

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-526493

(P2020-526493A)

(43) 公表日 令和2年8月31日 (2020.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 14/00 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/00 Z N A	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 47/65 (2017.01)</b>	A 6 1 K 47/65	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 38/16 (2006.01)</b>	A 6 1 K 38/16	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 3/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁)		

(21) 出願番号 特願2019-572023 (P2019-572023)  
 (86) (22) 出願日 平成30年7月9日 (2018.7.9)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年2月21日 (2020.2.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/041280  
 (87) 国際公開番号 W02019/010490  
 (87) 国際公開日 平成31年1月10日 (2019.1.10)  
 (31) 優先権主張番号 62/530,066  
 (32) 優先日 平成29年7月7日 (2017.7.7)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 517359152  
 サイミック アイビー, エルエルシー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946  
 08, エメリービル, ホートン スト  
 リート 5980, スイート 600  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 (74) 代理人 230113332  
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学的に修飾された主鎖を有するバイオコンジュゲート

## (57) 【要約】

本明細書では、化学的に修飾されたグリカン主鎖に共有結合により結合したコラーゲン結合ペプチドを含む合成バイオコンジュゲート、それを含有する組成物、およびその使用が提供される。本開示の組成物および方法は、これらの疾患、またはこれらの疾患と関連する症状もしくは特色のいずれかを防止および/または処置するのに適していることが企図される。線維症の発症は、コラーゲンおよびグリコサミノグリカンを含めた結合組織を敷く刺激細胞が関与する。

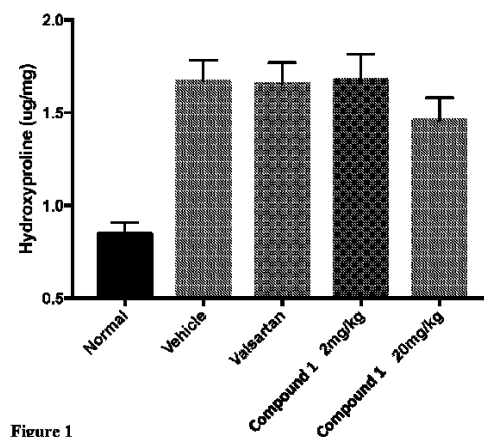


Figure 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

少なくとも 1 つのペプチド（複数可）を含むバイオコンジュゲートであって、前記ペプチド（複数可）が、化学的に硫酸化されたグリカンに共有結合により結合しているコラーゲン結合単位を含む、バイオコンジュゲート。

**【請求項 2】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 0.5 ～ 約 4 の硫酸化度に化学的に硫酸化されている、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

**【請求項 3】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、二糖 1 個当たり約 0.5 ～ 約 2.5 個のサルフェート部分を含む、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

10

**【請求項 4】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、二糖 1 個当たり約 2 ～ 約 3 個のサルフェート部分を含む、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

**【請求項 5】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、単糖 1 個当たり約 0.25 ～ 約 0.75 個のサルフェート部分を含む、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

**【請求項 6】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 5 ～ 約 1000 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

20

**【請求項 7】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 25 kDa を超える分子量を有する、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

**【請求項 8】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、150 kDa を超える分子量を有する、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

**【請求項 9】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 150 ～ 約 750 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

**【請求項 10】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 150 ～ 約 350 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

30

**【請求項 11】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 200 ～ 約 400 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

**【請求項 12】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、化学的に硫酸化されたアルギネート、化学的に硫酸化されたコンドロイチン、化学的に硫酸化されたコンドロイチン硫酸、化学的に硫酸化されたデルマトン、化学的に硫酸化されたヘパラン、化学的に硫酸化されたヘパロサン、化学的に硫酸化されたヘパラン硫酸、化学的に硫酸化されたヘパリン、化学的に硫酸化されたデキストラン、化学的に硫酸化されたデキストラン硫酸、化学的に硫酸化されたヒアルロン酸、またはその誘導体である、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

40

**【請求項 13】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、カルボキシメチル誘導体である、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

**【請求項 14】**

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルアルギネート、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルコンドロイチン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルコンドロイチン硫酸、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルデルマトン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパラン、化学的に硫酸化されたカルボキシ

50

メチルヘパロサン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパラン硫酸、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパリン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルデキストラン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルデキストラン硫酸、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヒアルロン酸、またはその誘導体である、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 1 5】

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、化学的に硫酸化されたヘパロサン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパロサン、化学的に硫酸化されたデキストラン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルデキストラン、化学的に硫酸化されたヒアルロン酸、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヒアルロン酸、またはその誘導体である、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

10

【請求項 1 6】

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 1 ~ 約 75 パーセント (%) のペプチドによる機能化を含み、ペプチドによる前記機能化パーセント (%) が、ペプチドで機能化されている前記化学的に硫酸化されたグリカン上の二糖単位のパーセントによって決定される、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 1 7】

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 5 ~ 約 30 パーセント (%) のペプチドによる機能化、または約 10 ~ 約 40 パーセント (%) のペプチドによる機能化を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

20

【請求項 1 8】

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、約 15 パーセント (%) のペプチドによる機能化、または約 20 パーセント (%) のペプチドによる機能化、または約 25 パーセント (%) のペプチドによる機能化、または約 30 パーセント (%) のペプチドによる機能化を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 1 9】

前記ペプチド (複数可) の前記コラーゲン結合単位が、約 1 mM 未満の解離定数 ( $K_d$ ) でコラーゲンに結合する、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 2 0】

前記ペプチド (複数可) が、最大約 120 個のアミノ酸、または最大約 100 個のアミノ酸、または最大約 50 個のアミノ酸、または最大約 40 個のアミノ酸を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

30

【請求項 2 1】

前記ペプチド (複数可) が、最大約 25 個のアミノ酸を含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 2 2】

1 ~ 約 25 個のペプチド (複数可)、または約 5 ~ 約 150 個のペプチド、または約 75 ~ 約 125 個のペプチド、または約 100 個のペプチドを含む、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 2 3】

前記化学的に硫酸化されたグリカンが、酸化的に切断されたサッカリド単位を含有していない、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

40

【請求項 2 4】

前記ヒドラジド基が、必要に応じてスペーサーを介して前記ペプチド (複数可) の C 末端に結合している、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 2 5】

前記ヒドラジド基が、必要に応じてスペーサーを介して前記ペプチド (複数可) の N 末端に結合している、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 2 6】

前記ヒドラジド基が、グリシン、アラニン、アルギニン、リシンおよびセリンからなる

50

群から選択される１つまたは複数のアミノ酸を含むスペーサーを介して前記Ｃ末端に結合している、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲート。

【請求項２７】

前記スペーサーが、配列グリシン - グリシン、セリン - グリシン、リシン - アルギニン、アルギニン - アルギニン、およびグリシン - セリン - グリシンを含む、請求項２５に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項２８】

グリカン１個当たりのペプチド（複数可）の平均数が、約５０を超える、先行する請求項のいずれかに記載のバイオコンジュゲートを含む組成物。

【請求項２９】

グリカン１個当たりのペプチド（複数可）の平均数が、約５０～約１５０である、請求項１～２７のいずれか一項に記載のバイオコンジュゲートを含む組成物。

【請求項３０】

グリカン１個当たりのペプチド（複数可）の平均数が、約１００である、請求項１～２７のいずれか一項に記載のバイオコンジュゲートを含む組成物。

【請求項３１】

請求項１～２７のいずれか一項に記載のバイオコンジュゲートまたは請求項２８～３０のいずれか一項に記載の組成物、およびコラーゲン結合単位を含む追加のペプチドを含む組成物であって、前記追加のペプチドが、前記バイオコンジュゲートに非共有結合により結合しており、さらに、前記組成物が、前記グリカンにおける二糖単位の数に基づく１％～約２００％のペプチドを含む、組成物。

【請求項３２】

前記追加のペプチドが、前記バイオコンジュゲートにイオン結合している、請求項３１に記載の組成物。

【請求項３３】

バイオコンジュゲートを作製するための方法であって、化学的に硫酸化されたグリカンを含む必要に応じて活性化剤の存在下、カップリング反応条件下で、コラーゲン結合単位を含む少なくとも１つのペプチド（複数可）と接触させて前記バイオコンジュゲートを提供することを含む方法。

【請求項３４】

最初にグリカンを含む、前記化学的に硫酸化されたグリカンを提供するのに十分な反応条件下で硫酸化剤と接触させることによって、前記化学的に硫酸化されたグリカンを提供することを含む、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記ペプチドが、ヒドラジド基を含む、請求項３３に記載の方法。

【請求項３６】

前記ペプチド（複数可）が、前記ペプチド上の末端ヒドラジド基と、前記化学的に硫酸化されたグリカン上のカルボニル基との間のヒドラジド - カルボニル連結を介して、前記化学的に硫酸化されたグリカンに結合している、請求項３３に記載の方法。

【請求項３７】

前記活性化剤が、カルボジイミド試薬である、請求項３３に記載の方法。

【請求項３８】

前記活性化剤が、 $N,N'$ -ジシクロヘキシルカルボジイミド、 $N,N'$ -ジイソプロピルカルボジイミド、１-エチル-３-(３-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよび $O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-$ テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレートからなる群から選択される、請求項３３に記載の方法。

【請求項３９】

前記カップリング反応条件が、有効量の反応性求核試薬、例えば $N$ -ヒドロキシスクシンイミド( $NHS$ )、ヒドロキシベンゾトリアゾール( $HOBt$ )、１-ヒドロキシ-１,２,３-ベンゾトリアゾール、 $HOBt/CuCl_2$ 、７-アザ-１-ヒドロキシ-１

10

20

30

40

50

、2、3 - ベンゾトリアゾール (H O A t)、3、4 - ジヒドロ - 3 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - 1、2、3 - ベンゾトリアゾール (H O O B t)、および / または 3 - スルホ - 1 - ヒドロキシルスクシンイミド (S - N H S)、またはその誘導体を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 40】

線維症を処置することを必要とする患者の線維症を処置するための方法であって、前記患者に、有効量の請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のバイオコンジュゲートまたは請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 41】

前記線維症が、線維性疾患の結果である、請求項 40 に記載の方法。

10

【請求項 42】

前記線維性疾患が、肺線維症、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、腎線維症、肝線維症、肝硬変、心臓線維症、心房線維症、心内膜心筋線維症、心筋梗塞、神経膠瘢痕、関節線維症、クローン病、デュピュイトラン拘縮、ケロイド、縦隔線維症、骨髄線維症、ペロニー病、腎性全身性線維症、進行性塊状線維症、後腹膜線維症、強皮症、全身性硬化症および癒着性関節包炎からなる群から選択される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記線維性疾患が、特発性肺線維症、腎線維症、または心臓線維症である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記線維性疾患が、肝線維症である、請求項 41 に記載の方法。

20

【請求項 45】

前記肝線維症が、慢性アルコール曝露、B 型肝炎ウイルス (H B V) 感染、非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D)、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H)、C 型肝炎ウイルス (H C V) 感染、ウィルソン病、アルファ - 1 - アンチトリプシン欠乏、ヘモクロマトーシス、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、または自己免疫性肝炎の結果である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記線維性疾患が、ファブリ病、ゴーシェ病、ニーマン - ピック病、またはハンター症候群 (ムコ多糖症) である、請求項 41 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、その開示全体が参照によって本明細書に組み込まれる、2017 年 7 月 7 日出願の米国仮特許出願第 62 / 530,066 号の利益を 35 U.S.C. § 119 (e) の下で主張する。

【0002】

本明細書では、化学的に修飾されたグリカン主鎖に共有結合により結合したコラーゲン結合ペプチドを含む合成バイオコンジュゲート、合成バイオコンジュゲートを含有する組成物、およびその使用が提供される。

40

【背景技術】

【0003】

組織内で、細胞は、バイオコンジュゲート、コラーゲン、ヒアルロン酸、ラミニン、フィブロネクチンなどのような様々な巨大分子を含有する細胞外マトリックス (ECM) によって取り囲まれている。哺乳動物では、バイオコンジュゲートは、細胞外マトリックスの主な構成成分であり、その場でバイオコンジュゲートは、他のバイオコンジュゲート、ヒアルロン酸、および線維マトリックスタンパク質 (例えばコラーゲン) と大きい複合体を形成する。哺乳動物が加齢し、創傷を負い、ある疾患状態にあると、身体のある特定のエリア (例えば、滑膜関節、硝子体液、脊椎円板、皮膚などにおける) において細胞外マ

50

トリックスが喪失または劣化して、望ましくない症状を引き起こすおそれがある。さらに、一部の組織傷害、例えば血管傷害、角膜傷害および創傷によって、細胞外マトリックスおよび/またはコラーゲンを含めたその構成成分が露出される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

驚くべきことに、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートは、G A G分解酵素の基質であることが見出されていないことから代謝されにくく、非硫酸化誘導体と比較した場合、低減された腎クリアランスを伴う延長された半減期を有しつつ、肝臓を標的とすることが見出された。本開示は、少なくとも1つのペプチドを含むバイオコンジュゲートを提

10

【0005】

また、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートを含む組成物、およびその使用方法が提供される。一態様では、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートを含む組成物であって、グリカンに結合したペプチドの数が変わる、組成物が提供される。例えば、組成物は、結合したペプチドの数が、グリカン1個当たり約50～約150個のペプチドなどの平均として算出されるバイオコンジュゲートを含むことができる。

【0006】

また、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートまたはバイオコンジュゲートを含有する組成物、または前記バイオコンジュゲートおよび1つまたは複数の賦形剤または担体（例えば、食塩水）を含む医薬組成物が提供される。

20

【0007】

本明細書に記載されるバイオコンジュゲートおよびバイオコンジュゲートを含む組成物は、それらに限定されるものではないが、肺線維症、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、腎線維症、肝線維症（例えば、慢性アルコール曝露、B型肝炎ウイルス（HBV）感染、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、C型肝炎ウイルス（HCV）感染、ウィルソン病、アルファ-1-アンチトリプシン欠乏、ヘモクロマトーシス、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、または自己免疫性肝炎の結果としての肝線維症）、肝硬変、心臓線維症、心房線維症、心内膜心筋線維症、心筋梗塞、神経膠癭痕、関節線維症、クローン病、デュピュイトラン拘縮、ケロイド、縦隔線維症、骨髄線維症、ペロニー病、腎性全身性線維症、進行性塊状線維症、後腹膜線維症、強皮症、全身性硬化症および癒着性関節包炎を含めた、線維症を処置することを必要とする患者の線維症を処置するために使用することができる。

30

【0008】

また本明細書では、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートを作製するための方法であって、化学的に硫酸化されたグリカンを、必要に応じて活性化剤の存在下、カップリング反応条件下で、コラーゲン結合単位を含む少なくとも1つのペプチドと接触させてバイオコンジュゲートを提供することを含む方法が提供される。ある特定の実施形態では、方法は、最初にグリカンを、化学的に硫酸化されたグリカンを提供するのに十分な反応条件下で硫酸化剤と接触させることによって、化学的に硫酸化されたグリカンを提供することを含む。

40

【0009】

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

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、2つの用量の化合物1についての肝臓におけるヒドロキシプロリン含量を示す。

【0011】

50

【図2】図2は、CC1<sub>4</sub>モデルにおける肝臓のシリウスレッド染色を示す。

【0012】

【図3】図3は、シリウスレッド染色によって組織学的に測定される、バルサルタンと比較した2つの用量の化合物1についての肝臓におけるコラーゲン含量を示す。

【0013】

【図4】図4は、シリウスレッドによって組織学的に測定される、テルミサルタンと比較した2つの用量の化合物1についての肝臓におけるコラーゲン含量を示す。

【0014】

【図5】図5は、9週齢のNASHモデルの動物における肝臓トリグリセリドレベルを示す。

10

【0015】

【図6】図6および7は、化合物1および2についての血小板阻害および肝星細胞阻害データを示す。

【図7】図6および7は、化合物1および2についての血小板阻害および肝星細胞阻害データを示す。

【0016】

【図8】図8は、腎臓、膀胱、または肝臓における蛍光標識分子（化合物1、化合物2および化合物3）の分布を示すIVIS画像化を示す。上の画像は、IV注射の5分後に撮影し、下の画像は、注射の1時間後に撮影した。左の画像は、マウスの腹側であり、右の画像は、背側である。

20

【0017】

【図9】図9は、VEGF189への非機能化HA、硫酸化HAおよび化合物1の結合を示す。

【0018】

【図10】図10は、PDGF-AAへの化合物1B、ペプチド単独、sHA-OPMおよびHAについての結合曲線を示す。破線は、高い分子濃度におけるコーティングなしのウェルへの結合（非特異的）を示す。

【0019】

【図11】図11は、PDGF-BBへの化合物1B、ペプチド単独、sHA-OPMおよびHAについての結合曲線を示す。破線は、高い分子濃度におけるコーティングなしのウェルへの結合（非特異的）を示す。

30

【0020】

【図12】図12は、PDGF-CCへの化合物1B、ペプチド単独、sHA-OPMおよびHAについての結合曲線を示す。破線は、高い分子濃度における非コーティングウェルへの結合（非特異的）を示す。

【0021】

【図13】図13は、PDGF-DDへの化合物1B、ペプチド単独、sHA-OPMおよびHAについての結合曲線を示す。破線は、高い分子濃度におけるコーティングなしのウェルへの結合（非特異的）を示す。

【0022】

【図14】図14は、量を増加させた化合物1、ペプチド単独、非機能化sHAまたは機能化sHA（OPM）の存在下、*in vitro*でのPDGF-BBのその受容体PDGF-Rへの結合を示す。

40

【0023】

【図15】図15は、量を増加させた、様々なペプチド負荷の化合物1の存在下、*in vitro*でのPDGF-BBのその受容体PDGF-Rへの結合を示す。

【0024】

【図16】図16は、ビヒクルで処置した動物と比較した、高スコアの線維症の発生の低下を示す。

【0025】

50

【図 17】図 17 は、試験物品を 2 週間投与した後、アルカリホスファターゼ (ALP) の血清レベルが、30 mg / kg の化合物 1 による処置で有意に低下したことを示す。

【0026】

【図 18】図 18 は、肝星細胞 (HSC) 増殖に対する、化合物 1 および様々な度合いの硫酸化およびペプチド負荷のバイオコンジュゲートの効果を実証する用量範囲研究を示す。

【0027】

【図 19】図 19 は、肝星細胞 (HSC) 増殖に対する、化合物 1、主鎖 (化学的誘導体化なし、すなわち硫酸化なし)、および主鎖 (0 のペプチド修飾、「sHA-OPM」) の効果を実証する用量範囲研究を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

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

1. 定義

【0029】

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

【0030】

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

【0031】

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

【0032】

本明細書で使用される場合、用語「バイオコンジュゲート」、「ペプチドグリカン」および「プロテオグリカン」および「合成バイオコンジュゲート」は、交換可能に使用され、それに共有結合により結合している 1 つまたは複数のペプチドを有する化学的に硫酸化されたグリカンを含む合成コンジュゲートを指す。

【0033】

本明細書で使用される場合、用語「化学的に硫酸化されたグリカン」は、サルフェート部分を含むように化学的に修飾されている、グリコシドにより連結した多数の単糖を有する化合物を指す。ある特定の実施形態では、グリカンは、ウロン酸と交互に連結した 2 - アミノ糖を含むグリコサミノグリカン (GAG) であり、それには、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、ケラチン、およびデルマタンなどのポリマーが含まれる。したがって、本明細書に記載される実施形態において使用され得るグリカンの非限定的な例として、アルギネート、アガロース、デキストラン、デキストラン硫酸、コンドロイチン、コ

10

20

30

40

50



ンドロイチン硫酸 (CS)、デルマタン、デルマタン硫酸 (DS)、ヘパラン硫酸、ヘパリン (Hep)、ケラチン、ケラタン硫酸、およびヒアルロン酸 (HA) (それらの誘導体を含む) が挙げられる。別の実施形態では、グリカンの分子量は、バイオコンジュゲートの効果を調整するために変えられる (例えば、Radek, K. A., et al., Wound Repair Regen., 2009, 17: 118-126 および Taylor, K. R., et al., J. Biol. Chem., 2005, 280:5300-5306 を参照されたい)。一実施形態では、グリカンは、酸化およびアルカリ脱離によって分解されて (例えば、Fransson, L. A., et al., Eur. J. Biochem., 1980, 106 :59-69 を参照されたい)、より低い分子量 (例えば、約 10 kDa ~ 約 50 kDa) を有する分解されたグリカンを生じる。別の実施形態では、グリカンは、酵素的に、熱によって、超音波によって、オゾン分解によって、せん断によって、またはグリカンを脱重合し、グリカンの分子量を低減することが公知の他の方法によって、分解される。ある特定の実施形態では、グリカンは、酸化的に切断されるサッカリド (saccharide) 環を含有しておらず、したがってアルデヒド官能基を含有しておらず、また含有してもしなかった。

10

#### 【0034】

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

#### 【0035】

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

20

30

#### 【0036】

本明細書で使用される場合、用語「細胞外マトリックス」は、周りを取り囲む細胞を構造的かつ生化学的に支持する、組織の細胞外部分を指す。

#### 【0037】

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

40

#### 【0038】

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

#### 【0039】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」は、ある器官もしくは身

50

体のある一部から、別の器官もしくは身体の別の一部に任意の補助成分もしくは組成物、もしくはその構成成分を運ぶもしくは輸送するのに関与するか、または静脈の内表面に薬剤を送達するための、薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクル、例えば液体または固体充填剤、賦形剤、添加剤、溶媒または被包材料を指す。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語「製剤化された」または「製剤」は、1つまたは複数の薬学的に活性な成分を含む様々な化学物質を組み合わせるプロセスを指す。ある特定の実施形態では、2つまたはそれよりも多い薬学的に活性な成分は、単一剤形もしくは組み合わせた投薬単位へと共製剤化する、または別個に製剤化し、その後、組み合わせる組み合わせた投薬単位とすることができる。持続放出製剤は、長期間にわたって体内に治療剤をゆっくり放出するように設計されている製剤であり、一方、即時放出製剤は、より短期間にわたって体内に治療剤を急速に放出するように設計されている製剤である。

10

【0041】

本明細書で使用される場合、用語「送達」は、医薬組成物の所望の治療効果を安全に達成するために、必要に応じて体内に医薬組成物を輸送するための経路、アプローチ、製剤、技術、および系を指す。送達経路は、それらに限定されるものではないが、血管内、静脈内、動脈内、筋肉内、皮膚、皮下、経皮、皮内、および表皮内経路を含めた任意の適切な経路であってよい。

20

【0042】

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

【0043】

本明細書で使用される場合、用語「処置すること」は、血管傷害または介入の前、間および/または後の、疾患または障害の1つまたは複数の臨床症状の防止、治療、逆転、減弱、軽減、最小化、阻害、抑制および/または停止することを指す。

30

2. バイオコンジュゲート

【0044】

本開示は、少なくとも1つのペプチドを含むバイオコンジュゲートであって、ペプチド（複数可）は、化学的に硫酸化されたグリカンに共有結合により結合しているコラーゲン結合単位を含む、バイオコンジュゲートを提供する。驚くべきことに、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートは、GAG分解酵素のための基質であることが見出されていないことから代謝されにくく、非硫酸化誘導体と比較した場合、低減された腎クリアランスを伴う延長された半減期を有しつつ、肝臓を標的とすることが見出された。

【0045】

本明細書に記載される実施形態において使用され得る化学的に硫酸化されたグリカンは、任意の化学的に硫酸化されたグリカン（例えば、グリコサミノグリカン（GAG））であってよい。非限定的な例として、化学的に硫酸化されたアルギネート、化学的に硫酸化されたコンドロイチン、化学的に硫酸化されたコンドロイチン硫酸、化学的に硫酸化されたデルマタン、化学的に硫酸化されたヘパラン、化学的に硫酸化されたヘパロサン、化学的に硫酸化されたヘパラン硫酸、化学的に硫酸化されたヘパリン、化学的に硫酸化されたデキストラン、化学的に硫酸化されたデキストラン硫酸、化学的に硫酸化されたヒアルロン酸、またはその誘導体が挙げられる。一実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、化学的に硫酸化されたヘパロサン、またはその誘導体である。一実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、化学的に硫酸化されたデキストラン、またはその誘導体である。一実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、化学的に硫酸化されたヒアルロン酸、またはその誘導体である。

40

50

## 【0046】

ある特定の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、さらに誘導体化されており、それは、硫酸化の前または後に行うことができる。ある特定の実施形態では、グリカンは、硫酸化ステップの前にカルボキシメチル置換基を含むように誘導体化されている。したがって、ある特定の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルアルギネート、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルコンドロイチン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルコンドロイチン硫酸、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルデルマタン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパラン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパロサン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパラン硫酸、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパリン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルデキストラン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルデキストラン硫酸、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヒアルロン酸、またはその誘導体である。

10

## 【0047】

ある特定の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、化学的に硫酸化されたヘパロサン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヘパロサン、化学的に硫酸化されたデキストラン、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルデキストラン、化学的に硫酸化されたヒアルロン酸、化学的に硫酸化されたカルボキシメチルヒアルロン酸 (hyaluronic acid)、またはその誘導体である。

20

## 【0048】

グリカン上の硫酸化度は、出発グリカンおよび最終的なバイオコンジュゲートの所望の特性に応じて変わり得る。ある特定の実施形態では、グリカンは、約0.5～約4、または約0.5～約3.9、または約0.5を超える、または約0.6、または約0.7、または約0.8、または約0.9、または約1.0、または約1.1、または約1.2、または約1.3、または約1.4、または約1.5、または約1.6、または約1.7、または約1.8、または約1.9、または約2.0、または約2.1、または約2.2、または約2.3、または約2.4、または約2.5、または約2.6、または約2.7、または約2.8、または約2.9、または約3.0、または約3.1、または約3.2、または約3.3、または約3.4、または約3.4、または約3.5、または約3.6、または約3.7、または約3.8、または約3.9、または約4の硫酸化度を有する。硫酸化度は、当技術分野で公知の方法によって算出することができる（例えば、実施例1およびBiomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297を参照されたい）。

30

## 【0049】

ある特定の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、二糖1個当たり約0.25～約4個、約0.5～約3個、約2～約3個、約0.5～約2.5個、もしくは約0.5～約2個のサルフェート部分、または二糖1個当たり約0.5個、もしくは約0.6個、もしくは約0.7個、もしくは約0.8個、もしくは約0.9個、もしくは約1.0個、もしくは約1.1個、もしくは約1.2個、もしくは約1.3個、もしくは約1.4個、もしくは約1.5個、もしくは約1.6個、もしくは約1.7個、もしくは約1.8個、もしくは約1.9個、もしくは約2.0個、もしくは約2.1個、もしくは約2.2個、もしくは約2.3個、もしくは約2.4個、もしくは約2.5個、もしくは約2.6個、もしくは約2.7個、もしくは約2.8個、もしくは約2.9個、もしくは約3.0個、もしくは約3.1個、もしくは約3.2個、もしくは約3.3個、もしくは約3.4個、もしくは約3.5個、もしくは約3.6個、もしくは約3.7個、もしくは約3.8個、もしくは約3.9個、もしくは約4個のサルフェート部分を含む。グリカンが従来の「二糖単位」を含有していない実施形態（例えば、アルギン酸）では、化学的に硫酸化されたグリカンは、典型的に、単糖1個当たり約0.25～約0.75個、または約0.3個、または約0.4個、または約0.5個、または約0.6個、または約0.7個、または約0.75個、または約0.8個、または約0.85個、または約0.9個、または約0.95個、または約1個、または約1.25個、または約1.5個、または約1.75個

40

50

、または約 2 個のサルフェート部分を含む。

【0050】

本明細書に記載されるバイオコンジュゲートでは、グリカンについて様々な分子量を使用することができるが、より高い分子量は、半減期増加などのある特定の利益をもたらすことができることが企図される。一部の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンの分子量は、約 5 ~ 約 1000 kDa である。一部の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、少なくとも約 20、または約 25、または約 30、または約 35、約 40、または約 45、または約 50、または約 100、または約 150、または約 200、または約 250、または約 300、または約 350、または約 400、または約 450、または約 500、または約 550、または約 600、または約 650、または約 700、または約 750、または約 800、または約 850、または約 900、または約 950、または約 1000 kDa である。一部の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、約 150 kDa を超える分子量を有する。一部の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、約 150 ~ 約 750 kDa の分子量を有する。一部の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、約 150 ~ 約 350 kDa の分子量を有する。一部の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカンは、約 200 ~ 約 400 kDa の分子量を有する。ある特定の実施形態では、グリカンは、酸化的に切断されたサッカリド環を含有しておらず、したがってアルデヒド官能基を含有しておらず、また含有してもいなかった。

10

【0051】

一実施形態では、バイオコンジュゲートは、コラーゲン I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、または XIV 型の 1 つまたは複数に結合するコラーゲン結合単位を有するペプチドを含む。一実施形態では、コラーゲン結合単位は、コラーゲンに結合すると、原線維形成を促進または阻害する。一実施形態では、コラーゲン結合単位は、コラーゲンに結合すると、原線維形成を促進も阻害もしない。一部の実施形態では、ペプチドは、I 型コラーゲンに結合する。他の実施形態では、ペプチドは、IV 型コラーゲンに結合する。ある特定の実施形態では、コラーゲンに対して特定の結合親和性を有する 1 つまたは複数のペプチドを、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートにおいて使用することができる。例えば、合成バイオコンジュゲートは、I 型コラーゲンに結合親和性を有する少なくとも 1 つのペプチド、および IV 型コラーゲンに結合親和性を有する少なくとも 1 つのペプチドを含むことができる。別の実施形態では、ペプチドは、I 型コラーゲンに結合親和性を有する。別の実施形態では、ペプチドは、IV 型コラーゲンに結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、ペプチドは、II 型コラーゲンに結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、ペプチドは、III 型コラーゲンに結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、ペプチドは、1 つよりも多い型のコラーゲンに結合し、各コラーゲン型への相対的親和性は、変わり得る。一実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 1 mM 未満、または約 900  $\mu$ M 未満、または約 800  $\mu$ M 未満、または約 700  $\mu$ M 未満、または約 600  $\mu$ M 未満、または約 500  $\mu$ M 未満、または約 400  $\mu$ M 未満、または約 300  $\mu$ M 未満、または約 200  $\mu$ M 未満、または約 100  $\mu$ M 未満の解離定数 ( $K_d$ ) でコラーゲンに結合する。

20

30

【0052】

さらに、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートは、1 つよりも多い結合単位を有するペプチドを含むことができ、結合単位は、同じでも異なってもよい。例えば、ある特定の実施形態では、ペプチドは、2 つまたはそれよりも多いコラーゲン結合単位を含み、コラーゲン結合単位は同じである。別の実施形態では、ペプチドは、2 つまたはそれよりも多いコラーゲン結合単位を含み、コラーゲン結合単位は異なる。

40

【0053】

グリカンに結合するペプチドの総数は、バイオコンジュゲートの所望の特性に応じて変わり得る。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートに存在するペプチドの総数は、グリカン 1 個当たりペプチド約 50 ~ 約 250 個、または約 50 ~ 約 150 個、または約 75 ~ 約 125 個、または約 50 個、または約 60 個、または約 70 個、または約 80

50

個、または約 90 個、または約 100 個、または約 110 個、または約 120 個、または約 130 個、または約 140 個、または約 150 個、または約 160 個、または約 170 個、または約 180 個、または約 190 個、または約 200 個、または約 210 個、または約 220 個、または約 230 個、または約 240 個、または約 250 個である。

#### 【0054】

ペプチドは、本明細書で使用される場合、直鎖であっても分岐であってもよく、典型的に 1 ~ 約 120 個のアミノ酸を含み、少なくとも 1 つのコラーゲン結合単位（または配列）を有する。一実施形態では、ペプチドは、約 3 ~ 約 120 個のアミノ酸、または約 3 ~ 約 110 個のアミノ酸、または約 3 ~ 約 100 個のアミノ酸、または約 3 ~ 約 90 個のアミノ酸、または約 3 ~ 約 80 個のアミノ酸、または約 3 ~ 約 70 個のアミノ酸、または約 3 ~ 約 60 個のアミノ酸、または約 3 ~ 約 50 個のアミノ酸、または約 3 ~ 約 40 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 120 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 100 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 90 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 80 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 70 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 60 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 50 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 40 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 30 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 20 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 10 個のアミノ酸を含む。これらのペプチドは、「コラーゲン結合ペプチド」と呼ぶこともできる。本明細書で使用される場合、用語「コラーゲン結合単位」は、コラーゲンに結合するペプチドの中のアミノ酸配列を指すことが意図される。「コラーゲン結合」は、化合物がコラーゲンと好都合に結合、または相互作用するように、疎水性、イオン性（荷電）、および/またはファンデルワールス相互作用を含み得る、コラーゲンとの相互作用を示す。この結合（または相互作用）は、共有結合性の結合および一般的官能基との非特異的相互作用とは区別されることが意図され、したがってペプチドは、コラーゲン上でペプチドが結合するその官能基を含有する任意の種と相互作用できる。ペプチドは、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、コラーゲンへの結合について試験、および評価することができる。例えば、Li, Y., et al., *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17: 968-975、Helmes, B.A., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 11683-11685、および Petsalaki, E., et al., *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(3): e1000335 を参照されたい。一実施形態では、ペプチド、またはペプチドのコラーゲン結合単位は、約 1 mM 未満、または約 900  $\mu$ M 未満、または約 800  $\mu$ M 未満、または約 700  $\mu$ M 未満、または約 600  $\mu$ M 未満、または約 500  $\mu$ M 未満、または約 400  $\mu$ M 未満、または約 300  $\mu$ M 未満、または約 200  $\mu$ M 未満、または約 100  $\mu$ M 未満の解離定数 ( $K_d$ ) でコラーゲンに結合する。

#### 【0055】

コラーゲン結合ペプチドは、コラーゲン I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、または XII 型の 1 つまたは複数に結合することができる。一部の実施形態では、コラーゲン結合ペプチドは、無傷であっても、切断されていても、分解されていてもよい IV 型コラーゲンに結合する。一部の実施形態では、コラーゲン結合ペプチドは、無傷であっても、切断されていても、分解されていてもよい I または III 型コラーゲンに結合する。

#### 【0056】

様々な実施形態では、I または III 型コラーゲンに結合するペプチドは、RRANAALKAGELYKSI LY（配列番号：）、GELYKSI LY（配列番号：）、RRANAALKAGELYKCI LY（配列番号：）、GELYKCI LY（配列番号：）、RLDGNEIKR（配列番号：）、AHEEISTTNEGVM（配列番号：）、NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPP LKRFPVQ（配列番号：）、CQDSETRTFY（配列番号：）、TKKTLRT（配列番号：）、GLRSKSKKFRRPDIQYPDATDEDITSHM（配列番号：）、SQNPVQP（配列番号：）、SYIRIADTNIT（配列番号：）、KELNLVYT（配列番号：）、GSIT（配列番号：）、GSITTI DV PWNV（配列番号：）、GQLYKSI LY（配列番号：）、GQLYKSI LYGS GSGSRR（配列番号：）、RRANAALKAGQL

Y K S I L Y (配列番号: )、または配列がコラーゲンに結合することができるという条件で、それらに対して少なくとも約 80 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 83 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 85 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 90 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 95 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 98 % 配列同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0057】

一実施形態では、I または I I I 型コラーゲンに結合するペプチドは、アミノ酸配列 R R A N A A L K A G E L Y K S I L Y (配列番号: )、または配列がコラーゲンに結合することができるという条件で、それに対して少なくとも約 80 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 83 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 85 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 90 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 95 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 98 % 配列同一性を有する配列を含む。

10

【0058】

一実施形態では、I または I I I 型コラーゲンに結合するペプチドは、アミノ酸配列 G E L Y K S I L Y (配列番号: )、または配列がコラーゲンに結合することができるという条件で、それに対して少なくとも約 80 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 83 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 85 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 90 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 95 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 98 % 配列同一性を有する配列を含む。

20

【0059】

一実施形態では、I または I I I 型コラーゲンに結合するペプチドは、アミノ酸配列 G Q L Y K S I L Y (配列番号: )、または配列がコラーゲンに結合することができるという条件で、それに対して少なくとも約 80 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 83 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 85 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 90 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 95 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 98 % 配列同一性を有する配列を含む。

30

【0060】

一実施形態では、I または I I I 型コラーゲンに結合するペプチドは、アミノ酸配列 G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R (配列番号: )、または配列がコラーゲンに結合することができるという条件で、それに対して少なくとも約 80 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 83 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 85 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 90 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 95 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 98 % 配列同一性を有する配列を含む。

40

【0061】

一実施形態では、I または I I I 型コラーゲンに結合するペプチドは、アミノ酸配列 R R A N A A L K A G Q L Y K S I L Y (配列番号: )、または配列がコラーゲンに結合することができるという条件で、それに対して少なくとも約 80 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 83 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 85 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 90 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 95 % 配列同一性、もしくは少なくとも約 98 % 配列同一性を有する配列を含む。

40

【0062】

I V 型コラーゲンに結合するコラーゲン結合単位の非限定的な例は、T L T Y T W S (配列番号: ) であり、これは MMP 2 および 9 - 分解基底膜 I V 型コラーゲンに特異的に結合する。同様に、G S G リンカーをさらに含む T L T Y T W S G S G (配列番号: ) も、切断または分解された I V 型コラーゲンに特異的に結合することができる。別の例は、K L W V L P K (配列番号: ) であり、これは無傷 I V 型コラーゲンに選択的に結合する。

【0063】

ある特定の実施形態では、ペプチドは、それぞれ参照によって本明細書に組み込まれる Chiang, T.M., et al. J. Biol. Chem., 2002, 277: 34896-34901、Huizinga

50

, E.G. et al., Structure, 1997, 5: 1147-1156、Romijn, R.A., et al., J. Biol. Chem., 2003, 278: 15035-15039、およびChiang, et al., Cardio. & Haemato. Disorders-Drug Targets, 2007, 7: 71-75に記載されている通り、フォンビルブランド因子 (vWF) または血小板コラーゲン受容体のコラーゲン結合ドメイン (複数可) と、少なくとも約 80%、または少なくとも約 83%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 100% 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。非限定的な例は、vWF から得られた W R E P S F C A L S (配列番号: ) である。

#### 【0064】

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

#### 【0065】

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

#### 【0066】

10

20

30

40

50

本明細書に開示されるバイオコンジュゲートおよび方法において使用され得る、コラーゲン結合親和性（またはコラーゲン結合単位）を有することが示されているさらなるペプチド配列には、それらに限定されるものではないが、RRANAALKAGELYKSI  
LYGC（配列番号：）、MIVIELGTNPLKSSGIENGAFQGMKK（配  
列番号：）、KELNLVY（配列番号：）、DARKSEVQK（配列番号：）、H  
WMQAP（配列番号：）、HWGSLRA（配列番号：）（Hendra Wahyudi et al.,  
J Control Release. 2016, 240, 323-331を参照されたい）、およびGKWH[  
CTTKFPHHYC]LYBip-CONH2（式中、Bipはビフェニルアラニンで  
ある）（Wei Chen et al., JACC Cardiovasc Imaging. 2013, 6(3): 373-384を  
参照されたい）が含まれる。

10

#### 【0067】

ある特定の実施形態では、ペプチドは、RVMHGLHLGDDE（配列番号：）、D  
- アミノ酸EDDGLHLGHMVR（配列番号：）、RVMHGLHLGNNQ（配列  
番号：）、D-アミノ酸QNNGLHLGHMVR（配列番号：）、RVMHGLHLG  
NNQ（配列番号：）、（GQLYKSI LYGS G）<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K（配列番号：）（4分岐  
ペプチド）、GSGQLYKSI LY（配列番号：）、GSGGQLYKSI LY（配列  
番号：）、KQLNLVYT（配列番号：）、CVWLWQQC（配列番号：）、WRE  
PSFSA LS（配列番号：）、GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGG  
GYR（配列番号：）、およびGHRPLNKKRQQAPSLRPAPPPISGG  
GYR（配列番号：）からなる群から選択される1つまたは複数の配列を含む。

20

#### 【0068】

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

#### 【0069】

一実施形態では、ペプチドは、コラーゲンI、IIIまたはIV型のいずれか1つまた  
は複数の結合する1つまたは複数のコラーゲン結合単位を含む。一実施形態では、ペプチ  
ドは、約1 mM未満、または約900 μM未満、または約800 μM未満、または約70  
0 μM未満、または約600 μM未満、または約500 μM未満、または約400 μM未  
満、または約300 μM未満、または約200 μM未満、または約100 μM未満の解離  
定数（K<sub>d</sub>）でI型コラーゲンに結合する。一実施形態では、ペプチドは、約1 mM未  
満、または約900 μM未満、または約800 μM未満、または約700 μM未満、または  
約600 μM未満、または約500 μM未満、または約400 μM未満、または約300  
μM未満、または約200 μM未満、または約100 μM未満の解離定数（K<sub>d</sub>）で、I  
III型コラーゲンに結合する。一実施形態では、ペプチドは、約1 mM未満、または約9  
00 μM未満、または約800 μM未満、または約700 μM未満、または約600 μM  
未満、または約500 μM未満、または約400 μM未満、または約300 μM未  
満、または約200 μM未満、または約100 μM未満の解離定数（K<sub>d</sub>）でIV型コラーゲン  
に結合する。一実施形態では、ペプチドは、約1 mM未満、または約900 μM未  
満、または約800 μM未満、または約700 μM未満、または約600 μM未  
満、または約500 μM未満、または約400 μM未満、または約300 μM未  
満、または約200 μM未

30

40

#### 【0070】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、ペプチドコラーゲン結合単位は、先行  
する段落に記載される任意のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列のいずれかに対

50



して少なくとも約 80 %、もしくは少なくとも約 83 %、もしくは少なくとも約 85 %、もしくは少なくとも約 90 %、もしくは少なくとも約 95 %、もしくは少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 100 % 相同性を有するアミノ酸配列を含む。様々な実施形態では、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートのペプチド構成成分は、1 つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含めることによって修飾され得る。当業者に周知の通り、ペプチドの重要ではない任意のアミノ酸を保存的置換によって変えても、置き換えるアミノ酸の側鎖が、置き換えられたアミノ酸の側鎖と類似の結合および接触を形成することができるはずであるので、そのペプチドの活性は有意には変わらないはずである。

#### 【0071】

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

#### 【0072】

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

【表 1】

表 1

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

10

20

30

## 【 0 0 7 3 】

ペプチド（複数可）は、グリカンに直接的にまたはリンカーを介して結合することができる。一部の実施形態では、リンカーは、任意の適切な二官能性リンカー、例えば、N-[ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPH）、3-（2-ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（PDPH）などであってよい。本明細書に記載される様々な実施形態のいずれかでは、ペプチドの配列は、グリカンまたはグリカン-リンカーコンジュゲートのための結合点を提供するために、ペプチドのC末端に結合したグリシン-システイン（GC）および/またはN末端に結合したグリシン-システイン-グリシン（GCG）を含むように修飾され得る。ある特定の実施形態では、リンカーは、N-[ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPH）である。ある特定の実施形態では、リンカーは、3-（2-ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（PDPH）である。

40

## 【 0 0 7 4 】

グリカンに結合するペプチドの総数は、バイオコンジュゲートの所望の特性に応じて変わり得る。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートに存在するペプチドの総数は、約50～約200個、または約50～約160個、または約50～約160個、または約50～約160個、または約50～約160個、または約50～約150個、または約50～約140個、または約60～約120個、または約70～約110個、または約80～約110個、または約90～約110個、または約50個、または約60個、または

50

約 70 個、または約 80 個、または約 90 個、または約 100 個、または約 110 個、または約 120 個、または約 130 個、または約 140 個、または約 150 個、または約 160 個、または約 170 個、または約 180 個、または約 190 個、または約 200 個である。他の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 5 ~ 約 200 個のペプチドを含む。様々な実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 4 ~ 約 180 個のペプチドを含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 200 個未満のペプチドを含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 180 個未満のペプチドを含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 150 個未満のペプチドを含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、約 100 個未満のペプチドを含む。

【0075】

10

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、グリカン 1 個当たりのペプチドの数は平均であり、組成物におけるある特定のバイオコンジュゲートは、グリカン 1 個当たりより多くのペプチドを有することができ、ある特定のバイオコンジュゲートは、グリカン 1 個当たりより少ないペプチドを有する。したがって、ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるペプチドの数は、バイオコンジュゲートの組成物における平均である。例えば、ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、グリカン 1 個当たりのペプチドの平均数が、約 50 または約 50 を超える組成物である。他の実施形態では、グリカン 1 個当たりのペプチドの平均数は、約 60、または約 70、または約 80、または約 90、または約 100、または約 110、または約 120、または約 130、または約 140、または約 150、または約 160、または約 170、または約 180、または約 190、または約 200、または約 250、または約 300 である。

20

【0076】

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

30

【0077】

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

40

【0078】

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

50

ト凝集体におけるペプチドの機能化パーセント(%)は、約1%~約50%、または約3%~約40%、または約5%~約30%、または約10%~約20%、または約1%、または約2%、または約5%、または約10%、または約15%、または約20%、または約25%、または約30%、または約35%、または約40%、または約45%、または約50%、または約55%、または約60%、または約65%、または約70%、または約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%、または約100%である。

#### 【0079】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、ヘパリンおよび約50~約150個、または約100個のペプチドを含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSILY(配列番号: )、RRANAALKAGELYKSILYGS(配列番号: )、GQLYKSILY(配列番号: )、またはGQLYKSILYGS(配列番号: )の少なくとも1つの配列を含み、ヒドラジド-カルボニル連結を介してヘパリンに結合している。ある特定の実施形態では、ヘパリンは、未分画ヘパリン(UFH)または低分子量ヘパリン(LMWH)である。

#### 【0080】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、ヘパリンおよび約15~約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSILY(配列番号: )RRANAALKAGELYKSILYGS(配列番号: )、GQLYKSILY(配列番号: )、またはGQLYKSILYGS(配列番号: )の少なくとも1つの配列を含み、ヒドラジド-カルボニル連結を介してヘパリンに結合している。

#### 【0081】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、ヘパリンおよび約15~約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、GQLYKSILY(配列番号: )、GQLYKSILYGS(配列番号: )、CPGRVMHGLHLGDDEGPC(配列番号: )、CVWLWEQC(配列番号: )もしくはWRPSPFCALS(配列番号: )の少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および/もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、バイオコンジュゲートは、少なくとも2つの異なるコラーゲン結合単位を含む。

#### 【0082】

ペプチドは、コラーゲンへの結合についてSPR、ELISA、ITC、アフィニティークロマトグラフィー、または当技術分野で公知の他の技術などの技術のいずれかによって合成、および評価することができる。一例は、固定化コラーゲンを含有するマイクロプレートでインキュベートされるビオチン修飾ペプチド配列(例えば、SILYbiotin)であり得る。コラーゲンに結合するペプチドの能力を決定するために、ストレプトアビジン発色団を使用して、用量応答結合曲線を生成することができる。本明細書に記載される様々な実施形態では、本明細書に記載されるペプチドは、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含ませることによって修飾され得る。当業者に周知の通り、ペプチドの重要な任意のアミノ酸を保存的置換によって変えても、置き換えるアミノ酸の側鎖が、置き換えられたアミノ酸の側鎖と類似の結合および接触を形成することができるはずであるので、そのペプチドの活性は有意には変わらないはずである。非保存的置換も、ペプチドの結合活性(すなわち、コラーゲン結合親和性)に実質的に影響を及ぼさないという条件で可能であり得る。

#### 【0083】

したがって、一部の実施形態では、グリカン上にアルデヒド結合部位を提供するために、酸化化学反応を利用してグリカン主鎖内のサッカリド環の1つまたは複数を選択的に切断することによって、ペプチドをデルマタン硫酸などのグリカンに結合させる。次にアルデヒド結合部位を使用して、ペプチドをコンジュゲートする(例えば、-C(O)-NH-N=C

10

20

30

40

50

結合を介して)。

【0084】

一部の実施形態では、ペプチドは、 $-C(O)-NH-NH-C(O)-$  (すなわちヒドラジド-カルボニル) 連結を介してグリカンに共有結合により結合することができる。ここでペプチドは、ヒドラジド-カルボニル連結を介してグリカンに結合され、ヒドラジド-カルボニルのカルボニル基は、グリカン上に存在する環外カルボニル基である。環外カルボニル基は、ネイティブなグリカン上に存在することができ、または、あるいはグリカンは、このような官能基を含むように修飾され得る。このような方法は、以下にさらに詳説される。本明細書に開示される通りバイオコンジュゲートによって示された有益な効果 (例えば、結合親和性の増加) は、酸化的に切断されたサッカリド環を含有していないグリカンに、少なくとも部分的に起因することが企図される。

10

【0085】

したがって、ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるペプチドは、ペプチドへのコンジュゲーションのためのヒドラジド部分をさらに含む。ヒドラジド基は、例えばC末端、N末端などの任意の適切な結合点において、またはアミノ酸上の側鎖を介してペプチド (複数可) に結合することができる。例えば、ペプチドが、ペプチドのアミノ酸の側鎖を介してグリカンに結合する場合、側鎖は、グルタミン酸またはアスパラギン酸である。ヒドラジドは、ペプチド配列のアミノ酸上に存在するカルボニル基 (例えば、C末端カルボニル基) または存在する場合にはスパーサーに結合したヒドラジン ( $-NHNH_2$ ) との間で形成され得る。

20

【0086】

ある特定の実施形態では、ペプチド (複数可) は、スパーサーを介してグリカン (またはリンカー、存在する場合) に結合している。本明細書で使用される場合、用語「スパーサー」は、ペプチド (または結合単位) を、存在する場合にはリンカーまたはグリカン (直接的に結合することができる) のいずれかに連結する、バイオコンジュゲートの必要に応じた部分を指すことが意図される。本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、ペプチドの任意の1つまたは複数は、1~約15個のアミノ酸を含む直鎖または分岐のスパーサー配列を有することができる。一実施形態では、スパーサーは、1つまたは複数の、または1~20個、または10~20個、または5~15個、または5~10個、または1~10個、または1~5個、または1~3個のアミノ酸を含む。天然または非天然の任意のアミノ酸は、スパーサー配列がペプチドの所期の結合を有意に妨害しないという条件で、スパーサー配列において使用することができることが企図される。アミノ酸は、一部の例では、非極性アミノ酸、例えばアラニン、システイン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシンおよびバリンである。ある特定の実施形態では、アミノ酸は、グリシン、アラニン、アルギニンおよびセリンからなる群から選択される。

30

【0087】

例示的なスパーサーとして、それらに限定されるものではないが、1~5個のグリシン単位 (例えば、G、GG、GGG、GGGG (配列番号: ))、またはGGGGG (配列番号: )) を含み、必要に応じてシステイン (例えば、GC、GCG、GSGC (配列番号: ))、またはGCC) および/またはセリン (例えば、GSG、SGG、またはGSSG (配列番号: )) またはGSSGS (配列番号: ))、1~5個のアルギニン単位 (例えば、R、RR、RRRなど)、またはそれらの組合せ (GSGRR (配列番号: ))、GSSGSR (配列番号: ))、GSSGSR (配列番号: )) またはGSSGSR (配列番号: )) を含む短い配列が挙げられる。スパーサーは、追加のアミノ酸スパーサーを伴うまたは伴わない、非アミノ酸部分、例えばポリエチレングリコール (PEG)、6-アミノヘキサン酸、コハク酸、またはそれらの組合せを含むこともできる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるペプチド配列は、GSG-NHNH<sub>2</sub> 部分をさらに含む。典型的に、GSG-NHNH<sub>2</sub> 部分は、CまたはN末端のいずれかに結合している。

40

【0088】

50

ある特定の実施形態では、スペーサーは、1つよりも多い結合部位（スペーサーは、直鎖であっても分岐であってもよい）を含み、したがって1つよりも多いペプチド配列がそれに結合し、したがって分岐構築物を作り出すことができる。さらに、ペプチドは、末端または非末端アミノ酸部分を介してグリカンに結合することができるので、非末端アミノ酸部分を介してグリカンに結合した場合には分岐となる。スペーサー上の結合部位は、同じでも異なってもよく、アミンまたはカルボン酸部分などの任意の適切な結合部位であってよく、したがって、所望のペプチド配列がそれに結合することができる（例えばアミド結合を介して）。したがって、ある特定の実施形態では、スペーサーは、1つまたは複数のリシン、グルタミン酸またはアスパラギン酸残基を含有する。ある特定の実施形態では、スペーサーは、2～6個のアミノ酸、または3個もしくは4個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、スペーサーは、式  $KXX$ （式中、各  $X$  は、独立に、天然または非天然アミノ酸である）の1つまたは複数のアミノ酸配列を含む。分岐構築物を作製するために単独でまたは組合せで使用され得るスペーサーの具体例として、それらに限定されるものではないが、 $KRR$ 、 $KKK$ 、 $(K)_n GSG$ 、および  $(KRR)_n - K GSG$ （式中、 $n$  は、0～5、または1、2、3、4もしくは5である）が挙げられる。一実施形態では、スペーサーは、 $GSGKRRGSG$ （配列番号：）である。

10

#### 【0089】

このような構築物は、式  $P_n L$ （式中、少なくとも1つの  $P$  は、コラーゲン結合単位であり、 $L$  は、スペーサーであり、 $n$  は、2～約10、または2～8、または2～6、または2～5、または2～4、または2、または3、または4、または5、または6、または7、または8、または9、または10の整数である）の1つよりも多い単位を有するペプチドを提供することができる。例えば、スペーサー  $L$  は、 $K GSG$ （配列番号：）、 $KK GSG$ （配列番号：）、 $K_2 K GSG$ （配列番号：）、または  $KKK GSG$ （配列番号：）などのアミノ酸配列であってよく、ペプチドは、N末端および側鎖窒素に結合して、それぞれ2つ、3つおよび4つの結合部位を提供することができる。ペプチドに結合したこれらのスペーサーの模式図を、以下の表に示す。

20

【表 7】

スペーサー	ペプチド(すなわち、結合部位)の数	スペーサーの構造
KGSG	2	
KKGSG	3	
KKKGSG	4	
K <sub>2</sub> KGSG	4	

【0090】

一部の実施形態では、ペプチド配列を修飾して、1つもしくは複数のグルタミン酸残基をグルタミンで、かつ/または1つもしくは複数のアスパラギン酸残基をアスパラギンで置き換える。

【0091】

10

20

30

40

50

例示的な分岐コラーゲン結合構築物として、それらに限定されるものではないが、(G E L Y K S I L Y G S G)<sub>2</sub> K (配列番号: )、(G E L Y K S I L Y G S G)<sub>2</sub> K G S G (配列番号: )、(G E L Y K S I L Y G S G)<sub>3</sub> K K (配列番号: )、(G E L Y K S I L Y G S G)<sub>3</sub> K K G S G (配列番号: )、(G E L Y K S I L Y G S G)<sub>4</sub> K K K (配列番号: )、(G E L Y K S I L Y G S G)<sub>4</sub> K K K G S G (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>2</sub> K (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>2</sub> K G S G (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>3</sub> K K (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>3</sub> K K G S G (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K G S G (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>4</sub> K K K (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>4</sub> K K K G S G (配列番号: )、(G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>4</sub> - (K R R)<sub>2</sub> - K (配列番号: )、および (G Q L Y K S I L Y G S G)<sub>4</sub> - (K R R)<sub>2</sub> - K G S G (配列番号: ) が挙げられる。

#### 【0092】

一実施形態では、ヒドラジド基は、グリシン、アラニン、アルギニンおよびセリンからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸を含むスペーサーを介してC末端に結合している。一実施形態では、スペーサーは、グリシン、グリシン-グリシン、およびグリシン-セリン-グリシンからなる群から選択される。様々な実施形態では、ペプチドは、グリシン-セリン-グリシン(G S G)、G S G S G S R R (配列番号: )、K R R G S G (配列番号: )、またはG S G K R R G S G (配列番号: )などのアミノ酸スペーサーを含む。

#### 3. バイオコンジュゲートの合成

#### 【0093】

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

#### 【0094】

以下のスキーム1に示される通り、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートは、化学的に硫酸化されたグリカン誘導体(例えば、硫酸化ヒアルロン酸)から合成される。本明細書に記載されるバイオコンジュゲートでの使用に適した様々なグリカン誘導体は、グリカン主鎖に沿ったヒドロキシルの求核置換を介するものなどの当技術分野で公知の方法を使用して、調製することができる(例えば、Biomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297を参照されたい)。スキーム1に示される通り、グリカン(例えば、ヒアルロン酸)1 Aを、S O<sub>3</sub> / D M F複合体などの適切な硫酸化剤と反応させて、1つまたは複数の化学的に硫酸化されたグリカン誘導体1 Bを提供することができる。当業者に明らかである通り、化学的に硫酸化されたグリカン誘導体1 Bは、部分的な、完全なまたは混合物の硫酸化グリカン誘導体(複数可)1 Bを得ることができるように、用いる試薬および反応条件に応じて調整され得る。次に、化学的に硫酸化されたグリカン誘導体1 Bを、必要に



じてカップリング剤の存在下で、典型的なペプチドカップリング反応条件下でペプチドと反応させて、バイオコンジュゲート 1 C を提供することができる。

【0095】

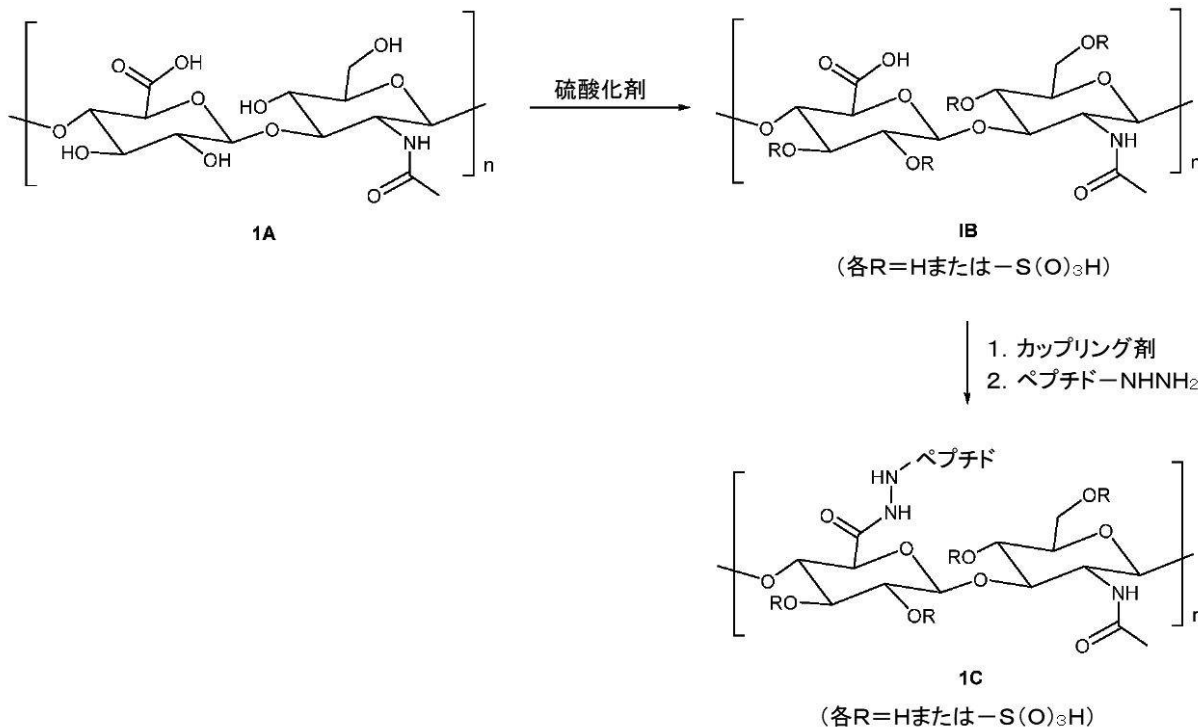
ペプチドカップリング反応において典型的である通り、活性化剤を使用して、反応を容易にすることができる。適切なカップリング剤（または活性化剤）は当技術分野で公知であり、それには、例えば、カルボジイミド（例えば、N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、N, N' - ジシクロペンチルカルボジイミド、N, N' - ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）、1 - エチル - 3 - （3 - ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）、N - t - ブチル - N - メチルカルボジイミド（BMC）、N - t - ブチル - N - エチルカルボジイミド（BEC）、1, 3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

【0096】

一実施形態では、ペプチドカップリング反応は、活性化グリカン中間体を介して、グリカンのカルボン酸部分をカップリング剤（例えば、カルボジイミド試薬、例えばそれらに限定されるものではないが、N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、N, N' - ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）、1 - エチル - 3 - （3 - ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）など）と反応させて、O - アシルイソ尿素中間体を形成することによって進行する。このようなカルボジイミド化学反応は、当技術分野で周知であり、適切なカップリング剤は、商業的供給源から購入することができる。O - アシルイソ尿素中間体を、所望のペプチドと接触させると、バイオコンジュゲートが得られる。グリカンは、ペプチドが存在する前にまたはペプチドの存在下で活性化剤と接触させることができる。

## 【化 1】

## スキーム1. バイオコンジュゲートの合成



10

20

## 【0097】

ある特定の実施形態では、ペプチド配列は、グリカン、またはそのO-アシル尿素中間体とのカップリング反応を助けるために、反応性部分（例えば、ヒドラジド官能基）を含むことができる。一部の実施形態では、ペプチド配列は、結合単位と、末端アミノ酸（例えば、終端グリシン）または反応性部分（すなわち、ヒドラジド官能基）との間のスペーサーとして作用する1つまたは複数のアミノ酸残基を含む。さらに、ペプチドの1つまたは複数のアミノ酸が反応性官能基（例えば、カルボン酸側鎖）を含有する、ある特定の場合には、1つまたは複数の側鎖を保護してカップリング反応を容易にするために、標準保護基化学を使用することができる。さらに、非アミノ酸スペーサーを、単独で、またはアミノ酸スペーサー（例えば、アミノヘキサン酸）と組み合わせて用いることもできる。ある特定の実施形態では、化学的に硫酸化されたグリカン誘導体1Bを、O-カルボキシメチル化グリカン誘導体（複数可）（すなわち、少なくとも1つのRは、 $-CH_2C(O)OH$ である）から調製し、次に必要に応じてカップリング剤の存在下でペプチドとさらに反応させて、代替バイオコンジュゲートを提供することができる。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの遊離のヒドロキシル基を有する化学的に硫酸化されたグリカン誘導体1B誘導体を、O-カルボキシメチル化グリカン誘導体（複数可）に転換し、次に必要に応じてカップリング剤の存在下でペプチドとさらに反応させて、代替バイオコンジュゲートを提供することができる。

30

40

## 【0098】

一部の実施形態では、反応は、反応性求核試薬、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、および/またはヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）、1-ヒドロキシ-1,2,3-ベンゾトリアゾール、HOBt/CuCl<sub>2</sub>、7-アザ-1-ヒドロキシ-1,2,3-ベンゾトリアゾール（HOAt）、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアゾール（HOObt）、および/または3-スルホ-1-ヒドロキシスクシンイミド（S-NHS）、またはそれらの誘導体の存在下で行われる。

50

#### 4. 使用方法

##### a. 線維症の処置

###### 【0099】

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

###### 【0100】

一実施形態では、本明細書で提供されるバイオコンジュゲートおよび方法は、肺線維症を防止および／または処置するために使用することができる。肺の線維症の種類には、嚢胞性線維症および特発性肺線維症などの肺線維症が含まれる。肺線維症は、肺組織内に瘢痕が形成されて重篤な呼吸問題が生じる呼吸器疾患である。瘢痕の形成により、壁が肥厚し、血中への酸素供給が減少する。結果として、患者は永続的息切れに苦しむ。

###### 【0101】

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

###### 【0102】

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

###### 【0103】

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

###### 【0104】

クモ状血管腫またはクモ状母斑は、多くのより小さい血管によって取り囲まれた中心細胞動脈からなる血管病変であり、エストラジオールの増加に起因して生じる。手掌紅斑は、やはりエストロゲンの増加の結果として生じる、手掌の母指球および小指球の発赤である

10

20

30

40

50

。男性の癌性ではない女性化乳房症または乳腺の大きさの増加は、エストラジオールの増加によって引き起こされ、最大患者の3分の2に生じ得る。性ホルモンの低下である性腺機能低下症は、性交不能症、不妊、性衝動の喪失、および精巣萎縮として現れ、原発性性腺傷害または視床下部/下垂体機能の抑制から生じ得る。性腺機能低下症は、アルコール依存症およびヘモクロマトーシスに起因する肝硬変と関連する。肝臓の大きさは、肝硬変を有するヒトでは肥大している、正常、または縮小している場合がある。

#### 【0105】

一実施形態では、本明細書で提供されるバイオコンジュゲートおよび方法は、腎線維症を防止および/または処置するために使用することができる。腎線維症は、腎臓への急性または持続性傷害から生じ得る。傷害は、細胞外マトリックスの過度の沈着をもたらすお

10

#### 【0106】

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

#### 【0107】

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

20

#### 【0108】

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

30

#### 【0109】

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

40

#### 【0110】

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

50

## 【0111】

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

## 【0112】

本明細書の一実施形態では、線維症の防止または処置のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。本明細書の一実施形態では、線維症の防止または処置のための医薬の調製のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。本明細書の一実施形態では、肝線維症の防止または処置のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。本明細書の一実施形態では、肺線維症の防止または処置のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。実施形態では、バイオコンジュゲートは、硫酸化ヒアルロン酸および約50～約150個、または約100個のペプチドを含み、ペプチドは、RRANAAL K A G E L Y K S I L Y（配列番号：）、RRANAAL K A G E L Y K S I L Y G S G（配列番号：）、G Q L Y K S I L Y（配列番号：）、またはG Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）、C P G R V M H G L H L G D D E G P C（配列番号：）、C V W L W E Q C（配列番号：）、もしくはW R E P S F C A L S（配列番号：）の少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および/もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、ペプチド（複数可）は、ヒドラジド - カルボニル連結を介してヘパリンまたは他のグリカンに結合している。一実施形態では、バイオコンジュゲートは、硫酸化ヒアルロン酸および約15～約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAAL K A G E L Y K S I L Y（配列番号：）、RRANAAL K A G E L Y K S I L Y G S G（配列番号：）、G Q L Y K S I L Y（配列番号：）、またはG Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）の少なくとも1つの配列を含む。一実施形態では、ペプチド（複数可）は、ヒドラジド - カルボニル連結を介してヘパリンに結合している。

## 【0113】

本明細書の一実施形態では、肝線維症または肺線維症を防止または処置することを必要とする患者の肝線維症または肺線維症を防止または処置するための方法であって、患者に、G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）またはG Q L Y K S I L Y（配列番号：）を含む約50～約150個、または約100個のペプチドに結合した硫酸化ヒアルロン酸を含む有効量のバイオコンジュゲートを投与することを含む、方法が提供される。本明細書の一実施形態では、肝線維症または肺線維症の防止または処置を必要とする患者の肝線維症または肺線維症の防止または処置のための本明細書に開示されるバイオコンジュゲート（複数可）の使用が提供される。一実施形態では、G Q L Y K S I L Y G S G S G S R R（配列番号：）を含む約50～約150個、または約100個のペプチドに結合した硫酸化ヒアルロン酸を含む有効量のバイオコンジュゲートが投与される。

## 【0114】

また本明細書では、血管炎を防止および/または処置するための方法が提供される。血管炎は、血管壁の炎症によって定義され、個々の疾患実体の多様な群の病理学的基礎を形成する。血管炎は、自己免疫疾患において一般に観測される難治性病態の1つであり、その多くの症例は、ステロイドおよび免疫抑制剤などの従来使用されている治療方法に対して難治性である。血管炎症候群では、炎症は、様々な大きさの動脈に生じ、発熱、筋肉および関節の疼痛、血管閉塞、皮膚潰瘍、ならびに多発性単神経炎が生じるおそれがある。方法は、大型血管の血管炎（L V V）、中型血管の血管炎（M V V）、小型血管の血管炎（S V V）、多様な（variable）血管の血管炎（V V V）、単一器官血管炎（S O V）、

全身性疾患と関連する血管炎、および／または可能性が高い病因と関連する血管炎を処置するために使用することができる。大型血管の血管炎（L V V）の非限定的な例として、高安動脈炎（T A K）および巨細胞動脈炎（G C A）が挙げられる。中型血管の血管炎（M V V）の非限定的な例として、結節性多発動脈炎（P A N）および川崎病（K D）が挙げられる。小型血管の血管炎（S V V）の非限定的な例として、抗好中球細胞質抗体（A N C A）関連血管炎（A A V）、顕微鏡的多発血管炎（M P A）、多発血管炎性肉芽腫症（ウェゲナー）（G P A）、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（チャージ - ストラウス）（E G P A）、免疫複合体 S V V、抗糸球体基底膜（抗 G B M）疾患、クリオグロブリン血症性（cryoglobulinemic）血管炎（C V）、I g A 血管炎（ヘノッホ - シェーンライン）（I g A V）、および低補体血症性蕁麻疹様血管炎（H U V）（抗 C 1 q 血管炎）が挙げられる。多様な血管の血管炎（V V V）の非限定的な例として、ベーチェット病（B D）およびコーガン症候群（C S）が挙げられる。単一器官血管炎（S O V）の非限定的な例として、皮膚白血球破砕性血管炎、皮膚動脈炎、原発性中枢神経系血管炎、および孤立性大動脈炎が挙げられる。全身性疾患と関連する血管炎の非限定的な例として、狼瘡血管炎、リウマチ性血管炎、およびサルコイド血管炎が挙げられる。可能性が高い病因と関連する血管炎の非限定的な例として、C 型肝炎ウイルス関連クリオグロブリン血症性血管炎、B 型肝炎ウイルス関連血管炎、梅毒関連大動脈炎、薬物関連免疫複合体血管炎、薬物関連 A N C A 関連血管炎、およびがん関連血管炎が挙げられる。血管炎の他の例として、抗リン脂質症候群、バージャー病（閉塞性血栓性血管炎）、クリオグロブリン血症、クリオピリン関連自己炎症性症候群（C A P S）（若年性）、グッドパスチャー、限局性強皮症（若年性）、リウマチ性多発筋痛、レイノー現象、強皮症、シェーグレン症候群、および全身性エリテマトーデスが挙げられる。本明細書に開示されるバイオコンジュゲートおよび方法は、血管炎を阻害および／または処置するために使用することができることが企図される。

10

20

30

40

50

#### 【0115】

本明細書の一実施形態では、血管炎を防止および／または処置するための方法が提供される。本明細書の一実施形態では、抗好中球細胞質抗体（A N C A）関連血管炎（A A V）、顕微鏡的多発血管炎（M P A）、多発血管炎性肉芽腫症（ウェゲナー）（G P A）、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（チャージ - ストラウス）（E G P A）、免疫複合体 S V V、抗糸球体基底膜（抗 G B M）疾患、クリオグロブリン血症性血管炎（C V）、I g A 血管炎（ヘノッホ - シェーンライン）（I g A V）、および／または低補体血症性蕁麻疹様血管炎（H U V）（抗 C 1 q 血管炎）を含めた、小型血管の血管炎を防止および／または処置するための方法が提供される。このような疾患は、小血管（例えば、非常に小さい動脈、細動脈、毛細血管、および小静脈）に影響を及ぼす。

#### 組合せ治療

#### 【0116】

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

#### 【0117】

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

#### 【0118】

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

#### 【0119】

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

b. 冠動脈疾患 (CAD) および末梢動脈疾患 (PAD)

#### 【0120】

本開示の一実施形態は、外科的バイパス術の成功率を改善し、かつ/またはその失敗を低減するための方法および関連組成物を提供する。バイパスグラフトは、冠動脈疾患 (CAD) および末梢動脈疾患 (PAD) の両方における動脈閉塞の処置の一形態として使用される。米国では、年間およそ500,000件の冠動脈バイパスグラフト (CABG) 術および70,000件を超える末梢バイパスグラフト術が実施されている。最も一般的には、伏在静脈から自家血管グラフトが採取されることが多い。

#### 【0121】

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

#### 【0122】

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

ことができる。

【0123】

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

【0124】

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

【0125】

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

【0126】

一部の実施形態では、方法は、血管の負の再構築を阻害するのに有効である。虚血または冠動脈性心疾患としても公知の冠動脈疾患は、冠動脈（心筋に血液を供給する動脈）の内側の平坦な弾性内膜の一部がアテローム性動脈硬化症を発症させ、心臓への血流を事実上制限する場合に生じる。アテローム性動脈硬化症または動脈硬化としても公知の末梢動脈疾患は、循環系の動脈内で生じる障害である。負の再構築には、血管径および内腔径の低減をもたらす刺激に対する、血管の生理的または病理学的応答が含まれる。このような刺激は、例えば、血流変化または血管形成術によってもたらされるおそれがある。一部の実施形態では、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートおよびバイオコンジュゲートを含む組成物の注射により、注射なしの血管径と比較して、約10%、20%、30%、40%、60%、70%、80%、95%のいずれか、またはそれを超えて血管径が増加する。負の再構築は、例えば、病変部位（または疾患部位）における狭窄径パーセントとして血管造影的に（angiographically）定量することができる。再構築の度合いを決定する別の方法には、血管内超音波（IVUS）を使用する病変内の外弾性板面積を測定することが含まれる。IVUSは、外弾性板ならびに血管内腔を画像化することができる技術である。一部の実施形態では、負の再構築は、血管介入術、例えば血管形成術、ステント留置、または粥腫切除術と関連する。したがって、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートおよびバイオコンジュゲートを含む組成物は、血管介入術の前、間および/または後に注射することができる。ある特定の実施形態では、大腿膝窩動脈内の狭窄または閉塞を処置することを必要とする患者の大腿膝窩動脈内の狭窄または閉塞を処置する方法であって、バルーン血管形成術の前、間および/または後に溶液を内腔の内壁に適用することを含み、溶液が、有効量の本明細書に記載されるバイオコンジュゲートまたはバイオコンジュゲートを含む組成物を含む、方法が提供される。

【0127】

したがって本開示は、血管（例えば、動脈）の負の再構築を阻害することを必要とする個体の血管（例えば、動脈）の負の再構築を阻害する方法であって、血管壁または血管壁を取り囲む組織に、有効量の本明細書に記載されるバイオコンジュゲートまたはバイオコンジュゲートを含む組成物を注射することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では



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

10

#### 【0128】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、硫酸化ヒアルロン酸および約15～約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSILY（配列番号：）、RRANAALKAGELYKSILYGS（配列番号：）、GQLYKSILY（配列番号：）、またはGQLYKSILYGS（配列番号：）、CPGRVMHGLHLGDDEGPC（配列番号：）、CVWLWEQC（配列番号：）、もしくはWREPSFCALS（配列番号：）の少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および/もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

20

#### c. 血管処置

#### 【0129】

本明細書に記載されるバイオコンジュゲートおよび組成物は、患者の血管を処置するために、血管傷害または介入の前、間および/または後に使用することができる。血管介入には、それらに限定されるものではないが、ステントを用いるおよび用いない血管形成術、グラフト血管、粥腫切除術、ならびに血管アクセス機能不全、または他の外科手技が含まれ得る。

30

#### 【0130】

本明細書に記載される様々な実施形態では、バイオコンジュゲートまたはその組成物は、血栓症、剥離内皮の露出したコラーゲンへの血小板結合、内皮剥離から生じる炎症、内膜過形成、または血管れん縮に関与するものなどの血小板活性化を阻害するために、処置を必要とする患者に投与することができる。

#### 【0131】

様々な実施形態では、バイオコンジュゲートは、例えば静脈内または筋肉内に投与することができる。非経口投与に適した他の経路には、血管内、静脈内、動脈内、筋肉内、皮膚、皮下、経皮、皮内、および表皮内送達が含まれる。非経口投与に適した手段には、針（マイクロニードルを含む）注射器、注入技術、およびカテーテルベースの送達が含まれる。カテーテルベースの送達は、バイオコンジュゲートを、バルーン上のコーティングとして、多孔質バルーンを介して、またはステント上のコーティングとして送達することを含み得る。別の実施形態では、バイオコンジュゲートは、全身的に送達され得る（すなわち、標的血管に直接的に送達されるのではなく、非経口投与によって送達される）。

40

#### 【0132】

これらのバイオコンジュゲートは、物理的ペプチド-コラーゲン相互作用を介して、露出したコラーゲンに局部的に結合する。バイオコンジュゲートは、コラーゲンに結合すると、1) 血小板付着/活性化に対するバリアとして作用すること、2) MMPアクセスを

50

阻害することによってコラーゲンを分解から保護すること、ならびに3)成長因子FGF-2、FGF-7、およびFGF-10を隔離し、したがって内皮細胞および上皮細胞の増殖および遊走を促進することを含めたいくつかの機能を有する。

【0133】

バイオコンジュゲートは、コラーゲン上の血小板結合部位を競合し、血小板の結合および活性化を防止することができる。バイオコンジュゲートのグリカン主鎖は、負電荷を帯び、水分子に結合して、コラーゲン表面上に、血小板およびタンパク質接着を防止する親水性バリアを作り出すことができる。バイオコンジュゲートは、正常な血小板機能を阻害するのではなく、露出したコラーゲンをマスキングすることによって、炎症および内膜過形成に至るカスケードの初期ステップに対処する局所的処置を提供することができる。

10

【0134】

一実施形態では、本開示は、血液透析を受けている患者における血管アクセス機能不全に対する満たされていない必要性に対処するための新しいアプローチを提供する。一実施形態では、このアプローチには、本明細書に記載されるバイオコンジュゲートから設計された血管内腔コーティングの生成が必然的に伴う。動静脈瘻(AVF)では、例えば新生内膜過形成は、主にAVFの静脈部分において生じる。内膜過形成の初期の機序は、動脈および静脈で類似しているが、生じる病変には差異がある。静脈の新生内膜過形成は、末梢血管疾患の状況において動脈の内膜過形成よりも侵襲性が高い病変になり、血管形成術に対する応答が少なくなる傾向がある。動脈傷害における血小板結合および内膜過形成を防止する開示されたバイオコンジュゲートの能力は、新生内膜過形成を低減または防止するその能力に寄与することが企図される。

20

【0135】

したがって、一部の実施形態では、本開示は、血液透析を必要とする患者の動静脈瘻(AVF)の成熟を改善するため、または、あるいは開存性を改善する、静脈の内径を拡大する、狭窄を低減する、新生内膜過形成を低減する、血行力学的ストレスを低減する、内皮もしくは平滑筋細胞傷害を低減する、血管アクセス機能不全を低減する、またはAVFにおける凝固もしくは炎症を低減するための方法を提供する。一部の実施形態では、方法には、AVFの内腔の内壁に溶液を適用し、AVFにおける血流を回復または開始することを伴い、溶液は、本開示のバイオコンジュゲートである、または溶液は、有効量の本開示のバイオコンジュゲートを含む。

30

【0136】

露出したコラーゲンに特異的に結合する合成ポリマーの内腔コーティングを使用する局在的処置が開示され、コーティングは、血管壁への血小板接着をブロックし、したがって血栓症および内膜過形成の開始イベントを阻害することができる。さらに、コーティングは、血管壁の急速な再内皮化を促進して、より急速な治癒をもたらすことができる。開示されたバイオコンジュゲートの、作製中の(during the creation)ネイティブなAV瘻への適用により、有意により少ない狭窄、およびより大きい直径を有する瘻が生じることが企図される。

【0137】

一部の実施形態では、血流が開始される前の新たに作製されたAVFについては、溶液は、血流が開始される約10分未満前に適用される。一部の実施形態では、溶液は、血流が開始される約20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、もしくは2分、または60、45、30、20、10もしくは5秒未満前に適用される。一部の実施形態では、溶液は、血流が開始される少なくとも1分または少なくとも2、3、4、5分前に適用される。一部の実施形態では、溶液は、血流が回復して少なくとも1分または少なくとも2、3、4、5分後に適用される。一部の実施形態では、血流が開始され、次に溶液を送達するために停止される。一部の実施形態では、溶液は、吻合の作製前、吻合の作製中、またはその後に血管に適用される。一部の実施形態では、溶液は、吻合の作製前、吻合の作製中、およびその後に血管に適用される。

40

【0138】

50

一部の実施形態では、液剤は、例えば、針、カテーテルまたは他の薬物 - 送達デバイスを用いて A V F の中を流される。一実施形態では、方法にはさらに、A V F に液剤を流した後、A V F を閉じることが必然的に伴う。一部の実施形態では、上記の通り液剤の適用に加えて、または、あるいは、確立された A V F の近位ならびに静脈および動脈をクランプすることによって生じた閉鎖内腔に、液剤を注射する。

#### 【0139】

一実施形態では、液剤は、静脈の内径を拡大するために使用される、A V F の静脈拡張または静脈部分の摩擦後約 5 分以内（あるいは 10、9、8、7、6、4、3、または 2 分以内）に適用される。機械的に拡張または摩擦した静脈内表面に液剤を適用することによって、摩擦中の表面上でのバイオコンジュゲートの喪失を低減することができる。

10

#### 【0140】

開示された組成物および方法は、患者における血管アクセスを確立するために使用することができ、その方法には、血管アクセスにおける血管壁に本開示の液剤を適用すること、および血管アクセスでの血流を回復または開始することが必然的に伴い得ることがさらに企図される。一部の実施形態では、壁は、血管内壁であるが、任意の血管の外壁であってもよい。

#### 【0141】

一部の実施形態では、血管アクセスは、動静脈瘻（A V F）、動静脈グラフト（A V G）、または非経口栄養法、化学療法、または血漿交換療法のために使用される堅牢な血管アクセスである。液剤は、血小板への壁の曝露を低減することが企図される。一部の実施形態では、壁は、傷害または外科手技に起因して血流に曝露された細胞または組織を含む。液剤の適用によって、開存性が改善される、生存が改善される、血流が改善される、血管内径が拡大する、または A V F および A V G などの血管アクセスの狭窄が低減することが示される。

20

#### 【0142】

一実施形態では、本開示は、血液透析を必要とする患者の動静脈瘻（A V F）の成熟を改善するため、または、あるいは開存性を改善する、静脈の内径を拡大する、狭窄を低減する、新生内膜過形成を低減する、血行力学的ストレスを低減する、内皮もしくは平滑筋細胞傷害を低減する、血管アクセス機能不全を低減する、または A V F における凝固もしくは炎症を低減するための方法を提供する。一部の実施形態では、方法には、A V F の内腔の内壁に液剤を適用すること、および A V F での血流を回復または開始することが必然的に伴い、液剤は、有効量の本開示のバイオコンジュゲートを含む。

30

#### 【0143】

バイオコンジュゲートは、患者の血管内部に経皮または静脈内投与することができることが企図される。経皮または静脈内送達は、術後の患者の瘻作製の処置を可能にする。バイオコンジュゲートは、血管の処置、血管の維持、または瘻の失敗の防止のために送達することができる。

#### 【0144】

一部の実施形態では、方法は、バルーン補助成熟、バルーン血管形成術、粥腫切除術、または血餅除去術などの 1 つまたは複数の維持適用を行うことをさらに含む。さらに一部の実施形態では、とりわけ、特に高流速によって内皮が損傷する場合の手技、およびグラフトまたは瘻内の注射の後の、血液透析の時点での予防的送達が、狭窄の維持および防止のために有益であることが企図される。

40

#### 【0145】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、硫酸化ヒアルロン酸および約 15 ~ 約 30 % のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSILY（配列番号：）、RRANAAALKAGELYKSILYGSG（配列番号：）、GQLYKSILY（配列番号：）、またはGQLYKSILYGSGSGSR（配列番号：）、CPGRVMHGLHLGDDEGPC（配列番号：）、CVWLWEQC（配列番号：）、もしくはWREPSFCALS（配列番号：）の

50

少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および/もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

#### d. 血管介入

##### 【0146】

血管介入、例えば経皮的冠動脈介入は、任意の従来の手順によって、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートの投与の前、間または後に行うことができる。本発明の方法と併せた使用が企図される血管介入術の例として、ステント留置、粥腫切除術、および血管形成術、例えばバルーン血管形成術が挙げられる。血管介入術は、血管を一時的に閉塞させるもの（例えば、バルーン血管形成術）であってよく、または血管を一時的に閉塞させないもの（例えば、非バルーン血管形成術、バルーン血管形成術を伴わないステント留置術など）であってよい。例示的な送達様式として、カテーテル、非経口投与、バルーン上のコーティング、多孔質バルーンを介するもの、コーティングされたステントおよびそれらの任意の組合せ、または血管介入術中の薬物送達の任意の他の公知の方法を挙げることができる。

10

##### 【0147】

別の例示的な実施形態では、血管介入術中、保存的アミノ酸置換を有するこれらのバイオコンジュゲートのいずれかは、剥離内皮の露出したコラーゲンへの血小板結合、血小板活性化、血栓症、内皮剥離から生じる炎症、内膜過形成、および/もしくは血管れん縮を阻害することができる、または内皮細胞増殖を刺激することができる、または剥離血管のコラーゲンに結合することができる。別の例示的な実施形態では、血管介入術中、この段落に記載される保存的アミノ酸置換を有するバイオコンジュゲートのいずれかは、剥離内皮の露出したコラーゲンへの血小板結合、血小板活性化、内膜過形成、および/もしくは血管れん縮を阻害することができる、または剥離血管のコラーゲンに結合することができる。

20

##### 【0148】

本明細書に記載される様々な実施形態では、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、患者（例えば、血栓症、剥離内皮の露出したコラーゲンへの血小板結合、血栓症、内皮剥離から生じる炎症、内膜過形成、または血管れん縮に関与するものなどの血小板活性化を阻害するために、処置を必要とする患者）に投与することができる。様々な実施形態では、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、例えば静脈内または筋肉内に投与することができる。非経口投与に適した経路には、血管内、静脈内、動脈内、筋肉内、皮膚、皮下、経皮、皮内、および表皮内送達が含まれる。非経口投与に適した手段には、針（マイクロニードルを含む）注射器、注入技術、およびカテーテルベースの送達が含まれる。例示的な実施形態では、a) 薬学的に活性な量のコラーゲン結合合成バイオコンジュゲート、b) 約pH 4.5 ~ 約pH 9の範囲のpHを提供するための薬学的に許容されるpH緩衝剤、c) 約0 ~ 約300ミリモル濃度の濃度範囲のイオン強度改变剤、およびd) 全処方重量 (formula weight) の約0.25% ~ 約10%の濃度範囲の水溶性粘度改变剤、または任意の個々の構成成分a)、b)、c) もしくはd)、またはa)、b)、c) およびd) の任意の組合せを含む、非経口投与またはカテーテルベースの送達のためにコラーゲン結合合成バイオコンジュゲートと共に使用するための医薬製剤が提供される。

30

40

##### 【0149】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、任意の適切な方式で患者の血管内に（例えば、動脈または静脈に）投与することができる。本明細書に記載される様々な実施形態では、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、血管介入の前、間または後に患者の血管に投与することができる。様々な実施形態では、血管介入、例えば経皮的冠動脈介入（PCI）には、例えば、ステント留置、粥腫切除術、グラフティング、および血管形成術、例えばバルーン血管形成術が含まれ得る。例示的に、血管介入は、動脈、例えば冠動脈もしくは静脈を一時的に閉塞させるもの（例えば、バルーン血管形成術）であってよく、または動脈もしくは静脈を一時的に閉塞させないもの（例えば、非バルーン血管形成術、バルーン血管形成術を伴わないステ

50

ント留置術など)であってよい。例示的な送達様式として、カテーテル、非経口投与、バルーン上のコーティング、多孔質バルーンを介するもの、コーティングされたステントおよびそれらの任意の組合せ、または血管介入術中の薬物送達の任意の他の公知の方法を挙げることができる。例示的な一実施形態では、標的血管には、ネイティブな冠動脈ならびに例えば早期冠動脈バイパス術で患者にグラフトされたものを含めた、冠動脈、例えば患者の心臓組織に血液を供給する任意の血管が含まれ得る。本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートが投与されるおよび血管介入術が実施される標的血管は、狭窄などの閉塞、または血管を通る血流の低減を引き起こす完全もしくは部分的閉塞の一部の他の形態を含有してよい。したがって、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、患者に経皮的に挿入され、患者の血管を介して標的血管に通されるカテーテル(例えば、拡張カテーテル、オーバーザワイヤー血管形成術バルーンカテーテル、注入カテーテル、迅速交換もしくはモノレールカテーテル、または当技術分野で公知の任意の他のカテーテルデバイス)によって、血管に送達することができる。参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第7,300,454号に記載されるものを含めた様々なカテーテルベースのデバイスが、当技術分野で公知である。カテーテルが使用される、本明細書に記載される様々な実施形態では、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートを送達するために使用されるカテーテルは、血管介入が実施されるものと同じカテーテルであってよく、または異なるカテーテルであってよい(例えば、同じもしくは異なる皮膚切開によって患者に経皮的に挿入され、かつ/または同じもしくは異なる経路を介して患者の血管を通して標的血管に通される、異なるカテーテル)。別の実施形態では、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、標的血管に直接注射することができる。別の実施形態では、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、全身送達することができる(すなわち、標的血管に直接送達されるのではなく、カテーテルベースの送達を用いずに非経口投与によって送達される)。

10

20

30

40

50

#### 【0150】

血管が閉塞(例えば、狭窄)を含有する場合、投与は、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートを、閉塞部位または閉塞の遠位部またはその両方の標的血管に直接送達することによって行うことができる。別の実施形態では、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、閉塞に近位の1つまたは複数の部位に送達することができる。例示的に、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートが送達されている間、カテーテルチップを静止させたままにすることができ、またはコラーゲン結合合成バイオコンジュゲートが送達されている間、カテーテルチップを移動することができる(例えば、閉塞に対して最初は遠位にある位置から、閉塞までもしくは閉塞を通して、または閉塞に近位の位置まで、近位方向に)。

#### 【0151】

上に示される通り、一実施形態では、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、血管介入、例えば経皮的冠動脈介入の前の時点で、患者の血管に直接投与することができる。例えば、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートの送達は、血管介入の直前に(例えば、血管介入前の約1時間以内、例えば約30分以内、約15分以内、および/または約5分以内に)行うことができる。必要に応じて、標的血管へのコラーゲン結合合成バイオコンジュゲートの直接送達は、血管介入術のすべりもしくは一部の間、および/またはこのような術の完了後に継続することができ、あるいは標的血管へのコラーゲン結合合成バイオコンジュゲートの直接送達は、血管介入術の開始前に停止し、その後再開しなくてもよい。本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートの送達は、継続的であってよく、または単回もしくは複数回の投与によって行うことができる。コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートを標的血管に投与する前、間および/または後、同じコラーゲン結合合成バイオコンジュゲート、または1つもしくは複数の異なるコラーゲン結合合成バイオコンジュゲートを投与することができる。

#### 【0152】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、硫酸化ヒア

ルロン酸および約 15 ~ 約 30 % のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSILY (配列番号: )、RRANAALKAGELYKSILYGSYG (配列番号: )、GQLYKSILY (配列番号: )、またはGQLYKSILYGSYGSGSR (配列番号: )、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (配列番号: )、CVWLWEQC (配列番号: )、もしくはWREPSFCALS (配列番号: )の少なくとも 1 つの配列、またはそれからそれぞれ 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ付加、欠失および / もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

e . 内皮機能不全

【0153】

本開示は、一実施形態では、内皮機能不全に関連する疾患に罹患している患者を処置するための組成物および方法を提供する。組成物は、一部の実施形態では、本開示の合成コラーゲン結合バイオコンジュゲートを含む。

10

【0154】

本明細書では、コラーゲン結合バイオコンジュゲートは、急性および慢性疾患の両方において、内皮機能不全または傷害の炎症性影響を低減することができることが発見される。このようなバイオコンジュゲートは、機能不全内皮へ血小板が結合することを阻害または低減し、したがって、血小板媒介性炎症を低減することが企図される。炎症は、血小板 - 血小板結合、血小板 - 白血球結合、白血球漏出の促進、または局所性および局所サイトカインの血小板からの単なる放出などの血小板プロセスを介して活性化され得る。

20

【0155】

さらに、コラーゲン結合バイオコンジュゲートは、曝露された内皮細胞において炎症促進性サイトカインの分泌、ならびに E - セレクチンおよび P - セレクチンの発現を低減することが発見される。さらに、これらのバイオコンジュゲートは、血小板由来成長因子 (PDGF) が存在下でも、内皮細胞の増殖および遊走を増加させ、IL - 6 分泌および血管傷害マーカーの生成を減弱することができる。コラーゲン結合バイオコンジュゲートを投与することによってもたらされるこれらの効果の一部またはすべては、機能不全内皮における炎症の低減に寄与することが企図される。

【0156】

一部の実施形態では、内皮機能不全に罹患している血管部位における炎症を防止または低減するための方法も提供される。方法には、本開示の合成コラーゲン結合バイオコンジュゲートを含む医薬組成物を、その部位に投与することが必然的に伴う。

30

【0157】

用語「内皮機能不全」は、「内皮細胞 (EC) 機能不全」、「機能不全内皮」または「機能不全内皮細胞」とも呼ばれる。内皮機能不全は、内皮細胞の細胞表面上の ICAM および VCAM 受容体またはセレクチン受容体のアンマスキングまたは露出により決定され得る。P - セレクチンおよび E - セレクチンは、損傷および炎症に起因して細胞表面上に一時的に発現され、機能不全内皮において慢性的に発現される、曝露されたセレクチン受容体の例である。

【0158】

一部の実施形態では、内皮機能不全は、透過した内皮内膜 (endothelial lining) または損傷を受けた内皮細胞により特徴付けられる。一部の実施形態では、内皮機能不全は、多糖外被の喪失によって特徴付けられる。一部の実施形態では、内皮機能不全は、内皮細胞の表面上に発現され、循環に曝露されたセレクチンタンパク質によって特徴付けられる。一部の実施形態では、その部位は、炎症に罹患している。

40

【0159】

一態様では、血管部位は、物理的手段によって剥離されず、血管介入術からの回復していない。血管介入術の非限定的な例として、経皮的冠動脈介入 (PCI) が挙げられる。

【0160】

「機能不全内皮細胞」または「内皮細胞 (EC) 機能不全」は、内皮細胞の細胞表面上

50

の ICAM および VCAM 受容体、ならびにセレクチン受容体のアンマスキングまたは露出を意味する。P - セレクチンおよび E - セレクチンは、損傷および炎症に起因して細胞表面上に一時的に発現され、機能不全内皮において慢性的に発現される、露出したセレクチン受容体の例である。慢性機能不全内皮細胞を有する疾患状況の一例は、糖尿病である。

【 0 1 6 1 】

内皮細胞は、機能的毛細管の維持に関与するので、内皮の機能不全は、広範な疾患の病因において重要な役割を演じている。

【 0 1 6 2 】

例えば、内皮は、末梢血管疾患、脳卒中、心疾患、糖尿病、インスリン抵抗性、慢性腎不全、腫瘍成長、転移、静脈血栓症、および重症ウイルス感染症に直接関与する (Rajendran et al., Int. J. Biol. Sci., 9:1057-1069, 2013)。

【 0 1 6 3 】

「内皮機能不全と関連する疾患」は、本明細書で使用される場合、内皮機能不全によって少なくとも部分的に引き起こされるか、または内皮機能不全を誘導する、ヒト疾患または状態を指す。したがって、内皮機能不全と関連する疾患を処置することは、疾患の処置、機能不全内皮を回復させること、または機能不全内皮から生じる状態もしくは症状、例えば炎症、内膜過形成、および血栓症を防止もしくは軽減させることを指す。

【 0 1 6 4 】

本発明者らは、コラーゲン結合バイオコンジュゲートを、ヒト患者の任意の器官に有効に送達することができることを実証した。したがって、コラーゲン結合バイオコンジュゲートは、器官のいずれかにおいて生じ、以下の疾患または状態のいずれかと関連する内皮機能不全を処置するために使用することができる。

【 0 1 6 5 】

血管疾患。コラーゲン結合バイオコンジュゲートを用いて適切に処置され得る血管疾患には、限定することなく、アテローム硬化性疾患 (末梢動脈疾患、冠動脈疾患、脳卒中、頸動脈疾患、腎臓動脈狭窄)、静脈血栓性疾患 (深部または表在静脈血栓症)、および医原性大血管傷害 (血管形成術、ステント装着を伴う血管形成術、粥腫切除術、血栓摘出術、透析アクセス作製、バイパスのための静脈採取、脳または大動脈瘤の処置) が含まれる。

【 0 1 6 6 】

腎疾患。コラーゲン結合バイオコンジュゲートを用いて適切に処置され得る腎疾患には、限定することなく、急性尿細管壊死、糖尿病性慢性腎不全、狼瘡腎炎、腎線維症、および急性系球体腎炎が含まれる。

【 0 1 6 7 】

肺疾患。コラーゲン結合バイオコンジュゲートを用いて適切に処置され得る肺疾患には、限定することなく、特発性肺線維症 (IPF)、慢性閉塞性肺疾患、喘息、および気腫が含まれる。

【 0 1 6 8 】

血液疾患。コラーゲン結合バイオコンジュゲートを用いて適切に処置され得る血液疾患には、限定することなく、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)、播種性血管内凝固 (DIC)、および溶血性尿毒症症候群 (HUS) が含まれる。

【 0 1 6 9 】

さらに、皮膚疾患、例えば全身性硬化症、血管炎障害 (狼瘡) を含むリウマチ疾患、関節リウマチおよび他の炎症性関節炎 (痛風)、炎症性腸疾患を含む胃腸疾患、肝炎および肝線維症、腫瘍成長、腫瘍転移、ウイルス性および細菌性敗血症を含む感染症、多発性硬化症、認知症および筋萎縮性側索硬化症を含む神経性疾患、黄斑変性、緑内障およびぶどう膜炎を含む眼科疾患、内分泌疾患、例えば糖尿病、ならびに複合性局所疼痛症候群 (CRPS) も、本開示のコラーゲン結合バイオコンジュゲートを用いて処置することができる。

10

20

30

40

50

## 【0170】

バイオコンジュゲートは、処置される疾患および影響を受けている機能不全内皮の位置に応じて最適化された処置のために、ペプチドの同一性、グリカンに結合させたペプチドの数、およびGAG主鎖の同一性に関して調整することができることが企図される。したがって、いくつかの分子設計パラメータを操作して、標的効果を最適化することができる。

## 【0171】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、硫酸化ヒアルロン酸および約15～約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSILY（配列番号：）、RRANAAALKAGELYKSILYGS（配列番号：）、GQLYKSILY（配列番号：）、またはGQLYKSILYGS SRR（配列番号：）、CPGRVMHGLHLGDDEGPC（配列番号：）、CVWLWEQC（配列番号：）、もしくはWREPSFCALS（配列番号：）の少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および/もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

f. 組織癒着

## 【0172】

本発明の方法は、組織癒着、例えば心臓、腹部または骨盤癒着に関する様々な適用において有用である。本発明の方法は、これらの持続的欠陥または再発性傷害を処置および/または防止するのに有用であり得ることが企図される。

## 【0173】

ある特定の実施形態では、本開示は、腹部または骨盤癒着を処置および/または防止することを必要とする患者の腹部または骨盤癒着を処置および/または防止する方法であって、器官の不自然に露出した組織に医薬組成物を適用することを含む方法を提供する。一実施形態では、組成物は、約1～約80個のコラーゲン結合ペプチドが結合したグリカンを含むバイオコンジュゲートを含む。「露出した組織」は、正常で健康な状態下で見られる新しい環境に曝露される組織もしくは表面、あるいは正常で健康な状態下での異なる器官の細胞もしくは組織には曝露されないが、疾患もしくは傷害に起因して、または医学的手順中に露出する組織（すなわち、「不自然に露出した組織」）を指すことができる。

## 【0174】

癒着は、普通は接続していない組織および/または器官を異常に結合する、線維性癒着組織帯である。癒着は、様々な種類の傷害または組織障害、例えば、手術、外傷、感染、化学療法、放射線、異物、またはがんなどに応答して生じる。

## 【0175】

腹部および骨盤癒着は、腹部外科手技の一般的な合併症である。腹部癒着は、重症の臨床的問題および/または疼痛を引き起こすおそれがある。例えば、腹部癒着に係る臨床的問題には、小腸閉塞症、続発性女性不妊症、異所性妊娠、慢性腹痛および骨盤痛、ならびに困難で危険な再手術が含まれ得る（Diamond, M. P., Freeman, M. L. Eur. Soc. Human. Repro. Embryo. 2001; 7(6): 567-576）。腹部癒着は、普通は接続していない組織および/または器官を繋ぎ、神経の牽引を引き起こすことによって、疼痛を引き起こすおそれがある。腸が閉塞すると、次に膨満によって疼痛が引き起こされる。したがって、腹部癒着は、腸管障害および腸閉塞症または閉塞を引き起こすおそれがある。極度の場合、腹部癒着は、血流を抑制し、組織死をもたらす線維帯を、腸セグメントの周りに形成するおそれがある。

## 【0176】

上の臨床的問題および/または疼痛を引き起こす腹部および骨盤癒着の標準処置は、外科的介入である。しかし、外科的介入には、追加の腹部癒着およびさらなる合併症の危険性がある。したがって、腹部癒着を処置および/または防止することを必要とする患者の腹部癒着を処置および/または防止するのに、腹部癒着のための代替処置および/または防止選択肢が有益となり得る。



## 【 0 1 7 7 】

一態様では、腹部組織または器官への外傷は、腹部組織および／または器官の間に線維組織帯を生じる。本明細書に記載される方法は、前記腹部癒着を処置および／または防止するのに有用であり得ることが企図される。

## 【 0 1 7 8 】

本明細書で提供される合成バイオコンジュゲートは、保護水和層を提供して疼痛を最小にし、腹部組織および／または器官のコラーゲンを分解から保護し、上皮遊走および上皮増殖を促進することが企図される。

## 【 0 1 7 9 】

ある特定の実施形態では、本開示は、腹部癒着を処置および／または防止することを必要とする患者の腹部癒着を処置および／または防止する方法であって、腹部器官の露出した組織に医薬組成物を適用することを含む方法を提供する。一実施形態では、組成物は、約 1 ～ 約 8 0 個のコラーゲン結合ペプチドが結合したグリカンを含むバイオコンジュゲートを含む。

10

## 【 0 1 8 0 】

ある特定の実施形態では、本開示は、腱 - 腱鞘癒着を処置および／または防止することを必要とする患者の腱 - 腱鞘癒着を処置および／または防止する方法であって、不自然に露出した腱および／または腱鞘に本明細書に記載されるバイオコンジュゲートまたは組成物を適用することを含む方法を提供する。

## 【 0 1 8 1 】

ある特定の実施形態では、本開示は、心臓癒着を処置および／または防止することを必要とする患者の心臓癒着を処置および／または防止する方法であって、不自然に露出した心臓組織に本明細書に記載されるバイオコンジュゲートまたは組成物を適用することを含む方法を提供する。

20

## 【 0 1 8 2 】

一部の態様では、組織は、手術、外傷、感染、化学療法、放射線、異物、またはがんに起因して露出する。一態様では、組織は、外科的に露出する。

## 【 0 1 8 3 】

一部の態様では、組成物は、スプレー剤として適用される。一部の態様では、組織は、腹膜組織である。

30

## 【 0 1 8 4 】

本開示の組成物および方法はまた、例えば手または指の手術の間に、整形外科的癒着を低減または防止するのに有用であることが企図される。

## 【 0 1 8 5 】

一部の実施形態では、方法は、癒着を低減または防止することにおいて、組織を囲むメッシュの使用などの当技術分野で公知の他の方法をさらに含むことができる。

## 【 0 1 8 6 】

本明細書で提供されるバイオコンジュゲートは、患者に、腹部組織および／または器官の細胞外マトリックス構成成分を標的とする合成バイオコンジュゲートを投与することによって、腹部癒着を処置および／または防止することを必要とする患者の腹部癒着を処置および／または防止するために使用することができる。本明細書で提供される合成バイオコンジュゲートは、腹部組織の血管新生を促進するために、ペプチドの同一性、グリコサミノグリカン (GAG) 主鎖に結合させたペプチドの数、および GAG 主鎖の同一性に関して調整することができることが企図される。したがって、いくつかの分子設計パラメータを操作して、標的効果を最適化することができる。

40

## 【 0 1 8 7 】

本明細書で提供されるバイオコンジュゲートは、組織癒着を防止または低減するために、手術における補助剤として使用することができる。手術中、合成バイオコンジュゲートは、潜在的に癒着形成性 (adhesiogenic) である組織または器官に送達することができる。このような投与は、術後癒着を防止および／または低減する一助になることが企図され

50

る。一実施形態では、本開示は、術後癒着を低減または防止するための方法であって、本明細書で提供される合成バイオコンジュゲートを、外科手術部位に送達することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本明細書で提供されるバイオコンジュゲートは、腹腔鏡下腹部手術などの腹部手技において有用であり得る。さらなる実施形態では、本明細書で提供されるバイオコンジュゲートは、潜在的に癒着形成性である組織または器官に、腹腔鏡によって送達することができる。バイオコンジュゲートを用いる処置は、傷害エリアに結合し、保護水和層を提供して疼痛を最小限にし、腹部組織および/または器官のコラーゲンを分解から保護し、上皮遊走および上皮増殖を促進することによって、腹部癒着を処置および/または防止することが企図される。さらに、バイオコンジュゲートは傷害を受けたエリアに留まり、したがって、1日に複数回の処置は必要ないことが企図される。

10

#### 【0188】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、硫酸化ヒアルロン酸および約15～約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSI LY (配列番号: )、RRANAALKAGELYKSI LYGS G (配列番号: )、GQLYKSI LY (配列番号: )、またはGQLYKSI LYGS GSGSR R (配列番号: )、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (配列番号: )、CVWLWEQC (配列番号: )、もしくはWREPSFCALS (配列番号: )の少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および/もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0189】

本開示の組成物は、直視下手術中、または腹腔鏡によって、または外科手術部位へのアクセスを可能にする任意の機器によって投与することができる。

g. 胃食道傷害

#### 【0190】

本開示は、一実施形態では、患者の胃食道傷害を処置または防止する、満たされていない必要性に対処するための新しいアプローチを提供する。一般に、新しいアプローチには、本開示の合成コラーゲン結合バイオコンジュゲートを含む医薬組成物を、傷害を受けた胃食道組織または細胞に適用することが必然的に伴う。

#### 【0191】

組成物のこのような適用は、合成コラーゲン結合バイオコンジュゲートのコーティングを生成することができる。合成コラーゲン結合バイオコンジュゲートは、物理的ペプチド-コラーゲン相互作用を介して、食道組織において露出したコラーゲンに結合することができる。バイオコンジュゲートは、コラーゲンに結合すると、1) 血小板付着/活性化に対するバリアとして作用すること、2) MMPアクセスを阻害することによってコラーゲンを分解から保護すること、ならびに3) 成長因子FGF-2、FGF-7、およびFGF-10を隔離し、したがって内皮細胞および上皮細胞の増殖および遊走を促進して組織を修復および回復させることを含めたいくつかの機能を有する。

30

#### 【0192】

コラーゲン結合バイオコンジュゲートは、一実施形態では、共有結合により付着したコラーゲン結合ペプチドを有する多糖主鎖を含む。合成バイオコンジュゲートは、コラーゲン上の血小板結合部位を競合し、血小板の結合および活性化を防止することができる。グリカン主鎖は、負電荷を運び、水分子に結合して、コラーゲン表面上に、血小板およびタンパク質接着を防止する親水性バリアを作製することができる。バイオコンジュゲートは、正常な血小板機能を阻害するのではなく、露出したコラーゲンをマスキングすることによって、炎症および内膜過形成に至るカスケードの初期ステップに対処する局部的処置を提供することができる。

40

#### 【0193】

この新しいアプローチは、それらに限定されるものではないがGERDまたは医原性介入によって引き起こされるものを含めた胃食道傷害を処置するのに有用であることが企図される。さらに、以下の分類の患者は、このアプローチから利益を得ることができると

50

が企図される。A)食道胃十二指腸内視鏡検査(esophagogastroduodenoscopic)(EGD)アブレーションを必要とするGERD関連食道病変、B)EGD拡張を必要とする食道狭窄、およびC)EGD処置を必要とする消化性潰瘍疾患(PUD)。

#### 【0194】

医薬組成物は、傷害を受けた胃食道組織の1つまたは複数の病変に局所適用することができる。組織の到達性が限られていることを考慮すると、送達デバイスの使用が有益であることが企図される。例えば、組成物は、食道胃十二指腸内視鏡検査(EGD)手順の間に、または食道胃十二指腸内視鏡を使用して送達することができる。

#### 【0195】

パリフェルミンは、口腔粘膜炎処置に有用なケラチノサイト成長因子である。本開示のバイオコンジュゲートは、コラーゲンに結合し、パリフェルミンなどの内因性または外因性成長因子にも結合する。したがって、このような製剤は、パリフェルミンの標的化送達を提供する。一部の実施形態では、本開示は、パリフェルミンを送達するための方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、バイオコンジュゲートおよびパリフェルミンを含む組成物を、それを必要とする患者に適用することを含む。他の実施形態では、本開示は、患者の口腔粘膜炎を処置するための方法であって、バイオコンジュゲートおよびパリフェルミンを含む組成物を、それを必要とする患者に適用することを含む方法を提供する。

#### 【0196】

液剤で提供されるバイオコンジュゲートは、傷害を受けた胃食道組織の回復を促進するために、ペプチドの同一性、グリカンに結合させたペプチドの数、およびGAG主鎖の同一性に関して調整することができることが企図される。したがって、いくつかの分子設計パラメーターを操作して、標的効果を最適化することができる。

#### 【0197】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、硫酸化ヒアルロン酸および約15~約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSI LY(配列番号:)、RRANAALKAGELYKSI LYGS G(配列番号:)、GQLYKSI LY(配列番号:)、またはGQLYKSI LYGS GS GS RR(配列番号:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC(配列番号:)、CVWLWEQC(配列番号:)、もしくはWREPSFCALS(配列番号: )の少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および/もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

h. 創傷治癒

#### 【0198】

本明細書に記載される方法および組成物は、慢性創傷および急性創傷、結合組織の創傷、ならびに筋肉、骨および神経組織の創傷を含めた、組織の完全性が損傷を受けた任意の状態を処置するために使用することができる。「創傷」には、本明細書で使用される場合、外科的切開、熱傷、酸およびアルカリによる熱傷、低温熱傷(凍傷)、日焼け、潰瘍、褥瘡、切り傷、擦過創、裂創、物理的外傷によって引き起こされた創傷、先天性障害によって引き起こされた創傷、歯周疾患によってまたは歯科手術後に引き起こされた創傷、ならびにがん組織または腫瘍と関連する創傷が含まれる。本明細書に記載の通り、創傷には、急性または慢性創傷のいずれかが含まれ得る。

#### 【0199】

急性創傷は、無傷皮膚への外部の損傷によって引き起こされ、外科的創傷、咬傷、熱傷、切り傷、裂創、擦過創などが含まれる。慢性創傷には、例えば、皮膚または上皮組織の完全性を損なう内因性機序、例えば、脚潰瘍、足潰瘍、および褥瘡によって引き起こされた創傷が含まれる。本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、創傷治癒を促進する、または瘢痕形成を低減するための組成物は、慢性または急性創傷を処置するためにいつでも使用することができる。例えば、外科的切開と関連する急性創傷は、患者の創傷治癒を促進する、および/または瘢痕形成を低減するために、手術前、手術中、または手術後

に処置することができる。様々な例示的な態様では、本明細書に記載される組成物は、創傷治癒を促進する、および／または瘢痕形成を低減するために、必要な場合1回用量または複数回用量で患者に投与することができる。

#### 【0200】

本明細書で使用される場合、「瘢痕形成を低減すること」には、瘢痕の極限引張強度の増加および／または目に見える瘢痕の長さの減少が含まれる。本明細書で使用される場合、瘢痕形成の低減には、患者の瘢痕形成の完全阻害または目に見える瘢痕化の完全除去も含まれる。

#### 【0201】

本明細書で使用される場合、「創傷治癒を促進すること」は、慢性もしくは急性創傷の部分的もしくは完全な治癒を引き起こすこと、または急性もしくは慢性創傷によって引き起こされた症状のいずれかを低減することを意味する。このような症状には、疼痛、出血、組織壊死、組織潰瘍化、瘢痕形成、および急性または慢性創傷から生じることが公知の任意の他の症状が含まれる。

10

#### 【0202】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、創傷治癒を促進する方法が提供される。方法は、患者にコラーゲン結合合成バイオコンジュゲートを投与するステップを含み、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、患者の創傷治癒を促進する。本明細書に記載される様々な実施形態のいずれかでは、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、異常コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートであっても、コラーゲン原線維形成を普通は調節するバイオコンジュゲートのアミノ酸配列の一部に対してアミノ酸相同性を有する原線維形成性コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートであってもよい。

20

#### 【0203】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、瘢痕形成を低減する方法が提供される。方法は、患者にコラーゲン結合合成バイオコンジュゲートを投与するステップを含み、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、患者の瘢痕形成を低減する。本明細書に記載される様々な実施形態のいずれかでは、コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートは、異常コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートであっても、コラーゲン原線維形成を普通は調節するバイオコンジュゲートのアミノ酸配列の一部に対してアミノ酸相同性を有する原線維形成性コラーゲン結合合成バイオコンジュゲートであってもよい。

30

#### 【0204】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、創傷治癒を促進する、および／または瘢痕形成を低減するための組成物は、綿、紙、不織布、織布、および編物、モノフィラメント、フィルム、ゲル、スポンジなどを含めた、創傷への組成物の送達に適した任意の材料に含浸させることができる。例えば、綿、紙、不織布、織布、編物、フィルムおよびスポンジの形態の外科縫合糸（モノフィラメント、撚糸または編糸）、吸収性パッド、経皮パッチ、包帯、熱傷包帯剤およびパッキングを使用することができる。

#### 【0205】

一実施形態では、上記の方法において使用されるバイオコンジュゲートは、硫酸化ヒアルロン酸および約15～約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドは、RRANAALKAGELYKSILY（配列番号：）、RRANAALKAGELYKSILYGS（配列番号：）、GQLYKSILY（配列番号：）、またはGQLYKSILYGS SRR（配列番号：）、CPGRVMHGLHLGDDEGPC（配列番号：）、CVWLWEQC（配列番号：）、もしくはWREPSFCALS（配列番号：）の少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および／もしくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

40

#### i. 角膜創傷

#### 【0206】

本発明の方法は、角膜創傷治癒に関する様々な適用において有用である。一実施形態では、処置を必要とする角膜創傷状態は、角膜への外傷的傷害の結果である（Chiapella,

50

A. P., Rosenthal, A. R. British Journal of Ophthalmology, 1985; 69: 865-870)。別の実施形態では、Epi-Lasikによって誘導された角膜傷害(Epi-Lasik induce corneal injury)などの、処置を必要とする創傷状態は、眼科的手順によって引き起こされる(Tuft, S.J., et al. Br J Ophthalmol. 1993; 77: 243-247)。ある場合には、治癒の欠如または不完全な治癒に起因して、持続的欠陥または再発性傷害が生じる場合がある(Kenyon, K. R. Cornea and Refractive Atlas of Clinical Wisdom. Eds. S.A. Melki and M. A. Fava. SLACK, Inc.: New Jersey, US, 2011; pp. 39)。本発明の方法は、これらの持続的欠陥または再発性傷害を処置するのに有用であり得ることが企図される。

#### 【0207】

一態様では、角膜上皮への傷害によって、角膜バリア機能が破損し、本明細書に記載される方法は、前記傷害を処置するのに有用であり得ることが企図される。

#### 【0208】

本明細書で提供されるバイオコンジュゲートは、角膜創傷治癒に関与する特異的細胞外マトリックス構成成分を標的とするバイオコンジュゲートを患者に投与することによって、角膜創傷治癒を促進することを必要とする患者の角膜創傷治癒を促進するために使用することができる。本明細書で提供されるバイオコンジュゲートは、角膜創傷治癒を促進するために、ペプチドの同一性、グリカンに結合させたペプチドの数、およびグリカンの同一性に関して調整することができることが企図される。したがって、いくつかの分子設計パラメータを操作して、標的効果を最適化することができる。

#### 【0209】

硫酸化ヒアルロン酸および約15～約30%のペプチドによる機能化を含み、ペプチドが、RRANAALKAGELYKSILY(配列番号: )、RRANAALKAGELYKSILYGS(配列番号: )、GQLYKSILY(配列番号: )、またはGQLYKSILYGS GSGSR(配列番号: )、CPGRVMHGLHLGDDEGPC(配列番号: )、CVWLWEQC(配列番号: )、もしくはWREPSFCALS(配列番号: )の少なくとも1つの配列、またはそれからそれぞれ1つ、2つもしくは3つのアミノ付加、欠失および/もしくは置換を有するアミノ酸配列を含むバイオコンジュゲートを用いる処置は、傷害エリアに結合し、保護水和層を提供して疼痛を最小限にし、角膜コラーゲンを分解から保護し、かつ/または上皮遊走および上皮増殖を促進することによって、角膜創傷(wound)治癒を増強することが企図される。さらに、バイオコンジュゲートは傷害を受けたエリアに留まり、したがって、1日に複数回の処置は必要ないことが企図される。

#### 5. 組成物

#### 【0210】

一実施形態では、バイオコンジュゲートは、組成物で投与される。本開示は、バイオコンジュゲートおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。水または食塩水を含めた当業者に公知の薬学的に許容される担体を使用され得る。当技術分野で公知の通り、構成成分ならびにそれらの相対量は、所期の使用および送達方法によって決定される。組成物において用いられる賦形剤または担体は、バイオコンジュゲートの所望の効果を低減しないように選択され得る。適切な組成物の例として、水溶液、例えば等張食塩水、5%グルコース中溶液が挙げられる。アルコール、グリコール、エステルおよびアミドなどの他の周知の薬学的に許容される液体担体を用いることができる。ある特定の実施形態では、組成物は、1つまたは複数の添加剤、例えばそれらに限定されるものではないが、イオン強度改变剤、溶解増強剤、糖、例えばマンニトールもしくはソルビトール、pH緩衝剤、界面活性剤、安定化ポリマー、防腐剤、および/または共溶媒をさらに含む。

#### 【0211】

ある特定の実施形態では、組成物は、水溶液である。水溶液は、製剤化の容易さ、ならびに溶液の点滴注入によってこのような組成物を容易に投与する能力に基づいて、組成物製剤で使用するのに適している。ある特定の実施形態では、組成物は、懸濁液、粘性もし

10

20

30

40

50

くは半粘性ゲル、または他の種類の固体もしくは半固体組成物である。一部の実施形態では、組成物は、当技術分野で十分周知のフォーム、軟膏、液体洗浄液、ゲル、スプレーおよびリポソームの形態である。あるいは、局所投与は、ポンプ - カテーテル系、連続的もしくは選択的放出デバイス、または接着バリアから選択されるデバイスを介する、提供されたバイオコンジュゲートの処置部位への注入である。ある特定の実施形態では、組成物は、静脈または動脈の内壁に直接的に適用されるか、または接触する溶液である。一部の実施形態では、組成物は、ポリマーマトリックスを含む。他の実施形態では、組成物は、吸収可能である。ある特定の実施形態では、組成物は、pH緩衝剤を含む。一部の実施形態では、組成物は、潤滑増強剤を含有する。

#### 【0212】

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

#### 【0213】

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

#### 【0214】

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

#### 【0215】

ある特定の実施形態では、組成物は、潤滑増強剤を含有する。本明細書で使用される場合、潤滑増強剤は、薬学的に許容される担体の粘度を改変することができる1つまたは複数の薬学的に許容されるポリマー材料を指す。適切なポリマー材料には、それらに限定されるものではないが、イオン性および非イオン性水溶性ポリマー；ヒアルロン酸およびその塩、コンドロイチン硫酸およびその塩、デキストラン、ゼラチン、キトサン、ジェラン、他のバイオコンジュゲートもしくは多糖類、またはそれらの任意の組合せ；セルロースポリマーおよびセルロースポリマー誘導体、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロース；コラーゲンおよび改変コラーゲン；ガラクトマンナン、例えばグアーガム、ローカストビーンガムおよびタラガム、ならびに上記の天然ガムおよび構造的な主構成成分としてマンノースおよび/またはガラクトース部分を含有する類似の天然または合成ガム（例えば、ヒドロキシプロピルグアー）から得られた多糖類；トラガントガムおよびキサンタンガムなどのガム；ジェランガム；アルギネートおよびアルギン酸ナトリウム；キトサン；ビニルポリマー；親水性ポリマー、例えばポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンコポリマー、およびポリビニルアルコール；カル

10

20

30

40

50

ボキシビニルポリマーまたは架橋アクリル酸ポリマー、例えばポリマーの「カルボマー」ファミリー、例えば、商標Carbopol（商標）で商業的に得ることができるカルボキシポリアルキレン；ならびに他の様々な粘性または粘弾性（viscoelastomeric）物質が含まれる。一実施形態では、潤滑増強剤は、ヒアルロン酸、デルマタン、コンドロイチン、ヘパリン、ヘパラン、ケラチン、デキストラン、キトサン、アルギネート、アガロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、カルボマー941、カルボマー940、カルボマー971P、カルボマー974P、または薬学的に許容されるその塩からなる群から選択される。一実施形態では、潤滑増強剤は、バイオコンジュゲートと並行して適用される。あるいは、一実施形態では、潤滑増強剤は、バイオコンジュゲートに対して逐次的に適用される。一実施形態では、潤滑増強剤は、コンドロイチン硫酸である。一実施形態では、潤滑増強剤は、ヒアルロン酸である。潤滑増強剤は、組成物の粘度を変化させることができる。

10

#### 【0216】

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

20

#### 【0217】

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

30

40

50

コンジュゲートを含む、フィルム剤、ゲル剤、パッチ剤、または液体液剤の形態であり、組成物は、必要に応じて防腐剤を含有し、前記組成物のpHは、約pH4～約pH8の範囲内である。

#### 【0218】

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

10

#### 【0219】

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

20

#### 【0220】

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

#### 【0221】

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

30

#### 【0222】

一部の実施形態では、使用中の微生物汚染を防止するために、防腐剤が組成物に添加される。組成物に添加される適切な防腐剤は、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、アルキルパラベン、安息香酸アルキル、クロロブタノール、クロクレゾール、セチルアルコール、脂肪アルコール、例えばヘキサデシルアルコール、水銀の有機金属化合物、例えば酢酸塩、硝酸フェニル水銀またはホウ酸フェニル水銀、ジアゾリジニル尿素、アジピン酸ジイソプロピル、ジメチルポリシロキサン、EDTAの塩、ビタミンEおよびそれらの混合物を含む。ある特定の実施形態では、防腐剤は、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、ベンゾドデシニウム臭化物、メチルパラベン、プロピルパラベン、フェニルエチルアルコール、エデト酸(edentate)二ナトリウム、ソルビン酸、またはポリクオタニウム-1から選択される。ある特定の実施形態では、組成物は、防腐剤を含む。一部の実施形態では、防腐剤は、約0.001w/v%～約1.0w/v%のレベルで用いられる。ある特定の実施形態では、組成物は、防腐剤を含有せず、「防腐剤不使用」と呼ばれる。一部の

40

50



実施形態では、単位用量組成物は無菌であるが、防腐剤不使用である。

【0223】

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

【0224】

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

10

【0225】

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

20

【0226】

カテーテルベースの送達のためにバイオコンジュゲートと共に使用するための例示的な組成物は、a)本明細書に記載される合成バイオコンジュゲート、b)薬学的に許容される担体、c)ポリマーマトリックス、d)約pH4～約pH8の範囲のpHを提供するためのpH緩衝剤、およびe)全製剤重量の約0.25%～約10%の濃度範囲の水溶性潤滑増強剤、または任意の個々の構成成分a)、b)、c)、d)もしくはe)、またはa)、b)、c)、d)もしくはe)の任意の組合せを含むことができる。

30

【0227】

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

【0228】

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

40

50

## 【 0 2 2 9 】

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

## 【 0 2 3 0 】

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

## 【 0 2 3 1 】

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

## 【 0 2 3 2 】

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

## 【 0 2 3 3 】

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

## 【 0 2 3 4 】

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

#### 【0235】

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

10

#### 【0236】

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

### 6. 投薬

#### 【0237】

バイオコンジュゲートの適切な投薬量は、標準の方法によって、例えば実験動物モデルでまたは臨床試験で用量応答曲線を確立することによって決定することができ、患者の状態、処置されている疾患状況、投与経路および組織分布、ならびに他の治療的処置の併用の可能性に応じて著しく変わり得る。患者に投与される有効量は、体表面積、患者の体重または質量、および医師による患者状態の評価に基づく。様々な例示的な実施形態では、用量は、約0.01 $\mu$ g~約10gの範囲である。例えば、全身送達のために、用量は、約10g、または約5g、または約1gであってよい。他の例示的な実施形態では、有効用量は、1用量当たり約100 $\mu$ g~約10g、または1用量当たり約100 $\mu$ g~約1g、または1用量当たり約100 $\mu$ g~約500mg、1用量当たり約0.01 $\mu$ g~約100mg、または1用量当たり約100 $\mu$ g~約50mg、または1用量当たり約500 $\mu$ g~約10mg、または1用量当たり約1mg~10mg、または1用量当たり約1~約100mg、または1用量当たり約1mg~500mg、または1用量当たり約1mg~200mg、または1用量当たり約10mg~100mg、または1用量当たり約10mg~75mg、または1用量当たり約10mg~50mg、または1用量当たり約10mg、または1用量当たり約20mg、または1用量当たり約30mg、または1用量当たり約40mg、または1用量当たり約50mg、または1用量当たり約60mg、または1用量当たり約70mg、または1用量当たり約80mg、または1用量当たり約90mg、または1用量当たり約100mgの範囲である。本明細書に記載される様々な実施形態のいずれにおいても、有効用量は、1用量当たり約0.01 $\mu$ g~約1000mg、1用量当たり1 $\mu$ g~約100mg、1用量当たり約100 $\mu$ g~約1.0mg、約50 $\mu$ g~約600 $\mu$ g、約50 $\mu$ g~約700 $\mu$ g、約100 $\mu$ g~約200 $\mu$ g、約100 $\mu$ g~約600 $\mu$ g、約100 $\mu$ g~約500 $\mu$ g、約200 $\mu$ g~約600 $\mu$ g、または約100 $\mu$ g~約50mg、または1用量当たり約500 $\mu$ g~約10mgまたは1用量当たり約1mg~約10mgの範囲である。

20

30

40

#### 【0238】

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

#### 【実施例】

50

## 【 0 2 3 9 】

## ( 実施例 1 )

硫酸化ヒアルロン酸 ( s H A ) の調製および特徴付け

ヒアルロン酸 ( H A ) のナトリウム塩は有機溶媒に溶けないので、H A のテトラブチルアンモニウム塩を、硫酸化する前に調製することが必要である。H A ( ナトリウム塩 ) 3 . 7 4 g ( 9 . 3 1 m m o l ) を、蒸留水 4 0 0 m L に溶解させた。D o w e x - 5 0 W X 8 ビーズ ( 7 5 . 7 4 g ) を、蒸留水 1 . 4 L で 3 回洗浄した。次に、酸性 D o w e x ビーズを H A 溶液に添加し、室温で 3 0 分間攪拌した。溶液を濾過して樹脂を除去し、p H = 6 . 5 になるまで、テトラブチルアンモニウム水酸化物 ( H <sub>2</sub> O 中 1 M ) で処理した。テトラブチルアンモニウム H A 塩 ( H A - T B A ) を凍結乾燥させ、白色固体として得た ( 5 . 7 6 g 、収率 9 9 % ) 。

10

## 【 0 2 4 0 】

硫酸化 H A の調製 : <sup>1</sup> 窒素下、乾燥三口フラスコ中、H A - T B A ( 5 . 7 6 2 2 g 、 9 . 2 8 m m o l 、 3 2 3 k D a の H A ) を無水 D M F ( 1 0 5 0 m L ) に溶解させ、一晚静置して溶解させた。窒素下、別の乾燥三口フラスコ中、S O <sub>3</sub> - ピリジン複合体 ( 3 8 . 8 9 0 g 、 2 4 4 . 3 m m o l 、 1 : 2 6 . 3 比の H A - T B A : S O <sub>3</sub> ) を、無水 D M F ( 4 3 2 m L ) に溶解させ、H A - T B A 溶液に添加した。反応物を、室温で 2 0 分間攪拌した。2 0 分後、冷水 ( 5 0 0 m L ) を急速に添加し、反応混合物をビーカーに移した。酢酸ナトリウムで飽和させた冷エタノール ( 2 L ) の添加後、沈殿物が観察された。濾過した後、沈殿物を水 ( 1 L ) に溶解させた後、0 . 5 M の N a C l 5 C V を用いた T F F によって、次いで水 8 C V で精製した。次に、生成物を 3 日間凍結乾燥させ、ベージュ色の固体を回収した ( 3 . 2 1 g 、収率 5 8 % ) 。

20

## 【 0 2 4 1 】

s H A の特徴付け : 硫酸化度を、窒素および硫黄含量の元素分析によって得た。それが得られたら、以下の算出を行って、硫酸化度 ( D S ) を決定した。

## 【 数 1 】

$$DS = \frac{\text{硫黄\%} / 32.065}{\text{窒素\%} / 14.0067}$$

30

## 【 0 2 4 2 】

また試料を、D <sub>2</sub> O 中 <sup>1</sup> H N M R 分析によって分析して、特有のピークを有するテトラブチルアンモニウムおよび / またはピリジニウム複合体から、任意の微量不純物を決定した。

## 【 0 2 4 3 】

硫酸化度は、H A : S O <sub>3</sub> - ピリジンのモル比、ならびに使用した初期 H A の分子量に基づいて算出し、二糖単位 1 個当たりのサルフェートの数として提示する。以下の表は、これらの差異を示す。

## 【 表 8 】

HAの初期MW	HA:SO <sub>3</sub> - ピリジンの比	硫酸化度
20 kDa	1:13.2	1.5
	1:19.8	1.9
136 kDa	1:13.2	1.5
323 kDa	1:13.2	1.5
	1:26.3	2.4
738 kDa	1:13.2	1.3
	1:26.3	1.7

40

<sup>1</sup> Biomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297

50

## (実施例2)

## 化合物の合成

## 【0244】

反応緩衝液の調製：8.0 M 尿素、0.6 % NaCl を含む 0.064 M の MES (2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸)、pH 5.5 を反応前 6 時間以内に調製した。8 M 尿素には、以下の通り溶質の体積変化の算出が必要であることに留意されたい。反応緩衝液は、以下の等式によって処方する。

- ・  $V_{0.1\text{ M MES}, 0.9\% \text{ NaCl}} (\text{mL}) = V_{\text{最終}} (\text{mL}) \times 0.64$
- ・ 尿素 (g) =  $V_{0.1\text{ M MES}, 0.9\% \text{ NaCl}} (\text{mL}) \times 0.7443$
- ・ 式中、 $V_{\text{最終}}$  = 尿素を添加した後の目的の最終体積

10

## 【0245】

次に、反応緩衝液を、0.2  $\mu\text{m}$  フィルターを通して濾過する。必要とされる場合には 1 M の HCl または 0.5 M の NaOH を用いて調整して、pH が pH 4.75 以内であることを検証する。

## 【0246】

TFF 緩衝液の調製：8.0 M 尿素、0.6 % NaCl を含む TFF 緩衝液 10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 ~ 7.8 を精製前 12 時間以内に調製した。8 M 尿素には、以下の通り溶質の体積変化の算出が必要であることに留意されたい。反応緩衝液は、以下の等式によって処方する。

- ・  $V_{15.6\text{ mM リン酸ナトリウム}} (\text{mL}) = V_{\text{最終}} (\text{mL}) \times 0.64$
- ・  $V_{100\text{ mM 二塩基性リン酸ナトリウム}} (\text{mL}) = V_{\text{最終}} (\text{mL}) \times 0.06$
- ・  $V_{100\text{ mM 一塩基性リン酸ナトリウム}} (\text{mL}) = V_{\text{最終}} (\text{mL}) \times 0.04$
- ・  $V_{\text{水}} (\text{mL}) = V_{15.6\text{ mM リン酸ナトリウム}} (\text{mL}) - (V_{100\text{ mM 二塩基性リン酸ナトリウム}} (\text{mL}) + V_{100\text{ mM 一塩基性リン酸ナトリウム}} (\text{mL}))$
- ・ 尿素 (g) =  $V_{15.6\text{ mM リン酸ナトリウム}} (\text{mL}) \times 0.7443$

20

## 【0247】

式中、 $V_{\text{最終}}$  = 尿素を添加した後の目的の最終体積。次に、反応緩衝液を、0.2  $\mu\text{m}$  フィルターを通して濾過する。必要とされる場合には 1 M の HCl または 0.5 M の NaOH を用いて調整して、pH が pH 7 ~ 7.8 以内であることを検証する。

## 【0248】

反応の算出：反応モル比は、以下の通りである。GAG 二糖当たり 2 モルの EDC、GAG 二糖当たり 0.12 モルのペプチド、ならびに 20 kDa の GAG 当たり 1 モルのビオチンおよび / または蛍光タグ CF633。反応比は、GAG : ペプチド : EDC として表す。例えば 300 kDa の硫酸化度 2.5 の sHA の反応では、反応モル比は 1 : 55 : 916 になり得る。

30

## 【0249】

反応：コンジュゲートの合成は、EDC 化学を介して、GAG 主鎖上のカルボン酸基の活性化 (GAG 活性化) によって GAG 主鎖上にヒドラジド機能化ペプチドをグラフティングして、活性化されたカルボン酸基を、ペプチドの N 末端におけるヒドラジド端部と反応させることを含む。

40

## 【0250】

sHA 20 mg / ml、ヒドラジド機能化ペプチド 3 mg / ml、検出タグ (ビオチンおよび / または CF633) それぞれ 3 mg / ml、および EDC 75 mg / ml を、反応緩衝液に溶解させる。GAG は、反応の 4 時間前に溶解させることができる。ペプチドを、GAG およびタグと混合した後、可溶化 EDC を添加する。

## 【0251】

EDC は、可溶化 GAG、ペプチドおよびタグを含有する反応混合物に添加する直前に溶解させなければならない。反応を 25 で 2 時間進行させると同時に、反応混合物を攪拌または振とうする。次に、反応を、0.5 M の NaOH を使用して pH を 8 に上昇させることによってクエンチし、30 分間振とう / 攪拌する。

50

## 【 0 2 5 2 】

T F F 精製：T F F 精製は、S p e c t r u m l a b s から購入した S p e c t r u m K R 2 i T F F 系を使用して行った。S p e c t r u m l a b s から購入した、30 k D 分子量カットオフの修飾ポリエーテルスルホン ( m P E S ) フィルターカートリッジを使用した。フィルター表面積は、バッチサイズに応じて変わる。T F F 緩衝液を T F F 系で 10 分間循環させて、系を平衡化し、次に T F F ラインを新しい緩衝液で置き換える。次に、合成反応容器を T F F 系に接続し、T F F を、100 m L / 分および 18 p s i に調整した T M P を使用して実施する。反応物を、6 精製体積 ( C V ) の T F F 緩衝液で、次いで 16 C V の水でダイアフィルトレーションする ( C V は、反応体積に、T F F ホールドアップ体積を加えたものに等しい)。

10

## 【 0 2 5 3 】

以下のバイオコンジュゲートを、上で概説した手順によって、表 ( 表 2 ) に示される様々な分子量の硫酸化 H A 主鎖およびヒドラジド機能化ペプチドを使用して調製した。

## 【 表 2 - 1 】

表 2

化合物	主鎖	ペプチド
化合物 1 (約8%ペプチド機能化)	sHA, MW = 163	GQLYKSILYGS GSGSRRNHNH <sub>2</sub>
化合物 1B (約8%ペプチド機能化)	sHA, MW = 163	ビオチン GQLYKSILYGS GSGSRRNHNH <sub>2</sub>

20

## 【 表 2 - 2 】

化合物	主鎖	ペプチド
化合物 2 (約8%ペプチド機能化)	sHA, MW = 323	GQLYKSILYGS GSGSRRNHNH <sub>2</sub>
化合物 2B (約8%ペプチド機能化)	sHA, MW = 323	ビオチン GQLYKSILYGS GSGSRRNHNH <sub>2</sub>
化合物 3 (約8%ペプチド機能化)	sHA, MW = 28	GQLYKSILYGS GSGSRRNHNH <sub>2</sub>

30

40

## 【 0 2 5 4 】

化合物 1 および化合物 1 B を、グリカン 1 個当たり約 30 個のペプチドの比でペプチドを反応させることによって合成した。この比を使用すると、グリカンにコンジュゲートするペプチドの平均数は、約 8 または約 8 ~ 12 % の修飾に相当する、グリカン 1 個当たりペプチド約 20 ~ 25 個であることが企図される。表 2 に示される様々な分子量の s H A

50

コンジュゲートについて、ペプチドコンジュゲーション度を、ペプチドの主鎖長に対する比が一定になるように線形スケリングした。具体的には、化合物 2 および化合物 2 B についてグリカンにコンジュゲートするペプチドの平均数は、グリカン 1 個当たりペプチド約 70 ~ 80 個であり、化合物 3 についてグリカンにコンジュゲートするペプチドの平均数は、グリカン 1 個当たりペプチド約 6 個であることが企図され、これらはすべて約 8 または約 8 ~ 12 % の修飾に相当する。

( 実施例 3 )

肝星細胞 ( H S C ) i n v i t r o アッセイ

【 0 2 5 5 】

細胞増殖アッセイ。単一のドナーヒト肝臓から単離した正常なヒト肝臓初代肝星細胞 ( H S C ) を、S c i e n C e l l R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s ( S a n D i e g o , C A ) から購入した。初期継代 H S C ( P 2 ) を、0 . 5 % ウシ胎仔血清 ( I n v i t r o g e n ) 、1 % 星状細胞成長サプリメント ( S c i e n C e l l R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s ) 、100 U / m l のペニシリン ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) 、および 100 U / m l のストレプトマイシン ( I n v i t r o g e n ) を補充した星状細胞培地 ( S t e C M ; S c i e n C e l l R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s ) 中、線維性コラーゲンでコーティングしたプレートにおいて、6000 個の細胞 / ウェルの播種密度で成長させた。初代 H S C を、10 n g / m L の T G F - 1 ( B i o - T e c h n e C o r p o r a t i o n , M i n n e a p o l i s , M N ) で一晚処理することによって、培養中において活性化させた。次に細胞を、1000 ~ 0 . 0001  $\mu$  g / m L の濃度範囲のビオチン標識化合物 1 B または 2 B を含有する低血清培地に、30 時間曝露した。H S C の増殖に対する各処理の効果を、C y Q U A N T D i r e c t 細胞増殖アッセイキット ( I n v i t r o g e n ) を使用して、製造者の指示に従って評価した。

【 0 2 5 6 】

アルファ平滑筋アクチンについての H S C 活性化および免疫染色に対する効果。初期継代 H S C ( P 2 ) を、以前に記載した通り、線維性コラーゲンでコーティングしたプレートにおいて、6000 個の細胞 / ウェルの播種密度で成長させ、10 n g / m L の T G F - 1 で一晚処理することによって、培養中において活性化させた。次に細胞を、6000 ~ 0 . 0001  $\mu$  g / m L の濃度範囲の化合物 1 B または化合物 2 B を含有する低血清培地に、30 時間曝露した。30 時間の処理の後、細胞を 4 % ホルムアルデヒドで 10 分間固定し、P B S で洗浄し、次に 0 . 1 % T r i t o n X - 100 で 7 分間透過処理した。次に、細胞を 1 % B S A 、10 % 正常ヤギ血清、0 . 1 % P B S - T w e e n 中 0 . 3 M グリシンで一晚ブロックした。アルファ平滑筋アクチンを染色するために、すべての試料を、200 倍希釈した抗アルファ平滑筋アクチン抗体 ( A b c a m ) と共に 4 で一晚インキュベートした。次に、試料を P B S で 4 回、それぞれ 5 分間洗浄した。この後、試料を、A l e x a F l u o r 633 二次抗体を使用して 2 時間対比染色し、次に、P B S で 4 回、それぞれ 5 分間洗浄した。次に細胞を、E V O S 蛍光顕微鏡 ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) を使用して画像化した。

【 0 2 5 7 】

血小板フローアッセイ。I b i d i  $\mu$  - S l i d e V I 0 . 1 ( I b i d i ) チャネルを、100  $\mu$  g / m L の線維性 I 型コラーゲン ( C h r o n o - L o g C o r p ) で 1 時間コーティングした。次に、チャネルを P B S ですすいだ。アッセイのために使用するヒト血液を、承認された I R B プロトコールに従って同意したドナーからクエン酸ナトリウムバキュテナーに収集した。新しく収集した血液を、400 倍希釈した C a l c e i n A M ( I n v i t r o g e n ) で 30 分間染色した。化合物 1 B または化合物 2 B を、予め染色した血液に 100  $\mu$  g / m L で添加し、血液を、1000  $\cdot$  <sup>-1</sup> s のせん断速度 ( s h e e r r a t e ) で 10 分間、各チャネルに流した。流した後、チャネルから目に見えるすべての微量の血液をすすぎ落とし、E V O S 蛍光顕微鏡 ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) を使用して画像化した。

## 結果

## 【0258】

細胞増殖アッセイ。化合物1Bおよび化合物2Bについて、1mg/mLの試験最高濃度で、HSC増殖はおよそ60%阻害される。両方のコンジュゲートによって、増殖が用量依存的に阻害される。

## 【0259】

アルファ平滑筋アクチンについてのHSC活性化および免疫染色に対する効果。慢性肝疾患では、TGF- $\beta$ 1は、筋線維芽細胞表現型へのHSCの活性化のための主要な刺激物である。活性化HSCは、対照群についての画像において示される通り、アルファ平滑筋アクチンの発現によって同定され得る。6mg/mLの試験最高濃度での、活性化HSCの化合物1Bおよび化合物2Bでの処理により、アルファ平滑筋アクチン染色が低減した(図7)。

10

## 【0260】

血小板フローアッセイ。蛍光画像は、全血流下での100 $\mu$ g/mLの化合物1Bおよび化合物2Bによる血小板結合および阻害を示す。処理しなかったチャンネル1(非阻害対照)は、結合血小板でほぼ完全にカバーされたが、コンジュゲートで処理したチャンネルでは、結合した血小板の数が有意に減少した(図6)。

## 【0261】

本明細書に記載されるバイオコンジュゲート(boconjugate)は、驚くべきことに、肝星細胞に対して抗線維効果および抗増殖効果を示したが、このことは、サルフェートおよびペプチドを用いる化学修飾が、生物学的効果を有意に低減しないことを示す。

20

(実施例4)

## 四塩化炭素モデル

## 【0262】

本明細書に記載の化合物が肝線維症に影響を及ぼす能力を、毒性傷害としての四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)を使用するマウスモデルにおいて試験した。C57BL/6マウスに、鉱油中5%CCl<sub>4</sub>100 $\mu$ Lを週2回、合計4週間、腹腔内投与をした。その4週間の間、動物に、食塩水(ビヒクル)または試験物品(化合物1)のいずれかを週3回静脈内投与した。ある群の動物には、バルサルタンの毎日経口投与をした。最後に、いずれの試験物品もCCl<sub>4</sub>も受けなかった健康な動物の群は、正常な対照群として働いた。

30

## 【0263】

4週間の最後に、動物を屠殺し、肝臓を生化学的および組織学的分析のために収集した。ヒドロキシプロリンレベルを、図1に示す。CCl<sub>4</sub>投与は、正常な健康な動物と比較して、ヒドロキシプロリンレベルを増加させた。20mg/kgの化合物1を用いる処置では、ヒドロキシプロリンレベルが統計的に有意な度合いに低下した( $p < 0.05$ )。コラーゲン含量についての肝臓の組織学的分析を、シリウスレッド染色を使用して実施した。図2は、肝臓片の代表的画像を示しており、ビヒクルで処置した群のコラーゲン染色が、正常な健康な動物と比較して増加しており、化合物を用いる処置によってコラーゲン染色が低減していた。染色を定量し、図3に提示した。CCl<sub>4</sub>は、シリウスレッドによって組織学的に測定される通り、肝臓におけるコラーゲンレベルを増加させた。化合物1を用いる処置では、ビヒクル対照と比較してコラーゲン染色が有意に低減した。

40

(実施例5)

## 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデル

## 【0264】

肝線維症に影響を及ぼす本明細書に記載の化合物の能力を、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)のマウスモデルで試験した。C57BL/6マウスに、出生後にストレプトゾトシン200 $\mu$ gの単回皮下注射をした。4週齢に始めて、動物に高脂肪食を与えた。動物に、5週目から初めて9週目までの4週間継続的に、食塩水または化合物1を用いて3回/週で静脈内処置をした。別個の群の動物には、同じ期間中、テルミサルタンの毎日経口投与をした。9週齢目に動物を屠殺し、組織学的および生化学的分析のために肝臓を

50



収集した。

【0265】

コラーゲン含量に関する肝臓の組織学的分析を、シリウスレッド染色を使用して実施した。染色を定量し、図4に提示した。テルミサルタンまたは化合物1を用いる処置では、ビヒクルで処置した群と比較して、肝臓におけるコラーゲンレベルが低下した。

【0266】

肝臓トリグリセリドを、図5に示す。テルミサルタンおよび化合物1を用いる処置では、研究中の肝臓トリグリセリドが低減した。

*in vivo* 画像化系による分布

【0267】

分子を、蛍光標識して合成した。具体的には、CF633を、1:1の色素対主鎖の合成モル比で、ヒドラジドを介して主鎖に連結した。分子を、10mg/kgでヌードマウスに静脈内投与し、*in vivo* 画像化系 (IVIS) を使用して画像化した。異なる時点において、動物を麻酔し、IVISを使用して画像化して、標識化合物の体内分布を決定した。図8は、注射の5および60分後の化合物の局在を示す。腎臓、膀胱、または肝臓へのいずれかの局在は、化合物の分子量に依存して実証される。

【0268】

化合物の分布の差異は、sHA主鎖の分子量に関係していた。低分子量のsHA (28 kDa) 主鎖 (化合物3) は、腎臓、膀胱、ならびに肝臓において観測された。それとは対照的に、より高分子量のsHA (323 kDa) 主鎖 (化合物2) は、肝臓内だけに局在していることが見出され、膀胱でも腎臓でもいかなるシグナルも示さなかった。163 kDaのsHA主鎖 (化合物1) は、主に肝臓内に局在することが見出されたが、膀胱内でもわずかなシグナルを示した。これらの結果は、IVで投与した場合、sHA主鎖の分子量と分子の分布との間に驚くべき相関があり、したがって、およそ150 kDaの分子量のsHAは主に腎臓から排除され、その代わりに主に肝臓内に局在することを実証している。肝臓内のsHA-ペプチドコンジュゲートの局在は、親HA主鎖上の硫酸化およびペプチドコンジュゲーションを用いる化学修飾の未知の性質を考慮すると、予期せぬ知見でもあった。肝臓内に局在し、他の組織または器官では分布が相対的に少ないことは、肝臓疾患を標的にして全身作用を抑えられることが期待される、めったにない機会を提供する。

(実施例6)

VEGF成長因子結合

【0269】

VEGF189 (R&D Systems、8147-VE) を、1xPBS中1μg/ml溶液75μlを各ウェルに添加し、4で一晩インキュベートすることによって、96ウェルプレート (Corning、9018) 上にコーティングした。プレートを、PBST (0.02% Tween 20を含む1xPBS) 300μLを使用して3回洗浄した。次に、プレートをPBS中1%BSAで室温において1時間ブロッキングした。次に、ビオチン化分子を、PBST中1%BSAに100μg/mLで溶解させ、最終濃度0.1ng/mLに達するまで、1:10の連続希釈を実施した。次に、試料50μLを、プレートにおいて37、1時間インキュベートした。次に、プレートを、PBST中1%BSAで3回洗浄し、1%BSA PBST中1:500のストレプトアビジン-HRP (Thermo N504) 100μLと共に室温で20分間インキュベートした。次に、プレートをPBSTで3回洗浄し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (Abcam ab171527) 100μlを用いて、光から保護して室温で10分間発色させた。反応を、0.16M硫酸100μLを添加することによって停止させた。450nmにおける吸光度を、10分以内にプレートリーダーで読み取った。

【0270】

二糖1個当たり2.5個のサルフェート基で硫酸化したHA (s2.5HA、163 kDa) を、VEGF189への結合について試験し、およそ1nMのEC<sub>50</sub>を観測した

(図9)。同じ硫酸化HA主鎖をペプチドとコンジュゲートした場合(化合物1)、類似のEC<sub>50</sub>値が観測された。しかし、硫酸化しなかった類似のMWのHAは、VEGF189に結合しなかった。FGF2結合を試験するアッセイについても、同じ傾向が観測された。これらのデータは、HAの硫酸化によって成長因子への結合が増強され、驚くべきことに、ペプチドとの硫酸化HAのコンジュゲーション(the conjugation of sulfated HA with peptides)は、この結合を低減しないことを実証している。

(実施例7)

PDGF成長因子結合

【0271】

以下のアッセイ(成長因子結合および受容体会合(engagement))によって、様々な硫酸化HA主鎖が組換えPDGF-BBに結合し、その受容体会合を妨害するそれらの能力について評価する。PDGF-BBは、細胞表面上でその受容体であるPDGF-Rと相互作用することによって細胞シグナル伝達を誘発する、線維症に見出される非常に重要な炎症性メディエーターである。

【0272】

PDGF-BBの主な役割は、HSCの遊走および増殖を促進することである。また、マウスおよびヒトの両方における活性化HSC(筋線維芽細胞)は、高度に上方制御されたPDGF-Rの発現を有することが示されている。活性化HSCはまた、PDGF-BBを生成して、自己分泌線維化促進ループをもたらす。最後に、PDGF-BB/PDGF-Rシグナル伝達は、TGF- $\beta$ の線維化促進シグナル伝達を相乗的に制御する。PDGFおよびTGF- $\beta$ は、共に肝線維症を媒介する重要な成長因子を構成する。

【0273】

本明細書で提供されるデータは、化合物1が、卓越した成長因子イソ型(PDGF-BB)および受容体(PDGF-R)会合を阻害することを実証している。さらに化合物1は、他のイソ型PDGF-AA、PDGF-CC、およびPDGF-DDへも結合する。このデータに基づくと、化合物1は、あらゆるPDGF異性体による受容体会合を、それらに結合し隔離することによって阻害することが企図される。

成長因子結合アッセイ法

【0274】

化合物1がPDGFのすべての異性体にin vitroで結合する能力を決定するために、R&D systemsからの組換えPDGF(AA、BB、CC、およびDD)を使用してELISAを開発した。簡潔には、PDGFの4つのすべての異性体を、製造者のプロトコルに従って復元し、Costar高結合プレートにおいて1 $\mu$ g/mLのコーティング濃度で個々に吸着させた。48で一晩のインキュベーション後、任意の非結合PDGFを、1xPBS Tween(0.02%)洗浄バッファーですすぐことによって除去した。次に、プレートを1xPBS中1%BSAで25 $^{\circ}$ Cにおいて1時間ブロッキングした。化合物1B(ペプチド負荷およびビオチンを伴う機能化SHA)、ゼロのペプチド修飾のグリカン主鎖(sHA-OPM)、またはペプチド単独(検出のためにビオチンですべて標識した)を、1%BSA 1xPBS Tween(0.02%)で100 $\mu$ g/mLから0.0001 $\mu$ g/mLに連続希釈した。次に、分子希釈物を、PDGFでコーティングしたウェルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。この後、任意の非結合分子を、プレートを1%BSA 1xPBS Tween(0.02%)で3回すすぐことによって除去した。次に、ビオチン標識を伴う結合分子を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートしたストレプトアビジンを用いてプローブした。洗浄後、プレートを、テトラメチルベンジジン(TMB)基質を使用して発色し、酸溶液を用いて反応を停止させた。プレートウェル吸光度を、BioTek Synergy H4マルチモードプレートリーダーを使用して450nmで測定した。

【0275】

このin vitroアッセイにおいて、化合物1Bは、PDGFのすべてのイソ型に様々な度合いで結合することが観測された(図10~13を参照されたい)。

## 【0276】

驚くべきことに、試験した化合物は、表3に列挙されるEC<sub>50</sub>によって示される通り、ある特定のイソ型への選択性を示したことが見出された。要約すると、化合物1Bは、PDGF-BB、PDGF-DD、およびPDGF-CCのそれぞれよりも良好に、PDGF-AAに結合する。sHA-OPMは、PDGF-BBおよびPDGF-DDよりも良好にPDGF-AAに結合することも観測された。このアッセイでは、PDGF-CC結合は検出されなかった。この研究に基づくと、非硫酸化HAおよびペプチド単独は、*in vitro*でいかなるPDGFイソ型にも結合しない。さらに、sHAへのペプチドのコンジュゲーションは、機能化sHA-OPMと比較した場合、PDGF-CCおよびPDGF-DDへの結合を改善する。

## 【0277】

## 【表3】

表3: *in vitro*での様々なPDGFイソ型についてのEC<sub>50</sub>( $\mu$ M)値。

分子	PDGF-AA	PDGF-BB	PDGF-CC	PDGF-DD
化合物1B	0.00068	0.0012	0.069	0.0059
sHA-OPM	0.00029	0.0007	-	0.16
ペプチド単独	-	-	-	-
HA	-	-	-	-

## 成長因子受容体会合

## 【0278】

異なる度合いの硫酸化および/またはペプチド負荷を有する化合物1または機能化グリカン主鎖（本明細書でコンジュゲートと呼ばれる）を、PDGF-RへのPDGF-BBの結合の阻害を測定するように設計された競合的ELISAアッセイで試験した。組換えヒトPDGF-R Fcキメラタンパク質およびビオチン標識PDGF-BB（R&D Systems）を、製造者のプロトコールに従って復元した。PDGF-R Fcキメラタンパク質を、Costar高結合プレートにおいてコーティング濃度1nMで4、一晩吸着させた。プレートを1xPBS中1%BSAを使用して25℃で1時間ブロッキングした後、非結合PDGF-R Fcを、1xPBS Tween（0.02%）洗浄バッファーですすぐことによって除去した。化合物1およびコンジュゲートを、1%BSA 1xPBS Tween（0.02%）中2倍濃度で調製した（結果1および2については、4000 $\mu$ g/mL~0.002 $\mu$ g/mLの範囲の連続希釈、以下の結果3については、2mg/mLの単一濃度（アッセイした有効ウェル濃度=1mg/mL））。PDGF-BB原液も、2倍濃度の20ng/mLで調製した。コンジュゲートおよびPDGF-BBを、同体積のそれぞれを室温で30分間インキュベートすることによって、1:1で一緒に混合した。次に、プレインキュベートした溶液を、PDGF-R Fcでコーティングされたプレートに添加し、37℃で1時間結合させた。次に、プレートを1%BSA 1xPBS Tween（0.02%）で3回すすいだ。結合したビオチン標識PDGF-BBを、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）とコンジュゲートしたストレプトアビジンを使用して検出した。洗浄後、テトラメチルベンジジン（TMB）基質をウェルに添加して、発色させた。反応を、酸溶液を用いて停止させ、吸光度を、Biotek Synergy H4マルチモードプレートリーダーを使用して450nmで測定した。阻害度が高いほど、プレート上の受容体に結合するPDGF-BBは少ないはずであり、したがってシグナルの読み取り値は、より低いはずである。コンジ

ユゲートの吸光度の参照に対する比を、結果 3 に記録した。

【 0 2 7 9 】

化合物 1 ( 3 0 個のペプチド負荷による機能化 s H A は、およそ 8 %、または 8 ~ 1 2 % ペプチド機能化を結果として生じる ) は、*in vitro* で P D G F - B B ( リガン  
ド ) がその受容体である P D G F - R に結合するのを阻害する ( 図 1 4 )。グリカンに  
コンジュゲートしたペプチドの平均数は、「ペプチド負荷」で示されるよりも少ないこと  
が企図される。例えば、3 0 P M コンジュゲートにおけるグリカンにコンジュゲートした  
ペプチドの平均数は、グリカン 1 個当たりペプチド約 2 0 ~ 2 5 個であり、約 8 ~ 1 2 %  
の修飾に相当し得ると考えられる。驚くべきことに、s H A ( 機能化または非機能化 ) は  
、これを阻害しない。以前に図 1 1 において、機能化 s H A - 0 P M が、*in vitro* で P D G F - B B に結合することが示された。しかし図 1 4 のデータに基づくと、P D  
G F - B B への s H A - 0 P M の結合は、その受容体の相互作用を妨害しないようである  
。

10

【 0 2 8 0 】

機能化 s H A に対するペプチド負荷を増加させると、*in vitro* で P D G F - B  
B のその受容体への結合を阻害するその能力が増加することも示されている ( 図 1 5 )。

【 0 2 8 1 】

これらの結果は、機能化 H A の硫酸化度が、*in vitro* アッセイにおいて P D G  
F - B B の受容体会合を妨害するその能力に影響を及ぼすことを示している。一般に、同  
じペプチド負荷では、硫酸化度を増加させると、*in vitro* で P D G F - B B のそ  
の受容体への結合の阻害が増加する。以下の表に列挙される通り、2 . 3 ~ 2 . 4 の硫酸  
化度を有する化合物による阻害は、1 . 4 または 0 の硫酸化度を有する化合物による阻害  
を上回った。

20

【 0 2 8 2 】

ペプチド負荷を増加させると、P D G F - B B のその受容体への結合の阻害は改善され  
、上の知見がさらに裏付けられることも見出された。

【 0 2 8 3 】

表 4 は、吸光度 4 5 0 コンジュゲート / 吸光度 4 5 0 参照の比を示す。太字の記入は、  
反応における類似量の参照化合物 1 と比較した場合、類似のまたはそれよりも良好な、P  
D G F - B B の受容体への結合を示す。網掛けのセルは、より高い阻害または P D G F -  
B B の受容体への結合の低減を示す。

30

【 表 4 】

表 4

ペプチド負荷	HA108 主鎖				HA163 主鎖
	HA	s1.4HA	s2.3HA	s2.4HA	s2.5HA
EDU なし	-	-	-	-	12.49
0PM	<b>17.27</b>	12.66	11.46	11.36	<b>16.40</b>
10PM	<b>16.96</b>	<b>15.05</b>	7.18	7.46	4.82
20PM	<b>16.33</b>	12.83	5.17	4.11	-
30PM	14.18	13.33	2.64	5.18	-
50PM	9.31	13.42	1.48	1.52	-
60PM	-	-	-	-	0.53

40

( 実施例 8 )

チオアセトアミド ( T A A ) モデル

50

## 【0284】

重症肝線維症を、ラットにおいて100～150mg/kgの間の濃度で週3回、合計8週間IP投与した毒素チオアセトアミドによって誘導した。5週目から、3つの異なる用量の化合物1またはsHA-OPM（ペプチドなし）のいずれかの試験物品の投与を開始し、週1回IV送達した。8週間の最後に、動物を屠殺した。血漿を収集し、肝臓バイオマーカーについて測定した。肝臓を、ヒドロキシプロリンによって測定される全コラーゲンの生化学的分析のために分離、またはシリウスレッド染色によって線維症を評価するための組織学的検査のために処理した。

## 【0285】

線維症を、0が線維症なしを示し、6が重症線維症を示す0～6の尺度を使用して、組織学的にスコア化した。ビヒクル対照で処置した動物の70%が、モデルの重症度を示す最高レベルの線維症にランク付けされた。化合物を用いる処置によって、ビヒクルで処置した動物と比較して高スコアの線維症の発生が低減した（図16）。線維症のこの低減は、逆用量応答へと向かう全体的な傾向を伴って、試験したすべての用量の化合物1で生じた。sHA-OPMの投与によって、線維症スコアが一部低減したが、化合物1ほどではなかった。さらに、アスピリンを血小板阻害のための陽性対照として使用し、その使用によって線維症スコアが低減した。

## 【0286】

アルカリホスファターゼ（ALP）の血清レベルも、研究中に測定した。ALPは、典型的に、胆汁うっ滞性または代謝的肝損傷の尺度として使用される。試験物品を2週間投与した後、ALPは、30mg/kgの化合物1による処置によって有意に低減したが（図17）、より低用量の化合物1では、ALPに対して有意な効果はなかった。sHA-OPMは、実際、ALPを有意に低減した。ALPに対するこの効果は、処置期間の途中で生じたが、この重症モデルでは研究を通して持続していなかった。ALPレベルの低下は、モデルにおいて期待された結果ではなかった。さらに、研究の途中のALPレベルの用量依存的効果は、予想外なことに、研究エンドポイントにおいて線維症スコアに見出される逆用量応答とは対照的である。

## 【0287】

追加の線維症データは、コラーゲン染色の組織学的定量を介して、または肝臓のコラーゲンの生化学的分析においてのいずれかで、線維症の量を定量することを含み得る。化合物1は、コラーゲンのこれらの尺度を低減すると期待される。さらに化合物1は、他のより軽度の線維症モデル（四塩化炭素モデル）における化合物1による処置で見られた通り、コラーゲンのmRNAレベル、ならびにプロコラーゲンIIIの血清レベルを低減することもできる。さらに化合物1は、PDGFRb、アルファ平滑筋アクチン、または線維症と関連することが公知の任意の他のマーカーなどの線維症の他のバイオマーカーを低減することができる。

（実施例9）

硫酸化研究

コラーゲンI結合アッセイ

## 【0288】

ラット尾モノマーコラーゲンI（Corning）を、0.2N氷酢酸を使用して50μg/mLの作業濃度に希釈した。Costar高結合プレートを、希釈したラット尾コラーゲンIで4において一晚コーティングした。プレートを1xPBST（0.05%）中1%BSAを使用して25で1時間ブロッキングした後、非結合コラーゲンを、1xPBSTween（0.05%）洗浄バッファーですすぐことによって除去した。化合物1および様々な度合いの硫酸化およびペプチド負荷のバイオコンジュゲートの連続希釈物（表5）を、1%BSA1xPBST（0.05%）中4000μg/mL～0.064μg/mLの範囲の2倍濃度で調製した。ビオチンでタグ付けした化合物1B原液も、8μg/mLの2倍濃度で調製した。試験バイオコンジュゲートおよび化合物1Bを、1:1の体積比で合わせ、室温で5分間インキュベートした。次に、ブレインキューバー

トした溶液を、コラーゲンでコーティングしたプレートに添加し、25℃で15分間結合させた。プレートを、1×PBST(0.05%)で3回すすぎ、1×PBST(0.05%)中5%BSAで25℃において1時間ブロッキングした。化合物1Bを、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートしたストレプトアビジンを使用して検出した。洗浄後、テトラメチルベンジジン(TMB)基質をウェルに添加して、発色させた。反応を、酸溶液を用いて停止させ、吸光度を、BioTek Synergy H4マルチモードプレートリーダーを使用して450nmで測定した。

【表5】

表5

	ペプチド負荷				
DOS	0	10	20	30	50
0	27.78	14.76	2.82	13.41	7.49
1.4	1000	161.28	1000	1.96	1000
2.3	53.88	1000	4.90	0.79	0.80
2.4	42.19	1000	0.50	0.43	0.25

10

20

30

40

50

【0289】

上の表5は、競合的コラーゲンI結合アッセイからのIC<sub>50</sub>試料/IC<sub>50</sub>化合物1の比を示す。比1は、化合物1と類似しているか、または化合物1よりも強力な結合を実証している。比>1は、化合物1よりも弱いコラーゲンへの結合を実証している。データは、コラーゲン結合が、ペプチド負荷の増加と共に増加することを、ならびに硫酸化度2.3および2.4では、主鎖当たりのペプチドの増加は、化合物1で見られたものと類似したコラーゲンへの結合を実証していることを示している。このことは、硫酸化度(DOS)およびペプチド負荷の両方が、コラーゲンへの結合の決定において相乗的な役割を果たすことを実証している。

肝星細胞増殖アッセイA

【0290】

この研究は、肝星細胞(HSC)増殖に対する、化合物1および様々な度合いの硫酸化およびペプチド負荷のバイオコンジュゲートの効果を実証する。初代ヒト肝星細胞(HSC)を、Sciencell Research Labs(San Diego, CA, USA)から得た。これらの細胞は継代1で提供されたものであり、したがって活性化表現型を示した。細胞を、2%ウシ胎仔血清を含有する、Sciencell Research Labsによって提供された培地中、95%空気、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中で、ポリ-L-リシンでコーティングされたT-75フラスコで増やした。細胞は75~80%コンフルエンスに成長させ、すべての実験において使用するためにP2で凍結保存した。

【0291】

組織培養処理した96ウェルのμ-プレート(Ibidi)を、95%空気、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中、50μg/mLのChrono-Par線維性コラーゲンIで2時間コーティングした。2時間のインキュベーション後、プレートを無菌1×PBSTを用いて手作業ですすいで、任意の過剰の線維性コラーゲンを除去した。次に、プレートを、0.5%ウシ胎仔血清を含有する、Sciencell Research Labsによって提供された培地、1ウェル当たり30μLを用いてプレインキュベートした。P2で凍結保存した細胞を解凍し、実験のために同じ低血清含有培地で復元した。細胞を

、線維性コラーゲンでコーティングされたウェル上に、1ウェル当たり30μL中6000個の細胞の播種密度で播種し、2～3時間付着させた。細胞付着を、Leica位相差顕微鏡を用いて画像化することによって確認した。TGF-β (R&D Systems) を、製造者のプロトコールに従って還元した。次に、1ウェル当たり30ng/mLのTGF-β 30μLを、各ウェルに添加し、プレートを、95%空気、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中で一晩インキュベートした。化合物1および様々な度合いの硫酸化およびペプチド負荷のコンジュゲートの原液を、1000、100、10、および1μg/mLの濃度で調製した。TGF-β 刺激の20時間後、培地を、1ウェル当たり80μLの調製した希釈物で置き換えた。陰性対照ウェルを、1ウェル当たり80μLの低血清培地で処理した。細胞を、95%空気、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中で48時間成長させた。細胞増殖を、48時間にCyQuant Directアッセイキットを使用して評価した。蛍光強度測定値を、Molecular Devices M5マルチモードプレートリーダーを使用して記録した。

10

20

#### 【0292】

ゼロ(s0HA)、1.4(s1.4HA)、2.3(s2.3HA)、および2.4(s2.4HA)の範囲の硫酸化度のHA主鎖を合成し、ペプチド負荷0、10、20、30、または50とコンジュゲートした。化合物1は、硫酸化度2.5のHA主鎖および30個のペプチドのペプチド負荷からなる。図18からわかる通り、硫酸化度およびペプチド負荷の両方が、HSCの増殖阻害に対して相乗効果を有する。低ペプチド負荷を伴う低硫酸化度は、化合物1と同様に阻害しないが、より低い硫酸化度のコンジュゲートへのペプチド負荷を増加させると、増殖を阻害するその能力が回復する。

#### 【0293】

表6は、1000μg/mLの濃度で試験した、化合物1および様々な度合いの硫酸化(DOS)およびペプチド負荷のバイオコンジュゲートによるHSCの増殖阻害パーセントを示している。

#### 【表6】

表6

	ペプチド負荷				
DOS	0	10	20	30	50
0	9.57	21.25	20.51	29.46	25.53
1.4	36.69	44.11	34.10	27.20	29.52
2.3	33.66	38.89	39.31	48.82	53.70
2.4	38.96	42.12	47.51	51.62	52.85
2.5	x	x	x	64.25	x

30

40

#### 【0294】

データは、HA主鎖の硫酸化度を増加させると、主鎖によって媒介されるHSCの増殖阻害が増加することを示している。硫酸化度2.3および2.4では、ペプチド負荷を増加させると、化合物1によって観測されたものと類似したHSCの増殖阻害が得られる。このことは、硫酸化度およびペプチド負荷の両方が、生物活性を決定するのに相乗的な役割を有することを実証している。

肝星細胞増殖アッセイB

#### 【0295】

50

この研究は、化学修飾なしの主鎖（非硫酸化HA）が、化合物1と同様にHSC増殖を阻害することを示す。初代ヒトHSCを、Sciencell Research Labs（San Diego, CA, USA）から得た。これらの細胞は継代1で提供されたものであり、したがって活性化表現型を示した。細胞を、2%ウシ胎仔血清を含有する、Sciencell Research Labsによって提供された培地中、95%空気、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中で、ポリ-L-リシンでコーティングされたT-75フラスコで増やした。細胞は75~80%コンフルエンスに成長させ、すべての実験において使用するためにP2で凍結保存した。

#### 【0296】

組織培養処理したCostar 96ウェルを、95%空気、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中、50 µg/mLのChrono-Par線維性コラーゲンIで2時間コーティングした。2時間のインキュベーション後、プレートを無菌1xPBSを用いて手作業ですすいで、任意の過剰の線維性コラーゲンを除去した。次に、プレートを、0.5%ウシ胎仔血清を含有する、Sciencell Research Labsによって提供された培地、1ウェル当たり100 µLを用いてプレインキュベートした。P2で凍結保存した細胞を解凍し、実験のために同じ低血清含有培地で復元した。細胞を、線維性コラーゲンでコーティングされたウェル上に、1ウェル当たり100 µL中6000個の細胞の播種密度で播種し、2~3時間付着させた。細胞付着を、Leica位相差顕微鏡を用いて画像化することによって確認した。TGF-β（R&D Systems）を、製造者のプロトコールに従って復元した。次に、1ウェル当たり30 ng/mLのTGF-β100 µLを、各ウェルに添加し、プレートを、95%空気、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中で一晩インキュベートした。化合物1、ならびに修飾したおよび修飾なしの主鎖の原液を、1000~0.001 µg/mLの範囲の濃度で調製した。TGF-β刺激の20時間後、培地を、1ウェル当たり200 µLの調製した希釈物で置き換えた。陰性対照ウェルを、1ウェル当たり200 µLの低血清培地で処理した。細胞を、95%空気、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中で48時間成長させた。細胞増殖を、48時間にCyQuant Directアッセイキットを使用して評価した。蛍光強度測定値を、Molecular Devices M5マルチモードプレートリーダーを使用して記録した。

#### 【0297】

図19は、肝星細胞（HSC）増殖に対する、化合物1、主鎖（化学的誘導体化なし、すなわち硫酸化なし）、および主鎖（0のペプチド修飾、「sHA-0PM」）の効果を実証する用量範囲研究を示す。化学修飾なしの主鎖は、化合物1と同様にHSC増殖を阻害する。HA主鎖を硫酸化すると、HSC増殖を阻害するその能力が低下する。ペプチドを硫酸化主鎖に付加すると（例えば、化合物1）、生物活性の喪失が回復する。したがって、HA主鎖のペプチド負荷および硫酸化度の両方は、HSC増殖の阻害に相乗的な役割を果たす。



【 図 1 】

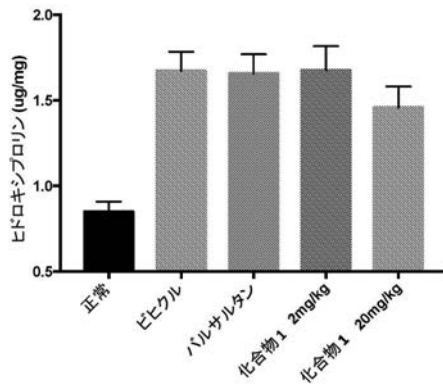


Figure 1

【 図 2 】

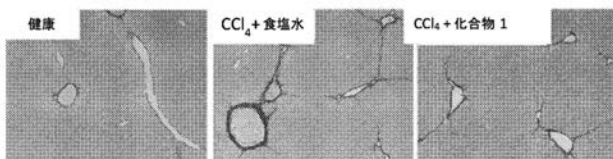


Figure 2

【 図 4 】

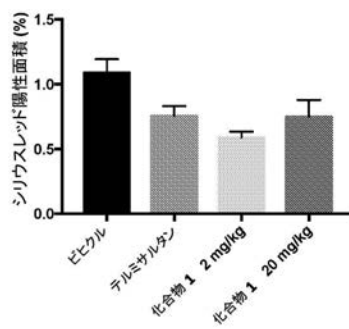


Figure 4

【 図 5 】

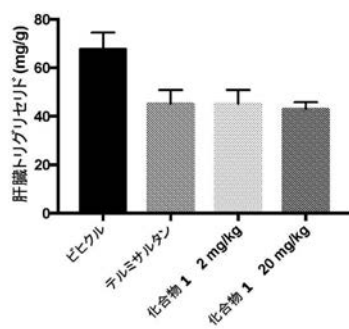


Figure 5

【 図 3 】

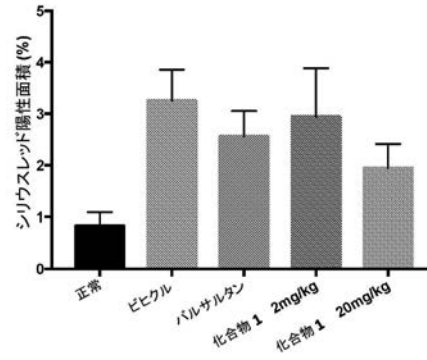


Figure 3

【 図 6 】

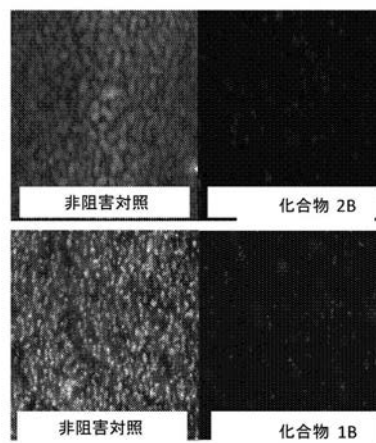


Figure 6

【 図 7 】

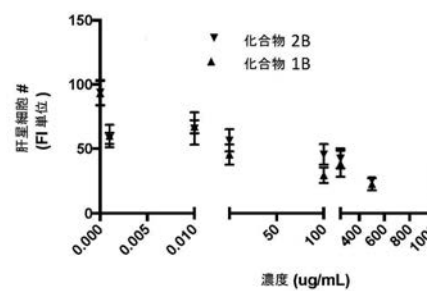


Figure 7

【 図 8 】

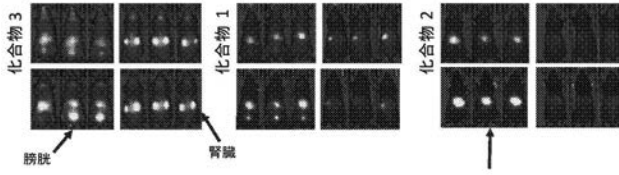


Figure 8

【 図 9 】

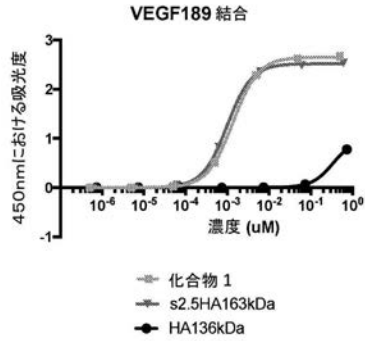


Figure 9

【 図 10 】

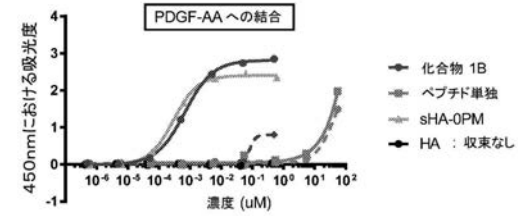


Figure 10

【 図 11 】

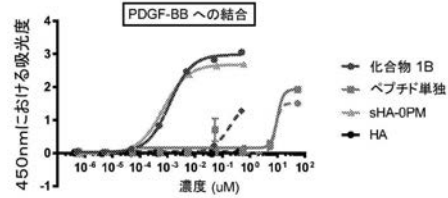


Figure 11

【 図 12 】

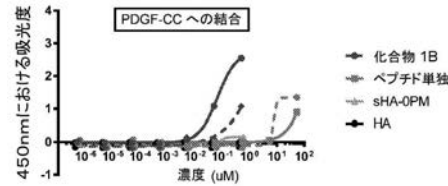


Figure 12

【 図 13 】

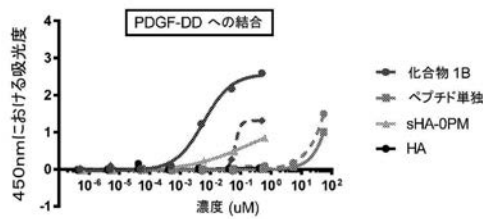


Figure 13

【 図 15 】

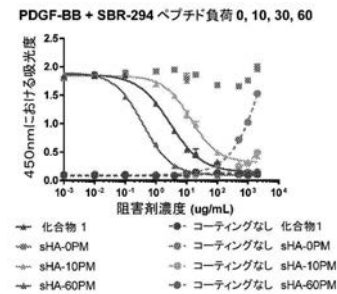


Figure 15

【 図 14 】

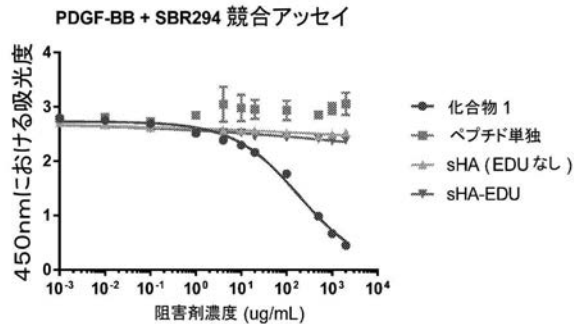


Figure 14

【 図 16 】

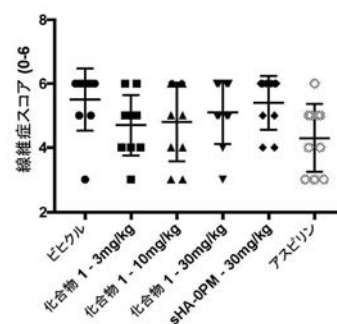


Figure 16

【図 17】

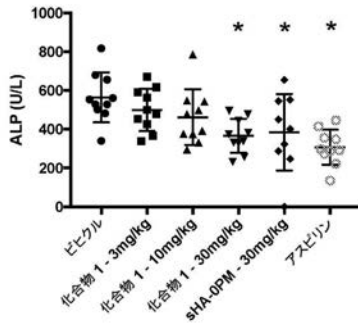


Figure 17

【図 18】

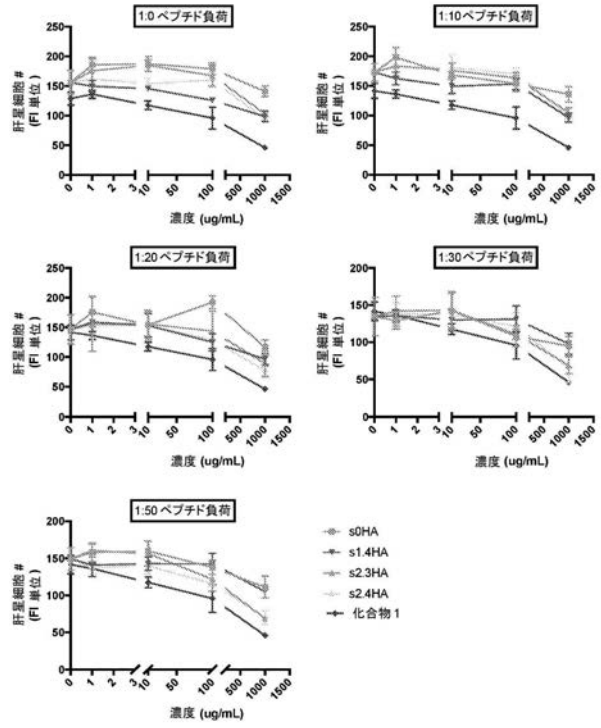


Figure 18

【図 19】

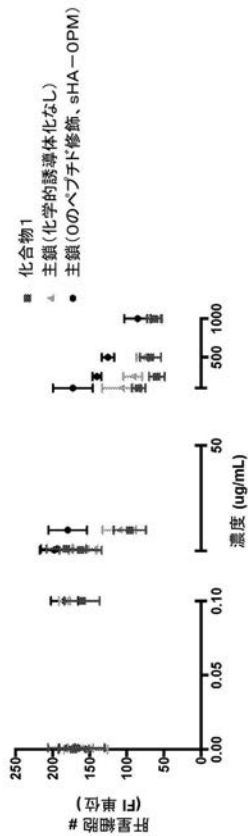


Figure 19

【配列表】

2020526493000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/041280

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 31/737; A61K 38/014; A61K 38/04; A61K 38/39; A61L 33/08; A61P 1/16 (2018.01)

CPC - A61K 31/737; A61K 38/014; A61K 38/04; A61K 38/39; A61L 33/08; A61P 1/16; C08B 37/0063; C08B 37/0072 (2018.08)

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

USPC - 424/422; 424/493; 514/54; 514/56; 514/59; 536/123; 536/123.1 (keyword delimited)

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.
Y	US 2016/0331841 A1 (SYMIC IP, LLC) 17 November 2016 (17.11.2016) entire document	1-16, 33-39
Y	US 6,051,701 A (CIALDI et al) 18 April 2000 (18.04.2000) entire document	1-16, 33-39
A	SCHUPPAN et al. "Matrix as a Modulator of Hepatic Fibrogenesis," Semin Liver Dis, 01 August 2001 (01.08.2001), Vol. 21, No. 3, Pgs. 351-372. entire document	1-16, 33-39
A	STUART et al. "Collagen-Binding Peptidoglycans Inhibit MMP Mediated Collagen Degradation and Reduce Dermal Scarring," PLoS One, 11 July 2011 (11.07.2011), Vol. 6, Iss. 7, e22139, Pgs. 1-8. entire document	1-16, 33-39
A	US 2015/0031619 A1 (SYMIC BIOMEDICAL, INC.) 29 January 2015 (29.01.2015) entire document	1-16, 33-39

☐ 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

"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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2018

Date of mailing of the international search report

15 NOV 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/041280

**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.: 17-32, 40-46  
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:

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.:

**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.

## フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

2. TWEEN

(72)発明者 パデリ, ジョン エリック  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エメリービル, ホートン ストリート 59  
80, スイート 600, サイミック バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 プレストウィッチ, グレン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エメリービル, ホートン ストリート 59  
80, スイート 600, サイミック バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 スチュアート, キャサリン アリソン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エメリービル, ホートン ストリート 59  
80, スイート 600, サイミック バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 カブラ, ハルシャ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エメリービル, ホートン ストリート 59  
80, スイート 600, サイミック バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 イクワ, エルヴィス  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エメリービル, ホートン ストリート 59  
80, スイート 600, サイミック バイオ, インコーポレイテッド 気付

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC21 EE30 EE37 EE43 EE59

4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA34 MA05 NA13 ZC211 ZC411

4H045 AA10 AA20 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19

BA20 BA21 EA28 FA20 FA50