



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101918433 B

(45) 授权公告日 2013.06.26

(21) 申请号 200880124743.2
 (22) 申请日 2008.11.19
 (30) 优先权数据
 60/996,488 2007.11.20 US
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2010.07.14
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/US2008/084043 2008.11.19
 (87) PCT申请的公布数据
 W02009/067520 EN 2009.05.28
 (73) 专利权人 中央研究院
 地址 中国台湾台北市
 (72) 发明人 吴汉忠 林钦塘 阿尔伯特·洛
 (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 11105
 代理人 岑晓东
 (51) Int. Cl.
 C07K 7/08 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 C07K 16/00 (2006.01)
 A61K 9/127 (2006.01)
 G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件
 CN 1398187 A, 2003.02.19, 全文.
 WO 2006029459 A, 2006.03.23, 全文.
 Du 等. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library. 《Biochemical and Biophysical research communications》. 2006, 第 12 卷 (第 1 期), 956-962.
 Lauren R H 等. The use of phage-displayed peptide libraries to develop tumor-targeting Drugs. 《International Journal of peptide research and therapeutics》. 2006, 第 12 卷 (第 1 期), 79-91.
 Han Cliff 等. Pathogenomic sequence analysis of Bacillus cereus and Bcillus thuringiensis isolates closely related to Bacillus anthracis. 《Journal of Bacteriology》. 2006, 第 188 卷 (第 9 期), 3382-3390.

审查员 尹军团

权利要求书2页 说明书25页
序列表6页 附图9页

(54) 发明名称
 肝细胞癌细胞特异性的肽及其应用

(57) 摘要
 肝细胞癌 (HCC) 是全世界癌症致死的第四位原因。随着对分子肿瘤学认识的增加, 新的治疗策略一直在不断的被研发以治愈此疾病。在此, 我们利用噬菌体展示来鉴定新的肽, 包括 (SP94), 它特异性的结合 HCC 细胞。在体外, 噬菌体克隆 PC94 结合 HCC 细胞系。在体内, PC94 特异性的归巢至携带人 HCC 异种移植物的 SCID 小鼠的肿瘤组织而不归巢至其正常的内脏器官。这种归巢能力可被合成肽 SP94 竞争性的抑制。PC94 定位于肿瘤组织但在 SP94 竞争的肿瘤组织或正常器官中则检测不到。此外, PC94 识别来自 HCC 患者的外科标本中的肿瘤组织但不识别其中的非肿瘤组织, 阳

性率为 61.3% (19/31)。随着 SP94 和脂质体多柔比星的偶联, 靶向药物递送系统通过增强肿瘤凋亡和降低肿瘤血管发生而提高了针对 HCC 异种移植物的治疗效力。我们的结果指示 SP94 能改善晚期 HCC 患者的系统性治疗。

CN 101918433 B

1. 一种多核苷酸,其由 SEQ ID NO :1 组成。
2. 一种多肽,其由 SEQ ID NO :2 组成。
3. 包含第一多肽与第二多肽融合的融合蛋白,其中的第一多肽由权利要求 2 所述多肽组成。
4. 一种偶联物,其包含权利要求 2 所述多肽,其中的多肽与一种或更多种药物偶联。
5. 权利要求 4 的偶联物,其中的一种或更多种药物选自多柔比星、长春瑞滨、长春新碱、帕利他塞、勒托替康、寡核苷酸、毒素、抗 -VEGF 适体以及放射性分子。
6. 与权利要求 2 所述多肽结合的抗体。
7. 包含权利要求 2 所述多肽的脂质体。
8. 权利要求 7 的脂质体,其中的脂质体进一步包含选自多柔比星、长春瑞滨、长春新碱、帕利他塞、勒托替康、寡核苷酸、毒素、抗 -VEGF 适体以及放射性分子的至少一种药物。
9. 权利要求 8 的脂质体,其中的药物是多柔比星。
10. 权利要求 4 所述偶联物在制备用于治疗哺乳动物中的疾病的药物中的用途,其中所述治疗包括对需要治疗的哺乳动物施用治疗有效量的权利要求 4 所述偶联物。
11. 权利要求 10 的用途,其中的哺乳动物是人。
12. 含有一种或更多种药物和权利要求 2 所述多肽的脂质体在制备用于治疗哺乳动物疾病的药物中的用途,其中所述治疗包括对需要治疗的哺乳动物施用治疗有效量的脂质体,该脂质体含有一种或更多种药物和权利要求 2 所述多肽。
13. 权利要求 12 的用途,其中所说的一种或更多种化学治疗药物选自多柔比星、长春瑞滨、长春新碱、帕利他塞、勒托替康、寡核苷酸、毒素、抗 -VEGF 适体以及放射性分子。
14. 权利要求 13 的用途,其中的化学治疗药物是多柔比星。
15. 权利要求 12 的用途,其中的疾病是癌症。
16. 权利要求 15 的用途,其中的癌症是肝癌。
17. 权利要求 16 的用途,其中的肝癌是肝细胞癌。
18. 权利要求 12 的用途,其中的哺乳动物是人。
19. 权利要求 2 所述多肽和 / 或权利要求 6 所述抗体在制备用于检测标本中肝癌的试剂中的用途,其中所述检测包括:
 - a) 在允许权利要求 2 所述多肽结合肝癌细胞的条件下使标本接触所述多肽 ;并
 - b) 用权利要求 6 所述抗体检测所述多肽的结合。
20. 权利要求 3 所述融合蛋白在制备用于检测标本中肝癌的试剂中的用途,其中所述检测包括:
 - a) 在允许权利要求 3 所述融合蛋白结合肝癌细胞的条件下使标本接触所述融合蛋白 ;并
 - b) 用特异针对所述融合多肽某表位的抗体检测该融合蛋白。
21. 鉴定与权利要求 2 所述多肽结合的分子的方法,包括:
 - a) 在允许包含权利要求 2 所述多肽及分子的复合物形成的条件下使细胞提取物与所述多肽接触 ;并
 - b) 对复合物进行分析以鉴定所述分子。
22. 权利要求 2 所述多肽在制备用于在受试者中检测癌症的试剂中的用途,其中所述

检测包括对受试者施用权利要求 2 所述多肽并检测所述多肽与受试者身体中癌症的结合，其中所说的多肽包含标记物。

23. 权利要求 22 的用途，其中的标记物包含放射性分子。

24. 权利要求 22 的用途，其中的受试者是人。

25. 一种药物组合物，其包含权利要求 2 所述多肽、权利要求 3 所述融合蛋白、权利要求 4 或 5 所述偶联物、权利要求 6 所述抗体、或权利要求 7-9 任一项所述脂质体。

26. 权利要求 25 的药物组合物，其进一步包含一种或多种已用于治疗癌症和抑制血管发生的药物。

27. 权利要求 26 的药物组合物，其中所说的一种或多种药物选自长春瑞滨、顺铂、吉西他滨、帕立他塞、依托泊苷、米托蒽醌、放线菌素 D、喜树碱或其水溶性衍生物、氨甲喋呤、丝裂霉素、达卡巴嗪 (DTIC)、环磷酰胺、或抗肿瘤抗生素。

28. 权利要求 27 的药物组合物，其中的丝裂霉素是丝裂霉素 C。

29. 权利要求 27 的药物组合物，其中的抗肿瘤抗生素是多柔比星或道诺霉素。

30. 权利要求 25 的药物组合物，其进一步包含细胞毒性药物、寡核苷酸、毒素或放射性分子。

31. 权利要求 25 的药物组合物，其进一步包含抗 VEGF 适体。

肝细胞癌细胞特异性的肽及其应用

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求 2007 年 11 月 20 日提交的临时申请 60/996,488 的优先权,通过述及将其完整收录。

[0003] 发明背景

[0004] 在全世界范围,肝细胞癌 (HCC) 是第十位最致命的癌症相关杀手。即便是随着外科手术、放射和化学疗法的进步和联合,HCC 的预后依然不佳 (1)。尽管进行了攻击性的常规治疗,在美国肝癌患者的 5 年存活率依然只有 8.9%,这使得此恶性肿瘤成为位于胰腺导管腺癌 (5 年时存活 4.4%) 之后的第二位最致命的癌症 (2)。2005 年,全世界有超过 667,000 例新增肝癌病例,其中 80% 在亚洲和撒哈拉沙漠以南非洲 (3)。随着分子肿瘤学领域的极大进步,新的治疗策略正在不断被研发以试图治愈此疾病。

[0005] 开发肿瘤细胞和非恶性肿瘤对应物的区分得到改进的针对癌症的靶向治疗法是当前抗癌研究的主要目标之一。大多数化疗剂并不优先积聚于肿瘤部位。实际上,到达肿瘤的剂量可能少到仅有积聚于正常器官剂量的 5% -10% (4)。毒性副作用经常限制了抗癌药物的剂量扩大,导致不完全的肿瘤响应、早期的疾病复发及最终形成耐药性。开发了多种方法来改善抗癌药物的选择性毒性,诸如将抗癌药物封装于递送系统中 (5) 及通过与过表达的或独特表达于癌细胞上的抗原或受体结合的单克隆抗体 (6,7) 或肽配体 (8,9) 使抗癌药物瞄准目标。

[0006] 已经调查了药物递送系统 (DDS),诸如基于脂类或聚合物的抗癌纳米医学 (10)。DDS 通常指直径 200nm 或更小的纳米颗粒和微米颗粒,包括脂质体和其它基于脂质的载体,诸如微团、脂质乳剂和脂质-药物复合物;还包括聚合物-药物偶联物及各种配体靶向产品诸如免疫偶联物 (11)。肿瘤脉管系统的超通透性是决定基于聚合物的癌症治疗法成功靶向肿瘤的关键因素之一 (12)。在静脉内施药后,血管发生中的肿瘤脉管系统的“易漏”,据估计平均孔径为 100-600nm (13),允许肿瘤组织中的偶联物选择性外渗。此外,肿瘤组织常常缺乏有效的淋巴排除,这随后促进聚合物滞留。这些因素联合起来导致偶联物在肿瘤组织中积聚-一种被动靶向现象,被 Maeda 命名为“增强的通透性和滞留 (EPR) 效应” (14)。经由脂质体进行的由 EPR 介导的被动肿瘤靶向可导致在实体瘤中的药物浓度相对于游离药物获得的浓度而言升高数倍 (15)。

[0007] DDS 的特殊力量在于它们改变其相关治疗法的药动学和生物分配的潜力 (5)。将聚乙二醇 (PEG) 或其它惰性聚合物与各种治疗性分子偶联可能减少肾脏和网状内皮系统 (RES) 对药物的清除 (16)。对于较大的微粒载体诸如脂质体和聚合物-药物偶联物而言,载体的大小 (通常为直径 50-200nm) 使其主要局限于血液隔室,对正常器官的有害作用较小。

[0008] 现在批准用于胃肠外施用的 DDS 大多包括脂质体或基于脂质的配制剂及与 PEG 连接的治疗性分子,例如 PEG 化的脂质体多柔比星,其用于治疗高度血管发生性肿瘤诸如 AIDS 相关卡波西氏肉瘤,总响应率为 43% 和 59% (17,18)。然而,微粒 DDS 引起药物在肝脏、脾脏和骨髓的单个核吞噬细胞系统细胞中积聚增加,而且存在对这些组织毒性增加的

可能性 (19)。此外,随着循环时间的延长和微粒 DDS 的限制,血液学毒性诸如嗜中性粒细胞减少症、血小板减少症和白细胞减少症也变得明显了 (20)。正努力通过将其与靶向肿瘤细胞和肿瘤脉管系统表面抗原或受体的配体联合来增强 DDS 的位点特异性作用,这一过程称为主动的或配体介导的靶向作用 (8, 21)。此外,正在调查将化疗药物经由亲和靶向作用递送至肿瘤组织 (22, 23)。

[0009] 尽管单克隆抗体已显示出作为肿瘤靶向剂的临床潜力,但抗体由于其大小而造成的肿瘤渗透差及由于非特异性抗体摄取而引起的肝脏 / 骨髓毒性是抗体疗法的两项主要限制。肽靶向剂可能使与抗体癌症疗法相关的问题减轻 (24)。将组合文库展示于微生物上是鉴定肿瘤特异性靶向配体的一种可能策略。

[0010] 噬菌体展示技术已应用于鉴定 B 细胞表位 (25-27)、发现肿瘤细胞 (8, 28, 29) 和肿瘤脉管系统特异性肽 (30-33)。将 DDS 与肿瘤特异性肽联合可能导致多达数千种抗癌药物分子仅仅经由少许靶向配体分子就被递送至肿瘤细胞处。抗癌药物分子在肿瘤部位的持续释放可能也具有治疗优势 (8, 34)。

[0011] 发明概述

[0012] 本公开包括单独的或组合的以下内容等：

[0013] 本公开提供了一种多核苷酸或其变体,其中所说的多核苷酸编码特异于肝细胞癌细胞的肽,并且所说的多核苷酸包含选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :25 和 SEQ ID NO :29 的序列。

[0014] 本公开提供了一种多肽或其变体,其中所说的多肽特异于肝细胞癌细胞,并且所说的多肽包含选自 SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :28 和 SEQ ID NO :30 的序列。在某一实施方案中,所述多肽包含 SP94 (SEQ ID NO :2) 或其变体。在另一实施方案中,所述多肽包含 SP94 (SEQ ID NO :2)。在又一实施方案中,所述多肽包含相连的氨基酸 PILP。

[0015] 本公开提供了包含相融合的第一多肽和第二多肽的融合蛋白,其中所述的第一多肽包含特异于肝细胞癌细胞的多肽。在某一实施方案中,所述的第二多肽包含一个或多个特异于肝细胞癌细胞的多肽 (例如所述多肽是同二聚体、异二聚体或其它多聚体)。在另一实施方案中,所述的第二多肽包含谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 结构域。在又一实施方案中,所述的第二多肽包含 GFP。在另一实施方案中,所述的第二多肽包含免疫学标签。在又一实施方案中,所述的第二多肽包含抗体结构域。在另一实施方案中,所述的抗体结构域是抗体的 Fc 区。

[0016] 本公开提供了多肽或其变体,其中所说的多肽特异于肝细胞癌细胞,并且其中所述多肽或其变体与一种或更多种药物偶联。在某一实施方案中,所述药物选自多柔比星 (doxorubicin)、长春瑞滨 (vinorelbine)、长春新碱 (vincristine)、帕利他塞 (paclitaxel)、勒托替康 (lutotecan)、寡核苷酸、毒素、抗 VEGF 适体及放射性分子。

[0017] 本公开提供了与特异于肝细胞癌细胞之多肽或其变体结合的抗体。

[0018] 本公开提供了包含特异于肝细胞癌细胞之多肽或其变体的脂质体。在某一实施方案中,所述脂质体包含 SP94 (SEQ ID NO :2) 或其变体。在另一实施方案中,所述脂质体包含

SP94(SEQ ID NO :2)。在又一实施方案中,本公开中的脂质体进一步包含至少一种选自多柔比星、长春瑞滨、长春新碱、帕利他塞、勒托替康、寡核苷酸、毒素、抗 VEGF 适体及放射性分子的药物。在另一实施方案中,所述脂质体包含多柔比星。

[0019] 本公开提供了用于治疗哺乳动物中的疾病的方法,包括对需要治疗的哺乳动物施用治疗有效量的特异于肝细胞癌细胞的多肽或其变体,其中所述多肽或其变体与一种或多种选自多柔比星、长春瑞滨、长春新碱、帕利他塞、勒托替康、寡核苷酸、毒素、抗 VEGF 适体及放射性分子的药物偶联。在某一实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0020] 本公开提供了用于治疗哺乳动物中的疾病的方法,包括对需要治疗的哺乳动物施用治疗有效量的包含一种或多种药物和特异于肝细胞癌细胞的多肽或其变体的脂质体。在某一实施方案中,所述脂质体包含的多肽包含 SEQ ID NO :2 或其变体。在另一实施方案中,所述脂质体包含的多肽包含 SEQ ID NO :2。在又一实施方案中,所述的脂质体包含一种或多种药物,包括多柔比星、长春瑞滨、长春新碱、帕利他塞、勒托替康、寡核苷酸、毒素、抗 VEGF 适体及放射性分子。在某一实施方案中,所述脂质体包含多柔比星。在另一实施方案中,所述的脂质体包含 SEQ ID NO :2 或其变体及多柔比星。在另一实施方案中,所述的脂质体包含 SEQ ID NO :2 和多柔比星。在另一实施方案中,所述疾病是癌症。在又一实施方案中,所述癌症是肝癌。在另一实施方案中,所述肝癌是肝细胞癌。在另一实施方案中,所述哺乳动物是人类。

[0021] 本公开提供了用于在标本中检测肝癌的方法,包括:a) 在允许下述多肽与肝癌细胞结合的条件下使标本接触特异于肝细胞癌细胞的多肽或其变体;并 b) 用结合所述多肽的抗体检测该多肽的结合。在某一实施方案中,所述多肽或其变体构成融合多肽,该融合蛋白包含特异于肝细胞癌之多肽和包含表位的另一序列。可利用结合所述表位的抗体来检测所述融合多肽对肝细胞癌细胞的结合。

[0022] 本公开提供了鉴定与特异于肝细胞癌细胞之多肽或其变体结合的细胞分子的方法,包括:a) 在允许包含所述多肽或其变体和所述分子的复合物形成的条件下使细胞提取物接触所述多肽或其变体;并 b) 分析所述复合物以鉴定所述细胞分子。在某一实施方案中,所述细胞分子驻留在肝细胞癌细胞表面上并结合所述多肽或其变体。

[0023] 本公开提供了本公开之多核苷酸的变体,其中所述的变体多核苷酸与选自以下的多核苷酸的互补物杂交:SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :25 和 SEQ ID NO :29。在某一实施方案中,所述多核苷酸在严谨条件下杂交。

[0024] 本公开提供了本公开之多肽的变体,其中所述的变体多肽由与选自以下的多核苷酸的互补物杂交的多核苷酸编码:SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :25 和 SEQ ID NO :29。在某一实施方案中,所述多核苷酸在严谨条件下杂交。

[0025] 本公开提供了用于检测受试者中的癌症的方法,包括对受试者施用本公开的多肽,其中所说的多肽包含标记物,并检测所述多肽对受试者中癌症的结合。在某一实施方案中,所述的标记物包含放射性分子。在另一实施方案中,所述癌症是肝癌。在另一实施方案

中,所述肝癌是肝细胞癌。在另一实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在又一实施方案中,所述哺乳动物是人类。

[0026] 附图和附表简述

[0027] 本专利或申请文件包含至少一幅制成彩色的图。带彩图的本专利或专利申请公开文本的副本在提出请求并支付必要费用后由专利局提供。

[0028] 图 1。利用体外噬菌体展示分离 HCC 细胞特异性噬菌体。

[0029] 图 2A-D。PC94 对 HCC 细胞系和人 HCC 活组织检查标本的结合活性。

[0030] 图 3A-C。在体内 PC94 的肿瘤归巢活性的证实。

[0031] 图 4A-D。在 HCC 异种移植模型中靶向肽 SP94 的偶联提高了治疗效力并降低了脂质体多柔比星的血液学毒性。

[0032] 图 5A-D。SP94-Lipo-Dox 处理的 HCC 异种移植物的组织病理学检查。

[0033] 图 6A-E。用 SP94-Lipo-Dox 处理携带较大 HCC 异种移植物的 SCID 小鼠。

[0034] 图 7。经由 FACS 对选定的噬菌体克隆的结合活性的剂量依赖性分析。

[0035] 图 8。PC88 和 94 在体内的肿瘤归巢活性的证实。

[0036] 表 1 提供了来自选自 Mahlavu 细胞的噬菌体的噬菌体展示多肽序列。

[0037] 表 2 提供了编码本公开之多肽的多核苷酸序列。

[0038] 发明详述

[0039] 在世界范围, HCC 是第五位最常见的癌症并且排名第四位癌症死亡原因 (1)。唯一有疗效的治疗方法是外科切除术或肝脏移植, 而且只有少数患者符合这些规程的条件 (36)。大多数处于晚期的 HCC 不再能进行有疗效的治疗。针对晚期 HCC 的全身性化学疗法, 或是作为单药疗法或是组合的, 在过去 30 年里都已经广泛研究并且被普遍认为是无效的 (36)。提高全身性治疗的效力并挑选那些会从中受益的患者仍然是一项主要的挑战。我们报道了经由噬菌体展示筛选鉴定的新型靶向肽、特异于肝细胞癌细胞的多肽、及利用所述肽开发针对 HCC 的靶向药物递送。

[0040] 首先, 我们使用噬菌体展示肽库来鉴别新的肽, 它们在体外和体内都能特异性地结合 HCC 细胞。SP94 就是这样一种肽。此外, 编码 SP94 的噬菌体 PC94 识别来自 HCC 患者的外科手术标本中的肿瘤组织表面但不识别正常的对应物。将靶向肽 SP94 与含有多柔比星的脂质体偶联提高了在 HCC 异种移植模型中的治疗效力。SP94 肽由此能改善晚期 HCC 的系统性治疗。

[0041] I. 定义

[0042] 如下文所列, 本文中所使用的术语具有它们的常规含意, 并且还可根据本说明书的上下文做进一步的理解。

[0043] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核酸”、“核酸分子”、“核酸序列”、“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”在本文中可互换使用来意指任何长度的核苷酸聚合形式。多核苷酸可包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和 / 或它们的类似物或衍生物。本文所示的核苷酸序列按 5' 至 3' 的方向列出。

[0044] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用, 意指任何长度的氨基酸聚合形式。

[0045] 术语“变体”包括本公开中多核苷酸或多肽序列中的插入、添加、删除或替代, 其中

所说的变体是对肝细胞癌细胞特异性的。

[0046] 短语“实质上相同”、“实质上相似”意味着所述的相关氨基酸或核苷酸序列相较于所公开的序列而言相同或者具有非实质性的差异（通过保守的氨基酸替代）。

[0047] 对于多肽而言，在最初的多肽和与该最初形式实质上相同的变体多肽之间至少 10、20、30、50、100 或更多个氨基酸将被加以比较。对于核酸而言，在最初的核酸和与该最初形式实质上相同的变体核酸之间至少 30、40、50、100、150、300 或更多个核苷酸将被加以比较。因此，某一变体可在某一区域或几个区域实质上相同，但在其它区域有所不同，而仍然符合“实质上相同”的定义。两条序列之间的百分比同一性是通过标准的比对算法确定的，诸如例如 Altschul 等, *J. Mol. Biol.*, 215 :403-410(1990) 中所述的基本局部比对工具 (Basic Local Alignment Tool (BLAST)), Needleman 等, *J. Mol. Biol.*, 48 :444-453(1970) 的算法, 或 Meyers 等, *Comput. Appl. Biosci.*, 4 :11-17(1988) 的算法。

[0048] 术语“脂质体”意指包含围绕内部水性空间的外部脂质双层或多层膜的组合物。该术语包括多薄层状脂质体, 它通常直径在大约 1 个至大约 10 个微米的范围内, 并且包含与水相层交替的两个至数百个同心脂质双层。该术语包括由单一脂质层构成的单薄层囊泡, 并且通常直径在大约 20 至大约 400 纳米 (nm)、大约 50 至大约 300nm、大约 300 至大约 400nm、或者大约 100 至大约 200nm 的范围内。该术语还包括直径大约 65nm 至大约 75nm 的脂质体。

[0049] 术语“抗体”指免疫球蛋白或其片段, 而且涵盖包含抗原结合片段或抗原结合域的任何多肽。该术语包括但不限于多克隆的、单克隆的、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化的、人 (源) 的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂合的、突变的、嫁接的和体外产生的抗体。除非在前面加上了“完整的”一词, 否则术语“抗体”包括抗体片段诸如 Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv、scFv、Fd、dAb 和保持抗原结合功能的其它抗体片段。通常, 这样的片段会包含抗原结合域。

[0050] 术语“抗原结合域”和“抗原结合片段”指包含负责抗体和抗原之间特异性结合的氨基酸的抗体分子部分。被抗体特异识别并结合的抗原部分被称为“表位”, 它可以是或者可以不是多肽中毗邻序列的氨基酸残基, 并且它可包含糖和 / 或具有其它化学结构的分子。抗原结合域可包含抗体轻链可变区 (V_L) 和抗体重链可变区 (V_H); 然而, 它不是必须两者都包含的。例如, Fd 片段具有两个 V_H 区并且经常保留完整抗原结合域的某些抗原结合功能。抗体的抗原结合片段的例子包括 (1) Fab 片段, 即具有 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域的单价片段; (2) $F(ab')_2$ 片段, 即具有由铰链区处二硫桥相联接之两个 Fab 片段的二价片段; (3) 具有两个 V_H 和 C_H1 结构域的 Fd 片段; (4) 具有抗体单臂之 V_L 和 V_H 结构域的 Fv 片段; (5) dAb 片段 (Ward et al., (1989) *Nature* 341 :544-546), 它具有 V_H 结构域; 及 (6) 分离的互补决定区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 是由分开的基因编码的, 但利用重组方法可将它们接合起来, 通过合成的接头使它们能够成为单一的蛋白链, 其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子 (称为单链 Fv (scFv); 参阅例如 Bird et al. (1988) *Science* 242 :423-426; 和 Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :5879-5883)。这些抗体片段可利用本领域技术人员已知的常规技术获得, 并且所说片段可被筛选以与完整抗体相同的方式发挥效用。

[0051] 术语“特异性杂交”在多核苷酸的上下文中指在严谨条件下杂交。提高 DNA/DNA 和

DNA/RNA 这两种杂交反应的严谨性的条件是本领域普遍已知并已发表的。严谨的杂交条件的例子包括在 4X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中于大约 65-70°C 杂交, 或者在 4X SSC 加 50% 甲酰胺中于大约 42-50°C 杂交, 随后在 1X SSC 中于大约 65-70°C 清洗一次或多次。

[0052] 当所述的肽与肝细胞癌细胞结合或相互作用但不与其它细胞显著结合或相互作用时, 该肽是对肝细胞癌细胞“特异性的”。

[0053] 术语“配体”指结合另一分子的分子, 包括受体。

[0054] “宿主细胞”是可以成为或已经成为任何重组载体或分离的多核苷酸的接受者的个体细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单一宿主细胞的后代, 并且所述后代可以由于天然的、意外的或蓄意的突变和 / 或改变而不必与最初的亲本细胞完全相同 (在形态学上或在全部 DNA 互补物中)。宿主细胞包括经本公开之重组载体或多核苷酸体内或体外转染或感染的细胞。包含本公开之重组载体的宿主细胞可被称为“重组宿主细胞”。

[0055] “标本”是自患者衍生的任何生物学标本。此术语包括但不限于生物学流体诸如血液、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、泪液、唾液、淋巴、透析液、灌洗液、精液和其它液体样品, 以及生物学来源的细胞和组织。该术语还包括细胞或自其衍生的细胞及其后代, 包括培养的细胞、细胞上清液和细胞溶胞物。它进一步包括器官或组织培养衍生的液体、组织活检样品、肿瘤活检样品、大便样品、和自生理学组织提取的液体、以及自实体组织离解的细胞、组织切片和细胞溶胞物。此定义涵盖在获取之后以任何方式被操作的样品, 诸如用试剂处理、增溶、或针对特定组分 (诸如多核苷酸或多肽) 富集。还包括在此术语中的是患者样品的衍生物和级分。患者样品可用于诊断、预后或其它监测测定法。该术语还应用于来自非人哺乳动物的生物学标本。所述标本可来自人患者或非人哺乳动物。

[0056] 如本文中所使用的, “治疗”涵盖针对包括人在内的哺乳动物中的疾病的治疗法的任何施用或应用, 而且包括抑制疾病、阻止其发展、或减缓病情, 例如通过引起消退, 或者恢复或修复丢失的、缺少的或有缺陷的功能, 或者刺激无效的过程。该术语包括获得期望的药理学和 / 或生理学效果, 涵盖对包括人在内的哺乳动物的病理学状况或病症的任何处理。所述的效果从完全或部分预防病症或其症状的角度而言可以是预防性的, 和 / 或从部分或完全治愈病症和 / 或由其造成之有害影响的角度而言可以是治疗性的。因此, 本公开既提供了治疗法也提供了预防法。它包括 (1) 预防病症在可能易患该病症但尚未有症状的受试者中发生或复发, (2) 抑制病症, 诸如阻止它的发展, (3) 停止或终止病症或至少其相关症状, 以便宿主不再受所述病症或其症状之苦, 诸如引起所述病症或其症状的消退, 例如, 通过恢复或修复丢失的、缺少的或有缺陷的功能, 或者刺激无效的过程, 或 (4) 解除、减轻或改善病症或其相关症状, 其中改善在广义上用于指至少某个参数量值 (诸如炎症、疼痛和 / 或肿瘤大小) 的减小。

[0057] “药学上可接受载体”指非毒性的固体、半固体或液体填充物、稀释剂、封装材料、配方助剂或任一常规类型的赋形剂。药学上可接受载体在所采用的剂量和浓度上是对接受者无毒的, 并且是与配方中的其它成分相容的。

[0058] “组合物”在此指通常包含载体诸如本领域常规的且适合出于治疗、诊断或预防目的施用于受试者的制药学可接受载体或赋形剂的混合物。它可以包括细胞培养物, 其中多肽或多核苷酸存在于所述细胞或培养液中。例如, 适于口服施用的组合物可形成溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放配制剂、漱口水或粉剂。

[0059] “疾病”指需要医疗干预或想要医疗干预的任何状况、感染、病症或综合征。这样的医疗干预可包括治疗、诊断和 / 或预防。

[0060] “癌症”是任何异常的细胞或组织生长,例如肿瘤,无论是恶性的、恶性前的或非恶性的。其特征在于细胞不受控制的增殖,它们可以侵入或可以不侵入周围组织并因此可以转移或可以不转移至新的身体部位。癌症 (cancer) 涵盖癌 (carcinoma), 它们是上皮细胞的癌症, 癌包括鳞状细胞癌、腺癌、黑素瘤和肝癌 (hepatoma)。癌症还涵盖肉瘤, 它们是间充质起源的肿瘤, 肉瘤包括骨源性肉瘤、白血病和淋巴瘤。癌症可涉及一种或多种新生物细胞类型。术语癌症包括肺癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌和口腔癌。

[0061] II. 本公开的特异于肝细胞癌细胞的多肽

[0062] 本公开提供了多核苷酸或其变体, 其中所说的多核苷酸编码特异于肝细胞癌细胞的多肽, 并且所说的多核苷酸包含选自以下的序列: SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :25 和 SEQ ID NO :29。

[0063] 本公开提供了多肽或其变体, 其中所说的多肽是特异于肝细胞癌细胞, 并且所说的多肽包含选自以下的序列: SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :28 和 SEQ ID NO :30。在某一实施方案中, 所述多肽包含 SP94 (SEQ ID NO :2) 或其变体。在另一实施方案中, 所述多肽包含 SP94 (SEQ ID NO :2)。

[0064] A. 变体

[0065] 变体包括所述肽的生物学活性变体, 其中包括在结构上实质相似或实质相同的变体。肽序列的变体可包括相较于主体肽而言的插入、添加、删除或替代。多肽序列的变体包括生物学活性多态变体。

[0066] 本公开之核苷酸和多肽的变体包括例如, 那些在序列上与所公开的核酸分子和多肽至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98% 或至少约 99% 相同的。

[0067] 本公开之核苷酸和多肽的变体包括例如, 那些在序列上与所公开的核酸分子和多肽至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98% 或至少约 99% 相似的。

[0068] 本公开之多肽的变体包括相较于表 1 中所提供的序列而言具有 1、2、3、4、5、6 个或更多处插入、添加、删除或替代的变体。在某一实施方案中, 所述变体相较于表 1 中所提供的序列而言包含 1、2、3、4、5、6 个或更多处插入、添加、删除或替代, 其中所述的插入、添加、删除或替代不改变表 1 中针对该序列粗体指示的氨基酸。在另一实施方案中, 所述变体包含来自单一序列并在表 1 中以粗体指示的氨基酸。

[0069] 本公开之多核苷酸的变体包括相较于表 2 中所提供的序列而言具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18 处插入、添加、删除或替代的变体。在某一实施方案中, 所述变体相较于表 2 中所提供的序列而言包含插入、添加、删除或替代, 其中所述的

插入、添加、删除或替代不改变编码表 1 中针对该序列粗体指示之氨基酸的核苷酸。在另一实施方案中,所述变体包含编码来自单一序列并在表 1 中以粗体指示之氨基酸的核苷酸。

[0070] 肽变体可包括编码和非编码氨基酸、化学或生化修饰、衍生或设计 (designer) 氨基酸、氨基酸类似物、肽膜似物 (peptidomimetic) 和酯肽 (depsipeptide), 及具有修饰的、环状的、双环的、缩环的 (depsicyclic) 或缩双环的 (depsibicyclic) 肽主干的多肽。变体包括单链蛋白质以及多聚体。

[0071] 本公开之肽的变体可包括天然存在的和非天然存在的氨基酸。变体可包含 D 型氨基酸、D 型和 L 型氨基酸的组合、及各种“设计”或“合成”氨基酸 (例如, β -甲基氨基酸、 $C\alpha$ -甲基氨基酸和 $N\alpha$ -甲基氨基酸等等) 来传达特殊特性。此外,变体可以是环状的。为了引人特殊构象基序,变体可以包括非经典氨基酸。任何已知的非经典氨基酸都可使用。可将氨基酸类似物和肽模拟物掺入肽中以诱导或促成特殊的二级结构,包括但不限于 LL-Acp (LL-3-氨基-2-propenidone-6-羧酸)、 β -转角诱导二肽类似物、 β -片层诱导类似物、 β -转角诱导类似物、 α -螺旋诱导类似物、 γ -转角诱导类似物、Gly-Ala 转角类似物、酰胺键等排物或 tretrazol、等等。

[0072] 可将脱氨基或脱羧基残基掺入所述变体的末端,以便没有末端氨基或羧基基团,从而降低对蛋白酶的易感性或约束构象。C-末端官能团包括酰胺、酰胺低级烃/烷基、酰胺二 (低级烃/烷基)、低级烃/烷氧基、羟基和羧基及其低级酯衍生物,及其药学可接受盐。

[0073] 此外,如果需要,还可将非经典氨基酸或化学氨基酸类似物作为替代或添加而引入多肽序列中。非经典氨基酸包括但不限于常见氨基酸的 D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、b-丙氨酸、氟-氨基酸、设计氨基酸诸如 b-甲基氨基酸、Ca-甲基氨基酸、Na-甲基氨基酸和通常的氨基酸类似物。此外,所述氨基酸可以是 D 型 (右旋的) 或 L 型 (左旋的)。

[0074] 变体包括与本公开之肽实质上相似的多核苷酸序列。这样的变体可由与本公开之多核苷酸的互补物杂交的核酸编码。

[0075] B. 融合蛋白和偶联物

[0076] 本公开提供了包含相融合的第一多肽和第二多肽的融合蛋白,其中所述的第一多肽包含特异于肝细胞癌细胞的多肽。所述的第二肽选自但不限于谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)、异源氨基酸序列诸如生物发光蛋白质,例如萤光素或水母发光蛋白 (绿色荧光蛋白),具有异源或同源前导序列。所述融合蛋白可包含 N-末端甲硫氨酸残基、PEG 化蛋白质和带免疫学标签的或带 HIS 标签的蛋白质。这样的融合蛋白还包括与表位的融合。这样的融合蛋白可包含本公开之肽的多聚体,例如同二聚体或同多聚体及异二聚体和异多聚体。

[0077] 可将本公开之肽与标记物偶联,诸如但不限于 FITC;生物素;和放射性同位素,包括但不限于 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{137}Cs 、 ^{186}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{241}Am 和 ^{244}Cm ;具有可检测产物的酶 (例如萤光素酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶,等等);荧光剂和荧光标记物;发射荧光的金属,例如 ^{152}Eu 或其它镧系元素;电化学发光化合物、化学发光化合物,例如鲁米诺、异鲁米诺或吖啶盐;特异性结合分子,例如磁性颗粒、微球体、纳米球体、等等。本公开之肽可与治疗剂偶联,诸如长春瑞滨 (vinorelbine)、顺铂

(cisplatin)、吉西他滨 (gemcitabine)、帕利他塞 (paclitaxel)、依托泊苷 (etoposide)、能灭瘤 (Novantrone) (米托蒽醌 (mitoxantrone))、放线菌素 D、喜树碱 (camptothecin) (或其水溶性衍生物)、氨甲喋呤 (methotrexate)、丝裂霉素 (mitomycin) (例如丝裂霉素 C)、达卡巴嗪 (dacarbazine) (DTIC)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、及抗肿瘤抗生素诸如多柔比星 (doxorubicin) 和道诺霉素 (daunomycin), 或其它例如文献 (De Vita et al., 2001) 中所述的治疗剂。肽还可与细胞毒性药物、寡核苷酸、毒素和放射性分子或诸如文献 (Ng et al., 2006) 中所述的抗 VEGF 适体等化合物偶联。

[0078] III. 特异于肝细胞癌细胞的多肽的制备方法

[0079] 本公开的肽可用本领域已知方法产生。基于细胞的方法和无细胞的方法都适于产生本公开的肽。基于细胞的方法通常包括在体外将核酸引入宿主细胞并在适合表达的条件下培养该宿主细胞, 然后自培养液中或者通过例如破裂宿主细胞的方式自宿主细胞中或者自这两者中收获所述的肽。适当的宿主细胞包括原核或真核细胞, 包括例如细菌、酵母、真菌、植物、昆虫和哺乳动物细胞。

[0080] 本公开还提供了用本领域众所周知的无细胞体外转录 / 翻译方法产生肽的方法。

[0081] 通常, 异源肽, 无论被修饰或未被修饰, 都可如上所述自己表达或者作为融合蛋白表达, 而且可以不仅包括分泌信号, 还包括分泌的前导序列。本公开之分泌前导序列可指引某些蛋白质到达内质网 (ER)。ER 将膜结合的蛋白质与其它蛋白质分开。一旦定位至 ER, 蛋白质可进一步被指引至高尔基体以分配至囊泡, 包括分泌小泡、质膜、溶酶体及其它细胞器。

[0082] 此外, 可将肽模块和 / 或纯化标签加至所述肽。这样的区域可在所述多肽的最终制备之前去除。为了分泌或排泄、提高溶解度、及方便纯化及其它原因而添加肽模块至多肽是本领域所熟悉和常规的技术。适当的纯化标签包括例如 V5、多组氨酸、亲和素和生物素。肽与诸如生物素等化合物的偶联可利用本领域众所周知的技术来完成 (Hermanson 编 (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press)。也可利用本领域已知的技术将肽与放射性同位素、毒素、酶、荧光标记物、胶体金、核酸、长春瑞滨和多柔比星偶联 (Hermanson 编 (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press; Stefano et al. (2006))。毒素包括免疫毒素。Kreitman and Pastan, *Immunotoxins in the treatment of hematologic malignancies. Curr Drug Targets. 7:1301-11* (2006)。

[0083] 适合用于本公开的融合配偶包括例如胎球蛋白、人血清清蛋白、Fc 和 / 或它们的一种或多种片段。此外还提供了诸如聚乙二醇偶联物等偶联的蛋白质。

[0084] 本公开的肽还可利用本领域已知的技术化学合成 (例如参阅 Hunkapiller et al., *Nature*, 310:105111 (1984); Grant 编 (1992) *Synthetic Peptides, A Users Guide*, W. H. Freeman and Co.; 美国专利 No. 6, 974, 884)。例如, 与某多肽的片段对应的多肽可通过使用肽合成仪或者通过使用本领域已知的固相方法进行合成。

[0085] 本公开的多肽可用标准方法回收和纯化自化学合成和重组细胞培养物, 所述的标准方法包括但不限于硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟磷灰石层析和凝集素层析。最优选的是采用高效液相层析 ("HPLC") 进行纯化。当多肽在分离和 / 或纯化期间变性时可采用众所周知用于蛋白质再折叠的技术以便重建活性构象。

[0086] 本公开的肽或肽模拟物可被修饰或共价偶联一个或多个多种亲水性聚合物以提高所述肽的溶解度和循环半衰期。适合用于与肽偶联的非蛋白质亲水性聚合物包括但不限于聚炔 / 烷基醚例如聚乙二醇和聚丙二醇、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氧化烯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素和纤维素衍生物、右旋糖苷 (dextran) 和右旋糖苷衍生物。通常, 这样的亲水性聚合物的平均分子量的范围为大约 500 至大约 100,000 道尔顿、大约 2,000 至大约 40,000 道尔顿、或者大约 5,000 至大约 20,000 道尔顿。可用以下文献所提出的任何方法将肽衍生或偶联这样的聚合物: Zallipsky, S. (1995) *Bioconjugate Chem.*, 6:150-165; Monfardini, C., et al. (1995) *Bioconjugate Chem.* 6:62-69; 美国专利 No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; 4,179,337 或 W095/34326。

[0087] IV. 抗体的产生

[0088] 本公开的分离的蛋白质可通过本领域普遍已知的抗体产生方法用于产生抗体, 或者单克隆的或者多克隆的。因此, 本公开还包括针对特异于肝细胞癌细胞的肽的抗体。抗体包括阻断活性的抗体和不阻断活性的抗体。

[0089] 可通过例如传统的杂交瘤技术 (Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-499 (1975))、重组 DNA 方法 (例如美国专利 No. 4,816,567) 或使用抗体文库的通过噬菌体展示技术 (Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)) 来制备抗体。有关各种抗体制备技术参阅 *Antibodies: A Laboratory Manual*, 编 Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)。

[0090] 本公开的抗体可用于治疗下文所述的疾病。抗体还可用于所述的检测测定法和方法中。

[0091] V. 脂质体的制备

[0092] 用于制备脂质体的多种方法是本领域所已知的, 其中几种可参阅 Lichtenberg and Barenholz, 于 *Methods of Biochemical Analysis*, 33 卷, 337-462 (1988)。可如前所述通过薄膜水合和重复挤压的标准方法的联合制备小的单层囊泡 (SUV, 尺寸 < 100nm) (Tseng et al., 1999)。特别涉及通过脂质体封装 DNA 的制备方法以及直接应用于脂质体介导的转染的方法可参阅 Hug and Sleight et al (1991)。制备脂质体的方法还披露于美国专利 No. 6,355,267 和美国专利 No. 6,663,885 中。可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物通过反相蒸发方法产生脂质体。通过限定孔径的滤器挤出脂质体以产生具有期望直径的脂质体。

[0093] 脂质体还可购自诸如 Taiwan Liposome Company (Taipei, Taiwan) 等来源。别的商品化脂质体包括 TLC-D99、Lipo-Dox、Doxil、DaunoXome、AmBisome、ABELCET、transfectace (DDAB/DOPE)、DOTAP/DOPE 和 Lipofectin。

[0094] 本公开的脂质体最常见的是制备自磷脂, 但分子形状和尺寸类似且同时具有疏水和亲水模块的其它分子也可使用。就本公开的目的而言, 所有这样的适合形成脂质体的分子在此都被称为脂质。一种或更多种天然存在和 / 或合成的脂质化合物可用于所述脂质体的制备。

[0095] 脂质体可以是阴离子的、阳离子的或者中性的, 这取决于亲水基团的选择。例如, 当使用具有磷酸根或硫酸根基团的化合物时, 所产生的脂质体将会是阴离子型的。当使用含氨基的脂质时, 脂质体将带正电荷, 并将是阳离子脂质体。

[0096] 适于形成本公开中可用之初始脂质体的代表性磷脂或脂质化合物包括但不限于磷脂相关材料诸如磷脂酰胆碱（卵磷脂）、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇-胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺（脑磷脂）、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、磷酸双十六酯、磷脂酰胆碱和二棕榈酰-磷脂酰甘油（dipalmitoyl-phosphatidylglycerol）。别的不含磷的脂质包括但不限于硬脂酰胺、十二烷胺（dodecylamine）、十六烷胺（hexadecyl-amine）、乙酰基棕榈酸酯（acetyl palmitate）、蓖麻油酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、兼性丙烯酸类聚合物、脂肪酸、脂肪酸酰胺、胆固醇、胆固醇酯、二酰甘油、琥珀酸二酰甘油酯（diacylglycerolsuccinate）、等等。

[0097] 用于本公开的脂质体制备物包括阳离子的（带正电荷的）、阴离子的（带负电荷的）和中性的制备物。

[0098] 将化合物远程装载入脂质体采用跨膜梯度的形成（Ceh and Lasic, 1995）。此方法包括将要装载入脂质体的化合物和硼酸化合物与悬浮的脂质体一起温育，由此完成所述化合物在脂质体内的聚集（Zalipsky et al., 1998 ; Ceh B. and Lasic D. D., 1995 ; Zalipsky et al 1998 ; 美国专利 No. 6, 051, 251）。

[0099] 可用磷酸盐测定法来测定脂质体浓度。一种磷酸盐测定法是以钼酸盐和孔雀石绿色染料之间的相互作用为基础的。主要原理包括无机磷酸盐与钼酸盐反应形成无色的未还原的磷钼酸盐复合物，该复合物在酸性条件下被还原时转变成蓝色复合物。在与孔雀石绿复合时磷钼酸盐颜色增强 20 或 30 倍。终产物即还原的绿色可溶性复合物通过其在 620nm 的吸光度来测量，并且是对溶液中无机磷酸盐的直接测量。

[0100] VI. 药物组合物的制备

[0101] 本公开的脂质体、肽和抗体可包含一种或多种广泛种类的已用于治疗癌症和抑制血管发生的药物，它们包括但不限于长春瑞滨、顺铂、吉西他滨、帕利他塞、依托泊苷、能灭瘤（米托蒽醌）、放线菌素 D、喜树碱（或其水溶性衍生物）、氨甲喋呤、丝裂霉素（例如丝裂霉素 C）、达卡巴嗪（DTIC）、环磷酰胺、及抗肿瘤抗生素诸如多柔比星和道诺霉素，或其它例如文献（De Vita et al., 2001）中所述的药物。脂质体、肽和抗体还可包含细胞毒性药物、寡核苷酸、毒素和放射性分子。脂质体、肽和抗体还可包含化合物诸如文献（Ng et al, 2006）中所述的抗 VEGF 适体。

[0102] 在某些实施方案中，所述的脂质体、肽或抗体在具有药学可接受载体、赋形剂和稀释剂的配制剂中提供，其中的广泛种类是本领域所已知的。这些药学载体、赋形剂和稀释剂包括 USP 药学赋形剂列表上所列出的那些。USP 和 NF 赋形剂列于产品目录第 2404-2406 页，USP 24 NF 19, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, Md. (ISBN 1-889788-03-1)。公众容易获取药学可接受赋形剂诸如媒介、佐剂、载体或稀释剂。此外，药学可接受辅助物质诸如 pH 调节和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等等是公众容易获取的。

[0103] 适当的载体包括但不限于水、右旋糖、甘油、盐水、乙醇及其组合。所述载体可包含别的试剂诸如湿润或乳化剂、pH 缓冲剂、或增强配制剂效力的佐剂。表面载体包括液态石油、棕榈酸异丙酯、聚乙二醇、乙醇（95%）、聚氧乙烯单月桂酸酯（5%）水溶液、或月桂基硫酸钠（5%）水溶液。可在必要时添加其它材料诸如抗氧化剂、保湿剂、粘性稳定剂和类似的制剂。还可包括经皮渗透增强剂诸如 Azone。

[0104] 就药理学剂量形式而言,本公开的组合物可以以其药理学可接受盐的形式施用,或者它们也可单独使用或与其它药理学活性化合物适当的联合及组合使用。受试组合物依照潜在施用模式配制。

[0105] 本公开的脂质体、肽和抗体可配制成供注射用的制剂,通过将其溶解、悬浮或乳化于水性或非水性溶剂中,诸如植物油或其它类似的油、合成的脂族酸甘油酯、高级脂族酸的酯或丙二醇,以及如果需要,加上常规的添加剂诸如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。正如本领域中常规的,还可使用用于口服或胃肠外递送的其它配制剂。

[0106] VII. 治疗方法

[0107] A. 施用路径、剂量和频率

[0108] 本公开包含治疗药物的肽或脂质体可通过以下方式施用于需要治疗的受试者:通过全身注射,诸如通过静脉内注射;或者通过注射或应用至有关部位,诸如通过直接注射入肿瘤或当某部位在外科手术中暴露时直接应用于该部位;或者通过表面应用,诸如例如若病症在皮肤上时。需要治疗的受试者包括罹患疾病诸如癌症包括 HCC 或肝癌的受试者。

[0109] 本公开的肽可用于将抗体靶向于癌症以进行治疗。在某一实施方案中,本公开的肽被施用于需要治疗的受试者,随后施用与该肽特异性结合的抗体。靶向抗体可介导抗体依赖性细胞细胞毒性或补体依赖性细胞毒性,或者可修饰靶分子的潜在功能。这样的抗体可以以抗体偶联物的形式使用以便直接递送对靶组织有治疗效果的药剂。这样的药剂包括放射性核素、毒素、化疗剂、抗 VEGF 抗体和抗血管发生化合物。

[0110] 可用各种各样的方式完成施用,包括口服、口腔、鼻、直肠、胃肠外、腹膜内、皮内、经皮、皮下、静脉内、动脉内、心内、心室内、颅内、气管内、鞘内施用,或别的通过植入或吸入。因此,受试组合物可配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,诸如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。以下方法和赋形剂只作为例示而决非限制。

[0111] 适当的赋形剂媒介是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等等,及其组合。此外,如果需要,所述媒介可包含少量的辅助物质诸如湿润或乳化剂或 pH 缓冲剂。制备所述剂量形式的实际方法是本领域技术人员所已知的或显而易见的。无论如何,要施用的组合物或配制剂会包含足以在所治疗的受试者中实现期望状态的量的药剂。

[0112] 通常,本公开的组合物施用于患者的剂量范围为大约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约 $20\text{mg}/\text{kg}$ 、大约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、大约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、大约 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、大约 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、大约 $100 \mu\text{g}$ 至大约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、或大约 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 之间。抗体以推注剂量 (bolus dose) 形式施用以使抗体施用于患者后在患者身体中可循环的时间间隔最大化。还可在最初的推注剂量后使用持续的输注。剂量给药可以是一剂,或者间隔一定时间诸如每天一次、每周一次或每月一次。剂量进程表可基于例如所述多肽对肝细胞癌细胞的亲和力、所述多肽的半衰期和患者状况的严重性进行调整。

[0113] B. 联合疗法

[0114] 本公开的肽或脂质体可作为单一疗法使用。或者,本公开的肽或脂质体可与标准化疗或放疗方案联合使用来治疗癌症。

[0115] 在癌症疗法中采用的药物可能对癌细胞具有毒害细胞或抑制细胞的作用,或者可能减少恶性细胞的增殖。本公开的脂质体、肽或抗体可与放射疗法结合。本公开的脂质体、

肽或抗体可附加与 De Vita et al., 编 (2001) 中所述的治疗方法一起使用。对于其中本公开的脂质体、肽或抗体与第二抗癌剂针对癌细胞发挥协同效果的那些组合, 第二药剂的剂量可以相较于该第二药剂单独施用时的标准剂量而言有所降低。提高癌细胞敏感性的方法包括将本公开的脂质体、肽或抗体与一定量的有效增强癌细胞敏感性的化疗抗癌药物共施用。共施用可以是同时或者非同时施用。在治疗方案的过程期间可将本公开的脂质体、肽或抗体连同其它治疗剂一起施用。在某一实施方案中, 本公开的脂质体、肽或抗体与其它治疗剂的施用是序贯的。可由内科医师根据诸如患者疾病的性质和患者状况等因素选择适当的时间进程。

[0116] VIII. 诊断方法

[0117] 疾病特异性生物标志物的检测提供了一种有效的筛选策略。早期检测不仅提供早期诊断, 而且在癌症的情况下, 还能提供筛选多态性和检测手术后残余肿瘤细胞及隐藏的转移的能力, 后者是肿瘤复发的早期指标。疾病特异性生物标志物的早期检测可由此在诊断前、治疗中及消退中改善患者的存活。

[0118] 本公开的肽可用作针对疾病包括癌症的诊断或预后。所述肽可通过许多方式被用作诊断剂, 包括但不限于 ELISA、Western 印迹、荧光、免疫荧光、免疫组化或放射自显影。

[0119] 本公开的抗体也可与本公开的肽联合用于检测肝癌。在某些实施方案中, 所述的测定法是结合测定法, 它检测抗体与结合至肝脏细胞癌细胞诸如肝细胞癌细胞的本公开之肽的结合。受试多肽或抗体可被固定化, 同时受试多肽和 / 或抗体可以被可检测地标记。例如, 所述抗体可被直接标记或可用经过标记的二抗进行检测。也就是说, 适合于抗体的可检测标记物包括直接标记物, 其标记目的蛋白质的抗体, 以及间接标记, 其标记识别目的蛋白质之抗体的抗体。在另一实施方案中, 所述肽包含标记物, 且所述肽与组织的结合是通过测定该标记物的存在来检测的。

[0120] IX. 筛选方法

[0121] 本公开提供了用于鉴定与本公开的肽结合的生物学分子的方法。这样的分子可以是细胞表面分子, 其充当结合该分子的治疗或诊断剂的靶物。例如, 特异于所述分子的肽或结合所述分子的抗体可用于治疗或诊断其细胞产生所述分子的患者。

[0122] 在某一方法中, 本公开的肽可用作双杂交测定法或三杂交测定法中的“诱饵蛋白质”(参阅例如美国专利 No. 5, 283, 317; Zervos et al. (1993); Madura et al. (1993); Bartel et al. (1993); Iwabuchi et al. (1993); 及 Suter et al. (2006)) 以鉴定与本公开之肽结合或相互作用的其它蛋白质。

[0123] 在另一方法中, 将本公开的与细胞提取物一起温育以鉴定与本公开的肽结合的生物学分子。在某一方法中, 本公开的肽被固定化于固体支持物上, 诸如 HPLC 柱, 而且在便于本公开的与靶分子结合的条件下使细胞提取物暴露于固定化的肽。洗脱被结合的分子并通过标准技术诸如质谱术进行鉴定。

实施例

[0124] 本说明书大部分依照本说明书内引用的参考文献的教导进行透彻的理解。本说明书内的以下实施方案提供了本公开之实施方案的例示, 而不应解释为限制本公开的范围。技术人员容易认识到许多其它实施方案也为本公开所涵盖。

[0125] I. 实施例 1:噬菌体展示随机肽库和生物淘选

[0126] A. 细胞系和细胞培养

[0127] 使用了 59T、Changliver、HA22T、Hep3B、HepG2、J5、NTUBL、Mahlavu 和 SKHepl (都是人肝细胞癌系) 及 NNM(人原代正常鼻粘膜上皮)(8)。HCC 细胞由 Hsiao M. 博士 (Genomic Research Center, Academia Sinica, Taiwan) 惠赠。全部的人 HCC 细胞系和 NNM 维持于 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM) 和 10% 胎牛血清 (FBS) 中, 37°C, 空气中 5% 或 10% CO₂ 的潮湿气氛。

[0128] 别的有用的细胞系包括人肺鳞状细胞癌系 A549、高度转移性人肺腺癌系 CL1-5、人肺腺癌系 H23、人肺大细胞癌系 H460、人肺癌系 PC13、人鼻咽癌系 NPC-TW01、人口腔鳞状细胞癌系 SAS、人胰腺癌 PaCa、结肠 (HCT116)、乳房 (BT483)、前列腺 (PC3)、NNM、人正常鼻粘膜上皮和成纤维细胞。A549、H23、H460、PC13、PaCa、HCT116、PC3、Mahlavu 和 SAS 可获自美国典型培养物保藏中心。CL1-5 和 NPC-TW01 细胞系分别由 (Chu et al., 1997) 和 (Lin et al., 1990) 建立。

[0129] B. 结合 HCC 细胞的噬菌体的分离

[0130] 用噬菌体展示随机肽库来选择 HCC、Mahlavu 细胞特异性噬菌体。我们的实验中采用了噬菌体展示随机肽库 (RPL) Ph. D. -12 试剂盒 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)。生物淘选规程依照先前的研究 (35) 并做一些修改进行。简言之, 使 Mahlavu 细胞生长至 70-80% 汇合, 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 漂洗, 用含 5mM EDTA 的 PBS 收获, 并用含 1% BSA 的无血清培养基收集。细胞悬浮液于 4°C 冷却, 然后添加 1.5×10^{11} 噬斑形成单位 (pfu) 的噬菌体展示肽库。反应混合物在 4°C 温育 1 小时, 转移至不易混合的有机溶剂 (酞酸二丁酯: 环己烷 9:1) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 的顶部, 并离心。将噬菌体所结合的细胞沉淀物用 LB 培养基重悬浮, 扩增噬菌体并用大肠杆菌 ER2738 培养物 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 滴定。用 Mahlavu 细胞对回收的噬菌体进行另外多轮的生物淘选。在 LB/IPTG/X-Gal 平板上对第 5 轮噬菌体洗提物进行滴定以便进行噬菌体克隆鉴定。经过 5 轮亲和力选择 (生物淘选) 之后, 第 5 轮的回收率比第 1 轮中观察到的提高了 3.5 倍 (图 1)。

[0131] C. 通过 ELISA 鉴定噬菌体克隆

[0132] 随机分离 96 个噬菌体克隆并用于通过 ELISA 测定法与 HCC 细胞和正常上皮细胞 (NNM) 反应。大约 1×10^4 个 Mahlavu 和 NNM 细胞分开接种于 96 孔 ELISA 平板并使其生长过夜。所述平板用无血清 DMEM 清洗并用含 1% BSA 的无血清 DMEM 培养基在 4°C 进行封闭。然后加入 10^9 pfu 的各噬菌体克隆并在 4°C 温育 1 小时。用 PBS 清洗平板, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的抗 M13 抗体 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 并在 4°C 温育 1 小时。平板用 PBS 清洗, 随后与过氧化物酶底物邻苯二胺二盐酸 (OPD; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 一起温育。用 3N HCl 终止反应, 并用微量板读数器测定 490nm 的光密度。

[0133] II. 实施例 2:流式细胞术和活检分析

[0134] A. 特异性结合 HCC 细胞的噬菌体克隆的鉴定

[0135] 为了分析特异性结合 HCC 细胞的噬菌体克隆, 进行了流式细胞术分析。将 HCC 细胞培养至 70-80% 汇合并用含 5mM EDTA 的 PBS 收获。将 HCC 细胞重悬浮于 FACS 缓冲液 (含

1% FBS 的 PBS) 中并分别与 PC94 或不编码蛋白质的对照噬菌体一起在 4°C 温育 1 小时。经 FACS 缓冲液清洗后, 将 HCC 细胞与单克隆抗 M13 抗体一起在 4°C 温育 1 小时, 随后与偶联 R-藻红蛋白的抗小鼠抗体 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) 一起温育 30 分钟。在 FACS-Calibur 上用 CellQuest 软件 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) 进行分析。

[0136] 结果揭示了噬菌体克隆 94 (PC94) 具有对 HCC 细胞最好的反应性, 而其余的噬菌体克隆显示出对 HCC 细胞中等的结合活性 (图 2A)。(A: 通过流式细胞术测定每个选定噬菌体对 HCC 细胞的表面结合活性; B: 用偶联 R-藻红蛋白的抗小鼠 IgG 对细胞进行染色; C: 细胞与对照噬菌体一起温育)。

[0137] 通过将不同剂量的噬菌体与 HCC 细胞温育并用 FACS 分析进一步证实 PC94 的结合活性。结果显示了 PC94 与 HCC 的结合以剂量依赖性方式发生 (图 2B)。此外, 用对照辅助噬菌体没有发现反应性, 当 PC94 与 NNM 一起温育时也没有反应性 (图 2B)。这些结果揭示了 HCC、Mahlavu 细胞表达能被 PC94 上展示的肽识别的未知分子。

[0138] 为了调查其它的 HCC 细胞是否能被 PC94 识别, 将 9 种 HCC 细胞系与 PC94 一起温育并用 FACS 分析。结果显示了 9 种 HCC 细胞系中有 6 种 (Mahlavu、59T、Hep3B、HepG2、NTUBL 和 SKHep1) 与 PC94 有强反应 (47-81.2%) 而其它的 HCC 细胞系 (Changliver 和 J5) 有中等的反应性 (25.7-31.9%), 而 HA22T 细胞系只有弱反应性 (19.1%) (图 2C)。分析了 PC94 对每种 HCC 细胞系的表面结合活性 (黄色: 用偶联 R-藻红蛋白的抗小鼠 IgG 进行染色; 橙色: 细胞与对照噬菌体一起温育)。结果显示了所有这些细胞系都表达能被 PC94 展示的肽识别的靶分子 (图 2C)。

[0139] 用来自 HCC 患者的外科手术标本通过免疫组化进一步测试了 PC94 对 HCC 细胞的结合特异性。结果显示了 PC94 能识别 HCC 手术标本中的肿瘤细胞 (图 2D, a 和 b) 但不识别它们的正常对应物 (图 2D, d)。对照噬菌体没有揭示在 HCC 外科手术标本的肿瘤组织中的免疫反应性 (图 2D, c)。将来自 HCC 患者的活检标本与 PC94 或对照噬菌体一起温育后用 HRP 偶联的抗 M13 噬菌体抗体进行检测。在肿瘤组织中发现了 PC94 免疫反应性 (D, a 和 b) 但在它们的正常对应物中没有发现 (D, d)。对照噬菌体不能结合这些活检标本 (B, c) (标尺, 50 μ m)。

[0140] 为了在肝癌组织上定位所述的肽结合能力, 用常规的免疫组化规程将人肝细胞癌的石蜡切片与噬菌体展示并生物素标记的肽一起温育。外科手术标本经国立台湾大学附属医院 (NTUH) 的设施内伦理委员会 (Institutional Review Board) 批准 (IRB9461702021) 后获自 NTUH 的组织库。

[0141] B. DNA 测序和计算机分析

[0142] 通过 ELISA 和流式细胞术 (图 2A) 选定具有较高 HCC 细胞反应性的 15 个噬菌体克隆 (PC 1、2、9、12、15、26、42、47、62、72、84、85、86、88 和 94) 进行测序。依照制造商的说明书提取噬菌体 DNA。通过双脱氧核苷酸链终止法使用自动化 DNA 测序仪 (ABI PRISM 377; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) 测定纯化的噬菌体的 DNA 序列。用 -96gIII 测序引物 5' -CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' (SEQ ID NO:31) 进行测序。用 Genetic Computer Group (GCG) 程序对噬菌体展示的肽序列进行翻译和比对。噬菌体展示的肽序列经由 GCG 软件进行比对, 揭示出独特的共有基序序列 (表 1)。相应的 DNA 序列见表 2。

[0143] 基于 GCG 序列比对 (表 1), 选择了均展示基序 Pro-Ile/Leu-Leu-Pro (P-I/L-L-P)

的 PC94 和 PC88。

[0144] III. 实施例 3:用于体内靶向测定法的动物模型和肽竞争测定法

[0145] 我们从几个方面评估了 PC94 所编码之多肽 SP94 作为针对 HCC 的靶向药物递送的药物递送导向器的潜力。首先,我们调查了 SP94 在体内是否能靶向 HCC 细胞。我们检查了 PC94 的肿瘤归巢能力及 HCC 异种移植物模型中 SP94 对它的竞争性抑制。体内归巢实验显示了 PC94 具有针对肿瘤组织的归巢能力,结合活性比对照噬菌体高 8 倍(图 3A)。此外,在肽竞争性抑制实验中,SP94 抑制了 PC94 对肿瘤块的结合,而相同浓度的对照肽没有这样的抑制效果(图 3B)。

[0146] A. 用于 PC94 靶向的动物模型

[0147] 为了证实 PC94 在体内的靶向能力,给携带 Mahlavu 衍生 HCC 异种移植物 (500mm³) 的小鼠通过尾静脉注射 PC94 或对照噬菌体。噬菌体循环,然后灌注。结合至肿瘤组织和正常内脏器官的噬菌体颗粒被回收。结果证实了回收自肿瘤组织的 PC94 噬菌体颗粒(标准化为每克组织)显著多于回收自正常器官的,诸如脑(220 倍)、心(32 倍)和肺(23 倍)。然而,对照噬菌体没有揭示出归巢现象,在肿瘤组织和正常器官中都没有(图 3A)。

[0148] 将 5×10^6 个 Mahlavu 细胞从背两侧皮下(s. c.)注射入 SCID 小鼠(4-6 周龄)。携带 Mahlavu 衍生异种移植物(500mm³)的小鼠静脉内(i. v.)注射 2×10^9 pfu 的 PC94 或对照噬菌体。在灌注后,取出器官(脑、心和肺)和肿瘤组织,用冷的 PBS 清洗并称重。用大肠杆菌 ER2738 培养物挽救结合至肿瘤组织和器官的噬菌体。在 LB/IPTG/X-Gal 平板上滴定洗脱的噬菌体颗粒。在肽竞争性抑制实验中,将 2×10^9 pfu 的 PC94 噬菌体与 100 μ g SP94 肽或对照肽共注射。通过免疫组化染色来检查在携带肿瘤的小鼠中靶向噬菌体的组织分布。将组织切片与小鼠抗 M13 抗体一起温育,随后与生物素化的马抗小鼠抗抗体(ABC 试剂盒; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)一起温育并用 PBS 清洗,然后浸入 ABC 试剂中。将切片浸入 DAB 溶液加 0.01%过氧化氢中,用 PBS 清洗并用含 50%甘油的 PBS 封固。

[0149] B. 肽竞争测定法

[0150] 肽竞争性抑制测定法(图 3)证实了 PC94 对 HCC 细胞的结合活性是依赖于 PC94 展示的肽而非噬菌体颗粒的其余部分。这些结果强烈指示这些 HCC 细胞的质膜表达未知靶分子,诸如蛋白质,它可能被合成肽 SP94 和 PC94 展示的肽识别,但不能被噬菌体的其它部分识别。

[0151] 1. 肽合成和标记

[0152] 靶向 SP94(SFSIIHTPILPL)(SEQ ID NO:2)和对照(FPWFPLPSYGN)(SEQ ID NO:32)肽由科学院生物化学研究所肽合成核心研究室合成并通过反相高效液相层析纯化至大于 95%的纯度。通过将生物素分子偶联至肽氨基末端来合成生物素标记的肽(生物素-SP94 和生物素-对照肽)。质谱术确认了预测的质量。

[0153] 给携带 HCC 异种移植物的小鼠共注射 PC94 和相关合成肽 SP94。结果显示 SP94 显著抑制自肿瘤组织中回收噬菌体颗粒。100 μ g SP94 抑制 88%的 PC94 结合肿瘤组织,但相同浓度的对照肽(con-P)没有这样的抑制效果(图 3B)。

[0154] 为了确认 PC94 的组织分布,用抗噬菌体抗体对自归巢和竞争实验衍生的肿瘤和正常器官的组织切片进行免疫染色。发现只有肿瘤细胞揭示了免疫反应性(图 3C,d 和 e),但正常器官诸如脑(图 3C,a)、心(图 3C,b)和肺(图 3C,c)没有。然而,当 PC94 与相关

合成肽 SP94 共注射时,在肿瘤组织中没有发现免疫反应性(图 3C, j)。肿瘤细胞或正常器官均没有用对照噬菌体发现具有免疫反应性(C, f 至 i)(标尺, 50 μ m)。

[0155] 为了检查 SP94 是否能提高靶向药物的治疗指数,我们调查了 SP94 对肿瘤组织而非正常器官的结合特异性。在归巢能力测定法和肽竞争性抑制实验二者中,PC94 被发现特异性结合肿瘤组织但不结合正常内脏器官诸如脑、心和肺(图 3A 和 B)。免疫组化染色证明了 PC94 颗粒只定位于肿瘤组织中,而不定位于脑、心和肺组织中(图 3C)。最后,我们检查了 SP94 肽是否能识别 HCC 患者肿瘤组织所产生的靶分子。PC94(图 2D)和生物素标记的 SP94 二者都识别在 HCC 患者外科手术标本上表达的靶蛋白质,阳性率为 61.3% (19/31)。综上所述,我们得出结论,SP94 特异性识别由 HCC 细胞而非正常组织产生的未知靶分子。此分子因此可用于针对 HCC 的靶向药物递送,而且 SP94 提供了用于鉴定此分子的试剂。

[0156] IV. 实施例 4:体内肿瘤靶向治疗法研究

[0157] 使用 SP94 和 PEG 化脂质体多柔比星的组合,一种被称为主动的或配体介导的靶向的方法,此靶向 DDS 的位点特异性作用进一步增强了抗肿瘤效果(图 4 和 6)并伴随着肿瘤凋亡增加(图 5A、5B 和 6E)及肿瘤血管发生减少(图 5C 和 6D)。

[0158] 在 PEG 化脂质体多柔比星(Lipo-Dox)配制剂的临床试验中已观察到改善的药理学特性和降低的系统毒性(40)。在此,我们的结果揭示了此靶向药物递送系统 SP94-Lipo-Dox 的位点特异性作用通过避免总白血球计数(WBC)的减少能进一步降低血液学毒性(图 4C 和 6C)。用非靶向 PEG 化脂质体多柔比星(Con-P-Lipo-Dox 和 Lipo-Dox)所观察到的总 WBC 计数的减少可归于其循环时间延长、血管限制及单个核吞噬细胞系统细胞对它的非特异性吸收机会增加。这样的白血球减少症已被报道于针对晚期 HCC 患者的 PEG 化脂质体多柔比星 II 期临床试验中(41, 42)。

[0159] PEG 化脂质体多柔比星 II 期临床试验的某些先前的研究已报道了所述药物展现出在晚期 HCC 中几乎没有活性,响应率最多 0-14% (41-43)。因此此处所述的 SP94-Lipo-Dox 的增强的治疗效力指示此靶向药物递送系统在治疗晚期 HCC 患者中的重要临床潜力。此外,与 SP94 相互作用的靶分子的鉴定会能够确认它在 HCC 肿瘤组织上的特异性表达并验证其作为 HCC 治疗靶标的用途。

[0160] 所述的靶向药物递送系统包含:抗癌药物、靶向配体,还可进一步包含载体。鉴于多柔比星已被报道在 HCC 中提供了最一致的总响应率(18%)(36)而且脂质体多柔比星也已显示出对顽固性乳腺癌和卵巢癌具有显著的活性(37, 38),此药物被选作抗癌剂且聚乙二醇包被的脂质体(PEG 化脂质体)被选作载体。将 PEG 化脂质体多柔比星与 SP94 偶联(SP94-Lipo-Dox)以评估针对 HCC 的靶向药物递送的效力。在人 HCC 异种移植物模型中,相较于对照肽偶联的 Lipo-Dox(Con-P-Lipo-Dox)和 Lipo-Dox 处理组而言 SP94-Lipo-Dox 显示出治疗效力的提高(图 4 和 6)。

[0161] 不受任何特殊机制所限制,Con-P-Lipo-Dox 和 Lipo-Dox 处理组的肿瘤生长的部分抑制可用以下因素来解释。首先,血管发生性肿瘤脉管系统的易漏可容许药物偶联物在肿瘤组织中选择性溢出。此外,药物偶联物由于缺乏有效的淋巴排除可保留在肿瘤组织中。这些因素可导致药物偶联物在肿瘤组织中的被动靶向和积聚(14)。此外动物研究也已显示出长时间循环的 PEG 化脂质体多柔比星导致了被动优选定位于肿瘤中,并造成相对于游离药物情况下获得的而言药物浓度在肿瘤中有数倍的升高(15, 39)。

[0162] A. 肽-脂质体多柔比星的制备和施用

[0163] 肽-脂质体多柔比星的制备规程已有记载 (8)。简言之,以 1 : 1.5 的摩尔比将肽偶联至 NHS-PEG-DSPE [N- 羟基琥珀酰亚胺羧基-PEG (分子量 3400) 衍生的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (NOF Corporation, Tokyo, Japan)]。用肽氨基末端的游离胺基团进行偶联反应以产生肽基-PEG-DSPE 并通过用三硝基苯磺酸盐试剂 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 对残余氨基定量加以确认。在高于脂双层转变温度的温度共温育后将肽基-PEG-DSPE 转移至预形成的 PEG 化脂质体多柔比星。

[0164] 将 5×10^6 个 Mahlavu 细胞从背两侧皮下 (s. c.) 注射入 SCID 小鼠 (4-6 周龄)。然后将携带肿瘤的小鼠 (100mm^3) 随机分成四组 (每组 6 只小鼠) 供不同的处理 :A : SP94-Lipo-Dox (SP94-LD) ;B :Con-P-Lipo-Dox (CP-LD) ;C :Lipo-Dox (LD) 和 D :PBS。处理通过尾静脉注射施行,每周两次 $1 \text{mg}/\text{kg}$,连续四周,总剂量为 $8 \text{mg}/\text{kg}$ 。在另一实验中,如所述将携带较大 Mahlavu 衍生异种移植物 (550mm^3) 的小鼠分成四组。处理通过尾静脉注射施行,每周一次 $5 \text{mg}/\text{kg}$,连续两周,总剂量为 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 。用电子秤和卡规测量体重和肿瘤大小。用公式计算肿瘤体积 :长度 \times (宽度)² $\times 0.52$ 。在实验结束时,取出每只小鼠的肿瘤组织和内脏器官,然后用 3% 甲醛固定并用 OCT 包埋供进一步的组织病理学检查。动物的照料依照台湾科学院的指导进行。

[0165] 在处理结束时 (第 28 天), Con-P-Lipo-Dox 和 Lipo-Dox 组的肿瘤大小比 SP94-Lipo-Dox 组的大 1.5 倍。对照 PBS 组的肿瘤大小比 SP94-Lipo-Dox 组的大 3.3 倍。 ($P < 0.01$) (图 4A)。此外,接受 SP94-Lipo-Dox 的携带肿瘤小鼠组被发现具有较低的肿瘤重量,相较于 Con-P-Lipo-Dox 和 Lipo-Dox 处理组中的肿瘤重量而言有大约 40% 的抑制 ($P < 0.01$) (图 4B)。图中的误差棒代表标准误差,而 P 值是通过 Student 氏 t 检验计算的。

[0166] 1. 总 WBC 计数

[0167] 自下颞静脉取血并与 15% EDTA 溶液温和混合以防止凝结。然后加入含 2% 乙酸和 1% 龙胆紫 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 的 RBC 裂解缓冲液并在室温温育。用血球计计算总 WBC。

[0168] 为了评估全身递送化疗药物的副作用,测定了总 WBC 计数。结果揭示了 SP94-Lipo-Dox 处理组 ($1.9 \times 10^3/\text{mm}^3$) 的总 WBC 计数高于 Con-P-Lipo-Dox ($1.6 \times 10^3/\text{mm}^3$) 和 Lipo-Dox ($1.6 \times 10^3/\text{mm}^3$) 处理组的,但低于 PBS 组 ($2.6 \times 10^3/\text{mm}^3$) 的 (图 4C)。在每个处理组中体重无显著改变 (图 4D)。图中的误差棒代表标准误差,而 P 值是通过 Student 氏 t 检验计算的。

[0169] V. 实施例 5 :肽-脂质体多柔比星疗法中的组织病理学检查、肿瘤血管和凋亡细胞的免疫荧光检测

[0170] A. TUNEL 染色

[0171] 将冷冻的肿瘤组织切片与末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺刻末端标记 (TUNEL) 反应混合物 (Roche Diagnostic, Grenzacherstrasse, Basel, CHE) 一起在 37°C 温育 1 小时。将载玻片用 Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 复染色并用封固介质 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 封固。然后在荧光显微镜下观察载玻片。

[0172] B. CD31 染色

[0173] 将冷冻的肿瘤组织切片用甲醇 - 丙酮 (1 : 1) 固定, 用 PBS 清洗并浸入封闭缓冲液 (含 1% BSA 的 PBS) 中随后与大鼠抗小鼠 CD31 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) 一起温育。切片用 PBST_{0.1} (含 0.1% Tween-20 的 PBS) 清洗, 然后与家兔抗大鼠抗体 (Stressgen, Ann Arbor, MI, USA) 一起温育并浸入罗丹明标记的山羊抗家兔抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) 中。将载玻片用 Hoechst 33258 复染色, 用封固介质封固并在荧光显微镜下观察。

[0174] 在用 H&E 染色后检查每个处理组中肿瘤组织的组织病理学。SP94-Lipo-Dox 处理的异种移植物的整个切片中存在显著的散布的坏死 / 凋亡区域, 而在 Lipo-Dox 和 Con-P-Lipo-Dox 处理的异种移植物中发现了中度的坏死 / 凋亡区域。PBS 处理组显示了正常的 HCC 细胞 (图 5A)。SP94-Lipo-Dox (SP94-LD) 处理的异种移植物的整个切片显示出显著的散布的坏死 / 凋亡区域, 而 Con-P-Lipo-Dox (CP-LD) 和 Lipo-Dox (LD) 异种移植物揭示出中等的坏死 / 凋亡区域, 而 PBS 组显示出正常的 HCC 细胞 (标尺: 上方组图 500 μ m 和下方组图 50 μ m)。

[0175] 用 TUNEL 标记所述切片以显现凋亡的肿瘤细胞 (绿色)。与 Con-P-Lipo-Dox 和 Lipo-Dox 组相比, TUNEL 阳性肿瘤细胞在 SP94-Lipo-Dox 处理组中分布更均匀。在 PBS 处理组中未发现凋亡的肿瘤细胞 (标尺, 100 μ m)。(图 5B)。用 TUNEL 来鉴定凋亡的肿瘤细胞并用抗 CD31 抗体来检测肿瘤血管。肿瘤的代表性显微视野显示在 SP94-Lipo-Dox 处理组中比在 Con-P-Lipo-Dox 和 Lipo-Dox 处理组中有更多的凋亡肿瘤细胞 (图 5B) 和较低的血管密度 (图 5C)。

[0176] 将切片用抗 CD31 抗体染色以显现肿瘤血管 (红色) 并用 H33258 复染色 (蓝色) (标尺, 100 μ m)。(图 5C)。在低放大倍数确定 CD31 阳性内皮细胞的面积 ($n = 6$), 在低放大倍数确定 CD31 阳性内皮细胞的面积 ($n = 6$)。与于 PBS 组的相比, CD31 阳性内皮细胞面积在 Lipo-Dox 和 Con-P-Lipo-Dox 处理组中显著减少 ($n = 6, P < 0.05$)。与 Con-P-Lipo-Dox 和 Lipo-Dox 组相比, CD31 阳性内皮细胞面积在 SP94-Lipo-Dox 处理组中有更多的减少 ($n = 6, P < 0.001$) (图 5D)。在 PBS 处理组中发现了高肿瘤血管密度及无凋亡细胞 (图 5B 和 C)。图中的误差棒代表标准误差, 而 P 值是通过 Student 氏 t 检验计算的。

[0177] VI. 实施例 6 : 用于治疗大 HCC 异种移植物肿瘤的肽 - 脂质体多柔比星疗法

[0178] 为了验证大的异种移植物是否也能对 SP94-Lipo-Dox 处理有响应, 将携带大 HCC 异种移植物 (550mm³) 的小鼠分成四组进行不同的处理 : A : SP94-Lipo-Dox (SP94-LD) ; B : Con-P-Lipo-Dox (CP-LD) ; C : Lipo-Dox (LD) 和 D : PBS。在处理结束时 (第 14 天), Con-P-Lipo-Dox 和 Lipo-Dox 组的肿瘤大小逐渐增加到比 SP94-Lipo-Dox 组的大 1.3 和 1.2 倍 (分别为 $P = 0.089, P < 0.05$)。对照 PBS 组的肿瘤大小比 SP94-Lipo-Dox 组的大 1.9 倍 ($P < 0.05$) (图 6A)。此外, 接受 SP94-Lipo-Dox 的携带肿瘤的小鼠组被发现具有比 Con-P-Lipo-Dox、Lipo-Dox 和 PBS 组低的肿瘤重量。Con-P-Lipo-Dox、Lipo-Dox 和 PBS 组的肿瘤重量分别增加到比 SP94-Lipo-Dox 组的大 1.3、1.2 和 2.1 倍 ($P < 0.05$) (图 6B)。此外还在第 10 天分析总 WBC 计数并且显示出 SP94-Lipo-Dox 处理组 ($11.8 \times 10^3/\text{mm}^3$) 的总 WBC 计数高于 Con-P-Lipo-Dox ($8.8 \times 10^3/\text{mm}^3$) 和 Lipo-Dox ($8.2 \times 10^3/\text{mm}^3$) 处理组的, 但低于 PBS 组 ($13.9 \times 10^3/\text{mm}^3$) 的 (图 6C)。

[0179] 通过 H&E 染色来检查每个处理组中肿瘤组织的组织病理学。SP94-Lipo-Dox 处理

的异种植物的整个切片中存在显著的坏死/凋亡区域,而在Lipo-Dox和Con-P-Lipo-Dox处理的异种植物中发现中度的坏死/凋亡区域,而PBS组显示了正常的HCC细胞(图6E)。在低放大倍数确定来自每个处理组的肿瘤组织中CD31阳性内皮细胞的面积($n = 6$)。CD31阳性内皮细胞面积在Lipo-Dox和Con-P-Lipo-Dox处理组中相较于PBS组而言有轻微减少。然而,CD31阳性内皮细胞面积在SP94-Lipo-Dox处理组中相较于Con-P-Lipo-Dox和Lipo-Dox组而言有显著的减少($n = 6, P < 0.001$)(图6D)。(标尺:上部组图 $500 \mu\text{m}$ 和下部组图 $50 \mu\text{m}$)。图中的误差棒代表标准误差,而P值是通过Student氏t检验计算的。

[0180] 此处讨论的出版物仅因其公开于本申请提交日之前而提供。本文的任何内容都不能解释为承认本公开没有资格因发明在先而早于所述出版物。此处任何出版物的引用并非承认所述参考文献是本发明的现有技术。此外,提供的出版日期可能不同于实际的出版日期,这可能需要独立确认。

[0181] X. 实施例7:PC88和PC94在结合方面的比较

[0182] 进行FACS分析以比较PC88和PC94的结合活性。将Mahlavu细胞分别与 1×10^9 、 5×10^9 、 7.5×10^9 和 1×10^{10} TU一起温育,并使用实施例2中所述规程通过FACS分析各个噬菌体克隆的表面结合活性。PC94的Mahlavu细胞结合活性好于PC88的(图7)。Con-噬菌体表示对照噬菌体。

[0183] XI. 实施例8:PC88和PC94的体内肿瘤归巢比较

[0184] 在SCID小鼠中比较了PC88和PC94的肿瘤归巢能力。给携带HCC异种植物的SCID小鼠i.v.注射PC88、PC94和对照辅助噬菌体,并如实施例3所述在灌注后回收噬菌体。在LB/IPTG/X-Gal平板上测定自肿瘤、对照器官诸如脑、心和肺回收的噬菌体的滴度。PC94的肿瘤归巢能力好于PC88的(图8)。

[0185] VII. 出版物

[0186] 1. Thomas, M. B., and Zhu, A. X. (2005) Hepatocellular carcinoma; the need for progress. *J Clin Oncol* 23, 2892-2899.

[0187] 2. Farazi, P. A., and DePinho, R. A. (2006) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6, 674-687.

[0188] 3. Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., Feuer, E. J., and Thun, M. J. (2005) Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55, 10-30.

[0189] 4. Bosslet, K., Straub, R., Blumrich, M., Czech, J., Gerken, M., Sperker, B., Kroemer, H. K., Gesson, J. P., Koch, M., and Monneret, C. (1998) Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res* 58, 1195-1201.

[0190] 5. Allen, T. M., and Cullis, P. R. (2004) Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303, 1818-1822.

[0191] 6. Allen, T. M., Mumbengegwi, D. R., and Charrois, G. J. (2005) Anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates. *Clin Cancer Res* 11, 3567-3573.

[0192] 7. MacDiarmid, J. A., Mugridge, N. B., Weiss, J. C., Phillips, L., Burn, A. L.,

Paulin, R. P. , Haasdyk, J. E. , Dickson, K. A. , Brahmhatt, V. N. , Pattison, S. T. , James, A. C. , Al Bakri, G. , Straw, R. C. , Stillman, B. , Graham, R. M. , and Brahmhatt, H. (2007) Bacterially derived 400nm particles for encapsulation and cancer cell targeting of chemotherapeutics. *Cancer Cell* 11,431-445.

[0193] 8. Lee, T. Y. , Wu, H. C. , Tseng, Y. L. , and Lin, C. T. (2004) A novel peptide specifically binding to nasopharyngeal carcinoma for targeted drug delivery. *Cancer Res* 64,8002-8008.

[0194] 9. Xiong, X. B. , Huang, Y. , Lu, W. L. , Zhang, X. , Zhang, H. , Nagai, T. , and Zhang, Q. (2005) Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic. *J Control Release* 107,262-275.

[0195] 10. Vasey, P. A. , Kaye, S. B. , Morrison, R. , Twelves, C. , Wilson, P. , Duncan, R. , Thomson, A. H. , Murray, L. S. , Hilditch, T. E. , Murray, T. , Burtles, S. , Fraier, D. , Frigerio, E. , and Cassidy, J. (1999) Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer doxorubicin] : first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. *Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. Clin Cancer Res* 5,83-94.

[0196] 11. Duncan, R. (2003) The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2,347-360.

[0197] 12. Satchi-Fainaro, R. , Mamluk, R. , Wang, L. , Short, S. M. , Nagy, J. A. , Feng, D. , Dvorak, A. M. , Dvorak, H. F. , Puder, M. , Mukhopadhyay, D. , and Folkman, J. (2005) Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin. *Cancer Cell* 7,251-261.

[0198] 13. Hashizume, H. , Baluk, P. , Morikawa, S. , McLean, J. W. , Thurston, G. , Roberge, S. , Jain, R. K. , and McDonald, D. M. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156,1363-1380.

[0199] 14. Matsumura, Y. , and Maeda, H. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : mechanism of tumor tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46, 6387-6392.

[0200] 15. Northfelt, D. W. , Martin, F. J. , Working, P. , Volberding, P. A. , Russell, J. , Newman, M. , Amantea, M. A. , and Kaplan, L. D. (1996) Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol : pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi' s sarcoma. *J Clin Pharmacol* 36,55-63.

[0201] 16. Papahadjopoulos, D. , Allen, T. M. , Gabizon, A. , Mayhew, E. , Matthey, K. , Huang, S. K. , Lee, K. D. , Woodle, M. C. , Lasic, D. D. , Redemann, C. , and et al. (1991) Sterically stabilized liposomes : improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88,11460-11464.

- [0202] 17. Northfelt, D. W. , Dezube, B. J. , Thommes, J. A. , Miller, B. J. , Fischl, M. A. , Friedman-Kien, A. , Kaplan, L. D. , Du Mond, C. , Mamelok, R. D. , and Henry, D. H. (1998) Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi' s sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol* 16, 2445-2451.
- [0203] 18. Stewart, S. , Jablonowski, H. , Goebel, F. D. , Arasteh, K. , Spittle, M. , Rios, A. , Aboulafia, D. , Galleshaw, J. , and Dezube, B. J. (1998) Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi' s sarcoma. International Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group. *J Clin Oncol* 16, 683-691.
- [0204] 19. Harrington, K. J. , Mohammadtaghi, S. , Uster, P. S. , Glass, D. , Peters, A. M. , Vile, R. G. , and Stewart, J. S. (2001) Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin Cancer Res* 7, 243-254.
- [0205] 20. Al-Batran, S. E. , Bischoff, J. , von Minckwitz, G. , Atmaca, A. , Kleeberg, U. , Meuthen, I. , Morack, G. , Lerbs, W. , Hecker, D. , Sehouli, J. , Knuth, A. , and Jager, E. (2006) The clinical benefit of pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer previously treated with conventional anthracyclines: a multicentre phase II trial. *Br J Cancer* 94, 1615-1620.
- [0206] 21. Wu, H. C. , Chang, D. K. , and Huang, C. T. (2006) Targeted therapy for cancer. *J Cancer Mol* 2, 57-66.
- [0207] 22. Jain, R. K. (1987) Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 47, 3039-3051.
- [0208] 23. Willett, C. G. , Boucher, Y. , di Tomaso, E. , Duda, D. G. , Munn, L. L. , Tong, R. T. , Chung, D. C. , Sahani, D. V. , Kalva, S. P. , Kozin, S. V. , Mino, M. , Cohen, K. S. , Scadden, D. T. , Hartford, A. C. , Fischman, A. J. , Clark, J. W. , Ryan, D. P. , Zhu, A. X. , Blaszkowsky, L. S. , Chen, H. X. , Shellito, P. C. , Lauwers, G. Y. , and Jain, R. K. (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has anti-vascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10, 145-147.
- [0209] 24. Mori, T. (2004) Cancer-specific ligands identified from screening of peptide-display libraries. *Curr Pharm Des* 10, 2335-2343.
- [0210] 25. Chen, Y. C. , Huang, H. N. , Lin, C. T. , Chen, Y. E. , King, C. C. , and Wu, H. C. (2007) Generation and characterization of monoclonal antibodies against dengue virus type 1 for epitope mapping and serological detection by epitope-based peptide antigens. *Clin Vaccine Immunol* 14, 404-411.
- [0211] 26. Liu, I. J. , Hsueh, P. R. , Lin, C. T. , Chiu, C. Y. , Kao, C. L. , Liao, M. Y. , and Wu, H. C. (2004) Disease-specific B Cell epitopes for serum antibodies from patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) and serologic detection of SARS antibodies by epitope-based peptide antigens. *The Journal of infectious diseases*

190,797-809.

[0212] 27. Wu, H. C. , Jung, M. Y. , Chiu, C. Y. , Chao, T. T. , Lai, S. C. , Jan, J. T. , and Shaio, M. F. (2003) Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. *The Journal of general virology* 84, 2771-2779.

[0213] 28. Shadidi, M. , and Sioud, M. (2003) Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *Faseb J* 17, 256-258.

[0214] 29. Zitzmann, S. , Mier, W. , Schad, A. , Kinscherf, R. , Askoxylakis, V. , Kramer, S. , Altmann, A. , Eisenhut, M. , and Haberkorn, U. (2005) A new prostate carcinoma binding peptide (DUP-1) for tumor imaging and therapy. *Clin Cancer Res* 11, 139-146.

[0215] 30. Arap, W. , Pasqualini, R. , and Ruoslahti, E. (1998) Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279, 377-380.

[0216] 31. Hoffman, J. A. , Giraud, E. , Singh, M. , Zhang, L. , Inoue, M. , Porkka, K. , Hanahan, D. , and Ruoslahti, E. (2003) Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 4, 383-391.

[0217] 32. Joyce, J. A. , Laakkonen, P. , Bernasconi, M. , Bergers, G. , Ruoslahti, E. , and Hanahan, D. (2003) Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell* 4, 393-403.

[0218] 33. Lee, T. Y. , Lin, C. T. , Kuo, S. Y. , K. , C. D. , and Wu, H. C. (2007) Tumor-homing peptides with targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery. *Cancer Research* 67, 10958-10965.

[0219] 34. Pastorino, F. , Brignole, C. , Di Paolo, D. , Nico, B. , Pezzolo, A. , Marimpietri, D. , Pagnan, G. , Piccardi, F. , Cilli, M. , Longhi, R. , Ribatti, D. , Corti, A. , Allen, T. M. , and Ponzoni, M. (2006) Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy. *Cancer Res* 66, 10073-10082.

[0220] 35. Giordano, R. J. , Cardo-Vila, M. , Lahdenranta, J. , Pasqualini, R. , and Arap, W. (2001) Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med* 7, 1249-1253.

[0221] 36. Burroughs, A. , Hochhauser, D. , and Meyer, T. (2004) Systemic treatment and liver transplantation for hepatocellular carcinoma: two ends of the therapeutic spectrum. *Lancet Oncol* 5, 409-418.

[0222] 37. Muggia, F. M. , Hainsworth, J. D. , Jeffers, S. , Miller, P. , Groshen, S. , Tan, M. , Roman, L. , Uziely, B. , Muderspach, L. , Garcia, A. , Burnett, A. , Greco, F. A. , Morrow, C. P. , Paradiso, L. J. , and Liang, L. J. (1997) Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: antitumor activity and toxicity modification by

liposomal encapsulation. *J Clin Oncol* 15,987-993.

[0223] 38. Ranson, M. R. , Carmichael, J. , O ' Byrne, K. , Stewart, S. , Smith, D. , and Howell, A. (1997) Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin : results of a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 15,3185-3191.

[0224] 39. Hong, R. L. , Huang, C. J. , Tseng, Y. L. , Pang, V. F. , Chen, S. T. , Liu, J. J. , and Chang, F. H. (1999) Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice : is surface coating with polyethylene glycol beneficial ? *Clin Cancer Res* 5,3645-3652.

[0225] 40. Hong, R. L. , and Tseng, Y. L. (2001) Phase I and pharmacokinetic study of a stable, polyethylene-glycolated liposomal doxorubicin in patients with solid tumors : the relation between pharmacokinetic property and toxicity. *Cancer* 91,1826-1833.

[0226] 41. Hong, R. L. , and Tseng, Y. L. (2003) A phase II and pharmacokinetic study of pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 51,433-438.

[0227] 42. Valle, J. W. , Dangoor, A. , Beech, J. , Sherlock, D. J. , Lee, S. M. , Scarffe, J. H. , Swindell, R. , and Ranson, M. (2005) Treatment of inoperable hepatocellular carcinoma with pegylated liposomal doxorubicin (PLD) : results of a phase II study. *Br J Cancer* 92,628-630.

[0228] 43. Schmidinger, M. , Wenzel, C. , Locker, G. J. , Muehlbacher, F. , Steininger, R. , Gnant, M. , Crevenna, R. , and Budinsky, A. C. (2001) Pilot study with pegylated liposomal doxorubicin for advanced or unresectable hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 85,1850-1852.

[0229] 表 1 : 通过 Mahlavu 细胞选择的噬菌体展示肽序列的比对。

噬菌体克隆	噬菌体展示肽序列 ^a	SEQ ID NO
	SFSIIHTPILPL	(SEQ ID NO: 2)
	ELMNPLLPFIQP	(SEQ ID NO: 4)
	HLPSTGNQYLSL	(SEQ ID NO: 6)
	ETNWTHRPLRV	(SEQ ID NO: 8)
	EYRMAHLTPSLL	(SEQ ID NO: 10)
	YHLQDSETLSLL	(SEQ ID NO: 12)
[0230]	SPWYMTSPNPTA	(SEQ ID NO: 14)
	SVSVGMKPSRP	(SEQ ID NO: 16)
	DPMTWTPSSVMR	(SEQ ID NO: 18)
	TPHRLDWSPHLV	(SEQ ID NO: 20)
	GSNPWNTWLTTL	(SEQ ID NO: 22)
	NPFNQHLHAQHP	(SEQ ID NO: 24)
	SESKDPTLWYPA	(SEQ ID NO: 26)
	SFRLATPESSRV	(SEQ ID NO: 28)
	SNNEPMLRYTGQ	(SEQ ID NO: 30)

[0231] ^a噬菌体展示的共有氨基酸序列以粗体显示。

[0232] 表 2 :通过 Mahlavu 细胞选择的噬菌体展示核苷酸序列。

噬菌体克隆	展示的核苷酸序列	SEQ ID NO :
[0234]	94 AGTTTTTCGATTATTCATACGCCTATTCTGCCGCTG	(SEQ ID NO :1)
[0235]	88 GAGTTGATGAATCCTCTTTTGCCGTTTATTCAGCCG	(SEQ ID NO :3)
[0236]	84 TCGTTTCGGCTTGCGACTCCTGAGTCTTCGCGTGTT	(SEQ ID NO :5)
[0237]	01 GAGACTAATTGGACTCATAGGCCTCCGCTGCGGGTG	(SEQ ID NO :7)
[0238]	15 GAGTATCGTATGGCGCATCTGACTCCGTCTTTGCTG	(SEQ ID NO :9)
[0239]	86 TATCATCTGCAGGATTCTTAGACTCTGTCTCTGCTT	(SEQ ID NO :11)
[0240]	42 TCTCCTTGGTATATGACTCCTAGTCCCTAATACGGCG	(SEQ ID NO :13)
[0241]	72 TCTGTTTCTGTGGGTATGAAGCCGAGTCCCTAGGCCT	(SEQ ID NO :15)
[0242]	47 GATCCTATGACTTGGACGCCCTAGTAGTGTATGCGT	(SEQ ID NO :17)
[0243]	26 ACTCCTCATCGTCTGGATTGGTCTCCGCATCTGGTG	(SEQ ID NO :19)
[0244]	02 GGGTCGAATCCTTGAATACTTGGCTGACTACGCTT	(SEQ ID NO :21)
[0245]	62 AATCCGTTTAATCAGCATCTGCATGCTCAGCATCCT	(SEQ ID NO :23)
[0246]	09 AGTGAGAGTAAGGATCCTACTCTTTGGTATCCTGCG	(SEQ ID NO :25)
[0247]	85 TCGTTTCGGCTTGCGACTCCTGAGTCTTCGCGTGTT	(SEQ ID NO :27)
[0248]	12 CTGCCAGTATAACGCAGCATCGGCTCATTATTCGA	(SEQ ID NO :29)

[0001]

序列表

<110> 中央研究院(ACADEMIA SINICA)
 WU, HAN-CHUNG
 LIN, CHIN-TARNG
 LO, ALBERT

<120> 肝细胞癌细胞特异性的肽及其应用

<130> 09934.0007-00000

<140>
 <141>

<150> 60/996,488
 <151> 2007-11-20

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 1
 agtttttcca ttattcatac gcctattctg ccgctg 36

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 2
 Ser Phe Ser Ile Ile His Thr Pro Ile Leu Pro Leu
 1 5 10

<210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 3
 gagttgatga atcctctttt gccgtttatt cagccg 36

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 4
 Glu Leu Met Asn Pro Leu Leu Pro Phe Ile Gln Pro
 1 5 10

<210> 5

[0002]

<211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 5
 tcgtttcggc ttgcgactcc tgagtcttcg cgtggtt 36

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 6
 His Leu Pro Ser Thr Gly Asn Gln Tyr Leu Ser Leu
 1 5 10

<210> 7
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 7
 gagactaatt ggactcatag gcctccgctg cgggtg 36

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 8
 Glu Thr Asn Trp Thr His Arg Pro Pro Leu Arg Val
 1 5 10

<210> 9
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 9
 gagtatcgta tggcgcatct gactccgtct ttgctg 36

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 10
 Glu Tyr Arg Met Ala His Leu Thr Pro Ser Leu Leu
 1 5 10

[0003]

<210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 11
 tatcatctgc aggattctta gactctgtct ctgctt 36

 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 12
 Tyr His Leu Gln Asp Ser Glu Thr Leu Ser Leu Leu
 1 5 10

 <210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 13
 tctccttggt atatgactcc tagtcctaatacggcg 36

 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 14
 Ser Pro Trp Tyr Met Thr Pro Ser Pro Asn Thr Ala
 1 5 10

 <210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 15
 tctgtttctg tgggtatgaa gccgagtcct aggctt 36

 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

[0004]

<400> 16
 Ser Val Ser Val Gly Met Lys Pro Ser Pro Arg Pro
 1 5 10

<210> 17
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 17
 gatcctatga cttggacgcc tagtagtggt atgcgt 36

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 18
 Asp Pro Met Thr Trp Thr Pro Ser Ser Val Met Arg
 1 5 10

<210> 19
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 19
 actcctcacc gtctggattg gtctccgcat ctggtg 36

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 20
 Thr Pro His Arg Leu Asp Trp Ser Pro His Leu Val
 1 5 10

<210> 21
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 21
 gggtcgaatc cttggaatac ttggctgact acgctt 36

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0005]

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 22
 Gly Ser Asn Pro Trp Asn Thr Trp Leu Thr Thr Leu
 1 5 10

<210> 23
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 23
 aatccgttta atcagcatct gcatgctcag catcct 36

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 24
 Asn Pro Phe Asn Gln His Leu His Ala Gln His Pro
 1 5 10

<210> 25
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 25
 agtgagagta aggatcctac tctttggtat cctgcg 36

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 26
 Ser Glu Ser Lys Asp Pro Thr Leu Trp Tyr Pro Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 27
 tcgittcggc ttgcgactcc tgagtcttcg cgtggt 36

<210> 28
 <211> 12

[0006]

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 28
 Ser Phe Arg Leu Ala Thr Pro Glu Ser Ser Arg Val
 1 5 10

<210> 29
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 29
 ctgccagta taacgcagca tcggctcatt attcga 36

<210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 30
 Ser Asn Asn Glu Pro Met Leu Arg Tyr Thr Gly Gln
 1 5 10

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的引物

<400> 31
 ccctcatagt tagcgtaacg 20

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 32
 Phe Pro Trp Phe Pro Leu Pro Ser Pro Tyr Gly Asn
 1 5 10

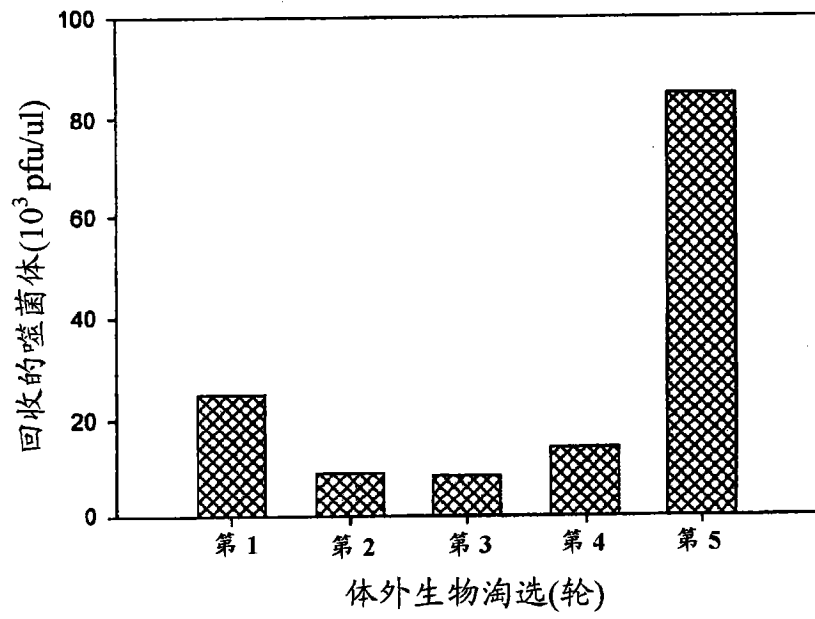


图 1

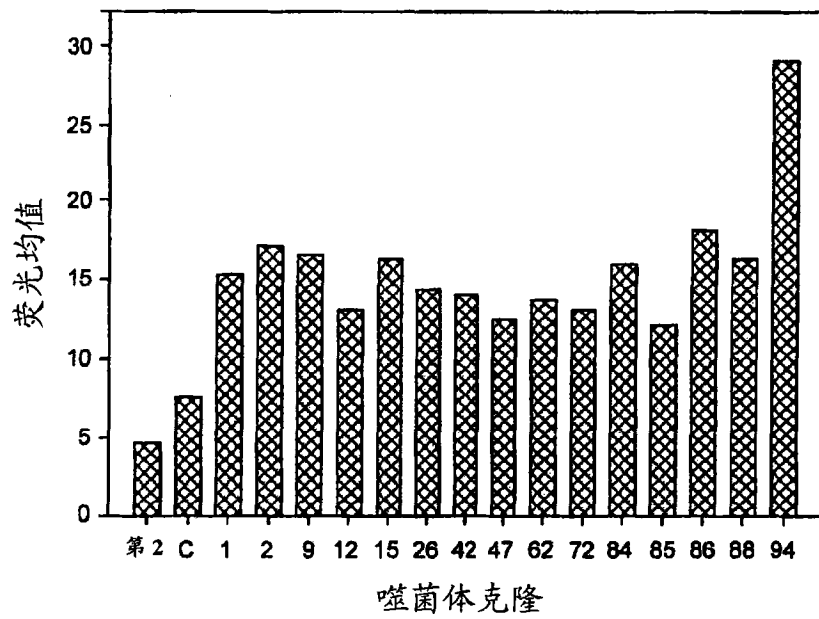


图 2A

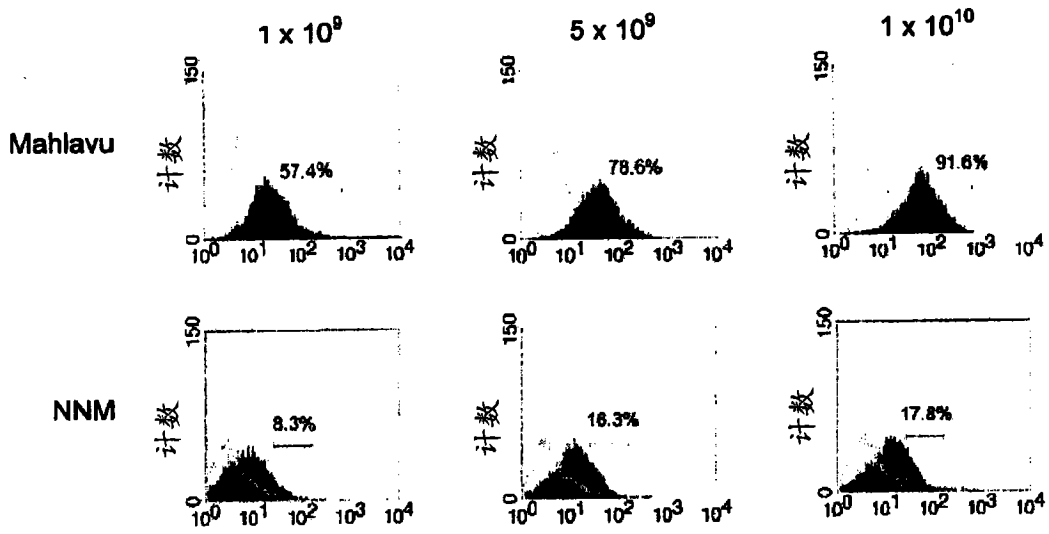


图 2B

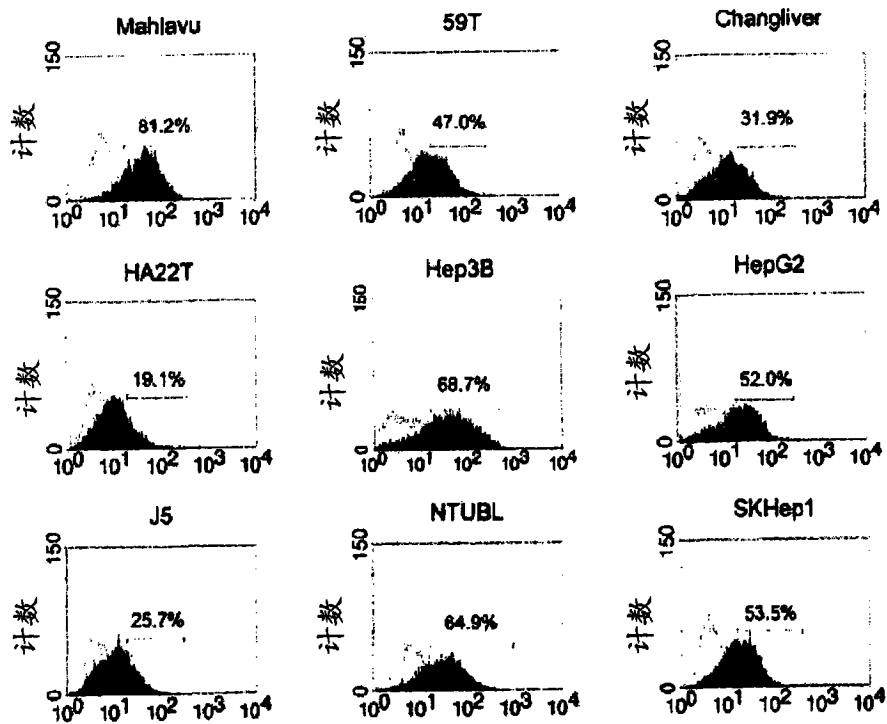


图 2C

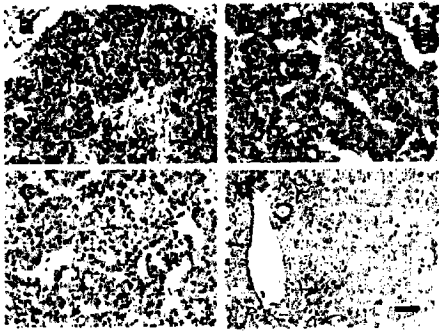


图 2D

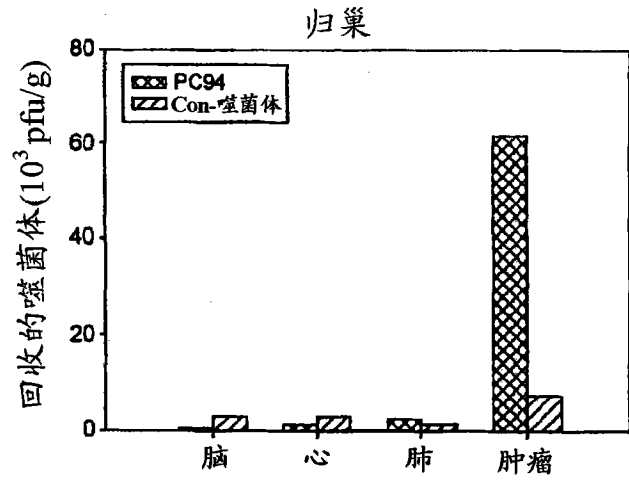


图 3A

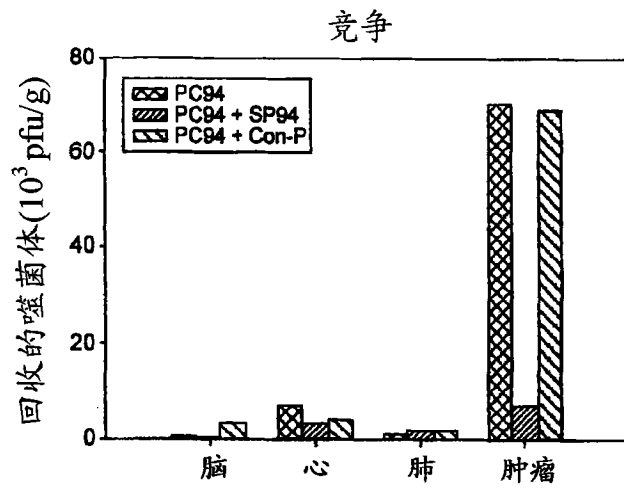


图 3B

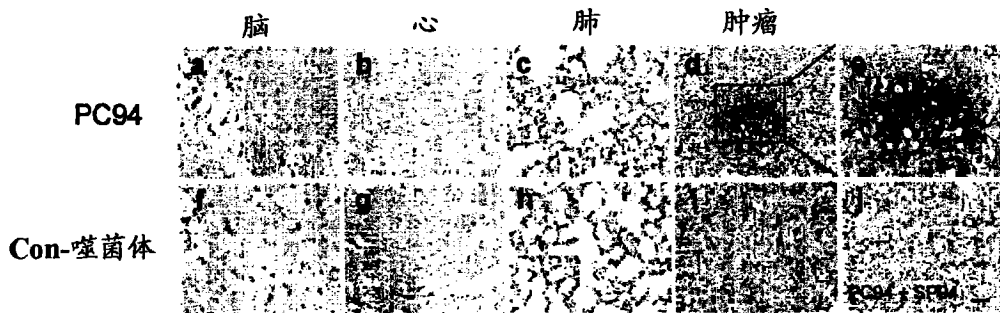


图 3C

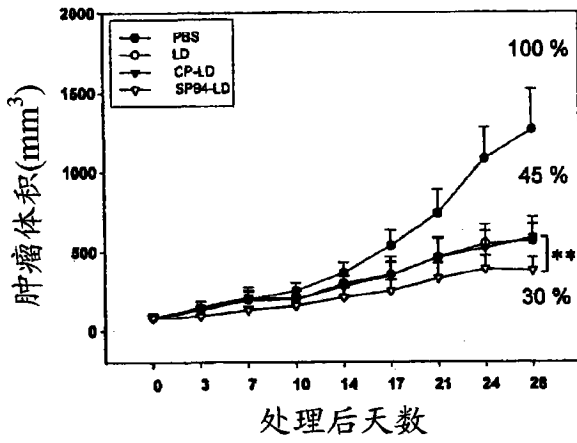


图 4A

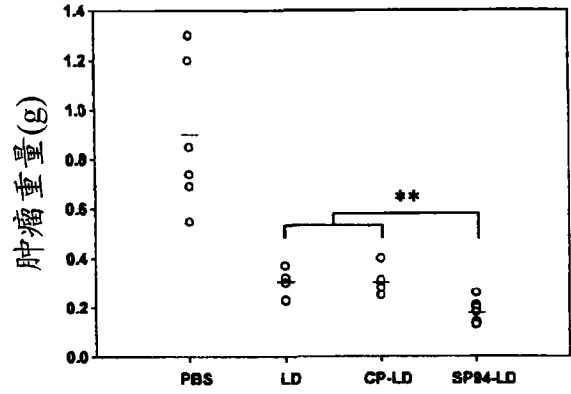


图 4B

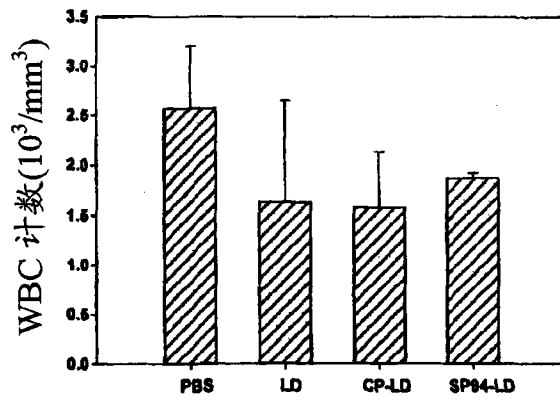


图 4C

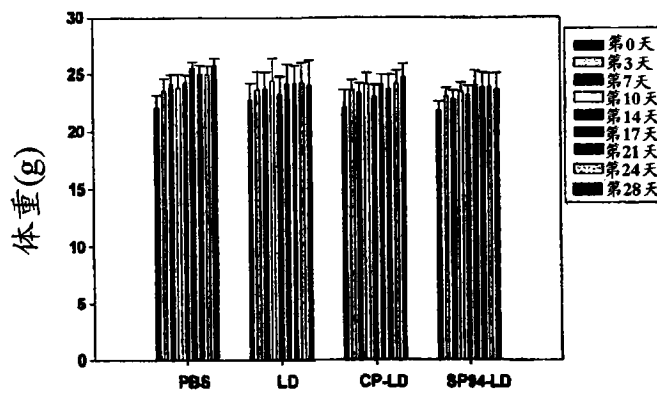


图 4D

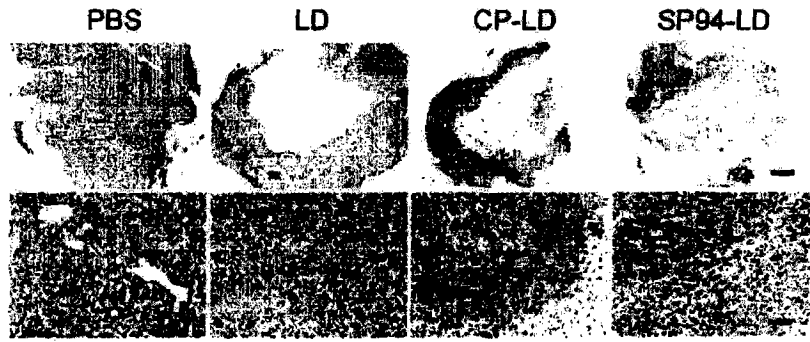


图 5A



图 5B



图 5C

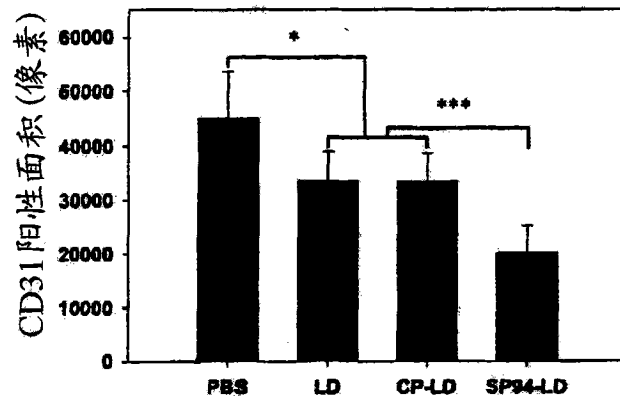


图 5D

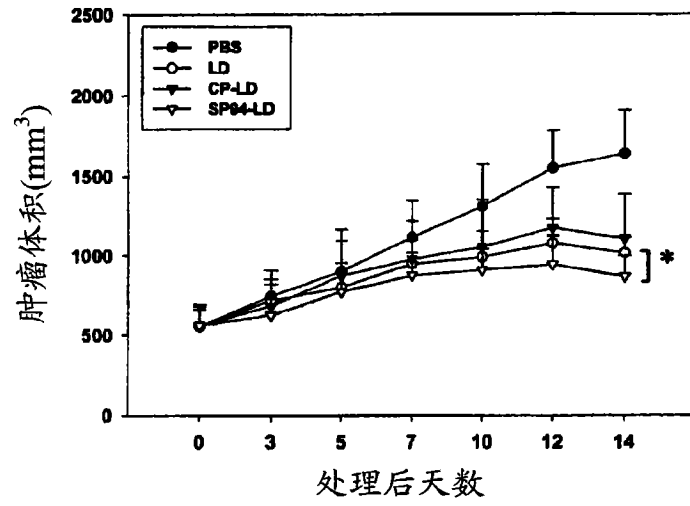


图 6A

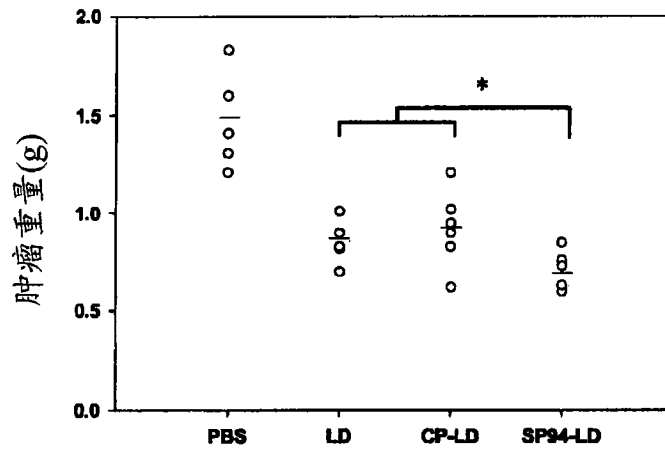


图 6B

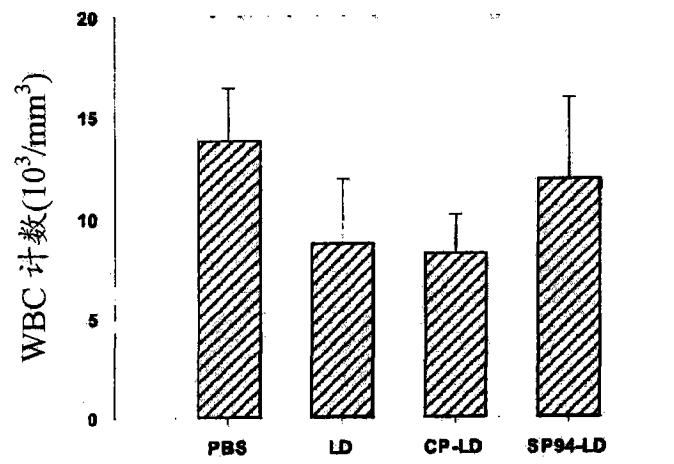


图 6C

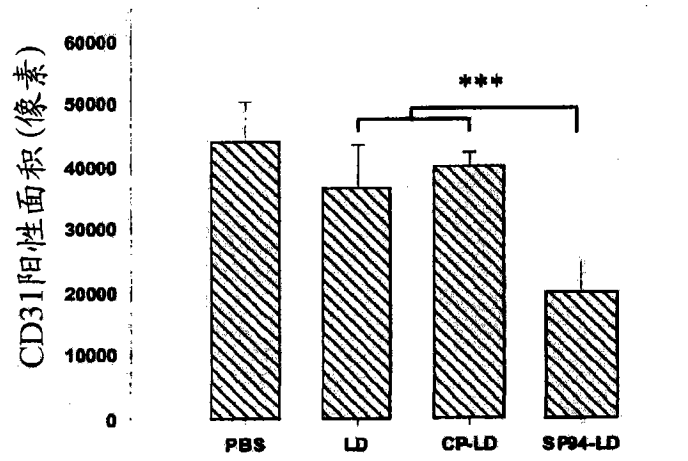


图 6D

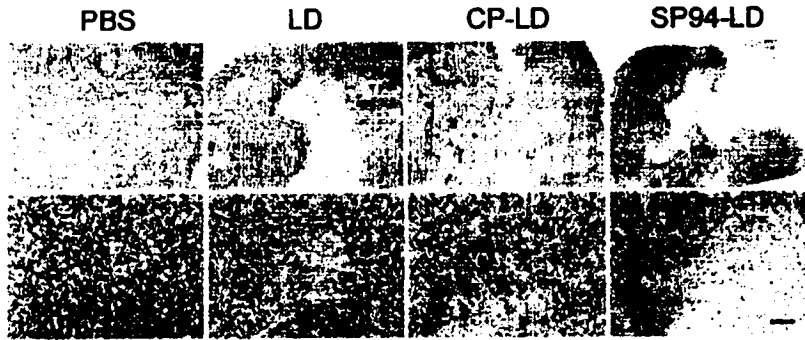


图 6E

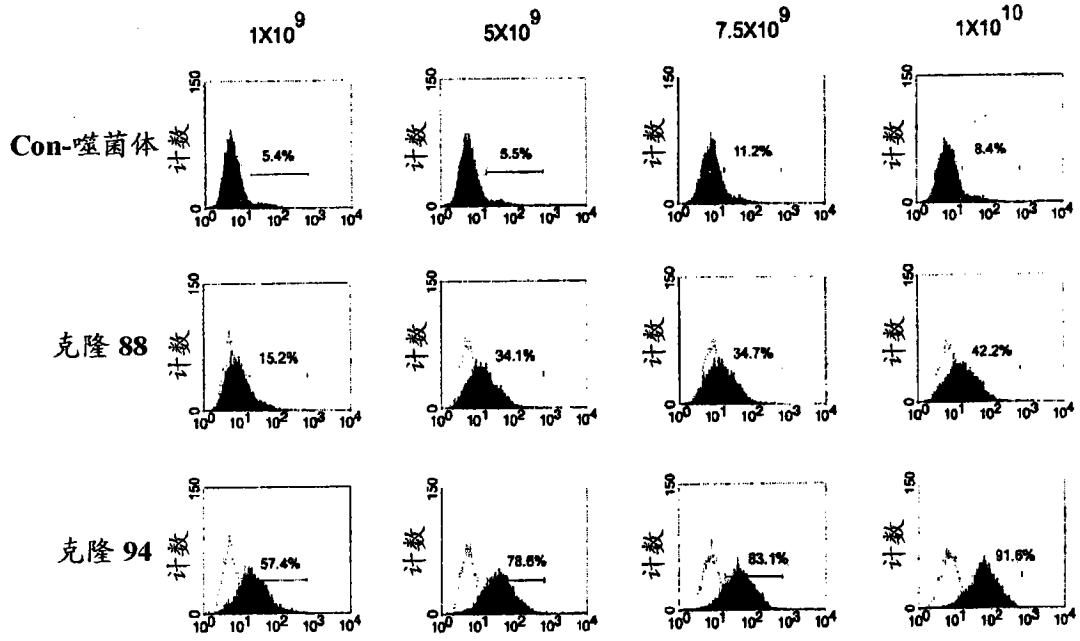


图 7

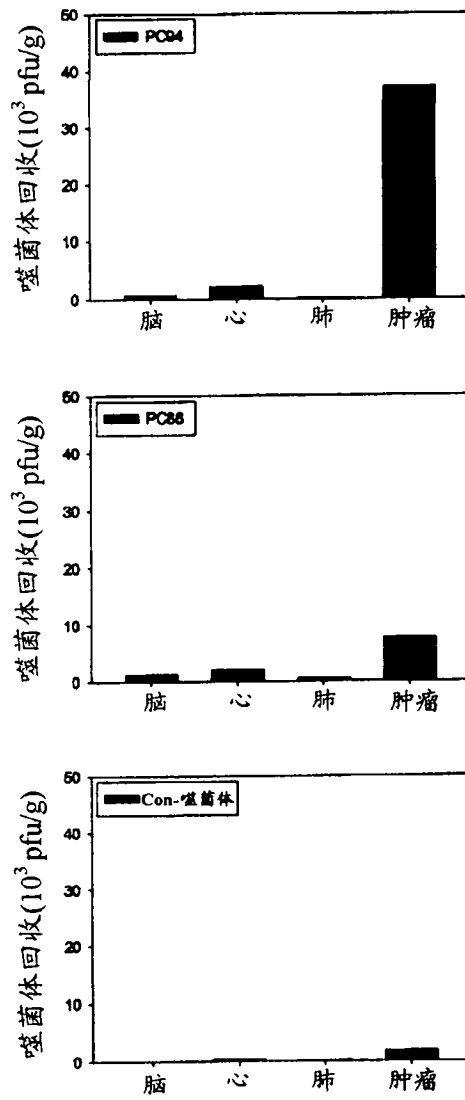


图 8

专利名称(译)	肝细胞癌细胞特异性的肽及其应用		
公开(公告)号	CN101918433B	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN200880124743.2	申请日	2008-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	中央研究院		
申请(专利权)人(译)	中央研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中央研究院		
[标]发明人	吴汉忠 林钦塘 阿尔伯特洛		
发明人	吴汉忠 林钦塘 阿尔伯特洛		
IPC分类号	C07K7/08 A61P35/00 C07K16/00 A61K9/127 G01N33/53		
CPC分类号	C07K7/08 A61K38/00 G01N33/57438 A61P35/00		
优先权	60/996488 2007-11-20 US		
其他公开文献	CN101918433A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	噬菌体克隆	噬菌体展示肽序列 ^a	SEQ ID NO
<p>肝细胞癌(HCC)是全世界癌症致死的第四位原因。随着对分子肿瘤学认识的增加,新的治疗策略一直在不断的被研发以治愈此疾病。在此,我们利用噬菌体展示来鉴定新的肽,包括(SP94),它特异性的结合HCC细胞。在体外,噬菌体克隆PC94结合HCC细胞系。在体内,PC94特异性的归巢至携带人HCC异种移植物的SCID小鼠的肿瘤组织而不归巢至其正常的内脏器官。这种归巢能力可被合成肽SP94竞争性的抑制。PC94定位于肿瘤组织但在SP94竞争的肿瘤组织或正常器官中则检测不到。此外,PC94识别来自HCC患者的外科标本中的肿瘤组织但不识别其中的非肿瘤组织,阳性率为61.3%(19/31)。随着SP94和脂质体多柔比星的偶联,靶向药物递送系统通过增强肿瘤凋亡和降低肿瘤血管发生而提高了针对HCC异种移植物的治疗效力。我们的结果指示SP94能改善晚期HCC患者的系统性治疗。</p>	94	SFSIIHTPILPL	(SEQ ID NO: 2)
	88	ELMNPLLPFIQP	(SEQ ID NO: 4)
	84	HLPSTGNQYLSL	(SEQ ID NO: 6)
	01	ETNWTTRPPLRV	(SEQ ID NO: 8)
	15	EYRMAHLTPSLL	(SEQ ID NO: 10)
	86	YHLQDSETLSLL	(SEQ ID NO: 12)
	42	SPWYMTSPNNTA	(SEQ ID NO: 14)
	72	SVSVGMKPSRP	(SEQ ID NO: 16)
	47	DPMTWTPSVMR	(SEQ ID NO: 18)
	26	TPHRLDWSPHLV	(SEQ ID NO: 20)
	02	GSNPWNWLTTL	(SEQ ID NO: 22)
	62	NPFNQHLHAQHP	(SEQ ID NO: 24)
	09	SESKDPTLWYPA	(SEQ ID NO: 26)
	85	SPRLATPSSRV	(SEQ ID NO: 28)
12	SNNEPMLRYTQQ	(SEQ ID NO: 30)	