

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-536815

(P2023-536815A)

(43)公表日 令和5年8月30日(2023.8.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	38/08 (2019.01)	A 6 1 K	38/08		4 C 0 7 6
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K	38/10 (2006.01)	A 6 1 K	38/10		4 C 0 8 5
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全36頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-505850(P2023-505850)			(71)出願人	509167914
(86)(22)出願日	令和3年6月24日(2021.6.24)				スサヴィオン バイオサイエンシーズ インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年3月23日(2023.3.23)				アメリカ合衆国アリゾナ州85281, テンピ, ウェスト・ユニバーシティ・ドライヴ 1615
(86)国際出願番号	PCT/US2021/038999			(74)代理人	100118902
(87)国際公開番号	WO2022/026092				弁理士 山本 修
(87)国際公開日	令和4年2月3日(2022.2.3)			(74)代理人	100106208
(31)優先権主張番号	63/057,741				弁理士 宮前 徹
(32)優先日	令和2年7月28日(2020.7.28)			(74)代理人	100196508
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 松尾 淳一
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く			(74)代理人	100188374
					弁理士 一宮 維幸
				(72)発明者	エギンク, ローラ・エル 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 好中球駆動性炎症性病変の治療方法

(57)【要約】

本発明は、患者における病的炎症を治療する方法であって、治療用ペプチドの複数のコピーを含む多価構造化ポリペプチドを患者に投与するステップを含む方法を提供する。本発明は、治療用ペプチドの複数のコピーを含む多価構造化ポリペプチドと、アトピー性皮膚炎を患う患者への多価構造化ポリペプチドの投与を教示する説明書とを含むキットも提供する。

【選択図】 図 1 1

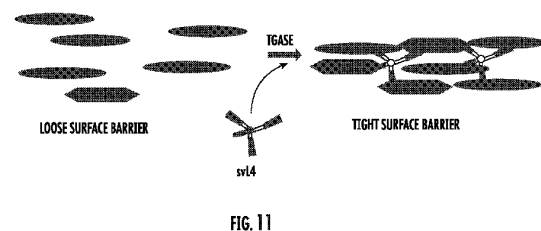


FIG. 11

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

好中球駆動性炎症性疾患を患う患者を治療する方法であって、
治療用ペプチドの少なくとも 2 個のコピーを含む多価構造化ポリペプチドを患者に投与
するステップを含み、

ここで、前記治療用ペプチドの配列は、配列 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - NQHTPR$ (配列番号 10) からなり、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 は、それぞれ独立して、存在しないか、または任意のアミノ酸残基であり、

前記治療用ペプチドは、少なくとも 7 個のアミノ酸残基を含み、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 のうちの少なくとも 1 個は Q である、方法。

10

【請求項 2】

前記治療用ペプチドが、トランスグルタミナーゼの基質として作用して、角質層の架橋を誘導し、表皮バリアを回復させ、かつ環境病原体およびアレルゲンから患者を保護する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

好中球駆動性炎症性疾患を患っていると前記患者を同定するステップをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記好中球駆動性炎症性疾患が、アトピー性皮膚炎 (AD)、乾癬、または喘息である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記好中球駆動性炎症性疾患が AD である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 のうちの少なくとも 2 個が Q であり、Q である少なくとも 2 個のアミノ酸残基が 2 個のアミノ酸残基によって分離されている、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記治療用ペプチドが、7 ～ 12 個のアミノ酸からなる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記治療用ペプチドが、VQATQSNQHTPR (配列番号 1) を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記多価構造化ポリペプチドが、中心フレームワーク、リンカー配列、および少なくとも 2 つのアームを有し、ここで、各アームは前記治療用ペプチドを含み、かつ各アームは前記リンカー配列を介して前記中心フレームワークに連結されている、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記リンカー配列が、GGGS (配列番号 3)、GGGSGGGG (配列番号 4)、SSSS (配列番号 5)、および SSSSSSSSSS (配列番号 6) からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記多価構造化ポリペプチドが四価である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記多価構造化ポリペプチドが、svL4 (配列番号 7) を含むか、またはそれからなる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記多価構造化ポリペプチドが、VQATQSNQHTPR (配列番号 1) を含む少な

50

くとも 2 個の治療用ペプチドと、N P S H P L S G（配列番号 2）を含む少なくとも 1 個の治療用ペプチドとを含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記治療用ペプチドが局所投与される、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記多価構造化ポリペプチドが、皮膚炎が存在する領域に投与される、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

少なくとも 1 種の局所用副腎皮質ステロイドおよび／または少なくとも 1 種のモノクローナル抗体を患者に投与するステップをさらに含む、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記少なくとも 1 種の局所用副腎皮質ステロイドが、トリアムシノロンアセトニド、ヒドロコルチゾン、およびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 種のモノクローナル抗体が、デュピルマブ、ネモリズマブ、セクキヌマブ、およびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

治療用ペプチドの少なくとも 2 個のコピーを含む多価構造化ポリペプチドと、
ここで、前記治療用ペプチドの配列は、配列 X₁－X₂－X₃－X₄－X₅－X₆－X₇－X₈－N Q H T P R（配列番号 10）からなり、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、および X₈ は、それぞれ独立して、存在しないか、または任意のアミノ酸残基であり、

20

前記治療用ペプチドは、少なくとも 7 個のアミノ酸残基を含み、かつ X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、および X₈ のうちの少なくとも 1 個は Q である；

好中球駆動性炎症性疾患を患う患者への前記多価構造化ポリペプチドの投与を教示する説明書と

を含む、キット。

30

【請求項 20】

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、および X₈ のうちの少なくとも 2 個が Q であり、Q である少なくとも 2 個のアミノ酸残基が 2 個のアミノ酸残基によって分離されている、請求項 19 に記載のキット。

【請求項 21】

前記治療用ペプチドが、7～12 個のアミノ酸からなる、請求項 19 または 20 に記載のキット。

【請求項 22】

前記治療用ペプチドが、V Q A T Q S N Q H T P R（配列番号 1）を含む、請求項 21 に記載のキット。

40

【請求項 23】

前記多価構造化ポリペプチドが、s v L 4（配列番号 7）を含むか、またはそれからなる、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 24】

少なくとも 1 種の局所用副腎皮質ステロイドおよび／または少なくとも 1 種のモノクローナル抗体をさらに含む、請求項 19～23 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 25】

前記少なくとも 1 種の局所用副腎皮質ステロイドが、トリアムシノロンアセトニド、ヒドロコルチゾン、およびそれらの組合せからなる群より選択され、および／または

前記少なくとも 1 種のモノクローナル抗体が、デュピルマブ、ネモリズマブ、セクキヌ

50

マブ、およびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

前記好中球駆動性炎症性疾患が、アトピー性皮膚炎（AD）、乾癬、または喘息である、請求項 19～25 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 27】

前記好中球駆動性炎症性疾患が AD である、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 28】

治療用ペプチドの少なくとも 2 個のコピーを含む多価構造化ポリペプチドと、
ここで、前記治療用ペプチドの配列は、配列 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - N Q H T P R$ （配列番号 10）からなり、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 は、それぞれ独立して、存在しないか、または任意のアミノ酸残基であり、

前記治療用ペプチドは、少なくとも 7 個のアミノ酸残基を含み、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 のうちの少なくとも 1 個は Q である；

副腎皮質ステロイドおよび／またはモノクローナル抗体である第 2 の薬剤介入を含む、医薬品組成物。

【請求項 29】

前記多価構造化ポリペプチドが、s v L 4（配列番号 7）を含むか、またはそれからなる、請求項 28 に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

前記第 2 の薬剤介入が、トリアムシノロンアセトニド、ヒドロコルチゾン、およびそれらの組合せより選択される局所用副腎皮質ステロイドを含む、請求項 28 または 29 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

前記第 2 の薬剤介入が、デュピルマブ、ネモリズマブ、セクキヌマブ、およびそれらの組合せからなる群より選択される注射可能なモノクローナル抗体を含む、請求項 28～30 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

[0001]本出願は、2020 年 7 月 28 日に出願された米国仮特許出願第 63 / 057,741 号の利益を主張し、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子的に提出された資料の参照による組み込み

[0002]参照によりその全体が本明細書に組み込まれるのは、本明細書と同時に提出され、以下のように特定されるコンピュータ読み取り可能なヌクレオチド／アミノ酸配列リストである：2021 年 6 月 23 日に作成された「Seq__List」と名付けられた 3,655 バイトの 1 個の ASCII（テキスト）ファイル。

【0003】

技術分野

[0003]本発明は、アトピー性皮膚炎（湿疹）、乾癬、および喘息などの過剰な好中球浸潤によって引き起こされる上皮組織の炎症性疾患の治療用ペプチドによる治療に関する。

【背景技術】

【0004】

[0004]この文献は、好中球駆動性炎症性疾患、例えば、アトピー性皮膚炎（湿疹および尋常性魚鱗癬を包含する AD）、乾癬、および喘息のための独特かつ有効な治療を記載する。

10

20

30

40

50

【0005】

【0005】アトピー性皮膚炎（AD、湿疹）は、発症年齢が3～5カ月で、小児の最大20%、および成人の10%が罹患する最も一般的な炎症性障害の1種である（Langanら、2020；Bitttonら、2020）。発生率は国によって異なり、米国では4.9%、および日本では2.1%であるが、スウェーデンでは20%である（Urbanら、2021）。世界中で2億3000万人を超える個人が湿疹を経験している。世界人口のおよそ2%（1億2500万人超）が乾癬に罹患しており、これは重症の場合には身体の10%超に影響を与える免疫原性疾患である（Lowesら、2014；Chiangら、2019）。ADにおける最も強い遺伝的危険因子は、フィラグリンをコードする遺伝子における突然変異であるが、患者の20～40%のみがFLG機能喪失突然変異を有する（Smithら、2006）。他の遺伝的および環境的要因が症例の大部分を占める。ADとは対照的に、乾癬は人生の後期、通常、成人初期に現れ、年齢とともに改善しない（Guttman-Yasskyら、2011）。これらの疾患による患者およびその家族の生活の質への影響は、深刻かつ多面的である。

10

【0006】

【0006】AD、特に小児のための最先端の治療は、炎症を軽減するための局所用副腎皮質ステロイドおよび保湿剤を含む。IL-4およびIL-13を支配的因子とする2型免疫応答は、炎症の主な原動力である。モノクローナル抗体（デュピルマブ）の皮下注射は、隔週で投薬を受ける患者において有効であった（Hamiltonら、2015；HarbおよびChatilla、2020）。この抗体は、IL-4およびIL-13の受容体の共通サブユニットであるIL-4Rαに結合し、IL-4RαはTH2分化およびアレルギー促進性適応免疫応答を媒介する。しかしながら、抗体治療を受けた患者の約3分の1が、著しい眼の痛み、特に結膜炎を経験する。いくつかのタイプの免疫細胞は、乾癬において役割を果たし、CD301b⁺樹状細胞（DC）によって産生されるIL-23は、活性化T細胞によるIL-17産生の刺激において極めて重要な役割を果たす（Lowesら、2014；Kimら、2017）。Munera-CamposおよびCarascosa（2019）、ならびにSainiおよびPansare（2019）は、IL-13、IL-22、IL-33および他のサイトカインに対する開発中の多くの追加の抗体、ならびに局所適用または経口適用のために開発中の多数の小分子を列挙した。

20

30

【0007】

【0007】有効な治療を達成するための現在の活動は、医療費の世界的負担およびこの病気によって引き起こされる罹患率を低減させる、特にADおよび乾癬に対する療法の必要性の表れである。したがって、ADに対するより有効な治療アプローチが必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

【0008】本発明は、好中球駆動性炎症性疾患を患う患者を治療する方法であって、治療用ペプチドの少なくとも2個のコピーを含む多価構造化ポリペプチドを患者に投与するステップを含み、ここで、前記治療用ペプチドの配列は、配列X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-NQHTPR（配列番号10）からなり、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、およびX₈は、それぞれ独立して、存在しないか、または任意のアミノ酸残基であり、治療用ペプチドは、少なくとも7個のアミノ酸残基を含み、かつX₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、およびX₈のうちの少なくとも1個はQである方法に関する。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

【0009】いくつかの態様において、治療用ペプチドは、トランスグルタミナーゼの基質として作用して、角質層の架橋を誘導し、表皮バリアを回復させ、かつ環境病原体およびアレルゲンから患者を保護する。

50

【0010】

【0010】他の態様において、本方法は、好中球駆動性炎症性疾患を患っていると患者を同定するステップをさらに含む。一態様において、好中球駆動性炎症性疾患は、アトピー性皮膚炎（AD）、乾癬、または喘息である。別の態様において、好中球駆動性炎症性疾患はADである。

【0011】

【0011】いくつかの態様において、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 のうちの少なくとも2個はQであり、Qである少なくとも2個のアミノ酸残基は2個のアミノ酸残基によって分離されている。他の態様において、治療用ペプチドは、7～12個のアミノ酸からなる。特定の態様において、治療用ペプチドは、VQATQSNQH TPR（配列番号1）を含む。

10

【0012】

【0012】さらに他の態様において、多価構造化ポリペプチドは、中心フレームワーク、リンカー配列、および少なくとも2つのアームを有し、ここで、各アームは治療用ペプチドを含み、かつ各アームはリンカー配列を介して中心フレームワークに連結されている。ある特定の態様において、リンカー配列は、GGGS（配列番号3）、GGGS GGGS（配列番号4）、SSSS（配列番号5）、およびSSSSSSSS（配列番号6）からなる群より選択される。一態様において、多価構造化ポリペプチドは四価である。別の態様において、多価構造化ポリペプチドは、svL4（配列番号7）を含むか、またはそれからなる。

20

【0013】

【0013】いくつかの態様において、多価構造化ポリペプチドは、VQATQSNQH TPR（配列番号1）を含む少なくとも2個の治療用ペプチドと、NP SHPLSG（配列番号2）を含む少なくとも1個の治療用ペプチドとを含む。

【0014】

【0014】他の態様において、治療用ペプチドは局所投与される。いくつかの態様において、多価構造化ポリペプチドは、皮膚炎が存在する領域に投与される。

【0015】

【0015】さらに他の態様において、本方法は、少なくとも1種の局所用副腎皮質ステロイドおよび／または少なくとも1種のモノクローナル抗体を患者に投与するステップをさらに含む。一態様において、少なくとも1種の局所用副腎皮質ステロイドは、トリアムシノロンアセトニド、ヒドロコルチゾン、およびそれらの組合せからなる群より選択される。別の態様において、少なくとも1種のモノクローナル抗体は、デュピルマブ、ネモリズマブ、セクキヌマブ、およびそれらの組合せからなる群より選択される。

30

【0016】

【0016】特定の態様において、本発明は、治療用ペプチドの少なくとも2個のコピーを含む多価構造化ポリペプチドと、ここで、治療用ペプチドの配列は、配列 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-NQH TPR$ （配列番号10）からなり、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 は、それぞれ独立して、存在しないか、または任意のアミノ酸残基であり、治療用ペプチドが少なくとも7個のアミノ酸残基を含み、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 のうちの少なくとも1個はQである；好中球駆動性炎症性疾患を患う患者への多価構造化ポリペプチドの投与を教示する説明書とを含むキットに関する。

40

【0017】

【0017】いくつかの態様において、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 のうちの少なくとも2個はQであり、Qである少なくとも2個のアミノ酸残基は2個のアミノ酸残基によって分離されている。他の態様において、治療用ペプチドは、7～12個のアミノ酸からなる。特定の態様において、治療用ペプチドは、VQATQSNQH TPR（配列番号1）を含む。一態様において、多価構造化ポリペプチドは、svL4（配列番号7）を含むか、またはそれからなる。

50

【0018】

【0018】いくつかの態様において、キットは、少なくとも1種の局所用副腎皮質ステロイドおよび／または少なくとも1種のモノクローナル抗体をさらに含む。一態様において、少なくとも1種の局所用副腎皮質ステロイドは、トリアムシノロンアセトニド、ヒドロコルチゾン、およびそれらの組合せからなる群より選択され；および／または少なくとも1種のモノクローナル抗体は、デュピルマブ、ネモリズマブ、セクキヌマブ、およびそれらの組合せからなる群より選択される。

【0019】

【0019】他の態様において、本発明は、治療用ペプチドの少なくとも2個のコピーを含む多価構造化ポリペプチドと、ここで、治療用ペプチドの配列は配列 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - N Q H T P R$ （配列番号10）からなり、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 は、それぞれ独立して、存在しないか、または任意のアミノ酸残基であり、治療用ペプチドが少なくとも7個のアミノ酸残基を含み、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、および X_8 のうちの少なくとも1個はQである；副腎皮質ステロイドおよび／またはモノクローナル抗体である第2の薬剤介入とを含む医薬組成物に関する。

10

【0020】

【0020】一態様において、多価構造化ポリペプチドは、 $s v L 4$ （配列番号7）を含むか、またはそれからなる。

【0021】

【0021】いくつかの態様において、第2の薬剤介入は、トリアムシノロンアセトニド、ヒドロコルチゾン、およびそれらの組合せより選択される局所用副腎皮質ステロイドを含む。

20

【0022】

【0022】他の態様において、第2の薬剤介入は、デュピルマブ、ネモリズマブ、セクキヌマブ、およびそれらの組合せからなる群より選択される注射可能なモノクローナル抗体を含む。

【0023】

【0023】特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1枚の図面を含む。カラー図面（複数可）を含む本特許または特許出願公開のコピーは、請求および必要な手数料の支払いに応じて、特許庁によって提供される。

30

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】【0024】図1A、図1B、および図1Cは未治療のC57BL/6マウスの皮膚を示す。図1Aは、薄い紫色の表皮を示すヘマトキシリンおよびエオシン染色を示し、基底層の細胞中の核を強く染色している。真皮のピンク染色の強度は、コラーゲンのレベルを示す。図1Bは、好中球を本質的に含まない真皮を明らかにする抗Ly6Gの適用を示す。図1Cは真皮を示し、真皮にはCD301b（MGL2）に対する抗体で染色される細胞（DCおよびマクロファージ）が豊富に存在する。バーは100 μm を表す。

【0025】

【図2】【0025】図2A～図2Fは、 $s v L 4$ による治療の間の皮膚の形態の変化を示す。14日間の研究の終わりに画像を得た。除毛は、厚い表皮（図2A）および病変の下にある真皮における多量の好中球（図2B）をもたらした。3日毎に1% SDSで2時間治療した後、毎日PBS包帯にLPSを添加すると、厚い表皮内での頻繁な壊死病変（図2C）および非常に高頻度の好中球（図2D）をもたらした。LPS含有包帯への1 μM $s v L 4$ の包含によって、薄い表皮および真皮におけるより強いコラーゲン染色を伴う正常な形態をもたらされ（図2E）、これは本質的に好中球を含まなかった（図2F）。バーは100 μm を表す。

40

【0026】

【図3-1】【0026】図3Aおよび図3Bは、図2A～図2Fに示される画像のグラフによる表現を示す。図3Aは、各動物（各群において $n = 4$ ）について皮膚の切片に沿って10部位で測定した表皮の厚さを示す。図3Bは、図3Aにおいて分析された各動物の真

50

皮の切片の5つの別々の規定された領域内の好中球の計測を示す。エラーバーは±標準誤差を示す。

【図3-2】[0026]図3Aおよび図3Bは、図2A～図2Fに示される画像のグラフによる表現を示す。図3Aは、各動物（各群において $n=4$ ）について皮膚の切片に沿って10部位で測定した表皮の厚さを示す。図3Bは、図3Aにおいて分析された各動物の真皮の切片の5つの別々の規定された領域内の好中球の計測を示す。エラーバーは±標準誤差を示す。

【図4-1】[0027]図4A～図4Hは、ブドウ球菌エンテロトキシンB（SEB）およびチリダニ抽出物（HDM）で皮膚炎を誘導した後、 $2\mu\text{M}$ s v L 4で5日間治療した皮膚の切片を示す。図4A、図4C、図4Eおよび図4Gは、好中球の数を明らかにするため、抗Ly6Gで染色した切片を示す。図4B、図4D、図4Fおよび図4Hは、抗CD301bで染色した切片を示す。図4Aおよび図4Bは、表皮および下層の真皮における広範な壊死および好中球の密集集団を明らかにする皮膚炎を誘導した後にPBSで治療した、同じ動物由来の切片を示す。図4Cおよび図4Dは、わずかに肥厚した表皮および多数のCD301b⁺細胞を示すが、真皮中の好中球はほとんど示さない、s v L 4で治療した同じ動物由来の切片を示す。図4Eおよび図4Fは、s v L 4 + $1\mu\text{M}$ デキサメタゾンで治療した動物由来の切片を示す。図4Gおよび図4Hは、 $1\mu\text{M}$ デキサメタゾンで治療した動物由来の切片を示す。バーは100から200 μm の間の長さを表す。

【図4-2】[0027]図4A～図4Hは、ブドウ球菌エンテロトキシンB（SEB）およびチリダニ抽出物（HDM）で皮膚炎を誘導した後、 $2\mu\text{M}$ s v L 4で5日間治療した皮膚の切片を示す。図4A、図4C、図4Eおよび図4Gは、好中球の数を明らかにするため、抗Ly6Gで染色した切片を示す。図4B、図4D、図4Fおよび図4Hは、抗CD301bで染色した切片を示す。図4Aおよび図4Bは、表皮および下層の真皮における広範な壊死および好中球の密集集団を明らかにする皮膚炎を誘導した後にPBSで治療した、同じ動物由来の切片を示す。図4Cおよび図4Dは、わずかに肥厚した表皮および多数のCD301b⁺細胞を示すが、真皮中の好中球はほとんど示さない、s v L 4で治療した同じ動物由来の切片を示す。図4Eおよび図4Fは、s v L 4 + $1\mu\text{M}$ デキサメタゾンで治療した動物由来の切片を示す。図4Gおよび図4Hは、 $1\mu\text{M}$ デキサメタゾンで治療した動物由来の切片を示す。バーは100から200 μm の間の長さを表す。

【図5】[0028]図5は、除毛した動物由来の皮膚の抽出物中のサイトカインの量に対するSDSおよびSDS + s v L 4の効果を示す。0日目、2日目および5日目に、対照抽出物を調製した（正方形）。0日目および3日目に2時間、1% SDSで皮膚を治療した。SDSによる第1の治療の4時間後、ならびに2日目および5日目に抽出物を調製するか（三角形）、またはSDSに加えてPBS中の $1\mu\text{M}$ s v L 4による治療の後に抽出物を調製した（丸）。

【図6】[0029]図6は、ラットにおけるs v L 4の毒物動態曲線を示す。 $12.5\mu\text{mol/kg}$ 体重の用量でペプチドを静脈注射した後のs v L 4の血清濃度の変化を、直線軸（上）および対数に基づく曲線（下）で示す。

【図7】[0030]図7Aおよび図7Bは、ペプチドs v H 1 C（正方形）を $12.5\mu\text{mol/kg}$ 体重の用量で静脈内注射した後の血清濃度の変化を、より短い（5量体）ペプチド、s v 6 B（丸）と比較して示す。図7Aは、均等目盛りで曲線を示す。図7Bは、対数に基づく軸上の曲線を示す。

【図8】[0031]図8Aおよび図8Bは、トランスグルタミナーゼ（TGase2）の基質としてのs v L 4のアッセイを示す。反応は、マイクロタイターウェル中で、受容体としてブタ肝臓トランスグルタミナーゼおよびポリリシンを使用して実施した。わずかに異なる条件下でアッセイを4回実施したが、結果は同じであった。図8Aは、 0.1M Tris HCl (pH 7.5) 緩衝液および 10mM CaCl_2 を含有する混合物中のs v L 4の濃度の関数としての反応の程度を示す。図8Bは、 15mM CaCl_2 を含有する 50mM HEPES (pH 7.2) 緩衝液を含有する混合物中の濃度の関数としての反応の程度を示す。s v L 4およびs v 6 Dは同じ条件下でアッセイした。

10

20

30

40

50

【図 9-1】[0032]図 9 A から図 9 C は、四価ペプチド s v H 1 C（配列番号 9）（図 9 A）、s v 6 D（配列番号 8）（図 9 B）、および s v L 4（配列番号 7）（図 9 C）の構造を示す。

【図 9-2】[0032]図 9 A から図 9 C は、四価ペプチド s v H 1 C（配列番号 9）（図 9 A）、s v 6 D（配列番号 8）（図 9 B）、および s v L 4（配列番号 7）（図 9 C）の構造を示す。

【図 10】[0033]図 10 は、四価ペプチド s v L 4 のアームの空間充填モデルを示し、2 個の露出したグルタミン残基が丸で示されている。

【図 11】[0034]図 11 は、多価ペプチドが複数のタンパク質および／または細胞と架橋する効果を示し、これはトランスグルタミナーゼによって触媒され、環境病原体およびアレルギーから個体を保護するように機能する堅固な表皮表面バリアを形成する。

【発明を実施するための形態】

【0025】

[0035]本発明の特定の態様において、本発明者らは、トランスグルタミナーゼ（T G a s e）の機能的基質として働く多価ペプチド s v L 4 の適用によるアトピー性皮膚炎の局所治療を記載する。s v L 4 が提供するさらなる架橋能力は、病変の封じ込めおよび表皮表面バリアの修復を可能にする。浸透促進剤として 3 日毎に 1 % S D S で 2 時間治療した後、除毛したマウス皮膚にリポ多糖（L P S）により皮膚炎を誘導した。刺激物は、表皮の肥厚、多数の壊死性病変、および病変の下にある真皮における多量の好中球を引き起こした。s v L 4 を局所治療に含めた場合、真皮中に好中球は本質的に存在せず、皮膚は治療の 14 日後にその正常な形態に戻った。チリダニ抽出物およびブドウ球菌エンテロトキシン B による皮膚炎の誘導後の s v L 4 による 5 日間の治療は、部分的な消散をもたらし、ほとんどが薄い表皮、ごく少数の小さな病変、および真皮または皮下の基部における低頻度の好中球を伴った。s v L 4 は、N-アセチルガラクトサミンの模倣物であり、真皮中の樹状細胞（D C）およびマクロファージによって発現され、ヒト C L E C 10 A のオルソログである、マウス C 型レクチン受容体 M G L 2（C D 3 0 1 b）に潜在的に結合する。しかし、分解の機構を示唆する s v L 4 の唯一の特徴は、四価ペプチドの各アームの N 末端半分における 2 個のグルタミン残基である（図 10 参照）。これらのグルタミン残基は T G a s e の基質である。したがって、いくつかの態様において、多機能基質、s v L 4 によって提供される T G a s e 活性の活性化による表皮バリア機能の回復は、表皮形態を回復し、真皮における好中球を減少させる。これらのデータは、臨床使用に適した小分子薬物としての s v L 4 を裏付ける。

【0026】

[0036]マウス皮膚は、A D のモデル治療に広く使用されている（J i n ら、2009；M a r t e l ら、2017）。マウスは、2 つの C 型マクロファージガラクトース型レクチンホモログ（H i g a s h i ら、2002）、マクロファージにおいて最も強く発現されるガラクトース（G a l）特異的 C D 3 0 1 a（M G L 1）および C D 3 0 1 b（M G L 2）、C D 1 c⁺D C のマーカーであるヒト N-アセチルガラクトサミン（G a l N A c）特異的 C 型レクチン受容体 C L E C 10 A（C D 3 0 1）のマウスオルソログ（S i n g h ら、2009；v a n K o o y k ら、2015；H e g e r ら、2018；V i l l a n i ら、2017；B r o w n ら、2019）を発現する。K a n e m a r u ら（2019）は、マウスの N C / N g a 系統が、M G L 1（C D 3 0 1 a）をコードする C l e c 10 a 遺伝子における機能喪失突然変異を有することを発見し、この突然変異はチリダニに応答して A D に対する感受性をもたらし、チリダニは一次アレルギー D e r f 2（J o h a n n e s s e n ら、2005）を含有し、D e r f 2 は I g E のエピートープとして働くトランスグルタミナーゼ 3（T G a s e 3）と相同配列を共有するタンパクである。チリダニアレルギーは、トール様受容体 4（T L R 4）によって媒介される、皮膚炎の特徴である I L - 6 および T N F - α などの炎症性サイトカインの産生を誘導した。この観察に続いて、T L R 4 に対する周知のリガンドであるリポ多糖（L P S）の適用によって皮膚炎を誘導した。L P S は、C D 14 によって媒介され、T L R 4 からのシ

10

20

30

40

50

グナル伝達経路を開始し、NF- κ Bの活性化ならびにTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8およびIL-12p40などの炎症性サイトカインの放出ならびにマクロファージのM1極性化をもたらす(Luら、2008; Liuら、2017)。これらのサイトカインは好中球の主要な誘引物質であり、好中球は皮膚、特に表皮に壊死性病変が生じる領域に多数浸潤する。

【0027】

【0037】本発明者らは、CD301bの小分子リガンドがADの消散を達成するかどうかを決定するための研究を開始した。本発明者らは、ペプチドsvL4およびsv6Dが、LPSで誘導されたマウス皮膚における炎症を減少させるのに有効であるかどうかを試験した。本発明者らは、1 μ M svL4の局所適用が0.1 μ M svL4または1 μ M sv6Dよりも有効であることを見出した。両方とも塩基性ペプチドであり、角質層の酸性表面において10~12個の正電荷を有する(Behneら、2002; Hansonら、2002)。可能な識別因子は親水性指数であり(HoppおよびWoods、1981)、親水性指数はsv6Dについて0.4であるが、svL4について0.1である。svL4の高い正電荷および低減された親水性は、正味の負電荷を有する皮膚への移行を容易にする可能性がある(NguyenおよびSoulika、2019)。しかし、この研究から明らかになった特に重要な特徴は、ペプチドの各アームのN末端付近に存在する2個のグルタミン残基の役割である。

【0028】

【0038】いくつかの態様において、本発明は、患者における好中球駆動性炎症性疾患を治療する方法に関する。好中球駆動性炎症性疾患は、呼吸器状態または皮膚状態であってもよい。

【0029】

【0039】いくつかの実施において、患者は、治療用ペプチドを含む多価構造化ポリペプチドを投与される。いくつかの態様において、多価構造化ポリペプチドは、治療用ペプチドの少なくとも2個のコピーを含む。いくつかの実施形態において、多価構造化ポリペプチドは、少なくとも2個の異なる治療用ペプチドを含む。特定の実施形態では、多価構造化ポリペプチドは、中心フレームワーク、リンカー配列、および少なくとも2つのアームを有する。各アームは1個の治療用ペプチドを含み、かつ各アームはリンカー配列を介して中心フレームワークに連結されている。特定の実施形態では、多価構造化ポリペプチドの各アームは、同じ治療用ペプチドを含む。他の実施形態では、多価構造化ポリペプチドのアームは、同じ治療用ペプチドを含まない。特定の実施形態では、多価構造化ポリペプチドは4つのアームを有し、したがって四価である。いくつかの態様において、リンカー配列は、GGGS(配列番号3)、GGGS GGGS(配列番号4)、SSSS(配列番号5)、またはSSSSSSSS(配列番号6)を含む配列を有する。

【0030】

【0040】特定の実施形態では、多価構造化ポリペプチドは四価である。例示的な一実施形態では、多価構造化ポリペプチドはsvL4(配列番号7)であり、これは4つのアームを含み、かつ各アームはVQATQSNQHTPR(配列番号1)からなる治療用ペプチドを含む。

【0031】

【0041】この方法は、好中球駆動性炎症性疾患を治療するための第2の薬剤介入、例えば、ステロイドまたはモノクローナル抗体を患者に投与するステップをさらに含んでよい。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、炎症経路の活性化を抑えるために、炎症性サイトカインを標的とする。

【0032】

【0042】患者の好中球駆動性炎症性疾患を治療するための組成物およびキットも記載される。組成物は、本明細書に記載の治療用ペプチドまたは多価構造化ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、好中球駆動性炎症性疾患を治療するための第2の薬剤介入をさらに含む。例えば、第2の薬剤介入は、ステロイドまたはモノクローナ

ル抗体である。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、炎症経路の活性化を抑えるために炎症性サイトカインを標的とする。キットは、治療用ペプチドまたは多価構造化ポリペプチドの投与を教示する説明書を含む。

【0033】

[0043]特に悲惨な炎症性疾患は、肺に影響を及ぼし、したがって患者が効果的に呼吸する能力に影響を及ぼす。残念なことに、呼吸器系における持続性炎症は、喘息、COPD、および肺線維症などのいくつかの有害疾患を頻繁にもたらす。実際、炎症を起こした肺における好中球浸潤は、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）の顕著な特徴と考えられている。

【0034】

[0044]喘息、ARDS、COPD、およびコロナウイルスによるウイルス感染は、重篤な結果を有し、これは、治療のための薬物を同定するための主要な努力の動機であった。肺組織への好中球の浸潤は、これらの状態における炎症の主な原因として同定されている。多数の薬物、多くは臨床使用について承認されており、他は開発中である、が、ARDSについて試験されている。炎症性呼吸器状態の治療に使用されるモノクローナル抗体のいくつかは、ADおよび乾癬などの他の使用について承認された。したがって、特定の実施において、患者の好中球駆動性炎症性疾患を治療する方法は、第2の薬剤介入を対象に投与するステップをさらに含む。いくつかの態様において、第2の薬剤介入は、炎症経路またはロイコトリエン修飾薬を標的とするモノクローナル抗体である。興味深いことに、副腎皮質ステロイドは、これらの状態において炎症促進性であり、治療薬に適していない。患者の呼吸が容易になるよう改善するために、第2の薬剤介入は、ベータアゴニスト、ロイコトリエン修飾薬、クロモリンナトリウム、またはテオフィリンであってよい。

【0035】

[0045]特定の実施において、患者は、治療用ペプチドまたは記載されている組成物を吸入によって投与される。したがって、患者に投与される治療用ペプチドを含む組成物は、エアロゾル化されてもよく、または乾燥粉末の形態であってもよい。組成物が液体形態の治療用ペプチドを含む場合、組成物は、治療用ペプチドが吸入によって投与できるように、噴霧器を介して送達される。

【0036】

[0046]Sanofiは、IL-4およびIL-13の受容体に対するモノクローナル抗体、デュピルマブ（Dupixent）を開発し、デュピルマブは発疹、喘息、および重度のアトピー性湿疹の治療に成功した。デュピルマブは、湿疹を含むアレルギー性疾患の最も成功した治療法として出現している。抗体は、TH2分化およびアレルギー促進性適応免疫応答を媒介する、IL-4およびIL-13の受容体の共通サブユニットであるIL-4R α に結合する。したがって、この抗体は、ペリオスチン発現およびフィラグリン合成の阻害におけるIL-13の効果を軽減する。しかし、IL-4およびIL-13の活性を妨害することによって、デュピルマブは、マクロファージのCD301b⁺M2a状態への代替活性化（alternate activation）を阻害し、IL-10⁺TH2集団の拡大を妨害し、IL-10⁺TH2の喪失は宿主に対して非常に有害である。真皮環境は、IL-4／IL-13シグナル伝達とは独立して、食細胞におけるCD301bの発現を誘導する。種々の疾患においてTH2炎症を下方制御できることは、中度から重度のアトピー性皮膚炎の治療のためのデュピルマブの米国食品医薬品局（FDA）による承認をもたらし、承認によって隔週4カ月の皮下注射の後に患者のおよそ3分の2の症状が軽減した。しかしながら、患者の30～40%のみが、12週間の治療後に綺麗な皮膚を経験する。

【0037】

[0047]皮膚炎の治療のためにFDAによって承認された別の医薬品はクリサボロールであり、クリサボロールもまたIL-4の効果を低減する。クリサボロールは、ホスホジエステラーゼ4の小分子阻害剤であり、サイクリックAMPのレベルを低下させ、それによってIL-2、IL-4およびIL-31の放出を低減し、その結果、T細胞の増殖

10

20

30

40

50

を低減する。皮膚炎を治療するための他の治療用小分子薬には、ピメクロリムスおよびタクロリムスなどのカルシニューリンのマクロライドベースの阻害剤が含まれる。広範な全身性免疫抑制剤シクロスポリンは、ADの治療として有効であるが、この目的のために米国または欧州において認可されていない。

【0038】

[0048]いくつかのペプチドがADの治療のために研究されてきた。12量体の抗微生物ペプチドであるオミガナンは、皮膚上のスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 集団を減少させたが、臨床的改善は観察されなかった。血清アルブミンの分解断片である12量体誘導体は、アトピー性皮膚炎において過剰発現されるSDF-1 (間質細胞由来因子-1、CXCL12) の受容体であるCXCR4に結合することが見出され、マウス皮膚への局所適用には有効な治療剤であった。このペプチドは、癌および炎症性疾患に関与するCXCR4/CXCL12シグナル伝達を破壊する見込みがある。いくつかの緑色野菜におけるトリプトファンの代謝の小分子産物である3,3'-ジインドリルメタンは、転写因子NF-κBを介したシグナル伝達を阻害し、調節性T細胞の分化を促進した。いくつかの研究は、JAK1およびJAK2の阻害剤、例えば、ウパダシチニブおよびルキシソリチニブによる炎症の低減を報告した。しかしながら、JAK1およびTyk2は、IL-10のその受容体への結合に応答してSTAT3を活性化し、活性化はNF-κBの阻害および関連する炎症促進性遺伝子の発現をもたらす。したがって、JAK1およびJAK2の阻害は、抗炎症という目標に反するようである。IL-10によるJAK1の活性化は、STAT6の活性化を抑制することによって、IL-4およびIL-13に応答する遺伝子の発現をも阻害する。特に興味深いことは、非病原性グラム陰性ビトレオシラ・フィリフォルミス (*Vitreoscilla filiformis*) の溶解物のマウスの皮膚への適用が、DCを活性化して、IL-10を産生させ、NC/Ngaマウスのアトピー性皮膚炎におけるTH2優勢過敏症の皮膚炎症を抑制したという知見であった。IL-10は、慢性炎症および組織損傷を予防するために、過剰なT細胞応答を制限して最終的に終結させる、重要な調節性サイトカインである。

【0039】

[0049]いくつかの態様において、第2の治療剤は、本明細書に開示されているペプチドと組み合わせられる (すなわち、対象に同時にまたはその後に投与される)。これらの第2の治療剤としては、例えば、副腎皮質ステロイド、ベタメタゾン、タクロリムス、ピメクロリムス、狭帯域UVB、PDE4阻害剤、トファシチニブ、デュピルマブ、およびネモリズマブが挙げられる。非常に具体的な実施形態において、第2の治療剤は、ベタメタゾン、ピメクロリムス、またはデュピルマブである。

【0040】

[0050]乾癬皮膚は、IL-17AおよびIL-17Fの高発現を特徴とし、高発現は好中球蓄積に関与する。IL-17Aに対するモノクローナル抗体は、乾癬患者の約50%において印象的な臨床効果を示している。MOR106と命名されたIL-17Cを中和する抗体を使用した臨床研究は、ADの治療において無益であったので放棄された。しかしながら、セクキヌマブ (コセンティクス、Novartis)、イキセキズマブ (トルツ、Lilly)、およびプロダルマブ (シリク (Siliq)、Ortho Dermatologics) などの抗IL-17抗体は、治療された患者のおよそ半分において効力を示している。IL-23に対する抗体は、乾癬を治療するために過去数年間に開発されてきた。グセルクマブ (Janssen) およびチルドラキズマブ (イルミア、Sun Pharmaceutical) は、FDAによって承認されている。ウステキヌマブ (Janssen)、リサンキズマブ (Abbvie) およびミリキズマブ (Lilly) などの他の抗体が臨床試験中である。これらの抗体のほとんどは、IL-23複合体のサブユニットp19に結合する。類似の抗体が開発されており、これらは重大な免疫不均衡または危険シグナルに対する正常ではない反応を引き起こす可能性がある。

【0041】

[0051]皮膚状態の治療のために、治療用ペプチドまたは多価構造化ポリペプチドは、好ましくは、その皮膚状態が存在すると考えられる領域に局所的に投与される。いくつかの態様において、治療用ペプチドまたは多価構造化ポリペプチドは、皮下注射によって投与される。他の態様において、治療用ペプチドまたは多価構造化ポリペプチドは、局所適用によって局所的に投与される。治療用ペプチドまたは多価構造化ポリペプチドが局所的に適用される特定の態様において、ペプチドは、クリーム、軟膏、またはローションに組み込まれる。他の態様において、治療用ペプチドは、局所適用のためにビヒクル溶媒中に溶解される。ある特定の態様において、ペプチドは、その皮膚状態が存在すると考えられる領域上に配置されるガーゼまたは包帯に適用される。

【0042】

10

[0052]いくつかの態様において、好中球浸潤と関連する皮膚状態（例えば、AD、湿疹、または乾癬）を治療する方法は、第2の薬剤介入を患者に投与するステップをさらに含む。第2の薬剤介入は、皮膚状態のための既存の治療として使用される、ステロイド、キノリン誘導体、マクロライド、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリンA、もしくは三環系麻酔化合物、またはモノクローナル抗体のような炎症経路を標的とする薬物であってよい。いくつかの態様において、ステロイドは、局所用副腎皮質ステロイド、例えば、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、プレドニゾンおよびその誘導体、トリアムシノロンアセトニド、ベタメタゾン、クロベタゾール、フルオシノニド、フルオシノロン（fluocinoline）である。いくつかの第2の薬剤介入は、ステロイドの組合せ、例えばトリアムシノロンアセトニドおよびヒドロコルチゾンを使用する局所クリームである。標的薬物としては、IL-2産生を減少させるマクロライドベースのカルシニューリン阻害剤（ピメクロリムス、エリデル（Eidel）；およびタクロリムス、プロトピック）、ホスホジエステラーゼ-4阻害剤（クリサボロール、ユークリサ）、およびモノクローナル抗体（デュピルマブ、デュピクセント、抗IL-4受容体モノクローナル抗体（mAb）、およびトラロキヌマブ、抗IL-13 mAb）が挙げられる。デュピクセントは、IL-4 R α サブユニットに結合して、IL-4およびIL-13の作用を阻害する。抗体は皮下注射によって送達されるため、肺の内膜を含む体内の他の組織にも作用する。一態様において、治療用ペプチドおよび1種または複数種の局所用副腎皮質ステロイドは、同時に投与される。他の態様において、治療用ペプチドおよび1種または複数種の局所用副腎皮質ステロイドは、連続して投与される。

20

30

【0043】

[0053]好中球浸潤に関連する皮膚状態のための組成物およびキットは、本明細書に記載の治療用ペプチドまたは多価構造化ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、好中球駆動性炎症性疾患を治療するための第2の薬剤介入をさらに含む。例えば、第2の薬剤介入は、ステロイドまたはモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、炎症経路の活性化を抑えるために、炎症性サイトカインを標的とする。

【0044】

[0054]本発明は、以下の実施例によってさらに説明されるが、これらの実施例は限定として解釈されるべきではない。本出願を通して引用される全ての参考文献、特許、および公開された特許出願の内容、ならびに図面は、全ての目的のため、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【実施例】

【0045】

実施例1

実験材料および方法

ペプチド

[0055]内毒素陰性 s v L 4 および s v 6 D の合成および精製は、以前記載した（E g g i n k ら、2018）。

【0046】

50

動物

【0056】研究は、Watertown、MAのAAALAC認定施設であるBiodels LLCで実施した。この研究の承認は、Biodels IACUC（プロトコル番号17-0613-4）から得た。10週齢の雌C57BL/6JマウスをThe Jackson Laboratory（Bar Harbor、ME）から入手し、Biodelsで飼育した。-1日目に、マウスをイソフルランで麻酔して、背部皮膚を電気バリカンで除毛し、ナイール（Nair）で化学治療した。次いで、皮膚を70%エタノールおよびPBSで洗浄した。0日目に、マウスを再び麻酔し、生体閉鎖包帯（bio-occlusive dressing）（テガダーム）で固定した1cm²のガーゼ片中の0.2mLの1%SDSで2時間治療した。未治療のマウスについては、滅菌水をSDSの代わりに使用した。マウスを再び麻酔して、皮膚を拭い取って乾燥させ、0.1mLの10μg/mL LPSおよび0.1mL PBSまたは2μM s v L 4の混合物を含有するガーゼで、皮膚を覆った。治療溶液は毎日交換し、SDS治療は3日毎に繰り返した。

10

【0047】

【0057】同様の実験を、ブドウ球菌エンテロトキシンB（100μg、Toxin Technology, Inc.、Sarasota、FL）およびチリダニ抽出物（10μg、Greer Laboratories, Inc.、Lenoir、NC）を使用して行い、これらを、SDSで2時間治療した後、2日間皮膚に適用した。SDS/アレルギー治療は、第2の2日間であった。次いで、皮膚をPBSで洗浄し、SDS治療を続け、2μM s v L 4をSDS治療の間にさらに5日間適用した。

20

【0048】

組織学的分析

【0058】治療期間の終わりに、マウスをCO₂吸入によって安楽死させ、皮膚の1cm²部分を切除した。半分を組織病理学的分析のためにホルマリンで固定し、他の半分を急速冷凍した。H&E染色による組織学的分析、表皮厚さの測定、および免疫染色は、HistoTox Labs, Inc.、Boulder、COが実施した。モノクローナル抗Ly6G（RB6-8C5、eBioscience）を使用して固定切片上で好中球を染色し、その一方で、OCT化合物中に包埋することによって切片化のために凍結試料を調製し、切片をモノクローナル抗CD301b（11A10-B7、eBioscience）で染色した。各試料の表皮厚さを、組織学的に無作為な10部位で、切片の長軸に垂直に、長さ9~13mmで測定し、平均して平均厚さを得た。データは、治療ごとに、平均±平均の標準として示す。ノンパラメトリックT検定（マン-ホイットニーU検定）によって、半定量的重症度スコアを分析した。両側検定を利用して、全ての検定について有意性をp ≤ 0.05に設定した。

30

【0049】

皮膚処理およびサイトカイン分析

【0059】凍結後、1個の皮膚試料/動物を粉碎して、次いでホモジナイズして100mg/mL ホモジネートを作製し、遠心分離して不溶性物質を除去し、下流アッセイで使用するために96ウェルプレートに等分した。マウスTNFRSF14 ELISAキット（HVEM）（AbCam、カタログ番号：ab213892）を使用して、HVEMを評価した。マウスペリオスチン/OSF-2 DuoSet ELISA（R&D Systems、カタログ番号：DY2955）を使用して、ペリオスチンを評価した。マウスPDGFC ELISAキット（MyBioSource、カタログ番号：MBS165969）を使用して、PDGFCを評価した。マウス/ラットIGF-I/IGF-1 DuoSet ELISA（R&D Systems、カタログ番号：DY791）を使用して、IGF1を評価した。マウスIL-24 DuoSet ELISA（R&D Systems、カタログ番号：DY2786-05）を使用して、IL-24を評価した。multiplex ProcartaPlexアッセイ（ThermoFisher Scientific、カタログ番号：PPX-03）を使用して、IL-10

40

50

、IL-13、およびIL-27を評価した。

【0050】

トランスグルタミナーゼアッセイ

【0060】ポリリシン被覆マイクロタイターウェル中で、2種の反応混合物（50 μ L）を試験した。第1は、100mM Tris HCl、pH 7.5、10mM CaCl₂、5mM DTT、1mM EDTA、150mM NaClおよび0.05% Tween-20を含有した。第2は、15mM CaCl₂、5mM DTT、0.5mM EDTA、125mM NaClおよび0.05% Tween-20を含有する、50mM HEPES緩衝液、pH 7.2を含有した。ペプチドを添加して、0~200 μ Mの一連の濃度を得た。ブタ肝臓由来のTGase2（10 μ Units）（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）を各ウェルに添加して、30分間のインキュベーション後、ウェルを水で3回洗浄した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した50 μ Lの0.1 μ g/mLストレプトアビジンを添加して、20分間インキュベートした。次いで、0.05% Tween-20を含有するPBSでウェルを4回洗浄して、100 μ Lの3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン基質を添加した。反応を5分間進行させ、次いで50 μ Lの1N H₂SO₄で停止させ、直ちに450nmで読み取った。

10

【0051】

皮膚炎の誘導

【0061】ADを治療するためのペプチドの活性を試験するために、Kanemaruら（2019）によって記載されたモデルの改変を設計した。未治療の健康なマウス皮膚では、表皮は薄く（図1A）、Ly6G⁺好中球はほとんど存在しない（図1B）。真皮は、DCおよびマクロファージのマーカー（図1C）であってsvL4およびsv6Dの潜在的標的である、CD301b⁺を染色する豊富な細胞を含む。

20

【0052】

【0062】本発明者らは、Kanemuraら（2019）によって記載されたように、3日毎に4% SDSで2時間治療することによって皮膚に広範な損傷が引き起こされることを発見した。したがって、ヒト皮膚のバリア機能を破壊する1% SDS（Tormaら、2008）を浸透促進剤として使用した（Karandeら、2004）。-1日目に、マウスの背部皮膚を剃毛し、チオグリコレートおよび水酸化ナトリウム（Nair）で除毛し、70%エタノールで洗浄し、続いてPBSで洗浄した。この治療は、14日目に検査した場合、追加の刺激物なしで、表皮の肥厚および好中球の広範な浸潤を引き起こした（図2Aおよび図2B）。皮膚を1% SDSで2時間さらに治療した。SDSによる治療を3日毎に繰り返し、その間、皮膚の1cm²領域をPBS中の治療液で湿らせたガーゼで覆った。治療の際LPSを添加することによって、病変の領域内の真皮および表皮で好中球が高密度になり、病状は悪化した（図2Cおよび図2D）。

30

【0053】

実施例2

svL4またはsvH1Cによる治療はアトピー性皮膚炎を軽減する

【0063】真皮中のCD301b⁺細胞が皮膚炎の消散において役割を果たす可能性があるため、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）の模倣体であるsvL4およびsv6D（Egginkら、2018）について、皮膚炎の形態学的特徴を抑制する能力を試験した。消散は、薄い表皮および好中球を含まない真皮の回復として定義する。0.1、1.0もしくは2.0 μ Mで局所的にペプチドを試験し、または1nmole/g体重の毎日の皮下注射でペプチドを試験した。代替ペプチドとして、シアル酸の模倣物であるsvH1C（Egginkら、2015）を試験した。1 μ M svL4をLPSと組み合わせて皮膚に適用した場合、14日間の治療の終わりに、表皮は均一で正常な厚さであり、真皮は好中球をほとんど含まなかった（図2Eおよび図2F）。svL4治療皮膚も壊死病変を欠いていた。表皮の厚さおよび好中球の頻度のグラフ表示を図3Aおよび図3Bに示す。

40

50

【0054】

【0064】病理報告書は、 $1\mu\text{M}$ svL4の局所適用が、刺激物に対する応答を克服する唯一の治療であることを示した（表1）。局所 $0.1\mu\text{M}$ svL4は、 $1\mu\text{M}$ svL4よりも有効性が低く、肥厚した表皮および頻繁な壊死性病変を伴った（図示せず）。興味深いことに、svL4（Egginkら、2018）のC末端側半分である $1\mu\text{M}$ sv6Dの局所適用または皮下注射は有効でなかった。好中球の広範な浸潤が、svL4を除く各治療で観察された。 $1\mu\text{M}$ svH1Cを皮下注射した後に、皮膚炎のレベルがいくらか減少したことが観察され、真皮好中球の存在量は大きく減少したが、局所適用は有効でなかった。

【0055】

【0065】表1に示すように、SDS（1%）、LPS（ $1\mu\text{g}/0.2\text{mL}$ ）およびペプチドで治療するために、背部皮膚の領域を除毛して 1cm^2 の表面を提供した。SDSを3日毎に適用し、ペプチドを含むか、または含まないLPSを含有する包帯を毎日交換した。各治療における平均表皮厚さを、その群の各動物における10回の測定値の平均値の平均として計算した。ペプチドを $1\mu\text{M}$ の濃度で局所的に適用し、 1nmole/g の用量で毎日皮下注射した。未治療のマウスの背部皮膚の厚さの値は、Weiら（2017）からであった。組織病理学的分析により、表皮壊死病変の頻度が同定され、真皮コラーゲンは、真皮コラーゲン束の密度の増加およびより強いエオシン染色によって特徴付けられた。値は土標準誤差である。

【0056】

【表1】

表1. 各治療後の皮膚の組織病理学的パラメータ

治療	表皮の厚さ (μm)	壊死	増加した コラーゲン量
未治療	14.9 ± 1.5	—	—
除毛	33.6 ± 3.9	0.33 ± 0.33	0
SDS/LPS	34.7 ± 4.6	0.50 ± 0.22	0.83 ± 0.40
SDS/LPS + svL4 (局所)	17.5 ± 0.93	0	1.50 ± 0.65
SDS/LPS + svL4 (皮下)	33.2 ± 4.7	1.25 ± 0.75	2.00 ± 0.71
SDS/LPS + sv6D (皮下)	40.7 ± 6.4	0	2.00 ± 0.58
SDS/LPS + svH1C (局所)	35.4 ± 9.2	0.75 ± 0.48	1.50 ± 0.29
SDS/LPS + svH1C (皮下)	31.9 ± 7.1	0	1.50 ± 0.29

【0057】

【0066】治療の経過の見識を得るために、一般的に遭遇するアレルゲン（Kawakamiら、2007）である、チリダニ抽出物（HDM、 $10\mu\text{g}$ ）およびブドウ球菌エンテロトキシンB（SEB、 $100\mu\text{g}$ ）の組合せ $200\mu\text{L}$ を使用して、svL4なしで4日間にわたって皮膚炎を誘導した。これらのアレルゲンによる各2日間の治療の前に、

先の実験と同様に、1% SDS による2時間の治療を行った。アレルゲンで4日間治療した後、 $2 \mu\text{M}$ s v L 4 $\pm$ $1 \mu\text{M}$ デキサメタゾンでさらに5日間皮膚を治療し、これにより消散の中間段階が得られると予想された。図3 A および図3 B に示された結果と同様に、HDM および S E B で治療した動物由来の組織において、肥厚した表皮および広範な壊死病変が、好中球の下層の高密度集団とともに明らかになった（図4 A）。s v L 4 による治療は、表皮の厚さをほぼ正常まで減少させ、肥厚した領域および薄い表皮の領域を伴うものの、少数の小さな病変のみを有した（図4 C および図4 D）。好中球は、真皮、特に病変の下にほとんど存在しないか、または真皮の基部もしくは皮下領域に低頻度で存在した（図4 C）。同様の結果は、s v L 4 + デキサメタゾンで治療された動物由来の試料でも得られた（図4 E および図4 F）。デキサメタゾン単独での治療は、P B S に対してほとんど改善を示さず、いくつかの壊死病変が、好中球をほとんど含まない領域に隣接していた（図4 G および図4 H）。

10

20

30

40

50

【0058】

[0067] C D 3 0 1 b⁺細胞は、好中球の密度が高い病変の下にある真皮では検出されなかった（図4 B）。治療の終わりに、s v L 4 治療皮膚は好中球を欠き、豊富な C D 3 0 1 b⁺細胞は、薄い表皮の下にある真皮において、最初の頻度に回復した（図4 D）。これらの事象は明らかに消散期中に起こった。C D 3 0 1 b⁺細胞は、高度炎症期の間、病変付近で検出されなかった。治療においてデキサメタゾンを含むことは、C D 3 0 1 b⁺細胞の頻度を有意に増加させなかった（図4 F）。デキサメタゾン単独での治療は表皮を正常な厚さに回復しなかったが、真皮の基部の C D 3 0 1 b⁺細胞はより強く染色されたようであり（図4 H）、これは受容体がより高いレベルで発現されたことを示唆した（v a n V l i e t ら、2006）。

【0059】

実施例 3

s v L 4 での治療に対するサイトカイン応答

[0068] 表皮炎症の消散において他の因子が役割を果たすことができるかどうかを決定するために、本発明者らは、アトピー性皮膚炎および創傷治療において重要であると同定されているいくつかの重要なサイトカインの調査を実施した。この研究のために、s v L 4 を除毛した皮膚に局所的に適用し、L P S なしの S D S で治療した。皮膚の抽出物中のサイトカインを、S D S による第1の2時間の治療の4時間後、2日後および5日後に測定し、S D S による治療を3日目に繰り返した。

【0060】

[0069] I L - 1 3 は、アトピー性皮膚炎の病変皮膚において主要な役目を果たし（F u r u e ら、2019；B i t t o n ら、2020）、ペリオスチンおよび I L - 2 4 を上方制御する（M i t a m u r a ら、2020）。対照試料において、I L - 1 3 のレベルは、皮膚の除毛の2日後に増加し、5日目には高いままであった。I L - 1 3 のレベルは、0日目および2日目に S D S によって一時的に増加したが、5日目に S D S および s v L 4 / S D S によって除毛皮膚対照のレベル未満にまで抑制された。ペリオスチンは、サイトカインの I L - 1 0 ファミリーのサブグループであり、I L - 2 0 ファミリーのメンバーである、I L - 2 4 の I L - 1 3 誘導を媒介する（M i t a m u r a ら、2020）。I L - 1 3 レベルは5日目より低かったが、ペリオスチンは S D S の効果と並行して s v L 4 / S D S 治療で増加し続け、これがおそらく I L - 2 4 の増加の原因であった。I L - 2 4 レベルは、創傷において上方制御され、ペリオスチンを介して I L - 1 3 の炎症促進効果および増殖効果を媒介するが、ウイルス感染における免疫抑制の役割も有する（M i t a m u r a ら、2020）。I L - 2 4 を含む I L - 2 0 ファミリーは、I L - 1 β および I L - 1 7 A の産生を抑制し（M i t a m u r a ら、2020；M y l e s ら、2013）、皮膚角化細胞増殖および創傷治療を抑制し（K o l u m a m ら、2017；M e n e z e s ら、2018）、それによって表皮の厚さを減少させる重要な因子であってよい。2日目のピークの後、I L - 1 0 の放出は抑制された（図5）。

【0061】

[0070]筋線維芽細胞の脂肪細胞前駆体亜集団の増殖は、創傷治癒において必須のプロセスであり、CD301b⁺マクロファージによって産生される血小板由来増殖因子C (PDGFC) およびインスリン様増殖因子1 (IGF1) によって誘導される (Shookら、2018)。本発明者らは、治療にかかわらず、皮膚におけるPDGFCのレベルの変化を発見しなかったが、IGF1はsvL4およびSDSによって増加した (図5)。IL-27は皮膚角化細胞の増殖を刺激し、これは表皮の早期肥厚に関与している可能性があるが (Yangら、2017)、svL4治療の最初の5日間は有意に変化しなかった。これらの結果は、svL4が、治療の初期の間、サイトカイン応答に対してSDSの効果を超える有意な効果を有さず、有意な相違はIL-24でのみ見られることを示す。

10

[0062]

実施例 4

急性毒性研究

[0071]10匹の雄Hsd:Sprague Dawley (登録商標) (商標) SD (登録商標) (商標) ラットに、ペプチドsvL4またはペプチドsvH1Cを、1日目および8日目に、体重1kgあたりの被験物質が12.5 μmol である用量レベルで、静脈注射によって与えた。この用量は、最大治療用量よりも100倍高かった。各群の用量体積は2.5 mL/kgであった。毒性の評価は、死亡率、臨床的徴候、体重、摂食量、臨床的病理、および巨視的観察に基づいた。毒物動態評価のために血液試料も採取した。2回目の注射後の血清中のsvL4の濃度の変化を図6に示す。同じ分析をsvH1C (図7Aおよび図7B) について実施し、より短い (5量体) ペプチドであるsv6Bと比較した。血清中のsvL4およびsvH1Cの寿命の比較は、注射の1時間後の血清中のsvL4の濃度がsvH1Cの濃度よりも約100倍高く、svH1Cはより短いsv6Bよりも有意に長い寿命を有することを示した。

20

[0063]

[0072]被験物質に関連する臨床的徴候、体重もしくは体重変化の差、または摂食量の変化は、観察されなかった。9日目において、12.5 $\mu\text{mol/kg}$ 用量を投与された雄の血液学、凝固、または臨床化学の試験結果において、被験物質と関連する影響は存在しなかった。予定された解剖で巨視的病変は明らかではなかった。ペプチドは終末体重に影響を及ぼさず、臓器重量変動のいずれも明らかに被験物質に起因しなかった。

30

[0064]

[0073]この予備的な毒性研究は、Covance Laboratories, Inc. との契約の下で実施され、安全範囲を実証するように設計された。静脈注射と比較して皮下投与されたペプチドのより低い生物学的利用能のために、この研究は、提案された標準治療用量の少なくとも1000倍の安全域を提供したはずである。2.5 mL/kgの容量を使用する12.5 $\mu\text{mol/kg}$ 用量の用量で、ビヒクル対照物質 (発熱物質を含まない滅菌水で調製した標準PBS) 中に懸濁したペプチドsvL4またはsvH1Cの雄ラットへの投与は、十分に許容された。被験物質に関連する所見は認められなかった。

[0065]

実施例 5

ペプチドの安定性/強制分解の分析

[0074]ペプチドの純度は、製造者によって95%を超えていると報告され、独立して確認された。ペプチドは、乾燥形態で無期限に安定である。精製後、ペプチドをPBSまたは150 mM NaCl中の溶液として調製した。PBSに溶解し、時々解凍しながら-20°Cで3年間保存した場合、ペプチドの質量スペクトルに有意な変化は生じなかった。svH1Cを4°Cで1年間保存した後に得られた質量スペクトルは、精製直後に得られたスペクトルと比較して有意な劣化を示さなかった。svH1Cの分子量は4,594 Daである。同様の安定性がsvL4 (分子量6,826 Da) で見出された。

40

[0066]

50

【0075】合成物の安定性は、それらを特定の一連の厳しい条件に供した後、質量分析によって評価した。Blue Stream Laboratoriesによって実施された強制分解研究の概要を表2に示す。

【0067】

【0076】血漿中のsvL4の安定性に関する研究は、ラット血漿では室温で48時間にわたって55%の損失が生じたが、イヌ血漿では15%の損失しか生じなかったことを示した。ラットおよびイヌ血漿中のsvH1Cの安定性は、ラット血漿中では室温で48時間にわたって完全な分解が起こったが、イヌ血漿中では92%の損失が起こったことを示した。生物学的分析試料のため、シュウ酸カリウム、NaFおよびギ酸（2%）の添加によって血漿中のペプチドの損失を防止した。

10

【0068】

【表2】

表2. ストレス条件下での最初にPBS(pH 7.4)に溶解したペプチドの安定性

svL4	
ストレス条件	残留パーセント
熱ストレス: 60°C/周囲の相対湿度、14日	約60
高pH: 40°C、0.1N NaOH/pH11、5日間	0
低pH: 40°C、0.1N HCl/pH3、5日間	100
酸化: 40°C、0.5% H_2O_2 、2日間	100
svH1C	
ストレス条件	残留パーセント
熱ストレス: 60°C/周囲の相対湿度、14日	0
高pH: 40°C、0.1N NaOH/pH11、5日間	0
低pH: 40°C、0.1N HCl/pH3、5日間	100
酸化: 40°C、0.5% H_2O_2 、2日間	50

20

30

【0069】

実施例6

皮膚炎のsvL4消散におけるトランスグルタミナーゼ（TGase）の関与

【0077】svL4およびsv6Dは、DCおよびマクロファージによって発現されるCD301bに対するリガンドであり、CD301b⁺細胞は、治療の消散期に豊富であったが、初期回復期におけるこれらの細胞の役割は、もしあればだが、明らかではなかった。したがって、本発明者らは他の可能性を検討した。Liedenら（2012）およびSuら（2020）は、アトピー性皮膚炎患者の角質層の下でTGaseの発現が顕著に増加することを実証した。TGase活性は正常な表皮バリアの形成に必要とされるので、この上方制御は炎症およびバリア機能不全に対する応答であるようである。本発明者らは、四価svL4のアームのそれぞれにおけるグルタミン残基がTGaseのための基質を提供し、それによってさらなる架橋の機会を提供する可能性があると考えた。図8Aおよび図8Bに示すように、svL4を使用したアッセイは、TGase2との強い反応を示した。sv6Dを基質とした場合の最小活性は、svL4が皮膚炎を消散させる能力が、TGaseの基質として働く能力のみに関連することを明らかにした。これに関連して、svL4中のグルタミンは、基質として酵素にアクセス可能である（図9Cおよび図10参照）。TGase1は、表皮の顆粒層において発現され、最終分化皮膚角化細胞の原形質膜の下の角化膜の形成に関与する主要な酵素である（Kalininら、2001

40

50

）。T G a s e 1は、最初に足場タンパク質であるインボルクリンの膜の内表面への付着を触媒し、続いて角化膜の主要タンパク質であるロリクリンの架橋を触媒する。崩壊した不溶性の物理的バリアに至る細胞の減少は、細胞間の空間を密封するセラミド脂質による原形質膜の置換を伴う。T G a s e 1は細胞内部に限定されるが、s v L 4の局所適用すると正常な表皮形態が消散することから、細胞を架橋する細胞外反応が示唆された。壊死性病変内で、ペプチドがT G a s e 1に接近するのに十分なほど細胞構造が破壊される可能性がある。その代わりに、遍在的に発現されるT G a s e 2は、細胞から分泌され、細胞接着および創傷治癒に関与する（G r i f f i nら、2002；E c k e r tら、2005）。したがって、T G a s e 2は、表面バリアの回復において重要な活性を提供し得る。

10

【0070】

s v L 4は、角質層の架橋を増強するためにT G a s eの基質を提供し、それによって表皮バリアを回復し、アトピー性皮膚炎を軽減する

【0078】これらのデータは、A Dの回復におけるs v L 4の作用機序が、角質層の架橋を増強して、表皮バリア機能を回復するため、T G a s eに対する基質の提供であることを示唆している。

【0071】

【0079】配列特異的ペプチド基質は、トランスグルタミナーゼアイソザイム1～6の各々について同定されている（S u g i m u r aら、2008；F u k u iら、2013；T a n a b eら、2019）。これらの研究者らは、単一ペプチドとタンパクとの間の共有結合性イソペプチド結合による酵素反応を実証した（T a n a b eら、2019）。しかしながら、「単一の」一価ペプチドは、タンパク質の架橋を提供せず、ペプチドを1個のタンパク質に結合させるだけである。本明細書に開示される多価構造化ポリペプチド（例えば、s v L 4）のアームは、複数のタンパク質（すなわち、四価構造に対する潜在的に4個のタンパク質）への付着を提供し、複数のタンパク質を架橋する。架橋メッシュは、T G a s eの基質として働く開示された多価ペプチドによってのみ可能である。したがって、本発明は、堅固で機能的な表皮表面バリアを回復するためのT G a s e架橋活性の基質として働く多価ペプチドを提供する。この技術の重要な特徴を図11に示す。

20

【0072】

【0080】マウスA Dについてのこの研究において、s v L 4が正常な表皮形態を回復する能力は、2個のグルタミン残基を含有する四価ペプチドの各アームのN末端半分におけるアミノ酸によって完全に提供された。グルタミン残基はT G a s eのための基質を提供し、本発明者らは、ペプチドのマルチアーム構造が角質層のタンパク質間のさらなる架橋の形成を可能にしたことを提案する。したがって、本発明者らは、これらの事象が、皮膚の堅固なバリア機能の回復におけるペプチドの作用機序を説明することを提案する。

30

【0073】

【0081】本発明者らは、C D 3 0 1 bのリガンドがA Dの有効な治療を提供するかどうかを調査した。C D 3 0 1 a⁺/C D 3 0 1 b⁺マクロファージは、マウス皮膚の真皮において優勢な免疫細胞種であり、全ての有核細胞の50%を構成し、C D 3 0 1 b⁺D Cとしておよそ7%を構成する（D u p a s q u i e rら、2004）。D Cは主なC D 3 0 1 b（M G L 2）発現細胞であるが、K a n e m a r uら（2019）は、真皮D CもC D 3 0 1 a（M G L 1）を発現することを示した。同様に、C D 3 0 1 aはマウスマクロファージによって主に発現されるが、A Dの消散に必須である真皮マクロファージもC D 3 0 1 bを発現する。K a n e m a r uら（2019）は、マウスモデルにおけるA Dの主な原因は好中球の浸潤であり、これは他の炎症性疾患にも当てはまり得ると結論付けた。図2A～図2Fに示すように、ペプチドs v L 4の局所適用は、刺激性のS D SおよびL P Sに対する皮膚の応答を無効にし、L P Sが継続的に存在する場合であっても、正常な形態への復帰を可能にする。治療に対する一次応答は、真皮中の好中球数の減少である。C D 3 0 1 b⁺細胞は、回復の開始において重要な因子であるようには見えなかったが、マクロファージは、おそらく、消散期の間のアポトーシスに関する好中球の食作用（

40

50

Greenlee-Wacker、2016)の原因であった。

【0074】

表皮バリアの回復は、 Ca^{2+} 勾配の形成および正常な表皮形態への復帰を促進する
[0082] Ca^{2+} は、表皮の恒常性の調節において主要な役割を果たす。特徴的な Ca^{2+} 勾配は、顆粒層内にピーク濃度を有し、外側の角質およびより深い基底層に向かって濃度が減少する (Eliasら、2002; Mauroら、1998)。勾配は、細胞外、細胞質および細胞小器官の遊離 Ca^{2+} から構成されるが、顆粒層のわずか2%が細胞外スペースにある (Celliら、2010; Behneら、2011)。細胞質 Ca^{2+} は通常非常に低く (約 $0.1 \mu M$) 維持されるので、 $10 \sim 20 \mu M$ の平均濃度は、細胞質小器官、すなわち小胞体およびゴルジ構造における Ca^{2+} の巨大な貯蔵を示唆する。プロフィラグリンのN末端領域は、 Ca^{2+} に結合するS100ドメインを含み (Oswawaら、2011)、これはタンパクが分解されるにつれてカチオンを放出する。

10

【0075】

[0083] 低 Ca^{2+} 濃度 ($30 \mu M$) の培地は皮膚角化細胞の増殖を促進するが、表皮の3-D再構築の間は、外側の細胞層の分化および形成のために、より高い濃度 ($100 \mu M$ を超える) が必要である (Bikleら、2012; LeeおよびLee、2018; Lee、2020; Teshimaら、2020)。角質層のバリア機能の破壊は、勾配を消失させる。したがって、皮膚炎の誘導による表皮の拡大は、外層におけるより低い Ca^{2+} から生じる可能性があり、治療による正常な薄い表皮は、 Ca^{2+} 勾配の回復による皮膚角化細胞分化を反映するようである。酸性の角質は、ペプチドを表皮表面に引き付ける働きをしている可能性がある (Behneら、2002; Hansonら、2002)。svL4の局所適用であるが皮下適用ではない観察は、皮膚の外表面におけるペプチドの物理的存在についての役割を支持する。バリア機能の回復およびその結果としての Ca^{2+} 勾配の回復は、皮膚角化細胞の最終分化および表皮の正常な形態への復帰の前提条件である (Behneら、2011; Elsholzら、2014; Lee、2020)。

20

【0076】

[0084] 別途定義されない限り、本明細書における全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本開示の実施または試験において、本明細書の記載に類似または均等である任意の方法および材料を使用できるが、好ましい方法および材料を本明細書に記載する。引用された全ての刊行物、特許、および特許公開は、全ての目的のために、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0077】

[0085] 全ての見出しは読者の便宜のためのものであり、指定されない限り、見出しに続くテキストの意味を限定するために使用されるべきではない。

【0078】

[0086] 本明細書において説明された刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示のためにのみ提供される。本明細書中のいかなるものも、本発明が、先行発明の効力によってそのような刊行物に先行する権利を与えられないことの承認と解釈されない。

40

【0079】

[0087] 本発明をその具体的な実施形態に関連して説明してきたが、本発明はさらなる修正が可能であり、本出願は本発明の任意の変形、使用、または適合を包含することを意図しており、これらは、一般的に、本発明の原理に従うとともに、本開示からの逸脱を含み、本開示からの逸脱は、本発明が属する技術分野における公知または慣習的な実施の範囲内にあり、本明細書で前述した本質的な特徴に適用でき、添付の特許請求の範囲に従う。

【0080】

参考文献

【0081】

50

【表 3 - 1】

Behne MJ, Meyer JW, Hanson KM, Barry NP, Murata S, Crumrine D, et al. NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging. *J Biol Chem* 2002; 277:47399-406.

Behne MJ, Sanchez S, Barry NP, Kirschner N, Meyer W, Mauro TM, et al. Major translocation of calcium upon epidermal barrier insult: imaging and quantification via FLIM/Fourier vector analysis. *Arch Dermatol Res* 2011; 303:103-15.

Bikle DD, Xie Z, Tu C-L. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2012; 7:461-72.

Bitton A, Avlas S, Reichman H, Itan M, Karo-Atar D, Azouz NP, et al. A key role for IL-13 signaling via the type 2 IL-4 receptor in experimental atopic dermatitis. *Sci Immunol* 2020; 5:eaaw2938.

Brown CC, Gudjonson H, Pritykin Y, Deep D, Lavallée V-P, Mendoza A, et al. Transcriptional basis of mouse and human dendritic cell heterogeneity. *Cell* 2019; 179:846-63.

Celli A, Sanchez S, Behne M, Hazlett T, Gratton E, Mauro. The epidermal Ca^{2+} gradient: measurement using the phasor representation of fluorescent lifetime imaging. *Biophys J* 2010; 98:911-21.

Chiang C-C, Cheng W-J, Korinek M, Lin C-Y, Hwang T-L. Neutrophils in psoriasis. *Front Immunol* 2019; 10:2376.

Dupasquier M, Stoitzner P, van Oudenaren A, Romani N, Leenen PJM. Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. *J Invest Dermatol* 2004; 123:876-9.

Eckert RL, Sturniolo MT, Broome A-M, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 2005; 124:481-92.

Eggink LL, Roby KF, Cote R, Hooper JK. An innovative immunotherapeutic strategy for ovarian cancer: CLEC10A and glycomimetic peptides. *J ImmunoTher Cancer* 2018; 6:28.

Eggink LL, Spyroulias GA, Jones NG, Hanson CV, Hooper JK. A peptide mimetic of 5-acetylneuraminic acid-galactose binds with high avidity to siglecs and NKG2D. *PloS One* 2015; 10:e0130532.

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

Elias PM, Ahn SK, Brown BE, Crumrine D, Feingold KR. Origin of the epidermal calcium gradient: regulation by barrier status and role of active vs passive mechanisms. *J Invest Dermatol* 2002; 119:1269-74.

Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K. Calcium – a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatol* 2014; 24:650-61.

Fukui M, Kuramoto K, Yamasaki R, Shimizu Y, Itoh M, Kawamoto T, Hitomi K. Identification of a highly reactive substrate peptide for transglutaminase 6 and its use in detecting transglutaminase activity in the skin epidermis. *FEBS J* 2013; 280:1420-9.

Furue K, Ito T, Tsuji G, Ulzii D, Vu YH, Kido-Nakahara M, et al. The IL-13-OVOL1-FLG axis in atopic dermatitis. *Immunology* 2019; 158:281-6.

Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev* 2016; 273:357-70.

Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* 2002; 368:377-96.

Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis—Part 1: Clinical and pathologic concepts. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:1110-8.

Hamilton JD, Ungar B, Guttman-Yassky E. Drug evaluation review: dupilumab in atopic dermatitis. *Immunotherapy* 2015; 7:1043-58.

Hanson KM, Behne MJ, Barry NP, Mauro TM, Gratton E, Clegg RM. Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient. *Biophys J* 2002; 83:1682-90.

Harb H, Chatila TA. Mechanisms of dupilumab. *Clin Exp Allergy* 2020; 50:5-14.

Heger L, Balk S, Lühr JJ, Heidkamp GF, Lehmann CHK, Hatscher L, et al. CLEC10A is a specific marker for human CD1c⁺ dendritic cells and enhances their toll-like receptor 7/8-induced cytokine secretion. *Front Immunol* 2018; 9:744.

Higashi N, Fujioka K, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Sato T, et al. The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells. *J Biol Chem* 2002; 277:20686-93.

Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3824-8.

Jin H, He R, Oyoshi M, Geha RS. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009; 129:31-40.

【 0 0 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

Johannessen BR, Skov LK, Kastrup JS, Kristensen O, Bolwig C, Larsen JN, et al. Structure of the house dust mite allergen Der f 2: implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. *FEBS Lett* 2005; 579:1208-12.

Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci* 2001; 114:3069-70.

Kanemaru K, Noguchi E, Tahara-Hanaoka S, Mizuno S, Tatenno H, Denda-Nagai K, et al.

Clec10a regulates mite-induced dermatitis. *Sci Immunol* 2019; 4:eaax6908.

Karande P, Jain A, Mitragotri S. Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. *Nat Biotech* 2004; 22:192-7.

Kawakami Y, Yumoto K, Kawakami T. An improved mouse model of atopic dermatitis and suppression of skin lesions by an inhibitor of Tec family kinases. *Allergol Internatl* 2007; 56:403-9.

Kim T-G, Kim SH, Park J, Choi W, Sohn M, Na HY, et al. Skin-specific CD301b⁺ dermal dendritic cells drive IL-17-mediated psoriasis-like immune response in mice. *J Invest Dermatol* 2018; 138:844-53.

Kolumam G, Wu X, Lee WP, Hackney JA, Zavala-Solorio J, Gandham V, et al. IL-22R ligands IL-20, IL-22, and IL-24 promote wound healing in diabetic *db/db* mice. *PLOS One* 2017; 12:e0170639.

Langan S, Irvine AD, Weidinger. Atopic dermatitis. *Lancet* 2020; 396:345-60.

Lee SE, Lee SH. Skin barrier and calcium. *Ann Dermatol* 2018; 30:265-75.

Lee A-Y. Molecular mechanism of epidermal barrier dysfunction as primary abnormalities. *Int J Mol Sci* 2020; 21:1194.

Liedén A, Winge MCG, Sääf A, Kockum I, Ekelund E, Rodriguez E, et al. Genetic variation in the epidermal transglutaminase genes is not associated with atopic dermatitis. *PLOS ONE* 2012; 7:e49694.

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Trans Targ Therapy* 2017; 2:e17023.

Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:227-55.

Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42:145-51.

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

Martel BC, Lovato P, Baumer W, Olivry T. Translational animal models of atopic dermatitis for preclinical studies. *Yale J Biol Med* 2017; 90:389-402.

Mauro T, Bench G, Sidders-Haddad E, Feingold K, Elias P, Cullander C. Acute barrier perturbation abolishes the Ca^{2+} and K^{+} gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J Invest Dermatol* 1998; 111:1198-201.

Menezes ME, Bhoopathi P, Pradhan AK, Emdad L, Das SK, Guo C, et al. Roles of MDA-7/IL-24 a multifunction protein in human diseases. *Adv Cancer Res* 2018; 138:143-82.

10

Mitamura Y, Nunomura S, Furue M, Izuhara K. IL-24: a new player in the pathogenesis of pro-inflammatory and allergic skin diseases. *Allergol Internatl* 2020; 69:405-11.

Myles IA, Fontecilla NM, Valdez PA, Vithayathil PJ, Naik S, Belkaid Y, et al. Signaling via the IL-20 receptor inhibits cutaneous production of IL-1 β and IL-17A to promote infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Immunol* 2013; 14:804-13.

Munera-Campos M, Carrascosa JM. Innovation in atopic dermatitis: from pathogenesis to treatment. *Actas Dermasifiliogr* 2020; 111:205-21.

Nguyen AV, Soulika AM. The dynamics of the skin's immune system. *Int J Molec Sci* 2019; 20:1811.

20

Osawa R, Akiyama M, Shimizu H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergol Internatl* 2011; 60:1-9.

Saini S, Pansare M. New insights and treatments in atopic dermatitis. *Ped Clin North Am* 2019; 66:1021-33.

Shook BA, Wasko RR, Rivera-Gonzalez GC, Salazar-Gatzimas E, López-Giráldez F, Dash BC, et al. Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair. *Science* 2018; 362:909.

30

Singh SK, Streng-Ouwehand I, Litjens M, Weelij DR, Garcia-Vallejo, van Vliet SJ, et al. Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties. *Molec Immunol* 2009; 46:1240-9.

Smith FJD, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 2006; 38:337-341.

【 0 0 8 5 】

40

【表 3 - 5】

Su H, Luo Y, Sun J, Liu X, Ling S, Xu B, et al. Transglutaminase 3 promotes skin inflammation in atopic dermatitis by activating monocyte-derived dendritic cells via DC-SIGN. *J Invest Dermatol* 2020; 140 :170-9.

Sugimura Y, Hosono M, Kitamura M, Tsuda T, Yamanishi K, Maki M, Hitomi K. Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1—development of a novel peptide that an efficiently detect cross-linking enzuyme activity in the skin. *FEBS J* 2008; 275:5667-77.

Tanabe Y, Yamane M, Kato M, Teshima H, Kuribayashi M, Tatsukawa H, et al. Studies on differentiation-dependent expresión and activity of distinct transglutaminases by specific substrate peptides using three-dimensional reconstructed epidermis. *FEBS J* 2019; 286:2536-48.

Teshima H, Kato M, Tatsukawa H, Hitomi K. Analysis of the expression of transglutaminases in the reconstructed human epidermis using a three-dimensional cell culture. *Anal Biochem* 2020; 603:113606.

Törmä H, Lindberg M, Berne B. Skin barrier disruption by sodium lauryl sulfateexposure alters the expression of involucrin, transglutamnase 1, profilaggrin, and kallikreins during the repair phase in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1212-19.

Urban, K, Chu S, Giesey RL, Mehrmal S, Uppal P, Nedley N, Delost GR. The global, regional, and national burden of atopic dermatitis in 195 countries and territories: an ecological study from the Global Burden of Disease Study 2017. *JAAD Internat* 2021; 2:12-18.

van Kooyk Y, Ilarregui JM, van Vliet SJ. Novel insights into the immunomodulatory role of the dendritic cell and macrophage-expressed C-type lectin MGL. *Immunobiology* 2015; 220:185-92

van Vliet SJ, van Liempt E, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets. *Immunobiology* 2006; 211:577-585.

Villani A-C, Saija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 2017; 356:eaah4573.

Wei JCJ, Edwards GA, Martin DJ, Huang H, Crichton ML, Kendall MAF. Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: from mice, rats, rabbits, pigs to humans. *Sci Rep* 2017; 7:15885.

Yang B, Suwanpradid J, Sanchez-Lagunes R, Choi HW, Hoang P, Wang D, et al. IL-27 facilitates skin wound healing through induction of epidermal proliferation and host defense. *J Invest Dermatol* 2017; 137:1166-75.

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

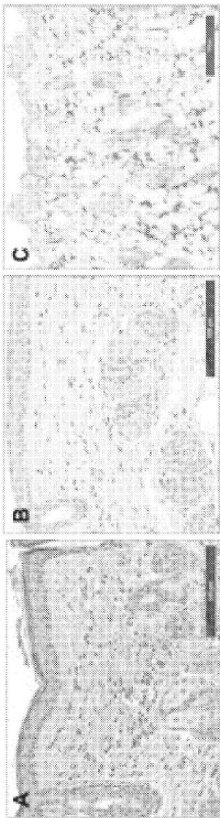
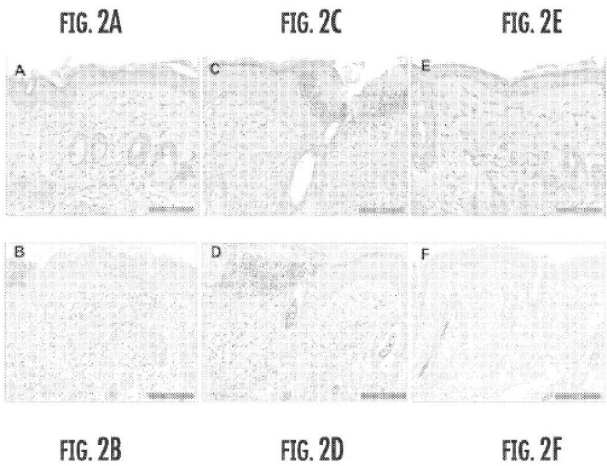


FIG. 1C
FIG. 1B
FIG. 1A

【図 2】



10
20

【図 3 - 1】

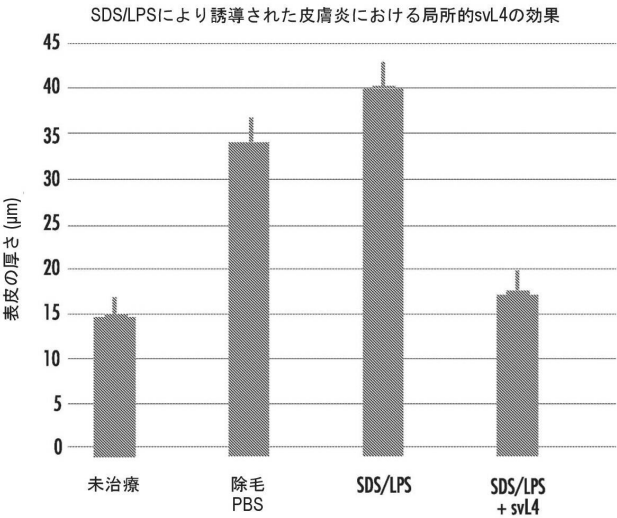


FIG. 3A

【図 3 - 2】

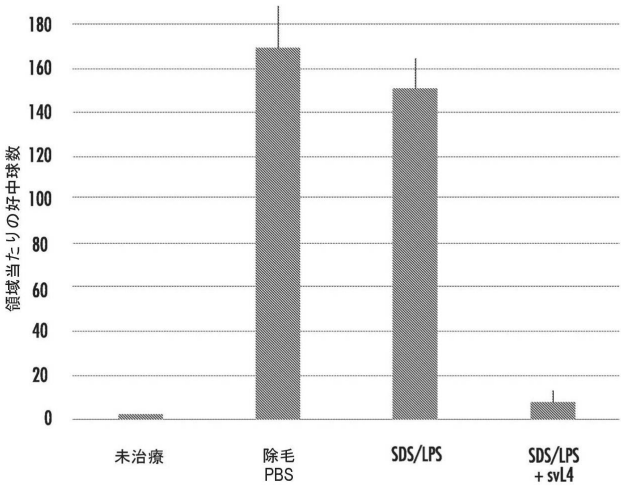
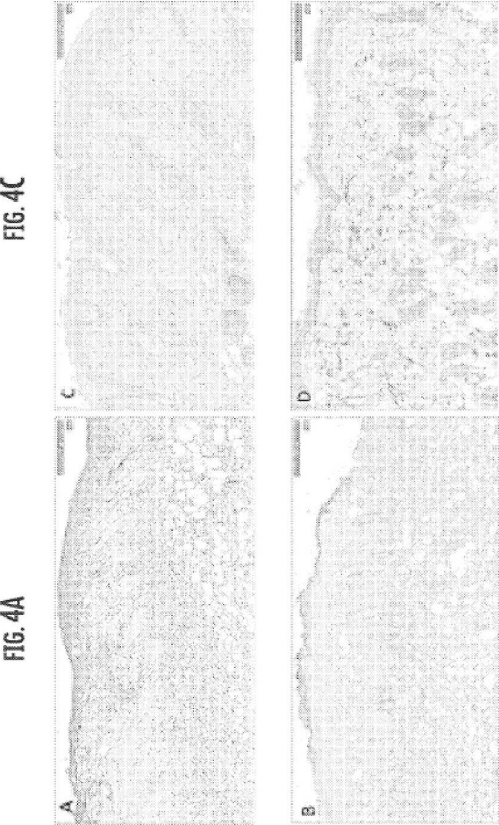


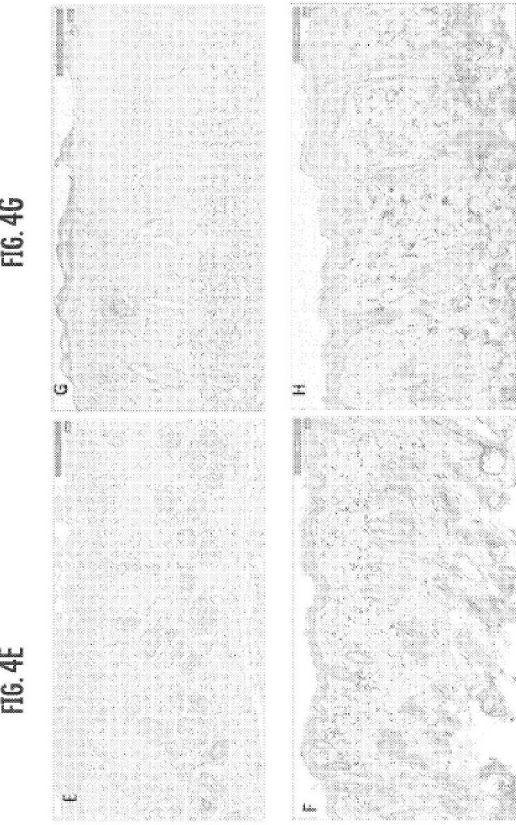
FIG. 3B

30
40

【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



【図 5】

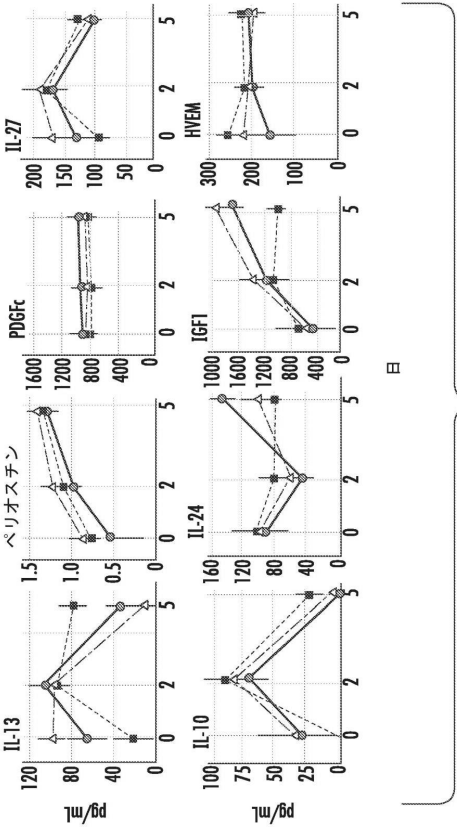


FIG. 5

【図 6】

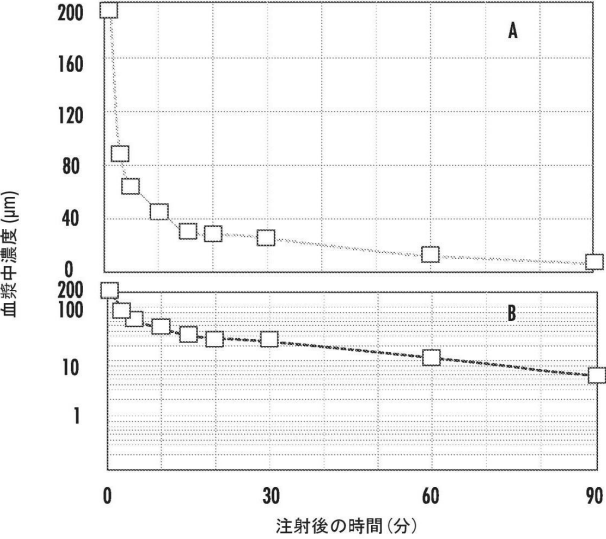


FIG. 6

10

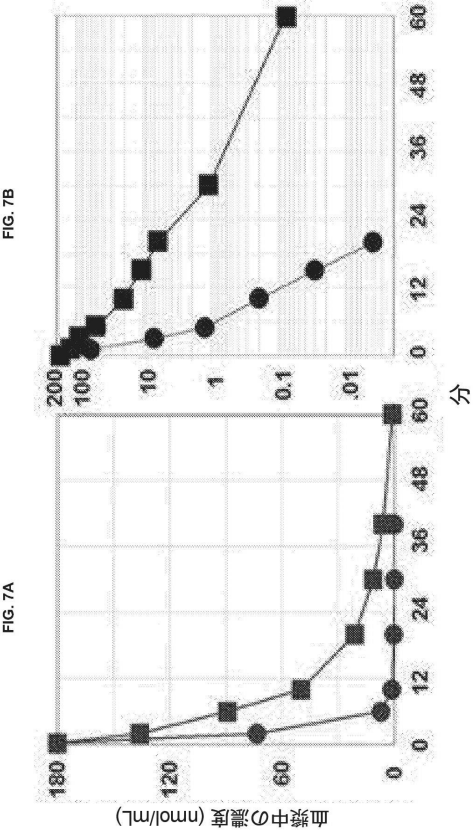
20

30

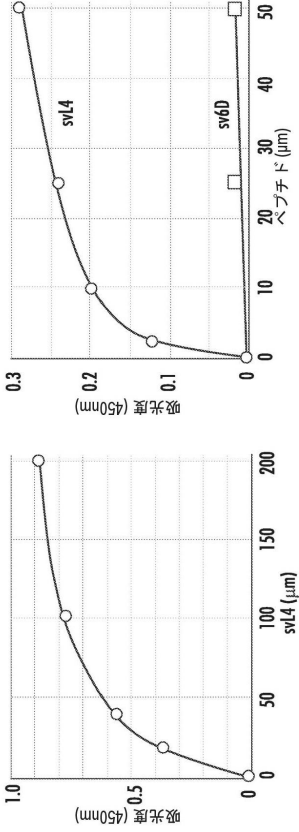
40

50

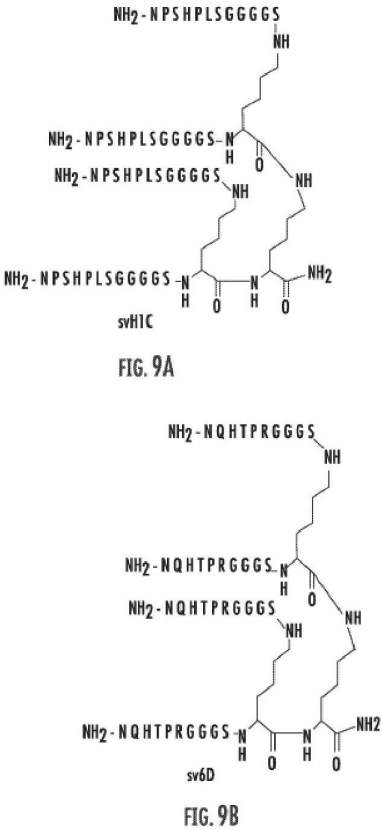
【 図 7 】



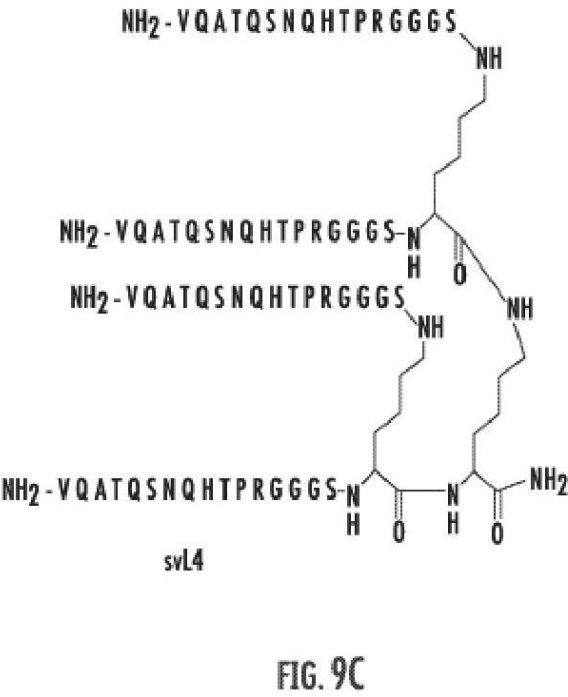
【 図 8 】



【 図 9 - 1 】



【 図 9 - 2 】



10

20

30

40

50

【 図 1 0 】

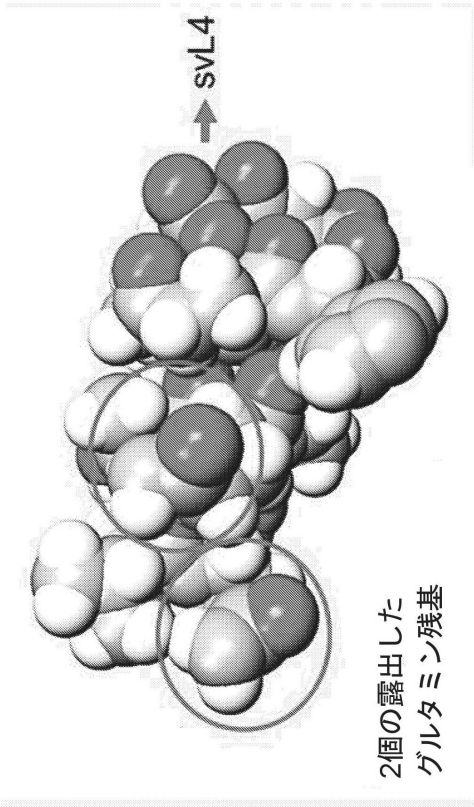


FIG. 10

【 配 列 表 】

2023536815000001.app

【 図 1 1 】

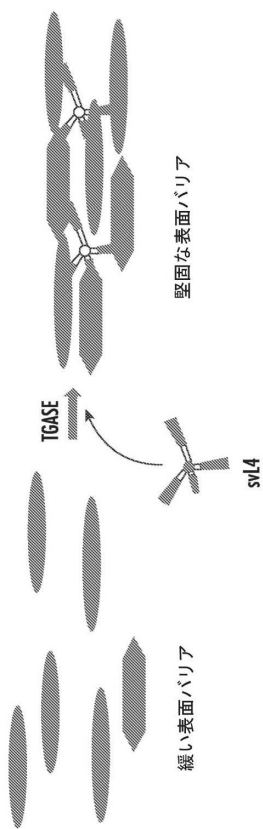


FIG. 11

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US21/38999
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 38/08; A61K 39/395; A61P 31/12; A61P 37/02 (2021.01) CPC - A61K 38/08; A61K 39/395; A61P 31/12; A61P 37/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/175878 A1 (SUSAVION BIOSCIENCES, INC.) 3 November 2016; abstract; page 7, third paragraph; page 8, third paragraph; page 20, third paragraph	1, 3/1
Y		19, 21/19, 28, 30/28
A		2, 3/2
Y	WO 2007/024182 A1 (ASTRAZENECA AB) 1 March 2007; page 4, lines 22-25	19, 21/19
Y	US 2019/0167789 A1 (SUSAVION BIOSCIENCES, INC.) 6 June 2019; paragraph [0041]	28, 30/28
Y	(KAPLAN, MJ) Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. Arthritis Research and Therapy. 2 October 2013, Vol. 15, No. 219; pages 1-9; abstract; page 3, first column, fourth paragraph; page 4, first column, fifth paragraph -- second column, first paragraph; DOI: 10.1186/ar4325	1, 3/1
A	WO 2019/136185 A1 (SUSAVION BIOSCIENCES, INC.) 11 July 2019; paragraph [0017]	3, 3/2
A	(AKIYAMA, T et al.) The Human Cathelicidin LL-37 Host Defense Peptide Upregulates Tight Junction-Related Proteins and Increases Human Epidermal Keratinocyte Barrier Function. Journal of Innate Immunity. 2014, Vol. 6, No. 6; pages 739-753; abstract; DOI: 10.1159/000362789	2, 3/2
Y	US 2011/0129546 A1 (UMBERT MILL, I) 2 June 2011; paragraph [0225]	30/28
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C: ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 November 2021 (22.11.2021)		Date of mailing of the international search report JAN 19 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/38999

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/38999

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-18, 24-27, 31
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I+, Claims 1-3, 19-23, 28-30; NQHTPR, wherein X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 are independently absent (therapeutic peptide)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/38999

---Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

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

Group I+, Claims 1-3, 19-23, 28-30; NQHTPR, wherein X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 are independently absent (therapeutic peptide) are directed toward a method, kit and composition for treating pathological inflammation in a patient comprising: administering to the patient a multivalent structured polypeptide comprising multiple copies of the therapeutic peptide.

The method, kit, and composition will be searched to the extent that they encompass a therapeutic peptide comprising NQHTPR (first exemplary therapeutic peptide). Applicant is invited to elect additional therapeutic peptide(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO., such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), to be searched. Additional therapeutic peptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-3 (each in-part), 19 (in-part), 21 (in-part), 28 (in-part) and 30 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass NQHTPR (therapeutic peptide). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected therapeutic peptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be VQATQSNQHTPR (therapeutic peptide).

No technical features are shared between the therapeutic peptides of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a method of treating a patient having a neutrophil-driven inflammatory disease, the method comprising: administering to the patient a multivalent structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide; wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q; a kit, comprising: a multivalent structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide; wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q; and instructions teaching administration of the multivalent structured polypeptide to a patient having a neutrophil-driven inflammatory disease; a pharmaceutical composition comprising: a multivalent structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide; wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q; and a second pharmaceutical intervention, wherein the second pharmaceutical intervention is a corticosteroid and/or a monoclonal antibody; these shared technical features are previously disclosed by US 2019/0167789 A1 (SUSAVION BIOSCIENCES, INC.) as evidenced by US 10,093,712 B2 to Eggink, et al. (hereinafter "Eggink").

Susavion discloses a method of treating a patient having a neutrophil-driven inflammatory disease (administering to a subject a tetravalent peptide comprising VQATQSNQHTPR (a method of treating a patient having a neutrophil-driven inflammatory disease); abstract; paragraph [0014]; as further indicated by the Eggink evidentiary reference that a peptide comprising the sequence VQATQSNQHTPR treats psoriasis (a neutrophil-driven inflammatory disease; column 3, lines 48-53; column 19, lines 3, 32), the method comprising: administering to the patient a multivalent structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide (the method comprising: administering to the patient a multivalent structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide; abstract; paragraphs [0011], [0014]); wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q (wherein the sequence of the therapeutic peptide is VQATQSNQHTPR (wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q (wherein the sequence of the therapeutic peptide is VQATQSNQHTPR (wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q); abstract; paragraph [0011]); a kit (abstract), comprising: a multivalent structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide (comprising: a tetravalent (multivalent) structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide; abstract); wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q (wherein the sequence of the therapeutic peptide is VQATQSNQHTPR (wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q); abstract; paragraph [0011]); and instructions teaching administration of the multivalent structured polypeptide to a patient having a neutrophil-driven inflammatory disease (the instructions are not being afforded patentable weight since instructions are not functionally related to the kit); a pharmaceutical composition comprising: a multivalent structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide (a pharmaceutical composition comprising: a multivalent structured polypeptide comprising at least two copies of a therapeutic peptide; abstract; claim 1); wherein the sequence of the therapeutic peptide consists of the sequence X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-NQHTPR (SEQ ID NO: 10) with each of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 independently being absent or any amino acid residue, so long as the therapeutic peptide comprises at least 7 amino acid residues and at least one of X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, and X8 is Q); abstract; paragraph [0011]); and a second pharmaceutical intervention (and a second pharmaceutical intervention; claim 1), wherein the second pharmaceutical intervention is a corticosteroid and/or a monoclonal antibody (wherein the second pharmaceutical intervention is a

---Continued Within the Next Supplemental Box---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/38999

.***-Continued from previous Supplemental Box-***.

corticosteroid and/or a monoclonal antibody; paragraph [0041]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Susavion reference, unity of invention is lacking.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	31/56 (2006.01)	A 6 1 K	31/56	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	31/573 (2006.01)	A 6 1 K	31/573	
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 2 5 7, スコッツデール, ノース・エイティセブンス・ウェイ 2
5 3 8

(72)発明者 フーバー, ジェイ・ケネス

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 0 4 8, フェニックス, サウス・サーティーンズ・ウェイ 1 5 8
4 9

F ターム (参考)

4C076 AA95 BB11 CC04 CC15 CC18 EE41
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 BA18 BA23 CA59 NA05 NA14
ZA59 ZA89 ZB11 ZB13 ZC75
4C085 AA14 BB31 CC23 DD62 EE03 GG01
4C086 AA01 AA02 DA10 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA59 ZA89
ZB11 ZB13 ZC75
4H045 AA10 AA20 AA30 BA14 BA15 BA16 BA41 EA20 FA10