

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-517518  
(P2024-517518A)

(43)公表日 令和6年4月23日(2024.4.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 7/00 (2006.01)	C 0 7 K 7/00	Z N A 4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全60頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2022-519465(P2022-519465)  
 (86)(22)出願日 令和4年2月4日(2022.2.4)  
 (85)翻訳文提出日 令和4年4月22日(2022.4.22)  
 (86)国際出願番号 PCT/IB2022/051007  
 (87)国際公開番号 WO2022/234346  
 (87)国際公開日 令和4年11月10日(2022.11.10)  
 (31)優先権主張番号 63/185,503  
 (32)優先日 令和3年5月7日(2021.5.7)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (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 522119938  
 ツインピグ バイオラブ インコーポレイ  
 テッド  
 大韓民国 0 2 4 5 3 ソウル トンデム  
 ン-ク キュンヒデ-ロ 2 3 (オー  
 ド) カレッジ オブ ナチュラルサイエ  
 ンシズ ルーム 6 0 7  
 (74)代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74)代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74)代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74)代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マクロファージを標的とするペプチド、ならびにそのコンジュゲート、組成物、および使  
 用

(57)【要約】

本開示は、マクロファージを標的とするポリペプチド、  
 ならびにそのコンジュゲート、組成物および使用に  
 関する。ポリペプチドは、腫瘍関連マクロファージなどの、  
 M2型、M1型、および/またはM0型マクロファージに  
 選択的である。

FIG. 7A

SEQ ID NO.	Peptide	Sequence	M0	M1	M2	M2/M1			
			% BD	% BD	% BD	Ratio			
2	Mpep	VLTTLGFPALISWKKRQGG	100.0	23.0	103.0	35.3	100.0	23.0	100
12	A8	ALLTGLPALISWKKRQGG	276.7	51.0	151.4	64.0	128.2	35.4	85
13	A9	VATLGLPALISWKKRQGG	317.7	65.0	243.4	114.0	156.8	46.2	64
14	A10	VLATGLPALISWKKRQGG	1.9	3.3	45.2	39.1	53.8	53.9	119
15	A11	VLTAGLPALISWKKRQGG	155.8	44.8	118.3	70.9	66.9	52.6	83
16	A12	VLTGLPALISWKKRQGG	69.3	26.9	119.0	78.7	71.2	71.5	73
17	A13	VLTGLPALISWKKRQGG	8.4	7.3	5.0	4.3	33.9	40.5	655
18	A14	VLTTLGALISWKKRQGG	352.0	100.4	289.9	74.4	130.5	55.1	49
19	A16	VLTTLGPAISWKKRQGG	37.5	31.3	23.4	28.9	55.4	35.2	237
20	A17	VLTTLGPAISWKKRQGG	34.6	25.0	83.3	48.8	38.3	49.2	145
21	A18	VLTTLGPAISWKKRQGG	185.5	18.8	293.4	95.2	146.1	50.3	95
22	A19	VLTTLGPAISWKKRQGG	12.3	12.7	11.4	14.0	38.6	35.4	337
23	A20	VLTTLGPAISWKKRQGG	42.5	18.2	38.0	36.8	42.2	47.8	111
24	A21	VLTTLGPAISWKKRQGG	129.1	56.4	25.0	64.1	67.6	57.1	79
25	A22	VLTTLGPAISWKKRQGG	33.3	29.3	21.2	27.0	62.4	62.5	263
26	A23	VLTTLGPAISWKKRQGG	107.4	78.8	31.7	35.1	37.0	45.4	117
27	A24	VLTTLGPAISWKKRQGG	35.8	17.0	85.0	51.1	52.9	44.7	81
28	A25	VLTTLGPAISWKKRQGG	185.7	51.8	64.8	48.3	37.3	47.8	247
29	A26	VLTTLGPAISWKKRQGG	278.7	45.1	193.0	35.1	115.8	47.8	56
30	A8B10	ALATGLPALISWKKRQGG	210.3	28.2	55.0	68.0	84.0	54.4	98
31	A1011	VLAAGLPALISWKKRQGG	125.8	43.5	34.0	28.2	64.9	45.6	191
32	A1018	VLATGLPALISWKKRQGG	278.8	84.7	244.8	84.8	126.8	49.8	82
33	A1218	VLTTLGALISWKKRQGG	303.1	105.3	25.2	21.1	26.4	31.0	191
34	A2526	VLTTLGPAISWKKRQGA	92.0	45.3	54.8	94.8	85.2	83.3	131
35	A95	VLATGLPALISWKKRQGA	172.5	80.8	7.4	8.3	22.7	28.2	305

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

X1-X2-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19 (SEQ ID NO:3)の amino 酸配列を含むポリペプチドであって、X1がバリン以外の amino 酸であり、X2がロイシン以外の amino 酸であり、X4がスレオニン以外の amino 酸であり、X7がプロリン以外の amino 酸であり、X11がセリン以外の amino 酸であり、X14がリジン以外の amino 酸であり、X18がグルタミン以外の amino 酸であり、かつ/またはX19がグルタミン以外の amino 酸である、ポリペプチド。

## 【請求項 2】

X1がアラニンである (SEQ ID NO:4)、請求項 1 記載のポリペプチド。

10

## 【請求項 3】

X2がアラニンである (SEQ ID NO:5)、請求項 1 記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

X4がアラニンである (SEQ ID NO:6)、請求項 1 記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

X7がアラニンである (SEQ ID NO:7)、請求項 1 記載のポリペプチド。

## 【請求項 6】

X11がアラニンである (SEQ ID NO:8)、請求項 1 記載のポリペプチド。

## 【請求項 7】

X14がアラニンである (SEQ ID NO:9)、請求項 1 記載のポリペプチド。

20

## 【請求項 8】

X18がアラニンである (SEQ ID NO:10)、請求項 1 記載のポリペプチド。

## 【請求項 9】

X19がアラニンである (SEQ ID NO:11)、請求項 1 記載のポリペプチド。

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載のポリペプチドおよび第 2 の治療薬を含む、コンジュゲート。

## 【請求項 11】

第 2 の治療薬が、KLA、 $\alpha$ -デフェンシン-1、BMAP-28、プレベニン-2R、プロホリン II b、セクロピン A-マガイニン 2 (CA-MA-2)、セクロピン A、セクロピン B、クリソフィシン-1、D-K6L9、ゴメシン、ラクトフェリシン B、LLL27、LTX-315、マガイニン 2、マガイニン II ボンベシンコンジュゲート (MG2B)、パルダキシン、ドキシソルピシン、メトトレキサート、エンチノスタット、クラドリピン、プララトレキサート、ロルラチニブ、メイタンシン DM1、メイタンシン DM3、メイタンシン DM4、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 10 記載のコンジュゲート。

30

## 【請求項 12】

ポリペプチドを第 2 の治療薬へ連結するリンカーをさらに含む、請求項 10 または 11 記載のコンジュゲート。

## 【請求項 13】

リンカーの両末端が、カルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (NHS エステル)、イミドエステル、ペンタフルオロフェニエステル (pentafluoropheny ester)、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルホナート、ビニルスルホン、EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、DCC (N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド)、SATA (アセチルチオ酢酸スクシンイミジル)、スルホ-SMCC (スルホスクシンイミジル-4-(NDマレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシルアート)、DMA (アジプイミド酸ジメチル・2HCl)、DMP (ジメチルピメリミダート・2HCl)、DMS (スベリミド酸ジメチル・2HCl)、DTBP (ジメチル 3,3'-ジチオビスプロピオンイミダート・2HCl)、スルホ-SIAB (スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SIAB (スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SBAP (スクシンイミジル 3-(プロモアセトア

40

50

ミド)プロピオナート)、SIA (ヨード酢酸スクシンイミジル)、SM(PEG)<sub>n</sub> (スクシンイミジル-[Nマレイミドプロピオンアミド]-エチレングリコールエステル、式中、n = 2、4、6、8、12または24)、SMCC (スクシンイミジル-4-(N-Dマレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシラート)、LCSMCC (スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシ-(6-アミドカプロアート)、スルホ-EMCS (N- エステル)、EMCS (N- スルホ-GMBS(N- エステル)、GMBS (N- エステル)、スルホ-KMUS (N- エステル)、スルホ-MBS (mマレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスルホスクシンイミドエステル)、MBS (m-マレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスクシンイミドエステル)、スルホ-SMPB (スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート)、SMPB (スクシンイミジル4-(pマレイミドフェニル)ブチラート)、AMAS (N- -マレイミドアセトキシスクシンイミドエステル)、BMPS (N- -マレイミドプロピルオキシスクシンイミドエステル)、SMPH (スクシンイミジル6-[( -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノアート])、PEG12-SPDP (2-ピリジルジチオールテトラオキサオクタトリアコンタン-N-ヒドロキシスクシンイミド)、PEG4-SPDP、スルホ-LCSPDP (スルホスクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SPDP (3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸スクシンイミジル)、LC-SPDP (スクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SMPT (4-スクシンイミジルオキシカルボニル- -メチル (2-ピリジルジチオ)トルエン)、DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル)、BS(PEG)<sub>5</sub> (ビス(スクシンイミジル)ペンタ(エチレングリコール))、BS(PEG)<sub>9</sub> (ビス(スクシンイミジル)ノナ(エチレングリコール))、BS3 (スベリン酸ビス[スルホスクシンイミジル])、BSOCOES (ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン)、PDPH (3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド)、DSG (グルタル酸ジスクシンイミジル)、DSP (ジチオビス[プロピオン酸スクシンイミジル])、BM(PEG)<sub>n</sub> (1,8-ビスマレイミド-エチレングリコール、n = 2または3)、BMB (1,4-ビスマレイミドブタン)、BMDB (1,4-ビスマレイミド-2,3-ジヒドロキシブタン)、BMH (ビスマレイミドヘキサノ)、BMOE (ビスマレイミドエタン)、DTME (ジチオビスマレイミドエタン)、TMEA (トリス(2-マレイミドエチル)アミン)、DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル)、DST (酒石酸ジスクシンイミジル)、DTSSP (3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオナート])、EGS (エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシナート])、スルホ-EGS (エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシナート])、TSAT (トリス-スクシンイミジルアミノトリアセタート)、DFDNB (1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される官能基を含む、請求項12記載のコンジュゲート。

10

20

30

40

50

【請求項14】

請求項1~13のいずれか一項記載のポリペプチドまたはコンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項15】

ポリペプチドが0.05 µg/ml~100 µg/mlの濃度である、請求項14記載の組成物。

【請求項16】

皮下投与または静脈内投与に適した投薬形態である、請求項14または15記載の組成物

【請求項17】

凍結乾燥形態またはカプセル化形態である、請求項14または15記載の組成物。

【請求項18】

その必要がある対象においてM2型マクロファージを減少させるかまたはM2型マクロファージ媒介疾患を処置する方法であって、請求項1、2、3、5、および6のいずれか一項記載のポリペプチドを該対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項19】

ポリペプチドが、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM2型マクロファージを減少させる、請求項18記載の方法。

## 【請求項 20】

疾患が癌である、請求項18記載の方法。

## 【請求項 21】

癌が、黒色腫、前立腺癌、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、または癌微小環境中にM2型腫瘍関連マクロファージを有する他の固形腫瘍である、請求項20記載の方法。

## 【請求項 22】

疾患が、線維症関連疾患；末期肝疾患；腎疾患；特発性肺線維症(IPF)；心不全；強皮症、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、骨髄線維症、および全身性エリテマトーデスを含む、多くの慢性自己免疫疾患；腫瘍浸潤および転移；慢性移植片拒絶および多くの進行性ミオパシーの病因；肝硬変および線維症；良性前立腺肥大症；または前立腺炎である、請求項18記載の方法。 10

## 【請求項 23】

その必要がある対象においてM1型マクロファージを減少させるかまたはM1型マクロファージ媒介疾患を処置する方法であって、請求項1、2、3、5、6、および9のいずれか一項記載のポリペプチドを該対象へ含む、方法。

## 【請求項 24】

ポリペプチドが、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM1型マクロファージを減少させる、請求項23記載の方法。

## 【請求項 25】

疾患が、敗血症性ショック、多臓器不全症候群(MODS)、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ、または自己免疫障害を含む、慢性炎症性疾患である、請求項23記載の方法。 20

## 【請求項 26】

その必要がある対象においてM0型マクロファージを減少させるかまたはM0型マクロファージ媒介疾患を処置する方法であって、請求項1～9のいずれか一項記載のポリペプチドを該対象へ投与する工程を含む、方法。

## 【請求項 27】

ポリペプチドが、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM0型マクロファージを減少させる、請求項26記載の方法。

## 【請求項 28】

ポリペプチドが第2の治療薬へ連結されている、請求項18～27のいずれか一項記載の方法。 30

## 【請求項 29】

第2の治療薬が、KLA、 $\alpha$ -デフェンシン-1、BMAP-28、ブレベニン-2R、ブホリンII b、セクロピンA-マガニン2(CA-MA-2)、セクロピンA、セクロピンB、クリソフィシン-1、D-K6L9、ゴメシン、ラクトフェリシンB、LLL27、LTX-315、マガニン2、マガニンIIボンベシンコンジュゲート(MG2B)、パルダキシン、ドキシソルピシン、メトトレキサート、エンチノスタット、クラドリピン、プララトレキサート、ロルラチニブ、メイタンシンDM1、メイタンシンDM3、メイタンシンDM4、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項28記載の方法。

## 【請求項 30】

ポリペプチドが、リンカーによって第2の治療薬へ連結されている、請求項18～28のいずれか一項記載の方法。 40

## 【請求項 31】

リンカーが、両末端で、カルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHSエステル)、イミドエステル、ペンタフルオロフェニエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルホナート、ピニルスルホン、EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、DCC (N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド)、SATA (アセチルチオ酢酸スクシンイミジル)、スルホ-SMCC (スルホスクシンイミジル-4-(NDマレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート)、DMA (アジプイミド酸ジメチル・2HCl)、DMP (ジメチルピメリミダ 50

ート・2HCl)、DMS (スベリミド酸ジメチル・2HCl)、DTBP (ジメチル3,3'-ジチオビスプロピオンイミダート・2HCl)、スルホ-SIAB (スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SIAB (スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SBAP (スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオナート)、SIA (ヨード酢酸スクシンイミジル)、SM(PEG)<sub>n</sub> (スクシンイミジル-([Nマレイミドプロピオンアミド]-エチレングリコールエステル、式中、n = 2、4、6、8、12または24)、SMCC (スクシンイミジル-4-(N-Dマレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート)、LCSMCC (スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロアート)、スルホ-EMCS (N- エステル)、EMCS (N- スルホ-GMBS (N- エステル)、GMBS (N- エステル)、スルホ-KMUS (N- エステル)、スルホ-MBS (mマレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスルホスクシンイミドエステル)、MBS (m-マレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスクシンイミドエステル)、スルホ-SMPB (スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート)、SMPB (スクシンイミジル4-(pマレイミドフェニル)ブチラート)、AMAS (N- -マレイミドアセトキシスクシンイミドエステル)、BMPS (N- -マレイミドプロピルオキシスクシンイミドエステル)、SMPH (スクシンイミジル6-([ -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノアート)、PEG12-SPDP (2-ピリジルジチオールテトラオキサオクタトリアコンタン-N-ヒドロキシスクシンイミド)、PEG4-SPDP、スルホ-LCSPDP (スルホスクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SPDP (3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸スクシンイミジル)、LC-SPDP (スクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SMPT (4-スクシンイミジルオキシカルボニル- -メチル (2-ピリジルジチオ)トルエン)、DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル)、BS(PEG)5 (ビス(スクシンイミジル)ペンタ(エチレングリコール))、BS(PEG)9 (ビス(スクシンイミジル)ノナ(エチレングリコール))、BS3 (スベリン酸ビス[スルホスクシンイミジル])、BSOC OES (ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン)、PDPH (3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド)、DSG (グルタル酸ジスクシンイミジル)、DSP (ジチオビス[プロピオン酸スクシンイミジル])、BM(PEG)<sub>n</sub> (1,8-ビスマレイミド-エチレングリコール、n = 2または3)、BMB (1,4-ビスマレイミドブタン)、BMDB (1,4-ビスマレイミド-2,3-ジヒドロキシブタン)、BMH (ビスマレイミドヘキサン)、BMOE (ビスマレイミドエタン)、DTME (ジチオビスマレイミドエタン)、TMEA (トリス(2-マレイミドエチル)アミン)、DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル)、DST (酒石酸ジスクシンイミジル)、DTSSP (3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオナート])、EGS (エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシナート])、スルホ-EGS (エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシナート])、TSAT (トリス-スクシンイミジルアミノトリアセタート)、DFDNB (1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される官能基を含む、請求項30記載の方法。

【請求項32】

ポリペプチドが0.05 µg/ml ~ 100 µg/mlの濃度である、請求項18~31のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

ポリペプチドが皮下投与または静脈内投与される、請求項18~32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

癌が肝細胞癌である、請求項20記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年5月7日に米国出願第63/185,503号の出願日の恩典を

10

20

30

40

50

主張し、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

電子的に提出された配列表の参照

本出願と共に出願されたASCIIテキストファイル(名称:3409-0001WO01\_Sequence\_Listing\_ST25.txt;サイズ:20 KB;および作成日:2022年2月4日)で電子的に提出された配列表の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0003】

発明の分野

本開示は、マクロファージを標的とするポリペプチド、ならびにそのコンジュゲート、組成物、および使用に関する。ポリペプチドは、M2型、M1型、および/またはM0型マクロファージに選択的である。

10

【背景技術】

【0004】

発明の背景

マクロファージは、ほぼ全ての組織において見られる重要な自然免疫細胞であり、骨髄に由来し、血中を循環し、溢出を介して組織において分化する。これらのマクロファージは3つの表現型:M0マクロファージ、腫瘍抑制性M1マクロファージ、および腫瘍支持性M2マクロファージに分類される。

【0005】

M0マクロファージは、ヒト末梢血単球から分化した不活性化マクロファージである。

20

【0006】

M1マクロファージは、強い抗原提示能力を有し、一般に、インターフェロン、リポ多糖(LPS)、および腫瘍壊死因子(TNF)によって活性化され、炎症作用および殺菌作用を有する。

【0007】

M2マクロファージは、様々な細胞外基質成分、血管新生因子および走化性因子を放出することによって、免疫抑制、腫瘍発生および血管新生を促進することが公知である。一般に、M2マクロファージはIL-4およびIL-13によって誘導され、M1マクロファージと区別され、ここで、M2マクロファージは、アルギナーゼ-1、マンノース(MMR、CD206)、およびスカベンジャー受容体(SR-A、CD204)などの特有のM2マーカーを発現する。

30

【0008】

メリチンは、ミツバチ(アピス・メリフェラL.(*Apis mellifera* L.))のハチ毒の主要成分であり、26個のアミノ酸残基を有する両親媒性ペプチドである。メリチンは、細孔形成、融合および小胞形成などの膜摂動作用を有する。メリチンは、腫瘍細胞に対するその細胞毒性、ならびに細胞増殖を阻害するかまたは細胞死および壊死を誘導するその能力のために、腫瘍担持ラット研究において使用された(Russell, Cancer Immunol Immunother. 2004; 53:411-421(非特許文献1))。

【0009】

加えて、メリチンを使用する従来技術は、メリチンを含有する動脈硬化を処置するための組成物(韓国特許出願公開第10-2011-0117789号(特許文献1))、メリチンを含有する線維芽細胞様滑膜細胞の活性を阻害する組成物(韓国特許出願公開第10-2011-0117788号(特許文献2))などに関連する。メリチンを使用してM2型マクロファージを選択的に死滅させる薬学的組成物が同定された(韓国特許出願公開第10-2019-0021765号(特許文献3))。抗癌薬へコンジュゲートされたメリチンを含有する組成物が、韓国特許出願公開第10-2019-0053334号(特許文献4)に記載されている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】韓国特許出願公開第10-2011-0117789号

50

【特許文献2】韓国特許出願公開第10-2011-0117788号

【特許文献3】韓国特許出願公開第10-2019-0021765号

【特許文献4】韓国特許出願公開第10-2019-0053334号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Russell, Cancer Immunol Immunother. 2004; 53:411-421

【発明の概要】

【0012】

本明細書に開示されるのは、  
X1-X2-Thr-

10

X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19 (SEQ ID NO:3)

のアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、ここで、X1はバリン以外のアミノ酸であり、X2はロイシン以外のアミノ酸であり、X4はスレオニン以外のアミノ酸であり、X7はプロリン以外のアミノ酸であり、X11はセリン以外のアミノ酸であり、X14はリジン以外のアミノ酸であり、X18はグルタミン以外のアミノ酸であり、かつ/またはX19はグルタミン以外のアミノ酸である。いくつかの態様において、X1はアラニンであり(SEQ ID NO:4)、X2はアラニンであり(SEQ ID NO:5)、X4はアラニンであり(SEQ ID NO:6)、X7はアラニンであり(SEQ ID NO:7)、X11はアラニンであり(SEQ ID NO:8)、X14はアラニンであり(SEQ ID NO:9)、X18はアラニンであり(SEQ ID NO:10)、X19はアラニンであり(SEQ ID NO:11)、またはそれらの任意の組み合わせである。

20

【0013】

SEQ ID NO:12~35のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを本明細書にさらに開示する。SEQ ID NO:49~55のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを本明細書にさらに開示する。

【0014】

本明細書に開示されるポリペプチドおよび第2の治療薬を含むコンジュゲートを、本明細書にさらに開示する。いくつかの態様において、第2の治療薬は、KLA、-デフェンシン-1、BMAP-28、ブレベニン-2R (brevenin-2R)、ブホリンIIb、セクロピンA-マガイニン2(CA-MA-2)、セクロピンA、セクロピンB、クリソフィシン-1 (chrysothsin-1)、D-K6L9、ゴメシン (gomesin)、ラクトフェリシンB、LL27、LTX-315、マガイニン2、マガイニンIIポンベシンコンジュゲート(MG2B)、パルダキシシン、ドキシソルピシン、メトトレキサート、エンチノスタット、クラドリピン、プララトレキサート、ロルラチニブ、メイタンシンDM1、メイタンシンDM3、メイタンシンDM4、またはそれらの組み合わせである。

30

【0015】

コンジュゲートは、ポリペプチドを第2の治療薬へ連結するリンカーをさらに含むことができる。いくつかの態様において、リンカーの一末端または両末端は、カルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHSエステル)、イミドエステル、ペンタフルオロフェニエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルホナート、ビニルスルホン、EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、DCC (N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド)、SATA (アセチルチオ酢酸スクシンイミジル)、スルホ-SMCC (スルホスクシンイミジル-4-(NDマレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシルアート)、DMA (アジプイミド酸ジメチル・2HCl)、DMP (ジメチルピメリミダート・2HCl)、DMS (スベリミド酸ジメチル・2HCl)、DTBP (ジメチル3,3'-ジチオビスプロピオンイミダート・2HCl)、スルホ-SIAB (スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SIAB (スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SBAP (スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオナート)、SIA (ヨード酢酸スクシンイミジル)、SM(PEG)n

40

50

(スクシンイミジル-([Nマレイミドプロピオンアミド]-エチレングリコールエステル、式中、 $n = 2, 4, 6, 8, 12$ または $24$ )、SMCC (スクシンイミジル-4-(N-Dマレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート)、LCSMCC (スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロアート))、スルホ-EMCS (N- エステル)、EMCS (N- スルホ-GMBS(N- エステル)、GMBS (N- エステル)、スルホ-KMUS (N- エステル)、スルホ-MBS (mマレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスルホスクシンイミドエステル)、MBS (m-マレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスクシンイミドエステル)、スルホ-SMPB (スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート)、SMPB (スクシンイミジル4-(pマレイミドフェニル)ブチラート)、AMAS (N- -マレイミド-アセトキシスクシンイミドエステル)、BMPS (N- -マレイミドプロピルオキシスクシンイミドエステル)、SMPH (スクシンイミジル6-[( -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノアート])、PEG12-SPDP (2-ピリジルジチオール-テトラオキサオクタトリアコンタン-N-ヒドロキシスクシンイミド)、PEG4-SPDP、スルホ-LCSPDP (スルホスクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SPDP (3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸スクシンイミジル)、LC-SPDP (スクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SMPT (4-スクシンイミジルオキシカルボニル- -メチル (2-ピリジルジチオ)トルエン)、DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル)、BS(PEG)5 (ビス(スクシンイミジル)ペンタ(エチレングリコール))、BS(PEG)9 (ビス(スクシンイミジル)ノナ(エチレングリコール))、BS3 (スベリン酸ビス[スルホスクシンイミジル])、BSOCOES (ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン)、PDPH (3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド)、DSG (グルタル酸ジスクシンイミジル)、DSP (ジチオビス[プロピオン酸スクシンイミジル])、BM(PEG)n (1,8-ビスマレイミド-エチレングリコール、 $n = 2$ または $3$ )、BMB (1,4-ビスマレイミドブタン)、BMDB (1,4-ビスマレイミド-2,3-ジヒドロキシブタン)、BMH (ビスマレイミドヘキサン)、BMOE (ビスマレイミドエタン)、DTME (ジチオビスマレイミドエタン)、TMEA (トリス(2-マレイミドエチル)アミン)、DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル)、DST (酒石酸ジスクシンイミジル)、DTSSP (3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオナート])、EGS (エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシナート])、スルホ-EGS (エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシナート])、TSAT (トリス-スクシンイミジルアミノトリアセタート)、DFDNB (1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される官能基を含む。

10

20

30

#### 【0016】

本明細書に開示されるポリペプチドまたはコンジュゲートおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を、本明細書にさらに開示する。いくつかの態様において、ポリペプチドは $0.05 \mu\text{g/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の濃度である。いくつかの態様において、組成物は皮下または静脈内投与に適した投薬形態である。いくつかの態様において、組成物は凍結乾燥またはカプセル化形態である。

#### 【0017】

その必要がある対象においてM2型マクロファージを減少させるかまたはM2型マクロファージ媒介疾患を処置する方法を開示し、本方法は、本明細書に開示されるポリペプチドを対象へ投与する工程を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:3、4、5、7、または8のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM2型マクロファージを減少させる。いくつかの態様において、疾患は癌である。いくつかの態様において、癌は、黒色腫、前立腺癌、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、または癌微小環境中にM2型腫瘍関連マクロファージを有する他の固形腫瘍である。いくつかの態様において、癌は肝細胞癌である。いくつかの態様において、疾患は、線維症関連疾患、末期肝疾患、腎疾患、特発性肺線維症(IPF)、心不全、多くの慢性自己免疫疾患、例えば、強皮症、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、骨髄線維症および全身性エリテマトーデス、腫瘍浸潤

40

50

および転移、慢性移植片拒絶および多くの進行性ミオパシーの病因、肝硬変および線維症、良性前立腺肥大症、または前立腺炎である。いくつかの態様において、疾患は肺線維症である。

【0018】

その必要がある対象においてM1型マクロファージを減少させるかまたはM1型マクロファージ媒介疾患を処置する方法をさらに開示し、本方法は、本明細書に開示されるポリペプチドを対象へ投与する工程を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:3、4、5、7、8、または11のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM1型マクロファージを減少させる。いくつかの態様において、疾患は、敗血症性ショック、多臓器不全症候群(MODS)、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ、または自己免疫障害を含む、慢性炎症性疾患である。いくつかの態様において、疾患は、敗血症性ショックを含む、敗血症である。

10

【0019】

その必要がある対象においてM0型マクロファージを減少させるかまたはM0型マクロファージ媒介疾患を処置する方法をさらに開示し、本方法は、本明細書に開示されるポリペプチドを対象へ投与する工程を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、10、または11のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM0型マクロファージを減少させる。

20

【0020】

その必要がある対象におけるM2型マクロファージ媒介疾患の処置のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートの使用を、本明細書にさらに開示する。その必要がある対象におけるM2型マクロファージ媒介疾患の処置における使用のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートを、本明細書にさらに開示する。その必要がある対象におけるM2型マクロファージ媒介疾患の処置のための医薬の製造のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートの使用を、本明細書にさらに開示する。

【0021】

その必要がある対象におけるM1型マクロファージ媒介疾患の処置のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートの使用を、本明細書にさらに開示する。その必要がある対象におけるM1型マクロファージ媒介疾患の処置における使用のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートを、本明細書にさらに開示する。その必要がある対象におけるM1型マクロファージ媒介疾患の処置のための医薬の製造のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートの使用を、本明細書にさらに開示する。

30

【0022】

その必要がある対象におけるM0型マクロファージ媒介疾患の処置のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートの使用を、本明細書にさらに開示する。その必要がある対象におけるM0型マクロファージ媒介疾患の処置における使用のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートを、本明細書にさらに開示する。その必要がある対象におけるM0型マクロファージ媒介疾患の処置のための医薬の製造のための本明細書に開示されるペプチドおよび/またはコンジュゲートの使用を、本明細書にさらに開示する。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1A~F。THP-1由来マクロファージの極性化。THP-1細胞をM0マクロファージについてはPMAで処理し、次いでM1マクロファージのためにLPSおよびIFN- $\gamma$ と共に、M2マクロファージのためにIL-4およびIL-13と共にインキュベートした。マクロファージの極性化を、IL-12、CXCL10、およびCD86などの、M1のマーカー、ならび

50

にIL-10、TGF- $\beta$ 、アルギナーゼ1、およびCD206などの、M2のマーカーによって評価した。LPSおよびIFN- $\gamma$ で処理されたマクロファージは、M1マーカーの増加を示し(図1D、1E、および1F)、IL-4およびIL-13で処理されたマクロファージは、M0と比較してM2マーカーの増加を示した(図1A、1B、1C、および1F)。

【図2】図2A~C。THP-1由来M2マクロファージにおけるTAMpep断片の親和性。M2マクロファージへ結合するTAMpepの主要アミノ部位を決定するために、THP-1由来M2マクロファージにおいて、FITCとコンジュゲートされたTAMpepおよびTAMpepの断片(図2Aに提供されるアミノ酸配列)を使用することによって、親和性試験を行った(スクランブル化 - SEQ ID NO:48; TAMpep - SEQ ID NO:1; TAMpep114 - SEQ ID NO:49; TAMpep120 - SEQ ID NO:50; TAMpep820 - SEQ ID NO:51; TAMpep822 - SEQ ID NO:52; Mpep - SEQ ID NO:2; TAMpep1026 - SEQ ID NO:53; TAMpep1226 - SEQ ID NO:54; およびTAMpep1526 SEQ ID NO:55)。TAMpep (26個のアミノ酸を含む)は90%超の高い親和性を示し、Mpep (C末端から7個のアミノ酸が除去されている)は、M2マクロファージにおいて45%超の2番目に高い親和性を示した。TAMpepの断片(C末端から10個超のアミノ酸またはN末端から4個超のアミノ酸が除去されている)は、26個のアミノ酸のペプチドと比較して低い親和性を示した(図2Bおよび2C)。

10

【図3】図3A~C。THP-1由来(THP-1-derived) M2マクロファージにおけるTAMpep断片の細胞傷害性。TAMpep断片をTHP-1由来M2マクロファージにおいて細胞傷害性アッセイで試験した。TAMpepはIC50で0.815  $\mu$ Mの高い細胞傷害値を示し、一方、他のペプチド断片はM2マクロファージにおいて細胞傷害効果を示さなかった。

20

【図4】図4A~D。TAMpepおよびMpepの溶血。TAMpepおよびMpepの溶血を決定するために、ペプチドをマウスRBCにおいて漸増濃度(0.1~50  $\mu$ M)で処理した。TAMpepはIC50で6.669  $\mu$ Mを示し、MpepはIC50で50  $\mu$ Mを示した(図4Aおよび4B)。加えて、dKLAへコンジュゲートされたTAMpepおよびMpepは、それぞれ、IC50で1.122  $\mu$ Mおよび50  $\mu$ Mを示した(図4Cおよび4D)。

【図5】図5A~C。THP-1由来マクロファージにおけるTAMpepおよびMpepの親和性。TAMpepおよびMpepがマクロファージのサブタイプの中でM2マクロファージへより特異的に付着するかどうかを比較するために、FITCとコンジュゲートされたペプチドを、THP-1細胞から極性化されたM0、M1、およびM2マクロファージで処理し、FACsによって分析した。TAMpepおよびMpepは両方とも、M0およびM1マクロファージと比較してM2マクロファージにおいて有意により高い親和性を示した(図5Aおよび5B)。さらに、TAMpepは、免疫蛍光顕微鏡法によってM2マクロファージにおける高い親和性を示した(図5C)。

30

【図6】図6A~D。THP-1由来マクロファージにおけるTAMpepKおよびMpepKの細胞傷害性。dKLAへコンジュゲートされたTAMpepKおよびMpepKが選択的にアポトーシスを誘発するかどうかを評価するために、M2マクロファージを漸増濃度のTAMpepKまたはMpepK(0.01~10  $\mu$ M)で処理した。TAMpepKおよびMpepKは、M0およびM1マクロファージと比較してM2マクロファージにおいてアポトーシスを誘発した(図6Aおよび6B)。さらに、アポトーシスと関連する、カスパーゼ-3の発現が、他のサブタイプマクロファージと比較してM2マクロファージにおいて増加した(図6Cおよび6D)。

40

【図7】図7A~E。THP-1由来マクロファージにおけるアラニン置換ライブラリーによるMpepの親和性。M2マクロファージにおけるMpepの接着能力における鍵となるアミノ酸配列を見つけるために、Mpepのアラニン置換ライブラリーを使用した。M2マクロファージにおいて、3番目のT(スレオニン)、6番目のL(ロイシン)、9番目のL(ロイシン)、12番目のW(トリプトファン)、13番目のI(イソロイシン)、16番目のK(リジン)および17番目のR(アルギニン)においてアラニンを代わりに用いた場合、ペプチドの親和性は減少した。加えて、6番目のL(ロイシン)~9番目のL(ロイシン)、ならびに3番目のT(スレオニン)、15番目のK(リジン)、16番目のR(アルギニン)、17番目のK(リジン)、および19番目のQ(グルタミン)が置換されたペプチド(A13~16およびA05)において、ペ

50

プチドの親和性は低下した。2番目のL(ロイシン)および11番目のS(セリン)が置換されたペプチド(A9およびA18)は、M2マクロファージにおいて増加した親和性を示した(図7A~7E)。図7B~7Eの各々中のMpepアミノ酸配列はSEQ ID NO:2である。

【図8】図8A~C。M2マクロファージおよびヒト黒色腫細胞におけるTAMpepKの細胞傷害性。TAMpepKが黒色腫細胞と比べてM2マクロファージにおいてより多くのアポトーシスおよび結合を誘発するかどうかを決定するために、TAMpepおよびTAMpepKの各々をTHP-1由来M2マクロファージまたはSk-Mel-28細胞で処理した(図8Aおよび8C)。TAMpepKは、黒色腫細胞(IC50: 3.583  $\mu$ M)と比較してM2マクロファージにおいて低いIC50値(1.055  $\mu$ M)を示し(図8B)、カスパーゼ-3の発現も、黒色腫細胞と比較してM2マクロファージにおいて増加した(図8C)。

10

【図9】図9A~C。TAMpepKで処理されたM2マクロファージの馴化培地による黒色腫細胞における増殖および遊走。M2マクロファージによって誘発された黒色腫細胞の増殖および遊走をTAMpepKが阻害するかどうかを試験するために、TAMpepK (1  $\mu$ M)で前処理されなかったまたは前処理されたM0、M1およびM2マクロファージの馴化培地、ならびに黒色腫細胞において処理された馴化培地を調製した。黒色腫細胞の増殖は、M2マクロファージの馴化培地によって増加し、一方、TAMpepKで前処理されたM2マクロファージの馴化培地においては阻害された(図9A)。さらに、TAMpepKで前処理されたM2マクロファージの馴化培地は黒色腫細胞の遊走を阻害し、一方、黒色腫細胞の遊走はM2マクロファージの馴化培地によって増加した(図9Bおよび9C)。

【図10】図10A~D。黒色腫のマウスモデルにおけるTAMpepKの抗癌効果。インビボでのTAMpepKの抗癌効果を評価するために、マウス黒色腫細胞(B16F10細胞株)をC57BL6Jマウスの右側腹部に皮下注射し、1週間後、TAMpepKを3日毎に腹腔内注射した。TAMpepKで処置されたマウスは、PBS群と比較して有意に減少した腫瘍体積および重量を示した(図10A、10C、および10D)。他方で、マウスの体重はPBS群およびTAMpepK群の間で有意に変化しなかった(図10B)。

20

【図11】図11A~C。黒色腫のマウスモデルにおけるM2様TAMを標的とするTAMpepKの効果。TAMpepKが黒色腫のマウスモデル中のM2様TAMを減少させるかどうかを決定するために、マクロファージを腫瘍組織から単離し、FACsによって分析した。M2様TAM(F4.80+およびCD206+細胞)は、PBS群と比較してTAMpepK群において有意に減少した(図11Aおよび11B)。しかし、M1様TAM(F4/80+およびCD86+細胞)は、PBS群およびTAMpepK群の間で変化を示さなかった(図11Aおよび11B)。さらに、M1/M2比率によって腫瘍微小環境の変化を分析した。TAMpepK群は、PBS群と比較して、M2マクロファージを減少させることによってM1マクロファージの割合の増加を示した(図11C)。

30

【図12】図12A~D。黒色腫のマウスモデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果。この研究は、黒色腫モデルにおけるMpepKの抗癌効果を決定するために行った。図12に示されるように、腫瘍体積および重量はTAMpepK群およびMpepK群の両方において減少し(図12A~12C)、生存率はPBS群と比較してMpepK群において延長された(図12D)。

【図13】図13A~E。黒色腫のマウスモデルにおけるM2様TAMを標的とするTAMpepKおよびMpepKの効果。MpepKが黒色腫中の腫瘍微小環境の変化を誘発するかどうかを決定するために、マクロファージのM1/M2比率およびCD8疲弊をFACsによって分析した。M2様TAM(F4.80+およびCD206+細胞)は、PBS群と比較してTAMpepKおよびMpepK群において減少した。しかし、M1様TAM(F4/80+およびCD86+細胞)は全ての群において変化を示さなかった(図13Aおよび13B)。M1/M2比率は、PBS群と比較してTAMpepKおよびMpepK群において有意に増加した(図13C)。加えて、CD8+ T細胞中の、PD-1およびLAG3などの、疲弊マーカーは、PBS群と比較してTAMpepKおよびMpepK群において有意に減少した(図13Dおよび13E)。

40

【図14】図14AおよびB。前立腺腫瘍細胞の馴化培地(TCM)によるTHP-1由来M2マクロファージの分化。前立腺癌細胞の馴化培地(TCM)によるM2マクロファージの極性化を

50

決定するために、THP-1由来マクロファージをTCMと共にインキュベートした。TCM処理マクロファージは、M0マクロファージと比較して、アルギナーゼ1、CD206およびCD163などのM2マーカーのmRNA発現の増加、ならびにNOS2およびCCR7などのM1マーカーのmRNA発現の減少を示した(図14Aおよび14B)。

【図15】図15A~C。M2マクロファージの馴化培地による前立腺癌細胞の増殖および遊走。図15A~15Cに示されるように、癌細胞の増殖および遊走がTHP-1由来M2マクロファージによって増加した。この研究は、TCMによって極性化されたM2マクロファージが、前立腺癌細胞の増殖および遊走を誘発するかどうかを試験した。TCMで処理されたマクロファージ(M-TCM)の馴化培地は、THP-1由来M2マクロファージの馴化培地と同様に、前立腺癌細胞の増殖および遊走の増加を示した(図15A~15C)。

10

【図16】図16AおよびB。TAMpepKまたはMpepKによるマクロファージの細胞生存性。TAMpepKおよびMpepKが、TCMによって分化されたM2マクロファージの細胞生存性を低下させるかどうかを評価するために、THP-1由来マクロファージをTAMpepKおよびMpepK(1 $\mu$ M)で処理した(図16A)。TAMpepKおよびMpepKは、M2マクロファージと同様に、TCMで処理されたマクロファージにおいてアポトーシスの誘発をもたらした(図16B)。

【図17】図17A~C。TAMpepKおよびMpepKで処理されたM2マクロファージの馴化培地による前立腺癌細胞における増殖および遊走。M2マクロファージおよびTCMによって誘導されたM2様TAMの馴化培地は、前立腺癌細胞(PC3細胞)の増殖および遊走を増加させた(図17A~17C)。しかし、TAMpepKおよびMpepKで前処理されたM2マクロファージおよびM2様TAMの馴化培地は、M2マクロファージまたはM2様TAMの群と比較して、PC3細胞の増殖および遊走を有意に減少させた(図17A~17C)。

20

【図18】図18AおよびB。TAMpepKおよびMpepKで処理されたM2マクロファージの馴化培地による前立腺癌細胞における浸潤。PC3細胞をマクロファージの馴化培地で処理した。M2マクロファージおよびTCMによって誘導されたM2様TAMの馴化培地は、PC3細胞の浸潤を増加させた。しかし、TAMpepKおよびMpepKで前処理されたM2マクロファージおよびM2様TAMの馴化培地は、M2マクロファージまたはM2様TAMの群と比較して、PC3細胞の浸潤を有意に減少させた(図18Aおよび18B)。

【図19】図19A~F。前立腺癌のマウスモデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの効果。前立腺癌モデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果を評価するために、TRAMP-C2細胞をC57BL6Jマウスの右側腹部に皮下注射し、1週間後、TAMpep、dKLA、TAMpepKおよびMpepKを3日毎に腹腔内注射した。TAMpepKおよびMpepKで処置されたマウスは、PBS群と比較して、腫瘍体積および重量の有意な減少を示した(図19B、19C、19E、および19F)。他方で、マウスの体重は全ての群間で有意に変化しなかった(図19D)。

30

【図20】図20A~D。前立腺癌モデルの増殖およびEMTにおけるTAMpepKおよびMpepKの効果。前立腺癌モデルの腫瘍成長およびEMTにおけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果を決定するために、増殖マーカーとしてのPCNA、ならびにEMT(上皮間葉転換)マーカーとしてのE-カドヘリン、ビメンチン、フィブロネクチン、TGF- $\beta$ 、およびMMP9の発現を、腫瘍組織において測定した。PCNAの発現はTAMpepKおよびMpepK群において減少した(図20Cおよび20D)。EMTマーカーについて、上皮細胞マーカーとして公知のE-カドヘリンはTAMpepKおよびMpepK群において増加し(図20Aおよび20D)、一方、間葉マーカーとして公知のビメンチンおよびフィブロネクチンはTAMpepKおよびMpepK群において減少した(図20Bおよび20D)。さらに、EMTに関連するTGF- $\beta$  およびMMP9の発現もまた、TAMpepKおよびMpepK群において減少した(図20D)。従って、これらの知見は、TAMpepKおよびMpepKが、前立腺癌においてM2様TAMを標的として腫瘍成長および転移を阻害することによって抗癌効果を有することを示唆している。

40

【図21】図21A~E。結腸癌モデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果。結腸癌モデルの腫瘍成長におけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果を決定するために、腫瘍組織を体積および重量について測定した。TAMpepKおよびMpepKで処置されたマ

50

ウスは、PBS群と比較して腫瘍体積および重量の有意な減少を示し、一方、腫瘍重量はMpepKにおいて有意に変化しなかった(図21A~21E)。

【図22】図22A~C。肺線維症のマウスモデルにおけるMpepKの効果。MpepKが肺線維症の抑制についての治療効果を有するかどうかを決定するために、肺線維症のマウスモデルを、プレオマイシンを気管内投与することによって確立した。プレオマイシンによって誘発された肺線維症は、MpepKによって低減された(図22B)。さらに、*fosl2*、1型コラーゲンおよびフィブロネクチン1などの、線維症に関連する遺伝子発現が、PBSと比較してMpepKにおいて有意に減少した(図22C)。

【図23】図23A~E。乳癌のマウスモデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの効果。乳癌におけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果を決定するために、乳癌の第4乳房同所性マウスモデルを確立した。TAMpepKおよびMpepKは、PBS群と比較して減少した腫瘍体積および重量を示した(図23B~23D)。さらに、M2マクロファージマーカーとして公知のアルギナーゼ1の遺伝子発現が、PBSと比較してMpepKにおいて有意に低下した(図23E)。

【図24】図24A~C。乳癌の肺転移におけるTAMpepKおよびMpepKの効果。肺転移が、PBS群と比較してMpepK群において減少した(図24A~24C)。

【図25】図25A~C。M2型、M1型、および/またはM0型マクロファージに選択的なポリペプチドの細胞傷害性。M2型、M1型、および/またはM0型マクロファージに選択的なポリペプチドを、THP-1由来M2、M1およびM0マクロファージ中で、細胞傷害性アッセイにおいて試験した。極性化された細胞をMpepK、A12K、A14K、A17K、A18K、A22K、A25KまたはA26Kペプチドで処理した。MpepKは、M2マクロファージにおいてIC<sub>50</sub>で1.121 μMの高い細胞傷害値を示し、一方、A26Kは、M1マクロファージにおいてIC<sub>50</sub>で1.192 μMの高い細胞傷害値を示した。また、A17K、A22KおよびA25Kは、M2マクロファージにおいて1.5 μMでMpepKと同様の細胞傷害性を示し、一方、A26Kは、対照と比較して、M1マクロファージにおいて1.5 μMで生存性の50%を超える阻害を示した。

【図26】図26A~B。インビトロ敗血症モデル、LPS刺激M1(LPS-M1)マクロファージにおけるA26Kの細胞傷害性および効果。M1マクロファージについて最も選択的なポリペプチドであるA26Kを、インビトロ敗血症モデル、LPS刺激M1(LPS-M1)マクロファージにおいて試験した。CCK-8アッセイを使用して細胞生存性を分析した。炎症性遺伝子(IL-8、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  およびCXCL10)の発現レベルをリアルタイム定量的PCRによって定量化した。LPS-M1マクロファージにおけるA26Kの細胞傷害性を調べるために、M0、M1、およびLPS-M1マクロファージを1.5 μMのA26Kで処理した。A26Kは、LPS-M1マクロファージおよびM1マクロファージにおいて有意な細胞傷害効果を示した。さらに炎症性遺伝子の発現レベルを調べるために、M0、M1、およびLPS-M1マクロファージを1.5 μMのA26Kで1時間処理した。LPS(1 μg/ml)刺激は、M0マクロファージと比較して、IL8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ BおよびCXCL10の発現を有意に増加させた。A26K処理は、LPS刺激によるIL8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ BおよびCXCL10の発現レベルの増強を有意に阻害した。

【図27】図27A~B。IL-4およびIL-13誘導THP-1マクロファージと共培養された、インビトロ肺線維症モデル、TGF- $\beta$ 1誘導A549細胞におけるA17KまたはA22Kの効果。細胞共培養系を使用して、TGF- $\beta$ 1誘導A549細胞を、IL-4およびIL-13誘導THP-1マクロファージと共培養した。楕円形の上皮細胞から紡錘状の線維芽細胞様細胞へのA549における形態学的変化が、明らかに検出された。A17KまたはA22K介入は、IL-4およびIL-13誘導マクロファージとの共培養によって刺激されるA549細胞におけるEMTの紡錘様間葉形態表現型を顕著にブロックした。A17KまたはA22K処理は、M2マクロファージ単独のそれらと比較してA549細胞において、EMT阻害マーカーである、E-カドヘリンの発現を有意に増強し、FMT増強マーカーである、 $\alpha$ -SMAの発現を減少させた。

【図28】図28A~D。肝細胞癌のマウスモデルにおけるMpepKの効果。インビボでの

MpepKの抗癌効果を評価するために、マウスhepa1-6細胞をC57BL/6Jマウスの右側腹部に皮下注射した。細胞接種後12日目に、MpepKを3日毎に腹腔内注射した。結果として、群間で体重変化の有意差はなかった。他方で、全ての用量(100、200および400 nmol/kg)のMpepKで処置されたマウスが、PBS群と比較して有意に減少した腫瘍体積を示し、生存率は、PBS群と比較してMpepK群(100、200および400 nmol/kg)において有意に延長された。

【発明を実施するための形態】

【0024】

発明の詳細な説明

本開示における用語「メリチン」(MEL)は、  
Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-

Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln (SEQ ID NO:1)

のような配列を有するハチ毒の主成分を構成するペプチドである。本明細書において使用されるような用語「ハチ毒(BV)」は、ハチ(アピスメリフェラ)の腹部において産生される酸性および塩基性分泌物の混合物であり、無色の苦い液体形態を有する。その主成分は、メリチン、ならびにペプチドとしてのアパミンおよび肥満細胞脱顆粒(MCD)ペプチド、ならびに酵素としてのホスホリパーゼA2(PLA2)などである。加えて、BVは様々な微量の成分を含有する。

【0025】

メリチンの最初の7個のアミノ酸が除去されたペプチド、例えば、  
Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-  
Arg-Gln-Gln (SEQ ID NO:2; MEL826 または Mpep)

は、M0型、M1型、またはM2型マクロファージを選択的に標的とするためにSEQ ID NO:3~11 (Mpep、または各Mpep)のように変異させることができる。

【0026】

従って、  
X1-X2-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19 (SEQ ID  
NO:3)

のアミノ酸配列を含むポリペプチドを本明細書に開示し、ここで、X1はバリン以外のアミノ酸であり、X2はロイシン以外のアミノ酸であり、X4はスレオニン以外のアミノ酸であり、X7はプロリン以外のアミノ酸であり、X11はセリン以外のアミノ酸であり、X14はリジン以外のアミノ酸であり、X18はグルタミン以外のアミノ酸であり、かつ/またはX19はグルタミン以外のアミノ酸である。いくつかの態様において、X1はアラニンであり(SEQ ID NO:4)、X2はアラニンであり(SEQ ID NO:5)、X4はアラニンであり(SEQ ID NO:6)、X7はアラニンであり(SEQ ID NO:7)、X11はアラニンであり(SEQ ID NO:8)、X14はアラニンであり(SEQ ID NO:9)、X18はアラニンであり(SEQ ID NO:10)、X19はアラニンであり(SEQ ID NO:11)、またはそれらの任意の組み合わせである(表1)。そのようなポリペプチドは、活性成分もしくは治療薬として単独で、または他の活性成分もしくは治療薬との併用で、使用することができる。

【0027】

(表1)

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	アミノ酸配列
3	X1-X2-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19
4	Ala-X2-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19
5	X1-Ala-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19
6	X1-X2-Thr-Ala-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19
7	X1-X2-Thr-X4-Gly-Leu-Ala-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19
8	X1-X2-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-Ala-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-X19
9	X1-X2-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-Ala-Arg-Lys-Arg-X18-X19
10	X1-X2-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-Ala-X19
11	X1-X2-Thr-X4-Gly-Leu-X7-Ala-Leu-Ile-X11-Trp-Ile-X14-Arg-Lys-Arg-X18-Ala

10

20

## 【 0 0 2 8 】

SEQ ID NO:12～35のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを本明細書にさらに開示する。SEQ ID NO:49～55のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを本明細書にさらに開示する。

30

## 【 0 0 2 9 】

本明細書において交換可能に使用される、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、アミド結合(またはペプチド結合)を介してコンジュゲートされた任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。NH<sub>2</sub>は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。COOHは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシル基を指す。

## 【 0 0 3 0 】

本開示によれば、ペプチドは、当技術分野において周知の様々な方法によって得ることができる。例えば、ペプチドは、遺伝子組み換えおよびタンパク質発現系を使用して、またはペプチド合成などの化学合成によりインビトロでペプチドを合成する方法によって、無細胞タンパク質合成法によって、および/または同様のものによって、調製することができる。本明細書に開示されるポリペプチドおよび第2の治療薬を含むコンジュゲートを、本明細書にさらに開示する。いくつかの態様において、第2の治療薬は、dKLA (SEQ ID NO:47)、 $\alpha$ -デフェンシン-1、BMAP-28、プレベニン-2R、ブホリンIIb、セクロピンA-マガイニン2(CA-MA-2)、セクロピンA、セクロピンB、クリソフィシン-1、D-K6L9、ゴメシン、ラクトフェリシンB、LL27、LTX-315、マガイニン2、マガイニンIIボンベシンコンジュゲート(MG2B)、パルダキシン、ドキソルピシン、メトトレキサート、エンチノスタット、クラドリピン、プラトトレキサート、ロルラチニブ、メイタンシンDM1、メイタンシンDM3、メイタンシンDM4、またはそれらの組み合わせである。

40

## 【 0 0 3 1 】

50

本開示の用語「コンジュゲート」は、Mpepペプチドおよび第2の治療薬が互いにコンジュゲートされているコンジュゲートを指し、マクロファージを標的とすることができる。コンジュゲートは、例えば、薬物によって標的とされるM2型マクロファージへ結合し、マクロファージのミトコンドリアを損傷して腫瘍成長および転移を阻害することができる。腫瘍の周りの血管新生を選択的に抑制することによって癌を抑制することができる。即ち、本開示のコンジュゲートは、第2の治療薬単独と比較して改善された活性を有し得る。しかし、本開示はそれらに限定されない。

#### 【0032】

コンジュゲートは、ポリペプチドを第2の治療薬へ連結するリンカーをさらに含むことができる。リンカーは、天然に存在するマルチドメインタンパク質から誘導され得るか、または経験的に設計され得る。Chen, X. et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 65:1357-1369 (2013)を参照のこと。リンカーは、可動性リンカー、剛直リンカー、およびインビポ開裂性リンカーを含み得る。機能ドメインと一緒に連結すること(可動性リンカーおよび剛直リンカーにおけるように)またはインビポで遊離機能ドメインを放出すること(インビポ開裂性リンカーにおけるように)における役割に加えて、リンカーは、融合タンパク質の生成において他の利点、例えば、生物活性の改善、発現収率の増加、および所望の薬物動態プロファイルの達成を提供することができる。リンカーは、それぞれ、 $4.5 \pm 0.7$ 、 $9.1 \pm 2.4$ 、および $21.0 \pm 7.6$ 残基の平均長を有する小、中、および大リンカーであり得る。いくつかの態様において、アミノ酸は、天然にコードされたアミノ酸のおよそ50%を構成する、極性の非荷電または荷電残基であり得る。

10

20

#### 【0033】

可動性リンカーは、通常、結合されたドメインがある程度の運動または相互作用を必要とする場合に適用される。それらは、一般に、小さな、無極性(例えばGly)または極性(例えばSerもしくはThr)アミノ酸から構成される。これらのアミノ酸の小さなサイズは、柔軟性を提供し、機能ドメインを連結する移動性を可能にする。SerまたはThrの組み入れは、水分子と水素結合を形成することによって、水溶液中でのリンカーの安定性を維持することができる。従って、リンカーとタンパク質部分との好ましくない相互作用を低減する。最も一般的に使用される可動性リンカーは、GlyおよびSer残基のストレッチを主に含む配列を有する(「GS」リンカー)。最も広く使用される可動性リンカーの例は、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:36)の配列を有する。コピー数「n」を調節することによって、このGSリンカーの長さは、機能ドメインの適切な分離を達成するために、または必要なドメイン間相互作用を維持するために、最適化することができる。

30

#### 【0034】

剛直リンカーは、ドメイン間の固定距離を維持してそれらの独立した機能を維持するために、首尾よく適用された。(EAAAK)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:37)の配列を有するヘリックス形成リンカーが、多くの組み換え融合タンパク質の構築に適用された。別のタイプの剛直リンカーは、Proリッチ配列、(XP)<sub>n</sub>を有し、Xは、Ala、Lys、またはGluなどの任意のアミノ酸を指定する。剛直リンカーは、 $\alpha$ -ヘリックス構造を採用することによって、または多数のPro残基を含有することによって、比較的硬い構造を示す。多くの状況において、それらは可動性リンカーよりも効率的に機能ドメインを分離する。リンカーの長さは、ドメイン間の最適距離を達成するためにコピー数を変えることによって容易に調節することができる。結果として、剛直リンカーは、融合タンパク質の安定性または生物活性を保つためにドメインの空間分離が重要である場合に選択される。

40

#### 【0035】

いくつかの態様において、開裂性リンカーは、インビポで遊離機能ドメインを放出するために導入される。例えば、リンカー上の2つのシステイン(Cys)残基間に形成された分子内ジスルフィド結合、ならびに2つのCys残基間のトロンピン感受性配列(PRS)を含有するジチオシクロペプチドに基づく、ジスルフィドリンカー(LEAGCKNFFPR↓SFTSCGSLE)(SEQ ID NO:38)

50

を使用することができる。ジチオシクロペプチド配列(CRRRRRREAEEAC) (SEQ ID NO:39)は、2つのCys残基間の分子内ジスルフィド結合、ならびに酵母分泌経路に内在する分泌シグナル処理プロテアーゼに敏感なペプチド配列を含有する。

【0036】

リンカーはまた、本明細書に開示されるペプチドの細胞取り込みを増強することができる細胞透過性ペプチドを含むことができる。細胞透過性リンカーは、例えば、5~30個のアミノ酸を含むことができ、カチオン性、両親媒性、または疎水性であり得る。細胞透過性リンカーの例としては、

RLRWR (SEQ ID NO:40), GRPRESGKKRKRKRLKP (SEQ ID NO:41),

GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:42), RYIRS (SEQ ID NO:43), RRMKWKK (SEQ ID NO:44), R8-12 (SEQ ID NO:45), および RRRRRRRRRRFFC (SEQ ID NO:46)

10

が挙げられる。参照により本明細書に組み入れられるBohmova, E. et al., *Physiol. Res.* 67 (Supp. 2):S267-S279 (2018)、特に表1~3を参照のこと。

【0037】

例えば、コンジュゲートは、ペプチドdKLA (SEQ ID NO:47; d(KLAKLAKKLAKLAK))を、GGGGSリンカー(SEQ ID NO:36)を介して、Mpep (SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、10、または11)へコンジュゲートすることによって得ることができる。

【0038】

あるいは、ドキシソルピシン、メトトレキサート、エンチノスタット、クラドリピン、プラトトレキサート、およびロルラチニブなどの抗癌薬を、SPDPリンカーを介して、Mpepへコンジュゲートすることによって、コンジュゲートを得ることができる。あるいは、メイタンシンDM1、メイタンシンDM3およびメイタンシンDM4をリンカー無しでMpepへコンジュゲートすることによって、コンジュゲートを得ることができる。しかし、本開示はそれらに限定されない。即ち、本開示のコンジュゲートは、Mpepが抗癌薬へ直接コンジュゲートされているかまたはリンカーを介してそれへコンジュゲートされている形態であり得る。しかし、本開示はそれらに限定されない。

20

【0039】

本開示によれば、リンカーは、Mpepおよび抗癌薬上のアミン、カルボキシル、またはスルフヒドリル基を介して、抗癌薬およびMpepへ結合することができる。しかし、本開示はそれらに限定されない。抗癌薬へコンジュゲートされたメリチンを含む組成物については韓国特許出願公開第10-2019-0053334号を参照のこと。

30

【0040】

いくつかの態様において、リンカーの一端または両末端は、カルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHSエステル)、イミドエステル、ペンタフルオロフェニエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルホナート、ビニルスルホン、EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、DCC (N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド)、SATA (アセチルチオ酢酸スクシンイミジル)、スルホ-SMCC (スルホスクシンイミジル-4-(NDマレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート)、DMA (アジブイミド酸ジメチル・2HCl)、DMP (ジメチルピメリミダート・2HCl)、DMS (スベリミド酸ジメチル・2HCl)、DTBP (ジメチル3,3'-ジチオビスプロピオンイミダート・2HCl)、スルホ-SIAB (スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SIAB (スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SBAP (スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオナート)、SIA (ヨード酢酸スクシンイミジル)、SM(PEG)<sub>n</sub> (スクシンイミジル-([Nマレイミドプロピオンアミド]-エチレングリコールエステル、式中、n = 2、4、6、8、12または24)、SMCC (スクシンイミジル-4-(N-Dマレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート)、LCSMCC (スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロアート)、スルホ-EMCS (N-

40

50

エステル)、EMCS (N-スルホ-GMBS(N-エステル)、GMBS (N-エステル)、スルホ-KMUS (N-エステル)、スルホ-MBS (m-マレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスルホスクシンイミドエステル)、MBS (m-マレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスクシンイミドエステル)、スルホ-SMPB (スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート)、SMPB (スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート)、AMAS (N-マレイミド-アセトキシスクシンイミドエステル)、BMPS (N-マレイミドプロピルオキシスクシンイミドエステル)、SMPH (スクシンイミジル6-[(マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノアート])、PEG12-SPDP (2-ピリジルジチオール-テトラオキサオクタトリアコンタン-N-ヒドロキシスクシンイミド)、PEG4-SPDP、スルホ-LCSPDP (スルホスクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SPDP (3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸スクシンイミジル)、LC-SPDP (スクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SMPT (4-スクシンイミジルオキシカルボニル-メチル(2-ピリジルジチオ)トルエン)、DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル)、BS(PEG)5 (ビス(スクシンイミジル)ペンタ(エチレングリコール))、BS(PEG)9 (ビス(スクシンイミジル)ノナ(エチレングリコール))、BS3 (スベリン酸ビス[スルホスクシンイミジル])、BSOCOES (ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン)、PDPH (3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド)、DSG (グルタル酸ジスクシンイミジル)、DSP (ジチオビス[プロピオン酸スクシンイミジル])、BM(PEG)n (1,8-ビスマレイミド-エチレングリコール、n = 2または3)、BMB (1,4-ビスマレイミドブタン)、BMDB (1,4-ビスマレイミド-2,3-ジヒドロキシブタン)、BMH (ビスマレイミドヘキサノ)、BMOE (ビスマレイミドエタン)、DTME (ジチオビスマレイミドエタン)、TMEA (トリス(2-マレイミドエチル)アミン)、DSS (スベリン酸ジスクシンイミジル)、DST (酒石酸ジスクシンイミジル)、DTSSP (3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオナート])、EGS (エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシナート])、スルホ-EGS (エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシナート])、TSAT (トリス-スクシンイミジルアミノトリアセタート)、DFDNB (1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)、またはそれらの組み合わせの官能基を含む。

#### 【0041】

本開示によれば、ペプチドは、ターゲッティング配列、タグ、標識残基、および/またはペプチドの半減期もしくは安定性を増加させるという特定の目的のために設計された追加のアミノ酸配列を含有することができる。さらに、本開示のペプチドは、エフェクター、薬物、プロドラッグ、毒素、ペプチド、および/または送達分子などのカップリングパートナーへコンジュゲートすることができる。いくつかの態様において、本開示のペプチドは、RNA、DNA、または抗体などのカップリングパートナーへコンジュゲートすることができる。Shoari et al., *Pharmaceutics* 13:1391, pp. 1-32 (2021)を参照のこと。

#### 【0042】

いくつかの態様において、本明細書に開示されるペプチドのインビボ半減期を延長する、安定性を増加させる、かつ/またはクリアランスを減少させるために、ペプチドは、担体タンパク質へのコンジュゲーション、リガンドへのコンジュゲーション、抗体へのコンジュゲーション、PEG化、ポリシアリル化、HES化、組み換えPEG模倣物、ナノ粒子付着、ナノ粒子封入、コレステロール融合、鉄融合、アシル化、アミド化、グリコシル化、側鎖酸化、リン酸化、ビオチン化、マイクロスフェアもしくはマイクロスフェアポリマー薬物送達システム、または表面活性物質、アミノ酸模倣物、もしくは非天然アミノ酸の付加によって修飾することができるが、これらに限定されない。

#### 【0043】

本開示によれば、ペプチドは、薬学的に許容される塩の形態で調製することができる。具体的には、塩は、それへ酸を付加することによって形成することができる。例えば、塩は、以下の物質をペプチドへ付加することによって形成することができる：無機酸(例え

ば、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸など)、有機カルボン酸(例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸などのハロ酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、サリチル酸)、酸性糖(グルクロン酸、ガラクトロン酸、グルコン酸、アスコルビン酸)、酸性多糖(例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、アルギン酸)、コンドロイチン硫酸などのスルホン酸糖エステルを含む有機スルホン酸(例えば、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸)など。

【0044】

本明細書に開示されるポリペプチドまたはコンジュゲートおよび薬学的に許容される担体を含む、組成物、例えば薬学的組成物を、本明細書にさらに開示する。

【0045】

本開示によれば、ペプチドまたはコンジュゲートはヒトのために使用することができる。しかし、ペプチドまたはコンジュゲートは、例えば炎症性疾患または癌が生じる、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ラクダ、アンテロープなどの家畜、またはイヌもしくはネコなどのペットへ投与することができる。

【0046】

本開示に従う癌を予防または処置するための組成物を投与するための投与経路および様式は、特に限定されない。組成物が標的部位に達することができる限り、任意の投与経路および様式を使用することができる。具体的には、組成物は、様々な経路を介して、即ち、経口的にまたは非経口的に投与することができる。投与経路の非限定的な例としては、眼、経口、直腸、局所、静脈内、腹腔内、筋内、動脈内、経皮、鼻、または吸入経路が挙げられ得る。さらに、組成物は、活性物質を標的細胞へ動かすことができる任意のデバイスを使用して投与することができる。いくつかの態様において、組成物は皮下または静脈内投与に適した投薬形態である。いくつかの態様において、組成物は凍結乾燥またはカプセル化形態である。

【0047】

本開示によれば、薬学的組成物は、薬学的組成物の調製において一般的に使用される薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤をさらに含むことができる。担体は天然ではない担体を含み得る。

【0048】

本開示によれば、用語「薬学的に許容される」は、組成物へ曝露される細胞またはヒトに有害でない特徴を示すことを意味する。

【0049】

薬学的組成物は、従来の方から従って、経口投薬形態、例えば、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エアロゾル剤など、外用剤、坐剤、および滅菌注射剤の形態で製剤化され得る。意図された疾患または癌の予防または処置のために使用される限り、任意の製剤を使用することができる。従って、本開示はそれらに限定されない。

【0050】

薬学的組成物中に含有され得る担体、賦形剤および希釈剤としては、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、デンプン、アカシアゴム、アルギナート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾアート、プロピルヒドロキシベンゾアート、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリカプロラクトン(PCL)、ポリ乳酸(PLA)、ポリ-L-乳酸(PLLA)、鉱油などが挙げられ得る。

【0051】

製剤は、一般的に使用される、希釈剤または賦形剤、例えば、充填剤、増量剤、コンジュゲーション剤、湿潤剤、崩壊剤、および界面活性剤を使用して調製することができる。

【0052】

10

20

30

40

50

経口投与用の固体調製物としては、錠剤、丸剤、散剤、課粒剤、カプセル剤などが挙げられる。そのような固体調製物は、組成物と、デンプン、炭酸カルシウム、スクロースまたはラクトース、およびゼラチンなどの少なくとも1つの賦形剤とを混合することによって調製することができる。さらに、単純な賦形剤に加えて、ステアリン酸マグネシウムおよびタルクなどの滑沢剤を使用することができる。

【0053】

経口投与用の液体調製物としては、懸濁剤、液体溶液、乳剤、シロップ剤などが挙げられる。一般的に使用される単純な希釈剤である、水および流動パラフィンに加えて、様々な賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが、液体調製物中に含有される。非経口投与用の調製物としては、滅菌水溶液、非水溶媒、懸濁化剤、乳剤、凍結乾燥調製物、坐剤などが挙げられ得る。非水溶媒および懸濁化剤としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、および注射用エステル、例えばオレイン酸エチルが挙げられ得る。坐剤用の基剤として、ウイテップゾール、マクログール、ツイーン61、カカオ脂、ラウリン、グリセロゼラチンなどを使用することができる。

10

【0054】

本開示の組成物は、上記の成分に加えて、滑沢剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁化剤、保存剤などをさらに含むことができる。好適な薬学的に許容される担体および製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)に詳細に記載されている。本開示の組成物は、単位用量形態で調製されるかまたは複数回用量容器中への導入によって調製されるために、当業者によって容易に行うことができる方法に従って、薬理的に許容される担体および/または賦形剤を使用することによって製剤化される。この場合、製剤はまた、油もしくは水性媒体中の液剤、懸濁剤、もしくは乳剤の形態、または賦形剤、散剤、顆粒剤、錠剤もしくはカプセル剤の形態であり得、分散剤または安定剤をさらに含むことができる。本明細書において使用される用語「投与」は、本開示の所定の組成物を任意の好適な方法によって対象へ提供することを意味する。

20

【0055】

本開示の組成物は、非経口的に、皮下注入によって、または皮膚を通しての局所投与(経皮投与)によって投与することができるが、それらに限定されない。

【0056】

薬学的組成物の好適な用量は、製剤化法、投与タイプ、患者の年齢、体重、および性別、病的状態、食物、投与時間、投与経路、排泄速度、および反応感受性などの因子によって様々に処方され得る。本開示の組成物の経口用量は、1日当たり0.1 mg/kg ~ 10 mg/kg (体重)、0.5 mg/kg ~ 1 mg/kg (体重)、またはそれらから誘導される任意の用量もしくは範囲であり得るが、それらに限定されない。加えて、腫瘍関連マクロファージを除去するためにその必要がある対象へ本開示の組成物を投与する場合、その用量は、0.01 ug/ml ~ 100 ug/ml、0.05 ug/ml ~ 100 ug/ml、0.1 ug/ml ~ 100 ug/ml、0.1 ug/ml ~ 70 ug/ml、0.1 ug/ml ~ 50 ug/ml、0.1 ug/ml ~ 40 ug/ml、0.1 ug/ml ~ 30 ug/ml、0.1 ug/ml ~ 25 ug/ml、またはそれらから誘導される任意の用量もしくは範囲であり得るが、それらに限定されない。

30

40

【0057】

本明細書において使用される用語「対象」は、サル、イヌ、ヤギ、ブタ、またはマウスなどの、全ての動物を含む、ヒトおよび非ヒトを指す。そのような対象は疾患の処置の必要があり得、様々な癌または炎症性疾患の症状が本開示のペプチドまたはその組成物を投与することによって改善され得る。

【0058】

本明細書において使用される用語「ホスホリパーゼA2(PLA2)」は、グリセロールを第2炭素位置で加水分解することによって脂肪酸を生成するように機能する酵素であり、これは、リン脂質のsn-2アシル結合を特異的に認識することによって加水分解活性を触媒し、アラキドン酸およびリゾリン脂質を放出する。PLA2は、哺乳動物組織ならびに細

50

菌、昆虫、およびヘビ毒においてさえ一般的に見られる。

【0059】

上記の目的を達成するための本開示のいくつかの局面において、Mpep-抗癌薬コンジュゲートを調製するための方法を提供し、本方法は、Mpepおよび抗癌薬を互いにコンジュゲートする工程を含む。

【0060】

その必要がある対象においてM2型マクロファージを減少させるかまたはM2型マクロファージ媒介疾患を処置する方法を開示し、本方法は、本明細書に開示されるようなポリペプチドまたはその組成物を対象へ投与する工程を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:3、4、5、7、または8のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM2型マクロファージを減少させる。いくつかの態様において、疾患は癌である。いくつかの態様において、癌は、黒色腫、前立腺癌、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、または癌微小環境中にM2型腫瘍関連マクロファージを有する他の固形腫瘍である。いくつかの態様において、癌は肝細胞癌である。いくつかの態様において、疾患は、線維症関連疾患、末期肝疾患、腎疾患、特発性肺線維症(IPF)、心不全、多くの慢性自己免疫疾患、例えば、強皮症、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、骨髄線維症および全身性エリテマトーデス、腫瘍浸潤および転移、慢性移植片拒絶および多くの進行性ミオパシーの病因、肝硬変および線維症、良性前立腺肥大症、または前立腺炎である。いくつかの態様において、疾患は肺線維症である。

【0061】

その必要がある対象においてM1型マクロファージを減少させるかまたはM1型マクロファージ媒介疾患を処置する方法をさらに開示し、本方法は、本明細書に開示されるようなポリペプチドまたはその組成物を対象へ投与する工程を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:3、4、5、7、8、または11のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM1型マクロファージを減少させる。いくつかの態様において、疾患は、敗血症性ショック、多臓器不全症候群(MODS)、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ、または自己免疫障害を含む、慢性炎症性疾患である。いくつかの態様において、疾患は、敗血症性ショックを含む、敗血症である。

【0062】

その必要がある対象においてM0型マクロファージを減少させるかまたはM0型マクロファージ媒介疾患を処置する方法をさらに開示し、本方法は、本明細書に開示されるようなポリペプチドまたはその組成物を対象へ投与する工程を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、10、または11のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較してM0型マクロファージを減少させる。

【0063】

本明細書に開示されるMpepポリペプチドは、M2、M1、および/またはM0マクロファージを選択的に標的とすることができる。本明細書において使用される場合、「選択的な」は、例えば、しかしそれらに限定されないが、少なくとも1/4倍、少なくとも1/3倍、少なくとも1/2倍、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍など、またはそれらから誘導される任意の倍もしくは範囲の、別のタイプと比べての1つまたは複数のタイプのマクロファージへの優先度またはより大きな結合もしくは親和性を意味する。

【0064】

上記の目的を達成するための本開示のいくつかの局面において、腫瘍関連マクロファージ媒介疾患の予防または処置のための薬学的組成物を提供する。

【0065】

本開示によれば、組成物は、M2型腫瘍関連マクロファージの除去による癌成長および

10

20

30

40

50

転移の予防または処置のための薬学的組成物であり得る。しかし、本開示はそれらに限定されない。

【0066】

本開示に従う用語「予防」は、本開示のコンジュゲートを使用することによって腫瘍成長および転移を阻害するかまたは遅らせる任意の作用を指す。

【0067】

本開示に従う用語「処置」は、炎症性疾患もしくは癌などの疾患の症状、腫瘍成長、および/または転移を、本明細書に開示されるペプチドを使用して減少させる、阻害する、または有利に変更する、任意の作用を指す。

【0068】

本開示によれば、用語「抗癌薬」は、化学療法薬などの、癌を処置するために使用される薬物についての総称である。抗癌薬は、化合物またはアポトーシス促進性ペプチドであり得る。しかし、本開示はそれらに限定されない。

【0069】

本開示によれば、用語「癌」は、体組織の自律的過成長に起因して異常に成長した腫瘍、または腫瘍に関連する疾患を指す。いくつかの態様において、癌は、黒色腫、前立腺癌、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、または癌微小環境中にM2型腫瘍関連マクロファージを有する他の固形腫瘍である。本開示によれば、抗癌薬は、ドキソルビシン、メトトレキサート、エンチノスタット、クラドリピン、プラトレキサート、ロルラチニブ、メイタンシンDM1、メイタンシンDM3、およびメイタンシンDM4であり得る。しかし、本開示はそれらに限定されない。

【0070】

本開示によれば、用語「プロアポトーシス」は、バイオエネルギーであるATPを細胞が能動的に消費しながら、細胞が死に至る、プロセスを指す。典型的なアポトーシスプロセスは、細胞収縮、DNAの規則的な開裂、および細胞膜の断片化を介して進行する。アポトーシスは、異常細胞分裂、放射線、紫外線放射、細菌感染またはウイルス感染に起因して細胞が正常機能を維持できない場合に誘発され得る。

【0071】

本開示によれば、アポトーシス促進性ペプチドは、dKLA、 $\alpha$ -デフェンシン-1、BMAP-28、プレベニン-2R、ブホリンIIb、セクロピンA-マガイニン2(CA-MA-2)、セクロピンA、セクロピンB、クリソフィシン-1、D-K6L9、ゴメシン、ラクトフェリシンB、LL27、LTX-315、マガイニン2、マガイニンII-ボンベシンコンジュゲート(MG2B)、パルダキシン、またはそれらの組み合わせであり得る。しかし、本開示はそれらに限定されない。

【0072】

本開示の用語「腫瘍関連マクロファージ(TAM)」は、癌成長および転移などの、全体的な腫瘍微小環境において重要な役割を果たすマクロファージを指す。腫瘍の周囲に存在する腫瘍関連マクロファージは、腫瘍細胞の増殖および転移に密接に関連している。腫瘍関連マクロファージは2つの表現型：腫瘍抑制性M1マクロファージまたは腫瘍支持性M2マクロファージに分類される。M2型腫瘍関連マクロファージは、癌成長を促進し、表面受容体を介してT細胞およびNK細胞の抗腫瘍活性を抑制する、IL-10、TGF $\beta$ 、およびCCL18などのサイトカインを生成する。これらの腫瘍関連マクロファージ(TAM)は、骨髓、卵黄嚢、または髄外造血に由来する、単球およびマクロファージから分化され得る。いくつかの態様において、TAMは骨髓から単離することができる。しかし、本開示はそれらに限定されない。

【0073】

上記の目的を達成するための本開示の他の局面において、腫瘍関連マクロファージ媒介疾患を予防または処置するための方法を提供し、本方法は、その必要がある対象へコンジュゲートまたはそれを含有する薬学的組成物を投与する工程を含む。

【0074】

10

20

30

40

50

上記の目的を達成するための本開示の他の局面において、腫瘍関連マクロファージ媒介疾患の予防または処置のためのMpep-抗癌薬コンジュゲートの使用を提供する。

【0075】

本明細書において使用される用語「治療有効量」は、炎症性疾患、癌、または腫瘍関連マクロファージ媒介疾患などの、意図された疾患を処置するために有効なMpepの量を指す。

【0076】

本開示のMpep-抗癌薬コンジュゲートは、M2型腫瘍関連マクロファージ(TAM)を標的とする抗癌物質であり、M2型腫瘍関連マクロファージ(TAM)を選択的に選択する優れた効果を有する。従って、Mpepと抗癌薬とのコンジュゲーション方法は、M2型腫瘍関連マクロファージを標的とする薬物の送達のために使用することができる。

10

【0077】

本開示の腫瘍関連マクロファージ媒介疾患を予防または処置するための方法、特に、肺癌または炎症性疾患を予防または処置するための方法は、Mpepを投与することによって、症状の発現前に疾患自体を処置することだけでなく、その症状を抑制または回避することも含む。疾患の管理において、具体的な活性成分の予防的または治療的用量は、疾患または状態の性質または重症度、および活性成分が投与される経路に依存して、変動するだろう。その用量は、1日当たり0.1 mg/kg ~ 10 mg/kg (体重)、1日当たり0.2 mg/kg ~ 8 mg/kg (体重)、1日当たり0.3 mg/kg ~ 5 mg/kg (体重)、1日当たり0.4 mg/kg ~ 3 mg/kg (体重)、1日当たり0.5 mg/kg ~ 1 mg/kg (体重)、またはそれらから誘導される任意の用量もしくは範囲であり得るが、それらに限定されない。本開示の組成物の経口用量は、1日当たり0.1 mg/kg ~ 10 mg/kg (体重)、1日当たり0.1 mg/kg ~ 10 mg/kg (体重)、1日当たり0.2 mg/kg ~ 8 mg/kg (体重)、1日当たり0.3 mg/kg ~ 5 mg/kg (体重)、1日当たり0.4 mg/kg ~ 3 mg/kg (体重)、1日当たり0.5 mg/kg ~ 1 mg/kg (体重)、またはそれらから誘導される任意の用量もしくは範囲であり得るが、それらに限定されない。加えて、腫瘍関連マクロファージを除去するためにその必要がある対象へ本開示の組成物を投与する場合、その用量は、0.01 ug/ml ~ 100 ug/ml、0.05 ug/ml ~ 100 ug/ml、0.1 ug/ml ~ 100 ug/ml、0.2 ug/ml ~ 70 ug/ml、0.3 ug/ml ~ 50 ug/ml、0.4 ug/ml ~ 40 ug/ml、0.5 ug/ml ~ 30 ug/ml、0.6 ug/ml ~ 25 ug/ml、またはそれらから誘導される任意の用量もしくは範囲であり得るが、それらに限定されない。

20

30

【0078】

投与は1日1回または数回行うことができる。しかし、その用量および投薬頻度は、個々の患者の年齢、体重および応答に依存して変動し、好適な投薬量は、そのような因子を自然に考慮する当業者によって容易に選択され得る。

【実施例】

【0079】

本明細書以下において、本開示のよりよい理解のために例示的な態様を提供する。しかし、以下の例示的な態様は本開示のより容易な理解のためにのみ提供されるが、本開示の内容は以下の例示的な態様に限定されない。

40

【0080】

実施例1. 材料および方法

1-1. ペプチド合成。

保護アミノ酸および2-(6-クロロ-1Hベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスファート(HCTU)を、AAPPTec (Louisville, KY) およびAnaSpec (Fremont, CA)から購入した。標準Fmoc固相ペプチド合成化学に従って、ペプチド合成を自動PS3ペプチド合成装置(Protein Technologies, Phoenix, AZ)において行った。必要に応じて、DMF中0.4 M N-メチルモルホリン中に溶解されたアミノ酸およびHCTUの溶液における3時間のインキュベーションによって、アミノ酸を手動でカップリングした。カップリング反応をカイザーテストによって完了について確認

50

した。Fmoc保護基を、DMF中20% (v/v)ピペリジン中で2回の30分間インキュベーションによって除去した。ペプチドを、無水酢酸/トリエチルアミン/DCM (1:1:5 v/v/v)中で2時間、N末端でアセチル化した。ペプチドを、TFA (トリフルオロ酢酸) / TIPS (トリイソプロピルシラン) / EDT (1,2-エタンジチオール) / DMB (1,3-ジメトキシベンゼン(90:2.5:2.5:5 v/v/v/v)中で2.5時間、開裂した。システイン含有ペプチドについてのみEDTを開裂溶液中に含めた。開裂されたペプチドを、冷エーテル中に2回沈殿させ、移動相AとしてのH<sub>2</sub>O (0.1% TFA)および移動相BとしてのACN (0.1% TFA)中で、Phenomenex Fusion-RP C18半分取カラム(Torrance, CA)を使用して、RP-HPLC (Agilent 1200, Santa Clara, CA)によって精製した。ペプチドを、次いで、HyperSep<sup>TM</sup> C18カートリッジを使用して脱塩し、RP-HPLCで純度について確認した。精製されたペプチドの分子量を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS、Bruker Daltonics, Billerica, MA)によって確認した。

10

## 【0081】

以下のペプチドを上述の方法に従って合成した。

TAMpep: 全長メリチン(SEQ ID NO:1);

Mpep: 最初の7個のアミノ酸が除去されている全長メリチン(SEQ ID NO:2);

TAMpepK:

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

20

へ結合されている、リンカー(GGGGS)(SEQ ID NO:36)へ結合された全長メリチンペプチド(SEQ ID NO:1); および

MpepK:

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-

Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

へ結合されている、リンカー(GGGGS)(SEQ ID NO:36)へ結合されたMpep (SEQ ID NO:2)。

30

## 【0082】

1-2. 細胞。

THP-1細胞をAmerican Type Culture Collection (ATCC)から購入し、これらを、非熱処理10%ウシ胎仔血清(FBS; WeIGENE)、2 mM L-グルタミン、0.05 mM β-メルカプトエタノール、10 mM HEPES、4500 mg/Lグルコース、100 U/mlペニシリン、および100 μg/mlストレプトマイシン(Gibco)が補われたRPMI 1640培地を使用して、具体的な指示に従って培養した。B16F10マウス黒色腫細胞をATCCから購入し、10% FBS (WeIGENE)およびペニシリン/ストレプトマイシン(100 U/ml; Gibco)が補われたダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; WeIGENE)中で増殖させた。Sk-Mel-28ヒト黒色腫細胞(ATCC製)を、10% FBS (WeIGENE)、および100 U/mlペニシリンおよび100 μg/mlストレプトマイシン(Gibco)を含有する、RPMI-1640培地中で増殖させかつ維持した。マウス前立腺癌細胞(TRAMP-C2)をAmerican Type Culture Collection (ATCC)から得、これらを、ペニシリンおよびストレプトマイシン(Gibco)を含有しかつ10% FBS (WeIGENE)が補われたダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; WeIGENE)中で培養した。American Type Culture Collection (ATCC)から得られた、ヒト前立腺癌細胞株(PC3)を、加湿5% CO<sub>2</sub>雰囲気中37 °Cで、2.05 mMのL-グルタミン、2 g/リットルの重炭酸ナトリウムおよび2 g/リットルのグルコース(WeIGENE)を10% FBS (WeIGENE)、100 U/mlペニシリン、および100 μg/mlストレプトマイシン(Gibco)と一緒に含有するRPMI 1640培地中で培養した。

40

## 【0083】

50

### 1-3 . 動物研究。

BALB/cおよびC57BL/6 (B6)野生型マウスをDBLから購入した。黒色腫および前立腺癌の皮下腫瘍モデルについて、CT26 ( $3 \times 10^5$ 細胞/マウス)、B16F10 ( $1 \times 10^6$ 細胞/マウス)、およびTRAMP-C2細胞( $1 \times 10^6$ 細胞/マウス)を、Matrigelマトリクス(Corning)と混合し、マウスの右側腹部へ皮下接種し、かつ4T1 ( $1 \times 10^5$ 細胞/マウス)細胞をMatrigelマトリクスと混合し、マウスの第4乳房脂肪体へ接種した。TAMpepKおよびMpepKペプチド(200 nmol/kg)を、腫瘍接種後7日目に開始して、3日毎に腹腔内注射し、腫瘍体積を電子キャリパーによって測定した。全ての腫瘍組織を、研究の終了後に採取し、腫瘍重量を電子天秤によって測定した。

#### 【0084】

肺線維症マウスモデルについて、C57BL/6 (B6)野生型マウスを2.5%イソフルランで軽度に麻酔し、これに、マイクロピペットを使用する口腔咽頭吸引(OA)によってプレオマイシン(BLM、2 mg/kg)を投与した。14日後、マウスに一日おきにMpepK (200 nmol/kg)を腹腔内注射した。動物研究はInstitutional Animal Care and Use Committee of Kyung Hee Universityによって承認された(黒色腫についてKHUASP(SE)-20-530および前立腺癌について20-382)。全ての動物を、食料および水へのフリーアクセスで12時間明/暗サイクルにおいて、特定病原体除去環境に維持した。ネスティングシートをエンリッチメントのために使用した。実験終了後、全てのマウスを、イソフルランおよび頸椎脱臼を使用して安楽死させた。

#### 【0085】

### 1-4 . マクロファージ分化。

100 nMホルボール12-ミリストート13-アセタート(PMA、Sigma)と共に24時間インキュベーションし、続いて、RPMI培地(Invitrogen)中で24時間インキュベーションすることによって、THP-1単球をマクロファージへ分化させた。20 ng/mlのIFN- $\gamma$  (Prospec)および100ng/mlのLPS (Sigma)と共にインキュベーションすることによって、マクロファージをM1マクロファージ(M1)に極性化させた。20 ng/mlのインターロイキン(IL) 4 (Prospec)および20 ng/mlのインターロイキン13 (Prospec)と共にインキュベーションすることによって、マクロファージM2極性化(M2)を得た。PC3細胞の20%馴化培地と共にインキュベーションすることによって、M2様腫瘍関連マクロファージを極性化させた。

#### 【0086】

### 1-5 . 馴化培地の調製。

腫瘍馴化培地(TCM)を得るために、PC3細胞を24ウェルプレート(Corning Inc)中の培養培地中に $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルで播種した。24時間後、培地を無血清RPMI1640培地へ交換し、細胞を24時間インキュベートした。マクロファージの馴化培地について、THP-1細胞を、24ウェルプレート(Corning Inc)における培養培地中に $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルで播種し、100 nMのPMAと共に24時間インキュベートした。細胞を、M0、M1、およびM2マクロファージまたはTAMマクロファージへTCMによって極性化させ、無血清RPMI1640培地へ交換した。24時間後、培地を無血清RPMI1640培地へ交換し、細胞を24時間インキュベートした。上澄みを採取し、シリンジフィルター(0.2  $\mu$ m、Milipore)で浄化した。PC3細胞の上澄みを腫瘍馴化培地(TCM)と名付けた。

#### 【0087】

### 1-6 . フローサイトメトリー分析。

THP-1細胞を、100 nMのPMAと共に24時間インキュベーションすることによってマクロファージへ分化させ、20 ng/mlのIL-4および20 ng/mlのIL-13と共に72時間のインキュベーションすることによってM2マクロファージに極性化させた。極性化された細胞を、FITCとコンジュゲートされた50 nM TAMpepおよびTAMpepの断片またはMpepおよびMpepのアラニンライブラリーで1時間処理した。黒色腫組織におけるマクロファージ集団の変化を試験するために、DNアーゼI (1 U/mL)およびコラゲナーゼD (1 mg/ml)による解離後に、40  $\mu$ mナイロンメッシュストレーナーによって単一細胞を

10

20

30

40

50

腫瘍組織から単離した。細胞をBD FACSCaliburおよびBD FACSCantoII機器上において検出し、FlowJoソフトウェアによって分析した。

【0088】

#### 1-7. 細胞生存性試験。

THP-1細胞を、100 nMのPMAと共に24時間インキュベーションすることによってマクロファージへ分化させ、20 ng/mlのIL-4および20 ng/mlのIL-13と共に72時間のインキュベーションすることによってM2マクロファージに極性化させた。極性化された細胞を、漸増濃度のTAMpepおよびTAMpepの断片(0.05~20 μM)で24時間処理した。CCK-8アッセイを使用して細胞生存性を分析した：CCK-8試薬(Enzo Life Sciences)を各ウェルへ添加し；インキュベーションを2時間継続し、吸光度をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で450 nmにて測定した。

10

【0089】

#### 1-8. 溶血活性アッセイ。

マウス血液サンプルを、抗凝血薬としてのヘパリンを含有するチューブ中に採取し、使用前は4℃で保存した。全血サンプルを1,500 × gで5分間遠心分離し、結果として生じた血漿分画をサンプルから除去した。ペレットを、反転によって混合して、等体積の食塩水で洗浄した。遠心分離および洗浄工程を5回繰り返した。赤血球を血球計によってカウントし、 $-5 \times 10^7$ 細胞/mLへ調節した。赤血球を次いで1% Triton X-100 (陽性対照)中で、PBS (ブランク)中で、または漸増濃度のTAMpepおよびMpep (0.1~50 μM)と共に、37℃で1時間インキュベートし、評価した。サンプルを次いで10,000 gで5分間遠心分離し、上澄みをペレットから分離し、その吸光度を570 nmで測定した。1% Triton X-100で処理された懸濁液のそれと比較した相対的光学密度を、溶血のパーセンテージとして定義した。

20

【0090】

#### 1-9. ELISAアッセイ。

ヒトマクロファージの極性化を試験するために、THP-1細胞を24ウェルプレート(Corning Inc)中の培養培地中に $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルで播種し、100 nMのPMAと共に24時間インキュベートした。20 ng/mlのIFN- $\gamma$  および100 ng/mlのLPSと共にインキュベーションすることによってM1マクロファージに、20 ng/mlのIL-4および20 ng/mlのIL-13と共にインキュベーションすることによってM2マクロファージに、マクロファージを極性化させた。分化後、マクロファージの上澄みを採取した。IL-10およびTGFBなどのM2マクロファージのマーカーならびにIL-12およびCXCL10などのM1マクロファージのマーカーを、製造業者の説明書(BD Biosciences Inc.)に従ってELISAキットによって測定した。

30

【0091】

#### 1-10. 免疫蛍光アッセイ。

THP-1細胞を24ウェルプレート中のカバーガラス上に播種し、M0、M1、およびM2マクロファージへ分化させた。細胞を1 μM TAMpepKおよびMpepKで1時間処理し、ペプチドの除去後に24時間インキュベートした。細胞を洗浄し、 $-20^\circ\text{C}$ にて10分間4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1%正常ヤギ血清で1時間ブロッキングした。カバーガラスを次いで抗-カスパーゼ-3抗体(1:50、ウサギポリクローナル、Abcam)と共に4℃で一晩インキュベートし、次いで洗浄し、37℃にて1時間、Alexa 594標識ヤギ抗-ウサギIgG (1:500、Invitrogen)で染色した。核を可視化するために、カバーガラスを、DAPIを含むVectashield封入剤(Vector Laboratories)中に封入した。蛍光顕微鏡(Leica)によって画像を撮影した。

40

【0092】

#### 1-11. リアルタイム定量的PCR。

Easy-Blue試薬を使用して全RNAを抽出した。分光光度計で260および280 nmでの吸光度を測定することによってRNAの濃度を決定および定量化した。Maxime RT Pre Mixキット(iNtRON)を使用して相補的DNA(cDNA)を全RNAから合成した。SYBR Gre

50

en Master Mixを用いてリアルタイムPCR分析を行った。PCR条件は、95 °Cで5分間、続いて95 °Cで10秒間、60 °Cで10秒間、および72 °Cで10秒間を45サイクルであった。mRNA発現をトリプレケートで定量化した。データをCFXソフトウェア(Bio-Rad)で測定した。GAPDHおよび  $\beta$ -アクチンを内部標準として使用した。

【0093】

1-12. ウェスタンブロット分析。

細胞を採取し、PRO-PREPタンパク質抽出溶液(iNtRON, Bio Inc, Sunngnam, Korea)中に溶解した。タンパク質濃度をBradford Protein Assay Reagentキット(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)で測定した。タンパク質を10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって分画し、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜上へ移した。これらを一次抗体としての抗-アルギナーゼ1、抗-CD206、抗-カスパーゼ3、抗-E-カドヘリン、抗-フィブロネクチン、抗-PCNA、抗-TGF- $\beta$ 、抗-MMP9、および抗- $\beta$ -アクチンAbと共にインキュベートした。ヤギ抗-ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート化IgGまたはヤギ抗-マウス西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート化IgG(Abcam, Cambridge, MA, USA)を二次抗体として役立てた。タンパク質バンドを化学発光試薬キット(SurModics)で検出した。

10

【0094】

1-13. 創傷治癒アッセイ。

前立腺癌および黒色腫細胞の遊走を創傷治癒アッセイで評価した。PC3およびSk-Mel-28細胞を24ウェルプレート中に $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルで播種し、10% FBSを含むRPMI 1640中に培養した。細胞がコンフルエンスに達したとき、滅菌マイクロピペットの先端で、ウェルの表面全体をこすることによって、それらを傷つけた。細胞を直ちに洗浄し、無血清培地、またはTAMpepKもしくはMpepK有りもしくは無しのM0、M1、M2、およびM-TCMの20% 馴化培地でウェルを満たし、24時間インキュベートした。インキュベーション前および後に、各サンプルの創傷領域の少なくとも5つの異なる視野を、倒立顕微鏡(Olympus)を使用して撮影した。創傷領域をImageJソフトウェア(NCI, Bethesda, MD, USA)で測定した。細胞遊走によって満たされた各創傷領域のパーセントを以下のように計算した： $(\text{平均創傷幅} - \text{平均残存幅}) / \text{平均創傷幅} \times 100$ 。

20

【0095】

1-14. 浸潤アッセイ。

マクロファージの馴化培地で処理された前立腺癌細胞の浸潤性を、少し変更を加えて浸潤アッセイ(Corning Inc.)についての製造業者の説明書に従って試験した。簡潔には、37 °Cで2時間、Matrigel (200 ~ 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )でプレコーティングされたポリカーボネート8- $\mu\text{m}$ 細孔膜インサート(Corning Inc.)が装着された24ウェルプレートを使用して、浸潤性を評価した。下側のウェルには350  $\mu\text{L}$ の無血清RPMI 1640培地または20% 馴化培地(TAMpepKまたはMpepK有りまたは無しでのM0、M1、M2、およびM-TCMの馴化培地)を充填した。上側のウェルには無血清培地中の200  $\mu\text{L}$  PC3細胞( $5 \times 10^4$ 細胞/ウェル)を充填した。プレートを24時間インキュベートした。細胞を次いでメタノール中で固定し、Giemsaで染色した。1つの膜当たり5つの無作為に選択された視野を光学顕微鏡(Olympus)下でカウントした。馴化培地無しの対照と比較しての馴化培地に応答して遊走した細胞の数から、浸潤指数を計算した。

30

40

【0096】

1-15. H&E染色。

肺線維症マウスモデルの肺組織を、10%中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィン中に包埋した。パラフィン包埋組織サンプルを5  $\mu\text{m}$ スライスに切断し、次いで脱パラフィンし、肺組織の線維化の程度を調べるためにH&Eで染色した。標準光学顕微鏡法(Olympus)を使用して、切片を無作為に調べて評価した。

【0097】

実施例2. 結果

2-1. THP-1由来マクロファージの極性化。

50

M1またはM2マクロファージへ極性化するために、THP-1細胞をM0マクロファージのためにPMAで処理し、次いでM1マクロファージのためにLPSおよびIFN- $\gamma$ と共に、M2マクロファージのためにIL-4およびIL-13と共にインキュベートした。マクロファージの極性化を、IL-12、CXCL10、およびCD86などの、M1のマーカー、ならびにIL-10、TGF- $\beta$ 、アルギナーゼ1、およびCD206などの、M2のマーカーによって評価した。LPSおよびIFN- $\gamma$ で処理されたマクロファージは、M1マーカーの増加を示し(図1D、1E、および1F)、IL-4およびIL-13で処理されたマクロファージは、M0と比較してM2マーカーの増加を示した(図1A、1B、1C、および1F)。

【0098】

従って、極性化されたマクロファージは、M2マクロファージを標的とするTAMpepKまたはMpepKの機能を評価するさらなる研究のために使用することができた。

【0099】

2-2. THP-1由来M2マクロファージにおけるTAMpep断片の親和性。

M2マクロファージへ結合するTAMpepの主要アミノ部位を決定するために、THP-1由来M2マクロファージにおいて、FITCとコンジュゲートされたTAMpepおよびTAMpepの断片(アミノ酸配列、図2A)を使用することによって、親和性試験を行った。TAMpep(26個のアミノ酸を含む)は90%超の高い親和性を示し、Mpep(C末端から7個のアミノ酸が除去されている)は、M2マクロファージにおいて45%超の2番目に高い親和性を示した。他方で、TAMpepの断片(C末端から10個超のアミノ酸またはN末端から4個超のアミノ酸が除去されている)は、26個のアミノ酸のスクランブル化ペプチドと比較して、低い親和性を示した(図2Bおよび2C)。従って、これらの結果は、N末端の4~6個のアミノ酸がM2マクロファージへのTAMpepの親和性において重要な役割を果たすためのアミノ部位であることを示唆した。

【0100】

2-3. THP-1由来M2マクロファージにおけるTAMpep断片の細胞傷害性。

26個のアミノ酸のTAMpepは細胞傷害性を有し、薬物担体として使用される場合、正常な細胞または組織に対して副作用を引き起こし得る。従って、M2マクロファージに対して高い親和性および低い細胞傷害性の特徴を有する新しい配列ペプチドが必要とされた。様々なTAMpep断片を、THP-1由来M2マクロファージにおいて細胞傷害性アッセイで試験した。TAMpepは、 $0.815 \mu\text{M}$  IC<sub>50</sub>の高い細胞傷害値を示し、一方、他のペプチド断片は、M2マクロファージにおいて細胞傷害効果を示さなかった(図3A~3C)。特に、Mpepは、M2マクロファージにおいて高い親和性および低い細胞傷害性を示し、従って、最適な薬物担体になることが期待された。

【0101】

2-4. TAMpepおよびMpepの溶血。

溶血作用は重篤な副作用を引き起こし得、薬物の投薬量を制限する因子の1つである。TAMpepおよびMpepの溶血を決定するために、マウスRBCにおいて漸増濃度( $0.1 \sim 50 \mu\text{M}$ )でペプチドを処理した。TAMpepはIC<sub>50</sub>で $6.669 \mu\text{M}$ を示し、一方、MpepはIC<sub>50</sub>で $50 \mu\text{M}$ を示した(図4Aおよび4B)。加えて、dKLAへコンジュゲートされたTAMpepおよびMpepは、それぞれ、IC<sub>50</sub>で $1.122 \mu\text{M}$ および $50 \mu\text{M}$ を示した(図4Cおよび4D)。従って、Mpepは、より少ない副作用を有する安全な薬物として開発することができる。

【0102】

2-5. THP-1由来マクロファージにおけるTAMpepおよびMpepの親和性。

TAMpepおよびMpepがマクロファージのサブタイプの中でM2マクロファージへより特異的に付着するかどうかを比較するために、FITCとコンジュゲートされたペプチドを、THP-1細胞から極性化されたM0、M1、およびM2マクロファージで処理し、FACsによって分析した。TAMpepおよびMpepは両方とも、M0およびM1マクロファージと比較してM2マクロファージにおいて有意により高い親和性を示した(図5Aおよび5B)。さらに、TAMpepは、免疫蛍光顕微鏡法によってM2マクロファージにおける高い親和性を

10

20

30

40

50

示した(図5C)。

【0103】

2-6. THP-1由来マクロファージにおけるTAMpepKおよびMpepKの細胞傷害性。

dKLAへコンジュゲートされたTAMpepKおよびMpepKが選択的アポトーシスを誘発するかどうかを評価するために、M2マクロファージを漸増濃度のTAMpepKまたはMpepK(0.01~10 $\mu$ M)で処理した。結果として、TAMpepKおよびMpepKは、M0およびM1マクロファージと比較してM2マクロファージにおいてアポトーシスを誘発した(図6Aおよび6B)。さらに、アポトーシスと関連する、カスパーゼ-3の発現が、他のサブタイプマクロファージと比較してM2マクロファージ中で増加した(図6Cおよび6D)。

【0104】

2-7. THP-1由来マクロファージにおけるアラニンライブラリーによるMpepKの親和性。

M2マクロファージにおけるMpepKの接着能力において重要な鍵となるアミノ酸配列を見つけるために、MpepKのアラニン置換ライブラリーを使用した。M2マクロファージにおいて、3番目のT(スレオニン)、6番目のL(ロイシン)、9番目のL(ロイシン)、12番目のW(トリプトファン)、13番目のI(イソロイシン)、16番目のK(リジン)および17番目のR(アルギニン)においてアラニンを代わりに用いた場合、ペプチドの親和性は減少した。加えて、6番目のL(ロイシン)~9番目のL(ロイシン)、ならびに3番目のT(スレオニン)、15番目のK(リジン)、16番目のR(アルギニン)、17番目のK(リジン)、および19番目のQ(グルタミン)が置換されたペプチド(A13~16およびA05)において、ペプチドの親和性は低下した。他方で、2番目のL(ロイシン)および11番目のS(セリン)が置換されたペプチド(A9およびA18)は、M2マクロファージにおいて増加した親和性を示した(図7A~7E)。

【0105】

2-8. M2マクロファージおよびヒト黒色腫細胞におけるTAMpepKの細胞傷害性。

TAMpepKが黒色腫細胞と比べてM2マクロファージに対してより多くのアポトーシスおよび結合を誘発するかどうかを決定するために、THP-1由来M2マクロファージおよびSk-Mel-28細胞をTAMpepK(図8A)またはTAMpepK(図8C)で処理した。TAMpepKは、黒色腫細胞(IC50: 3.583 $\mu$ M)と比較して、M2マクロファージにおいて低いIC50値(1.055 $\mu$ M)を示し、カスパーゼ-3の発現も、黒色腫細胞と比較して、M2マクロファージにおいて増加した(図8C)。従って、これらの知見は、TAMpepKは選択的にM2マクロファージへ結合してアポトーシスを誘発することを示唆している。

【0106】

2-9. TAMpepKで処理されたM2マクロファージの馴化培地による黒色腫細胞における増殖および遊走。

M2マクロファージによって誘発された黒色腫細胞の増殖および遊走を、TAMpepKが阻害するかどうかを試験するために、TAMpepK(1 $\mu$ M)で前処理されなかったまたは前処理されたM0、M1、およびM2マクロファージの馴化培地、ならびに黒色腫細胞において処理された馴化培地を調製した。黒色腫細胞の増殖は、M2マクロファージの馴化培地によって増加し、一方、TAMpepKで前処理されたM2マクロファージの馴化培地中では阻害された(図9A)。さらに、TAMpepKで前処理されたM2マクロファージの馴化培地は黒色腫細胞の遊走を阻害したが、遊走はM2マクロファージの馴化培地によって増加した(図9Bおよび9C)。従って、TAMpepKは、M2マクロファージのアポトーシスを誘発することによって黒色腫細胞の増殖および遊走を阻害する。

【0107】

2-10. 黒色腫のマウスモデルにおけるTAMpepKの抗癌効果。

インビボでのTAMpepKの抗癌効果を評価するために、マウス黒色腫細胞(B16F10細胞株)をC57BL6Jマウスの右側腹部に皮下注射し、1週間後、TAMpepKを3日毎に腹腔内注射した。TAMpepKで処置されたマウスは、PBS群と比較して有意に減少した腫瘍体積および重量を示した(図10A、10C、および10D)。他方で、マウスの体重は、PBS群およびTAMpepK群の間で有意に変化しなかった(図10B)。

10

20

30

40

50

## 【0108】

2-11．黒色腫のマウスモデルにおけるM2様TAMを標的とするTAMpepKの効果。

TAMpepKが黒色腫のマウスモデルにおけるM2様TAMを減少させるかどうかを決定するために、マクロファージを腫瘍組織から単離し、FACSによって分析した。M2様TAM(F4.80+およびCD206+細胞)は、PBS群と比較してTAMpepK群において有意に減少した。しかし、M1様TAM(F4/80+およびCD86+細胞)は、PBS群およびTAMpepK群の間で変化しなかった(図11Aおよび11B)。さらに、M1/M2比率によって腫瘍微小環境の変化を分析した。TAMpepK群は、PBS群と比較して、M2マクロファージを減少させることによってM1マクロファージの割合を増加させた(図11C)。従って、これらの知見は、TAMpepKが、黒色腫モデルにおいてM2様TAMを標的とすることによって抗癌効果を有することを示唆している。

10

## 【0109】

2-12．黒色腫のマウスモデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果。

TAMpepKの抗癌効果は上記の結果に示した。この研究は、黒色腫モデルにおけるMpepKの抗癌効果を決定するために行った。腫瘍の写真を図12Aに示す。腫瘍体積(図12C)および重量(図12B)はTAMpepK群およびMpepK群の両方において減少し、生存率(図12D)はPBS群と比較してMpepK群において延長された。

## 【0110】

2-13．黒色腫のマウスモデルにおけるM2様TAMを標的とするTAMpepKおよびMpepKの効果。

20

MpepKが黒色腫中の腫瘍微小環境の変化を誘発するかどうかを決定するために、マクロファージのM1/M2比率およびCD8疲弊をFACSによって分析した。M2様TAM(F4.80+およびCD206+細胞)は、PBS群と比較してTAMpepKおよびMpepK群において減少した。しかし、M1様TAM(F4/80+およびCD86+細胞)は全ての群において変化を示さなかった(図13Aおよび13B)。M1/M2比率は、PBS群と比較してTAMpepKおよびMpepK群において有意に増加した(図13C)。加えて、CD8+ T細胞中の、PD-1およびLAG3などの疲弊マーカーは、PBS群と比較してTAMpepKおよびMpepK群において有意に減少した(図13Dおよび13E)。従って、これらの知見は、MpepKが、黒色腫モデルにおいてM2様TAMを標的とすることによって抗癌効果を有することを示唆している。

## 【0111】

30

2-14．前立腺腫瘍細胞の馴化培地(TCM)によるTHP-1由来M2マクロファージの分化。

前立腺癌細胞の馴化培地(TCM)によるM2マクロファージの極性を決定するために、THP-1由来マクロファージをTCMと共にインキュベートした。TCM処理(TCM-treat)マクロファージは、M0マクロファージと比較して、アルギナーゼ1、CD206およびCD163などのM2マーカーのmRNA発現の増加を示し、NOS2およびCCR7などのM1マーカーのmRNA発現の減少を示した(図14Aおよび14B)。従って、この研究は、前立腺癌の腫瘍微小環境におけるM2様TAMへの極性の誘発を示した。

## 【0112】

2-15．M2マクロファージの馴化培地による前立腺癌細胞の増殖および遊走。

図15A～15Cに示されるように、癌細胞の増殖および遊走がTHP-1由来M2マクロファージによって増加した。TCMによって極性化されたM2マクロファージが、前立腺癌細胞の増殖および遊走を誘発するかどうかを試験した。TCMで処理されたマクロファージ(M-TCM)の馴化培地は、THP-1由来M2マクロファージの馴化培地と同様に、前立腺癌細胞の増殖(図15A)および遊走(図15Bおよび15C)を増加させた(図15A～15C)。

40

## 【0113】

2-16．TAMpepKまたはMpepKによるマクロファージの細胞生存性。

TAMpepKおよびMpepKは、上記の結果において示されたように、M2マクロファージのアポトーシスを誘発した。TAMpepKおよびMpepKが、TCMによって分化されたM2マクロファージの細胞生存性を低下させるかどうかを評価するために、THP-1由来マクロファージをTAMpepKおよびMpepK(1 μM)で処理した。TAMpepKおよびMpepK

50

は、M2マクロファージと同様に、TCMで処理されたマクロファージにおいてアポトーシスを誘発した(図16B)。従って、この結果は、TAMpepKおよびMpepKが、M2マクロファージ、ならびにTCMによって誘導されたマクロファージを標的とすることを示唆している。

【0114】

2-17. TAMpepKおよびMpepKで処理されたM2マクロファージの馴化培地による前立腺癌細胞における増殖および遊走。

M2マクロファージおよびTCMによって誘導されたM2様TAMの馴化培地は、前立腺癌細胞(PC3細胞)の増殖および遊走を増加させた。しかし、TAMpepKおよびMpepKで前処理されたM2マクロファージおよびM2様TAMの馴化培地は、M2マクロファージまたはM2様TAMの群と比較して、PC3細胞の増殖(図17A)および遊走(図17Bおよび17C)を有意に減少させた。

10

【0115】

2-18. TAMpepKおよびMpepKで処理されたM2マクロファージの馴化培地による前立腺癌細胞における浸潤。

TAMpepKおよびMpepKによって前立腺癌細胞の浸潤を阻害することを決定するために、PC3細胞をマクロファージの馴化培地で処理した。M2マクロファージおよびTCMによって誘導されたM2様TAMの馴化培地は、PC3細胞の浸潤を増加させた。しかし、TAMpepKおよびMpepKで前処理されたM2マクロファージおよびM2様TAMの馴化培地は、M2マクロファージまたはM2様TAMの群と比較して、PC3細胞の浸潤を有意に減少させた(図18Aおよび18B)。

20

【0116】

2-19. 前立腺癌のマウスモデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの効果。

前立腺癌モデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果を評価するために、TRAMP-C2細胞をC57BL6Jマウスの右側腹部に皮下注射し、1週間後、TAMpep、dKLA、TAMpepK、およびMpepKを3日毎に腹腔内注射した。TAMpepKおよびMpepKで処置されたマウスは、PBS群と比較して、腫瘍体積および重量の有意な減少を示した(図19B、19C、19E、および19F)。他方で、マウスの体重は全ての群間で有意に変化しなかった(図19D)。

30

【0117】

2-20. 前立腺癌モデルの増殖およびEMTにおけるTAMpepKおよびMpepKの効果。

前立腺癌モデルの腫瘍成長およびEMTにおけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果を決定するために、腫瘍組織を、増殖マーカーとしてのPCNAならびにEMT(上皮間葉転換)マーカーとしてのE-カドヘリン、ビメンチン、フィブロネクチン、TGF- $\beta$ 、およびMMP9の発現について測定した。PCNAの発現はTAMpepKおよびMpepK群において減少した(図20Cおよび20D)。EMTマーカーにおいて、上皮細胞マーカーとして公知のE-カドヘリンはTAMpepKおよびMpepK群において増加し(図20Aおよび20D)、一方、間葉マーカーとして公知のビメンチンおよびフィブロネクチンはTAMpepKおよびMpepK群において減少した(図20Bおよび20D)。さらに、EMTに関連するTGF- $\beta$  およびMMP9の発現もまた、TAMpepKおよびMpepK群において減少した(図20D)。従って、これらの知見は、TAMpepKおよびMpepKが、前立腺癌においてM2様TAMを標的として腫瘍成長および転移を阻害することによって抗癌効果を有することを示唆している。

40

【0118】

2-21. 結腸癌モデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果

結腸癌モデルの腫瘍成長におけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果を決定するために、腫瘍組織を体積および重量について測定した。TAMpepKおよびMpepKで処置されたマウスは、PBS群と比較して腫瘍体積および重量の有意な減少を示し、一方、腫瘍重量はMpepKにおいて有意に変化しなかった(図21A~21E)。

【0119】

2-22. 肺線維症についてのマウスモデルにおけるMpepKの効果

50

MpepKが肺線維症の抑制についての治療効果を有するかどうかを決定するために、肺線維症のマウスモデルを、プレオマイシンを気管内投与することによって確立した。プレオマイシンによって誘発された肺線維症は、MpepKによって低減された(図22B)。さらに、*fosl2*、1型コラーゲンおよびフィブロネクチン1などの、線維症に関連する遺伝子発現が、PBSと比較してMpepKにおいて有意に減少した(図22C)。

【0120】

2-23. 乳癌についてのマウスモデルにおけるTAMpepKおよびMpepKの効果

乳癌におけるTAMpepKおよびMpepKの抗癌効果を決定するために、乳癌の第4乳房同所性マウスモデルを確立した。TAMpepKおよびMpepKは、PBS群と比較して減少した腫瘍体積および重量を示した(図23B~23D)。さらに、M2マクロファージマーカーとして公知のアルギナーゼ1の遺伝子発現が、PBSと比較してMpepKにおいて有意に低下した(図23E)。加えて、肺転移が、PBS群と比較してMpepK群において減少した(図24A~24C)。

10

【0121】

実施例3. 材料および方法

3-1. ペプチド合成。

以下のペプチドを実施例1に上述される方法に従って合成した：

TAMpep : 全長メリチン(SEQ ID NO:1) ;

Mpep : 最初の7個のアミノ酸が除去されている全長メリチン(SEQ ID NO:2) ;

A12 : Mpepの5番目のG(グリシン)がアラニンで置換されている(SEQ ID NO:16) ;

20

A14 : Mpepの7番目のP(プロリン)がアラニンで置換されている(SEQ ID NO:18) ;

A17 : Mpepの10番目のI(イソロイシン)がアラニンで置換されている(SEQ ID NO:20) ;

A18 : Mpepの11番目のS(セリン)がアラニンで置換されている(SEQ ID NO:21) ;

A22 : Mpepの15番目のR(アルギニン)がアラニンで置換されている(SEQ ID NO:25) ;

A25 : Mpepの18番目のQ(グルタミン)がアラニンで置換されている(SEQ ID NO:28) ;

A26 : Mpepの19番目のQ(グルタミン)がアラニンで置換されている(SEQ ID NO:29) ;

30

TAMpepK :

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-

Ala-d-Lys-d- Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

へ結合されている、リンカー(GGGGS);(SEQ ID NO:36)へ結合された全長メリチンペプチド(SEQ ID NO:1) ;

MpepK :

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-

Lys-d- Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

40

へ結合されている、リンカー(GGGGS)(SEQ ID NO:36)へ結合されたMpep (SEQ ID NO:2) ;

A12K :

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-

d- Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

へ結合されている、リンカー(GGGGS)(SEQ ID NO:36)へ結合されたA12 (SEQ ID NO

50

:16);

A14K:

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-  
d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

へ結合されている、リンカー(GGGG)(SEQ ID NO:36)へ結合されたA13 (SEQ ID NO  
:18);

A17K:

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-  
d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

10

へ結合されている、リンカー(GGGG)(SEQ ID NO:36)へ結合されたA17 (SEQ ID NO  
:20);

A18K:

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-  
d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

20

へ結合されている、リンカー(GGGG)(SEQ ID NO:36)へ結合されたA18 (SEQ ID NO  
:21);

A22K:

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-  
d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

へ結合されている、リンカー(GGGG)(SEQ ID NO:36)へ結合されたA22 (SEQ ID NO  
:25);

A25K:

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-  
d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

30

へ結合されている、リンカー(GGGG)(SEQ ID NO:36)へ結合されたA25 (SEQ ID NO  
:28); および

A26K:

d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-d-Lys-d-Leu-d-Ala-d-Lys-  
d-Leu-d-Ala-d-Lys (dKLA) (SEQ ID NO:47)

40

へ結合されている、リンカー(GGGG)(SEQ ID NO:36)へ結合されたA26 (SEQ ID NO  
:29)。

【0122】

3-2. マクロファージ分化。

100 nMホルボール12-ミリストート13-アセタート(PMA、Sigma)と共に24時間イン  
ンキュベーションし、続いて、RPMI培地(Invitrogen)中で24時間インキュベーション  
することによって、THP-1単球をマクロファージ(M0)へ分化させた。20 ng/mlのIFN  
- (Prospec)および100 ng/mlのLPS (Sigma)と共にインキュベーションすることによ  
って、マクロファージをM1マクロファージ(M1)に極性化させた。20 ng/mlのイン

50

ターロイキン(IL) 4 (Prospect)および20 ng/mlのインターロイキン13 (Prospect)と共にインキュベーションすることによって、マクロファージM2極性化(M2)を得た。

【0123】

### 3-3. 細胞生存性試験。

極性化された細胞を、1.5 μMのMpepK、A12K、A14K、A17K、A18K、A22K、A25K、またはA26Kペプチドで1時間処理し、RPMI1640成長培地において24時間さらにインキュベートした。CCK-8アッセイを使用して細胞生存性を分析した：CCK-8試薬(Enzo Life Sciences)を各ウェルへ添加し；インキュベーションを2時間継続し、吸光度をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で450 nmにて測定した。

【0124】

### 3-4. インビトロ敗血症モデル、LPS刺激M1(LPS-M1)マクロファージにおけるA26Kの細胞傷害性

THP-1細胞( $1 \times 10^4$ 細胞/ウェル)を、24時間、100 nMのPMAでマクロファージへ分化させ(M0)、IFN- $\gamma$  (20 ng/ml)およびLPS (100 ng/ml)の処理によって古典的M1マクロファージへ極性化させ、LPS刺激マクロファージ(LPS-M1)を24時間のLPS(1 μg/ml)処理によって誘導した。細胞を1.5 μMのA26Kで1時間処理し、RPMI1640成長培地において24時間さらにインキュベートした。CCK-8アッセイを使用して細胞生存性を分析した。CCK-8試薬を各ウェルへ添加し、1.5~2時間インキュベートした。吸光度をマイクロプレートリーダーで450 nmにて測定した。

【0125】

### 3-5. LPS-M1マクロファージにおけるA26K処理の効果

THP-1細胞( $2 \times 10^5$ 細胞/ウェル)を、24時間、100 nMのPMAでマクロファージへ分化させ(M0)、IFN- $\gamma$  (20 ng/ml)およびLPS (100 ng/ml)の処理によって古典的M1マクロファージへ極性化させ、LPS-M1マクロファージを2時間のLPS(1 μg/ml)処理によって誘導した。極性化された細胞を1.5 μMのA26Kで1時間処理し、RPMI1640成長培地において24時間さらにインキュベートした。炎症性遺伝子(IL-8、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 、およびCXCL10)の発現レベルを、リアルタイム定量的PCRによって定量化した。

【0126】

### 3-6. 肺線維症インビトロモデル - 細胞

THP-1細胞をAmerican Type Culture Collection (ATCC)から購入し、これらを、非熱処理10%ウシ胎仔血清(FBS; WeIGENE)、2 mM L-グルタミン、0.05 mM β-メルカプトエタノール、10 mM HEPES、4500 mg/Lグルコース、100 U/mlペニシリン、および100 μg/mlストレプトマイシン(Gibco)が補われたRPMI 1640培地を使用して、具体的な指示に従って培養した。American Type Culture Collection (ATCC)から得られた、ヒト肺胞細胞、A549細胞を、2.05 mMのL-グルタミン、2 g/リットルの重炭酸ナトリウム、および2 g/リットルのグルコース(WeIGENE)を10% FBS (WeIGENE)、100 U/mlペニシリンおよび100 μg/mlストレプトマイシン(Gibco)と一緒に含有するRPMI 1640培地において培養した。80%のコンフルエンスを達成するために、細胞を5% CO<sub>2</sub>加湿インキュベーターにおいて37 °Cで培養した。

【0127】

### 3-7. 肺線維症インビトロモデル - マクロファージ分化

100 nMホルボール12-ミリストート13-アセート(PMA、Sigma)と共に24時間インキュベーションし、続いて、RPMI培地(Invitrogen)中で24時間インキュベーションすることによって、THP-1細胞をマクロファージへ分化させた。20 ng/mlのインターロイキン(IL)-4 (Prospect)および20 ng/mlのインターロイキン13 (Prospect)と共にインキュベーションすることによって、マクロファージM2極性化(M2)を得た。

【0128】

### 3-8. 肺線維症インビトロモデル - 培養細胞の処理および共培養

THP-1細胞およびA549細胞の非接触共培養系を、6穴プレートと組み合わせられたポリ

10

20

30

40

50

エチレンテレフタレートフィルムを有するTranswell懸濁培養チャンバ(Corning 3450; Corning, Inc., Corning, NY, USA)を使用して確立した。6ウェルプレートにおいて $1 \times 10^5$ 細胞/mlの播種密度を有するA549細胞を、インビトロでEMTまたはFMTを誘発するために、TGF- $\alpha$  (5 ng/ml)を含有する培地において48時間培養した。処理細胞に対する介入効果を観察するために、MpepK、A17K、またはA22Kを同期的に使用した。 $1 \times 10^5$ 細胞/mlの密度で播種されたTHP-1細胞を、M2-を誘導するために20 ng/mlのIL-4および20 ng/mlのIL-13へ48時間曝露した。細胞のうちの一部を $1.5 \mu$ MのMpepK、A17K、およびA22Kでさらに処理した。M2様マクロファージとの共培養を確立するために、本発明者らは、IL-4およびIL-13前処理マクロファージを含有する細胞培養インサートを、24時間培養するために、A549細胞( $5 \times 10^4$ 細胞/ml)が播種されたプレートへ移した。48時間の共培養後、さらなる実験のためにプレート底部の細胞を採取した。

10

【0129】

### 3-9 . 肺線維症インビトロモデル - リアルタイム定量的PCR

Easy-Blue試薬を使用して全RNAを抽出した。分光光度計で260および280 nmでの吸光度を測定することによってRNAの濃度を決定および定量化した。Maxime RT Pre Mixキット(iNtRON)を使用して、相補的DNA(cDNA)を全RNAから合成した。SYBR Green Master Mixを用いてリアルタイムPCR分析を行った。PCR条件は、95 °Cで5分間、続いて95 °Cで10秒間、60 °Cで10秒間および72 °Cで10秒間を45サイクルであった。mRNA発現をトリプリケートで定量化した。データをCFXソフトウェア(Bio-Rad)で測定した。GAPDHを内部標準として使用した。

20

【0130】

### 3-10 . 肝細胞癌のマウスモデルにおけるMpepKの抗癌効果

C57BL/6 (B6)野生型マウスをDBLから購入した。肝細胞癌の皮下腫瘍モデルについて、Hepa1-6細胞をMatrigelマトリクス(Corning)と混合し、マウスの右側腹部へ皮下接種した( $4 \times 10^5$ 細胞/マウス)。MpepKペプチド(100、200、および400 nmol/kg)を、腫瘍接種後12日目に開始して、3日毎に腹腔内注射し、腫瘍体積を電子キャリパーによって測定した。全ての動物を、食料および水へのフリーアクセスで12時間明/暗サイクルにおいて、特定病原体除去環境に維持した。実験終了後、全てのマウスを、イソフルランおよび頸椎脱臼を使用して安楽死させた。

30

【0131】

### 実施例4 . 結果

#### 4-1 . M2型、M1型、および/またはM0型マクロファージに選択的なポリペプチドの細胞傷害性。

アラニン置換Mpepの中で、いくつかのペプチドが、M2マクロファージと比較して、M1マクロファージにおいて相対的に増加した親和性、またはM1もしくはM2マクロファージと比較して、M0マクロファージにおいて相対的に増加した親和性を示した(図7A)。増加した親和性がM0またはM1またはM2マクロファージにおける選択的細胞傷害性に影響を与えるかどうかを評価するために、 $1.5 \mu$ MのMpepK、A12K、A14K、A17K、A18K、A22K、A25K、またはA26Kペプチドを、M0、M1およびM2マクロファージにおいて処理し、CCK-8アッセイを用いて細胞生存性について測定した。結果として、A26Kペプチドは、対照M1マクロファージと比較して、M1マクロファージにおいて大きく有意な選択的細胞傷害効果を示し( $^{***}p < 0.001$ 、対照M1マクロファージと比較して)、一方、A12K、A14K、およびA18Kペプチドは、M0、M1、およびM2マクロファージにおいて選択的細胞傷害性を示さなかった(図25A)。A17K、A22K、およびA25Kは、M2マクロファージにおいてMpepKと同様の有意な細胞傷害効果を示し( $^*p < 0.05$ 、対照M2マクロファージと比較して)、しかしM0およびM1マクロファージにおいては示さなかった(図25B)。M0、M1、およびM2マクロファージを漸増濃度のA26K ( $0.01 \sim 10 \mu$ M)で処理した場合、A26KペプチドはM1マクロファージにおいて $IC_{50}$ で $1.192 \mu$ Mを示した(図25C)。

40

50

## 【0132】

4-2. インビトロ敗血症モデル、LPS刺激M1(LPS-M1)マクロファージにおけるA26Kの細胞傷害性および効果。

敗血症は微生物病原体の感染に対する全身炎症反応である。LPSはグラム陰性細菌の外膜の一部であり、インビボおよびインビトロで単球およびマクロファージにおいて複数の炎症反応を誘発する。従って、LPS媒介炎症反応は、グラム陰性細菌感染への曝露由来の主な炎症源であり、敗血症と密接に関係している。LPS-M1マクロファージにおけるA26Kの細胞傷害性を調べるために、M0、M1、およびLPS-M1マクロファージを1.5 μMのA26Kで処理した。結果として、A26Kは、LPS-M1マクロファージ(37%阻害、\*p 0.05、対照と比較して)およびM1マクロファージ(53%阻害、\*p 0.05、対照と比較して)において有意な細胞傷害効果を示した(図26A)。さらに炎症性遺伝子の発現レベルを調べるために、M0、M1、およびLPS-M1マクロファージを、1.5 μMのA26Kで1時間処理した。LPS(1 μg/ml)刺激は、M0マクロファージと比較して、IL8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B、およびCXCL10の発現を有意に増加させた(\*p 0.05または\*\*p 0.01または\*\*\*p 0.001、M0マクロファージと比較して、図26B)。しかし、A26K処理は、LPS刺激によるIL8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B、およびCXCL10の発現レベルの増強を有意に阻害した(#p 0.05または##p 0.01または###p 0.001、LPS-M1マクロファージと比較して、図26B)。これらの結果は、A26K処理が、インビトロ敗血症モデルである、LPSによって誘導されたM1マクロファージの活性化を有意に抑制したことを示した。従って、A26K処理は、M1マクロファージの阻害によって初期の過剰な炎症反応を制御することができ、敗血症についての重要かつ有効な処置となるであろう。

10

20

## 【0133】

4-3. IL-4およびIL-13誘導THP-1マクロファージと共培養された、インビトロ肺線維症モデル、TGF- $\beta$ 1誘導A549細胞におけるA17KまたはA22Kの効果。

上皮間葉転換(EMT)および線維芽細胞から筋線維芽細胞への転換(FMT)反応に対するA17KまたはA22K処理の効果を調べるために、本発明者らは、A549細胞における間葉特徴または線維マーカーのTGF- $\beta$ 1誘導獲得の存在下で、A549(ヒト肺胞II型肺上皮のモデルとして一般的に使用される)を培養した。位相差顕微鏡法を使用して、形態学的変化を画像化した(200×倍率で示される)。本発明者らは、48時間のTGF- $\beta$ 1での処置で、ヒト肺胞上皮II型細胞の最もよく使用される細胞株である、A549細胞においてEMTを誘発した。細胞共培養系を使用して、TGF- $\beta$ 1誘導A549細胞を、IL-4およびIL-13誘導THP-1マクロファージと共培養した。楕円形の上皮細胞から紡錘状の線維芽細胞様細胞へのA549における形態学的変化が、明らかに検出された。A17KまたはA22K介入は、IL-4およびIL-13誘導マクロファージとの共培養によって刺激されるA549細胞におけるEMTの紡錘様間葉形態表現型を顕著にブロックした(図27A)。A17KまたはA22K処理は、M2マクロファージ単独のそれらと比較してA549細胞において、EMT阻害マーカーである、E-カドヘリンの発現を有意に増強し、FMT増強マーカーである、 $\alpha$ -SMAの発現を減少させた(#p 0.05または##p 0.01または###p 0.001、M2マクロファージと比較して)。しかし、MpepKの有意な阻害効果は、THP-1のM2極性化と共培養した場合、これらの上皮細胞のEMTおよびFMTに対して観察されなかった(図27Aおよび27B)。これらの結果は、A17KまたはA22KがMpepKよりも肺線維症のよりよい阻害を示し、肺線維症についてのより優れた治療薬となるであろうことを示唆している。

30

40

## 【0134】

4-4. 肝細胞癌のマウスモデルにおけるMpepKの抗癌効果。

インビボでのMpepKの抗癌効果を評価するために、マウスhepa1-6細胞をC57BL/6Jマウスの右側腹部に皮下注射した。細胞接種後から12日目に、MpepKを3日毎に腹腔内注射した(図28A)。結果として、群間で体重変化の有意差はなかった(図28B)。他方で、全ての用量(100、200、および400 nmol/kg)のMpepKで処置されたマウスが、PBS群と比較して有意に減少した腫瘍体積を示し、生存率は、PBS群と比較してMpepK群

50

(100、200、および400 nmol/kg)において有意に延長された(\*p 0.05または\*\*p 0.01または\*\*\*p 0.001、PBS群と比較して、図28Cおよび28D)。

【0135】

特定の態様の前述の説明は、他者が、当技術分野の技能内の知識を適用することによって、本開示の一般概念から逸脱することなく、様々な適用について容易に改変および/または適合することができるように、本開示の一般性質を完全に明らかにするだろう。従って、そのような適合および改変は、本明細書に提示される教示および指針に基づいて、開示される態様の均等物の意味および範囲内にあるように意図される。本明細書中の表現または用語は、説明のためであって限定のためではなく、従って、本明細書の使用または表現は、教示および指針を踏まえて当業者によって解釈されることが理解されるだろう。

10

【0136】

本開示の幅および範囲は、上述の例示的な態様のいずれによっても限定されず、しかし、以下の特許請求の範囲およびその均等物に従ってのみ定義されるものとする。

【0137】

本明細書に記載される様々な局面、態様、および選択肢の全ては、ありとあらゆるバリエーションで組み合わせることができる。

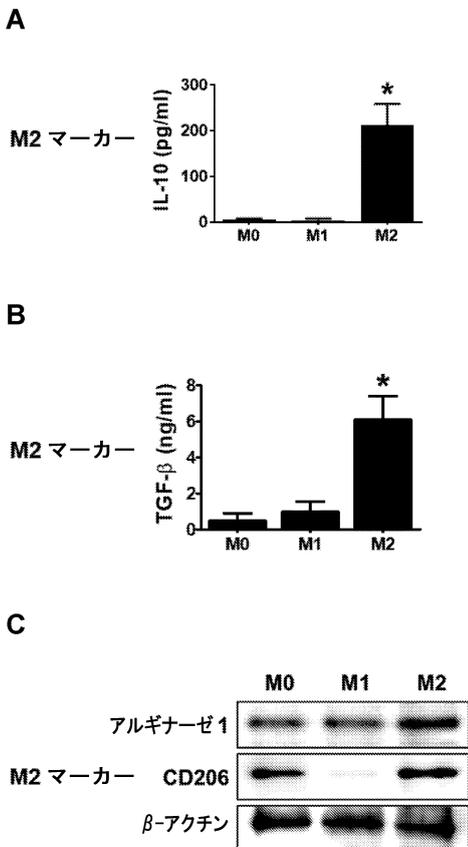
【0138】

本明細書に言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、個々の刊行物、特許、および特許出願が参照により本明細書に組み入れられるように具体的にかつ個々に示されているかのように同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

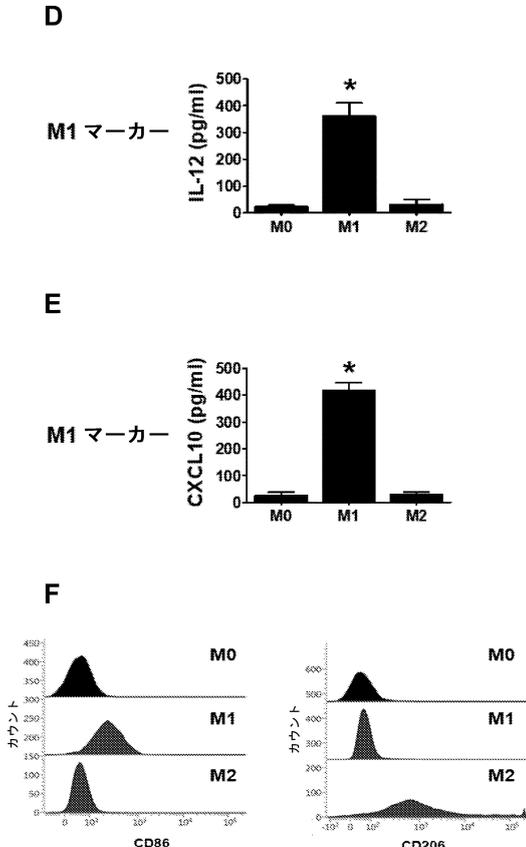
20

【図面】

【図1-1】



【図1-2】



30

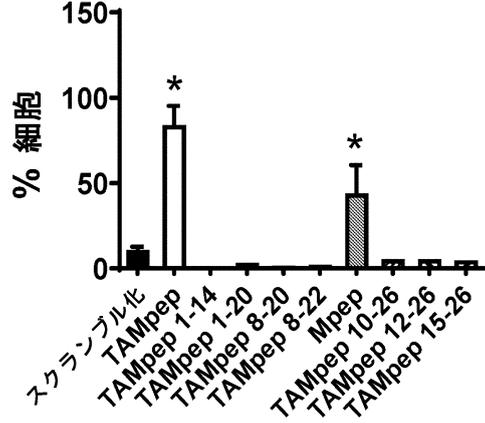
40

50

【 図 2 A 】

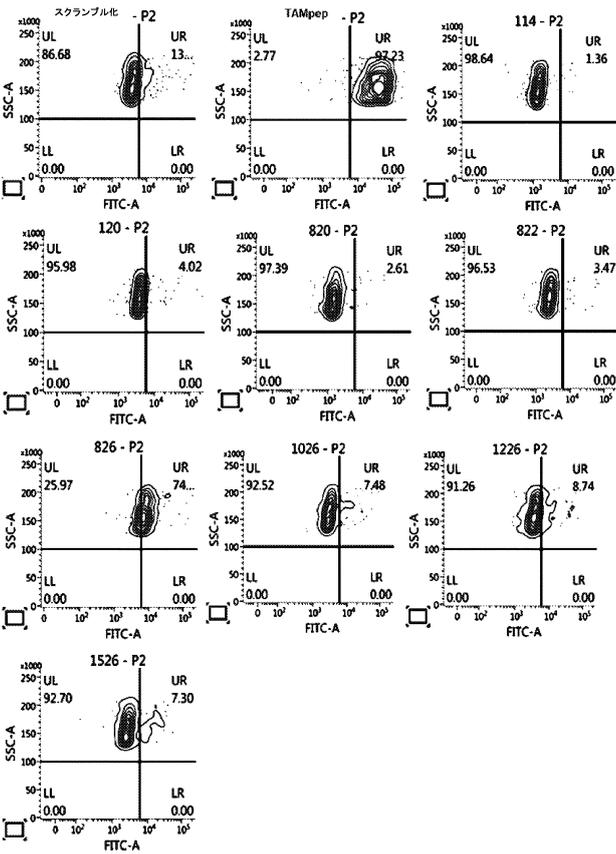
スクランブル化	L	S	R	Q	R	A	L	Q	I	K	G	L	I	N	T	P	W	K	I	A	G	V	L	G	V	T		
TAMpep	G	I	G	A	V	L	K	V	L	T	T	G	L	P	A	L	I	S	W	I	K	R	K	R	Q	Q		
TAMpep114	G	I	G	A	V	L	K	V	L	T	T	G	L	P														
TAMpep120	G	I	G	A	V	L	K	V	L	T	T	G	L	P	A	L	I	S	W	I								
TAMpep820								V	L	T	T	G	L	P	A	L	I	S	W	I								
TAMpep822								V	L	T	T	G	L	P	A	L	I	S	W	I	K	R						
Mpep								V	L	T	T	G	L	P	A	L	I	S	W	I	K	R	K	R	Q	Q		
TAMpep1026								T	T			G	L	P	A	L	I	S	W	I	K	R	K	R	Q	Q		
TAMpep1226												G	L	P	A	L	I	S	W	I	K	R	K	R	Q	Q		
TAMpep1526																	A	L	I	S	W	I	K	R	K	R	Q	Q

【 図 2 B 】

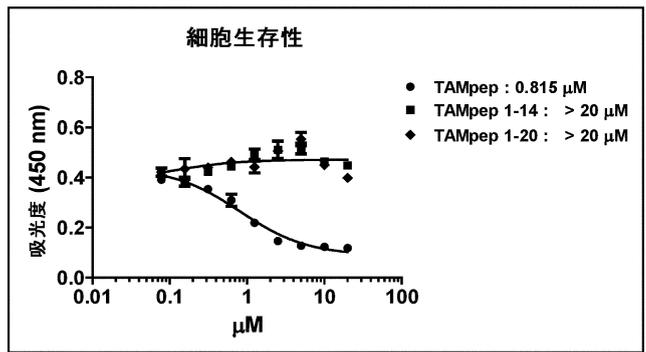


10

【 図 2 C 】



【 図 3 A 】



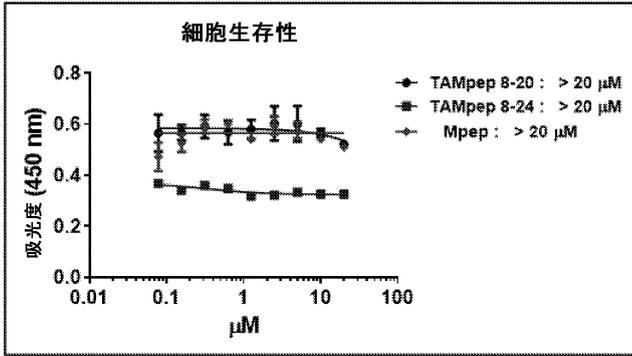
20

30

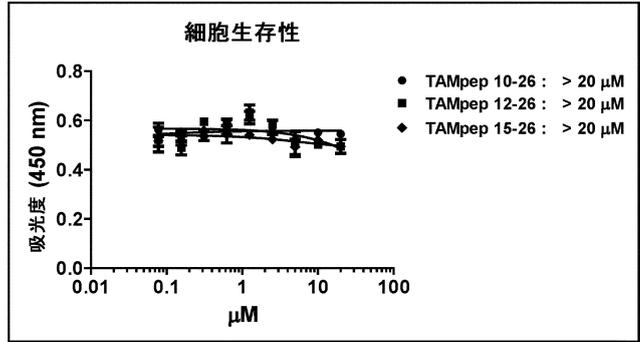
40

50

【 図 3 B 】



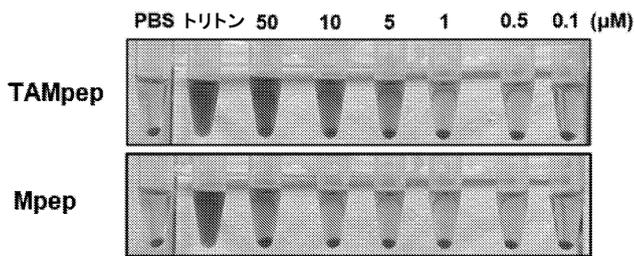
【 図 3 C 】



10

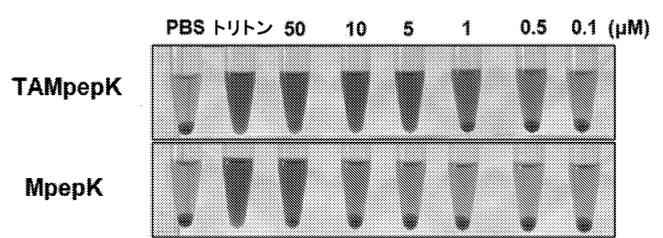
【 図 4 - 1 】

A



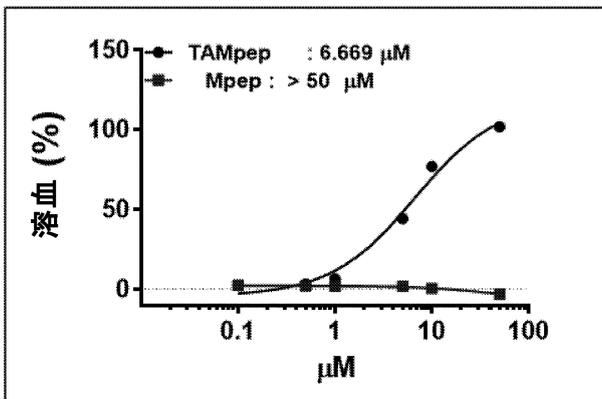
【 図 4 - 2 】

C

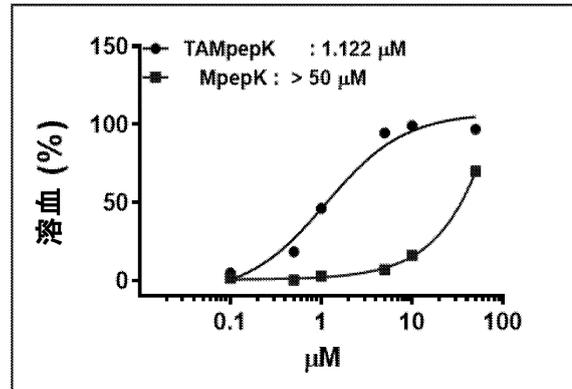


20

B



D

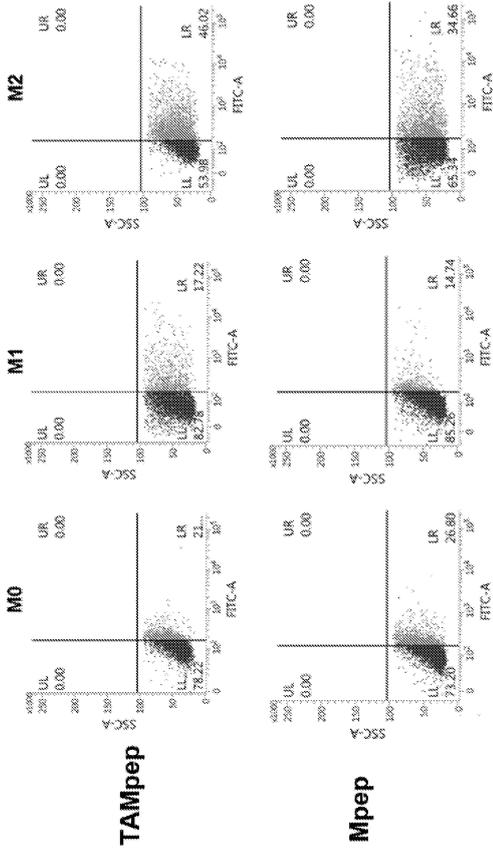


30

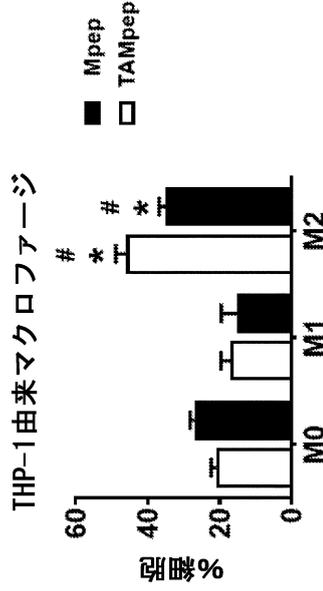
40

50

【 図 5 A 】



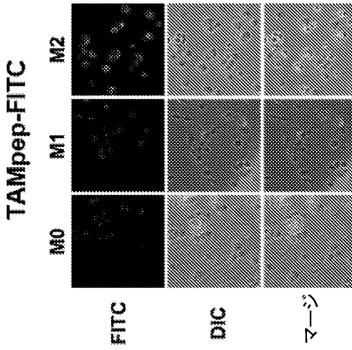
【 図 5 B 】



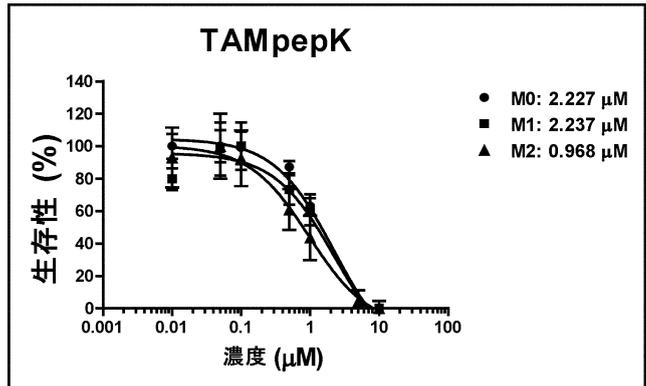
10

20

【 図 5 C 】



【 図 6 A 】

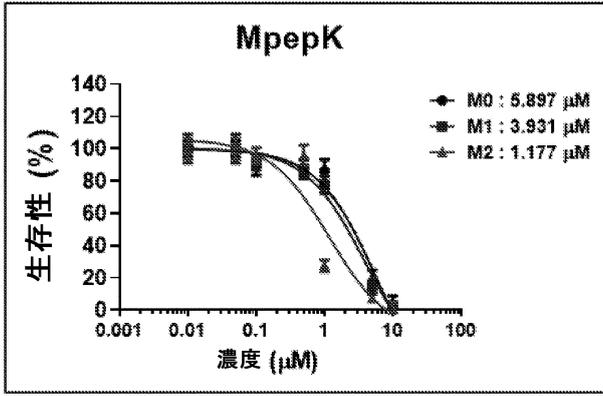


30

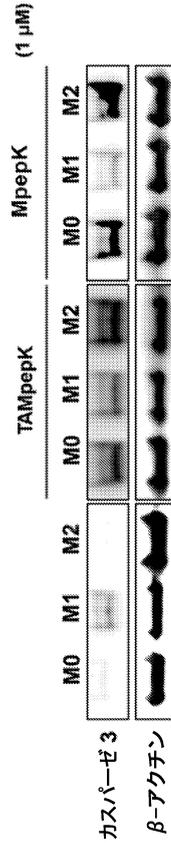
40

50

【 図 6 B 】



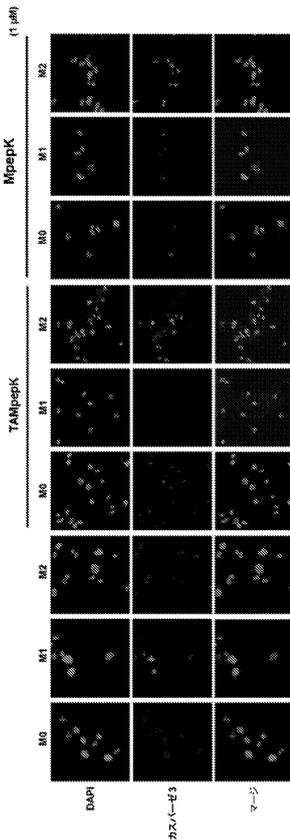
【 図 6 C 】



10

20

【 図 6 D 】



【 図 7 A 】

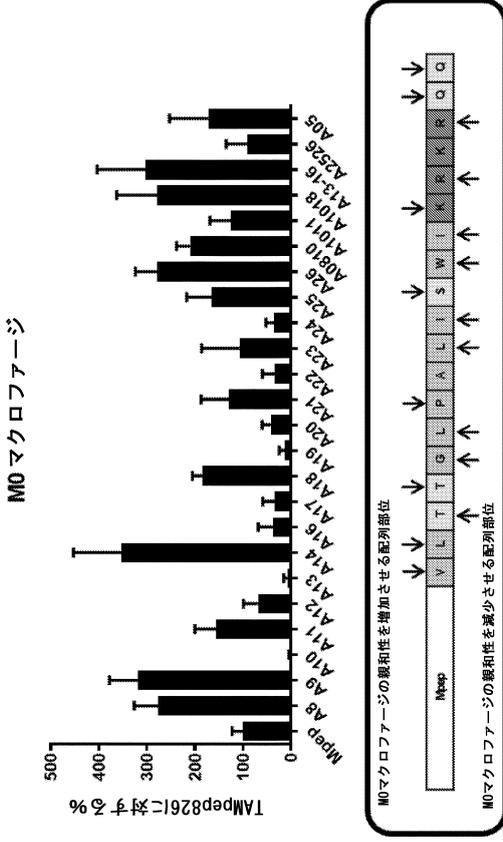
SEQ ID NO.	ペプチド	M0		M1		M2		M2/M1	比率
		%	SD	%	SD	%	SD		
2	Mpep	100.0	23.0	100.0	35.3	100.0	23.6	100	100
12	A8	275.7	51.0	151.4	64.0	128.2	38.4	85	85
13	A9	317.7	60.0	245.4	114.0	156.8	46.2	64	64
14	A10	1.9	3.3	45.2	39.1	53.8	50.9	119	119
15	A11	155.8	44.6	116.3	70.9	95.9	52.5	83	83
16	A12	69.3	29.9	119.0	76.7	71.2	71.5	73	73
17	A13	8.4	7.3	5.0	4.3	33.0	40.5	655	655
18	A14	352.6	100.4	266.9	74.4	130.5	50.1	49	49
19	A16	37.5	31.3	23.4	26.9	55.4	36.2	237	237
20	A17	34.5	25.0	66.3	46.8	99.3	49.2	145	145
21	A18	185.9	19.8	260.4	95.2	146.1	56.3	56	56
22	A19	12.3	12.7	11.4	14.0	38.6	35.4	337	337
23	A20	42.6	18.2	38.0	36.8	42.2	47.9	111	111
24	A21	129.1	58.4	86.0	64.1	67.8	57.1	79	79
25	A22	33.8	26.3	31.2	27.6	63.5	62.5	203	203
26	A23	107.4	78.8	31.7	30.1	37.0	48.4	117	117
27	A24	35.8	17.0	85.5	51.1	52.0	44.7	61	61
28	A25	165.7	51.5	64.8	48.3	97.3	47.9	247	247
29	A26	278.7	45.1	199.0	80.1	110.6	47.8	56	56
30	A0810	210.3	28.2	95.0	69.0	94.0	54.4	99	99
31	A1011	125.6	43.5	34.0	26.2	64.9	48.8	191	191
32	A1018	278.6	84.7	244.6	64.5	126.8	49.6	52	52
33	A13-16	303.4	100.3	28.2	21.1	28.4	31.0	101	101
34	A2526	92.0	43.3	64.9	94.6	85.2	63.3	131	131
35	A05	172.5	80.6	7.4	8.3	22.7	28.2	305	305

30

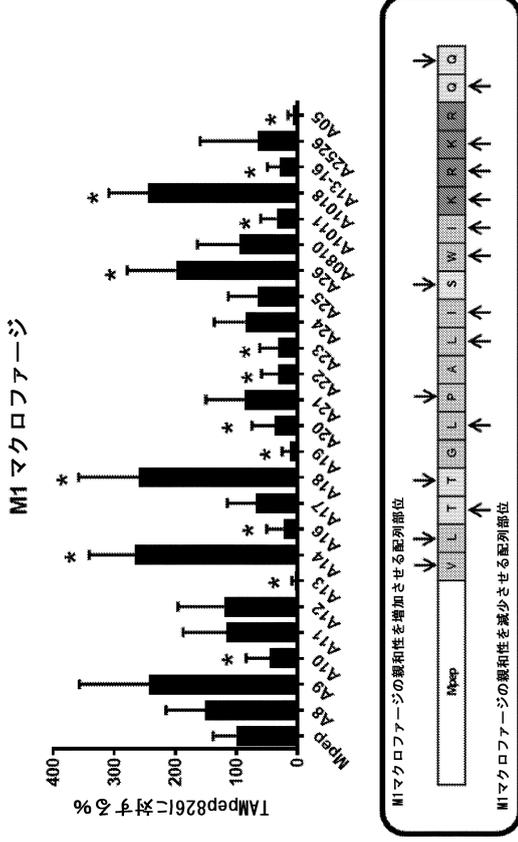
40

50

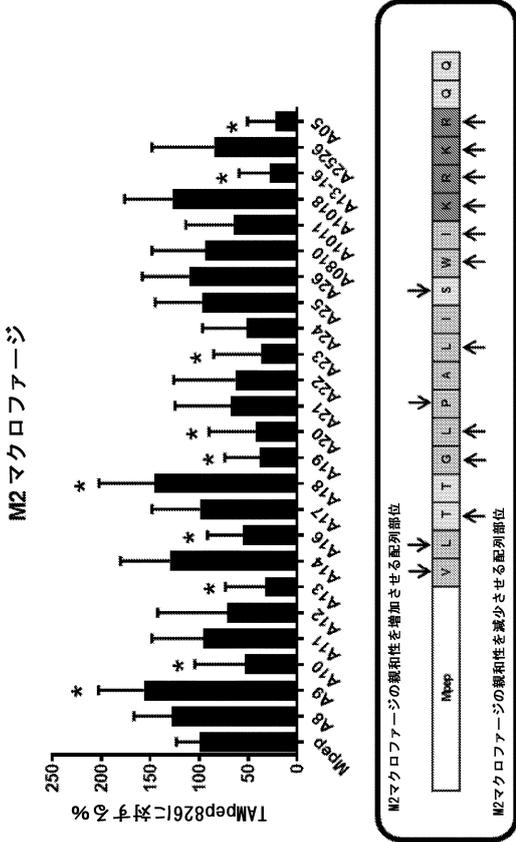
【 図 7 B 】



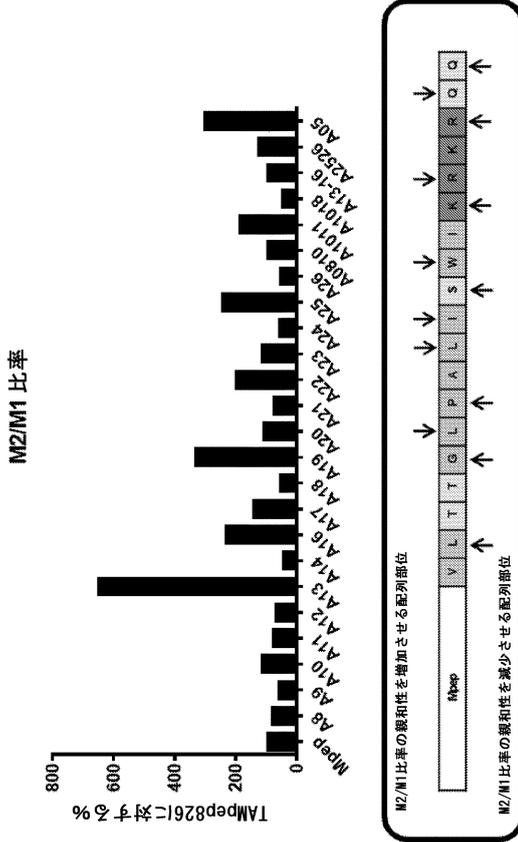
【 図 7 C 】



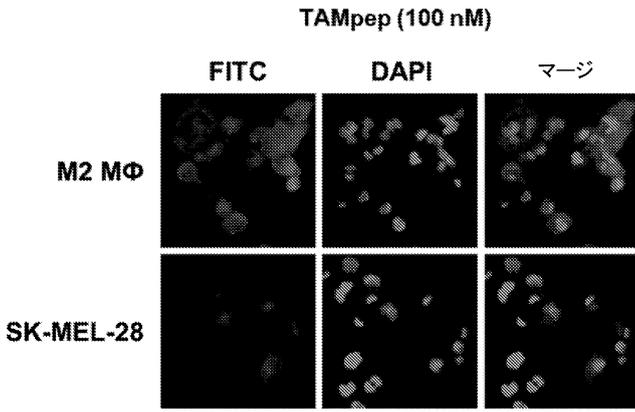
【 図 7 D 】



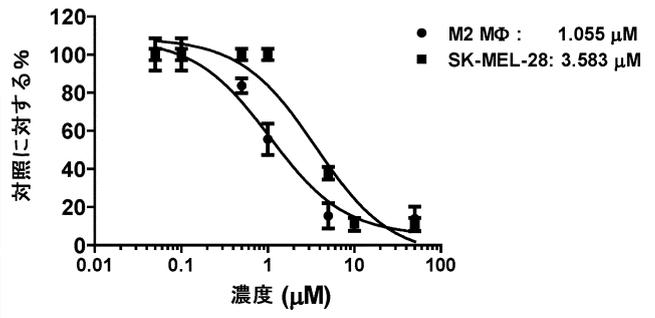
【 図 7 E 】



【 図 8 A 】

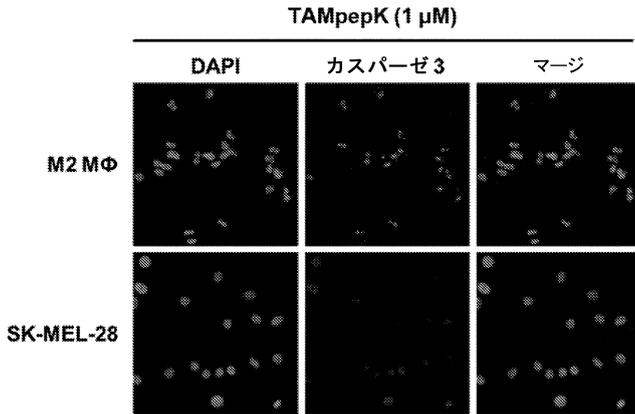


【 図 8 B 】

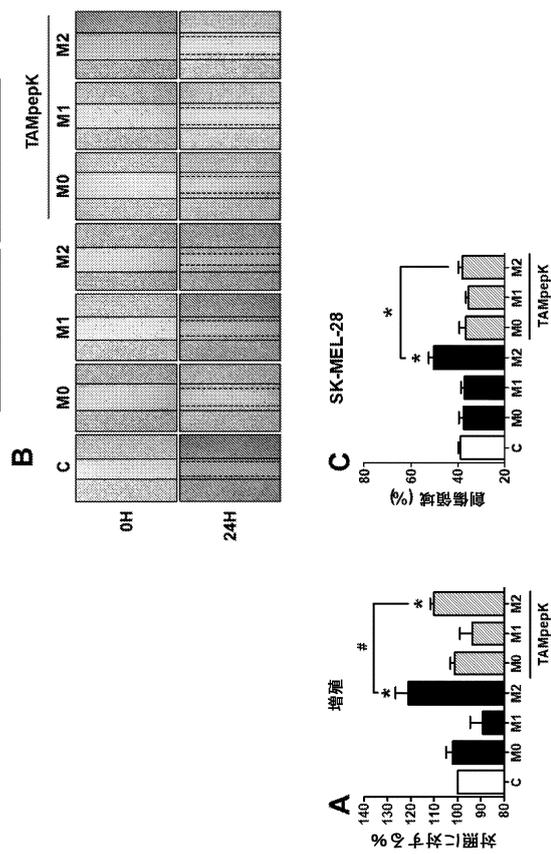


10

【 図 8 C 】



【 図 9 】



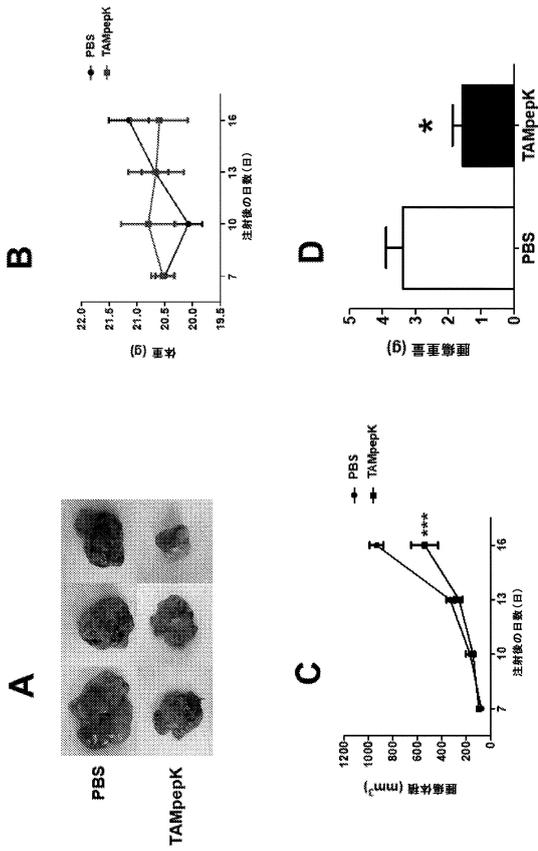
20

30

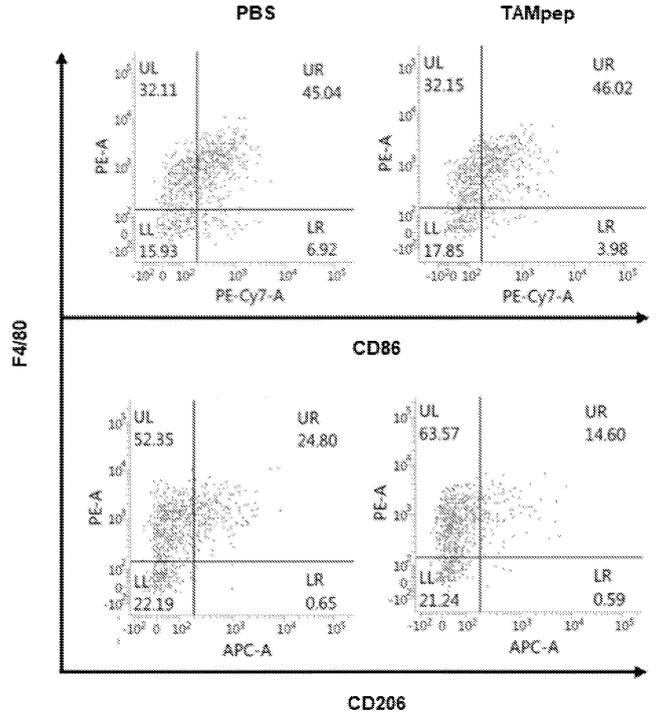
40

50

【 図 1 0 】



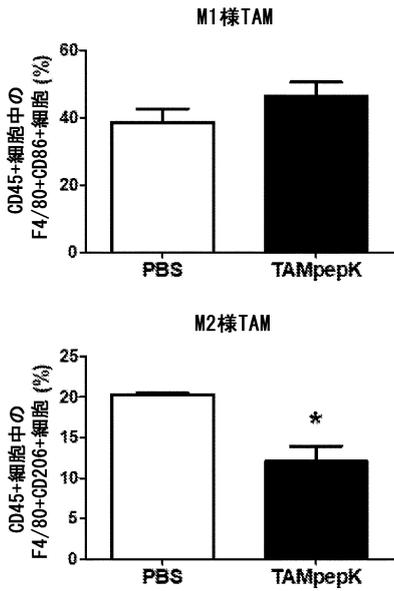
【 図 1 1 A 】



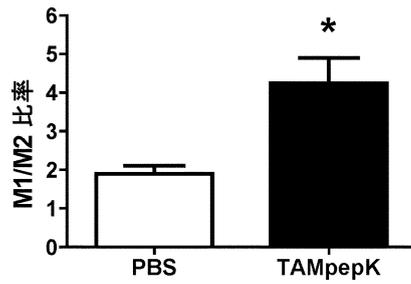
10

20

【 図 1 1 B 】



【 図 1 1 C 】

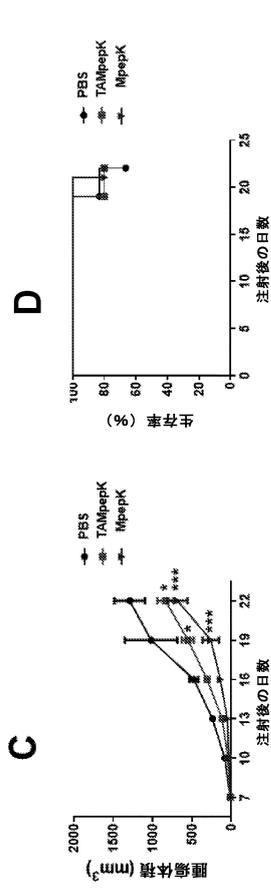
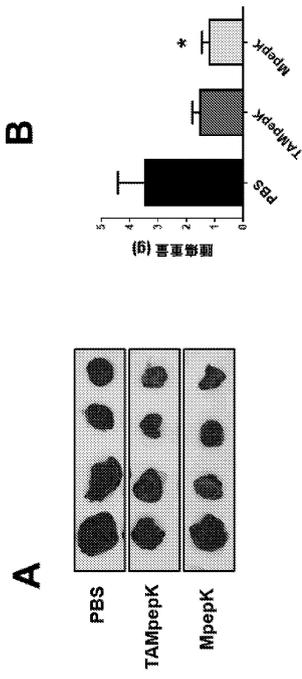


30

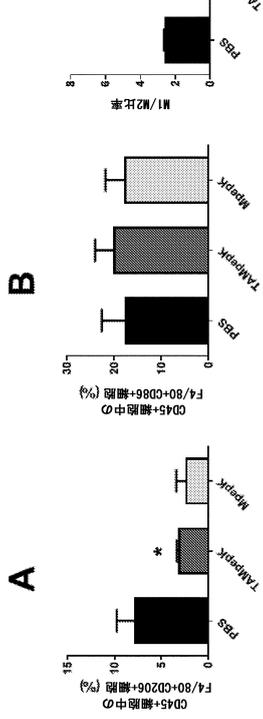
40

50

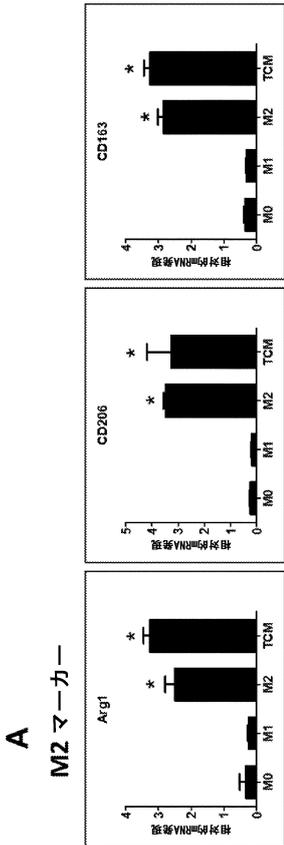
【 図 1 2 】



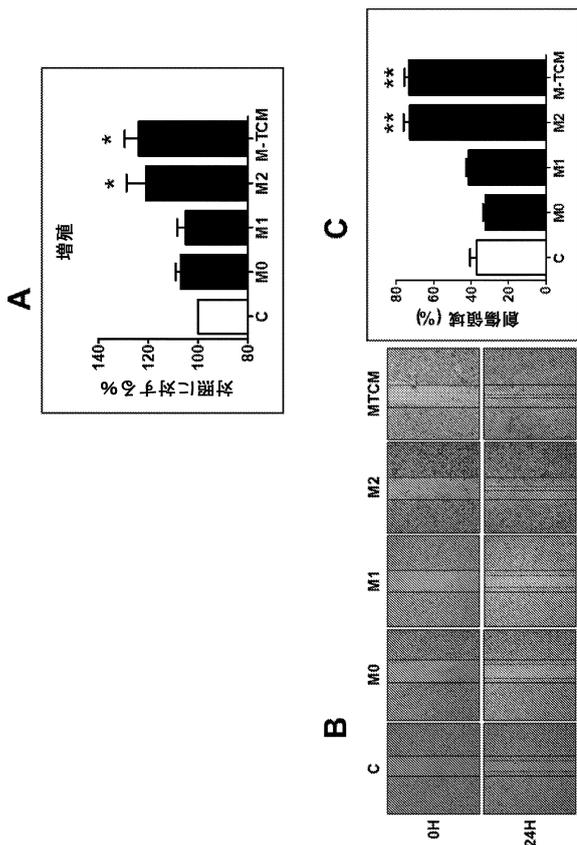
【 図 1 3 】



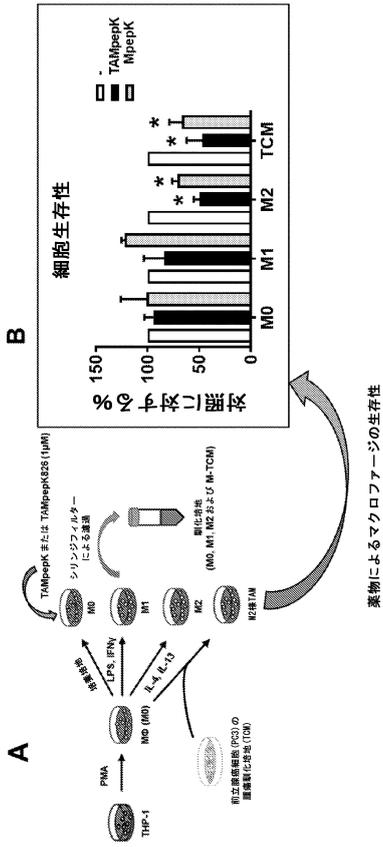
【 図 1 4 】



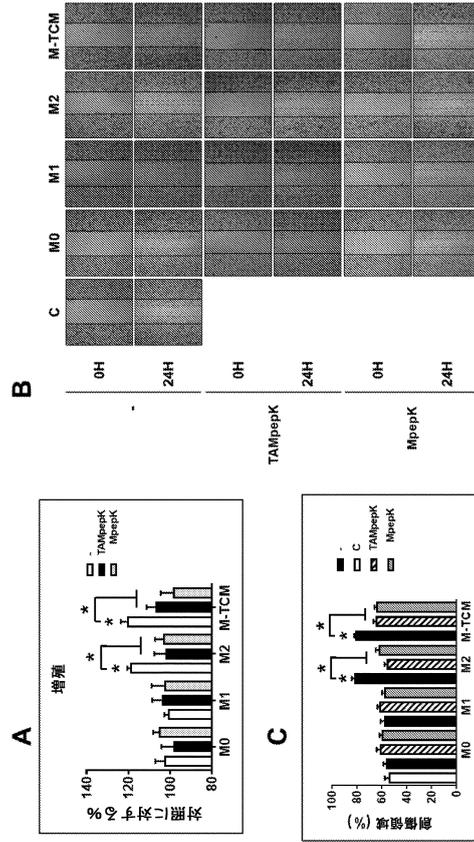
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



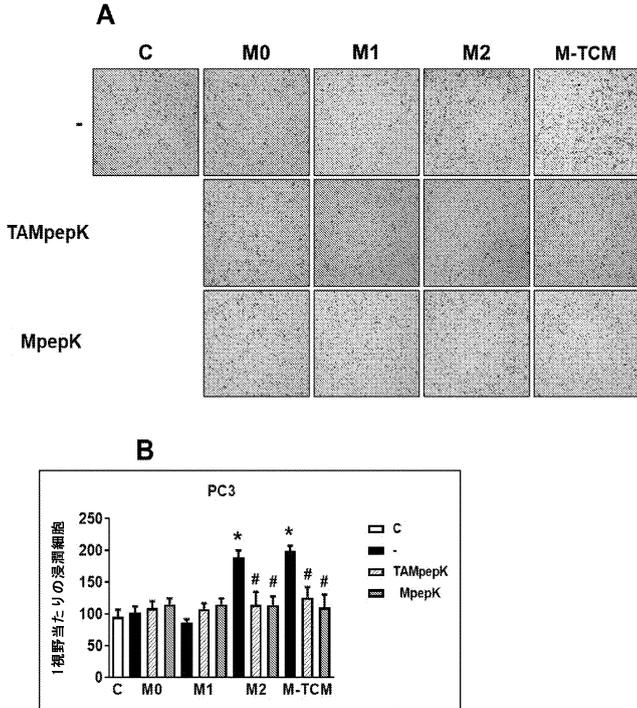
【 図 1 7 】



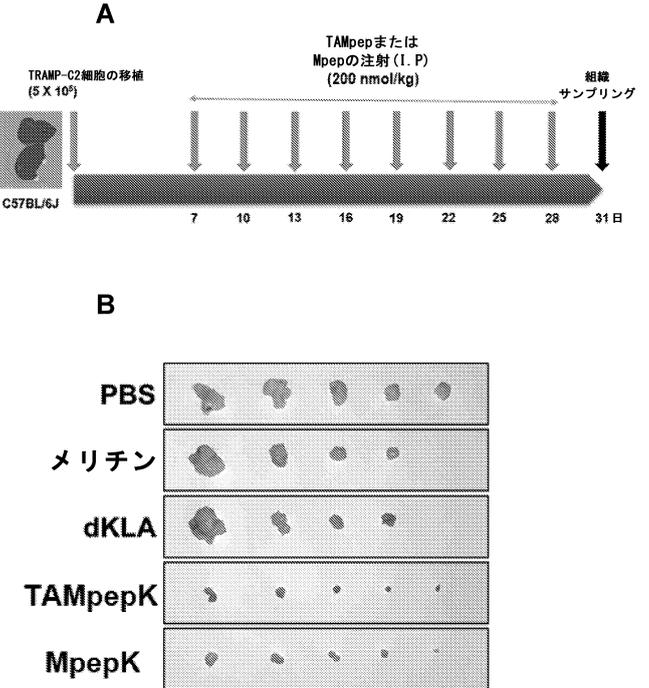
10

20

【 図 1 8 】



【 図 1 9 - 1 】

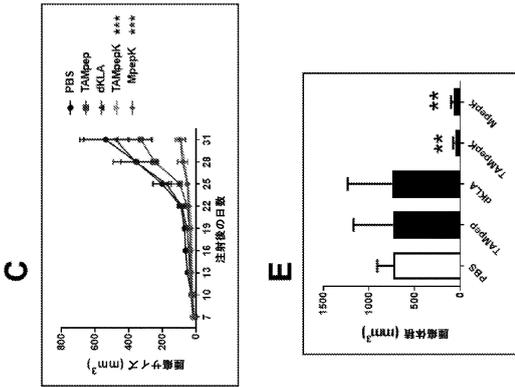
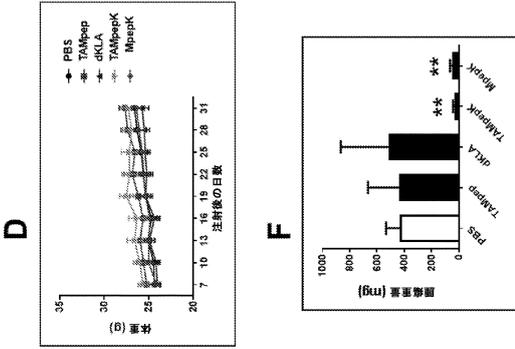


30

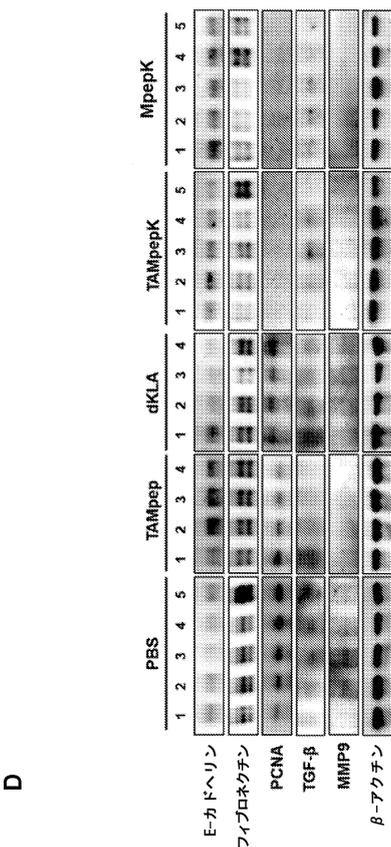
40

50

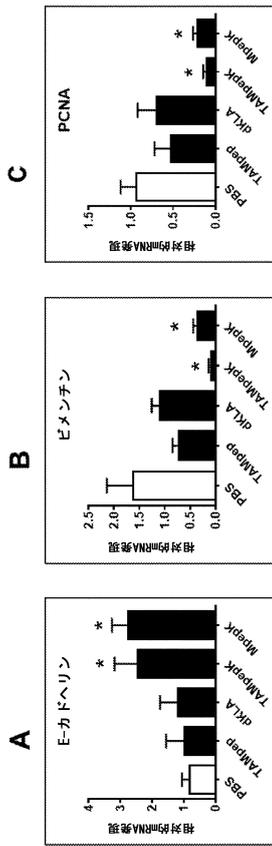
【図 19 - 2】



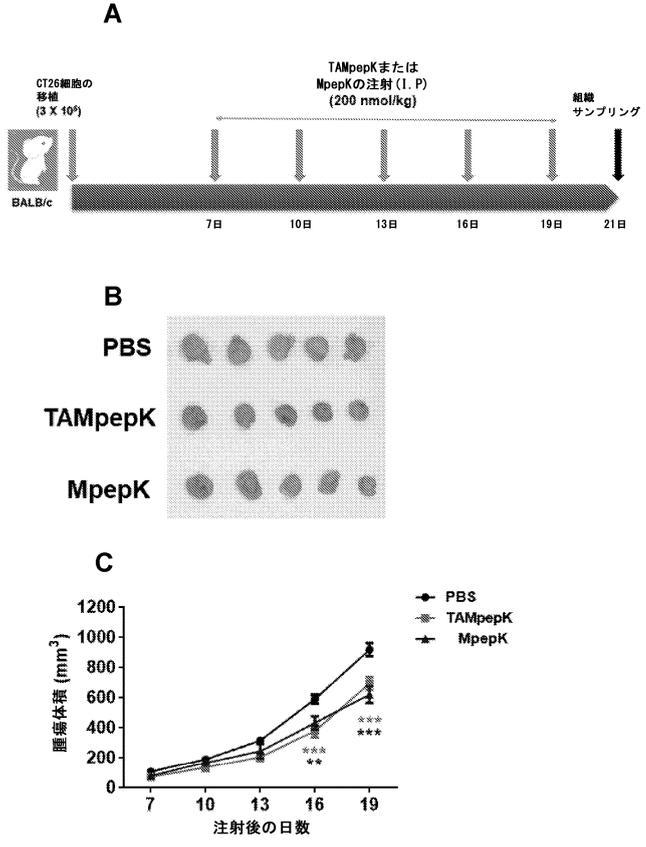
【図 20 - 2】



【図 20 - 1】



【図 21 - 1】



10

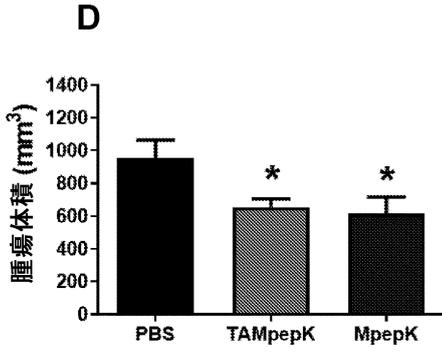
20

30

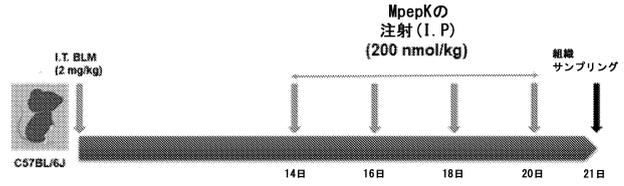
40

50

【 図 2 1 - 2 】

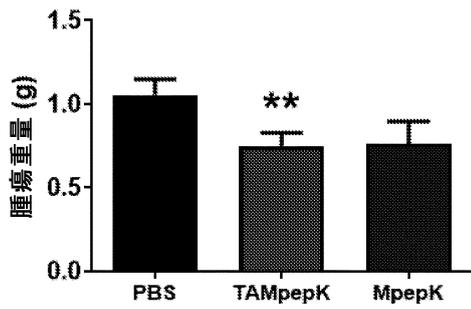


【 図 2 2 A 】



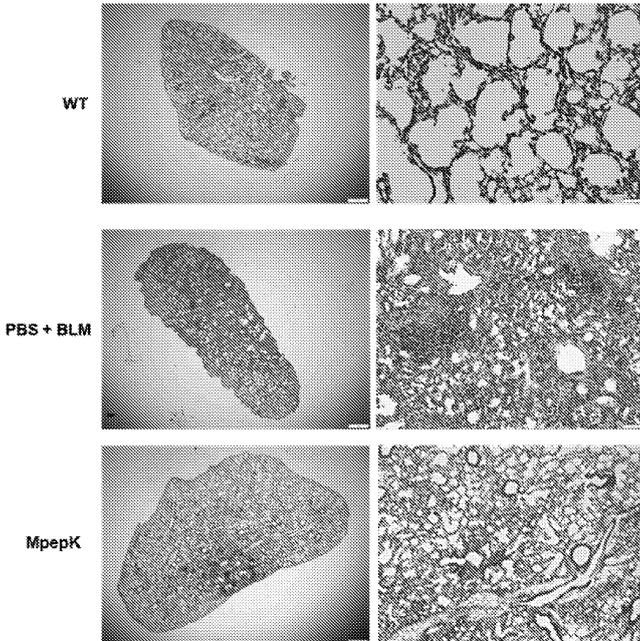
10

**E**

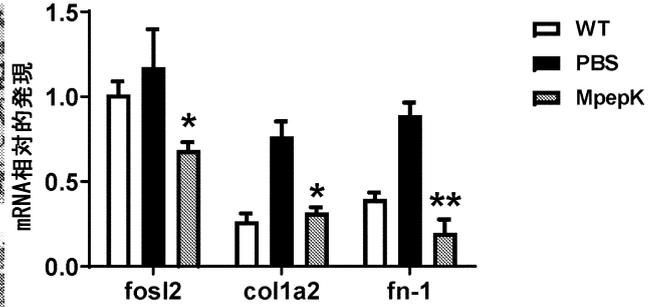


20

【 図 2 2 B 】



【 図 2 2 C 】

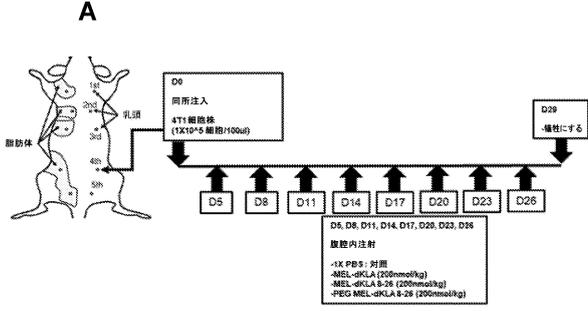


30

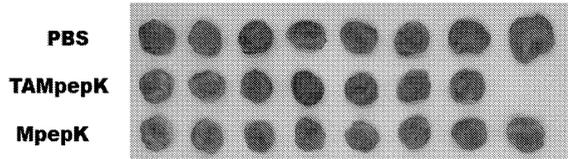
40

50

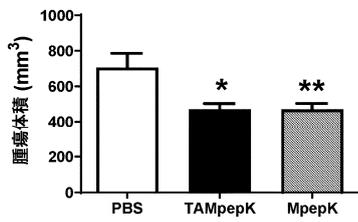
【 図 2 3 - 1 】



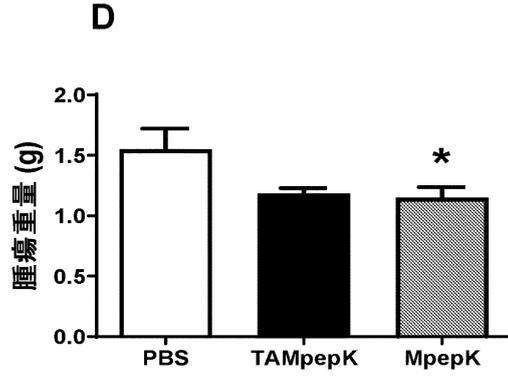
**B**



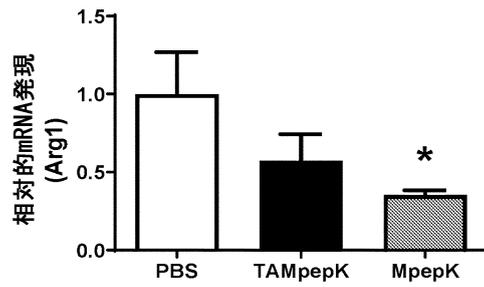
**C**



【 図 2 3 - 2 】



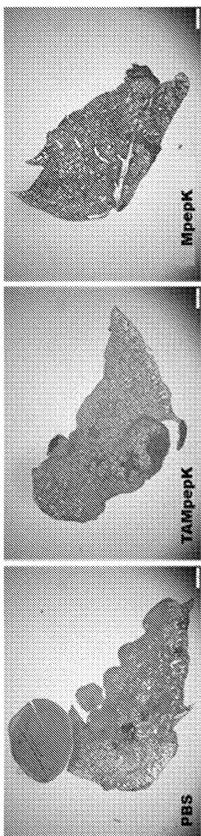
**E**



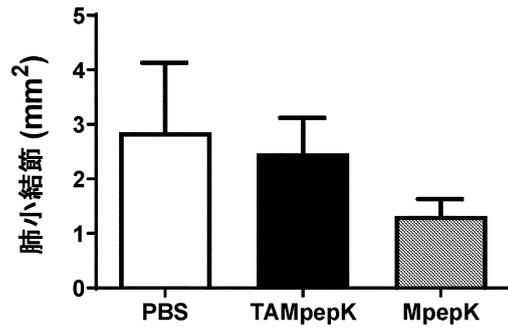
10

20

【 図 2 4 A 】



【 図 2 4 B 】

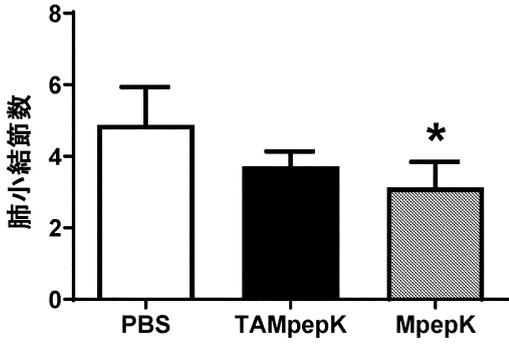


30

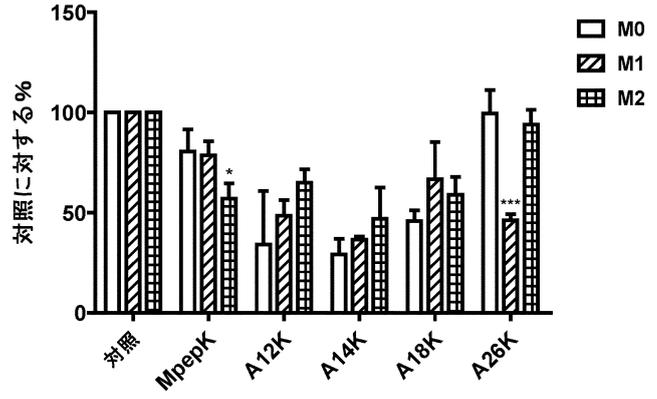
40

50

【 図 2 4 C 】

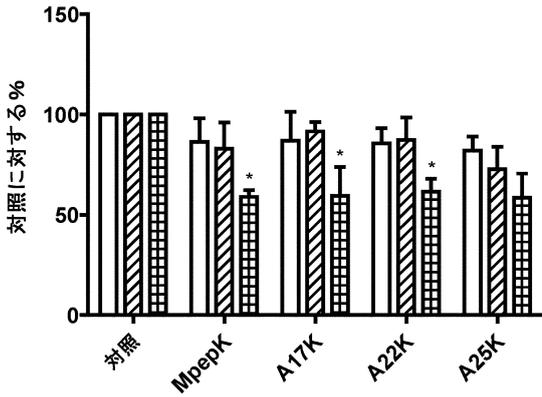


【 図 2 5 A 】

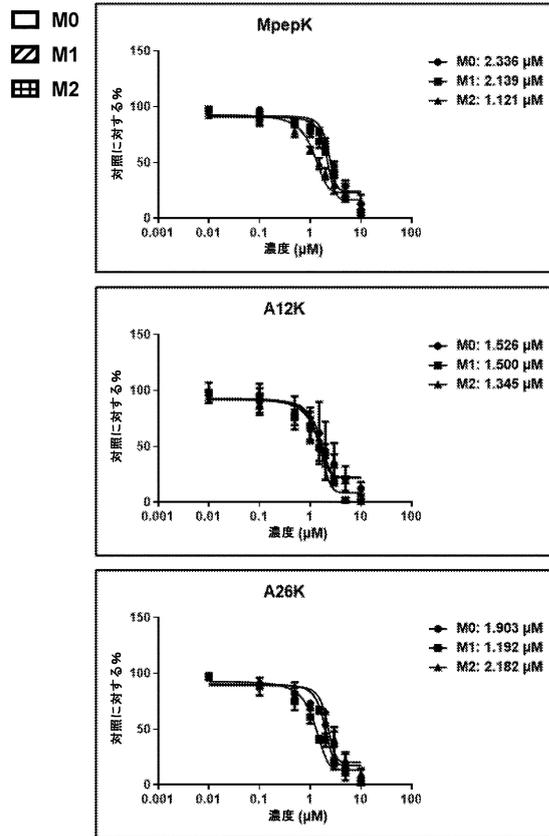


10

【 図 2 5 B 】



【 図 2 5 C 】



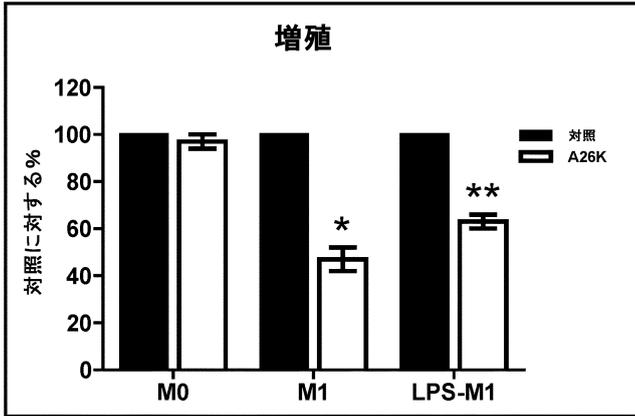
20

30

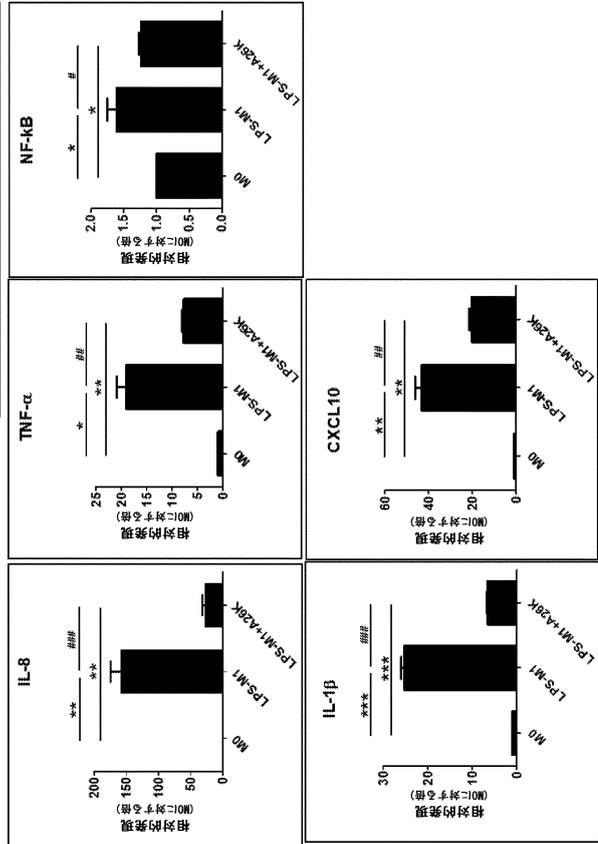
40

50

【 図 2 6 A 】



【 図 2 6 B 】



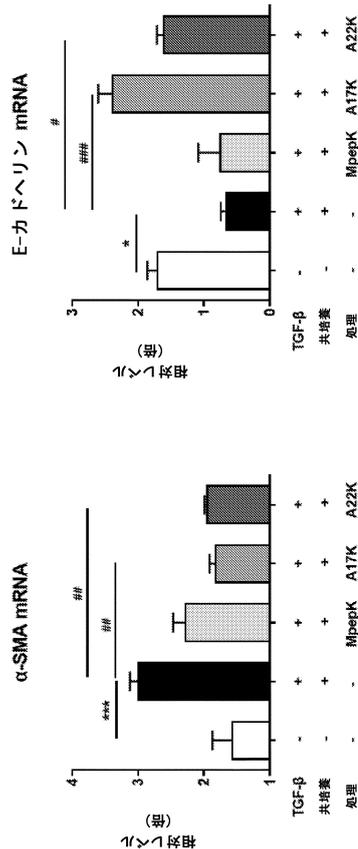
10

20

【 図 2 7 A 】



【 図 2 7 B 】

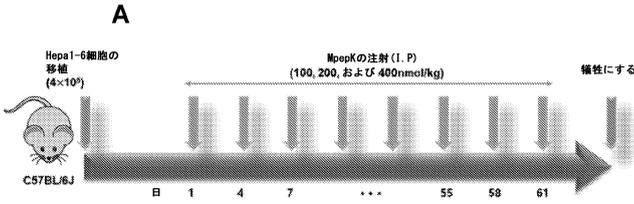


30

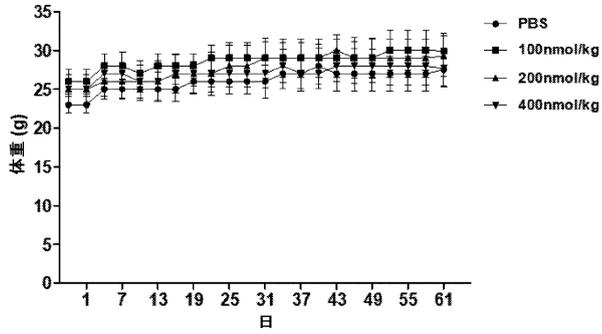
40

50

【 図 28 - 1 】

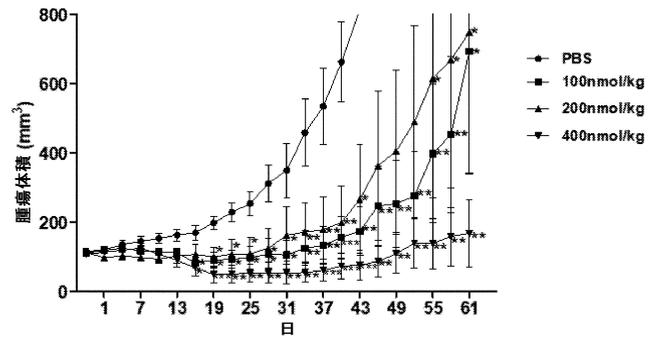


**B**



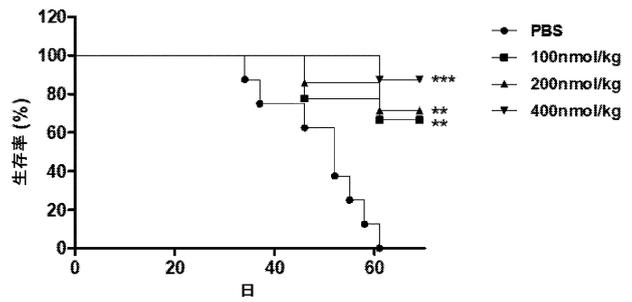
【 図 28 - 2 】

**C**



10

**D**



20

30

40

50

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和5年11月22日(2023.11.22)

【 手続補正1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2024517518000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/IB2022/051007**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>	
C07K 7/08(2006.01)i; C07K 14/435(2006.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 9/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 7/08(2006.01); A61K 47/48(2006.01); A61K 48/00(2006.01); A61K 51/12(2006.01); A61K 9/14(2006.01)	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: melittin peptide, conjugate, drug, alanine, substitution, macrophage, targeting	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X A	US 2011-0123438 A1 (WICKLINE, SAMUEL A. et al.) 26 May 2011 (2011-05-26) See paragraphs [0003], [0049], [0055]; Table A.
X	KR 10-2014-0012624 A (ARROWHEAD RESEARCH CORPORATION) 03 February 2014 (2014-02-03) See paragraphs [0071]-[0072]; table 10.
X	WO 2012-083046 A2 (ARROWHEAD RESEARCH CORPORATION) 21 June 2012 (2012-06-21) See pages 4-5; table 1.
A	LEE, CHANJU et al., 'Targeting of M2-like tumor-associated macrophages with a melittin-based pro-apoptotic peptide', Journal for Immunotherapy of Cancer, 2019, vol. 7, article no. 147, pp. 1-14 See the whole document.
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 <b>09 May 2022</b>	Date of mailing of the international search report <b>09 May 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/KR <b>Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208, Republic of Korea</b> Facsimile No. <b>+82-42-481-8578</b>	Authorized officer <b>HEO, Joo Hyung</b> Telephone No. <b>+82-42-481-5373</b>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/051007

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIAO, HONG et al., 'M2-like tumor-associated macrophage-targeted codelivery of STAT6 inhibitor and IKK $\beta$ siRNA induces M2-to-M1 repolarization for cancer immunotherapy with low immune side effects', ACS Central Science, 2020, vol. 6, pp. 1208-1222 See the whole document.	1-11

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/051007

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:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
- 2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/051007

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.: **18-34**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 18-34 pertain to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv)).
- 2.  Claims Nos.: **13,15,29,31**  
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:  
Claims 13, 15, 29, 31 refer to an unsearchable claim which does not comply with PCT Rule 6.4(a).
- 3.  Claims Nos.: **12,14,16-17,28,30,32-33**  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/IB2022/051007**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2011-0123438	A1	26 May 2011	US	8617516	B2	31 December 2013
				WO	2009-151788	A2	17 December 2009
KR	10-2014-0012624	A	03 February 2014	CN	103547272	A	29 January 2014
				EP	2651420	A2	23 October 2013
				EP	2651420	B1	03 October 2018
				JP	2014-507392	A	27 March 2014
				JP	2016-188207	A	04 November 2016
				JP	5926739	B2	25 May 2016
				US	2012-0165393	A1	28 June 2012
				US	2013-0281658	A1	24 October 2013
				US	2015-0352221	A1	10 December 2015
				US	2017-0056472	A1	02 March 2017
				US	8501930	B2	06 August 2013
				US	9107957	B2	18 August 2015
				US	9526796	B2	27 December 2016
				WO	2012-083185	A2	21 June 2012
WO	2012-083046	A2	21 June 2012	CN	103492568	A	01 January 2014
				EP	2652134	A2	23 October 2013
				EP	2652134	B1	01 March 2017
				EP	3192800	A1	19 July 2017
				JP	2014-504295	A	20 February 2014
				JP	2016-185968	A	27 October 2016
				JP	6261144	B2	17 January 2018
				KR	10-2013-0132475	A	04 December 2013
				US	2012-0157509	A1	21 June 2012
				US	2016-0102120	A1	14 April 2016
				US	9249179	B2	02 February 2016
				US	9796756	B2	24 October 2017

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 31/4406(2006.01)	A 6 1 K 31/4406	
A 6 1 K 31/4439(2006.01)	A 6 1 K 31/4439	
A 6 1 K 31/537(2006.01)	A 6 1 K 31/537	
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/19	
A 6 1 K 9/48 (2006.01)	A 6 1 K 9/48	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 38/03 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
	A 6 1 P 29/00	
	A 6 1 K 38/03	

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,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,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,N  
G,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. TRITON

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 バエ ヒュンス

大韓民国 0 5 2 2 9 ソウル カントン - ク アリス - ロ 5 0 - ギル 5 0 # 1 1 0 - 9 0 1

(72)発明者 ハン イク - ファン

大韓民国 1 2 1 6 1 キョンギ - ド ナミャンジュ - シ ファド - ウップ マソク - ロ 1 1 0 1 0  
4 - 6 0 4

(72)発明者 カン ムンキュ

---

大韓民国 1 2 2 5 7 キョンギ - ド ナミヤンジユ - シ ビョン - ギル 1 6 ダサンジゲウム - 口  
5 6 1 0 2 - 5 0 4

(72)発明者 チェ ホンソ  
大韓民国 0 4 9 9 9 ソウル クァンジン - ク クンジャ - 口 1 5 - ギル 4 2

(72)発明者 チェ ジョンヨン  
大韓民国 0 1 7 7 5 ソウル ノウォン - ク ドンギル - 口 2 0 7 - ギル 1 8 6 1 0 9 - 1 4 0 4

(72)発明者 リ ヒギョン  
大韓民国 1 6 9 2 7 キョンギ - ド ヨンイン - シ スチ - ク チンサン - 口 2 4

F ターム ( 参考 ) 4C076 AA31 AA53 BB13 BB16 CC01 CC04 CC07 CC15 CC16 CC17  
CC18 CC27 CC41 EE41 EE59

4C084 AA02 BA01 BA44 MA41 MA44 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA37  
ZA51 ZA52 ZA59 ZA68 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11 ZB15  
ZB21 ZB26 ZB35 ZC41

4C086 AA01 AA02 BC17 CB05 CB09 CB22 EA10 MA01 MA04 MA41  
MA44 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA37 ZA51 ZA52 ZA59 ZA68 ZA75  
ZA81 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11 ZB15 ZB21 ZB26 ZB35 ZC41

4H045 AA10 AA20 AA30 BA17 BA72 EA20 FA34