

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-515349
(P2025-515349A)

(43)公表日 令和7年5月14日(2025.5.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08		4 H 0 4 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
A 6 1 K	38/08 (2019.01)	A 6 1 K	38/08		
A 6 1 K	38/10 (2006.01)	A 6 1 K	38/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全62頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-563519(P2024-563519)				
(86)(22)出願日	令和5年4月27日(2023.4.27)				
(85)翻訳文提出日	令和6年12月17日(2024.12.17)				
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066321				
(87)国際公開番号	WO2023/212661				
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)				
(31)優先権主張番号	63/363,840				
(32)優先日	令和4年4月29日(2022.4.29)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)				
		最終頁に続く			(71)出願人 524253593 セルピン ファーマ リミテッド ライア ビリティ カンパニー アメリカ合衆国 2 0 1 0 9 ヴァージニ ア州 マナサス ディスカバリー プール バード 9 5 0 1 スイート 1 2 0 (74)代理人 100102978 弁理士 清水 初志 (74)代理人 100205707 弁理士 小寺 秀紀 (74)代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝 (74)代理人 100119507 弁理士 刑部 俊 (74)代理人 100142929 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 S E R P I Nペプチド誘導体およびその使用方法

(57)【要約】
SP16およびSP163MなどのSERPIN由来ペプチドは、LRP1の媒介に関連する多数の状態を処置するために使用することができる。既存のSERPIN由来ペプチドの安定性、バイオアベイラビリティ、および/または有効性をさらに改善するために、新規SERPINペプチド誘導体を開発する必要がある。SERPINペプチド誘導体、それらの作製方法、およびLRP1の媒介に関連する種々の状態を処置するためのそれらの使用が、本技術に関する。

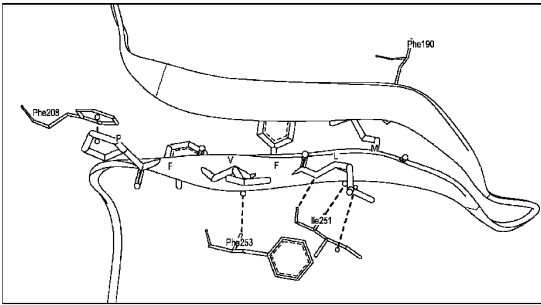
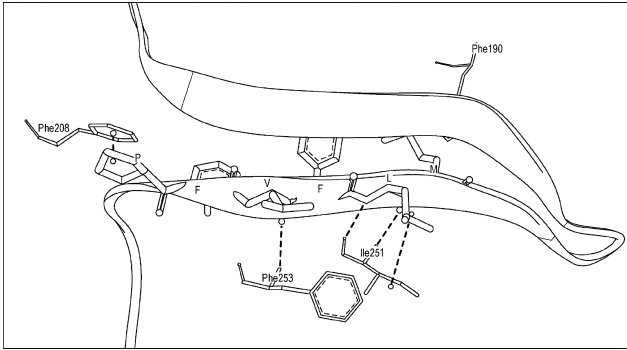


FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SERPINペプチド誘導体であって、
FVFLM(SEQ ID NO: 1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)、PFVFLM(SEQ ID NO: 8)、PFVFL[Nle](SEQ ID NO: 9)のコア配列と、

以下の修飾：

(i) 該コア配列のN末端に付加された極性頭部、該コア配列のC末端に付加された極性尾部、またはその両方；

(ii) 該ペプチド誘導体が環化され得るように該コア配列のN末端、該コア配列のC末端、またはその両方に付加された、1つまたは複数のアミノ酸残基；

(iii) 置換される該コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基と比較して、より低い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基；

(iv) 置換される該コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基と比較して、より高い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基；および

(v) 該コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が欠失している
うちの1種または複数種と

を含む、前記SERPINペプチド誘導体。

【請求項 2】

直鎖状ペプチドである、請求項1記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 3】

環化ペプチドである、請求項1記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 4】

2つのCys残基間にジスルフィド結合を形成することによって環化されている、請求項3記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 5】

2つのアミノ酸残基間のリンカーによって環化されている、請求項3記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 6】

極性頭部または極性尾部が、Arg、Lys、およびHisからなる群より選択される正に荷電したアミノ酸などの2つ以上の荷電アミノ酸を含む、請求項1～5のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 7】

15アミノ酸残基未満のサイズを有する、請求項1～6のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 8】

7、8、9、10、11、または12アミノ酸残基のサイズを有する、請求項1～7のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 9】

1つまたは複数のアミノ酸残基が、D-アミノ酸である、請求項1～8のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 10】

アミノ酸配列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO: 3)を含むSERPINペプチド誘導体であって、ここで、

X1は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X2は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X3は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X4は、Cysアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X5は、Proアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X6は、第1の疎水性アミノ酸残基であり；

X7は、短分岐アミノ酸残基であり；

X8は、第2の疎水性アミノ酸残基であり；

X9は、飽和疎水性アミノ酸残基であり；

X10は、D立体配置の親水性アミノ酸であり；かつ

X11は、該SERPINペプチド誘導体の環化を可能にする任意のアミノ酸残基である、前記SERPINペプチド誘導体。

【請求項11】

第1および第2の疎水性アミノ酸残基が、芳香族アミノ酸残基である、請求項10記載のSERPINペプチド。

【請求項12】

短分岐アミノ酸残基が、ValまたはThrである、請求項10～11のいずれか一項記載のSERPINペプチド。

【請求項13】

飽和疎水性アミノ酸が、Leuである、請求項10～12のいずれか一項記載のSERPINペプチド。

【請求項14】

D立体配置の親水性アミノ酸が、D立体配置型のAsp、Glu、Lys、Dap、またはCys残基である、請求項10～13のいずれか一項記載のSERPINペプチド。

【請求項15】

X1が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；

X2が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；かつ

X3が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在しない、

請求項10～14のいずれか一項記載のSERPINペプチド。

【請求項16】

X1が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在せず；

X2が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在せず；かつ

X3が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在しない、

請求項10～15のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項17】

X6が、PheまたはNalである、請求項10～16のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項18】

X8が、PheまたはNalである、請求項10～17のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項19】

X6がAla、Phe、またはNalであり、かつX4がNalである、請求項10～18のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項20】

X7が、Asp、Glu、Lys、Dap、またはCysである、請求項10～19のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項21】

直鎖状であるかまたは環化されている、請求項10～20のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項22】

15アミノ酸残基未満のサイズを有する、請求項10～21のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項23】

7、8、9、10、11、または12アミノ酸残基のサイズを有する、請求項10～22のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

SERPINペプチド誘導体であって、

FVFLM(SEQ ID NO: 1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)、PFVFLM(SEQ ID NO: 8)、PFVFL[Nle](SEQ ID NO: 9)のコア配列と、

以下の修飾：

(i) 該コア配列のN末端に付加された1つもしくは複数のLys、Glu、もしくはHis残基、該コア配列のC末端に付加された極性尾部、またはその両方；

(ii) 2つのCys残基間にジスルフィド結合を形成することによって該SERPINペプチド誘導体が環化され得るように該コア配列のN末端、該コア配列のC末端、またはその両方に付加された、1つまたは複数のアミノ酸残基；

(iii) 1つまたは複数のThrアミノ酸残基によって置換されている、該コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基；および

(iv) 置換される1つまたは複数のアミノ酸残基よりも高い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基

のうちの1種または複数種と

を含む、前記SERPINペプチド誘導体。

10

【請求項 25】

直鎖状ペプチドである、請求項24記載のSERPINペプチド誘導体。

20

【請求項 26】

15アミノ酸残基未満のサイズを有する、請求項24または25記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 27】

7、8、9、10、11、または12アミノ酸残基のサイズを有する、請求項24～26のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体。

【請求項 28】

アミノ酸配列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO: 3)を含むSERPINペプチド誘導体であって、ここで、

X1は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X2は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X3は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X4は、Cysアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X5は、Proアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X6は、第1の疎水性アミノ酸残基であり；

X7は、短分岐アミノ酸残基であり；

X8は、第2の疎水性アミノ酸残基であり；

X9は、飽和疎水性アミノ酸残基であり；

X10は、D立体配置の親水性アミノ酸であり；かつ

X11は、該SERPINペプチド誘導体の環化を可能にする任意のアミノ酸残基であり；

ここで、X4がCysであり、X5がProであり、X7がThrであり、かつ/またはX10がD立体配置型Lys残基である、

前記SERPINペプチド誘導体。

30

40

【請求項 29】

第1および第2の疎水性アミノ酸残基が、芳香族アミノ酸残基である、請求項28記載のSERPINペプチド。

【請求項 30】

短分岐アミノ酸残基が、ValまたはThrである、請求項28または29記載のSERPINペプチド。

【請求項 31】

飽和疎水性アミノ酸が、Leuである、請求項28～30のいずれか一項記載のSERPINペ

50

プチド。

【請求項 3 2】

D 立体配置の親水性アミノ酸が、D 立体配置型の Asp、Glu、Lys、Dap、または Cys 残基である、請求項 28～31 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド。

【請求項 3 3】

X1 が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；

X2 が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；かつ

X3 が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在しない、

請求項 28～32 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド。

【請求項 3 4】

X1 が、Arg、Lys、もしくは His 残基であるかまたは存在せず；

X2 が、Arg、Lys、もしくは His 残基であるかまたは存在せず；かつ

X3 が、Arg、Lys、もしくは His 残基であるかまたは存在しない、

請求項 28～33 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 3 5】

X6 が、Phe または Nal である、請求項 28～34 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 3 6】

X8 が、Phe または Nal である、請求項 28～35 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 3 7】

X6 が Ala、Phe、または Nal であり、かつ X4 が Nal である、請求項 28～36 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 3 8】

X7 が、Asp、Glu、Lys、Dap、または Cys である、請求項 28～37 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 3 9】

直鎖状であるかまたは環化されている、請求項 28～38 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 4 0】

15 アミノ酸残基未満のサイズを有する、請求項 28～39 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 4 1】

7、8、9、10、11、または 12 アミノ酸残基のサイズを有する、請求項 28～40 のいずれか一項記載の SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 4 2】

SEQ ID NO: 10～20 または 23～62 の配列を含む SERPIN ペプチド誘導体であって、コア配列の N 末端に付加された極性頭部、コア配列の C 末端に付加された極性尾部、またはその両方を含む、前記 SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 4 3】

SEQ ID NO: 15～17 または 23～62 の配列を含む SERPIN ペプチド誘導体であって、該ペプチド誘導体が環化され得るように、1 つまたは複数のアミノ酸残基が、コア配列の N 末端、コア配列の C 末端、またはその両方に付加されている、前記 SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 4 4】

SEQ ID NO: 27～29、38、39、または 42～62 の配列を含む SERPIN ペプチド誘導体であって、コア配列中の 1 つまたは複数のアミノ酸残基が、置換される該コア配列中の該 1 つまたは複数のアミノ酸残基と比較して、より低い疎水性を有する 1 つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、前記 SERPIN ペプチド誘導体。

【請求項 4 5】

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 30または31の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が、置換される該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基と比較して、より高い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、前記SERPINペプチド誘導体。

【請求項46】

SEQ ID NO: 41または47～53の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が欠失している、前記SERPINペプチド誘導体。

【請求項47】

SEQ ID NO: 10、11、13、または14、35、または36の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、1つもしくは複数のLys、Glu、もしくはHis残基がコア配列のN末端に付加されているか、極性尾部がコア配列のC末端に付加されているか、またはその両方である、前記SERPINペプチド誘導体。

10

【請求項48】

SEQ ID NO: 15～17または23～31の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、2つのCys残基間にジスルフィド結合を形成することによって該SERPINペプチド誘導体が環化され得るように、1つまたは複数のアミノ酸残基が、コア配列のN末端、コア配列のC末端、またはその両方に付加されている、前記SERPINペプチド誘導体。

【請求項49】

SEQ ID NO: 27～29、38、39、47～55、または59～62の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が、1つまたは複数のThrアミノ酸残基によって置換されている、前記SERPINペプチド誘導体。

20

【請求項50】

請求項1～49のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体と、エピトープタグ、半減期延長因子(half-life extender)、またはその両方とを含む、融合タンパク質。

【請求項51】

請求項1～49のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体と、透過性増強剤とを含む、コンジュゲート。

【請求項52】

請求項1～49のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体、請求項50記載の融合タンパク質、または請求項51記載のコンジュゲートを含む、薬学的組成物。

30

【請求項53】

1種または複数種の付加的な治療剤をさらに含む、請求項52記載の薬学的組成物。

【請求項54】

薬学的に許容される担体、賦形剤、添加剤、防腐剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項52または請求項53記載の薬学的組成物。

【請求項55】

透過性増強剤をさらに含む、請求項52～53のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項56】

経口投与、経皮投与、または非経口投与用に製剤化されている、請求項52～55のいずれか一項記載の薬学的組成物。

40

【請求項57】

請求項24～41、45、または47～49のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体と、エピトープタグ、半減期延長因子、またはその両方とを含む、融合タンパク質。

【請求項58】

請求項24～41、45、または47～49のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体と、透過性増強剤とを含む、コンジュゲート。

【請求項59】

請求項24～41、45、または47～49のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体、請求項57記載の融合タンパク質、または請求項58記載のコンジュゲートを含む、薬学的組成物。

50

【請求項 60】

1種または複数種の付加的な治療剤をさらに含む、請求項59記載の薬学的組成物。

【請求項 61】

薬学的に許容される担体、賦形剤、添加剤、防腐剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項59または請求項60記載の薬学的組成物。

【請求項 62】

透過性増強剤をさらに含む、請求項59～61のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 63】

経口投与、経皮投与、または非経口投与用に製剤化されている、請求項59～62のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 64】

LRP1に関連する疾患または状態に罹患している対象を処置する方法であって、該LRP1に関連する疾患または状態を処置するために、有効量の請求項1～49のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体、請求項50記載の融合タンパク質、請求項51記載のコンジュゲート、または請求項52～56のいずれか一項記載の薬学的組成物を該対象に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 65】

SERPINペプチドを投与する工程が、対象におけるNFκBの活性化を低減させる、請求項64記載の方法。

【請求項 66】

SERPINペプチドを投与する工程が、対象におけるTNFαを低減させる、請求項64または65記載の方法。

【請求項 67】

SERPINペプチドを投与する工程が、IL-6を低減させる、請求項64～66のいずれか一項記載の方法。

【請求項 68】

LRP1に関連する疾患または状態が、急性疼痛もしくは神経障害性疼痛、侵害受容性疼痛、または炎症性疼痛である、請求項64～67のいずれか一項記載の方法。

【請求項 69】

LRP1に関連する疾患または状態が、ウイルス感染症によって引き起こされる疾患または状態である、請求項64～68のいずれか一項記載の方法。

【請求項 70】

SERPINペプチドを投与する工程が、ウイルス複製を低減させる、請求項69記載の方法。

【請求項 71】

LRP1に関連する疾患または状態が、好酸球性食道炎である、請求項64～67のいずれか一項記載の方法。

【請求項 72】

LRP1に関連する疾患または状態が、急性肺損傷である、請求項64～67のいずれか一項記載の方法。

【請求項 73】

LRP1に関連する疾患または状態に罹患している対象を処置する方法であって、該LRP1に関連する疾患または状態を処置するために、有効量の請求項24～41、45、または47～49のいずれか一項記載のSERPINペプチド誘導体、請求項57記載の融合タンパク質、請求項58記載のコンジュゲート、または請求項59～63のいずれか一項記載の薬学的組成物を該対象に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 74】

SERPINペプチドを投与する工程が、対象におけるNFκBの活性化を低減させる、請求項73記載の方法。

【請求項 75】

10

20

30

40

50

SERPINペプチドを投与する工程が、対象におけるTNFaを低減させる、請求項73または74記載の方法。

【請求項76】

SERPINペプチドを投与する工程が、IL-6を低減させる、請求項73～75のいずれか一項記載の方法。

【請求項77】

LRP1に関連する疾患または状態が、ウイルス感染症によって引き起こされる疾患または状態である、請求項73～75のいずれか一項記載の方法。

【請求項78】

SERPINペプチドを投与する工程が、ウイルス複製を低減させる、請求項77記載の方法。

【請求項79】

LRP1に関連する疾患または状態が、好酸球性食道炎である、請求項73～75のいずれか一項記載の方法。

【請求項80】

LRP1に関連する疾患または状態が、急性肺損傷である、請求項73～75のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年4月29日に出願された米国仮特許出願第63/363,840号の恩典および優先権を主張し、その開示は、その全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0002】

配列表

本出願は、ST.26に準拠した配列表を含有しており、配列表は、Patent Centerを介して.xml形式で本明細書と同時的に提出されており、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。2023年4月26日に作られた.xmlコピーは、Serp138536-8004 W000 Sequence Listing.xmlと命名され、サイズは78KBである。

【背景技術】

【0003】

背景

セリンプロテアーゼインヒビター(SERPIN)は、線溶、血液凝固、および炎症などの多様な生物学的機能に関与するタンパク質の大型のファミリーである。SERPINがそれらの標的セリンプロテアーゼに結合して酵素活性を不活性化するとき、立体構造の変化が起こり、固有の短いペプチドモチーフ(5～11アミノ酸)が露出する^{8、43}。プロテアーゼ-インヒビター複合体は、新たに露出した短いペプチドモチーフにおいて低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP1)に結合し、このプロセスは、アルファ-1アンチトリプシン(AAT)およびアンチトロンビンIII(ATIII)などのセリンプロテアーゼインヒビター(SERPIN)の範囲領域全体にわたって保存されている^{22、25、43}。

【0004】

これまでに開示されているのは、SERPIN由来ペプチドのファミリーであり、これらは、LRP1に結合し、かつその抗炎症機能を超越して治療機能および恒常性機能を発揮することが判明した。例えば、米国特許第8,975,224号；同第9,951,104号；同第11,020,462号；ならびに米国特許出願公開第2021/0188912号および同第2021/0369822号を参照されたく、これらの内容は参照により本明細書に組み入れられる。SP16およびSP163MなどのSERPIN由来ペプチドは、LRP1の媒介に関連する多数の状態を処置するために使用することができる。既存のSERPIN由来ペプチドの安定性、バイオアベイラビリティ、および/または有効性をさらに改善するために、新規SERPINペプチド誘導体を開発する必要がある。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0005】

概要

一局面では、本技術に関するもの(of the present technology)は、FVFLM(SEQ ID NO: 1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)、PFVFLM(SEQ ID NO: 8)、またはPFVFL[Nle](SEQ ID NO: 9)のアミノ酸配列を有するペンタペプチドと、以下の修飾：(i)ペンタペプチドのN末端に付加された極性頭部、ペンタペプチドのC末端に付加された極性尾部、またはその両方；(ii)ペプチド誘導体が環化され得るようにペンタペプチドのN末端、ペンタペプチドのC末端、またはその両方に付加された、1つまたは複数のアミノ酸残基；(iii)より低い疎水性を有する1つまたは複数のアミノ酸残基によって置換されている、ペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基；(iv)より高い疎水性を有する1つまたは複数のアミノ酸残基によって置換されている、ペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基；および(v)ペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基が欠失している、うちの1種または複数種を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなるSERPINペプチド誘導体である。

10

【0006】

ある特定の態様では、本技術のSERPINペプチド誘導体は、直鎖状ペプチドである。ある特定の態様では、本技術のSERPINペプチド誘導体は、環化ペプチドである。ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、2つのCys残基間にジスルフィド結合を形成することによって環化されている。ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、2つのアミノ酸残基間の、例えばペンタペプチド配列の外側の2つのアミノ酸残基間のリンカーによって環化されている。ある特定の態様では、Arg、Lys、およびHisからなる群より選択される正に荷電したアミノ酸などの2つ以上の荷電アミノ酸を含む、極性頭部または極性尾部。ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、融合タンパク質または融合ペプチドを形成するために、エピトープタグ、半減期延長因子(half-life extender)、またはエピトープタグと半減期延長因子の両方を含む、1種または複数種の他のペプチドと融合されている。ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、透過性増強剤にコンジュゲートされている。

20

【0007】

別の局面では、本技術に関するものは、本技術のSERPINペプチド誘導体、融合体、またはコンジュゲートと、1種または複数種の薬学的に許容される担体とを含む組成物である。一部の態様では、組成物は、経口投与、経皮投与、または非経口投与に好適な剤形に製剤化される。

30

【0008】

別の局面では、本技術に関するものは、呼吸器のウイルス感染症または細菌感染症(例えば、COVID)、および急性呼吸窮迫、喘息、アトピー性皮膚炎、または好酸球性食道炎などの炎症性疾患などの、LRP1結合に関連する種々の状態または疾患を処置する方法である。他の状態には、末梢神経損傷および神経変性疾患などの、中枢神経系および末梢神経系の状態が含まれる。本方法は、有効量の本技術の1種もしくは複数種のSERPINペプチド誘導体、それらの融合体、または1種もしくは複数種のSERPINペプチド誘導体もしくはそれらの融合体を含む組成物を、LRP1結合に関連する状態に罹患している対象に投与することを要する。

40

【図面の簡単な説明】

【0009】

本出願は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含有する。カラー図面を含む本出願のコピーは、要請および必要な料金の支払い後に特許庁より提供される。

【図1】ペンタペプチド配列(SEQ ID NO: 8)を含む α_1 -アンチトリプシンの結晶構造を示す。

【図2】ペンタペプチド配列(SEQ ID NO: 8)を含む α_1 -アンチトリプシンの結晶構造に基づくアミノ酸間の距離を示す。

50

【図3】Lys-βAla-Gluの13個のC-C結合を例として使用した閉環戦略を例証する。

【図4】図4A～4Bは、SERPIN由来ペプチド誘導体SA1～SA8の構造活性相関を実証する。図4Aは、0、1、10、50、および100 μg/mlの種々の濃度でのペプチド誘導体SA1～SA8のNFκB活性化を低減させる際の活性を示す。図4Bは、SA3およびSA7の活性をSP163MおよびSP22の活性と比較している。これまでに開示されたSERPINペプチドSP163Mと比較して、LRP1結合部位を保持しながらペプチドをトランケートし、かつアルギニン残基を付加することで、NFκBレポーターアッセイにおいて改善された活性が付与された。

【図5】図5A～5Bは、SP163Mと比較したペプチド誘導体A1～A15の抗炎症機能を実証する。ペプチド誘導体(50または100 μg/ml)を、LPS(5 ng/ml)に応答するNFκBレポーターアッセイにおいて試験し、LPS(大腸菌(E.coli)0111:B4)刺激(100 ng/ml、24時間)に応答したIMGミクログリア細胞におけるTNFα分泌についてスクリーニングした。NFκBレポーター細胞において、上清中でNFκB誘導性分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)を測定した。上清中のTNFα分泌をELISAを介して測定した。

【図6】図6A～6Bは、環構造に対する修飾とアミノ酸置換を含むペプチド誘導体A2-1～A2-9の抗炎症活性を実証する。図6Aは、LPS(100 ng/ml、24時間)で活性化した後のIMGミクログリア細胞の上清中のTNFαの低減を示す。図6Bは、LPS刺激(5 ng/ml、24時間)後のNFκB活性化の低減パーセンテージを示す。比較のためにSP163M、SA7、A5、およびA15ペプチドを含めた。

【図7】図7A～7Bは、NFκBおよびTNFαの活性化に対するペプチド誘導体の用量反応効果を示す。ペプチド誘導体を、3.125、6.25、12.5、25、および50 μg/mlの濃度で試験した。SP163M、SP16、およびSA7を最大100 μg/mlの濃度で含めた。用量反応濃度はlogスケールで示している。ペプチド誘導体A2-1、A2-2、A2-3、A2-4、およびA2-5は、SA7、SP16、およびSP163Mよりも優れた活性を用量依存的に呈した。

【図8】IMG細胞(ミクログリア)に対する細胞毒性アッセイの結果を示す。IMG細胞を、活性アッセイ(図5～7)について試験した濃度またはそれを超える濃度のペプチド誘導体で24時間処置した。どのペプチドも、いかなる細胞毒性効果も呈さなかった。

【図9】環構造に対するさらなる最適化を含むペプチド誘導体A3-1～A3-16の、LPS刺激(5 ng/ml、24時間)に応答したNFκB活性化に対する効果を示す。ペプチド誘導体を1.56 μg/ml～12.5 μg/mlの濃度で試験した。比較のためにSP163MおよびA2-5を含めた。SP163Mを12.5 μg/ml～100 μg/mlの濃度で試験した。用量反応はlogスケールで示している。

【図10】LPS刺激(100 ng/ml、24時間)後のIMGにおけるIL-6分泌を低減させることに対するペプチド誘導体A3-1、A3-2、A3-3、A3-5、A3-6、A3-7、A3-9、A3-14、A3-15、およびA3-16の活性を示す。IL-6分泌をELISAによって測定した。比較のためにペプチド誘導体A2-5およびSP163Mを含めた。SP163Mを12.5～100 μg/mlの濃度で試験した。A2-5を含むペプチド誘導体を最大12.5 μg/mlの濃度で試験した。用量反応はlogスケールで示している。

【図11】図11A～11Bは、NFκBレポーター細胞(図11A)およびIMGミクログリア細胞(図11B)に対する細胞毒性アッセイの結果を示す。ペプチド誘導体A3-1、A3-2、A3-5、A3-6、A3-7、A3-9、A3-14、A3-15、およびA3-16は、NFκBとサイトカインIL-6およびTNFαの両方を低減させるのに有効な濃度(最大12.5 μg/ml)で試験したとき、細胞毒性効果を呈さなかった。比較のためにSP163Mを含めており、最大100 μg/mlの濃度で細胞毒性効果は実証されなかった。細胞を、指し示された濃度のSP163Mまたはペプチド誘導体A3-1、A3-2、A3-5、A3-6、A3-7、A3-9、A3-14、A3-15、A3-16、もしくはA2-5で24時間処置した。

【図12】ペプチド誘導体A15およびA2-5を、マウスにおいてカプサイシンによって誘導される疼痛行動を遮断するそれらの能力について試験したことを示す。カプサイシン注射(25 ng)の1時間前に、皮下投与によってペプチド誘導体でマウスを処置した。SP163Mを50 μg/マウスの用量で投与し、一方、ペプチド誘導体A15およびA2-5を5 μg/マ

ウスの用量で投与した。n=4~9匹のマウス/コホート。一元配置ANOVA。*P<0.05、**P<0.01。

【図13】SERPINペプチド誘導体SA7またはSERPINペプチドSP163Mのどちらかで処置したミクログリア細胞において試験したサイトカインプロファイルを比較している。SA7は、IL-6およびIL-1 β を含むいくつかのサイトカインを低減させる際に顕著に増加した活性を実証した。

【図14】図14A~14Bは、LPS誘導性神経炎症モデルにおいて、SERPINペプチド誘導体SA7が、ビヒクル(LPSで誘導)およびSP163Mの両方と比較して、臨床スコア(スコアリングシステムで毎日測定)を低減させたこと(図14A)、および体重減少の重症度を低減させたこと(図14B)を示す。SP163MおよびSA7を、LPS投与(1mg/kg)の1時間後に100 μ g/マウスの用量で皮下注射によって4日間連続で投与した。体重および臨床スコアを毎日測り、分析のために研究終了時に脳組織を収集し、処理した。スコアの凡例は次のとおりである：0：元気で、機敏であり、反応が良い；1~4：わずかに毛が乱れており/背を丸めており、活動性が低い；5~10：背を丸めており、不活発であり、体重が減少； ≥ 11 瀕死。

【図15】図14の神経炎症モデルにおいて、SA7処置動物が、IL-17A、IL-12、TNF α 、およびGM-CSFを含む脳溶解物中で測定した多くのサイトカインのレベルにおいて、ビヒクル処置動物およびSP163M処置動物の両方と比較して顕著な差を示したことを示す。IL-6は最も実質的に低減し、検出可能なレベルは測定されなかった。

【図16】図16A~16Bは、これまでに開示された神経炎症モデルから採取した脳溶解物における、神経軸索特異的マーカーである神経フィラメント軽鎖(NfL)およびアストロサイト活性化に特異的なマーカーである抗グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)のウェスタンブロット分析を示す。ペプチド誘導体SA7は、ビヒクル処置動物およびSP163M動物と比較して、NfLの発現を有意に増加させ(図16A)、一方GFAP発現は有意に減少した(図16B)。

【図17】図17A~17Bは、SA7がSERPINペプチドSP163Mと同様に炎症中にオートファジーを調節したことを示す。ミクログリア細胞をSP163MまたはSA7で処置し、次いでLPSに曝露させた。LC3 II対LC3 I比(オートファゴソームの形成の開始-オートファジーの検出に広く使用されているバイオマーカー)のウェスタンブロット分析により、SA7がLPS単独と比較してオートファジー(図17A)およびLRP1発現(図17B)を増加させ、SP163Mと同程度であることが示される。LRP1発現はまた、LPS処置を伴わないSA7で、SP163Mと比較して顕著に高かった。

【図18】SP163Mおよびペプチド誘導体SA7のプロテアーゼTMPRSS2活性およびIC50を示しており、SA7はSP163Mと比較して、過剰発現細胞系においてTMPRSS2活性の阻害の増加を示している。

【図19】図19A~19Bは、OVA誘導性マウスの食道においてLRP1が減少し、SP163MがLRP1タンパク質発現を回復させたことを実証する。さらに、SA7はSP163Mよりも、かつ対照細胞と比較して、SPINK7ノックアウト細胞におけるサイトカインTSLPの産生をより強力に阻害した。

【図20】図20A~20Cは、OVA誘導性アレルギー性喘息のモデルにおいて、ペプチド誘導体A2-5が、肺ホモジネート中のTSLP、総肺タンパク質、ならびにTH-2媒介性サイトカインIL-5、IL-4、およびIL-13を、OVAで誘導したビヒクル処置マウスおよびSP163Mマウスの両方よりも高い程度で低減させることを実証する。

【図21】本技術のペプチド誘導体(例えば、A2-5、SEQ ID NO: 42)と透過性増強剤を含むコンジュゲートを例証する。

【発明を実施するための形態】

【0010】

詳細な説明

本技術に関するものは、SERPINペプチド類似体、ならびにそれらのバリエーションおよび誘導体のほか、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質-1(LRP-1)を標的とするこ

10

20

30

40

50

とによる種々の状態の防止または処置におけるそれらの使用である。本明細書において使用される場合、「誘導体」という用語は、ペンタペプチドFVFLM(SEQ ID NO: 1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)、PFVFLM(SEQ ID NO: 8)、またはPFVFL[Nle](SEQ ID NO: 9)とアミノ酸配列または構造の類似性を共有し、かつペンタペプチドと比較して安定性、バイオアベイラビリティ、および/または生物学的活性もしくは生物学的有効性を改善するために、挿入、欠失、または置換を含む1つまたは複数の修飾を含有する、ペプチドを意味する。本開示において、「誘導体」、「バリエント」、および「類似体」という用語は、互換的に使用され得る。

【0011】

炎症の消失を促進し、かつ組織傷害を軽減するには、免疫応答の正確な協調が必要であり、単一のサイトカインまたはシグナリング経路を標的とすることでは、ここで論じられるようなある特定の疾患の病態における全ての寄与要因は解決されない。均衡の取れた炎症応答は、再生および修復において不可欠な役割を果たしており、抗炎症薬は、再生および組織修復に対する相反する作用に関連している³。

【0012】

SERPINペプチドは、(1)神経栄養効果を発揮すること、(2)再生特性および治癒特性を有すること、(3)鎮痛効果を示すこと、(4)抗ウイルス特性および抗菌特性を有すること、ならびに/または(5)抗アレルギー効果を発揮することがこれまでに示されていた。この活性の組み合わせは、糖尿病性末梢神経障害患者(diabetic peripheral neuropath)、変性障害、肺損傷、アレルギー性疾患、および感染性疾患などの末梢神経障害に関連する状態の処置において独特なメカニズムを提供する。本技術のSERPINペプチド類似体、ならびにそれらのバリエントおよび誘導体は、改善されたLRP1結合活性、改善された溶解性、および/または改善された薬物動態特性、経口バイオアベイラビリティを有する。例えば、データの裏付けのある実施例において実証されているように、本技術のSERPINペプチド誘導体は、神経炎症のモデルにおいて、改善された抗炎症効果および改善された有効性を示す。

【0013】

したがって、本技術に関するものは、SERPINペプチド誘導体、SERPINペプチド誘導体を含む薬学的組成物、ならびに末梢神経損傷およびその結果として生じる疼痛、肺損傷、感染性疾患、ならびにアレルギー性炎症に関連する状態におけるものなどの、免疫応答が調節不全であるもしくはエンドサイトーシス機能が障害されている、多数の状態、またはLRP1の媒介が病態に寄与する疾患を処置するためのそれらの使用方法である。

【0014】

ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、合成ペプチドである。ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、環化されている。ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、1つまたは複数の親水性アミノ酸置換を含む。ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、1つまたは複数の疎水性アミノ酸置換を含む。ある特定の態様では、SERPINペプチド誘導体は、N末端、C末端、またはN末端とC末端の両方に1つまたは複数の正に荷電したアミノ酸を含む。

【0015】

SERPINペプチド誘導体および修飾

本技術に関するものは、より強力な抗炎症効果および細胞再生効果を発揮するために、より高い親和性でLRP1を標的とするように設計されたSERPINペプチド誘導体である。これらのペプチド誘導体は、構造と活性の相関の研究およびペプチド/LRP1相互作用の3-Dモデリングに基づいて、元のSERPIN由来ペプチドから修飾されている。これらの誘導体は、溶解性、血漿安定性、および経口バイオアベイラビリティなどの、ペプチド治療薬に関連する課題の一部を克服する。

10

20

30

40

50

SP16

(VKFNKPFVFLMIEQNTK) (SEQ ID NO: 4) および SP163M (Ac-VKFNKPFVFL[Nle]IEQNTK-NH₂) (SEQ ID NO: 5)

(ここでNleはノルロイシンを表す)などのこれまでに開示されたSERPINペプチドと比較して、本技術のペプチド誘導体は、改善されたLRP1活性のみならず、改善された溶解性、薬物動態特性、ならびにバイオアベイラビリティ、特に経口および経皮バイオアベイラビリティも呈す。

【0016】

アルファ-1アンチトリプシン(原型的なSERPIN)のC末端部の小さなペプチド断片がLRP1に結合し、強力な細胞再生機能、組織保護機能、および免疫調節機能を発揮することができることがこれまでに実証されていた。しかしながら、アルファ-1アンチトリプシン(AAT)の三次構造により、LRP1へのその直接的な結合が防止される。むしろ、AATは、短い5~11個のアミノ酸結合モチーフを露出させる立体構造の変化がAATで起こることに起因して、その標的プロテアーゼと相互作用しているときにのみLRP1に結合することができる。驚くべきことに、これらの誘導体に対して実施された構造活性相関研究によって実証されているように、高度に保存されたコア配列VKFNKPFVFLM (SEQ ID NO: 6)

全体が、ペプチド誘導体の抗炎症効果に必要なというわけではない。誘導体は、LRP1結合活性を保持しているものの、SERPIN間で高度に保存されているFNKP(SEQ ID NO: 7)モチーフを含有していない。しかしながら、LRP1結合モチーフは疎水性が高く、かつ溶液中で不安定であるため、SERPINペプチド配列に対する修飾を必要とする。

【0017】

したがって、特性が改善されたSERPINペプチド誘導体を産生させるために、SP16/SP163Mペプチド、特にペンタペプチド中またはその周辺に対して種々の修飾が施される。本明細書において使用される場合、「ペンタペプチド」とは、SP16中のFVFLM(SEQ ID NO: 1)配列またはSP163中のFVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)配列を指し、ここでMet残基はNle残基で置き換えられている。ペンタペプチドは、LRP1との相互作用の大部分を担っている。本技術の時点では、改善された特性を有する新規SERPINペプチド誘導体を得るために、ペンタペプチドおよび/またはペンタペプチド周囲の配列に種々の修飾が施される。例えば、SP163Mペプチドの配列は、抗炎症活性、溶解性、LRP1結合活性、および/または経口バイオアベイラビリティをさらに改善するために、欠失、置換、および/または環化によってさらに修飾される。SP16またはSP163Mの配列と比較して、抗炎症活性またはLRP1結合活性を損なうことなく、より良好な経口バイオアベイラビリティおよびブルード脳関門(blood brain barrier)透過性を達成するために、より短いペプチド誘導体が開発されている。ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、7、8、9、10、11、12、13、14、または15アミノ酸残基、好ましくは8、9、または10アミノ酸残基のサイズを有する。例えば、本技術のペプチド誘導体は、8アミノ酸残基、9アミノ酸残基、または10アミノ酸残基のサイズを有する。

【0018】

ある特定の態様では、溶解性を改善するために、荷電側鎖を有する2つ以上のアミノ酸残基を含むN末端の極性頭部、荷電側鎖を有する2つ以上のアミノ酸残基を含むC末端の極性尾部、または極性頭部と極性尾部の両方が、ペンタペプチドに付加される。一部の態様では、極性頭部または極性尾部中のアミノ酸残基は、正に荷電しており、かつArg、His、およびLysを含む。極性頭部または極性尾部には、同じ荷電アミノ酸残基の組み合わせ、または異なるアミノ酸残基の組み合わせを使用することができる。例えば、極性頭部または極性尾部は、RR、RRR、KK、KKK、HH、HHH、KRR、KR、またはRRKのアミノ酸配列を含む。一部の態様では、極性頭部または極性尾部中の1つまたは複数の正に荷

電したアミノ酸残基は、反転した構造を有する。例えば、反転したLysとは、Lys残基が、 α 炭素によって保有されるアミノ基とカルボン酸基の両方ではなく、 α 炭素によって保有されるカルボン酸基と側鎖中の ϵ アミノ基とを使用して、ペプチド骨格に組み入れられていることを意味する。反転したArgとは、Arg残基が、 δ 炭素ではなく α 炭素によって保有されるグアニジニウム基を使用してペプチド骨格に組み入れられていることを意味する。一部の態様では、ペンタペプチドのどちらかまたは両方の末端に2つまたは3つのArg残基が付加される。一部の態様では、ペンタペプチドのN末端に2つまたは3つのArg残基が付加される。

【0019】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、例えば、2つのCys残基間にジスルフィド結合を形成することによって、または2つのアミノ酸残基間のリンカーによって、環化されている。本技術の時点では、ジスルフィド結合を介して環状ペプチド誘導体を得ることができるように、ペンタペプチドの両方の末端に2つのCys残基を付加することができる。環サイズが最適化された所望の環状構造を達成するために、ペプチド誘導体中の選択した位置にCys残基を配置することは、当業者の理解範囲内である。あるいは、他の天然、非天然、または修飾アミノ酸残基をペンタペプチドのどちらかまたは両方の末端に付加して、これらのアミノ酸残基間にリンカーが形成され得るようにすることができる。環サイズが最適化された所望の環状構造を達成するために、特定のアミノ酸残基を選択し、かつ選択した位置に配置することができる。アミド、ジスルフィド、および閉環メタセシス(RCM)またはオレフィンメタセシスなどの環化戦略に依存して、活性を顕著に喪失させることなく環化のためのアミノ酸残基の置換を選択することができる。例えば、AspおよびGluを含むがこれらに限定されない、その側鎖もしくはそのC末端にカルボン酸を有するアミノ酸残基、またはLys、Dab、およびDapを含むがこれらに限定されない、その側鎖またはそのN末端にアミノ基を有するアミノ酸残基は、アミド環化に使用することができ、その側鎖にスルヒドリル基を保有するCysまたは任意の非天然アミノ酸は、-S-S-環化に使用することができる。アミノ酸は、ペプチド誘導体の活性を実質的に含むことなく(without substantially comprising)、所望のサイズの環が形成され得るように、ペプチド誘導体の任意の所望の位置に配置することができる。一部の態様では、ヘッド・トゥ・テール環化が形成される。一部の態様では、リンカーは β -Alaを含む。一部の態様では、リンカーは2-[(2-アミノ)-エトキシ]-エトキシ-酢酸(AEEA)を含む。一部の態様では、アミノ酸残基間の環閉鎖長(ring closing length)は、5~15個のC-C結合であり、例えば、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、または約15個のC-C結合である。

【0020】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、血漿安定性を増強させるために、およびペプチドの対応(cognate)受容体に対する増加した結合親和性を達成するために、ペンタペプチドの配列中に1つまたは複数の置換を含む。例えば、LRP1との相互作用を有さないかまたはそれと最小限の相互作用しか有さないペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基は、1つまたは複数の親水性アミノ酸残基によって置き換えることができる。その上、LRP1と相互作用するペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基は、類似しているがより著しい(pronounce)物理化学的特徴を有する1つまたは複数のアミノ酸残基によって置き換えることができる。例えば、Phe残基はその側鎖に芳香環を有する。Phe残基は、ペプチド誘導体1-5および1-6においてNal(ナフチルアラニン)によって置換することができ、またはフェニル環の代わりにナフチル環もしくはインドール環を呈示するTrpによって置換することができる。これらの置換により、アミノ酸残基の芳香族性が大いに改善され、より疎水性かつより芳香族的な(パイスタッキング)相互作用が可能になる。一部の態様では、ペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基は、1つまたは複数の天然または非天然のアミノ酸残基によって置き換えることができる。一部の態様では、ペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基は、D立体配置を有する。一部の態様では、ペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基の側鎖は、修飾

されている。例えば、ペプチド誘導体A3-1は、数個の水素結合を導入しながらいくらかの疎水性を保持するためのValからThrへの置換、ならびに疎水性相互作用および芳香族相互作用を増加させるためのPheからNalへの置換を含む。別の例では、ペプチド誘導体A3-8は、NleからD-Serへの置換を含む。結晶構造の研究に基づく、NleはLRP-1と相互作用せず、むしろ水相中にある。Nleの側鎖は、疎水性の直鎖状炭化水素鎖であり、これを溶媒和させるにはエネルギーが必要である。親水性側鎖を有するD-SerによってNle残基を置き換えることで、エンタルピー的ペナルティが減少することにより溶媒和が促され、これにより、より強い結合エネルギーに転換される。したがって、一部の態様では、ペンタペプチドのNle残基は欠失している。一部の態様では、ペンタペプチド中の疎水性残基のうちの1つまたは複数、Alaなどの1つもしくは複数の疎水性がより低い残基によって、またはThrおよびSerなどの1つもしくは複数の中性残基もしくは親水性残基によって、置き換えられている。一部の態様では、ペンタペプチド中の疎水性残基のうちの1つまたは複数、Nalなどのより高い疎水性を有する1つまたは複数の残基によって置き換えられている。一部の態様では、ペンタペプチドのNle残基は、D-Dap、D-Lys、およびD-AspなどのD立体配置を有するアミノ酸残基によって置き換えられている。

10

【0021】

ペンタペプチド中のMetまたはNle残基は、長い直鎖状の疎水性側鎖を有する。MetまたはNleをD立体配置の親水性アミノ酸で置換することにより、LRP1へのペプチド誘導体の結合活性が大いに改善される。側鎖にカルボン酸を有するアミノ酸残基での置換により、ある程度の改善が生じるのに対し、ヒドロキシ基(Ser)またはアミノ基(Dap)を提示する短い側鎖を有するアミノ酸での置換により、最良の結果が達成される。

20

【0022】

ある特定の態様では、本技術のSERPINペプチド誘導体は、1つもしくは複数の非天然ペプチド結合もしくはアミノ酸を使用して、またはポリエチレングリコール(PEG)などのペプチド官能基に付着させることによって、さらに修飾して、有効期間および/またはバイオアベイラビリティを延長させることができる。

【0023】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、FVFLM(SEQ ID NO: 1)またはFVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)のアミノ酸配列を有するペンタペプチドと、ペンタペプチドのN末端に付加された極性頭部、ペンタペプチドのC末端に付加された極性尾部、またはその両方を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。極性頭部または極性尾部は、Arg、Lys、およびHisなどの2~9つの荷電アミノ酸残基を含む。一部の態様では、極性頭部または極性尾部は、2つまたは3つの荷電アミノ酸残基を含む。表1に示されるペプチド誘導体の一部の例は、SP163MおよびSP22を陽性対照として使用して、溶解性を改善させる際およびNFκB活性化をモジュレートする際の正に荷電したアミノ酸の役割を調べるために使用された。ペプチド誘導体は、LRP1結合部位のどちらかまたは両方の末端に付加された種々のトリペプチド配列を有する。

30

【0024】

一部の態様では、ペプチド誘導体は、HHHPFVFLMHHH (SEQ

40

ID NO: 10), HHHPFVFL[Nle]HHH (SEQ ID NO: 11), RRRPFVFL[Nle]RRR (SEQ ID NO: 12), KKKPFVFL[Nle]KKK (SEQ ID NO: 13), EEEVKFNKPFVFL[Nle]EEE (SEQ ID NO: 14), RRRCPFVFL[Nle]CRRR (SEQ ID NO: 15), RRRCPFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 16), CPFVFL[Nle]CRRR (SEQ ID NO: 17), RRRVKFNKPFVFLMRRR (SEQ ID NO: 18), または VKFNKPFVFL[Nle]IEQNTK (SEQ ID NO: 5)

のアミノ酸配列を有するペプチドを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

50

【 0 0 2 5 】

(表 1) 種々のトリペプチド修飾を持つペプチド誘導体

ペプチド	配列	SEQ ID NO
SA1	Ac- HHHPFVFLMHHH	10
SA2	Ac- HHHPFVFL[Nle]HHH	11
SA3	Ac-RRRPFVFL[Nle]RRR	12
SA4	Ac-KKKPFVFL[Nle]KKK	13
SA5	Ac-EEEVKFNKPFVFL[Nle]EEE	14
SA6	Ac-RRRCPFVFL[Nle]CRRR	15
SA7*	Ac-RRRC <u>PFVFL</u> [Nle] <u>C</u> (環状)	16
SA8	Ac-CPFVFL[Nle]CRRR	17
SP22	RRRVKFNKPFVFLMRRR	18
SP163M	Ac-VKFNKPFVFL[Nle]IEQNTK-NH ₂	5

*下線付きの配列は環化を表す。C残基間にジスルフィド結合が形成されてペプチドが環化される。

【 0 0 2 6 】

実施例1で実証されているように、アルギニン(R)残基などの1つまたは複数の正に荷電したアミノ酸がLRP1結合モチーフに付加されるとき、NFκB低減における活性が増加する。しかしながら、LRP1結合部位の両側に隣接した、正に荷電したアミノ酸、例えばヒスチジン(H)もしくはリジン(K)、または負に荷電したアミノ酸、例えばグルタミン酸(E)などの、1つまたは複数の他の荷電アミノ酸の付加では活性は付与されず、アルギニン残基の重要性および独自性が指し示された。

【 0 0 2 7 】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、環状ペプチドであり、かつFVFLM (SEQ ID NO: 1)またはFVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)のアミノ酸配列を有するペンタペプチドと、ペンタペプチドのN末端に付加された極性頭部、ペンタペプチドのC末端に付加された極性尾部、またはその両方とを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。環化は任意の2つの残基間であり得、例えば、環化はヘッド・トゥ・テール環化であり得る。2つの残基を連結するためのS-S結合の形成を促すために、Cysなどの付加的な残基を挿入することができる。一部の態様では、ペンタペプチド中のF、M、またはNleの1つまたは複数の疎水性残基が、中性残基または親水性残基で置換されている。したがって、表2に一部の例が示されている、正に荷電したアミノ酸残基の付加および/またはアミノ酸置換の種々の組み合わせを有するペプチド誘導体は、NFκBをモデュレートするそれらの活性を損なうことなく、溶解性、安定性、および/または経口バイオアベイラビリティを改善するように設計された。

【 0 0 2 8 】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、FVFLM (SEQ ID NO: 1)またはFVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)のアミノ酸配列と、付加的なプロリン(「P」)アミノ酸残基とを有するペンタペプチドを含む。一部の局面では、Pアミノ酸残基はペンタペプチドの

C末端部にあるので、ペプチド誘導体は、PFVFLM (SEQ ID NO: 8) または PFVFL[Nle] (SEQ ID NO: 9) のアミノ酸配列を含む。一部の局面では、PFVFLM (SEQ ID NO: 8) または PFVFL[Nle] (SEQ ID NO: 9) のアミノ酸配列を含むペプチド誘導体は、環化ペプチドであり得る。一部の局面では、PFVFLM (SEQ ID NO: 8) または PFVFL[Nle] (SEQ ID NO: 9) のアミノ酸配列を含むペプチド誘導体は、S-S結合の形成を促すためにCys残基をさらに含めることによって環化させることができ、例えば、CPFVFLMC (SEQ ID NO: 19) または CPFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 20) のアミノ酸配列を有するペプチド誘導体である。一部の局面では、CPFVFLMC (SEQ ID NO: 19) または CPFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 20) の配列を有するペプチド誘導体は、極性頭部、例えば3つのRアミノ酸残基をさらに含み得る。一部の局面では、ペプチド誘導体は、RRRCPFVFLMC (SEQ ID NO: 21) または RRRCPFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 22)

10

の配列を含み得る。一部の局面では、RRRCPFVFLMC (SEQ ID NO: 21) または RRRCPFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 22)

の配列を有するペプチド誘導体は、さらにアセチル化され得る。一部の局面では、ペプチド誘導体は、ペプチドSA7であり得る。

【0029】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、RCFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 23), RRCFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 24), RRCFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 25), RRRCFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 26), RRRCFVFT[Nle]C (SEQ ID NO: 27), RRRCFTFL[Nle]C (SEQ ID NO: 28), または RRRCFVFL[Nle]C (SEQ ID NO: 29)

20

のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

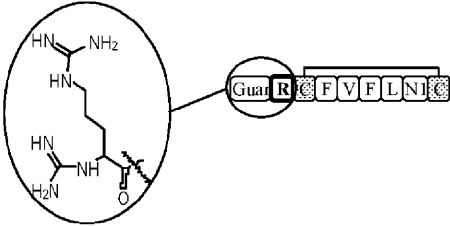
【0030】

(表2) 溶解性を改善するためのペプチド誘導体

30

40

50

ペプチド	配列	構造	SEQ ID NO
A1*	Guar-RCFVFL[Nle]C (環状)		23
A2*	RRCFVFL[Nle]C (環状)		24
A3*	Ac-RRCFVFL[Nle]C (環状)		25
A4*	Ac-RRRCFVFL[Nle]C (環状)		26
A7*	Ac-RRRCFVFT[Nle]C (環状)		27
A8*	Ac-RRRCFTFL[Nle]C (環状)		28
A9*	Ac-RRRCTVFL[Nle]C (環状)		29

*下線付きの配列は環化を表す。C残基間にジスルフィド結合が形成されてペプチドが環化される。

【0031】

図1に示すように、ペプタペプチドFVFLM(SEQ ID NO: 1)のF、F、およびM残基は一方方向を向いているのに対し、VおよびL残基は反対方向を向いている。ペプタペプチドのN末端のP残基は構造中にターンを作り出すが、LRP1との相互作用は有さない。ペプタペプチドの5つの残基全てがLRP1と直接相互作用する可能性は低い。その上、ペプチド誘導体A7～A9は、溶解性および/または活性が改善され得るかどうかを調べるために、疎水性アミノ酸残基(F、V、およびL)のうちの1つをTなどの親水性がより高い残基で置き換えるように設計されている。

【0032】

表3は、付加的な芳香環を持つ非天然アミノ酸である1-ナフィアラニン(1-naphylalanine)によってF残基のうちの1つが置き換えられている、ペプチド誘導体の一部の例を示す。ナフィアラニン(Nal)置換は、疎水性を増加させ、かつLRP1とのより強い疎水性相互作用を有し得る。

【0033】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、

10

20

30

40

50

RRRCFV[Nal]L[Nle]C (SEQ ID NO: 30) または RRRC[Nal]VFL[Nle]C (SEQ ID NO: 31) のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0034】

(表3) 活性を改善するための置換を持つペプチド誘導体

ペプチド	配列	構造	SEQ ID NO:
A5*	Ac- RRRCFV[Nal]L[Nle]C (環状)		30
A6*	Ac- RRRC[Nal]VFL[Nle]C (環状)		31

10

*下線付きの配列は環化を表す。C残基間にジスルフィド結合が形成されてペプチドが環化される。

【0035】

最適な環サイズを決定するために付加的なペプチド誘導体を設計した。例えば、環化を改善するために、Cys-Cys架橋をより長いリンカーによって置き換えることができる。L RP1結合部位の結晶構造に基づいて、ペプタペプチドFVFLM (SEQ ID NO: 1) のN末端上のアミノ酸のα炭素とC末端上のアミノ酸のα炭素間の距離を測定した。C-C結合の長さを1.5 Åと仮定すると、アミノ酸間の距離はC-C結合の数に変換され、これは環化戦略の設計に使用することができる。例えば、K368とI375のα炭素間の距離は22.4 Å (およそ15個のC-C結合) であり、P369とI375のα炭素間の距離は20.2 Å (約13.5個のC-C結合) である。図2を参照されたい。誘導体を環化させ、P369とI375との間の距離を模倣するために、β-Alaを使用した13~14個のC-C結合のリンカーを使用してLys残基の側鎖をGlu残基の側鎖に連結させ、13個のC-C結合の環閉鎖長を持つペプチド誘導体を環化させることができる。図3を参照されたい。

20

30

【0036】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、
RRRDFVFL[Nle][Dap] (SEQ ID NO: 32), RRRDFVFL[Nle][Dap] (SEQ ID NO: 33),
RRRDFVFL[Nle][Dap] (SEQ ID NO: 34), RRREFVFL[Nle]K (SEQ ID NO: 35),
RRREFVFL[Nle]K (SEQ ID NO: 36), RRREFVFL[Nle]D (SEQ ID NO: 37)

のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0037】

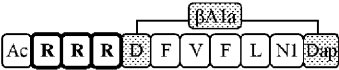
表4は、Cys-Cys架橋を置き換えるために環閉鎖リンカーが使用されている、種々の閉環設計を有するペプチド誘導体の一部の例を例証する。

40

【0038】

(表4) 種々の閉環を持つペプチド誘導体

50

ペプチド	配列	構造	閉環	SED ID No
A10*	Ac- RRRDFVFL[Nle][Dap]](環状)		5個のC-C結合の 環閉鎖長を有する、 Aspと2,3-ジアミノ プロピオン酸(Dap) との間のリンカー。	32
A11*	Ac- RRRDFVFL[Nle][Dap]](環状)		13個のC-C結合の 環閉鎖長を有する、 Asp-2-[(2-アミノ)- エトキシ]-エトキシ- 酢酸(AEEA)-Dap リンカー。	33
A12*	Ac- RRRDFVFL[Nle][Dap]](環状)		8個のC-C結合の 環閉鎖長を有する、 Asp-βAla-Dap リンカー。	34

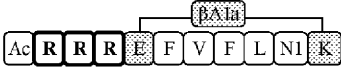
10

20

30

40

50

A13*	Ac-RRREFVFL[Nle]K (環状)		10個のC-C結合の 環閉鎖長を有する、 GluとLysとの間の リンカー。	35
A14*	Ac-RRREFVFL[Nle]K (環状)		13個のC-C結合の 環閉鎖長を有する、 Glu-βAla-Lys リンカー。	36
A15*	HN-RRREFVFL[Nle]D (環状)		12個のC-C結合の 環閉鎖長を有する、 N末端アミノ酸Arg のアミノ基とC末端 アミノ酸Aspの側 鎖上のカルボン酸 との間のヘッド・ トゥ・テール リンカー。	37

*下線付きの配列は環化を表す。

【0039】

実施例2は、ペプチド誘導体A5、A8、A10、およびA15がTNFα活性化を低減させる際に改善された活性を呈したことを実証する。表5は、類似した修飾を有する付加的なSERPINペプチド誘導体、およびペンタペプチド中に置換を有するペプチド誘導体の一部の例を列挙している。例えば、NleがLRP1との相互作用に関与しているかどうかを決定するために、ペンタペプチド中のNleがAlaで置換されているかまたは欠失している。その上、溶解性およびプロテアーゼに対する耐性を改善するために、ペンタペプチドの各残基がD-Ser(dS)で置換されている。

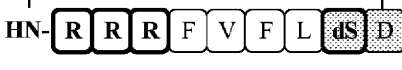
【0040】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、
 RRR[Dap]FT[Nal]L[Nle]D (SEQ ID NO: 38), RRRFT[Nal]L[Nle]D (SEQ ID NO: 39),
 RRRFVFLAD (SEQ ID NO: 40), RRRFVFLD (SEQ ID NO: 41), RRRFVFL[dS]D (SEQ
 ID NO: 42), RRRFVF[dS][Nle]D (SEQ ID NO: 43), RRRFV[dS]L[Nle]D (SEQ ID NO: 44),
 RRRF[dS]FL[Nle]D (SEQ ID NO: 45), または RRR[dS]VFL[Nle]D (SEQ ID NO: 46)

のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【 0 0 4 1 】

(表 5) 種々の閉環およびAA置換を持つペプチド誘導体

ペプチド	配列	構造	SEQ ID NO
A2-1*	Ac- RRR[Dap]FT[NaI]L[Nle]D (環状)		38
A2-2*	HN-RRRFT[NaI]L[Nle]D (環状)		39
A2-3*	HN-RRRFVFLAD (環状)		40
A2-4*	HN-RRRFVFLD (環状)		41
A2-5*	HN-RRRFVFL[dS]D (環状)		42
A2-6*	HN-RRRFVF[dS][Nle]D (環状)		43
A2-7*	HN-RRRFV[dS]L[Nle]D (環状)		44
A2-8*	HN-RRRF[dS]FL[Nle]D (環状)		45
A2-9*	HN-RRR[dS]VFL[Nle]D (環状)		46

*下線付きの配列は環化を表す。

【 0 0 4 2 】

図7に示すように、ペプチド誘導体A2-1、A2-2、A2-3、A2-4、およびA2-5は、TNF α およびNF κ Bの活性化を低減させる際にSP163MおよびSA7よりも優れた活性を実証した。試験したペプチド誘導体はどれも、試験した細胞株に対していかなる顕著な毒性も呈さなかった(図8)。

【 0 0 4 3 】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、

10

20

30

40

50

RRRFT[Na]LD (SEQ ID NO: 47), [rK]RRFT[Na]LD (SEQ ID NO: 48), [rR]RRFT[Na]LD (SEQ ID NO: 49), [rR][rR]FT[Na]LD (SEQ ID NO: 50), RRR[Dap]FT[Na]LD (SEQ ID NO: 51), RR[Dap]FT[Na]LD (SEQ ID NO: 52), RRRKFT[Na]LD (SEQ ID NO: 53), RR[Dap]FT[Na]L[dS]D (SEQ ID NO: 54), RRRFVFL[dDap]D (SEQ ID NO: 56), RRRFVFL[dK]D (SEQ ID NO: 57), RRRFVFL[dD]D (SEQ ID NO: 58), RRRFTF[Na]A[Nie]D (SEQ ID NO: 59), RRRAT[Na]L[Nie]D (SEQ ID NO: 60), RRRFT[Na]L[dS]D (SEQ ID NO: 61), RRRFTWL[dS]D (SEQ ID NO: 62)

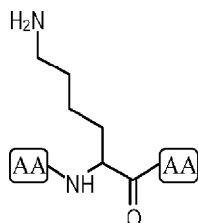
10

の amino 酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

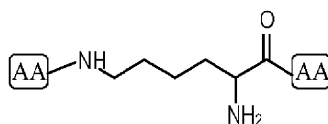
【 0 0 4 4 】

表6は、溶解性、活性、および/または経口アベイラビリティをさらに改善するために、ペプチド長を欠失を介して短縮し、環化を最適化し、かつ/または残基を置換することによってさらに最適化された、SERPINペプチド誘導体の例を提供する。ある特定の態様では、ペプチド誘導体のペンタペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸残基は、欠失しているか、または1つもしくは複数の天然もしくは非天然のアミノ酸残基で置換されている。例えば、Nle残基は、LRP1に結合するアゴニスト活性を改善するために、AlaまたはSer(D-Ser)などの疎水性のより低いアミノ酸によって置換することができる。ある特定の態様では、D立体配置のアミノ酸を使用して、ペプチドの3-D構造におけるアミノ酸の配向を変更すること、および/またはプロテアーゼ安定性を付与することができる。ある特定の態様では、Argおよび/またはLysなどの2つの荷電アミノ酸残基がペンタペプチドのN末端に付加される。ある特定の態様では、Argおよび/またはLysなどの3つの荷電アミノ酸残基がペンタペプチドのN末端に付加される。荷電アミノ酸は、以下の例に例証されるように、環サイズを最適化するために「反転した」化学構造を有することができる：

20

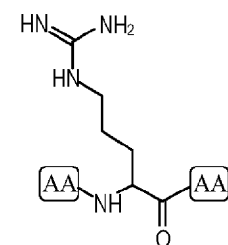


リジン-Lys

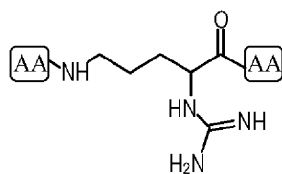


「反転」Lys-rLys

30



アルギニン-Arg



「反転」Arg-rArg

40

【 0 0 4 5 】

(表6) 付加的な修飾を持つペプチド誘導体

50

ペプチド	配列	構造	修飾	SEQ ID NO
A3-1*	<u>HN-</u> <u>RRRFT[NaI]LD</u> (環状)		ヘッド・トゥ・テール 環化においてNieを欠失 させた、最適化された ペンタペプチド配列。	47
A3-2*	<u>HN-</u> <u>[rK]RRFT[NaI]L</u> <u>D</u> (環状)		Nieを有する誘導体と 同じ環サイズを得るため の、リジン側鎖上のε- アミノ基からAspのカル ボン酸への反転Lysの 環化。	48
A3-3*	<u>HN-</u> <u>[rR]RRFT[NaI]L</u> <u>D</u> (環状)		溶解性を改善するために rArgを得るために、 A3-2の反転リジンのα- アミノがグアニル化 されている。	49

10

20

30

40

50

A3-4*	HN- [rR][rR]FT[Na]L D (環状)		環サイズおよび活性を保つために、1つのArgおよびNieを欠失させる一方で2つのrArgが使用されている。	50
A3-5*	Ac- RRR[Dap]FT[Nal]LD (環状)		Dap-Asp環化においてNieを欠失させた、最適化されたペプチド配列。	51
A3-6*	Ac- RR[Dap]FT[Na]LD (環状)		ペプチドを短縮するために1つのArg残基を欠失させている。	52
A3-7*	Ac- RRRKFT[Na]LD (環状)		Nieの欠失に起因するおよそ3つのC-C結合の環サイズの損失を補うためにLys-Asp環化が使用されている。	53
A3-8*	Ac- RR[Dap]FT[Na]L[dS]D (環状)		溶解性を改善するためにD-Ser残基が付加されている。	54
A3-9*	Ac- RR[Dap]FT[Na]L[dS]D (環状)	 アミンによる環化	溶解性を改善するために追加の塩基性中心を付加するために、アミド結合の代わりに第二級アミンを使用して環化が行われている。	54
A3-10*	HN- RRRFVFL[dDap]D (環状)		D-Dapでの置換であり、その側鎖はSerと同じ形状および長さを有するが、親水性を増加させるためにヒドロキシ基の代わりにアミノ基を呈示している。	56

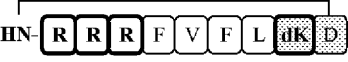
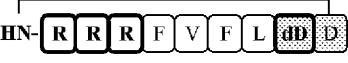
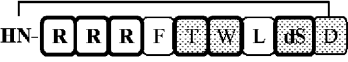
10

20

30

40

50

A3-11*	HN- <u>RRRFVFL[dK]D</u> (環状)	HN- 	D-Lysの側鎖は、 アミノ基を保有している が、ペプチド骨格から より遠くに離れている。	57
A3-12*	HN- <u>RRRFVFL[dD]D</u> (環状)	HN- 	D-Asp側鎖は、Serと同じ 形状および長さを有する が、親水性を増加させる ためにヒドロキシ基の 代わりにカルボン酸基を 呈示している。	58
A3-13*	HN- <u>RRRFTF[NaI]A[Nle]D</u> (環状)	HN- 	LeuはAlaによって 置換されている。	59
A3-14*	HN- <u>RRRAT[NaI]L[Nl e]D</u> (環状)	HN- 	PheはAlaによって 置換されている。	60
A3-15*	HN- <u>RRRFT[NaI]L[d S]D</u> (環状)	HN- 	Pheは、この位置で 疎水性相互作用を獲得 するために非天然アミノ 酸であるNaIによって 置換されている。	61
A3-16*	HN- <u>RRRFTWL[dS] D</u> (環状)	HN- 	Pheは、この位置で 疎水性相互作用を獲得 するために天然アミノ酸 であるTrpによって置換 されている。	62

*下線付きの配列は環化を表す。

【0046】

本技術のペプチド誘導体は、プロテアーゼ安定性および吸収性を改善するためにアミド結合をさらに修飾することができ、これらの修飾には、限定されるものではないが、ペプチド結合アイソスター、N-メチル化、および/またはD立体配置アミノ酸置換が含まれる。

【0047】

ある特定の態様では、開示されているのは、アミノ酸配列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO: 3)を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるペプチド誘導体であり、ここで、

X1は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X2は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X3は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X4は、Cysアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

10

20

30

40

50

X5は、Proアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X6は、第1の疎水性アミノ酸残基であり；

X7は、短分岐アミノ酸残基であり；

X8は、第2の疎水性アミノ酸残基であり；

X9は、飽和疎水性アミノ酸残基であり；

X10は、D立体配置の親水性アミノ酸であり；かつ

X11は、ペプチド誘導体の環化を可能にする任意のアミノ酸残基である。

【0048】

一部の態様では、SEQ ID NO: 3は、次のうちの1つまたは複数をさらに含む：X4はCysであり、X5はProであり、X7はThrであり、X10はD立体配置型Lys残基である。

10

【0049】

一部の態様では、X6およびX8の第1および第2の疎水性アミノ酸残基は、芳香族アミノ酸残基である。一部の態様では、X7の短分岐アミノ酸残基は、ValまたはThrである。一部の態様では、X9の飽和疎水性アミノ酸は、Leuである。一部の態様では、X10のD立体配置の親水性アミノ酸は、D立体配置型のAsp、Glu、Lys、Dap、またはCys残基である。

【0050】

一部の態様では、X1は、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；X2は、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；かつX3は、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在しない。一部の態様では、X1は、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在せず；X2は、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在せず；かつX3は、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在しない。

20

【0051】

一部の態様では、X6は、PheまたはNalである。一部の態様では、X8は、PheまたはNalである。一部の態様では、X6はAla、Phe、またはNalであり、X4はNalである。一部の態様では、X7は、Asp、Glu、Lys、Dap、またはCysである。

【0052】

一部の態様では、ペプチド誘導体は、直鎖状であるかまたは環化されている。一部の態様では、ペプチド誘導体は、15アミノ酸残基未満のサイズを有する。一部の態様では、ペプチド誘導体は、7、8、9、10、11、または12アミノ酸残基のサイズを有する。

30

【0053】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、N末端でアセチル化されているか、C末端でアミド化されているか、またはその両方である。

【0054】

ある特定の態様では、ペプチド誘導体は、SEQ ID NO: 3のX4のα炭素とX11との間で環を閉鎖するために、10個のC-C結合または同等のもので環化されている。環化は、SEQ ID NO: 3のX11と、X4とX5の間に付加された追加のアミノ酸残基との間でも起こり得る。環化は、SEQ ID NO: 3のX11と、X5とX6の間に付加された追加のアミノ酸残基との間でも起こり得る。この状況では、最適な環は、5つのC-C結合(または同等のもの)を使用して閉鎖される。ある特定の態様では、環化はヘッド・トゥ・テール環化である。

40

【0055】

ある特定の態様では、本技術のSERPINペプチド誘導体は、5～30アミノ酸、例えば5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30アミノ酸のサイズを有する。一部の態様では、本技術のSERPINペプチド誘導体は、20アミノ酸以下のサイズを有する。より長いペプチドは低下した溶解性を有し得、他方でより短いペプチドは低下した安定性を有し得る。ある特定の態様では、ペプチド誘導体は9アミノ酸残基のサイズを有する；しかしながら、最適化された環化戦略と併せた8アミノ酸残基のサイズを有するペプチド誘導体は、最小限の活性の損失しか被らない。

50

【0056】

ある特定の態様では、本技術のSERPINペプチド誘導体は、融合ペプチドまたは融合タンパク質を形成するために1種または複数種の他のペプチドまたは化合物と融合されている。例えば、1種または複数種の他のペプチドには、ALFAタグ、V5タグ、Mycタグ、HAタグ、Spotタグ、T7タグ、NEタグなどのエピトープタグ、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、脂質化、FC融合、もしくはアルブミン融合などの半減期延長因子、またはエピトープタグと半減期延長因子の両方が含まれる。

【0057】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体は、図21に例証されるように、経皮、経上皮、経鼻、胃、または局所のバイオアベイラビリティをさらに改善するために、オレイン酸、コール酸、カチオン性界面活性剤、またはラクタムなどの透過性増強剤とコンジュゲートさせることができる。

【0058】

SERPINペプチド誘導体を含む薬学的組成物

別の局面では、本開示は、有効量の本技術の1種または複数種のSERPINペプチド誘導体または融合ペプチドを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる薬学的組成物に関する。本技術の薬学的組成物は、経皮、舌下、経鼻、経口、吸入、直腸、または眼投与に対する任意の好適な剤形に製剤化することができる。一部の態様では、薬学的組成物は、本技術のSERPINペプチド誘導体ではない1種または複数種の付加的な治療剤をさらに含む。一部の態様では、薬学的組成物は、皮膚、粘膜、鼻粘膜、または上皮層へのペプチド誘導体または融合ペプチドの透過を促進するために、0.1~5%(w/w)の量の1種または複数種の透過性増強剤をさらに含む。透過性増強剤の非限定的な例には、オレイン酸などの脂肪酸、コール酸などの胆汁酸、セチルトリメチルアンモニウムなどのカチオン性界面活性剤、およびラウロカプラムなどのラクタムが含まれる。一部の態様では、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、添加剤、防腐剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む。許容される担体の例には、滅菌生理食塩水および滅菌緩衝生理食塩水などの生理学的に許容される溶液が含まれる。

【0059】

本明細書において使用される「有効量」という用語は、所望の効果を生み出す組成物の量を指す。組成物の有効量は、標的状态を防止もしくは処置すること、該状態に関連する症状を緩和すること、または所望の生理学的効果を生み出すことなどの、対象における予防効果または治療効果を生み出すために使用することができる。そのような場合、組成物の有効量は、「治療有効量」、「治療有効濃度」、または「治療有効用量」である。正確な有効量または治療有効量は、所与の対象または細胞集団における処置の有効性に関して最も効果的な結果を生む組成物の量である。この量は、組成物の特徴(活性、薬物動態、薬力学、およびバイオアベイラビリティを含む)、対象の生理学的状態(年齢、性別、疾患のタイプおよび段階、全般的な身体状態、所与の投与量に対する反応性、ならびに医薬のタイプを含む)、または細胞、製剤中の薬学的に許容される担体の性質、ならびに投与経路を含むがこれらに限定されない、多種多様な要因に依存して変動する。さらに、有効量または治療有効量は、組成物が単独で投与されるか、または別の組成物、薬物、療法、もしくは他の治療方法もしくは治療モダリティと組み合わせて投与されるかどうかによって変動し得る。臨床および薬理学の分野の当業者は、日常的な実験を通じて、すなわち組成物の投与に対する細胞または対象の応答をモニタリングし、それに応じて投与量を調整することによって、有効量または治療有効量を決定することができるであろう。付加的な指針については、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005を参照されたい。

【0060】

ある特定の態様では、本技術のペプチド誘導体または薬学的組成物は、経口投与、非経口投与、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与(ボラス注射、または注入ポンプ

10

20

30

40

50

などのデバイスを通じて)、皮内投与、経皮投与、局所投与、および鼻腔内投与用に製剤化することができる。ある特定の態様では、本技術のペプチドまたは薬学的組成物の送達に皮下注入ポンプを使用することができる。ペプチドまたは薬学的組成物は、1回を超えて投与されてもよい。より具体的には、初回投与後、1回または複数回の付加的な用量がブースターとして与えられてもよい。

【0061】

本技術のSERPINペプチド誘導体、融合ペプチド、または薬学的組成物は、種々の機能を有する。ある特定の態様では、本技術に関するものは、有効量の本明細書において開示される1種または複数種のSERPINペプチド誘導体、融合ペプチド、または薬学的組成物で、処置を必要とする対象を処置する方法である。一部の態様では、対象は、末梢神経損傷およびその結果として生じる疼痛、肺損傷、感染性疾患、ならびに好酸球性食道炎などのアレルギー性炎症に関連する状態におけるものなどの、LRP1の媒介が病態に寄与する疾患または状態に罹患している。一部の態様では、対象は、末梢神経障害、神経障害性疼痛、COVID-19感染症、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、敗血症、SARS-CoV-2、インフルエンザ、アルファウイルス感染症、およびサイトカインストームからなる群より選択される、調節不全の免疫応答に関連する疾患に罹患している。

10

【0062】

本明細書において使用される場合、状態を「処置する」または状態の「処置」とは、状態を防止すること、状態の発病もしくは発症速度を遅くさせること、状態の発症リスクを低減させること、状態に関連する症状の発症を防止するもしくは遅延させること、状態に関連する症状を低減もしくは終息させること、状態の完全もしくは部分的な退縮を発生させること、またはそれらの一部の組み合わせを指し得る。処置とは、状態の予防的または防止的処置を意味する場合もある。

20

【0063】

本明細書において使用される場合、「対象」という用語は動物を指す。一部の態様では、対象は哺乳動物である。一部の態様では、対象はヒトである。一部の態様では、対象は、本技術のペプチドによる処置の前に、アルファ-1-アンチトリプシン処置などのセリンプロテアーゼインヒビターによるいかなる前処置も受けていない。

【0064】

一部の態様では、ペプチドは、病的に増加したTNF- α レベルを有するヒト個体における血清TNF- α レベルを低減させるために使用することができる。ペプチドは、有効量でヒト対象に投与されたとき、血清TNF- α レベルの75%の減少を引き起こす。ある特定の態様では、ペプチドは、有効量でヒト対象に投与されたとき、ペプチドの投与前のレベルと比較して、血清TNF- α レベルの50%または75%の減少を生じさせる。

30

【0065】

LRP-1に関連する状態

LRP-1は、エンドサイトーシス受容体および細胞シグナル伝達受容体として機能し、細胞生存および抗炎症メカニズムに寄与することができる特定の細胞シグナリングカスケードを誘導するいくつかのリガンドを有する^{5、18、22、25}。LRP1は、多くの異なる臓器に遍在的に発現しており、脳、肺、心臓、および免疫細胞に豊富に発現する。これらの独自の性能、および組織と免疫細胞の両方での広い発現を理由に、LRP1は、炎症の調節、細胞代謝、および恒常性の維持において不可欠な役割を果たす。実例として、LRP1は、炎症誘発性(M1)マクロファージから抗炎症性(M2)マクロファージ表現型への変換を誘導するNF κ B経路およびJNK経路などの炎症性シグナリング経路を調節し、サイトカイン産出量を調節し、かつ効果的な遊走および食作用に寄与する^{22、26、51}。好中球では、LRP1依存性メカニズムにより、これらの細胞の増強された細胞接着、走化性、および抗細菌効果がもたらされ、これによって免疫抑制に抵抗する²⁵。急性感染または急性損傷中に、LRP1はまた、瀕死のまたは損傷した組織からPAMPSおよびDAMPSをスカベンジングすることを通じて炎症の消失を促進し、組織損傷サイクルを防止する²⁵。LRP1は感染中に、多種多様な疾患において重要な保護的役割を果たすことが近頃示された

40

50

重要な代謝プロセスであるオートファジーを媒介することも示された^{4、10}。よって、LRP1を標的とすることは、炎症を調節するためのその多機能能力を理由に、神経障害、感染性疾患、およびアレルギー性炎症性疾患を含む、いくつかの疾患の病態に寄与する免疫応答のいくつかの局面を軽減する実質的な可能性を有する。

【0066】

神経疾患

神経損傷および付随する疼痛に関しては、末梢神経系に対する損傷がLRP1発現の増加を誘導する。これまでに、LRP1アゴニストがCNSにおける軸索成長を促進することができ、かつ脊髄損傷後の再生を誘導することができることが実証されていた⁵³。LRP1は、組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)、および活性化 $\alpha 2$ -マクログロブリンを含む、多様な数のリガンドに対するエンドサイトーシス受容体である¹⁴。これらのリガンドは、抗炎症活性を誘導し³⁹、シュワン細胞修復プログラムを活性化し²¹、かつ軸索再生に関連するニューロンにおける細胞シグナリング経路をトランス活性化する³⁸ことができる。LRP1は、細胞シグナリングを活性化するためにリガンド結合を必要とするが、異なるリガンドは、別個の、かつ時には反対の細胞シグナリング応答を誘発し、これは独自の共受容体複合体をアセンブリする異なるリガンドの能力を反映するものである。さらに、多くのLRP1リガンドは、LRP1結合に関与しない細胞生理に対する数多くの効果を備えた、マルチドメインタンパク質である。例えば、組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)は、LRP1に結合してシュワン細胞(SC)の生存および遊走を促進する²³。しかし、LRP1非依存性活性によって、tPAは疼痛を誘発する¹。EI-tPAは、ヒトiPSC由来神経前駆細胞(iNPC)の生存を促進し、EI-tPAで活性化され重度の脊髄損傷を持つげっ歯類に移植されたiNPCは、改善された運動機能の回復を実証する⁴⁰。神経損傷後の微小環境における不均衡は、慢性神経障害性疼痛の状況の発症を含む、深刻な帰結を及ぼし得る¹²。末梢神経系(PNS)損傷において、TNF α 、IL-6、およびIL-1 β などの炎症誘発性サイトカインとIL-10などの抗炎症誘発性サイトカインの両方が、軸索の再生および修復において中心的な役割を果たすことが示されてきた⁶。

【0067】

アルツハイマー病(AD)などの神経変性疾患に関して、LRP1の役割が広範に研究されてきた。ADは、認知能力の進行性の喪失と、患っているヒトの海馬および皮質における、アミロイド β (A β)で主に構成される老人斑の形成および神経原線維タングル(NFT)と呼ばれるタウタンパク質凝集体とを特徴とする。疾患進行中のタンパク質凝集体の拡散は、神経変性疾患の病態の根底にある共通の主題である。LRP1は、エンドサイトーシス受容体として、脳および全身のアミロイド β ペプチドのクリアランス、分解、および産生を調節することが示された⁵⁴。LRP1媒介性の血液脳関門(BBB)を横切るA β のクリアランスは、脳から末梢へのA β トランスサイトーシスの調節における主要な事象であるので、本技術の1種または複数種のペプチド誘導体でLRP1を標的とすることは、新規の処置として役立ち得る。また、NFTを形成するタウタンパク質凝集体は、アルツハイマー病の病態形成において中心的な役割を果たしている。LRP1は、病態の悪化に関連するタウタンパク質のエンドサイトーシス、蓄積、および拡散を調節するように機能する³²。よって、本技術のSERPINペプチド誘導体は、LRP1が関連するタウおよびアミロイドa β のタンパク質凝集の媒介を通じて、斑およびタングルの両方の病態を是正する介入として役立ち得る。本技術のSERPINペプチド誘導体は、神経変性疾患において不可欠な役割を果たす神経炎症に対しても作用することができる。

【0068】

LRP1は、神経変性疾患の発症、ならびに脳および末梢におけるアミロイド β ペプチド(A β)の代謝の調節に関与していることが示されてきた。神経炎症は、アルツハイマー病(AD)などの神経変性疾患において不可欠な役割を果たす。LRP1は、CNSの細胞中で高度に発現され、ストレスの多い状況下で一次ニューロンの生存に不可欠な役割を果たすことが示されている^{56、57}。ミクログリア細胞は脳の常在免疫細胞として作用し、環境中

の恒常性を維持するのに役立つ。ミクログリアは、CNSの組織常在マクロファージ様自然免疫細胞の原型であると考えられている⁵⁸。これらの細胞は、走化性、食作用、抗原提示、およびサイトカイン産生に関与しているが、障害されたまたは感染したミクログリアは、神経炎症および神経変性の一因となる可能性がある⁵⁹。反応性グリア細胞(ミクログリア細胞など)および関連する神経炎症は、疾患の開始と進行の両方において主要な役割を果たし、ベータアミロイドおよび他の傷害関連分子パターン(DAMP)の調節不全のクリアランスを通じて活性になる¹³。ABの沈着およびタウの過剰リン酸化は、ミクログリアの活性化、NFκB炎症性経路の活性化、ならびにTNFα、IL-6、およびIL-1βなどの関連する炎症誘発性サイトカインに寄与し、これらはニューロンの傷害および喪失の一因となる。ベータアミロイドなどのタンパク質を分解しかつ再利用する恒常性プロセスであるオートファジーの障害は、ADと関連している⁷。LRP1は、オートファジーに関連する正常なリソソーム処理を媒介することが示されてきた。よって、LRP1を通じて、開示されたSERPINペプチド誘導体は、正常な細胞代謝を含むADのいくつかの局面を媒介して、タンパク質凝集の拡散を低減させ、神経炎症を緩和し、かつ神経機能障害を改善することで、これらの細胞の生存および場合によっては再生をもたらすことができる。

10

20

30

40

50

【0069】

急性肺損傷(急性呼吸窮迫症候群)

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)に至る急性肺損傷(ALI)は、肺炎、外傷、および/または感染などの多種多様な炎症性侵襲によって開始され得る。ALIにおける主要な開始段階は、傷害関連分子パターンまたは病原体関連分子パターン(それぞれDAMPまたはPAMP)に対する調節不全の自然免疫応答である。肺泡マクロファージは、さらなるマクロファージおよび循環好中球の動員をもたらすToll様およびNod様受容体シグナリング経路において感染性微生物によって活性化される。好中球は、肺に蓄積し、炎症誘発性サイトカインおよび他の細胞毒性物質を放出して、損傷の増悪を引き起こす。肺上皮はこれらの細胞によって傷害され、それらの分泌産物が肺水腫および潜在的な呼吸窮迫(ARDS)を引き起こす。炎症誘発性サイトカインであるTNF-アルファ、IL-1ベータ、IL-6、IL-8、およびIL-18の増加が起こり、その結果、敗血症の罹患率および死亡率を予測するものである「サイトカインストーム」が生じる。LRP1は肺炎症および肺組織の修復を調節するので、LRP1は敗血症およびARDSにおいて不可欠な役割を果たすものであると報告された⁴⁹。本技術のSERPINペプチド誘導体は、LRP1を標的とし、恒常性を回復するための免疫応答の正確な協調をもたらす。よって、開示されたペプチド誘導体は、特定のLRP1媒介性シグナリング経路を誘導することによって開始される複数のメカニズムを通じて、肺傷害を軽減しかつ生存を改善するのに顕著な影響を与えることができる。これらのメカニズムには、炎症の消失を促進するためにサイトカイン産出量を再均衡化すること、適切な細胞代謝プロセスを回復させるためにオートファジーを媒介すること、免疫細胞機能を回復させること、および組織損傷サイクルを調節するために受容体によりスカベンジングすることが含まれる。これらのメカニズムは、感染のクリアランスを助け、宿主が感染とより良好に戦うことを可能にする。これらのメカニズムに基づいて、開示されたSERPINペプチド誘導体は、LRP1シグナリングを媒介することによりARDSを防止または処置するための免疫調節治療剤として使用することができる。

【0070】

感染性疾患

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は、重度のCOVID-19疾病を持つ患者における主な合併症である。中国武漢からの臨床評価および後向き研究によって、入院した患者の全てが肺炎を起こしており、それらのうち29%がARDSを発症し、非生存者であった重篤患者のうちの大多数(81%)がARDSを発症していたことが示されている^{17, 52}。よって、ARDSを発症する患者は死亡リスクが実質的により高くなる。Toll様受容体(TLR)を通じた、ウイルス媒介性の自然免疫応答の活性化によって、感染を排除するために必要な炎症応答が開始される。一部の事例では、開始されたウイルスの侵襲および誘因が高度に増幅され、かつ制御不能であり、その結果、免疫細胞の過剰刺激および異常なサイトカイン放出(サ

イトカインストームとして公知である)が生じ、その結果、臓器不全および死亡に至る可能性がある組織傷害が生じる。サイトカインの調節は、過活動性の免疫応答の有害な効果を防止する際の主要な因子であり、サイトカインストームを制御することは、ウイルス性肺炎のARDSへの進行に顕著な影響を与え得る。SARS-CoV-2の事例では、新たに出現したエビデンスによって、重度の疾病を持つ患者の亜集団について、サイトカインストームが死亡率の寄与要因であることが示唆されている²⁷。近頃、肺合併症を持つコロナウイルス感染患者の処置のための、インターロイキン-6インヒビター(IL-6)であるKevzara(サリルマブ)の臨床試験が始まった。IL-6は、肺炎を有する個体のより高い死亡率に関連するバイオマーカーである。これらの試験は、単一のサイトカインを標的とした治療の有効性についての不可欠な洞察を提供することになる。しかしながら、歴史的に、ARDS患者において単一のサイトカインまたは経路を標的とすることは、効果的なアプローチであるとは証明されていない。

10

【0071】

本技術のSERPINペプチド誘導体によって媒介されるLRP1シグナリングは、サイトカインストームを抑えること、細胞生存を改善すること、感染をクリアするためにオートファジーおよび細胞代謝を調節すること、ならびに適切な治療を促進しかつ線維症を防止するために組織修復シグナリング経路を制御すること、を含む肺炎症のいくつかのメカニズムを調節することを通じて、COVID-19患者の転帰を改善するための免疫調節戦略としての治療可能性を有し得る。LRP1は、プロテアーゼ/アンチプロテアーゼ活性を調節し、かつウイルス侵入を媒介することが広く公知である⁴³。新型コロナウイルスは、プロテアーゼ(TMPRSS2)を利用して細胞侵入および感染を調節し、SERPINなどのそれに対応するプロテアーゼインヒビターによる処置は、肺細胞の感染を遮断した^{16、24、28}。SARS-CoV-2のウイルス侵入は、ウイルス複製サイクルの第1の段階である宿主細胞侵入に関与するウイルススタンパク質をプライミングする、セリンプロテアーゼであるTMPRSS2に依存している。カモスタットメシル酸塩は、TMPRSS2のプロテアーゼ阻害機能を持つ天然SERPINであり、SARS-CoV-2のウイルス侵入を低減させるのに効果的であった。これにより、疾患の感染と拡散の両方を制限することができる¹⁶。SP163Mなどの本技術のアルファ-1アンチトリプシン誘導体も、おそらくはLRP1を通じて、TMPRSS2を阻害することが可能であり、かつSARS-CoV-2のウイルス複製を低減させる効果を有し得る。開示されたSERPINペプチド誘導体は、宿主プロテアーゼ/ウイルスタンパク質相互作用のLRP1制御のメカニズムを介してSARS-CoV-2の複製を低減させて、ウイルス侵入を阻害し得る。

20

30

【0072】

節足動物介在性ウイルスは、急性脳炎の重要な原因であり、新たな地域への移入のリスクがますます高まっている新たに出現した世界的な問題である^{11、31}。ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)、東部ウマ脳炎ウイルス(EEEV)、および西部ウマ脳炎ウイルス(WEEV)を含む蚊介在性脳炎性アルファウイルスは、アメリカ大陸に特有であり、脳脊髄炎の大流行を引き起こしており、米国へと拡散する可能性がある。ヒトにおいて、VEEVは、発熱、倦怠感、および嘔吐を典型とする熱性疾病を引き起こす。一部の事例では、感染は中枢神経系(CNS)へと進行する。神経学的症例は、小児で35%もの高さであり、成人では10%である死亡率を有しており、生存者において長期の神経学的欠損が見られることが多い⁴²。神経学的後遺症を伴うVEEV生存者の全体的な推定値は4~14%であるが、アルボウイルス脳炎の誤診に起因してさらに高い場合がある³³。

40

【0073】

VEEV感染は、自然免疫応答を下方制御するために細胞の転写および翻訳を阻害することが公知である^{45、48}。対照的に、中枢神経系(CNS)では、VEEV感染は、炎症応答およびアポトーシス経路における数多くの遺伝子の上方制御を生じさせる^{45、48}。具体的には、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-12、および腫瘍壊死因子- α (TNF- α)を含む炎症誘発性サイトカインが、VEEVの病態形成において役割を果たしている^{9、20、30、34、35}。VEEV感染マウスの脳組織において遺伝子発現の変化が分析され、抗原

50

提示、炎症、アポトーシス、および従来の抗ウイルス応答に関与する免疫経路の改変が発見された³⁶。加えて、VEEV感染マウスの脳において、インテグリン、カドヘリン-1、カドヘリン-2、血管細胞接着分子-1、および細胞内接着分子-1(ICAM-1)などの、細胞外マトリックスおよび接着遺伝子のウイルスによるモジュレーションが観察された³⁷。ICAM-1ノックアウトマウスによって、脳における炎症の低減、およびそれに続く臨床疾患の発病の遅延が実証された³⁷。これらの研究は、アルファウイルス誘導性の炎症が神経学的傷害に実質的に寄与していること、および炎症の制御が実行可能な治療戦略であることを示唆している。

【0074】

本技術のSERPINペプチド誘導体は、LRP1に結合し、かつ免疫調節カスケードを開始することができる。LRP1発現は、虚血、組織損傷、およびウイルス感染中に増加する²、²²、²⁵、⁴³。開示された1種または複数種のペプチド誘導体のLRP1への結合は、炎症応答を阻害し、かつプロテインキナーゼであるAktのリン酸化を通じて生存促進シグナリングを誘導することができる。よって、LRP1を標的とすることは、感染性疾患に対する広い範囲領域の治療戦略としての可能性を有する。

【0075】

SERPINペプチド誘導体は、LRP1に向けられた宿主媒介性メカニズムを通じて、重度のCOVID-19疾患に付随する有害なサイトカインストームを抑え、肺傷害を防止するための保護経路を活性化し、かつ/または感染をより早くクリアすることができ、かつウイルス感染の抑制に直接的な影響を与える。よって、SERPINペプチド誘導体の抗炎症と抗ウイルスの二重メカニズムは、SARS-COV2誘導性ARDSを持つ患者における生存を改善する効果を有し得る。

【0076】

好酸球性食道炎

好酸球性食道炎(EoE)は、食道機能障害および攪乱された上皮バリア機能に関連する、主に2型免疫によって媒介される慢性のアレルギー性炎症応答である。食道の炎症は、嚥下困難、持続的な胸焼け、胸部および腹部の疼痛、体重減少、ならびに食物嵌頓を生じさせる。それは、好酸球、プロテアーゼ、カテリシジン、カリクレイン(KLK5)を含むセリンプロテアーゼ、またサイトカインでありかつ局所環境におけるアレルギー性2型炎症応答のマスターレギュレーターである胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の数が多ことを特徴とする⁴¹。食道上皮細胞では、セリンペプチダーゼインヒビターであるKazal7型-SPINK7の機能の喪失により、制御不能なプロテアーゼ活性、TNF α 、CCL2、GM-CSF、IL-8、およびCXCL10などの炎症誘発性サイトカインの放出、ならびに炎症が生じる。近頃、上皮バリア機能の重要なメディエーターであるセリンプロテアーゼKLK-5がSPINK7の直接の標的であり、SPINK7の喪失が、主に制御不能なKLK-5プロテアーゼ活性を通じて、EoEの病態形成を媒介することが判明した。興味深いことに、SERPINであるアルファ-1アンチトリプシンは、インビトロでKLK5活性を阻害し、インビボでアレルギー誘導性食道好酸球増加症を阻害することが可能である。しかしながら、該活性のメカニズムはまだ明らかではなく、直接的なタンパク質分解阻害の代わりに、またはそれに加えて、LRP1が関与している可能性がある。

【0077】

好酸球性喘息を持つ患者は、より低いレベルのLRP1を有する。加えて、マウスにおいてCD11bおよびCD11c樹状細胞のLRP1を特異的に欠失させることにより、アレルギー性気道疾患モデルにおいて増大したアレルギー性炎症応答が生じる²⁹。LRP1を欠失させたマウスは、抗原取り込みが増加しており、好酸球性炎症の増加、アレルギー性感作の増加、Th2媒介性サイトカイン産生の増加、および制御性T細胞の低減を被っていた²⁹。よって、LRP1は、食道環境におけるプロテアーゼ/インヒビターの恒常性を維持すること、TH2応答を媒介すること、および炎症性シグナリング経路(NF κ B、JNK)を阻害することを支援して、食道機能障害の修復を生じさせることができる。

【0078】

本明細書において実証されているように、プロテアーゼインヒビター機能を持たない強力なLRP1アゴニストであるSA7などの開示されたSERPINペプチド誘導体は、TMPRSS2の発現を低減させることができる。TMPRSS2の発現は、2型喘息およびアレルギー性鼻炎の鼻上皮細胞および気道上皮細胞において顕著に増加していることが示された。研究により、TMPRSS2の発現が、アレルギー性応答に重要なTH2媒介性免疫応答と正に関連していることも示されている。開示されたSERPINペプチド誘導体は、LRP1に対する制御を媒介することにより、好酸球性食道炎の緩和において顕著な意義を持ち得る。

【0079】

次の実施例は、本技術の種々の態様を例証することを意図している。そのため、論じられる特定の態様は、本技術の範囲に対する制限として構築される(constructed)べきではない。当業者には、本技術の範囲から逸脱することなく、種々の同等物、変更物、および修正物が作製され得ることが明白であり、そのような同等の態様が本明細書において含まれることが理解される。さらに、本開示において引用された全ての参考文献は、あたかも本明細書において完全に記載されているかのように、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0080】

本技術の種々の態様は、本明細書において以下の項0096～0175に記載されている。

【0081】

0096. SERPINペプチド誘導体であって、FVFLM(SEQ ID NO: 1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)、PFVFLM(SEQ ID NO: 8)、PFVFL[Nle](SEQ ID NO: 9)のコア配列と、以下の修飾：

(i)該コア配列のN末端に付加された極性頭部、該コア配列のC末端に付加された極性尾部、またはその両方；

(ii)該ペプチド誘導体が環化され得るように該コア配列のN末端、該コア配列のC末端、またはその両方に付加された、1つまたは複数のアミノ酸残基；

(iii)置換される該コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基と比較して、より低い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基；

(iv)置換される該コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基と比較して、より高い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基；および

(v)該コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が欠失しているうちの1種または複数種とを含む、前記SERPINペプチド誘導体。

【0082】

0097. 直鎖状ペプチドである、項0096のSERPINペプチド誘導体。

【0083】

0098. 環化ペプチドである、項0096のSERPINペプチド誘導体。

【0084】

0099. 2つのCys残基間にジスルフィド結合を形成することによって環化されている、項0098のSERPINペプチド誘導体。

【0085】

0100. 2つのアミノ酸残基間のリンカーによって環化されている、項0098のSERPINペプチド誘導体。

【0086】

0101. 極性頭部または極性尾部が、Arg、Lys、およびHisからなる群より選択される正に荷電したアミノ酸などの2つ以上の荷電アミノ酸を含む、項0096～0100のSERPINペプチド誘導体。

【0087】

0102. 15アミノ酸残基未満のサイズを有する、項0096～0101のSERPINペプチド誘導体。

10

20

30

40

50

【0088】

0103. 7、8、9、10、11、または12アミノ酸残基のサイズを有する、項0096～0102のSERPINペプチド誘導体。

【0089】

0104. 1つまたは複数のアミノ酸残基が、D-アミノ酸である、項0096～0103のSERPINペプチド誘導体。

【0090】

0105. アミノ酸配列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO: 3)を含むSERPINペプチド誘導体であって、ここで、

X1は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

10

X2は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X3は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X4は、Cysアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X5は、Proアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X6は、第1の疎水性アミノ酸残基であり；

X7は、短分岐アミノ酸残基であり；

X8は、第2の疎水性アミノ酸残基であり；

X9は、飽和疎水性アミノ酸残基であり；

X10は、D立体配置の親水性アミノ酸であり；かつ

X11は、該SERPINペプチド誘導体の環化を可能にする任意のアミノ酸残基である、前記SERPINペプチド誘導体。

20

【0091】

0106. 第1および第2の疎水性アミノ酸残基が、芳香族アミノ酸残基である、項0105のSERPINペプチド。

【0092】

0107. 短分岐アミノ酸残基が、ValまたはThrである、項0105～0106のSERPINペプチド。

【0093】

0108. 飽和疎水性アミノ酸が、Leuである、項0105～0107のSERPINペプチド。

【0094】

0109. D立体配置の親水性アミノ酸が、D立体配置型のAsp、Glu、Lys、Dap、またはCys残基である、項0105～0108のSERPINペプチド。

30

【0095】

0110. X1が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；

X2が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；かつ

X3が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在しない、

項0105～0109のSERPINペプチド。

【0096】

0111. X1が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在せず；

X2が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在せず；かつ

X3が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在しない、

項0105～0110のSERPINペプチド誘導体。

40

【0097】

0112. X6が、PheまたはNalである、項0105～0111のSERPINペプチド誘導体。

【0098】

0113. X8が、PheまたはNalである、項0105～0112のSERPINペプチド誘導体。

【0099】

0114. X6がAla、Phe、またはNalであり、かつX4がNalである、項0105～0113のSERPINペプチド誘導体。

【0100】

50

0115. X7が、Asp、Glu、Lys、Dap、またはCysである、項0105～0114のSERPINペプチド誘導体。

【0101】

0116. 直鎖状であるかまたは環化されている、項0105～0115のSERPINペプチド誘導体。

【0102】

0117. 15アミノ酸残基未満のサイズを有する、項0105～0116のSERPINペプチド誘導体。

【0103】

0118. 7、8、9、10、11、または12アミノ酸残基のサイズを有する、項0105～0117のSERPINペプチド誘導体。

【0104】

0119. SERPINペプチド誘導体であって、FVFLM(SEQ ID NO: 1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO: 2)、PFVFLM(SEQ ID NO: 8)、PFVFL[Nle](SEQ ID NO: 9)のコア配列と、以下の修飾：

(i) 該コア配列のN末端に付加された1つもしくは複数のLys、Glu、もしくはHis残基、該コア配列のC末端に付加された極性尾部、またはその両方；

(ii) 2つのCys残基間にジスルフィド結合を形成することによって該SERPINペプチド誘導体が環化され得るように該コア配列のN末端、該コア配列のC末端、またはその両方に付加された、1つまたは複数のアミノ酸残基；

(iii) 1つまたは複数のThrアミノ酸残基によって置換されている、該コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基；および

(iv) 置換される1つまたは複数のアミノ酸残基よりも高い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基

のうちの1種または複数種とを含む、前記SERPINペプチド誘導体。

【0105】

0120. 直鎖状ペプチドである、項0119のSERPINペプチド誘導体。

【0106】

0121. 15アミノ酸残基未満のサイズを有する、項0119または0120のSERPINペプチド誘導体。

【0107】

0122. 7、8、9、10、11、または12アミノ酸残基のサイズを有する、項0119～0121のSERPINペプチド誘導体。

【0108】

0123. アミノ酸配列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO: 3)を含むSERPINペプチド誘導体であって、ここで、

X1は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X2は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X3は、親水性アミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X4は、Cysアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X5は、Proアミノ酸残基であるかまたは存在せず；

X6は、第1の疎水性アミノ酸残基であり；

X7は、短分岐アミノ酸残基であり；

X8は、第2の疎水性アミノ酸残基であり；

X9は、飽和疎水性アミノ酸残基であり；

X10は、D立体配置の親水性アミノ酸であり；かつ

X11は、該SERPINペプチド誘導体の環化を可能にする任意のアミノ酸残基であり；

ここで、X4がCysであり、X5がProであり、X7がThrであり、かつ/またはX10がD立体配置型Lys残基である、

10

20

30

40

50

前記SERPINペプチド誘導体。

【0109】

0124. 第1および第2の疎水性アミノ酸残基が、芳香族アミノ酸残基である、項0123のSERPINペプチド。

【0110】

0125. 短分岐アミノ酸残基が、ValまたはThrである、項0123または0124のSERPINペプチド。

【0111】

0126. 飽和疎水性アミノ酸が、Leuである、項0123～0125のSERPINペプチド。

【0112】

0127. D立体配置の親水性アミノ酸が、D立体配置型のAsp、Glu、Lys、Dap、またはCys残基である、項0123～0126のSERPINペプチド。

【0113】

0128. X1が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；

X2が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在せず；かつ

X3が、正電荷を呈する塩基性残基であるかまたは存在しない、

項0123～0127のSERPINペプチド。

【0114】

0129. X1が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在せず；

X2が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在せず；かつ

X3が、Arg、Lys、もしくはHis残基であるかまたは存在しない、

項0123～0128のSERPINペプチド誘導体。

【0115】

0130. X6が、PheまたはNalである、項0123～0129のSERPINペプチド誘導体。

【0116】

0131. X8が、PheまたはNalである、項0123～0130のSERPINペプチド誘導体。

【0117】

0132. X6がAla、Phe、またはNalであり、かつX4がNalである、項0123～0131のSERPINペプチド誘導体。

【0118】

0133. X7が、Asp、Glu、Lys、Dap、またはCysである、項0123～0132のSERPINペプチド誘導体。

【0119】

0134. 直鎖状であるかまたは環化されている、項0123～0133のSERPINペプチド誘導体。

【0120】

0135. 15アミノ酸残基未満のサイズを有する、項0123～0134のSERPINペプチド誘導体。

【0121】

0136. 7、8、9、10、11、または12アミノ酸残基のサイズを有する、項0123～0135のSERPINペプチド誘導体。

【0122】

0137. SEQ ID NO: 10～20または23～62の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、コア配列のN末端に付加された極性頭部、コア配列のC末端に付加された極性尾部、またはその両方を含む、前記SERPINペプチド誘導体。

【0123】

0138. SEQ ID NO: 15～17または23～62の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、該ペプチド誘導体が環化され得るように、1つまたは複数のアミノ酸残基が、コア配列のN末端、コア配列のC末端、またはその両方に付加されている、前記SERPINペプチド誘導体。

10

20

30

40

50

【0124】

0139. SEQ ID NO: 27～29、38、39、または42～62の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が、置換される該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基と比較して、より低い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、前記SERPINペプチド誘導体。

【0125】

0140. SEQ ID NO: 30または31の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が、置換される該コア配列中の該1つまたは複数のアミノ酸残基と比較して、より高い疎水性を有する1つまたは複数の置換アミノ酸残基によって置換されている、前記SERPINペプチド誘導体。

10

【0126】

0141. SEQ ID NO: 41または47～53の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が欠失している、前記SERPINペプチド誘導体。

【0127】

0142. SEQ ID NO: 10、11、13、または14、35、または36の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、1つもしくは複数のLys、Glu、もしくはHis残基がコア配列のN末端に付加されているか、極性尾部がコア配列のC末端に付加されているか、またはその両方である、前記SERPINペプチド誘導体。

【0128】

20

0143. SEQ ID NO: 15～17または23～31の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、2つのCys残基間にジスルフィド結合を形成することによって該SERPINペプチド誘導体が環化され得るように、1つまたは複数のアミノ酸残基が、コア配列のN末端、コア配列のC末端、またはその両方に付加されている、前記SERPINペプチド誘導体。

【0129】

0144. SEQ ID NO: 27～29、38、39、47～55、または59～62の配列を含むSERPINペプチド誘導体であって、コア配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が、1つまたは複数のThrアミノ酸残基によって置換されている、前記SERPINペプチド誘導体。

【0130】

0145. 項0096～0144のSERPINペプチド誘導体と、エピトープタグ、半減期延長因子(half-life extender)、またはその両方とを含む、融合タンパク質。

30

【0131】

0146. 項0096～0144のSERPINペプチド誘導体と、透過性増強剤とを含む、コンジュゲート。

【0132】

0147. 項0096～0144のSERPINペプチド誘導体、項0145の融合タンパク質、または項0146のコンジュゲートを含む、薬学的組成物。

【0133】

0148. 1種または複数種の付加的な治療剤をさらに含む、項0147の薬学的組成物。

【0134】

40

0149. 薬学的に許容される担体、賦形剤、添加剤、防腐剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項0147または項0148の薬学的組成物。

【0135】

0150. 透過性増強剤をさらに含む、項0147～0149の薬学的組成物。

【0136】

0151. 経口投与、経皮投与、または非経口投与用に製剤化されている、項0147～0150の薬学的組成物。

【0137】

0152. 項0119～0136、0140、または0142～0144のSERPINペプチド誘導体と、エピトープタグ、半減期延長因子、またはその両方とを含む、融合タンパク質。

50

【0138】

0153. 項0119～0136、0140、または0142～0144のSERPINペプチド誘導体と、透過性増強剤とを含む、コンジュゲート。

【0139】

0154. 項0119～0136、0140、または0142～0144のSERPINペプチド誘導体、項0152の融合タンパク質、または項0153のコンジュゲートを含む、薬学的組成物。

【0140】

0155. 1種または複数種の付加的な治療剤をさらに含む、項0154の薬学的組成物。

【0141】

0156. 薬学的に許容される担体、賦形剤、添加剤、防腐剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項0154または項0155の薬学的組成物。

10

【0142】

0157. 透過性増強剤をさらに含む、項0154～0156の薬学的組成物。

【0143】

0158. 経口投与、経皮投与、または非経口投与用に製剤化されている、項0154～0157の薬学的組成物。

【0144】

0159. LRP1に関連する疾患または状態に罹患している対象を処置する方法であって、該LRP1に関連する疾患または状態を処置するために、有効量の項0096～0144のSERPINペプチド誘導体、項0145の融合タンパク質、項0146のコンジュゲート、または項0147～0151の薬学的組成物を該対象に投与する工程を含む、前記方法。

20

【0145】

0160. SERPINペプチドを投与する工程が、対象におけるNFkBの活性化を低減させる、項0159の方法。

【0146】

0161. SERPINペプチドを投与する工程が、対象におけるTNFaを低減させる、項0159または0160の方法。

【0147】

0162. SERPINペプチドを投与する工程が、IL-6を低減させる、項0159～0161の方法。

30

【0148】

0163. LRP1に関連する疾患または状態が、急性疼痛もしくは神経障害性疼痛、侵害受容性疼痛、または炎症性疼痛である、項0159～0162の方法。

【0149】

0164. LRP1に関連する疾患または状態が、ウイルス感染症によって引き起こされる疾患または状態である、項0159～0163の方法。

【0150】

0165. SERPINペプチドを投与する工程が、ウイルス複製を低減させる、項0164の方法。

【0151】

0166. LRP1に関連する疾患または状態が、好酸球性食道炎である、項0159～0162の方法。

40

【0152】

0167. LRP1に関連する疾患または状態が、急性肺損傷である、項0159～0162の方法。

【0153】

0168. LRP1に関連する疾患または状態に罹患している対象を処置する方法であって、該LRP1に関連する疾患または状態を処置するために、有効量の項0119～0136、0140、または0142～0144のSERPINペプチド誘導体、項0152の融合タンパク質、項0153のコンジュゲート、または項0154～0158の薬学的組成物を該対象に投与する工程を

50

含む、前記方法。

【0154】

0169. SERPINペプチドを投与する工程が、対象におけるNFκBの活性化を低減させる、項0168の方法。

【0155】

0170. SERPINペプチドを投与する工程が、対象におけるTNFαを低減させる、項0168または0169の方法。

【0156】

0171. SERPINペプチドを投与する工程が、IL-6を低減させる、項0168～0170の方法。

【0157】

0172. LRP1に関連する疾患または状態が、ウイルス感染症によって引き起こされる疾患または状態である、項0168～0170の方法。

【0158】

0173. SERPINペプチドを投与する工程が、ウイルス複製を低減させる、項0172の方法。

【0159】

0174. LRP1に関連する疾患または状態が、好酸球性食道炎である、項0168～0170の方法。

【0160】

0175. LRP1に関連する疾患または状態が、急性肺損傷である、項0168～0170の方法。

【実施例】

【0161】

実施例1：SERPIN由来誘導体の抗炎症効果

SP163MおよびSP22を陽性対照として使用して、表1に列挙したSERPINペプチド誘導体SA1～SA8をそれらの抗炎症効果について試験した。レポーター細胞(THP1-XBlue-MD2-CD14細胞)を、各ペプチド誘導体SA1～SA8、ならびにSP22およびSP163M(50 μg/ml)で処置してからLPS(5 ng/ml)で侵襲を与え、一晚インキュベートした。NFκB誘導性分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)を上清中で測定し、吸光度を読み取った。図1に示すように、最短のLRP1結合配列FVFL[Nle]と溶解性を改善するための隣接物としてのRRRトリペプチドとを保持するSERPINペプチド誘導体(SA3、SA6、およびSA7など)は、SP163Mと比較したときにNFκB阻害における改善された活性を実証した。しかしながら、HHHもしくはKKKトリペプチドのどちらか、または負に荷電したEEEトリペプチド(SA1、SA2、SA4、SA5など)が隣接したSERPINペプチド誘導体は、最小限のNFκB阻害活性を実証した。

【0162】

このデータは、短縮ペプチド(例えば、SA3)を作製することができること、ならびに短縮ペプチドが、FNKPとLRP1結合モチーフ(FVFLM/Nle)とを含む高度に保存されたコア配列を含有するSERPINペプチドSP163MおよびSP22よりもNFκB活性化を低減させるのに効果的であることを示している。

【0163】

実施例2：SERPINペプチド誘導体の生物学的活性の評価

種々のSERPINペプチド誘導体を、LRP-1活性化を介してTNFαおよびNFκBの分泌を低減させるそれらの能力についてインビトロでスクリーニングした。NFκBレポーター細胞(THP1-XBlue-MD2-CD14細胞)を、最大100 μg/mlの種々の濃度の各ペプチド誘導体で処置してからLPS(5 ng/ml)で侵襲を与え、一晚インキュベートした。NFκB誘導性分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)を上清中で測定し、吸光度を読み取った。ビヒクル(LPSで刺激した)細胞に対する、NFκB活性化の低減パーセンテージを図中に示している。IMGミクログリア細胞を、最大100 μg/mlの種々の濃度の各ペプチド誘

10

20

30

40

50

導体で処置してからLPS(100ng/ml)で24時間刺激した。ELISAを使用して上清中のTNF α (pg/ml)を測定した。

【0164】

図5に示すように、表2～4に列挙したSERPINペプチド誘導体A1～A15を、それらのTNF α 活性について試験した。アミノ酸置換を有するペプチド誘導体A5およびA8、ならびに修飾された閉環を有するペプチド誘導体A10およびA15は、TNF α 活性化を低減させる際に改善された活性を実証した。

【0165】

図6は、ペプチド誘導体A2-1、A2-2、A2-3、A2-4、およびA2-5が、TNF α (図6A)およびNF κ B(図6B)の活性化を低減させる際に優れた活性を呈したことを実証する。これらのペプチド誘導体の活性は用量依存的であり、改善された効力を示した(図7)。ペプチド誘導体を最大50 μ g/mLの濃度で試験し、一方でSP16未修飾、SP163M、およびSA7を最大100 μ g/mLの濃度で試験した。どのペプチド誘導体も細胞毒性を示さない(図8)。細胞毒性アッセイでは、細胞(NF κ Bレポーター細胞またはIMGミクログリア細胞)を、SP163Mまたはペプチド誘導体SA7、A5、A15、A2-1、A2-2、A2-3、A2-4、A2-5、A2-6、A2-7、A2-8、およびA2-9のいずれかで最大100 μ g/mLの濃度で24時間処置し、次いで、CellTiter-Glo(登録商標) Luminescent Cell Viability Assayを製造業者の指示に従って使用して細胞生存率を決定した。

【0166】

図9は、ペプチド誘導体A3-10およびA3-14がNF κ B活性化を低減させる際に優れた活性を呈したことを実証し、図10は、ペプチド誘導体A3-14がLPS刺激後のIMGにおけるIL-6分泌を低減させる際に優れた活性を呈したことを実証する。ペプチド誘導体A3-10は、合成に関する問題点に起因してIL-6アッセイには含めなかった。試験したこれらのペプチド誘導体はどれも、いかなる顕著な細胞毒性も示さなかった(図11)。

【0167】

以下の表7に、本技術のペプチド誘導体の一部に対するインビトロ試験のEC50を要約する。

【0168】

(表7) 種々のペプチド誘導体のEC50(μ g/mL)

ペプチド	NF κ B	TNF α	IL-6
A15	5.053	36.75	32.39
A2-1	5.77	12.99	9.644
A2-3	2.647	11.76	3.379
A2-4	5.247	12.54	11.27
A2-5	1.465	2.386	1.399
A3-7	22.41	n/a	3.651
A3-10	2.162	34.59	58.46
A3-14	3.775	6	0.605
SP163M	41.51	125.9	134.5
SP16	151.9	~617.9	n/a
SA7	470	124.3	318.5

【0169】

実施例3：SERPINペプチド誘導体のインビボ効果

SERPINペプチド誘導体A15およびA2-5を、SP163Mと比較して、マウスにおいてカ

ブサイシンによって誘導される疼痛関連行動を減らすそれらの能力について試験した。SP163M(50 μ g)、A15(5 μ g)、もしくはA2.5(5 μ g)、またはカプサイシン(25 ng)を雄マウスの後肢に注射し、フリンチングまたはリッキングなどの疼痛関連行動を10分間観察した。図12に示すように、5 μ g/マウスという低用量での両方のペプチド誘導体は、はるかに高い用量でのSP163Mの疼痛遮断効果のレベルと同様の疼痛遮断効果のレベルを呈した。

【0170】

実施例4：神経炎症に対するSERPINペプチド誘導体の効果

図13に示すように、SERPINペプチド誘導体SA7、SP163M、またはビヒクル対照で処置した、LPSで誘導したミクログリア細胞において、サイトカインプロファイルを調査した。サイトカインをLPSで誘導し、上清中で測定した。ミクログリア細胞では、SA7はペプチドSP163Mよりも強力に、IL-6、TNF α 、IL-1 β 、IL-12、およびCXCL1を含むいくつかのLPS媒介性サイトカインを低減させた。IMGミクログリア細胞を、LPS(100 ng/ml)を伴ってまたは伴わずに、SA7(100 μ g/ml)、SP163M(100 μ g/ml)で24時間処置した。上清中のサイトカインレベル(pg/ml)をマルチプレックスアッセイによって測定した。

【0171】

次に、ペプチド誘導体SA7の有効性を神経炎症のインビボモデルにおいて調査した。神経炎症のLPSモデルは、神経変性疾患を理解するための数多くの研究で使用されてきた60~63。これらの研究により、C57BL/6マウスにおいてLPSが認知障害を引き起こすことが確認されている。さらに、急性の全身性LPSは、脳内のミクログリア細胞の活性化、障害されたアミロイドベータクリアランス、ならびに血液および脳の炎症誘発性サイトカインの増加を引き起こす。よって、LPS誘導性神経炎症モデルを使用して、ペプチド誘導体SA7の活性を試験した。

【0172】

雌C57BL/6マウス(n=3~4)に、1mg/kgのLPS(大腸菌0111:B4)を4日間連続で腹腔内注射によって投与し、その後、LPS注射の1時間後にSP163M(100 μ g)またはSA7(100 μ g)のどちらかを毎日皮下投与した。体重および臨床評定を毎日記録した。研究終了時(5日目)(最後のLPS注射から24時間後)に、マウスの体重を測定し、スコア付けして、殺した。図3は、SA7処置マウスの臨床スコアが、ビヒクル処置マウスとSP163M処置マウスの両方と比較して顕著に改善したことを示す(図14A)。SA7処置マウスには、SP163M処置マウスでは見られなかった体重減少におけるわずかな利点もあった(図14B)。

【0173】

蛍光コード化ビーズを使用したフローベースのマルチプレックスアッセイであるLEGENDplex(商標) Mouse Inflammation Panelを使用して、脳ホモジネートをサイトカイン分析のために評定した。このパネルは、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IL-23、IL-27、MCP-1、IFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、およびGM-CSFを含む13種のマウスサイトカインの同時定量を可能にする。図15は、ビヒクル処置動物およびSP163M処置動物と比較して、SA7処置群では多くのLPS誘導性サイトカインのレベルに差が示されたことを示す。実例として、ビヒクルおよびSP163Mの脳ホモジネートでは中程度のレベルのIL-6が測定されたが、SA7処置動物のいずれにおいても検出可能なレベルのIL-6は測定されず、一方、IL-17A、IL-12、TNF α 、およびGM-CSFもまた顕著により低いレベルを示した。これは、SA7処置で見られた臨床徴候の改善と一致する。

【0174】

次に、神経軸索中で発現する神経フィラメント軽鎖(NfL)、およびアストロサイト活性化のマーカーでありアストロサイト中で発現するグリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、というCNS損傷の2つのバイオマーカーについて脳ホモジネートを分析した。皮質領域の炎症レベルと血漿NfLレベルとの間の逆相関関係に関する報告がある。LPSはニューロン

における神経フィラメント軽鎖の発現を選択的に減少させることが判明した。NfLは、ニューロン再生、シナプス連結、およびニューロンの恒常性シグナリングの働きに必要であり、NfLの増加がニューロンのLPS誘導性傷害からの保護を指し示している可能性があることが指し示される。図16Aは、ウェスタンブロットによって測定した場合に、ペプチド誘導体SA7が、LPSによって活性化された神経炎症後の脳ホモジネート中のNfLタンパク質発現を、ビヒクルとSP163Mの両方と比較して有意に増加させることを示す。GFAPの異常発現は、反応性アストロサイトおよび神経炎症を指し示すものである。図16Bは、ペプチド誘導体SA7が、SP163M処置動物とビヒクル処置動物の両方と比較して、ウェスタンブロット分析によって測定した脳溶解物中のGFAP発現を有意に減少させることを示す。これらの結果は、ペプチド誘導体の高度な神経保護効果を示唆している。

10

【0175】

実施例5：オートファジーに対するSERPINペプチド誘導体の効果

神経炎症に加えて、ベータアミロイドなどのタンパク質を分解しかつ再利用する恒常性プロセスであるオートファジーの障害は、ADと関連している⁷。LRP1は、オートファジーに関連する正常なリソソーム処理を媒介することが示されてきた。よって、SERPINペプチド由来の誘導体などのLRP1アゴニストを通じて、正常な細胞代謝を含むADのいくつかの局面を媒介して、タンパク質凝集の拡散を低減させ、神経炎症を緩和し、かつ神経機能障害を改善することで、これらの細胞の生存および場合によっては再生をもたらす可能性を有する。SP163Mおよびペプチド誘導体SA7のオートファジーマーカーに対する効果をミクログリア細胞において試験した。IMGミクログリア細胞をSP163M(100 µg/ml)またはSA7(100 µg/ml)で処置してから、LPS(100 ng/ml)を24時間添加した。溶解物を収集し、LRP1と微小管関連タンパク質軽鎖3(LC3 IおよびII)の両方のウェスタンブロット分析を実施した。オートファジーフラックスを指し示す、オートファジーについて一般的に使用されるマーカーであるLC3 II/I比を決定した。図17Aは、LPSによって活性化されたミクログリア細胞においてオートファジーフラックスが低減していることを示しており、通常のリソソーム処理が障害されていることが指し示される。LPS存在下でのSP163Mまたはペプチド誘導体SA7のどちらかによる処置は、オートファジー機能をベースラインレベル近くまで回復させた。LRP1タンパク質発現を測定し、図17BにLPSがレベルの低下を引き起こしたこと(おそらくLRP1シェディングが増加したことの指標)を示す。SP163Mおよびペプチド誘導体SA7は、LPSによって活性化されたミクログリア細胞におけるLRP1タンパク質発現を増加させた。興味深いことに、LPSの不在下では、SA7による処置は、SP163Mと比較してLRP1発現を顕著に増加させた。これらの結果は、SP163MによるLRP1の調節が調節不全の細胞プロセスの恒常性バランスに寄与する、別のメカニズムを指し示している。

20

30

【0176】

実施例6：ウイルス感染症に対するSERPINペプチド誘導体の効果

SERPIN由来ペプチドSP163Mは、抗ウイルス効果を実証した。SP163Mは、東部ウマ脳炎(EEEV)などの神経炎症性アルファウイルスのウイルス複製を顕著に低減させることができた。SP163Mは、新型コロナウイルスSARS-CoV-2のウイルス複製も抑制した。SARS-CoV-2およびインフルエンザなどの他のウイルスは、ウイルス侵入に宿主細胞プロテアーゼを使用することが公知である。TMPRSS2は、プライミングと呼ばれるプロセスにおいてSARS-CoV2エンベロープ上のSタンパク質を処理する。Sタンパク質のプライミングは、Sタンパク質と宿主受容体ACE2との間の結合に必要である。LRP1は、プロテアーゼ/アンチプロテアーゼ活性を調節することが広く公知である。アルファ-1アンチトリプシンなどのプロテアーゼインヒビターは、TMPRSS2のタンパク質分解活性を低減させ、Sタンパク質のプライミングを防止することによって、ウイルス侵入を遮断する。加えて、TMPRSS2の阻害によりACE2の処理が防止され、これによりコロナウイルスの感染力が低下する。図18は、種々の濃度でのSP163Mおよびペプチド誘導体SA7のTMPRSS2に対する阻害効果を示す。SP163MのIC50は1125 ng/mLであったのに対し、SA7誘導体はIC50が83 ng/mLとはるかに強力であった。

40

50

【0177】

実施例7：好酸球性食道炎に対するSERPINペプチド誘導体の効果

好酸球性食道炎(EoE)に関して、A1ATはネズミ科モデルおよびインビトロにおいて実験的EoEを減弱させることが示されてきた。A1ATの効果がタンパク質分解活性の阻害によって媒介されるのか、それともLRP1シグナリングの活性化を通じて媒介されるのかは不明である。好酸球性喘息を持つ患者は、より低いLRP1を有しており、動物モデルにおいては、LRP1の喪失は悪化したアレルギー性応答と関連している。SP163Mは、抗プロテアーゼ活性のためのいかなる配列も含有しておらず、タンパク質分解活性を通じてではなくLRP1の媒介を通じて働いている可能性が高い。マウスをオボアルブミン(OVA)に腹腔内で感作させ、次いで別々の4日間で鼻腔内にOVAでチャレンジした、好酸球性食道炎のマウスモデルにおいて、EoE誘導マウスの食道溶解物は、ウェスタンブロット分析によって測定した場合により低いレベルのLRP1タンパク質発現を示す。SERPIN由来ペプチドSP163Mでのマウスの処置により、LRP1の増加したレベルが示される(図19A)。セリンペプチダーゼインヒビターであるkazal7型(SPINK7)の食道発現の喪失は、EoEの病態形成における上流事象であることが、エビデンスにより示される。よって、SPINK7の喪失後に、EoEの病態形成に関与する主要な細胞である2型T細胞(Th2)の生成を極性化するための樹状細胞の刺激に関与する、主要な免疫チェックポイントサイトカインである胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)を低減させる際の、SP163Mおよびペプチド誘導体SA7のインビトロ効果を試験した。図19Bは、SP163MがSPINK7ノックアウトEPC2細胞(ヒト食道上皮細胞)によるポリI:C誘導性TSLP産生を阻害したことを示す。SPINK7 KO細胞および対照細胞を、高カルシウムかつ高密度において48時間プレーティングしてから、SP163Mまたは誘導体SA7(200 µg/ml)のどちらかおよびポリI:C(5 µg/ml、または未処置)で8時間処置した。上清中のTSLP産生をELISAによって測定した。

10

20

【0178】

さらに、自然免疫応答とTH2媒介性免疫応答の両方の強い誘導剤であるアジュバントミョウバンを含有する2回の腹腔内注射によってマウスをオボアルブミンに感作させ、次いで別々の4日間で鼻腔内滴注によって与えたオボアルブミンでチャレンジした、アレルギー性喘息マウスモデルにおいて、ペプチド誘導体A2-5で処置したマウスは炎症性メディエーターの低減を示した。ビヒクルで処置したova誘導性マウス(ビヒクル/OVA)の肺ホモジネートは、非ova誘導性マウス(生理食塩水/生理食塩水)と比較して、TSLPの有意に増加したレベルを実証した($p=0.001$)。ペプチド誘導体A2-5で処置したova誘導性マウス(A2-5/OVA)は、ova誘導性ビヒクル処置マウスと比較して、TSLPの有意により低いレベルを実証した($p=0.026$)(図20A)。アレルゲン曝露はまた、非曝露動物と比較して肺組織中の総タンパク質の増加も生じさせた。肺への免疫細胞の浸潤が、肺中の総タンパク質レベルの増加を説明するものである可能性が高い。図20Bは、SP163Mで処置したマウス(SP163M/OVA)、ステロイドであるデキサメタゾンで処置したマウス(Dex/OVA)、およびペプチド誘導体A2-5で処置したマウスの肺中のタンパク質レベルが、ビヒクルで処置した動物と比較して有意に減少したことを示す($p<0.005$)。A2-5で処置したマウスにおいて、これは、ビヒクルで処置したマウスと比較した、肺組織中のTH-2媒介性サイトカインIL-5、IL-4、およびIL-13の低減と関連していた(図20C)。

30

40

【0179】

参考文献

以下に列挙する参考文献、特許、および公開特許出願、ならびに上の本明細書において引用された全ての参考文献は、あたかも本明細書において完全に記載されているかのよう、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

1. Berta, T., Y. C. Liu, Z. Z. Xu and R. R. Ji (2013). "Tissue plasminogen activator contributes to morphine tolerance and induces mechanical allodynia via astrocytic IL-1 β and ERK signaling in the spinal cord of mice." Neuroscience **247**: 376-385.
2. Christia, P., M. Bujak, C. Gonzalez-Quesada, W. Chen, M. Dobaczewski, A. Reddy and N. G. Frangogiannis (2013). "Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction." J Histochem Cytochem **61**(8): 555-570. 10
3. Cooke, J. P. (2019). "Inflammation and Its Role in Regeneration and Repair." Circ Res **124**(8): 1166-1168.
4. Feng, Y., B. Liu, X. Zheng, L. Chen, W. Chen and Z. Fang (2019). "The protective role of autophagy in sepsis." Microb Pathog **131**: 106-111.
5. Franchini, M. and M. Montagnana (2011). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: new functions for an old molecule." Clin Chem Lab Med **49**(6): 967-970. 20
6. Fregnan, F., L. Muratori, A. R. Simões, M. G. Giacobini-Robecchi and S. Raimondo (2012). "Role of inflammatory cytokines in peripheral nerve injury." Neural regeneration research **7**(29): 2259-2266.
7. Gali, C. C., E. Fanaee-Danesh, M. Zandi-Lang, N. M. Albrecher, C. Tam-Amersdorfer, A. Stracke, V. Sachdev, F. Reichmann, Y. Sun, A. Avdili, M. Reiter, D. Kratky, P. Holzer, A. Lass, K. K. Kandimalla and U. Panzenboeck (2019). "Amyloid-beta impairs insulin signaling by accelerating autophagy-lysosomal degradation of LRP-1 and IR- β in blood-brain barrier endothelial cells in vitro and in 3XTg-AD mice." Molecular and Cellular Neuroscience **99**: 103390. 30
8. Gettins, P. G. W. and S. T. Olson (2016). "Inhibitory serpins. New insights into their folding, polymerization, regulation and clearance." The Biochemical journal **473**(15): 2273-2293. 40

9. Griffin, D., B. Levine, W. Tyor, S. Ubol and P. Despres (1997). "The role of antibody in recovery from alphavirus encephalitis." Immunol Rev **159**: 155-161.
10. Grosso, R. A., P. V. Subirada Caldarone, M. C. Sanchez, G. A. Chiabrando, M. I. Colombo and C. M. Fader (2018). "Hemin induces autophagy in a leukemic erythroblast cell line through the LRP1 receptor." Biosci Rep.
11. Gubler, D. J. (2002). "The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems." Archives of Medical Research **33**(4): 330-342. 10
12. Hashizume, H., J. A. DeLeo, R. W. Colburn and J. N. Weinstein (2000). "Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat." Spine (Phila Pa 1976) **25**(10): 1206-1217.
13. Hemonnot, A.-L., J. Hua, L. Ulmann and H. Hirbec (2019). "Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities." Frontiers in Aging Neuroscience **11**(233).
14. Herz, J. and D. K. Strickland (2001). "LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor." J Clin Invest **108**(6): 779-784. 20
15. Hoffmann, M., H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T. S. Schiergens, G. Herrler, N.-H. Wu, A. Nitsche, M. A. Müller, C. Drosten and S. Pöhlmann (2020). "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor." Cell.
16. Hoffmann, M., H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T. S. Schiergens, G. Herrler, N. H. Wu, A. Nitsche, M. A. Müller, C. Drosten and S. Pöhlmann (2020). "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor." Cell **181**(2): 271-280.e278. 30
17. Huang, C., Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu, Z. Cheng, T. Yu, J. Xia, Y. Wei, W. Wu, X. Xie, W. Yin, H. Li, M. Liu, Y. Xiao, H. Gao, L. Guo, J. Xie, G. Wang, R. Jiang, Z. Gao, Q. Jin, J. Wang and B. Cao (2020). "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China." The Lancet **395**(10223): 497-506. 40

18. Joslin, G., R. J. Fallon, J. Bullock, S. P. Adams and D. H. Perlmutter (1991). "The SEC receptor recognizes a pentapeptide neodomain of alpha 1-antitrypsin-protease complexes." J Biol Chem **266**(17): 11282-11288.
19. Kawamura, A., D. Baitsch, R. Telgmann, R. Feuerborn, G. Weissen-Plenz, C. Hagedorn, K. Saku, S. M. Brand-Herrmann, A. von Eckardstein, G. Assmann and J. R. Nofer (2007). "Apolipoprotein E interrupts interleukin-1beta signaling in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(7): 1610-1617. 10
20. Kehn-Hall, K., A. Narayanan, L. Lundberg, G. Sampey, C. Pinkham, I. Guendel, R. Van Duyne, S. Senina, K. L. Schultz, E. Stavale, M. J. Aman, C. Bailey and F. Kashanchi (2012). "Modulation of GSK-3beta activity in Venezuelan equine encephalitis virus infection." PLoS One **7**(4): e34761.
21. Landowski, L. M., M. Pavez, L. S. Brown, R. Gasperini, B. V. Taylor, A. K. West and L. Foa (2016). "Low-density Lipoprotein Receptor-related Proteins in a Novel Mechanism of Axon Guidance and Peripheral Nerve Regeneration." The Journal of biological chemistry **291**(3): 1092-1102. 20
22. Lillis, A. P., L. B. Van Duyn, J. E. Murphy-Ullrich and D. K. Strickland (2008). "LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies." Physiol Rev **88**(3): 887-918.
23. Mantuano, E., M. S. Lam, M. Shibayama, W. M. Campana and S. L. Gonias (2015). "The NMDA receptor functions independently and as an LRP1 co-receptor to promote Schwann cell survival and migration." Journal of Cell Science **128**(18): 3478-3488. 30
24. Matsuyama, S., N. Nao, K. Shirato, M. Kawase, S. Saito, I. Takayama, N. Nagata, T. Sekizuka, H. Katoh, F. Kato, M. Sakata, M. Tahara, S. Kutsuna, N. Ohmagari, M. Kuroda, T. Suzuki, T. Kageyama and M. Takeda (2020). "Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **117**(13): 7001.
25. May, P. (2013). "The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in inflammation." Curr Opin Lipidol **24**(2): 134-137. 40

26. May, P., H. H. Bock and J. R. Nofer (2013). "Low density receptor-related protein 1 (LRP1) promotes anti-inflammatory phenotype in murine macrophages." Cell Tissue Res **354**(3): 887-889.
27. Mehta, P., D. F. McAuley, M. Brown, E. Sanchez, R. S. Tattersall and J. J. Manson (2020). "COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression." The Lancet **395**(10229): 1033-1034.
28. Meyer, M. and I. Jaspers (2015). "Respiratory protease/antiprotease balance determines susceptibility to viral infection and can be modified by nutritional antioxidants." American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology **308**(12): L1189-L1201. 10
29. Mishra, A., X. Yao, A. Saxena, E. M. Gordon, M. Kaler, R. A. Cuento, A. V. Barochia, P. K. Dagur, J. P. McCoy, K. J. Keeran, K. R. Jeffries, X. Qu, Z.-X. Yu and S. J. Levine (2018). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 attenuates house dust mite-induced eosinophilic airway inflammation by suppressing dendritic cell-mediated adaptive immune responses." Journal of Allergy and Clinical Immunology **142**(4): 1066-1079.e1066. 20
30. Muehlenbein, M. P., F. B. Cogswell, M. A. James, J. Koterski and G. V. Ludwig (2006). "Testosterone correlates with Venezuelan equine encephalitis virus infection in macaques." Virology **3**: 19.
31. Olival, K. J. and P. Daszak (2005). "The ecology of emerging neurotropic viruses." Journal of Neurovirology **11**(5): 441-446.
32. Rauch, J. N., G. Luna, E. Guzman, M. Audouard, C. Challis, Y. E. Sibih, C. Leshuk, I. Hernandez, S. Wegmann, B. T. Hyman, V. Gradinaru, M. Kampmann and K. S. Kosik (2020). "LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread." Nature **580**(7803): 381-385. 30
33. Ronca, S. E., K. T. Dineley and S. Paessler (2016). "Neurological Sequelae Resulting from Encephalitic Alphavirus Infection." Front Microbiol **7**: 959.
34. Schoneboom, B. A., K. M. Catlin, A. M. Marty and F. B. Grieder (2000). "Inflammation is a component of neurodegeneration in response to Venezuelan equine encephalitis virus infection in mice." J Neuroimmunol **109**(2): 132-146. 40

35. Schoneboom, B. A., J. S. Lee and F. B. Grieder (2000). "Early expression of IFN-alpha/beta and iNOS in the brains of Venezuelan equine encephalitis virus-infected mice." J Interferon Cytokine Res **20**(2): 205-215.
36. Sharma, A., B. Bhattacharya, R. K. Puri and R. K. Maheshwari (2008). "Venezuelan equine encephalitis virus infection causes modulation of inflammatory and immune response genes in mouse brain." BMC Genomics **9**: 289. 10
37. Sharma, A., M. Bhomia, S. P. Honnold and R. K. Maheshwari (2011). "Role of adhesion molecules and inflammation in Venezuelan equine encephalitis virus infected mouse brain." Virology Journal **8**: 197-197.
38. Shi, Y., E. Mantuano, G. Inoue, W. M. Campana and S. L. Gonias (2009). "Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway." Sci Signal **2**(68): ra18.
39. Shi, Y., T. Yamauchi, A. Gaultier, S. Takimoto, W. M. Campana and S. L. Gonias (2011). "Regulation of cytokine expression by Schwann cells in response to alpha2-macroglobulin binding to LRP1." J Neurosci Res **89**(4): 544-551. 20
40. Shiga, Y., A. Shiga, P. Mesci, H. Kwon, C. Brifault, J. H. Kim, J. J. Jeziorski, C. Nasamran, S. Ohtori, A. R. Muotri, S. L. Gonias and W. M. Campana (2019). "Tissue-type plasminogen activator-primed human iPSC-derived neural progenitor cells promote motor recovery after severe spinal cord injury." Scientific Reports **9**(1): 19291.
41. Simon, D., B. Page, M. Vogel, C. Bussmann, C. Blanchard, A. Straumann and H.-U. Simon (2018). "Evidence of an abnormal epithelial barrier in active, untreated and corticosteroid-treated eosinophilic esophagitis." Allergy **73**(1): 239-247. 30
42. Steele, K. E. and N. A. Twenhafel (2010). "REVIEW PAPER: pathology of animal models of alphavirus encephalitis." Vet Pathol **47**(5): 790-805.
43. Strickland, D. K., S. C. Muratoglu and T. M. Antalis (2011). "Serpine-Enzyme Receptors LDL Receptor-Related Protein 1." Methods Enzymol **499**: 17-31.
44. Subramaniam, D., P. Glader, K. von Wachenfeldt, J. Burneckiene, T. Stevens and S. Janciauskiene (2006). "C-36 peptide, a degradation product of alpha1-

antitrypsin, modulates human monocyte activation through LPS signaling pathways." Int J Biochem Cell Biol **38**(4): 563-575.

45. Taylor, K. G. and S. Paessler (2013). "Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis." Vet Microbiol **167**(1-2): 145-150.

46. Toldo, S., D. Austin, A. G. Mauro, E. Mezzaroma, B. W. Van Tassell, C. Marchetti, S. Carbone, S. Mogelsvang, C. Gelber and A. Abbate (2017). "Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Is a Therapeutic Target in Acute Myocardial Infarction." JACC Basic Transl Sci **2**(5): 561-574.

10

47. Wang, Y., K. Jiang, Q. Zhang, S. Meng and C. Ding (2018). "Autophagy in Negative-Strand RNA Virus Infection." Frontiers in Microbiology **9**(206).

48. Weaver, S. C., C. Ferro, R. Barrera, J. Boshell and J. C. Navarro (2004). "Venezuelan equine encephalitis." Annu Rev Entomol **49**: 141-174.

49. Wujak, L., P. Markart and M. Wygrecka (2016). "The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 1 and its function in lung diseases." Histol Histopathol **31**(7): 733-745.

20

50. Wujak, L., J. Schnieder, L. Schaefer and M. Wygrecka (2018). "LRP1: A chameleon receptor of lung inflammation and repair." Matrix Biology **68-69**: 366-381.

51. Yang, L., C.-C. Liu, H. Zheng, T. Kanekiyo, Y. Atagi, L. Jia, D. Wang, A. N'songo, D. Can, H. Xu, X.-F. Chen and G. Bu (2016). "LRP1 modulates the microglial immune response via regulation of JNK and NF- κ B signaling pathways." Journal of Neuroinflammation **13**(1): 304.

30

52. Yang, X., Y. Yu, J. Xu, H. Shu, J. a. Xia, H. Liu, Y. Wu, L. Zhang, Z. Yu, M. Fang, T. Yu, Y. Wang, S. Pan, X. Zou, S. Yuan and Y. Shang (2020). "Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study." The Lancet Respiratory Medicine.

53. Yoon, C., E. A. Van Niekerk, K. Henry, T. Ishikawa, S. Orita, M. H. Tuszynski and W. M. Campana (2013). "Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1)-dependent Cell Signaling Promotes Axonal Regeneration." Journal of Biological Chemistry **288**(37): 26557-26568.

40

54. Zlokovic, B. V., R. Deane, A. P. Sagare, R. D. Bell and E. A. Winkler (2010). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the brain." Journal of neurochemistry **115**(5): 1077-1089.
55. Zurhove, K., C. Nakajima, J. Herz, H. H. Bock and P. May (2008). "Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1." Science signaling **1**(47): ra15-ra15.
56. Yamauchi, K., T. Yamauchi, E. Mantuano, K. Murakami, K. Henry, K. Takahashi and W. M. Campana (2013). "Low-density lipoprotein receptor related protein-1 (LRP1)-dependent cell signaling promotes neurotrophic activity in embryonic sensory neurons." PLoS One **8**(9): e75497.
57. Yoon, C., E. A. Van Niekerk, K. Henry, T. Ishikawa, S. Orita, M. H. Tuszynski and W. M. Campana (2013). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-dependent cell signaling promotes axonal regeneration." J Biol Chem **288**(37): 26557-26568.
58. Prinz, M., S. Jung and J. Priller (2019). "Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts." Cell **179**(2): 292-311.
59. Michell-Robinson, M. A., H. Touil, L. M. Healy, D. R. Owen, B. A. Durafour, A. Bar-Or, J. P. Antel and C. S. Moore (2015). "Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair." Brain **138**(Pt 5): 1138-1159.
60. Liu, Y., L. Qin, B. Wilson, X. Wu, L. Qian, A. C. Granholm, F. T. Crews and J. S. Hong (2008). "Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and motor behavioral deficits." Neurotoxicology **29**(5): 864-870.
61. Cazareth, J., A. Guyon, C. Heurteaux, J. Chabry and A. Petit-Paitel (2014). "Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling." Journal of Neuroinflammation **11**(1): 132.
62. Meneses, G., G. Gevorkian, A. Florentino, M. A. Bautista, A. Espinosa, G. Acero, G. Diaz, A. Fleury, I. N. Perez Osorio, A. Del Rey, G. Fragos, E. Sciutto and H. Besedovsky (2017). "Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation." Clin Exp Immunol **190**(3): 304-314.
63. Zhao, J., W. Bi, S. Xiao, X. Lan, X. Cheng, J. Zhang, D. Lu, W. Wei, Y. Wang, H. Li, Y. Fu and L. Zhu (2019). "Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice." Scientific Reports **9**(1): 5790.

10

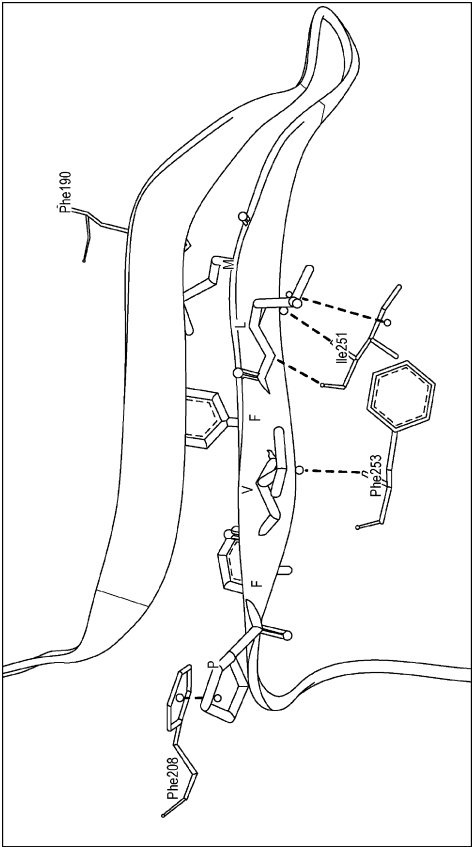
20

30

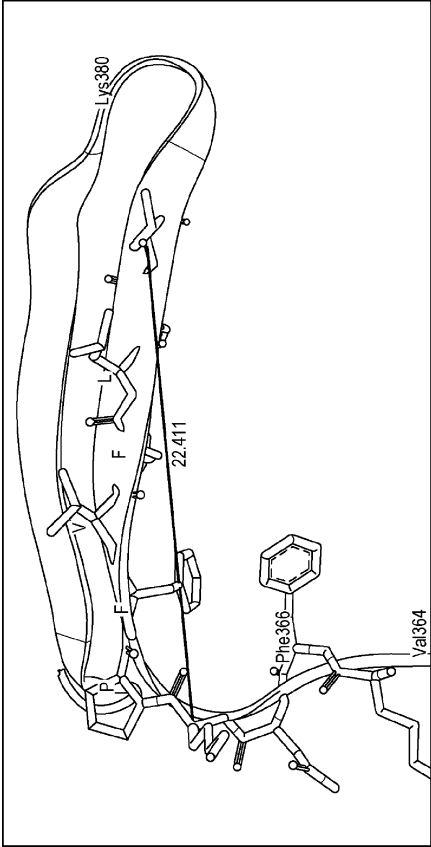
40

50

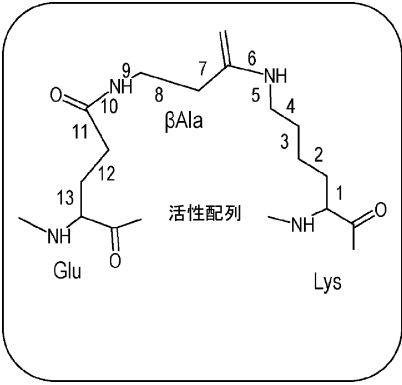
【図面】
【図 1】



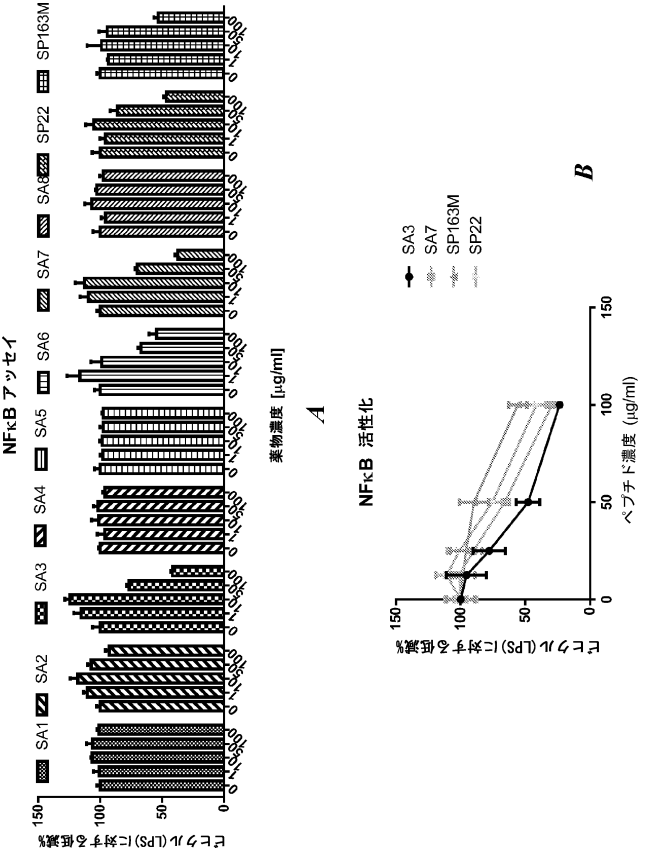
【図 2】



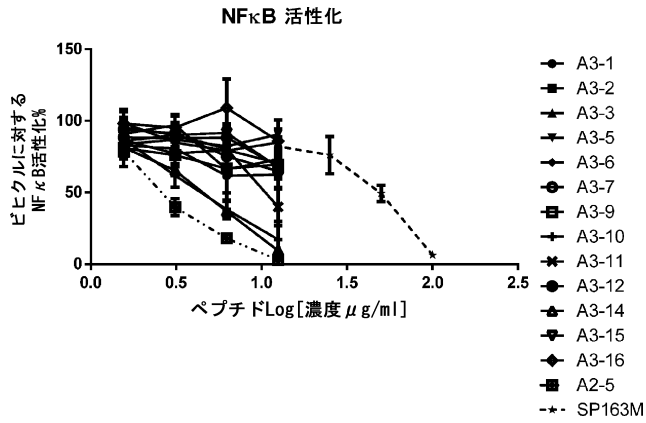
【図 3】



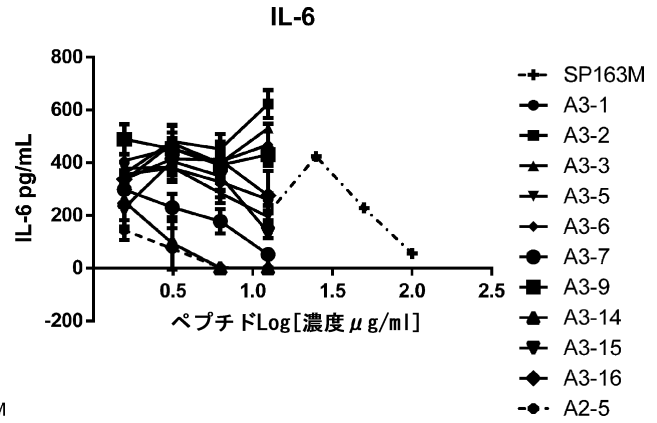
【図 4】



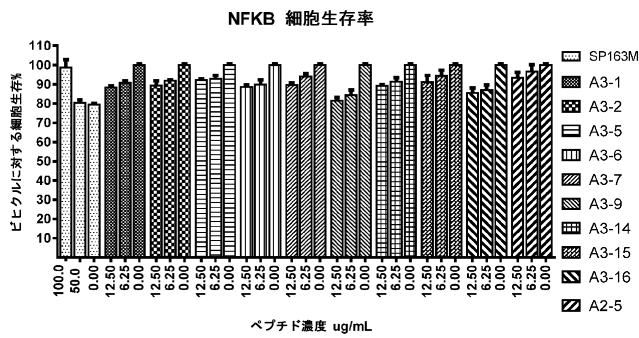
【図 9】



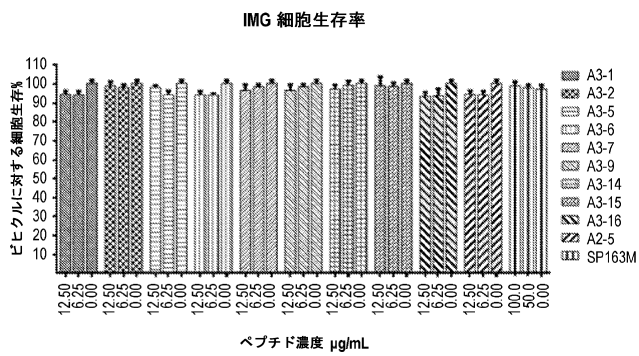
【図 10】



【図 11】

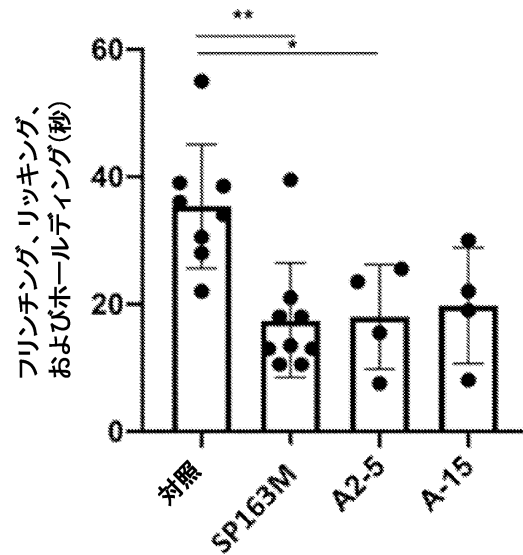


A



B

【図 12】



10

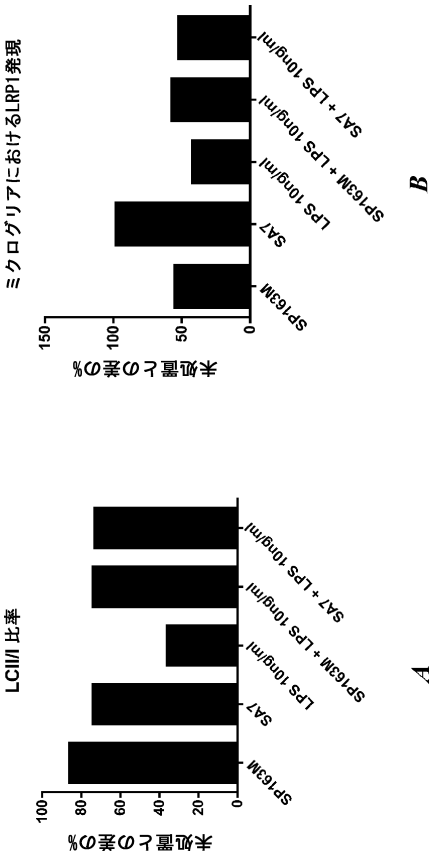
20

30

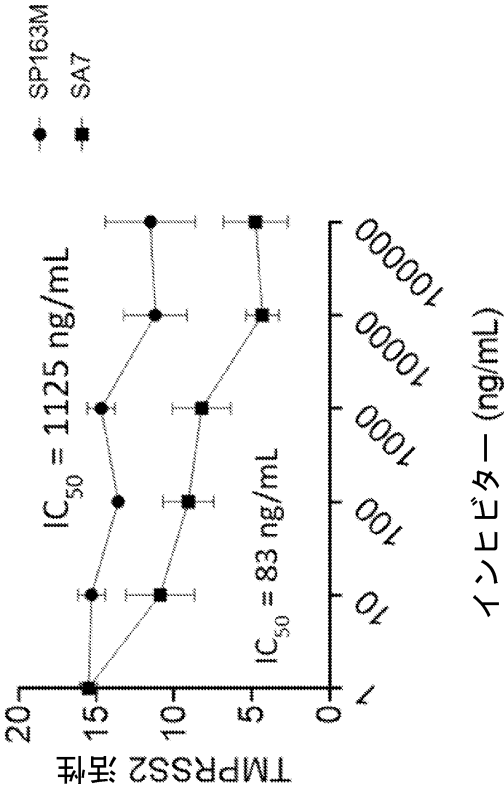
40

50

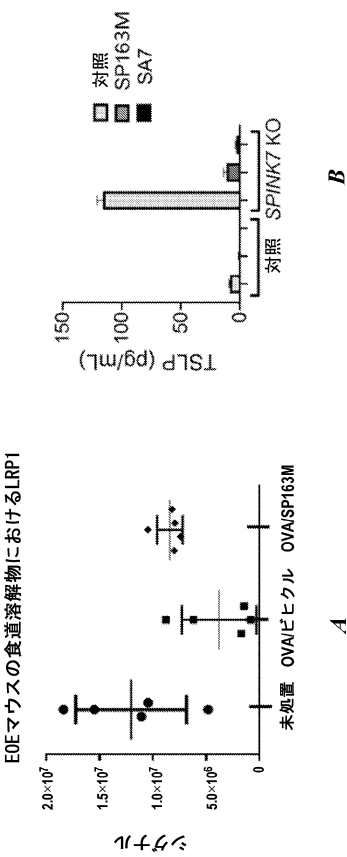
【図 17】



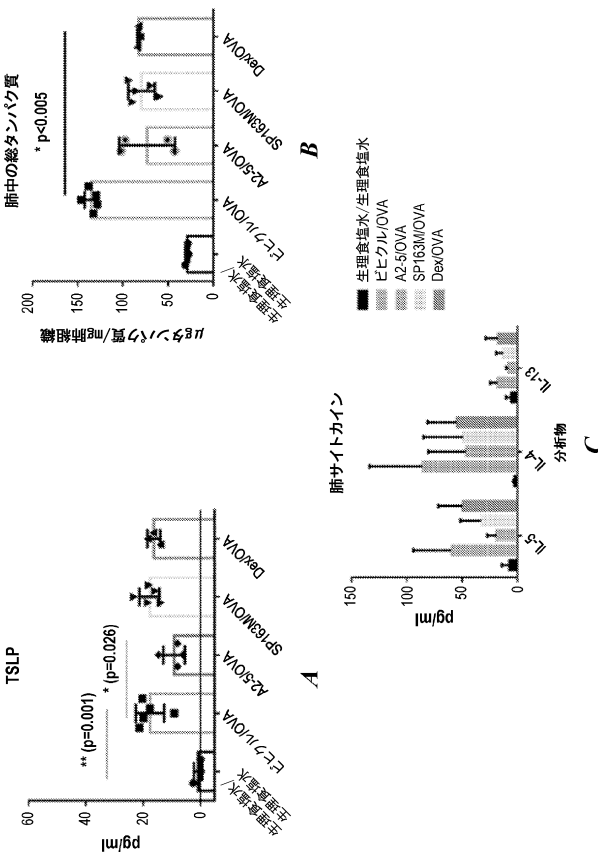
【図 18】



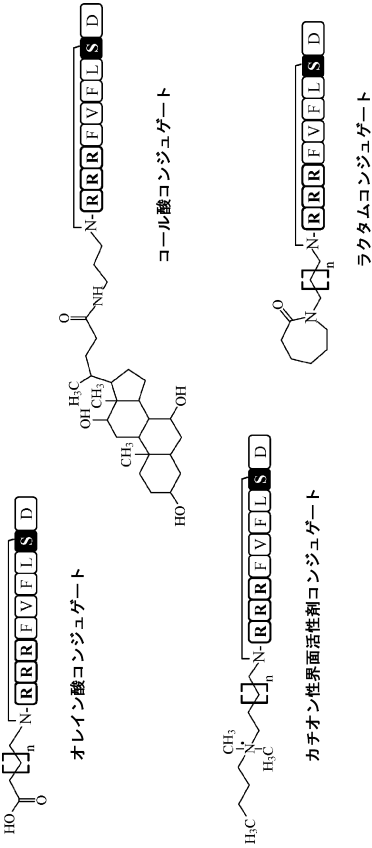
【図 19】



【図 20】



【図 2 1】



10

20

【配列表】

2025515349000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US23/66321
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. C07K 14/81; A61K 38/55; A61P 29/00; A61P 31/12 (2023.01) ADD. CPC - INV. C07K 14/8121; A61K 38/55; A61P 29/00; A61P 31/12 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	WO 2022/010939 A2 (SERPIN PHARMA, LLC) 13 January 2022; paragraphs [0004], [0064]; fig. 12	1-2, 6/1-2, 24-26 — 3-5, 8/3-5 — 42, 47
Y	US 2016/0083430 A1 (RA PHARMACEUTICALS, INC.) 24 March 2016; paragraphs [0017]-[0019], [0026], [0074]	3-5, 8/3-5
A	US 5,439,829 AA (ANDERSON, LD et al.) 8 August 1995; table 1	42, 47
A	(SUN, Y et al.) hypothetical protein C7M84_008318 [Penaeus vannamei], Genbank entry (online). National Institute of Biotechnology Information. 16 November 2018 (Retrieved on 18 September 2018). Retrieved from the Internet: [URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ROT73248.1]; pages 1-2	42, 47
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 September 2023 (18.09.2023)		Date of mailing of the international search report OCT 05 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/66321

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/66321

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a), for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-9, 13-23, 27, 31-41, 50-80
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-6, 10-12, 24-26, 28-30, 42-49, and SEQ ID NO: 1 (SERPIN peptide core sequence), a Lys, Glu, or His polar head residues added to the N-terminus of the core sequence, a polar tail added to the C-terminus of the core sequence, or both (SERPIN peptide modification); SEQ ID NO: 10 (SERPIN peptide derivative sequence).

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/66321

Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-6, 10-12, 24-26, 28-30, 42-49, and SEQ ID NO: 1 (SERPIN peptide core sequence), a Lys, Glu, or His polar head residues added to the N-terminus of the core sequence, a polar tail added to the C-terminus of the core sequence, or both (SERPIN peptide modification); SEQ ID NO: 10 (SERPIN peptide derivative sequence) are directed towards SERPIN peptides and derivatives associated therewith.

The SERPIN peptides and derivatives of Claims 1 (in-part), 2-6, 24 (in-part), 25-26, 42 (in-part), 47 (in-part) are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (first exemplary SERPIN peptide core sequence), a Lys, Glu, or His polar head residues added to the N-terminus of the core sequence, a polar tail added to the C-terminus of the core sequence, or both (first exemplary SERPIN peptide modification), SEQ ID NO: 10 (first exemplary SERPIN peptide derivative sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 1, 24, 42, 47 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional SERPIN peptide core sequence(s), SERPIN peptide modification(s), SERPIN peptide derivative sequence(s) to be searched. Additional SERPIN peptide core sequence(s), SERPIN peptide modification(s), SERPIN peptide derivative sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected SERPIN peptide core sequence(s), SERPIN peptide modification(s), SERPIN peptide derivative sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. Exemplary elections would be SEQ ID NO: 2 (SERPIN peptide core sequence), one or more amino acid residues added to the N-terminus of the core sequence, C-terminus of the core sequence, or both such that the SERPIN peptide derivative can be cyclized by forming a disulfide bond between two Cys residues (SERPIN peptide modification); SEQ ID NO: 15 (SERPIN peptide derivative sequence).

Groups I+ share the technical features including: a SERPIN peptide derivative comprising a core sequence, and one or more modifications. These shared technical features are previously disclosed by WO 2022/010939 A2 to SERPIN PHARMA, LLC (hereinafter "Serpin").

Serpin discloses a SERPIN peptide derivative comprising a core sequence, and one or more modifications (a SERPIN peptide derivative comprising a modified core sequence by adding a flanking sequence (one or more modification); abstract; paragraphs [0064], [0065]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Serpin reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 K	38/55	(2006.01)	A 6 1 K	38/55

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

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 ゲルバー コハヴァ

アメリカ合衆国 2 0 1 0 9 ヴァージニア州 マナサス ディスカバリー ブールバード 9 5 0 1
スイート 1 2 0

(72)発明者 ジネスティ シリル

アメリカ合衆国 2 0 1 0 9 ヴァージニア州 マナサス ディスカバリー ブールバード 9 5 0 1
スイート 1 2 0

(72)発明者 オースティン デイナ

アメリカ合衆国 2 0 1 0 9 ヴァージニア州 マナサス ディスカバリー ブールバード 9 5 0 1
スイート 1 2 0

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA09 BA18 BA23 BA26 CA59 DC32 MA52

MA55 MA63 NA14 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZB111 ZB112 ZB331 ZB332

4H045 AA10 AA30 BA01 BA13 BA14 BA15 BA16 BA31 BA32 BA50

BA72 DA56 EA20