(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-506487
(P2025-506487A)
(43)公表日　令和7年3月11日(2025.3.11)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
Ａ６１Ｋ	*38/08*	*(2019.01)*	Ａ６１Ｋ	38/08		ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*1/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04			４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16			
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12			
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10			

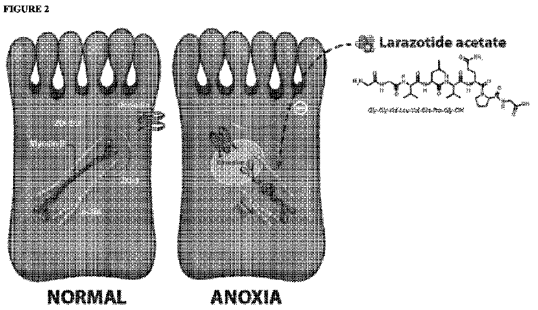
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全27頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-547502(P2024-547502)
(86)(22)出願日　令和5年2月9日(2023.2.9)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月17日(2024.9.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/062247
(87)国際公開番号　WO2023/154770
(87)国際公開日　令和5年8月17日(2023.8.17)
(31)優先権主張番号　63/308,330
(32)優先日　令和4年2月9日(2022.2.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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
最終頁に続く

(71)出願人　524299373
インタールード バイオファオーマ カンパニー
アメリカ合衆国 ３３１３１ フロリダ マイアミ ブリッケル アベニュー １４５０
(71)出願人　520159592
ユニバーシティ オブ メリーランド，カレッジ パーク
アメリカ合衆国，メリーランド州 ２０７４２ カレッジ パーク リージェンツ ドライブ ７８０９ リー ビルディング ０１３４ ユーエム ベンチャーズ
(74)代理人　110000796
弁理士法人三枝国際特許事務所
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｒｈｏキナーゼを阻害する組成物及び方法

(57)【要約】
本発明は、組織内のＲＯＣＫ活性を阻害するのに有効な量及び方式で、有効量のララゾチド又はララゾチド誘導体、又はその薬学的に許容可能な塩を、治療を必要とする被験体に投与することにより、該被験体におけるＲｈｏ関連コイルドコイルキナーゼ（ＲＯＣＫ）活性を特徴とする病態を治療する組成物及び方法を提供する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｒｈｏ関連コイルドコイルキナーゼ（ＲＯＣＫ）活性を特徴とする病態について被験体を治療する方法であって、組織内のＲＯＣＫ活性を阻害するのに有効な量及び方式で、有効量のララゾチド若しくはララゾチド誘導体、又はその薬学的に許容可能な塩を、前記被験体に投与することを含む、方法。
【請求項２】
前記組織が消化管である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記病態が、癌、腺腫、セリアック病、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、クローン病、潰瘍性大腸炎、環境性腸症、食道炎、壊死性腸炎、腸管虚血、炎症性肝疾患、腎臓病、膵炎、高血糖症、及び肺又は心臓の炎症又は線維症から選択される、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記癌が任意の組織に由来し、任意に前記癌が、皮膚、結腸、乳房、肺、脳、骨、膵臓、腎臓、肝臓、膀胱、卵巣、精巣、又は前立腺に由来する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記癌が任意に大腸癌、白血病、骨髄腫、又はリンパ腫である、請求項３に記載の方法。
【請求項６】
前記被験体が大腸癌を起こすリスクがある、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記被験体の家族歴、遺伝子変異、及び／又は健康歴が大腸癌のリスクを高める、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
被験体の家族の一員が、家族性大腸腺腫症（ＦＡＰ）、遺伝性非ポリポーシス大腸癌（ＨＮＰＣＣ）、ポイツジェガース症候群、又はＭＵＴＹＨ関連ポリポーシス（ＭＡＰ）に罹患しているか又は罹患していた、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記被験体が、大腸癌のリスクを高める、ＡＰＣ、ＭＬＨ１、ＭＳＨ２、ＭＳＨ６、ＰＭＳ２、ＥＰＣＡＭ、ＳＴＫ１１（ＬＫＢ１）、及びＭＵＴＹＨから選択される１つ以上の遺伝子の変異を有する、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記被験体が、ｒｓ６９８３２６７、ｒｓ４９３９８２７、ｒｓ３８０２８４２、ｒｓ１６８９２７６６、ｒｓ１０７９５６６８、ｒｓ４４４４２３５、ｒｓ１０４１１２１０、ｒｓ６６９１１７０、ｒｓ４９２５３８６、ｒｓ３８２４９９９、ｒｓ６４７１６１、ｒｓ２４２３２７９、ｒｓ３２１７８１０、及びｒｓ５９３３６から選択される１つ以上の一塩基多型（ＳＮＰ）を有する、請求項６～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記組織が癌であり、任意に原発性癌又は転移性癌である、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記癌が、肺癌、乳癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、子宮頸癌、大腸癌、膵臓癌、黒色腫、卵巣癌、骨癌、尿路上皮癌、胃癌、頭頸部癌、膠芽腫、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）、膀胱癌、ホルモン抵抗性前立腺癌、及びリンパ腫から選択される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記組織が転移性癌である、請求項１１又は１２に記載の方法。
【請求項１４】
患者が転移性黒色腫を有する、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記癌が肉腫又は癌腫である、請求項１１～１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】
前記被験体が、化学療法、放射線、切除、並びに免疫療法及び癌免疫療法剤の１つ以上から選択される癌治療を受けているか又は受けたことがあり、任意に前記癌免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤による治療法である、請求項１１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記ララゾチド又はララゾチド誘導体が、腫瘍内投与用に製剤化されている、請求項１１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記組織が眼である、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
前記ララゾチド又はララゾチド誘導体が、眼科投与用に、任意に眼表面に、又は眼の奥への眼内投与用に製剤化されている、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記ララゾチド又はララゾチド誘導体が、鼻腔及び／又は副鼻腔への投与用に製剤化されている、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
前記ララゾチド又はララゾチド誘導体が、外耳道への投与用に製剤化されている、請求項１に記載の方法。
【請求項２２】
前記組織が呼吸器であり、前記被験体が任意に、喘息、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺線維症、嚢胞性線維症、急性肺損傷（ＡＬＩ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、気腫、気管支炎、肺炎、肺癌、及び呼吸器感染症から選択される病態を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項２３】
前記ララゾチド又はララゾチド誘導体が、肺への溶液エアロゾル又は粉末としての投与用に製剤化されている、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記組織が血管系であり、前記被験体が任意に、心筋線維症、心臓肥大、高血圧、肺高血圧、狭心症、冠攣縮性狭心症、心不全、及び脳卒中から選択される病態を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項２５】
前記ララゾチド又はララゾチド誘導体が肺投与用に製剤化されている、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記被験体が、ＲＯＣＫ１アイソフォームに対するＶａｌ１３０９、Ｔｙｒ４０５、Ｓｅｒ１１２６、Ｐｒｏ１１９３Ｓ、及び／又は、ＲＯＣＫ２アイソフォームに対するＴｈｒ４３１Ａｓｎ、Ａｓｐ６０１Ｖａｌ、及びＬｙｓ１０８３Ｍｅｔの１つ以上から選択されるＲＯＣＫ変異を有する、請求項１～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記被験体に、ララゾチド誘導体又はその薬学的に許容可能な塩が投与される、請求項１～２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記ララゾチド誘導体が、ララゾチドと比較してＲＯＣＫ阻害剤活性を高める１つ以上の修飾を含む、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記ララゾチド誘導体が、少なくとも１つの、少なくとも２つの、少なくとも３つの、少なくとも４つの、少なくとも５つのＤ－アミノ酸を含む、請求項２７に記載の方法。
【請求項３０】
前記ララゾチド誘導体の各アミノ酸（Ｇｌｙ以外）がＤ－アミノ酸であり、前記誘導体

が任意にレトロ－インベルソララゾチドである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記ララゾチド又はララゾチド誘導体を前記組織に局所投与する、請求項１～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
組織におけるＲＯＣＫ活性を阻害するアミノ酸配列Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ（配列番号１）を有する有効量のペプチド又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、Ｒｈｏ関連コイルドコイルキナーゼ（ＲＯＣＫ）活性に関連する病態を治療及び予防する組成物、製剤及び方法を提供する。
【０００２】
［関連出願の相互参照］
本願は、２０２２年２月９日に出願された米国仮特許出願第６３／３０８，３３０号の利益を主張するものであり、この出願の開示は、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。
【０００３】
［電子的に提出されたテキストファイルの記載］
本願には、本願とともに特許センターを介して電子的に提出されたＸＭＬ形式の配列表が含まれる。２０２３年２月７日に作成されたＸＭＬコピーの内容は、「ＮＭＴ-０３８ＰＣ_１１６０３１-５０３８.ｘｍｌ」という名称で、サイズは６９１９バイトである。配列表は引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。
【背景技術】
【０００４】
Ｒｈｏ関連コイルドコイル含有キナーゼ（ＲＯＣＫ）は、ＲｈｏＡ低分子量ＧＴＰアーゼのエフェクターであり、ＲｈｏＡ及びＲｈｏＣの活性化の下流でアクトミオシン細胞骨格の収縮性を促進させる重要な役割を果たす。ＲＯＣＫキナーゼは、細胞収縮、遊走、アポトーシス、生存及び増殖等のプロセスに重要なものである。２つの哺乳類ＲＯＣＫホモログであるＲＯＣＫ１及びＲＯＣＫ２は、とりわけ心血管疾患、血管損傷、線維症、炎症性腸疾患、及び癌等の様々な疾患プロセスに関与している。
【０００５】
ＲＯＣＫを阻害する、すなわちＲＯＣＫ関連の病状の治療又は予防のための医薬組成物及び方法が求められている。
【発明の概要】
【０００６】
本発明は一つには、Ｒｈｏ関連コイルドコイルキナーゼ（ＲＯＣＫ）に関連する病態を治療するのに有用な組成物及び方法を意図している。
【０００７】
様々な態様において、本発明は、Ｒｈｏ関連コイルドコイルキナーゼ（ＲＯＣＫ）活性を特徴とする病態について被験体を治療する方法を提供する。本方法は、器官又は組織内のＲＯＣＫ活性を阻害するのに有効な量及び方式で、有効量のララゾチド若しくはララゾチド誘導体、又はその薬学的に許容可能な塩を、上記被験体に投与することを含む。様々な実施の形態において、器官又は組織は、消化管、癌組織、眼、呼吸器、及び血管系から選択される。
【０００８】
幾つかの実施の形態において、ララゾチド又はその誘導体は消化管に投与される。このような実施の形態において、被験体は、癌（例えば、大腸癌若しくは胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ ｃａｎｃｅｒ）等のＧＩ癌、又は非ＧＩ癌）、腺腫、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）（例えば、クロ

ーン病又は潰瘍性大腸炎）、セリアック病、食道炎、炎症性肝疾患、腎臓病、膵炎、高血糖症、糖尿病、及び肺又は心臓の炎症又は線維症から選択される病態を有している場合がある。或る特定の実施の形態において、被験体は大腸癌に罹患しているか、又は大腸癌を起こすリスクがある。例えば、被験体の家族歴、遺伝子変異、及び／又は健康歴は、被験体の大腸癌のリスクを高める可能性がある。

【０００９】

他の実施の形態において、ララゾチド又は誘導体は、原発性腫瘍又は転移性腫瘍であり得る癌組織に直接送達される。例えば、被験体は、肺癌、乳癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、子宮頸癌、大腸癌、膵臓癌、黒色腫、卵巣癌、骨癌、尿路上皮癌、胃癌、頭頸部癌、膠芽腫、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）、膀胱癌、ホルモン抵抗性前立腺癌、及びリンパ腫から選択される癌に罹患している場合がある。幾つかの実施の形態において、組織は転移性癌、例えば転移性黒色腫である。幾つかの実施の形態において、癌は肉腫又は癌腫である。

【００１０】

他の実施の形態において、ララゾチド又は誘導体は眼に投与される。例えば、被験体は、シェーグレン症候群、ドライアイ症候群、加齢黄斑変性（ＡＭＤ）、黄斑浮腫、糖尿病網膜症、及び緑内障から選択される眼病態を有している場合がある。

【００１１】

幾つかの実施の形態において、ララゾチド又は誘導体は呼吸器に投与される。例えば、被験体は、喘息、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺線維症、嚢胞性線維症、急性肺損傷（ＡＬＩ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、気腫、気管支炎、肺炎、肺癌、及び呼吸器感染症から選択される病態を有している場合がある。

【００１２】

他の実施の形態において、ララゾチド又は誘導体は血管系に投与されるか、又は全身投与される。例えば、被験体は、心筋線維症、心臓肥大、高血圧、肺高血圧、狭心症、冠攣縮性狭心症、心不全、アテローム性動脈硬化、動脈硬化、糖尿病、膵炎、腎臓病（腎線維症を含む）、及び脳卒中（例えば、脳卒中の予防又は脳卒中の回復における）から選択される病態を有している場合がある。

【００１３】

様々な実施の形態において、ララゾチド誘導体は、ララゾチドと比較してＲＯＣＫ阻害剤活性を高める１つ以上の修飾を含む。例えば、実施の形態において、ララゾチド誘導体は、少なくとも１つの、少なくとも２つの、少なくとも３つの、少なくとも４つの、少なくとも５つの（ｄ）－アミノ酸を含む。或る特定の実施の形態において、ララゾチド誘導体の各アミノ酸（Ｇｌｙ以外）は（ｄ）－アミノ酸であり、誘導体は任意にレトロ－インベルソララゾチドである。

【００１４】

本発明の他の態様及び実施の形態は、以下の詳細な説明及び実施例から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】図１Ａ及び図１Ｂは、ララゾチド酢酸塩（ＬＡ）処理したＣ２ＢＢｅ１腸細胞における無酸素／再酸素化（Ａ／Ｒ）損傷中の傍細胞透過性の評価を示す図である。図１Ａは、Ａ／Ｒ損傷におけるＬＡ処理及びＴＥＥＲ測定のスケジュールを示す概略図を示す。図１Ｂは、１０ｍＭのＬＡによる処理によって、未処理のＡ／Ｒ損傷細胞と比較してＴＥＥＲが有意に（ｐ＜０．００１）増大することを示す。

【図２】無酸素状態によりミオシンがリン酸化され、タイトジャンクションタンパク質オクルディンが内部移行することを示す図である。この概略図は、ＬＡがこのリン酸化を防ぐと予測される仕組みを示す。

【図３】１時間の再酸素化後の膜画分及び細胞質画分からの免疫ブロット法及びＩＦ解析によって分析されるＴＪタンパク質の分布を示す図である。図３は、無酸素損傷細胞では

対照細胞と比較して膜貫通タンパク質オクルディンが有意に（ｐ＜０．０５）内部移行することを示す。しかしながら、オクルディンは、未処理の無酸素損傷細胞と比較して、１０ｍＭのＬＡによって膜内で有意に（ｐ＜０．０５）増加した。

【図４】１時間の酸素化での免疫蛍光顕微鏡分析によるタイトジャンクションタンパク質及び細胞骨格タンパク質の局在性の評価を示す図である。透過性支持膜を固定し、ＺＯ－１（赤）、オクルディン（緑）、及びＦ－アクチン（紫）で染色した。ＺＯ－１及びオクルディンの免疫局在性は、Ｚスタック３Ｄ分析によって分析した。未処理の無酸素損傷細胞ではオクルディン、ＺＯ－１、及びＦ－アクチンが破壊されていたが、ララゾチド酢酸塩（ＬＡ）処理細胞では、タイトジャンクションタンパク質及びＦ－アクチンが十分に組織化されていた。

【図５】１時間の再酸素化時点での免疫ブロット法によって評価したｐＭＬＣ－２／ＭＬＣ－２の比率を示す図である。ｐＭＬＣ－２の発現はＡ／Ｒ損傷後に劇的に増加し、１０ｍＭのＬＡによる前処理によって有意に減少した（＃＃＜０．０１）。

【図６】腸管上皮細胞におけるＴＪバリアを調節するＭＬＣのリン酸化の調節を示す図である。ＴＪバリアは主に、ミオシン軽鎖キナーゼ（ＭＬＣＫ）及びｒｈｏ関連コイルドコイルプロテインキナーゼ（ＲＯＣＫ）の２つの酵素によって調節されるミオシンの調節軽鎖（ＭＬＣ）のリン酸化レベルによって決定される。細胞内Ca^{2+}レベルの上昇はＭＬＣＫ活性を刺激する。強化されたＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）活性もＭＬＣを直接リン酸化し、またミオシンホスファターゼ標的サブユニット１（ＭＹＰＴ１）をリン酸化することによってミオシン軽鎖ホスファターゼ（ＭＬＣＰ）活性を阻害する。

【図７】ＭＬＣＫ及びＲＯＣＫの阻害により、ララゾチドの有無にかかわらず、未処理のＡ／Ｒ損傷細胞と比較してＴＥＥＲが増大することを示す図である。Ｐｅｐ１８（ＭＬＣＫ阻害剤）単独又はＬＡとの併用処理により、ＴＥＥＲが増大した。ファスジル（ＲＯＣＫ阻害剤）処理した単層では、ＴＥＥＲが増大した。ファスジルとＬＡとの併用処理はＴＥＥＲを増大させたが、ファスジルの単独処理よりも程度が低かった（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００５、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１）。

【図８】腸管上皮細胞における傍細胞アクチンミオシンリングを調節するＭＬＣのリン酸化の調節の考えられ得るメカニズムを示す図である。ＴＪバリアは主に、ミオシンの調節軽鎖（ＭＬＣ）のリン酸化レベルによって決定され、これはミオシン軽鎖キナーゼ（ＭＬＣＫ）及びミオシン軽鎖ホスファターゼ（ＭＬＣＰ）の２つの酵素によって調節される。これらのメカニズムは、Ca^{2+}恒常性、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）、及び成長因子（ＧＦ）経路等の様々な細胞経路によって調節することができる。

【図９】図９Ａ及び図９Ｂは、次世代ＲＮＡ－ｓｅｑを使用した種々の発現解析を示す図である。図９Ａは、同定された発現変動遺伝子（ＤＥＧ）の数量のベン図解析を示す。図９Ｂは、ＤＥＧの階層的クラスタリングを示し、これは、異なる実験条件下での発現パターンを推定するために使用した。

【図１０】種々のグループの組合せからの（ＤＥＧ）の遺伝子オントロジー（ＧＯ）機能分類分析を示す図である。これには、生物学的プロセス、細胞成分、及び分子機能の３つの主要なブランチが含まれる。ｐａｄｊ＜０．０５のＧＯタームが有意にエンリッチメントである。図１０は、有意にエンリッチメントな２０の生物学的プロセス、細胞成分及び分子機能を示す。

【図１１】種々のグループの組合せからのＤＥＧのエンリッチメントの京都遺伝子ゲノム百科事典（ＫＥＧＧ）のパスウェイ解析を示す図である。ｐａｄｊ＜０．０５のＫＥＧＧパスウェイタームが有意にエンリッチメントである。

【図１２】Ｃ２ＢＢｅ１腸細胞における傍細胞透過性の評価を示す図である。１０ｍＭのＬＡで処理すると、処理後１時間で、未処理のＡ／Ｒ損傷細胞と比較してＴＥＥＲが有意に増大した。

【図１３】Ｃ２ＢＢｅ１腸細胞の増殖の評価を示す図である。１０ｍＭのＬＡで処理すると、未処理細胞と比較して増殖が大幅に増大する。

【図１４】図１４Ａ及び図１４Ｂは、Ｃ２ＢＢｅ１腸細胞の増殖及び遊走の評価を示す図

である。図１４Ａは、通常の培地中の１０ｍＭ　ＬＡ処理細胞が４８時間で創傷治癒を大幅に増大させたことを示す。図１４Ｂは、無血清培地中の１０ｍＭ　ＬＡ処理細胞と未処理細胞との間に有意に異なる遊走パターンが検出されなかったことを示す。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

本発明は、組織内のＲＯＣＫ活性を阻害するのに有効な量及び方式で、有効量のララゾチド又はララゾチド誘導体、又はその薬学的に許容可能な塩を、治療を必要とする被験体に投与することにより、該被験体におけるＲｈｏ関連コイルドコイルキナーゼ（ＲＯＣＫ）活性を特徴とする病態を治療する組成物及び方法を提供する。

【００１７】

本開示は、ララゾチド及びララゾチド誘導体、又はその薬学的に許容可能な塩がｒｈｏ関連プロテインキナーゼ（ＲＯＣＫ）を阻害することを示す。ＲＯＣＫの阻害は、ＲＯＣＫ活性に関連する病態を有する被験体に治療上の利益をもたらすことができる。ＲＯＣＫ及びその下流の標的は、アクチン細胞骨格の動態の調節に関与しており、それ故、細胞の遊走及び運動性の原因となっている。さらに、それらは、細胞結合の完全性、細胞周期の制御、及び細胞アポトーシス等の多様な生物学的プロセスに関係している。

【００１８】

ＲＯＣＫ酵素には、ＲＯＣＫ１及びＲＯＣＫ２の２つのアイソフォームがある。どちらのキナーゼも、Ｎ末端に触媒キナーゼドメイン、続いて、Ｒｈｏ結合ドメイン（ＲＢＤ）を含む中央のコイルドコイルドメイン、及びＣ末端プレクストリン相同（ＰＨ）ドメインを含む。

【００１９】

ララゾチドとして知られるペプチド剤は、アミノ酸配列Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ（配列番号１）を有する。ララゾチドは、腸管上皮を含む上皮組織及び内皮組織のタイトジャンクション完全性を促進させ、セリアック病（ＣｅＤ）患者の治療法として評価されている。或る特定の態様及び実施形態によれば、本発明は、とりわけ、アミノペプチダーゼ分解を含むエキソペプチダーゼ分解に対する耐性を高めるララゾチド誘導体を提供する。様々な実施形態において、ララゾチド誘導体は、配列番号１のアミノ酸配列を有するペプチドに関して１つ以上のアミノ酸の置換、欠失及び／又は挿入を含む。例示的な修飾は、米国特許第８，７８５，３７４号、米国特許第８，９５７，０３２号、米国特許第９，２７９，８０７号、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／１９３５０号、及び国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２１／２７４１０号（これらは全て引用することにより本明細書の一部をなす）に記載されている。

【００２０】

幾つかの実施形態において、ララゾチドのペプチド誘導体は、１つ以上の（ｄ）アミノ酸を含有する。例えば、ララゾチド誘導体は、１つ、２つ、３つ、４つ又は５つの（ｄ）アミノ酸（すなわち、Ｌ体ではなくＤ体）を含有し得る。幾つかの実施形態において、ララゾチド誘導体は、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｎ－（ｄ）Ｐｒｏ－Ｇｌｙ（配列番号２）のアミノ酸配列を有する。このペプチドは本明細書において「（ｄ）－Ｐｒｏ」又は（ｄ）－Ｐｒｏララゾチドと称される。他の実施形態において、ララゾチド誘導体は、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－（ｄ）Ｖａｌ－（ｄ）Ｌｅｕ－（ｄ）Ｖａｌ－（ｄ）Ｇｌｎ－（ｄ）Ｐｒｏ－Ｇｌｙ（配列番号３）のアミノ酸配列を有する。このペプチドは本明細書において「（ｄ）－ララゾチド」と称される。本明細書で実証されるように、（ｄ）－ララゾチドは、大幅に低い濃度でも高い濃度でも、ララゾチド（ベル型の用量反応曲線を示す）と比較してタイトジャンクション完全性を促進させるのに驚くほど効果的である。これは驚くべき観察である。なぜなら、通常、ペプチド薬物においてＬアミノ酸をＤアミノ酸に置き換えると、効力が失われるからである。すなわち、Ｄアミノ酸を有するペプチドは、天然のＬアミノ酸を有するペプチドと比較して受容体機能への低い親和性での結合が予想されると考えられている。

【００２１】

様々な実施形態において、本発明は、特に消化管への投与の場合に、ララゾチドと比較して、実質的に低用量又は高用量でより効果的なララゾチド誘導体を使用する。したがって、本発明の医薬組成物は約０．５ｍｇ未満のララゾチド誘導体を含有していてもよい。例えば、幾つかの実施形態において、医薬組成物は、約０．４ｍｇ以下のララゾチド誘導体、又は約０．３ｍｇ以下のララゾチド誘導体、又は約０．２５ｍｇ以下のララゾチド誘導体、又は約０．２ｍｇ以下のララゾチド誘導体、又は約０．１５ｍｇ以下のララゾチド誘導体、又は約０．１ｍｇ以下のララゾチド誘導体、又は約５０μｇ以下のララゾチド誘導体、又は約２５μｇ以下のララゾチド誘導体を含有する。幾つかの実施形態において、医薬組成物は、約５０μｇ～約４００μｇ以下のララゾチド誘導体、又は約５０μｇ～約２００μｇ以下のララゾチド誘導体、又は約５０μｇ～約１５０μｇ以下のララゾチド誘導体を含有する。

【００２２】

他の実施形態において、本発明は、約０．５ｍｇを超えるララゾチド誘導体を含有し、ララゾチドで観察される逆用量又は「ベル型」反応を実質的に回避する医薬組成物を意図している。例えば、幾つかの実施形態において、医薬組成物は、約０．６ｍｇ以上のララゾチド誘導体、又は約０．７５ｍｇ以上のララゾチド誘導体、又は約１．０ｍｇ以上のララゾチド誘導体、又は約１．２５ｍｇ以上のララゾチド誘導体、又は約１．５ｍｇ以上のララゾチド誘導体、又は約２．０ｍｇ以上のララゾチド誘導体を含有する。

【００２３】

幾つかの実施形態において、ララゾチド誘導体（例えば、（ｄ）－ララゾチド又は（ｄ）－Ｐｒｏ）は約０．５ｍｇで投与される。例えば、誘導体は、ララゾチドよりも０．５ｍｇの用量でより効果的であり得る。

【００２４】

本発明は、ララゾチド又はララゾチド誘導体を含む組成物を、ＲＯＣＫ活性を有する組織に投与し、それにより該組織内のＲＯＣＫ活性を阻害することによって、治療を必要とする被験体におけるＲＯＣＫ活性に関連する病態を治療する方法及び組成物を提供する。「被験体」及び「患者」という用語は、本明細書において区別なく使用され、一般的に哺乳類の被験体／患者を指す。様々な実施形態において、被験体はヒト被験体である。このため、組成物は、所望の器官又は組織内のＲＯＣＫ活性を阻害するために処方され、及び／又は様々な経路で送達され得る。様々な実施形態において、ララゾチド又はその誘導体（又はその塩）を含む医薬組成物は、例えば、消化管（ＧＩ）（例えば、経腸送達）に、又は非経口、鼻腔内、口腔内、眼科若しくは肺送達によって投与される。送達は、影響を受けた組織に対して局所的又は全身的であってもよい。

【００２５】

幾つかの実施形態において、ペプチド又は医薬組成物は、被験体の消化管（ＧＩ）に投与される。

【００２６】

幾つかの実施形態において、被験体は、セリアック病、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）（例えば、クローン病又は潰瘍性大腸炎）、環境性腸症、食道炎、壊死性腸炎、及び腸管虚血等の、消化管に対する炎症病態又は損傷を有する。幾つかの実施形態において、被験体は、腺腫（例えば、進行性腺腫）、大腸癌、又は胃癌（stomach cancer）に罹患している。ＲＯＣＫ活性は、腫瘍の発生に関与していることが示されている。Wei L., et al., Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer, Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2016; 64: 259-278。幾つかの実施形態において、被験体は癌に罹患しており、この癌は、皮膚、結腸、乳房、肺、脳、骨、膵臓、腎臓、肝臓、膀胱、卵巣、精巣、又は前立腺等の任意の組織から発生する可能性がある。

【００２７】

他の実施形態において、被験体は白血病、骨髄腫、又はリンパ腫に罹患している。

【００２８】

幾つかの実施形態において、被験体は大腸癌を起こすリスクがある。例えば、実施形態

において、被験体は、被験体の家族歴、遺伝子変異、及び／又は健康歴（例えば、進行性腺腫又は大腸癌の既往歴）に起因して大腸癌のリスクが高い。幾つかの実施形態において、被験体、又は被験体の家族の一員は、家族性大腸腺腫症（ＦＡＰ）、遺伝性非ポリポーシス大腸癌（ＨＮＰＣＣ）、ポイツジェガース症候群、又はＭＵＴＹＨ関連ポリポーシス（ＭＡＰ）に罹患しているか又は罹患していた。幾つかの実施形態において、被験体は、限定するものではないが、ＡＰＣ、ＭＬＨ１、ＭＳＨ２、ＭＳＨ６、ＰＭＳ２、ＥＰＣＡＭ、ＳＴＫ１１（ＬＫＢ１）、及びＭＵＴＹＨ等の、大腸癌のリスクを高める１つ以上の遺伝子の変異を有する。例えば、限定するものではないが、被験体は、ｒｓ６９８３２６７、ｒｓ４９３９８２７、ｒｓ３８０２８４２、ｒｓ１６８９２７６６、ｒｓ１０７９５６６８、ｒｓ４４４４２３５、ｒｓ１０４１１２１０、ｒｓ６６９１１７０、ｒｓ４９２５３８６、ｒｓ３８２４９９９、ｒｓ６４７１６１、ｒｓ２４２３２７９、ｒｓ３２１７８１０、及びｒｓ５９３３６から選択される１つ以上の一塩基多型（ＳＮＰ）を有していてもよい。幾つかの実施形態において、被験体は、慢性的な抗生物質の使用を受けている。例えば、慢性的な抗生物質の使用は、少なくとも６か月の抗生物質療法の使用を含み、ＣＲＣのリスクを高める可能性がある。

【００２９】

幾つかの実施形態において、被験体は、癌の発症に関連するＲＯＣＫ変異を有する。このような変異の例としては、ＲＯＣＫ１アイソフォーム対するＶａｌ１３０９、Ｔｙｒ４０５、Ｓｅｒ１１２６、Ｐｒｏ１１９３Ｓ、又はＲＯＣＫ２アイソフォームに対するＴｈｒ４３１Ａｓｎ、Ａｓｐ６０１Ｖａｌ、及びＬｙｓ１０８３Ｍｅｔが挙げられる。

【００３０】

幾つかの実施形態において、被験体は、化学療法、放射線、切除、並びに免疫療法及び癌免疫療法剤の１つ以上から選択される癌治療を受けているか又は受けたことがある。実施形態において、癌免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤又は免疫刺激リガンドを用いた治療法であり、これには、プログラム細胞死リガンド１（ＰＤ－Ｌ１、別名Ｂ７－Ｈ１、ＣＤ２７４）、プログラム細胞死１（ＰＤ－１）、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣ、ＣＤ２７３）、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＩＤＯ１、ＩＤＯ２の阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。Ｔ細胞刺激リガンドとしては、ＣＤ２８、ＯＸ－４０及びＩＣＯＳのアゴニストが挙げられるが、これらに限定されない。或る特定の実施形態において、被験体には、抗ＣＴＬＡ－４、抗ＰＤ－１、抗ＰＤ－Ｌ１及び／又はＰＤ－Ｌ２剤から選択される免疫チェックポイント阻害剤が投与される。幾つかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、イピリムマブ、トレメリムマブ、ペムブロリズマブ及びニボルマブから選択される。

【００３１】

更に他の実施形態において、被験体は、炎症性肝疾患、腎臓病、膵炎、高血糖症、又は肺若しくは心臓の炎症若しくは線維症に罹患している。例えば、幾つかの実施形態において、被験体は、限定するものではないが、ＮＡＦＬＤ、ＮＡＳＨ、アルコール性脂肪肝炎（ＡＳＨ）、又は、肝炎、肥満、糖尿病（diabetes）、インスリン抵抗性、高グリセリド血症、慢性腎臓病、ＩｇＡ腎症（ベルジェ病としても知られている）、無βリポタンパク血症、糖原病、ウェーバークリスチャン病、ウォルマン病、急性妊娠脂肪肝、及びリポジストロフィーに起因する脂肪性肝疾患を含む脂肪性肝疾患に罹患している。米国特許出願公開第２０１９／０３５８２８９号及び米国特許出願公開第２０２１／００６９２８６号を参照されたい（引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）。

【００３２】

幾つかの実施形態において、被験体は、肺線維症、心筋線維症、腎線維症、又は肝線維症等の臓器線維症を伴う病態を有する。Knipe R., et al. The Rho Kinases: Critical Mediators of Multiple Profibrotic Processes and Rational Targets for New Therapies for Pulmonary Fibrosis, Pharmacol Rev. 2015 Jan; 67(1): 103-117。幾つかの実施形態において、被験体は、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、嚢胞性線維症、急性肺損傷（ＡＬＩ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、気腫、気管支炎

、喘息、肺炎、及び呼吸器感染症等の肺線維症に関連する病態を有する。

【００３３】

他の実施形態において、ララゾチド又は誘導体は、癌組織に直接投与され、これには、限定するものではないが、腫瘍内投与、又はナノ粒子へのカプセル化若しくは結合を介した手段、又は他の手段が含まれる。ＲＯＣＫ酵素は、腫瘍の浸潤及び転移、増殖、及びアポトーシス又は生存等の癌の進行の様々なプロセスで機能し、また癌、並びに線維芽細胞及び内皮細胞等の癌関連細胞の両方に影響を与える。

【００３４】

実施形態において、組織は原発性癌である。原発性癌とは、臨床的に検出可能になる発生部位の癌細胞を指し、原発性腫瘍である可能性がある。例えば、癌はステージＩ又はステージＩＩの癌である可能性がある。幾つかの実施形態において、組織は、原発性癌であり、癌は、肺癌、乳癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、子宮頸癌、大腸癌、膵臓癌、黒色腫、卵巣癌、骨癌、尿路上皮癌、胃癌、頭頸部癌、膠芽腫、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）、膀胱癌、ホルモン抵抗性前立腺癌、及びリンパ腫から選択される。

【００３５】

実施形態において、組織は転移性癌である。「転移」とは、原発性部位から体内の他の場所への癌の拡散を指す。癌細胞は、原発性腫瘍から分離し、リンパ管及び血管に浸透し、血流を介して循環し、体内の他の場所の正常組織内の遠隔病巣で増殖する（転移する）可能性がある。転移は局所的であっても又は遠隔的であってもよい。幾つかの実施形態において、組織は、転移性黒色腫等の転移性癌である。様々な実施形態において、患者は、肉腫又は癌腫である癌に罹患している。

【００３６】

幾つかの実施形態において、被験体は、化学療法、放射線、切除、並びに免疫療法及び癌免疫療法剤の１つ以上から選択される癌治療を受けているか又は受けたことがある。実施形態において、癌免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤又は免疫刺激リガンドを用いた治療法であり、これには、プログラム細胞死リガンド１（ＰＤ－Ｌ１、別名Ｂ７－Ｈ１、ＣＤ２７４）、プログラム細胞死１（ＰＤ－１）、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣ、ＣＤ２７３）、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＩＤＯ１、ＩＤＯ２の阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。Ｔ細胞刺激リガンドとしては、ＣＤ２８、ＯＸ－４０及びＩＣＯＳのアゴニストが挙げられるが、これらに限定されない。或る特定の実施形態において、被験体には、抗ＣＴＬＡ－４、抗ＰＤ－１、抗ＰＤ－Ｌ１及び／又はＰＤ－Ｌ２剤から選択される免疫チェックポイント阻害剤が投与される。幾つかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、イピリムマブ、トレメリムマブ、ペムブロリズマブ及びニボルマブから選択される。

【００３７】

幾つかの実施形態において、ララゾチド又は誘導体は、眼の表面等の眼に、又は硝子体内注射によって投与される。

【００３８】

実施形態において、被験体はシェーグレン症候群（ＳＳ）に罹患している。シェーグレン症候群は、体内の水分産生腺が影響を受け、例えばドライマウス（口腔乾燥症）、ドライアイ症候群（例えば、慢性ドライアイ及び／又は眼球乾燥症）、及び／又はドライスキン（例えば乾皮症）、並びに他の症状を引き起こす自己免疫状態である。本発明の実施形態によれば、シェーグレン症候群は、一次性シェーグレン症候群である場合もあれば、又は、二次性シェーグレン症候群である、すなわち、別の自己免疫疾患又は結合組織病に関連して発生する場合もある。ＳＳに起因する炎症は、腺を徐々に損傷し、腺内のリンパ球浸潤、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）のレベルの上昇、及び自己抗体の産生（例えば抗ＳＳＡ／Ｒｏ）を特徴とする。Nair JJ and Singh TP, Sjogren's syndrome: Review of the etiology pathophysiology & potential therapeutic interventions. J. Clin. Exp. Dent. 2017; 9(4): e584-9を参照されたい。例示的な実施形態に

おいて、ララゾチド又は誘導体は、一次性シェーグレン症候群又は二次性シェーグレン症候群の治療のために眼の表面に投与される。

【００３９】

幾つかの実施形態において、被験体は緑内障に罹患している。ＲＯＣＫ阻害剤は、例えば緑内障における眼圧（ＩＯＰ）を下げるための有望な治療の選択肢である。例えば、幾つかの実施形態において、緑内障は、ララゾチド又はその誘導体（又はその塩）を眼表面に投与することによって治療される。

【００４０】

他の実施形態において、被験体は、黄斑変性、黄斑浮腫、又は糖尿病網膜症等の炎症性眼疾患に罹患している。加齢黄斑変性（ＡＭＤ）は、加齢とともに段階的に進行する失明を引き起こす眼疾患である。炎症は、脈絡膜新生血管及び地図状委縮を含むＡＭＤの病因に関与している。幾つかの実施形態において、ララゾチド又はその誘導体は、眼の奥への眼内投与（例えば硝子体内注射）によって投与される。

【００４１】

本発明の幾つかの実施形態において、ララゾチド又は誘導体は呼吸器に投与される。米国特許第１０，７２３，７６３号、米国仮出願第６３／１８１，４８６号、及び国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２１／２７４１号（これらは全て引用することにより本明細書の一部をなす）を参照されたい。実施形態において、被験体は、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺線維症、嚢胞性線維症、急性肺損傷（ＡＬＩ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、気腫、気管支炎、喘息、肺炎、肺癌、及び呼吸器感染症から選択される病態を有する。

【００４２】

実施形態において、ララゾチド又はララゾチド誘導体は、肺への溶液エアロゾル又は粉末としての投与用に製剤化されている。

【００４３】

他の実施形態において、ララゾチド又はララゾチド誘導体は、鼻腔用溶液又は鼻腔用乳剤として鼻腔上皮に投与される。

【００４４】

幾つかの実施形態において、ララゾチド又は誘導体は血管系に投与される。例えば、ララゾチド又は誘導体は、全身投与されてもよく、又はカテーテルによって局所的に適用することもできる。例えば、被験体は、心筋線維症、心臓肥大、高血圧、肺高血圧、狭心症、冠攣縮性狭心症、心不全、アテローム性動脈硬化、動脈硬化、糖尿病、膵炎、腎臓病（腎線維症を含む）、及び脳卒中（例えば、虚血性脳卒中の予防又は脳卒中の回復）から選択される病態を有している場合がある。

【００４５】

本明細書で提供される医薬組成物は、ＧＩの患部（例えば、胃、小腸及び／又は大腸）で放出されるように製剤化することができる。他の実施形態において、ララゾチド又は誘導体は、（例えば、静脈内又は皮下注射により）全身投与される。幾つかの実施形態において、ペプチド組成物は、溶液エアロゾル又は粉末として肺に投与される。幾つかの実施形態において、ペプチド組成物は、鼻腔用溶液又は鼻腔用乳剤として鼻腔上皮に投与される。幾つかの実施形態において、ペプチド組成物は、液体又は口腔内崩壊錠として口腔又は食道に投与される。幾つかの実施形態において、ペプチド組成物は、眼表面又は眼内に投与される。

【００４６】

本発明のララゾチド誘導体は、塩を含む任意の適切な形態で投与することができる。例えば、ペプチドは酢酸塩として投与してもよい。代替的な塩を使用してもよく、これには、Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977)、及びThe Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002（引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）に挙げられているもの等の任意の薬学的に許容可能な塩が含まれる。

【００４７】
様々な実施形態において、ペプチドは医薬組成物として製剤化され、錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル、液体を含有するカプセル、多粒子を含有するカプセル、粉末、溶液、乳剤、ドロップ剤、坐剤、乳剤、エアロゾル、スプレー、懸濁液、遅延放出製剤、持続放出製剤、放出調節製剤、制御放出製剤の形態、又は使用に適した任意の他の形態をとることができる。
【００４８】
幾つかの実施形態において、医薬組成物は、非経口投与に適応する組成物として製剤化される。非経口投与に適した剤形（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は腹腔内注射及び注入）としては、例えば、溶液、懸濁液、分散液、乳剤等が挙げられる。それらは、使用直前に滅菌注射媒体に溶解又は懸濁することができる滅菌固体組成物（例えば凍結乾燥組成物）の形態で製造することもできる。それらには、例えば、懸濁剤又は分散剤が含まれていてもよい。これらの実施形態において、組成物は、全身性炎症又は損傷若しくは炎症を起こした内皮組織を伴う病態を治療するのに有効であり得る。
【００４９】
幾つかの実施形態において、組成物は、消化管の上皮組織又は粘膜表面に接触させることによって被験体に投与される。例えば、組成物は、胃、小腸及び／又は大腸の１つ以上に送達されるように製剤化することができる。患部領域（複数の場合もある）（例えば、十二指腸、空腸及び回腸、横行結腸、下行結腸、上行結腸、Ｓ状結腸、並びに盲腸）におけるペプチドの放出を標的とすることにより、ＧＩ内の任意の位置でのＲＯＣＫ阻害を行うことができる。小腸又は大腸におけるペプチドの標的送達は、ペプチドでビーズ又は粒子をコーティングすることで、胃での放出を防いで、標的の位置（複数の場合もある）又はその近くで分解する遅延放出コーティングを施すことによって達成することができる。
【００５０】
幾つかの実施形態において、ララゾチド又はララゾチド誘導体は、腸内で約０．５ｍｇ～約５ｍｇのララゾチド又は誘導体を放出する持続放出製剤又は制御放出製剤において投与される。或る特定の実施形態において、制御放出製剤は少なくとも０．５ｍｇ又は１ｍｇのララゾチド又は誘導体を含有する。
【００５１】
幾つかの実施形態において、ペプチド（例えば、ララゾチド又はララゾチド誘導体）は、ＧＩの１箇所以上の位置での持続的又は調節された又は制御された送達のために製剤化される。例えば、本発明は、少なくとも約２時間にわたって、又は少なくとも約２．５時間にわたって、又は少なくとも約３時間にわたって、又は少なくとも約４時間にわたって、又は少なくとも約５時間にわたって、小腸及び／又は大腸においてペプチドを機能的に放出し得る持続放出製剤又は制御放出製剤を意図している。幾つかの実施形態において、持続放出組成物又は制御放出組成物は、模擬腸液への曝露の約１０分～約３０分以内にペプチドを放出し始め、ペプチドの放出は、模擬腸液への曝露から少なくとも約１８０分間、又は少なくとも約２１０分間、又は少なくとも約２４０分間、又は少なくとも約２８０分間継続する。放出プロファイルは、例えば、異なる腸溶性ポリマーコート及び／又はポリマーコートの異なる厚さを有する組成物を使用して作成することができる。幾つかの実施形態において、本発明は、生分解性又は浸食性ポリマーマトリックス内に含有される有効量のララゾチド又は誘導体（又はその塩）を含む組成物を提供し、この組成物は腸溶性コーティングを更に含む。生分解性又は浸食性マトリックスを使用する製剤は、国際公開第２０２１／０３４６２９号（引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）に記載されている。さらに、浸食性ポリマーマトリックスは多糖類マトリックスを含んでいてもよい。幾つかの実施形態において、マトリックスは、セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩、アミロース、ペクチン、カロース、ラミナリン、クリソラミナリン、キシラン、アラビノキシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナン、キサンタンガム、デキストラン、ウェランガム、ゲランガム、ジウタンガム、プルラン、ヒアルロン酸、及びそれらの誘導体の１つ以上を含む。更なる実施形態において、マトリックスは微結晶

セルロースを含む。これらの実施形態において、組成物は、低有効用量のララゾチド又はララゾチド誘導体（例えば、（ｄ）－ララゾチド又は（ｄ）－Ｐｒｏ）を活用しながら、不活性フラグメントの局所的蓄積を最小限に抑える。さらに、これらの実施形態の製剤は、輸送中に継続的に沈着する低用量のペプチドでＧＩの広い表面を治療するという利点がある。

【００５２】

様々な実施形態において、医薬組成物は、遅延放出プロファイルを備えるように、すなわち、摂取後すぐに有効成分（複数の場合もある）を放出するのではなく、むしろ、例えば、小腸（例えば、十二指腸、空腸、回腸の１つ以上）又は大腸（例えば、盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸又はＳ状結腸の１つ以上）での放出のために、ペプチドが胃を通過して消化管の下部に到達するまで有効成分（複数の場合もある）の放出を延期するように、製剤化することができる。実施形態において、医薬組成物は、例えば米国特許第８，１６８，５９４号（その内容全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載されているような遅延放出プロファイルを備えるように製剤化される。

【００５３】

例えば、ペプチドは、ペプチドを含有する経口投与用の（ｏｒａｌ ｄｏｓａｇｅ）遅延放出組成物として、患者の少なくとも十二指腸に投与され得る。このような実施形態において、組成物は、胃液中では安定で、腸液中では不安定なコーティングを有する第１の集団のビーズを含み、そのため、十二指腸でペプチドを分解して実質的に放出する。組成物は、患者の空腸及び／又は回腸でのペプチドの放出に影響を与えるｐＨ依存性コーティングを有する第２の集団のビーズを更に含み得る。例えば、第２の集団のビーズは、ビーズが十二指腸でペプチドを放出した約３０分又は約４５分後にペプチドを放出し得る。経口投与用組成物はカプセル又は錠剤の形態をとることができる。幾つかの実施形態におけるｐＨ依存性コーティングは、メタクリル酸とアクリル酸エチルとの１：１コポリマーであり、層の厚さによって各ビーズの放出プロファイルが決定される。ビーズは、ベースコート、分離層、及びオーバーコート層等の１つ以上の追加コーティングを有していてもよい。これらの実施形態において、ビーズの内容物は、標的位置でよりボーラス的に放出されるが、（ｄ）－ララゾチド又は（ｄ）－Ｐｒｏの特性は、このような放出プロファイルを備えたララゾチドよりも効果的である。

【００５４】

例示的な経口投与用組成物では、有効量のペプチド（例えば酢酸塩として）が、患者の十二指腸でペプチドを放出することができる第１の遅延放出粒子、及び患者の空腸でペプチドを放出することができる第２の遅延放出粒子で提供される。各粒子は、コア粒子、コア粒子を覆うペプチド（例えば、（ｄ）－ララゾチド又は（ｄ）－Ｐｒｏ）を含むコート、及びペプチドを含むコートの外側の遅延放出コーティング（例えば、アクリレートとメタクリレートとの１：１コポリマー）を有する。第１の遅延放出粒子は、ｐＨが５を超える模擬腸液に約６０分曝すことによって、第１の遅延放出粒子中のペプチドの少なくとも７０％を放出するのに対し、第２の遅延放出粒子は、ｐＨが５を超える模擬腸液に約３０分及び約９０分曝すことによって、ペプチドの少なくとも７０％を放出する。

【００５５】

一般的に、遅延放出コーティングは、ｐＨ及び／又は酵素の存在に関係なく、時間に応じて分解する可能性がある。このようなコーティングは、例えば水不溶性ポリマーを含み得る。それ故、その溶解度はｐＨに依存しない。本明細書で使用される「ｐＨ非依存性」という用語は、ポリマーの透過性及び医薬成分を放出する能力が、ｐＨに応じたものではなく、及び／又はｐＨに極めて僅かしか依存しないことを意味する。このようなコーティングは、例えば持続放出製剤を調製するために使用することができる。適切な水不溶性ポリマーとしては、セルロースエーテル、セルロースエステル又はセルロースエーテルエステル、すなわち、セルロース骨格上のヒドロキシ基の一部がアルキル基で置換され、また一部がアルカノイル基で修飾されたセルロース誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。例としては、エチルセルロース、アセチルセルロース、ニトロセルロース等が挙げ

られる。

【００５６】

遅延放出コーティングを構成するポリマーの他の例としては、ラッカー、並びにアクリル及び／又はメタクリルエステルポリマー、第四級アンモニウム含有量の低いアクリレート若しくはメタクリレートのポリマー若しくはコポリマー、又はそれらの混合物等が挙げられるが、これらに限定されない。不溶性ポリマーの例としては、ＥＵＤＲＡＧＩＴ　ＲＳ（商標）、ＥＵＤＲＡＧＩＴ　ＲＬ（商標）、及びＥＵＤＲＡＧＩＴ　ＮＥ（商標）が挙げられる。不溶性ポリマーとしては、例えばポリビニルエステル、ポリビニルアセタール、ポリアクリル酸エステル、ブタジエンスチレンコポリマー等が挙げられる。

【００５７】

活性剤をＧＩ管に遅延して実質的に送達するための様々なタイプの腸溶性コーティングが知られている。幾つかの実施形態において、持続放出組成物には、酸性環境では実質的に安定であり、中性付近からアルカリ性の環境では実質的に不安定な腸溶剤が含まれる。実施形態において、持続放出コーティングは、胃液中で実質的に安定な腸溶剤を含有する。腸溶剤は、例えば、メタクリル酸コポリマー、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ポリビニルアセテートフタレート、カルボキシメチルエチルセルロース、及びＥＵＤＲＡＧＩＴ（商標）型ポリマー（ポリ（メタクリル酸）、メタクリル酸メチル）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートスクシネート、セルロースアセテートトリメリテート、シェラック、又は他の適切な腸溶性コーティングポリマーの溶液又は分散液から選択することができる。ＥＵＤＲＡＧＩＴ（商標）型ポリマーとしては、例えば、ＥＵＤＲＡＧＩＴ（商標）ＦＳ　３０Ｄ、Ｌ　３０Ｄ－５５、Ｌ　１００－５５、Ｌ　１００、Ｌ　１２．５、Ｌ　１２．５　Ｐ、ＲＬ　３０Ｄ、ＲＬ　ＰＯ、ＲＬ　１００、ＲＬ　１２．５、ＲＳ　３０　Ｄ、ＲＳ　ＰＯ、ＲＳ　１００、ＲＳ　１２．５、ＮＥ　３０　Ｄ、ＮＥ　４０　Ｄ、ＮＭ　３０　Ｄ、Ｓ　１００、Ｓ　１２．５、及びＳ　１２．５　Ｐが挙げられる。幾つかの実施形態において、ＥＵＤＲＡＧＩＴ（商標）ＦＳ　３０Ｄ、Ｌ　３０　Ｄ－５５、Ｌ　１００－５５、Ｌ　１００、Ｌ　１２．５、Ｌ　１２．５　Ｐ　ＲＬ　３０　Ｄ、ＲＬ　ＰＯ、ＲＬ　１００、ＲＬ　１２．５、ＲＳ　３０　Ｄ、ＲＳ　ＰＯ、ＲＳ　１００、ＲＳ　１２．５、ＮＥ　３０　Ｄ、ＮＥ　４０　Ｄ、ＮＭ　３０　Ｄ、Ｓ　１００、Ｓ　１２．５、及びＳ　１２．５　Ｐの１つ以上が使用される。腸溶剤は前述の溶液又は分散液の組合せであってもよい。幾つかの実施形態において、腸溶剤はＥＵＤＲＡＧＩＴ　Ｆ３０Ｄであり、アクリル酸メチル、メタクリル酸メチル、及びメタクリル酸のコポリマーを含む。コポリマーは、遊離カルボニル基とエステル基との比率が約１：１０である。

【００５８】

幾つかの実施形態において、ビーズは、模擬胃液への溶解に対して実質的に耐性がある腸溶性コーティングを含む。組成物は、胃液中で本質的に無傷のままであるか、又は本質的に不溶性であってもよい。胃耐性コーティングの安定性はｐＨに依存する可能性がある。例えば、腸溶性コーティングは、模擬胃液中、及びｐＨが約５．５の模擬腸液中におけるペプチドの実質的な放出を防ぐことができる。幾つかの実施形態において、マトリックスは、ｐＨが約６以上、例えば約６．５～約７．０の模擬腸液中におけるペプチドの持続放出を提供する。このため、腸溶性コーティングは、模擬胃液中では安定しているが、ｐＨが約６．０を上回る模擬腸液中では不安定である。このような実施形態の腸溶性コーティングは、十二指腸ではペプチドを実質的に放出せず、組成物が空腸に入るまで放出を遅らせ、その後、空腸及び回腸で持続放出をもたらす。

【００５９】

幾つかの実施形態において、組成物は、ビーズの集団を含む経口送達用カプセルであり、ビーズの集団は、浸食性ポリマーマトリックス内に含まれるララゾチド又は誘導体（例えば、（ｄ）－ララゾチド若しくは（ｄ）－Ｐｒｏ又はその塩）を有効量含み、ビーズは腸溶性コーティングを更に含み、該腸溶性コーティングは、アクリル酸メチル、メタクリル酸メチル、及びメタクリル酸のコポリマーを含んでいてもよい。コポリマーにおける遊

離カルボニル基とエステル基との比率は、約１：１０とすることができる（例えばＥＵＤＲＡＧＩＴ　Ｆ３０Ｄ）。このような実施形態において、腸溶性コーティングは、組成物の総重量の約２０％～約３０％であってもよい。幾つかの実施形態において、浸食性マトリックスは微結晶セルロースを含む。幾つかの実施形態において、組成物は、模擬胃液中で約２時間後にペプチドの約１５％未満の放出を提供する。さらに、組成物は、ｐＨが約５．５の模擬腸液中で約２時間後にペプチドの約２５％未満の放出を提供する。様々な実施形態において、組成物は、ｐＨが約７．０の模擬腸液中で約２時間後にペプチドの少なくとも約４０％～約８０％以下を放出する。様々な実施形態において、ｐＨが約７の模擬腸液中における１００％の放出には、少なくとも３時間まで、又は幾つかの実施形態では、少なくとも約３．５時間若しくは少なくとも約４時間まで到達しない。

【００６０】

幾つかの実施形態において、医薬組成物は、例えば米国特許第８，１６８，５９４号（その内容全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載されているような遅延放出プロファイルを備えるコーティングされた錠剤、又はコーティングされたビーズ若しくは顆粒を含む。例示的な腸溶性コーティングは、アクリレートとメタクリレートとのコポリマーを含み、幾つかの実施形態では１：１コポリマーである。シールコート又はトップコート用のものを含む他の充填剤、結合剤及び可塑剤は、米国特許第８，１６８，５９４号（引用することにより本明細書の一部をなす）に記載されている。

【００６１】

或る特定の実施形態によれば、本発明は、本明細書に記載の組成物を１日１回以上投与することを提供する。例えば、組成物は、１日約１回、１日約２回、又は１日約３回投与してもよい。様々な実施形態において、１日１回から１日３回のレジメンは、長期間にわたり継続される。幾つかの実施形態において、組成物は毎日投与される。他の実施形態において、ララゾチド又はララゾチド誘導体組成物は、週に１回～３回投与される。幾つかの実施形態において、レジメンは、少なくとも約１か月、少なくとも約２か月、少なくとも約４か月、少なくとも約６か月、又は少なくとも約８か月継続される。幾つかの実施形態において、治療は、疾患の進行を遅らせるか若しくは防止するため、又は慢性疾患の症状を軽減若しくは改善するために継続される。

【実施例】

【００６２】

実施例１：腸管バリア機能におけるララゾチド酢酸塩の作用機序の解明

本実施例は、Ａ／Ｒ損傷時のＭＬＣ－２のリン酸化の調節におけるララゾチド酢酸塩の役割を調査した結果を提供する。結果は、Ａ／Ｒ損傷を受けたＣａｃｏ－２ＢＢｅ１単層に頂端処理したララゾチド酢酸塩が、ＴＪタンパク質の調節とアクチンの安定化を介して上皮バリア機能を保護したことを示す。さらに、ララゾチド酢酸塩処理は、Ａ／Ｒ損傷時のＭＬＣ－２のリン酸化の増加を軽減し、上皮バリア機能を調節した。

【００６３】

Ａ．バリア機能の評価

ララゾチド酢酸塩によるヒト腸管上皮細胞の前処理は、無酸素／再酸素化（Ａ／Ｒ）損傷時に腸管バリアを引き締めることが示された。傍接合部のアクトミオシンリングは、ミオシン軽鎖２（ＭＬＣ－２）のリン酸化に反応して収縮し、ＴＪ膜貫通タンパク質の内部移行を引き起こすため、本研究では、ララゾチド酢酸塩が、ＭＬＣ－２リン酸化の阻害を介して無酸素／再酸素化（Ａ／Ｒ）損傷時にＴＪバリアを保護するかどうかを評価する。

【００６４】

具体的には、バリア機能を評価するために、ララゾチド酢酸塩（ＬＡ）で処理したか又は処理していない無酸素／再酸素化（Ａ／Ｒ）損傷Ｃ２ＢＢｅ１（Ｃａｃｏ－２刷子縁－Ｃａｃｏ－２発現）細胞において経上皮電気抵抗（ＴＥＥＲ）を測定した。Ｃ２ＢＢｅ１の単層をＬＡ（０．００１ｍＭ、０．１ｍＭ、１ｍＭ、及び１０ｍＭ）で処理し、２時間無酸素状態にした後、２１％O_2で再酸素化した。図１Ａを参照されたい。Ａ／Ｒ損傷を生じさせるために、Ｃ２ＢＢｅ１細胞をモジュラーインキュベーターチャンバ（Billups

-Rothenberg（カリフォルニア州サンディエゴ））に入れ、９５％N_2／５％CO_2で５分間フラッシュを行った。次に、モジュラーチャンバを気密にし、インキュベーターに２時間置いた。２時間後、細胞をモジュラーインキュベーターチャンバから取り出し、２１％O_2の通常環境に置いた。Ａ／Ｒ損傷及び回復中のバリア機能を評価するために、ＴＥＥＲを測定した。ＴＥＥＲは、単層の基底側と頂端側にチョップスティック型電極セット（Chopstick Electrode Set）（WPI, LLC（フロリダ州サラソタ））を使用し、Ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ Ｖｏｌｔ Ｏｈｍ Ｍｅｔｅｒ２（WPI, LLC（フロリダ州サラソタ））に取り付けて測定した。

【００６５】

得られたＴＥＥＲは、対照細胞と比較して、１０ｍＭのＬＡで処理したＣ２ＢＢｅ１単層で有意に増大した（ｐ＜０．００１）ことが示された。図１Ｂを参照されたい。ＴＥＥＲの増大は、無酸素損傷によって誘発された「漏れやすい」タイトジャンクションバリアを閉じるＬＡの能力の証拠である。

【００６６】

Ｂ．タイトジャンクション及びＭＬＣ活性の評価

図２に示すように、Ａ／Ｒ損傷は、タイトジャンクションタンパク質を内部移行するようなミオシン軽鎖２（ＭＬＣ－２）のリン酸化を誘発する。この実験の目的は、ＬＡが、Ａ／Ｒ損傷中にタイトジャンクションバリアを保護するためにリン酸化ＭＬＣ－２の阻害を助けるかどうかを判定することであった。この目的のために、タイトジャンクションタンパク質の局在化、アクチンの構造、及びｐＭＬＣ－２について調べた。

【００６７】

具体的には、膜画分及び細胞質画分のウエスタンブロットと、免疫蛍光顕微鏡分析とを使用して、タイトジャンクションタンパク質と、アクチン構造との分布を評価した。Ｍｅｍ－ＰＥＲ真核生物膜タンパク質抽出試薬キット（Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit）（Thermo Scientific）を使用して、膜及び細胞質のコンパートメントを分画した。抽出したタンパク質は、抗ＺＯ－１及び抗オクルディンの一次抗体（Invitrogen）でブロットした。冷メタノールで固定した単層を一次抗体（ＺＯ－１及びオクルディン）及びファロイジン（Ｆ－アクチン）で染色し、免疫蛍光顕微鏡分析を行った。染色した単層は、ｃｅｌｌＳｅｎｓソフトウェアを搭載したＯｌｙｍｐｕｓ ＩＸ８３倒立電動顕微鏡（Olympus IX83 Inverted Motorized Microscope）（オリンパス株式会社（日本、東京））で検査した。ｐＭＬＣ－２／ＭＬＣ－２発現は、ｐＭＬＣ－２及びＭＬＣ－２に対する一次抗体（CST（マサチューセッツ州ダンバース））を使用したウエスタンブロット分析で評価した。

【００６８】

データから、Ａ／Ｒ損傷中にタイトジャンクションタンパク質オクルディンが細胞質に内部移行し、ＺＯ－１が破壊されたことが示された。しかしながら、図３に示すように、１０ｍＭのＬＡで処理すると、Ａ／Ｒ損傷中のタイトジャンクションタンパク質の破壊が防止された。Ｆ－アクチン構造もＡ／Ｒ損傷中に破壊されたが、１０ｍＭのＬＡで保護された。図４を参照されたい。さらに、図５は、ｐＭＬＣ－２がＡ／Ｒ損傷によって大幅に増加し、１０ｍＭのＬＡで処理するとこのリン酸化が大幅に減少したことを示す。総合すると、データは、ＬＡがｐＭＬＣ－２を減少させることによってＡ／Ｒ損傷中のタイトジャンクションバリアを保護することを示唆している。

【００６９】

ＬＡ処理により、Ａ／Ｒ損傷中のヒト腸管細胞におけるタイトジャンクションバリアが強化された。Ａ／Ｒ損傷中のＣ２ＢＢｅ１細胞では、ＬＡ処理によりタイトジャンクションタンパク質が保護されることが示された。Ａ／Ｒ損傷中に増加した無酸素誘導性のリン酸化ＭＬＣ－２及びリン酸化ＭＬＣ－２は、ＬＡによって大幅に減少した。

【００７０】

Ａ／Ｒ損傷中のヒト腸管上皮細胞では、ＬＡ処理によりタイトジャンクションタンパク質の分布が保護された。ＬＡ処理によって誘導されるＡ／Ｒ損傷中のこの強化されたバリ

ア機能は、アクチンの安定化によるリン酸化ＭＬＣ－２の減少によってもたらされた。
【００７１】
Ｃ．ＭＬＣＫ及びＲＯＣＫ活性の評価
図６は、リン酸化ミオシン軽鎖（ｐＭＬＣ）が、ミオシン軽鎖キナーゼ（ＭＬＣＫ）、ミオシン軽鎖ホスファターゼ（ＭＬＣＰ）、及びＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）によって制御されていることを示す。本実施例の目的は、キナーゼ阻害実験を行うことによって、キナーゼ活性におけるＬＡの役割を明らかにすることであった。
【００７２】
バリア機能を評価するために、ＬＡで処理したか又は処理していないＡ／Ｒ損傷を受けたＣ２ＢＢｅ１細胞においてＴＥＥＲを測定した。Ｃ２ＢＢｅ１の単層を１０ｍＭのＬＡ、１μＭのＹ－２７６３２二塩酸塩（ＲＯＣＫ阻害剤、ApexBio（テキサス州ヒューストン））、及び４００μＭのペプチド１８（ＭＬＣＫ阻害剤、Tocris Bioscience（ミネソタ州ミネアポリス））で処理し、その後、２時間無酸素状態にしてから、２１％O_2で再酸素化した。
【００７３】
図７に示すように、Ａ／Ｒ損傷細胞においてペプチド１８を単独又はＬＡとともに処理すると、未処理のＡ／Ｒ損傷細胞と比較してＴＥＥＲ値が増大した。特に、ペプチド１８とＬＡとの併用処理が、Ａ／Ｒ損傷細胞において相乗効果を示した。しかしながら、ＬＡと併用して処理したＹ－２７６３２では、相加効果も相乗効果も示されなかった。
【００７４】
ＴＥＥＲが大幅に増大したことから、ＬＡとペプチド１８とをＡ／Ｒ損傷細胞に併せて適用すると、ＬＡがＭＬＣＫとは別の経路で作用すると推定される。ＬＡ処理したＡ／Ｒ損傷細胞と、ＬＡ及びＹ－２７６３２で処理したＡ／Ｒ損傷細胞とのＴＥＥＲレベルは、同様であった。これらのデータから、ＬＡによるＭＬＣ－２のリン酸化の減少がＲＯＣＫ活性によって制御され得ることが示される。
【００７５】
Ｄ．ＲＮＡｓｅｑ解析
ＭＬＣのリン酸化は、図８に示すように様々な細胞経路によって制御され得ることから、ＬＡの作用機序を解明するために、ハイスループットＲＮＡｓｅｑ解析を実施した。具体的には、Ｃ２ＢＢｅ１の単層を１０ｍＭのＬＡで処理し、２時間無酸素状態にしてから、２１％O_2で１時間再酸素化した。次世代ＲＮＡシーケンス及び生物統計解析を使用して、細胞制御経路を評価した。
【００７６】
種々の発現解析により、１２９９９個のクラスターが存在することが明らかになり、そのうち１１９２５個が、対照群（ＣＴ）、ＬＡを伴う対照群（ＣＴ＋ＬＡ）、無酸素状態群（Ａｎｏｘ）、及びＬＡを伴う無酸素状態群（Ａｎｏｘ＋ＬＡ）の間で共有されるものであった。図９Ｂを参照されたい。これらの解析では、ＣＴとＣＴ＋ＬＡ及びＡｎｏｘとＡｎｏｘ＋ＬＡの間で最も有意な発現変動遺伝子も示される（表１に示す）。
【００７７】

【表１】

表１．対照群ｖｓ．ＬＡに３時間曝された群における最も有意なＤＥＧ

遺伝子名	アノテーション	対照と比較した発現	ｐａｄｊ
ＤＤＩＴ４	ＤＮＡ損傷誘導性転写産物＿４	高	１．１６×１０$^{-45}$
ＥＧＲ１	初期増殖応答１	高	１．３０×１０$^{-38}$
Ｈ１Ｆ０	Ｈ１ヒストンファミリーメンバー０	高	１．４２×１０$^{-33}$
ＣＥＢＰＢ	ＣＣＡＡＴ／エンハンサー結合タンパク質（Ｃ／ＥＢＰ）β	高	４．２２×１０$^{-29}$
ＩＤ２	ＤＮＡ結合阻害剤２ドミナントネガティブヘリックスループヘリックスタンパク質	高	２．０５×１０$^{-28}$
ＩＴＧＡ２	インテグリンα２	低	１．８６×１０$^{-115}$
ＳＡＭＤ５	滅菌αモチーフドメイン（sterile alpha motif domain）含有＿５	低	３．６６×１０$^{-63}$
ＭＡＴ２Ａ	メチオニンアデノシルトランスフェラーゼＩＩα	低	２．３６×１０$^{-41}$
ＩＧＦＢＰ４	インスリン様成長因子結合タンパク質４	低	２．５６×１０$^{-40}$
ＳＹＴＬ２	シナプトタグミン様２	低	５．２４×１０$^{-40}$

【００７８】

遺伝子オントロジーアノテーションの更なる解析により、細胞極性の確立に関与する生物学的プロセス、接合構造を制御する分子機能、及び上皮修復に関連する細胞成分（細胞先端、波状構造、及び頂端結合複合体）を含む、ＬＡ処理された細胞で異なる発現を示す重要なシグナル伝達経路が幾つか明らかになった。表２を参照されたい。

【００７９】

【表２】

表２．無酸素細胞群ｖｓ．ＬＡに３時間曝された群における最も有意なＤＥＧ

遺伝子名	アノテーション	対照と比較した発現	ｐａｄｊ
ＴＮＳ１	テンシン１	高	１．０２×１０$^{-255}$
ＮＤＲＧ１	Ｎ－ｍｙｃ下流調節１	高	７．３８×１０$^{-230}$
ＰＦＫＦＢ４	６－ホスホフルクト－２－キナーゼ／フルクトース－２６－ビホスファターゼ４	高	２．４９×１０$^{-180}$
ＳＬＣ２Ａ３	溶質輸送体ファミリー２（促進グルコース輸送体）メンバー３	高	４．８３×１０$^{-131}$
ＪＰＨ２	ジャンクトフィリン２	高	６０．６×１０$^{-100}$
ＥＧＲ１	初期増殖応答１	低	１．７８×１０$^{-100}$
ＨＥＳ１	ＨＥＳ（hairy and enhancer of split）１（ショウジョウバエ）	低	６．６３×１０$^{-96}$
ＨＳＰＨ１	ヒートショック１０５ｋＤａ／１１０ｋＤａタンパク質１	低	２．９２×１０$^{-72}$
ＳＡＭＤ５	滅菌αモチーフドメイン含有５	低	１．８７×１０$^{-69}$
ＡＭＯＴＬ２	アンジオモチン様２	低	３．７７×１０$^{-62}$

【００８０】

さらに、図１０は、ＬＡ処理した細胞においてＲａｓ／Ｒｈｏ　ＧＴＰアーゼ結合と、タンパク質セリン／スレオニンキナーゼ活性とが異なる発現をすることを示す。また、京

都遺伝子ゲノム百科事典のパスウェイエンリッチメント解析により、「細胞周期」、「接着結合」及び「Ｗｎｔシグナル伝達経路」に関する標的遺伝子がエンリッチメントされていることが明らかになった。図１１を参照されたい。

【００８１】

ＧＯ解析に基づき、ＬＡ処理細胞では、未処理細胞と比較して、様々な翻訳プロセスが大幅に増大した。解析により、ＬＡはタンパク質翻訳シグナル伝達において重要な機能を持つことが示された。ＬＡ処理は、カドヘリン結合及び細胞接着等の様々な結合経路にも関連していた。ＫＥＥＧ経路解析では、ＬＡが細胞周期、接着結合、及び翻訳経路と密接に関連していることが示された。ＲＮＡｓｅｑ解析を含むデータは、ＬＡが、細胞周期、遊走及び頂端結合複合体を含む様々な細胞経路を調節することによってＡ／Ｒ損傷時にタイトジャンクションバリアを保護することを示唆する。

【００８２】

Ｅ．正常条件下でのバリア機能の評価

この実験では、正常条件で傍細胞透過性におけるＬＡの役割を評価した。

【００８３】

バリア機能分析では、１０ｍＭのＬＡで処理したか又は処理していないＣ２ＢＢｅ１細胞の単層でＴＥＥＲを測定した。ＴＥＥＲは、単層の基底側と頂端側にチョップスティック型電極セット（ＷＰＩ，ＬＬＣ（フロリダ州サラソタ））を使用し、Ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ Ｖｏｌｔ　Ｏｈｍ　Ｍｅｔｅｒ２（ＷＰＩ，ＬＬＣ（フロリダ州サラソタ））に取り付けて測定した。

【００８４】

図１２に示す結果は、１０ｍＭのＬＡで処理すると、Ｃ２ＢＢｅ１単層でＴＥＥＲが増大したことを示し、Ａ／Ｒ損傷時だけでなく正常条件下でも傍細胞間孔を引き締める機能がＬＡにあることが実証される。ＬＡには、正常条件で細胞間結合構造を引き締める機能がある。

【００８５】

Ｆ．増殖及び遊走の評価

この実験では、増殖及び遊走におけるＬＡの役割を評価した。具体的には、未処理又はＬＡ処理（１０ｍＭ）Ｃ２ＢＢｅ１細胞の増殖を、製造業者の指示に従ってＣＣＫ－８アッセイキット（Dojindo Molecular Technologies（メリーランド州ロックビル））で評価した。９６ウェル培養プレートに播種した細胞に１日おきに１０ｍＭのＬＡを処理した。生存細胞はＣＣＫ－８アッセイキットで５日間連続して評価した。遊走は、Ｃ２ＢＢｅ１細胞を３ウェル培養インサート（ibidi GmbH（ドイツ、グレーフェルフィング））に播種し、コンフルエンスに達した後にインサートを除去して細胞単層に「創傷」を作ることで評価した。１０ｍＭのＬＡを無血清培地及び通常培地に加えて、それぞれ遊走及び増殖を評価した。画像は、Ａｘｉｏ　Ｖｅｒｔ　Ａ１顕微鏡（Carl Zeiss AG（ドイツ、オーバーコッヘン））で０時間、４時間、８時間、２４時間及び４８時間後に撮影し、ＩｍａｇｅＪソフトウェアで遊走距離を測定することによって創傷の閉鎖を分析した。

【００８６】

図１３は、Ｃ２ＢＢｅにおいて１０ｍＭのＬＡ処理を行うと、ＣＣＫ８により測定される増殖が大幅に増大したことを示す。１０ｍＭ　ＬＡ処理細胞の増殖は、未処理Ｃ２ＢＢｅ１細胞と比較して大幅に増大したことを示した。さらに、図１４は、無血清培地条件で証明されるように、ＬＡの追加によって遊走が大幅に変化しなかったことを示す。

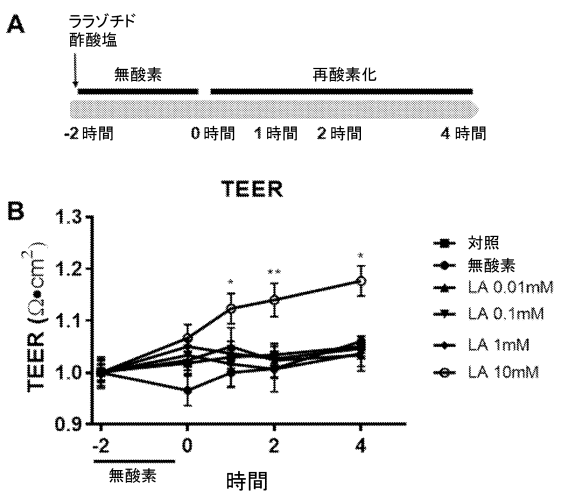
【００８７】

結果は、ＬＡが細胞増殖を促進させるが、細胞遊走は促進させないことを示唆している。ＬＡにより誘発されるこの増殖は、腸の損傷からの修復メカニズムを促す可能性がある。

【図面】

【図１】

FIGURE 1



【図２】

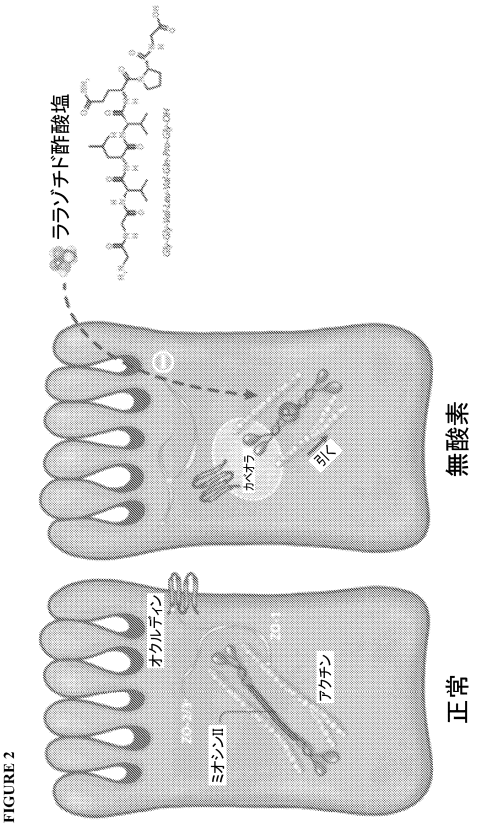
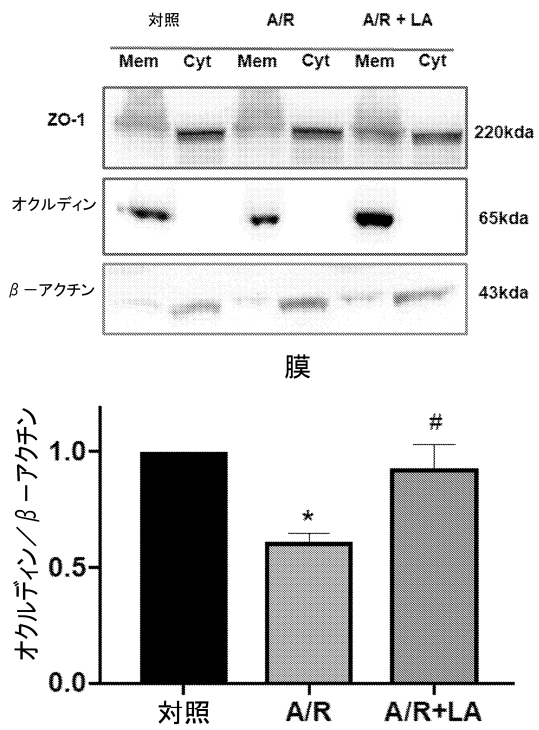


FIGURE 2

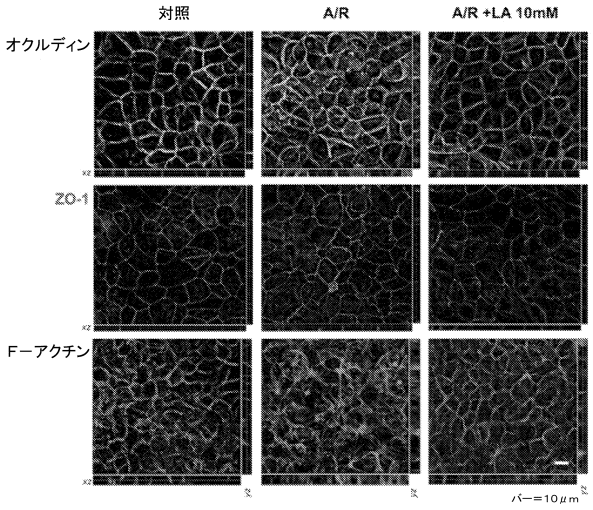
【図３】

FIGURE 3



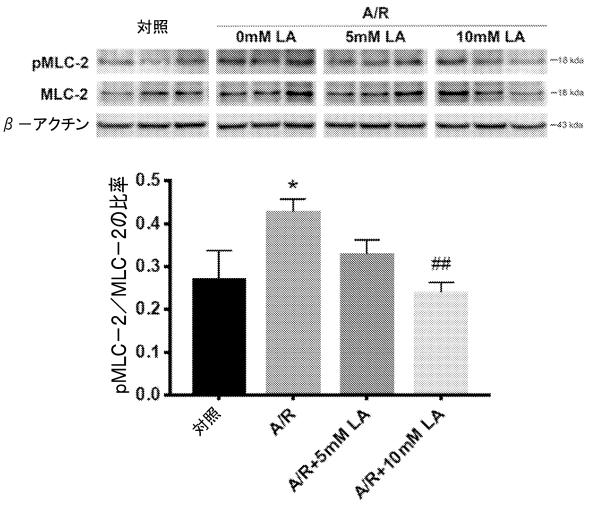
【図４】

FIGURE 4



【図５】

FIGURE 5



【図６】

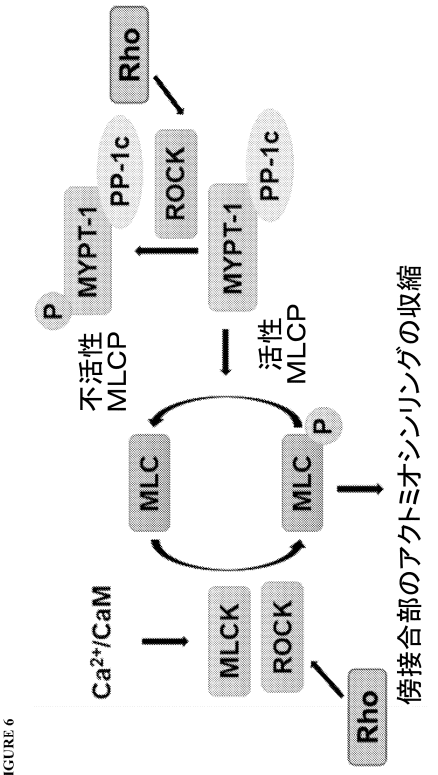
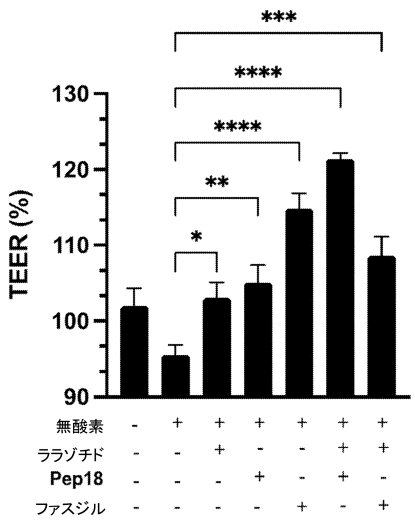


FIGURE 6

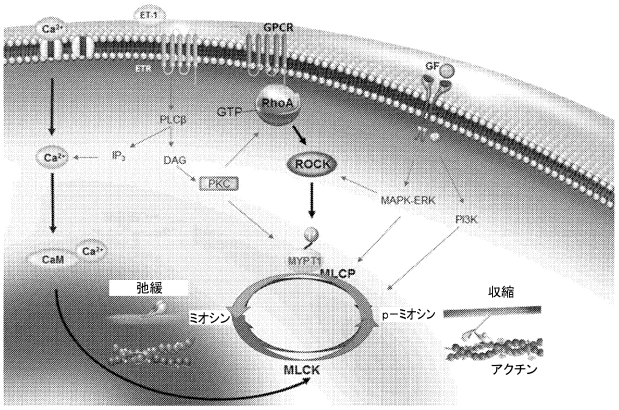
【図７】

FIGURE 7



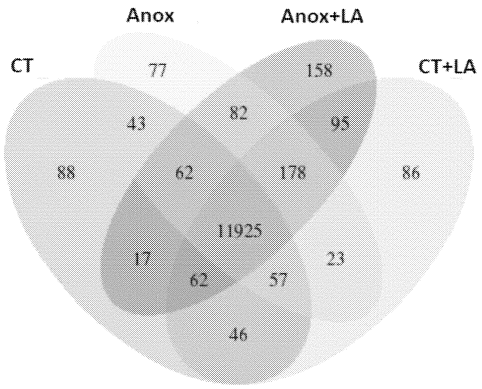
【図８】

FIGURE 8



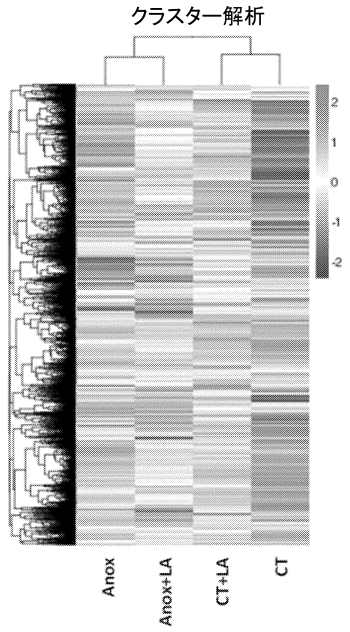
【図９Ａ】

FIGURE 9A



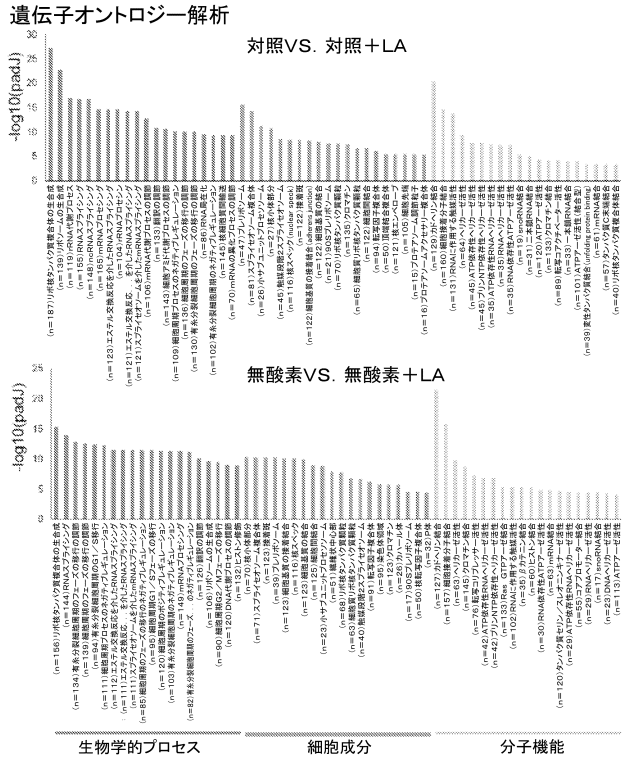
【図９Ｂ】

FIGURE 9B



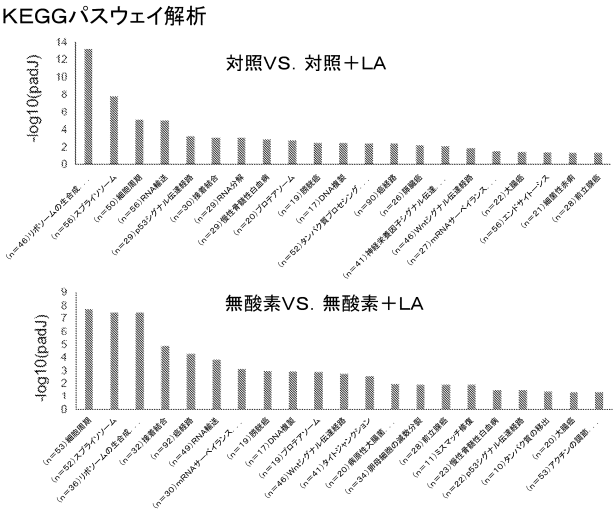
【図１０】

FIGURE 10



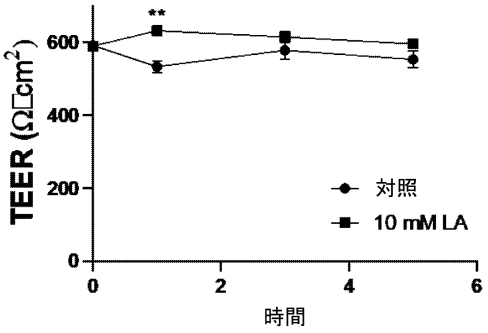
【図１１】

FIGURE 11



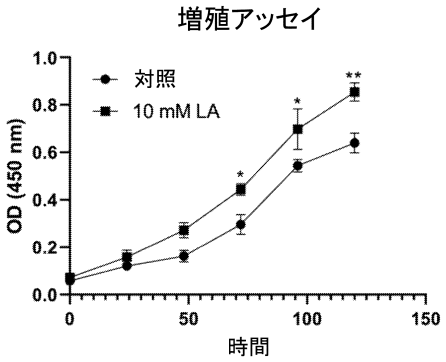
【図１２】

FIGURE 12



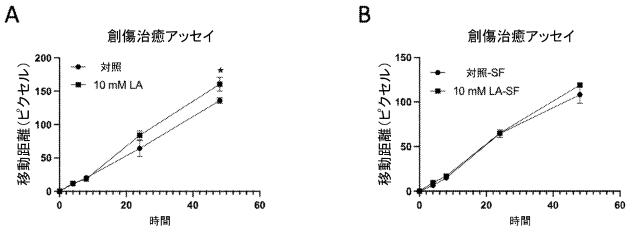
【図１３】

FIGURE 13



【図１４】

FIGURE 14



【配列表】

2025506487000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/62247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 38/08; A61K 45/06; A61P 1/16; A61P 25/28 (2023.01)
ADD.

CPC - INV. A61K 38/08; A61K 9/0043; A61K 9/0048; A61K 45/06; A61P 1/16; A61P 25/28
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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	SLIFER. "Larazotide Acetate: A Pharmacological Peptide Approach to Tight Junction Regulation" PloS One. 15 April 2021; abstract; website: https://journals.physiology.org/doi/prev/20210421-aop/pdf/10.1152/ajpgi.00386.2020; DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250165	1-3 --- 4-14, 18-25, 32
Y	WO 2021/211795 A1 (9 METERS BIOPHARMA INC.) 21 October 2021	4-14, 18-20, 22-25, 32
Y	WO 2009/047532 A2 (CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED) 16 April 2009	7-10
Y	US 2016/0095902 A1 (OTONOMY INC.) 07 April 2016	21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 April 2023 (27.04.2023)	JUN 14 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/62247

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 13*ter*.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/US23/62247

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.: 15-17, 26-31
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	
Ａ６１Ｐ	*35/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/04	
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ	*11/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06	
Ａ６１Ｐ	*9/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/12	
Ａ６１Ｐ	*9/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/04	
Ｃ０７Ｋ	*7/06*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	7/06	

,MC,ME,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,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,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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

(72)発明者　ジン ヨンゴン
アメリカ合衆国 ２０７４２ メリーランド カレッジ パーク リージェンツ ドライブ ７８０９ リー ビルディング ０１３４ ユーエム ベンチャーズ シー／オー ユニバーシティ オブ メリーランド， カレッジ パーク

(72)発明者　バラク ニール
アメリカ合衆国 ２７６１５ ノース カロライナ ローリー ハニーカット ロード ８４８０ スイート １２０ シー／オー ９ ミーターズ バイオファーマ インコーポレイテッド

(72)発明者　キム ジェイン
アメリカ合衆国 ２０７４２ メリーランド カレッジ パーク リージェンツ ドライブ ７８０９ リー ビルディング ０１３４ ユーエム ベンチャーズ シー／オー ユニバーシティ オブ メリーランド， カレッジ パーク

Ｆターム（参考）　4C084 AA02 BA01 BA09 BA17 BA23 CA59 DC32 MA13 MA43 MA55 MA56 MA58 MA59 MA65 NA14 ZA331 ZA332 ZA341 ZA342 ZA361 ZA362 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA681 ZA682 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC351 ZC352
4H045 AA10 AA30 BA14 DA55 EA20