

(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2010-517576  
(P2010-517576A)

(43) 公表日 平成22年5月27日(2010.5.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 7 6
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-549136 (P2009-549136)  
 (86) (22) 出願日 平成20年2月12日 (2008. 2. 12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年10月8日 (2009. 10. 8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/001810  
 (87) 国際公開番号 W02008/100482  
 (87) 国際公開日 平成20年8月21日 (2008. 8. 21)  
 (31) 優先権主張番号 60/900, 980  
 (32) 優先日 平成19年2月13日 (2007. 2. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/901, 086  
 (32) 優先日 平成19年2月14日 (2007. 2. 14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 11/783, 926  
 (32) 優先日 平成19年4月13日 (2007. 4. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596118493  
 アカデミア シニカ  
 ACADEMIA SINICA  
 台湾, タイペイ, ナンカーン, アカデミア  
 シニカ ロード, セクション 2, 12  
 8  
 (71) 出願人 503209342  
 ナショナル タイワン ユニバーシテイ  
 台湾 106 タイペイ ルーズベルト  
 ロード セクション 4 ナンバー1  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺癌の腫瘍血管を標的とするペプチドおよびその適用

(57) 【要約】

本発明は、診断および治療法を含む適用に用いるための核酸、ペプチドおよび抗体を提供する。ペプチドは新生血管系を標的とし、インビボファージディスプレイによって同定された。こうしたペプチドの1つであるSP5-52は、SCIDマウスにおける複数の腫瘍の新生血管系を認識したが、正常な血管はターゲティングしなかった。このペプチドはヒト肺癌生検試料の血管にも結合する。SP5-52およびドキシソルピシンを含むリポソームは、SCIDマウスにおける複数のヒト癌異種移植片に対する薬物の効果を高めた。

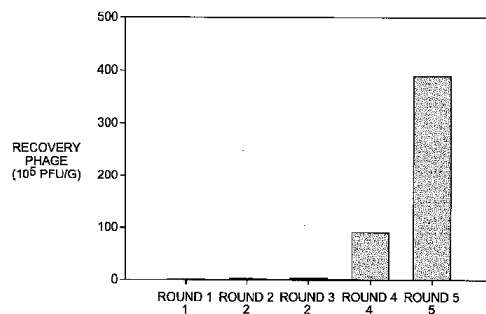


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15 および配列番号 17 からなる群より選択される配列を含む、ポリヌクレオチドまたはその変異体。

**【請求項 2】**

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16 および配列番号 18 からなる群より選択される配列を含む、ペプチドまたはその変異体。

**【請求項 3】**

前記ペプチドは配列番号 2 またはその変異体を含む、請求項 2 に記載のペプチド。

**【請求項 4】**

前記ペプチドは配列番号 2 を含む、請求項 3 に記載のペプチド。

**【請求項 5】**

第 2 のペプチドに融合された第 1 のペプチドを含む融合タンパク質であって、前記第 1 のペプチドは請求項 2 に記載のペプチドを含む、融合タンパク質。

**【請求項 6】**

前記第 2 のペプチドはエピトープを含む、請求項 5 に記載の融合ペプチド。

**【請求項 7】**

前記ペプチドは 1 つまたはそれ以上の標識を含む、請求項 2 に記載のペプチド。

**【請求項 8】**

前記標識は、FITC、ビオチンおよび放射性同位元素からなる群より選択される、請求項 7 に記載のペプチド。

**【請求項 9】**

前記ペプチドは、ドキシソルピシン、ピノレルピン、オリゴヌクレオチド、毒素、抗 VEGF アプタマー、および放射性分子からなる群より選択される 1 つまたはそれ以上の薬物に結合される、請求項 2 に記載のペプチド。

**【請求項 10】**

請求項 2 に記載のペプチドに結合する抗体。

**【請求項 11】**

請求項 2 に記載のペプチドを少なくとも 1 つ含むリボソーム。

**【請求項 12】**

前記ペプチドは配列番号 2 またはその変異体を含む、請求項 11 に記載のリボソーム。

**【請求項 13】**

前記ペプチドは配列番号 2 を含む、請求項 11 に記載のリボソーム。

**【請求項 14】**

前記リボソームは、ドキシソルピシン、ピノレルピン、オリゴヌクレオチド、毒素、抗 VEGF アプタマー、および放射性分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの薬物をさらに含む、請求項 11 に記載のリボソーム。

**【請求項 15】**

前記薬物はドキシソルピシンである、請求項 14 に記載のリボソーム。

**【請求項 16】**

前記リボソームはさらに医薬的に許容できる担体を含む、請求項 14 に記載のリボソーム。

**【請求項 17】**

哺乳動物の疾患を処置する方法であって、処置を必要とする哺乳動物に請求項 9 に記載のペプチドの有効量を投与する工程を含む、方法。

**【請求項 18】**

前記哺乳動物はヒトである、請求項 17 に記載の方法。

**【請求項 19】**

10

20

30

40

50

哺乳動物の疾患を処置する方法であって、処置を必要とする哺乳動物に、1つまたはそれ以上の薬物と1つ以上の請求項2に記載のペプチドを含有するペプチドとを含むリポソームの有効量を投与する工程を含む、方法。

【請求項20】

前記リポソームは、配列番号2を含むペプチドまたはその変異体を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記リポソームは、配列番号2を含むペプチドを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記リポソームは1つ以上の化学療法薬物を含み、前記1つ以上の化学療法薬物は、ドキソルビシン、ピノレルピン、オリゴヌクレオチド、毒素、および抗VEGFアプタマー、および放射性分子からなる群より選択される、請求項19に記載の方法。

10

【請求項23】

前記化学療法薬物はドキソルビシンである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記疾患は癌である、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

前記癌は、肺癌、結腸癌、乳癌、前立腺癌、肝癌、膵癌、および口腔癌からなる群より選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記癌は、肺癌である、請求項25に記載の方法。

20

【請求項27】

前記癌は、口腔癌である、請求項25に記載の方法。

【請求項28】

前記疾患は、加齢性黄斑変性である、請求項19に記載の方法。

【請求項29】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項19に記載の方法。

【請求項30】

試料中の新生血管系を検出するための方法であって、

a) 前記試料を請求項2に記載のペプチドに、新生血管系に前記ペプチドが結合できる条件下で接触させる工程と、

b) 請求項10に記載の抗体を用いて、前記ペプチドの結合を検出する工程とを含む、方法。

30

【請求項31】

試料中の新生血管系を検出するための方法であって、

a) 前記試料を請求項6に記載の融合ペプチドに、新生血管系に前記融合ペプチドが結合できる条件下で接触させる工程と、

b) 前記融合ペプチドのエピトープに特異的な抗体を用いて、融合タンパク質の結合を検出する工程と

を含む、方法。

40

【請求項32】

試料中の新生血管系を検出するための方法であって、

a) 前記試料を請求項7に記載のペプチドに、新生血管系に前記ペプチドが結合できる条件下で接触させる工程と、

b) 前記ペプチドの標識を検出する工程と

を含む、方法。

【請求項33】

前記標識は、FITCおよびビオチンからなる群より選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

50

請求項 2 に記載のペプチドに結合する生体分子を同定する方法であって、

a) 細胞抽出物を請求項 2 に記載のペプチドに、前記ペプチドおよびリガンドを含む複合体を形成できる条件下で接触させる工程と、

b) 前記複合体を分析して前記リガンドを同定する工程とを含む、方法。

【請求項 35】

ストリンジェントな条件下で請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。

【請求項 36】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

10

【請求項 37】

請求項 36 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 38】

請求項 35 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2007年2月13日に提出された米国仮出願第60/900,980号および2007年2月14日に提出された米国仮出願第60/901,086号ならびに2007年4月13日に提出された米国特許出願第11/783,926号(これらは全て、それらの全体が参考として援用される)への優先権を主張する。

20

【背景技術】

【0002】

腫瘍発達の際に、腫瘍細胞は老廃物を除去するためにより多くの酸素および代謝産物を必要とする。加えて、宿主脈管系への接近および腫瘍血液供給の生成は、腫瘍発達にとっての律速段階である(Bergersら、2003)。同様に、加齢性黄斑変性などの疾患は、新たな血管の生成を伴う。(Ngら、2006)。よって、腫瘍血管は腫瘍成長を阻害するための主要な標的であり、加齢性黄斑変性に伴う血管はこの疾患を阻害するための好適な標的である。腫瘍血管は、正常な組織の血管に存在しない特異的マーカを発現する。これらの特異的マーカの多くは、腫瘍が誘導する血管新生、すなわち新たな血管の発芽に関連するタンパク質である(Ruoslahti、2002)。細胞接着受容体のインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>および<sub>v<sub>5</sub></sub>は、腫瘍血管系中で過剰発現する(EliceiriおよびCheresh、1999)。確かに、腫瘍ホーミングまたはターゲティングに対するインビボのフェージディスプレイによって同定されたRGDペプチドの1つは<sub>v<sub>3</sub></sub>を認識する(Pasqualiniら、1997)。これらのインテグリンに対して特異的なペプチドは、抗癌剤および抗血管新生剤のターゲティングによる送達のためのリガンドとして使用されてきた(Arapら、1998)。血管系の不均一性は、ターゲティングによる治療法の送達に対する新たな機会を与えるかもしれない。

30

【0003】

従来の化学療法は、その正常な組織に対する毒性によって制限される。もし化学療法薬物を腫瘍部位または腫瘍脈管に直接結合させて正常な組織から離すことができれば、治療結果は大きく改善されるだろう。大部分の小分子化学療法薬剤は、静脈内(intravenous: i.v.)投与における大量の分配を有する(Spethら、1988)。この分配によって、正常な組織への高レベルの毒性のために治療指数がしばしば小さくなる。薬物をリポソームなどの高分子担体に封入することによって、分配の体積が顕著に低減され、腫瘍における薬物の濃度が増加する(Drummondら、1999)。封入によって、非特異的毒性の重篤度およびタイプを減少でき、腫瘍部位に有効に送達される薬物の量を増加できる(GabizonおよびMartin、1997; Martin、1998; Papahadjopoulosら、1991)。腫瘍ターゲティングリガンドを用いて、リポソームなどの高分子担体を腫瘍部位にターゲティングできる。代替的には

40

50

、薬物を腫瘍ターゲティングリガンドに結合または連結させることによって、薬物の腫瘍へのターゲティングを促進できる。

【0004】

リポソームは、癌化学療法における薬物担体として提案された (Gregoriadisら、1974)。そのとき以来、リポソームに対する関心は増加し、リポソーム系は現在薬物担体として広範囲に研究されている。薬物を特異的に送達するのに使用するために、リポソームには以下の3つの基本的要求が望まれる：(i)血液循環を長くすること、(ii)腫瘍または他の標的組織における十分な蓄積、(iii)薬物の薬力学に適合する放出プロフィールを有しながら、制御された薬物放出および腫瘍細胞または他の標的組織による取込みが行なわれること。

10

【0005】

最初、リポソーム薬物送達系の研究は、細網内皮系 (reticuloendothelial system: RES) による非常に速い血液クリアランスに苦しめられた。粒子サイズ、表面電荷 (Weinstein、1984)、およびリポソーム組成物は、クリアランスプロフィールに対する影響が強い (例、ホスファチジルイノシトールまたはモノシアロガングリオシドの組み込みによって、血液中のリポソーム循環が長くなる) ことが確認された (AllenおよびChonn、1987; GabizonおよびPapahadjopoulos、1988; Senior、1987)。漏出性毛細血管を介して優先的に循環から出て、広範囲の新血管新生を示す腫瘍に蓄積してより高濃度となり、効能を高めると予測される「ステルス」リポソームによって、この取込みは回避され得る (Wuら、1993)。

20

【0006】

しかし、合成ポリマーポリエチレングリコール (polyethyleneglycol: PEG) で被覆されたリポソームが血中の半減期を有意に増加させることが発見されたときには、リポソームは単に良好な薬物送達候補としてのみ認識されていた (Allenら、1991; BlumeおよびCevc、1990; Klibanovら、1990; Papahadjopoulosら、1991; Seniorら、1991)。このペグ化リポソームは、リポソームのタンパク質吸着およびオプソニン作用を阻害する高度に水和し保護されたリポソーム表面のために、長く循環する (WoodleeおよびLasick、1992)。速いオプソニン作用およびクリアランスの問題を解決して、血中で最大72時間の半減期を有するリポソームを提供する (Drummondら、1999) と、次の挑戦事項は能動的ターゲティングによって腫瘍組織または他の疾患組織内にリポソームを蓄積させることだった。

30

【0007】

ターゲティングリポソームの使用によって、腫瘍標的部位における薬物放出を有意に高め、治療効果を増加できる可能性があり得る (非特許文献1; 非特許文献2)。薬物送達研究分野では、腫瘍組織内で蓄積する長く循環するリポソームの構築に成功しており、閉じ込められた薬物は、能動的なトリガが存在しない限り、次いで受動拡散によってリポソームの外に漏出する。疾患組織に特異的に薬物を放出できる部位特異的トリガの使用は、腫瘍標的部位における薬物の生物学的利用率を増加させる方法の1つである。薬物の生物学的利用率を最適化する別の方法は、能動的ターゲティングによってより高程度のリポソーム蓄積を得ることである。さらに、能動的ターゲティングと能動的トリガとの組合せによって、腫瘍標的部位における有意に高められた特異的な薬物放出をもたらす得る可能性がある (非特許文献1; 非特許文献2)。

40

【0008】

ヒトの癌の90%より多くを含む固形悪性腫瘍に対しては、免疫結合体が腫瘍組織に侵入できないため、腫瘍特異的な抗原を認識する抗体が薬物送達に与える有用性はほとんどなかった (Dvorakら、1991; Shockleyら、1991)。しかし、過去10年間のファージディスプレイペプチドライブラリの発達は、抗体よりも有効な小さいペプチドを同定する機会をもたらした。

50

## 【0009】

ファージディスプレイのランダムペプチドライブラリは、B細胞エピトープ (D' Me l l o ら、1997; Fu ら、1997; S c o t t および S m i t h、1990; W u ら、2001; W u ら、2003) およびタンパク質-タンパク質接触 (A t w e l l ら、1997; B o t t g e r ら、1996; N o r d ら、1997; S m i t h ら、1999) をマッピングする機会、受容体 (K o i v u n e n ら、1999; L i ら、1995; W r i g h t o n ら、1996) またはタンパク質 (B o t t g e r ら、1996; C a s t a n o ら、1995; D e L e o ら、1995; K r a f t ら、1999; P a s q u a l i n i ら、1995) に結合する生理活性ペプチドを選択する機会、疾患特異的な抗原模倣 (F o l g o r i ら、1994; L i u ら、2004; P r e z z i ら、1996) を探索する機会、ならびに細胞特異的ペプチド (B a r r y ら、1996; L e e ら、2004; M a z z u c c h e l l i ら、1999) および器官特異的ペプチド (A r a p ら、1998; E s s l e r および R u o s l a h t i、2002; P a s q u a l i n i ら、1995; P a s q u a l i n i および R u o s l a h t i、1996) を定める機会を与える。

10

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0010】

【非特許文献1】Lee ら、C a n c e r R e s ( 2 0 0 4 ) 6 4 , 8 0 0 2 ~ 8 0 0 8

20

【非特許文献2】Park ら、C l i n C a n c e r R e s ( 2 0 0 2 ) 8 , 1 1 7 2 - 1 1 8 1

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0011】

したがって、特定の標的組織に対してファージディスプレイライブラリをスクリーニングすることは、薬物、遺伝子送達ベクターまたはその他の治療薬剤のターゲティングに用いられるペプチド配列の同定における直接的かつ迅速な方法となる。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0012】

本発明はとりわけ、以下のものを単独または組合せて含む。

30

## 【0013】

本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15および配列番号17を含むポリヌクレオチドおよびその変異体を提供する。

## 【0014】

本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16および配列番号18を含むペプチドおよびその変異体を提供する。一実施形態において、ペプチドは配列番号2またはその変異体である。別の実施形態において、ペプチドは配列番号2である。別の実施形態において、ペプチドは融合タンパク質を含む。別の実施形態において、ペプチドは1つまたはそれ以上の標識を含む。別の実施形態において、ペプチドは1つまたはそれ以上の薬物に結合される。ペプチドに結合され得る薬物はドキシソルピシン、ピノレルピン、オリゴヌクレオチド、毒素、抗VEGFアプタマー、および放射性分子を含んでもよい。

40

## 【0015】

本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16および配列番号18からなる群より選択される本発明のペプチドまたはその変異体に結合する抗体を提供する。

## 【0016】

本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番

50

号12、配列番号14、配列番号16および配列番号18からなる群より選択される少なくとも1つのペプチドを含むリポソームを提供する。一実施形態において、リポソームは配列番号2またはその変異体を含む。別の実施形態において、リポソームは配列番号2を含む。リポソームは、ドキソルビシン、ピノレルピン、オリゴヌクレオチド、毒素、抗VEGFアプタマー、および放射性分子からなる群より選択される1つまたはそれ以上の薬物を含んでもよい。一実施形態において、使用され得る薬物のうちの1つは、リン脂質1 $\mu\text{mol}$ 当たり約110 $\mu\text{g}$ から約130 $\mu\text{g}$ の量であり得るドキソルビシンである。ある実施形態において、リポソームは約65nmから約75nmの直径を有する。別の実施形態において、リポソーム当りのペプチド分子の数は約300から約500である。リポソームは医薬的に許容できる担体を含んでもよい。

10

**【0017】**

本発明は、処置を必要とする対象に本発明のペプチドを投与する工程を含む、疾患を処置する方法を提供し、前記ペプチドは薬物に結合される。ペプチドに結合され得る薬物は、ドキソルビシン、ピノレルピン、オリゴヌクレオチド、毒素、抗VEGFアプタマー、および放射性分子を含む。

**【0018】**

本発明は、1つまたはそれ以上の薬物と、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、および配列番号18からなる群より選択されるより多くもしくはそれ以上のペプチド、またはその変異体とを含むリポソームを対象に接触させる工程を含む、疾患を処置する方法を提供する。この方法は、1つまたはそれ以上の薬物と、配列番号2またはその変異体とを含むリポソームを対象に接触させる工程を含んでもよい。リポソームは1つまたはそれ以上の化学療法薬物を含んでもよい。治療薬物はドキソルビシンであってもよい。この方法は癌を処置するために用いられてもよく、癌は、肺癌、結腸癌、乳癌、前立腺癌、肝癌、膵癌、および口腔癌からなる群より選択される癌を含んでもよい。実施形態の1つにおいて、癌は肺癌である。別の実施形態において、癌は口腔癌である。この方法は、加齢性黄斑変性を処置するために用いられてもよい。

20

**【0019】**

本発明は新生血管系を検出する方法を提供し、この方法は、ペプチドが新生血管系に結合できる条件下で、試料を本発明のペプチドに接触させる工程と、そのペプチドを検出する工程とを含む。ペプチドは、そのペプチドに対する抗体によって検出されてもよい。ペプチドはエピトープを含む融合タンパク質を含んでもよく、この融合タンパク質はエピトープに対する抗体によって検出される。ペプチドは標識を含んでもよく、このペプチドの標識を検出することによってペプチドが検出される。実施形態の1つにおいて、標識はFITCを含む。別の実施形態において、標識はビオチンを含む。

30

**【0020】**

本発明は、本発明のペプチドに結合する生体分子を同定する方法を提供し、この方法は、ペプチドとリガンドとを含む複合体を形成できる条件下で本発明のペプチドを細胞抽出物に接触させる工程と、その複合体を分析してリガンドを同定する工程とを含む。

**【0021】**

本発明は、ストリンジェントな条件下で請求項1に記載のポリヌクレオチドの相補体 (complement) にハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

40

**【0022】**

本発明は、請求項1に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、およびそのベクターを含む宿主細胞を提供する。

**【0023】**

本発明は、ストリンジェントな条件下で請求項1に記載のポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるペプチドを提供する。

**【図面の簡単な説明】****【0024】**

50

【図 1】インビボのファージディスプレイによる、肺癌ターゲティングファージの選択を示す図である。

【図 2 A】腫瘍ホーミングファージの特異性を示す図である。

【図 2 B】腫瘍ホーミングファージの特異性を示す図である。

【図 2 C】腫瘍ホーミングファージの特異性を示す図である。

【図 2 D】腫瘍ホーミングファージの特異性を示す図である。

【図 3】(A) ヒト肺への静脈内注射後の PC5-52 ファージの免疫蛍光局在化を示す図である。(B) 肺癌異種移植片の腫瘍脈管へのファージ結合の調査を示す図である。(C) FITC 標識された SP5-52 ペプチドと肺癌異種移植片の腫瘍脈管との結合を示す図である。

10

【図 4 A】異なるヒト癌異種移植片を有する SCID マウスからの腫瘍ターゲティングファージ PC5-52 の回収を示す図である。

【図 4 B】異なるヒト癌異種移植片を有する SCID マウスからの腫瘍ターゲティングファージ PC5-52 の回収を示す図である。

【図 5】(A) ターゲティングファージが VEGF 刺激された HUVEC と反応することを示す図である。(B) 肺腺癌試料におけるビオチン標識された SP5-52 ペプチドの免疫組織化学的局在化を示す図である。

【図 6 A】ヒト肺癌異種移植片を有する SCID マウスの SP5-52-Lipo-Dox による処置を示す図である。

【図 6 B】SP5-52-Lipo-Dox で処置されたヒト肺癌異種移植片を有する SCID マウスの生存曲線を示す図である。

20

【図 6 C】SP5-52-Lipo-Dox で処置されたマウスにおける腫瘍脈管の減少および損傷を示す図である。

【図 6 D】口腔癌異種移植片を有する SCID マウスの SP5-52-Lipo-Dox による処置を示す図である。

【図 6 E】SP5-52-Lipo-Dox による口腔癌異種移植片を有する SCID マウスの生存曲線を示す図である。

【図 7】さまざまなヒト癌の異種移植片を有する SCID マウスの SP5-52-Lipo-Dox による処置を示す図である。

【発明を実施するための形態】

30

【0025】

表の簡単な説明

表 1 は、肺癌異種移植片から選択されたファージからのファージディスプレイペプチド配列を提供する。

【0026】

癌の化学療法のひとつは、強力な副作用および薬剤耐性の獲得を伴う。したがって当該技術分野においては、薬物を腫瘍脈管上だけでなく腫瘍細胞上の標的部位にも送達する薬物送達系が必要とされている。いくつかの試みの中には、腫瘍組織に対する 1 本鎖 Fv (single-chain Fv: scFv) 抗体 (Park ら、2002) およびターゲティングペプチド (Lee ら、2004) の使用が含まれる。最近、脈管ターゲティングが注目を集めている。なぜなら、特定の薬物または薬物担体は腫瘍の血管外遊出よりも前にまず血管系に出会うためである (Oku ら、2002)。その概念は、血管新生が腫瘍形成の際の拡張に必要な工程だということである。同様に、血管新生は加齢性黄斑変性などの疾患を伴う。(Ng ら、2006)。腫瘍血管系は正常な血管系とは異なる固有なマーカを発現する (Hoffman ら、2003) ため、これらのマーカに基づくターゲティングは癌処置に対する有望な戦略である。これらの抗血管新生療法は、効果が高く毒性が低い見込みがある。さらに、ターゲティングリガンドの親和性に基づく化学療法薬物の腫瘍組織への送達は、高い腫瘍間質液圧および薬物耐性に起因する癌治療法の障害を克服するものである。開示されるペプチドはリガンド標的療法に用いることができ、したがってこのペプチドは従来の抗癌薬よりも治療効果を改善する新たな処置に対する基礎を

40

50

提供する。

【0027】

インビボのファージディスプレイを用いて、腫瘍血管に特異的にホーミングするペプチドを同定した。表1。この出願において、「ホーミングする(home)」、「ホーミング(homing)」、「標的(target)」および「ターゲティング(targeting)」という用語は相互交換可能に用いられる。SP5-52という1つのペプチド、SVSVGMPSPRP[配列番号2]のさらなる研究から、彼のペプチドは、ヒト腫瘍を有するSCIDマウスにおける腫瘍の血管系は認識するが正常な血管は認識しないことが明らかになった。SP5-52は、動物モデルにおける複数の腫瘍からの異種移植片の腫瘍脈管だけでなく、VEGF刺激されたヒト脈管内皮細胞(human vascular endothelial cell: HUVEC)およびヒト肺癌からの血管にも特異的に結合できることが発見された。加えて、SP5-52ペプチドに結合された、ドキシルビシン(doxorubicin)を有するリポソーム(SP5-52-Lipo-Dox)は、SCIDマウスにおけるヒト癌異種移植片に対する薬物の効果を高めた。これらの研究から、SP5-52ペプチドは複数の腫瘍の血管系に特異的に結合できて、固形腫瘍を標的とする薬物送達に対する良い候補であることが示される。SP5-52およびその他のペプチドは、腫瘍血管系のターゲティングに有用である。

10

【0028】

本発明者らの研究において、インビボのバイオニングの第5ラウンドからのファージは、肺癌異種移植片との結合活性が最初のファージライブラリのものより156倍高かった(図1)。特定のファージクローンは、プロリン-セリン-プロリン(PPP)というコンセンサスペプチドモチーフを提示した(表1)。別個のインビボファージディスプレイ実験において、本発明者らはIVO-2と名付けられたファージクローンを同定し、これは口腔癌異種移植片の腫瘍組織にホーミングした。IVO-2もPC5-52と同じアミノ酸配列を提示することを本発明者らは定めた。

20

【0029】

インビボのホーミング実験から、PC5-52は肺癌および口腔癌の異種移植片からの腫瘍組織の脈管には特異的に結合できるが、他の正常な器官、たとえば肺、心臓および脳などには結合できないことが示された(図2および図3)。ペプチド競合的阻害アッセイが行なわれたとき、PC5-52と腫瘍組織との結合活性は、合成ペプチドSP5-52によって阻害された(図2Bおよび図2D)。これらの結果は、この合成ペプチドがそれぞれのファージクローンと同じ結合部位に結合することを示唆する。

30

【0030】

腫瘍塊および正常な器官におけるホーミングファージの局在化を調べるために、肺癌のSCIDマウスにPC5-52を静脈内注射し、次いでこれらのマウスからの冷凍切片を、抗マウスCD31および抗M13 mAbを用いた二重局在化に供した。その結果、CD31およびファージ粒子はほとんどの異種移植片脈管内皮に共存しており、腫瘍細胞およびその他の正常な器官においては稀であることが明らかになった(図3)。これらの結果から、PC5-52は腫瘍血管系の内皮細胞を特異的にターゲティングできるが、腫瘍細胞または正常な器官の血管はターゲティングできないことが示された。

40

【0031】

本発明者らは調査を拡大して、PC5-52が他のヒト腫瘍細胞、たとえばヒト肺癌(H460)、結腸癌(HCT116)、乳癌(BT483)、前立腺癌(PC3)、肝癌(Mahlavu)および膵癌(Paca)細胞などに由来する異種移植片の血管系にも結合できるのかどうかを調べた。その結果、異なる癌細胞系からのこれらの異種移植片腫瘍組織は、正常な器官よりもPC5-52のタイターが高い(正常な器官に比べて10倍より多い)ことが示された(図4)。これらのデータから、PC5-52は8つの異なるタイプのヒト癌異種移植片からの腫瘍組織に対して、より高い結合親和性を有することが示される。この現象は、固形腫瘍の血管系が、SP5-52ペプチドによって認識される未知の普遍的受容体を発現している可能性を示唆するものである。PC5-52ファージ

50

ジおよびFITC標識されたSP5-52ペプチドはどちらも異種移植片における腫瘍血管内皮には特異的に結合できたが、正常な血管には結合できなかったという本発明者らの実証(図3)は、この可能性をさらに支持する。

#### 【0032】

コンセンサスモチーフであるプロリン(P)-セリン(S)-プロリン(P)は、表1に示される3つのクローンPC5-5、PC-52およびPC-54の提示ペプチドに存在し、このコンセンサスモチーフの役割を調べるために、本発明者らはSP5-52(SVSVGMPSPRP)中のこれら3つのアミノ酸残基を、変異ペプチドMP5-52(SVSVGMPGGRP)[配列番号20]においてGGGに変えた。図4Bに示されるとおり、PC5-52の腫瘍ホーミング能力はSP5-52によって顕著に阻害されたが、変異ペプチドMP5-52には阻害されなかった(図4B)。

10

#### 【0033】

ヒトの癌治療法に対するSP5-52の適用可能性を評価するために、本発明者らは、ネズミ血管新生モデルにおいて選択されたペプチドがヒト腫瘍の血管系内皮に対する結合親和性を有するかどうかを調べた。本発明者らは、このペプチドがVEGF刺激された内皮細胞およびヒト肺癌生検試料に特異的に結合できることを確認した(図5)。本発明者らの結果から、ヒト肺癌または他の癌に対するリガンド標的療法の開発に対するターゲティングリガンドとしてSP5-52を用いることができることが示される。

#### 【0034】

本発明者らはSP5-52に結合したリポソームを調製して、SP5-52およびドキシソルピシンを含むリポソーム、すなわちSP5-52-Lipo-Doxと、ドキシソルピシンを含むリポソーム、すなわちLipo-Doxとが腫瘍成長に与える影響を比較した。その結果、SP5-52-Lipo-Doxはヒトの肺癌および口腔癌異種移植片の両方に対する薬物の効果を高めることが明らかになった(図6Aおよび図6D)。さらに、このターゲティングリポソームはこれら2つのヒト癌動物モデルの生存率をも有意に増加した(図6Bおよび図6E)。SP5-52-Lipo-Dox処置によって、腫瘍血管系は破壊されて顕著に減少した(図6C)。

20

#### 【0035】

SP5-52-Lipo-Doxが他の固形腫瘍に対する治療効果も高めることができるかどうかを調べるために、本発明者らは、ヒト肺癌(H460)、結腸癌(HCT116)、乳癌(BT483)、肝癌(Mahlavu)および膵癌(Paca)を含む5タイプのヒト癌からの異種移植片を有するマウスを処置した。興味深いことに、ターゲティングリポソームSP5-52-Lipo-Doxは、これら5つのヒト癌に対する治療効果の増加を示した(図7)。これらの結果から、Lipo-DoxをペプチドSP5-52に結合させることによって、薬物がヒト固形腫瘍異種移植片を阻害する能力が高められることが示された。

30

#### 【0036】

よって、本明細書に記載されるものを含むこれらの新たなターゲティング戦略は、癌処置を顕著に改善する可能性を有する。

#### 【0037】

腫瘍血管系は、一般的に安定で薬物耐性をほとんどまたはまったく誘導しない非悪性の内皮細胞からなっているために、癌治療法に対する特に好適な標的である(Boehmら、1997)。加えて、これらの細胞は薬物にもっと接近でき、固有の増幅機構を有する。1個の内皮細胞の除去によって100個の腫瘍細胞の生育を阻害できると見積もられている(BurrowsおよびThorpe、1994;Denekamp、1993)。本発明者らの結果から、SP5-52-Lipo-Dox処置によって、腫瘍血管系は破壊されて顕著に減少することが証明された(図6C)。これらのデータは、このターゲティングリポソームが異種移植片動物モデルにおける化学療法の効果を改善することを明らかに示すものである。この効果は、ターゲティングリポソームが腫瘍組織内に蓄積することによるものかもしれない。固形腫瘍の腫瘍間質液圧(interstitial fl

40

50

uid pressure : I F P ) が高いことは、効率的な薬物送達にとって障壁である ( H e l d i n ら、2004 )。I F P が増加すると、腫瘍内の経毛細管輸送が減少するために薬物の吸収が減少し、その結果治療法が最終的に失敗となる。これらの現象には、薬剤耐性および転移性疾患の発達が伴う ( B o u c h e r ら、1990 ; B o u c h e r ら、1991 ; G u t m a n n ら、1992 ; H e l d i n ら、2004 ; L e s s ら、1992 )。本明細書に記載されるような効果的なリガンド標的療法は、リガンドの親和性を利用して抗癌薬を腫瘍組織に運ぶものであり、腫瘍の I F P が高くても薬物の蓄積を増加させることによって機能する可能性がある。

【 0 0 3 8 】

インビボのファージディスプレイを用いて腫瘍内皮細胞の分子上のターゲティングリガンドを単離することにより、本発明者らは P C 5 - 5 2 を含むいくつかのペプチドを同定し、これらのペプチドは2つの N S C L C および6つのヒト腫瘍異種移植片における血管系を標的とする。このペプチドを介してターゲティングされたリポソームは、リポソームの治療効果を高めて、ヒトの肺癌および口腔癌異種移植片を有するマウスの生存率を増加させた。S P 5 - 5 2 は固形腫瘍の血管系への薬物送達に対する優れた薬剤であり、臨床的な癌処置に適用可能である。

10

【 0 0 3 9 】

参考文献

【 0 0 4 0 】

【化 1】

- [044] AFSA., H. (1966). Determination of free amino groups in protein by trinitrobenzene sulfuric acid. *Anal Biochem* *14*, 328.
- [045] 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.
- [046] Atwell, S., Ultsch, M., De Vos, A. M., and Wells, J. A. (1997). Structural plasticity in a remodeled protein-protein interface. *Science* *278*, 1125-1128. 10
- [047] Barry, M. A., Dower, W. J., and Johnston, S. A. (1996). Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat Med* *2*, 299-305.
- [048] Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., and Hanahan, D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation* *111*, 1287-1295. 20
- [049] Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., and O'Reilly, M. S. (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* *390*, 404-407.
- [050] Bottger, V., Bottger, A., Howard, S. F., Picksley, S. M., Chene, P., Garcia-Echeverria, C., Hochkeppel, H. K., and Lane, D. P. (1996). Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display. *Oncogene* *13*, 2141-2147. 30

【 0 0 4 1 】

【化 2】

[051] Boucher, Y., Baxter, L. T., and Jain, R. K. (1990). Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer research* 50, 4478-4484.

[052] Boucher, Y., Kirkwood, J. M., Opacic, D., Desantis, M., and Jain, R. K. (1991). Interstitial hypertension in superficial metastatic melanomas in humans. *Cancer research* 51, 6691-6694. 10

[053] Burrows, F. J., and Thorpe., P. E. (1994). Vascular targeting: A new approach to the therapy of solid tumors. *Pharmacol Ther* 64, 155-174.

[054] Castano, A. R., Tangri, S., Miller, J. E., Holcombe, H. R., Jackson, M. R., Huse, W. D., Kronenberg, M., and Peterson, P. A. (1995). Peptide binding and presentation by mouse CD1. *Science* 269, 223-226. 20

[055] Chu, Y. W., Yang, P. C., Yang, S. C., Shyu, Y. C., Hendrix, M. J., Wu, R., and Wu, C. W. (1997). Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17, 353-360.

[056] D'Mello, F., Partidos, C. D., Steward, M. W., and Howard, C. R. (1997). Definition of the primary structure of hepatitis B virus (HBV) pre-S hepatocyte binding domain using random peptide libraries. *Virology* 237, 319-326. 30

[057] DeLeo, F. R., Yu, L., Burritt, J. B., Loetterle, L. R., Bond, C. W., Jesaitis, A. J., and Quinn, M. T. (1995). Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7110-7114. 40

[058] Denekamp, J. (1993). Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol* 66, 181-196.

【 0 0 4 2】

【化3】

[059] Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., and Papahadjopoulos, D. (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological reviews* 51, 691-743.

[060] Dvorak, H. F., Nagy, J. A., and Dvorak, A. M. (1991). Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies. *Cancer Cells* 3, 77-85. 10

[061] Eliceiri, B. P., and Cheresh, D. A. (1999). The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of clinical investigation* 103, 1227-1230.

[062] Essler, M., and Ruoslahti, E. (2002). Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2252-2257. 20

[063] Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfre, G., Cortese, R., Monaci, P., and Nicosia, A. (1994). A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *Embo J* 13, 2236-2243.

[064] Fu, Y., Shearing, L. N., Haynes, S., Crewther, P., Tilley, L., Anders, R. F., and Foley, M. (1997). Isolation from phage display libraries of single chain variable fragment antibodies that recognize conformational epitopes in the malaria vaccine candidate, apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* 272, 25678-25684. 30

[065] Gabizon, A., and Martin, F. (1997). Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* 54 Suppl 4, 15-21. 40

[066] Gutmann, R., Leunig, M., Feyh, J., Goetz, A. E., Messmer, K., Kastenbauer, E., and Jain, R. K. (1992). Interstitial hypertension in head and neck tumors in patients: correlation with tumor size. *Cancer research* 52, 1993-1995.

【0043】

【化4】

[067] Heldin, C. H., Rubin, K., Pietras, K., and Ostman, A. (2004). High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nature reviews* 4, 806-813.

[068] 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. 10

[069] Kirpotin, D., Park, J. W., Hong, K., Zalipsky, S., Li, W. L., Carter, P., Benz, C. C., and Papahadjopoulos, D. (1997). Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry* 36, 66-75.

[070] Koivunen, E., Arap, W., Rajotte, D., Lahdenranta, J., and Pasqualini, R. (1999). Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med* 40, 883-888. 20

[071] Kraft, S., Diefenbach, B., Mehta, R., Jonczyk, A., Luckenbach, G. A., and Goodman, S. L. (1999). Definition of an unexpected ligand recognition motif for alpha v beta 6 integrin. *J Biol Chem* 274, 1979-1985.

[072] 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. 30

[073] Less, J. R., Posner, M. C., Boucher, Y., Borochovit, D., Wolmark, N., and Jain, R. K. (1992). Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer research* 52, 6371-6374.

[074] Li, B., Tom, J. Y., Oare, D., Yen, R., Fairbrother, W. J., Wells, J. A., and Cunningham, B. C. (1995). Minimization of a polypeptide hormone. *Science* 270, 1657-1660. 40

[075] 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

【0044】

【化5】

severe acute respiratory syndrome (SARS) and serologic detection of SARS antibodies by epitope-based peptide antigens. *J Infect Dis* 190, 797-809.

[076] Martin, F. J. (1998). Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL (pegylated liposomal doxorubicin), in *Medical Applications of Liposomes* (Lasic DD and Papahadjopoulos D eds), (New York: Elsevier Science BV). 10

[077] Mazzucchelli, L., Burritt, J. B., Jesaitis, A. J., Nusrat, A., Liang, T. W., Gewirtz, A. T., Schnell, F. J., and Parkos, C. A. (1999). Cell-specific peptide binding by human neutrophils. *Blood* 93, 1738-1748.

[078] Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M., and Nygren, P. A. (1997). Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol* 15, 772-777. 20

[079] Oku, N., Asai, T., Watanabe, K., Kuromi, K., Nagatsuka, M., Kurohane, K., Kikkawa, H., Ogino, K., Tanaka, M., Ishikawa, D., *et al.* (2002). Anti-neovascular therapy using novel peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* 21, 2662-2669.

[080] Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 11460-11464. 30

[081] Park, J. W., Hong, K., Kirpotin, D. B., Colbern, G., Shalaby, R., Baselga, J., Shao, Y., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Moore, D., *et al.* (2002). Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res* 8, 1172-1181. 40

【0045】

【化6】

[082] Pasqualini, R., Koivunen, E., and Ruoslahti, E. (1995). A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol* 130, 1189-1196.

[083] Pasqualini, R., Koivunen, E., and Ruoslahti, E. (1997). Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature biotechnology* 15, 542-546. 10

[084] Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1996). Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 380, 364-366.

[085] Prezzi, C., Nuzzo, M., Meola, A., Delmastro, P., Galfre, G., Cortese, R., Nicosia, A., and Monaci, P. (1996). Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* 156, 4504-4513. 20

[086] Ruoslahti, E. (2002). Specialization of tumour vasculature. *Nature reviews* 2, 83-90.

[087] Scott, J. K., and Smith, G. P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249, 386-390.

[088] Shockley, T. R., Lin, K., Nagy, J. A., Tompkins, R. G., Dvorak, H. F., and Yarmush, M. L. (1991). Penetration of tumor tissue by antibodies and other immunoproteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 618, 367-382. 30

[089] Smith, W. C., McDowell, J. H., Dugger, D. R., Miller, R., Arendt, A., Popp, M. P., and Hargrave, P. A. (1999). Identification of regions of arrestin that bind to rhodopsin. *Biochemistry* 38, 2752-2761.

[090] Speth, P. A., van Hoesel, Q. G., and Haanen, C. (1988). Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clinical pharmacokinetics* 15, 15-31. 40

[091] Tseng, Y. L., Hong, R. L., Tao, M. H., and Chang, F. H. (1999). Sterically stabilized anti-idiotypic immunoliposomes improve the therapeutic efficacy of doxorubicin in a murine B-cell lymphoma model. *International journal of cancer* 80, 723-730.

【0046】

## 【化7】

[092] Wrighton, N. C., Farrell, F. X., Chang, R., Kashyap, A. K., Barbone, F. P., Mulcahy, L. S., Johnson, D. L., Barrett, R. W., Jolliffe, L. K., and Dower, W. J. (1996). Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 273, 458-464.

[093] Wu, H. C., Huang, Y. L., Chao, T. T., Jan, J. T., Huang, J. L., Chiang, H. Y., King, C. C., and Shaio, M. F. (2001). Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J Clin Microbiol* 39, 977-982. 10

[094] 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. *J Gen Virol* 84, 2771-2779. 20

[095] Zalipsky, S., Mullah, N., Harding, J. A., Gittelman, J., Guo, L., and DeFrees, S. A. (1997). Poly(ethylene glycol)-grafted liposomes with oligopeptide or oligosaccharide ligands appended to the termini of the polymer chains. *Bioconjugate chemistry* 8, 111-118.

## 【0047】

## 定義

本明細書において用いられる用語は以下に示すとおりの通常の意味を有し、明細書の文脈においてさらに理解されてもよい。

## 【0048】

「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド配列」、および「ヌクレオチド配列」という用語は本明細書において相互交換可能に用いられて、あらゆる長さのヌクレオチドの重合形をいう。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および/またはそれらの類似体もしくは誘導体を含む。この用語は、変異体を含む。変異体は、挿入、付加、欠失または置換を含み得る。本明細書に示されるヌクレオチド配列は5'から3'の方向にリストされる。

## 【0049】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は本明細書において相互交換可能に用いられて、あらゆる長さのアミノ酸の重合形を示し、それは天然に発生するアミノ酸、コードおよび非コードアミノ酸、化学的または生化学的に修飾、誘導されたアミノ酸またはデザイナアミノ酸 (designer amino acid)、アミノ酸類似体、ペプチド模倣薬およびデプシペプチド、ならびに修飾された、環状の、二環状の、デプシ環状の (depsicyclic) またはデプシ二環状の (depsibicyclic) ペプチドバックボーンを有するポリペプチドを含んでもよい。この用語は1本鎖タンパク質およびマルチマーを含む。この用語は、以下のものに結合されたタンパク質も含む：たとえばFITC、ビオチン、ならびに<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>90</sup>Y、<sup>9</sup>mTc、<sup>111</sup>In、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>137</sup>Cs、<sup>186</sup>Re、<sup>211</sup>At、<sup>212</sup>Bi、<sup>213</sup>Bi、<sup>223</sup>Ra、<sup>241</sup>Am、および<sup>244</sup>Cmを含むがこれらに限定されない放射性同位元素などの標識；検出可能な生成物を有する酵素（たと 40 50

えば、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなど)；蛍光剤および蛍光標識、蛍光発光金属、たとえば $^{152}\text{Eu}$ 、またはその他のランタニド系列、電気化学発光化合物、化学発光化合物、たとえばルミノール、イソルミノールまたはアクリジニウム塩など；特異的結合分子、たとえば磁性粒子、微小球、ナノ球体など。この用語は、治療薬剤に結合されたペプチドも含む。

#### 【0050】

この用語は融合タンパク質も含み、この融合タンパク質は、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase: GST) 融合タンパク質、たとえばルシフェリンまたはエクオリン (緑色蛍光タンパク質) などの生物発光タンパク質などの異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、異種および同種リーダー配列を有する融合タンパク質、N末端メチオニン残基を有する融合タンパク質または有さない融合タンパク質、ペグ化タンパク質、ならびに免疫学的にタグ付けされたタンパク質またはhisタグ付けされたタンパク質を含むが、これらに限定されない。こうした融合タンパク質はエピトープとの融合も含む。こうした融合タンパク質は、本発明のペプチドのマルチマー、たとえばホモダイマーまたはホモマルチマー、ならびにヘテロダイマーおよびヘテロマルチマーなどを含んでもよい。この用語はペプチドアダプターも含む。

10

#### 【0051】

本発明のペプチドは、ペプチドの生物学的に活性な変異体を含み、こうした変異体は構造が実質的に同様である。ペプチド配列の変異体は、対象のペプチドに比べて挿入、付加、欠失または置換を含んでいてもよい。ポリペプチド配列の変異体は、生物学的に活性な多形変異体を含む。

20

#### 【0052】

本発明のペプチドは、天然に発生するアミノ酸および天然に発生しないアミノ酸を含んでもよい。ペプチドはD-アミノ酸、D-およびL-アミノ酸の組合せ、およびさまざまな「デザイナー」または「合成」アミノ酸 (たとえば、 $\beta$ -メチルアミノ酸、C $\beta$ -メチルアミノ酸、およびN $\alpha$ -メチルアミノ酸など) を含むことによって特別な特性を有してもよい。加えて、ペプチドは環状であってもよい。ペプチドは非古典的アミノ酸を含むことによって特定の立体構造モチーフを導入してもよい。あらゆる公知の非古典的アミノ酸が用いられてもよい。以下を含むがこれらに限定されないアミノ酸類似体およびペプチド模倣薬をペプチドに組み込むことによって、特定の二次構造を誘導または有利にしてもよい：LL-Acp (LL-3-アミノ-2-プロペニドン (propenidone) -6-カルボン酸)、 $\beta$ -ターンを誘導するジペプチド類似体； $\beta$ -シートを誘導する類似体； $\alpha$ -ターンを誘導する類似体； $\alpha$ -ヘリックスを誘導する類似体； $\beta$ -ターンを誘導する類似体；Gly-Alaターン類似体；アミド結合アイソスター；またはテトラゾール (tetrazole) など。

30

#### 【0053】

ペプチドの末端部にデアミノまたはデアカルボキシ残基を組み込むことによって、末端アミノ基またはカルボキシル基をなくして、プロテアーゼに対する感受性を低下させるか、または立体構造を制限してもよい。C末端官能基は、アミド、アミド低級アルキル、アミドジ (低級アルキル)、低級アルコキシ、ヒドロキシ、およびカルボキシ、ならびにそれらの低級エステル誘導体、ならびにそれらの医薬的に許容できる塩を含む。

40

#### 【0054】

「リポソーム」という用語は、内部の水性空間を囲む外側の脂質二重層または多層の膜を含む組成物をいう。この用語は多重膜リポソームを含み、これは一般的に約1マイクロメートルから約10マイクロメートルの範囲の直径を有し、水相の層と交互になった2から数百の同心の脂質二重層を含む。この用語は、単一脂質層からなり、一般的に約20ナノメートルから約400ナノメートル (nm)、約50nmから約300nm、約300nmから約400nm、または約100nmから約200nmの範囲の直径を有する単層膜の小胞を含む。この用語は、約65nmから約75nmの直径を有するリポソームも含む。

50

## 【0055】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、特定の抗原を認識して結合できる、たとえば免疫系によって、合成によって、または組換えによって生成されるものなどのタンパク質を示す。抗体は当該技術分野において一般的に公知であり、当該技術分野において公知の方法によって調製できる。

## 【0056】

「エピトープ」とは抗体が結合する分子であり、それはポリペプチド中のアミノ酸残基の隣接する配列であってもなくてもよく、他の化学構造を有する糖および/または分子を含んでもよい。

## 【0057】

ポリヌクレオチドの状況における「特異的にハイブリダイズする」という用語は、ストリンジентな条件下でのハイブリダイゼーションを示す。DNA/DNAおよびDNA/RNA両方のハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーを増大させる条件は、当該技術分野において広く公知であり公表されている。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件の例には、約65~70 での4×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)におけるハイブリダイゼーション、または約42~50 での4×SSCに50%ホルムアミドを加えたものにおけるハイブリダイゼーションの後に、約65~70 での1×SSCにおける1回またはそれ以上の洗浄が行なわれるものが含まれる。

## 【0058】

「リガンド」という用語は、受容体を含む、別の分子に結合する分子を示す。

## 【0059】

「宿主細胞」とは、あらゆる組換えベクターまたは単離されたポリヌクレオチドのレシピエントとなり得るかまたはレシピエントであった個々の細胞または細胞培養物である。宿主細胞は単一の宿主細胞の子孫を含み、その子孫は、自然の、偶発的な、または計画的な突然変異および/または変化のために、必ずしも(形態または全体のDNA相補体が)元の親細胞と完全に同一でないことがある。宿主細胞は、インビボまたはインビトロで本発明の組換えベクターまたはポリヌクレオチドによってトランスフェクトまたは感染された細胞を含む。本発明の組換えベクターを含む宿主細胞は、「組換え宿主細胞」と呼ばれてもよい。

## 【0060】

「試料」とは、患者に由来するあらゆる生体試料である；この用語は、生物学的な流体、たとえば血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、涙、唾液、リンパ、透析液、洗浄液、精液、およびその他の液体サンプルなど、ならびに生体由来の細胞および組織を含むがそれらに限定されない。この用語は細胞またはその細胞に由来する細胞およびその子孫も含み、それは培養物中の細胞、細胞上清および細胞溶解物を含む。この用語はさらに、器官または組織培養由来の流体、組織生検サンプル、腫瘍生検サンプル、糞便サンプル、および生理学的組織から抽出された流体、ならびに固体組織から分離された細胞、組織切片、および細胞溶解物を含む。この定義は、たとえば試薬による処理、可溶化、またはポリヌクレオチドもしくはポリペプチドなどの特定の成分に対する濃縮などによって、調達後にあらゆる態様で処理されたサンプルを含む。この用語には、患者サンプルの誘導體および画分も含まれる。患者サンプルは、診断、予後またはその他のモニタリングアッセイに用いられてもよい。この用語はまた、ヒト以外の哺乳動物からの生体試料に適用される。試料はヒトの患者またはヒト以外の哺乳動物からのものであってもよい。

## 【0061】

本明細書において用いられる「処置」は、ヒトを含む哺乳動物における疾患に対する治療のあらゆる投与または適用を含み、それは、たとえば退縮をもたらすか、または機能の欠失、欠落もしくは障害を回復もしくは修復することなどによる疾患の障害、疾患の進行の阻止、もしくは疾患の緩和；または非効率的なプロセスの刺激を含む。この用語は、所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることを含み、ヒトを含む哺乳動物における病理学的状態または障害のあらゆる処置を含む。その効果は、障害もしくはその症状を

10

20

30

40

50

完全もしくは部分的に防ぐという観点から予防的であってもよく、ならびに/または、障害および/もしくはその障害に起因し得る悪影響に対する部分的もしくは完全な治癒という観点から治療的であってもよい。よって本発明は、処置および予防の両方を提供する。本発明は以下を含む：(1) 障害を起こす可能性があるがまだ症状が出ていない対象において、障害の発生または再発を防ぐこと、(2) 障害の進行を阻止するなど、障害を阻害すること、(3) 障害または少なくともそれに伴う症状を停止または終結させることによって、宿主がもう障害またはその症状に苦しまないようにすること、たとえば、機能の欠失、欠落もしくは障害を回復もしくは修復するか、または非効率的なプロセスを刺激することなどによって、障害またはその症状の退縮をもたらすことなど、または(4) 障害またはそれに伴う症状を緩和、軽減または改善すること、ここで改善とは広い意味で用いられ、少なくとも、炎症、痛みおよび/または腫瘍サイズなどのパラメータの大きさの低減を示す。

10

#### 【0062】

「医薬的に許容できる担体」とは、あらゆる従来型の非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、封入材料(encapsulating material)、調合補助剤(formulation auxiliary)、または賦形剤を示す。医薬的に許容できる担体は、使用される用量および濃度ではレシピエントに対して非毒性であり、処方物の他の成分と適合できる。

#### 【0063】

本明細書における「組成物」とは、当該技術分野において従来のものであって、かつ治療、診断または予防の目的のための対象への投与に適した、たとえば医薬的に許容できる担体または賦形剤などの担体を通常含有する混合物を示す。医薬組成物は、細胞または培養液中にポリペプチドまたはポリヌクレオチドが存在する細胞培養物を含んでもよい。たとえば、経口投与のための組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、徐放性処方物、口腔リンス液、または粉末を形成してもよい。

20

#### 【0064】

「疾患」とは、医療介入を必要とするか、または医療介入を行なうことが望ましいようなあらゆる状態、感染症、障害または症候群を示す。こうした医療介入は、処置、診断および/または予防を含み得る。

#### 【0065】

「癌」とは、あらゆる異常な細胞または組織の成長であり、たとえば悪性、前悪性または良性の腫瘍などである。癌は、細胞の無制御の増殖を特徴とし、それは周囲の組織に侵入することもしないこともあるし、新たな身体部位に転移することもしないこともある。癌は、上皮細胞の癌である癌腫を含む；癌腫は、扁平上皮癌、腺癌、黒色腫、および肝癌を含む。癌は、間充織由来の腫瘍である肉腫も含む；肉腫は、骨原性肉種、白血病およびリンパ腫を含む。癌は、1つまたはそれ以上の新生物細胞型を含んでもよい。癌という用語は、肺癌、結腸癌、乳癌、前立腺癌、肝癌、膵癌、および口腔癌を含む。

30

#### 【0066】

「黄斑変性」は、不適切に制御された、漏出性の血管の成長を含み、これらとしては、加齢性黄斑変性(AMD)、増殖性糖尿病性網膜症(PDR)および未熟児網膜症(ROP)が挙げられる。

40

#### 【0067】

##### 細胞系

有用な細胞系は、A549、ヒト肺扁平上皮癌系、CL1-5、高転移性ヒト肺腺癌系、H23、ヒト肺腺癌系、H460、ヒト肺大細胞癌系、PC13、ヒト肺癌系、NPC-TW01、ヒト上咽頭癌系、SAS、ヒト口腔扁平上皮癌系、PaCa、ヒト膵臓癌、結腸(HCT116)、乳房(BT483)、前立腺(PC3)、肝臓(Mahlavu)、NNM、ヒト正常鼻粘膜上皮、および線維芽細胞を含む。A549、H23、H460、PC13、PaCa、HCT116、PC3、MahlavuおよびSASは、American Type Culture Collectionから入手可能である。

50

CL1-5およびNPC-TW01細胞系は、それぞれ(Chura, 1997)および(Linら, 1990)によって樹立された。

【0068】

ペプチドの調製

本発明のペプチドは、当該技術分野において公知の方法を用いて発現できる。本発明のペプチドを生産するためには、細胞に基づく方法および無細胞の方法が好適である。一般的に、細胞に基づく方法は、インビトロで宿主細胞に核酸構築物を導入する工程と、発現に適した条件下で宿主細胞を培養する工程と、次いで培養液もしくは(たとえば、宿主細胞を破壊することなどによって)宿主細胞のいずれかから、またはその両方からペプチドを採取する工程とを含む。本発明は、当該技術分野において周知の無細胞インビトロ転写/翻訳方法を用いてペプチドを生成する方法も提供する。

10

【0069】

好適な宿主細胞は原核細胞または真核細胞を含み、たとえば細菌、酵母、真菌、植物、昆虫および哺乳動物の細胞などを含む。

【0070】

典型的には、異種ペプチドは、修飾されていても修飾されていなくても、上述のとおり単独で、または融合タンパク質として発現されてもよく、分泌シグナルだけでなく分泌リーダー配列を含んでもよい。本発明の分泌リーダー配列は、特定のタンパク質をERに向けてもよい。ERは膜結合タンパク質をその他のタンパク質から分離する。一旦ERに局在化されると、タンパク質はさらに、分泌小胞を含む小胞;細胞膜、リソソーム、およびその他の小器官への分配のためにゴルジ体に向けられてもよい。

20

【0071】

加えて、ペプチドにペプチド部分および/または精製タグが加えられてもよい。こうした領域は、ポリペプチドの最終的調製の前に取除かれてもよい。ポリペプチドにペプチド部分を付加することによって、特に分泌または排出を誘発したり、安定性を改善したり、精製を容易にしたりすることは、当該技術分野においてよく知られた慣用技術である。好適な精製タグは、たとえばV5、ポリヒスチジン、アビジンおよびビオチンなどを含む。ペプチドをビオチンなどの化合物に結合することは、当該技術分野において周知の技術を用いて達成できる。(Hermanson編(1996)Bioconjugate Techniques; Academic Press)。ペプチドは、当該技術分野において公知の技術を用いて、放射性同位元素、毒素、酵素、蛍光標識、コロイド金、核酸、ビノレルピン、およびドキシソルピシンにも結合できる。(Hermanson編(1996)Bioconjugate Techniques; Academic Press; Stefanoら(2006)A conjugate of doxorubicin with lactosaminated albumin enhances the drug concentrations in all the forms of rat hepatocellular carcinomas independently of their differentiation grade. Liver Int. 26: 726-33)。毒素は当該技術分野において公知のものである。KreitmanおよびPastan, Immunotoxins in the treatment of hematologic malignancies. Curr Drug Targets. 7: 1301-11(2006)。

30

40

【0072】

本発明における使用のために好適な融合パートナーは、たとえば、フェチュイン、ヒト血清アルブミン、Fc、および/またはそれらの断片の1つもしくはそれ以上などを含む。たとえばポリエチレングリコール結合体などの結合タンパク質も提供される。

【0073】

本発明のペプチドは、当該技術分野において公知の技術を用いて化学的に合成することもできる(例、Hunkapillerら, Nature, 310: 105-111(1984); Grant編(1992)Synthetic Peptides, A Us

50

ers Guide, W. H. Freeman and Co.; 米国特許第 6, 974, 884 号を参照)。たとえば、ペプチド合成機の使用によって、または当該技術分野において公知の固相法の使用を通じて、ポリペプチドの断片に対応するポリペプチドを合成できる。

#### 【0074】

さらに、所望であれば、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸類似体を置換または追加としてポリペプチド配列に導入してもよい。非古典的アミノ酸は、一般的なアミノ酸の D 異性体、2, 4 - ジアミノ酪酸、 $\alpha$  - アミノイソ酪酸、4 - アミノ酪酸、Abu、2 - アミノ酪酸、g - Abu、e - Ahx、6 - アミノヘキサ酸、Aib、2 - アミノイソ酪酸、3 - アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t - ブチルグリシン、t - ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、b - アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナアミノ酸、たとえば b - メチルアミノ酸、Ca - メチルアミノ酸、Na - メチルアミノ酸など、および一般的なアミノ酸類似体を含むがそれらに限定されない。さらに、アミノ酸は D (右旋性 (dextrorotary)) または L (左旋性 (levorotary)) であってもよい。

10

#### 【0075】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、リン酸セルロースクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、およびレクチンクロマトグラフィを含むがそれらに限定されない標準的な方法によって、化学合成および組換え細胞培養物から回収および精製されてもよい。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィ (「HPLC」) が精製に使用される。単離および/または精製の際にポリペプチドが変性したときは、タンパク質をリフォールディングするための周知の技術を用いて活性の立体構造を再生してもよい。

20

#### 【0076】

本発明のペプチドまたはペプチド模倣薬 (peptidomimetic) は、さまざまな親水性ポリマーの 1 つまたはそれ以上で修飾するか、またはそれと共有結合させることによって、ペプチドの可溶性および循環半減期を増加させることができる。ペプチドに結合させるために好適な非タンパク質親水性ポリマーは、ポリアルキルエーテル、たとえばポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールによって例示されるものなど、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、セルロースおよびセルロース誘導体、デキストランおよびデキストラン誘導体を含むがこれらに限定されない。一般的に、こうした親水性ポリマーの平均分子量は、約 500 ダルトンから約 100, 000 ダルトン、約 2, 000 ダルトンから約 40, 000 ダルトン、または約 5, 000 ダルトンから約 20, 000 ダルトンの範囲である。ペプチドは、以下において示される方法のいずれかを用いて、こうしたポリマーによって誘導化されるか、またはそれらに結合されてもよい (Zallipsky, S. (1995) Bioconjugate Chem., 6: 150 - 165; Monfardini, C. (1995) Bioconjugate Chem., 6: 62 - 69; 米国特許第 4, 640, 835 号; 第 4, 496, 689 号; 第 4, 301, 144 号; 第 4, 670, 417 号; 第 4, 791, 192 号、第 4, 179, 337 号、または WO 95/34326 号)。

30

40

#### 【0077】

##### リポソームの調製

リポソームを調製するためのさまざまな方法が当該技術分野において公知であり、そのいくつかは Lichtenberg および Barenholz によって、Methods of Biochemical Analysis、第 33 巻、337 - 462 (1988) に記載されている。以前に記載される薄膜水和反応 (thin film hydration) と、反復押し出し (repeated extrusion) との標準的な

50

方法の組合せによって、小単層膜リポソーム (small unilamellar vesicle: SUV、サイズ < 100 nm) を調製できる (Tsengら、1999)。特にリポソームによるDNAの封入を含む調製法、およびリポソーム介在型トランスフェクションへの直接適用を有する方法は、HugおよびSleightら (1991) によって記載されている。リポソームを作成する方法は、米国特許第6,355,267号および米国特許第6,663,885号にも開示されている。リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-derivatized phosphatidylethanolamine: PEG-PE) を含む脂質組成物による逆位相蒸着法によって生成できる。リポソームを定められたポアサイズのフィルタから押出すことによって、所望の直径のリポソームを得る。

10

**【0078】**

リポソームは、たとえばTaiwan Liposome Company、Taipei Taiwanなどの供給源から商業的に入手することもできる。付加的な商業的に入手可能なリポソームは、TLC-D99、Lipo-Dox、Doxil、DaunoXome、AmBisome、ABELCET、transfectace (DDAB/DOPE)、ならびにDOTAP/DOPEおよびLipofectinを含む。

**【0079】**

本発明のリポソームは、リン脂質から調製されることが最も多いが、疎水性および親水性部分の両方を有する類似の分子形および寸法のその他の分子が用いられてもよい。本発明の目的に対して、すべてのこうした好適なリポソーム形成分子は、本明細書において脂質と呼ばれる。リポソームの調製には、1つまたはそれ以上の天然に発生する脂質化合物および/または合成脂質化合物が用いられてもよい。

20

**【0080】**

リポソームは、親水性基の選択によって、アニオン、カチオンまたは中性であってもよい。たとえば、リン酸基または硫酸基を有する化合物が用いられるときには、得られるリポソームはアニオンになる。アミノを含有する脂質が用いられるときには、リポソームは正電荷を有し、カチオンリポソームとなる。

**【0081】**

本発明において有用な最初のリポソームを形成するための代表的な好適なリン脂質または脂質化合物は、リン脂質関連材料、たとえばホスファチジルコリン (レシチン)、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン (ケファリン)、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、リン酸ジセチル、ホスファチジルコリン、およびジパルミトイルホスファチジルグリセロールなどを含むが、これらに限定されない。付加的な非リン (non-phosphorous) 脂質は、ステアシルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、アセチルパルミチン酸塩、グリセロールリシノール酸塩、ヘキサデシルステアリン酸塩 (hexadecyl stearate)、イソプロピルミリステート、両性アクリルポリマー、脂肪酸、脂肪酸アミド、コレステロール、コレステロールエステル、ジアシルグリセロール、ジアシルグリセロールコハク酸塩

30

40

**【0082】**

本発明における使用のためのリポソーム調製物は、カチオン (正に荷電した) 調製物、アニオン (負に荷電した) 調製物、および中性調製物を含む。

**【0083】**

化合物のリポソーム内への遠隔負荷 (remote loading) には、膜貫通配の形成が用いられる (CehおよびLasie、1995)。この方法は、リポソーム内に負荷すべき化合物とポロン酸化合物とを懸濁リポソームとともにインキュベートすることによって、リポソーム内に化合物を蓄積させる工程を含む (Zalipskyら、1998; Ceh B. および Lasie D. D.、1995; Zalipskyら、1

50

998 ; 米国特許第 6 , 0 5 1 , 2 5 1 号 ) 。

【 0 0 8 4 】

リン酸塩アッセイを用いてリポソーム濃度を定めてもよい。リン酸塩アッセイの 1 つは、モリブデン酸塩とマラカイトグリーン色素との相互作用に基づくものである。主要な原理は、無機リン酸塩とモリブデン酸塩とを反応させて無色の非還元リンモリブデン酸塩複合体を形成することを含み、この複合体は酸性条件下で還元されるときに青色の複合体に変えられる。リンモリブデン酸塩はマラカイトグリーンと複合体を形成すると 2 0 倍から 3 0 倍多く発色する。最終生成物である還元された緑色の可溶性複合体は、6 2 0 nm における吸光度によって測定され、これは溶液中の無機リン酸塩の直接的な尺度である。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態において、リポソームは、当該技術分野において多様なものが公知である医薬的に許容できる担体、賦形剤および希釈剤を有する処方物中に与えられる。これらの医薬的担体、賦形剤および希釈剤は、USP 医薬賦形剤リストにリストされるものを含む。USP and NF Excipients, Listed by Categories, p. 2404 - 2406, USP 24 NF 19, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, Md. (ISBN 1 - 889788 - 03 - 1)。医薬的に許容できる賦形剤、たとえばビヒクル、アジュバント、担体または希釈剤は、一般に容易に入手可能である。さらに、医薬的に許容できる補助的物質、たとえば pH 調整および緩衝剤、張度調整剤 (tonicity adjusting agent)、安定剤、湿潤剤などは、一般に容易に入手可能である。

【 0 0 8 6 】

好適な担体は、水、デキストロース、グリセロール、食塩水、エタノール、およびそれらの組合せを含むがこれらに限定されない。担体は、湿潤剤もしくは乳化剤、pH 緩衝剤、または処方物の効果を高めるアジュバントなどの付加的な薬剤を含有してもよい。局所的担体は、液体石油、イソプロピルパルミテート、ポリエチレングリコール、エタノール (95%)、水中のポリオキシエチレンモノラウレート (5%)、または水中のラウリル硫酸ナトリウム (5%) を含む。必要に応じて他の材料、たとえば抗酸化剤、湿潤剤、粘性安定剤、および類似の薬剤などが加えられてもよい。たとえば Azone などの経皮浸透促進剤が含まれてもよい。

【 0 0 8 7 】

医薬用量の形において、本発明の組成物は医薬的に許容できる塩の形で投与されてもよく、さらに単独で用いられても、または他の医薬的に活性の化合物との適切な結合および組合せにおいて用いられてもよい。対象組成物は、可能な投与のモードに従って調合される。

【 0 0 8 8 】

処置の方法

治療薬を含む本発明のペプチドまたはリポソームは、全身的な注射、たとえば静脈注射などによって；または関連部位への注射または適用、たとえば腫瘍への直接注射、もしくは手術中にその部位が露出しているときにはその部位への直接適用などによって；または、たとえば皮膚に障害があるときなどには局所適用によって、処置を必要とする対象に投与されてもよい。処置を必要とする被験体は、癌、加齢性黄斑変性、増殖性糖尿病性網膜症および未熟児網膜症のような、新生血管形成を伴う疾患に罹患した被験体を含む。

【 0 0 8 9 】

本発明のペプチドまたはリポソームは、単独療法として用いられてもよい。代替的には、本発明のペプチドまたはリポソームは、癌を処置するための標準的な化学療法または放射線療法あるいは加齢性黄斑変性のような疾患のための療法と組合せて用いられてもよい。

【 0 0 9 0 】

本発明のペプチドは、処置のために抗体を血管系にターゲティングするために用いられ

10

20

30

40

50

てもよい。一実施形態においては、本発明のペプチドが処置を必要とする対象に投与された後に、そのペプチドに特異的に結合する抗体が投与される。ターゲティングされる抗体は、抗体依存性の細胞毒性または相補体依存性の細胞毒性を媒介してもよく、または標的分子の基礎をなす機能を変更してもよい。こうした抗体は抗体結合体の形で用いられることによって、標的組織に治療効果を有する薬剤を直接送達してもよい。こうした薬剤は、放射性核種、毒素、化学療法薬物、抗VEGFアプタマーおよび抗血管新生化合物を含む。

#### 【0091】

薬剤の投与は、経口、口腔、経鼻、直腸、非経口、腹膜内、皮内、経皮、皮下、静脈内、動脈内、心臓内、心室内、頭蓋内、気管内、および髄腔内投与などを含むさまざまな方法で、または移植もしくは吸入による別様で達成されてもよい。よって、対象組成物は固体、半固体、液体または気体の形の調製物、たとえば錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、溶液、座薬、注射薬、吸入剤、およびエアロゾルなどに処方されてもよい。以下の方法および賦形剤は単なる例示であって、いかなる態様でも限定するものではない。

10

#### 【0092】

好適な賦形剤ビヒクル媒体は、たとえば水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組合せである。加えて、所望であれば、ビヒクルは少量の補助的物質、たとえば湿潤剤または乳化剤またはpH緩衝剤などを含有してもよい。こうした投薬形態を調製する実際の方法は、当業者に公知であるか、または明らかになる。いずれにせよ、投与される組成物または処方物は、処置される対象における所望の状態を達成するために適切な量の薬剤を含有する。

20

#### 【0093】

本発明のリポソームまたはペプチドは、水性溶媒または非水系溶媒、たとえば植物油またはその他の類似の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸またはプロピレングリコールのエステルなどに；所望であれば従来の添加剤、たとえば溶解剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定剤、および保存剤などとともに、溶解、懸濁または乳化させることによって、注射のための調製物に処方されてもよい。当該技術分野における従来どおりの、経口または非経口送達のためのその他の処方物が用いられてもよい。

#### 【0094】

本発明のリポソームまたはペプチドは、癌の処置および血管新生の阻害に用いられてきたさまざまな薬物の1つまたはそれ以上を含んでもよく、その薬物は、ビンレルビン、シスプラチン、ゲムシタピン、パクリタキセル、エトポシド、Novantrone（ミトキサントロン）、アクチノマイシンD、カンプトテシン（camptothecin）（またはその水溶性誘導体）、メトトレキサート、マイトマイシン（たとえばマイトマイシンCなど）、ダカルバジン（DTIC）、シクロホスファミド、ならびに抗新生物性抗生物質、たとえばドキソルビシンおよびダウノマイシンなど、またはたとえばDeVitaら編、2001などに記載されるその他のものを含むが、それらに限定されない。リポソームまたはペプチドは、細胞毒性薬物、オリゴヌクレオチド、毒素および放射性分子も含んでもよい。リポソームまたはペプチドは、（Ngら、2006）に記載される抗VEGFアプタマーなどの化合物も含んでもよい。

30

40

#### 【0095】

癌療法において用いられる薬物は、癌細胞に対する細胞毒性もしくは細胞増殖抑制の効果を有してもよく、または悪性細胞の増殖を低減させてもよい。癌処置に用いられる薬物はペプチドであってもよい。本発明のリポソームまたはペプチドは、放射線療法と組合せられてもよい。本発明のリポソームまたはペプチドは、（DeVitaら（2001））に記載される治療アプローチとともに付随的に用いられてもよい。本発明のリポソームまたはペプチドと第2の抗癌剤とが癌細胞に対して相乗効果を及ぼすような組合せに対しては、第2の薬剤の用量は、第2の薬剤が単独で投与されるとき標準的な用量よりも減らされてもよい。癌細胞の感受性を増加させるための方法は、本発明のリポソームまたはペプチドを、癌細胞の感受性を高めるために有効な量の化学療法の抗癌薬と共投与する（c

50

o - administering) 工程を含む。共投与は同時投与であっても、または非同時投与であってもよい。本発明のリポソームまたはペプチドは、処置療法の過程において他の治療薬剤とともに投与されてもよい。一実施形態において、本発明のリポソームまたはペプチドと、他の治療薬剤との投与は連続的である。適切な時間経過は、患者の病気の性質および患者の状態などの因子に従って医師によって選択されてもよい。

#### 【0096】

##### 診断方法

疾患特異的バイオマーカの検出は、有効なスクリーニング戦略を提供する。早期の検出は早期の診断を与えるだけでなく、癌の場合には多形性をスクリーニングし、手術後の残余腫瘍細胞および潜在性の転移、すなわち腫瘍再発の初期指標を検出することを可能にできる。よって疾患特異的バイオマーカの早期検出は、診断前、処置の最中および寛解期の患者における生存性を改善できる。

10

#### 【0097】

本発明のペプチドは、癌および新生血管形成を伴う他の疾患を含む疾患に対する診断または予後として用いられてもよい。ペプチドは、ELISA、ウエスタンブロット、蛍光、免疫蛍光、免疫組織化学、またはオートラジオグラフィを含むがこれらに限定されないいくつかの方法で、診断として用いられてもよい。

#### 【0098】

本発明の抗体は、血管系を検出するために本発明のペプチドと組合せて用いられてもよい。いくつかの実施形態において、そのアッセイは、血管マーカに結合した本発明のペプチドと抗体との結合を検出する結合アッセイである。対象ポリペプチドまたは抗体は固定されてもよく、対象ポリペプチドおよび/または抗体は検出可能になるよう標識されてもよい。たとえば、抗体は直接標識されても、または標識された二次抗体によって検出されてもよい。すなわち、抗体に対する好適な検出可能な標識は、目的のタンパク質に対する抗体を標識する直接標識と、目的のタンパク質に対する抗体を認識する抗体を標識する間接標識とを含む。別の実施形態において、ペプチドは標識を含み、ペプチドの組織への結合は標識の存在をアッセイすることによって検出される。

20

#### 【0099】

##### スクリーニング方法

本発明は、本発明のペプチドに結合する生体リガンドを同定するための方法を提供する。

30

#### 【0100】

方法の1つにおいて、本発明のペプチドは、2ハイブリッドアッセイまたは3ハイブリッドアッセイ(例、米国特許第5,283,317号; Zervosら(1993) Cell, 72:223-232; Maduraら(1993); Bartelら(1993); Iwabuchiら(1993); および Suterら(2006)を参照)における「ペイトタンパク質」として用いられることによって、本発明のペプチドと結合または相互作用する他のタンパク質を同定することができる。

#### 【0101】

別の方法においては、本発明のペプチドが細胞抽出物とともにインキュベートされて、本発明のペプチドに結合する分子が同定される。方法の1つにおいて、本発明のペプチドはHPLCカラムなどの固体支持上に固定され、本発明のペプチドの標的分子への結合を促進する条件下で細胞抽出物が固定ペプチドに露出される。結合した分子は溶出され、質量分析法などの標準的な技術を通じて同定される。一実施形態において、この細胞抽出物は、VEGF刺激されたHUVECを含む。

40

#### 【0102】

##### 標的タンパク質のアフィニティ精製

肺癌細胞からタンパク質を溶解緩衝液(50mMのTris-HCl、pH7.4、150mMのNaCl、30μg/mlのDNアーゼ、1%のノニデットP-40、およびプロテアーゼ阻害剤(Complete tabs; Roche Molecular

50

Biochemicals)) によって4 にて30分間抽出する。15,000×gでの20分間の遠心分離によって、タンパク質溶解物から、残屑を取除く。溶解物を最初に対照ペプチドを含有する1mlカラム上で予め清澄にし、SP5-52またはSP5-2ペプチド固定アフィニティカラムの第2の1mlカラムにフロースルーを直接添加する。カラムを洗浄して溶出する。単離されたタンパク質の純度をSDS-PAGE(8%ポリアクリルアミド)によってモニタし、銀染色によって視覚化する。所望のタンパク質バンドを、トリプシンによるインゲル(in-gel)消化のためにゲルから切出す。その結果得られるポリペプチドをさらに質量分析法によって分析する。

#### 【実施例】

##### 【0103】

実施例は本発明を純粹に例示することが意図され、したがっていかなる態様でも本発明を制限すると考えられるべきでなく、さらに上記において議論した本発明の詳細な局面および実施形態をも説明するものである。

##### 【0104】

実施例1. インビボのファージディスプレイバイオニングの手順

CL1-5、H460およびPC3を、2gの重炭酸塩、1リットル当り40mgのカナマイシン、2mMのL-グルタミン、および10%のウシ胎児血清(FCS、Gibco、CA、USA)を補ったRPMI1640中で、95%の空気および5%のCO<sub>2</sub>(v/v)の加湿された環境下で37 にて生育した。CL1-5はChur(Chur、1997)によって樹立された。SAS、HCT116、BT483、MahlavuおよびPaCaを、3.7gの重炭酸塩、1リットル当り40mgのカナマイシン、2mMのL-グルタミン、5%のFCSを含有するDMEM(Gibco、CA、USA)中で生育し、10%のCO<sub>2</sub>インキュベータ中でインキュベートした。胎盤からの分離後の臍静脈からHUVECを単離して、20%のFCS、抗生物質、15μg/mlの内皮成長因子(upsstate、NY、USA)を補ったM199培地(Gibco、CA、USA)中で生育し、5%のCO<sub>2</sub>インキュベータ中でインキュベートした。

##### 【0105】

腫瘍組織から腫瘍ホーミングファージを単離するために、本発明者らはファージディスプレイペプチドライブラリを用いて、インビボ選択(バイオニング)の5ラウンドに対してNSCLC(CL1-5)腫瘍マウスを処置した。4~6週齢のSCIDマウスの背外側の側腹部に、CL1-5細胞を別々に皮下注射して肺癌異種移植片を生成した。サイズを合せたCL1-5由来の腫瘍(約500mm<sup>3</sup>)を有するSCIDマウスの尾静脈に、ファージディスプレイペプチドライブラリ(New England Biolabs, Inc.、MA、USA)を注射した。8分間のファージ循環後に、マウスをジエチルエーテルで処置してマウスを深い麻酔に導き、50mlのPBSを灌流させて未結合ファージを洗浄した。器官(肺、心臓、脳など)および腫瘍塊を取出して重量測定し、冷たいPBSで洗浄した。器官および腫瘍サンプルをホモジナイズし、ER2738細菌(New England Biolabs、MA、USA)によってファージ粒子を回収した。ファージを、1mg/LのIPTG/X-Galの存在下で寒天プレート上で力価測定した。ER2738培養物中で結合ファージを増幅して力価測定した。回収されたファージを、上述のとおり肺癌異種移植片を有するSCIDマウスを用いたバイオニングの4つの連続するラウンドに供した。第5ラウンドから溶出したファージをLB/IPTG/X-Galプレート上で力価測定した。腫瘍ホーミングファージクローンの候補をランダムに選択し、細胞ELISAおよびインビボのホーミング実験によって同定した。

##### 【0106】

選択されたファージクローンをDNA配列決定によってさらに分析した。精製ファージのDNA配列を、自動DNA配列決定装置(ABI PRISM 377、Perkin-Elmer、CA、USA)を用いてジデオキシヌクレオチド鎖終止法に従って決定した。配列決定は、p111遺伝子配列に対応するプライマ5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'[配列番号19]によって行なわれた。ファージディスプレイ

10

20

30

40

50

ペプチド配列は、Genetics Computer Group (GCG) プログラムを用いて翻訳およびアラインメントされた。

【0107】

バイオニングの第5ラウンドの回収率は、第1ラウンドの156倍に増加した(図1)。これらの濃縮されたファージをランダムに選択して配列決定した。GCGソフトウェアを用いて、これら9つは一致する残基のプロリン(P)を有し、4つのクローン(PC5-10、PC-53、PC-58およびPC-60)はコンセンサスアミノ酸残基のセリン(S)-プロリン(P)を有することが見出され; 3つのクローン(PC5-5、PC-52およびPC-54)はコンセンサスモチーフのプロリン(P)-セリン(S)-プロリン(P)を有することが見出された(表1)。本発明者らのファージホーミング系でテストされたコンセンサスペプチドモチーフの中でも、ファージクローンPC5-52は、インビボのファージディスプレイによって、肺および口腔(IVO-2と名付けられた)腫瘍マウスの両方から選択された(表1および図2C)。2つの異なるヒト癌(肺癌および口腔癌)異種移植片から同じファージクローンが単離されたことから、PC5-52に提示されるペプチドは複数の固形腫瘍をターゲティングできることが示される。

10

【0108】

実施例2. 異種移植片腫瘍脈管におけるインビボのホーミングおよびペプチド結合

PC5-52のターゲティング能力を調べるために、ヒト肺癌細胞由来の腫瘍を有するSCIDマウスの尾静脈にファージを注射し、灌流後に回収した。本発明者らは、腫瘍塊および他の正常な器官におけるファージの力価を定めた。ファージクローンまたは対照ヘルパーファージ(挿入なしのファージ)を、ヒト肺癌腫瘍異種移植片を有するSCIDマウスの尾静脈(i.v.)に8分間または24時間注入した。灌流後に異種移植片腫瘍および器官を取出し、回収されたファージの力価を測定した。以下に記載するペプチド競合的阻害実験においては、ファージクローンを100 $\mu$ gの合成ペプチドと同時に注入した。候補または対照のファージクローンの注入後、器官および腫瘍を取出して2つの部分に分割した。1つの部分はER2738によって力価を測定し、別の部分はOptimal Cutting Temperature(OCT、Tissue-Tek、NL、USA)に埋め込んだ。OCTに埋め込んだ冷凍組織を5ミクロンに切断し、冷たいPBS緩衝液に移した。次いでこの切片をアセトン-メタノール(1:1)で固定し、PBSで洗浄し、ブロッキング緩衝液(PBS中の1%BSA)に1時間浸漬した。次いで、ブロックされたサンプルをラット抗マウスCD31(BD Pharmingen、MA、USA)、ウサギ抗ラットAb(Stressgen、Canada)とともにインキュベートし、ローダミン標識されたヤギ抗ウサギ抗体(Jackson ImmunoResearch、PA、USA)に浸漬した。スライドをさらにマウス抗M13 mAb(Amersham Biosciences、Uppsala、Sweden)とともにインキュベートした後、FITC標識されたヤギ抗マウス抗体(Jackson ImmunoResearch)とともにインキュベートし、Hoechst 33258(Molecular probe、OR、USA)とともに浸漬した。最後にスライドを洗浄し、封入剤(mounting medium)(Vector、CA、USA)によって封入した。

20

30

40

【0109】

本発明者らは、ファージの代わりに、FITC標識された候補ペプチドおよび対照ペプチドも用いた。ペプチド結合アッセイにおいては、腫瘍異種移植片マウスの尾静脈からFITC標識ペプチドを注射した。灌流後、組織を取出して上述のとおり処理した。次いでLeica Universal顕微鏡の下でスライドを調べた。画像をSimple PCI(C-IMAGING、PA、USA)ソフトウェアによってマージした。

【0110】

PC5-52は腫瘍塊におけるホーミング能力を示し、腫瘍塊においては脳、肺および心臓を含む他の器官よりも8.0倍から135倍高い濃度を示した(図2A)が、対照ヘルパーファージはこうしたホーミング能力を示さなかった(図2B)。

50

## 【0111】

PC5-52の腫瘍ホーミング能力は、リガンド競合実験によっても証明された。候補ペプチドSVSVGMPSPRP(SP5-52)および対照ペプチド(RLLDTNRPLLPY)[配列番号20]を合成して、Invitrogen, Inc.(CA、USA)により逆相高速液体クロマトグラフィによって>95%の純度までに精製した。同じ会社によってペプチドNH<sub>2</sub>末端にFITCまたはビオチンを付加することによって、これらのペプチドとFITCまたはビオチンとの結合を行なった。リガンド競合実験から、合成SP5-52ペプチドとPC5-52ファージ粒子との同時注入が腫瘍組織からのPC5-52の回収を阻害することが示された(図2B)。100μgのSP5-52は、NSCLC腫瘍塊へのPC5-52ホーミングの97%を阻害した。同様の結果から、IVO-2(PC5-52によって提示されるペプチドと同じアミノ酸配列を有するペプチドを提示する)も口腔癌異種移植片の腫瘍組織にホーミングすることが示された(図2C)。IVO-2は腫瘍塊におけるホーミング能力を示し、腫瘍においては脳、肺および心臓を含む他の器官よりも1.2倍から12.1倍高い濃度を示した(図2C)。IVO-2の腫瘍ホーミング能力はSP5-52によって阻害できた。100μgのSP5-52の同時注入は、口腔癌異種移植片へのIVO-2ホーミングの95.9%を阻害した(図2D)。対照ペプチドは腫瘍組織へのIVO-2ホーミングを阻害できなかった(図2D)。PC5-52を24時間注入した後に、ファージが腫瘍組織中に対照組織よりも10倍多く蓄積したことも本発明者らは見出した。

10

## 【0112】

実施例3.PC5-52およびSP5-52の局在化

PC5-52のホーミング特異性を調べるために、本発明者らは免疫蛍光アッセイを用いて、灌流後のファージの結合活性を局在化した。上述のとおりヒト肺腺癌凍結切片を調製した。スライドをブロッキング緩衝液中で30分間インキュベートし、次いでメタノール中の3%の過酸化水素と0.1%のNaN<sub>3</sub>とで処理して内因性のペルオキシダーゼ活性を遮断し、ビオチン標識したペプチドとともにインキュベートした。スライドを慣用的な免疫組織化学染色に供した。

20

## 【0113】

その結果、ファージ粒子は肺癌の異種移植片腫瘍切片とは反応するが、正常な肺組織とは反応しないことが示された(図3A)。しかし、ファージは癌細胞に局在化しなかった。腫瘍塊はパネル(a)に示され、正常な肺はパネル(c)に示される。パネル(b)および(d)はH33258によって核DNAを対比染色したものであり、それぞれパネル(a)および(c)に対応する。抗M13 mAb(緑)およびマウス内皮細胞マーカーCD31(赤)とともにインキュベートされた腫瘍組織からの凍結切片を用いたとき、異種移植片腫瘍組織の腫瘍血管系においてPC5-52がCD31と共存することを本発明者らは見出した(図3B)。正常な心臓(図3B)、肺および脳の脈管にはファージは見出されなかった。ファージ注射後の腫瘍血管系内皮における抗ファージ免疫蛍光と抗CD31との共存は、パネル(i-k)に示される。対照ファージは腫瘍脈管に結合できない(a)のに対し、PC5-52は正常な心臓を認識できない(e)。抗CD31は心臓脈管(fおよびg)ならびに異種移植片腫瘍脈管(b、c、jおよびk)において示される。核染色は(d、hおよびl)に示される。

30

40

## 【0114】

腫瘍血管系へのファージディスプレイペプチドホーミングをさらに調べるために、本発明者らはPC5-52ファージの代わりにFITC標識されたSP5-52ペプチドを用いてペプチドホーミング研究を行なった。FITC標識されたSP5-52ペプチドも、肺癌異種移植片の腫瘍血管系においてマウスCD31マーカーと共存することを本発明者らは見出した(図3Cのi-l)。このペプチドは心臓脈管と反応しなかった(図3Cのe-h)。FITC標識された対照ペプチドは腫瘍血管系を認識できなかった(図3Cのa-d)。ローダミン-抗CD31は、ヒト肺癌異種移植片(bおよびj)ならびに正常な心臓(f)において示される。H33253による核染色は(d、hおよびl)に示され

50

る。(バー、20 μm)。

【0115】

実施例4．複数の癌異種移植片へのPC5-52の結合、およびPSPモチーフの調査  
本発明者らは、インビボのファージディスプレイによって、肺癌および口腔癌の異種移植片から腫瘍ホーミングファージPC5-52を単離した。これらの結果は、SP5-52の標的が固形腫瘍の血管系において発現されている可能性があることを示すものである。この仮説を検証するために、本発明者らは、ヒト肺癌(H460)、結腸癌(HCT116)、乳癌(BT483)、前立腺癌(PC3)、肝癌(Mahlavu)および膵癌(Paca)の異種移植片を含む、ヒト癌の別の6つの異なるタイプにおけるPC5-52のホーミング能力を調べた。SCIDマウスにPC5-52を静脈内注射した。8分後に、PBS緩衝液による灌流によって遊離ファージを洗い出し、異種移植片腫瘍塊を取出してファージ力価を定めた。これらのヒト癌異種移植片のすべてにおいて、PC5-52は腫瘍組織をターゲティングしたが、脳、肺および心臓などの正常な器官はターゲティングしなかった(図4)。このターゲティングリガンドを有さない対照ファージにはこうしたホーミング能力はなかった。

10

【0116】

インビボのファージディスプレイより、3つのクローン(PC5-5、PC5-52およびPC5-54)によって提示されるペプチドがコンセンサスモチーフのプロリン(P)-セリン(S)-プロリン(P)を有することを本発明者らは見出した(表1)。これら3つのアミノ酸残基は腫瘍組織へのホーミングにおける役割を有するのではないかと本発明者らは提案した。この仮説を検証するために、本発明者らはSP5-52(SVSVGMPSPRP)中のこれら3つのアミノ酸残基を、変異ペプチドMP5-52(SVSVGMPGGGRP)(配列番号20)においてGGGに変えた。インビボのホーミングアッセイにおいて、腫瘍ホーミングファージPC5-52はCL1-5由来の腫瘍にターゲティングできた(図4B)。PC5-52の腫瘍ホーミング能力は、SP5-52によって顕著に阻害されたが、MP5-52の変異ペプチドには阻害されなかった(図4B)。

20

【0117】

実施例5．PC5-52は刺激されたHUV ECと反応し、SP5-52はヒト肺癌生検試料に結合する

30

このファージがヒトの新生血管系内皮に対する親和性を有するかどうかをさらに確認するために、本発明者らはVEGF刺激されたヒト脈管内皮細胞(HUV EC)にPC5-52ファージ粒子を適用した。HUV ECをカバーガラス上に蒔いて、約80%集密になるまで生育した。細胞をVEGF(B&D Systems、MN、USA)およびbFGF(PEPROTECH、Landon、UK)で48時間前処理した。VEGF刺激されたHUV ECを無血清M199で洗浄し、ブロッキング緩衝液(無血清M199に3%のBSAを加えたもの)の中で4 にて30分間インキュベートした。次いでカバーガラスをファージとともに4 にて1時間インキュベートし、洗浄して、3%のホルムアルデヒドで10分間固定した。次いでカバーガラスをマウス抗M13 mAb(Amersham Biosciences)とともに1時間インキュベートした後に、FITC標識した抗マウス抗体(Jackson ImmunoResearch)とともにインキュベートし、次いでHoechst 33258とともに浸漬した。最後にカバーガラスを洗浄し、封入剤によって封入した。

40

【0118】

その結果、PC5-52はVEGF刺激されたHUV ECに結合することが明らかになった(図5Aのa)。VEGF刺激なしのHUV ECにおいては、PC5-52の結合は観察されなかった(図5Aのb)。このペプチドを有さない対照ファージは結合活性を示さなかった(図5Aのc)。さらに、ビオチン標識されたSP5-52ペプチドは、ヒト肺癌生検試料の腫瘍脈管に結合できたが、対照の肺の非腫瘍脈管には結合できなかった(図5B)。これらのデータから、SP5-52はヒト血管新生内皮細胞および腫瘍新生血

50

管系における未知の受容体を認識したことが示される。

【0119】

ファージの腫瘍脈管への結合が提示ペプチドに媒介されたものかどうかを定めるために、H U V E C 結合研究におけるファージの代わりに F I T C 標識したペプチドを用いる。カバーガラス上の H U V E C を、F I T C 標識したペプチドまたは対照ペプチドとともに 2 時間インキュベートする。次いでカバーガラスを洗浄して H o e c h s t 3 3 2 5 8 とともに浸漬し、次いで洗浄して封入剤によって封入し、L e i c a U n i v e r s a l 顕微鏡の下で調べる。

【0120】

実施例 6 . ドキソルピシンを含有するリポソーム - ペプチドの調製および動物モデルの処置

腫瘍脈管ホーミングペプチドの S P 5 - 5 2 を用いて癌化学療法の治療効果を改善できるかどうかを定めるために、本発明者らはドキソルピシンを含有するリポソームに S P 5 - 5 2 を結合し ( S P 5 - 5 2 - L i p o - D o x ) 、異種移植片を有するマウスをこのリポソームで処置した。

【0121】

ドキソルピシンを含有するリポソームの調製の手順は、過去の報告 ( L e e ら、2 0 0 4 ; T s e n g ら、1 9 9 9 ) において公開される方法から適合した。簡単に述べると、L - ペプチドを N H S - P E G - D S P E [ N - ヒドロキシスクシニミド - カルボキシル - ポリエチレングリコール ( N - h y d r o x y s u c c i n i m i d o - c a r b o x y l - p o l y e t h y l e n e g l y c o l ) ( P E G ; 平均分子量、3 0 0 0 ) 由来のジステアロイルホスファチジルエタノールアミン ( d i s t e a r o y l p h o s p h a t i d y l e t h a n o l a m i n e ) ( N O F C o r p o r a t i o n , T o k y o , J a p a n ) ] に 1 : 1 . 5 のモル比で結合した。この結合は、ペプチジル - P E G - D S P E を生成するためのペプチドの N 末端の固有な遊離アミン基を用いて行なった。この反応は完了し、残りのアミノ基の定量化によって確認された。アミノ基は T N B S ( トリニトロベンゼンスルホネート ( T r i n i t r o b e n z e n e s u l f o n a t e ) ) 試薬によって測定された ( A F S A , 1 9 6 6 ) 。

【0122】

D S P C ( ジステアロイルホスファチジルコリン ( d i s t e a r o y l p h o s p h a t i d y l c h o l i n e ) ) 、コレステロール、P E G - D S P E からなるリポソームを硫酸アンモニウム溶液 ( 2 5 0 m M ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、p H = 5 . 0、5 3 0 m O s ) 中で 5 5 にて水和し、6 0 にて高圧押し出し装置 ( L i p e x B i o m e m b r a n e s , V a n c o u v e r , B C , C a n a d a ) を用いて 0 . 1 μ m および 0 . 0 5 μ m のポアサイズのポリカーボネート膜フィルタ ( C o s t a r , C a m b r i d g e , M A , U S A ) から押し出した ; ドキソルピシンを、1 0 μ m o l のリン脂質当り 1 m g のドキソルピシンの濃度で、遠隔負荷法によってリポソームに封入した。リン酸塩アッセイによってリポソームの最終濃度を定めた。0 . 2 m l の希釈薬物負荷リポソームに 1 m l の酸性イソプロパノール ( 8 1 m M の H C l ) を加えた後、励起波長として 4 7 0 n m を用い、放出波長として 5 8 2 n m を用いる分光蛍光光度計 ( H i t a c h i F - 4 5 0 0 , H i t a c h i , L t d , T o k y o , J a p a n ) によって、リポソームの内側に閉じ込められたドキソルピシンの量を定めた。サブミクロン粒子分析計 ( モデル N 4 プラス ; C o u l t e r E l e c t r o n i c s , H i a l e a h , F L , U S A ) による動的レーザ散乱によって、小胞サイズを測定した。調製後のリポソームは、リン脂質 1 μ m o l 当り 1 1 0 μ g から 1 3 0 μ g のドキソルピシンを含有し、直径 6 5 n m から 7 5 n m の範囲の粒子サイズを有した。比較のために、同じ方法を用いて N H S - P E G - D S P E に対照ペプチドを結合したものを調製した。脂質二重層の遷移温度を超える温度とともにインキュベートした後に、ペプチジル - P E G - D S P E を予め形成されたりポソームに移した ( Z a l i p s k y ら、1 9 9 7 ) 。以前に記載されたとおりに算出したところ ( K i r p o t i n ら、1 9 9 7 ) 、リポソーム当り 3 0 0 ~ 5 0 0 個のペプチド

10

20

30

40

50

分子があった。

【0123】

ヒト肺癌（CL1-5）および口腔癌（SAS）異種移植片をSCIDマウス中で確立した。4～6週令のマウスの背外側の側腹部に、ヒト癌細胞を皮下注射した。サイズを合せた腫瘍（腫瘍サイズ約100mm<sup>3</sup>）を有するマウスを異なる処置群にランダムに割当て、尾静脈を通じて、複数用量（1mg/kg、週2回）のSP5-52-Lipo-DoxおよびLipo-Doxによって処置した。対照群には、PBSをSP5-52-Lipo-Doxと同じ体積およびスケジュールで静脈内投与した。マウスの体重および腫瘍サイズをノギスで週2回測定した。腫瘍体積は次の式を用いて算出した：体積 = 長さ × (幅)<sup>2</sup> × 0.52。平均腫瘍体積の差をANOVAによって評価した。

10

【0124】

CL1-5由来の腫瘍（腫瘍サイズ約100mm<sup>3</sup>）を有するSCIDマウスをランダムに3つの群に分けて、静脈を通じて、合計ドキシソルピシン用量が7mg/kg（1mg/kg、週2回）のSP5-52-Lipo-Dox、Lipo-DoxまたはPBSで処置した。SP5-52ペプチド-Lipo-Doxで処置したマウスは、Lipo-DoxおよびPBSで処置した場合よりも有意に小さい腫瘍サイズを示した（P < 0.01）（図6A）。Lipo-Dox群のマウスの腫瘍サイズは徐々に増加して、day 28までにSP5-52-Lipo-Dox群よりも1.9倍大きくなった。対照PBS群のマウスの腫瘍サイズは、SP5-52-Lipo-Dox群よりも4.1倍大きかった。ターゲティングリポソームの治療効果をさらに特徴付けるために、本発明者らはSP5-52-Lipo-Dox、Lipo-DoxまたはPBSによって別々に処置した後の動物の生存率を比較した。day 81に実験を終了したとき、PBSおよびLipo-Dox処置の群ではすべての動物（n = 6）が死亡し（生存率0%）、SP5-52-Lipo-Dox処置の群では2匹の動物のみが死亡した（生存率66.7%）（図6B）。SP5-52-Lipo-Dox処置マウスにおいては腫瘍脈管が顕著に減少し損傷していることも本発明者らは見出した（図6C）。

20

【0125】

SP5-52が口腔癌に対する治療効果を増加できるかどうかをテストするために、本発明者らは動物モデルにおけるこの癌に対するリガンド標的療法も開発した。ターゲティングリポソームで処置したSAS由来口腔癌を有するSCIDマウスにおいても同様の結果が見出された。SP5-52-Lipo-Dox、Lipo-DoxまたはPBSによる処置を、合計ドキシソルピシン用量が7mg/kg（7回、1mg/kg、週2回）で静脈内投与した。SP5-52ペプチド-Lipo-Doxで処置したマウスは、Lipo-DoxおよびPBSで処置したマウスよりも有意に小さい腫瘍サイズを示した（P < 0.05）（図6D）。Lipo-Dox群のマウスの腫瘍サイズは徐々に増加して、day 24.5にはSP5-52-Lipo-Dox群よりも3.6倍大きくなった。対照PBS群のマウスの腫瘍サイズは、SP5-52-Lipo-Dox群よりも7.1倍大きいことが見出された（図6D）。さらに、day 60に実験を終了したとき、PBS処置の群ではすべての動物（n = 6）が死亡し（生存率0%）、Lipo-Dox処置の群では4匹の動物が死亡した（生存率33.3%）のに対し、SP5-52-Lipo-Dox処置群はすべてが生存した（生存率100%）（図6E）。本発明者らはこの実験を再び繰り返し、その結果、SP5-52-Lipo-DoxはLipo-Doxよりも口腔癌異種移植片の処置に効果的であることがさらに確認された。Lipo-Doxで処置したマウスの腫瘍サイズは徐々に増加して、SP5-52-Lipo-Dox群よりも3.2倍大きくなった。対照PBSで処置したマウスの腫瘍サイズは、SP5-52-Lipo-Dox群よりも5.9倍大きいことが見出された。これらの結果から、Lipo-DoxをターゲティングリガンドSP5-52に結合することによって、SCIDマウスにおけるヒト肺癌および口腔癌異種移植片を含む固形腫瘍異種移植片を阻害する薬物の能力が高められることが示される。

30

40

【0126】

50

表 1 . 肺癌異種移植片から選択されたファージディスプレイペプチド配列のアラインメント

【 0 1 2 7 】

【表 1】

ファージクローン	ファージディスプレイされたペプチド配列 <sup>a</sup>
PC5-52	SVSVGMKPSRP ( 配列番号 2)
PC5-54	WPLHTSVYPPSP ( 配列番号 4)
PC5-5	NTPPFSPSP ( 配列番号 6)
PC5-10	SFPDSNIAPSSP ( 配列番号 8)
PC5-8	QHAPSNSKSVLT ( 配列番号 10)
PC5-60	NSHQALWSPAQ ( 配列番号 12)
PC5-58	SPMFTMIQGDAQ ( 配列番号 14)
PC5-53	SPLLSTRAVQLS ( 配列番号 16)
PC5-4	STLPPPLRFANV ( 配列番号 18)

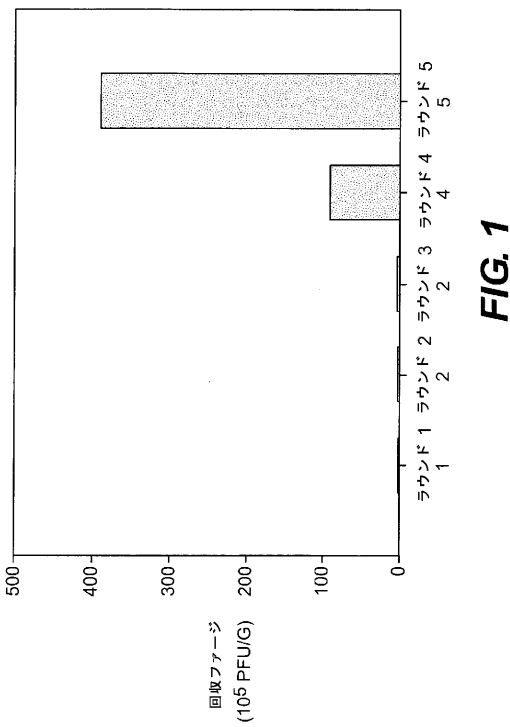
10

20

【 0 1 2 8 】

<sup>a</sup> ファージディスプレイされるコンセンサスアミノ酸配列を太字体で示す。

【 図 1 】



【 図 2 A 】

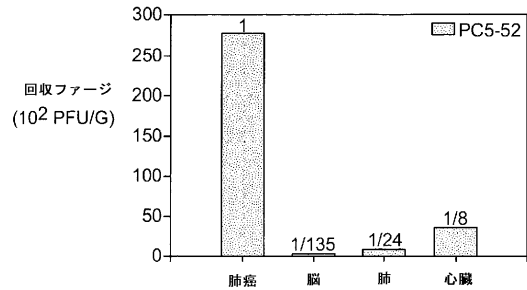


FIG. 2A

【 図 2 B 】

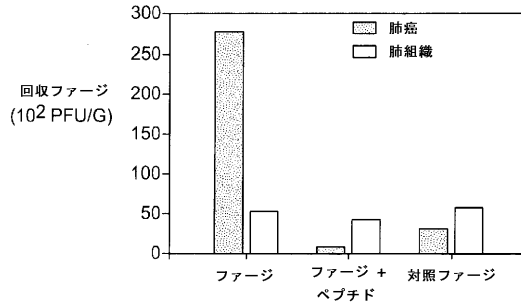


FIG. 2B

【 図 2 C 】

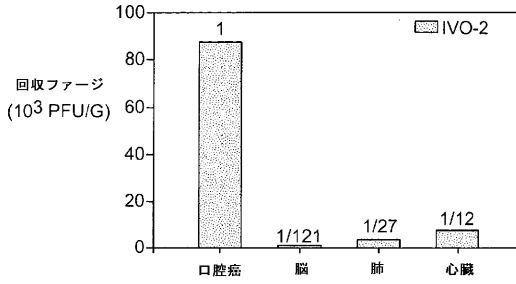


FIG. 2C

【 図 2 D 】

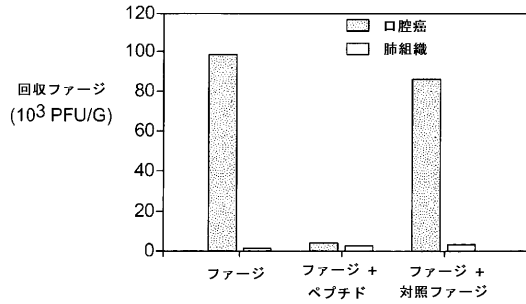


FIG. 2D

【 図 3 】

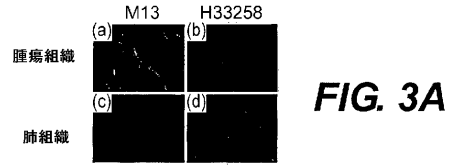


FIG. 3A

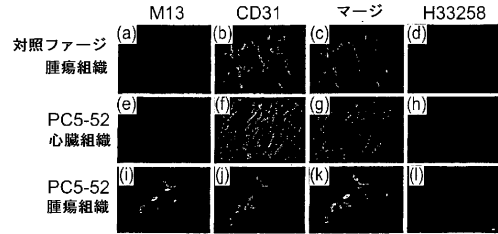


FIG. 3B

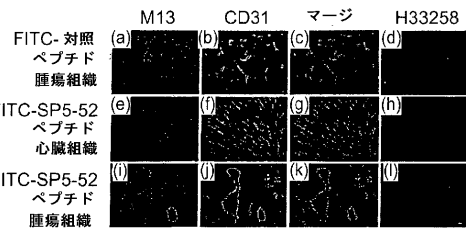


FIG. 3C

【 図 4 A 】

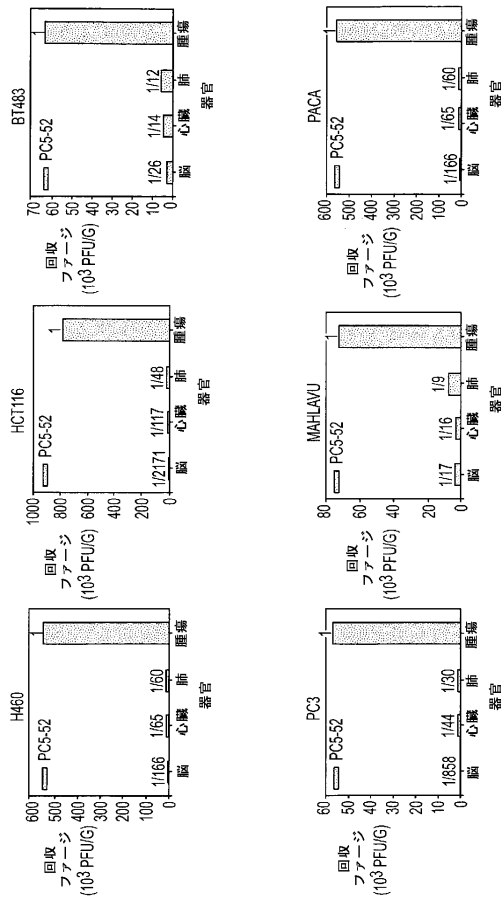


FIG. 4A

【 図 4 B 】

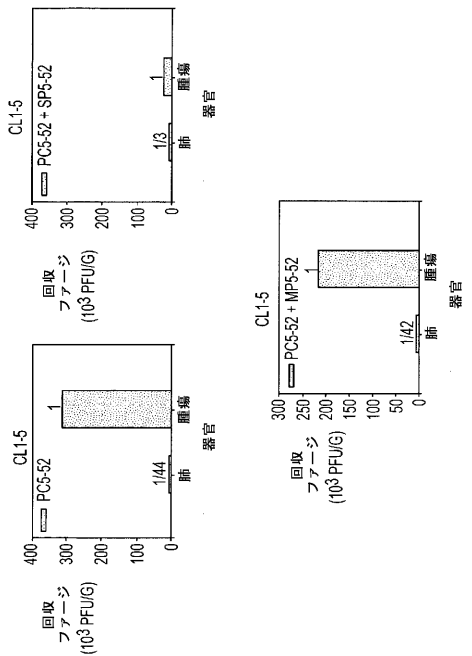


FIG. 4B

【 図 5 】

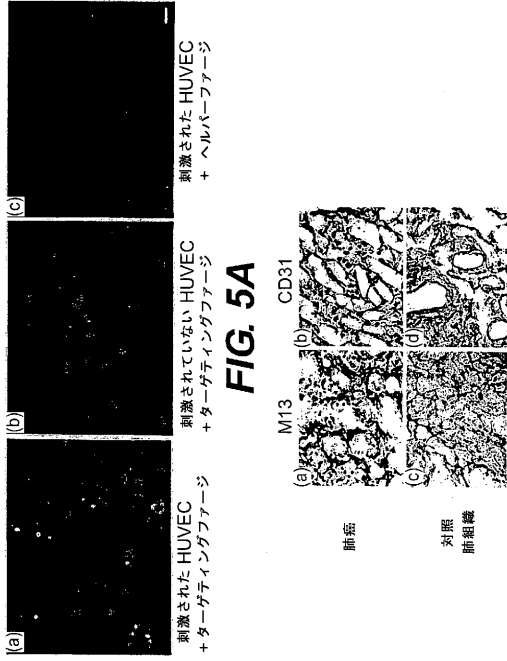


FIG. 5B

【 図 6 A 】

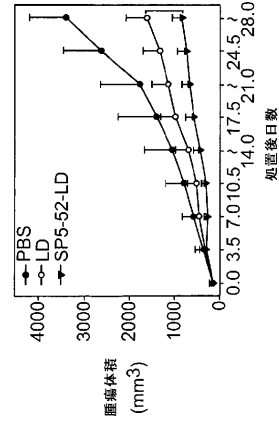


FIG. 6A

【 図 6 B 】

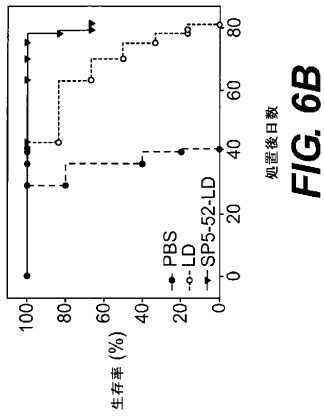
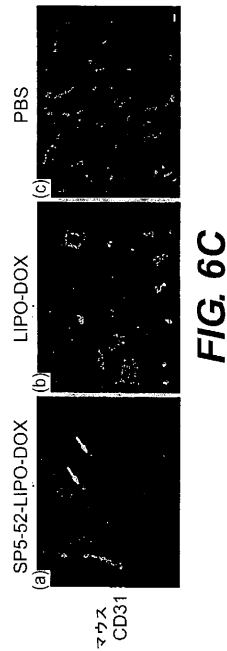


FIG. 6B

【 図 6 C 】



【 図 6 D 】

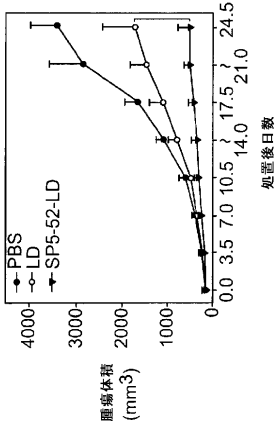


FIG. 6D

【 図 6 E 】

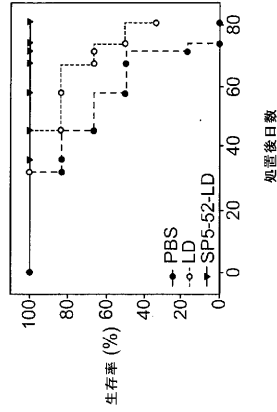


FIG. 6E

【 図 7 】

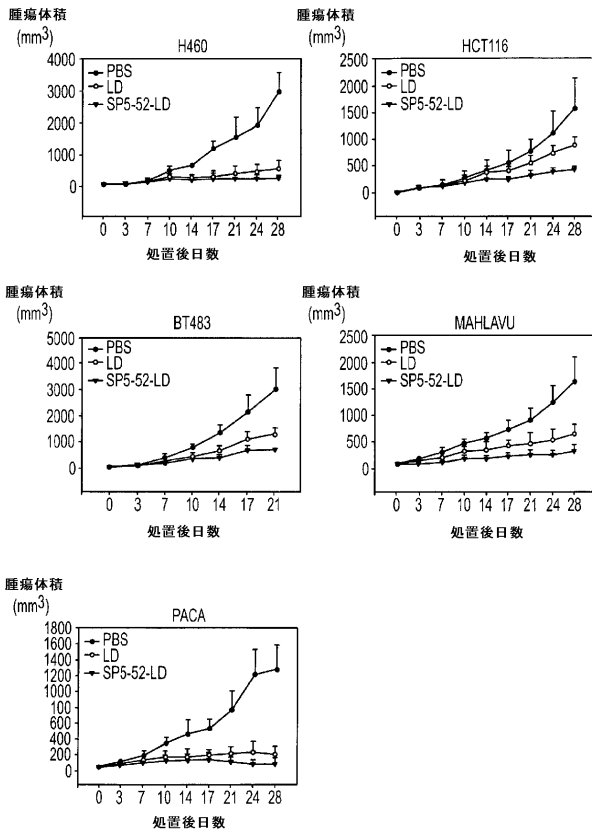


FIG. 7

【手続補正書】

【提出日】平成21年10月14日(2009.10.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2010517576000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2008/001810
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K9/127 C07K7/04 A61K47/48 C12N15/09		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	LEE TONG-YOUNG ET AL: "Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery" CANCER RESEARCH; vol. 67, no. 22, November 2007 (2007-11), pages 10958-10965, XP002488417 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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 16 July 2008		Date of mailing of the international search report 08/12/2008
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 Seroz, Thierry

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/001810
---------------------------------------------------

C(Continuation): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOREIRA J N ET AL: "Antagonist G-mediated targeting and cytotoxicity of liposomal doxorubicin in NCI-H82 variant small cell lung cancer" BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH, vol. 37, no. 8, August 2004 (2004-08), pages 1185-1192, XP002488418 ISSN: 0100-879X page 1186, right-hand column, paragraph 2 - page 1187, right-hand column, paragraph 3 page 1191, right-hand column, last paragraph	1-3, 5-12, 14-38
X	MOREIRA<A B> J N ET AL: "A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically stabilized liposomes in human small cell lung cancer" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1514, no. 2, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 303-317, XP004319634 ISSN: 0005-2736 page 305, left-hand column, paragraph 3 - page 308, left-hand column, paragraph 1 page 315, right-hand column, paragraph 3	1-3, 5-12, 14-38
X	SUGANO M ET AL: "ANTIBODY TARGETING OF DOXORUBICIN-LOADED LIPOSOMES SUPPRESSES THE GROWTH AND METASTATIC SPREAD OF ESTABLISHED HUMAN LUNG TUMOR XENOGRAFTS IN SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENT MICE" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 60, no. 24, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 6942-6949, XP000980029 ISSN: 0008-5472 page 6942, right-hand column, paragraph 3 - page 6943, right-hand column, paragraph 2 page 6948, left-hand column, last paragraph	1-3, 5-12, 14-38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/US2008/001810

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. /
X	MAEDA N ET AL: "Synthesis of angiogenesis-targeted peptide and hydrophobized polyethylene glycol conjugate" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 4, 23 February 2004 (2004-02-23), pages 1015-1017, XP002411827 ISSN: 0960-894X the whole document	1-3, 5-12, 14-38
X	PASTORINO FABIO ET AL: "Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy" CANCER RESEARCH, vol. 66, no. 20, October 2006 (2006-10), pages 10073-10082, XP002488419 ISSN: 0008-5472 page 10074, left-hand column, paragraph 4 - page 10075, left-hand column, paragraph 2 page 10081, left-hand column, last paragraph - page 10081, right-hand column, paragraph 1	1-3, 5-12, 14-38
X	EP 0 960 942 A (INTROGENE BV [NL]) 1 December 1999 (1999-12-01) paragraphs [0003] - [0007]; claim 11; examples 2-6	1-6, 11-13, 16, 34-38
Y	EP 1 537 858 A (VECTRON THERAPEUTICS AG [DE]) 8 June 2005 (2005-06-08) claims 1-31; examples 1-12	1-3, 5-12, 14-38
Y	ALLEN T M ET AL: "ADVENTURES IN TARGETING" JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, TAYLOR & FRANCIS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 12, no. 1/02, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 5-12, XP001126048 ISSN: 0898-2104 page 6, paragraphs 3,4; figures 2,4 page 11, last paragraph	1-3, 5-12, 14-38

International Application No. PCT/US2008 /001810

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

## Continuation of Box II.1

Although claims 1-29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 30-33 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2008/001810

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see annex

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008/001810

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. claims: 1-38 (all partially)

A peptide consisting of SEQ ID No 2, derived products thereof and methods using the same

## 2. claims: 1-38 (all partially)

A peptide consisting of SEQ ID No 4, derived products thereof and methods using the same

## 3. claims: 1-38 (all partially)

A peptide consisting of SEQ ID No 6, derived products thereof and methods using the same

## 4. claims: 1-38 (all partially)

A peptide consisting of SEQ ID No 8, derived products thereof and methods using the same

## 5. claims: 1-38 (all partially)

A peptide consisting of SEQ ID No 10, derived products thereof and methods using the same

## 6. claims: 1-38 (all partially)

A peptide consisting of SEQ ID No 12, derived products thereof and methods using the same

## 7. claims: 1-38 (all partially)

A peptide consisting of SEQ ID No 14, derived products thereof and methods using the same

## 8. claims: 1-38 (all partially)

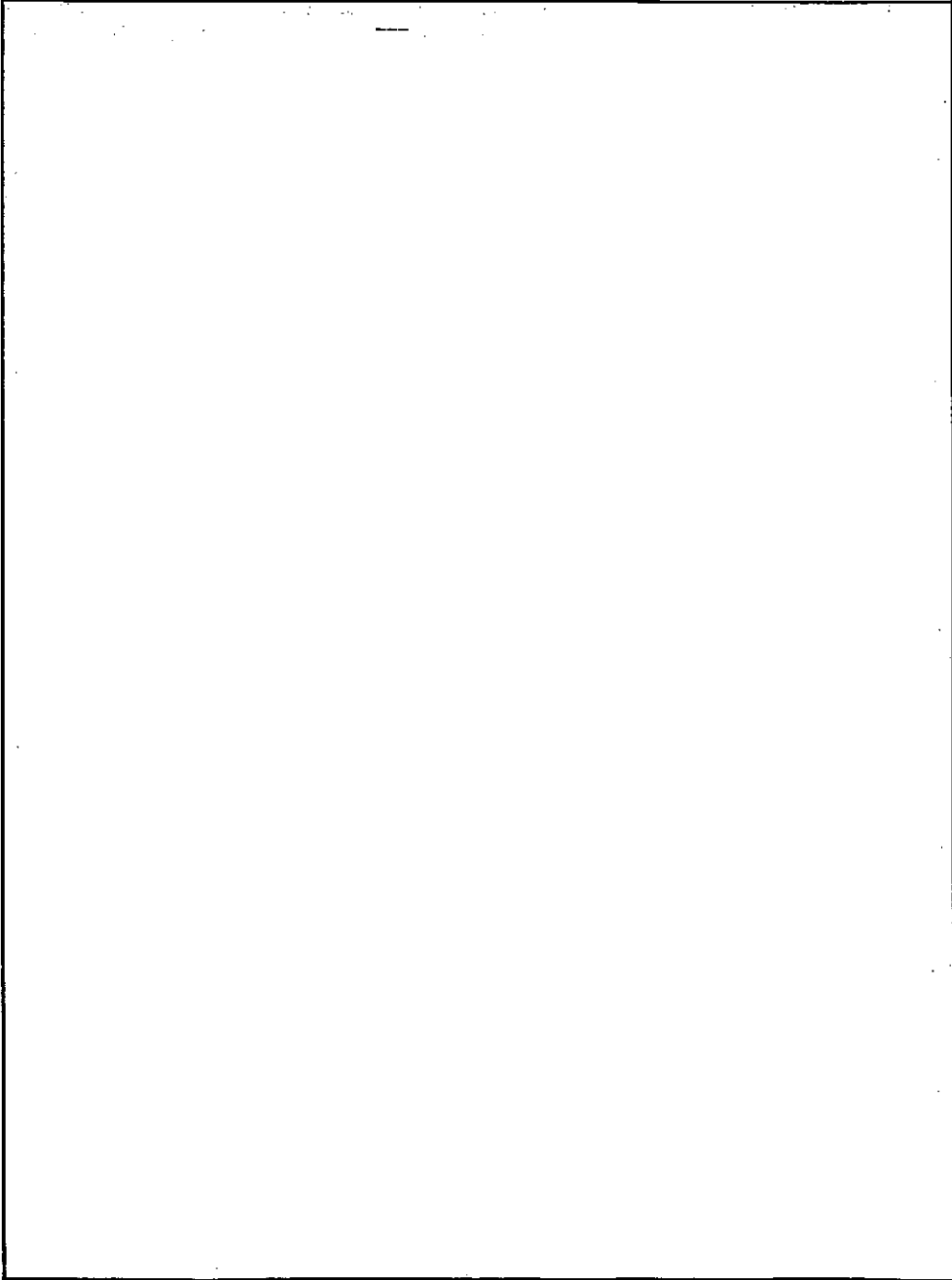
A peptide consisting of SEQ ID No 16, derived products thereof and methods using the same

## 9. claims: 1-38 (all partially)

A peptide consisting of SEQ ID No 18, derived products thereof and methods using the same

International Application No. PCT/US2008/001810

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTASA/ 210.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/001810

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0960942	A	01-12-1999	NONE
EP 1537858	A	08-06-2005	AU 2004294724 A1 16-06-2005 CA 2544890 A1 16-06-2005 WO 2005053642 A1 16-06-2005 JP 2007513122 T 24-05-2007

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K 31/475 (2006.01)	A 6 1 K	31/475	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D	
G 0 1 N 33/533 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 U	
	G 0 1 N	33/533	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ウー, ハン - チュン

台湾 1 0 5, タイペイ, ソンズハン ディストリクト, シンドン ストリート, レーン 6 6, ナンバー 1 2, 5フロアー

(72)発明者 リン, チン - タルン

台湾 1 0 6, タイペイ, チン - ティエン ストリート, レーン 7, 6エフ, ナンバー 7 - 1

(72)発明者 リー, トン - ヤン

台湾 1 0 8, タイペイ, ワンホア ディストリクト, チンニアン ロード, レーン 3 0, ナンバー 3, 1 2エフ - 1

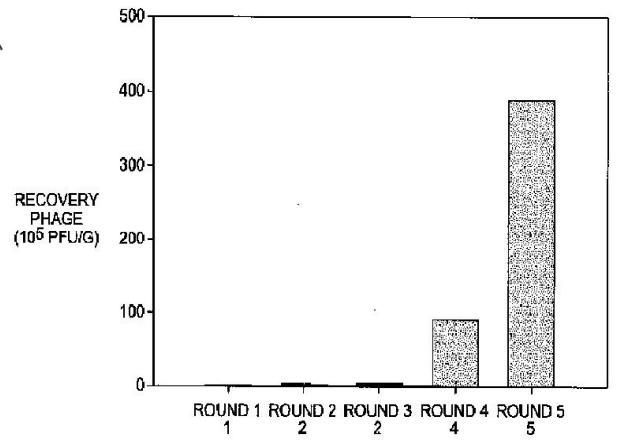
(72)発明者 クオ, スー - ヤオ

台湾 タオユエン, ジョンリー, チャンチュエン ロード, ナンバー 2 7 3, 1 0エフ

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA80 CA02 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04  
GA11 HA03  
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C076 AA19 CC15 CC27 CC29 DD63 DD70 EE23 EE41  
4C084 AA02 AA03 AA07 AA19 BA01 BA02 BA08 BA18 BA23 BA31  
BA32 BA35 BA41 CA59 MA24 NA13 NA14 ZA332 ZA592 ZA672  
ZB262  
4C086 AA01 AA02 CB21 EA10 EA16 MA02 MA04 MA24 NA05 NA13  
ZA33 ZA59 ZA66 ZA67 ZA75 ZA81 ZB26  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA16 BA41 BA72 DA76 DA86  
EA28 EA51 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	靶向肺癌肿瘤血管的肽及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010517576A</a>	公开(公告)日	2010-05-27
申请号	JP2009549136	申请日	2008-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	中央研究院 国立台湾大学		
申请(专利权)人(译)	中央研究院 国立台湾大学		
[标]发明人	ウーハンチュン リンチンタルン リートンヤン クオスーヤオ		
发明人	ウー, ハン-チュン リン, チン-タルン リー, トン-ヤン クオ, スー-ヤオ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/08 C07K19/00 C07K16/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/00 A61K31/704 A61K31/475 A61K31/7088 A61K45/00 A61K9/127 A61P35/00 A61P27/02 A61P11/00 G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	A61K9/1271 A61K47/62 A61K47/6911 A61P11/00 A61P27/02 A61P35/00 G01N33/5082 G01N33 /57423		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/08 C07K19/00 C07K16/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K37/02 A61K31/704 A61K31/475 A61K31/7088 A61K45/00 A61K9/127 A61P35/00 A61P27/02 A61P11/00 G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/533		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA19 4C076/CC15 4C076/CC27 4C076/CC29 4C076/DD63 4C076/DD70 4C076/EE23 4C076/EE41 4C084 /AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/BA31 4C084/BA32 4C084/BA35 4C084/BA41 4C084/CA59 4C084/MA24 4C084 /NA13 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA592 4C084/ZA672 4C084/ZB262 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/CB21 4C086/EA10 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA24 4C086/NA05 4C086/NA13 4C086/ZA33 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA67 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086 /ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/BA41 4H045/BA72 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045 /GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/900980 2007-02-13 US 60/901086 2007-02-14 US 11/783926 2007-04-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本发明提供了用于包括诊断和治疗的应用的核酸，肽和抗体。肽靶向新血管系统并通过体内噬菌体展示鉴定。一种这样的肽SP5-52识别SCID小鼠中多种肿瘤的新血管系统，但不靶向正常血管。该肽还与人肺癌活组织检查样本的血管结合。包含SP5-52和多柔比星的脂质体增强了药物对SCID小鼠中的多种人癌异种移植物的功效。



**FIG. 1**