(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7525855号
(P7525855)

(45)発行日　令和6年7月31日(2024.7.31)

(24)登録日　令和6年7月23日(2024.7.23)

(51)国際特許分類

Ｃ０７Ｋ　14/47　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	14/47	ＺＮＡ
Ｃ０７Ｋ　7/06　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	7/06	
Ｃ０７Ｋ　7/08　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	7/08	
Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/12	
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	35/00	

ＦＩ

請求項の数　12　（全39頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-557810(P2020-557810)
(86)(22)出願日　令和1年11月28日(2019.11.28)
(86)国際出願番号　PCT/JP2019/046505
(87)国際公開番号　WO2020/111167
(87)国際公開日　令和2年6月4日(2020.6.4)
審査請求日　令和4年11月10日(2022.11.10)
(31)優先権主張番号　特願2018-225660(P2018-225660)
(32)優先日　平成30年11月30日(2018.11.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　304020292
国立大学法人徳島大学
徳島県徳島市新蔵町２丁目２４番地
(73)特許権者　502240113
オンコセラピー・サイエンス株式会社
神奈川県川崎市川崎区東田町１番地２
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＢＩＧ３－ＰＨＢ２相互作用阻害ＰＨＢ２由来ペプチドを含む乳がん治療薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害するペプチドであって、以下の（a）～（ｂ）からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるペプチド：

（a）配列番号25、123、124、125、1、106～109および114～118からなる群より選択されるアミノ酸配列；および

（ｂ）配列番号25、123、124、125、1、106～109および114～118からなる群より選択されるアミノ酸配列において、配列番号28のアミノ酸配列における15番目のグリシン及び18番目のグリシンに対応する位置以外の1個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列。

【請求項２】

配列番号25、123、124、125、1、106～109、および114～118からなる群より選択される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】

細胞膜透過性物質により修飾されている、請求項1に記載のペプチド。

【請求項４】

環状型である、請求項1に記載のペプチド。

【請求項５】

架橋型である、請求項1に記載のペプチド。

【請求項６】
以下の（i）及び（ii）のいずれか一方又は両方の性質を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載のペプチド：
（i）BIG3陽性細胞の細胞増殖を抑制する；及び
（ii）BIG3陽性細胞において、PHB2ポリペプチドのセリン残基のリン酸化を促進する。
【請求項７】
請求項1～6のいずれか一項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。
【請求項８】
請求項1～6のいずれか一項に記載のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される少なくとも１つの成分、ならびに薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
【請求項９】
乳がん細胞の増殖を抑制するため、又は乳がんを治療及び／若しくは予防するための、請求項8に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
乳がんがBIG3陽性の乳がんである、請求項9に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
乳がんがエストロゲン受容体陽性の乳がんである、請求項9～10のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
請求項1～6のいずれか一項に記載のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される成分の、乳がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物の製造における使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、BIG3-PHB2相互作用を阻害するPHB2由来ペプチド及びそれを含む乳がん治療薬に関する。
【背景技術】
【０００２】
エストロゲン受容体α（Estrogen-receptor:ERα）は、乳がんの発生と進行に中心的な役割を果たす。近年の乳がんに対する内分泌療法は、選択的ERαモジュレーター（例えば、タモキシフェン及びラロキシフェン）、ERαダウンレギュレーター（例えば、フルベストラント）、およびアロマターゼ阻害剤（aromatase inhibitor:AI）を使用するものであり、ERαシグナリングを主に標的としている（非特許文献１～３）。これらの治療法のうち、ERαへの競合的結合を介して乳がん細胞の増殖を阻害するタモキシフェンを用いる方法は、ERα陽性乳がん患者に対する標準療法である。しかしながら、タモキシフェン療法は、しばしば有効でない場合があり、患者は内分泌療法耐性腫瘍を再発して死亡することもある（非特許文献４、５）。また、エストロゲン合成をブロックするAIは、タモキシフェンと比較して、良好な有効性、無再発生存期間の有意な延長、および閉経女性における再発期間の延長のような実質的な臨床効果をもたらすが、AI療法を受けた一部の患者は再発する（非特許文献６、７）。これらの内分泌療法の有効性に影響を与える正確な分子事象は、未だ解明されていない。
【０００３】
がん特異的タンパク質であるブレフェルジンA阻害グアニンヌクレオチド交換タンパク質3（brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3:BIG3）と腫瘍サプレッサーであるプロヒビチン2（prohibitin 2:PHB2）との複合体は、ERα陽性乳がんにおけるエストロゲンシグナル調節において中心的な役割を果たす（非特許文献８、９）。BIG3は、PHB2と結合してエストロゲン依存性転写活性化を抑制するPHB2の能力を阻害し、恒常的なERα活性をもたらす。

これらの知見に基づき、BIG3-PHB2相互作用の阻害によりBIG3との複合体からPHB2を遊離させ、PHB2の腫瘍抑制活性を発揮させるという戦略は、乳がんの新規療法となりうる。この戦略に基づき、本発明者らは、以前、BIG3-PHB2相互作用を特異的に阻害するBIG3のドミナントネガティブペプチドを開発した（特許文献１）。このペプチドは、PHB2の腫瘍抑制活性を再活性化することにより、乳がん増殖をもたらすERαシグナルパスウェイを阻害し、乳がん増殖を抑制することが確認されている（特許文献１）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００４】

【文献】WO2013/018690

【非特許文献】

【０００５】

【文献】Johnston, S. R., Clin. Cancer Res. 16(7), 1979-87 (2010).

【文献】Fisher, B. et al., J. Natl. Cancer Inst. 97(22), 1652-62 (2005).

【文献】Jordan, V. C., Nature Rev. Drug Discov. 2(3), 205-13 (2003).

【文献】Clarke, R. et al., Pharmacol. Rev. 53(1), 25-71 (2001).

【文献】Fisher, B. et al., J. Natl. Cancer Inst. 93(9), 684-90 (2001).

【文献】Chlebowski, R. et al., Breast 2, S1-11 (2009).

【文献】Chumsri, S. et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 125(1-2), 13-22 (2011).

【文献】Kim, J. W. et al., Cancer Sci. 100(8), 1468-78 (2009).

【文献】Yoshimaru, T. et al., Nat. Commun. 4, 2443 (2013).

【文献】Yoshimaru, T. et al., Sci Rep. 7(1), 1821 (2017).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

さきに述べたとおり、エストロゲン受容体(ER)活性化制御分子BIG3が抑制因子PHB2と相互作用してERの恒常的活性化を導くこと、およびBIG3-PHB2相互作用標的阻害ペプチド(ERAP：BIG3タンパク質の165番目から177番目までのアミノ酸配列（QMLSDLTLQLRQR：配列番号33）によるエストロゲン（E2）依存性乳がん細胞増殖抑制効果が明らかにされている(特許文献1、WO2017/126461)。しかしながら、BIG3配列由来のERAPは、PHB2に結合することによって相互作用阻害を果たすが、PHB2はヒトの全身の臓器にて発現を認めることから、がん組織以外の臓器における非選択的な作用の発現を否定することはできない。

【０００７】

そのため、本発明は、BIG3-PHB2相互作用を標的とし、乳がんに対する高い選択性を期待できる治療戦略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、in silico解析を通じて予測されたPHB2アミノ酸配列上のタンパク質相互作用候補領域のデータに基づいて、複数のPHB2由来ペプチド(PHB2ペプチド)を設計し、それらを用いて細胞増殖抑制効果を指標とした相互作用領域の同定のスクリーニングを進めた。その結果、PHB2ペプチドNo.1（11-RLPAGPRGMGTA-22（配列番号1））とPHB2ペプチドNo.5（76-QYPIIYDIRARPRKI-90（配列番号5））において、それぞれ約50%の増殖抑制効果を認め、特にPHB2ペプチドNo.1およびNo.5の併用にて、ERAPと同様の90%を超える増殖抑制効果、BIG3-PHB2相互作用阻害効果を認めることに成功した。さらに、これらの効果は、PHB2ペプチドNo.1およびNo.5の周辺の配列からなるペプチドや、PHB2ペプチドNo.1およびNo.5における種々の位置のアミノ酸残基を置換したペプチドについても認められた。

【０００９】

一方、エストロゲン受容体等を発現しないが、BIG3の発現が認められているトリプルネ

ガティブ乳がん細胞においても、PHB2ペプチドNo.1およびNo.5の細胞増殖抑制効果が認められた。また、これらのペプチドの併用では効果の増強が認められた。ホルモン等の増殖シグナルに非依存的に増殖するトリプルネガティブ乳がんでは、細胞内でこれらのシグナル受容なしに、PHB2とBIG3が結合することで増殖の活性化が起こっていると考えられる。PHB2由来ペプチドは、少なくともBIG3を発現している乳がんにおいて、BIG3とPHB2の結合を阻害することにより細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。

【００１０】

このように、本発明者らは、BIG3-PHB2相互作用を阻害し、E2依存性乳がんおよびトリプルネガティブ乳がんに対する抗腫瘍効果を発揮するPHB2由来ペプチドを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のペプチド、ならびにその用途を提供する。

【００１１】

［１］PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害するペプチド。

［２］配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における11～21番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部、76～88番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部、および44～57番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部のうちのいずれか１つまたは組み合わせを含む、［1］に記載のペプチド。

［３］以下の（a）～（f）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害するペプチド：

（a）配列番号1および36～41（PHB2配列由来ペプチドNo.1、36～41）からなる群より選択されるアミノ酸配列；

（b）配列番号1および36～41（PHB2配列由来ペプチドNo.1、36～41）からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列；

（c）配列番号5および47～53（PHB2配列由来ペプチドNo.5、47～53）からなる群より選択されるアミノ酸配列；

（d）配列番号5および47～53（PHB2配列由来ペプチドNo.5、47～53）からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列；

（e）配列番号82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.82～83）からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

（f）配列番号82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.82～83）からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列。

［４］以下の（a'）～（b'）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、［3］に記載のペプチド：

（a'）配列番号1および36～41（PHB2配列由来ペプチドNo.1、36～41）からなる群より選択されるアミノ酸配列において、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における15番目のグリシン（Gly/G）及び18番目のグリシンに対応する位置以外の1個、2個、または数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列；ならびに

（b'）配列番号5および47～53（PHB2配列由来ペプチドNo.5、47～53）からなる群より選択されるアミノ酸配列において、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における82番目のアスパラギン酸（Asp/D）に対応する位置以外の1個、2個、または数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列。

［５］80残基以下のアミノ酸残基からなる、［1］～［4］のいずれかに記載のペプチド。

［６］25残基以下のアミノ酸残基からなる、［1］～［5］のいずれかに記載のペプチド。

［７］配列番号1、5、36～41、47～53、および82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.1、5、36～41、47～53、82～83）からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、［1］～［6］のいずれかに記載のペプチド。

［８］細胞膜透過性物質により修飾されている、［1］～［7］のいずれかに記載のペプチド。
［９］環状型である、［1］～［8］のいずれかに記載のペプチド。
［１０］架橋型である、［1］～［9］のいずれかに記載のペプチド。
［１１］以下の（i）及び（ii）のいずれか一方又は両方の性質を有する、［1］～［10］のいずれかに記載のペプチド：
（i）BIG3陽性細胞の細胞増殖を抑制する；及び
（ii）BIG3陽性細胞において、PHB2ポリペプチドのセリン残基のリン酸化を促進する。
［１２］［1］～［11］のいずれかに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。
［１３］［1］～［11］のいずれかに記載の1種もしくは複数種のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される少なくとも１つの成分、ならびに薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
［１４］配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における11～21番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチド、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における44～57番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチド、ならびに配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における76～88番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドのうちのいずれか１つまたは組み合わせを含む、［13］に記載の医薬組成物。
［１５］がん細胞の増殖を抑制するため、又はがんを治療及び／若しくは予防するための、［13］又は［14］に記載の医薬組成物。
［１６］がんがBIG3陽性のがんである、［15］に記載の医薬組成物。
［１７］がんが乳がんである、［15］又は［16］に記載の医薬組成物。
［１８］がんがエストロゲン受容体陽性のがんである、［15］～［17］のいずれかに記載の医薬組成物。
［１９］［1］～［11］のいずれかに記載の1種もしくは複数種のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される少なくとも１つを対象に投与する工程を含む、がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための方法。
［２０］配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における11～21番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチド、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における44～57番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチド、ならびに配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における76～88番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドのうちのいずれか１つまたは組み合わせを投与する工程を含む、［19］に記載の方法。
［２１］薬物療法抵抗性の乳がん患者（例えば、トリプルネガティブの乳がん患者）を選択する工程と、［1］～［11］のいずれかに記載の1種もしくは複数種のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される少なくとも１つを対象に投与する工程とを含む、薬物療法抵抗性の乳がん（例えば、トリプルネガティブの乳がん）の治療及び予防のいずれか又は両方のための方法。
【００１２】
あるいは本発明は、前記［1］～［11］のいずれかに記載の1種もしくは複数種のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される少なくとも１つの、がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物の製造における使用を提供する。また本発明は、がんの治療及び予防のいずれか又は両方において使用するための、前記［1］～［11］のいずれかに記載の1種もしくは複数種のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される少なくとも１つに関する。更に

本発明は、前記［1］～［11］のいずれかに記載の1種もしくは複数種のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される少なくとも１つを、担体と混合あるいは配合する工程を含む、がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物の製造方法に関する。

【発明の効果】

【００１３】

本発明のペプチドは、ヒトの全身の臓器にて発現が認められるPHB2ではなく、特にエストロゲン受容体陽性のがんに特異的に高発現するタンパク質であるBIG3への結合能を有し、BIG3-PHB2相互作用を阻害することができる。そのため、本発明のペプチドは、エストロゲン受容体陽性のがんに対する高い選択性を期待できる。

また、本発明のペプチドは、エストロゲン依存性乳がん細胞のみならず、トリプルネガティブ乳がん細胞に対する増殖抑制効果も示す。これまで、トリプルネガティブ乳がんには、有効な分子標的治療薬がなく、既存の副作用の強い抗がん剤による治療しか選択肢がなかった。一方、本発明のペプチドによる細胞増殖抑制効果は、BIG3の発現が認められない正常乳腺上皮細胞においては認められなかった。これらのことから、本発明のペプチドは、ホルモンの依存性の有無にかかわらず、BIG3陽性のがんの治療薬として有用であることが示唆された。

【図面の簡単な説明】

【００１４】

【図１－１】エストロゲン依存性細胞増殖を抑制するPHB2配列由来ペプチドのスクリーニングを示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を10μMの各PHB2配列由来ペプチドで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激し、24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。グラフの下にはヒトPHB2タンパク質の全長配列を示しており、下線を付した部分の配列のC末端にアルギニン残基を8個付加した合成ペプチドをアッセイに用いた。また、太字はin silico解析でBIG3との相互作用に関与することが示唆されたアミノ酸を、四角で囲んだ「S」はPHB2のリン酸化部位を、破線はBIG3との結合が証明されている領域を表している。

【図１－２】（B, C）11-22aa（B）および76-90aa（C）を中心としたPHB2配列由来のペプチド（配列番号1、34～43、5、44～55）の各10μMでMCF-7を処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。グラフの左には、アッセイに用いた合成ペプチドに含まれるPHB2由来配列の位置を示している。

【図１－３】（D）11-22aaのPHB2配列由来ペプチドと76-90aaを中心とした各PHB2配列由来のペプチドの各10μMを併用し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。（E）76-90aaのPHB2配列由来ペプチドと11-22aaを中心とした各PHB2配列由来のペプチドの各10μMを併用し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図２】エストロゲン依存性増殖の抑制に対するPHB2ペプチド11-22aaと76-90aaの併用効果を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を各10μMのERAP（ポジティブ・コントロール）、PHB2ペプチド11-22aa、76-90aa、86-100aa（ネガティブ・コントロール）、および11-22aaと76-90aaの併用、76-90aaと86-100aaの併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（B）PHB2ペプチド11-22aa、76-90aa、およびその併用がMCF-7のBIG3とPHB2の相互作用に対する阻害効果をウェスタンブロットにより評価した。MCF-7を各PHB2ペプチドの20μMと50μMで24時間処理した後、細胞を溶解し、抗BIG3抗体を用いて免疫沈降し、図に示した抗体を用いたイムノブロット解析を行った。結合阻害率は非処理細胞でのPHB2のバンド面積を100としたときの比率で表した。（C）ヒト乳がん細胞株MCF-7を各10μMのERAP、PHB2ペプチド11-22aa、76-90aa、86-100aa、および11-22aaと76-90aaの併用、76-90aaと86-10

0aaの併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後のPHB2（Ser39）のリン酸化をウェスタンブロットにより評価した。リン酸化強度はエストロゲン存在下でERAP処理したときのリン酸化バンドの面積を1.0としたときの比率で表した。

【図３】PHB2ペプチド11-90aaがエストロゲン依存性増殖とBIG3とPHB2の相互作用に及ぼす影響を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7をPHB2ペプチド11-90aa（10, 20, 50μM）、11-22aa（50μM）、76-90aa（50μM）、および11-22aaと76-90aaの併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（B）PHB2ペプチド11-90aa、および10μM ERAP（ポジティブ・コントロール）がMCF-7のBIG3とPHB2の相互作用に対する阻害効果をウェスタンブロットにより評価した。（C）ヒト乳がん細胞株MCF-7をPHB2ペプチド11-90aa（20, 50, 100μM）および10μM ERAPで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後のPHB2（Ser39）のリン酸化をウェスタンブロットにより評価した。リン酸化強度は未処理のリン酸化バンド面積を1.0としたときの比率で表した。

【図４】分岐型および環状型PHB2ペプチドの模式図を表す。（A）直鎖結合型PHB2ペプチド。（B）分岐型PHB2ペプチド。（C）環状型PHB2ペプチド。

【図５】分岐型および環状型PHB2ペプチドによるエストロゲン依存性増殖の抑制効果を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を各10μMの直鎖型ペプチド11-22aa、76-90aa、11-22aaと76-90aaの併用、直鎖結合型、分岐結合型、および環状型11-21aa、環状型76-88aa、環状型ペプチドの併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（B）直鎖型11-22aa、直鎖型76-90aa、直鎖結合型、分岐結合型、および環状型11-21aa、環状型76-88aaペプチドは、正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に影響を及ぼさないことを示したMTTアッセイの結果を示す。（C）ヒト乳がん細胞株MCF-7を各10μMの直鎖型ペプチド11-22aa、76-90aa、11-22aaと76-90aaの併用、直鎖結合型、分岐結合型、および環状型11-21aa、環状型76-88aa、環状型ペプチドの併用で処理したときのBIG3とPHB2の相互作用に対する阻害効果をウェスタンブロットにより評価した。

【図６】エストロゲン依存性増殖の抑制に対する環状型PHB2ペプチドの併用効果を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を直鎖型11-22aaおよび環状型11-21aa（左図）、または直鎖型76-90aaおよび環状型76-88aa（右図）で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間ごとに96時間までMTTアッセイで阻害効果を評価した。（B）環状型11-21aa、環状型76-88aaペプチドは、正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に影響を及ぼさないことを示したMTTアッセイの結果を示す。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図７】エストロゲン依存性増殖に対する環状型PHB2ペプチドの濃度依存的な抑制効果を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を環状型11-21aaおよび環状型76-88aaを各0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20μMで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（B）ヒト乳がん細胞株MCF-7を環状型11-21aa（4μM）、環状型76-88aa（2μM）、およびその併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間ごとに96時間までMTTアッセイで阻害効果を評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（C）環状型11-21aa（4μM）、環状型76-88aa（2μM）、およびその併用は、正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に影響を及ぼさないことを示したMTTアッセイの結果を示す。

【図８－１】エストロゲン依存性増殖の抑制に重要なPHB2のアミノ酸を示す。（A）No.1（11-22aa）およびNo.5（76-90aa）のアラニン変異PHB2ペプチドを表す。（B、C）ヒト乳がん細胞株MCF-7を10μMの各PHB2配列由来のアラニン変異ペプチドで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激し、24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図８－２】（D）No.2（42-50aa）とNo.3（38-50aa）のPHB2ペプチドに51-57aaを付加したPHB2ペプチドを表す。（E）（D）のPHB2配列由来ペプチドの各10μMを添加し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。
【図９】トリプルネガティブ乳がん細胞におけるPHB2ペプチド11-22aa（A）と76-90aa（B）の細胞増殖抑制効果を示す。乳がん細胞株MDA-MB-231に対する細胞を各ペプチドは、20μMから3倍系列希釈を行い計11点濃度で添加した。ペプチド添加から96時間後に生細胞数を測定し、ペプチド未添加の陰性対照細胞を基準に相対値を算出しグラフにした。データは、3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。(C)PHB2ペプチド11-22aaと76-90aaのMDA-MB-231の細胞増殖に対する併用効果を調べた結果を示す。ペプチドをIC50値で単独および混合して細胞に添加し、96時間後に生細胞数を測定し、陰性対照のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）添加細胞を基準に相対値を算出しグラフを作成した。データは、3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。
【図１０－１】エストロゲン依存性増殖に対する架橋型PHB2ペプチドの抑制効果を示す。（A）架橋形式の模式図を表す。（B）11-21aaおよび76-88aaのPHB2ペプチドの両端にシステインを付加して架橋したPHB2ペプチドを示す（配列番号106～108、110～112、115～117、119～121）。配列番号109、113、114、118、122のPHB2ペプチドは両端にアラニンを付加して非架橋型にした。配列番号106～114のPHB2ペプチドはC末端にポリアルギニンを付加した。また、11-21aaのPHB2ペプチドは合成中の酸化を回避するため、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における19番目のメチオニンをノルロイシン（Nle）に置換した。
【図１０－２】（C）ヒト乳癌細胞株MCF-7を11-21aaの架橋型PHB2ペプチド（左図）、または76-88aaの架橋型PHB2ペプチド（右図）で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。
【図１１】エストロゲン依存性増殖に対する環状型PHB2ペプチドの抑制効果を示す。（A）環状型11-21aa（配列番号25）および環状型76-88aa（配列番号26）のPHB2ペプチドの架橋形式を表す。配列番号125と128の環状型PHB2ペプチドは、11-21aaおよび76-88aaのPHB2ペプチドの両端にアラニンを付加して非架橋型の環状型ペプチドにした。すべての環状型PHB2ペプチドはC末端に非天然アミノ酸及び連続する複数のアルギニン残基を付加した。また、11-21aaの環状型PHB2ペプチドは合成中の酸化を回避するため、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における19番目のメチオニンをノルロイシン（Nle）に置換した。（B）ヒト乳癌細胞株MCF-7を環状型PHB2ペプチドで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。
【図１２】PHB2ペプチド11-22aaの改変がエストロゲン依存性増殖に及ぼす影響を示す。（A）配列番号1（11-22aa）のPHB2ペプチドについて、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における15番目と18番目のグリシンをD型アラニンおよびD型ロイシンに置換したPHB2ペプチドを表す。（B）ヒト乳癌細胞株MCF-7を11-22aaの改変PHB2ペプチドで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。
【図１３】架橋型PHB2ペプチドが正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に及ぼす影響を示す。架橋型PHB2ペプチドおよび環状型PHB2ペプチドは、正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に影響を及ぼさないことを示したMTTアッセイの結果を示す。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似のまたは同等の任意の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法、装置、

および材料をここに記載する。しかしながら、本発明の材料および方法について記載する前に、本明細書に記載の特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコール等は慣例的な実験法および最適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。本記載に使用する専門用語は特定の型または態様のみを説明する目的のためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図されないことも、また理解されるべきである。

【００１６】

定義

本明細書で使用する「1つの（a）」、「1つの（an）」、および「その（the）」という単語は、特に明記しない限り「少なくとも1つの」を意味する。

【００１７】

本明細書においては、特に断りの無い限り、大文字で表記されるアミノ酸は、L-アミノ酸を表す。一方、小文字で表記されるアミノ酸は、D-アミノ酸を表す。また、本明細書において表記されるL-アミノ酸およびD-アミノ酸は、アミノ基、カルボキシル基および側鎖のいずれかが修飾されたものも含み得る。好ましい修飾の例としては、アミノ基のアセチル化、カルボキシル基のアミド化、およびFLAGタグ、HAタグ等のタグペプチドの付加等が挙げられる。

【００１８】

また、本明細書においては、特に断りのない限り、アミノ酸配列中のアミノ酸残基の位置を示す番号は、N末端のアミノ酸残基を1としてC末端方向に順に付与したものである。

【００１９】

本明細書で使用する「BIG3」という用語は、ブレフェルジンA阻害グアニンヌクレオチド交換タンパク質3（brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein）をさす。BIG3は、PHB2と複合体を形成することにより、エストロゲン依存的転写活性化を抑制するPHB2の機能を阻害する。BIG3は、「ARFGEF3（ARFGEF family member 3）」または「A7322」とも称される。ヒトBIG3遺伝子の代表的な塩基配列の例を配列番号31（GenBank Accession No.NM_020340.4）に、またそれによってコードされるアミノ酸配列を配列番号32に示す。本発明において、BIG3は前記塩基配列にコードされるものに限定されず、これらのアイソフォームや変異体も包含する。

【００２０】

本明細書で使用する「PHB2」という用語は、プロヒビチン2（prohibitin 2）をさす。PHB2は、エストロゲン受容体と結合してエストロゲン受容体シグナル伝達経路を阻害し、エストロゲン依存性細胞増殖を抑制する。PHB2は、「REA（Repressor of Estrogen Activity）」とも称される。ヒトPHB2遺伝子の代表的な塩基配列の例を配列番号27（GenBank Accession No.NM_001144831.1）および配列番号29（GenBank Accession No.NM_001267700.1）に、またそれらによってコードされるアミノ酸配列を配列番号28および配列番号30にそれぞれ示す。本発明において、PHB2は前記塩基配列にコードされるものに限定されず、これらのアイソフォームや変異体も包含する。

【００２１】

本明細書において使用される「エストロゲン受容体」という用語は、エストロゲン受容体α（ERα）及びエストロゲン受容体β（ERβ）の両方を包含する。ERα及びERβはそれぞれESR1遺伝子及びESR2遺伝子によってコードされている。代表的なヒトESR1遺伝子の塩基配列及びヒトERαのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号86（GenBank Accession No. NM_000125.3）及び配列番号87（GenBank Accession No. NP_000116.2）に示す。また、代表的なヒトESR2遺伝子の塩基配列及びヒトERβのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号88（GenBank Accession No. NM_001437.2）及び配列番号89（GenBank Accession No. NP_001428.1）に示す。しかしながら、本発明において、エストロゲン受容体の塩基配列及びアミノ酸配列はこれらに限定されるものではなく、これらのアイソフォームや変異体を包含する。好ましい態様では、エストロゲン受容体はERαである。ERα及びERβのいずれもPHB2ポリペプチドにより転写活性化が制御されることが報告さ

れている（Montano MM, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 96(12): 6947-52(1999).）。

本明細書において、細胞又はがんに関して使用される「エストロゲン受容体陽性」という用語は、細胞又はがんを構成するがん細胞が、エストロゲン受容体を発現していることを意味する。エストロゲン受容体陽性か否かはELISA法や免疫組織化学染色法等の公知の方法により確認することができる。また、本明細書において、細胞又はがんに関して使用される「エストロゲン受容体陰性」という用語は、細胞又はがんを構成するがん細胞が、エストロゲン受容体を発現していないことを意味する。

【００２２】

本明細書において使用される「ERAP」という用語は、配列番号33に記載のアミノ酸配列からなるペプチドをさす。配列番号33に記載のアミノ酸配列は、BIG3のアミノ酸配列（配列番号32）の165～177番目のアミノ酸残基からなる配列であり、PHB2との結合に重要なアミノ酸残基（配列番号32に記載のアミノ酸配列中、165番目のグルタミン（Q）、169番目のアスパラギン酸（D）および173番目のグルタミン（Q））を含む。ERAPは、PHB2に対する結合能を有し、PHB2に競合的に結合することにより、BIG3がPHB2と複合体を形成することを阻害する。

【００２３】

本明細書において使用される「治療」という用語は、対象疾患によって生じる少なくとも1つの症状を緩和・改善すること、疾患の進行を抑制すること、および疾患部位の拡大を抑制すること等を包含する。例えば、「がんの治療」には、がん細胞の増殖抑制、がんの進行抑制、がんの退縮・寛解の誘導、がんに伴う症状の緩和・改善、がんの転移の抑制、術後の再発抑制、および生存期間延長の誘導などが含まれる。

【００２４】

１．PHB2ペプチド

本発明は、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害するペプチドを提供する。本発明のペプチドは、本明細書において、「PHB2ペプチド」、「PHB2由来ペプチド」または「PHB2配列由来ペプチド」とも記載される。

本発明のペプチドは、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含むことによりBIG3ポリペプチドと結合する能力を有する。その結果、PHB2ポリペプチドのBIG3ポリペプチドへの結合を競合的に阻害する。本発明におけるPHB2ペプチドは、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチド間の結合を阻害する作用を有する限り、塩であることもできる。例えば、酸（無機酸、有機酸など）又は塩基（アルカリ金属、アルカリ土類金属、アミンなど）との塩であることができる。酸との塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸、酢酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、メグルミン酸など）との塩などが挙げられる。塩基との塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウムとの塩などが挙げられる。本発明のペプチドの塩の好ましい例としては、例えば、酢酸塩、塩酸塩、メグルミン酸塩、及びアンモニウム塩などが挙げられる。

【００２５】

「PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位」とは、PHB2ポリペプチドを構成するアミノ酸配列において、BIG3ポリペプチドとの結合に関与するアミノ酸残基を意味する。そのようなアミノ酸残基としては、例えば、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における15番目と18番目のグリシンおよび82番目のアスパラギン酸が挙げられる。したがって、好ましい態様では、本発明のペプチドは、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における15番目と18番目のグリシンおよび82番目のアスパラギン酸を含むペプチドであって、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害するペプチドである。なお、本明細書において、アミノ酸配列における特定のアミノ酸残基の番号は、N末端から数えたアミノ酸残基の数を表す。

【００２６】
PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含むアミノ酸配列の例として、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における（a）11～21番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号84）の全部または一部、（b）76～88番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号85）の全部または一部、および（c）44～57番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号82）の全部または一部が挙げられる。したがって、本発明のペプチドの好ましい例として、以下の（a）～（c）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドが挙げられる：
（a）配列番号1および36～41（PHB2配列由来ペプチドNo.1、36～41）からなる群より選択されるアミノ酸配列；
（b）配列番号5および47～53（PHB2配列由来ペプチドNo.5、47～53）からなる群より選択されるアミノ酸配列；及び
（c）配列番号82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.82～83）からなる群より選択されるアミノ酸配列。
しかしながら、本発明のペプチドは、これらに限定されず、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性を有していれば、ペプチドを構成するアミノ酸配列は特に限定されない。
【００２７】
一般的に、ペプチド中の1つ又は複数のアミノ酸の改変は、ペプチドの機能に影響しないことが知られている。実際に、1つ又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は付加によって改変されたアミノ酸配列を有するペプチドは、元のペプチドの生物活性を保持することが知られている（Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81(18): 5662-6(1984); ZollerおよびSmith, Nucleic Acids Res 10(20):6487-500(1982); Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 79(21): 6409-13(1982)）。本発明のペプチドは、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性を有する限り、PHB2由来のアミノ酸配列中、例えば、BIG3ポリペプチドとの結合部位以外の位置においてアミノ酸残基の置換もしくは欠失を含んでいてもよいし、BIG3ポリペプチドとの結合に影響を与えない位置においてアミノ酸残基が挿入もしくは付加されていてもよい。実際、本明細書の実施例において、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位以外のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列を有するペプチドも、当該置換のないペプチドと同等の生物活性を保持することが示されている。したがって、本発明のペプチドは、以下の（a'）～（b'）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、かつPHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性を有するペプチドを包含する：
（a'）配列番号1および36～41（PHB2配列由来ペプチドNo.1、36～41）からなる群より選択されるアミノ酸配列において、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における15番目のグリシン及び18番目のグリシンに対応する位置以外の1個、2個又は数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列；ならびに
（b'）配列番号5および47～53（PHB2配列由来ペプチドNo.5、47～53）からなる群より選択されるアミノ酸配列において、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における82番目のアスパラギン酸に対応する位置以外の1個、2個又は数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列。
【００２８】
上記（a'）～（b'）において、置換されるアミノ酸残基は、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する能力が維持される限り、いずれのアミノ酸残基であってもよい。いずれのアミノ酸残基を置換するかは、例えば、PSIVERのような計算法を用いて、BIG3ペプチドとの結合に関与していないアミノ酸残基を予測して決定することもできる。置換されるアミノ酸残基の数もまた、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結

合を阻害する能力が維持される限り特に限定されず、1個、2個又は数個のアミノ酸残基が置換され得る。「数個」とは、好ましくは6個、5個、4個又は3個である。

【００２９】

一般的に、元のアミノ酸残基のアミノ酸側鎖の特性が保存された別のアミノ酸残基への置換は、元のペプチドの機能に影響を及ぼさない傾向にあることが認識されている。そのような置換はしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称される。したがって、上記（a'）～（b'）における置換は、保存的置換により行われることが好ましい。

機能的に類似したアミノ酸を示す保存的置換の表は、当技術分野において周知である。保存することが望ましいアミノ酸側鎖の特性の例には、例えば、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、並びに以下の官能基又は特徴を共通して有する側鎖が含まれる：脂肪族側鎖（G、A、V、L、I、P）；ヒドロキシル基含有側鎖（S、T、Y）；硫黄原子含有側鎖（C、M）；カルボン酸およびアミド含有側鎖（D、N、E、Q）；塩基含有側鎖（R、K、H）；並びに芳香族含有側鎖（H、F、Y、W）。加えて、以下の8群はそれぞれ、相互に保存的置換であるとして当技術分野で認められるアミノ酸を含む：

1）アラニン（A）、グリシン（G）；
2）アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；
3）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；
4）アルギニン（R）、リジン（K）；
5）イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；
6）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）；
7）セリン（S）、スレオニン（T）；および
8）システイン（C）、メチオニン（M）（例えば、Creighton, Proteins 1984を参照されたい）。

【００３０】

しかしながら、上記（a'）～（b'）における置換はこれらに限定されず、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性が維持される限り、非保存的置換であってもよい。

本発明のペプチドは、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性が維持される限り、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位以外のアミノ酸残基を含み得る。例えば、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含むPHB2ポリペプチドの断片は、本発明のペプチドとして好適である。したがって、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における15番目のグリシン及び18番目のグリシン及びその周辺配列を含むPHB2ポリペプチド（配列番号1および36～41（PHB2配列由来ペプチドNo.1、36～41））ならびに配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における82番目のアスパラギン酸及びその周辺配列を含むPHB2ポリペプチド（配列番号5および47～53（PHB2配列由来ペプチドNo.5、47～53））は、本発明のペプチドの好ましい例として挙げられる。本発明のペプチドの別の好ましい例として、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における44～57番目のアミノ酸及びその周辺配列を含むPHB2ポリペプチド（配列番号82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.82～83）も挙げられる。

【００３１】

たとえば、配列番号1、5、36～41、47～53、および82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.1、5、36～41、47～53、82～83）のアミノ酸配列を含み、たとえば30残基、あるいは20残基、典型的には19残基、好ましくは18残基、より好ましくは17残基以下のアミノ酸で構成されるペプチドを、本発明におけるPHB2ペプチドとして例示することができる。このようなペプチドとしては、配列番号1、5、36～41、47～53、および82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.1、5、36～41、47～53、82～83）のアミノ酸配列（9残基）と、PHB2ポリペプチドを構成する全長アミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を含み、30残基、あるいは20残基、典型的には19残基、好ましくは18残基、より好ましく

は17残基以下のアミノ酸で構成されるペプチドを示すことができる。

【００３２】

本発明の好ましい態様において、配列番号1、5、36～41、47～53、および82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.1、5、36～41、47～53、82～83）のアミノ酸配列に付加するアミノ酸は、0（すなわち配列番号1、5、36～41、47～53、および82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.1、5、36～41、47～53、82～83）からなるアミノ酸配列）、PHB2ポリペプチドを構成する全長アミノ酸配列（配列番号28（PHB2ポリペプチド全長））から選択された1、あるいは2以上の連続するアミノ酸配列であることができる。配列番号1、5、36～41、47～53、および82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.1、5、36～41、47～53、82～83）のアミノ酸配列は、PHB2ポリペプチドを構成する全長アミノ酸配列（配列番号28（PHB2ポリペプチド全長））における15番目のグリシン、18番目のグリシン、82番目のアスパラギン酸、または44～57番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である。したがって、本発明の好ましい態様において、配列番号1、5、36～41、47～53、および82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.1、5、36～41、47～53、82～83）に付加するアミノ酸残基、またはアミノ酸配列は、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における15番目のグリシン、18番目のグリシン、82番目のアスパラギン酸、または44～57番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列に隣接するアミノ酸配列から選択することができる。

【００３３】

本発明のペプチドは、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性に加えて、以下の（i）及び（ii）のいずれか又は両方の性質を有することが望ましい：

（i）BIG3ポリペプチドを発現しているエストロゲン受容体陽性細胞において、PHB2ポリペプチドの核内移行を促進する；及び

（ii）BIG3ポリペプチドを発現しているエストロゲン受容体陽性細胞において、核内及び／又は細胞膜に存在するエストロゲン受容体とPHB2ポリペプチドとの結合を促進する。

上記（i）及び（ii）のいずれか又は両方の性質を有することにより、本発明のペプチドは、BIG3発現細胞において、エストロゲン受容体の活性化を抑制し、その結果としてエストロゲン受容体陽性細胞の細胞増殖の抑制を導く。PHB2ペプチドの前記性質(i)および(ii)は、いずれも、当業者に公知の方法に従って評価することができる。

【００３４】

PHB2ポリペプチドは、エストロゲン受容体選択的なコレギュレーターであることが知られており、エストロゲン受容体との相互作用によりエストロゲン受容体の転写活性化を抑制する（Kasashima K, J Biol Chem 281(47): 36401-10(2006)）。一方、BIG3ポリペプチドはPHB2ポリペプチドと結合することにより、PHB2ポリペプチドの核内移行を妨げ、核内におけるPHB2ポリペプチドとエストロゲン受容体との相互作用を阻害する。また、細胞膜に存在するエストロゲン受容体とPHB2ポリペプチドとの結合を妨げる。これらの作用の結果として、BIG3ポリペプチドを過剰発現している細胞では、PHB2ポリペプチドによるエストロゲン受容体の活性化抑制が十分に働かず、細胞増殖の亢進が誘導される。

【００３５】

本発明のペプチドは、BIG3ポリペプチドとPHB2ポリペプチドとの結合を競合的に阻害することにより、BIG3ポリペプチドとの結合によって阻害されたPHB2ポリペプチドのエストロゲン受容体活性化抑制機能を回復させる点に特徴を有する。一方、PHB2ポリペプチドは、エストロゲン受容体との結合を通して、エストロゲン受容体の活性化を抑制する。したがって、本発明のペプチドは、BIG3ポリペプチドとPHB2ポリペプチドとの結合は阻害するが、エストロゲン受容体とPHB2ポリペプチドとの結合を妨げず、ひいてはPHB2ポリペプチドによるエストロゲン受容体活性化の抑制を妨げないものであることが望ましい。上記のように、BIG3ポリペプチドとの結合部位を含むPHB2ポリペプチドの断片は、本発明のペプチドとして好適ではあるが、PHB2ポリペプチドの全長に近いペプチドは、内在性PHB2ポリペプチドとエストロゲン受容体との結合を妨げ、結果として内在性PHB2

ポリペプチドによるエストロゲン受容体活性化の抑制を妨げる可能性がある。よって、本発明のペプチドに含まれるPHB2ポリペプチドの部分アミノ酸配列は、100残基以下であることが好ましく、80残基以下であることがより好ましく、70残基以下であることがさらに好ましい。より好ましい態様では、本発明のペプチドに含まれるPHB2ポリペプチドの部分アミノ酸配列は、50残基以下、40残基以下、30残基以下、25残基以下、又は20残基以下である。PHB2におけるエストロゲン受容体との結合部位は、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）のアミノ酸配列における175～198番目のアミノ酸からなる部位であることから、本発明のペプチドは当該部位を含まないことが好ましく、その場合、本発明のペプチドに含まれるPHB2ポリペプチドの部分アミノ酸配列は、175～198番目のアミノ酸配列を除いた、100残基以下であることが望ましく、80残基以下であることがより好ましく、70残基以下であることがさらに好ましい。より好ましい態様では、本発明のペプチドに含まれるPHB2ポリペプチドの部分アミノ酸配列は、175～198番目のアミノ酸配列を除いた、50残基以下、40残基以下、30残基以下、25残基以下、又は20残基以下である。

【００３６】

また、本発明のペプチドは、BIG3ポリペプチドとPHB2ポリペプチドとの結合を阻害する活性が維持され、かつPHB2ポリペプチドによるエストロゲン受容体活性化の抑制を妨げない限り、PHB2ポリペプチドに由来するアミノ酸配列以外の追加のアミノ酸配列も含み得る。この場合も、追加のアミノ酸配列は内在性PHB2ポリペプチドとエストロゲン受容体との結合を妨げないことが望ましい。そのため、本発明のペプチドは、100残基以下、80残基以下、又は70残基以下のペプチドであることが好ましい。より好ましい態様では、本発明のペプチドは、50残基以下、40残基以下、又は30残基以下のペプチドである。本発明のペプチドに含まれるアミノ酸配列の好ましい例としては、例えば後述する細胞透過性ペプチドを構成するアミノ酸配列、他の物質を結合するためのリンカー配列などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００３７】

また、本発明のペプチドは、他の物質により修飾されていてもよい。本明細書において、ペプチドに関して使用される「修飾された」という用語は、ペプチドに直接的又は間接的に他の物質が結合していることを指す。本発明のペプチドを修飾する他の物質としては、例えば、ペプチド、脂質、糖類、及び天然性又は合成性のポリマーなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のペプチドは、BIG3ポリペプチドとPHB2ポリペプチドとの結合を阻害する活性を維持する限り、任意の修飾を有し得る。また、本発明のペプチドは、修飾により追加的な機能を付与されてもよい。追加的な機能の例としては、例えば、標的指向性、安定性、細胞膜透過性などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３８】

本発明において、修飾の好ましい例としては、例えば、細胞膜透過性物質の導入が挙げられる。通常、細胞内構造は細胞膜によって外界と遮断されている。そのため、細胞外物質を細胞内に効率的に導入することは困難である。しかし、ある種の物質は、細胞膜透過性を有し、細胞膜に遮られることなく細胞内に導入され得る。このような細胞膜透過性を有する物質（細胞膜透過性物質）で修飾することにより、細胞膜透過性を有さない物質に細胞膜透過性を付与することが可能である。したがって、本発明のペプチドを細胞膜透過性物質で修飾することにより、本発明のペプチドを細胞内に効率的に導入することができる。なお、本明細書において、「細胞膜透過性」とは、哺乳動物の細胞膜を透過して細胞質に入ることのできる性質を指す。また、「細胞膜透過性物質」とは、「細胞膜透過性」を有する物質を指す。

【００３９】

細胞膜透過性物質の例としては、例えば、膜融合性リポソーム、細胞膜透過性ペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、膜融合性リポソームは細胞膜と融合して、その内容物を細胞内に放出する。膜融合性リポソームは、例えば、膜融合性を有する物質でリポソーム表面を修飾することにより調製することができる。膜融合性リポソ

ームの例としては、例えば、pH感受性リポソーム（Yuba E, et al., J. Control. Release, 149, 72-80 (2011)）、センダイウィルス膜融合性リポソーム（WO97/016171）、細胞膜透過性ペプチドで修飾されたリポソームなどが挙げられる。本発明のペプチドは、細胞内に効率的に導入するために、膜融合性リポソーム内に封入されてもよい。本発明では、膜融合性リポソーム内へのペプチドの封入も、ペプチドの「修飾」に包含される。

【００４０】

細胞膜透過性ペプチドについては、これまでに様々な天然の又は人工的に合成されたペプチドが報告されている（Joliot A. & Prochiantz A., Nat Cell Biol. 2004; 6: 189-96）。細胞膜透過性ペプチドの例としては、例えば、以下のペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４１】

ポリアルギニン（Matsushita et al., J. Neurosci.; 21(16), 6000-7(2003)）；

Tat／RKKRRQRRR（配列番号90）（Frankel et al., Cell 55(6),1189-93(1988)., Green & Loewenstein Cell 55, 1179-88(1988)）；

Penetratin／RQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号103）（Derossi et al., J. Biol. Chem. 269(14), 10444-50 (1994)）；

Buforin II／TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK（配列番号91）（Park et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 97(15), 8245-50(2000)）；

Transportan／GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL（配列番号92）（Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77(1998)）；

MAP (Model Amphipathic Peptide)／KLALKLALKALKAALKLA（配列番号93）（Oehlke et al., Biochim. Biophys. Acta. 1414(1-2), 127-39(1998)）；

K-FGF／AAVALLPAVLLALLAP（配列番号94）（Lin et al., J. Biol. Chem. 270(24), 14255-8 (1995)）；

Ku70／VPMLK（配列番号95）（Sawada et al., Nature Cell Biol. 5(4), 352-7(2003)）；

Ku70／PMLKE（配列番号96）（Sawada et al., Nature Cell Biol. 5(4), 352-7(2003)）；

Prion／MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP（配列番号97）（Lundberg et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 299(1), 85-90(2002)）；

pVEC／LLIILRRRIRKQAHAHSK（配列番号98）（Elmquist et al., Exp. Cell Res. 269(2), 237-44(2001)）；

Pep-1／KETWWETWWTEWSQPKKKRKV（配列番号99）（Morris et al., Nature Biotechnol. 19(2), 1173-6(2001)）；

SynB1／RGGRLSYSRRRFSTSTGR（配列番号100）（Rousselle et al., Mol. Pharmacol. 57(4), 679-86(2000)）；

Pep-7／SDLWEMMMVSLACQY（配列番号101）（Gao et al., Bioorg. Med. Chem. 10(12), 4057-65(2002)）；及び

HN-1／TSPLNIHNGQKL（配列番号102）；（Hong & Clayman Cancer Res. 60(23), 6551-6(2000)）。

【００４２】

上記に挙げたポリアルギニンは、任意の数のアルギニン残基から構成され得る。例えば、5～20個のアルギニン残基から構成され得る。ポリアルギニンを構成するアルギニン残基の数は、BIG3ポリペプチドとPHB2ポリペプチドとの結合を阻害する本ペプチドの活性を妨げない限り、特に限定されない。

【００４３】

また、ペプチドのin vivo安定性を高めるために、特に有用な様々なアミノ酸模倣体又は非天然アミノ酸を（例えば、置換、付加、又は挿入により）導入することが当技術分野において公知である。導入されるアミノ酸模倣体又は非天然アミノ酸の例としては、βアミノ酸、D-アミノ酸、およびN-メチルアミノ酸が挙げられるが、それらに限定されない。し

たがって、本発明のペプチドは、インビボ安定性を高めるために、そのようなアミノ酸模倣体又は非天然アミノ酸を導入することができる。また、アミノ酸のα炭素をアミノ基に置換したアザペプチドや、ペプチド内のアミド結合を、その等価体（エステル、スルホンアミド、アルケンイソスターなど）に置換する手法も当技術分野において公知である。ペプチドの安定性は、例えば、ペプチダーゼ、並びにヒト血漿及び血清などの様々な生物学的培地を用いて確認することができる（例えば、Coos Verhoef et al. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin. 11(4): 291-302(1986).を参照されたい）。

【００４４】

したがって、本発明は、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害するペプチドであって、アミノ酸模倣体又は非天然アミノ酸（例えば、βアミノ酸、D-アミノ酸、およびN-メチルアミノ酸）を少なくとも1つ含む、ペプチドを提供する。特定の態様において、本発明のペプチドは、配列番号1、5、36～41、47～53、および82～83（PHB2配列由来ペプチドNo.1、5、36～41、47～53、82～83）からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1個、2個、または数個のアミノ酸が、対応するアミノ酸模倣体又は非天然アミノ酸（例えば、βアミノ酸、D-アミノ酸、およびN-メチルアミノ酸）に置換されている、アミノ酸配列を含む。

また、本発明は、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害するペプチドであって、少なくとも1つのアミド結合がその等価体（例えば、エステル、スルホンアミド、およびアルケンイソスター）に置き換えられたペプチドも提供する。

【００４５】

<u>環状型および架橋型ペプチド</u>

特定の態様において、本発明のペプチドは環化されていてもよく、環化によって本発明のペプチドの安定性が向上しうる。本発明のペプチドに環構造を導入する方法は周知であり、例えば、直鎖型ペプチドのN末端及びC末端にシステインを付加し、これらのシステインにジスルフィド結合を形成させることによってペプチドを環化することができる。本明細書において、このようにペプチドを構成するアミノ酸配列中2つ（1対）のアミノ酸残基の側鎖が架橋（ステープル化）されている構造を「ステープリング構造」と呼ぶことができ、１つまたは複数のステープリング構造が導入されている架橋型ペプチドは「ステープル化ペプチド」とも表記される。このような分子内架橋を形成するアミノ酸残基の位置は、元の直鎖型ペプチドのN末端及びC末端に限定されず、元の直鎖型ペプチド内に存在するアミノ酸残基が分子内架橋を形成してもよいし、元の直鎖型ペプチドに（例えば、置換、付加、又は挿入により）導入されたアミノ酸残基が分子内架橋を形成してもよい。分子内架橋を形成するアミノ酸残基は天然アミノ酸に限定されず、上記のようなアミノ酸模倣体又は非天然アミノ酸であってもよい。また、ペプチドを架橋する方法は、ジスルフィド結合の形成に限定されず、（例えば、ヘキサフルオロベンゼンまたはデカフルオロビフェニルを用いることによる）フルオロベンゼンを介したシステイン残基間の架橋、チオエーテル結合の形成、エステル結合の形成、及び閉環オレフィンメタセシス等の炭化水素ステープリング技術（例えばWO2017/126461に記載）等も挙げられる。

【００４６】

さらに、ペプチドを環化する方法は、上記のような分子内架橋を形成させる方法に限定されず、ペプチドのC末端アミノ酸残基とN末端アミノ酸残基とのアミド結合の形成等も挙げられる。このように種々の方法によって環化したペプチドは、本明細書において環状型ペプチドと表記され、分子内架橋を含む（すなわち架橋型の）環状型ペプチド（例えば、図4及び11に記載の配列番号25、26、123～124、及び126～127）と、分子内架橋を含まない環状型ペプチド（例えば、図11に記載の配列番号125、128）の両方を含む。

したがって、本発明は、PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する環状ペプチドであって、少なくとも１つの分子内結合によって環化されている、環状ペプチドを提供する。当該

分子内結合の例としては、ジスルフィド結合、（例えば、ヘキサフルオロベンゼンまたはデカフルオロビフェニルを用いることによる）フルオロベンゼンを介したシステイン残基間の架橋、チオエーテル結合、エステル結合、チオエステル結合、炭化水素鎖（例えば、オレフィン、アリール等）による結合、複素環（例えば、トリアゾール、オキサゾール、チアゾール等）による結合、アミド結合、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。

【００４７】

そのような分子内結合は、環状ペプチドの元となる直鎖型ペプチドの両末端のアミノ酸残基によって形成されてもよいし、直鎖型ペプチド内のアミノ酸残基によって形成されてもよい。また、前記分子内結合は、PHB2ポリペプチドに由来するアミノ酸配列中のアミノ酸残基によって形成されてもよいし、当該アミノ酸配列に（例えば、置換、付加、又は挿入により）導入されたアミノ酸残基によって形成されてもよい。そのような本発明の環状ペプチドの好ましい例として、11-21aa及び76-88aaの環状型PHB2ペプチド（それぞれ、配列番号25、106～108、115～117、又は123～124；及び配列番号26、110～112、119～121、又は126～127からなる環状ペプチド）が挙げられる。これらの例示的環状ペプチドは、構造の安定化（およびそれに伴う活性向上やプロテアーゼ耐性の向上）と膜透過性の向上を目的に、PHB2配列由来の11-21aa及び76-88aaの直鎖型ペプチドに対して、分子内結合（分子内架橋）を形成する２つのシステイン残基の付加（配列番号25～26、106～108、110～112、115～117、119～121、123～124、126～127）；非天然アミノ酸の付加または置換（配列番号25～26、106～108、115～117、123～124、126～127）；及び連続する複数のアルギニン残基の付加（配列番号25～26、106～108、110～112、123～124、126～127）がなされており、導入された２つのシステイン残基が分子内架橋を形成すること（配列番号25～26、106～108、110～112、115～117、119～121、123～124、126～127）、および付加されたC末端アミノ酸残基とN末端アミノ酸残基がアミド結合を形成すること（配列番号25～26、123～124、126～127）によって環化されている（図4C、図10A、図11A）。これらの例示的環状ペプチド（特に環状型かつ架橋型のペプチド）は、元の直鎖型ペプチドと比較して増殖抑制効果が亢進しており（図5A、図10C、図11B）、さらに抑制効果が長期的に持続することが示された（図6A）。

【００４８】

本発明は、以下の工程を含む、環状ペプチドの製造方法にも関する：

(a) PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する直鎖型ペプチドを提供する工程；ならびに

(b) 前記直鎖型ペプチドにおいて、少なくとも１つの分子内結合を形成させる工程であって、それによって前記直鎖型ペプチドが環化される、工程。

前記分子内結合は、任意で、ジスルフィド結合、（例えば、ヘキサフルオロベンゼンまたはデカフルオロビフェニルを用いることによる）フルオロベンゼンを介したシステイン残基間の架橋、チオエーテル結合、エステル結合、チオエステル結合、炭化水素鎖（例えば、オレフィン、アリール等）による結合、複素環（例えば、トリアゾール、オキサゾール、チアゾール等）による結合、アミド結合、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。

前記方法は、任意で、システイン残基、アミノ酸模倣体又は非天然アミノ酸、及び連続する複数のアルギニン残基からなる群より選択される少なくとも１つを前記直鎖型ペプチドに（例えば、置換、付加、又は挿入により）導入する工程を含む。

【００４９】

本発明のペプチドは、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性を有する点に特徴を有する。作成したペプチドが、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性を有するか否かは、該ペプチドの存在下及び非存在下におけるPHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合レベルを比較することにより、確認することができる。すなわち、該ペプチドの非存在下における結合レベルと比較して、該ペプ

チドの存在下における結合レベルの方が低い場合には、該ペプチドは、「PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性」を有すると判定できる。

【００５０】

PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合レベルの測定は、種々の公知の方法を用いて行うことができる。例えば、抗PHB2抗体又は抗BIG3抗体を用いた免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィー、表面プラズモン共鳴現象を使用するバイオセンサーなどが使用可能である。

【００５１】

具体的な方法としては、例えば、試験ペプチドの存在下及び非存在下において、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとをインキュベートする。その後、反応液を抗PHB2抗体又は抗BIG3抗体で免疫沈降し、免疫沈降物のウェスタンブロット解析を行う。PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合レベルは、抗PHB2抗体で免疫沈降されたBIG3ポリペプチドレベル又は抗BIG3抗体で免疫沈降されたPHB2ポリペプチドレベルの少なくとも一方を検出することにより確認することができる。ここで使用するPHB2ポリペプチド及びBIG3ポリペプチドは、公知の遺伝子工学的手法によって調製することができる。また、これらのポリペプチドの産生細胞の細胞溶解物を用いることもできる。これらのポリペプチドの産生細胞としては、本明細書の実施例に記載されるような細胞株が利用可能である。

【００５２】

あるいは、本明細書の実施例に記載されるような方法を用いることもできる。具体的には、試験ペプチドの存在下及び非存在下において、エストロゲン受容体陽性細胞を培養する。その後、細胞を適切な溶解バッファーで溶解し、その細胞溶解物を用いて上記と同様の免疫沈降及びウェスタンブロット解析を行ってもよい。

上記のような方法のいずれかにより、「PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性」が確認されたペプチドは、「PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性」を有するペプチドであると判定される。

【００５３】

また、本発明のペプチドは、好ましい性質として、以下の（i）及び（ii）のいずれか又は両方の性質を有し得る：

（i）BIG3ポリペプチドを発現しているエストロゲン受容体陽性細胞において、PHB2ポリペプチドの核内移行を促進する；及び

（ii）BIG3ポリペプチドを発現しているエストロゲン受容体陽性細胞において、核内及び／又は細胞膜に存在するエストロゲン受容体とPHB2ポリペプチドとの結合を促進する。

【００５４】

本発明のペプチドが、上記の性質を有するか否かは、本発明のペプチドの存在下及び非存在下における（i）PHB2ポリペプチドの核移行レベル、及び／又は（ii）エストロゲン受容体とPHB2ポリペプチドとの結合レベル、を比較することにより、確認することができる。すなわち、本発明のペプチドの非存在下におけるレベルと比較して、本発明のペプチドの存在下におけるレベルの方が高い場合には、本発明のペプチドは、上記（i）及び／又は（ii）の性質を有すると判定できる。

【００５５】

上記（i）及び／又は（ii）の性質の有無を判定するための具体的な方法の例としては、当業者に周知の方法を使用することができる。具体的には、上記（i）の性質について調べる場合には、本発明のペプチドを添加し又は添加しないで、エストロゲン受容体陽性細胞をエストラジオールで24時間刺激する。その後、比重遠心により細胞を分画し、核画分に存在するPHB2ポリペプチドをウェスタンブロット解析等により検出する。本発明のペプチドを添加した場合の方が、添加しなかった場合と比較して、核画分で検出されるPHB2ポリペプチドのレベルが増加していた場合には、本発明のペプチドは上記（i）の性質を有すると判定される。また、核内に存在するPHB2ポリペプチドのレベルは、免疫細胞化学的染色により検出することもできる。

【００５６】
上記（ii）の性質について調べる場合には、本発明のペプチドを添加し又は添加しないで、エストロゲン受容体陽性細胞をエストラジオールで24時間刺激する。その後、比重遠心により細胞を分画し、細胞質画分及び核画分を抗エストロゲン受容体抗体又は抗PHB2抗体で免疫沈降し、免疫沈降物のウェスタンブロット解析を行う。その結果、本発明のペプチドを添加した場合の方が、添加しなかった場合と比較して、細胞質画分及び／又は核画分において、エストロゲン受容体とPHB2ポリペプチドとの結合レベルが増加していた場合には、本発明のペプチドは上記（ii）の性質を有すると判定される。
【００５７】
本発明のペプチドは、当業者に周知の方法を用いて製造することができる。例えば、そのアミノ酸配列に基づいた化学合成により、本発明のペプチドを得ることができる。ペプチドの化学合成方法は、公知であり、当業者であれば、本発明のペプチドとして選択されたアミノ酸配列に基づき、本発明のペプチドを化学合成することができる。ペプチドの化学合成方法については、例えば、以下のような文献に記載されている；
（i）Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
（ii）The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
（iii）ペプチド合成，丸善, 1975;
（iv）ペプチド合成の基礎と実験, 丸善, 1985;
（v）医薬品の開発　続第14巻（ペプチド合成）, 広川書店, 1991;
（vi）WO99/67288;及び
（vii）Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, 「Solid Phase Peptide Synthesis」, Academic Press, New York, 1980, 100-118。
【００５８】
また、遺伝子工学的手法（例えば、Morrison J, J Bacteriology, 132(1): 349-51（1977）;Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.), 101: 347-62(1983)）により、本発明のペプチドを得ることもできる。例えば、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを適切な発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に導入して形質転換細胞を調製する。次いで、該宿主細胞を培養して本発明のペプチドを産生させ、その細胞抽出物を調製する。該細胞抽出物からの本ペプチドの精製には、タンパク質精製のための標準的な手法を用いることができる。例えば、カラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、及び再結晶化を適切に選択し、組み合わせることにより、本ペプチドを精製することができる。また、本発明のペプチドは、タンパク質合成のために必要な要素がインビトロで再構成されたインビトロ翻訳系によっても合成することができる。
【００５９】
遺伝子工学的手法を用いる場合には、本発明のペプチドを、他のペプチドとの融合タンパク質として発現させることもできる。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドと他のペプチドをコードするポリヌクレオチドとを、インフレームとなるように連結して、適切な発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に導入して形質転換細胞を調製する。次いで、該宿主細胞を培養して本発明のペプチドと他のペプチドとの融合タンパク質を産生させ、その細胞抽出物を調製する。該細胞抽出物からの該融合タンパク質の精製は、例えば、融合タンパク質と親和性を有する物質を結合させたカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより該融合タンパク質を捕捉することにより、行うことができる。また、本発明のペプチドと他のペプチドとを、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、及びプロテアソームなどの酵素によって切断され得るリンカー配列を介して結合させておけば、カラムに捕捉された該融合タンパク質をこれらの酵素で処理することにより、本発明のペプチドをカラムから分離することができる。融合タンパク質の形成に使用し得る他のペプチドには、例えば、以下のようなペプチドが含まれるが、これらに限定されない：
FLAG（Hopp et al., Bio/Technology 6, 1204-10(1988)）；

ヒスチジン（His）残基からなる6xHis又は10xHis；
インフルエンザ血球凝集素（HA）；
ヒトc-myc断片、VSV-GP断片；p18 HIV断片；
T7タグ； HSVタグ；
Eタグ；SV40T抗原断片；
lckタグ；
α-チューブリン断片；
Bタグ；
プロテインC断片；
GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）；
HA（インフルエンザ血球凝集素）；
免疫グロブリン定常領域；
β-ガラクトシダーゼ；及び；
MBP（マルトース-結合タンパク質）。

【００６０】

2．本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、ベクター、及び宿主細胞

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするポリヌクレチドも提供する。また、本発明は、該ポリヌクレチドを含むベクター、及び該ベクターを含む宿主細胞も提供する。該ポリヌクレチド、該ベクター、及び該宿主細胞は、本発明のペプチドを製造するために使用することができる。

【００６１】

本発明のポリヌクレオチドは、当業者に知られた方法によって作製することができる。例えば、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron, 48: 2223-311(1992);Matthes et al., EMBO J, 3(4): 801-5(1984)に記載されるような固相技法を用いて、本発明のポリヌクレオチドを合成することができる。また、遺伝子工学的手法を用いて本発明のポリヌクレオチドを調製することもできる。例えば、本発明のペプチドとして選択したアミノ酸配列をコードするPHB2遺伝子（配列番号27）の部分塩基配列に基づいて、プライマーを作成し、PHB2ポリペプチドを発現する細胞から抽出したmRNAを鋳型として、逆転写PCRを行う。これにより、本発明のポリヌクレオチドを増幅することができる。

【００６２】

本発明のポリヌクレオチドは、適切な発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に導入することにより、宿主細胞内で本発明のペプチドを産生させることができる。

【００６３】

例えば、大腸菌を宿主細胞として選択し、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5α、HB101、またはXL1Blue）の内部で大量に増幅させる場合には、ベクターは、大腸菌内で増幅するための「ori」、及び、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどの薬剤によって選択される薬剤抵抗性遺伝子）を有する必要がある。例えば、M13シリーズのベクター、pUCシリーズのベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどを用いることができる。本発明のペプチドの産生のためにベクターを用いる場合には、発現ベクターが特に有用である。例えば、大腸菌内で発現させようとする発現ベクターは、大腸菌内で増幅させるための上記の特徴を有する必要がある。JM109、DH5α、HB101、またはXL1Blueなどの大腸菌を宿主細胞として用いる場合には、ベクターは、大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現しうるプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら、Nature 341(6242): 544-6 (1989)；FASEB J 6(7): 2422-7 (1992)）、araBプロモーター（Betterら、Science 240(4855): 1041-3 (1988)）、又はT7プロモーターなどを有する必要がある。さらに、ベクターは、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列をも含みうる。大腸菌の周辺質（periplasm）へのポリペプチド分泌を指令するシグナル配列の一例は、pelBシグナル配列（Leiら、J Bacteriol 169(9): 4379-83 (1987)）である。ベクターを標的宿主細胞に導入するための手段には、例えば、塩化カルシウム法お

よび電気穿孔法が含まれる。

【００６４】

大腸菌以外に、例えば、哺乳動物細胞由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（インビトロジェン（Invitrogen）)及びpEGF-BOS（Mizushima S., Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」（ギブコBRL（GIBCO BRL））、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば、pMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIpneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia発現キット」（インビトロジェン）、pNV11、SP-Q01）、及び枯草菌（Bacillus subtilis）由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）も使用可能である。

【００６５】

ベクターをCHO細胞、COS細胞又はNIH3T3細胞などの動物細胞内で発現させるためには、ベクターは、この種の細胞における発現のために必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター（Mulliganら、Nature 277(5692): 108-14 (1979)）、MMLV-LTRプロモーター、EF1αプロモーター（Mizushimaら、Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)）、CMVプロモーターなどを有する必要があるほか、形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、薬剤（例えば、ネオマイシン、G418）によって選択される薬剤抵抗性遺伝子）を有することが好ましい。これらの特徴を備えた既知のベクターの例には、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、およびpOP13が含まれる。

【００６６】

また、本発明のポリヌクレオチドは、標的細胞の細胞内で本発明のペプチドを産生させるために、適切なベクターに挿入されて、標的細胞内に導入されてもよい。標的細胞内で産生された本発明のペプチドは、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害し、該標的細胞の細胞増殖の抑制を誘導する。この場合には、本発明のポリヌクレオチドが挿入されるベクターは、本発明のポリヌクレオチドを、標的細胞のゲノムに安定に挿入するためベクターであり得る（例えば、相同的組換えカセットベクターの記述についてはThomas KR & Capecchi MR, Cell, 51(3): 503-12(1987)を参照されたい）。例えば、Wolff et al., Science, 247: 1465-8(1990)；米国特許第5,580,895号；米国特許第5,589,466号；米国特許第5,804,566号；米国特許第5,739,118号；米国特許第5,736,524号；米国特許第5,679,647号；及び国際公開公報第98/04720号を参照されたい。

【００６７】

また、本発明のポリヌクレオチドは、例えば、ウイルスベクター又は細菌ベクターなどの発現ベクターにも挿入され得る。発現ベクターの例としては、例えば、牛痘又は鶏痘などの弱毒化ウイルス宿主が挙げられる（例えば、米国特許第4,722,858号を参照のこと）。使用可能なベクターの他の例としては、カルメットゲラン桿菌（Bacille Calmette Guerin；BCG）が挙げられる（Stover et al., Nature, 351(6326): 456-60(1991)）。他の例としては、アデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌（Salmonella typhi）ベクター、無毒化炭疽毒素ベクターなどが挙げられる（Shata et al., Mol Med Today , 6(2): 66-71(2000); Shedlock et al., J Leukoc Biol, 68(6): 793-806(2000)；およびHipp et al., In Vivo, 14(5): 571-85(2000)）。

【００６８】

なお、本発明のペプチドは、N末端およびC末端のアミノ酸残基のいずれかまたは両方が修飾されたものも包含する。修飾の種類は、特に限定されないが、BIG3に対する親和性に影響を与えないものであることが好ましい。好ましい修飾の例としては、例えば、N末端のアミノ酸残基のアセチル化、C末端のアミノ酸残基のアミド化、およびHAタグ、FLAGタグ等のタグペプチドの付加等を挙げることができる。

【００６９】

本発明のペプチドは、L-アミノ酸から構成されるものに限定されず、1つ以上のD-アミノ酸を含むものであってもよい。ペプチド中のL-アミノ酸とD-アミノ酸の構成比は特に限定されず、全てのアミノ酸残基がL型である場合（以下「L型ペプチド」）、全てのアミノ酸残基がD型である場合（以下「D型ペプチド」）、または特定の位置のアミノ酸残基のみがD型である場合のいずれであってもよい。本発明のペプチドの一つの好ましい態様として、上記の本発明のペプチドのいずれかにおいて、全てのアミノ酸残基がD型のアミノ酸残基に置き換えられたペプチドが挙げられる。本発明のペプチドの別の好ましい態様として、BIG3との結合に重要である特定の位置のアミノ酸残基が、対応するD型のアミノ酸残基に置き換えられたペプチドも挙げられる。そのような位置の例としては、配列番号28のアミノ酸配列における15番目のグリシン、18番目のグリシン、及び82番目のアスパラギン酸に対応する位置が挙げられる。

【００７０】

さらに本発明のペプチドは、上記の本発明のペプチドのいずれかのレトロインバース体であってもよい。レトロインバース体では、元のペプチドとはアミノ酸配列が逆になっており、全てのアミノ酸残基がD型のアミノ酸残基に置き換えられている。すなわち、レトロインバース体は、元のペプチドとは逆向きのアミノ酸配列を有するD型ペプチドである。したがって、上記の本発明のペプチドのいずれかのレトロインバース体であるペプチドもまた、本発明のペプチドの好ましい態様として挙げられる。

【００７１】

また本発明のペプチドは、塩の形態であってもよい。塩の形態は特に限定されないが、薬学的に許容される塩であることが好ましい。なお、本明細書において「薬学的に許容される塩」とは、ペプチドの薬理学的または薬学的な有効性および特性を保持する塩をさす。塩の好ましい例としては、アルカリ金属（リチウム、カリウム、ナトリウムなど）との塩、アルカリ土類金属（カルシウム、マグネシウムなど）との塩、その他の金属（銅、鉄、亜鉛、マンガンなど）との塩、有機塩基との塩、アミンとの塩、有機酸（酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸など）との塩、および無機酸（塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸など）との塩等を挙げることができる。これらの塩は、公知の方法に従って調製することができる。

【００７２】

3. 本発明のペプチド又はポリヌクレオチドを含む医薬組成物及びその使用

本発明はまた、本発明のペプチド若しくはその塩又は本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを薬学的に許容される担体とともに含む医薬組成物を提供する。

本発明のペプチドは、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害することにより、PHB2ポリペプチドによるエストロゲン受容体の活性化抑制を誘導し、その結果として、エストロゲン受容体陽性細胞における細胞増殖の抑制を導く。したがって、本発明の医薬組成物は、エストロゲン受容体の活性化に起因する細胞増殖性疾患の治療及び予防のいずれか又は両方に有用である。そのような細胞増殖性疾患としては、例えば、がんが挙げられる。

【００７３】

がんの中でも、特に乳がんは、エストロゲン受容体の活性化と深い関連があることが知られている。BIG3ポリペプチドは、新規のエストロゲン受容体活性化制御因子であり、多くの乳がん検体及び乳がん細胞で高頻度に発現している一方、正常組織ではほとんど発現が認められないことが確認されている（Kim JW, Akiyama M, Park JH, et al. Cancer Sci.; 100(8):1468-78(2009).）。したがって、乳がんでは、BIG3ポリペプチドが発現されることにより、PHB2ポリペプチドによるエストロゲン受容体の活性化抑制機能が阻害され、その結果として、乳がん細胞の増殖が促進されるものと考えられる。よって、本発明の医薬組成物は、乳がんの治療及び予防のいずれか又は両方に特に適している。また、乳がんの中でも、エストロゲン受容体陽性であって、BIG3ポリペプチドを発現している乳がんに特に有用である。しかしながら、本発明の医薬組成物は、乳がんに対する使用に

限定されるものではなく、エストロゲン受容体陽性であって、BIG3ポリペプチドを発現しているがんであれば、本発明の医薬組成物を使用することができる。乳がん以外のエストロゲン受容体陽性のがんとしては、例えば、子宮体がん、卵巣がん、前立腺がん（Nelles JL, et al., Expert Rev Endocrinol Metab.;6(3):437-51(2011)）、肺がん（特に非小細胞肺がん）（Stabile LP, et al., Cancer Res.;65(4):1459-70(2005); Marquez-Garban DC, et al., Steroids.;72(2):135-43(2007)）などが挙げられるが、これらに限定されない。なお、本発明の医薬組成物を適用するがんは、BIG3およびPHB2を発現していることが好ましいが、エストロゲン受容体陽性のがんは、一般的に、BIG3およびPHB2を発現している。がんがエストロゲン受容体陽性か否かは、ELISA法や免疫組織化学染色法等の公知の方法により確認することができる。

【００７４】

さらに、本発明のペプチドは、エストロゲン受容体陰性の乳がん細胞であるトリプルネガティブの乳がん細胞においても優れた細胞増殖抑制作用を示した（図９）。トリプルネガティブとは、一般に、乳がん細胞が、主要な薬物治療の標的因子である、HER2、エストロゲン受容体、およびプロゲステロン受容体の発現を欠くことを指す。そのため、トリプルネガティブの乳がんは、通常、薬物治療に抵抗性である。したがって、本発明の医薬組成物は、エストロゲン受容体陰性乳がんの治療及び予防のいずれか又は両方にも適用することができ、このような治療抵抗性の乳がんの患者に投与するための医薬組成物としても有用である。

すなわち本発明は、本発明のペプチドを含む医薬組成物であって、薬物療法抵抗性の乳がん患者に投与するための医薬組成物を提供する。また本発明は、薬物療法抵抗性の乳がん患者の治療及び予防のいずれか又は両方において使用するための、本発明のペプチドに関する。更に本発明は、本発明のペプチドの、薬物療法抵抗性の乳がん患者の治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物の製造における使用に関する。あるいは本発明は、薬物療法抵抗性の乳がん患者を選択する工程と、選択された患者に本発明のペプチドを投与する工程を含む、乳がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための方法をも提供する。

薬物療法抵抗性の乳がん患者は、一般的な薬物療法の後に、その治療成績を観察することで特定することができる。具体的には、治療によって、病巣の縮退が明確に観察されない場合に、治療抵抗性であることを知ることができる。なお病巣の拡大が阻止された状態は、病巣の縮退に含まれる。前述のトリプルネガティブの乳がん患者も薬物療法に抵抗性を持つとされている。トリプルネガティブとは、HER2に加えて、エストロゲン受容体とプロゲステロン受容体の発現を欠くことによって特徴付けられる乳がんである。これらの薬物療法抵抗性のマーカーは、免疫染色や遺伝子発現解析によって定量的に評価することができる。たとえば、陰性対照と同程度の発現レベルに有る場合には、ネガティブと判断される。陰性対照には、これらのマーカーの発現を欠いた治療抵抗性のがん細胞株を用いることができる。

【００７５】

本発明の医薬組成物は、本発明のペプチドまたはその塩と、薬学的に許容される担体とを配合して、公知の製剤化技術を用いて製造することができる。なお、本明細書において「薬学的に許容される担体」とは、薬物のための希釈剤または溶媒剤として使用する不活性な物質をさす。本発明の医薬組成物に使用する薬学的に許容される担体は、調製する医薬組成物の剤形に応じて、一般的な医薬品に使用される担体を適宜選択すればよい。

【００７６】

本発明の医薬組成物の剤形は、特に限定されず、液剤、錠剤、エリキシル剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の医薬品に一般的に使用される剤形を適宜選択することができる。また、選択した剤形に応じて、適宜、賦形剤、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤、溶解補助剤、pH調整剤、凝集抑制剤等の添加物を添加することができる。

【００７７】

本発明の医薬組成物は、活性成分として、薬学的有効量の本発明のペプチド若しくはそ

の塩又は該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。「薬学的有効量」とは、本発明の医薬組成物がその目的を達成するために十分な量である。例えば、本発明の医薬組成物ががんの治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物である場合、薬学的有効量の一例は、患者に投与されたときに、がんの増殖速度の抑制、転移能の抑制、生存期間の延長、がんの発生の抑制若しくは遅延、又はがんに伴う様々な臨床症状の緩和を誘導する量であり得る。がんの増殖速度の抑制は、本発明の医薬組成物を投与しなかった場合と比較して、例えば、約5%以上の抑制であり得る。好ましくは、がん増殖速度の抑制は、約10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、75%以上、80%以上、90%以上、又は100%以上であり得る。

【００７８】

薬学的有効量は、医薬組成物の剤形、投与間隔、投与対象の年齢、性別、体重、体表面積、疾患の種類等に応じて、適宜選択することができる。例えば、本発明の医薬組成物における本発明のペプチドまたはその塩の含有量の例として、0.001mg～1000mg、0.01mg～100mg、0.1mg～30mg、0.1mg～10mg等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００７９】

また、本発明の医薬組成物は、任意で、他の薬剤を含んでもよい。他の薬剤の例としては、抗炎症剤、鎮痛剤、解熱剤、他のがん治療剤等が挙げられる。本発明の医薬組成物に使用できる他のがん治療剤は特に限定されないが、エストロゲン陽性のがんに使用する場合には、選択的ERαモジュレーター（例えば、タモキシフェン及びラロキシフェン）、ERαダウンレギュレーター（例えば、フルベストラント）、アロマターゼ阻害剤、LH-RHアゴニスト製剤、プロゲステロン製剤等のホルモン療法剤を挙げることができる。またこれらの薬剤は、プロドラッグや薬学的に許容される塩の形で配合してもよい。

【００８０】

本発明の医薬組成物は、剤形に応じて、適宜適切な投与経路を選択して、対象に投与することができる。投与経路は、特に限定されないが、例えば、経口投与、ならびに皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹膜および静脈内注射等を挙げることができる。また、全身投与および疾患部位の近傍への局所投与のいずれであってもよいが、局所投与が好ましい。より具体的には、がん組織やその近傍に注射等の手段によって本発明の医薬組成物を投与することができる。あるいは本発明の医薬組成物を、外科的にがん組織内やその近傍に投与することもできる。本発明の医薬組成物は、適当な担体と配合することによって徐放性製剤とすることもできる。

【００８１】

本発明の医薬組成物の投与間隔もまた、投与対象の年齢、性別、体重、体表面積、および疾患の種類等、ならびに本医薬組成物の剤形および投与経路等に応じて、適宜選択することができる。投与間隔の例としては、例えば、毎日、4日毎、7日毎等が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８２】

本発明の医薬組成物の用量もまた、投与対象の年齢、性別、体重、体表面積、および疾患の種類等、ならびに本医薬組成物の剤形および投与経路等に応じて、適宜選択することができる。

本発明のペプチドまたはその塩の用量の例としては、例えば、0.001～1000mg/kg/日、0.005～500mg/kg/日、0.01～250mg/kg/日等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００８３】

本発明の医薬組成物は、投与対象の状態に応じて、他の医薬品と併用してもよい。併用する医薬品は特に限定されないが、エストロゲン受容体陽性のがんに使用する場合には、選択的ERαモジュレーター（例えば、タモキシフェン及びラロキシフェン）、ERαダウンレギュレーター（例えば、フルベストラント）、アロマターゼ阻害剤、LH-RHアゴニスト製剤、プロゲステロン製剤等のホルモン療法剤を挙げることができる。これらのホルモン

療法剤のうち、特に好ましいものとしては、タモキシフェンおよびフルベストラントを挙げることができる。

【００８４】

本発明の医薬組成物をがんの治療のために使用する場合には、投与の前に、治療対象のがんがBIG3およびPHB2を発現しているか否かを調べてもよい。治療対象のがんがBIG3およびPHB2を発現しているか否かは、対象から採取された試料においてこれらの遺伝子の転写産物や翻訳産物を検出することにより確認することができる。検出方法には公知の方法を用いることができ、例えば、転写産物をプローブやPCR法により検出する方法（例えば、cDNAマイクロアレイ法、ノーザンブロット法、RT-PCR法など）、および翻訳産物を抗体等により検出する方法（例えば、ウェスタンブロット法、免疫染色法など）等を用いることができる。

【００８５】

本発明はまた、本発明の医薬組成物を含む製品またはキットを提供する。本発明の製品またはキットは、本発明の医薬組成物を収容した容器を含み得る。適切な容器の例としては、ボトル、バイアル、および試験管が挙げられるが、これらに限定されない。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器には、ラベルが貼付されていてもよく、ラベルには、本発明の薬学的組成物が使用されるべき疾患または疾患の状態を記載することができる。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。

【００８６】

本発明の製品またはキットは、本発明の医薬組成物を収容した容器に加えて、任意で、薬学的に許容される希釈剤を収容した第2の容器をさらに含み得る。本発明の製品またはキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明を記載した添付文書などの、商業上の観点および使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含み得る。

【００８７】

本発明の医薬組成物はまた、必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置にて、提供することができる。該パックは、例えば、ブリスターパックのように金属ホイルまたはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与に関する説明書が添付され得る。

【００８８】

別の態様において、本発明はまた、以下の使用および方法等を提供する：

（ａ）がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物の製造における、本発明のペプチド若しくはその塩または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用；

（ｂ）がんの治療及び予防のいずれか又は両方において用いるための本発明のペプチド若しくはその塩または該ペプチドをコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物を製造するための方法またはプロセスであって、本発明のペプチド若しくはその塩または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドと、薬学的に許容される担体とを製剤化する段階を含む方法またはプロセス；

（ｄ）がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物を製造するための方法またはプロセスであって、本発明のペプチド若しくはその塩または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを薬学的に許容される担体と混合する段階を含む方法またはプロセス；および

（ｅ）本発明のペプチド若しくはその塩または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む、がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための方法。

上記の使用および方法等において、がんは好ましくはBIG3陽性のがんであり、エストロゲン受容体陽性のがんであってもエストロゲン受容体陰性のがん（例えば、トリプルネガティブの乳がん）であってもよい。このようながんの好適な例として乳がんが挙げられる。

【００８９】

以下、実施例を参照して本発明をより詳細に記載する。しかしながら、以下の材料、方

法および実施例は、本発明のある形態の作製および使用において当業者を支援するために役立ち得る一方、本発明の局面を説明するためのものにすぎず、したがって本発明の範囲を決して限定することを意図しない。当業者は、本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができる。

【００９０】

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【００９１】

[実施例1] エストロゲン依存性乳がんに対する効果

1．材料と方法

細胞株および培養条件

ヒト乳がん細胞株MCF-7 はJCRB細胞バンク（大阪、日本）から購入し、10% FBS（ニチレイバイオサイエンス、東京、日本）、1% Antibiotic/Antimycotic solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）、0.1mM NEAA（Thermo Fisher Scientific）、1mM ピルビン酸ナトリウム(Thermo Fisher Scientific）および10μg/mL インスリン（Sigma, St. Louis, MO, USA）を補充したMEM (Thermo Fisher Scientific）で、5% CO_2、37℃で維持した。

正常乳腺上皮細胞株MCF-10AはAmerican Type Culture Collection（ATCC, Manassas, VA, USA）から購入し、SingleQuotsキット（BPE、ヒドロコルチゾン、hEGF、インスリン、ゲンタマイシン/アンホテリシンB）（Lonza, Walkersville, MD, USA）および100ng/mLコレラトキシンを補充したMEBM（Lonza）で、5% CO_2、37℃で維持した。

【００９２】

細胞増殖アッセイ

MCF-7の増殖アッセイは、48ウェルプレート（2×10^4細胞/200μL）に播種して行った。まず、翌日に10% FBS、1% Antibiotic/Antimycotic solution、0.1mM NEAA、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび10μg/mLインスリンを補充したフェノールレッドフリーのDMEM/F12（Thermo Fisher Scientific）に培地を変更し、24時間後に10nM 17β-エストラジオール（エストロゲン、Sigma）のみ、または10nMエストロゲンとPHB2配列由来ペプチドで細胞を処理した。MCF-10Aの増殖アッセイは、48ウェルプレート（2×10^4細胞/200μL）に播種して、24時間後にPHB2配列由来ペプチドを添加した。増殖アッセイは、Cell Counting Kit-8（CCK-8、同仁堂、熊本、日本）を用いて行い、データは3つの独立した実験の平均±標準偏差で示した。

【００９３】

抗体およびイムノブロット解析

イムノブロット解析は、SDS-PAGE後にタンパク質をブロットしたメンブレンを4%ブロックエース溶液（大日本製薬、大阪、日本）で3時間ブロッキングした後、BIG3（1：1,000）、PHB2（1：1,000、Abcam, Cambridge, UK）、およびリン酸化PHB2（Ser39、Scrum、東京、日本）に対する抗体と12時間反応させた。その後、HRP標識二次抗体（BIG3は抗ラットIgG-HRP, 1:5,000、PHB2とリン酸化PHB2は抗ウサギIgG-HRP, 1：1,000、Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA）と1時間反応させ、ブロットを増強化学発光（ECL）システム（GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）で展開し、Image Reader LAS-3000 mini（富士フィルム、東京、日本）を用いてスキャンした。

【００９４】

免疫沈降

免疫沈降はMCF-7を10cmディッシュ（2×10^6細胞/10mL）に播種して、細胞増殖アッセイと同様に、MCF-7を10nMエストロゲンのみ、または10nMエストロゲンとPHB2配列由来ペプチドで処理した。免疫沈降解析は、細胞溶解緩衝液（50mM Tris-HCl; pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, and 0.5% CHAPS、0.1% protease inhibitor coc

ktail III）で溶解した細胞溶解物をラットIgG抗体とrec-Protein Gセファロース4B（Thermo Fisher Scientific）を用いて、4℃で3時間プレクリアした。その後、上清をBIG3に対する抗体5μgと4℃で12時間反応させた。次に、抗原抗体複合体をrec-Protein Gセファロース4B用いて4℃で1時間沈降した。免疫沈降されたタンパク質複合体を細胞溶解緩衝液で4回洗浄して、SDS-PAGEおよびイムノブロット解析を行った。

【００９５】

ペプチドの合成

すべてのペプチドはFmoc型固相合成法により合成した。樹脂はNovaSyn TGR樹脂（0.25mmol アミン/g)もしくはRink Amide AM樹脂（0.62mmol アミン/g）を用い、手動のFmoc固相合成法を利用した。Fmoc基の除去は、20%（v/v）ピペリジン/DMF溶液を室温で10分間作用させ、樹脂をDMFで5～10回洗浄したあと、Fmocアミノ酸3当量をDMF溶媒中、N,N-ジイソプロピルカルボジイミド（DIPCDI、3.0当量）と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（HOBt・H2O、3.3当量）あるいは N,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA、3.0当量）とN,N,N,N-テトラメチル-O-（ベンゾトリアゾール-1-イル）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU、2.9当量）を用いて、室温で90分間カップリングさせた。DMF、メタノール、エタノールで洗浄乾燥後、保護ペプチド樹脂100mgに対して、TFA：チオアニソール：m-クレソール：1,2-エタンジチオール：水（80：5：5：5：5）のカクテル5mLを、室温で90分間作用させた。TFAを窒素気流により濃縮後、残渣にエーテルを加え沈殿化させ、エーテルで沈殿物を洗浄後、適当な水性溶媒に溶解後、HPLCで分取精製した。

【００９６】

２．結果

PHB2配列由来ペプチドのスクリーニング

図1Aに示す20種類のPHB2タンパク質配列由来ペプチドを用いて、MCF-7のエストロゲン（E2）依存性増殖に対する抑制効果を検討した（各ペプチド10μM、24時間処理）。その結果、MCF-7はE2刺激により有意に増殖促進したのに対して、PHB2由来ペプチドNo.1（11-22aa：配列番号1）とNo.5（76-90aa：配列番号5）の処理にて、約50%の有意なE2依存性増殖の抑制効果を示した（No.1：58%、No.5：49%の抑制率）。これらは、ともにin silico解析によるBIG3との結合予測領域（太字のアミノ酸）とほぼ一致していた。また、No.2（42-50aa：配列番号2）とNo.3（38-50aa：配列番号3）のペプチドにおいても、22%、23%のE2依存性増殖の抑制効果を示した。しかしながら、各PHB2配列由来ペプチドはERAPと比較すると、E2依存性増殖抑制効果は低いことから、PHB2側のBIG3結合領域は複数存在する可能性が示唆された。

次に、No.1（11-22aa）およびNo.5（76-90aa）を中心としたPHB2配列由来のペプチドを新たに合成して（図1B, C）、各10μMで24時間処理したときのE2依存性増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、No.1（11-22aa）の近辺ではPHB2（11-22aa）ペプチドの抑制率がもっとも高く（63%の抑制率）、そこを中心に抑制効果は減弱していった（図1B）。一方、No.5（76-90aa）近辺でもPHB2（76-90aa）ペプチドが高い抑制率を示し（51%の抑制率）、No.50（75-89aa）もほぼ同じ抑制効果を有していたが、上記と同様に、これらのペプチドを中心に抑制率は減弱していた（図1C）。これらのデータで共通していることは、in silico解析でBIG3との結合予測部位で高いスコアを示した11-21aaおよび76-88aaの各アミノ酸を含んでいることであり、PHB2にはBIG3の結合部位が二つ存在することを示唆するものであった。

そこで、No.1（11-22aa）とNo.5（76-90aa）を中心としたペプチド、およびNo.5（76-90aa）とNo.1（11-22aa）を中心としたペプチドを併用したときのMCF-7のE2依存性増殖抑制効果を検討した。その結果、E2依存性の増殖に対してNo.1（11-22aa）ペプチドの単独処理は65%の抑制率とほぼ再現され、これにNo.5（76-90aa）を中心としたPHB2ペプチドを併用したとき、No.5（76-90aa）およびNo.50（75-89aa）との併用が各100%、97%とほぼ完全な抑制効果を示した（図１D）。同様に、No.5（76-90aa）の単独処理は55%の抑制率を示し、No.1（11-22aa）を中心としたPHB2ペプチドとの併用

はNo.1（11-22aa）のときほぼ完全に抑制し、5～26aaの領域からなるペプチド（No.36, 37, 38, 39, 40）と併用すると90%以上の抑制率になり（図1E）、No.1（11-22aa）およびNo.5（76-90aa）PHB2領域がBIG3との結合に重要であり、これらの領域を考慮したドミナントネガティブペプチドの開発が必要であると考えられた。

【００９７】

E2依存性増殖に対するPHB2配列由来ペプチドの抑制効果

続いて、MCF-7のE2依存性増殖を抑制できるPHB2配列由来ペプチド2種類（No.1、No.5）を併用したときのMCF-7のE2依存性増殖抑制効果を検討した。その結果、No.1とNo.5の各単独処理に比して、両ペプチド併用では効果が亢進され、88%の増殖抑制効果を示した（図2A）。また、単独処理では抑制効果を示さなかったNo.6(86-100aa、約10%の抑制率）とNo.5を併用投与しても抑制効果の亢進は認められなかったことから、PHB2の11-22aaと76-90aa のそれぞれに、BIG3結合領域が存在する可能性が示唆された。

次に、No.1とNo.5の20μMと50μM処理における、BIG3とPHB2の結合阻害について、BIG3抗体を用いた免疫沈降法により検討した。その結果、No.1とNo.5ともに濃度依存的にBIG3とPHB2の結合を阻害したが、No.1は50μMで64%、No.5は50μMで80%の阻害率であった（図2B）。また、両ペプチドの50μMの併用では87%の阻害率が得られた（図2B）。続いて、各ペプチド（No.1、No.5、No.6）のPHB2のSer39のリン酸化への影響を検討した。ポジティブ・コントロールであるERAP処理によるPHB2のSer39のリン酸化に比して、No.1とNo.5の単独処理はそれぞれ、各40%、20%のリン酸化バンド強度しか認めず（図2C）、また、両ペプチドの併用でも70%のリン酸化強度であった（図2C）。一方、No.6はPHB2のリン酸化を10%のバンド強度で有り、ほとんど誘導できなかった（図2C）。また、No.5とNo.6の併用でも、20%のバンド強度であったことから、PHB2とBIG3の結合はNo.1とNo.5の領域に複数にわたることが示唆された。

【００９８】

No.1とNo.5のPHB2ペプチドのBIG3結合領域を網羅した新規ペプチド（11-90aa）のE2依存性増殖に対する抑制効果

PHB2配列由来ペプチド（No.1とNo.5）はE2依存性増殖の抑制およびPHB2のSer39リン酸化の誘導を50%しかできないので、この2つの領域を含む11-90aaのPHB2ペプチドを新たに合成して、MCF-7のE2依存性増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、11-90aaのPHB2ペプチドは24時間のE2刺激により2倍に増殖したMCF-7を濃度依存的に抑制していたが、50μMでも57%の抑制率しかなく（図3A）、No.1およびNo.5のペプチドとほぼ同じ抑制率であった。

そこで、11-90aaペプチドがBIG3とPHB2の結合阻害およびPHB2リン酸化の誘導をできるかどうかを評価した。その結果、11-90aaのPHB2ペプチドはBIG3とPHB2の結合を未処理より阻害していたが、十分な結合阻害効果は得られなかった（図3B）。また、PHB2のSer39のリン酸化は11-90aaのPHB2ペプチドの濃度依存的に誘導されていたが、ERAP処理により得られたリン酸化の30%と十分なリン酸化を誘導することができなかった（図3C）。これは、アミノ酸数が80個と多いために、BIG3のαヘリックス構造との結合が不十分だった可能性も考えられる。

【００９９】

直鎖型、分岐型および環状型PHB2によるE2依存性増殖の抑制効果

PHB2配列由来ペプチド11-22aaと76-90aaの併用がエストロゲン依存性増殖を88%の抑制率まで亢進したことから（図2A）、両方の配列を直鎖上に合成したペプチド（直鎖結合型、図4A）と分岐させて合成したペプチド（分岐結合型、図4B）、および構造の安定化と膜透過性の向上を目的に各配列を環状型に合成したペプチド（環状型、図4C）を新たに作成し、各ペプチドの増殖抑制効果の亢進を検討した（各ペプチド10μM、24時間処理）。その結果、PEG（ポリエチレングリコール）配列を介して両配列を結合させた直鎖結合型および分岐結合型PHB2ペプチドの抑制率は各71%、57%となり、その抑制率は単独の直鎖型ペプチドの投与より亢進していたが、その併用投与より劣っていた（図5A）。また、11-21aaおよび76-88aaの環状型PHB2ペプチドは非環状型ペプチドと比較して、そ

の抑制率は亢進していた（図5A）。さらに、環状型ペプチドの併用はほぼ完全な抑制効果を獲得したが（96%の抑制率、図5A）、細胞が浮いてくるようなアポトーシス様の現象は確認できなかった。

次に、環状型ペプチドがERαおよびBIG3を発現しない正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に及ぼす影響を検討した（各ペプチド10μM、24時間処理）。その結果、直鎖結合型と環状結合型PHB2ペプチドで僅かな抑制効果が観察されたが（図5B、直鎖結合型：10%の阻害率、環状型11-21aa：14%の阻害率、環状型76-88aa：15%の阻害率）、ほとんどのPHB2ペプチドはMCF-10Aの増殖にほとんど影響をせずに、E2依存性増殖を特異的に抑制していることが示唆された。

次に、これらのPHB2ペプチドがBIG3とPHB2の相互作用を阻害することができるかどうか検討した。その結果、未処理およびE2刺激したときBIG3とPHB2は強く結合していたのに対して（図5C）、各PHB2ペプチドの単独処理はBIG3とPHB2の相互作用をほとんど阻害することができなかったが（図5C）、直鎖型PHB2ペプチドおよび環状型PHB2ペプチドのそれぞれの併用投与は顕著に阻害することが可能であり（図5C、直鎖型併用：67%の阻害率、環状型併用：81%の阻害率）、BIG3に対するPHB2の結合領域が二つあることを示唆していた。一方、直鎖結合型ならびに分岐結合型のPHB2ペプチドはPHB2上の二つのBIG3結合領域をカバーすることはできないと判断された。

【０１００】

<u>E2依存性増殖に対する環状型PHB2ペプチドの抑制効果の長期安定性</u>

環状型PHB2ペプチドが膜透過性亢進および構造固定化により、低濃度かつ長期安定性を獲得する可能性が考えられるため、10μMの環状型PHB2ペプチドを単独処理したときの96時間までの長期安定性を検討した。その結果、直鎖型のPHB2ペプチド11-22aaと76-90aaは24時間処理で40%と61%の抑制率であったが、96時間後では31%、24%に顕著に抑制していたのに対して（図6A）、環状型ペプチドは96時間後でも環状型11-21aaは67%（24時間処理は53%）、環状型76-88aaは72%（24時間処理は58%）の抑制率を示し（図6A）、その抑制効果は96時間まで安定的に持続していた。これらのデータは、環状型が架橋型と同様に立体構造が安定的に固定化されたことで、長期的な抑制効果が持続できていると考えられた。

次に、環状型PHB2ペプチドがその抑制効果を96時間まで持続することができたので、各環状型PHB2ペプチドの1および10μMの96時間までの処理がERαおよびBIG3を発現しないMCF-10Aの増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、PHB2配列11-21aaと76-88aaの各環状型ペプチドは、1μMではほとんど影響なかったが（ともに5～7%の抑制率）、10μMでは10～15%の抑制率を示し（図6B）、僅かな非特異的な阻害効果を有していると示唆されたが、環状型PHB2ペプチドによるMCF-7のE2依存的増殖の抑制はおもにBIG3とPHB2の結合阻害によるものであると考えられた。

【０１０１】

<u>E2依存性増殖に対する環状型PHB2ペプチドの濃度依存的な抑制効果</u>

環状型PHB2ペプチドがE2依存性MCF-7の増殖に対する50%阻害濃度（IC_{50}）を算出して、そのIC_{50}による相乗的な抑制効果を検討した。その結果、各環状PHB2ペプチドはE2依存性増殖に対して濃度依存的に抑制し、環状型11-21aaは4.06μM、環状型76-88aaは2.11μMのIC_{50}を示した（図7A）。そこで、4μMの環状型11-21aaと2μMの環状型76-88aaを用いて、長期的な併用効果を検討したところ、24時間の併用投与で82%の相乗的な抑制効果を示し、その抑制効果は96時間まで持続していた（図7B、併用投与：88%の抑制率、環状型11-21aa：41%の抑制率、環状型76-88aa：59%の抑制率）。さらに、これらの濃度はMCF-10Aの増殖にほとんど影響を及ぼさなかった（図7C）。

【０１０２】

<u>PHB2ペプチド配列でBIG3との結合に重要なアミノ酸の同定</u>

PHB2由来ペプチドNo.1（11-22aa：配列番号1）とNo.5（76-90aa：配列番号5）が、E2依存性増殖に対して約50%の抑制効果を有していたことから、No.1とNo.5のペプチド配列中の各アミノ酸をアラニンに変異させたペプチドを作製して（図8A）、増殖抑制に

重要なアミノ酸の同定を試みた。実験は、MCF-7を播種して48時間後に10μMの各PHB2ペプチドおよび10nMのエストロゲンを添加し、さらに24時間後の細胞数をモニターした。まず、PHB2配列11～22aaのアミノ酸を評価したところ、No.1（11-22aa）はエストロゲン依存性の細胞増殖を65%まで抑制したのに対して、No.59とNo.62のアラニン変異ペプチド（配列番号59、62）のみが19%と8%の抑制率に減弱していた（図8B）。一方、そのほかのアラニン変異ペプチドはNo.1の抑制率とほぼ同じであったことから（図8B）、15番目と18番目のグリシンがBIG3との結合に重要であると考えられ、この部位をD-アミノ酸の異性体型に変換することで、抑制活性が向上する可能性を示唆するものである。

次に、PHB2配列76～90aaのアミノ酸を評価したところ、No.5（76-90aa）のエストロゲン依存性増殖に対する抑制率は54%とほぼ再現されたが（図8C）、No.71～No.73のアラニン変異ペプチド（配列番号71～73）の抑制率がNo.5（76-90aa）より減弱し、各38%、37%、13%であり（図8C）、特に82番目のアスパラギン酸がBIG3とPHB2の結合に必要であると考えられた。

さらに、No.1（11-22aa）とNo.5（76-90aa）のペプチド以外に抑制効果を示したNo.2（42-50aa：配列番号2）とNo.3（38-50aa：配列番号3）に（図1A）、in silico解析でBIG3とPHB2の相互作用に関与することが予測された53-57aa（図1A）を含む51-57aaを付加したペプチドを用いて（（図8D）、No.82とNo.83：配列番号82、83）、エストロゲン依存性の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、No.2とNo.3の抑制率は各20%、17%であったのに対して、57番目までのアミノ酸を付加したNo.82とNo.83のペプチドでは、その抑制率が59%、61%に向上し（図8E）、44番目のグルタミン酸から57番目のグリシンまでのアミノ酸を有することで、No.1とNo.5の抑制率に匹敵するPHB2ペプチドになり得ることが示唆された。

【０１０３】

[実施例2] トリプルネガティブ乳がんに対する効果

1.材料と方法

細胞株および培養条件

ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231は、American Type Culture Collection（ATCC, Manassas, VA, USA）から購入し、10% FBS（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）、1%抗生物質-抗真菌剤溶液（和光純薬, 大阪, 日本 ）を補充したLeibovitz's L-15 培地（Thermo Fisher Scientific）を用いて、CO_2濃度調節なし、37℃で培養した。

【０１０４】

細胞増殖アッセイ

MDA-MB-231細胞を48ウェルプレートに1×10^4細胞/200 μL in wellの細胞密度で播種し、48時間後に各ウェルの培地をPHB2ペプチド11-22aaまたは76-90aaを加えた培地（それぞれ20 μMから3倍の希釈系列を作製）と交換し、さらに96時間培養後、Cell Counting Kit-8（同仁堂、熊本、日本）を用いて細胞増殖レベルを測定した。データは3つの独立した実験より取得し、グラフ作成・データ解析ソフトウェアSigmaPlot （Systat Software, San Jose, CA, USA）を用いてグラフ作成（平均±標準偏差）および細胞増殖に対するペプチドの50%阻害濃度（IC_{50}）の算出を行った。

【０１０５】

併用アッセイ

MDA-MB-231細胞を48ウェルプレートに1×10^4細胞/200 μL in wellの細胞密度で播種し、48時間後に各ウェルの培地をPHB2ペプチド11-22aa（添加濃度IC_{50}値）、PHB2ペプチド76-90aa（添加濃度IC_{50}値）、両ペプチドの混合液（添加濃度はそれぞれのIC_{50}値）をそれぞれ加えた培地、および陰性対照としてリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を加えた培地と交換し、さらに96時間培養後、Cell Counting Kit-8（同仁堂、熊本、日本）を用いて細胞増殖レベルを測定した。得られたデータは、PBS添加時の増殖レベルを基準に相対値を算出し、グラフを作成した。

【０１０６】

２．結果

PHB2ペプチドによる乳がん細胞株の増殖抑制効果

乳がん細胞株MDA-MB-231に対するPHB2ペプチド11-22aaおよび76-90aaの細胞増殖抑制効果を調べるため、ペプチドの段階希釈系列を準備し、細胞添加96時間後に増殖レベルを測定した。その結果、図9AとBに示すように両ペプチドともに濃度依存的な細胞増殖抑制効果が観察された。50%阻害濃度（IC_{50}）は、ペプチド11-22aaでは0.462μM、ペプチド76-90aaでは0.273 μMとなり、ペプチド76-90aaの方が高い増殖抑制効果を示した。

【０１０７】

PHB2ペプチド11-22aaと76-90aaの併用効果

細胞増殖抑制におけるPHB2ペプチド11-22aaと76-90aaの併用効果を検討するため、乳がん細胞株MDA-MB-231を用いて、両ペプチドを各IC_{50}値で混合添加した場合と各ペプチドをIC_{50}値で単独添加した場合の細胞増殖レベルを比較した。その結果、図9Cに示すように、各ペプチド単独では陰性対照のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）添加時と比較して約50%の増殖抑制であったが、併用により約62%まで抑制効果が増強された。

【０１０８】

[実施例3]エストロゲン依存性乳がんに対する架橋型PHB2ペプチドの効果

１．材料と方法

細胞株および培養条件

ヒト乳がん細胞株MCF-7 はJCRB細胞バンク（大阪、日本）から購入し、10% FBS（ニチレイバイオサイエンス、東京、日本）、1% Antibiotic/Antimycotic solution（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）、0.1 mM NEAA（Thermo Fisher Scientific）、1 mM ピルビン酸ナトリウム（Thermo Fisher Scientific）および10μg/mLインスリン（Sigma, St. Louis, MO, USA）を補充したMEM（Thermo Fisher Scientific）で、5% CO_2、37℃で維持した。

正常乳腺上皮細胞株MCF-10AはAmerican Type Culture Collection（ATCC, Manassas, VA, USA）から購入し、SingleQuotsキット（BPE、ヒドロコルチゾン、hEGF、インスリン、ゲンタマイシン/アンホテリシンB）（Lonza, Walkersville, MD, USA）および100 ng/mLコレラトキシンを補充したMEBM（Lonza）で、5% CO_2、37℃で維持した。

【０１０９】

細胞増殖アッセイ

MCF-7の増殖アッセイは、48ウェルプレート（2×10^4細胞／200μL）に播種して行った。まず、翌日に10% FBS、1% Antibiotic/Antimycotic solution、0.1mM NEAA、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび10μg/mLインスリンを補充したフェノールレッドフリーのDMEM/F12（Thermo Fisher Scientific）に培地を変更し、24時間後に10nM 17β-エストラジオール（エストロゲン、Sigma）のみ、または10nMエストロゲンとPHB2配列由来ペプチドで細胞を処理した。MCF-10Aの増殖アッセイは、48ウェルプレート（2×10^4細胞／200μL）に播種して、24時間後にPHB2配列由来ペプチドを添加した。増殖アッセイは、Cell Counting Kit-8（CCK-8、同仁堂、熊本、日本）を用いて行い、データは３つの独立した実験の平均±標準偏差で示した。

【０１１０】

２．結果

エストロゲン依存性増殖に対する架橋型PHB2ペプチドの抑制効果

PHB2ペプチド11-21aaおよび76-88aaを3種類の架橋法（図10A：ヘキサフルオロベンゼン架橋、デカフルオロビフェニル架橋、ジスルフィド架橋）により架橋して架橋型PHB2ペプチド（ステープル化PHB2ペプチド）を作製し（図10B）、エストロゲン依存性増殖に対するこれらのペプチドの抑制効果を検討した。実験は、乳癌細胞MCF-7を播種して48時間後に10μMの各PHB2ペプチドおよび10nMエストロゲンを添加し、さらに24時間後の細胞数をMTT assayで評価した。

11-22aaおよび76-88aaの各架橋型PHB2ペプチドは、エストロゲン依存性増殖に対する抑制効果を非架橋型PHB2ペプチド（配列番号109、113、114、118、122）より約1.5倍に改善した（ポリアルギニン付加：図10C左、ポリアルギニンなし：図10C右）。なお、架橋法（ステープル化法）の違いによる改善効果は認められなかった。また、C末端にポリアルギニンを有さない架橋型PHB2ペプチド（配列番号115、116、117、119、120、121）がポリアルギニン付加ペプチドより抑制率が僅かに高く（ポリアルギニンあり：約60%の抑制率、ポリアルギニンなし：約70%の抑制率）、ポリアルギニンが架橋構造の機能を妨害する可能性を示唆した。

【０１１１】

エストロゲン依存性増殖に対する環状型PHB2ペプチドの抑制効果

環状型PHB2ペプチド（図4C、配列番号25と26）の細胞膜透過性と構造安定性の向上を目的に、架橋形態を変化させて、エストロゲン依存性増殖に対する抑制効果を検討した。これまでのジスルフィド架橋（配列番号25と26）に加えて、ヘキサフルオロベンゼン架橋（図11A：配列番号123と126）とデカフルオロビフェニル架橋（図11A：配列番号124と127）を評価した。その結果、フルオロベンゼンを用いて架橋した環状型PHB2ペプチド（図11A：配列番号123、124、126、127）は、ジスルフィド架橋より僅かな増殖抑制効果の改善を示し（図11B）、環状型PHB2ペプチド11-21aaで約70%、環状型PHB2ペプチド76-88aaで約80%に亢進した。なお、フルオロベンゼン架橋はシングル架橋（ヘキサフルオロベンゼン架橋）とダブル架橋（デカフルオロビフェニル架橋）の間に相違はなかった。

【０１１２】

PHB2ペプチド11-22aaの改変がエストロゲン依存性増殖に及ぼす影響

PHB2ペプチド11-22aaについて、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における15番目と18番目のグリシンがBIG3との結合に重要であると考えられたことから（図8）、この位置をD型アラニンおよびD型ロイシンに置換したとき（図12A）、その抑制活性が亢進するかどうか検討した。その結果、15番目と18番目のグリシンをD型ロイシンに置換したPHB2ペプチド（配列番号134）は約65%の抑制率を示した一方で（図12B）、D型アラニンへの置換（配列番号133）はまったく抑制効果を示さなかった（図12B）。しかしながら、PHB2ペプチド11-22aa（配列番号１、図8B）の抑制率が約65%であったことから、D型ロイシンに置換しても抑制効果の改善はほとんど認められなかった。

【０１１３】

架橋型PHB2ペプチドが乳腺上皮細胞の増殖に及ぼす影響

架橋型および環状型のPHB2ペプチドがERαおよびBIG3を発現しない正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に及ぼす影響を検討した（各PHB2ペプチドは10μMで24時間処理）。その結果、評価したすべてのPHB2ペプチドはMCF-10Aの増殖にまったく影響しなかった（図13）。

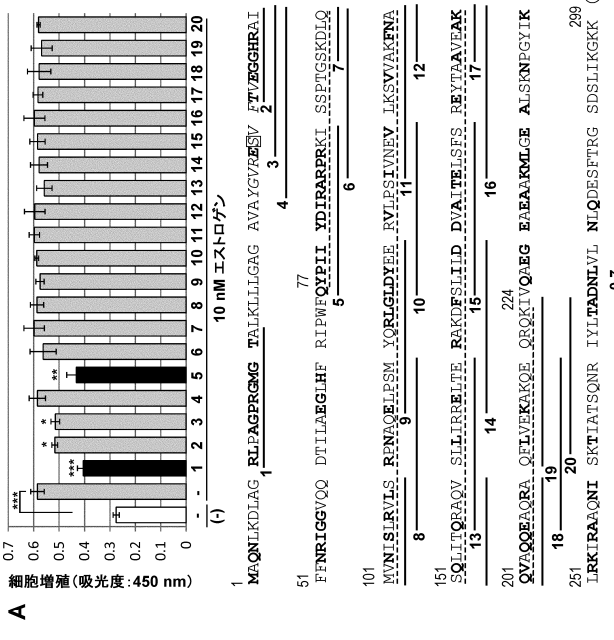
【産業上の利用可能性】

【０１１４】

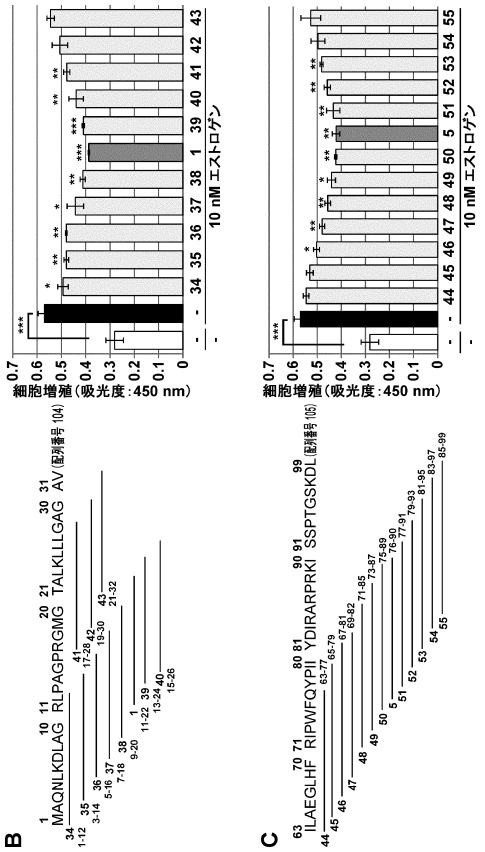
本発明によれば、BIG3-PHB2相互作用に対する阻害効果を発揮し、乳がん治療薬として有用な、PHB2アミノ酸配列由来ペプチドが提供される。本発明によって提供されたペプチドは、乳がん等のがんの治療に有用である。より具体的には、本発明のペプチドはBIG3陽性かつ／またはエストロゲン受容体陽性のがんの治療に有用である。本発明のペプチドは、ヒトの全身の臓器にて発現が認められるPHB2ではなく、特にエストロゲン受容体陽性のがんに特異的に高発現するタンパク質であるBIG3を標的としているため、エストロゲン受容体陽性のがんに対する高い選択性を期待できる。また、本発明のペプチドはトリプルネガティブ乳がんに対しても抗腫瘍効果を発揮する。

【図面】

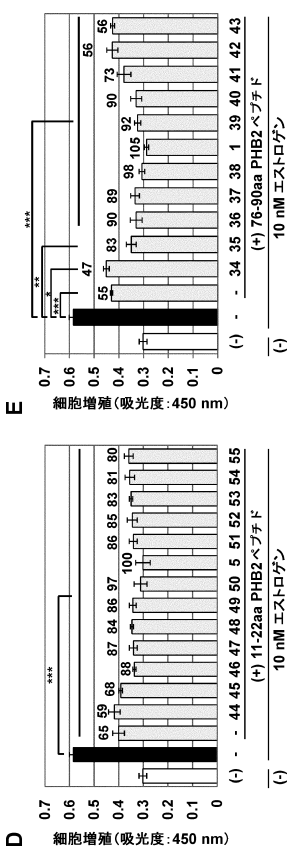
【図１－１】



【図１－２】



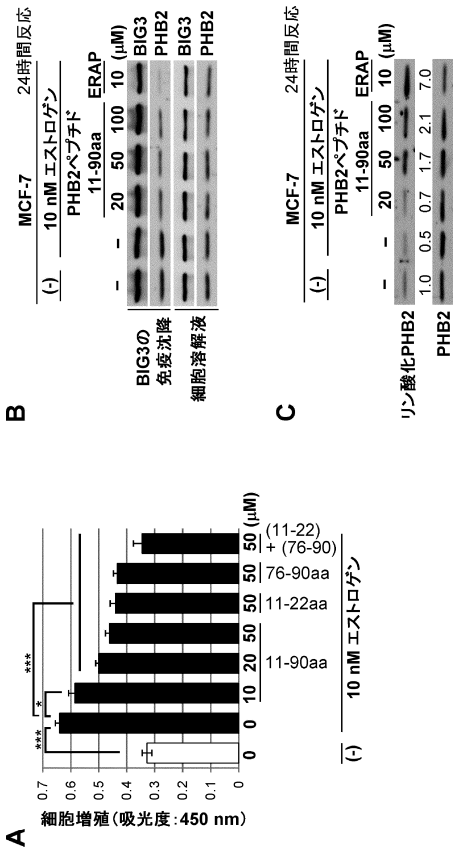
【図１－３】


E
細胞増殖（吸光度：450 nm）
(-) - - 34 35 36 37 38 1 39 40 41 42 43
(+) 76-90aa PHB2ペプチド
10 nM エストロゲン
(-)
D
細胞増殖（吸光度：450 nm）
(-) - - 44 45 46 47 48 49 50 5 51 52 53 54 55
(+) 11-22aa PHB2ペプチド
10 nM エストロゲン
(-)

【図２】

B
MCF-7 24時間反応
PHB2ペプチド 濃度（μM）
11-22aa 0 20 50
76-90aa 20 50
併用 50
BIG3の免疫沈降
結合阻害率（%）
BIG3 PHB2
細胞溶解液
A
細胞増殖（吸光度：450 nm）
(76-90) + (86-100)
86-100aa
(11-22) + (76-90)
76-90aa
11-22aa
ERAP
10 nM エストロゲン
(-)
C
MCF-7 24時間反応
10 nM エストロゲン
(-)
(76-90) + (86-100)
86-100aa
(11-22) + (76-90)
76-90aa
11-22aa
ERAP
リン酸化PHB2
PHB2

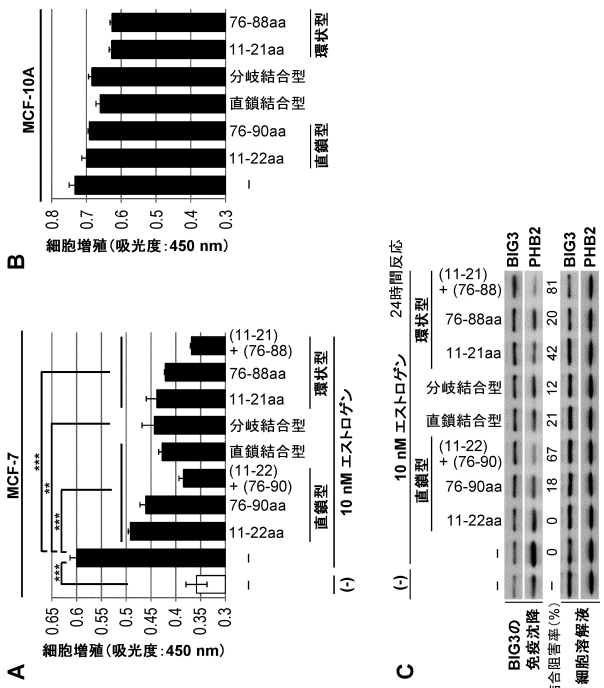
【図３】


B
MCF-7 24時間反応
10 nM エストロゲン
(-)
PHB2ペプチド
11-90aa 20 50 100
ERAP 10 (μM)
BIG3の免疫沈降
細胞溶解液
BIG3 PHB2
C
MCF-7 24時間反応
10 nM エストロゲン
(-)
11-90aa 20 50 100
ERAP 10 (μM)
リン酸化PHB2 1.0 0.5 0.7 1.7 2.1 7.0
PHB2
A
細胞増殖（吸光度：450 nm）
11-90aa
11-22aa
76-90aa
(11-22) + (76-90)
10 nM エストロゲン
(-)

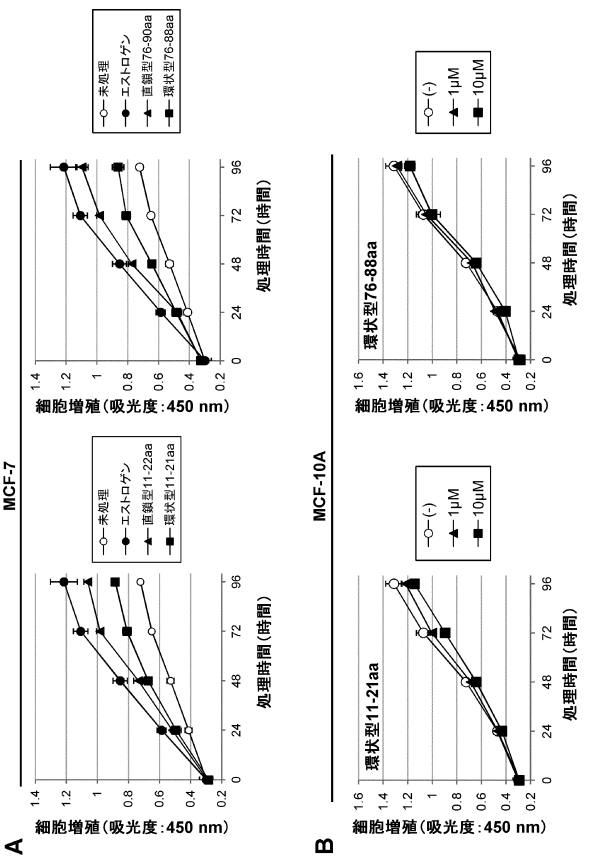
【図４】

miniPEG
A
Ac-RLPAGPRGMGTA-(miniPEG)x-QYPIIYDIRARPRKI
(配列番号 22)
RRRRRRRR-NH2
(配列番号 23)
B
Ac-RLPAGPRGMGTA-(miniPEG)x-NH
(配列番号 22)
Ac-QYPIIYDIRARPRK-RRRRRRRR-NH2
(配列番号 24)
C
(配列番号 25)
(配列番号 26)

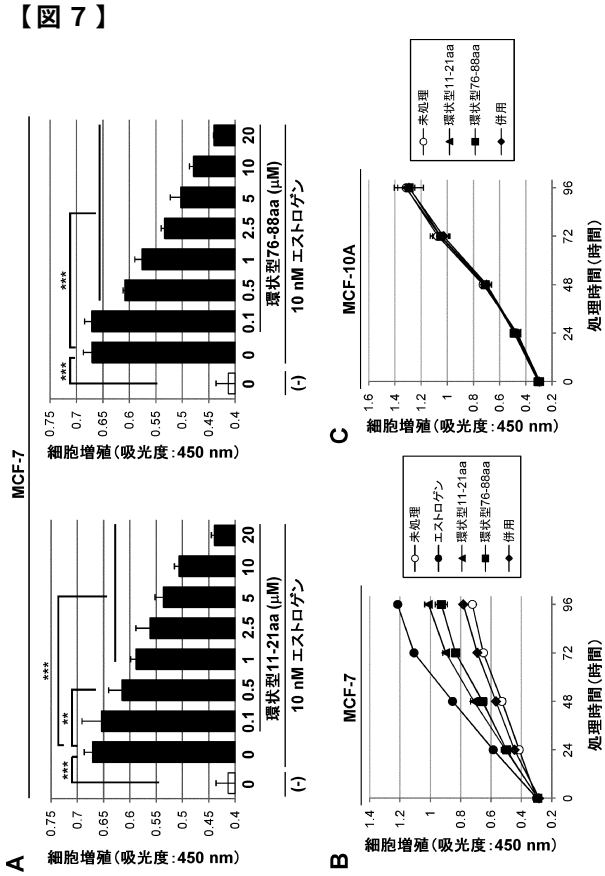
【図５】


A
MCF-7
細胞増殖（吸光度：450 nm）
直鎖型
環状型
10 nM エストロゲン
(-)
11-22aa
76-90aa
(11-22) + (76-90)
11-21aa
76-88aa
(11-21) + (76-88)
直鎖結合型
分岐結合型
B
MCF-10A
C
24時間反応
BIG3
PHB2
BIG3の免疫沈降
結合阻害率（%）
細胞溶解液

【図６】


A
MCF-7
B
MCF-10A
細胞増殖（吸光度：450 nm）
処理時間（時間）
未処理
エストロゲン
直鎖型11-22aa
環状型11-21aa
直鎖型76-90aa
環状型76-88aa
(-)
1μM
10μM

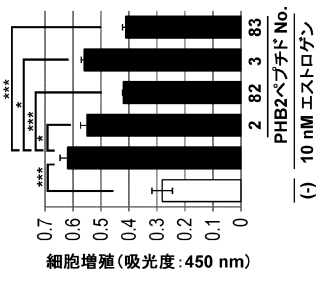
【図７】


A
MCF-7
細胞増殖（吸光度：450 nm）
環状型11-21aa (μM)
環状型76-88aa (μM)
10 nM エストロゲン
(-)
B
C
MCF-10A
処理時間（時間）
未処理
エストロゲン
環状型11-21aa
環状型76-88aa
併用

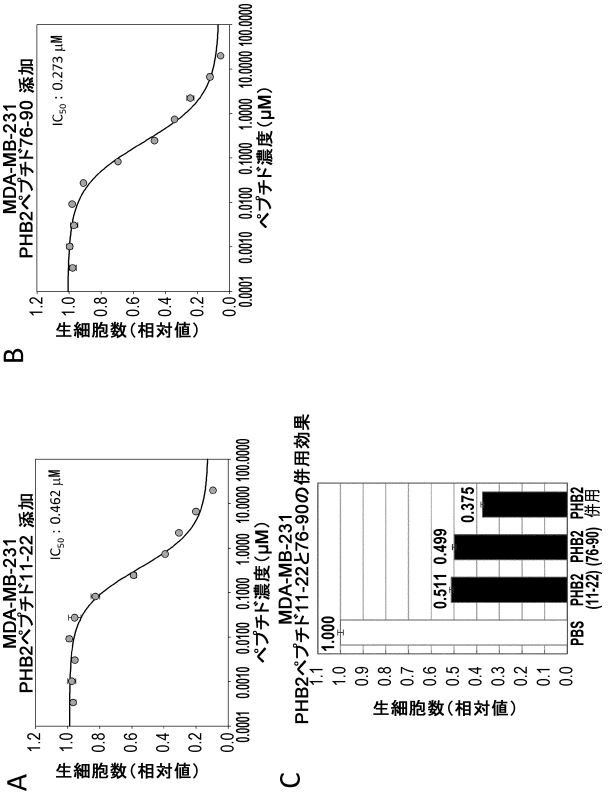
【図８－１】

A
配列番号 1 RLPAGPRGMGTA
配列番号 56 ALPAGPRGMGTA
配列番号 57 RAPAGPRGMGTA
配列番号 58 RLAAGPRGMGTA
配列番号 59 RLPAAPRGMGTA
配列番号 60 RLPAGARGMGTA
配列番号 61 RLPAGPAGMGTA
配列番号 62 RLPAGPRAMGTA
配列番号 63 RLPAGPRGAGTA
配列番号 64 RLPAGPRGMATA
配列番号 65 RLPAGPRGMGAA
配列番号 66 ALPAGPAGMGTA
配列番号 5 QYPIIYDIRARPRKI
配列番号 67 AYPIIYDIRARPRKI
配列番号 68 QAPIIYDIRARPRKI
配列番号 69 QYAIIYDIRARPRKI
配列番号 70 QYPAIYDIRARPRKI
配列番号 71 QYPIADIRARPRKI
配列番号 72 QYPIIYAIRARPRKI
配列番号 73 QYPIIYDARARPRKI
配列番号 74 QYPIIYDIAARPRKI
配列番号 75 QYPIIYDIRAAPRKI
配列番号 76 QYPIIYDIRARARKI
配列番号 77 QYPIIYDIRARPAKI
配列番号 78 QYPIIYDIRARPRKA
配列番号 79 QYPIIYDIRARPRAI
配列番号 80 QYPIIYDIRARPRKA
配列番号 81 QAPIIYDIAARPRKI
B
細胞増殖（吸光度：450 nm）
PHB2ペプチド No.
10 nM エストロゲン
(-)
C

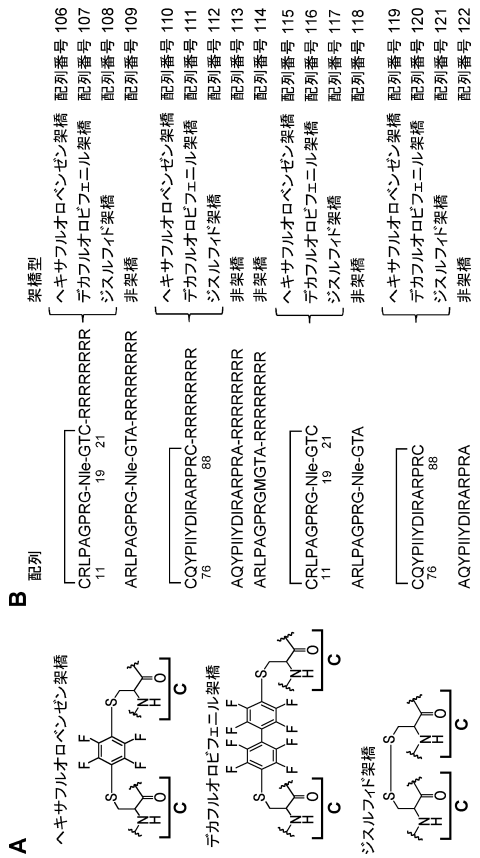
【図８－２】



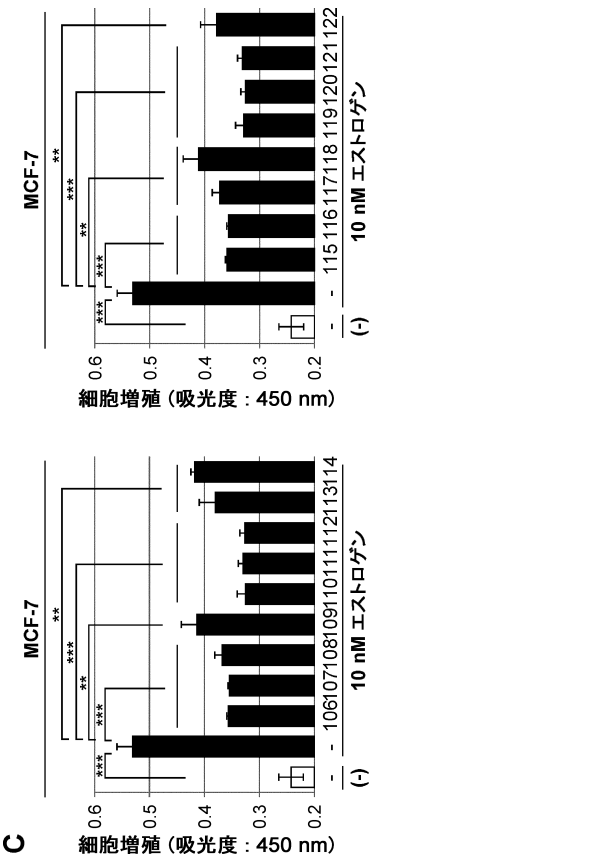
【図９】



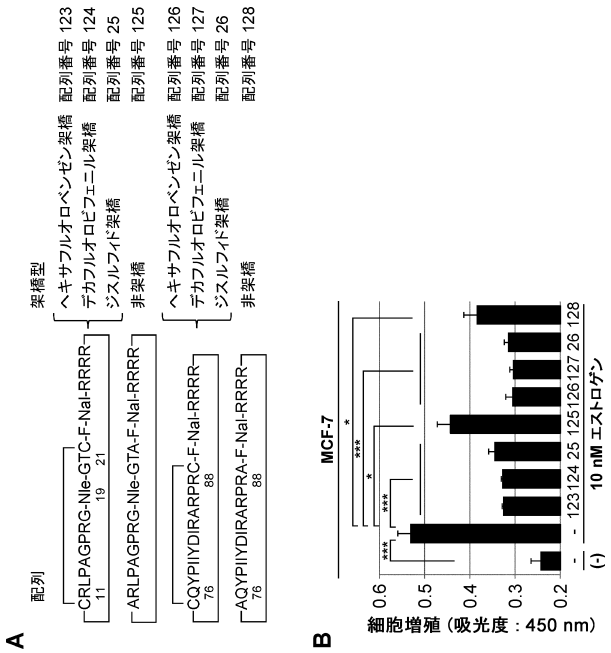
【図１０－１】



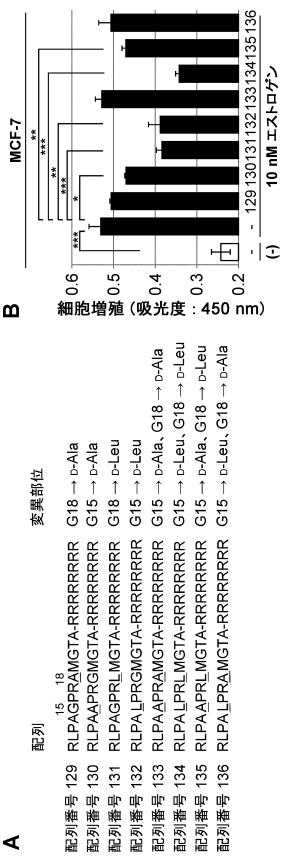
【図１０－２】



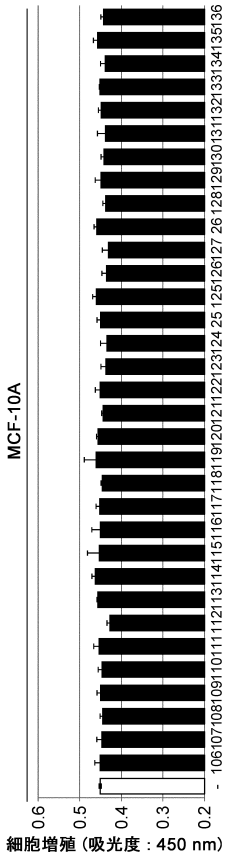
【図１１】


A
配列
架橋型
CRLPAGPRG-Nle-GTC-F-Nal-RRRR-
11 19 21
ヘキサフルオロベンゼン架橋 配列番号 123
デカフルオロビフェニル架橋 配列番号 124
ジスルフィド架橋 配列番号 25
ARLPAGPRG-Nle-GTA-F-Nal-RRRR-
非架橋 配列番号 125
CQYPIIYDIRARPRC-F-Nal-RRRR-
76 88
ヘキサフルオロベンゼン架橋 配列番号 126
デカフルオロビフェニル架橋 配列番号 127
ジスルフィド架橋 配列番号 26
AQYPIIYDIRARPRA-F-Nal-RRRR-
76 88
非架橋 配列番号 128
B
MCF-7
細胞増殖（吸光度：450 nm）
0.2 0.3 0.4 0.5 0.6
- 123124 25 125126127 26 128
(-) 10 nM エストロゲン

【図１２】


B
MCF-7
細胞増殖（吸光度：450 nm）
0.2 0.3 0.4 0.5 0.6
- 129 130131132133134135136
(-) 10 nM エストロゲン
A
配列
変異部位
配列番号 129 RLPAGPRAMGTA-RRRRRRRR G18 → D-Ala
配列番号 130 RLPAAPRGMGTA-RRRRRRRR G15 → D-Ala
配列番号 131 RLPAGPRLMGTA-RRRRRRRR G18 → D-Leu
配列番号 132 RLPALPRGMGTA-RRRRRRRR G15 → D-Leu
配列番号 133 RLPAAPRAMGTA-RRRRRRRR G15 → D-Ala、G18 → D-Ala
配列番号 134 RLPALPRLMGTA-RRRRRRRR G15 → D-Leu、G18 → D-Leu
配列番号 135 RLPAAPRLMGTA-RRRRRRRR G15 → D-Ala、G18 → D-Leu
配列番号 136 RLPALPRAMGTA-RRRRRRRR G15 → D-Leu、G18 → D-Ala

【図１３】


MCF-10A
細胞増殖（吸光度：450 nm）
0.2 0.3 0.4 0.5 0.6
- 1061071081091101111121131141151161171181191201211221231241251261271281291301311321331341351361

【配列表】
0007525855000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類
Ａ６１Ｋ　38/16　(2006.01)

ＦＩ
Ａ６１Ｋ　38/16

弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　片桐 豊雅
徳島県徳島市新蔵町２丁目２４番地 国立大学法人徳島大学内
(72)発明者　吉丸 哲郎
徳島県徳島市新蔵町２丁目２４番地 国立大学法人徳島大学内
(72)発明者　大高 章
徳島県徳島市新蔵町２丁目２４番地 国立大学法人徳島大学内
(72)発明者　宮本 貴史
神奈川県川崎市高津区坂戸３丁目２－１ オンコセラピー・サイエンス株式会社内
(72)発明者　岡本 康秀
神奈川県川崎市高津区坂戸３丁目２－１ オンコセラピー・サイエンス株式会社内
審査官　鳥居 敬司

(56)参考文献
国際公開第２０１３／０１８６９０（WO，Ａ１）
Cancer Sci.，2015年，Vol.106, No.5，pp.550-558
第４１回日本分子生物学会年会 要旨集，2018年11月09日，2P-0632
BMC Research Notes，2014年，Vol.7, No.435，pp.1-8
Nature Communications，2013年，4:2443

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１４／００－１４／８２５
Ｃ０７Ｋ　７／００－７／６６
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ