

明 細 書

発明の名称： K L K 5 阻害ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、ペプチドの製造方法、かかる方法により得られるペプチド、ペプチドを含むコンジュゲート、ペプチド又はコンジュゲートを含む組成物、医薬組成物、各種疾患の治療又は予防のための医薬組成物、各種疾患の治療又は予防のためのペプチド又はコンジュゲートの使用、ペプチド又はコンジュゲートを投与する工程を含む各種疾患の治療方法、ペプチド又はコンジュゲートを含む各種疾患の診断又は検査のための組成物等に関する。

背景技術

[0002] カリクレイン5 (K a l l i k r e i n 5 ; K L K 5) はトリプシン様セリンプロテアーゼ (C l a n P A, f a m i l y S 1) であり、s t r a t u m c o r n e u m t r y p t i c e n z y m e (S C T E) とも呼ばれる。カリクレイン7 (K a l l i k r e i n 7 ; K L K 7) はキモトリプシン様プロテアーゼ (C l a n P A, f a m i l y S 1) であり、s t r a t u m c o r n e u m c h y m o t r y p t i c e n z y m e (S C C E) とも呼ばれる。また、カリクレイン14 (K a l l i k r e i n 1 4 ; K L K 1 4) はトリプシン様プロテアーゼ (C l a n P A, f a m i l y S 1) である。K L K 5、K L K 7及びK L K 1 4は、1 5種の非常に保存されたトリプシン又はキモトリプシン様セリンプロテアーゼから成る組織カリクレインファミリーに属している。K L K 5は細胞で発現した後、自己活性化により活性型K L K 5へと変換されるのに対し、K L K 7及びK L K 1 4は、不活性型であるプレプロ酵素として発現し、K L K 5に代表されるプロテアーゼによってプレプロ配列が切断され、活性型へと変換される（非特許文献1）。K L K 5は皮膚において発現が認められており、D e s m o g l e i nやD e s m o c o l l i nなどの細胞接着に

関わる因子を分解することが報告されている（非特許文献2）。KLK5、KLK7及びKLK14は皮膚落屑に重要とされており、さらにプロテアーゼ受容体2（proteinase-activated receptor 2；PAR-2）の活性化に関与する（非特許文献3）。PAR-2の活性化によりサイトカインやケモカインが誘導され、免疫や炎症反応などが増強される。

[0003] ネザートン症候群（Netherton syndrome）は常染色体劣性遺伝により、重度の皮膚炎症や落屑、毛髪異常、また喘息やアレルギー性皮膚炎などのアレルギー症状を伴う魚鱗癬症候群の1つで、希少疾患である（OMIM256500）（非特許文献4）。出生時から剥脱性皮膚炎を発症するため、皮膚バリア機能の著しい損傷に起因する脱水や感染症などを示し、発育遅延を伴うこともある。詳細な疫学データは無いが、高い生後死亡率を示すとされている。ネザートン症候群は、皮膚上皮細胞に発現するセリンプロテアーゼインヒビター（LEKTI）をコードする遺伝子（SPINK5）変異に伴うLEKTIの機能欠損（loss of function）により発症する。LEKTIは15個のKazal様インヒビタードメインから成るが、ネザートン症候群患者では各ドメインをコードするSPINK5において複数の変異箇所が見つかっており、変異箇所に関連して症状や重篤度が変化する（非特許文献4、5）。

[0004] SPINK5欠損マウス（Spink5^{-/-}）はネザートン症候群様の皮膚症状を示し、皮膚上皮においてKLK5やKLK7の高いプロテアーゼ活性が認められる（非特許文献1）。SPINK5欠損マウスは生後数時間で致死になるが、SPINK5欠損マウスにKLK5欠損マウスを交配させたマウス（Spink5^{-/-}Klk5^{-/-}）では新生児致死率の改善が報告されている（非特許文献6）。また、Spink5^{-/-}Klk5^{-/-}マウスでは、Spink5^{-/-}で認められた重篤な皮膚バリアの欠損や上皮構造の欠陥、皮膚炎症などが回復している。同様に、ネザートン症候群の患者で認められたSPINK5変異Spink5^{A135X/A135X}を持つマウスはネザートン症候群

様の皮膚症状を示し、生後12時間以内に死亡が観察されるのに対し、KLK5欠損マウスを掛け合わせた $Klk5^{-/-}Spink5^{A135X/A135X}$ では皮膚バリア及び重篤な皮膚症状が改善している（非特許文献7）。さらに、KLK7欠損マウスを掛け合わせることで（ $Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Spink5^{A135X/A135X}$ ）、皮膚症状の異常は認められなくなる。KLK5トランスジェニックマウスもネザートン症候群様の皮膚症状を示すことが報告されている（非特許文献8）。ネザートン症候群の患者及びネザートン症候群モデルマウスの角質層においては、トリプシン様及びキモトリプシン様の高いプロテアーゼ活性が認められており、KLK5に加え、KLK7やKLK14など下流に位置するカリクレインファミリーが角質層のプロテアーゼ活性に関与することが示唆される。以上のことから、ネザートン症候群はSPINK5の遺伝子変異を原因として、角質において異常に亢進したKLK5又はKLK7、KLK14プロテアーゼ活性を伴うことで発症すると考えられる。現在は保湿剤の塗布をはじめとする対症療法しか存在せず、根本的治療薬は存在しない。

[0005] KLK5は顔面の慢性炎症性疾患である酒さとの関連も示唆されている。酒さ患者では、KLK5及び抗菌ペプチドCathelicidinの発現上昇が報告されている。その病因の詳細は不明であるが、発現亢進したKLK5がCathelicidinを分解することにより、酒さの原因となるペプチドを産生すると考えられている（非特許文献9）。

[0006] SPINK5の多型は、アトピー性皮膚炎の重症度と関連するという複数の報告がある（非特許文献10～14）。420番目のアミノ酸残基がリジンであるLEKTIをコードするSPINK5遺伝子を両アレルに有するアトピー性皮膚炎患者の皮膚では、グルタミン酸を両アレルにコードする場合に比べ、Desmoglein1のタンパクレベルでの発現低下や、KLK5やKLK7をはじめとするプロテアーゼ活性が高くなっていることが報告されている（非特許文献15）。これらのプロテアーゼの活性化は、皮膚バリア機能の低下によるアレルゲンの侵入を容易にし、また、炎症反応が生じ

やすい状態を作り出すと考えられる。

- [0007] SPINK2 (Serine Protease Inhibitor Kazal-type 2) は、3つのジスルフィド結合を有するKazal様ドメインであり、trypsin/acrosin inhibitorとして機能する（非特許文献16）が、SPINK2及びその変異体と、ネザートン症候群や酒さ、アトピー性皮膚炎等の疾患との関係は明らかにされていない。

先行技術文献

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：オバエア ピー他 (Ovaere P, et al.) (2009年刊) トレンズ・イン・バイオケミカル・サイエンス (Trends Biochem Sci.) 34巻 (9号) : 453-463頁
- 非特許文献2：デスカルガス ピー他 (Descargues P, et al.) (2005年刊) ネイチャー・ジェネティックス (Nat Genet.) 37巻 (1号) : 56-65頁
- 非特許文献3：ラッテンホール エイ他 (Rattenholl A, et al.) (2008年刊) ドラッグ・ニュース・アンド・パースペクティブズ (Drug News Perspect.) 21巻 (7号) : 369-381頁
- 非特許文献4：ホフナニアン エー (Hovnanian A.) (2013年刊) セル・ティッシュ・リサーチ (Cell Tissue Res.) 351巻 (2号) : 289-300頁
- 非特許文献5：サリ シーエー他 (Sarri CA, et al.) (2017年刊) モレキュラー・ダイアグノシス・アンド・セラピー (Mol Diagn Ther.) 21巻 (2号) : 137-152頁
- 非特許文献6：フリオ エル他 (Furio L, et al.) (2015年刊) プロス・ジェネティックス (PLoS Genet.) 11巻 (9号) : e1005389

非特許文献7: カスパレク ピー他 (Kasperek P, et al.)
(2017年刊) プロス・ジェネティクス (PLOS Genet.) 13
巻 (1号) : e1006566

非特許文献8: フリオ エル他 (Furio L, et al.) (2014
年刊) ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン (J Exp
Med.) 211巻 (3号) : 499-513頁

非特許文献9: ヤマサキ ケイ他 (Yamasaki K, et al.) (2007
年刊) ネイチャー・メディスン (Nat Med.) 13巻 (8
号) : 975-980頁

非特許文献10: ニシオ ワイ他 (Nishio Y, et al.) (2003
年刊) ジーンズ・アンド・イムニティ (Genes Immun.) 4
巻 (7号) : 515-517頁

非特許文献11: クスノキ ティー他 (Kusunoki T, et al.)
(2005年刊) ジャーナル・オブ・アレルギー・アンド・クリニカル
イムノロジー (J Allergy Clin Immunol.) 4巻 (7
号) : 515-517頁

非特許文献12: ラン シーシー他 (Lan CC, et al.) (2011
年刊) エクスペリメンタル・ダーマトロジー (Exp Dermatol.) 20
巻 (12号) : 975-979頁

非特許文献13: カトウ エイ他 (Kato A, et al.) (2003
年刊) ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ダーマトロジー (Br J
Dermatol.) 148巻 (4号) : 665-669頁

非特許文献14: ツァオ エルピー他 (Zhao LP, et al.) (2012
年刊) ジャーナル・オブ・ヨーロピアン・アカデミー・オブ・ダーマ
トロジー・アンド・ヴァニアリアラジー (J Eur Acad Dermatol
Venereol.) 26巻 (5号) : 572-577頁

非特許文献15: フォルツノ ピー他 (Fortugno P, et al.)
(2012年刊) ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス (Hu

m Mol Genet.) 21巻(19号): 4187-4200頁
非特許文献16: チェン ティー他 (Chen T, et al.) (2009年刊) プロテインズ (Proteins.) 77巻(1号): 209-219頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 新規なKLK5阻害ペプチド、該ペプチドを含有するコンジュゲート、該ペプチド又は該コンジュゲートを含有する医薬組成物等を提供すること。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は

(1)

配列番号61(図69)で示されるアミノ酸配列を含み、且つ、活性型ヒトKLK5の有するプロテアーゼ活性を阻害する、SPINK2変異体ペプチド、

(2)

ヒトKLK7又はヒトKLK14の有するプロテアーゼ活性を阻害する、

(1)記載のペプチド、

(3)

該阻害がヒトKLK5及び任意でヒトKLK7又はKLK14選択的である、(1)記載のペプチド、

(4)

16番Xaa(X₁)はAla、Asp、Gly、Gln、Leu、Ser又はThrである、(1)乃至(3)のいずれか一つに記載のペプチド、

(5)

17番Xaa(X₂)はArg、Glu、Asn、Gln又はSerである、(1)乃至(4)のいずれか一つに記載のペプチド、

(6)

18番Xaa(X₃)はAsp、Gln、Ile、Thr、Trp又はTy

rである、(1)乃至(5)のいずれか一つに記載のペプチド、

(7)

19番Xaa(X₄)はArg、Gly、Met、Gln又はThrである、
(1)乃至(6)のいずれか一つに記載のペプチド、

(8)

20番Xaa(X₅)はAsp、Glu、Leu、Lys、Thr又はTyrである、(1)乃至(7)のいずれか一つに記載のペプチド、

(9)

21番Xaa(X₆)はGlu、Gly、His、Leu、Ser、Gln又はTyrである、(1)乃至(8)のいずれか一つに記載のペプチド、

(10)

22番Xaa(X₇)はAsp、Gly、Gln、Ser又はTyrである、
(1)乃至(9)のいずれか一つに記載のペプチド、

(11)

24番Xaa(X₈)はAla、Asp、Glu、Gly、Asn、Ser又はThrである、(1)乃至(10)のいずれか一つに記載のペプチド、

(12)

25番Xaa(X₉)はArg又はLysである、(1)乃至(11)のいずれか一つに記載のペプチド、

(13)

26番Xaa(X₁₀)はAsp、Glu、Gln、Ser又はValである、(1)乃至(12)のいずれか一つに記載のペプチド、

(14)

27番Xaa(X₁₁)はPhe又はTyrである、(1)乃至(13)のいずれか一つに記載のペプチド、

(15)

28番Xaa(X₁₂)はAsp又はGluである、(1)乃至(14)のいずれか一つに記載のペプチド、

(16)

配列番号6、8、10、12、14、16、18及び20(図14、16、18、20、22、24、26及び28)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至63を含む、(1)乃至(15)記載のいずれか一つに記載のペプチド、

(17)

16番Xaa(X_1)はGly、Met又はTyrである、(1)乃至(3)のいずれか一つに記載のペプチド、

(18)

17番Xaa(X_2)はGlu、Gln又はThrである、(1)乃至(3)及び(17)のいずれか一つに記載のペプチド、

(19)

18番Xaa(X_3)はHis、Met又はTyrである、(1)乃至(3)、(17)及び(18)のいずれか一つに記載のペプチド、

(20)

19番Xaa(X_4)はAla、Arg、Lys又はGlnである、(1)乃至(3)及び(17)乃至(19)のいずれか一つに記載のペプチド、

(21)

20番Xaa(X_5)はGly、Arg又はSerである、(1)乃至(3)及び(17)乃至(20)のいずれか一つに記載のペプチド、

(22)

21番Xaa(X_6)はArg、Lys、Gln又はSerである、(1)乃至(3)及び(17)乃至(21)のいずれか一つに記載のペプチド、

(23)

22番Xaa(X_7)はGlyである、(1)乃至(3)及び(17)乃至(22)のいずれか一つに記載のペプチド、

(24)

24番Xaa(X_8)はHis、Thr又はTyrである、(1)乃至(3)

) 及び (17) 乃至 (23) のいずれか一つに記載のペプチド、

(25)

25番Xaa (X₉) はHis又はTyrである、(1) 乃至 (3) 及び (17) 乃至 (24) のいずれか一つに記載のペプチド、

(26)

26番Xaa (X₁₀) はAsp、Glu又はHisである、(1) 乃至 (3) 及び (17) 乃至 (25) のいずれか一つに記載のペプチド、

(27)

27番Xaa (X₁₁) はTyrである、(1) 乃至 (3) 及び (17) 乃至 (26) のいずれか一つに記載のペプチド、

(28)

28番Xaa (X₁₂) はAsp又はGluである、(1) 乃至 (3) 及び (17) 乃至 (27) のいずれか一つに記載のペプチド、

(29)

配列番号22、24、26及び28 (図30、32、34及び36) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至63を含む、(1) 乃至 (3) 及び (17) 乃至 (28) 記載のいずれか一つに記載のペプチド、

(30)

16番Xaa (X₁) はGly、Ser又はTyrである、(1) 乃至 (3) のいずれか一つに記載のペプチド、

(31)

17番Xaa (X₂) はAsp又はGlnである、(1) 乃至 (3) 及び (30) のいずれか一つに記載のペプチド、

(32)

18番Xaa (X₃) はThr又はValである、(1) 乃至 (3)、(30) 及び (31) のいずれか一つに記載のペプチド、

(33)

19番Xaa (X₄)はThr又はValである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(32)のいずれか一つに記載のペプチド、

(34)

20番Xaa (X₅)はGlu又はThrである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(33)のいずれか一つに記載のペプチド、

(35)

21番Xaa (X₆)はHis又はThrである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(34)のいずれか一つに記載のペプチド、

(36)

22番Xaa (X₇)はTyrである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(35)のいずれか一つに記載のペプチド、

(37)

24番Xaa (X₈)はAsn又はSerである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(36)のいずれか一つに記載のペプチド、

(38)

25番Xaa (X₉)はArgである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(37)のいずれか一つに記載のペプチド、

(39)

26番Xaa (X₁₀)はAsp又はGluである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(38)のいずれか一つに記載のペプチド、

(40)

27番Xaa (X₁₁)はTyrである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(39)のいずれか一つに記載のペプチド、

(41)

28番Xaa (X₁₂)はAspである、(1)乃至(3)及び(30)乃至(40)のいずれか一つに記載のペプチド、

(42)

配列番号30及び32(図38及び40)のいずれか一つで示されるアミ

ノ酸配列のアミノ酸番号 1 乃至 63 を含む、(1) 乃至 (3) 及び (30) 乃至 (41) 記載のいずれか一つに記載のペプチド、

(43)

3つのジスルフィド結合を有し、ループ構造、 α ヘリックス及び β シートを含むことで特徴付けられる立体構造を有する、(1) 乃至 (42) のいずれか一つに記載のペプチド、

(44)

(1) 乃至 (43) のいずれか一つに記載のペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、

(45)

(44) 記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

(46)

(44) 記載のポリヌクレオチド若しくは (45) 記載のベクターを含むか又は (1) 乃至 (43) のいずれか一つに記載のペプチドを産生する細胞、

(47)

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

(i) (46) 記載の細胞を培養する工程；

(ii) 該培養物から SPINK2 変異体ペプチドを回収する工程、

(48)

(1) 乃至 (43) のいずれか一つに記載のペプチドを化学合成又はイン・ビトロ翻訳により調製する工程を含む、該ペプチドの製造方法、

(49)

(47) 又は (48) 記載の方法により得られる SPINK2 変異体ペプチド、

(50)

(1) 乃至 (43) 及び (49) のいずれか一つに記載のペプチドに 1 つ又は 2 つ以上の任意の部分が結合してなるコンジュゲート、

(51)

1つの任意の部分が、SPINK2変異体ではない第2ペプチドを含む、

(50) 記載のコンジュゲート、

(52)

第2ペプチドが、SPINK2変異体のアミノ末端側に位置する、(51) 記載のコンジュゲート、

(53)

第2ペプチドが、SPINK2変異体のカルボキシル末端側に位置する、(51) 記載のコンジュゲート、

(54)

第2ペプチドが抗体又はその断片であり、且つ1つ又は2つ以上のFc領域を含む、(51)乃至(53)のいずれか一つに記載のコンジュゲート、

(55)

Fc領域がヒト免疫グロブリンのFc領域又はその断片である、(54) 記載のコンジュゲート、

(56)

Fc領域がIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、及び／又は、IgEのFc領域又はその断片である、

(54)又は(55) 記載のコンジュゲート、

(57)

Fc領域がヒトIgG1のFc領域又はその断片である、(54)乃至(56)のいずれか一つに記載のコンジュゲート、

(58)

ヒトIgG1のFc領域が、配列番号87(図95)で示されるアミノ酸配列を含む、(57) 記載のコンジュゲート、

(59)

Fc領域が野生型又は変異型である、(54)乃至(57)のいずれか一つに記載のコンジュゲート、

(60)

アミノ末端に1乃至数個のアスパラギン酸及び／又はグルタミン酸が付加してなる、(51)乃至(59)のいずれか一つに記載のコンジュゲート、

(61)

下記(i)又は(ii)に記載のアミノ酸配列を含む、(50)乃至(60)のいずれか一つに記載のコンジュゲート：

(i) 配列番号34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60及び96(図42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68及び106)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列；

(ii) 上記(i)に記載のアミノ酸配列と90%以上同一であり、且つKLK5の有するプロテアーゼ活性を阻害するコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列、

(62)

SPINK2変異体及び第2ペプチドが、リンカーを介して結合している、(51)乃至(61)のいずれか一つに記載のコンジュゲート、

(63)

リンカーが、SPINK2変異体及び第2ペプチドではない第3ペプチドである、(62)に記載のコンジュゲート、

(64)

下記工程(i)及び(ii)を含む、(50)乃至(63)のいずれか一つに記載のコンジュゲートの製造方法：

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

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

(65)

(50) 乃至 (63) のいずれか一つに記載の S P I N K 2 変異体ペプチドコンジュゲート又は該コンジュゲートに含まれるペプチド部分を化学合成又はイン・ビトロ翻訳により調製する工程を含む、該コンジュゲートの製造方法、

(66)

(64) 又は (65) 記載の方法により得られる S P I N K 2 変異体ペプチドコンジュゲート、

(67)

(1) 乃至 (43) 及び (49) のいずれか一つに記載のペプチドに結合する抗体又はその結合断片、

(68)

(1) 乃至 (43) 及び (49) のいずれか一つに記載のペプチド、(44) 記載のポリヌクレオチド、(45) 記載のベクター、(46) 記載の細胞、(50) 乃至 (63) 及び (66) のいずれか一つに記載のコンジュゲート、及び／又は、(67) 記載の抗体若しくはその結合断片を含む組成物、

(69)

(1) 乃至 (43) 及び (49) のいずれか一つに記載のペプチド、(44) 記載のポリヌクレオチド、(45) 記載のベクター、(46) 記載の細胞、並びに／又は、(50) 乃至 (63) 及び (66) のいずれか一つに記載のコンジュゲートを含む、医薬組成物、

(70)

K L K 5 関連疾患の治療又は予防のための、(69) 記載の医薬組成物、

(71)

K L K 5 関連疾患がネザートン症候群、アトピー性皮膚炎、酒さ、紫外線による皮膚傷害、乾癬、喘息、脊髄損傷、がん又は B a r r e t t 食道である、(70) 記載の医薬組成物、

(72)

他の医薬品と組み合わせて使用される、(69)乃至(71)記載のいずれか一つに記載の医薬組成物、

(73)

(1)乃至(43)及び(49)のいずれか一つに記載のペプチド、(44)記載のポリヌクレオチド、(45)記載のベクター、(46)記載の細胞、(50)乃至(63)及び(66)のいずれか一つに記載のコンジュゲート、及び／又は、(67)記載の抗体又はその結合断片を含む、検査用又は診断用組成物、

(74)

(67)記載の抗体又はその結合断片を用いたアフィニティー精製工程を含む、(47)、(48)、(64)及び(65)のいずれか一つに記載の方法、

(75)

下記工程(i)乃至(iii)を含む、KLK5阻害SPINK2変異体ペプチドの同定方法：

(i)被験SPINK2変異体ペプチド存在下及び非存在下で、KLK5プロテアーゼ及び基質を保温する工程；

(ii)被験SPINK2変異体ペプチド存在下及び非存在下におけるKLK5プロテアーゼ活性を測定する工程；及び、

(iii)該ペプチド存在下でのKLK5プロテアーゼ活性が、該ペプチド非存在下でのKLK5プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該ペプチドを陽性と判定する工程、

(76)

下記工程(i)乃至(iii)を含み、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32(図14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38及び40)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチド又は該ペプチドを含むコンジュゲートが参照化合物として使用される、KLK5阻

害化合物の同定方法：

(i) 被験化合物存在下及び非存在下で、K L K 5 プロテアーゼ及び基質を保温する工程；

(i i) 該化合物存在下及び非存在下におけるK L K 5 プロテアーゼ活性を測定する工程；及び、

(i i i) 該化合物存在下でのK L K 5 プロテアーゼ活性が、該化合物非存在下でのK L K 5 プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該化合物を陽性と判定する工程、

(77)

下記工程(i)乃至(i i i)を含む、K L K 5 阻害化合物の同定方法：

(i) 被験化合物のK L K 5 プロテアーゼ阻害活性を測定する工程；

(i i) 配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32(図14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38及び40)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチド又は該ペプチドを含むコンジュゲートである参照化合物のK L K 5 プロテアーゼ阻害活性を測定する工程；及び、

(i i i) 被験化合物のK L K 5 プロテアーゼ阻害活性が、参照化合物のK L K 5 プロテアーゼ阻害活性と同等又はより強い場合、該化合物を陽性と判定する工程、

(78)

下記工程(i)及び(i i)を含み、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32(図14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38及び40)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチド又該ペプチドを含むコンジュゲートが参照化合物として使用される、K L K 5 プロテアーゼ活性を測定する方法：

(i) K L K 5 プロテアーゼ、基質及び任意で他の成分を保温する工程；

(i i) 工程(i)の後、基質量及び／又は生成物量を測定する工程、

(79)

K L K 5 阻害 S P I N K 2 変異体ペプチド又は S P I N K 2 変異体ペプチドコンジュゲートであって、表面プラズモン共鳴分析において、該ペプチド又はコンジュゲートを固定化し、K L K 5 を添加することにより測定された K L K 5 に対する解離定数 (K_D) が $1 \times 10^{-9} M$ 以下である、該ペプチド又はコンジュゲート、

(80)

配列番号 34 (図 42) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(81)

配列番号 36 (図 44) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(82)

配列番号 38 (図 46) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(83)

配列番号 40 (図 48) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(84)

配列番号 42 (図 50) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(85)

配列番号 44 (図 52) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(86)

配列番号 46 (図 54) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(87)

配列番号 48 (図 56) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(88)

配列番号 50 (図 58) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(89)

配列番号 52 (図 60) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(90)

配列番号 54 (図 62) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(91)

配列番号56 (図64) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(92)

配列番号58 (図66) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、

(93)

配列番号60 (図68) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート、
及び、

(94)

配列番号96 (図106) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート
、
等に関する。

発明の効果

[0011] 本発明の提供するペプチド、該ペプチドを含有するコンジュゲート、及び、該ペプチド又は該コンジュゲートを含有する医薬組成物は、KLK5阻害活性を有し、KLK5関連疾患（後述）の治療又は予防等に有用である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1] ヒトKLK5、KLK7及びKLK14のアミノ酸配列類似性を比較した図。

[図2] ペプチド基質の分解速度を指標として、KLK5阻害ペプチドのKLK5阻害活性（50%阻害濃度： IC_{50} ）を示した図。KLK5阻害活性評価には終濃度10nMのKLK5及び終濃度100 μ MのBoc-Val-Pro-Arg-AMC（R&D Systems；ES011）を使用した。

[図3(A)] ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドの交差性を評価した図。Bovine trypsin阻害活性評価には、終濃度5nM trypsin（Pierce；20233）、終濃度100 μ M 基質ペプチドBoc-Val-Pro-Arg-AMC（R&D Systems；ES011）を用いた。Human trypsin

in阻害活性評価には、終濃度1nM trypsin (Sigma-Aldrich; T6424)、終濃度100μM 基質ペプチドBoc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)を用いた。Bovine α-chymotrypsin阻害活性評価には、終濃度10nM chymotrypsin (Worthington Biochemical Corporation; LS001434)、終濃度100μM 基質ペプチドSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3120-v)を用いた。

[図3(B)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドの交差性を評価した図。Human chymotrypsin阻害活性評価には、終濃度10nM chymotrypsin (Sigma-Aldrich; C8946)、終濃度10μM 基質ペプチドSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3120-v)を用いた。Human tryptase阻害活性評価には、終濃度1nM tryptase (Sigma-Aldrich; T7063)、終濃度100μM 基質ペプチドBoc-Phe-Ser-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3107-v)を使用した。Human chymase阻害活性評価には、終濃度100nM chymase (Sigma-Aldrich; C8118)、終濃度100μM 基質ペプチドSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3120-v)を用いた。

[図3(C)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドの交差性を評価した図。Human plasmin阻害活性評価には、終濃度50nM Plasmin (Sigma-Aldrich; P1867)、終濃度100μM 基質ペプチドBoc-Val-Leu-Lys-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3104-v)を用いた。Human thrombin阻害活性評価には、終濃度1nM thrombin (Sigma-Aldrich; T6884)、終濃度100μM 基質

ペプチドBoc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011) を用いた。Human neutrophil elastase阻害活性評価には、終濃度0.00001U/ μ L Neutrophil elastase (Enzo Life Sciences; BML-SE284)、終濃度100 μ M 基質ペプチドSuc(OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3153-v) を用いた。

[図3(D)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドの交差性を評価した図。Human matrilysin阻害活性評価には、終濃度1nM matrilysin (R&D Systems; 3946-SE)、終濃度100 μ M 基質ペプチドBoc-Gln-Ala-Arg-AMC (R&D Systems; ES014) を用いた。Human proteinase C阻害活性評価には、終濃度100nM proteinase C (Sigma-Aldrich; P2200)、終濃度100 μ M 基質ペプチドBoc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3112-v) を用いた。Human tPA阻害活性評価には、終濃度10nM tPA (Sigma-Aldrich; T0831)、終濃度100 μ M 基質ペプチドPyr-Gly-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3145-v) を用いた。

[図3(E)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドの交差性を評価した図。Human uPA阻害活性評価には、終濃度2nM uPA (Sigma-Aldrich; U0633)、終濃度100 μ M 基質ペプチドPyr-Gly-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3145-v) を用いた。Human plasma kallikrein阻害活性評価には、終濃度0.125 μ g/mL plasma kallikrein (R&D Systems; 2497-SE)、終濃度100 μ M 基質ペプチドZ-Phe-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3095-v) を用いた。

[図3(F)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドの交差性を評価した図。Human K L K 1 阻害活性評価には、終濃度 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ h K L K 1 (R & D S y s t e m s ; 2 3 3 7 - S E)、終濃度 $100 \mu\text{M}$ 基質ペプチド P r o - P h e - A r g - M C A (株式会社ペプチド研究所 ; 3 0 9 6 - v) を用いた。Human K L K 2 阻害活性評価には、終濃度 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ h K L K 2 (R & D S y s t e m s ; 2 3 3 7 - S E)、終濃度 $100 \mu\text{M}$ 基質ペプチド P r o - P h e - A r g - M C A (株式会社ペプチド研究所 ; 3 0 9 6 - v) を用いた。Human K L K 4 阻害活性評価には、終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ h K L K 4 (R & D S y s t e m s ; 1 7 1 9 - S E)、終濃度 $100 \mu\text{M}$ 基質ペプチド B o c - V a l - P r o - A r g - A M C (R & D S y s t e m s ; E S 0 1 1) を用いた。

[図3(G)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドの交差性を評価した図。Human K L K 7 阻害活性評価には、終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ h K L K 7、終濃度 $20 \mu\text{M}$ 基質ペプチド M c a - A r g - P r o - L y s - P r o - V a l - G l u - N v a l - T r p - A r g - L y s (D n p) - N H₂ (R & D S y s t e m s ; E S 0 0 2) を用いた。Human K L K 8 阻害活性評価には、終濃度 5 nM h K L K 8 (U n i P r o t : 0 6 0 2 5 9 , 発明者らが調製)、終濃度 $100 \mu\text{M}$ 基質ペプチド B o c - V a l - P r o - A r g - A M C (R & D S y s t e m s ; E S 0 1 1) を用いた。Human K L K 1 2 阻害活性評価には、終濃度 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ h K L K 1 2 (R & D S y s t e m s ; 3 0 9 5 - S E)、終濃度 $100 \mu\text{M}$ 基質ペプチド B o c - V a l - P r o - A r g - A M C (R & D S y s t e m s ; E S 0 1 1) を用いた。

[図3(H)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドの交差性を評価した図。Human K L K 1 3 阻害活性評価では、終濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ h K L K 1 3 (R & D S y s t e m s ; 2 6 2 5 - S E)、終濃度 $100 \mu\text{M}$ 基質ペプチド B o c - V a l - P r o -

Arg-AMC (R&D Systems; ES011)、蛍光シグナル $\text{excitation } 380\text{nm} / \text{emission } 460\text{nm}$ を用いた。Human KKK14 阻害活性評価には、終濃度 $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ の KKK14、終濃度 $100\text{ }\mu\text{M}$ の基質ペプチド Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011) を用いた。

[図4] X線結晶構造解析により得られた KKK5 / KKK5 阻害ペプチド複合体を示した図。該阻害ペプチド K51034 は KKK5 活性中心を含む領域に結合していた。

[図5] ペプチド基質の分解速度を指標として、KKK5 阻害ペプチドFc融合体の KKK5 阻害活性 (IC_{50}) を示した図。KKK5 阻害活性評価には終濃度 10 nM の KKK5 及び終濃度 $100\text{ }\mu\text{M}$ の Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011) を使用した。

[図6(A)] ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドFc融合体の交差性を評価した図。Bovine trypsin、Human trypsin、Bovine α -chymotrypsin の阻害活性評価では図3 (A) と同様の条件を用いた。

[図6(B)] ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドFc融合体の交差性を評価した図。Human chymotrypsin、Human tryptase、Human chymase の阻害活性評価では図3 (B) と同様の条件を用いた。

[図6(C)] ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドFc融合体の交差性を評価した図。Human plasmin、Human thrombin、Human neutrophil elastase の阻害活性評価では図3 (C) と同様の条件を用いた。

[図6(D)] ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドFc融合体の交差性を評価した図。Human matrilysin、Human proteinase 3、Human tPA の阻害活性評価では図3 (D) と同様の条件を用いた。

[図6(E)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドFc融合体の交差性を評価した図。Human uPA、Human plasma kallikreinの阻害活性評価では図3(E)と同様の条件を用いた。

[図6(F)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドFc融合体の交差性を評価した図。Human KLK1、Human KLK2、Human KLK4の阻害活性評価では図3(F)と同様の条件を用いた。

[図6(G)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドFc融合体の交差性を評価した図。Human KLK7、Human KLK8、Human KLK12の阻害活性評価では図3(G)と同様の条件を用いた。

[図6(H)]ペプチド基質の分解を指標として、各プロテアーゼに対する各阻害ペプチドFc融合体の交差性を評価した図。Human KLK13、Human KLK14の阻害活性評価では図3(H)と同様の条件を用いた。

[図7]Crusty2モデルマウスにおいて、KLK5阻害ペプチドFc融合体の投与群が皮膚水分蒸散量(TEWL)を抑制することを示した図。SPINK5変異がヘテロ(+/-)な場合、皮膚炎症は発症していないが、SPINK5変異がホモ(+/-)であるとき、皮膚炎症が強く発症し、TEWLが亢進した。SPINK5変異がホモ(+/-)であるCrusty2マウスに当該ペプチドFc融合体を投与することで、皮膚炎が改善し、TEWLが減少した。尚、PBS投与群又はD1-K50055-Fc投与群に問わず、Crusty2(+/-)マウスの例数は9、Crusty2(+/-)マウスの例数は12であった。図中のエラーバーは標準誤差を示す。

[図8]ヒトSPINK2、ヒトSPINK5のD8及びD9、並びに、ヒトSPINK9の配列同一性を比較した図。ヒトSPINK5のD8及びD9並びにヒトSPINK9は、ヒトKLK5阻害活性を有することが知られているが、ヒトKLK5阻害活性について報告されていないヒトSPINK2と

のアミノ配列同一性は、いずれも低いことが判る。

[図9]ヒトSPINK2のアミノ酸配列（配列番号1）

[図10]ヒトKLK5のアミノ酸配列（配列番号2）

[図11]ヒトKLK7のアミノ酸配列（配列番号3）

[図12]ヒトKLK14のアミノ酸配列（配列番号4）

[図13]KLK5阻害ペプチドK50032のヌクレオチド配列（配列番号5）

[図14]KLK5阻害ペプチドK50032のアミノ酸配列（配列番号6）

[図15]KLK5阻害ペプチドK50055のヌクレオチド配列（配列番号7）

[図16]KLK5阻害ペプチドK50055のアミノ酸配列（配列番号8）

[図17]KLK5阻害ペプチドK51072のヌクレオチド配列（配列番号9）

[図18]KLK5阻害ペプチドK51072のアミノ酸配列（配列番号10）

[図19]KLK5阻害ペプチドK50016のヌクレオチド配列（配列番号11）

[図20]KLK5阻害ペプチドK50016のアミノ酸配列（配列番号12）

[図21]KLK5阻害ペプチドK51034のヌクレオチド配列（配列番号13）

[図22]KLK5阻害ペプチドK51034のアミノ酸配列（配列番号14）

[図23]KLK5阻害ペプチドK50062のヌクレオチド配列（配列番号15）

[図24]KLK5阻害ペプチドK50062のアミノ酸配列（配列番号16）

[図25]KLK5阻害ペプチドK51090のヌクレオチド配列（配列番号17）

[図26]KLK5阻害ペプチドK51090のアミノ酸配列（配列番号18）

[図27]KLK5阻害ペプチドK50098のヌクレオチド配列（配列番号19）

- [図28] K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 9 8 のアミノ酸配列（配列番号 2 0）
- [図29] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 2 8 のヌクレオチド配列（配列番号 2 1）
- [図30] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 2 8 のアミノ酸配列（配列番号 2 2）
- [図31] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 0 5 のヌクレオチド配列（配列番号 2 3）
- [図32] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 0 5 のアミノ酸配列（配列番号 2 4）
- [図33] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 0 0 3 1 のヌクレオチド配列（配列番号 2 5）
- [図34] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 0 0 3 1 のアミノ酸配列（配列番号 2 6）
- [図35] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 5 7 のヌクレオチド配列（配列番号 2 7）
- [図36] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 5 7 のアミノ酸配列（配列番号 2 8）
- [図37] K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド K 5 1 0 6 9 のヌクレオチド配列（配列番号 2 9）
- [図38] K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド K 5 1 0 6 9 のアミノ酸配列（配列番号 3 0）
- [図39] K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド K 5 0 0 1 5 のヌクレオチド配列（配列番号 3 1）
- [図40] K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド K 5 0 0 1 5 のアミノ酸配列（配列番号 3 2）
- [図41] K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 3 - K 5 0 0 3 2 d N - F c のヌクレオチド配列（配列番号 3 3）
- [図42] K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 3 - K 5 0 0 3 2 d N - F c のア

ミノ酸配列（配列番号34）

[図43] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K50055-Fcのヌクレオチド配列（配列番号35）

[図44] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K50055-Fcのアミノ酸配列（配列番号36）

[図45] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K51072-Fcのヌクレオチド配列（配列番号37）

[図46] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K51072-Fcのアミノ酸配列（配列番号38）

[図47] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K50016dN-Fcのヌクレオチド配列（配列番号39）

[図48] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K50016dN-Fcのアミノ酸配列（配列番号40）

[図49] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K51034-Fcのヌクレオチド配列（配列番号41）

[図50] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K51034-Fcのアミノ酸配列（配列番号42）

[図51] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K50062-Fcのヌクレオチド配列（配列番号43）

[図52] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K50062-Fcのアミノ酸配列（配列番号44）

[図53] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K51090-Fcのヌクレオチド配列（配列番号45）

[図54] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K51090-Fcのアミノ酸配列（配列番号46）

[図55] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K50098dN-Fcのヌクレオチド配列（配列番号47）

[図56] K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D3-K50098dN-Fcのア

ミノ酸配列（配列番号48）

[図57] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K51028-Fcのヌクレオチド配列（配列番号49）

[図58] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K51028-Fcのアミノ酸配列（配列番号50）

[図59] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K51005-Fcのヌクレオチド配列（配列番号51）

[図60] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K51005-Fcのアミノ酸配列（配列番号52）

[図61] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K50031-Fcのヌクレオチド配列（配列番号53）

[図62] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K50031-Fcのアミノ酸配列（配列番号54）

[図63] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K51057-Fcのヌクレオチド配列（配列番号55）

[図64] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K51057-Fcのアミノ酸配列（配列番号56）

[図65] K L K 5 / K L K 14 阻害ペプチドFc融合体D3-K51069dN-Fcのヌクレオチド配列（配列番号57）

[図66] K L K 5 / K L K 14 阻害ペプチドFc融合体D3-K51069dN-Fcのアミノ酸配列（配列番号58）

[図67] K L K 5 / K L K 14 阻害ペプチドFc融合体D3-K50015-Fcのヌクレオチド配列（配列番号59）

[図68] K L K 5 / K L K 14 阻害ペプチドFc融合体D3-K50015-Fcのアミノ酸配列（配列番号60）

[図69] S P I N K 2 変異体ペプチドの一般式（配列番号61）

[図70] プライマー1のヌクレオチド配列（配列番号62）

[図71] プライマー2のヌクレオチド配列（配列番号63）

- [図72]プライマー3のヌクレオチド配列（配列番号64）
- [図73]プライマー4のヌクレオチド配列（配列番号65）
- [図74]プライマー5のヌクレオチド配列（配列番号66）
- [図75]プライマー6のヌクレオチド配列（配列番号67）
- [図76]プライマー7のヌクレオチド配列（配列番号68）
- [図77]プライマー8のヌクレオチド配列（配列番号69）
- [図78]プライマー9のヌクレオチド配列（配列番号70）
- [図79]プライマー10のヌクレオチド配列（配列番号71）
- [図80]プライマー11のヌクレオチド配列（配列番号72）
- [図81]プライマー12のヌクレオチド配列（配列番号73）
- [図82]プライマー13のヌクレオチド配列（配列番号74）
- [図83]プライマー14のヌクレオチド配列（配列番号75）
- [図84]プライマー15のヌクレオチド配列（配列番号76）
- [図85]KLK7基質ペプチド（アミノ酸配列は配列番号77）
- [図86]ウシ α -キモトリプシン基質ペプチド（アミノ酸配列は配列番号78）
- [図87]ニュートロフィル・エラスターゼ基質ペプチド（アミノ酸配列は配列番号79）
- [図88]ヒトプロテインC基質ペプチド（アミノ酸配列は配列番号80）
- [図89]プライマー16のヌクレオチド配列（配列番号81）
- [図90]プライマー17のヌクレオチド配列（配列番号82）
- [図91]プライマー18のヌクレオチド配列（配列番号83）
- [図92]プライマー19のヌクレオチド配列（配列番号84）
- [図93]プライマー20のヌクレオチド配列（配列番号85）
- [図94]プライマー21のヌクレオチド配列（配列番号86）
- [図95]ヒトIgG1のFcのアミノ酸配列（配列番号87）
- [図96]ヒトSPINK5のD8のアミノ酸配列（配列番号88）
- [図97]ヒトSPINK5のD9のアミノ酸配列（配列番号89）

[図98]ヒトSPINK9のアミノ酸配列（配列番号90）

[図99]マウスKLK5のアミノ酸配列（配列番号91）

[図100]マウスKLK7のアミノ酸配列（配列番号92）

[図101]マウスKLK14のアミノ酸配列（配列番号93）

[図102]阻害定数 K_i 算出のため、ペプチド基質の分解速度を指標として、KLK5阻害ペプチドFc融合体のKLK5阻害活性（ $n=3$, Mean $\pm$ SD）を評価した図。KLK5阻害活性評価には終濃度10nMのKLK5及び終濃度100 μ MのBoc-Val-Pro-Arg-AMC（R&D Systems; ES011）を使用した。

[図103(A)]ヒトDesmoglein1の分解を指標として、KLK5阻害ペプチドFc融合体のKLK5阻害活性を評価した図。KLK5阻害活性評価には終濃度1 μ MのKLK5及び終濃度1 μ MのRecombinant Human Desmoglein-1 Fc Chimera Protein（R&D Systems; 944-DM-100）を使用した。Desmoglein 1 Antibody（aa471-499）（LSBio; LS-C167542）及びAnti-Rabbit IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment Donkey（GE healthcare; NA9340V）を用いたWestern blotにより解析した。

[図103(B)]ヒトDesmocollin1の分解を指標として、KLK5阻害ペプチドFc融合体のKLK5阻害活性を評価した図。KLK5阻害活性評価には終濃度0.2 μ MのKLK5及び終濃度2 μ MのRecombinant Human Desmocollin-1 Protein with C-terminal His tag（R&D Systems; 4955-DC-050）を使用した。Penta His HRP Conjugate（QIAGEN; 34460）を用いたWestern blotにより解析した。

[図104]プライマー22のヌクレオチド配列（配列番号94）

[図105] K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 1 - K 5 0 0 5 5 - F c のヌクレオチド配列 (配列番号 9 5)

[図106] K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 1 - K 5 0 0 5 5 - F c のアミノ酸配列 (配列番号 9 6)

[図107(A)] ペプチド基質の分解速度を指標として、K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 1 - K 5 0 0 5 5 - F c の K L K 5 阻害活性 (IC_{50}) を示した図。K L K 5 阻害活性評価には終濃度 1 0 nM の K L K 5 及び終濃度 1 0 0 μ M の Boc - Val - Pro - Arg - AMC (R & D Systems ; E S 0 1 1) を使用した。

[図107(B)] ペプチド基質の分解速度を指標として、K L K 7 に対する K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 1 - K 5 0 0 5 5 - F c の交差性を評価した図。図 3 (G) と同様の条件を用いた。

[図107(C)] ペプチド基質の分解速度を指標として、K L K 1 4 に対する K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 1 - K 5 0 0 5 5 - F c の交差性を評価した図。図 3 (H) と同様の条件を用いた。

発明を実施するための形態

[0013] 1. 定義

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

[0014] 本発明において、「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」及び「核酸分子」は同義であり、それらの構成単位であるリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド等の個数によっては何ら限定されず、例えば、DNA、RNA、mRNA、cDNA、cRNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、プライマー等もその範囲に含まれる。「核酸分子」は略

して「核酸」と呼ばれる場合がある。

[0015] 本発明において、「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「蛋白質」は同義である。

[0016] 本発明において、標的分子Xを認識する、又は標的分子Xに結合する（以下、その認識又は結合作用をまとめて「X結合活性」という）ペプチドを、「X結合ペプチド」と呼ぶことができる。さらに、標的分子Xを認識し、又は標的分子Xに結合し、且つ標的分子Xの有する1つ又は2つ以上の活性又は機能を阻害又は抑制する（以下、それらの阻害又は抑制作用をまとめて「X阻害活性」という）ペプチドを、「X阻害ペプチド」と呼ぶことができる。

[0017] 本発明において、「SPINK2」は、Serine Protease Inhibitor Kazal-type 2を意味し、3つのジスルフィド結合を有するKazal様ドメインから成る7kDaの蛋白質である。好適なSPINK2はヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、ヒトSPINK2（配列番号1：図9）を単に「SPINK2」という。

[0018] 本発明において、「KLK5」はN末プロペプチドとプロテアーゼ活性ドメインからなり、3箇所のN型糖鎖が付加したトリプシン様及びキモトリプシン様のプロテアーゼ活性を示す蛋白質である。好適なKLK5はヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、ヒトKLK5（配列番号2：図10）を単に「KLK5」ということがある。

[0019] 本発明において、「KLK7」はN末プロペプチドとプロテアーゼ活性を有するトリプシン様ドメインからなり、N型糖鎖が付加した蛋白質である。好適なKLK7はヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、ヒトKLK7（配列番号3：図11）を単に「KLK7」ということがある。

[0020] 本発明において、「KLK14」はニューロプシンともよばれ、N末プロペプチドとプロテアーゼ活性を有するトリプシン様ドメインからなり、N型

糖鎖が付加した蛋白質である。好適なKLK14はヒト由来である。本発明においては、別段記載された場合を除き、ヒトKLK14（配列番号4：図12）を単に「KLK14」ということがある。

[0021] 本発明において、「前駆型KLK5」はpro-KLK5を意味し、プロペプチド及びプロテアーゼ活性を有するドメインから構成される。「活性型KLK5」はactive KLK5を意味し、プロテアーゼ活性を有するドメインで構成される。好適な活性型KLK5はヒト由来である。

[0022] 本発明において、「前駆型KLK7」はpro-KLK7を意味し、プロペプチド及びプロテアーゼ活性を有するドメインから構成される。「活性型KLK7」はactive KLK7を意味し、プロテアーゼ活性を有するドメインで構成される。好適な活性型KLK7はヒト由来である。

[0023] 本発明において、「前駆型KLK14」はpro-KLK14を意味し、プロペプチド及びプロテアーゼ活性を有するドメインから構成される。「活性型KLK14」はactive KLK14を意味し、プロテアーゼ活性を有するドメインで構成される。好適な活性型KLK14はヒト由来である。

[0024] 本発明において、「KLK5阻害ペプチド」、「KLK5/KLK7阻害ペプチド」又は「KLK5/KLK14阻害ペプチド」は、KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14の有する1つ又は2つ以上の活性又は機能を阻害又は抑制するペプチドをそれぞれ意味する。

[0025] 「KLK5阻害ペプチド」、「KLK5/7阻害ペプチド」及び「KLK5/KLK14阻害ペプチド」の範囲には、当該ペプチドの断片、他の部分（moiety）が当該ペプチド又はその断片に付加又は結合してなるコンジュゲートのうち、KLK5阻害（結合）活性、KLK5/KLK7阻害（結合）活性、又は、KLK5/KLK14阻害（結合）活性を維持しているものがそれぞれ含まれる。すなわち、KLK5阻害（結合）活性、KLK5阻害（結合）活性及びKLK7阻害（結合）活性、又は、KLK5阻害（結合）活性及びKLK14阻害（結合）活性を維持する当該ペプチドの断片、

付加体及び修飾体（コンジュゲート）も「K L K 5 阻害ペプチド」、「K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド」又は「K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド」にそれぞれ含まれる。

[0026] 本発明において、ペプチドが結合する「部位」、すなわちペプチドが認識する「部位」とは、ペプチドが結合又は認識する標的分子上の連続的若しくは断続的な部分アミノ酸配列又は部分高次構造を意味する。本発明においては、かかる部位のことを標的分子上のエピトープ又は結合部位と呼ぶことができる。

[0027] 本発明において、「細胞」には、動物個体に由来する各種細胞、継代培養細胞、初代培養細胞、細胞株、組換え細胞、酵母、微生物等も含まれる。

[0028] 本発明において、「S P I N K 2 変異体」とは、野生型S P I N K 2 の有するアミノ酸配列において、1 個又は2 個以上のアミノ酸が野生型とは異なるアミノ酸で置換され、1 個又は2 個以上の野生型のアミノ酸が欠失し、1 個又は2 個以上の野生型には無いアミノ酸が挿入されて（以下、「変異」と総称する）なるアミノ酸配列を含むペプチドを意味する。「S P I N K 2 変異体」のうち、K L K 5 阻害活性、K L K 5 阻害活性及びK L K 7 阻害活性（K L K 5 / K L K 7 阻害活性）、又は、K L K 5 阻害活性及びK L K 1 4 阻害活性（K L K 5 / K L K 1 4 阻害活性）を有するものは、K L K 5 阻害ペプチド、K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド、又は、K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチドに包含される。なお、本発明においては「挿入」も「付加」の範囲に含まれ得る。

[0029] 本発明において、「1 乃至数個」における「数個」とは、3 乃至1 0 個を指す。

[0030] 本発明において、「ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする」とは、5 × S S C を含む溶液中で6 5 °C にてハイブリダイゼーションを行い、ついで2 × S S C - 0 . 1 % S D S を含む水溶液中で6 5 °C にて2 0 分間、0 . 5 × S S C - 0 . 1 % S D S を含む水溶液中で6 5 °C にて2 0 分間、並びに、0 . 2 × S S C - 0 . 1 % S D S を含む水溶液中で6 5 °C にて2 0 分

間、それぞれ洗浄する条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることを意味する。SSCとは150mM NaCl-15mMクエン酸ナトリウムの水溶液であり、 $n \times \text{SSC}$ は n 倍濃度のSSCを意味する。

[0031] 本発明において「特異的」及び「特異性」なる語は「選択的」及び「選択性」とそれぞれ同義であり、互換性がある。例えば、KLK5特異的な阻害ペプチドは、KLK5選択的な阻害ペプチドと、KLK5及びKLK7特異的な阻害ペプチドは、KLK5及びKLK7選択的な阻害ペプチドと、それぞれ同義である。

[0032] 2. ペプチド

2-1. アミノ酸

「アミノ酸」は、アミノ基及びカルボキシル基を含む有機化合物であり、好適には蛋白質に、より好適には天然の蛋白質に、構成単位として含まれる α -アミノ酸を意味する。本発明において、より好適なアミノ酸は、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr及びValであり、特に明記しない限り「アミノ酸」はこれらの計20アミノ酸を意味する。それらの計20アミノ酸を「天然アミノ酸」と呼ぶことができる。本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、好適には天然アミノ酸を含有する。

[0033] 本発明においては「アミノ酸残基」は「アミノ酸」と略記される場合がある。

[0034] また、本発明において、アミノ酸は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、又はその混合物（DL-アミノ酸）であるが、特に明記しない限りL-アミノ酸を意味する。

[0035] 天然アミノ酸は、その共通する側鎖の性質に基づいて、例えば、次のグループに分けることができる。

(1) 疎水性アミノ酸グループ：Met、Ala、Val、Leu、Ile

(2) 中性親水性アミノ酸グループ: C y s、S e r、T h r、A s n、G l n

(3) 酸性アミノ酸グループ: A s p、G l u

(4) 塩基性アミノ酸グループ: H i s、L y s、A r g

(5) 主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸のグループ: G l y、P r o

(6) 芳香族アミノ酸グループ: T r p、T y r、P h e

ただし、天然アミノ酸の分類はこれらに限定されるものではない。

[0036] 本発明においては、天然アミノ酸は保存的アミノ酸置換を受け得る。

[0037] 「保存的アミノ酸置換 (c o n s e r v a t i v e a m i n o a c i d s u b s t i t u t i o n)」とは、機能的に等価又は類似のアミノ酸との置換を意味する。ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、該ペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば、同様の極性を有する一つ又は二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し、かかるペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に、あるグループ内の置換は構造及び機能について保存的であると考えることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の(チオール)フォームと比較してより極性の低い、酸化型の(ジスルフィド)フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分の構造及び機能的に重要な特徴を構成し得る。また、芳香環を含む側鎖(トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン)はイオン-芳香族相互作用又は陽イオン-パイ相互作用に寄与し得る。かかる場合において、これらの側鎖を有するアミノ酸を、酸性又は非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的及び機能的には保存的であり得る。プロリン、グリシン、システイン(ジスルフィド・フォーム)等の残基は主鎖の立体構造に直接的な効果を与える可能性があり、しばしば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

[0038] 保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的

置換（レーニンジャ、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73乃至75頁：L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975)）及び典型的置換を含む。

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

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

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

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

本発明において、アミノ酸は、天然アミノ酸以外のアミノ酸であってもよい。例えば、天然のペプチドや蛋白質において見出されるセレノシステイン、N-ホルミルメチオニン、ピロリジン、ピログルタミン酸、シスチン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、チロキシン、O-ホスホセリン、デスモシン、 β -アラニン、サルコシン、オルニチン、クレアチン、 γ アミノ酪酸、オパイン、テアニン、トリコロミン酸、カイニン酸、ドウモイ酸、ア

クロメリン酸等を挙げることができ、ノルロイシン、Ac-アミノ酸、Boc-アミノ酸、Fmoc-アミノ酸、Trt-アミノ酸、Z-アミノ酸等のN末端保護アミノ酸、アミノ酸t-ブチルエステル、ベンジルエステル、シクロヘキシルエステル、フルオレニルエステル等のC末端保護アミノ酸、ジアミン、 ω アミノ酸、 β アミノ酸、 γ アミノ酸、アミノ酸のTic誘導体、アミノフォスホン酸を含むその他の天然界には見出されないアミノ酸等を挙げることができるが、それらに限らず上記20の「天然アミノ酸」以外のアミノ酸を、本発明では便宜的に「非天然アミノ酸」と総称する。

[0039] 2-2. K L K 5 阻害ペプチド、K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド、及び、K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド

本発明のペプチドは、K L K 5 阻害活性、K L K 5 / K L K 7 阻害活性、又は、K L K 5 / K L K 1 4 阻害活性を有する。

[0040] 本発明のK L K 5 阻害ペプチド、K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド、及び、K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチドの標的である、K L K 5、K L K 7 及びK L K 1 4 は、好適には脊椎動物、より好適には哺乳類、より一層好適には霊長類、最適にはヒトに由来する。K L K 5、K L K 7、及び、K L K 1 4 は組織や細胞から精製するか、又は、遺伝子組換え、イン・ビトロ翻訳、ペプチド合成等の蛋白質の調製方法として当業者に公知の方法により、調製することができる。K L K 5、K L K 7、及び、K L K 1 4 には、シグナル配列、免疫グロブリンのFc領域、タグ、標識等が連結されてもよい。K L K 5 阻害活性、K L K 5 / K L K 7 阻害活性、及び、K L K 5 / K L K 1 4 阻害活性は、K L K 5、K L K 5 及びK L K 7、並びに、K L K 5 及びK L K 1 4 の有するプロテアーゼ活性を指標として評価することができる。例えば、K L K 5、K L K 5 及びK L K 7 若しくはK L K 5 及びK L K 1 4、又はそれらの機能断片、基質及び本発明のK L K 5 阻害ペプチド、K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド若しくはK L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド、又はその候補を共存させた場合に、対照の存在下又は該阻害剤若しくはその候補の非存在下と比較して、K L K 5、K L K 5 及びK L K 7、又は、K L K 5 及

びKLK14のプロテアーゼ活性が70%以下、50%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、1%以下又は0%である場合、KLK5阻害、KLK5/KLK7阻害又はKLK5/KLK14阻害が生じており、その阻害活性はそれぞれ30%以上、50%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、99%以上又は100%である。KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、及び、KLK5/KLK14阻害活性は、反応条件、基質の種類や濃度等により異なり得る。反応条件については、実施例に記載のものを例示することができるが、それに限定されない。一定濃度のKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14に基質ペプチド又は基質蛋白質を添加し、一定時間反応させた後、基質ペプチドの蛍光を検出する、又は基質蛋白質をSDS-PAGEやWestern blot法、液体クロマトグラフィー等により検出することで、酵素活性は評価できる。緩衝液としては、例えば、ホスフェート・バッファー・セイライン(phosphate buffer saline:以下「PBS」という)、トリスバッファー(50mM トリス, pH7乃至8.5、例えばpH7.5)等を用いることができ、NaCl(0乃至200mM、例えば200mM)、CaCl₂(0乃至10mM、例えば2mM)、ZnCl₂、Brij-35等の塩を添加することもできるが、それらに限定されない。

[0041] KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、及び、KLK5/KLK14阻害活性は、阻害定数 K_i で示すことができる。一定濃度の酵素に基質ペプチドを添加し、一定時間反応させた後、基質ペプチドの蛍光を検出してプロテアーゼ活性を測定する。各基質濃度におけるプロテアーゼ活性から、Michaelis-Mentenの式(Michaelis L, et al. (2011年) Biochemistry. 50巻39号, 8264-8269頁)に従い、最大反応速度 V_{max} 及びミカエリス定数 K_m を算出する。さらに、一定濃度の酵素に阻害剤を添加したときのプロテアーゼ活性から、Morrisonの式(Morrison JF. (1969年) B

iochim Biophys Acta, 185巻2号, 269-286頁)に従い、阻害定数 K_i を算出する。算出に用いるソフトウェアにはGraphPad Prism (GraphPad Software Inc.)等を例示することができる。

- [0042] K L K 5、K L K 7及びK L K 5、又は、K L K 5及びK L K 14の有するプロテアーゼの基質は、内在性の基質、外因性の基質、合成基質等、特に限定されるものではない。K L K 5のヒトの内在性の基質としては、低分子キニノーゲンやカリスタチン、コラーゲン、Desmoglein、Desmocollin、Cathelicidin等を例示することができる。K L K 7のヒトの内在性の基質としては、Pro-K L K 3やフィブロネクチン、コラーゲン等を例示することが出来る。K L K 14のヒトの内在性の基質としては、t P Aやフィブロネクチン、コラーゲン等を例示することが出来る。コラーゲンを熱変性して得られるゼラチンも基質として用いることができる。合成基質としては、特に限定されないが、P F R - A M CやB o c - V P R - A M C等を例示することができる。本発明のK L K 5阻害ペプチドのK L K 5阻害活性($I C_{50}$ 又は K_i)、K L K 5/K L K 7阻害ペプチドのK L K 5阻害活性、並びに、K L K 5/K L K 14阻害ペプチドのK L K 5阻害活性及びK L K 14阻害活性は、それぞれ $1 \mu M$ 以下、好適には $300 nM$ 以下、より好適には $100 nM$ 以下、より一層好適には $30 nM$ 、さらにより一層好適には $10 nM$ 以下である。K L K 5/K L K 7阻害ペプチドのK L K 7阻害活性は、好適には $1000 nM$ 以下、より好適には $300 nM$ 以下、より一層好適には $100 nM$ 、さらにより一層好適には $30 nM$ 以下である。また、K L K 5/K L K 7阻害ペプチド又はK L K 5/K L K 14阻害ペプチドは、K L K 5阻害活性とK L K 7阻害活性又はK L K 14阻害活性(いずれも $I C_{50}$ 又は K_i)の相対的な大小により分類することができ、好適には、(i) K L K 5阻害活性がK L K 7阻害活性又はK L K 14阻害活性の0.5倍未満、(i i) K L K 5阻害活性がK L K 7阻害活性又はK L K 14阻害活性の0.5倍以上2倍未満、(i i i) K L K 5阻害

活性がKLK7阻害活性又はKLK5/KLK7阻害活性の2倍以上、の3群に分類され、治療等の用途に応じてそれらの群から所望のペプチドが選択され得る。

[0043] また、本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、それぞれKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14以外のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制しないか、又はそれらに対する阻害若しくは抑制の程度が相対的に弱いことが好ましい。言い換えれば、本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドのプロテアーゼ阻害活性は、好適には、KLK5特異性、KLK5/KLK7特異性、又は、KLK5/KLK14特異性が高い。好適な本発明のペプチドは、KLK1、KLK2、KLK3、KLK4、KLK6、KLK8、KLK9乃至KLK13、KLK15、キモトリプシン、トリプターゼ、キマーゼ、プラスミン、トロンピン、エラスターゼ、マトリプターゼ、プロテインC、組織（tPA）、ウロキナーゼ・プラスミノゲン活性化因子（uPA）、血漿カリクレイン等のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制しないか、又はそれらに対する阻害若しくは抑制の程度が相対的に弱い。そのような本発明の好適なペプチドは、他のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制することに起因する副作用を示さず、KLK5関連疾患（後述）の治療薬又は予防薬として好適に使用され得る。さらに、本発明の好適なKLK5特異的阻害ペプチドは、KLK7及びKLK14のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制しないか、又はそれらに対する阻害若しくは抑制の程度が相対的に弱い；本発明の好適なKLK5/KLK7特異的阻害ペプチドは、KLK14のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制しないか、又はそれらに対する阻害若しくは抑制の程度が相対的に弱い；本発明の好適なKLK5/KLK14阻害ペプチドは、KLK7のプロテアーゼ活性を阻害若しくは抑制しないか、又はそれに対する阻害若しくは抑制の程度が相対的に弱い。

[0044] KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14に対す

る特異性が低く、KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14に加えて、他のKLKが有するプロテアーゼ活性も阻害するような阻害剤、すなわち非選択的阻害剤は、ヒトに投与した場合に副作用を生じ得る(Coussens, LM他、Science、295巻(5564号)、2387-2392頁(2002年):Bissett, D他、J. Clin. Oncol.、23巻(4号)、842-849頁(2005年))。一方、KLK5、KLK5/KLK7、又は、KLK5/KLK14に対する特異性が高い阻害剤、すなわちKLK5特異的阻害ペプチド、KLK5/KLK7特異的阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14特異的阻害ペプチドは、前述のような副作用を回避し得るため、KLK5関連疾患(後述)の治療又は予防のためにそれぞれ好適に使用することができる。

[0045] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK5阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、KLK5、KLK5及び/若しくはKLK7、又は、KLK5及び/若しくはKLK14へのプロテアーゼ基質の結合において、競合的であってもよい。

[0046] 前述の通り、本発明のペプチドの標的であるKLK5、KLK7及びKLK14は、脊椎動物、好適には哺乳動物、より好適には霊長類、より一層好適にはヒトに由来するが、非ヒト動物、例えば、ラット、マウス等のげっ歯類、カニクイザル、コモンマーモセット、アカゲザル等の霊長類に由来してもよい。非ヒト動物由来のKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14に対して阻害活性を有するペプチドは、かかる非ヒト動物におけるKLK5に関わる疾患の診断、検査、治療又は予防等に使用することができる。また、そのようなペプチドが、ヒトKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14も阻害する場合、KLK5関連疾患(後述)の治療薬又は予防薬としての該ペプチドの非臨床研究開発において、かかる非ヒト動物を動物病態モデルとして使用した薬効薬理試験や薬物動態試験、健常動物として使用した安全性試験や毒性試験等を行うことができる。

[0047] また、本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、及びKLK5/KLK14阻害ペプチドは、医薬及び診断薬として当該分野で使用される抗体等の他の生体高分子と比較して分子量が小さく、その製造（後述）が比較的容易であり、保存安定性や熱安定性等の物性の面で優れており、医薬組成物（後述）として使用される場合の投与経路、投与方法、製剤等の選択の幅が広い等の長所を有する。また、生体高分子やポリマーの付加等、公知の方法を適用して本発明のペプチドの分子量を大きくすることにより、医薬組成物として使用された場合の血中半減期をより長く調節することもできる。そのような本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、及びKLK5/KLK14阻害ペプチドの分子量は10,000未満、好適には8,000未満、より好適には約7,000～7,200である。また、配列番号61（図69）の15番Cys～31番Cysからなる可変ループ部分又は15番Cys～63番Cysからなる部分（以下「6つのCysを含む部分」という）のうち、KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性を有するものも、本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドにそれぞれ包含され、可変ループ部分の分子量は2,500未満、好適には約1,800～2,000であり、6つのCysを含む部分の分子量は6,000未満、好適には約5,300～5,500である。

[0048] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、SPINK2の有する骨格が少なくとも部分的に維持されたSPINK2変異体（以下、「SPINK2変異体」と略記する）であり、好適には、KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14の部分ペプチド、部分高次構造等を認識する、又はそれらに結合する（以下、かかる認識又は結合作用をまとめて「標的結合活性」という）。

[0049] 本発明におけるSPINK2変異体とKLK5、KLK7又はKLK14

の結合は、ELISA法、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: 以下、「SPR」という) 解析法、バイオレイヤー干渉 (BioLayer Interferometry: 以下、「BLI」という) 法、等温滴定量熱測定 (Isothermal Titration Calorimetry: 以下、「ITC」という)、フローサイトメトリー、免疫沈降法等により、当業者に公知の方法を用いて、測定又は判定することができる。

[0050] ELISA法としては、プレート上に固相化されたKLK5、KLK5/KLK7、又は、KLK5/KLK14を認識して結合したKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドを検出する方法が挙げられる。KLK5、KLK5/KLK7、又は、KLK5/KLK14の固相化には、ビオチンーストレプトアビジンの他、KLK5、KLK5/KLK7、若しくは、KLK5/KLK14、又は、KLK5、KLK5/KLK7、若しくは、KLK5/KLK14に融合したタグを認識する固相用抗体等を利用することができる。KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドの検出には、標識されたストレプトアビジンの他、KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、若しくは、KLK5/KLK14阻害ペプチド、又は、KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、若しくは、KLK5/KLK14阻害ペプチドに融合したタグを認識する標識された検出用抗体等を利用することができる。標識には、ビオチンの他、HRP、アルカリフォスファターゼ、FITC等生化学的解析に実施可能な方法を利用することができる。酵素標識を利用した検出にはTMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)、p-NPP (p-nitrophenyl phosphate)、OPD (o-Phenylenediamine)、ABTS (3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfoni

c acid)、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) 等の発色基質やQuantaBlu (登録商標) Fluorogenic Peroxidase Substrate (Thermo Fisher Scientific) 等の蛍光基質、及び化学発光基質を用いることができる。検出シグナルの測定には、吸光プレートリーダー、蛍光プレートリーダー、発光プレートリーダー、RI液体シンチレーションカウンター等を利用することができる。

[0051] SPR解析による測定方法は、SPINK2変異体ペプチドをセンサーチップ上に固定化し、KLK5等の標的分子を添加することにより両者の結合を測定する方法、及び、KLK5等の標的分子をセンサーチップ上に固定化し、SPINK2変異体ペプチドを添加することにより両者の結合を測定する方法、のいずれであってもよく、好適には前者である。本発明のペプチド又はコンジュゲートに含まれるSPINK2変異体の固定化には直接法又は捕捉法を利用することができ、好適には後者である。直接法ではSPINK2変異体の疎水性や、SPINK2の持つアミノ基やカルボキシル基等を利用して直接固定化することができる。捕捉法ではビオチン-ストレプトアビジンの他、該コンジュゲート又は該コンジュゲートに融合したタグを認識する抗体、プロテインA又はプロテインG等を利用して固定化することができる。SPINK2変異体を固定化したセンサーチップに、測定用緩衝液を用いて希釈したKLK5等の標的分子を添加し、SPRシグナルを経時的に観察して結合のセンサーグラムを取得する。続いてKLK5等の標的分子を含まない測定用緩衝液を添加し、SPRシグナルを経時的に観察して解離のセンサーグラムを取得する。取得したセンサーグラムを用いて結合親和性を解析し、解離定数 K_D を算出する。SPR解析に用いる機器としては、BIAcore (登録商標) (GE healthcare)、ProteOn (登録商標) (BioRad)、SPR-Nav i (登録商標) (BioNavis Oy)、Spreeta (登録商標) (Texas Instru-

nts)、SPRi-PlexII(登録商標)(ホリバ)、Autolab SPR(登録商標)(Metrohm)等を例示することができる。BLI法に用いる機器としては、Octet(登録商標)(Pall)を例示することができる。

[0052] 免疫沈降法としては、ビーズ上に固相化されたKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドによって認識され、結合したKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14を検出する方法が挙げられる。ビーズには磁気ビーズやアガロースビーズ等を利用することができる。KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドの固相化には、ビオチン-ストレプトアビジンの他、該ペプチド又は該ペプチドに融合したタグを認識する抗体、プロテインA又はプロテインG等を利用することができる。磁石や遠心分離等によってビーズを分離し、ビーズと共に沈殿したKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14をSDS-PAGEやWestern blot法で検出する。KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14の検出には、標識されたストレプトアビジンの他、KLK5、KLK7若しくはKLK14、又は、KLK5、KLK7若しくはKLK14に融合したタグを認識する標識された検出用抗体等を利用することができる。標識には、ビオチンの他、HRP、アルカリフォスファターゼ、FITC等生化学的解析に実施可能な方法を利用することができる。酵素標識を利用した検出にはELISA法と同様の基質を利用することができる。検出シグナルの測定にはChemidoc(登録商標)(BioRad)やLuminograph(ATTO)等を利用することができる。

[0053] 本発明において「特異的な認識」、すなわち「特異的な結合」とは、非特異的な吸着ではない結合を意味する。結合が特異的であるか否かの判定基準としては、例えば、ELISA法における結合活性 EC_{50} を挙げることができる。他の判定基準としては、例えば、解離定数(dissociatio

n constant : 以下、「 K_D 」という)を挙げることができる。本発明におけるKLK5阻害ペプチドのKLK5に対する K_D 値、KLK5/KLK7阻害ペプチドのKLK5及びKLK7に対する K_D 値、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドのKLK5及びKLK14に対する K_D 値は $1 \times 10^{-5}M$ 以下、 $5 \times 10^{-6}M$ 以下、 $2 \times 10^{-6}M$ 以下又は $1 \times 10^{-6}M$ 以下、より好適には $5 \times 10^{-7}M$ 以下、 $2 \times 10^{-7}M$ 以下又は $1 \times 10^{-7}M$ 以下、より一層好適には $5 \times 10^{-8}M$ 以下、 $2 \times 10^{-8}M$ 以下又は $1 \times 10^{-8}M$ 以下、さらにより一層好適には $5 \times 10^{-9}M$ 以下、 $2 \times 10^{-9}M$ 以下又は $1 \times 10^{-9}M$ 以下である。他の判定基準としては、例えば、免疫沈降法での解析結果を挙げることができる。本発明における好適なKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドをビーズに固相化し、それぞれKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14を添加した後にビーズを分離し、ビーズと共に沈殿したKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14を検出した場合、KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14のシグナルが検出される。

[0054] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又はKLK5/KLK14阻害ペプチドとしてのSPINK2変異体は、上記のようなプロテアーゼ阻害活性、標的結合活性、その他の性質、機能、特徴等を有し得る一方で、その全長アミノ酸配列はヒト野生型SPINK2のアミノ酸配列に対して高い配列同一性を有する。本発明のSPINK2変異体は、ヒトSPINK2のアミノ酸配列（配列番号1：図7）と60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有する。

[0055] 「同一性」とは、2つの配列の間の、類似性又は関係の程度を示す性質を意味する。アミノ酸配列の同一性(%)は、同一であるアミノ酸又はアミノ酸残基の数をアミノ酸又はアミノ酸残基の総数で割って得られる数値に、100を掛けることにより、算出される。

- [0056] 「ギャップ」とは、2つ以上の配列のうち少なくとも1つにおける欠失及び／又は付加の結果である、当該配列間のアライメントにおける隙間を意味する。
- [0057] 完全に同一なアミノ酸配列を有する2つのアミノ酸配列の間の同一性は100%であるが、一方のアミノ酸配列を他方と比較して1つ又は2つ以上のアミノ酸又はアミノ酸残基の置換、欠失又は付加があれば、両者の同一性は100%未満となる。ギャップをも考慮して2つの配列間の同一性を決定するためのアルゴリズムやプログラムとしては、標準的なパラメータを用いるBLAST (Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25巻、3389-3402頁、1997年)、BLAST2 (Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215巻、403-410頁、1990年)、Smith-Waterman (Smith, et al. J. Mol. Biol. 147巻、195-197頁、1981年) 等の当業者に公知のものを例示することができる。
- [0058] 本発明において、「変異した」とは、天然に存在する核酸分子又はペプチドと比較のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列において、1つ又は2つ以上のヌクレオチド若しくはヌクレオチド残基又はアミノ酸若しくはアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入がなされていることを意味する。本発明のSPINK2変異体のアミノ酸配列は、ヒトSPINK2のアミノ酸配列と比較して、1つ又は2つ以上のアミノ酸又はアミノ酸残基が変異されている。
- [0059] 本発明のある態様において、SPINK2変異体のアミノ酸配列は、ヒトSPINK2のアミノ酸配列（配列番号1：図9）の：
- 16番Ser～22番Glyのうち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又は7つのアミノ酸が他のアミノ酸又はアミノ酸残基に置換されており；
- 24番Pro～28番Asnのうち1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのアミノ酸が他のアミノ酸又はアミノ酸残基に置換されており；
- 15番Cys、23番Cys、31番Cys、42番Cys、45番Cys

及び63番Cysは、天然型のジスルフィド結合を維持するためには野生型と同じくCysであることが好ましく、天然型のジスルフィド結合を消失させたり、非天然型のジスルフィド結合を生じさせたりするためには、それらのうち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つを他のアミノ酸に置換してもよい。本発明のSPINK2変異体うち一部の好適なKKK5阻害ペプチド、KKK5/KKK7阻害ペプチド、又は、KKK5/KKK14阻害ペプチドにおいては、天然型と同じ当該6箇所Cysが維持され、ジスルフィド結合が保持されている。かかるペプチドのうちより好適な一部の態様においては、15番Cys-45番Cys、23番Cys-42番Cys、及び、31番Cys-63番Cysが、それぞれジスルフィド結合を形成している。

[0060] そのようなSPINK2変異体の有するアミノ酸配列がKKK5阻害ペプチド、KKK5/KKK7阻害ペプチド、又は、KKK5/KKK14阻害ペプチドに含まれる場合、野生型SPINK2のアミノ酸配列に含まれる16番Ser乃至30番Valからなるループ構造、31番Cys及び32番Glyからなるβストランド(1)並びに57番Ile乃至59番Argからなるβストランド(2)から構成されるβシート、41番Glu乃至51番Glyからなるαヘリックス、又は、それらに類似しているか若しくはそれら(の位置)に少なくとも部分的に対応するループ構造、βシート、αヘリックス等から構成される立体構造が、KKK5阻害活性、KKK5/KKK7阻害活性、又は、KKK5/KKK14阻害活性を発揮し得る程度に、維持されていることが好ましい。

[0061] 本発明のSPINK2変異体のうち、一部のKKK5阻害ペプチド、KKK5/KKK7阻害ペプチド、又は、KKK5/KKK14阻害ペプチドの有するアミノ酸配列について以下に述べる。上述の通り、本発明において「アミノ酸残基」は単に「アミノ酸」と表記されることがある。

[0062] 配列番号61(図69)で示されるアミノ酸配列(一般式)において、X₁乃至X₁₂は、KKK5、KKK5及びKKK7、又は、KKK5及びKKK

14を阻害する限りにおいてそれぞれ任意のアミノ酸であれば特に限定されない。以下、 X_1 乃至 X_{12} の好適なアミノ酸について記載するが、それらのアミノ酸の中には天然型、すなわち野生型ヒトSPINK2のアミノ酸配列中と同一のアミノ酸が含まれている場合がある。

[0063] K L K 5 阻害ペプチドに含まれる配列番号61（図69）で示されるアミノ酸配列において、好適には：

16番Xaa (X_1) はAla、Asp、Gly、Gln、Leu、Ser又はThr；

17番Xaa (X_2) はArg、Glu、Asn、Gln又はSer；

18番Xaa (X_3) はAsp、Gln、Ile、Thr、Trp又はTyr；

19番Xaa (X_4) はArg、Gly、Met、Gln又はThr；

20番Xaa (X_5) はAsp、Glu、Leu、Lys、Thr又はTyr；

21番Xaa (X_6) はGlu、Gly、His、Leu、Ser、Gln又はTyr；

22番Xaa (X_7) はAsp、Gly、Gln、Ser又はTyr；

24番Xaa (X_8) はAla、Asp、Glu、Gly、Asn、Ser又はThr；

25番Xaa (X_9) はArg又はLys；

26番Xaa (X_{10}) はAsp、Glu、Gln、Ser又はVal；

27番Xaa (X_{11}) はPhe又はTyr；及び

28番Xaa (X_{12}) はAsp又はGlu

である。

[0064] K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドに含まれる配列番号61（図69）で示されるアミノ酸配列において、好適には：

16番Xaa (X_1) はGly、Met又はTyr；

17番Xaa (X_2) はGlu、Gln又はThr；

18番Xaa (X₃) はHis、Met又はTyr ;
19番Xaa (X₄) はAla、Arg、Lys又はGln ;
20番Xaa (X₅) はGly、Arg又はSer ;
21番Xaa (X₆) はArg、Lys、Gln又はSer ;
22番Xaa (X₇) はGly ;
24番Xaa (X₈) はHis、Thr又はTyr ;
25番Xaa (X₉) はHis又はTyr ;
26番Xaa (X₁₀) はAsp、Glu又はHis ;
27番Xaa (X₁₁) はTyr ;及び
28番Xaa (X₁₂) はAsp又はGlu

である。

[0065] K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチドに含まれる配列番号61 (図69) で示されるアミノ酸配列において、好適には :

16番Xaa (X₁) はGly、Ser又はTyr ;
17番Xaa (X₂) はAsp又はGln ;
18番Xaa (X₃) はThr又はVal ;
19番Xaa (X₄) はThr又はVal ;
20番Xaa (X₅) はGlu又はThr ;
21番Xaa (X₆) はHis又はThr ;
22番Xaa (X₇) はTyr ;
24番Xaa (X₈) はAsn又はSer ;
25番Xaa (X₉) はArg ;
26番Xaa (X₁₀) はAsp又はGlu ;
27番Xaa (X₁₁) はTyr ;
28番Xaa (X₁₂) はAsp

である。

[0066] なお、野生型の16乃至22番及び24乃至28番Xaa (X₁乃至X₁₂) は、それぞれSer、Gln、Tyr、Arg、Leu、Pro、Gly、

Pro、Arg、His、Phe及びAsnである。

[0067] 本発明においては、1番アミノ酸のN末側に、さらに1つ乃至数個又はそれ以上、好適には1乃至5個のアミノ酸が付加していてもよい。そのようなアミノ酸の付加としては、好適にはAsp及び／又はGluが1乃至5個付加したもの（AspとGluの両方を含んでいてもよい）、より好適にはAspが1乃至5個付加したもの又はGluが1乃至5個付加したものを挙げることができる。

[0068] 本発明においては、SPINK2変異体ペプチドのN末及び／又はC末付加体（以下、「親ペプチド」と呼ぶ）の付加部分において、1つ又は2つ以上のアミノ酸が置換、付加及び／又は欠失されてなり、且つ該SPINK2変異体ペプチドの活性の一部又は全部を維持しているペプチドを「親ペプチドの誘導体」又は「親ペプチド誘導体」と呼ぶことがある。かかる「誘導体」も本発明の「ペプチド」の範囲に含まれる。

[0069] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5／KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5／KLK14阻害ペプチドの範囲に含まれるSPINK2変異体の有するアミノ酸配列においては、 X_1 乃至 X_{12} 以外の部分、すなわち、野生型ヒトSPINK2のアミノ酸配列（配列番号1：図9）中の、2番Pro～15番Cys、23番Cys及び29番Pro～63番Cysの位置において、天然型のアミノ酸若しくは変異したアミノ酸又はアミノ酸配列を含むことができる。例えば、SPINK2変異体は、KLK5阻害活性、KLK5／KLK7阻害活性、又は、KLK5／KLK14阻害活性又はフォールディングを少なくとも部分的に妨げないか又は干渉をしない限りにおいて、1つ又は2つ以上の位置において変異してよい。そのような変異は、当業者に公知の標準的な方法を使用することによりなし得る。アミノ酸配列中の典型的な変異としては、1つ又は2つ以上のアミノ酸の置換、欠失又は挿入を挙げることができ、置換としては、保存的置換を例示することができる。保存的置換により、あるアミノ酸残基は、嵩高さのみならず、極性の面についても化学的特徴が類似しているアミノ酸残基により置換される。保存的置換

の例は、本明細書の他の部分に記載されている。一方で、 X_1 乃至 X_{12} 以外の部分は、KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性又はフォールディングを少なくとも部分的に妨げないか又は干渉をしない限りにおいて、1つ又は2つ以上のアミノ酸の非保存的置換も許容し得る。

[0070] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドとしてのSPINK2変異体の有するアミノ酸配列は、 X_1 乃至 X_{12} が、好適には、配列番号6、8、10、12、14、16、18及び20（図14、16、18、20、22、24、26及び28）、配列番号22、24、26及び28（図30、32、34及び36）、又は、配列番号30及び32（図38及び40）のいずれか一つにおける X_1 乃至 X_{12} の各アミノ酸であり、且つ、 X_1 乃至 X_{12} 以外の部分がKLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性又はフォールディングを少なくとも部分的に妨げないか又は干渉をしないアミノ酸又はアミノ酸配列を有することができる。

[0071] また、本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドとしてのSPINK2変異体のアミノ酸配列の例として、次の(a1)乃至(a4)、(b1)乃至(b4)又は(c1)乃至(c4)のいずれか一つに記載のアミノ酸配列をそれぞれ挙げることができる：

(a1) 配列番号6、8、10、12、14、16、18及び20（図14、16、18、20、22、24、26及び28）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至63からなるアミノ酸配列；

(a2) (a1)に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つKLK5阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；

(a3) (a1)に記載のアミノ酸配列において1乃至20個、1乃至15

個、1乃至10個、1乃至8個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、1若しくは2個、又は1個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つKLK5阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；及び、

(a4) (a1)に記載のアミノ酸配列と60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つKLK5阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列、

(b1) 配列番号22、24、26及び28（図30、32、34及び36）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至63からなるアミノ酸配列；

(b2) (b1)に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つKLK5／KLK7阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；

(b3) (b1)に記載のアミノ酸配列において1乃至20個、1乃至15個、1乃至10個、1乃至8個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、1若しくは2個、又は1個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つKLK5／KLK7阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；及び、

(b4) (b1)に記載のアミノ酸配列と60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つKLK5／KLK7阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列、又は、

(c1) 配列番号30及び32（図38及び40）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至63からなるアミノ酸配列；

(c2) (c1)に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つKLK5／KLK14阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配

列をコードするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；

(c3) (c1)に記載のアミノ酸配列において1乃至20個、1乃至15個、1乃至10個、1乃至8個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、1若しくは2個、又は1個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つKLK5／KLK14阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；及び、

(c4) (c1)に記載のアミノ酸配列と60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つKLK5／KLK14阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列。

[0072] なお、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32(図14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38及び40)のアミノ酸番号64及び65は、野生型ヒトSPINK2(配列番号1、図9:63アミノ酸からなる)に対応するアミノ酸ではなく、本発明のある態様において本発明のペプチドを発現させるために付加されたものである。

[0073] 本発明のペプチドに、そのフォールディング安定性、熱安定性、保存安定性、血中半減期、水溶性、生物活性、薬理活性、副次的作用等を改善する目的で、変異を導入することができる。例えば、ポリエチレングルコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、ビオチン、ペプチド又は蛋白質等の他の物質にコンジュゲートさせるため、Cysのような新たな反応性基を変異により導入することができる。

[0074] 本発明において、KLK5阻害ペプチド、KLK5／KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5／KLK14阻害ペプチドは他の部分に連結又は付加していてもよく、そのようなコンジュゲート体を「KLK5阻害ペプチドのコンジュゲート」、「KLK5／KLK7阻害ペプチドのコンジュゲート」又は「KLK5／KLK14阻害ペプチドのコンジュゲート」とそれぞれ総称する。本発明において「コンジュゲート」とは、本発明のペプチド又はその

断片に他の部分が結合してなる分子を意味する。「コンジュゲート」又は「コンジュゲーション」には、ある部分が架橋剤等の化学物質を介して、ある部分をアミノ酸の側鎖に連結するのに適した作用物質等を介して、本発明のペプチドのN末及び／又はC末に合成化学的手法や遺伝子工学的手法等により、本発明のペプチドに連結又は結合される形態が含まれる。そのような「部分」には、血中半減期を改善するものとして、ポリエチレングリコール（PEG）等のポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、パルミチン酸等の脂肪酸分子、免疫グロブリンのFc領域（例えば、ヒト免疫グロブリンG1のFc領域：そのアミノ酸配列を配列番号87、図95に示す）、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン又はその断片、アルブミン結合ペプチド、連鎖球菌プロテインG等のアルブミン結合蛋白質、トランスフェリンを、例示することができる。その他の「部分」としては、かかる「部分」はペプチドリンカー等のリンカーを介して本発明のペプチドが連結され得る。

[0075] 本発明のある態様において、コンジュゲートは、本発明のSPINK2変異体ペプチドと、抗体のFc領域又はその断片との融合体である。抗体の起源は、ヒト、及び、非ヒト動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ等のげっ歯類、ウシ、ブタ、イヌ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル等その他の哺乳類、ニワトリ等の鳥類を上げることができ、好適にはヒトである。抗体としては、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD及びIgEを例示することができ、好適にはIgG1である。より好適には、コンジュゲートは、本発明のペプチドと、ヒトIgG1のFc領域又はその断片との融合体である。本発明のペプチドと抗体のFc領域又はその断片の融合体を「Fc融合体」又は「コンジュゲート」と記載することがあるが、いずれも同義である。

[0076] ヒトIgG1のFc領域としては、例えば、配列番号87（図95）で示されるアミノ酸配列を含むか該配列からなるものを挙げることができるが、それに限定されない。抗体のFc領域は、野生型、変異型のいずれであって

もよい。

[0077] また、本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドには、薬理活性を発揮するか又は増強するために、他の薬物がコンジュゲートされていてもよい。抗体分野において抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate: ADC) として当業者に公知の技術や態様は、抗体を本発明のペプチドに置き換えることにより、本発明の一部の態様となり得る。

[0078] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、それぞれKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14以外の標的分子に対する結合親和性、阻害活性、拮抗活性、作動活性等を発揮する1つ又は2つ以上の部分をさらに含むか、そのような部分にコンジュゲートされていてもよい。かかる「部分」としては、抗体又はその断片、SPINK2変異体のような抗体以外の骨格を有する蛋白質又はその断片を例示することができる。抗体分野において多重特異的抗体及び二重特異的抗体 (multispecific antibody、bispecific antibody) として当業者に公知の技術や態様は、それらに含まれる2つ以上の「抗体」のうち少なくとも1つを本発明のペプチドに置き換えることにより、本発明のコンジュゲートの一部の態様となる。

[0079] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、若しくは、KLK5/KLK14阻害ペプチド又はその前駆体は、シグナル配列を含み得る。あるポリペプチド若しくはその前駆体のN末に存在するか又は付加されたシグナル配列は、当該ポリペプチドを細胞の特定の区画、例えば、大腸菌であれば周辺質、真核細胞であれば小胞体に送達するために有用であり、多くのシグナル配列が当業者に公知であり、宿主細胞に応じて選択され得る。大腸菌の周辺質中に所望のペプチドを分泌させるためのシグナル配列としては、OmpAを例示することができる、シグナル配列を含む形態も、本発明のコンジュゲートに、その一部の態様として含まれ得る。

[0080] また、本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、若しくは、KLK5/KLK14阻害ペプチドに予めタグを付加させることにより、アフィニティー・クロマトグラフィーによって該ペプチドを精製することができる。

[0081] 本発明のペプチドは、例えば、そのC末に、ビオチン、Streptag（登録商標）、StreptagII（登録商標）、His6等のオリゴヒスチジン、ポリヒスチジン、免疫グロブリンドメイン、マルトース結合蛋白質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、ジゴキシゲニンやジニトロフェノール等のハプテン、FLAG（登録商標）等のエピトープタグ、mycタグ、HAタグ等（以下まとめて「アフィニティー・タグ」と呼ぶ）を含むことができる。タグ付加体も、本発明のコンジュゲートに、その一部の態様として含まれ得る。本発明のコンジュゲートは、全体としてペプチド（ポリペプチド）であってもよい。

[0082] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又はKLK5/KLK14阻害ペプチドは、標識のための部分を含むことができ、具体的には、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属複合体、金属、コロイド金等の標識部分がコンジュゲートされ得る。標識のための部分を含む態様も、本発明のコンジュゲートに、その一部の態様として含まれ得る。

[0083] 本発明のKLK5阻害ペプチドのコンジュゲート、KLK5/KLK7阻害ペプチドのコンジュゲート、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドのコンジュゲートのアミノ酸配列の例として、次の(a1)乃至(a4)、(b1)乃至(b4)又は(c1)乃至(c4)のいずれか一つに記載のアミノ酸配列をそれぞれ挙げることができる：

(a1) 配列番号34、36、38、40、42、44、46、48及び96（図42、44、46、48、50、52、54、56及び106）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列；

(a 2) (a 1)に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つKLK5阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；

(a 3) (a 1)に記載のアミノ酸配列において1乃至20個、1乃至15個、1乃至10個、1乃至8個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、1若しくは2個、又は1個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つKLK5阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；及び、

(a 4) (a 1)に記載のアミノ酸配列と60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つKLK5阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列、

(b 1) 配列番号50、52、54及び56（図58、60、62及び64）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列；

(b 2) (b 1)に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つKLK5／KLK7阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；

(b 3) (b 1)に記載のアミノ酸配列において1乃至20個、1乃至15個、1乃至10個、1乃至8個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、1若しくは2個、又は1個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つKLK5／KLK7阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；及び、

(b 4) (b 1)に記載のアミノ酸配列と60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つKLK5／KLK7阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列、又は、

(c 1) 配列番号58及び60（図66及び68）のいずれか一つで示され

るアミノ酸配列；

(c 2) (c 1) に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ K L K 5 / K L K 1 4 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；

(c 3) (c 1) に記載のアミノ酸配列において 1 乃至 20 個、1 乃至 15 個、1 乃至 10 個、1 乃至 8 個、1 乃至 6 個、1 乃至 5 個、1 乃至 4 個、1 乃至 3 個、1 若しくは 2 個、又は 1 個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つ K L K 5 / K L K 1 4 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列；及び、

(c 4) (c 1) に記載のアミノ酸配列と 60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98% 又は 99% 以上同一であり、且つ K L K 5 / K L K 1 4 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列。

[0084] 本発明の K L K 5 阻害ペプチド、K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド、又は K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド（のアミノ酸配列）には、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸のいずれをも含むことができ、天然アミノ酸としては L-アミノ酸及び D-アミノ酸のいずれをも含むことができる。

[0085] 本発明の K L K 5 阻害ペプチド、K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド、又は K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチドは、単量体、2 量体、3 量体以上のオリゴマー又は多量体として存在し得る。2 量体、3 量体以上のオリゴマー及び多量体は、単一の単量体から構成されるホモ、及び、2 つ以上の異なる単量体から構成されるヘテロ、のいずれでもよい。単量体は、例えば、速やかに拡散し組織への浸透に優れている場合がある。2 量体、オリゴマー及び多量体は、例えば、局所において標的分子に対して高い親和性若しくは結合活性を有するか、遅い解離速度を有するか、又は、高い K L K 5 阻害活性、K L K 5 / K L K 7 阻害活性若しくは K L K 5 / K L K 1 4 阻害活性を示す等の優れた側面を有し得る。自発的な 2 量体化、オリゴマー化及び多量体化に加

え、意図した2量体化、オリゴマー化及び多量体化も、junfosドメイン、ロイシンジッパー等を本発明のペプチドに導入することにより、なし得る。

[0086] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、単量体、2量体、3量体以上のオリゴマー又は多量体で、1つ又は2つ以上の標的分子に結合するか又は標的分子の活性を阻害することができる。

[0087] 本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドがとり得る形態としては、単離された形態（凍結乾燥標品、溶液等）、上述のコンジュゲート体、他の分子に結合した形態（固相化された形態、異分子との会合体、標的分子と結合した形態等）等を挙げることができるが、それらに限定されるものではなく、発現、精製、使用、保存等に適合した形態を任意に選択することができる。

[0088]

3. KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、及び、KLK5/KLK14阻害ペプチドの同定

KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、及び、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、SPINK2のアミノ酸配列又は本発明のKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、及び、KLK5/KLK14阻害ペプチドの有するアミノ酸配列（例えば、上記（a1）、（b1）又は（c1）に記載のアミノ酸配列）、該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、該ヌクレオチド配列を含む核酸分子等を出発材料として、当業者に周知の方法により、同定することができる。好適な一例として、ヒトSPINK2変異体ライブラリーより、KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性を指標としてそれぞれ同定することができ、KLK5、KLK5/KLK7、又は、KLK5/KLK14に対する結合活性もそれぞれ指標として組み合わせてもよい。

[0089] 例えば、出発材料としての核酸分子は、変異誘発に供され、組換えDNA技術を用いて適切な細菌宿主又は真核性宿主中に導入され得る。SPINK 2変異体ライブラリーは、標的分子のバインダーや阻害剤を同定するための技術として公知であり、例えば、WO2014/024914公報における開示も、その全体を参照することにより本発明の開示に含まれる。適切な宿主において変異誘発に供されたヌクレオチド配列を発現させた後、所望の性質、活性、機能等を有するSPINK 2変異体とその遺伝形質とリンクしてなるクローンを、前記のライブラリーから濃縮及び／又は選抜し、同定することができる。クローンの濃縮及び／又は選抜には、細菌ディスプレイ法 (Francisco, J. A., et al. (1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90巻, 10444-10448頁)、酵母ディスプレイ法 (Boder, E. T., et al. (1997年) Nat. Biotechnol. 15巻, 553-557頁)、哺乳動物細胞ディスプレイ法 (Ho M, et al. (2009年) Methods Mol Biol. 525巻, 337-352頁)、ファージディスプレイ法 (Smith, G. P. (1985年) Science. 228巻, 1315-1317頁)、リボソームディスプレイ法 (Mattheakis LC, et al. (1994年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91巻19号, 9022-9029頁)、mRNAディスプレイ等の核酸ディスプレイ法 (Nemoto N, et al. (1997年) FEBS Lett. 414巻2号, 405-408頁)、コロニースクリーニング法 (Pini, A. et al. (2002年) Comb. Chem. High Throughput Screen. 5巻, 503-510頁)等、当業者に公知の方法を使用することにより、選抜され同定されたクローンに含まれるSPINK 2変異体のヌクレオチド配列を決定することにより、該ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を、当該クローンに含まれるSPINK 2変異体すなわちKLK5阻害ペプチド、KLK5/KL

K 7 阻害ペプチド、又は、K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチドの有するアミノ酸配列として決定することができる。

- [0090] 本発明の S P I N K 2 変異体は、例えば、天然型の S P I N K 2 に変異を誘発することにより得ることができる。「変異の誘発」とは、あるアミノ酸配列の各位置に存在する 1 つ又は 2 つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換するか若しくは欠失させるか、又は当該アミノ酸配列中には存在しないアミノ酸を挿入することができるようにすることを意味する。かかる欠失又は挿入により、配列長が変わり得る。本発明の S P I N K 2 変異体において、変異の誘発は、好適には、配列番号 6 1 (図 6 9) で示されるアミノ酸配列中の、 X_1 乃至 X_{12} の 1 つ又は 2 つ以上の位置において生じ得る。
- [0091] 但し、そのような好適な変異の誘発の後に、 X_1 乃至 X_{12} の 1 つ又は 2 つ以上の位置において、天然型のアミノ酸、すなわち天然型のアミノ酸配列中の特定の位置に存在するのと同じアミノ酸が維持されたものも、全体として少なくとも 1 つのアミノ酸が変異されていれば、変異体の範囲に含まれる。同様に、本発明のある態様において、 X_1 乃至 X_{12} 以外の部分の 1 つ以上の位置に変異を誘発した後に、当該位置に天然型のアミノ酸、すなわち天然型のアミノ酸配列中の特定の位置に存在するのと同じアミノ酸が維持されたものも、全体として少なくとも 1 つのアミノ酸が変異されていれば、変異体の範囲に含まれる。
- [0092] 「ランダム変異の誘発」とは、配列上の特定の位置について、1 つ又は 2 つ以上の異なるアミノ酸が、変異の誘発により、当該位置に一定の確率で導入させることを意味するが、少なくとも 2 つの異なるアミノ酸の導入される確率が全て同じではなくてもよい。また、本発明においては、少なくとも 2 つの異なるアミノ酸に、天然型のアミノ酸 (1 種) が含まれることを妨げるものではなく、そのような場合も「ランダム変異の誘発」の範囲に含まれる。
- [0093] 特定の位置にランダム変異を誘発する方法としては、当業者に公知の標準的方法を使用することができる。例えば、配列中の特定の位置に、縮重ヌク

レオチド組成物を含む合成オリゴヌクレオチドの混合物を用いたPCR (polymerase chain reaction) により変異を誘発することができる。例えば、コドンNNK又はNNS (N=アデニン、グアニン、シトシン又はチミン; K=グアニン又はチミン; S=アデニン又はシトシン) を使用すれば、天然アミノ酸20種全てに加え、停止コドンが導入される変異の誘発されるのに対し、コドンVVS (V=アデニン、グアニン又はシトシン) を使用すれば、Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr及びValが導入される可能性が無く、残る12の天然アミノ酸の導入が変異誘発される。また、例えば、コドンNMS (M=アデニン又はシトシン) を使用すれば、Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp及びValが導入される可能性が無く、残る11の天然アミノ酸の導入が変異誘発される。非天然アミノ酸の導入を変異誘発するために、特殊なコドン、人工的なコドン等を用いることができる。

[0094] 部位特異的な変異誘発は、高次構造を含む標的及び／又は該標的に対するペプチド若しくはペプチドが由来する野生型ペプチドの構造情報を利用して行うことができる。本発明においては、標的であるKLK5、KLK7、若しくは、KLK14、及び／又は、KLK5、KLK5及びKLK7、若しくは、KLK5及びKLK14に対するSPINK2変異体若しくは野生型SPINK2の、又は両者の複合体の、高次情報を含む構造情報を利用して、部位特異的な変異を導入することができる。例えば、KLK5阻害活性、KLK5／KLK7阻害活性、又は、KLK5／KLK14阻害活性を有するSPINK2変異体を同定し、次いでKLK5、KLK7又はKLK14及び当該SPINK2変異体の複合体の結晶を取得してX線結晶構造解析を行い、その解析結果に基づいて該SPINK2変異体が結合するKLK5、KLK7又はKLK14分子上のエピトープ及び該エピトープに対応する該SPINK2変異体上のパラトープを特定すること等を通じて得られる構造情報と、KLK5阻害活性、KLK5／KLK7阻害活性、又は、KLK5／KLK14阻害活性との相関を見出すことができる場合がある。そのよ

うな構造活性相関に基づいて、特定の位置において特定のアミノ酸への置換、特定の位置におけるアミノ酸の挿入又は欠失等をデザインし、実際にKLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性を確認することができる。

[0095] また、例えば、イノシン等の塩基対の特異性が改変されたヌクレオチド構成単位を用いて、変異を誘発することができる。

[0096] さらに、例えば、Taq DNAポリメラーゼ等の、校正機能を欠き、エラー率の高いDNAポリメラーゼを用いたエラー・ブローンPCR法、化学変異誘発等により、ランダムな位置への変異誘発が可能である。

[0097] KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳細胞ディスプレイ、ファージディスプレイ、リボゾームディスプレイ、核酸ディスプレイ、コロニースクリーニング等を利用して、ファージライブラリー、コロニーライブラリー等それぞれのスクリーニング方法に適した当業者に公知のライブラリーより濃縮及び／又は選抜することができる。それらのライブラリーのうち、ファージライブラリーにはファージミド、コロニースクリーニングにはコスミド等、それぞれのライブラリーに適した当業者に公知のベクター及び方法により構築することができる。そのかかるベクターは、原核細胞又は真核細胞に感染するウイルス又はウイルス性ベクターであってもよい。それらの組換えベクターは、遺伝子操作等当業者に公知の方法により調製することができる。

[0098] 細菌ディスプレイは、例えば、大腸菌の外膜リポ蛋白質（Lpp）の一部及び外膜蛋白質OmpAと所望の蛋白質を融合させ、大腸菌表面上に所望の蛋白質を提示させる技術である。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られるDNA群を細菌ディスプレイに適したベクターに導入し、当該ベクターで細菌細胞を形質転換すれば、形質転換細菌細胞表面上に、ランダム変異誘発された蛋白質群を提示するライブラリーを得ることができる（Francisco, J. A.,

et al. (1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90巻, 10444-10448頁)。

[0099] 酵母ディスプレイは、酵母の細胞表面の外殻にある α -アグルチニン等の蛋白質に所望の蛋白質を融合させ、酵母表面上に提示させる技術である。 α -アグルチニンには、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー付着シグナルと推定されるC末疎水性領域、シグナル配列、活性ドメイン、細胞壁ドメイン等が含まれ、それら进行操作することにより、酵母の細胞表面上に所望の蛋白質をディスプレイすることができる。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られるDNA群を酵母ディスプレイに適したベクターに導入し、当該ベクターで酵母細胞を形質転換すれば、形質転換酵母細胞表面上に、ランダム変異誘発された蛋白質群を提示するライブラリーを得ることができる (Ueda, M. & Tanaka, A., Biotechnol. Adv., 18巻、121頁～、2000年刊; Ueda, M. & Tanaka, A., J. Biosci. Bioeng., 90巻、125頁～、2000年刊等)。

[0100] 動物細胞ディスプレイは、例えば、血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) に代表される膜蛋白質の膜貫通領域と所望の蛋白質を融合させ、HEK 293やチャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞等の哺乳動物細胞表面上に所望の蛋白質を提示させる技術である。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られるDNA群を動物細胞ディスプレイに適したベクターに導入し、当該ベクターで動物細胞を形質転換すれば、形質転換動物細胞表面上に、ランダム変異誘発された蛋白質群を提示するライブラリーを得ることができる (Ho M, et al. (2009年) Methods Mol Biol. 525巻, 337-352頁)。

[0101] 酵母、細菌、動物細胞等の細胞上に提示された所望のライブラリーは、標的分子の存在下で保温するか、又は、標的分子と接触させることができる。

例えば、ビオチン等で修飾されたK L K 5、K L K 7又はK L K 1 4とライブラリーを含む細胞を一定時間保温した後、磁性ビーズ等の担体を添加し、細胞を担体から分離し、次いで担体を洗浄することにより非特異的な吸着物及び結合物を除去し、担体（に結合したK L K 5、K L K 7又はK L K 1 4）に結合したペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物が提示された細胞群を回収することができる。同様に、磁性ビーズ添加後に磁気細胞分離（M A C S）をする、又は、抗K L K 5抗体、抗K L K 7抗体又は抗K L K 1 4抗体を用いた細胞染色後にF A C Sを実施することで、担体（に結合したK L K 5、K L K 7若しくはK L K 1 4）又は、K L K 5、K L K 7若しくはK L K 1 4と結合したペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物が提示された細胞群を回収することができる。非特異的な吸着物部位及び／又は結合部位は、例えば、ブロッキング処理することも可能であり、ブロッキング工程も適切な方法であれば組み入れられ得る。そのようにして得られたペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を発現しているベクターを回収し、ベクターに挿入されたポリヌクレオチドの有するヌクレオチド配列を決定し、該ヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を決定することができる。また、ベクターを再度宿主細胞に導入し、上述の操作をサイクルとして1回乃至数回繰り返すことにより、標的分子に結合するペプチド集合物をより高度に濃縮することができる。

[0102] ファージディスプレイの場合、例えば、ファージミドは、プラスミド複製起点の他に、一本鎖バクテリオファージから誘導された第二の複製起点を含む細菌プラスミドである。ファージミドを有する細胞は、M 1 3又はそれに類似のヘルパーバクテリオファージによる重感染において、一本鎖複製モードを介してファージミドを複製することができる。すなわち、バクテリオファージ被覆蛋白質により被覆された感染性粒子の中に、一本鎖ファージミドDNAがパッケージされる。このようにして、ファージミドDNAを、感染細菌中にクローン二本鎖DNAプラスミドとして、ファージミドを、重感染した細胞の培養上清からバクテリオファージ状の粒子として、それぞれ形成

することができる。バクテリオファージ状の該粒子を、F性線毛を有する細菌にかかるDNAを感染させるために該細菌中に注入することにより、粒子自体をプラスミドとして再形成することができる。

[0103] 被検ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド及びバクテリオファージ被覆蛋白質 (coat protein) 遺伝子を含んで構成される融合遺伝子を該ファージミドに挿入して細菌に感染させ、該細胞を培養すれば、かかるペプチドを、該細菌上又はファージ様粒子上に発現若しくは提示 (ディスプレイと同義) させるか、又は、該被覆蛋白質との融合蛋白質としてファージ粒子中若しくは該細菌の培養上清中に産生することができる。

[0104] 例えば、該ポリヌクレオチド及びバクテリオファージ被覆蛋白質遺伝子 gpIII を含んで構成される融合遺伝子をファージミドに挿入し、M13又はそれに類似のヘルパーファージとともに大腸菌に重感染させれば、該ペプチド及び該被覆蛋白質を含んで構成される融合蛋白質として、該大腸菌の培養上清中に産生させることができる。

[0105] ファージミドの代わりに、環状又は非環状の各種ベクター、例えば、ウィルスベクターを用いる場合、当業者に公知の方法に従って、該ベクターに挿入された該ポリヌクレオチドの有するヌクレオチド配列によりコードされたアミノ酸配列を有するペプチドを、該ベクターが導入された細胞若しくはウィルス様粒子上に発現又は提示させるか、又は該細胞の培養上清中に産生することができる。

[0106] そのようにして得られる、ペプチドを発現しているライブラリーを、標的分子の存在下で保温するか、又は、標的分子と接触させることができる。例えば、KLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14が固相化された担体を、ライブラリーを含む移動相と一定時間保温した後、移動相を担体から分離し、次いで担体を洗浄することにより非特異的な吸着物及び結合物を除去し、担体 (に結合したKLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14

）に結合したペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を、溶出により回収することができる。溶出は、相対的に高いイオン強度、低いpH、中程度の変性条件、カオトロピック塩の存在下等で、非選択的に行うか、又は、KLK5、KLK7、KLK14等の可溶性の標的分子、標的分子に結合する抗体、天然のリガンド、基質等を添加して固相化された標的分子と競合させることにより選択的に行うことができる。非特異的な吸着部位及び／又は結合部位は、例えば、ブロッキング処理することも可能であり、ブロッキング工程も適切な方法であれば組み入れられ得る。

[0107] そのようにして得られたペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を発現しているベクターを回収し、ベクターに挿入されたポリヌクレオチドの有するヌクレオチド配列を決定し、該ヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を決定することができる。また、ベクターを再度宿主細胞に導入し、上述の操作をサイクルとして1回乃至数回繰り返すことにより、標的分子に結合するペプチド集合物をより高度に濃縮することができる。

[0108] リボゾームディスプレイは、例えば、終始コドンを持たない所望の蛋白質をコードするmRNAと無細胞蛋白質合成系を用いることで、試験管内で所望の蛋白質とそれに対応するmRNA、及びリボゾームが連結した分子を合成する技術である。ある蛋白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られるmRNA群と無細胞蛋白質合成系を利用することで、ランダム変異誘発された蛋白質群がリボゾーム上に提示されたライブラリーを得ることができる (Mattheakis LC, et al. (1994年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91巻19号, 9022-9029頁)。

[0109] 核酸ディスプレイは、mRNAディスプレイともよばれ、例えば、チロシルtRNAの3'末端に類似の構造をもつピューロマイシン等のリンカーを用いることで、所望の蛋白質、それをコードするmRNA及びリボゾームが連結した分子を合成する技術である。当該技術は生細胞ではなく、無細胞蛋白質合成系を利用するため、試験管内で合成することが可能である。ある蛋

白質の有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にランダム変異を誘発して得られる mRNA 群とピューロマイシン等のリンカー、及び、無細胞蛋白質合成系を利用することで、ランダム変異誘発された蛋白質群がリボゾーム上に提示されたライブラリーを得ることができる (Nemoto N, et al. (1997年) FEBS Lett. 414巻2号, 405-408頁)。

[0110] リボゾームディスプレイや核酸ディスプレイ等の無細胞合成系を介して得られる、ペプチドを発現しているライブラリーは、標的分子の存在下で保温するか、又は、標的分子と接触させることができる。例えば、KLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14が固相化された担体を、ライブラリーを含む移動相と一定時間保温した後、移動相を担体から分離し、次いで担体を洗浄することにより非特異的な吸着物及び結合物を除去し、担体（に結合したKLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14）に結合したペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を、溶出により回収することができる。溶出は、相対的に高いイオン強度、低いpH、中程度の変性条件、カオトロピック塩の存在下等で、非選択的に行うか、又は、KLK5、KLK7、KLK14等の可溶性の標的分子、標的分子に結合する抗体、天然のリガンド、基質等を添加して固相化された標的分子と競合させることにより選択的に行うことができる。非特異的な吸着物部位及び／又は結合部位は、例えば、ブロッキング処理することも可能であり、ブロッキング工程も適切な方法であれば組み入れられ得る。

[0111] そのようにして得られたペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物を発現している核酸を回収し、mRNAの場合はcDNAに逆転写反応後にヌクレオチド配列を決定し、該ヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を決定することができる。また、回収した核酸からmRNAを転写し、上述の操作をサイクルとして1回乃至数回繰り返すことにより、標的分子に結合するペプチド集合物をより高度に濃縮することができる。

- [0112] ペプチド、ペプチドの集合物又は濃縮されたペプチド集合物に予めアフィニティー・タグをコンジュゲートさせておけば、効率的に当該ペプチド又はそれらの集合物を精製することができる。例えば、プロテアーゼの基質をタグとして予めペプチド集合物にコンジュゲートさせておけば、該プロテアーゼ活性により切断することにより、ペプチドを溶出することができる。
- [0113] 得られた配列情報及びペプチドの機能等に基づき、得られたクローン又はライブラリーにさらなる変異を誘発させ、変異が導入されたライブラリーから、その機能（例えば、KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性）、物性（熱安定性、保存安定性等）、体内動態（分布、血中半減期）等が改善されたペプチドを取得することも可能である。
- [0114] 得られたペプチドが、KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性を有しているか否かを決定することにより、KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドをそれぞれ同定することができる。
- [0115] また、KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドは、好適には、野生型SPINK2のアミノ酸配列に含まれる16番Ser乃至30番Valからなるループ構造、31番Cys及び32番Glyからなるβストランド（1）並びに57番Ile乃至59番Argからなるβストランド（2）から構成されるβシート、並びに、41Glu番アミノ酸乃至51番Glyからなるαヘリックス、又は、それらに類似するか若しくはそれら（の位置）に少なくとも部分的に対応するループ構造、βシート、αヘリックス等から構成される立体構造が、KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性をそれぞれ発揮し得る程度に、維持され得る。かかる立体構造（全体の構造又は部分構造）を指標の一部として、より好適なKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドを同定することも可能である。

[0116] さらに、本発明は、SPINK2変異体ライブラリーを使用して、KLK5阻害ペプチド、KLK5／KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5／KLK14阻害ペプチドを同定する方法に関し、上記（75）記載の方法を例示することができる。また、本発明は、各種化合物ライブラリーを使用して、KLK5阻害化合物、KLK5／KLK7阻害化合物、又は、KLK5／KLK14阻害化合物を同定する方法に関し、かかる方法においては本発明のペプチド又はコンジュゲートを参照化合物、コントロール等として使用することができ、そのような方法として上記（76）を例示することができる。かかる方法においては、被験化合物の酵素阻害活性が参照化合物又はコントロールの酵素阻害活性と同等又はより強い場合、当該化合物を陽性と判定し、より弱い場合、当該化合物を陰性と判定してもよく、そのような比較を伴う方法としては、上記（77）を例示することができる。一方、KLK5及び任意でKLK7又はKLK14の有するプロテアーゼ活性を測定する工程を伴う任意の試験において、本発明のペプチド又はコンジュゲートを参照化合物、コントロール等として使用することができ、そのような試験方法も本発明に包含される。かかる試験には、特に限定はなく、上記（78）を例示することができるが、本発明の診断方法、検査方法、検出方法、及び、医薬組成物を投与する個体の同定方法（いずれも後述）も好適な例として挙げることができる。

[0117] 4. 本発明ペプチド又はコンジュゲートをコードする核酸分子、それを含むベクター、それらを含む細胞、並びに、組換え型ペプチド又はコンジュゲートの製造方法

本発明は、KLK5阻害ペプチド、KLK5／KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5／KLK14阻害ペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（以下、それぞれ「KLK5阻害ペプチドをコードする核酸分子」、「KLK5／KLK7阻害ペプチドをコードする核酸分子」又は「KLK5／KLK14阻害ペプチドをコードする核酸分子」という）、該遺伝子が挿入された組換えベクター、該遺伝子若

しくはベクターが導入された細胞（以下、「KLK5阻害ペプチドをコードする核酸分子含有細胞」、「KLK5/KLK7阻害ペプチドをコードする核酸分子含有細胞」又は「KLK5/KLK14阻害ペプチドをコードする核酸分子含有細胞」という）、KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドを産生する細胞（以下、それぞれ「KLK5阻害ペプチド産生細胞」、「KLK5/KLK7阻害ペプチド産生細胞」又は「KLK5/KLK14阻害ペプチド産生細胞」という）をも提供する。

[0118] 本発明のKLK5阻害ペプチドをコードする核酸分子、KLK5/KLK7阻害ペプチドをコードする核酸分子、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドをコードする核酸分子の好適な例として、それぞれ次の（a1）乃至（a4）、（b1）乃至（b4）又は（c1）乃至（c4）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列（以下、それぞれ「KLK5阻害ペプチドのヌクレオチド配列」、「KLK5/KLK7阻害ペプチドのヌクレオチド配列」若しくは「KLK5/KLK14阻害ペプチドのヌクレオチド配列」という）を含んでなるか、KLK5阻害ペプチドのヌクレオチド配列、KLK5/KLK7阻害ペプチドのヌクレオチド配列若しくはKLK5/KLK14阻害ペプチドのヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるか、又は、KLK5阻害ペプチドのヌクレオチド配列、KLK5/KLK7阻害ペプチドのヌクレオチド配列若しくはKLK5/KLK14阻害ペプチドのヌクレオチド配列からなるものを挙げるができる：

（a1）配列番号6、8、10、12、14、16、18及び20（図14、16、18、20、22、24、26及び28）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至63からなるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド番号1乃至189からなるヌクレオチド配列、又は、配列番号5、7、9、11、13、15、17及び19（図13、15、17、19、21、23、25及び27）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列；

(a 2) (a 1) に記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ K L K 5 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

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

(a 4) (a 1) に記載のヌクレオチド配列と 60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98% 又は 99% 以上同一であり、且つ K L K 5 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b 1) 配列番号 22、24、26 及び 28 (図 30、32、34 及び 36) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 乃至 63 からなるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又は、配列番号 21、23、25 及び 27 (図 29、31、33 及び 35) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 1 乃至 189 からなるヌクレオチド配列；

(b 2) (b 1) に記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ K L K 5 / K L K 7 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b 3) (b 1) に記載のヌクレオチド配列において 1 乃至 20 個、1 乃至 15 個、1 乃至 10 個、1 乃至 8 個、1 乃至 6 個、1 乃至 5 個、1 乃至 4 個、1 乃至 3 個、1 若しくは 2 個、又は 1 個のヌクレオチド又はヌクレオチド残基が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つ K L K 5 / K L K 7 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

ド配列；及び、

(b 4) (b 1) に記載のヌクレオチド配列と 60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つ K L K 5 / K L K 7 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列：

(c 1) 配列番号 30 及び 32 (図 38 及び 40) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 乃至 63 からなるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又は、配列番号 29 又は 31 (図 37 又は 39) に記載のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 1 乃至 189 からなるヌクレオチド配列；

(c 2) (c 1) に記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ K L K 5 / K L K 14 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(c 3) (c 1) に記載のヌクレオチド配列において 1 乃至 20 個、1 乃至 15 個、1 乃至 10 個、1 乃至 8 個、1 乃至 6 個、1 乃至 5 個、1 乃至 4 個、1 乃至 3 個、1 若しくは 2 個、又は 1 個のヌクレオチド又はヌクレオチド残基が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つ K L K 5 / K L K 14 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；及び、

(c 4) (c 1) に記載のヌクレオチド配列と 60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%又は99%以上同一であり、且つ K L K 5 / K L K 14 阻害活性を有するペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列。

[0119] 上記 (a 1) 乃至 (a 4)、(b 1) 乃至 (b 4) 又は (c 1) 乃至 (c 4) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなるか又は該アミノ酸配列を含む S P I N K 2 変異体ペプチドは、K L K 5、K L K 5 及び K L K 7、又は、K L K 5 及び K L K 14 の有する

プロテアーゼ活性を阻害し、好適には該プロテアーゼ活性を特異的に阻害する。

[0120] なお、配列番号5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29及び31（図13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37及び39）のヌクレオチド番号190乃至195は、野生型ヒトSPINK2（配列番号1、図9：63アミノ酸からなる）をコードするヌクレオチド配列に対応するヌクレオチドではなく、本発明のある態様において本発明のペプチドを発現させるために付加されたものである。

[0121] しかしながら、KLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドをコードする核酸分子は（a1）乃至（a4）、（b1）乃至（b4）又は（c1）乃至（c4）に限定されるものではなく、KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性を有するSPINK2変異体に含まれるアミノ酸配列、好適には配列番号61（図69）で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子は遍くKLK5阻害ペプチド、KLK5/KLK7阻害ペプチド、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドをコードする核酸分子の範囲に包含される。

[0122] また、本発明は、KLK5阻害ペプチドのコンジュゲート、KLK5/KLK7阻害ペプチドのコンジュゲート、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドのコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（以下、それぞれ「KLK5阻害コンジュゲートをコードする核酸分子」、「KLK5/KLK7阻害コンジュゲートをコードする核酸分子」又は「KLK5/KLK14阻害コンジュゲートをコードする核酸分子」という）、該遺伝子が挿入された組換えベクター、該遺伝子若しくはベクターが導入された細胞（以下、「KLK5阻害コンジュゲートをコードする核酸分子含有細胞」、「KLK5/KLK7阻害コンジュゲートをコードする核酸分子含有細胞」又は「KLK5/KLK14阻害コン

ジュゲートをコードする核酸分子含有細胞」という）、KLK5阻害ペプチドのコンジュゲート、KLK5/KLK7阻害ペプチドのコンジュゲート、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチドのコンジュゲートを産生する細胞（以下、それぞれ「KLK5阻害コンジュゲート産生細胞」、「KLK5/KLK7阻害コンジュゲート産生細胞」又は「KLK5/KLK14阻害コンジュゲート産生細胞」という）をも提供する。

[0123] 本発明のKLK5阻害コンジュゲートをコードする核酸分子、KLK5/KLK7阻害コンジュゲートをコードする核酸分子、又は、KLK5/KLK14阻害コンジュゲートをコードする核酸分子の好適な例として、それぞれの（a1）乃至（a4）、（b1）乃至（b4）又は（c1）乃至（c4）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列（以下、それぞれ「KLK5阻害コンジュゲートのヌクレオチド配列」、「KLK5/KLK7阻害コンジュゲートのヌクレオチド配列」若しくは「KLK5/KLK14阻害コンジュゲートのヌクレオチド配列」という）を含んでなるか、KLK5阻害コンジュゲートのヌクレオチド配列、KLK5/KLK7阻害コンジュゲートのヌクレオチド配列若しくはKLK5/KLK14阻害コンジュゲートのヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるか、又は、KLK5阻害コンジュゲートのヌクレオチド配列、KLK5/KLK7阻害コンジュゲートのヌクレオチド配列若しくはKLK5/KLK14阻害ペプチドのヌクレオチド配列からなるものを挙げる事ができる：

（a1）配列番号34、36、38、40、42、44、46、48及び96（図42、44、46、48、50、52、54、56及び106）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又は、配列番号33、35、37、39、41、43、45、47及び95（図41、43、45、47、49、51、53、55及び105）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列；

（a2）（a1）に記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つKLK5阻害活性を有

するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(a 3) (a 1) に記載のヌクレオチド配列において 1 乃至 20 個、1 乃至 15 個、1 乃至 10 個、1 乃至 8 個、1 乃至 6 個、1 乃至 5 個、1 乃至 4 個、1 乃至 3 個、1 若しくは 2 個、又は 1 個のヌクレオチド又はヌクレオチド残基が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つ K L K 5 阻害活性を有するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；及び、

(a 4) (a 1) に記載のヌクレオチド配列と 60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98% 又は 99% 以上同一であり、且つ K L K 5 阻害活性を有するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b 1) 配列番号 50、52、54 及び 56 (図 58、60、62 及び 64) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又は、配列番号 49、51、53 及び 55 (図 57、59、61 及び 63) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列；

(b 2) (b 1) に記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ K L K 5 / K L K 7 阻害活性を有するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b 3) (b 1) に記載のヌクレオチド配列において 1 乃至 20 個、1 乃至 15 個、1 乃至 10 個、1 乃至 8 個、1 乃至 6 個、1 乃至 5 個、1 乃至 4 個、1 乃至 3 個、1 若しくは 2 個、又は 1 個のヌクレオチド又はヌクレオチド残基が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つ K L K 5 / K L K 7 阻害活性を有するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；及び、

(b 4) (b 1) に記載のヌクレオチド配列と 60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98% 又は 99% 以上同

ーであり、且つK L K 5 / K L K 7 阻害活性を有するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列：

(c 1) 配列番号 5 8 及び 6 0 (図 6 6 及び 6 8) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又は、配列番号 5 7 又は 5 9 (図 6 5 又は 6 7) 記載のヌクレオチド配列；

(c 2) (c 1) に記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つK L K 5 / K L K 1 4 阻害活性を有するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(c 3) (c 1) に記載のヌクレオチド配列において 1 乃至 2 0 個、1 乃至 1 5 個、1 乃至 1 0 個、1 乃至 8 個、1 乃至 6 個、1 乃至 5 個、1 乃至 4 個、1 乃至 3 個、1 若しくは 2 個、又は 1 個のヌクレオチド又はヌクレオチド残基が置換、欠失、付加及び／又は挿入してなり、且つK L K 5 / K L K 1 4 阻害活性を有するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；及び、

(c 4) (c 1) に記載のヌクレオチド配列と 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 4 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % 以上同一であり、且つK L K 5 / K L K 1 4 阻害活性を有するペプチド又はコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列。

[0124] 上記 (a 1) 乃至 (a 4)、(b 1) 乃至 (b 4) 又は (c 1) 乃至 (c 4) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなるか又は該アミノ酸配列を含む S P I N K 2 変異体ペプチドは、K L K 5、K L K 5 及び K L K 7、又は、K L K 5 及び K L K 1 4 の有するプロテアーゼ活性を阻害し、好適には該プロテアーゼ活性を特異的に阻害する。

[0125] しかしながら、K L K 5 阻害ペプチド、K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド、又は、K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチドをコードする核酸分子は (a 1) 乃至 (a 4)、(b 1) 乃至 (b 4) 又は (c 1) 乃至 (c 4) に限定さ

れるものではなく、KLK5阻害活性、KLK5/KLK7阻害活性、又は、KLK5/KLK14阻害活性を有するSPINK2変異体に含まれるアミノ酸配列、好適には配列番号61（図69）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子は遍くKLK5阻害コンジュゲートをコードする核酸分子、KLK5/KLK7阻害コンジュゲートをコードする核酸分子、又は、KLK5/KLK14阻害コンジュゲートをコードする核酸分子の範囲に包含される。

[0126] アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を設計するには、各アミノ酸に対応するコドンをも1種又は2種以上使用することができる。そのため、あるペプチドが有する単一のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、複数のバリエーションを有し得る。かかるコドンの選択に際しては、該ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド又はそれを含むベクターが導入される、発現用の宿主細胞のコドン使用（codon usage）に応じて適宜コドンを選択したり、複数のコドンの使用の頻度若しくは割合を適宜調節したりすることができる。例えば、大腸菌を宿主細胞として用いる場合は、大腸菌において使用頻度が高いコドンを使用してヌクレオチド配列を設計してもよい。

[0127] 本発明のペプチド又はコンジュゲートをコードする核酸分子は、1つ又は2つ以上の調節配列に機能的に連結されていてもよい。「機能的に連結される」とは、連結された核酸分子を発現させることができる、又は、該分子に含まれるヌクレオチド配列の発現を可能にする、ことを意味する。調節配列は、転写調節及び／又は翻訳調節に関する情報を含む配列エレメントを含む。調節配列は、種により様々であるが、一般に、プロモーターを含み、原核生物の-35/-10ボックス及びシャイン・ダルガノ配列、真核生物のTATAボックス、CAAT配列、及び5'キャッピング配列等で例示される、転写及び翻訳の開始に関与する5'非コード配列を含む。かかる配列は、エンハンサーエレメント及び／又はリプレッサーエレメント、並びに宿主細胞内外の特定の区画へと天然型又は成熟型のペプチドを送達するための、翻

訳され得るシグナル配列、リーダー配列等を含んでもよい。さらに、調節配列は3'非コード配列を含んでよく、かかる配列には、転写終結又はポリアダニル化等に関与するエレメントを含み得る。ただし、転写終結に関する配列が、特定の宿主細胞において十分に機能しない場合は、当該細胞に適した配列で置換され得る。

- [0128] プロモーター配列としては、原核生物では *t e t* プロモーター、*l a c U V 5* プロモーター、*T 7* プロモーター等を、真核細胞では *S V 4 0* プロモーター、*C M V* プロモーター等を例示することができる。
- [0129] 本発明のペプチド又はコンジュゲートをコードする核酸分子は、単離された形態、ベクター若しくは他のクローニングビヒクル（以下、単に「ベクター」という：プラスミド、ファージミド、ファージ、バキュロウイルス、コスミド等）中又は染色体中に含まれる形態であってよいが、それらの形態に限定されない。ベクターは、上記調節配列に加え、発現に使用される宿主細胞に適した複製配列及び制御配列、並びに形質転換等により核酸分子が導入された細胞を選択可能な表現型を与える選択マーカーを含んでいてもよい。
- [0130] 本発明のペプチド又はコンジュゲートをコードする核酸分子、及び、本発明のペプチド又はコンジュゲートのヌクレオチド配列を含むベクターは、当該ペプチド、コンジュゲート又はヌクレオチド配列を発現可能な宿主細胞に形質転換等の当業者に公知の方法により導入することができる。該核酸分子又はベクターを導入された宿主細胞は、当該ペプチド又はヌクレオチド配列の発現に適した条件下で培養され得る。宿主細胞は、原核及び真核のいずれでもよく、原核では大腸菌、枯草菌等、真核ではサッカロミセス・セレビィシエ、ピキア・パストリス等の酵母、*S F 9*、*H i g h 5*等の昆虫細胞、*H e L a*細胞、*C H O*細胞、*C O S*細胞、*N S 0*等の動物細胞を例示することができる。真核細胞等を宿主細胞として用いることにより、発現した本発明のペプチドに所望の翻訳後修飾を施すことができる。翻訳後修飾としては、糖鎖等の官能基付加、ペプチド又は蛋白質の付加、アミノ酸の化学的性質の変換等を例示することができる。また、本発明のペプチド又はコンジュゲ-

トへの所望の修飾を人工的に施すことも可能である。そのようなペプチド又はコンジュゲートの修飾体も、本発明の「ペプチド」又は「コンジュゲート」の範囲に包含される。

[0131] 本発明はペプチド又はコンジュゲートの製造方法をも提供する。当該方法には、KLK5阻害ペプチド（若しくはKLK5阻害コンジュゲート）をコードする核酸分子含有細胞若しくはKLK5阻害ペプチド（若しくはKLK5阻害コンジュゲート）産生細胞、KLK5/KLK7阻害ペプチド（若しくはKLK5/KLK7阻害コンジュゲート）をコードする核酸分子含有細胞若しくはKLK5/KLK7阻害ペプチド（若しくはKLK5/KLK7阻害コンジュゲート）産生細胞、又は、KLK5/KLK14阻害ペプチド（若しくはKLK5/KLK14阻害コンジュゲート）をコードする核酸分子含有細胞若しくはKLK5/KLK14阻害ペプチド（若しくはKLK5/KLK14阻害コンジュゲート）産生細胞を培養する工程1、及び／又は、工程1で得られた培養物からSPINK2変異体を回収する工程2が含まれる。工程2には、当業者に公知の分画、クロマトグラフィー、精製等の操作を適用することができ、例えば、後述する本発明の抗体又はその結合断片を利用したアフィニティー・クロマトグラフィーによる精製が適用可能である。

[0132] 本発明の一部の態様において、ペプチド又はコンジュゲートに含まれるペプチドは、分子内ジスルフィド結合を有する。分子内ジスルフィド結合を有するペプチドは、シグナル配列等を用いて、酸化性の酸化還元環境を有する細胞区間に送達させることが好ましい場合がある。酸化性環境は、大腸菌等のグラム陰性細菌の周辺質、グラム陽性細菌の細胞外環境、真核細胞の小胞体内腔等により提供することが可能であり、かかる環境下では、構造的なジスルフィド結合の形成が促進され得る。また、大腸菌等の宿主細胞の細胞質において分子内ジスルフィド結合を有するペプチドを作製することも可能であり、その場合ペプチドは、可溶性の折り畳まれた状態で直接的に獲得されるか、又は封入体の形態で回収され、次いでイン・ビトロで復元され得る。

さらに、酸化性の細胞内環境を有する宿主細胞を選択し、その細胞質において分子内ジスルフィド結合を有するペプチドを作製することもできる。一方、ペプチドが分子内ジスルフィド結合を有さない場合は、還元性の酸化還元環境を有する細胞区間、例えば、グラム陰性細菌の細胞質において作製され得る。

[0133] 本発明のペプチド又はコンジュゲート（に含まれるペプチド部分）は、メリフィールド他のペプチド固相合成法、並びに、*t*-ブトキシカルボニル（*t*-Butoxycarbonyl: Boc）や9-フルオレニルメトキシカルボニル（9-Fluorenylmethoxycarbonyl: Fmoc）等を利用した有機合成化学的ペプチド合成法により例示される化学合成、イン・ビトロ翻訳等の、他の当業者に公知の方法によっても製造することができる。

[0134] 本発明は、その一部の態様として、本発明のペプチド又はコンジュゲートに含まれるペプチドに結合する抗体及びその結合断片を提供する。抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれでもよく、モノクローナル抗体としては、免疫グロブリン又はそれに由来するものであれば特に限定されない。抗体の結合断片は、抗原結合活性すなわち該ペプチドへの結合活性を有している範囲において限定はなく、重鎖及び軽鎖の両方若しくは一方又はその断片、定常領域やFc領域を欠くもの、他の蛋白質や標識用物質とのコンジュゲート体等も含まれる。かかる抗体及びその結合断片は、当業者に公知の方法により調製することができ、該ペプチドのアフィニティー・クロマトグラフィーによる精製、該ペプチドを含む医薬組成物又はその使用に関連した臨床検査、診断等における該ペプチドの検出、イムノアッセイ等に有用である。本発明の抗体又はその結合断片は、該抗体又は断片が結合する本発明のペプチドを用いたアフィニティー・クロマトグラフィーにより精製することができる。

[0135] 5. 医薬組成物

本発明は又はそのコンジュゲートを含む医薬組成物をも提供する。

[0136] 本発明のペプチド又はそのコンジュゲートを含む医薬組成物は、KLK5により惹起されるか又は増悪化され、KLK5の発現又は機能を阻害又は抑制することにより、かかる惹起又は増悪化の抑制、治癒、症状の維持若しくは改善、二次性疾患の回避等し得る各種疾患（以下、「KLK5に関わる疾患」又は「KLK5関連疾患」という）の治療及び／又は予防に有用である。KLK5に関わる疾患としては、例えば、ネザートン症候群（Netherton syndrome）（Furio, L., et al. (2015年) PLoS. Genet. 11巻, e1005389頁）、アトピー性皮膚炎（Fortugno, P., et al. (2012年) Hum. Mol. Genet. 21巻, 4187-4200頁）、酒さ（Yamasaki, K., et al. (2007年) Nat. Med. 13巻, 975-980頁）、紫外線による皮膚傷害（Nin, M., et al. (2009年) J. Dermatol. Sci. 54巻, 17-24頁）、乾癬（Komatsu, N., et al. (2007年) Br. J. Dermatol. 156巻, 875-883頁）、喘息（Grunberg, M., et al. (2018年) Eur. J. Immunol. 48巻, 1592-1594頁）、脊髄損傷（Radulovic, M., et al. (2013年) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 72巻, 1072-1089頁）、がん（例えば、子宮癌、膀胱尿路上皮癌、大腸癌、口腔扁平上皮癌、乳癌、頭頸部癌、メラノーマ、前立腺癌、グリオーマ等）（Emami, N., et al. (2007年) Mol. Oncol. 1巻, 269-287頁）、Barrett食道（Gene Expression Omnibus, accession #GSE13083に基づく）等を挙げることができるが、それらに限定されない。

[0137] KLK5はネザートン症候群様の皮膚症状発症の主因子と考えられる。KLK5は自己活性型のプロテアーゼで、KLK7及びKLK14の活性化にも関与する。一方、ネザートン症候群の患者及びネザートン症候群モデルマ

ウスの角質層においては、トリプシン様及びキモトリプシン様の高いプロテアーゼ活性が認められており、KLK5に加え、KLK7やKLK14など下流に位置するカリクレインファミリーが角質層のプロテアーゼ活性に関与することが示唆される。KLK5の阻害に加え、KLK7又はKLK14をも阻害することにより、ネザートン症候群様の皮膚症状をより強く抑制することができる場合があることが期待される。ネザートン症候群と関連のあるSPINK5の変異はHuman Gene Mutation Database (HGMD) に70以上挙げられており、ネザートン症候群の重症度と関連することが報告されている。SPINK5のエクソン1～9までに変異を持つ場合は、より重症化したネザートン症候群の病態と関連する。SPINK5の変異を調べることにより、ネザートン症候群の治療又は予防に本発明のペプチド又はコンジュゲートを含む医薬組成物を使用すべきか否かを判定することが可能となる。

- [0138] 本発明の医薬組成物には、治療又は予防に有効な量のペプチド又はコンジュゲートと薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含有せしめることができる。
- [0139] 「治療又は予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態及び投与経路につき治療又は予防効果を奏する量を意味し、「薬理学的に有効な量」と同義である。
- [0140] 本発明の医薬組成物には、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、該組成物又はそれに含まれるペプチド、コンジュゲート等の安定性、溶解性、徐放性、吸収性、浸透性、剤型、強度、性状、形状等を変化させたり、維持したり、保持したりするための物質（以下、「製剤用の物質」という）を含有せしめることができる。製剤用の物質としては、薬理学的に許容される物質であれば特に限定されるものではない。例えば、非毒性又は低毒性であることは、製剤用の物質が好適に具備する性質である。
- [0141] 製剤用の物質として、例えば、以下のものを挙げることができるが、これらに限定されるものではない；グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラ

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

[0142] これらの製剤用の物質の添加量は、本発明のペプチド、又はコンジュゲートに含まれるペプチドの重量に対して0.001乃至1000倍、好適には0.01乃至100倍、より好適には0.1乃至10倍である。

[0143] 本発明のペプチド又はコンジュゲートをリポソーム中に含有せしめたもの、該ペプチドとリポソームとが結合してなる修飾体を含有する医薬組成物も、本発明の医薬組成物に含まれる。

[0144] 賦形剤や担体は、通常液体又は固体であり、注射用の水、生理食塩水、人工脳脊髄液、その他の、経口投与又は非経口投与用の製剤に用いられる物質

であれば特に限定されない。生理食塩水としては、中性のもの、血清アルブミンを含むもの等を挙げることができる。

[0145] 緩衝剤としては、医薬組成物の最終pHが7.0乃至8.5になるように調製されたTrisバッファー、同じく4.0乃至5.5になるように調製された酢酸バッファー、同じく5.0乃至8.0になるように調製されたクエン酸バッファー、同じく5.0乃至8.0になるように調製されたヒスチジンバッファー等を例示することができる。

[0146] 本発明の医薬組成物は、固体、液体、懸濁液等である。本発明の別の医薬組成物の例として、凍結乾燥製剤を挙げることができる。凍結乾燥製剤を成型するには、スクロース等の賦形剤を用いることができる。

[0147] 本発明の医薬組成物の投与経路としては、点眼、経腸投与、局所投与及び非経口投与のいずれでもよく、例えば、結膜上への点眼、硝子体内投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与等を挙げることができる。

[0148] かかる医薬組成物の組成は、投与方法、本発明のペプチド、又はコンジュゲートに含まれるペプチドの、KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14に対する阻害活性、結合親和性等に応じて決定することができる。本発明の阻害ペプチドの標的に阻害活性が強い（ IC_{50} 値又は K_i 値が小さい）か又は親和性が高い（ K_D 値が小さい）ほど、少ない投与量でその薬効を発揮し得る。

[0149] 本発明のペプチド又はコンジュゲートの投与量は、薬理学的に有効な量であれば限定されず、個体の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、該ペプチドの標的に対する阻害活性、結合親和性、その他の要素に応じて適宜決定することができるが、通常、0.01乃至1000mg/kg、好適には0.1乃至100mg/kgを、1乃至180日間に1回、又は1日2回若しくは3回以上投与することができる。

[0150] 医薬組成物の形態としては、注射剤（凍結乾燥製剤、点滴剤を含む）、坐剤、経鼻型吸収製剤、経皮型吸収製剤、舌下剤、カプセル、錠剤、軟膏剤、

顆粒剤、エアゾール剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、点眼剤、生体埋め込み型製剤等を例示することができる。

[0151] 本発明のペプチド又はコンジュゲートを有効成分として含む医薬組成物は、他の医薬と同時に又は別個に投与することができる。例えば、他の医薬を投与した後に本発明のペプチド又はコンジュゲートを有効成分として含む医薬組成物を投与するか、かかる医薬組成物を投与した後に、他の医薬を投与するか、又は、当該医薬組成物と他の医薬とを同時に投与してもよい。同時に投与する場合、本発明のペプチド又はコンジュゲートと他の医薬とは、単一の製剤、及び、別々の製剤（複数の製剤）、のいずれに含有されてもよい。

[0152] それらの他の医薬は、1つの場合もあり、2つ、3つあるいはそれ以上を投与するか又は受けることもできる。それらをまとめて本発明の医薬組成物と「他の医薬との併用」又は「他の医薬との組み合わせ」と呼び、本発明のペプチド又はそのコンジュゲートに加えて他の医薬を含むか又は他の療法と組み合わせて使用される本発明の医薬組成物も「他の医薬との併用」又は「他の医薬との組み合わせ」の態様として本発明に含まれる。

[0153] 例えば、ネザートン症候群には、保湿剤、ステロイド薬、抗菌剤、等を挙げることができる。アトピー性皮膚炎には、ステロイド薬、カルシニューリン阻害剤、PDE4阻害剤、免疫抑制薬、IL-4/IL-13阻害剤、光線療法、等を挙げることができる。酒さには、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、アゼライン酸、ブリモニジン、等を挙げることができる。乾癬には、TNF α 阻害剤、IL-12/23阻害剤、IL-17阻害剤、PDE4、代謝拮抗剤、カルシニューリン阻害剤、フマル酸エステル、レチノイド製剤、ステロイド薬、ビタミンD3アナログ、光線療法、等を挙げることができる。喘息には、ステロイド薬、 β 2作動薬、等を挙げることができる。子宮癌、膀胱尿路上皮癌、大腸癌、口腔扁平上皮癌、乳癌、頭頸部癌、メラノーマ、前立腺癌、グリオーマ等のがんには、各種抗がん剤を挙げることができる。

[0154] 本発明のペプチド又はコンジュゲートを投与する工程を含む、KLK5に関わる疾患の治療方法又は予防方法、該疾患の治療用又は予防用医薬組成物を調製するための本発明のペプチド又はコンジュゲートの使用、該疾患の治療又は予防のための該ペプチド又はコンジュゲートの使用、をも本発明は提供する。該ペプチド又はコンジュゲートを含む治療用又は予防用キットも本発明に含まれる。

[0155] さらに、本発明のペプチド又はそのコンジュゲートの有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、又は、該ポリヌクレオチド若しくは該ベクターを含む細胞か又は本発明のペプチド若しくはそのコンジュゲートを発現する細胞を含む医薬組成物をも提供する。例えば、かかるポリヌクレオチド及びベクターはKLK5に関わる疾患の遺伝子治療に、かかる細胞はKLK5に関わる疾患の細胞治療に、それぞれ公知の手法を用いて適用することができる。また、例えば、かかるポリヌクレオチド又はベクターを、自家細胞又は他家細胞（同種細胞）に導入することにより、細胞治療用の細胞を調製することができる。そのようなポリヌクレオチド及びベクターは、細胞治療薬調製用の組成物としても、本発明に包含される。しかしながら、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、細胞等を含む医薬組成物の態様は上記のものに限定されない。

[0156] 本発明の医薬組成物に有効成分として含有されるペプチド又はそのコンジュゲートのKLK5に関わる疾患の治療効果を評価する手段として、動物モデルを使用することができる。例えば、ネザートン症候群では、その原因遺伝子であるSPINK5遺伝子に変異を有するモデルとして、SPINK5遺伝子欠損マウス（Descargues, P., et al. (2004年) Nat. Genet. 37巻, 56-65頁）、SPINK5遺伝子コンディショナルノックアウトマウス（Petrova, E., et al. (2019年) 8th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-

Related Peptidasesにおける口頭発表演題：Abstract Book 28頁）、Crusty2マウス（Mutagenetic database）等を挙げることができるが、それらに限定されない。

[0157] 6. 診断用組成物

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

[0158] 本発明の診断用組成物は、KLK5に関わる疾患、KLK5発現、KLK7発現、KLK14発現等の検査又は診断に有用である。本発明において検査又は診断には、例えば、罹患リスクの判定又は測定、罹患の有無の判定、進行や増悪化の程度の測定、本発明のペプチド又はコンジュゲートを含む医薬組成物による薬物治療の効果の測定又は判定、薬物治療以外の治療の効果の測定又は判定、再発リスクの測定、再発の有無の判定等が含まれるが、検査又は診断であればそれらに限定されるものではない。

[0159] 本発明の診断用組成物は、本発明のペプチド又はそのコンジュゲート、それらを含む組成物、それらを含む医薬組成物を投与する個体の同定に有用である。

[0160] かかる診断用組成物には、pH緩衝剤、浸透圧調節剤、塩類、安定化剤、防腐剤、顕色剤、増感剤、凝集防止剤等を含有せしめることができる。

[0161] 本発明はKLK5に関わる疾患の検査方法又は診断方法、該疾患の診断用組成物を調製するための本発明のペプチドの使用、該疾患の検査又は診断のための本発明のペプチドの使用、をも提供する。本発明のペプチドを含む検査又は診断用キットも本発明に含まれる。

[0162] 本発明のペプチドを含む検査又は診断の方法としてはサンドウィッチELISAが望ましいが、通常のELISA法やRIA法、ELISPOT（Enzyme-Linked ImmunoSpot）法、ドットブロット法、オクタロニー法、CIE（Counterimmunoelectrophoresis）法、CLIA（Chemiluminescent im

muno assay)、FCM (Flow Cytometry) 等の検出方法が利用可能である。検出には抗体又はその結合断片や本発明のペプチド若しくはそのコンジュゲート等を標識したものが利用される。標識法としてはビオチンのほか、HRP、アルカリフォスファターゼ、FITC等の発蛍光団、放射性同位元素等のラベル等生化学的解析に実施可能な標識法が利用できる。酵素標識を利用した検出にはTMB (3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine)、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)、p-NPP (p-nitrophenyl phosphate)、OPD (o-Phenylenediamine)、ABTS (3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) 等の発色基質やQuantaBlu (登録商標) Fluorogenic Peroxidase Substrate (Thermo Fisher Scientific) 蛍光基質のほか、化学発光基質を用いることができる。本測定には、ヒト又は非ヒト動物由来の試料に加え、組換え蛋白質等の人工的な処理を加えた試料をも供することができる。生物個体由来の被検試料としては、例えば、血液、関節液、腹水、リンパ液、脳脊髄液、肺胞洗浄液、唾液、痰、組織ホモジネート上清、組織切片等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

- [0163] 本発明のペプチドを含む検査又は診断用のサンドウィッチELISAキットには、本発明のペプチド又はコンジュゲートの蛋白質標準液、発色試薬、希釈用緩衝液、固相用蛋白質、検出用蛋白質、並びに洗浄液等が含まれてよい。抗原に結合した蛋白質量を測定する方法としては、吸光法、蛍光法、発光法、RI (Radioisotope) 法等が好適に適用され、測定には、吸光プレートリーダー、蛍光プレートリーダー、発光プレートリーダー、RI液体シンチレーションカウンター等が好適に使用される。

[0164] また、免疫沈降法を利用した方法でも検査又は診断が可能である。

[0165] また、本発明は被検サンプル中のKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14を検出又は測定する方法を提供する。これらの検出又は測定方法には、本発明の診断用組成物を使用することができる。本発明のペプチド又はそのコンジュゲートを被検試料と接触させ（工程1）、次いで該ペプチド又はコンジュゲートに結合したKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14の量又は測定を測定する（工程2）ことにより、該試料中のKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14を検出することができる。工程1としては、例えば、本発明のペプチドに免疫グロブリンのFc領域をコンジュゲーションしたものをプロテインGを介して磁気ビーズに固相化し、そこに被検試料を添加する等、工程2としては、例えば、磁気ビーズを分離し、ビーズと共に沈殿した可溶性蛋白質をSDS-PAGEやWestern blot法で解析し、KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14を検出する等を挙げることができる。本測定には、ヒト又は非ヒト動物由来の試料に加え、組換え蛋白質等の人工的な処理を加えた試料をも供することができる。生物個体由来の被検試料としては、例えば、血液、関節液、腹水、リンパ液、脳脊髄液、肺胞洗浄液、唾液、痰、組織ホモジネート上清、組織切片等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

[0166] 前記のKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14の検出は、イン・ビトロのみならず、イン・ビボでも実施することができる。画像診断の場合は、薬学的に許容可能な放射性核種や発光体で標識された本発明のペプチド又はそのコンジュゲートを利用することができる。工程1としては、例えば、被験者に、標識された該ペプチド若しくはそのコンジュゲートを投与する、工程2としては、例えば、PET/CT等の画像診断技術を使用して画像を取り、KLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14の存在を判定又は検査する等を挙げることができる。

[0167] 本発明の診断用組成物に含まれるペプチド又はそのコンジュゲートはKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14結合し、好適にはKLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14特異的結合活性を有する。

[0168] 本発明の医薬組成物が投与される個体を同定する方法も本発明に包含される。かかる同定方法においては、該個体由来サンプル中のKLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14を測定し、該サンプル中に、KLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14が検出されたか、又は、健常個体由来サンプル中に検出されたKLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14の量と比較してより多くのKLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14が検出された場合に、該個体を陽性と判定することができる。当該方法には、本発明の診断用組成物を使用することができる。

[0169] また、かかる同定方法の好適な一態様において、該個体はKLK5関連疾患に罹患しているか又はそのリスクがある。

[0170] さらに、本発明の医薬組成物は、その一態様において、かかる同定方法において陽性と判定された個体に投与され得る。

[0171]

7. KLK5、KLK5及びKLK7、又は、KLK5及びKLK14の分離法

本発明のペプチド又はコンジュゲートは、好適には、KLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14に特異的な結合活性を有する。したがって、本発明のペプチド又はそのコンジュゲートを用いて、KLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14と他のKLKが混在した試料中から、KLK5、KLK5及び／若しくはKLK7、又は、KLK5及び／若しくはKLK14を特異的に分離することができる。ペプチド又はコンジュゲートからの

K L K 5、K L K 5 及び／若しくは K L K 7、又は、K L K 5 及び／若しくは K L K 1 4 の遊離は、相対的に高いイオン強度、低い pH、中程度の変性条件、カオトロピック塩の存在下等で、非選択的に行うことができるが、K L K 5、K L K 5 及び／若しくは K L K 7、又は、K L K 5 及び／若しくは K L K 1 4 のプロテアーゼ活性を減弱させない範囲で行うことが好ましい。

実施例

[0172] 以下の実施例において、本発明の一部の態様についてさらに詳述するが、本発明はそれらに限定されない。

[0173] なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及び Maniatis, T. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1982 年発刊又は 1989 年発刊) に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。

[0174] 実施例 1. K L K 5 阻害ペプチドの調製

(1-1) K L K 5 阻害ペプチド発現ベクターの構築

各阻害ペプチドのヌクレオチド配列 (配列番号 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31) と SPINK2 のヌクレオチド配列を鋳型として、下記プライマー及び KOD-plus (TOYOBO) を用いた PCR 法 ((94℃ 15 秒、60℃ 30 秒、68℃ 20 秒) × 30 サイクル) により阻害ペプチド断片を増幅した。
プライマー 1 : 5' - AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG - 3' (配列番号 62 : 図 70)

プライマー 2 : 5' - AAAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTTGCGAATAA - 3' (配列番号 63 : 図 71)

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望の DNA 断片

を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) によりDNAを調製した。調製したDNA断片及びpET 32a (Novagen) を制限酵素BamHI (NEB) 及びXhoI (NEB) を用いて、37℃で1時間以上処理し、アガロースゲル電気泳動後に、所望のDNA断片を切り出し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製した。LigaFast Rapid DNA Ligation System (Promega) を用いて、それぞれの精製断片を室温で10分間反応させることでligation反応を実施した。Ligation溶液は、大腸菌JM109 (TOYOBO) に添加し、氷上で30分間静置した後、42℃で45秒の熱処理、さらに氷上で5分間静置し、0.1mg/mLアンピシリンを含む2YTプレートに播種後、37℃で一晩静置培養することで、大腸菌を形質転換した。翌日、形質転換した大腸菌を、0.1mg/mLアンピシリンを含むTerrific Broth培地 (Invitrogen) に植菌し、37℃で一晩培養後、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドDNAを回収し (以下、「miniprep処理」という)、配列解析を実施することで、pET 32a__Kex2__KLK5阻害ペプチドを構築した。

[0175] (1-2) KLK5阻害ペプチドの調製

(1-1) で構築したベクターで大腸菌Origami B (DE3) (Novagen) を形質転換し、0.1mg/mLアンピシリンを含む2YT培地を用いて37℃で培養後、IPTG (最終濃度1mM) を添加し、16℃で一晩培養した。翌日、遠心分離 (3,000g、20分、4℃) により集菌後、BugBuster Master Mix (Novagen) を用いてlysateを調製し、TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を用いてHis tag融合目的蛋白質を精製した。次に、Kex2 (Saccharomyces cerevisiae: Accession CAA96143) を用いてthior

edoxin tagと所望の蛋白質とを切断し、TALONを用いて精製した。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 75 10 / 300 GL) 又は逆相クロマトグラフィー (YMC-Pack ODS-AM) に供することで、KLK5阻害ペプチド14種を調製した。該誘導体の有するアミノ酸配列は、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34 (図14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40) に記載されている。

[0176] 実施例2. KLK5、KLK7及びKLK14の調製

(2-1) ヒトKLK5、ヒトKLK7及びヒトKLK14発現ベクターの構築

ヒトpro-KLK5、ヒトpro-KLK7及びヒトpro-KLK14のクローニングに用いたプライマー並びにPCR条件は次の通り。下記プライマー及びKOD-plus (TOYOBO) を用いたPCR法 (94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 10秒) ×30サイクル) により断片Aを増幅した。

プライマー3: 5' -GGCGATTATAAAGATGACGATGATAAACACCATCACCATCATC-3' (配列番号64: 図72)

プライマー4: 5' -GTTTAAACTCAATGATGGTGGTGATGGTGTTTATCATCGTCAT-3' (配列番号65: 図73)

次に、ヒトpro-KLK5 (Uniprot: Q9Y337)、ヒトpro-KLK7 (Uniprot: P49862)、ヒトpro-KLK14 (Uniprot: Q9P0G3) をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ鋳型として、下記プライマー及びKOD-plus (TOYOBO) を用いたPCR法 (94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 60秒) ×30サイクル) により断片を増幅した。

[0177] ヒトpro-KLK5増幅プライマー

プライマー5: 5' -AAAATCTAGAGCCGCCACCATGGC

CACAGCTAGACCCCT-3' (配列番号66:図74)

プライマー6:5'-CGTCATCTTTATAATCGCCGCTGT
TGGCCTGGATGGTTTCTCTG-3' (配列番号67:図75)

[0178] ヒトpro-KLK7増幅プライマー

プライマー7:5'-AAAATCTAGAGCCGCCACCATGGC
CAGATCTCTGCTGCTGCCC-3' (配列番号68:図76)

プライマー8:5'-CGTCATCTTTATAATCGCCCCGGT
GTTTCTTCATGGTGTCGTT-3' (配列番号69:図77)

[0179] ヒトpro-KLK14増幅プライマー

プライマー9:5'-AAAATCTAGAGCCGCCACCATGTT
CCTCCTCCTCACCGCCCTC-3' (配列番号70:図78)

プライマー10:5'-CGTCATCTTTATAATCGCCCTTG
TCGCGCATGGTCTCCTCGAT-3' (配列番号71:図79
)

[0180] 上記で増幅した断片と断片A、下記プライマー及びKOD-plus-(
TOYOBO)を用いたオーバーラップPCR法により、所望のDNA断片
を増幅した。

プライマー5 (配列番号66:図74) 又はプライマー7 (配列番号68:
図76) 又はプライマー9 (配列番号70:図78)

プライマー11:5'-AAAAGTTTAACTCAATGATGGT
GGTGATGGTGT-3' (配列番号72:図80)

[0181] 次に、マウスpro-KLK7(Uniprot:Q91VE3)、マウ
spro-KLK14(Uniprot:Q8CGR5)をコードするヌク
レオチド配列をそれぞれ鋳型として、下記プライマー及びKOD-plus-
(TOYOBO)を用いたPCR法((94℃ 15秒、60℃ 30秒
、68℃ 60秒)×30サイクル)により断片を増幅した。

[0182] マウスpro-KLK7増幅プライマー

プライマー12:5'-AAAATCTAGAGCCGCCACCATGG

GAGTGTGGCTGCTGAGCCTG-3' (配列番号73:図81)

プライマー13:5'-AAAAGTTTAACTCAATGATGGTGGTGATGGTGCCGGTGGGTCTTCATGGTTTCCATG-3' (配列番号74:図82)

[0183] マウスpro-KLK14増幅プライマー

プライマー14:5'-AAAATCTAGAGCCGCCACCATGTTTCTGCTGCTGATCATCCTG-3' (配列番号75:図83)

プライマー15:5'-AAAAGTTTAACTCAATGATGGTGGTGATGGTGGTTGCTCTGCATGGTCCGCTGAA-3' (配列番号76:図84)

[0184] 増幅した所望のDNA断片、制限酵素XbaI (NEB) 及びPmeI (NEB) を用いたクローニングにより、各遺伝子のC末端にHis tagが付加した哺乳細胞発現ベクターpCMA__pro-hKLK5、pCMA__pro-hKLK7、pCMA__pro-hKLK14、pCMA__pro-mKLK7、pCMA__pro-mKLK14を構築した。尚、操作は(1-1)に記載の方法に準じて行った。

[0185] (2-2) ヒトKLK5、ヒトpro-KLK7、ヒトpro-KLK14、マウスpro-KLK7、マウスpro-KLK14の発現精製

(2-1)で構築した発現ベクターは、PEI MAX 40000 (Polysciences) を用いてExpi293F細胞 (ThermoFisher Scientific) にトランスフェクションし、培養3日後に培養上清を回収した。HisTrap excel (GE healthcare) を用いて培養上清から所望のHis tag融合タンパク質を回収し、Amicon Ultra NMWL 10,000 (Merck Millipore) を用いてPBSにバッファー交換することで、KLK5、ヒトpro-KLK7、ヒトpro-KLK14、マウスpro-

KLK7、マウスpro-KLK14をそれぞれ精製した。

- [0186] (2-3) ヒトKLK5、ヒトKLK7、ヒトKLK14、マウスKLK5、マウスKLK7、マウスKLK14の調製

KLK活性化バッファー (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0.05% (w/w) Brij-35, pH 7.5) で調製した200μg/mLのpro-KLK7又は14に等量の20μg/mLのthermolysinを添加し、37℃で一定時間反応後、100mM EDTAを等量混合することで活性化ヒトKLK7、活性化ヒトKLK14、活性化マウスKLK7、活性化マウスKLK14を調製した。

- [0187] また、活性化バッファー (50mM Tris-HCl, 0.005% (w/w) Brij-35, pH8.0) で調製した200μg/mLのマウスKLK5 (R&D Systems; 7236-SE) と2μg/mLのヒトKLK5を等量混ぜ、37℃で24時間反応することで活性化マウスKLK5を調製した。

- [0188] 実施例3. KLK5阻害ペプチドの評価

(3-1) KLK5阻害ペプチドのヒト/マウスKLK5、ヒト/マウスKLK7及びヒト/マウスKLK14阻害活性評価

基質ペプチドを10mMになるようDMSOで溶解し、Assay buffer (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH8.0) で希釈して使用した。Assay bufferで希釈したヒト/マウスKLK5、ヒト/マウスKLK7、又はヒト/マウスKLK14と阻害ペプチドをそれぞれ25μLずつ混ぜ、37℃で20分反応させた後にAssay bufferで希釈した基質を50μL加えて、Enspire (PerkinElmer) で蛍光シグナルを測定した。各酵素と基質の組み合わせは以下の通り使用した。なお、各阻害ペプチドは終濃度0.098~1,000nM、反応及び測定にはプロテオセーブ (登録商標) SS96F黒プレート (住友ベークライト株式会社) を使用した。

- [0189] Human KLK5 阻害活性評価；終濃度 10 nM hKLK5、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems)、蛍光シグナル excitation 380 nm / emission 460 nm
- [0190] Human KLK7 阻害活性評価；終濃度 1 μ g/mL hKLK7、終濃度 20 μ M 基質ペプチド Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp) -NH₂ (R&D Systems：図 85、アミノ酸配列は配列番号 77)、蛍光シグナル excitation 320 nm / emission 405 nm
- [0191] Human KLK14 阻害活性評価；終濃度 0.2 μ g/mL hKLK14、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems)、蛍光シグナル excitation 380 nm / emission 460 nm
- [0192] Mouse KLK5 阻害活性評価；終濃度 0.25 μ g/mL mouse KLK5、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems)、蛍光シグナル excitation 380 nm / emission 460 nm
- [0193] Mouse KLK7 阻害活性評価；終濃度 0.5 μ g/mL mouse KLK7、終濃度 7 μ M 基質ペプチド Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp) -NH₂ (R&D Systems：図 85、アミノ酸配列は配列番号 77)、蛍光シグナル excitation 320 nm / emission 405 nm
- [0194] Mouse KLK14 阻害活性評価；終濃度 0.1 μ g/mL mouse KLK14、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems)、蛍光シグナル excitation 380 nm / emission 460 nm
- [0195] 各濃度における各阻害ペプチドの基質ペプチド分解速度を算出し、阻害ペ

プチド濃度 0 nM の分解速度を 100% として GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software Inc.) を用いて 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を算出した結果、いずれの阻害ペプチドも低濃度でヒト K L K 5 酵素活性を阻害することが明らかとなった (表 1、図 2)。一部の阻害ペプチドはヒト K L K 7 又はヒト K L K 14 酵素活性を低濃度で阻害し、また、一部の阻害ペプチドはこれらのプロテアーゼに対して弱く阻害活性を示した (表 1)。当該阻害ペプチドは、マウス K L K 5、K L K 7 又は K L K 14 に対しても同様の活性を示した (表 2)。尚、 IC_{50} 値の算出には、独立した 3 回の実験の平均値を使用した。

[0196] [表1]

K L K 5 阻害ペプチドのヒト K L K 5、ヒト K L K 7、ヒト K L K 14 阻害活性

ID	IC_{50} (nM) for hK L K 5	IC_{50} (nM) for hK L K 7	IC_{50} (nM) for hK L K 14
K 5 1 0 2 8	6.1 ± 0.5	249 ± 25	>1,000
K 5 0 0 3 2	7.1 ± 0.4	>1,000	>1,000
K 5 0 0 5 5	6.7 ± 0.2	>1,000	>1,000
K 5 1 0 6 9	6.8 ± 0.4	>1,000	72 ± 23
K 5 1 0 7 2	7.0 ± 0.2	>1,000	434 ± 18
K 5 0 0 1 5	6.8 ± 0.3	>1,000	17 ± 1
K 5 0 0 1 6	6.9 ± 1.1	>1,000	>1,000
K 5 1 0 3 4	6.4 ± 0.3	>1,000	>1,000
K 5 0 0 6 2	7.5 ± 0.7	>1,000	499 ± 27
K 5 1 0 9 0	4.5 ± 0.3	>1,000	>1,000
K 5 0 0 9 8	8.3 ± 0.9	>1,000	268 ± 31
K 5 1 0 0 5	5.8 ± 2.1	17 ± 0.2	>1,000
K 5 0 0 3 1	5.4 ± 0.1	13 ± 0.3	>1,000
K 5 1 0 5 7	12 ± 1	24 ± 0.7	>1,000

[0197]

[表2]

KLK5阻害ペプチドのマウスKLK5、マウスKLK7、マウスKLK14阻害活性

ID	IC ₅₀ (nM) for mKLK5	IC ₅₀ (nM) for mKLK7	IC ₅₀ (nM) for mKLK14
K51028	<0.5	77	>1,000
K50032	127	>1,000	>1,000
K50055	<0.5	>1,000	>1,000
K51069	<0.5	181	40
K51072	2	512	>1,000
K50015	<0.5	248	108
K50016	15	>1,000	>1,000
K51034	54	>1,000	>1,000
K50062	10	>1,000	>1,000
K51090	2	658	>1,000
K50098	14	>1,000	547
K51005	48	23	214
K50031	40	4	244
K51057	149	27	437

[0198] (3-2) KLK5阻害ペプチドの交差性評価

基質ペプチドの分解を指標に、他のプロテアーゼに対する特異性を評価した。(3-1)に記載の方法と同様、Assay bufferで希釈したプロテアーゼとサンプル(終濃度1 μ M)をそれぞれ25 μ Lずつ混ぜ、37°Cで20分反応させた後にAssay bufferで希釈した基質を50 μ L加えて、Enspire (PerkinElmer)で蛍光シグナルを測定した。尚、プロテアーゼ活性評価にはAssay buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, pH8.0)を用い、反応及び測定にはプロテオセーブ(登録商標)SS96F黒プレート(住友ベークライト株式会社)を使用した。特異性評価に用いたプロテアーゼ及び基質の組み合わせは以下の通り。

[0199] Bovine trypsin阻害活性評価; 終濃度5nM trypsin (Pierce; 20233)、終濃度100 μ M 基質ペプチドBoc

-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)
)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission
460nm

[0200] Human trypsin阻害活性評価；終濃度1nM trypsin
(Sigma-Aldrich; T6424)、終濃度100μM 基質ペ
プチドBoc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems
; ES011)、蛍光シグナルexcitation 380nm/em
ission 460nm

[0201] Bovine α-chymotrypsin阻害活性評価；終濃度10n
M chymotrypsin (Worthington Biochem
ical Corporation; LS001434)、終濃度100μ
M 基質ペプチドSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (株式
会社ペプチド研究所；3120-v：図86、アミノ酸配列は配列番号78
)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission
460nm

[0202] Human chymotrypsin阻害活性評価；終濃度10nM c
hymotrypsin (Sigma-Aldrich; C8946)、終
濃度10μM 基質ペプチドSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-M
CA (株式会社ペプチド研究所；3120-v：図87、アミノ酸配列は配
列番号79)、蛍光シグナルexcitation 380nm/em
ission 460nm

[0203] Human tryptase阻害活性評価；終濃度1nM trypta
se (Sigma-Aldrich; T7063)、終濃度100μM 基
質ペプチドBoc-Phe-Ser-Arg-MCA (株式会社ペプチド研
究所；3107-v)、蛍光シグナルexcitation 380nm/
emission 460nm

[0204] Human chymase阻害活性評価；終濃度100nM chyma
se (Sigma-Aldrich; C8118)、終濃度100μM 基

質ペプチド Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3120-v: 図87、アミノ酸配列は配列番号79)、蛍光シグナル excitation 380nm/emission 460nm

[0205] Human plasmin 阻害活性評価; 終濃度 50nM Plasmin (Sigma-Aldrich; P1867)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc-Val-Leu-Lys-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3104-v)、蛍光シグナル excitation 380nm/emission 460nm

[0206] Human thrombin 阻害活性評価; 終濃度 1nM thrombin (Sigma-Aldrich; T6884)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)、蛍光シグナル excitation 380nm/emission 460nm

[0207] Human neutrophil elastase 阻害活性; 終濃度 0.00001U/ μ L Neutrophil elastase (Enzo Life Sciences)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Suc(OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-MCA (株式会社ペプチド研究所; 3153-v: 図88、アミノ酸配列は配列番号80)、蛍光シグナル excitation 380nm/emission 460nm

[0208] Human matrilysin 阻害活性評価; 終濃度 1nM matrilysin (R&D Systems; 3946-SE)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (R&D Systems; ES014)、蛍光シグナル excitation 380nm/emission 460nm

[0209] Human proteinase 3 阻害活性評価; 終濃度 100nM proteinase 3 (Sigma-Aldrich; P2200)、終濃度 100 μ M 基質ペプチド Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (株

式会社ペプチド研究所；3112-v：図89、アミノ酸配列は配列番号8

1) 蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0210] Human tPA阻害活性評価；終濃度10nM tPA (Sigma-Aldrich; T0831)、終濃度100μM 基質ペプチドPyr-Gly-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所；3145-v)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0211] Human uPA阻害活性評価；終濃度2nM uPA (Sigma-Aldrich; U0633)、終濃度100μM 基質ペプチドPyr-Gly-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所；3145-v)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0212] Human plasma kallikrein阻害活性評価；終濃度0.125μg/mL plasma kallikrein (R&D Systems; 2497-SE)、終濃度100μM 基質ペプチドZ-Phe-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所；3095-v)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0213] Human KLK1阻害活性評価；終濃度0.1μg/mL KLK1 (R&D Systems; 2337-SE)、終濃度100μM 基質ペプチドPro-Phe-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所；3096-v)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0214] Human KLK2阻害活性評価；終濃度2μg/mL KLK2 (R&D Systems; 2337-SE)、終濃度100μM 基質ペプチドPro-Phe-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所；3096-v)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0215] Human KLK4阻害活性評価；終濃度1μg/mL KLK4 (R&

D Systems; 1719-SE)、終濃度 $100\mu\text{M}$ 基質ペプチド Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0216] Human KKK7 阻害活性評価; 終濃度 $1\mu\text{g/mL}$ KKK7、終濃度 $20\mu\text{M}$ 基質ペプチドMca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH₂ (R&D Systems: 図85、アミノ酸配列は配列番号77)、蛍光シグナルexcitation 320nm/emission 405nm

[0217] Human KKK8 阻害活性評価; 終濃度 5nM KKK8 (UniProt: O60259, 発明者らが調製)、終濃度 $100\mu\text{M}$ 基質ペプチド Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0218] Human KKK12 阻害活性評価; 終濃度 $0.1\mu\text{g/mL}$ KKK12 (R&D Systems; 3095-SE)、終濃度 $100\mu\text{M}$ 基質ペプチドBoc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0219] Human KKK13 阻害活性評価; 終濃度 $0.5\mu\text{g/mL}$ KKK13 (R&D Systems; 2625-SE)、終濃度 $100\mu\text{M}$ 基質ペプチドBoc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; ES011)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0220] Human KKK14 阻害活性評価; 終濃度 $0.2\mu\text{g/mL}$ hKKK14、終濃度 $100\mu\text{M}$ 基質ペプチドBoc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems)、蛍光シグナルexcitation 380nm/emission 460nm

[0221] (3-1)と同様、ペプチド基質の分解を指標に、KLK5阻害ペプチドのKLK5以外のプロテアーゼに対する交差性を評価した。一部の阻害ペプチドはChymotrypsinに対して阻害ペプチド終濃度1 μ Mで弱く交差性を示した(IC_{50} 値は1 μ M未満)が、大半の阻害ペプチドはKLKn($n=1, 2, 4, 5, 7, 8, 12$ 又は 14)以外のいずれのプロテアーゼに対しても阻害活性を示さなかった(図3)。一方、一部の阻害ペプチドはKLK4又はKLK12に対して阻害ペプチド終濃度1 μ Mで阻害活性を示した(IC_{50} 値は1 μ M未満)が、多くの阻害ペプチドはKLK5、KLK7及びKLK14を除くKLKnに対してもプロテアーゼ阻害活性を示さず、阻害ペプチドが高い特異性を有していることが明らかとなった。

[0222] (3-3) KLK5阻害ペプチドのKLK5結合活性評価

KLK5阻害ペプチドの結合親和性を測定するため、BLAcORE T 200 (GE healthcare)を用いて表面プラズモン共鳴分析を実施した。一本鎖DNAが固定化されたSensor Chip CAP (GE healthcare)に、ストレプトアビジンコンジュゲートの相補鎖DNAをハイブリダイゼーションでキャプチャーさせた。次に、EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo Fisher Scientific)を用いてビオチン化したKLK5を流速10 μ L/minでキャプチャーさせることで、約10 RUを固定化した。その後、HBS-EPで2倍段階希釈したKLK5阻害ペプチド(0.625~10 nM)をアナライトとして流速30 μ L/minで添加した。BLAcORE T 200 Evaluation software (version 2.0)において、simple one-to-one Langmuir binding modelでSingle cycle kineticsを用いて解析し、 k_{on} 及び k_{off} を算出した。尚、解離定数 K_D は k_{off}/k_{on} の比率として算出した。さらに、Biotin CAPture Kit (GE healthcare) 付属のRegeneration bufferでSensor Chip CAPを再生し、ビオ

チン化KLK5を繰り返しキャプチャーさせることで、複数のKLK5阻害ペプチドを測定した。

[0223] 測定した14種のKLK5阻害ペプチドはいずれも1 nMを下回る K_D 値を示しており、非常に強い結合力であることが明らかとなった（表3（A））

。

[0224] [表3(A)]

KLK5阻害ペプチドのKLK5結合活性

ID	K_{on} (1/M·s)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
K51028	1.5×10^6	2.0×10^{-5}	1.4×10^{-11}
K50032	2.0×10^6	2.7×10^{-4}	1.3×10^{-10}
K50055	9.8×10^5	1.8×10^{-5}	1.9×10^{-11}
K51069	9.4×10^5	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-12}
K51072	8.4×10^5	2.2×10^{-5}	2.6×10^{-11}
K50015	9.4×10^5	1.0×10^{-6}	1.1×10^{-12}
K50016	7.0×10^6	2.9×10^{-4}	4.2×10^{-11}
K51034	5.2×10^5	3.5×10^{-5}	6.8×10^{-11}
K50062	1.2×10^6	2.9×10^{-6}	2.5×10^{-12}
K51090	2.1×10^6	5.7×10^{-5}	2.7×10^{-11}
K50098	1.0×10^6	1.8×10^{-5}	1.8×10^{-11}
K51005	3.5×10^6	1.2×10^{-3}	3.4×10^{-10}
K50031	8.2×10^5	5.0×10^{-5}	6.1×10^{-11}
K51057	6.0×10^6	1.5×10^{-3}	2.6×10^{-10}

[0225] (3-4) KLK5阻害ペプチドFc融合体のKLK5結合活性評価

後述の(5-2)で調製したKLK5阻害ペプチドFc融合体の結合親和性を測定するため、BIAcore T 200 (GE healthcare) を用いて表面プラズモン共鳴分析を実施した。

[0226] 抗ヒトIgG (Fc) 抗体を固定化したSensor Chip CM5 (GE healthcare) に、KLK5阻害ペプチドFc融合体を流速 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ でキャプチャーさせることで、約30~50RUを固定化した。その後、HBS-EPで2倍段階希釈したKLK5 ($0.625 \sim 10 \text{ nM}$) をアナライトとして流速 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で添加した。BIAc

ore T 200 Evaluation software (version 2.0) において、simple one-to-one Langmuir binding modelでSingle cycle kineticsを用いて解析し、 k_{on} 及び k_{off} を算出した。尚、解離定数 K_D は k_{off}/k_{on} の比率として算出した。さらに、Human Antibody Capture Kit (GE healthcare) 付属のRegeneration bufferで、抗ヒトIgG (Fc) 抗体を固定化したSensor Chip CM5を再生し、KLK5阻害ペプチドFc融合体を繰り返しキャプチャーさせることで、複数のKLK5阻害ペプチドFc融合体へのKLK5の結合活性を測定した。

[0227] 測定した14種のKLK5阻害ペプチドFc融合体はいずれも1 nMを下回る K_D 値を示しており、非常に強い結合力であることが明らかとなった（表3 (B)）。

[0228]

[表3(B)]

KLK5阻害ペプチドFc融合体のKLK5結合活性

ID	$K_{on}(1/M \cdot s)$	$K_{off}(1/s)$	$K_D(M)$
D3-K5102 8-Fc	5.39×10^5	1.81×10^{-6}	3.35×10^{-12}
D3-K5003 2dN-Fc	1.08×10^6	5.69×10^{-6}	5.25×10^{-12}
D3-K5005 5-Fc	5.49×10^5	2.32×10^{-6}	4.22×10^{-12}
D3-K5106 9dN-Fc	7.14×10^5	2.81×10^{-6}	3.93×10^{-12}
D3-K5107 2-Fc	2.25×10^5	1.68×10^{-6}	7.48×10^{-12}
D3-K5001 5-Fc	1.04×10^6	3.52×10^{-6}	3.38×10^{-12}
D3-K5001 6dN-Fc	7.18×10^5	5.60×10^{-6}	7.81×10^{-12}
D3-K5103 4-Fc	2.83×10^5	2.93×10^{-6}	1.03×10^{-11}
D3-K5006 2-Fc	5.66×10^5	6.52×10^{-6}	1.15×10^{-11}
D3-K5109 0-Fc	7.00×10^5	7.86×10^{-6}	1.12×10^{-11}
D3-K5009 8dN-Fc	9.22×10^5	$<1.62 \times 10^{-6}$	$<1.76 \times 10^{-12}$
D3-K5100 5-Fc	1.47×10^5	1.96×10^{-5}	1.33×10^{-10}
D3-K5003 1-Fc	8.81×10^4	$<1.00 \times 10^{-6}$	$<1.14 \times 10^{-11}$
D3-K5105 7-Fc	8.69×10^4	1.79×10^{-5}	2.06×10^{-10}

[0229] 実施例4. X線結晶構造を用いたKLK5阻害ペプチドの解析

(4-1) KLK5/KLK5阻害ペプチド複合体の調製

(1-2) 及び(2-2)に記載した方法に従って、配列番号で示される

アミノ酸配列を有するKLK5阻害ペプチドK51034、及びKLK5をそれぞれ調製した。50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 8.0の条件下で両者を混合後、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200 10/300 GL) により複合体を単離精製した。

[0230] (4-2) X線結晶構造解析

(4-1)で調製した複合体溶液を12mg/mLまで濃縮後、リザーバー溶液 (0.2M Magnesium Chloride hexahydrate, 20%PEG3350) と1対1で混合し、蒸気拡散法により結晶化した。得られた立方体状の単結晶を、20%のグリセロールを含むリザーバー溶液に浸漬した後、液体窒素にて凍結した。凍結結晶をクライオ気流下でX線照射し、回折イメージを得た (HyPIXel 6000HE/MicroMax007)。CrysAlisProを使用した解析により、最大分解能1.7Åのスケーリングデータを取得した。KLK5単体 (PDB ID: 2PSX)、及びSPINK2単体 (PDB ID: 2JXD) を鋳型とした分子置換法により位相を決定し、構造精密化後、分解能1.8ÅでKLK5/該ペプチドK51034の複合体結晶を決定した。単位格子中にはKLK5とSPINK2が各1分子ずつ含まれていた。SPINK2分子については、配列情報と観測された電子密度に基づき、KLK5との相互作用部位を含む部分的な分子モデルを構築した。当該KLK5阻害ペプチドK51034はKLK5酵素活性中心を含む領域へ結合していることが認められた (図4)。

[0231] 実施例5. KLK5阻害ペプチドFc融合体の調製

(5-1) KLK5阻害ペプチドFc融合体発現ベクターの構築

各阻害ペプチドのヌクレオチド配列 (配列番号5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31) を鋳型として、下記プライマー及びKOD-plus (TOYOBO) を用いたPCR法 ((94°C 15秒、60°C 30秒、68°C 20秒) ×30サイクル) により阻害ペプチド断片を増幅した。

プライマー16 : 5' - AGATGGGTGTTGTCTGATGACGA
CGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTC-3' (配列番号81 : 図
89)

プライマー17 : 5' - GCAGGGGGCCATTCCGGAT-3' (配
列番号82 : 図90)

[0232] 下記プライマー及びKOD-plus (TOYOBO) を用いたPCR
法 ((94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 10秒) ×30サイクル
) により断片Bを増幅した。

プライマー18 : 5' - AAAATCTAGAGCCGCCACCATGA
AGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCT-3' (配列番号8
3 : 図91)

プライマー19 : 5' - AGACAACACCCATCTAGGAGCGG
CCACCAGCAGCAGAAAGAACC-3' (配列番号84 : 図9
2)

[0233] ヒトIgG1のFc領域 (配列番号87) を鋳型として下記プライマー及
びKOD-plus (TOYOBO) を用いたPCR法 ((94℃ 15
秒、60℃ 30秒、68℃ 30秒) ×30サイクル) によりヒトIgG
1のFc領域を含む断片Cを増幅した。

プライマー20 : 5' - ATCCGGAATGGCCCCCTGCGAACC
CAAGAGCTGCGAC-3' (配列番号85 : 図93)

プライマー21 : 5' - AAAAGTTTAAACTCATTTGCCGG
GGCTCAG-3' (配列番号86 : 図94)

[0234] 上記で増幅した阻害ペプチド断片と断片B、断片C、プライマー18、プ
ライマー21及びKOD-plus (TOYOBO) を用いたオーバーラ
ップPCR法により、所望のDNA断片を増幅した。

[0235] さらに、制限酵素XbaI (NEB) 及びPmeI (NEB) を用いたク
ローニングにより、哺乳細胞発現ベクターpCMA_KLK5阻害ペプチド
Fc融合体を構築した。尚、操作は (1-1) に記載の方法に準じて行った

。

[0236] (5-2) K L K 5 阻害ペプチドFc融合体の調製

(5-1)で構築した発現ベクターは、P E I MAX 40000 (P o l y s c i e n c e s) を用いてE x p i 293 F細胞 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) にトランスフェクションし、培養6日後に培養上清を回収した。M a b S e l e c t S u R e (G E h e a l t h c a r e) を用いて培養上清から所望のFc融合体を回収し、A m i c o n U l t r a N M W L 10,000 (M e r c k M i l l i p o r e) を用いてP B S にバッファー交換することで、K L K 5 阻害ペプチドFc融合体を調製した。K L K 5 阻害ペプチド内に糖鎖付加配列を有するクローンは、1 残基置換により糖鎖付加配列を除去し、糖鎖除去体を示すI Dとして「dN」を付加した。尚、糖鎖付加配列の改変はK L K 5 阻害活性や交差性など、何ら活性に影響は与えない。

[0237] (5-3) K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D1-K50055-Fc発現ベクターの構築

K L K 5 阻害ペプチドK50055のヌクレオチド配列(配列番号7)を鋳型として、下記プライマー及びK O D - p l u s - (T O Y O B O) を用いたP C R 法 ((94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 20秒) × 30サイクル) により阻害ペプチド断片を増幅した。

[0238] プライマー22: 5' - A G A T G G G T G T T G T C T G A C G G C C C T C A G T T C G G C C T G T T C - 3' (配列番号94: 図104)

プライマー17: 5' - G C A G G G G C C A T T C C G G A T - 3' (配列番号82: 図90)

[0239] 上記で増幅した阻害ペプチド断片と(5-1)で増幅した断片B、断片C、プライマー18、プライマー21及びK O D - p l u s - (T O Y O B O) を用いたオーバーラップP C R 法により、所望のD N A 断片を増幅した。

[0240] さらに、制限酵素X b a I (N E B) 及びP m e I (N E B) を用いたクローニングにより、哺乳細胞発現ベクターp C M A _ _ K L K 5 阻害ペプチド

Fc融合体を構築した。尚、操作は(1-1)に記載の方法に準じて行った。

[0241] (5-4) K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D1-K50055-Fcの調製

(5-3)で構築した発現ベクターは、PEI MAX 40000 (Polysciences)を用いてExpi293F細胞(Thermo Fisher Scientific)にトランスフェクションし、培養6日後に培養上清を回収した。MabSelect SuRe (GE Healthcare)を用いて培養上清から所望のFc融合体を回収し、Amicon Ultra NMWL 10,000 (Merck Millipore)を用いてPBSにバッファー交換することで、K L K 5 阻害ペプチドFc融合体D1-K50055-Fcを調製した。

[0242] 実施例6. K L K 5 阻害ペプチドFc融合体の評価

(6-1) K L K 5 阻害ペプチドFc融合体のヒト/マウスK L K 5、ヒト/マウスK L K 7及びヒト/マウスK L K 14 阻害活性評価

実施例3-1に記載の方法に準じて、K L K 5 阻害ペプチドFc融合体の、ヒト/マウスK L K 5、ヒト/マウスK L K 7及びヒト/マウスK L K 14 に対する阻害活性を評価した。各濃度における各阻害ペプチドFc融合体の基質ペプチド分解速度を算出し、阻害ペプチドFc融合体濃度0 nMの分解速度を100%としてGraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software Inc.)を用いて50%阻害濃度(IC_{50})を算出した結果、いずれの阻害ペプチドFc融合体も低濃度でヒトK L K 5 酵素活性を阻害することが明らかとなった(表4、図5、図107)。一部の阻害ペプチドFc融合体はヒトK L K 7又はヒトK L K 14 酵素活性を低濃度で阻害し、また、一部の阻害ペプチドFc融合体はこれらのプロテアーゼに対して弱く阻害活性を示した。阻害ペプチドFc融合体は、マウスK L K 5、K L K 7又はK L K 14 に対しても同様の活性を示した(表5)。尚、 IC_{50} 値の算出には、独立した3回の実験の平均値を

使用した。

[0243] [表4]

KLK5阻害ペプチドFc融合体のヒトKLK5、ヒトKLK7、ヒトKLK14阻害活性

ID	IC ₅₀ (nM) for hKLK5	IC ₅₀ (nM) for hKLK7	IC ₅₀ (nM) for hKLK14
D3-K51028-Fc	4.5±0.1	220±10	>1,000
D3-K50032dN -Fc	3.9±0.3	>1,000	>1,000
D3-K50055-Fc	3.7±0.1	>1,000	340±120
D3-K51069dN -Fc	4.5±0.4	>1,000	42±11
D3-K51072-Fc	4.5±0.3	>1,000	260±60
D3-K50015-Fc	3.1±0.2	>1,000	4.5±1.3
D3-K50016dN -Fc	4.3±0.7	>1,000	>1,000
D3-K51034-Fc	5.7±0.8	>1,000	960±320
D3-K50062-Fc	4.3±0.1	>1,000	190±50
D3-K51090-Fc	4.6±0.5	>1,000	350±30
D3-K50098dN -Fc	4.3±0.3	>1,000	210±60
D3-K51005-Fc	8.6±1.4	28±3	>1,000
D3-K50031-Fc	9.5±0.4	9.3±1.3	>1,000
D3-K51057-Fc	12±1	18±1	>1,000
D1-K50055-Fc	5.8±0.6	>1,000	>1,000

[0244]

[表5]

KLK5阻害ペプチドFc融合体のマウスKLK5、マウスKLK7、マウスKLK14阻害活性

ID	IC ₅₀ (nM) for mKLK5	IC ₅₀ (nM) for mKLK7	IC ₅₀ (nM) for mKLK14
D3-K51028-Fc	16	110	>1,000
D3-K50032dN-Fc	26	>1,000	>1,000
D3-K50055-Fc	6.8	>1,000	>1,000
D3-K51069dN-Fc	6.8	410	24
D3-K51072-Fc	50	>1,000	>1,000
D3-K50015-Fc	4.4	340	48
D3-K50016dN-Fc	35	>1,000	>1,000
D3-K51034-Fc	39	>1,000	>1,000
D3-K50062-Fc	5.4	>1,000	>1,000
D3-K51090-Fc	5.1	730	510
D3-K50098dN-Fc	6.8	>1,000	350
D3-K51005-Fc	330	37	240
D3-K50031-Fc	270	6.3	300
D3-K51057-Fc	600	24	380
D1-K50055-Fc	6.3	>1,000	>1,000

[0245] (6-2) KLK5阻害ペプチドFc融合体の交差性評価

(3-2)の結果と同様、一部の阻害ペプチドFc融合体はbovine trypsin、キモトリプシン、plasminに対して、阻害ペプチド終濃度1 μ Mで弱く交差性を示した(IC₅₀値は1 μ M未満)が、大半の阻害ペプチドはKLKs以外のいずれのプロテアーゼに対しても阻害活性を示さなかった(図6)。一部の阻害ペプチドFc融合体はKLK4又はKLK12に対して終濃度1 μ Mで阻害活性を示した(IC₅₀値は1 μ M未満)が、多くの阻害ペプチドFc融合体はKLK7又はKLK14を除くKLKsに対してもプロテアーゼ阻害活性を示さなかった。よって、阻害ペプチドと同様、阻害ペプチドFc融合体は高い特異性を有していることが明らかとなった。

[0246] (6-3) ペプチド基質を用いたKLK5阻害ペプチドFc融合体のKLK5阻害活性評価(阻害定数 K_i の算出)

KLK5阻害ペプチドFc融合体の、ヒトKLK5に対する阻害活性を評価し、阻害定数 K_i を算出した。基質ペプチドBoc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems; E011) を10mMになるようDMSOで溶解し、Assay buffer (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH8.0) で希釈して終濃度25~200 μ Mで使用した。Assay bufferで希釈したヒトKLK5とKLK5阻害ペプチドFc融合体をそれぞれ25 μ Lずつ混ぜ、37℃で20分反応させた後にAssay bufferで希釈した基質を50 μ L加えて、Enspireで蛍光シグナル(excitation 380nm/emission 460nm)を測定した。ヒトKLK5は終濃度10nM、KLK5阻害ペプチドFc融合体は終濃度0.5~25nM、反応及び測定にはプロテオセーブ(登録商標)SS96F黒プレート(住友ベークライト株式会社)を使用した。

[0247] 各濃度の各阻害ペプチドFc融合体における基質ペプチド分解速度を算出し、阻害ペプチドFc融合体濃度0nMの分解速度を100%として、各阻害ペプチドFc融合体のヒトKLK5阻害活性を評価した(図102)。GraphPad Prism(version 5.0; GraphPad Software Inc.)を用いて、Michaelis-Mentenの式に従い、酵素濃度10nMにおける最大反応速度 V_{max} 及びミカエリス定数 K_m を算出した。さらにGraphPad Prismを用いて、Morrisonの式に従い、基質濃度100 μ Mにおける阻害定数 K_i を算出した結果、いずれのKLK5阻害ペプチドFc融合体も低濃度でヒトKLK5酵素活性を阻害することが明らかとなった(表6)。尚、 K_i 値の算出には、独立した3回の実験の平均値を使用した。

[0248]

[表6]

KLK5阻害ペプチドFc融合体のヒトKLK5阻害定数 K_i

ID	K_i (pM)
D3-K50032dN-Fc	440±10
D3-K50055-Fc	190±60
D3-K51072-Fc	360±70
D3-K50016dN-Fc	360±40

[0249] (6-4) タンパク基質を用いたKLK5阻害ペプチドFc融合体のKLK5阻害活性評価

タンパク基質としてヒトDesmoglein1及びヒトDesmocollin1を用い、KLK5阻害ペプチドFc融合体のKLK5阻害活性を評価した。Assay bufferで希釈したヒトKLK5と各KLK5阻害ペプチドFc融合体(D3-K50032dN-Fc, D3-K50055-Fc, D3-K51072-Fc, 又はD3-K50016dN-Fc)を混合し、37℃で1時間反応させた。次に、Assay bufferで希釈したタンパク基質を加えて37℃で4時間反応させた後、還元剤を含むSDSサンプルバッファーを添加し、99℃で5分間処理することで酵素反応を停止した。その後、SDS-PAGE(還元条件)及びWestern blot解析により、タンパク基質の分解を評価した。各基質と酵素、各阻害ペプチドFc融合体、Western blot解析用抗体の組み合わせは以下の通り。

[0250] Human Desmoglein1を用いた評価; 終濃度1 μ M hKLK5、終濃度0.001~10 μ M 阻害ペプチドFc融合体、終濃度1 μ M Recombinant Human Desmoglein-1 Fc Chimera Protein (R&D Systems)、Desmoglein 1 Antibody (aa471-499) (LSBio) 及びAnti-Rabbit IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment Donkey (GE healthcare)

e)

[0251] Human Desmocollin1を用いた評価；終濃度0.2 μ M hKLK5、終濃度0.0002～2 μ M 阻害ペプチドFc融合体、終濃度2 μ M Recombinant Human Desmocollin-1 Protein with C-terminal His tag (R&D Systems)、Penta His HRP Conjugate (QIAGEN)

[0252] ヒトDesmoglein1及びヒトDesmocollin1は、ヒトKLK5非存在下では分解されなかったが、ヒトKLK5存在下では完全に分解された。ヒトKLK5とKLK5阻害ペプチドFc融合体をブレインキュベートして評価した結果、いずれの阻害ペプチドFc融合体もヒトKLK5酵素によるヒトDesmoglein1及びヒトDesmocollin1分解活性を阻害することが明らかとなった。ヒトKLK5濃度と阻害ペプチドFc融合体濃度が等しい条件において、ヒトDesmoglein1及びヒトDesmocollin1の分解は完全に阻害された。(図103)。

[0253] 実施例7. ネザートン症候群モデルマウスにおけるKLK5阻害ペプチドFc融合体の経皮水分蒸散量(TEWL)上昇抑制効果

(7-1) ネザートン症候群モデルマウス

ネザートン症候群の原因遺伝子であるSPINK5に変異を有するCrusty2マウスは、ネザートン症候群のモデルマウスとして知られ、そのホモマウスCrusty2(+/-)は皮膚症状を呈する(Mutagenetix database)。

[0254] (7-2) ネザートン症候群モデルマウスにおけるKLK5阻害ペプチドFc融合体のTEWL上昇抑制効果

Crusty2(+/-)マウスとCrusty2(+/-)マウスを人工授精で掛け合わせ、得られた産仔(Crusty2(+/-)マウス又はCrusty2(+/-)マウス)を用いて、(5-4)で作製したKLK5阻害ペプチドFc融合体D1-K50055-Fcを評価した。生後0又

は1日後から、PBS又は100mg/kgのD1-K50055-Fcを1日おきに4週間皮下投与した。初回投与時のみローディングドーズとして3倍量のD1-K50055-Fcを投与した。VAPO SCAN (AS-VT100RS, 株式会社アサヒテクノラボ)を用いて、投与2及び4週時点で、マウスの背中又は臀部の皮膚におけるTEWLを測定した(図7)。尚、PBS投与群又はD1-K50055-Fc投与群に問わず、Crusty2(+/-)マウスの例数は9、Crusty2(+/+)マウスの例数は12であった。

- [0255] Crusty2(+/-)マウスに比べ、Crusty2(+/+)マウスでは統計学的に有意なTEWLの上昇が確認され、2週齢に比べ4週齢の方がより顕著であった。投与4週後において、D1-K50055-Fc投与群ではPBS投与群に比し、背中及びよりシビアな臀部の両方において、統計学的に有意なTEWLの低下が見られた。以上のことから、マウスにおいてSPINK5の変異に起因するTEWL上昇が認められるのに対し、D1-K50055-Fcが抑制作用を示すことが明らかとなり、D1-K50055-Fcを含む本発明のペプチド及びコンジュゲートがネザートン症候群の皮膚症状の軽減に有用であることが示された。

産業上の利用可能性

- [0256] 本発明の提供するペプチド及びコンジュゲート、並びに、それを含む医薬組成物は、各種疾患の治療に有用である。

配列表フリーテキスト

- [0257] 配列番号1：ヒトSPINK2のアミノ酸配列(図9)
配列番号2：ヒトKLK5のアミノ酸配列(図10)
配列番号3：ヒトKLK7のアミノ酸配列(図11)
配列番号4：ヒトKLK14のアミノ酸配列(図12)
配列番号5：KLK5阻害ペプチドK50032のヌクレオチド配列(図13)
配列番号6：KLK5阻害ペプチドK50032のアミノ酸配列(図14)

配列番号 7 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 5 5 のヌクレオチド配列 (図 1 5)

配列番号 8 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 5 5 のアミノ酸配列 (図 1 6)

配列番号 9 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 1 0 7 2 のヌクレオチド配列 (図 1 7)

配列番号 1 0 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 1 0 7 2 のアミノ酸配列 (図 1 8)

配列番号 1 1 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 1 6 のヌクレオチド配列 (図 1 9)

配列番号 1 2 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 1 6 のアミノ酸配列 (図 2 0)

配列番号 1 3 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 1 0 3 4 のヌクレオチド配列 (図 2 1)

配列番号 1 4 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 1 0 3 4 のアミノ酸配列 (図 2 2)

配列番号 1 5 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 6 2 のヌクレオチド配列 (図 2 3)

配列番号 1 6 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 6 2 のアミノ酸配列 (図 2 4)

配列番号 1 7 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 1 0 9 0 のヌクレオチド配列 (図 2 5)

配列番号 1 8 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 1 0 9 0 のアミノ酸配列 (図 2 6)

配列番号 1 9 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 9 8 のヌクレオチド配列 (図 2 7)

配列番号 2 0 : K L K 5 阻害ペプチド K 5 0 0 9 8 のアミノ酸配列 (図 2 8)

配列番号 2 1 : K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 2 8 のヌクレオチ

ド配列 (図 29)

配列番号 22 : K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 2 8 のアミノ酸配列 (図 30)

配列番号 23 : K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 0 5 のヌクレオチド配列 (図 31)

配列番号 24 : K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 0 5 のアミノ酸配列 (図 32)

配列番号 25 : K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 0 0 3 1 のヌクレオチド配列 (図 33)

配列番号 26 : K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 0 0 3 1 のアミノ酸配列 (図 34)

配列番号 27 : K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 5 7 のヌクレオチド配列 (図 35)

配列番号 28 : K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチド K 5 1 0 5 7 のアミノ酸配列 (図 36)

配列番号 29 : K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド K 5 1 0 6 9 のヌクレオチド配列 (図 37)

配列番号 30 : K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド K 5 1 0 6 9 のアミノ酸配列 (図 38)

配列番号 31 : K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド K 5 0 0 1 5 のヌクレオチド配列 (図 39)

配列番号 32 : K L K 5 / K L K 1 4 阻害ペプチド K 5 0 0 1 5 のアミノ酸配列 (図 40)

配列番号 33 : K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 3 - K 5 0 0 3 2 d N - F c のヌクレオチド配列 (図 41)

配列番号 34 : K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 3 - K 5 0 0 3 2 d N - F c のアミノ酸配列 (図 42)

配列番号 35 : K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 3 - K 5 0 0 5 5 - F c

のヌクレオチド配列（図43）

配列番号36：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K50055-Fc

のアミノ酸配列（図44）

配列番号37：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K51072-Fc

のヌクレオチド配列（図45）

配列番号38：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K51072-Fc

のアミノ酸配列（図46）

配列番号39：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K50016dN-Fcのヌクレオチド配列（図47）

配列番号40：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K50016dN-Fcのアミノ酸配列（図48）

配列番号41：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K51034-Fcのヌクレオチド配列（図49）

配列番号42：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K51034-Fcのアミノ酸配列（図50）

配列番号43：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K50062-Fcのヌクレオチド配列（図51）

配列番号44：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K50062-Fcのアミノ酸配列（図52）

配列番号45：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K51090-Fcのヌクレオチド配列（図53）

配列番号46：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K51090-Fcのアミノ酸配列（図54）

配列番号47：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K50098dN-Fcのヌクレオチド配列（図55）

配列番号48：KLK5阻害ペプチドFc融合体D3-K50098dN-Fcのアミノ酸配列（図56）

配列番号49：KLK5/KLK7阻害ペプチドFc融合体D3-K510

28-Fcのヌクレオチド配列 (図57)

配列番号50: K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K510

28-Fcのアミノ酸配列 (図58)

配列番号51: K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K510

05-Fcのヌクレオチド配列 (図59)

配列番号52: K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K510

05-Fcのアミノ酸配列 (図60)

配列番号53: K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K500

31-Fcのヌクレオチド配列 (図61)

配列番号54: K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K500

31-Fcのアミノ酸配列 (図62)

配列番号55: K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K510

57-Fcのヌクレオチド配列 (図63)

配列番号56: K L K 5 / K L K 7 阻害ペプチドFc融合体D3-K510

57-Fcのアミノ酸配列 (図64)

配列番号57: K L K 5 / K L K 14 阻害ペプチドFc融合体D3-K51

069dN-Fcのヌクレオチド配列 (図65)

配列番号58: K L K 5 / K L K 14 阻害ペプチドFc融合体D3-K51

069dN-Fcのアミノ酸配列 (図66)

配列番号59: K L K 5 / K L K 14 阻害ペプチドFc融合体D3-K50

015-Fcのヌクレオチド配列 (図67)

配列番号60: K L K 5 / K L K 14 阻害ペプチドFc融合体D3-K50

015-Fcのアミノ酸配列 (図68)

配列番号61: S P I N K 2 変異体ペプチドの一般式 (図69)

配列番号62: プライマー1のヌクレオチド配列 (図70)

配列番号63: プライマー2のヌクレオチド配列 (図71)

配列番号64: プライマー3のヌクレオチド配列 (図72)

配列番号65: プライマー4のヌクレオチド配列 (図73)

- 配列番号 66 : プライマー 5 のヌクレオチド配列 (図 7 4)
- 配列番号 67 : プライマー 6 のヌクレオチド配列 (図 7 5)
- 配列番号 68 : プライマー 7 のヌクレオチド配列 (図 7 6)
- 配列番号 69 : プライマー 8 のヌクレオチド配列 (図 7 7)
- 配列番号 70 : プライマー 9 のヌクレオチド配列 (図 7 8)
- 配列番号 71 : プライマー 10 のヌクレオチド配列 (図 7 9)
- 配列番号 72 : プライマー 11 のヌクレオチド配列 (図 8 0)
- 配列番号 73 : プライマー 12 のヌクレオチド配列 (図 8 1)
- 配列番号 74 : プライマー 13 のヌクレオチド配列 (図 8 2)
- 配列番号 75 : プライマー 14 のヌクレオチド配列 (図 8 3)
- 配列番号 76 : プライマー 15 のヌクレオチド配列 (図 8 4)
- 配列番号 77 : K L K 7 基質ペプチド (図 8 5) 中のアミノ酸配列
- 配列番号 78 : ウシ α -キモトリプシン基質ペプチド (図 8 6) 中のアミノ酸配列
- 配列番号 79 : ニュートロフィル・エラスターゼ基質ペプチド (図 8 7) 中のアミノ酸配列
- 配列番号 80 : ヒトプロテイン C 基質ペプチド (図 8 8) 中のアミノ酸配列
- 配列番号 81 : プライマー 16 のヌクレオチド配列 (図 8 9)
- 配列番号 82 : プライマー 17 のヌクレオチド配列 (図 9 0)
- 配列番号 83 : プライマー 18 のヌクレオチド配列 (図 9 1)
- 配列番号 84 : プライマー 19 のヌクレオチド配列 (図 9 2)
- 配列番号 85 : プライマー 20 のヌクレオチド配列 (図 9 3)
- 配列番号 86 : プライマー 21 のヌクレオチド配列 (図 9 4)
- 配列番号 87 : ヒト Ig G 1 の F c のアミノ酸配列 (図 9 5)
- 配列番号 88 : ヒト S P I N K 5 の D 8 のアミノ酸配列 (図 9 6)
- 配列番号 89 : ヒト S P I N K 5 の D 9 のアミノ酸配列 (図 9 7)
- 配列番号 90 : ヒト S P I N K 9 のアミノ酸配列 (図 9 8)
- 配列番号 91 : マウス K L K 5 のアミノ酸配列 (図 9 9)

配列番号 92 : マウス K L K 7 のアミノ酸配列 (図 100)

配列番号 93 : マウス K L K 14 のアミノ酸配列 (図 101)

配列番号 94 : プライマー 22 のヌクレオチド配列 (図 104)

配列番号 95 : K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 1 - K 5 0 0 5 5 - F c
のヌクレオチド配列 (図 105)

配列番号 96 : K L K 5 阻害ペプチド F c 融合体 D 1 - K 5 0 0 5 5 - F c
のアミノ酸配列 (図 106)

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号61（図69）で示されるアミノ酸配列を含み、且つ、活性型ヒトKLK5の有するプロテアーゼ活性を阻害する、SPINK2変異体ペプチド。
- [請求項2] ヒトKLK7又はヒトKLK14の有するプロテアーゼ活性を阻害する、請求項1記載のペプチド。
- [請求項3] 該阻害がヒトKLK5及び任意でヒトKLK7又はKLK14選択的である、請求項1記載のペプチド。
- [請求項4] 16番Xaa（X₁）はAla、Asp、Gly、Gln、Leu、Ser又はThrである、請求項1乃至3のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項5] 17番Xaa（X₂）はArg、Glu、Asn、Gln又はSerである、請求項1乃至4のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項6] 18番Xaa（X₃）はAsp、Gln、Ile、Thr、Trp又はTyrである、請求項1乃至5のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項7] 19番Xaa（X₄）はArg、Gly、Met、Gln又はThrである、請求項1乃至6のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項8] 20番Xaa（X₅）はAsp、Glu、Leu、Lys、Thr又はTyrである、請求項1乃至7のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項9] 21番Xaa（X₆）はGlu、Gly、His、Leu、Ser、Gln又はTyrである、請求項1乃至8のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項10] 22番Xaa（X₇）はAsp、Gly、Gln、Ser又はTyrである、請求項1乃至9のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項11] 24番Xaa（X₈）はAla、Asp、Glu、Gly、Asn、Ser又はThrである、請求項1乃至10のいずれか一つに記載

のペプチド。

- [請求項12] 25番Xaa (X₉)はArg又はLysである、請求項1乃至11のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項13] 26番Xaa (X₁₀)はAsp、Glu、Gln、Ser又はValである、請求項1乃至12のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項14] 27番Xaa (X₁₁)はPhe又はTyrである、請求項1乃至13のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項15] 28番Xaa (X₁₂)はAsp又はGluである、請求項1乃至14のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項16] 配列番号6、8、10、12、14、16、18及び20(図14、16、18、20、22、24、26及び28)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至63を含む、請求項1乃至15記載のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項17] 16番Xaa (X₁)はGly、Met又はTyrである、請求項1乃至3のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項18] 17番Xaa (X₂)はGlu、Gln又はThrである、請求項1乃至3及び17のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項19] 18番Xaa (X₃)はHis、Met又はTyrである、請求項1乃至3、17及び18のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項20] 19番Xaa (X₄)はAla、Arg、Lys又はGlnである、請求項1乃至3及び17乃至19のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項21] 20番Xaa (X₅)はGly、Arg又はSerである、請求項1乃至3及び17乃至20のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項22] 21番Xaa (X₆)はArg、Lys、Gln又はSerである、請求項1乃至3及び17乃至21のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項23] 22番Xaa (X₇)はGlyである、請求項1乃至3及び17乃至

至 22 のいずれか一つに記載のペプチド。

- [請求項24] 24番Xaa (X₈) はHis、Thr又はTyrである、請求項1乃至3及び17乃至23のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項25] 25番Xaa (X₉) はHis又はTyrである、請求項1乃至3及び17乃至24のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項26] 26番Xaa (X₁₀) はAsp、Glu又はHisである、請求項1乃至3及び17乃至25のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項27] 27番Xaa (X₁₁) はTyrである、請求項1乃至3及び17乃至26のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項28] 28番Xaa (X₁₂) はAsp又はGluである、請求項1乃至3及び17乃至27のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項29] 配列番号22、24、26及び28 (図30、32、34及び36) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至63を含む、請求項1乃至3及び17乃至28記載のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項30] 16番Xaa (X₁) はGly、Ser又はTyrである、請求項1乃至3のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項31] 17番Xaa (X₂) はAsp又はGlnである、請求項1乃至3及び30のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項32] 18番Xaa (X₃) はThr又はValである、請求項1乃至3、30及び31のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項33] 19番Xaa (X₄) はThr又はValである、請求項1乃至3及び30乃至32のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項34] 20番Xaa (X₅) はGlu又はThrである、請求項1乃至3及び30乃至33のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項35] 21番Xaa (X₆) はHis又はThrである、請求項1乃至3及び30乃至34のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項36] 22番Xaa (X₇) はTyrである、請求項1乃至3及び30乃至

- 至 35 のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項37] 24番 X a a (X_8) は A s n 又は S e r である、請求項 1 乃至 3 及び 30 乃至 36 のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項38] 25番 X a a (X_9) は A r g である、請求項 1 乃至 3 及び 30 乃至 37 のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項39] 26番 X a a (X_{10}) は A s p 又は G l u である、請求項 1 乃至 3 及び 30 乃至 38 のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項40] 27番 X a a (X_{11}) は T y r である、請求項 1 乃至 3 及び 30 乃至 39 のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項41] 28番 X a a (X_{12}) は A s p である、請求項 1 乃至 3 及び 30 乃至 40 のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項42] 配列番号 30 及び 32 (図 38 及び 40) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 乃至 63 を含む、請求項 1 乃至 3 及び 30 乃至 41 記載のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項43] 3つのジスルフィド結合を有し、ループ構造、 α ヘリックス及び β シートを含むことで特徴付けられる立体構造を有する、請求項 1 乃至 42 のいずれか一つに記載のペプチド。
- [請求項44] 請求項 1 乃至 43 のいずれか一つに記載のペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。
- [請求項45] 請求項 44 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [請求項46] 請求項 44 記載のポリヌクレオチド若しくは請求項 45 記載のベクターを含むか又は請求項 1 乃至 43 のいずれか一つに記載のペプチドを産生する細胞。
- [請求項47] 下記工程 (i) 及び (i i) を含む、S P I N K 2 変異体ペプチドの製造方法：
(i) 請求項 46 記載の細胞を培養する工程；
(i i) 該培養物から S P I N K 2 変異体ペプチドを回収する工程。
- [請求項48] 請求項 1 乃至 43 のいずれか一つに記載のペプチドを化学合成又は

イン・ビトロ翻訳により調製する工程を含む、該ペプチドの製造方法。

- [請求項49] 請求項47又は48記載の方法により得られるSPINK2変異体ペプチド。
- [請求項50] 請求項1乃至43及び49のいずれか一つに記載のペプチドに1つ又は2つ以上の任意の部分が結合してなるコンジュゲート。
- [請求項51] 1つの任意の部分が、SPINK2変異体ではない第2ペプチドを含む、請求項50記載のコンジュゲート。
- [請求項52] 第2ペプチドが、SPINK2変異体のアミノ末端側に位置する、請求項51記載のコンジュゲート。
- [請求項53] 第2ペプチドが、SPINK2変異体のカルボキシル末端側に位置する、請求項51記載のコンジュゲート。
- [請求項54] 第2ペプチドが抗体又はその断片であり、且つ1つ又は2つ以上のFc領域を含む、請求項51乃至53のいずれか一つに記載のコンジュゲート。
- [請求項55] Fc領域がヒト免疫グロブリンのFc領域又はその断片である、請求項54記載のコンジュゲート。
- [請求項56] Fc領域がIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、及び／又は、IgEのFc領域又はその断片である、請求項54又は55記載のコンジュゲート。
- [請求項57] Fc領域がヒトIgG1のFc領域又はその断片である、請求項54乃至56のいずれか一つに記載のコンジュゲート。
- [請求項58] ヒトIgG1のFc領域が、配列番号87（図95）で示されるアミノ酸配列を含む、請求項57記載のコンジュゲート。
- [請求項59] Fc領域が野生型又は変異型である、請求項54乃至57のいずれか一つに記載のコンジュゲート。
- [請求項60] アミノ末端に1乃至数個のアスパラギン酸及び／又はグルタミン酸が付加してなる、請求項51乃至59のいずれか一つに記載のコンジ

ュゲート。

[請求項61] 下記 (i) 又は (i i) に記載のアミノ酸配列を含む、請求項50乃至60のいずれか一つに記載のコンジュゲート：

(i) 配列番号34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60及び96 (図42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68及び106) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列；

(i i) 上記 (i) 記載のアミノ酸配列と90%以上同一であり、且つKLK5の有するプロテアーゼ活性を阻害するコンジュゲートに含まれるアミノ酸配列。

[請求項62] SPINK2変異体及び第2ペプチドが、リンカーを介して結合している、請求項51乃至61のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

[請求項63] リンカーが、SPINK2変異体及び第2ペプチドではない第3ペプチドである、請求項62記載のコンジュゲート。

[請求項64] 下記工程 (i) 及び (i i) を含む、請求項50乃至63のいずれか一つに記載のコンジュゲートの製造方法：

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

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

[請求項65] 請求項50乃至63のいずれか一つに記載のSPINK2変異体ペプチドコンジュゲート又は該コンジュゲートに含まれるペプチド部分を化学合成又はイン・ビトロ翻訳により調製する工程を含む、該コンジュゲートの製造方法。

[請求項66] 請求項64又は65記載の方法により得られるSPINK2変異体ペプチドコンジュゲート。

- [請求項67] 請求項1乃至43及び49のいずれか一つに記載のペプチドに結合する抗体又はその結合断片。
- [請求項68] 請求項1乃至43及び49のいずれか一つに記載のペプチド、請求項44記載のポリヌクレオチド、請求項45記載のベクター、請求項46記載の細胞、請求項50乃至63及び66のいずれか一つに記載のコンジュゲート、及び／又は、請求項67記載の抗体若しくはその結合断片を含む組成物。
- [請求項69] 請求項1乃至43及び49のいずれか一つに記載のペプチド、請求項44記載のポリヌクレオチド、請求項45記載のベクター、請求項46記載の細胞、並びに／又は、請求項50乃至63及び66のいずれか一つに記載のコンジュゲートを含む、医薬組成物。
- [請求項70] K L K 5 関連疾患の治療又は予防のための、請求項69記載の医薬組成物。
- [請求項71] K L K 5 関連疾患がネザートン症候群、アトピー性皮膚炎、酒さ、紫外線による皮膚傷害、乾癬、喘息、脊髄損傷、がん又は B a r r e t t 食道である、請求項70記載の医薬組成物。
- [請求項72] 他の医薬品と組み合わせて使用される、請求項69乃至71記載のいずれか一つに記載の医薬組成物。
- [請求項73] 請求項1乃至43及び49のいずれか一つに記載のペプチド、請求項44記載のポリヌクレオチド、請求項45記載のベクター、請求項46記載の細胞、請求項50乃至63及び66のいずれか一つに記載のコンジュゲート、及び／又は、請求項67記載の抗体又はその結合断片を含む、検査用又は診断用組成物。
- [請求項74] 請求項67記載の抗体又はその結合断片を用いたアフィニティー精製工程を含む、請求項47、48、64及び65のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項75] 下記工程 (i) 乃至 (i i i) を含む、K L K 5 阻害 S P I N K 2 変異体ペプチドの同定方法：

(i) 被験SPINK2変異体ペプチド存在下及び非存在下で、KLK5プロテアーゼ及び基質を保温する工程；

(ii) 被験SPINK2変異体ペプチド存在下及び非存在下におけるKLK5プロテアーゼ活性を測定する工程；及び

(iii) 該ペプチド存在下でのKLK5プロテアーゼ活性が、該ペプチド非存在下でのKLK5プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該ペプチドを陽性と判定する工程。

[請求項76]

下記工程(i)乃至(iii)を含み、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32(図14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38及び40)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチド又は該ペプチドを含むコンジュゲートが参照化合物として使用される、KLK5阻害化合物の同定方法：

(i) 被験化合物存在下及び非存在下で、KLK5プロテアーゼ及び基質を保温する工程；

(ii) 該化合物存在下及び非存在下におけるKLK5プロテアーゼ活性を測定する工程；及び、

(iii) 該化合物存在下でのKLK5プロテアーゼ活性が、該化合物非存在下でのKLK5プロテアーゼ活性と比較して小さい場合、該化合物を陽性と判定する工程。

[請求項77]

下記工程(i)乃至(iii)を含む、KLK5阻害化合物の同定方法：

(i) 被験化合物のKLK5プロテアーゼ阻害活性を測定する工程；

(ii) 配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32(図14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38及び40)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチド又は該ペプチドを含むコンジュゲートである参照化合物のKLK5プロテアーゼ阻

害活性を測定する工程；及び、

(i i i) 被験化合物の K L K 5 プロテアーゼ阻害活性が、参照化合物の K L K 5 プロテアーゼ阻害活性と同等又はより強い場合、該化合物を陽性と判定する工程。

[請求項78] 下記工程 (i) 及び (i i) を含み、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30 及び 32 (図 14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 及び 40) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含むペプチド又該ペプチドを含むコンジュゲートが参照化合物として使用される、K L K 5 プロテアーゼ活性を測定する方法：

(i) K L K 5 プロテアーゼ、基質及び任意で他の成分を保温する工程；

(i i) 工程 (i) の後、基質量及び／又は生成物量を測定する工程。

[請求項79] K L K 5 阻害 S P I N K 2 変異体ペプチド又は S P I N K 2 変異体ペプチドコンジュゲートであって、表面プラズモン共鳴分析において、該ペプチド又はコンジュゲートを固定化し、K L K 5 を添加することにより測定された K L K 5 に対する解離定数 (K_D) が 1×10^{-9} M 以下である、該ペプチド又はコンジュゲート。

[請求項80] 配列番号 34 (図 42) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。

[請求項81] 配列番号 36 (図 44) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。

[請求項82] 配列番号 38 (図 46) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。

[請求項83] 配列番号 40 (図 48) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。

[請求項84] 配列番号 42 (図 50) で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲ

- ート。
- [請求項85] 配列番号44（図52）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項86] 配列番号46（図54）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項87] 配列番号48（図56）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項88] 配列番号50（図58）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項89] 配列番号52（図60）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項90] 配列番号54（図62）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項91] 配列番号56（図64）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項92] 配列番号58（図66）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項93] 配列番号60（図68）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。
- [請求項94] 配列番号96（図106）で示されるアミノ酸配列を含むコンジュゲート。