

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02019/017338

発行日 令和2年5月28日 (2020.5.28)

(43) 国際公開日 平成31年1月24日 (2019.1.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/15 (2006.01)	C 1 2 N 15/15	4 B 0 6 3
C 0 7 K 14/81 (2006.01)	C 0 7 K 14/81	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 C 0 7 6
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2019-531038 (P2019-531038)	(71) 出願人	307010166
(21) 国際出願番号	PCT/JP2018/026732		第一三共株式会社
(22) 国際出願日	平成30年7月17日 (2018.7.17)		東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(31) 優先権主張番号	特願2017-138998 (P2017-138998)	(74) 代理人	100146581
(32) 優先日	平成29年7月18日 (2017.7.18)		弁理士 石橋 公樹
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(74) 代理人	100113583
			弁理士 北野 範子
		(74) 代理人	100161160
			弁理士 竹元 利泰
		(74) 代理人	100119622
			弁理士 金原 玲子
		(72) 発明者	矢野 秀法
			東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
			第一三共株式会社内

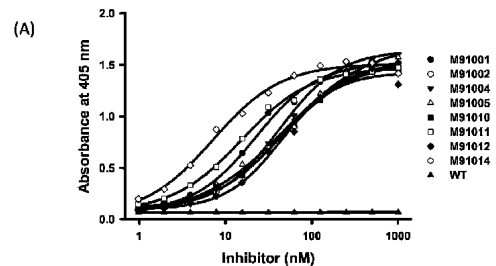
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性型MMP-9結合ペプチド

(57) 【要約】

新規ペプチドを提供すること

配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、且つ、活性型プロテアーゼに結合するが、前駆型プロテアーゼには結合しないペプチド。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 18 (図 32) で示されるアミノ酸配列を含み、且つ、活性型ヒト MMP - 9 に結合するが、前駆型ヒト MMP - 9 には結合しない SPINK2 変異体ペプチド。

【請求項 2】

活性型ヒト MMP - 9 酵素活性ドメインに結合する、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

ヒト MMP - 9 の有するプロテアーゼ活性を阻害する、請求項 1 又は 2 記載のペプチド。

10

【請求項 4】

該阻害が MMP - 9 特異的である、請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載のペプチド。

【請求項 5】

X₁ は Asp 又は Gly である、請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載のペプチド。

【請求項 6】

X₇ は Pro、X₉ は Gln、並びに、X₁₀ は Met である、請求項 1 乃至 5 のいずれか一つに記載のペプチド。

【請求項 7】

X₂ は Arg、Gln、Gly、Trp 又は Tyr、X₃ は Arg、Asp、Gln、Glu、Lys、Met、Ser、Thr 又は Val、X₄ は Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Gly、Leu、Lys 又は Val、X₅ は Ala、Arg、Asn、Gly、Ile、Leu 又は Lys、X₆ は Ala、Glu、Gly、Met 又は Ser、X₈ は Ala、Leu 又は Ser、X₁₁ は Ala、Gly 又は Ser、X₁₂ は Leu、Phe、Ser 又は Tyr、並びに、X₁₃ は Asn、Asp、Gln、Leu 又は Lys である、請求項 6 記載のペプチド。

20

【請求項 8】

X₂ は Arg 又は Gln、X₃ は Arg、Gln、Lys、Thr 又は Val、X₄ は Arg、Gly 又は Val、X₅ は Arg、Gly、Ile 又は Lys、X₆ は Glu 又は Gly、X₈ は Ala 又は Ser、X₁₁ は Ala、Gly 又は Ser、X₁₂ は Phe 又は Tyr、並びに、X₁₃ は Asn、Gln 又は Lys である、請求項 7 記載のペプチド。

30

【請求項 9】

配列番号 2 乃至 6 及び 8 (図 16 乃至 20 及び 22) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 記載のペプチド。

【請求項 10】

X₆ は Tyr、X₈ は Gln、並びに、X₉ は Ser である、請求項 1 乃至 5 のいずれか一つに記載のペプチド。

【請求項 11】

X₂ は Arg、Lys、Met 又は Val、X₃ は Arg、Gln、Lys 又は Met、X₄ は Phe 又は Tyr、X₅ は Gln、Glu 又は Lys、X₇ は Ala 又は Gly、X₁₀ は Asn 又は His、X₁₁ は Leu、Lys、Met 又は Val、X₁₂ は Phe、Ser 又は Tyr、並びに、X₁₃ は Ala、Asn、Gln 又は Lys 又は Gln 又は Lys である、請求項 10 記載のペプチド。

40

【請求項 12】

X₂ は Met 又は Val、X₃ は Met、X₄ は Tyr、X₅ は Lys、X₇ は Ala、X₁₀ は His、X₁₁ は Lys、X₁₂ は Ser 又は Tyr、並びに、X₁₃ は Gln 又は Lys である、請求項 11 記載のペプチド。

【請求項 13】

配列番号 7 (図 21) 又は配列番号 9 (図 23) で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 12 記載のペプチド。

50

【請求項 14】

配列番号 18 (図 32) で示されるアミノ酸配列のアミノ末端側に、1 乃至 3 個のアミノ酸残基が付加してなるアミノ酸配列、又は、配列番号 19 (図 33) もしくは配列番号 20 (図 34) で示されるアミノ酸配列が付加してなるアミノ酸配列を含む、請求項 1 乃至 13 のいずれか一つに記載のペプチド。

【請求項 15】

配列番号 18 (図 32) で示されるアミノ酸配列のカルボキシル末端側に、1 乃至 6 個のアミノ酸からなるアミノ酸配列が付加してなるアミノ酸配列を含む、請求項 1 乃至 14 のいずれか一つに記載のペプチド。

【請求項 16】

配列番号 2 乃至 17 (図 16 乃至 31) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 乃至 15 のいずれか一つに記載のペプチド。

【請求項 17】

3 つのジスルフィド結合を有し、ループ構造、 α ヘリックス及び β シートを含むことで特徴付けられる立体構造を有する、請求項 1 乃至 16 のいずれか一つに記載のペプチド。

【請求項 18】

請求項 1 乃至 17 のいずれか一つに記載のペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 19】

請求項 18 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 20】

請求項 18 記載のポリヌクレオチド若しくは請求項 19 記載のベクターを含むか又は請求項 1 乃至 17 のいずれか一つに記載のペプチドを産生する細胞。

【請求項 21】

下記工程 (i) 及び (ii) を含む、SPINK2 変異体ペプチドの製造方法：

(i) 請求項 20 記載の細胞を培養する工程；

(ii) 該培養物から SPINK2 変異体ペプチドを回収する工程。

【請求項 22】

請求項 1 乃至 17 のいずれか一つに記載のペプチドを化学合成又はイン・ビトロ翻訳により調製する工程を含む、該ペプチドの製造方法。

【請求項 23】

請求項 21 又は 22 記載の方法により得られる SPINK2 変異体ペプチド。

【請求項 24】

請求項 1 乃至 17 及び 23 のいずれか一つに記載のペプチドに他の部分が結合してなるコンジュゲート。

【請求項 25】

ペプチドである、請求項 24 記載のコンジュゲート。

【請求項 26】

免疫グロブリンのFc領域又はその機能断片を含む、請求項 24 又は 25 記載のコンジュゲート。

【請求項 27】

下記工程 (i) 及び (ii) を含む、請求項 24 乃至 26 のいずれか一つに記載の SPINK2 変異体ペプチドコンジュゲートの製造方法：

(i) 該コンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド又は該ポリヌクレオチドが挿入されたベクターを含む細胞を培養する工程；

(ii) 該培養物から SPINK2 変異体ペプチドコンジュゲート又は該コンジュゲートに含まれるペプチド部分を回収する工程。

【請求項 28】

請求項 24 乃至 26 のいずれか一つに記載の SPINK2 変異体ペプチドコンジュゲート

10

20

30

40

50

ト又は該コンジュゲートに含まれるペプチド部分を化学合成又はイン・ビトロ翻訳により調製する工程を含む、該コンジュゲートの製造方法。

【請求項 29】

請求項 27 又は 28 記載の方法により得られる S P I N K 2 変異体ペプチドコンジュゲート。

【請求項 30】

請求項 1 乃至 17 及び 23 のいずれか一つに記載のペプチドに結合する抗体又はその機能断片。

【請求項 31】

請求項 1 乃至 17 及び 23 のいずれか一つに記載のペプチド、請求項 18 記載のポリヌクレオチド、請求項 19 記載のベクター、請求項 20 記載の細胞、請求項 24 乃至 26 及び 29 のいずれか一つに記載のコンジュゲート、及び / 又は、請求項 30 記載の抗体もしくはその機能断片を含む組成物。

10

【請求項 32】

請求項 1 乃至 17 及び 23 のいずれか一つに記載のペプチド及び / 又は請求項 24 乃至 26 及び 29 のいずれか一つに記載のコンジュゲートを含む、検査用又は診断用組成物。

【請求項 33】

下記工程 (i) 及び (i i) を含む、活性型 M M P - 9 の検出方法：

(i) 請求項 1 乃至 17 及び 23 のいずれか一つに記載のペプチド及び / 又は請求項 24 乃至 26 及び 29 のいずれか一つに記載のコンジュゲートを被検試料と接触させる工程；
及び

20

(i i) 該被検試料の成分に結合した該ペプチド及び / 又はコンジュゲートを測定する工程。

【請求項 34】

工程 (i i) が該被検試料と接触させた該ペプチド及び / 又はコンジュゲートを回収し、該ペプチド及び / 又はコンジュゲートに結合した活性型 M M P - 9 の量又は活性を測定する工程である、請求項 33 記載の検出方法

【請求項 35】

請求項 1 乃至 17 及び 23 のいずれか一つに記載のペプチド、請求項 18 記載のポリヌクレオチド、請求項 19 記載のベクター、請求項 20 記載の細胞、並びに / 又は、請求項 24 乃至 26 及び 29 のいずれか一つに記載のコンジュゲートを含む、医薬組成物。

30

【請求項 36】

M M P - 9 関連疾患の治療又は予防のための、請求項 35 記載の医薬組成物。

【請求項 37】

M M P - 9 関連疾患が炎症性・自己免疫性疾患、神経変性疾患、精神疾患、血管系疾患、又は悪性腫瘍である、請求項 36 記載の医薬組成物。

【請求項 38】

炎症性・自己免疫性疾患が関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、気管支喘息、間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、肝炎、湿疹（皮膚炎）、乾癬、扁平苔癬、紅斑・紅皮症、蕁麻疹、脱毛症、天疱瘡、尋常性ざ瘡、褥瘡・創傷、結膜炎、角膜炎、鼻炎、口内炎、舌炎、ベーチェット病、多発性硬化症、脳炎、頭痛、末梢神経炎、糖尿病合併症（糖尿病網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害）、アテローム性動脈硬化症、肺炎、慢性心不全、又は、腎炎である、請求項 37 記載の医薬組成物。

40

【請求項 39】

神経変性疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、脳損傷、脊髄損傷、低酸素症、痙攣、又は、外傷性脳障害である、請求項 37 記載の医薬組成物。

【請求項 40】

精神疾患が大うつ病、双極性障害、不安、外傷後ストレス障害（P T S D）、摂食障害、睡眠障害、統合失調症、依存症、自閉症、脆弱 X 症候群、注意欠陥多動性障害、又は、

50

ダウン症候群である、請求項 37 記載の医薬組成物。

【請求項 41】

血管系疾患が脳血管障害、脳動脈瘤、脳アミロイド血管症、末梢血管障害、大動脈瘤、大動脈解離、動静脈瘤、動脈硬化症、高安動脈炎、川崎病、静脈瘤、又は、血管石灰化である、請求項 37 記載の医薬組成物。

【請求項 42】

悪性腫瘍が肺癌、乳癌、膵臓癌、大腸癌、又は、神経膠腫である、請求項 37 記載の医薬組成物。

【請求項 43】

請求項 30 記載の抗体又はその機能断片を含む、検査用又は診断用組成物。

10

【請求項 44】

請求項 30 記載の抗体又はその機能断片を用いたアフィニティー精製工程を含む、請求項 21、22、27 又は 28 に記載の製造方法。

【請求項 45】

下記工程 (i) 乃至 (iii) を含む、ヒト MMP-9 阻害 SPINK2 変異体ペプチドの同定方法：

(i) 被験 SPINK2 変異体ペプチド存在下及び非存在下で、ヒト MMP-9 プロテアーゼ及び基質を保温する工程；

(ii) 被験 SPINK2 変異体ペプチド存在下及び非存在下におけるヒト MMP-9 プロテアーゼ活性を測定する工程；及び

20

(iii) 該ペプチド存在下でのヒト MMP-9 プロテアーゼ活性が、該ペプチド非存在下でのヒト MMP-9 プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該ペプチドを陽性と判定する工程。

【請求項 46】

下記工程 (i) 乃至 (iii) を含む、ヒト MMP-9 特異的阻害化合物の同定方法：

(i) 配列番号 2 乃至 17 (図 16 乃至 31) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチドの存在下で、被験化合物をヒト活性型 MMP-9 と結合させる工程；

(ii) 該化合物が、ヒト活性型 MMP-9 との結合において、該ペプチドと競合するかどうかを決定する工程；及び、

(iii) 該化合物がヒト MMP-9 特異的結合活性を有するか否かを決定する工程。

30

【請求項 47】

該化合物が SPINK2 変異体ペプチドである、請求項 46 記載の方法。

【請求項 48】

該化合物が抗体又は抗原結合タンパク質である、請求項 46 記載の方法。

【請求項 49】

該ペプチド、抗体又は抗原結合タンパク質を、化学合成、イン・ビトロ翻訳、又は組換えにより調製する工程をさらに含む、請求項 45、47 又は 48 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、ペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、ペプチドの製造方法、かかる方法により得られるペプチド、ペプチドを含む組成物、ペプチドを含む医薬組成物、ペプチドを含む各種疾患の治療又は予防のための該医薬組成物、各種疾患の治療又は予防のためのペプチドの使用、ペプチドを投与する工程を含む各種疾患の治療方法、ペプチドを含む各種疾患の診断又は検査のための組成物等に関する。

【背景技術】

【0002】

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) はメタロプロテアーゼ (Clan MA, family M10) であり、N 末のプロペプチド、亜鉛イオンを配位した酵素活性ドメイン、基質との結合に関与するフィブロネクチン II 型

50

ドメイン、C末のHPXドメインから構成される（非特許文献1）。MMP-9は非活性型の前駆型MMP-9（pro-MMP-9）として分泌され、MMP-3やプラスミン等のプロテアーゼによるプロペプチドの切断によって、活性型MMP-9（active MMP-9）へと変換される（非特許文献2、3）。活性型MMP-9はIV型コラーゲンやエラスチン等多くの細胞外マトリックス蛋白質や、IL-1 β やIL-8等のサイトカインを基質として切断し、細胞増殖や分化、遊走、アポトーシス等多くの生理作用に関与する（非特許文献4）。

【0003】

MMP-9の過剰な亢進は組織構築の破壊並びに細胞機能の制御不全を起因とする様々な疾患の発症や増悪に繋がると考えられている。特に、大腸炎をはじめとする多くの炎症性疾患では上皮構造及びバリア機能の破綻並びに炎症反応の持続的な増幅、脳血管障害や大動脈疾患を代表とする血管系疾患では血液脳関門や基底膜の破綻、弾性線維の破壊等、その病態生理に深く関与することが示唆されている。過剰に亢進したMMP-9活性を抑えるMMP-9阻害剤は、MMP-9関連疾患の治療薬になり得ると期待され、これまでに多くのMMP-9阻害剤が取得された。MMPファミリー分子の活性中心のアミノ酸配列は相同性が非常に高いため、MMP-9の酵素活性中心に配位する亜鉛イオンをキレートする低分子化合物は強力なMMP-9阻害活性を示す一方、他のMMPの活性も強く阻害する（非特許文献5）。このような非選択的MMP-9阻害剤を投与した臨床試験では、筋骨格系に重篤な副作用が認められ、開発は中止に至っている（非特許文献6、7）。酵素活性中心を標的とする場合、低分子阻害剤を用いてMMP-9特異的阻害剤を取得することは困難である。

【0004】

抗体医薬創製技術の進歩に伴い、抗体分子を用いたMMP阻害抗体の取得が試みられており、MMP-9阻害抗体についても報告されている。酵素活性中心に結合する抗体は強力なMMP-9阻害活性を示す一方、MMP-2及びMMP-14阻害活性も示し、MMP-9を特異的に阻害することはできない（特許文献1、2、3、非特許文献8）。また、MMPファミリー分子間のアミノ酸配列相同性が低い領域に結合する抗体は、強力かつMMP-9特異的な阻害活性を示す一方、活性型MMP-9のみならず非活性型の前駆型MMP-9にも結合するため、活性型MMP-9特異的に結合することはできない（特許文献4、5、6、非特許文献9、10）。前駆型MMP-9には結合せず、活性型MMP-9特異的に結合してMMP-9活性を特異的に阻害する抗体も報告されている（特許文献7、8、非特許文献11）が、抗体又はその断片以外の分子量の小さい蛋白質（例えば、免疫グロブリン可変領域を含まない蛋白質又はペプチド）であって、前駆型MMP-9には結合せず、活性型MMP-9特異的に結合してMMP-9活性を阻害するものは知られていない。

【0005】

SPINK2（Serine Protease Inhibitor Kazal-type 2）は、3つのジスルフィド結合を有するKazal様ドメインであり、trypsin/acrosin inhibitorとして機能する（非特許文献12）が、活性型MMP-9結合活性との関係は明らかにされていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO2004/087042

【特許文献2】WO2008/102359

【特許文献3】WO2011/092700

【特許文献4】WO2012/027721

【特許文献5】WO2013/130078

【特許文献6】WO2013/130905

【特許文献7】WO2016/023972

10

20

30

40

50

【特許文献 8】W O 2 0 1 6 / 0 2 3 9 7 9

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】ナガセ エイチ他 (Nagase H, et al.) (1999 年刊)
ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J Biol Chem.) 274 巻 (31 号) : 21491 - 4 頁

【非特許文献 2】オガタ ワイ他 (Ogata Y, et al.) (1992 年刊)
ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J Biol Chem.) 267 巻 (6 号) : 3581 - 4 頁

【非特許文献 3】レイネン エイチ・アール他 (Lijnen HR, et al.) (1998 年刊) ブラッド (Blood) 91 巻 (6 号) : 2045 - 53 頁

10

【非特許文献 4】バンドーレン ジェイ他 (Vandooren J, et al.) (2013 年刊) クリティカル・レビューズ・イン・バイオケミストリー・アンド・モレキュラー・バイオロジー (Crit Rev Biochem Mol Biol.) 48 巻 (3 号) : 222 - 72 頁

【非特許文献 5】チェン エム他 (Cheng M, et al.) (2000 年刊)
ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J Med Chem.) 43 巻 (3 号) : 369 - 80 頁

【非特許文献 6】クーセン エル・エム他 (Coussens LM, et al.) (2002 年刊) サイエンス (Science.) 295 巻 (5564 号) : 2387 - 92 頁

20

【非特許文献 7】ビセット ディー他 (Bissett D, et al.) (2005 年刊) ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J Clin Oncol.) 23 巻 (4 号) : 842 - 9 頁

【非特許文献 8】セラ・パスウェル エヌ他 (Sela - Passwell N, et al.) (2011 年刊) ネイチャー・メディシン (Nat Med.) 18 巻 (1 号) : 143 - 7 頁

【非特許文献 9】マーシャル ディー・シー他 (Marshall DC, et al.) (2015 年刊) プロス・ワン (PLOS One.) 10 巻 (5 号) : e0127063 頁

30

【非特許文献 10】アップルビー ティー・シー他 (Appleby TC, et al.) (2017 年刊) ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J Biol Chem.) 292 巻 (16 号) : 6810 - 20 頁

【非特許文献 11】ゴフィン エル他 (Goffin L, et al.) (2016 年刊) インフラマトリー・パウエル・ディジーズ (Inflamm Bowel Dis.) 22 巻 (9 号) : 2041 - 57 頁

【非特許文献 12】チェン ティー他 (Chen T, et al.) (2009 年刊) プロテインズ (Proteins.) 77 巻 (1 号) : 209 - 19 頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0008】

新規な活性型 Matrix metalloproteinase - 9 (MMP - 9) 結合ペプチドを提供すること。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は

(1)

配列番号 18 (図 32) で示されるアミノ酸配列を含み、且つ、活性型ヒト MMP - 9 に結合するが、前駆型ヒト MMP - 9 には結合しない SPINK2 変異体ペプチド、

(2)

50

活性型ヒトMMP-9酵素活性ドメインに結合する、(1)記載のペプチド、

(3)

ヒトMMP-9の有するプロテアーゼ活性を阻害する、(1)又は(2)記載のペプチド、

(4)

該阻害がMMP-9特異的である、(1)乃至(3)のいずれか一つに記載のペプチド、

(5)

X_1 はAsp又はGlyである、(1)乃至(4)のいずれか一つに記載のペプチド、

【0010】

(6)

X_7 はPro、 X_9 はGln、並びに、 X_{10} はMetである、(1)乃至(5)のいずれか一つに記載のペプチド、

(7)

X_2 はArg、Gln、Gly、Trp又はTyr、 X_3 はArg、Asp、Gln、Glu、Lys、Met、Ser、Thr又はVal、 X_4 はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Gly、Leu、Lys又はVal、 X_5 はAla、Arg、Asn、Gly、Ile、Leu又はLys、 X_6 はAla、Glu、Gly、Met又はSer、 X_8 はAla、Leu又はSer、 X_{11} はAla、Gly又はSer、 X_{12} はLeu、Phe、Ser又はTyr、並びに、 X_{13} はAsn、Asp、Gln、Leu又はLysである、(6)記載のペプチド、

(8)

X_2 はArg又はGln、 X_3 はArg、Gln、Lys、Thr又はVal、 X_4 はArg、Gly又はVal、 X_5 はArg、Gly、Ile又はLys、 X_6 はGlu又はGly、 X_8 はAla又はSer、 X_{11} はAla、Gly又はSer、 X_{12} はPhe又はTyr、並びに、 X_{13} はAsn、Gln又はLysである、(7)記載のペプチド、

(9)

配列番号2乃至6及び8(図16乃至20及び22)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、(8)記載のペプチド、

(10)

X_6 はTyr、 X_8 はGln、並びに、 X_9 はSerである、(1)乃至(5)のいずれか一つに記載のペプチド、

【0011】

(11)

X_2 はArg、Lys、Met又はVal、 X_3 はArg、Gln、Lys又はMet、 X_4 はPhe又はTyr、 X_5 はGln、Glu又はLys、 X_7 はAla又はGly、 X_{10} はAsn又はHis、 X_{11} はLeu、Lys、Met又はVal、 X_{12} はPhe、Ser又はTyr、並びに、 X_{13} はAla、Asn、Gln又はLysはGln又はLysである、(10)記載のペプチド、

(12)

X_2 はMet又はVal、 X_3 はMet、 X_4 はTyr、 X_5 はLys、 X_7 はAla、 X_{10} はHis、 X_{11} はLys、 X_{12} はSer又はTyr、並びに、 X_{13} はGln又はLysである、(11)記載のペプチド、

(13)

配列番号7(図21)又は配列番号9(図23)で示されるアミノ酸配列を含む、(12)記載のペプチド、

(14)

配列番号18(図32)で示されるアミノ酸配列のアミノ末端側に、1乃至3個のアミノ酸残基が付加してなるアミノ酸配列、又は、配列番号19(図33)もしくは配列番号

10

20

30

40

50

20 (図34)で示されるアミノ酸配列が付加してなるアミノ酸配列を含む、(1)乃至(13)のいずれか一つに記載のペプチド、
(15)

配列番号18(図32)で示されるアミノ酸配列のカルボキシル末端側に、1乃至6個のアミノ酸からなるアミノ酸配列が付加してなるアミノ酸配列を含む、(1)乃至(14)のいずれか一つに記載のペプチド、

【0012】

(16)

配列番号2乃至17(図16乃至31)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、(1)乃至(15)のいずれか一つに記載のペプチド、

10

(17)

3つのジスルフィド結合を有し、ループ構造、 α ヘリックス及び β シートを含むことで特徴付けられる立体構造を有する、(1)乃至(16)のいずれか一つに記載のペプチド、

(18)

(1)乃至(17)のいずれか一つに記載のペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、

(19)

(18)記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

(20)

20

(18)記載のポリヌクレオチド若しくは(19)記載のベクターを含むか又は(1)乃至(17)のいずれか一つに記載のペプチドを産生する細胞、

【0013】

(21)

下記工程(i)及び(ii)を含む、SPINK2変異体ペプチドの製造方法：

(i)(20)記載の細胞を培養する工程；

(ii)該培養物からSPINK2変異体ペプチドを回収する工程、

(22)

(1)乃至(17)のいずれか一つに記載のペプチドを化学合成又はイン・ビトロ翻訳により調製する工程を含む、該ペプチドの製造方法、

30

(23)

(21)又は(22)記載の方法により得られるSPINK2変異体ペプチド、

(24)

(1)乃至(17)及び(23)のいずれか一つに記載のペプチドに他の部分が結合してなるコンジュゲート、

(25)

ペプチドである、(24)記載のコンジュゲート、

【0014】

(26)

免疫グロブリンのFc領域又はその機能断片を含む、(24)又は(25)記載のコンジュゲート、

40

(27)

下記工程(i)及び(ii)を含む、(24)乃至(26)のいずれか一つに記載のSPINK2変異体ペプチドコンジュゲートの製造方法：

(i)該コンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド又は該ポリヌクレオチドが挿入されたベクターを含む細胞を培養する工程；

(ii)該培養物からSPINK2変異体ペプチドコンジュゲート又は該コンジュゲートに含まれるペプチド部分を回収する工程、

(28)

50

(2 4) 乃至 (2 6) のいずれか一つに記載の S P I N K 2 変異体ペプチドコンジュゲート又は該コンジュゲートに含まれるペプチド部分を化学合成又はイン・ビトロ翻訳により調製する工程を含む、該コンジュゲートの製造方法、

(2 9)

(2 7) 又は (2 8) 記載の方法により得られる S P I N K 2 変異体ペプチドコンジュゲート、

(3 0)

(1) 乃至 (1 7) 及び (2 3) のいずれか一つに記載のペプチドに結合する抗体又はその機能断片、

【 0 0 1 5 】

(3 1)

(1) 乃至 (1 7) 及び (2 3) のいずれか一つに記載のペプチド、(1 8) 記載のポリヌクレオチド、(1 9) 記載のベクター、(2 0) 記載の細胞、(2 4) 乃至 (2 6) 及び (2 9) のいずれか一つに記載のコンジュゲート、及び / 又は、(3 0) 記載の抗体もしくはその機能断片を含む組成物、

(3 2)

(1) 乃至 (1 7) 及び (2 3) のいずれか一つに記載のペプチド及び / 又は (2 4) 乃至 (2 6) 及び (2 9) のいずれか一つに記載のコンジュゲートを含む、検査用又は診断用組成物、

(3 3)

下記工程 (i) 及び (i i) を含む、活性型 M M P - 9 の検出方法：

(i) (1) 乃至 (1 7) 及び (2 3) のいずれか一つに記載のペプチド及び / 又は (2 4) 乃至 (2 6) 及び (2 9) のいずれか一つに記載のコンジュゲートを被験試料と接触させる工程；及び

(i i) 該被験試料の成分に結合した該ペプチド及び / 又はコンジュゲートを測定する工程、

(3 4)

工程 (i i) が該被験試料と接触させた該ペプチド及び / 又はコンジュゲートを回収し、該ペプチド及び / 又はコンジュゲートに結合した活性型 M M P - 9 の量又は活性を測定する工程である、(3 3) 記載の検出方法、

(3 5)

(1) 乃至 (1 7) 及び (2 3) のいずれか一つに記載のペプチド、(1 8) 記載のポリヌクレオチド、(1 9) 記載のベクター、(2 0) 記載の細胞、並びに / 又は、(2 4) 乃至 (2 6) 及び (2 9) のいずれか一つに記載のコンジュゲートを含む、医薬組成物、

【 0 0 1 6 】

(3 6)

M M P - 9 関連疾患の治療又は予防のための、(3 5) 記載の医薬組成物、

(3 7)

M M P - 9 関連疾患が炎症性・自己免疫性疾患、神経変性疾患、精神疾患、血管系疾患、又は悪性腫瘍である、(3 6) 記載の医薬組成物、

(3 8)

炎症性・自己免疫性疾患が関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、気管支喘息、間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、肝炎、湿疹（皮膚炎）、乾癬、扁平苔癬、紅斑・紅皮症、蕁麻疹、脱毛症、天疱瘡、尋常性ざ瘡、褥瘡・創傷、結膜炎、角膜炎、鼻炎、口内炎、舌炎、ベーチェット病、多発性硬化症、脳炎、頭痛、末梢神経炎、糖尿病合併症（糖尿病網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害）、アテローム性動脈硬化症、脾炎、慢性心不全、又は、腎炎である、(3 7) 記載の医薬組成物、

(3 9)

神経変性疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬

10

20

30

40

50

化症、前頭側頭型認知症、脳損傷、脊髄損傷、低酸素症、痙攣、又は、外傷性脳障害である、(37)記載の医薬組成物、

(40)

精神疾患が大うつ病、双極性障害、不安、外傷後ストレス障害(P T S D)、摂食障害、睡眠障害、統合失調症、依存症、自閉症、脆弱X症候群、注意欠陥多動性障害、又は、ダウン症候群である、(37)記載の医薬組成物、

【0017】

(41)

血管系疾患が脳血管障害、脳動脈瘤、脳アミロイド血管症、末梢血管障害、大動脈瘤、大動脈解離、動静脈瘻、動脈硬化症、高安動脈炎、川崎病、静脈瘤、又は、血管石灰化である、(37)記載の医薬組成物、

(42)

悪性腫瘍が肺癌、乳癌、膵臓癌、大腸癌、又は、神経膠腫である、(37)記載の医薬組成物、

(43)

(30)記載の抗体又はその機能断片を含む、検査用又は診断用組成物、

(44)

(30)記載の抗体又はその機能断片を用いたアフィニティー精製工程を含む、(21)、(22)、(27)又は(28)記載の製造方法、

(45)

下記工程(i)乃至(iii)を含む、ヒトMMP-9阻害SPINK2変異体ペプチドの同定方法：

(i)被験SPINK2変異体ペプチド存在下及び非存在下で、ヒトMMP-9プロテアーゼ及び基質を保温する工程；

(ii)被験SPINK2変異体ペプチド存在下及び非存在下におけるヒトMMP-9プロテアーゼ活性を測定する工程；及び

(iii)該ペプチド存在下でのヒトMMP-9プロテアーゼ活性が、該ペプチド非存在下でのヒトMMP-9プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該ペプチドを陽性と判定する工程、

【0018】

(46)

下記工程(i)乃至(iii)を含む、ヒトMMP-9特異的阻害化合物の同定方法：

(i)配列番号2乃至17(図16乃至31)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチドの存在下で、被験化合物をヒト活性型MMP-9と結合させる工程；

(ii)該化合物が、ヒト活性型MMP-9との結合において、該ペプチドと競合するかどうかを決定する工程；及び、

(iii)該化合物がヒトMMP-9特異的結合活性を有するか否かを決定する(任意の)工程、

(47)

該化合物がSPINK2変異体ペプチドである、(46)記載の方法、

(48)

該化合物が抗体又は抗原結合タンパク質である、(46)記載の方法、及び、

(49)

該ペプチド、抗体又は抗原結合タンパク質を、化学合成、イン・ビトロ翻訳、又は組換えにより調製する工程をさらに含む、(45)、(47)又は(48)記載の方法、等に関する。

【発明の効果】

【0019】

本発明の提供するペプチド又はそれを含む医薬組成物は、活性型MMP-9結合活性を有し、MMP-9関連疾患の治療又は予防、活性型MMP-9の検出等に有用である。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1(A)】ヒト/サル/ラット/マウスMMP-9の配列類似性を比較した図。破線はプロペプチド(ヒトMMP-9: Ala20~Arg106)を、実線はフィブロネクチンII型ドメイン(ヒトMMP-9: Ala225~Ser273、Ala283~Thr331、Ser342~Asp390)を含む酵素活性ドメイン(ヒトMMP-9: Phe107~Pro449)を示す。

【図1(B)】ヒト/サル/ラット/マウスMMP-9の配列類似性を比較した図(続き)。

【図1(C)】ヒト/サル/ラット/マウスMMP-9の配列類似性を比較した図(続き)。

【図2(A)】活性型MMP-9結合ペプチドのアミノ末端に付加したタグの検出強度を指標として、各結合ペプチド又は野生型SPINK2の活性型ヒトMMP-9結合活性($n=2$)を評価した図。

【図2(B)】活性型MMP-9結合ペプチドのアミノ末端に付加したタグの検出強度を指標として、各結合ペプチド又は野生型SPINK2の前駆型ヒトMMP-9結合活性($n=2$)を評価した図。

【図3】活性型MMP-9結合ペプチドの活性型ヒトMMP-9結合活性 EC_{50} ($n=2$)を示した表。

【図4(A)】基質ペプチドの分解速度を指標として、活性型MMP-9結合ペプチドのヒトMMP-9阻害活性($n=3$, Mean $\pm$ SD)を評価した図。

【図4(B)】基質ペプチドの分解速度を指標として、活性型MMP-9結合ペプチドのヒトMMP-9阻害活性($n=3$, Mean $\pm$ SD)を評価した図(続き)。

【図5】基質ペプチドを用いた場合の、活性型MMP-9結合ペプチドのヒトMMP-9阻害定数 K_i ($n=3$, Mean $\pm$ SD)を示した表。

【図6】基質ゼラチンの分解速度を指標として、活性型MMP-9結合ペプチドのヒトMMP-9阻害活性($n=3$, Mean $\pm$ SD)を評価した図。

【図7】基質ゼラチンを用いた場合の、活性型MMP-9結合ペプチドのヒトMMP-9阻害活性 IC_{50} ($n=3$, Mean $\pm$ SD)を示した表。

【図8】基質ペプチドの分解速度を指標として、活性型MMP-9結合ペプチドのマウスMMP-9阻害活性($n=3$, Mean $\pm$ SD)を評価した図。

【図9】基質ペプチドを用いた場合の、活性型MMP-9結合ペプチドのマウスMMP-9阻害活性 IC_{50} ($n=3$, Mean $\pm$ SD)を示した表。

【図10】基質ペプチドの分解速度を指標として、活性型MMP-9結合ペプチドの各MMP又はADAM17阻害活性 IC_{50} ($n=3$, Mean $\pm$ SD)を示した表。

【図11(A)】基質ペプチドの分解速度を指標として、活性型MMP-9結合ペプチドM91002、そのC末誘導体M91002__G3、M91002__G2及びM91002__G0のヒトMMP-9阻害活性($n=3$, Mean $\pm$ SD)を評価した図。

【図11(B)】基質ペプチドを用いた場合の、活性型MMP-9結合ペプチドM91002、そのC末誘導体M91002__G3、M91002__G2及びM91002__G0のヒトMMP-9阻害活性 IC_{50} ($n=3$, Mean $\pm$ SD)を示した表。

【図12(A)】基質ペプチドの分解速度を指標として、活性型MMP-9結合ペプチドM91005及びそのC末コンジュゲートM91005-Fc-01のヒトMMP-9阻害活性($n=1$)を評価した図。

【図12(B)】基質ペプチドを用いた場合の、活性型MMP-9結合ペプチドM91005及びそのC末コンジュゲートM91005-Fc-01のヒトMMP-9阻害活性 IC_{50} ($n=1$)を示した表。

【図13(A)】基質ペプチドの分解速度を指標として、活性型MMP-9結合ペプチドのC末コンジュゲートM91005-Fc-01及びそのN末誘導体M91005__D1G-Fc-01のヒトMMP-9阻害活性($n=1$)を評価した図。

10

20

30

40

50

【図 13 (B)】基質ペプチドを用いた場合の、活性型 MMP - 9 結合ペプチドの C 末コンジュゲート M91005 - Fc - 01 及びその N 末誘導体 M91005 __ D1G - Fc - 01 のヒト MMP - 9 阻害活性 IC_{50} ($n = 1$) を示した表。

【図 14 (A)】活性型 MMP - 9 結合ペプチドが前駆型ヒト MMP - 9 に結合せず、活性型ヒト MMP - 9 に結合することを免疫沈降法により評価した図。添加したヒト MMP - 9 酵素活性ドメインは Input (Inp)、ビーズと結合しなかった上清画分は Flow-through (FT)、ビーズに結合した沈殿画分は Eluate (Elu) と表す。前駆型ヒト MMP - 9 酵素活性ドメインを添加したとき、Inp と FT のレーンに約 50 kDa のバンドが検出され、Elu のレーンにはバンドが検出されなかった。活性型ヒト MMP - 9 酵素活性ドメインを添加したとき、Inp と Elu のレーンに約 40 kDa のバンドが検出され、FT のレーンにはバンドが検出されなかった。活性型 MMP - 9 結合ペプチドの C 末コンジュゲート M91005 - Fc - 01 を添加せずに免疫沈降した場合、Elu のレーンにはバンドが検出されなかった。

【図 14 (B)】活性型 MMP - 9 結合ペプチドが前駆型マウス MMP - 9 に結合せず、活性型マウス MMP - 9 に結合することを免疫沈降法により評価した図。添加したマウス MMP - 9 酵素活性ドメインは Input (Inp)、ビーズと結合しなかった上清画分は Flow-through (FT)、ビーズに結合した沈殿画分は Eluate (Elu) と表す。前駆型マウス MMP - 9 酵素活性ドメインを添加したとき、Inp と FT のレーンに約 60 kDa のバンドが検出され、Elu のレーンにはバンドが検出されなかった。活性型マウス MMP - 9 酵素活性ドメインを添加したとき、Inp と Elu のレーンに約 40 kDa のバンドが検出され、FT のレーンにはバンドが検出されなかった。活性型 MMP - 9 結合ペプチドの C 末コンジュゲート M91005 - Fc - 01 を添加せずに免疫沈降した場合、Elu のレーンにはバンドが検出されなかった。

【図 15】ヒト SPINK2 のアミノ酸配列 (配列番号 1)

【図 16】ペプチド M91001 のアミノ酸配列 (配列番号 2)

【図 17】ペプチド M91002 のアミノ酸配列 (配列番号 3)

【図 18】ペプチド M91004 のアミノ酸配列 (配列番号 4)

【図 19】ペプチド M91005 のアミノ酸配列 (配列番号 5)

【図 20】ペプチド M91010 のアミノ酸配列 (配列番号 6)

【図 21】ペプチド M91011 のアミノ酸配列 (配列番号 7)

【図 22】ペプチド M91012 のアミノ酸配列 (配列番号 8)

【図 23】ペプチド M91014 のアミノ酸配列 (配列番号 9)

【図 24】ペプチド誘導体 M91001 __ D1G のアミノ酸配列 (配列番号 10)

【図 25】ペプチド誘導体 M91002 __ D1G のアミノ酸配列 (配列番号 11)

【図 26】ペプチド誘導体 M91004 __ D1G のアミノ酸配列 (配列番号 12)

【図 27】ペプチド誘導体 M91005 __ D1G のアミノ酸配列 (配列番号 13)

【図 28】ペプチド誘導体 M91010 __ D1G のアミノ酸配列 (配列番号 14)

【図 29】ペプチド誘導体 M91011 __ D1G のアミノ酸配列 (配列番号 15)

【図 30】ペプチド誘導体 M91012 __ D1G のアミノ酸配列 (配列番号 16)

【図 31】ペプチド誘導体 M91014 __ D1G のアミノ酸配列 (配列番号 17)

【図 32】活性型 MMP - 9 結合ペプチドの一般式 (配列番号 18)。X₁ 乃至 X₁₃ は任意のアミノ酸を示す。

【図 33】Stag + リンカー 1 からなるアミノ酸配列 (配列番号 19)

【図 34】Stag + リンカー 2 からなるアミノ酸配列 (配列番号 20)

【図 35】C 末 6 マーのアミノ酸配列 (配列番号 21)

【図 36】C 末 3 マーのアミノ酸配列、Gly - Gly - Gly を示す。

【図 37】C 末 2 マーのアミノ酸配列、Gly - Gly を示す。

【図 38】G4S リンカーのアミノ酸配列 (配列番号 22)

【図 39】ヒト免疫グロブリン G1 Fc 領域のアミノ酸配列 (配列番号 23)

【図 40】プライマー 1 のヌクレオチド配列 (配列番号 24)

【図 4 1】プライマー 2 のヌクレオチド配列 (配列番号 2 5)

【図 4 2】プライマー 3 のヌクレオチド配列 (配列番号 2 6)

【図 4 3】プライマー 4 のヌクレオチド配列 (配列番号 2 7)

【図 4 4】ヒト MMP - 9 のアミノ酸配列 (配列番号 2 8)

【図 4 5】マウス MMP - 9 のアミノ酸配列 (配列番号 2 9)

【図 4 6】MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ のアミノ酸配列 (配列番号 3 0)。N 末端の「MOCAc - K」は (7 - Methoxycoumarin - 4 - yl) acetyl - L - lysine を、「A₂pr (Dnp) - A」は [Nβ - (2, 4 - dinitrophenyl) - L - 2, 3 - diaminopropionyl] - L - alanine を、C 末端の「R - NH₂」は L - arginine amide を、それぞれ意味する。

【図 4 7】MOCAc - PLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ のアミノ酸配列 (配列番号 3 1)。N 末端の「MOCAc - P」は (7 - Methoxycoumarin - 4 - yl) acetyl - L - proline を、「A₂pr (Dnp) - A」は [Nβ - (2, 4 - dinitrophenyl) - L - 2, 3 - diaminopropionyl] - L - alanine を、C 末端の「R - NH₂」は L - arginine amide を、それぞれ意味する。

【図 4 8】DNP - PLGMWSR のアミノ酸配列 (配列番号 3 2)。N 末端の「DNP - P」は N - (2, 4 - Dinitrophenyl) - L - proline を意味する。

【図 4 9】MOCAc - RPKPVE - Nva - WR - Lys (Dnp) - NH₂ のアミノ酸配列 (配列番号 3 3)。N 末端の「MOCAc - R」は (7 - Methoxycoumarin - 4 - yl) acetyl - L - arginine を、「Nva」は L - norvaline を、「Lys (Dnp) - NH₂」は [Nε - (2, 4 - dinitrophenyl)] - L - lysine amide を、それぞれ意味する。

【図 5 0】FLAG タグのアミノ酸配列 (配列番号 3 4)。

【図 5 1】Avi タグのアミノ酸配列 (配列番号 3 5)。

【図 5 2】基質ペプチドの分解速度を指標として、活性型 MMP - 9 結合ペプチドの各セリンプロテアーゼ阻害活性 IC₅₀ (n = 1) を示した表。

【図 5 3 (A)】活性型 MMP - 9 結合ペプチドが活性型ヒト MMP - 9 に結合することをサイズ排除クロマトグラフィーにより評価した図。阻害剤非存在下では、活性型ヒト MMP - 9 酵素活性ドメインのピークは保持時間 7 . 0 分に検出された (点線)。TIMP - 1 又は活性型 MMP - 9 結合ペプチド M91005、M91011 存在下では、活性型ヒト MMP - 9 酵素活性ドメインのピークの保持時間は高分子量側にシフトした。

【図 5 3 (B)】活性型 MMP - 9 結合ペプチドがヒト MMP - 9 E402Q 変異体に結合しないことをサイズ排除クロマトグラフィーにより評価した図。阻害剤非存在下では、ヒト MMP - 9 酵素活性ドメイン E402Q 変異体のピークは保持時間 7 . 1 分に検出された (点線)。TIMP - 1 存在下ではヒト MMP - 9 酵素活性ドメイン E402Q 変異体のピークの保持時間は高分子量側にシフトした。対照的に、活性型 MMP - 9 結合ペプチド M91005 又は M91011 存在下では、ヒト MMP - 9 酵素活性ドメイン E402Q 変異体のピークの保持時間は変化しなかった。

【図 5 3 (C)】TIMP - 1 又は活性型 MMP - 9 結合ペプチド M91005、M91011 をサイズ排除クロマトグラフィーにより評価した図。

【図 5 4 (A)】基質ペプチドを用いた場合の、活性型 MMP - 9 結合ペプチドのヒト MMP - 9 変異体阻害活性 IC₅₀ (n = 3, Mean ± SD) 及び野生型ヒト MMP - 9 に対する IC₅₀ を 1 とした時の IC₅₀ の相対値を示した表。

【図 5 4 (B)】基質ペプチドを用いた場合の、活性型 MMP - 9 結合ペプチドのヒト MMP - 9 変異体阻害活性 IC₅₀ (n = 3, Mean ± SD) 及び野生型ヒト MMP - 9 に対する IC₅₀ を 1 とした時の IC₅₀ の相対値を示した表 (続き)。

【図 5 5】Boc - FSR - MCA のアミノ酸配列。N 末端の「Boc」は t - Buty

10

20

30

40

50

l o x y c a r b o n y l を、C 末端の「M C A」は 4 - m e t h y l c o u m a r y l - 7 - a m i d e を、それぞれ意味する。

【図 5 6】S u c - L L V Y - M C A のアミノ酸配列（配列番号 3 6）。N 末端の「S u c」は S u c c i n y l を、C 末端の「M C A」は 4 - m e t h y l c o u m a r y l - 7 - a m i d e を、それぞれ意味する。

【図 5 7】S u c - A A P F - M C A のアミノ酸配列（配列番号 3 7）。N 末端の「S u c」は S u c c i n y l を、C 末端の「M C A」は 4 - m e t h y l c o u m a r y l - 7 - a m i d e を、それぞれ意味する。

【図 5 8】B o c - V L K - M C A のアミノ酸配列。N 末端の「B o c」は t - B u t y l o x y c a r b o n y l を、C 末端の「M C A」は 4 - m e t h y l c o u m a r y l - 7 - a m i d e を、それぞれ意味する。

10

【図 5 9】B o c - V P R - A M C のアミノ酸配列。N 末端の「B o c」は t - B u t y l o x y c a r b o n y l を、C 末端の「A M C」は 7 - A m i n o - 4 - m e t h y l c o u m a r i n を、それぞれ意味する。

【図 6 0】S u c (O M e) - A l a - A l a - P r o - V a l - M C A のアミノ酸配列（配列番号 3 8）。N 末端の「S u c (O M e)」は N - M e t h o x y s u c c i n y l を、C 末端の「M C A」は 4 - m e t h y l c o u m a r y l - 7 - a m i d e を、それぞれ意味する。

【図 6 1】B o c - Q A R - A M C のアミノ酸配列。N 末端の「B o c」は t - B u t y l o x y c a r b o n y l を、C 末端の「A M C」は 7 - A m i n o - 4 - m e t h y l c o u m a r i n を、それぞれ意味する。

20

【図 6 2】B o c - L S T R - M C A のアミノ酸配列（配列番号 3 9）。N 末端の「B o c」は t - B u t y l o x y c a r b o n y l を、C 末端の「M C A」は 4 - m e t h y l c o u m a r y l - 7 - a m i d e を、それぞれ意味する。

【図 6 3】P y r - G R - M C A のアミノ酸配列。N 末端の「P y r」は L - P y r o g l u t a m y l を、C 末端の「M C A」は 4 - m e t h y l c o u m a r y l - 7 - a m i d e を、それぞれ意味する。

【図 6 4】Z - F R - M C A のアミノ酸配列。N 末端の「Z」は B e n z y l o x y c a r b o n y l を、C 末端の「M C A」は 4 - m e t h y l c o u m a r y l - 7 - a m i d e を、それぞれ意味する。

30

【図 6 5】エンテロキナーゼ認識配列のアミノ酸配列（配列番号 4 0）。

【0 0 2 1】

なお、本発明において「配列番号 X（図 Y）」又は「図 Y（配列番号 X）」のように、配列番号 X と図 Y とが併記される場合、当該配列は配列番号 X により示されるか又は図 Y により示されることを意味する。

【0 0 2 2】

また、アミノ酸（X）、数字（1 乃至数桁）及び他のアミノ酸（Y）が、X n Y、X n n Y、X n n n Y 等のように表記される場合、n 番目、n n 番目、n n n 番目（それぞれ 1 桁の数、2 桁の数、3 桁の数の番目）のアミノ酸 X が他のアミノ酸 Y に置換されることを意味する。例えば、A r g 3 4 4 L y s は、3 4 4 番目のアミノ酸が A r g から L y s に置換されることを意味する。

40

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 3】

1. 定義

本発明において、「遺伝子」とは、蛋白質に含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子又はその相補鎖を意味し、一本鎖、二本鎖又は三本鎖以上となり、DNA 鎖と RNA 鎖の会合体、一本の鎖上にリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドが混在するもの及びそのよう鎖を含む二本鎖又は三本鎖以上の核酸分子も「遺伝子」の意味に含まれる。

【0 0 2 4】

50

本発明において、「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」及び「核酸分子」は同義であり、それらの構成単位であるリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド等の個数によっては何ら限定されず、例えば、DNA、RNA、mRNA、cDNA、cRNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、プライマー等もその範囲に含まれる。「核酸分子」は略して「核酸」と呼ばれる場合がある。

【0025】

本発明において、「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「蛋白質」は同義である。

【0026】

本発明において、標的分子Xを認識する、又は標的分子Xに結合する（以下、その認識又は結合作用をまとめて「X結合活性」という。）ペプチドを、「X結合ペプチド」と呼ぶことができる。さらに、標的分子Xを認識し、又は標的分子Xに結合し、かつ標的分子Xの有する1つ又は2つ以上の活性又は機能を阻害又は抑制する（以下、それらの阻害又は抑制作用をまとめて「X阻害活性」という。）ペプチドを、「X阻害ペプチド」と呼ぶことができる。

10

【0027】

本発明において、「SPINK2」は、Serine Protease Inhibitor Kazal-type 2を意味し、3つのジスルフィド結合を有するKazal様ドメインから成る7kDaの蛋白質である。好適なSPINK2はヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、ヒトSPINK2を単に「SPINK2」という。

20

【0028】

本発明において、「MMP-9」は、matrix metalloproteinase-9を意味し、分泌シグナルペプチド、プロペプチド、亜鉛イオンを配位した酵素活性ドメイン、基質との結合に関与するフィブロネクチンII型ドメイン並びにC末のHPXドメインから構成される、MMPファミリーに属する蛋白質である。好適なMMP-9はヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、ヒトMMP-9を単に「MMP-9」ということがある。

【0029】

本発明において、「前駆型MMP-9」は、pro-matrix metalloproteinase-9を意味し、プロペプチド、亜鉛イオンを配位した酵素活性ドメイン、基質との結合に関与するフィブロネクチンII型ドメイン並びにC末のHPXドメインから構成される。好適な前駆型MMP-9はヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、ヒト前駆型MMP-9を単に「前駆型MMP-9」というが、「全長成熟MMP-9」もしくは「hMMP-9(full)」ともいうことがある。

30

【0030】

本発明において、「活性型MMP-9」は、active matrix metalloproteinase-9を意味し、亜鉛イオンを配位した酵素活性ドメイン、基質との結合に関与するフィブロネクチンII型ドメイン並びにC末のHPXドメインから構成される。好適な活性型MMP-9はヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、ヒト活性型MMP-9を単に「活性型MMP-9」というが、「活性型MMP-9(full)」ともいうことがある。

40

【0031】

本発明において、「前駆型MMP-9酵素活性ドメイン」は、pro-matrix metalloproteinase-9 catalytic domainを意味し、プロペプチド及び亜鉛イオンを配位した酵素活性ドメインを必須の構成要素として含み、任意に基質との結合に関与するフィブロネクチンII型ドメインをも含み得る。好適な前駆型MMP-9酵素活性ドメインはヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、前駆型ヒトMMP-9酵素活性ドメインを単に「前駆型MMP-9酵素活性ドメイン」というが、「前駆型MMP-9(cat)」ともいうことがある。

【0032】

50

本発明において、「活性型 MMP - 9 酵素活性ドメイン」は、active matrix metalloproteinase - 9 catalytic domainを意味し、亜鉛イオンを配位した酵素活性ドメインを必須の構成要素として含み、任意に基質との結合に関与するフィブロネクチン II 型ドメインをも含み得る。好適な活性型 MMP - 9 酵素活性ドメインはヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、活性型ヒト MMP - 9 酵素活性ドメインを略して「活性型 MMP - 9 酵素活性ドメイン」といい、活性型 MMP - 9 酵素活性ドメインを「活性型 MMP - 9 (cat)」ということがある。

【0033】

本発明において、「MMP - 9 結合ペプチド」は、MMP - 9 の部分ペプチド又は部分高次構造等を認識する、又はそれらに結合するペプチドを意味する。「MMP - 9 結合ペプチド」の範囲には、当該ペプチドの断片、他の部分 (moiety) の付加体、又は、コンジュゲートのうち、MMP - 9 結合活性を維持しているものが含まれる。すなわち、MMP - 9 結合活性を維持する当該ペプチドの断片、付加体及び修飾体も「MMP - 9 結合ペプチド」に含まれる。

10

【0034】

本発明において、「活性型 MMP - 9 結合ペプチド」は、活性型 MMP - 9 の部分ペプチド又は部分高次構造等を認識する、又はそれらに結合するペプチドを意味する。「活性型 MMP - 9 結合ペプチド」の範囲には、当該ペプチドの断片、他の部分 (moiety) の付加体、又は、コンジュゲートのうち、活性型 MMP - 9 結合活性を維持しているものが含まれる。すなわち、活性型 MMP - 9 結合活性を維持する当該ペプチドの断片、付加体及び修飾体も「活性型 MMP - 9 結合ペプチド」に含まれる。

20

【0035】

本発明において、「MMP - 9 阻害ペプチド」は、MMP - 9 の有する 1 つ又は 2 つ以上の活性又は機能を阻害又は抑制するペプチドを意味する。「MMP - 9 阻害ペプチド」の範囲には、当該ペプチドの断片、他の部分 (moiety) の付加体、又は、コンジュゲートのうち、MMP - 9 阻害活性を維持しているものが含まれる。すなわち、MMP - 9 阻害活性を維持する当該ペプチドの断片、付加体及び修飾体も「MMP - 9 阻害ペプチド」に含まれる。

【0036】

本発明において、「細胞」には、動物個体に由来する各種細胞、継代培養細胞、初代培養細胞、細胞株、組換え細胞、酵母、微生物等も含まれる。

30

【0037】

本発明において、ペプチドが結合する「部位」、すなわちペプチドが認識する「部位」とは、ペプチドが結合又は認識する標的分子上の連続的もしくは断続的な部分アミノ酸配列又は部分高次構造を意味する。本発明においては、かかる部位のことを標的分子上のエピトープ又は結合部位と呼ぶことができる。

【0038】

本発明において、「SPINK2 変異体」とは、野生型 SPINK2 の有するアミノ酸配列において、1 個又は 2 個以上のアミノ酸が野生型とは異なるアミノ酸で置換され、1 個又は 2 個以上の野生型のアミノ酸が欠失し、1 個又は 2 個以上の野生型には無いアミノ酸が挿入され、及び/又は、野生型には無いアミノ酸が野生型のアミノ末端 (N 末) 及び/又はカルボキシル末端 (C 末) に付加されて (以下、「変異」と総称する) なるアミノ酸配列を含むペプチドを意味する。「SPINK2 変異体」のうち、活性型 MMP - 9 結合活性を有するものは、活性型 MMP - 9 結合ペプチドに包含される。なお、本発明においては「挿入」も「付加」の範囲に含まれ得る。

40

【0039】

本発明において、「1 乃至数個」における「数個」とは、3 乃至 10 個を指す。

【0040】

本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、5 × S S

50

Cを含む溶液中で65℃にてハイブリダイゼーションを行い、ついで2×SSC-0.1%SDSを含む水溶液中で65℃にて20分間、0.5×SSC-0.1%SDSを含む水溶液中で65℃にて20分間、並びに、0.2×SSC-0.1%SDSを含む水溶液中で65℃にて20分間、それぞれ洗浄する条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることを意味する。SSCとは150mM NaCl-15mMクエン酸ナトリウムの水溶液であり、n×SSCはn倍濃度のSSCを意味する。

【0041】

2. ペプチド

2-1. アミノ酸

「アミノ酸」は、アミノ基及びカルボキシル基を含む有機化合物であり、好適には蛋白質に、より好適には天然の蛋白質に、構成単位として含まれるα-アミノ酸を意味する。本発明において、より好適なアミノ酸は、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr及びValであり、特に明記しない限り「アミノ酸」はこれらの計20アミノ酸を意味する。それらの計20アミノ酸を「天然アミノ酸」と呼ぶことができる。本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、好適には天然アミノ酸を含有する。

10

【0042】

本発明においては「アミノ酸残基」は「アミノ酸」と略記される場合がある。

【0043】

また、本発明において、アミノ酸は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、又はその混合物(DL-アミノ酸)であるが、特に明記しない限りL-アミノ酸を意味する。

20

【0044】

天然アミノ酸は、その共通する側鎖の性質に基づいて、例えば、次のグループに分けることができる。

- (1) 疎水性アミノ酸グループ：Met、Ala、Val、Leu、Ile
- (2) 中性親水性アミノ酸グループ：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln
- (3) 酸性アミノ酸グループ：Asp、Glu
- (4) 塩基性アミノ酸グループ：His、Lys、Arg
- (5) 主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸のグループ：Gly、Pro
- (6) 芳香族アミノ酸グループ：Trp、Tyr、Phe

30

ただし、天然アミノ酸の分類はこれらに限定されるものではない。

【0045】

本発明においては、天然アミノ酸は保存的アミノ酸置換を受け得る。

【0046】

「保存的アミノ酸置換(conservative amino acid substitution)」とは、機能的に等価又は類似のアミノ酸との置換を意味する。ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、該ペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば、同様の極性を有する一つ又は二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し、かかるペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に、あるグループ内の置換は構造及び機能について保存的であると考えることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の(チオール)フォームと比較してより極性の低い、酸化型の(ジスルフィド)フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分は構造的及び機能的に重要な特徴を構成し得る。また、芳香環を含む側鎖(トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン)はイオン-芳香族相互作用又は陽イオン-パイ相互作用に寄与し得る。かかる場合において、これらの側鎖を有するアミノ酸を、酸性又は非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的及び機能的には保存的であり得る。プロリン、グリシン、システイン(ジスルフィド・フォーム)等の残基は主鎖の立体構造に直接的な効果を与える可能性があり、しばし

40

50

ば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

【0047】

保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的置換（レーニンジャ、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73乃至75頁：L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975)）及び典型的置換を含む。

(1) 非極性アミノ酸グループ：アラニン（以下、「Ala」又は単に「A」と記す）、バリン（以下、「Val」又は単に「V」と記す）、ロイシン（以下、「Leu」又は単に「L」と記す）、イソロイシン（以下、「Ile」又は単に「I」と記す）、プロリン（以下、「Pro」又は単に「P」と記す）、フェニルアラニン（「Phe」又は単に「F」と記す）、トリプトファン（以下、「Trp」又は単に「W」と記す）、メチオニン（以下、「Met」又は単に「M」と記す）

10

(2) 非荷電極性アミノ酸グループ：グリシン（以下、「Gly」又は単に「G」と記す）、セリン（以下、「Ser」又は単に「S」と記す）、スレオニン（以下、「Thr」又は単に「T」と記す）、システイン（以下、「Cys」又は単に「C」と記す）、チロシン（以下、「Tyr」又は単に「Y」と記す）、アスパラギン（以下、「Asn」又は単に「N」と記す）、グルタミン（以下、「Gln」又は単に「Q」と記す）

(3) 酸性アミノ酸グループ：アスパラギン酸（以下、「Asp」又は単に「D」と記す）、グルタミン酸（以下、「Glu」又は単に「E」と記す）

20

(4) 塩基性アミノ酸グループ：リジン（以下、「Lys」又は単に「K」と記す）、アルギニン（以下、「Arg」又は単に「R」と記す）、ヒスチジン（以下、「His」又は単に「H」と記す）

本発明において、アミノ酸は、天然アミノ酸以外のアミノ酸であってもよい。例えば、天然のペプチドや蛋白質において見出されるセレノシステイン、N-ホルミルメチオニン、ピロリジン、ピログルタミン酸、シスチン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、チロキシン、O-ホスホセリン、デスモシン、β-アラニン、サルコシン、オルニチン、クレアチン、γアミノ酪酸、オパイン、テアニン、トリコロミン酸、カイニン酸、ドウモイ酸、アクロメリン酸等をあげることができ、ノルロイシン、Ac-アミノ酸、Boc-アミノ酸、Fmoc-アミノ酸、Trt-アミノ酸、Z-アミノ酸等のN末端保護アミノ酸、アミノ酸t-ブチルエステル、ベンジルエステル、シクロヘキシルエステル、フルオレニルエステル等のC末端保護アミノ酸、ジアミン、ωアミノ酸、βアミノ酸、γアミノ酸、アミノ酸のTic誘導体、アミノフォスホン酸を含むその他の天然界には見出されないアミノ酸等をあげることができるが、それらに限らず上記20の「天然アミノ酸」以外のアミノ酸を、本発明では便宜的に「非天然アミノ酸」と総称する。

30

【0048】

2-2. 活性型MMP-9結合ペプチド

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、SPINK2の有する骨格が少なくとも部分的に維持されたSPINK2変異体（以下、「SPINK2変異体」と略記する）であり、活性型MMP-9、その部分ペプチド又は部分高次構造等を認識する、又はそれらに結合する（以下、かかる認識又は結合作用をまとめて「活性型MMP-9結合活性」という）。本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、好適には前駆型MMP-9には結合しないことが好ましい。言い換えれば、本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、好適には、活性型MMP-9特異的に結合する。

40

【0049】

本発明におけるSPINK2変異体とMMP-9の結合は、ELISA法、表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance：以下、「SPR」という）解析法、バイオレイヤー干渉（BioLayer Interferometry：以下、「BLI」という）法、等温滴定熱量測定（Isothermal Titration Calorimetry：以下、「ITC」という）、フローサイトメトリー

50

、免疫沈降法等により、当業者に公知の方法を用いて、測定又は判定することができる。

【0050】

ELISA法としては、プレート上に固相化された活性型MMP-9を認識して結合した活性型MMP-9結合ペプチドを検出する方法が挙げられる。活性型MMP-9の固相化には、ビオチン-ストレプトアビジンの他、活性型MMP-9又は活性型MMP-9に融合したタグを認識する固相用抗体等を利用することができる。活性型MMP-9結合ペプチドの検出には、標識されたストレプトアビジンの他、活性型MMP-9結合ペプチド又は活性型MMP-9結合ペプチドに融合したタグを認識する標識された検出用抗体等を利用することができる。標識には、ビオチンの他、HRP、アルカリフォスファターゼ、FITC等生化学的解析に実施可能な方法を利用することができる。酵素標識を利用した検出にはTMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)、BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)、p-NPP(p-nitrophenyl phosphate)、OPD(o-phenylenediamine)、ABTS(3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher Scientific)等の発色基質やQuantaBlu(商標)Fluorogenic Peroxidase Substrate(Thermo Fisher Scientific)等の蛍光基質、及び化学発光基質を用いることができる。検出シグナルの測定には、吸光プレートリーダー、蛍光プレートリーダー、発光プレートリーダー、RI液体シンチレーションカウンター等を利用することができる。

10

20

【0051】

SPR解析に用いる機器としては、BIAcore(商標)(GE Healthcare)、Protein(商標)(BioRad)、SPR-Navi(商標)(Bio Navi Oy)、Spreeta(商標)(Texas Instruments)、SPRi-PlexII(商標)(ホリバ)、Autolab SPR(商標)(Metrohm)等を例示することができる。BLI法に用いる機器としては、Octet(商標)(Pall)を例示することができる。

【0052】

免疫沈降法としては、ビーズ上に固相化された活性型MMP-9結合ペプチドによって認識され、結合した活性型MMP-9を検出する方法が挙げられる。ビーズには磁気ビーズやアガロースビーズ等を利用することができる。活性型MMP-9結合ペプチドの固相化には、ビオチン-ストレプトアビジンの他、活性型MMP-9結合ペプチド又は活性型MMP-9結合ペプチドに融合したタグを認識する抗体、プロテインA又はプロテインG等を利用することができる。磁石や遠心分離等によってビーズを分離し、ビーズと共に沈殿した活性型MMP-9をSDS-PAGEやWestern blot法で検出する。活性型MMP-9の検出には、標識されたストレプトアビジンの他、活性型MMP-9又は活性型MMP-9に融合したタグを認識する標識された検出用抗体等を利用することができる。標識には、ビオチンの他、HRP、アルカリフォスファターゼ、FITC等生化学的解析に実施可能な方法を利用することができる。酵素標識を利用した検出にはELISA法と同様の基質を利用することができる。検出シグナルの測定にはChemidoc(商標)(BioRad)やLuminoGraph(ATTO)等を利用することができる。

30

40

【0053】

本発明において「特異的な認識」、すなわち「特異的な結合」とは、非特異的な吸着ではない結合を意味する。結合が特異的であるか否かの判定基準としては、例えば、ELISA法における結合活性EC₅₀をあげることができる。プレート上に固相化された活性型MMP-9に過剰量の活性型MMP-9結合ペプチドを添加し、検出されたシグナルの最大値を100%とする時、50%のシグナルが得られるペプチド濃度をEC₅₀と呼ぶ。本発明の好適な活性型MMP-9結合ペプチドの活性型MMP-9に対するEC₅₀値

50

は 1×10^{-6} M 以下、 5×10^{-7} M 以下、 2×10^{-7} M 以下又は 1×10^{-7} M 以下、より好適には 5×10^{-8} M 以下、 2×10^{-8} M 以下又は 1×10^{-8} M 以下、より一層好適には 5×10^{-9} M 以下、 2×10^{-9} M 以下又は 1×10^{-9} M 以下である。本発明における好適な活性型 MMP-9 結合ペプチドは活性型 MMP-9 特異的結合ペプチドであり、前駆型 MMP-9 を認識しない、すなわち前駆型 MMP-9 に結合しない。そのような活性型 MMP-9 特異的結合ペプチドの前駆型 MMP-9 に対する EC_{50} 値は、 1×10^{-6} M 以上、好適には 1×10^{-5} M 以上であるか、又は 1×10^{-6} M のペプチド濃度条件とペプチド非添加条件のシグナル強度に差が見られない。他の判定基準としては、例えば、解離定数 (dissociation constant: 以下、「 K_D 」という) をあげることができる。本発明における好適な活性型 MMP-9 結合ペプチドの活性型 MMP-9 に対する K_D 値は 1×10^{-5} M 以下、 5×10^{-6} M 以下、 2×10^{-6} M 以下又は 1×10^{-6} M 以下、より好適には 5×10^{-7} M 以下、 2×10^{-7} M 以下又は 1×10^{-7} M 以下、より一層好適には 5×10^{-8} M 以下、 2×10^{-8} M 以下又は 1×10^{-8} M 以下、さらにより一層好適には 5×10^{-9} M 以下、 2×10^{-9} M 以下又は 1×10^{-9} M 以下である。本発明における好適な活性型 MMP-9 結合ペプチド、すなわち前駆型 MMP-9 に結合しない、活性型 MMP-9 特異的結合ペプチドの前駆型 MMP-9 に対する K_D 値は、 1×10^{-6} M 以上、好適には 1×10^{-5} M 以上である。他の判定基準としては、例えば、免疫沈降法での解析結果をあげることができる。本発明における好適な活性型 MMP-9 結合ペプチドをビーズに固相化し、活性型 MMP-9 を添加した後にビーズを分離し、ビーズと共に沈殿した活性型 MMP-9 を検出した場合、活性型 MMP-9 のシグナルが検出される。本発明における好適な活性型 MMP-9 結合ペプチド、すなわち前駆型 MMP-9 に結合しない、活性型 MMP-9 特異的結合ペプチドをビーズに固相化し、前駆型 MMP-9 を添加した後にビーズを分離し、ビーズと共に沈殿した前駆型 MMP-9 を検出した場合、前駆型 MMP-9 のシグナルは検出されない。言い換えると、同様の方法で任意の MMP-9 結合ペプチドをビーズに固相化し、前駆型 MMP-9 を添加した後にビーズを分離し、ビーズと共に沈殿した前駆型 MMP-9 を検出したとき、前駆型 MMP-9 のシグナルが検出される場合には、当該 MMP-9 結合ペプチドは活性型 MMP-9 特異的結合活性を有していないと判定できる。

【0054】

また、ある態様における本発明の活性型 MMP-9 結合ペプチドは、好適には、MMP-9 阻害活性を有する。

【0055】

本発明の活性型 MMP-9 結合ペプチドの標的である MMP-9 は、好適には脊椎動物、より好適には哺乳類、より一層好適には霊長類、最適にはヒトに由来する。前駆型ヒト MMP-9、すなわち全長成熟ヒト MMP-9 (以下、「hMMP-9 (full)」という) のアミノ酸配列は、配列番号 28 (図 44) で示されるアミノ酸配列の 20 番乃至 707 番からなり、1 番乃至 19 番からなるシグナル配列を含まない。前駆型ヒト MMP-9 酵素活性ドメイン (以下、「pro-hMMP-9 (cat)」という) のアミノ酸配列としては、配列番号 28 (図 44) の 20 番 Ala ~ 449 番 Pro からなるもの、20 番 Ala ~ 215 番 Gly 並びに 391 番 Glu ~ 443 番 Tyr を含むもの (基質との結合に関与するフィブロネクチン II 型ドメインを欠失させたもの) 等を例示することができる。活性型ヒト MMP-9 酵素活性ドメイン (以下、「active hMMP-9 (cat)」という) のアミノ酸配列としては、該プロテアーゼ活性が保持されていれば特に限定されないが、配列番号 28 (図 44) の 107 番 Phe ~ 449 番 Pro からなるもの、107 番 Phe ~ 215 番 Gly 並びに 391 番 Glu ~ 443 番 Tyr を含むもの (基質との結合に関与するフィブロネクチン II 型ドメインを欠失させたもの) 等を例示することができる。MMP-9 及びその機能断片は、MMP-9 プロテアーゼとも表記され、組織や細胞から精製するか、又は、遺伝子組換え、イン・ビトロ翻訳、ペプチド合成等の蛋白質の調製方法として当業者に公知の方法により、調製することができる。

。MMP - 9 及びその機能断片には、シグナル配列、免疫グロブリンのFc領域、タグ、標識等が連結されてもよい。

【0056】

MMP - 9 阻害活性は、MMP - 9 の有するプロテアーゼ活性を指標として評価することができる。例えば、MMP - 9 又はその機能断片、基質及び本発明の活性型MMP - 9 結合ペプチド又はその候補を共存させた場合に、対照の存在下又は該阻害剤又はその候補の非存在下と比較して、MMP - 9 のプロテアーゼ活性が70%以下、50%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、1%以下又は0%である場合、MMP - 9 阻害が生じており、その阻害活性はそれぞれ30%以上、50%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、99%以上又は100%である。MMP - 9 阻害活性は、反応条件、基質の種類や濃度等により異なり得る。反応条件については、実施例に記載のものを例示することができるが、それに限定されない。一定濃度のMMP - 9 に基質ペプチド又は基質蛋白質を添加し、一定時間反応させた後、基質ペプチドの蛍光を検出する、又は基質蛋白質をSDS - PAGEやWestern blot法、液体クロマトグラフィー等により検出することで、酵素活性は評価できる。緩衝液としては、例えば、ホスフェート・バッファー・セリン(phosphate buffer saline: 以下「PBS」という)、トリスバッファー(50mM トリス, pH7乃至8.5、例えばpH7.5)等を用いることができ、NaCl(0乃至200mM、例えば200mM)、CaCl₂(0乃至10mM、例えば2mM)、ZnCl₂、Brij - 35等の塩を添加することもできるが、それらに限定されない。

10

20

【0057】

MMP - 9 の有するプロテアーゼの基質は、内在性の基質、外因性の基質、合成基質等、特に限定されるものではない。ヒトの内在性の基質としては、コラーゲン等を例示することができる。コラーゲンを熱変性して得られるゼラチンも基質として用いることができる。合成基質としては、特に限定されないが、MOCAc - KPLGL - A₂pr(Dnp) - AR - NH₂(配列番号30: 図46)やMOCAc - PLGL - A₂pr(Dnp) - AR - NH₂(配列番号31: 図47)、DNP - PLGMWSR(配列番号32: 図48)、MOCAc - RPKPVE - Nva - WR - Lys(Dnp) - NH₂(配列番号33: 図49)等を例示することができる。本発明の活性型MMP - 9 結合ペプチドのMMP - 9 阻害活性(IC₅₀又はK_i)は、1μM以下、好適には100nM以下、より好適には10nM以下、より一層好適には1nM以下である。

30

【0058】

また、本発明の活性型MMP - 9 結合ペプチドは、MMP - 9 以外のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制しないか、又はそれらに対する阻害若しくは抑制の程度が相対的に弱いことが好ましい。言い換えれば、本発明の活性型MMP - 9 結合ペプチドのプロテアーゼ阻害活性は、好適には、MMP - 9 特異性が高い。好適な本発明の活性型MMP - 9 結合ペプチドは、MMP - 1、MMP - 2、MMP - 3、MMP - 7、MMP - 8、MMP - 10、MMP - 12、MMP - 13、MMP - 14、MMP - 15、MMP - 16、MMP - 17、ADAM17等のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制しないか、又はそれらに対する阻害若しくは抑制の程度が相対的に弱い。より好適な本発明の活性型MMP - 9 結合ペプチドは、トリプシン、キモトリプシン、トリプターゼ、キマーゼ、プラスミン、トロンビン、エラスターゼ、マトリプターゼ、プロテインC、tPA、uPA、血漿カリクレイン等のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制しないか、又はそれらに対する阻害若しくは抑制の程度が相対的に弱い。そのような本発明の好適なペプチドは、他のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制することに起因する副作用を示さず、MMP - 9 に関わる疾患(後述)の治療薬又は予防薬として好適に使用され得る。

40

【0059】

MMP - 9 に対する特異性が低く、MMP - 9 に加えて、他のMMPが有するプロテアーゼ活性も阻害する阻害剤、すなわち非選択的MMP - 9 阻害剤は、ヒトに投与した場合に重篤な副作用を示す。亜鉛イオンをキレートする低分子阻害剤は非選択的MMP - 9 阻

50

害剤であり、この阻害剤を投与した臨床試験では、骨や関節の痛み、拘縮等、筋骨格系の重篤な副作用が認められた（非特許文献6、7）。一方、MMP-9に対する特異性が高い阻害剤、すなわちMMP-9特異的阻害剤は、前述のような副作用を回避できる可能性が高い。ラットを用いた安全性試験において、非選択的MMP-9阻害剤Marimastatを投与した群では、筋骨格症候群の症状が認められたが、MMP-9特異的阻害抗体を投与した群では、そのような症状が全く見られなかったことが報告されており（特許文献6）、MMP-9特異的にプロテアーゼ活性を阻害する本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、MMP-9に関わる疾患の治療又は予防のために好適に使用することができる。

【0060】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、MMP-9へのプロテアーゼ基質の結合において、競合的であってもよい。

【0061】

前述の通り、本発明のペプチドの標的であるMMP-9は、脊椎動物、好適には哺乳動物、より好適には霊長類、より一層好適にはヒトに由来するが、非ヒト動物、例えば、ラット、マウス等のげっ歯類、カンクイザル、コモンマーモセット、アカゲザル等の霊長類に由来してもよい。非ヒト動物由来のMMP-9に対して活性型MMP-9特異的結合活性を有するペプチドは、かかる非ヒト動物の活性型MMP-9特異的な検出や測定に供することができる。また、非ヒト動物由来のMMP-9を標的とする本発明のペプチドは、かかる非ヒト動物由来のMMP-9が有するプロテアーゼ活性を阻害するペプチドであつてもよい。そのような、非ヒト動物由来のMMP-9に対して活性型特異的結合活性及び/又はプロテアーゼ阻害活性を有するペプチドは、かかる非ヒト動物におけるMMP-9に関わる疾患の診断、検査、治療又は予防等に使用することができる。また、そのような非ヒト動物由来MMP-9プロテアーゼ阻害活性を有するペプチドが、ヒトMMP-9の有するプロテアーゼ活性も阻害する場合、ヒトMMP-9に関わる疾患の治療薬又は予防薬としての該ペプチドの非臨床研究開発において、かかる非ヒト動物を動物病態モデルとして使用した薬効薬理試験や薬物動態試験、健常動物として使用した安全性試験や毒性試験等を行うことができる。

【0062】

また、本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、医薬及び診断薬として当該分野で使用される抗体等の他の生体高分子と比較して分子量が小さく、その製造（後述）が比較的容易であり、保存安定性や熱安定性等の物性の面で優れており、医薬組成物（後述）として使用される場合の投与経路、投与方法、製剤等の選択の幅が広い等の長所を有する。また、生体高分子やポリマーの付加等、公知の方法を適用して本発明のペプチドの分子量を大きくすることにより、医薬組成物として使用された場合の血中半減期をより長く調節することもできる。そのような本発明の活性型MMP-9結合ペプチドの分子量は10,000未満、好適には8,000未満、より好適には約7,000～7,200である。また、配列番号18（図32）の15番Cys～31番Cysからなる可変ループ部分又は15番Cys～63番Cysからなる部分（以下「6つのCysを含む部分」という）のうち、活性型MMP-9結合活性を有するものも、本発明の活性型MMP-9結合ペプチドに包含され、可変ループ部分の分子量は2,500未満、好適には約1,800～2,000であり、6つのCysを含む部分の分子量は6,000未満、好適には約5,300～5,500である。

【0063】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドとしてのSPINK2変異体は、上記のような特異的結合活性、プロテアーゼ阻害活性、その他の性質、機能、特徴等を有し得る一方で、その全長アミノ酸配列はヒト野生型SPINK2のアミノ酸配列に対して高い配列同一性を有する。本発明のSPINK2変異体は、ヒトSPINK2のアミノ酸配列（配列番号1：図15）と60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

【0064】

「同一性」とは、2つの配列の間の、類似性又は関係の程度を示す性質を意味する。アミノ酸配列の同一性(%)は、同一であるアミノ酸もしくはアミノ酸残基の数をアミノ酸もしくはアミノ酸残基の総数で割って得られる数値に、100を掛けることにより、算出される。

【0065】

「ギャップ」とは、2つ以上の配列のうち少なくとも1つにおける欠失及び/又は付加の結果である、当該配列間のアライメントにおける隙間を意味する。

【0066】

完全に同一なアミノ酸配列を有する2つのアミノ酸配列の間の同一性は100%であるが、一方のアミノ酸配列を他方と比較して1つ又は2つ以上のアミノ酸又はアミノ酸残基の置換、欠失又は付加があれば、両者の同一性は100%未満となる。ギャップをも考慮して2つの配列間の同一性を決定するためのアルゴリズムやプログラムとしては、標準的なパラメータを用いるBLAST(Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25巻、3389-3402頁、1997年)、BLAST2(Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215巻、403-410頁、1990年)、Smith-Waterman(Smith, et al. J. Mol. Biol. 147巻、195-197頁、1981年)等の当業者に公知のものを例示することができる。

10

【0067】

本発明において、「変異した」とは、天然に存在する核酸分子又はペプチドと比較のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列において、1つ又は2つ以上のヌクレオチドもしくはヌクレオチド残基又はアミノ酸もしくはアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入がなされていることを意味する。本発明のSPINK2変異体のアミノ酸配列は、ヒトSPINK2のアミノ酸配列と比較して、1つ又は2つ以上のアミノ酸又はアミノ酸残基が変異されている。

20

【0068】

本発明のある態様において、SPINK2変異体のアミノ酸配列は、ヒトSPINK2のアミノ酸配列(配列番号1:図15)の:

16番Ser~22番Glyのうち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又は7つのアミノ酸が他のアミノ酸又はアミノ酸残基に置換されており;

30

24番Pro~28番Asnのうち1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのアミノ酸が他のアミノ酸又はアミノ酸残基に置換されており;

15番Cys、23番Cys、31番Cys、42番Cys、45番Cys及び63番Cysは、天然型のジスルフィド結合を維持するためには野生型と同じくCysであることが好ましく、天然型のジスルフィド結合を消失させたり、非天然型のジスルフィド結合を生じさせたりするためには、それらのうち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つを他のアミノ酸に置換してもよい。本発明のSPINK2変異体うち一部の好適な活性型MMP-9結合ペプチドにおいては、天然型と同じ当該6箇所にCysが維持され、ジスルフィド結合が保持されている。かかる活性型MMP-9結合ペプチドのうちより好適な一部の態様においては、15番Cys-45番Cys、23番Cys-42番Cys、及び、31番Cys-63番Cysが、それぞれジスルフィド結合を形成している。

40

【0069】

そのようなSPINK2変異体の有するアミノ酸配列が活性型MMP-9結合ペプチドに含まれる場合、野生型SPINK2のアミノ酸配列に含まれる16番Ser乃至30番Valからなるループ構造、31番Cys及び32番Glyからなるβストランド(1)並びに57番Ile乃至59番Argからなるβストランド(2)から構成されるβシート、41番Glu乃至51番Glyからなるαヘリックス、又は、それらに類似しているか若しくはそれら(の位置)に少なくとも部分的に対応するループ構造、βシート、αヘリックス等から構成される立体構造が、活性型MMP-9結合活性を発揮し得る程度に、

50

維持されていることが好ましい。

【0070】

本発明のSPINK2変異体のうち、一部の活性型MMP-9結合ペプチドの有するアミノ酸配列について以下に述べる。上述の通り、本発明において「アミノ酸残基」は単に「アミノ酸」と表記されることがある。

【0071】

配列番号18(図32)で示されるアミノ酸配列において、 X_1 乃至 X_{13} は、MMP-9に結合し且つMMP-9活性を阻害する限りに置いてそれぞれ任意のアミノ酸であれば特に限定されない。以下、 X_1 乃至 X_{13} の好適なアミノ酸について記載するが、それらのアミノ酸の中には天然型、すなわち野生型ヒトSPINK2のアミノ酸配列中と同一のアミノ酸が含まれている場合がある。

10

【0072】

1番 X_1 は、好適にはAsp又はGly、より好適にはGlyである。

【0073】

21番 X_7 がPro、24番 X_9 がGln、且つ、25番 X_{10} がMetのとき、

16番 X_2 は、好適にはArg、Gln、Gly、Trp又はTyr、より好適にはArg又はGlnであり；

17番 X_3 は、好適にはArg、Asp、Gln、Glu、Lys、Met、Ser、Thr又はVal、より好適にはArg、Gln、Lys、Thr又はValであり；

18番 X_4 は、好適にはAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Gly、Leu、Lys又はVal、より好適にはArg、Gly又はValであり；

20

19番 X_5 は、好適にはAla、Arg、Asn、Gly、Ile、Leu又はLys、より好適にはArg、Gly、Ile又はLysであり；

20番 X_6 は、好適にはAla、Glu、Gly、Met又はSer、より好適にはGlu又はGlyであり；

22番 X_8 は、好適にはAla、Leu又はSer、より好適にはAla又はSerであり；

26番 X_{11} は、好適にはAla、Gly又はSerであり；

27番 X_{12} は、好適にはLeu、Phe、Ser又はTyr、より好適にはPhe又はTyrであり；

30

28番 X_{13} は、好適にはAsn、Asp、Gln、Leu又はLys、より好適にはAsn、Gln又はLysである。

【0074】

20番 X_6 がTyr、22番 X_8 がGln、且つ24番 X_9 がSerのとき、

16番 X_2 は、好適にはArg、Lys、Met又はVal、より好適にはMet又はValであり；

17番 X_3 は、好適にはArg、Gln、Lys又はMet、より好適にはMetであり；

18番 X_4 は、好適にはPhe又はTyr、より好適にはTyrであり；

19番 X_5 は、好適にはGln、Glu又はLys、より好適にはLysであり；

40

21番 X_7 は、好適にはAla又はGly、より好適にはAlaであり；

25番 X_{10} は、好適にはAsn又はHis、より好適にはHisであり；

26番 X_{11} は、好適にはLeu、Lys、Met又はVal、より好適にはLysであり；

27番 X_{12} は、好適にはPhe、Ser又はTyr、より好適にはSer又はTyrであり；

28番 X_{13} は、好適にはAla、Asn、Gln又はLys、より好適にはGln又はLysである。

【0075】

なお、野生型の X_1 乃至 X_{13} は、それぞれAsp、Ser、Gln、Tyr、Arg

50

、L e u、P r o、G l y、P r o、A r g、H i s、P h e 及び A s n である。

【0076】

本発明においては、1番アミノ酸のN末側に、さらに1つ乃至数個又はそれ以上のアミノ酸が付加していてもよく、そのような付加されるアミノ酸としては、例えば、S t a g + リンカーからなるアミノ酸配列（配列番号19及び20：図33及び34）等をあげることができる。

【0077】

さらに、C末に位置する63番C y sに1乃至数個のアミノ酸が付加していてもよく、例えば、G l y - G l yを加えC末が65番G l yであるアミノ酸配列等をあげることができる。そのような付加されるアミノ酸としては、例えば、C末6マー（配列番号21：図35）、G l y - G l y - G l y（図36）、G l y - G l y（図37）等をあげることができる。

10

【0078】

本発明においては、S P I N K 2変異体ペプチド又はS P I N K 2変異体ペプチドのN末及び/又はC末付加体（以下、「親ペプチド」と呼ぶ）において、1つ又は2つ以上のアミノ酸が置換、付加及び/又は欠失されてなるペプチドを「親ペプチドの誘導体」又は「親ペプチド誘導体」と呼ぶことがある。かかる「誘導体」も本発明の「ペプチド」の範囲に含まれる。

【0079】

本発明の活性型M M P - 9結合ペプチドの範囲に含まれるS P I N K 2変異体の有するアミノ酸配列においては、X₁乃至X₁₃以外の部分、すなわち、野生型ヒトS P I N K 2のアミノ酸配列（配列番号1：図15）中の、2番P r o ~ 15番C y s、23番C y s及び29番P r o ~ 63番C y sの位置において、天然型のアミノ酸もしくは変異したアミノ酸又はアミノ酸配列を含むことができる。例えば、S P I N K 2変異体は、活性型M M P - 9結合活性又はフォールディングを少なくとも部分的に妨げないか又は干渉をしない限りにおいて、1つ又は2つ以上の位置において変異してよい。そのような変異は、当業者に公知の標準的な方法を使用することによりなし得る。アミノ酸配列中の典型的な変異としては、1つ又は2つ以上のアミノ酸の置換、欠失又は付加をあげることができ、置換としては、保存的置換を例示することができる。保存的置換により、あるアミノ酸残基は、嵩高さのみならず、極性の面についても化学的特徴が類似しているアミノ酸残基により置換される。保存的置換の例は、本明細書の他の部分に記載されている。一方で、X₁乃至X₁₃以外の部分は、活性型M M P - 9結合活性又はフォールディングを少なくとも部分的に妨げないか又は干渉をしない限りにおいて、1つ又は2つ以上のアミノ酸の非保存的置換も許容し得る。

20

30

【0080】

本発明の活性型M M P - 9結合ペプチドとしてのS P I N K 2変異体の有するアミノ酸配列は、X₁乃至X₁₃が、好適には配列番号2乃至17（図16乃至31）のいずれか一つにおけるX₁乃至X₁₃の各アミノ酸であり、且つ、X₁乃至X₁₃以外の部分が活性型M M P - 9結合活性又はフォールディングを少なくとも部分的に妨げないか又は干渉をしないアミノ酸又はアミノ酸配列を有することができる。

40

【0081】

また、本発明の活性型M M P - 9結合ペプチドとしてのS P I N K 2変異体のアミノ酸配列の例として、次の（a）乃至（d）のいずれか一つに記載のアミノ酸配列をあげることができる：

- （a）配列番号2乃至17（図16乃至31）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列；
- （b）（a）に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ活性型M M P - 9結合活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；
- （c）（a）に記載のアミノ酸配列において1乃至20個、1乃至15個、1乃至10個

50

、1乃至8個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、1若しくは2個、又は1個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入してなり、且つ活性型MMP-9結合活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；及び、

(d)(a)に記載のアミノ酸配列と60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つ活性型MMP-9結合活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列。

【0082】

上記(a)乃至(d)のいずれか一つに記載のアミノ酸配列からなるか又は該アミノ酸配列を含むペプチドは、好適には、前駆型MMP-9には結合せず、より好適にはMMP-9の有するプロテアーゼ活性を阻害し、より一層好適にはMMP-9の有するプロテアーゼ活性を特異的に阻害する(そのようなペプチドを、「MMP-9特異的阻害ペプチド」又は「MMP-9特異的阻害SPINK2変異体ペプチド」という)。

10

【0083】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドに、そのフォールディング安定性、熱安定性、保存安定性、血中半減期、水溶性、生物活性、薬理活性、副次的作用等を改善する目的で、変異を導入することができる。例えば、ポリエチレングルコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンブロン(HES)、ビオチン、ペプチド又は蛋白質等の他の物質にコンジュゲートさせるため、Cysのような新たな反応性基を変異により導入することができる。

【0084】

本発明において、活性型MMP-9結合ペプチドは他の部分に連結していてもよく、そのようなコンジュゲート体を「活性型MMP-9結合ペプチドのコンジュゲート」と総称する。「コンジュゲート」又は「コンジュゲーション」には、ある部分が架橋剤等の化学物質を介して、ある部分をアミノ酸の側鎖に連結するのに適した作用物質等を介して、本発明のペプチドのN末及び/又はC末に遺伝子工学的手法により、本発明のペプチドに連結される形態が含まれる。そのような「部分」には、血中半減期を改善するものとして、ポリエチレングリコール(PEG)等のポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンブロン、パルミチン酸等の脂肪酸分子、免疫グロブリンのFc領域、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン又はその断片、アルブミン結合ペプチド、連鎖球菌プロテインG等のアルブミン結合蛋白質、トランスフェリンを、例示することができる。その他の「部分」としては、かかる「部分」はペプチドリッ

20

30

【0085】

また、本発明の活性型MMP-9結合ペプチドには、薬理活性を発揮するか又は増強するために、他の薬物がコンジュゲートされていてもよい。抗体分野において抗体-薬物複合体(antibody-drug conjugate: ADC)として当業者に公知の技術や態様は、抗体を本発明のペプチドに置き換えることにより、本発明の一部の態様となり得る。

【0086】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、MMP-9以外の標的分子に対する結合親和性、阻害活性、拮抗活性、作動活性等を発揮する1つ又は2つ以上の部分をさらに含むか、そのような部分にコンジュゲートされていてもよい。かかる「部分」としては、抗体又はその断片、SPINK2変異体のような抗体以外の骨格を有する蛋白質又はその断片を例示することができる。抗体分野において多重特異的抗体及び二重特異的抗体(multispecific antibody、bisppecific antibody)として当業者に公知の技術や態様は、それらに含まれる2つ以上の「抗体」のうち少なくとも1つを本発明のペプチドに置き換えることにより、本発明のコンジュゲートの一部の態様となる。

40

【0087】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチド又はその前駆体は、シグナル配列を含み得る。あるポリペプチドもしくはその前駆体のN末に存在するか又は付加されたシグナル配列は

50

、当該ポリペプチドを細胞の特定の区画、例えば、大腸菌であれば周辺質、真核細胞であれば小胞体に送達するために有用であり、多くのシグナル配列が当業者に公知であり、宿主細胞に応じて選択され得る。大腸菌の周辺質中に所望のペプチドを分泌させるためのシグナル配列としては、OmpAを例示することができる、シグナル配列を含む形態も、本発明のコンジュゲートに、その一部の態様として含まれ得る。

【0088】

また、本発明の活性型MMP-9結合ペプチドに予めタグを付加させることにより、アフニティークロマトグラフィーによって該ペプチドを精製することができる。本発明のペプチドは、例えば、そのC末に、ビオチン、Streptタグ(商標)、StreptタグII(商標)、His6等のオリゴヒスチジン、ポリヒスチジン、免疫グロブリンドメイン、マルトース結合蛋白質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、ジゴキシゲニンやジニトロフェノール等のハプテン、FLAG(商標)等のエピトープタグ、mycタグ、HAタグ等(以下まとめて「アフニティー・タグ」と呼ぶ)を含むことができる。タグ付加体も、本発明のコンジュゲートに、その一部の態様として含まれ得る。

10

【0089】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、標識のための部分を含むことができ、具体的には、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属複合体、金属、コロイド金等の標識部分がコンジュゲートされ得る。標識のための部分を含む態様も、本発明のコンジュゲートに、その一部の態様として含まれ得る。

20

【0090】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、そのペプチド部分に天然アミノ酸及び非天然アミノ酸のいずれをも含むことができ、天然アミノ酸としてはL-アミノ酸及びD-アミノ酸のいずれをも含むことができる。

【0091】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドのアミノ酸配列には、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸のいずれをも含むことができ、天然アミノ酸としてはL-アミノ酸及びD-アミノ酸のいずれをも含むことができる。

【0092】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、単量体、2量体、3量体以上のオリゴマー又は多量体として存在し得る。2量体、3量体以上のオリゴマー及び多量体は、単一の単量体から構成されるホモ、及び、2つ以上の異なる単量体から構成されるヘテロ、のいずれでもよい。単量体は、例えば、速やかに拡散し組織への浸透に優れている場合がある。2量体、オリゴマー及び多量体は、例えば、局所において標的分子に対して高い親和性もしくは結合活性を有するか、遅い解離速度を有するか、又は高い活性型MMP-9結合活性を示す等の優れた側面を有し得る。自発的な2量体化、オリゴマー化及び多量体化に加え、意図した2量体化、オリゴマー化及び多量体化も、jun-fosドメイン、ロイシンジッパー等を本発明の活性型MMP-9結合ペプチドに導入することにより、なし得る。

30

40

【0093】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、単量体、2量体、3量体以上のオリゴマー又は多量体で、1つ又は2つ以上の標的分子に結合するか又は標的分子の活性を阻害することができる。

【0094】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドがとり得る形態としては、単離された形態(凍結乾燥標品、溶液等)、上述のコンジュゲート体、他の分子に結合した形態(固相化された形態、異分子との会合体、標的分子と結合した形態等)等をあげることができるが、それらに限定されるものではなく、発現、精製、使用、保存等に適合した形態を任意に選択することができる。

50

【0095】

ある態様において、本発明の好適な活性型 MMP - 9 結合ペプチドである、MMP - 9 阻害ペプチド、とりわけ MMP - 9 特異的阻害ペプチドが認識する、活性型ヒト MMP - 9 分子上の結合部位は、次の (i) 又は (ii) であり得る：

(i) 活性型 MMP - 9 のアミノ酸配列 (配列番号 28) 中、
(ia) 第 402 番 Glu、及び、
(ib) 第 110 番 Phe、第 179 番 Tyr、第 187 番 Leu、第 192 番 Phe、
第 199 番 Gln、第 393 番 Tyr、第 397 番 Leu、第 398 番 Val、第 420
番 Tyr、第 422 番 Met 及び第 423 番 Tyr からなる群より選択される 1 つ又は 2
つ以上のアミノ酸；又は

(ii) 活性型 MMP - 9 のアミノ酸配列 (配列番号 28) 中、
(iia) 第 402 番 Glu、及び、
(iib) 第 179 番 Tyr、第 185 番 Asp、第 192 番 Phe、第 193 番 Phe
、第 393 番 Tyr、第 397 番 Leu、第 398 番 Val、第 422 番 Met、第 42
3 番 Tyr 及び第 424 番 Arg からなる群より選択される 1 つ又は 2 つ以上のアミノ酸
。

10

【0096】

ここで、「2 つ以上」とは、好適には 3 つ以上、4 つ以上、5 つ以上又は 6 つ以上、で
あり、より好適には 7 つ以上、8 つ以上又は 9 つ以上であり、最適には 10、又は、10
若しくは 11、である。

20

【0097】

活性型 MMP - 9 結合ペプチドが認識する、活性型 MMP - 9 分子上の結合部位は、活
性型 MMP - 9 の野生型及び変異体と該ペプチドを用いた阻害活性を測定することで特定
することができる。例えば、野生型である活性型 MMP - 9 の基質ペプチド分解活性を 1
00 % として測定される被験化合物の 50 % 阻害濃度 (IC₅₀) と比較して、nnn 番
目のアミノ酸 X を置換した活性型 MMP - 9 変異体の基質ペプチド分解活性に対する被験
化合物の IC₅₀ が増加する場合、基準は特に限定されないが、例えば、2 倍以上、好ま
しくは 3 倍以上、より好ましくは 4 倍以上、より一層好ましくは 5 倍以上増加する場合、
被験化合物は nnn 番目のアミノ酸 X を認識して活性型 MMP - 9 に結合する、と判定す
る。

30

【0098】

3. 活性型 MMP - 9 結合ペプチドの同定

活性型 MMP - 9 結合ペプチドは、SPINK 2 のアミノ酸配列又は本発明の活性型 M
MP - 9 結合ペプチドの有するアミノ酸配列 (例えば、配列番号 2 乃至 17 からなる群、
又は、図 16 乃至 31 からなる群から選択されるアミノ酸配列)、該アミノ酸配列をコー
ドするヌクレオチド配列、該ヌクレオチド配列を含む核酸分子等を出発材料として、当業
者に周知の方法により、同定することができる。好適な一例として、ヒト SPINK 2 変
異体ライブラリーより、活性型 MMP - 9 結合活性を指標として同定することができ、前
駆型 MMP - 9 結合活性又は MMP - 9 阻害活性も指標として組み合わせてもよい。

40

【0099】

例えば、出発材料としての核酸分子は、変異誘発に供され、組換え DNA 技術を用いて
適切な細菌宿主又は真核性宿主中に導入され得る。SPINK 2 変異体ライブラリーは、
標的分子のバインダーや阻害剤を同定するための技術として公知であり、例えば、WO 2
012 / 105616 公報における開示も、その全体を参照することにより本発明の開示
に含まれる。適切な宿主において変異誘発に供されたヌクレオチド配列を発現させた後、
所望の性質、活性、機能等を有する SPINK 2 変異体がその遺伝形質とリンクしてなる
クローンを、前記のライブラリーから濃縮及び / 又は選抜し、同定することができる。ク
ローンの濃縮及び / 又は選抜には、細菌ディスプレイ法 (Francisco, J. A.
, et al. (1993 年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.
. A. 90 巻, 10444 - 10448 頁)、酵母ディスプレイ法 (Boder, E.

50

T., et al. (1997年) Nat. Biotechnol. 15巻, 553 - 557頁)、哺乳動物細胞ディスプレイ法 (Ho M, et al. (2009年) Methods Mol Biol. 525巻: 337 - 52頁)、ファージディスプレイ法 (Smith, G. P. (1985年) Science. 228巻, 1315 - 1317頁)、リボソームディスプレイ法 ((Mattheakis LC, et al. (1994年) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91巻19号, 9022 - 9029頁))、mRNAディスプレイ等の核酸ディスプレイ法 (Nemoto N, et al. (1997年) FEBS Lett. 414巻2号, 405 - 408頁)、コロニースクリーニング法 (Pini, A. et al. (2002年) Comb. Chem. High Throughput Screen. 5巻, 503 - 510頁)等、当業者に公知の方法を使用することにより、選抜され同定されたクローンに含まれるSPINK2変異体のヌクレオチド配列を決定することにより、該ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を、当該クローンに含まれるSPINK2変異体すなわち活性型MMP-9結合ペプチドの有するアミノ酸配列として決定することができる。

10

20

30

40

50

【0100】

本発明のSPINK2変異体は、例えば、天然型のSPINK2に変異を誘発することにより、得ることができる。「変異の誘発」とは、あるアミノ酸配列の各位置に存在する1つ又は2つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換するもしくは欠失させるか、又は当該アミノ酸配列中には存在しないアミノ酸を付加もしくは挿入することができるようにすることを意味する。かかる欠失又は付加もしくは挿入により、配列長が変わり得る。本発明のSPINK2変異体において、変異の誘発は、好適には、配列番号18(図32)で示されるアミノ酸配列中の、 X_1 乃至 X_{13} の1つ又は2つ以上の位置において生じ得る。

【0101】

但し、そのような好適な変異の誘発の後に、 X_1 乃至 X_{13} の1つ又は2つ以上の位置において、天然型のアミノ酸、すなわち天然型のアミノ酸配列中の特定の位置に存在するのと同じアミノ酸が維持されたものも、全体として少なくとも1つのアミノ酸が変異されていれば、変異体の範囲に含まれる。同様に、本発明のある態様において、 X_1 乃至 X_{13} 以外の部分の1つ以上の位置に変異を誘発した後に、当該位置に天然型のアミノ酸、すなわち天然型のアミノ酸配列中の特定の位置に存在するのと同じアミノ酸が維持されたものも、全体として少なくとも1つのアミノ酸が変異されていれば、変異体の範囲に含まれる。

【0102】

「ランダム変異の誘発」とは、配列上の特定の位置について、1つ又は2つ以上の異なるアミノ酸が、変異の誘発により、当該位置に一定の確率で導入させることを意味するが、少なくとも2つの異なるアミノ酸の導入される確率が全て同じではなくてもよい。また、本発明においては、少なくとも2つの異なるアミノ酸に、天然型のアミノ酸(1種)が含まれることを妨げるものではなく、そのような場合も「ランダム変異の誘発」の範囲に含まれる。

【0103】

特定の位置にランダム変異を誘発する方法としては、当業者に公知の標準的方法を使用することができる。例えば、配列中の特定の位置に、縮重ヌクレオチド組成物を含む合成オリゴヌクレオチドの混合物を用いたPCR(polymerase chain reaction)により変異を誘発することができる。例えば、コドンNNK又はNNS(N=アデニン、グアニン、シトシン又はチミン; K=グアニン又はチミン; S=アデニン又はシトシン)を使用すれば、天然アミノ酸20種全てに加え、停止コドンが導入される変異の誘発されるのに対し、コドンVVS(V=アデニン、グアニン又はシトシン)を使用すれば、Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr及びValが導入される可能性が無く、残る12の天然アミノ酸の導入が変異誘発される。また、例えば、

コドン N M S (M = アデニン又はシトシン) を使用すれば、 A r g、 C y s、 G l y、 I l e、 L e u、 M e t、 P h e、 T r p 及び V a l が導入される可能性が無く、残る 11 の天然アミノ酸の導入が変異誘発される。非天然アミノ酸の導入を変異誘発するために、特殊なコドン、人工的なコドン等を用いることができる。

【 0 1 0 4 】

部位特異的な変異誘発は、高次構造を含む標的及び / 又は該標的に対するペプチドもしくはペプチドが由来する野生型ペプチドの構造情報を利用しても行うことができる。本発明においては、標的である M M P - 9 及び / 又は標的に対する S P I N K 2 変異体もしくは野生型 S P I N K 2 の、又は両者の複合体の、高次情報を含む構造情報を利用して、部位特異的な変異を導入することができる。例えば、活性型 M M P - 9 結合活性を有する S P I N K 2 変異体を同定し、次いで M M P - 9 及び当該 S P I N K 2 変異体の複合体の結晶を取得して X 線結晶構造解析を行い、その解析結果に基づいて該 S P I N K 2 変異体が結合する M M P - 9 分子上のエピトープ及び該エピトープに対応する該 S P I N K 2 変異体上のパラトープを特定すること等を通じて得られる構造情報と、活性型 M M P - 9 結合活性との相関を見出すことができる場合がある。そのような構造活性相関に基づいて、特定の位置において特定のアミノ酸への置換、特定の位置におけるアミノ酸の挿入又は欠失等をデザインし、実際に活性型 M M P - 9 結合活性を確認することができる。

また、例えば、イノシン等の塩基対の特異性が改変されたヌクレオチド構成単位を用いて、変異を誘発することができる。

【 0 1 0 5 】

さらに、例えば、T a q DNA ポリメラーゼ等の、校正機能を欠き、エラー率の高い DNA ポリメラーゼを用いたエラー・ブローン P C R 法、化学変異誘発等により、ランダムな位置への変異誘発が可能である。

【 0 1 0 6 】

活性型 M M P - 9 結合ペプチドは、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳細胞ディスプレイ、ファージディスプレイ、リボゾームディスプレイ、核酸ディスプレイ、コロニースクリーニング等を利用して、ファージライブラリー、コロニーライブラリー等それぞれのスクリーニング方法に適した当業者に公知のライブラリーより濃縮及び / 又は選抜することができる。それらのライブラリーのうち、ファージライブラリーにはファージミド、コロニースクリーニングにはコスミド等、それぞれのライブラリーに適した当業者に公知のベクター及び方法により構築することができる。そのかかるベクターは、原核細胞又は真核細胞に感染するウイルス又はウイルス性ベクターであってもよい。それらの組換えベクターは、遺伝子操作等当業者に公知の方法により調製することができる。

【 0 1 0 7 】

細菌ディスプレイは、例えば、大腸菌の外膜リポ蛋白質 (L p p) の一部及び外膜蛋白質 O m p A と所望の蛋白質を融合させ、大腸菌表面上に所望の蛋白質を提示させる技術である。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られる DNA 群を細菌ディスプレイに適したベクターに導入し、当該ベクターで細菌細胞を形質転換すれば、形質転換細菌細胞表面上に、ランダム変異誘発された蛋白質群を提示するライブラリーを得ることができる (F r a n c i s c o , J . A . , e t a l . (1 9 9 3 年) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 0 巻 , 1 0 4 4 4 - 1 0 4 4 8 頁) 。

【 0 1 0 8 】

酵母ディスプレイは、酵母の細胞表面の外殻にある α - アグルチニン等の蛋白質に所望の蛋白質を融合させ、酵母表面上に提示させる技術である。 α - アグルチニンには、グリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) アンカー付着シグナルと推定される C 末疎水性領域、シグナル配列、活性ドメイン、細胞壁ドメイン等が含まれ、それらを操作することにより、酵母の細胞表面上に所望の蛋白質をディスプレイすることができる。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られる DNA 群を酵母ディスプレイに適したベクターに導入し、当該ベクターで酵母細胞を

形質転換すれば、形質転換酵母細胞表面上に、ランダム変異誘発された蛋白質群を提示するライブラリーを得ることができる (Ueda, M. & Tanaka, A., Biotechnol. Adv., 18巻、121頁～、2000年刊: Ueda, M. & Tanaka, A., J. Biosci. Bioeng., 90巻、125頁～、2000年刊等)。

【0109】

動物細胞ディスプレイは、例えば、血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) に代表される膜蛋白質の膜貫通領域と所望の蛋白質を融合させ、HEK293やチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞等の哺乳動物細胞表面上に所望の蛋白質を提示させる技術である。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られるDNA群を動物細胞ディスプレイに適したベクターに導入し、当該ベクターで動物細胞を形質転換すれば、形質転換動物細胞表面上に、ランダム変異誘発された蛋白質群を提示するライブラリーを得ることができる (Hommel, et al. (2009年) Methods Mol Biol. 525巻: 337-52頁)。

【0110】

酵母、細菌、動物細胞等の細胞上に提示された所望のライブラリーは、標的分子の存在下で保温するか、又は、標的分子と接触させることができる。例えば、ビオチン等で修飾されたMMP-9とライブラリーを含む細胞を一定時間保温した後、磁性ビーズ等の担体を添加し、細胞を担体から分離し、次いで担体を洗浄することにより非特異的な吸着物及び結合物を除去し、担体 (に結合したMMP-9) に結合したペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物が提示された細胞群を回収することができる。同様に、磁性ビーズ添加後に磁気細胞分離 (MACS) をする、又は、抗MMP-9抗体を用いた細胞染色後にFACSを実施することで、担体 (に結合したMMP-9) 又はMMP-9と結合したペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物が提示された細胞群を回収することができる。非特異的な吸着物部位及び/又は結合部位は、例えば、ブロッキング処理することも可能であり、ブロッキング工程も適切な方法であれば組み入れられ得る。そのようにして得られたペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を発現しているベクターを回収し、ベクターに挿入されたポリヌクレオチドの有するヌクレオチド配列を決定し、該ヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を決定することができる。また、ベクターを再度宿主細胞に導入し、上述の操作をサイクルとして1回乃至数回繰り返すことにより、標的分子に結合するペプチド集合物をより高度に濃縮することができる。

【0111】

ファージディスプレイの場合、例えば、ファージミドは、プラスミド複製起点の他に、一本鎖バクテリオファージから誘導された第二の複製起点を含む細菌プラスミドである。ファージミドを有する細胞は、M13又はそれに類似のヘルパーバクテリオファージによる重感染において、一本鎖複製モードを介してファージミドを複製することができる。すなわち、バクテリオファージ被覆蛋白質により被覆された感染性粒子の中に、一本鎖ファージミドDNAがパッケージされる。このようにして、ファージミドDNAを、感染細菌中にクローン二本鎖DNAプラスミドとして、ファージミドを、重感染した細胞の培養上清からバクテリオファージ状の粒子として、それぞれ形成することができる。バクテリオファージ状の該粒子を、F性線毛を有する細菌にかかるDNAを感染させるために該細菌中に注入することにより、粒子自体をプラスミドとして再形成することができる。

【0112】

被験ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド及びバクテリオファージ被覆蛋白質 (coat protein) 遺伝子を含んで構成される融合遺伝子を該ファージミドに挿入して細菌に感染させ、該細胞を培養すれば、かかるペプチドを、該細菌上又はファージ様粒子上に発現もしくは提示 (ディスプレイと同義) させるか、又は、該被覆蛋白質との融合蛋白質としてファージ粒子中もしくは該細菌の培養上清中に産生することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 3 】

例えば、該ポリヌクレオチド及びバクテリオファージ被覆蛋白質遺伝子 g p I I I を含んで構成される融合遺伝子をファージミドに挿入し、M 1 3 又はそれに類似のヘルパーファージとともに大腸菌に重感染させれば、該ペプチド及び該被覆蛋白質を含んで構成される融合蛋白質として、該大腸菌の培養上清中に産生させることができる。

【 0 1 1 4 】

ファージミドの代わりに、環状又は非環状の各種ベクター、例えば、ウイルスベクターを用いる場合、当業者に公知の方法に従って、該ベクターに挿入された該ポリヌクレオチドの有するヌクレオチド配列によりコードされたアミノ酸配列を有するペプチドを、該ベクターが導入された細胞もしくはウイルス様粒子上に発現又は提示させるか、又は該細胞の培養上清中に産生することができる。

10

【 0 1 1 5 】

そのようにして得られる、ペプチドを発現しているライブラリーを、標的分子の存在下で保温するか、又は、標的分子と接触させることができる。例えば、M M P - 9 が固相化された担体を、ライブラリーを含む移動相と一定時間保温した後、移動相を担体から分離し、次いで担体を洗浄することにより非特異的な吸着物及び結合物を除去し、担体（に結合した M M P - 9 ）に結合したペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を、溶出により回収することができる。溶出は、相対的に高いイオン強度、低い p H 、中程度の変性条件、カオトロピック塩の存在下等で、非選択的に行うか、又は、M M P - 9 等の可溶性の標的分子、標的分子に結合する抗体、天然のリガンド、基質等を添加して固相化された標的分子と競合させることにより選択的に行うことができる。非特異的な吸着物部位及び／又は結合部位は、例えば、ブロッキング処理することも可能であり、ブロッキング工程も適切な方法であれば組み入れられ得る。

20

【 0 1 1 6 】

そのようにして得られたペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を発現しているベクターを回収し、ベクターに挿入されたポリヌクレオチドの有するヌクレオチド配列を決定し、該ヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を決定することができる。また、ベクターを再度宿主細胞に導入し、上述の操作をサイクルとして 1 回乃至数回繰り返すことにより、標的分子に結合するペプチド集合物をより高度に濃縮することができる。

30

【 0 1 1 7 】

リボゾームディスプレイは、例えば、終始コドンを持たない所望の蛋白質をコードする m R N A と無細胞蛋白質合成系を用いることで、試験管内で所望の蛋白質とそれに対応する m R N A 、及びリボゾームが連結した分子を合成する技術である。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られる m R N A 群と無細胞蛋白質合成系を利用することで、ランダム変異誘発された蛋白質群がリボゾーム上に提示されたライブラリーを得ることができる (M a t t h e a k i s L C , e t a l . (1 9 9 4 年) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 1 巻 1 9 号 , 9 0 2 2 - 9 0 2 9 頁) 。

【 0 1 1 8 】

核酸ディスプレイは、m R N A ディスプレイともよばれ、例えば、チロシル t R N A の 3 ' 末端に類似の構造をもつピューロマイシン等のリンカーを用いることで、所望の蛋白質、それをコードする m R N A 及びリボゾームが連結した分子を合成する技術である。当該技術は生細胞ではなく、無細胞蛋白質合成系を利用するため、試験管内で合成することが可能である。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られる m R N A 群とピューロマイシン等のリンカー、及び、無細胞蛋白質合成系を利用することで、ランダム変異誘発された蛋白質群がリボゾーム上に提示されたライブラリーを得ることができる (N e m o t o N , e t a l . (1 9 9 7 年) F E B S L e t t . 4 1 4 巻 2 号 , 4 0 5 - 4 0 8 頁) 。

40

【 0 1 1 9 】

50

リボゾームディスプレイや核酸ディスプレイ等の無細胞合成系を介して得られる、ペプチドを発現しているライブラリーは、標的分子の存在下で保温するか、又は、標的分子と接触させることができる。例えば、MMP-9が固相化された担体を、ライブラリーを含む移動相と一定時間保温した後、移動相を担体から分離し、次いで担体を洗浄することにより非特異的な吸着物及び結合物を除去し、担体（に結合したMMP-9）に結合したペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を、溶出により回収することができる。溶出は、相対的に高いイオン強度、低いpH、中程度の変性条件、カオトロピック塩の存在下等で、非選択的に行うか、又は、MMP-9等の可溶性の標的分子、標的分子に結合する抗体、天然のリガンド、基質等を添加して固相化された標的分子と競合させることにより選択的に行うことができる。非特異的な吸着物部位及び/又は結合部位は、例えば、ブロッキング処理することも可能であり、ブロッキング工程も適切な方法であれば組み入れられ得る。

10

【0120】

そのようにして得られたペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を発現している核酸を回収し、mRNAの場合はcDNAに逆転写反応後にヌクレオチド配列を決定し、該ヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を決定することができる。また、回収した核酸からmRNAを転写し、上述の操作をサイクルとして1回乃至数回繰り返すことにより、標的分子に結合するペプチド集合物をより高度に濃縮することができる。

20

【0121】

ペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物に予めアフィニティー・タグをコンジュゲートさせておけば、効率的に当該ペプチド又はそれらの集合物を精製することができる。例えば、プロテアーゼの基質をタグとして予めペプチド集合物にコンジュゲートさせておけば、該プロテアーゼ活性により切断することにより、ペプチドを溶出することができる。

【0122】

得られた配列情報及びペプチドの機能等に基づき、得られたクローン又はライブラリーにさらなる変異を誘発させ、変異が導入されたライブラリーから、その機能（例えば、活性型MMP-9結合活性）、物性（熱安定性、保存安定性等）、体内動態（分布、血中半減期）等が改善されたペプチドを取得することも可能である。

30

【0123】

得られたペプチドが、活性型MMP-9結合活性を有しているか否かを決定することにより、活性型MMP-9結合ペプチドを同定することができる。

【0124】

また、活性型MMP-9結合ペプチドは、好適には、野生型SPINK2のアミノ酸配列に含まれる16番Ser乃至30番Valからなるループ構造、31番Cys及び32番Glyからなるβストランド（1）並びに57番Ile乃至59番Argからなるβストランド（2）から構成されるβシート、並びに、41Glu番アミノ酸乃至51番Glyからなるαヘリックス、又は、それらに類似するか若しくはそれら（の位置）に少なくとも部分的に対応するループ構造、βシート、αヘリックス等から構成される立体構造が、活性型MMP-9結合活性を発揮し得る程度に、維持され得る。かかる立体構造（全体の構造又は部分構造）を指標の一部として、より好適な活性型MMP-9結合ペプチドを同定することも可能である。

40

【0125】

4. 活性型MMP-9結合ペプチドをコードする核酸分子、それを含むベクター、それらを含む細胞、並びに、組換え活性型MMP-9結合ペプチドの製造方法

本発明は、活性型MMP-9結合ペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（以下、「活性型MMP-9結合ペプチドをコードする核酸分子」という）、該遺伝子が挿入された組換えベクター、該遺伝子もしくはベクターが導入された細胞（以下、「活性型MMP-9結合ペプチドをコードする核酸分子含有

50

細胞」という)、又は活性型 MMP - 9 結合ペプチドを産生する細胞(以下、「活性型 MMP - 9 結合ペプチド産生細胞」という)をも提供する。

【0126】

本発明の活性型 MMP - 9 結合ペプチドをコードする核酸分子の一部の好適な例として、次の(a)乃至(d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列(以下、「活性型 MMP - 9 結合ペプチドのヌクレオチド配列」という)を含んでなるか、活性型 MMP - 9 結合ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるか、又は活性型 MMP - 9 結合ペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるものをあげることができる:

(a) 配列番号2乃至17(図16乃至31)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

(b) (a)に記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ活性型 MMP - 9 結合活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

(c) (a)に記載のヌクレオチド配列において1乃至20個、1乃至15個、1乃至10個、1乃至8個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、1若しくは2個、又は1個のヌクレオチド又はヌクレオチド残基が置換、欠失、付加及び/又は挿入してなり、且つ活性型 MMP - 9 結合活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;及び、

(d) (a)に記載のヌクレオチド配列と60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つ活性型 MMP - 9 結合活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列。

【0127】

上記(a)乃至(d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなるか又は該アミノ酸配列を含む SPINK2 変異体ペプチドは、好適には前駆型 MMP - 9 には結合せず、より好適には MMP - 9 の有するプロテアーゼ活性を阻害し、より一層好適には MMP - 9 の有するプロテアーゼ活性を特異的に阻害する。

【0128】

しかしながら、活性型 MMP - 9 結合ペプチドをコードする核酸分子は(a)乃至(d)に限定されるものではなく、活性型 MMP - 9 結合活性を有する SPINK2 変異体に含まれるアミノ酸配列、好適には配列番号18(図32)で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子は遍く活性型 MMP - 9 結合ペプチドをコードする核酸分子の範囲に包含される。

【0129】

アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を設計するには、各アミノ酸に対応するコドンを用いて1種又は2種以上使用することができる。そのため、あるペプチドが有する単一のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、複数のバリエーションを有し得る。かかるコドンの選択に際しては、該ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド又はそれを含むベクターが導入される、発現用の宿主細胞のコドン使用(codon usage)に応じて適宜コドンを選択したり、複数のコドンの使用の頻度もしくは割合を適宜調節したりすることができる。例えば、大腸菌を宿主細胞として用いる場合は、大腸菌において使用頻度が高いコドンを使用してヌクレオチド配列を設計してもよい。

【0130】

活性型 MMP - 9 結合ペプチドをコードする核酸分子は、1つ又は2つ以上の調節配列に機能的に連結されていてもよい。「機能的に連結される」とは、連結された核酸分子を発現させることができる、又は、該分子に含まれるヌクレオチド配列の発現を可能にする、ことを意味する。調節配列は、転写調節及び/又は翻訳調節に関する情報を含む配列エレメントを含む。調節配列は、種により様々であるが、一般に、プロモーターを含み、原核生物の-35/-10ボックス及びシャイン・ダルガノ配列、真核生物のTATAボックス、CAAT配列、及び5'キャッピング配列等で例示される、転写及び翻訳の開始に

関与する 5' 非コード配列を含む。かかる配列は、エンハンサーエレメント及び/又はリプレッサーエレメント、並びに宿主細胞内外の特定の区画へと天然型又は成熟型のペプチドを送達するための、翻訳され得るシグナル配列、リーダー配列等を含んでもよい。さらに、調節配列は 3' 非コード配列を含んでよく、かかる配列には、転写終結又はポリアデニル化等に関与するエレメントを含み得る。ただし、転写終結に関する配列が、特定の宿主細胞において十分に機能しない場合は、当該細胞に適した配列で置換され得る。

【0131】

プロモーター配列としては、原核生物では *tet* プロモーター、*lacUV5* プロモーター、*T7* プロモーター等を、真核細胞では *SV40* プロモーター、*CMV* プロモーター等を例示することができる。

10

【0132】

活性型 MMP-9 結合ペプチドをコードする核酸分子は、単離された形態、ベクターもしくは他のクローニングベヒクル（以下、単に「ベクター」という：プラスミド、ファージミド、ファージ、バキュロウイルス、コスミド等）中又は染色体中に含まれる形態であってよいが、それらの形態に限定されない。ベクターには、活性型 MMP-9 結合ペプチドのヌクレオチド配列及び上記調節配列に加え、発現に使用される宿主細胞に適した複製配列及び制御配列、並びに形質転換等により核酸分子が導入された細胞を選択可能な表現型を与える選択マーカーを含んでいてもよい。

【0133】

活性型 MMP-9 結合ペプチドをコードする核酸分子、活性型 MMP-9 結合ペプチドのヌクレオチド配列を含むベクターは、当該ペプチド又はヌクレオチド配列を発現可能な宿主細胞に形質転換等の当業者に公知の方法により導入することができる。該核酸分子又はベクターを導入された宿主細胞は、当該ペプチド又はヌクレオチド配列の発現に適した条件下で培養され得る。宿主細胞は、原核及び真核のいずれでもよく、原核では大腸菌、枯草菌等、真核ではサッカロミセス・セレビシエ、ピキア・パストリス等の酵母、SF9、High5等の昆虫細胞、HeLa細胞、CHO細胞、COS細胞、NS0等の動物細胞を例示することができる。真核細胞等を宿主細胞として用いることにより、発現した本発明のペプチドに所望の翻訳後修飾を施すことができる。翻訳後修飾としては、糖鎖等の官能基付加、ペプチド又は蛋白質の付加、アミノ酸の化学的性質の変換等を例示することができる。また、本発明のペプチドへの所望の修飾を人工的に施すことも可能である。そのようなペプチドの修飾体も、本発明の「ペプチド」の範囲に包含される。

20

30

【0134】

本発明は活性型 MMP-9 結合ペプチドの製造方法をも含む。当該方法には、活性型 MMP-9 結合ペプチドをコードする核酸分子もしくは活性型 MMP-9 結合ペプチドのヌクレオチド配列を含むベクターが導入された宿主細胞又は活性型 MMP-9 結合ペプチドを発現する細胞を培養する工程 1、及び/又は、工程 1 で得られた培養物から活性型 MMP-9 結合ペプチドを回収する工程 2 が含まれる。工程 2 には、当業者に公知の分画、クロマトグラフィー、精製等の操作を適用することができ、例えば、後述する本発明の抗体を利用したアフィニティー・クロマトグラフィーによる精製が適用可能である。

【0135】

本発明の一部の態様において、活性型 MMP-9 結合ペプチドは、分子内ジスルフィド結合を有する。分子内ジスルフィド結合を有するペプチドは、シグナル配列等を用いて、酸化性の酸化還元環境を有する細胞区間に送達させることが好ましい場合がある。酸化性環境は、大腸菌等のグラム陰性細菌の周辺質、グラム陽性細菌の細胞外環境、真核細胞の小胞体内腔等により提供することが可能であり、かかる環境下では、構造的なジスルフィド結合の形成が促進され得る。また、大腸菌等の宿主細胞の細胞質において分子内ジスルフィド結合を有するペプチドを作製することも可能であり、その場合ペプチドは、可溶性の折り畳まれた状態で直接的に獲得されるか、又は封入体の形態で回収され、次いでイン・ピットロで復元され得る。さらに、酸化性の細胞内環境を有する宿主細胞を選択し、その細胞質において分子内ジスルフィド結合を有するペプチドを作製することもできる。一方

40

50

、活性型 MMP - 9 結合ペプチドが分子内ジスルフィド結合を有さない場合は、還元性の酸化還元環境を有する細胞区間、例えば、グラム陰性細菌の細胞質において作製され得る。

【0136】

本発明の活性型 MMP - 9 結合ペプチドは、メリフィールド他のペプチド固相合成法、並びに、t - ブトキシカルボニル (t - B u t o x y c a r b o n y l : B o c) や 9 - フルオレニルメトキシカルボニル (9 - F l u o r e n y l m e t h o x y c a r b o n y l : F m o c) 等を利用した有機合成化学的ペプチド合成法により例示される化学合成、イン・ピトロ翻訳等の、他の当業者に公知の方法によっても製造することができる。

【0137】

本発明は、その一部の態様として、活性型 MMP - 9 結合活性を有する SPINK 2 変異体ペプチドに結合する抗体及びその機能断片を提供する。抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれでもよく、モノクローナル抗体としては、免疫グロブリン又はそれに由来するものであれば特に限定されない。抗体の機能断片は、抗原結合活性すなわち該 SPINK 2 変異体ペプチドへの結合活性を有している範囲において限定はなく、重鎖及び軽鎖の両方もしくは一方又はその断片、定常領域や Fc 領域を欠くもの、他の蛋白質や標識用物質とのコンジュゲート体等も含まれる。かかる抗体及びその機能断片は、当業者に公知の方法により調製することができ、該 SPINK 2 変異体ペプチドのアフィニティー・クロマトグラフィーによる精製、該ペプチドを含む医薬組成物又はその使用に関連した臨床検査、診断等における該ペプチドの検出、イムノアッセイ等に有用である。本発明の抗体は、該抗体が結合する本発明のペプチドを用いたアフィニティー・クロマトグラフィーにより精製することができる。

【0138】

5 . 医薬組成物

本発明は活性型 MMP - 9 結合ペプチド又はそのコンジュゲートを含む医薬組成物をも提供する。好適には、活性型 MMP - 9 結合ペプチド又はそのコンジュゲートは、MMP - 9 阻害活性を持つ MMP - 9 阻害ペプチド又はそのコンジュゲートである。

【0139】

本発明の医薬組成物は、MMP - 9 により惹起されるか又は増悪化され、MMP - 9 の発現又は機能を阻害又は抑制することにより、かかる惹起又は増悪化の抑制、治癒、症状の維持もしくは改善、二次性疾患の回避等し得る各種疾患（以下、「MMP - 9 に関わる疾患」又は「MMP - 9 関連疾患」という）の治療及び / 又は予防に有用である。

【0140】

MMP - 9 に関わる疾患としては、例えば、炎症性・自己免疫性疾患、神経変性疾患、精神疾患、血管系疾患、又は悪性腫瘍等をあげることができる。

【0141】

炎症性・自己免疫性疾患としては、例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、気管支喘息、間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、肝炎、湿疹（皮膚炎）、乾癬、扁平苔癬、紅斑・紅皮症、蕁麻疹、脱毛症、天疱瘡、尋常性ざ瘡、褥瘡・創傷、結膜炎、角膜炎、鼻炎、口内炎、舌炎、ベーチェット病、多発性硬化症、脳炎、頭痛、末梢神経炎、糖尿病合併症（糖尿病網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害）、アテローム性動脈硬化症、膵炎、慢性心不全、又は腎炎をあげることができる。

【0142】

神経変性疾患としては、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、脳損傷、脊髄損傷、低酸素症、痙攣、又は外傷性脳障害をあげることができる。

【0143】

精神疾患としては、例えば、大うつ病、双極性障害、不安、外傷後ストレス障害（PTSD）、摂食障害、睡眠障害、統合失調症、依存症、自閉症、脆弱 X 症候群、注意欠陥多動性障害、又はダウン症候群をあげることができる。

【 0 1 4 4 】

血管系疾患としては、例えば、脳血管障害、脳動脈瘤、脳アミロイド血管症、抹消血管障害、大動脈瘤、大動脈解離、動静脈瘤、動脈硬化症、高安動脈炎、川崎病、静脈瘤、又は血管石灰化をあげることができる。

【 0 1 4 5 】

悪性腫瘍としては、例えば、肺癌、乳癌、膵臓癌、大腸癌、又は神経膠腫をあげることができる。

【 0 1 4 6 】

但し、MMP - 9に関わる疾患は、ここに例示された疾患に限定されるものではない。

【 0 1 4 7 】

本発明の医薬組成物には、治療又は予防に有効な量の活性型MMP - 9結合ペプチドと薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び/又は補助剤を含有せしめることができる。

【 0 1 4 8 】

「治療又は予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態及び投与経路につき治療又は予防効果を奏する量を意味し、「薬理学的に有効な量」と同義である。

【 0 1 4 9 】

本発明の医薬組成物には、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、該組成物又はそれに含まれるペプチド又はコンジュゲートの安定性、溶解性、徐放性、吸収性、浸透性、剤型、強度、性状、形状等を変化させたり、維持したり、保持したりするための物質（以下、「製剤用の物質」という）を含有せしめることができる。製剤用の物質としては、薬理学的に許容される物質であれば特に限定されるものではない。例えば、非毒性又は低毒性であることは、製剤用の物質が好適に具備する性質である。

【 0 1 5 0 】

製剤用の物質として、例えば、以下のものをあげることができるが、これらに限定されるものではない；グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリス - 塩酸（Tris - HCl）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、β - シクロデキストリンやヒドロキシプロピル - β - シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類やグルコース、マンノースやデキストリン等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレングリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルビテート20やポリソルビテート80等のポリソルビテート、トリトン（triton）、トロメタミン（tromethamine）、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、マンニトールやソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、希釈剤、賦形剤、及び/又は薬学上の補助剤。

【 0 1 5 1 】

これらの製剤用の物質の添加量は、活性型MMP - 9結合ペプチドの重量に対して0.001乃至1000倍、好適には0.01乃至100倍、より好適には0.1乃至10倍である。

【 0 1 5 2 】

活性型MMP - 9結合ペプチドをリボソーム中に含有せしめたもの、活性型MMP - 9結合ペプチドとリボソームとが結合してなる修飾体を含有する医薬組成物も、本発明の医

10

20

30

40

50

薬組成物に含まれる。

【0153】

賦形剤や担体は、通常液体又は固体であり、注射用の水、生理食塩水、人工脳脊髄液、その他の、経口投与又は非経口投与用の製剤に用いられる物質であれば特に限定されない。生理食塩水としては、中性のもの、血清アルブミンを含むもの等をあげることができる。

【0154】

緩衝剤としては、医薬組成物の最終pHが7.0乃至8.5になるように調製されたTrisバッファー、同じく4.0乃至5.5になるように調製された酢酸バッファー、同じく5.0乃至8.0になるように調製されたクエン酸バッファー、同じく5.0乃至8.0になるように調製されたヒスチジンバッファー等を例示することができる。

10

【0155】

本発明の医薬組成物は、固体、液体、懸濁液等である。本発明の別の医薬組成物の例として、凍結乾燥製剤をあげることができる。凍結乾燥製剤を成型するには、スクロース等の賦形剤を用いることができる。

【0156】

本発明の医薬組成物の投与経路としては、点眼、経腸投与、局所投与及び非経口投与のいずれでもよく、例えば、結膜上への点眼、硝子体内投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与等をあげることができる。

20

【0157】

かかる医薬組成物の組成は、投与方法、活性型MMP-9結合ペプチドの活性型MMP-9結合親和性又はMMP-9阻害活性等に応じて決定することができる。本発明の活性型MMP-9結合ペプチドの活性型MMP-9蛋白質に対する親和性が高いほど(K_D 値、 IC_{50} 値又は K_i 値が低いほど)、少ない投与量でその薬効を発揮し得る。

【0158】

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドの投与量は、薬理的に有効な量であれば限定されず、個体の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、該ペプチドのMMP-9蛋白質結合親和性又はその生物活性、その他の要素に応じて適宜決定することができるが、通常、0.01乃至1000mg/kg、好適には0.1乃至100mg/kgを、1乃至180日間に1回、又は1日2回若しくは3回以上投与することができる。

30

【0159】

医薬組成物の形態としては、注射剤(凍結乾燥製剤、点滴剤を含む)、坐剤、経鼻型吸収剤、経皮型吸収剤、舌下剤、カプセル、錠剤、軟膏剤、顆粒剤、エアゾル剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、点眼剤、生体埋め込み型製剤等を例示することができる。

【0160】

活性型MMP-9結合ペプチドを有効成分として含む医薬組成物は、他の医薬と同時に又は別個に投与することができる。例えば、他の医薬を投与した後に活性型MMP-9結合ペプチドを有効成分として含む医薬組成物を投与するか、かかる医薬組成物を投与した後に、他の医薬を投与するか、又は、当該医薬組成物と他の医薬とを同時に投与してもよい。同時に投与する場合、活性型MMP-9結合ペプチドと他の医薬とは、単一の製剤、及び、別々の製剤(複数の製剤)、のいずれに含有されてもよい。

40

【0161】

それらの他の医薬は、1つの場合もあり、2つ、3つあるいはそれ以上を投与するか又は受けることもできる。それらをまとめて本発明の医薬組成物と「他の医薬との併用」又は「他の医薬との組み合わせ」と呼び、本発明のペプチド又はそのコンジュゲートに加えて他の医薬を含むか又は他の療法と組み合わせ使用される本発明の医薬組成物も「他の医薬との併用」又は「他の医薬との組み合わせ」の態様として本発明に含まれる。

【0162】

本発明は、活性型MMP-9結合ペプチドを投与する工程を含む、MMP-9に関わる

50

疾患の治療方法又は予防方法、該疾患の治療用又は予防用医薬組成物を調製するための本発明の活性型 MMP - 9 結合ペプチドの使用、該疾患の治療又は予防のための活性型 MMP - 9 結合ペプチドの使用、をも提供する。本発明の活性型 MMP - 9 結合ペプチドを含む治療用又は予防用キットも本発明に含まれる。

【0163】

さらに、本発明は、本発明の活性型 MMP - 9 結合ペプチド又はそのコンジュゲートの有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、又は、該ポリヌクレオチドもしくは該ベクターを含むか又は本発明の活性型 MMP - 9 結合ペプチド又はそのコンジュゲートを発現する細胞を含む医薬組成物をも提供する。例えば、かかるポリヌクレオチド及びベクターは MMP - 9 に関わる疾患の遺伝子治療に、かかる細胞は MMP - 9 に関わる疾患の細胞治療に、それぞれ公知の手法を用いて適用することができる。また、例えば、かかるポリヌクレオチド又はベクターを、自家細胞又は他家細胞（同種細胞）に導入することにより、細胞治療用の細胞を調製することができる。そのようなポリヌクレオチド及びベクターは、細胞治療薬調製の組成物としても、本発明に包含される。しかしながら、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、細胞等を含む医薬組成物の態様は上記のものに限定されない。

【0164】

6. 診断用組成物

本発明の活性型 MMP - 9 結合ペプチド又はそのコンジュゲートを含む検査用又は診断用組成物（以下、まとめて「診断用組成物」という）を提供する。

【0165】

本発明の診断用組成物は、炎症性疾患や血管系疾患等 MMP - 9 に関わる疾患、MMP - 9 発現の検査又は診断に有用である。本発明において検査又は診断には、例えば、罹病リスクの判定又は測定、罹病の有無の判定、進行や増悪化の程度の測定、MMP - 9 阻害剤等の医薬組成物による薬物治療の効果の測定又は判定、薬物治療以外の治療の効果の測定又は判定、再発リスクの測定、再発の有無の判定等が含まれるが、検査又は診断であればそれらに限定されるものではない。

【0166】

本発明の診断用組成物は、本発明のペプチド又はそのコンジュゲート、それらを含む組成物、それらを含む医薬組成物を投与する個体の同定に有用である。

【0167】

かかる診断用組成物には、pH 緩衝剤、浸透圧調節剤、塩類、安定化剤、防腐剤、顕色剤、増感剤、凝集防止剤等を含ませしめることができる。

【0168】

本発明は炎症性疾患や血管系疾患等 MMP - 9 に関わる疾患の検査方法又は診断方法、該疾患の診断用組成物を調製するための本発明のペプチドの使用、該疾患の検査又は診断のための本発明のペプチドの使用、をも提供する。本発明のペプチドを含む検査又は診断用キットも本発明に含まれる。

【0169】

本発明のペプチドを含む検査又は診断の方法としてはサンドウィッチ ELISA が望ましいが、通常の ELISA 法や RIA 法、ELISPOT (Enzyme - Linked Immunospot) 法、ドットプロット法、オクタロニー法、CIE (Counterimmuno electrophoresis) 法、CLIA (Chemiluminescent immuno assay)、FCM (Flow Cytometry) 等の検出方法が利用可能である。検出には抗体や本発明のペプチドもしくはそのコンジュゲート等を標識したものが利用される。標識法としてはビオチンのほか、HRP、アルカリフォスファターゼ、FITC 等の発蛍光団、放射性同位元素等のラベル等生化学的解析に実施可能な標識法が利用できる。酵素標識を利用した検出には TMB (3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine)、BCIP (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl phosphate)、p - NPP (p - nit

10

20

30

40

50

ropheny l phosphate)、OPD(o-Pheny l enedi ami ne)、ABTS(3-Ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher Scientific)等の発色基質やQuantaBlu(商標) Fluorogenic Peroxidase Substrate(Thermo Fisher Scientific)蛍光基質のほか、化学発光基質を用いることができる。本測定には、ヒト又は非ヒト動物由来の試料に加え、組換え蛋白質等の人工的な処理を加えた試料をも供することができる。生物個体由来の被験試料としては、例えば、血液、関節液、腹水、リンパ液、脳脊髄液、肺胞洗浄液、唾液、痰、組織ホモジネート上清、組織切片等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

10

【0170】

本発明のペプチドを含む検査又は診断用のサンドウィッチELISAキットには、活性型MMP-9蛋白質標準液、発色試薬、希釈用緩衝液、固相用蛋白質、検出用蛋白質、並びに洗浄液等が含まれてよい。抗原に結合した蛋白質量を測定する方法としては、吸光法、蛍光法、発光法、RI(Radioisotope)法等が好適に適用され、測定には、吸光プレートリーダー、蛍光プレートリーダー、発光プレートリーダー、RI液体シンチレーションカウンター等が好適に使用される。

【0171】

また、免疫沈降法を利用した方法でも検査又は診断が可能である。

20

【0172】

また、本発明は被験サンプル中の活性型MMP-9を検出又は測定する方法を提供する。これらの検出又は測定方法には、本発明の診断用組成物を使用することができる。活性型MMP-9結合ペプチドもしくはそのコンジュゲートを被験試料と接触させ(工程1)、次いで該ペプチドに結合したMMP-9の量又は測定を測定する(工程2)ことにより、該試料中の活性型MMP-9を検出することができる。工程1としては、例えば、活性型MMP-9結合ペプチドに免疫グロブリンのFc領域をコンジュゲートしたものをプロテインGを介して磁気ビーズに固相化し、そこに被験試料を添加する等、工程2としては、例えば、磁気ビーズを分離し、ビーズと共に沈殿した可溶性蛋白質をSDS-PAGEやWestern blot法で解析し、活性型MMP-9を検出する等をあげることができる。本測定には、ヒト又は非ヒト動物由来の試料に加え、組換え蛋白質等の人工的な処理を加えた試料をも供することができる。生物個体由来の被験試料としては、例えば、血液、関節液、腹水、リンパ液、脳脊髄液、肺胞洗浄液、唾液、痰、組織ホモジネート上清、組織切片等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

30

【0173】

前記の活性型MMP-9検出は、イン・ビトロのみならず、イン・ビボでも実施することができる。画像診断の場合は、薬学的に許容可能な放射性核種や発光体で標識された活性型MMP-9結合ペプチドもしくはそのコンジュゲートを利用することができる。工程1としては、例えば、被験者に、標識された該ペプチドもしくはそのコンジュゲートを投与する、工程2としては、例えば、PET/CT等の画像診断技術を使用して画像を取り、活性型MMP-9の存在を判定又は検査する等をあげることができる。

40

【0174】

本発明の診断用組成物に含まれるペプチド又はそのコンジュゲートは活性型MMP-9に結合し、好適には活性型MMP-9特異的結合活性を有する、すなわち前駆型MMP-9には結合しない。

【0175】

本発明の医薬組成物が投与される個体を同定する方法も本発明に包含される。かかる同定方法においては、該個体由来サンプル中の活性型MMP-9を測定し、該サンプル中に、活性型MMP-9が検出されたか、又は、健常個体由来サンプル中に検出された活性型MMP-9の量と比較してより多くの活性型MMP-9が検出された場合に、該個体を陽

50

性と判定することができる。

当該方法には、本発明の診断用組成物を使用することができる。

【0176】

また、かかる同定方法の好適な一態様において、該個体はMMP-9関連疾患に罹患しているか又はそのリスクがある。

【0177】

さらに、本発明の医薬組成物は、その一態様において、かかる同定方法において陽性と判定された個体に投与され得る。

【0178】

7. 活性型MMP-9の分離法

本発明の活性型MMP-9結合ペプチドは、活性型MMP-9特異的結合活性を有し、好適には、前駆型MMP-9結合活性を有しない。したがって、本発明の好適な活性型MMP-9結合ペプチド又はそのコンジュゲートを用いて、前駆型MMP-9と活性型MMP-9が混在した試料中から、活性型MMP-9を特異的に分離することができる。ペプチドからの活性型MMP-9の遊離は、相対的に高いイオン強度、低いpH、中程度の変性条件、カオトロピック塩の存在下等で、非選択的に行うことができるが、活性型MMP-9のプロテアーゼ活性を減弱させない範囲で行うことが好ましい。

【0179】

8. MMP-9関連疾患の治療薬又は予防薬の同定方法

本発明はそのある態様において、MMP-9阻害活性を指標として、MMP-9阻害化合物又はMMP-9関連疾患の治療薬もしくは予防薬、又はその候補を同定する方法を提供する。該方法には、MMP-9プロテアーゼ及び基質を、被験化合物の存在下又は非存在下（若しくはヴィークル存在下）で保温する工程（i）、被験化合物の存在下及び非存在下でのMMP-9プロテアーゼ活性を決定する工程（ii）、及び、被験化合物の存在下でのMMP-9プロテアーゼ活性が、被験化合物の非存在下でのMMP-9プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該被験化合物を陽性と判定する工程（iii）、を含み得る。また、別の態様において、本発明のMMP-9特異的阻害化合物の同定方法は、本発明のMMP-9特異的阻害SPINK2変異体ペプチド、好適には、配列番号2乃至17（図16乃至31）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチドの存在下で、被験化合物をヒト活性型MMP-9と結合させる工程（i）、該化合物が、ヒト活性型MMP-9との結合において、該ペプチドと競合するか否かを決定する工程（ii）、及び、該化合物がヒトMMP-9特異的結合活性を有するか否かを決定する任意の工程（iii）、を含み得る。これらの同定方法における被験化合物は、ペプチド性、非ペプチド性のいずれであってもよく、ペプチド性としては、SPINK2変異体に限定されず、抗体、抗体の抗原結合断片、抗原結合蛋白質、免疫グロブリンではない蛋白質の骨格を有するSPINK2変異体以外のペプチド、MMP-9基質アナログ等を例示することができるが、好適なペプチド性のものはSPINK2変異体ペプチドである。非ペプチド性としては合成低分子化合物、核酸等を例示することができるが、それらに限定されない。かかる方法におけるMMP-9は、好適には、ヒトMMP-9である。

【実施例】

【0180】

以下の実施例において、本発明の一部の態様についてさらに詳述するが、本発明はそれらに限定されない。

【0181】

なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Molecular Cloning）」（Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及びManiatis, T. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1982年発刊又は1989年発刊）に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従った。

【0182】

実施例1．活性型MMP-9結合ペプチドの調製

(1-1) 活性型MMP-9結合ペプチド発現ベクターpET 32a(改変)―活性型MMP-9結合ペプチドの構築

まず、SPINK2 scaffoldを骨格とした活性型MMP-9結合ペプチドの発現ベクターを構築した。各結合ペプチドのアミノ酸配列(配列番号2乃至9)をコードするヌクレオチド配列とSPINK2のアミノ酸配列(配列番号1)をコードするヌクレオチド配列を鋳型として、下記プライマー及びKOD-plus-(TOYOBO)を用いたPCR法((94 15秒、60 30秒、68 30秒)×30サイクル)により結合ペプチド断片を増幅した。

プライマー1: 5'-AAAAGAATTCTGATCCGCGAGTTTGGTCTGT
TTAG-3'

プライマー2: 5'-AAAACCTCGAGTTATGCGGCCGCGAGACGCGC
CGCACGGGACC-3'

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)によりDNAを調製した。調製したDNA断片及びpET 32a(改変)を制限酵素EcoRI(NEB)及びXhoI(NEB)を用いて、37で1時間以上処理し、アガロースゲル電気泳動後に、所望のDNA断片を切り出し、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)により精製した。T4 DNA Ligase(NEB)を用いて、精製した断片を16で一晩反応させることでligation反応を実施した。Ligation溶液は、大腸菌JM109(TOYOBO)に添加し、氷上で30分間静置した後、42で45秒の熱処理、さらに氷上で5分間静置し、0.1mg/mlアンピシリンを含む2YTプレートに播種後、37で一晩静置培養することで、大腸菌へ形質転換した。翌日、形質転換された大腸菌を、0.1mg/mlアンピシリンを含むTerrific Broth培地(Thermo Fisher Scientific)に植菌し、37で一晩培養後、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを回収し(以下、「miniprep処理」という)、配列解析を実施することで「pET 32a(改変)―活性型MMP-9結合ペプチド」を構築した。

【0183】

(1-2) 活性型MMP-9結合ペプチドの発現精製

(1-1)で構築したベクターpET 32a(改変)―活性型MMP-9結合ペプチドを大腸菌Origami B(DE3)(Merck)へ形質転換し、0.1mg/mlアンピシリンを含む2YT培地を用いて37で培養後、IPTG(最終濃度1mM)を添加し、16で一晩培養した。翌日、遠心分離(3,000g、20分、4)により集菌後、BugBuster Master Mix(Merck)を用いてlysateを調製し、TALON Metal Affinity Resin(Clontech)を用いてHisタグ融合目的蛋白質を精製した。次に、Thrombin Cleavage Capture Kit(Merck)を用いてthioredoxin tagと所望の蛋白質とを切断し、TALONを用いて精製した。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィー(Superdex 75 10/300 GL)又は逆相クロマトグラフィー(YMC-Pack ODS-AM)に供することで、活性型MMP-9結合ペプチドを調製した。得られたペプチドのN末端にはStag+リンカー1からなる部分(配列番号19:図33)が、C末端にはC末6マー(配列番号21:図35)が、それぞれコンジュゲートされている。

【0184】

実施例2．活性型MMP-9結合ペプチド評価用MMP-9の調製

ヒト/サル/ラット/マウスMMP-9の配列類似性を図1に示す。

(2-1) ヒトMMP-9酵素活性ドメインhMMP-9(cat)の調製

(2-1-1) pCMA-pro-hMMP-9(cat) __His6の構築

プラスミドpcDNA3.3-TOPO/LacZ(Thermo Fisher Scientific)を制限酵素XbaI(NEB)及びPmeI(NEB)で消化して得られる約5.4kbのフラグメントと、配列番号28(図44)に示すヒトMMP-9(P14780)をコードするヌクレオチド配列を含むDNA断片を、In-Fusion HD Cloning Kit(ClonTech)を用いて結合して、pcDNA3.3-hMMP-9を作製した。pcDNA3.3-hMMP-9を鋳型として、下記プライマーを用いたPCRを行い、得られた約5.5kbのフラグメントをリン酸化後セルフライゼーションすることによりCMVプロモーターの下流に配列番号28(図44)に示すヒトMMP-9をコードするヌクレオチド配列を持つ、pCMA-hMMP-9を構築した。

10

プライマー3: 5'-TATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGC-3'

プライマー4: 5'-GCTATGGCAGGGGCTGCGCGCCCGACGTTG-3'

pCMA-hMMP-9を鋳型としてPCRを行い、CMVプロモーターの下流にヒトMMP-9(配列番号28(図44))の分泌シグナル(Met1~Ala19)、プロペプチド(Ala20~Arg106)、酵素活性ドメイン(Phe107~Pro449)及びHisタグをコードするヌクレオチド配列を持つ、pCMA-pro-hMMP-9(cat) __His6を構築した。

20

【0185】

(2-1-2) pCMA-pro-hMMP-9(cat) __His6 __FLAG __A viの構築

pCMA-hMMP-9を鋳型としてPCRを行い、CMVプロモーターの下流にヒトMMP-9(配列番号28(図44))の分泌シグナル(Met1~Ala19)、Hisタグ、プロペプチド(Ala20~Arg106)、酵素活性ドメイン(Phe107~Pro449)、FLAGタグ(DYKDDDDK:図50:配列番号34)及びA viタグ(GGGLNDIFEAQKIEWHE:図51:配列番号35)をコードするヌクレオチド配列を持つ、pCMA-pro-hMMP-9(cat) __His6 __FLAG __A viを構築した。

30

【0186】

(2-1-3) pro-hMMP-9(cat) __His6の調製

(2-1-1)で構築したpCMA-pro-hMMP-9(cat) __His6はPolyethylenimine Max(PolySciences)を用いてFreeStyle 293F(Thermo Fisher Scientific)にtransfectionし、6日後に培養上清を回収した。HisTrap excel(GE Healthcare)によりHisタグ融合蛋白質を回収し、緩衝液をPBSに置換してpro-hMMP-9(cat) __His6を精製した。

【0187】

(2-1-4) active hMMP-9(cat) __His6の調製

40

(2-1-3)で取得したpro-hMMP-9(cat) __His6と、APMAで活性化したhMMP-3を混合し、37℃で4時間反応させた。反応液を低温下でPBSに置換し、active hMMP-9(cat) __His6を精製した。

【0188】

(2-1-5) pro-hMMP-9(cat) __His6 __FLAG __A viの調製

(2-1-3)と同様に、(2-1-2)で構築したpCMA-pro-hMMP-9(cat) __His6 __FLAG __A viを用いてpro-hMMP-9(cat) __His6 __FLAG __A viを精製した。

【0189】

(2-1-6) ビオチン標識 pro-hMMP-9(cat) __His6 __FLAG __A

50

v i の調製

(2 - 1 - 5) で取得した p r o - h M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i を 1 0 m M T r i s - H C l , p H 8 . 0 に置換し、ビオチンリガーゼ B i r A (A v i d i t y) のプロトコルに従い、3 0 で 1 時間ビオチン標識した。反応液を低温下で P B S に置換し、ビオチン標識 p r o - h M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i を精製した。

【 0 1 9 0 】

(2 - 1 - 7) ビオチン標識 a c t i v e h M M P - 9 (c a t) _ _ F L A G _ _ A v i の調製

(2 - 1 - 4) と同様に、(2 - 1 - 6) で取得したビオチン標識 p r o - h M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i を活性化し、ビオチン標識 a c t i v e h M M P - 9 (c a t) _ _ F L A G _ _ A v i を精製した。

【 0 1 9 1 】

(2 - 2) マウス M M P - 9 酵素活性ドメイン m M M P - 9 (c a t) の調製

(2 - 2 - 1) p C M A - p r o - m M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i の構築

プラスミド p c D N A 3 . 3 - T O P O / L a c Z (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を制限酵素 X b a I 及び P m e I で消化して得られる約 5 . 4 k b のフラグメントと、配列番号 2 9 (図 4 5) に示すマウス M M P - 9 (P 4 1 2 4 5) をコードするヌクレオチド配列を含む D N A 断片を、I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i t (C l o n t e c h) を用いて結合して、p c D N A 3 . 3 - m M M P - 9 を作製した。p c D N A 3 . 3 - m M M P - 9 を鋳型として、下記プライマーを用いた P C R を行い、得られた約 5 . 6 k b のフラグメントをリン酸化後セルフライゲーションすることにより C M V プロモーターの下流に配列番号 2 9 (図 4 5) に示すマウス M M P - 9 をコードするヌクレオチド配列を持つ、p C M A - m M M P - 9 を構築した。

プライマー 3 : 5 ' - T A T A C C G T C G A C C T C T A G C T A G A G C T T G G C - 3 '

プライマー 4 : 5 ' - G C T A T G G C A G G G C C T G C C G C C C C G A C G T T G - 3 '

p C M A - m M M P - 9 を鋳型として P C R を行い、C M V プロモーターの下流にマウス M M P - 9 (配列番号 2 9 (図 4 5)) の分泌シグナル (M e t 1 ~ A l a 1 9) 、H i s タグ、プロペプチド (A l a 2 0 ~ A r g 1 0 7) 、酵素活性ドメイン (P h e 1 0 8 ~ P r o 4 4 9) 、F L A G タグ (図 5 0 : 配列番号 3 4) 及び A v i タグ (図 5 1 : 配列番号 3 5) をコードするヌクレオチド配列を持つ、p C M A - p r o - m M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i を構築した。

【 0 1 9 2 】

(2 - 2 - 2) p r o - m M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i の調製

(2 - 1 - 3) と同様に、(2 - 2 - 1) で構築した p C M A - p r o - m M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i を用いて p r o - m M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i を精製した。

【 0 1 9 3 】

(2 - 2 - 3) a c t i v e m M M P - 9 (c a t) _ _ F L A G _ _ A v i の調製

(2 - 1 - 4) と同様に、(2 - 2 - 2) で取得した p r o - m M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i を活性化し、a c t i v e m M M P - 9 (c a t) _ _ F L A G _ _ A v i を精製した。

【 0 1 9 4 】

実施例 3 . 活性型 M M P - 9 結合ペプチドの M M P - 9 結合活性評価

ストレプトアビジンコート 9 6 - ウェルプレート (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) に (2 - 1 - 6) で取得したビオチン標識 p r o - h M M P - 9 (c a t) _ _ H i s 6 _ _ F L A G _ _ A v i 又は (2 - 1 - 7) で取得したビオチン標識 a c t

10

20

30

40

50

ive hMMP-9 (cat) __FLAG__ Avi を固相化した。3% BSA でブロッキングした後、 $1 \sim 1,000 \text{ nM}$ の結合ペプチドを添加し、室温で 1.5 時間反応させた。洗浄後、Goat anti-S-Tag HRP conjugated (BETHYL) を添加して、室温で 1 時間反応させた。洗浄後、ELISA POD 基質 A.B.T.S キット (ナカライテスク) の基質を添加して室温で反応させ、反応停止液を添加後、Enspire (PerkinElmer) で吸光度 405 nm を測定し、活性型 MMP-9 結合ペプチドの MMP-9 結合活性を評価した。GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software) を用いて 50% 効果濃度 (EC_{50}) を算出した結果、いずれの活性型 MMP-9 結合ペプチドも低濃度で活性型ヒト MMP-9 酵素活性ドメインに結合する一方、 $1 \mu\text{M}$ においても前駆型ヒト MMP-9 酵素活性ドメインには結合しないことが明らかとなった (図 2 及び 3)。対照的に、野生型 SPINK2 (WT) は活性型ヒト MMP-9 酵素活性ドメイン及び前駆型ヒト MMP-9 酵素活性ドメインに結合しなかった (図 2)。

10

【0195】

実施例 4. 活性型 MMP-9 結合ペプチドの MMP-9 阻害活性評価

(4-1) 基質ペプチドを用いた活性型 MMP-9 結合ペプチドのヒト MMP-9 阻害活性評価

基質ペプチド MOCAc-KPLGL-A₂pr(Dnp)-AR-NH₂ (配列番号 30 (図 46)) (ペプチド研究所; 3226-v) を 1 mM になるよう水で溶解し、Assay buffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.5) で希釈して終濃度 $2.5 \sim 10 \mu\text{M}$ で使用した。Assay buffer で希釈した active hMMP-9 (cat) __His6 と活性型 MMP-9 結合ペプチドをそれぞれ $50 \mu\text{l}$ ずつ混ぜ、 37°C で 1 時間反応させた後に Assay buffer で希釈した基質を $100 \mu\text{l}$ 加えて、Enspire (PerkinElmer) で蛍光シグナル (excitation 328 nm / emission 393 nm) を測定した。Active hMMP-9 (cat) __His6 は終濃度 0.4 nM 、活性型 MMP-9 結合ペプチドは終濃度 $0.5 \sim 25 \text{ nM}$ 、反応及び測定にはプロテオセーブ (商標) SS96F 黒プレート (住友ベークライト) を使用した。

20

【0196】

各濃度の活性型 MMP-9 結合ペプチドにおける基質ペプチド分解速度を算出し、阻害剤濃度 0 nM の分解速度を 100% として、各結合ペプチドのヒト MMP-9 阻害活性を評価した (図 4)。GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software) を用いて、Morrisson の式に従い阻害定数 K_i を算出した結果、いずれの活性型 MMP-9 結合ペプチドも低濃度で強力にヒト MMP-9 酵素活性を阻害することが明らかとなった (図 5)。

30

【0197】

(4-2) 基質ゼラチンを用いた活性型 MMP-9 結合ペプチドのヒト MMP-9 阻害活性評価

基質ゼラチン DQ gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate (Thermo Fisher Scientific) を 1 mg/ml になるよう水で溶解し、Assay buffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.5) で希釈して終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ で使用した。Assay buffer で希釈した active hMMP-9 (cat) __His6 と活性型 MMP-9 結合ペプチドをそれぞれ $50 \mu\text{l}$ ずつ混ぜ、 37°C で 1 時間反応させた後に Assay buffer で希釈した基質を $100 \mu\text{l}$ 加えて、Enspire (PerkinElmer) で蛍光シグナル (excitation 495 nm / emission 515 nm) を測定した。Active hMMP-9 (cat) __His6 は終濃度 0.6 nM 、活性型 MMP-9 結合ペプチドは終濃度 $0.002 \sim 100 \text{ nM}$ 、反応及び測定にはプロテオセーブ (商標) SS96F 黒プレート (住友ベークライト) を使用した。

40

50

【0198】

各濃度の活性型MMP-9結合ペプチドにおける基質ゼラチン分解速度を算出し、阻害剤濃度0nMの分解速度を100%として、各結合ペプチドのヒトMMP-9阻害活性を評価した(図6)。GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software)を用いて50%阻害濃度(IC₅₀)を算出した結果、ゼラチンを基質とした場合にも、(4-1)と同様、いずれの活性型MMP-9結合ペプチドも低濃度で強力にヒトMMP-9酵素活性を阻害することが明らかとなった(図7)。

【0199】

実施例5．基質ペプチドを用いた活性型MMP-9結合ペプチドのマウスMMP-9阻害活性評価

基質ペプチドMOCAc-KPLGL-A₂pr(Dnp)-AR-NH₂(配列番号30(図46))(ペプチド研究所; 3226-v)を1mMになるよう水で溶解し、Assay buffer(50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 2mM CaCl₂, pH7.5)で希釈して終濃度10μMで使用した。Assay bufferで希釈したactive mMMP-9(cat)_FLAG_Aviと活性型MMP-9結合ペプチドをそれぞれ50μlずつ混ぜ、37℃で1時間反応させた後にAssay bufferで希釈した基質を100μl加えて、Enspire(PerkinElmer)で蛍光シグナル(excitation 328nm/emission 393nm)を測定した。Active mMMP-9(cat)_FLAG_Aviは終濃度0.4nM、活性型MMP-9結合ペプチドは終濃度0.002~100nM、反応及び測定にはプロテオセーブ(商標)SS96F黒プレート(住友ベークライト)を使用した。

【0200】

各濃度の活性型MMP-9結合ペプチドにおける基質ペプチド分解速度を算出し、阻害剤濃度0nMの分解速度を100%として、各結合ペプチドのマウスMMP-9阻害活性を評価した(図8)。GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software)を用いて50%阻害濃度(IC₅₀)を算出した結果、いずれの活性型MMP-9結合ペプチドも低濃度で強力にマウスMMP-9酵素活性を阻害することが明らかとなった(図9)。

【0201】

実施例6．活性型MMP-9結合ペプチドの特異性評価

基質ペプチドの切断を指標に、他のMMP又はADAM17プロテアーゼに対する特異性を評価した。(3-1)に記載の方法と同様、Assay bufferで希釈したプロテアーゼとサンプル(終濃度1μM)をそれぞれ50μlずつ混ぜ、MMP-13及びMMP-17は37℃で10分、その他のプロテアーゼは37℃で60分反応させた後に、Assay bufferで希釈した基質を100μl加えて、Enspire(PerkinElmer)で蛍光シグナル(excitation 328nm/emission 393nm)を測定した。なお、MMP-17活性評価にはAssay buffer(50mM Tris-HCl, 10mM CaCl₂, pH7.5)、MMP-17以外のプロテアーゼ活性評価にはAssay buffer(50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 2mM CaCl₂, pH7.5)を用い、反応及び測定にはプロテオセーブ(商標)SS96F黒プレート(住友ベークライト)を使用した。特異性評価に用いたプロテアーゼ及び基質の組み合わせは以下の通り。

【0202】

Human MMP-1阻害活性評価; 終濃度5nM APMAで活性化したヒトMMP-1酵素活性ドメイン(自社調製)、終濃度10μM 基質ペプチドMOCAc-KPLGL-A₂pr(Dnp)-AR-NH₂(配列番号30:図46)(ペプチド研究所; 3226-v)

【0203】

Human MMP - 2 阻害活性評価；終濃度 1.4 nM MMP - 2, active, Human, Recombinant, CHO Cells (Merck; PF023)、終濃度 50 μM 基質ペプチド MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号 30：図 46) (ペプチド研究所；3226 - v)

【0204】

Human MMP - 3 阻害活性評価；終濃度 25 nM APMA で活性化したヒト MMP - 3 (自社調製)、終濃度 10 μM 基質ペプチド MOCAc - RPKPVE - Nva - WR - Lys (Dnp) - NH₂ (配列番号 33：図 49) (ペプチド研究所；3168 - v)

【0205】

Human MMP - 7 阻害活性評価；終濃度 1 nM MMP - 7 (catalytic domain) (human), (recombinant) (Enzo Life Sciences; BML - SE181)、終濃度 10 μM 基質ペプチド MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号 30：図 46) (ペプチド研究所；3226 - v)

【0206】

Human MMP - 8 阻害活性評価；終濃度 0.6 nM APMA で活性化したヒト MMP - 8 酵素活性ドメイン (自社調製)、終濃度 10 μM 基質ペプチド MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号 30：図 46) (ペプチド研究所；3226 - v)

【0207】

Human MMP - 10 阻害活性評価；終濃度 4 nM MMP - 10 (catalytic domain) (human), (recombinant) (Enzo Life Sciences; BML - SE329)、終濃度 10 μM 基質ペプチド MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号 30：図 46) (ペプチド研究所；3226 - v)

【0208】

Human MMP - 12 阻害活性評価；終濃度 4 nM MMP - 12 (catalytic domain) (human), (recombinant) (Enzo Life Sciences; BML - SE138)、終濃度 10 μM 基質ペプチド MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号 30：図 46) (ペプチド研究所；3226 - v)

【0209】

Human MMP - 13 阻害活性評価；終濃度 2 nM APMA で活性化したヒト MMP - 13 酵素活性ドメイン (自社調製)、終濃度 10 μM 基質ペプチド MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号 30：図 46) (ペプチド研究所；3226 - v)

【0210】

Human MMP - 14 阻害活性評価；終濃度 1 nM MMP14 Recombinant Protein (Thermo Fisher Scientific; RP - 77531)、終濃度 10 μM 基質ペプチド MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号 30：図 46) (ペプチド研究所；3226 - v)

【0211】

Human MMP - 15 阻害活性評価；終濃度 1 nM MT2 - MMP, Catalytic Domain, Human, Recombinant, E. coli (Merck; 475938)、終濃度 10 μM 基質ペプチド MOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号 30：図 46) (ペプチド研究所；3226 - v)

【0212】

Human MMP - 16 阻害活性評価；終濃度 3 nM Recombinant Human MMP - 16 / MT3 - MMP Protein, CF (R&D System

10

20

30

40

50

s ; 1785 - MP)、終濃度10 μM 基質ペプチドMOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号30 : 図46) (ペプチド研究所 ; 3226 - v)

【0213】

Human MMP - 17 阻害活性評価 ; 終濃度3 nM Recombinant Human MMP - 17 Protein, CF (R&D Systems ; 7796 - MP)、終濃度10 μM 基質ペプチドMOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号30 : 図46) (ペプチド研究所 ; 3226 - v)

【0214】

Human ADAM17 阻害活性評価 ; 終濃度3 nM ADAM17 (catalytic domain) (human), (recombinant) (His - tag) (Enzo Life Sciences ; BML - SE268)、終濃度10 μM 基質ペプチドMOCAc - KPLGL - A₂pr (Dnp) - AR - NH₂ (配列番号30 : 図46) (ペプチド研究所 ; 3226 - v)

【0215】

(4 - 1)と同様、基質ペプチドの分解を指標に、他のMMP又はADAM17プロテアーゼに対する特異性を評価した。阻害剤の終濃度1 μMにおいては、いずれのプロテアーゼに対しても各結合ペプチドはプロテアーゼ活性を阻害せず、活性型MMP - 9結合ペプチドはMMP - 9特異的な阻害作用を有することが示された(図10)。対照的に、非選択的阻害剤sc - 311438 (Santa Cruz Biotechnology)は終濃度1 μMにおいて全てのプロテアーゼを阻害した(図10)。

【0216】

実施例7 . 活性型MMP - 9結合ペプチド誘導体の調製

(7 - 1) 活性型MMP - 9結合ペプチド誘導体発現ベクターの構築

(7 - 1 - 1) 活性型MMP - 9結合ペプチド誘導体(C末誘導体)発現ベクターの構築

(1 - 1)で構築したベクターpET 32a(改変) __ 活性型MMP - 9結合ペプチドのうち、活性型MMP - 9結合ペプチドM91002が挿入されたベクターpET 32a(改変) __ M91002を鋳型としてPCRを行い、T7プロモーターの下流にTrxタグ、Hisタグ、Stag + リンカー2 (配列番号20 : 図34) 及びM91002 (配列番号3 : 図17) をコードするヌクレオチド配列を持つ、pET 32a(改変) __ M91002 __ G0を構築した。次に、構築したpET 32a(改変) __ M91002 __ G0を鋳型としてPCRを行い、T7プロモーターの下流にTrxタグ、Hisタグ、Stag + リンカー2 (配列番号20 : 図34)、M91002 (配列番号3 : 図17) 及びC末2マー (Gly - Gly : 図37) をコードするヌクレオチド配列を持つ、pET 32a(改変) __ M91002 __ G2を構築した。次に、構築したpET 32a(改変) __ M91002 __ G0を鋳型としてPCRを行い、T7プロモーターの下流にTrxタグ、Hisタグ、Stag + リンカー2 (配列番号20 : 図34)、M91002 (配列番号3 : 図17) 及びC末3マー (Gly - Gly - Gly : 図36) をコードするヌクレオチド配列を持つ、pET 32a(改変) __ M91002 __ G3を構築した。

【0217】

(7 - 1 - 2) 活性型MMP - 9結合ペプチド誘導体(Fcコンジュゲート)発現ベクターの構築

(2 - 1 - 1)で構築したベクターpCMA - hMMP - 9を制限酵素XbaI (NEB) 及びPmeI (NEB) で消化してヒトMMP - 9をコードするヌクレオチド配列を取り除いたDNA断片と、ヒトIgG1重鎖シグナル配列、Stag + リンカー1 (配列番号19 : 図33)、M91005 (配列番号5 : 図19)、C末6マー (配列番号21 : 図35)、G4Sリンカー (配列番号22 : 図38) 及びhuman IgG1 Fc (配列番号23 : 図39) をコードするヌクレオチド配列を含むDNA断片をIn - Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて結合して、pCMA - M91005 - Fc - 01を作製した。

【0218】

(7-1-3) 活性型 MMP-9 結合ペプチド誘導体 (N 末誘導体) 発現ベクターの構築
(7-1-2) で構築したベクター pCMA-M91005-Fc-01 を鋳型として PCR を行い、CMV プロモーターの下流に ヒト IgG1 重鎖シグナル配列、Stag+ リンカー 1 (配列番号 19: 図 33)、M91005__D1G (配列番号 13: 図 27)、C 末 6 マー (配列番号 21: 図 35)、G4S リンカー (配列番号 22: 図 38) 及び human IgG1 Fc (配列番号 23: 図 39) をコードするヌクレオチド配列を持つ、pCMA-M91005__D1G-Fc-01 を構築した。

【0219】

(7-2) 活性型 MMP-9 結合ペプチド誘導体の発現精製

10

(1-2) と同様に、(7-1-1) で構築したベクター pET 32a (改変)__M91002__G0、pET 32a (改変)__M91002__G2 又は pET 32a (改変)__M91002__G3 を用いて、活性型 MMP-9 結合ペプチド誘導体 (C 末誘導体) を調製した。得られたペプチド誘導体の N 末端には Stag+ リンカー 2 からなる部分 (配列番号 20: 図 34) がコンジュゲートされている。M91002__G2 の C 末端には C 末 2 マー (Gly-Gly: 図 37) が、M91002__G3 の C 末端には C 末 3 マー (Gly-Gly-Gly: 図 36) が、それぞれコンジュゲートされている。

【0220】

(7-1-2) で構築した pCMA-M91005-Fc-01 又は (7-1-3) で構築した pCMA-M91005__D1G-Fc-01 は Polyethylenimine Max (Polysciences) を用いて FreeStyle 293F (Thermo Fisher Scientific) に transfection し、6 日後に培養上清を回収した。MabSelect SuRe (GE Healthcare) により Fc コンジュゲート蛋白質を回収し、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200 Increase 10/300 GL) に供することで、活性型 MMP-9 結合ペプチド誘導体 (Fc コンジュゲート) 又は活性型 MMP-9 結合ペプチド誘導体 (N 末誘導体) を調製した。得られたペプチド誘導体の N 末端には Stag+ リンカー 1 からなる部分 (配列番号 19: 図 33) が、C 末端には C 末 6 マー (配列番号 21: 図 35)、G4S リンカー (配列番号 22: 図 38) 及び human IgG1 Fc (配列番号 23: 図 39) がコンジュゲートされている。

20

30

【0221】

実施例 8 . 活性型 MMP-9 結合ペプチド誘導体の MMP-9 阻害活性評価

(4-1) 記載の方法に準じて、active hMMP-9(cat)__His6 は終濃度 0.6 nM、活性型 MMP-9 結合ペプチドは終濃度 0.0015 ~ 100 nM で、各結合ペプチドのヒト MMP-9 阻害活性を評価した (図 11 (A)、12 (A) 及び 13 (A))。GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software) を用いて、50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した結果、M91002__G3、M91002__G2 及び M91002__G0 の阻害活性は M91002 と同等であり (図 11 (B))、結合ペプチドの C 末端に 1 乃至 6 個のアミノ酸が付加したことによる MMP-9 阻害活性への影響は無いことが示された。また、M91005-Fc-01 と M91005 の阻害活性は同等であり (図 12 (B))、Fc コンジュゲートによる MMP-9 阻害活性への影響は無いことが示された。また、M91005-Fc-01 と M91005__D1G-Fc-01 の阻害活性は同等であり (図 13 (B))、結合ペプチドの 1 番 Asp の Gly への置換による MMP-9 阻害活性への影響は無いことが示された。

40

【0222】

実施例 9 . 活性型 MMP-9 結合ペプチド誘導体 (Fc コンジュゲート) を用いた活性型 MMP-9 の検出

(7-2) で調製した M91005-Fc-01、(2-1) で調製した pro-hMMP-9(cat)__His6 及び active hMMP-9(cat)__His6 を

50

用いて、免疫沈降法により結合性を評価した。3 μ g の活性型 MMP - 9 結合ペプチド誘導体と 1.5 mg の Dynabeads (商標) Protein G for Immunoprecipitation (Thermo Fisher Scientific) を混合して室温で 30 分反応させた。洗浄後、0.39 μ g の前駆型ヒト MMP - 9 酵素活性ドメイン又は 0.63 μ g の活性型ヒト MMP - 9 酵素活性ドメインを添加して 4 で 1 時間反応させた。磁石でビーズを分離後、上清画分 (FT) を回収した。ビーズを洗浄後、SDS - PAGE 用サンプルバッファー (還元) を添加して 99 で 5 分反応させ、ビーズに結合したサンプルを沈殿画分 (Elu) として回収した。添加したヒト MMP - 9 酵素活性ドメイン (Inp)、FT 及び Elu を SDS - PAGE に供し、Bio

10

【0223】

M91005 - Fc - 01 を結合させたビーズを用いた場合、pro - hMMP - 9 (cat) __His6 は Elu のレーンに検出されず、active hMMP - 9 (cat) __His6 は Elu のレーンに検出された。対照的に、M91005 - Fc - 01 を結合させていないビーズを用いた場合、pro - hMMP - 9 (cat) __His6 及び active hMMP - 9 (cat) __His6 は Elu のレーンに検出されなかった (図 14 (A))。よって、活性型 MMP - 9 結合ペプチド誘導体 (Fc コンジュゲート) は前駆型ヒト MMP - 9 に結合せず、活性型ヒト MMP - 9 特異的に結合することが示された。

20

【0224】

同様に、(7 - 2) で調製した M91005 - Fc - 01、(2 - 2) で調製した pro - mMMP - 9 (cat) __His6 __FLAG __Avi 及び active mMMP - 9 (cat) __FLAG __Avi を用いて、免疫沈降法により結合性を評価した。評価用サンプルを SDS - PAGE に供し、Mouse MMP - 9 Antibody (R & D Systems; AF909) 及び Peroxidase AffiniPure F (ab')₂ Fragment Donkey Anti - Goat IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch; 705 - 036 - 147) を用いて検出することで結合性を評価した。

30

【0225】

M91005 - Fc - 01 を結合させたビーズを用いた場合、pro - mMMP - 9 (cat) __His6 __FLAG __Avi は Elu のレーンに検出されず、active mMMP - 9 (cat) __FLAG __Avi は Elu のレーンに検出された。対照的に、M91005 - Fc - 01 を結合させていないビーズを用いた場合、pro - mMMP - 9 (cat) __His6 __FLAG __Avi 及び active mMMP - 9 (cat) __FLAG __Avi は Elu のレーンに検出されなかった (図 14 (B))。よって、活性型 MMP - 9 結合ペプチド誘導体 (Fc コンジュゲート) は前駆型マウス MMP - 9 に結合せず、活性型マウス MMP - 9 特異的に結合することが示された。

40

【0226】

実施例 10 . 活性型 MMP - 9 結合ペプチドの特異性評価 (セリンプロテアーゼ)

基質ペプチドの切断を指標に、12 種のセリンプロテアーゼに対する特異性を評価した。Assay buffer (50 mM Tris - HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) で希釈したプロテアーゼとサンプル (終濃度 1 μ M) をそれぞれ 25 μ l ずつ混ぜ、37 で 20 分反応させた後に、Assay buffer で希釈した基質を 50 μ l 加えて、Enspire (PerkinElmer) で蛍光シグナル (excitation 380 nm / emission 460 nm) を測定した。反応及び測定にはプロテオセーブ (商標) SS96F 黒プレート (住友ベークライト) を使用した。特異性

50

評価に用いたプロテアーゼ及び基質の組み合わせは以下の通り。

- 【0227】
Human Trypsin 阻害活性評価；終濃度 1 nM Trypsin From Human Pancreas (Sigma - Aldrich ; T6264)、終濃度 10 μ M 基質ペプチド Boc - FSR - MCA (図55) (ペプチド研究所；3107 - v)
- 【0228】
Human Chymotrypsin 阻害活性評価；終濃度 10 nM α - Chymotrypsin from human pancreas (Sigma - Aldrich ; C8946)、終濃度 10 μ M 基質ペプチド Suc - LLVY - MCA (配列番号 36：図56) (ペプチド研究所；3120 - v) 10
- 【0229】
Human Tryptase 阻害活性評価；終濃度 1 nM Tryptase from human lung (Sigma - Aldrich ; T7063)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc - FSR - MCA (図55) (ペプチド研究所；3107 - v)
- 【0230】
Human Chymase 阻害活性評価；終濃度 100 nM Chymase human recombinant, expressed in Pichia pastoris (Sigma - Aldrich ; C8118)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Suc - AAPF - MCA (配列番号 37：図57) (ペプチド研究所；3114 - v) 20
- 【0231】
Human Plasmin 阻害活性評価；終濃度 50 nM Plasmin from human plasma (Sigma - Aldrich ; P1867)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc - VLK - MCA (図58) (ペプチド研究所；3104 - v)
- 【0232】
Human Thrombin 阻害活性評価；終濃度 1 nM Thrombin from human plasma (Sigma - Aldrich ; T1063)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc - VPR - AMC (図59) (RD - systems ; ES011) 30
- 【0233】
Human Elastase 阻害活性評価；終濃度 0.01 U/ml Neutrophil elastase (human) (Enzo Life Sciences ; BML - SE284)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Suc (OMe) - Ala - Ala - Pro - Val - MCA (配列番号 38：図60) (ペプチド研究所；3153 - v)
- 【0234】
Human Matryptase 阻害活性評価；終濃度 1 nM Recombinant Human Matryptase / ST14 Catalytic Domain (RD - systems ; 3946 - SE)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc - QAR - AMC (図61) (RD - systems ; ES014) 40
- 【0235】
Human Protein C 阻害活性評価；終濃度 100 nM Protein C from human plasma (Sigma - Aldrich ; P2562)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc - LSTR - MCA (配列番号 39：図62) (ペプチド研究所；3112 - v)
- 【0236】
Human tPA 阻害活性評価；終濃度 10 nM Tissue plasminog 50

en activator human (Sigma - Aldrich ; T 0 8 3 1)、
終濃度 1 0 0 μ M 基質ペプチド Pyr - GR - MCA (図 6 3) (ペプチド研究所 ; 3
1 4 5 - v)

【 0 2 3 7 】

Human uPA 阻害活性評価 ; 終濃度 2 nM Urokinase from hu
man urine (Sigma - Aldrich ; U 0 6 3 3)、終濃度 1 0 0 μ M
基質ペプチド Pyr - GR - MCA (図 6 3) (ペプチド研究所 ; 3 1 4 5 - v)

【 0 2 3 8 】

Human Plasma Kallikrein 阻害活性評価 ; 終濃度 0 . 1 2 5 μ g
/ ml Recombinant Human Plasma Kallikrein /
KLKB1 Protein (RD - systems ; 2 4 9 7 - SE)、終濃度 1 0 0
μ M 基質ペプチド Z - FR - MCA (図 6 4) (ペプチド研究所 ; 3 0 9 5 - v)

【 0 2 3 9 】

(4 - 1) と同様、基質ペプチドの分解を指標に、セリンプロテアーゼに対する特異性
を評価した。阻害剤の終濃度 1 μ M においては、いずれのプロテアーゼに対しても各結合
ペプチドはプロテアーゼ活性を阻害せず、活性型 MMP - 9 結合ペプチドは MMP - 9 特
異的な阻害作用を有することが示された (図 5 2)。対照的に、非選択的阻害剤 Prot
ease Inhibitor Cocktail (Sigma - Aldrich ; 1 1
8 3 6 1 7 0 0 0 1) は終濃度 1 μ M において全てのプロテアーゼを阻害した (図 5 2)

。

【 0 2 4 0 】

実施例 1 1 . ヒト MMP - 9 酵素活性ドメイン E 4 0 2 Q 変異体の調製

(1 1 - 1) pCMA - pro - hMMP - 9 (cat) __ E 4 0 2 Q __ His 6 の構築
(2 - 1 - 1) で構築した pCMA - pro - hMMP - 9 (cat) __ His 6 を鋳
型として PCR を行い、CMV プロモーターの下流にヒト MMP - 9 (配列番号 2 8 (図
4 4)) の分泌シグナル (Met 1 ~ Ala 1 9)、プロペプチド (Ala 2 0 ~ Arg
1 0 6)、酵素活性ドメイン E 4 0 2 Q 変異体 (Phe 1 0 7 ~ Pro 4 4 9、E 4 0 2
Q) 及び His タグをコードするヌクレオチド配列を持つ、pCMA - pro - hMMP
- 9 (cat) __ E 4 0 2 Q __ His 6 を構築した。

(1 1 - 2) pro - hMMP - 9 (cat) __ E 4 0 2 Q __ His 6 の調製

(1 1 - 1) で構築した pCMA - pro - hMMP - 9 (cat) __ E 4 0 2 Q __ H
is 6 は Polyethylenimine Max (Polysciences) を用
いて FreeStyle 2 9 3 F (Thermo Fisher Scientific) に transfection し、6 日後に培養上清を回収した。His Trap e
xcel (GE Healthcare) により His タグ融合蛋白質を回収し、緩衝液
を PBS に置換して pro - hMMP - 9 (cat) __ E 4 0 2 Q __ His 6 を精製した

。

(1 1 - 3) hMMP - 9 (cat) __ E 4 0 2 Q __ His 6 の調製

(1 1 - 2) で取得した pro - hMMP - 9 (cat) __ E 4 0 2 Q __ His 6 と、
APMA で活性化した hMMP - 3 を混合し、3 7 で 4 時間反応させた。反応液を低温
下で PBS に置換し、hMMP - 9 (cat) __ E 4 0 2 Q __ His 6 を精製した。

【 0 2 4 1 】

実施例 1 2 . 活性型 MMP - 9 結合ペプチドとヒト MMP - 9 活性中心 Glu 4 0 2 残基
との相互作用解析

(1 - 2) で調製した M 9 1 0 0 5 及び M 9 1 0 1 1、(2 - 1 - 4) で調製した a c
tive hMMP - 9 (cat) __ His 6、(1 1 - 3) で調製した hMMP - 9 (c
at) __ E 4 0 2 Q __ His 6 を用いて、サイズ排除クロマトグラフィーにより結合性を
評価した。2 5 μ M の active hMMP - 9 (cat) __ His 6 又は hMMP - 9
(cat) __ E 4 0 2 Q __ His 6 と、7 5 μ M の活性型 MMP - 9 結合ペプチド又は h
TIMP - 1 (自社調製) を混合して 4 で 1 時間反応させた。反応後、1 0 μ l の反応

10

20

30

40

50

液をサイズ排除クロマトグラフィーで分析した。

クロマトグラフィー条件は以下の通り。

【0242】

カラム：ACQUITY UPLC BEH200 column (Waters; 186005225)

移動相：PBS

検出：吸光度 (280nm)

【0243】

Active hMMP-9(cat)_His6のみを分析した場合、active hMMP-9(cat)_His6のピークは保持時間7.0分に検出された(図53(A))。Active hMMP-9(cat)_His6とhTIMP-1又は活性型MMP-9結合ペプチドM91005、M91011を混合した反応液を分析した場合、active hMMP-9(cat)_His6のピークの保持時間は高分子量側にシフトした(図53(A))。よって、hTIMP-1及び活性型MMP-9結合ペプチドM91005、M91011は活性型ヒトMMP-9酵素活性ドメインに結合することが示された。Human MMP-9(cat)_E402Q_His6のみを分析した場合、hMMP-9(cat)_E402Q_His6のピークは保持時間7.1分に検出された(図53(B))。Human MMP-9(cat)_E402Q_His6とhTIMP-1を混合した反応液を分析した場合、hMMP-9(cat)_E402Q_His6のピークの保持時間は高分子量側にシフトした(図53(B))。よって、hTIMP-1はヒトMMP-9酵素活性ドメインE402Q変異体に結合することが示された。対照的に、hMMP-9(cat)_E402Q_His6と活性型MMP-9結合ペプチドM91005又はM91011を混合した反応液を分析した場合、hMMP-9(cat)_E402Q_His6のピークの保持時間は変化しなかった(図53(B))。なお、hTIMP-1又は活性型MMP-9結合ペプチドM91005、M91011のみを分析した場合、hTIMP-1のピークは保持時間7.3分に検出され、活性型MMP-9結合ペプチドM91005のピークは保持時間8.2分に検出され、活性型MMP-9結合ペプチドM91011のピークは保持時間8.1分に検出された(図53(C))。

【0244】

よって、活性型MMP-9結合ペプチドM91005及びM91011はヒトMMP-9酵素活性ドメインE402Q変異体に結合しないことが示された。以上のことから、活性型MMP-9結合ペプチドM91005及びM91011はヒトMMP-9の活性中心であるGlu402残基を認識して結合することが示された。

【0245】

実施例13. 活性型ヒトMMP-9酵素活性ドメイン変異体の調製

【0246】

(13-1) pCMA-pro-His6_EK-hMMP-9(cat)の構築

(2-1-1)で構築したpCMA-pro-hMMP-9(cat)_His6を鋳型としてPCRを行い、CMVプロモーターの下流にヒトMMP-9(配列番号28(図44))の分泌シグナル(Met1~Ala19)、Hisタグ、プロペプチド(Ala20~Arg106)、エンテロキナーゼ認識配列(図65:配列番号40)、酵素活性ドメイン(Phe107~Pro449)をコードするヌクレオチド配列を持つ、pCMA-pro-His6_EK-hMMP-9(cat)を構築した。

【0247】

(13-2) pCMA-pro-His6_EK-hMMP-9(cat)_XnnnYの構築

(13-1)で構築したpCMA-pro-His6_EK-hMMP-9(cat)を鋳型としてPCRを行い、CMVプロモーターの下流にヒトMMP-9(配列番号28(図44))の分泌シグナル(Met1~Ala19)、Hisタグ、プロペプチド(A

la20~Arg106)、エンテロキナーゼ認識配列(図65:配列番号40))、酵素活性ドメイン(Phe107~Pro449)の変異体(Q108N、T109F、F110A、E111P、G112R、D113K、L114P、Y179A、P180A、D185A、G186A、L187A、F192A、P193A、P196T、I198V、Q199G、Y393A、L397A、V398A、D410E、S413Q、L418A、Y420A、P421A、M422I、Y423A又はR424T)をコードするヌクレオチド配列を持つ、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__Q108N、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__T109F、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__F110A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__E111P、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__G112R、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__D113K、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__L114P、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__Y179A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__P180A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__D185A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__G186A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__L187A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__F192A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__P193A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__P196T、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__I198V、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__Q199G、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__Y393A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__L397A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__V398A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__D410E、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__S413Q、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__L418A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__Y420A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__P421A、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__M422I、pCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__Y423A及びpCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__R424Tを構築した。

【0248】

(13-3) pro-His6__EK-hMMP-9(cat)の調製

(13-1)で構築したpCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)はPolyethylenimine Max(Poly sciences)を用いてFreeStyle 293F(Thermo Fisher Scientific)にtransfectionし、6日後に培養上清を回収した。HisTrap excel(GE Healthcare)とgelatin-Sepharose resin(GE Healthcare)によりHisタグ融合蛋白質を回収し、緩衝液をPBSに置換してpro-His6__EK-hMMP-9(cat)を精製した。

【0249】

(13-4) Active hMMP-9(cat)の調製

(13-3)で取得したpro-His6__EK-hMMP-9(cat)と、EKMax Enterokinase(Thermo Fisher Scientific)を混合し、4で2時間反応させた。EKapture Agarose(EMD Millipore)により反応液からエンテロキナーゼを除去した後、緩衝液を低温下でPBSに置換してactive hMMP-9(cat)を精製した。

【0250】

(13-5) pro-His6__EK-hMMP-9(cat)__XnnnYの調製

(13-2)で構築したpCMA-pro-His6__EK-hMMP-9(cat)

__XnnnnYはPolyethylenimine Max (Polysciences)を用いてFreeStyle 293F (Thermo Fisher Scientific)にtransfectionし、6日後に培養上清を回収した。HisTrap excel (GE Healthcare)とgelatin-Sepharose resin (GE Healthcare)によりHisタグ融合蛋白質を回収し、緩衝液をPBSに置換してpro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__Q108N、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__T109F、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__F110A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__E111P、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__G112R、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__D113K、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__L114P、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__Y179A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__P180A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__D185A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__G186A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__L187A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__F192A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__P193A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__P196T、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__I198V、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__Q199G、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__Y393A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__L397A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__V398A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__D410E、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__S413Q、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__L418A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__Y420A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__P421A、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__M422I、pro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__Y423A及びpro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__R424Tを精製した。

(13-6) Active hMMP-9 (cat)__XnnnnYの調製

(13-5)で取得したpro-His6__EK-hMMP-9 (cat)__XnnnnYと、EKMax Enterokinase (Thermo Fisher Scientific)を混合し、4 で2時間反応させた。EKapture Agarose (EMD Millipore)により反応液からエンテロキナーゼを除去した後、緩衝液を低温下でPBSに置換してactive hMMP-9 (cat)__Q108N、active hMMP-9 (cat)__T109F、active hMMP-9 (cat)__F110A、active hMMP-9 (cat)__E111P、active hMMP-9 (cat)__G112R、active hMMP-9 (cat)__D113K、active hMMP-9 (cat)__L114P、active hMMP-9 (cat)__Y179A、active hMMP-9 (cat)__P180A、active hMMP-9 (cat)__D185A、active hMMP-9 (cat)__G186A、active hMMP-9 (cat)__L187A、active hMMP-9 (cat)__F192A、active hMMP-9 (cat)__P193A、active hMMP-9 (cat)__P196T、active hMMP-9 (cat)__I198V、active hMMP-9 (cat)__Q199G、active hMMP-9 (cat)__Y393A、active hMMP-9 (cat)__L397A、active hMMP-9 (cat)__V398A、active hMMP-9 (cat)__D410E、active hMMP-9 (cat)__S413Q、active hMMP-9 (cat)__L418A、active hMMP-9 (cat)__Y420A、active hMMP-9 (cat)__P421A、active hMMP-9 (cat)__M422I、active hMMP-9 (cat)__Y423A及びactive hMMP-9 (cat)__R424Tを精製し

た。

【0251】

実施例14．活性型MMP-9結合ペプチドと活性型ヒトMMP-9酵素活性ドメイン変異体との相互作用解析

【0252】

(1-2)で調製したM91005及びM91011、(13-4)で調製したactive hMMP-9(cat)及び(13-6)で調製したactive hMMP-9(cat)―XnnnYを用いて、ヒトMMP-9阻害活性を評価した。

【0253】

基質ペプチドMOCAc-KPLGL-A₂pr(Dnp)-AR-NH₂(配列番号30(図46))(ペプチド研究所;3226-v)を1mMになるよう水で溶解し、Assay buffer(50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 2mM CaCl₂, pH7.5)で希釈して終濃度10μMで使用した。Assay bufferで希釈したactive hMMP-9(cat)又はactive hMMP-9(cat)―XnnnYと活性型MMP-9結合ペプチド又はsc-311438(Santa Cruz Biotechnology)をそれぞれ50μlずつ混ぜ、37で1時間反応させた後にAssay bufferで希釈した基質を100μl加えて、Enspire(PerkinElmer)で蛍光シグナル(excitation 328nm/emission 393nm)を測定した。Active hMMP-9(cat)及びactive hMMP-9(cat)―XnnnYは終濃度1nM、活性型MMP-9結合ペプチド及びsc-311438は終濃度0.5~330nM、反応及び測定にはプロテオセーブ(商標)SS96F黒プレート(住友ベークライト)を使用した。

【0254】

各濃度の活性型MMP-9結合ペプチドにおける基質ペプチド分解速度を算出し、阻害剤濃度0nMの分解速度を100%として、GraphPad Prism(version 5.0; GraphPad Software)を用いて各結合ペプチドの50%阻害濃度(IC₅₀)を算出した(図54(A)及び図54(B))。野生型であるactive hMMP-9(cat)を用いた場合、非選択的阻害剤sc-311438のIC₅₀は28±7nM、活性型MMP-9結合ペプチドM91005のIC₅₀は17±7nM、活性型MMP-9結合ペプチドM91011のIC₅₀は17±5nMであった。Active hMMP-9(cat)―XnnnYを用いた場合、非選択的阻害剤sc-311438のIC₅₀は野生型を用いた場合に比べて2倍未満であり、顕著な違いは見られなかった。非選択的阻害剤sc-311438は活性中心の亜鉛イオンを認識して結合するため、活性中心以外の残基の置換による影響はほとんど無いと考えられる。対照的に、活性型MMP-9結合ペプチドM91005のIC₅₀は、active hMMP-9(cat)―F110A、active hMMP-9(cat)―Y179A、active hMMP-9(cat)―L187A、active hMMP-9(cat)―F192A、active hMMP-9(cat)―Q199G、active hMMP-9(cat)―Y393A、active hMMP-9(cat)―L397A、active hMMP-9(cat)―V398A、active hMMP-9(cat)―Y420A、active hMMP-9(cat)―M422I及びactive hMMP-9(cat)―Y423Aを用いた場合、野生型を用いた場合に比べて4.0倍、3.2倍、6.7倍、>57.8倍、2.3倍、2.7倍、2.2倍、2.2倍、3.1倍、2.6倍及び13.2倍増加した。よって、活性型MMP-9結合ペプチドM91005はヒトMMP-9のPhe110、Tyr179、Leu187、Phe192、Gln199、Tyr393、Leu397、Val398、Tyr420、Met422及びTyr423を認識して活性型ヒトMMP-9に結合することが示唆された。同様に、活性型MMP-9結合ペプチドM91011のIC₅₀は、active hMMP-9(cat)―Y179A、active hMMP-9

10

20

30

40

50

(cat) __D185A、active hMMP-9(cat) __F192A、active hMMP-9(cat) __P193A、active hMMP-9(cat) __Y393A、active hMMP-9(cat) __L397A、active hMMP-9(cat) __V398A、active hMMP-9(cat) __M422I、active hMMP-9(cat) __Y423A及びactive hMMP-9(cat) __R424Tを用いた場合、野生型を用いた場合に比べて4.9倍、19.0倍、5.0倍、6.5倍、>57.6倍、3.5倍、4.8倍、2.6倍、>20.0倍及び2.7倍増加した。よって、活性型MMP-9結合ペプチドM91011はヒトMMP-9のTyr179、Asp185、Phe192、Phe193、Tyr393、Leu397、Val398、Met422、Tyr423及びArg424を認識して活性型ヒトMMP-9に結合することが示唆された。

10

【産業上の利用可能性】

【0255】

本発明の提供するペプチド、並びに、それを含む医薬組成物及び診断用組成物は、MMP-9に関わる疾患の治療、予防、検査又は診断等に有用である。

【配列表フリーテキスト】

【0256】

配列番号1：ヒトSPINK2のアミノ酸配列(図15)

配列番号2：活性型MMP-9結合ペプチドM91001のアミノ酸配列(図16)

配列番号3：活性型MMP-9結合ペプチドM91002のアミノ酸配列(図17)

配列番号4：活性型MMP-9結合ペプチドM91004のアミノ酸配列(図18)

配列番号5：活性型MMP-9結合ペプチドM91005のアミノ酸配列(図19)

配列番号6：活性型MMP-9結合ペプチドM91010のアミノ酸配列(図20)

配列番号7：活性型MMP-9結合ペプチドM91011のアミノ酸配列(図21)

配列番号8：活性型MMP-9結合ペプチドM91012のアミノ酸配列(図22)

配列番号9：活性型MMP-9結合ペプチドM91014のアミノ酸配列(図23)

配列番号10：活性型MMP-9結合ペプチドM91001 __D1Gのアミノ酸配列(図24)

配列番号11：活性型MMP-9結合ペプチドM91002 __D1Gのアミノ酸配列(図25)

配列番号12：活性型MMP-9結合ペプチドM91004 __D1Gのアミノ酸配列(図26)

配列番号13：活性型MMP-9結合ペプチドM91005 __D1Gのアミノ酸配列(図27)

配列番号14：活性型MMP-9結合ペプチドM91010 __D1Gのアミノ酸配列(図28)

配列番号15：活性型MMP-9結合ペプチドM91011 __D1Gのアミノ酸配列(図29)

配列番号16：活性型MMP-9結合ペプチドM91012 __D1Gのアミノ酸配列(図30)

配列番号17：活性型MMP-9結合ペプチドM91014 __D1Gのアミノ酸配列(図31)

配列番号18：活性型MMP-9結合ペプチドの一般式(図32)

配列番号19：Stag+リンカー1のアミノ酸配列(図33)

配列番号20：Stag+リンカー2のアミノ酸配列(図34)

配列番号21：C末6マーのアミノ酸配列(図35)

配列番号22：G4Sリンカーのアミノ酸配列(図38)

配列番号23：ヒトIgG1 Fcのアミノ酸配列(図39)

配列番号24：プライマー1のヌクレオチド配列(図40)

配列番号25：プライマー2のヌクレオチド配列(図41)

20

30

40

50

- 配列番号 26 : プライマー 3 のヌクレオチド配列 (図 4 2)
 配列番号 27 : プライマー 4 のヌクレオチド配列 (図 4 3)
 配列番号 28 : ヒト MMP - 9 のアミノ酸配列 (図 4 4)
 配列番号 29 : マウス MMP - 9 のアミノ酸配列 (図 4 5)
 配列番号 30 : M O C A c - K P L G L - A₂ p r (D n p) - A R - N H₂ のアミノ酸配列 (図 4 6)
 配列番号 31 : M O C A c - P L G L - A₂ p r (D n p) - A R - N H₂ のアミノ酸配列 (図 4 7)
 配列番号 32 : (図 4 8) D N P - P L G M W S R のアミノ酸配列
 配列番号 33 : M O C A c - R P K P V E - N v a - W R - L y s (D n p) - N H₂ のアミノ酸配列 (図 4 9)
 配列番号 34 : F L A G タグのアミノ酸配列 (図 5 0)
 配列番号 35 : A v i タグのアミノ酸配列 (図 5 1)
 配列番号 36 : S u c - L L V Y - M C A のアミノ酸配列 (図 5 6)
 配列番号 37 : S u c - A A P F - M C A のアミノ酸配列 (図 5 7)
 配列番号 38 : S u c (O M e) - A l a - A l a - P r o - V a l - M C A のアミノ酸配列 (図 6 0)
 配列番号 39 : B o c - L S T R - M C A のアミノ酸配列 (図 6 2)
 配列番号 40 : エンテロキナーゼ認識配列のアミノ酸配列 (図 6 5)

10

【図 1 (A)】

HUMAN MMP-9 P14780	1	MSWQPLALVLTGSCCCAPQRCQ	49
CYNO MMP-9 XP 005569271	1	MSWQPLALVLTGSCCCAPQRCQ	49
RAT MMP-9 P50282	1	MSWQPLALVLTGSCCCAPQRCQ	49
MOUSE MMP-9 P41245	1	MSWQPLALVLTGSCCCAPQRCQ	50
HUMAN MMP-9 P14780	50	IRYGYTRALVLTGSCCCAPQRCQ	99
CYNO MMP-9 XP 005569271	50	IRYGYTRALVLTGSCCCAPQRCQ	99
RAT MMP-9 P50282	51	IRYGYTRALVLTGSCCCAPQRCQ	100
MOUSE MMP-9 P41245	51	IRYGYTRALVLTGSCCCAPQRCQ	100
HUMAN MMP-9 P14780	100	GVPELEKQFECGLKHHNITWICQ	149
CYNO MMP-9 XP 005569271	100	GVPELEKQFECGLKHHNITWICQ	149
RAT MMP-9 P50282	101	GVPELEKQFECGLKHHNITWICQ	150
MOUSE MMP-9 P41245	101	GVPELEKQFECGLKHHNITWICQ	150
HUMAN MMP-9 P14780	150	AMPELTFVRYSRADIVIOFGVAEHGDCYPFGKGLLAHAFPG	199
CYNO MMP-9 XP 005569271	150	AMPELTFVRYSRADIVIOFGVAEHGDCYPFGKGLLAHAFPG	199
RAT MMP-9 P50282	151	AMPELTFVRYSRADIVIOFGVAEHGDCYPFGKGLLAHAFPG	200
MOUSE MMP-9 P41245	150	AMPELTFVRYSRADIVIOFGVAEHGDCYPFGKGLLAHAFPG	199
HUMAN MMP-9 P14780	200	GDHFDDDELSLGGKGVPTFCNAGAPCHFFPEGRSYSACTTGR	249
CYNO MMP-9 XP 005569271	200	GDHFDDDELSLGGKGVPTFCNAGAPCHFFPEGRSYSACTTGR	249
RAT MMP-9 P50282	201	GDHFDDDELSLGGKGVPTFCNAGAPCHFFPEGRSYSACTTGR	250
MOUSE MMP-9 P41245	200	GDHFDDDELSLGGKGVPTFCNAGAPCHFFPEGRSYSACTTGR	249

【図 1 (B)】

HUMAN MMP-9 P14780	250	SQCFKPCSTTAYDQKREGKCPSELYTDENALGKCEPFTLS	299
CYNO MMP-9 XP 005569271	250	SQCFKPCSTTAYDQKREGKCPSELYTDENALGKCEPFTLS	299
RAT MMP-9 P50282	251	NDGKPCSTTAYDQKREGKCPSELYTDENALGKCEPFTLS	300
MOUSE MMP-9 P41245	250	NDGKPCSTTAYDQKREGKCPSELYTDENALGKCEPFTLS	299
HUMAN MMP-9 P14780	300	SACTTGRSDGYRWCATTANYDQKIFGCFPTASTVFGNSAGECYE	349
CYNO MMP-9 XP 005569271	300	SACTTGRSDGYRWCATTANYDQKIFGCFPTASTVFGNSAGECYE	349
RAT MMP-9 P50282	301	SACTTGRSDGYRWCATTANYDQKIFGCFPTASTVFGNSAGECYE	350
MOUSE MMP-9 P41245	300	SACTTGRSDGYRWCATTANYDQKIFGCFPTASTVFGNSAGECYE	349
HUMAN MMP-9 P14780	350	PEFLGKYSCTSGRSGRLWCATTNFDQKKGWCPDQYSFLFA	399
CYNO MMP-9 XP 005569271	350	PEFLGKYSCTSGRSGRLWCATTNFDQKKGWCPDQYSFLFA	399
RAT MMP-9 P50282	351	PEFLGKYSCTSGRSGRLWCATTNFDQKKGWCPDQYSFLFA	400
MOUSE MMP-9 P41245	350	PEFLGKYSCTSGRSGRLWCATTNFDQKKGWCPDQYSFLFA	399
HUMAN MMP-9 P14780	400	AHERGHALGLDHSVPEALMYPRTPEPTHHODVNGIYGRPE	449
CYNO MMP-9 XP 005569271	400	AHERGHALGLDHSVPEALMYPRTPEPTHHODVNGIYGRPE	449
RAT MMP-9 P50282	401	AHERGHALGLDHSVPEALMYPRTPEPTHHODVNGIYGRPE	450
MOUSE MMP-9 P41245	400	AHERGHALGLDHSVPEALMYPRTPEPTHHODVNGIYGRPE	449
HUMAN MMP-9 P14780	450	ERRPPTTTPORTAPPTTTPVHRSSEETGTSAGPTG--	495
CYNO MMP-9 XP 005569271	450	ERRPPTTTPORTAPPTTTPVHRSSEETGTSAGPTG--	495
RAT MMP-9 P50282	451	ERRPPTTTPORTAPPTTTPVHRSSEETGTSAGPTG--	498
MOUSE MMP-9 P41245	450	ERRPPTTTPORTAPPTTTPVHRSSEETGTSAGPTG--	495

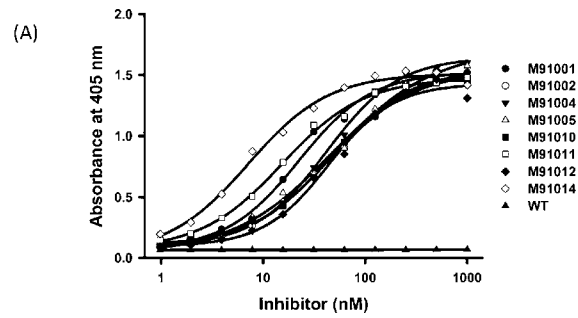
【 図 1 (C) 】

HUMAN MMP-9_P14780	496	-----PPTAGSSTTTTTFEPEMDKNNNIEDALAEENCL	531
CYNO MMP-9_XP_005569271	496	-----PPTAGSSTTTTTFEPEMDKNNNIEDALAEENCL	531
RAT MMP-9_P50282	499	-----PPTAGSSTTTTTFEPEMDKNNNIEDALAEENCL	534
MOUSE MMP-9_P41245	500	SPGPTGAFSPGPTAPPTAGSSTTTTFEPEMDKNNNIEDALAEENCL	549
HUMAN MMP-9_P14780	532	YIFKQGLWSESESRPGGFTLADKWPALPKLLSFEERLSKLEFF	581
CYNO MMP-9_XP_005569271	532	YIFKQGLWSESESRPGGFTLADKWPALPKLLSFEERLSKLEFF	581
RAT MMP-9_P50282	535	HFEKQGLWSESESRPGGFTLADKWPALPKLLSFEERLSKLEFF	584
MOUSE MMP-9_P41245	550	HFEKQGLWSESESRPGGFTLADKWPALPKLLSFEERLSKLEFF	599
HUMAN MMP-9_P14780	582	ESGRQWVYTGASVIGRRRLDKLIGLGLVQVTEELASGRKMLLSGR	631
CYNO MMP-9_XP_005569271	582	ESGRQWVYTGASVIGRRRLDKLIGLGLVQVTEELASGRKMLLSGR	631
RAT MMP-9_P50282	585	ELWQWVYTGASVIGRRRLDKLIGLGLVQVTEELASGRKMLLSGR	634
MOUSE MMP-9_P41245	600	ESGRQWVYTGASVIGRRRLDKLIGLGLVQVTEELASGRKMLLSGR	649
HUMAN MMP-9_P14780	632	IMFEDKQVDESRSEMDRFPVSLDTHDVOYDEKAYFCDDKFWR	681
CYNO MMP-9_XP_005569271	632	IMFEDKQVDESRSEMDRFPVSLDTHDVOYDEKAYFCDDKFWR	681
RAT MMP-9_P50282	635	IMFEDKQVDESRSEMDRFPVSLDTHDVOYDEKAYFCDDKFWR	684
MOUSE MMP-9_P41245	650	VAREKSEVDESRSEMDRFPVSLDTHDVOYDEKAYFCDDKFWR	699
HUMAN MMP-9_P14780	682	VSRSEIN-----QVDVGVTVYDHLQCPED	707
CYNO MMP-9_XP_005569271	682	VSRSEIN-----QVDVGVTVYDHLQCPED	707
RAT MMP-9_P50282	685	VSFHNRN-----QVDVGVTVYDHLQCPED	708
MOUSE MMP-9_P41245	700	VSFQNEAKVDHEVQVDVGVTVYDHLQCPED	730

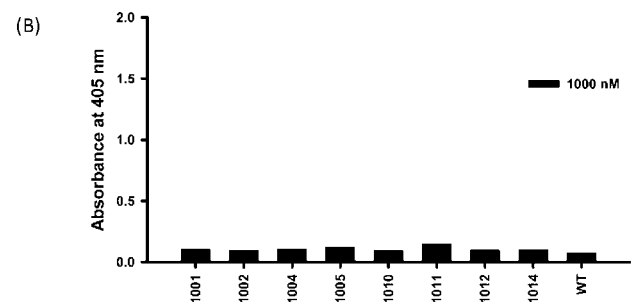
【 図 3 】

Clone	EC ₅₀ (nM)
M91001	22
M91002	47
M91004	42
M91005	46
M91010	48
M91011	16
M91012	46
M91014	8.0

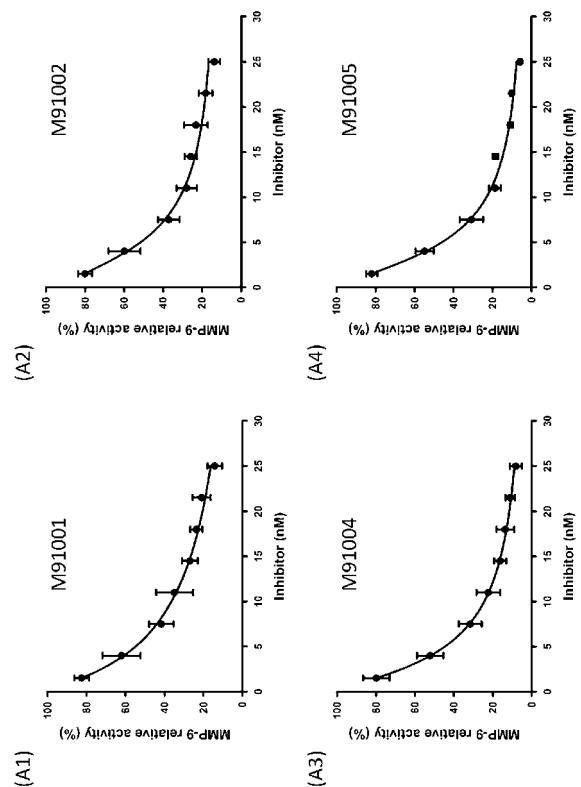
【 図 2 (A) 】



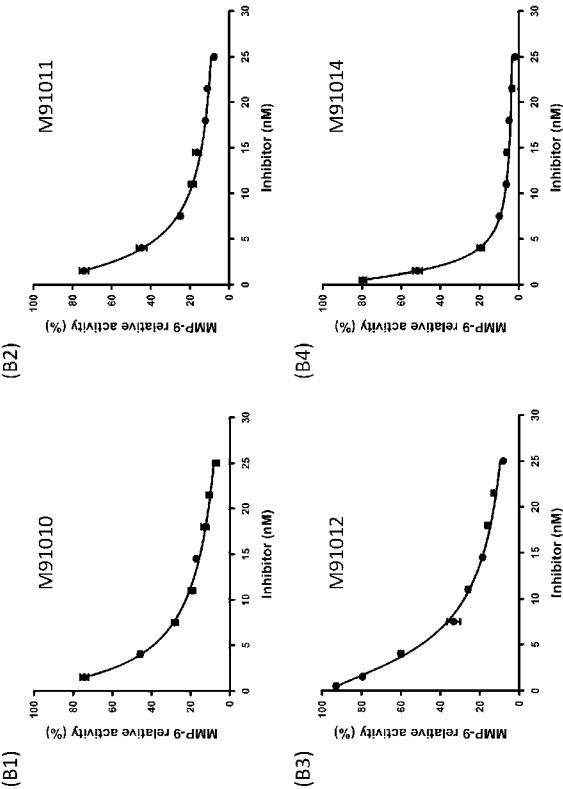
【 図 2 (B) 】



【 図 4 (A) 】



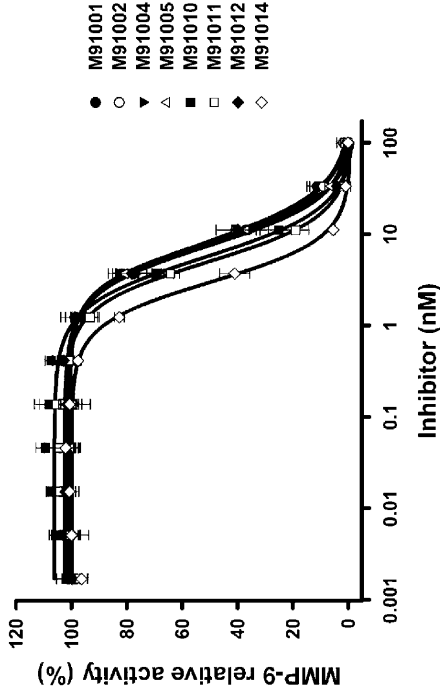
【 図 4 (B) 】



【 図 5 】

Clone	K_i (nM)
M91001	2.6±0.7
M91002	2.3±0.6
M91004	1.2±0.2
M91005	1.4±0.2
M91010	1.2±0.5
M91011	1.6±0.1
M91012	2.1±0.1
M91014	0.45±0.11

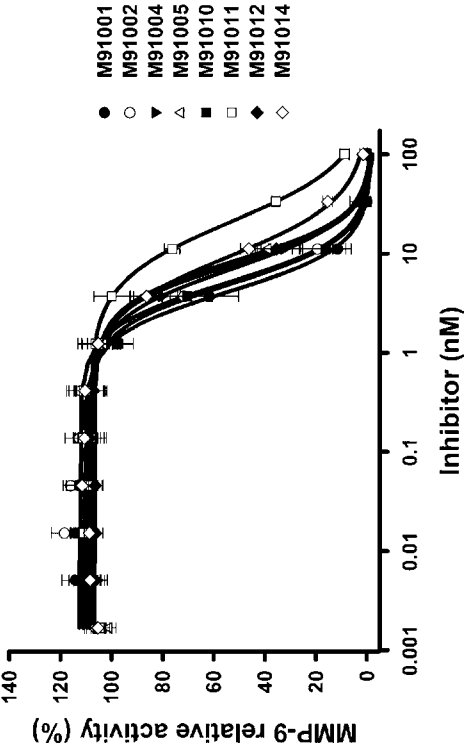
【 図 6 】



【 図 7 】

Clone	IC_{50} (nM)
M91001	8.3±1.1
M91002	8.5±2.1
M91004	7.6±1.8
M91005	8.2±1.2
M91010	5.8±1.6
M91011	5.0±0.5
M91012	8.6±1.7
M91014	3.0±0.3

【 図 8 】



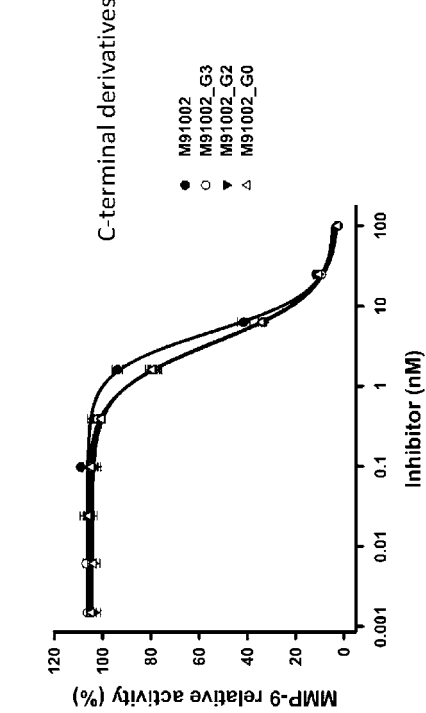
【 図 9 】

Clone	IC ₅₀ (nM)
M91001	4.1±0.9
M91002	5.1±1.1
M91004	7.1±1.2
M91005	8.4±0.7
M91010	5.0±0.9
M91011	21±3
M91012	7.8±1.2
M91014	9.2±0.6

【 図 10 】

Enzyme	IC ₅₀								Remaining activity at 1 μM	
	M91001	M91002	M91004	M91005	M91010	M91011	M91012	M91014	sc-311438	
MMP-1	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	6.8±1.8%	
MMP-2	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	
MMP-3	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	1.6±1.5%	
MMP-7	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	45±2%	
MMP-8	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	
MMP-10	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	
MMP-12	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	
MMP-13	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	
MMP-14	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	
MMP-15	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	
MMP-16	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	3.0±0.1%	
MMP-17	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	
ADAM17	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	>1 μM	0%	

【 図 11 (A) 】

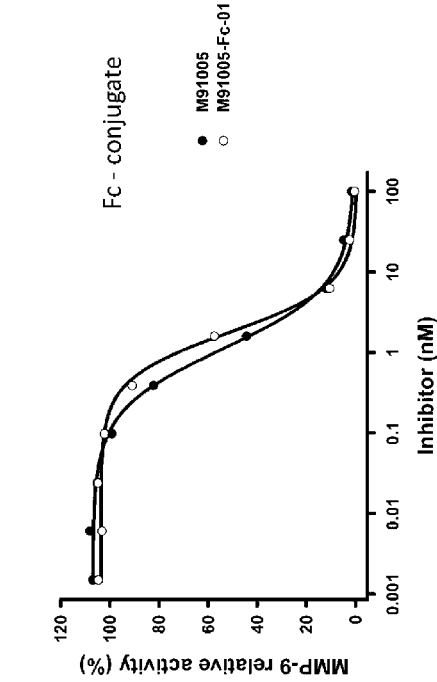


(A)

【 図 1 1 (B) 】

Clone	IC ₅₀ (nM)
M91002	5.0±0.3
M91002_G3	3.5±0.2
M91002_G2	3.5±0.2
M91002_G0	3.6±0.2

【 図 1 2 (A) 】



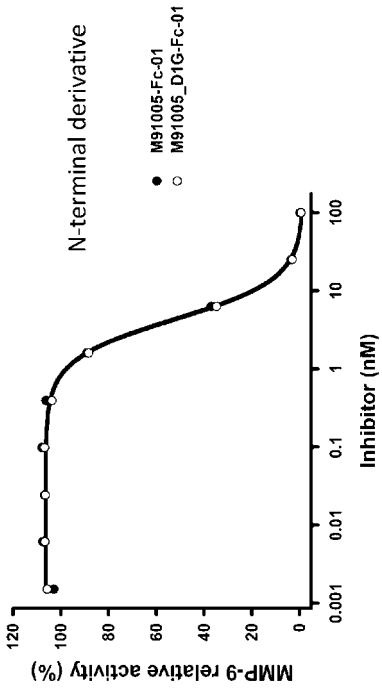
(A)

【 図 1 2 (B) 】

(B)

Clone	IC ₅₀ (nM)
M91005	1.1
M91005-Fc-01	1.8

【 図 1 3 (A) 】



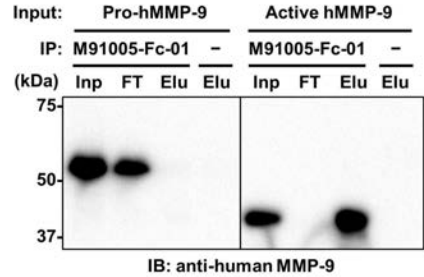
(A)

【 図 1 3 (B) 】

(B)

Clone	IC ₅₀ (nM)
M91005-Fc-01	4.5
M91005_D1G-Fc-01	4.3

【 図 1 4 (A) 】



【 図 2 0 】

M91010
DPQFGLFSKYRTPNCRKVGEPACQMSFNPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 6)

【 図 2 1 】

M91011
DPQFGLFSKYRTPNCMMYKQAQCSHKSPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 7)

【 図 2 2 】

M91012
DPQFGLFSKYRTPNCRVRGGPSCQMSFNPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 8)

【 図 2 3 】

M91014
DPQFGLFSKYRTPNCVMYKQAQCSHKYPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 9)

【 図 2 4 】

M91001_D1G
GPQFGLFSKYRTPNCQRGIGPSCQMSYKPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 10)

【 図 2 5 】

M91002_D1G
GPQFGLFSKYRTPNCRTRGPACQMGFPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 11)

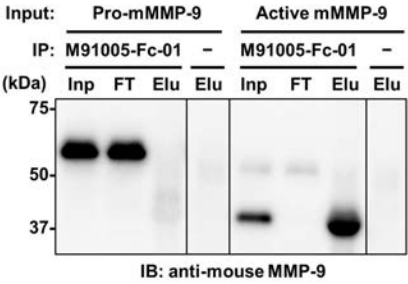
【 図 2 6 】

M91004_D1G
GPQFGLFSKYRTPNCRKRGPSQMAFPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 12)

【 図 2 7 】

M91005_D1G
GPQFGLFSKYRTPNCRKRGPSQMSYNPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 13)

【 図 1 4 (B) 】



【 図 1 5 】

hSPINK2
DPQFGLFSKYRTPNCSQYRLPGCPRHFPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 1)

【 図 1 6 】

M91001
DPQFGLFSKYRTPNCQRGIGPSCQMSYKPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 2)

【 図 1 7 】

M91002
DPQFGLFSKYRTPNCRTRGPACQMGFPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 3)

【 図 1 8 】

M91004
DPQFGLFSKYRTPNCRKRGPSQMAFPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 4)

【 図 1 9 】

M91005
DPQFGLFSKYRTPNCRKRGPSQMSYNPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 5)

【 図 2 8 】

M91010_D1G
GPQFGLFSKYRTPNCRKVGEPACQMSFNPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 14)

【 図 2 9 】

M91011_D1G
GPQFGLFSKYRTPNCMMYKQAQCSHKSPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 15)

【 図 3 0 】

M91012_D1G
GPQFGLFSKYRTPNCRVRGGPSCQMSFNPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 16)

【 図 3 1 】

M91014_D1G
GPQFGLFSKYRTPNCVMYKQAQCSHKYPVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 17)

【 図 3 2 】

X₁PQFGLFSKYRTPNCSX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CSX₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃PVCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (配列番号 18)

【 図 3 3 】

Stag+リンカー 1
GSGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDGDDDKAMADIGSANS (配列番号 19)

【 図 3 4 】

Stag+リンカー 2
GSGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDGDDDKAMAENLYFQG (配列番号 20)

【 図 3 5 】

C 末 6 マー
GASAAA (配列番号 21)

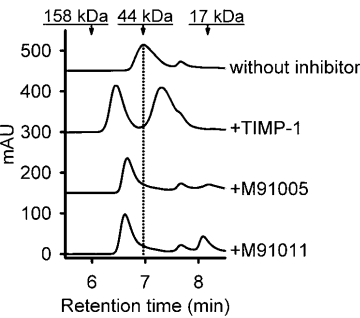
GGGLNDIFEAQKIEWHE (配列番号 35)

DNP-PLGMWSR (配列番号 32)

[illegible]

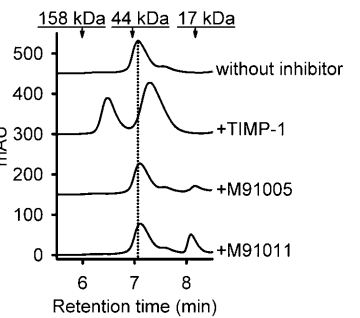
【 図 5 3 (A) 】

(A)



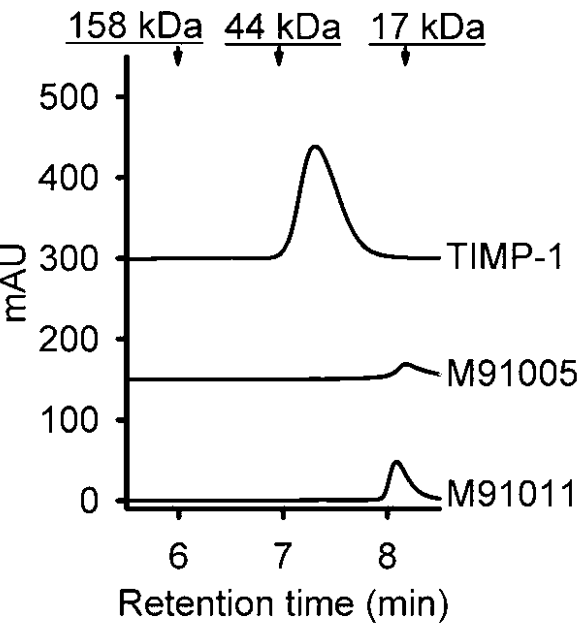
【 図 5 3 (B) 】

(B)



【 図 5 3 (C) 】

(C)



【 図 5 4 (A) 】

	IC ₅₀ (nM)			IC ₅₀ ratio (WT=1)		
	sc-311438	M91005	M91011	sc-311438	M91005	M91011
WT	28 ± 7	17 ± 7	17 ± 5	1	1	1
Q108N	29 ± 1	20 ± 6	21 ± 7	1.0	1.2	1.3
T109F	20 ± 3	15 ± 4	15 ± 8	0.7	0.8	0.9
F110A	20 ± 4	69 ± 12	7.3 ± 1.9	0.7	4.0	0.4
E111P	29 ± 4	31 ± 9	23 ± 9	1.0	1.8	1.4
G112R	29 ± 4	19 ± 5	15 ± 5	1.0	1.1	0.9
D113K	34 ± 7	21 ± 7	21 ± 6	1.2	1.2	1.3
L114P	29 ± 2	22 ± 6	19 ± 5	1.0	1.3	1.2
Y179A	20 ± 4	55 ± 13	81 ± 11	0.7	3.2	4.9
P180A	31 ± 6	25 ± 4	24 ± 9	1.1	1.4	1.4
D185A	22 ± 3	29 ± 5	310 ± 120	0.8	1.7	19.0
G186A	19 ± 1	15 ± 0	16 ± 3	0.7	0.9	1.0
L187A	27 ± 4	120 ± 10	20 ± 5	1.0	6.7	1.2
F192A	25 ± 6	>1000	83 ± 20	0.9	>57.8	5.0
P193A	27 ± 0	13 ± 3	110 ± 30	0.9	0.7	6.5
P196T	24 ± 4	18 ± 7	17 ± 7	0.9	1.0	1.0
I198V	30 ± 4	16 ± 4	16 ± 4	1.1	0.9	1.0
Q199G	37 ± 10	40 ± 16	22 ± 9	1.3	2.3	1.3

【 図 5 4 (B) 】

	IC ₅₀ (nM)			IC ₅₀ ratio (WT=1)		
	sc-311438	M91005	M91011	sc-311438	M91005	M91011
WT	28 ± 7	17 ± 7	17 ± 5	1	1	1
Y393A	28 ± 2	48 ± 14	>950	1.0	2.7	>57.6
L397A	32 ± 6	37 ± 10	57 ± 16	1.2	2.2	3.5
V398A	44 ± 5	39 ± 3	79 ± 8	1.6	2.2	4.8
D410E	34 ± 9	22 ± 9	20 ± 8	1.2	1.3	1.2
S413Q	36 ± 12	30 ± 14	28 ± 12	1.3	1.8	1.7
L418A	9.2 ± 3.4	9.3 ± 2.9	5.0 ± 1.4	0.3	0.5	0.3
Y420A	13 ± 1	54 ± 8	33 ± 3	0.5	3.1	2.0
P421A	14 ± 5	23 ± 9	8.7 ± 2.0	0.5	1.3	0.5
M422I	40 ± 7	45 ± 18	43 ± 20	1.4	2.6	2.6
Y423A	24 ± 0	230 ± 20	>330	0.9	13.2	>20.0
R424T	19 ± 8	31 ± 20	45 ± 25	0.7	1.8	2.7

【 図 5 5 】

Boc-FSR-MCA

【 図 5 6 】

Suc-LLVY-MCA (配列番号 36)

【 図 5 7 】

Suc-AAPF-MCA (配列番号 37)

【 図 5 8 】

Boc-VLK-MCA

【 図 5 9 】

Boc-VPR-AMC

【 図 6 0 】

Suc(OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-MCA(配列番号 38)

【 図 6 1 】

Boc-QAR-AMC

【 図 6 2 】

Boc-LSTR-MCA(配列番号 39)

【 図 6 3 】

Pyr-GR-MCA

【 図 6 4 】

Z-FR-MCA

【 図 6 5 】

DDDDK(配列番号 40)

【 配 列 表 】

2019017338000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/026732
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. See extra sheet		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/024914 A1 (DAIICHI SANKYO CO., LTD.) 13 February 2014, claims, paragraphs [0003], [0006], [0013], fig. 1-4, examples & US 2015/0197546 A1	1-8, 10-12, 14-15, 17-45, 49
A	claims, paragraphs [0003], [0008], [0063], examples & EP 2883954 A1 & CA 2881431 A	9, 13, 16, 46-48
Y	GOFFIN, Laurence et al., "Anti-MMP-9 Antibody: A promising therapeutic strategy for treatment of inflammatory bowel disease complications with fibrosis", Inflamm. Bowel Dis., September 2016, vol. 22, no. 9, pp. 2041-2057, abstract, page 2047, left column, paragraph [0003] to page 2049, left column, paragraph [0001], etc.	1-8, 10-12, 14-15, 17-45
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 October 2018 (11.10.2018)		Date of mailing of the international search report 23 October 2018 (23.10.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/026732

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2016/023979 A1 (CALYPSO BIOTECH SA, MERCK PATENT GMBH) 18 February 2016, page 1, paragraphs [0001]-[0003], page 5, paragraph [0006], examples & JP 2017-532005 A paragraphs [0001]-[0004], [0020], examples & US 2017/0233495 A1 & EP 2985296 A1 & CN 106573984 A & KR 10-2017-0041222 A	1-8, 10-12, 14-15, 17-45, 49 9, 13, 16, 46-48
X A	KHERRAF, ZINE-EDDINE et al., "SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes", EMBO Molecular Medicine, 29 May 2017, vol. 9, pp. 1132-1149, page 1145, left column, page 7 to right column, paragraph [0001]	30-31, 43 1-29, 32-42, 44-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/026732

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/12(2006.01)i,	A61K35/12(2015.01)i,	A61K35/76(2015.01)i,
A61K38/55(2006.01)I,	A61K48/00(2006.01)i,	A61P1/04(2006.01)i,
A61P1/14(2006.01)i,	A61P1/16(2006.01)i,	A61P1/18(2006.01)i,
A61P3/10(2006.01)i,	A61P9/00(2006.01)i,	A61P9/04(2006.01)i,
A61P9/10(2006.01)i,	A61P11/00(2006.01)i,	A61P11/02(2006.01)i,
A61P11/06(2006.01)i,	A61P13/12(2006.01)i,	A61P17/00(2006.01)i,
A61P17/02(2006.01)i,	A61P17/04(2006.01)i,	A61P17/06(2006.01)i,
A61P17/10(2006.01)i,	A61P17/14(2006.01)i,	A61P19/02(2006.01)i,
A61P21/02(2006.01)i,	A61P25/00(2006.01)i,	A61P25/08(2006.01)i,
A61P25/10(2006.01)i,	A61P25/14(2006.01)i,	A61P25/18(2006.01)i,
A61P25/20(2006.01)i,	A61P25/22(2006.01)i,	A61P25/24(2006.01)i,
A61P25/28(2006.01)i,	A61P25/30(2006.01)i,	A61P25/32(2006.01)i,
A61P27/02(2006.01)i,	A61P35/00(2006.01)i,	A61P37/02(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i,	C07K14/81(2006.01)i,	C07K16/38(2006.01)i,
C12N1/15(2006.01)i,	C12N1/19(2006.01)i,	C12N1/21(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i,	C12P21/02(2006.01)i,	G01N33/53(2006.01)i

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/026732

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/12, A61K35/12, A61K35/76, A61K38/55, A61K48/00, A61P1/04, A61P1/14, A61P1/16, A61P1/18, A61P3/10, A61P9/00, A61P9/04, A61P9/10, A61P11/00, A61P11/02, A61P11/06, A61P13/12, A61P17/00, A61P17/02, A61P17/04, A61P17/06, A61P17/10, A61P17/14, A61P19/02, A61P21/02, A61P25/00, A61P25/08, A61P25/10, A61P25/14, A61P25/18, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, A61P25/30, A61P25/32, A61P27/02, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00, C07K14/81, C07K16/38, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, G01N33/53

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 6 7 3 2	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	WO 2014/024914 A1 (第一三共株式会社) 2014.02.13, 特許請求の範囲、[0003]、[0006]、[0013]、図 1-4、実施例 & US 2015/0197546 A1 CLAIMS, [0003], [0008], [0063], EXAMPLES & EP 2883954 A1 & CA 2881431 A	1-8, 10-12, 14-15, 17-45, 49	
A		9, 13, 16, 46-48	
Y	GOFFIN, Laurence et al., Anti-MMP-9 Antibody: A promising therapeutic strategy for treatment of inflammatory bowel disease	1-8, 10-12, 14-15, 17-45,	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 11.10.2018		国際調査報告の発送日 23.10.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美	4B 7880
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 6 7 3 2
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	complications with fibrosis, Inflamm. Bowel Dis., 2016.09, vol. 22, no. 9, p. 2041-2057, 要約、第 2047 頁左欄第 3 段落-第 2049 頁左欄第 1 段落等	49 9, 13, 16, 46-48
Y	WO 2016/023979 A1 (CALYPSO BIOTECH SA, MERCK PATENT GMBH) 2016.02.18, 第 1 頁第 1-3 段落、第 5 頁第 6 段落、実施例 & JP 2017-532005 A [0001]-[0004], [0020], EXAMPLES & US 2017/0233495	1-8, 10-12, 14-15, 17-45, 49
A	A1 & EP 2985296 A1 & CN 106573984 A & KR 10-2017-0041222 A	9, 13, 16, 46-48
X A	KHERRAF, ZINE-EDDINE et al., SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes, EMBO Molecular Medicine, 2017.05.29, vol. 9, p. 1132-1149, 第 1145 頁左欄第 7 頁-右欄第 1 段落	30-31, 43 1-29, 32-42, 4 4-49

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 6 7 3 2

発明の属する分野の分類

C12N15/12(2006.01)i, A61K35/12(2015.01)i, A61K35/76(2015.01)i, A61K38/55(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P1/14(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P11/02(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P17/04(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i, A61P17/10(2006.01)i, A61P17/14(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P21/02(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/08(2006.01)i, A61P25/10(2006.01)i, A61P25/14(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/20(2006.01)i, A61P25/22(2006.01)i, A61P25/24(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P25/30(2006.01)i, A61P25/32(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/81(2006.01)i, C07K16/38(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 6 7 3 2

調査を行った最小限資料

C12N15/12, A61K35/12, A61K35/76, A61K38/55, A61K48/00, A61P1/04, A61P1/14, A61P1/16, A61P1/18, A61P3/10, A61P9/00, A61P9/04, A61P9/10, A61P11/00, A61P11/02, A61P11/06, A61P13/12, A61P17/00, A61P17/02, A61P17/04, A61P17/06, A61P17/10, A61P17/14, A61P19/02, A61P21/02, A61P25/00, A61P25/08, A61P25/10, A61P25/14, A61P25/18, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, A61P25/30, A61P25/32, A61P27/02, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00, C07K14/81, C07K16/38, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, G01N33/53

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)
 C 0 7 K 16/38 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/37 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)
 A 6 1 P 37/08 (2006.01)
 A 6 1 P 17/14 (2006.01)
 A 6 1 P 17/10 (2006.01)
 A 6 1 P 17/02 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)
 A 6 1 P 11/02 (2006.01)
 A 6 1 P 1/02 (2006.01)
 A 6 1 P 25/06 (2006.01)
 A 6 1 P 25/04 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 9/04 (2006.01)
 A 6 1 P 1/18 (2006.01)
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 P 19/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/08 (2006.01)
 A 6 1 P 25/24 (2006.01)
 A 6 1 P 25/22 (2006.01)
 A 6 1 P 1/14 (2006.01)
 A 6 1 P 25/18 (2006.01)
 A 6 1 P 25/20 (2006.01)
 A 6 1 P 25/30 (2006.01)
 A 6 1 K 38/16 (2006.01)

C 0 7 K 19/00
 C 1 2 N 15/62
 C 0 7 K 16/38
 C 1 2 Q 1/37
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 P 43/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 37/08
 A 6 1 P 17/14
 A 6 1 P 17/10
 A 6 1 P 17/02
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 11/02
 A 6 1 P 1/02
 A 6 1 P 25/06
 A 6 1 P 25/04
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 9/04
 A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 19/00
 A 6 1 P 25/08
 A 6 1 P 25/24
 A 6 1 P 25/22
 A 6 1 P 1/14
 A 6 1 P 25/18
 A 6 1 P 25/20
 A 6 1 P 25/30
 A 6 1 P 9/10

Z

4 C 0 8 6
 4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

1 1 1

1 0 1

A 6 1 K 38/55 (2006.01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 38/55
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/64
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 35/76
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
	G 0 1 N 33/53

D

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. B r i j

(72)発明者 西宮 大祐

東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内

(72)発明者 橋本 隆二

東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内

(72)発明者 新津 陽一

東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ36 QR48

4B064 AG23 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
CA46

4C076 AA95 CC01 CC04 CC07 CC10 CC11 CC15 CC16 CC17 CC18
CC20 CC21 CC27 EE41 EE59

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA02 BA20 CA53 DC32 NA13
NA14 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA051 ZA052 ZA061 ZA062 ZA081
ZA082 ZA121 ZA122 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA181 ZA182 ZA201
ZA202 ZA291 ZA292 ZA331 ZA332 ZA341 ZA342 ZA361 ZA362 ZA401
ZA402 ZA591 ZA592 ZA671 ZA672 ZA681 ZA682 ZA691 ZA692 ZA751
ZA752 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA921 ZA922 ZA941 ZA942 ZA961
ZA962 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132 ZB151 ZB152 ZB211
ZB212 ZB261 ZB262 ZC201 ZC202 ZC351 ZC352 ZC411 ZC412

4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA05 ZA06 ZA08
ZA12 ZA15 ZA16 ZA18 ZA20 ZA29 ZA33 ZA34 ZA36 ZA40
ZA59 ZA67 ZA68 ZA69 ZA75 ZA81 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96
ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZC20 ZC35 ZC41

4C087 AA01 BB63 BC83 NA14 ZA01 ZA02 ZA05 ZA06 ZA08 ZA12
ZA15 ZA16 ZA18 ZA20 ZA29 ZA33 ZA34 ZA36 ZA40 ZA59
ZA67 ZA68 ZA69 ZA75 ZA81 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96 ZB08
ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZC20 ZC35 ZC41

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA56 DA76 EA20
EA21 EA22 EA24 EA27 EA28 EA50 FA74 GA26

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	活性mmp-9结合肽		
公开(公告)号	JPWO2019017338A1	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019531038	申请日	2018-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	第一三共株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一三共株式会社		
[标]发明人	西宫大祐 橋本隆二 新津陽一		
发明人	矢野 秀法 西宫 大祐 橋本 隆二 新津 陽一		
IPC分类号	C12N15/15 C07K14/81 C12N15/63 C12P21/02 C07K16/00 C07K19/00 C12N15/62 C07K16/38 C12Q1/37 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P43/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P25/28 A61P25/00 A61P9/00 A61P35/00 A61P17/00 A61P11/06 A61P11/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P17/06 A61P37/08 A61P17/14 A61P17/10 A61P17/02 A61P27/02 A61P11/02 A61P1/02 A61P25/06 A61P25/04 A61P3/10 A61P13/12 A61P9/10 A61P9/04 A61P1/18 A61P25/16 A61P25/14 A61P21/00 A61P19/00 A61P25/08 A61P25/24 A61P25/22 A61P1/14 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/30 A61K38/16 A61K38/55 A61K47/64 A61K47/68 A61K48/00 A61K35/12 A61K35/76 A61K31/7088 G01N33/53		
CPC分类号	A61K35/12 A61K35/76 A61K38/55 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/10 A61P17/14 A61P19/02 A61P21/02 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/10 A61P25/14 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P25/32 A61P27/02 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/81 C07K16/38 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/15 C07K14/81.ZNA C12N15/63.Z C12P21/02.C C07K16/00 C07K19/00 C12N15/62.Z C07K16/38 C12Q1/37 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P43/00.111 A61P29/00 A61P37/06 A61P25/28 A61P25/00 A61P9/00 A61P35/00 A61P17/00 A61P11/06 A61P11/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P17/06 A61P37/08 A61P17/14 A61P17/10 A61P17/02 A61P27/02 A61P11/02 A61P1/02 A61P25/06 A61P25/04 A61P3/10 A61P13/12 A61P9/10 A61P9/04 A61P1/18 A61P25/16 A61P25/14 A61P21/00 A61P19/00 A61P25/08 A61P25/24 A61P25/22 A61P1/14 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/30 A61P9/10.101 A61K38/16 A61K38/55 A61K47/64 A61K47/68 A61K48/00 A61K35/12 A61K35/76 A61K31/7088 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ36 4B063/QR48 4B064/AG23 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC01 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC10 4C076/CC11 4C076/CC15 4C076/CC16 4C076/CC17 4C076/CC18 4C076/CC20 4C076/CC21 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA20 4C084/CA53 4C084/DC32 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA012 4C084/ZA021 4C084/ZA022 4C084/ZA051 4C084/ZA052 4C084/ZA061 4C084/ZA062 4C084/ZA081 4C084/ZA082 4C084/ZA121 4C084/ZA122 4C084/ZA151 4C084/ZA152 4C084/ZA161 4C084/ZA162 4C084/ZA181 4C084/ZA182 4C084/ZA201 4C084/ZA202 4C084/ZA291 4C084/ZA292 4C084/ZA331 4C084/ZA332 4C084/ZA341 4C084/ZA342 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA401 4C084/ZA402 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA671 4C084/ZA672 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C084/ZA691 4C084/ZA692 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA921 4C084/ZA922 4C084		

/ZA941 4C084/ZA942 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC201 4C084/ZC202 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA05 4C086/ZA06 4C086/ZA08 4C086/ZA12 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA20 4C086/ZA29 4C086/ZA33 4C086/ZA34 4C086/ZA36 4C086/ZA40 4C086/ZA59 4C086/ZA67 4C086/ZA68 4C086/ZA69 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA92 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC20 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4C087/AA01 4C087/BB63 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA02 4C087/ZA05 4C087/ZA06 4C087/ZA08 4C087/ZA12 4C087/ZA15 4C087/ZA16 4C087/ZA18 4C087/ZA20 4C087/ZA29 4C087/ZA33 4C087/ZA34 4C087/ZA36 4C087/ZA40 4C087/ZA59 4C087/ZA67 4C087/ZA68 4C087/ZA69 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA92 4C087/ZA94 4C087/ZA96 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4C087/ZC20 4C087/ZC35 4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA56 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA24 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26

代理人(译)	石桥 公树 竹元利泰
优先权	2017138998 2017-07-18 JP
外部链接	Espacenet

摘要(译)

提供新的肽 一种肽，其包含由SEQ ID NO：18表示的氨基酸序列并且与活性蛋白酶结合，但不与前体蛋白酶结合。

