P.J. Glaudemans, B.N. Manjula, L.G. Bennett, C.T. Bishop, Binding of phosphorylcholine-containing antigens from *Streptococcus pneumoniae* to myeloma immunoglobulins M-603 and H-8, *Immunochemistry* 14 (1977) 675-679.
- 28 D.E. Briles, J.L. Claflin, K. Schroer, C. Forman, Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*, *Nature* 294 (1981) 88-90.

【0067】

10

20

30

40

50

データ分析により、1つの D は、遊離 IgG の自己相関関数を説明するのに十分であることが示された。過剰な抗原を添加した際に、FCS データの分析のために 3 つの D 値が必要であった(図6)。IgG と 10 倍過剰の PC-BSA 抗原(すなわち、50 μ M) の相互作用の際に、分散時間に基づいて、3 つの異なる種: 遊離の結合していない IgG 分子、および 1 つの抗原分子または 2 つの抗原分子に結合した IgG 分子が同定された(図6)。データ分析により、抗原の存在に関係なく、遊離 IgG 分子は、検出体積を介して約 1,060 μ 秒の拡散時間を有することが示された。ペプチドヒドロゲルを介した放出の前後の IgG の拡散時間の比較により、抗原との相互作用の際に同じ型の IgG- (PC-BSA)_x 複合体が形成されたことが示された。これらの複合体は、1 つまたは 2 つの抗原分子のそれぞれへの IgG の結合に対応して、約 1,135 μ 秒および 1,230 μ 秒の拡散時間を有した。図6 はまた、ヒドロゲルを介した放出の前後のそれぞれの種類の IgG 分子(すなわち、遊離および 1 つまたは 2 つの抗原分子と相互作用)の割合は同様であったことを示す。これらの結果は、PC-BSA 抗原に対する IgG の結合親和性は、ペプチドヒドロゲルからの放出に応じて変化しないので、IgG の生物学的活性は、ヒドロゲルへの封入およびヒドロゲルからの放出により影響を受けないことを示唆する。

【 0 0 6 8 】

ポリクローナルヒト IgG 試料中の比較的高い割合の抗 PC IgG 分子(図6)は、さらなる調査を促した。文献の報告により、ヒト血清中のかなりの割合の抗 PC-BSA 抗体、すなわち 100 ~ 800 μ g/ml も、ラジオイムノアッセイ法およびいくつかの個体由来の血液試料を使用して、Scott らにより以前に観察されたことが示された^[29]。これらの値および約 8 ~ 16 mg/ml のヒト血清中の IgG の濃度に基づいて、一分子分析を使用して観察された比較的高い割合の抗 PC 抗体が妥当であることが示唆される。発明者らの実験において、PC-BSA は、1 BSA タンパク質単位当たり約 17 個の PC 基を含む。これは、FluoroPoint により観察された結合は、非特異的な結合のためではなく、抗 PC イムノグロブリンの PC-BSA 抗原への高いアビティの結果であることを示唆する。他の供給源由来のヒト IgG 試料を使用してこの観察を再現できるかどうかを決定するために、さらなる試験が必要である。

【 表 9 】

29 M.G. Scott, D.E. Briles, P.G. Shackelford, D.S. Smith, M.H. Nahm, Human-antibodies to phosphocholine. IgG anti-PC antibodies express restricted numbers of V-regions and C-regions, J. Immunol. 138 (1987) 3325-3331.

【 0 0 6 9 】

ペプチドスキャホールドヒドロゲルから放出される前後のヒト IgG の機能性を試験するために、QCM 技術も使用した。IgG 機能性についての基準は、モノクローナル IgG と PC-BSA 抗原の間の結合の速度および親和性定数であった。QCM の金表面に固定された PC-BSA との相互作用の際に、ペプチドヒドロゲル中 48 時間、1 か月および 2 か月後に、放出されたヒト IgG は、天然の IgG と比較して、機能的な変化を起こさなかったことが示された。図 7 におけるデータの適合の際に、力学的分析により、天然の IgG について、結合 $k_a = 9.47 \pm 0.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ および解離 $k_d = 1.65 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の速度定数は、ヒドロゲルから放出された IgG の $k_a = 11.85 \pm 0.10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d = 2.39 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ について観察されたものと同様であることが示された。さらに、天然の IgG およびヒドロゲルから放出された IgG についての結合定数、 $K_D = 17.4 \pm 0.2 \text{ nM}$ および $K_D = 20.2 \pm 0.2 \text{ nM}$ はそれぞれ同様であった。これらの結果により一分子分析が確認され、放出後の抗体の機能は、一連の放出実験の際に、ペプチドヒドロゲルとの相互作用により影響を受けなかったことが示される。

【 0 0 7 0 】

結論

持続薬物送達の主要な目標の 1 つは、特定の組織に治療を効率的に方向づけることである。副作用を有する薬物の場合、局所送達は、患者に対しより低い毒性の副作用をもたらす。生理学的条件下でゲル化する注射可能自己組織化ペプチドスキャホールド系は、活性な抗体を特定の組織中局所的に、長期間にわたり放出する免疫療法などの持続放出適用について、確固とした系になる可能性を有する。この研究において、ヒト抗体は ac- (RADA)₄ -CONH₂ または ac- (KLDL)₃ -CONH₂ ペプチドヒドロゲルから 3 か月の期間にわたりゆっくり放

10

20

30

40

50

出され、さらに放出速度は、ヒドロゲルを形成する自己組織化ペプチドのアミノ酸配列およびヒドロゲル中のペプチドナノ線維の密度に依存したことが示される。効率的な制御放出系は、生物学的に活性なタンパク質を提示するはずである。ヒドロゲルから放出される抗体の二次および三次構造ならびにそれらの生物学的活性を調べ、それらは、ヒドロゲルへの封入およびヒドロゲルからの放出により影響を受けないことが示された。これらの結果は、新規の、抗体および他のタンパク質の持続放出のためにテーラーメイドのプログラム可能なペプチドヒドロゲルを作製する機会を提示する。ペプチドヒドロゲル系は、IgGおよび他の治療化合物の放出を制御するために、容易に設計および合成され得る。ペプチド配列のプログラム可能性は特有であり、ナノ線維の特性を分子レベルで制御し、次いで生体分子の拡散および放出速度を変化し得る手段を可能にする。

10

【0071】

この発明は、その好ましい態様を参照して具体的に示され、記載されるが、添付の特許請求の範囲に包含される発明の範囲を逸脱することなく、形態および詳細における種々の変化が該発明においてなされ得ることが、当業者には理解されよう。

【0072】

ペプチド配列表

ac-(RADA)₂-CONH₂ (配列表:1)

ac-(RADA)₃-CONH₂ (配列表:2)

ac-(RADA)₄-CONH₂ (配列表:3)

ac-(RADA)₅-CONH₂ (配列表:4)

ac-(KLDL)₂-CONH₂ (配列表:5)

ac-(KLDL)₃-CONH₂ (配列表:6)

ac-(KLDL)₃-CONH₂ (配列表:7)

ac-(KLDL)₄-CONH₂ (配列表:8)

ac-(KLDL)₅-CONH₂ (配列表:9)

KLEALWLGF₂GFFILG₃ISYIR (配列表:10)

KLEALYI₁IMVLGF₂GFFILG₃IMLSYIR (配列表:11)

20

【図1】

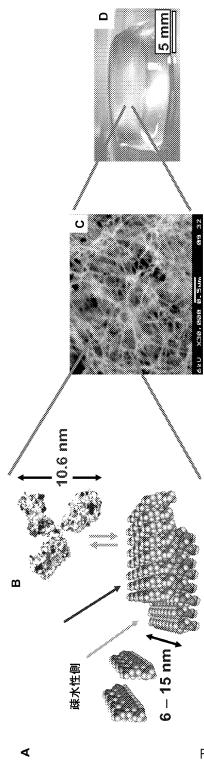


FIGURE 1

【図2】

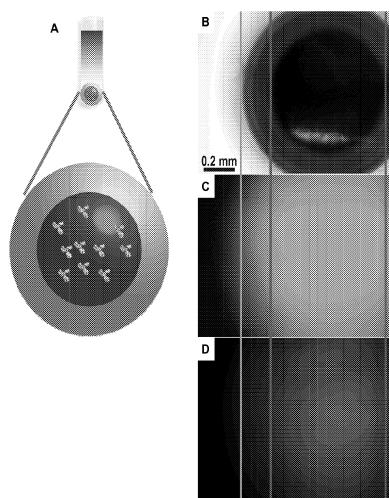


Figure 2

【図3】

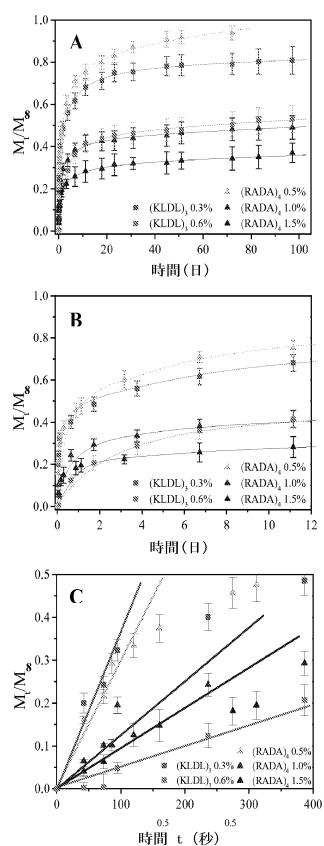


Figure 3

【図4】

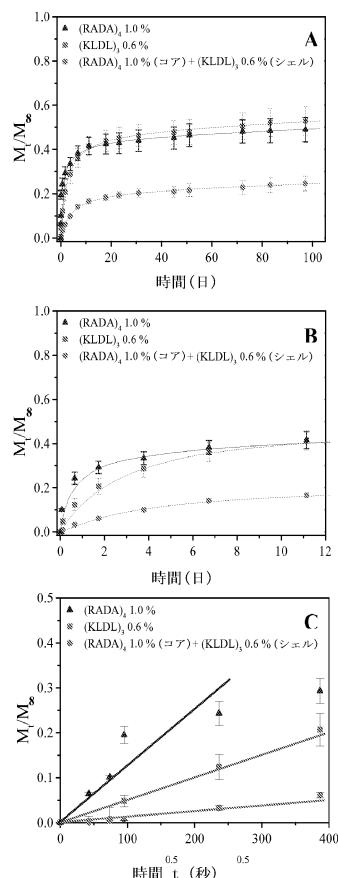


Figure 4

【図5】

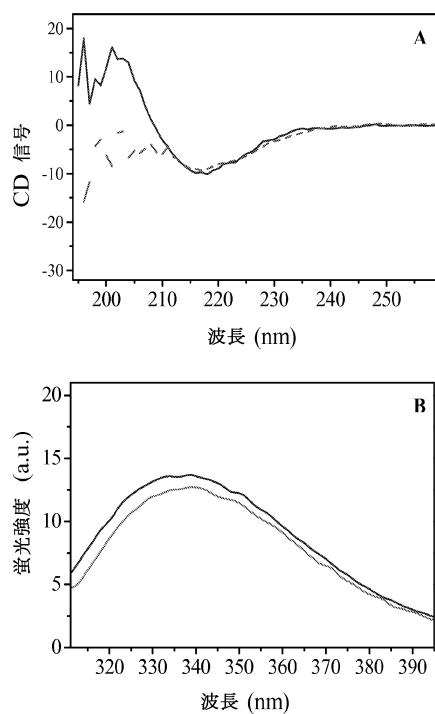


Figure 5

【図6】

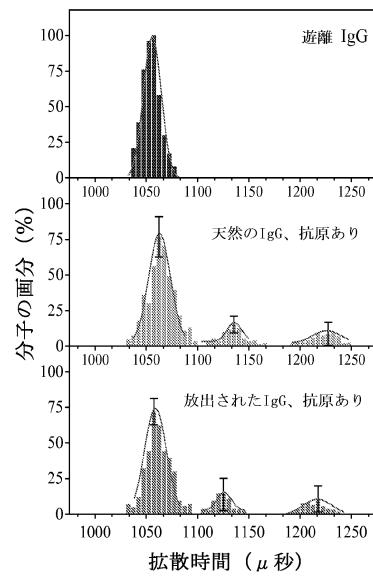


Figure 6

【図7】

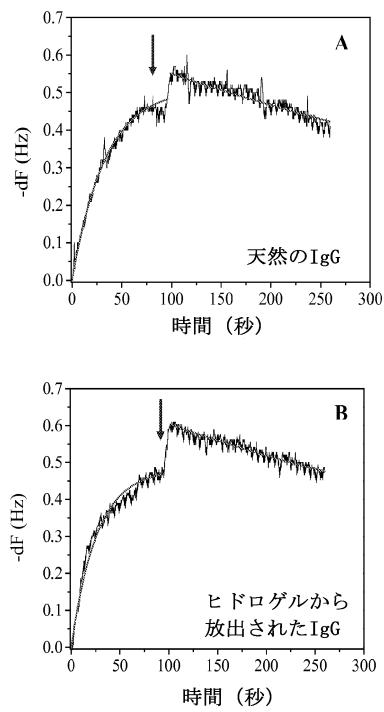


Figure 7

【図8】

ペプチドヒドロゲル	ヒドロゲル 密度 (w/v)	拡散定数 ($10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)	
		ストークス- AINSHUTAIN 推定	ゲル中での見かけ (式1)
ac-(RADA) ₄ -CONH ₂	0.5%		0.183 ± 0.002
	1.0%	0.4	0.028 ± 0.001
	1.5%		0.017 ± 0.001
ac-(KLDL) ₃ -CONH ₂	0.3%		0.205 ± 0.004
	0.6%	0.4	0.0040 ± 0.0001
ac-(RADA) ₄ -CONH ₂ (コア)	1.0% (コア)		
+	+	0.4	0.0010 ± 0.0001
ac-(KLDL) ₃ -CONH ₂ (シェル)	0.6% (シェル)		

Figure 8

【配列表】

0006134050000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/00 (2006.01) C 0 7 K 14/00

(72)発明者 チャン, シューグアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1 レキシントン, ポーカー ストリート 25

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特開2011-162537 (JP, A)
Journal of Controlled Release, 2012, Vol.160, p.451-458

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
A 6 1 K 4 5 / 0 0
A 6 1 K 4 7 / 4 2
C 0 7 K 7 / 0 6
C 0 7 K 7 / 0 8
C 0 7 K 1 4 / 0 0
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)