(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7019600号
(P7019600)

(45)発行日　令和4年2月15日(2022.2.15)

(24)登録日　令和4年2月4日(2022.2.4)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	ZNA
C07K 14/81 (2006.01)		C07K	14/81	
C12N 9/99 (2006.01)		C12N	9/99	
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	

請求項の数　18　（全69頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-558083(P2018-558083)
(86)(22)出願日　平成29年12月21日(2017.12.21)
(86)国際出願番号　PCT/JP2017/046044
(87)国際公開番号　WO2018/117244
(87)国際公開日　平成30年6月28日(2018.6.28)
審査請求日　令和2年12月11日(2020.12.11)
(31)優先権主張番号　特願2016-249020(P2016-249020)
(32)優先日　平成28年12月22日(2016.12.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　307010166
第一三共株式会社
東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号
(74)代理人　100146581
弁理士　石橋 公樹
(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　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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　加齢黄斑変性症治療用ペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１及び２３乃至２９（図１５、図１７、図１９、図２１、図２３、図２５、図２７、図２９、図３１、図３３及び、図３５乃至４１）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、ＨＴＲＡ１の有するプロテアーゼ活性を阻害するＳＰＩＮＫ２変異体ペプチド。

【請求項２】

請求項１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３】

請求項２記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項４】

請求項２記載のポリヌクレオチド若しくは請求項３記載のベクターを含むか又は請求項１記載のペプチドを産生する細胞。

【請求項５】

下記工程（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、ＨＴＲＡ１の有するプロテアーゼ活性を阻害するＳＰＩＮＫ２変異体ペプチドの製造方法：

（ｉ）請求項４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６】

請求項５記載の方法により得られるＳＰＩＮＫ２変異体ペプチド。
【請求項７】
請求項１又は６記載のペプチドに他の部分が連結してなるコンジュゲート。
【請求項８】
ポリペプチドである、請求項７記載のコンジュゲート。
【請求項９】
請求項１又は６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１０】
請求項１又は６記載のペプチド、請求項２記載のポリヌクレオチド、請求項３記載のベクター、請求項４記載の細胞、請求項７若しくは８記載のコンジュゲート、及び／又は、請求項９記載の抗体もしくはその機能断片を含む組成物。
【請求項１１】
請求項１又は６記載のペプチド、請求項７又は８に記載のコンジュゲート、請求項２記載のポリヌクレオチド、請求項３記載のベクター、及び／又は、請求項４記載の細胞を含む医薬組成物。
【請求項１２】
ＨＴＲＡ１関連疾患の治療又は予防のための、請求項１１記載の医薬組成物。
【請求項１３】
ＨＴＲＡ１関連疾患が滲出型加齢黄斑変性症、萎縮型加齢黄斑変性症、地図状萎縮、糖尿病網膜症、未熟児網膜症、ポリープ状脈絡膜血管症、関節リウマチ、及び変形性関節症よりなる群から選択される１つ又は２つ以上である、請求項１２記載の医薬組成物。
【請求項１４】
１つ又は２つ以上の他の医薬を含む、請求項１１乃至１３のいずれか一つに記載の医薬組成物。
【請求項１５】
１つ又は２つ以上の他の医薬と組み合わせて使用される、請求項１１乃至１３のいずれか一つに記載の医薬組成物。
【請求項１６】
網膜保護剤である、請求項１１乃至１５のいずれか一つに記載の医薬組成物。
【請求項１７】
萎縮型加齢黄斑変性症の治療又は予防のための、請求項１１乃至１５のいずれか一つに記載の医薬組成物。
【請求項１８】
滲出型加齢黄斑変性症の治療又は予防のための、請求項１１乃至１５のいずれか一つに記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
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等に関する。
【背景技術】
【０００２】
Ｈｉｇｈ ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ ｒｅｑｕｉｒｅｍｅｎｔ Ａ ｓｅｒｉｎｅ ｐｅｐｔｉｄａｓｅ １（ＨＴＲＡ１）はトリプシン様セリンプロテアーゼ（ＰＲＳＳ１１；Ｃｌａｎ ＰＡ，ｆａｍｉｌｙ Ｓ１）であり、ＩＧＦＢＰ様モジュールおよびＫａｚａｌ様モジュールから成るＮ末ドメイン、プロテアーゼドメインおよびＣ末のＰＤＺドメインから構成される。ＨＴＲＡ１はＨＴＲＡ２、ＨＴＲＡ３、ＨＴＲＡ４を含むＨＴＲＡファミリーに属しており、他のＨＴＲＡ分子と同様、可逆的に活性型と非活性型構造を示す（

非特許文献１，２）。その発現はヒトの体内において偏在的であり、軟骨や滑膜、胎盤等において相対的に高い発現が認められている。ＨＴＲＡ１はＡｍｙｌｏｉｄ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ ｐｒｏｔｅｉｎ、Ｆｉｂｒｏｍｏｄｕｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、ＡＤＡＭ９、Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎなど多くの細胞外マトリックス構成成分を基質として切断し、関節炎や骨石灰化に代表される疾患と関連することが知られている（非特許文献３，４，５，６）。さらに、ＨＴＲＡ１プロモーター領域に遺伝子多型（ｒｓ１１２００６３８）がある場合、ＨＴＲＡ１転写量が上昇することが知られており、また、その多型と加齢黄斑変性症（Ａｇｅ－ｒｅｌａｔｅｄ Ｍａｃｕｌａｒ Ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ：以下ＡＭＤ」という）が強く相関することがゲノムワイド関連解析から明らかになっている（非特許文献７，８）。

ＡＭＤは加齢に伴う慢性変性疾患であり、中心視力の低下を特徴とする。後天的失明原因疾患として欧米では第１位、日本では緑内障、糖尿病網膜症、網膜色素変性に次いで第４位の患者数である（非特許文献１２）。ＡＭＤ患者のリンパ球、あるいは網膜色素上皮細胞でｍＲＮＡおよび蛋白質のレベルでＨＴＲＡ１1が上昇している（非特許文献１３）。また、ＡＭＤの前駆病変であるドルーゼン、変性した網膜色素上皮細胞、あるいは新生血管膜において、ＨＴＲＡ１の蛋白質の発現が上昇しているとの報告がある（非特許文献１１及び１４～１６）。また、網膜剥離、網膜静脈閉塞症、硝子体出血、黄斑円孔等の硝子体液中にＨＴＲＡ１蛋白質が検出されており、その値は血管新生マーカーであるＶＥＧＦと連動しているとする報告もある（非特許文献１７）。さらに、ＨＴＲＡ１トランスジェニックマウスでは、Ｆｉｂｕｌｉｎ５やＴｒｏｐｏｅｌａｓｔｉｎといった基底膜を構成する蛋白質の分解およびブルッフ膜のＥｌａｓｔｉｃ ｌａｙｅｒの断片化が観察されている（非特許文献９）。しかし、上記疾患を治療するため、並びに網膜を保護するために、ＨＴＲＡ１のプロテアーゼ活性の阻害が有効であるか否かについては直接的に示されていない。

【０００３】

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１０）が、ＡＭＤとの関係は明らかにされていない。

ＡＭＤを評価する動物モデルとしては、マウスとウサギのものが知られているが（非特許文献１８、１９、２０）。ヒト眼疾患に外挿し得るモデルとしてより好ましいウサギについて（非特許文献２１）、従来のモデルでは、網膜・脈絡膜内の異常所見を観察するのみで、網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ細胞）の機能異常などを評価することは難しい上、モデル形成に８ヶ月という長期間を要する等問題点があった（非特許文献２０）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【文献】トルーベスタイン エル他（Ｔｒｕｅｂｅｓｔｅｉｎ Ｌ，ｅｔ ａｌ．）（２０１１年刊） ナショナル・ストラクチュラル・モレキュラー・バイオロジー（Ｎａｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．）１８巻（３号）：３８６－８頁

アイゲンブロート シー他（Ｅｉｇｅｎｂｒｏｔ Ｃ，ｅｔ ａｌ．）（２０１２年刊）ストラクチャー（Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ）２０巻（６号）：１０４０－５０頁

グラウ エス他（Ｇｒａｕ Ｓ，ｅｔ ａｌ．）（２００５年刊）プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オズ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．）１０２巻（１７号）：６０２１－２６頁

グラウ エス他（Ｇｒａｕ Ｓ，ｅｔ ａｌ．）（２００６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．）２８１巻（１０号）：６１２４－２９頁

ハッドフィールド ケイ・ディー他（Ｈａｄｆｉｅｌｄ ＫＤ，ｅｔ ａｌ．）（２００８

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．）２８３巻（９号）：５９２８－３８頁
アン イー他（Ａｎ Ｅ，ｅｔ ａｌ．）（２０１０年刊）インベスティゲイティブ・オフタモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ．）５１巻（７号）：３３７９－８６頁
ヤン ゼット他（Ｙａｎｇ Ｚ，ｅｔ ａｌ．）（２００６年刊）サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ．）３１４巻（５８０１号）：９９２－９３頁
タン エヌ・ピー他（Ｔａｎｇ ＮＰ，ｅｔ ａｌ．）（２００９年刊）アナルス・オブ・エピデミオロジー（Ａｎｎ Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌ．）１９巻（１０号）：７４０－４５頁
サラ ビエルコッテン他（Ｖｉｅｒｋｏｔｔｅｎ Ｓ， ｅｔ ａｌ．）（２０１１年刊）プロス・ワン（ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．）６巻（８号）：ｅ２２９５９頁
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
ヤン Ｚ（Ｙａｎｇ Ｚ）他、サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ）（２００６年刊）、３１４巻５８０１号：９９２－９３頁
中江 公裕他、厚生労働省難治性疾患克服研究事業網脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班 平成１９年度班会議（２００７年刊）
ブラック ＪＲ及びクラーク ＳＪ（Ｂｌａｃｋ ＪＲ ａｎｄ Ｃｌａｒｋ ＳＪ）、ジェネティカル・メディシン（Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｄ．）（２０１６年刊）、１８巻４号：２８３－８９頁.
キャメロン ＤＪ（Ｃａｍｅｒｏｎ ＤＪ）他、セル・サイクル（Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ）（２００７年刊）、６巻９号：１１２２－２５頁
チャン ＣＣ（Ｃｈａｎ ＣＣ）他、トランスアクションズ・オブ・ジ・アメリカン・カル・ソサエティ（Ｔｒａｎｓ．Ａｍ．．Ｓｏｃ．）（２００７年刊）、１０５巻：９２－９７頁
テゥオ Ｊ（Ｔｕｏ Ｊ）他、（２００８年刊）、１１５巻１１号：１８９１－９８頁
ング ＴＫ（Ｎｇ ＴＫ）他、インヴェスチゲーショナル・オフタルモロジカル・ヴィジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ）（２０１１年刊）、５２巻６号：３７０６－１２頁
エスピノーザ－ハイデマン ディー・ジー他（Ｅｓｐｉｎｏｓａ－Ｈａｉｄｅｍａｎｎ Ｄ．Ｇ，ｅｔ ａｌ．）、インヴェスティゲイティヴ・オフタルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｖｅ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ ＆ Ｖｉｓｕａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ）（２００６年刊）、４７巻（２号）：７２９－３７頁
ポンス エム他（Ｐｏｎｓ Ｍ，ｅｔ ａｌ．）、アメリカン・ジャーナル・オブ・パソロジー（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ）（２０１０年刊）、１７７巻：１１９８－１２１３頁
トリビーノ エー他（Ｔｒｉｖｉｎｏ Ａ，ｅｔ ａｌ．）、エクスペリメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｅｙｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）（２００６年刊）、８３巻：３５７－３６６頁
ゼルニイ イー・ワイ他（Ｚｅｒｎｉｉ Ｅ．Ｙ，ｅｔ ａｌ．）、シー・エヌ・エス・アンド・ニューロロジカル・ディスオーダーズ－ドラッグ・ターゲッツ（ＣＮＳ ＆ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ－Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ）（２０１６年刊）、１５巻：２６７－２９１頁

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
新規なＨｉｇｈ ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ ｒｅｑｕｉｒｅｍｅｎｔ Ａ ｓｅｒｉｎｅ ｐｅｐｔｉｄａｓｅ １（ＨＴＲＡ１）阻害剤を提供すること。
【課題を解決するための手段】
【０００６】

本発明は
（１）
配列番号３０（図４２）で示されるアミノ酸配列を含み、且つ、ヒトＨＴＲＡ１の有するプロテアーゼ活性を阻害する、ＳＰＩＮＫ２変異体ペプチド、
（２）
１番目のＸａａ（Ｘ１）はＡｓｐ、Ｇｌｕ、Ｓｅｒ、Ｇｌｙ，又はＩｌｅ、２番目のＸａａ（Ｘ２）はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｌｅｕ、Ｓｅｒ又はＴｈｒ、３番目のＸａａ（Ｘ３）はＡｓｐ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ又はＧｌｎ、４番目のＸａａ（Ｘ４）はＡｓｐ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｓｅｒ又はＴｙｒ、５番目のＸａａ（Ｘ５）はＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｍｅｔ又はＡｓｎ、６番目のＸａａ（Ｘ６）はＭｅｔ又はＴｒｐ、７番目のＸａａ（Ｘ７）はＧｌｎ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ又はＶａｌ、８番目のＸａａ（Ｘ８）はＰｈｅ、Ｌｅｕ又はＴｙｒ、９番目のＸａａ（Ｘ９）はＰｈｅ又はＴｙｒ、１０番目のＸａａ（Ｘ１０）はＡｌａ、Ｇｌｕ、Ｍｅｔ又はＶａｌ、並びに、１１番目のＸａａ（Ｘ１１）はＡｌａ、Ｔｈｒ又はＶａｌである、（１）記載のペプチド、
（３）
配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１及び２３乃至２９（図１５、図１７、図１９、図２１、図２３、図２５、図２７、図２９、図３１、図３３及び、図３５乃至４１）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、（１）又は（２）記載のペプチド、
（４）
配列番号３０（図４２）で示されるアミノ酸配列のアミノ末端側に１乃至３個のアミノ酸がペプチド結合してなるアミノ酸配列を含む、（１）乃至（３）のいずれか一つに記載のペプチド、
（５）
配列番号３０（図４２）で示されるアミノ酸配列のカルボキシル末端側に１又は２個のアミノ酸がペプチド結合してなるアミノ酸配列を含む、（１）乃至（４）のいずれか一つに記載のペプチド、
（６）
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（５）のいずれか一つに記載のペプチド、
（７）
（１）乃至（６）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、
（８）
（７）記載のポリヌクレオチドを含むベクター、
（９）
（７）記載のポリヌクレオチド若しくは（８）記載のベクターを含むか又は（１）乃至（６）のいずれか一つに記載のペプチドを産生する細胞、
（１０）
下記工程（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、ＨＴＲＡ１の有するプロテアーゼ活性を阻害するＳＰＩＮＫ２変異体ペプチドの製造方法：
（ｉ）（９）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、
（１１）
（１０）記載の方法により得られるＳＰＩＮＫ２変異体ペプチド、
（１２）
（１）乃至（６）及び（１１）のいずれか一つに記載のペプチドに他の部分が連結してなるコンジュゲート、
（１３）
ポリペプチドである、（１２）記載のコンジュゲート、

（１４）
（１）乃至（６）及び（１１）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、
（１５）
（１）乃至（６）及び（１１）のいずれか一つに記載のペプチド、（７）記載のポリヌクレオチド、（８）記載のベクター、（９）記載の細胞、（１２）若しくは（１３）記載のコンジュゲート、及び／又は、（１４）記載の抗体もしくはその機能断片を含む組成物、
（１６）
（１）乃至（６）及び（１１）のいずれか一つに記載のペプチド及び／又は（１２）又は（１３）に記載のコンジュゲートを含む医薬組成物。
（１７）
ＨＴＲＡ１関連疾患の治療又は予防のための、（１６）記載の医薬組成物、
（１８）
ＨＴＲＡ１関連疾患が滲出型加齢黄斑変性症、萎縮型加齢黄斑変性症、地図状萎縮、糖尿病網膜症、未熟児網膜症、ポリープ状脈絡膜血管症、関節リウマチ、及び変形性関節症よりなる群から選択される１つ又は２つ以上である、（１７）記載の医薬組成物、
（１９）
１つ又は２つ以上の他の医薬を含む、（１６）乃至（１８）のいずれか一つに記載の医薬組成物、
（２０）
１つ又は２つ以上の他の医薬と組み合わせて使用される、（１６）乃至（１８）のいずれか一つに記載の医薬組成物、
（２１）
網膜保護剤である、（１６）乃至（２０）のいずれか一つに記載の医薬組成物、
（２２）
下記の工程１乃至工程３を含む、加齢黄斑変性症の治療薬又は予防薬を同定する方法：
［工程１］ＨＴＲＡ１プロテアーゼ及び基質を、被検物質の存在下又は非存在下で保温する；
［工程２］被検物質の存在下及び非存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性を検出する；
［工程３］被検物質の存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性が、被検物質の非存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該被検物質を陽性と判定する、
（２３）
下記の工程１乃至工程３を含む、網膜保護剤を同定する方法：
［工程１］ＨＴＲＡ１プロテアーゼ及び基質を、被検物質の存在下又は非存在下で保温する；
［工程２］被検物質の存在下及び非存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性を検出する；
［工程３］被検物質の存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性が、被検物質の非存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該被検物質を陽性と判定する、
（２４）
ハイドロキノンを含む高脂肪食を３乃至６ヶ月摂食させる工程を含む、網膜障害モデルウサギの作製方法であって、該モデルウサギの網膜色素上皮細胞が正常ウサギの網膜色素上皮細胞に比して肥大していることを特徴とする方法、
（２５）
（２４）記載の方法により作製され、正常ウサギに比して肥大した網膜色素上皮細胞を有していることを特徴とする、網膜障害モデルウサギ、
（２６）
下記工程（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、加齢黄斑変性症の治療薬若しくは予防薬、又は、網膜保護剤を同定する方法：
（ｉ）（２５）記載のウサギにおける網膜色素上皮細胞の肥大を、被検物質投与下及び非投与下で測定する工程；及び

（ｉｉ）該被検物質投与下における網膜色素上皮細胞の肥大が非投与下と比較して抑制された場合、該検物質を陽性と判定する工程、
（２７）
工程（ｉ）における測定が、網膜色素上皮細胞の平均面積又は肥大した網膜色素上皮細胞数の測定である、（２６）記載の方法、
（２８）
萎縮型加齢黄斑変性症の治療又は予防のための、（１６）乃至（１８）のいずれか一つに記載の医薬組成物、及び、
（２９）
滲出型加齢黄斑変性症の治療又は予防のための、（１６）乃至（１８）のいずれか一つに記載の医薬組成物、
等に関する。
【発明の効果】
【０００７】
本発明の提供するペプチド、それを含む医薬組成物は、ＨＴＲＡ１阻害活性を有し、加齢黄斑変性症の治療又は予防等に有用である。
【図面の簡単な説明】
【０００８】
【図１（Ａ）】ヒト／マウス／ラット／サルＨＴＲＡ１の配列類似性を比較した図。破線は酵素活性ドメイン（２０４Ｇｌｙ～３６４Ｌｅｕ）を示す。
【図１（Ｂ）】ヒト／マウス／ラット／サルＨＴＲＡ１の配列類似性を比較した図（続き）。
【図２】ペプチド基質の分解速度を指標として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害活性を評価した図。パネルＡ乃至Ｃでは、各阻害ペプチドを、パネルＤは対照の野生型ＳＰＩＮＫ２でそれぞれ評価した。
【図３】ペプチド基質の分解速度を指標として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）阻害活性を評価した図（パネルＡ乃至Ｃ）。
【図４（Ａ）】ヒトＶｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎの分解を指標として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害活性を評価した図。Ｈｕｍａｎ　Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＭＡＢ２３４９）を用いたＷｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔにより解析した。
【図４（Ｂ）】ヒトＶｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎの分解を指標として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害活性を評価した図（続き）。
【図５（Ａ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その１）。使用した各プロテアーゼの名称とその濃度、基質の名称とその濃度等は実施例３参照。
【図５（Ｂ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その２）。
【図５（Ｃ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その３）。
【図５（Ｄ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その４）。
【図６】Ｘ線結晶構造解析により得られたＨＴＲＡ１（ｃａｔ）／ＨＴＲＡ１阻害ペプチド複合体を示した図。ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）が形成するＨＴＲＡ１三量体にそれぞれ阻害ペプチドが結合していた。
【図７】Ｘ線結晶構造解析により得られたＨＴＲＡ１（ｃａｔ）／ＨＴＲＡ１阻害ペプチド複合体を単量体として示した図。該阻害ペプチドはＨＴＲＡ１（ｃａｔ）活性中心を含む領域に結合していた。
【図８】Ｈ２－Ｏｐｔのアミノ酸配列（配列番号５４）。Ｎ末端の「Ｍｃａ－Ｉ」は、Ｎ－（４－ｍｅｔｈｙｌｃｏｕｍａｒｙｌ－７－ａｍｉｄｅ）－ｉｓｏｌｅｕｃｉｎｅを、

Ｃ末端の「（Ｄｎｐ）Ｋ」は、Ｎ ｅｐｓｉｌｏｎ－（２，４－ｄｉｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌ）－ｌｙｓｉｎｅを、それぞれ意味する。
【図９】ラット光照射網膜障害モデルの硝子体液中でＨＴＲＡ１の発現が亢進したことを示した図。Ｈｕｍａｎ ＨＴＲＡ１／ＰＲＳＳ１１ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＡＦ２９１６）を用いたＷｅｓｔｅｒｎ ｂｌｏｔにより解析した。
【図１０】ラット光照射網膜障害モデルにおいて、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド投与群が網膜断層の外顆粒層に含まれる核数の減少を抑制することを示した図。生理食塩水投与群の例数は４であり、その他の群の例数は５であった。
【図１１】ペプチド基質の分解速度を指標として、５種のＨＴＲＡ１阻害ペプチド誘導体のＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害活性を評価した図。
【図１２】ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）と３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドが結合していることを免疫沈降法により評価した図。
【図１３】ヒトＳＰＩＮＫ２のアミノ酸配列（配列番号１）
【図１４】ヒトＳＰＩＮＫ２のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号２）
【図１５】ペプチドＨ２１８のアミノ酸配列（配列番号３）
【図１６】ペプチドＨ２１８のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号４）
【図１７】ペプチドＨ２２３のアミノ酸配列（配列番号５）
【図１８】ペプチドＨ２２３のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号６）
【図１９】ペプチドＨ２２８のアミノ酸配列（配列番号７）
【図２０】ペプチドＨ２２８のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号８）
【図２１】ペプチドＨ３０８のアミノ酸配列（配列番号９）
【図２２】ペプチドＨ３０８のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号１０）
【図２３】ペプチドＨ３２１のアミノ酸配列（配列番号１１）
【図２４】ペプチドＨ３２１のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号１２）
【図２５】ペプチドＨ３２２のアミノ酸配列（配列番号１３）
【図２６】ペプチドＨ３２２のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号１４）
【図２７】ペプチド誘導体Ｈ３０８ＡＴのアミノ酸配列（配列番号１５）
【図２８】ペプチド誘導体Ｈ３０８ＡＴのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号１６）
【図２９】ペプチド誘導体Ｈ３２１ＡＴのアミノ酸配列（配列番号１７）
【図３０】ペプチド誘導体Ｈ３２１ＡＴのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号１８）
【図３１】ペプチド誘導体Ｈ３２２ＡＴのアミノ酸配列（配列番号１９）
【図３２】ペプチド誘導体Ｈ３２２ＡＴのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号２０）
【図３３】ペプチドＭ７のアミノ酸配列（配列番号２１）
【図３４】ペプチドＭ７のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号２２）
【図３５】ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（配列番号２３）
【図３６】ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（配列番号２４）
【図３７】ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｄ１Ｓ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（配列番号２５）
【図３８】ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｄ１Ｅ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（配列番号２６）
【図３９】ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｄ１ＳＬＩ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（配列番号２７）
【図４０】ペプチド誘導体Ｈ３２１ＡＴ＿Ｄ１Ｓ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（配列番号２８）
【図４１】ペプチド誘導体Ｈ３２２ＡＴ＿Ｄ１Ｓ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（配列番号２９）

【図４２】ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの一般式（配列番号３０）。Ｘ１乃至Ｘ１１は任意のアミノ酸を示す。
【図４３】Ｓ　ｔａｇ及びリンカーからなるアミノ酸配列（配列番号３１）
【図４４】Ｃ末６マーのアミノ酸配列（配列番号３２）
【図４５】プライマー１のヌクレオチド配列（配列番号３３）
【図４６】プライマー２のヌクレオチド配列（配列番号３４）
【図４７】プライマー３のヌクレオチド配列（配列番号３５）
【図４８】プライマー４のヌクレオチド配列（配列番号３６）
【図４９】プライマー５のヌクレオチド配列（配列番号３７）
【図５０】プライマー６のヌクレオチド配列（配列番号３８）
【図５１】プライマー７のヌクレオチド配列（配列番号３９）
【図５２】プライマー８のヌクレオチド配列（配列番号４０）
【図５３】プライマー９のヌクレオチド配列（配列番号４１）
【図５４】プライマー１０のヌクレオチド配列（配列番号４２）
【図５５】プライマー１１のヌクレオチド配列（配列番号４３）
【図５６】プライマー１２のヌクレオチド配列（配列番号４４）
【図５７】プライマー１３のヌクレオチド配列（配列番号４５）
【図５８】プライマー１４のヌクレオチド配列（配列番号４６）
【図５９】プライマー１５のヌクレオチド配列（配列番号４７）
【図６０】プライマー１６のヌクレオチド配列（配列番号４８）
【図６１】プライマー１７のヌクレオチド配列（配列番号４９）
【図６２】プライマー１８のヌクレオチド配列（配列番号５０）
【図６３】プライマー１９のヌクレオチド配列（配列番号５１）
【図６４】プライマー２０のヌクレオチド配列（配列番号５２）
【図６５】ヒトＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）のアミノ酸配列（配列番号５３）
【図６６（Ａ）】ペプチド基質の分解速度を指標として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害活性を評価した図。
【図６６（Ｂ）】ペプチド基質の分解速度を指標として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）阻害活性を評価した図。
【図６７】ヒトＶｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎの分解を指標として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害活性を評価した図。Ｈｕｍａｎ　Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｒ＆ＤＳｙｓｔｅｍｓ；ＭＡＢ２３４９）を用いたＷｅｓｔｅｒｎｂｌｏｔにより解析した。
【図６８（Ａ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その１）。
【図６８（Ｂ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その２）。
【図６８（Ｃ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その３）。
【図６８（Ｄ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その４）。
【図６８（Ｅ）】ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対するＨＴＲＡ１阻害ペプチドの交差性を評価した図（その５）。
【図６９】ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）と３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドが結合していることを免疫沈降法により評価した図。
【図７０（Ａ）】ラット光照射網膜障害モデルにおいて、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ投与群が網膜断層の外顆粒層に含まれる核数の減少を抑制することを示した図。いずれの群の例数も６、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ投与量は０．２および１μｇ／ｅｙｅであった。
【図７０（Ｂ）】ラット光照射網膜障害モデルにおいて、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３２

１ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ投与群が網膜断層の外顆粒層に含まれる核数の減少を抑制することを示した図。いずれの群の例数も６、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３２１ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ投与量は０．２および１μｇ／ｅｙｅであった。
【図７０（Ｃ）】ラット光照射網膜障害モデルにおいて、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３２２ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ投与群が網膜断層の外顆粒層に含まれる核数の減少を抑制することを示した図。いずれの群の例数も６、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３２２ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ投与量は０．２および１μｇ／ｅｙｅであった。
【図７１（Ａ）】１２週齢ウサギ、３歳齢ウサギ、および、ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギにおけるＲＰＥ細胞を、ＺＯ－１抗体（Ｔｈｅｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）を用いて免疫染色した図。
【図７１（Ｂ）】１２週齢ウサギ、３歳齢ウサギ、および、ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギにおけるＲＰＥ細胞の平均面積。
【図７１（Ｃ）】ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギの網膜組織において、ＡＭＤ関連因子である補体第三成分Ｃ３のｍＲＮＡが発現亢進していることを示した図。
【図７１（Ｄ）】ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギのＲＰＥ／脈絡膜組織において、ＡＭＤ関連因子である補体第三成分Ｃ３のｍＲＮＡが発現亢進していることを示した図。
【図７１（Ｅ）】ＬＣ－ＭＳ／ＭＳにより、１２週齢ウサギ、３歳齢ウサギ、および、ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギにおける硝子体液中のＨＴＲＡ１濃度を測定した図。
【図７２（Ａ）】ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギにおいて、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８投与群がＲＰＥ細胞の肥大に対して抑制効果を示した図。いずれの群も例数は５で、平均面積を指標とした。
【図７２（Ｂ）】ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギにおいて、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８投与群がＲＰＥ細胞の肥大に対して抑制効果を示した図。いずれの群も例数は５で、細胞面積が１５００μｍ^{2}以上のＲＰＥ細胞数を指標とした。
【図７３】ヒト／サル／ウサギ／マウス／ラットＨＴＲＡ１の配列類似性を比較した図。破線は酵素活性ドメイン（２０４Ｇｌｙ～３６４Ｌｅｕ）を示す。
【図７４】H_2O_2およびＮｏｒｍａｌ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｕｍ Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ、ＨＴＲＡ１添加により、ヒト網膜色素上皮細胞株ＡＲＰＥ－１９において誘導されたＶＥＧＦ ｍＲＮＡに対して、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドが抑制効果を示した図。
【図７５】血清によって誘導されたヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）の遊走に対して、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドが抑制効果を示した図。
【図７６】プライマー２１のヌクレオチド配列（図６６）
【図７７】プライマー２２のヌクレオチド配列（図６７） 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）」と記載される場合、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。
【発明を実施するための形態】
【０００９】
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からなり、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。
【００１０】
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。
【００１１】

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。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。

【００１２】

「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。

【００１３】

「ＨＴＲＡ１」は、ｈｉｇｈ　ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ　ｒｅｑｕｉｒｅｍｅｎｔ　Ａ　ｓｅｒｉｎｅ　ｐｅｐｔｉｄａｓｅ　１を意味し、ＩＧＦＢＰ様モジュール及びＫａｚａｌ用モジュールから成るＮ末ドメイン、プロテアーゼドメイン並びにＣ末のＰＤＺドメインから構成される、ＨＴＲＡファミリーの属する蛋白質である。好適なＨＴＲＡ１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ＨＴＲＡ１を単に「ＨＴＲＡ１」ということがある。

【００１４】

「ＨＴＲＡ１阻害ペプチド」は、ＨＴＲＡ１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。「ＨＴＲＡ１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、ＨＴＲＡ１阻害活性を維持しているものが含まれる。すなわち、ＨＴＲＡ１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「ＨＴＲＡ１阻害ペプチド」に含まれる。

【００１５】

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。

【００１６】

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。

【００１７】

「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、ＨＴＲＡ１阻害活性を有するものは、ＨＴＲＡ１阻害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。

【００１８】

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。

【００１９】

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×ＳＳＣ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、ならびに、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。

【００２０】

本発明において「特異的」及び「特異性」なる語は「選択的」及び「選択性」とそれぞれ同義であり、互換性がある。例えば、ＨＴＲＡ１特異的な阻害ペプチドは、ＨＴＲＡ１選択的な阻害ペプチドと同義である。

【００２１】

２．ペプチド

【００２２】

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、好適にはタンパク質に、より好適には天然のタンパク質に、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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、好適には天然アミノ酸を含有する。

【００２３】

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。

【００２４】

また、本発明において、アミノ酸は、Ｌ－アミノ酸、Ｄ－アミノ酸、またはその混合物（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。

【００２５】

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

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。

【００２６】

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。

【００２７】

「保存的アミノ酸置換（ｃｏｎｓｅｒｖａｔｉｖｅ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）」とは、機能的に等価また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また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およ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およ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－芳香族相互作用または陽イオン－ｐｉ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、酸性または非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的およ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、しばしば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

【００２８】

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））およ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」または単に「Ａ」と記す）、バリン（以下、「Ｖａｌ」または単に「Ｖ」と記す）、ロイシン（以下、「Ｌｅｕ」または単に「Ｌ」と記す）、イソロイシン（以下、「Ｉｌｅ」または単に「Ｉ」と記す）、プロリン（以下、「Ｐｒｏ」または単に「Ｐ」と記す）、フェニルアラニン（「Ｐｈｅ」または単に「Ｆ」と記す）、トリプトファン（以下、「Ｔｒｐ」または単に「Ｗ」と記す）、メチオニン（以下、「Ｍｅｔ」または単に「Ｍ」と記す）
（２）非荷電極性アミノ酸グループ：グリシン（以下、「Ｇｌｙ」または単に「Ｇ」と記す）、セリン（以下、「Ｓｅｒ」または単に「Ｓ」と記す）、スレオニン（以下、「Ｔｈｒ」または単に「Ｔ」と記す）、システイン（以下、「Ｃｙｓ」または単に「Ｃ」と記す）、チロシン（以下、「Ｔｙｒ」または単に「Ｙ」と記す）、アスパラギン（以下、「Ａｓｎ」または単に「Ｎ」と記す）、グルタミン（以下、「Ｇｌｎ」または単に「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」または単に「Ｄ」と記す）、グルタミン酸（以下、「Ｇｌｕ」または単に「Ｅ」と記す）
（４）塩基性アミノ酸グループ：リジン（以下、「Ｌｙｓ」または単に「Ｋ」と記す）、アルギニン（以下、「Ａｒｇ」または単に「Ｒ」と記す）、ヒスチジン（以下、「Ｈｉｓ」または単に「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挙げることができ、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、アミノフォスフォ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挙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。

【００２９】

２－２．ＨＴＲＡ１阻害ペプチド

本発明のＨＲＴＡ１阻害ペプチドは、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、ＨＴＲＡ１又はその酵素活性が保持された断片（以下、「機能断片」という）の有するプロテアーゼ活性を阻害又は抑制する（以下、かかる阻害又は抑制をまとめて「ＨＴＲＡ１阻害活性」という）。

【００３０】

本発明の阻害ペプチドの標的であるＨＴＲＡ１は、好適には哺乳類の、より好適には霊長類の、より一層好適にはヒトのＨＴＲＡ１であり、全長成熟ヒトＨＴＲＡ１（以下、「ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）」という）のアミノ酸配列は配列番号５３（図６５）で示されるアミノ酸配列を有する。当該アミノ酸配列は、２３番乃至４８０番からなり、１番乃至２２番からなるシグナル配列を含まない。ヒトＨＴＲＡ１の機能断片（以下、「ＨＴＲＡ１（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５３（図６５）の１５８番Ｇｌｙ～３７３番Ｌｙｓからなるもの、１５８番Ｇｌｙ～３７３番Ｌｙｓを含むもの等を例示することができる。本発明の阻害ペプチドの標的であるＨＴＲＡ１及びその機能断片は、ＨＴＲＡ１プロテアーゼとも

表記され、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し、それらの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。ＨＴＲＡ１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。

【００３１】

ＨＴＲＡ１阻害活性は、ＨＴＲＡ１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、ＨＴＲＡ１又はその機能断片、基質及び本発明の阻害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、ＨＴＲＡ１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、ＨＴＲＡ１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。ＨＴＲＡ１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ＨＴＲＡ１に基質ペプチドまたは基質タンパク質を添加し、一定時間反応させた後、基質ペプチドの蛍光を検出する、または基質タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥやＷｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔ法、液体クロマトグラフィーなど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・セイライン(ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｂｕｆｆｅｒ　ｓａｌｉｎｅ：以下「ＰＢＳ」という)、ホウ酸バッファー（５０ｍＭ　ホウ酸，ｐＨ７乃至９、例えばｐＨ８．５）、トリスバッファー（５０ｍＭ　トリス，ｐＨ６乃至９、例えばｐＨ８．０）などを用いることができ、ＮａＣｌ（５０乃至３００ｍＭ、例えば１５０ｍＭ）やＣＨＡＰＳやＯｃｔｙｌ　β－Ｄ－ｇｌｕｃｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅなどの界面活性剤を添加することもできるが、それらに限定されない。

【００３２】

ＨＴＲＡ１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、ビトロネクチン等を例示することができる。合成基質としては、特に限定されないが、Ｈ２－Ｏｐｔ（Ｍｃａ－ＩＲＲＶＳＹＳＦＫ（Ｄｎｐ）Ｋ）やβ－Ｃａｓｅｉｎ、他のＨＴＲＡ１基質等を例示することができる。本発明のペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性（ＩＣ５０又はＫｉ）は、１μＭ以下、好適には１００ｎＭ以下である。

【００３３】

また、本発明の阻害ペプチドは、ＨＴＲＡ１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、本発明の阻害ペプチドは、好適には、ＨＴＲＡ１特異性が高い。好適な本発明の阻害ペプチドは、トリプシン、α－キモトリプシン、トリプターゼ、プラスミン、トロンビン、マトリプターゼ、プロテインＣ、組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）、ウロキナーゼ（ｕＰＡ）、プラスミン、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、ＨＴＲＡ１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。

前述の通り、本発明のペプチドの標的であるＨＴＲＡ１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、カニクイザル、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ＨＴＲＡ１に対して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ＨＴＲＡ１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、そのようなペプチドが、ヒトＨＴＲＡ１も阻害する場合、ヒトＨＴＲＡ１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。
【００３４】
また、本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、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、組織への浸透性、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ＨＴＲＡ１阻害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２３（図２９）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、ＨＴＲＡ１阻害活性を有するものも、本発明ＨＴＲＡ１阻害ペプチドにそれぞれ包含され、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。
【００３５】
さらに、本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドの範囲に含まれる、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）は、ＨＴＲＡ１に結合してもよく、好適には哺乳類の、より好適には霊長類の、より一層好適にはヒトのＨＴＲＡ１に結合し得る。そのようなＨＴＲＡ１に結合するペプチドは、ＨＴＲＡ１の部分ペプチド、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「標的結合活性」という）。
また、ある態様における本発明の阻害ペプチドは、ＨＴＲＡ１の免疫原性断片に結合し得る。ＨＴＲＡ１の免疫原性断片は、１つ又は２つ以上のエピトープ、ミモトープ又はその他の抗原決定基を有するので、免疫応答を誘発し得るか又は当該断片に対する抗体が産生され得る。
本発明におけるＳＰＩＮＫ２変異体とＨＴＲＡ１又はその免疫原性断片の結合は、検出可能な結合親和性の測定（ＥＬＩＳＡ法、表面プラズモン共鳴（Ｓｕｒｆａｃｅ Ｐｌａｓｍｏｎ Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ ：以下、「ＳＰＲ」という）解析法（「ＢＩＡｃｏｒｅ」法ともいう）、等温滴定熱量測定（Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ Ｔｉｔｒａｔｉｏｎ Ｃａｌｏｒｉｍｅｔｒｙ：以下「ＩＴＣ」という）法、フローサイトメトリー、免疫沈降法等）等により、当業者に公知の方法を用いて、評価、測定又は判定することができる。
【００３６】
ＥＬＩＳＡ法としては、プレート上に固相化されたＨＴＲＡ１を認識して結合したＨＴＲＡ１阻害ペプチドを検出する方法が挙げられる。ＨＴＲＡ１の固相化には、ビオチン－ストレプトアビジンの他、ＨＴＲＡ１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。ＨＴＲＡ１阻害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、ＨＴＲＡ１阻害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。

【００３７】

ＳＰＲ解析に用いる機器としては、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、ＰｒｏｔｅＯｎ（商標）（ＢｉｏＲａｄ）、ＳＰＲ－Ｎａｖｉ（商標）（ＢｉｏＮａｖｉｓＯｙ）、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。

【００３８】

免疫沈降法としては、ビーズ上に固相化されたＨＴＲＡ１阻害ペプチドによって認識され、結合したＨＴＲＡ１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。ＨＴＲＡ１阻害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、該ペプチド又は該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ＨＴＲＡ１をＳＤＳ－ＰＡＧＥやＷｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔ法で検出する。ＨＴＲＡ１の検出には、標識されたストレプトアビジンの他、ＨＴＲＡ１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。

【００３９】

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EC_{50}をあげることができる。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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１に対するK_D値は1×10^{-4}Ｍ以下、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。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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドをビーズに固相化し、それぞれＨＴＲＡ１を添加した後にビーズを分離し、ビーズと共に沈殿したＨＴＲＡ１を検出した場合、ＨＴＲＡ１のシグナルが検出される。

前述の記載にもかかわらず、ＨＴＲＡ１阻害活性を有する限りにおいて、ＨＴＲＡ１又はその免疫原性断片への結合能は本発明の阻害ペプチドとしてのＳＰＩＮＫ２変異体にとって必須ではない。

【００４０】

本発明の阻害ペプチドは、ＨＴＲＡ１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。

【００４１】

また、好適ないくつかの態様において、本発明の阻害ペプチドは、網膜保護効果を有する。例えば、実施例において詳述される光照射網膜障害モデルにおいて、本発明の好適な阻害剤は、外顆粒層に含まれる核の数の光照射による減少を、抑制することができる。当該モデルにおいては、非照射の群と比較して、光照射した群の硝子体液中により多量のＨＴＲＡ１蛋白質が検出されており、網膜障害にＨＴＲＡ１が関与すること、ＨＴＲＡ１阻害活性が網膜保護効果をもたらすことを、本発明は開示している。

【００４２】

本発明の阻害ペプチドとしてのＳＰＩＮＫ２変異体は、上記のような活性、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１３）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。

【００４３】

「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。

【００４４】

「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。

【００４５】

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。

【００４６】

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。

【００４７】

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１３）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；

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；

３９番Ａｌａ及び４３番Ｔｈｒのうち１つ又は２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いても、野生型であっても、１６番～３０番等のアミノ酸残基から構成されるループ主鎖３次構造が、ＨＴＲＡ１阻害活性を少なくとも部分的に発揮し得る限りにおいて、いずれでもよく（当該２アミノ酸又はアミノ酸残基はαヘリックスに含まれる）；

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ＨＴＲＡ１阻害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。かかる阻害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。

【００４８】

そのようなＳＰＩＮＫ２変異体の有するアミノ酸配列がＨＴＲＡ１阻害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、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、ＨＴＲＡ１阻害活性を発揮し得る程度に、維持されていることが好ましい。

【００４９】

本発明のＳＰＩＮＫ２変異体のうち、一部のＨＴＲＡ１阻害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。

【００５０】

配列番号３０（図４２）で示されるアミノ酸配列において、１番目乃至１１番目のＸａａ（それぞれＸ１乃至Ｘ１１に同じ）は、ＨＴＲＡ１に結合し且つＨＴＲＡ１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、Ｘ１乃至Ｘ１１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。

【００５１】

１番Ｘ１は、好適にはＡｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ又はＩｌｅ、より好適にはＡｓｐ又はＧｌｙ、より一層好適にはＧｌｙであり；

１６番Ｘ２は、好適にはＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ又はＴｙｒ、より好適にはＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ又はＴｈｒ、より一層好適にはＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｌｙｓ、Ｌｅｕ、Ｓｅｒ又はＴｈｒ、さらにより一層好適にはＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｌｅｕ、Ｓｅｒ又はＴｈｒ、その上さらにより一層好適にはＡｌａ又はＳｅｒであり；

１７番Ｘ３は、好適には、Ａｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ又はＴｙｒ、より好適にはＡｓｐ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ又はＴｙｒ、より一層好適にはＡｓｐ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ又はＧｌｎ、さらにより一層好適にはＡｓｐ又はＧｌｎであり；

１８番Ｘ４は、好適にはＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｇｌｙ，Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｖａｌ、Ｔｒｐ又はＴｙｒ、より好適にはＡｓｐ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ又はＴｙｒ、より一層好適にはＡｓｐ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｓｅｒ又はＴｙｒ、さらにより一層好適にはＰｈｅ又はＨｉｓであり；

１９番Ｘ５は、好適にはＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｖａｌ又はＴｙｒ、より好適にはＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ又はＶａｌ、より一層好適にはＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｍｅｔ又はＡｓｎ、さらにより一層好適にはＡｌａ、Ａｓｐ又はＧｌｕであり；

２１番Ｘ６は、好適にはＡｌａ、Ｇｌｕ，Ｐｈｅ、Ｇｌｙ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ，Ｔｒｐ又はＴｙｒ、より好適にはＧｌｕ，Ｐｈｅ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ又はＴｒｐ、より一層好適にはＭｅｔ又はＴｒｐ、さらにより一層好適にはＭｅｔであり；

２４番Ｘ７は、好適にはＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｌ

ｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ，Ｖａｌ、Ｔｒｐ又はＴｙｒ、より好適にはＡｓｐ、Ｇｌｕ、Ｈｉｓ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｖａｌ、Ｔｒｐ又はＴｙｒ、より一層好適にはＧｌｎ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ又はＶａｌ、さらにより一層好適にはＴｙｒ又はＶａｌであり；
２６番Ｘ８は、好適にはＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｙｓ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｖａｌ又はＴｙｒであり、より好適にはＡｌａ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｖａｌ又はＴｙｒであり、より一層好適にはＰｈｅ、Ｌｅｕ又はＴｙｒであり、さらにより一層好適にはＰｈｅ又はＬｅｕであり；
２７番Ｘ９は、好適にはＧｌｕ、Ｐｈｅ、Ｌｅｕ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ又はＴｙｒであり、より好適にはＰｈｅ、Ｌｅｕ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ又はＴｙｒであり、より一層好適にはＰｈｅ又はＴｙｒ、さらにより一層好適にはＴｙｒであり；
３９番Ｘ１０は、好適にはＡｌａ、Ｇｌｕ、Ｍｅｔ又はＶａｌ、より好適にはＡｌａ又はＧｌｕであり；
４３番Ｘ１１は、好適にはＡｌａ、Ｔｈｒ又はＶａｌ、より好適にはＴｈｒまたはＶａｌである。

【００５２】

なお、野生型のＸ１乃至Ｘ１１は、それぞれＡｓｐ、Ｓｅｒ、Ｇｌｎ、Ｔｙｒ、Ａｒｇ、Ｐｒｏ、Ｐｒｏ、Ｈｉｓ、Ｐｈｅ、Ａｌａ及びＴｈｒである。また、２０番はＬｅｕ、２２番はＧｌｙ、２５番はＡｒｇ、２８番はＡｓｎである。

【００５３】

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、Ｓｅｒ－Ｌｅｕ、Ｓ　ｔａｇ及びリンカーからなるアミノ酸配列（配列番号３１：図４３）等をあげることができる。

【００５４】

さらに、Ｃ末に位置する６３番Ｃｙｓに１乃至数個のアミノ酸が付加していてもよく、例えば、Ｃ末が６４番Ｇｌｙであるアミノ酸配列、Ｇｌｙ－Ｇｌｙを加えＣ末が６５番Ｇｌｙ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、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ｃ末６マー（配列番号３２：図４４）等をあげることができる。

【００５５】

配列番号３０（図４２）で示されるアミノ酸配列又は配列番号３０から派生したアミノ酸配列のＮ末及び/又はＣ末に他のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列として、配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１及び２３乃至２９（図１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３及び３５乃至４１）並びに配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０及び２２（図１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２及び３４）のいずれか一つにより示されるヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列はより好適な態様に、配列番号２４、２８及び２９（図３６、４０及び４１）はより一層好適な態様にそれぞれ含まれる。

【００５６】

本発明においては、ＳＰＩＮＫ２変異体ペプチド又はＳＰＩＮＫ２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（例えば、実施例６）。かかる「誘導体」も本発明の「ペプチド」の範囲に含まれる。

【００５７】

本発明の阻害ペプチドの範囲に含まれるＳＰＩＮＫ２変異体の有するアミノ酸配列においては、Ｘ１乃至Ｘ１１以外の部分、すなわち、野生型ヒトＳＰＩＮＫ２のアミノ酸配列（配列番号１：図１３）中の、２番Ｐｒｏ～１５番Ｃｙｓ、２０番Ｐｒｏ、２２番Ｇｌｙ、

２３番Ｃｙｓ、２５番Ａｒｇ、２８番Ａｓｎ～３８番Ｔｙｒ、４１Ｇｌｕ、４２番Ｃｙｓ及び４４番Ｔｈｒ～６３番Ｃｙｓ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、ＳＰＩＮＫ２変異体は、ＨＴＲＡ１阻害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Ｘ１１以外の部分は、ＨＴＲＡ１阻害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。

【００５８】

本発明の阻害ペプチドとしてのＳＰＩＮＫ２変異体の有するアミノ酸配列は、Ｘ１乃至Ｘ１１が、好適には配列番号配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１及び２３乃至２９（図１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３及び３５乃至４１）の、より好適には配列番号２４、２８及び２９（図３６、４０及び乃至４１）のいずれか一つにおけるＸ１乃至Ｘ１１の各アミノ酸であり、且つ、Ｘ１乃至Ｘ１１以外の部分がＨＴＲＡ１阻害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。

また、本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドとしてのＳＰＩＮＫ２変異体のアミノ酸配列の例として、次の（ａ）乃至（ｅ）のいずれか一つに記載のアミノ酸配列をそれぞれあげることができる：

（ａ）配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３乃至２９（図１５、１７、１９、２１、２３、２５、２５、２９、３１、３３、３５乃至４１）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ＨＴＲＡ１阻害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、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ＨＴＲＡ１阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；

（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ＨＴＲＡ１阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；及び、

（ｅ）配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０及び２２（図１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２及び３４）のいずれか一つで示されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列。

【００５９】

しかしながら、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドをコードする核酸分子は（ａ）乃至（ｅ）に限定されるものではなく、ＨＴＲＡ１阻害活性を有するＳＰＩＮＫ２変異体に含まれるアミノ酸配列、好適には配列番号３０（図４２）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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドをコードする核酸分子の範囲に包含される。

【００６０】

本発明の阻害ペプチドに、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プン（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。本発明において、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは他の部分に付加、連結又は結合していてもよく、そのようなコンジュゲート体を「ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのコンジュゲート」と総称する。本発明において「コンジュゲート」とは、本発明のペプチド又はその断片に他の部分が付加、連結又は結合してなる分子を意味する。「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末に合成化学的手法や、遺伝子工学的手法等により、本発明のペプチドに連結又は結合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プン、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タンパク質、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」はペプチドリンカー等のリンカーを介して本発明のペプチドが連結され得る。

【００６１】

また、本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドには、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る。

【００６２】

本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、ＨＴＲＡ１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、ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　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。

【００６３】

本発明の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、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。

【００６４】

また、本発明のペプチドに予めタグを付加させることにより、アフィ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、Ｓｔｒｅｐタグ（商標）、Ｓｔｒｅｐ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、マルトース結合タンパク質、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「アフィニティー・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。本発明のコンジュゲートは、全体としてペプチド（ポリペプチド）であってもよい。

【００６５】
本発明のペプチドは、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。
【００６６】
本発明の阻害ペプチドは、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。
【００６７】
本発明の阻害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。
【００６８】
本発明の阻害ペプチドは、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ＨＴＲＡ１阻害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阻害ペプチドに導入することにより、なし得る。
【００６９】
本発明の阻害ペプチドは、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。
【００７０】
本発明の阻害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。
【００７１】
３．ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの同定
ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、ＳＰＩＮＫ２のアミノ酸配列又は本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドの有するアミノ酸配列（例えば、配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１及び２３乃至２９からなる群、又は、図１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３及び３５乃至４１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ＳＰＩＮＫ２変異体ライブラリーより、ＨＴＲＡ１阻害活性を指標として同定することができ、ＨＴＲＡ１結合活性も指標として組み合わせてもよい。
【００７２】
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。ＳＰＩＮＫ２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、ＷＯ２０１２／１０５６１６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ＳＰＩＮＫ２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．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ＨＴＲＡ１阻害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。

【００７３】

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か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３０（図４２）で示されるアミノ酸配列中の、Ｘ１乃至Ｘ１１の１つ又は２つ以上の位置において生じ得る。

【００７４】

但し、そのような好適な変異の誘発の後に、Ｘ１乃至Ｘ１１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、Ｘ１乃至Ｘ１１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。

【００７５】

「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。

【００７６】

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ＮＭＳ（Ｍ＝アデニン又はシトシン）を使用すれば、Ａｒｇ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｉｌｅ

、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ及びＶａｌ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。

【００７７】

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ＨＴＲＡ１及び／又は標的に対するＳＰＩＮＫ２変異体もしくは野生型ＳＰＩＮＫ２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、ＨＴＲＡ１阻害活性を有するＳＰＩＮＫ２変異体を同定し、次いでＨＴＲＡ１及び当該ＳＰＩＮＫ２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ＳＰＩＮＫ２変異体が結合するＨＴＲＡ１分子上の部位及び該部位との相互作用に関わる該ＳＰＩＮＫ２変異体中のアミノ酸残基を特定すること等を通じて得られる構造情報と、ＨＴＲＡ１阻害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ＨＴＲＡ１活性を確認することができる。

【００７８】

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。

【００７９】

さらに、例えば、Ｔａｑ　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・プローンＰＣＲ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。

【００８０】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、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。

【００８１】

細菌ディスプレイは、例えば、大腸菌の外膜リポ蛋白質（Ｌｐｐ）の一部および外膜蛋白質ＯｍｐＡ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（Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｊ．Ａ．，ｅｔａｌ．（１９９３年）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　Ｕ．Ｓ．Ａ．　９０巻，１０４４４－１０４４８頁）。

【００８２】

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（ＧＰＩ）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）。

【００８３】

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）細胞など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（Ｈｏ　Ｍ，ｅｔ　ａｌ．（２００９年）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．５２５巻：３３７－５２頁）。

【００８４】

酵母、細菌、動物細胞など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ＨＴＲＡ１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ＨＴＲＡ１）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、または、抗ＨＴＲＡ１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ＨＴＲＡ１）またはＨＴＲＡ１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、ブロッキングする（ｓａｔｕｒａｔｅ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。

【００８５】

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また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タンパク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。

【００８６】

被検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、該細菌上また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、または、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。

【００８７】
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タンパク質遺伝子ｇｐＩＩＩ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、Ｍ１３また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、該ペプチドおよ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。
【００８８】
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、または該細胞の培養上清中に産生することができる。
【００８９】
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、ＨＴＲＡ１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ＨＴＲＡ１）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、ＨＴＲＡ１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。
【００９０】
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。
【００９１】
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ｍＲＮＡ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ｍＲＮＡ、およ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ｍＲＮＡ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（Ｍａｔｔｈｅａｋｉｓ ＬＣ，ｅｔａｌ．（１９９４年）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９１巻１９号，９０２２－９０２９頁）。
【００９２】
核酸ディスプレイは、ｍＲＮＡディスプレイともよばれ、例えば、チロシルｔＲＮＡの３’末端に類似の構造をもつピューロマイシンなど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ｍＲＮＡおよ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ｍＲＮＡ群とピューロマイシン等のリンカー、および、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（Ｎｅｍｏｔｏ Ｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９７年）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４１４巻２号，４０５－４０８頁）。
【００９３】

リボゾームディスプレイや核酸ディスプレイなど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、ＨＴＲＡ１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ＨＴＲＡ１）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、ＨＴＲＡ１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。

【００９４】

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。

【００９５】

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。

【００９６】

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、ＨＴＲＡ１阻害活性）、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。

【００９７】

得られたペプチドが、ＨＴＲＡ１阻害活性を有しているか否かを決定することにより、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドを同定することができる。

【００９８】

また、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、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、ＨＴＲＡ１阻害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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドを同定することも可能である。

【００９９】

４．ＨＴＲＡ１阻害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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの製造方法

本発明は、ＨＴＲＡ１阻害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、「ＨＴＲＡ１阻害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、「ＨＴＲＡ１阻害ペプチドをコードする核酸分子含有細胞」という）、又はＨＴＲＡ１阻害ペプチドを産生する細胞（以下、「ＨＴＲＡ１阻害ペプチド産生細胞」と

いう）をも提供する。
【０１００】
本発明のＨＴＲＡ１阻害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（ｅ）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列（以下、「ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのヌクレオチド配列」という）を含んでなるか、抗体遺伝子配列を含むヌクレオチド配列からなるか、または抗体遺伝子配列からなるものをあげることができる：
（ａ）配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３乃至２９（図１５、１７、１９、２１、２３、２５、２５、２９、３１、３３、３５乃至４１）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）配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０及び２２（図１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２及び３４）のいずれか一つで示されるヌクレオチド配列；
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）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ＨＴＲＡ１阻害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；
（ｄ）（ａ）又は（ｂ）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、または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ＨＴＲＡ１阻害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；および、
（ｅ）（ａ）又は（ｂ）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ＨＴＲＡ１阻害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。
【０１０１】
しかしながら、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドをコードする核酸分子は（ａ）乃至（ｅ）に限定されるものではなく、ＨＴＲＡ１阻害活性を有するＳＰＩＮＫ２変異体に含まれるアミノ酸配列、好適には配列番号３０（図４２）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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドをコードする核酸分子の範囲に包含される。
【０１０２】
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を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。
【０１０３】
ＨＴＲＡ１阻害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などに関

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充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。

【０１０４】

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。

【０１０５】

ＨＴＲＡ１阻害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ビヒクル（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、ＨＴＲＡ１阻害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。

【０１０６】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドをコードする核酸分子、ＨＴＲＡ１阻害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、当該ペプチド又ヌクレオチド配列の発現に適した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・セレヴィシエ、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。

【０１０７】

本発明はＨＴＲＡ１阻害ペプチドの製造方法をも含む。当該方法には、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドをコードする核酸分子もしくはＨＴＲＡ１阻害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ＨＴＲＡ１阻害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ＨＴＲＡ１阻害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精製が適用可能である。

【０１０８】

本発明の一部の態様において、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、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・ビ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、ＨＴＲＡ１阻害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。

【０１０９】

本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、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－Ｂｕｔｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌ：Ｂｏｃ）や９－フルオレニルメトキシカルボニル（９－Ｆｌｕｏｒｅｎｙｌｍｅｔｈｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌ：Ｆｍｏｃ）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・ビトロ翻訳等の、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。

【０１１０】

本発明は、その一部の態様として、ＨＴＲＡ１阻害活性を有するＳＰＩＮＫ２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ＳＰＩＮＫ２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ＳＰＩＮＫ２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。

【０１１１】

５．医薬組成物

本発明はＨＴＲＡ１阻害ペプチド、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。

【０１１２】

本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲート医薬組成物は、ＨＴＲＡ１により惹起されるか又は増悪化され、ＨＴＲＡ１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、「ＨＴＲＡ１に関わる疾患」又は「ＨＴＲＡ１関連疾患」という）の治療及び／又は予防に有用である。ＨＴＲＡ１に関わる疾患には、網膜保護効果により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も包含される。ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは網膜保護効果を有し、ＨＴＲＡ１に関わる疾患の治療及び／又は予防に有用である。

【０１１３】

ＨＴＲＡ１に関わる疾患としては、例えば、加齢黄斑変性症、未熟児網膜症、ポリープ状脈絡膜血管症、関節リウマチ、又は変形性関節症等をあげることができ、加齢黄斑変性症としては、滲出型加齢黄斑変性症、萎縮型加齢黄斑変性症、地図状萎縮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。また、本発明の医薬組成物は、視細胞保護剤、網膜保護剤等（まとめて「網膜保護剤」という）としても使用され得る。

加齢性黄斑変性症は、滲出型および萎縮型に分かれる。滲出型は、さらに典型加齢性黄斑変性症（典型ＡＭＤ）、ポリープ状脈絡膜血管症（ＰＣＶ）、網膜血管腫状増殖（ＲＡＰ）に分類される。滲出型に対しては、抗ＶＥＧＦ薬や光線力学療法（ＰＤＴ）等の治療法が存在するが必ずしも十分ではなく、萎縮型に対しては、食生活の改善やＡｇｅ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｅｙｅ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｓｔｕｄｙ （ＡＲＥＤＳ）に基づくサプリメント摂取が行われているに過ぎない。

本発明の医薬組成物が、加齢黄斑変性症の治療又は予防に使用し得ることは、例えば、ラット光照射網膜障害モデルにおいて、光照射前又は後に、それぞれ本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドを投与することにより、対照群では外顆粒層に含まれる核の数が減少するのに対し、投与群では外顆粒層に含まれる核の数の減少を抑制したことから（実施例５、１０及び１４）、あるいは高脂肪食及びハイドロキノンの摂食により作製されるウサギ網膜障害モデル（後述）において、本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドを投与することにより、対照群では網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ細胞）の面積又は一定以上の細胞面積を持つＲＰＥ細胞数が増加するのに対し、投与群ではかかる増加が抑制されること（実施例１１）から示

される。ウサギ網膜障害モデルは、ヒト萎縮型加齢黄斑変性症のリスク因子を加味していることから、とりわけ萎縮型加齢黄斑変性症のモデルとして優れている。
網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ）細胞を用いたＶＥＧＦ ｍＲＮＡ誘導試験において、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドを投与すると、ＶＥＧＦ ｍＲＮＡの発現抑制が認められた（実施例１２）。網膜色素上皮細胞からのＶＥＧＦ誘導は滲出型加齢性黄斑変性病態形成に関与していることに加え（Ｋｌｅｔｔｎｅｒ Ａ．ｅｔ ａｌ．，（２００９） Ｇｒａｅｆｅｓ Ａｒｃｈ Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．２４７巻：１４８７－１４９２頁）、病態の維持にもそれらの病的なＶＥＧＦ誘導が関与していると考えられており、本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、萎縮型加齢性黄斑変性症ならびに滲出型加齢性黄斑変性症の治療及び予防に対して有用であることが示される。
ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）の遊走試験において、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドを投与すると、遊走の抑制が認められたことから（実施例１３）、血管新生を特徴とする滲出型加齢黄斑変性症の治療及び予防に有用であることが示される。
滲出型加齢性黄斑変性症は進行性である。また抗ＶＥＧＦ薬の投与により病状を一時的に抑えることができるものの、高頻度に再発を繰り返すことが問題となっている（ＹａｎｄＳ他、Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ Ｄｅｖｅｌ Ｔｈｅｒ．、２巻１０号：１８５７－６７頁、２０１６年刊）。また、近年では滲出型加齢性黄斑変性症患者に新たに萎縮を発症し視力低下を引き起こすことが問題となっている（Ｂｅｒｇ Ｋ他、Ａｃｔａ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｉｃａ、９５巻８号：７９６－８０２頁、２０１７年刊）。本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドの投与は、単独又は抗ＶＥＧＦ薬と併用することにより、これら滲出型加齢性黄斑変性症（ポリープ状脈絡膜血管症、網膜内血管腫状増殖を含む）に対する治療効果を奏し得る。加えて、該ペプチドを予防的に投与することにより、病状の再発を阻止するか又は遅らせ、抗ＶＥＧＦ薬による治療の開始又は再開を遅らせること等が可能である。さらに、滲出加齢性黄斑変性症患者における萎縮の形成に対しても該ペプチドは抑制的に働くことから、長期的な視力上のベネフィットをもたらし得る。
本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、組織への浸透性に優れ（実施例１１）、物性・安定性、安全性、投与後の動態、生産性等にも優れており、医薬組成物に有効成分として好適に含有せしめることができる。

【０１１４】

本発明の医薬組成物には、治療または予防に有効な量のＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲート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。

【０１１５】

「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態および投与径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。

【０１１６】

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本発明のペプチド、その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。

【０１１７】

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、チメロサール、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。

【０１１８】

これらの製剤用の物質の添加量は、ＨＴＲＡ１阻害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。

【０１１９】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートをリポソーム中に含有せしめたもの、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートとリポ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、本発明の医薬組成物に含まれる。

【０１２０】

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。

【０１２１】

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。

【０１２２】

本発明の医薬組成物は、固体、液体、懸濁液等である。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。

【０１２３】

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。

【０１２４】

かかる医薬組成物の組成は、投与方法、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１結合親和性等に応じて決定することができる。本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチドの標的であるＨＴＲＡ１に対する阻害活性が強い（ＩＣ５０値が小さい）か又はＨＴＲＡ１蛋白質に対する親和性が高いほど（ＫＤ値が低い）ほど、少ない投与量でその薬効を発揮し得る。

【０１２５】

本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートの投与量は、薬理学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ＨＴＲＡ１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。

【０１２６】

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、経鼻型吸収製剤、経皮型吸収製剤、舌下剤、カプセル、錠剤、軟膏剤、顆粒剤、エアーゾル剤、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。
【０１２７】
ＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲート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ＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲート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、または、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、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートと他の医薬とは、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。
【０１２８】
本発明の医薬組成物と組み合わせて使用される他の医薬としては、例えば、抗ＶＥＧＦ剤、抗炎症剤、炎症性サイトカイン中和剤、補体活性化経路抑制剤等をあげることができる。抗ＶＥＧＦ剤は、抗ＶＥＧＦ抗体、ＶＥＧＦ阻害剤、ＶＥＧＦ受容体アンタゴニスト及び可溶型ＶＥＧＦ受容体等に分類され、ベバシズマブ、ラニビズマブ、アフリベルセプト、ペガプタニブ、ブロルシツマブ（ｂｒｏｌｕｃｉｔｕｍａｂ）等が含まれる。抗炎症剤としては、眼内又は関節内炎症を抑制するために局所投与され得るものであれば特に限定されない。炎症性サイトカイン中和剤には、抗ＴＮＦα抗体、抗インターロイキン－６（以下、「ＩＬ－６」という）抗体、抗ＩＬ－６受容体抗体、可溶型ＴＮＦ受容体等があり、具体的にはインフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ、トシリズマブ、エタネルセプト等をあげることができる。補体活性化経路抑制剤としては、ランパリズマブ等をあげることができる。それらはＨＴＲＡ１に関わる疾患の治療又は予防のために好適であるが、ＨＴＲＡ１に関わる疾患以外の疾患の治療又は予防においても本発明の医薬組成物と組み合わせることができる。
【０１２９】
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、本発明の抗体、その結合断片若しくはその修飾体に加えて他の医薬を含むか又は他の療法と組み合わせて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。
【０１３０】
本発明は、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートを投与する工程を含む、加齢黄斑変性症等ＨＴＲＡ１に関わる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ＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートの使用、該疾患の治療又は予防のためのＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートの使用、をも提供する。本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートを含む治療用又は予防用キットも本発明に含まれる。
【０１３１】
さらに、本発明は、ＨＴＲＡ１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ＨＴＲＡ１阻害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ＨＴＲＡ１に関わる疾患の遺伝子治療に、かかる細胞はＨＴＲＡ１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、細胞治療薬調製用の組成物としても、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。
【０１３２】
６．診断用組成物及びＨＴＲＡ１の検出及び分離方法

本発明のＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートは、ＨＴＲＡ１プロテアーゼ阻害活性に加え、ＨＴＲＡ１結合活性を有していてもよく、ＨＴＲＡ１阻害剤探索研究のポジティブコントロールとしての使用等の様々な研究、ＨＴＲＡ１の検出、該検出を利用した検査及び診断、ＨＴＲＡ１の分離、試薬及びその他の用途で使用され得る。ＨＴＲＡ１の検出や分離の際には、本発明のペプチド及びＨＴＲＡ１のうち少なくとも一方が固相化され得る。

本発明は、ＨＴＲＡ１に結合する本発明の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。

本発明の診断用組成物は、ＨＴＲＡ１に関わる疾患、ＨＴＲＡ１発現等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、罹患リスクの判定又は測定、罹患の有無の判定、進行や増悪化の程度の測定、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド又はそのコンジュゲートを含む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。

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。

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、凝集防止剤等を含有せしめることができる。

本発明はＨＴＲＡ１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、ＨＴＲＡ１に結合する本発明のペプチド又はそのコンジュゲートの使用、をも提供する。かかる本発明のペプチド又はそのコンジュゲートを含む検査又は診断用キットも本発明に含まれる。

ＨＴＲＡ１に結合する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法、ドットブロット法、オクタロニー法、ＣＩＥ法、ＣＬＩＡ、フローサイトメトリー等の検出方法が利用可能である。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。

また、本発明は被検サンプル中のＨＴＲＡ１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。ＨＴＲＡ１阻害ペプチド、又は、そのコンジュゲートを被検試料と接触させ（工程１）、次いで該ペプチドに結合したＨＴＲＡ１の量又は測定を測定する（工程２）ことにより、該試料中のＨＴＲＡ１を検出することができる。工程１としては、例えば、ＨＴＲＡ１阻害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、そこに被検試料を添加する等、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、ＨＴＲＡ１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。生物個体由来の被検試料としては、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。

前記のＨＴＲＡ１の検出は、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ＨＴＲＡ１阻害ペプチド、又は、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、ＨＴＲＡ１の存在を判定又は検査する等をあげることができる。

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ＨＴＲＡ１に結合し、好適にはＨＴＲＡ１特異的結合活性を有する。

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ＨＴＲＡ１を本発明のＨＴＲＡ１結合ペプチドを用いて測定し、該サンプル中に、ＨＴＲＡ１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ＨＴＲＡ１の量と比較してより多くのＨＴＲＡ１が検出された場合に、該個体を陽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。
また、かかる同定方法の好適な一態様において、該個体はＨＴＲＡ１関連疾患に罹患しているか又はそのリスクがある。
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。
【０１３３】
ＨＴＲＡ１に特異的な結合活性を有する本発明のペプチド又はそのコンジュゲートを用いて、ＨＴＲＡ１と他の成分が混在した試料中から、ＨＴＲＡ１を特異的に分離することができる。ペプチドからのＨＴＲＡ１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、ＨＴＲＡ１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。
【０１３４】
７．ＨＴＲＡ１に関わる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、ＨＴＲＡ１阻害活性を指標として、ＨＴＲＡ１に関わる疾患、好適には加齢黄斑変性症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、ＨＴＲＡ１プロテアーゼ及び基質を、被検物質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１、被検物質の存在下及び非存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性を決定する工程２、及び／又は、被検物質の存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性が、検物質の非存在下でのＨＴＲＡ１プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該被検物質を加齢黄斑変性症の治療薬もしくは予防薬、又はその候補と判定する工程３、を含み得る。被検物質は、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、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、ＨＴＲＡ１基質アナローグ等を例示することができ、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。また、上記の１つ又は２つ以上の工程は、網膜保護効果を有する物質又はその候補の同定方法にも、好適に含まれ得る。本発明は網膜保護効果を有する物質又はその候補の同定方法にも関する。
【０１３５】
８．ウサギ網膜障害モデル
本発明は、ハイドロキノン（Ｈｙｄｒｉｇｕｉｎｏｎｅ：以下「ＨＱ」という）を含有する高脂肪食（Ｈｇｉｈ　Ｆａｔ　Ｄｉｅｔ：以下「ＨＦＤ」という）負荷によるウサギ網膜障害モデル、その作製方法、当該モデルを用いた試験方法等も提供する。
【０１３６】
本モデルには、２歳以上の白色種のウサギであれば、雌雄を別なく、ＮＺＷ、ＪＷ等任意のものを使用することができる。
【０１３７】
ＨＦＤとしては、０．１～２％（ｗ／ｖ）コレステロール、１～１０％（ｗ／ｖ）ココナッツオイル、１～１０％（ｗ／ｖ）ピーナッツオイル、１～１０％（ｗｖ）大豆油、１０～２０％（ｗ／ｖ）牛脂、１０～５０％（ｗ／ｖ）ラード、１～１０％（ｗ／ｖ）コーンオイルに例示されるような、任意の油脂を任意の分量含有せしめることができるが、当該モデルの作製に適していればそれらに限定されない。
【０１３８】
ＨＱ－ＨＦＤに含有せしめるＨＱの量は、０～４％（ｗ／ｖ）、好適には０．５～３．５％（ｗ／ｖ）であり、より好適には１．０～３．０％（ｗ／ｖ）、より一層好適には２．２～２．８％（ｗ／ｖ）、最適には２．４％（ｗ／ｖ）である。
【０１３９】
ＨＱ－ＨＦＤの摂食期間は、３～６ヶ月、好適には３．５～５ヶ月、より好適には４ヶ月である。８ヶ月以上摂食を継続するのは避けるべきである。

【０１４０】
本発明のモデルは、マウスのモデル（非特許文献１８、１９）と比較して、眼球のサイズ、機能の点でよりヒトに近い点で好ましい。また、ウサギのモデル（非特許文献２０）でその作製に８ヶ月を要していたが、本発明のモデルはより短期間に作製可能な上、従来のモデルでは不明確であったＲＰＥ細胞の肥大を誘導することができ、加齢黄斑変性症のモデルとしてより好ましい。
本発明のモデルは、網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ細胞）が、正常ウサギに比して肥大しており、加齢黄斑変性症の初期病態を発症している。一方、従来のウサギモデル（非特許文献２０）に近い１０週齢のウサギにＨＱ－ＨＦＤを４ヶ月間摂取させたが、ＲＰＥ細胞肥大は視覚的に確認できなかった。
病態を発症した本モデルを使用することにより、加齢黄斑変性症の治療薬及び／若しくは予防薬、又は網膜保護剤を同定することができる。かかる同定方法は（ｉ）本モデルのウサギにおける網膜色素上皮細胞の肥大を、被検物質投与下及び非投与下で測定する工程；及び（ｉｉ）該被検物質投与下における網膜色素上皮細胞の肥大が非投与下と比較して抑制された場合、該検物質を陽性と判定する工程、を含むことができる。工程（ｉ）における測定は、網膜色素上皮細胞の平均面積、及び／又は、肥大した網膜色素上皮細胞数が好適である。
【実施例】
【０１４１】
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。
【０１４２】
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．およびＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．著，Ｃｏｌｄ ＳｐｒｉｎｇＨａｒｂｏｒ 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、または、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て行った。
【０１４３】
実施例１．ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの調製
（１－１）ＨＴＲＡ１阻害ペプチド発現ベクターの構築
（１－１－１）ｐＥＴ ３２ａ（改変）＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの構築
まず、ＳＰＩＮＫ２ｓｃａｆｆｏｌｄを骨格としたＨＴＲＡ１阻害ペプチドの発現ベクターを構築した。各阻害ペプチドのヌクレオチド配列（配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０及び２２）とＳＰＩＮＫ２のヌクレオチド配列（配列番号２）を鋳型として、下記プライマーおよびＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃ １５秒、６０℃ ３０秒、６８℃ ３０秒）×３０サイクル）により阻害剤断片を増幅した。
プライマー１：５’－ＡＡＡＡＧＡＡＴＴＣＴＧＡＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ－３’
プライマー２：５’－ＡＡＡＡＣＴＣＧＡＧＴＴＡＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＧＡＣＧＣＧＣＣＧＣＡＣＧＧＡＣＣ－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断片およびｐＥＴ ３２ａ（改変）を制限酵素ＥｃｏＲＩ（ＮＥＢ）および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、形質転換した大腸菌を、０．１ｍｇ／ｍｌアンピシリンを含むＴｅｒｒｉｆｉｃ Ｂｒｏｔｈ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）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）＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチド」を構築した。

（１－１－２）ｐＥＴ ３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチド＿Ｋｅｘ２の構築

同様に、各阻害剤の配列（配列表）とＳＰＩＮＫ２を鋳型として、下記プライマーおよびＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃ １５秒、６０℃ ３０秒、６８℃ ３０秒）×３０サイクル）により阻害剤断片を増幅した。

プライマー３：５’－ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＧＡＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ－３’

プライマー４：５’－ＡＡＡＡＣＴＣＧＡＧＴＴＡＧＣＣＧＣＣＧＣＡＣＧＧＡＣＣＡＴＴＧＣＧＡＡＴＡＡＴＴＴＴＡ－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断片およびｐＥＴ ３２ａ（Ｎｏｖａｇｅｎ）を制限酵素ＢａｍＨＩ（ＮＥＢ）および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、それぞれの精製断片を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、大腸菌を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、ｍｉｎｉｐｒｅｐおよび配列解析を実施することで、「ｐＥＴ ３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチド＿Ｋｅｘ２」を構築した。尚、操作は（１－１－１）に記載の方法に準じて行った。

（１－２）ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの発現精製

（１－１－１）で構築したベクターｐＥＴ ３２ａ（改変）＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチドを大腸菌Ｏｒｉｇａｍｉ Ｂ （ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ）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（Ｎｏｖａｇｅｎ）を用いてｌｙｓａｔｅを調製し、ＴＡＬＯＮ Ｍｅｔａｌ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｒｅｓｉｎ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてＨｉｓ ｔａｇ融合目的蛋白質を精製した。次に、Ｔｈｒｏｍｂｉｎ Ｃｌｅａｖａｇｅ Ｃａｐｔｕｒｅ Ｋｉｔ（Ｎｏｖａｇｅｎ）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（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５ １０／３００ ＧＬ）または逆相クロマトグラフィー（ＹＭＣ－Ｐａｃｋ ＯＤＳ－ＡＭ）に供することで、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドを調製した。得られたペプチドのＮ末端にはＳ ｔａｇ及びリンカーからなる部分（配列番号３１：図４３）が、Ｃ末端にはＧｌｙ－Ｇｌｙの代わりにＣ末６マー（配列番号３２：図４４）が、それぞれコンジュゲートされている。

【０１４４】

同様に、（１－１－２）で構築したベクターｐＥＴ ３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチド＿Ｋｅｘ２を大腸菌Ｏｒｉｇａｍｉ Ｂ （ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ）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（Ｎｏｖａｇｅｎ）を用いてｌｙｓａｔｅを調製し、ＴＡＬＯＮ Ｍｅｔａｌ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｒｅｓｉｎ（Ｃ

ｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてＨｉｓ　ｔａｇ融合目的蛋白質を精製した。次に、Ｋｅｘ２　（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ：Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ＣＡＡ９６１４３）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（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５　１０／３００　ＧＬ）または逆相クロマトグラフィー（ＹＭＣ－Ｐａｃｋ　ＯＤＳ－ＡＭ）に供することで、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド（Ｎ末及びＣ末にタグ、リンカー等はコンジュゲートされていない）を調製した。

【０１４５】

実施例２．ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性評価

ヒト／マウス／ラット／サルＨＴＲＡ１の配列類似性を図１に示す。酵素活性ドメインであるＨＴＲＡ１プロテアーゼドメイン（２０４Ｇｌｙ－３６４Ｌｅｕ）を構成する一次配列はヒトとサルにおいて完全に一致している。ヒトとマウスまたはラットのＨＴＲＡ１プロテアーゼドメイン配列は１残基異なっているが、構造上、当該残基は酵素活性中心の反対側に位置していることから酵素活性中心に影響を与えないと推測された（図１）。よって、ＨＴＲＡ１プロテアーゼドメインはヒト／マウス／ラット／サルの種によらず同配列であることから、種に関しては明示しない。

（２－１）ＨＴＲＡ１プロテアーゼドメインＨＴＲＡ１（ｃａｔ）の調製

（２－１－１）ｐＥＴ　２１ｂ＿ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）の構築

ヒトＨＴＲＡ１（Ｑ９２７４３）のＮ末ドメインおよびＰＤＺドメインを除いたプロテアーゼドンメイン（１５８Ｇｌｙ－３７３Ｌｙｓ）をＨＴＲＡ１（ｃａｔ）として、ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）発現ベクターを構築した。ヒトＨＴＲＡ１挿入プラスミド（ＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ；ＧＣ－Ｍ０５５８）を鋳型として下記プライマーおよびＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃　１５秒、６０℃　３０秒、６８℃　４５秒）×３０サイクル）により所望のＤＮＡ断片を増幅した。

プライマー５：５’－ＡＡＡＣＡＴＡＴＧＧＧＧＣＡＧＧＡＡＧＡＴＣＣＣＡＡＣＡＧＴＴＴＧＣ－３’

プライマー６：５’－ＡＡＡＣＴＣＧＡＧＴＴＴＧＧＣＣＴＧＴＣＧＧＴＣＡＴＧＧＧＡＣＴＣ－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断片およびｐＥＴ　３２ａ（Ｎｏｖａｇｅｎ）を制限酵素ＮｄｅＩ（ＮＥＢ）および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、それぞれの精製断片を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、大腸菌を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、ｍｉｎｉｐｒｅｐおよび配列解析を実施することで、「ｐＥＴ　２１ｂ＿ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）」を構築した。尚、操作は（１－１－１）に記載の方法に準じて行った。

（２－１－２）ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）の調製

構築したｐＥＴ　２１ｂ＿ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）は大腸菌ＢＬ２１　（ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ）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、２８℃で一晩培養した。集菌後に１ｍｇ／ｍｌリゾチームを含むリン酸バッファー（５０ｍＭ　Ｓｏｄｉｕｍ　ｐｈｏｓｐｈａｔｅ，３００ｍＭ　ＮａＣｌ）で懸濁し、超音波破砕によりｌｙｓａｔｅを調製した。ＴＡＬＯＮ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて所望のＨｉｓ　ｔａｇ融合タンパクを回収し、ゲルろ過クロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　１０／３００　ＧＬ）に供することでＨＴＲＡ１（ｃａｔ）を精製した。

（２－２）ＨＴＲＡ１全長ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）の調製
（２－２－１）ｐｃＤＮＡ３．１＿ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）＿Ｈｉｓの構築
合成したヒトＨＴＲＡ１（Ｑ９２７４３）ＤＮＡ（ＧＥＮＥＡＲＴ）を鋳型とし、下記プライマーおよびＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃　１５秒、６０℃　３０秒、６８℃　９０秒）×３０サイクル）により所望のＤＮＡ断片を増幅した。
プライマー７：５’－ＡＡＡＡＧＡＡＴＴＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧＣＡＧＡＴＴＣＣＴＡＧＡＧＣＣＧ－３’
プライマー８：５’－ＡＡＡＡＣＴＣＧＡＧＴＣＡＧＴＧＧＴＧＡＴＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＣＣＧＧ－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断片とｐｃＤＮＡ３．１（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を制限酵素ＥｃｏＲＩ（ＮＥＢ）および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、それぞれの精製断片を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、大腸菌を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、ｍｉｎｉｐｒｅｐおよび配列解析を実施することで、「ｐｃＤＮＡ３．１＿ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）＿Ｈｉｓ」を構築した。尚、操作は（１－１－１）に記載の方法に準じて行った。
（２－２－２）ｐｃＤＮＡ３．３＿ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）＿ＦＬＡＧ＿Ｈｉｓの構築
（２－２－１）で構築したｐｃＤＮＡ３．１＿ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）＿Ｈｉｓを鋳型として、下記プライマーおよびＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃　１５秒、６０℃　３０秒、６８℃　９０秒）×３０サイクル）により断片Ａを増幅した。
プライマー７
プライマー９：５’－ＣＴＴＧＴＣＧＴＣＡＴＣＧＴＣＣＴＴＧＴＡＧＴＣＧＣＣＧＧＧＧＴＣＧＡＴＴＴＣＣＴＣ－３’
次に、下記プライマーおよびＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃　１５秒、６０℃　３０秒、６８℃　１０秒）×３０サイクル）により断片Ｂを増幅した。
プライマー１０：５’－ＧＣＧＡＣＴＡＣＡＡＧＧＡＣＧＡＴＧＡＣＧＡＣＡＡＧＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＴＣＡＴＣＡＣ－３’
プライマー１１：５’－ＡＡＡＡＡＣＴＣＧＡＧＣＴＡＧＴＧＡＴＧＡＴＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＣＴＴＧＴＣＧＴＣ－３’
断片Ａおよび断片Ｂを鋳型として、プライマー７および１１、ＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃　１５秒、６０℃　３０秒、６８℃　９０秒）×３０サイクル）により所望のＤＮＡ断片を増幅した。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断片とｐｃＤＮＡ３．３（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を鋳型としたベクター）を制限酵素ＥｃｏＲＩ（ＮＥＢ）および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、それぞれの精製断片を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ＪＭ１０

９（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、大腸菌を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、ｍｉｎｉｐｒｅｐおよび配列解析を実施することで、「ｐｃＤＮＡ３．３＿ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）＿ＦＬＡＧ＿Ｈｉｓ」を構築した。尚、操作は（１－１－１）に記載の方法に準じて行った。

（２－２－３）ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）の調製

（２－２－２）で構築したｐｃＤＮＡ３．３＿ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）＿ＦＬＡＧ＿ＨｉｓはＰｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｉｍｉｎｅ Ｍａｘ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．）を用いてＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）にｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎし、６日後に培養上精を回収した。ＨｉｓＴｒａｐ ｅｘｃｅｌ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）によりＨｉｓ ｔａｇ融合タンパク質を回収し、さらにＡＮＴＩ－ＦＬＡＧ Ｍ２ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ａｇａｒｏｓｅ Ｇｅｌ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を用いることでＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）を精製した。

【０１４６】

（２－３）ＨＴＲＡ１不活性変異体ＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）の調製

（２－３－１）ｐｃＤＮＡ３．３＿ＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）＿ＦＬＡＧ＿Ｈｉｓの構築

ＨＴＲＡ１不活性変異体ＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）発現ベクターを構築するため、実施例（２－２－２）で構築したベクター「ｐｃＤＮＡ３．３＿ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）＿ＦＬＡＧ＿Ｈｉｓ」を鋳型として、下記プライマーおよびＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ ＩＩ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔｓ（アジレント・テクノロジー株式会社）を用いたＰＣＲ法（（９５℃ ３０秒、５５℃ １分、６８℃ ７分）×１８サイクル）を実施した。

プライマー２１：５’－ＣＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＴＡＣＧＧＣＡＡＣＧＣＧＧＧＣＧＧＡＣＣＣＴＣＧＴＧＡＡＣＣ－３’（配列番号５５：図７６）

プライマー２２：５’－ＧＧＴＴＣＡＣＧＡＧＧＧＧＴＣＣＧＣＣＣＧＣＧＴＴＧＣＣＧＴＡＧＴＴＧＡＴＧＡＴＧＧ－３’（配列番号５６：図７７）

ＰＣＲ反応後、キット付属のプロトコールに従い、ＤｐｎＩ処理したＰＣＲ反応液を用いて大腸菌ＪＭ１０９（ＴＯＹＯＢＯ）を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、ｍｉｎｉｐｒｅｐおよび配列解析を実施することで、「ｐｃＤＮＡ３．３＿ＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）＿ＦＬＡＧ＿Ｈｉｓ」を構築した。尚、操作は（１－１－１）に記載の方法に準じて行った。

（２－３－２）ＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）の調製

（２－２－３）に記載の方法に従い、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆを用いてＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）を発現し、Ａｆｆｉｎｉｔｙ精製によりＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）を調製した。

実施例３．ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性評価

（３－１）ペプチド基質を用いたＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性評価

基質ペプチドＨ２－Ｏｐｔ（Ｍｃａ－ＩＲＲＶＳＹＳＦＫ（Ｄｎｐ）Ｋ）（株式会社ペプチド研究所：配列番号５４、図８）を１０ｍＭになるようＤＭＳＯで溶解し、Ａｓｓａｙ ｂｕｆｆｅｒ（５０ｍＭ ｂｏｒａｔｅ，１５０ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ８．５）で希釈して終濃度１０μＭで使用した。Ａｓｓａｙ ｂｕｆｆｅｒで希釈したＨＴＲＡ１（ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）またはＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ））とＨＴＲＡ１阻害ペプチドをそれぞれ２５μＬ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５０μＬ加えて、Ｅｎｓｐｉｒｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で蛍光シグナル（ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ３２８ｎｍ／ｅｍｉｓｓｉｏｎ ３９３ｎｍ）を測定した。ＨＴＲＡ１は終濃度１００ｎＭ、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは終濃度１．８７５～１，０００ｎＭ、反応および測定にはプロテオセーブ（登録商標）ＳＳ９６Ｆ黒プレート（住友ベークライト株式会社）を使用した。

【０１４７】

各濃度におけるＨＴＲＡ１阻害ペプチドの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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｃａｔ）およびＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）阻害活性を評価した（図２及び３）。ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ（ｖｅｒｓｉｏｎ ５．０； ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｉｎｃ．）を用いて５０％阻害濃度（ＩＣ５０）を算出した結果、いずれのＨＴＲＡ１阻害ペプチドも低濃度でＨＴＲＡ１（ｃａｔ）およびＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）酵素活性を阻害することが明らかになった（図２Ａ乃至Ｃ及び図３）。対照的に、野生型ＳＰＩＮＫ２（ｗｔ）はＨＴＲＡ１阻害活性を示さなかった（図２Ｄ）。

【０１４８】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性

【０１４９】

【表１】

ＩＤ	ＩＣ５０ （ｎＭ） ｆｏｒ ＨＴＲＡ１ （ｃａｔ）	ＩＣ５０ （ｎＭ） ｆｏｒ ＨＴＲＡ１ （ｆｕｌｌ）
Ｈ２１８	７２	５５
Ｈ２２３	４１	６６
Ｈ２２８	７１	３８
Ｈ３０８	３７	１５
Ｈ３２１	４８	２９
Ｈ３２２	５０	１７
Ｈ３０８ＡＴ	４９	３１
Ｈ３２１ＡＴ	４６	１８
Ｈ３２２ＡＴ	４５	２５
Ｍ７	４３	２４

【０１５０】

（３－２）タンパク基質を用いたＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性評価

ヒトＶｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎをタンパク基質として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性を評価した。Ａｓｓａｙ ｂｕｆｆｅｒ（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ，１５０ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ８．０）で希釈したＨＴＲＡ１（ｃａｔ）と各ＨＴＲＡ１阻害ペプチドを混合し、３７℃で１時間反応した。次に、Ａｓｓａｙ ｂｕｆｆｅｒで希釈したヒトＶｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；３５４２３８）を加えて３７℃で２時間反応させ、ＳＤＳサンプルバッファーを添加し、９９℃で５分処理することで酵素反応を停止した。その後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＷｅｓｔｅｒｎ ｂｌｏｔ解析により、ヒトＶｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎの分解を評価した。ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの終濃度は０～２５μＭ、ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）の終濃度は１μＭ、ヒトＶｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎの終濃度は１μＭであった。また、Ｗｅｓｔｅｒｎ ｂｌｏｔ解析では、一次抗体にＨｕｍａｎ Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＭＡＢ２３４９）、二次抗体にＡｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ，ＨＲＰ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｗｈｏｌｅ Ａｂ Ｓｈｅｅｐ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ；ＮＡ９３１）を使用した。

【０１５１】
（３－１）と同様、ヒトｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎを基質とした場合でもＨＴＲＡ１阻害ペプチドは強力にＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害を示した（図４）。
（３－３）ＨＴＲＡ１阻害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２５μＬ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５０μＬ加えて、Ｅｎｓｐｉｒｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で蛍光シグナル（ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ　３８０ｎｍ／ｅｍｉｓｓｉｏｎ　４６０ｎｍ）を測定した。尚、ＨＴＲＡ２活性評価では実施例２と同様のＡｓｓａｙ　ｂｕｆｆｅｒ（５０ｍＭ　ｂｏｒａｔｅ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ８．５）、ＨＴＲＡ２以外のプロテアーゼ活性評価にはＡｓｓａｙ　ｂｕｆｆｅｒ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ８．０）を用い、反応および測定にはプロテオセーブ（登録商標）ＳＳ９６Ｆ黒プレート（住友ベークライト株式会社）を使用した。特異性評価に用いたプロテアーゼおよび基質の組み合わせは以下の通り。
Ｂｏｖｉｎｅ　ｔｒｙｐｓｉｎ阻害活性評価；終濃度５ｎＭ　ｔｒｙｐｓｉｎ（Ｐｉｅｒｃｅ；２０２３３）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＢｏｃ－ＶＰＲ－ＡＭＣ　Ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＥＳ０１１）
Ｂｏｖｉｎｅ　α－ｃｈｙｍｏｔｒｙｐｓｉｎ阻害活性評価；終濃度１０ｎＭ　ｃｈｙｍｏｔｒｙｐｓｉｎ（Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；ＬＳ００１４３４）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＳｕｃ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｔｙｒ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１２０－ｖ）
Ｈｕｍａｎ　ｔｒｙｐｔａｓｅ阻害活性評価；終濃度１ｎＭ　ｔｒｙｐｔａｓｅ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｔ７０６３）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＢｏｃ－Ｐｈｅ－Ｓｅｒ－Ａｒｇ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１０７－ｖ）
Ｈｕｍａｎ　ｃｈｙｍａｓｅ阻害活性評価；終濃度１００ｎＭ　ｃｈｙｍａｓｅ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃ８１１８）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＳｕｃ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｔｙｒ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１２０－ｖ）
Ｈｕｍａｎ　ｐｌａｓｍｉｎ阻害活性評価；終濃度５０ｎＭ　Ｐｌａｓｍｉｎ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｐ１８６７）、終濃度１００μＭ基質　ペプチドＢｏｃ－Ｖａｌ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１０４－ｖ）
Ｈｕｍａｎ　ｔｈｒｏｍｂｉｎ阻害活性評価；終濃度１ｎＭ　ｔｈｒｏｍｂｉｎ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｔ６８８４）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＢｏｃ－ＶＰＲ－ＡＭＣ　Ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＥＳ０１１）
Ｈｕｍａｎ　ｍａｔｒｉｐｔａｓｅ阻害活性評価；終濃度１ｎＭ　ｍａｔｒｉｐｔａｓｅ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｅ３９４６－ＳＥ）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＢｏｃ－ＱＡＲ－ＡＭＣ　Ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＥＳ０１４）
Ｈｕｍａｎ　ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃ阻害活性評価；終濃度１００ｎＭ　ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｐ２２００）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＢｏｃ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ａｒｇ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１１２－ｖ）
Ｈｕｍａｎ　ｔＰＡ阻害活性評価；終濃度１０ｎＭ　ｔＰＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｔ０８３１）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＰｙｒ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１４５－ｖ）
Ｈｕｍａｎ　ｕＰＡ阻害活性評価；終濃度１０ｎＭ　ｕＰＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｔ０８３１）、終濃度１００μＭ　基質ペプチドＰｙｒ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１４５－ｖ）
Ｈｕｍａｎ　ｐｌａｓｍａ　ｋａｌｌｉｋｒｅｉｎ阻害活性評価；終濃度０．１２５μｇ／

ｍｌ ｐｌａｓｍａ ｋａｌｌｉｋｒｅｉｎ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｔ０８３１）、終濃度１００μＭ 基質ペプチドＺ－Ｐｈｅ－Ａｒｇ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３０９５－ｖ）
Ｈｕｍａｎ ＨＴＲＡ２阻害活性評価；終濃度２００ｎＭ ＨＴＲＡ２（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；１４５８－ＨＴ）、終濃度５０μＭ 基質ペプチドＨ２－Ｏｐｔ（株式会社ペプチド研究所）
（３－２）と同様、ペプチド基質の分解を指標にＨＴＲＡ１以外のプロテアーゼへの交差性を評価した。阻害剤の終濃度１ｕＭにおいては、いずれのプロテアーゼに対しても各ＨＴＲＡ１阻害ペプチドはプロテアーゼ活性を抑制せず、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドはＨＴＲＡ１特異的な阻害作用を有することが示された（図５）。

【０１５２】

実施例４．Ｘ線結晶構造を用いたＨＴＲＡ１阻害ペプチドの解析
（４－１）ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）／ＨＴＲＡ１阻害ペプチド複合体の調製
（１－２）および（２－１）に記載した方法に従って、ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）および配列番号３で示されるアミノ酸配列を有するＨＴＲＡ１阻害ペプチドをそれぞれ調製した。２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ７．６の条件下で両者を混合後、ゲルろ過クロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬ）により複合体を単離精製した。
（４－２）Ｘ線結晶構造解析
（４－１）で調製した複合体溶液を１８ｍｇ／ｍｌまで濃縮後、リザーバー溶液（ＬｉＣｌ １．０Ｍ，７．５％ＰＥＧ６０００，０．１Ｍ Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ（ｐＨ８．５））と１対１で混合し、蒸気拡散法により結晶化した。得られた立方体状の単結晶を、２０％のエチレングリコールを含むリザーバー溶液に浸漬した後液体窒素にて凍結した。凍結結晶をクライオ気流下でＸ線照射し、回折イメージを得た（ｐｈｏｔｏｎ ｆａｃｔｏｒｙ ＢＬ５Ａ：高エネルギー加速器研究機構）。ＨＫＬ２０００を使用した解析により、最大分解能２．６Ａのスケーリングデータを取得した。Ｓｅｒｉｎｅ ｐｒｏｔｅａｓｅ ＨＴＲＡ１（ＰＤＢ ＩＤ：３ＮＺＩ）を鋳型とした分子置換法により位相を決定し、構造精密化後、分解能２．６ＡでＨＴＲＡ１（ｃａｔ）／該ペプチドの複合体結晶を決定した。単位格子中にはＨＴＲＡ１とＳＰＩＮＫ２が各１分子ずつ含まれていた。ＳＰＩＮＫ２分子については、配列情報と観測された電子密度に基づき、ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）との相互作用部位を含む部分的な分子モデルを構築した。当該ＨＴＲＡ１阻害ペプチドはＨＴＲＡ１酵素活性中心を含む領域へ結合していることが認められた（図６及び７）。

【０１５３】

実施例５．ラット光照射網膜障害モデルにおけるＨＴＲＡ１阻害による網膜保護効果
（５－１）ラット光照射網膜障害モデルの作製
ラット光照射網膜障害モデルは光照射により網膜視細胞の細胞死を誘発させるモデルであり、網膜変性のモデル動物として汎用されている（Ｄａｎｉｅｌ Ｔ． Ｏｒｇａｎｉｓｃｉａｋ ｅｔ ａｌ．，（１９９６） Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ． ３７巻（１１号）：２２４３－２２５７頁）。７２時間暗順応させたラットに対し、０．５％（Ｗ／Ｖ）トロピカミド－０．５％塩酸フェニレフリン点眼液を暗順応下で点眼し、その後５５００Ｌｕｘの白色光を３時間照射した。照射後、再び約２４時間暗順応させ、その後は通常飼育の明暗条件に戻して２日間飼育した。安楽殺後に眼球を摘出し、３．７％（Ｗ／Ｖ）ホルムアルデヒド－０．５～１％（Ｗ／Ｖ）メタノール－０．２％（Ｗ／Ｖ）ピクリン酸固定液で２４時間以上浸漬させ固定した。パラフィン包埋後、薄切切片を作製した。切片はヘマトキシリン－エオジン染色を行い、網膜断層の外顆粒層に含まれる核の数を数えることで、網膜障害を評価した。ラット光照射網膜障害モデルは光照射により、外顆粒層に含まれる核の数が顕著に減少することが明らかになった。
（５－２）網膜障害時の細胞外ＨＴＲＡ１の発現確認
ラット光照射網膜障害モデルにおけるＨＴＲＡ１の関与を調べるため、（５－１）で作製したモデルラットから硝子体液を採取し、Ｗｅｓｔｅｒｎ ｂｌｏｔ解析によりＨＴＲＡ

１発現量を評価した。硝子体液は還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、一次抗体Ｈｕｍａｎ ＨＴＲＡ１／ＰＲＳＳ１１ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＡＦ２９１６）および二次抗体Ｓｈｅｅｐ ＩｇＧ Ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＨＡＦ０１６）を用いてラットＨＴＲＡ１を検出した。非照射群と比較し、光照射した群においては硝子体液中のＨＴＲＡ１量の増加が認められたことから、当該モデルでは、光照射による網膜障害の過程にＨＴＲＡ１が関与するものと考えられる（図９）。

（５－３）ラット光照射網膜障害モデルにおけるＨＴＲＡ１阻害ペプチドの網膜保護効果

ラットへの光照射直前に麻酔下で、０．０４ｍｇ／ｍＬまたは０．２ｍｇ／ｍＬの濃度のＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８を５ｕＬ硝子体内に投与した。尚、生理食塩水投与群の例数は４であり、その他の群の例数は５であった。生理食塩水投与群は光照射により網膜断層の外顆粒層に含まれる核が減少したのに対し、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド投与群では外顆粒層に含まれる核の減少を抑制する効果が認められた（図１０）。以上より、ＨＴＲＡ１により引き起こされた組織障害に対し、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは薬効を示すことが明らかになった。

【０１５４】

実施例６．ＨＴＲＡ１阻害ペプチド誘導体の評価

（６－１）ｐＥＴ ３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｓ１６Ａ＿Ｅｘ２の構築

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８を鋳型として、配列番号９（図２１）で示されるアミノ酸配列中の１６番ＳｅｒがＡｌａに置換されたアミノ酸配列を有する誘導体Ｓ１６Ａを調製した。下記プライマーおよびＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃ １５秒、６０℃ ３０秒、６８℃ １５秒）×３０サイクル）により断片Ｃを増幅した。

プライマー１２：５’－ＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧＣＡＡＡＴＡＴＣＧＴＡＣＣＣＣＧＡＡＴＴＧＴ－３’

プライマー１３：５’－ＧＣＣＡＴＡＣＣＡＧＣＡＴＧＧＴＣＣＧＣＡＣＡＡＴＴＣＧＧＧＧＴＡＣＧＡＴＡＴＴＴＧＣ－３’

次に、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８を鋳型として、下記プライマーおよびＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃ １５秒、６０℃ ３０秒、６８℃ ２０秒）×３０サイクル）により断片Ｄを増幅した。

プライマー１４：５’－ＧＣＧＧＡＣＣＡＴＧＣＴＧＧＴＡＴＧＧＣＡＴＧＴＧＴＴＧＣＴＣＴＧＴＡＴＧＡＡＣ－３’

プライマー１５：５’－ＡＡＡＡＣＴＣＧＡＧＴＴＡＧＣＣＧＣＣＧＣＡＣＧＧＡＣＣＡＴＴＧＣＧＡＡＴＡＡ－３’

断片ＣとＤ、下記プライマー、ＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃ １５秒、６０℃ ３０秒、６８℃ ２０秒）×３０サイクル）により所望のＤＮＡ断片を増幅した。

プライマー１６：５’－ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＧＡＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ－３’

プライマー１５

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断片およびｐＥＴ ３２ａ（Ｎｏｖａｇｅｎ）を制限酵素ＢａｍＨＩ（ＮＥＢ）および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、それぞれの精製断片を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、大腸菌を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、ｍｉｎｉｐｒｅｐおよび配列解析を実施することで、「ｐＥＴ　３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｓ１６Ａ＿Ｋｅｘ２」を構築した。尚、操作は（１－１－１）に記載の方法に準じて行った。

（６－２）ＨＴＲＡ１阻害ペプチド＿Ｎ末誘導体発現ベクターの調製

配列番号９（図２１）で示されるアミノ酸配列中、１番ＡｓｐがＧｌｙ、Ｓｅｒ、Ｇｌｕ又はＳｅｒ－Ｌｅｕ－Ｉｌｅで置換されたアミノ酸配列を有する、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＮ末端配列誘導体４種（それぞれＤ１Ｇ，Ｄ１Ｓ，Ｄ１Ｅ又はＤ１ＳＬＩと表記する）を調製するため、（６－１）と同様の手法で発現ベクターを構築した。断片ＣおよびＤ、下記プライマー、ＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（（９４℃　１５秒、６０℃　３０秒、６８℃　２０秒）×３０サイクル）により目的断片４種をそれぞれ増幅した。

Ｄ１Ｇ作製プライマー

プライマー１７：５’－ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＧＧＣＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ－３’

プライマー１５

Ｄ１Ｓ作製プライマー

プライマー１８：５’－ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＡＧＣＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ－３’

プライマー１５

Ｄ１Ｅ作製プライマー

プライマー１９：５’－ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＧＡＡＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ－３’

プライマー１５

Ｄ１ＳＬＩ作製プライマー

プライマー２０：５’－ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＡＧＣＣＴＧＡＴＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ－３’

プライマー１５

増幅した４種の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断片およびｐＥＴ　３２ａ（Ｎｏｖａｇｅｎ）を制限酵素ＢａｍＨＩ（ＮＥＢ）および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、それぞれの精製断片を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、大腸菌を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、ｍｉｎｉｐｒｅｐおよび配列解析を実施することで、「ｐＥＴ　３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ＿Ｋｅｘ２」「ｐＥＴ　３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１Ｓ＿Ｓ１６Ａ＿Ｋｅｘ２」「ｐＥＴ　３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１Ｅ＿Ｓ１６Ａ＿Ｋｅｘ２」「ｐＥＴ　３２ａ＿ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１ＳＬＩ＿Ｓ１６Ａ＿Ｋｅｘ２」を構築した。尚、操作は（１－１－１）に記載の方法に準じて行った。

（６－３）ＨＴＲＡ１阻害ペプチド誘導体の調製

（６－１）および（６－２）で構築したベクター５種をそれぞれ大腸菌Ｏｒｉｇａｍｉ　Ｂ（ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ）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、ＢｕｇＢｕｓｔ

ｅｒ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｎｏｖａｇｅｎ）を用いてｌｙｓａｔｅを調製し、ＴＡＬＯＮ Ｍｅｔａｌ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｒｅｓｉｎ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてＨｉｓ ｔａｇ融合目的蛋白質を精製した。次に、Ｋｅｘ２（前述）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（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５ １０／３００ ＧＬ）または逆相クロマトグラフィー（ＹＭＣ－Ｐａｃｋ ＯＤＳ－ＡＭ）に供することで、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド誘導体５種を調製した。該誘導体の有するアミノ酸配列は、配列番号２３乃至２７（図３５乃至３９）に記載されている。

（６－４）ＨＴＲＡ１阻害ペプチド誘導体の評価

（３－１）記載の方法に従い、ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害活性を測定した結果、いずれの誘導体も阻害活性はＨ３０８と同等であった（図１１）。

【０１５５】

実施例７．ＨＴＲＡ１阻害ペプチドとＨＴＲＡ１（ｃａｔ）の結合性評価

実施例（１－２）で調製した３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチド（Ｈ３０８、Ｈ３２１ＡＴ、Ｈ３２２ＡＴ）および（２－１）で調製したＨＴＲＡ１（ｃａｔ）を用いて、免疫沈降法により結合性を評価した。２．５μｇの各ＨＴＲＡ１阻害ペプチドと１０μｇのＨＴＲＡ１（ｃａｔ）を室温で３０分反応した後、１０μＬのＴＡＬＯＮ Ｍｅｔａｌ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｒｅｓｉｎ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を添加した。さらに３０分の反応後のＲｅｓｉｎをＩｍｍｕｎｏｐｒｅｃｉｐｉｔａｔｉｏｎ（ＩＰ）画分として回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに供することで結合性を評価した。尚、反応のバッファーにはＰＢＳを用いた。

【０１５６】

３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドまたはＨＴＲＡ１（ｃａｔ）それぞれとＴＡＬＯＮを反応させた場合、Ｈｉｓ ｔａｇが融合したＨＴＲＡ１（ｃａｔ）のみのバンドがｉｎｐｕｔレーンに検出された。一方、各阻害ペプチドとＨＴＲＡ１（ｃａｔ）を反応させたＩＰレーンのみで、阻害ペプチドと酵素のバンドが検出された。よって、３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドはそれぞれＨＴＲＡ１（ｃａｔ）に結合することが確認された。

【０１５７】

実施例８．ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性評価

（８－１）ペプチド基質を用いたＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性評価

実施例６で構築した３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチド（Ｈ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ、Ｈ３２１ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ、Ｈ３２２ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ）について、基質ペプチドＨ２－Ｏｐｔを用いて、ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）またはＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）阻害活性を評価した（ｎ＝３）。基質ペプチドＨ２－Ｏｐｔ（Ｍｃａ－ＩＲＲＶＳＹＳＦＫ（Ｄｎｐ）Ｋ）（株式会社ペプチド研究所：配列番号５４、図８）を１０ｍＭになるようＤＭＳＯで溶解し、Ａｓｓａｙ ｂｕｆｆｅｒ（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ，１５０ｍＭ ＮａＣｌ，０．２５％ ＣＨＡＰＳ，ｐＨ８．０）で希釈して終濃度１０μＭで使用した。Ａｓｓａｙ ｂｕｆｆｅｒで希釈したＨＴＲＡ１（ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）またはＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）；実施例２）とＨＴＲＡ１阻害ペプチドをそれぞれ２５μＬ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５０μＬ加えて、Ｅｎｓｐｉｒｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で蛍光シグナル（ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ３２８ｎｍ／ｅｍｉｓｓｉｏｎ ３９３ｎｍ）を測定した。ＨＴＲＡ１は終濃度１０ｎＭ、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは終濃度１．８７５～１，０００ｎＭ、反応および測定にはプロテオセーブ（登録商標）ＳＳ９６Ｆ黒プレート（住友ベークライト株式会社）を使用した。

【０１５８】

各濃度におけるＨＴＲＡ１阻害ペプチドの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ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１（ｃａｔ）およびＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）阻害活性を評価した。

ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ（ｖｅｒｓｉｏｎ ５．０；ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｉｎｃ．）を用いて５０％阻害濃度（ＩＣ５０）を算出した結果、いずれのＨＴＲＡ１阻害ペプチドも低濃度でＨＴＲＡ１（ｃａｔ）およびＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）

酵素活性を阻害することが明らかになった（図６６）。
【０１５９】
ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性
【０１６０】
【表２】

	ＩＣ５０　（ｎＭ）ｆｏｒ　ＨＴＲＡ１（ｃａｔ）	ＩＣ５０　（ｎＭ）ｆｏｒ　ＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）
Ｈ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ	７．９±１．３	９．１±１．４
Ｈ３２１ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ	９．０±０．６	１２．０±１．９
Ｈ３２２ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ	１２．９±０．２	１２．２±２．２

【０１６１】
（８－２）タンパク基質を用いたＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性評価
ヒトＶｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎをタンパク基質として、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドのＨＴＲＡ１阻害活性を評価した。操作は実施例（３－２）に従った。
（８－１）と同様、ヒトｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎを基質とした場合でもＨＴＲＡ１阻害ペプチドは強力にＨＴＲＡ１（ｃａｔ）阻害を示した（図６７）。
【０１６２】
（８－３）ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの特異性評価
基質ペプチドの切断を指標に、他のプロテアーゼに対する特異性を評価した。Ｂｏｖｉｎｅ　ｔｒｙｐｓｉｎ、Ｂｏｖｉｎｅ　α－ｃｈｙｍｏｔｒｙｐｓｉｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃ、Ｔｒｙｐｔａｓｅ、Ｃｈｙｍａｓｅ、Ｔｈｒｏｍｂｉｎ、Ｐｌａｓｍｉｎ、ｔＰＡ、Ｐｌａｓｍａ　ｋａｌｌｉｋｒｅｉｎ、Ｍａｔｒｉｐｔａｓｅ、ｕＰＡ、ＨＴＲＡ２については実施例（３－３）に記載の方法に従った（ｎ＝３）。また、他のプロテアーゼに対する阻害活性の手順、プロテアーゼおよび基質の組み合わせは以下の通り。
【０１６３】
反応および測定にはプロテオセーブ（登録商標）ＳＳ９６Ｆ黒プレート（住友ベークライト株式会社）を使用し、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２５μＬ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５０μＬ加えて、Ｅｎｓｐｉｒｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で蛍光シグナルを測定した。
【０１６４】
Ｈｕｍａｎ　ｔｒｙｐｓｉｎ阻害活性評価；終濃度１ｎＭ　ｔｒｙｐｓｉｎ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｔ６４２４）、終濃度１００μＭ 基質ペプチドＢｏｃ－ＶＰＲ－ＡＭＣ Ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｒ＆ＤＳｙｓｔｅｍｓ；ＥＳ０１１）、蛍光シグナルｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ　３８０ｎｍ／ｅｍｉｓｓｉｏｎ　４６０ｎｍ。
【０１６５】
Ｈｕｍａｎ　ｃｈｙｍｏｔｒｙｐｓｉｎ阻害活性評価；終濃度１０ｎＭ　ｃｈｙｍｏｔｒｙ

ｐｓｉｎ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃ８９４６）、終濃度１０μＭ 基質ペプチドＳｕｃ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｔｙｒ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１２０－ｖ）、蛍光シグナルｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ３８０ｎｍ／ｅｍｉｓｓｉｏｎ ４６０ｎｍ。

【０１６６】

Ｈｕｍａｎ ＦａｃｔｏｒＸＩＩａ阻害活性評価；終濃度１００ｎＭ Ｆａｃｔｏｒ Ａｌｐｈａ－ＸＩＩａ（Ｅｎｚｙｍｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、終濃度１００μＭ 基質ペプチドＰｙｒ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３１４５－ｖ）、蛍光シグナルｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ３８０ｎｍ／ｅｍｉｓｓｉｏｎ ４６０ｎｍ。

【０１６７】

Ｈｕｍａｎ ＭＭＰ－２阻害活性評価；終濃度１ｎＭ ｔｒｙｐｔａｓｅ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ；ＰＦ０２３）、終濃度１００μＭ 基質ペプチドＭＯＣＡｘ－ＫＰＬＧＬ－Ａ２ｐｒ（Ｄｎｐ）－ＡＲ（株式会社ペプチド研究所；３２２６－ｖ）、蛍光シグナルｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ３２８ｎｍ／ｅｍｉｓｓｉｏｎ ３９３ｎｍ。

【０１６８】

Ｈｕｍａｎ ＴＰＰ１阻害活性評価；終濃度０．５μｇ／ｍＬ ＴＰＰ１（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ；２２３７－ＳＥ）、終濃度２００μＭ 基質ペプチドＡＡＦ－ＭＣＡ（株式会社ペプチド研究所；３２０１－ｖ）、蛍光シグナルｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ３８０ｎｍ／ｅｍｉｓｓｉｏｎ ４６０ｎｍ。

【０１６９】

ペプチド基質の分解を指標にＨＴＲＡ１以外のプロテアーゼへの交差性を評価した。いずれのプロテアーゼに対しても、各ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの終濃度１ｕＭではプロテアーゼ活性を抑制せず、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドはＨＴＲＡ１特異的な阻害作用を有することが示された（図６８）。

【０１７０】

実施例９．ＨＴＲＡ１阻害ペプチドとＨＴＲＡ１（ｃａｔ）の結合性評価

実施例６で調製した３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドおよび（２－１）で調製したＨＴＲＡ１（ｃａｔ）を用いて、実施例７の操作に従い、免疫沈降法により結合性を評価した。

３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドまたはＨＴＲＡ１（ｃａｔ）それぞれとＴＡＬＯＮを反応させた場合、Ｈｉｓ ｔａｇが融合したＨＴＲＡ１（ｃａｔ）のみのバンドがｉｎｐｕｔレーンに検出された。一方、各阻害ペプチドとＨＴＲＡ１（ｃａｔ）を反応させたＩＰレーンのみで、阻害ペプチドと酵素のバンドが検出された。よって、３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドはそれぞれＨＴＲＡ１（ｃａｔ）に結合することが確認された（図６９）。

【０１７１】

実施例１０．ラット光照射網膜障害モデルにおけるＨＴＲＡ１阻害による網膜保護効果（その２）

実施例（５－１）で構築したラット光照射網膜障害モデルを用いて、実施例６で作製した３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドの網膜保護効果を評価した。操作は実施例５に従った。いずれの群も例数は６であった。

網膜病理評価の結果を図７０に示す。３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、光照射によって引き起こされる外顆粒層に含まれる核の数の減少に対して顕著な抑制作用を示した。

【０１７２】

実施例１１．ハイドロキノン含有高脂肪食負荷によるウサギ網膜障害モデルにおけるＨＴＲＡ１阻害による網膜色素上皮細胞の保護効果

（１１－１）ハイドロキノン含有高脂肪食負荷によるウサギ網膜障害モデルの作製

高脂肪食（Ｈｉｇｈ Ｆａｔ Ｄｉｅｔ；ＨＦＤ）とハイドロキノン（Ｈｙｄｒｏｑｕｉｎｏｎｅ；ＨＱ）を用いた網膜障害モデルは、酸化促進物質により酸化ストレスを惹起し網膜障害を引き起こすモデルであり、マウスにおいてのみモデルが報告されている（Ｄｉｅｇｏ Ｇ．Ｅｓｐｉｎｏｓａ－Ｈｅｉｄｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，（２００６） Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ． ４７巻（２号）：７２９－７３７頁）

。そこで、１．５％（Ｗ／Ｖ）ココナッツオイル－０．２５％（Ｗ／Ｖ）コレステロール－１．５％（Ｗ／Ｖ）ピーナッツオイル－２．４％（Ｗ／Ｖ）ハイドロキノン含有ＲＣ４（オリエンタル酵母）食（ＨＦＤ－ＨＱ）を３歳齢ＪＷウサギに４ヶ月間摂食させることでウサギ網膜障害モデルを構築した。安楽殺後に眼球を摘出し、角膜輪部より５ｍｍ程度外側で切開して前眼部を取り除き、さらに硝子体を分離した後、網膜－脈絡膜－強膜を４％（Ｗ／Ｖ）パラホルムアルデヒド固定液で２４時間以上浸漬させ固定した。固定後、脈絡膜を分離し、一次抗体ＺＯ－１ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ （ＺＯ１－１Ａ１２）（Ｔｈｅｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ；３３－９１００）および二次抗体Ｃｈｉｃｋｅｎ ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ （Ｈ＋Ｌ） Ｃｒｏｓｓ－Ａｄｓｏｒｂｅｄ Ｓｅｃｏｎｄａｒｙ Ａｎｔｉｂｏｄｙ，Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５９４（Ｔｈｅｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ；Ａ－２１２０１）を用いて免疫染色を行った。蛍光顕微鏡（ＢＺ－９０００；ＫＥＹＥＮＣＥ）を用いて染色した脈絡膜を観察し、染色された網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞の面積を求め、ＲＰＥ細胞障害を評価した。

図７１に、１２週齢ウサギ、３歳齢ウサギおよび、ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギのＲＰＥ細胞の染色像（図７１（Ａ））とＲＰＥ細胞の平均面積（図７１（Ｂ））のグラフを示す。３歳齢のウサギでは１２週齢のウサギよりもＲＰＥ細胞が肥大しており、ＨＦＤ－ＨＱ負荷でさらに肥大することが確認され、ＲＰＥ細胞に障害が現れていることを認めた。加齢黄斑変性症患者の眼球においても同様の変化が観察されている（Ｄｉｎｇ ＪＤ ｅｔ ａｌ．，（２０１１） Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１０８巻（２８号）：２７９－８７頁）。

【０１７３】

（１１－２）網膜障害時のＡＭＤ関連因子Ｃ３発現量の増加

ＡＭＤ関連因子の発現を評価するため、当該ウサギ網膜障害モデルから網膜およびＲＰＥ／脈絡膜からそれぞれ組織を採取し、ＲＮｅａｓｙ ｍｉｎｉ ｋｉｔ （ＱＩＡＧＥＮ）を用いてｍＲＮＡを抽出後、ＴａｑＭａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて逆転写反応を行った。ＴａｑＭａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙ（Ｏｃ０３３９７８３２＿ｇ１およびＯｃ０３８２４８５７＿ｇ１；Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、７９００ＨＴ Ｆａｓｔ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）により補体第三因子Ｃ３および内部標準β－ａｃｔｉｎのｍＲＮＡ量を定量解析した。尚、３歳齢ウサギの例数は４、ＨＦＤ－ＨＱ負荷３歳齢ウサギの例数は１０として解析を実施した。

【０１７４】

網膜、および、ＲＰＥ細胞と脈絡膜におけるＣ３発現量を図７１（Ｃ）および（Ｄ）に示す。いずれの組織においても、ＨＦＤ－ＨＱを与えたウサギ群でＣ３の発現量が亢進していることを認めた。

【０１７５】

（１１－３）網膜障害時のＨＴＲＡ１タンパク量の増加

ウサギ網膜障害モデルにおけるＨＴＲＡ１の関与を調べるため、（６－１）で作製したモデルウサギから硝子体液を採取し、Ｔｒｙｐｓｉｎ／Ｌｙｓ－Ｃ Ｍｉｘ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて酵素消化後、ＬＣ（ＥＡＳＹ－ｎＬＣ １０００； Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）－ＭＳ（ＴｒｉｐｌｅＴＯＦ ６６００；ＳＣＩＥＸ）を用いてＨＴＲＡ１のペプチド断片を定量した。ＨＦＤ－ＨＱを与えたウサギの硝子体液中ではＨＴＲＡ１タンパク量が増加していることが明らかになった（図７１（Ｅ））。以上のことから、ＲＰＥ細胞肥大化およびＡＭＤ関連因子Ｃ３、ＨＴＲＡ１の発現亢進が認められたことから、当該ウサギ網膜障害モデルが加齢性網膜疾患研究に有用であることが示された。

【０１７６】

（１１－４）ウサギ網膜障害モデルにおけるＨＴＲＡ１阻害剤の網膜保護効果

当該ウサギモデルを用いて、実施例１で作製したＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８の網膜保護効果を評価した。ＨＦＤ－ＨＱの給餌開始から２ヶ月後に、４０ｍｇ／ｍＬのＨ３０８溶液５０μＬを麻酔下で片眼に硝子体内に投与した。僚眼には生理食塩水を硝子体内投与した。いずれの群も例数は５であった。
給餌開始４ヶ月後に、モデル動物のＲＰＥ細胞肥大を評価した結果を図７２に示す。ＲＰＥ細胞の平均面積（図７２（Ａ））または細胞面積が１５００μｍ^{2}以上の肥大したＲＰＥ細胞数（図７２（Ｂ））、いずれの指標においても、ＨＴＲＡ１阻害剤はＲＰＥ細胞の肥大に対して抑制効果を示した。図７１（Ｅ）に示す通り、当該モデルの硝子体液中ではＨＴＲＡ１の増加が認められ、ＨＦＤ－ＨＱによるＲＰＥ細胞の障害過程に対してＨＴＲＡ１の関与が示唆された。このように、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、抗加齢黄斑変性症剤として有用であり、本試験ではとりわけ萎縮型の加齢黄斑変性症の予防に有用であることが示された。
また、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドを投与した正常ウサギ網膜においてＨＴＲＡ１阻害ペプチドの存在が認められ、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの高い組織浸透性が示された。
【０１７７】
実施例１２．ヒト網膜色素上皮細胞ＡＲＰＥ－１９を用いたＶＥＧＦ ｍＲＮＡ誘導試験におけるＨＴＲＡ１阻害ペプチドの抑制効果
ＡＲＰＥ－１９細胞を１０％Ｆｅｔａｌ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ（ＦＢＳ）、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）含有のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（和光純薬工業株式会社）を用いて３７℃、５％CO_2条件下で、１２ｍｍ Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ ｗｉｔｈ ０．４μｍ Ｐｏｒｅ Ｐｏｌｙｅｓｔｅｒ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｉｎｓｅｒｔ，Ｓｔｅｒｉｌｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中にてコンフルエントになるまで培養した。その後、ＦＢＳ非含有のＤＭＥＭ／Ｆ－１２で５日間培養し、チャンバー上下層に終濃度が５００μＭのH_2O_2を、チャンバー上層に終濃度２５％のＮｏｒｍａｌ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｕｍ Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ（Ｑｕｉｄｅｌ）をそれぞれ添加した。さらにチャンバー上下層にＨＴＲＡ１（実施例２－２）、ＨＴＲＡ１プロテアーゼ不活性変異体ＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）（実施例２－３）、または、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ（実施例６）をそれぞれ終濃度１μＭとなるように加えた。４時間後に培養上清を除去し、ＰＢＳで洗浄後、ＳｕｐｅｒＰｒｅｐ^{TM} Ｃｅｌｌ Ｌｙｓｉｓ ＆ ＲＴ Ｋｉｔ ｆｏｒ ｑＰＣＲ（東洋紡株式会社）によりｍＲＮＡを抽出し、逆転写反応を行った。ＴａｑＭａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙｓ（Ｈｓ０００９０００５５＿ｍ１およびＨｓ０２７８６６２４＿ｇ１；Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、７９００ＨＴ Ｆａｓｔ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によりＶＥＧＦのｍＲＮＡ量を定量解析した。尚、ｍＲＮＡ量の補正にはＧＡＰＤＨを用いた。
結果を図７４に示す。H_2O_2、Ｎｏｒｍａｌ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｕｍ ＣｏｍｐｌｅｍｅｎｔおよびＨＴＲＡ１不活性変異体ＨＴＲＡ１（Ｓ３２８Ａ）添加条件と比べて、H_2O_2、Ｎｏｒｍａｌ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｕｍ ＣｏｍｐｌｅｍｅｎｔおよびＨＴＲＡ１を添加することで、ＶＥＧＦのｍＲＮＡ量が顕著に増加した。さらに、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａを共添加することにより、ＶＥＧＦの発現抑制が認められた。網膜色素上皮細胞からのＶＥＧＦ誘導は滲出型加齢性黄斑変性病態形成に重要とされている（Ｋｌｅｔｔｎｅｒ Ａ．ｅｔ ａｌ．，（２００９） Ｇｒａｅｆｅｓ Ａｒｃｈ Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ． ２４７巻：１４８７－１４９２頁）。また、病態形成だけでなく、病態の維持にもこれらの病的なＶＥＧＦ誘導が関与していると考えられており、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａ等本発明のペプチドの投与は滲出型加齢性黄斑変性の予防および治療に対して有効である。
【０１７８】
実施例１３．ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿ＤＩＧ＿Ｓ１６Ａによるヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）遊走抑制効果

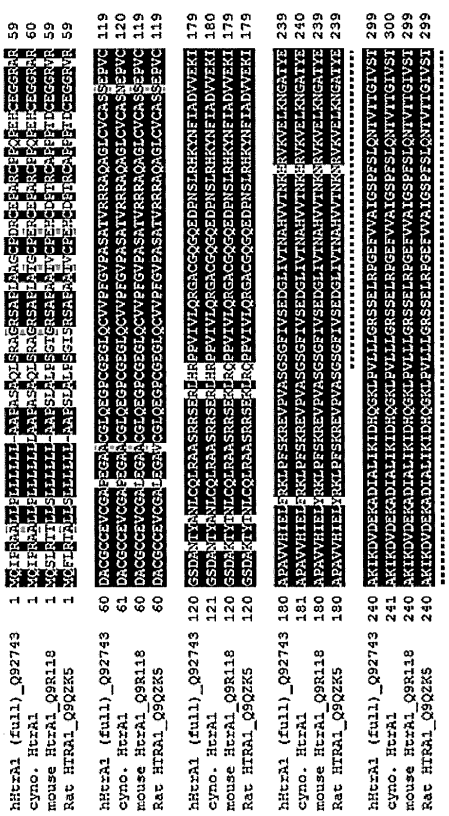
（１３－１）ＨＵＶＥＣ遊走試験
ＨＵＶＥＣ（Ｋｕｒａｂｏ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ）は０．１％ＢＳＡ含有ＥＢＭ™－２基本培地（Ｌｏｎｚａ　Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ）に血清とＶＥＧＦを除いたＥＧＭ™－２　ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔｓ™添加因子セットを添加した培地（０．１％ＢＳＡ含有無血清ＥＧＭ）で３７℃、５％CO_2条件下で１８時間培養した後、０．１％ＢＳＡ含有無血清ＥＧＭで４×10^5個／ｍＬとなるよう調製した。メンブレンをゼラチンコートしたＣｏｒｎｉｎｇ　ＦｌｕｏｒｏＢｌｏｋ　ＨＴＳ　９６　Ｗｅｌｌ　Ｍｕｌｔｉｗｅｌｌ　Ｐｅｒｍｅａｂｌｅ　Ｓｕｐｐｏｒｔ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｗｉｔｈ　３．０　μｍ　Ｈｉｇｈ　Ｄｅｎｓｉｔｙ　ＰＥＴ　Ｍｅｍｂｒａｎｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）のチャンバー上層に、４×10^5個／ｍＬのＨＵＶＥＣ懸濁液を５０μＬ／ウェルで添加した後、チャンバー下層に２１０μＬ／ウェルで下記サンプル（培地１または２、３）を添加した（ｎ＝３）。また、ＨＵＶＥＣを添加していないチャンバー上層には、０．１％ＢＳＡ含有無血清ＥＧＭを５０μＬ添加し、そのチャンバー下層には、０．１％ＢＳＡ含有無血清ＥＧＭを２１０μＬ添加した（ｎ＝３）。
培地１；０．１％ＢＳＡ含有無血清ＥＧＭ
培地２；全てのＥＧＭ™－２　ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔｓ™ 添加因子を添加したＥＢＭ™－２培地（ＥＧＭ増殖培地）
培地３；３００ｎＭのＨ３０８＿ＤＩＧ＿Ｓ１６Ａを含むＥＧＭ増殖培地
細胞とサンプルを添加したＦｌｕｏｒｏＢｌｏｋ　ＨＴＳ　９６　Ｗｅｌｌ　Ｍｕｌｔｉｗｅｌｌ　Ｓｕｐｐｏｒｔ　Ｓｙｓｔｅｍを３７℃、５％CO_2条件下で２時間インキュベーションし、下層へ遊走したＨＵＶＥＣをＰＢＳで洗浄後、４μｇ／ｍＬのＣａｌｃｅｉｎ－ＡＭ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）含有０．１％ＢＳＡ含有無血清ＥＧＭで１５分間染色した。その後、培地をＰＢＳに置換し、各ウェルの蛍光強度（励起波長／蛍光波長：４８５ｎｍ／５３５ｎｍ）をプレートリーダー（ＡＲＶＯ－ＭＸ、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で測定し、次式で各ウェルの遊走細胞を算出した。
遊走細胞＝ＨＵＶＥＣ存在ウェルの蛍光強度の平均（ｎ＝３）－ブランクウェルの蛍光強度の平均（ｎ＝３）。
結果を図７５に示す。ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８＿ＤＩＧ＿Ｓ１６Ａは血清含有培地で誘導されたＨＵＶＥＣの遊走に対して抑制効果を認めた。よって、本発明のペプチドは、滲出型加齢黄斑変性症の特徴である血管新生に対して抑制効果を示すことが明らかになった。
【０１７９】
実施例１４．ウサギ網膜障害モデルにおけるＨＴＲＡ１阻害ペプチドの網膜保護効果（その２）
実施例（１１－１）～（１１－３）で作製、評価したウサギ網膜障害モデルを用いて、実施例１で作製したＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８又は実施例６で作製した３種のＨＴＲＡ１阻害ペプチドのうち１種の網膜障害に対する治療効果を評価する。４０ｍｇ／ｍＬの阻害ペプチド溶液５０μＬを麻酔下でモデル動物の片眼に硝子体内に投与し２ヶ月間飼育する。僚眼には生理食塩水を硝子体内投与する。いずれの群も例数は５とする。
生理食塩水投与群ではＲＰＥ細胞面積の増大又は細胞数の増加が見られるのに対し、ＨＴＲＡ１阻害ペプチド投与群ではＲＰＥ細胞面積の増大又は細胞数の増加が抑制されるであろう。このように、ＨＴＲＡ１阻害ペプチドは、抗加齢黄斑変性症剤として有用であること、本実施例ではとりわけ萎縮型の加齢黄斑変性症の治療に有用であることを確認することができる。
【産業上の利用可能性】
【０１８０】
本発明の提供するペプチド、及び、それを含む医薬組成物は、加齢黄斑変性症等の治療又は予防等に有用である。
【配列表フリーテキスト】
【０１８１】

配列番号１：ヒトＳＰＩＮＫ２のアミノ酸配列（図１３）
配列番号２：ヒトＳＰＩＮＫ２のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図１４）
配列番号３：ペプチドＨ２１８のアミノ酸配列（図１５）
配列番号４：ペプチドＨ２１８のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図１６）
配列番号５：ペプチドＨ２２３のアミノ酸配列（図１７）
配列番号６：ペプチドＨ２２３のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図１８）
配列番号７：ペプチドＨ２２８のアミノ酸配列（図１９）
配列番号８：ペプチドＨ２２８のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図２０）
配列番号９：ペプチドＨ３０８のアミノ酸配列（図２１）
配列番号１０：ペプチドＨ３０８のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図２２）
配列番号１１：ペプチドＨ３２１のアミノ酸配列（図２３）
配列番号１２：ペプチドＨ３２１のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図２４）
配列番号１３：ペプチドＨ３２２のアミノ酸配列（図２５）
配列番号１４：ペプチドＨ３２２のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図２６）
配列番号１５：ペプチド誘導体Ｈ３０８ＡＴのアミノ酸配列（図２７）
配列番号１６：ペプチド誘導体Ｈ３０８ＡＴのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図２８）
配列番号１７：ペプチド誘導体Ｈ３２１ＡＴのアミノ酸配列（図２９）
配列番号１８：ペプチド誘導体Ｈ３２１ＡＴのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図３０）
配列番号１９：ペプチド誘導体Ｈ３２２ＡＴのアミノ酸配列（図３１）
配列番号２０：ペプチド誘導体Ｈ３２２ＡＴのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図３２）
配列番号２１：ペプチドＭ７のアミノ酸配列（図３３）
配列番号２２：ペプチドＭ７のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（図３４）
配列番号２３：ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（図３５）
配列番号２４：ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（図３６）
配列番号２５：ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｄ１Ｓ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（図３７）
配列番号２６：ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｄ１Ｅ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（図３８）
配列番号２７：ペプチド誘導体Ｈ３０８＿Ｄ１ＳＬＩ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（図３９）
配列番号２８：ペプチド誘導体Ｈ３２１ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（図４０）
配列番号２９：ペプチド誘導体Ｈ３２２ＡＴ＿Ｄ１Ｇ＿Ｓ１６Ａのアミノ酸配列（図４１）
配列番号３０：ＨＴＲＡ１阻害ペプチドの一般式（図４２）
配列番号３１：Ｓ　ｔａｇ及びリンカーからなるアミノ酸配列（図４３）
配列番号３２：Ｃ末６マーのアミノ酸配列（図４４）
配列番号３３：プライマー１のヌクレオチド配列（図４５）
配列番号３４：プライマー２のヌクレオチド配列（図４６）
配列番号３５：プライマー３のヌクレオチド配列（図４７）
配列番号３６：プライマー４のヌクレオチド配列（図４８）
配列番号３７：プライマー５のヌクレオチド配列（図４９）
配列番号３８：プライマー６のヌクレオチド配列（図５０）
配列番号３９：プライマー７のヌクレオチド配列（図５１）
配列番号４０：プライマー８のヌクレオチド配列（図５２）
配列番号４１：プライマー９のヌクレオチド配列（図５３）
配列番号４２：プライマー１０のヌクレオチド配列（図５４）
配列番号４３：プライマー１１のヌクレオチド配列（図５５）
配列番号４４：プライマー１２のヌクレオチド配列（図５６）
配列番号４５：プライマー１３のヌクレオチド配列（図５７）
配列番号４６：プライマー１４のヌクレオチド配列（図５８）
配列番号４７：プライマー１５のヌクレオチド配列（図５９）

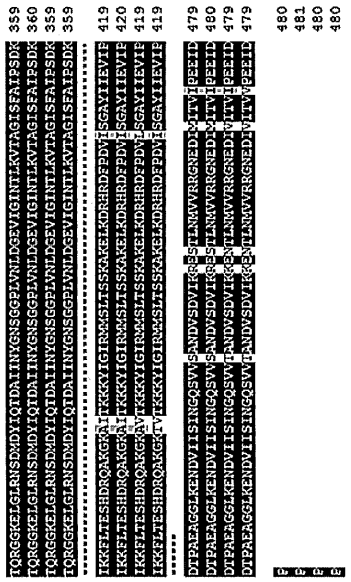
配列番号４８：プライマー１６のヌクレオチド配列（図６０）
配列番号４９：プライマー１７のヌクレオチド配列（図６１）
配列番号５０：プライマー１８のヌクレオチド配列（図６２）
配列番号５１：プライマー１９のヌクレオチド配列（図６３）
配列番号５２：プライマー２０のヌクレオチド配列（図６４）
配列番号５３：ヒトＨＴＲＡＩ（ｆｕｌｌ）のアミノ酸配列（図６５）
配列番号５４：Ｈ２－Ｏｐｔのアミノ酸配列（図８）
配列番号５５：プライマー２１のヌクレオチド配列（図７６）
配列番号５６：プライマー２２のヌクレオチド配列（図７７）

【図面】

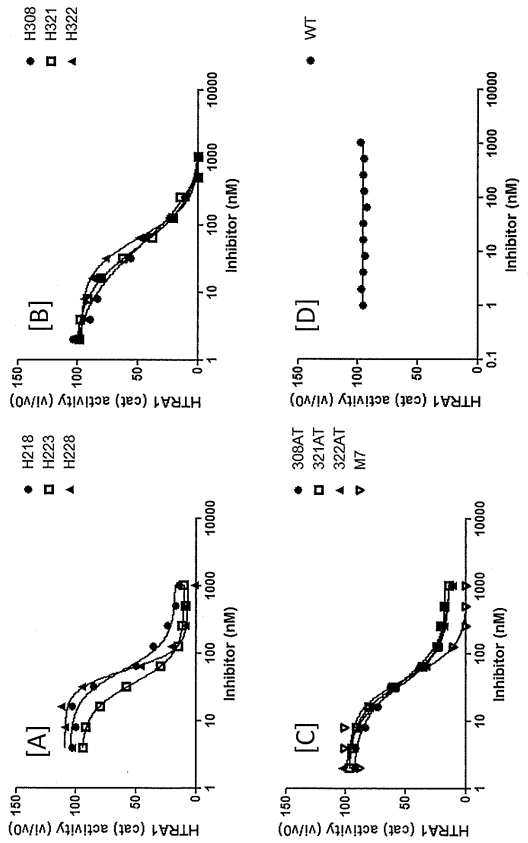
【図１（Ａ）】



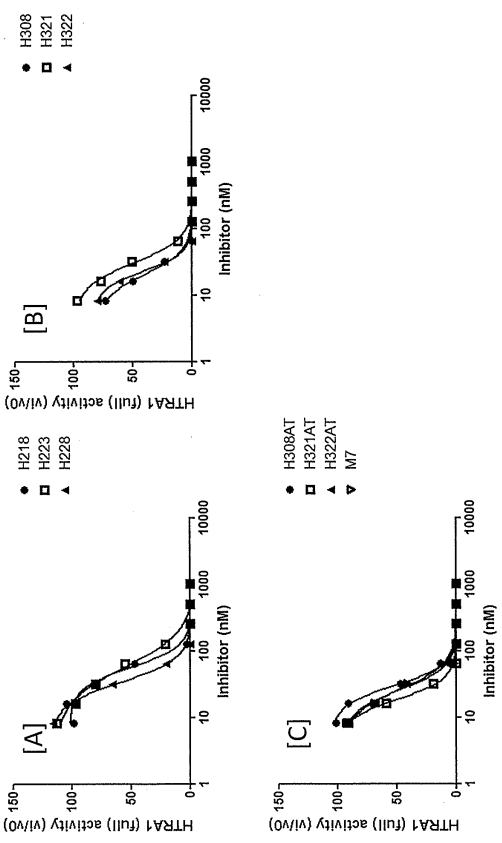
【図１（Ｂ）】



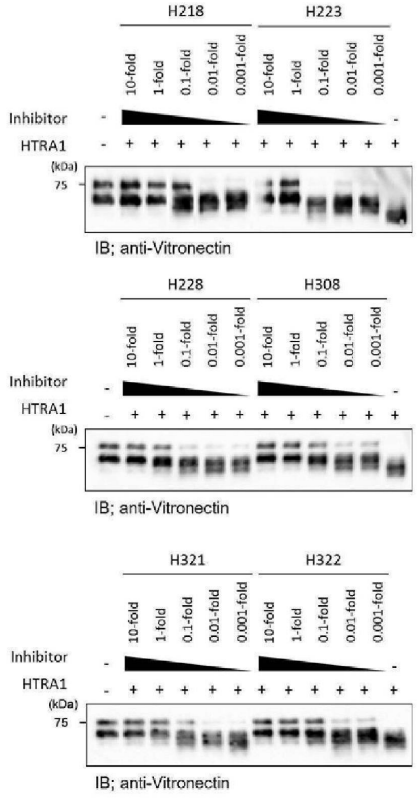
【図２】


H308
H321
H322
WT
H218
H223
H228
308AT
321AT
322AT
M7
[A]
[B]
[C]
[D]
HTRA1 (cat) activity (V1/V0)
Inhibitor (nM)

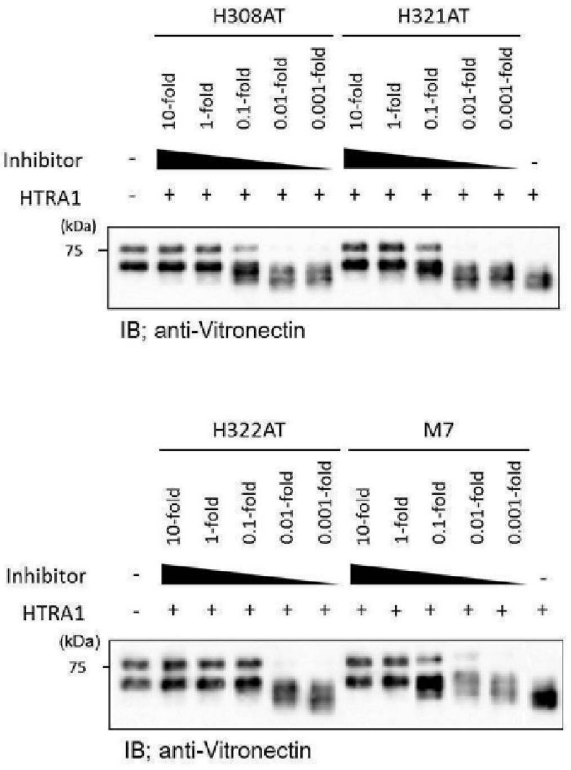
【図３】


H308
H321
H322
H218
H223
H228
H308AT
H321AT
H322AT
M7
[A]
[B]
[C]
HTRA1 (full) activity (V1/V0)
Inhibitor (nM)

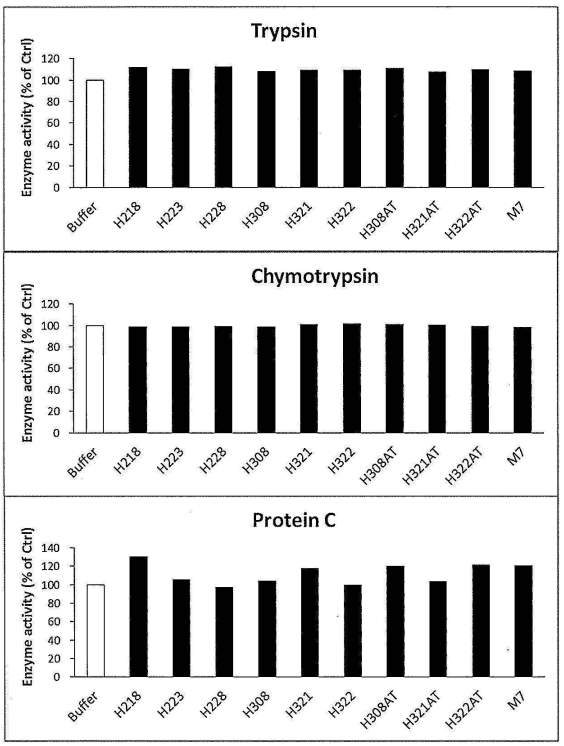
【図４（Ａ）】


H218
H223
H228
H308
H321
H322
10-fold
1-fold
0.1-fold
0.01-fold
0.001-fold
Inhibitor
HTRA1
(kDa)
75
IB; anti-Vitronectin

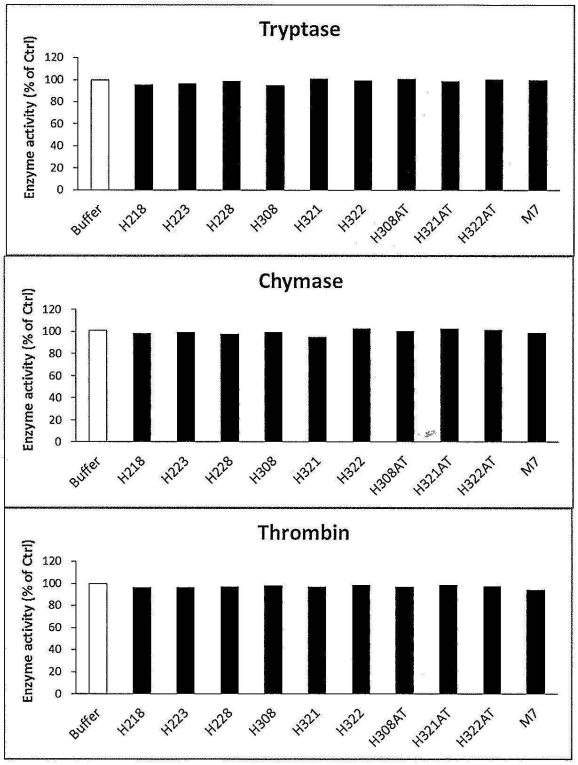
【図４（Ｂ）】


H308AT
H321AT
H322AT
M7
10-fold
1-fold
0.1-fold
0.01-fold
0.001-fold
Inhibitor
HTRA1
(kDa)
75
IB; anti-Vitronectin

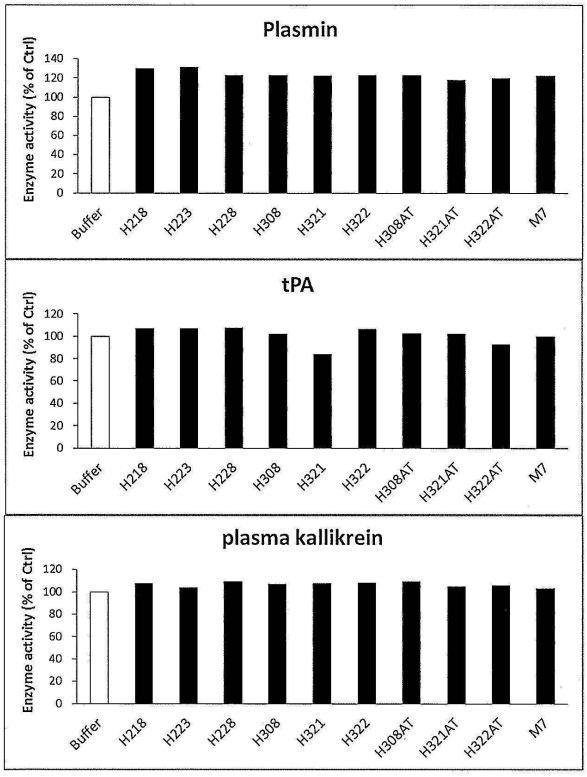
【図５（Ａ）】



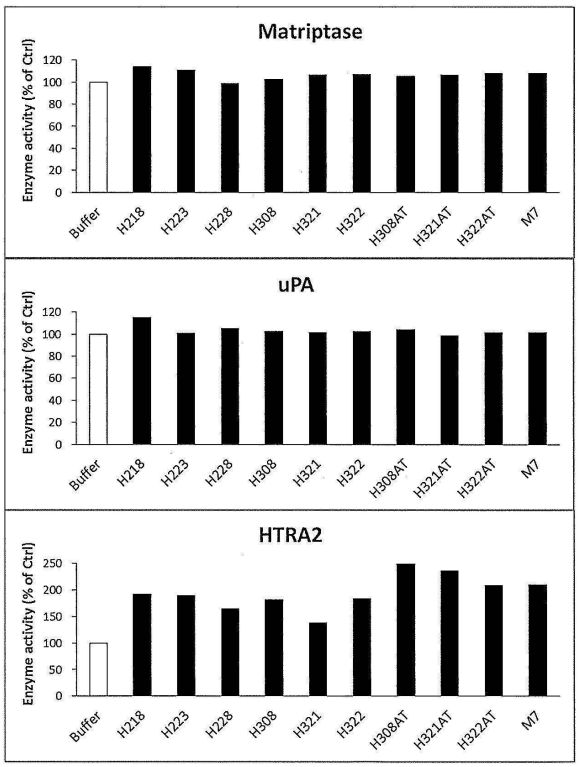
【図５（Ｂ）】



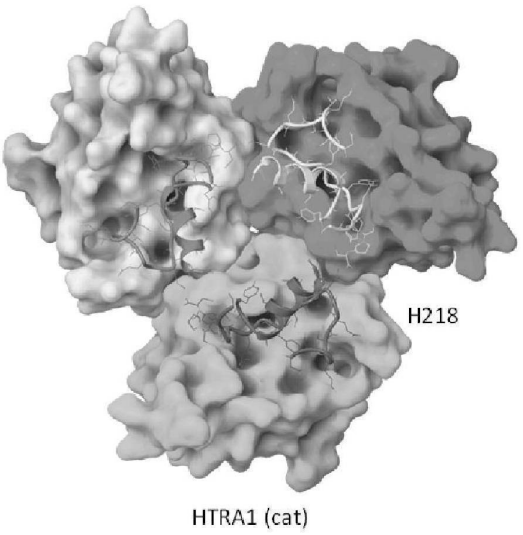
【図５（Ｃ）】



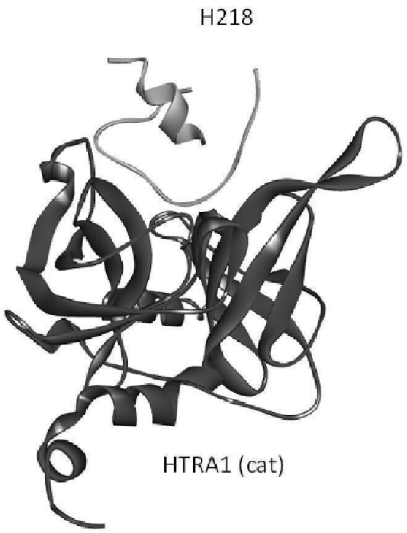
【図５（Ｄ）】



【図６】



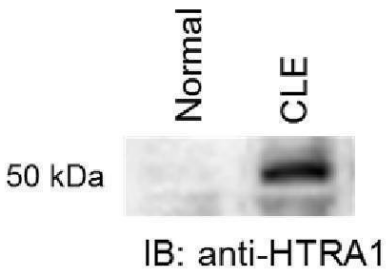
【図７】



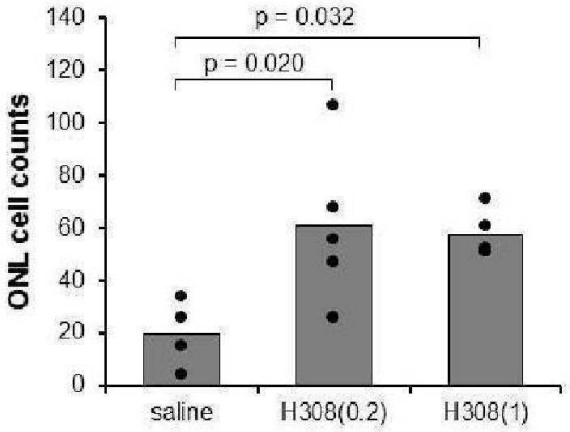
【図８】

Ｈ２－Ｏｐｔ
Ｍｃａ－ＩＲＲＶＳＹＳＦＫ（Ｄｎｐ）Ｋ（配列番号５４）

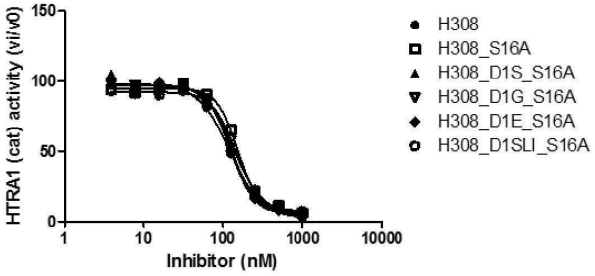
【図９】



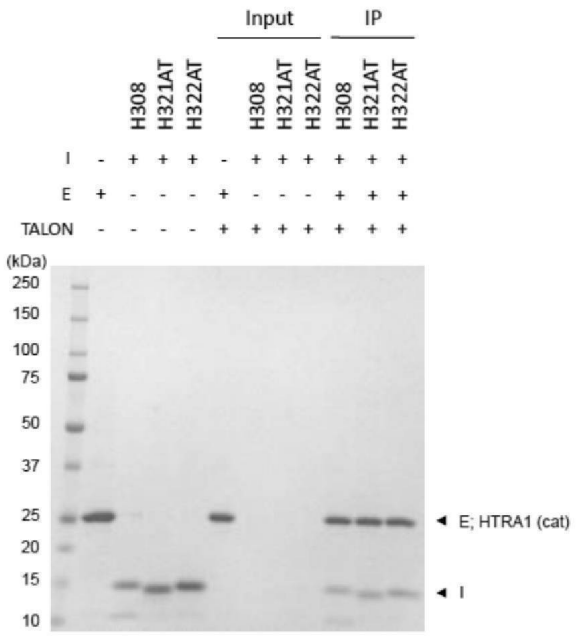
【図１０】



【図１１】



【図１２】



【図１３】

ヒトSPINK2
DPQFGLFSKYRTPNCSQYRLPGCPRHFNPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC（配列番号1）

【図１４】

ヒトＳＰＩＮＫ２

ＧＡＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧＣＡＡＡＴＡＴＣＧＴＡＣ
ＣＣＣＧＡＡＴＴＧＴＡＧＣＣＡＧＴＡＴＣＧＴＣＴＧＣＣＴＧＧＴＴＧＴＣ
ＣＧＣＧＴＣＡＴＴＴＴＡＡＴＣＣＧＧＴＴＴＧＴＧＧＴＡＧＣＧＡＴＡＴＧ
ＡＧＣＡＣＣＴＡＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＴＧＴＡＣＣＣＴＧＴＧＣＡＴＧＡＡ
ＡＡＴＴＣＧＴＧＡＡＧＧＴＧＧＣＣＡＴＡＡＴＡＴＴＡＡＡＡＴＴＡＴＴＣ
ＧＣＡＡＴＧＧＴＣＣＧＴＧＣＴＡＡ（配列番号２）

【図１５】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ２１８

ＤＰＱＦＧＬＦＳＫＹＲＴＰＮＣＬＫＳＥＧＭＡＣＹＡＹＹＥＰＶＣＧＳＤＭ
ＳＴＹＡＮＥＣＴＬＣＭＫＩＲＥＧＧＨＮＩＫＩＩＲＮＧＰＣＧＧ（配列番号３）

【図１６】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ２１８

ＧＡＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧＣＡＡＡＴＡＴＣＧＴＡＣ
ＣＣＣＧＡＡＴＴＧＴＣＴＧＡＡＡＴＣＴＧＡＡＧＧＴＡＴＧＧＣＴＴＧＴＴ
ＡＣＧＣＴＴＡＣＴＡＣＧＡＡＣＣＧＧＴＴＴＧＴＧＧＴＡＧＣＧＡＴＡＴＧ
ＡＧＣＡＣＣＴＡＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＴＧＴＡＣＣＣＴＧＴＧＣＡＴＧＡＡ
ＡＡＴＴＣＧＴＧＡＡＧＧＴＧＧＣＣＡＴＡＡＴＡＴＴＡＡＡＡＴＴＡＴＴＣ
ＧＣＡＡＴＧＧＴＣＣＧＴＧＣＧＧＣＧＧＣＴＡＡ（配列番号４）

【図１７】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ２２３

ＤＰＱＦＧＬＦＳＫＹＲＴＰＮＣＴＭＤＭＧＭＡＣＷＡＦＹＥＰＶＣＧＳＤＭ
ＳＴＹＡＮＥＣＴＬＣＭＫＩＲＥＧＧＨＮＩＫＩＩＲＮＧＰＣＧＧ（配列番号５）

【図１８】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ２２３

ＧＡＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧＣＡＡＡＴＡＴＣＧＴＡＣ
ＣＣＣＧＡＡＴＴＧＴＡＣＴＡＴＧＧＡＣＡＴＧＧＧＴＡＴＧＧＣＴＴＧＴＴ
ＧＧＧＣＴＴＴＣＴＡＣＧＡＡＣＣＧＧＴＴＴＧＴＧＧＴＡＧＣＧＡＴＡＴＧ
ＡＧＣＡＣＣＴＡＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＴＧＴＡＣＣＣＴＧＴＧＣＡＴＧＡＡ
ＡＡＴＴＣＧＴＧＡＡＧＧＴＧＧＣＣＡＴＡＡＴＡＴＴＡＡＡＡＴＴＡＴＴＣ
ＧＣＡＡＴＧＧＴＣＣＧＴＧＣＧＧＣＧＧＣＴＡＡ（配列番号６）

【図１９】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ２２８

ＤＰＱＦＧＬＦＳＫＹＲＴＰＮＣＧＨＹＮＧＷＡＣＱＡＦＦＥＰＶＣＧＳＤＭ
ＳＴＹＡＮＥＣＴＬＣＭＫＩＲＥＧＧＨＮＩＫＩＩＲＮＧＰＣＧＧ（配列番号７）

【図２０】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ２２８

ＧＡＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧＣＡＡＡＴＡＴＣＧＴＡＣ
ＣＣＣＧＡＡＴＴＧＴＧＧＴＣＡＴＴＡＣＡＡＣＧＧＴＴＧＧＧＣＴＴＧＴＣ
ＡＧＧＣＴＴＴＣＴＴＣＧＡＡＣＣＧＧＴＴＴＧＴＧＧＴＡＧＣＧＡＴＡＴＧ
ＡＧＣＡＣＣＴＡＴＧＣＡＡＡＴＧＡＡＴＧＴＡＣＣＣＴＧＴＧＣＡＴＧＡＡ
ＡＡＴＴＣＧＴＧＡＡＧＧＴＧＧＣＣＡＴＡＡＴＡＴＴＡＡＡＡＴＴＡＴＴＣ
ＧＣＡＡＴＧＧＴＣＣＧＴＧＣＧＧＣＧＧＣＴＡＡ（配列番号８）

【図２１】

ＨＴＲＡ１阻害ペプチドＨ３０８

ＤＰＱＦＧＬＦＳＫＹＲＴＰＮＣＳＤＨＡＧＭＡＣＶＡＬＹＥＰＶＣＧＳＤＭ
ＳＴＹＥＮＥＣＶＬＣＭＫＩＲＥＧＧＨＮＩＫＩＩＲＮＧＰＣＧＧ（配列番号９）

【図２２】

HTRA1阻害ペプチドH308
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGGCATGTG
TTGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGAAAATGAATGTGTTCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA（配列番号１０）

【図２３】

HTRA1阻害ペプチドH321
DPQFGLFSKYRTPNCSDFDGMACYAFYEPVCGSDM
STYMNECALCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
１１）

【図２４】

HTRA1阻害ペプチドH321
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACTTCGACGGTATGGCATGTT
ACGCTTTCTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATATGAATGAATGTGCTCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA（配列番号１２）

【図２５】

HTRA1阻害ペプチドH322
DPQFGLFSKYRTPNCSQHEGMACYALYEPVCGSDM
STYVNECALCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
１３）

【図２６】

HTRA1阻害ペプチドH322
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCCAGCATGAAGGTATGGCATGTT
ACGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGTTAATGAATGTGCTCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA（配列番号１４）

【図２７】

HTRA1阻害ペプチドH308AT
DPQFGLFSKYRTPNCSDHAGMACVALYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
１５）

【図２８】

HTRA1阻害ペプチドH308AT
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGGCATGTG
TTGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA（配列番号１６）

【図２９】

HTRA1阻害ペプチドH321AT
DPQFGLFSKYRTPNCSDFDGMACYAFYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
１７）

【図３０】

HTRA１阻害ペプチドH３２１AT
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACTTCGACGGTATGGCATGTT
ACGCTTTCTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA（配列番号１８）

【図３１】

HTRA１阻害ペプチドH３２２AT
DPQFGLFSKYRTPNCSQHEGMACYALYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
１９）

【図３２】

HTRA１阻害ペプチドH３２２AT
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCCAGCATGAAGGTATGGCATGTT
ACGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA（配列番号２０）

【図３３】

HTRA１阻害ペプチドM７
DPQFGLFSKYRTPNCSDHAGMACVAFYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
２１）

【図３４】

HTRA１阻害ペプチドM７
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGGCATGTG
TTGCTTTTTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA（配列番号２２）

【図３５】

HTRA１阻害ペプチドH３０８＿S１６A
DPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
２３）

【図３６】

HTRA１阻害ペプチドH３０８＿D１G＿S１６A
GPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
２４）

【図３７】

HTRA１阻害ペプチドH３０８＿D１S＿S１６A
SPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
２５）

【図３８】

HTRA１阻害ペプチドH３０８＿D１E＿S１６A
EPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号
２６）

【図３９】

HTRA１阻害ペプチドH３０８＿D１SLI＿S１６A
SLIPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGS
DMSTYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列
番号２７）

【図４０】

H３２１AT_D１G_S１６A
GPQFGLFSKYRTPNCADFDGMACYAFYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号２８）

【図４１】

H３２２AT_D１G_S１６A
GPQFGLFSKYRTPNCAQHEGMACYALYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（配列番号２９）

【図４２】

HTRA１阻害ペプチドの一般式
X_1PQFGLFSKYRTPNC$X_2X_3X_4X_5$GX_6ACX_7AX_8X_9EPV
CGSDMSTYX_{10}NECX_{11}LCMKIREGGHNIKIIRNGPC
（配列番号３０）

【図４３】

Ｓｔａｇ＋リンカー
GSGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIG
SANS（配列番号３１）

【図４４】

C末６マー
GASAAA（配列番号３２）

【図４５】

プライマー１
AAAAGAATTCTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG
（配列番号３３）

【図４６】

プライマー２
AAAACTCGAGTTATGCGGCCGCAGACGCGCCGCAC
GGACC（配列番号３４）

【図４７】

プライマー３
AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTG
GTCTGTTTAG（配列番号３５）

【図４８】

プライマー４
AAAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCGA
ATAATTTTA（配列番号３６）

【図４９】

プライマー５
AAACATATGGGGCAGGAAGATCCCAACAGTTTGC
（配列番号３７）

【図５０】

プライマー６
AAACTCGAGTTTGGCCTGTCGGTCATGGGACTC（配列番号３８）

【図５１】

プライマー７
AAAAGAATTCGCCACCATGCAGATTCCTAGAGCCG
（配列番号３９）

【図５２】

プライマー８
AAAACTCGAGTCAGTGGTGATGGTGGTGGTGGCCG
G（配列番号４０）

【図５３】

プライマー９
CTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCGCCGGGGTCGA
TTTCCTC（配列番号４１）

【図５４】

プライマー１０
ＧＣＧＡＣＴＡＣＡＡＧＧＡＣＧＡＴＧＡＣＧＡＣＡＡＧＣＡＣＣＡＣＣＡＣ
ＣＡＴＣＡＴＣＡＣ（配列番号４２）

【図５５】

プライマー１１
ＡＡＡＡＡＣＴＣＧＡＧＣＴＡＧＴＧＡＴＧＡＴＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＣＴＴ
ＧＴＣＧＴＣ（配列番号４３）

【図５６】

プライマー１２
ＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧＣＡＡＡＴＡＴＣＧＴＡＣＣＣＣ
ＧＡＡＴＴＧＴ（配列番号４４）

【図５７】

プライマー１３
ＧＣＣＡＴＡＣＣＡＧＣＡＴＧＧＴＣＣＧＣＡＣＡＡＴＴＣＧＧＧＧＴＡＣＧ
ＡＴＡＴＴＴＧＣ（配列番号４５）

【図５８】

プライマー１４
ＧＣＧＧＡＣＣＡＴＧＣＴＧＧＴＡＴＧＧＣＡＴＧＴＧＴＴＧＣＴＣＴＧＴＡ
ＴＧＡＡＣ（配列番号４６）

【図５９】

プライマー１５
ＡＡＡＡＣＴＣＧＡＧＴＴＡＧＣＣＧＣＣＧＣＡＣＧＧＡＣＣＡＴＴＧＣＧＡ
ＡＴＡＡ（配列番号４７）

【図６０】

プライマー１６
ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＧＡＴＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧ
ＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ（配列番号４８）

【図６１】

プライマー１７
ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＧＧＣＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧ
ＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ（配列番号４９）

【図６２】

プライマー１８
ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＡＧＣＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧ
ＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ（配列番号５０）

【図６３】

プライマー１９
ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＧＡＡＣＣＧＣＡＧＴＴＴＧ
ＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ（配列番号５１）

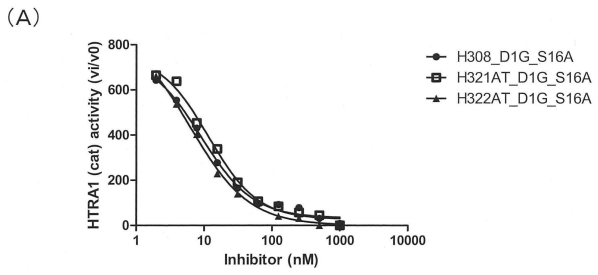
【図６４】

プライマー２０
ＡＡＡＡＧＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＡＡＡＣＧＴＡＧＣＣＴＧＡＴＴＣＣＧＣ
ＡＧＴＴＴＧＧＴＣＴＧＴＴＴＡＧ（配列番号５２）

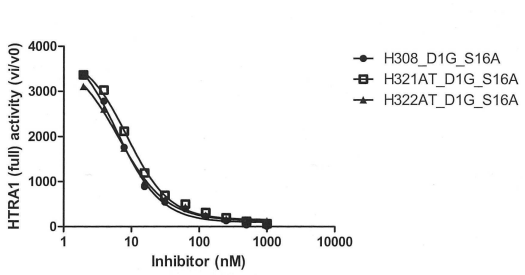
【図６５】

ヒトＨＴＲＡ１（ｆｕｌｌ）
ＱＬＳＲＡＧＲＳＡＰＬＡＡＧＣＰＤＲＣＥＰＡＲＣＰＰＱＰＥＨＣＥＧＧＲ
ＡＲＤＡＣＧＣＣＥＶＣＧＡＰＥＧＡＡＣＧＬＱＥＧＰＣＧＥＧＬＱＣＶＶＰ
ＦＧＶＰＡＳＡＴＶＲＲＲＡＱＡＧＬＣＶＣＡＳＳＥＰＶＣＧＳＤＡＮＴＹＡ
ＮＬＣＱＬＲＡＡＳＲＲＳＥＲＬＨＲＰＰＶＩＶＬＱＲＧＡＣＧＱＧＱＥＤＰ
ＮＳＬＲＨＫＹＮＦＩＡＤＶＶＥＫＩＡＰＡＶＶＨＩＥＬＦＲＫＬＰＦＳＫＲ
ＥＶＰＶＡＳＧＳＧＦＩＶＳＥＤＧＬＩＶＴＮＡＨＶＶＴＮＫＨＲＶＫＶＥＬ
ＫＮＧＡＴＹＥＡＫＩＫＤＶＤＥＫＡＤＩＡＬＩＫＩＤＨＱＧＫＬＰＶＬＬＬ
ＧＲＳＳＥＬＲＰＧＥＦＶＶＡＩＧＳＰＦＳＬＱＮＴＶＴＴＧＩＶＳＴＴＱＲ
ＧＧＫＥＬＧＬＲＮＳＤＭＤＹＩＱＴＤＡＩＩＮＹＧＮＳＧＧＰＬＶＮＬＤＧ
ＥＶＩＧＩＮＴＬＫＶＴＡＧＩＳＦＡＩＰＳＤＫＩＫＫＦＬＴＥＳＨＤＲＱＡ
ＫＧＫＡＩＴＫＫＫＹＩＧＩＲＭＭＳＬＴＳＳＫＡＫＥＬＫＤＲＨＲＤＦＰＤ
ＶＩＳＧＡＹＩＩＥＶＩＰＤＴＰＡＥＡＧＧＬＫＥＮＤＶＩＩＳＩＮＧＱＳＶ
ＶＳＡＮＤＶＳＤＶＩＫＲＥＳＴＬＮＭＶＶＲＲＧＮＥＤＩＭＩＴＶＩＰＥＥ
ＩＤＰ（配列番号５３）

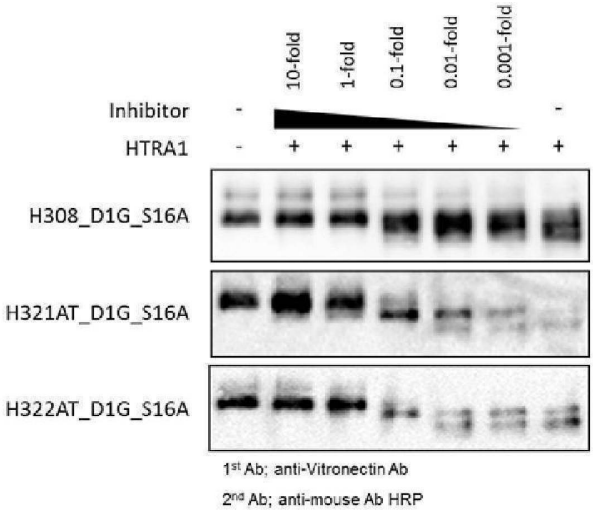
【図６６（Ａ）】



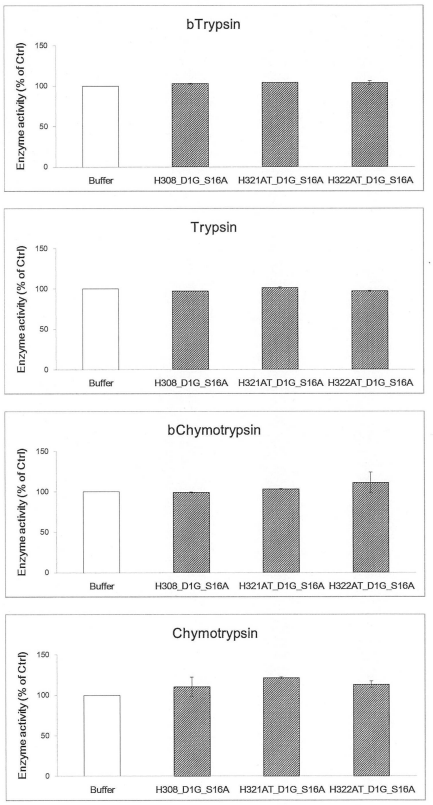
【図６６（Ｂ）】



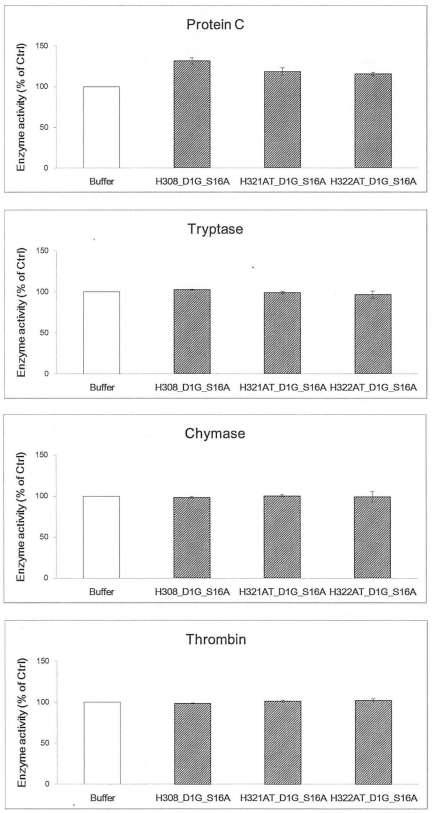
【図６７】



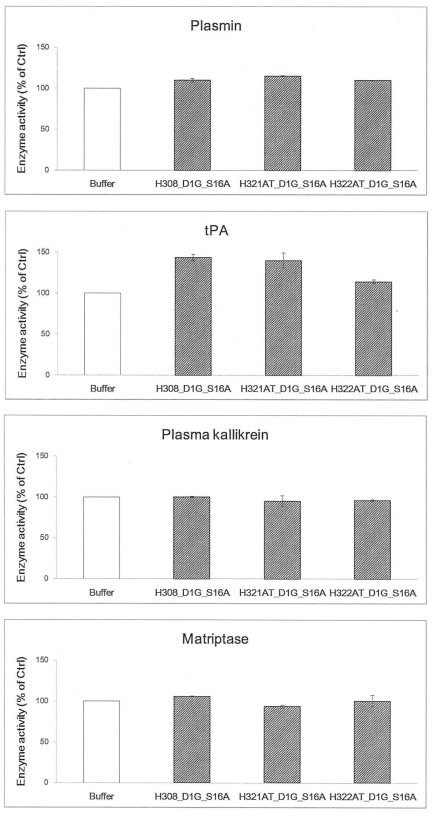
【図６８（Ａ）】



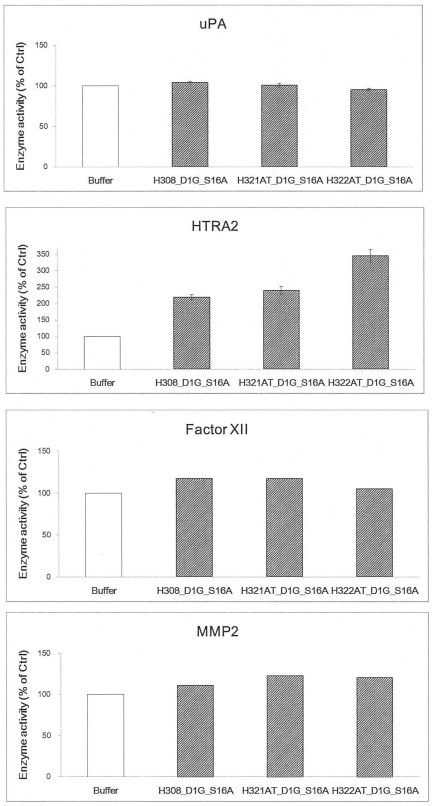
【図６８（Ｂ）】



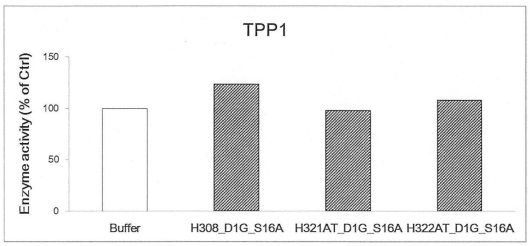
【図６８（Ｃ）】



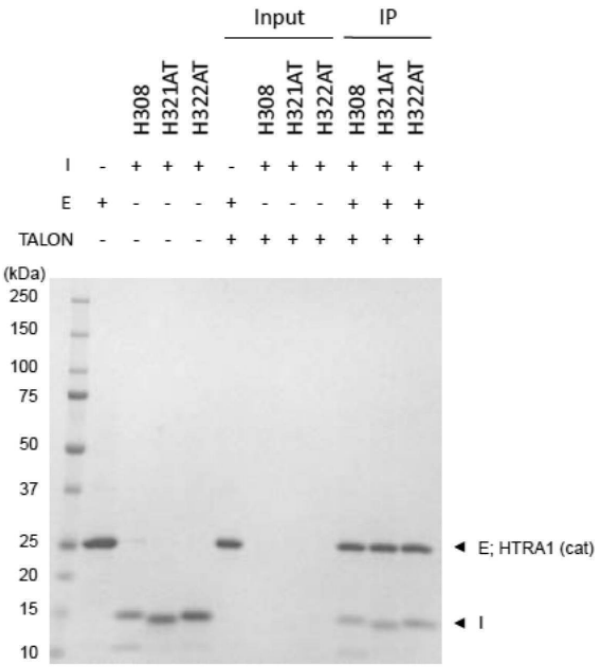
【図６８（Ｄ）】



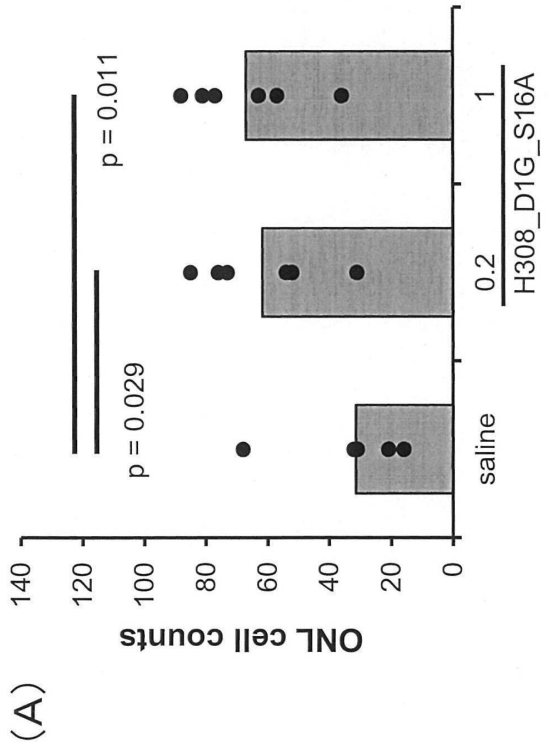
【図６８（Ｅ）】



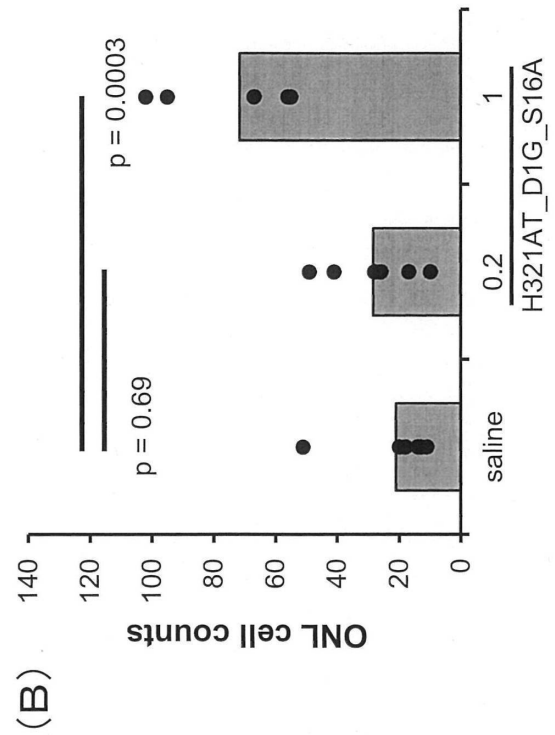
【図６９】



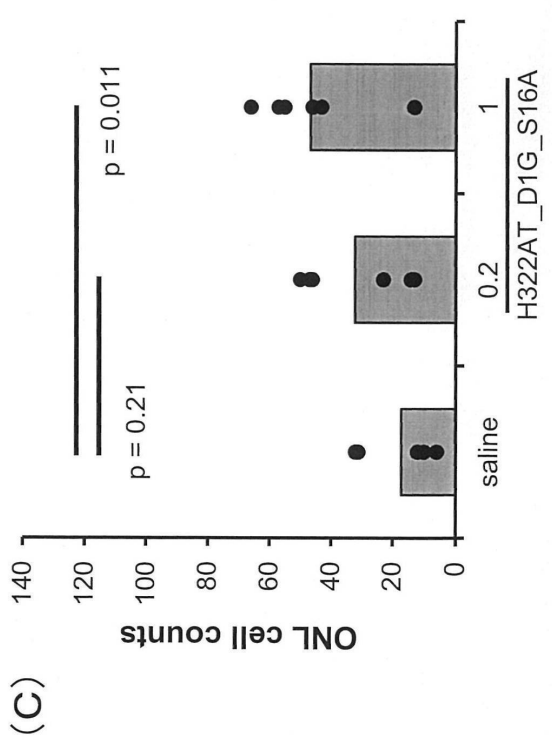
【図７０（Ａ）】



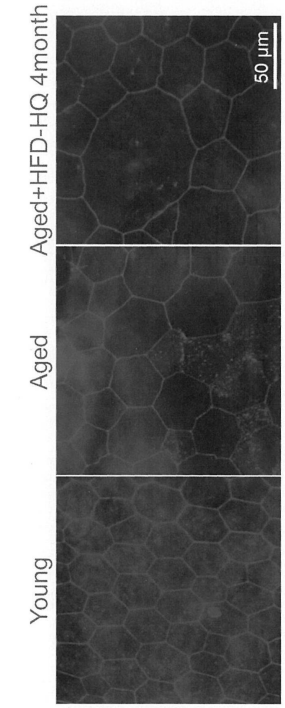
【図７０（Ｂ）】



【図７０（Ｃ）】

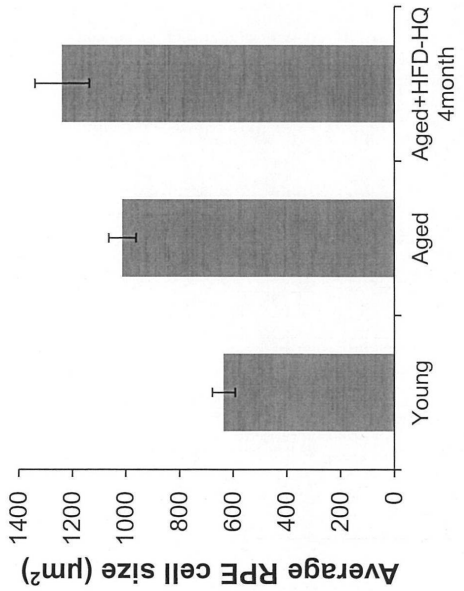


【図７１（Ａ）】



（A）

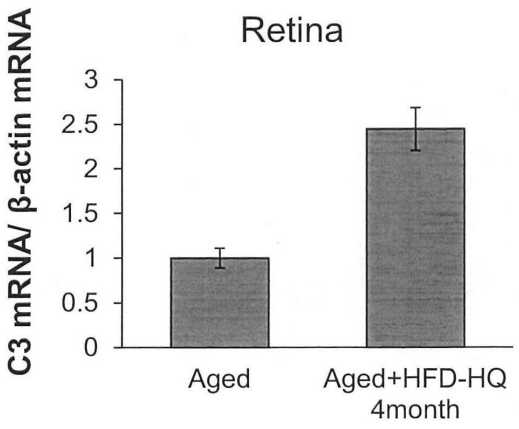
【図７１（Ｂ）】



（B）

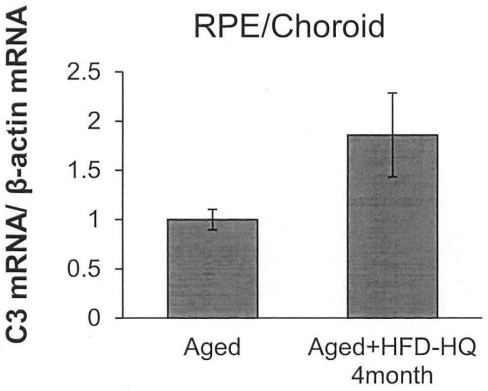
【図７１（Ｃ）】

（C）

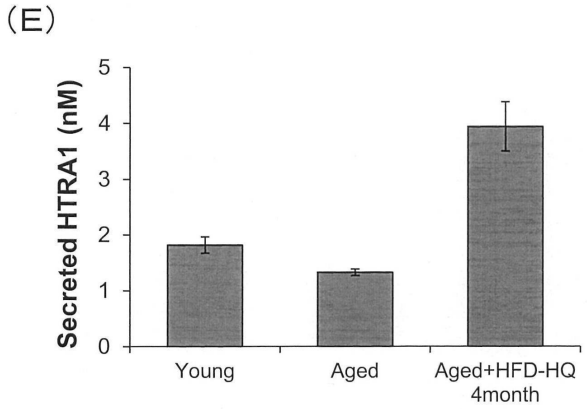


【図７１（Ｄ）】

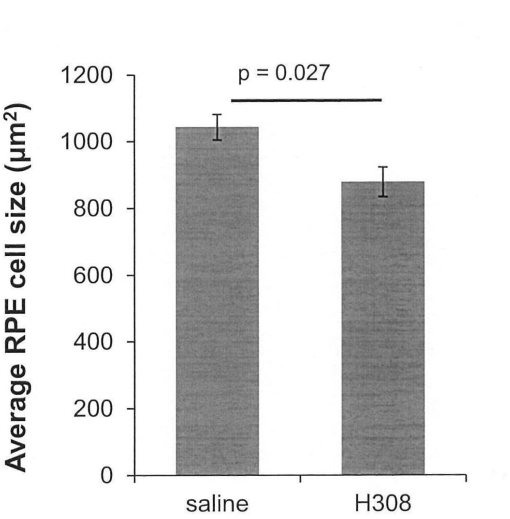
（D）



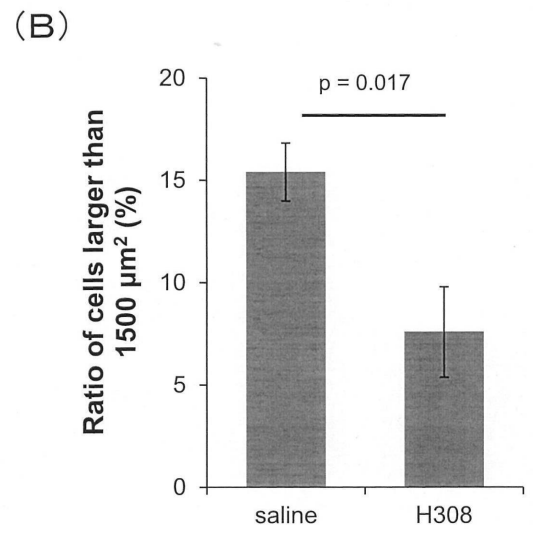
【図７１（Ｅ）】



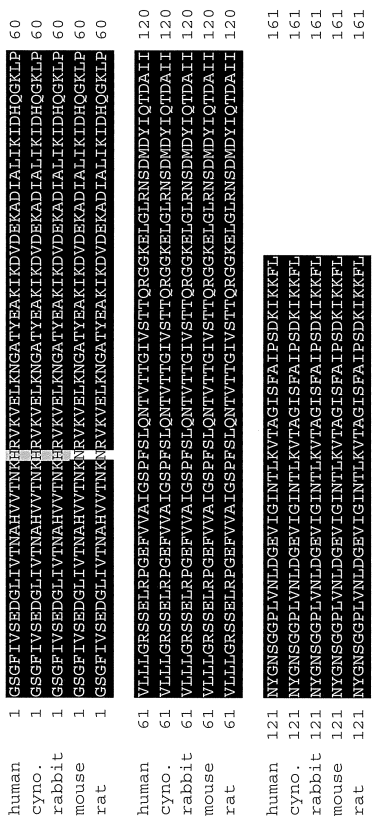
【図７２（Ａ）】



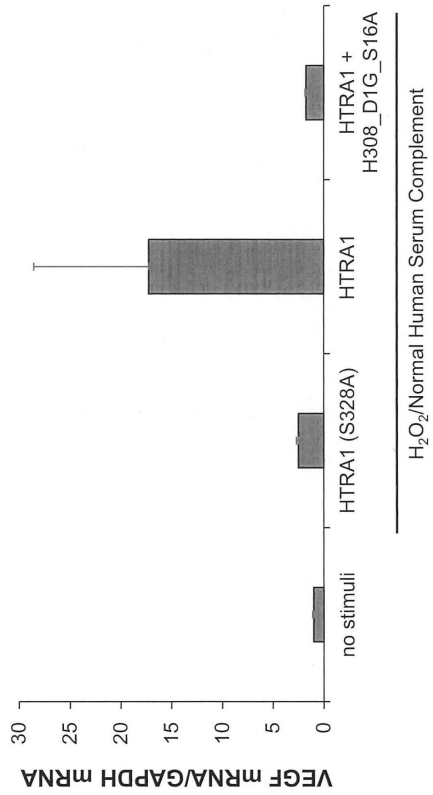
【図７２（Ｂ）】



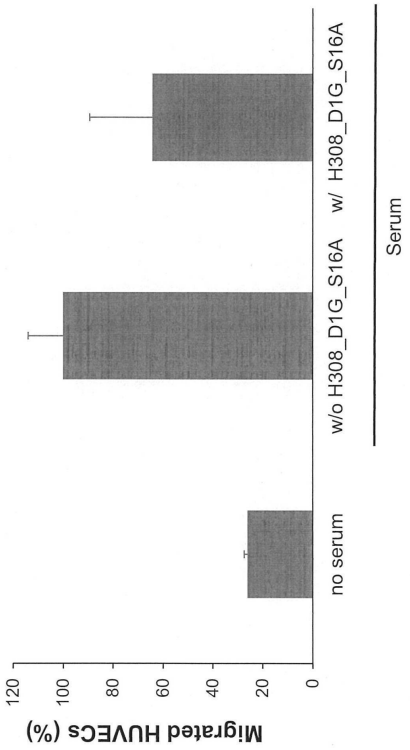
【図７３】



【図７４】



【図７５】



【図７６】

プライマー２１

ＣＣＡＴＣＡＴＣＡＡＣＴＡＣＧＧＣＡＡＣＧＣＧＧＧＣＧＧＡＣＣＣＣＴＣＧＴＧＡＡＣＣ（配列番号５５）

【図７７】

プライマー２２

ＧＧＴＴＣＡＣＧＡＧＧＧＧＴＣＣＧＣＣＣＧＣＧＴＴＧＣＣＧＴＡＧＴＴＧＡＴＧＡＴＧＧ（配列番号５６）

【配列表】

0007019600000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10	
C12P	*21/02*	*(2006.01)*	C12P	21/02	C
C07K	*16/38*	*(2006.01)*	C07K	16/38	
C12Q	*1/37*	*(2006.01)*	C12Q	1/37	
A61K	*47/68*	*(2017.01)*	A61K	47/68	
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00	101
A61P	*27/02*	*(2006.01)*	A61P	27/02	
A61P	*19/02*	*(2006.01)*	A61P	19/02	
A61P	*3/10*	*(2006.01)*	A61P	3/10	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	111
A61K	*38/55*	*(2006.01)*	A61K	38/55	
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	C
A61K	*35/76*	*(2015.01)*	A61K	39/395	L
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	A61K	35/76	
			C07K	19/00	

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 佐藤 俊之
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 木村 貴子
東京都江戸川区北葛西一丁目１６番１３号 第一三共ＲＤノバーレ株式会社内
(72)発明者 山崎 淳史
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 井上 達也
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
審査官 山本 晋也

(56)参考文献
特表２０１５－５０１１４９（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５４４３１７（ＪＰ，Ａ）
特表２０１６－５１３１０９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１６－５１３１２５（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５１５８３６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／０２４９１４（WO，Ａ１）
ESPINOSA-HEIDMANN, Diego G. et al.，Cigarette Smoke-Related Oxidants and the Development of Sub-RPE Deposits in an Experimental Animal M，Investigative Ophthalmology & Visual Science，2006年02月，Vol.47, No.2，p.729-737，特に要旨, 第730頁右欄「HQ Diet」

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ
Ｃ１２Ｑ
Ｃ１２Ｐ
Ｃ０７Ｋ
Ａ６１Ｋ
Ａ６１Ｐ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）