

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6666613号  
(P6666613)

(45) 発行日 令和2年3月18日(2020.3.18)

(24) 登録日 令和2年2月26日(2020.2.26)

(51) Int.Cl.			F I		
<b>C07K</b>	<b>7/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	7/06	Z N A
<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	43/00	1 2 1
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	35/00	
<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	43/00	1 1 1
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/64</b>	<b>(2017.01)</b>	A 6 1 K	45/00	

請求項の数 8 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-534447 (P2018-534447)	(73) 特許権者	301021533
(86) (22) 出願日	平成29年8月16日 (2017.8.16)		国立研究開発法人産業技術総合研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/030003		東京都千代田区霞が関1-3-1
(87) 国際公開番号	W02018/034356	(74) 代理人	100080791
(87) 国際公開日	平成30年2月22日 (2018.2.22)		弁理士 高島 一
審査請求日	平成31年2月15日 (2019.2.15)	(74) 代理人	100136629
(31) 優先権主張番号	特願2016-159743 (P2016-159743)		弁理士 鎌田 光宜
(32) 優先日	平成28年8月16日 (2016.8.16)	(74) 代理人	100125070
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
(出願人による申告) 平成28年度、国立研究開発法人		(74) 代理人	100174296
日本医療研究開発機構「D-型ペプチドによる血液-脳			弁理士 當麻 博文
腫瘍関門突破と脳腫瘍治療」委託研究、産業技術力強化		(74) 代理人	100137729
法第19条の適用を受ける特許出願			弁理士 赤井 厚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 悪性腫瘍標的ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(i)のアミノ酸配列を含むペプチド(下記の配列中、直後に記号[D]を付した各アミノ酸記号は該アミノ酸のD体を示す。)

(i) T[D] I[D] T[D] W[D] P[D] T[D] M[D]のアミノ酸配列

【請求項2】

上記(i)のアミノ酸配列からなる、請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

請求項1または2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4】

前記1つ以上の成分が抗がん剤を含む、請求項3に記載のコンジュゲート。

【請求項5】

前記抗がん剤が、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、分子標的薬、および抗血管新生剤からなる群から選択される、請求項4に記載のコンジュゲート。

【請求項6】

前記1つ以上の成分が検出可能な物質を含む、請求項3に記載のコンジュゲート。

【請求項7】

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6に記載のコンジュゲート。

【請求項8】

前記検出可能な物質が、放射性同位体、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6または7に記載のコンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概してはがん生物学の分野に関し、より詳細にはアネキシンA1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】

脳腫瘍の中でも髄膜腫や神経鞘腫など、髄膜や脳・脊髄神経から発生する腫瘍は多くが良性脳腫瘍であり、外科手術によって摘出できれば完全治癒が可能である。それに対して、神経膠腫（グリオーマ）を始めとする神経上皮性腫瘍は基本的に悪性脳腫瘍である。特にグレード4の膠芽腫（グリオブラストーマ）に至っては、頭開手術による摘出後、放射線療法と化学療法を行ったとしても、予後は極めて悪い（5年生存率は10%程度）。脳腫瘍に対して有効な化学療法が実施できていない大きな理由として、血液脳関門の存在が挙げられる。一方、膠芽腫に有効な新薬であるテモゾロミドが2006年に日本で承認された。この薬は分子量が極めて小さく（194Da）、拡散によって血液脳関門を通過できることが明らかになったものの、平均余命を12ヶ月から16ヶ月に延ばすことしかできていない。従って、今後悪性脳腫瘍に対する治療成績を劇的に改善するためには、血液脳関門を低分子の拡散に頼る消極的な方法ではなく、脳腫瘍に圧倒的高濃度で集積し、かつ積極的に血管内皮の壁を越えることのできる治療薬の開発が必須である。

【0003】

最近の研究開発費の高騰や抗体医薬品の普及によって、患者の経済的負担は次第に重くなりつつある。今後、遺伝子情報による診断システムなど、医療の高度化によって、この傾向はさらに加速するものと思われる。また、これら薬価の高騰が国の医療費に与える影響も計り知れない。さらに、高価な抗体医薬品が後進国には手の届かないものになり、世界規模でのさらなる医療格差を招く。以上の問題に対して、より長期的な視野で対策を講じるならば、優れた医薬品シーズの探索を追い求めることに加えて、今後は短鎖ペプチドのような安価なバイオ医薬品の可能性も模索する必要がある。

【0004】

本発明者の一人である福田は2014年に産業技術総合研究所に赴任するまでの30年以上の間、米国のSanford Burnham Preby Medical Discovery Instituteにて研究室を主催してきた。その間、福田は、糖鎖の構造を模倣したペプチドを使って、糖鎖依存性の癌転移を阻害することに世界で初めて成功した（非特許文献1）。さらに、これらの糖鎖模倣ペプチド群が相互作用する血管内皮受容体を調べる過程で、IF7と名付けたペプチドがアネキシンA1（Annexin A1；Anxa1）に結合することを見出した（非特許文献2）。Anxa1は現在知られている腫瘍血管特異的マーカー分子の中で最も特異性が高いことがJan Schnitzlerらのグループによって明らかにされており、正常細胞では細胞内に発現するが、腫瘍新生血管内皮細胞では血流に接する管腔表面に強発現する（非特許文献3）。福田らは、IF7に抗癌剤（SN38）を結合させた薬剤（IF7-SN38）が低投与量で担癌マウスの腫瘍を消失させることを明らかにした（非特許文献2）。IF7はマウスAnxa1のN末端領域に結合するが、その領域のアミノ酸配列はマウスとヒトの間で高度に保存されている。従って、IF7-SN38はヒトにおいても有効である可能性があることから、この発見はPNAS誌の“*In this issue in PNAS*”に取り上げられ、NIHが特集記事を紹介、さらには世界中のメディアが報道する等、大きな注目を浴びた。

10

20

30

40

50

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

【非特許文献1】Fukuda et al., Cancer Research, 60: 450-6, 2000

【非特許文献2】Hatakeyama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108: 19587-92, 2011

【非特許文献3】Oh et al., Nature 429: 629-35, 2004

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

10

## 【0006】

担癌マウスにIF7を静脈投与すると、IF7は腫瘍周囲の血管に到達した後、血管内皮細胞の管腔側から小胞に取り込まれて基底側へ移動し、癌細胞が存在する間質へ遊離される。マウス血管内皮F2細胞においても、Anxa1に結合したIF7はトランスサイトシスで能動的に腫瘍血管内皮細胞を縦断した。従って、IF7は脳腫瘍内の血管-脳腫瘍関門を通過する活性を有することが示唆された。驚くべきことに、グリオーマ細胞を移植した脳腫瘍モデルマウスに、蛍光ラベルしたIF7を静脈注射したところ、蛍光が脳腫瘍部位に高濃度で集積する様子が観察された。また、蛍光は血管を乗り越えて脳の間質にあるがん細胞へ到達した。さらに、同一マウス内に皮下腫瘍と脳腫瘍を作製し(dual tumor model)、IF7-SN38の治療効果を検証したところ、脳腫瘍と皮下腫瘍の両方が抑制され、その効果は皮下腫瘍よりも脳腫瘍の方が高かった。B16メラノーマの転移脳腫瘍モデルにおいても同様の結果が得られ、ホストマウスをC57BL/6やSCIDの系統に変えても結果は変わらなかった。これらの事実は、Anxa1を標的とするDDSは効率よく血液-脳腫瘍関門を越えるだけでなく、脳腫瘍で優れた治療効果をあげることを示している。

20

## 【0007】

この様に、IF7は優れた悪性腫瘍標的活性をもつが、臨床開発を目指す上で、難溶性であることと安定性が低いことの2点に問題がある。すなわち、まずIF7ペプチドはプロテアーゼ感受性であり分解されやすい。実際、A488-IF7を健常マウスの静脈に投与した実験では、末梢血の蛍光シグナルが1時間程度でほとんど消失した。しかし、担癌マウスの尾静脈投与では、A488-IF7は末梢血から回収される蛍光が健常マウスよりも顕著に少なかった。この結果は、A488-IF7が分解を受けつつも大部分が腫瘍に急速に集積することを示唆する。また、IF7は疎水性が高く抗癌剤と結合させた化合物を静脈投与する際に沈殿を避けるためにDMSOに溶解した後に界面活性剤を加えるなど剤形に困難が伴う。

30

## 【0008】

従って、本発明は、IF7に付随する上記の問題点を少なくとも部分的に克服し得る、アネキシンA1に結合する新規のペプチドおよびその用途を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

40

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討を行い、アネキシンA1に結合し得るD型のペプチドを探索することを着想した。そのために、本発明者らは、IF7と結合することが知られているAnxa1のN末端15残基に修飾用Cys残基を付加した16残基のL型ペプチド(L-MC16)と鏡像関係にあるD型ペプチド(D-MC16)を合成し、T7ファージライブラリーを用いたスクリーニングにより、D-MC16と結合する7アミノ酸の複数のL型ペプチドを同定した。そして、同定されたL型ペプチドの中でも特に有望であったTIT7ペプチドと呼称するペプチドについて更なる試験を行った。本発明者らが予想した通り、このTIT7ペプチドと鏡像関係にあるD型ペプチド(dTIT7ペプチド)はAnxa1と結合することを本発明者らは確認した。更に、本発明者らは、in vivoの実験により、dTIT7ペプチドは脳腫瘍モデルマウスに尾

50

静脈投与されたときに腫瘍部位に集積すること、抗がん剤（ゲルダナマイシン）と結合させた d T I T 7 ペプチド（G A - d T I T 7）は担癌マウスに静脈投与されたときに腫瘍の増殖を顕著に抑制し、腫瘍部位に大量の壊死を生じさせたこと、G A - d T I T 7 は C 6 細胞を脳に移植した脳腫瘍モデルマウスと B 1 6 細胞を脳に移植した脳転移モデルマウスのいずれの場合においても経口投与されたときに腫瘍の増殖を抑制し、薬剤の投与を中止した後も腫瘍が減少し続け、ついには一部の動物において完全治癒が得られたことを実証した。

【 0 0 1 0 】

本発明者らは以上の結果に基づき更なる研究を重ね、本発明を完成するに至った。本発明は即ち、以下の通りである。

[ 1 ] 下記式 ( I ) - ( I I I ) のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド。

( I ) ( X 1 ) [ D ] P [ D ] ( X 2 ) [ D ] のアミノ酸配列（該配列中、X 1 は W または F を示し、X 2 は S または T を示し、直後に記号 [ D ] を付した各アミノ酸記号は該アミノ酸の D 体を示す。）

( I I ) P [ D ] T [ D ] ( X ) <sub>n</sub> F [ D ] のアミノ酸配列（該配列中、( X ) <sub>n</sub> は互いに独立して選択される n 個の任意のアミノ酸を示し、n は 0 - 4 の整数を示し、記号 [ D ] は前記と同義を示す。）

( I I I ) 前記 ( I ) または ( I I ) のいずれかのアミノ酸配列の R e t r o - i n v e r s o であるアミノ酸配列。

[ 2 ] 下記 ( i ) - ( v i i ) のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド（下記の配列中、記号 [ D ] は前記と同義を示す。）

( i ) T [ D ] I [ D ] T [ D ] W [ D ] P [ D ] T [ D ] M [ D ] のアミノ酸配列、

( i i ) L [ D ] R [ D ] F [ D ] P [ D ] T [ D ] V [ D ] L [ D ] のアミノ酸配列、

( i i i ) L [ D ] L [ D ] S [ D ] W [ D ] P [ D ] S [ D ] A [ D ] のアミノ酸配列

( i v ) S [ D ] P [ D ] T [ D ] S [ D ] L [ D ] L [ D ] F [ D ] のアミノ酸配列、

( v ) M [ D ] P [ D ] T [ D ] L [ D ] T [ D ] F [ D ] R [ D ] のアミノ酸配列、

( v i ) 前記 ( i ) - ( v ) のいずれか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、

( v i i ) 前記 ( i ) - ( v i ) のいずれかのアミノ酸配列の R e t r o - i n v e r s o であるアミノ酸配列。

[ 3 ] 上記 ( i ) のアミノ酸配列を含む、[ 2 ] に記載のペプチド。

[ 4 ] 上記 ( i ) のアミノ酸配列からなる、[ 2 ] に記載のペプチド。

[ 5 ] [ 1 ] ~ [ 4 ] 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。

[ 6 ] 前記 1 つ以上の成分が抗がん剤を含む、[ 5 ] に記載のコンジュゲート。

[ 7 ] 前記抗がん剤が、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、分子標的薬、および抗血管新生剤からなる群から選択される、[ 6 ] に記載のコンジュゲート。

[ 8 ] 前記抗がん剤が、

エノシタピン、カペシタピン、カルモフル、クラドリピン、ゲムシタピン、シタラピン、シタラピンオクホスファート、テガフル、テガフル・ウラシル、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム、ドキシフルリジン、ネララピン、ヒドロキシカルバミド、フルオロウラシル、フルダラピン、ペメトレキセド、ペントスタチン、メルカプトプリン、メトトレキサート；

シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、ブスルファン、チオテパ、ニムスチン、ラニムスチン、ダカルバシン、プロカルバシン、テモゾロマイド、カルムスチン、ストレプトゾトシン、ペンダムスチン；

アクチノマイシン D、アクラルピシン、アムルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ジノスタチンスチマラマー、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ピラルピシン、プレオマイ

10

20

30

40

50

シン、ペプロマイシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン、リボソーマルドキソルピシン；

ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、パクリタキセル、タキソール、ドセタキセル；

オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、ネダプラチン；

カンプトテシン、イリノテカン、ノギテカン、SN-38、ドキソルピシン、エトポシド、レボフロキサシン、シプロフロキサシン；

レゴラフェニブ、セツキシマブ、パニツムマブ、ラムシルマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アフアチニブ、クリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブ、レンパチニブ、トラスツズマブ、ラパチニブ、ベルツズマブ、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ、バゾ

10

パニブ、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、イピリムマブ、ベムラフェニブ、エベロリムス、テムシロリムス、リツキシマブ、ベバシズマブ、ゲルダナマイシン；

アンギオスタチン、エンドスタチン、メタスタチン、抗VEGF抗体、およびVEGFR-2インヒビター

からなる群から選択される、[6]または[7]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、[5]に記載のコンジュゲート。

[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、[9]に記載のコンジュゲート。

20

[11]前記検出可能な物質が、放射性同位体、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、[9]または[10]に記載のコンジュゲート。

[12]前記検出可能な物質が、

$^{18}\text{F}$ 、 $^{51}\text{Mn}$ 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 $^{83}\text{Sr}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{110}\text{In}$ 、 $^{120}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{197}\text{Hg}$ 、および $^{201}\text{Tl}$ から選択される放射性核種；

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)、およびエルビウム(III)から選択される常磁性イオン、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、ビスマス(III)；

30

ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物、タリウム化合物；

ローダミン、フルオレセイン、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、ならびに近赤外線蛍光試薬

からなる群から選択される、[9]~[11]のいずれかに記載のコンジュゲート。

40

[13][1]~[4]のいずれかに記載のペプチドまたは[5]~[12]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。

[14][6]~[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。

[15][9]~[12]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。

[16]がんが固形がんまたは液性がんである、[14]または[15]に記載の組成物。

[17]固形がんが、血管新生する固形がんである、[16]に記載の組成物。

[18]固形がんが、脳・神経系のがん、頭頸部がん、消化器がん、泌尿器または生殖器

50

のがん、呼吸器系のがん、乳がん、皮膚がん、骨のがん、または筋肉のがんである、[ 16 ] または [ 17 ] に記載の組成物。

[ 19 ] 固形がんが、脳腫瘍、脊髄腫瘍、喉頭がん、口腔がん、唾液腺がん、副鼻腔がん、甲状腺がん、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、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、肺がん、乳がん、悪性黒色腫、骨肉腫、または横紋筋肉腫である、[ 16 ] ~ [ 18 ] のいずれかに記載の組成物。

[ 20 ] 固形がんが良性または悪性の脳腫瘍である、[ 19 ] に記載の組成物。

[ 21 ] 脳腫瘍が原発性脳腫瘍または転移性脳腫瘍である、[ 20 ] に記載の組成物。

[ 22 ] 脳腫瘍が、髄膜腫、下垂体腺腫、神経鞘腫、星細胞腫（アストロサイトーマ）、乏突起神経膠腫（オリゴデンドログリオーマ）、退形成性星細胞腫、退形成性乏突起膠腫、退形成性乏突起星細胞腫、または膠芽腫（グリオブラストーマ）である、[ 20 ] または [ 21 ] に記載の組成物。

[ 23 ] 液性がんがB細胞性リンパ腫である、[ 16 ] に記載の組成物。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、アネキシンA1に結合する新規のペプチドが提供される。

エリスロポエチンや最近の抗PD-1抗体の例で明らかのように、臨床で成功している医薬品は薬剤が標的とする生体内分子の発現特異性が非常に高い。本発明のペプチドが標的とするアネキシンA1は、現在知り得る悪性腫瘍の新生血管標的のマーカの中で最も特異性の高い分子であるので、本発明のペプチドと結合させた抗がん剤は既存の抗がん剤と比べて優れた治療効果を示し得る。

特に、当該ペプチド-抗がん剤コンジュゲートは、悪性腫瘍に高効率で抗がん剤を集積し得るだけでなく、プロテアーゼ耐性であるので、有効投与回数の減少と更なる低投与量が見込まれる。更に免疫機構が温存されると考えられるため、抗がん剤と免疫治療の併用による悪性腫瘍の完全治癒が期待され得る。

アネキシンA1の特徴的な点は、腫瘍内にできた新生血管内皮細胞の血液側に発現し、本発明のペプチドのようなリガンドと血液側で結合すると、リガンドをトランスサイトosisによって基底側に運び、癌細胞が存在する間質へ積極的に放出することである。この性質は血管脳障壁を積極的に乗り越える機序としても働いていると考えられる。アネキシンA1を標的とする本発明のペプチドは、従来の血管新生阻害剤（アバスタチン）やテモゾロミド（上記）とは異なり、画期的なメカニズムによる悪性脳腫瘍の治療を可能にするものである。即ち、現在、化学療法剤として血液脳関門を通過するもの、腫瘍組織に集積するもの、体内で安定で経口投与可能なものがそれぞれ開発されているが、その全てを兼ね備え得る化学療法剤は本発明のペプチド以外には存在しない（図10）。

本発明のペプチドは様々な抗がん剤と結合させることができるので、生理活性にも幅を持たせることができる。

本発明は、脳腫瘍の治療にブレイクスルーを開くものである。さらにANXA1は様々な悪性腫瘍の血管表面に発現することが公知であり、dTIT7結合抗癌剤は、脳腫瘍のみでなく広範な癌治療薬として臨床応用が期待される。

また、本発明のペプチドは化学合成や修飾が容易であることから、抗体医薬品に代わる中分子バイオ医薬品として将来性が極めて高い。特に、本発明のペプチドは短鎖ペプチド（例えば、アミノ酸7残基）であり得るので、化学合成で安価に製造し得る。

更に、本発明のペプチドや、該ペプチドと他の機能性部分を含むコンジュゲートは、安定性に優れ、また経口投与用医薬品としても用い得る。従って、臨床試験も容易である。実際に医療薬として承認された後は、医療施設の乏しい後進国においても医薬品として普及させることが可能である。

【0012】

また、本発明のペプチドと検出可能な物質を含むコンジュゲートは、例えばがんの診断

10

20

30

40

50

用途において有用である。本発明者らは過去に、IF7を使ったマウスのPET検査を試みたが、腫瘍特異的なイメージは得られなかった。不成功の理由は、IF7を放射性試薬と結合させたものの、高い疎水性に起因してIF7が化合物の内側に埋没したためと考えられる。本発明のペプチドは水溶性であり得るので、この点を克服し得ると考えられる。また、本発明のペプチドは例えばN末端修飾が比較的容易であり、PETを始めとする3Dイメージング用の試薬の標識ができ、診断薬開発が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】IF7の脳腫瘍標的効果を示す図である。IF7-A488を脳腫瘍モデルマウスに静脈投与した後の脳組織切片。A488(左)とHoechst(右、腫瘍部位)。RQ7はIF7の逆配列negative control。Bars; 5mm。

10

【図2】蛍光ラベルIF7を投与したマウスからの脳腫瘍組織切片の蛍光顕微鏡像を示す図である。図1に示した脳腫瘍組織切片の拡大図を示したものである。血管内皮細胞はCD31特異抗体で染色した(赤)。IF7-A488(緑)は血管を通過して間質のがん細胞まで到達している。RQ7は、IF7の逆配列コントロール。Bars; 40μm。

【図3】Dual Tumor Model Mouseを説明する図である。血管-脳腫瘍関門(BBTB)の影響を調べるため、一匹のマウスの脳と皮下にルシフェラーゼ(Luc)発現がん細胞を移植し、腫瘍を作らせた。尾静脈から投与した抗がん剤の脳腫瘍への浸透をBBTBが阻害する場合(BBTB+)、抗がん剤の効果は皮下腫瘍にのみ現れる。一方、抗がん剤が脳腫瘍に浸透する場合(BBTB-)、抗がん剤は脳腫瘍にも皮下腫瘍にも効果を示す。

20

【図4】IF7-SN38の脳腫瘍に対する治療効果を示す図である。C6-Luc細胞(ラットグリオーマにルシフェラーゼを強制発現した細胞)を免疫不全SCIDマウスの脳と皮下に移植して腫瘍を作らせdual tumor modelとした。IF7-SN38を尾静脈から毎日投与して腫瘍中のルシフェラーゼ活性による発光を測定してC6-Luc細胞の生存率を測定した。IF7-SN38は脳腫瘍の増殖を抑えるのみならず、脳腫瘍を皮下腫瘍よりもより強く抑制した。

【図5】担癌マウスと健常マウスに静脈投与したA488-IF7の血中に残存する蛍光の定量解析を示す図である。メラノーマB16の皮下担癌マウスにA488-IF7を尾静脈から投与し、経時的に抹消血を眼静脈から採取して蛍光を測定した。回収される蛍光は腫瘍の大きさに依存して減少した。

30

【図6】Anxa1に結合するD-型ペプチドのスクリーニングを説明する図である。(A)鏡像スクリーンによるD-型ペプチド配列同定法。アミノ酸16残基からなるAnxa1 N-末端ペプチド((1)L-型MC16)にIF7は結合する。(2)D-型MC16を合成し、それに結合する配列を選別する。(3)得られたL-型ペプチドをD-アミノ酸で合成すればAnxa1に結合するD-型ペプチドができる。(B)D-MC16を標的としたT7ファージライブラリーのスクリーニング結果。ファージの濃縮がラウンドごとにみられた。(C)次世代シーケンサーによるD-MC16特異的なT7ファージの配列解析。(D)濃縮されたペプチドとその割合。(E)TIT7ファージのD-MC16に対する結合の確認(ブランク形成実験)。

40

【図7】IRDye-dTIT7投与実験の結果を示す図である。ルシフェラーゼを強制発現させたラットグリオーマ細胞(C6-Luc)をヌードマウスの脳に移植し脳腫瘍モデルマウスを作製した。近赤外線蛍光試薬(IRDye800CW)で標識したdTIT7(IRDye-dTIT7、未精製品)を尾静脈注射し、時間経過毎にIVIS Imagerにより蛍光を観察した。24時間以降に脳腫瘍部位と腎臓に蛍光シグナルが集積している様子が観察された。(A)時間経過毎の全体像(B)拡大写真(C)IVISイメージャーのソフトウェアによるシグナルの定量化。

【図8】GA-dTIT7縮合体の構造を示す図である。ゲルダナマイシンにアミノ基を導入しマレイミドリンカーを結合させる。dTIT7のC末端に予めシステインを付加して合成する。システイン残基のスルフヒドリル基を介してマレイミドと反応させ、GA-

50

d T I T 7 縮合体を得る。

【図9】d T I T 7 に抗癌剤ゲルダナマイシン ( G A ) を結合させた薬剤 ( G A - d T I T 7 ) を脳腫瘍モデルマウスに隔日経口投与した実験の結果を示す。脳腫瘍の生存はルシフェラーゼによる発光で定量した。W I P T T M T ( d T I T 7 を構成する D 型アミノ酸配列の順序のみを変えたペプチド ) にゲルダナマイシンを結合させた G A - d W I P 7 をコントロールとしてマウスに投与した。悪性腫瘍の生細胞シグナル ( 左図 ) を定量したグラフ ( 右上 ) 、および生存曲線 ( 右下 ) を示す。

【図10】I F 7、d T I T 7 結合抗癌剤による悪性脳腫瘍の標的治療を概念的に説明する図である。便宜上、脳血液関門を首から上とした。一般的な抗癌剤は腫瘍標的能を持たない。テモゾロミドは拡散によって脳腫瘍にある程度浸透するが濃縮されない。またアバ

10

スチンは新生血管に働くが直接腫瘍細胞に効くものではない。対照的に、A n x a 1 結合ペプチドは血液脳腫瘍関門を通過し、腫瘍のみに高濃度で集積する。

【図11】d L R F 7、d S P T 7、d M P T 7 および d L L S 7 ペプチドと A n x a 1 の分子間相互作用の結果を示す図である。試験した全てのペプチドが、A n x a 1 への陽性結合を示した。

【図12】I R D y e - d L R F 7、I R D y e - d S P T 7、I R D y e - d M P T 7 および I R D y e - d L L S 7 の脳腫瘍モデルマウスへの投与実験の結果を示す図である。d L L S 7 を注射したマウス以外の全てのマウスで、脳腫瘍部位に強いシグナルを示し、d L L S 7 以外の d L R F 7、d M P T 7 および d S P T 7 の3つのペプチドが、血管系経路を介した脳腫瘍標的能を有することを示した。

20

【発明を実施するための形態】

【0014】

#### 1. ペプチド

本発明は、下記 ( I ) - ( I I I ) のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。

( I ) ( X 1 ) [ D ] P [ D ] ( X 2 ) [ D ] のアミノ酸配列 ( 該配列中、X 1 は W または F を示し、X 2 は S または T を示す。 ) 、

( I I ) P [ D ] T [ D ] ( X ) <sub>n</sub> F [ D ] のアミノ酸配列 ( 該配列中、( X ) <sub>n</sub> は互いに独立して選択される n 個の任意のアミノ酸を示し、n は 0 - 4 の整数を示す。 ) 、

( I I I ) 前記 ( I ) または ( I I ) のいずれかのアミノ酸配列の R e t r o - i n v e r s o であるアミノ酸配列。

30

【0015】

本発明はまた、下記 ( i ) - ( v i i ) のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドも提供する。

( i ) T [ D ] I [ D ] T [ D ] W [ D ] P [ D ] T [ D ] M [ D ] のアミノ酸配列、

( i i ) L [ D ] R [ D ] F [ D ] P [ D ] T [ D ] V [ D ] L [ D ] のアミノ酸配列、

( i i i ) L [ D ] L [ D ] S [ D ] W [ D ] P [ D ] S [ D ] A [ D ] のアミノ酸配列、

、

( i v ) S [ D ] P [ D ] T [ D ] S [ D ] L [ D ] L [ D ] F [ D ] のアミノ酸配列、

( v ) M [ D ] P [ D ] T [ D ] L [ D ] T [ D ] F [ D ] R [ D ] のアミノ酸配列、

40

( v i ) 前記 ( i ) - ( v ) のいずれか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、

( v i i ) 前記 ( i ) - ( v i ) のいずれかのアミノ酸配列の R e t r o - i n v e r s o であるアミノ酸配列。

【0016】

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、アミノ酸配列中の直後に記号 [ D ] を付した各アミノ酸記号は該アミノ酸の D 体を示し、アミノ酸配列中の直後に記号 [ D ] を付していない各アミノ酸記号は、文脈に反しない限り、該アミノ酸の L 体を示す。本明細書において、上記 ( I ) - ( I I ) のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドおよび上記

50



( i ) - ( v i i ) のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドを総称して、本発明のペプチドという。

【 0 0 1 7 】

上記 ( I ) のアミノ酸配列は、W [ D ] P [ D ] S [ D ]、W [ D ] P [ D ] T [ D ]、F [ D ] P [ D ] S [ D ]、または F [ D ] P [ D ] T [ D ] のいずれであってもよい。

【 0 0 1 8 】

上記 ( I I ) のアミノ酸配列において、整数 n は 0 - 4 であり、好ましくは 2 - 3 である。X は互いに独立して選択される任意のアミノ酸であってもよい。

【 0 0 1 9 】

本発明のペプチドは上記の ( I ) - ( I I I ) および ( i ) - ( v i i ) のいずれかのアミノ酸配列からなるものであってもよいし、これらの配列の N 末端側および / または C 末端側に 1 つ以上のアミノ酸が付加されていてもよい。

【 0 0 2 0 】

本明細書において、ペプチドとは、2 つ以上のアミノ酸がペプチド結合したものをいう。本発明のペプチドの長さは特に限定されない。本発明のペプチドは、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、または少なくとも 15 個のアミノ酸を含んでもよい。本発明のペプチドは、50 個まで、45 個まで、40 個まで、35 個まで、30 個まで、25 個まで、20 個まで、19 個まで、18 個まで、17 個まで、16 個まで、15 個まで、14 個まで、13 個まで、12 個まで、11 個まで、10 個まで、9 個まで、8 個まで、または 7 個までのアミノ酸からなるものであってもよい。本発明のペプチドは、3 - 10 個、3 - 15 個、3 - 20 個、3 - 25 個、3 - 30 個、3 - 40 個、3 - 50 個、4 - 10 個、4 - 15 個、4 - 20 個、4 - 25 個、4 - 30 個、4 - 40 個、4 - 50 個、5 - 10 個、5 - 15 個、5 - 20 個、5 - 25 個、5 - 30 個、5 - 40 個、5 - 50 個、6 - 10 個、6 - 15 個、6 - 20 個、6 - 25 個、6 - 30 個、6 - 40 個、6 - 50 個、7 - 10 個、7 - 15 個、7 - 20 個、7 - 25 個、7 - 30 個、7 - 40 個、7 - 50 個、8 - 10 個、8 - 15 個、8 - 20 個、8 - 25 個、8 - 30 個、8 - 40 個、または 8 - 50 個のアミノ酸の長さであってもよい。例えば、本発明のペプチドは、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、または 15 個のアミノ酸の長さであってもよい。

【 0 0 2 1 】

本発明のペプチドは、D 型アミノ酸および L 型アミノ酸の組み合わせにより構成されていてもよい。より詳細には、上記 ( I ) - ( I I ) および ( i ) - ( v i ) のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドを構成するアミノ酸は、全てが D 型アミノ酸であってもよいし、D 型アミノ酸に加えて L 型アミノ酸を含んでいてもよく、上記 ( I I I ) または ( v i i ) のアミノ酸配列を含むペプチドを構成するアミノ酸は、全てが L 型アミノ酸であってもよいし、L 型アミノ酸に加えて D 型アミノ酸を含んでいてもよい。L 型アミノ酸は、天然に存在する L 型アミノ酸であってもよく、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。

【 0 0 2 2 】

本発明のペプチドは、37C.F.R. 1.821-1.822 に言及されるものなどの、修飾 ( m o d i f i e d ) または異常 ( u n u s u a l ) アミノ酸を含んでいてもよい。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異常アミノ酸を

10

20

30

40

50

含まない。修飾または異常アミノ酸としては、例えば、3 - アミノアジピン酸、 $\beta$  - 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、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、オルニチンなどが挙げられる。

#### 【0023】

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、 $-\text{NHCH}_3$ 、または $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ）、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（ $\text{RCOO}-$ ）もしくはスルホニル官能基（ $\text{R}-\text{SO}_2-$ ）（ここでRは、アルキル、アリール、ヘテロアリール、およびアルキルアリ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（ $-\text{CONH}_2$ ）やエステル化（ $-\text{COOR}$ ）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 $\text{C}_{1-6}$ 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 $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基；例えば、フェニル、 $\beta$  - ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル -  $\text{C}_{1-2}$ アルキル基； $\beta$  - ナフチル -  $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ 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。

#### 【0024】

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 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、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 $\text{C}_{1-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されていてもよい。

#### 【0025】

上記(vi)のアミノ酸配列を含む本発明のペプチドは、上記(i) - (v)のアミノ酸配列中の、連続する4個のアミノ酸からなる部分配列、連続する5個のアミノ酸からなる部分配列、または連続する6個のアミノ酸からなる部分配列を含んでもよい。具体的には、例えば元となるアミノ酸配列が上記(i)のアミノ酸配列の場合、該ペプチドは、T[D]I[D]T[D]W[D]のアミノ酸配列、I[D]T[D]W[D]P[D]のアミノ酸配列、T[D]W[D]P[D]T[D]のアミノ酸配列、W[D]P[D]T[D]M[D]のアミノ酸配列、T[D]I[D]T[D]W[D]P[D]のアミノ酸配列、I[D]T[D]W[D]P[D]T[D]のアミノ酸配列、T[D]W[D]P[D]T[D]M[D]のアミノ酸配列、T[D]I[D]T[D]W[D]P[D]T[D]のアミノ酸配列、またはI[D]T[D]W[D]P[D]T[D]M[D]のアミノ酸配列を含んでもよい。

#### 【0026】

上記(vi)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 - 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

10

20

30

40

50

個である。

【0027】

上記(vi)のアミノ酸配列において挿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。該アミノ酸は、L型またはD型のアミノ酸であってよく、例えば、上述したような天然に存在するL型アミノ酸、またはその光学異性体であるD型アミノ酸であってよい。また、該アミノ酸は、上述したような様々な化学修飾を受けていてもよい。

【0028】

上記(vi)のアミノ酸配列中の置換は、保存的アミノ酸置換であることが好ましい。「保存的アミノ酸置換」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。本明細書において、保存的アミノ酸置換は、D型アミノ酸をその光学異性体であるL型アミノ酸に置換することも包含し得る。従って、保存的アミノ酸置換は、上記(1)-(5)のグループ内での、2つのL型アミノ酸の間の置換、2つのD型アミノ酸の間の置換、またはL型アミノ酸とD型アミノ酸との間の置換であってよい。

【0029】

一実施形態において、上記(vi)の配列は上記(I)または(II)の配列に包含されるものであってもよい。その場合、上記(vii)の配列は上記(III)の配列に包含されるものとなる。当該実施形態において、上記(i)の配列において4番目のアミノ酸はW[D]またはF[D]でありかつ5番目のアミノ酸はP[D]でありかつ6番目のアミノ酸はT[D]またはS[D]であってよく、上記(ii)の配列において3番目のアミノ酸はW[D]またはF[D]でありかつ4番目のアミノ酸はP[D]でありかつ5番目のアミノ酸はT[D]またはS[D]であってよく、上記(iii)の配列において4番目のアミノ酸はW[D]またはF[D]でありかつ5番目のアミノ酸はP[D]でありかつ6番目のアミノ酸はT[D]またはS[D]であってよく、上記(iv)の配列において2番目のアミノ酸はP[D]でありかつ3番目のアミノ酸はT[D]でありかつ6番目のアミノ酸はF[D]であってよく、上記(v)の配列において2番目のアミノ酸はP[D]でありかつ3番目のアミノ酸はT[D]でありかつ5番目のアミノ酸はF[D]であってよい。

【0030】

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), pp266-273、及びPLoS One . 2013 Dec 2; 8(12): e80390)。具体的には、上記(vii)のアミノ酸配列としては、例えば、上記(i)の配列のRetro-inversoであるMTPWTIT(配列番号1)、上記(ii)の配列のRetro-inversoであるLVTPFRL(配列番号2)、上記(iii)の配列のRetro-inversoであるASPWSLL(配列番号3)、上記(iv)の配列のRetro-inversoであるFLLPSTPS(配列番号4)、上記(v)の配列のRetro-inversoであるRFTLTPM(配列番号5)が挙げられる。

【0031】

本発明のペプチドは、上記(I)-(III)および(i)-(vii)から選択される配列を2つ以上含んでいてもよい。一実施形態において、本発明のペプチドは、上記(

I) - (III) および (i) - (vii) 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) - (III) および (i) - (vii) 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。具体的なリピート構造として、例えば、T[D]I[D]T[D]W[D]P[D]T[D]M[D] - T[D]I[D]T[D]E[D]P[D]T[D]M[D]、および T[D]I[D]T[D] - T[D]I[D]T[D] が挙げられる。あるいは、本発明のペプチドは、 dendrimer により多価ペプチドを構成していてもよい。

#### 【0032】

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。

#### 【0033】

本発明のペプチドはアネキシン A1 に結合し得る。アネキシン A1 (Annexin A1; Anxa1) はリポコルチン 1 (lipocortin 1) としても知られる、アネキシンファミリーに属する公知のタンパク質である。種々の生物種について Anxa1 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 Anxa1 について mRNA の RefSeq No. NM\_000700.2 (配列番号 6)、タンパク質の RefSeq No. NP\_000691.1 (配列番号 7); マウス Anxa1 について mRNA の RefSeq No. NM\_010730.2 (配列番号 8)、タンパク質の RefSeq No. NP\_034860.2 (配列番号 9) が挙げられる。本発明のペプチドは Anxa1 の N 末端領域に結合するものであり得る。より詳細には、本発明のペプチドは、ヒト Anxa1 中の、配列番号 7 における 1 ~ 15 番目のアミノ酸からなる領域、または、マウス Anxa1 中の、配列番号 9 における 1 ~ 15 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、例えばマウスまたはヒトの Anxa1 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、好ましくは  $10^{-6}$  M 未満、より好ましくは  $10^{-7}$  M 未満、更により好ましくは  $5 \times 10^{-8}$  M 未満の解離定数 (Kd 値) を有し得る。上記測定のために、ATGen社 (Seongnam-si, South Korea) から市販されている 346 アミノ酸残基から構成されるヒト組換え Anxa1 タンパク質を用いることができる。

#### 【0034】

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。

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)

10

20

30

40

50

(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

(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)

10

【0035】

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。

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。

【0036】

上述したように、アネキシンA1は現在知られている腫瘍血管特異的マーカー分子の中で最も特異性が高いことが知られており、正常細胞では細胞内に発現するが、腫瘍新生血管内皮細胞では血流に接する管腔表面に強発現する(Oh et al., Nature 429: 629-35, 2004)。従って、本発明のペプチドは、インビボにおいて、血管新生する腫瘍に選択的に結合し得る。更に、Anxa1は、腫瘍内にできた新生血管内皮細胞の血液側に発現し、本発明のペプチドのようなりガンドと血液側で結合すると、リガンドをトランスサイトーシスによって基底側に運び、癌細胞が存在する間質へ積極的に放出する。従って、本発明のペプチドは、インビボにおいて悪性腫瘍を標的化し得る。このように、本発明のペプチドは、例えば、悪性腫瘍の標的化の用途のために有用である。

20

【0037】

## 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。

30

【0038】

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、1000Da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。

40

【0039】

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。本発明のペプチドに対応する部分の働きにより本発明のコンジュゲートは悪性腫瘍に標的化され得るので、該機能性の好ましい例として、抗がん活性、および検出可能性の付与が挙げられる。従って、該成分は、例えば、抗がん剤、または検出可能な物質であってもよい。

【0040】

(抗がん剤)

50

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。

#### 【0041】

代謝拮抗剤は、例えば、葉酸代謝拮抗薬、ジヒドロプロテ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（サンラピン）、カベシタピン（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）、シタラピン（キロサイド）、シタラピ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）、ネララピン（アラノンジ）、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）、フルダラピン（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。

#### 【0042】

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）、プスルファン、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）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。

#### 【0043】

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（ピノルピン、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。

#### 【0044】

微小管阻害剤は、例えば、ピンブラスチン（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）などのピンカルカロイド系微小管重合阻害薬、パクリタキセル（タキソール）やドセタキセル（タキソテール）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。

#### 【0045】

白金製剤としては、例えば、オキサリプラチン（エルブラット）、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（アクブラ）などが挙げられる。

#### 【0046】

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、ベプシド）などのエピポドフィロトキシ系薬物、レ

10

20

30

40

50

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。

【0047】

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（レンピマ）、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（パーゼタ）、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）、ベムプロリズマブ、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

【0048】

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、アンギオスタチン、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。

【0049】

（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、放射性同位体、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。

20

【0050】

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

30

【0051】

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

【0052】

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。

【0053】

蛍光性物質としては、例えば、ローダミン、フルオレセイン、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。

【0054】

(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。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。

10

【0055】

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、アリルアジド、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。用いるクロスリンカーに応じて、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。

20

【0056】

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 Aktolun et al. 編, Nuclear Medicine Therapy: Principles and Clinical Applications, Springer, 2013などを参照。

30

【0057】

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。

【0058】

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。

40

50



## 【 0 0 5 9 】

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。

## 【 0 0 6 0 】

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。

10

## 【 0 0 6 1 】

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 ~ 5 0 0 m g、とりわけ注射剤では 1 ~ 1 0 0 m g、その他の剤形では 1 0 ~ 2 5 0 m g 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。

## 【 0 0 6 2 】

本発明の組成物は、腫瘍、特に血管新生する悪性腫瘍を標的化し得、好ましくは該腫瘍に該ペプチドまたはコンジュゲートを集積させ得る。従って、該コンジュゲート中に抗がん剤を含む本発明の組成物は、標的化した悪性腫瘍の治療または予防のために有用である。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る。

20

## 【 0 0 6 3 】

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。固形がんとしては、好ましくは A n x a 1 を細胞表面に発現する固形がん、従って血管新生する固形がんが挙げられる。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

## 【 0 0 6 4 】

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、M A L T 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。

40

## 【 0 0 6 5 】

本発明のペプチドまたはコンジュゲートは、効率よく血液 - 脳腫瘍関門を越えることができるので、特に好ましい標的として脳腫瘍を挙げることができる。脳腫瘍は、原発性脳腫瘍または転移性脳腫瘍であってよい。また、脳腫瘍は良性（例えば、髄膜腫、下垂体腺腫、神経鞘腫など）または悪性の脳腫瘍であってよく、好ましくは悪性の脳腫瘍である。悪性の脳腫瘍としては、星細胞腫（アストロサイトーマ）、乏突起神経膠腫（オリゴデン

50

ドログリオーマ)などのグレード2の脳腫瘍、退形成性星細胞腫、退形成性乏突起膠腫、退形成性乏突起星細胞腫などのグレード3の脳腫瘍、膠芽腫(グリオブラストーマ)などのグレード4の脳腫瘍が挙げられる。

【0066】

本発明の組成物は、アネキシンA1を発現する動物、特に哺乳動物に投与され得る。哺乳動物としては、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。

【0067】

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0.1~10mg/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0.1~10mg/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。

【実施例】

【0068】

以下に実施例などを挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例などにより限定されるものではない。

【0069】

(実験動物の作製)

ラットグリオーマC6細胞を10%ウシ胎仔血清、高グルコースおよび抗生物質を添加したDulbecco's Modified Eagles Medium中で培養した。レンチウイルスベクターPGK-LucをSanford-Burnham-Prebys Medical Discovery InstituteのVirus Core Facilityにおいて作製した。C6細胞およびB16細胞をPGK-Lucレンチウイルスに感染させ、ルシフェラーゼ陽性細胞を作製した。定位フレームを用いてC6-Luc細胞(4μl PBSに懸濁した $4.8 \times 10^4$ 細胞)をC57BL/6マウスの脳線条体に注射した。2日後、ルシフェラーゼを発現する腫瘍についてマウスを画像化した。そのために、100μlのルシフェリン(30mg/ml PBS)を腹腔に注射した後、マウスを酸素(1ml/分)と共にイソフルラン気体(20ml/分)を用いて麻酔し、Xenogen IVIS 200 imagerを備えたカメラの下に置いた。光子数を1-10秒間測定した。dual tumor modelについて、同様にC6-Luc細胞をNOD-SCIDマウスの脳に注射し、腫瘍増殖をXenogen imagerによりモニタリングした。

脳腫瘍が検出可能になった時に、C6-Luc細胞(100μl PBSに懸濁した $2 \times 10^5$ 細胞)を同マウスの背側脇腹に皮下注射した。脳腫瘍および皮下腫瘍における光子数をXenogen imagerを用いて測定した。同系C57BL/6マウスにおいてB16-Luc細胞を用いたdual tumor modelも作製した。C6-Luc細胞について上述したように8-10週齢のC57BL/6雌性マウスの脳にB16-Luc細胞( $5 \times 10^4$ 細胞)を注射した。脳のB16-Luc腫瘍が検出可能になった時に、B16-Luc細胞( $2 \times 10^5$ 細胞)を皮下に注射した。

【0070】

検討例1: 担癌マウスへのIF7の投与実験

担癌マウスにIF7(即ち、IFLLWQR(配列番号10)のアミノ酸配列を有するL型ペプチド)を静脈投与すると、IF7は腫瘍周囲の血管に到達した後、血管内皮細胞の管腔側から小胞に取り込まれて基底側へ移動し、癌細胞が存在する間質へ遊離された。

マウス血管内皮F2細胞においても、Anxa1に結合したIF7はトランスサイト-

10

20

30

40

50

シスで能動的に腫瘍血管内皮細胞を縦断した。従って、IF7は脳腫瘍内の血管-脳腫瘍関門を通過する活性を有することが示唆された。

驚くべきことに、グリオーマ細胞を移植した脳腫瘍モデルマウスに、蛍光ラベルしたIF7を静脈注射したところ、蛍光が脳腫瘍部位に高濃度で集積する様子が観察された(図1および2)。また、蛍光は血管を乗り越えて脳の間質にあるがん細胞へ到達した。

【0071】

#### 検討例2: dual tumor modelへのIF7-SN38の投与実験

同一マウス内に皮下腫瘍と脳腫瘍を有するマウス(dual tumor model)を用いて、IF7-SN38の治療効果を検証した。実験は以下の通りに行った。

脳腫瘍の光子数が  $1.0 \times 10^6$  となったら(これは通常、2週間後に起こった)、IF7C(RR)-SN38を担癌マウスに尾静脈注射した。IF7C(RR)-SN38(14.2mgまたは6.63mmol)を100 $\mu$ lのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した後、1 $\mu$ lの溶液(142mgまたは66.3nmol)を50% Cremophore ELのエタノール溶液(10 $\mu$ l)で希釈し、更に90 $\mu$ lのPBSを加えた。注射あたりのIF7C(RR)-SN38量は142mg/マウスまたは7.1mg/kgであった。IF7の逆配列または同様に作製したRQ7C(RR)-SN38をコントロールとした。PBS中に溶解したイリノテカン、およびPBS単独をネガティブコントロールとした。

その結果、脳腫瘍と皮下腫瘍の両方が抑制され、その効果は皮下腫瘍よりも脳腫瘍の方が高かった(図3および4)。B16メラノーマの転移脳腫瘍モデルにおいても同様の結果が得られ、ホストマウスをC57BL/6やSCIDの系統に変えても結果は変わらなかった。これらの事実は、Anxa1を標的とするDDSは効率よく血液-脳腫瘍関門を越えるだけでなく、腫瘍細胞の種類やマウスの系統に関係なく脳腫瘍で優れた治療効果をあげて示している。

【0072】

#### 検討例3: IF7の薬物動態の検討

検討例1および2において実証されたように、IF7は優れた悪性腫瘍標的活性をもつが、臨床開発を目指す上で、難溶解性であることと安定性が低いことの2点に問題がある。即ち、まずIF7ペプチドはプロテアーゼ感受性であり分解されやすい。実際、A488-IF7を健常マウスの静脈に投与した実験では、末梢血の蛍光シグナルが1時間程度でほとんど消失した(図5)。しかし、担癌マウスへの尾静脈投与では、A488-IF7は末梢血から回収される蛍光が健常マウスよりも顕著に少なかった。この結果は、A488-IF7が分解を受けつつも大部分が腫瘍に急速に集積することを示唆する。また、IF7は疎水性が高く抗癌剤と結合させた化合物を静脈投与する際に沈殿を避けるためにDMSOに溶解した後に界面活性剤を加えるなど剤形に困難が伴う。

【0073】

#### 実施例1: dTIT7ペプチドの同定

本発明者らは、IF7に伴う上述したような弱点を克服できればより優れた治療薬が創り出されると考え、新規配列からなる次世代ペプチドの開発に着手した。

本研究の基礎となる技術は、7残基アミノ酸からなる約10億種類( $20^7$ 種類)のランダムペプチドを表面提示したファージライブラリーをスクリーニングするという方法である。生物を構成するアミノ酸は一部の例外を除いてすべてがL型のアミノ酸である。従って、通常ファージライブラリースクリーニングでは、標的に結合するD型ペプチドの配列を得ることは不可能である。そこで、新たにT7ファージライブラリーを用いた鏡像スクリーニング(Funke et al., Mol. Biosyst. 2009, 7: 3-6)を実施した(図6)。

下記の知見・仮定に基づきスクリーニングを実施し、Anxa1と高い結合親和性を有するファージを取得した。IF7がAnxa1のN末端15残基(MAMVSEFLKQAWFIE; 配列番号11)と相互作用すること、また、IF7はAnxa1のN末端15残基に修飾用Cys残基を付加した16残基のL-体ペプチド(L-MC16)と結合

することが明らかになっている (Sasai et al., 未発表)。まず、L-MC16と鏡像関係にあるD-MC16(16塩基が全てD-型)を合成し、T7ファージライブラリーを用いたスクリーニングにより、D-MC16と結合する7アミノ酸(L-型のTIT7ペプチド)を同定した。得られた配列を元にD-型のアミノ酸で構成されるTIT7ペプチド(dTIT7)を合成した。このdTIT7ペプチドはAnxa1と結合することが予想される。

また、ファージが提示するペプチド配列を解析する時に、以前はペプチド配列に様々な変異を導入して配列の最適化をするのが一般的であったが、現在我々は、得られたファージ群を次世代DNAシーケンサーにかけることで、のべ10,000種類以上の候補ペプチドの配列の中から最適なペプチド配列を一度に評価、同定できる。

解析の結果、Anxa1のN末部位に結合する配列として、TIT(トレオニン-イソロイシン-トレオニン)で始まる7アミノ酸の出現頻度が多く、中でもTIT7配列「TITWPTM」(配列番号12)が突出していることが明らかになった。TIT7の部分配列の頻度も上位に現れた一方、TIT7の配列置換体にあたるものは見出されなかった。また、TIT7のペプチドはIF7(IFLLWQR;配列番号10)の配列とは全く異なる新規の配列より構成されていた。

以上の結果は、7つのアミノ酸が全てD体アミノ酸で構成される直鎖型ペプチドdTIT7の取得に成功したことを示すものであった。

さらに、dTIT7とAnxa1の分子間相互作用をQCM法にて測定したところ、解離定数(Kd値)は $4.57 \times 10^{-8}$  Mであった。

また、図6Dに示す通りTIT7配列(配列番号12)以外に、LRFPTVL(配列番号13)、SPTSLLF(配列番号14)、MPTLTFR(配列番号15)、LKGLRI(配列番号16)、およびLLSWPSA(配列番号17)の配列のペプチドの出現頻度も高く、 $10^9$ 種類という膨大な数のランダムペプチドのうち、これら6つのペプチドが全体の50%程度を占めていた。

#### 【0074】

##### 実施例2：dTIT7ペプチドの脳腫瘍標的能

我々は、近赤外線蛍光試薬IRDye800CWで標識したdTIT7(IRDye-dTIT7)を作製した。ラットグリオーマをヌードマウスの脳に移植した脳腫瘍ヌードマウスモデルを作製し、マウスの尾静脈からIRDye-dTIT7を注入した。その結果、IRDye-dTIT7が脳腫瘍モデルマウスの腫瘍部位に集積することがin vivoイメージングによって観察された(図7)。

#### 【0075】

##### 実施例3：dTIT7結合抗癌剤の脳腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果

次に、我々はdTIT7-抗癌剤のコンジュゲートが脳腫瘍モデルマウスに与える影響を調べた。

dTIT7ペプチドに抗癌剤ゲルダナマイシンを結合させたGA-dTIT7(図8)は、プロテアーゼにもエステラーゼにも耐性で生体内でより安定であると考えられる。推奨投与量の1/10量(モル数換算)のGA-dTIT7を担癌マウス(メラノーマB16細胞、皮下投与)に1-2日おきに静脈投与したところ、腫瘍の増殖は顕著に抑制され、病理組織学的観察ではGA-dTIT7投与マウスの腫瘍部位に大量の壊死が観察された。このような効果は、連日投与が必要であったIF7よりも(Hatakeyama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108:19587-92, 2011)、dTIT7が優れている可能性を強く示唆する。

さらに驚くべきことに、B16細胞を脳に移植した脳腫瘍モデルにGA-dTIT7を経口投与すると腫瘍退縮が観察され、薬剤の投与を中止した後も腫瘍が減少し続け、ついには完全治癒が4匹中2匹で観察された(図9)。同様の治療効果がC6細胞を使った脳腫瘍モデルでも観察された。このことは、GA-dTIT7が経口投与可能な抗癌剤として脳腫瘍を完全治癒に導く可能性を示すものである。

#### 【0076】

#### 実施例4：dLRF7、dSPT7、dMPT7およびdLLS7ペプチドとAnxa1の分子間相互作用

実施例1に記載のTIT7配列（配列番号12）以外の出現頻度が高かったLRFPTVL（配列番号13）、SPTSLLF（配列番号14）、MPTLTFR（配列番号15）およびLLSWPSA（配列番号17）の配列のペプチドについても、dTIT7ペプチドと同様に、D-型のアミノ酸で構成されるペプチド（dLRF7、dSPT7、dMPT7およびdLLS7ペプチド）を合成し、下記方法により、Anxa1との分子間相互作用を、それぞれ測定した。

センサーチップをピラニア溶液で5分間2回洗浄し、その後、0.9mMヒドロキシ-EG3-ウンデカンチオール（Dojindo）および0.1mMアミノ-EG6-ウンデカンチオール（Dojindo）の溶液に一晩浸した。水で洗浄した後、チップを1mMGMBS（Dojindo）で処理し、室温で1時間インキュベートした。残りのGMBSを洗い流した後、1mMのペプチド溶液をチップ上に加え、30分間インキュベートした。ペプチド結合センサーチップをQCM装置（Single-Q、ASONE）に設置し、0.5mlのPBSをウェルに添加した。種々の投与量のAnxa1を反応チャンバに注入し、各ペプチドに対する結合親和性（kd値）を決定した。

結果、試験した全てのペプチドがAnxa1への陽性結合を示した（表1および図11）。

【0077】

【表1】

合成ペプチド名	Kd値 (M)
dLRF7	$3.119 \times 10^{-8}$
dSPT7	$9.029 \times 10^{-8}$
dMPT7	$2.982 \times 10^{-7}$
dLLS7	$5.418 \times 10^{-8}$

【0078】

#### 実施例5：dLRF7、dSPT7、dMPT7およびdLLS7ペプチドの脳腫瘍標的能

末端システインを付加して伸長させたdLRF7、dSPT7、dMPT7およびdLLS7ペプチドを化学合成した。次いで、各ペプチドと近赤外蛍光色素IRDye 800CWマレイミド（Li-Cor）とを、システイン残基を介して結合させた。生じたペプチドコンジュゲートをHPLCで精製し、次いで、凍結乾燥した。各ペプチド-IRDyeコンジュゲートをDMSOおよび6%グルコースに溶解し、そして脳腫瘍モデルマウスに、100μl/マウスで静脈注射した。24時間後、IVISスペクトル（Perkin Elmer）により蛍光画像を測定した。

結果、dLLS7を注射したマウス以外の全てのマウスで、脳腫瘍部位にIRDyeの強いシグナルを示し、dLLS7以外のdLRF7、dMPT7およびdSPT7の3つのペプチドが、血管系経路を介した脳腫瘍標的能を有することを示した（図12）。

【0079】

本発明は、日本国で出願された特願2016-159743（出願日：2016年8月16日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

[配列表]

## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and  
 Technology  
 <120> Cancer targeting peptides  
 <130> 092619  
 <150> JP 2016-159743  
 <151> 2016-08-16  
 <160> 17 10  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> A tumor-targeting peptide  
 <400> 1  
 Met Thr Pro Trp Thr Ile Thr  
 1 5 20  
 <210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> A tumor-targeting peptide  
 <400> 2  
 Leu Val Thr Pro Phe Arg Leu  
 1 5 30  
 <210> 3  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> A tumor-targeting peptide  
 <400> 3  
 Ala Ser Pro Trp Ser Leu Leu  
 1 5 40  
 <210> 4  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> A tumor-targeting peptide  
 <400> 4  
 Phe Leu Leu Ser Thr Pro Ser

1

5

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> A tumor-targeting peptide

<400> 5

Arg Phe Thr Leu Thr Pro Met  
1 5

10

<210> 6  
<211> 1556  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 6

acttgtttca ctttgttttt ggacatagct gagccatgta cttcaaacag aaggcagcca 60  
attactaact tctggttgct aggtgtggct tcctttaaaa tcctataaaa tcagaagccc 120  
aagtctccac tgccagtgtg aaatcttcag agaagaatct ctcttttagtt ctttgcaaga 180  
aggtagagat aaagacactt tttcaaaaat ggcaatggta tcagaattcc tcaagcaggc 240  
ctggtttatt gaaaatgaag agcaggaata tgttcaaact gtgaagtcac ccaaaggtgg 300  
tcccggatca gcggtgagcc cctatocctac cttcaatcca tcctcggatg tcgctgcctt 360  
gcataaggcc ataatggtta aaggtgtgga tgaagcaacc atcattgaca ttctaactaa 420  
gcgaaacaat gcacagcgtc aacagatcaa agcagcatat ctccaggaaa caggaaagcc 480  
cctggatgaa aactgaaga aagcccttac aggtcacctt gaggaggttg ttttagctct 540  
gctaaaaact ccagcgcaat ttgatgctga tgaacttctg gctgccatga agggccttgg 600  
aactgatgaa gatactctaa ttgagatctt ggcatcaaga actaacaag aaatcagaga 660  
cattaacagg gtctacagag aggaactgaa gagagatctg gccaaagaca taacctcaga 720  
cacatctgga gatcttcgga acgctttgct ttctcttgct aagggtgacc gatctgagga 780  
ctttgggtgtg aatgaagact tggctgattc agatgccagg gccttgtatg aagcaggaga 840  
aaggagaaag gggacagacg taaacgtggt caataccatc cttaccacca gaagctatcc 900  
acaacttgc agagtgttcc agaaatacac caagtacagt aagcatgaca tgaacaaagt 960  
tctggacctg gagttgaaag gtgacattga gaaatgcctc acagctatcg tgaagtgcgc 1020  
cacaagcaaa ccagctttct ttgcagagaa gcttcatcaa gccatgaaag gtggttgaac 1080  
tcgccataag gcattgatca ggattatggt ttcccgttct gaaattgaca tgaatgatat 1140  
caaagcattc taccagaaga tgtatggtat ctccccttgc caagccatcc tggatgaaac 1200  
caaaggagat tatgagaaaa tcctgggtggc tctttgtgga ggaactaaa cattcccttg 1260  
atggtctcaa gctatgatca gaagacttta attatatatt ttcatcctat aagcttaaat 1320  
aggaaagttt cttcaacagg attacagtgt agctacctac atgctgaaaa atatagcctt 1380

20

30

40

taaatacattt ttatattata actctgtata atagagataa gtccattttt taaaaatggt 1440  
 ttccccaac cataaaacc tatacaagtt gttctagtaa caatacatga gaaagatgtc 1500  
 tatgtagctg aaaataaat gagtcacaa gacaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1556

<210> 7  
 <211> 346  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7 10

Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn  
 1 5 10 15

Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro  
 20 25 30

Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val  
 35 40 45

Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr 20

Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile  
 65 70 75 80

Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu  
 85 90 95

Lys Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu  
 100 105 110

Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Ala Ala Met Lys 30

Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Ala Ser Arg  
 130 135 140

Thr Asn Lys Glu Ile Arg Asp Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu  
 145 150 155 160

Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe 40

Arg Asn Ala Leu Leu Ser Leu Ala Lys Gly Asp Arg Ser Glu Asp Phe  
 180 185 190

Gly Val Asn Glu Asp Leu Ala Asp Ser Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu  
 195 200 205

Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Asn Thr Ile  
 210 215 220



Leu Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gln Leu Arg Arg Val Phe Gln Lys Tyr  
225 230 235 240

Thr Lys Tyr Ser Lys His Asp Met Asn Lys Val Leu Asp Leu Glu Leu  
245 250 255

Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Ala Ile Val Lys Cys Ala Thr  
260 265 270

Ser Lys Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu His Gln Ala Met Lys Gly  
275 280 285

10

Val Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser  
290 295 300

Glu Ile Asp Met Asn Asp Ile Lys Ala Phe Tyr Gln Lys Met Tyr Gly  
305 310 315 320

Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu  
325 330 335

20

Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn  
340 345

- <210> 8
- <211> 1395
- <212> DNA
- <213> Mus musculus

<400> 8

```

gtctgaaacc atctgagcag agtctctctt cagtccccgg gaagacaagc aaatacaaag      60
atacttctct aaaaatggca atggtatcag aattcotcaa gcaggcccggt tttottgaaa      120
atcaagaaca ggaatatggt caagctgtaa aatcatacaa aggtggtcct gggtcagcag      180
tgagccccta cccttccttc aatgtatcct cggatgttgc tgcccttgac aaagctatca      240
tggttaaagg tgtggatgaa gcaaccatca ttgacattct taocaagagg accaatgctc      300
agcggccagca gatcaaggcc gcgtacttac aggagaatgg aaagcccttg gatgaagtct      360
tgagaaaagc cottacaggc cacctggagg aggttgtttt ggctatgcta aaaactccag      420
ctcagtttga tgcagatgaa ctccgtggtg ccatgaaggg acttggaaca gatgaagaca      480
ctctcattga gattttgaca acaagatcta acgaacaaat cagagagatt aatagagtct      540
acagagaaga gctgaaaaga gatctggcca aagacatcac ttcagatata tctggagact      600
ttcggaaaagc cttgcttgcg cttgccaagg gtgaccgttg tcaggacttg agtgtgaatc      660
aagatttggc tgatacagat gccagggctt tgtatgaagc tggagaaaag agaaagggga      720
cagacgtgaa cgtcttcacc acaattctga ccagcaggag ctttcctcat cttgcagag      780
tgtttcagaa ttacggaaag tacagtcaac atgacatgaa caaagctctg gatctggaac      840
tgaagggatg cattgagaag tgcctcacia ccatcgtgaa gtgtgccacc agcaactccag      900

```

30

40

ctttctttgc cgagaagctg tacgaagcca tgaagggtgc cggaactcgc cataaggoat 960  
 tgatcaggat tatggctccc cgttcggaaa ttgacatgaa tgaatcaaa gtattttacc 1020  
 agaagaagta tggaaatctct ctttgccaag ccatacctgga tgaaaccaaa ggagactatg 1080  
 aaaaaatcct ggtggctctg tgtggtggaa actagacatc ccaactattc tgcaaggttc 1140  
 tgaggagaat gtctcttagc tgttttcctt cgatggcatg ggcttaagta ggaaagtgc 1200  
 tttggcagat aagtctaatt acctgctttg aataatatag cctataaata gattttacat 1260  
 cactactctg tacaatagag aaatacttgt tttgttaatt atgtttatcc caaattataa 1320 10  
 agccccataa gcaagtcact ttggtacat tcttgagaaa gaagtttaca tataataaaa 1380  
 taaaacaatt ttata 1395

<210> 9  
 <211> 346  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 9

Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Arg Phe Leu Glu Asn 20  
 1 5 10 15

Gln Glu Gln Glu Tyr Val Gln Ala Val Lys Ser Tyr Lys Gly Gly Pro  
 20 25 30

Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Ser Phe Asn Val Ser Ser Asp Val  
 35 40 45

Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr  
 50 55 60

Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Thr Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile 30  
 65 70 75 80

Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Asn Gly Lys Pro Leu Asp Glu Val Leu  
 85 90 95

Arg Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Met Leu  
 100 105 110

Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Gly Ala Met Lys 40  
 115 120 125

Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Thr Thr Arg  
 130 135 140

Ser Asn Glu Gln Ile Arg Glu Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu  
 145 150 155 160

Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe  
 165 170 175

Arg Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala Lys Gly Asp Arg Cys Gln Asp Leu  
180 185 190

Ser Val Asn Gln Asp Leu Ala Asp Thr Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu  
195 200 205

Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Thr Thr Ile  
210 215 220

Leu Thr Ser Arg Ser Phe Pro His Leu Arg Arg Val Phe Gln Asn Tyr  
225 230 235 240

10

Gly Lys Tyr Ser Gln His Asp Met Asn Lys Ala Leu Asp Leu Glu Leu  
245 250 255

Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Thr Ile Val Lys Cys Ala Thr  
260 265 270

Ser Thr Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu Tyr Glu Ala Met Lys Gly  
275 280 285

20

Ala Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser  
290 295 300

Glu Ile Asp Met Asn Glu Ile Lys Val Phe Tyr Gln Lys Lys Tyr Gly  
305 310 315 320

Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu  
325 330 335

Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn  
340 345

30

- <210> 10
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> A tumor-targeting peptide

<400> 10

Ile Phe Leu Leu Trp Gln Arg  
1 5

40

- <210> 11
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu  
1 5 10 15

<210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TIT7 sequence

<400> 12

Thr Ile Thr Trp Pro Thr Met  
 1 5

10

<210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> A random peptide

<400> 13

Leu Arg Phe Pro Thr Val Leu  
 1 5

20

<210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> A random peptide

<400> 14

Ser Pro Thr Ser Leu Leu Phe  
 1 5

30

<210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> A random peptide

<400> 15

Met Pro Thr Leu Thr Phe Arg  
 1 5

40

<210> 16  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> A random peptide

<400> 16

Leu Lys Gly Met Leu Arg Ile  
 1 5

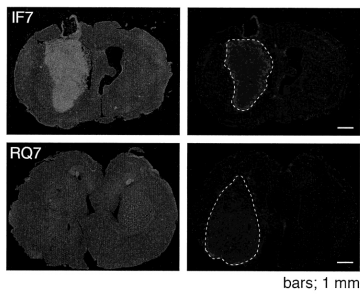
<210> 17  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> A random peptide

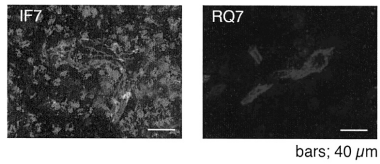
<400> 17

Leu Leu Ser Trp Pro Ser Ala  
1 5

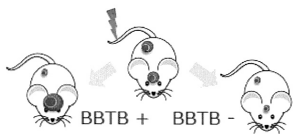
【 図 1 】



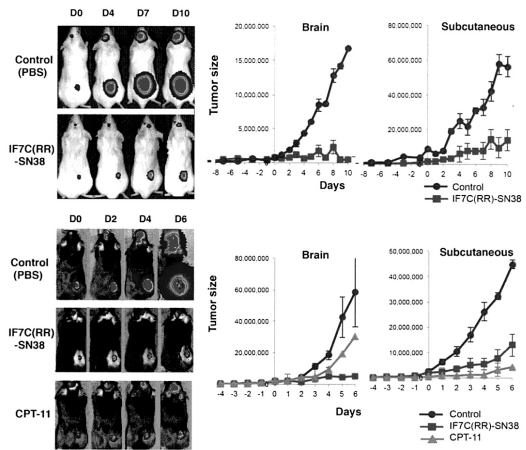
【 図 2 】



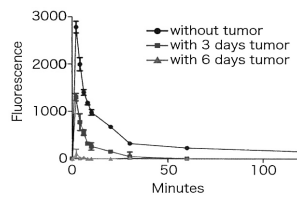
【 図 3 】



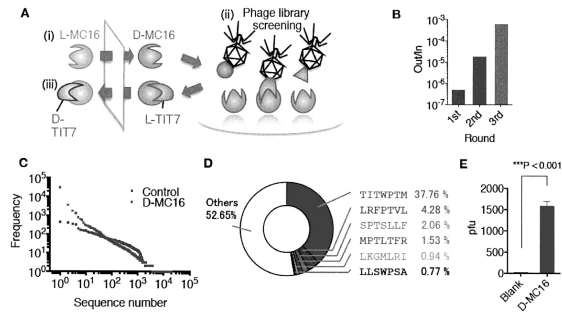
【 図 4 】



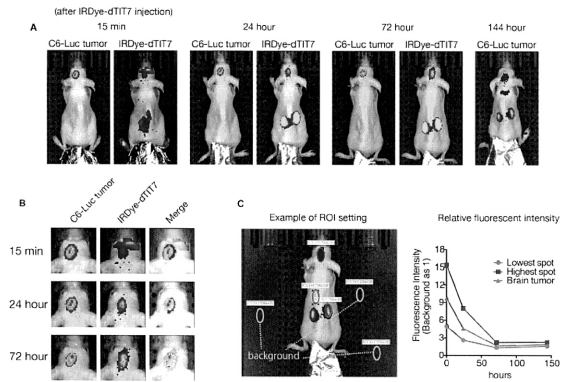
【 図 5 】



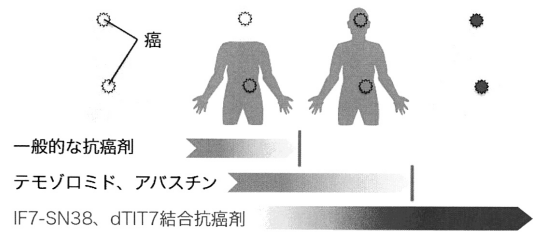
【 図 6 】



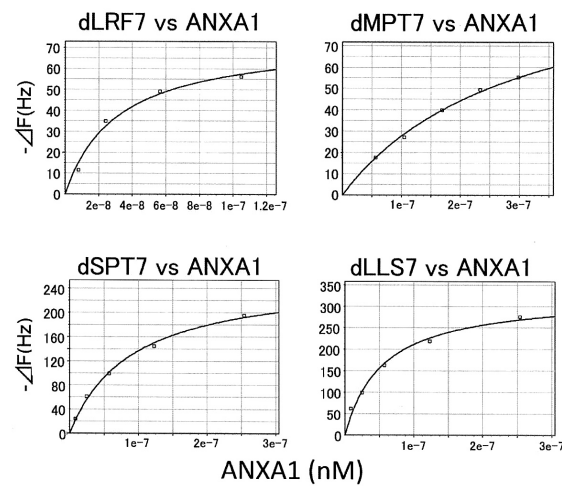
【 図 7 】



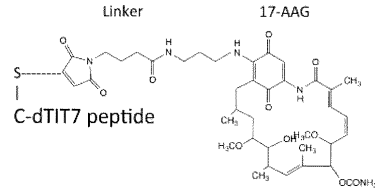
【 図 10 】



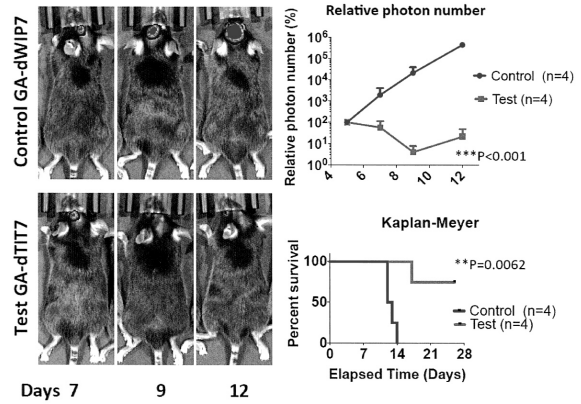
【 図 11 】



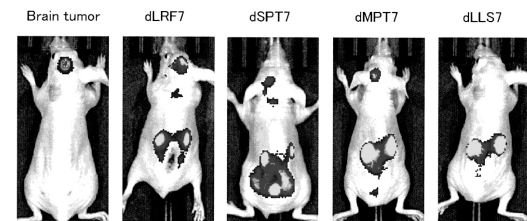
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 12 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 49/04	(2006.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K 49/14	(2006.01)	A 6 1 K	49/04
A 6 1 K 49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/14
A 6 1 K 51/08	(2006.01)	A 6 1 K	49/00
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	A 6 1 K	51/08 2 0 0
		C 0 7 K	19/00

## 早期審査対象出願

- (74)代理人 100151301  
弁理士 戸崎 富哉
- (74)代理人 100179039  
弁理士 伊藤 洋介
- (72)発明者 福田 道子  
茨城県つくば市梅園1 - 1 - 1 中央第2 国立研究開発法人産業技術総合研究所内
- (72)発明者 野中 元裕  
茨城県つくば市梅園1 - 1 - 1 中央第2 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 国際公開第2015/016768(WO, A1)  
国際公開第2010/022444(WO, A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/REGISTRY(STN)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
UniProt/GeneSeq