

(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2018-80159

(P2018-80159A)

(43) 公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47 ZNA	4C076
C07K 7/00 (2006.01)	C07K 7/00	4C084
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C085
A61K 45/08 (2006.01)	A61K 45/08	4C093
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4C096
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-205389 (P2017-205389)
 (22) 出願日 平成29年10月24日(2017.10.24)
 (31) 優先権主張番号 特願2016-212199 (P2016-212199)
 (32) 優先日 平成28年10月28日(2016.10.28)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(71) 出願人 504205521
 国立大学法人 長崎大学
 長崎県長崎市文教町1-14
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宜
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子
 (74) 代理人 100163658
 弁理士 小池 順造
 (74) 代理人 100174296
 弁理士 當麻 博文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Survivin標的ペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】最も癌に特異的蛋白質の一つである、Survivin蛋白質中の染色体パッセンジャー複合体(CPC)形成に寄与する領域に高親和性で結合できるペプチド、及び癌の治療や診断等における当該ペプチドの用途の提供。

【解決手段】特定のアミノ酸配列又はその変異体配列を有する、Survivinと結合できるIN CENP又はBorealin由来のペプチド、該ペプチドに1以上の成分が結合したコンジュゲート、及び、癌の治療や診断為において使用するための該ペプチド又は該コンジュゲートを含む組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記(i)-(iv)のいずれかのアミノ酸配列を有する、Survivinと結合できるINCENPまたはBorealin由来のペプチド。

(i) 配列番号4-9からなる群から選択されるいずれかの配列番号に示されるアミノ酸配列、

(ii) 前記(i)のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはこれらの組み合わせを有するアミノ酸配列、

(iii) 前記(i)または(ii)のアミノ酸配列において、N末端、C末端、またはN末端とC末端の両方に1-20個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、

(iv) 前記(i)-(iii)のいずれかのアミノ酸配列のRetro-inversoであるアミノ酸配列。

10

【請求項 2】

下記(i')-(iv')のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のペプチド。

(i') 配列番号4または9に示されるアミノ酸配列、

(ii') 前記(i')のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはこれらの組み合わせを有するアミノ酸配列、

(iii') 前記(i')または(ii')のアミノ酸配列において、N末端、C末端、またはN末端とC末端の両方に1-20個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、

(iv') 前記(i')-(iii')のいずれかのアミノ酸配列のRetro-inversoであるアミノ酸配列。

20

【請求項 3】

配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号9に示されるアミノ酸配列、および配列番号9に示されるアミノ酸配列において1番目または7番目のロイシンをシクロロイシンに置換したアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 または 2 に記載のペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドおよび1つ以上の成分を含む、コンジュゲート。

【請求項 5】

前記1つ以上の成分が膜透過性物質を含む、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

前記膜透過性物質が、(D-Arg)_n (D-ArgはアルギニンのD体を示し、nは6-12の整数を示す) である、請求項 5 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 7】

前記1つ以上の成分が抗がん剤を含む、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記1つ以上の成分ががん治療用の放射性核種を含む、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

前記 1 つ以上の成分が検出可能な物質を含む、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 10】

前記検出可能な物質が、X線撮影、コンピュータ断層撮影 (CT)、核磁気共鳴画像法 (MRI)、超音波検査、シンチグラフィ、ポジトロン断層法 (PET)、内視鏡、および腹腔鏡からなる群から選択される手段によりインビボにおける該コンジュゲートの検出を可能にするものである、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

前記検出可能な物質が、放射性核種、MRI用増強剤、放射線不透過性物質、造影剤、または蛍光性物質である、請求項 9 または 10 に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

50

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは請求項 4 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む、がんの治療用組成物。

【請求項 14】

請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む、がんの検査用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、概してはがん生物学の分野に関し、より詳細にはSurvivinに結合するペプチドおよびその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

Survivin (サバイビン) は、最もがん特異的な蛋白質の一つであり、その発現レベルの高いがん組織は、抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示し、予後不良に繋がる (非特許文献 1)。Survivinは、最も小さなInhibitor of apoptosis (IAP) 蛋白質ファミリーの一つであり、XIAP等の他のIAP蛋白質と結合してカスパーゼの作用を阻害することでアポトーシスの阻害を行う。また、染色体の運搬を担う複合体の構成蛋白質であり、染色体の位置、紡錘体の集合、細胞質分裂を調節している。Survivinは、がんの進行に深く関与するPI3K/AKT経路により活性化される。また、がん抑制遺伝子のp53により発現抑制を受ける。多くのがん細胞では、上記のシグナル伝達が制御不能になっており、結果的にSurvivinは殆どのがん細胞で高発現している。また、Survivinの発現上昇に伴い、抗アポトーシス機能や細胞分裂機能が亢進するため、あらゆるがん治療への抵抗性が上昇することが知られている。このため、Survivinを標的とした薬剤は、がん選択的な抗がん剤や放射線増感剤として期待されている (非特許文献 2、3)。

20

【0003】

そこでこれまでに、Survivinを標的とした抗がん剤の開発に関して、間接的にSurvivinの発現阻害作用を誘導するYM155 (特許文献 1) やアンチセンス薬剤であるLY2181308 (特許文献 2) が第II相臨床試験中であるが、その臨床における抗がん剤としての有効性に関しては未だ十分な確証が得られておらず、Food and Drug Administration (FDA) やEuropean Medicines Agency (EMA) あるいは厚生労働省より承認された薬剤は未だ得られていない。一方、Survivin蛋白質のN末端領域における二量体形成部位へ直接結合できるフェネチルインドリノン誘導體 (特許文献 3) 等が報告されており、新たな抗がん剤としての応用が期待されているが、Survivinに対する選択性も不明であり、抗がん剤として応用可能であるか否かは疑問が残っており、未だ臨床応用には至っていない (非特許文献 3 - 5)。

30

【0004】

通常、Survivin蛋白質は細胞質中でダイマーとして存在しているが、細胞分裂の際にセントロメアに移行してBorealinおよびINCENPと共に染色体パッセンジャー複合体 (CPC) を形成し、モノマーの状態になることが報告されている (非特許文献 6)。これまでに図 1 左に示すようなSurvivinのN末端領域にある二量体形成部位を標的とした低分子化合物は報告されているが、図 1 右に示すようなSurvivinのC末端領域を標的とした化合物またはSurvivin単量体を標的とした化合物の開発に関しては報告例が全くない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】EP2609920 A1

【特許文献 2】US7288530 B2

50

【特許文献3】WO2010083505 A1

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Mita et al., Clin. Cancer Res., 2008, 14, 5000-5005

【非特許文献2】Altieri, Nat. Rev. Cancer, 2008, 8, 61-70

【非特許文献3】Coumar et al., Cancer Treat Rev., 2013, 39, 802-811

【非特許文献4】Wendt et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, 17, 3122-3129

【非特許文献5】Berezov et al., Oncogene, 2012, 31, 1938-1948

【非特許文献6】Jeyaprakash et al., Cell, 2007, 131, 271-285

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は当該技術分野における上述の現状に鑑みて為されたものであり、Survivin蛋白質中の染色体パッセンジャー複合体(CPC)形成に寄与する領域に高親和性で結合できるペプチドおよびその用途を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために、細胞分裂時にSurvivinへ強い結合相互作用を示すINCENPおよびBorealinのアミノ酸配列(上記非特許文献6)に注目し、INCENP₇₋₄₇(INCENP蛋白質の7-47番目のアミノ酸残基からなるペプチド)およびBorealin₂₀₋₇₅(Borealin蛋白質の20-75番目のアミノ酸残基からなるペプチド)のいずれかの部分アミノ酸配列を有する7-22アミノ酸残基からなる種々の部分ペプチド、およびそれらの各種改変ペプチドを設計し、設計したこれらのペプチドをSurvivin蛋白質との結合親和性について評価することにより、Survivinに高親和性で結合できるペプチドを同定することに成功した。本発明者らは更に、ヒト乳がん細胞株を用いた試験により、同定したペプチドが強い増殖抑制効果を有することを確認した。本発明者らはこれらの発見に基づき更に検討を進め、本発明を完成するに至った。

【0009】

本発明は即ち、以下を提供する。

[1] 下記(i)-(iv)のいずれかのアミノ酸配列を有する、Survivinと結合できるINCENPまたはBorealin由来のペプチド。

(i) 配列番号4-9からなる群から選択されるいずれかの配列番号に示されるアミノ酸配列

(ii) 前記(i)のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはこれらの組み合わせを有するアミノ酸配列、

(iii) 前記(i)または(ii)のアミノ酸配列において、N末端、C末端、またはN末端とC末端の両方に1-20個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、

(iv) 前記(i)-(iii)のいずれかのアミノ酸配列のRetro-inversoであるアミノ酸配列。

[2] 下記(i')-(iv')のいずれかのアミノ酸配列を有する、上記[1]に記載のペプチド。

(i') 配列番号4または9に示されるアミノ酸配列、

(ii') 前記(i')のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはこれらの組み合わせを有するアミノ酸配列、

(iii') 前記(i')または(ii')のアミノ酸配列において、N末端、C末端、またはN末端とC末端の両方に1-20個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、

(iv') 前記(i')-(iii')のいずれかのアミノ酸配列のRetro-inversoであるアミノ酸配列。

[3] 配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号9に示されるアミノ酸配列、および配列番号9に示されるアミノ酸配列において1番目または7番目のロイシンをシクロロイシンに置換したアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、上記[1]または[2]に記載のペプチド。

10

20

30

40

50

[4] 上記 [1] ~ [3] のいずれかに記載のペプチドおよび1つ以上の成分を含む、コンジュゲート。

[5] 前記1つ以上の成分が膜透過性物質を含む、上記 [4] に記載のコンジュゲート。

[6] 前記膜透過性物質が、(D-Arg)_n (D-ArgはアルギニンのD体を示し、nは6-12の整数を示す) である、上記 [5] に記載のコンジュゲート。

[7] 前記1つ以上の成分が抗がん剤を含む、上記 [4] ~ [6] のいずれかに記載のコンジュゲート。

[8] 前記1つ以上の成分ががん治療用の放射性核種を含む、上記 [4] ~ [7] のいずれかに記載のコンジュゲート。

[9] 前記1つ以上の成分が検出可能な物質を含む、上記 [4] ~ [6] のいずれかに記載のコンジュゲート。 10

[10] 前記検出可能な物質が、X線撮影、コンピュータ断層撮影 (CT)、核磁気共鳴画像法 (MRI)、超音波検査、シンチグラフィ、ポジトロン断層法 (PET)、内視鏡、および腹腔鏡からなる群から選択される手段によりインビボにおける該コンジュゲートの検出を可能にするものである、上記 [9] に記載のコンジュゲート。

[11] 前記検出可能な物質が、放射性核種、MRI用増強剤、放射線不透過性物質、造影剤、または蛍光性物質である、上記 [9] または [10] に記載のコンジュゲート。

[12] 上記 [1] ~ [3] のいずれかに記載のペプチドまたは上記 [4] ~ [11] のいずれかに記載のコンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[13] 上記 [1] ~ [3] のいずれかに記載のペプチドまたは上記 [4] ~ [8] のいずれかに記載のコンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む、がんの治療用組成物。 20

[14] 上記 [9] ~ [11] のいずれかに記載のコンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む、がんの検査用組成物。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、Survivin蛋白質中の染色体パッセンジャー複合体 (CPC) 形成に寄与する領域に高親和性で結合できるペプチド、およびがんの治療や診断などにおける当該ペプチドの用途が提供される。

【0011】

本発明によるペプチドは、単一分子としてもがん治療への応用が期待されるが、既存の抗がん剤との併用療法による新たながん治療戦略や既存の抗がん剤を結合させたがん選択性の高い新規抗がん剤への応用も可能である。また、⁹⁰ 等の治療用放射性核種を導入することで、がん選択性の高い内用放射線治療薬剤への応用が可能である。また、⁵⁸G等の核医学診断用放射性核種を導入することで、がん選択性の高い画像診断薬剤への応用も可能である。 30

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】Survivin指向性分子の標的部位の概要を示す図である。

【図2】ヒト組換えSurvivin蛋白質の生成を確認するためのウエスタンブロッティングの結果を示す図である。 40

【図3】FITC標識したINC₁₆₋₂₂ (FITC-INC₁₆₋₂₂) のHeLa細胞を用いた蛍光染色実験の結果を示す図である。

【図4】r9-INC₁₆₋₂₂の抗腫瘍活性をMTTアッセイを用いて評価した結果 (左) を、既存のSurvivin二量体形成部位を標的とした低分子化合物S12を用いて得られた結果 (右) と対比して示す図である。

【図5】MTTアッセイによる各種化合物の抗腫瘍活性評価を示す図である。

【図6】化合物添加によるMIA PaCa-2のSurvivin蛋白発現量変化を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

10

20

30

40

50

1. ペプチド

本発明は、下記(i)-(iv)のいずれかのアミノ酸配列を有する、Survivinと結合できるINCENPまたはBorealin由来のペプチドを提供する。

(i) 配列番号4-9からなる群から選択されるいずれかの配列番号に示されるアミノ酸配列、

(ii) 前記(i)のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはこれらの組み合わせを有するアミノ酸配列、

(iii) 前記(i)または(ii)のアミノ酸配列において、N末端、C末端、またはN末端とC末端の両方に1-20個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、

(iv) 前記(i)-(iii)のいずれかのアミノ酸配列のRetro-inversoであるアミノ酸配列。

10

【0014】

本明細書において、鎖状ペプチドのアミノ酸配列は、ペプチド標記の慣例に従って左側がN末端側、右側がC末端側で記載される。また、一文字または三文字表記の各アミノ酸記号は該アミノ酸のL体を示す。本明細書において、上記(i)-(iv)のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドを総称して、本発明のペプチドという。

【0015】

本発明のペプチド(後述のコンジュゲートについても同様。以下同じ。)はSurvivinに結合できる。Survivinは、上述の通り、公知のタンパク質であり、種々の生物種についてSurvivinの遺伝子配列およびアミノ酸配列が知られている。例えば、ヒトSurvivinの蛋白質のRefSeq No. NP_001159.2(配列番号1)。本発明のペプチドは、単量体Survivinおよび/または二量体Survivinに結合するものであってよい。本発明のペプチドは、Survivin蛋白質中の染色体パッセンジャー複合体(CPC)形成に寄与する領域、即ち、Survivin蛋白質中のINCENPおよび/またはBorealinと相互作用する領域に結合し得る。より詳細には、本発明のペプチドは、ヒトSurvivin中の、配列番号1における7-15番目のアミノ酸からなる領域、および/または、C末端領域(具体的には、配列番号1における93-141番目のアミノ酸からなる領域)に結合し得る。本発明のペプチドは、例えばヒトSurvivinとの分子間相互作用をQCM(Quartz Crystal Microbalance)法を用いて測定したときに、通常300 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは、150 nM未満、140 nM未満、130 nM未満、120 nM未満、110 nM未満、100 nM未満、90 nM未満、80 nM未満、70 nM未満、60 nM未満、50 nM未満、40 nM未満、30 nM未満、20 nM未満、または15 nM未満の解離定数(K_d 値)を有し得る。上記測定のために、例えば後述の実施例に記載されるヒト組換えSurvivin蛋白質を用いることができる。本発明のペプチドは、Survivinに特異的に結合するものであり得る。

20

30

【0016】

本発明のペプチドは、好ましくは、腫瘍細胞(特に、Survivinを発現する腫瘍細胞)に対するアポトーシス誘導活性を有する。従って、本発明のペプチドは、好ましくは、抗腫瘍活性を有する。本発明のペプチドが抑制し得る腫瘍としては、例えば、本発明の組成物に関連して後述する各種のがんが挙げられる。

【0017】

本発明のペプチドは、INCENPまたはBorealinのアミノ酸配列に由来し、特にINCENPまたはBorealinにおいてSurvivinとの結合相互作用に関与する領域のアミノ酸配列に由来する。INCENPおよびBorealinについても公知のタンパク質であり、種々の生物種についてINCENPおよびBorealinの遺伝子配列およびアミノ酸配列が知られている。例えば、ヒトINCENPについてタンパク質のRefSeq No. NP_001035784.1(配列番号2); ヒトBorealinについてタンパク質のRefSeq No. NP_060571.1(配列番号3)。本発明のペプチドは、ヒトINCENP中の、配列番号2における7-47番目のアミノ酸からなる部分配列、または、ヒトBorealin中の、配列番号3における20-75番目のアミノ酸からなる部分配列に由来するものであり得る。

40

【0018】

より詳細には、上記(i)のアミノ酸配列において、

50

DQKLMEF (配列番号4) は、ヒト INCENP 中の、配列番号2における16-22番目のアミノ酸からなる部分配列であり、

LCNMDNKD (配列番号5) は、ヒト INCENP 中の、配列番号2における23-30番目のアミノ酸からなる部分配列であり、

LVWLEEIQ (配列番号6) は、ヒト INCENP 中の、配列番号2における31-38番目のアミノ酸からなる部分配列であり、

KLASFLKDFDREVEIRIKQIES (配列番号7) は、ヒト Borealin 中の、配列番号3における20-41番目のアミノ酸からなる部分配列であり、

QIESDRQNLLKEVDNLYNIEIL (配列番号8) は、ヒト Borealin 中の、配列番号3における38-59番目のアミノ酸からなる部分配列であり、

LREMNWLDYFA (配列番号9) は、ヒト Borealin 中の、配列番号3における65-75番目のアミノ酸からなる部分配列である。

【0019】

上記(ii)のアミノ酸配列における変異(即ち、挿入、置換、欠失、およびこれらの組み合わせ)の位置は特に限定されない。当該変異は、(a)挿入のみ、(b)置換のみ、(c)欠失のみ、(d)挿入および置換のみ、(e)挿入および欠失のみ、(f)置換および欠失のみ、または(g)挿入、置換および欠失の組み合わせから構成されるものであってもよい。上記(a)-(g)の変異の個数は、例えば1-数個(例、1-5個)、好ましくは1-4個、より好ましくは1-3個、更により好ましくは1または2個、いっそう好ましくは1個である。該変異は、元となるペプチドと比較して、Survivinへの結合親和性の向上、抗腫瘍活性の増大、および/または安定性の向上等の有利な作用を付与するものであり得る。

【0020】

上記(ii)のアミノ酸配列において挿入されるアミノ酸、および、上記(iii)のアミノ酸配列において付加されるアミノ酸は、任意のアミノ酸であってよい。該アミノ酸は、L型またはD型のアミノ酸であってよい。L型アミノ酸は、天然に存在するL型アミノ酸であってよく、例えば、いずれもL体である、グリシン、アラニン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、リジン、アルギニン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、トリプトファン、バリンなどが挙げられる。D型アミノ酸としては、例えば、上記したようなL型アミノ酸の光学異性体が挙げられる。なお、本明細書において、光学活性を示さないアミノ酸であるグリシンは、文脈に反しない限り、L型かつD型のアミノ酸であるとして読むことができる。

【0021】

上記(ii)のアミノ酸配列において挿入されるアミノ酸、および、上記(iii)のアミノ酸配列において付加されるアミノ酸は、37 C.F.R. 1.821-1.822に言及されるものなどの、修飾(modified)または特殊(unusual)アミノ酸であってよい。あるいは、一つの実施形態において、本発明のペプチドは修飾または特殊アミノ酸を含まない。修飾または特殊アミノ酸としては、例えば、3-アミノアジピン酸、 β -アラニン、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、 β -アミノイソブチル酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、2,4-ジアミノ酪酸、デスモシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ヒドロキシリジン、アロ-ヒドロキシリジン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリジン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、シクロロイシン、L-tert-ロイシン、オルニチン、ジメチルチロシンなどが挙げられる。

【0022】

上記(ii)のアミノ酸配列中の置換は、本発明のペプチドの機能(例えば、Survivinへの結合活性、アポトーシス誘導活性、抗腫瘍活性、または安定性等)を著しく損なわない限り特に限定されない。置換により導入されるアミノ酸は、上述したような任意のアミノ酸であってよい。該置換は、例えば保存的アミノ酸置換であってよい。「保存的アミノ酸

10

20

30

40

50

置換」は当該技術分野においてよく知られている。例えば、保存的アミノ酸置換は、側鎖の性質が類似するアミノ酸の間の置換として定義することができる。従って、保存的アミノ酸置換は、例えば、(1)芳香族アミノ酸 (Phe、Trp、Tyr) の間の置換、(2)非極性脂肪族アミノ酸 (Gly、Ala、Val、Leu、Met、Ile、Pro) の間の置換、(3)非電荷極性アミノ酸 (Ser、Thr、Cys、Asn、Gln) の間の置換、(4)塩基性アミノ酸 (Lys、Arg、His) の間の置換、または(5)酸性アミノ酸 (Asp、Glu) の間の置換であり得る。該置換は、類似の構造を有するアミノ酸の間の置換であってもよい。そのような置換としては、例えば、グルタミンとグルタミン酸との間の置換、アスパラギンとアスパラギン酸との間の置換等が挙げられる。該置換はまた、上述したようなD型アミノ酸への置換、および/または、上述したような修飾または特殊アミノ酸への置換 (例えば、ロイシンのシクロロイシン、イソロイシン、L-tert-ロイシン等への置換、チロシンのジメチルチロシン等への置換、アラニンの α -アミノイソブチル酸、 β -アラニン等への置換、等) を含んでいてもよい。

10

【0023】

上記(ii)のアミノ酸配列における欠失は、例えば、元となる上記(i)のアミノ酸配列におけるN末端および/またはC末端から、1、2、または3アミノ酸の欠失であってもよい。

【0024】

具体的には、上記(ii)のアミノ酸配列として以下のものが挙げられる。

Asp-Gln-Lys-cLeu-Met-Glu-Phe (即ち、DQKLMEF (配列番号4) において、4番目のL (ロイシン) をcLeu (シクロロイシン) に置換したもの)、

Asp-Gln-Lys-Tle-Met-Glu-Phe (即ち、DQKLMEF (配列番号4) において、4番目のL (ロイシン) をTle (L-tert-ロイシン) に置換したもの)、

20

Glu-Gln-Lys-Leu-Met-Glu-Phe (配列番号10; 即ち、DQKLMEF (配列番号4) において、1番目のAsp (アスパラギン酸) をGlu (グルタミン酸) に置換したもの)、

Asp-Asn-Lys-Leu-Met-Glu-Phe (配列番号11; 即ち、DQKLMEF (配列番号4) において、2番目のGln (グルタミン) をAsn (アスパラギン) に置換したもの)、

Asp-Gln-Arg-Leu-Met-Glu-Phe (配列番号12; 即ち、DQKLMEF (配列番号4) において、3番目のLys (リシン) をArg (アルギニン) に置換したもの)、

Asp-Gln-Lys-Ile-Met-Glu-Phe (配列番号13; 即ち、DQKLMEF (配列番号4) において、4番目のL (ロイシン) をIle (イソロイシン) に置換したもの)、

Asp-Gln-Lys-Leu-Met-Asp-Phe (配列番号14; 即ち、DQKLMEF (配列番号4) において、6番目のGlu (グルタミン酸) をAsp (アスパラギン酸) に置換したもの)、

30

D-Asp- D-Gln- D-Lys- D-Leu- D-Met- D-Glu- D-Phe (即ち、DQKLMEF (配列番号4) において、全てのL-アミノ酸をD-アミノ酸に置換したもの)、

Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-cLeu-Asp-Tyr-Phe-Ala (即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9) において、7番目のL (ロイシン) をcLeu (シクロロイシン) に置換したもの)、

cLeu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala (即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9) において、1番目のLeu (ロイシン) をcLeu (シクロロイシン) に置換したもの)、

Ile-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala (配列番号15; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9) において、1番目のLeu (ロイシン) をIle (イソロイシン) に置換したもの)、

Tle-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala (即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9) において、1番目のLeu (ロイシン) をTle (L-tert-ロイシン) に置換したもの)、

40

Leu-Lys-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala (配列番号16; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9) において、2番目のArg (アルギニン) をLys (リシン) に置換したもの、

Leu-Arg-Asp-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala (配列番号17; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9) において、3番目のGlu (グルタミン酸) をAsp (アスパラギン酸) に置換したもの、

Leu-Arg-Glu-Met-Gln-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala (配列番号18; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9) において、5番目のAsn (アスパラギン) をGln (グルタミン) に置換したもの、

Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Phe-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala (配列番号19; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9) において、6番目のTrp (トリプトファン) をPhe (フェニルアラニン) に置換した

50

もの、

Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Ile-Asp-Tyr-Phe-Ala (配列番号20; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9)において、7番目のLeu (ロイシン)をIle (イソロイシン)に置換したもの、

Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Tle-Asp-Tyr-Phe-Ala (即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9)において、7番目のL (ロイシン)をTle (L-tert-ロイシン)に置換したもの)、

Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Glu-Tyr-Phe-Ala (配列番号21; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9)において、8番目のAsp (アスパラギン酸)をGlu (グルタミン酸)に置換したもの、

Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Dmt-Phe-Ala (配列番号22; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9)において、9番目のTyr (チロシン)をDmt (ジメチルチロシン)に置換したもの)

10

、
Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Val (配列番号23; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9)において、11番目のA (アラニン)をVal (バリン)に置換したもの)、

Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Aib (配列番号24; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9)において、11番目のA (アラニン)をAib (-アミノイソブチル酸)に置換したもの)、

Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe- bAla (配列番号25; 即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9)において、11番目のA (アラニン)をbAla (-アラニン)に置換したもの)、

D-Leu- D-Arg- D-Glu- D-Met- D-Asn- D-Trp- D-Leu- D-Asp- D-Tyr- D-Phe- D-Ala (即ち、LREMNLWDYFA (配列番号9)において、全てのL-アミノ酸をD-アミノ酸に置換したもの)

20

【0025】

上記(iii)のアミノ酸配列では、元となる上記(i)または(ii)のアミノ酸配列のN末端、C末端、またはN末端とC末端の両方に1-20個、好ましくは1-15個、より好ましくは、1-10個、1-9個、1-8個、1-7個、1-6個、1-5個、1-4個、1-3個、1-2個、または1個のアミノ酸が付加されている。付加されてもよいアミノ酸の種類については上述の通りである。N末端および/またはC末端に付加される好ましいアミノ酸またはアミノ酸配列としては、DQKLMEF (配列番号4)の誘導体に関しては、N末端にAspやGluのような酸性アミノ酸、C末端にPheやD-Phe等が挙げられ、LREMNLWDYFA (配列番号9)の誘導体に関しては、N末端にLeu、Ile、Tle、D-Leuのような疎水性アミノ酸、C末端にはAla、Val、Aibのような疎水性アミノ酸が挙げられる。

30

【0026】

ペプチドのRetro-inverso異性体は、元となるペプチドに対して、各アミノ酸残基のキラリティが反対であり("inverso")、かつアミノ酸配列の方向が反転している("Retro")ものをいう。Retro-inverso異性体は、元となるペプチドと類似の構造および機能を示すことが知られている(例えば、Acc. Chem. Res., 1993, 26 (5), pp 266-273、及びPLOS One. 2013 Dec 2;8(12):e80390)。

【0027】

本発明のペプチドは、上記(i)-(iv)から選択される配列を2つ以上含んでもよい。一実施形態において、本発明のペプチドは、上記(i)-(iv)のいずれかの配列のタンデムリピート(即ち、同一の配列部分が互いに直接的に連結された構造)を含む。別の実施形態において、本発明のペプチドは、上記(i)-(iv)の異なる2以上の配列が直接的に連結された構造を含む。あるいは、本発明のペプチドは、ループペプチドを介した環状2量体や、 dendrimerにより多価ペプチドを構成していてもよい。

40

【0028】

本発明のペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシ末端は、改変されていてもよい。アミノ末端の改変としては、メチル化(例えば、-NHCH₃、または-N(CH₃)₂)、アセチル化(例えば、酢酸またはそのハロゲン化誘導体による)などであってもよく、あるいはベンジルオキシカルボニル基、カルボキシレート官能基(RCOO-)もしくはスルホン基官能基(R-SO₂-)(ここでRは、アルキル、アリール、ヘテロアリール、およびアルキルア

50

ルールなどから選択される。)などの任意の保護基が導入されていてもよい。カルボキシ末端の改変としては、アミド化(-CONH₂)やエステル化(-COOR)などが挙げられる。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基；例えば、フェニル、*p*-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基；*p*-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

【0029】

本発明のペプチドは、N末端またはC末端以外においても種々の修飾を受けていてもよい。化学修飾は、例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化などであってもよい。本発明のペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されていてもよい。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。あるいは、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されていてもよい。本発明のペプチドは、Stapledペプチドとなるよう修飾されていてもよい(Walensky et al., Science, 2004, 305, 1466-1470.; Bernal et al., J Am Chem Soc. 2007, 129, 2456-2457.; Walensky et al., J Med Chem. 2014, 57, 6275-88.)。

10

【0030】

本発明のペプチドは遊離体であってもよいし、塩の形態であってもよい。本発明のペプチドの塩としては、医薬的に許容される酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硫酸、硝酸およびリン酸などの無機酸との塩、酢酸、リンゴ酸、コハク酸、酒石酸およびクエン酸などの有機酸との塩が挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウムおよびカリウムなどのアルカリ金属との塩、カルシウムおよびマグネシウムなどのアルカリ土類金属との塩、アンモニウムおよびトリエチルアミンなどのアミン類との塩が挙げられる。

20

【0031】

本発明のペプチドは、公知のペプチド合成法に従って製造することができる。ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。本発明のペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とするペプチドを製造することができる。

30

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の(1)-(8)に記載された方法に従って行うことができる。

(1) M. Bodanszky & M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966年)

(2) Schroeder & Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965年)

(3) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)(1975年)

(4) 矢島治明および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV 205 (1977年)

(5) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、廣川書店

40

(6) Stewart, J.M. & Young, J.D., "Solid phase peptide synthesis (2nd ed.)", Pierce Chemical Company, Rockford (1984年)

(7) Atherton, E. & Sheppard, R.C., "Solid Phase peptide synthesis: a practical approach", IRL Press, Oxford (1989年)

(8) "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Practical Approach Series)", Oxford University Press (2000年)

【0032】

このようにして得られたペプチドは、公知の精製法により精製単離することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

50

上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にペプチドが塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0033】

2. コンジュゲート

本発明はまた、上記の本発明のペプチドに1つ以上の成分が結合したコンジュゲート（以下、本発明のコンジュゲートともいう。）を提供する。

【0034】

該成分は、本発明のペプチドに連結させることができる限り特に限定されず、動物（例えばヒト）への投与に適したものであり得、また該動物の体内において何らかの機能を果たし得る。成分は天然物または非天然物であり得る。例えば、成分としては、生物学的材料（例えば、細胞、ファージ、ウイルスなど）、オリゴヌクレオチドおよび核酸（例えば、DNA、RNA、またはDNA/RNAキメラなど）、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質、抗体、脂質、多糖、低分子化合物（例えば、1000 Da以下の、有機または無機化合物）、粒子（例えば、金粒子、各種ナノ粒子など）、およびこれらの組み合わせなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0035】

該成分は、動物（例えばヒト）体内の標的部位において所与の機能性を果たし得る。該機能性の種類は特に限定されない。本発明のペプチドはSurvivinを標的化し得るので、該機能性の好ましい例として、膜透過性、抗がん活性、検出可能性の付与等が挙げられる。従って、該成分は、例えば、膜透過性物質、抗がん剤、がん治療用の放射性核種、または検出可能な物質であってもよい。また、該成分は、本発明のペプチド単独の場合と比較してSurvivinとの結合親和性を向上させるのもであってもよい。好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートは、(1) 膜透過性物質と、(2) 抗がん剤、がん治療用の放射性核種、および検出可能な物質から選択される少なくとも1つとを含む。

【0036】

（膜透過性物質）

膜透過性物質は、細胞膜に対する透過性を本発明のペプチドに付与する任意の物質であってもよい。膜透過性物質は、例えば、膜透過性ペプチドであり得る。膜透過性ペプチドとして、TAT、オリゴアルギニン（(Arg)_n；ここでnは6-12程度である。）、penetratin、TP-10等、またこれらのペプチドにおいて生体内での対酵素安定性や活性強化のために一部または全てのアミノ酸をD体としたもの等が当該技術分野において用いられており（例えば、D-TAT、(D-Arg)_n（nは6-12程度であり、例えば9、11）等）、このような膜透過性ペプチドを本発明のコンジュゲートにおける成分として適宜用いることができる（例えば、"Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)", Humana Press社刊、2010等を参照）。また、膜透過性物質として、膜透過性ポリジスルフィドを用いることもできる（E. Bang et al., J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 2088-2091）。

上記したような膜透過性物質は、本発明のペプチドと結合することにより、該ペプチド単独の場合と比較してSurvivinとの結合親和性を向上させる効果を有することがある。この目的のためには、上述した(D-Arg)_n（nは6-12程度である）、特にr9（D-アルギニンノナマー）を有する物質が好ましいものとして例示される。また、このような本発明のコンジュゲートとして具体的には例えば、配列番号4のペプチドまたはその誘導体と上記r9を含むコンジュゲート（例えば、実施例のr9-INC16-22）等が挙げられる。

【0037】

（抗がん剤）

本明細書において、抗がん剤とは、悪性腫瘍（がん）の増殖を抑えることを目的とした薬剤をいう。抗がん剤の作用機序は特に限定されない。抗がん剤は、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗がん性抗生物質、微小管阻害剤、白金製剤、トポイソメラーゼ阻害剤、分子標

10

20

30

40

50

的薬などであってよい。本発明のコンジュゲートは、2つ以上の同一または異なる抗がん剤を含んでいてもよい。

【0038】

代謝拮抗剤は、例えば、葉酸代謝拮抗薬、ジヒドロプテロイン酸シンターゼ阻害薬、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害薬（DHFR阻害薬）、ピリミジン代謝阻害薬、チミジル酸シンターゼ阻害薬、プリン代謝阻害薬、IMPDH阻害薬、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害薬、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害薬、ヌクレオチドアナログ、L-アスパラギナーゼなどであってもよい。代謝拮抗剤の具体例としては、エノシタピン（サンラビン）、カペシタピン（ゼローダ）、カルモフル（ミフロール）、クラドリピン（ロイスタチン）、ゲムシタピン（ジェムザール）、シタラビン（キロサイド）、シタラビンオクホスファート（スタラシド）、テガフル（アチロン、アフトフル、テフシール、フトラフル、ルナシンほか）、テガフル・ウラシル（ユーエフティ）、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム（TS-1:ティーエスワン）、ドキシフルリジン（フルツロン）、ネララビン（アラノンジー）、ヒドロキシカルバミド（ハイドレア）、フルオロウラシル（5-FU、カルゾナール、ベンナン、ルナコール、ルナボン）、フルダラビン（フルダラ）、ペメトレキセド（アリムタ）、ペントスタチン（コホリン）、メルカプトプリン（ロイケリン）、メトトレキサート（メソトレキサート）などが挙げられる。

10

【0039】

アルキル化剤の具体例としては、シクロホスファミド（エンドキサン）、イホスファミド（イホマイド）、メルファラン（アルケラン）、ブスルファン、チオテパ（テスパミン）などのナイトロジェンマスタード系アルキル化剤、ニムスチン（ニドラン）、ラニムスチン（サイメリン）、ダカルバシン（ダカルバシン）、プロカルバシン（塩酸プロカルバシン）、テモゾロマイド（テモダール）、カルムスチン（ギリアデル）、ストレプトゾトシン（ザノサー）、ベンダムスチン（トレアキシン）などのニトロソウレア系アルキル化剤などが挙げられる。

20

【0040】

抗がん性抗生物質の具体例としては、アクチノマイシンD（コスメゲン）、アクラルピシン（アクラシノン）、アムルピシン（カルセド）、イダルピシン（イダマイシン）、エピルピシン（エピルピシン塩酸塩、ファモルピシン）、ジノスタチンスチマラマー（スマンクス）、ダウノルピシン（ダウノマイシン）、ドキシソルピシン（アドリアシン）、ピラルピシン（ピノルビン、テラルピシン）、プレオマイシン（プレオ）、ペプロマイシン（ペプレオ）、マイトマイシンC（マイトマイシン）、ミトキサントロン（ノバントロン）、リボソーマルドキシソルピシン（ドキシル）などが挙げられる。

30

【0041】

微小管阻害剤は、例えば、ピンラスチン（エクザール）やピンクリスチン（オンコピン）、ピンデシン（フォルデシン）などのピンカアルカロイド系微小管重合阻害薬、バクリタキセル（タキソール）やドセタキセル（タキソテル）などのタキサン系微小管脱重合阻害薬などが挙げられる。

【0042】

白金製剤としては、例えば、オキサリプラチン（エルプラット）、カルボプラチン（カルボプラチン、カルボメルク、パラプラチン）、シスプラチン（アイエーコール、コナブリ、シスプラチンなど）、ネダプラチン（アクプラ）などが挙げられる。

40

【0043】

トポイソメラーゼ阻害剤としては、例えば、カンプトテシンおよびその誘導体（例えば、イリノテカン（カンプト）、ノギテカン（ハイカムチン）、SN-38など）などのI型トポイソメラーゼ阻害剤；ドキシソルピシン（アドリアシン）などのアントラサイクリン系薬物、エトポシド（ラステッド、ペプシド）などのエピポドフィロトキシ系薬物、レボフロキサシン（クラビット）やシプロフロキサシン（シプロキサ）などのキノロン系薬物などのII型トポイソメラーゼ阻害剤が挙げられる。

【0044】

50

分子標的薬としては、例えば、レゴラフェニブ（スチバーガ）、セツキシマブ（アービタックス）、パニツムマブ（ベクティビックス）、ラムシルマブ（サイラムザ）、ゲフィチニブ（イレッサ）、エルロチニブ（タルセバ）、アフアチニブ（ジオトリフ）、クリゾチニブ（ザーコリ）、アレクチニブ（アレセンサ）、セリチニブ、レンパチニブ（レンビマ）、トラスツズマブ（ハーセプチン）、ラパチニブ（タイケルブ）、ペルツズマブ（パージェタ）、スニチニブ（スーテント）、ソラフェニブ（ネクサパール）、アキシチニブ（インライタ）、パゾパニブ（ヴォトリエント）、ニボルマブ（オブジーボ）、ペムプロリズマブ、イピリムマブ（ヤーボイ）、ベムラフェニブ（ゼルボラフ）、エベロリムス（アフィニトール）、テムシロリムス（トーリセル）、リツキシマブ（リツキサン）、ペバシズマブ（アバステン）、ゲルダナマイシンなどが挙げられる。

10

【0045】

抗がん剤はまた、抗血管新生剤であってもよい。抗血管新生剤は、血管内皮成長因子（VEGF）もしくは他の血管新生因子、またはこれらの受容体を阻害するものであり得る。抗血管新生剤の具体例としては、アンジオスタチン、エンドスタチン、メタスタチン、抗VEGF抗体（例えば、アバステン）、VEGFR-2インヒビター（例えば、SU5416、SU6668）などが挙げられる。

【0046】

（がん治療用の放射性核種）

がん治療用の放射性核種は、高エネルギーの放射線を放出することにより標的とするがん細胞を死滅させることができる任意の放射性核種であってよい。該放射性核種としては、例えば、 ^{67}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{90}Sr 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{201}Tl 、 ^{223}Ra 等を用いることができるが、これらに限定されない。

20

【0047】

（検出可能な物質）

本明細書において、検出可能な物質とは、それを含む本発明のコンジュゲートを検出可能にする任意の物質をいう。好ましくは、検出可能な物質は、直接的にまたは適切な可視化もしくは画像化手段を用いて間接的に、インビボにおける本発明のコンジュゲートの検出を可能にする。可視化または画像化手段としては、例えば、X線撮影、コンピュータ断層撮影（CT）、核磁気共鳴画像法（MRI）、超音波検査、シンチグラフィ、ポジトロン断層法（PET）、内視鏡、腹腔鏡などが挙げられるが、これらに限定されない。検出可能な物質は、例えば、放射性核種、MRI用増強剤（例えば、常磁性イオン）、放射線不透過性物質、造影剤、蛍光性物質などであってもよい。

30

【0048】

PETに有用な放射性核種としては、例えば、 ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{110}In 、 ^{120}I 、 ^{124}I などが挙げられる。線の検出のために有用な放射性核種としては、例えば、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{97}Ru 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{169}Yb 、 ^{197}Hg 、 ^{201}Tl などが挙げられる。

【0049】

好適な常磁性イオンとしては、例えば、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジウム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、エルビウム(III)などが挙げられ、ガドリニウムが特に好ましい。また、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、ビスマス(III)などの金属もX線画像化などの用途において有用である。

40

【0050】

放射線不透過性物質および造影剤としては、例えば、ヨウ素化合物（例えば、ヨードカルボン酸などの有機ヨウ素酸、ヨードホルム、トリヨードフェノール、テトラヨードエチレンなど）、バリウム化合物（例えば、硫酸バリウムなど）、ガリウム化合物（例えば、クエン酸ガリウムなど）、タリウム化合物（例えば、塩化タリウムなど）などが挙げられ

50

る。

【0051】

蛍光性物質としては、例えば、ローダミン、フルオレセイン (FITC)、Cy dye、Alexa (登録商標) Fluor、フィコエリトリン (PE)、アロフィコシアニン (APC)、およびこれらの誘導体などが挙げられる。また、インドシアニンなどの近赤外線蛍光試薬も好ましい蛍光性物質として例示される。

【0052】

(本発明のペプチドと成分との結合)

本発明のコンジュゲートにおける本発明のペプチドと1つ以上の成分との間の結合の様式は特に限定されない。結合は、直接的なものであってもよいし、またはリンカーなどを介した間接的なものであってもよい。結合は、共有結合、非共有結合、またはこれらの組み合わせによるものであってもよい。1つ以上の成分は、直接的または間接的に、本発明のペプチドのN末端、C末端、またはそれ以外の位置において結合していてもよい。例えば、上記の膜透過性ペプチド等のペプチドと本発明のペプチドとは、直接的またはリンカーを介して間接的に、本発明のペプチドのN末端またはC末端にアミド結合を介して結合していてもよい。ペプチドと他の成分 (または第2のペプチド) との連結は当該技術分野において周知であり、本発明のコンジュゲートにおいても、該結合は任意の公知の手段によるものであってもよい。

【0053】

例えば、結合がリンカーを介する場合、NHSエステル、イミドエステル、マレイミド、カルボジイミド、アシルアジド、ジアジリン、イソシアン、ソラレンなどの公知のクロスリンカー (架橋剤) を用いることができる。また、1つ以上の成分がペプチドである場合、アミド結合を介した連結のために、 α -アミノカプロン酸リンカーなども好ましく用いることができる。用いるリンカーに応じて、本発明のペプチドを適宜改変してもよい。例えば、マレイミドリンカーとの結合のために、本発明のペプチドのC末端に予めシステインを付加することができる。

【0054】

また、上述したような放射性金属または常磁性イオンと本発明のペプチドとの連結のために、適切なキレート剤 (例えば、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N-N',N'',N'''-四酢酸 (DOTA) など) および/またはメタロチオネインなどを用いることができる。例えば、Culali Akto lun et al. 編, "Nuclear Medicine Therapy: Principles and Clinical Applications", Springer, 2013などを参照。

【0055】

3. 組成物

本発明はまた、本発明のペプチドまたはコンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む組成物 (以下、本発明の組成物ともいう。) を提供する。該組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供され得る。

【0056】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含し得る。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、本発明のペプチドまたはコンジュゲートを通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール (例、エタノール)、ポリアルコール (例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤 [例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)] などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液

は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、本発明のペプチドまたはコンジュゲートを通常の坐薬用基剤に混合することによって調製され得る。

【0057】

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

10

【0058】

なお前記した各組成物は、上記ペプチドまたはコンジュゲートとの配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【0059】

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げられる。ペプチドまたはコンジュゲートの含有量としては、投薬単位剤形当たり通常1~500mg、とりわけ注射剤では1~100mg、その他の剤形では10~250mgの上記ペプチドまたはコンジュゲートが含有されていることが好ましい。

20

【0060】

本発明の組成物に含まれる本発明のペプチドまたはコンジュゲートは、Survivinを標的化し得る。また、本発明のペプチドは、それ自体が抗腫瘍活性（アポトーシス誘導活性）を有し得る。従って、本発明の組成物は、標的化した悪性腫瘍の治療または予防等のために有用であり得る。また、該コンジュゲート中に検出可能な物質を含む本発明の組成物は、悪性腫瘍の検査または診断のために有用であり得る。

【0061】

悪性腫瘍（がん）は任意の種類のがんであってよく、固形がんまたは液性がんであってもよい。がんは、好ましくは、Survivinを発現するがんである。

【0062】

固形がんとしては、例えば、脳・神経系のがん（例えば、脳腫瘍、脊髄腫瘍など）、頭頸部がん（例えば、喉頭がん、口腔がん、唾液腺がん、副鼻腔がん、甲状腺がんなど）、消化器がん（例えば、胃がん、食道がん、小腸がん、結腸がん、直腸がん、肛門がん、肝臓がん、胆道がん、膵臓がんなど）、泌尿器または生殖器のがん（例えば、腎がん、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、腎盂および尿管がん、胆嚢がん、胆管がん、精巣がん、陰茎がん、子宮がん、子宮内膜がん、子宮肉腫、子宮頸がん、膣がん、外陰がん、卵巣がん、卵管がんなど）、呼吸器系のがん（例えば、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、転移性肺がんを含む）、気管支がんなど）、乳がん、皮膚がん（例えば、悪性黒色腫など）、骨のがん（例えば、骨肉腫など）、筋肉のがん（例えば、横紋筋肉腫など）などが挙げられる。

30

40

【0063】

液性がんとしては、白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異型性症候群などが挙げられる。白血病としては、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病などが挙げられる。悪性リンパ腫は、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に分類され、非ホジキンリンパ腫としては、B細胞性リンパ腫、成人T細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、MALTリンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫などが挙げられる。

【0064】

本発明の組成物は、Survivinを発現する動物、特に哺乳動物に投与され得る。哺乳動

50

物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなどのげっ歯類やウサギなどの実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンクなどの家畜、イヌ、ネコなどのペット、ヒト、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類などを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0065】

本発明の組成物の投与量は、投与目的、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なる。例えば、上述したようながんの治療・予防のために使用する場合には、抗がん剤を含む本発明のコンジュゲートを1回量として、通常0.1~10 mg/kg体重程度を、週1回、静脈注射または経口投与するのが好都合である。あるいは、上述したようながんの検査または診断のために使用する場合には、検出可能な物質を含む本発明のコンジュゲートを通常0.1~10 mg/kg体重程度、検査に先立って静脈注射または経口投与するのが好都合である。

【0066】

以下に実施例等を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例等により限定されるものではない。

【実施例】

【0067】

1. Survivinに高親和性で結合できるペプチドの開発

Survivinへ強固かつ特異的に結合できる分子の開発を目指し、細胞分裂時にSurvivinへ強い結合相互作用を示すINCENPおよびBorealinのアミノ酸配列 (Jeyaprakash et al., Cell, 2007, 131, 271-285) に注目し、INCENP₇₋₄₇ (INCENP蛋白質の7-47番目のアミノ酸残基からなるペプチド) およびBorealin₂₀₋₇₅ (Borealin蛋白質の20-75番目のアミノ酸残基からなるペプチド) のいずれかの部分アミノ酸配列を有する7-22アミノ酸残基からなる種々の部分ペプチドを設計した。

設計したINCENP誘導体のアミノ酸配列は以下の通りである。括弧内の数字はINCENP蛋白質中の位置を示す。

INC8a (7-14): GPIHLLEL (配列番号26)

INC8b (15-22): CDQKLMEF (配列番号27)

INC7 (16-22): DQKLMEF (配列番号4)

INC19 (16-34): DQKLMEFLCNMDNKDLVWL (配列番号28)

INC8c (23-30): LCNMDNKD (配列番号5)

INC8 (27-34): DNKDLVWL (配列番号29)

INC8d (31-38): LVWLEEIQ (配列番号6)

INC9 (39-47): EEAERMFTR (配列番号30)

設計したBorealin誘導体のアミノ酸配列は以下の通りである。括弧内の数字はBorealin蛋白質中の位置を示す。

BOR22A (20-41): KLASFLKDFDREVEIRIKQIES (配列番号7)

BOR22B (38-59): QIESDRQNLLKEVDNLYNIEIL (配列番号8)

BOR11 (65-75): LREMNWLDYFA (配列番号9)

【0068】

設計したINCENPまたはBorealinより誘導したペプチドを固相合成法にてそれぞれ合成し、水晶振動子マイクロバランス法 (株式会社イニシウム製AFFINIX Q) を用いて、ヒト組換えSurvivin蛋白質への結合親和性を評価した。評価に用いたヒト組換えSurvivin蛋白質は、文献記載の手法 (Chantalat et al., Mol. Cell. 2000, 6, 183-189.) と同様の手順にて作製した。すなわち、HeLa細胞よりRNAを抽出し、survivin forward primer [5' -GAGAGGATCCATGGGTGCCCGACGTTG-3' (配列番号31)], survivin reverse primer [5' -GAGAAAAGCTTGAGGCCTCAATCCATGGCAGCCAGCTGCTC-3' (配列番号32)] を用いてRT-PCRを行い、SurvivinのcDNAを合成した。得られたSurvivin cDNAをpMD20-T vectorへライゲーションし、大腸菌 (JM109) へトランスフォーメーションし、コロニーPCRにてSurvivin蛋白を発現できる大腸菌を選別した後、DNAシーケンシングを行い、Survivin蛋白をコードした

塩基配列 (GAGAGAGGATCCATGGGTGCCCGACGTTGCCCCCTGCCTGGCAGCCCTTTCTCAAGGACCACCGCATCTC
TACATTCAAGAACTGGCCCTTCTTGGAGGGCTGCGCCTGCACCCCGAGCGGATGGCCGAGGCTGGCTTCATCCACTGCC
CCACTGAGAACGAGCCAGACTTGGCCAGTGTTCCTTCTGCTTCAAGGAGCTGGAAGGCTGGGAGCCAGATGACGACCCC
ATAGAGGAACATAAAAAGCATTTCGTCCGGTTGCGCTTTTCTTTCTGTCAAGAAGCAGTTTGAAGAATTAACCCTTGGTGA
ATTTTTGAAACTGGACAGAGAAAAGAGCCAAGAACAATAAGAAAGAAAGAATTTGAGGAAA
CTGCGAAGAAAGTGCGCCGTGCCATCGAGCAGCTGGCTGCCATGGATTGAGGCCTCAAGCTTTCTCTC) (配列番号3
3) がベクターに組み込まれていることを確認した。GSTタグをコードしているpGEX-6P-1
vectorへSurvivin cDNAの組み換えを行い、大腸菌(BL21)にトランスフォーメーションさ
せた。大腸菌より抽出したGST-rSurvivinのGST tagを切断することで、ヒト組換えSurviv
in蛋白質を溶出・回収した。ヒト組換えSurvivin蛋白質の生成は、anti-survivin monoclonal antibody (D-8. sc-17779)を用いたウエスタンブロッティングにて確認した(図2)
。ウエスタンブロッティングでは、Survivin単量体の分子量(16.5 kDa)が検出されるが、
溶液状態ではヒト組換えSurvivin蛋白質は二量体であることが知られているため(Chantal
at et al., Mol. Cell. 2000, 6, 183-189.)、本実施例にて用いたヒト組換えSurvivin蛋
白質も二量体であると考えられる。

10

【 0 0 6 9 】

結果を下記表1および表2に示す。これらの表において、阻害定数 K_d の値(平均 ± SEM)
は、3回以上の独立した実験データを平均化することにより決定した。

【 0 0 7 0 】

【表 1】

20

INCENP 由来ペプチド

ペプチド	K_d (nM)
INC ₇₋₁₄	214.3 ± 46.3
INC ₁₅₋₂₂	248.0 ± 61.0
INC ₁₆₋₂₂	91.4 ± 4.9
INC ₁₆₋₃₄	160.0 ± 40.3
INC ₂₃₋₃₀	116.5 ± 20.4
INC ₂₇₋₃₄	254.5 ± 23.0
INC ₃₁₋₃₈	108.3 ± 14.7
INC ₃₉₋₄₇	134.6 ± 31.1

30

【 0 0 7 1 】

【表 2】

Borealin 由来ペプチド

40

ペプチド	K_d (nM)
BoR ₂₀₋₄₁	124.2 ± 68.3
BoR ₃₈₋₅₉	84.8 ± 21.3
BoR ₆₅₋₇₅	43.6 ± 10.7

【 0 0 7 2 】

50

上記表1および表2に示すように、設計したいずれのペプチド分子もSurvivinへの親和性を示したが、その値はアミノ酸配列によって大きく異なることが見出された ($K_d = 44-255$ nM)。また、INCENP由来の部分ペプチドの中ではINC₁₆₋₂₂ ($K_d = 91$ nM) が最も親和性が高く、Borealin由来の部分ペプチドの中ではBOR₆₅₋₇₅ ($K_d = 44$ nM) が最も親和性が高いことを発見した。

【0073】

更に、上記INC₁₆₋₂₂をFITC標識したFITC-INC₁₆₋₂₂を作製し、HeLa細胞を用いた蛍光染色実験を行ったところ、Survivinの発現が特に増加する分裂期の細胞において強い蛍光が観察され、またその染色部位は、Survivin蛋白質発現部位と一致していることが確認された(図3)。従って、本研究で設計した合成ペプチドはSurvivinを選択的に認識していることが示唆された。

【0074】

2. 改変ペプチドの開発

続いて、非天然配列のペプチド分子の開発を行い、INC_{16-22(Q17N)} ($K_d = 168$ nM)等のSurvivinへの親和性を有する合成ペプチドが得られた。更に、シクロロイシン等の特殊アミノ酸を導入したnn-INC₁₆₋₂₂ ($K_d = 97$ nM)およびnn-Bor₆₅₋₇₅ ($K_d = 14$ nM)を合成し、評価したところ、Survivinへの高親和性を有することが見出された(下記表3および表4)。特にnn-Bor₆₅₋₇₅は天然配列のペプチド分子よりもSurvivinへ高親和性を有することが判明した。高親和性ペプチドのアミノ酸配列をランダムに並び替えたスクランブルペプチド(sc-INC₁₆₋₂₂、sc-Bor₆₅₋₇₅)はSurvivinへの結合性を示さなかった($K_d > 1000$ nM)ことから、本発明のペプチド分子は、アミノ酸配列がSurvivin蛋白質の認識に極めて重要であることが明らかとなった。また、抗がん剤としての応用を考慮した膜透過性ペプチド(D-Arg)₉を導入したr9-INC₁₆₋₂₂ ($K_d = 52.1$ nM)ペプチド分子は、母体ペプチドよりも高いSurvivinへの親和性を有することが分かった。

【0075】

合成した改変ペプチドの配列をINC₁₆₋₂₂およびBor₆₅₋₇₅の配列と共に以下に示す。

INC₁₆₋₂₂: Asp-Gln-Lys-Leu-Met-Glu-Phe-NH₂ (配列番号4)

sc-INC₁₆₋₂₂: Gln-Leu-Asp-Met-Phe-Lys-Glu-NH₂ (配列番号34)

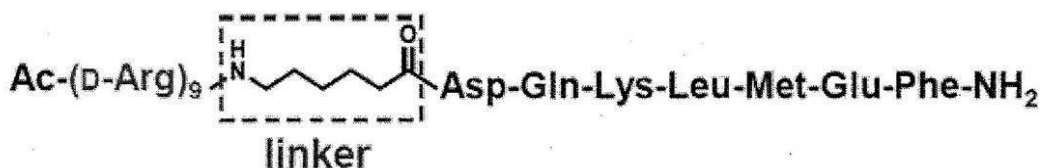
INC_{16-22(Q17N)}: Asp-Asn-Lys-Leu-Met-Glu-Phe-NH₂ (配列番号11)

nn-INC₁₆₋₂₂: Asp-Gln-Lys-cLeu-Met-Glu-Phe-NH₂

r9-INC₁₆₋₂₂:

【0076】

【化1】



【0077】

Bor₆₅₋₇₅: Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala-NH₂ (配列番号9)

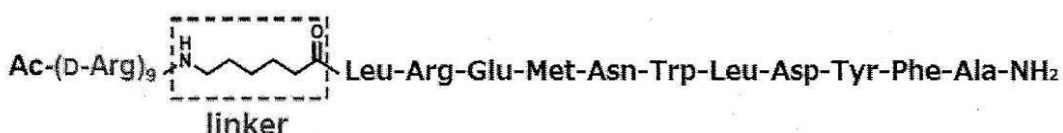
sc-Bor₆₅₋₇₅: Arg-Phe-Asn-Tyr-Glu-Leu-Met-Asp-Leu-Ala-Trp-NH₂ (配列番号35)

nn-Bor₆₅₋₇₅: Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-cLeu-Asp-Tyr-Phe-Ala-NH₂

r9-Bor₆₅₋₇₅:

【0078】

【化2】



【0079】

10

20

30

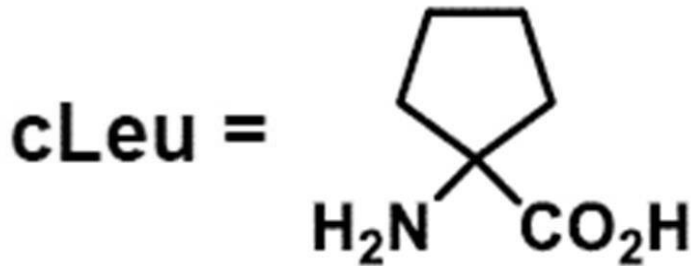
40

50

シクロロイシン (cLeu) の構造式は以下の通りである。

【 0 0 8 0 】

【 化 3 】



10

【 0 0 8 1 】

これらのペプチドについて得られたSurvivin蛋白質への結合親和性を下記表3および表4に示す。

【 0 0 8 2 】

【 表 3 】

ペプチド	K_d (nM)
INC ₁₆₋₂₂	91.4 ± 4.9
sc-INC ₁₆₋₂₂	> 300
INC _{16-22(Q17N)}	167.5 ± 27.4
nn-INC ₁₆₋₂₂	97.13 ± 24.3
r9-INC ₁₆₋₂₂	52.1 ± 13.0

20

【 0 0 8 3 】

【 表 4 】

ペプチド	K_d (nM)
Bor ₆₅₋₇₅	43.6 ± 10.7
sc-Bor ₆₅₋₇₅	> 1000
nn-Bor ₆₅₋₇₅	14.0
r9-Bor ₆₅₋₇₅	

40

【 0 0 8 4 】

3. ヒト乳がん細胞株を用いた抗腫瘍活性評価

r9-INC₁₆₋₂₂のMDA-MB-231細胞(ヒト乳がん細胞株)を用いた抗腫瘍効果をMTTアッセイ(Zhang et al., *Molecules*, 2016, 21, 620.; Cheng et al., *Oncotarget*, 2016, 7, 7096-7109.)にて評価したところ、1.0 μ Mで15%、10 μ Mで40%の強い増殖抑制効果が認められた(図4左)。既存のSurvivin二量体形成部位を標的とした低分子化合物S12(K_d = 2.7 nM; Berezov et al., *Oncogene*, 2012, 31, 1938-1948)も同様に評価したところ、1.0 μ Mで2.1%、10 μ Mで25%の増殖抑制効果にとどまった(図4右)。従って、本発明におけるr9-INC₁₆₋₂₂は、既存のSurvivin蛋白質を標的とした低分子化合物(S12)よりも高い

50

抗腫瘍活性を有することが示された。

【 0 0 8 5 】

4. Survivinに高親和性で結合できるペプチドの開発(2)

上記1. と同様にして、以下の配列：

Bor₆₅₋₇₅(A75V)：Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-cLeu-Asp-Tyr-Phe-Val-NH₂；

Bor₆₅₋₇₅(L65Cyl)：cLeu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-Leu-Asp-Tyr-Phe-Ala-NH₂

の改変ペプチドを合成し、ヒト組換えSurvivin蛋白質への結合親和性を評価した。また、

Bor₆₅₋₇₅(L71Cyl)：Leu-Arg-Glu-Met-Asn-Trp-cLeu-Asp-Tyr-Phe-Ala-NH₂；についてもヒト組換えSurvivin蛋白質への結合親和性を評価した。

Bor₆₅₋₇₅(L71Cyl)の配列は上記nn-Bor₆₅₋₇₅の配列と同一であり、再実験として行った。結果を表5に示す。

10

【 0 0 8 6 】

【表5】

ペプチド	Kd (nM)
Bor ₆₅₋₇₅ (A75V)	57.4±6.58
Bor ₆₅₋₇₅ (L65Cyl)	36.4±11.8
Bor ₆₅₋₇₅ (L71Cyl)	23.9±9.85

20

【 0 0 8 7 】

5. MTTアッセイによる各種化合物の抗腫瘍活性評価

MTTアッセイにより、INC₁₆₋₂₂、r9-INC₁₆₋₂₂、S12の各化合物の抗腫瘍活性を、MDA-MB-231細胞およびMIA PaCa-2細胞に対して評価した。また、Bor₆₅₋₇₅の抗腫瘍活性を、MIA PaCa-2細胞に対して評価した。MTTアッセイは、以下の手順で行った。

(1) MDA-MB-231細胞またMIA PaCa-2細胞を12又は48ウェルプレートに播種した。

(2) 培養開始24時間後に培地を取り除いて、各INCペプチドの1% DMSO入りの培地をそれぞれ最終濃度が0, 1, 10 μMになるように添加した。

30

(3) INCペプチド添加48時間後にMTT (5 mg/mL, PBS溶液)を添加し、37℃で4時間インキュベーションした。培地(+ MTT)を捨ててPBSで洗浄後、DMSOを加えてよく攪拌した。

(4) マイクロプレートリーダーにて570 nmの波長で測定し、650 nmの波長で測定したバックグラウンドを差し引いた。

(5) 化合物を添加していない条件での吸光度を100%生存として、生存曲線を作成した(生存曲線により、細胞の生存率を求めた)。

【 0 0 8 8 】

結果を図5に示す。左側のMDA-MB-231細胞についてのグラフでは、各化合物濃度において、それぞれ、左からINC₁₆₋₂₂、r9-INC₁₆₋₂₂及びS12のデータを示す。右側のMIA PaCa-2細胞についてのグラフでは、各化合物濃度において、それぞれ、左からINC₁₆₋₂₂、r9-INC₁₆₋₂₂、Bor₆₅₋₇₅及びS12のデータを示す。MDA-MB-231細胞に対しては、INC₁₆₋₂₂およびr9-INC₁₆₋₂₂は、10 μMで、生存率をそれぞれ約80%および約60%に低下させ、100 μMで、それぞれ約40%前後に低下させた(図5左)。既存のSurvivin二量体形成部位を標的とした低分子化合物S12(K_d = 2.7 nM; Berezov et al., Oncogene, 2012, 31, 1938-1948)も同様に評価したところ、10 μMでは生存率低下が認められず、100 μMで約60%に低下させる効果にとどまった(図5右)。従って、本発明におけるINC₁₆₋₂₂およびr9-INC₁₆₋₂₂は、既存のSurvivin蛋白質を標的とした低分子化合物(S12)よりも高い抗腫瘍活性を有することが示された。

40

【 0 0 8 9 】

50

MIA Paca-2細胞に対しては、INC₁₆₋₂₂、r9-INC₁₆₋₂₂およびBor₆₅₋₇₅は、0.1 μMで、生存率をそれぞれ約40～60%に低下させ、1 μMで約30～50%に低下させ、10 μMでも約30～50%に低下させた。

【0090】

6. 化合物添加によるMIA PaCa-2のSurvivin蛋白発現量変化

ウエスタンブロッティングを用いて、INC₁₆₋₂₂、r9-INC₁₆₋₂₂、S12の各化合物による、MIA PaCa-2細胞のSurvivin蛋白質発現量変化を解析した。実験は、以下の手順で行った。
<細胞質抽出液作製>

- (1) ディッシュで一晩MIA PaCa-2細胞を培養した。
- (2) 培地を除去し、PBSで2回細胞洗浄した。
- (3) 1% DMSO, BPI (40 μM), INC₁₆₋₂₂(40 μM), r9-INC₁₆₋₂₂ (40 μM)を加え、48 hr 培養した。
- (4) 培地を除去し、PBSで2回細胞洗浄した。
- (5) PBSを加え、セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。
- (6) 遠心(4,000 rpm, 5 min)後、上清を除去し、400 μL抽出バッファー(50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4)を加え、超音波処理(5 s × 6回)を行い、細胞を完全に破壊した。
- (7) 破砕液を15,000 rpm, 30 min, 4℃で遠心した。
- (8) 上清を回収し、細胞質画分の可溶性蛋白質溶液とした。

<ウエスタンブロッティング>

- (1) 細胞溶解液(MIA PaCa-2細胞)のSDS-PAGEを行った。
- (2) 泳動後のゲルを、転写装置を用いてP膜に転写した。P膜を洗浄後、5% skim milkを用いてP膜のブロッキングを行った。
- (3) 洗浄後、一次抗体 Survivin D-8(1:500)又は β -actin (1:500)を加え、4℃で一晩振とうした。
- (4) 洗浄後、二次抗体(1:2000)を加え、室温で1 hr 振とうした。
- (5) 洗浄後、Clarity Western ECL (化学発光試薬)を用いて、ChemIDoc Touch イメージングシステム(Bio-Rad)により、化学発光を観察した。

【0091】

結果を図6に示す。INC₁₆₋₂₂およびr9-INC₁₆₋₂₂は、MIA PaCa-2細胞のSurvivin蛋白質の発現を、それぞれ約70%および約60%に低下させた(図6)。S12も同様に作用させたところ、Survivin蛋白質の発現をやや低下させる効果にとどまった(図6)。複合体が形成できないSurvivin蛋白質は、分解されやすくなる傾向があるものと考えられる。なお、化合物の添加量は40 μMであり、コントロールは化合物無しの溶媒のみの添加であり、タンパク質発現量は β -actinにより補正した。

【産業上の利用可能性】

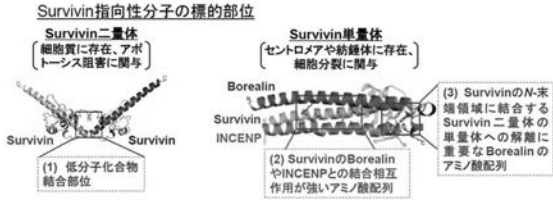
【0092】

本発明によれば、Survivin蛋白質中の染色体パッセンジャー複合体(CPC)形成に寄与する領域に高親和性で結合できるペプチド分子、ならびに当該ペプチドを利用することを特徴とするがんの治療剤および診断剤等が提供される。

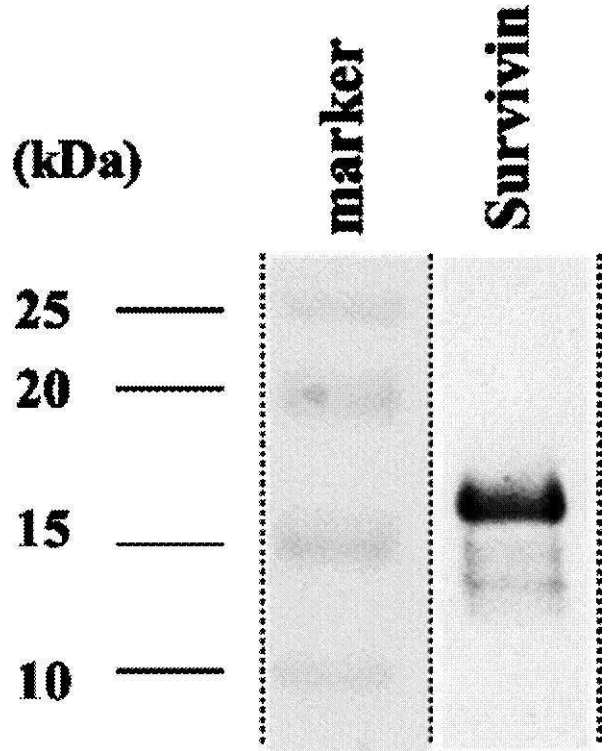
【0093】

本発明によるペプチドは、単一分子としてもがん治療への応用が期待されるが、既存の抗がん剤との併用療法による新たながん治療戦略や既存の抗がん剤を結合させたがん選択性の高い新規抗がん剤への応用も可能である。また、⁹⁰Y等の治療用放射性核種を導入することで、がん選択性の高い内用放射線治療薬剤への応用が可能である。また、⁵⁸G等の核医学診断用放射性核種を導入することで、がん選択性の高い画像診断薬剤への応用も可能である。

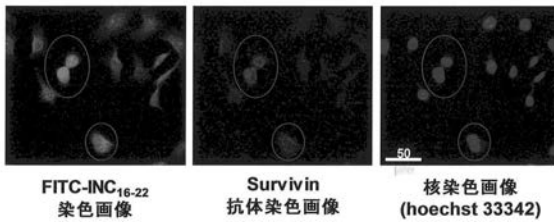
【 図 1 】



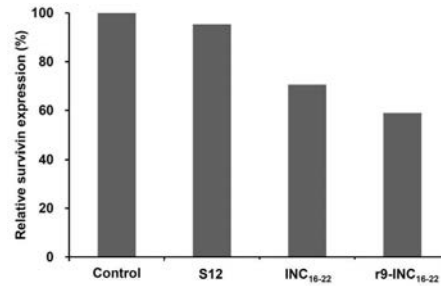
【 図 2 】



【 図 3 】

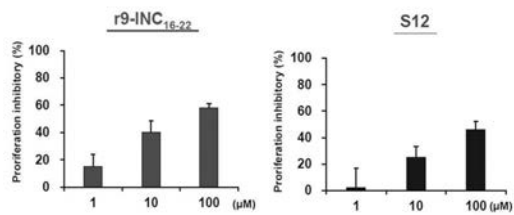


【 図 6 】

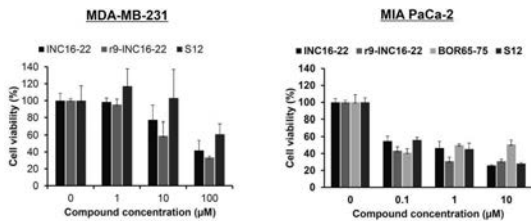


【 図 4 】

抗腫瘍活性評価 --- MTT アッセイ (MDA-MB-231細胞)



【 図 5 】



【配列表】

2018080159000001.app

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 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 51/08 (2006.01)	A 6 1 K 51/08	2 0 0
A 6 1 K 49/22 (2006.01)	A 6 1 K 49/22	
A 6 1 K 49/04 (2006.01)	A 6 1 K 49/04	
A 6 1 K 49/14 (2006.01)	A 6 1 K 49/14	
A 6 1 K 38/04 (2006.01)	A 6 1 K 51/08	1 0 0
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 38/04	
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 B 6/03 (2006.01)	A 6 1 B 5/05	3 8 3
C 0 7 K 14/82 (2006.01)	A 6 1 B 6/03	3 7 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 K 14/82	
	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 淵上 剛志

長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 中山 守雄

長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 吉田 さくら

長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 石川 夏海

長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学内

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA17 AA22 AA30 AA31 AA36 AA53 AA95 BB01 BB11
BB13 BB15 BB16 BB17 BB29 CC27 EE41 EE59 FF02 FF04
FF14 FF15 FF16 FF34 FF43
4C084 AA07 AA12 AA17 AA27 BA02 BA17 BA18 BA19 BA20 BA23
CA18 CA59 DC32 MA05 MA17 MA22 MA23 MA31 MA35 MA37
MA41 MA43 MA52 MA55 MA60 MA66 NA13 ZB261 ZB262 ZB271
ZB272
4C085 HH03 HH05 HH07 HH09 JJ02 JJ03 KA28 KA29 KA36 KB02
KB03 KB05 KB07 KB08 KB09 KB11 KB12 KB15 KB18 KB19
KB20 KB82 LL18
4C093 AA01 AA22 AA24
4C096 AA11 FC14
4H045 AA10 AA30 BA09 BA14 BA15 BA16 BA17 EA20 EA51 FA33
FA72 FA74

专利名称(译)	存活蛋白靶肽		
公开(公告)号	JP2018080159A	公开(公告)日	2018-05-24
申请号	JP2017205389	申请日	2017-10-24
申请(专利权)人(译)	国立大学法人长崎		
[标]发明人	淵上剛志 中山守雄 吉田さくら 石川夏海		
发明人	淵上 剛志 中山 守雄 吉田 さくら 石川 夏海		
IPC分类号	C07K14/47 C07K7/00 A61P35/00 A61K45/08 A61K45/00 A61K47/42 A61P35/02 A61K51/08 A61K49/22 A61K49/04 A61K49/14 A61K38/04 A61K47/64 A61B5/055 A61B6/03 C07K14/82 C12N15/09		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K7/00 A61P35/00 A61K45/08 A61K45/00 A61K47/42 A61P35/02 A61K51/08.200 A61K49/22 A61K49/04 A61K49/14 A61K51/08.100 A61K38/04 A61K47/64 A61B5/05.383 A61B6/03.375 C07K14/82 C12N15/00.A A61B5/055.383 A61K38/02 A61K38/03 A61K49/06 A61K49/08 A61K49/18 A61K51/00.100 A61K51/00.200 A61K51/02.100 A61K51/02.200 A61K51/12.200		
F-TERM分类号	4C076/AA11 4C076/AA17 4C076/AA22 4C076/AA30 4C076/AA31 4C076/AA36 4C076/AA53 4C076/AA95 4C076/BB01 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB17 4C076/BB29 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF02 4C076/FF04 4C076/FF14 4C076/FF15 4C076/FF16 4C076/FF34 4C076/FF43 4C084/AA07 4C084/AA12 4C084/AA17 4C084/AA27 4C084/BA02 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA59 4C084/DC32 4C084/MA05 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/NA13 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C085/HH03 4C085/HH05 4C085/HH07 4C085/HH09 4C085/JJ02 4C085/JJ03 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KA36 4C085/KB02 4C085/KB03 4C085/KB05 4C085/KB07 4C085/KB08 4C085/KB09 4C085/KB11 4C085/KB12 4C085/KB15 4C085/KB18 4C085/KB19 4C085/KB20 4C085/KB82 4C085/LL18 4C093/AA01 4C093/AA22 4C093/AA24 4C096/AA11 4C096/FC14 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA33 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
优先权	2016212199 2016-10-28 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

甲大多数癌症是有助于区域染色体乘客复杂形成在Survivin蛋白肽 (CPC) 的特定蛋白之一，在高亲和力的肽可以结合在和癌症治疗和诊断提供的应用程序。具有特定的氨基酸序列或变体序列，使用从INCENP或Borealin衍生的肽可结合存活，与一种或多种共轭组分肽键合，并且，在癌症治疗和诊断肽或肽包含缀合物的组合物。

(5) Int. Cl.	F I				テーマコード (参考)
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K	14/47	Z N A		4 C O 7 6
C O 7 K 7/00 (2006.01)	C O 7 K	7/00			4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00			4 C O 8 5
A 6 1 K 45/08 (2006.01)	A 6 1 K	45/08			4 C O 9 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00			4 C O 9 6

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-205389 (P2017-205389)	(71) 出願人	504205521
(22) 出願日	平成29年10月24日 (2017.10.24)		国立大学法人 長崎大学
(31) 優先権主張番号	特願2016-212199 (P2016-212199)		長崎県長崎市文教町1-14
(32) 優先日	平成28年10月28日 (2016.10.28)	(74) 代理人	100080791
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宣
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100163658
			弁理士 小池 順造
		(74) 代理人	100174296
			弁理士 菅原 博文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Survivin 標的ペプチド