

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-542779
(P2024-542779A)

(43)公表日 令和6年11月15日(2024.11.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	Z N A	4 C 0 8 1
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02		
A 6 1 L	33/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全69頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-532976(P2024-532976)			(71)出願人	507002516
(86)(22)出願日	令和4年12月2日(2022.12.2)				アンスティチュート、ナショナル、ドゥ
(85)翻訳文提出日	令和6年7月31日(2024.7.31)				、ラ、サンテ、エ、ドゥ、ラ、ルシェル
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/084241				シュ、メディカル
(87)国際公開番号	WO2023/099748				INSTITUT NATIONAL D
(87)国際公開日	令和5年6月8日(2023.6.8)				ELA SANTE ET DE LA R
(31)優先権主張番号	PCT/IB2021/000860				ECHERCHE MEDICALE
(32)優先日	令和3年12月3日(2021.12.3)				フランス・7 5 0 1 3・パリ・リュ・ド
(33)優先権主張国・地域又は機関	国際事務局(IB)				ゥ・トルビアク・1 0 1
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			(71)出願人	520053762
					ユニヴェルシテ・パリ・シテ
					UNIVERSITE PARIS CI
					TE
					フランス共和国, 7 5 0 0 6 パリ, ブ
					ールパール サン＝ジェルマン 8 5 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血管内ステント用の生体模倣コーティング

(57)【要約】

血管内ステント用の生体模倣コーティング

本発明者らは、移植されたデバイスと接触できるすべての健康な内皮細胞および休止血小板および白血球上での無傷のCD31分子の結合を可能にするペプチドを合成した。したがって、これらの細胞は、循環および血管新生組織の恒常性を維持するために不可欠なCD31のトランスホモフィリック結合によって伝達される「leave-me-alone」シグナルを受け取ることができる。血栓性または生命を脅かす出血性または血栓塞栓性合併症の発生は、血管内デバイスの使用を妨げてきた。本発明の模倣ペプチドを有するデバイスは、血小板および白血球によって健康な内皮、すなわち「自己」成分として認識されるため、迅速に統合される。さらに、生理的な内皮細胞表現型で迅速に内皮化されるそれらの能力も、デバイス移植部位での血小板および白血球の活性化を長期的に制限する。したがって、本発明は、トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣するペプチドに関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣するペプチド。

【請求項 2】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1の細胞間相互作用を模倣するペプチドであって、以下の配列の1つを含む、請求項1に記載のペプチド：

a)

【表 1】

QHXXLFYKDDXXFYNISSXX	配列番号 5 3
----------------------	----------

10

ここで、互いに独立して、

1 QはQ、C、L、K、またはRのいずれか1つであってもよく、

2 HはH、I、V、QまたはRのいずれか1つであってもよく、

5 LはL、R、V、FまたはEのいずれか1つであってもよく、

9 DはD、EまたはNのいずれか1つであってもよく、

1 3 FはF、V、LまたはIのいずれか1つであってもよく、

1 4 YはY、H、RまたはNのいずれか1つであってもよく、

1 5 NはNまたはDのいずれか1つであってもよく、

1 6 IはI、V、TまたはAのいずれか1つであってもよく、

1 7 SはSまたはTのいずれか1つであってもよく、

1 8 SはSまたはTのいずれか1つであってもよく、他のアミノ酸Xは任意の他のアミノ酸であってもよい；または

20

b)

【表 2】

YKSTVIXNNKEKTTXE	配列番号 5 4
------------------	----------

ここで、互いに独立して、

2 Kは、KまたはRのいずれか1つであってもよく、

3 SはSまたはCのいずれか1つであってもよく、

4 TはT、RまたはSのいずれか1つであってもよく、

5 VはVまたはAのいずれか1つであってもよく、

6 IはI、K、V、L、TまたはSのいずれか1つであってもよく、

8 NはN、SまたはDのいずれか1つであってもよく、

9 NはN、S、KまたはRのいずれか1つであってもよく、

1 1 EはE、Q、V、KまたはMのいずれか1つであってもよく、

1 2 KはKまたはRのいずれか1つであってもよく、

1 3 TはT、AまたはPのいずれか1つであってもよく、

1 4 TはTまたはSのいずれか1つであってもよく、

1 6 EはE、A、QまたはDのいずれか1つであってもよく、他のアミノ酸Xは任意の他のアミノ酸であってもよい；または

30

40

c)

【表 3】

PXCTLDKKEXIQGGXVXVNCSPVEEK	配列番号 5 5
----------------------------	----------

ここで、互いに独立して、

3 CはC、V、MまたはIのいずれか1つであってもよく、

50

4 TはT、I、MまたはEのいずれか1つであってもよく、

5 LはLまたはVのいずれか1つであってもよく、

6 DはDまたはNのいずれか1つであってもよく、

7 KはKまたはRのいずれか1つであってもよく、

8 KはK、T、M、RまたはIのいずれか1つであってもよく、

11 IはI、T、M、VまたはEのいずれか1つであってもよく、

12 QはQまたはEのいずれか1つであってもよく、

14 GはGまたはEのいずれか1つであってもよく、

16 VはVまたはIのいずれか1つであってもよく、

18 VはVまたはIのいずれか1つであってもよく、

19 NはN、T、R、S、GまたはHのいずれか1つであってもよく、

22 VはV、MまたはLのいずれか1つであってもよく、

23 PはP、Q、K、E、LまたはRのいずれか1つであってもよく、

24 EはE、GまたはNのいずれか1つであってもよく、

26 KはK、Q、E、RまたはNのいずれか1つであってもよく、他のアミノ酸Xは任意の他のアミノ酸であってもよい。または

d) a) から c) の任意の組み合わせ、特に a) と b) の組み合わせ、および a) と c) の組み合わせ。

【請求項3】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1または2に記載のペプチドであって、以下の配列の1つを含む、ペプチド。

10

20

30

40

50

【表 4】

アミノ酸性配列	配列番号
HQMLFYKDDVLFYNISS	4
YKSTVIVNNKEKTAE	5
PRVTLDDKKEAIQGGIVRVNSSVP	6
HQMLFYKDDVLFYNISSC	7
SHQMLFYKDDVLFYNISSS	8
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK	9
CHQMLFYKDDVLFYNISSCK	10
YKDDVLFYNISSMKST	11
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	12
FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMK STESYFIPEVRIYDSGTYK	13
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVR IYDSGTYKSTVIV	14
YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTY KSTVIV	15
HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIY DSGTYKSTVIV	16
LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF	17
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	18
QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK、hC=ホモシステイン	28
YKSTVIVNNKEKTAE	19
DDVLFYNISSMK	20
QHQMLFY	21
CYKSTVIVNNKEKTAEYC	22
hCYKSTVIVNNKEKTAEYhC、hC=ホモシステイン	23
GTYKSTVIVNNKEKTAEYQ	24
PRCTLDKKEAIQGGIVRVNCSVP	25
RDQNFVILEFP	26

【請求項 4】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1に記載のペプチドであって、前記配列のうちの2つを含む、ペプチド。

【請求項 5】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1に記載のペプチドであって、
構造（IA）に基づくペプチド、

10

20

30

40

50

【表 5】

アミノ酸配列 (I A)	配列番号
HQMLFYKDDVLFYNISSC	7
SHQMLFYKDDVLFYNISSS	8
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK	9
CHQMLFYKDDVLFYNISSCK	10
YKDDVLFYNISSMKST	11
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	12
FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMK STESYFIPEVRIYDSGTYK	13
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVR IYDSGTYKSTVIV	14
YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTY KSTVIV	15
HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIY DSGTYKSTVIV	16
LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF	17
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	18
QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	28
hC=ホモシステイン	

10

20

および構造 (I B) に基づくペプチド、

【表 6】

アミノ酸配列 (I B)	配列番号
YKSTVIVNNKEKTAE	19
DDVLFYNISSMK	20
QHQMLFY	21
CYKSTVIVNNKEKTAEYC	22
hCYKSTVIVNNKEKTAEYhC	23
GTYKSTVIVNNKEKTAEYQ	24
hC=ホモシステイン	

30

または

構造 (I A) に基づくペプチド、

40

50

【表 7】

アミノ酸配列 (IA)	配列番号
HQMLFYKDDVLFYNISSC	7
SHQMLFYKDDVLFYNISSS	8
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK	9
CHQMLFYKDDVLFYNISSCK	10
YKDDVLFYNISSMKST	11
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	12
FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMK STESYFIPEVRIYDSGTYK	13
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVR IYDSGTYKSTVIV	14
YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTY KSTVIV	15
HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIY DSGTYKSTVIV	16
LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF	17
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	18
QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	28
hC=ホモシステイン	

10

20

および構造 (IC) に基づくペプチド

【表 8】

アミノ酸配列 (IC)	配列番号
PRCTLDKKEAIQGGIVRVNCSVPE EK	25

30

を含む、ペプチド。

【請求項 6】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1～5のいずれか一項に記載のペプチドであって、以下の配列を含むことを特徴とする、ペプチド。

【表 9】

アミノ酸配列	配列番号
GTYSKSTVIVNNKEKTTAEYQおよびQHQM LFYhCDDVLFYNISSMK	24および28 (配列番号37および38)
PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEKお よびQHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	6および28 (配列番号39および40)

40

【請求項 7】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1～6のいずれか一項に記載のペプチドであって、環状ペプチドである、ペプチド。

50

【請求項 8】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1～7のいずれか一項に記載のペプチドであって、任意の末端にリンカーおよび／またはスペーサーおよび／または尾部を含むか、あるいはアミノ酸残基に結合されている、ペプチド。

【請求項 9】

前記リンカーおよび／またはスペーサーおよび／または尾部が以下のものまたはそれらの組み合わせに代表される、請求項1～8のいずれか一項に記載のトランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣するペプチド。

【表 10】

10

GGSGGSGG	配列番号 27
1つ以上のPEG 4ユニット	
1つ以上のTtdsユニット	

【請求項 10】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1～9のいずれか一項に記載のペプチドであって、C末端および／またはN末端に修飾を含む、ペプチド。

【請求項 11】

20

前記修飾が以下から選択される、請求項10に記載の医療デバイス。

【表 11】

Ac-
Br-CH ₂ -CO-
CH ₂ -CO-
CH ₂ -CONH ₂ -
Ac-K (N ₃)
-NH ₂
-CO-NH ₂

30

【請求項 12】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1～11のいずれか一項に記載のペプチドであって、以下のいずれか1つの修飾を含む、ペプチド：

- ・システイン残基が対応するホモシステインで置換されてもよい；
- ・L-アミノ酸残基が対応するD-アミノ酸残基で置換されてもよい。

【請求項 13】

トランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する請求項1～12のいずれか一項に記載のペプチドであって、以下の構造の1つを有することを特徴とする、ペプチド。

40

【表 1 2】

アミノ酸配列	配列番号
QHQM L F Y C D D V L F Y N I S S M K - C O N H ₂	1
(B r C H ₂ C O - G T Y K S T V I V N N K E K T T A E Y Q - (T t d s) ₄ - K (N ₃) - N H ₂)	2
A c - K (N ₃) - (T t d s) ₄ - P R V T L D K K E A I Q G G I V R V N S S V P E E K - T t d s - K (B r C H ₂ C O) - C O N H ₂	3
A c - c * H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S C * - G G S G G S G G - K (N ₃) - C O N H ₂	2 9
S H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S S - G G S G G S G G - K (N ₃) - C O N H ₂	3 0
A c - K K K c * H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S C * - T t d s - T t d s - K (N ₃) - C O N H ₂	3 1
Q H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S M K - T t d s - T t d s - T t d s - T t d s - K (N ₃) - C O N H ₂	3 2
h C H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S h C K - T t d s - T t d s - T t d s - T t d s - K (N ₃) - C O N H ₂	3 3
Y K S T V I V N N K E K T T A E - P E G 4 - K (N ₃) - C O N H ₂	3 4
A c - K (N ₃) - P E G 4 - P R V T L D K K E A I Q G G I V R V N S S V P E E K - C O N H ₂	3 5
A c - K (N ₃) - (T t d s) ₄ - P R h C T L D K K E A I Q G G I V R V N h C S V P E E K - C O N H ₂	3 6
[# C H ₂ C O N H ₂ G T Y K S T V I V N N K E K T T A E Y Q - (T t d s) ₄ - K (N ₃) - N H ₂] - [Q H Q M L F Y h C # D D V L F Y N I S S M K - C O N H ₂]	3 7 および 3 8
[A c - K (N ₃) - (T t d s) ₄ - P R V T L D K K E A I Q G G I V R V N S S V P E E K - T t d s - K # (C H ₂ C O) - C O N H ₂] - [Q H Q M L F Y h C # D D V L F Y N I S S M K - C O N H ₂]	3 9 および 4 0
A c - K (N ₃) - G G S G G S G G - Y K D D V L F Y N I S S M K S T - N H ₂	4 1
A c - Y K D D V L F Y N I S S M K S T - G G S G G S G G - K (N ₃) - N H ₂	4 2
A c - P Q H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S M K (G G S G G S G G - K (N ₃)) S T E S Y F I - C O N H ₂	4 3
A c - K (N ₃) - G G S G G S G G - F A D V S T T S H V K P Q H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S M K S T E S Y F I P E V R I Y D S G T Y K - C O N H ₂	4 4

10

20

30

40

50

Ac-K(N ₃)-GGSGGSGG-PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV-CO NH ₂	45
Ac-K(N ₃)-GGSGGSGG-YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV-CONH ₂	46
Ac-K(N ₃)-GGSGGSGG-HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV-CONH ₂	47
Ac-LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF-GGSGGSGG-K(N ₃)-CONH ₂	48
Ac-LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF-Ttds-Ttds-K(N ₃)-CONH ₂	49
Ac-PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK(GGSGGSGG-K(N ₃))STESYFIKK-CONH ₂	50
RDQNFVILEFP-PEG4-K(N ₃)-NH ₂	51
ここで hCはホモシステインであり、cはD-システインであり、**は環状ペプチドのジスルフィド架橋形成の位置であり、#はアセチルチオエーテル結合である。	

10

20

30

40

50

【請求項14】

医療用途に用いる、請求項1～13のいずれか一項に記載のトランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣するペプチド。

【請求項15】

血管病変の予防または治療に用いる、請求項1～14のいずれか一項に記載のトランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣するペプチド。

【請求項16】

心臓弁病変、アテローム性動脈硬化症、血栓症、虚血、出血、再狭窄、動脈瘤を含む群から選択される血管病変の予防または治療に用いる、請求項1～15のいずれか一項に記載のトランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣するペプチド。

【請求項17】

ステント内狭窄に代表される病的状態を予防するための医療用途に用いる、請求項14～16のいずれか一項に記載のトランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣するペプチド。

【請求項18】

ヒトまたは動物における医療用途に用いる、請求項14～17のいずれか一項に記載のトランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣するペプチド。

【請求項19】

請求項1～13のいずれか一項に記載の一種以上のペプチドを含む、コーティング。

【請求項20】

単層または多層のコーティングである、請求項19に記載のコーティング。

【請求項21】

血管デバイスへの接着のための、請求項1～13のいずれか一項に記載のバイオミメティックペプチドの使用。

【請求項22】

血管の内皮化の促進、新内膜の成長の防止、またはターゲット血管内での血管デバイスの統合のための、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載のバイオミメティックペプチドの使用。

【請求項 23】

血管デバイスの接着の向上のための、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載のバイオミメティックペプチドの使用。

【請求項 24】

ステントセグメントに回復した内皮の抗炎症および抗血栓特性を付与するための、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載のバイオミメティックペプチドの使用。

【請求項 25】

ステントセグメントに適応的リモデリングを改善し、その機能特性の回復を可能にすることが開示されるための、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載のバイオミメティックペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は医療分野に応用され、特に埋め込み型医療デバイスの統合と性能を向上させることを目的とする。

【背景技術】

【0002】

医療デバイスの生体適合性を向上させるための戦略が必要である。これは、医療デバイスの植え込みに対する生体組織の反応を防ぐためであり、患者に予期せぬリスクをもたらす可能性がある。

【0003】

「異物反応」は、植え込み部位の組織の損傷によって引き起こされ、生体適合性のない材料が血液と接触することによって開始される。

【0004】

血小板の付着と活性化に続いて炎症細胞の動員が続き、慢性炎症と肉芽腫性組織の形成を特徴とする異常な創傷治癒配列が続く。

【0005】

損傷が発生すると、内皮バリアの中断により、損傷を封じ込めるために血小板が活性化され、白血球が浸潤して破片を除去し、組織再生のための部位を準備する。

【0006】

しかし、医療機器はクリアランスされることはない。

【0007】

その結果、迅速な内皮化がない場合、移植部位で白血球と血小板の強い活性化が起こる。

【0008】

過剰な血小板の付着と凝集は血流の閉塞（虚血）を引き起こす可能性があり、活性化された血小板と白血球によって放出されるプロテアーゼは血管壁の破裂（出血）を引き起こす可能性がある。

【0009】

このような状態の一つは、心臓弁や血管デバイスの存在によって引き起こされ、これらは体にとって異物と見なされる。

【0010】

それが、重篤な心血管状態の予防と治療のための弁および血管デバイスの使用を妨げている。

【0011】

CD31 は、血小板、白血球、および内皮細胞（EC）に構成的かつ排他的に発現する膜貫通型糖タンパク質である。健康な状態では、トランスホモフィリック CD31-CD

10

20

30

40

50

31 相互作用により、内皮細胞、血小板、および白血球が「自己」を認識し、不適切な活性化を防ぐ。

【0012】

血液と接触するインプラントデバイスの好ましい問題は、それらの表面を「生体適合性」にする治療によって達成され、機能的な内皮層の迅速な形成を可能にし、生体材料の適切な統合を保証する。

【0013】

健康な内皮によるCD31の豊富な発現は、循環および血管化組織の恒常性の維持に重要な役割を果たす。

【0014】

Cortese et al (Stroke, 2021年2月)は、CD31模倣ペプチドP8RI (kwpalfr)の固定化が血液成分の反応を減少させ、生体内皮細胞の接着を増加させ、生体での血管内デバイスの統合を強化することを明らかにしている。

【0015】

Diaz-Rodriguez et al (EHJ, 2021)は、P8RIと呼ばれる可溶性ペプチドがCD31アゴニストのように作用することを明らかにした。したがって、CD31模倣金属ステントコーティングが内皮細胞および血液成分の接着に与える影響と、生体での内皮ストラットの被覆および異物反応による新内膜成長に与える影響が研究された。

【0016】

CD31は、膜遠位のN末端から番号が付けられた6つの細胞外Ig様ドメイン、短い膜貫通フラグメント、および細胞質尾から構成されるI型膜貫通糖タンパク質である。

【0017】

CD31の従事は、最初の細胞Aによって発現された分子のドメイン1および2と、相互作用する細胞Bによって発現された同じドメインとの間のトランスホモフィリックに依存した。

【0018】

相互作用するドメイン1および2（それぞれ「Ig L1」および「Ig L2」と呼ばれる）に関して、より具体的には、これらは二層のβシートを持つ古典的なIgドメイン構造を採用し、逆平行βストランドがジスルフィド結合を形成する一対のシステインによって固定された。

【0019】

2つの相互作用する細胞のCD31分子間のトランスホモフィリックにより、CD31二量体界面には疎水性および親水性相互作用が含まれた。

【0020】

トランスホモフィリックするCD31分子の2つのIg L1-2フラグメントは、1つのβシートの側面（Ig L1が反対のモノマーのIg L2と相互作用する）と面対面の逆平行パターンで互いにパックされた。

【0021】

結晶構造には2つの相互作用する表面があり、1つは鎖AのIg L1（Ig L1-A、すなわち最初の細胞AのCD31分子のIg L1ドメイン）と鎖BのIg L2（Ig L2-B、すなわち相互作用する細胞BのCD31分子のIg L2ドメイン）の間、もう1つは鎖AのIg L2（Ig L2-A、すなわち最初の細胞AのCD31分子のIg L2ドメイン）と鎖BのIg L1（Ig L1-B、すなわち相互作用する細胞BのCD31分子のIg L1ドメイン）の間であった。

【0022】

CD31ドメイン1および2のトランスホモフィリックは、トランスメンブランおよび膜近傍の細胞外配列の強いシスホモフィリックと側方変位によって分子のクラスター化を促進した。

【0023】

10

20

30

40

50

このシスホモフィリックは細胞活性化の部位で発生し、C D 3 1の調節機能を許可するために不可欠である。なぜなら、このタンパク質は自己リン酸化することができないからである。

【0024】

C D 3 1のリン酸化は、分子が活性化されたチロシンキナーゼ受容体の近くにクラスターとして留まる能力に依存した。

【0025】

細胞が活性化されると、細胞膜プロテアーゼの活性化がC D 3 1タンパク質の細胞外部分の大部分の切断と脱落を促進した。

【0026】

C D 3 1の脱落は、分子のトランスホモフィリックを無効にした。なぜなら、そのトランス同種間部分（ドメイン1と2の間に含まれる）が失われ、C D 3 1のクラスターが解消されるからである。

【0027】

P 8 R I配列に含まれるアミノ酸は、C D 3 1のシス同種間膜部分から発行される。P 8 R Iはこの配列と共にクラスターを形成し、炎症や血栓症の部位で活性化された内皮細胞、血小板、白血球において切断されたC D 3 1分子の調節シグナル特性を維持する。

【発明の概要】

【0028】

本特許出願の発明者は、トランス同種間（ドメイン1と2）C D 3 1－C D 3 1細胞間相互作用を模倣する特性を持ついくつかのペプチドを驚くべきことに発見した。

【発明の目的】

【0029】

最初の目的によると、トランスホモフィリックC D 3 1－C D 3 1ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する特性を持つペプチドが開示される。

【0030】

好ましい側面として、これらのペプチドは3つの異なる一般的な構造を持つことができる。

【0031】

他の側面として、これらのペプチドの誘導体が開示される。

【0032】

第二の目的によると、開示されたペプチドまたはペプチド誘導体の医療用途が開示される。

【0033】

好ましい側面として、その医療用途は心臓および血管の病理を治療するための医療デバイスの植え付けに関連する合併症の予防である。

【0034】

別の好ましい側面として、その医療用途は心臓血管の病理の治療である。

【0035】

発明の第三の目的によると、開示されたバイオミメティックペプチドを含むコーティングが開示される。

【0036】

発明の第四の目的によると、開示されたバイオミメティックペプチドを含むコーティングの調製方法が開示される。

【0037】

第五の目的によると、ペプチドまたは発明のコーティングでコーティングされた部分を含むデバイスが開示される。

【0038】

第六の目的によると、血管病理の予防、治療、または診断のための方法が開示されており、発明のバイオミメティックペプチドの使用を含む。

10

20

30

40

50

【0039】

そじみた使用は、発明によるペプチドでコーティングされたデバイスの植え付けを含む場合がある。

【0040】

別の目的によると、発明のバイオミメティックペプチドをデバイスの表面に接着するための使用が開示される。

【0041】

実施形態によると、発明のバイオミメティックペプチドを血管デバイスに接着するための使用が開示される。

【0042】

さらに別の目的によると、発明のバイオミメティックペプチドを動脈血管の内皮化を促進し、内膜増殖を防止し、ターゲット血管内でデバイスを統合するための使用が開示される。

【発明の詳細説明】

【0043】

定義

本発明の目的のために、「バイオミメティック」という用語は自然な効果を模倣することを意味するものとする。

【0044】

本発明において、バイオミメティックペプチドは、内皮、すなわち血管の内壁および特に動脈の内壁を覆う内皮細胞（EC）の層の自然な効果を模倣する特性を備えている。

【0045】

特に、健康な状態での内皮の自然な効果は、トランスホモフィリックCD31-CD31細胞間相互作用によって提供されるものを模倣している。

【0046】

さらに具体的には、前述の模倣活動は、内皮細胞（EC）、血小板細胞（循環血小板細胞）、および白血球を活性化しない効果を持っている。

【0047】

前述の模倣特性は、発明のペプチドで覆われた表面にも提供することができる。

【0048】

本特許出願の目的のために、発明のペプチドはトランスホモフィリックCD31-CD31ドメイン1および2の細胞間相互作用を模倣する。

【0049】

「ホモフィリック」とは、同一の分子間の相互作用を意味し、本発明の目的のためには、それぞれが1つの細胞と相互作用する細胞によって発現される2つのCD31分子の相互作用を意味する。

【0050】

より具体的には、各CD31分子内で、相互作用は細胞外ドメイン1およびドメイン2を通じて発生する。

【0051】

第一の側面によると、発明のバイオミメティックペプチドはグループIと呼ばれる。

【0052】

好ましい実施形態では、グループIペプチドはHis71-Ser87に対応するヒトCD31 I g L 1の領域またはオルソログ哺乳類CD31分子の対応する領域をカバーする。あるいは、ペプチドはGln70-Lys89に対応するヒトCD31 I g L 1の領域またはオルソログ哺乳類CD31分子の対応する領域をカバーする。オルソログ哺乳類CD31分子のアミノ酸配列は、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5175/ortholog/?scope=40674>で利用可能なNCBIオルソログデータベースから取得できる。対応する領域は、関心のあるCD31オルソログアミノ酸配列とヒトCD31アミノ酸配列のアラインメントに基づいて熟

10

20

30

40

50

練者によって決定される。

【0053】

一つの実施形態では、グループIペプチドは、ジスルフィド結合と環状構造を提供する変異したGln70hCysおよびMet88hCysホモシステインを含む。

【0054】

グループIペプチドは以下の配列を含む、

【表1】

QHXXLFYKDDXXFYNISSXX	配列番号53
----------------------	--------

10

【0055】

本発明の目的のために、前記配列内で、互いに独立して、1Q（すなわち、配列番号、53でQと呼ばれる位置1の残基）は、Q、C、L、K、またはRのいずれか1つであってもよく、

2HはH、I、V、QまたはRのいずれか1つであってもよく、

5LはL、R、V、FまたはEのいずれか1つであってもよく、

9DはD、EまたはNのいずれか1つであってもよく、

13FはF、V、LまたはIのいずれか1つであってもよく、

14YはY、H、RまたはNのいずれか1つであってもよく、

15NはNまたはDのいずれか1つであってもよく、

16IはI、V、TまたはAのいずれか1つであってもよく、

17SはSまたはTのいずれか1つであってもよく、

18SはSまたはTのいずれか1つであってもよく、他のアミノ酸Xは任意の他のアミノ酸であってもよい。

20

【0056】

コンセンサス配列の配列番号53は、2022年12月1日にNCBIオルソログデータベースから取得された哺乳類CD31アミノ酸配列の複数配列アラインメントにおけるヒトCD31のアミノ酸配列の位置70から89に対応する領域に基づいている。X以外の残基は、哺乳類オルソログCD31アミノ酸配列における保存された残基に対応する。残基Xは、複数アラインメントにおける非常に可変な位置に対応する。

30

【0057】

グループIのペプチドは以下を含む、SP722、SP745、SP765、SP1374、SP1375。

【0058】

第2の側面によると、発明のバイオミメティックペプチドはグループIIとして参照される。

【0059】

好ましい実施形態では、グループIIペプチドはヒトCD31IgL1のTyr107-Glu122に対応する領域またはオルソログ哺乳類CD31分子の対応する領域をカバーする。あるいは、ペプチドはヒトCD31IgL1の106-124aaに対応する領域またはオルソログ哺乳類CD31分子の対応する領域をカバーする。

40

【0060】

一つの実施形態では、変異した106hCysおよび124hCysホモシステインがジスルフィド結合および環状構造を提供する。

【0061】

グループIIペプチドは以下の配列を含みます、

【表2】

YKSTVIXNNKEKTTXE	配列番号54
------------------	--------

50

【0062】

本発明の目的のために、前記配列内で、互いに独立して、

2 K（すなわち、配列番号、54でKと呼ばれる位置2の残基）はKまたはRのいずれか1つであってもよく、

3 SはCまたはSのいずれか1つであってもよく、

4 TはT、RまたはSのいずれか1つであってもよく、

5 VはVまたはAのいずれか1つであってもよく、

6 IはI、K、V、L、TまたはSのいずれか1つであってもよく、

8 NはN、SまたはDのいずれか1つであってもよく、

9 NはN、S、KまたはRのいずれか1つであってもよく、

11 EはE、Q、V、KまたはMのいずれか1つであってもよく、

12 KはKまたはRのいずれか1つであってもよく、

13 TはT、AまたはPのいずれか1つであってもよく、

14 TはTまたはSのいずれか1つであってもよく、

16 EはE、A、QまたはDのいずれか1つであってもよく、他のアミノ酸Xは任意の他のアミノ酸であってもよい。

10

【0063】

コンセンサス配列の配列番号54は、2022年12月1日にNCBIオルソログデータベースから取得された哺乳類CD31アミノ酸配列の複数配列アラインメントにおけるヒトCD31のアミノ酸配列の位置107から122に対応する領域に基づいている。X以外の残基は、哺乳類オルソログCD31アミノ酸配列における保存された残基に対応する。残基Xは、複数アラインメントにおける非常に可変な位置に対応する。

20

【0064】

グループIIのペプチドは以下を含みます、SP1072、SP1376。

【0065】

第3の側面によると、本発明のバイオミメティックペプチドはグループIIIと呼ばれる。

【0066】

好ましい実施形態では、グループIIIペプチドはヒトCD31 IgL2のPro133-Lys158に対応する領域またはオルソログ哺乳類CD31分子の対応する領域をカバーする。

30

【0067】

一つの実施形態では、グループIIIペプチドは変異したVal135h CysおよびCys152h Cysを含み、これによりジスルフィド結合と環状構造を提供する。

【0068】

グループIIIペプチドは以下の配列を含む。

【表3】

PXCTLDKKEXIQGGXVXVNCSPVEEK	配列番号55
----------------------------	--------

40

【0069】

本発明の目的のために、前記配列内で、互いに独立して、

3 C（すなわち、配列番号、55でCと呼ばれる位置3の残基）はC、V、MまたはIのいずれか1つであってもよく、

4 TはT、I、MまたはEのいずれか1つであってもよく、

5 LはLまたはVのいずれか1つであってもよく、

6 DはDまたはNのいずれか1つであってもよく、

7 KはKまたはRのいずれか1つであってもよく、

8 KはK、T、M、RまたはIのいずれか1つであってもよく、

11 IはI、T、M、VまたはEのいずれか1つであってもよく、

50

1 2 QはQまたはEのいずれか1つであってもよく、
1 4 GはGまたはEのいずれか1つであってもよく、
1 6 VはVまたはIのいずれか1つであってもよく、
1 8 VはVまたはIのいずれか1つであってもよく、
1 9 NはN、T、R、S、GまたはHのいずれか1つであってもよく、
2 2 VはV、MまたはLのいずれか1つであってもよく、
2 3 PはP、Q、K、E、LまたはRのいずれか1つであってもよく、
2 4 EはE、GまたはNのいずれか1つであってもよく、
2 6 KはK、Q、E、RまたはNのいずれか1つであってもよく、他のアミノ酸Xは任意の他のアミノ酸であってもよい。

10

【0070】

コンセンサス配列の配列番号53は、2022年12月1日にNCBIオルソログデータベースから取得された哺乳類CD31アミノ酸配列の複数配列アラインメントにおけるヒトCD31のアミノ酸配列の位置133から158に対応する領域に基づいている。X以外の残基は、哺乳類オルソログCD31アミノ酸配列における保存された残基に対応する。残基Xは、複数アラインメントにおける非常に可変な位置に対応する。

【0071】

グループIIIのペプチドは以下を含みます、SP1071、SP1380。

【0072】

第四の側面によると、発明のバイオミメティックペプチドはグループIVaと呼ばれる。

20

【0073】

好ましい実施形態では、グループIVaペプチドはヘテロ二量体であり、以下を含みます、a) グループIIIのペプチドとグループIのペプチドが共有結合している。

【0074】

グループIVaのペプチドは以下を含みます、SP1379。

【0075】

第五の側面によると、発明のバイオミメティックペプチドはグループIVbと呼ばれる。

【0076】

好ましい実施形態では、グループIVbペプチドはヘテロ二量体であり、以下を含みます、a) グループIIIのペプチドとグループIが共有結合している。

30

【0077】

グループIVbのペプチドは以下を含む、SP1383。

【0078】

第一の側面によると、発明のバイオミメティックペプチドは以下の配列IAに基づいている。

【表4】

HQMLFYKDDVLFYNISS	配列番号4
-------------------	-------

40

【0079】

第二の側面によると、発明のバイオミメティックペプチドは以下の配列IBに基づいている。

【表5】

YKSTVI VNNKEKTTAE	配列番号5
-------------------	-------

【0080】

第三の側面によると、発明のバイオミメティックペプチドは以下の配列ICに基づいて

50

いる。

【表 6】

PRVTLDKKEA IQGG IVRVNSSVPEEK	配列番号 6
------------------------------	--------

【0081】

本発明の目的のために、バイオメティックペプチドには環状ペプチドも含まれる。特に、システインまたはホモシステインを含むバイオメティックペプチドは、ジスルフィド結合を介して環状形態にすることができる。

【0082】

本発明の目的のために、バイオメティックペプチドはリンカーおよび／またはスペーサーおよび／または尾を含むことができ、オプションでアミノ酸配列で表されることがある。特に、該当する配列はペプチド末端または1つのアミノ酸残基に結合されることがある。

【0083】

特に好ましい実施形態では、該当するアミノ酸配列は以下の配列で表されることがある。

【表 7】

GGSGGSGG	配列番号 27
----------	---------

【0084】

本発明の目的のために、バイオメティックペプチドは、上記で説明した2つのペプチド配列を含むヘテロペプチドも含む。

【0085】

特に、ヘテロペプチドは以下を含むことがある。

【0086】

構造IAに基づく配列を持つペプチドと構造IBに基づく配列を持つペプチド、または構造IAに基づく配列を持つペプチドと構造ICに基づく配列を持つペプチド。

【0087】

ヘテロペプチドは、異なる配列のアミノ酸間またはリンカーおよび／またはスペーサー間のアセチルチオエーテル結合を介して結合されたペプチド配列を含むことがある。

【0088】

好ましい側面として、本発明のペプチドは以下の配列に基づいている。

10

20

30

40

50

【表 8】

アミノ酸配列 (I A)	配列番号
HQMLFYKDDVLFYNISSC	7
SHQMLFYKDDVLFYNISSS	8
QHQMFLFYKDDVLFYNISSMK	9
CHQMLFYKDDVLFYNISSCK	10
YKDDVLFYNISSMKST	11
PQHQMFLFYKDDVLFYNISSMK	12
FADVSTTSHVKPQHQMFLFYKDDVLFYNISSMK STESYFIPVRIYDSGTYK	13
PQHQMFLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPVRIYDSGTYKSTVIV	14
YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPVRIYDSGTYKSTVIV	15
HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPVRIYDSGTYKSTVIV	16
LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF	17
PQHQMFLFYKDDVLFYNISSMK	18
QHQMFLFYhCDDVLFYNISSMK	28
hC = ホモシステイン	

10

20

【0089】

好ましい側面として、本発明のペプチドは以下の配列に基づいている

【表 9】

アミノ酸配列 (I B)	配列番号
YKSTVIVNNKEKTAE	19
DDVLFYNISSMK	20
QHQMFLFY	21
CYKSTVIVNNKEKTAEYC	22
hCYKSTVIVNNKEKTAEYhC	23
GTYKSTVIVNNKEKTAEYQ	24
hC = ホモシステイン	

30

【0090】

好ましい側面として、本発明のペプチドは以下の構造に基づいている。

【表 10】

アミノ酸配列 (I C)	配列番号
PRCTLDKKEAIQGGIVRVNCSVP E E K	25

40

【0091】

好ましい側面として、本発明のペプチドは以下の構造に基づいている。

【表 11】

アミノ酸配列	配列番号
RDQNFVILEFP	26

【0092】

50

特に好ましい側面として、本発明のヘテロペプチドは以下のペプチドを含むことを特徴とする。

【表 1 2】

アミノ酸配列	配列番号
G T Y K S T V I V N N K E K T T A E Y QおよびQ H Q M L F Y h C D D V L F Y N I S S M K	2 4および2 8 (配列番号3 7および3 8)
P R V T L D K K E A I Q G G I V R V N S S V P E E KおよびQ H Q M L F Y h C D D V L F Y N I S S M K	6および2 8 (配列番号3 9および4 0)

10

【0 0 9 3】

好ましい側面によると、本発明のバイオミメティックペプチドは以下の変更を含むことができる、システイン残基が対応するホモシステイン残基に置換されることがある、L-アミノ酸が対応するD-アミノ酸に置換されることがある。本発明の好ましい実施形態によると、本発明のバイオミメティックペプチドは、以下から選択されたスペーサーおよび／またはリンカーおよび／または尾を含むことができる：

【表 1 3】

G G S G G S G G	配列番号 2 7
1つ以上のPEG 4ユニット	
1つ以上のT t d sユニット	
KN ₃	

20

およびそれらの組み合わせ、例えば、

【表 1 4】

K (N ₃) (T t d s) ₄
(T t d s) ₂ - K (N ₃)
(T t d s) ₄ - K (N ₃)
K (N ₃) G G S G G S G G

30

【0 0 9 4】

本発明の目的のために、上記開示された構造はC末端および／またはN末端での変更を含む場合がある。

【0 0 9 5】

特に、これらの変更は以下を含む場合がある。

【表 1 5】

A c -
B r - C H ₂ - C O -
C H ₂ - C O -
C H ₂ - C O N H ₂ -
A c - K N ₃
- N H ₂
- C O - N H ₂

40

【0 0 9 6】

発明の好ましい実施形態によると、以下のバイオミメティックペプチドが開示される。

50

【表 16】

アミノ酸配列	配列番号	参照 (S P)
QHQM L F Y C D D V L F Y N I S S M K - C O N H ₂	1	内部A
(B r C H ₂ C O - G T Y K S T V I V N N K E K T T A E Y Q - (T t d s) 4 - K (N ₃) - N H ₂)	2	内部B
A c - K (N ₃) - (T t d s) 4 - P R V T L D K K E A I Q G G I V R V N S S V P E E K - T t d s - K (B r C H ₂ C O) - C O N H ₂	3	内部C
A c - c * H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S C * - G G S G G S G G - K (N ₃) - C O N H ₂	29	722
S H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S S - G G S G G S G G - K (N ₃) - C O N H ₂	30	745
A c - K K K c * H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S C * - T t d s - T t d s - K (N ₃) - C O N H ₂	31	765
Q H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S M K - T t d s - T t d s - T t d s - T t d s - K (N ₃) - C O N H ₂	32	1375
h C H Q M L F Y K D D V L F Y N I S S h C K - T t d s - T t d s - T t d s - T t d s - K (N ₃) - C O N H ₂	33	1374
Y K S T V I V N N K E K T T A E - P E G 4 - K (N ₃) - C O N H ₂	34	1072
A c - K (N ₃) - P E G 4 - P R V T L D K K E A I Q G G I V R V N S S V P E E K - C O N H ₂	35	1071
A c - K (N ₃) - (T t d s) 4 - P R h C T L D K K E A I Q G G I V R V N h C S V P E E K - C O N H ₂	36	1380
[# C H ₂ C O N H ₂ G T Y K S T V I V N N K E K T T A E Y Q - (T t d s) 4 - K (N ₃) - N H ₂] - [Q H Q M L F Y h C # D D V L F Y N I S S M K - C O N H 2]	37および38	1379
[A c - K (N ₃) - (T t d s) 4 - P R V T L D K K E A I Q G G I V R V N S S V P E E K - T t d s - K # (C H ₂ C O) - C O N H ₂] - [Q H Q M L F Y h C # D D V L F Y N I S S M K - C O N H ₂]	39および40	1383
A c - K (N ₃) - G G S G G S G G - Y K D D V L F Y N I S S M K S T - N H ₂	41	547
A c - Y K D D V L F Y N I S S M K S T - G G S G G S G G - K (N ₃) - N H ₂	42	548

10

20

30

40

50

Ac-PQHQMFLFYKDDVLFYNISSMK (GGS GGSGG-K (N ₃)) STESYFI-CONH ₂	4 3	7 2 4
Ac-K (N ₃) -GGSGGSGG-FADVSTTSHV KPQHQMFLFYKDDVLFYNISSMKSTESYF IPEVRIYDSGTyk-CONH ₂	4 4	7 3 2
Ac-K (N ₃) -GGSGGSGG-PQHQMFLFYKD DVLFIYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGT YKSTV-CONH ₂	4 5	7 2 3
Ac-K (N ₃) -GGSGGSGG-YKDDVLFYNI SSMKSTESYFIPEVRIYDSGTykSTVIV -CONH ₂	4 6	7 4 6
Ac-K (N ₃) -GGSGGSGG-HQMFLFYKDDV LFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTyk STVIV-CONH ₂	4 7	7 4 7
Ac-LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF-GG SGGSGG-K (N ₃) -CONH ₂	4 8	7 6 2
Ac-LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF-T t d s-T t d s-K (N ₃) -CONH ₂	4 9	7 6 3
Ac-PQHQMFLFYKDDVLFYNISSMK (GGS GGSGG-K (N ₃)) STESYFIKK-CONH ₂	5 0	7 6 6
RDQNFVILEFP-PEG4-K (N ₃) -NH ₂	5 1	1 0 7 0
ここでhCはホモシステインであり、cはD-システインであり、**は環 状ペプチドのジスルフィド架橋形成の位置であり、#はアセチルチオエーテ ル結合である。		

10

20

30

40

50

【0097】

本発明の目的のために、本発明のバイオミメティックペプチドは、上記開示された構造のいずれかと少なくとも95%の同一性を有するペプチドを含み、好ましくは少なくとも97%、さらに好ましくは少なくとも99%の同一性を有する。本発明の開示において言及されるパーセント同一性は、比較される配列の最適なグローバルアラインメント後に決定され、その最適なグローバルアラインメントには、したがって、1つ以上の挿入、削除、切断および／または置換を含む場合がある。アラインメントはグローバルであり、比較される配列全体がその全長にわたって含まれることを意味する。アラインメントは「最適」であり、挿入、削除、切断および／または置換の数が可能な限り少なくなるように行われることを意味する。最適なグローバルアラインメントは、当業者によく知られている任意の配列解析方法を使用して実行され、パーセント同一性が計算される場合がある。手動比較に加えて、NeedlemanとWunsch (1970) のアルゴリズムを使用してグローバルアラインメントを決定することも可能である。ヌクレオチド配列の場合、配列比較は、Needleソフトウェアなど、当業者によく知られている任意のソフトウェアを使用して実行される場合がある。使用されるパラメータは特に以下の通りである、「ギャップオープン」10.0、「ギャップエクステンド」0.5、およびEDNAFULLマトリックス (NCBIEMBOSSバージョンNUC4.4)。アミノ酸配列の場合、配列比較は、Needleソフトウェアなど、技術分野の熟練者によく知られている任意のソフトウェアを使用して実行できる。使用されるパラメータは特に以下の通りである、「ギャップオープン」は10.0、「ギャップエクステンド」は0.5、そしてBLOSUM62マトリックス。

【0098】

第二の目的によると、開示されたペプチドの医療用途が開示される。

【0099】

好ましい側面によれば、医療用途は血管病理の予防のためである。

【0100】

こじみた医療用途は、発明によるペプチドでコーティングされたデバイスの植え付けを含む場合がある。

【0101】

特に、現在の発明によると、これらの病理は、心臓弁病理、動脈硬化症、血栓症、虚血、出血、再狭窄、動脈瘤を含むグループから選択される。

10

【0102】

上記に加えて、ステント内狭窄によって表される病的状態の予防のための医療用途が開示される。

【0103】

別の好ましい側面によれば、医療用途は血管病理の治療のためである。

【0104】

上記の医療用途は、人間だけでなく獣医学分野の動物にも開示される。

【0105】

発明の第三の目的によると、開示されたバイオミメティックペプチドを含むコーティングが開示される。

20

【0106】

本発明の実施形態によれば、コーティングは単層コーティングであり、本発明の別の実施形態によれば、コーティングは多層コーティングである。

【0107】

発明の第四の目的によると、開示されたバイオミメティックペプチドを含むコーティングの調製方法が開示される。

【0108】

本発明の目的のために、デバイスまたはその一部のコーティングは、コーティングされる部分をコーティング浴に浸漬することによって、ディップコーティングで得ることができる。

30

【0109】

表面を機能化するためのよく知られた方法は、例えばUS 2018 / 0296732、WO 2020 / 109836、またはWO 2021 / 239905に開示されるように、クリックケミストリーである。

【0110】

銅を使用しないクリックケミストリーは、アジド標識反応パートナーとのジアリールシクロオクチン部分（DBCO、アザジベンゾシクロオクチンのADIBOまたはジベンゾアザシクロオクチンのDIBACとしても知られる）の反応に基づいており、これはひずみ促進アルキンアジド環化付加（SPAAC）として知られている。このクリックケミストリーは室温で非常に速く、Cu（I）触媒を必要としない。ジアリールシクロオクチンは、アジドに対して非常に狭く特異的な反応性を持ち、安定したトリアゾールのほぼ定量的な収率をもたらす。反応は水性緩衝媒体で行うことができる。

40

【0111】

好ましい実施形態によれば、この方法は以下を含む三段階のディップコーティング法である：

- ・ポリドーパミンコーティングのための第一段階、
- ・適切なリンカーをグラフトするための第二段階、そして
- ・発明ペプチドでコーティングするための第三段階。

【0112】

第一段階は、デバイスの表面またはその一部にポリドーパミン層のコーティングを実現

50

することを意味し、ドーパミンからポリドーパミンコーティングされた表面を得るためのものである。

【0113】

ドーパミンは、いくつかの種類の基板上に非常に付着性の高いフィルムに自己重合することが知られている。ポリドーパミン（以下PDA）は、ドーパミンの酸化によって形成される自己組織化ポリマーである。実際、PDAにはドーパミン、インドール、およびピロールユニットが含まれている。PDAは多様な反応性基を持つため、特に生体活性分子の固定化において、基板の機能化に対していくつかの可能性を提供することが知られている。PDAコーティングは、デバイスまたはその一部をドーパミンの塩、特にドーパミン塩酸塩またはドーパミンアンモニアを含む溶液に浸すことによって行うことができる。溶液は水溶液、アルコール溶液、または水-アルコール溶液であることができる。溶液の溶媒は、デバイスが水に敏感な場合（例えば腐食の場合）、好ましくはアルコール、特に無水エタノールである。デバイスは、例えばフッ化水素酸などの強酸でエッチングすることによって、ドーパミン溶液に浸す前に前処理することができる。

10

【0114】

最後に、ポリドーパミンがコーティングされていない部分やPDAの凝集体を除去するために、すすぎ工程および／または超音波洗浄工程を行うことができる。すすぎ工程は、脱塩水またはアルコールで行うことができる。

【0115】

第二段階は、興味のあるペプチドを後で接合するために、ポリドーパミンコーティングにリンカーを固定化することに対応する。バイオミメティックペプチドの固定化を可能にする任意のリンカーを使用できる。その目的のために、第一段階で得られたポリドーパミンコーティングを、適切な手段でリンカー溶液と接触させ、ポリドーパミンコーティング上にリンカーフィルムを形成する。

20

【0116】

リンカーは任意の適切な二官能性試薬である。リンカーは好ましくはバイオオーソゴナルである。

【0117】

リンカーは好ましくは上記で開示されたクリックケミストリーに適している。したがって、リンカーは自由な三重結合を含み、好ましくはシクロオクチン部分、さらに好ましくはDBCOじみたジアリルシクロオクチン部分を含む。三重結合はペプチドのアジド基と反応できる。リンカーはさらに、ポリドーパミンコーティングに対して反応性のあるアミンおよび／またはチオール官能基で機能化されている。

30

【0118】

水および中程度の極性を持つ一般的に使用される有機溶媒への溶解性を高めるために、リンカーは好ましくはスペーサーを含む。このスペーサーは、好ましくはポリマーまたはオリゴマーである。使用される可能性のあるポリマーまたはオリゴマーには、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ乳酸、ポリ乳酸、糖類、脂質、ポリグルタミン酸（PGA）、ポリグリコール酸、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）（PLGA）、ポリ酢酸ビニル（PVA）、およびそれらの組み合わせが含まれる。PEGが特に好ましいである。具体的には、PEG 4親水性スペーサーは凝集や沈殿の問題を減少または排除することが知られている。

40

【0119】

シクロオクチンPEGの例としては、DBCO-PEG誘導体、例えばDBCO-PEG 4-アミンやDBCO-スルホ-PEG 4-NH₂などがある。

【0120】

リンカーがPDAコーティングの表面に固定されていない場合、それを除去するために洗浄ステップが好ましく行われる。洗浄ステップは、脱塩水および／またはアルコールで行うことができる。

【0121】

50

第三のステップは、適切なリンカーを用いて修飾されたポリドーパミンコーティングデバイスにバイオミメティックペプチドをグラフトすることを含む。その目的のために、ペプチドは、リンカーの官能基（例えば、自由な三重結合）と反応できるアジド基などの官能基を好ましく含む。

【0122】

第二のステップの後に得られたデバイスまたはその一部は、特定の官能基を含むバイオミメティックペプチドと接触させるために、適切な手段によって接触させられる。グラフトは、デバイスまたはその一部をバイオミメティックペプチドを含む水溶液に浸すことによって行うことができる。反応は室温で行うことができる。

【0123】

発明の第五の目的によると、バイオミメティックペプチドまたは発明のコーティングでコーティングされた部分を含むデバイスが開示される。

【0124】

コーティングは、デバイス全体またはデバイスの一部の表面を含むことができる。

【0125】

本発明の目的のために、発明のバイオミメティックペプチドで完全または部分的に覆うことができるデバイスは、冠動脈ステント、フローダイバーティングステント、大動脈チューブ、心臓弁、バルーン拡張ステント、自己拡張型スキャフォールド、グラフトステントのポリマーチューブ、フローダイバーティングメッシュ、大動脈チューブ、心臓弁、ステントリトリバー、経カテーテル僧帽弁デバイス、カテーテル、リーフレットまたはその一部、そして一般的には、限られた期間または延長された期間にわたって血液と接触することができる任意の医療デバイスを含む。

【0126】

完全または部分的にコーティングされたデバイスは、例えば以下じみた任意の適切な材料で構成される場合がある：

- ・金属または合金、ステンレス鋼、コバルトクロム合金、プラチナクロム合金、ニッケルチタン合金（ニチノールとしても知られる）、コバルトクロムニッケル合金、マグネシウムまたはJDBM、Mg-Nd-Zn-Zr合金、Mg-Nd-Zn-Ca合金、Mg-Zn-Y-Nd合金、Mg-Al、Mg-Al-Zr、WE43、AZ31などのマグネシウム合金；

- ・合成高分子材料、PEBAx、PVP、PE、PP、Dacron（登録商標）、Teflon（登録商標）；

- ・臨床グレードの生物組織、例えば心臓弁生体補綴物のための心膜シート。

【0127】

第六の目的によると、発明のバイオミメティックペプチドを使用した心臓および血管の病理の予防または治療のための方法が開示される。

【0128】

特定の側面によると、心臓および血管の病理の予防または治療のための方法は、発明のコーティングで完全または部分的にコーティングされたデバイスの使用を含む。特に、デバイスはバルーンマウントステント、心臓弁生体補綴物、フローダイバータであり、これらのデバイスは冠動脈および末梢動脈の血行再建術、インターベンショナル神経学、心臓弁植え込み術などの介入的心血管手技で使用することができる。

【0129】

特に、対象となる病理は以下によって表される、心臓弁病理、狭窄性血管疾患（動脈硬化症を含む、特にアテローム性動脈硬化症）、アテローム血栓症、虚血性心疾患および末梢疾患、出血のリスクを伴う血管リモデリング、再狭窄、動脈瘤。

【0130】

上記に加えて、ステント内狭窄によって表される状態の予防方法が開示される。

【0131】

異物が血液と接触していることに関連する病理組織のリモデリングを引き起こす初期の

10

20

30

40

50

メカニズムの一つは、異物の表面への血小板の付着であり、これが白血球の募集と活性化を引き起こし、その後一連の反応の開始を引き起こし、最終的には血栓の形成および／または活性化された血小板と白血球によって放出された可溶性因子に応答して急速に増殖する血管細胞による異物のカプセル化につながり、最終的には血管内腔の減少、例えば（再）狭窄の発生につながることがよく知られている（例えば以下を参照、Forrester et al., J Am Coll Cardiol., 17, 758-769(1991)）。

【0132】

心臓および血管の病理の文脈において、ステントや弁の生体補綴物などの医療デバイスが移植された個人には、一般的に抗血小板療法（アスピリンおよび／または抗 P2Y12 療法、例えばクロピドグレル、チクロピジン、チカグレロル、またはプラスグレル）が少なくともステント植え付け後 1 ヶ月から数ヶ月間投与されるのは、そじみた理由によるものである。1 つ、そしてより頻繁には 2 つの抗血小板治療の使用は、完全に再内皮化されるまで血流にさらされるステントとの接触で血小板の活性化のリスクを排除し、したがってステント血栓症のリスクを排除し、再狭窄率を制限することを目的としている。ほとんどの場合、アスピリンと抗 P2Y12 療法を含む二重抗血小板療法（DAPT）は 6～12 ヶ月間投与される。こじみた治療は最終的に患者を出血のリスクにさらし、この観察結果は抗血小板治療の期間を短縮する安全性を評価するきっかけとなった。DAPT（二重抗血小板療法）を 30 日に短縮した薬剤溶出ステントを用いた臨床試験が現在進行中である。DAPT が必要な期間が終了すると、抗血小板治療は一般的にアスピリン単独（抗 P2Y12 療法なし）での継続療法となる。

【0133】

薬剤溶出ステントを使用する場合、ヒトにおけるアスピリン（アセチルサリチル酸またはその塩）の推奨用量は 50～100 mg／日であり、例えば 75 mg／日である。抗 P2Y12 薬剤に関しては、使用される特定の抗 P2Y12 薬剤に応じてヒトにおける推奨用量は異なる。クロピドグレルの推奨用量は 50～100 mg／日であり、特に 75 mg／日（一般的には 1 日 1 回 75 mg）である。チクロピジンの推奨用量は 300～300 mg／日であり、特に 250 mg／日（一般的には 1 日 1 回 250 mg）である。チカグレロルの推奨用量は 160～300 mg／日であり、特に 180 mg／日（一般的には 90 mg を 1 日 2 回）である。プラスグレルの推奨用量は 5～20 mg／日であり、特に 10 mg／日（一般的には 10 mg を 1 日 1 回）である。

【0134】

しかし、抗血小板療法は、特に出血性疾患（血友病 A（因子 VII 欠乏症）、血友病 B（因子 IX 欠乏症）、フォン・ヴィレブランド病、I、II、V、VII、X、XI、XII、XIII を含む稀な因子欠乏症など）を患っている個人において、重大な副作用のリスクや困難を伴う可能性がある。特に、抗 P2Y12 薬は非常に強力な分子であり、特定の理由なしに全身にあざを引き起こす傾向がある。さらに、抗 P2Y12 療法中の患者に対しては、どの歯科医、胃腸科医、または外科医も介入時の管理不能な出血のリスクを避けるために触れたくないだろう。場合によっては、心血管以外の一部の疾患に対する介入を妨げるため、これは深刻な問題となることがある。これらの分子は、下痢、かゆみ、吐き気、皮膚発疹、胃痛などの顕著な副作用も持っている。

【0135】

発明による医療デバイスに CD31 由来のペプチドで作られたコーティングの生理的、非活性化、内皮組織模倣特性に基づいて、デバイスと接触する血小板の初期付着／活性化が防止されるか、または大幅に減少する可能性があり、通常はデバイスの植え付け後に続く抗血小板治療が不要になるか、少なくとも低用量に減らされるか、または通常より短い期間で投与されることになる。

【0136】

したがって、発明による医療デバイスの植え付け後に、心臓弁病変、動脈硬化症、アテローム血栓症、虚血、出血、再狭窄、動脈瘤を含む心臓および血管病変の予防または治療のための方法、またはステント内狭窄によって表される状態の予防のための方法のいずれ

かの文脈において、受け取る個人は好ましくは次のようにする。

【0137】

- a) 抗P2Y₁₂療法を受けない（個人は抗血小板療法を全く受けない場合もある）；
- b) 伝統的な二重抗血小板療法（DAPT）内の薬剤溶出ステントに推奨されるよりも著しく低い（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍・・・）抗P2Y₁₂療法の用量（およびオプションでアスピリンの用量も著しく低い、例えば少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍・・・低い用量）を取る；
- c) 伝統的な二重抗血小板療法（DAPT）内の薬剤溶出ステントに推奨されるよりも著しく短い（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍・・・短い）期間、抗P2Y₁₂療法（およびオプションでアスピリン）を取る；または
- d) b)とc)の任意の組み合わせ。

10

【0138】

上記のa)からd)のすべての項目は、医療デバイス（特にステント）の植え付け後の治療にのみ関連し、医療デバイスの植え付け中に投与される可能性のある薬剤には関連しません。これらの薬剤は臨床推奨に従って医師が選択する。

【0139】

上記の項目b)、c)、d)において、「薬剤溶出ステント」または「DES」は、シロリムスなどの平滑筋細胞（SMC）の増殖を抑制する薬剤を徐々に放出するステントを指す。市販されている薬剤溶出ステントの例には、HT Supreme（登録商標）、Xience V（登録商標）、Promus（登録商標）、Cypher（登録商標）、Taxus（登録商標）、Endeavor（登録商標）がある。

20

【0140】

上記の項目b)において、移植後、発明による医療デバイスが移植された個人は、伝統的な二重抗血小板療法（DAPT）内の薬剤溶出ステントに推奨されるよりも著しく低い（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍・・・）抗P2Y₁₂療法の用量を取る。特に、移植後、個人は以下を取ることができる、クロピドグレルの1日あたり50mg未満、好ましくは1日あたり40mg未満、1日あたり35mg未満、1日あたり30mg未満、1日あたり25mg未満、または1日あたり20mg未満。

【0141】

チクロピジンの摂取量は1日あたり300mg未満、好ましくは1日あたり175mg未満、1日あたり150mg未満、1日あたり125mg未満、または1日あたり100mg未満であることが望ましい。

30

【0142】

チカグレロールの摂取量は1日あたり160mg未満、好ましくは1日あたり150mg未満、1日あたり140mg未満、1日あたり130mg未満、1日あたり120mg未満、1日あたり110mg未満、1日あたり100mg未満、1日あたり90mg未満、または1日あたり80mg未満であることが望ましい（通常、1日の投与量の半分を1日に2回摂取する）。

【0143】

プラスグレルの摂取量は1日あたり5mg未満、好ましくは1日あたり4mg未満、1日あたり3mg未満、1日あたり2.5mg未満、または1日あたり2mg未満であることが望ましい。

40

【0144】

個人は、植え付け後にアスピリンの著しく低い（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍・・・）用量をさらに摂取することができる。例えば、個人は1日あたり50mg未満、好ましくは1日あたり40mg未満、1日あたり35mg未満、1日あたり30mg未満、1日あたり25mg未満、または1日あたり20mg未満のアスピリンを服用することができる。

【0145】

上記の項目c)において、発明による医療デバイスが移植された個人は、薬剤溶出ステ

50

ントに推奨される期間よりも著しく短い（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍・・・短い）期間、抗P2Y12療法を受ける。個人はさらに、薬剤溶出ステントに推奨される期間よりも著しく短い（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍・・・短い）期間、移植後にアスピリンを服用することができる。

【0146】

例えば、個人はDAPTを3か月未満、好ましくは2か月未満、1か月未満、または4週間未満、3週間未満、2週間未満、または1週間未満の期間服用することができる。より短い抗血小板治療は、治療の一定期間後に個人が抗P2Y12療法を完全に停止することを意味する場合もある。

【0147】

上記の項目d)は、上記の項目b)およびc)の任意の組み合わせである。

【0148】

抗血小板療法なし、または少ない抗血小板療法でのこの改訂されたプロトコルは、抗血小板療法に関連する副作用（出血イベント）を防止または強く抑制するため、どの個人にも有用である。しかし、これは特に、血友病A（因子VII欠乏症）、血友病B（因子IX欠乏症）、フォン・ウィレブランド病、およびI、II、V、VII、X、XI、XII、XIIIを含む稀な因子欠乏症などの出血障害を持つ個人にとって有用である。

【0149】

上記で開示された予防または治療の方法は、人間だけでなく獣医分野の動物にも開示される。

【0150】

別の目的によると、発明のバイオミメティックペプチドをデバイスの表面に接着するための使用が開示される。

【0151】

一つの実施形態によれば、発明のバイオミメティックペプチドを血管デバイスへの接着に使用することが開示される。

【0152】

さらに別の目的によれば、発明のバイオミメティックペプチドを使用して、血管の内皮化を促進し、新内膜の成長を防止し、ターゲット血管内でデバイスを統合することが開示される。

【0153】

特に、対象血管は冠動脈血管、末梢動脈血管、または脳血管によって表される。

【0154】

さらに別の目的によると、本発明のバイオミメティックペプチドを使用してデバイスの生体適合性を向上させることが開示される。

【0155】

さらに別の目的によると、本発明のバイオミメティックペプチドを使用して、ステントセグメントに回復した内皮の抗炎症および抗血栓特性を付与することが開示される。

【0156】

さらに別の目的によると、本発明のバイオミメティックペプチドを使用して、ステントセグメントに適応的リモデリングを改善し、その機能特性の回復を可能にすることが開示される。

【0157】

本発明は、以下の非制限的な例でさらに開示される。

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図1】図1Aおよび1Bは、オクタペプチドP8RIの構造を示している。

【図2】図2は、ヒト内皮細胞と相互作用するニチノールディスクの生体適合性を分析するために使用された戦略を示している。

【図3】図3は、裸およびコーティングされたディスク上で成長するHAECのフォーアク

10

20

30

40

50

チン染色の代表的な画像と定量化を示している。

【図 4】図 4 は、裸およびコーティングされたディスク上で成長する H A E C の C D 3 1 染色の代表的な画像と定量化を示している。

【図 5】図 5 は、コーティングされたディスクと裸の対照ニチノールディスク上で成長する H A E C の F - アクチンおよび C D 3 1 発現の定量分析を示している。

【図 6】図 6 は、C D 3 1 と F - アクチン発現の比率を示している。

【図 7 - 1 7】図 7 から図 1 7 は、発明の好ましいペプチドの構造を示している。

【図 1 8】図 1 8 は、中間体 A の構造を示している。

【図 1 9】図 1 9 は、中間体 B の構造を示している。

【図 2 0】図 2 0 は、中間体 C の構造を示している。

【図 2 1】図 2 1 は、本発明によるリンカーの構造を示している。

【図 2 2】図 2 2 は、異なるグループに属する発明のペプチドの機能スコアの結果を示している。

【図 2 3】図 2 3 は、異なるグループに属する発明のペプチドの機能スコアの結果を表すグラフを示している。

【図 2 4】図 2 4 は、異なるグループに属する発明のペプチドのバイオミメティック性能を示すグラフを示している。

【図 2 5】図 2 5 は、C D 3 1 と F - アクチン発現の比率を示している。

【図 2 6】図 2 6 は、e G (商標) N T M A フィルムの赤外スペクトルを示している。

【図 2 7】図 2 7 は、裸の表面と e G (商標) N T M A 表面上の水滴の形状を示している。

【図 2 8】図 2 8 は、C F D ステント植え付け後 7 日目の S E M 断面を示し、e G N T M A と S P 1 0 7 2 ペプチドコーティングを比較している。

【図 2 9】図 2 9 は、C F D ステント植え付け後 7 日目の S E M 断面の病理組織学的分析を示し、e G N T M A と S P 1 0 7 2 ペプチドコーティングを比較している。

【図 3 0】図 3 0 は、C F D ステント植え付け後 6 0 日目の S E M 断面の病理組織学的分析を示し、S P 1 0 7 2 ペプチドコーティングを使用している。略語

【0 1 5 9】

実施例および本文中で使用される特定の略語は次のとおりである、

「A A」はアミノ酸を指す、

「A l l o c」はアリルオキシカルボニルを指し、

「B o c」は t e r t - ブチルオキシカルボニルをし、

「t B u」は第三ブチルを指し、

「D C M」はジクロロメタンを指し、

「D I C」は N、N' - ジイソプロピルカルボジイミドを指し、

「D I P E A」は N、N - ジイソプロピルエチルアミンを指し、

「D M F」はジメチルホルムアミドを指し、

「F m o c」はフルオレニルメチルオキシカルボニルを指し、

「H O A t」は 1 - ヒドロキシー 7 - アザベンゾトリアゾールを指し、

「H P L C」は高速液体クロマトグラフィーを指し、

「L C M S」は液体クロマトグラフィー／質量分析を指し、

「U P L C」は高速クロマトグラフィーを指し、

「R P - H P L C」は逆相高速液体クロマトグラフィーを指し、

「M S」は質量分析を指し、

「O t B u」は O - ターシャリーブチルを指し、

「O x y m a」はエチルシアノヒドロキシイミノアセテートを指し、

「P b f」は 2、2、4、6、7 - ペンタメチルジヒドロベンゾフラン - 5 - スルホニルを指し、

「T I P S」はトリイソプロピルシランを指し、

「T F A」はトリフルオロ酢酸を指し、

「Trt」はトリチルを指す。

【実施例】

【0160】

材料と方法

ペプチドは、Fmoc/t-Bu化学を使用した標準的な固相ペプチド合成（SPPS）によって合成された。溶媒としてDMFが使用された。以下の出発物質と方法が、実施例に記載された合成手順で使用された。

【0161】

Fmoc保護された天然アミノ酸は、Novabiochem、Iris Biotech、Bachem、またはChem-Impex Internationalから購入された。合成には以下の標準アミノ酸が使用された、Fmoc-L-Ala-OH、Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-L-Asn(Trt)-OH、Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH、Fmoc-L-Gln(Trt)-OH、Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-L-Gly-OH、Fmoc-L-Ile-OH、Fmoc-L-Leu-OH、Fmoc-L-Lys(Boc)-OH、Fmoc-L-Pro-OH、Fmoc-L-Ser(tBu)-OH、Fmoc-L-Thr(tBu)-OH、Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-L-Val-OH。

10

【0162】

さらに、以下のアミノ酸も上記と同じ供給元から購入した、Fmoc-K-(N₃)OH；Fmoc-K(alloc)OH；Fmoc-c-OH，Fmoc-hC-OH，Fmoc-Ttds-COOH，Fmoc-NH-PEG4-COOH。

20

【0163】

分析特性評価

粗ペプチドと精製ペプチドは、UVおよび質量分析検出を備えた超高性能液体クロマトグラフィー（UPLC-UV-MS）によって分析された。分析用UPLCは、次のいずれかの方法に従って実施された、

方法A：

214 nmでの検出

カラム：Acquity Waters BEH130 C4、1.7 μm (2.1 x 100 mm) 45 °C

30

溶媒：H₂O + 0.1% TFA、ACN + 0.1% TFA（流量0.4 mL/分）

勾配：85、15（0分）から85、15（1分）から65、35（5分）から10、90（5.2分）から10、90（5.5分）から85、15（5.7分）から85、15（6分）

質量分析計：正イオン検出モードでエレクトロスプレーイオン化を使用したWaters SQ検出器

【0164】

方法B：

214 nmでの検出

カラム：Acquity Waters BEH130 C4、1.7 μm (2.1 x 100 mm) 45 °C

40

溶媒：H₂O + 0.1% TFA、ACN + 0.1% TFA（流量0.4 mL/分）

勾配：80、20（0分）から80、20（1分）から60、40（5分）から10、90（5.2分）から10、90（5.5分）から80、20（5.7分）から80、20（6分）

【0165】

方法C：

214 nmでの検出

カラム：Acquity Waters BEH130 C4、1.7 μm (2.1 x 100 mm) 45 °C

50

0 0 mm) 4 5 °C

溶媒、H₂O + 0 . 1 % T F A、A C N + 0 . 1 % T F A (流量 0 . 4 m l / 分)

勾配：7 5、2 5 (0 分) から 7 5、2 5 (1 分) から 5 5、4 5 (4 分) から 1 0、9 0 (4 . 2 分) から 1 0、9 0 (4 . 5 分) から 8 0、2 0 (4 . 7 分) から 7 5、2 5 (5 分)

質量分析計：正イオン検出モードでエレクトロスプレーイオン化を使用したW a t e r s S Q 検出器

【 0 1 6 6 】

質量分析は、W a t e r s S Q 検出器を用いて、正イオン検出モードでエレクトロスプレーイオン化により行われ、質量対電荷比のスキャン範囲は 4 0 0 – 1 8 0 0 だった。

【 表 1 7 】

表 1 . 分析方法、保持時間、計算された質量および発見された質量、実施例の化合物

S P	配列番号	正確な質量 (モノアイソトピック)	観察された [M+2H] ²⁺	観察された [M+3H] ³⁺	観察された [M+4H] ⁴⁺	観察された [M+5H] ⁵⁺	保持時間 (分)	方法
722	29	3034.32	1519.2	1013.5	ND	ND	3.27	C
745	30	2962.37	1483.8	989.4	ND	ND	2.85	C
765	31	3506.78	1756.2	1171.0	878.6	ND	2.90	C
1375	32	3868.04	ND	1291.8	969.2	775.5	4.20	B
1374	33	3843.58	ND	1282.8	962.4	770.2	4.05	B
1072	34	2225.21	1114.0	743.0	ND	ND	2.97	A
1376	23	3580.90	ND	1195.4	897.1	ND	3.57	A
1071	35	3249.83	ND	1085.0	814.0	651.6	3.65	A
1380	36	4298.36	ND	1435.4	1076.8	861.8	3.23	B
1379	37-38	6169.14	ND	ND	1545.5	ND	4.35	B
1383	39-40	7216.85	ND	ND	ND	1445.9	4.59	B
N D、未検出								

【 0 1 6 7 】

固相支持体上でのペプチド合成の一般的な手順

すべてのペプチドの合成は、L i b e r t y B l u e マイクロ波合成装置 (C E M 社) を用いた標準的な F m o c 逐次固相合成 (S P P S) によって行われた。組み立ては、P r o t i d e R i n k – a m i d e (4 – (2 ′、4 ′ – ジメトキシフェニル – F m o c – アミノメチル) – フェノキシアセタミド – ノルロイシルアミノメチル樹脂、C E M、3 0 0 μ m o l、1 0 0 – 3 0 0 メッシュ；ローディング 0 . 2 m m o l / g) を 0 . 2 m m o l スケールで使用し、D I C / O x y m a 活性化で行われた。溶媒として D M F が使用された。

【0168】

すべてのアミノ酸はDMF中で0.4M濃度で溶解された。アシル化反応は、樹脂の遊離アミノ基に対して活性化されたアミノ酸を5倍過剰に用い、90℃で3分間マイクロ波照射下で行われた。アミノ酸は、DMF中の0.5MのDIC溶液およびDMF中の1MのOxyma溶液の等モル量で活性化された。

【0169】

以下の条件が使用された：

標準的な脱保護：DMF中20%ピペリジンを2 x 120秒、90℃

洗浄：4 x DMF

標準的な単一カップリング：5当量AA0.4M／5当量DIC1M／5

当量オキシマ1M、120秒、90℃

標準的な二重カップリング：標準的な単一カップリングを2回繰り返す

洗浄：4 x DMF

【0170】

組み立ての最後に、樹脂はDMF、MeOH、DCM、Et2Oで洗浄された。

【0171】

樹脂からのペプチドの切断は、以下の切断カクテルを使用して行われた、

【0172】

ミックス1) 87.5%TFA、5%フェノール、5%水、2.5%TIPSを室温で1.5から2.5時間(30ml)。

【0173】

ミックス2) 87.5%TFA、5%フェノール、5%水、2.5%チオアニソールを室温で1.5から2.5時間(20ml)。

【0174】

合成に使用された樹脂は、C末端が一次アミドとして樹脂から切断されるようなものだった。

【0175】

切断混合物はろ過によって収集され、粗ペプチドはメチルtert-ブチルエーテルに沈殿させ、遠心分離し、上澄みを除去し、新鮮なジエチルエーテルをペプチドに加えて再遠心分離し、2回行った。その後、粗ペプチドは凍結乾燥された。

【0176】

ペプチドは分析用UPLCで分析され、ESI+質量分析法で確認された。粗ペプチドは、Waters2489HPLCシステム(波長214nmでのUV検出)を用いた従来の製備RP-HPLC精製によって精製された。溶媒として以下のものを使用した、アセトニトリル+0.1%TFA(移動相A)および水+0.1%TFA(移動相B)。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥してTFA塩として精製された生成物を得ました。特に記載がない限り、化合物はTFA塩としてテストされた。

【0177】

配列番号29の合成手順：Ac-c*HQMLFYKDDVLFYNISSC*-GGSGGSGG-K(N₃)-CONH₂

【0178】

ペプチドの構造は図7に示されている。

【0179】

配列番号29(PepSP722)は、アセチル化されたN末端D-システインとC末端位置のセリン87にシステインを持つCD31Ig1-AのHis71-Ser87領域をカバーし、2つのチオール基がジスルフィド結合に関与している。

【0180】

一般的な手順(Mix1)に従って合成および切断を行った後、混合物を分析UPLCで分析し、ESI+質量分析で確認し、粗生成物(Y=64%)を得るために凍結乾燥した。粗材料は1mg/mLの濃度で8/2アセトニトリル/水の混合物に溶解された、水

10

20

30

40

50

性NH₃を加えてpH9に達し、混合物は室温で72時間攪拌された。TFAを混合物に加え、凍結乾燥した。粗ペプチドは、調製用Reprosil Gold C4 (250 x 40 mm、120 Å、5 μm) カラムを使用して逆相HPLCで精製された。次のエリュエントBのグラジエントが使用された、20%Bから20%Bまで5分間、25分間で40%Bまで、流量60 mL/min、波長214 nm。配列番号1は、白色の凍結乾燥固体 (Y = 5%)、TFA塩として単離された。精製されたペプチドは、アセトニトリル/水8/2の混合物中で1 mg/mLの濃度で溶解された。HCl 50 mM (10 eq) を加え、混合物を室温で1時間攪拌した。凍結乾燥後、ペプチドをアセトニトリル/水8/2に溶解し、再度凍結乾燥した。ペプチドはLC/MS (方法C) で分析された。[M+3H]³⁺質量シグナルは保持時間3.27分のピーク下で見つかり、ペプチド質量1013.5が明らかになり、これは予想される分子量3036.37と一致している。

10

【0181】

配列番号30の合成手順：

SHQMLFYKDDVLFYNISSSGSGSGSGG-K(N₃)-CONH₂ ペプチドの構造は図8に示されている。配列番号30 (PepSP745) は、配列番号29と共通するCD31IgL1-AのHis71-Ser87領域をカバーしているが、配列番号1の2つのシステイン残基をセリンに置換した線形配列である。

【0182】

一般的な手順 (Mix 1) に従って合成および切断を行った後、混合物を分析UPLCで分析し、ESI+質量分析で確認し、粗生成物 (Y = 66%) を得るために凍結乾燥した。粗ペプチドは、調製用Reprosil Gold C4 (250 x 40 mm、120 Å、5 μm) カラムを使用して逆相HPLCで精製された。次のエリュエントBのグラジエントが使用された、20%Bから20%Bを5分間、20分間で40%Bに、流量60 mL/min、波長214 nm。配列番号2はアモルファス凍結乾燥固体 (Y = 4%)、TFA塩として単離された。ペプチドはアセトニトリル/水8/2の混合物中で1 mg/mLの濃度で溶解された、HCl 50 mM (10 eq) を加え、混合物を室温で1時間攪拌した。凍結乾燥後、ペプチドをアセトニトリル/水8/2に溶解し、再度凍結乾燥した。ペプチドはLC/MS (方法C) で分析された。[M+3H]³⁺保持時間2.85分のピーク下で見つかった質量信号は、予想される分子量2964.22と一致するペプチド質量989.4を明らかにした。

20

30

【0183】

配列番号31の合成手順：

Ac-KKKc*HQMLFYKDDVLFYNISSSC*-Ttds-Ttds-K(N₃)-CONH₂ ペプチドの構造は図9に示されている。

【0184】

配列番号31 (PepSP765) は、CD31IgL1-AのHis71-Ser87と同じ領域をカバーし、配列番号29と同様のジスルフィド結合を持っているが、N末端に3つのリジン残基の可溶化尾部がある。

【0185】

合成は一般的な手順に従って行われた。組み立ての最後に、樹脂はAc2O (10 eq) とDMFで30分間処理された。切断はMix 1を使用して一般的な手順に従って行われ、混合物は分析UPLCによって分析され、ESI+質量分析法によって確認され、凍結乾燥された (Y = 61%)。粗材料は1 mg/mLの濃度で8/2アセトニトリル/水の混合物に溶解された、水性NH₃を加えてpH9に達し、混合物は室温で72時間攪拌された。TFAを混合物に加え、凍結乾燥した。粗ペプチドは、調製用Reprosil Gold C4 (250 x 40 mm、120 Å、5 μm) カラムを使用して逆相HPLCで精製された。次のエリュエントBのグラジエントが使用された、25%Bから5分間で25%B、25分間で40%B、流量60 mL/min。配列番号3はアモルファス凍結乾燥固体 (Y = 2%)、TFA塩として単離された。ペプチドはアセトニトリル/水8/2の混合物中で1 mg/mLの濃度で溶解された、HCl 50 mM (10 eq) を加え、混

40

50

合物を室温で1時間攪拌した。凍結乾燥後、ペプチドをアセトニトリル／水8／2に溶解し、再度凍結乾燥した。ペプチドはLC／MS（方法C）で分析された。保持時間2．90分のピーク下で見つかった[M+3H]³⁺質量信号は、予想される分子量3509．17に一致するペプチド質量1171．0を明らかにした。

【0186】

配列番号32の合成手順：

QHQM L F Y K D D V L F Y N I S S M K - T t d s - T t d s - T t d s - T t d s - K (N ₃) - C O N H ₂

ペプチドの構造は図10に示されている。

【0187】

10

シーケンス番号32（PepSP1375）は、CD31Ig L1-AのGln70-Lys89とTtdsユニットの長いリンカーと同じ領域をカバーしている。

【0188】

固相でのペプチド組み立て中に、ValとLeuの二重アシル化反応が行われた。Fmoc脱保護は、DMF中20%（V／V）ピペリジンを用いた樹脂の二重処理で120分間90℃で行われ、Asp残基が9番目の位置に達するまで行われた。この残基の後、アスパルチミド形成を最小限に抑えるために室温で脱保護が行われた。切断は、Mix2を使用した一般的な手順に従って行われた。混合物は分析用UPLCで分析され、ESI+質量分析法で確認され、粗生成物（Y=70%）を得るために凍結乾燥された。

20

【0189】

粗材料の精製は、XBridge C18（250x50mm、120Å、10μm）カラムと溶媒Bの勾配を使用して次のように行われた、5分間15%B；20分で15%Bから35%B；流速、80mL／分。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥してTFA塩として精製生成物を得ました（Y=10%）。精製されたペプチドはLC／MS（方法B）で分析された。[M+4H]⁴⁺保持時間4．20分のピーク下で見つかった質量信号は、予想される分子量3870．58に一致するペプチド質量969．2を示した。

【0190】

配列番号33の合成手順：

hCHQM L F Y K D D V L F Y N I S S h C K - T t d s - T t d s - T t d s - T t d s - K (N ₃) - C O N H ₂ ペプチドの構造は図11に示されている。

30

【0191】

配列番号33（PepSP1374）は、配列番号32のCD31Ig L1-AのGln70-Lys89領域をホモシステインに変異させたものである、Gln70hCysおよびMet88hCysがシクロ構造を持つジスルフィド結合を形成する。

【0192】

ペプチド組み立て中に、ValおよびLeuの二重アシル化反応が行われた。Fmoc脱保護は、90℃で120秒間、20%（V／V）ピペリジンを含むDMFで樹脂を二重処理することにより、位置9のAsp残基まで行われた。この残基の後、アスパルチミド形成を最小限に抑えるために室温で脱保護が行われた。切断は、Mix2を使用した一般的な手順に従って行われた。混合物は分析用UPLCで分析され、ESI+質量分析法で確認され、粗生成物（Y=70%）を得るために凍結乾燥された。粗ペプチドは分析UPLCで分析され、ESI+質量分析法で確認された。粗材料はDMSO／H₂Oの9／1混合物に1mg／mLの濃度で溶解された、水性NH₃を加えてpH9に達し、混合物を室温で48時間攪拌した。この時間の後、ジスルフィド橋の形成がUPLCで確認され、混合物は凍結乾燥された。粗材料の精製は、以下の勾配を使用してWaters XBridge C18（250x50mm、120Å、10μm）カラムで行われた、5分間15%B；20分間でBの15%から35%；流速80mL／min。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥してTFA塩として精製生成物を得ました（Y=10%）。精製されたペプチドはLC／MS（方法B）で分析された。保持時間4．05分のピーク下で見つかった[M+4H]⁴⁺質量信号は、ペプチド質量962．4を示し、分子量3843．58

40

50

の予想値と一致している。

【0193】

配列番号34の合成手順：

YKSTVIVNNKEKTTAE-PEG4-K(N₃)-CONH₂ペプチドの構造は図12に示されている。配列番号34(PepSP1072)はCD31IGL1-AのTyr107-Glu122領域をカバーしている。

【0194】

組み立て中、すべての天然アミノ酸とFmoc-NH-PEG4-COOHに対して二重アシル化反応が行われた。合成および一般的な手順(Mix1)に従って行われた切断後、混合物は分析的UPLCで分析され、ESI+質量分析法で確認された；凍結乾燥して粗生成物を得ました(Y=70%)。LCMS分析計算。C₉₆H₁₆₆N₂₇O₃₃の場合、2225.21Da；found；1114.0(M+2)²⁺。粗ペプチドは、調製用WatersXBridgeC18(250x50mm、120A、10μm)カラムを使用して逆相HPLCで精製され、次の溶出液Bの勾配を使用した、5%Bから5%Bまで5分間、5%Bから25%Bまで20分間、流速80mL/分。配列番号34は、TFA塩としてアモルフ凍結乾燥固体(Y=25%)として単離された。精製されたペプチドはLC/MS(方法A)で分析された。[M+3H]³⁺質量シグナルは保持時間2.97分のピーク下で見つかり、ペプチド質量743.0が明らかになり、これは分子量2226.54の予想値と一致している。

【0195】

配列番号23の合成手順：

hCYKSTVIVNNKEKTTAEYhC-(Ttds)₄-K(N₃)-NH₂ペプチドの構造は図13に示されている。

【0196】

配列番号23(PepSP1376)は106-124の領域をカバーしており、位置106と124がホモシステインに変異しており、これにより環状構造を持つジスルフィド結合が形成される。

【0197】

合成と切断は一般的な手順(Mix1)に従って行われ、切断された混合物は分析UPLCで分析され、ESI+質量分析法で確認され、凍結乾燥されて粗生成物(Y=65%)が得られた。粗材料はDMSO/H₂Oの9/1混合物に1mg/mLの濃度で溶解された、水性NH₃を加えてpH9に達し、混合物を室温で48時間攪拌した。ジスルフィド橋の形成はUPLCによって確認され、混合物は凍結乾燥された。粗ペプチドは、XBridgeC18(250x50mm、120A、10μm)カラムを使用した逆相HPLCによって精製され、以下の溶媒Bの勾配を使用した、5%Bから5%Bを5分間、20分間で25%Bに、流速80mL/min。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥してTFA塩として精製生成物を得ました(Y=28%)。精製されたペプチドはLC/MS(方法A)で分析された。[M+3H]³⁺質量信号は保持時間3.57分のピークの下で見つかり、ペプチド質量1195.4が分子量3583.22の予想値と一致することが明らかになった。

【0198】

配列番号35の合成手順：

K(N₃)-PEG4-PRVTLDDKEAIIQGGIVRVNSSVP EEK-CONH₂ペプチドの構造は図14に示されている。

【0199】

配列番号35(PepSP1071)はCD31IGL2-AのPro133-Lys158領域をカバーしている。

【0200】

合成および切断は一般的な手順(Mix1)に従って行われ、切断された混合物は分析用UPLCで分析され、ESI+質量分析法で確認され、粗生成物(収率=54%)を得

10

20

30

40

50

るために凍結乾燥された。粗ペプチドは、調製用ダブル Waters Delta Pack C18 カートリッジ (100 x 40 mm、300 Å、15 μm) を使用して逆相 HPLC で精製された。次のエリュエント B のグラジエントが使用された、5 % B から 5 % B を 5 分間、20 分間で 25 % B に、流量 80 mL / 分。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥して TFA 塩として精製生成物を得ました (Y = 35 %)。精製されたペプチドは LC / MS (方法 A) で分析された。[M + 3H]³⁺ 質量信号は保持時間 3.57 分のピークの下で見つかり、ペプチド質量 1085.0 が分子量 3251.76 の予想値と一致することが明らかになった。

【0201】

配列番号 36 の合成手順：

A c - K (N₃) - (T t d s) 4 - P R h C T L D K K E A I Q G G I V R V N h C S V P E E K - C O N H₂ ペプチドの構造は図 15 に示されている。

【0202】

配列番号 36 (PepSP1380) は、配列番号 35 と同様に CD31 IgL2 - A の Pro133 - Lys158 領域をカバーしているが、位置 135 および 152 のホモシステインの変異により、環状構造を持つジスルフィド結合が形成される。

【0203】

合成は一般的な手順に従って行われた。ペプチド組み立て中、Ser - Val - Pro、Ile - Val - Arg - Val、および Pro - Arg - homoCys - Thr - Leu フラグメントの残基に対して二重アシル化反応が行われた。Fmoc 脱保護は、DMF 中の 20 % (V / V) ピペリジンを用いて、90 °C で 120 秒間、位置 6 の Asp まです樹脂を二重処理することで行われた。この残基の後、アスパルチミド形成を最小限に抑えるために室温で脱保護が行われた。4 つの T t d s および末端の L y s - アジド残基は、HOAT (5 eq) および DIPIC (5 eq) をカップリング試薬として DMF 中で手動で導入された。最後の T t d s 残基の三重カップリングが完全な変換を達成するために行われた。組み立ての最後に、樹脂は Ac2O (10 eq) と DMF で 30 分間処理された。切断は一般的な手順に従って Mix 1 を使用して行われ、混合物は分析 UPLC によって分析され、ESI + 質量分析によって確認され、粗生成物 (Y = 73 %) を得るために凍結乾燥された。粗材料は DMSO / H₂O の 9 / 1 混合物に 1 mg / mL の濃度で溶解された、水性 NH₃ を加えて pH 9 に達し、混合物を室温で 72 時間攪拌した。この時間の後、ジスルフィド橋の形成が UPLC によって確認され、反応混合物を停止するために TFA が添加され、その後凍結乾燥された。粗ペプチドは ReprosilC8 (250 x 40 mm、300 Å、5 μm) カラムを使用して RP - HPLC によって精製され、次の溶媒 B の勾配が使用された、20 % B を 5 分間 ; 20 % B から 40 % に 25 分間 ; 流量 60 mL / 分。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥して TFA 塩として精製生成物を得ました (Y = 5 %)。精製されたペプチドは LC / MS (方法 B) で分析された。[M + 4H]⁴⁺ ピークの保持時間 3.23 分で見つかった質量信号は、ペプチド質量 1076.8 を示し、予想値 4301.09 分子量と一致している。

【0204】

配列番号 37 の合成：

[#CH₂CONH₂GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ - (T t d s) 4 - K (N₃) - NH₂] - [QHQM L F Y h C # D D V L F Y N I S S M K - C O N H₂] ペプチドの構造は図 16 に示されている。

【0205】

配列番号 37 - 38 (SP1379) は、インターミディエイト A (INTA) (QHQM L F Y h C # D D V L F Y N I S S M K - C O N H₂) の hCys8 とインターミディエイト B (INTB) [BrCH₂CO - G # TYKSTVIVNNKEKTTAEYQ - (T t d s) 4 - K (N₃) - NH₂] のブロモアセチル基との間のチオエーテル結合を介して得られたヘテロ二量体である。

【0206】

DMSO中のINTB (1 eq) の5mM溶液を、DIPEA (5 eq) の存在下でDMSO中のINTA (1 eq) の2mM溶液に滴下した。反応は室温で1時間攪拌され、その間に反応の進行はLCMSでモニターされた。TFAを反応混合物に加えてpH4に達し、ReprosilC8 (250 x 40mm、300 Å、5 μm) カラムを使用してRP-HPLCで粗製品を精製した。以下の勾配が使用された、25% Bを5分間；25%から45%のBを25分間；流速、40 mL/min。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥してTFA塩として精製された生成物を得ました (Y = 21%)。精製されたペプチドはLC/MS (方法B) で分析された。[M + 4H]⁴⁺質量信号は保持時間4.35分のピーク下で見つかり、ペプチド質量1545.5が明らかになり、分子量6173.13の予想値と一致した。

10

【0207】

配列番号38の合成：

[Ac-K(N₃)-(Ttds)4-PRVTLDKKEA IQGGIVRVNSSVP EEK-Ttds-K#(CH₂CO)-CONH₂]-[QHQM L F Y h C # D D V L F Y N I S S M K-CONH₂] ペプチドの構造は図17に示されている。

【0208】

配列番号38は、中間体A (INTA) (QHQM L F Y h C D D V L F Y N I S S M K-CONH₂) のhCys8と中間体C (INTC) [Ac-K(N₃)-(Ttds)4-PRVTLDKKEA IQGGIVRVNSSVP EEK-Ttds-K(BrCH₂CO)-CONH₂] のブromoアセチル基との間のチオエーテル結合を通じて得られたヘテロ二量体である。

20

【0209】

INTC (1 eq) の5mM溶液をDMSO中のINTA (1 eq) の2mM溶液にDIPEA (5 eq) の存在下で滴下した。反応は室温で1時間攪拌され、その間に反応の進行はLCMSでモニターされた。TFAを反応混合物に加えてpH4に達し、ReprosilC8 (250 x 40mm、300 Å、5 μm) をカラムとして使用してRP-HPLCで粗製品を精製した。次のエルエントBのグラジエントを使用した、25% Bを5分間；25%から45%のBを25分間；流速、40 mL/min。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥してTFA塩として精製された生成物を得ました (Y = 5%)。精製されたペプチドはLC/MS (方法B) で分析された。[M + 5H]⁵⁺4.59分の保持時間でピークの下に見つかった質量信号は、ペプチド質量1445.9を示し、予想される分子量7221.47と一致している。

30

【0210】

配列番号1の合成：

中間体A：QHQM L F Y h C D D V L F Y N I S S M K-CONH₂

【0211】

中間体Aの構造は図18に示されている。

【0212】

ヘテロ二量体配列番号37 (SP1379) および配列番号38 (SP1383) の共通線形前駆体中間体は、合成および切断の一般的な手順に従って調製された、すべてのFmoc脱保護は室温で行われた。粗ペプチドは、カラムとしてReprosilC4 (250 x 40mm、120 Å、5 μm) を使用し、次のエルエントBの勾配で精製された、20% Bを5分間；20% Bから40% Bに25分間；流量、60 mL/分、波長214 nm。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥してTFA塩として精製された生成物を得ました (Y = 2%)。

40

【0213】

配列番号2の合成：

中間体B：(BrCH₂CO-GTYKSTVIVNNKEKT TAEYQ-(Ttds)4-K(N₃)-NH₂)

【0214】

50

中間体 B の構造は図 19 に示されている。

【0215】

ヘテロ二量体の線形前駆体配列番号 37-38 (SP1379) は、合成の一般的な手順に従って調製された。組み立ての最後に、樹脂上の最後の残基 (グリシン) の遊離アミノ基は、DIC/HOAt 法 (樹脂負荷に対して 4 倍の過剰量) に従って臭化酢酸 (5 当量) で処理された。混合物は室温で 1 時間振とうされ、反応はカイザーテストによって監視された。樹脂はろ過され、DMF/DCM/DMF (各 6 回) で洗浄され、一般的な合成手順で報告されているように切断混合物 (Mix 1) で処理された。粗ペプチドは、Reprosil C4 (250 x 40 mm、120 Å、5 μm) カラムを使用して RP-HPLC で精製され、次の勾配を使用した。20% B を 5 分間; 20% B から 40% B に 25 分間; 流量、60 mL/分、波長 214 nm。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥して TFA 塩として精製された生成物を得ました (Y = 30%)。

10

【0216】

配列番号 3 の合成:

【0217】

INTC、Ac-K(N₃)-(Ttds)4-PRVTLDKKEA IQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K(BrCH₂CO)-CONH₂

【0218】

中間体 C の構造は図 20 に示されている。

【0219】

ヘテロ二量体配列番号 39-40 (SP1383) の線形前駆体 C は、一般的な合成手順に従って調製された。樹脂に最初にロードされたアミノ酸は、側鎖アミノ基に all o c で保護されたリシンだった。次の残基に対して二重アシル化が行われた、SVP、IVRV、および PRVTL、PRVTL 残基の後、すべての Fmoc 脱保護は室温で行われた。

20

【0220】

組み立ての最後に、樹脂は DCM に懸濁された、フェニルシラン (24 eq) と Pd(PPh₃)₄ (0.25 eq) を加え、樹脂を 30 分間振動させた。サイクルを 2 回繰り返した。2 回目のサイクルの終わりに、0.5% DIPEA と 0.5% ジチオカルバマートナトリウムの DMF 溶液を樹脂に通してパラジウム残留物を除去した。Lys の保護解除されたアミノグループとプロモ酢酸 (5 eq) のカップリングは、DIC/HOAt 法 (樹脂負荷に対して 4 倍の過剰量) で DMF 中で行った。混合物は室温で 1 時間振とうされ、反応はカイザーテストによって監視された。樹脂はろ過され、DMF/DCM/DMF (各 6 回) で洗浄され、一般的な合成手順で報告されているように切断混合物 (Mix 1) で処理された。粗ペプチドを精製した、Reprosil C4 (250 x 40 mm、120 Å、5 μm) カラムと以下のグラジエント、20% B を 5 分間; 20% B から 40% B に 25 分間; 流量、60 mL/分、波長 214 nm。生成物を含む画分を収集し、凍結乾燥して TFA 塩として精製された生成物を得ました (Y = 30%)。

30

【0221】

配列番号 41 の合成:

Ac-K(N₃)-GGSGGSGG-YKDDVL FYNIS SMKST-NH₂ (SP547) 配列番号 41 (PepSP547) は、CD31 I g L 1-A の Tyr 76-Thr 91 領域をカバーする線状ペプチドで、アジド-リンカーの位置は N 末端にある。

40

【0222】

配列番号 42 の合成:

Ac-YKDDVL FYNIS SMKST-GGSGGSGG-K(N₃)-NH₂ (SP548) 配列番号 42 (PepSP548) も同じく CD31 I g L 1-A の Tyr 76-Thr 91 領域をカバーする線状ペプチドであるが、アジド-リンカーの位置は C 末端にある。

50

【0223】

プロトコル

ニチノールディスクは未処理（ベアメタル）またはドメイン1、ドメイン2、またはドメイン1と2のCD31アナログペプチドでコーティングされる。テストされたペプチドは、ポリドーパミン、DBCO-PEG4-アミン、およびアジドCD31誘導体ペプチドを使用したシーケンシャルディップコーティング層形成手順に従ってニチノールディスクにグラフトされる。このステップの後、すべてのディスクは48時間ヒト大動脈内皮細胞とインキュベートされる。ディスクはその後洗浄され、細胞はホルマリン溶液で固定され、染色される。染色は、アレクサフルオール（登録商標）488色素（アクチンの緑色蛍光）に結合したファロイジンを使用して行われ、DAPIはDNA染色に使用され、ドメイン1のCD31抗体はAPCに結合されて外部ドメイン1の染色に使用される。細胞接着およびアクチン／CD31の発現は、染色後の表面の画像解析によって評価された。

【0224】

結果は図2から図6に示されている。

【0225】

特に、図2に示すように、裸のまたはコーティングされたニチノールディスクは培養ウェルの底に配置された。一次ヒト大動脈内皮細胞（HAEC）は、48時間の期間ディスク上で成長することが許可された。その後、ディスクはリン酸緩衝生理食塩水で洗浄され、ホルマリンで固定され、蛍光顕微鏡検査のために処理された。ディスクに付着した細胞は、Hoechst33342（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、核を染色するため）、AlexaFluor（登録商標）488染料に結合したファロイジン（ $0.5\mu\text{M}$ 、F-アクチン繊維を染色するため）およびCD31ドメイン1に対するモノクローナル抗体、アロフィコシアニンに結合したもの（細胞表面での完全なCD31の存在と局在を検出するため）を含む溶液に37℃で1時間浸漬され、洗浄され、ガラス底のイメージングチャンバーに裏返しに取り付けられ、倒立蛍光顕微鏡でイメージングされた。代表的な画像は、裸の材料上で成長するHAECが強いF-アクチン染色を示し、ストレスファイバーの形成が強化されていることを反映している一方で、完全なCD31の発現はむしろ弱いことを示している。対照的に、CD31模倣ペプチドでコーティングされたディスクは、ストレスファイバーのシグナルがほとんど見られず、細胞境界で強く均一なCD31発現を示し、より生理的な内皮表現型を反映していた。

【0226】

図3は、個々のディスク画像のシグナルの定量分析を示しており、「統合密度」（シグナル密度に陽性染色の面積を掛けたものとして、ImageJ解析オープンソフトウェアによって報告されている）として表現されている。表面タイプはY軸に示され、データは平均±SD（ $N=6$ ／表面タイプ）として表現されている。各ドットは特定の表面変更に対応している。F-アクチンの発現は、外来材料の存在下での細胞の細胞ストレスに関連している。すべての表面変更は、SP1070ペプチドを除いて、裸金属と比較して細胞ストレスの減少をもたらす。SP1070ペプチドは、裸金属と比較して細胞ストレスに影響を示しません。

【0227】

図4では、表面タイプがY軸に示されている。各ドットは特定の表面変更に対応している。データは「統合密度」平均±SD（ $N=6$ ／表面タイプ）として表現されている。CD31の発現は、内皮細胞が特定の基質上で成長する際に生理的な表現型を採用する能力に関連している。ニチノールディスクの表面修飾に応じて、HAECによるCD31発現に関して重要な変動が観察される。表示されたCD31アナログペプチドのうち4つ（ペプチドSP1072-1374-1375および1380）は、他の修飾ディスクおよび裸のコントロールと比較して、CD31発現に明らかなプラスの効果を示す。

【0228】

図5の「ミラー」バーは、ディスク表面にコーティングされた各ペプチドタイプ（Y軸に示されている）および裸のディスクに対するF-アクチン（左）およびCD31（右）

染色の平均統合密度を報告している。データは、各コーティングの細胞ストレス（アクチン発現）の増加に従って（上から下へ）並べ替えられている。図に示されているように、裸の金属ディスク上で成長したH A E Cでは、細胞ストレスの度合い（高いアクチン発現によって検出される）および内皮表現型の障害（低いC D 3 1発現によって記録される）が明らかである。逆に、S P 1 3 7 4 ペプチドでコーティングされたディスクじみたC D 3 1 模倣表面は、低い細胞ストレス（低いアクチン発現）と一貫した機能的内皮表現型（高いC D 3 1 発現）をもたらす。

【0229】

図6に示されているデータは、C D 3 1 とF-アクチン発現の比率として表されている。裸の金属およびP D A のみでコーティングされたディスクと比較して、ペプチドS P 1 0 7 2、1 0 7 4、1 0 7 5 および1 0 8 0 でコーティングされた表面で成長する細胞は、明らかにより高いC D 3 1 / アクチン比を示し、より生理的な内皮細胞表現型を反映している。

10

【0230】

実施例1

機能スコアとバイオミメティック性能

機能スコア

図6と同じプロトコルに従って、異なるグループに属する異なるペプチドの効果がバッチでテストされた。各グループからの異なるペプチドがバッチでテストされ、個々のペプチドの効果が別々の実験で繰り返し評価された。すべての実験からのデータは、内皮細胞で覆われたディスク側の画像のコンピュータ支援解析によって得られ、逆位蛍光顕微鏡の青、緑および赤チャネルでキャプチャされた。異なるグループに属するペプチドの機能スコアは、細胞数（青色、D a p i + 核の数で検出）をC D 3 1 発現の統合密度（マウス抗ヒトC D 3 1 モノクローナル抗体、クローン9 G 1 1、アロフィコシアニン結合による赤色シグナル）で掛け、その積をF-アクチン重合の統合密度（緑色蛍光色素に結合したファロイジン）で割ることによって計算された。

20

【0231】

すべての実験からの生データを使用してスコアを計算するために使用された式は次のとおりである、核の数 $\times$ C D 3 1 染色の統合密度 $\div$ F-アクチン染色の統合密度 スコアは各実験で $(x - \min) / (\max - \min)$ の式を使用して0-1にスケールされた。

30

【0232】

データは図22に示された表および図23のグラフに報告されている。

【0233】

バイオミメティック性能

異なるグループに属するペプチド（ペプチド番号は括弧内に示されている）の機能効果（バイオミメティック性能）は、図6の実施例で説明されたのと同じプロトコルを使用してスクリーニングされた。各グループからの異なるペプチドがバッチでテストされ、個々のペプチドの効果が別々の実験で繰り返し評価された。すべての実験からのデータは、内皮細胞で覆われたディスク側の画像のコンピュータ支援解析によって得られ、逆位蛍光顕微鏡の青、緑および赤チャネルでキャプチャされた。異なるグループに属するペプチドの機能スコアは、細胞数（青色、D a p i + 核の数で検出）をC D 3 1 発現の統合密度（マウス抗ヒトC D 3 1 モノクローナル抗体、クローン9 G 1 1、アロフィコシアニン結合による赤色シグナル）で掛け、その積をF-アクチン重合の統合密度（緑色蛍光色素に結合したファロイジン）で割ることによって計算された。

40

【0234】

すべての実験からの生データを使用してスコアを計算するために使用された式は次のとおりである、核の数 $\times$ C D 3 1 染色の統合密度 $\div$ F-アクチン染色の統合密度 スコアは各実験で $(x - \min) / (\max - \min)$ の式を使用して0-1にスケールされ、すべての実験からのスケールされたスコアは図24に示されている。

【0235】

50

実施例 2

発明によるペプチドのさらなる C D 3 1 / アクチンスコアと従来技術のペプチド P 8 R I との比較

材料と方法

実施例 1 と同じプロトコルに従い、上記で定義された発明によるペプチド (S P 5 4 7 、 S P 5 4 8 、 S P 7 4 5 、 S P 1 3 7 4 、 S P 1 0 7 2 、 S P 1 0 7 0 、 S P 1 0 7 1 、 S P 1 3 7 9 および S P 1 3 8 3) と、配列 K W P A L F V R (配列番号、) の従来技術のペプチド P 8 R I を使用した。 5 2) 。

【 0 2 3 6 】

結果

「 C D 3 1 / アクチン」スコアは、 C D 3 1 免疫染色シグナルの統合密度をファロイジンのシグナルで割ったもので、ファロイジンは細胞骨格の重合 F - アクチンに結合する。このスコアは、培養ウェルの底に置かれた実験ディスクの表面に成長する動脈内皮細胞の生理的 / 非ストレス状態を識別するために使用された。より高いスコアはより生理的な状態を示し、より低いスコアは内皮細胞のストレス状態を反映し、血栓形成促進 / 炎症促進活動と関連している (個別の培養ウェルの上清中の可溶性 P A I - 1 および I L - 6 のレベルによって確認される) 。したがって、 C D 3 1 / アクチンスコアが高いほど良いである。

【 0 2 3 7 】

異なるペプチドを用いて繰り返し行われた実験の結果は図 2 5 に示されている。発明による新しいペプチド S P 7 4 5 、 S P 1 3 7 4 、 S P 1 0 7 2 、 S P 1 0 7 0 、 S P 1 0 7 1 、 S P 1 3 7 9 および S P 1 3 8 3 で得られた C D 3 1 / アクチンスコアは、裸の金属ディスクや P D A 単独でコーティングされたディスクで得られたものよりも著しく高いである。統計的有意性は一つの測定だけでは達成できませんが、新しいペプチド S P 5 4 7 および S P 5 4 8 でコーティングされたセクションは、発明による他のペプチドでコーティングされたセクションと同等の C D 3 1 / アクチンスコアを持っているようである。さらに、発明によるすべてのペプチドの平均 C D 3 1 / アクチンスコアは、従来技術のペプチド P 8 R I の平均 C D 3 1 / アクチンスコアよりも高いである。

【 0 2 3 8 】

結論

上記の結果は、発明による新しいペプチドでコーティングされたディスクが、 P D A のみでコーティングされたセクションや、従来技術のペプチド P 8 R I でコーティングされたセクションよりも高く、したがってより良い C D 3 1 / アクチンスコアを示すことを確認している。

【 0 2 3 9 】

実施例 3

本発明によるペプチド S P 1 0 7 2 でコーティングされたフローダイバータースtent (C F D) の生体内効果と、親水性ポリマー N T M A のみでコーティングされたtent との比較

【 0 2 4 0 】

材料と方法

ステント

フローダイバータースtent (C F D) は、 S i n o m e d 製のニチノール製の編み目メッシュである。彼らは次のいずれかのコーティングでコーティングされている、

1. 発明による S P 1 0 7 2 ペプチド、または
2. 親水性ポリマー e G N T M A (N - [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] アクリルアミドのエレクトログラフティングから得られる) 。

10

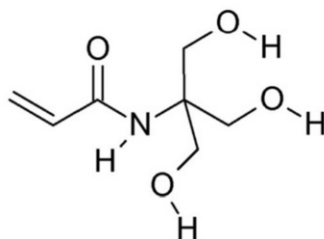
20

30

40

50

【化 1】



10

【0241】

SP1072でコーティングされたフローダイバーターステントの場合、次の材料とプロトコルを使用してコーティングが行われた、

【0242】

材料：

脱塩水

Tris 10mM（分子量、121.135すなわち1.21mg/mL）pH 8.5 緩衝液

0.6g トリズマベース（CAS 77-86-1）

500mL 脱塩水

pHを8.5にHClで調整

0.45μm フィルターで濾過室温で保存

ポリドーパミン（PDA）2mg/mL

ドーパミン塩酸塩 99%（CAS 62-31-7、分子量、189.64、4℃で保存）

最終濃度 2mg/mL の溶液を得るために、10mM Tris 緩衝液 pH 8.5 に適量のドーパミン塩酸塩を溶解する（暗所で保管）

DBCO（分子量、678.79、DBCO-スルホ-PEG（4）-NH₂（参照、RL-2421、IRIS biotech）

化合物を受け取ったら、15-20mg のストック重量を準備する。粉末を溶解して、10mM Tris バッファー pH 8.5 で 20mg/mL のストック溶液を作成する。最終濃度 300μM（203μg/mL）でコーティングプロセスのための必要な体積を準備する。

20

30

【0243】

SP1072 ペプチドを 50μg/mL で使用する。

【0244】

プロトコル、

1) 各ステントを 5mL のポリプロピレン丸底チューブ（Bd Falcon Ref 352063）に移す。ステントがチューブの底に落ちることを確認する。

2) 各チューブに 2mg/mL の PDA 溶液を 4.5mL 追加する。各チューブを回転ホイール（約 20rpm）で一晩（18+/-2時間）室温で均質化し、光から保護する。ステントがチューブ内で動き、キャップに引っかからないようにする。ステントの色が銀色から茶色/黒に変わるはずである。インキュベーション期間後、溶液は小さな PDA 凝集体とともに黒くなる

3) 各ステントを新しいチューブに移し、脱塩水で 3 回すすぎます。各すすぎで回転ホイールで 5 分間均質化する。

4) 最後のすすぎを残し、チューブを少なくとも 30 秒間超音波処理して、残っている PDA の塊を除去する。

5) 各ステントを 2mL のエッペンドルフチューブに移し、チューブごとに 1.8mL の DBCO（300μM）を含める。各チューブを回転ホイール（約 20rpm）で一晩

40

50

室温で均質化し、光から保護する。

6) 各ステントを新しいチューブに移し、脱塩水で3回すすぎます。各すすぎで回転ホイールで5分間均質化する。

7) 各ステントを2 mLのエッペンドルフチューブに移し、チューブごとに1.8 mLのCD31ペプチド(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を含める。各チューブを回転ホイール(約20 rpm)で2時間、室温で均質化し、光から保護する。

8) 各ステントを新しいチューブに移し、脱塩水で3回すすぎます。各すすぎで回転ホイールで5分間均質化する。

9) 各ステントを絶対エタノールに5秒間浸してから乾燥させます。

【0245】

比較用の親水性ポリマーeGNTMAコーティングフローダイバーターステントは、以下のプロトコルに従って得られた、(1)洗浄前処理、ステントフレームはアセトン、エタノール、および注射用水でそれぞれ10分間超音波処理された。

【0246】

(2) 電気グラフト溶液の調製、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アクリルアミド、濃度0.30 M; NaNO_3 、濃度0.05 M; 4-ニトロフェニルテトラフルオロボレートジアゾニウム塩、0.005 M; 残りの量はDMSO溶媒。

【0247】

(3) 電気グラフトプロセス、前処理されたステントを作業電極として使用し、白金箔を対極として使用し、電気グラフト溶液に浸し、-0.1 Vから-3.0 Vまでの線形掃引電圧を適用し、電圧スキャン速度0.05 V/sで10サイクル間、2つの電極間に適用した。

【0248】

(4) コーティングの平滑化および乾燥、電気グラフトされた足場を窒素バブリング(速度0.5-1.0 L/min)を伴うアセトン(2 L)で10分間平滑化し、40°Cの真空乾燥オーブンに2時間静置した。

【0249】

同じ組成の編みメッシュと同じ組成のクーポンにも同じプロトコルが適用される。木の棒で電気グラフトされたクーポンに傷をつけたステップでプロフィロメトリー(KLA-Tencor)で測定したところ、125 nmのフィルムが得られた。

【0250】

動物手順

合計8匹の健康なニュージーランドホワイトウサギ(予備動物2匹を含む)、オスとメス、体重約3 kgがこの研究に含まれた。術後7日、30日、60日の3つの観察時間ポイントが設定された。実験は2つのステップに分かれた、

1) 動脈瘤動物モデルの作成;

2) 各動物の動脈瘤を持つ動脈および腹部大動脈に密なメッシュステントを植え込む。動脈瘤を持つ動脈へのステント植え込みは、動脈瘤治療におけるステントの安全性と有効性を調べるために使用され、腹部大動脈へのステント植え込みは、腰動脈の一对を覆うことで、テストされたステントの安全性を調べるために使用された。詳細は以下の表1を参照してください。

10

20

30

40

50

【表 1 8】

表 2. 実験デザイン

観察期間 (日)	動物の数 (のみ)	ブラケット数 (個)	ステント植え付け部分	評価指標
7	2	4	動脈瘤を有する動脈、 腹部大動脈	適応期間中、術前、およびサンプリング前の定期的な血液 および血液生 化学検査。
3 0	2 + 2	4 + 4		密なメッシュサポートの操作性と有効性を評価する。
6 0	2 + 2	4 + 4		動物は介入手術後、期待されるエンドポイントまで飼育さ れ、エンドポイントフォローアップ後に安楽死させられ、肉眼解 剖および組織サンプリングが行われた。 組織病理学的評価、動脈瘤を有する動脈の定性的および 定量的分析。 S E M分析；7 D時点で選択された腹部大動脈のS E M分析；3 0 D時点で選択された腹部大動脈のS E M 分析、キャリア動脈のS E M検出は未定；6 0 D時点で それぞれ1つのキャリア動脈と1つの腹部大動脈 ☆ S E M分析。

【0 2 5 1】

ステップ1) および2) のために、麻酔は以下のように行われた、すべての外科手術は
無菌技術を使用して行われ、実験動物は植え付け手術中に全身麻酔下にあった。

【0 2 5 2】

手術当日、実験動物は鎮静され、6 m g / k g の S u t e x (登録商標) 5 0を筋肉内
注射して麻酔が導入される。必要に応じて、実験動物は呼吸マスクを使用して吸入による
イソフルランで麻酔することができる。

【0 2 5 3】

麻酔の導入が成功した後、実験動物は口腔内視トラキアを通じて挿管され、呼吸アクセ
ス確立し、麻酔と酸素の混合物を連続吸入して麻酔を維持するために人工呼吸器デバイ
スに接続される。手術前に実験動物が嘔吐を止めるためにアトロピンを投与する必要があ
るかもしれません。これは、嘔吐物による窒息を防ぐためである。

【0 2 5 4】

麻酔され挿管された実験動物は、側臥位または仰臥位で手術台に置かれ、拘束バンドを
使用して固定され、その位置が写真撮影および記録された (後の観察のために同じ位置と
角度を容易にするため)。右後肢の手術部位が準備され、消毒され、シートが敷かれる。
動物の位置が変更された場合、新しいシートと手術部位の準備が必要である。

【0 2 5 5】

末梢静脈のいずれかに静脈内針を挿入し、必要に応じてカテーテルを通じて薬物や補液
を投与する。

【0 2 5 6】

ステップ1) (動脈瘤動物モデルの作成) は以下のように行われた、

(a) ウサギを仰向けに手術台に置き、首を剃ります。通常、ヨードホルムとアルコールで消毒し、タオルを敷く。

(b) 右総頸動脈を見つけます、正中頸部切開（上胸骨窩の上と下1.5cm）を行い、皮膚を切開し、右胸鎖乳突筋の外側に沿って分離し、右総頸動脈を見つけて解放し、迷走神経の保護に注意してウサギの心拍と呼吸が遅くなったり止まったりしないようにする。20分ごとに、生理食塩水をウサギの頸部血管と迷走神経に注入して湿らせます。2本のNo. 1シルクワイヤーが右総頸動脈に巻き付けられた。

(c) 右総頸動脈の開始部分を完全に露出させる、組織剪刀で右胸筋の一部を開き、右総頸動脈に沿って近位に分離し、右総頸動脈と右鎖骨下動脈の一部を慎重に分離する。

(d) 右総頸動脈の開始部分で閉鎖ルーメンを作成する、右総頸動脈の開始部分から約2.5cmの位置でNo. 1ワイヤーを結紮し、別のNo. 1ワイヤーを結び目に巻き付けますが、結紮はせず、動脈瘤クリップを右鎖骨下動脈近くの右総頸動脈の開始部分にクランプし、動脈瘤クリップの内側が右総頸動脈と右鎖骨下動脈の接合部の下にあることを確認する。

(e) エラスターゼの注入、眼科用ハサミで右総頸動脈の始まりから1.5cmの位置で動脈の側壁を切り、エラスターゼを含むカニューレ針（末端に注射器が付いた22Gカニューレ針）を挿入し、針の先端が動脈瘤クリップにできるだけ近づくようにし、液体が漏れないように絹糸でカニューレ針の挿入部を結紮し、約75Uの豚膵臓エラスターゼを管腔内に注入する。

(f) 血管結紮、エラスターゼアブレーションから20分後にトロカール針を取り外し、穿刺部を結紮し、動脈瘤クリップを慎重に緩め、必要に応じて生理食塩水の点滴で湿らせます。

(g) 傷口を縫合する、乾燥した蓄積血液に浸したガーゼで、筋肉と皮膚層を層ごとに縫合し、ヨードホルムで切開部を消毒する。

(h) 手術直後、ヘパリンナトリウム300U/kgおよびセフトリアキソンナトリウム溶液0.3g/kgを静脈内注射し、動物のバイタルサインを清掃まで注意深く観察し、別々のケージで飼育した。手術後3-5日間、抗生物質の使用を続けてください。

【0257】

ステップ2）（各動物の動脈瘤を持つ動脈および腹部大動脈に高密度メッシュス TENT を植え込む）は以下のように行われた、

(a) 麻酔、上記の通り。

(b) 右大腿動脈を切開し、5F保護血管穿刺シースを挿入した。

(c) 5Fイントロデューサーカテーテルを大動脈弓に配置し、DSA血管造影を行った。

(d) マイクロカテーテルの配置、静脈内ヘパリンは全身ヘパリン化で処理され、マイクロカテーテルが鎖骨下動脈から血管の遠位端までマイクロガイドワイヤーを通して押し込まれ、引き抜かれた。

(e) キャリア動脈の位置におけるス TENT 植え付け、高密度メッシュス TENT システムは、イントロデューサーシースを通してマイクロカテーテルに挿入され、プッシュロッドを適切な位置まで前進させ、イントロデューサーシースを引き抜き、プッシュロッドをさらに押し続けてス TENT をキャリア動脈に押し込み、腫瘍の首がス TENT の中央付近に来るようにス TENT の位置を調整する。プッシュロッドを固定し、マイクロカテーテルを引き戻してス TENT を部分的にリリースし、回収ポイントの位置にする。ス TENT の位置が満足できる場合は、マイクロカテーテルを引き続き引き戻してス TENT を完全にリリースする。位置が満足できない場合は、マイクロカテーテルを後方に押し戻してス TENT をマイクロカテーテルに回収し、位置を調整して再度リリースして動脈瘤の首を完全に覆う。ス TENT の配置が完了した後、デリバリーシステムとマイクロカテーテルを引き抜く。

(f) 腹部大動脈におけるス TENT 植え込み、キャリア動脈の位置にテスト記事ス TENT のリリースが完了した後、ガイドカテーテルを引き戻して腹部大動脈の位置に配置し、同じ方法で2番目のス TENT を配置する。ス TENT は少なくとも一対の腰動脈の始まりを通

して腹部大動脈に配置する必要がある。リリースが完了した後、送達システム、マイクロカテーテル、およびガイドカテーテルを引き戻し、大腿動脈切開部を縫合する。

(g) 動物が目を覚まし、通常通りに餌を与えるのを待ちます。

【0258】

テストグループは、動脈瘤の位置（総頸動脈）および動物モデルの腹部大動脈に密なメッシュステントシステムを移植され、対照グループは動脈瘤を持つ動脈に密なメッシュステントシステムを移植された。腹部大動脈にデバイスを移植して、ステントが貫通および分岐血管に与える影響を評価した。

【0259】

植え付け中にIVでヘパリンナトリウム注射150U/kgに加えて、抗血小板療法（アスピリンとクロピドグレル）を動物に手術の3日前から1日1回5mg/kgずつ経口投与し、術後もエンドポイントまで5mg/kgずつ経口投与した。

【0260】

組織病理学的分析

キャリア動脈のステントセグメントから収集された組織は、10%中性ホルマリンで48時間以上浸漬固定され、アルコールグラデーションで脱水され、キシレン透明化処理を受けて組織病理学的分析が行われた。

【0261】

動脈瘤を持つ動脈の樹脂埋め込みステントセグメントは、動脈瘤の首を通して横断的に切断され、動脈瘤で1切片、非動脈瘤で2切片が切断され、HE染色された。非ステントセグメントはパラフィン埋め込みされ、近位端と遠位端でそれぞれ1切片が切断された。組織病理学的評価のためにHE染色が行われた。

【0262】

走査型電子顕微鏡（SEM）分析

7D（7日）、30D（30日）、および60D（60日）で各1匹の動物をランダムに選択し、上記の時間点で移植された動脈瘤を持つ動脈および腹部大動脈を収集してSEMを行い、動脈瘤の首部および腹部大動脈の分枝血管の開口部における流れ指向ステントの内皮化を観察した。

【0263】

注：7D時点では腹部大動脈のみがSEMで検査され、30D時点ではキャリア動脈のSEMが決定され、60D時点ではキャリア動脈および腹部大動脈がSEMで検査された。

【0264】

結果

電気グラフトクーポン上のeG（商標）NTMAフィルムグラフトの確認eG（商標）NTMAフィルムの赤外スペクトルは図26に示されている。

【0265】

さらに、サンプルの親水性の比較は水滴の形状によって視覚化できる（図27）、裸の表面では水滴が表面に立っているのに対し、eG（商標）NTMA表面では水滴が完全に平らであり、水接触角はほとんど測定できず、表面が超親水性であることを示している。

【0266】

これらの結果は、比較CFDステント上のeG（商標）NTMAフィルムの効率的なエレクトログラフティングを確認する。

【0267】

SEM結果

発明によるeGTMNTMAまたはSP1072ペプチドでコーティングされたステントの7日目の代表的なSEM断面は、図28に示されている。

【0268】

eGTMNTMAコーティングされたステント（左側を参照）の場合、ステントは血管内で完全に拡張され、良好なステント血管接合および血管内腔の開存性が見られた。少量

10

20

30

40

50

の血栓が部分的な領域に散在していた。少量のステントでは、ステント表面に内皮被覆があり、内皮被覆がない領域では、赤血球、炎症細胞、および血小板凝集がステント表面に付着している程度が異なっていた。側副血管の口径に閉塞は見られず、側副血管内の血流の開存性を示している。

【0269】

SP1072コーティングされたステント（右側参照）では、ステントは血管内で完全に拡張され、良好なステント血管の適合性と血管内腔の開存性が見られた。明らかな血栓は見られませんでした。eGTMNTMAコーティングされたステントとは対照的だった。ステント表面には部分的に内皮被覆が見られ（特に図26Bの領域BおよびDでの良好な被覆を参照）、内皮被覆がない領域では、赤血球、炎症細胞、および血小板がステント表面に付着していた。側副血管の口径に閉塞は見られず、側副血管内の血流の開存性を示している。

10

【0270】

組織病理学的分析

7日目の代表的な病理結果は図29に示されている。

【0271】

eGTMNTMAコーティングされたステント（図29A参照）では、動脈瘤の首の前にあるステント（右側参照）は新しい壁で覆われている。しかし後者は白血球に浸潤されているように見える（筋肉部分内の黒い核、およびステントストラットの近く、右下の写真参照）、内側には新鮮なフィブリン層が層を成し、外側には赤血球と血小板が詰まっている（フィブリン層の暗灰色の領域、左下の写真の黒い円参照）。さらに、動脈瘤嚢内の血栓は組織化されていないように見える（重合された細胞外マトリックスシートの存在の証拠はあらない）し、新鮮な血液（赤血球、血小板、白血球）がまだ血栓内に入っている。これは重要である。なぜなら、新鮮な血液がまだ入って嚢内に閉じ込められるという事実は、遅発性動脈瘤破裂のリスクを高める可能性があるからである。新鮮な血液の持続的な到来により新たな血栓形成／線溶の波が発生し、最終的に二つのシステム（トロンビン、プラスミンなど）の酵素が動脈瘤壁の分解を促進するからである。総じて、これらのデータは動脈瘤の首を覆う新生組織が過剰反応している（血栓形成および炎症を起こしている）、おそらく金属（異物）に対して、そして漏れやすいことを示している。

20

【0272】

対照的に、SP1072コーティングされたステント（図29A参照）の場合、動脈瘤嚢内の血栓は「組織化された」ものであり、明確で整列した細胞外マトリックスシートが見えるため、暗灰色の長く波打った線として検出される。注目すべきは、動脈瘤嚢内の新しい壁と血栓の間の空間が、無定形の灰色物質（新鮮なフィブリンや赤血球）を含まないことであり、これは新鮮な血液がもはやそこに入って閉じ込められることがないことを示しており、したがって血液酵素による動脈瘤壁の分解のリスクが低いことを反映している。嚢の周りの動脈壁の厚く規則的な形状はこの仮定を支持しており、血栓内の無定形物質／暗い核の欠如は、新鮮な血小板や凝固因子に対して不浸透性であるという仮定を支持している。

30

【0273】

右上の画像の黒い円、新しい動脈壁、細胞外マトリックスが豊富でコンパクト（濃い灰色）であり、炎症がない（黒い核がない）または血栓症がステントの下で形成されている。

40

【0274】

外側に組織化された血栓と内側に組織化された新しい壁の存在は、血液がまだ大きな動脈瘤の袋に入る可能性があるとしても、実施例に示されているように、ステントの特定の部分を通っても、血栓に入ることも新しい壁の上で凝固することもできないという事実を支持しており、血栓の完全な治癒と短期間での閉塞を可能にする、血液が新鮮な血栓や裸のステントに接触できる状況と比較して。実際、キャビティが仮想的になると、裸のステント（新しい壁がない部分）にCD31模倣コーティングが施されることで、隣接する内

50

皮細胞がデバイス上およびその間に移動し成長するのを促進し、組織化された血栓を完全に覆い、それによって動脈瘤の首を閉塞することができる。

【0275】

SP1072コーティングステントの動脈瘤に対する60日目の代表的な病理結果は、図30に示されている。非常に大きな動脈瘤囊にもかかわらず、血栓は非常によく組織化されている（血栓全体にわたる長く整然とした細胞外マトリックスのシート、新鮮な血液に対して不浸透性であり、血栓への白血球／血小板／赤血球の浸潤がないことによって検出可能）。組織化された血栓の前面がステントに到達するとすぐに、首は新しい動脈壁で完全に覆われる。後者は、ステントストラットと既に接触している動脈壁の炎症／血栓症の欠如（異物に対する反応の欠如）によって示唆されるように、よく組織化されている可能性が高いである。

10

【0276】

結論

上記の結果は、SP1072コーティングが以下を示していることを示している、

- ・フローダイバーターステントの内面で早期内皮化を促進する、
- ・動脈瘤囊の入口で組織化された血液不浸透性の新しい動脈壁の成長を促進し、囊内に組織化され非炎症性の血栓を形成することを可能にする、そして
- ・動脈瘤の入口以外の部位では、デバイスの内皮化が迅速かつ完全であり、明らかな炎症や新内膜形成は見られない。

【0277】

発明による他のペプチドで得られた同等の*in vitro*結果を考慮すると、熟練者によって同様の*in vivo*結果も期待されるろう。

20

【0278】

実施例 4

本発明によるペプチドSP1072でコーティングされたフローダイバーターステント（CFD）の生体効果を、抗血小板化合物の投与がない場合において、親水性ポリマーNTMAのみでコーティングされたステントと比較する

【0279】

実施例3で得られた良好な結果は、SP1072（または発明による別のペプチド）でコーティングされたステントが、移植後に抗血小板化合物、特に抗P2Y₁₂剤の投与を防ぐために、十分に迅速な再内皮化と十分な炎症の欠如を許す可能性があることを示唆している。

30

【0280】

この仮説をテストするための予備実験が行われた。

【0281】

材料と方法

実施例3と同じ材料とプロトコルが使用されたが、以下の点が異なる、

- ・各条件に対して3匹の動物のみが使用され、
- ・移植後に動物にアスピリンやクロピドグレルは投与されませんでした。

【0282】

40

結果

予備結果は次のことを示している、

- ・SP1072でコーティングされたフローダイバーステントを移植された動物は、7日後も血栓なしで生存している（*n* = 3）、
- ・対照的に、eGTMNTMAでコーティングされたステントを移植された動物は、7日目にすべて血栓症で死亡した（*n* = 3）。

【0283】

結論

予備的なものであるが、この実験は、発明によるペプチドでコーティングされた医療デバイスをを用いた植え付け後の治療において、患者が抗P2Y₁₂の使用を必要としない可

50

能性があり、さらに一般的には抗血小板療法（アスピリンを含む）を必要としない可能性があることを示唆している。

【0284】

この結果は非常に重要であり、抗血小板化合物、特に抗 P 2 Y 1 2 療法は出血リスクのある個人には安全に使用できない。さらに、出血リスクのない個人でも、抗血小板化合物は重大な副作用（アスピリンによる消化性潰瘍、抗 P 2 Y 1 2 による好中球減少症など）を引き起こす可能性があり、発明によるペプチドでコーティングされた医療デバイスの使用により、抗血小板化合物が必要ない場合や、はるかに低い濃度で 사용할 場合にはこれらの副作用を防ぐことができるかもしれない。

【0285】

実施例 5

本発明によるペプチド S P 1 0 7 2 でコーティングされた自己拡張型ステントの生体効果と、親水性ポリマー N T M A のみでコーティングされたステントの比較

【0286】

材料と方法

ステント

自己拡張型ステント（I S S）は、S i n o m e d 製のニチノールで作られた編み目メッシュである。彼らは次のいずれかのコーティングでコーティングされている、

1. 発明による S P 1 0 7 2 ペプチド、または
2. 親水性ポリマー e G T M N T M A（N- [トリス（ヒドロキシメチル）メチル] アクリルアミドの電着から得られる）。S P 1 0 7 2 ペプチドコーティングは、上記の実施例 3 に記載されているように行われる。

【0287】

親水性ポリマー e G T M N T M A コーティングされたステントは、上記の実施例 3 に記載されているように得られる。

【0288】

動物手順

この研究では、実験動物として 5 匹の健康なニュージーランドホワイトウサギが選ばれ、さらに 2 匹の予備動物が追加される。術後 7 日、1 4 日、2 8 日の 3 つの観察時間点があり、7 日目の時間点に 2 匹、1 4 日目の時間点に 1 匹、2 8 日目の時間点に 2 匹の動物がいる。各実験動物に合計 4 本のステントが移植され（テスト記事 A とテスト記事 B にそれぞれ 2 本ずつ）、各動物のステント移植部位として腹部大動脈と両側腸骨動脈が選択され、腹部大動脈に 2 本、両側腸骨動脈にそれぞれ 1 本のステントが移植される。術後の観察期間は画像診断でフォローアップされ、グループ A および B の各動物からランダムに選択された 1 つのサンプルが S E M に使用され、残りのサンプルは組織病理学的に分析される。実験の一般的な設計は以下の通りである。

10

20

30

40

50

【表 1 9】

表 3. 一般的な実験設計

時間点	動物の数	ステント移植の数		移植部位	実験内容
		テスト記事グループ A	テスト記事グループ B		
7 日間	1	2	2	両側外腸骨動脈を伴う腹部大動脈	1. 適応期間、術前、術前の血液ルーチンおよび血清化学検査。
1 4 日間	1	2	2		2. 術後観察飼育期間中の実験動物の日常観察。
2 8 日間	1	2	2		3. 解剖および肉眼観察と写真撮影。 4. 電子顕微鏡走査分析。 5. 病理組織学的分析のための標的血管。

注：試験記事グループ A とグループ B は、自己拡張ステントの 2 つの異なるコーティングである。

注：試験記事グループ A とグループ B は、自己拡張ステントの 2 つの異なるコーティングである。

【 0 2 8 9 】

外科手術手順、

（1）麻酔は以下のように行われた、

すべての外科手術は無菌技術を使用して行われ、実験動物は植え付け手順中に全身麻酔下にある。手術当日、実験動物は鎮静され、6 m g / k g の S u t e x （登録商標）5 0 を筋肉内注射して麻酔が導入される。必要に応じて、実験動物は呼吸マスクを使用して吸入によるイソフルランで麻酔することができる。

【 0 2 9 0 】

麻酔の誘導が成功した後、実験動物は口腔平面気管を通して挿管され、呼吸アクセスを確立し、麻酔と酸素の混合物を連続吸入して麻酔を維持するために人工呼吸器装置に接続される。手術前に実験動物が嘔吐を止めるためにアトロピンを投与する必要があるかもしれません。これは、嘔吐物による窒息を防ぐためである。

【 0 2 9 1 】

麻酔された挿管された実験動物は、側臥位または仰臥位で手術台に置かれ、拘束バンドを使用して動物を固定し、位置を写真撮影および記録する（後の観察に同じ位置と角度を使用するため）。右後肢の手術部位が準備され、消毒され、シートが敷かれる。動物の位置が変更された場合、手術部位のシートと準備を再度行う必要がある。

【 0 2 9 2 】

末梢静脈のいずれかに静脈内針を挿入し、必要に応じてカテーテルを通じて薬物や補液を投与する。

【 0 2 9 3 】

（2）5 F の血管シースを左または右の総頸動脈に挿入して血管アクセスを確立する。

【 0 2 9 4 】

（3）ガイドワイヤーの指導の下で血管アクセスを介して 5 F カテーテルを心臓の下行大動脈に導入し、腸骨動脈の血管造影を行いる。血管造影後に定量的な動脈血管測定を行い、ステント植え込み部位の選択を指導する。

【0295】

(4) マイクロカテーテルの配置、全身ヘパリン化で静脈内ヘパリンを処理し、マイクロカテーテルを配置する。マイクロカテーテルはマイクロガイドワイヤーを通して腸骨動脈の実験動物ステントを移植する部位まで押し進められ、マイクロガイドワイヤーは引き抜かれる。

【0296】

(5) 腸骨動脈ステントの植え込み、システムは導入シースを通してマイクロカテーテルに入り、プッシュロッドを適切な位置まで前進させ、導入シースを引き抜き、プッシュロッドをさらに押し進めてステントを腸骨動脈に押し込み、ステントの位置を調整してステントが血管内の所定の位置にあることを確認する。プッシュロッドを固定し、マイクロカテーテルを引き戻してステントの部分的なリリースを開始し、回収ポイント位置に配置する。ステントの位置が満足できるものであれば、マイクロカテーテルを引き続き引き戻してステントを完全にリリースする。位置が満足できない場合は、マイクロカテーテルを後方に押し戻してステントをマイクロカテーテル内に回収し、位置を調整して再度リリースする。ステントの配置が完了した後、デリバリーシステムを引き戻し、マイクロガイドワイヤーを再度マイクロカテーテルに押し込み、マイクロガイドワイヤーとマイクロカテーテルと一緒に反対側の腸骨動脈に押し込み、同じ方法で反対側のステントの植え付けを完了する。

10

【0297】

(6) 腹部大動脈におけるステントの植え付け、腸骨動脈の位置テストピンステントのリリースが完了した後、マイクロカテーテルを引き戻して腹部大動脈の位置に配置し、同じ方法で腹部大動脈に2セットのステントを配置する。手順の最後に、すべての器具と装置は実験動物から取り除かれる。

20

【0298】

(7) 動物が目を覚ますのを待ち、実験が終了するまで通常通りに保ちます。

【0299】

植え付け中にヘパリンナトリウム注射150U/kgをIVで投与することに加えて、アスピリンを手術の3日前から1日1回5mg/kgを経口投与し、手術後もエンドポイントまで5mg/kgを経口投与する。また、クロピドグレルを手術の3日前から1日1回18.75mgを経口投与し、手術後もエンドポイントまで18.75mgを経口投与する。

30

【0300】

組織病理学的分析

キャリア動脈のステントセグメントから収集された組織は、10%中性ホルマリンで48時間以上浸漬固定され、アルコールグラデーションで脱水され、キシレン透明化処理を行い、組織病理学的分析のために保存される。

【0301】

腸骨動脈の樹脂包埋されたステントセグメントは横断的に切断され、HE染色される。非ステントセグメントはパラフィン包埋され、近位端と遠位端でそれぞれ1枚ずつ切片が作成される。HE染色は組織病理学的評価のために行われる。

40

【0302】

走査型電子顕微鏡(SEM)分析

7D(7日)、14D(14日)、および28D(28日)で各1匹の動物をランダムに選択し、上記の時間点で移植されたステント付き腸骨動脈および腹部大動脈を収集してSEMで観察し、ISSステントの内皮化を確認する。

【0303】

結果

実施例3でCFDステントで既に得られた結果に基づいて、SP1072ペプチドでコーティングされたISSステントは、eGTMNTMAエレクトログラフトISSステントよりも良好な内皮化と限られた新内膜形成が期待される。

50

【0304】

実施例 6

本発明によるペプチドSP1072でコーティングされたバルーン拡張可能なCoCrステントの生体効果を、ベアメタルステントおよびHTスプリームステントと比較

【0305】

材料と方法

ステント

3種類のバルーン拡張可能なステントが使用される、
・SP1072ペプチドでコーティングされたCoCrステント、
・ベアメタルステント、および
・Sinomedによって商業化されたFTSupremeステントは、eGBuMAプライマー層と10μm厚のPLGA（ポリ（乳酸-コハク酸））層を含み、シロリムスの濃度は1.2μg/mm2

【0306】

動物手順

この研究では、9匹の健康なニュージーランドホワイトウサギが実験動物として選ばれ、2匹の予備動物が選ばれた。動物は3つの観察時間ポイントに分けられる、手術後7日、14日、28日で、それぞれの時間ポイントに3匹の動物がいる。各動物には4つのステントが移植され、各動物の腹部大動脈と両側腸骨動脈がステント植え付け部位として選ばれる。腹部大動脈に2つのステントが植え付けられ、各両側腸骨動脈に1つのステントが植え付けられる。術後観察期間の終わりに、異なるコーティングを持つ各動物の2つのサンプルがランダムに選ばれてSEMにかけられ、残りのサンプルは組織病理学的に分析される。実験の一般的な設計は、以下の表4に示されている。

【表20】

時間点	動物の数	ステント移植の数	移植部位	実験内容
7日間	3	12	両側外腸骨動脈を伴う腹部大動脈	1. 適応期間中、術前、およびサンプリング前の定期的な血液および血清化学検査； 2. 術後の観察および給餌段階における実験動物の日常観察； 3. 解剖および肉眼観察と写真撮影； 4. 電子顕微鏡スキャン分析； 5. 標的血管の組織病理学的分析。
14日間	3	12		
28日間	3	12		
待機（28日間）	2	8		

【0307】

外科手術手順

（1）麻酔、

すべての外科手術は無菌技術を使用して行われ、実験動物は植え付け手術中に全身麻酔下にあった。手術当日、実験動物は鎮静され、6mg/kgのSutex（登録商標）50を筋肉内注射して麻酔が導入される。必要に応じて、実験動物は吸入用マスクを使用してイソフルランで麻酔することができる。

【0308】

麻酔の導入が成功した後、実験動物は口腔内視トラキアを通じて挿管され、呼吸アクセ

スを確立し、麻酔と酸素の混合物を連続吸入して麻酔を維持するために人工呼吸器デバイスに接続される。手術前に実験動物が嘔吐を止めるためにアトロピンを投与する必要があるかもしれません。これは、嘔吐物による窒息を防ぐためである。

【0309】

麻酔され、挿管された実験動物は、側臥位または仰臥位で手術台に置かれ、拘束バンドを使用して固定される。手術部位は準備され、消毒され、シートが敷かれる。動物の位置が変更された場合、手術部位は再度シートを敷き、準備する必要がある。

【0310】

末梢静脈のいずれかに静脈内針を挿入し、必要に応じてカテーテルを通じて薬物や補液を投与する。

【0311】

(2) 6 F の血管シースを左または右の総頸動脈に挿入して血管アクセスを確立する。

【0312】

(3) ガイドワイヤーの指導の下、5 F カテーテルを血管アクセスを介して心臓の下行大動脈に導入し、腹部大動脈および腸骨動脈の血管造影を行った。血管造影後、ステント植え込み部位の選択を導くために定量的な動脈血管測定を行った。

【0313】

(4) 腸骨動脈ステントの植え込み、造影カテーテルを引き抜き、ステント送達システムを準備し、負圧に達するまで送達システムのバルーン内の空気を排出し、その後、バルーンに造影剤とヘパリン化生理食塩水の混合物を吸入させる。ステント送達システムは 0.014 ガイドワイヤーによって誘導され、選択されたステント植え込み部位にステントを送達する。ステントが腸骨動脈血管植え込み部位に送達された後、バルーン拡張圧力ポンプがステントを加圧して開き、ステント植え込み情報を記録するために透視画像を保存する。バルーンは、ステント直径と移植部位の標的血管直径の比率が 1.10 - 1.20、1 の適切な圧力で拡張され、バラストステントがリリースされて 30 秒間保持され、移植されたステントの壁への良好な接触が確保される。

【0314】

(5) 一方の側にステントを移植した後、デリバリーバルーンは体内から引き抜かれ、移植されたステントを評価するために別の血管造影が行われた。他方の腸骨動脈のステント留置も同様に完了した。

【0315】

(6) 腹部大動脈におけるステントの植え付け、腸骨動脈部位でのステントリリースが完了した後、同様にして腹部大動脈に 2 セットのステントが配置された。手術後、すべての器具と装置は実験動物から取り除かれた。

【0316】

(7) 動物が目覚めるのを待ち、実験が終了するまで通常通りに保ちます。

【0317】

植え付け中に IV でヘパリンナトリウム注射 150 U / kg に加えて、抗血小板療法（アスピリンとクロピドグレル）を動物に手術の 3 日前から 1 日 1 回 5 mg / kg ずつ経口投与し、術後もエンドポイントまで 5 mg / kg ずつ経口投与した。

【0318】

組織病理学的分析

キャリア動脈のステントセグメントから収集された組織は、10% 中性ホルマリンで 48 時間以上浸漬固定され、アルコールグラデーションで脱水され、キシレン透明化処理を行い、組織病理学的分析のために保存される。

【0319】

腸骨動脈の樹脂包埋されたステントセグメントは横断的に切断され、H E 染色される。非ステントセグメントはパラフィン包埋され、近位端と遠位端でそれぞれ 1 枚ずつ切片が作成される。H E 染色は組織病理学的評価のために行われる。

【0320】

10

20

30

40

50

走査型電子顕微鏡（SEM）分析

7D（7日）、14D（14日）、および28D（28日）で各1匹の動物をランダムに選択し、上記の時間点で移植されたステント付き腸骨動脈および腹部大動脈を収集してSEMで観察し、ISSステントの内皮化を確認する。

【0321】

結果

実施例3でCFDステントで既に得られた結果に基づいて、SP1072ペプチドコーティングされたバルーン拡張可能なステントは、バルーン拡張可能なベアメタルステントやHTスプリームステントよりも良好な内皮化と限られた新内膜形成が期待される。

【0322】

10

上記の説明から、本発明の利点は当業者に明らかである。

【0323】

P8RI配列が活性化細胞によって発現される切断されたCD31分子のクラスター化を維持できる一方で、本発明のペプチドの存在は、移植されたデバイスと接触できるすべての健康な内皮細胞および休息中の血小板および白血球上の完全なCD31分子の従事を可能にする。

【0324】

したがって、これらの細胞は、循環および血管新生組織の恒常性を維持するために不可欠なCD31のトランスホモフィリック結合によって伝達される「leave-me-alone」シグナルを受け取ることができる。

20

【0325】

血栓性または生命を脅かす出血性または血栓塞栓性合併症の発生は、血管内デバイスの使用を妨げてきた。

【0326】

本発明の模倣ペプチドを有するデバイスは、血小板および白血球によって健康な内皮、すなわち「自己」成分として認識されるため、迅速に統合される。

【0327】

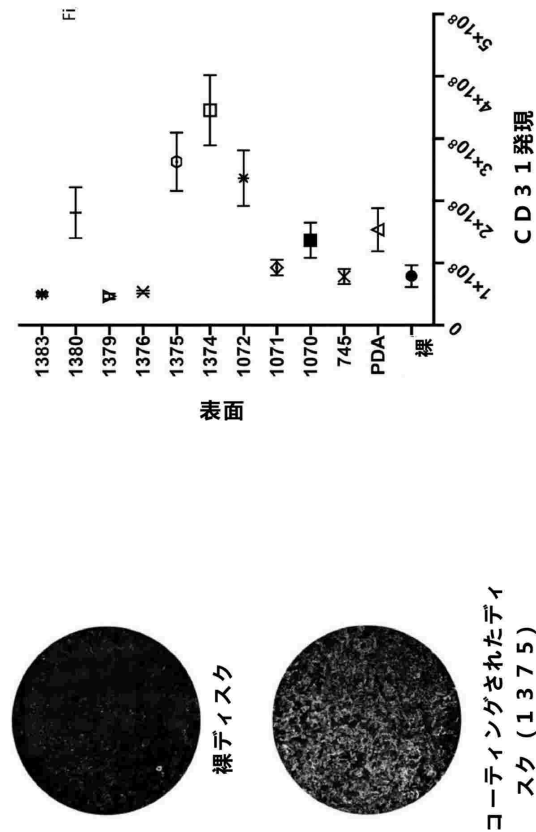
さらに、生理的な内皮細胞表現型で迅速に内皮化されるそれらの能力も、デバイス移植部位での血小板および白血球の活性化を長期的に制限する。

30

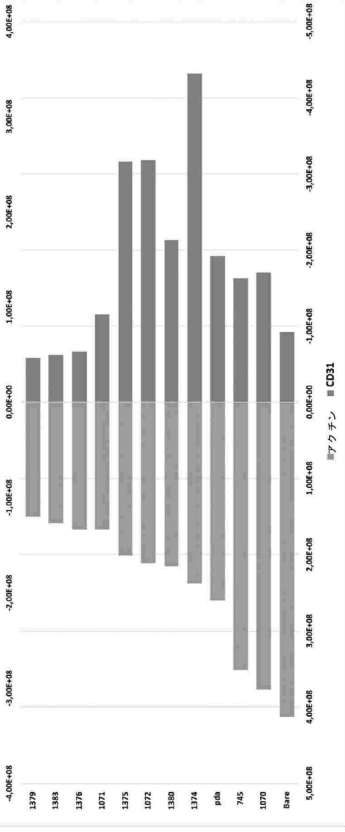
40

50

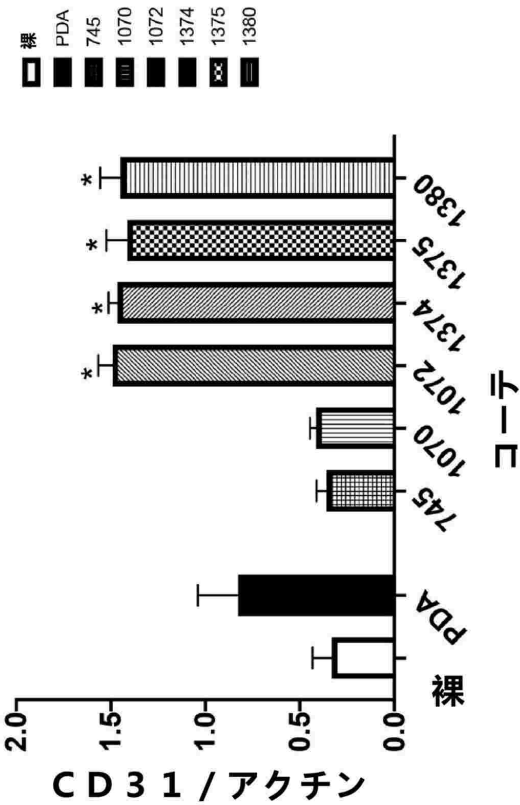
【図 4】



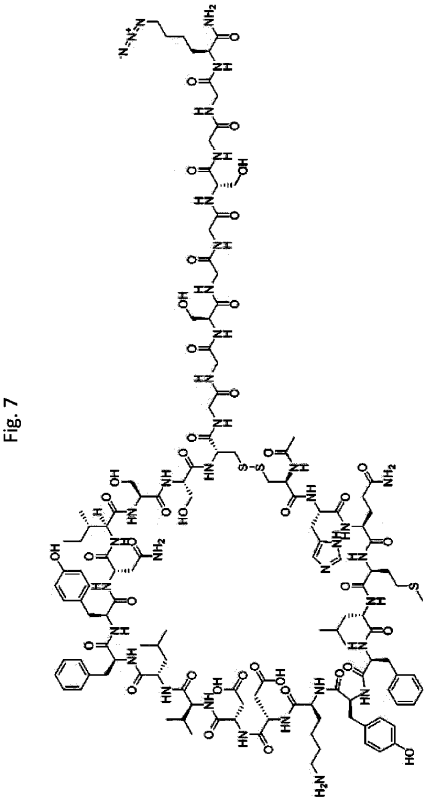
【図 5】



【図 6】

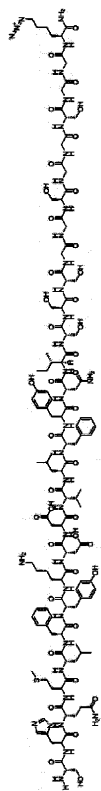


【図 7】



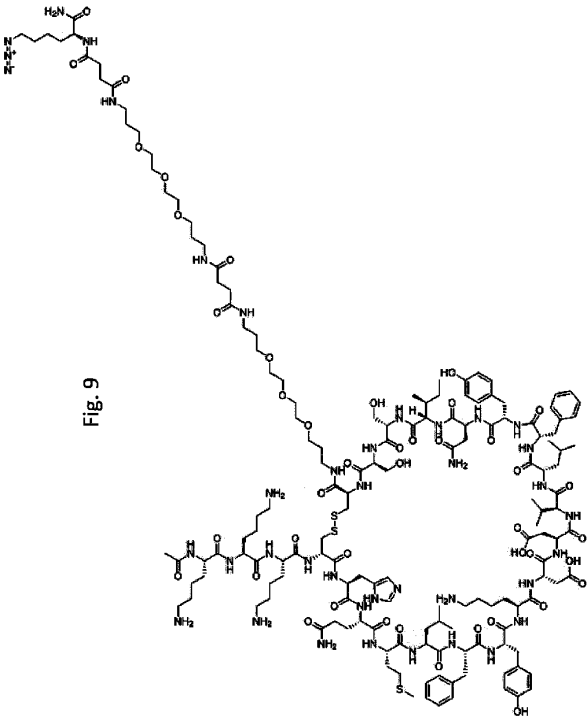
【図 8】

Fig. 8



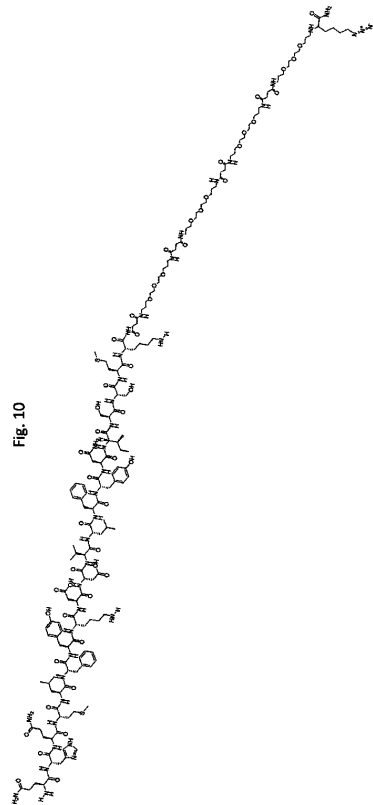
【図 9】

Fig. 9



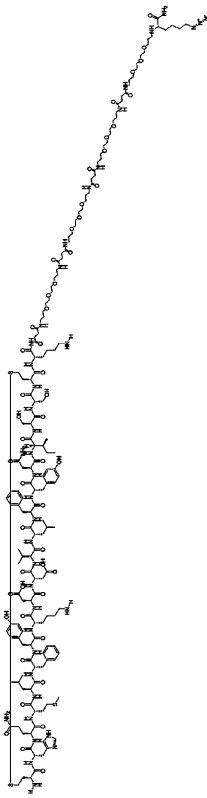
【図 10】

Fig. 10



【図 11】

Fig. 11



10

20

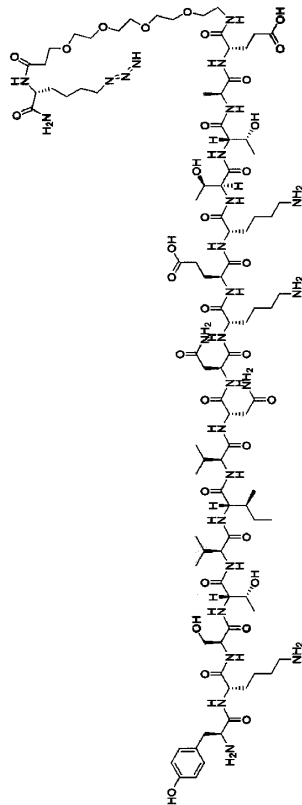
30

40

50

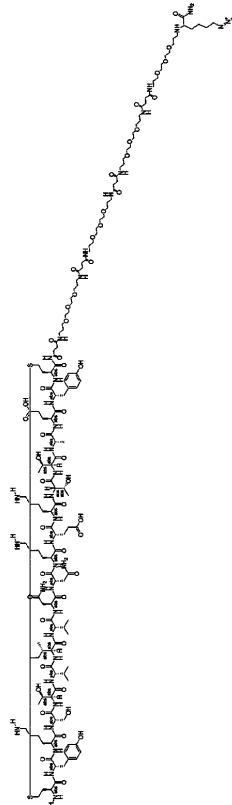
【図 1 2】

Fig. 12



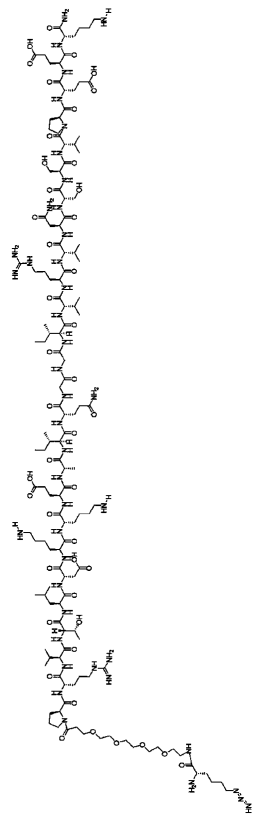
【図 1 3】

Fig. 13



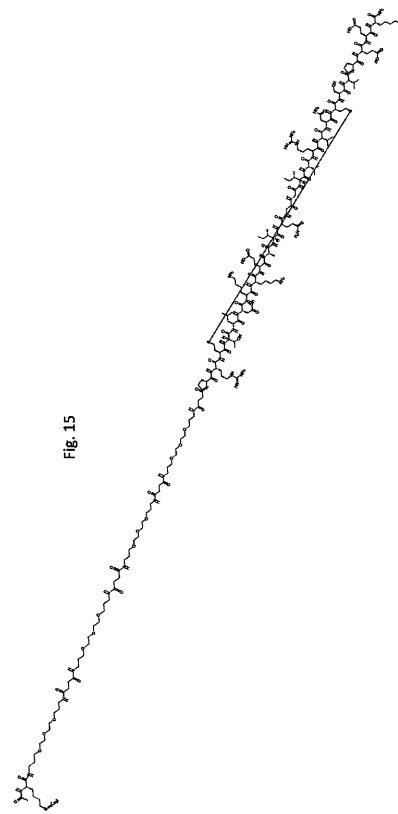
【図 1 4】

Fig. 14



【図 1 5】

Fig. 15



10

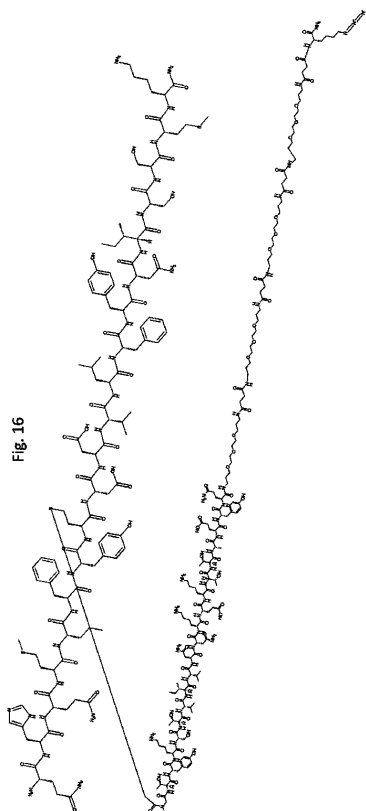
20

30

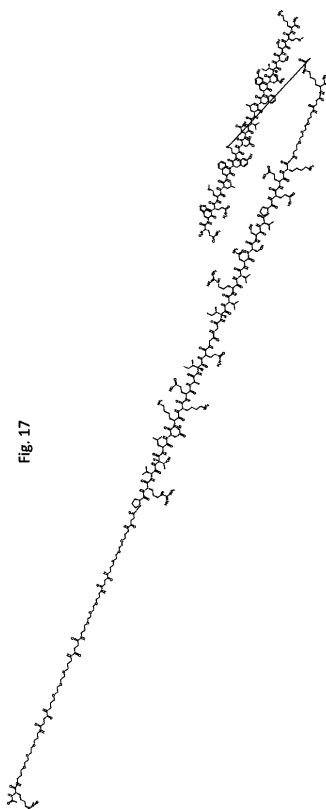
40

50

【図 16】



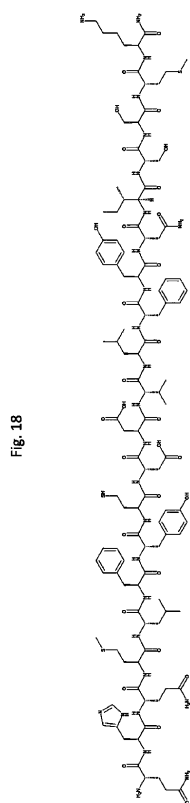
【図 17】



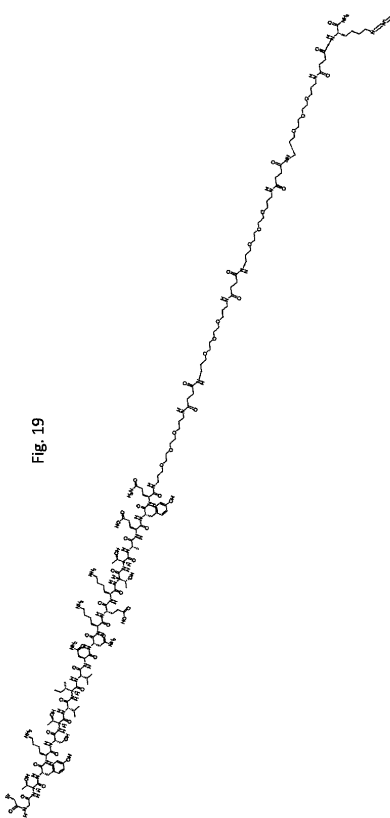
10

20

【図 18】



【図 19】

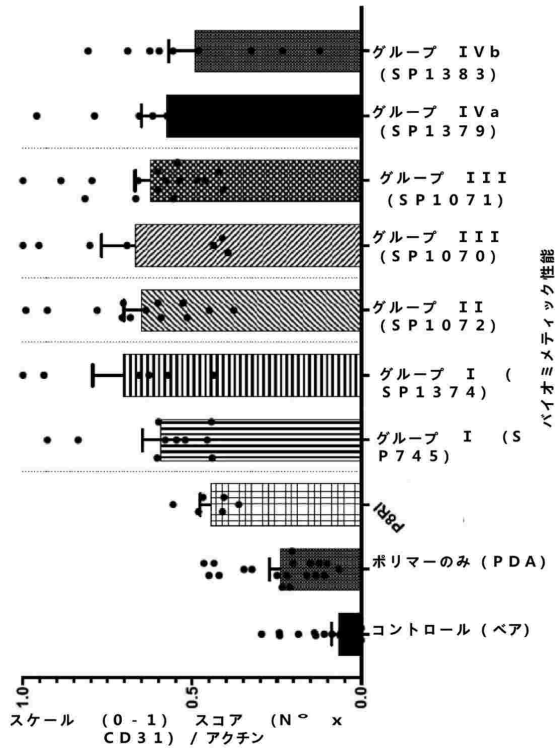


30

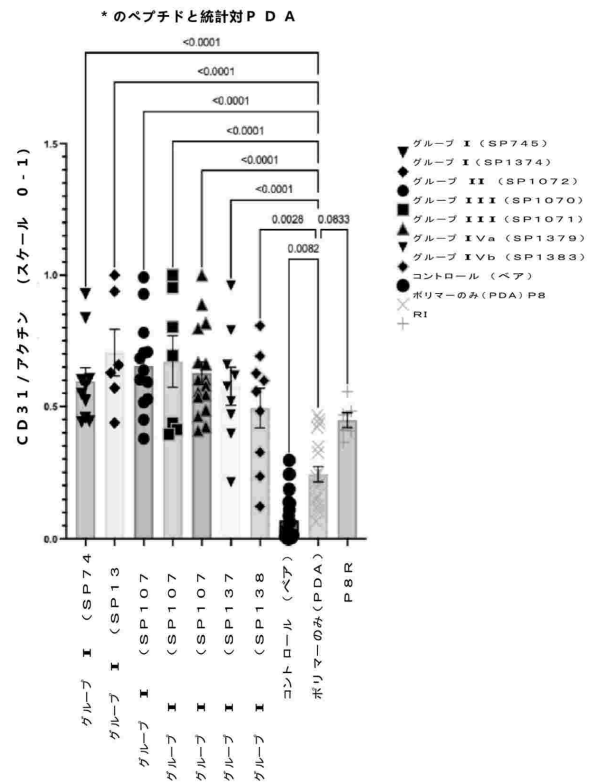
40

50

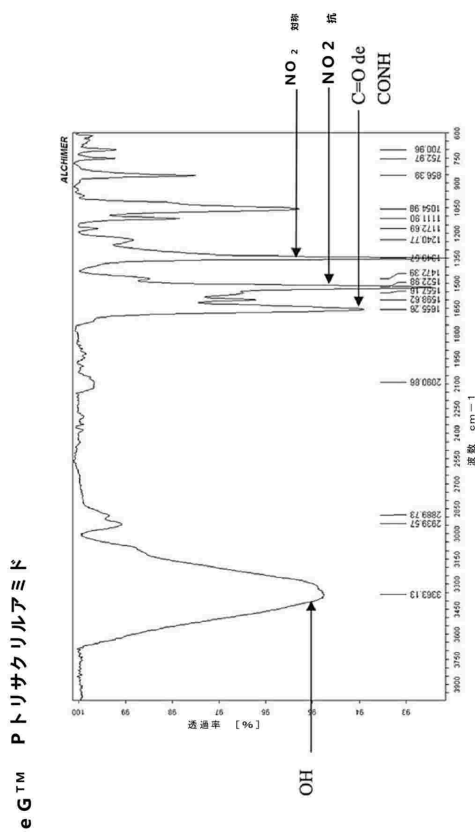
【図 2 4】



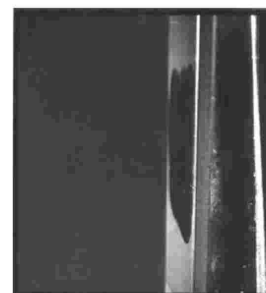
【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 7】



eGTM NTMA



裸の表面

10

20

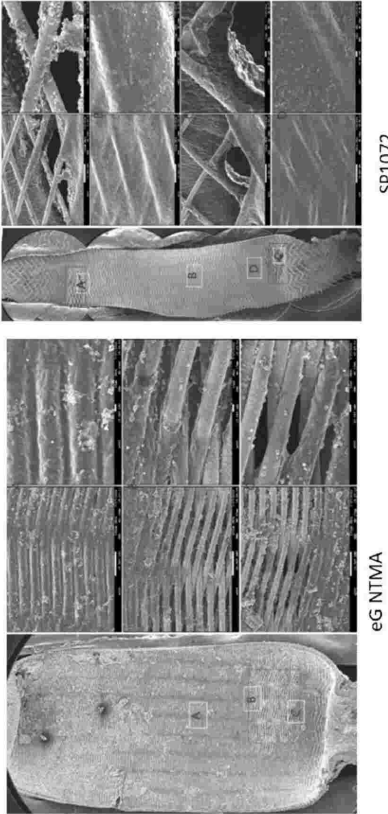
30

40

50

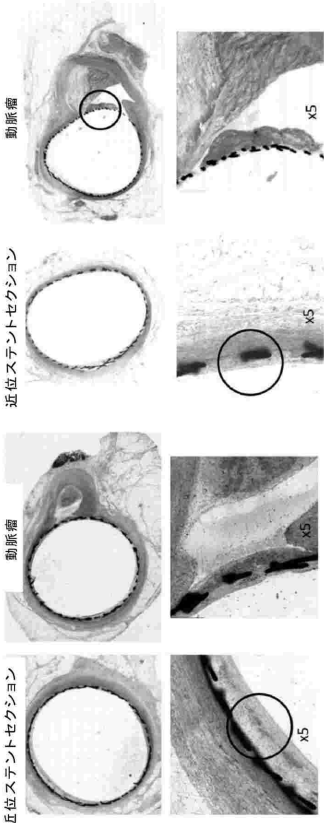
【図 28】

SEM断面、7日間、eG NTMA VS SP1072コーティング



【図 29】

SEM断面、7日間
A. eG NTMAコーティング
B. SP1072コーティング



【図 30】

SEM断面、60日、SP1072コーティング



10

20

30

40

50

【配列表】

2024542779000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/084241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61L31/00 A61K38/00 A61P9/10 C07K14/705 ADD.		
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) A61L A61P A61K C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DIAZ-RODRIGUEZ SERGIO ET AL: "Coronary stent CD31-mimetic coating favours endothelialization and reduces local inflammation and neointimal development in vivo.", EUROPEAN HEART JOURNAL 07 05 2021, vol. 42, no. 18, 7 May 2021 (2021-05-07), pages 1760-1769, XP055945712, ISSN: 1522-9645 figure 3 page 1763, paragraph bridging column 1 and 2 -----	1, 4, 7-12, 14-25
A	WO 2020/109833 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; UNIV PARIS 13 PARIS NORD [FR] ET AL.) 4 June 2020 (2020-06-04) page 25, line 1 - page 40, line 20 page 3, line 9 - line 29 ----- -/-	1-25
☒ 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 March 2023		Date of mailing of the international search report 26/05/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Voigt-Ritzer, Heike

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2022/084241
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/084241

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:
1-25 (partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2022 /084241

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-25(partially)

peptides comprising Seq ID No:53, medical use, coating

2. claims: 1-25(partially)

peptides comprising Seq ID No:54, medical use, coating

3. claims: 1-25(partially)

peptides comprising Seq ID No:55, medical use, coating

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/084241

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	QUOCTHANG HOANG ET AL: "Peptide binding to cleaved CD31 dampens ischemia/reperfusion-induced intestinal injury", INTENSIVE CARE MEDICINE EXPERIMENTAL, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 6, no. 1, 15 August 2018 (2018-08-15) , pages 1-12, XP021259664, DOI: 10.1186/S40635-018-0192-3 the whole document -----	1-25
A	WO 2010/000741 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; CALIGIURI GIUSEPPINA [FR] ET AL.) 7 January 2010 (2010-01-07) example 10 page 2, line 20 - page 3, line 1 sequence 1 -----	1-25
A	WERNER HELD ET AL: "Cis-trans interactions of cell surface receptors: biological roles and structural basis", CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHÄUSER-VERLAG, BA, vol. 68, no. 21, 24 August 2011 (2011-08-24), pages 3469-3478, XP019964063, ISSN: 1420-9071, DOI: 10.1007/S00018-011-0798-Z the whole document -----	1-25
A	WO 2013/190014 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 27 December 2013 (2013-12-27) abstract; sequence 1 -----	1-25
A	CORTESE JONATHAN ET AL: "CD31 Mimetic Coating Enhances Flow Diverting Stent Integration into the Arterial Wall Promoting Aneurysm Healing", STROKE, vol. 52, no. 2, 1 February 2021 (2021-02-01), pages 677-686, XP093032945, US ISSN: 0039-2499, DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.030624 page 1; figure 4 -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No	
Information on patent family members				PCT/EP2022/084241	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2020109833	A1	04-06-2020	NONE		

WO 2010000741	A1	07-01-2010	EP 2313432 A1		27-04-2011
			ES 2651946 T3		30-01-2018
			JP 2011526485 A		13-10-2011
			US 2012010136 A1		12-01-2012
			US 2015376258 A1		31-12-2015
			US 2019177396 A1		13-06-2019
			WO 2010000741 A1		07-01-2010

WO 2013190014	A1	27-12-2013	DK 2861241 T3		05-07-2021
			EP 2861241 A1		22-04-2015
			ES 2877513 T3		17-11-2021
			HR P20211017 T1		01-10-2021
			HU E055593 T2		28-12-2021
			JP 6357470 B2		11-07-2018
			JP 2015521611 A		30-07-2015
			PL 2861241 T3		25-10-2021
			PT 2861241 T		02-07-2021
			SI 2861241 T1		30-11-2021
			US 2015203536 A1		23-07-2015
			WO 2013190014 A1		27-12-2013

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 L	33/12
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 L	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	7/04
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	A 6 1 L	31/10
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K	14/00
		C 0 7 K	7/06

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,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,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 505429360

ユニヴェルシテ パリ 13 パリ ノール

UNIVERSITE PARIS 13 - PARIS NORD

フランス、エフー93430 ヴィルタヌーズ、アヴェニュー ジャンーバプティスト クレマン、99
99, avenue Jean-Baptiste Clement, F-93430 Ville
taneuse, FRANCE

(74)代理人 100120031

弁理士 宮嶋 学

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 ジュゼッピーナ、カリジューリ

フランス国パリ、セデックス、リュ、アンリ、ユシャール、46、ジェアシュ、ビシャ、クロード
、ベルナールーユ1148

(72)発明者 アントニオ、ニコレッティ

フランス国パリ、リュ、アンリ、ユシャール、46、ジェアシュ、ビシャ、クロード、ベルナール
ーユ1148

(72)発明者 シャルル、スカーベック

フランス国パリ、リュ、アンリ、ユシャール、46、ジェアシュ、ビシャ、クロード、ベルナール
ーユ1148

(72)発明者 エリザベッタ、ピアンキ

イタリア国ボメーツィア、ピア、ポンティーナ、キロメートウロ、30、600、イエツレビエン
メ、ソチエタ、ペル、アチオニ

(72)発明者 ラッファエーレ、インジェニート

イタリア国ボメーツィア、ピア、フラテッリ、バンディエーラ、90

F ターム (参考) 4C081 AC06 BA01 BA05 CD112 DA03 DC03 EA06

4C084 AA01 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA18 BA19 BA23 CA59

MA17 MA65 MA67 NA06 NA10 NA14 ZA361 ZA362 ZA451 ZA452 ZA531

ZA532 ZA541 ZA542

4H045 AA10 AA30 BA14 BA16 BA17 BA18 CA40 EA20 EA34 FA33