

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-535224

(P2018-535224A)

(43) 公表日 平成30年11月29日 (2018. 11. 29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/03 (2006.01)	A 6 1 K 38/03	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/08 (2006.01)	A 6 1 K 38/08	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
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2018-526543 (P2018-526543)	(71) 出願人	518172082
(86) (22) 出願日	平成28年11月18日 (2016. 11. 18)		アスクレピクス セラピューティクス エルエルシー.
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月22日 (2018. 6. 22)		アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/062816		ボルチモア ワイマン パーク ドライブ 8 1 0
(87) 国際公開番号	W02017/087825	(74) 代理人	110000796
(87) 国際公開日	平成29年5月26日 (2017. 5. 26)		特許業務法人三枝国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	62/257, 569	(72) 発明者	プレスラー エリック エム.
(32) 優先日	平成27年11月19日 (2015. 11. 19)		アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ボルチモア ワイマン パーク ドライブ 8 1 0 シー/オー アスクレピクス セラピューティクス エルエルシー
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗血管新生、抗リンパ管新生及び抗浮腫特性を有するペプチド及びナノ粒子製剤

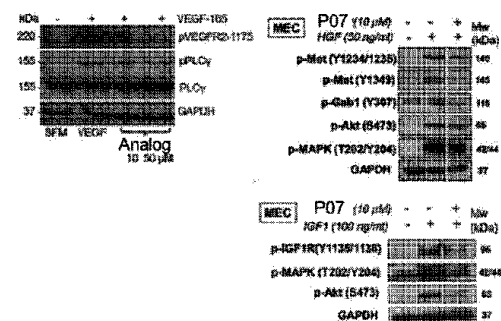
(57) 【要約】

本発明の様々な態様及び実施形態は、I V型コラーゲン

5 線維由来のペプチド医薬組成物、及び薬物治療におけるその使用方法に關与する。ペプチドは 5 1 及び V 3 インテグリンを標的とし、複数の受容体を通してシグナル伝達を阻害し、血管透過性、血管新生、リンパ管新の阻害を目的とする使用法を呈示する。

【選択図】 図 1

Figure 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 ~ 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有するペプチド、またはその誘導体の効果的容量を、治療が必要な患者に投与することを含む、微小血管漏出を治療または予防する方法。

【請求項 2】

前記誘導体が配列番号 7 ~ 31 のいずれか 1 つのペプチドである、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 3】

前記患者がインフルエンザに罹患しているか、または罹患しているリスクを有する、請求項 1 に記載の前記方法。

10

【請求項 4】

前記ペプチドが、インフルエンザの最初の症状から 3 日以内に最初に投与される、請求項 3 に記載の前記方法。

【請求項 5】

前記ペプチドが、インフルエンザの最初の症状の後に最初に投与される、請求項 3 に記載の前記方法。

【請求項 6】

前記ペプチドが、インフルエンザの最初の症状の前に最初に投与される、請求項 3 に記載の前記方法。

20

【請求項 7】

前記ペプチドが肺の中の浮腫を低減する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 8】

前記ペプチドが 1 日に 1 ~ 5 回投与される、請求項 7 に記載の前記方法。

【請求項 9】

前記ペプチドが前記肺に局所的に投与される、請求項 7 に記載の前記方法。

【請求項 10】

前記患者が少なくとも 1 つの抗ウイルス剤及び / または抗炎症剤を使用した治療を受けている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

30

【請求項 11】

血管新生または微小血管漏出の調節不全に関連し、選択的に MS または PD である神経病変を有する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 12】

患者がアルツハイマー病に罹患しているか、またはアルツハイマー病に罹患しているリスクが確認され、前記ペプチドが血液脳関門の健全性を保持し、アルツハイマー病の発症または進行を遅らせるまたは予防する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 13】

前記患者がアルツハイマー病の治療を目的とする少なくとも 1 つの追加の薬剤を用いた治療を受けている、請求項 12 に記載の前記方法。

40

【請求項 14】

前記ペプチドが 1 日に 1 ~ 5 回投与される、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 15】

前記患者が出血熱に罹患しているか、または罹患しているリスクを有する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 16】

前記患者がエボラウイルスを有する、請求項 15 に記載の前記方法。

【請求項 17】

前記患者が少なくとも 1 つの出血熱の治療用の抗ウイルス剤を使用して治療を受けてい

50

る、請求項 15 に記載の前記方法。

【請求項 18】

前記ペプチドが 1 日に 1 ～ 5 回投与される、請求項 15 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 19】

前記患者が脳性マラリアに罹患している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ペプチドが脳性マラリアに関連する脳浮腫及び／または虚血を低減する、請求項 19 に記載の前記方法。

【請求項 21】

前記患者が抗マラリア薬治療を受けている、請求項 19 に記載の前記方法。

【請求項 22】

前記ペプチドが脳性マラリア患者の血液脳関門及び血管の健全性を保持する、請求項 19 に記載の前記方法。

【請求項 23】

前記ペプチドが 1 日に 1 ～ 5 回投与される、請求項 19 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 24】

免疫チェックポイント阻害薬治療を受けている、または準備をしているがん患者に配列番号 1 ～ 6 のいずれか 1 つの前記アミノ酸配列を有するペプチド、またはその誘導体の効果的容量を投与することを含む、がんを治療する方法。

【請求項 25】

前記誘導体が配列番号 7 ～ 31 のいずれか 1 つのペプチドである、請求項 24 に記載の前記方法。

【請求項 26】

前記免疫チェックポイント阻害剤が抗 PD - 1 抗体、抗 PD - L 1 抗体または抗 CTLA - 4 抗体である、請求項 24 に記載の前記方法。

【請求項 27】

前記がんが非小細胞肺癌、メラノーマ、前立腺がん、転移性腎細胞がんから選択される、請求項 24 ～ 26 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 28】

前記がんが PD - 1、PD - L 1 または CTLA - 4 に対して陽性である、請求項 24 ～ 27 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 29】

前記チェックポイント阻害薬治療は、PD - 1 及び PD - L 1 または CTLA - 4 及び B7 の間の相互関係を阻害する薬剤である、請求項 24 ～ 28 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 30】

インテグリンを標的とする PLGA - PEG 共重合体及びコンジュゲートされたペプチドを含む、ナノ粒子。

【請求項 31】

前記ペプチドが配列番号 1 ～ 6 のいずれか 1 つの前記アミノ酸配列、またはその誘導体を含む、請求項 30 に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 32】

前記誘導体が配列番号 7 ～ 31 のいずれか 1 つのペプチドである、請求項 31 に記載の前記方法。

【請求項 33】

前記ナノ粒子が PLGA - PEG ペプチドコンジュゲートから形成される、請求項 30 ～ 32 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 34】

前記ナノ粒子が血管新生及び／またはリンパ管新生の阻害に対して効果的である、請求項 33 に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 35】

前記高分子の少なくとも 50% はコンジュゲートされたペプチドを有する、請求項 33 に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 36】

封入された活性剤をさらに含む、請求項 30～35 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 37】

前記ナノ粒子が前記活性剤の徐放を提供する、請求項 36 に記載の前記ナノ粒子。

10

【請求項 38】

前記活性剤が化学療法剤である、請求項 36 または 37 に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 39】

前記活性剤がペプチド薬剤、または標的抗がん薬治療である、請求項 36 または 37 に記載のナノ粒子。

【請求項 40】

約 50 nm～約 500 nm、または約 50 nm～約 100 nm の範囲内の平均径を有する、請求項 30～39 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 41】

前記ナノ粒子がその表面にコンジュゲートされた追加の薬物または標的薬剤を含有する、請求項 30～40 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子。

20

【請求項 42】

前記ナノ粒子が -10～-40 mV の範囲内のゼータ電位を有する、請求項 40 に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 43】

前記ナノ粒子が球状である、請求項 30～42 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 44】

前記粒子が非球状である、請求項 30～42 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子。

【請求項 45】

前記ナノ粒子または微粒子が長時間有効デポ剤を提供する、配列番号 1～6 のいずれか 1 つのペプチドまたはその誘導体を封入する微粒子。

30

【請求項 46】

前記誘導体が配列番号 7～31 のいずれか 1 つのペプチドである、請求項 45 に記載の前記微粒子。

【請求項 47】

前記粒子高分子が PLGA-PEG 高分子のみから実質的になる、請求項 45 または 46 に記載の前記微粒子。

【請求項 48】

前記粒子が 1 週間に 1 回以下または 1 ヶ月に 1 回以下で投与される、請求項 45～47 のいずれか 1 項に記載の前記微粒子。

40

【請求項 49】

前記微粒子が約 1 μm～約 100 μm の範囲内の平均径を有する、請求項 45～48 のいずれか 1 項に記載の前記微粒子。

【請求項 50】

前記粒子が球状である、請求項 45～49 のいずれか 1 項に記載の前記微粒子。

【請求項 51】

前記粒子がだ円である、請求項 45～50 のいずれか 1 項に記載の前記微粒子。

【請求項 52】

請求項 30～51 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子または微粒子の投与を含む、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、網膜静脈閉塞または糖尿病性網膜症を治療する方法。

50

【請求項 5 3】

前記ナノ粒子または微粒子を眼内注入によって投与する、請求項 5 2 に記載の前記方法。

【請求項 5 4】

前記ナノ粒子または微粒子を、約 1 日に 1 回から約 1 ヶ月に 1 回から約 6 ヶ月ごとに 1 回注入する、請求項 5 2 または 5 3 に記載の前記方法。

【請求項 5 5】

請求項 3 0 に記載の前記ナノ粒子が 1 つ以上の細胞に接触し、前記ナノ粒子と細胞の結合を可視化または検出することを含む、インテグリンを同定する方法。

【請求項 5 6】

前記細胞が溶液中または培養液中に存在する、請求項 5 5 に記載の前記方法。

【請求項 5 7】

前記ナノ粒子を、インテグリンを過剰発現している血管がイメージ化された患者に投与する、請求項 5 5 に記載の前記方法。

【請求項 5 8】

請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子の効果的容量を、治療が必要な患者に投与することを含む、固形腫瘍を治療する方法。

【請求項 5 9】

固形腫瘍がグリア芽腫または乳がんである、請求項 5 8 に記載の前記方法。

【請求項 6 0】

前記乳がんがトリプルネガティブ乳がんである、請求項 5 9 に記載の前記方法。

【請求項 6 1】

請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか 1 項に記載の前記ナノ粒子の効果的容量を投与することを含む、血管新生または血管漏出を特徴とする疾病を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

優先権

本出願は 2015 年 11 月 19 日に提出された米国仮特許出願第 62 / 257, 569 号明細書の利益及び優先権を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の背景

これまでに、IV 型コラーゲンに由来するペプチドの、血管新生及びリンパ管新生を阻害する潜在的 가능성이言及されてきた。IV 型コラーゲン 5 線維の非コラーゲン領域に由来するペプチドモチーフは米国特許第 9, 056, 923 号明細書に記載され、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、モチーフ N I N N V を含むペプチドは、ヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) の増殖、移動、及び細管形成を阻害することが記載されている。Rosca et al., Structure - activity relationship study of collagen derived anti - angiogenic biomimetic peptides, Chem. Biol. Drug Des. 80 (1): 27 - 37 (2012)。

【0003】

薬剤学的使用及び製品開発を支援及び / または誘導するために、これらのペプチドの生物学的標的、生物学的活性及び薬剤学的特性についてより詳細に理解する必要がある。

【0004】

簡単な説明

本発明の様々な態様及び実施形態は、IV 型コラーゲン 5 線維由来のペプチド医薬組成物、及び薬物治療におけるその使用法に關与する。例示的なペプチドは、アミノ酸配列 L R R F S T A P F A F I D I N D V I N F (配列番号 2)、L R R F S T A P F A F I

10

20

30

40

50

N I N N V I N F (配列番号3)、L R R F S T A P F A F I D I N D V I N W (配列番号4)、F T N I N N V T N (配列番号5)もしくはF T D I N D V T N (配列番号6)、または本明細書に記載の様々な誘導体を包含する、前述のいずれかの誘導体であるアミノ酸配列を含む。ペプチドは 5 1 及び V 3 インテグリンを標的とし、血管内皮増殖因子受容体 (V E G F R)、肝細胞増殖因子受容体 (H G F R)、インスリン様増殖因子受容体 (I G F R) 及び血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R) を包含する複数の受容体を通してシグナル伝達を阻害する。

【0005】

一部の態様では、本発明は治療が必要な患者にペプチド薬剤の効果的用量を投与することを含む、微小血管漏出または透過性を治療または予防する方法を提供する。微小血管漏出が病状に關与し得るまたは病状を悪化させ得る疾患には、インフルエンザ (f l u)、アルツハイマー病、神経病変 (例えば、多発性硬化症)、出血熱、脳性マラリア、黄斑変性、黄斑浮腫 (例えば、糖尿病性黄斑浮腫)、網膜静脈閉塞 (R V O)、糖尿病性網膜症、湿式 A M D、急性呼吸窮迫症候群、肺水腫、喘息、C O P D、呼吸器合胞体ウイルス、S A R S、肺炎、組織または臓器移植に関連する微小血管漏出及び血管透過性が包含される。

10

【0006】

他の態様では、本発明はがんを治療する方法、特にチェックポイント阻害薬治療を改善する方法を提供する。具体的には、本方法はこれらの実施形態において、血管新生を阻害し、樹状細胞の成熟及びより強固なリンパ球の内皮輸送を可能にすることで、免疫チェックポイント阻害薬治療を改善する。本方法は、免疫チェックポイント阻害薬治療を受けているがん患者にペプチドの効果的容量を投与することを含む。ペプチドまたは医薬組成物は、免疫チェックポイント阻害薬治療と一緒に (または治療期間中に) 投与される場合がある。あるいは、患者にペプチドを用いて 1 ~ 4 週間治療を行い、その後免疫チェックポイント阻害薬治療を行う場合がある。

20

【0007】

ペプチドは全身送達または局所送達を目的として処方される場合があり、一部の実施形態では、ペプチドは高分子ナノ粒子または微粒子キャリアと共に処方される。一部の実施形態では、本発明は、例えば配列番号 1 ~ 6 のいずれか 1 つのペプチド、またはその誘導体及び/またはその組合せなど、インテグリンを標的とする P L G A - P E G 共重合体及びコンジュゲートされたペプチドを含むナノ粒子を提供する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、ペプチドに共有結合したサイズ調節が可能な乳酸グリコール酸共重合体ポリエチレングリコール (P L G A - P E G) ブロック共重合体、または上記の他の結合剤から合成される。様々な比率のコンジュゲート及び未コンジュゲート高分子の混合物は、表面に望ましい密度の標的薬剤を備えたナノ粒子を生成する可能性がある。粒子は循環血中の特性、体内分布及び分解速度を包含する、望ましい薬力学的有益性を提供するように設計される場合がある。このようなパラメータは、サイズ、形状、表面電荷、高分子の組成、リガンドコンジュゲーションの化学的性質、ペプチドコンジュゲーションの密度などを包含する。

30

【0008】

一部の実施形態では、ナノ粒子はさらに封入された活性剤を含み、インフルエンザ、アルツハイマー病、出血熱、脳性マラリア、がん、黄斑変性または黄斑浮腫、臓器または組織移植、及び本明細書に記載のその他を包含する、微小血管漏出を特徴とする疾患の治療を目的として本明細書に開示された活性剤である場合がある。一部の実施形態では、封入された薬剤は本明細書に記載のペプチドである。ナノ粒子は一部の実施形態では実質的に球状であるが、ナノ粒子は細胞との相互作用、特にクリアランスを回避する免疫システムの細胞との相互作用に影響するよう選択的に非球状である場合がある。

40

【0009】

一部の実施形態では、粒子は、送達薬物 (例えば、本明細書に記載のペプチド、及び/または他の薬剤) を封入する微粒子である。粒子はその表面にコンジュゲートされたペプ

50

チドを含有するか、または含有しない場合がある。これらの実施形態では、粒子はペプチドの徐放を提供するために、長時間有効薬物デポ剤を提供する可能性がある。

【0010】

本発明の他の態様及び実施形態は、以下の詳細な説明から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】P07が、微小血管内皮細胞内でVEGF、HGF及びIGFのシグナル伝達を阻害することを示す図である。

【図2】P07が、マウスモデルの過剰な血管漏出によって引き起こされる網膜剥離を阻害することを示す図である。

【図3】P07が、ウサギの眼によるVEGF誘発漏出モデルにおいて血管漏出を阻害することを示す図である。漏出は、無処置時を1.0に設定して比較する。

【図4】P07が、用量依存的に同所性トリプルネガティブ乳がん(TNBC)異種移植片の増殖を阻害することを示す図である。

【図5】P07が、同所性TNBC異種移植片の新血管形成を阻害することを示す図である。

【図6】P08がPLGA-PEG-NHS共重合体に効率的にコンジュゲートされ、逆相HPLCによって定量化されたことを実証する、P08コンジュゲーションに対するHPLCの結果を示す図である。

【図7】P07のZ平均粒子径が約70~80nmであることを示す図である。ナノ粒子にコンジュゲートされたP07を用いたサンプルでは、サイズの増加がわずかに見られた。

【図8】N07は、脱イオン水中でゼータ電位が陰性であり、PEG上の種々の末端基を使用して-25mV付近に調節することはほとんど不可能であることを示す図である。中性はメトキシ末端PEGである。陰性はカルボキシ末端PEGである。

【図9】インテグリン α_3 及び β_1 に対する粒子の結合を示す図である。

【図10】様々なペプチドの競合によるインテグリン α_3 に対する粒子の結合を示す図である。

【図11】N07粒子のMDA-MB-231及びMEC細胞に対する結合を示す図である。

【図12】N07で前処理したプレートに対して細胞の接着を測定する接着阻害アッセイの結果を示す図である。％はコンジュゲートされたP07を有するPLGA-PEG分子の量を表す。「+」または「-」は、封入されたP07の有無を表す。

【図13】MEC細胞の増殖に対するN07の抑制効果を示す図である。％はコンジュゲートされたP07を有するPLGA-PEG分子の量を表す。「+」または「-」は、封入されたP07の有無を表す。

【図14】P07で前処理したプレートに対して細胞の接着を測定する接着アッセイの結果を示す図である。

【図15】85/15PLGA及びP07を用いてダブルエマルジョン技術により作製した、M07とも呼ばれる微粒子(MP)を示す図である。凍結乾燥したサンプルをSEMを用いてイメージ化した。(A)充填0%、(B)最終ペプチド充填0.6重量%、(C)最終充填1%である。目盛りは10 μ mを示す。

【図16】2.25倍に延伸したM07を示す図である。凍結乾燥したサンプルをSEMを用いてイメージ化した。(A)ブランクMP、(B)M07、(C)拡大したブランクMP、(D)拡大したM07である。

【図17】ペプチドを充填したMPの未延伸(左)または2倍延伸(右)のTEMイメージ図を示す図である。

【図18】延伸したMP中のP07充填のゲル定量化を示す図である。銀染色及びペプチドスタンダードを使用して定量化した。最終のP07w/w比は約1%であり、延伸前のP07w/w比の約1%と同程度であった。

10

20

30

40

50

【図 19】 P 0 7 で充填した 6 5 / 3 5 P L G A 微粒子からの P 0 7 の放出を示す図である。エラーバーは、標準偏差を表す。

【 0 0 1 2 】

詳細な説明

本発明の様々な態様及び実施形態は、I V 型コラーゲン 5 線維由来のペプチド医薬組成物、及び薬物治療におけるその使用法に關与する。例示的なペプチドは、アミノ酸配列 L R R F S T A P F A F I D I N D V I N F (配列番号 2)、L R R F S T A P F A F I N I N N V I N F (配列番号 3)、L R R F S T A P F A F I D I N D V I N W (配列番号 4)、F T N I N N V T N (配列番号 5) もしくは F T D I N D V T N (配列番号 6) または前述のいずれかの誘導体であるアミノ酸配列を含む。様々な誘導体が本明細書に開示される。ペプチドは 5 1 及び V 3 インテグリンを標的とし、血管内皮増殖因子受容体 (V E G F R)、肝細胞増殖因子受容体 (H G F R)、インスリン様増殖因子受容体 (I G F R) 及び血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R) を包含する複数の受容体を通してシグナル伝達を阻害する。

10

【 0 0 1 3 】

インテグリンを標的とするペプチドは米国特許第 9 , 0 5 6 , 9 2 3 号明細書に記載のペプチドを包含し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、以下の開示によるペプチドは、アミノ酸配列 L R R F S T X P X X X X N I N N V X N F (配列番号 1) を包み、ここで、X は標準アミノ酸または遺伝的にコードされていないアミノ酸である。一部の実施形態では、7 番目の部位 X は M、A または G であり、9 番目の部位 X は F、A、Y または G であり、10 番目の部位 X は M、A、G、d A または N l e であり、11 番目の部位 X は F、A、Y、G または 4 - C l P h e であり、12 番目及び 18 番目の部位 X は A b u、G、S、A、V、T、I、L または A l l y l - G l y から独立に選択される。様々な実施形態では、ペプチドは約 30 個以下のアミノ酸、約 25 個以下のアミノ酸、約 24 個のアミノ酸、約 23 個のアミノ酸、約 22 個のアミノ酸、約 21 個のアミノ酸または約 20 個のアミノ酸を含有する。さらに他の実施形態では、例えば配列番号 1 の 1、2 または 3 個のアミノ酸など、1 ~ 10 個のアミノ酸を欠失させる。例えば、一部の実施形態では N 末端からアミノ酸を欠失させる。

20

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、ペプチドはアミノ酸配列 L R R F S T A P F A F I D I N D V I N F (配列番号 2)、L R R F S T A P F A F I N I N N V I N F (配列番号 3)、L R R F S T A P F A F I D I N D V I N W (配列番号 4)、F T N I N N V T N (配列番号 5)、または F T D I N D V T N (配列番号 6)、または前述のいずれかの誘導体であるアミノ酸配列を含む。配列番号 2 のペプチドは、本明細書では P 0 7 と呼ばれる。配列番号 3 のペプチドは、本明細書では P 0 6 と呼ばれる。配列番号 4 のペプチドは、本明細書では P 0 8 と呼ばれる。配列番号 5 のペプチドは、本明細書では P 0 5 と呼ばれる。配列番号 6 のペプチドは、本明細書では P 0 9 と呼ばれる。配列番号 2 のペプチドは (配列番号 1 と比較して) 13 番目及び 16 番目の部位にアスパラギン酸を有し、これにより生物学的活性に悪影響を与えることなくペプチドの物理的特性が改善される。配列番号 2、3 または 4 に関して、配列番号 2 ~ 4 のペプチドの誘導体は、1 ~ 5 個のアミノ酸置換、挿入または欠失 (例えば 1、2、3、4 または 5 個のアミノ酸の一括した置換、挿入または欠失) を有するペプチドを包含する。一部の実施形態では、配列番号 2 の 13 番目及び 16 番目の部位にある A s p は保持される。一部の実施形態では、配列 D I N D V または N I N N V は、誘導体の中で保持される。配列番号 1 に対応する部位で X が占有する部位に、アミノ酸置換が選択的にある可能性がある。ペプチドは、通常少なくとも 8 個のアミノ酸を有する。配列番号 5 または 6 に関して、配列番号 5 または 6 のペプチドの誘導体は 1、2 または 3 個のアミノ酸置換を有する配列を含むペプチドを包含する。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的または非保存的置換が独立的に選択される。これらのまたは他の実施形態では、ペプチドは 1 ~ 10 個のアミノ酸を末端の一方または両方に (一括して) 加えたものを包含する。N 及び / または C 末端は別の化学基 (アミンま

30

40

50

たはカルボキシ以外、例えばアミドまたはチオール)が選択的に占有する場合があります、これは、本明細書でさらに詳細に記載されるように、PEGまたはPLGA-PEG共重合体を包含する他部のコンジュゲーションに有用である可能性がある。ペプチドは、特定の組織へ標的化したまたは持続した送達を行うために、一部の実施形態では製薬上許容される塩の形で提供されるか、または他の成分と複合化されるかもしくは粒子中に封入される場合がある。

【0015】

保存的置換は、例えば、極性、荷電、サイズ、溶解性、疎水性、親水性および/または関与するアミノ酸残基の両親媒性の類似性に基づいて成される場合がある。遺伝的にコードされたアミノ酸20個は、以下の6つの標準アミノ酸群

- (1) 疎水性: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) 中性: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln;
- (3) 酸性: Asp, Glu;
- (4) 塩基性: His, Lys, Arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基: Gly, Pro; 及び
- (6) 芳香族化合物: Trp, Tyr, Pheに分類することができる。

【0016】

本明細書で述べる「保存的置換」とは、アミノ酸が上記の6つの標準アミノ酸群において同群内に列挙された別のアミノ酸と交換されることとして定義される。例えば、AspをGluと交換することで、非常に改良されたポリペプチドにおいて1つの負電荷を保有する。加えて、グリシン及びプロリンは、ヘリックスを破壊する能力に基づいて互いに置換される場合がある。上記の6つの群内における一部の好ましい保存的置換は、以下の下位群(i) Ala、Val、Leu及びIle、(ii) Ser及びThr、(iii) Asn及びGln、(iv) Lys及びArgならびに(v) Tyr及びPheの範囲内での交換である。

【0017】

本明細書で述べる「非保存的置換」とは、アミノ酸が上記6つの標準アミノ酸群(1)~(6)の異なる群中に列挙された別のアミノ酸によって交換されることとして定義される。

【0018】

様々な実施形態では、ペプチド薬剤は約8~約30個のアミノ酸、または約10個~約20個のアミノ酸のペプチドであり、配列番号2、3、4、5または6の少なくとも4個、少なくとも5個または少なくとも6個の連続したアミノ酸を有する。一部の実施形態では、ペプチドは少なくとも1個、少なくとも2個または少なくとも3個のD-アミノ酸を含有する。一部の実施形態では、ペプチドは1~約5個(例えば、1、2または3個)の遺伝的にコードされていないアミノ酸を含有し、これらのアミノ酸は2-アミノ酪酸(Abu)、ノルロイシン(Nle)、4-クロロフェニルアラニン(4-ClPhe)及びアリルグリシン(AllylGly)から選択的に選ばれる。

【0019】

例示的なペプチド薬剤は、

LRRFSTMPFMMF(Abu)NINNVA(Abu)NF(配列番号7)、
 LRRFSTMPAMF(Abu)NINNVA(Abu)NF(配列番号8)、
 LRRFSTMPFAF(Abu)NINNVA(Abu)NF(配列番号9)、
 LRRFSTMPFMA(Abu)NINNVA(Abu)NF(配列番号10)、
 LRRFSTMPF(Nle)F(Abu)NINNVA(Abu)NF(配列番号11)、
 、
 LRRFSTMPFMM(4-ClPhe)(Abu)NINNVA(Abu)NF(配列番号12)、
 LRRFSTMPFMMFSNINNVS NF(配列番号13)、
 LRRFSTMPFMMFANINNVA NF(配列番号14)、

10

20

30

40

50

L R R F S T M P F M F I N I N N V I N F (配列番号 1 5) 、
L R R F S T M P F M F T N I N N V T N F (配列番号 1 6) 、
L R R F S T M P F M F (A l l y G l y) N I N N V (A l l y G l y) N F (配列番号 1 7) 、
L R R F S T M P F M F V N I N N V V N F (配列番号 1 8) 、
L R R F S T M P F d A F I N I N N V I N F (配列番号 1 9) 、
L R R F S T M P F A F I N I N N V I N F (配列番号 2 0) 、
L R R F S T A P F A F I N I N N V I N F (配列番号 2 1) 、
L R R F S T A P F d A F I D I N D V I N F (配列番号 2 2) 、
F (A b u) N I N N V (A b u) N (配列番号 2 3) 、
F T N I N N V T N (配列番号 2 4) 、
F I N I N N V I N F (配列番号 2 5) 、
F S N I N N V S N F (配列番号 2 6) 、
F A N I N N V A N F (配列番号 2 7) 、
F (A l l y G l y) N I N N V (A l l y G l y) N F (配列番号 2 8) 、
F V N I N N V V N F (配列番号 2 9) 、
A (A b u) N I N N V (A b u) N F (配列番号 3 0) または
(4 - C l P h e) (A b u) N I N N V (A b u) N F (配列番号 3 1) を包含する、
本開示による配列番号 2 ~ 6 のペプチドの誘導体である場合がある。

10

20

【 0 0 2 0 】

本明細書に記載の様々な態様及び実施形態では、ペプチドはナノ粒子及び微粒子製剤の形態で、表面にコンジュゲートされるかまたは封入されるかのいずれかで送達される場合がある。P L G A - P E G 高分子をベースにした例示的な粒子製剤は、本明細書に詳細に記載される。

【 0 0 2 1 】

ペプチド製剤は、例えば固相合成など、既知の技術を用いて化学的に合成及び精製される可能性がある。米国特許第 9 , 0 5 1 , 3 4 9 号明細書を参照のこと。これによって、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 2 2 】

本明細書に記載のペプチドは、 5 1 及び V 3 インテグリンを標的とし、血管内皮増殖因子受容体 (V E G F R) 、肝細胞増殖因子受容体 (H G F R) 、インスリン様増殖因子受容体 (I G F R) 及び血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R) を包含する複数の受容体を通してシグナル伝達を阻害する。インテグリンは、細胞と細胞間、及び細胞と細胞外マトリックス (E C M) 間の相互作用において架橋の役割を果たす膜貫通受容体である。インテグリンからのシグナル伝達は、例えば、細胞周期、細胞の形状、及び / または運動性の調節など、非常に多くの生物学的応答を制御する E C M の化学的組成及び物理的状态、または細胞膜に追加されている新規の受容体に影響する。これにより、細胞表面のイベントに対して迅速で柔軟な応答が可能になる。インテグリンにはいくつかのタイプが存在し、細胞はその表面に関していくつかのタイプを有する場合がある。インテグリンは、例えば、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子、セレクチン及びシンデカンなど、他の受容体と共に作用し、細胞と細胞間、及び細胞とマトリックス間の相互作用を媒介する。インテグリンに対するリガンドは、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲン及びラミニンを包含する。

30

40

【 0 0 2 3 】

一部の態様では、本発明は上述のように配列番号 1 ~ 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有するペプチド、またはその誘導体及び / またはその組合せの効果的用量を治療が必要な患者に投与することを含む、微小血管漏出または透過性を治療または予防する方法を提供する。血管透過性は、多くの場合が毛細血管透過性または微小血管透過性の形態をとるが、小分子 (イオン、水、栄養素) または細胞そのものまでも血管内外へ流出入させる血管壁の能力を特徴とする。血管壁は、内皮細胞の単一層によって内側を覆われている。密

50

着結合として知られている内皮細胞間のギャップは、組織のタイプ及び生理学的状態に応じて厳密に調節される。血管透過性の亢進は、体腔または身体組織に過剰の液体が集まることを特徴とした症状である浮腫を引き起こす可能性がある。

【0024】

微小血管内皮は、炎症及び他の刺激に応答し、これにより多くの内科的疾患の病状に関して重要な役割を果たす可能性がある。可溶性因子及び細胞受容体を包含する血管透過性の潜在的仲介役、ならびにその潜在的役割及び相互作用は複雑であり、また組織及び特定の病状に依存し得る。例えば、微小血管の漏出は、インフルエンザ（f l u）、アルツハイマー病、出血熱、脳性マラリア、黄斑変性、黄斑浮腫、網膜静脈閉塞、糖尿病性網膜症、急性呼吸窮迫症候群、肺水腫、喘息、C O P D、呼吸器合胞体ウイルス、S A R S、肺炎、組織または臓器移植に関連する血管透過性などの病状に影響を与える場合がある。本明細書に記載のペプチドは、血管内皮増殖因子受容体（V E G F R）、肝細胞増殖因子受容体（H G F R）、インスリン様増殖因子受容体（I G F R）及び血小板由来増殖因子受容体（P D G F R）を包含する、微小血管透過性に関与する複数の受容体を通してシグナル伝達を阻害することにより、これらの疾患の治療を支援する可能性がある。図1を参照のこと。

10

【0025】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、微小血管漏出または透過性を防止または低減するため、肺、皮膚または眼に局所的に投与される。

【0026】

一部の実施形態では、患者はインフルエンザに罹患しているか、または罹患しているリスクを有する。インフルエンザ（「f l u」）は、インフルエンザウイルスによって引き起こされる感染症である。症状は、高熱、鼻水、咽喉痛、筋肉痛、頭痛、咳及び疲労などがある。これらの症状は、一般的にウイルスに暴露した2日後に発症する。感染は、咽喉、喀痰、または鼻からウイルスの有無を検査することにより確認される場合がある。世界保健機関は、高リスクの対象者に年に1度のインフルエンザの予防接種を推奨しており、ワクチンは一般的に3または4タイプのインフルエンザに対して効果的である。抗ウイルス薬は、例えば、ノイラミニダーゼ阻害剤（例えば、オセルタミビルなど）がインフルエンザの治療に使用され、適度な効用を示してきたが、効用を提供するためには感染初期（例えば、症状が現れたら速やかに）に使用しなければならない。インフルエンザに罹患した人の約33%は、無症状である。インフルエンザの症状は、感染して約1~2日後に急に発症する可能性がある。通常、最初の症状は悪寒または寒気であるが、感染初期は発熱も一般的である。抗ウイルス薬による治療は、適度な効用を提供する場合があるが、強力な世界的流行株で特に問題となるウイルス耐性のリスクを冒す。

20

30

【0027】

ウイルス性疾患を治療する魅力的な代替法として、薬物耐性が生じる可能性を大幅に減らす宿主応答の治療があり、より進行した病期での治療を可能にするにあたって、その有効性を確かめるより大きな機会を提供し得る。宿主による主要な応答の1つは、呼吸不全に至る場合がある肺微小血管の漏出及び肺損傷によって引き起こされる炎症応答である。微小血管の漏出を阻害する抗浮腫剤は、インフルエンザの症状を改善する可能性がある。

40

【0028】

一部の実施形態では、ペプチドまたは同ペプチドを含む医薬組成物は、インフルエンザの症状が現れる前に最初に投与される。例えば、患者のサンプルでウイルスの有無を検出する臨床検査を使用することにより、患者のインフルエンザが診断される場合があり、または患者がウイルスに暴露した後はインフルエンザに罹患しているリスクを有する。暴露の状況は、感染した及び/または症状のある個人との密接な接触によって決定する可能性がある。

【0029】

別の実施形態では、ペプチドまたは医薬組成物は最初のインフルエンザの症状が現れた後に最初の投与を行う。一部の実施形態では、ペプチドまたは医薬組成物は最初のインフ

50

ルエンザの症状が現れてから 1 ~ 4 日以内（例えば、1 または 2 日）に投与される。

【0030】

本発明のこの態様により、ペプチドはインフルエンザウイルスに関連する肺の中の浮腫を低減し、これにより疾患の症状及び/または重症度を改善する。一部の実施形態では、罹患している全期間の長さは 1 日、2 日、3 日、4 日またはそれ以上短縮する可能性があり、及び/または重症度及び不快感を実質的に低減する可能性がある。

【0031】

インフルエンザに罹患しているか、またはそのリスクがある患者の治療に対して、本明細書に記載のペプチドまたは医薬組成物は、例えば 1 日に約 1 ~ 約 3 回など、1 日に約 1 ~ 約 5 回投与される可能性がある。一部の実施形態では、ペプチドまたは医薬組成物は、例えば粉末または溶液エアロゾルによって肺へ局所的に投与されるか、または他の実施形態において全身的に投与される。

10

【0032】

一部の実施形態では、ペプチドは、個別の薬物製剤または合剤製品のいずれかとして、インフルエンザに有効な 1 つ以上の抗ウイルス剤と併せて投与されるか、または代替的に 1 つ以上の抗炎症剤と併せて投与される。例示的な抗ウイルス剤は、タミフル（リン酸オセルタミビル）、リレンザ（ザナミビル）、ラビバブ（ペラミビル）、アマンタジン及びリマンタジンを包含する。抗炎症剤は、NSAID（例えばアスピリン、イブプロフェン、アセトアミノフェン及びナプロキセン）を包含する。

【0033】

他の実施形態では、ペプチドまたは医薬組成物は、アルツハイマー病の治療またはその進行を遅らせるために投与される。血液脳関門（BBB）は、血液由来産物、病原体及び細胞の脳内への侵入を制限し、これは正常な神経機能及び情報処理に不可欠である。剖検による組織解析から、アルツハイマー病において BBB の損傷が示唆されている。BBB が破綻するタイミングは、まだ解明されていない。高時空間分解能を有した先進的なダイナミック造影 MRI により、ヒト生体脳の BBB の透過性を定量化することで、アルツハイマー病（AD）初期に影響を受ける学習及び記憶に関して重要な海馬領域で、年齢に依存した BBB の破綻が示された。これらのデータは、BBB の破綻が高齢のヒト脳の海馬で始まる初期イベントであり、認知障害に寄与し得ることを示唆している。したがって、血液脳関門の損傷を阻害し、その結果透過性を亢進させる薬剤はアルツハイマー病の進行を遅らせる可能性を有する。一部の実施形態において本明細書に記載のペプチドまたは組成物の投与は、血液脳関門の健全性を保持し、したがってアルツハイマー病の発症または進行を遅らせるか、または予防する。

20

30

【0034】

一部の実施形態では、患者はアルツハイマー病の治療を目的とする少なくとも 1 つの追加の薬剤を用いた治療を受けており、その薬剤はアセチルコリンエステラーゼ阻害剤（タクリン、リバスチグミン、ガラントミン及びドネペジル）またはメマンチンから選択される場合がある。

【0035】

アルツハイマー病の潜在的な症状を示す患者、特に疾病初期の患者の治療に対し、本明細書に記載のペプチドまたは医薬組成物は、疾病の発症または進行を遅らせるため、例えば 1 日に約 1 ~ 約 3 回など、1 日に約 1 ~ 約 5 回投与される可能性がある。疾病初期は多くの場合、学習及び記憶における障害の悪化が観察され、最終的に決定的診断に至る。一部では、言語、実行機能、認知（失認）または運動の実行（失行）に伴う困難は記憶に関する問題より顕著である。言語の問題は、全般的な話し言葉及び書き言葉による言語の貧困につながる、語彙の縮小及び発言の流暢さの欠如を特徴とする。

40

【0036】

一部の実施形態では、初期アルツハイマー病患者またはアルツハイマー病を発症するリスクを有する患者（遺伝的な素因があるか、または AD に関連する 1 つ以上のバイオマーカーが陽性であるかのいずれか）に、ペプチドまたは医薬組成物が投与され、ここでペプ

50

チド薬治療は脳循環を正常化し、疾病の進行を遅らせるかまたは予防する。

【 0 0 3 7 】

一部の実施形態では、患者は、例えば多発性硬化症（MS）またはパーキンソン病（PD）などの、血管新生または血管漏出の調節不全に関連する神経病変を有する。一部の実施形態では、ペプチドまたは医薬組成物は、疾病の進行を予防するかもしれない遅らせる、または疾病の症状を改善するために1日に1～3回投与される。

【 0 0 3 8 】

他の実施形態では、患者は出血性ウイルスによって引き起こされる出血熱もしくは出血症候群に罹患しているか、または罹患しているリスクを有する。これらのうち最も有名なものは、エボラウイルス及びマールブルグウイルスである。デング熱またはラッサ熱罹患患者も同様に出血が起こる。エボラでは、この出血症候群はしばらく遅れて症状が起こり、一般的に死亡の24～48日前に発症する。出血を伴う場合は症状が劇的である可能性があり、鼻、口、および身体他の開口部より起こる場合がある。出血に至る機序は大筋として次のように知られている。ウイルスは、肝臓によって産生される凝固因子のアップレギュレーションを引き起こし、凝固因子の増加により小血管で血栓が形成され、肝臓によって産生される凝固因子の供給は、肝臓がウイルスの攻撃下にあるために枯渇し、過剰に活性化した免疫系が血管の出血を起こす炎症性タンパク質の産生量を増加させ、凝固因子の欠乏は出血の抑止が不可能であることを意味する。出血がない場合であっても多くの患者が死亡するが、出血した患者の死亡率は非常に高い。症状が最初に現れた後に投与された薬剤は、未投与の場合に出血症候群の進行が見られる患者の微小血管からの出血を止める可能性がある。

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態では、患者はエボラウイルスまたはマールブルグウイルスを有する。例えば、患者は、例えば、発熱及び出血に対する感受性の増加、ならびに／または顔面及び胸部の紅潮、小さな赤色もしくは紫色の斑点（点状出血）など、出血熱の初期徴候を有する場合がある。出血熱の他の兆候及び症状には、倦怠感、筋肉痛、頭痛、嘔吐及び下痢が包含される。一部の実施形態では、エボラウイルスまたは他の出血熱ウイルスの存在が患者のサンプルで確認される。一部の実施形態では、患者は、例えばリバビリンの静脈内投与など、少なくとも1つの抗ウイルス剤もしくは抗炎症剤、または出血熱の治療薬を使用した治療を受けている。出血熱に罹患しているか、またはそのリスクを有する患者の治療に対して、本明細書に記載のペプチドまたは医薬組成物は、疾病の進行を遅らせるため、例えば1日に約1～約3回など、1日に約1～約5回投与される可能性がある。

【 0 0 4 0 】

さらに他の実施形態では、患者は脳性マラリア（CM）に罹患しているか、または罹患しているリスクを有する。CMは熱帯熱マラリア原虫によるマラリアの最も致命的な合併症の1つであり、マラリアに関連する死亡者数の大部分を占めている。世界保健機関（WHO）はCMを、無性熱帯熱マラリア原虫による寄生虫血症の発症、かつ他の脳症の原因がない状態で、発作終了後または低血糖の回復後に、少なくとも1時間持続する昏睡（痛みを伴う刺激の認識不能、またはBlantyre昏睡スコア2）と定義している。CMに関連する死亡率は75%にのぼり、入院から24時間以内に起こる。イメージ化、拡散、灌流、血管造影、分光法などのマルチモーダル磁気共鳴技術により、CM罹患時に起こる血液脳関門の破綻及び出血を包含した血管損傷が示されてきた。これらの影響は、炎症過程に起因すると考えられている。Penet et al. (J Neurosci. 2005 Aug 10; 25(32): 7352-8)では、CMのマウスモデルを用いることで、CM罹患時に脳灌流が低減すると共に多数の浮腫が形成され、高エネルギーリン酸塩が減少し、脳内の乳酸濃度が上昇した虚血性の代謝プロファイルを伴うことを示している。著者グループはまた、主要な血行動態の機能不全に対して有力な証拠を提供する血管造影法を使用した。重要な事として、最終的には死因となる血流虚脱に至る大脳動脈の圧迫によって、浮腫がさらに虚血を悪化させることが呈示された。これらの所見は炎症性病変及び虚血性病変の共存を実証し、実験に基づいた脳性マラリアの致死性転帰に

において浮腫の主要な役割を証明するものである。脳内の浮腫及び／または虚血を阻害する薬剤は、これらの患者の治療を改善するために寄生虫を直接標的とする抗マラリア剤と組み合わせて使用される可能性がある。一部の実施形態では、患者はクロロキン、メフロキン、ドキシサイクリンまたはアトバクオン及び塩酸プログアニル（マラロン）の組合せから選択された抗マラリア薬治療を受ける。

【0041】

これらの実施形態では、ペプチドは、脳性マラリア患者の血液脳関門及び血管の健全性を保持する。脳性マラリアに罹患しているか、またはそのリスクを有する患者の治療に対して、本明細書に記載のペプチドまたは医薬組成物は、疾病の進行を遅らせる及び／または死亡を予防するため、例えば1日に約1～約3回など、1日に約1～約5回投与される可能性がある。

10

【0042】

他の態様では、本発明はがんを治療するか、または腫瘍の微小環境を正常化する方法、特にチェックポイント阻害薬治療を改善する方法を提供する。

【0043】

本方法は、免疫チェックポイント阻害薬治療を受けている（または治療の準備をしている）がん患者に配列番号1～6のいずれか1つのアミノ酸配列を有するペプチド、その誘導体またはその組合せの効果的容量を投与することを含む。血管新生は、がんを治療するための薬物標的である。VEGF及びその受容体VEGFR2は、血管新生の重要な仲介役である。様々なタイプのがんに対して、ヒトVEGFを抑制する抗体ベバシズマブ、及びVEGFR2を阻害する他のチロシンキナーゼ阻害剤の小分子が開発されてきた。その血管新生促進活性が広く知られていることに加え、VEGFは樹状細胞の成熟を阻害することにより免疫抑制因子としても機能する。腫瘍は新生血管系を誘引するため、また成熟免疫細胞の数を減少させ、リンパ球内皮輸送を変調させることで免疫系を抑制するためにVEGFを産生すると考えられている。

20

【0044】

腫瘍は、自身の増殖を促進するために免疫系を制御する。ここ2～3年にわたって、腫瘍が免疫系を抑制し続けることによる多くの機序が解明された。腫瘍細胞の多くのタイプが、腫瘍を侵攻して休止させるT細胞上の受容体と相互作用する、PD-L1及びCTLA-4などの表面分子を発現する。これらの発見は、例えば、イピリムマブ、トレメリムマブ、ニボルマブ及びペンブロリズマブなどの制がん剤として、いわゆる「チェックポイント阻害剤」の開発を可能にした。これらの薬物は、腫瘍細胞の細胞障害性T細胞に対する結合を遮断して抑制状態から解放し、腫瘍細胞を死滅させることを可能にする。

30

【0045】

進行メラノーマ患者に対し、CTLA-4を遮断する抗体ベバシズマブ及びイピリムマブを組み合わせた少なくとも1つの試験を実施した（Cancer Immunol Res. 2014 Jul; 2(7): 632-42）。炎症に関してVEGFの遮断の効果に加えて、リンパ球輸送及び免疫制御についても明らかとなった。これらの試験をベースに、ベバシズマブ及び他の抗血管新生剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤の小分子）をチェックポイント阻害剤と組み合わせた、さらなる臨床試験が開始された。

40

【0046】

本発明のペプチド及び組成物が相乗的に作用し得る、チェックポイント阻害剤の他の標的は、LAG-3、KIR、OX40L、IDO-1及びTIM-3を包含する。

【0047】

さらに、本明細書に開示のように、5 α 1及びV β 3インテグリンに対するペプチド（例えば、配列番号1～6、及び誘導体）の特異性は、がん薬治療においてペプチドが医学的に重要な別の役割を果たすことを示唆している。受容体は5 α 1及びV β 3インテグリンと同定された。インテグリンは補助受容体として多くの種々の増殖因子受容体に対して機能する。本明細書に記載のペプチド及びその誘導体は、血管内皮増殖因子受容体（VEGFR2）、肝細胞増殖因子受容体（c-met）及びインスリン様増殖因子受

50

容体などからのシグナル伝達を阻害する。P07は、例えば、網膜及び脈絡膜の新血管形成ならびに血管漏出のマウスモデルにおいて、VEGF誘発による新血管形成及び漏出を強力に阻害する。血管新生を促進することに加え、VEGFは免疫抑制も引き起こし、これは腫瘍によって利用され、腫瘍に対する免疫応答を弱める。P07はVEGFによるシグナル伝達を遮断するため、免疫系の増強剤として効果的に働き、これにより免疫系による腫瘍への攻撃を促進する可能性がある。これらのデータは、P07（本明細書に開示された他のペプチド及び誘導体と同様に）がチェックポイント阻害剤との組み合わせにより良好に作用する可能性があることを示唆する。これは同時に血管新生の阻害、ならびに樹状細胞の成熟及びより強固なリンパ球内皮輸送を可能にすることで腫瘍への免疫応答の強化を支援し、これによってチェックポイント阻害剤が、腫瘍細胞を死滅させる細胞傷害性T細胞の浸潤を可能にし得る。

10

【0048】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体または抗CTLA-4抗体である。本方法は、免疫チェックポイント薬治療が有用であるいずれかのがんに対して効果的であり得るが、一部の実施形態では、がんは、肉腫、がん腫または生殖細胞系腫瘍から選択された固形腫瘍がん、中枢神経系の腫瘍、乳がん、前立腺がん、子宮頸がん、子宮がん、肺がん、卵巣がん、精巣がん、甲状腺がん、星細胞腫、グリオーマ、膵がん、胃がん、肝がん、大腸がん、メラノーマ（進行メラノーマを包含する）、腎臓がん、膀胱がん、食道がん、喉頭がん、耳下腺がん、胆道がん、直腸がん、子宮内膜がん、扁平上皮がん、腺がん、小細胞がん、神経芽細胞腫、中皮腫、副腎皮質がん、上皮がん、類腱腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、内分泌腫瘍、Ewing肉腫ファミリー腫瘍、胚細胞腫瘍、肝芽腫、肝細胞がん、リンパ腫、メラノーマ、非横紋筋肉腫性軟部肉腫、骨肉腫、末梢性未分化神経外胚葉性腫瘍、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫及び腎芽腫である。一部の実施形態では、がんは非小細胞肺がん、メラノーマ、前立腺がん、転移性腎細胞がんである。通常、がんはPD-1、PD-L1またはCTLA-4に対して陽性であり、チェックポイント阻害薬治療はPD-1及びPD-L1間、またはCTLA-4及びB7間の相互作用を阻害する薬剤である。

20

【0049】

様々な実施形態では、患者は初期ステージがん（例えば、ステージIもしくはII）、または後期ステージがん（ステージIIIもしくはステージIV）である可能性がある。ステージIのがんは身体の一部に局限している。ステージIIのがんは局所的に進行し、ステージIIIのがんも同様である。がんがステージIIまたはステージIIIのどちらに認定されるかは、がんの特定のタイプに依存する可能性がある。例えば、ステージIIは隔膜の片側のみに影響を受けたリンパ節を示唆する可能性があり、一方、ステージIIIは隔膜の両側が影響を受けたリンパ節を示唆する。したがって、ステージII及びIIIの特定基準は診断によって異なる。ステージIVのがんは多くの場合、他の臓器または身体全体に転移または拡散している。

30

【0050】

一部の実施形態では、がんは切除不可能である。切除不可能ながんは、転移病巣の数または外科手術において危険な部位にあることのいずれかに起因して、外科的に除去することができない悪性腫瘍である。

40

【0051】

一部の実施形態では、患者は免疫チェックポイント阻害剤単独の使用に対して応答しないか、または部分的にしか応答しない。一方、ペプチドまたは医薬組成物は、免疫チェックポイント阻害薬治療と共に（または治療期間中に）投与される場合があり、一部の実施形態では、患者にペプチドを用いて1～4週間治療を行い、その後免疫チェックポイント阻害薬治療を行う。

【0052】

一部の実施形態では、ペプチドまたは医薬組成物は、臓器または組織移植に関連する微小血管漏出もしくは血管透過性またはリンパ管新生を低減し、これにより急性または超急

50

性拒絶反応の発生を低減するために投与される。例えば、ペプチドは皮膚移植、角膜同種移植、腎臓、肺、もしくは心臓移植、または他の臓器もしくは組織移植のレシピエントに投与される可能性がある一方で、急性または超急性拒絶反応のリスクを有する。例えば、ペプチドは少なくとも1日に1回を、1～8週間または1～4週間にわたり投与する場合がある。

【0053】

上記の様々な実施形態では、ペプチドは望ましい経路及び/または用量によって様々な形態で投与される可能性がある。

【0054】

ペプチドは製薬上許容される塩として送達される可能性があり、当技術分野で既知の任意数のキャリアを包含する場合がある。「製薬上許容される塩」には、比較的非毒性の酸または塩基を用いて調製された塩を包含する。本明細書で述べる「製薬上許容されるキャリア」とは、水、生理食塩水、ブドウ糖溶液、ヒト血清アルブミン、リボソーム、ヒドロゲル、微粒子及びナノ粒子を包含することを意図するが、これに限定されない。

【0055】

治療される特異的疾患によって、ペプチド薬剤は液体または固体剤形として処方され、全身的または局所的に投与される場合がある。薬剤は、例えば、当業者に既知の持続性放出または徐放の形態で送達される場合がある。製剤及び投薬の技術はRemington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000)に呈示されている場合がある。好適な経路は、経口、口腔内、吸入スプレー、舌下、直腸、経皮、膣、経粘膜、経鼻または腸内投与を包含し、非経口的送達では、筋肉内、皮下、髄腔内及び髄内注入、脳室内直接投与、静脈内、関節内、胸骨内、滑膜内、肝臓内、病巣内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、もしくは眼内注入またはその他の送達方法を包含する場合がある。

【0056】

投与の形態及び/または経路は変更する可能性があり、一部の実施形態では、ペプチドまたは医薬組成物は非経口的に投与される(例えば、皮下、静脈内または筋肉内への投与)か、または一部の実施形態では肺に直接投与される。肺への局所的投与は、医薬エアロゾルを包含する様々な製剤計画によって達成される可能性があり、医薬エアロゾルは、溶液エアロゾルまたは粉末エアロゾルであってもよい。粉末製剤は一般的に小粒子を含む。好適な粒子は、当技術分野で既知の任意の手段を用いて、例えばエアージェットミル、ボールミルもしくは振動ミルによる粉碎、ふるい分け、微量沈降、噴霧乾燥、凍結乾燥または制御結晶化により調製される可能性がある。一般的に、粒子は直径約10ミクロン以下である。粉末製剤は、当業者に既知の少なくとも1つの製薬上許容される微粒子キャリアを選択的に含有する場合がある。好適な医薬キャリアの実施例は、例えばアラビノース、ブドウ糖、フルクトース、リボース、マンノース、ショ糖、トレハロース、ラクトース、マルトース、でんぷん、デキストラン、マンニトールまたはソルビトールなど、単糖類、二糖類、多糖類及び糖アルコールを包含する糖類を包含するが、これに限定されない。あるいは、溶液エアロゾルは当業者に既知の任意の手段、例えば計量した用量の組成物を送達するように適合させたバルブを備えるエアロゾルを用いて調製される場合がある。活性成分の吸入可能な形態が噴霧可能な水性、有機または水性/有機分散系である場合、吸入装置は、例えば、分散液1～50ml、一般には1～10mlを含有する場合があるネブライザーで、例えばエアージェットネブライザーのような、従来の空気噴霧式ネブライザーもしくは超音波式ネブライザー、または、より少ない噴霧量、例えば10～100μlを可能にする携帯ネブライザーである場合がある。

【0057】

注入を目的として、本開示の薬剤は、例えばハंकス液、リンゲル液または生理的食塩水緩衝液など、生理学的に適合する緩衝液などの水性溶液中で処方及び希釈される場合がある。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

本開示の実践のために本明細書に開示の化合物を全身投与に好適な投薬量で処方するための、製薬上許容される不活性キャリアの使用法については、本開示の範囲内である。キャリアの適切な選択及び好適な製造方法を用いて、本開示の組成物、特に溶液として製剤化された組成物は、例えば、静脈内注入などによって非経口的に投与される場合がある。化合物は、当技術分野で周知の製薬上許容されるキャリアを使用し、経口投与に好適な投薬量に容易に処方される可能性がある。このようなキャリアは本開示の化合物を、治療対象（例えば、患者）の経口摂取を目的としてタブレット、ピル、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方することを可能にする。

【 0 0 5 9 】

経鼻または吸入による送達を目的として、本開示の薬剤は当業者に既知の方法によって処方される場合があり、例えば、生理食塩水、ベンジルアルコールなどの防腐剤、吸収促進剤、及びフッ化炭素など、実施例の可溶化、希釈または分散物質を包含し得るが、これに限定されない。

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態では、ペプチドは高分子ナノ粒子または微粒子キャリアを用いて処方される。例えば、一部の実施形態では、微粒子またはナノ粒子は、例えば、エステル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、無水物結合及び酵素分解の影響を受けやすい結合など、1つ以上の分解可能な結合を有する物質を含む。特定の実施形態では、微粒子またはナノ粒子は、生分解性高分子または、乳酸グリコール酸共重合体（PLGA）、ポリ（ - アミノエステル）（PBAE）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸（PLA）、ポリ（アクリル酸）（PAA）、ポリ - 3 - ヒドロキシ酪酸（P3HB）及びヒドロキシ酪酸ヒドロキシ吉草酸共重合体のみからなる群から選択された高分子の混合物を含む。他の実施形態では、例えば、ポリスチレンなど当技術分野で使用される非分解性の高分子は、分解性高分子または上記の高分子と混合され、共重合体系を生成する。したがって、一部の実施形態では、非分解性高分子は生分解性高分子と混合される。

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態では、本発明はインテグリンを標的とするPLGA - PEG共重合体及びコンジュゲートされたペプチドを含むナノ粒子を提供する。コンジュゲートされたペプチドは、配列番号1 ~ 31のいずれか1つ以上のペプチド、またはその誘導体である可能性がある。例えば、N07は抗血管新生及び抗腫瘍形成の特性を有するP07をベースとしてペプチドがコンジュゲートされたナノ粒子に対し、本明細書で使用される呼称である。N07は、*in vitro*での抗血管新生及び抗腫瘍形成活性、インテグリン V3複合体に対する特異的結合性、ならびに封入された送達薬物を運搬する能力を有する。

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態では、ナノ粒子はその表面にコンジュゲートされた追加の薬物または標的薬剤を含有する。例えば、ナノ粒子はPLGA - PEG - X及びPLGA - PEG - Y高分子から作製される場合があり、ここでXは前記ペプチドであり、Yは別の薬物または標的薬剤である。標的薬剤は組織選択的な標的薬剤である場合があるか、またはがん細胞に対して選択的である場合がある。これらの実施形態でのナノ粒子（コンジュゲートされたペプチド、及び選択的に追加の標的薬剤を有する）は、上記の固形腫瘍を包含するがん、及びグリア芽腫または乳がん（トリプルネガティブ乳がんを包含する）を包含するがんの治療に使用される場合がある。

【 0 0 6 3 】

他の標的結合剤は、追加的または代替的（代替のインテグリン結合部を包含する）に使用される場合があり、この標的結合剤は抗体及びその抗体結合部分を包含する。さまざまな標的結合のフォーマットには、単ドメイン抗体、組換え重鎖のみ抗体（VHH）、単鎖抗体（scFv）、サメ重鎖のみ抗体（VNAR）、微小タンパク質（システインノットタンパク質、*knottin*）、設計アンキリンリピートタンパク質、テトラネクチン

10

20

30

40

50

、アフィボディ；トランスボディ、アンチカリン、アドネクチン、アフィリン、マイクロボディ、ペプチドアプタマー、フィロマー、ストラドボディ、マキシボディ、エピボディ、フィノマー、アルマジロリピータンパク質、K u n i t z ドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、プロボディ、ワクシボディ、ユニボディ、デュオボディ、F v、F a b、F a b'、F (a b') 2、ペプチド模倣分子、もしくは合成分子、または米国特許もしくは米国特許出願公開第7, 417, 130号、第2004/132094号、第5, 831, 012号、第2004/023334号、第7, 250, 297号、第6, 818, 418号、第2004/209243号、第7, 838, 629号、第7, 186, 524号、第6, 004, 746号、第5, 475, 096号、第2004/146938号、第2004/157209号、第6, 994, 982号、第6, 794, 144号、第2010/239633号、第7, 803, 907号、第2010/119446号及び/または第7, 166, 697号明細書に記載のフォーマットを包含し、それらの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。S t o r z M A b s . 2011 M a y - J u n ; 3 (3) : 310 317を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0064】

一部の実施形態では、ナノ粒子は、ペプチド（例えば配列番号1～6のいずれか1つの配列、またはその誘導体を含む）に共有結合したサイズ調節が可能な乳酸グリコール酸共重合体ポリエチレングリコール（P L G A - P E G）ブロック共重合体、または上記の他の結合剤から合成される。任意の比率のコンジュゲート及び未コンジュゲート高分子の混合物は、表面に望ましい密度の標的薬剤を備えたナノ粒子を生成するために使用される可能性がある。粒子の調節可能な特徴の説明は、表1で呈示される可能性がある。

【0065】

一部の実施形態では、粒子にコンジュゲートされるペプチドは、上述の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5もしくは配列番号6のアミノ酸配列、またはその誘導体（例えば、配列番号7～31のペプチドを包含する）を有する。一部の実施形態におけるナノ粒子は、P L G A - P E G ペプチドコンジュゲートから形成される、または他の実施形態では、ペプチドはあらかじめ形成された粒子にコンジュゲートされる。

【0066】

本明細書で述べる「ナノ粒子」とは、1nm～1000nmの間の任意の整数値を包含し（約1、2、5、10、20、50、60、70、80、90、100、200、500及び1000nm、ならびにその間の全ての整数及び小数を包含する）、約1nm～約1000nmの範囲内の少なくとも1つの寸法を有するペプチドを表す。一部の実施形態では、ナノ粒子は約50～約100nmの少なくとも1つの寸法、例えば直径を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は約70～約100nmの直径を有する。

【0067】

一部の実施形態では、粒子は微粒子である。「微粒子」には、少なくとも約1マイクロメートル（ μm ）の範囲内で少なくとも1つの寸法を有する粒子を包含する。本明細書で述べる「粒子」とは、ナノ粒子及び微粒子を包含することを意味する。

【0068】

粒子は循環血中の特性、体内分布及び分解速度を包含する、望ましい薬力学的有益性を提供するように設計される場合がある。このようなパラメータは、サイズ、形状、表面電荷、高分子の組成、リガンドコンジュゲーションの化学的性質、ペプチドコンジュゲーションの密度などを包含する。例えば、一部の実施形態では、P L G A - P E G 高分子の一部がペプチドの末端結合を有し、粒子はP L G A 高分子コア、及びP L G A - P E G 共重合体のP E G 部分によって形成された親水性シェルを有する。親水性シェルは、例えば、P L G A - P E G - M e O H 高分子などの官能基に関して不活性な、エステルでエンドキャップされたP L G A - P E G 高分子をさらに含む場合がある。一部の実施形態では、未コンジュゲート高分子の一部または全てが他の末端基（例えば、カルボキシ）を有し、表

面特性の微調節を提供する。

【0069】

本明細書に記載のペプチドは、任意の利用可能な工程を使用し、粒子に対して化学的にコンジュゲートされ得る。ペプチドコンジュゲーションに使用される官能基は、PEG-COOH、PEG-NH₂、PEG-SHを包含する。例えば、Hermanson, BLOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, New York, 1996を参照のこと。活性官能基は、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アシル、アミン、スルフヒドリル、アルデヒド、不飽和結合、ヒドラジド、イソシアネート、イソチオシアネート、ケトン、及び化学結合で活性化することが知られている他の官能基を包含する。あるいは、ペプチドは小分子カップリング試薬を用いることによりコンジュゲートされる可能性がある。カップリング試薬の非限定的な実施例は、カルボジイミド、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ビスクロロエチルアミン、例えばグルタルアルデヒド、無水物などの二官能性アルデヒドを包含する。

10

【0070】

例示的な一実施形態では、ナノ粒子は、(PLGA高分子の乳酸(LA)：グリコール酸(GA)の比率及び/または分子量を調整することによって) *in vivo*で特異的生分解速度が調節される可能性があるコア(PLGA)を有する。一部の実施形態では、PLGAは、乳酸/グリコール酸(L/G)組成が5/95、10/90、15/85、20/80、25/75、30/70、35/65、40/60、45/55、50/50、55/45、60/40、65/35、70/30、75/25、80/20、85/15、90/10、または95/5であることを包含し、LA：GAの比率が20：1～1：20であることをベースにする。PLGAは、そのエステル結合の加水分解によって分解する。PLGAの分解に必要な時間はモノマーの比率に関連し、グリコリド単位の含有量が多いほど、主にラクチド単位と比較して分解に必要な時間は短くなる。加えて、エステルでエンドキャップされた高分子は(遊離カルボン酸に対して)、より長い分解半減期を有する。

20

【0071】

一部の実施形態では、ナノ粒子を製造するために用いるPLGA高分子は、調節が可能な粒径を提供するため、例えば約20K、約25K、約30K、約40K、約50K、約60Kまたは約70Kなど、約10K～約70Kの範囲内の分子量を有する。一部の実施形態では、微粒子を製造するために使用されるPLGA高分子は、例えば約100～約200Kなど、約20K～約200Kの範囲内の分子量を有する。高分子のPEG部分は、通常2K～5Kの範囲内である。様々な実施形態では、PLGA-PEGペプチドと未コンジュゲートPLGA-PEGの比率は、例えば約1：15～約15：1、約1：10～約10：1、約1：5～5：1、または約1：2～約2：1など、約1：20～約20：1の範囲に及ぶ。一部の実施形態では、PLGA-PEGペプチド及び未コンジュゲート共重合体の比率は約1：1である。一部の実施形態では、高分子の少なくとも50%はコンジュゲートされたペプチドを有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は約50～約200nm、または約50～約100nmの範囲内のサイズ(平均径)を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は脱イオン水中で約-5mV～約-40mVの範囲内、また、一部の実施形態では、約-10mV～約-30mVの範囲内(例えば、約-20mV、約-25mVまたは約-30mV)のゼータ電位を有する。

30

40

【0072】

一部の実施形態では、ナノ粒子はさらに封入された活性剤を含み、その活性剤はインフルエンザ、アルツハイマー病、出血熱、脳性マラリア、がん、急性拒絶反応の予防及び本明細書に記載のその他を包含する、微小血管漏出を特徴とする疾患の治療を目的として本明細書に開示された活性剤である場合がある。これらの実施形態では、ナノ粒子は活性剤の徐放を提供する。例えば、一部の実施形態では、活性剤は、例えばアミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、ピカルタミド、プレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンプトセシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルム

50

スチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロドロン酸、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエンエストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタビン、ゲニステイン、ゴセレリン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、イリノテカン、イロノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロン酸、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、ラバマイシン、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タクロリムス、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストステロン、チオグアニン、チオテバ、二塩化チタノセン、トボテカン、トラスツズマブ、トレチノイン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン及びビンレルピンのうち1つ以上の化学療法剤である。

【0073】

一部の実施形態ではナノ粒子が実質的に球状であるが、ナノ粒子は選択的に非球状である場合がある。

【0074】

物質が生体系と相互作用する経緯に影響を及ぼし得る、様々な物理的及び化学的特性が存在する。微粒子及びナノ粒子ベースの物質の場合、物質の選択、粒径分布及び粒子の形状分布は、全て粒子の活性に影響する重要なパラメータである。粒子のサイズ及び形状は、身体のような細胞との相互作用に影響し得ることが示されてきた。例えば、粒子の形状は様々な細胞タイプがどのように粒子を取り込み得るかに影響する可能性があり、通常だ円粒子は、細胞による取込みが球状粒子よりも困難である。粒子の形状を延伸することにより、例えば免疫系細胞などによる不要な粒子の取込みが低減する可能性があり、したがって身体内での粒子の半減期が延長される。粒子のサイズは、細胞の取込及び粒子との相互作用の能力にも影響する。したがって、粒子ベース系の活性の最適化は、粒子の粒径分布及び形状分布を調節することによって達成され得る。

【0075】

一部の実施形態では、国際公開第2013/086500号パンフレットに開示のナノ粒子の寸法及び/または粒子を延伸する工程は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0076】

特定の実施形態では、三次元の微粒子またはナノ粒子は、長だ円体が $a > b = c$ の式で記載できるように、 x 軸に沿った寸法(a)が y 軸に沿った寸法(b)よりも大きく、 y 軸に沿った寸法(b)が z 軸に沿った寸法(c)と実質的に等しい長だ円体を含む。他の実施形態では、三次元の微粒子またはナノ粒子は、三軸だ円体が $a > b > c$ の式で記載できるように、 x 軸に沿った寸法(a)が y 軸に沿った寸法(b)よりも大きく、 y 軸に沿った寸法(b)が z 軸に沿った寸法(c)よりも大きい三軸だ円体である。さらに他の実施形態では、だ円体は、扁平だ円体が $a = b > c$ の式で記載できるように、 x 軸に沿った寸法(a)が y 軸に沿った寸法(b)と等しく、 y 軸に沿った寸法(b)が z 軸に沿った寸法(c)よりも大きい扁平だ円体である。ただし、本明細書に開示の非対称粒子は、 $a = b = c$ である実施形態を包含しない。

【0077】

さらに他の実施形態では、微粒子またはナノ粒子は、約1.1~約5の範囲のアスペクト比を有する。他の実施形態では、アスペクト比は約5~約10の範囲を有する。一部の実施形態では、アスペクト比は約1.5~約3.5の範囲を有する。

【0078】

一部の実施形態では、粒子は、送達薬物（例えば、本明細書に記載のペプチド、及び／または他の薬剤）を封入する微粒子である。これらの実施形態では、粒子はその表面にコンジュゲートされたペプチドを含有するか、または含有しない場合がある。これらの実施形態では、粒子はペプチドの徐放を提供するために、長時間有効薬物デポ剤を提供する可能性がある。例示的な粒子のフォーマットは、国際公開第2014/197892号パンフレットに記載のものを包含し、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、粒子がポリ（ α -アミノエステル）（PBAE）を取り込まず、高分子は実質的にPLGA-PEGブロック共重合体のみからなる。これらの粒子が、例えば、黄斑変性（例えば、滲出性または萎縮性加齢性黄斑変性）または糖尿病性黄斑浮腫の治療として、眼内注入に使用される可能性がある。一部の実施形態では、送達物には望ましい場所に送達される活性剤を組み合わせることができる。一部の実施形態では、ナノ粒子はがんの治療を目的として投与される。これらのまたは他の実施形態では、粒子は、例えば約1～約250 μm の範囲内など、1～500 μm の範囲内のサイズ（平均径）を有する。粒子は、ペプチドまたは薬物の徐放期間に応じて、約1日1回～6ヶ月に1回、または約1週間もしくは約1ヶ月に1回注入する可能性がある。

10

20

30

40

50

【0079】

他の態様では、本発明は1つ以上の細胞上でインテグリンの発現を同定する方法を提供する。例えば一部の実施形態では、本方法は、記載された配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5もしくは配列番号6のペプチド（または配列番号7～31のペプチドを包含する、上述の配列番号1～6のいずれか1つの誘導体）を有した、（上記のように）その表面に1つ以上の細胞とコンジュゲートしたナノ粒子または微粒子に接触すること、及びナノ粒子の細胞への結合を可視化または検出することを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、例えば蛍光性、発光性、酵素性、または放射性標識などの検出可能な標識をさらに含み、その標識はPLGA-PEG高分子の一部にコンジュゲートされるか、ナノ粒子内に封入されるか、または他部を介して間接的に結合する可能性がある。一部の実施形態では、細胞は溶液中または培養液中に存在する場合がある。In vitroの用途では、結合は、結合粒子の直接可視化、フローサイトメトリー、または溶液中の細胞からのプルダウンによって判定することができる。一部の実施形態では、磁性粒子は、高分子粒子とは対照的に、標的のインテグリンを発現している細胞を分離する利便性の高い方法を実現するために用いられる。

【0080】

さらに他の実施形態では、ナノ粒子は患者に投与され、インテグリンを過剰発現している血管は、例えば腫瘍の近くでイメージ化される。

【実施例】

【0081】

実施例1

VEGF、HGF及びIGFのシグナル伝達を阻害するP07

P07の標的は、5 α 1及びV β 3インテグリンと同定された。インテグリンは、例えば血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）、肝細胞増殖因子受容体（HGF α またはc-met）、インスリン様増殖因子受容体（IGFR）及び血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）などの多くの増殖因子受容体に対する補助受容体として機能する。この機序と一致して、P07はこれらの受容体からのシグナル伝達を阻害することを呈示した（図1）。

【0082】

これらの受容体及びその他は、血管新生及び微小血管透過性に関与する。この多因子阻害は、複数の機序が関与する疾病が、P07及びその誘導体を用いて効果的に治療される可能性を高める。

【0083】

実施例2

複数の眼モデルで新血管形成を阻害するP07

P 0 7 は、ヒト血管内皮の増殖因子 (V E G F) を網膜で過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいて、血管漏出を阻害することを呈示した。モデルの血液漏出は、網膜下に溜まった血液が網膜剥離を引き起こすほど重度である。本モデルにおいて、P 0 7 はほぼ完全に網膜剥離を抑止した (図 2) 。

【 0 0 8 4 】

P 0 7 は、ウサギ眼の浮腫モデルにおいても同様に試験を行った。本モデルでは、局所血管が漏出しやすくなっている眼に、ヒト V E G F を直接注入した。V E G F を注入した3日後にフルオレセインナトリウムを静脈内投与し、その結果生じた漏出から眼中の蛍光の量を測定して漏出の程度を評価した。V E G F の注入前に、眼中に約 5 0 μ g の P 0 7 が存在した場合、血管漏出は劇的に阻害された (図 3) 。これらの結果は、P 0 7 が i n v i v o において強力な抗浮腫剤であることを示唆する。

10

【 0 0 8 5 】

実施例 3

がん組織の増殖を阻害する P 0 7

P 0 7 は、同所性トリプルネガティブ乳がん (T N B C) 異種移植片 (図 4) 、小細胞肺がん (S C L C) 及びグリア芽腫異種移植片 (図なし) の増殖を阻害する。P 0 7 に応答する腫瘍は、劇的に血管を減退させる (図 5) 。

【 0 0 8 6 】

これらの結果は、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせた場合に、P 0 7 が相乗効果を有し得ることを示唆する。P 0 7 及び免疫チェックポイント阻害剤は、同時に血管新生の阻害、ならびに樹状細胞の成熟及びより強固なリンパ球内皮輸送を可能にすることで腫瘍への免疫応答を強化し、チェックポイント阻害剤が、腫瘍細胞を死滅させる細胞傷害性 T 細胞の浸潤を可能にし得る。

20

【 0 0 8 7 】

実施例 4

P 0 7 とコンジュゲートしたナノ粒子 (N 0 7) の特性

N 0 7 は、抗血管新生及び抗腫瘍形成の特性を有する、ペプチドとコンジュゲートしたナノ粒子である。N 0 7 はインテグリン V 3 複合体と特異的に結合し、封入された送達薬物を運搬する能力を有する。

【 0 0 8 8 】

N 0 7 は、共有結合によって N 0 7 とコンジュゲートする、サイズ調節が可能な乳酸グリコール酸共重合体ポリエチレングリコール (P L G A - P E G) ブロック共重合体から合成される。任意の比率のコンジュゲート及び未コンジュゲート高分子の混合物は、表面に望ましい密度の P 0 7 を備えたナノ粒子を生成するために使用される可能性がある。粒子の調節可能な特徴についての説明は、表 1 に示される可能性がある。

30

【 0 0 8 9 】

【 表 1 】

表 1

調節可能なパラメータ	適用範囲
P L G A の分子量	1 0 k D a ~ 7 0 k D a
P E G の分子量	2 k D a ~ 5 k D a
ペプチドにコンジュゲートされた高分子の割合	0 ~ 1 0 0 %

40

【 0 0 9 0 】

N 0 7 は、P 0 7 ペプチド及び P L G A - P E G ブロック共重合体から合成された。P 0 7 は、New E n g l a n d P e p t i d e にて固相合成により産生され、H P L C / M S により純度を評価した。ペプチドは N 末端にアミン、かつ C 末端にアミドを有する。P L G A - P E G ブロック共重合体は P o l y S c i T e c h (登録商標) から購入

50

し、純度及び分子量はゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）及びフーリエ変換赤外分光法（FTIR）により評価した。

【0091】

コンジュゲーションを行うため、P07をDMSO中に溶解して100mg/mlとし、170mg/mlのNHS官能基化PLGA-PEG（PLGA-PEG-NHS）のDMF溶液に加えた。混合物に40倍モル過剰量のジイソプロピルエチルアミン（DIEA）を加え、一晚室温で攪拌した。その後、混合物をエーテル及びメタノールの冷混合物に滴下して加え、遠心機により22,000×gで沈降させた。その後、ペレットをメタノールで繰り返し洗浄し、未反応のペプチドを除去するために遠心機で沈降させた。上澄みを廃棄し、ペレットは真空下に放置して数時間乾燥し、固形のPLGA-PEG-S

10

【0092】

PLGA-PEG-P07及びPLGA-PEGの混合物をDMF中に溶解して10mg/mlとし、磁気攪拌下で脱イオン水中に滴下して、ナノ沈降と呼ばれる工程によりナノ粒子を形成した。ナノ沈降を行う前に、望ましい送達物をDMF混合物に加え、疎水性PLGAコア内に充填した送達物を備えたナノ粒子を得た。数時間攪拌した後、粒子はUltra Centrifugation Columns（EMD Millipore、UFC810096）を用いて過及び濃縮した。

20

【0093】

HPLCを使用して、PLGA-PEG-NHSのP07に対するコンジュゲーションの効率を評価した。場合によっては、c末端のFはWに交換され、W残基の吸光度及び蛍光の計測を可能にした。エーテル及びメタノール中で沈降させる前の反応混合物からPLGA-PEG-P07をDMSOで希釈し、Agilent Poroshell 300カラムを通じて水-アセトニトリル移動相内で流した。ペプチドは、吸光度が220nm（ペプチド骨格）及び280nm、ならびに蛍光が295/348nmの励起/発光（トリプトファン、W）を介して検出された。未反応のP07の量は、遊離したP07のピークを積分することにより判定した。PLGA-PEG-P07反応混合物を、PLGA-PEG-COOHまたはPLGA-mPEG及びP07の対照反応混合物と比較したが、いずれもPLGA-PEG-P07を形成する反応を起こさないと考えられる。反応したP07は、遊離したP07のピークに寄与しないと考えられたため、対照反応と比較した時のP07のピークの減少は、PLGA-PEG-NHS共重合体へのコンジュゲーションを示唆する。全ての積分値がペプチド濃度の直線範囲内に収まるように、結果を遊離ペプチドの標準曲線と比較した。結果を表2及び図6に示す。

30

【0094】

【表2】

表2

定量したシグナル	コンジュゲーション効率
蛍光（295/348nm）	0.869
吸光度（280nm）	0.920
吸光度（220nm）	0.854

40

【0095】

LavaPep（商標）による評価：N07の表面上のペプチドを直接検出するため、LavaPep（商標）ペプチド定量化キット（Gel Company、LP022010）を使用した。粒子を超純水中に3～5mg/mlになるよう懸濁させ、暗所でLavaPep希釈標準溶液と共に96ウェルプレート中で1時間インキュベートした。LavaPep希釈標準溶液中のエピコノン色素は、ペプチド上のArg残基と相互作用して高蛍光性分子になる。蛍光は、Biotek HT Synergyプレートリーダー

50

により530/590nmで計測した。ナノ粒子から得たシグナルを、既知量の遊離ペプチドの標準希釈曲線と比較した。定量化の結果は表3に示され、SP2043が効率的にPLGA-PEG-NHS共重合体にコンジュゲートされ、ナノ粒子に取り込まれたことを実証している。

【0096】

【表3】

表3

SP2043 の表面の割合	平均シグナル	対応するペプ チド (μg)	ペプチド標準 偏差 (μg)	コンジュゲー ション効率
100	1992	14.80	0.538	0.889
50	1432	7.01	0.249	0.842
0	0	0	—	—

10

【0097】

サイズ評価：N07を水に懸濁させて1mg/mlとし、Malvern Zetasizer Nano ZS90を使用して分析した。Z平均粒子径及び強度ベースの粒径分布を測定して記録した。結果は表4及び図7に示され、P07のZ平均粒子径が約70~80nmであり、ナノ粒子にコンジュゲートされたP07を用いたサンプルでは、サイズの増加がわずかに見られたことを実証している。

20

【0098】

【表4】

表4

サンプル	Z平均粒子径 (直径nm)	PDI
PLGA-PEG-COOH	68.24 ± 0.26	0.23
PLGA-PEG-COOH/P07 (50/50)	73.39 ± 1.03	0.18
PLGA-PEG-P07	77.59 ± 2.65	0.29

30

【0099】

ゼータ電位：N07を水に懸濁させて1mg/mlとし、Malvern Zetasizer Nano ZS90を使用して分析した。表面のゼータ電位を測定して記録した。結果は図8に示され、N07は、脱イオン水中においてゼータ電位が陰性であり、PEG上の種々の末端基を用いて25mV付近に調節することはほとんど不可能であることを実証している。図8では、中性はメトキシ末端PEGであり、陰性はカルボキシ末端PEGである。

40

【0100】

実施例5

インテグリン α_3 及びインテグリン α_5 1 標的に対するPLGA-PEG-P07の結合

粒子は上記のように調製され、PLGA-PEG-P07またはPLGA-mPEGのいずれかになるよう完全に作製される。インテグリン α_3 、インテグリン α_5 1 及びヒト血清アルブミンは、Alexafluor 488 TFP-esterによって標識された。粒子はインテグリンのPBS溶液と共に、並行して粒子を含まないインテグリンまたはヒト血清アルブミン (HSA) のPBS溶液を対照サンプルと共に室温で一晩

50

インキュベートした。その後、Sephacryl S-500 HRメディアを使用し、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）遠心分離スピナラムを介して遊離したインテグリンまたはHSAタンパク質から粒子を分離した。分離後、蛍光シグナルをBiotek Synergy HTマイクロプレートリーダーで計測し、SECメディアに通した粒子からのインテグリンの量を評価した。結果を図9に示す。

【0101】

インテグリン α_3 に対する結合について、競合サンプルを添加して上記プロトコルを繰り返し行った。簡潔に述べれば、様々なペプチド（P07及び不活性であることが示されているP07の部分的スクランブル配列）を、標的粒子及び100倍過剰のAlexafluor 488で標識した遊離インテグリン溶液に加えて室温で一晩インキュベートした。Sephacryl S-500 HRメディアを使用し、SEC遠心分離スピナラムを介して溶液を分離した。前述のように、蛍光を使用して、SECメディアに通した粒子から得たインテグリンの量を評価した。結果を図10に示す。

10

【0102】

ナノ粒子のMDA-MB-231及び微小血管内皮細胞（MEC細胞）に対する結合試験を行った。粒子は、上記のように1重量%のTAMRA色素を添加して調製した。ナノ沈降を行った後、粒子はAmicon ultracentrifugation filters（MWCO 100,000）を用いて濃縮し、Sephacryl S-500 HRメディアを使用し、SEC遠心分離スピナラムを介してろ過することによって、遊離したTAMRA色素または遊離した高分子もしくはペプチド物質を除去した。その後、細胞をナノ粒子と共に100,000細胞/ml及び粒子1mg/mlの条件でインキュベートした。ナノ粒子は、標的PLGA-PEG-P07高分子または非標的PLGA-mPEG高分子のいずれかから作製される。37℃で1時間インキュベーションを行った後、細胞を遠心機により沈降させ、上澄みを除去した。細胞をPBSに再懸濁させ、その結果生じたシグナルをBiotek Synergy HTマイクロプレートリーダーで読み取り、細胞からの蛍光粒子の量を評価した。結果を図11に示す。

20

【0103】

MDA-MB-231細胞及び微小血管内皮細胞（MEC）の接着を阻害する能力について、粒子の試験を行った。In vitroアッセイを行う前に、粒子は超遠心分離カラムを使用して超純水から適切なメディアに移し、メディア中で10mg/mlに濃縮し、96ウェルプレートに加えた。メディア単体及び100 μ M及び25 μ MのAXT201（既知の接着阻害剤）を有するメディアを、陽性対照及び陰性対照としてプレートに加えた。MDA-MB-231またはMEC細胞を、20,000細胞/ウェルの条件で粒子、ペプチド及びメディアに加えた。96ウェルプレートを、37℃及び5%CO₂下で約2時間インキュベートした。その後、ウェルをCa²⁺及びMg²⁺含有DPBSで洗浄し、4 μ g/mlのカルセインAM色素を含有したメディアを注いだ。その後、プレートを30分間インキュベートし、Ca²⁺及びMg²⁺含有DPBSで再洗浄した。その後、蛍光をBiotek Synergy HTマイクロプレートリーダーにより485/528nmで計測し、ウェルの表面に接着した細胞数を定量した。結果は図12に示され、N07がMDA-MB-231腫瘍細胞及びMEC細胞に対して抗接着活性を有することを実証している。図12では、%はP07とコンジュゲートしたPLGA-PEG分子の量を表す。「+」または「-」は、封入されたP07の有無を表す。

30

40

【0104】

MEC増殖の阻害について粒子の試験を行った。MEC細胞に対して、MTT Vyrant Assay Kitを使用した比色ベースの増殖アッセイを実行した。2000細胞/ウェルになるようフェノールレッド不含ECM-2MVメディアを使用して96ウェルプレートに播種し、18~20時間かけて接着させた。粒子を含まない元のメディアは、5mg/mlになるようメディアに懸濁させたN07粒子、もしくはAXT201ペプチド含有メディア、またはメディア単体と交換した。メーカーの推奨に従って、4日後にメディアを100 μ lのMTT試薬と交換した。4時間後、100 μ lのSDS溶液

50

を各ウェルに加え、37℃でさらに4時間インキュベートした。吸光度は、BioTek HT Synergyプレートリーダーにより570nmで計測し、生細胞中のミトコンドリア還元酵素によるMTTからホルマゼンへの変化をとらえた。結果は図13に示され、N07がMEC細胞に対して抗増殖活性を有することを実証している。図13では、%はP07とコンジュゲートしたPLGA-PEG分子の量を表す。「+」または「-」は、封入されたP07の有無を表す。

【0105】

PEG-P07コンジュゲートが接着を阻害する能力について試験を行った。NHSで官能基化したPEG8及びPEG24を、DMFに約150mg/mlになるよう溶解した。ペプチドを1:1モル比でDMSOに加えて100mg/mlとし、同時に40倍モル過剰量のDIPAを加えた。混合物を冷エーテル及びメタノール中で沈降させて数回洗浄し、DIPA、溶媒及び遊離PEGを除去した。その結果生じた混合物を、上記のMDA-MB-231細胞を用いた接着アッセイにおいて、陽性及び陰性対照と共に使用した。結果は図14に示され、PEG-P07の接着活性を実証している。

【0106】

実施例6

ペプチドとコンジュゲートした粒子の延伸

粒子のサイズ及び形状は、粒子の活性を最適化するために精巧に処理された。粒子は効率よく作製及び延伸された。延伸プロトコルの前後でペプチドの充填量は同じままであり、ペプチドは工程を通して安定し続けている。

【0107】

微粒子形成：最初に乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)をジクロロメタン(DCM)に20mg/mlになるよう試験管内で溶解し、ボルテックスで十分に溶解した。ジメチルスルホキシド(DMSO)中のP07ペプチドストック(20mg/ml)を、PLGA/DCM溶液にマイクロピペットで移した。初期のペプチドのPLGAに対する質量比は、例えばペプチド:PLGAが1:50及び1:20など、変更する可能性がある。ブランクの微粒子用に、DMSOのみ同じ容量をピペットで量り取った。混合物の超音波処理を、試験管を用いて氷上で行った。超音波処理を約5~10Wに等しい振幅設定である「30」で20秒間行った。この一次エマルジョンを、速やかに50mLの1%ポリビニルアルコール(PVA)溶液に注ぎ、3.6~3.8krpmで1分間ホモジナイズした。全容量を100mLの0.5%PVA溶液に移し、ドラフトの中で約3.5時間攪拌した。その後、洗浄過程を3回行った。洗浄過程ごとに、微粒子溶液を4、4krpmで5分間遠心機にかけ、その後上澄みを除去した。続いて、40mLの冷却Milli-Q水を加えて微粒子のペレットを再懸濁させ、洗浄過程を繰り返し行った。最後の遠心分離を行った後、5mLの水を加えてサンプルを再懸濁させた。サンプルは液体窒素中で簡易凍結させ、凍結乾燥機内に置いた。凍結乾燥後、全ての微粒子を-20℃で保存した。

【0108】

ナノ粒子形成：最初にPLGAをDCMに望ましい濃度(通常20mg/mlまたは40mg/ml)になるよう試験管内で溶解し、ボルテックスで十分に溶解した。DMSO中の、例えばP07などのペプチドストック(20mg/ml)を、PLGA/DCM溶液にマイクロピペットで移した。ペプチドのPLGAに対する質量比は変更する可能性がある。例示的な製剤は、ペプチド:PLGAが1:50である。ブランクのナノ粒子用に、DMSOのみ同じ容量をピペットで量り取った。混合物の超音波処理を、試験管を用いて氷上で行った。超音波処理(Misonix)を約5~10Wに等しい振幅設定である「30」で20秒間行った。この一次エマルジョンを、速やかに50mLの1%PVA溶液に注ぎ、「30」~「100」のうち任意の振幅設定で、氷上において2分間超音波処理を行った。全容量を100mLの0.5%PVA溶液に移し、ドラフトの中で約3.5時間攪拌した。その後、洗浄過程を3回行った。洗浄過程ごとに、ナノ粒子溶液を4、17krpmで10分間遠心機にかけ、その後上澄みを除去した。続いて、30mLの冷却Milli-Q水を加えてナノ粒子のペレットを再懸濁させ、洗浄過程を繰り返し行っ

た。最後の遠心分離を行った後、5 mLの水を加えてサンプルを再懸濁させた。サンプルは液体窒素中で簡易凍結させ、凍結乾燥機内に置いた。凍結乾燥後、全てのナノ粒子を-20℃で保存した。

【0109】

微粒子の延伸：凍結乾燥したPLGA粒子は、10%PVA/2%グリセロール溶液中で2.5 mg/mLの濃度になるよう溶解し、この溶液の10 mLを長方形のペトリ皿に入れて一晩乾燥した。その結果生じたフィルムを一定のサイズに切断し、2つのアルミニウム台の間に充填して90℃になるまで加熱した。フィルムの長さを測定し、カスタマイズした延伸装置を使用してフィルムを徐々に延伸し、望ましい倍数の延伸フィルム（例えば、2倍延伸した円粒子）を産生した。その後、フィルムを室温まで冷却し、アルミニウムブロックから除去した。PVAフィルムは水に溶解して、その結果生じた粒子懸濁液を3回洗浄した。粒子は使用する前に凍結乾燥させた。

10

【0110】

SEM及びTEMによる評価：走査電子顕微鏡（SEM）で使用するため、凍結乾燥させた粒子をカーボンテープ（Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA）の上に置き、アルミニウム台の上に置いた。サンプルは金パラジウムを用いてスパッタされ、JHU School of Medicine MicrofacのLEO/Zeiss FSEMを用いてSEMイメージングを行った。SEMイメージのImageJ解析を用いて、微粒子サンプルのサイジングを行った。結果を図15に示す。延伸した粒子を図16に示す。

20

【0111】

透過電子顕微鏡（TEM）で使用するため、最初にナノ粒子を水に1 mg/mLになるように再懸濁させた。10 µLのサンプルをカーボンコーティングした銅グリッドの上に滴下し、ドラフトの中で2時間乾燥させた。その後、Phillips CM120システムを使用して、TEMによる無染色イメージングを行った。結果は図17に示され、ペプチドを充填したNPの未延伸（左）または2倍延伸（右）の状態を示す。

【0112】

微粒子の充填及び放出の定量化：充填量を測定するため、既知の質量の微粒子をDMSOに溶解した。ペプチド充填微粒子及び対応するブランク微粒子に対し、ゲル電気泳動（Bio-Rad Mini-PROTEANシステム）及び銀染色解析による定量化を行った。12ウェルの10%~20%Mini-PROTEANトリス-トリシingleルを使用し、同時に10倍トリス/トリシン/SDS泳動用緩衝液をMilli-Q水で1倍に希釈した。各ゲルは、既知量のペプチドのスタンダードシリーズを含有した。ペプチドのスタンダードシリーズは各ウェルにつき0、62.5、125、250及び500 ngのペプチドを包含した。残りのウェルはタンパク質スタンダード、ならびにペプチド充填及び対照用ブランクの、2つの微粒子サンプルを包含した。DMSOサンプルを1:1の容量でサンプル緩衝液と混合した。サンプル緩衝液を24%グリセロール1倍PBS溶液で作製した。ゲル電気泳動では、2.5 kDaのタンパク質スタンダードのバンドが、ゲル下流側へ約3分の2進むまで泳動を行った。ゲル染色の後に銀染色プロトコールを行った。展開を行う過程で、最小のペプチドスタンダード（この場合は62.5 ng）が現れ始めたら直ちに反応停止液を加えた。ゲルイメージをデジタルカメラでキャプチャし、ImageJのゲルバンド強度定量化機能を用いて解析した。結果を図18に示す。

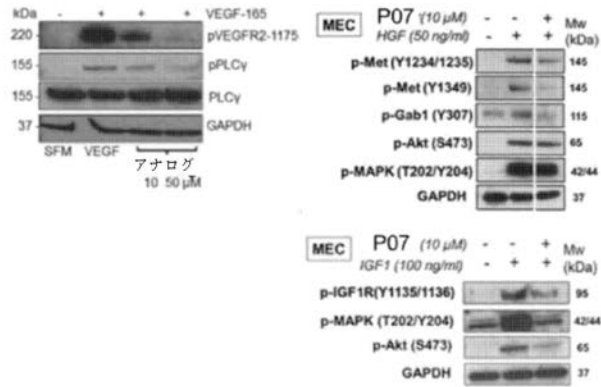
30

40

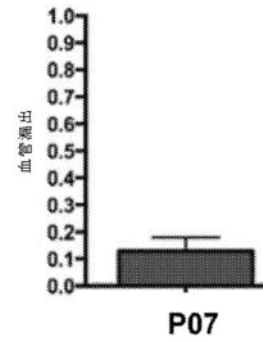
【0113】

放出量を測定するため、既知の質量の微粒子を1xPBSに懸濁させて、37℃のオープン内にあるシェーカーの上に置いた。様々な時点で、サンプルを約2.5 krcfで5分間遠心機にかけた。上澄みを採取して-80℃で保存し、新鮮なPBSをサンプルに加えた。上澄みに放出されたペプチドの定量化を、ゲル電気泳動、銀染色、及びゲルバンド解析により行った。結果を図19に示す。

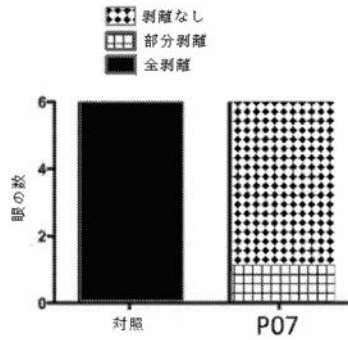
【図1】



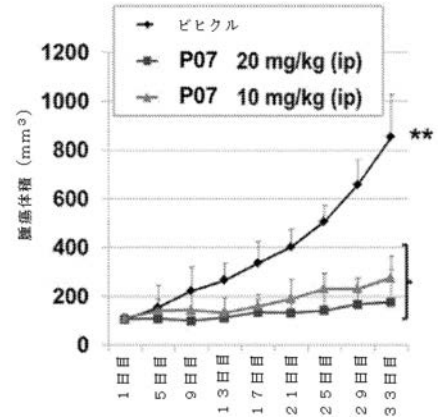
【図3】



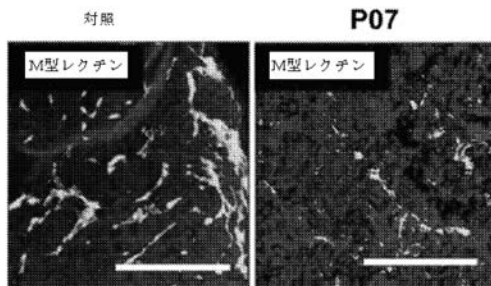
【図2】



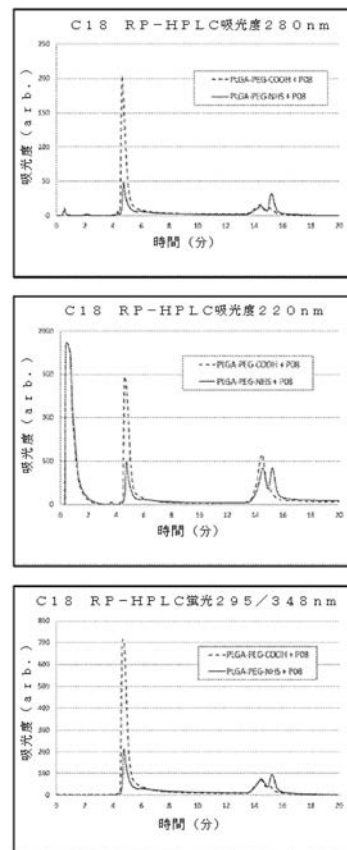
【図4】



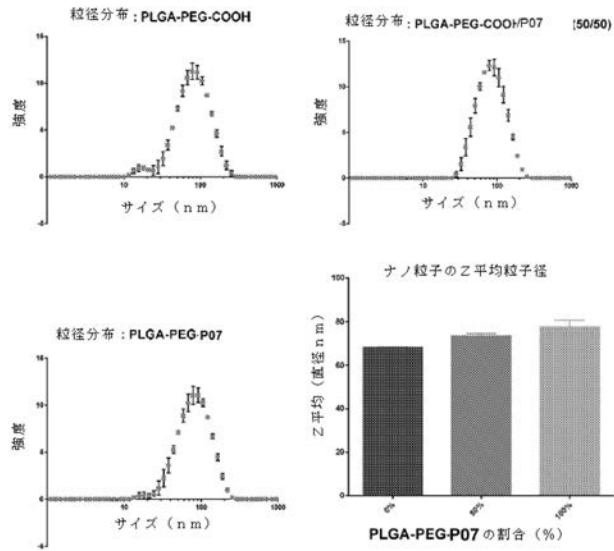
【図5】



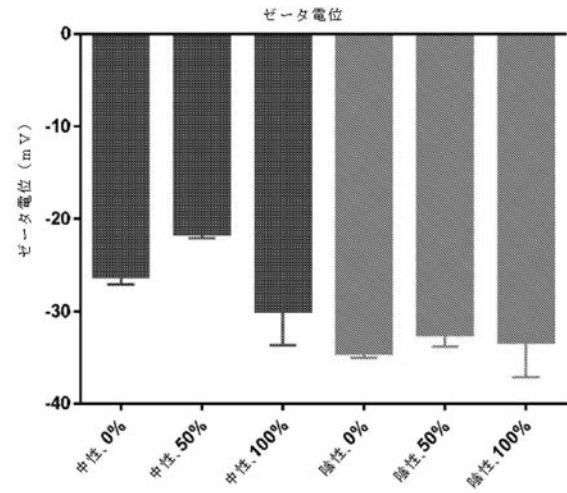
【図6】



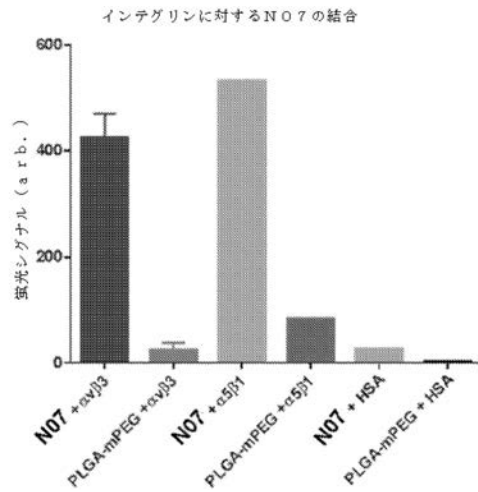
【図 7】



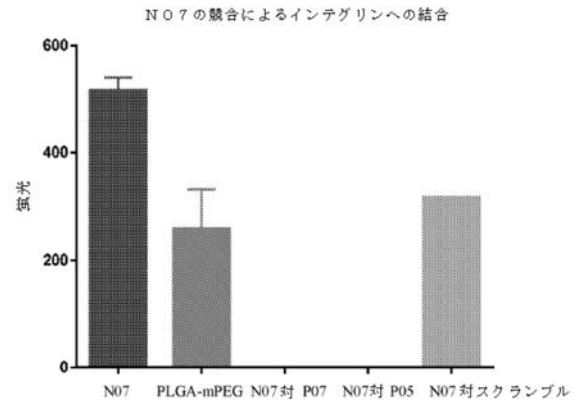
【図 8】



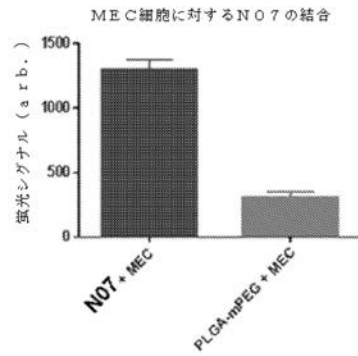
【図 9】



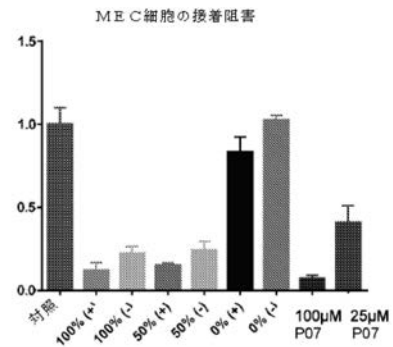
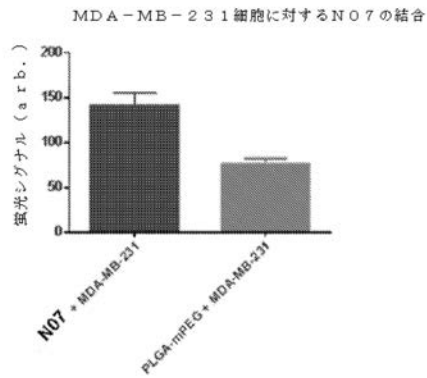
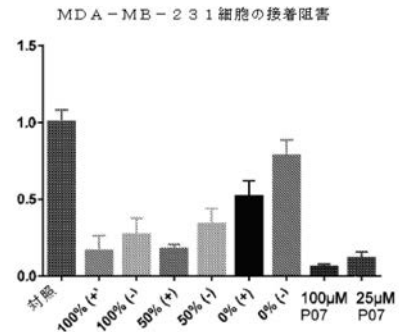
【図 10】



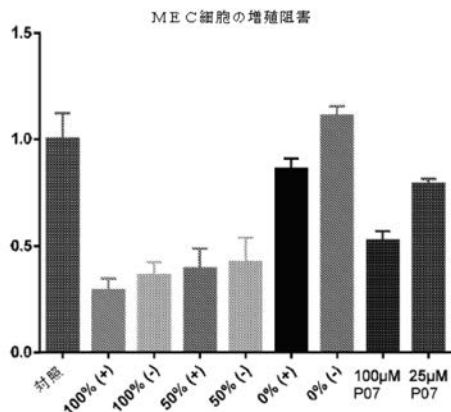
【図 1 1】



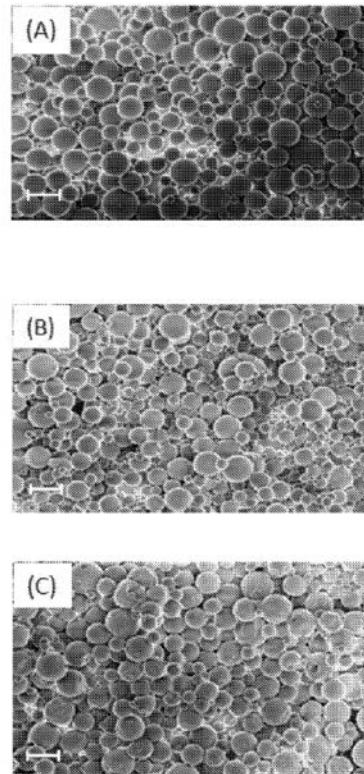
【図 1 2】



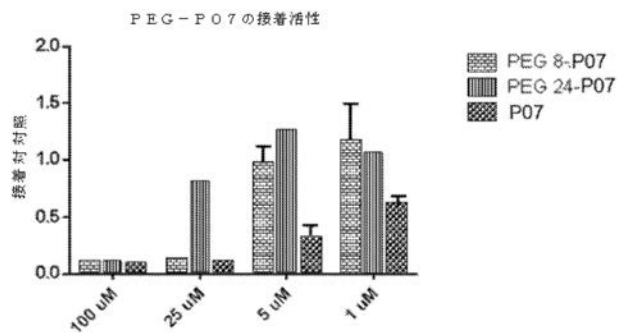
【図 1 3】



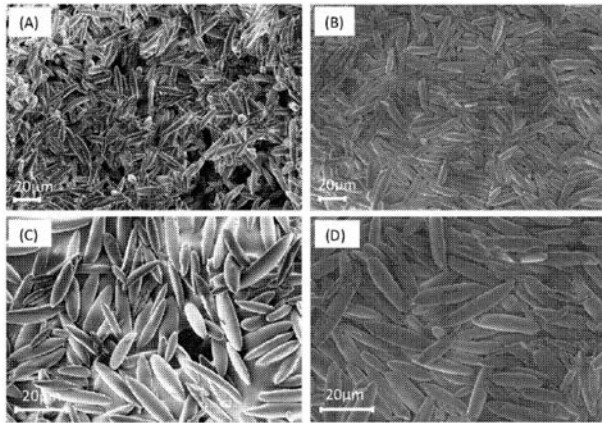
【図 1 5】



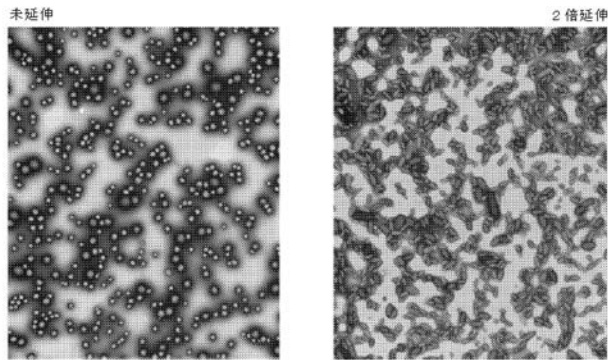
【図 1 4】



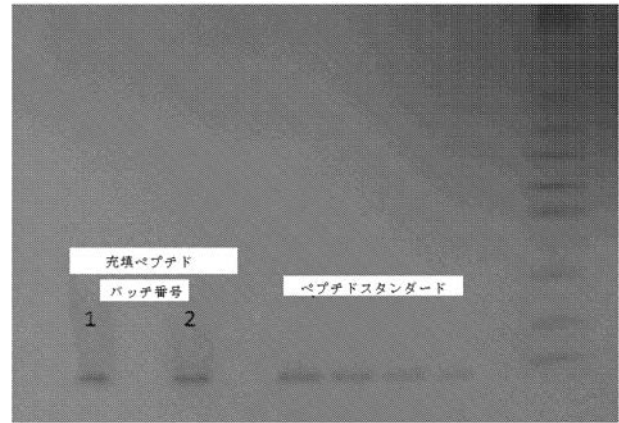
【図 16】



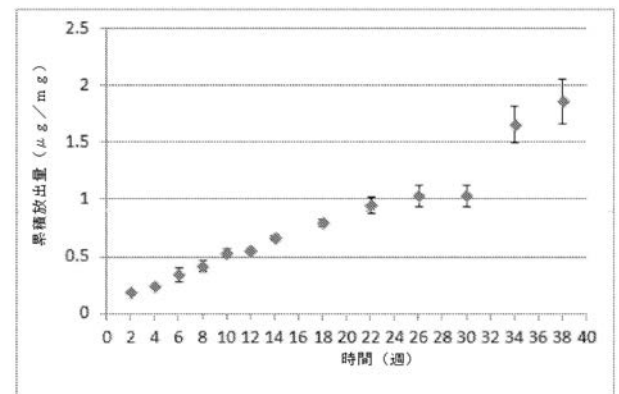
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【配列表】

2018535224000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/62816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 35/44, 38/08, 38/10, 38/39, 39/145; C07K 7/08, 14/78; G01N 33/574 (2017.01) CPC - A61K 35/44, 38/10, 38/08, 38/014, 38/39, 39/145; C07K 7/08, 14/115, 14/78; G01N 33/574		
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 — Y	WO 2014/197892 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 11 December 2014; page 2, lines 26-28; page 3, lines 6-9, 17-21, and 29-33; page 6, lines 20-24; page 10, lines 24-26; page 12, lines 28-34; ; page 14, lines 15-17; page 42, lines 5-15; page 44 lines 10-14; claims 1, 4, 5; Figure 17	1, 45, 47 3-6, 7/1, 7/3-6, 8/7/1, 8/7/3-6, 9/7/1, 9/7/3-6, 11-13, 14/11-13, 15-17, 18/15-17, 19-22, 23/19-22, 34/33/30-31, 35
X — Y	(GRAF, N et al.) [Alpha]V[beta]3 Integrin-targeted PLGA-PEG nanoparticles for enhanced anti-tumor efficacy of a Pt(IV) prodrug. ACS Nano. 14 May 2012, Vol 6, Issue 5; pages 4530-4539; Abstract; page 2, 2nd and 3rd paragraphs; page 4, 4th paragraph; page 5, 4th paragraph; page 6, 1st paragraph; DOI: 10.1021/n301148e	30, 33/30-31 31, 34/33/30-31, 35/33/30-31, 55-57
Y	(ARMOTRONC, SM et al.) Influenza Infacts Lung Microvascular Endothelium Leading to Microvascular Leak: Role of apoptosis and Claudin-5. PLoS ONE. 24 October 2012, Vol. 7, No. 10; e47323; page 13, 2nd column, 2nd paragraph; DOI: 10.1371/journal.pone.0047323	3-6
Y	US 2014/0256614 A1 (KAYYALI US) 11 September 2014; paragraphs [0015], [0021], [0022], [0114]-[0115].	7/1, 7/3-6, 8/7/1, 8/7/3-6, 9/7/1, 9/7/3-6
Y	WO 2014/018018 A1 (MOREHOUSE SCHOOL OF MEDICINE) 30 January 2014; paragraphs [0014], [0025], [0044], [0072]-[0073], [0103], [0110], [0118]-[0119], [0169]-[0170]; claims 1, 6, 16, 25.	11-13, 14/11-13, 17, 19-22, 23/19-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 April 2017 (17.04.2017)		Date of mailing of the international search report 25 APR 2017
Name and mailing address of the ISA/ 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 PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/62816

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(HELLMAN, J) Addressing the Complications of Ebola and Other Viral Hemorrhagic Fever Infections: Using Insights from Bacterial and Fungal Sepsis. PLoS Pathology. 1 October 2015, Vol. 11, No. 10; e1005088; page 1, 1st paragraph; page 5, 4th paragraph; DOI: 10.1371/journal.ppat.1005088	15-17, 18/15-17
Y	US 2014/0100164 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 10 April 2014; abstract; figures 15A; paragraphs [0026], [0034], [0037], [0042], [0044], [0087], [0092], [0096], [0098], [0107]-[0108], [0112], [0147], [0195], [0256], [0272], [0278]-[0279], [0324]; claims 29, 44	24, 26, 27/24, 27/26, 31, 55-57
Y	(OTT, PA et al.) Inhibition of Immune checkpoints and vascular endothelial growth factor as combination therapy for metastatic melanoma: an overview of rationale, preclinical evidence, and initial clinical data. Frontiers in Oncology 22 Sep 2015, Vol 5, No. 202; Table 1; page 4, 2nd column, 2nd paragraph; page 5, 1st column, 1st paragraph; DOI: 10.3389/fonc.2015.00202	24, 26, 27/24, 27/26
Y	WO 2015/051010 A1 (MEDIMMUNE, LLC, et al.) 9 April 2015; page 81, lines 5-12	4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/62816

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.: 10, 28-29, 36-44, 48-54, 58-61
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.:
Groups I+, Claims 1-9, 11-27, 30-35, 45-47, and 55-57; SEQ ID NO:1 (integrin targeting 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
Information on patent family members

International application No.
PCT/US16/62816

---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.

Groups I+, Claims 1-9, 11-27, 30-35, 45-47, and 55-57; SEQ ID NO:1 (Integrin targeting peptide) are directed toward methods and particles comprising peptides derived from the alpha 5 fibril of type IV collagen, and uses thereof for medical treatment.

The methods and particles will be searched to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (first exemplary integrin targeting peptide). Applicant is invited to elect additional integrin targeting peptide sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, to be searched. Additional integrin targeting peptide sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5 (in-part), 6 (in-part), 7 (in-part), 8 (in-part), 9 (in-part), 11 (in-part), 12 (in-part), 13 (in-part), 14 (in-part), 15 (in-part), 16 (in-part), 17 (in-part), 18 (in-part), 19 (in-part), 20 (in-part), 21 (in-part), 22 (in-part), 23 (in-part), 24 (in-part), 26 (in-part), 27 (in-part), 30, 31 (in-part), 33 (in-part), 34 (in-part), 35 (in-part), 45 (in-part), 47 (in-part), and 55-57 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO:1 (integrin targeting peptide). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected integrin targeting peptide sequence(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 an integrin targeting peptide encompassing SEQ ID NO: 2 (first exemplary elected integrin targeting peptide).

No technical features are shared between the Integrin targeting peptide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: a method for treating or preventing microvascular leakage, comprising administering an effective amount of a peptide having the amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 1 to 6, or a derivative thereof, to a patient in need of treatment; a method for treating cancer, comprising administering an effective amount of a peptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 to 6, or a derivative thereof, to a cancer patient undergoing or preparing to undergo therapy with an immune checkpoint inhibitor; a nanoparticle comprising PLGA-PEG copolymers and a conjugated peptide targeting integrins; a microparticle encapsulating a peptide of any one of SEQ ID NOS: 1 to 6, or derivative thereof, wherein the nanoparticle or microparticle provide a long acting depot; a method for identification of integrins, comprising: contacting said nanoparticle with one or more cells, and visualizing or detecting binding of the nanoparticle to cells.

However, these shared technical features are previously shared by WO 2011/084509 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) (hereinafter "MIT") in view of US 2012/0114759 A1 to Green, et al. (hereinafter "Green") and the publication entitled 'Inhibition of Immune Checkpoints and Vascular Endothelial Growth Factor as Combination Therapy for Metastatic Melanoma: an Overview of Rationale, Preclinical Evidence, and Initial Clinical Data' by Ott et al. (hereinafter "Ott").

MIT discloses a method for treating or preventing microvascular leakage (page 2, lines 17-31; page 3, lines 12-18; page 4, lines 1-5; page 24, lines 21-22; page 32, lines 15-25), comprising administering an effective amount of a peptide (comprising administering an effective amount of a peptide; abstract; page 29, lines 1-3; claim 22) to a patient in need of treatment (intravenous administration (to a patient in need of treatment); abstract; claim 22); a method for treating cancer (a method for treating cancer; claims 22-23), comprising administering an effective amount of a peptide (comprising administering an effective amount of a peptide; abstract; page 29, lines 1-3; claim 22) to a cancer patient (claims 22-23); a nanoparticle comprising PLGA-PEG copolymers (a nanoparticle comprising PLGA-PEG copolymers; page 4, lines 6-8; page 13, line 31 – page 14, line 1; page 21, lines 8-15) and a conjugated peptide targeting integrins (a conjugated peptide targeting integrins; page 3, lines 4-8; claims 13-14); a microparticle encapsulating a peptide (a microparticle encapsulating a peptide; page 14, lines 7-9), wherein the nanoparticle or microparticle provide a long acting depot (wherein the nanoparticle or microparticle provide a long acting depot; page 14, lines 7-9); a method for identification of integrins (method for detection of ligands that bind to integrins; page 12, lines 9-12; claim 14), comprising: contacting said nanoparticle of with one or more cells (contacting said nanoparticle of with one or more cells; abstract), and visualizing or detecting binding of the nanoparticle to cells (visualizing or detecting binding of the nanoparticle to cells; page 45, lines 14-17).

MIT does not disclose a peptide of any one of SEQ ID NOS: 1 to 6 or a cancer patient undergoing or preparing to undergo therapy with an immune checkpoint inhibitor.

US 2012/0114759 A1 to Green, et al. (hereinafter "Green") discloses a polymeric nanoparticle specific peptide that is 100% identical to SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2462 of the Green is 100% identical to SEQ ID NO: 1 of the instant PCT application, wherein X is any amino acid; paragraphs [0188], [0189]) for treating angiogenesis-dependent diseases (abstract).

Ott discloses a cancer patient undergoing combination therapy with an immune checkpoint inhibitor (abstract; page 4, second column, second paragraph) to prevent angiogenesis (abstract; page 4, second column, second paragraph).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of MIT, for integrating SEQ ID NO: 1, as previously disclosed by Green, into the composition of MIT, for providing a highly potent anti-proliferative and anti-migratory peptide targeting $\alpha\beta 1$ integrins on both endothelial and tumor cells, to effectively inhibit angiogenesis-dependent diseases, such as age-related macular degeneration and cancer. Furthermore, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of MIT, for integrating a cancer patient undergoing therapy with an immune checkpoint inhibitor, as previously disclosed by Ott, for simultaneously inhibiting angiogenesis and vascular leakage while enhancing the immune response against cancer in a subject in need thereof.

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 a combination of the MIT, Green, and Ott references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 47/59 (2017.01)	A 6 1 K 47/59	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	Z N A
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 17/08 (2006.01)	C 0 7 K 17/08	

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

(72)発明者 グリーン ジョーダン ジェイ .

アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド ボルチモア ワイマン パーク ドライブ 8 1 0
シーノオー アスクレピクス セラピューティクス エルエルシー

(72)発明者 パンディー ニランジャン ビー .

アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド ボルチモア ワイマン パーク ドライブ 8 1 0
シーノオー アスクレピクス セラピューティクス エルエルシー

(72)発明者 ボーベル アレクサンダー エス .

アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド ボルチモア ワイマン パーク ドライブ 8 1 0
シーノオー アスクレピクス セラピューティクス エルエルシー

(72)発明者 シュムエリ ロン ビー .

アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド ボルチモア ワイマン パーク ドライブ 8 1 0
シーノオー アスクレピクス セラピューティクス エルエルシー

F ターム(参考) 4C076 AA31 AA95 BB01 BB11 BB24 CC11 CC15 CC27 CC35 CC41

EE23A EE24A EE48A EE59

4C084 AA02 AA03 AA19 BA01 BA02 BA08 BA17 BA18 BA23 CA70

MA02 MA05 MA43 MA58 MA65 NA05 NA14 ZA021 ZA161 ZA331

ZA361 ZA591 ZA811 ZA891 ZB261 ZB331 ZB381 ZC411 ZC412

4H045 AA10 AA30 BA15 BA17 CA40 EA20 FA80