

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-501857

(P2016-501857A)

(43) 公表日 平成28年1月21日(2016.1.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 7/06 (2006.01)</b>	C 0 7 K 7/06 Z N A	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 1/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/18	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 35/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-543431 (P2015-543431)	(71) 出願人	515135583
(86) (22) 出願日	平成25年11月21日 (2013.11.21)		アムキュア ゲーエムベーハー
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月14日 (2015.7.14)		ドイツ国 7 6 3 4 4 エッゲンシュタイ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/074401		ン-レオポルトシュハーフェン, ヘルマン
(87) 国際公開番号	W02014/079940		ーフォン-ヘルムホルツ-ブラッツ 1
(87) 国際公開日	平成26年5月30日 (2014.5.30)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	1220901.1		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成24年11月21日 (2012.11.21)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100110663
			弁理士 杉山 共永
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膀胱を処置するための C D 4 4 V 6 由来ペプチド

(57) 【要約】

本発明は、様々な型の膀胱を処置するための化合物、医薬組成物および方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトの膀胱の処置において使用するための化合物であって、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  ( $X_1$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択され、 $X_5$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択される) (配列番号 1) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$  もしくは  $X_{14}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択される) (配列番号 7) の内の少なくとも 5 個の、6 個の、7 個の、8 個の、9 個の、10 個の、11 個の、12 個の、13 個のまたは 14 個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号 7 の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  および  $X_{11}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

を含む化合物。

## 【請求項 2】

前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  (式中、 $X_1$  が、K、R、N もしくは Q のような  $NH_2$  基を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_5$  が、E もしくは D のような負荷電側鎖を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択される) (配列番号 4) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、K、R、N もしくは Q のような  $NH_2$  基を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_2$  が、E もしくは D のような負荷電側鎖を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_3$  が、K、R、N もしくは Q のような  $NH_2$  基を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_4$  が、F、W もしくは Y のような非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_5$  が、F、W もしくは Y のような非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_6$  が、G または、A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_7$  が、K、R、N もしくは Q のような  $NH_2$  基を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、E もしくは D のような負荷電側鎖を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{12}$  が、G または、A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{13}$  が、F、W もしくは Y のような非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{14}$  が、K、R、N もしくは Q のような  $NH_2$  基を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択される) (配列番号 8) の内の少なくとも 5 個の、6 個の、7 個の、8 個の、9 個の、10 個の、11 個の、12 個の、13 個のまたは 14 個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号 8 の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  が、K、R、N もしくは Q のような  $NH_2$  基を有するアミノ酸、または A、V、L もしくは I のような非極性側鎖を有するア

10

20

30

40

50

ミノ酸を含む群から選択され、 $X_{11}$ が、EもしくはDのような負荷電側鎖を有するアミノ酸、またはA、V、LもしくはIのような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択される)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、請求項1に記載の使用のための化合物。

【請求項3】

前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列 $X_1 - R - W - H - X_5$ (式中、 $X_1$ が、K、R、NもしくはQのような $NH_2$ 基を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_5$ が、EもしくはDのような負荷電側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択される)(配列番号5)含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (式中、 $X_1$ が、K、R、NまたはQのような $NH_2$ 基を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_2$ が、EまたはDのような負荷電側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_3$ が、K、R、NまたはQのような $NH_2$ 基を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_4$ が、F、WまたはYのような非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_5$ が、F、WまたはYのような非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_6$ が、Gまたは、A、V、LもしくはIのような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_7$ が、K、R、NまたはQのような $NH_2$ 基を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{11}$ が、EまたはDのような負荷電側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{12}$ が、Gまたは、A、V、LもしくはIのような非極性側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{13}$ が、F、WまたはYのような非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{14}$ が、K、R、NまたはQのような $NH_2$ 基を有するアミノ酸を含む群から選択される)(配列番号9)の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号9の少なくとも $X_7 - R - W - H - X_{11}$ (式中、 $X_7$ が、K、R、NまたはQのような $NH_2$ 基を有するアミノ酸を含む群から選択され、 $X_{11}$ が、EまたはDのような負荷電側鎖を有するアミノ酸を含む群から選択される)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、請求項2に記載の使用のための化合物。

【請求項4】

前記化合物が、アミノ酸配列 $N - R - W - H - E$ (配列番号2)、アミノ酸配列 $K - E - Q - W - F - G - N - R - W - H - E - G - Y - R$ (配列番号6)を含む、場合により、からなるペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、請求項1、2または3のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項5】

前記化合物が前記ペプチドまたは前記ペプチド模倣物の改変型である、請求項1、2、3または4のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項6】

前記化合物が、前記ペプチドまたはペプチド模倣物のペグ化型、ヘシル化型、パシル化型、ミリストイル化型、グリコシル化型および/または環状型である、請求項5に記載の使用のための化合物。

【請求項7】

化合物が経口投与用に、経鼻投与用にまたは皮下投与用に製剤化されている、請求項1、2、3、4または5のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項8】

前記膀胱がんが転移をまだ形成していない、請求項1、2、3、4、5、6または7のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項9】

前記膀胱がんが転移を既に形成している、請求項1、2、3、4、5、6または7のいずれ

10

20

30

40

50

かに記載の使用のための化合物。

【請求項 10】

前記膵癌が、対癌米国合同委員会の癌病期分類システムの T N M 解剖学的 / 予後群システムに従ってステージ I V と分類できる、請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項 11】

膵癌が膵外分泌癌または膵内分泌癌である、請求項 8、9 または 10 のいずれかに記載の使用のための化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、様々な型の膵癌を処置するための化合物、医薬組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

米国では、膵癌は 2 番目に多い消化管の悪性腫瘍であり、成人において 4 番目に多い癌関連死である (Cancer Staging Manual、第 7 版、2010、American Joint Committee on Cancer、Springer)。膵癌は、膵臓を形成する組織で生じる形質転換細胞に由来する悪性新生物である。最も一般的なタイプの膵癌は腺癌または膵外分泌癌であり、これらは、光学顕微鏡検査で、膵臓の外分泌成分と共に生じる腺構造を示す腫瘍である。マイナーなタイプは膵管細胞から生じ、神経内分泌腫瘍と分類される。

20

【0003】

膵癌の処置は概して、癌のステージに依存する。現在のところ、限局性癌のみが治癒目的の手術に適していると考えられるが、症例のわずか約 20% が診断時に限局性疾患と診断される。悪性腫瘍が十二指腸または結腸に侵入しているまたはこれらを圧迫している場合、緩和を目的として手術を行なうこともできる。更なる処置の選択肢として、放射線および緩和的化学療法が挙げられる。現在の化学療法として、ゲムシタビンによる処置、またはゲムシタビン / オキサリプラチンもしくはゲムシタビン / シスプラチン等のゲムシタビンとの併用療法が挙げられる。

【0004】

集中的な研究努力にもかかわらず、長期の無増悪生存をもたらすと考えられるであろう、現在利用可能な処置は存在しない。従って、膵癌はこれまで、全ての新生物の中で予後が最も悪い悪性腫瘍の一つである。特に転移が肝臓、腹腔および肺等へと体中に広がっている場合、既存の転移の効果的な退縮を可能にするであろう、利用可能で効果的な処置は存在しない。

30

【0005】

そのため、特に転移性拡散が起きている場合に、様々なタイプの膵癌を処置するために使用することができる新規の化合物および方法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0006】

本発明の目的の一つは化合物およびそのような化合物を含む医薬組成物を提供することであり、該化合物および医薬組成物はヒトの膵癌を処置するために使用することができる。

40

【0007】

別の目的は、ヒトの膵癌を処置するための新規の方法を提供することである。

【0008】

別の目的は、転移が肝臓等の人体の異なる部位、腹腔および肺に既に広がっている膵癌の処置を可能にし、好ましくは、この既に形成された転移を除去することにより膵癌の処置を可能にする、新規の化合物、医薬組成物および方法を提供することである。

【0009】

以下の説明から明らかになるであろうこれらの目的およびその他の目的は、独立請求項

50

の主題によって達成される。本発明の好ましい実施形態の一部が従属請求項で述べられる。

【0010】

本発明は、共受容体分子CD44v6の分子機能を解明することを目的の一部とする以下に記載の実験データにある程度基づいている。CD44膜貫通糖タンパク質は、細胞接着分子(CAM)の大きなファミリーの一部を形成する。CD44は、選択的にスプライシングされたバリエーションを含み、該バリエーションの一部は、受容体型チロシンキナーゼMetおよびVEGFRの活性化による転移のプロセスに参与することが認識されている(Matzke他、Cancer Res (2005)、65(14) 6105~6109を参照)。

【0011】

以下に記載の実験から、エクソンv6を含む、選択的にスプライシングされたバージョンのCD44(CD44v6)が、例えばヒト膵癌の動物モデルにおける転移の誘導に関与していることが分かる。

【0012】

以下に記載する実験では、N-R-W-H-E等、5個のアミノ酸のペプチド骨格に組み込まれているトリペプチド配列R-W-Hを最小必要条件として有するペプチドがヒト膵癌の動物モデルにおいて転移の形成をブロックすることができることが更に示されている。更に、本明細書に記載するデータは、マウスでのヒト膵癌の同所性モデルにおいて、このペプチドにより、全身にわたって既に広がって形成されている転移の効果的な退縮も可能になることを示す。

【0013】

既に上述したように、トリペプチド配列R-W-Hが5個のアミノ酸のペプチド骨格に組み込まれる場合には、本明細書に記載のペプチドは転移の阻害だけでなく既に形成された転移の実際の除去にも効果的であることが発見されている。このことは、ペンタペプチドN-R-W-H-Eのアミノ酸NおよびEをそれぞれAに変更することにより発見された。これらは非保存的アミノ酸置換であったにもかかわらず、MetのCD44v6媒介性活性化の阻害においてペプチドは依然として活性がある。そのため、ペンタペプチドN-R-W-H-Eの第1位のNをK、RまたはQ等のアミノ酸で保存的に置換するだけでなく、任意のその他のアミノ酸またはV、LもしくはI等のAに相当する非極性側鎖を有するアミノ酸により保存的に置換することができると結論付けるのが正しいと思われる。当然のことながら、同様の考察をペンタペプチドの第5位に適用し、その結果、アミノ酸EをKによる等の保存的置換により置き換えるだけでなく、任意のその他のアミノ酸または特にV、LもしくはI等のアラニンの特性と類似するアミノ酸に置き換えることができる。

【0014】

更に、ペンタペプチドN-R-W-H-Eはまた、より長いペプチドに組み込まれる場合に、Metシグナル伝達のCD44v6媒介性活性化を阻害するのに効果的であることも示されており、より長いペプチドの上限は14merであると仮定するのが妥当である。保存的アミノ酸置換だけでなく非保存的アミノ酸置換によりペンタペプチドの最初の位置および最後の位置を置換する可能性の発見を前提として、R-W-Hの必須モチーフ外の任意のアミノ酸を同じ理由に従って置き換えることができた結論付けるのが妥当であると思われる。

【0015】

そのため、本発明は一実施形態において、ヒトの膵癌の処置において使用するための化合物であって、

・少なくともアミノ酸配列 $X_1$ -R-W-H- $X_5$ ( $X_1$ が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択され、 $X_5$ が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される)(配列番号1)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

10

20

30

40

50

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$  もしくは  $X_{14}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択される) (配列番号 7) の内の少なくとも 5 個の、6 個の、7 個の、8 個の、9 個の、10 個の、11 個の、12 個の、13 個のまたは 14 個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号 7 の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  および  $X_{11}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む化合物に関する。

10

## 【0016】

上記に記載の知見を前提として、即ちペントペプチド N - R - W - H - E 中のアミノ酸 N およびアミノ酸 E をアラニンに置き換えることができるという知見を前提として、これらの位置で、V、L または I 等の物理化学特性がアラニンと同程度である保存的アミノ酸置換またはアミノ酸置換のどちらかを含むペプチドが、N - R - W - H - E と同じ活性を実現することもできると仮定するのが妥当であると思われる。同様の考察が、必須のトリペプチドモチーフ R - W - H に隣接する位置に関する 14 mer 由来のペプチドに当てはまる。

## 【0017】

そのため、好ましい実施形態では、本発明は、ヒトの膵癌の処置において使用するための化合物に関し、前記化合物は以下を含む：

20

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_5$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択される) (配列番号 4) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W もしくは Y または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W もしくは Y または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_6$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{12}$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W もしくは Y または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択される) (配列番号 8) の内の少なくとも 5 個の、6 個の、7 個の、8 個の、9 個の、10 個の、11 個の、12 個の、13 個のまたは 14 個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号 8 の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは

30

40

50

Qまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、X<sub>11</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物。

【0018】

ペンタペプチドまたは以下に記載する14mer由来の任意のより長いペプチドは、膵癌において、転移の予防だけでなく既に形成された転移の実際の除去にも効果的であるだろうが、本発明の好ましい実施形態は、以下に記載するペンタペプチド配列に関し、特に好ましい実施形態はアミノ酸配列N-R-W-H-E(配列番号2)に注目する。

【0019】

配列番号1または配列番号2のペンタペプチド等の本明細書に記載のペプチドと同じアミノ酸または該ペプチドと少なくとも同じ全体構成のペプチドを提供する任意の化合物は、膵癌において、転移の形成の予防だけでなく既に形成された転移の除去にも効果的であることができることも当業者は理解するだろう。

【0020】

従って、本発明はいくつかの実施形態において、以下に記載のペプチドの内のいずれかのペプチド模倣物の、特に配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4もしくは5のペプチド模倣物の使用を意図する。このペプチド模倣物は、同じアミノ酸を好ましくは有することができるが骨格が変更されており、該骨格は、ペプチド自体が提供するのと同じ全体構成のペプチド模倣物を提供するが、例えばプロテアーゼ開裂に対してより耐性を示す。好ましいペプチド模倣物は例えば等配電子のペプトイドであり、該ペプトイドは、骨格のペプチド結合中にポリ-N-置換グリシンを含む。

【0021】

本発明はまた、本明細書に記載のペプチドおよびペプチド模倣物の更なる改変型も検討する。そのような改変ペプチドまたは改変ペプチド模倣物は、例えばプロテアーゼ分解に対してペプチドをより安定させる、例えば化学的にまたは酵素的に付加された改変を含むことができ、これにより、ペプチドもしくはペプチド模倣物を薬学的に許容される塩として提供することが可能となる、または例えばペプチドもしくはペプチド模倣物の半減期等の生物学的特性を改善することが可能となる。そのようなペプチドまたはペプチド模倣物のそのような好ましい改変型は、このペプチドおよびペプチド模倣物における、特に配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5のペプチドまたはこれらの配列のペプチド模倣物におけるペグ化型、ヘシル化(hesylated)型、パシル化(pasylated)型、ミリストイル化型、グリコシル化型および/または環状型を指す。

【0022】

そのような改変ペプチドまたは改変ペプチド模倣物は一般に、本発明に関して化合物またはペプチド化合物と称される。この化合物またはペプチド化合物を、例えば吸入による経口投与用に、経鼻投与用に、または皮下投与等の注射による投与用に製剤化することができる。

【0023】

一実施形態では、本発明はまた、ヒトの膵癌の処置において使用するための医薬組成物であって、この医薬組成物は、上記に記載の化合物/ペプチド化合物を含む、医薬組成物に関する。この医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含むことができ、該医薬組成物を、吸入による等の経口投与用に、経鼻投与用に、または注射による投与用に製剤化することができる。

【0024】

本発明はまた、ヒトの膵癌の処置において使用するための医薬品の製造での、そのようなペプチド、このペプチド模倣物または改変ペプチドおよび改変ペプチド模倣物の使用に関する。

【0025】

更に、本発明は、ペプチド、このペプチド模倣物またはこれらの改変型を投与すること

10

20

30

40

50

により、即ち、本発明に係る化合物または本発明に係る化合物を含む医薬組成物を、これらを必要とするヒトに投与することにより、ヒトの肺癌を処置する方法に関する。

【0026】

転移がまだ形成されていない肺癌を処置するために、本発明に係る化合物、即ちペプチド、このペプチド模倣物またはその改変型、本発明の医薬組成物および本発明に係る方法が検討される。しかしながら、好ましい実施形態では、化合物、即ちペプチド、このペプチド模倣物およびこれらの改変型、本発明に係る医薬組成物、ならびに本発明に係る方法は、転移が既に形成されて体中に広がっている肺癌を処置するために使用することができると考えられる。そのため、特に好ましい実施形態では、本発明は、ヒト対象の肺癌を処置するために、本発明の化合物、即ちペプチド、このペプチド模倣物またはこれらの改変型、本明細書に記載の医薬組成物および以下に記載の方法を考慮し、肺癌は、対癌米合同委員会の癌病期分類マニュアルのTNM解剖学的段階/予後群システム(7<sup>th</sup> edition, 2010, Springer)に従ってステージIVと分類できる。

10

【0027】

本発明の全ての態様および実施形態に関して、即ち、以下に記載の化合物、医薬組成物および方法に関して、ヒトの肺癌を処置するために、好ましくは肺癌が転移を既に形成している状況のヒトの肺癌を処置するために、特に、対癌米合同委員会(American Joint Committee on Cancer)の癌病期分類マニュアル(Cancer Staging Manual)のTNM解剖学的段階/予後群システム(TNM Anatomic Stage /Prognostic Group System)(7<sup>th</sup> edition, 2010, Springer)に従ってステージIVと分類できる肺癌を処置するために、本明細書に記載のペントペプチド、例えば配列番号1の、配列番号2の、配列番号3の、配列番号4のおよび配列番号5のペントペプチド、特に配列番号2のペントペプチドを使用することが常に好ましいということを理解すべきである。

20

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】Metに関するCD44v6の共受容体機能が腫瘍転移に必要であることを示す図である。A:示した箇所ではBSp73ASおよびその形質移入体をHGFで導入し、MetおよびERKの活性化を材料および方法に記載したように測定した。数字は、コンピュータプログラムImageJにより算出した誘導倍数(fold induction)を示す。全ての実験を少なくとも3回行ない、同様の結果を得た。B:Aで使用した細胞を同系ラットの右後脇腹に皮下注射した(材料および方法)。4週間後、免疫組織化学的分析のためにリンパ節および肺を調製した。表したリンパ節は腋窩リンパ節である。肺について2枚の写真を表示しており、矢印は転移を示す。C:コントロール-shRNAまたはMet-shRNAを発現するレトロウイルスに感染させたASS6腫瘍のパラフィン切片の免疫組織化学的分析。切片を抗GFPA抗体で染色してshRNA形質導入領域をモニタリングした、またはホスホ-Met抗体で染色した。倍率20倍。

30

【図2】CD44v6特異的ペプチドが腫瘍細胞の転移性拡散をブロックすることを示す図である。A:示したように、CD44v6特異的ラットペプチド、CD44v6特異的抗体またはコントロールペプチド(マウス)の存在下でBSp73ASS6細胞をHGFで誘導した。ホスホ特異的抗体を使用して、MetおよびErkの活性化を測定した。数値は誘導倍数を示す。B:BSp73ASS6細胞をBD10ラットの右後脇腹に皮下注射した。腫瘍増殖から1週間後に、動物をCD44v6ペプチド(腫瘍投与または静脈内注射)、コントロールペプチド、CD44v6抗体またはPBSで処理した(材料および方法)。図1に記載したように、転移に関して腋窩リンパ節(左側)および肺(右側)を分析した。C:CD44v6ペプチドまたはコントロールペプチドのどちらかで処理した動物の肺の切片をH&EおよびPASで染色した。H&E-ヘマトキシリンおよびエオシン;PAS-過ヨウ素酸シッフ反応。倍率1.5倍。D:示すように28日にわたる処理による動物におけるBSp73ASS6腫瘍の増殖カーブ。ノギスを使用して、処理の開始後に毎週および28日にわたり連続して、PBS、CD44v6抗体、CD44v6ペプチドまたはコントロールペプチド(マウス)で処理したラットの平均腫瘍体積を測定し

40

50



た。

【図3】インビボでのCD44v6ペプチドの原発性腫瘍および転移への特異的結合を示す図である。A：左側：BSp73Ass6細胞を固定し、1時間にわたりDY681標識CD44v6ラットペプチドまたはマウスペプチド（コントロール）のどちらかで染色した。20倍の対物レンズを備えたレーザー走査型共焦点顕微鏡（Leica TCS2 SP2）を使用して撮像した。右側：それぞれDY681ラットv6ペプチドとマウスペプチドの存在下においてHGFでBSp73Ass6細胞を誘導し、Erkの活性化を測定した。数値は誘導倍数を示す。B：BSp73Ass6細胞（3週間にわたり増殖させた）の皮下腫瘍を有するラットに、200μgのDY681ラットv6ペプチドまたはDY681マウスv6ペプチド（コントロール）を静脈内注射し、Optix MX2（ART、モントリオール、カナダ）を使用するNIRF撮像により分析した。蛍光強度をNC（正規化関数）で表示する。指定のペプチドの注射後の様々な時点で得た一連の蛍光データセットでは、2日の範囲内でラットv6ペプチドが腫瘍に結合するがマウスv6ペプチドは結合しないことを示す24時間後のおよび48時間後の蛍光シグナルが見られる。C：DY681ラットv6ペプチドを注射したラット由来の腫瘍および肺のエクスビボ走査から、腫瘍領域全体だけでなくラットペプチドの転移への結合を示す肺の特定領域において特異的蛍光シグナルが見られた。

【図4-1】膵癌の同所性モデルにおいてCD44v6ペプチドがヒト腫瘍細胞の転移を防ぐことを示す図である。A：L3.6p1細胞をヒトv6ペプチドまたはコントロールとしてのラットv6ペプチドで処理した後、10ng/mlのHGFで誘導した。ERKの活性化をウェスタンブロットで測定した。数字は誘導倍数を示す。B：L3.6p1細胞を雄のヌードマウス（材料および方法）の膵臓の上部に同所的に注射した。7日後、動物にヒトCD44v6ペプチドまたはコントロール（ラット）ペプチド（各20μg）を注射した。ペプチド注射を週当たり3回繰り返した。最初のペプチド処理から23日後に動物を屠殺した。腫瘍を単離し、CD44v6発現（BIWA）またはコントロールとしての二次抗体に関して染色した。ヘマトキシリンで核を染色した。C：ホスホ-Met抗体およびMet抗体を使用する、v6ペプチドまたはコントロールペプチドで処理した動物由来のL3.6p1腫瘍の免疫蛍光染色。DAPIで核を染色する。Dの上部：式 体積 = (幅) × 長さ / 2 を使用して、実験の終了時に、v6ペプチドまたはコントロールペプチドのどちらかで処理した動物の腫瘍体積を測定した。バーは、実験の終了時の平均腫瘍体積を表す。Dの下部：15匹の動物からなる、ペプチドの内の1つで処理した各群の動物。バーは、転移を有する動物のパーセントを示す。ペプチドの内の1つで処理した各群の動物は15匹の動物から成った。全てのグラフにおいて、スチューデントt検定：\*\*\* p < 0.001を使用して有意性を算出した。

【図4-2】膵癌の同所性モデルにおいてCD44v6ペプチドがヒト腫瘍細胞の転移を防ぐことを示す図である。E：コントロールペプチドまたはCD31特異的抗体を有するv6ペプチドで処理したL3.6p1腫瘍の染色。倍率は50倍である。グラフは、5つの独立した腫瘍から算出した、平均血管数または平均血管サイズを示す。F：v6ペプチド（培養培地中に200ng/ml）の存在下または非存在下でL3.6p1細胞により産生されたヒトVEGF濃度。バーは、3つの独立した実験で得た3通りからの平均VEGF濃度を反映する。Gの左側：v6ペプチドまたはコントロールペプチドで処理した動物の肝臓の巨視的な転移を調べた。右側：バーは転移の平均数を示す。ペプチドの内の1つで処理した各群の動物は15匹の動物から成った。全てのグラフにおいて、スチューデントt検定：\*\*\* p < 0.001を使用して有意性を算出した。

【図5】ヒト膵癌モデルの原発性腫瘍および転移におけるCD44v6ペプチドの特異的蓄積を示す図である。A：左側：DY681標識CD44v6ヒトペプチドまたはDY681標識CD44v6ラットペプチドのどちらかでL3.6p1細胞を染色した。レーザー走査型共焦点顕微鏡（Leica TCS2 SP2）で撮像した。右側：DY681ヒトv6ペプチドまたはDY681ラットv6ペプチドの存在下でL3.6p1細胞をHGFで誘導し、ERKの活性化を測定した。数字は誘導倍数を示す。B：図4に記載した

ように3週間にわたりL3・6p1腫瘍を同所的に誘導し、その後、DY681ヒトv6ペプチドまたはDY681ラットv6ペプチドを1回静脈内注射した(各20 $\mu$ g)。Pearl(登録商標)Impulse Small Animal Imaging System(Li-Cor)を使用して、麻酔したラットにおいて注射から24時間後にペプチドの結合を分析した。ペプチド処理していない、腫瘍がない動物および腫瘍を有する動物をコントロールとして使用した。C:Bに示す動物から原発性腫瘍、肝臓および脾臓を切除し、標識ペプチドの蛍光をエキスピボでモニタリングした。横のスケールは同期のシグナル強度を示す。

【図6】CD44v6ペプチドによる、既存の転移の復帰を示す図である。A:実験手順の略図。ラットまたはヌードマウスにおいてBSp73Ass6細胞またはL3・6p1細胞を注射した。3週間にわたり腫瘍を成長させ、転移を3週の期間後に検出した。v6ペプチドまたはコントロールペプチド(ラットでは200 $\mu$ g、ヌードマウスでは20 $\mu$ g)で処理した群では、3週間後に処理を開始した。更に21日後に動物を屠殺し、肺または肝臓の転移に関して分析した。B:BSp73Ass6皮下腫瘍を有し、v6ペプチド(ラット)またはコントロールペプチド(マウス)で処理したラットの肺を示す。下部の左側:定量化は転移の平均数を表す。各群で使用した動物の数を表3に示す。下部の右側:転移を有する動物の数のグラフ評価を表す。C:L3・6p1脾臓腫瘍を有し、v6ペプチド(ヒト)またはコントロールペプチド(ラット)で処理したマウス由来の肝臓を示す。下部の右側:コントロールペプチド処理動物およびCD44v6ペプチド処理動物における肝転移の数を評価するグラフを示す。下部の右側:転移を有する動物の数のグラフ評価を表す。

【図7】既に生じた転移においてCD44v6ペプチドがアポトーシスを誘導することを示す図である。腫瘍細胞の注射から3週間後に肺転移を有する動物に、CD44v6ペプチドまたはコントロールペプチドを1日おきに注射した。指定の日に、各群の内の1匹の動物を屠殺した。開裂カスパーゼ-3および開裂カスパーゼ-8(材料および方法)に対する抗体を使用して、肺転移におけるアポトーシスをパラフィン切片でモニタリングした。転移の領域に印を付けた(M)。倍率は4.5倍である。実験を2回行ない、同様の結果であった。

【図8】表1から3を示す図である。

【図9】ラット脾臓細胞におけるERKの活性化へのペグ化ラットCD44v6ペプチドの効果を示す図である。

【図10】ラット脾臓細胞におけるERKおよびMetの活性化へのペグ化ラットCD44v6ペプチドの効果を示す図である。

【図11】結腸癌細胞におけるHGF誘導性クラスター形成へのペグ化ラットCD44v6ペプチドの効果を示す図である。

【図12】A:L3・6p1細胞においてHGFにより誘導されるMetおよび信号伝達の活性化がCD44v6に依存することを示す図である。L3・6p1細胞をヒトv6ペプチド(ヒトv6 14mer)またはコントロールとしてのラットv6ペプチドで処理した後、10ng/ml HGFで誘導した。MetおよびERKの活性化をウェスタンブロットで測定した。数字は誘導倍数を示す。実験を少なくとも5回繰り返した。B:HGFにより誘導されるc-Metおよび信号伝達の活性化がCD44v6 HeLa細胞に依存することを示す図である。飢餓させたHeLa細胞またはHT29細胞を37で10分にわたりv6ペプチド(ヒトv6 14mer)またはコントロールペプチドと共にインキュベートし、次いで指定の時点で、25ng/mlのHGFで誘導した。次いで、細胞を溶解させ、溶解物をホスホ-MetおよびMetに関するウェスタンブロット分析にかけた。C:HT29細胞においてHGFにより誘導されるc-Metおよび信号伝達の活性化がCD44v6に依存することを示す図である。ホスホ特異的抗体を使用して、上記に記載したようにHT29におけるHGF依存性のc-MetおよびErkのリン酸化を測定した。示した箇所では、細胞をCD44v6ペプチド(ヒトv6 14mer)またはコントロールペプチド(実施例3の材料および方法を参照)で前処理した。ロー

10

20

30

40

50

ディングコントロールをそれぞれ c - M e t 抗体とチューブリン抗体で染色した。

【図 1 3】E G F および E R とは対照的に、T G F - 、B C、H e r、H B - E G F または A R による E r b B 受容体の誘導が C D 4 4 v 6 に完全に非依存的であることを示す図である。血清飢餓させた H T 2 9 細胞を 1 0 0 n g / m l の C D 4 4 v 6 特異的ペプチド (ヒト v 6 1 4 m e r ) またはコントロールペプチドと共に 5 分にわたりブレインキュベートした。その後、示したように細胞を 2 0 n g / m l の様々な E r b B リガンドで誘導した。細胞溶解物を S D S - P A G E により分離した。ウェスタンブロッティングを使用して、E r b B リガンド誘導性の E r k キナーゼのリン酸化を検出した。

【図 1 4】H T 2 9 細胞において E r b B 受容体の E G F 依存性の誘導を C D 4 4 v 6 特異的ペプチドによりブロックすることができることを示す図である。血清飢餓させた H T 2 9 細胞を 1 0 0 n g / m l の C D 4 4 v 6 特異的ペプチド (ペプチド 1 = 1 4 m e r、ペプチド 2 = 5 m e r ) またはコントロールペプチドと共に 5 分にわたりブレインキュベートした。その後、細胞を 2 0 n g / m l の E G F または T G F で誘導して溶解させた。細胞溶解物を S D S - P A G E により分離した。ウェスタンブロッティングを使用して、E G F 誘導性のおよび T G F 誘導性の E r k キナーゼのリン酸化を検出した。

【図 1 5 - 1】様々な濃度 (注射当たり 2  $\mu$  g、2 0  $\mu$  g および 2 0 0  $\mu$  g) でヒト v 6 ペプチドおよびこの P E G 化誘導体 (P E G 8 4 0 および P E G 2 0 0 0) を使用する、転移および原発性腫瘍の増殖の阻害を示す図である。A : L 3 . 6 p l 腫瘍を、1 週間にわたりヌードマウスに同所的に移植し、その後、3 週間にわたり週当たり 3 回、指定のペプチドを腹腔内注射した。実験の終了時に動物を屠殺して調べた。赤色の矢印は転移を示す。スチューデント t 検定 : \* \* \* p < 0 . 0 0 1 を使用して有意性を算出した。各群は 3 匹の動物から成った。

【図 1 5 - 2】様々な濃度 (注射当たり 2  $\mu$  g、2 0  $\mu$  g および 2 0 0  $\mu$  g) でヒト v 6 ペプチドおよびこの P E G 化誘導体 (P E G 8 4 0 および P E G 2 0 0 0) を使用する、転移および原発性腫瘍の増殖の阻害を示す図である。B : 原発性腫瘍体積の定量化。C : 動物当たりのマクロ転移の平均数の概要。

【図 1 6 - 1】様々な濃度 (注射当たり 0 . 2  $\mu$  g、2  $\mu$  g、1 0  $\mu$  g および 2 0  $\mu$  g) で C D 4 4 v 6 ペプチド (直鎖 1 4 m e r ) およびヒト環状 8 m e r を使用する、転移および原発性腫瘍の増殖の阻害を示す図である。A : L 3 . 6 p l 腫瘍を、1 週間にわたりヌードマウスに同所的に移植し、その後、3 週間にわたり週当たり 3 回、指定のペプチドを腹腔内注射した。実験の終了時に動物を屠殺して調べた。赤色の矢印は転移を示す。スチューデント t 検定 : \* p < 0 . 0 1、\* \* \* p < 0 . 0 0 1 を使用して有意性を算出した。各群は 5 匹の動物から成った。

【図 1 6 - 2】様々な濃度 (注射当たり 0 . 2  $\mu$  g、2  $\mu$  g、1 0  $\mu$  g および 2 0  $\mu$  g) で C D 4 4 v 6 ペプチド (直鎖 1 4 m e r ) およびヒト環状 8 m e r を使用する、転移および原発性腫瘍の増殖の阻害を示す図である。B : 各動物における巨視的転移の平均数の概要。C は、2  $\mu$  g の投薬量から始まる転移性伝播の低下および 2 0  $\mu$  g での完全な阻害を示す。C : v 6 1 4 m e r および環状 8 m e r は原発性腫瘍の増殖を低減する。

【図 1 7】原発性腫瘍の増殖に関する、v 6 1 4 m e r と、この誘導体 (1 4 m e r P E G 8 4 0、1 4 m e r P E G 2 0 0 0、ミリスティル化 1 4 m e r、D - アミノ酸誘導体 D O T A C D 4 4 v 6 - 1 4 [ d a a 7 ] および D O T A C D 4 4 v 6 - 1 4 [ r 1 4 ]、環状 8 m e r、環状 5 m e r ならびにミリスティル化環状 8 m e r) との対照比較を示す図である。L 3 . 6 p l 腫瘍を、1 週間にわたりヌードマウスに同所的に移植し、その後、3 週間にわたり週当たり 3 回、指定のペプチドを腹腔内注射した。実験の終了時に動物を屠殺して調べた。A : 指定の化合物 (n = 5) で処理した動物の平均腫瘍サイズを示す。スチューデント t 検定 : \* \* \* p < 0 . 0 0 1 を使用して有意性を算出した。各群は 5 匹の動物から成った。B : 各群における動物の個々の腫瘍サイズ。

【図 1 8 - 1】転移の阻害に関する、v 6 1 4 m e r と、この誘導体 (1 4 m e r P E G 8 4 0、1 4 m e r P E G 2 0 0 0、ミリスティル化 1 4 m e r、D - アミノ酸誘導体 D O T A C D 4 4 v 6 - 1 4 [ d a a 7 ] および D O T A C D 4 4 v 6 - 1 4 [ r 1

10

20

30

40

50

4 ]、環状 8 mer、環状 5 mer ならびにミリスティル化環状 8 mer ) との対照比較を示す図である。A : 指定の化合物に関する原発性腫瘍および肝転移の代表例。赤色の矢印は転移を指す。赤色の円 : コントロール群における原発性腫瘍の非常に強力な血管新生に留意すべきである。

【図 18 - 2】転移の阻害に関する、v6 14 mer と、この誘導体 ( 14 mer PEG 840、14 mer PEG 2000、ミリスティル化 14 mer、D - アミノ酸誘導体 DOT A CD 44 v6 - 14 [ d a a 7 ] および DOT A CD 44 v6 - 14 [ r 1 4 ]、環状 8 mer、環状 5 mer ならびにミリスティル化環状 8 mer ) との対照比較を示す図である。B : 転移を有する動物の数および動物当たりの転移の平均数の概要。

【発明を実施するための形態】

【0029】

いくつかの本発明の好ましい実施形態に関して本発明をより詳細に説明する前に、一般的な定義を以下に記載する。

【0030】

本明細書で具体的に開示していない任意の構成要素 ( element ) または構成要素 ( elements )、限定事項 ( limitation ) または限定事項 ( limitations ) の非存在下で、以下で例示的に説明する本発明を適宜実行することができる。

【0031】

特定に実施形態に関しておよびいくつかの図面を参照して本発明を説明するが、本発明はそれらに限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【0032】

用語「含む」を本発明の説明および特許請求の範囲で使用する場合、該用語は、その他の構成要素を除外しない。本発明の目的のために、用語「からなる」は用語「から構成される」の好ましい実施形態であるとみなす。以下において群が少なくともいくつかの実施形態を含むと定義する場合、このことは、これらの実施形態のみから好ましくはなる群も開示していると理解すべきである。

【0033】

本発明の目的のために、用語「得られる」は、用語「得ることができる」の好ましい実施形態であるとみなす。以下において例えば抗体を特定の供給源から得ることができると定義する場合、このことは、この供給源から得られる抗体も開示していると理解すべきである。

【0034】

単数名詞を示す際に不定冠詞または定冠詞、例えば「a」、「an」または「the」を使用する場合、その他に何らかが具体的に述べられている場合を除き、これらはその名詞の複数形を含む。用語「約 ( about ) 」または「約 ( approximately ) 」は本発明に関連して、当該特徴の技術的効果が依然として保証されると当業者が理解するであろう精度の間隔を意味する。この用語は、示した数値の  $\pm 20\%$  の、好ましくは  $\pm 15\%$  の、より好ましくは  $\pm 10\%$  の、更により好ましくは  $\pm 5\%$  のずれを典型的には示す。

【0035】

更に、本明細書および特許請求の範囲において、類似の構成要素を区別するために用語「第 1 の」、「第 2 の」、「第 3 の」または「( a )」、「( b )」、「( c )」、「( d )」または「( i )」、「( ii )」、「( iii )」、「( iv )」等を使用するが、これらを逐次的なまたは経時的な順序で記載する必要はない。そのように使用する用語を適切な状況下で交換可能であること、および本明細書に記載の本発明の実施形態を本明細書に記載以外のまたは本明細書で例示以外の順序で実行可能であることを理解すべきである。

【0036】

用語「第 1 の」、「第 2 の」、「第 3 の」または「( a )」、「( b )」、「( c )」、「( d )」または「( i )」、「( ii )」、「( iii )」、「( iv )」等が方法または使用またはアッセイの工程に関する場合、別段の指示がない限り、工程間に時間コ

10

20

30

40

50

ヒーレンスまたは時間間隔コヒーレンスは存在しない。即ち、本明細書で上記のまたは下記の用途において別段の指示がない限り、工程を同時に行なうことができる、または各工程間に数秒の、数分の、数時間の、数日の、数週間の、数カ月もしくは更に数年の時間間隔が存在することができる。

【0037】

専門用語をその一般的な意味で使用する。ある用語に特定の意味を与える場合、以下のその用語を使用する文脈において、その用語を定義するだろう。

【0038】

上述したように、本発明は、ヒトの膵癌の処置に使用するためのペプチドまたはペプチド化合物に関する。

10

【0039】

本発明は、アミノ酸配列 N - R - W - H - E (配列番号 2) のペプチドがヒト膵癌細胞の転移を阻害することができるだけでなくヒト膵癌の同所性動物モデルにおいて既に生じた転移を除去することもできるという、以下に記載の実験的発見にある程度に基づく。N から A へのおよび E から A への変異により、アミノ酸配列 A - R - W - H - A (配列番号 3) のペプチドが M e t 活性化を抑止することができることが更に分かった (Matzke 他、Cancer Res. (2005)、65 (14)、6105 ~ 6110 を参照)。K から A へのおよび F から A への非保存的アミノ酸置換 (Matzke 他、上記参照) にもかかわらず N - R - W - H - E (配列番号 2) による M e t 活性化への効果が維持されるならば、アミノ酸配列  $X_1$  - R - W - H -  $X_5$  (配列番号 1) (式中、 $X_1$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y を含む群から選択され、 $X_5$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y を含む群から選択される) のペプチドもヒトの膵癌を処置するために使用できると仮定するのが妥当であると思われる。

20

【0040】

そのため、本発明は一実施形態において、ヒトの膵癌の処置において使用するための化合物であって、少なくともアミノ酸配列  $X_1$  - R - W - H -  $X_5$  (式中、 $X_1$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y を含む群から選択され、 $X_5$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y を含む群から選択される) (配列番号 1) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む化合物に関する。

30

【0041】

好ましくは、本発明は一実施形態において、ヒトの膵癌の処置において使用するための化合物であって、少なくともアミノ酸配列  $X_1$  - R - W - H -  $X_5$  (式中、 $X_1$  が、NH<sub>2</sub> 基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_5$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択される) (配列番号 4) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む化合物に関する。一例は、アミノ酸配列 A - R - W - H - A (配列番号 3) のペプチドまたはこのペプチド模倣物である。

40

【0042】

更により好ましくは、本発明は一実施形態において、ヒトの膵癌の処置において使用するための化合物であって、少なくともアミノ酸配列  $X_1$  - R - W - H -  $X_5$  (式中、 $X_1$  が、K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_5$  が、E または D を含む群から選択される) (配列番号 5) を含むペプチドを含む化合物に関する。最も好ましい実施形態の一例として、ペプチドはアミノ酸配列 N - R - W - H - E (配列番号 2) を含むことができ、好ましくは該アミノ酸配列 N - R - W - H - E (配列番号 2) からなることができる。

【0043】

用語「ペプチド」は本明細書で使用する場合、少なくとも上述の 5 個のアミノ酸および最大で 14 個のアミノ酸を含む任意の化合物を示す。

50

## 【 0 0 4 4 】

本発明に係るペプチドが上述の5個のアミノ酸よりも多くを有する場合、このアミノ酸は、例えばアミノ酸配列 K - E - Q - W - F - G - N - R - W - H - E - G - Y - R (配列番号6) のペプチドまたはそのパリアント中に見られるものであることができる。配列番号6のアミノ酸7位~11位が配列番号2に相当することが留意される。配列番号2のペプチドに関しては、Met 活性化への悪影響を有することなくアミノ酸1位、2位、3位、4位、5位、6位、12位、13位または14位をアラニンに置換することができる、アラニン置換によるリンカースクリーン分析 (linker screen analysis) で発見されている。そのため、そのようなペプチドは、 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_2$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_3$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_4$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_5$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_6$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_7$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_{11}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_{12}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_{13}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択され、 $X_{14}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WまたはYを含む群から選択される) (配列番号7) のアミノ酸6~12位、5~13位、4~14位等を含む任意のペプチドであることができる。好ましくは、上記に提示した原理に従って選択を行なう。そのため、 $X_1$  は、Kに類似のアミノ酸または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIのどちらかであることができる。同様の考察を $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$  または $X_{14}$  に適用する。好ましい一実施形態では、そのようなより長いペプチドは、 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_6$  が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{12}$  が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまた

10

20

30

40

50

は非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択される) (配列番号 8) のアミノ酸 6 ~ 12 位、5 ~ 13 位、4 ~ 14 位等を含む。更により好ましい実施形態では、そのようなより長いペプチドは、 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E または D を含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_6$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E または D を含む群から選択され、 $X_{12}$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択される) (配列番号 9) のアミノ酸 6 ~ 12 位、5 ~ 13 位、4 ~ 14 位等を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0045】

ペプチドは直鎖状であることができ、分枝状であることができ、および分枝しているまたは分枝していない環状であることができる。環状の、分枝状のおよび分枝した環状のペプチドは、翻訳後の天然プロセスによって生じることができる、または合成方法によって作製され得る。

#### 【0046】

最も好ましい実施形態のいくつかでは、本発明に係るペプチドは、上述したように 5 個のまたは 14 個のアミノ酸を含み、より好ましくは該アミノ酸から成り、配列番号 1、2、3、4、5 または 6 ~ 10 のペプチドを含む。本発明の最も好ましい実施形態は配列番号 2 または配列番号 6 のペプチドに関する。

#### 【0047】

用語「ペプチドを含む化合物」は、例えば薬学的に許容される塩の形態で、ペプチドを含む化合物を指す。この用語は、例えば化学的にまたは酵素的に改変されているペプチドも同様に指し、その結果、例えば配列番号 1、2、3、4 または 5 のペプチドは、以下に記載する更なる改変を含む。配列番号 2 のペプチドの改変型が特に好ましい。

#### 【0048】

そのため、用語「ペプチドを含む化合物」およびその文法的バリエーション、例えば「ペプチド化合物」として本明細書に記載のペプチドの塩が挙げられ、好ましくは本明細書に記載のペプチドの薬学的に許容される塩が挙げられる。用語「薬学的に許容される塩」に包含される塩は、本発明のペプチド化合物の非毒性塩を指す。代表的な塩およびエステルとして、以下のものが挙げられる：アセテート、アスコルベート、ベンゼンスルホネート、ベンゾエート、ピカルボネート、ビスルフェート、ピタートレート、ボレート、カミシレート (caamsylate)、カーボネート、シトレート、ジヒドロクロリド、メタンズルホネート、エタンズルホネート、p - トルエンズルホネート、シクロヘキシルスルファメート、キネート、エデテート、エジシレート、エストレート、エシレート、フマレート、グルコネート、グルタメート、グリセロホスフェート (glycerophosphates)、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヒドロキシナフトエート、ラクテート、ラクチオネート、ラウレート、マレレート、マレエート、マンデレート、メシレート、ムケート、ナブシレート、ニトレート、n - メチルグルカミン、オレエート、オキサレート、パルモエート、パモエート (エンボネート)、パルミテート、パントテネート、ペルクロレート、ホスフェート / ジホスフェート、ポリガラクトネート、サリシレート、ステアレート、スクシネート、スルフェート、スルファメート、サブアセテート、スクシネート、タンエート、タートレート、トシレート、トリフルオロアセテートおよびバレレート。その他の塩として、Ca 塩、Li 塩

、Mg塩、Na塩およびK塩；リシンまたはアルギニン等のアミノ酸の塩；グアニジン、ジエタノールアミンまたはコリン；アンモニウム、置換アンモニウム塩またはアルミニウム塩が挙げられる。従来の方法によりこの塩を調製する。

#### 【0049】

しかしながら、「ペプチドを含む化合物」のペプチド成分は、配列番号1～9のいずれかのペプチド配列に加えて、その他のタンパク質由来のアミノ酸配列を含むことができる。従って、本発明のペプチド化合物として、異種アミノ酸配列に融合した配列番号1～9から本質的になる異種融合ペプチドが挙げられる。異種アミノ酸配列は、1個の、2個の、3個の、4個のまたはより多くのアミノ酸を含むことができる、または該アミノ酸からなることができる。異種アミノ酸配列は、例えば少なくとも5個のまたは少なくとも10個のまたは少なくとも20個の異種アミノ酸を含むことができる、または該異種アミノ酸からなることができる。異種アミノ酸を、CD44由来の配列である配列番号1～9のN末端および/またはC末端に融合させ、細胞膜を横切る転位の改善等の、その他の機能性を付与することができる。

10

20

#### 【0050】

本発明のペプチド成分が単離されたペプチドであることが好ましい。用語「単離」は、自然の状態から「人の手によって」変更されたことを意味する。「単離」された組成物または物質が天然に存在する場合、該組成物または物質は、その元々の環境から変化しているもしくは該環境から取り出されているまたはその両方である。この用語を本明細書で用いる場合、例えば、生きている動物中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されていないが、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの天然の状態で共存する材料から分離されている、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されている。

#### 【0051】

本発明のペプチドが純粋な状態であることも好ましい。好ましくは、ペプチドは80%の純度であり、好ましくは90%の純度であり、より好ましくは95%の純度であり、更により好ましくは99%の純度であり、夾雑している巨大分子、特にその他のペプチドに対して99.9%の純度を超えている薬学的に純粋な状態が特に好ましい。ペプチドが感染因子および発熱因子を含まないことが好ましい。

30

#### 【0052】

好ましくは、精製されたペプチドは、その他のペプチドを実質的に含まない。この文脈で使用する場合、用語「純粋な」は、二量体等の別の物理的形態での同じペプチドの存在を排除しない。

#### 【0053】

本発明のペプチドを、化学合成によりまたは宿主細胞中での組み換え発現により調製することができる。化学合成による調製が好ましい。タンパク質産物として、例えば配列番号2のまたは本発明のその他のペプチドの内のいずれかの化合物の、液相ペプチド合成または固相ペプチド合成の技法による産生が可能である。合成的なペプチド合成アプローチは一般に、自動合成器および固相としての適切な樹脂の使用を伴い、該樹脂には、所望のペプチドのC末端のアミノ酸が結合している。次いで、合成が完了するまで、典型的にはFmocベースのまたはBocベースの化学プロトコルのどちらかを使用して、適切に保護された形態の次の所望のアミノ酸を連続的に連結させることにより、N末端方向へのペプチドの伸長が達成される。次いで、通常は樹脂からのペプチドの開裂と同時に、保護基をペプチドから開裂し、次いで、従来技法を使用して、例えば、溶媒としてアセトニトリルを使用し、イオン対形成剤としてトリフルオロ酢酸を使用する逆相HPLCにより、ペプチドを単離して精製する。そのような手順は一般に、多くの刊行物に記載されており、例えばStewartおよびYoung、「Solid Phase Peptide Synthesis」、第2版、Pierce Chemical Company、Rockford、Ill. (1984)を参照することができる。

40

#### 【0054】

用語「ペプチド模倣物」は、対応するペプチドを模倣するように設計されている低分子

50



タンパク質様鎖を指す。ペプチド模倣物は、既存のペプチドの改変から、またはペプチドおよび - ペプチド等のペプチドを模倣する同様のシステムを設計することにより典型的には生じることができる。アプローチに関係なく、生物活性に悪影響を及ぼすことなく代謝安定性および生物学的利用性等の分子特性を有利に調整するように、改変された化学構造が設計される。

#### 【0055】

典型的には、ペプチド模倣物は、ペプチド結合のアミド基の代わりにメチル化アミド基等の改変骨格を有し、プロテアーゼによる分解に対するペプチド模倣物の安定性を高めることができる。代わりにまたは加えて、ペプチド模倣物として、非天然アミノ酸またはD - 鏡像異性体を挙げることができる。ペプチド模倣物の共通のテーマは、骨格構造中のおよび / またはアミノ酸中の分子変化が、ペプチド模倣物の生物活性に悪影響を及ぼさないように、対応するペプチドと比べてペプチド模倣物の全体構造への実質的影響を有すべきでないことである。そのため、ペプチド模倣物は、対応するペプチドの同配体である。好ましいペプチド模倣物は例えば等配電子のペプチドであり、該ペプチドは、骨格のペプチド結合中にポリ - N - 置換グリシンを含む。従って、本発明によれば、ペプチド模倣物は、以下に記載する実験において例えば配列番号 1、2、3、4 または 5 のペプチド等の以下に記載のペプチドと同じ活性を有するだろう。最も好ましいペプチド模倣物は、配列番号 2 のペプチド模倣物等の 5 個のアミノ酸を有するもの、8 個のアミノ酸を有するもの (配列番号 16、17 または 18 のペプチド模倣物等) または 14 個のアミノ酸を有するもの (配列番号 6、7、8、9 または 10 を参照) である。そのようなペプチド模倣物は、好ましくは等配電子のペプチドであり、該ペプチドは、骨格のペプチド結合中にポリ - N - 置換グリシンを含む。

#### 【0056】

本発明はまた、例えばヒトの膀胱癌を処置するための医薬組成物としてのペプチドまたはペプチド模倣物の改変型の使用も意図する。そのような改変型は例えば、例えばプロテアーゼによるペプチドまたはペプチド模倣物の分解を減少させるおよびペプチドまたはペプチド模倣物の安定性を高めるために、F M O C もしくは B O C 等のブロック基によりまたはメチル化等のアルキル化により、各 N 末端および / または C 末端で化学的に改変されているペプチドまたはペプチド模倣物に関する。その他の改変として、アセチル化、アシル化、A D P リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、即ち環状ペプチド、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、ガンマ - カルボキシル化、グリコシル化、G P I アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化した環状の 5 m e r (配列番号 2 をベースとする)、6 m e r、8 m e r または 14 m e r 等のミリスチル化した環状ペプチド等のミリスチル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化等のタンパク質へのアミノ酸のトランスファー R N A 媒介性の付加、ユビキチン化および s u m o 化が挙げられる。そのようなペプチド模倣物の例を表 4 に示す。好ましい実施形態では、本発明のペプチドは、2000 D a の分子量を有する P E G または 200 ~ 20000 D a の範囲の分子量を有する P E G でペグ化した 14 m e r、14 m e r、環状 8 m e r または環状 5 m e r である。典型的なペプチド模倣物 (peptidomimetic) は 1 つまたは複数の改変を有することができる、即ち環状であることができる、ならびに該ペプチド模倣物を更にミリスチル化することができる、ペグ化することができるおよび / または D - アミノ酸の使用による等の本明細書に記載の任意のその他の方法で改変することができる。ペプチド模倣物の典型例として、配列番号 1 ~ 18 と L - アミノ酸および / または D - アミノ酸とを有するものが挙げられる。

#### 【0057】

例えば Zitzmann 他 (2005、Journal of Nuclear Medicine、46(5):782) に記載された、当業者に一般的に既知である方法により、ペプチドの環化を行なう。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 8 】

本発明の化合物を、細胞毒性化合物および／または化学療法薬と併用投与することでもきる。本発明の化合物を１種もしくは複数種の細胞毒性化合物および／もしくは化学療法薬と一緒に投与することが可能である、または、細胞毒性化合物を本発明のペプチドもしくは化合物に共有結合的に接合させることが可能である。好ましい細胞毒性化合物はマイタンシノイドであり、好ましい化学療法化合物はタキサンである。

## 【 0 0 5 9 】

加えてまたは代わりに、本発明に係るペプチドまたはペプチド模倣物の好ましい改変型として、例えば、生物学的特性が改善されている、例えば溶解性、吸収、生物学的半減期等が改善されている、本発明に係るペプチドまたはペプチド模倣物の化学的なまたは酵素的な改変型が挙げられる。改変により、分子の毒性を選択的に低減することができ、分子のあらゆる望ましくない副作用等を選択的に除去するまたは軽減することができる。例えば生物学的半減期を増加させる改変として、ペグ化、ヘシル化、パシル化、グリコシル化末端でシアル酸残基を有するグリコシル構造を有する等が挙げられる。

10

## 【 0 0 6 0 】

用語「ペグ化 (pegylated)」およびその文法的バリエーション、例えば「ペグ化 (pegylation)」は全て、ペプチドまたはペプチド模倣物が様々な型で (例えば単離型で、薬学的に許容される塩として等)、本明細書に記載のペプチドまたはペプチド模倣物に共有結合する PEG 部分、即ちポリエチレングリコール (polyethyleneglycol) 鎖を含むことを説明する。

20

## 【 0 0 6 1 】

以下に記載するように、配列番号 2 のヒト CD44v6 ペンタペプチドのカウンターパートであり、PEG750 または PEG3000 で改変されている、配列 NEWQG (配列番号 11) のラット CD44v6 ペンタペプチドは、少なくとも PEG3000 部分が、約 620 Da である配列番号 11 の配列の算出した分子量よりも著しく高い分子量、即ち 3000 Da を有するにもかかわらず、Met および Erk の HGF 刺激性のおよび CD44 媒介性の活性化を阻害することができる。更に、そのような分子量の PEG は、長いジグザグ構造を有することが知られている。従って、驚くことに、配列番号 11 のペンタペプチド等の比較的小さいペプチドの改変により活性は失われない。同じ事を配列番号 2 のペンタペプチド、このペプチド模倣物またはより長いペプチド、例えば配列番号 6 のペプチド等のヒトカウンターパートに適用すべきであると結論付けるのが正しいと思われる。更に驚くことに、非ペグ化ペプチドと比べてペグ化ペプチドにより ERK シグナル伝達がより効果的に阻害される。

30

## 【 0 0 6 2 】

用語「PEG 部分」または「ポリエチレングリコール (Polyethyleneglycol) 部分」は以下で使用する場合、約 200 Da ~ 約 35,000,000 Da の平均分子量の PEG を指す。約 400 Da ~ 約 20,000 Da の、好ましくは約 600 Da ~ 約 10,000 Da の、更により好ましくは約 700 Da ~ 約 10,000 Da の平均分子量を有する PEG を使用することが好ましい。最も好ましい PEG は、約 800 Da ~ 約 8,000 Da の、約 900 Da ~ 約 7,000 Da の、約 1,000 Da ~ 約 6,000 Da の、例えば約 2,000 Da の、約 3,000 Da の、約 4,000 Da のまたは約 5,000 Da の平均分子量を有する。好ましい実施形態では、PEG は、200 ~ 200,000 Da の範囲の平均分子量を有する。

40

## 【 0 0 6 3 】

PEG は概して、その平均分子量により命名される。そのため、9 個の繰り返し単位を有する PEG は 400 Da の平均分子量を有し、PEG-400 と呼ばれるだろう。そのため、本発明のために検討する PEG は、PEG400、PEG600、PEG50、PEG840、PEG1000、PEG1500、PEG2000、PEG3000、PEG3350、PEG4000、PEG4600、PEG8000、PEG10000、PEG12000 等の PEG であることができる。なぜならば、これらは例えば Sigma

50

- Aldrich から市販されているからである。

【0064】

PEG は、直鎖状の、分枝状の、星状のまたは櫛状の PEG として生じることができる。分枝状の PEG は、中心コア基から放射状に広がる 3 ~ 10 個の PEG 鎖を有する。星状の PEG は、中心コア基から放射状に広がる 10 ~ 100 個の PEG 鎖を有する。櫛状の PEG は、通常はポリマー骨格にグラフトされた複数の PEG 鎖を有する。

【0065】

本発明の目的のために、直鎖状の PEG を使用することが通常は好ましく、PEG 2000、PEG 3000、PEG 4000 もしくは PEG 5000 またはより高い分子量の PEG 等の約 1,000 ~ 6,000 Da の範囲の平均分子量を有する直鎖状の PEG を使用することが特に好ましい。

10

【0066】

PEG 部分を更に改変することができる。例えば、脂肪アルコールおよび脂肪酸で PEG 部分を共有結合的に改変することができる。そのような更なる改変により、改変ペグ化ペプチドおよび改変ペグ化ペプチド模倣物を構築することまたはミセル様構造体またはリポソーム様構造体に少なくとも組み込むことが可能になる。

【0067】

本発明はまた、そのようなミセル様構造体またはリポソーム様構造体にも関する。ペグ化ペプチドまたはこのペグ化ペプチド模倣物、およびそのようなペグ化ペプチドまたはこのペグ化ペプチド模倣物を含む医薬組成物は、例えば、薬物溶解性の改善、投薬の頻度の低減、循環半減期の延長、薬物安定性の上昇、タンパク質分解からの保護の強化等を提供することができる。脂肪アルコール鎖または脂肪酸鎖等の更なる改変により、細胞膜との相互作用の改善が可能になることから、ミセル様構造体またはリポソーム様構造体により、ペグ化ペプチドまたはペグ化ペプチド模倣物をより効率的に送達することが更に可能になる。更に、ミセル様構造体またはリポソーム様構造体は、化学療法薬等の追加の薬学的活性剤を含むことができる。膀胱癌の場合、この薬剤として例えばゲムシタビンを挙げることができる。

20

【0068】

本発明はまた、追加の薬学的活性剤を含むそのようなミセル様構造体またはリポソーム様構造体にも関する。そのようなミセル様構造体またはリポソーム様構造体により、ペグ化ペプチドまたはこのペグ化ペプチド模倣物によるそのような化学療法薬の例えば CD44 v6 を発現する腫瘍へのターゲティングが可能になり、そのため、治療のターゲティングおよび改善が可能になる。

30

【0069】

ペプチドまたはペプチド模倣物を PEG 部分で改変する方法は当業者に既知である。PEG 部分の共有結合を化学的にまたは酵素的に行なうことができる。

【0070】

化学的な改変における最初の工程では概して、PEG ポリマーの一方の末端または両方の末端のどちらかが官能化される。官能化により、単官能性の、ホモ二官能性のまたはヘテロ二官能性の PEG を区別することができる。

40

【0071】

化学的なペグ化プロセスは概して、2つのタイプ、即ち溶液相バッチプロセスまたはオンカラムフェドバッチプロセス (on-column fed-batch process) に分類され得る。一般に採用されるバッチプロセスは、好ましくは 4 ~ 6 の温度での、適切な緩衝溶液中での試薬の混合、その後の、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたは疎水性相互作用クロマトグラフィー等の技法を使用する所望の産物の分離および精製を含む。

【0072】

PEG 誘導体に適した官能基の選択は、PEG に連結され得る分子上の利用可能な反応基の種類に基づく。タンパク質およびペプチドの場合、典型的な反応性アミノ酸として、

50

リシン、システイン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシンが挙げられる。アルデヒド官能性ポリマーとの接合による部位特異的な部位として、N末端のアミノ基およびC末端のカルボン酸を使用することもできる。例えばペプチドのN末端のみを除いてアミノ酸とPEGとを反応させないことが好ましい場合、例えばFmocでアミノ酸の官能基をブロックし、ペプチドをペグ化し、次いでアミノ酸を脱ブロックすることができる。

【0073】

ペグ化ペプチド等のPEG誘導体を形成するために使用する技法は一般的に、PEGポリマーと、ヒドロキシル基と反応する基、典型的には無水物、酸塩化物、クロロギ酸塩および炭酸塩とを反応させている。第2世代のペグ化化学では、アルデヒド、エステル、アミド等のより効果的な官能基を接合に利用可能である。

10

【0074】

ヘテロ二官能性PEGは、2つの構成成分を連結するのに非常に有用であり、この連結では、親水性で柔軟な生体適合性のスペーサが必要である。ヘテロ二官能性PEGに好ましい末端基は、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、アミン、カルボン酸およびNHSEステルである。

【0075】

本発明に係るペグ化ペプチドおよびこのペグ化ペプチド模倣物を、場合により薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物の形態で提供することができる。

【0076】

20

以下では、本発明に係る化合物、即ちペプチド、このペプチド模倣物およびこれらの改変型、これらの化合物を含む医薬組成物ならびにこれらの化合物を使用する方法をどのようにしてヒトの膵癌を処置するために使用することができるかを述べる。以下において膵癌の処置を言及する際は常に、この言及は、好ましい実施形態として、以下に記載するペントペプチド、即ち配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5のペントペプチド、特に配列番号2のペントペプチド、これらのペプチド模倣物またはこれらの改変型の使用を意図すると理解されたい。

【0077】

膵癌は一般に、膵外分泌癌、即ち腺癌と膵神経内分泌腫瘍とに分類される。これらの内、神経内分泌癌は膵臓悪性腫瘍の約3～5%に当てはまる(Cancer Staging Manual、7<sup>th</sup> edition、2010、American Joint Committee on Cancer、Springer、243～251を参照)。以下に記載の化合物、医薬組成物および方法を、両方のタイプの膵癌を処置するために使用できると考えられる。

30

【0078】

以下に記載の実験から導き出すことができるように、実験で使用したペプチドは、膵癌モデルにおける転移の形成を阻害することができた。そのため、一態様において本発明は、転移がまだ形成されていない膵癌を処置するための、本明細書に記載の化合物、医薬組成物の使用および本明細書に記載の方法の適用に関する。

【0079】

そのような癌を、対癌米国合同委員会の癌病期分類マニュアルに記載の解剖学的段階/予後群システムに従って、ステージ0、ステージIA、ステージIB、ステージ2A、ステージ2Bまたはステージ3と分類することができる(Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer、2001、Springer、243～251)。本明細書においてステージおよびTNM分類システムに言及する場合は常に、膵癌に関してCancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer、7th Edition、2010、Springer、243～251頁に記載の病期分類システムおよび解剖学的段階/予後群システムを適用する。

40

【0080】

本発明が、転移がまだ形成されていない癌の処置を検討する限りにおいて、好ましい態様において本発明は、ステージIIBの処置、更により好ましくはステージIIIの処置を考慮する。なぜならば、特にステージIIIの場合、まだ検出することはできないが転

50

移が既に形成され始めていることを除外することができないからである。そのため、ステージⅢの膵癌の処置の場合、本明細書に記載の化合物、医薬組成物の投与または本明細書に記載の方法の適用により、転移の形成の予防だけでなく、まだ検出することはできないが既に形成され始めている転移の除去も可能になるだろう。

【0081】

本発明の最も好ましい実施形態は、転移が既に形成されて人体中に広がっているヒトの膵癌の処置における本明細書に記載の化合物、即ち、ペプチド、このペプチド模倣物およびこれらの改変型、この化合物を含む医薬組成物の使用ならびに本明細書に記載の方法の適用に関する。好ましくは、そのような癌を、対癌米国合同委員会の癌病期分類マニュアルに従ってステージⅣと分類することができる。

10

【0082】

そのため、ステージⅣのヒト膵癌の処置に言及する場合、この処置は、人体中で転移が検出される癌の処置を意味する。現在、対処療法的な化学療法を除いて、このタイプの癌に選択的に焦点を当てることを可能にするであろう利用可能な処置はない。

【0083】

そのため、特に好ましい実施形態は、膵癌を処置するための、以下に記載するペントペプチド、例えば配列番号1、2、3、4または5のペントペプチド、最も好ましくは配列番号2のペントペプチド、このペプチド模倣物またはこれらの改変型、およびこれらの化合物を含む医薬組成物の使用に関し、該膵癌は、対癌米国合同委員会の癌病期分類マニュアルに従ってステージⅣと分類できる。

20

【0084】

癌病期分類マニュアルにおいて膵癌に関して記載されているように、TNM解剖学的段階/予後群システムに従って膵癌の分類を行なうことができる。この目的のために、当業者は、例えばCancer Staging Manual、7<sup>th</sup> edition、2010、American Joint Committee on Cancer、Springerの249~251頁に示されている膵臓の病期分類を使用することができる。

【0085】

化合物およびこの塩を、少なくとも1種のそのような化合物のみを含む、または場合により、薬学的に許容される担体、賦形剤および/もしくは希釈剤との混合物で少なくとも1種のそのような化合物を含む、医薬組成物（例えば、液体、懸濁液、エマルション、ロゼンジ剤、サシェ、アンプル、エアロゾル、粉剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射液、溶液等）として上述したように製剤化することができる。

30

【0086】

化合物/この塩および医薬組成物を、例えば吸入による経口投与用に、経鼻投与用に、または皮下注射等の注射による投与用に製剤化することができる。

【0087】

これより実験に関して本発明を説明するが、実験は限定の意味で解釈されるべきではない。

（実施例）

【実施例1】

【0088】

40

1. 材料および方法

細胞株

ラット膵癌細胞株BSp73AS（ASとも表す）およびその形質移入体が説明されており（Orlan-Rousseau他、Genes & Development(2002)、16:3074~3086）、それらを、10%FCS（PAA、ケルベ、ドイツ）を加えたRPMI（Invitrogen、カールスルーエ、ドイツ）中で増殖させた。ヒト膵癌細胞L3.6pl（Bruns他、Neoplasia(1999)、1、50~62）を、10%FCS（PAA、ケルベ、ドイツ）、ビルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、L-グルタミンおよびMEMビタミン溶液（Pan Biotech、アイデンバッハ、ドイツ）を補充したDMEM（低グルコース；Invitrogen、カールスルーエ、ドイツ）中で維持した。

50

## 【0089】

## 抗体およびその他の試薬

CD44v6に対するヒトモノクローナル抗体(VFF18)はBender (e Bioscience、キャンパスヴィエナバイオセンター2、A-1030、ヴィエナ、オーストリア)からの贈与であり、抗ERK1(K-23)、c-Met(C-28)およびGFP抗体(sc-101525)はSanta Cruz Biotechnology(ハイデルベルク、ドイツ)からであり、開裂カスパーゼ-8抗体(IMG-5703)はImgenex(サンディエゴ、カリフォルニア州、米国)からであり、CD31抗体(MEC13.3)はBD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツからであり、開裂カスパーゼ-3(Asp175)、ホスホ-Met(Tyr1234/1235)(D26)、Met(25H2)およびホスホ-ERKホスホ-p44/42抗体はCell Signaling Technology(ビバリー、英国)からであった。ラットエクソンv6特異的抗体1.1ASMLが説明されている(Gunthert他、Cell(1991)、65、13~24)。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された二次抗体はDako(グロストルップ、ドイツ)からであった。Alexa Fluor R546ヤギ抗ウサギ二次抗体をLife Technologies(ダルムシュタット、ドイツ)から購入した。HGFをPeprotech(ハンブルク、ドイツ)から購入した。CD44v6ラットペプチドおよびCD44v6ヒトペプチド(14merおよび5mer)が説明されている(Matzke他、Cancer Res. (2005)、65(14)、6105~6110)。ラット14merの配列はKEKWFEENEWQGKNP(配列番号10)であり、ラット5merはNEWQG(配列番号11)に対応する。ヒト14merはKEQWFGNRWHEGYR(配列番号6)に対応し、ヒト5merは以下の配列を有する:NRWHE(配列番号2)。インビボでの撮像実験用に、ラット11mer WFEENEWQGKNP(配列番号12)、マウス11mer WFQNGWQGKNP(配列番号13)およびヒト11mer WFGNRWHEGYR(配列番号14)を蛍光色素DY681で標識した。ラット細胞またはラット同系モデルの場合におけるコントロールペプチドとして、特異的ラットv6ペプチドと同一の長さのヒトv6ペプチドを使用した。ヒト腫瘍細胞またはヒト同所性腫瘍モデルの場合、コントロールとしてラットv6ペプチドを使用した。全てのペプチドはBachem(ブーベンドルフ、スイス)またはIntavis(ケルン、ドイツ)により産生された。凍結乾燥ペプチドを1%BSA含有PBS中に1mg/mlのストック濃度まで再懸濁した。PBS中に希釈することにより、最終希釈液を得た。

## 【0090】

## shRNAのレンチウイルス遺伝子導入

Metをサイレンシングするために使用するレンチウイルスシステムは既に説明されている(Corso他、Oncogene (2008)、27(5):684~93)。他に記載されているようにレンチウイルスを産生した(Vigna他、J.Gene Med. (2000)、2(5):308~16)。手短にいうと、 $4 \times 10^6$ 個の293T細胞(p12~15)を10cmのプレートに播種した。24時間後にパッケージングベクターVSV-G、PMDLおよびRev、TetRならびにレンチウイルス構築物(Met-shRNA構築物またはコントロール-shRNA構築物のどちらか)を混合し、450μlの最終体積までTEを添加した。この混合物に、450μlの2.5M CaCl<sub>2</sub>溶液を添加した。ボルテックスおよび5分間のインキュベーション後、DNA-TE-CaCl<sub>2</sub>混合物を全速力でボルテックスしつつ、500μlの2×HBS溶液を滴加した。沈殿物を293T細胞に添加した。16時間後、培地を置き換えて5mM 酪酸ナトリウムを含有する新鮮培地を添加した。24時間後および48時間後に培地を回収した。次いで、8μg/mlのポリブレンの存在下で、ウイルス含有培地を標的細胞BSp73Ass6(70%培養密度)に添加した。感染から24時間後に培地を置き換え、1μg/mlの最終濃度までドキシサイクリン(Doxycycline)を添加することによりshRNAの産生を誘導した。TetRおよびコントロール-shRNAまたはMet-shRNAを形質導入したBSp73Ass6細胞を72時間にわたりドキシサイクリンで処理した後、動物でのアッセイまたは注射を開始した。

## 【0091】

## ウェスタンブロット分析

血清飢餓させた細胞（24時間）を、5分にわたり37℃において増殖因子HGF（10 ng/mL）で誘導した。示した箇所では、細胞をペプチド（100 ng/mL）で処理した後に、10分にわたり37℃で誘導した（100 ng/mLのCD44v6ペプチドまたはコントロールペプチド）。HGFによる誘導後、細胞を氷冷リン酸塩緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄した。活性化されたMetおよびErkを検出するために、細胞をドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、即ち100 mMジチオスレイトール（DTT）を含むサンプルバッファーに溶解させ、煮沸し、ホスホ-Metおよびホスホ-ERKに対する抗体を使用するウェスタンブロット分析にかけた。Met抗体またはERK抗体で確かめることにより、ストリッピング（62.5 mM Tris、pH 6.8、2% SDS、0.8% DTT）後の同じブロットに対してローディングコントロールを行なった。増強化学発光システム（Thermo Fisher Scientific、シュヴェアト、ドイツ）を使用してブロットを染色した。ウェスタンブロット分析におけるバンドをプログラムImage J（National Institutes of Health）で定量化した。

10

## 【0092】

## 細胞培養の上清におけるHGFおよびVEGFの定量測定

Roche（マンハイム、ドイツ）のQuantikine Human HGF ImmunoassayおよびQuantikine Human VEGF Immunoassayを使用して、L3.6 pl細胞の細胞培養培地におけるヒトHGFおよびヒトVEGFの濃度の測定を行なった。この目的のために、指定の各ペプチドの存在下で、15 cmのプレート中において5日にわたり $3 \times 10^6$ 個の細胞を培養した。上清（20 mL）を遠心分離し（1200 rpm）、メーカーの説明書に従ってアッセイを行なった。

20

## 【0093】

## 動物実験

雄の胸腺欠損のヌードマウス（NCI-nu）をHarlan（ロスドルフ、ドイツ）から購入した。BD10ラットおよびBDXラットを自家で繁殖させた。Regierungsprasidium Karlsruheにより承認された施設内に動物を収容して特定の病原体フリー条件下で維持した。動物実験に関するドイツの規則に従って全ての動物を取り扱った。Regierungsprasidium Karlsruheから動物実験を承認された（35-9185.817 G-192/10）。ゲッティンゲンで撮像実験（図3）を行ない、これはRegierungsprasidiumから認可された（35-9185.817 G-106/09）。

30

## 【0094】

ラット同系モデルの場合、 $1 \times 10^6$ 個の腭臓細胞（BSp73ASおよびその形質移入体）を動物の右後脇腹に皮下注射した。4週間にわたり腫瘍を発育させた。この期間中、Met-shRNAまたはコントロール-shRNAを発現するBSp73ASs6細胞を注射した動物に、飲料水中のドキシサイクリンを与えた。実験の終了時に、原発性腫瘍を単離した。肺および腋窩リンパ節を分析した。組織を、亜鉛固定剤（1 Lの0.1 M Tris pH 7.4中の0.5 g 酢酸カルシウム、5.0 g 酢酸亜鉛、5.0 g 塩化亜鉛）中で24時間にわたりインキュベートし、更なる分析のためにパラフィンに埋め込んだ。ペプチド処理または抗体処理の場合、最初の処理前に1週間にわたり腫瘍を発育させた。そのように表した箇所では、4週間にわたり週当たり3回の注射当たり200 µgのペプチドまたは抗体を動物に与えた。ノギスを使用して腫瘍の増殖を毎週モニタリングした。処理の開始後28日目にまたは30日目に動物を屠殺した。

40

## 【0095】

ヒト同所性モデルの場合、L3.6 pl膵癌細胞（24～26継代）をトリプシン処理後にハンクス平衡塩溶液（Invitrogen、カールスルーエ、ドイツ）に懸濁した

50

。説明されたように細胞を雄のヌードマウスの脾臓に同所的に注射した (Bruns CJ他(1999) Neoplasia 1(1):50~62)。7日後に、15匹のマウスからなる2つの群それぞれにヒトv6ペプチドまたはラットコントロールペプチド(20 µg)のどちらかを腹腔内注射した。本明細書に記載した実験および示した実験全てに、ラット14merコントロールペプチドまたはヒト14merペプチドのどちらかを使用した。次いで、全ての実験をラット5merコントロールペプチドまたはヒト5merペプチド(N-R-W-H-E)で繰り返した。14merペプチドの場合と同じ結果を観測した。注射を21日にわたり週当たり3回繰り返した。最終処理から2日後に動物を屠殺した。

#### 【0096】

調べるために、上記に記載したように、退縮した転移(BSp73Ass6またはL3.6p1のどちらか)を移植した。3週間にわたり腫瘍が増殖した。このとき、コントロール群において全ての動物で転移が発症した。週当たり3回、動物に20 µgのペプチド(L3.6p1同所性マウスモデル:ヒトv6ペプチドもしくはラットコントロールペプチド)を腹腔内注射した、または200 µgのペプチド(ラット同系モデル:ラットv6ペプチドもしくはマウスコントロールペプチド)を静脈内注射した。ペプチド処理の開始から23日後に動物を屠殺した。

#### 【0097】

Optix MX2を使用するインビボでの撮像

既に説明されているように(Napp他、Int J Cancer(2010)、127:1958~1974)、近赤外蛍光(NIRF)撮像システムOptix MX2(ART、モンリオール、カナダ)を使用して、BD10ラットまたはBDXラットにおいて皮下で増殖したBSp73Ass6腫瘍のインビボでの撮像を行なった。毛皮の自己蛍光を避けるために、撮像前に腫瘍周囲のラットの毛を剃った。その後、2%イソフルランを使用して動物に麻酔をかけ、データの取得の間中、装置の加熱プレート上に動物を静かに固定した。蛍光バックグラウンドを低減するために、NIRF撮像前に1週間にわたり、ラットにクロロフィル低減飼料(Provimi Kliba AG、カイザーアウークシュト、スイス)を与えた。いかなる蛍光プローブも注射しない動物のネイティブ走査により、全てのインビボ分析を先行させた。インビボ分析の場合、尾静脈を介してラットにDY681標識したラットv6の11merペプチドまたはヒトv6の11merペプチド200 µgを注射した。等量のDY681標識マウスv6の11merペプチドをコントロールに注射した。ラット11merは配列WFENEWQGNP(配列番号12)を有し、マウス11merは配列WFQNGWQGNP(配列番号13)を有し、ヒト11merは配列WFGNRWH EGYR(配列番号14)を有した。全てのペプチドを蛍光色素DY681で標識した。ペプチドの注射から指定された時間後にデータを取得した。エクスピボでのモニタリングの場合、ペプチド注射から24時間で動物を屠殺し、Optix MX2を使用して目的の腫瘍および器官をエクスピボで走査した。

#### 【0098】

700 nmのロングパスエミッションフィルタと共に670 nmでの励起を使用して、DY681の蛍光を測定した。1.5 mmのラスター、走査点当たり0.5~1秒の光子収集時間および可変レーザー出力で走査を行なった。OptiView(ART)でデータセットを解析した。蛍光強度データを、測定した蛍光強度(数値)を可変レーザー出力および積分時間に関して正規化した正規化数値(NC)で表示し、これにより様々な設定での測定の比較が可能になる。

#### 【0099】

Pearl撮像装置を使用するインビボでの撮像

Pearl(商標)撮像装置(LI-COR Biosciences、バートンブルク、ドイツ)を使用して、L3.6p1腫瘍を有するマウスのインビボでの撮像を行なった。このシステムは、励起用に2つのレーザー(685 nmおよび785 nm)を使用し、シグナル検出用に電荷結合素子検出器を使用する。レーザー励起により、深組織への浸透が可能になる。近赤外検出により、組織の自己発光の低減に起因して高感度が達成さ



れる。画像を標準化するために、発明者らは Pearl Cam Software を使用した。撮像の1週間前にクロロフィル低減飼料を動物に与え、蛍光バックグラウンドを低減させた (Regime 210、安全な飼料、オジー、フランス)。撮像前に、2.0% イソフルランでマウスに麻酔をかけた。動物を撮像装置の加熱プレート上に置き、撮像ドロー (imaging drawer) 中のノーズコーンを介してイソフルランを継続的に送った。700 nm および 800 nm の白色光で撮像した。ペプチドの静脈内注射前に、および DY681 標識ヒト v6 ペプチドまたはコントロールとしての DY681 標識ラット v6 ペプチドのどちらかの注射から 24 時間後に、動物を撮像した。各撮像セッション直後に動物を屠殺し、腫瘍、肝臓および脾臓を単離し、700 nm および 800 nm の白色光においてエキスピボで走査した。

10

#### 【0100】

##### 免疫蛍光

ASS6 細胞または L3.6 pl 細胞を、Lab-Tek Chamber Slide TM (Nunc、ネーピアビル、イリノイ州、米国) のウェル当たり 5,000 個の細胞で播種した。翌日に細胞を冷 PBS で洗浄し、室温で 30 分にわたり 4% ホルマリンで固定した。室温で 1 時間にわたり、PBS 中の 1% BSA により非特異的結合をブロックした。細胞を DY681 標識ペプチドと共に 1 時間にわたりインキュベートした。PBS による 3 回の洗浄工程後、蛍光マウンティング培地 (Dako、グロストルップ、デンマーク) と共にカバーガラスを載置し、レーザー走査型共焦点顕微鏡 Leica TCS 2 SP2 (Exton、ペンシルバニア州、米国) により免疫蛍光を測定し、Leica 共焦点ソフトウェアを使用して処理した。20 倍の対物レンズを撮像に使用した。

20

#### 【0101】

##### 組織学的検査

組織形態学的分析のために、肺のパラフィン埋め込み切片をヘマトキシリンおよびエオシンならびに過ヨウ素酸シッフ (H&E または PAS) で染色した。20  $\mu$ m おきに切片を分析することにより全組織ブロックの連続切片を調べ、各切片において、微小転移の存在を評価するために病理学者によって定常的に使用される手順に従って、転移性沈着物の存在および進展を評価した。

#### 【0102】

##### 免疫組織学的分析および免疫蛍光分析

7  $\mu$ m 厚のパラフィン切片を脱パラフィンして再水和した。P-Met 染色の場合、1 mM EDTA pH 8.0 中でスライドを煮沸し、続いて沸点より低い温度で 15 分にわたりインキュベートすることにより抗原アンマスキングを実現し、CD31 染色の場合、切片を 37 で 10 分にわたりプロテイナーゼ K (8  $\mu$ g/ml) で処理した。P-Met による免疫蛍光染色の場合、60 分にわたり 5% ヤギ血清 (DAKO、グロストルップ、デンマーク) (1 x PBS / 0.3% Triton X-100 に希釈した) で非特異的結合をブロックした。免疫組織化学的検査の場合、内因性ペルオキシダーゼを PBS 中の 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で最初にブロックし、続いてビオチンブロッキングシステム (Dako、グロストルップ、デンマーク) と共にインキュベートし、次いで PBS 中の 5% FCS と共にインキュベートすることにより非特異的結合を阻害した。切片を 4 で、P-Met 抗体 (D26、1 x PBS / 1% BSA / 0.3% Triton X-100 中に 1:50 で希釈)、Met 抗体 (C-28、1:50 で希釈)、GFP 抗体 (sc-101525、1:50 で希釈) もしくは抗体 (5  $\mu$ g/ml) と共に一晚インキュベートした、または VFF18 (5  $\mu$ g/ml) と共に一晚インキュベートした。PBS 中での洗浄後、切片を 45 分にわたり、Alexa Fluor R 546 ヤギ抗ウサギ (免疫蛍光 P-Met 染色および免疫蛍光 Met 染色の場合、1:500 で希釈) またはビオチン化二次抗体 (免疫組織化学染色の場合、VFF18 および CD31 用にウサギ抗ラット抗体、P-Met 用にヤギ抗ウサギ、GFP 用に開裂カスパーゼ-3 および開裂カスパーゼ-8 およびウサギ抗マウス、1:500 で希釈) と共にインキュベートした。DAB (3,3'-ジアミノベンジジン) 染色の場合、切片をストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体

30

40

50

(Dako、グロストルupp、デンマーク)で処理し、DAB基材システム(3,3'-ジアミノベンジジン;Biozol、エヒング、ドイツ)で現像した。免疫蛍光の場合、核染色にDAPIを使用した。

#### 【0103】

##### 2. 結果

Metに対するCD44v6の共受容体機能は、ラット臍臓腫瘍細胞の転移性拡散の決定的な手段である

Met受容体に対するCD44v6の共受容体機能が腫瘍細胞の転移性拡散の決定的な手段であるかどうかを調べるために、エクソンv6のみを含有するまたはCD44v1~10アイソフォームに含まれる全てのバリエーションv1~10を含有するCD44アイソフォームがラットBSp73AS細胞に転移能を付与することができたかどうかを最初に調べた。この細胞では、CD44v6含有アイソフォームが遺伝子導入されている場合を除いて、HGFによりMetを誘導することできない(図1A)。例えばCD44v1~10v6におけるエクソンv6の除去により、HGFによるMetの活性化が損なわれた(図1A)。

#### 【0104】

親BSp73AS細胞および上述した構築物(CD44v6、CD44v1~10およびCD44v1~10v6)を安定的に遺伝子導入した細胞を同質遺伝子のラットに皮下注射した。全ての動物において、1週間後に原発性腫瘍を既に触知することができた。CD44v6またはCD44v1~10を遺伝子導入した細胞の場合、対応する動物の腋窩リンパ節が注射から2週間後に既に肥大しており、6週間後に動物を屠殺した。肺およびリンパ節の組織形態学的実験から、腫瘍を発現するCD44v6またはCD44v1~10を有する全てのラットが結節性の肺内転移を発症したことが明らかになった。対照的に、リンパ節または肺のどちらにおいても、親細胞またはCD44v1~10v6を遺伝子導入した細胞から原発性腫瘍が発生したが転移は発生しなかった(図1Bおよび表1)。この動物の肺では、微小転移を検出できなかった(表1)。そのため、Met活性化が可能である、CD44v6等のCD44アイソフォームはまた、BSp73AS細胞に転移能も付与する。

#### 【0105】

次に、Met shRNA配列を発現するレンチウイルスをBSp73ASs6細胞(CD44に加えてCD44v6アイソフォームを発現するBSp73AS細胞)に安定的に遺伝子導入した。細胞がMetを発現しないことを確認した(図1A、最後の2つのレーン)。次いで、この細胞(またはコントロールsh-RNA配列を発現するレンチウイルスを感染させた細胞)を同系動物に注射した。注射から6週間後に動物を調べた。全ての動物が原発性腫瘍を発症した(表1)。しかしながら、コントロールsh-RNA発現レンチウイルスを感染させた細胞の原発性腫瘍でのみMet活性化を観測し、Met sh-RNAを発現する原発性腫瘍では観測しなかった(図1C)。更に、Met発現が消失しなかった場合、肺または腋窩リンパ節のどちらにおいても転移または微小転移を検出せず(図1B、表1)、このことは転移プロセスに対するMetの重要性を示す。このデータから、CD44v6およびMetの両方がBSp73AS細胞の転移性拡散に必要であると結論付けることができる。

#### 【0106】

次に、共受容体機能を妨げる配列番号2(ヒトCD44v6の5merペプチド)または配列番号6(ヒトCD44v6の14merペプチド)のペプチドのラット対応物も転移形成を阻害するかどうかを調べた。ラットペプチドは、配列KEKWFENEWQGKNP(配列番号10)およびNEWQG(配列番号11)を有した。BSp73ASs6細胞を同系ラットに皮下注射し、配列番号10または配列番号11のラットCD44v6ペプチド(もしくはマウスのコントロールペプチド)またはCD44v6抗体(もしくははコントロールとしてのIgG)を腫瘍内にまたは静脈内に週に3回注射した。v6特異的抗体による処理またはv6特異的ペプチドによる処理の両方とも転移を完全に阻害した(

図 2 B、表 2 )。C D 4 4 v 6 ペプチドで処理した動物由来の肺切片では、P A S および H & E 染色を使用する組織学的分析で転移または微小転移のどちらも検出することができなかった (図 2 C および表 2 )。このことは、肺で多数の転移を検出した、コントロールペプチド (またはコントロール I g G ) で処理した動物から得た結果との対比において明らかである (図 2 B、C )。興味深いことに、原発性腫瘍の増殖はどちらの処理の影響も受けなかった (図 2 D )。このことは、B S p 7 3 A S 細胞または B S p 7 3 A S v 1 ~ 1 0 v 6 細胞も v 6 形質移入体と同様に原発性腫瘍の形成を誘導することができるという事実と両立することができる。まとめると、実験から、M e t に対する C D 4 4 v 6 の共受容体機能がラット膵臓細胞系における転移性拡散の決定的な手段であること、および M e t に対する C D 4 4 v 6 の共受容体機能が原発性腫瘍の増殖の主要因ではないことが示唆される。

10

#### 【 0 1 0 7 】

インビボでの C D 4 4 v 6 ペプチドの腫瘍細胞への特異的結合

C D 4 4 v 6 ペプチドの腫瘍部位へのおよび転移への結合の特異性を検証するために、ならびにインビボでの結合反応速度を推定するために、O p t i x M X 2 による近赤外蛍光 (N I R F ) 撮像を行なった。この目的のために、以下の 2 種の C D 4 4 v 6 ペプチドをフルオロフォア D Y 6 8 1 で標識した：ラット特異的 C D 4 4 v 6 ペプチド、即ち r v 6 ペプチド D y 6 8 1、およびコントロールとしてのマウス特異的 C D 4 4 v 6 ペプチド、即ち m v 6 ペプチド D y 6 8 1。図 3 A の右側に示すように、インビトロでの試験により、実際には標識ラットペプチドのみが M e t 活性化を阻害し、マウスペプチドは M e t 活性化を阻害しなかったことが明らかとなった。更に、組織培養液中において、D Y 6 8 1 標識ラット v 6 ペプチドは B S p 7 3 A S s 6 細胞に結合したが、D Y 6 8 1 標識マウス v 6 ペプチドは B S p 7 3 A S s 6 細胞に結合しなかった (図 3 A の左側)。

20

#### 【 0 1 0 8 】

インビボでの実験の場合、B S p 7 3 A S s 6 細胞を同系ラットに皮下注射した。3 週間後、尾静脈 (tail vein) への注射により、どちらかの標識 v 6 ペプチドをラットに投与した。指定の時点で、O p t i x M X 2 により、腫瘍領域における蛍光の蓄積を測定した。D y 6 8 1 標識ペプチドの静脈内 (i . v . ) 注射前に、マウスをネイティブに走査して自己蛍光バックグラウンドの濃度を測定した。次いで、D y 6 8 1 標識 v 6 ペプチドの皮下腫瘍へのインビボ結合反応速度を測定した。ペプチド注射から 1 日後に、2 日後に、3 日後および 7 日後に撮影した一連の代表的な N I R F 画像に示すように、インビボで少なくとも 2 日にわたり腫瘍領域全体で高蛍光強度を検出し、1 日目で最大であった。コントロールペプチドである m 6 ペプチド D y 6 8 1 の注射では、腫瘍領域全体で蛍光シグナルが全く生じなかった (図 3 D )。

30

#### 【 0 1 0 9 】

腫瘍中における v 6 ペプチドの分布を特に調べるために、および肺中における v 6 ペプチドの分布も特に調べるために、ペプチドの注射から 2 4 時間後に両方の組織を摘出し、O p t i x M X 2 によりエキスピボで調べた (図 3 C )。エキスピボで走査したおよび r v 6 ペプチド D y 6 8 1 を投与したマウスから摘出した腫瘍および肺の特定領域においてのみ蛍光強度を検出することができ、m v 6 ペプチド D y 6 8 1 を事前に注射した全てのコントロールラット由来の腫瘍および肺では蛍光強度を検出することができなかった (図 3 C )。この結果は、ラットペプチドが皮下のラット膵臓腫瘍に特異的に結合するというインビボでの観測を裏付けており、転移にインビボで結合することもまた更に示唆する。実際に、組織学的分析により、全ての動物の肺において転移の存在が明らかになった。

40

#### 【 0 1 1 0 】

配列番号 2 または配列番号 6 のヒト C D 4 4 v 6 ペプチドによりヒト膵臓腫瘍細胞の転移形成が阻害される

ヒト膵臓腫瘍への研究を進展させるために、高転移性ヒト膵癌細胞 L 3 . 6 p 1 (Brun s 他、Neoplasia (1999)、1(1):50 ~ 62) を調べた。この細胞は、該細胞を更に転移させる手段である、肝臓中および膵臓中で数回継代している C O L O 3 7 5 細胞が起源である

50

。この細胞ではM e t がその活性化およびシグナル伝達をC D 4 4 v 6 に依存していることを確認した(図4 A)。配列番号2または配列番号6のヒトv 6 ペプチドの存在下または非存在下で、L 3 . 6 p 1 細胞をH G F で処理し、M e t 活性化およびE R K への下流シグナル伝達を測定した。ヒトv 6 ペプチドによりM e t およびE R K の両方のリン酸化が阻害された。対応するラットv 6 ペプチド(コントロールペプチド、配列番号1 0 または1 1)による処理は、受容体活性化および信号伝達に影響を及ぼさなかった(図4 A)。

#### 【0 1 1 1】

腫瘍増殖および転移形成へのペプチドの影響を検証するために、免疫不全マウス(N C I - n u)の脾臓中にL 3 . 6 p 1 細胞を同所的に注射した。このマウスは原発性腫瘍を発症し、4週間後に肝臓中に多数の転移を示した。原発性腫瘍は多量のC D 4 4 v 6 を発現する(図4 B)。腫瘍におけるホスホ-M e t およびM e t に関する免疫蛍光染色で示すように、3週間にわたる週当たり3回のヒト特異的ペプチドの腹腔内(i . p .)注射により、M e t 活性化が完全に抑圧された(図4 C)。このデータは、ペプチドがインビボでM e t に対するC D 4 4 v 6 の共受容体機能を妨げるおよびM e t リン酸化を抑止することを示す。M e t の活性化は種特異的であり、ヒトH G F によってのみヒトM e t 受容体を活性化することができることから、この結果は、L 3 . 6 p 1 細胞が自らH G F を産生することを示唆する。興味深いことに、ラット系とは対照的に、脾臓における原発性腫瘍の増殖はヒトv 6 ペプチドにより強力に抑圧された(図4 D 上部)。脾臓における原発性腫瘍の増殖も強力に抑圧された(図4 D 下部)。ラット特異的ペプチド(コントロールペプチド)では転移形成へのいかなる影響または原発性腫瘍の増殖のどちらもなかった(図4 D)。この結果は、L 3 . 6 p 1 細胞が自らH G F を産生することを示唆する。実際に、培養から5日後の上清(材料および方法を参照)中にヒトH G F を3 3 7 5 p g / m l の濃度で検出した(データを示さず)。

#### 【0 1 1 2】

マウス特異的v 6 ペプチドによる腫瘍血管新生の阻害により原発性腫瘍の増殖が遅延したことを観測した。ここで、v 6 ペプチド処理腫瘍における血管の数および血管のサイズの減少で例示されるように、ヒトペプチドによる処理は血管新生も縮小させたことが分かる。血管新生の縮小で腫瘍体積の減少が説明される(図4 D、E)。v 6 ペプチドが種特異的な方法で作用することから、血管新生の阻害は、ヒト脾癌細胞によるV E G F 産生の阻害よりもマウスの内皮細胞への影響への影響に起因し得ない。実際に、ヒトL 3 . 6 p 1 細胞は、ヒトv 6 ペプチドによる処理によってブロックされ得る分泌物であるh V E G F を産生する(図4 F)。最も目立つ観測は、ヒト特異的ペプチドが肝臓内での転移形成を完全に阻害したことをであった(図4 G)。ラット特異的ペプチド(コントロールペプチド)は転移形成または原発性腫瘍の増殖に影響を及ぼさなかった(図4 C ~ G)。

#### 【0 1 1 3】

次いで、小動物撮像システムP e a r l I m p u l s e を使用して、ヒトC D 4 4 v 6 ペプチドのインビボでの腫瘍への結合の特異性を調べた。ヒト標識ペプチドはL 3 . 6 p 1 細胞中においてM e t 活性化を阻害したがラットペプチドは阻害せず(図5 A の右側)、細胞培養液中で、ヒト標識ペプチドはL 3 . 6 p 1 細胞に結合したが、ラットペプチドはL 3 . 6 p 1 細胞に結合しなかった(図5 A の左側)。インビボで、蛍光標識(D Y 6 8 1)ヒトペプチドは、同所的に注射したL 3 . 6 p 1 細胞により誘導された腫瘍中に特異的に蓄積した(図5 B)。コントロールペプチドで処理した動物では蛍光を検出しなかった。更に、腫瘍を発症したかどうかに関わらずペプチドを投与しなかった動物ではシグナルを観測しなかった(図5 B)。標識ヒトv 6 ペプチドで処理した動物から単離した器官のエキスビボでの分析により、原発性腫瘍だけでなく転移にほぼ確実に対応する肝臓の領域への結合の検出が可能になった(図5 C)。そのため、この実験から、C D 4 4 v 6 ペプチドは原発性腫瘍だけでなく遠位の転移も標的とすることが明らかになる。

#### 【0 1 1 4】

既に生じた転移がC D 4 4 v 6 ペプチドにより除去される

10

20

30

40

50

ラット系における肺のおよびヒトモデルにおける肝臓の特定の領域へのCD44v6ペプチドの特異的結合から、このペプチドが既に生じた転移に影響を及ぼすことができたかどうかの疑問が惹起される。図2および4に記載の実験において、腫瘍細胞の注射直後にペプチドを投与し、該ペプチドは転移の発生を完全に抑圧した。既に生じた転移へのCD44v6ペプチドの効果を測定するために、その他の実験的設定を使用した。BSP73ASs6細胞を同系ラットに皮下注射し、L3.6p1細胞を雄のヌードマウスに同所的に皮下注射し、3週間にわたり増殖させた。このとき、コントロール群由来の全ての動物は、ペプチド処理に使用した群の場合と同様であることを示唆する転移(表3)を発症していた。次いで、動物を種特異的CD44v6ペプチドまたはコントロールペプチド(ラット系の場合はマウスおよびヒト系の場合はラット)のどちらかで更に3週間にわたり週当たり2回処理し(図6Aのスキーム)、次いで転移の存在に関して検証した。実験の終了時に、コントロールペプチドで処理した全ての動物で転移を検出することができた(BSP73ASs6細胞の場合は表3、図6B、L3.6p1細胞の場合は表3、図6C)が、種特異的CD44v6ペプチドで処理した動物には転移がなかった。そのため、既に生じた転移はCD44v6ペプチドでの処理により除去される。

#### 【0115】

転移の消失に関する1つの仮説は、ペプチドが第2の器官におけるCD44v6発現転移性細胞のアポトーシスを誘導することである。この仮説を検証するために、BSP73ASs6細胞を使用して上記に記載の実験を繰り返した。BSP73ASs6細胞を同系ラットで皮下注射し、3週間にわたり腫瘍を成長させた。その後、動物を、特異的ラットCD44v6ペプチドまたはコントロールペプチド(マウス)のどちらかを1日おきに注射した10匹の動物からなる2つの群に分けた。ペプチドの各注射から1日後に1匹の動物の肺を取り出し、カスパーゼ3の開裂型を検出する抗体を使用してアポトーシスを測定した。CD44v6ペプチドで処理した動物の腫瘍領域において、ペプチドの最初の注射から早くも3日後にアポトーシス性細胞を検出した。コントロールペプチドを注射した動物ではアポトーシスを全く検出しなかった(図7)。CD44v6ペプチドの最初の注射から8日後に最大のアポトーシスを測定した。CD44v6ペプチドの注射から12日後にはアポトーシスをほとんど観測しなかった。22日目に、CD44v6ペプチドで処理した動物では転移をもはや検出することができなかったが、コントロール動物の肺では転移性拡散が明らかだった(図7)。この実験から、CD44v6ペプチドが転移性細胞のアポトーシスを誘導すると結論付けられる。

#### 【0116】

ミトコンドリアタンパク質の放出を特徴とする内因性経路、またはアポトーシスに関する、リガンドが結合した細胞死受容体により活性化された外因性経路のどちらがv6ペプチドにより誘導されたかを識別するために、v6ペプチドで処理した転移における開裂カスパーゼ-8の発現を調べた。v6ペプチド処理動物の肺における、カスパーゼ-3の場合に得たものと同様のカスパーゼ-8の活性化の動力学を観測した。この実験から、発明者らは、CD44v6ペプチドは外因性のアポトーシス経路を介して転移性細胞のアポトーシスを誘導すると結論付ける。

#### 【実施例2】

#### 【0117】

ペグ化CD44v6ペプチドはHGF依存性のCD44v6媒介シグナル伝達を阻害する

#### 1. 材料および方法

#### ペグ化ペプチドの合成

Applied Biosystems自動ペプチド合成機(モデル433A)でペプチド合成を行ない、分取HPLCによりペプチドを精製した。配列NEWQG(配列番号11)のペプチドおよびコントロールペプチドNAAAG(配列番号15)を合成した。質量分析計に接続されたLC(Bruker Daltonics-Bremen(ドイツ))製のμTOF LCMsにより、粗製物および精製物の特徴を明らかにした。

#### 【0118】

標準的な Fmoc 固相ペプチド合成プロトコル (例えば Fields 他、Int J Pept Protein Res. (1990)、35、161~214、Maisch 他、J Am Chem Soc. (2009)、131、15596~15597、Strandberg 他、Biophys J. (2006)、90、1676~1686 および Wadhvani 他、J Org Chem. (2006)、71、55~61 を参照) を使用してペプチド合成を行なった。NMP 中の 20~22% ピペリジンにより Fmoc 脱保護を行なった。DMF 中の Fmoc-アミノ酸: HOBt: HBTU: DIEA (4:4:3.9:8) の混合物を使用してカップリングを行なった。TFA: H<sub>2</sub>O: TIS (93.5:2.5:4) の混合物を使用して、ペプチドを固体支持体から切断した。N<sub>2</sub> フロー下で切断試薬を除去し、ジエチルエーテルを使用して標識ペプチドを沈殿させた。

#### 【0119】

10

ダイオードアレイ検出器が取り付けられた Jasco-HPLC システム (東京、日本) を使用して、35 において逆相 C18 カラム (4.6 mm x 240 mm) で分取 HPLC を行なった。アセトニトリル/水勾配が 0.1% の TFA を使用して、エピマー型ペプチドを分離した。

#### 【0120】

全てのアミノ酸を Novabiochem (シュヴァルバッハ、ドイツ) から購入した。MeO-PEG-COOH (分子量 750 Da および 2000 Da) ならびにカップリング試薬 (HBTU、HCTU) ならびに DIEA は Iris Biotech (マルクトレディッツ、ドイツ) 製であり、溶媒およびその他の試薬は VWR-Merck (ブルフザル、ドイツ) 製であった。

20

#### 【0121】

以下の化合物を合成した:

PEG-コントロールペプチド: PEG-NAAAAG、

PEG-ラット CD44 v6 ペプチド: PEG-NEWQG

パルミチン酸-NH-PEG-CONH-コントロールペプチド

パルミチン酸-NH-PEG-CONH-ラット CD44 V6 ペプチド

#### 【0122】

Fmoc-NH-PEG-COOH 分子量 3000 Da を配列番号 11 または配列番号 15 のどちらかに最初にカップリングさせることにより、パルミチン酸-NH-PEG-CONH-コントロールペプチドおよびパルミチン酸-NH-PEG-CONH-ラット CD44 V6 ペプチドを合成した。次いで、ペグ化ペプチドをパルミチン酸と反応させた。

30

#### 【0123】

活性化アッセイ

PEG-コントロールペプチドおよび PEG-ラット CD44 v6 ペプチドを、受容体型チロシンキナーゼ Met および ERK の HGF 誘導性活性化をブロックする能力に関して比較した。

#### 【0124】

ラット膀胱癌細胞 BSp73Ass6 (Ass6 と表す) を、コントロールペプチド (配列番号 15)、非ペグ化 v6 ペプチド (配列番号 11) および高濃度のペグ化ペプチド、即ち PEG-ラットコントロールペプチドならびに PEG-ラット CD44 v6 ペプチドのいずれかと共に 37 で 10 分にわたりインキュベートした後、HGF で誘導した (10 ng/ml; 37 で 5 分)。

40

#### 【0125】

ホスホ-Met およびホスホ-Erk 特異的抗体 (ホスホ-Met クローン D16 細胞シグナル伝達、ホスホ-Erk p42/44 細胞シグナル伝達) を使用する標準的な SDS およびウェスタンブロッティング技法により、ERK および Met の活性化を測定した。

#### 【0126】

細胞アッセイ

50

散乱アッセイを更に行なった。HT29 結腸癌細胞を 10% FCS 含有培地中で増殖させた。播種から 1 日後に細胞を飢餓させた。3 日目に、細胞を HGF (10 ng/ml) で誘導し、ペプチドなし、コントロールペプチド (配列番号 15)、非ペグ化 v6 ペプチド (配列番号 11) またはペグ化ペプチド、即ち PEG-ラットコントロールペプチドおよび PEG-ラット CD44 v6 ペプチドのいずれかと共にブレインキュベートした。

【0127】

## 2. 結果

図 9 および 10 は、ペグ化ペプチドが Met および ERK の HGF 依存性活性化の阻害で効果的であることを示す。非ペグ化ペプチドと比べてペグ化ペプチドにより ERK がより効果的に阻害される。

10

【0128】

図 11 は、ペグ化ペプチド、更に非ペグ化ペプチドにより細胞が細胞クラスターから離れて解離して遊走するが、コントロールペプチドにより細胞が細胞クラスターから離れて解離して遊走しないことを示す。

【実施例 3】

【0129】

インビトロでの結果

本明細書の記載の直鎖 CD44 v6 ペプチド

ラット: 14mer KEKWFENEWQGNP、5mer NEWQG、DY681 標識 11mer WFENEWQGNP

20

ヒト: 14mer KEQWFGNRWHEGYR、5mer NRWHE、DY681 標識 11mer WFGNRWHEGYR

マウス: DY681 標識 11mer WFQNGWQGNP

【0130】

1. ヒト v6 ペプチドを使用する RTK のインビトロでの阻害

直鎖ペプチド (ヒト、14mer KEQWFGNRWHEGYR、5mer NRWHE)

使用した細胞株

HT29 (結腸直腸癌)

HeLa (子宮頸癌)

30

L3.6pl (ヒト膵癌細胞)

MCF7 (ヒト乳癌)

【0131】

1.1 上皮細胞

CD44 v6 ペプチド (v6 14mer; v6 5mer も検証した、データを示さず) を使用して、ヒト上皮膵癌細胞 L3.6pl (Colo357 に由来する)、子宮頸癌細胞 HeLa および結腸癌細胞 HT29 における CD44 v6 の Met シグナル伝達への寄与を分析した。HGF による誘導前に細胞に添加した場合に、Met のおよびその下流標的 Erk の活性化を妨げることができた (図 12 A、B および C)。コントロールペプチドとのインキュベーションにより Met 活性化およびシグナル伝達を妨げられなかったことから、この結果から、この細胞株全てにおける Met 活性化に CD44 v6 が必要であることが分かる。

40

【0132】

VEGFR および Met に加えて、Erbb1 の CD44 v6 への依存性を調べた。EGF およびその他の 5 種のリガンド、即ち AR、BC、ER、HB-EGF および TGF- $\beta$  は、Erbb1 受容体を活性化することができる。EGF、AR および TGF- $\beta$  は、Erbb1 ホモ二量体または Erbb1 / 2 ヘテロ二量体のどちらかに結合する。これらの二量体に加えて、BC、ER および HB-EGF は、Erbb4 / 4 ホモ二量体または Erbb2 / 4 ヘテロ二量体にも結合することができる。ここで、指定のリガンドによる Erbb 受容体の活性化も CD44 v6 に依存しているかどうかを調べた。

50

## 【0133】

この目的のために、HT29細胞を24時間にわたり血清飢餓させ、v6特異的ペプチドまたはコントロールペプチドで前処理した。次いで、HT29細胞を、指定のErkBリガンドで誘導した。Erkキナーゼのリン酸化を、受容体活性化のリードアウトとして使用した。全てのリガンドはErkキナーゼを活性化することができた。HT29細胞のCD44v6ペプチド(ヒトv6 14mer)とのプレインキュベーションにより、EGF依存性およびER依存性のErkのリン酸化が阻害されたが、コントロールペプチドは効果が見られなかった(図13)。このことは、EGFに加えて、ERが、共受容体としてのCD44v6に依存している別のErkB1リガンドであることを示す。対照的に、CD44v6をブロックすることによりErkB受容体のAR依存性の、BC依存性の、HB-EGF依存性およびTGF- $\beta$ 依存性の活性化を阻害することはできなかった(図13)。これらのリガンドでは、それらのErkB受容体の誘導がCD44v6に非依存である。このことは特に印象的である。なぜならば、EGFおよびTGF- $\beta$ は同じ受容体対(ErkB1/1またはErkB1/2)に焦点を当てるからである。これらのデータは、ErkB活性化の共受容体として使用される特異的なCD44アイソフォームは、ErkB受容体を活性化させるリガンドにより決定されるが、受容体のタンパク質自体により決定されないことを示唆する。

10

## 【0134】

MC7では、CD44v6特異的ペプチドにより、Erkのリン酸化がEGF処理でブロックされるがTGF- $\beta$ 誘導ではブロックされない。5merおよび14merの両方のペプチドが同様の効果を示した。コントロールペプチドはErkのリン酸化に対する効果を有しなかった(図14)。

20

## 【実施例4】

## 【0135】

## 1. 直鎖ペプチドおよびPEG化v6 5merによる用量の増減

ポリエチレングリコールポリマー鎖の共有結合のプロセスであるPEG化は、免疫原性および抗原性を低下させることが知られている。PEG化により、化合物の流体力学的サイズが増大し、腎クリアランスの低下により動物中での循環時間が延びる。

## 【0136】

3種のCD44v6特異的化合物(ヒト由来のv6 5mer、PEG840-v6 5merおよびPEG2000-v6 5mer)ならびにコントロールペプチドを、4週間にわたり週当たり3回3種の濃度(注射当たり2 $\mu$ g、20 $\mu$ g、200 $\mu$ g)で腹腔内投与した。処理の開始1週間前に、L3.6p1腫瘍細胞をヌードマウスに同所的に移植した。結果は、PEG化はペプチドの効果に影響を及ぼさないことを示した。全てのv6特異的化合物が腫瘍細胞の転移性拡散を防ぎ、原発性腫瘍の増殖が減少した。注射当たり20 $\mu$ gの場合に転移の完全なブロックを観測したが、10倍低い濃度を使用して阻害効果を既に観測した(図15)。更に、処理用量を注射当たり200 $\mu$ gまで増加しても動物に副作用は生じなかった。

30

## 【0137】

## 2. 直鎖v6 14merおよび環状v6 8merの用量の減少に関する結果

40

この実験では、ペプチドの用量の減少を調べた。週当たり3回の注射の処理サイクルを維持した。更に、共受容体機能に必要である3つの重要なアミノ酸を含有する直鎖配列に基づく環状v6 8merを、その阻害効果に関してインビボで検証した。インビトロでのデータは、全てのペプチドによるリン酸化アッセイおよび細胞アッセイでMetおよびErkの活性化が既にブロッキングされていることを示した。

## 【0138】

環を形成するペプチド結合を有するアミノ末端とカルボキシル末端との連結により、環化による直鎖ペプチドの改変が実現される。環化は、ペプチドの安定性を高めるのに、および透過性を改善するのに効果的な方法である。

## 【0139】

50



L3-6p1細胞を動物に同所的に移植した。1週間にわたり腫瘍を増殖させた後、直鎖v6-14mer、環状v6-8merおよびコントロールペプチド(ラットv6-14mer)による処理を開始した。3週間にわたり注射当たり0.2、2および10μgの濃度で、週当たり3回、全てのペプチドを注射した。処理の終了時に動物を屠殺した。  
【0140】

コントロール群の全ての動物は、巨視的な転移を示した。0.2および2μgのv6-14merを注射した動物は、肝転移を示したが、動物当たりの転移の平均数は減少した。注射当たり10μgの用量により、転移性拡散が完全に阻害された(図16A、B)。更に、v6-14merによる処理により、コントロール群と比較して原発性腫瘍のサイズが有意に減少した(図16C)。

【0141】

環状v6-8merは、注射当たり2μgおよび20μgで転移性拡散を非常に効率的にブロックしており、このことは、環化による構造的変化はペプチドの機能の喪失につながらなかったことを示す(図16A、B)。環状v6-8merはまた、原発性腫瘍の増殖への劇的な影響も示した(図16C)。

【0142】

3. L3-6p1同所的異種移植片モデルにおける様々なCD44v6ペプチド誘導体の対照比較

同所的L3-6p1腫瘍を有する動物において、様々なCD44v6ペプチド誘導体の比較を行なった。それぞれ5匹の動物からなる10個の群に、3週間にわたり週当たり3回、注射当たり20μgの用量のペプチドを投与し、化合物を表4に列挙する。処理の開始から3週後に動物を屠殺し、巨視的な転移および腫瘍の体積を分析した。

【0143】

転移に関する組織学的分析(H&E染色)、ならびに腫瘍血管新生(抗CD31染色)および腫瘍中における様々なRTKの活性化に関する免疫組織学的分析はまだ途中である。

【0144】

【表1】

ペプチド	配列
コントロール(14mer ラット)	H-KEKWFENEWQGANP-OH
PEG840 14-mer	PEG840-KEQWFGNRWHEGYR-OH
PEG2000 14-mer	PEG2000-KEQWFGNRWHEGYR-OH
ミリスチル-14-mer	Myr-KEQWFGNRWHEGYR
14-mer(ヒト)	H-KEQWFGNRWHEGYR-OH
DOTA CD44v6-14 [daa <sub>7</sub> ]	DOTA-keqwfgnrwhegyr
DOTA CD44v6-14 [r <sup>14</sup> ]	DOTA-KEQWFGNRWHEGYR
環状、8mer	cy[KGNRWHEG]
環状5mer	DOTA-cy[KRWHE]
Myr-Y-環状8mer	Myr-Y-cy[KGNRWHEG]

表4:検証したペプチド誘導体の概要

【0145】

CD44v6-14merで処理した、PEG化14mer(PEG840およびPEG2000)で処理した、D-アミノ酸改変を含有する14merで処理した、および環状ペプチド(ミリスチル化環状ペプチドを含む)で処理した動物は、コントロールペプチドと比べて、腫瘍増殖の有意な減少を示した。ミリスチル化直鎖14merは、腫瘍増殖に対して阻害効果を示さなかった。コントロール動物と比べて、PEG2000-14mer、v6-14mer、環状8merおよび環状5mer(図17A)により腫瘍サイズの最大の減少が達成された(ここで、原発性腫瘍の強い可視血管新生(図18A)に留意すること)。これらの4種の化合物はまた、群内の個々の腫瘍サイズの低い変動性も示した(図17B)。

【0146】

肝臓の分析により、PEG 840 - 14mer、PEG 2000 - 14mer v6 - 14 [ d a a 7 ] およびミリストイル化環状 8mer の場合に転移性拡散の減少が分かった。動物を v6 - 14mer、v6 - 14 [ r 1 4 ]、環状 8mer および環状 5mer で処理した場合に、転移の完全な阻害を観測した (図 18 A、B)。

#### 【 0 1 4 7 】

この対照比較により v6 - 14mer の効果を確認したが、インビボでの安定性の増加を示すことができた直鎖ペプチド配列の有望な改変としての v6 - 14 [ r 1 4 ]、環状 8mer および環状 5mer が明らかになった。

#### 【 0 1 4 8 】

本発明の実施形態の内のいくつかは以下に関する。

10

1. ヒトの膵癌の処置において使用するための化合物であって、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  ( $X_1$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択され、 $X_5$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択される) (配列番号 1) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$  もしくは  $X_{14}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択される) (配列番号 7) の内の少なくとも 5 個の、6 個の、7 個の、8 個の、9 個の、10 個の、11 個の、12 個の、13 個のまたは 14 個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号 7 の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  および  $X_{11}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W もしくは Y を含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む化合物。

20

#### 【 0 1 4 9 】

2. 前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_5$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択される) (配列番号 4) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

30

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W もしくは Y または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W もしくは Y または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_6$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{12}$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖もし

40

50

くは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W もしくは Y または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択される) (配列番号 8) の内の少なくとも 5 個の、6 個の、7 個の、8 個の、9 個の、10 個の、11 個の、12 個の、13 個のまたは 14 個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号 8 の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

を含む、実施形態 1 に記載の使用のための化合物。

#### 【0150】

3. 前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q を含む群から選択され、 $X_5$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D を含む群から選択される) (配列番号 5) 含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E または D を含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_6$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E または D を含む群から選択され、 $X_{12}$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択される) (配列番号 9) の内の少なくとも 5 個の、6 個の、7 個の、8 個の、9 個の、10 個の、11 個の、12 個の、13 個のまたは 14 個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号 9 の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E または D を含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

を含む、実施形態 2 に記載の使用のための化合物。

#### 【0151】

4. 前記化合物が、アミノ酸配列  $N - R - W - H - E$  (配列番号 2)、アミノ酸配列  $K - E - Q - W - F - G - N - R - W - H - E - G - Y - R$  (配列番号 6) を含む、場合により、からなるペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、実施形態 1、2 または 3 に記載の使用のための化合物。

#### 【0152】

5. 前記化合物が前記ペプチドまたは前記ペプチド模倣物の改変型である、実施形態 1、2、3 または 4 に記載の使用のための化合物。

#### 【0153】

6. 前記化合物が、前記ペプチドまたはペプチド模倣物のペグ化型、ヘシル化型、パシル化型、ミリストイル化型、グリコシル化型および / または環状型である、実施形態 5 に記載の使用のための化合物。

10

20

30

40

50

## 【0154】

7. 化合物が経口投与用に、経鼻投与用にまたは皮下投与用に製剤化されている、実施形態1、2、3、4または5に記載の使用のための化合物。

## 【0155】

8. ヒトの膵癌の処置において使用するための医薬組成物であって、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  ( $X_1$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択され、 $X_5$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される) (配列番号1) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$  もしくは  $X_{14}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される) (配列番号7) の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号7の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  および  $X_{11}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

を含む化合物を含む医薬組成物。

## 【0156】

9. 前記医薬組成物が、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_5$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される) (配列番号4) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_6$  が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{12}$  が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される) (配列番号8) の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号8の少なくとも  $X_7 - R -$

W - H - X<sub>11</sub> (式中、X<sub>7</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、X<sub>11</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

を含む化合物を含む、実施形態8に記載の使用のための医薬組成物。

【0157】

10. 前記医薬組成物が、

・少なくともアミノ酸配列X<sub>1</sub> - R - W - H - X<sub>5</sub> (式中、X<sub>1</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQを含む群から選択され、X<sub>5</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDを含む群から選択される) (配列番号5) 含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - R - W - H - X<sub>11</sub> - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> (式中、X<sub>1</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択され、X<sub>2</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEまたはDを含む群から選択され、X<sub>3</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択され、X<sub>4</sub>が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WまたはYを含む群から選択され、X<sub>5</sub>が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WまたはYを含む群から選択され、X<sub>6</sub>が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、X<sub>7</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択され、X<sub>11</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEまたはDを含む群から選択され、X<sub>12</sub>が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、X<sub>13</sub>が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WまたはYを含む群から選択され、X<sub>14</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択される) (配列番号9) の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号9の少なくともX<sub>7</sub> - R - W - H - X<sub>11</sub> (式中、X<sub>7</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択され、X<sub>11</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEまたはDを含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

を含む化合物を含む、実施形態9に記載の使用のための医薬組成物。

【0158】

11. 前記化合物が、アミノ酸配列N - R - W - H - E (配列番号2)、アミノ酸配列K - E - Q - W - F - G - N - R - W - H - E - G - Y - R (配列番号6) を含む、場合により、からなるペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、実施形態8、9または10に記載の使用のための医薬組成物。

【0159】

12. 前記化合物が前記ペプチドまたは前記ペプチド模倣物の改変型である、実施形態8、9、10または11に記載の使用のための医薬組成物。

【0160】

13. 前記化合物が、前記ペプチドまたはペプチド模倣物のペグ化型、ヘシル化型、パシル化型、ミリストイル化型、グリコシル化型および/または環状型である、実施形態12に記載の使用のための医薬組成物。

【0161】

14. 前記医薬組成物が薬学的に許容される賦形剤を含む、実施形態8、9、10、11、12または13に記載の使用のための医薬組成物。

【0162】

15. 前記医薬組成物が経口投与用に、経鼻投与用にまたは皮下投与用に製剤化されている、実施形態8、9、10、11、12、13または14に記載の使用のための医薬組

10

20

30

40

50

成物。

【0163】

16. ヒトの膀胱癌の処置において使用するための医薬品の製造における化合物の使用であって、

前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  ( $X_1$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択され、 $X_5$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される) (配列番号1)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ もしくは $X_{14}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される) (配列番号7)の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号7の少なくとも $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  および $X_{11}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

を含む、化合物の使用。

【0164】

17. 前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_5$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される) (配列番号4)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_6$  が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{12}$  が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される) (配列番号8)の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号8の少なくとも $X_7 - R -$

W - H - X<sub>11</sub> (式中、X<sub>7</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、X<sub>11</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

を含む、実施形態16に記載の化合物の使用。

【0165】

18. 前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列X<sub>1</sub> - R - W - H - X<sub>5</sub> (式中、X<sub>1</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQを含む群から選択され、X<sub>5</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDを含む群から選択される) (配列番号5) 含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - R - W - H - X<sub>11</sub> - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> (式中、X<sub>1</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択され、X<sub>2</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEまたはDを含む群から選択され、X<sub>3</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択され、X<sub>4</sub>が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WまたはYを含む群から選択され、X<sub>5</sub>が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WまたはYを含む群から選択され、X<sub>6</sub>が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、X<sub>7</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択され、X<sub>11</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEまたはDを含む群から選択され、X<sub>12</sub>が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、X<sub>13</sub>が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WまたはYを含む群から選択され、X<sub>14</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択される) (配列番号9) の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号9の少なくともX<sub>7</sub> - R - W - H - X<sub>11</sub> (式中、X<sub>7</sub>が、NH<sub>2</sub>基を有するアミノ酸、例えばK、R、NまたはQを含む群から選択され、X<sub>11</sub>が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEまたはDを含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、実施形態17に記載の化合物の使用。

【0166】

19. 前記化合物が、アミノ酸配列N - R - W - H - E (配列番号2)、アミノ酸配列K - E - Q - W - F - G - N - R - W - H - E - G - Y - R (配列番号6) を含む、場合により、からなるペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、実施形態16、17または18に記載の化合物の使用。

【0167】

20. 前記化合物が前記ペプチドまたは前記ペプチド模倣物の改変型である、実施形態16、17、18または19に記載の化合物の使用。

【0168】

21. 前記化合物が、前記ペプチドまたはペプチド模倣物のペグ化型、ヘシル化型、パシル化型、グリコシル化型、ミリストイル化型および/または環状型である、実施形態20に記載の化合物の使用。

【0169】

22. 前記医薬品が経口投与用に、経鼻投与用にまたは皮下投与用に製剤化されている、実施形態16、17、18、19、20または21に記載の化合物の使用。

【0170】

23. 化合物を投与することによりヒトの膀胱癌を処置する方法であって、前記化合物が

、

10

20

30

40

50

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  ( $X_1$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択され、 $X_5$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される) (配列番号1)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ もしくは $X_{14}$ が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される) (配列番号7)の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号7の少なくとも $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  および  $X_{11}$  が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYを含む群から選択される)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、方法。

【0171】

24. 前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_5$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される) (配列番号4)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_6$  が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{12}$  が、Gまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖もしくは非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えばF、WもしくはYまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される) (配列番号8)の内の少なくとも5個の、6個の、7個の、8個の、9個の、10個の、11個の、12個の、13個のまたは14個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号8の少なくとも $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えばK、R、NもしくはQまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えばEもしくはDまたは非極性側鎖を有するアミノ酸、例えばA、V、LもしくはIを含む群から選択される)を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物

10

20

30

40

50



を含む、実施形態 2 3 に記載の方法。

【0172】

25. 前記化合物が、

・少なくともアミノ酸配列  $X_1 - R - W - H - X_5$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N もしくは Q を含む群から選択され、 $X_5$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E もしくは D を含む群から選択される) (配列番号 5) 含むペプチドまたはこのペプチド模倣物、または

・アミノ酸配列  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - R - W - H - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (式中、 $X_1$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_2$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E または D を含む群から選択され、 $X_3$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_4$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_5$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_6$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E または D を含む群から選択され、 $X_{12}$  が、G または非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A、V、L もしくは I を含む群から選択され、 $X_{13}$  が、非極性側鎖または非荷電側鎖と芳香環構造とを有するアミノ酸、例えば F、W または Y を含む群から選択され、 $X_{14}$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択される) (配列番号 9) の内の少なくとも 5 個の、6 個の、7 個の、8 個の、9 個の、10 個の、11 個の、12 個の、13 個のまたは 14 個のアミノ酸を含むペプチドであり、配列番号 9 の少なくとも  $X_7 - R - W - H - X_{11}$  (式中、 $X_7$  が、 $NH_2$  基を有するアミノ酸、例えば K、R、N または Q を含む群から選択され、 $X_{11}$  が、負荷電側鎖を有するアミノ酸、例えば E または D を含む群から選択される) を含むペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、実施形態 2 4 に記載の方法。

10

20

【0173】

26. 前記化合物が、アミノ酸配列  $N - R - W - H - E$  (配列番号 2)、アミノ酸配列  $K - E - Q - W - F - G - N - R - W - H - E - G - Y - R$  (配列番号 6) を含む、場合により、からなるペプチドまたはこのペプチド模倣物を含む、実施形態 2 3、2 4 または 2 5 に記載の方法。

30

【0174】

27. 前記化合物が前記ペプチドまたは前記ペプチド模倣物の改変型である、実施形態 2 3、2 4、2 5 または 2 6 に記載の方法。

【0175】

28. 前記化合物が、前記ペプチドまたはペプチド模倣物のペグ化型、ヘシル化型、パシル化型、グリコシル化型、ミリストイル化型または環状型である、実施形態 2 7 に記載の方法。

40

【0176】

29. 前記化合物が経口投与用に、経鼻投与用にまたは皮下投与用に製剤化されている、実施形態 2 3、2 4、2 5、2 6、2 7 または 2 8 に記載の方法。

【0177】

30. 前記腫瘍が転移をまだ形成していない、実施形態 1、2、3、4、5、6 もしくは 7 のいずれかに記載の使用のための化合物、実施形態 8、9、10、11、12、13、14 もしくは 15 のいずれかに記載の使用のための医薬組成物、実施形態 16、17、18、19、20、21 もしくは 22 のいずれかに記載の使用または実施形態 2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8 もしくは 2 9 のいずれかに記載の方法。

【0178】

31. 前記腫瘍が転移を既に形成している、実施形態 1、2、3、4、5、6 もしくは

50

7のいずれかに記載の使用のための化合物、実施形態8、9、10、11、12、13、14もしくは15のいずれかに記載の使用のための医薬組成物、実施形態16、17、18、19、20、21もしくは22のいずれかに記載の使用または実施形態23、24、25、26、27、28もしくは29のいずれかに記載の方法。

【0179】

32．前記膵癌が対癌米国合同委員会の癌病期分類システムのTNM解剖学的／予後群システムに従ってステージIVと分類できる、実施形態1、2、3、4、5、6、もしくは7のいずれかに記載の使用のための化合物、実施形態8、9、10、11、12、13、14、もしくは15のいずれかに記載の使用のための医薬組成物、実施形態16、17、18、19、20、21、もしくは22のいずれかに記載の使用または実施形態23、24、25、26、27、28、もしくは29のいずれかに記載の方法。

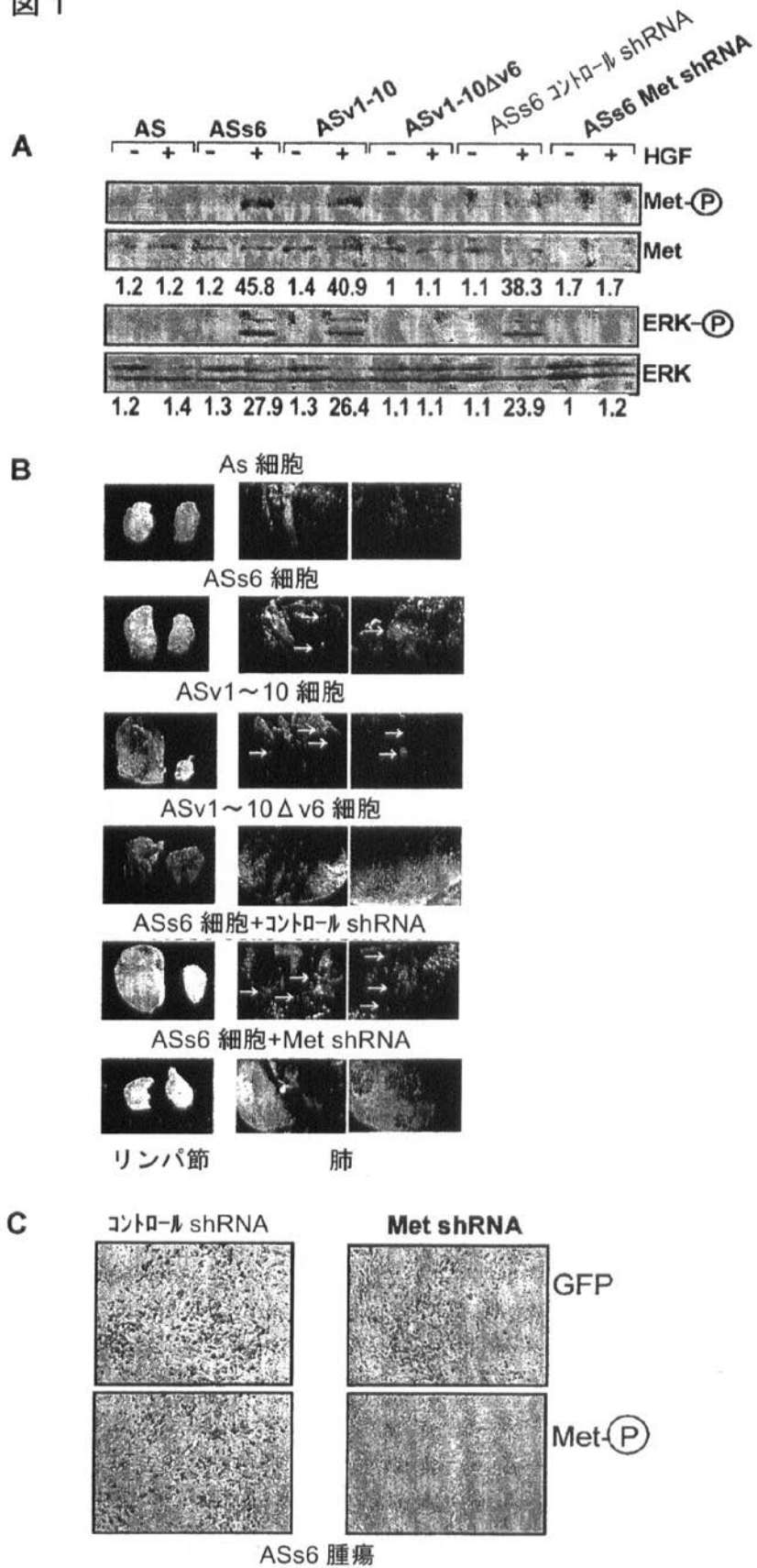
10

【0180】

33．膵癌が膵外分泌癌または膵内分泌癌である、実施形態30、31または32のいずれかに記載の使用のための化合物、使用のための医薬組成物、使用または方法。

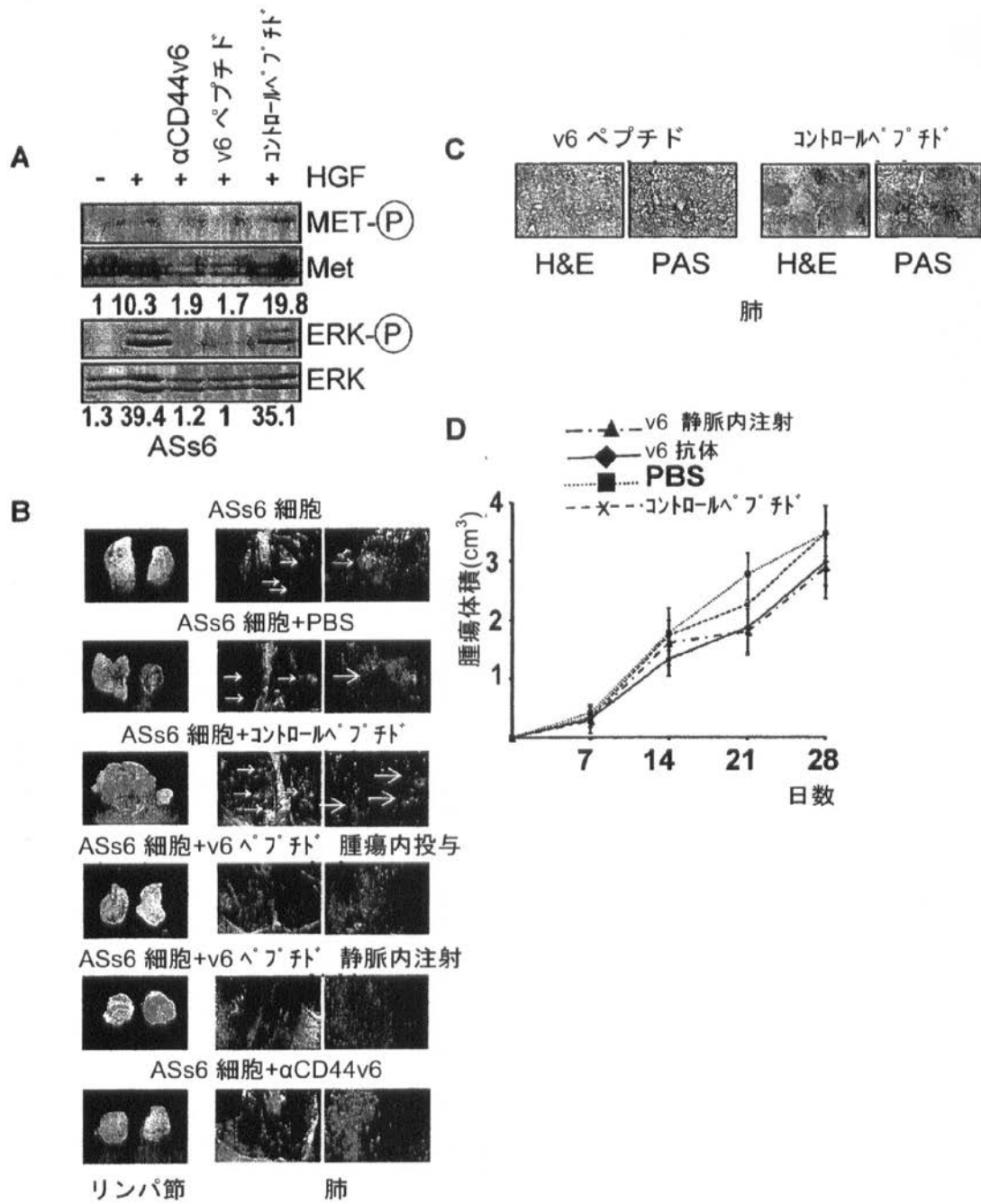
【図 1】

図 1



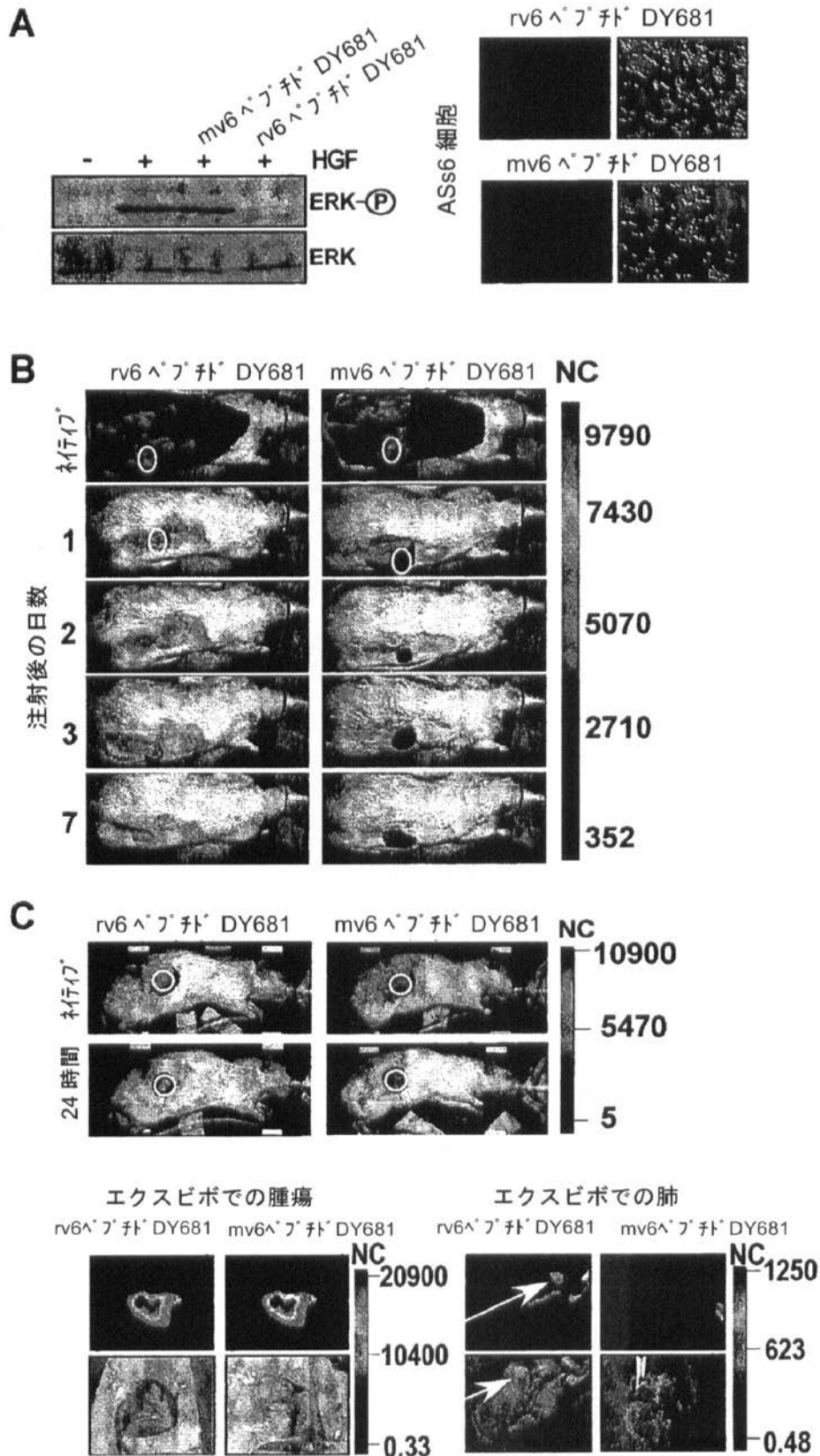
【図2】

図2



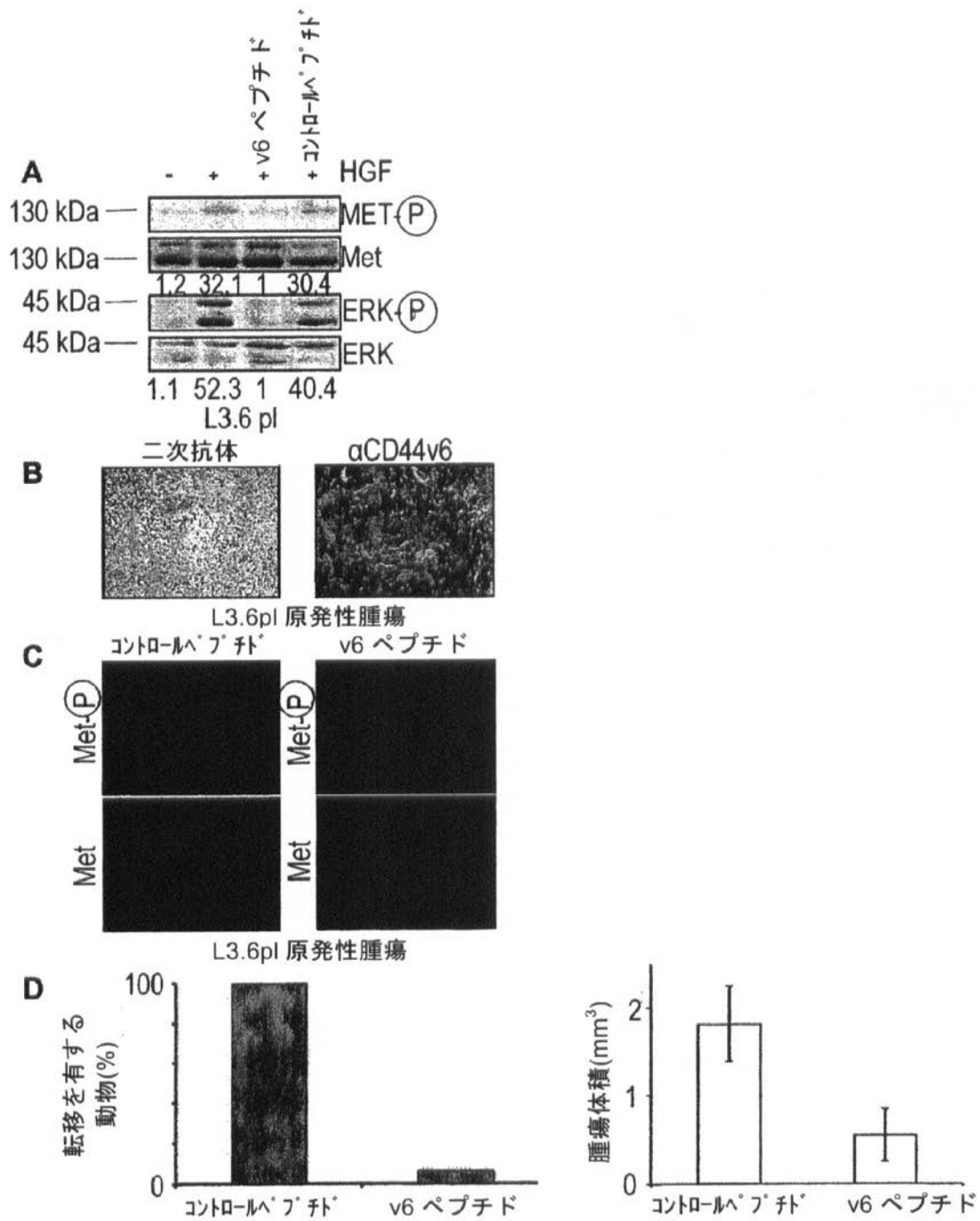
【図 3】

図 3



【図 4 - 1】

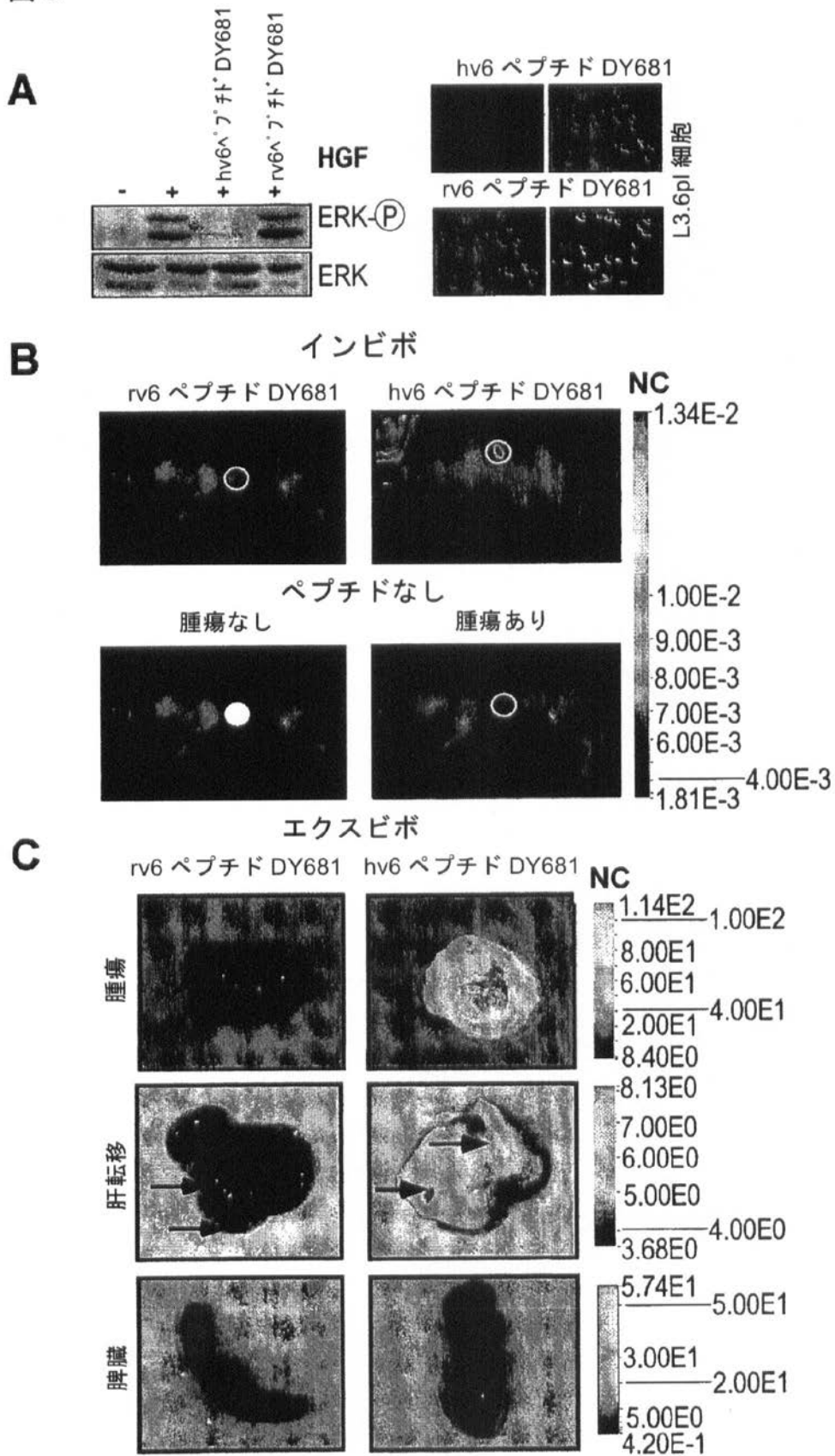
図 4





【図 5】

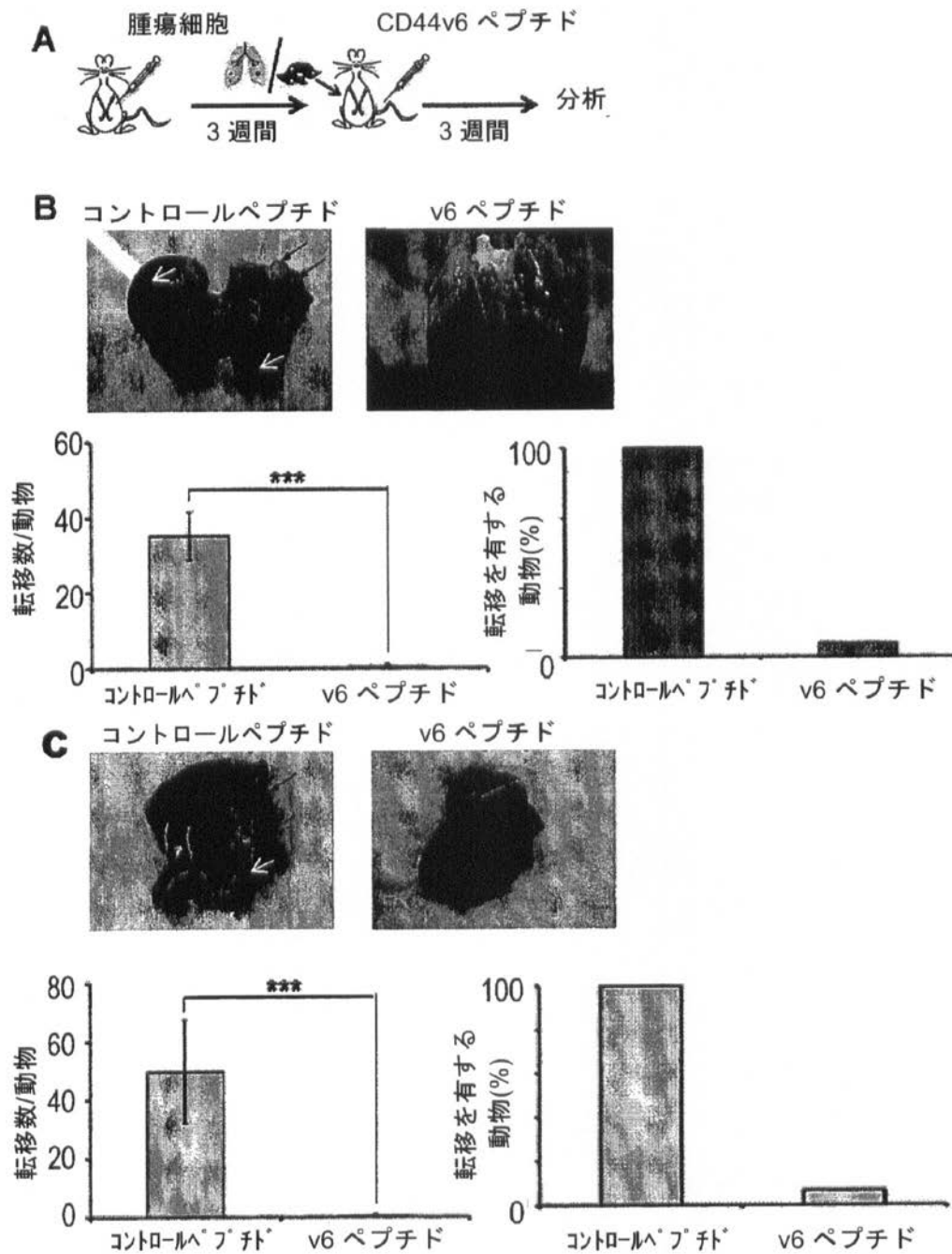
図 5





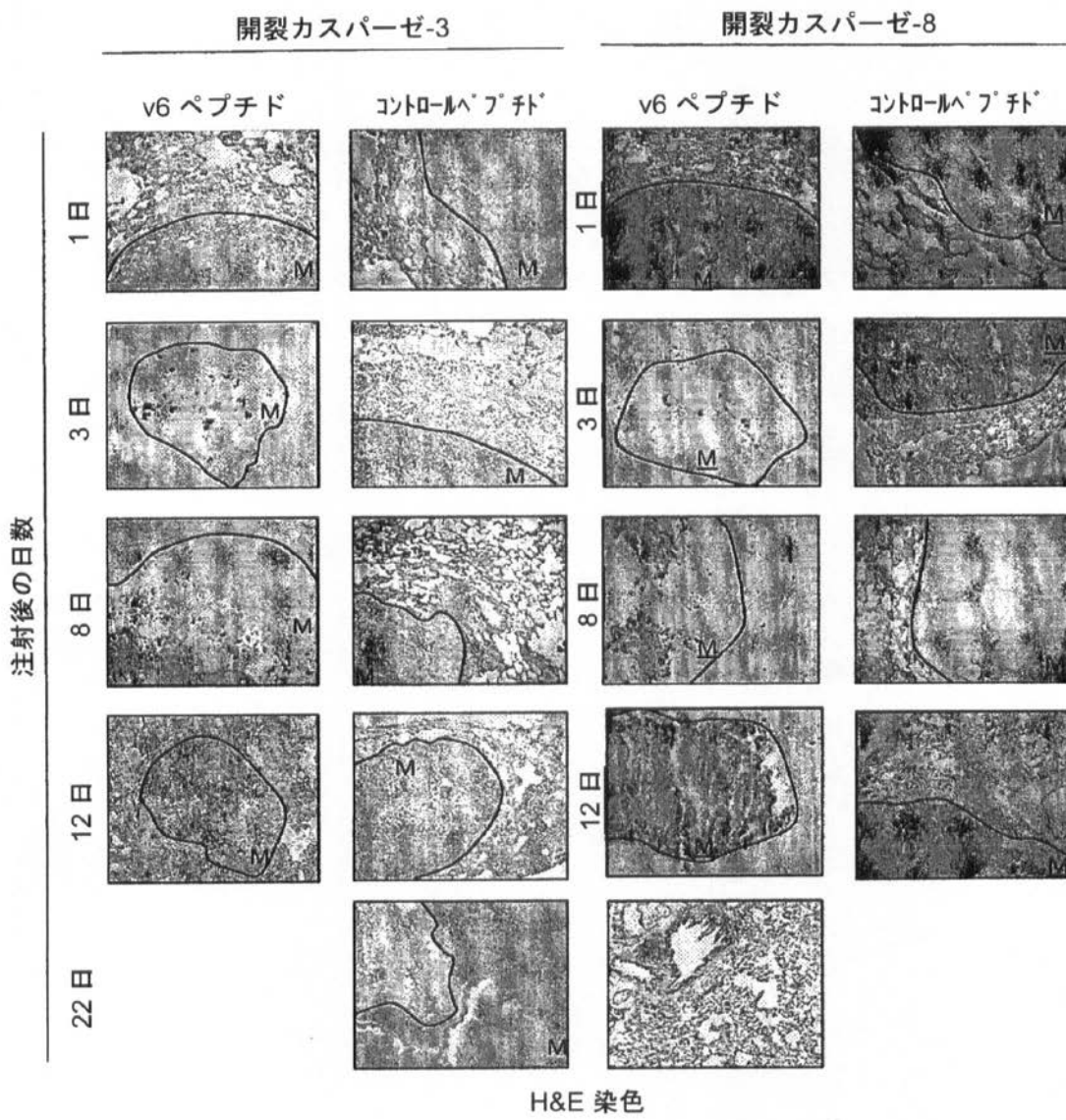
【図 6】

図 6



【図 7】

図 7



## 【 図 8 】

図 8

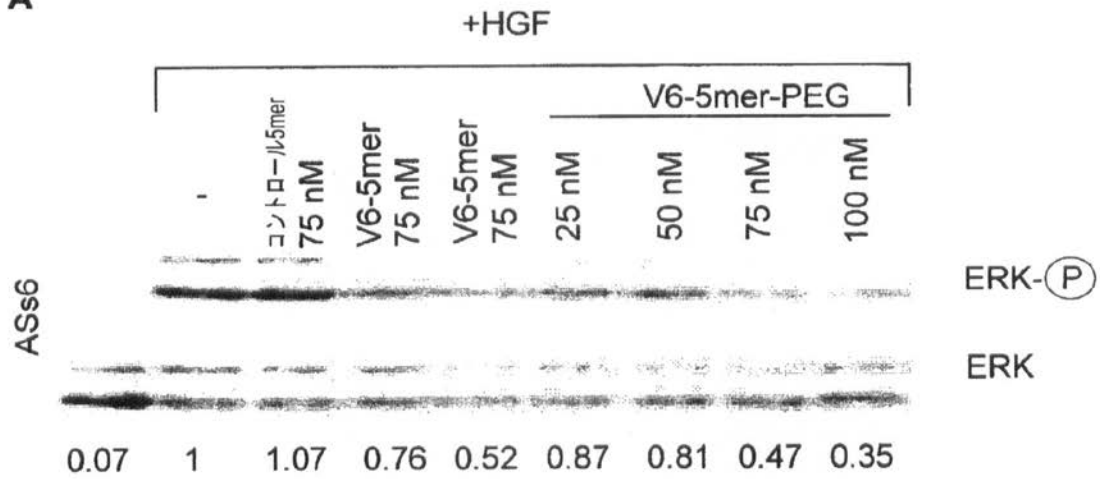
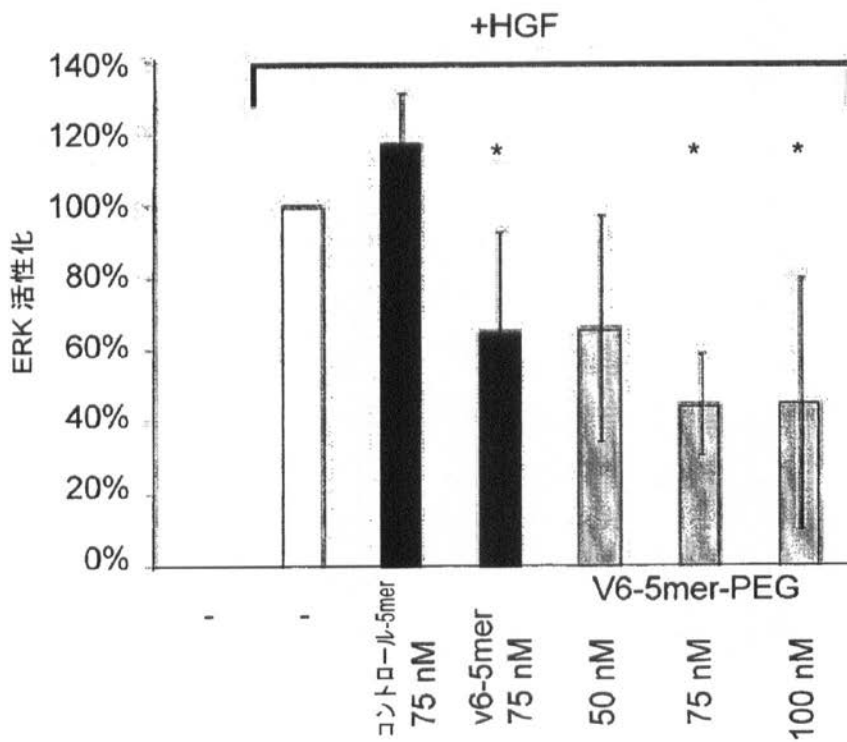
表 1				
細胞株	原発性腫瘍	転移 肺	転移 リンパ節	微小転移
AS	5/5	0/5	0/5	0/5
ASs6	15/15	15/15	15/15	
ASv1～10Δv6	10/10	0/10	0/10	0/10
ASv1～v10	10/10	10/10	10/10	
ASs6 コントロール shRNA	10/10	10/10	10/10	
ASs6 Met shRNA	10/10	0/10	0/10	0/10

表 2				
ASs6+処理	原発性腫瘍	転移 肺	転移 リンパ節	微小転移
CD44v6 抗体	14/14	1/14	1/14	1/14
CD44v6 <sup>+</sup> ペプチド 腫瘍内投与	14/14	0/14	0/14	0/14
CD44v6 <sup>+</sup> ペプチド 静脈内注射	15/15	0/15	0/15	0/15
コントロールペプチド	15/15	15/15	15/15	
PBS	10/10	10/10	10/10	

表 3				
	BSp73ASs6		L3.6pl	
	原発性腫瘍	肺転移	原発性腫瘍	肝臓転移
コントロール(腫瘍細胞注射後 3 週間)	10/10	10/10	10/10	10/10
コントロールペプチド処理(さらに 3 週間)	15/15	15/15	15/15	15/15
v6 ペプチド処理(さらに 3 週間)	15/15	1/15	15/15	1/15

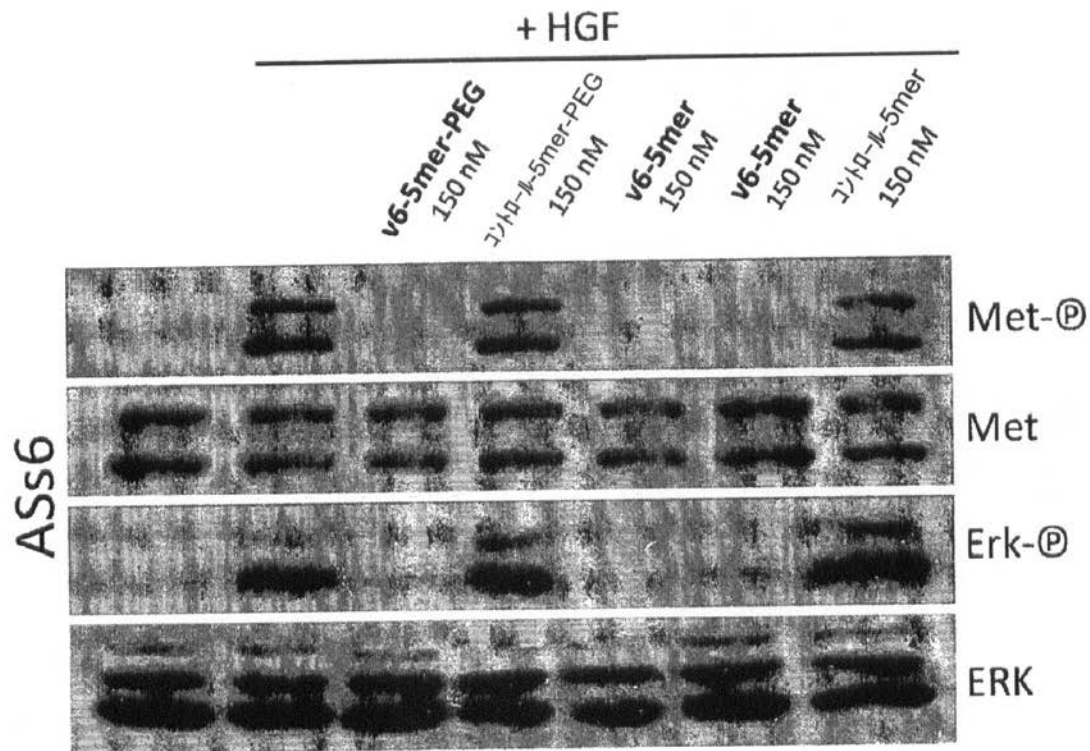
【図 9】

図 9

**A****B**

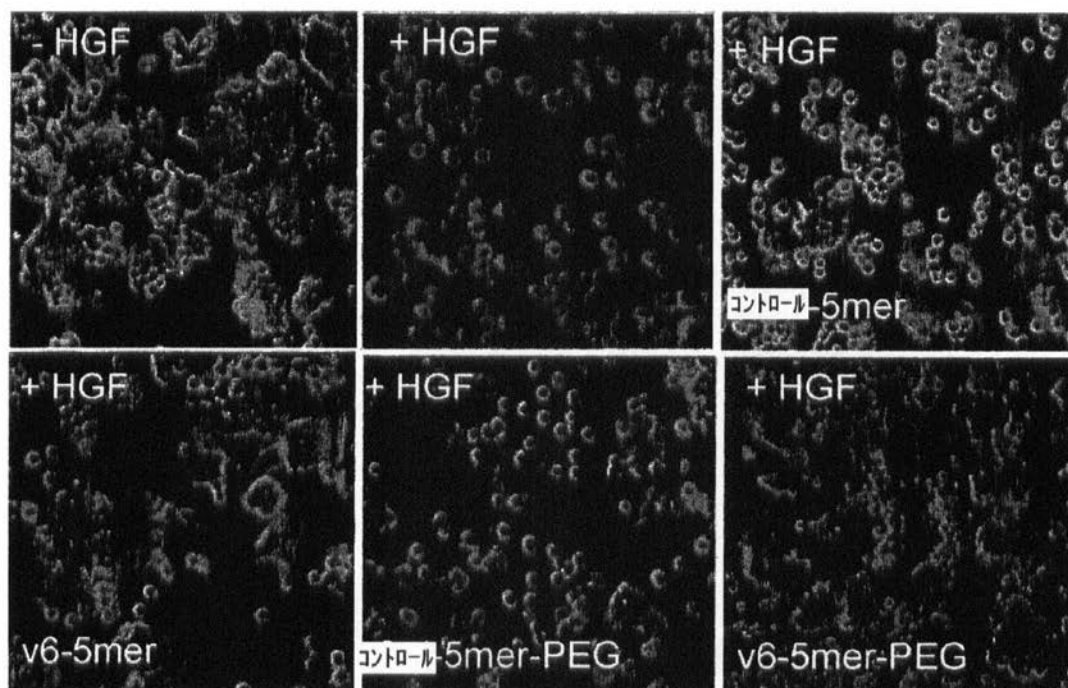
【図 10】

図 10



【図 11】

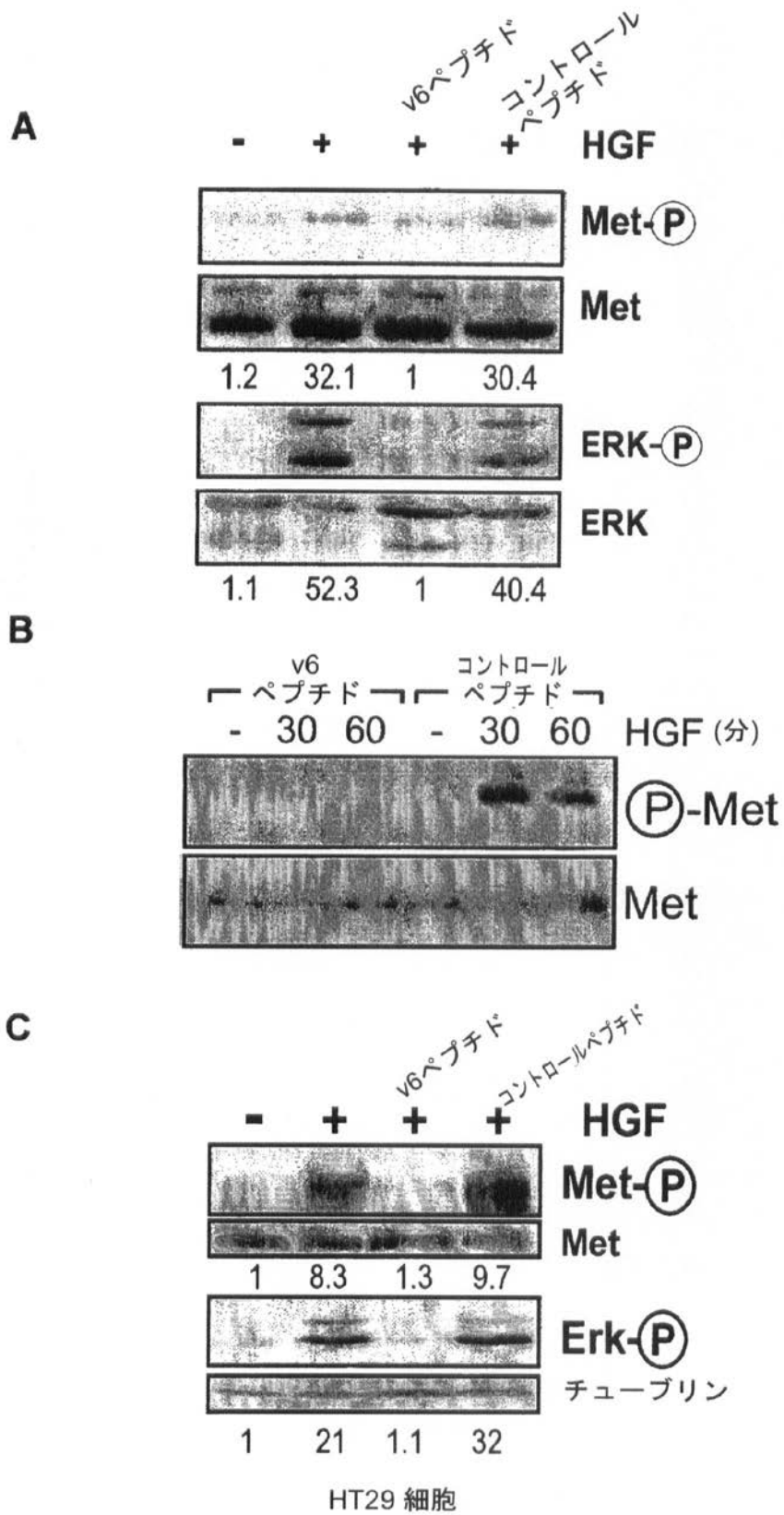
図 11



HT29

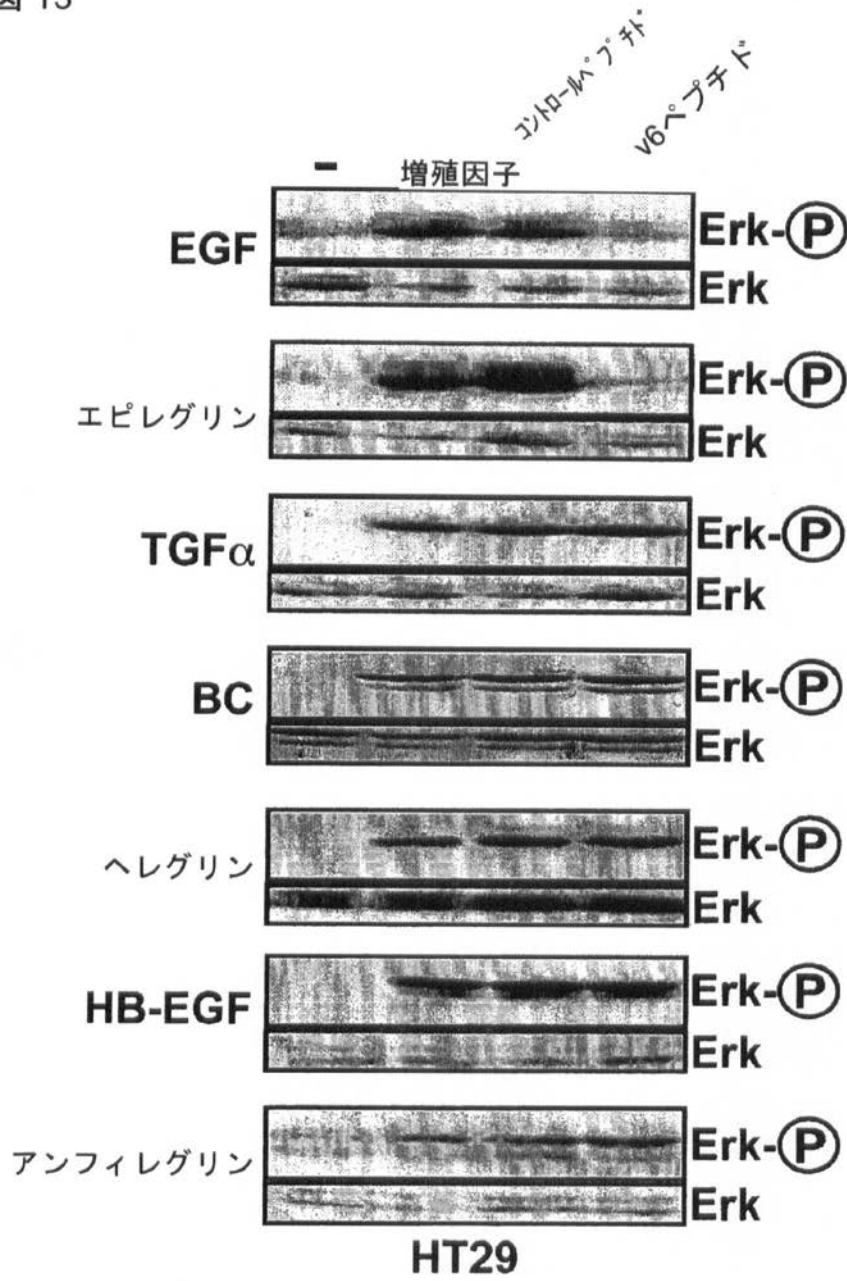
【図 12】

図 12



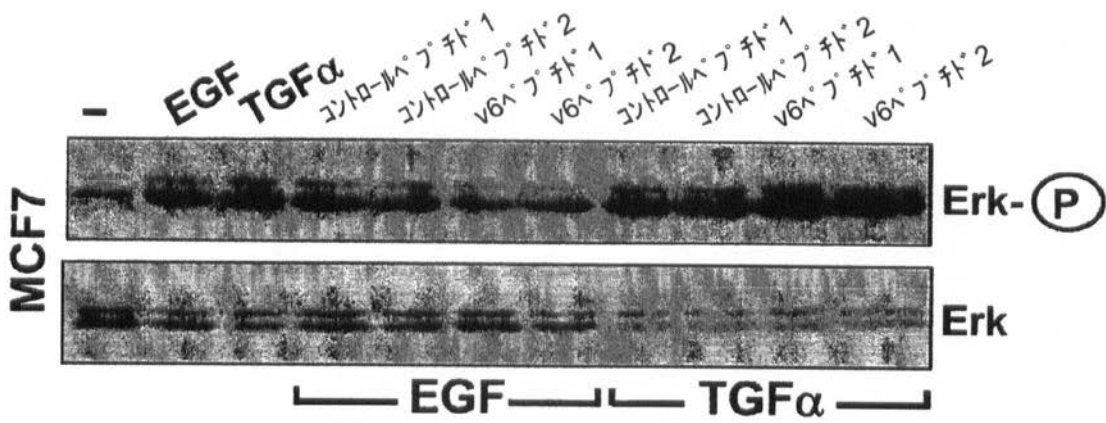
【図 13】

図 13



【図 14】

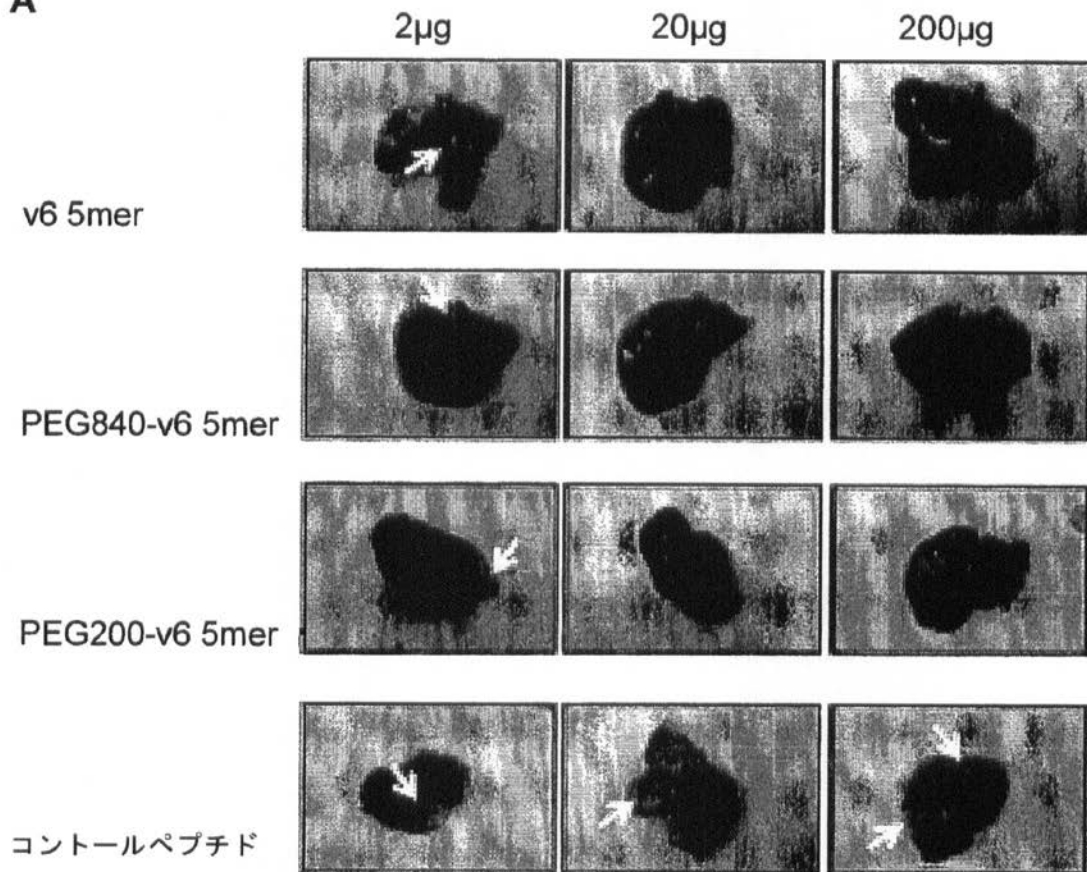
図 14



【図 15 - 1】

図 15

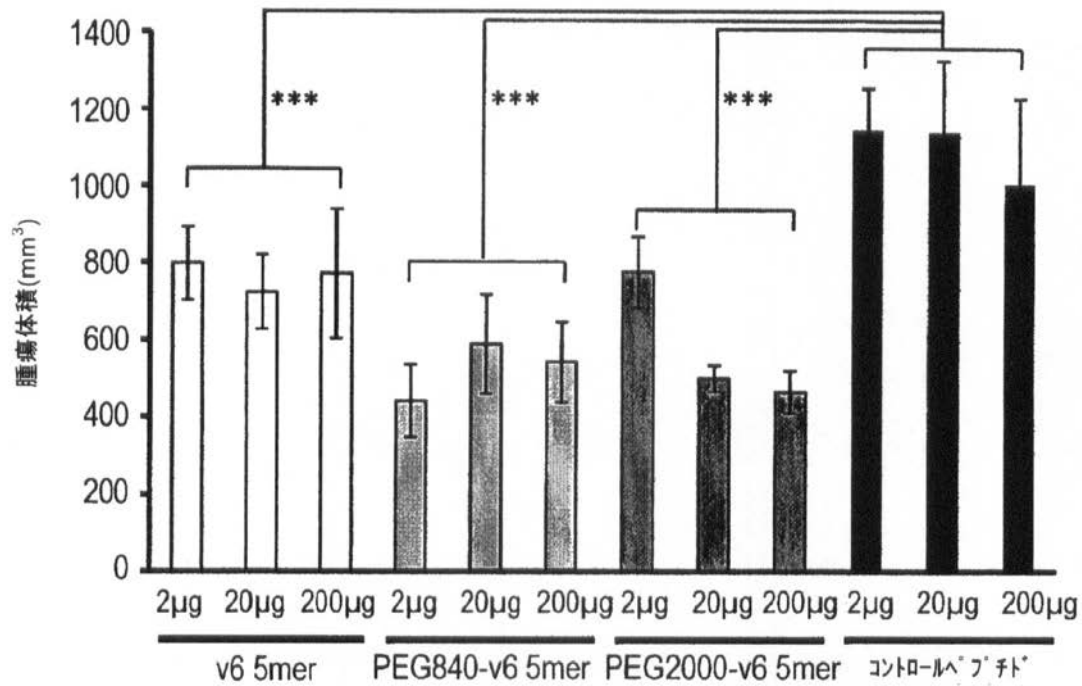
A





【図 15 - 2】

図 15 (続き)

**B****C**

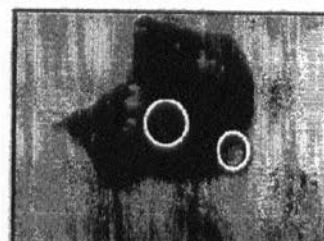
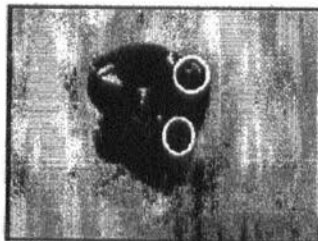
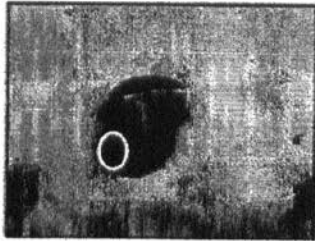
量/注射	2μg	20μg	200μg
v6 5mer	3	0	0
PEG840-v6 5mer	5	0	0
PEG2000-v6 5mer	3	0	0
コントロールペプチド	10	11	11

【図 16 - 1】

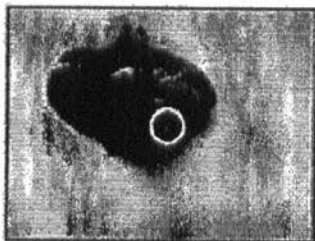
図 16

A

コントロール 14mer



ヒトv6 14mer



0.2µg/注射



2µg/注射

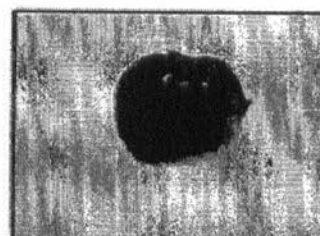


10µg/注射

ヒト環状8mer



2µg/注射



20µg/注射

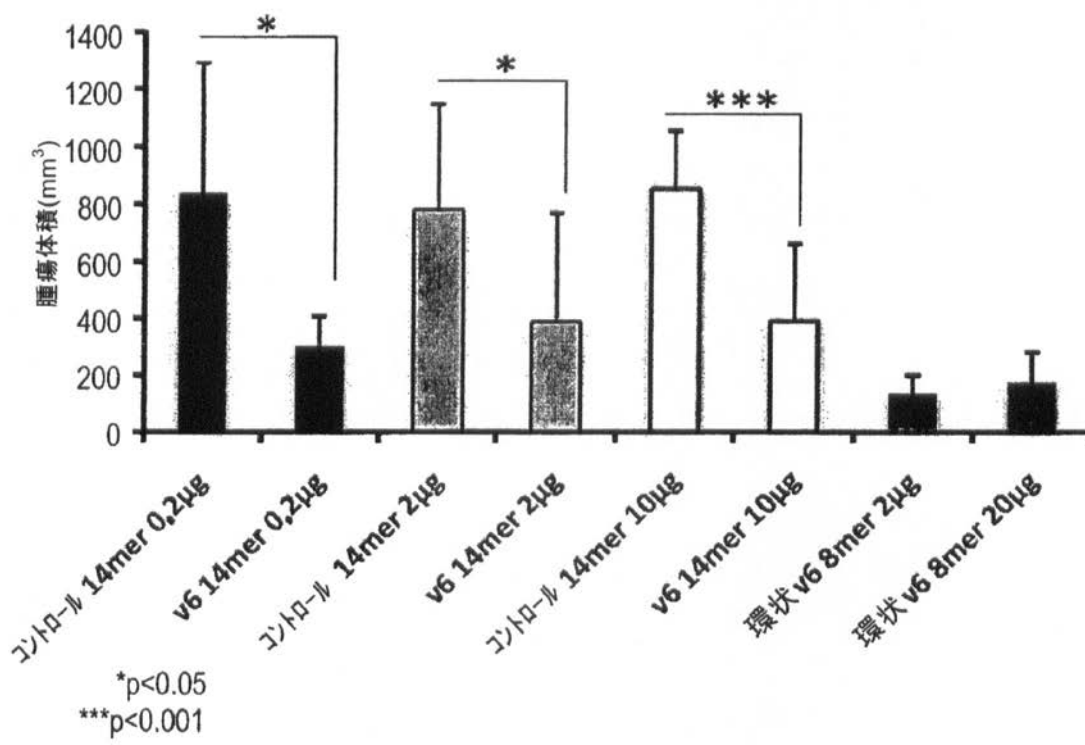
【図 16 - 2】

図 16 (続き)

**B**

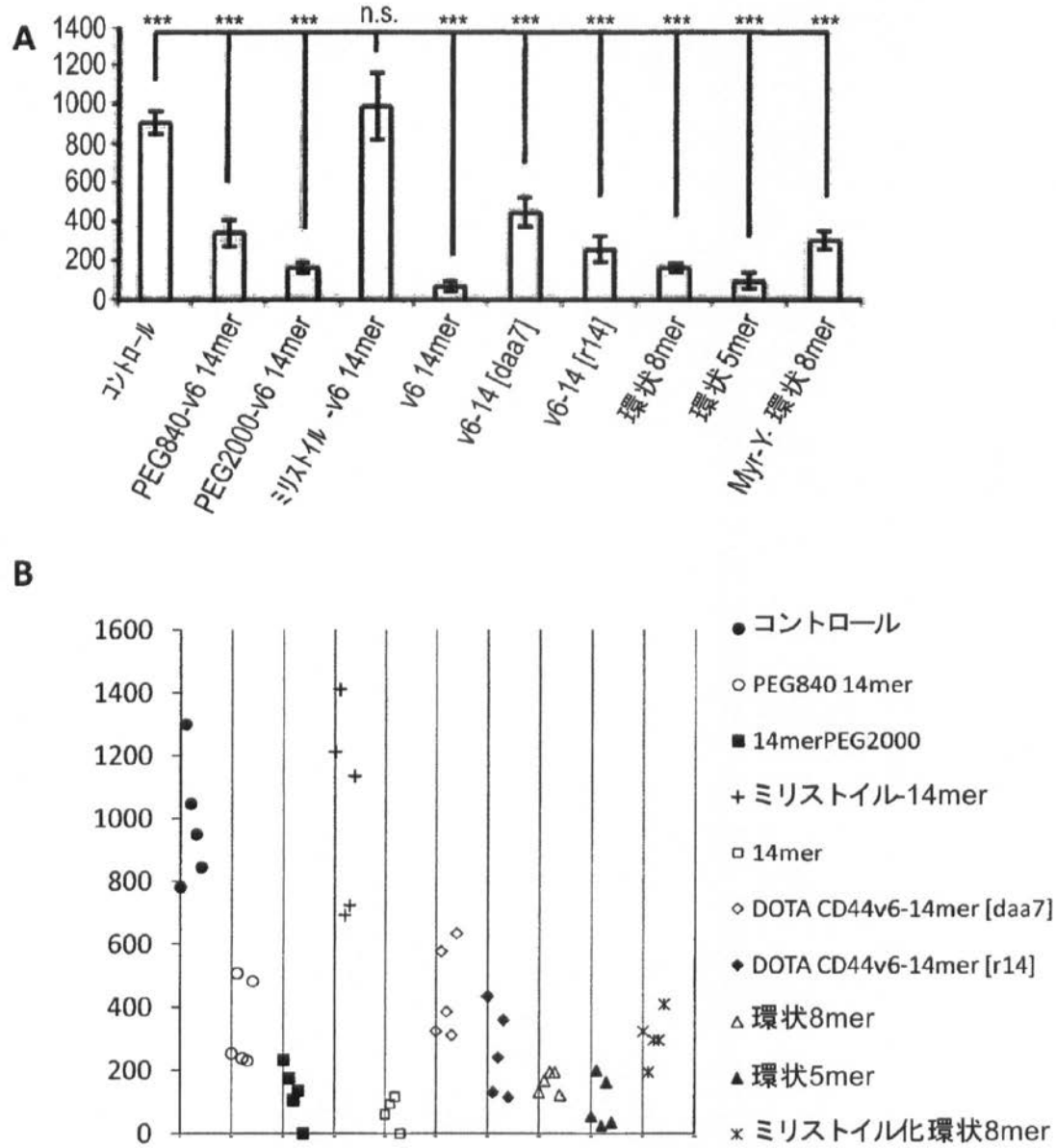
量/注射	0.2 $\mu$ g	2 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g
コントロール 14mer	10	9	10	-
ヒトv6 14mer	4	2	0	-
ヒト環状8mer	-	0	-	0

n=5

**C**

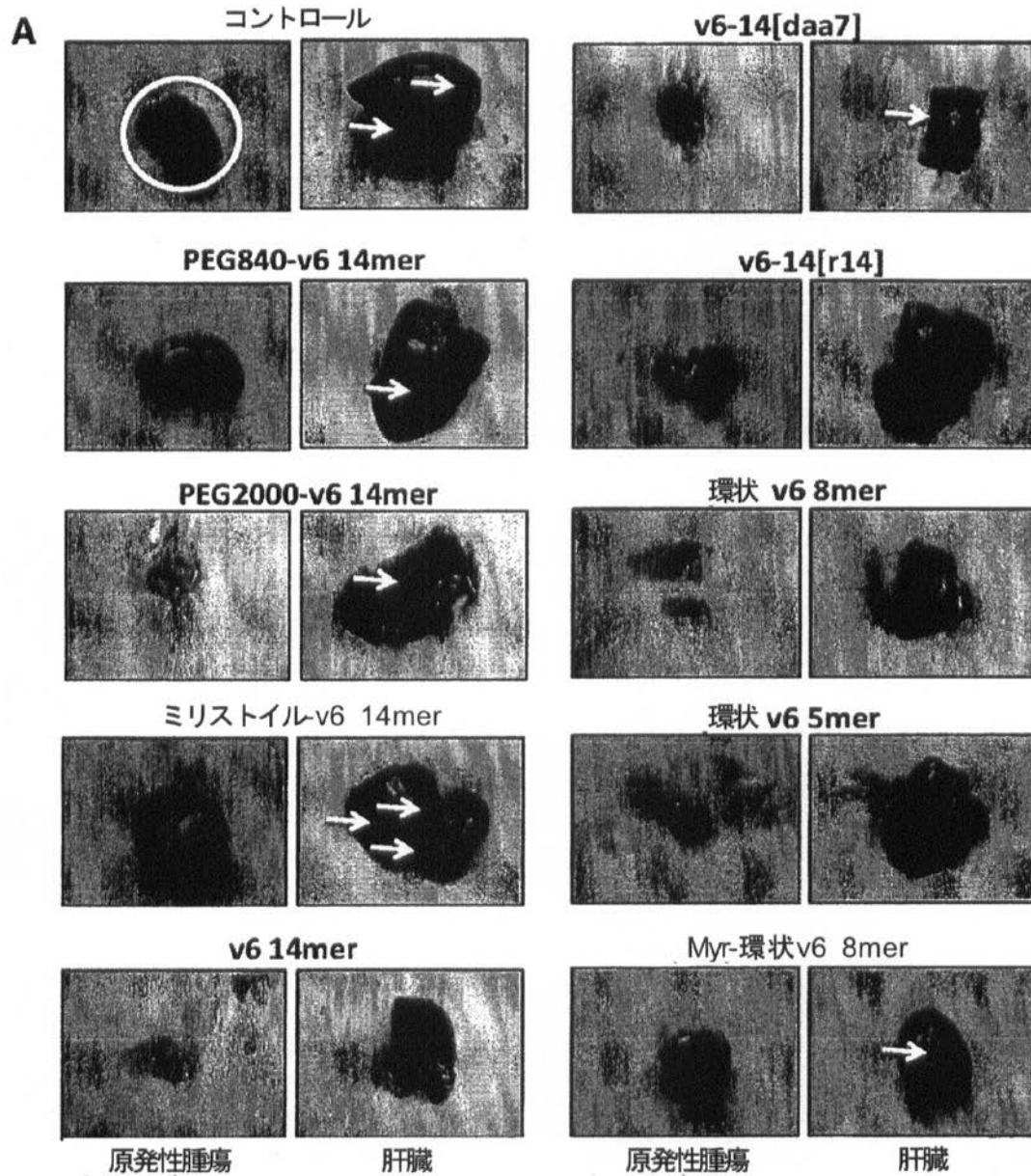
【図 17】

図 17



【図 18 - 1】

図 18



【図 18 - 2】

図 18 (続き)

**B**

群の番号	処理	転移を有する 動物	転移の平均数
1	コントロール	5/5	13
2	PEG840-v6 14mer	2/5	5
3	PEG2000-v6 14mer	1/5	2
4	ミリストイル-v6 14mer	5/5	12
5	v6 14mer	0/5	0
6	v6-14 [daa <sub>7</sub> ]	1/5	2
7	v6-14 [r <sup>14</sup> ]	0/5	0
8	環状8mer	0/5	0
9	環状5mer	0/5	0
10	Myr-Y-環状8mer	3/5	12

【配列表】

2016501857000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/074401

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/17 A61P35/00  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 647 556 A1 (TOPOTARGET GERMANY AG [DE]; KARLSRUHE FORSCHZENT [DE] KARLSRUHER INST) 19 April 2006 (2006-04-19) sequence 2 figures 1-6; examples 1-4 claims tables 1,2 paragraphs [0055] - [0059] -----	1-11
X	EP 2 266 593 A1 (KARLSRUHER INST TECHNOLOGIE [DE]) 29 December 2010 (2010-12-29)	1-11
Y	sequence 2 claims paragraphs [0011] - [0018] paragraph [0005] paragraphs [0046] - [0048] paragraphs [0066] - [0089] ----- -/-	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier application or patent but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2014

Date of mailing of the international search report

27/01/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Camilleri, Alain

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/074401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALEXANDRA MATZKE ET AL: "Cell Migration A Five-Amino-Acid Peptide Blocks Met-and Ron-Dependent", CANCER RESEARCH, 15 July 2005 (2005-07-15), pages 6105-6110, XP055096269, cited in the application	1-11
Y	abstract page 6105, right-hand column, paragraph 2 page 6106, left-hand column, paragraph 2-3 page 6106, left-hand column, paragraph 5 - page 6109, right-hand column, paragraph 3 -----	1-11
X	M. TREMMEL ET AL: "A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis", BLOOD, vol. 114, no. 25, 22 September 2009 (2009-09-22), pages 5236-5244, XP055096616, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2009-04-219204	1-11
Y	abstract page 5236, left-hand column, paragraph 1-3 page 5236, right-hand column, paragraph 4 - page 5237, left-hand column, paragraph 4 page 5242, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 page 5243, right-hand column, last paragraph	1-11
X	ORIAN-ROUSSEAU ET AL: "CD44, a therapeutic target for metastasising tumours", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 46, no. 7, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 1271-1277, XP027027302, ISSN: 0959-8049 [retrieved on 2010-03-19]	1-11
Y	abstract page 1272, right-hand column, paragraph 2 page 1273, right-hand column, last paragraph - page 1274, left-hand column, paragraph 1 page 1274, right-hand column, last paragraph - page 1275, right-hand column, last paragraph figure 2 ----- -/--	1-11



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/074401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 258 255 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]) 20 November 2002 (2002-11-20) abstract paragraphs [0035], [0038] claim 5 sequences 1,2 -----	1-11
X	EP 1 417 974 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]) 12 May 2004 (2004-05-12) abstract sequence 3 paragraph [0054] claims 1-42 -----	1-11
Y	WO 2005/065709 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA [DE]; GARID) 21 July 2005 (2005-07-21) sequence 3 claims page 19, line 8 -----	1-11
X	WO 2011/022335 A1 (SINAI SCHOOL MEDICINE [US]; CT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS [CH];) 24 February 2011 (2011-02-24) abstract paragraphs [0013] - [0015], [0019] - [0025] examples sequence 67 claims -----	1-11
X	EP 1 391 213 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]) 25 February 2004 (2004-02-25) abstract paragraph [0051] claims sequences 2,3 -----	1-11
Y	WO 97/16557 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; KARLSRUHE FORSCHZENT [DE]; HEKELE ARMIN) 9 May 1997 (1997-05-09) page 9; claims 6,25 page 23; sequence 2 page 2, paragraph 4 - page 3, paragraph 1 page 2, paragraph 2 examples -----	1-11
Y	EP 2 218 457 A1 (KARLSRUHER INST TECHNOLOGIE [DE]) 18 August 2010 (2010-08-18) abstract paragraphs [0051] - [0052], [0059] examples claims 1-8; sequence 2 -----	1-11
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/074401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/258998 A1 (TAN PATRICK [SG] ET AL) 11 October 2012 (2012-10-11) abstract claims paragraphs [0055] - [0065] examples	1-11
Y	----- HOFMANN M ET AL: "CD44 SPLICE VARIANTS CONFER METASTATIC BEHAVIOUR IN RATS: HOMOLOGOUS SEQUENCES ARE EXPRESSED IN HUMAN TUMOR CELL LINES1", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 51, no. 19, 1 October 1991 (1991-10-01), pages 5292-5297, XP000472695, ISSN: 0008-5472 abstract page 5292, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 4 page 5296, left-hand column, last paragraph - page 5297, left-hand column, paragraph 1 figure 3 -----	1-11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/074401

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1647556	A1	19-04-2006	AT 468350 T 15-06-2010 DK 1647556 T3 19-07-2010 EP 1647556 A1 19-04-2006 ES 2343797 T3 10-08-2010
EP 2266593	A1	29-12-2010	EP 2266593 A1 29-12-2010 JP 2012530735 A 06-12-2012 US 2012115794 A1 10-05-2012 US 2013109632 A1 02-05-2013 WO 2010149281 A1 29-12-2010
EP 1258255	A1	20-11-2002	AR 035977 A1 28-07-2004 BG 108366 A 30-09-2004 BR 0209862 A 08-06-2004 CA 2443438 A1 28-11-2002 CN 1509187 A 30-06-2004 CO 5550468 A2 31-08-2005 CZ 20033477 A3 12-05-2004 EE 200300568 A 15-04-2004 EP 1258255 A1 20-11-2002 EP 1395290 A2 10-03-2004 HR P20030932 A2 30-04-2004 HU 0400046 A2 28-04-2004 JP 2004529963 A 30-09-2004 KR 20030097883 A 31-12-2003 MX PA03010432 A 02-04-2004 NO 20035108 A 17-11-2003 NZ 530167 A 28-10-2005 PE 10972002 A1 13-02-2003 PL 365480 A1 10-01-2005 SK 15582003 A3 06-04-2004 WO 02094325 A2 28-11-2002 YU P91503 A 25-05-2006 ZA 200307364 A 20-04-2004
EP 1417974	A1	12-05-2004	AU 2003293665 A1 07-06-2004 EP 1417974 A1 12-05-2004 WO 2004041307 A2 21-05-2004
WO 2005065709	A2	21-07-2005	AR 046774 A1 21-12-2005 WO 2005065709 A2 21-07-2005
WO 2011022335	A1	24-02-2011	CA 2771606 A1 24-02-2011 EP 2467491 A1 27-06-2012 JP 2013502421 A 24-01-2013 US 2012207753 A1 16-08-2012 WO 2011022335 A1 24-02-2011
EP 1391213	A1	25-02-2004	AR 041023 A1 27-04-2005 AU 2003264068 A1 11-03-2004 EP 1391213 A1 25-02-2004 EP 1531869 A2 25-05-2005 PE 08962004 A1 15-02-2005 UY 27943 A1 31-03-2004 WO 2004018000 A2 04-03-2004
WO 9716557	A1	09-05-1997	AU 7494696 A 22-05-1997 CO 4520255 A1 15-10-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/074401

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		DE 19540515 C1	06-02-1997	
		WO 9716557 A1	09-05-1997	
		ZA 9609077 A	24-06-1998	
-----				
EP 2218457	A1	18-08-2010	AT 523204 T	15-09-2011
			EP 2218457 A1	18-08-2010
			US 2010305026 A1	02-12-2010
			US 2013072423 A1	21-03-2013
-----				
US 2012258998	A1	11-10-2012	NONE	
-----				

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 0 7 K 7/08 (2006.01) C 0 7 K 7/08

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 オリアン - ルソー , ペロニーク  
フランス国 エフ - 6 7 6 9 0 リッテショフェン , リュ ドゥ ベッシェドルフ , 4 1

(72)発明者 マッケ , アレクサンドラ  
ドイツ国 7 6 7 0 6 デッテンハイム , バルドシュトラッセ 3 イー

(72)発明者 ボンタ , ヘルムト  
ドイツ国 7 6 6 7 6 グラーベン - ノイドルフ , ビスマルクシュトラッセ 6 2

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA16 BA17 BA18 BA23 CA59  
MA52 MA59 MA66 NA14 ZA662 ZB262  
4H045 AA10 BA13 BA14 BA15 BA16 EA20