

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-29403

(P2020-29403A)

(43) 公開日 令和2年2月27日(2020.2.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00 ZNA	2G045
C12Q 1/37 (2006.01)	C12Q 1/37	2G060
A61K 38/16 (2006.01)	A61K 38/16	4B063
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C084
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 111	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-153788 (P2018-153788)
 (22) 出願日 平成30年8月20日 (2018.8.20)

(71) 出願人 304024430
 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学
 石川県能美市旭台一丁目1番地
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 マニッシュ ビヤニ
 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学
 法人北陸先端科学技術大学院大学内
 (72) 発明者 西垣 功一
 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国
 立大学法人埼玉大学内
 (72) 発明者 高村 禅
 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学
 法人北陸先端科学技術大学院大学内

最終頁に続く

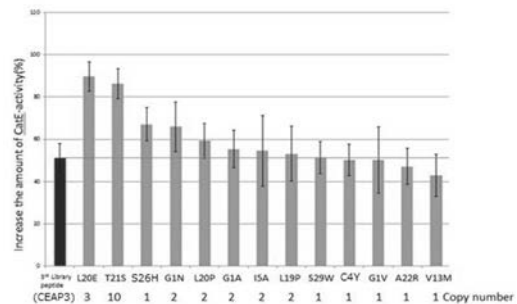
(54) 【発明の名称】 カテプシンEに強く結合し活性化するペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】カテプシンE (CE) の生物学的活性を促進するペプチドであって、従来のペプチドよりも高い活性化機能を有するペプチド、及びこのペプチドを用いた試料中のCE活性及びCE量の測定方法の提供。

【解決手段】式1: X1-C-X3-X4-X5-D-X7-X8-V-E-V-Q-X13-E-V-A-E-A-X19-X20-X21-X22-L-X24-L-X26-P-G-X29 (式1中、X1はG、L、N、A又はV、X3はP又はT、X4はC、H又はY、X5はI、A、E又はV、X7はF又はL、X8はK又はM、X13はV又はM、X19はL、T、Q又はP、X20はL、S、Q、E又はP、X21はS、T又はA、X22はA又はR、X24はS又はH、X26はS又はH、X29はW又はSである) (配列番号1) のアミノ酸配列を有し、ただしX8がMであり且つX29がSであるアミノ酸配列を除く、ペプチド。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 1 : X 1 - C - X 3 - X 4 - X 5 - D - X 7 - X 8 - V - E - V - Q - X 1 3 - E - V - A - E - A - X
1 9 - X 2 0 - X 2 1 - X 2 2 - L - X 2 4 - L - X 2 6 - P - G - X 2 9

(式 1 中、X 1 は G、L、N、A または V であり、

X 3 は P または T であり、

X 4 は C、H または Y であり、

X 5 は I、A、E または V であり、

X 7 は F または L であり、

X 8 は K または M であり、

10

X 1 3 は V または M であり、

X 1 9 は L、T、Q または P であり、

X 2 0 は L、S、Q、E または P であり、

X 2 1 は S、T または A であり、

X 2 2 は A または R であり、

X 2 4 は S または H であり、

X 2 6 は S または H であり、

X 2 9 は W または S である) (配列番号 1) のアミノ酸配列を有し、但し X 8 が M であり且つ X 2 9 が S であるアミノ酸配列を除く、ペプチド。

【請求項 2】

20

前記式 1 の X 8 が K である (配列番号 2)、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

前記式 1 の X 8 が M であり、X 2 9 が W である (配列番号 3)、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 4】

前記式 1 中、

X 1 は G または L であり、

X 3 は P であり、

X 4 は C または H であり、

X 5 は I または A であり、

30

X 7 は F であり、

X 1 9 は L であり、

X 2 0 は L、S、Q または E であり、

X 2 1 は S または T であり、

X 2 2 は A である (配列番号 4 ~ 6)、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 5】

カテプシン E の元の酵素活性を 100% とすると、三次ライブラリーで得られたペプチド (CEAP3) よりも、カテプシン E の酵素活性をさらに約 20% 以上、上昇させる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチド。

40

【請求項 6】

カテプシン E への結合に対する解離定数 (KD) は 1 nM 以下である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドを含む、がんを治療するための医薬。

【請求項 8】

試料中のカテプシン E の酵素活性測定方法であって、

(a) 固相化されたペプチドアダプターと試料を混合し、固相化ペプチドアダプターに結合したカテプシン E を得る工程、

(b) 固相化ペプチドアダプターに結合したカテプシン E と、標識されたカテプシン E

50

基質を接触させる工程、および

(C) カテプシン E によるカテプシン E 基質の切断を検出してカテプシン E 酵素活性を求める工程

を含み、前記ペプチドアダプターが請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドである、方法。

【請求項 9】

試料中に含まれるカテプシン E 量の測定方法であって、

(a) 固相化されたペプチドアダプターと試料を混合し、固相化ペプチドアダプターに結合したカテプシン E を得る工程、および

(b) カテプシン E が結合したペプチドアダプターを検出し、試料中のカテプシン E 量を求める工程

を含み、前記ペプチドアダプターが請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドである、方法。

【請求項 10】

カーボンナノチューブ電界効果型トランジスタ法を用いて実施される請求項 9 に記載の方法であって、

前記工程 (a) において、固相化されたペプチドアダプターは、電極に設置されたカーボンナノチューブに固相化されたペプチドアダプターであり、そして

前記工程 (b) は、前記ペプチドアダプターとカテプシン E の結合前後において、前記電極に生じる標準電極に対する電位差を測定することを含む工程である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規ペプチドとその使用に関する。より具体的には、酵素活性に影響を与えるペプチド、該ペプチドを含む医薬、および該ペプチドを利用した酵素の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

カテプシン E (以下、CE と略記することがある) は細胞内アスパラギン酸プロテアーゼであり、免疫系細胞、消化系上皮細胞および皮膚組織など特定の細胞で主に発現する (非特許文献 1)。本酵素は正常皮膚では角化細胞 (ケラチノサイト) および毛包の内毛根鞘の領域に存在し、また免疫系細胞のマクロファージなどの抗原提示細胞では主としてエンドソームなどの細胞内小器官に存在する (特許文献 1)。

【0003】

カテプシン E 活性の低下により、悪性腫瘍や免疫アレルギー疾患などが生じることが報告されている。川久保らは、カテプシン E はマウス乳腺におけるシグナル伝達、発生、分化および増殖に関連するタンパク質の発現を調節すること、カテプシン E の欠損はマウス乳腺組織において前がん状態を誘発すること (非特許文献 2)、さらには血清カテプシン E 活性が患者の好ましい予後結果と有意に相関していること (非特許文献 3) を報告している。この研究は、カテプシン E 発現の抑制が乳房発がんリスクを高め、乳がんの予後不良に結びつくことを示している。加えて、カテプシン E 欠損マウスは無菌環境下で飼育しても全く異常を示さないが、通常環境下に移すとアトピー性皮膚炎様症状 (AD) を示すことが報告されており、カテプシン E の発現の減少は、AD を有するヒトおよび AD マウスモデル NC / Ng a の両方の赤血球においても観察されている (非特許文献 4)。一方、臨床的意義は議論の余地があるものの、特定のヒトがんのバイオマーカーとしてのカテプシン E の有用性を示唆する報告がある (非特許文献 5 ~ 9)。しかし、この相反する報告は、異なるタイプのがん細胞における非機能的カテプシン E の発現レベルの差異から生じていると考えられる (非特許文献 3)。

【0004】

カテプシン E は、強力な抗がん作用を有するプロテアーゼである。マウス実験ではカテ

プシンEの発現レベルが腫瘍抑制の程度と正に相関することがわかっており、カテプシンEは複数の経路を介して強力な腫瘍増殖と転移を抑制すると考えられている（非特許文献10）。第1にインビトロでカテプシンEががん細胞表面からアポトーシス誘導分子TRAILを特異的に切断遊離し、がん細胞表面のデス受容体に結合することによってがん細胞特異的アポトーシスが誘導されることが明らかになっている（非特許文献10）。さらにはカテプシンEが、腫瘍関連血管新生の抑制に関与していることや、腫瘍周辺部におけるマクロファージの浸潤増加と活性化亢進を誘導することが報告されている（非特許文献10）。また、カテプシンEは、ヒト前立腺がん細胞の増殖停止とアポトーシスを誘導することも報告されている（非特許文献11）。最近の研究では、カテプシンE発現の血清レベルと臨床病理学的パラメータとの間の相関分析により、タンパク質レベルではなく活性レベルが乳がんステージおよび進行と負に関連しているとの報告がある（非特許文献3）。

10

【0005】

したがって、カテプシンEの発現/活性を増加させる薬剤が、がん治療に役立つことが期待されている。特に、ペプチド創薬の標的としてカテプシンEは非常に興味深い。創薬で現在主流となっている抗体医薬の問題点として、抗体の分子量が大きいことや合成コストが高いことなどが挙げられる。一方、ペプチドは、抗体の100分の1ほどのサイズであり低コストで合成できること、分子改変や化学修飾が容易であるためドラッグデリバリーシステムへの応用や分子ミミック化によって標的分子の生理活性の調節が可能であるといったメリットがある。

20

【0006】

カテプシンEに特異的に結合し、その活性について阻害作用を有するペプチドが報告されている（特許文献2）。このペプチドはin-vitro-virus（IVV）法を使用した、分子淘汰操作により作成された。

一方、酵素に特異的に結合するペプチド（ペプチドアプタマー）の開発において、酵素活性阻害作用を有するものに比較し、酵素活性化作用を有するペプチドの開発は困難である。カテプシンE活性化ペプチドは、高速化された試験管内分子進化法である発達ライブラリー法を用いてライブラリーを進化させ、SFリンク法（非特許文献12）を使用して酵素活性機能について淘汰することにより開発されている（非特許文献13および14）。ピヤニらは、一次ライブラリーおよび二次ライブラリーとして、中性環境下でカテプシンEを活性化する8から16アミノ酸残基長のペプチドの開発を報告した（非特許文献13）。小松らは、8アミノ酸残基長の2つのペプチドをリンカーで連結した三次ライブラリーの作成を報告している（非特許文献14）。

30

【0007】

さらには、カテプシンEについて腫瘍マーカーとしての利用が提案されている。被検試料中のカテプシンEの量を測定し、測定結果と乳がんの可能性または乳がんの予後とを関連付けることにより乳がんを検出する方法が報告されている（特許文献3）。カテプシンEの測定が、カテプシンEの基質、カテプシンEに対する抗体、またはカテプシンEに対して特異的に親和性を有するペプチド性化合物（アプタマー）を用いて行われてもよいと報告されている（特許文献3）。カテプシンEに特異的に結合するペプチドを用いてカテプシンEの量を測定する方法が報告されている（特許文献4及び非特許文献15）。さらには、カテプシンEタンパク質あるいはカテプシンEタンパク質の発現促進作用（インターフェロン またはリポ多糖）を有する物質を含む、老化現象を改善、防止または遅延させるための医薬組成物が報告されている（特許文献1）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2011-105686

【特許文献2】特開2007-332085

【特許文献3】特開2011-137685

50

【特許文献4】特開2011-115146

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Yamamoto K, Kawakubo T, Yasukochi A, Tsukuba T, Emerging roles of cathepsin E in host defense mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Volume 1824, Issue 1, 2012, Pages 105-112.

【非特許文献2】Kawakubo T. et al. (2008) Gene expression profiling of mammary glands of cathepsin E-deficient mice compared with wild-type littermates. *Biochimie*, 90, 396-404.

【非特許文献3】Kawakubo T, Yasukochi A, Toyama T, et al. Repression of cathepsin E expression increases the risk of mammary carcinogenesis and links to poor prognosis in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2014 Mar;35(3):714-26. 10

【非特許文献4】Tsukuba T, Okamoto K, Okamoto Y et al. Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. *J Biochem*. 2003 Dec;134(6):893-902.

【非特許文献5】Ullmann, R. et al. (2004) Protein expression profiles in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the lung generated using tissue microarrays. *J. Pathol.*, 203, 798-807.

【非特許文献6】Blaveri, E. et al. (2005) Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin. Cancer Res.*, 11, 4044-4055. 20

【非特許文献7】Mota, F. et al. (1997) Cathepsin E expression by normal and premalignant cervical epithelium. *Am. J. Pathol.*, 150, 1223-1229.

【非特許文献8】Caruso, M. et al. (2009) Over-expression of cathepsin E and trefoil factor 1 in sessile serrated adenomas of the colorectum identified by gene expression analysis. *Virchows Arch.*, 454, 291-302.

【非特許文献9】Uno, K. et al. (2000) Clinical significance of cathepsin E in pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15, 1333-1338.

【非特許文献10】Kawakubo, T, Yasukochi, A, Nakamura S, and Yamamoto, K. Cathepsin E as a potent anticancer protease. *J. Oral Biosci.*53(2):128-136, 2011. 30

【非特許文献11】Kawakubo T, Okamoto K, Iwata JI, et al. Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface. *Cancer Research*. 2007;67(22):10869-10878.

【非特許文献12】Naimuddin M, Kitamura K, Kinoshita Y, et al. Selection-by-function: efficient enrichment of cathepsin E inhibitors from a DNA library. *Journal of Molecular Recognition*. 2007;20(1):58-68.

【非特許文献13】Biyani M, Futakami M, Kitamura K, et al. In vitro selection of cathepsin E-activity-enhancing peptide aptamers at neutral pH. *International Journal of Peptides*. International Journal of Peptides Volume 2011 (2011), Article ID 834525, 10 pages 40

【非特許文献14】Komatsu M, et al., "Peptide-Modulated Activity Enhancement of Acidic Protease Cathepsin E at Neutral pH," *International Journal of Peptides*, vol. 2012, Article ID 316432, 7 pages, 2012.

【非特許文献15】Tung et al., "1 Peptide aptamer-modified single walled carbon nanotube-based transistors for high-performance biosensors *Scientific Reports* 7: 17881 DOI:10.1038 (2017).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

カテプシンEの活性を促進するペプチドであって、従来のペプチドよりも高い活性化機 50

能を有するペプチド、および/または従来のペプチドよりもカテプシンEに対し高い結合親和性を有するペプチドを提供することを課題とする。加えて、上記ペプチドを用いたカテプシンEの酵素活性測定方法およびカテプシンE量の測定方法の提供を課題とする。さらには、該カテプシンEの活性を促進するペプチドを含むがん治療用医薬の提供を課題する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、三次ライブラリーを基礎として、それを独自のアプローチによりさらに進化させて、三次ライブラリーに属する最高の活性化力を有するカテプシンE活性化ペプチドよりも一段と高い活性化機能を有するペプチドを見出した。また、このペプチドを含むがん治療用医薬を見出した。

10

【0012】

上記三次ライブラリーに属するペプチドアプタマーは、検出感度が解離定数で数十nMである。一定の強度を持つとはいえ、生物試料中(例えば血液中)のカテプシンEの濃度(数nM以下)を測定するには精度的に十分ではなかった。今回取得したペプチドアプタマーは十分な精度で、血液中の低濃度カテプシンEを検出することが期待される。

【0013】

本発明は以下の通りである。

[1] 式1: X1-C-X3-X4-X5-D-X7-X8-V-E-V-Q-X13-E-V-A-E-A-X19-X20-X21-X22-L-X24-L-X26-P-G-X29

20

(式1中、X1はG、L、N、AまたはVであり、

X3はPまたはTであり、

X4はC、HまたはYであり、

X5はI、A、EまたはVであり、

X7はFまたはLであり、

X8はKまたはMであり、

X13はVまたはMであり、

X19はL、T、QまたはPであり、

X20はL、S、Q、EまたはPであり、

X21はS、TまたはAであり、

X22はAまたはRであり、

X24はSまたはHであり、

X26はSまたはHであり、

X29はWまたはSである)(配列番号1)のアミノ酸配列を有し、但しX8がMであり且つX29がSであるアミノ酸配列を除く、ペプチド。

30

[2] 上記式1のX8がKである(配列番号2)、[1]に記載のペプチド。

[3] 上記式1のX8がMであり、X29がWである(配列番号3)、[1]に記載のペプチド。

[4] 上記式1中、

X1はGまたはLであり、

X3はPであり、

X4はCまたはHであり、

X5はIまたはAであり、

X7はFであり、

X19はLであり、

X20はL、S、QまたはEであり、

X21はSまたはTであり、

X22はAである(配列番号4~6)、

[1]~[3]のいずれかーに記載のペプチド。

40

[5] カテプシンEの元の酵素活性を100%とすると、三次ライブラリーで得られたペ

50

プチド (CEAP3) よりも、カテプシン E の酵素活性をさらに約 20% 以上、上昇させる、[1] ~ [5] のいずれかーに記載のペプチド。

[6] カテプシン E への結合に対する解離定数 (KD) は 1 nM 以下である、[1] ~ [5] のいずれかーに記載のペプチド。

[7] [1] ~ [6] のいずれかーに記載のペプチドを含む、がんを治療するための医薬。

[8] 試料中のカテプシン E の酵素活性測定方法であって、

(a) 固相化されたペプチドアプタマーと試料を混合し、固相化ペプチドアプタマーに結合したカテプシン E を得る工程、

(b) 固相化ペプチドアプタマーに結合したカテプシン E と、標識されたカテプシン E 基質を接触させる工程、および

(c) カテプシン E によるカテプシン E 基質の切断を検出してカテプシン E 酵素活性を求める工程

を含み、上記ペプチドアプタマーが [1] ~ [6] のいずれかーに記載のペプチドである、方法。

[9] 試料中に含まれるカテプシン E 量の測定方法であって、

(a) 固相化されたペプチドアプタマーと試料を混合し、固相化ペプチドアプタマーに結合したカテプシン E を得る工程、および

(b) カテプシン E が結合したペプチドアプタマーを検出し、試料中のカテプシン E 量を求める工程

を含み、上記ペプチドアプタマーが [1] ~ [6] のいずれかーに記載のペプチドである、方法。

[10] カーボンナノチューブ電界効果型トランジスタ法を用いて実施される [9] に記載の方法であって、

上記工程 (a) において、固相化されたペプチドアプタマーは、電極に設置されたカーボンナノチューブに固相化されたペプチドアプタマーであり、そして

上記工程 (b) は、上記ペプチドアプタマーとカテプシン E の結合前後において、上記電極に生じる標準電極に対する電位差を測定することを含む工程である、方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明のペプチドは従来のペプチドと比較してカテプシン E に対する結合親和性が高い。したがって、本発明のペプチドは、ペプチドアプタマーとして利用して試料中の低濃度カテプシン E を検出することができる。本発明のペプチドは従来のペプチドと比較して、カテプシン E に対する結合親和性が高くかつカテプシン E 活性を促進する作用がより高い。したがって、本発明のペプチドは、ペプチドアプタマーとして利用して、試料中のカテプシン E の酵素活性を高い感度により測定することができる。本発明のペプチドは従来のペプチドと比較してカテプシン E 活性を促進する作用がより高い。したがって、本発明のペプチドは、がん細胞にアポトーシスを誘導する働きをより増強することができ、がん治療への応用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1】点置換体四次ライブラリー用のコンストラクト (P109) (配列番号 45)。Variable 領域 (382 から 468 番目の塩基) の 1 コドンにつき元のアミノ酸を除く 19 種類のアミノ酸に変異が加わるように設計されており、理論上 $19 \times 19 = 361$ 種類の変異体が含まれたライブラリー。

【図 2】 Selection-by-Function 導入型 cDNA ディスプレイを用いた in vitro Selection の概要図。

【図 3】点置換体四次ライブラリー淘汰産物のゲル電気泳動図。レーン 1 : 100 bp ラダー、レーン 2 : カテプシン E に対して結合のないもの、レーン 3 : Selection buffer による洗浄 1、レーン 4 : Selection buffer による洗浄 2、レーン 5 : Selection buffer による洗浄 3、レーン 6 : カテプシン E 酵素反応産物、レーン 7 : wash buffer による洗浄

10

20

30

40

50

、レーン 8 : 溶出物 (各 5 2 4 b p のバンド)。

【図 4】点置換体四次ライブラリー淘汰産物のアミノ酸配列。リンカー領域は影をつけて示した。アミノ酸点置換を (囲み文字) で示す。アミノ酸配列の横の数字は、得られたコピー数である。

【図 5】点置換体ペプチドのカテプシン E 活性促進度合。縦軸の標記は活性促進度合であり、C E の活性としては、この数値に 1 0 0 % を加えたものである。エラーバーは標準偏差 (実験 3 回) を示す。

【図 6】加算的点置換体四次ライブラリーのゲル電気泳動結果。レーン 1 : 1 0 0 b p ラダー、レーン 2 : 参照バンド (5 4 5 b p)、レーン 3 : 加算的点置換体ライブラリー (5 2 4 b p)。レーン 3 は、後に転写、ライゲーション、翻訳、淘汰を行う際に必要な配列を含めた 5 2 4 b p のバンドを表している。

【図 7】加算的点置換体四次ライブラリーのダイレクトシーケンス法による塩基配列波形。

【図 8】淘汰前後での加算的点置換体四次ライブラリーの塩基配列波形。淘汰前後のダイレクトシーケンス法による塩基配列波形を上下に並べて示す。

【図 9】加算的点置換体四次ライブラリー淘汰産物のアミノ酸配列。太字 + 下線で示した残基は、表 3 のオリゴマーで導入され、作製された変異体ライブラリーを用いて淘汰された結果、変異が確認された部位を示す。下線のみを記した残基はライブラリー構築時における断片ごとのハイブリダイゼーションからの伸長反応の際のエラーによるものであると考えられる変異を含む部位を示す。アミノ酸配列の横の数字は、得られたコピー数である。

【図 1 0】加算的点置換体ペプチドのカテプシン E 活性促進度合。活性評価は、加算的点置換体四次ライブラリー淘汰産物 1 3 種類と、点置換体ライブラリー淘汰の際にカテプシン E に対する活性を調べていない M 8 K 変異体ペプチドを含む。縦軸の標記は活性促進度合であり、C E の活性としては、この数値に 1 0 0 % を加えたものである。エラーバーは標準偏差 (実験 3 回) を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

以下に記載する本発明の説明は、代表的な実施形態や具体例に基づいてなされることがあるが、本発明はそのような実施形態に限定されるものではない。なお、本明細書において「 ~ 」を用いて表される数値範囲は「 ~ 」前後に記載される数値を下限値及び上限値として含む範囲を意味する。

【 0 0 1 7 】

(定義)

本明細書中の「カテプシン E」は、カテプシン E タンパク質を意味し、本明細書では C a t E あるいは C E と記載することがある。

本明細書中の「ペプチドアプタマー」は、特定の分子と特異的に結合するペプチドを指す。本明細書中で使用する場合、「ペプチドアプタマー」という言葉は、特定の分子がもつ生物学的活性を抑制するか促進するかを問わず、または特定の分子がもつ生物学的活性に影響を及ぼすか及ぼさないかを問わず、特定の分子に特異的に結合するペプチドを意味する。本明細書において、「ペプチドアプタマー」を単にアプタマーと記載する場合がある。

【 0 0 1 8 】

本明細書中の「カテプシン E 活性化ペプチド (C E A P) 」とは、直接的または間接的に、実質的に完全にまたは部分的に、カテプシン E の生物学的活性を誘導、促進、または増強することが可能である任意のペプチドを含む。通常、カテプシン E は酸性 p H で機能するが、本明細書では中性 p H で機能するカテプシン E の第 2 の活性に対して、それに有効な基質を用いて淘汰 (スクリーニング) しており、本発明のペプチドは中性 p H 環境下でカテプシン E を活性化する。

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

50

本明細書中の「CEAP3」は三次ライブラリー淘汰産物であり、アミノ酸配列「GCPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSLSPGS」（配列番号7）を有する。ペプチド非存在下でのカテプシンEの活性を100%とすると、CEAP3の存在下でカテプシンEの活性は150%である。なお、非特許文献14では、ペプチド非存在下と比較して、ペプチド存在下で、カテプシンEの活性を175%や186%にすることができるペプチドが得られている。

【0020】

本明細書中の式1、2または3の「X1」「X3」「X4」「X5」「X7」「X8」「X13」「X19」「X20」「X21」「X22」「X24」「X26」「X29」は、任意のアミノ酸残基を示し、Xに付された番号は便宜上、式1に記載のアミノ酸配列のN末端側からの位置を示す。なお、例えば、N末端から2番目のアミノ酸残基は式1ではX2とは記載せずC(cys)と記載している。本発明のペプチドはN末端側に任意のアミノ酸残基が付加されてもよいので、その場合はX1が1番目のアミノ酸残基とはならない。

10

【0021】

用語「ペプチド」は、一般に、ペプチド(アミド)結合によって結合したアミノ酸の連続する比較的短い配列を指す。典型的には、必ずしもそうではないが、ペプチドは、約2から約50個のアミノ酸、約4から40個のアミノ酸、または約10から30個のアミノ酸の長さを有する。

【0022】

用語「ポリペプチド」は、一般に、ペプチドの長い形態を指すが、「ポリペプチド」と「ペプチド」は、本明細書の幾つかの文脈では互換的に使用することができる。

20

用語「アミノ酸」および「残基」は、本明細書において互換的に使用される。

【0023】

ペプチドまたはポリペプチドの「領域」は、典型的には、2以上のアミノ酸の連続配列である。少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15の連続するアミノ酸からなる。

【0024】

本明細書中「ライブラリー」とは、構造が異なる分子の群を意味する。本発明のライブラリーは、mRNAディスプレイライブラリーやcDNAディスプレイライブラリー等を含む。ライブラリー中から特定の性質を有する分子を選択する工程を、本明細書では特に分子の機能活性により選択しているので「淘汰」という。本明細書において「淘汰」と「選択」は互換的に使用される。

30

【0025】

(ペプチド)

本発明のペプチドは、前述のように、三次ライブラリーの淘汰産物を基礎として、それを独自のアプローチによりさらに進化させて、三次ライブラリーの淘汰産物(CEAP3を含む)よりも一段と高い活性化機能を有するペプチド群を見出したことを基礎とする。さらなる進化の手法は、第1段階が、配列中に点置換を導入することによる四次ライブラリー(第1段階)の作成であり、第2段階は、そのライブラリーを淘汰して得られた優位変異体(元より活性の高い変異体)の配列情報から、活性を向上させると考えられる点置換を選び、それらを任意の組合せで複数含む変異体(複数点置換変異体)の分子ライブラリー(加算的点置換体ライブラリー)、すなわち、四次ライブラリー(第2段階)を作製し、その四次ライブラリーの淘汰による、カテプシンEに対する高活性化機能を有するペプチド群の選択である。これら2つの段階において、ペプチドアダプターが高活性化機能を有するために適したアミノ酸配列に関する知見を得て、下記式1の本発明のペプチドに到達した。

40

【0026】

第1段階の点置換体による四次ライブラリーの作成においては、図4に示すアミノ酸配列および図5に示すカテプシンE活性促進度合から、CEAP3よりも一段と高い活性化機能を有するペプチドとして点置換L20EおよびT21Sを有するペプチドを見出した

50

。さらにこれらの結果は、2つのアプタマー領域において、アミノ酸置換が入っても、活性が大きく低下しない部位とアミノ酸の種類を明らかにしている。

【0027】

さらに、第2段階の加算的置換体四次ライブラリーの淘汰においては、図9に示すアミノ酸配列および図10に示すカテプシンE活性促進度合から、カテプシンEに対する高活性化機能を有するペプチド群として、置換M8Kおよび/またはS29Wを有するペプチド群を見出した。さらにこれらの結果は、2つのアプタマー領域において、アミノ酸置換が入ってもペプチドが有する生物学的活性が大きく低下しない位置とそのアミノ酸の種類、および活性が低下する傾向がある位置とそのアミノ酸の種類を明らかにしている。

【0028】

これら2段階の実験結果から、カテプシンE活性促進を格段に向上させるのは、M8KおよびS29Wの一方または両方であり、第1段階において見出されたL20EおよびT21Sは、カテプシンE活性促進の格段の向上には寄与していないことが分かるとともに、しかしこれら置換前後のいずれのアミノ酸であっても、M8KおよびS29Wの一方または両方が含まれるペプチドにおいてはカテプシンE活性促進の格段の向上が得られることが分かる。

【0029】

同様にこれらの2つの実験結果に基づいて、本発明では、以下の式1を定めた。

式1：X1-C-X3-X4-X5-D-X7-X8-V-E-V-Q-X13-E-V-A-E-A-X
19-X20-X21-X22-L-X24-L-X26-P-G-X29

(X1はG、L、N、AまたはVであり、
X3はPまたはTであり、
X4はC、HまたはYであり、
X5はI、A、EまたはVであり、
X7はFまたはLであり、
X8はKまたはMであり、
X13はVまたはMであり、
X19はL、T、QまたはPであり、
X20はL、S、Q、EまたはPであり、
X21はS、TまたはAであり、
X22はAまたはRであり、
X24はSまたはHであり、
X26はSまたはHであり、

X29はWまたはSである)(配列番号1)のアミノ酸配列を有し、ただしX8がMであり且つX29がSであるアミノ酸配列を除く、ペプチド。

【0030】

本発明の好ましい第一実施態様では、式1におけるX8はKである。

2段階の実験結果において示すX8がKであるペプチドは、いずれもCEAP3より高いカテプシンE活性促進効果を示し、特に、MP04、02、13、01、03、10、09、11は、有意差を持ってCEAP3より高いカテプシンE活性促進効果を示す(図10参照)。また、MP07およびMP06も、CEAP3より高いカテプシンE活性促進効果を有するが有意差を持つものではない。前者の結果から、MP04、02、13、01、03、10、09、11が有するX8以外のアミノ酸置換は、X8がKであることによって得られるカテプシンE活性促進効果を妨げるものではなく、これらの置換を有するペプチドは、MP04、MP03とほぼ同等のカテプシンE活性促進効果を奏する。MP07およびMP06が有するアミノ酸置換は、MP03と比べてカテプシンE活性促進効果をやや低下させるが、CEAP3より高いカテプシンE活性促進効果を示す。MP07およびMP06は、いずれもX29が(Wではなく)Sであり、MP02の結果との対比からは、MP07およびMP06においてX29がWであるペプチドは、MP07およびMP06よりはさらに高いカテプシンE活性促進効果であって、有意差を持ってCEA

10

20

30

40

50

P 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を示すであろうことが推察される。

【 0 0 3 1 】

本発明の好ましい第二の実施態様では、式 1 における X 2 9 は W である。

MP 1 2 および 0 5 の結果から、X 8 が K ではなく M であるペプチドについては、X 2 9 が S ではなく W であっても、大幅なカテプシン E 活性促進効果は得られないが、CEAP 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有する（図 10 参照）。ただし、有意差を持つものではない。X 8 が K であり、且つ X 2 9 が W であるペプチドが、より高いカテプシン E 活性促進効果を有するという観点から好ましい。

【 0 0 3 2 】

X 8 および X 2 9 以外のアミノ酸で、置換可能であることが実験的に確認されたアミノ酸は、X 1、X 3、X 4、X 5、X 7、X 1 3、X 1 9、X 2 0、X 2 1、X 2 2、X 2 4、X 2 6 である。

X 1 は G、L、N、A または V である。X 1 が G または L であるペプチドは、第 2 段階の結果から CEAP 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 1 が N、A または V であるペプチドは、第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させないことは明らかであり、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、MP 0 2 および MP 0 3 とほぼ同様のカテプシン E 活性促進効果を奏する蓋然性が高いことが予想される。ここで、MP 0 2 は点置換 M 8 K、V 1 3 M および S 2 9 W を有するが他の置換を含まないペプチドであり、MP 0 3 は点置換 M 8 K および V 1 3 M を有するが他の置換を含まないペプチドである。MP 0 2 および MP 0 3 は高いカテプシン E 活性促進効果を示す（図 10）。

【 0 0 3 3 】

X 3 は P または T である。X 3 が P であるペプチドは、第 2 段階の結果から CEAP 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 3 が T であるペプチドとしては、MP 0 8 (X 8 = M (K ではない)、X 2 9 = S (W ではない)) のみの結果であるが、大幅なカテプシン E 活性促進効果の低下は見られないことから、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、MP 0 2 および MP 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。

【 0 0 3 4 】

X 4 は C、H または Y である。X 4 が C または H であるペプチドは、第 2 段階の結果から CEAP 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 4 が Y であるペプチドは、第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させないことは明らかであり、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、MP 0 2 および MP 0 3 とほぼ同様のカテプシン E 活性促進効果を示す蓋然性が高いことが予想される。

【 0 0 3 5 】

X 5 は I、A、E または V である。X 5 が I、A、E または V であるペプチドは、第 2 段階の結果から CEAP 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 5 が A であるペプチドは、第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させないことも示されており、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、MP 0 2 および MP 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。

【 0 0 3 6 】

X 7 は F または L である。X 7 が F であるペプチドは第 2 段階の結果から CEAP 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 7 が L であるペプチドとしては、MP 0 8 (X 8 = M (K ではない)、X 2 9 = S (W ではない)) のみの結果であるが、大幅なカテプシン E 活性促進効果の低下は見られないことから、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、MP 0 2 および MP 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

X 1 3 は V または M である。X 1 3 が V または M であるペプチドは第 2 段階の結果から C E A P 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 1 3 が M であるペプチドは、第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させないことも示されており、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、M P 0 2 および M P 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏する。

【 0 0 3 8 】

X 1 9 は L、T、Q または P である。X 1 9 が L、T または Q であるペプチドは第 2 段階の結果から C E A P 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 1 9 が P であるペプチドは第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させないことが示されており、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、M P 0 2 および M P 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。

10

【 0 0 3 9 】

X 2 0 は L、S、Q、E または P である。X 2 0 が L、S または Q であるペプチドは第 2 段階の結果から C E A P 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 2 0 が E または P であるペプチドは第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させないことが示されており、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、M P 0 2 および M P 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。

20

【 0 0 4 0 】

X 2 1 は S、T、または A である。X 2 1 が S または T であるペプチドは第 2 段階の結果から C E A P 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 2 1 が S であるペプチドは、第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させないことも示されており、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、M P 0 2 および M P 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。X 2 1 が A であるペプチドとしては、M P 0 8 (X 8 = M (K ではない)、X 2 9 = S (W ではない) のみの結果であるが、大幅なカテプシン E 活性促進効果の低下は見られないことから、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、M P 0 2 および M P 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。

30

【 0 0 4 1 】

X 2 2 は A または R である。X 2 2 が A であるペプチドは第 2 段階の結果から C E A P 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 2 2 が R であるペプチドは、第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させないことも示されており、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、M P 0 2 および M P 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。

【 0 0 4 2 】

X 2 4 は S または H である。X 2 4 が S または H であるペプチドは第 2 段階の結果から C E A P 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。

40

【 0 0 4 3 】

X 2 6 は S または H である。X 2 6 が S であるペプチドは第 2 段階の結果から C E A P 3 より高いカテプシン E 活性促進効果を有することが明らかである。X 2 6 が H であるペプチドは、第 1 段階の結果からペプチドが有するカテプシン E 活性促進効果を実質的に低下させることがないことも示されており、X 8 が K であり、X 2 9 が S または W であるペプチドにおいて、M P 0 2 および M P 0 3 に近いカテプシン E 活性促進効果を奏するものと予想される。

【 0 0 4 4 】

本発明の好ましいペプチドは、上記式 1 中の X 8 が K である場合には X 2 9 が W または S であり、且つ X 8 が M である場合には X 2 9 が W であるアミノ酸配列を有する。本発明

50

の別の好ましいペプチドは、上記式 1 中の X 2 9 が W である場合には X 8 が K または M であり、且つ上記式 1 の X 2 9 が S である場合には X 8 が K であるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 4 5 】

本発明のペプチドは、好ましい実施態様において、式 1 中、X 1 が G または L であり、X 3 が P であり、X 4 が C または H であり、X 5 が I または A であり、X 7 が F であり、X 8 が M または K であり、X 1 3 が V または M であり、X 1 9 が L であり、X 2 0 が L、S、Q または E であり、X 2 1 が S または T であり、X 2 2 が A であり、X 2 4 が S または H であり、X 2 6 が S または H であり、X 2 9 が W または S であるアミノ酸配列を有し、但し X 8 が M であり且つ X 2 9 が S であるアミノ酸配列を除くペプチドである。

【 0 0 4 6 】

本発明のペプチドは、好ましい実施態様において、式 1 中、X 1 が G または L であり、X 3 が P であり、X 4 が C または H であり、X 5 が I または A であり、X 7 が F であり、X 8 が K であり、X 1 3 が V または M であり、X 1 9 が L であり、X 2 0 が L、S、Q または E であり、X 2 1 が S または T であり、X 2 2 が A であり、X 2 4 が S または H であり、X 2 6 が S または H であり、X 2 9 が W または S であるアミノ酸配列を有するペプチドである。

【 0 0 4 7 】

本発明のペプチドは、好ましい実施態様において、式 1 中、X 1 が G または L であり、X 3 が P であり、X 4 が C または H であり、X 5 が I または A であり、X 7 が F であり、X 8 が K であり、X 1 3 が V または M であり、X 1 9 が L であり、X 2 0 が L、S、または Q であり、X 2 1 が S または T であり、X 2 2 が A であり、X 2 4 が S または H であり、X 2 6 が S であり、X 2 9 が W または S であるアミノ酸配列を有するペプチドである。

【 0 0 4 8 】

本発明のペプチドは、好ましい実施態様において、式 1 中、X 1 が G であり、X 3 が P であり、X 4 が C であり、X 5 が I または A であり、X 7 が F であり、X 8 が K であり、X 1 3 が V または M であり、X 1 9 が L であり、X 2 0 が L であり、X 2 1 が S または T であり、X 2 2 が A であり、X 2 4 が S または H であり、X 2 6 が S であり、X 2 9 が W であるアミノ酸配列を有するペプチドである。

【 0 0 4 9 】

本発明のペプチドは、上記式 1 のアミノ酸配列を有し、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9 または 5 0 アミノ酸残基からなる。

【 0 0 5 0 】

本発明のペプチドは、上記式 1 のアミノ酸配列の N 末端側に N 個（ここで N は、1 以上 2 1 以下の整数）のアミノ酸をさらに含み、そして / または、C 末端側に M 個（ここで M は、1 以上 2 1 以下の整数）のアミノ酸をさらに含むことができる。

【 0 0 5 1 】

本発明のペプチドは、第 1 のアプタマー領域として、式 2 : X 1 - C - X 3 - X 4 - X 5 - D - X 7 - X 8（式 2 中、X 1 は G、L、N、A または V であり、X 3 は P または T であり、X 4 は C、H または Y であり、X 5 は I、A、E または V であり、X 7 は F または L であり、または X 8 は K または M である）（配列番号 8）のアミノ酸配列を含む。すなわち、第 1 のアプタマー領域は、少なくとも 8 アミノ酸残基の長さであり、以下の表の各位置（X 1 から X 8）に記載したアミノ酸種類の組み合わせで構成されたアミノ酸配列の全てを含む。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

【表 1】

X1	X2	X3	X4	X5	X4	X7	X8
G	C	P	C	I	D	F	K
L		T	H	A		L	M
N			Y	E			
A				V			
V				A			

【0053】

10

本発明のペプチドの第1のアプタマー領域の例としては、GCPCIDFK（配列番号9）、GCPCADFK（配列番号10）、GCPHIDFK（配列番号11）、LCP CIDFK（配列番号12）、GCPCADFM（配列番号13）、GCPCEDFM（配列番号14）、GCPCVDFK（配列番号15）、GCTCIDLM（配列番号16）、GCPCIDFM（配列番号17）、NCPCIDFM（配列番号18）、ACPC IDFM（配列番号19）、GCPCADFM（配列番号20）、GCPYIDFM（配列番号21）およびVCPCIDFM（配列番号22）などがある。

【0054】

20

本発明のペプチドは、第2のアプタマー領域として、式3：X19-X20-X21-X22-L-X24-L-X26-P-G-X29（式3中、X19はL、T、QまたはPであり、X20はL、S、Q、EまたはPであり、X21はS、TまたはAであり、X22はAまたはRであり、X24はSまたはHであり、X26はSまたはHであり、X29はWまたはSである）（配列番号23）のアミノ酸配列を含む。すなわち、第2のアプタマー領域は、少なくとも11アミノ酸残基の長さであり、以下の表の各位置（X19からX29）に記載したアミノ酸種類の組み合わせで構成されたアミノ酸配列の全てを含む。

【0055】

【表 2】

X19	X20	X21	X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28	X29
L	L	S	A	L	S	L	S	P	G	W
T	S	T	R		H		H			S
Q	Q	A								
P	E									
	P									

30

【0056】

40

本発明のペプチドの第2のアプタマー領域の例としては、LLSALSLSPGW（配列番号24）、LLTALSLSPGW（配列番号25）、LLTALHLSPGW（配列番号26）、LLTALSLSPGW（配列番号27）、LLTALSLSPGS（配列番号28）、LSTALSLSPGS（配列番号29）、LLTALSLSPGW（配列番号30）、LQTALSLSPGW（配列番号31）、TLTALSLSPGW（配列番号32）、QLTALSLSPGS（配列番号33）、LLAALSLSPGS（配列番号34）、LLTALSLSPGS（配列番号35）、LLSALSLSPGS（配列番号36）、LETALSLSPGS（配列番号37）、PLTALSLSPGS（配列番号38）、LPTALSLSPGS（配列番号39）、LLTRLSLSPGS（配列番号40）およびLLTALSLSHPGS（配列番号41）などがある。

【0057】

上記式1のアミノ酸配列中のV-E-V-Q-X13-E-V-A-E-A（X13はVまたはMである）（配列番号42）はリンカー領域である。リンカー領域は、標的分子（タンパク質）に独立に結合する2つのペプチド（アプタマー領域）を連結するために必要な一定のスペーサーである。リンカーを構成するアミノ酸は、三次ライブラリーではグリシンを

50

主な構成とする (Gly-Gly-Gly-Ser) × 2 ~ 3 を使用した (非特許文献 14)。三次ライブラリーの淘汰では、グリシンを主な構成とするリンカーのフレームシフトにより得られた V-E-V-Q-V-E-V-A-E-A をリンカーとして使用したペプチドが選択されたペプチドとして残ったので、本発明の四次ライブラリー用のコンストラクトはリンカー配列：V-E-V-Q-V-E-V-A-E-A (配列番号 43) を使用して設計した。本発明のペプチドのリンカー領域は、V-E-V-Q-V-E-V-A-E-A であるか、または V-E-V-Q-M-E-V-A-E-A (配列番号 44) である。本発明のペプチドは、第 1 のアダプター領域と第 2 のアダプター領域が上記リンカーにより連結されている。第 1 のアダプター領域とリンカー領域と第 2 のアダプター領域の組み合わせは、図 9 に示した 13 の組み合わせに限定されない。当然であるが、本発明のペプチドは、式 1：X1-C-X3-X4-X5-D-X7-X8-V-E-V-Q-X13-E-V-A-E-A-X19-X20-X21-X22-L-X24-L-X26-P-G-X29 (式 1 中、X1 は G、L、N、A または V であり、X3 は P または T であり、X4 は C、H または Y であり、X5 は I、A、E または V であり、X7 は F または L であり、X8 は K または M であり、X13 は V または M であり、X19 は L、T、Q または P であり、X20 は L、S、Q、E または P であり、X21 は S、T または A であり、X22 は A または R であり、X24 は S または H であり、X26 は S または H であり、X29 は W または S である) (配列番号 1) のアミノ酸配列に包含される第 1 のアダプター領域とリンカー領域と第 2 のアダプター領域のあらゆる組み合わせを含む。ある実施態様では、本発明のペプチドは N 末端から C 末端の方向に順に第 1 のアダプター領域、リンカー領域および第 2 のアダプター領域を含む。別の実施態様では、本発明のペプチドは N 末端から C 末端の方向に順に第 2 のアダプター領域、リンカー領域および第 1 のアダプター領域を含む。

【0058】

本発明に用いられ、そして本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチドおよび小分子は、当技術分野で公知の標準的な技術を用いて製造することができる。

【0059】

本発明のペプチドは、担体にコンジュゲートされてもよい。担体は、生分解性ポリマー (例えば、PEG、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリカプロラクトン、およびそれらの共重合体、炭水化物、セルロース、キチン、およびリグニン、またはポリペプチド担体 (Fc および血清アルブミンなど)) である。担体にコンジュゲートされた本発明のペプチドは、担体にコンジュゲートされていないものと比較して、半減期および/または生物学的利用率が向上する。

【0060】

(四次ライブラリー淘汰産物)

本発明のペプチドは、カテプシン E の酵素活性を促進する機能を有する、カテプシン E を活性化する分子 (カテプシン E 活性化ペプチド (CEAP)) である。

本発明のペプチドは、ペプチド非存在下と比較して、ペプチド存在下のカテプシン E の活性を少なくとも約 140 から 220%、約 170 から 220%、あるいは約 190 から 220% にすることができるものであり、特に「200%以上」という値 (すなわち、カテプシン E の活性を 2 倍以上にすることができること) は、本発明のペプチドの、がん治療のための医薬用途に大きな期待を与える。また、カテプシン E の活性を特異的かつ高感度に検出する方法にもつながる。血清カテプシン E 活性と乳がん患者の予後の研究では、好ましい予後結果を有する患者のカテプシン E 活性は、好ましくない予後結果を有する患者に比較して、約 2 倍高いことがわかっている (非特許文献 3、Fig.1(E) 等)。したがって、乳がん患者のカテプシン E 活性を少なくとも 200% に活性化できる分子 (例えば、ペプチド) は、予後予測が悪い患者の治療に有用であることが期待される。本発明のペプチドは、ペプチド非存在下の活性と比較して、カテプシン E の活性を 140% 以上、150% 以上、170% 以上、172% 以上、173% 以上、175% 以上、180% 以上、185% 以上、188% 以上、190% 以上、195% 以上、200% 以上、205% 以

10

20

30

40

50

上、208%以上、210%以上、215%以上、218%以上、あるいは220%以上にすることができる。本発明のペプチドは、ペプチド非存在下の活性と比較して、カテプシンEの活性を約140から220%、約150から220%、約170から220%、約172から220%、約173から220%、約175から220%、約180から220%、約185から220%、約188から220%、約190から220%、約195から220%、約200から220%、約205から220%、約208から220%、約210から220%、あるいは約215から220%、にすることができる。

【0061】

本発明のペプチドは、カテプシンEの元の酵素活性を100%とすると、三次ライブラリーで得られたペプチド(CEAP3)よりも、カテプシンEの活性をさらに少なくとも約20%、少なくとも約22%、少なくとも約23%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約38%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約58%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約68%、あるいは少なくとも約70%上昇させることができる。

10

【0062】

本発明のペプチドは、カテプシンEに対し1nM以下の解離定数(KD)で結合することができる。本発明のペプチドは、1nM以下、すなわちpMオーダーの解離定数を有するため、試料中の低濃度カテプシンEを検出することが期待される。本発明のペプチドは、カテプシンEの異なる部分にそれぞれ結合する第1のアプタマー領域と第2のアプタマー領域を有するため、カテプシンEに対する特異性が高い。

20

【0063】

(医薬)

本発明のペプチドは、該ペプチドを含む医薬として提供される。ある実施態様では、本発明の医薬は個体における疾患または障害を治療するためのものである。ある実施態様では疾患または障害の症状は、自己免疫疾患である。別の実施態様では、本発明の医薬はがんの治療のためのものである。

【0064】

本発明が治療対象とするがんは任意の種類のがんである。好ましい実施態様では、本発明のペプチドは、とりわけカテプシンEが関与すると考えられるTRAILリガンドの遊離とそれに伴うTRAIL受容体への結合およびそれに続くアポトーシス反応によるがん細胞死が期待されるがんの有効と考えられる。本発明のペプチドは、カテプシンEの接近が容易な遊離がん細胞(血液系や浮遊性のがん細胞)には特に有効と考えられる。本発明のペプチドは、固形がん細胞であっても、その表層細胞を順次細胞死する形で、縮小消滅させることが期待される。本発明のペプチドは、治療方法に使用することができる。また、本発明のペプチドは医薬の製造または調製方法に使用することができる。

30

本発明の治療対象の個体または患者は、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

【0065】

本発明は、有効成分としてカテプシン活性化ペプチドを含む、がんを治療するための医薬を提供する。カテプシンE酵素活性を促進するために、本発明の医薬の有効量が患者に投与される。本発明の医薬は、有効成分であるペプチドに加えて、医薬として許容される担体を含んでもよい。

40

【0066】

別の態様において、本発明の医薬は、2種類以上のカテプシンE活性化ペプチド(CEAP)を含む。第1のCEAPと第2のCEAPは、カテプシンEの同じ部位に結合するものであってもよく、または異なる部位に結合するものであってもよい。

【0067】

本発明の医薬は、任意の適切な手段によって、経口投与、肺内投与、鼻腔内投与、病巣内投与、局所投与、または眼内投与されてもよい。本発明の医薬は非経口注入により投与されてもよく、非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、または腹腔内への注入、また

50

は皮下注射などが含まれる。投薬レジユメは、投与が短期間かまたは長期であるかによって適切に計画される。本発明の医薬は治療目的に最適な剤形で処方され、医療従事者の知識に基づいて治療に最適且つ臨床的に妥当な投与経路、投与方法、投与量および投与スケジュールが決定される。

【0068】

(カテプシンEの酵素活性測定方法)

本発明のペプチドはペプチドアダプターとして、以下の(a)から(c)を含む、試料中のカテプシンEの酵素活性測定方法に使用することができる。

(a) 固相化されたペプチドアダプターと試料を混合し、固相化ペプチドアダプターに結合したカテプシンEを得る工程、

(b) 固相化ペプチドアダプターに結合したカテプシンEと、標識されたカテプシンE基質を接触させる工程、および

(c) カテプシンEによるカテプシンE基質の切断を検出してカテプシンE酵素活性を求める工程。

本発明のペプチドは、カテプシンEを捕捉しても、それとの結合はいわゆるアロステリック結合であり、酵素の活性を妨げず、むしろ活性を向上させる機能がある。このため、カテプシンE酵素活性の測定感度が上昇する。

【0069】

乳がん患者の予後と相関しているのは、カテプシンEの物質的総量ではなく、カテプシンEの活性である(非特許文献3)。可能性としては、これに限定されないが、乳がん患者のカテプシンEは一部失活しているか、そもそも発現量が減っているかの両方があり、前者はカテプシンEの物質量と活性量の両者を測定することで判断できる。従来技術では、高感度に活性を測定するのが難しく、腕のいいエキスパートしかできなかったという事情がある。本発明のペプチドは、1 nM以下、すなわちpMオーダーの解離定数でカテプシンEに結合してかつカテプシンEの酵素活性を向上させるため、カテプシンE活性の測定に用いた場合、測定感度が、従来のペプチドを用いた場合と比較して格段に上昇する。

【0070】

カテプシンEの酵素活性測定方法工程(a)

本発明のカテプシンEの酵素活性測定方法では、ペプチドアダプターは、プレート、プレートのウェル、アレイ、ビーズ、チューブ、チップなどの固相に固相化される。ペプチドアダプターは、固相に、ペプチドやPEGなどのリンカーを介して固相化されてもよいし、直接的に固相化されてもよい。

【0071】

本発明の測定方法に用いられる試料は、CEを含有する試料であれば、特に制限はなく、通常は生物由来検体であり、例えば哺乳動物の血液、血清、血漿、尿、便、髄液、唾液、ぬぐい液、各種組織液等の体液、細胞(がん細胞、良性腫瘍細胞、悪性腫瘍細胞)およびそれらの細胞溶解液、または組織(がん組織、良性腫瘍組織、悪性腫瘍組織)およびそれらの組織溶解液であることができる。

【0072】

固相化されたペプチドアダプターと試料との混合は、例えばペプチドアダプターが固相化された固相を含む容器に、上記試料を含む緩衝液を注入することにより実施してもよいし、上記試料と緩衝液を含む容器にペプチドアダプターが固相化されたビーズ等を投入することにより実施してもよい。この混合により、試料中のCEは、固相化ペプチドアダプターに結合する。これにより固相化ペプチドアダプターに結合したカテプシンEを得る。ペプチドアダプターと試料との混合は、試料がカテプシンEを含む場合にはペプチドアダプターとカテプシンEが結合できる条件を適宜選択して行われる。すなわち、仮に測定試料にカテプシンE濃度が過剰に存在し、結合可能なペプチド濃度を超えるような場合は、試料を緩衝液で希釈して用いることができる。固相化ペプチドアダプターに非特異的に弱く結合している夾雑物を除去するため、上記固相や固相を含む容器(例えばプレートのウェルやチューブ)を、試料を含む緩衝液の除去後に、蒸留水等で洗浄することが好ましい

10

20

30

40

50

。

【0073】

カテプシンEの酵素活性測定方法の工程(b)

固相化ペプチドアプタマーに結合したカテプシンEと、標識されたカテプシンE基質を接触させる。標識は、例えば、発色物質、蛍光発生物質、化学発光物質、酵素などを利用するものであってもよい。固相化ペプチドアプタマーに結合したカテプシンEと、標識されたカテプシンE基質との接触は、pHを中性に調整した溶液中で実施される。本発明のペプチドは、中性pH環境下でカテプシンEを活性化するためである。

【0074】

カテプシンEの酵素活性測定方法の工程(c)

カテプシンEによるカテプシンE基質の切断を検出してカテプシンE酵素活性を求める。カテプシンEによるカテプシンE基質の切断は、標識物質の化学的变化をモニターすることにより検出される。検出は当業者に公知の方法により行うことができ、例えば、蛍光物質の場合には蛍光光度計により検出することができ、発色物質の場合には分光光度計により検出することができる。

試料中のカテプシンEの酵素活性の測定方法について、以下に具体例を記載する。但し、この例に限定される意図ではない。

【0075】

<ペプチドアプタマーの固相化>

本発明のペプチド(ペプチドアプタマー)をカップリング緩衝液(0.2M NaHCO₃、0.5M NaCl、pH8.3)で1mg/mlに希釈し、50μlのペプチド溶液をペプチドコーティングプレート(TaKaRa)のアレイに注ぎ、直ちに、10μlのReaction solution(TaKaRa)を各ウェルに加え、室温で2時間インキュベートする。インキュベーション後、溶液をプレートのウェルから移動させ、ペプチドコーティングウェルを200μlの蒸留水で3回洗浄する。次に、ブロッキング溶液(0.5Mエタノールアミン、0.5M NaCl(pH8.3))200μlを各ウェルに添加し、容器内に存在する非特異的結合物質を失活させるために室温で1時間インキュベートする。ブロッキング溶液を除去した後、ウェルを200μlの蒸留水で3回洗浄する。

【0076】

<ペプチドアプタマーによるカテプシンEの捕捉>

カテプシンEプロテアーゼ含有組織抽出物または血清を緩衝液(500mM酢酸ナトリウム、1M NaCl、pH4.0)でpH7.4に調整する。15,000rpmで5分間の遠心分離によってできた沈殿を除去し、上清を回収する。30μlの上清を各認識ペプチド固定化ウェルに添加し、室温で20分間インキュベートし、溶液を除去する。プレート上に残っている溶液を200μlの蒸留水で2回洗浄する。

【0077】

<Enzyme on peptideでの測定>

ペプチド上に捕捉されたカテプシンEの量を蛍光発生物質を用いたアッセイにより測定する。蛍光発生物質で標識されたカテプシンE基質(Nma-Gly-Gly-Arg-Arg-Ser-Gly-Thr-Cys-Gly(Dnp)-D-Arg-NH₂:配列番号101)、50mMの酢酸ナトリウムおよび100mMのNaClを含む溶液(pH4.5)を各ウェルに添加し、次いで40で10分間インキュベートする。

蛍光プレートリーダーFluorO(TaKaRa)を用いて、インキュベーション中に基質切断によって生成された蛍光強度の増加を、励起波長360nm/蛍光波長430nmで測定する。

【0078】

(カテプシンE量の測定方法)

本発明のペプチドは、ペプチドアプタマーとして、以下の(a)および(b)を含む、試料中に含まれるカテプシンE量を測定する方法に使用される。

(a)固相化されたペプチドアプタマーと試料を混合し、固相化ペプチドアプタマーに

10

20

30

40

50

結合したカテプシン E を得る工程、および

(b) カテプシン E が結合したペプチドアプタマーを検出し、試料中のカテプシン E 量を求める工程。

【0079】

カテプシン E 量の測定方法の工程 (a)

本発明のカテプシン E 量の測定方法では、ペプチドアプタマーは、プレート、プレートのウェル、アレイ、ビーズ、チューブ、チップ、バイオセンサチップなどの固相に固相化される。また、固相の材料としては、例えば、ガラス、プラスチック、金属、カーボンなど挙げられる。

【0080】

本発明の測定方法に用いられる試料は、C E を含有する試料であれば、特に制限はなく、通常は生物由来検体であり、例えば哺乳動物の血液、血清、血漿、尿、便、髄液、唾液、ぬぐい液、各種組織液等の体液、細胞（がん細胞、良性腫瘍細胞、悪性腫瘍細胞）およびそれらの細胞溶解液、または組織（がん組織、良性腫瘍組織、悪性腫瘍組織）およびそれらの組織溶解液であることができる。

【0081】

固相化されたペプチドアプタマーと試料との混合は、緩衝液中で上記試料と固相化されたペプチドアプタマーを混合することにより実施してもよく、例えば、当該固相を含む容器に上記試料と緩衝液を加えることにより実施してもよい。この混合により、試料中の C E は、固相化ペプチドアプタマーに結合する。これにより、ペプチドアプタマーに結合したカテプシン E を得る。ペプチドアプタマーと試料との混合は、試料がカテプシン E を含む場合にはペプチドアプタマーとカテプシン E が結合できる条件を適宜選択して行われる。

【0082】

カテプシン E 量の測定方法の工程 (b)

カテプシン E が結合したペプチドアプタマーの検出は、例えば適当な標識を予めペプチドアプタマーに結合させておき、この標識から得られるシグナルを測定することができる。ここで使用可能な標識としては、例えば、化学発光物質を基質とするような、HRP (Horse Radish Peroxidase)、ALP (Alkaline Phosphatase) などの他、蛍光標識などの公知の物質を使用することができる。

【0083】

本発明のペプチドアプタマーの、第 1 のアプタマー領域と第 2 のアプタマー領域はカテプシン E タンパク質の同じ部位に結合するか、あるいは異なる部位に結合する。本発明の好ましい実施態様では、本発明のペプチドアプタマーの、第 1 のアプタマー領域と第 2 のアプタマー領域はカテプシン E タンパク質の異なる部位に結合し、ペプチドアプタマーのカテプシン E に対する結合力が相加的にまたは相乗的に増大する。本発明のペプチドアプタマーは、カテプシン E の異なる部分にそれぞれ結合する第 1 のアプタマー領域と第 2 のアプタマー領域を有するため、カテプシン E に対する特異性が高く、試料中に含まれるカテプシン E 量を精度よく測定することができる。

本発明のペプチドアプタマーは、1 nM 以下、pM オーダーの解離定数 (K_D) でカテプシン E に結合するため、カテプシン E 量の測定精度が、従来のペプチドと比較して上昇する。

【0084】

好ましい実施形態では、本発明のカテプシン E 量測定方法は、単層カーボンナノチューブ電界効果型トランジスタ法 (SWCNT FET) を用いて実施することができる。ここで、カテプシン E 量の測定方法の工程 (a) の固相化されたペプチドアプタマーは、電極に設置されたカーボンナノチューブに固相化されたペプチドアプタマーであってもよく、そして工程 (b) は、上記ペプチドアプタマーとカテプシン E の結合前後において、上記電極に生じる標準電極に対する電位差を測定することを含む工程としてもよい。

【0085】

10

20

30

40

50

SWCNT FET法を用いたカテプシンE量の測定方法では、SWCNT FETを製造し、本発明のペプチドをペプチドアダプターとしてSWCNTチャンネルのカーボンナノチューブにリンカーを介して固相化して、カテプシンE検出用SWCNT FETセンサーを用意する。固相化のための、ペプチドアダプターとリンカーの濃度およびインキュベーション条件は、当該分野の公知技術に基づいて、体系的に調整し決定することができる。ペプチドアダプターを修飾したセンサーは0.0005×PBS(pH7.4)中に入れ、さまざまな濃度(例えば、0.1~10ng/mL)のカテプシンEで計測をすることができる。SWCNT FET法を用いたカテプシンE量の測定方法については、非特許文献15を参考にして実施することができる。

【0086】

(ライブラリーについて)

本発明のペプチドは、高速化された試験管内分子進化法である発達ライブラリー法を使用したカテプシン活性化ペプチド開発の最終段階に位置付けられた四次ライブラリーから開発された。試験管内進化法はランダムな配列をもつ集団をはじめとし、分子集団であるライブラリーから目的の機能をもつ分子群を淘汰する集団選択と、個々のクローンごとに淘汰するクローン選択のプロセスを経てライブラリーを高い活性を持つ集団へと絞りこんでいく。淘汰が進むにつれて弱い活性、低い親和性の分子は取り除かれ、ライブラリーの多様性は減少する。すなわち構成する分子群の種類は減っていくが、高い活性をもつ分子が残る。ここからさらに高い活性を示す分子群を選び出すために、人工的に変異を加えることで次段階のライブラリーを構成する。発達ライブラリー法の中では、ライブラリーの進化のためにY連結ブロックシャフリング(YLS)法を用いる段階がある。この方法では、N種(たとえば、10種)のブロックを原料としてわずか4回連結するだけで N^{16} (たとえば、出発時に10種の要素から始めると、 10^{16})の分子多様性が実現する。集団での淘汰、および個々のクローンでの淘汰を行った後に得られたペプチド分子から、4つのアミノ酸ブロックを選び出し連結して二次ライブラリーを得て、続いて淘汰を行う。この結果得られた二次ライブラリー淘汰産物はすでに機能単位(モジュール)とみなすことができる(Kitamura K et al. Journal of Molecular Biology, 2009;387(5):1186-1198、非特許文献13)。この機能単位とスペーサ配列を組み合わせることで三次ライブラリー(ペアペプチドライブラリー)が作製された(非特許文献14)。本明細書ではこの三次ライブラリーの淘汰産物に対してさらにアミノ酸配列に点置換を加えて得られる点置換体四次ライブラリーを作製する(図1)。点置換体四次ライブラリーを淘汰した後に、さらに、それらの点置換体四次ライブラリー淘汰産物にDNAシャフリング(Stemmer WP. Nature.1994, Aug4;370(6488):389-91)を導入する。

【0087】

(cDNAディスプレイ法)

ペプチドを創製するために、まず表現型であるペプチド部分と遺伝型部分であるDNAを対応付ける必要がある。本研究室で開発されたcDNAディスプレイ法を用いて、四次ライブラリーから目的のペプチド・タンパクを得る手順を図2に示す。

ペプチドをコードする四次ライブラリーのDNAをPCRすることで増幅し、転写することによってmRNAをつくり、表現型と遺伝型の対応をつける小分子ピューロマイシンリンカーと連結する。そして、翻訳を行うことによってピューロマイシンにペプチドを連結させる。その後、mRNAを安定化させるために逆転写を行う。続いてピューロマイシンに連結しているペプチド鎖の精製過程を経ることによってcDNAディスプレイを作製する。最後にターゲットに対して淘汰を行うことによって、より機能(結合能)の高いペプチドが得られる(非特許文献12、Tsuji-Ueno S, et al. Protein and Peptide Letters. 2011;18(6):642-650)。この連結体にはSFリンク(Naimuddin et al. J. MOL, Recog. 2007)が導入されており、機能(例えば、酵素活性制御)により淘汰できる。

【0088】

実験方法について以下に説明する。

実験方法1:cDNAディスプレイの作製

10

20

30

40

50

図1に記載の点置換体四次ライブラリーのコンストラクトのDNAを増幅したPCR産物と転写反応試薬を以下のとおり混合する。

PCR産物	1 pmol
25 mM r(A,T,U,G)TP mix (Promega)	3 μ l
5 \times T7 Trans Buffer (Promega)	2 μ l
RNase-free water (Promega)	up to 9 μ l
T7 Enz mix (Promega)	1 μ l

【0089】

PCR産物を含む溶液を37℃で3時間インキュベートし、更にRQ1 RNase-Free DNase (1 U / μ l、Promega)を1 μ lを加えて37℃で15分間インキュベートする。RNeasy (Qiagen)を用いてRNA精製を行い、最終溶液量を14 μ lにした。分光光度計Nano Drop ND-1000を用いてmRNA産物を定量する。

10

上記得られたmRNA産物とライゲーション試薬を以下のとおり混合する。

mRNA産物	20 pmol
SBP (streptavidin puromycin) linker (20pmol / μ l)	22 pmol
10 \times T4 ligase buffer (TaKaRa)	2.5 μ l
RNase-free water	up to 20 μ l

【0090】

次に、mRNAを含む溶液について、ライゲーション反応を、90℃ : 2 min 70℃ : 2 min 25℃ : 3 sec 4℃ : Holdの手順で行う。T4 RNK (10 U / μ l ; TaKaRa) 1 μ lおよびT4 RNA ligase (30 U / μ l ; TaKaRa) 1 μ lを加えた後、25℃で1時間20分インキュベートする。RNA精製を行い、最終溶液量を27 μ lにする。電気泳動でライゲーション産物を確認する (Gel組成 : Polyacrylamide gel (6%T,5%C) containing 8M Urea、1 \times TBE ; 泳動条件100V、55℃、5 \times TBE、8min)。

20

ライゲーション産物と翻訳用試薬を以下のとおり混合する。0.2 mlのチューブで2本分作製する。

ライゲーション産物 (2.2pmol / μ l)	4 μ l
20 \times Master Mix-Me	1.25 μ l
20 \times Master Mix-Leu	1.25 μ l
Reticulocyte lysate	34 μ l
RNase-free water	up to 50 μ l

30

【0091】

ライゲーション産物を含む溶液を翻訳のため、30℃で20分間インキュベートした後、3 MのKClを20 μ l、1 MのMgCl₂を6 μ lを加え、37℃で1時間20分間インキュベートする。SDS PAGEによりmRNAディスプレイ産物を確認する (Gel組成 : Polyacrylamide gel (4-6%T 5%C) containing 8 M Urea、0.1 SDS ; 泳動条件 : 電流10 mA、2時間、泳動用緩衝液25mM Tris、192mM Glycine、0.1% SDS)。mRNAディスプレイ産物をSA-ビーズ (Dynabeads MyOne Streptavidin C1)を使用して精製する。

40

mRNAディスプレイ産物が結合したSA-ビーズと逆転写用試薬を以下のとおり混合する。

mRNAディスプレイ産物が結合したビーズ	全量
5 \times ReverTraAce buffer (TOYOBO)	8 μ l
2.5 mM dNTP mix	16 μ l
RNase-free water	up to 15 μ l
ReverTraAce Enzyme (TOYOBO)	1 μ l

【0092】

ビーズを含む溶液を42℃で20分混和しながらインキュベートした後、上澄みを除去する。100 μ lの5 mM imidazole in PBS500で2回洗浄する。0.5 μ lのRNase

50

T 1 (1 0 0 0 U / μ l) を 3 9 . 5 μ l の ビーズ を 含む 5 mM imidazole in PBS500 に 加える。3 7 °C で 2 0 分 間 インキュベート し、上 澄み を 回収 する。さら に、ピ ューロ マイ シン に 連 結 し て い る ペ プ チ ド 鎖 を 精 製 し (His Mag sepharose Ni-ビーズ、バ イ オ ス ピ ン カ ラ ム、Xa)、c D N A デ ィ ス プ レ イ を 得 る。

【 0 0 9 3 】

実験方法 2 : In vitro selection 法

得られた c D N A デ ィ ス プ レ イ に つ い て、selection-by-function 法 を 使 用 し て カ テ プ シ ン E 活 性 化 ペ プ チ ド を 選 択 する。カ テ プ シ ン E を 固 定 化 し た N H S - ビ ー ズ (NHS Mag Sepharose, GE Healthcare) を 用 意 する。c D N A デ ィ ス プ レ イ を、カ テ プ シ ン E 固 定 化 N H S - ビ ー ズ を 含 む Selection buffer (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH 7.4) 中 で、2 5 °C で 1 0 分 間 インキュベート する。非 結 合 D N A 分 子 を Selection buffer に よ り 3 回 洗 浄 除 去 する。カ テ プ シ ン E 固 定 化 N H S - ビ ー ズ に 結 合 し た D N A 分 子 を カ テ プ シ ン E 蛋 白 分 解 反 応 に 適 し た 温 度 (3 7 °C) で インキュベート する。Wash buffer (5 0 mM Tris-HCl, 1.0 mM NaCl pH 7.4) に よ り 洗 浄 し、elution buffer (25% NH₃) で 6 5 °C、1 0 分 間 溶 出 さ せ る。ビ ー ズ か ら 溶 出 し た D N A 分 子 は 大 部 分 が カ テ プ シ ン E の 増 強 さ れ た タ ン パ ク 質 分 解 反 応 に よ っ て 生 成 さ れ る と 想 定 可 能 な の で、次 の 評 価 工 程 の た め に 回 収 する。こ の 手 順 を、カ テ プ シ ン E 蛋 白 分 解 反 応 の た め の 反 応 時 間 を 短 く し て、3 回 繰 り 返 す (1min、20sec、10sec)。最 終 産 物 を ク ロ ー ニ ン グ お よ び 配 列 決 定 に 供 し て、点 置 換 体 四 次 ラ イ ブ ラ リ ー 淘 汰 産 物 で あ る カ テ プ シ ン E 活 性 化 ペ プ チ ド を 同 定 し た。

【 0 0 9 4 】

実験方法 3 : カ テ プ シ ン E 活 性 化 ペ プ チ ド の 評 価

選 択 さ れ た ペ プ チ ド に よ る カ テ プ シ ン E 活 性 に つ い て の 促 進 活 性 を 決 定 する た め に、ペ プ チ ド を in vitro 翻 訳 ま た は 化 学 合 成 に よ り 合 成 し た。2 0 n M カ テ プ シ ン E と 選 択 さ れ た ペ プ チ ド を Selection buffer (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH7.4) 中、2 5 °C で 1 0 分 間 前 も っ て インキュベート する。次 に 蛍 光 基 質 (MOCac-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH₂: 配 列 番 号 1 0 2) を 5 μ M 加 え、3 7 °C で 1 時 間 反 応 さ せ る。蛍 光 測 定 器 を 用 い て 蛍 光 強 度 を 4 4 0 n m (励 起 3 4 0 n m) で 観 察 する。カ テ プ シ ン E は 通 常、酸 性 p H で 機 能 する が、中 性 p H (7 . 4) で 感 受 性 の 蛍 光 発 生 基 質 は、S. B.P. Athauda and K. Takahashi (Protein and Peptide Letters, vol.9, no.1, pp.15-22, 2002) ら の 文 献 を も と に 設 計 さ れ た。

【 0 0 9 5 】

カ テ プ シ ン E の 活 性 (%) は 以 下 の 計 算 式 か ら 導 いた。

$$A = 100 \times \frac{(S_f - B_f)}{(C_f - B_f)} [\% \text{ activation}], \quad (1)$$

S f は 選 択 さ れ た ペ プ チ ド の 存 在 下 で の カ テ プ シ ン E 反 応 の 蛍 光 強 度、C f は 選 択 さ れ た ペ プ チ ド の 不 在 下 で の カ テ プ シ ン E 反 応 の 蛍 光 強 度、B f は 蛍 光 基 質 の み を 含 む 溶 液 の バ ッ ク グ ラ ウ ン ド 蛍 光 で あ る。ペ プ チ ド 不 在 化 で カ テ プ シ ン E の 活 性 は 1 0 0 % と な る。な お、図 5 お よ び 1 0 の グ ラ フ は、縦 軸 の 標 記 は 活 性 促 進 度 合 で あ り、カ テ プ シ ン E の 活 性 と し て は、こ の 数 値 に 1 0 0 % を 加 え た も の で あ る。

【 0 0 9 6 】

実験方法 4 : 加 算 的 点 置 換 体 四 次 ラ イ ブ ラ リ ー の 設 計 と 構 築

オ リ ゴ マ ー を 用 い て、D N A の ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン と 伸 長 反 応 を 行 う こ と に よ り 新 た な ラ イ ブ ラ リ ー を 作 製 する。ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン 試 薬 を 以 下 の と お り 混 合 する。

10 x Ex taq Buffer	2.5 μ l
2.5 mM dNTP mixture	2 μ l
Hybridization oligomer	各 100 pmol
Template DNA	500 ng

D.D.W up to 25 μ l

Ex Taq (5 U/ μ l)(TaKaRa) 0.125 μ l

各ハイブリダイゼーションステップにおいて、同じチューブのままで多段階反応させる

以下のサイクルで反応を行う:95 =2min 25 (35) =5min 40 =10min 72 =5min。但し、ハイブリダイゼーション温度は各オリゴマーのT_mに対して変更する。

【0097】

上記サイクルを6回行い、断片をつなぎ合わせる。最終産物を通常のプライマーを用いたPCRによって増幅させることにより、加算的 point mutation 四次ライブラリーを得る。

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明の範囲は、実施例に限定されない。

10

【実施例】

【0098】

実施例1：機能淘汰型 cDNA ディスプレイ

以前得られた三次ライブラリーの淘汰産物（非特許文献14）に対してさらにアミノ酸配列に point mutation を加えて得られる point mutation 四次ライブラリーを図1のコンストラクトから作製した。

通常の cDNA ディスプレイ法に対して、Selection-by-Function法を導入して行う *in vitro* selection（図2の左挿入図参照）においては、いわゆる cDNA ディスプレイ部分は、cDNA部分（情報）+リンカー+ペプチド（機能）からなるが、このペプチド部分の先頭にカテプシンEの基質配列が仕組まれている。そのために、カテプシンEにペプチドが結合したときに、結合様式（阻害/中立/活性化）によっては、カテプシンEを活性化する場合があり、そのとき、「馬の鼻先にニンジン垂らした状態」になり、基質部分が切断されることになる。その場合は、ペプチドの機能領域はカテプシンEに結合したままであるが、DNA部分は基質部分のペプチドの開裂によりフリーになり溶液中に出てくる。逆に、ペプチドがカテプシンEを阻害するときには切断が起こらず、cDNA ディスプレイ全体はカテプシンEに結合し溶液中にはDNAはでてこない。この原理を利用して、切断されたDNA断片をアクリルアミドゲル電気泳動で確認した実験を図3に示す。この一連の *in vitro* selection法で選択された cDNA ディスプレイ（レーン6）は、洗浄後に選択工程を経ていない cDNA ディスプレイ（レーン5）と比較して濃いバンド（524bp）を示した。

20

30

【0099】

実施例2：point mutation 四次ライブラリー淘汰産物の配列決定

次に point mutation 四次ライブラリーの淘汰産物の配列を決定した。合計62クローン、42種類の配列を決定した。結果を図4に示す。特に21番目のアミノ酸ThrがSerに変異した配列が10コピー、20番目のLeuがGluに変異した配列が3コピー得られた。リンカー配列にもアミノ酸置換があったが本来 point mutation を加えた箇所ではないためPCR由来による非意図的有利変異であると考えられる。

【0100】

実施例3：カテプシンEに対する point mutation ペプチドの機能評価

淘汰産物である42種類のクローン配列の内、同一の配列が得られた7クローン、ランダムに選んだ6クローン、変異を加えていない三次ライブラリー淘汰産物（CEAP3）の計14クローンについて無細胞翻訳を行い、実験方法3に従って、ペプチドによるカテプシンEの機能促進能を検証した。結果を図5に示す。

40

特に取得クローンの内コピー数が多かった変異T21SまたはL20Eを有するペプチドが三次ライブラリー淘汰産物（CEAP3）に比べてそれぞれ約35%、38%の上昇がみられた。一方、変異C4Y、G1V、またはA22Rを有するペプチドにおいては、CEAP3と比較してわずかに低い活性促進能を示した。また、変異V13Mを有するペプチドにおいては10%ほどの減少度が確認された。また、出現頻度の高かった21番目のセリンは元のトレオニン（T）と同じ親水性、20番目のグルタミン酸は酸性を示す極性電荷側鎖アミノ酸であり、親水性アミノ酸がカテプシンEの活性促進に関与しているこ

50

とが示唆される。

【 0 1 0 1 】

実施例 4：加算的 point mutation library の作製

次に、実施例 3 の結果に基づいて、複数の point mutation を組み合わせた加算的 point mutation library を作製した。

表 3 に示したオリゴマー（配列番号 46 から 74）を用いて、実験方法 4 に記載した DNA のハイブリダイゼーションおよび伸長反応を行うことにより新たな library を作製した。仮にすべての point mutation 候補が導入された場合には、アミノ酸配列：NCPYADFKVEVQMEVAEPESALHLSPGW（配列番号 103）が作成される。

【 0 1 0 2 】

【表 3】

F145	ATTGAAGGTCGTAAGTGGCCATATGCGGACTTT
F45	ATTGAAGGTCGTGGCTGGCCATATGCGGACTTT
F15	ATTGAAGGTCGTAAGTGGCCATGCGCGGACTTT
F14	ATTGAAGGTCGTAAGTGGCCATATATTGACTTT
F5	ATTGAAGGTCGTGGCTGGCCATGCGCGGACTTT
F1	ATTGAAGGTCGTAAGTGGCCATGCATTGACTTT
F4	ATTGAAGGTCGTGGCTGGCCATATATTGACTTT
FW145	ATTGAAGGTCGTGGCTGGCCATGCATTGACTTT
St145	ATTGAAGGTCGTTTCTGGCCATTCTTCGACTTT
R8	CTGAACCTCCACCTTAAAGTC
RW8	CTGAACCTCCACCATAAAGTC
St8	CTGAACCTCCACCAGGAAGTC
R13	TGCCTCCGCTACCTCCATCTGAACCTCCAC
R13W	TGCCTCCGCTACCTCCACCTGAACCTCCAC
St13	TGCCTCCGCTACCTCTCCCTGAACCTCCAC
R19	TAATGCTGTCAGCGGTGCCTCCGCTAC
R20	TAATGCTGTTTCTAATGCCTCCGCTAC
R19-20	TAATGCGCTCAGTAATGCCTCCGCTAC
R19-21	TAATGCGCTCAGCGGTGCCTCCGCTAC
R20-21	TAATGCGCTTTCTAATGCCTCCGCTAC
R19-20-21	TAATGCGCTTTCCGGTGCCTCCGCTAC
R19W	TAATGCTGTCAGTAATGCCTCCGCTAC
R19st	TAATGCGCCGCGAATGCCTCCGCTAC
R24	TCCAGGAGATAAATGTAATGC
R24W	TCCAGGAGATAATGATAATGC
R24st	TCCAGGAGATAAGCCTAATGC
R29	CTTGCTGGTGGCCGTCATCACCATCCAGGA
R29W	CTTGCTGGTGGCCGTCATCACGATCCAGGA
R29st	CTTGCTGGTGGCCGTCATCAGAATCCAGGA

【 0 1 0 3 】

加算的 point mutation library を電気泳動で確認した（図 6、レーン 3）。また、伸

10

20

30

40

50

長反応によるライブラリー全体が正確に構築されていることをダイレクトシーケンスにより確認した(図7)。次の淘汰工程に必要な配列が構築できたことを確認した。その他の点置換においては、最低でも50%の割合で変異が加わった配列が得られた。G1N、C4Y、I5Aの点置換においては、変異が加わっていない配列が優勢であった。

【0104】

実施例5：加算的点置換体四次ライブラリーの淘汰と評価

実施例4で作成した加算的点置換体四次ライブラリーについて、実験方法1から3に従って、cDNAディスプレイを作製し、カテプシンEと反応させることにより選択された加算的点置換体四次ライブラリー淘汰産物を得た。この淘汰産物をダイレクトシーケンス法で分析した。得られた塩基配列波形を図8に示す。

10

淘汰前後のDNA塩基配列の波形より、M8Kの変異においては、2番目の塩基が淘汰前ではほとんど同程度の強度を示していたが、Metを示すATGのコードンからLysを示すAAGのコードンが強い強度を示していた。同様にS29Wでは淘汰前はSerを示すTCGとTrpを示すTGGのコードンが同程度の強度であったが、淘汰後はTrpに対応するコードンがより強い強度を示した。また、点置換体四次ライブラリー淘汰産物の中でもっとも高い活性を示したL20E、T21Sについても淘汰によってwild typeに近い配列に収束した。これらの結果は、M8K、S29Wの変異をもつペプチドがカテプシンEの活性をより促進する作用を持つことを示唆する。

【0105】

実施例6：加算的点置換体四次ライブラリー淘汰産物の配列決定

20

加算的点置換体四次ライブラリーに対して2ラウンドの淘汰を行って得られた淘汰産物のアミノ酸配列を図9に示す。興味深いことには、元の点置換体4次ライブラリー淘汰産物中で、一番高い活性促進能を持つT21SとL20Eの加算的点置換体は選択されなかった。このことは単純な推論では及ばない配列空間形状の複雑性、すなわち、タンパク質の立体構造の形状やその機能に関して、個々のアミノ酸の寄与だけではなく、それらの相互関係が重要であるということを示している。

変異体として、M8K、V13M、S29Wの変異が多く見られ、これらの2点、3点の加算的点置換体配列も得られた。また、点置換体四次ライブラリーの淘汰産物の中で最も活性の高かった2クローンの中のT21Sの変異が加わった加算的点置換体配列も得られた。

30

【0106】

実施例7：加算的点置換体四次ライブラリー淘汰産物の評価活性

2ラウンドの淘汰を行って得られた実験方法3に従ってカテプシンEに対する活性評価を行った。淘汰によって得られた13種類の配列と点置換体ライブラリー淘汰の際にカテプシンEに対する活性を調べていないM8K変異体ペプチドの計14種類について活性評価を行った結果を図10に示す。

特にM8Kの変異とS29Wの変異を持つ配列を含む加算的点置換体ペプチドは、カテプシンEを高く活性化した。点置換ペプチドの活性評価で得られた活性促進度に対して、非線形で正に相関した加算活性度が得られ、タンパク質科学的に合理的な結果となった(一般に単純加算にはならない)。このことで、加算的点置換体ライブラリーの有効性を実証できた。

40

カテプシンE活性の促進作用が最も高かった加算的点置換体四次ライブラリー淘汰産物は、カテプシンEの活性を218%に増大した。発達ライブラリー法第3段階の成果であるCEAP3との比較では、68%の上昇がみられた(MP04)。

【0107】

実施例8：解離定数による特徴づけ

実施例7で得られた加算的点置換体四次ライブラリー淘汰産物であるペプチドMP04とカテプシンEの結合親和性を、Biacore X100(GE Healthcare)を用いた表面プラズモン共鳴法(SPR法)により決定した。カテプシンEを、アミンカップリングキット(GE Healthcare、UK)を用いたアミンカップリング法によりBiacore

50

reセンサーチップNTA (GE Healthcare、UK) に固定化した。解離定数を決定するために、5つの異なる濃度 (200 μ M、40 μ M、8 μ M、1.6 μ M及び0.32 μ M) のペプチドMP04を相互作用に使用した。ペプチドMP04はあまり溶解性が高くないため、10% DMSOを実験で使用し、高い濃度のペプチド濃度で実験を行った。解離定数は、Evaluation Software version 2.0.1において、反応モデルは1:1結合を用いて算出した。結果を以下の表に示す。

【表4】

ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
3.278×10^{-5}	1.028×10^{-6}	3.137×10^{-12}	7.525×10^{-5}

10

ペプチドMP04 (配列番号91) の解離定数 (KD) は3.13 pMと算出された。従来の三次ライブラリーでは、1 nM以下の解離定数 (KD) でカテプシンEに結合するペプチドは開発されていない。本発明のペプチドは、1 nM以下の解離定数でカテプシンEに結合するため、生物試料中 (例えば血液中) に低濃度で含まれるカテプシンE (数 nM以下) を十分な精度で測定することができる。

【配列表フリーテキスト】

【0108】

配列番号1~41: カテプシンE活性化ペプチド

配列番号42~44: リンカー配列

配列番号45: コンストラクト

配列番号46~74: 表3に記載のオリゴマー

配列番号75~87: 図4に記載のペプチド

配列番号88~100: 図9に記載のペプチド

配列番号101及び102: カテプシンE基質

配列番号103及び104: 変異ペプチド

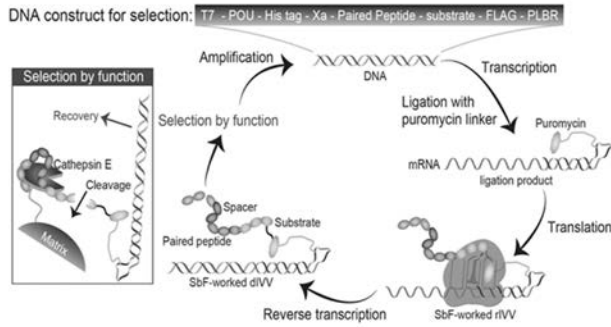
20

【 図 1 】

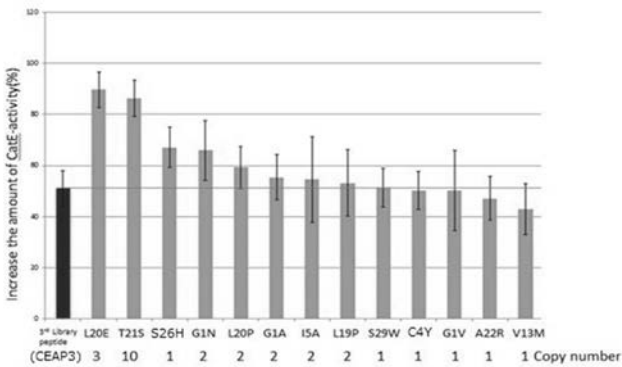
GATCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAAGTATTTTACAACA
 ATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTACATTTTACATCTACAAC
 TACAAGCCACCATGGACCTTGAGGAGCTTGAGCAGTTTGCCAAGACCTTCA
 AACAAAGACGAATCAAACCTTGATTCACTCAGGGTGATGTTGGGCTCGCTA
 TGGGGAAACTATATGGAAATGACTTCAGCCAACTACCATCTCTCGATTTGA
 AGCCTTGAACCTCAGCTTTAAGAACATGGCTAAGTTGAAGCCACTTTAGAG
 AAGTGGCTAAATGATGCAGAGGGGGAGGCAGCCATCATCATCATCATCAC
 GCGGAAGCATTGAAGTCTGGCTGCCATGCATTGACTTTATGGTGGGA
 GGTTCAGGTGGAGGTAGCGGAGGCATTACTGACAGCATTATCATTATCTCC
 TGGATCGGGAGGACGCCACCAACCATCTTTTTAGACTGAAGATTACGGG
 GGGCGCGGGGAA

スパーサ: 1~13, T7: 14~33, 5'cap: 34~36, Ω: 37~109, Kozak: 110~114, ATG: 115~117
 Pou: 118~330, GGS spacer: 331~342, His tag: 343~360, GGS spacer: 361~369
 Xa site: 370~381, Variable:382~468 (下線部), Spacer:469~474, CE Substrate 475~504,
 Ytag:505~525

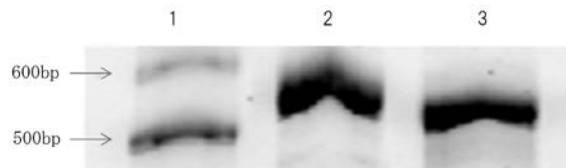
【 図 2 】



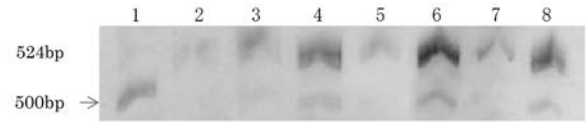
【 図 5 】



【 図 6 】



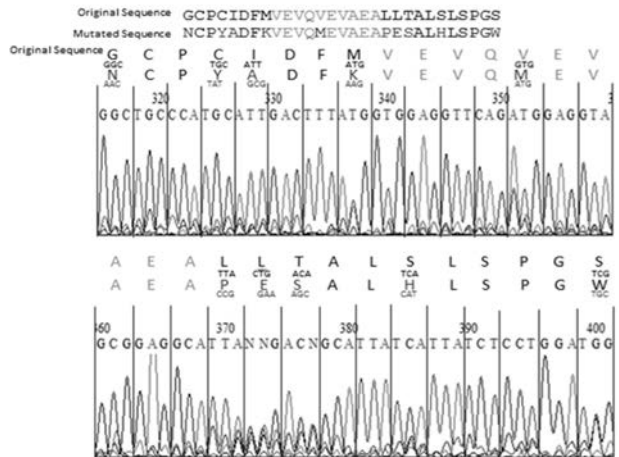
【 図 3 】



【 図 4 】

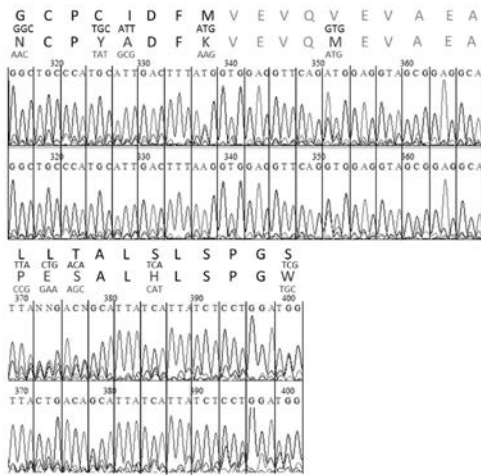
Sequence	Linker Region	Peptide
GCPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSPGS	リンカー領域	CEAP3
GCPCIDFMVEVQVEVAEALLSALSLSPGS		10 T21S
GCPCIDFMVEVQVEVAEAELETALSLSPGS		3 L20E
NCPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSPGS		2 G1N
ACPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSPGS		2 G1A
GCPCADFMEVQVEVAEALLTALSLSPGS		2 I5A
GCPCIDFMVEVQVEVAEAPLTALSLSPGS		2 L20P
GCPCIDFMVEVQVEVAEALPTALSLSPGS		2 L19P
GCPYIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSPGS		1 C4Y
GCPCIDFMVEVQVEVAEALLTRLALSLSPGS		1 A22R
GCPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSHPGS		1 S26H
VCPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSPGS		1 G1V
GCPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSPGW		1 S29W
GCPCIDFMVEVQMEVAEALLTALSLSPGS		1 V13M

【 図 7 】



【 8 】

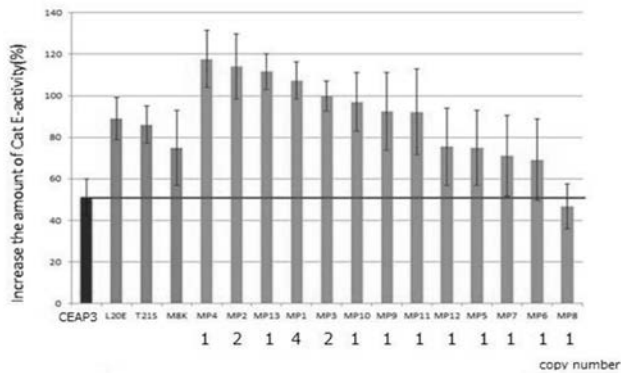
GCPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSPGS



【 9 】

	0	1	2
CEAP3	12345678901234567890123456789		
Mutated peptide	GCPCIDFMVEVQVEVAEALLTALSLSPGS	NCPCADF KVEVQMEVAE APES AL HL SPGW	
MP01:	GCPCIDF K VEVQVEVAEALLTALSLSPGW		4
MP02:	GCPCIDF K VEVQMEVAEALLTALSLSPGW		2
MP03:	GCPCIDF K VEVQMEVAEALLTALSLSPGS		2
MP04:	GCPCIDF K VEVQVEVAEALL S ALSLSPGW		1
MP05:	GCPC I DFMVEVQMEVAEALLTALSLSPGW		1
MP06:	GCPC V DFKVEVQVEVAEALLTALSLSPGS		1
MP07:	GCPCIDF K VEVQVEVAE A QLTALSLSPGS		1
MP08:	GC T CIDLMVEVQMEVAEALLAALSLSPGS		1
MP09:	GCP H IDFKVEVQVEVAEALLTALSLSPGW		1
MP10:	GCPC A DFKVEVQMEVAEAL S TALSLSPGS		1
MP11:	L CPCIDFKVEVQMEVAEAL Q TALSLSPGW		1
MP12:	GCPC A DFMVEVQMEVAEAL T LALSLSPGW		1
MP13:	GCPCIDF K VEVQMEVAEALL TAL H LSPGW		1

【 10 】



【配列表】

2020029403000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年8月20日(2018.8.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2020029403000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N 33/483 (2006.01)	G 0 1 N 33/483	F
G 0 1 N 27/00 (2006.01)	G 0 1 N 27/00	J
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	
C 0 7 K 17/00 (2006.01)	C 0 7 K 17/00	

(72)発明者 黒田 大斗

埼玉県さいたま市桜区下大久保 2 5 5 国立大学法人埼玉大学内

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA20 FB05 GC18
 2G060 AA15 AD06 AF15 DA19 GA04
 4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ36 QQ42 QR16 QR82 QS02 QS32
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19 BA23 CA53 DC50 NA14 ZB261
 ZC191
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA18 BA60 DA89 EA20 EA50 FA10
 FA80