

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公 開 特 許 公 報(A)

(11)特許出願公開番号
特開2024-170286
(P2024-170286A)

(43)公開日
令和6年12月6日(2024. 12. 6)

(51)Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/435 (2006. 01)	C 0 7 K 14/435	4 C 0 7 6
C 0 7 K 19/00 (2006. 01)	C 0 7 K 19/00	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/64 (2017. 01)	A 6 1 K 47/64	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/68 (2017. 01)	A 6 1 K 47/68	

審査請求 有 請求項の数 1 書面 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 (22)出願日 (62)分割の表示 原出願日 (31)優先権主張番号 (32)優先日 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	特願2024-37633(P2024-37633) 令和6年2月19日(2024. 2. 19) 特願2020-541538(P2020-541538) の分割 平成31年1月31日(2019. 1. 31) 62/624, 491 平成30年1月31日(2018. 1. 31) 米国(US)	(71)出願人 520116791 ヴェラ セラビューティクス エルエルシ ー アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 4 8 8 2、イサカ、アズベリー ロード 1 2 7 1 2 7 Asbury Rd., Itha ca, NY 14882, United States of America (74)代理人 110002860 弁理士法人秀和特許事務所 (74)代理人 100114775 弁理士 高岡 亮一 (74)代理人 100121511 弁理士 小田 直 最終頁に続く
---	--	---

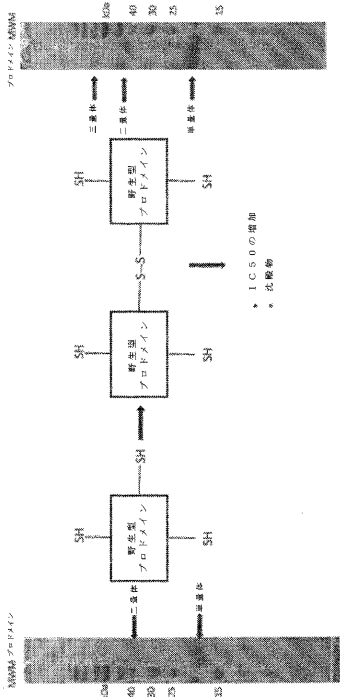
(54)【発明の名称】 A D A M 9 生物活性を阻害するための方法および組成物

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 A D A M 9 モジュレーティングペプチド、ならびにそれを使用してインビトロおよび/またはインビボで A D A M 9 生物活性を阻害するため、対象における疾患または障害に関連する A D A M 9 生物活性を阻害するため、炎症を減少させるため、および望ましくない細胞増殖、線維症および血管新生を阻害するための方法を提供する。

【解決手段】 幾つかの実施形態において、 A D A M 9 モジュレーティングペプチドは、ヒト A D A M 9 プロドメインアミノ酸配列の 1 つまたは複数のアミノ酸の修飾を含み、幾つかの実施形態において、 A D A M 9 モジュレーティングペプチドは、非限定的に P E G 基の付加などの他の修飾を含む。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO : 3 に示されたアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列からなるペプチドであって、SEQ ID NO : 2 に示されたアミノ酸配列に比較して、前記ペプチドが、アミノ酸 6、7、24、26、27、61、62、85、104、137、138、146、160、161、162、163、および 164 からなる群から選択されるアミノ酸位置に 1 つまたは複数のアミノ酸置換および / または修飾を含み、そのため前記ペプチドが、前記 1 つまたは複数のアミノ酸置換および / または修飾のないペプチドに比較して、メブリンへの阻害性が低い、フリン切断への感度が低い、酸化および / もしくはジスルフィド結合形成への感受性が低い、またはその任意の組み合わせである、ペプチド。

10

【請求項 2】

前記ペプチドが、SEQ ID NO : 2 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列からなり、さらに SEQ ID NO : 2 に比較して、前記アミノ酸配列が、

(i) アルギニン 24 の別のアミノ酸、場合によりアラニン、セリン、グリシン、もしくはリジンへの置換 ;

(i i) アルギニン 26 の別のアミノ酸、場合によりアラニン、セリン、グリシン、もしくはリジンへの置換 ;

(i i i) アルギニン 27 の別のアミノ酸、場合によりアラニン、セリン、グリシン、もしくはリジンへの置換 ;

20

(i v) システイン 85 の別のアミノ酸、場合によりセリン、アラニン、もしくはグリシンへの置換 ;

(v) システイン 104 の別のアミノ酸、場合によりセリン、アラニン、もしくはグリシンへの置換 ;

(v i) システイン 146 の別のアミノ酸、場合によりセリン、アラニン、もしくはグリシンへの置換、ならびに

(v i i) システイン 85、104、および 146 の 1 つ、2 つ、もしくは全ての 3 つの化学修飾、

またはそれらの任意の組み合わせ、

30

からなる群から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸置換および / または修飾を含む、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

SEQ ID NO : 2 に比較して、前記アミノ酸配列が、

(i) アミノ酸 6 および 7 の一方または両方に置換を有し、各置換が独立して、対応する位置で SEQ ID NO : 2 中に存在する前記アミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換が独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、およびグリシンからなる群から選択されるか、または

(i i) アミノ酸 24、26、および 27 の 1 つ、2 つ、もしくは全ての 3 つに置換を有し、各置換が独立して、対応する位置で SEQ ID NO : 2 中に存在する前記アミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換が独立して、アラニン、セリン、グリシン、およびリジンからなる群から選択されるか、または

40

(i i i) アミノ酸 61 および 62 の一方もしくは両方に置換を有し、各置換が独立して、対応する位置で SEQ ID NO : 2 中に存在する前記アミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換が独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、およびグリシンからなる群から選択されるか、または

(i v) アミノ酸 137 および 138 の一方もしくは両方に置換を有し、各置換が独立して、対応する位置で SEQ ID NO : 2 中に存在する前記アミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換が独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、およびグリシンからなる群から選択されるか、または

50

(v) アミノ酸 160 ~ 164 の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、もしくは全ての 5 つに置換を有し、各置換が独立して、対応する位置で SEQ ID NO : 2 中に存在する前記アミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換が独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、およびグリシンからなる群から選択されるか、または

(vi) アミノ酸 85、104、および 146 の 1 つ、2 つ、もしくは全ての 3 つに置換を有し、各置換が独立して、システイン以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換が独立して、セリン、アラニン、およびグリシンからなる群から選択されるか、あるいは上記の任意の組み合わせを有する、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 4】

SEQ ID NO : 2 に比較して、前記アミノ酸配列が、

10

(vii) アミノ酸 24 での置換およびアミノ酸 26 での置換を有し、前記第一の置換および前記第二の置換が場合により独立して、アラニン、セリン、グリシン、およびリジンからなる群から選択されるか、あるいは

(viii) アミノ酸 24 での置換およびアミノ酸 27 での置換を有し、前記第一の置換および前記第二の置換が場合により独立して、アラニン、セリン、グリシン、およびリジンからなる群から選択され、さらに場合によりアミノ酸 24 および 27 が、両者ともリジンもしくは両者ともグリシンであるか、またはアミノ酸 24 および 27 の一方が、グリシンでありかつ他方が、リジンであるか、あるいは

(ix) アミノ酸 26 での置換およびアミノ酸 27 での置換を有し、前記第一の置換および前記第二の置換が場合により独立して、アラニン、セリン、グリシン、およびリジンからなる群から選択されるか、あるいは

20

(x) アミノ酸 24 での置換、アミノ酸 26 での置換、およびアミノ酸 27 での置換を有し、前記置換が全て場合により独立して、アラニン、セリン、グリシン、およびリジンからなる群から選択されるか、あるいは

(xi) アミノ酸 85 での置換およびアミノ酸 104 での置換を有し、前記置換が場合により独立して、セリン、アラニン、およびグリシンからなる群から選択され、かつさらに場合によりアミノ酸 85 および 104 のそれぞれが、セリンであるか、あるいは

(xii) アミノ酸 85 での置換およびアミノ酸 146 での置換を有し、前記置換が場合により独立して、セリン、アラニン、およびグリシンからなる群から選択され、かつさらに場合によりアミノ酸 85 および 146 のそれぞれが、セリンであるか、あるいは

30

(xiii) アミノ酸 104 での置換およびアミノ酸 146 での置換を有し、前記置換が場合により独立して、セリン、アラニン、およびグリシンからなる群から選択され、かつさらに場合によりアミノ酸 104 および 146 のそれぞれが、セリンであるか、あるいは

(xiv) アミノ酸 85、104、および 146 のそれぞれに置換を有し、前記置換が場合により独立して、セリン、アラニン、およびグリシンからなる群から選択され、かつさらに場合によりアミノ酸 85、104、および 146 のそれぞれが、セリンであるか、あるいは

(xv) アミノ酸 85 での置換およびアミノ酸 104、アミノ酸 146、またはその両方での化学修飾を有し、前記置換が場合により、セリン、アラニン、およびグリシンからなる群から選択され、かつさらに場合により前記置換が、セリンであるか、あるいは

40

(xvi) アミノ酸 104 での置換およびアミノ酸 85、アミノ酸 146、またはその両方での化学修飾を有し、前記置換が場合により、セリン、アラニン、およびグリシンからなる群から選択され、かつさらに場合により前記置換が、セリンであるか、あるいは

(xvii) アミノ酸 146 での置換およびアミノ酸 85、アミノ酸 146、またはその両方での化学修飾を有し、前記置換が場合により、セリン、アラニン、およびグリシンからなる群から選択され、かつさらに場合により前記置換が、セリンであるか、あるいは

(xviii) アミノ酸 161、163、および 164 の 1 つ、2 つ、または全ての 3 つに置換を有し、各置換が場合により、アスパラギン、グリシン、アラニン、およびセリンからなる群から選択されるか、あるいは

(xix) アミノ酸 162 ~ 164 の 1 つ、2 つ、または全ての 3 つに置換を有し、各置

50

換が場合により、アスパラギン、グリシン、アラニン、およびセリンからなる群から選択されるか、

あるいはそれらの任意の組み合わせを有する、請求項 3 に記載のペプチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 2 に比較して、前記アミノ酸配列が、
(xx) アミノ酸 85 でのセリンとアミノ酸 104 でのセリン；
(xxi) アミノ酸 26 でのアラニンとアミノ酸 146 でのセリン；
(xxii) アミノ酸 26 でのアラニンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリン；
(xxiii) アミノ酸 24 でのアラニンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリン；
(xxiv) アミノ酸 27 でのアラニンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリン；
(xxv) アミノ酸 85、104、および 146 でのセリン；
(xxvi) アミノ酸 26 でのアラニンと；アミノ酸 85、104、および 146 でのセリンと；アミノ酸 62 でのアラニン；
(xxvii) アミノ酸 27 でのグリシンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリン；
(xxviii) アミノ酸 27 でのセリンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリン；
(xxix) アミノ酸 27 でのアラニンと；アミノ酸 85、104、および 146 でのセリンと、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 1 ~ 6 の欠失；
(xxx) アミノ酸 27 でのアラニンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリンとアミノ酸 138 でのセリン；
(xxxi) アミノ酸 27 でのアラニンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリンと、アミノ酸 161 および 163 でのアスパラギン；
(xxxii) アミノ酸 26 でのアラニンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリンと、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 174 への GSGSC (SEQ ID NO: 27) ペンタペプチド C 末端の付加；
(xxxiii) アミノ酸 27 でのアラニンとアミノ酸 85 および 104 でのセリン；
(xxxiv) アミノ酸 27 でのアラニンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリンと、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 1 への GSCGS (SEQ ID NO: 26) ペンタペプチド N 末端の付加；ならびに
(xxxv) アミノ酸 27 でのアラニンとアミノ酸 85、104、および 146 でのセリンと、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 174 への GSGSC (SEQ ID NO: 27) ペンタペプチド C 末端の付加、
を有する、請求項 3 に記載のペプチド。

【請求項 6】

システイン 85、104、および 146 の 1 つ、2 つ、または全ての 3 つが、そのスルフィドヒドリル基で化学修飾され、場合により前記スルフィドヒドリル基（複数可）が、マレイミドエステル、 α -ハロカルボニル、チオスルホナート、またはそれらの任意の組み合わせの付加により化学修飾される、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 7】

前記アミノ酸配列が、アルギニン以外のアミノ酸へのアルギニン 24、26、および/もしくは 27 の 1 つもしくは複数の置換、システイン以外のアミノ酸、場合によりセリンへのシステイン 85、104、および 146 の 1 つもしくは複数の置換、またはそれらの任意の組み合わせを含むか、前記置換から本質的になるか、または前記置換からなる、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 8】

N 末端に、C 末端に、または両方に付加されたペグ化システインをさらに含み、場合に

10

20

30

40

50

より前記ペグ化システインの一方または両方が、約 1 キロダルトン (k D a) ~ 約 4 0 k D a の分子量を有する P E G 基を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9】

前記アミノ酸配列が、アルギニン以外のアミノ酸へのアルギニン 2 4、アルギニン 2 6、およびアルギニン 2 7 の少なくとも 1 つの置換、ならびにセリンへのシステイン 8 5、1 0 4、および 1 4 6 の置換を含むか、前記置換から本質的になるか、または前記置換からなる、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 0】

1 4 6 位での前記アミノ酸が、システインでありかつさらにシステイン 1 4 6 が、ペグ化され、場合によりシステイン 1 4 6 が、約 1 k D a ~ 約 4 0 k D a の分子量を有する P E G 基を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

10

【請求項 1 1】

システイン 8 5、1 0 4、および 1 4 6 の 1 つまたは複数、マレイミドエステルによる化学修飾を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 2】

フリン切断に対する前記ペプチドの耐性を上昇させるためにアルギニン 2 4、アルギニン 2 6、および / またはアルギニン 2 7 を修飾することをさらに含む、請求項 1 1 に記載のペプチド。

【請求項 1 3】

システイン 8 5、1 0 4、および 1 4 6 の 1 つまたは複数、前記 1 つまたは複数のシステインをジスルフィドと反応させることにより得られる化学修飾を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

20

【請求項 1 4】

フリン切断に対する前記ペプチドの耐性を上昇させるためにアルギニン 2 4、アルギニン 2 6、および / またはアルギニン 2 7 を修飾することをさらに含む、請求項 1 3 に記載のペプチド。

【請求項 1 5】

前記ペプチドが、S E Q I D N O : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 の任意の 1 つに対して少なくとも 8 7 % の同一性 % を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列からなり、場合により前記同一性 % が、少なくとも 9 5 % である、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

30

【請求項 1 6】

前記ペプチドが、その全長にわたり S E Q I D N O : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 の任意の 1 つに対して 1 0 0 % の同一性 % を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列からなる、請求項 1 5 に記載のペプチド。

【請求項 1 7】

前記ペプチドが、保存的アミノ酸置換、非天然アミノ酸置換、D - または D , L - ラセミ混合物異性体アミノ酸置換、アミノ酸化学置換、カルボキシ - および / またはアミノ - 末端修飾、グリコシル化、ならびに非限定的に脂肪酸および目的のペプチドなどの生体適合性分子へのコンジュゲーションからなる群から選択される 1 つまたは複数の追加的修飾をさらに含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

40

【請求項 1 8】

前記ペプチドが、システイン 8 5、1 0 4、および / または 1 4 6 の少なくとも 1 つの修飾をさらに含み、前記修飾が、P E G 基、蛍光部分、アルキル部分、比色測定部分、二官能性部分、放射線測定部分、グリコシル部分、脂肪酸部分、毒素、治療薬、場合により化学療法薬、リンカー、ペプチド、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも 1 つの部分を含むマレイミドエステル誘導体の付着を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 9】

対象への投与のために配合されるかまたはヒトへの投与のために配合される医薬組成物

50

である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む組成物。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 2 1】

前記ペプチドが、治療部分、診断部分、検出可能な部分、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される薬剤にコンジュゲートされ、場合により前記ペプチドが、リンカー分子を介してまたはペプチド結合を介して前記薬剤にコンジュゲートされる、請求項 2 0 に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 2】

前記治療分子が、治療抗体、F c 断片、受容体、毒素、化学療法分子、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 2 1 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 2 3】

SEQ ID NO : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むか、または前記配列から本質的になるか、または前記配列からなる、ポリペプチド。

【請求項 2 4】

発現系からの前記ポリペプチドの精製および / または単離のために用いられ得る、タグ、場合により His タグをさらに含む、請求項 2 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 5】

タンパク質分解性切断により前記ポリペプチドから前記タグを放出するために用いられ得る前記タグと前記ポリペプチドのアミノ酸の間のプロテアーゼのための認識部位をさらに含む、請求項 2 4 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 2 6】

SEQ ID NO : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 の任意の 1 つに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドの N 末端への 1 つもしくは複数のアミノ酸の付加、前記ポリペプチドの C 末端への 1 つもしくは複数のアミノ酸の付加、または前記ポリペプチドの N 末端および C 末端の両方への 1 つもしくは複数のアミノ酸の付加をさらに含み、前記 1 つまたは複数のアミノ酸が、前記ポリペプチドに目的の部分をコンジュゲートする官能性を提供する少なくとも 1 つのシステイン残基を含む、ポリペプチド。

30

【請求項 2 7】

前記ポリペプチドの N 末端に付加された前記 1 つもしくは複数のアミノ酸が、SEQ ID NO : 2 6 を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなりかつ / または前記ポリペプチドの C 末端に付加された 1 つもしくは複数のアミノ酸が、SEQ ID NO : 2 7 を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなる、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 8】

前記ポリペプチドの N 末端および / または C 末端に付加された前記 1 つまたは複数のアミノ酸中に存在するシステインにコンジュゲートされた PEG 基をさらに含み、前記 PEG 基が、PEG 基を欠く前記ポリペプチドに比較して前記ポリペプチドの適当なフォールディングを増進しかつ / またはメプリン切断に対して前記ポリペプチドを安定化する、請求項 2 6 または 2 7 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 2 9】

インビトロで ADAM 9 生物活性をモジュレートするための方法であって、ADAM 9 タンパク質を含む溶液または細胞を前記 ADAM 9 タンパク質の活性を阻害するのに十分な量で請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは請求項 1 9 に記載の組成物と接触させることを含む、方法。

【請求項 3 0】

対象における ADAM 9 生物活性を阻害するための方法であって、前記対象に存在する ADAM 9 ポリペプチドと接触するのに十分な量および経路で請求項 1 ~ 1 8 のいずれか

50

1 項に記載のペプチドまたは請求項 1 9 に記載の組成物を前記対象に投与すること、それにより対象の体内の A D A M 9 生物活性がモジュレートされることを含む、方法。

【請求項 3 1】

インビボで A D A M 9 生物活性を阻害するための方法であって、インビボで A D A M 9 生物活性を阻害するのに十分な量および経路で S E Q I D N O : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 の任意の 1 つに示されるアミノ酸配列を含むか、または前記配列から本質的になるか、または前記配列からなるポリペプチドを対象に投与することを含み、場合により前記ポリペプチドが、ペグ化される、方法。

【請求項 3 2】

対象における疾患または障害に関連する A D A M 9 生物活性を阻害するための方法であって、前記対象に存在する A D A M 9 タンパク質を請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは請求項 1 9 に記載の組成物の有効量と接触させることを含み、前記疾患もしくは障害が、癌、炎症、C O P D、線維症、アルツハイマー病、創傷、および望ましくない血管新生からなる群から選択されるか、または前記対象が、その素因を有する、方法。

10

【請求項 3 3】

前記疾患または障害が、肺傷害、場合によりタバコの煙への暴露により生じた肺傷害を含み、かつ前記有効量が、前記対象の肺の一方または両方においてエラスチン分解、炎症、マトリックスメタロプロテイン生物活性、またはそれらの任意の組み合わせを減少させるのに充分である、請求項 3 2 に記載の方法。

20

【請求項 3 4】

前記疾患または障害が、肺傷害、場合により肝線維症に関連する肝傷害を含み、かつ前記有効量が、前記対象の肝臓において M M P 9 遺伝子産物、A D A M 8 遺伝子産物、またはそれらの任意の組み合わせの生物活性を低下させるのに充分である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記疾患または障害が、A D A M 9 生物活性に関連する過剰な細胞増殖から少なくとも部分的に生じる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記対象が、望ましくなく高い A D A M 9 生物活性または A D A M 9 タンパク質発現により少なくとも部分的に特徴づけられる疾患または障害を有する、請求項 3 0 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 3 7】

前記対象が、A D A M 1 0 活性の低下により少なくとも部分的に特徴づけられる疾患または障害を有する、請求項 3 0 ~ 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

炎症を減少させるための方法であって、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは請求項 1 9 に記載の組成物の有効量を対象に投与することを含む、方法。

【請求項 3 9】

対象における望ましくない A D A M 9 生物活性に関連する細胞浸潤を阻害するための方法であって、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは請求項 1 9 に記載の組成物の有効量を前記対象に投与することを含む、方法。

40

【請求項 4 0】

インビボで A D A M 9 の基質の放出を阻害するための方法であって、S E Q I D N O : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 の任意の 1 つに示されるアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列を含むペプチドをそれを必要とする対象に投与することを含み、場合により前記ペプチドが、ペグ化される、方法。

【請求項 4 1】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは請求項 1 9 に記載の組成物が、吸入、経口投与、脂肪内投与、動脈内投与、関節内投与、頭蓋内投与、皮内投与、病巣内

50

投与、筋肉内投与、鼻内投与、眼内投与、心膜内投与、腹腔内投与、胸膜内投与、前立腺内投与、直腸内投与、髄腔内投与、気管内投与、腫瘍内投与、臍内投与 (i n t r a u m b i l i c a l a d m i n i s t r a t i o n)、腔内投与、静脈内投与、膀胱内投与、硝子体内投与、結膜下投与、皮下投与、舌下投与、局所投与、経頬投与、中咽頭吸引、および経皮投与からなる群から選択される経路を介した投与のために配合される、請求項 30 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは請求項 19 に記載の組成物が、脂質組成物、場合によりリポソームまたはエソソーム中で；クリーム中で；カテーテルを介して；洗浄法により；輸液、場合により連続輸液を介して；吸入を介して；注射を介して；局所送達を介して；局在化灌流を介して；標的細胞を直接浸すことにより；またはそれらの任意の組み合わせにより送達される、請求項 41 に記載の方法。

10

【請求項 43】

SEQ ID NO : 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 のいずれかに示されたアミノ酸配列からなるか、前記配列から本質的になるか、または前記配列を含むペプチドを抗体、抗体断片、または他のタンパク質に付着させるための方法であって、場合によりリンカーを介して、さらに場合によりペプチドリンカーを介して、前記ペプチドを前記抗体、抗体断片、または他のタンパク質にコンジュゲートすることを含む、方法。

【請求項 44】

それを必要とする対象において望ましくない ADAM9 生物活性に関連する障害の少なくとも 1 つの症状の発症を予防するためかつ / または前記症状の重症度を低下させるための抗体、抗体断片、ポリペプチド、タンパク質、特異的抗体、モノクローナル抗体、ペプチド、阻害性核酸、および / または ADAM9 生物活性の低分子量阻害剤の使用であって、場合により望ましくない ADAM9 生物活性に関連する前記障害が、癌、炎症、COPD、線維症、アルツハイマー病、および望ましくない血管新生からなる群から選択される、使用。

20

【請求項 45】

前記対象が、ヒトである、請求項 44 に記載の使用。

【請求項 46】

望ましくない ADAM9 生物活性に関連する前記障害が、COPD および線維症からなる群から選択され、場合により前記線維症が、肝線維症である、請求項 44 または 45 に記載の使用。

30

【請求項 47】

SEQ ID NO : 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 のいずれかを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるペプチドであって、そこに存在する少なくとも 1 つのメブリン切断部位が、前記ペプチドをメブリンに対してより低い阻害性にするように修飾される、ペプチド。

【請求項 48】

前記少なくとも 1 つのメブリン切断部位が、SEQ ID NO : 3 のアミノ酸 5 ~ 7、SEQ ID NO : 3 のアミノ酸 60 ~ 62、SEQ ID NO : 3 のアミノ酸 136 ~ 138、および SEQ ID NO : 3 のアミノ酸 159 ~ 164 からなる群から選択され、かつさらにそこに存在する前記少なくとも 1 つのメブリン切断部位が、FXX、PXX、MXX、FXQ、FQX、PXD、PEX、MXD、MDX、KXEXEX、KDXEXEX、KDXXXEX、KXEXXXEX、KXXXEXEX、KDXXXXEX、KXEXXXEX、KXXXEXEX、KXXXEXEX またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むように修飾され、ここで各 X が独立して、任意のアミノ酸配列であり、かつさらに場合により各 X が独立して、アスパラギン、グリシン、アラニン、およびセリンからなる群から選択される、請求項 47 に記載のペプチド。

40

【請求項 49】

50

SEQ ID NO: 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 の任意の 1 つに示されるアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列からなるポリペプチドであって、システイン 85、104、および 146、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される SEQ ID NO: 3 のアミノ酸残基に対応するシステインが、その部分を欠く前記ポリペプチドに比較して前記ポリペプチドの阻害能、溶解度、および/もしくは薬物動態特性を改善する 1 つもしくは複数の前記部分にコンジュゲートされ、かつ/または 1 つもしくは複数のクロモフォア、フルオロフォア、および/もしくは放射性核種にコンジュゲートされる、ポリペプチド。

【請求項 50】

望ましくない ADAM9 生物活性に関連する障害を有する対象を処置する際の使用のための、SEQ ID NO: 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 の 1 つに示されるアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列からなるポリペプチドであって、場合により望ましくない ADAM9 生物活性に関連する前記障害が、癌、炎症、COPD、線維症、アルツハイマー病、創傷、および望ましくない血管新生からなる群から選択され、場合により前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 の前記アミノ酸の 1 つまたは複数でペグ化される、ポリペプチド。

10

【請求項 51】

前記ポリペプチドが、ペグ化される、請求項 50 に記載のポリペプチド。

【請求項 52】

前記対象が、ヒトである、請求項 50 または 51 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 53】

望ましくない ADAM9 生物活性に関連する障害を有する対象を処置するための ADAM9 生物活性の阻害剤の使用であって、前記 ADAM9 生物活性の前記阻害剤が、抗体またはその断片からなる群から選択され、場合により前記抗体が、モノクローナル抗体、タンパク質、ペプチド、阻害性核酸、および/または低分子量物質であり、場合により望ましくない ADAM9 生物活性に関連する前記障害が、癌、炎症、COPD、線維症、アルツハイマー病、創傷、および望ましくない血管新生からなる群から選択される、使用。

【請求項 54】

前記対象が、ヒトである、請求項 53 に記載の使用。

【請求項 55】

望ましくない ADAM9 生物活性に関連する障害の少なくとも 1 つの症状の発症を予防すること、および/または前記症状の重症度を低下させることにおける使用のための、SEQ ID NO: 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 の 1 つに示されるアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列からなるポリペプチドであって、場合により望ましくない ADAM9 生物活性に関連する前記障害が、それを必要とする対象における、癌、炎症、COPD、線維症、アルツハイマー病、創傷、および望ましくない血管新生からなる群から選択され、場合により前記対象が、前記少なくとも 1 つの症状を発症する素因を有する、ポリペプチド。

30

【請求項 56】

前記ポリペプチドが、ペグ化される、請求項 55 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 57】

前記対象が、ヒトである、請求項 55 または 56 に記載のポリペプチド。

【請求項 58】

望ましくない ADAM9 生物活性に関連する前記障害が、COPD および線維症からなる群から選択され、場合により前記線維症が、肝線維症である、請求項 55 ~ 57 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年1月31日出願の米国特許仮出願第62/624,491号の利益を主張するものであり、仮出願の開示は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

技術分野

本明細書に開示された主題は、ADAM9の阻害に関係する組成物および方法に関する。詳細には、本明細書に開示された主題は、ADAM9の修飾および精製されたプロドメイン、プロドメインポリペプチドの突然変異、ならびにインビトロおよびインビボ使用のためにプロドメインを安定化させる修飾に関する。本明細書に開示された主題はさらに、細胞アッセイにおけるプロドメインの使用、ならびに癌、線維症および慢性閉塞性肺疾患などの疾患の処置のためのプロドメインの使用に関する。

10

【背景技術】

【0003】

背景

ADAM9は、TACE (ADAM17)、ADAM8およびADAM10などの酵素を含むディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ (ADAM) ファミリー (Edwards et al., 2008) のメンバーである。全体として、ヒトの場合、33種のADAMファミリーメンバーが存在する。ADAMタンパク質は、細胞を介する酵素の適切なフォールディングおよび輸送に重要なプロドメインと、典型的なHEXXHモチーフを含有する触媒ドメインと、インテグリンと相互作用するのに用いられるディスインテグリンドメインと、基質認識に重要と考えられるシステインリッチ領域と、膜貫通ドメインと、シグナル伝達イベントに関与する細胞質尾部とを含む。

20

【0004】

ADAMファミリーのメンバーは、I型およびII型の1回膜貫通型タンパク質を細胞から切断して、種々の生理学的役割を有する可溶性成熟タンパク質を生成することが知られている (Edwards et al., 2008)。例えば、TACEは、TGF- α 、アンフィレグリン、およびHB-EGFなどの可溶性上皮成長因子 (EGF) リガンドを生成することが知られている (Sahin et al., 2004)。同様に、ADAM10活性は、非限定的にEGFリガンド、EGF、HB-EGFおよびベータセルリン (Sahin et al., 2004)、Notch、アミロイド前駆体タンパク質、エフリン、カドヘリン、プロトカドヘリン、CXCL16およびCX3CL1などのケモカイン、HER2、AXL、cMET、ならびに低親和性IgE受容体であるCD23をはじめとする可溶性タンパク質を生成する (Pruessmeyer & Ludwig, 2009内で評論)。過剰なADAM9活性は、可溶性上皮成長因子 (EGF) リガンドおよびMT-MMP16の生成増進により、腫瘍細胞アッセイにおいて細胞浸潤および成長を促進する場合がある (Moss et al., 2011)。加えて、ADAM9活性は、Tie-2および他の因子、ならびにVEGFR2のプロセッシングを通して新生血管生成イベントに関係しており (Guaiqui et al., 2009; Maretzky et al., 2017)、ADAM9ノックアウトマウスが、野生型の同等マウスよりも良好であったことから創傷治癒 (Mauch et al., 2010)、急性肺傷害 (Roychaudhuri et al., 2014)、およびCOPD (Wang et al., 2018) において防御的役割を果たす。加えて、ADAM9の阻害は、ADAM10活性を上昇させ、それは、アルツハイマー病の人々の支援に関係している可溶性アミロイド前駆体タンパク質アルファの形成を促進する (Moss et al., 2011)。ADAM9の阻害はまた、BMP7の増加、線維症に関連づけられるTGF- β RIおよびアクチビンRIの減少 (表1参照)、ならびにMAC-1およびリンホタクチンの減少 (表1参照) に関係している。これらの知見は、ADAM9阻害剤での個体の処置が特定の線維性および炎症促進性の病気に有益であることを示唆する。

30

40

【0005】

したがって、ADAM9活性を特異的にモジュレートする能力は、このタンパク質の生

50

物学的機能を試験するために、そして非限定的に癌、血管新生疾患、アルツハイマー病、創傷治癒、急性肺傷害および慢性閉塞性肺疾患（COPD）をはじめとする障害の処置のために、有用であろう。

【0006】

残念なことに、既存の低分子量阻害剤は、ADAM9 活性に対して特異的でない。例えば GSK により開発されたヒドロキサム酸塩は、多くの ADAM メンバーならびにマトリックスメタロプロテイナーゼファミリーの他のメンバーを阻害する（Ludwig et al., 2005）。Incyte により開示された阻害剤もまた、MMP と、おそらく他の ADAM ファミリーメンバーを阻害する（Zhou et al., 2006）。そのような非特異的阻害は多くの場合、望まない副作用をもたらし、この場合この化合物の医薬品への開発を妨害した（Moss & Sklair-Tavron, 2008）。

10

【0007】

ADAM ファミリーメンバーは、酵素を潜伏状態に保持するプロドメインを有するチモゲンとして発現される。例えば TACE のプロドメインは、 K_i 50 nM で触媒ドメインの活性を抑制し、インビボで TACE 活性を阻害する（Wong et al., 2016）。しかし TACE の野生型プロドメインは、良好な薬物動態特性をもたない。上流のフリン部位およびシステイン残基を修飾した突然変異体プロドメインは、インビボ使用のための TACE プロドメインを安定化した（Wong et al., 2016）。同様に、ADAM10 の野生型プロドメインは、良好な薬物動態特性がなく、それにより ADAM10 は薬物としての使用が困難である。薬物動態性が乏しい理由は、上流の切断部位（ヒト ADAM10 のアミノ酸 48 ~ 51）でのフリンコンバーターゼによるプロセッシングが原因である可能性がある。加えて、173 位の唯一のシステインは、それが酸化を受けてプロドメインの二量体形態を形成し得るため、良好な薬物動態特性を有するプロドメインの能力を妨げる可能性がある。ADAM9 プロドメインは、複数のメプリンベータ部位を有する。ADAM10 は、メプリンベータの基質であることが示されており（Jefferson et al., 2013）、メプリンベータの阻害は、望まない副作用を有する可能性がある（Bergin et al., 2008; Deuss et al., 2008; Banerjee et al., 2011; Vazeille et al., 2011; Schette et al., 2014）。

20

【0008】

ADAM10 および ADAM17 と異なり、ADAM9 のプロドメインは、3 つのシステインおよび上流のフリン部位を有する。プロドメインのこれらの特色により、それはインビトロおよびインビボ使用には不安定である。

30

【発明の概要】

【0009】

したがって、当該技術分野において、ADAM9 の生物学的機能を試験するために、かつ非限定的に、癌、新生血管疾患、創傷治癒、急性肺傷害、および COPD などの疾患および障害を処置するために、ADAM9 の選択的阻害剤が求められている。

【0010】

概要

40

この概要は、本明細書に開示された主題の複数の実施形態を列挙しており、多くの場合、これらの実施形態の変形例および置き換えを列挙している。この概要は単に、数多くの実施形態および改変された実施形態の例示である。所与の実施形態の 1 つまたは複数の代表的特色の言及は、同様に例示である。そのような実施形態は、言及された特色（複数可）を含みながら、または含まずに存在する可能性があり、同様にそれらの特色は、この概要に列挙されているか否かにかかわらず、本明細書に開示された主題の他の実施形態に適用され得る。過剰な反復を回避するために、この概要は、そのような特色の可能な組み合わせの全てを列挙しているわけではない。

【0011】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題は、SEQ ID NO: 3 に示

50

されたアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなるペプチドに関し、このペプチドは、SEQ ID NO: 2に示されたアミノ酸配列に比較して、アミノ酸6、7、24、26、27、61、62、85、104、137、138、146、160、161、162、163、および164からなる群から選択されるアミノ酸位置に1つまたは複数のアミノ酸置換および/または修飾（例えば、SEQ ID NO: 2中に存在するシステインの1つまたは複数のスルフヒドリル基の化学修飾）を含み、そのためこのペプチドは、この1つまたは複数のアミノ酸置換および/または修飾を有さないペプチドに比較して、メブリンへの阻害性が低い、フリン切断への感度が低い、酸化および/もしくはジスルフィド結合形成への感受性が低い、またはその任意の組み合わせである。幾つかの実施形態において、このペプチドは、SEQ ID NO: 2と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなる。幾つかの実施形態において、このペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2に比較して、アルギニン24の、別のアミノ酸、場合によりアラニン、セリン、グリシンもしくはリジンへの置換；アルギニン26の、別のアミノ酸、場合によりアラニン、セリン、グリシンもしくはリジンへの置換；アルギニン27の、別のアミノ酸、場合によりアラニン、セリン、グリシンもしくはリジンへの置換；システイン85の、別のアミノ酸、場合によりセリン、アラニンもしくはグリシンへの置換；システイン104の、別のアミノ酸、場合によりセリン、アラニンもしくはグリシンへの置換；システイン146の、別のアミノ酸、場合によりセリン、アラニンもしくはグリシンへの置換、ならびにシステイン85、104および146のうちの1つ、2つもしくは3つ全ての化学修飾、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換および/または修飾を含む。幾つかの実施形態において、このアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2に比較して、アミノ酸6および7の一方または両方に置換を有し、各置換は、独立して、対応する位置でSEQ ID NO: 2中に存在するこのアミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換は、独立して、アラニン、セリン、およびグリシンからなる群から選択され、そして/またはアミノ酸24、26および27のうちの1つ、2つもしくは3つ全てに置換を有し、各置換は、独立して、対応する位置でSEQ ID NO: 2中に存在するこのアミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換は、独立して、アラニン、セリン、グリシンおよびリジンからなる群から選択され、そして/またはアミノ酸61および62のうちの一方もしくは両方に置換を有し、各置換は、独立して、対応する位置でSEQ ID NO: 2中に存在するこのアミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換は、独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、およびグリシンからなる群から選択され、そして/またはアミノ酸137および138の一方もしくは両方に置換を有し、各置換は、独立して、対応する位置でSEQ ID NO: 2中に存在するこのアミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換は、独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、およびグリシンからなる群から選択され、そして/またはアミノ酸160～164のうちの1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つ全てに置換を有し、各置換は、独立して、対応する位置でSEQ ID NO: 2中に存在するこのアミノ酸以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換は、独立して、アラニン、セリン、グリシン、およびアスパラギンからなる群から選択され、そして/またはアミノ酸85、104および146のうちの1つ、2つもしくは3つ全てに置換を有し、各置換は、独立して、システイン以外の任意のアミノ酸であり、場合により各置換は、独立して、セリン、アラニンおよびグリシンからなる群から選択されるか、あるいは上記の任意の組み合わせまたは部分的組み合わせである。幾つかの実施形態において、このアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2に比較して、アミノ酸85でのセリンとアミノ酸104でのセリン；アミノ酸26でのアラニンとアミノ酸85、104および146でのセリン；アミノ酸24でのアラニンとアミノ酸85、104および146でのセリン；アミノ酸27でのアラニンとアミノ酸85、104および146でのセリン；アミノ酸85、104および146でのセリン；アミノ酸26でのアラニン；アミノ酸85、104および146でのセリン；ならびにアミノ酸62でのアラニン；アミノ酸27のグリシンとアミノ酸85、

10

20

30

40

50

104および146でのセリン；アミノ酸27でのセリンとアミノ酸85、104および146でのセリン；アミノ酸27でのアラニン；アミノ酸85、104および146でのセリンとSEQ ID NO：3のアミノ酸1～6の欠失；アミノ酸27でのアラニンとアミノ酸85、104および146でのセリン；ならびにアミノ酸138でのセリン；アミノ酸27でのアラニンとアミノ酸85、104および146でのセリンとアミノ酸161および163でのアスパラギン；アミノ酸26でのアラニンとアミノ酸85、104および146でのセリンとSEQ ID NO：3のアミノ酸174への、GSGSC (SEQ ID NO：27) ペンタペプチドC末端の付加；アミノ酸27でのアラニンとアミノ酸85および104でのセリン；アミノ酸27でのアラニンとアミノ酸85、104および146でのセリンとSEQ ID NO：3のアミノ酸1への、GSCGS (SEQ ID NO：26) ペンタペプチドN末端の付加；ならびにアミノ酸27でのアラニンとアミノ酸85、104および146でのセリンとSEQ ID NO：3のアミノ酸174への、GSGSC (SEQ ID NO：27) ペンタペプチドC末端の付加を有する。幾つかの実施形態において、システイン85、104、および146のうちの1つ、2つまたは3つ全ては、スルフヒドリル基で化学修飾されており、場合によりこのスルフヒドリル基（複数可）は、マレイミドエステル、 α -ハロカルボニル、チオスルホナートまたはそれらの任意の組み合わせの付加により化学修飾されている。幾つかの実施形態において、このアミノ酸配列は、アルギニン以外のアミノ酸へのアルギニン24、26および/もしくは27のうちの1つもしくは複数の置換、システイン以外のアミノ酸、場合によりセリンへのシステイン85、104および146のうちの1つもしくは複数の置換、またはそれらの任意の組み合わせを含むか、この置換から本質的になるか、またはこの置換からなる。

10

20

【0012】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のペプチドは、N末端、C末端または両方に付加されたペグ化システインをさらに含み、場合によりこのペグ化システインの一方または両方は、約1キロダルトン(kDa)～約40kDaの分子量を有するPEG基を含む。幾つかの実施形態において、このアミノ酸配列は、アルギニン以外のアミノ酸へのアルギニン24、アルギニン26およびアルギニン27のうちの少なくとも1つの置換、ならびにセリンへのシステイン85、104および146の置換を含むか、この置換から本質的になるか、またはこの置換からなる。幾つかの実施形態において、146位のアミノ酸は、システインであり、さらにシステイン146は、ペグ化されており、場合によりシステイン146は、約1kDa～約40kDaの分子量を有するPEG基を含む。幾つかの実施形態において、システイン85、104および146のうちの1つまたは複数は、マレイミドエステルによる化学修飾を含む。

30

【0013】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のペプチドは、フリン切断に対するこのペプチドの耐性を上昇させるために、アルギニン24、アルギニン26および/またはアルギニン27の修飾をさらに含む。幾つかの実施形態において、アルギニン24、アルギニン26および/またはアルギニン27の修飾は独立して、各アミノ酸で、システイン以外の任意のアミノ酸での置換と化学修飾、幾つかの実施形態においてシステインのスルフヒドリル基を酸化への耐性が低い基へと修飾する化学修飾、からなる群から選択される。幾つかの実施形態において、システイン85、104および146のうちの1つまたは複数は、この1つまたは複数のシステインをジスルフィドと反応させることにより得られる化学修飾を含む。

40

【0014】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のペプチドは、SEQ ID NO：3～23および28～430、947のうちの任意の1つに対して少なくとも87%の同一性%を有するアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなり、場合により同一性%は、少なくとも93%であり、さらに場合により同一性%は、少なくとも95%である。幾つかの実施形態において、このペプチドは、全長にわたりSEQ ID NO：3～23および28～430、947のうちの任意の1つに対し

50

て100%の同一性%を有するアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなる。

【0015】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のペプチドは、保存的アミノ酸置換、非天然アミノ酸置換、D-またはD, L-ラセミ混合物異性体アミノ酸置換、アミノ酸化学置換、カルボキシ-および/またはアミノ-末端修飾、グリコシル化、ならびに非限定的に脂肪酸および該当する他のペプチドなどの生体適合性分子へのコンジュゲーション、からなる群から選択される1つまたは複数の追加的修飾をさらに含む。

【0016】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のペプチドは、システイン85、104および/または146のうちの少なくとも1つの修飾をさらに含み、修飾は、PEG基、蛍光部分、アルキル部分、比色測定部分、二官能性部分、放射線測定部分、グリコシル部分、脂肪酸部分、毒素、治療薬、場合により化学療法薬、リンカー、該当するペプチド、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの部分を含むマレイミドエステル誘導体の付着を含む。

10

【0017】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、本明細書に開示されたペプチドを含む組成物に関する。幾つかの実施形態において、組成物は、対象への投与のために配合されているか、またはヒトへの投与のために配合された医薬組成物である。

【0018】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、本明細書に開示されたペプチドを含む融合タンパク質に関する。幾つかの実施形態において、融合タンパク質は、治療部分、診断部分、検出可能な部分、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される薬剤にコンジュゲートされたペプチドを含み、場合によりペプチドは、リンカー分子を介して、またはペプチド結合を介して薬剤にコンジュゲートされている。幾つかの実施形態において、治療分子は、治療抗体、Fc断片、受容体、毒素、化学療法分子、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

20

【0019】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、SEQ ID NO: 3 ~ 23および28 ~ 430、947のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むか、またはこの配列から本質的になるか、またはこの配列からなるポリペプチドに関する。幾つかの実施形態において、ポリペプチドは、SEQ ID NO: 2を含まず、つまりアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2と比較して、少なくとも1つの置換、化学修飾、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

30

【0020】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のポリペプチドは、発現系からのポリペプチドの精製および/または単離に用いられ得るタグ、場合によりHisタグをさらに含む。

【0021】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のポリペプチドは、タグとポリペプチドのアミノ酸の間に、タンパク質分解性切断によりポリペプチドからタグを放出するために用いられ得るプロテアーゼのための認識部位をさらに含む。

40

【0022】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、SEQ ID NO: 3 ~ 23および28 ~ 430、947のうちの任意の1つに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに関し、ポリペプチドのN末端への1つもしくは複数のアミノ酸の付加、ポリペプチドのC末端への1つもしくは複数のアミノ酸の付加、またはポリペプチドのN末端およびC末端の両方への1つもしくは複数のアミノ酸の付加をさらに含み、1つまたは複数のアミノ酸は、ポリペプチドに該当する部分をコンジュゲートする官能性を提供する少なくとも1つのシステイン残基を含む。幾つかの実施形態において、ポリペプチドのN末

50

端に付加された1つもしくは複数のアミノ酸は、SEQ ID NO: 26を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなり、そして/またはポリペプチドのC末端に付加された1つもしくは複数のアミノ酸は、SEQ ID NO: 27を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなる。幾つかの実施形態において、ポリペプチドは、ポリペプチドのN末端および/またはC末端に付加された1つまたは複数のアミノ酸中に存在するシステインにコンジュゲートされたPEG基をさらに含み、PEG基は、PEG基が欠如したポリペプチドに比較して、ポリペプチドの適当なフォールディングを増進し、そして/またはメプリン切断に対してポリペプチドを安定化させる。

【0023】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、インビトロでADAM 9生物活性をモジュレートするための方法に関する。幾つかの実施形態において、方法は、ADAM 9タンパク質を含む溶液または細胞を、本明細書に開示されたペプチドまたは組成物と、ADAM 9タンパク質の活性を阻害するのに十分な量で接触させることを含む。

10

【0024】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、対象におけるADAM 9生物活性を阻害するための方法に関する。幾つかの実施形態において、方法は、本明細書に開示されたペプチドまたは組成物を、対象の体内に存在するADAM 9ポリペプチドと接触するのに十分な量および経路で対象に投与し、それにより対象の体内のADAM 9生物活性が、モジュレートされることを含む。

20

【0025】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、インビボでADAM 9生物活性を阻害するための方法に関する。幾つかの実施形態において、方法は、SEQ ID NO: 3~23および28~430、947のうちの任意の1つに示されるアミノ酸配列を含むか、またはこの配列から本質的になるか、またはこの配列からなるポリペプチドを、インビボでADAM 9生物活性を阻害するのに十分な量および経路で対象に投与することを含み、場合によりポリペプチドは、ペグ化されている。

【0026】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、対象における疾患または障害に関連するADAM 9生物活性を阻害するための方法に関する。幾つかの実施形態において、方法は、対象の体内に存在するADAM 9タンパク質を、本明細書に開示されたペプチドまたは組成物の有効量と接触させることを含み、疾患もしくは障害は、癌、炎症、COPD、線維症、アルツハイマー病、創傷および望ましくない血管新生からなる群から選択されるか、または対象は、その素因を有する。幾つかの実施形態において、疾患または障害は、肺傷害、場合によりタバコの煙への暴露により生じた肺傷害を含み、有効量は、対象の肺の一方または両方においてエラスチン分解、炎症、マトリックスメタロプロテイン生物活性、またはそれらの任意の組み合わせを減少させるのに充分である。幾つかの実施形態において、疾患または障害は、肺傷害、場合により肝線維症に関連する肝傷害を含み、有効量は、対象の肝臓においてMMP 9遺伝子産物、ADAM 8遺伝子産物、またはそれらの任意の組み合わせの生物活性を低下させるのに充分である。幾つかの実施形態において、疾患または障害は少なくとも部分的に、ADAM 9生物活性に関連する過剰な細胞増殖から生じる。幾つかの実施形態において、対象は、少なくとも部分的に望ましくないほど高いADAM 9生物活性またはADAM 9タンパク質発現を特徴とする疾患または障害を有する。幾つかの実施形態において、対象は、少なくとも部分的にADAM 10活性の低下を特徴とする疾患または障害を有する。

30

40

【0027】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、炎症を減少させるための方法に関する。幾つかの実施形態において、方法は、本明細書に開示されたペプチドまたは組成物の有効量を、対象に投与することを含む。

【0028】

50

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、対象における望ましくないADAM9生物活性に関連する細胞浸潤を阻害するための方法に関する。幾つかの実施形態において、方法は、本明細書に開示されたペプチドまたは組成物の有効量を、必要とする対象に投与することを含む。

【0029】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、インビボでADAM9の基質の放出を阻害するための方法に関する。幾つかの実施形態において、方法は、SEQ ID NO: 3～23および28～430、947のうちの任意の1つに示されるアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列を含むペプチドを、必要とする対象に投与することを含み、場合によりペプチドは、ペグ化されている。

10

【0030】

本明細書に開示された方法の幾つかの実施形態において、ペプチドまたは組成物は、吸入、経口投与、脂肪内投与、動脈内投与、関節内投与、頭蓋内投与、皮内投与、病巣内投与、筋肉内投与、鼻内投与、眼内投与、心膜内投与、腹腔内投与、胸膜内投与、前立腺内投与、直腸内投与、髄腔内投与、気管内投与、腫瘍内投与、臍内投与 (intratumoral administration)、腔内投与、静脈内投与、膀胱内投与、硝子体内投与、結膜下投与、皮下投与、舌下投与、局所投与、経頬投与、中咽頭吸引、および経皮投与からなる群から選択される経路を介した投与のために配合される。幾つかの実施形態において、ペプチドまたは組成物は、脂質組成物、場合によりリポソームまたはエソソーム中で；クリーム中で；カテーテルを介して；洗浄法により；輸液、場合により連続輸液を介して；吸入を介して；注射を介して；局所送達を介して；局在化灌流を介して；標的細胞を直接浸すことにより；またはそれらの任意の組み合わせにより送達される。

20

【0031】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、SEQ ID NO: 3～23および28～430、947のいずれかに示されたアミノ酸配列からなるか、この配列から本質的になるか、またはこの配列を含むペプチドを、抗体、抗体断片または他のタンパク質に付着させるための方法に関し、方法は、場合によりリンカーを介して、さらに場合によりペプチドリリンカーを介して、ペプチドを抗体、抗体断片または他のタンパク質にコンジュゲートすることを含む。

30

【0032】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、それを必要とする対象において、望ましくないADAM9生物活性に関連する障害の少なくとも1つの症状の発症を予防するため、そして/または症状の重症度を低下させるための、抗体、抗体断片、ポリペプチド、タンパク質、特異的抗体、モノクローナル抗体、ペプチド、阻害性核酸、および/またはADAM9生物活性の低分子量阻害剤の使用に関し、場合により望ましくないADAM9生物活性に関連する障害は、癌、炎症、COPD、線維症、アルツハイマー病および望ましくない血管新生からなる群から選択される。幾つかの実施形態において、対象は、ヒトである。幾つかの実施形態において、望ましくないADAM9生物活性に関連する障害は、COPDおよび線維症からなる群から選択され、場合により線維症は、肝線維症である。

40

【0033】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、SEQ ID NO: 3～23および28～430、947のいずれかを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるペプチドに関し、そこに存在する少なくとも1つのメブリン切断部位は、ペプチドをメブリンに対してより低い阻害性にするように修飾されており、場合により少なくとも1つのメブリン切断部位は、SEQ ID NO: 3のアミノ酸5～7、SEQ ID NO: 3のアミノ酸60～62、SEQ ID NO: 3のアミノ酸136～138、およびSEQ ID NO: 3のアミノ酸159～164からなる群から選択され、さらに少なくとも1つのメブリン切断部位は、SEQ ID NO: 3のアミノ酸5～7、SE

50

Q I D N O : 3 のアミノ酸 6 0 ~ 6 2、S E Q I D N O : 3 のアミノ酸 1 3 6 ~ 1 3 8、および S E Q I D N O : 3 のアミノ酸 1 5 9 ~ 1 6 4 からなる群から選択され、さらにそこに存在する少なくとも 1 つのメブリン切断部位は、F X X、P X X、M X X、F X Q、F Q X、P X D、P E X、M X D、M D X、K X E X E X、K D X E X E、K D X X X E、K X E X X E、K X X E X E、K D X X X X、K X E X X X、K X X E X X、K X X X E X、K X X X X E、K X X X X X またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むように修飾されており、ここで各 X は独立して、任意のアミノ酸配列であり、さらに場合により各 X は独立して、アスパラギン、グリシン、アラニン、およびセリンからなる群から選択される。

【 0 0 3 4 】

10

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、S E Q I D N O : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 のうちの任意の 1 つに示されるアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなるポリペプチドに関し、システイン 8 5、1 0 4 および 1 4 6、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される S E Q I D N O : 3 のアミノ酸残基に対応する 1 つまたは複数のシステインは、ポリペプチドの阻害能、溶解度、および / もしくは薬物動態特性を改善する部分が欠如したポリペプチドに比較して 1 つもしくは複数の部分にコンジュゲートされ、かつ / または 1 つもしくは複数のクロモフォア、フルオロフォア、および / もしくは放射性核種にコンジュゲートされている。

【 0 0 3 5 】

20

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、望ましくない A D A M 9 生物活性に関連する障害を有する対象を処置する際の使用のための、S E Q I D N O : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 のうちの 1 つに示されるアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなるポリペプチドに関し、場合により、望ましくない A D A M 9 生物活性に関連する障害は、癌、炎症、C O P D、線維症、アルツハイマー病、創傷、および望ましくない血管新生からなる群から選択され、場合によりポリペプチドは、S E Q I D N O : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 のアミノ酸の 1 つまたは複数でペグ化されている。幾つかの実施形態において、ポリペプチドは、ペグ化されている。幾つかの実施形態において、対象は、ヒトである。

【 0 0 3 6 】

30

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、望ましくない A D A M 9 生物活性に関連する障害を有する対象を処置するための A D A M 9 生物活性の阻害剤の使用に関する。幾つかの実施形態において、A D A M 9 生物活性の阻害剤は、抗体またはその断片からなる群から選択され、場合により抗体は、モノクローナル抗体、タンパク質、ペプチド、阻害性核酸、および / または低分子量物質であり、場合により望ましくない A D A M 9 生物活性に関連する障害は、癌、炎症、C O P D、線維症、アルツハイマー病、創傷、および望ましくない血管新生からなる群から選択される。幾つかの実施形態において、対象は、ヒトである。

【 0 0 3 7 】

40

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、望ましくない A D A M 9 生物活性に関連する障害の少なくとも 1 つの症状の発症を予防すること、および / または症状の重症度を低下させることにおける使用のための、S E Q I D N O : 3 ~ 2 3 および 2 8 ~ 4 3 0、9 4 7 のうちの 1 つに示されるアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなるポリペプチドに関する。幾つかの実施形態において、望ましくない A D A M 9 生物活性に関連する障害は、それを必要とする対象における、癌、炎症、C O P D、線維症、アルツハイマー病、創傷、および望ましくない血管新生からなる群から選択され、場合により対象は、少なくとも 1 つの症状を発症する素因を有する。幾つかの実施形態において、ポリペプチドは、ペグ化されている。幾つかの実施形態において、対象は、ヒトである。幾つかの実施形態において、望ましくない A D A M 9 生物活性に関連する障害は、C O P D および線維症からなる群から選択され、場合によ

50

り線維症は、肝線維症である。

【 0 0 3 8 】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、SEQ ID NO : 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 のいずれかを含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなるペプチドに関し、そこに存在する少なくとも1つのフリンまたはフリン様切断部位は、修飾されていない少なくとも1つのフリンまたはフリン様切断部位と比較して、少なくとも1つのフリンまたはフリン様切断部位をフリンまたはフリン様コンバーターゼによる切断に対してより耐性にするように修飾されている。幾つかの実施形態において、少なくとも1つのフリンまたはフリン様切断部位は、テトラペプチド配列 R X R R、R X K R、R X X R、または R X R K からなり、ここで X は、任意のアミノ酸である。

10

【 0 0 3 9 】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、SEQ ID NO : 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 のうちの任意の1つに示されるアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなるポリペプチドに関し、アミノ酸配列は、SEQ ID NO : 2 に比較して1つまたは複数の荷電アミノ酸の置換を含み、それによりポリペプチドの溶解度は、所定の溶媒中で、SEQ ID NO : 2 に示されるアミノ酸配列を含むか、この配列から本質的になるか、またはこの配列からなるポリペプチドと比較して高く、さらに所定の溶媒は、生体液および細胞培地からなる群から選択される。

20

【 0 0 4 0 】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、SEQ ID NO : 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 のうちの任意の1つに示されるアミノ酸配列を含み、場合により Asp、Glu、Arg および Lys からなる群から選択される、1つまたは複数の荷電残基を含有する C 末端スぺーサをさらに含む、ポリペプチドに関し、所定の溶媒に対する C 末端スぺーサを有するポリペプチドの溶解度は、C 末端スぺーサが存在しない同じポリペプチドのものよりも大きい。

【 0 0 4 1 】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題はまた、SEQ ID NO : 3 ~ 23 および 28 ~ 430、947 のうちの任意の1つに示されるアミノ酸配列を含み、場合により Asp、Glu、Arg および Lys からなる群から選択される、1つまたは複数の荷電残基を含有する N 末端スぺーサをさらに含む、ポリペプチドに関し、所定の溶媒に対する N 末端スぺーサを有するポリペプチドの溶解度は、N 末端スぺーサが存在しない同じポリペプチドのものよりも大きい。

30

【 0 0 4 2 】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題の本明細書に開示されたペプチド、ポリペプチド、および/または融合タンパク質は、アミノ酸置換、化学修飾、またはそれらの組み合わせにより修飾され、それによりペプチド、ポリペプチドおよび/または融合タンパク質は、修飾(複数可)が欠如したペプチド、ポリペプチドおよび/または融合タンパク質と比較して、メブリンによる切断への感受性が低い。幾つかの実施形態において、修飾は、SEQ ID NO : 3 のシステイン 85、104 および/もしくは 146 のうちの1つもしくは複数の修飾、または SEQ ID NO : 3 のシステイン 85、104 および/もしくは 146 のうちの1つもしくは複数の対応するペプチド、ポリペプチドおよび/もしくは融合タンパク質中の位置での修飾である。

40

【 0 0 4 3 】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題の本明細書に開示されたペプチド、ポリペプチド、および/または融合タンパク質は、組成物、場合により医薬組成物中に存在し、組成物は、対象への投与のために配合されるか、またはヒトへの投与のために配合された医薬組成物である。

【 0 0 4 4 】

50

先に述べられた本明細書に開示された主題の目的、他の目的および利点は、特に図に照らした、以下の詳細な記載および実施例の評論により明白となろう。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】特に二量体および三量体形成に関して、-20での野生型ADAM9プロドメインペプチド(SEQ ID NO: 2)の貯蔵の影響を示す染色ゲルを示す。貯蔵の際、SEQ ID NO: 2は、2週間後に沈殿した。ゲルは、新たに調製されたSEQ ID NO: 2(左パネル)および-20で2週間貯蔵された後の尿素可溶化沈殿物(右パネル)を示す。

【図2】20mM Tris緩衝液pH 8中、37での種々のインキュベーション時間の後の新たにリフォールディングおよび透析されたSEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 10(0.5 μg/μl)のSDS PAGEゲルである。タンパク質の二量体化および三量体化は、SDS PAGEゲルで泳動し、続いてSimply Blue(Fisher Scientific、ペンシルバニア州ピッツバーグ所在)で染色することにより視覚化された。MWMは、予め染色された分子量マーカを示す。ペプチドは両者とも、遊離スルフヒドリル基を含有し(SEQ ID NO: 9は、C146S突然変異を有する)、酸化に対し感受性であり、二量体および三量体形成の量は、経時的に増加した。

【図3】ALEXA FLUOR(登録商標)647ブランドのマレイミドエステルフルオロフォアでの野生型ADAM9プロドメインペプチド(SEQ ID NO: 2)の効率的標識を示す染色ゲルを表す。修飾SEQ ID NO: 2中には二量体または出発原料はほとんど、または全く存在せず、標識が完全であったことを示す。加えて、分子量は約3 kDa高くシフトし、プロドメインが3つのシステイン上でうまく修飾された(即ち、プロドメインはまた、エルマン試薬での測定で、遊離スルフヒドリル基を有しなかった)ことを示す。

【図4】0、30および60分でのフリンによる様々な修飾ADAM9プロドメインペプチドの切断を示す染色ゲルを表す。SEQ ID NO: 12は最も安定な突然変異体であった。加えて、他のフリン突然変異体もまた、非フリン突然変異体SEQ ID NO: 13に比較して、切断への耐性が低かった。

【図5】0および10分でのメブリンによる様々な修飾ADAM9プロドメインペプチドの切断を示す染色ゲルを表す。右端のレーンは、分子量マーカであり、15 kDa、25 kDa、および35 kDaマーカに対応するバンドの位置が標識されている。メブリン突然変異のないSEQ ID NO: 12は、示された全てのメブリン突然変異体に比較して安定性が低かった。

【図6】0、10および40分でのメブリンによる様々な修飾ADAM9プロドメインペプチドの切断を示す染色ゲルを表す。アミノ酸161および163での置換を有するSEQ ID NO: 19は、アミノ酸62または138での突然変異に比較して最も安定であった。

【図7】0および10分でのメブリンによる、ペグ化されていない、またはペグ化された様々な修飾ADAM9プロドメインペプチドの切断を示す染色ゲルを表す。SEQ ID NO: 12は、非ペグ化ペプチドを表し、SEQ ID NO: 21~23の前の「p」は、これらのペプチドが、システイン146ではSEQ ID NO: 21が、N末端ではSEQ ID NO: 22が、およびC末端ではSEQ ID NO: 23がペグ化されたことを示す。

【図8】0、10、40および120分でのメブリンによる野生型ADAM9プロドメインペプチドの切断を示す染色ゲルを表す。プロドメインの単量体および二量体の位置が、標識されている。左端のレーンは、分子量マーカであり、15 kDa、25 kDa、30 kDaおよび40 kDaマーカに対応するバンドの位置が標識されている。ゲルは、野生型ADAM9プロドメインペプチドがメブリンにより切断されたことを示す。

【図9】図9A - 図9B。蛍光単位(FU)により測定されたインビトロでの様々な既知

10

20

30

40

50

のADAM9基質(MMP9、FGF-4、I309、MCP-3、MCP-4、およびTGF)のシェディングを阻害するヒトADAM9プロドメインペプチドの能力に関する実験の結果(図9A)、およびVEGFR2活性を阻害する能力に関する実験の結果(図9B)を示す棒グラフである。フリン突然変異体SEQ ID NO:12およびSEQ ID NO:13(非フリン突然変異)を30 nMおよび300 nMでテストした。加えて、C末端ペグ化SEQ ID NO:20もまた、100 nMでテストした。各基質について、図9Aにバー6本があり、左から右に向かって、3 nMのプールされたSEQ ID NO:12および13の平均(阻害なしと表す)、300 nMフリン突然変異体SEQ ID NO:12、30 nMフリン突然変異体SEQ ID NO:12、300 nMフリン突然変異体SEQ ID NO:13(フリン突然変異なし)、30 nM SEQ ID NO:13(フリン突然変異なし)、および100 nM C末端ペグ化SEQ ID NO:20(SEQ ID NO:12より切断に対し感受性であるがSEQ ID NO:13より良好であるフリン突然変異体)である。図9Bにおいて、30 nMおよび300 nMフリン突然変異体SEQ ID NO:12、30 nMおよび300 nM SEQ ID NO:13(非フリン突然変異)および100 nM C末端ペグ化SEQ ID NO:20についてのビヒクル対照と比較したVEGFR2シグナル伝達の阻害率%を示す。エラーバーは、+平均の標準誤差(S.E.M.)である。SEQ ID NO:12は、タンパク質レベルのほとんどを減少させ、SEQ ID NO:13より良好な能力を有した。ペグ化SEQ ID NO:20は、インビトロ酵素アッセイを用いて最良のIC50も有し、最も強力な阻害剤であると思われた。

10

20

【図10】デスモシンに関するELISAにより測定される、急性タバコの煙(CS)モデルにおいてエラスチン分解を阻害するヒトADAM9プロドメインペプチドの能力に関する実験の結果を示す棒グラフである。エラーバーは、+平均の標準誤差(S.E.M.)である。SEQ ID NO:10またはビヒクル対照が、2週間にわたり鼻内に与えられた。エラスチン分解は、SEQ ID NO:10投与により完全に遮断された。

【図11】プロドメインまたはビヒクル対照がマウスにi.p.注射された後72時間目の、記載された通り測定された血清中プロドメインレベルの棒グラフである。データは、2~3個の血清の平均を表す。エラーバーは、各試料のSEMを示す。pegは、プロドメインペプチドがペグ化されていることを示す。N末端ペグ化SEQ ID NO:22は、メブリンおよびフリン切断に対して最も安定であり、72時間後に最高の血清レベルを有した。他のペグ化プロドメインは、非ペグ化SEQ ID NO:12よりも低い血清レベルを有しており、N末端ペグ化が最良であったことを示す。SEQ ID NO:14は、メブリンに対してより安定であったが切断に完全に耐性でないフリン部位を有し、メブリン突然変異のないSEQ ID NO:12よりも低い血清レベルを有し、メブリン安定性の他にも、フリン安定性が薬物動態特性を増大することを示す。

30

【図12】フリン突然変異体SEQ ID NO:12で処置された(処置)または処置されていない(ビヒクル)いずれかのマウスでの急性肝傷害モデルにおける様々な肝酵素機能マーカーのレベルを示す一連のグラフである。上左パネルは、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(ALT)レベルを示し、上右パネルは、アラニンアミノ基転移酵素(ALT)レベルを示し、下左パネルは、ビリルビンレベルを示し、下中央棒グラフは、肝重量を示し、下右パネル内の棒グラフは、コラーゲン沈着量を決定することにより測定された肝線維症スコアを示す。肝酵素レベル、ビリルビンレベル、肝重量および線維症スコアは全て、ビヒクル対照に比較してSEQ ID NO:12処置により低減された。エラーバーは、+平均の標準誤差(S.E.M.)である。

40

【図13】図12について先に記載された急性肝傷害モデルからのマウス肝ホモジネート中のMMP9(上左パネル)、MMP13(上右パネル)、およびADAM8(下パネル)の酵素濃度を示す一連のグラフである。データは、SEQ ID NO:12処置が肝試料中のMMP9およびADAM8のレベルを低下させ、MMP13レベルが増加されたことを示した。エラーバーは、+平均の標準誤差(S.E.M.)である。

【発明を実施するための形態】

50

【0046】

コンパクトディスクで提出された配列表の参照

本開示に関連する配列表は、3枚のコンパクトディスクに3つずつ、671MBファイルとして提出した(CRFコピー、コピー1、およびコピー2、各コンパクトディスクの内容は同一である)。コンパクトディスクは、対応する米国実用出願の出願者、表題、ファイル名(FINAL__3217__4__PCT__ST25.txt)、作成日(2019年1月31日)、コンピュータシステム(ASCII DOSフォーマット)、整理番号(3217/4 PCT)およびシリアル番号を同定するためにインデリブルインクで表記される。コンパクトディスクで提出された配列表は、全体として参照により本開示に組み入れられる。

10

【0047】

配列表の簡単な記載

SEQ ID NO: 1は、GENBANK(登録商標)バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NP_003807.1に示された例示的ヒトADAM9遺伝子産物のアミノ酸配列である。

【0048】

SEQ ID NO: 2は、例示的ヒトADAM9プロドメインペプチドのアミノ酸配列である。これは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸30~203に対応する。

【0049】

SEQ ID NO: 3は、本明細書に開示された主題の修飾ADAM9プロドメインペプチドのコンセンサスコアアミノ酸配列である。これは、SEQ ID NO: 2を基にしており、その位置のためSEQ ID NO: 2と異なっており、そこでは本明細書に開示された主題の修飾ADAM9プロドメインペプチドは、Xにより表されるコア内がSEQ ID NO: 2と異なっており、ここでXは、任意のアミノ酸またはその修飾物である。

20

【0050】

SEQ ID NO: 4は、N末端システインが付加されたSEQ ID NO: 3である。

【0051】

SEQ ID NO: 5は、C末端システインが付加されたSEQ ID NO: 3である。

30

【0052】

SEQ ID NO: 6は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸24、26および27にてフリリン認識部位中で置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0053】

SEQ ID NO: 7は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸24、26および27にてフリリン認識部位中で置換され、システイン85および104にてセリンで置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0054】

SEQ ID NO: 8は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがシステイン85および104にてセリンで置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

40

【0055】

SEQ ID NO: 9は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸26にてフリリン認識部位をアラニンで置換され、システイン146でもセリン置換で置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0056】

SEQ ID NO: 10(本明細書では「Seq 11」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸26にてフリリン認

50

識部位をアラニンで置換され、システイン85、104および146でもセリン置換で置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0057】

SEQ ID NO: 11 (本明細書では「Seq 17B」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸24にてフリン認識部位をアラニンで置換され、システイン85、104および146にてセリン置換で置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0058】

SEQ ID NO: 12 (本明細書では「Seq 25」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸27にてフリン認識部位をアラニンで置換され、システイン85、104および146にてセリン置換で置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

10

【0059】

SEQ ID NO: 13 (本明細書では「Seq 26」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがシステイン85、104および146にてセリン置換で置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0060】

SEQ ID NO: 14 (本明細書では「Seq 27」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸26にてフリン認識部位をアラニンで置換され、アミノ酸62にて第二のメブリン認識部位をアラニンで置換され、かつシステイン85、104および146にてセリン置換で置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

20

【0061】

SEQ ID NO: 15 (本明細書では「Seq 28」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸27にてフリン認識部位をグリシンで置換され、システイン85、104および146にてセリン置換で置換されてもいる、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0062】

SEQ ID NO: 16 (本明細書では「Seq 29」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸27にてフリン認識部位をセリンで置換され、システイン85、104および146にてセリン置換で置換されてもいる、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

30

【0063】

SEQ ID NO: 17 (本明細書では「Seq 30」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドのアミノ酸1~6が欠失され、フリン認識部位がアミノ酸27にてアラニンで置換され、システイン85、104および146がセリンで置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0064】

SEQ ID NO: 18 (本明細書では「Seq 31」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸27にてフリン認識部位をアラニンで置換され、アミノ酸138にて第三のメブリン認識部位をセリンで置換され、システイン85、104および146にてセリンで置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

40

【0065】

SEQ ID NO: 19 (本明細書では「Seq 32」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸27にてフリン認識部位をアラニンで置換され、アミノ酸161および163にて第四のメブリン認識部位をアスパラギンで置換され、システイン85、104および146にてセリンで置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

50

【0066】

SEQ ID NO: 20 (本明細書では「Seq 11 C 2」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸26にてフリン認識部位をアラニンで置換され、システイン85、104および146にてセリンで置換され、C末端に付加されたペンタペプチドを有する、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0067】

SEQ ID NO: 21 (本明細書では「Seq 25 - 1」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸27にてフリン認識部位をアラニンで置換され、システイン85および104にてセリンで置換されている、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

10

【0068】

SEQ ID NO: 22 (本明細書では「Seq 25 - 2」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸27にてフリン認識部位をアラニンで置換され、システイン85、104および146にてセリンで置換され、N末端に付加されたペンタペプチドを有する、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

【0069】

SEQ ID NO: 23 (本明細書では「Seq 25 - 3」とも称される)は、SEQ ID NO: 2の野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドがアミノ酸27にてフリン認識部位をアラニンで置換され、システイン85、104および146にてセリンで置換され、C末端に付加されたペンタペプチドを有する、修飾ADAM9プロドメインペプチドである。

20

【0070】

SEQ ID NO: 24は、6つのHisアミノ酸からなるHisタグペプチドの配列である。

【0071】

SEQ ID NO: 25は、SEQ ID NO: 2のADAM9プロドメインペプチドの第四のメブリン認識配列に対応する例示的メブリン認識配列である。

【0072】

SEQ ID NO: 26は、PEG基をコンジュゲートするための官能性を提供するために本明細書に開示された主題の修飾ADAM9プロドメインペプチドのN末端に付着され得る、例示的ペンタペプチド配列である。

30

【0073】

SEQ ID NO: 27は、PEG基をコンジュゲートするための官能性を提供するために本明細書に開示された主題の修飾ADAM9プロドメインペプチドのC末端に付着され得る、例示的ペンタペプチド配列である。

【0074】

SEQ ID NO: 28 ~ 430、947は、本明細書に開示された主題の例示的ADAM9プロドメインペプチドのアミノ酸配列である。

40

【0075】

詳細な記載

本明細書に開示された主題は、幾つかの実施形態において、ADAM9の生物学的機能を試験するのに有用であり、かつ/または非限定的に癌、炎症、COPD (小気道線維症、粘膜化生および肺気腫などのあらゆる表現型を特徴とする)、線維症、アルツハイマー病、創傷および望ましくない血管新生などの望ましくないADAM9生物活性に関連する疾患および障害、ならびに少なくとも部分的に、炎症、過剰な細胞増殖、血管新生、線維症、および表1に記載される過剰な、または減少された可溶性タンパク質の1つまたは複数の存在を特徴とする障害の処置に有用である、修飾ADAM9モジュレーティングペプチドおよび関連の組成物に関する。

50

【表 1】

表 1
ADAM9 モジュレーションペプチドにより影響を受ける例示的タンパク質

下方制御される因子
アクチビンRI A / ALK-2 ; CCL14 / HCC-1 / HCC-3 ; Dkk-1 ; G ITRリガンド / TNFSF18 ; TGF- α ; TNF- β ; LBP ; リンホタクチン / XCL1 ; MAC-1 ; MMP-16 / MT3-MMP ; MAC-1 ; ニューロピリン- 2 ; OX40リガンド / TNFSF4 ; PD-ECGF ; PDGFRA ; ROBO4 ; S 100 A8 / A9 ; SAA ; シグレック-5 / CD170 ; スピネシン ; Tarc ; T CCR / WSX-1 ; TECK / CCL25 ; TGF-ベータRI / ALK-5 ; TNF - β ; TWEAK / TNFSF12
上方制御される因子
MMP-2 ; BMPRI A / ALK-3 ; IFN- γ ; BMPRI ; IL-1 α ; I L-1Ra ; IL-1sRI ; フラクタルキン ; BMPRI ; BMP-5 ; BMP-7 ; BMP-15 ; CD30 / TNFRSF8 ; CD40 / TNFRSF5 ; CD40リガ ンド / TNFSF5 / CD154 ; IL-1sRII ; IL-3 ; IL-5 ; IL-7 ; I L-1OR β ; IL-15 ; IL-15R α ; IL-16 ; リンホトキシンベータR / T NFRSF3 ; sAPP α

【0076】

したがって幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題は、ADAM9の生物機能を研究するため、かつ／または望ましくないADAM9生物活性に関連する疾患および障害の処置のための、ADAM9活性の特異的阻害剤およびそれを使用するための方法を提供する。

20

【0077】

ここに、本明細書に開示された主題を、本明細書に開示された主題の全てではないが一部の実施形態に記載した以後の部分に、より完全に記載する。事実、本明細書に開示された主題は、多くの異なる形態で具体化され得、本明細書に示された実施形態に限定されると解釈されてはならず、これらの実施形態は、本開示が適用可能な法的要件を満たすように提供される。

【0078】

30

I. 定義

本明細書で用いられる用語法は、特定の実施形態に記載することのみを目的とし、本明細書に開示された主題の限定を意図するものではない。

【0079】

以下の用語は、当業者に十分に理解されられると思われるが、以下の定義は、本明細書に開示された主題の説明を容易にするために示されている。

【0080】

本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、以下に他に定義されない限り、当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有するものとする。本明細書で用いられる技術の参照は、当業者に明白である当該技術分野で一般に理解される技術の変更、または同等の技術の置き換えを含む、当該技術分野で一般に理解される技術を指すものとする。以下の用語は、当業者に十分に理解されられると思われるが、以下の定義は、本明細書に開示された主題の説明を容易にするために示されている。

40

【0081】

本明細書に開示された主題を記載する際に、複数の技術およびステップが開示されることは理解されよう。これらのそれぞれは、個々の利益を有し、それぞれはまた、他の開示された技術の1つもしくは複数、または幾つかの例では全てと併せて、用いることができる。

【0082】

したがって明瞭さのために、本明細書では、個々のステップのそれぞれの可能な組み合

50

わせを不要に繰り返すことは控えている。それでもなお、本明細書および特許請求の範囲は、そのような組み合わせが全体として本発明および特許請求の範囲の範囲に含まれることを理解して、読まれなければならない。

【0083】

長年の特許法の条約に従い、用語「a」、「an」、および「the」は、特許請求の範囲を含む本明細書で用いられる場合、1つまたは複数を指す。例えば語句「抗体」は、複数の同じ抗体を含む1つまたは複数の抗体を指す。同様に、語句「少なくとも1つ」は、本明細書で用いられる場合、1つの物体を指し、例えば、非限定的に1～100の間および100より大きな数値の全てなど、その物体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、またはより多くを指す。

10

【0084】

他に示されない限り、本明細書および特許請求の範囲で用いられる原材料、反応条件などの量を表す全ての数値は、用語「約」により全例が修飾されると理解されなければならない。本明細書で用いられる用語「約」は、質量、重量、時間、容量、濃度、またはパーセント値の量などの、測定可能な値を指す場合、指定された量の、幾つかの実施形態において±20%、幾つかの実施形態において±10%、幾つかの実施形態において±5%、幾つかの実施形態において±1%、幾つかの実施形態において±0.5%、および幾つかの実施形態において±0.1%の変動を含むものとし、それは、そのような変動が、本開示の方法を実施するのに適当なためである。したがって反することが示されない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲に示される数多くのパラメータは、本開示の主題により得られるように探求される所望の特性に応じて変化し得る近似である。

20

【0085】

本明細書で用いられる用語「および/または」は、物体のリストに関連して用いられる場合、単体または組み合わせとして存在する物体を指す。したがって例えば語句「A、B、C、および/またはD」は、A、B、CおよびDを個別に包含するが、A、B、CおよびDのあらゆる組み合わせおよび部分的組み合わせも包含する。

【0086】

「包含する」、「含有する」または「特徴とする」の同義語である用語「含む」は、包括的または無制限であり、追加的で列挙されていない要素および/または方法ステップを除外しない。「含む」は、挙げられた要素および/またはステップが存在するが、他の要素および/またはステップが追加され得ること、およびそれでも関連の主題の範囲に含まれることを意味する当該技術分野の用語である。

30

【0087】

本明細書で用いられる語句「からなる」は、具体的に列挙されていない任意の要素、ステップまたは原材料を除外する。語句「からなる」が、前文の直後よりもむしろ特許請求の範囲の本文の条項に出現している場合、それは、条項に示された要素のみを限定し、他の要素は全体として特許請求の範囲から除外されないことに留意されたい。

【0088】

本明細書で用いられる語句「から本質的になる」は、関連の開示または特許請求の範囲の範囲を、指定された材料および/またはステップと、加えて開示および/または請求された主題の基本的かつ新規な特徴（複数可）に実質的に影響を及ぼさないそれらのものに限定する。例えば医薬組成物は、1種の医薬活性剤または複数の医薬活性剤「から本質的になる」ことができ、それは、列挙された医薬活性剤（複数可）が医薬組成物中に存在する医薬活性剤（複数可）のみであることを意味する。しかし、担体、賦形剤、および他の不活性剤が同様に医薬組成物中に存在する可能性があり、かつ存在しそうであることに留意されたい。

40

【0089】

用語「含む」、「からなる」および「から本質的になる」に関して、これら3つの用語の1つが、本明細書で用いられる場合、本明細書に開示され、請求された主題は、他の2

50

つの用語の一方の使用を包含し得る。例えば幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題は、抗体を含む組成物に関する。このため本明細書に開示された主題が本明細書に開示された主題の抗体から本質的になる組成物に加え、本明細書に開示された主題の抗体からなる組成物を包含することが、本開示の検討後に当業者に理解されよう。

【0090】

本明細書で用いられる語句「慢性閉塞性肺疾患（COPD）」は、非限定的に肺気腫、小気道線維症、および粘膜細胞化生（それがCOPD患者の大気道に生じ、慢性気管支炎の表現型に寄与するため）を含む慢性閉塞性肺疾患およびその重大なCOPD様表現型を指す。

【0091】

本明細書で用いられる用語「対象」は、任意の非脊椎動物種または脊椎動物種のメンバーを指す。したがって用語「対象」は、非限定的に脊索動物門（例えば、硬骨魚綱（硬骨魚）、両生綱（両生類）、爬虫綱（爬虫類）、鳥綱（鳥類）および哺乳綱（哺乳類）のメンバー）、ならびにそれらに包含される全ての目および科を含む動物界の任意のメンバーを包含するものとする。

【0092】

本明細書に開示された主題の組成物および方法は、温血脊椎動物に特に有用である。したがって本明細書に開示された主題は、哺乳類および鳥類に関する。より詳細には、提供されるのは、ヒトおよび他の霊長類などの哺乳類に加え、絶滅寸前であるための重要性（シベリア虎など）、経済的重要性（ヒトに消費されるために農場で生育される動物）および/またはヒトへの社会的的重要性（ペットとして、または動物園で飼育される動物）のあるそれらの哺乳類、例えばヒト以外の肉食生物（ネコおよびイヌなど）、ブタ（豚、去勢した雄豚、および去勢していない雄豚）、反芻動物（畜牛、去勢牛、羊、キリン、鹿、山羊、野牛、およびラクダなど）、げっ歯類（マウス、ラット、およびウサギなど）、有袋目、および馬に由来する、かつ/またはそのような哺乳類における使用のための組成物および方法である。また提供されるのは、絶滅の危惧があり、動物園で飼育されるそれらの種類の鳥類に加え、それらがヒトに対し経済的に重要でもあるため、大型の鳥、より具体的には家で飼う大型の鳥、例えば七面鳥、鶏、アヒル、雁、ホロホロチョウなどの家禽を含む、鳥類への開示された方法および組成物の使用である。したがって提供されるのはまた、非限定的に飼育ブタ（豚および去勢した雄豚）、反芻動物、馬、家禽などを含む、家畜への開示された方法および組成物の使用である。

【0093】

同様に、本明細書に開示された全ての遺伝子、遺伝子名および遺伝子産物は、本明細書に開示された組成物および方法が適用可能である任意の種からの相同体に対応するものとする。したがってこの用語は、非限定的にヒトおよびマウスからの遺伝子および遺伝子産物を包含する。特定の種からの遺伝子または遺伝子産物が開示されている場合、この開示は、例示に過ぎず、表れた文脈が明確に示さない限り限定と解釈されてはならないことを、理解されたい。したがって例えば本明細書に表された遺伝子の場合、開示されたヒトアミノ酸配列は、非限定的に他の哺乳類、魚、両生類、爬虫類および鳥類を含む他の動物からの相同性遺伝子および遺伝子産物を包含するものとする。同じく包含されるのは、非限定的に対応するGENBANK（登録商標）エントリーの中で開示されたものを含む、開示されたアミノ酸配列をコードするあらゆるヌクレオチド配列である。

【0094】

表2は、本明細書に開示された主題の例示的なADAM9核酸およびポリペプチドについてのGENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセション番号を提供する。表2のエントリーが例示にすぎないことに留意されたい。

10

20

30

40

【表 2】

表 2

例示的A D A M 9 相同分子種のヌクレオチドおよびアミノ酸配列

種	ヌクレオチド	アミノ酸
ホモサピエンス	NM_003816.2	NP_003807.1
	XM_011544682.2	XP_011542984.1
	XM_017013942.1	XP_016869431.1
チンパンジー	XM_001135576.3	XP_001135576.1
ニシローランドゴリラ	XM_004046912.2	XP_004046960.1
スマトラオランウータン	XM_003777238.2	XP_003777286.1
	XM_009243738.1	XP_009242013.1
アカゲザル	XM_001092710.3	XP_001092710.1
ハツカネズミ	NM_001270996.1	NP_001257925.1
	NM_007404.2	NP_031430.2
ハイイロオオカミ	NM_001195402.1	NP_001182331.1
イエネコ	XM_003984768.5	XP_003984817.1
ウマ属ウマ	XM_001491500.4	XP_001491550.2
イノシシ	XM_001925664.5	XP_001925699.2

【0095】

表 2 に提供された G E N B A N K (登録商標) バイオシーケンシングデータベースのアクセッション番号が、全長 A D A M 9 遺伝子産物の配列を表し、そのうちプロドメインペプチドは、部分配列に過ぎないことに、留意されたい。例えば、G E N B A N K (登録商標) バイオシーケンシングデータベースのアクセッション番号 N P _ 0 0 3 8 0 7 . 1 に示されるヒト A D A M 9 ポリペプチド配列は、アミノ酸 8 1 9 個の全長 A D A M 9 前駆体タンパク質に対応し、S E Q I D N O : 1 として示される。その一方で、ヒト A D A M 9 プロドメインペプチドは、S E Q I D N O : 1 のアミノ酸 3 0 ~ 2 0 3 に対応し、それ自体は S E Q I D N O : 2 で表される。

30

【0096】

用語「癌」および「腫瘍」は、本明細書では互換的に用いられ、非限定的に、乳房；結腸；直腸；肺；中咽頭；下咽頭；食道；胃；脾臓；肝臓；胆嚢；胆管；小腸；腎臓、膀胱および尿路上皮を含む尿路；子宮頸部、子宮および卵巣（例えば、絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患）を含む女性生殖路；前立腺、精嚢、精巣および胚細胞腫瘍を含む男性生殖路；甲状腺、副腎および下垂体を含む内分泌腺；皮膚（例えば血管腫および黒色腫）、骨または軟組織；血管（例えば、カポジ肉腫）；脳、神経、眼および髄膜（例えば、星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽症、網膜芽腫、神経腫、神経芽腫、神経鞘腫および髄膜腫）を含む、対象における任意の組織の原発性および転移性の両方の固形腫瘍および癌腫を指し得る。本明細書で用いられる「癌」および「腫瘍」はまた、多細胞腫瘍に加え、個々の新生物細胞または新生物発生前の細胞を指すものとする。幾つかの実施形態において、癌または腫瘍は、非限定的に癌腫などの上皮組織の癌または腫瘍を含む。幾つかの実施形態において、腫瘍は、腺癌であり、幾つかの実施形態において、脾臓、乳房、卵巣、結腸もしくは直腸の腺癌、および／またはそれに由来する転移細胞である。

40

【0097】

本明細書で用いられる用語「創傷」は、非限定的に、擦過傷、裂傷、打撲傷、火傷、穿

50

通創、刺創、皮膚切開、手術創、床ずれ（非限定的に褥瘡および褥瘡性潰瘍など）、糖尿病性創傷および潰瘍、線維性創傷（*fibrotic wound*）、鉄砲傷（火器から生じる創傷）、熱傷（火傷、日焼けおよび凍傷）、化学的創傷、咬み傷、および刺傷、ならびに電氣的創傷を含む多数のタイプの創傷を指す。

【0098】

II. 修飾ADAM9プロドメインペプチド

本明細書に開示された主題は、幾つかの実施形態において、未修飾の同等物に比較して所望の生物活性を有する修飾ADAM9プロドメインペプチドを提供する。限定ではなく例として、本明細書に開示された主題の修飾ADAM9プロドメインペプチドは、幾つかの実施形態において、フリンおよびフリン様タンパク質による切断に対して幾分か感受性であり得、幾つかの実施形態において、メブリンおよびメブリン様タンパク質による切断に対して幾分か感受性であり得、かつ幾つかの実施形態において、それ自身へ、またはタンパク質の他のADAMファミリーの他のメンバー（非限定的にADAM9を含む）へ、システイン架橋を介して二量体および他の多量体を形成する可能性が幾分かあり得、かつ幾つかの実施形態において。

10

【0099】

本明細書で用いられる語句「修飾ADAM9プロドメインペプチド」、「修飾ADAM9ペプチド」、「ADAM9モジュレーティングペプチド」などは、SEQ ID NO: 2もしくはSEQ ID NO: 3に示されたアミノ酸配列の1つもしくは複数の修飾および/または、非限定的にそれが基となる野生型ADAM9プロドメインペプチドを含む、その修飾（複数可）のないADAM9ペプチドに比較して修飾されたADAM9ペプチドの幾つかの所望の生物学的もしくは生化学的特性をもたらす他の修飾、を有するペプチドを指す。限定ではなく例として、本明細書に開示された主題の修飾ADAM9ペプチドに導入され得る修飾のタイプとしては、非限定的に所与の溶媒（非限定的に血液、血清、脳脊髄液などの生体液を含む）への溶解度、結合パートナーに関する解離定数、酵素（非限定的にディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼのADAM9またはADAMファミリーの別のメンバーなど）に対する50%阻害濃度（IC50）など、修飾ADAM9ペプチドの1つもしくは複数の生物学的もしくは生化学的特性を改変するように、かつ/または該当する様々な薬物動態特性を改善するように、設計されたアミノ酸置換、欠失、付加および他のタイプの修飾が挙げられる。

20

30

【0100】

本明細書に開示された主題に包含される修飾に関して、本明細書に開示された主題の修飾ADAM9ペプチドを生成するために活用され得るADAM9などのADAMファミリーのメンバーの少なくとも3つの生物学的に関連する特色が存在する。限定ではなく例として、ADAM9タンパク質およびそれに由来するプロドメインペプチドは、フリンおよびフリン様エンドプロテアーゼの認識部位、メブリンおよびメブリン様メタロペプチダーゼの認識部位、ならびにジスルフィド結合の形成を介してホモ二量体、ヘテロ二量体、およびより高次の多量体を形成し得る数多くのシステイン残基を特徴とする。フリンおよびフリン様エンドプロテアーゼ、ならびにメブリンおよびメブリン様メタロペプチダーゼによる切断に加え、ジスルフィド結合の形成は、ADAM9などのADAMファミリーのメンバーの生物活性の幾つかに関連し、これらの活性を担うアミノ酸配列は、ADAM9などのADAMファミリーのメンバーの生物活性をモジュレートするために修飾され得る。

40

【0101】

例えばSEQ ID NO: 2により表される野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸24~27にフリン認識部位を有する。本明細書に開示される通り、SEQ ID NO: 2のアミノ酸24、26および/または27の修飾は、フリンおよびフリン様エンドプロテアーゼによる切断に対して大なり小なりの感度を有する修飾ADAM9ペプチドをもたらす。同様に、SEQ ID NO: 2により表される野生型ヒトADAM9プロドメインペプチドは、4つのメブリン認識部位、つまりSEQ ID NO: 2のアミノ酸5~7（本明細書では「第一のメブリン部位」と称される

50

); SEQ ID NO: 2のアミノ酸60~62(本明細書では「第二のメブリン部位」と称される); SEQ ID NO: 2のアミノ酸136~138(本明細書では「第三のメブリン部位」と称される); およびアミノ酸159~164(本明細書では「第四のメブリン部位」と称される)を有する。本明細書に開示される通り、SEQ ID NO: 2の第一のメブリン部位のアミノ酸6および/もしくは7、ならびに/またはSEQ ID NO: 2の第二のメブリン部位のアミノ酸61および/もしくは62、ならびに/またはSEQ ID NO: 2の第三のメブリン部位のアミノ酸137および/もしくは138、ならびに/またはSEQ ID NO: 2の第四のメブリン部位のアミノ酸160~164の任意の1つ、あるいはそれらの任意の組み合わせの修飾は、メブリンおよびメブリン様メタロペプチダーゼによる阻害および/または切断に対して大なり小なりの感度を有する修飾ADAM9ペプチドをもたらす。また同様に、非限定的にSEQ ID NO: 2のシステイン85、104および146を含む、ジスルフィド結合形成に関与するSEQ ID NO: 2のシステインのいずれかの修飾は、ADAM9タンパク質および/または他のADAMファミリーメンバータンパク質とジスルフィド結合を形成する大なり小なりの能力を有する修飾ADAM9ペプチドをもたらす。当業者には理解されるであろうが、フリン部位修飾、メブリン部位修飾、および/またはシステインの組み合わせが、所望なら、複数の新しい官能性を有する修飾ADAM9ペプチドをもたらし得る。

【0102】

それゆえ幾つかの実施形態において、SEQ ID NO: 2に由来するアミノ酸配列を有する本明細書に開示された主題のADAM9モジュレーティングペプチドは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸24、26および/もしくは27(即ち、フリン認識配列)の少なくとも1つ、SEQ ID NO: 2のアミノ酸6、7、61、62、137、138および160~164(即ち、メブリン認識配列)の少なくとも1つ、ならびに/またはSEQ ID NO: 2のシステイン85、104および146の少なくとも1つ、の少なくとも1つのアミノ酸置換または他の修飾を含む。非限定的にアミノ酸置換などの修飾が、SEQ ID NO: 2のアミノ酸6、7、24、26、27、61、62、85、104、137、138、146、および160~164の任意の1つまたは複数で、任意の組み合わせで起こり得ること、ならびにこれらのアミノ酸位置の任意の組み合わせまたは部分的組み合わせでのアミノ酸置換の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせが、本明細書に開示された主題により包含されることは、理解されよう。

【0103】

より具体的には、ADAM9プロドメインの第一のメブリン部位は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸5~7であり、アミノ酸6および/またはアミノ酸7が置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸6および/またはアミノ酸7は、任意のアミノ酸で置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸6および/またはアミノ酸7は、独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンで置換されている。

【0104】

代わりにまたは追加で、置換は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸60~62であるADAM9プロドメインの第二のメブリン部位に導入され得、アミノ酸61および/またはアミノ酸62が置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸61および/またはアミノ酸62は、任意のアミノ酸で置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸61および/またはアミノ酸62は、独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンで置換されている。

【0105】

さらに代わりにまたは追加で、置換は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸136~138であるADAM9プロドメインの第三のメブリン部位に導入され得、アミノ酸137および/またはアミノ酸138が置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸137および/またはアミノ酸138は、任意のアミノ酸で置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸137および/またはアミノ酸138は独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンで置換されている。

【0106】

さらに代わりにまたは追加で、置換は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸159~164（即ち、SEQ ID NO: 25）であるADAM9プロドメインの第四のメブリン部位に導入され得、アミノ酸160~164の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ全てが置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸160~164の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ全ては、任意のアミノ酸で置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸160~164の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ全ては独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンで置換されている。幾つかの実施形態において、アミノ酸160~164の少なくとも3つは、任意のアミノ酸で置換されており、それは、幾つかの実施形態において独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンであり得る。そのため、幾つかの実施形態において、SEQ ID NO: 2のアミノ酸159~164（即ち、SEQ ID NO: 25）は、KXEXEX、KDXEXE、KDXXXE、KXEXXE、またはKXXEXEに置換されており、ここでXは、幾つかの実施形態において、任意のアミノ酸であり、幾つかの実施形態において、各Xは独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンからなる群から選択される。幾つかの実施形態において、アミノ酸160~164の少なくとも4つは、任意のアミノ酸で置換されており、それは、幾つかの実施形態において、独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンであり得る。そのため、幾つかの実施形態において、SEQ ID NO: 2のアミノ酸159~164（即ち、SEQ ID NO: 25）は、KDXXXX、KXEXXX、KXXEXX、KXXXEX、またはKXXXXEに置換されており、ここでXは、幾つかの実施形態において、任意のアミノ酸であり、幾つかの実施形態において、各Xは独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンからなる群から選択される。幾つかの実施形態において、アミノ酸160~164の5つ全ては、任意のアミノ酸で置換されており、それは、幾つかの実施形態において、独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンであり得る。そのため、幾つかの実施形態において、SEQ ID NO: 2のアミノ酸159~164（即ち、SEQ ID NO: 25）は、KXXXXXに置換されており、ここでXは、幾つかの実施形態において、任意のアミノ酸であり、幾つかの実施形態において、各Xは独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンからなる群から選択される。

【0107】

本明細書の先に記載されたメブリン修飾のいずれかに加えて、かつ/またはその代わりに、SEQ ID NO: 2のアミノ酸5~7でメブリン認識部位は、幾つかの実施形態において、6位のアミノ酸、7位のアミノ酸またはその両方での置換により、修飾され得る。幾つかの実施形態において、6位のアミノ酸、7位のアミノ酸またはその両方での置換は、任意のアミノ酸である。幾つかの実施形態において、6位のアミノ酸、7位のアミノ酸またはその両方での置換は、独立して、アスパラギン、アラニン、セリン、またはグリシンからなる群から選択される。

【0108】

本明細書の先に記載されたメブリンおよび/またはフリン修飾のいずれかに加えて、かつ/またはその代わりに、ジスルフィド結合形成に関与するシステインの1つまたは複数、修飾され得る。幾つかの実施形態において、これらのシステインは、任意の組み合わせまたは部分的組み合わせでのSEQ ID NO: 2のシステイン85、104および/または146を含む。したがって幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のADAM9プロドメインペプチドは、システイン85の修飾、システイン104の修飾、システイン146の修飾、システイン85および104の両方の修飾、システイン104および146の両方の修飾、またはシステイン85と104と146の全ての修飾を含む。幾つかの実施形態において、これらのシステインでの修飾は、任意のアミノ酸の置換であり、システイン85、104および146のそれぞれが独立して、同じまたは異なるアミノ酸で置換されている。幾つかの実施形態において、システイン85、104および/または146は独立して、セリンで置換されている。

【0109】

SEQ ID NO: 3の6、7、24、26、27、61、62、85、104、137、138、146、および160～164位の修飾に加えて、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列の他の修飾が、導入され得る。限定ではなく例として、1つまたは複数のアミノ酸（幾つかの実施形態において、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはより多くのアミノ酸）が、SEQ ID NO: 3のペプチドのN末端および/またはC末端に付加され得る。限定ではなく例として、システイン残基は単独でまたは他のアミノ酸との組み合わせで、N末端および/またはC末端に付加されて、システイン残基により保有されることが知られた官能性を提供し得る。例えばシステイン残基は単独でまたは他のアミノ酸との組み合わせで、N末端および/またはC末端に付加されて、ADAM9モジュレーティングペプチドのペグ化のための部位を提供し得る。例示的ペグ化部位としては、N末端および/もしくはC末端の単一システイン残基、SEQ ID NO: 26のペンタペプチド、ならびに/またはSEQ ID NO: 27のペンタペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0110】

したがって、幾つかの実施形態においてADAM9モジュレーティングペプチドは、幾つかの実施形態においてPEG基が付着され得るシステインを含むNおよび/またはC末端にペプチド配列を付加することにより、約1～40kDaのPEG基にコンジュゲートされ得る。本明細書に開示された主題のADAM9モジュレーティングペプチドは、大腸菌、昆虫細胞、哺乳類系などでのADAM9モジュレーティングペプチドの有効な発現に必須であるNおよび/またはC末端での付加配列（例えば、アミノ酸）を含有するペプチドを包含し得る。加えて、本明細書に開示された主題のADAM9モジュレーティングペプチドの精製を支援する1つまたは複数のタグが、付加され得る。タグとしては、Hisタグ、C-mycタグ、Flagタグ、HAタグ、ストレプトタグチンタグ、ジスルフィドタグ、およびビオチンタグを挙げることができるが、これらに限定されない。タグ（複数可）とプロドメインペプチドの間の配列は、幾つかの実施形態において、エンテロキナーゼ、トロンピン、および/またはTevプロテアーゼについて見出されるものなどのプロテアーゼ切断部位を含み得る。本明細書に開示された主題のADAM9モジュレーティングペプチドは、インビトロ使用のためにペプチドを安定化する修飾を含んでもよい。そのような修飾は、一般に当業者に知られており、脂肪酸およびペグ化での修飾、D-アミノ酸の組み込み、ならびにアミノ酸の置換、欠失および/または付加が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0111】

修飾および変化を、本明細書に開示された主題のADAM9モジュレーティングペプチドの構造中に作製でき、それでもなおADAM9モジュレーティング特性を有する分子を得ることができる。例えば、ペプチド活性の明らかな損失なしに、特定のアミノ酸を配列中の他のアミノ酸と置換できる。ポリペプチドの生物学的機能の活性を定義するのはそのポリペプチドの相互作用的能力および性質であるため、特定のアミノ酸配列置換を、ポリペプチド配列中に作製し、それでもなおADAM9モジュレーティング特性を有するポリペプチドを得ることができる。

40

【0112】

そのような変化を作製する際に、アミノ酸のハイドロパシーインデックスが、考慮され得る。ポリペプチドに相互作用性の生物学的機能を付与する際のアミノ酸ハイドロパシーインデックスの重要性は、当該技術分野で一般に理解されている（Kyte & Doolittle, 1982）。特定のアミノ酸を、類似のハイドロパシーインデックスまたはスコアを有する他のアミノ酸と置換し、それでも類似の生物学的機能を有するポリペプチドをもたらすことは、公知である。各アミノ酸は、その疎水性および電荷の特徴に基づいてハイドロパシーインデックスを割り付けられている。それらのインデックスは、イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン/シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；ア

50

ラニン (+ 1 . 8) ; グリシン (- 0 . 4) ; トレオニン (- 0 . 7) ; セリン (- 0 . 8) ; トリプトファン (- 0 . 9) ; チロシン (- 1 . 3) ; プロリン (- 1 . 6) ; ヒスチジン (- 3 . 2) ; グルタミン酸 (- 3 . 5) ; グルタミン (- 3 . 5) ; アスパラギン酸 (- 3 . 5) ; アスパラギン (- 3 . 5) ; リジン (- 3 . 9) ; およびアルギニン (- 4 . 5) 、である。

【 0 1 1 3 】

アミノ酸の相対的ハイドロパシーインデックスが、得られたポチペプチドの二次構造を決定し、その二次構造がまた、酵素、基質、受容体、抗体、抗原などの他の分子とポリペプチドの相互作用を定義する、と考えられる。あるアミノ酸が類似のハイドロパシーインデックスを有する別のアミノ酸により置換され、それでも機能的に同等なポリペプチドを得ることができることは、当該技術分野で公知である。そのような変化において、ハイドロパシーインデックスが ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内の置換が特に好ましく、 $\pm 0 . 5$ 以内の置換は、さらにより特に好ましい。

10

【 0 1 1 4 】

同様のアミノ酸の置換は、特に、それにより作出された生物学的機能が等しいポリペプチドまたはペプチドが免疫学的実施形態における使用を意図される場合、親水性に基づいて作製されてもよい。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1 号には、隣接するアミノ酸の親水性により左右されるポリペプチドの最大局所平均親水性が、免疫原性および抗原性、即ちポリペプチドの生物学的特性と相関することが述べられている。米国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1 号に詳述される通り、以下の親水性値が、アミノ酸残基に割り付けられた：アルギニン (+ 3 . 0) ; リジン (+ 3 . 0) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0 ± 1) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0 ± 1) ; セリン (+ 0 . 3) ; アスパラギン (+ 0 . 2) ; グルタミン (+ 0 . 2) ; グリシン (0) ; プロリン (- 0 . 5 ± 1) ; トレオニン (- 0 . 4) ; アラニン (- 0 . 5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (- 1 . 0) ; メチオニン (- 1 . 3) ; バリン (- 1 . 5) ; ロイシン (- 1 . 8) ; イソロイシン (- 1 . 8) ; チロシン (- 2 . 3) ; フェニルアラニン (- 2 . 5) ; トリプトファン (- 3 . 4) 。あるアミノ酸が、類似の親水性値を有する別のアミノ酸と置換され、それでも生物学的に同等な、特に免疫学的に同等なポリペプチドを得られることは、理解されよう。そのような変化において、親水性値が ± 2 以内のアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内の置換は特に好ましく、 $\pm 0 . 5$ 以内の置換は、さらにより特に好ましい。

20

30

【 0 1 1 5 】

それゆえ先に概説された通り、アミノ酸置換は一般に、アミノ酸側鎖置換の相対的類似性、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。様々な前述の特徴を考慮した例示的置換は、当業者に周知であり、アルギニンとリジン ; グルタミン酸とアスパラギン酸 ; セリンとトレオニン ; グルタミンとアスパラギン ; およびバリンとロイシンとイソロイシン (以下の表 3 参照) を含む。したがって、本明細書に開示された主題は、先に示されたペプチドの機能的または生物学的な同等物を企図する。

【表 3】

表 3
例示的アミノ酸置換

元の残基	例示的置換	元の残基	例示的置換
Ala	Gly; Ser	Ile	Leu; Val
Arg	Lys	Leu	Ile; Val
Asn	Gln; His	Lys	Arg
Asp	Glu	Met	Leu, Tyr
Cys	Ser	Ser	Thr
Gln	Asn	Thr	Ser
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Ala	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu

【0116】

ペプチドまたはポリペプチドの生物学的または機能的な同等物は、当該技術分野で周知の
 手順に従って部位特異的突然変異誘発を利用して調製され得る。したがって、ペプチド
 の官能性を改変することなく、標準の分子生物学的技術を利用して、アミノ酸残基を本明
 細書に開示された主題のADAM9モジュレーティングペプチドに付加、またはそれらか
 ら欠失させることができる。具体的例としては、本明細書に開示された主題のヒトADAM9
 プロドメインペプチドが挙げられる。

20

【0117】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題のADAM9プロドメインペプ
 チドは、SEQ ID NO: 3～23および28～430、947のいずれかに示された
 アミノ酸配列からなるか、この配列から本質的になるか、もしくはこの配列を含むか、ま
 たはSEQ ID NO: 3～23および28～430、947の任意の1つと少なくとも
 87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、
 97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するADAM9プロドメインペ
 プチドである。幾つかの実施形態において、ADAM9プロドメインペプチドは、SEQ
 ID NO: 3～23および28～430、947の1つを含むか、またはSEQ ID
 NO: 3～23および28～430、947の1つと少なくとも87%、88%、89%
 、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%
 、もしくは100%の相同性を有するADAM9プロドメインペプチドであり、ペグ化さ
 れている。

30

【0118】

上記を考慮して、本明細書に開示された主題の例示的な修飾ADAM9ペプチドは、S
 EQ ID NO: 3～23および28～430、947のいずれかに示されたアミノ酸配
 列を含み得る、この配列から本質的になり得る、かつ/またはこの配列からなり得る。S
 EQ ID NO: 3は、6、7、24、26、27、61、62、85、104、137
 、138、146、および160～164位が本明細書に示された任意のアミノ酸で置換
 され得る一般的なコンセンサス配列である。本明細書に開示された主題の他の非限定的な
 例示的修飾ADAM9ペプチドは、SEQ ID NO: 3に関する以下の置換を有するア
 ミノ酸配列を含み得るか、この配列から本質的になり得るか、またはこの配列からなり得
 る。

40

・SEQ ID NO: 3のシステイン85、104および146のうちの1つ、2つま
 たは3つ全てが、セリンで置換され、アルギニン26が、アラニンで置換されている；

50

・SEQ ID NO: 3のシステイン146が、セリンで置換され、アルギニン26が、アラニンで置換され、システイン85および104が、両者とも約1~40kDaのPEG基で置換され、それは幾つかの実施形態において、修飾ADAM9ペプチドのインビトロおよび/またはインビボ生物学および/または生化学的特性を改善する；

・システイン85、システイン104およびシステイン146が全て、セリンで置換され、アルギニン24が、アラニンで置換されている；

・システイン85、システイン104およびシステイン146が全て、セリンで置換され、アルギニン26が、アラニンで置換されている；

・システイン85、システイン104およびシステイン146が全て、セリンで置換され、アルギニン27が、アラニンで置換されている；

・システイン85、システイン104およびシステイン146が全て、セリンで置換され、アミノ酸24、26および/または27の1つまたは複数のアルギニンが、アラニン、またはフリンもしくはPCコンバターゼ切断を減少もしくは排除する任意のアミノ酸で、場合によりアミノ酸174の後のC末端に配置されたシステインで、置換されている；

・システイン85、システイン104およびシステイン146が全て、セリンで置換され、アミノ酸24、26および/または27の1つまたは複数のアルギニンが、アラニン、またはフリンもしくはPCコンバターゼ切断を減少もしくは排除する任意のアミノ酸で、場合によりアミノ酸1の前のN末端に配置されたシステインで、置換されている；

・システイン85およびシステイン104が、セリンで置換され、アミノ酸24、26および/または27の1つまたは複数のアルギニンが、アラニンで置換され、システイン146が、約1~40kDaのPEG基でペグ化されている；

・システイン85、システイン104およびシステイン146が全て、セリンで置換されている；かつ

・アミノ酸24、26および/または27の1つまたは複数のアルギニンが、場合によりフリン切断またはPCコンバターゼを減少もしくは排除するアラニンで、置換され、システイン85、104および146の1つまたは複数が、非限定的に低分子量アルキルエステル、あるいはシステインを酸化に対して耐性にする官能基または比色測定性、蛍光性もしくは放射性標識基が付着されたエステルなどのマレイミドエステルを含むように修飾されている。

【0119】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題は、ADAM9モジュレーションペプチドと、生理学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を提供する。幾つかの実施形態において、医薬組成物は、SEQ ID NO: 3~23および28~430、947に示されたアミノ酸配列からなり、この配列から本質的になり、かつ/またはこの配列を含む、ADAM9モジュレーションペプチドを含む。

【0120】

典型的には本明細書に開示された主題の組成物は、所望なら、標準的で周知であり非毒性の生理学的に許容できる担体、アジュバント、およびビヒクルを含有する投与単位配合剤中で非経口投与される。本明細書で用いられる非経口という用語は、静脈内、筋肉内、動脈内注射、腹腔内、局所、または輸液技術を包含する。

【0121】

注射可能な調製物、例えば滅菌注射可能水性または油性懸濁液は、適切な分散または湿潤剤および懸濁剤を用いて公知の技術に従って配合される。滅菌注射可能調製物はまた、例えば1,3-ブタンジオール中の溶液としての、非毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶媒中の滅菌注射可能溶液および/または懸濁液であり得る。

【0122】

用いられ得る例示的で非限定的な許容できるビヒクルおよび溶媒は、水、リンゲル液および等張塩化ナトリウム溶液である。加えて、滅菌不揮発油が、従来から溶媒または懸濁媒体として用いられる。この目的では、合成モノ-またはジ-グリセリドを含む任意の無刺激の不揮発油を、用いることができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸が、注射可能

10

20

30

40

50

液の調製において用途を見出す。好ましい担体としては、リン酸塩、乳酸塩、T r i sなどで緩衝された中性生理食塩溶液が挙げられる。

【0123】

III. 本明細書に開示された主題の修飾ADAM9プロドメインペプチドの使用のための方法およびこれらのペプチドの使用

本明細書に開示された主題のADAM9モジュレーティングペプチド、およびそれらを含むまたはそれらから本質的になる組成物は、インビトロおよびインビボでADAM9タンパク質活性をモジュレートするのに有用である。幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題は、ADAM9モジュレーティングプロドメインペプチドを、ADAM9タンパク質の活性をモジュレートするのに十分な条件および量（本明細書では「有効量」、または処置もしくは予防法の場合には、「治療有効量」と称される）で、ADAM9タンパク質を含む溶液または細胞と接触させることを含む、インビトロでADAM9活性をモジュレートするための方法を提供する。

10

【0124】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示された主題は、インビボでADAM9活性をモジュレートするための方法を提供し、方法は、対象に、ADAM9モジュレーティングプロドメインペプチドを含む組成物（幾つかの実施形態において、医薬組成物）を治療有効量で、ADAM9活性をモジュレートするのに十分な投与経路により投与することを含む。幾つかの実施形態において、対象は、少なくとも部分的にとして、過剰なADAM9生物活性（即ち、望ましくないレベルのADAM9生物活性）の存在を特徴とする疾患または障害を有する。幾つかの実施形態において、障害は、炎症、アレルギー反応、喘息、血管新生、感染性疾患、癌、それらの素因、および/またはそれらの症状もしくは結果の1つまたは複数を特徴とする。幾つかの実施形態において、障害は、癌であり、その症状または結果は、線維症を含む。

20

【0125】

したがって幾つかの実施形態において、疾患または障害は、アルツハイマー病、癌、炎症、COPD、新生血管疾患、もしくはそれらの素因、および/またはそれらの症状もしくは結果の1つまたは複数を特徴とする。

【0126】

実施例

以下の実施例は、例としての実施形態を提供する。本開示および当該技術分野での一般的技能レベルに照らせば、以下の実施例が例示を意図するに過ぎず、本明細書に開示された主題の範囲を逸脱することなく数多くの変更、修正および改変を用い得ることは、当業者に察知されよう。

30

【0127】

実施例1

ADAM9のヒトプロドメインペプチドはインビトロでADAM9を阻害する

H i s₆タグ（SEQ ID NO: 24）と共にSEQ ID NO: 2をコードする核酸配列をプラスミド発現ベクターにクローニングすることにより、ADAM9プロドメインペプチドを調製した。いくつかのプロドメインペプチドは、BL21DE3細胞を形質転換した後、16 で発現させることにより調製した。これは、可溶性プロドメインペプチドと、封入体中のプロドメインペプチドの両方を生成した。他のものは、37 で発現させて封入体を生成することにより調製した。可溶性プロドメインペプチドを、1 mg / ml リソザイム（Sigma - Aldrich Corp.、米国ミズーリ州セントルイス所在）、Benzonase（Sigma - Aldrich）、プロテアーゼインヒビターカクテル（Gold Biotechnology）および1×CELLLYTIC（登録商標）溶液（Sigma - Aldrich）を含み、2~5mM Tris（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP; Gold Biotechnology, Inc.、米国ミズーリ州セントルイス所在）を含む、または含まない20mM Tris pH 8の中に、細菌を室温で15~40分間溶解することにより精製した。遠心分離

40

50

後のペレットを再度、同じ緩衝液で処置し、もう一度、遠心分離した。可溶性タンパク質の場合、最初の、または両方の上清をNi-NTAカラム(Fisher Scientific、米国ペンシルバニア州フィラデルフィア所在)に添加した。洗浄後、プロドメインを、5 mM TCEPを含む、または含まない2 Mイミダゾール、20 mM Tris pH 9で溶出した。その後、材料を、20 mM Tris pH 8および40 mM NaClで平衡化したSUPERDEX(登録商標)200ブランドのカラム(GE Healthcare Bio-Sciences、米国ペンシルバニア州ピッツバーグ所在)に通した。濃縮およびエンドトキシン除去の後、グリセロールを10%に添加し、材料を-20℃で貯蔵した。

【0128】

封入体を、先に記載された通り細菌をこじ開けることにより調製し、その後、材料を3,000 rpmで30分間遠心分離した。その後、ペレットを溶解緩衝液に再懸濁させて、室温で30分間振とうした後、再度スピンして、封入体をペレット化した。プロドメインを、2~4 mM TCEPを含む、または含まない8 M尿素、20 mM Tris pH 8中での可溶性により封入体から精製し、その後、Fisher Scientific(米国マサチューセッツ州ウォルサム所在)製のNi-NTAビーズと共に振とうした。ビーズを、複数の容量の、TCEPを含む、または含まない8 M尿素、20 mM Trisで洗浄し、その後、材料を、2~4 mM TCEPを含む、または含まない6 M尿素および20 mM Tris pH 9と、666 mMイミダゾールpH 9とで溶出した。プロドメインを尿素からリフォールディングし、その後、20 mM Tris緩衝液pH 8を用いて透析して、残留する尿素およびイミダゾールを除去した。透析後にプロドメインを濃縮し、ADAMファミリーメンバーのための蛍光エネルギー移動基質である10 μM PEPDAB064(BioZyme Inc、米国ノースカロライナ州アベックス所在)を含む黒色コーティング96ウェルプレート内の20 mM Tris pH 8および0.001% BRIJ(登録商標)35ブランドの界面活性剤中で、ヒトまたはマウスADAM9と共に種々の濃度にてインキュベートした。データを、Prismソフトウェアを用いてあてはめてIC50値を決定した。結果を表4に表す。

10

20

【表 4】

表 4
ADAM9 の阻害のための IC50 値

構築物	精製	IC50 (nM)
SEQ ID NO: 2 (野生型)	封入体	20 ± 6
SEQ ID NO: 9	封入体	46 nM で 66 % 阻害
SEQ ID NO: 10	可溶性画分	49 ± 8
SEQ ID NO: 10	封入体	> 200 nM
SEQ ID NO: 11	可溶性画分	13.8 ± 3.9
SEQ ID NO: 11	封入体	> 200 nM
SEQ ID NO: 12	可溶性画分	39 ± 6.2
SEQ ID NO: 12	封入体	41 ± 10.5
SEQ ID NO: 13	封入体	46 ± 9
SEQ ID NO: 14	封入体	136 ± 36
SEQ ID NO: 15	封入体	46 nM で 66 % 阻害
SEQ ID NO: 16	封入体	29 ± 3.6
SEQ ID NO: 17	封入体	185 ± 57
SEQ ID NO: 18	封入体	181 ± 61
SEQ ID NO: 19	封入体	33 ± 6
化学修飾された SEQ ID NO: 2	封入体	125 ± 68
ペグ化 SEQ ID NO: 20	封入体	16 ± 3
ペグ化 SEQ ID NO: 21	封入体	40.5 ± 14
ペグ化 SEQ ID NO: 22	封入体	60 ± 8.8
ペグ化 SEQ ID NO: 23	封入体	39.9 ± 8.2

【0129】

実施例 2

選択性プロファイル

特異性を決定するために、野生型ヒト ADAM9 または SEQ ID NO: 10 を、ADAM10 または ADAM17 (R&D Systems、米国ミネソタ州ミネアポリス所在) のいずれか、および ADAM9 に関して記載されたものと同じ基質緩衝液ミックス (2 μM 濃度より大きな濃度) と共にインキュベートした。それらをまた、0.001 % BRU (登録商標) 35 ブランドの界面活性剤を含む 20 mM Tris / 150 mM NaCl / 10 μM CaCl₂ 中の 15 μM PEPDAB008、BioZyme Inc (米国ノースカロライナ州アベックス所在) を用いて、MMP1、MMP2、MMP9 および MMP14 に対してテストした。テストした酵素のいずれの阻害もなかった。

30

【0130】

実施例 3

酸化によるプロドメインの二量体化および多量体化

野生型プロドメインペプチド (SEQ ID NO: 2) は、3 つのシステインを有する。これらのシステインの全ては、エルマン試薬テストによる評価では、遊離でありジスルフィド結合していない。低温またはより高温でのインキュベートの際、または -20 °C の貯蔵の際に、このタンパク質のスルフヒドリル基は酸化により互いに反応して、ジスルフィド結合を形成した (図 1 参照)。ADAM9 の阻害について IC50 は、還元剤を除去した後に ADAM9 を新たに調製した場合、典型的には 20 nM 前後であった。しかし、1 週間後の透析およびアッセイの際には、それが凍結されていたとしても、二量体形成が起こり、IC50 が 120 nM に上昇した。最終的に -20 °C で 1 時間貯蔵した後、このタンパク質はさらに二量体化および三量体化し、最終的に解凍の際に沈殿した。また、37 °C で 0 ~ 25 時間インキュベートした後、二量体および三量体形成が、野生型プロドメイン (SEQ ID NO: 2) と、146 位にシステインからセリンへの置換を有する

40

50

(図2参照)がアミノ酸位85および104でのシステインをなお保持するSEQ ID NO: 9とで増加した。

【0131】

実施例4

プロドメインのペグ化は封入体からの精製後に適当なリフォールディングおよび改善された効能を可能にする

8M尿素、20mM Tris、および666mMイミダゾールpH9中でNi-NTAビーズから溶出された後のSEQ ID NO: 10を、20mM Tris pH9に希釈し、4で一晩放置した。その後、材料を濃縮し、20mM Tris pH8、40mM NaClで平衡化したSUPERDEX(登録商標)200ブランドのサイズ分離カラムに通した。材料のほとんどが、空隙容量付近でカラムからはずれ、材料が凝集していることが示された。画分を混和し濃縮した。IC50値を、種々の濃度のプロドメインとのADAM9のインキュベーションにより決定した。IC50は、200nMより大きかった(表4参照)一方で、SEQ ID NO: 10の可溶性形態は、49nMのIC50を有した(表4参照)。

10

【0132】

C末端にシステインを有するSEQ ID NO: 10のバージョン(SEQ ID NO: 20)を封入体から可溶化し、実施例1に記載された通りNi-NTAビーズで精製し、その後、尿素およびリン酸緩衝液で平衡化したZEB(A(商標)ブランドのスピカラムに通した。過剰の20kDaマレイミドPEG(Nanocs Inc、米国マサチューセッツ州ボストン所在)を添加した。2時間後に、反応の進行を、10mMまでのTCPEPの添加により停止させた。TCPEPをプロドメインと共にさらに1時間インキュベートし、その後、材料をリフォールディングし、20mM Tris pH8および40mM NaClで平衡化したSUPERDEX(登録商標)G200ブランドのカラムに通した。純粋なペグ化材料を含有する画分を濃縮し、サイズ分離カラムにさらに2回通した。精製された画分を、グリセロールの添加後に-20で凍結させた。ペグ化されたSEQ ID NO: 20は、ADAM9を 16 ± 3 nMのIC50で阻害した。比較として、可溶性SEQ ID NO: 10は、 49 ± 8 nMのIC50を有し、封入体からリフォールディングされた材料は、ADAM9を阻害しなかった。

20

【0133】

実施例5

システイン修飾

WTプロドメイン(SEQ ID NO: 2)を、尿素およびリン酸緩衝液で平衡化したZEB(A(商標)ブランドの脱塩スピカラムに通した。プロドメイン10μgを、スルフヒドリル基と特異的に反応し得るALEXA FLUOR(登録商標)647ブランドのマレイミドエステル(Fluoroprobes、米国アリゾナ州スコッツデール所在)2μgと4で反応させた。3.5時間後に、TCPEPを20mMまで添加し、反応物を4でさらに1時間静置した。その後、材料をリフォールディングし、透析した。

30

【0134】

インビトロアッセイを利用して、ADAM9の阻害についてIC50を決定した(IC50 125 ± 68 nM)。エルマン試薬を用いて、反応後の遊離スルフヒドリル基の含有量を評価した。材料のおよそ1~3%は、未反応であった。SDSゲルを泳動して、標識が起こったことを確認した。結果を図3に表す。検出可能な出発原料は存在せず、プロドメインの分子量が、約3kDaのより大きな分子にシフトし、タンパク質が正しく標識されたことを示した。

40

【0135】

実施例6

切断実験

ADAM9のプロドメイン中に上流部位があり、それは、フリンにより切断される。この部位での修飾が、ADAM9のプロドメインによるシェディングイベントの阻害のIC

50

50 または薬物動態特性を改善し得ると仮定した。各プロドメイン 50 μ g を、1.7 ml Eppendorf 管中のおよそ 100 μ l の容量でフリンまたはメブリンと反応させた。フリンのアッセイでは、緩衝液は、20 mM Tris pH 8 / 150 mM NaCl / 10 mM CaCl_2 であった。メブリン緩衝液は、20 mM Tris pH 8 であった。試料を 37 でインキュベートし、タイムコースを、溶液のおよそ 20 ~ 30 μ l を取り出しローディングダイの 4 x 溶液 10 μ l でクエンチすることにより実行した。試料を 16 % Nowex ゲルで泳動し、Simply Blue Safe Stain (Thermo Fisher Scientific) で染色した。

【0136】

結果を、フリンについては図 4 に、メブリンについては図 5 ~ 7 に示した。結果は、突然変異体がフリンによる切断に耐性があることを示した。SEQ ID NO: 12 は、最も安定であった。SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14 および SEQ ID NO: 11 は、フリンにより切断されたが、フリン突然変異を有しない SEQ ID NO: 13 よりもかなり低い度合いであった。

【0137】

メブリンは、ADAM10 プロドメインを切断することが示されたが、メブリンが ADAM9 のプロドメインも切断するか否かは、未知である。切断への安定性も改善しつつメブリンの障害を予防することに対するプロドメインの選択性を改善することをテストした。図 8 は、野生型プロドメイン (SEQ ID NO: 2) がメブリンにより切断されたことを示している。

【0138】

SEQ ID NO: 2 には少なくとも 4 つの可能なメブリン部位が存在する。修飾を、各部位に作製した。プロドメインが SEQ ID NO: 2 におけるアミノ酸 1 ~ 6 の後に始まるように、部位 1 を欠失させた (SEQ ID NO: 17 参照)。第二の部位を、PED (SEQ ID NO: 2 のアミノ酸 60 ~ 62) から PEA に突然変異させた (SEQ ID NO: 14 参照)。第三の部位 (SEQ ID NO: 2 のアミノ酸 136 ~ 138) を、MDD から MDS に修飾し (SEQ ID NO: 18 参照)、最後の部位 (aa 159 ~ 164) を、KDEEEE (SEQ ID NO: 25) から KDNENE に修飾した (SEQ ID NO: 19 参照)。SEQ ID NO: 2 の切断に基づき、最初の切断が部位 4 (アミノ酸 159 ~ 164) で起こっていたと仮定した。メブリン突然変異体は、非メブリン突然変異体より安定であった (図 5; SEQ ID NO: 12 を SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18 および SEQ ID NO: 19 と比較)。さらに、ペグ化された非メブリン突然変異体、特に N 末端ペグ化部位を有するペグ化 SEQ ID NO: 22 は、メブリン切断に対してより耐性があった (図 7 参照)。意外にも、N 末端でのペグ化は、プロドメインの C 末端切断を防御した。反対に、C 末端ペグ化プロドメインのいずれも、C 末端切断を防御しなかった。形成された切断生成物から、C 末端がおそらく KDEEEE (SEQ ID NO: 25) モチーフでの、初期切断部位であることが決定され得る。KDNENE へのこの部位の修飾は、切断速度を低下させ (図 6 の SEQ ID NO: 19 参照)、ADAM9 に対する効能を上昇させた (表 4 参照)。

【0139】

実施例 7

プロドメインによるメブリンベータの障害

ヒトメブリンベータ (R & D Systems、米国ミネソタ州ミネアポリス所在) を、製造業者の使用説明によりトリプシンで活性化し、続いて 1 mM 4 - (2 - アミノエチル) ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩 (AEBSF: Thermo Fisher Scientific) でクエンチした。プロドメインを種々の濃度で、96 ウェル黒色コーティングプレート中で 20 mM Tris pH 8、0.001 % BRIJ (登録商標) 35 ブランドの界面活性剤中の 15 μ M の活性化メブリンベータおよび蛍光基質 PEDAB022 (BioZyme Inc、米国ノースカロライナ州アベックス所在) と共に、室温でインキュベートした。低濃度のメブリンベータおよび短い反応時間を利用

10

20

30

40

50

して、これらの条件下でのプロドメインの切断を回避しようと試みた。反応速度は、経時的に直線性があり、時間依存的活性化を示さなかった。

【表 5】

表 5
メブリンペーターの阻害についての I C 5 0

構築物	I C 5 0 v s メブリン
WT (SEQ ID NO : 2)	2 0 0 nM
2 5 (SEQ ID NO : 1 2)	7 . 4 μ M
2 5 - 1 (SEQ ID NO : 2 1)	2 . 8 μ M
2 5 - 2 (SEQ ID NO : 2 2)	3 . 8 μ M
2 5 - 3 (SEQ ID NO : 2 3)	5 . 7 μ M
2 7 (SEQ ID NO : 1 4)	5 . 7 μ M で 1 4 %
3 1 (SEQ ID NO : 1 8)	2 . 4 μ M で 3 3 %
3 2 (SEQ ID NO : 1 9)	2 . 4 μ M で 3 2 %

【 0 1 4 0 】

実施例 8

A D A M 9 のヒトプロドメインはインビトロで細胞内シェディングイベントを阻害した B T 4 7 4 細胞 (2 0 , 0 0 0 個) を生育培地および血清と共に 9 6 ウェルプレートに播種し、プロドメインまたはピヒクル対照を 3 n M ~ 2 . 5 μ M 添加した。培地を取り出し、R a y B i o t e c h (米国ジョージア州ノークロス所在) の血管新生アレイと共にインキュベートした。タンパク質レベルを、蛍光シグナルの検出のためにプレートをスキャンすることにより定量した。図 9 は、3 0 および 3 0 0 n M の S E Q I D N O : 1 2 (フリン突然変異体) および S E Q I D N O : 1 3 (フリン突然変異なし) のインキュベーションからのデータを表す。加えて、ペグ化 S E Q I D N O : 2 0 も、1 0 0 n M でテストした。

20

【 0 1 4 1 】

結果は、全てのプロドメインが V E G F R 2 および T G F シェディングの強力な阻害剤であり (V E G F R 2 および T G F は、A D A M 9 の公知の基質である) 、フリン切断耐性突然変異体は、非フリン突然変異体よりも良好な効能を有することを示した。加えて、プロドメインは、M M P 9 、 F G F 4 、 M C P - 3 、 M C P - 4 、および 1 3 0 9 などの媒体中の他のタンパク質レベルを低下させた (図 9 A 参照) 。

30

【 0 1 4 2 】

実施例 9

プロドメインペプチドの薬理学的効果

S E Q I D N O : 1 0 を、マウスにおける薬物動態試験に導入した。手短に述べると、マウス (3 ~ 6 匹 / 群) は、単回の腹腔内 (i . p .) もしくは鼻内用量またはピヒクル対照を受けた。i . p . 注射の場合、血液試料をそれぞれ 2 群から心穿刺により採取するか、または気管支洗浄液を鼻内投与後に処置後として回収した。血清または気管支洗浄液を調製し、- 8 0 で貯蔵した。プロドメイン処置により増加または減少した血清または気管支洗浄液中のタンパク質を、定量した。A D A M 9 プロドメインペプチドの血清または気管支洗浄液中濃度もまた、A D A M 9 酵素活性に対する液体の阻害能に基づくバイオアッセイを利用して、間接的に決定した。液体 5 ~ 5 0 μ l を、3 0 μ M 基質の P E P D A B 0 6 4 (B i o Z y m e I n c .) 含有プロテアーゼ阻害剤、ペプスタチン、A E B S F 、ペスタチン、および E - 6 4 (トランス - エポキシスクシニル - L - ロイシルアミド (4 - グアニド) ブタン ; C A S 番号 6 6 7 0 1 - 2 5 - 5 ; S i g m a - A l d r i c h) と共にインキュベートし、種々の濃度で A D A M 9 プロドメイン 1 0 μ l によりスパイクし、A D A M 9 を添加して反応を開始させた。A D A M 9 阻害率 % を、血清に加えた既知濃度の A D A M 9 プロドメインを利用することにより標準曲線を作成するために、決定した。その後、試料 5 ~ 5 0 μ l を採取し、先の基質溶液 5 5 μ l に添加し、

40

50

それをプロドメインが溶解された緩衝液（20 mM Tris 緩衝液 pH 8、40 mM NaCl、および10%グリセロール）により1：6で希釈した。阻害率%を、ビヒクル対照を注射されたマウスの対照群から採取された液体に相対的に決定した。

【0143】

48時間後の血清中プロドメイン濃度は、6 mg/kgで投与された場合には約9, 4 ± 1.9 μMであった。SEQ ID NO：10がインビボで生物学的効果を有したことを決定するために、Raybiotechアレイ（米国ジョージア州ノークロス所在）を用いて、ビヒクル対照と処置マウスとを比較することにより血清中の異なる因子のレベルを評価した。表6は、SEQ ID NO：10投与により上方または下方制御された因子の幾つかを列挙している。

10

【表6】

表6

SEQ ID NO：10処置により減少または増加した血清中因子

因子	阻害率または活性化率%	SEM
HGF	54	25
FcγRIIB	44	1
ALK-1	100	57
HAI-1	43	6
VEGFR3	100	45
I-TAC	55	27
フラクタルキン	74	56
ガレクチン-1	-36	-5
CD40	-57	-18
Axl	-22	-2

【0144】

実施例10

フリンおよびメブリン切断耐性突然変異体は良好な薬物動態特性を有した

ペグ化SEQ ID NO：21、22、23、ならびに非ペグ化SEQ ID NO：12およびSEQ ID NO：14を、ビヒクル対照（20 mM Tris pH 8、40 mM NaCl、および10%グリセロール）と共に、Balb/Cマウス2～3匹にi.p.注射した。72時間後に、血液を心穿刺により回収し、血清を調製した。プロドメインレベルを、最初に標準曲線を作成することにより測定し、ここで種々の量の各プロドメインを黒色Hisタグコーティングプレート（Fisher Scientific）中でインキュベートした。

30

【0145】

標準曲線を作成するために、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有するブロッキング緩衝液75 μlを、対照マウス血清（非処置）およびプロドメインでスパイクした。30分後に、溶液を吸引し、ウェルを洗浄緩衝液で、その後、アッセイ緩衝液（20 mM Tris pH 8、0.001% BRU（登録商標）35ブランドの非イオン性界面活性剤 pH 8）で2回洗浄した。その後、15 μM PEPDAB064（BioZyme Inc.）を含有するアッセイ緩衝液40～50 μlを各ウェルに添加し、マウスADAM9（R&D Systems）を添加して反応を開始させた。ADAM9の阻害率%をプロドメイン濃度に対してプロットして、標準曲線を得た。

40

【0146】

PK実験からのプロドメインのレベルを計算するために、72時間目に回収された血清を先に記載された通りブロッキング緩衝液75 μlに添加し、30分間インキュベートした。洗浄後に、アッセイ緩衝液をPEPDAB064およびADAM9と共に添加し、阻害率%をもう一度定量した。血清レベルを、各プロドメインで作成された標準曲線に阻害率%をあてはめることにより計算した。

50

【0147】

血清レベルを72時間目に測定したPK実験について、結果を図10に表す。ペグ化SEQ ID NO: 22は、最も安定な構築物であり、メブリンとフリンの組み合わせによる分解の感受性が最も低い構築物でもあった。他のペグ化構築物 (SEQ ID NO: 21およびSEQ ID NO: 23) は、SEQ ID NO: 12およびペグ化SEQ ID NO: 22よりも悪い血清レベルを有した。ペグ化SEQ ID NO: 22はまた、メブリン切断に対して安定でない非ペグ化の同等のSEQ ID NO: 12より安定であった。最も安定なフリン切断部位をもたなかったSEQ ID NO: 14は、それがより安定したメブリン部位を有しながら、より乏しいPK値を有したことに、留意されたい。

【0148】

実施例11

急性タバコの煙モデル

C57BL/6系統Tマウス(8~12週齢)を、Teague TE 10zチャンバー (Teague Enterprises、米国カリフォルニア州ウッドランド所在) において、空気または混合した主流および副流のタバコの煙 (CS) に6日/週にわたり2時間/日、暴露した。2週間後、CSを与えられたマウスは、ビヒクル対照 (20 mM Tris pH 8、40 mM NaClおよび10%グリセロール) またはSEQ ID NO: 10 (0.75 mg/kgで30 µl) のいずれか30 µlを鼻内投与により1日おきに与えられた。さらに2週間の追加的CS暴露の後、気管支肺胞洗浄液 (BAL) を得て、エラスチン分解 (デスモシンに関するELISA; Cusabio Technology LLC、米国テキサス州ヒューストン所在) に加え、炎症促進性および抗炎症性メディエータレイ (Ray Biotech)。

【0149】

表7は、対象と処置群を比較した場合の、CS暴露マウスのBALで減少された因子のリストを表す。増加された因子は、IL1-RAおよびIL-10を含み、それらは両者とも抗炎症性メディエータである。CS暴露マウスにおいて、デスモシンレベルにより測定されたエラスチン分解は、極めて高い。BALデスモシンレベルを、図11に示す。SEQ ID NO: 10の投与は、エラスチン分解を完全に予防した。SEQ ID NO: 10レベルを、実施例8で先に記載されたバイオアッセイを利用して投与後30分目に決定した。0.75 mg/kgで投与された場合のBALレベルは、約10 µMであった。

10

20

30

【表 7】

表 7
対照に比較して処置マウスのBALで減少された因子

因子	減少率%	機能
P r o M M P 9	7 8	肺組織のマトリックスタンパク質を分解するプロテアーゼ
M M P 2	7 9	分解性プロテアーゼ
M M P 3	8 9	分解性プロテアーゼ
M M p 1 0	4 4	分解性プロテアーゼ
リンホタクチン	7 0	T細胞のためのケモカイン
I L - 1 5	1 0 0	ナチュラルキラー細胞の増殖を誘導する
L I X	1 0 0	好中球動員のためのケモカイン
M I P - 1 アルファ	1 0 0	炎症を生成するマクロファージケモカイン
ラングカイン (L u n g k i n e)	7 0	肺により生成される炎症促進性ケモカイン
T a r c	9 2	炎症を促進するケモカイン
P F 4	9 5	創傷修復および炎症
V C A M - 1	6 3	炎症性細胞の接着を促進する
マラスピン (M a r a s p i n)	1 0 0	炎症に関与する、肺により生成されるセリンプロテアーゼ
T W E A K	1 0 0	炎症および死のバイオマーカー
T R A I L	8 7	細胞死プロモーター
T G F ベータ	6 7	線維症を促進する
T W E A K 受容体	6 5	炎症および細胞死メディエーター
F A S リガンド	8 4	細胞死を促進する

【 0 1 5 0 】

実施例 1 2

急性肝傷害および線維症モデル

雄 8 週齢 B A L B / c マウス 1 8 匹を、体重に基づいて試験群に無作為化した。C C 1₄ 溶液での処置を全マウスで開始し、2 週間の期間、継続した。治療的処置を、C C 1₄ の開始と同時にを行った。化合物投与と C C 1₄ 溶液は、表 8 に概説される通り、この 2 週間の予防的投与試験の間、少なくとも 4 時間離された。

30

【表 8】

表 8
試験群および処置

試験群番号	群あたりのマウス数	線維症導入	テスト物 (T A)
1	6	2 0 % C C 1 ₄ 、0 ~ 2 週間にわたり B I W	ビヒクル、i . p .、7 用量を E O D、0 ~ 2 週間
2	6	2 0 % C C 1 ₄ 、0 ~ 2 週間にわたり B I W	S E Q I D N O : 1 2、i . p .、7 用量を E O D、0 ~ 2 週間
3	6	2 0 % C C 1 ₄ 、0 ~ 2 週間にわたり B I W	S E Q I D N O : 1 2、i . p .、7 用量を E O D、0 ~ 2 週間

B I W : 週 2 回 ; E O D : 1 日おき

【 0 1 5 1 】

試験終了時に、全血およそ 4 0 0 μ l を、A L T、A S T、A L P およびビリルビン分析のために血清分離管に収集した。最後の血液回収に続いて、各マウスの肝臓を単離し、計量し、以下の通り 4 つの切片に切開した：左葉の中央切片を、組織学的分析のためにホ

50

ルマリン固定 (F F P E) し、3つのより小さな別の切片、つまり残りの左葉からの1つと右葉からの2つ (それぞれ約 50 ~ 100 mg) を、瞬間凍結し、- 80 °C で貯蔵した。

【 0 1 5 2 】

組織学的分析：終了時に採取された F F P E 肝からの H & E / P S R 染色肝切片の肝線維症スコアリングを、Board Certified Veterinary Pathologist (D V M) により提供した。スコアリングは、線維症および他の関連する観察、例えば壊死および炎症などを含んだ。

【 0 1 5 3 】

図 1 1 は、試験の結果を表す。対照群と比較して、肝重量が減少され、化合物処置による有益な効果を示す。A S T および A L T レベルならびにビリルビンレベルもまた、処置群で低下された。最後に、肝線維症スコアの低下もあった。肝臓試料を採取し、溶解物を作製し、MMP および A D A M ファミリーメンバーの酵素レベルを、5 種の異なる蛍光基質による P r o t e o l y t i c A c t i v i t y M a t r i x A n a l y s i s (P r A M A ; M i l l e r e t a l . , 2 0 1 1) を用いて定量した。この分析では、MMP 9 および A D A M 8 レベルが処置群で低下したが、MMP 1 3 レベルは上昇した (図 1 3 参照) 。

【 0 1 5 4 】

実施例 1 3

インビトロ試験：腫瘍異種移植片モデル

A D A M 9 プロドメインがインビボでの腫瘍成長阻害の治療能力を有するか否かを決定するために、有効性試験を、胸腺欠損マウスでの誘導された異種移植片腫瘍モデルを利用して実施する。手短に述べると、細胞 1×10^7 個を、6 週齢雌胸腺欠損マウスの脇腹に s . c . 移植する。二次元での腫瘍サイズをキャリパーで測定し、体積を計算する。腫瘍サイズがおよそ 200 mm^3 に達したら、処置を開始する。ビヒクル対照および 2 用量の単独での A D A M 9 プロドメインペプチドを、薬物動態データから決定された通り与える。各処置群 ($n = 6 \sim 12$ 匹 / 群) を、最大 7 ~ 8 週間モニタリングする。体重および腫瘍を、週 2 回測定し、腫瘍の成長および縮小率を決定する。動物を実験終了時に安楽死させ、肝臓、心臓、内臓脂肪、腎臓および脳を保持し、組織損傷および毒性について検査する。

【 0 1 5 5 】

A D A M 9 プロドメインペプチドを、異種移植片腫瘍モデルにおいて他の癌薬と組み合わせて適当な用量で使用する。癌薬を単独で、または A D A M 9 プロドメインペプチドと組み合わせて投与し、実験を上記のとおり実施する。

【 0 1 5 6 】

実施例 1 4

プロドメインペプチドによる新生血管生成の阻害

脈絡膜血管新生 (C N V) は、主に加齢性黄斑変性患者において、重度視覚喪失の主因である。C N V のネズミモデルを用いて、新生血管生成を阻害する A D A M 9 プロドメインペプチドの能力についてテストする。雄成体 C 5 7 B L / 6 J マウス 13 匹 (13 匹 / 群、2 群) を、滅菌水で 1 : 10 に希釈されたケタミン塩酸塩 0 . 3 m l の腹腔内注射により麻酔する。瞳孔を 1 % トロピカミドで散大させ、クリプトンレーザ光凝固の 3 回の焼灼 (b u r n s) ($50 \mu\text{m}$ スポットサイズ ; 0 . 0 5 秒間 ; 3 5 0 ~ 4 0 0 m W) を、スリットランプ送達システムおよびコンタクトレンズとしてのカバーガラスを利用して各網膜に実行し、網膜を検出する。レーザの時点での泡の生成は、ブルッフ膜の崩壊を示す。

【 0 1 5 7 】

泡が生じた焼灼を、本試験に含める。焼灼を、網膜の後極の 9 時、12 時および 3 時の位置で実施し、各焼灼を検死で同定しフルオレセイン血管造影での特徴および組織病理学的特徴に関して比較できるようにする。プロドメインペプチドまたはビヒクル対照 (20 m M T r i s p H 8、10 % グリセロール) を 1 ~ 4 週間、i . p . で与え、その間

フルオレセイン血管造影を、1%フルオレセインナトリウム (Alcon、米国テキサス州フォートワース所在) 0.3 ml の i.p. 注射後に、一連の眼底写真を TRC-50 FT カメラ (Topcon、米国ニュージャージー州パラマス所在) で撮影することにより、一部のマウスで実行する。レーザ処置後の様々な時間で、マウスを殺処分し、それらの眼球を摘出し、0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) 中の 2% パラホルムアルデヒド / 2% グルタルアルデヒド中、4 で 24 時間固定するか、または 4% パラホルムアルデヒドのみを含有する同じ緩衝液中で固定する。レーザ処置後の様々な時点での CNV の発生率の推定を得るために、焼灼を処置期間で無作為に選択する。病変を光学顕微鏡により検査し、いくつかの病変を、透過型電子顕微鏡によっても分析する。

【0158】

10

実施例 15

プロドメインペプチドによる創傷治癒の阻害

C57/B16 (8~10 週齢; 8 匹 / 群; 2 群) マウスを、ケタミン / キシラジンの単回 i.p. 注射で麻酔する。背中を剃毛し、皮膚を 70% エタノールで拭く。2 つの全層切開創 (4 mm 径) を、先に記載された通り皮膚および皮幹筋を切除することにより、各動物の背中で作製する。この創傷を放置して乾燥させ、かさぶたを形成させる。動物に、ビヒクル対照 (20 mM Tris pH 8、10% グリセロール) またはプロドメインを、IP 注射または局所塗布により 1~3 日ごとに 2 週間投与する。マウスを創傷作製後の異なる時点で殺処分し、上皮周辺部を含む全ての創傷を単離する。創傷を尾頭方向に二等分し、組織を O.C.T. Compound (Tissue Tek、Vogel 社、ドイツ ギーセン所在) に包埋し、免疫組織化学的検査に用いる。組織学的分析を、創傷の中央部分からの一連の切片で実施する。創傷の凍結切片 (5 μm) を、ヘマトキシリンおよびエオジン (H&E; Shandon、ドイツ フランクフルト所在) で染色し、記録し、Leica 顕微鏡 (DMLB、ドイツ ヴェッツラー所在) を用いて測定する。

20

【0159】

実施例 16

プロドメインペプチドによるアルツハイマー病の処置

8 週齢の PDAPP、APP_{1v7171} または Tg2576 マウス (10 匹 / 群、2 群) に、ビヒクル対照またはプロドメインを 3~7 ヶ月の過程で 1~7 日ごとに鼻内または脳内に与える。脳を解剖し、免疫組織化学的検査および定量的 プラーク分析を実施する。手短に述べると、一方の半球を、PBS 中の 4% パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、前頭部の四半分をパラフィンに包埋する。アミロイド斑を、A40 および 42 を検出する抗体 6F/3D で同定する。後頭部のパラホルムアルデヒド固定された四半分を、ビブラトームで切断された切片 (40 μm 厚) のチオフラビン S 染色を用いる海馬台中のアミロイド斑負荷の定量に用いる。蛍光画像を、3CCD デジタルカメラ (Sony DXC-9100P; Sony Corp.、ドイツ ケルン所在) を具備した倒立顕微鏡 (Leica DMR; Leica Microsystems、ドイツ ベンスハイム所在) で獲得し、専用のソフトウェア (Leica QWin system) で分析する。アミロイド沈着の総表面積を測定し、海馬台の総表面に対する割合 % として表す。

30

【0160】

40

電子生理学的検査では、海馬切片を、ビブラトームを用いて麻酔されたマウスから調製する。その後、切片を、浸漬チャンバー内で、加温された酸素化人工脊髄液と共にインキュベートする。その後、シャッフアー側枝経路を、双極タングステン微小電極を用いて刺激する。マウスを、モーリス水迷路にも供する。1 群あたりマウス 9~10 匹を、沈んだプラットフォームを含むモーリス水迷路のタスクを用いて、迷路で訓練する。4 日間にわたり 1 日 4 回試験を、90 秒の休憩を入れながら最大 90 秒の長さで実施した。

【0161】

マウスを、最初にプラットフォーム上に 30 秒間静置する。5 日目に、プラットフォームを含まない 60 秒間の試験を実施する。想定されたプラットフォームの場所に到達する時間を測定し、潜時として表す。加えて、アニュラス横断 (annulus cross

50

ings)の回数を計算する。

【0162】

参考資料

非限定的に、全ての特許、特許出願およびその発行物、科学雑誌文献、ならびにデータベースエントリー（例えば、GENBANK（登録商標）バイオシーケンシングデータベースエントリーおよびその中で利用可能な注釈の全て）をはじめとする、以下に列挙される全ての参考資料および本開示に引用された全ての参考資料は、それらが本明細書で用いられる方法論、技術および/または組成物を補足する、説明する、そのバックグラウンドを提供する、または教示する範囲内で、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【0163】

10

Banerjee et al. (2011) American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 300:G273-282.

Bergin et al. (2008) Journal of Biological Chemistry 283:31736-31744.

Deuss et al. (2008) Current Alzheimer Research 5: 187-201.

20

Edwards et al. (2008) Molecular Aspects of Medicine 29(5):258-289.

Guaiquil et al. (2009) Molecular and Cellular Biology 29(10):2694-2703.

Jefferson et al. (2013) Cellular and Molecular Life Sciences 70:309-333.

Kyte & Doolittle (1982) Journal of Molecular Biology 157:105-132.

30

Ludwig et al. (2005) Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 8(2):161-171.

Maretzky et al. (2017) The Biochemical Journal 474(9): 1467-1479.

Mauch et al. (2014) The Journal of Investigative Dermatology 130:2120-2130.

40

Miller et al. (2011) Integr Biol (Camb) 3:422-438.

Moss et al. (2008) Nature Clinical Practice Rheumatology 4(6):300-309.

Moss et al. (2011) Journal of Biological Chemistry 286(47):40443-40451.

50

Pruessmeyer & Ludwig (2009) Seminars in Cell & Developmental Biology 20(2): 164 - 174 .

Roychaudhuri et al. (2014) Journal of Immunology 193: 2469 - 2482 .

Sahin et al. (2004) The Journal of Cell Biology 164(5): 769 - 779 .

10

Schutte et al. (2014) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111: 12396 - 12401 .

Vazeille et al. (2011) Role of meprins to protect ileal mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive E. coli, PLoS One 6:e21199 .

Wang et al. (2018) A Disintegrin and A Metalloproteinase-9 (ADAM9): A Novel Proteinase Culprit with Multifarious Contributions to COPD. American Journal of Respiratory and Critical

20

Care Medicine. Jun 4. doi: 10.1164/rccm.201711-2300OC. [Epub ahead of print]

Wong et al. (2015) Journal of Biological Chemistry 290(19): 12135 - 12146 .

30

Wong et al. (2016) Scientific Reports 6: 35598 .

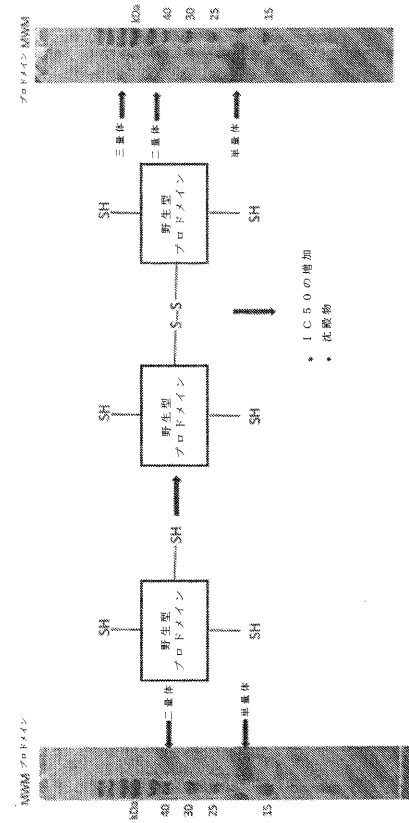
Zhou et al. (2006) Cancer Cell 10(1): 39 - 50 .

【0164】

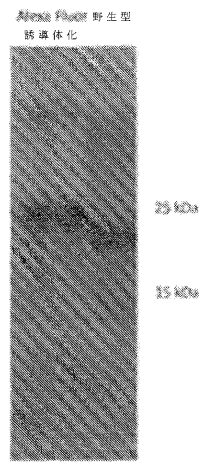
本明細書に開示された主題の様々な詳細が、本明細書に開示された主題の範囲を逸脱することなく変更され得ることは、理解されよう。さらに、前述の記載は、例示を目的とし、限定を目的とするものではない。

40

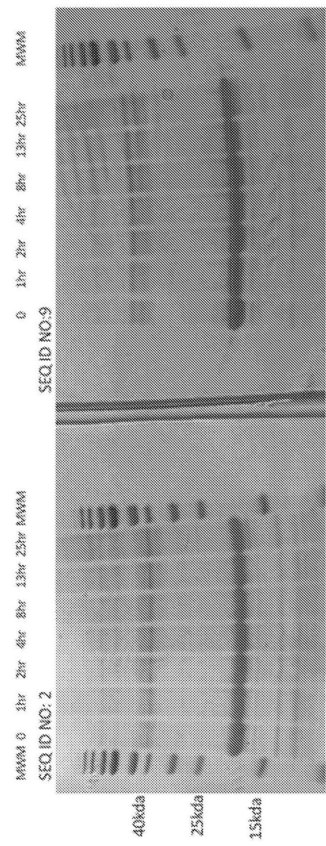
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】

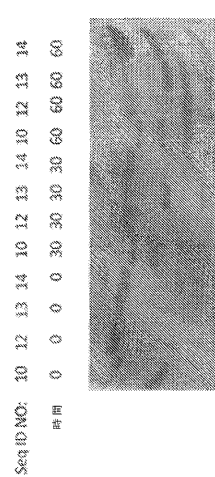
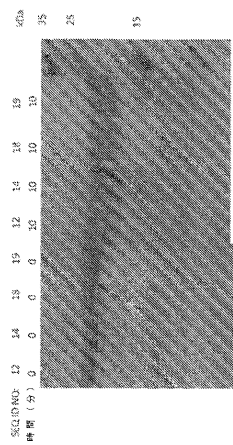
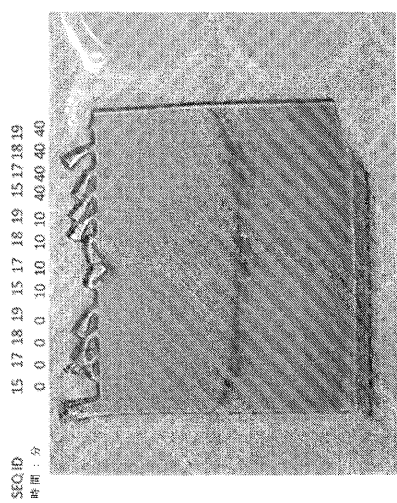


Fig. 2

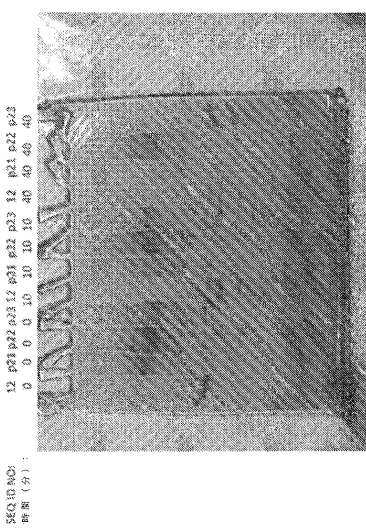
【 図 5 】



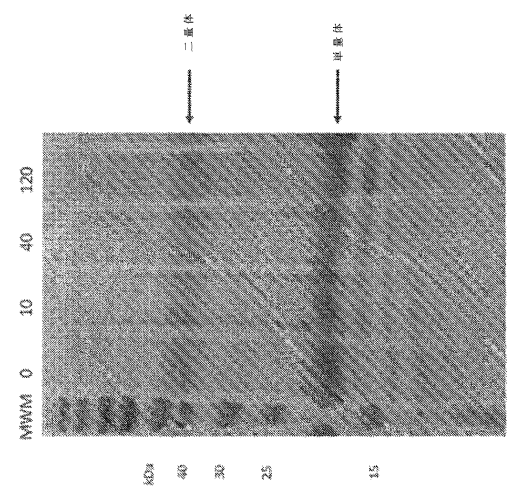
【 図 6 】



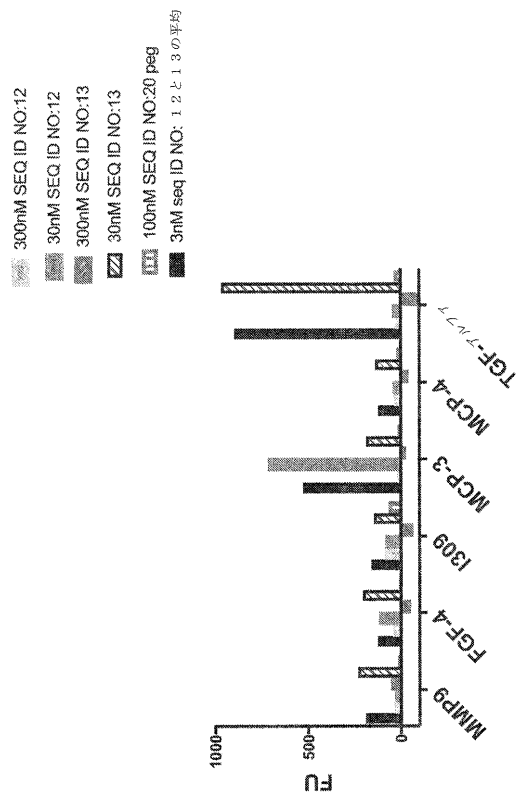
【 図 7 】



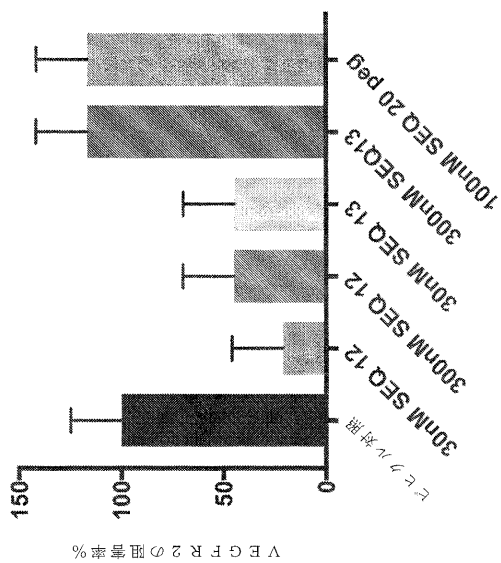
【 図 8 】



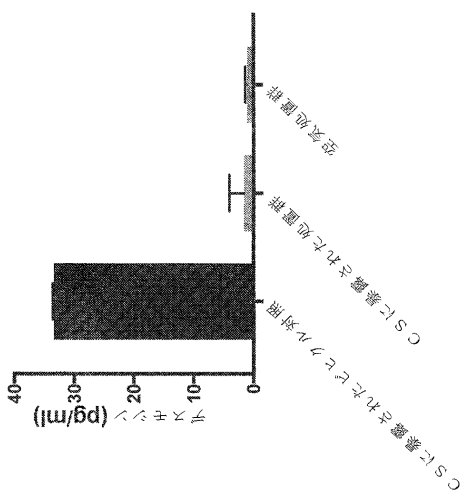
【 図 9 A 】



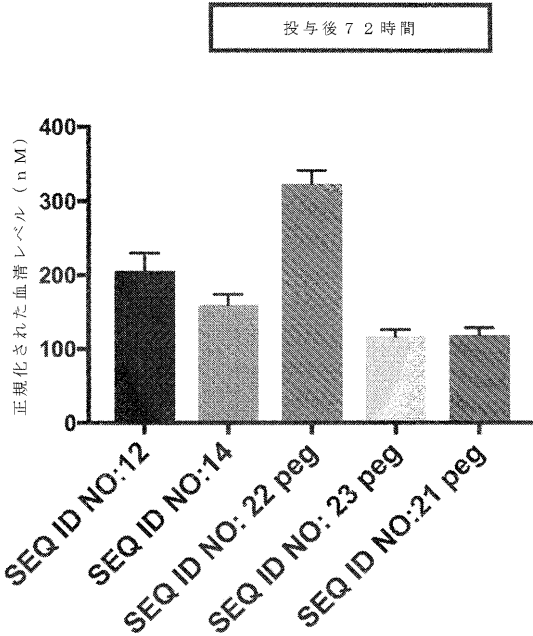
【 図 9 B 】



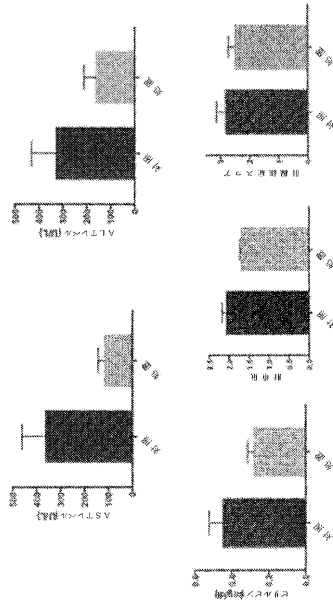
【 図 1 0 】



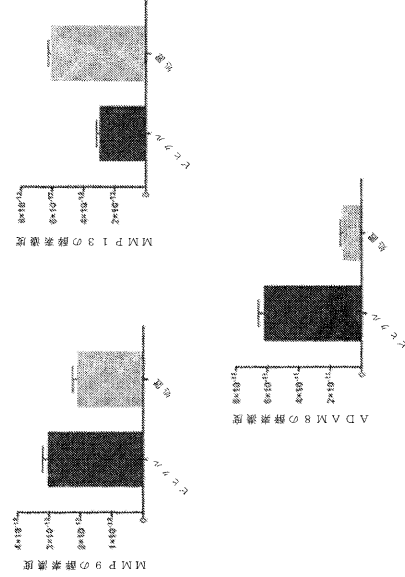
【 図 1 1 】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

2024170286000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和6年3月19日(2024.3.19)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO: 3 に示されたアミノ酸配列を含むか、前記配列から本質的になるか、または前記配列からなるペプチドであって、SEQ ID NO: 2 に示されたアミノ酸配列に比較して、前記ペプチドが、アミノ酸 6、7、24、26、27、61、62、85、104、137、138、146、160、161、162、163、および 164 からなる群から選択されるアミノ酸位置に 1 つまたは複数のアミノ酸置換および/または修飾を含み、そのため前記ペプチドが、前記 1 つまたは複数のアミノ酸置換および/または修飾のないペプチドに比較して、メブリンへの阻害性が低い、フリン切断への感度が低い、酸化および/もしくはジスルフィド結合形成への感受性が低い、またはその任意の組み合わせである、ペプチド。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 K	47/60	(2017.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	38/57	(2006.01)	A 6 1 K	38/57	
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
(74)代理人	100202751				
	弁理士 岩堀 明代				
(74)代理人	100208580				
	弁理士 三好 玲奈				
(74)代理人	100191086				
	弁理士 高橋 香元				
(72)発明者	モス, マルシア, エル .				
	アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 5 2 3 , エーペックス, オールド ホワイト オーク				
	チャーチ ロード 1 5 1 3				
(72)発明者	プリンス, クリス				
	アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 4 8 5 0 , イサカ, イースト ショア ドライブ 1 1 0 6				
(72)発明者	ラスムッセン, ロバート				
	アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 4 8 8 2 , ランシング, アズベリー ロード 1 2 7				
F ターム(参考)	4C076 AA95 BB01 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB22 BB24 BB29 BB30 BB31 CC01 CC04				
	CC11 CC15 CC19 CC27 EE59 FF31 FF63				
	4C084 AA02 AA07 BA02 BA22 CA18 DC32 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA60 MA63 MA65				
	NA14 ZA161 ZA162 ZA361 ZA362 ZA591 ZA592 ZA891 ZA892 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZC201				
	ZC202				
	4C085 AA14 BB11 EE01 GG01 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08				
	4H045 AA10 AA30 BA40 BA41 BA57 BA72 DA56 EA20				