

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6603650号  
(P6603650)

(45) 発行日 令和1年11月6日(2019.11.6)

(24) 登録日 令和1年10月18日(2019.10.18)

(51) Int.Cl.	F 1		
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00
A61K 38/17	(2006.01)	A61K	38/17
A61P 17/00	(2006.01)	A61P	17/00
A61P 19/08	(2006.01)	A61P	19/08
A61P 27/02	(2006.01)	A61P	27/02

請求項の数 13 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-503156 (P2016-503156)
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)
(65) 公表番号	特表2016-516065 (P2016-516065A)
(43) 公表日	平成28年6月2日 (2016.6.2)
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/029596
(87) 国際公開番号	W02014/144969
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)
審査請求日	平成29年3月7日 (2017.3.7)
(31) 優先権主張番号	61/798, 916
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	598063203 パーデュー・リサーチ・ファウンデーション PURDUE RESEARCH FOUNDATION アメリカ合衆国 47906 インディアナ州, ウエスト ラファイエット, ニューマン ロード 1801 1801 Newman Road, West Lafayette, IN 47906, U. S. A.
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカン

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a ) コンドロイチン硫酸 ;
- b ) 1 個から 80 個までのコラーゲン結合性ペプチド ; および
- c ) 1 個から 80 個までのヒアルロン酸結合性ペプチド

を含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンであって、 b ) および c ) の該ペプチドが該コンドロイチン硫酸に共有結合しており、かつさらに、該コラーゲン結合性ペプチドがアミノ酸配列 W Y R G R L を含み、該ヒアルロン酸結合性ペプチドがアミノ酸配列 G A H W Q F N A L T V R を含む、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカン。

## 【請求項 2】

前記コラーゲン結合性ペプチドが W Y R G R L G C である、請求項 1 に記載の合成ペプチドグリカン。

## 【請求項 3】

前記ヒアルロン酸結合性ペプチドが G A H W Q F N A L T V R G G G C である、請求項 1 に記載の合成ペプチドグリカン。

## 【請求項 4】

前記ペプチドが前記コンドロイチン硫酸にリンカーを介して共有結合している、請求項 1 に記載の合成ペプチドグリカン。

## 【請求項 5】

前記リンカーが N - [ - マレイミドプロピオン酸 ] ヒドラジド ( B M P H ) である、

10

20

請求項4に記載の合成ペプチドグリカン。

【請求項6】

- a) コンドロイチン硫酸；
- b) 5個から20個までのコラーゲン結合性ペプチド；および
- c) 5個から20個までのヒアルロン酸結合性ペプチド

を含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンであって、b)およびc)の該ペプチドが該コンドロイチン硫酸にN-[  
-マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド(BM  
PH)を介して共有結合しており、かつさらに、該コラーゲン結合性ペプチドがWYRG  
RLGCであり、該ヒアルロン酸結合性ペプチドがGAHWQFNALT  
TVRG  
GGGCである、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカン。

10

【請求項7】

請求項1～6のいずれか一項に記載の細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物。

【請求項8】

患者においてヒアルロン酸リッチな組織の分解を処置および／または予防するための、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記ヒアルロン酸リッチな組織が皮膚である、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項10】

患者において軟骨変性を処置および／または予防するための、請求項7に記載の医薬組成物。

20

【請求項11】

患者において軟骨変性を処置および／または予防するための、請求項7に記載の医薬組成物であって、それを必要としている該患者の滑液腔へ注射されることを特徴とする、医薬組成物。

【請求項12】

患者において硝子体液変性を処置および／または予防するための、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項13】

患者において髄核変性を処置および／または予防するための、請求項7に記載の医薬組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この開示は、グリカンにコンジュゲートした1つまたは複数の合成ペプチドで構成された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカン、およびそれらの使用の方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

ほとんどの組織において、細胞は、コラーゲン、ラミニン、およびフィブロネクチンなどのタンパク質を含有する細胞外マトリックス(ECM)によって囲まれている。哺乳動物が加齢するにつれて、およびいくつかの疾患状態において、身体のある特定の領域(例えば、滑膜関節、硝子体液、脊椎円板、皮膚など)における細胞外マトリックスは、分解し得、様々な型の関節炎、視力喪失などの望ましくない症状を引き起こす。

40

【0003】

表面ゾーンタンパク質(suprificial zone protein)(SZP)またはPRG4としても知られたラブリシンは、動物関節の内部表面を裏打ちする組織によって分泌される粘液性糖タンパク質である(Schumacher, B. L.ら、Arch Biochem Biophys, 1994, 311(1): 144-52参

50

照）。関節組織表面トポグラフィーと共に吸着分子層の形成によって特徴づけられる境界潤滑領域（regime）における運動力学状態によって、表面滑りがもたらされる場合、ラブリシンは、関節において直接的な固体間接触に対して軟骨保護バリアとして働く（Neu, C. P.、K. Komvopoulos、およびA. H. Reddi、Tissue Engineering, Part B: Reviews、2008参照）。強吸着性の連続性自己補充境界潤滑層が存在しない場合、断続的な粗面間の相互作用は、癒着、摩耗、表面疲労、および剥離などの様々な機械的摩耗過程によって関節表面の急速な悪化をもたらす。ラブリシン摩擦補強は、軟骨変性を低下させることが示されている（Jay, G. D.ら、Arthritis and rheumatism、2012、64（4）: 1162-71、およびTeeple, E.ら、The American Journal of Sports Medicine、2011、39（1）: 164-72参照）。関節軟骨接触面において摩擦を低下させることは、軟骨摩耗および表面損傷を抑制する。

#### 【0004】

別の細胞外マトリックスは、眼の後部腔を満たし、およそ99重量%の水、0.9重量%の塩、0.1重量%未満のヘテロタイプコラーゲン原線維（II、V/XI、およびIX型）、およびヒアルロンネットワークで構成される複雑なゲル状ネットワークである、硝子体液である。硝子体液は、いくつかの目的（発生的、光学的、保護的を含む）を果たし、その分解は、網膜裂孔、網膜剥離、網膜浮腫、脈絡膜剥離、硝子体出血、および緑内障などのいくつかの眼病態に結びつけられている。

#### 【0005】

加えて、脊椎円板の内核におけるゲル状物質である、髓核の変性は、結果として、負荷を椎体間に均等かつ効率的に伝達する脊椎円板の能力の低下を生じ、線維（fibrosis）輪として知られた円板の輪状領域に損傷をもたらす。髓核は、圧縮負荷下で各円板内の全方向に水圧を分配するように機能し、軟骨細胞様細胞、コラーゲン原線維、およびヒアルロン酸鎖を通して凝集するプロテオグリカンのアグリカンで構成される。輪における亀裂または断裂は、ヘルニアまたは円板の破裂になり得、円板の領域における神経のインピンジメント、最後には、腰痛または下腿痛を生じる。

#### 【0006】

この開示は、身体において細胞外マトリックス液を補給および/または交換し、それにつながって、その分解に起因する疾患または障害を処置および/または予防するのに用いる細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを提供する。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0007】

【非特許文献1】Schumacher, B. L.ら、Arch Biochem Biophys、1994、311（1）: 144-52

【非特許文献2】Neu, C. P.、K. Komvopoulos、およびA. H. Reddi、Tissue Engineering, Part B: Reviews、2008

【非特許文献3】Jay, G. D.ら、Arthritis and rheumatism、2012、64（4）: 1162-71

【非特許文献4】Teeple, E.ら、The American Journal of Sports Medicine、2011、39（1）: 164-72

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

グリカン；約1個から60個までのコラーゲン結合性ペプチド；および約1個から60個までのヒアルロン酸結合性ペプチドを含む、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンが本明細書に提供される。細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンにおいて

10

20

30

40

50

て、コラーゲン結合性ペプチドおよびヒアルロン酸結合性ペプチドは、グリカンに共有結合している。合成ペプチドグリカンは、任意のグリカンを含むことができ、そのグリカンには、デキストラン、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン、デルマタン硫酸、ヘパラン、ヘパリン、ケラチン、ケラタン硫酸、またはヒアルロン酸が挙げられるが、それらに限定されない。

【0009】

グリカン；約1個から80個までのコラーゲン結合性ペプチド；および約1個から80個までのヒアルロン酸結合性ペプチドを含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物であって、前記コラーゲン結合性ペプチドおよび前記ヒアルロン酸結合性ペプチドが前記グリカンに共有結合している、医薬組成物もまた提供される。

10

【0010】

本明細書に記載されているような合成ペプチドグリカンは、軟骨、髄核、および眼の硝子体液などの、コラーゲンとヒアルロン酸の両方を有する組織を補給し、および/または保護するのに有用である可能性がある。したがって、患者において軟骨変性を処置および/または予防する方法であって、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法が提供される。加えて、患者において硝子体液変性を処置および/または予防する方法であって、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法が提供される。患者において髄核変性を処置および/または予防する方法であって、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法が提供される。

20

【0011】

細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンおよびその医薬組成物は、例えば、剥皮した内皮の露出したコラーゲンへの血小板結合、血小板活性化、血栓症、内皮を剥皮することに起因する炎症、内膜過形成、および血管攣縮のいずれか1つまたは組み合わせを予防することを含む血管インターベンション術に用い得ることがさらに企図される。本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンはまた、内皮細胞増殖を刺激するために用いることができ、剥皮した血管においてコラーゲンに結合することができる。

30

【0012】

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

a) グリカン；

b) 約1個から約80個までのコラーゲン結合性ペプチド；および

c) 約1個から約80個までのヒアルロン酸結合性ペプチド

を含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンであって、b) およびc) の該ペプチドが該グリカンに共有結合している、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカン。

(項目2)

前記グリカンが、デキストラン、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン、デルマタン硫酸、ヘパラン、ヘパリン、ケラチン、ケラタン硫酸、またはヒアルロン酸である、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

40

(項目3)

前記グリカンがデルマタン硫酸である、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目4)

前記グリカンがコンドロイチン硫酸である、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目5)

前記グリカンがヒアルロン酸である、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目6)

50

前記ペプチドが前記グリカンにリンカーを介して共有結合している、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目7)

前記リンカーがN-[ - マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド(BMPH)である、項目6に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目8)

合計約50個未満のペプチドを含む、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目9)

合計約10個から約40個までのペプチドを含む、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

10

(項目10)

合計約22個のペプチドを含む、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目11)

前記コラーゲン結合性ペプチドが、コラーゲンI型、II型、III型、またはIV型の1つまたは複数に対して結合親和性を有する、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目12)

前記コラーゲン結合性ペプチドが、I型コラーゲンに結合する少なくとも1個のコラーゲン結合性ペプチド、およびII型コラーゲンに結合する少なくとも1個のコラーゲン結合性ペプチドを含む、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目13)

前記コラーゲン結合性ペプチドが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、項目1に記載の合成ペプチドグリカン：

i) W Y R G R L G C、R R A N A A L K A G E L Y K S I L Y G C、R L D G N E I K R G C、A H E E I S T T N E G V M G C、G C G G E L Y K S I L Y、N G V F K Y R P R Y F L Y K H A Y F Y P P L K R F P V Q G C、C Q D S E T R T F Y、T K K T L R T G C、G L R S K S K K F R R P D I Q Y P D A T D E D I T S H M G C、S Q N P V Q P G C、S Y I R I A D T N I T G C、S Y I R I A D T N I T、K E L N L V Y T、K E L N L V Y T G C、G S I T T I D V P W N V、G E L Y K S I L Y G C、およびG S I T T I D V P W N V G C、または

i i) i)のアミノ酸配列と少なくとも約80%配列同一性を有する配列を含む任意のペプチド配列。

20

(項目14)

前記コラーゲン結合性ペプチドが、W Y R G R L G C、R R A N A A L K A G E L Y K S I L Y G C、R L D G N E I K R G C、A H E E I S T T N E G V M G C、G C G G E L Y K S I L Y、N G V F K Y R P R Y F L Y K H A Y F Y P P L K R F P V Q G C、C Q D S E T R T F Y、T K K T L R T G C、G L R S K S K K F R R P D I Q Y P D A T D E D I T S H M G C、S Q N P V Q P G C、S Y I R I A D T N I T G C、S Y I R I A D T N I T、K E L N L V Y T、K E L N L V Y T G C、G S I T T I D V P W N V、G E L Y K S I L Y G C、またはG S I T T I D V P W N V G Cである、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

30

(項目15)

前記コラーゲン結合性ペプチドがW Y R G R L G Cである、項目1に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目16)

前記ヒアルロン酸結合性ペプチドが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、項目1に記載の合成ペプチドグリカン：

i) G A H W Q F N A L T V R G G、G D R R R R R M W H R Q、G K H L G G K H R R S R、R G T H H A Q K R R S、R R H K S G H I Q G S K、S R M H G R V R G R H E、R R R A G L T A G R P R、R Y G G H R T S R K W V、R S A R Y G H R R G V G、G L R G N R R V F A R P、S R G Q R G R L G K T R、D R R G R S S L P K L A G P

40

50

VEFPDRKIKGRR、RMRRKGKVHWG、RGGARGRHKTGR、TGARQRGLQGGWGPRHLRGKDQPPGR、RQRRRDLTRVEG、STKDHNRGRRNVGPVSRSTLRDPIRR、RRIGHQVGGRRN、RLESRAAGQRRRA、GGPRRHLGRRGH、VSKRGHRRTAHE、RGTRSGSTR、RRRKIKQGRSKR、RKSYGYQGR、KGRYSISR、RRRCGQKK、KQKIKHVVVKLK、KLKSQLVKRK、RYPISRPRKR、KVGKSPPVVR、KTFGKMKPR、RIKWSRVSK、およびKRTMRPTRR、または

i i ) i ) のアミノ酸配列と少なくとも約 80 % 配列同一性を有する配列を含む任意のペプチド配列。

10

(項目 17)

前記ヒアルロン酸結合性ペプチドが、GAHWQFNALT V R G G、GD R R R R R MW H R Q、G K H L G G K H R R S R、R G T H H A Q K R R S、R R H K S G H I Q G S K、S R M H G R V R G R H E、R R R A G L T A G R P R、R Y G G H R T S R K W V、R S A R Y G H R R G V G、G L R G N R R V F A R P、S R G Q R G R L G K T R、D R R G R S S L P K L A G P V E F P D R K I K G R R、R M R R K G R V K H W G、R G G A R G R H K T G R、T G A R Q R G L Q G G W G P R H L R G K D Q P P G R、R Q R R R D L T R V E G、S T K D H N R G R R N V G P V S R S T L R D P I R R、R R I G H Q V G G R R N、R L E S R A A G Q R R A、G G P R R H L G R R G H、V S K R G H R R T A H E、R G T R S G S T R、R R R K K I Q G R S K R、R K S Y G K Y Q G R、K G R Y S I S R、R R R C G Q K K、K Q K I K H V V V K L K、K L K S Q L V K R K、R Y P I S R P R K R、K V G K S P P V R、K T F G K M K P R、R I K W S R V S K、またはKRTMRPTRRである、項目 1 に記載の合成ペプチドグリカン。

20

(項目 18)

前記ヒアルロン酸結合性ペプチドが G A H W Q F N A L T V R G G G C である、項目 1 に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目 19)

a ) コンドロイチン硫酸；  
b ) 約 1 個から約 80 個までのコラーゲン結合性ペプチド；および  
c ) 約 1 個から約 80 個までのヒアルロン酸結合性ペプチド  
を含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンであって、b ) および c ) の該ペプチドが該グリカンに共有結合しており、かつさらに、該コラーゲン結合性ペプチドが W Y R G R L G C であり、該ヒアルロン酸結合性ペプチドが G A H W Q F N A L T V R G G G C である、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカン。

30

(項目 20)

前記ペプチドが前記グリカンにリンカーを介して共有結合している、項目 19 に記載の合成ペプチドグリカン。

(項目 21)

前記リンカーが N - [ - マレイミドプロピオン酸 ] ヒドラジド ( B M P H ) である、項目 20 に記載の合成ペプチドグリカン。

40

(項目 22)

a ) コンドロイチン硫酸；  
b ) 約 5 個から約 20 個までのコラーゲン結合性ペプチド；および  
c ) 約 5 個から約 20 個までのヒアルロン酸結合性ペプチド  
を含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンであって、b ) および c ) の該ペプチドが該グリカンに N - [ - マレイミドプロピオン酸 ] ヒドラジド ( B M P H ) を介して共有結合しており、かつさらに、該コラーゲン結合性ペプチドが W Y R G R L G C であり、該ヒアルロン酸結合性ペプチドが G A H W Q F N A L T V R G G G C である、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカン。

50

(項目 2 3 )

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物。

(項目 2 4 )

患者においてヒアルロン酸リッチな組織の分解を処置および / または予防する方法であって、項目 2 3 に記載の医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法。

(項目 2 5 )

ヒアルロン酸リッチな組織が皮膚である、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6 )

患者において軟骨変性を処置および / または予防する方法であって、項目 2 3 に記載の医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法。

10

(項目 2 7 )

患者において軟骨変性を処置および / または予防する方法であって、項目 2 3 に記載の医薬組成物を、それを必要としている患者の滑液腔へ注射することを含む方法。

(項目 2 8 )

患者において硝子体液変性を処置および / または予防する方法であって、項目 2 3 に記載の医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法。

(項目 2 9 )

患者において髄核変性を処置および / または予防する方法であって、項目 2 3 に記載の医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法。

20

添付の図面と併せて読む場合、以下の詳細な説明から、ある特定の態様が最もよく理解される。慣行により、図面の様々な外観は一定の縮尺ではないことを強調しておく。反対に、様々な外観の寸法は、明確にするために、任意に拡大され、または縮小される。以下の図が図面に含まれる：

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

【図1】図1は、非損傷軟骨（アグリカン欠乏がない）の場合における摩擦力を示し、本開示による合成ペプチドグリカンで、軟骨表面間の摩擦が増加することを示している。

30

## 【0014】

【図2】図2は、損傷軟骨（変形性関節症をシミュレートするアグリカン欠乏がある）の場合における摩擦力を示し、実施例1による合成ペプチドグリカンが軟骨に加えられた場合、軟骨表面間の摩擦が減少することを示している。

## 【0015】

【図3】図3は、未処理の（対照）、P B S 緩衝液処理された、およびトリプシン処理されたウシ硝子体におけるレオロジー的測定（図3 A ）、トリプシン、および3つの異なるペプチドグリカンと組み合わせたトリプシンで処理されたウシ硝子体におけるレオロジー的測定（図3 B ）、ならびに未処理の（対照）、P B S 緩衝液処理された、およびトリプシンなしで3つの異なるペプチドグリカンで処理されたウシ硝子体におけるレオロジー的測定（図3 C ）を示す。

40

## 【発明を実施するための形態】

## 【0016】

この開示は、記載された特定の実施形態に限定されず、かかる実施形態は当然に変化し得ることは、理解されるべきである。本明細書で用いられる専門用語は、特定の実施形態を説明することを目的とするのみであって、限定することを意図するものではなく、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。

## 【0017】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる場合、単数形「1つの（a）」、「1つの（a n ）」、および「その（t h e ）」は、文脈上明らかに他に指図がない限り、複数の指示対象を含むことは留意されなければならない。したがって、例えば、「1つの

50

ペプチド ( a p e p t i d e ) 」への言及は、複数のペプチドを含む。

【 0 0 1 8 】

定義

他に規定がない限り、本明細書に用いられる全ての技術的および科学的用語は、当業者によって一般的に理解されているのと同じ意味をもつ。本明細書で用いられる場合、以下の用語は以下の意味をもつ。

【 0 0 1 9 】

本明細書で用いられる場合、用語「含むこと ( c o m p r i s i n g ) 」または「含む ( c o m p r i s e s ) 」は、組成物および方法が、列挙された要素を含むが、他のものを排除しないことを意味することが意図される。組成物および方法を定義するために用いられる場合の「から本質的になること ( c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f ) 」は、述べられた目的のために、その組み合わせにとって任意の本質的な意義をもつ他の要素を排除することを意味するものとする。したがって、本明細書で定義されているような要素から本質的になる組成物は、主張された基本的かつ新規な特徴に具体的には影響しない他の材料またはステップを排除しない。「からなる ( c o n s i s t i n g o f ) 」は、他の成分および実質的な方法ステップの微量より多い要素も排除することを意味するものとする。これらの移行句のそれぞれにより定義される実施形態は、この開示の範囲内である。

10

【 0 0 2 0 】

範囲を含む、数字表示、例えば、温度、時間、量、および濃度の前に用いられる場合の用語「約」は、( + ) または ( - ) 10 %、5 %、または 1 %、変化し得る近似値を示す。

20

【 0 0 2 1 】

本明細書で用いられる場合、用語「滑液腔」は、滑液で満たされている滑膜関節の骨間の空間を指す。

【 0 0 2 2 】

本明細書で用いられる場合、用語「処置および / または予防する」は、疾患状態、疾患進行、または他の異常な状態の有害な効果を予防し、治癒させ、逆転させ、減弱し、軽減し、最小化し、抑制し、または停止させることを指す。

【 0 0 2 3 】

30

本明細書で用いられる場合、用語「患者」は、疾患状態、疾患進行、または他の異常な、もしくは有害な状態のリスクがあるか、またはそれらを患っている対象（すなわち、ヒト）を指す。

【 0 0 2 4 】

本明細書で用いられる場合、用語「合成ペプチドグリカン」は、グリカン、およびそれに共有結合した 1 個または複数の合成ペプチドを含む合成コンジュゲートを指す。グリカン部分は、合成的に作製することができ、または動物供給源に由来し得る。合成ペプチドは、グリカンに直接的に、またはリンカーを介して、共有結合することができる。ヒアルロン酸結合性ペプチドをグリカンにコンジュゲートする方法について、例えば、W O 2 0 1 2 / 1 6 2 5 3 4 を参照されたい。コラーゲン結合性ペプチドをグリカンにコンジュゲートする方法について、例えば、U S 2 0 1 3 / 0 1 9 0 2 4 6、U S 2 0 1 2 / 0 1 0 0 1 0 6、および U S 2 0 1 1 / 0 0 2 0 2 9 8（それらの開示は全体として参照により本明細書に組み入れられている）を参照されたい。

40

【 0 0 2 5 】

本明細書で用いられる場合、用語「共有結合した」は、1 個または複数の電子対が 2 個の原子によって共有されている結合を指す。

【 0 0 2 6 】

本明細書で用いられる場合、用語「グリカン」は、グリコシド結合した多数の单糖からなる化合物を指す。ある特定の実施形態において、グリカンは、グリコサミノグリカンであり、グルコサミノグリカンは、ウロン酸と交互様式で連結した 2 - アミノ糖を含み、ヘ

50

パリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、ケラチン、およびデルマタンなどのポリマーが挙げられる。したがって、本明細書に記載された実施形態において用いることができるグリカンの非限定的例には、アルギナート、アガロース、デキストラン、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン、デルマタン硫酸、ヘパラン、ヘパリン、ケラチン、ケラタン硫酸、およびヒアルロン酸が挙げられる。

## 【0027】

本明細書で用いられる場合、「ヒアルロン酸結合性ペプチド」は、ヒアルロン酸結合性配列を含む合成ペプチドを指す。本明細書に記載された様々な実施形態において、合成ペプチドグリカンのペプチド構成要素は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことができる：GAHWQFNALTVR、GAHWQFNALTVRGG、GDRR  
10 RRRMWHRQ、GKHLGGKHRRSR、RGTHHAQKRRS、RRHKSG  
HIQGSK、SRMHGRVRGRHE、RRRAGLTAGRPR、RYGGHRT  
SRKWV、RSARYGHRRGVG、GLRGNRRVFARP、SRGQRGRL  
GKTR、DRRGGRSSLPKLAGPVEFPDRKIKGRR、RMRRKGRV  
KHWG、RGGARGRHKTGR、TGARQRGLQGGWGPRHLRGKDQ  
PPGR、RQRRRDLTRVEG、STKDHNRGRRNVGPVSRSTLRD  
PIRR、RRIGHQVGGRRN、RLESRAAGQRRRA、GGPRRHLGR  
RGH、VSKRGHRRTAHE、RGTRSGSTR、RRRKKIQGRSKR、  
RKSYGYQGR、KGRYSISR、RRRCGQKK、KQKIKHVVVKLK  
、KLKSQLVKRK、RYPISRPRKR、KVGKSPPPVR、KTFGKMK  
PR、RIKWSRVSK、もしくはKRTMRPTRR、またはそのアミノ酸配列と少なくとも約80%配列同一性を有する配列を含む任意のペプチド配列。ヒアルロン酸結合性合成ペプチドグリカンのペプチド構成要素として含まれ得る追加のペプチドには、RR  
ASRSRGQVGL、GRGTHHAQKRRS、QPVRRLLGTPVVG、ARR  
AEGKTRMLQ、PKVRGRRHQASG、SDRHRRRREADG、NQRV  
R RVKHPPG、RERRERHAVARHGPGLERDARNLARR、TRPG  
GKRGQQVGPPAGVLHGRARNS、NVRSRRGHRMNS、DRRG  
RTRNIGN、KTAGHGRRWSRN、AKRGEGRRREWPR、GGDRRK  
AHKLQA、RRGGRKWGSFEG、およびRQRRRDLTRVEGからなる群  
から選択される1個または複数のペプチドなどのArg-Arg(R-R)モチーフを有するペプチドが挙げられる（例えば、参照により本明細書に組み入れられた、Amemiyaら、Biochem. Biophys. Acta、2005、1724、94-99  
20 参照）。別の実施形態において、ペプチドは、RDGTRYVQKGEYR、HREAR  
SGKYK、PDKKHKLYGV、およびWDKERSRYDVからなる群から選択される（例えば、Yangら、EMBO Journal、1994、13、286-296、およびGoetinckら、J. Cell. Biol.、1987、105、2403-2408  
30 参照（どちらも参照により本明細書に組み入れられている））。

## 【0028】

本明細書で用いられる場合、用語「コラーゲン結合性ペプチド」は、コラーゲン結合性配列を含む合成ペプチドを指す。「コラーゲン結合性ペプチド」は、コラーゲン原線維形成に通常関与し、または通常には関与しないタンパク質の部分とアミノ酸相同性を有し得る。一実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドは、約5個から約40個までのアミノ酸、または約5個から約20個までのアミノ酸、または約5個から約10個までのアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、これらのペプチドは、低分子量ロイシンリッチプロテオグリカン、血小板受容体配列、またはコラーゲン原線維形成を制御するタンパク質のアミノ酸配列と相同性または配列同一性を有する。様々な実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドは、RRANAALKAGELYKSILY、RLDGNEIKR  
40 、AHEEISTTNEGVM、GELYKSILY、NGVFKYRPRYFLYKH  
AYFYPPPLKRFPVQ、CQDSETRTFY、TKKTLRT、GLRSKSK  
KFRRPDIQYPDATDEDITSHM、SQNPVQP、SYIRIADTNI  
50

T、K E L N L V Y T、G S I T T I D V P W N V G C、およびG S I T T I D V P W N V、ならびにそのアミノ酸配列と少なくとも約80%配列同一性を有する配列を含む任意のペプチド配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドは、Chiangら、J. Biol. Chem. 277: 34896 - 34901 (2002)、Huizingaら、Structure 5: 1147 - 1156 (1997)、Romijnら、J. Biol. Chem. 278: 15035 - 15039 (2003)、およびChiangら、Cardio. & Haemato. Disorders - Drug Targets 7: 71 - 75 (2007)（それぞれは参照により本明細書に組み入れられている）に記載されているようなウォン・ヴィレブランド因子または血小板コラーゲン受容体のコラーゲン結合性ドメインと約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、または約100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。 10

#### 【0029】

本明細書に記載された実施形態のいずれかにおいて、合成ペプチドのいずれか1個または複数（例えば、ヒアルロン酸結合性ペプチドおよび/またはコラーゲン結合性ペプチド）は、そのペプチドのC末端に付着したグリシン-システイン(GC)、および/またはそのペプチドのN末端に付着したグリシン-システイン-グリシン(GCG)を有し得る。例えば、コラーゲン結合性ペプチドは、RRANAALKAGELYKSI LYGC、RLDGNEIKRGC、AHEEISTTNEGVMGC、GCGGELYKSI LY、NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPPLKRFPVQGC、CQDSETRTFYGC、TKKTLRTGC、GLRSKSKFRRPDIQYYPDATDEDITSHMGC、SQNPVQPGC、SYIRIADTNITGC、KELNLVYTGC、GSITTIDVPWNVGC、GCGGELYKSI LYGC、およびGELYKSI LYGCからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得る。 20

#### 【0030】

本明細書で用いられる場合、用語「アミノ酸」は、グリシン、およびDとLの両方の光学異性体、アミノ酸類似体、およびペプチド模倣体を含む、天然および/または非天然もしくは合成のアミノ酸のいずれかを指す。天然に存在するアミノ酸の1文字および3文字の略語は、下記の表1に挙げられている。3個またはそれを超えるアミノ酸のペプチドは、ペプチド鎖が短い場合には、オリゴペプチドと一般的に呼ばれる。ペプチド鎖が長い場合には、ペプチドはポリペプチドまたはタンパク質と一般的に呼ばれる。 30

#### 【表1-1】

表1

1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	L-チロシン
G	Gly	L-グリシン
F	Phe	L-フェニルアラニン
M	Met	L-メチオニン

## 【表1-2】

1文字	3文字	アミノ酸
A	Ala	L-アラニン
S	Ser	L-セリン
I	Ile	L-イソロイシン
L	Leu	L-ロイシン
T	Thr	L-スレオニン
V	Val	L-バリン
P	Pro	L-プロリン
K	Lys	L-リジン
H	His	L-ヒスチジン
Q	Gln	L-グルタミン
E	Glu	L-グルタミン酸
W	Trp	L-トリプトファン
R	Arg	L-アルギニン
D	Asp	L-アスパラギン酸
N	Asn	L-アスパラギン
C	Cys	L-システィン

10

## 【0031】

20

本明細書に記載された実施形態のいずれかにおいて、合成ペプチド（例えば、ヒアルロン酸結合性ペプチドおよび／またはコラーゲン結合性ペプチド）は、前記の段落に記載された任意のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列のいずれかと80%、85%、90%、95%、98%、もしくは100%相同性を有するアミノ酸配列を含む。様々な実施形態において、本明細書に記載された合成ペプチドグリカンのペプチド構成要素は、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含めることにより改変することができる。当業者によく知られているように、ペプチドの任意の重要ではないアミノ酸を保存的置換によって変化させることは、交換アミノ酸の側鎖が、交換されているアミノ酸の側鎖と類似した結合および接触を形成することができるため、そのペプチドの活性を有意には変化させない。非保存的置換は、これらが、ペプチドのヒアルロン酸結合活性に過度には影響しないとの条件で、可能である。

30

## 【0032】

本明細書で用いられる場合、用語「相同性」は、2個のペプチドの間または2個の核酸分子の間の配列類似性を指す。相同性は、比較のために整列され得る各配列における位置を比較することにより決定することができる。比較される配列におけるある位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合、その分子はその位置において相同である。配列間の相同性の程度は、配列によって共有される一致した、または相同の位置の数の関数である。ペプチド（またはポリペプチドまたはペプチド領域）が、別の配列とある特定のパーセンテージ（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%）の「相同性」または「配列同一性」を有するとは、整列された場合、そのパーセンテージの塩基（またはアミノ酸）が、2つの配列の比較において同じであることを意味する。このアラインメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、当技術分野において知られたソフトウェアプログラム（例えば、BLAST）、および例えば、Ausubelら編（2007）Current Protocols in Molecular Biologyに記載されたプログラムを用いて決定することができる。

40

## 【0033】

当技術分野においてよく知られているように、アミノ酸の「保存的置換」またはペプチドの「保存的置換変異体」は、以下を維持するアミノ酸置換を指す：1)ペプチドの二次構造；2)アミノ酸の電荷または疎水性；および3)側鎖のかさ高さ、またはこれらの特

50

徵の任意の1つもしくは複数。実例としては、よく知られた専門用語「親水性残基」は、セリンまたはスレオニンに関する。「疎水性残基」は、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、またはアラニンなどを指す。「正荷電残基」は、リジン、アルギニン、オルニチン、またはヒスチジンに関する。「負荷電残基」は、アスパラギン酸またはグルタミン酸を指す。「かさ高い側鎖」を有する残基は、フェニルアラニン、トリプトファン、またはチロシンなどを指す。実例的な保存的アミノ酸置換のリストは表2に示されている。

【表2-1】

表2

10

以下のアミノ酸を	以下のアミノ酸に置き換える
アラニン	D-Ala, Gly, Aib, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn, D-Orn
アスパラギン	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
グルタミン	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, $\beta$ -Ala
イソロイシン	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
リジン	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
メチオニン	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp

20

【表2-2】

以下のアミノ酸を	以下のアミノ酸に置き換える
プロリン	D-Pro
セリン	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
スレオニン	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
チロシン	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
バリン	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

40

【0034】

一実施形態において、本開示の合成ペプチドグリカンは、コラーゲンおよび/またはヒアルロン酸に直接的にか、または間接的にかのいずれかで結合する。本明細書で用いられる場合、用語「結合すること (binding)」または「結合する (bind)」は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、表面プラズモン共鳴、ELISA、競合的結合アッセイ、等温滴定熱量測定、ファージディスプレイ、アフィニティクロマトグラフィー、レオロジー、または免疫組織化学を用いて検出され得る、分子間の相互作用を含むものとする。その用語はまた、分子間の「結合性 (binding)」相互作用を含むも

50

のとする。結合 (binding) は、「直接的」でも「間接的」でもよい。「直接的」結合 (binding) は、分子間の直接的な物理的接触を含む。分子間の「間接的」結合は、1つまたは複数の分子との直接的な物理的接触を同時に有する分子を含む。例えば、本開示の合成ペプチドグリカンは、ヒアルロン酸とII型コラーゲンの両方と直接的に結合して、相互作用し、関節軟骨の低摩擦性を回復させ、それにしたがって、表面を機械的摩耗から保護するために用い得ることが企図される。この結合 (binding) は、相互作用分子を含む「複合体」の形成を生じ得る。「複合体」は、共有結合性または非共有結合性の結合、相互作用、または力によって一緒に保持された2つまたはそれを超える分子の結合を指す。

【0035】

10

## 合成ペプチドグリカン

本開示は、a) グリカン；b) 約1個から約80個までのコラーゲン結合性ペプチド；およびc) 約1個から約80個までのヒアルロン酸結合性ペプチドを含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンであって、b) およびc) のペプチドが前記グリカンに共有結合している、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを提供する。

【0036】

20

本明細書に開示された合成ペプチドグリカンにおいて、グリカンは、任意のグリカンまたは多糖であり得、それには、デキストラン、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン、デルマタン硫酸、ヘパラン、ヘパリン、ケラチン、ケラタン硫酸、およびヒアルロン酸が挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態において、グリカンはコンドロイチン硫酸である。いくつかの実施形態において、グリカンはデルマタン硫酸である。いくつかの実施形態において、グリカンはヒアルロン酸である。

【0037】

30

ペプチドは、グリカンへ直接的に、またはリンカーを介して、結合することができる。ある特定の実施形態において、ペプチドは、グリカンにリンカーを介して共有結合している。リンカーは、任意の適切な二官能性リンカー、例えば、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド (PDPH)、N-[2-マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド (BMPH) などであり得る。本明細書に記載された様々な実施形態のいずれかにおいて、ペプチドの配列は、グリカンに付着点を供給するためにグリシン-システインセグメントを含むように改変されてもよい。ある特定の実施形態において、リンカーは、N-[2-マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド (BMPH) である。

【0038】

40

合成ペプチドグリカンの望まれる性質に依存して、グリカンに結合したペプチドの総数は変わり得る。ある特定の実施形態において、合成ペプチドグリカンに存在するペプチドの総数は、約2個から約160個まで、約10個から約160個まで、約20個から約160個まで、約30個から約160個まで、約40個から約160個まで、約40個から約150個まで、約40個から約140個まで、約10個から約120個まで、または約20個から約110個まで、または約20個から約100個まで、または約20個から約90個まで、または約30個から約90個まで、または約40個から約90個まで、または約50個から約90個まで、または約50個から約80個まで、または約60個から約80個まで、または約10個、または約20個、または約30個、または約40個、または約50個、または約60個、または約70個、または約80個、または約90個、または約100個、または約110個、または約120個である。ある特定の実施形態において、合成ペプチドグリカンに存在するペプチドの総数は、約50個未満である。ある特定の実施形態において、合成ペプチドグリカンに存在するペプチドの総数は、約10個から約40個までである。ある特定の実施形態において、合成ペプチドグリカンに存在するペプチドの総数は、約22個である。ある特定の実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドの総数は、約5個から約20個まで、または約10個、または約11個である。ある特定の実施形態において、ヒアルロン酸結合性ペプチドの総数は、約5個から約20個まで、または約10個、または約11個である。

50

## 【0039】

一態様において、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンに存在するコラーゲン結合性ペプチドは、コラーゲンI型、II型、III型、またはIV型の1つまたは複数に対して結合親和性を有する。特定された結合親和性を有する1個または複数のコラーゲン結合性ペプチドを、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンに用いることができる。例えば、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンは、I型コラーゲンに対して結合親和性を有する少なくとも1個のコラーゲン結合性ペプチド、およびII型コラーゲンに対して結合親和性を有する少なくとも1個のコラーゲン結合性ペプチドを含み得る。別の態様において、コラーゲン結合性ペプチドは、I型コラーゲンに対して結合親和性を有する。ある特定の態様において、コラーゲン結合性ペプチドは、II型コラーゲンに対して結合親和性を有する。

10

## 【0040】

適切なコラーゲン結合性ペプチドは当技術分野において知られている（例えば、US 2013/0190246、US 2012/0100106、およびUS 2011/0020298参照（それらの開示は全体として参照により本明細書に組み入れられている））。一実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドは約5個から約40個までのアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、これらのペプチドは、低分子量ロイシンリッチプロテオグリカン、血小板受容体配列、またはコラーゲン原線維形成を制御するタンパク質のアミノ酸配列と相同性を有する。

20

## 【0041】

様々な実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドは、WYRGRLGC、RRANAAALKAGELYKSILYGC、RLDGNEIKRGCG、AHEEISTTNEGVMGC、GCGGELYKSILY、NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQGC、CQDSETRTFY、TKKTLRTGC、GLRSKSKKFRRPDIQYPDATDEDITSHMGC、SQNPVQPGC、SYIRIADTNITGC、SYIRIADTNIT、KELNLVYT、KELNLVYTGC、GSITTIDVPWNV、GELYKSILYGC、およびGSITTIDVPWNVGCからなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約85%配列同一性、もしくは少なくとも約90%配列同一性、もしくは少なくとも約95%配列同一性、もしくは少なくとも約98%配列同一性を有する配列を含む任意のペプチド配列を含む。ある特定の実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドは、WYRGRLGC、または少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約85%配列同一性、もしくは少なくとも約90%配列同一性、もしくは少なくとも約95%配列同一性、もしくは少なくとも約98%配列同一性を有する任意のペプチドである。ある特定の実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドは、Chiangら、J. Biol. Chem. 277: 34896-34901(2002)、Huizingaら、Structure 5: 1147-1156(1997)、Romijnら、J. Biol. Chem. 278: 15035-15039(2003)、およびChiangら、Cardio. & Haemato. Disorders - Drug Targets 7: 71-75(2007)（それぞれが参照により本明細書に組み入れられている）に記載されているようなウォン・ヴィレブランド因子または血小板コラーゲン受容体のコラーゲン結合性ドメインと約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、または約100%相同である。

30

## 【0042】

適切なヒアルロン酸結合性ペプチドは当技術分野において知られている（例えば、WO 2012/162534参照）。本明細書に記載された様々な実施形態において、合成ペプチドグリカンのペプチド構成要素は、GAHWQFNALTVRGG、GDRRRRRMWHRQ、GKHLGGKHRRSR、RGTHHAQKRRS、RRHKSGHIQGSK、SRMHGRVRGRHE、RRRAGLTAGRPR、RYGGHRTSRKWV、RSARYGHRRGVG、GLRGNRRVFAFP、SRGQRGRGLGKT

40

50

R、D R R G R S S L P K L A G P V E F P D R K I K G R R、R M R R K G R V K H W G、R G G A R G R H K T G R、T G A R Q R G L Q G G W G P R H L R G K D Q P P G R、R Q R R R D L T R V E G、S T K D H N R G R R N V G P V S R S T L R D P I R R、R R I G H Q V G G R R N、R L E S R A A G Q R R A、G G P R R H L G R R G H、V S K R G H R R T A H E、R G T R S G S T R、R R R K K I Q G R S K R、R K S Y G K Y Q G R、K G R Y S I S R、R R R C G Q K K、K Q K I K H V V K L K、K L K S Q L V K R K、R Y P I S R P R K R、K V G K S P P V R、K T F G K M K P R、R I K W S R V S K、およびK R T M R P T R R からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約85%配列同一性、もしくは少なくとも約90%配列同一性、もしくは少なくとも約95%配列同一性、もしくは少なくとも約98%配列同一性を有する配列を含む任意のペプチド配列を含み得る。 10

#### 【0043】

ヒアルロン酸結合性合成ペプチドグリカンのペプチド構成要素として含むことができる追加のペプチドには、R R A S R S R G Q V G L、G R G T H H A Q K R R S、Q P V R R L G T P V V G、A R R A E G K T R M L Q、P K V R G R R H Q A S G、S D R H R R R R E A D G、N Q R V R R V K H P P G、R E R R E R H A V A R H G P G L E R D A R N L A R R、T R P G G K R G G Q V G P P A G V L H G R R A R S、N V R S R R G H R M N S、D R R R G R T R N I G N、K T A G H G R R W S R N、A K R G E G R R E W P R、G G D R R K A H K L Q A、R R G G R K W G S F E G、およびR Q R R R D L T R V E G からなる群から選択される1個または複数のペプチド、または少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約85%配列同一性、もしくは少なくとも約90%配列同一性、もしくは少なくとも約95%配列同一性、もしくは少なくとも約98%配列同一性を有する配列を含む任意のペプチド配列などのA r g - A r g (R - R) モチーフを有するペプチドが挙げられる（例えば、参照により本明細書に組み入れられた、A m e m i y a ら、B i o c h e m . B i o p h y s . A c t a 、2 0 0 5 、1 7 2 4 、9 4 - 9 9 参照）。ある特定の実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドは、G A H W Q F N A L T V R G G、または少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約80%配列同一性、もしくは少なくとも約85%配列同一性、もしくは少なくとも約90%配列同一性、もしくは少なくとも約95%配列同一性、もしくは少なくとも約98%配列同一性を有する配列を含む任意のペプチド配列である。別の実施形態において、ペプチドは、R D G T R Y V Q K G E Y R、H R E A R S G K Y K、P D K K H K L Y G V、およびW D K E R S R Y D V からなる群から選択される（例えば、Y a n g ら、E M B O J o u r n a l 、1 9 9 4 、1 3 、2 8 6 - 2 9 6、およびG o e t i n c k ら、J . C e l l . B i o l . 、1 9 8 7 、1 0 5 、2 4 0 3 - 2 4 0 8（どちらも参照により本明細書に組み入れられている）参照）。 20

#### 【0044】

別の実施形態において、ヒアルロン酸結合性ペプチドは、B - X 7 - B 相同体 (h o m o l o g y) からなる群から選択されてもよく、式中、B はリジンまたはアルギニンのいずれかであり、X は任意の非酸性アミノ酸残基（すなわち、アスパラギン酸とグルタミン酸以外の任意のアミノ酸）であり、7 個の X 残基の少なくとも 1 個が塩基性残基（すなわち、アルギニン、リジン、またはヒスチジン）である。ペプチドはまた、ヒアルロン酸への結合についてのポジティブ選択を利用するファージディスプレイにより選択されてもよい。ヒアルロン酸結合性ペプチドは、そのヒアルロン酸との相互作用により決定されてもよく、分子相互作用を評価するために用いられる技術のいずれかによって測定され得る。例えば、表面プラズモン共鳴、E L I S A、競合的結合アッセイ、等温滴定熱量測定、アフィニティーコロマトグラフィー、レオロジー、または免疫組織化学。「ヒアルロン酸結合性」とみなされるペプチドは、ヒアルロン酸またはヒアルロン酸含有組織と相互作用し得、その相互作用は既知の化学反応基に起因しないものであり得る。相互作用は、ペプチドにおけるアミノ酸残基から生じた疎水性相互作用および電荷相互作用により得る。相 40

互作用は、マイクロプレート上にヒアルロン酸を固定化し、ヒアルロン酸結合性ペプチドとインキュベートし、続いて、発色団を使用するビオチン・アビジンなどの検出技術によって測定されてもよい。相互作用はまた、ヒアルロン酸結合性ペプチドと、または1個もしくは複数のヒアルロン酸結合性ペプチドを含有するペプチドグリカンとインキュベートされているヒアルロン酸含有流体、ゲル、または組織上への力学的影響によって測定されてもよい。

【0045】

ペプチドの同定のために、ファージディスプレイから選択されたペプチド、またはタンパク質においてヒアルロン酸結合モチーフから同定されるペプチドを合成して、そのヒアルロン酸との相互作用について評価することができる。例えば、B-X7-B配列を、N末端にビオチン修飾して合成し、ヒアルロン酸コーティング化マイクロプレート上でインキュベートすることができる。用量反応結合曲線を作成して、ペプチドのヒアルロン酸に結合する能力を決定することができる。

【0046】

同様に、コラーゲン結合性ペプチドについて、コラーゲン結合性について選択されたファージディスプレイライブラリー由来の合成ペプチドを作製することができる。ペプチドを合成して、SPR、ELISA、ITC、アフィニティークロマトグラフィー、または当技術分野において知られた他の技術などのいずれかによってコラーゲンへの結合について評価することができる。例は、固定化コラーゲンを含有するマイクロプレート上でインキュベートされるビオチン修飾化ペプチド配列であり得る。用量反応結合曲線を、ストレプトアビジン・発色団を用いて作成し、ペプチドのコラーゲンに結合する能力を決定することができる。

【0047】

一実施形態において、  
 a) コンドロイチン硫酸；  
 b) 約1個から約80個のコラーゲン結合性ペプチド；および  
 c) 約1個から約80個のヒアルロン酸結合性ペプチド  
 を含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンであって、b) およびc) のペプチドが前記グリカンに共有結合しており、かつさらに、コラーゲン結合性ペプチドがWYRGRGLGCであり、ヒアルロン酸結合性ペプチドがGAHWQFNALTVRGGGCである、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンが本明細書に提供される。ある特定の実施形態において、ペプチドは、N-[ - マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド(BMPH)などのリンカーを介してグリカンに共有結合している。

別の実施形態において、

a) コンドロイチン硫酸；  
 b) 約5個から約20個のコラーゲン結合性ペプチド；および  
 c) 約5個から約20個のヒアルロン酸結合性ペプチド  
 を含む細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンであって、b) およびc) のペプチドが前記グリカンにN-[ - マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド(BMPH)を介して共有結合しており、かつさらに、コラーゲン結合性ペプチドがWYRGRGLGCであり、ヒアルロン酸結合性ペプチドがGAHWQFNALTVRGGGCである、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンが本明細書に提供される。

【0048】

本明細書に記載された様々な実施形態において、本明細書に記載されたペプチドは、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含めることにより改変することができる。当業者によく知られているように、ペプチドの任意の重要ではないアミノ酸を保存的置換によって変化させることは、そのペプチドの活性を有意には変化させず、その理由は交換アミノ酸の側鎖が、交換されているアミノ酸の側鎖と類似した結合および接触を形成することができるからである。非保存的置換もまた、それらが、ペプチドの結合活性(すなわち、ヒアルロン酸またはコラーゲン結合親和性)に実質的には影響しないとの条件で、可能であり

10

20

30

40

50

得る。

【0049】

本明細書に記載された様々な実施形態において、合成ペプチドグリカンは、アグリカナーゼに対して抵抗性である。アグリカナーゼは、アグリカンを切断することが知られた任意の酵素として当技術分野において特徴づけられている。一実施形態において、合成ペプチドグリカンは、メタクリレート、エタクリレート、イタコネート、アクリルアミド、チオール、ペプチド、およびアルデヒドなどの重合可能な基を含有しない。

【0050】

ペプチドグリカンの合成

本明細書に記載された合成ペプチドグリカンに用いられるペプチド（すなわち、ヒアルロン酸結合性ペプチドおよびコラーゲンペプチド）は、商業的供給元から購入されてもよいし、または当技術分野においてよく知られた方法（例えば、化学的および／またはバイオテクノロジー的方法）を用いて部分的に、もしくは完全に合成されてもよい。ある特定の実施形態において、ペプチドは、当技術分野においてよく知られている固相ペプチド合成プロトコールに従って合成される。別の実施形態において、ペプチドは、よく知られた F m o c プロトコールに従って固体支持体上で合成され、トリフルオロ酢酸で支持体から切断され、クロマトグラフィーにより当業者に知られた方法に従って精製される。他の実施形態において、ペプチドは、当業者によく知られているバイオテクノロジーの方法を利用して合成される。一実施形態において、所望のペプチドについてのアミノ酸配列情報をコードする D N A 配列が、当業者に知られた組換え D N A 技術によって発現プラスミド（例えば、ペプチドのアフィニティー精製のためにアフィニティータグを組み込むプラスミド）へライゲーションされ、そのプラスミドが、発現のために宿主生物体へトランスフェクションされ、その後、そのペプチドが、宿主生物体または成長培地から、例えば、アフィニティー精製により単離される。組換え D N A テクノロジー方法は、参照により本明細書に組み入れられた、 S a m b r o o k ら、「 M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 」、第3版、 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s 、（ 2 0 0 1 ）に記載されており、当業者によく知られている。

【0051】

ある特定の実施形態において、ペプチドは、グリカンへ直接的に（すなわち、リンカーなしで）共有結合している。そのような実施形態において、合成ペプチドグリカンは、グリカン上の酸性基、アルデヒド基、ヒドロキシ基、アミノ基、またはヒドラゾ基との間の1つまたは複数のアミド結合、エステル結合、またはイミノ結合の形成を通してペプチドをグリカンに共有結合させることにより形成され得る。これらの方法の全ては、当技術分野において知られており、またはこの出願の実施例セクション、もしくは参照により本明細書に組み入れられた、 H e r m a n s o n G . T . 、 B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s 、 A c a d e m i c P r e s s 、 p p . 1 6 9 - 1 8 6 ( 1 9 9 6 ) にさらに記載されている。スキーム1に示されているように、グリカン（例えば、「 C S 」）は、ペプチドをグリカンに共有結合させるためにグリカン上にアルデヒド官能基（例えば、「 o x - C S 」）を供給するために、過ヨウ素酸ナトリウムなどの過ヨウ素酸塩試薬を用いて酸化することができる。そのような実施形態において、ペプチドは、当技術分野において知られた方法を利用して、例えば、還元剤の存在下で、ペプチドの遊離アミノ基を酸化グリカンのアルデヒド官能基と反応させることにより、グリカンに共有結合し得る。

【0052】

ペプチドがグリカンにリンカーを介して共有結合している実施形態において、酸化グリカン（例えば、「 o x - C S 」）は、ペプチドと接触させる前に、リンカー（例えば、3 - ( 2 - ピリジルジチオ ) プロピオニルヒドラジド ( P D P H ) または N - [ - マレイミドプロピオン酸 ] ヒドラジド ( B M P H ) などの任意の適切な二官能性リンカー）と反応させることができる。リンカーは、典型的には、約 1 個～約 30 個の炭素原子、または

10

20

30

40

50

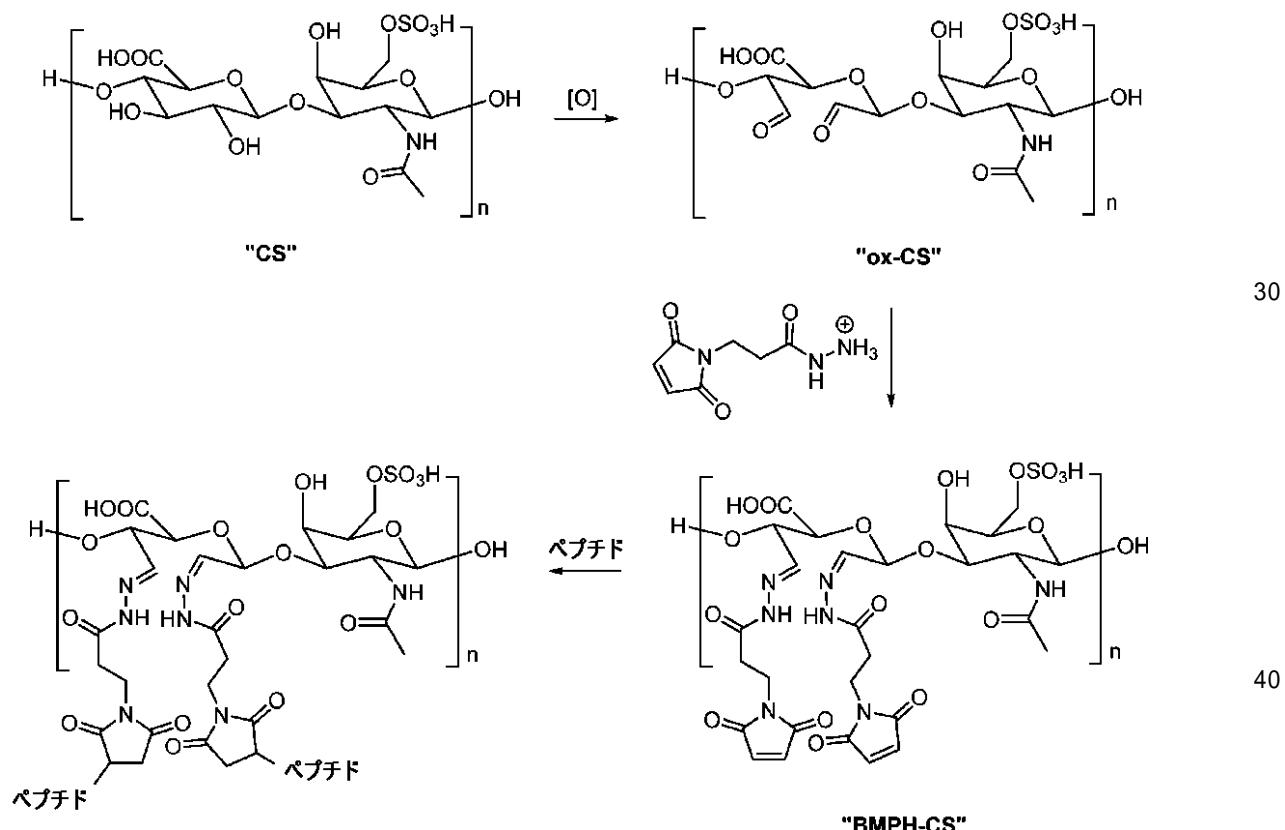
約2個～約20個の炭素原子を含む。より低分子量のリンカー（すなわち、約20～約50の近似分子量を有するもの）が典型的には用いられる。加えて、リンカーの構造的改変が企図される。例えば、アミノ酸がリンカーに含まれてもよく、そのアミノ酸には、天然に存在するアミノ酸、加えて、～、～、およびより長鎖のアミノ酸などの通常の合成方法から入手可能なものが挙げられるが、それらに限定されない。

【0053】

スキーム1において示されているように、一実施形態において、ペプチドは、酸化グリカン（例えば、「ox-CS」）のアルデヒド官能基を3-（2-ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（PDPH）またはN-[（-マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPH）と反応させて、グリカン中間体（例えば、「BMPH-CS」）を形成し、さらに、そのグリカン中間体を、少なくとも1つの遊離チオール基（すなわち、-SH基）を含有するペプチドと反応させて、合成ペプチドグリカンを生じることにより、グリカン（例えば、「CS」）に共有結合させられる。さらに別の実施形態において、ペプチドの配列は、HA結合性またはコラーゲン結合性ペプチド配列と末端システイン（C）との間のスペーサーとして働く1個または複数のアミノ酸残基を含むように改変されてもよい。例えば、グリカン中間体に付着点を供給するために、グリシン-システイン（GC）またはグリシン-グリシン-グリシン-システイン（GGGC）またはグリシン-セリン-グリシン-システイン（GSGC）セグメントが付加されてもよい。

【化1】

スキーム1



【0054】

したがって、一実施形態において、本明細書に記載された合成ペプチドグリカンは、a) グリカンの少なくとも1つの隣接するジオール基を酸化して、少なくとも2つのアルデヒド官能基を有するグリカンを提供するステップ；b) 任意でそのグリカンをリンカーと反応させ、そのグリカンを約1個から約80個までのコラーゲン結合性ペプチドおよび約

10

20

30

40

50

1個から約80個までのヒアルロン酸結合性ペプチドと、それらのペプチドがグリカンに共有結合するように反応させるステップにより提供される。

【0055】

合成ペプチドグリカンは、グリカン（すなわち、酸化グリカンまたはグリカン中間体）に異なる結合親和性を有するペプチドを逐次的に加えることにより、または代わりに、全てのペプチドを同時に加えることにより、合成することができる。合成ペプチドグリカンは、合成における任意の時点で、サイズ排除クロマトグラフィーなどの公知の方法を用いて単離および／または精製することができる。

【0056】

医薬組成物および投与

10

細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物であって、合成ペプチドグリカンが、グリカンに共有結合した約1個から約80個までのコラーゲン結合性ペプチドおよび約1個から約80個までのヒアルロン酸結合性ペプチドを有するグリカンを含む、医薬組成物が本明細書に開示される。

【0057】

当技術分野において知られているように、構成要素およびそれらの相対的量は、意図される使用および送達方法によって決定される。医薬組成物は、関節内、椎間、または眼内の送達を含む、経口、局所的、または非経口送達であってもよい。本明細書に記載された実施形態のいずれかにおいて、合成ペプチドグリカンは、単独で、または適切な薬学的担体もしくは希釈剤と組み合わせて、投与することができる。医薬組成物に用いられる希釈剤または担体は、それらが、合成ペプチドグリカンの所望の効果を減少させないように選択することができる。医薬組成物は、任意の適切な形であってもよい。適切な剤形の例には、水溶液、例えば、等張食塩水、5%グルコースにおける溶液、あるいはアルコール、グリコール、エステル、およびアミドなどの他のよく知られた薬学的に許容され得る液体担体が挙げられる。ある特定の実施形態において、医薬組成物は、1つまたは複数のpH緩衝剤、1つまたは複数のイオン強度変換剤、および1つまたは複数の粘度調整剤をさらに含む。

20

【0058】

ある特定の実施形態において、医薬組成物は、コラーゲン結合性ペプチドグリカンをさらに含む。適切な「コラーゲン結合性ペプチドグリカン」は、当技術分野において記載されている（例えば、US2013/0190246、US2012/0100106、およびUS2011/0020298参照）。ある特定の実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドグリカンは、本明細書に記載されているような約1個から約20個までのコラーゲン結合性ペプチドにコンジュゲートしたコンドロイチン硫酸を含む。ある特定の実施形態において、コラーゲン結合性ペプチドグリカンのコラーゲン結合性ペプチドは、WYRGRLGCである。

30

【0059】

ある特定の実施形態において、医薬組成物は、ヒアルロン酸結合性ペプチドグリカンをさらに含む。適切な「ヒアルロン酸結合性ペプチドグリカン」は、当技術分野において記載されている（例えば、WO2012/162534参照）。ある特定の実施形態において、ヒアルロン酸結合性ペプチドグリカンは、本明細書に記載されているような約1個から約20個までのヒアルロン酸結合性ペプチドにコンジュゲートしたコンドロイチン硫酸を含む。ある特定の実施形態において、ヒアルロン酸結合性ペプチドグリカンのヒアルロン酸結合性ペプチドは、GAHWQFNALTVRGGGCである。

40

【0060】

本明細書に記載された医薬組成物に用いる適切なpH緩衝剤には、例えば、酢酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、およびリン酸緩衝剤、加えて、塩酸、水酸化ナトリウム、酸化マグネシウム、リン酸一カリウム、重炭酸塩、アンモニア、炭酸、塩酸、クエン酸ナトリウム、クエン酸、酢酸、リン酸水素二ナトリウム、ホウ砂、ホウ酸、水酸化ナトリウム、ジエチルバルビツール酸、およびタンパク質、加えて、様々な生物

50

学的緩衝剤、例えば、TAPS、Bicine、Tris、Tricine、HEPES、TES、MOPS、PIPES、カコジル酸塩、またはMESが挙げられる。

【0061】

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

【0062】

適切な粘度調整剤には、イオン性および非イオン性水溶性ポリマー；「カルボマー」ファミリーのポリマーなどの架橋アクリル酸ポリマー、例えば、Carbopol（商標）として商業的に入手することが可能であるカルボキシポリアルキレン；ポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー、およびポリビニルアルコールなどの親水性ポリマー；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロースなどのセルロースポリマーおよびセルロースポリマー誘導体；トラガカントおよびキサンタンガムなどのガム；アルギン酸ナトリウム；ゼラチン、ヒアルロン酸およびその塩、キトサン、ジェラン、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。典型的には、製剤が望ましいpHに達するのを促進するために、中性または塩基性の作用物質などの非酸性粘度増強剤が用いられる。

【0063】

いくつかの実施形態において、合成ペプチドグリカンは、ミネラル、アミノ酸、糖、ペプチド、タンパク質、ビタミン（アスコルビン酸など）、またはラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、フィブリン、エラスチン、またはアグリカン、または上皮成長因子、血小板由来成長因子、トランスフォーミング成長因子、もしくは線維芽細胞成長因子などの成長因子、およびデキサメタゾンなどのグルココルチコイド、またはイオン性および非イオン性水溶性ポリマーなどの粘弾性改変剤；アクリル酸ポリマー；ポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー、およびポリビニルアルコールなどの親水性ポリマー；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、およびエーテル化セルロースなどのセルロースポリマーおよびセルロースポリマー誘導体；ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、乳酸とグリコール酸のコポリマー、または天然と合成の両方の他のポリマー剤と組み合わすことができる。

【0064】

非経口製剤は、滅菌非水性溶液として、または発熱物質を含まない滅菌水などの適切な溶媒と共に用いられる乾燥した形として適切に製剤化されてもよい。無菌条件下での、例えば凍結乾燥による、非経口製剤の調製は、当技術分野においてよく知られた標準薬学的技術を用いて容易に達成され得る。

【0065】

ある特定の実施形態において、合成ペプチドグリカンの溶解性は、増強されることを必要とする場合がある。そのような場合、溶解性は、マンニトール、エタノール、グリセリン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ポロキソマー、および当技術分野において知られた他のものなどの溶解性増強組成物の組み入れなどの適切な製剤技術を用いることにより増加され得る。

【0066】

合成ペプチドグリカンは、望ましくない汚染物質を除去するために滅菌されてもよく、その汚染物質には、内毒素および感染病原体が挙げられるが、それらに限定されない。合成ペプチドグリカンの構造および生体栄養性（biotrophic）に悪影響をおぼさない滅菌技術を用いることができる。ある特定の実施形態において、合成ペプチドグリカンは、プロピレンオキシドもしくはエチレンオキシド処理、滅菌濾過、ガスプラズマ滅菌

10

20

30

40

50

、ガンマ線照射、電子ビーム、および／または過酢酸などの過酸での滅菌を含む通常の滅菌技術を用いて消毒および／または滅菌することができる。一実施形態において、合成ペプチドグリカンは、1つまたは複数の滅菌工程に供することができる。あるいは、合成ペプチドグリカンは、プラスチックラップまたはホイルラップを含む任意の型の容器にラップされてもよく、さらに滅菌されてもよい。

【0067】

様々な実施形態において、合成ペプチドグリカンは、例えば静脈内に、または筋肉へ、投与することができる。非経口投与のための適切な経路には、血管内、静脈内、動脈内、筋肉内、皮膚、皮下、経皮的、皮内、および表皮内の送達が挙げられる。非経口投与のための適切な手段には、針（マイクロニードルを含む）注射器、注入技術、およびカテーテルに基づいた送達が挙げられる。

10

【0068】

本明細書に記載された様々な実施形態において、非経口投与のための製剤は、即時放出および／または放出調節のために製剤化されてもよい。放出調節製剤には、遅延放出、持続放出、パルス放出、制御放出、標的放出、およびプログラム化放出の製剤が挙げられる。したがって、合成ペプチドグリカンは、活性化合物の放出調節を提供する埋め込みデボーとしての投与のための固体、半固体、またはチキソトロピー性液体として製剤化されてもよい。そのような製剤の実例的例には、薬物コーティング化ステントおよびコポリマー酸（d 1 - 乳酸、グリコール酸）（P G L A）マイクロスフェアが挙げられる。別の実施形態において、合成ペプチドグリカンまたは合成ペプチドグリカンを含む組成物は、適切な場合には、連続的に投与されてもよい。

20

【0069】

本明細書に記載された実施形態のいずれかにおいて、合成ペプチドグリカンまたは合成ペプチドグリカンを含む組成物は、任意の適切な方法で患者へ血管内に（例えば、動脈または静脈へ）投与することができる。本明細書に記載された様々な実施形態において、合成ペプチドグリカンまたは合成ペプチドグリカンを含む組成物は、血管インターベンション前、中、または後に患者の血管へ投与することができる。様々な実施形態において、経皮的冠動脈インターベンション（P C I）などの血管インターベンションには、例えば、ステント留置、粥腫切除、移植、およびバルーン血管形成などの血管形成が挙げられる。実例的には、血管インターベンションは、冠動脈などの動脈もしくは静脈を一時的に閉鎖することを含むもの（例えば、バルーン血管形成）であり得、またはそれは、動脈もしくは静脈を一時的に閉鎖することを含まないもの（例えば、非バルーン血管形成術、バルーン血管形成を含まないステント留置術など）であり得る。例示的な送達様式には、カテーテル、非経口投与、バルーン上のコーティング、多孔性バルーンを通して、コーティング化ステント、およびそれらの任意の組み合わせ、または血管インターベンション術中の薬物の任意の他の公知の送達方法を挙げることができる。一つの実例的実施形態において、標的血管には、冠動脈、例えば、患者の心臓組織に血液を供給する任意の血管を挙げることができ、生まれつきの冠動脈ならびに患者へ移植されている（例えば、以前の冠動脈バイパス術において）ものを挙げることができる。

30

【0070】

非経口投与またはカテーテルに基づいた送達のために合成ペプチドグリカンと共に用いられる例示的な医薬組成物は以下を含み得る：a ) 本明細書に記載されているような合成ペプチドグリカン；b ) pHを約pH 4 . 5 ~ 約pH 9 の範囲で提供するための薬学的に許容され得るpH緩衝剤；c ) 約0 ~ 約300ミリモルの濃度範囲におけるイオン強度変化剤；およびd ) 約0 . 25 % ~ 約10 %全式量の濃度範囲における水溶性粘度変化剤、または任意の個々の構成要素a )、b )、c )、もしくはd )、またはa )、b )、c )、およびd )の任意の組み合わせ。

40

【0071】

合成ペプチドグリカンの適切な用量は、標準方法、例えば、実験動物モデルまたは臨床試験において用量反応曲線を確立することにより、決定することができ、患者状態、処置

50

されることになっている病状、投与経路、および組織分布、ならびに他の治療的処置の同時使用の可能性によって有意に異なり得る。患者に投与される有効量は、体表面積、患者の体重または質量、および患者状態の医師の評価に基づく。様々な例示的な実施形態において、有効用量は、約 1 ng / kg から約 10 mg / kg まで、100 ng / kg ~ 約 1 mg / kg、約 1 µg / kg から約 500 µg / kg まで、または約 100 µg / kg から約 400 µg / kg までの範囲である。これらの実施形態のそれれにおいて、用量 / kg は、患者の質量または体重の 1 キログラムあたりの用量を指す。他の実例的態様において、有効用量は、用量あたり約 0.01 µg から約 1000 mg まで、用量あたり 1 µg ~ 約 100 mg、または用量あたり約 100 µg から約 50 mg まで、または用量あたり約 500 µg から約 10 mg まで、用量あたり約 1 mg から 10 mg まで、または用量あたり約 1 mg から約 100 mg まで、または用量あたり約 1 mg から 5000 mg まで、または用量あたり約 1 mg から 3000 mg まで、または用量あたり約 1000 mg から 3000 mg までの範囲である。本明細書に記載された様々な実施形態のいずれかにおいて、有効用量は、用量あたり約 0.01 µg から約 1000 mg まで、用量あたり 1 µg ~ 約 100 mg、約 100 µg ~ 約 1.0 mg、約 50 µg ~ 約 600 µg、約 50 µg ~ 約 700 µg、約 100 µg ~ 約 200 µg、約 100 µg ~ 約 600 µg、約 100 µg ~ 約 500 µg、約 200 µg ~ 約 600 µg、または用量あたり約 100 µg から約 50 mg まで、または用量あたり約 500 µg から約 10 mg まで、または用量あたり約 1 mg から 10 mg までの範囲である。他の実例的実施形態において、有効用量は、1 µg、10 µg、25 µg、50 µg、75 µg、100 µg、125 µg、150 µg、200 µg、250 µg、275 µg、300 µg、350 µg、400 µg、450 µg、500 µg、550 µg、575 µg、600 µg、625 µg、650 µg、675 µg、700 µg、800 µg、900 µg、1.0 mg、1.5 mg、2.0 mg、10 mg、100 mg、または 100 mg ~ 30 グラムであり得る。  
10

#### 【0072】

合成ペプチドグリカンを投与するための任意の有効な投与計画を用いることができる。例えば、合成ペプチドグリカンは、単回投与の、または複数回投与の連日投与計画として、与えることができる。さらに、連日処置に代わるものとして、スタッガード (staggered) 投与計画、例えば、週あたり 1 ~ 5 日間を用いることができる。  
20

#### 【0073】

本明細書に記載された様々な実施形態において、患者は、合成ペプチドグリカンの複数回注射で処置される。一実施形態において、患者は、合成ペプチドグリカンを複数の時点（例えば、約 2 回 ~ 約 50 回までの時点）で、例えば、12 ~ 72 時間の間隔を置いて、または 48 ~ 72 時間の間隔を置いて、注射される。合成ペプチドグリカンの追加の注射は、最初の注射から数日間または数ヶ月間おいて、患者に投与することができる。

#### 【0074】

##### 方法

本明細書に記載された合成ペプチドグリカンは、軟骨、滑液、および硝子体液などのコラーゲンとヒアルロン酸の両方を有する組織を交換し、若返らせ、または補給するのに有用であり得る。  
40

#### 【0075】

##### 軟骨変性

関節軟骨上によく潤滑された表面は、滑膜関節の最適な機能性をもたらす。しかしながら、変形性関節症において生じているように、潤滑の低下は、結果として、軟骨分解およびフィブリル化を生じ、それらは次に、関節機能障害および疼痛の一因となる。潤滑の低下はまた、関節リウマチを含む他の型の関節炎において関節機能障害および疼痛をもたらす。

#### 【0076】

実施例 2 に示されているように、本明細書に提供される合成ペプチドグリカンは、動物

関節の内部表面を裏打ちする組織によって分泌される粘液性糖タンパク質である、ラブリシンの機能の一部を模倣するために用いることができる。したがって、合成ペプチドグリカンは、関節軟骨表面において潤滑を増強し、それにより軟骨の、摩耗によって引き起こされる侵食を低下させる可能性をもつ。合成ペプチドグリカンはまた、ヒアルロン酸およびI I型コラーゲンのような高分子を酵素誘導性分解から保護する可能性をもつ。

#### 【0077】

したがって、患者において軟骨変性を処置および／または予防する方法であって、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法が提供される。一実施形態において、患者は、細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物を滑液腔へ注射することにより処置される。

10

#### 【0078】

合成ペプチドグリカンが、外傷性分解およびサイトカイン誘発性酵素分解から関節軟骨マトリックスを保護することにより関節軟骨疾患を処置および／または予防するために用いられ得ることもまた企図される。

#### 【0079】

硝子体液変性  
硝子体液は、眼の後部腔を満たす粘弾性のゲル状物質である。硝子体代替物は、例えば、硝子体の不透明化または物理的崩壊および液化が生じている場合、機能障害性硝子体液を置換するために、および網膜手術中の一時的または永久的硝子体代替物として、用いられている。適切な硝子体代替物は、透明で生体適合性であるべきであり、それらは、天然の硝子体に近い密度および屈折率を有するべきである。

20

#### 【0080】

したがって、患者において硝子体液変性を処置および／または予防する方法であって、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法が提供される。

#### 【0081】

髓核変性  
髓核は、脊椎円板に存在するゲル状物質であり、圧縮負荷下で各円板内の全方向に水圧を分配するように機能し、軟骨細胞様細胞、コラーゲン原線維、およびヒアルロン酸鎖を通して凝集するプロテオグリカンアグリカンで構成される。髓核の変性は、結果として、負荷を椎体間に均等かつ効率的に伝達する円板の能力の低下を生じ、線維(fibrosis)輪として知られた円板の輪状領域の損傷をもたらす。輪における亀裂または断裂は、ヘルニアまたは円板の破裂になり得、円板の領域における神経のインピンジメント、最後には、腰痛または下腿痛を生じる。

30

#### 【0082】

髓核のみを交換する試みもまた行われている。髓核の交換は、変性した核の初期の脱水を停止させ、円板を完全な水和状態に戻し、その結果、関連した疼痛を含む変性過程が延期または予防され、力学的機能が椎骨セグメントで回復することが予想される。

#### 【0083】

本明細書に記載された合成ペプチドグリカンは、線維(fibrosis)輪に結合し、かつ保護するだろうことが企図される。したがって、患者において線維(fibrosis)輪変性を処置および／または予防する方法であって、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法が提供される。患者において髓核変性を処置および／または予防する方法であって、本明細書に記載された細胞外マトリックス結合性合成ペプチドグリカンを含む医薬組成物を、それを必要としている患者に投与することを含む方法もまた提供される。

40

#### 【0084】

## 【表3】

## 略語表

本明細書で用いられる以下の略語は以下の意味をもつ。

μg	マイクログラム	
μm	マイクロメートル	
BMPH	N-[β-マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド	10
CS	コンドロイチン硫酸	
DNA	デオキシリボ核酸	
HBSS	ハンクス平衡塩類溶液	
HEPES	ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸	
hr	時間	
Hz	ヘルツ	
kg	キログラム	
M	モル濃度(Molar)	
M	モル濃度(Molar)	20
m	メートル	
MES	2-エタンスルホン酸	
mg	ミリグラム	
min	分	
mL	ミリリットル	
mm	ミリメートル	
MOPS	3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸	
N	ニュートン	30
Pa	パスカル	
PBS	リン酸緩衝食塩水	
PDPH	3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド	
PIPES	ピペラジン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸)	
rad/s	ラジアン/秒	
TAPS	3-[[1, 3-ジヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-2-イル]アミノ]プロパン-1-スルホン酸	
TES	2-[[1, 3-ジヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-2-イル]アミノ]エタンスルホン酸	40
wt%	重量パーセント	

## 【実施例】

## 【0085】

実施例1：ペプチドグリカンの合成

試薬

## 【0086】

ペプチド G A H W Q F N A L T V R G G G C ( G A H ) および W Y R G R L G C ( W Y R G R L ) を G e n s c r i p t ( P i s c a t a w a y 、 N J ) から購入した。N-[ 50

- マレイミドプロピオン酸]ヒドラジドトリフルオロ酢酸塩 (BMPH) を Pierce (Rockford, IL) から購入した。

### 【0087】

#### 方法

コラーゲンI型結合性およびヒアルロン酸結合性ペプチドグリカンの合成は以前に記載されている（例えば、Bernhard J. C.、Panitch A. *Acta Biomater* 2012; 8: 1543-1550、およびPaderi J. E.、Panitch A. *Biomacromolecules* 2008; 9: 2562-2566 参照）。本合成ペプチドグリカンを、そこに記載された方法、および以下のように改変された方法に従って、調製した。

10

### 【0088】

コンドロイチン硫酸 (10 mg / mL) を、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5 中、メタ過ヨウ素酸ナトリウムで酸化した。酸化の程度は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムの濃度により調節した。約40倍モル過剰BMPHをコンドロイチン硫酸と、1×PBS pH 7.2 緩衝液中、室温で2時間反応させることにより、ヘテロ二官能性架橋剤BMPHを、官能化させたコンドロイチン硫酸にコンジュゲートさせた。CS-BMPHの過剰BMPHからの精製中、BMPHの消費量を測定することにより、官能性付与の程度を決定した。コンジュゲーションの最終ステップにおいて、ペプチドWYRGRLGCおよびGAHWQFNALTVRGGGCを水に溶解し、それを、コンドロイチン上のBMPH反応基の数の2分の1モル当量で加えた。例えば、平均約22個のBMPH官能基を有するコンドロイチン硫酸を、約11個のWYRGRLGCペプチドおよび約11個のGAHWQFNALTVRGGGCペプチドとコンジュゲートさせた。両方のペプチドを含有する混合物を室温で2時間、反応させ、続いて、超純水における精製および凍結乾燥を行った。

20

### 【0089】

全ての中間体を、AKTA精製装置FPLC (GE Healthcare) およびポリアクリルアミドビーズで充填されたカラム (Bio-Rad Labs) を用いるサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。最終生成物を、sephadex G-25ビーズで充填されたカラムを用いて同様に精製した。合成後、合成ペプチドグリカンは、凍結乾燥して、-80°で長期間、保存することができる。

30

### 【0090】

#### 実施例2：ラブリシン模倣体

ラブリシン (lubrican) 模倣体ペプチドグリカンの、軟骨表面間の摩擦力を低減する能力を、以下のように試験した。軟骨プラグを、レオメーターのプレートに接着し、第2の軟骨プラグを、レオメーターの回転固定具に接着した。その2つの軟骨表面に、5 N の力を一緒に加え、その後、剪断を適用した。トルクを測定し、それを用いて、表面間の摩擦力を計算した。

#### レオメーター

##### 1. 調整ステップを設定する：

a. 温度：37

40

b. 垂直力：5 N

c. 垂直力耐性：0.1 N

d. 持続時間：1 hr

##### 2. ピーク保持ステップを設定する：

a. 角速度範囲：0.001~100.0 rad/s

b. サンプルポイント：180

c. 温度：37

d. 持続時間：1 hr

e. ギャップ下限値：10000 μm

f. ギャップ上限値：100 μm

50

3. 軟骨プラグの重量を測定する。

4. 大きい方の軟骨プラグを、大きなペトリ皿の内側に置かれた一片のテープに接着する。ペトリ皿をレオメーターブレート上に置き、それを所定の位置に2つのクランプで保持する。

5. 小さい方の軟骨プラグを一片のテープに接着し、それをジオメトリー・ヘッド(20mm)上に置く。

6. 10 μLのヒアルロン酸を大きい方のプラグに加え、両方のプラグが接触するまでジオメトリー・ヘッドを下げる。水和を維持するために、20mLのH B S Sをペトリ皿に加える。

7. ステップを実行し、要求された時、そのファイルに名前を付ける。 10

8. 時々H B S Sが蒸発していないかどうかをチェックする。それが蒸発している場合には、さらに加える。

9. ステップが一旦済んだら、Data Analysisを開き、そのファイルを開く。

10. そのファイル名の上を右クリックし、Tableを選択する。サンプルポイントを含む表が現れる。各サンプルについての異なるステップについて、プルダウンタブが出現し、1回に1ステップを選択することができ、スクリーン上にその値が現れる。

11. コピーし、Excelにペーストする。

12. 分での時間およびN/mでのトルクを計算する。

13. 総摩擦力(F)を以下のように計算する： 20

【数1】

$$F = \frac{(3 + \alpha)(r_o^3 - r_i^3)}{(2 + \alpha)(r_o^4 - r_i^4)} M$$

式中、 $r = 1$ 、M = トルク、 $r_o$  = プラグの外側半径、および $r_i$  = プラグの内側半径。

14. 軟骨プラグの単位面積あたりの平均摩擦力(f)を以下のように計算する：

【数2】

$$f = \frac{F}{\pi(r_o^2 - r_i^2)} 30$$

式中、 $r_o$  = プラグの外側半径、 $r_i$  = プラグの内側半径、およびF = 総摩擦力。

15. 以下を用いて摩擦係数を計算する： $\mu = F / W$ 、式中、F = 総摩擦力およびW = 重量。

【0091】

データ

図1は、非損傷軟骨(アグリカン欠乏がない)の場合における摩擦力を示し、本開示によるラブリシン模倣体ペプチドグリカンで、軟骨表面間の摩擦が増加することを示している。図2は、損傷軟骨(変形性関節症をシミュレートするアグリカン欠乏がある)の場合における摩擦力を示し、本開示によるラブリシン模倣体ペプチドグリカンが軟骨に加えられた場合、軟骨表面間の摩擦が減少することを示している。したがって、本開示によるラブリシン模倣体ペプチドグリカンが2つの軟骨表面間に適用された場合、より高い振動剪断において摩擦力が減少し、それが、素早い動作中に軟骨を保護し得ることを示唆した。 40

【0092】

実施例3：硝子体液模倣体

方法

本開示による合成ペプチドグリカンは、以下のように試験することができる。粘弾性は、レオメーター、例えば、T A I n s t r u m e n t s A R G 2 レオメーターを用いて測定することができる。円錐および平板ジオメトリーまたは平行板ジオメトリーを用いる

ことができる。（例えば、ウシの）硝子体液を、ジオメトリー内に置くことができる。温度は調節することができ、周波数掃引は、約0.1Hzのから約100Hzまでの範囲（例えば、1Hz）で実施することができ、貯蔵弾性率、損失弾性率、および複素弾性率は、約0.1Pa～約10Paの間（例えば、10Pa）での振動剪断応力において測定することができる。温度：37。

【0093】

データ

図3Aは、未処理の（対照）、PBS緩衝液処理された、およびトリプシン処理されたウシ硝子体液におけるレオロジー的測定を示し、トリプシン処理されたウシ硝子体は、より低い粘度を示し、したがって、疾患状態を模倣していた。

10

【0094】

図3Bおよび図3Cにおいて、GAHは、コンドロイチン硫酸を、それに（BMPHを介して）共有結合したヒアルロン酸結合性ペプチド（すなわち、GAHWQFNALTVRGGGC）と共に含む合成ペプチドグリカンであり、WYRは、コンドロイチン硫酸を、それに（BMPHを介して）共有結合したコラーゲンII結合性ペプチド（すなわち、WYRGRLGC）と共に含む合成ペプチドグリカンであり、WYRGAHは、たった今記載された2つの合成ペプチドグリカンWYRとGAHの混合物である。

【0095】

図3Bは、合成ペプチドグリカンでの処理後の硝子体液機械的強度の回復を示している。

20

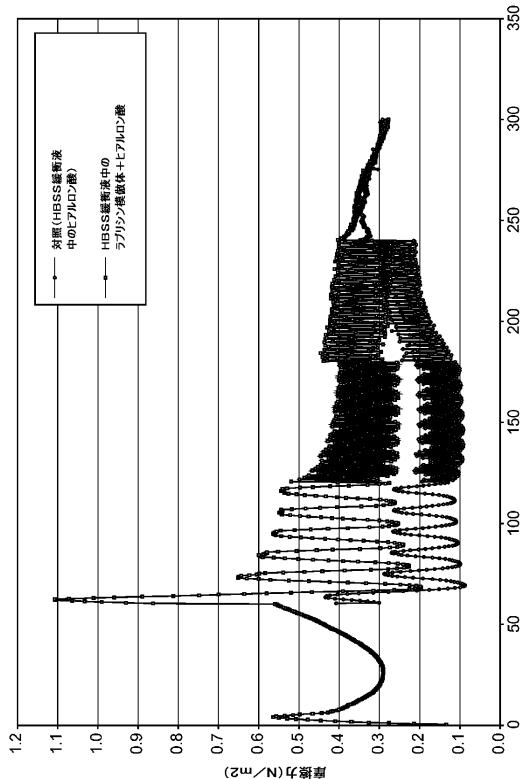
【0096】

図3Cは、硝子体液の機械的強度が合成ペプチドグリカンの存在下で十分に維持されることを示している。

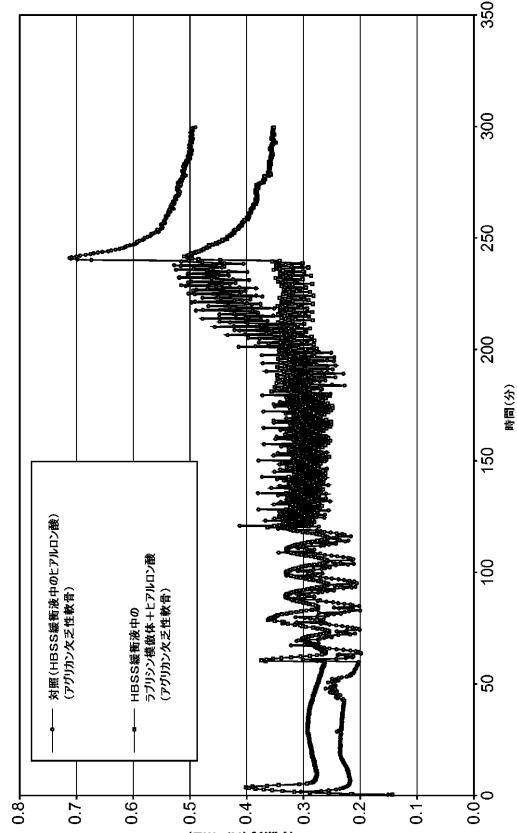
【0097】

図3A、3B、および3Cに示されたデータに基づいて、本合成ペプチドグリカンは、硝子体液を冒す疾患および障害を処置するために用いられ得ることが企図される。

【図1】



【図2】



【図3】

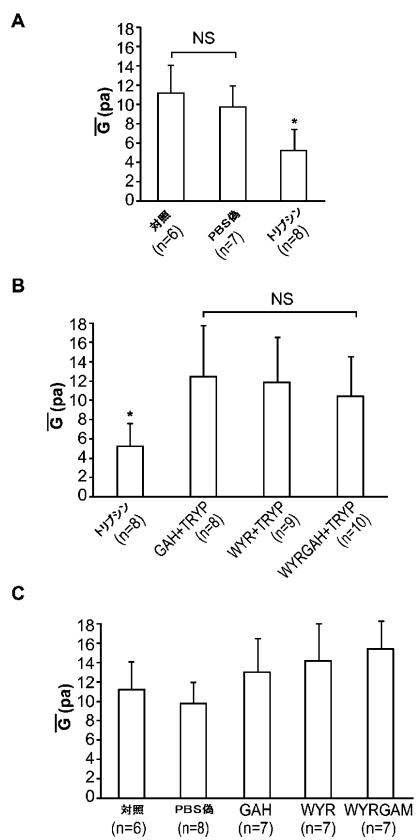


FIG. 3

【配列表】

0006603650000001.app

## フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I
- |               |           |                     |
|---------------|-----------|---------------------|
| A 6 1 P 29/00 | (2006.01) | A 6 1 P 29/00       |
| A 6 1 P 43/00 | (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 0 1 |
| C 0 7 K 7/08  | (2006.01) | C 0 7 K 7/08        |
| C 0 7 K 7/06  | (2006.01) | C 0 7 K 7/06        |
- (74) 代理人 100181674  
弁理士 飯田 貴敏
- (74) 代理人 100181641  
弁理士 石川 大輔
- (74) 代理人 230113332  
弁護士 山本 健策
- (72) 発明者 パニッチ, アリッサ  
アメリカ合衆国 インディアナ 47906, ウエスト ラファイエット, ウィン ヘンツシ  
エル ブールバード 1281, パーデュー リサーチ ファウンデーション 気付
- (72) 発明者 パデリ, ジョン エリック  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94107, サンフランシスコ, インディアナ ストリー  
ト 953, シミック バイオメディカル, インコーポレイテッド 気付
- (72) 発明者 シャルマ, シャイリ  
アメリカ合衆国 インディアナ 47906, ウエスト ラファイエット, ウィン ヘンツシ  
エル ブールバード 1281, パーデュー リサーチ ファウンデーション 気付
- (72) 発明者 スチュアート, キャサリン アリソン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94107, サンフランシスコ, インディアナ ストリー  
ト 953, シミック バイオメディカル, インコーポレイテッド 気付
- (72) 発明者 バスケス - ポルタラティン, ネルダ マリー  
アメリカ合衆国 インディアナ 47906, ウエスト ラファイエット, ウィン ヘンツシ  
エル ブールバード 1281, パーデュー リサーチ ファウンデーション 気付
- 審査官 田ノ上 拓自
- (56) 参考文献 国際公開第2012/162534 (WO, A1)  
特表2011-515499 (JP, A)  
Nature Materials, 2008年, Vol.7, p.248-254
- (58) 調査した分野 (Int.Cl., DB名)
- |   |                     |
|---|---------------------|
| C 0 7 K   | 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0 |
| A 6 1 K   | 3 8 / 1 7           |
| A 6 1 P   | 1 7 / 0 0           |
| A 6 1 P   | 1 9 / 0 8           |
| A 6 1 P   | 2 7 / 0 2           |
| A 6 1 P   | 2 9 / 0 0           |
| A 6 1 P   | 4 3 / 0 0           |
| C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N ) |                     |
| W P I D S / W P I X ( S T N )   |                     |
| P u b M e d   |                     |