РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 770 197**(13) **C2**

(51) МПК
C07K 5/08 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C08G 69/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 7/06 *(2021.08);* ***C07K 19/00*** *(2021.08);* ***C08G 69/08*** *(2021.08);* ***A61K 38/03*** *(2021.08);* ***A61K 38/06*** *(2021.08);* ***A61P 35/00*** *(2021.08);* ***C07K 2318/20*** *(2021.08)*

(21)(22) Заявка: **2019107377, 16.08.2017**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.08.2017

Дата регистрации:
14.04.2022

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
16.08.2016 JP 2016-159743

(43) Дата публикации заявки: **18.09.2020** Бюл. № **26**

(45) Опубликовано: **14.04.2022** Бюл. № **11**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **18.03.2019**

(86) Заявка PCT:
JP 2017/030003 (16.08.2017)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2018/034356 (22.02.2018)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
ФУКУДА, Митико (JP),
НОНАКА, Мотохиро (JP)

(73) Патентообладатель(и):
НЭШНЛ ИНСТИТЬЮТ ОФ ЭДВАНСТ ИНДАСТРИАЛ САЙЕНС ЭНД ТЕКНОЛОДЖИ (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2010022444 A1, 04.03.2010. WO 2015016768 A1, 05.02.2015. МАРЧЕНКО А. В. и др. Новые пептидные ингибиторы киназы легких цепей миозина подавляют гиперпроницаемость эндотелия сосудов, Биофизика, 2010, V. 55, N. 6, с.1008-1013. ACCHIONE M. et al. Impact of linker and conjugation chemistry on antigen binding, Fc receptor binding and thermal** (см. прод.)

(54) ПЕПТИД ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ, ЯВЛЯЮЩИЙСЯ МИШЕНЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к пептиду, который связывается с аннексином A1, и может быть использовано в медицине. Полученный пептид с аминокислотной последовательностью C[D]T[D]I[D]T[D]W[D]P[D]T[D]M[D], где аминокислоты представлены в D-форме, может быть использован для эффективного лечения злокачественной опухоли. 12 ил., 1 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):
stability of model antibody-drug conjugates, MAbs, 2012, V. 4, N. 3, p.362-372. PAKULA A.A. et al. Genetic analysis of protein stability and function, Annual review of genetics, 1989, V. 23, N. 1, p.289-310. SCHUMACHER T. N. M. et al. Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display, Science, 1996, V. 271, N.5257, p.1854-1857.

RU 2770197 C2

RU 2770197 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 770 197**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
C07K 5/08 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C08G 69/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C07K 7/06 *(2021.08);* ***C07K 19/00*** *(2021.08);* ***C08G 69/08*** *(2021.08);* ***A61K 38/03*** *(2021.08);* ***A61K 38/06*** *(2021.08);* ***A61P 35/00*** *(2021.08);* ***C07K 2318/20*** *(2021.08)*

(21)(22) Application: **2019107377, 16.08.2017**

(24) Effective date for property rights:
16.08.2017

Registration date:
14.04.2022

Priority:
(30) Convention priority:
16.08.2016 JP 2016-159743

(43) Application published: **18.09.2020** Bull. № **26**

(45) Date of publication: **14.04.2022** Bull. № **11**

(85) Commencement of national phase: **18.03.2019**

(86) PCT application:
JP 2017/030003 (16.08.2017)

(87) PCT publication:
WO 2018/034356 (22.02.2018)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
FUKUDA, Michiko (JP),
NONAKA, Motohiro (JP)

(73) Proprietor(s):
NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (JP)

(54) PEPTIDE OF A MALIGNANT TUMOUR, CONSTITUTING A TARGET

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically, to a peptide binding to annexin A1, and can be used in medicine.

EFFECT: produced peptide with the amino acid sequence C[D]T[D]I[D]T[D]W[D]P[D]T[D]M[D], wherein amino acids are presented in a D form, can be used to effectively treat a malignant tumour.

1 cl, 12 dwg, 1 tbl, 5 ex

RU 2770197 C2

RU 2770197 C2

[Область техники]

[0001]

Настоящее изобретение, главным образом, относится к области биологии злокачественной опухоли, и, более конкретно, к пептидам, которые связываются с аннексином A1, и к их применению.

[Уровень техники]

[0002]

Среди опухолей головного мозга многие опухоли, происходящие из оболочек головного мозга, нервов головного или спинного мозга, такие как менингиомы и шванномы, представляют собой доброкачественные опухоли головного мозга и могут быть полностью вылечены, если их можно удалить посредством хирургической операции. Напротив, нейроэпителиальные опухоли, включающие глиому, в основном являются злокачественными опухолями головного мозга. В частности, глиобластома 4 степени имеет чрезвычайно плохой прогноз (5-летняя выживаемость составляет приблизительно 10%), даже если проводят лучевую терапию и химиотерапию после удаления путем краниотомии. Основной причиной отсутствия эффективной химиотерапии опухоли головного мозга является наличие гематоэнцефалического барьера. С другой стороны, темозоломид, который представляет собой новое лекарственное средство, эффективное в отношении глиобластомы, был одобрен в Японии в 2006 году. Это лекарственное средство имеет очень небольшую молекулярную массу (194 Да), и, как было показано, способно проходить через гематоэнцефалический барьер путем диффузии. Однако это лекарственное средство способно продлевать жизнь на от 12 месяцев до 16 месяцев. Таким образом, для значительного улучшения результатов лечения злокачественной опухоли головного мозга в будущем, необходимо разработать терапевтическое лекарственное средство, которое накапливается в опухоли головного мозга в очень высокой концентрации и может активно проходить через стенку эпителия сосудов, а не пассивным путем, в основе которого лежит диффузия низкомолекулярных соединений через гематоэнцефалический барьер.

[0003]

В последнее время расходы пациентов становятся все более высокими вследствие растущих затрат на исследование и разработку, и широкое применение фармацевтических препаратов на основе антител. Считается, что в будущем эта тенденция усилится в результате усложнения медицинского ухода, такого как система диагностики с помощью генетической информации и т.п. Кроме того, эффект этих стремительно растущих цен на лекарственные средства на общественное здравоохранение также является огромным. Более того, дорогостоящие фармацевтические средства на основе антител становятся недоступными неразвитым странам, что приводит к дальнейшему медицинскому неравенству во всемирном масштабе. Для того, чтобы предпринять меры в отношении вышеупомянутых проблем с точки зрения долгосрочной перспективы, в будущем необходимо исследовать возможность недорогих биофармацевтических средств, таких как пептиды с короткой цепью, в дополнение к цели нахождения лучшего источника лекарственных средств.

[0004]

Fukuda, одна из авторов настоящего изобретения, возглавляла лабораторию в Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute в США в течение более чем 30 лет, после чего ее назначили в National Institute of Advanced Industrial Science and Technology в 2014 году. За это время Fukuda впервые в мире успешно ингибировала зависимое от сахарных цепей метастазирование злокачественной опухоли с использованием пептида,

имитирующего структуру сахарной цепи (непатентный документ 1). Более того, в ходе исследования сосудисто-эндотелиальных рецепторов, взаимодействующих с этими пептидами, имитирующими сахарную цепь, она обнаружила, что пептид под названием IF7 связывается с аннексином A1 (Anxa1) (непатентный документ 2). Как было показано группой Jan Schnitzer et al., Anxa1 является наиболее специфическим из известных в настоящее время специфических для сосудов опухоли маркерных молекул, и он экспрессируется внутриклеточно в нормальных клетках, но в высокой степени экспрессируется на обращенных к просвету поверхностях, соседствующих с кровотоком, в неоваскулярных эндотелиальных клетках опухоли (непатентный документ 3). Fukuda et al. установили, что лекарственное средство (IF7-SN38), полученное посредством связывания средства против злокачественной опухоли (SN38) с IF7, устраняет опухоль у имеющих опухоль мышей в низкой дозе (непатентный документ 2). В то время как IF7 связывается с N-концевой областью Anxa1 мыши, аминокислотная последовательность в этой области является высококонсервативной между мышью и человеком. Таким образом, IF7-SN38 также может быть полезным у человека. Это открытие было размещено в "текущем выпуске PNAS" журнала PNAS и NIH внесла специальную статью. Это открытие далее привлекло значительное внимание, включая репортажи средств массовой информации по всему миру.

[Список документов]

[непатентные документы]

[0005]

Непатентный документ 1: Fukuda et al., Cancer Research, 60: 450-6, 2000

Непатентный документ 2: Hatakeyama et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 108: 19587-92,2011

Непатентный документ 3: Oh et al., Nature 429: 629-35, 2004

[СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ]

[Проблемы, решаемые с помощью изобретения]

[0006]

При введении IF7 внутривенно мышам со злокачественной опухолью он достигает кровеносных сосудов, окружающих опухоль, после чего IF7 захватывается в везикулы с обращенной в просвет стороны эндотелиальных клеток сосудов и перемещается на базальную сторону, где он высвобождается в строму, в которой находятся злокачественные клетки. Также в сосудисто-эндотелиальных клетках F2 мыши IF7, связанный с Anxa1, активно пересекает эндотелиальные клетки сосудов посредством трансцитоза. Таким образом, было предположено, что IF7 обладает активностью прохождения через барьер кровеносный сосуд-опухоль головного мозга в опухолях головного мозга. Неожиданно, внутривенная инъекция флуоресцентно меченного IF7 модельным мышам с опухолью головного мозга, которым трансплантированы клетки глиомы, приводила к накоплению флуоресценции в высокой концентрации в области опухоли головного мозга. Флуоресценция также пересекала кровеносные сосуды и достигала злокачественных клеток в строме головной мозге. Более того, подкожную опухоль и опухоль головного мозга создавали у одной и той же мыши (модель с двумя опухолями), и тестировали терапевтический эффект IF7-SN38. В результате, как опухоль головного мозга, так и подкожная опухоль, подавлялись, и их эффект был более высоким в опухоли головного мозга, чем в подкожной опухоли. Аналогичные результаты были получены в модели метастазов меланомы B16 в головной мозг и результаты были такими же, даже когда мышь-хозяина заменяли на мышь линии C57BL/6 или SCID. Эти факты указывают на то, что DDS, нацеленный на Anxa1, не только эффективно проходит через барьер кровь-опухоль головного мозга, но также обеспечивает превосходные

терапевтические эффекты в отношении опухоли головного мозга.

[0007]

Как описано выше, между тем как IF7 обладает превосходной активностью нацеливания на злокачественную опухоль, его клиническая разработка имеет две проблемы: низкая растворимость и низкая стабильность. Во-первых, пептид IF7 является чувствительным к протеазам и легко деградируется. В действительности, в эксперименте, включавшем внутривенное введение A488-IF7 здоровым мышам, флуоресцентный сигнал в периферической крови практически исчезал в течение приблизительно 1 часа. Однако при введении в хвостовую вену мышей со злокачественной опухолью флуоресценция A488-IF7 в периферической крови была значительно меньшей, чем у здоровых мышей. Этот результат указывает на то, что большая часть A488-IF7 быстро накапливается в опухоли, одновременно подвергаясь деградации. Также IF7 является в высокой степени гидрофобным, и это приводит к проблемам с дозированной формой, например, когда соединение, связанное со средством против злокачественной опухолью, вводят внутривенно, необходимо добавлять поверхностно-активное вещество во избежание преципитации, после растворения в DMSO.

[0008]

Таким образом, задачей настоящего изобретения является предоставление нового связывающегося с аннексином A1 пептида, который способен по меньшей мере частично преодолевать вышеупомянутые проблемы, связанные с IF7, и его применение.

[Способы решения проблем]

[0009]

Для решения вышеупомянутых проблем авторы настоящего изобретения провели тщательные исследования, и у них возникла идея исследовать D-форму пептида, способного связываться с аннексином A1. В связи с этим, авторы настоящего изобретения синтезировали D-форму пептида (D-MC16), являющегося зеркальным отражением L-формы пептида (L-MC16) из 16 остатков, имеющего модифицирующий остаток Cys, присоединенный к 15 N-концевым остаткам Anxa1, о котором известно, что он связывается с IF7, и провели скрининг с использованием библиотеки фага T7 для идентификации множества пептидов в L-форме из 7 аминокислот, которые связываются с D-MC16. Они провели дальнейшие исследования пептида, называемого пептидом TIT7, который был особенно перспективным среди идентифицированных пептидов в L-форме. Как авторы изобретения и прогнозировали, они подтвердили, что пептид в D-форме (пептид dTIT7), который является зеркальным отражением пептида TIT7, связывается с Anxa1. Более того, авторы настоящего изобретения продемонстрировали посредством экспериментов *in vivo,* что пептиды dTIT7 накапливаются в области опухоли при введении модельным мышам с опухолью головного мозга через хвостовую вену, что пептид dTIT7 (GA-dTIT7), связанный со средством против злокачественной опухоли (гелданамицин), значительно ингибировал рост опухоли при внутривенном введении мышам, имеющим злокачественную опухоль, таким образом, вызывая массивный некроз в области опухоли, и что пероральное введение GA-dTIT7 подавляло рост опухоли как у модельных мышей с опухолью головного мозга, которым были трансплантированы клетки C6 в головной мозг, так и у модельных мышей с метастазами в головном мозге, которым в головной мозг B16 были трансплантированы клетки B16, что опухоль продолжала уменьшаться даже после прекращения введения лекарственного средства, и что у некоторых животных в итоге достигалось полное излечение.

[0010]

Авторы настоящего изобретения провели дополнительные исследования на основе описанных выше результатов и осуществили настоящее изобретение. Настоящее изобретение является следующим.

[1] Пептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно любой из формул (I)-(III) ниже:

(I) аминокислотная последовательность (X1)[D]P[D](X2)[D], где X1 представляет собой W или F, X2 представляет собой S или T, и каждое обозначение аминокислоты после символа [D] соответствует D-форме аминокислоты,

(II) аминокислотная последовательность P[D]T[D]$(X)_n$ F[D], где $(X)_n$ представляет собой любую аминокислоту в количестве n, выбранную независимо от других, n представляет собой целое число, составляющее 0-4, и символ [D] имеет значение, указанное выше,

(III) аминокислотная последовательность, которая представляет собой ретро-инверсную форму аминокислотной последовательности любой из вышеупомянутой (I) и вышеупомянутой (II).

[2] Пептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно любому из следующих (i)-(vii) (в приведенных ниже последовательностях символ [D] является таким, как определено выше):

(i) аминокислотная последовательность T[D] I[D] T[D] W[D] P[D] T[D] M[D],

(ii) аминокислотная последовательность L[D] R[D] F[D] P[D] T[D] V[D] L[D],

(iii) аминокислотная последовательность L[D] L[D] S[D] W[D] P[D] S[D] A[D],

(iv) аминокислотная последовательность S[D] P[D] T[D] S[D] L[D] L[D] F[D],

(v) аминокислотная последовательность M[D] P[D] T[D] L[D] T[D] F[D] R[D],

(vi) аминокислотная последовательность согласно любому из вышеупомянутых (i)-(v), в которой 1 или несколько аминокислот вставлены, замещены или удалены, или имеется их комбинация,

(vii) аминокислотная последовательность, которая представляет собой ретро-инверсную форму аминокислотной последовательности согласно любому из вышеупомянутых (i)-(vi).

[3] Пептид согласно [2], содержащий аминокислотную последовательность согласно вышеупомянутому (i).

[4] Пептид согласно [2], состоящий из аминокислотной последовательности согласно вышеупомянутому (i).

[5] Конъюгат, содержащий пептид согласно любому из [1]-[4], и один или несколько компонентов.

[6] Конъюгат согласно [5], где один или несколько компонентов содержат средство против злокачественной опухоли.

[7] Конъюгат согласно [6], где вышеупомянутое средство против злокачественной опухоли выбрано из группы, состоящей из антиметаболита, алкилирующего средства, антибиотика против злокачественной опухоли, ингибитора микротрубочек, препарата платины, ингибитора топоизомераз, средства для молекулярного нацеливания и антиангиогенного средства.

[8] Конъюгат согласно [6] или [7], который выбран из группы, состоящей из

эноцитабина, капецитабина, кармофура, кладрибина, гемцитабина, цитарабина, окфосфата цитарабина, тегафура, тегафура/урацила, тегафура/гимерацила/отерасила калий, доксифлуридина, неларабина, гидроксикарбамида, фторурацила, флударабина, пеметрекседа, пентостатина, меркаптопурина, метотрексата;

циклофосфамида, ифосфамида, мелфалана, бусульфана, тиотепы, нимустина,

ранимустина, дакарбазина, прокарбазина, темозоломида, кармустина, стрептозотоцина, бендамустина;

актиномицина D, акларубицина, амрубицина, идарубицина, эпирубицина, зиностатина стималамера, даунорубицина, доксорубицина, пирарубицина, блеомицина, пепломицина, митомицина С, митоксантрона, липосомального доксорубицина;

винбластина, винкристина, виндезина, паклитаксела, доцетаксела,

оксалиплатина, карбоплатина, цисплатина, недаплатина;

камптотецина, иринотекана, ногитекана, SN-38, доксорубицина, этопозида, левофлоксацина, ципрофлоксацина;

лиголафениба, цетуксимаба, панитумумаба, рамсилмаба, гефитиниба, эрлотиниба, афатиниба, кризотиниба, алектиниба, церитиниба, либертиниба, трастузумаба, лапатиниба, пертузумаба, сунитиниба, сорафениба, акситиниба, пазопаниба, ниволумаба, пембролизумаба, ипилимумаба, вемурафениба, эверолимуса, темсиролимуса, ритуксимаба, бевацизумаба, гелданамицина;

ангиостатина, эндостатина, метастатина, антитела против VEGF и ингибитора VEGFR-2.

[9] Конъюгат согласно [5], где один или несколько компонентов содержат поддающееся обнаружению вещество.

[10] Конъюгат согласно [9], где поддающееся обнаружению вещество позволяет обнаружение конъюгата *in vivo* способами, выбранными из группы, состоящей из рентгенофотографии, компьютерной томографии (СТ), ядерной магнитно-резонансной томографии (МРТ), ультрасонографии, сцинтиграфии, позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), эндоскопии и лапараскопии.

[11] Конъюгат согласно [9] или [10], где поддающееся обнаружению вещество представляет собой радиоизотоп, усиливающее средство для МРТ, рентгеноконтрастное вещество, контрастное вещество или флуоресцентное вещество.

[12] Конъюгат согласно любому из [9]-[11], где поддающееся обнаружению вещество выбрано из группы, состоящей из

радионуклида, выбранного из ^{18}F, ^{51}Mn, ^{52m}Mn, ^{52}Fe, ^{55}Co, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{82m}Rb, ^{83}Sr, ^{86}Y, ^{89}Zr, ^{94m}Tc, ^{110}In, ^{120}I, ^{124}I и т.п. Примеры радионуклида, пригодного для обнаружения γ-лучей, включают ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{75}Se, ^{97}Ru, ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{114m}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{169}Yb, ^{197}Hg и ^{201}Tl;

парамагнитного иона, выбранного из хрома (III), марганца (II), железа (III), железа (II), кобальта (II), никеля (II), меди(II), неодимия (III), самария (III), иттербия (III), гадолиния (III), ванадия (II), тербия (III), диспрозия (III), гольмия (III) и эрбия (III), лантана (III), золота (III), свинца (II), висмута (III);

соединения йода, соединения бария, соединения галлия, соединения таллия;

родамина, флуоресцеина, красителя Cy, Alexa (зарегистрированный торговый знак) Fluor, фикоэритрина (PE), аллофикоцианина (APC), их производных и флуоресцентного реагента ближней инфракрасной области.

[13] Композиция, содержащая пептид согласно любому из [1]-[4] или конъюгат согласно любому из [5]-[12] и фармакологически приемлемый носитель.

[14] Композиция для лечения злокачественной опухоли, содержащая конъюгат согласно любому из [6]-[8] и фармакологически приемлемый носитель.

[15] Композиция для тестирования злокачественной опухоли, содержащая конъюгат согласно любому из [9]-[12] и фармакологически приемлемый носитель.

[16] Композиция согласно [14] или [15], где злокачественная опухоль представляет

собой солидную злокачественную опухоль или жидкостную злокачественную опухоль.

[17] Композиция согласно [16], где солидная злокачественная опухоль представляет собой ангиогенную солидную злокачественную опухоль.

[18] Композиция согласно [16] или [17], где солидная злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль головного мозга или нервной системы, злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль пищеварительного тракта, злокачественную опухоль органов мочевой и половой системы, злокачественную опухоль дыхательной системы, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль кости или злокачественную опухоль мышцы.

[19] Композиция согласно любому из [16]-[18], где солидная злокачественная опухоль представляет собой опухоль головного мозга, опухоль спинного мозга, рак гортани, рак полости рта, рак слюнных желез, рак околоносовых пазух, рак щитовидной железы, рак желудка, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак толстого кишечника, рак прямой кишки, рак анального канала, рак печени, рак желчных путей, рак поджелудочной железы, рак почки, почечно-клеточный рак, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак почечной лоханки и мочеточника, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак яичника, рак полового члена, рак тела матки, рак эндометрия, саркому матки, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, рак яичника, рак фаллопиевых труб, рак легкого, рак молочной железы, злокачественную меланому, остеосаркому или рабдомиосаркому.

[20] Композиция согласно [19], где солидная злокачественная опухоль представляет собой доброкачественную или злокачественную опухоль головного мозга.

[21] Композиция согласно [20], где опухоль головного мозга представляет собой первичную опухоль головного мозга или метастатическую опухоль головного мозга.

[22] Композиция согласно [20] или [21], где опухоль головного мозга представляет собой менингиому, аденому гипофиза, шванному, астроцитому, олигоденроглиому, анапластическую астроцитому, анапластическую олигоденроглиому, анапластическую олигоастроцитому или глиобластому.

[23] Композиция согласно [16], где жидкостная злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную лимфому.

[Эффект изобретения]

[0011]

В соответствии с настоящим изобретением, предусматривается новый пептид, который связывается с аннексином А1.

Как очевидно в случае эритропоэтина и новых антител против PD-1, клинически успешные фармацевтические препараты обладают очень высокой специфичностью в отношении экспрессии биомолекулы, на которую нацелены лекарственные средства. Поскольку аннексин А1, на который нацелен пептид по настоящему изобретению, является наиболее специфической молекулой среди известных в настоящее время неоваскулярных маркеров-мишеней злокачественной опухоли, средство против злокачественной опухоли, включающее комбинацию пептида по настоящему изобретению, может демонстрировать лучший терапевтический эффект по сравнению с существующими средствами против злокачественной опухоли.

В частности, конъюгат пептид-средство против злокачественной опухоли не только способен накапливать средство против злокачественной опухоли в злокачественной опухоли с высокой эффективностью, но также является резистентным к действию протеаз, что позволяет снизить количество эффективных доз и уменьшить дозы. Кроме

того, посредством комбинированного применения средства против злокачественной опухоли и иммунотерапии можно ожидать полного излечения злокачественной опухоли, поскольку считается, что иммунная система сохраняется.

Характерным признаком аннексина A1 является то, что он экспрессируется в неоваскулярной клетке, образовавшейся в опухоли, со стороны крови, и когда он связывается с лигандом со стороны крови, таким как пептид по настоящему изобретению, лиганд транспортируется к базальной стороне посредством трансцитоза и активно высвобождается в строму, где находятся злокачественные клетки. Это свойство также может служить в качестве механизма для активного прохождения через барьер сосуд-головной мозг. Пептид по настоящему изобретению, нацеленный на аннексин A1, в отличие от общепринятых ингибиторов ангиогенеза (Авастин) и темозоломида (описанного выше), позволяет лечение злокачественной опухоли головного мозга посредством инновационного механизма. Иными словами, в настоящее время разработаны химиотерапевтические средства, которые проходят через гематоэнцефалический барьер, которые накапливаются в опухолевой ткани и которые могут быть стабильными в организме и могут быть введены перорально, однако химиотерапевтическое средство, сочетающее в себе все из этих качеств, не существует, за исключением пептида по настоящему изобретению (фиг.10).

Поскольку пептид по настоящему изобретению может быть комбинирован с различными средствами против злокачественной опухоли, он может осуществлять физиологическую активность в широком диапазоне.

Настоящее изобретение является прорывом в области лечения опухолей головного мозга. Кроме того, известно, что ANXA1 экспрессируется на поверхностях сосудов различных злокачественных опухолей, и ожидается, что связанное с dTIT7-средство против злокачественной опухоли будет клинически применимым в качестве терапевтического средства не только против опухоли головного мозга, но также и против широкого диапазона злокачественных опухолей.

Кроме того, поскольку химический синтез и модификация пептида по настоящему изобретению являются простыми, он является в высокой степени перспективным в качестве среднемолекулярного биофармацевтического средства, заменяющего фармацевтические препараты на основе антител. В частности, поскольку пептид по настоящему изобретению может представлять собой пептид короткой цепи (например, 7 остатков аминокислот), его можно получение можно осуществлять экономно химическим синтезом.

Более того, пептид по настоящему изобретению и конъюгат, содержащий пептид и другую функциональную часть, обладает превосходной стабильностью и также может использоваться в качестве фармацевтического средства для перорального введения. Таким образом, клинические испытания также являются простыми. После фактического одобрения в качестве медицинского лекарственного средства, он может быть распространен в качестве фармацевтического средства даже в неразвитых странах, где медицинских учреждений мало.

[0012]

Кроме того, конъюгат, содержащий пептид по настоящему изобретению и поддающееся обнаружению вещество, является пригодным, например, в диагностических применениях в отношении злокачественной опухоли. Авторы настоящего изобретения в прошлом предприняли попытку тестирования посредством ПЭТ мышей с использованием IF7, однако не получили специфических изображений опухоли. Причиной неуспеха считается то, что IF7, связанный с радиоактивным реагентом, был

погружен внутрь соединения вследствие высокой гидрофобности IF7. Пептид по настоящему изобретению может быть растворимым в воде и, таким образом, может преодолеть эту проблему. Пептид по настоящему изобретению позволяет относительно простую модификацию, например, на N-конце, может быть мечен реагентами для 3D-визуализации, такой как ПЭТ, и может быть разработан в качестве диагностического средства.

[Краткое описание чертежей]

[0013]

На фиг.1 представлен эффект нацеливания IF7 на опухоль головного мозга. Срезы ткани головного мозга после внутривенного введения IF7-A488 модельным мышам с опухолью головного мозга. A488 (слева) и краситель Хехста (справа, область опухоли). RQ7 представляет собой отрицательный контроль с последовательностью, обратной IF7. Планки: 5 мм.

На фиг.2 представлено флуоресцентное микроскопическое изображение среза ткани опухоли головного мозга мыши, которой вводили флуоресцентно меченный IF7. Увеличенное изображение среза ткани опухоли головного мозга, представленного на фиг.1. Сосудисто-эндотелиальную клетку окрашивали антителом, специфичным к CD31 (красный). IF7-A488 (зеленый) проходит через кровеносные сосуды, достигая злокачественных клеток в строме. RQ7 представляет собой контроль с последовательностью, обратной IF7. Планки: 40 мкм.

На фиг.3 поясняется модель на мыши с двойной опухолью. Для исследования влияния на барьер сосуд-опухоль головного мозга (BBTB), экспрессирующие люциферазу (Luc) злокачественные клетки трансплантировали в головной мозг и под кожу одной мыши для формирования опухоли. Когда BBTB ингибирует проникновение лекарственного средства против злокачественной опухоли, вводимого через хвостовую вену, в опухоль головного мозга (BBTB+), эффекты лекарственного средства против злокачественной опухоли появляются только в подкожной опухоли. С другой стороны, когда лекарственное средство против злокачественной опухоли проникает через опухоль головного мозга (BBTB-), оно является эффективным как в опухолях головного мозга, так и в подкожных опухолях.

На фиг.4 представлены терапевтические эффекты IF7-SN38 на опухоль головного мозга. Клетки C6-Luc (клетки, принудительно экспрессирующие люциферазу в глиоме крысы) трансплантировали в головной мозг и под кожу иммунодефицитной мыши SCID для формирования опухоли, получая модель с двойной опухолью. IF7-SN38 вводили каждые сутки через хвостовую вену, количественно определяли люминесценцию вследствие активности люциферазы в опухоли и определяли жизнеспособность клеток C6-Luc. IF7-SN38 не только ингибировал рост опухоли головного мозга, но также ингибировал опухоль головного мозга сильнее, чем подкожную опухоль.

На фиг.5 приведен количественный анализ остаточной флуоресценции в крови после внутривенного введения A488-IF7 мышам со злокачественной опухолью и здоровым мышам. A488-IF7 вводили через хвостовую вену мышам с подкожной карциномой из меланомы B16 и проводили взятие периферической крови из вены глаза в различные моменты времени и количественно определяли флуоресценцию. Полученные результаты флуоресценция снижались в зависимости от размера опухоли.

На фиг.6 поясняется скрининг пептида в D-форме, который связывается с Anxa1. (A) Способ идентификации последовательности пептида в D-форме путем скрининга зеркального отображения. IF7 связывается с N-концевым пептидом Anxa1 ((1) L-форма MC16), состоящая из 16 аминокислотных остатков. (2) D-форму MC16 синтезируют и

последовательность, связывающуюся с ней, отбирают. (3) Полученный пептид в L-форме синтезируют с D-аминокислотами, с получением пептида в D-форме, который связывается с Anxa1.) (B) Результаты скрининга библиотеки фага T7, нацеленной на D-MC16. Для каждого раунда наблюдали увеличение фага в количестве. (C) Анализ последовательности специфичных к D-MC16 фагов T7 с использованием секвенатора последнего поколения. (D) Увеличенные в количестве пептиды и их соотношение. (E) Подтверждение связывание фага TIT7 с D-MC16 (эксперимент по образованию бляшек).

На фиг.7 представлены результаты эксперимента с введением IRDye-dTIT7. Клетки глиомы крысы (C6-Luc), принудительно экспрессирующие люциферазу, трансплантировали в головной мозг мышей nude с получением модельной мыши с опухолью головного мозга. dTIT7 (IRDye-dTIT7, неочищенный продукт), меченный флуоресцентным реагентом ближней инфракрасной области (IRDye 800CW)), инъецировали в хвостовую вену и наблюдали флуоресценцию с течением времени с использованием IVIS Imager. Накопление сигнала флуоресценции наблюдали в области опухоли головного мозга и почке через 24 часа. (A) Общее изображение с течением времени (B) Увеличенная фотография (C) Количественное определение сигнала с использованием программного обеспечения IVIS imager.

На фиг.8 представлена структура конъюгата GA-dTIT7. Аминогруппу вносят в гелданамицин для связывания с малеинимидным линкером. На C-конец dTIT7 заранее добавляют цистеин для проведения синтеза. Его подвергают реакции с малеинимидом через сульфгидрильную группу остатка цистеина с получением конъюгата GA-dTIT7.

На фиг.9 представлены результаты эксперимента, включающего пероральное введение лекарственного средства, представляющего dTIT7, связанный со средством против злокачественной опухоли гелданамицином (GA) (GA-dTIT7), модельной мыши с опухолью головного мозга раз в двое суток. Выживание опухоли головного мозга количественно определяли по люминесценции люциферазы. GA-dWIP7, содержащий WIPTTMT (пептид, в котором был изменен порядок последовательности D-аминокислот, составляющих dTIT7), связанный с гелданамицином, вводили мыши в качестве контроля. Представлены графики (сверху справа), на котором представлена величина сигнала жизнеспособных клеток (слева) злокачественной опухоли, и кривая выживаемости (снизу справа).

На фиг.10 принципиально поясняется направленная обработка злокачественной опухоли головного мозга посредством IF7, связанного с dTIT7 средства против злокачественной опухоли. Для удобства считали, что гематоэнцефалический барьер присутствует выше шеи. Обычные лекарственные средства против злокачественной опухоли не обладают способностью к нацеливанию на опухоль. Темозоломид проникает в опухоль головного мозга в некоторой степени, однако не концентрируется. Авастин действует на новые кровеносные сосуды, но не действует непосредственно на опухолевую клетку. Напротив, связанный с Anxa1 пептид проходит через барьер кровь-опухоль головного мозга и накапливается только в опухоли в высокой концентрации.

На фиг.11 представлены результаты межмолекулярных взаимодействий Anxa1 с пептидами dLRF7, dSPT7, dMPT7 и dLLS7. Все протестированные пептиды продемонстрировали положительное связывание с Anxa1.

На фиг.12 представлены результаты эксперимента по введению IRDye-dLRF7, IRDye-dSPT7, IRDye-dMPT7 и IRDye-dLLS7 модельным мышам nude с опухолью головного мозга. Все мыши, за исключением мышей, которым инъецировали dLLS7, продемонстрировали выраженные сигналы в области опухоли головного мозга, и три пептида: dLRF7, dMPT7 и dSPT7, отличных от dLLS7, продемонстрировали способность

к нацеливанию на опухоль головного мозга через сосуды.

[ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ]

[0014]

1. Пептид

Настоящее изобретение относится к пептиду, содержащему аминокислотную последовательность согласно любому из (I)-(III) ниже.

(I) аминокислотная последовательность (X1)[D]P[D](X2)[D], где X1 представляет собой W или F, X2 представляет собой S или T,

(II) аминокислотная последовательность P[D]T[D]$(X)_n$ F[D], где $(X)_n$ представляет собой любую аминокислоту в количестве n, независимо выбранную от других, n представляет собой целое число 0-4,

(III) аминокислотная последовательность, которая представляет собой ретро-инверсную форму аминокислотной последовательности любой из вышеупомянутой (I) и вышеупомянутой (II).

[0015]

Настоящее изобретение также относится к пептиду, содержащему аминокислотную последовательность согласно любому из следующих (i)-(vii):

(i) аминокислотная последовательность T[D] I[D] T[D] W[D] P[D] T[D] M[D],

(ii) аминокислотная последовательность L[D] R[D] F[D] P[D] T[D] V[D] L[D],

(iii) аминокислотная последовательность L[D] L[D] S[D] W[D] P[D] S[D] A[D],

(iv) аминокислотная последовательность S[D] P[D] T[D] S[D] L[D] L[D] F[D],

(v) аминокислотная последовательность M[D] P[D] T[D] L[D] T[D] F[D] R[D],

(vi) аминокислотная последовательность согласно любому из вышеупомянутых (i)-(v), в которой 1 или несколько аминокислот вставлены, замещены или удалены, или имеется их комбинация,

(vii) аминокислотная последовательность, которая представляет собой ретро-инверсную форму аминокислотной последовательности согласно любому из вышеупомянутых (i)-(vi).

[0016]

В настоящем описании аминокислотная последовательность пептидной цепи описано общепринятым способом обозначения пептидов с N-концом слева и C-концом справа. Кроме того, каждое обозначение аминокислоты с символом [D] сразу после аминокислотной последовательности указывает на D-форму аминокислоты, и каждое обозначение аминокислоты без символа [D] сразу после аминокислотной последовательности указывает на L-форму аминокислоты, если это не противоречит контексту. В настоящем описании пептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно любому из вышеупомянутых (I)-(II), и пептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно любому из вышеупомянутых (i)-(vii), обобщенно называются пептидом по настоящему изобретению.

[0017]

Аминокислотная последовательность вышеупомянутого (I) может представлять собой любую из W[D] P[D] S[D], W[D] P[D] T[D], F[D] P[D] S[D] и F[D] P[D] T[D].

[0018]

В аминокислотной последовательности согласно вышеупомянутому (II), целое число n составляет от 0 до 4, предпочтительно от 2 до 3. X может представлять собой любую аминокислоту, выбранную независимо от других.

[0019]

Пептид по настоящему изобретению может состоять из аминокислотной

последовательности согласно любому из вышеупомянутых (I)-(III) и (i)-(vii), или может иметь одну или несколько аминокислот, добавленных со стороны N-конца и/или C-конца этих последовательностей.

[0020]

В настоящем описании пептид относится к пептиду, в котором две или более аминокислот связаны пептидной связью. Длина пептида по настоящему изобретению конкретно не ограничена. Пептид по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14 или по меньшей мере 15 аминокислот. Пептид по настоящему изобретению может состоять из вплоть до 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 аминокислот. Пептид по настоящему изобретению может иметь длину 3-10, 3-15, 3-20, 3-25, 3-30, 3-40, 3-50, 4-10, 4-15, 4-20, 4-25, 4-30, 4-40, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-40, 5-50, 6-10, 6-15, 6-20, 6-25, 6-30, 6-40, 6-50, 7-10, 7-15, 7-20, 7-25, 7-30, 7-40, 7-50, 8-10, 8-15, 8-20, 8-25, 8-30, 8-40 или 8-50 аминокислот. Например, пептид по настоящему изобретению может иметь длину 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот.

[0021]

Пептид по настоящему изобретению может состоять из комбинации аминокислот в D-форме и аминокислот в L-форме. Более подробно, все аминокислоты, составляющие пептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно любому из вышеупомянутых (I)-(II) и (i)-(vi), могут представлять собой аминокислоты в D-форме, могут содержать аминокислоту в L-форме в дополнение к аминокислотам в D-форме, и все аминокислоты, составляющие пептид, содержащий аминокислотную последовательность вышеупомянутых (III) или (vii), могут представлять собой аминокислоты в L-форме или могут содержать аминокислоту в D-форме в дополнение к аминокислотам в L-форме. Аминокислота в L-форме может представлять собой встречающуюся в природе аминокислоту в L-форме, и ее примеры включают глицин, аланин, лейцин, пролин, фенилаланин, тирозин, метионин, серин, треонин, цистеин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аспарагин, глутамин, лизин, аргинин, гидроксилизин, гистидин, триптофан, валин, все из которых находятся в L-форме. Аминокислота в D-форме включает, например, оптический изомер аминокислоты в L-форме, как описано выше. В настоящем описании глицин, который представляет собой аминокислоту, которая не проявляет оптическую активность, может читаться как кислота в L-форме и D-форме, если это не противоречит контексту.

[0022]

Пептид по настоящему изобретению может содержать модифицированную или необычную аминокислоту, такую как аминокислоты, приведенные в 37 C.F.R. 1.821-1.822 и т.п. В одном варианте осуществления пептид по настоящему изобретению не содержит модифицированную или необычную аминокислоту. Примеры модифицированной или необычной аминокислоты включают 3-аминоадипиновую кислоту, β-аланин, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроновую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, 2,4-диаминомасляную кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицину, N-этиласпарагину, гидроксилизину, аллогидроксилизин, 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, изодесмозин, аллоизолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, 6-N-метиллизин, N-метилвалин, норвалин, норлейцин, орнитин и т.п.

[0023]

N-конец и/или С-конец пептида по настоящему изобретению может быть модифицированным. Модификация N-конца может представлять собой метилирование (например,-$NHCH_3$ или -$N(CH_3)_2$), ацетилирование (например, посредством уксусной кислоты или ее галогенированного производного), или можно вносить любую защитную группу, такую как бензилоксикарбонильная группа, карбоксилатная функциональная группа (RCOO-) или сульфонильная функциональная группа (R-SO_2-) (где R выбран из алкила, арила, гетероарила и алкиларила. Модификация С-конца включает амидирование (-$CONH_2$), этерификацию (-COOR) и т.п. В данном случае, в качестве R в сложном эфире, например, используют C_{1-6} алкильную группу, такую как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил; C_{3-8} циклоалкильную группу, такую как циклопентил, циклогексил; C_{6-12} арильную группу, такую как фенил, α-нафтил; фенил-C_{1-2} алкильную группу, такую как бензил, фенэтил; C_{7-14} аралкильную группу, такую как α-нафтил-C_{1-2} алкильная группа; пивалоилоксиметильная группа и т.п.

[0024]

Пептид по настоящему изобретению может быть подвергнут различным модификациям, отличным от N-концевых или С-концевых. Химическая модификация может представлять собой, например, метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Когда пептид по настоящему изобретению имеет карбоксильную группу (или карбоксилат) в области, отличной от С-конца, карбоксильная группа может быть амидирована или этерифицирована. В качестве сложного эфира в этом случае используют, например, С-концевой сложный эфир, описанный выше, и т.п. Альтернативно заместители боковой цепи аминокислоты в молекуле (например, -OH, -SH, аминогруппа, имидазольная группа, индольная группа, гуанидиногруппа и т.д.) могут быть защищены соответствующей защитной группой (например, C_{1-6} ацильной группой, такой как C_{1-6} алканоильная группа, такая как формил, ацетил и т.д.).

[0025]

Пептид по настоящему изобретению, содержащий аминокислотную последовательность согласно вышеупомянутому (vi), может содержать частичную последовательность, состоящую из четырех последовательно расположенных аминокислот, частичную последовательность, состоящую из пяти последовательно расположенных аминокислот, или частичную последовательность, состоящую из шести последовательно расположенных аминокислот в аминокислотной последовательности согласно вышеупомянутым (i)-(v). Конкретнее, например, когда исходная аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность согласно вышеупомянутому (i), пептид может содержать аминокислотную последовательность T[D] I[D] T[D] W[D], аминокислотную последовательность I[D] T[D] W[D] P[D], аминокислотную последовательность T[D] W[D] P[D] T[D], аминокислотную последовательность W[D] P[D] T[D] M[D], аминокислотную последовательность T[D] I[D] T[D] W[D] P[D], аминокислотную последовательность I[D] T[D] W[D] P[D] T[D], аминокислотную последовательность T[D] W[D] P[D] T[D] M[D], аминокислотную последовательность T[D] I[D] T[D] W[D] P[D] T[D] или аминокислотную последовательность I[D] T[D] W[D] P[D] T[D] M[D].

[0026]

Положение мутации (т.е. инсерции, замены, делеции и их комбинации) в

аминокислотной последовательности согласно вышеупомянутому (vi) конкретно не ограничено. Мутация может состоять (a) только из инсерции, (b) только из замены, (c) только из делеции, (d) только из инсерции и замены, (e) только из инсерции и делеции, (f) только из замены и делеции, или (g) комбинации инсерции, замены и делеции. Количество мутаций в вышеупомянутых (a)-(g) составляет, например, 1-5, предпочтительно 1-4, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2, еще более предпочтительно 1.

[0027]

Аминокислота, вставленная в аминокислотную последовательность согласно вышеупомянутому (vi), может представлять собой любую аминокислоту, описанную выше. Аминокислота может представлять собой аминокислоту в L-форме или в D-форме, например, встречающуюся в природе аминокислоту в L-форме, описанную выше, или аминокислоту в D-форме, которая является ее оптическим изомером. Аминокислота также может быть подвергнута различным химическим модификациям, описанным выше.

[0028]

Предпочтительно, замена в аминокислотной последовательности согласно вышеупомянутому (vi) представляет собой консервативную аминокислотную замену. "Консервативная аминокислотная замена" хорошо известна в данной области. Например, консервативная аминокислотная замена может быть определена как замена между аминокислотами, имеющими сходные свойства боковой цепи. Таким образом, консервативная аминокислотная замена может представлять собой, например, (1) замену между ароматическими аминокислотами (Phe, Trp, Tyr), (2) замену между неполярными алифатическими аминокислотами (Gly, Ala, Val, Leu, Met, Ile, Pro), (3) замену между незаряженными полярными аминокислотами (Ser, Thr, Cys, Asn, Gln), (4) замену между основными аминокислотами (Lys, Arg, His) или (5) замену между кислотными аминокислотами (Asp, Glu). В настоящем описании консервативная аминокислотная замена также может включать замену аминокислоты в D-форме аминокислотой в L-форме, которая является ее оптическим изомером. Таким образом, консервативная аминокислотная замена также может представлять собой замену между двумя аминокислотами в L-форме, замену между двумя аминокислотами в D-форме, или замену между аминокислотами в L-форме и D-форме в группах согласно вышеупомянутым (1)-(5).

[0029]

В одном варианте осуществления последовательность согласно вышеупомянутому (vi) может охватываться последовательностью согласно вышеупомянутому (I) или (II). В этом случае последовательность согласно вышеупомянутому (vii) охватывается последовательностью согласно вышеупомянутому (III). В таких вариантах осуществления четвертая аминокислота может представлять собой W[D] или F[D], и пятая аминокислота может представлять собой P[D], и шестая аминокислота может представлять собой T[D] или S[D] в последовательности согласно вышеупомянутому (i), третья аминокислота может представлять собой W[D] или F[D], и четвертая аминокислота может представлять собой P[D], и пятая аминокислота может представлять собой T[D] или S[D] в последовательности согласно вышеупомянутому (ii), четвертая аминокислота может представлять собой W[D] или F[D], и пятая аминокислота может представлять собой P[D], и шестая аминокислота может представлять собой T[D] или S[D] в последовательность согласно вышеупомянутому (iii), вторая аминокислота может представлять собой P[D], и третья аминокислота

может представлять собой T[D], и шестая аминокислота может представлять собой F [D] в последовательность согласно вышеупомянутому (iv) и вторая аминокислота может представлять собой P[D], и третья аминокислота может представлять собой T [D], и пятая аминокислота может представлять собой F[D] в последовательности согласно вышеупомянутому (v).

[0030]

Ретро-инверсный изомер пептида относится к пептиду, в котором хиральность каждого аминокислотного остатка является обратной ("инверсо"), и направление аминокислотной последовательности является обратным ("ретро") относительно исходного пептида. Известно, что ретро-инверсный изомер имеет структуру и функцию, сходную со структурой и функцией исходного пептида (например, Acc. Chem. Res., 1993, 26(5), pp 266 273, и PLoS One. 2013 Dec 2; 8(12):e80390). В частности, аминокислотная последовательность согласно вышеупомянутому (vii) включает, например, MTPWTIT (SEQ ID NO: 1), который является ретро-инверсной формой последовательности согласно вышеупомянутому (i), LVTPFRL (SEQ ID NO: 2), который является ретро-инверсной формой последовательности согласно вышеупомянутому (ii), ASPWSLL (SEQ ID NO: 3), который является ретро-инверсной формой последовательности согласно вышеупомянутому (iii), FLLSTPS (SEQ ID NO: 4), который является ретро-инверсной формой последовательности согласно вышеупомянутому (iv), и RFTLTPM (SEQ ID NO: 5), который является ретро-инверсной формой последовательности согласно вышеупомянутому (v).

[0031]

Пептид по настоящему изобретению может содержать две или более последовательностей, выбранных из вышеупомянутых (I)-(III) и (i)-(vii). В одном варианте осуществления пептид по настоящему изобретению содержит тандемный повтор любой из последовательностей согласно вышеупомянутым (I)-(III) и (i)-(vii) (т.е. структура, в которой идентичные части последовательности прямо связаны друг с другом). В другом варианте осуществления пептид по настоящему изобретению содержит структуру, в которой две или более различных последовательностей согласно вышеупомянутым (I)-(III) и (i)-(vii) связаны прямо. Конкретные повторяющиеся структуры включают, например, T[D]I[D]T[D]W[D]P[D]T[D]M[D]-T[D]I[D]T[D]E[D]P [D]T[D]M[D] и T[D]I[D]T[D]-T[D]I[D]T[D]. Альтернативно пептид по настоящему изобретению может представлять собой поливалентный пептид с дендримером.

[0032]

Пептид по настоящему изобретению может представлять собой свободную форму или форму соли. Примеры соли пептида по настоящему изобретению включают фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль и основно-аддитивную соль. Примеры кислотно-аддитивной соли включают соли с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.п., и соли с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, яблочная кислота, янтарная кислота, виннокаменная кислота, лимонная кислота и т.п. Примеры основно-аддитивной соли включают соли с щелочными металлами, такими как натрий, калий и т.п., соли с щелочноземельными металлами, такими как кальций, магний и т.п., и соли с аминами, такими как аммоний, триэтиламин и т.п.

[0033]

Пептид по настоящему изобретению может связываться с аннексином A1. Аннексин A1 (Anxa1) представляет собой известный белок, принадлежащий семейству аннексинов, также известный как липокортин 1. Генетическая последовательность и аминокислотная

последовательность Anxa1 известны для различных видов. Например, могут быть упомянуты RefSeq № NM-000700.2 (SEQ ID NO: 6) для мРНК, RefSeq № NP-000691.1 (SEQ ID NO: 7) для белка Anxa1 человека; RefSeq № NM-010730.2 (SEQ ID NO: 8) для мРНК, RefSeq № NP-034860.2 [ARRAY ID NO:9] для белка Anxa1 мыши. Пептид по настоящему изобретению может связываться с N-концевой областью Anxa1. Более конкретно, пептид по настоящему изобретению может связываться с областью, состоящей из аминокислот с 1 по 15 SEQ ID NO: 7 в Anxa1 человека, или областью, состоящей из аминокислот с 1 по 15 SEQ ID NO: 9 в Anxa1 мыши. Пептид по настоящему изобретению может иметь константу диссоциации (величина Kd), предпочтительно составляющую менее 10^{-6} М, более предпочтительно менее 10^{-7} М, еще более предпочтительно менее 5×10^{-8} М, когда, например, межмолекулярные взаимодействия с Anxa1 мыши или человека количественно определяют с использованием способа QCM (микровзвешивание с кристаллом кварца). Для вышеупомянутого способа измерения можно использовать рекомбинантный белок Anxa1 человека, состоящий из 346 аминокислотных остатков, который является коммерчески доступным от ATGen Corporation (Seongnam-si, South Korea).

[0034]

Пептид по настоящему изобретению можно получать известным способом синтеза пептидов. Способ синтеза пептидов может представлять собой любой из, например, твердофазного способа синтеза и жидкофазного способа синтеза. Заданный пептид можно получать путем конденсации частичного пептида или аминокислоты, способной составлять пептид по настоящему изобретению, и остальной части и, когда продукт имеет защитную группу, путем устранения защитной группы.

В рамках настоящего изобретения конденсацию и элиминацию защитных групп можно проводить способом, по существу известным, например, способами, описанными в следующих (1)-(8).

(1) M. Bodanszky & M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)

(2) Schroeder & Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965)

(3) Nobuo Izumiya, et al.: Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Basics and experiments of peptide synthesis), опубликованная Maruzen Co. (1975)

(4) Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara: Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

(5) Haruaki Yajima, ed.: Zoku Iyakuhin no Kaihatsu (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Synthesis, опубликованная Hirokawa Shoten.

(6) Stewart, J.M. & Young, J.D., "Solid phase peptide synthesis (2nd ed.)", Pierce Chemical Company, Rockford (1984)

(7) Atherton, E. & Sheppard, R.C., "Solid Phase peptide synthesis: a practical approach", IRL Press, Oxford (1989)

(8) "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Practical Approach Series)", Oxford University Press (2000)

[0035]

Полученный таким образом пептид можно очищать и выделять известным способом очистки. Примеры способа очистки включают экстракцию в растворителе, дистилляцию, колоночную хроматографию, жидкостную хроматографию, перекристаллизацию, их комбинации и т.п.

Когда пептид, полученный вышеупомянутым способом, находится в свободной форме, эту форму можно конвертировать в подходящую соль известным способом или

способом, аналогичным ему; наоборот, когда пептид получают в форме соли, соль можно конвертировать в свободную форму или другую соль известным способом или способом, аналогичным ему.

[0036]

Как указано выше, известно, что аннексин A1 обладает наиболее высокой специфичностью среди известных в настоящее время специфических маркерных молекул сосудов опухоли, и он экспрессируется внутриклеточно в нормальных клетках, но в высокой степени экспрессируется на поверхностях просвета, соседствующих с кровотоком, в неоваскулярных эндотелиальных клетках опухоли (Oh et al., Nature 429: 629-35, 2004). Таким образом, пептид по настоящему изобретению может селективно связываться с ангиогенными опухолями *in vivo*. Кроме того, Anxa1 экспрессируется на неоваскулярных эндотелиальных клетках, образовавшихся в опухолях, со стороны крови, и, когда он связывается с лигандами со стороны крови, такими как пептиды по настоящему изобретению, лиганды транспортируются на базальную сторону путем трансцитоза и активно высвобождаются в строму, где присутствуют злокачественные клетки. Таким образом, пептид по настоящему изобретению может быть нацелен на злокачественные опухоли *in vivo*. Таким образом, пептид по настоящему изобретению является пригодным, например, для нацеливания на злокачественные опухоли.

[0037]

2. Конъюгат

Настоящее изобретение также относится к конъюгату, в котором один или несколько компонентов связаны с вышеупомянутым пептидом по настоящему изобретению (далее также называемый конъюгатом по настоящему изобретению).

[0038]

Этот компонент конкретно не ограничен при условии, что он может быть связан с пептидом по настоящему изобретению и может быть пригодным для введения животному (например, человеку), и может выполнять ту же функцию в организме животного. Компонент может быть природным или неприродным. Примеры компонента включают, но не ограничиваются ими, биологические материалы (например, клетку, фаг, вирус и т.д.), олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты (например, ДНК, РНК, химера ДНК/РНК и т.д.), пептид, полипептид, белок, антитело, липид, полисахарид, низкомолекулярные молекула соединения (например, органические или неорганические соединения размером не более чем 1000 Да), частицы (например, золотые частицы, различные наночастицы и т.д.), их комбинации и т.п.

[0039]

Компонент может иметь данную функциональность в заданной области организма животного (например, человека). Тип функциональности конкретно не ограничен. Поскольку конъюгат по настоящему изобретению может быть нацелен на злокачественную опухоль действием части, соответствующей пептиду по настоящему изобретению, предпочтительные примеры функциональности включают активность против злокачественной опухоли и обеспечение возможности обнаружения. Таким образом, компонент может представлять собой, например, средство против злокачественной опухоли или поддающееся обнаружению вещество.

[0040]

(Средство против злокачественной опухоли)

В настоящем описании средство против злокачественной опухоли относится к лекарственному средству, предназначенному для подавления роста злокачественной опухоли (рака). Механизм действия средства против злокачественной опухоли конкретно

не ограничен. Средство против злокачественной опухоли может представлять собой антиметаболит, алкилирующее средство, антибиотик против злокачественной опухоли, ингибитор микротрубочек, препарат платины, ингибитор топоизомеразы, средство для молекулярного нацеливания и т.п. Конъюгат по настоящему изобретению может содержать два или более одинаковых или различных средства против злокачественной опухоли.

[0041]

Антагонист метаболизма может представлять собой, например, антиметаболит фолиевой кислоты, ингибитор дигидроптероатсинтазы, ингибитор дигидрофолатредуктазы (ингибитор DHFR), ингибитор метаболизма пиримидинов, ингибитор тимидилатсинтазы, ингибитор метаболизма пуринов, ингибитор IMPDH, ингибитор рибонуклеотидредуктазы, ингибитор рибонуклеотидредуктазы, нуклеотидный аналог, L-аспарагиназу и т.п. Конкретные примеры антагониста метаболизма включают эноцитабин (СУНРАБИН), капецитабин (Кселода), кармофур (Мифурол), кладрибин (Леустатин), гемцитабин (Гемзар), цитарабин (килозид), окфосфата цитарабина (Старазид), тегафур (Ахиллон, АФТОУР, Тефсеал, Футрафур, Луназин и т.д.), тегафур/урацил (UFT), тегафур/Гимерацил/Отеразил калий (TS-1: T-S-One), доксифлуридин (ФУРТУРОН), неларабин (Арранон G), гидроксикарбамид (ГИДРЕА), фторурацил (5-FU, карзонал, Бентон, Лунахол, Лунапон), флударабин (флудара), пеметрексед (алимта), пентостатин (кофолин), меркаптопурин (лейкерин), метотрексат (метотрексат) и т.п.

[0042]

Конкретные примеры алкилирующего средства включают алкилирующие средства на основе азотистого иприта, такие как циклофосфамид (эндоксан), ифосфамид (ифомид), мелфалан (алкеран), бусульфан, тиотепа (теспаамин) и т.п., алкилирующие средства на основе нитрозомочевины, такие как нимустин (нидран), ранимустин (цимерин), дакарбазин (дакарбазин), прокарбазин (прокарбазина гидрохлорид), темозоломид (Темодал), кармустин (Глиадел), стрептозотоцин (заносар), бендамустин (треакисим) и т.п.

[0043]

Конкретные примеры антибиотика против злокачественной опухоли включают актиномицин D (космеген), акларубицин (аклацинон), амрубицин (Калсед), идарубицин (идамицин), эпирубицин (эпирубицина гидрохлорид, Фарморубицин), зиностатин стималамер (Smancs), даунорубицин (дауномицин), доксорубицин (адриацин), пирарубицин (Пинорубицин, ТЕРАРУБИЦИН), блеомицин (Bleo), пепломицин (Peleo), митомицин C (Митомицин), митоксантрон (Новантрум), липосомальный доксорубицин (Doxil) и т.п.

[0044]

Примеры ингибитора микротрубочек включают ингибиторы полимеризации микротрубочек на основе алкалоида барвинка, такие как винбластин (эксал), винкристин (онковин), виндезин (Филдезин) и т.п., ингибиторы деполимеризации микротрубочек таксанового типа, такие как паклитаксел (таксол), доцетаксел (таксотер) и т.п.

[0045]

Примеры препарата платины включают оксалиплатин (El Prat), карбоплатин (Карбоплатин, Карбомерк, Параплатин), цисплатин (IA-call, Конабури, Цисплатин и т.д.), недаплатин (Акупла) и т.п.

[0046]

Примеры ингибитора топоизомеразы включают ингибиторы топоизомеразы типа I, такие как камптотецин и его производное (например, иринотекан (Campto), ногитекан

(ГИКАМТИН), SN-38 и т.п.) и т.п.; ингибиторы топоизомеразы типа II, такие как лекарственные средства на основе антрациклина, такие как доксорубицин (адриацин) и т.п., лекарственные средства на основе эпиподофиллотоксина, такие как этопозид (Ластет, Вепезид) и т.п., и лекарственные средства на основе хинолона, такие как как левофлоксацин (кравит), ципрофлоксацин (ципроксан) и т.п.

[0047]

Примеры лекарственного средства против молекулярной мишени включают леголафениб (Стиварга), цетуксимаб (Эрбитукс), панитумумаб (Вектибикс), рамсилмаб (Цирамза), гефитиниб (Иресса), эрлотиниб (Тарцева), афатиниб (ГИОТРИФ), кризотиниб (КСАЛКОРИ), алектиниб (АЛЕЦЕНСА), церитиниб, Ленватиниб (Ленвима), трастузумаб (Герцептин), лапатиниб (Тайкерб), пертузумаб (ПЕРДЖЕТА), сунитиниб (Сутент), сорафениб (Нексавар), акситиниб (Инлита), пазопаниб (Вотриенто), Ниволумаб (ОПДИВО), пембролизумаб, ипилимумаб (ЕРВОЙ), вемурафениб (ЗЕЛБОРАФ), эверолимус (АФИНИТОР), темсиролимус (ТОРИСЕЛ), ритуксимаб (Ритуксан), бевацизумаб (Авастин), гелданамицин и т.п.

[0048]

Средство против злокачественной опухоли также может представлять собой антиангиогенное средство. Антиангиогенное средство может представлять собой средство, которое ингибирует сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF) или другой ангиогенный фактор, или его рецептор. Конкретные примеры антиангиогенного средства включают ангиостатин, эндостатин, метастатин, антитело против VEGF (например, Авастин), ингибитор VEGFR-2 (например, SU5416, SU6668) и т.п.

[0049]

(Поддающееся обнаружению вещество)

В настоящем описании поддающееся обнаружению вещество относится к любому веществу, которое делает конъюгат по настоящему изобретению, содержащий это вещество, поддающимся обнаружению. Предпочтительно, поддающееся обнаружению вещество позволяет обнаружение конъюгата по настоящему изобретению *in vivo* прямо или непрямо с использованием подходящих способов визуализации или отображения. Примеры способов визуализации или отображения включают, но не ограничиваются ими, рентгенофотографию, компьютерную томографию (CT), ядерную магнитно-резонансную томографию (MRI), ультрасонографию, сцинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (PET), эндоскопию, лапараскопию и т.п. Поддающееся обнаружению вещество может представлять собой, например, радиоизотоп, усиливающее средство для МРТ (например, парамагнитные ионы), рентгеноконтрастное вещество, контрастное вещество, флуоресцентное вещество и т.п.

[0050]

Примеры радиоактивного нуклида, пригодного для ПЭТ, включают ^{18}F, ^{51}Mn, ^{52m}Mn, ^{52}Fe, ^{55}Co, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{82m}Rb, ^{83}Sr, ^{86}Y, ^{89}Zr, ^{94m}Tc, ^{110}In, ^{120}I, ^{124}I и т.п. Примеры радиоактивного нуклида, пригодного для обнаружения γ-лучей, включают ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{75}Se, ^{97}Ru, ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{114m}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{169}Yb, ^{197}Hg, ^{201}Tl и т.п.

[0051]

Предпочтительные примеры парамагнитного иона включают хром (III), марганец (II), железо (III), железо (II), кобальт (II), никель (II), медь(II), неодимий (III), самарий (III), иттербий (III), гадолиний (III), ванадий (II), тербий (III), диспрозий (III), гольмий (III), эрбий (III) и т.п., и особенно предпочтительным является гадолиний. Кроме того,

также для рентгеновской визуализации и т.п. пригодны металлы, такие как лантан (III), золото (III), свинец (II), висмут (III) и т.п.

[0052]

Примеры рентгеноконтрастного вещества и контрастного вещества включают соединения йода (например, органические йодные кислоты, такие как йодкарбоновая кислота, йодоформ, трийодфенол, тетрайодэтилен, и т.д.), соединения бария (например, сульфат бария и т.п.), соединения галлия (такие как цитрат галлия), соединения таллия (такие как хлорид талия) и т.п.

[0053]

Примеры флуоресцентных веществ включают родамин, флуоресцеин, краситель Cy, Alexa (зарегистрированный торговый знак) Fluor, фикоэритрин (PE), аллофикоцианин (APC), их производные и т.п. Также примерами предпочтительных флуоресцентных веществ являются флуоресцентные реагенты ближней инфракрасной области.

[0054]

(Связывание пептида по настоящему изобретению с компонентом)

Способ связывания пептида по настоящему изобретению с одним или несколькими компонентами в конъюгате по настоящему изобретению конкретно не ограничен. Связывание может быть прямым или непрямым через линкер и т.д. Связывание может осуществляться посредством ковалентного связывания, нековалентного связывания или их комбинации. Один или несколько компонентов могут быть прямо или непрямо связаны с N-концом, C-концом или другим положением пептида по настоящему изобретению. Связывание пептида с другим компонентом (или вторым пептидом) хорошо известно в данной области, и связывание в конъюгате по настоящему изобретению может быть осуществлено любыми известными способами.

[0055]

Например, когда связывание осуществляется через линкер можно использовать известные линкеры, такие как сложный эфир NHS, имидный сложный эфир, малеинимид, карбодиимид, аллилазид, диазилин, изоцианид, псорален и т.п. В зависимости от используемого линкера пептид по настоящему изобретению может быть модифицирован соответствующим образом. Например, цистеин может быть присоединен заранее к C-концу пептида по настоящему изобретению для связывания с малеинимидным линкером.

[0056]

Для связывания радиоактивного металла или парамагнитного иона, упомянутого выше, с пептидом по настоящему изобретению, можно использовать подходящий хелатирующий агент (например, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA), 4,7,10-тетраазациклододекан-N-N',N",N"'-тетрауксусная кислота (DOTA) и т.п.) и/или металлотеонеин и т.п. См., например, Culali Aktolun et al. ed., "Nuclear Medicine Therapy: Principles and Clinical Applications", Springer, 2013, и т.п.

[0057]

3. Композиция

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей пептид или конъюгат по настоящему изобретению и фармакологически приемлемый носитель (далее ее также называют композицией по настоящему изобретению. Композиция может быть предоставлена в дозированной форме, подходящей для перорального или парентерального введения.

[0058]

Примеры композиции для парентерального введения включают инъекционную

форму, суппозиторий и т.п. Инъекционная форма может включать дозированные формы, такие как форма для внутривенной инъекции, подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутримышечной инъекции, капельной внутривенной инъекции и т.п. Такие инъекционные формы можно получать известным способом. В качестве способа получения инъекционной формы, например, пептид или конъюгат по настоящему изобретению может быть получен растворением, суспендированием или эмульгированием пептида или конъюгата по настоящему изобретению в стерильном водном растворе или масляном растворе, обычно используемом для инъекций. В качестве водного раствора для инъекций можно использовать, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозе и другой адъювант, и их можно использовать в комбинации с подходящими солюбилизирующими средствами, такими как спирты (например, этанол), полиспирты (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионные поверхностно-активные вещества (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)), и т.п. В качестве масляного раствора можно использовать, кунжутное масло, соевое масло и т.п., и бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. можно использовать в комбинации в качестве солюбилизирующего средства. Полученным раствором для инъекций предпочтительно заполняют подходящую ампулу. Суппозиторий, подлежащий применению для ректального введения, можно получать путем смешения пептида или конъюгата по настоящему изобретению с общепринятой основой для суппозитория.

[0059]

Композиция для перорального введения включает, например, твердые или жидкие дозированные формы, в частности, таблетку (в том числе покрытую сахаром таблетку, покрытую пленкой таблетку), пилюлю, гранулу, порошок, капсулу (в том числе мягкую капсулу), сироп, эмульсию, суспензию и т.п. Такие композиции получают известным способом и они могут содержать носитель, разбавитель или эксципиент, обычно используемый в области составления препаратов. В качестве носителя и эксципиента для таблеток используют, например, лактозу, крахмал, сахарозу, стеарат магния.

[0060]

Каждая из вышеупомянутых композиций может содержать другой активный ингредиент при условии, что смешение с вышеупомянутым пептидом или конъюгатом не вызывает нежелательного взаимодействия.

[0061]

Вышеупомянутые парентеральные или пероральные фармацевтические композиции в подходящем случае составляют в виде единичной дозированной формы, совместимой с дозировкой активного ингредиента. Примеры дозированной формы для такой дозированной единицы включают таблетку, пилюлю, капсулу, инъекционную форму (ампулу) и суппозиторий. Содержание пептида или конъюгата обычно составляет предпочтительно от 1 до 500 мг на единичную дозированную форме, в частности, предпочтительно от 1 до 100 мг для инъекционной формы и от 10 до 250 мг для других дозированных форм.

[0062]

Композиция по настоящему изобретению может быть нацелена на опухоль, в частности, ангиогенную злокачественную опухоль, и предпочтительно может накапливать пептид или конъюгат в опухоли. Таким образом, композиция по настоящему изобретению, содержащая средство против злокачественной опухоли в конъюгате, является пригодной для лечения или предупреждения злокачественной опухоли, являющейся мишенью. Композиция по настоящему изобретению, содержащая

поддающееся обнаружение вещество в конъюгате, также пригодна для исследования или диагностики злокачественной опухоли.

[0063]

Злокачественная опухоль (рак) может представлять собой злокачественную опухоль любого типа, и также может представлять собой солидную злокачественную опухоль или жидкостную злокачественную опухоль. В качестве солидной злокачественной опухоли предпочтительно могут быть упомянуты злокачественные опухоли, которые экспрессируют Anxa1 на поверхности клетки, и, таким образом, солидные опухоли, которые являются ангиогенными. Примеры солидной злокачественной опухоли включают злокачественную опухоль головного мозга/нервной системы (например, опухоль головного мозга, опухоль спинного мозга и т.д.), рак головы и шеи (например, рак гортани, рак полости рта, рак слюнных желез, рак околоносовых пазух, рак щитовидной железы и т.д.), рак органов пищеварения (например, рак желудка, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак толстого кишечника, рак прямой кишки, рак анального канала, рак печени, рак желчных путей, рак поджелудочной железы и т.д.), рак органов мочевой и репродуктивной системы (например, рак почки, почечно-клеточный рак, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак почечной лоханки и мочеточника, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак яичка, рак полового члена, рак тела матки, рак эндометрия, саркому матки, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, рак яичника, рак фаллопиевых труб и т.п.), рак дыхательной системы (например, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, метастатический рак легкого), рак бронхов и т.п.), рак молочной железы, рак кожи (например, злокачественная меланома и т.д.), рак кости (например, остеосаркома и т.д.), злокачественную опухоль мышц (например, рабдомиосаркома и т.д.) и т.п.

[0064]

В качестве жидкостной злокачественной опухоли могут быть упомянуты лейкоз, злокачественная лимфома, множественная миелома, миелодиспластический синдром и т.п. В качестве лейкоза может быть упомянут острый миелоидный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и т.п. Злокачественную лимфому подразделяют на лимфому Ходжкина и неходжскинскую лимфому, и примеры неходжскинской лимфомы включают В-клеточную лимфому, взрослую Т-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, диффузную крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликуляную лимфому, лимфому MALT, периферическую Т-клеточную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны и т.п.

[0065]

Поскольку пептид или конъюгат по настоящему изобретению может эффективно проходить через барьер кровь-опухоль головного мозга, опухоль головного мозга может быть упомянута в качестве особенно предпочтительной мишени. Опухоль головного мозга может представлять собой первичную опухоль головного мозга или метастатическую опухоль головного мозга. Опухоль головного мозга также может представлять собой доброкачественную опухоль головного мозга (например, менингиома, аденома гипофиза, шваннома, и т.д.) или злокачественную опухоль головного мозга, предпочтительно злокачественную опухоль головного мозга. Примеры злокачественной опухоли головного мозга включают опухоль головного мозга 2 степени, такую как астроцитома, олигоденроглиома, опухоль головного мозга 3 степени, такую как анапластическая астроцитома, анапластическая олигоденроглиома, анапластическая олигоастроцитома, и опухоль головного мозга 4 степени, такую как

глиобластома.

[0066]

Композицию по настоящему изобретению можно вводить животному, в частности, млекопитающему, у которого экспрессируется аннексин A1. Примеры млекопитающего включают, но не ограничиваются ими, лабораторных животных, таких как грызуны, такие как мышь, крыса, хомячок, морская свинка и кролик, и т.п., домашних животных, таких как свинья, корова, коза, лошадь, овца, норка и т.п., животных-компаньонов, таких как собака, кошка и т.п., приматов, таких как человек, обезьяна, макак-резус, мартышка, орангутан, шимпанзе и т.п.

[0067]

Дозировка композиции по настоящему изобретению также варьируется в зависимости от цели введения, индивидуума, которому проводят введение, заболевания-мишени, состояния, пути введения и т.п. Например, в случае применения для лечения или предупреждения злокачественной опухоли, описанной выше, удобно вводить конъюгат по настоящему изобретению, содержащий средство против злокачественной опухоли, один раз в неделю внутривенно или перорально, как правило, в дозе от 0,1 до 10 мг на кг массы тела в качестве однократной дозы. Альтернативно в случае применения для тестирования или диагностики злокачественной опухоли, описанной выше, удобно вводить конъюгат по настоящему изобретению, содержащий поддающееся обнаружению вещество внутривенно или перорально в дозе, составляющей, как правило, приблизительно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела, перед тестированием.

[Примеры]

[0068]

Настоящее изобретение более подробно описано ниже с помощью примеров и т.п., однако настоящее изобретение не ограничивается следующими примерами и т.п.

[0069]

(Подготовка экспериментального животного)

Клетки глиомы крысы C6 культивировали в модифицированной способом Дульбекко среде Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, высоким содержанием глюкозы и антибиотиком. Лентивирусный вектор PGK-Luc был получен в Virus Core Facility в Sanford-Burnham-Prebys Medical Discovery Institute. Клетки C6 и клетки B16 инфицировали лентивирусом PGK-Luc и получали положительные по люциферазе клетки. С использованием стереотаксической рамки клетки C6-Luc ($4{,}8\times10^4$ клеток, суспендированных в 4 мкл PBS) инъецировали в полосатое тело головного мозга мыши C57BL/6. Через двое суток мышь визуализировали в отношении опухолей, экспрессирующих люциферазу. Для этого 100 мкл люциферина (30 мг/мл PBS) инъецировали в брюшную полость, мышь подвергали антестезии газообразным изофлураном (20 мл/мин) вместе с кислородом (1 мл/мин) и помещали под камеру, поставляемую с устройством для визуализации Xenogen IVIS 200. Количество фотонов определяли в течение 1-10 секунд. Для модели с двойной опухолью клетки C6-Luc аналогичным образом инъецировали в головной мозг мыши NOD-SCID и проводили мониторинг роста опухоли с использованием устройства для визуализации Xenogen.

Когда опухоль головного мозга становилась подающейся обнаружению, клетки C6-Luc (2×10^5 клеток, суспендированных в 100 мкл PBS) подкожно инъецировали в бок той же мыши. Количество фотонов в опухоли головного мозга и подкожной опухоли количественно определяли с использованием устройства для визуализации Xenogen. Модель с двойной опухолью той же линии мышей C57BL/6 также получали с

использованием клеток B16-Luc. Клетки B16-Luc (клетки 5×10^4) инъецировали в головной мозг самки мыши C57BL/6 в возрасте от 8 до 10 недель, как описано выше для клеток C6-Luc. Клетки B16-Luc (2×10^5 клеток) подкожно инъецировали, когда опухоль B16-Luc в головном мозге становилась поддающейся обнаружению.

[0070]

Пример исследования 1: Эксперимент по введению IF7 мыши с опухолью

IF7 (т.е. L-форму пептида, имеющую аминокислотную последовательность IFLLWQR (SEQ ID NO: 10)) внутривенно вводили мыши с опухолью. После достижения кровеносных сосудов вокруг опухоли IF7 захватывался в везикулу сосудисто-эндотелиальных клеток с обращенной к просвету стороны, перемещался к базальной стороне и высвобождался в строму, где находились злокачественные клетки.

Даже в сосудисто-эндотелиальных клетках F2 мыши IF7, связанный с Anxa1, активно пересекал сосудисто-эндотелиальные клетки опухоли посредством трансцитоза. Таким образом, было предположено, что IF7 обладает активностью прохождения через барьер сосуд-опухоль головного мозга в опухоли головного мозга.

Неожиданно, когда флуоресцентно меченный IF7 внутривенно инъецировали модельной мыши с опухолью головного мозга, которой были трансплантированы клетки глиомы, наблюдали накопление флуоресценции в высокой концентрации в области опухоли головного мозга (фиг.1 и 2). Кроме того, флуоресценция пересекала кровеносный сосуд и достигала злокачественных клеток в строме головного мозга.

[0071]

Пример исследования 2: Эксперимент по введению IF7-SN38 в модели с двойной опухолью

С использованием мыши, у которой присутствует как подкожная опухоль, так и опухоль головного мозга (модель с двойной опухолью), проверяли эффект лечения посредством IF7-SN38. Эксперимент проводили следующим образом.

IF7C(RR)-SN38 инъецировали мыши с опухолью через хвостовую вену, когда количество фотонов в опухоли головного мозга становилось $>1{,}0\times10^6$ (это обычно происходило через 2 недели). IF7C(RR)-SN38 (14,2 мг или 6,63 ммоль) растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (DMSO), 1 мкл раствора (142 мг или 66,3 нмоль) разбавляли 50% раствором в этаноле (10 мкл) Cremophore EL, а затем добавляли 90 мкл PBS. Количество IF7C(RR)-SN38 на инъекцию составляло 142 мг/мышь или 7,1 мг/кг. В качестве контроля использовали последовательность, обратную IF7 или RQ7C(RR)-SN38, приготовленную аналогичным образом. В качестве отрицательного контроля использовали иринотекан, растворенный в PBS, и PBS отдельно.

В результате происходило подавление как опухоли головного мозга, так и подкожной опухоли, и этот эффект был более высоким в опухоли головного мозга, чем в подкожной опухоли (фиг.3 и 4). Аналогичные результаты были получены в модели метастатической опухоли головного мозга из клеток меланомы B16, и результате не изменились, даже когда мышь-хозяина заменяли на линию C57BL/6 или SCID. Эти факты указывают на то, что DDS, нацеленный на Anxa1, не только эффективно проходит через барьер кровь-опухоль головного мозга, но также обеспечивает превосходный терапевтический эффект в опухоли головного мозга независимо от типа опухолевых клеток и линии мыши.

[0072]

Пример исследования 3: Исследование фармакокинетики IF7

Как продемонстрировано в примерах исследования 1 и 2, IF7 обладает превосходной активностью нацеливания на злокачественную опухоль. Однако с точки зрения

клинической разработки существует две проблемы: низкая растворимость и низкая стабильность. Таким образом, пептид IF7 является чувствительным к протеазам и подвержен деградации. В действительности, в эксперименте, включавшем внутривенное введение A488-IF7 здоровым мышам, флуоресцентный сигнал в периферической крови практически исчезал в течение приблизительно 1 часа (Фиг.5). Однако при введении в хвостовую вену мышей со злокачественной опухолью флуоресценция A488-IF7 в периферической крови была значительно меньшей, чем у здоровых мышей. Этот результат указывает на то, что большая часть A488-IF7 быстро накапливается в опухоли, одновременно подвергаясь деградации. Кроме того, IF7 является в высокой степени гидрофобным, и это приводит к проблемам с дозированной формой, таким как необходимость добавлять поверхностно-активное вещество во избежание преципитации после растворения в DMSO, когда соединение, связанное со средством против злокачественной опухолью, вводят внутривенно.

[0073]

Пример 1: Идентификация пептида dTIT7

Авторы настоящего изобретения предположили, что лучшее терапевтическое средство может быть получено после решения вышеупомянутых проблем, связанных с IF7, и начали разрабатывать пептид следующего поколения, состоящий из новой последовательности.

Способом, являющимся основой для этого исследования, является способ скрининга фаговой библиотеки, которая экспонирует на поверхности приблизительно 1 миллиард (20^7 видов) случайных пептидов, состоящих из 7 аминокислотных остатков. Все аминокислоты, являющиеся компонентами живых организмов, представляют собой аминокислоты в L-форме с некоторыми исключениями. Таким образом, невозможно получить последовательность пептида в D-форме, который связывается с мишенью, обычным скринингом фаговой библиотеки. Таким образом, был впервые проведен зеркальный скрининг с использованием фаговой библиотеки T7 (Funke et al., Mol. Biosystem. 2009, 783-6) (фиг.6).

Скрининг проводили, исходя из следующих данных и предположений, для получения фага, имеющего высокую аффинность к Anxa1. Было установлено, что IF7 взаимодействует с 15 N-концевыми остатками Anxa1 (MAMVSEFLKQAWFIE; SEQ ID NO: 11), и что IF7 связывается с L-пептидом из 16 остатков (L-MC16), который представляет собой Axna1 с добавлением остатка Cys для модификации его 15 N-концевых остатков (Sasai et al., не опубликована). Во-первых, синтезировали D-MC16 (все 16 оснований представляют собой D-форму), который является зеркальным отображением L-MC16 и были идентифицированы 7 аминокислот (пептид TIT7 в L-форме), которые связываются с D-MC16, посредством скрининга с использованием фаговой библиотеки T7. Исходя из полученной последовательности, синтезировали пептид TIT7 (dTIT7), состоящий из аминокислот в D-форме. Ожидается, что этот пептид dTIT7 будет связываться с Anxa1.

При анализе пептидной последовательности, экспонируемой фагом, является общей практикой оптимизация последовательности путем внесения различных мутаций в пептидную последовательность. В настоящее время можно оценить и идентифицировать оптимальные пептидные последовательности за один раз из последовательностей не менее 10000 пептидов-кандидатов путем использования для полученных групп фагов ДНК-секвенатора последнего поколения.

Результаты анализа показали, что частота появления 7 аминокислот, начинающихся с TIT (треонин-изолейцин-треонин) является высокой в качестве последовательности,

связывающейся с N-концевой частью Anxa1, и среди них последовательность TIT7 "TITWPTM" (SEQ ID NO: 12) является основной. В то время как частота частичной последовательности TIT7 также оказалась высокой, не было обнаружено последовательности, способной заменить TIT7. Кроме того, пептид TIT7 состоял из новой последовательности, полностью отличной от последовательности IF7 (IFLLWQR; SEQ ID NO: 10).

Описанные выше результаты продемонстрировали, что был успешно получен неразветвленный пептид TIT7 из семи аминокислот, который состоит из всех аминокислот в D-форме.

Более того, когда межмолекулярное взаимодействие между dTIT7 и Anxa1 количественно определяли способом QCM, the константа диссоциации (величина Kd) составила $4{,}57\times10^{-8}$ M.

Как показано на фиг.6D, пептиды с последовательностями LRFPTVL (SEQ ID NO: 13), SPTSLLF (SEQ ID NO: 14), MPTLTFR (SEQ ID NO: 15), LKGMLRI (SEQ ID NO: 16) и LLSWPSA (SEQ ID NO: 17) часто выявлялись в дополнение к последовательности TIT7 (SEQ ID NO: 12), и среди большого количества случайных пептидов, составлявшего 10^9, эти шесть пептидов составляли 50% от всех.

[0074]

Пример 2: Способность пептида dTIT7 к нацеливанию на опухоль головного мозга

Получали dTIT7 (IRDye-dTIT7), меченный флуоресцентным реагентом ближней инфракрасной области IRDye 800CW. Получали модельную мышь nude с опухолью головного мозга, которой в головной мозг была трансплантирована глиома крысы и IRDye-dTIT7 инъецировали через хвостовую вену мыши. В результате посредством визуализации *in vivo* было обнаружено, что IRDye-dTIT7 накапливается в области опухоли у модельной мыши с опухолью головного мозга (фиг.7).

[0075]

Пример 3: Противоопухолевый эффект связанного с dTIT7 средства против злокачественной опухоли в модели опухоли головного мозга

Далее исследовали эффект конъюгата dTIT7-средство против злокачественной опухоли на модельной мыши с опухолью головного мозга.

GA-dTIT7, в котором лекарственное средство против злокачественной опухоли гелданамицин связан с пептидом dTIT7 (фиг.8) является резистентным как к протеазам, так и к эстеразам и считается более стабильным *in vivo*. GA-dTIT7 в дозе, составляющей 1/10 (в молярном количестве) от рекомендованной дозы внутривенно вводили мыши с опухолью (клетки меланомы B16, введенные подкожно) каждые 1 или 2 суток. В результате рост опухоли значительно подавлялся и наблюдали значительный некроз в области опухоли мыши, которой вводили GA-dTIT7, посредством гистопатологического наблюдения. Этот эффект прямо указывает на возможность того, что dTIT7 лучше IF7, который требует непрерывного введения (Hatakeyama et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 108: 19587-92, 2011).

Более удивительно, что, когда GA-dTIT7 перорально вводили в модели опухоли головного мозга с трансплантацией клеток B16 в головной мозг, наблюдали регрессию опухоли, опухоль продолжала уменьшаться даже после прекращения введения лекарственного средства и, наконец, наблюдалось полное излечение у 2 из 4 мышей (фиг.9). Аналогичные терапевтические эффекты также наблюдали в модели опухоли головного мозга с использованием клеток C6. Это указывает на то, что GA-dTIT7 может приводить к полному излечению опухоли головного мозга в качестве средства против злокачественной опухоли, которое можно вводить перорально.

[0076]

Пример 4: Межмолекулярное взаимодействие между пептидами dLRF7, dSPT7, dMPT7 и dLLS7 и Anxa1

Что касается пептидов с последовательностями LRFPTVL (SEQ ID NO: 13), SPTSLLF (SEQ ID NO: 14), MPTLTFR (SEQ ID NO: 15) и LLSWPSA (SEQ ID NO: 17) частота выявления которых была высокой, помимо последовательности TIT7 (SEQ ID NO: 12), описанной в примере 1, аналогично пептиду dTIT7 были синтезированы пептиды (пептиды dLRF7, dSPT7, dMPT7 и dLLS7), состоящие из аминокислот в D-форме, и для каждого из них было количественно определено межмолекулярное взаимодействие с Anxa1 следующим способом.

Сенсорный чип промывали два раза раствором Piranha в течение 5 мин, а затем погружали на ночь в раствор 0,9 мМ гидрокси-EG3-ундекантиола (Dojindo) и 0,1 мМ амино-EG6-ундекантиола (Dojindo). После промывания водой чип обрабатывали 1 мМ GMBS (Dojindo) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После смывания оставшегося GMBS на чип добавляли 1 мМ раствор пептида и чип инкубировали в течение 30 мин. Сенсорный чип, с которым был связан пептид, помещали в устройство QCM (Single-Q, ASONE) и добавляли 0,5 мл PBS на лунку. Различные дозы Anxa1 инжектировали в реакционную камеру и для каждого пептида определяли аффинность связывания (величину kd).

В результате, все протестированные пептиды продемонстрировали положительное связывание с Anxa1 (таблица 1 и фиг.11).

[0077]

[Таблица 1]

Название синтетического пептида	Величина kd (M)
dLRF7	$3{,}119\times10^{-8}$
dSPT7	$9{,}029\times10^{-8}$
dMPT7	$2{,}982\times10^{-7}$
dLLS7	$5{,}418\times10^{-8}$

[0078]

Пример 5: Способность пептидов dLRF7, dSPT7, dMPT7 и dLLS7 к нацеливанию на опухоль головного мозга

Химически синтезировали пептиды DLRF7, dSPT7, dMPT7 и dLLS7, продленные добавлением концевого цистеина. Затем каждый пептид связывали с флуоресцентным красителем ближней инфракрасной области IRDye 800CW малеинимидом (Li-Cor) через остаток цистеина. Полученный конъюгат пептида очищали посредством ВЭЖХ, а затем лиофилизировали. Каждый конъюгат пептид-IRDye растворяли в DMSO и 6% глюкозе и внутривенно инъецировали модельной мыши nude с опухолью головного мозга в дозе 100 мкл/мышь. Через 24 ч определяли спектр IVIS флуоресцентного изображения IVIS (Perkin Elmer).

В результате все мыши за исключением мышей, которым инъецировали dLLS7, продемонстрировали сильный сигнал IRDye в области опухоли головного мозга, и три пептида dLRF7, dMPT7 и dSPT7, отличных от dLLS7 продемонстрировали способность к нацеливанию на опухоль головного мозга через сосуды (фиг.12).

[0079]

Данная заявка основана на патентной заявке № 2016-159743, поданной в Японии (дата подачи: 16 августа 2016 года), содержание которой включено в настоящее описание в полном объеме.

Перечень последовательностей
<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
<120> НАЦЕЛИВАЮЩИЕ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННУЮ ОПУХОЛЬ ПЕПТИДЫ
<130> 092619
<150> JP 2016-159743
<151> 2016-08-16
<160> 17
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Нацеливающий на опухоль пептид
<400> 1
Met Thr Pro Trp Thr Ile Thr
1 5
<210> 2
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Нацеливающий на опухоль пептид
<400> 2
Leu Val Thr Pro Phe Arg Leu
1 5
<210> 3
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Нацеливающий на опухоль пептид
<400> 3
Ala Ser Pro Trp Ser Leu Leu
1 5
<210> 4
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Нацеливающий на опухоль пептид
<400> 4
Phe Leu Leu Ser Thr Pro Ser
1 5
<210> 5
<211> 7
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Нацеливающий на опухоль пептид
<400> 5
Arg Phe Thr Leu Thr Pro Met
1 5
<210> 6
<211> 1556
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 6
acttgtttca ctttgttttt ggacatagct gagccatgta cttcaaacag aaggcagcca 60
attactaact tctggttgct aggtgtggct tcctttaaaa tcctataaaa tcagaagccc 120
aagtctccac tgccagtgtg aaatcttcag agaagaattt ctctttagtt ctttgcaaga 180
aggtagagat aaagacactt tttcaaaaat ggcaatggta tcagaattcc tcaagcaggc 240
ctggtttatt gaaaatgaag agcaggaata tgttcaaact gtgaagtcat ccaaaggtgg 300
tcccggatca gcggtgagcc cctatcctac cttcaatcca tcctcggatg tcgctgcctt 360
gcataaggcc ataatggtta aaggtgtgga tgaagcaacc atcattgaca ttctaactaa 420
gcgaaacaat gcacagcgtc aacagatcaa agcagcatat ctccaggaaa caggaaagcc 480
cctggatgaa acactgaaga aagcccttac aggtcacctt gaggaggttg ttttagctct 540
gctaaaaact ccagcgcaat ttgatgctga tgaacttcgt gctgccatga agggccttgg 600
aactgatgaa gatactctaa ttgagatttt ggcatcaaga actaacaaag aaatcagaga 660
cattaacagg gtctacagag aggaactgaa gagagatctg gccaaagaca taacctcaga 720
cacatctgga gattttcgga acgctttgct ttctcttgct aagggtgacc gatctgagga 780
ctttggtgtg aatgaagact tggctgattc agatgccagg gccttgtatg aagcaggaga 840
aaggagaaag gggacagacg taaacgtgtt caataccatc cttaccacca gaagctatcc 900
acaacttcgc agagtgtttc agaaatacac caagtacagt aagcatgaca tgaacaaagt 960
tctggacctg gagttgaaag gtgacattga gaaatgcctc acagctatcg tgaagtgcgc 1020
cacaagcaaa ccagctttct ttgcagagaa gcttcatcaa gccatgaaag gtgttggaac 1080
tcgccataag gcattgatca ggattatggt ttcccgttct gaaattgaca tgaatgatat 1140
caaagcattc tatcagaaga tgtatggtat ctccctttgc caagccatcc tggatgaaac 1200
caaaggagat tatgagaaaa tcctggtggc tctttgtgga ggaaactaaa cattcccttg 1260
atggtctcaa gctatgatca gaagacttta attatatatt ttcatcctat aagcttaaat 1320
aggaaagttt cttcaacagg attacagtgt agctacctac atgctgaaaa atatagcctt 1380
taaatcattt ttatattata actctgtata atagagataa gtccattttt taaaaatgtt 1440
ttccccaaac cataaaaccc tatacaagtt gttctagtaa caatacatga gaaagatgtc 1500
tatgtagctg aaaataaaat gacgtcacaa gacaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1556
<210> 7
<211> 346
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 7
Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn
1 5 10 15
Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro
20 25 30
Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val
35 40 45

Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr
50 55 60
Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile
65 70 75 80
Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu
85 90 95
Lys Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu
100 105 110
Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Ala Ala Met Lys
115 120 125
Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Ala Ser Arg
130 135 140
Thr Asn Lys Glu Ile Arg Asp Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu
145 150 155 160
Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe
165 170 175
Arg Asn Ala Leu Leu Ser Leu Ala Lys Gly Asp Arg Ser Glu Asp Phe
180 185 190
Gly Val Asn Glu Asp Leu Ala Asp Ser Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu
195 200 205
Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Asn Thr Ile
210 215 220
Leu Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gln Leu Arg Arg Val Phe Gln Lys Tyr
225 230 235 240
Thr Lys Tyr Ser Lys His Asp Met Asn Lys Val Leu Asp Leu Glu Leu
245 250 255
Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Ala Ile Val Lys Cys Ala Thr
260 265 270
Ser Lys Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu His Gln Ala Met Lys Gly
275 280 285
Val Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser
290 295 300
Glu Ile Asp Met Asn Asp Ile Lys Ala Phe Tyr Gln Lys Met Tyr Gly
305 310 315 320
Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu
325 330 335
Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn
340 345

<210> 8
<211> 1395
<212> ДНК
<213> Mus musculus
<400> 8

gtctgaaacc atctgagcag agtctctctt cagtccccgg gaagacaagc aaatacaaag 60
atacttctct aaaaatggca atggtatcag aattcctcaa gcaggcccgt tttcttgaaa 120
atcaagaaca ggaatatgtt caagctgtaa aatcatacaa aggtggtcct gggtcagcag 180
tgagccccta cccttccttc aatgtatcct cggatgttgc tgccttgcac aaagctatca 240
tggttaaagg tgtggatgaa gcaaccatca ttgacattct taccaagagg accaatgctc 300

agcgccagca gatcaaggcc gcgtacttac aggagaatgg aaagcccttg gatgaagtct 360
tgagaaaagc ccttacaggc cacctggagg aggttgtttt ggctatgcta aaaactccag 420
ctcagtttga tgcagatgaa ctccgtggtg ccatgaaggg acttggaaca gatgaagaca 480
ctctcattga gattttgaca acaagatcta acgaacaaat cagagagatt aatagagtct 540
acagagaaga gctgaaaaga gatctggcca aagacatcac ttcagataca tctggagact 600
ttcggaaagc cttgcttgct cttgccaagg gtgaccgttg tcaggacttg agtgtgaatc 660
aagatttggc tgatacagat gccagggctt tgtatgaagc tggagaaagg agaaagggga 720
cagacgtgaa cgtcttcacc acaattctga ccagcaggag ctttcctcat cttcgcagag 780
tgtttcagaa ttacggaaag tacagtcaac atgacatgaa caaagctctg gatctggaac 840
tgaagggtga cattgagaag tgcctcacaa ccatcgtgaa gtgtgccacc agcactccag 900
ctttctttgc cgagaagctg tacgaagcca tgaagggtgc cggaactcgc cataaggcat 960
tgatcaggat tatggtctcc cgttcggaaa ttgacatgaa tgaaatcaaa gtattttacc 1020
agaagaagta tggaatctct ctttgccaag ccatcctgga tgaaaccaaa ggagactatg 1080
aaaaaatcct ggtggctctg tgtggtggaa actagacatc ccaactattc tgcaaggttc 1140
tgaggagaat gtctcttagc tgttttcctt cgatggcatg ggcttaagta ggaaagttgc 1200
tttggcagat aagtctaatt acctgctttg aataatatag cctataaata gattttacat 1260
cattactctg tacaatagag aaatacttgt tttgttaatt atgtttatcc caaattataa 1320
agccccataa gcaagtcact ttggtaccat tcctgagaaa gaagtttaca tataataaaa 1380
taaaacaatt ttata 1395

<210> 9
<211> 346
<212> БЕЛОК
<213> Mus musculus
<400> 9

Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Arg Phe Leu Glu Asn
1 5 10 15
Gln Glu Gln Glu Tyr Val Gln Ala Val Lys Ser Tyr Lys Gly Gly Pro
20 25 30
Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Ser Phe Asn Val Ser Ser Asp Val
35 40 45
Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr
50 55 60
Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Thr Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile
65 70 75 80
Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Asn Gly Lys Pro Leu Asp Glu Val Leu
85 90 95
Arg Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Met Leu
100 105 110
Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Gly Ala Met Lys
115 120 125
Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Thr Thr Arg
130 135 140
Ser Asn Glu Gln Ile Arg Glu Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu
145 150 155 160
Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe
165 170 175
Arg Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala Lys Gly Asp Arg Cys Gln Asp Leu
180 185 190

Ser Val Asn Gln Asp Leu Ala Asp Thr Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu
195 200 205
Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Thr Thr Ile
210 215 220
Leu Thr Ser Arg Ser Phe Pro His Leu Arg Arg Val Phe Gln Asn Tyr
225 230 235 240
Gly Lys Tyr Ser Gln His Asp Met Asn Lys Ala Leu Asp Leu Glu Leu
245 250 255
Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Thr Ile Val Lys Cys Ala Thr
260 265 270
Ser Thr Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu Tyr Glu Ala Met Lys Gly
275 280 285
Ala Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser
290 295 300
Glu Ile Asp Met Asn Glu Ile Lys Val Phe Tyr Gln Lys Lys Tyr Gly
305 310 315 320
Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu
325 330 335
Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn
340 345

<210> 10
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Нацеливающий на опухоль пептид
<400> 10
Ile Phe Leu Leu Trp Gln Arg
1 5

<210> 11
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 11
Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu
1 5 10 15

<210> 12
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> последовательность TIT7
<400> 12
Thr Ile Thr Trp Pro Thr Met
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Случайный пептид
<400> 13
Leu Arg Phe Pro Thr Val Leu
1 5
<210> 14
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Случайный пептид
<400> 14
Ser Pro Thr Ser Leu Leu Phe
1 5
<210> 15
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Случайный пептид
<400> 15
Met Pro Thr Leu Thr Phe Arg
1 5
<210> 16
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Случайный пептид
<400> 16
Leu Lys Gly Met Leu Arg Ile
1 5
<210> 17
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Случайный пептид
<400> 17
Leu Leu Ser Trp Pro Ser Ala
1 5

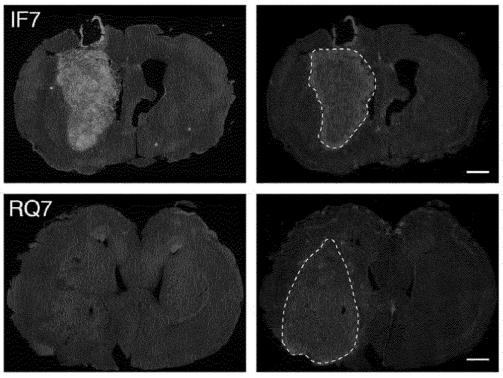
(57) Формула изобретения

Пептид, который связывается с аннексином A1, состоящий из аминокислотной последовательности согласно следующему (i) (в приведенных ниже последовательностях каждый символ аминокислоты, за которым сразу следует символ [D], является D-формой аминокислоты):

(i) аминокислотная последовательность C[D] T[D] I[D] T[D] W[D] P[D] T[D] M[D].

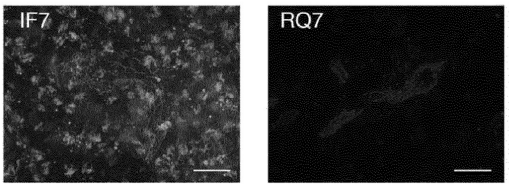
1

ФИГ.1



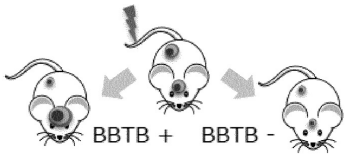
планки; 1 мм

ФИГ.2

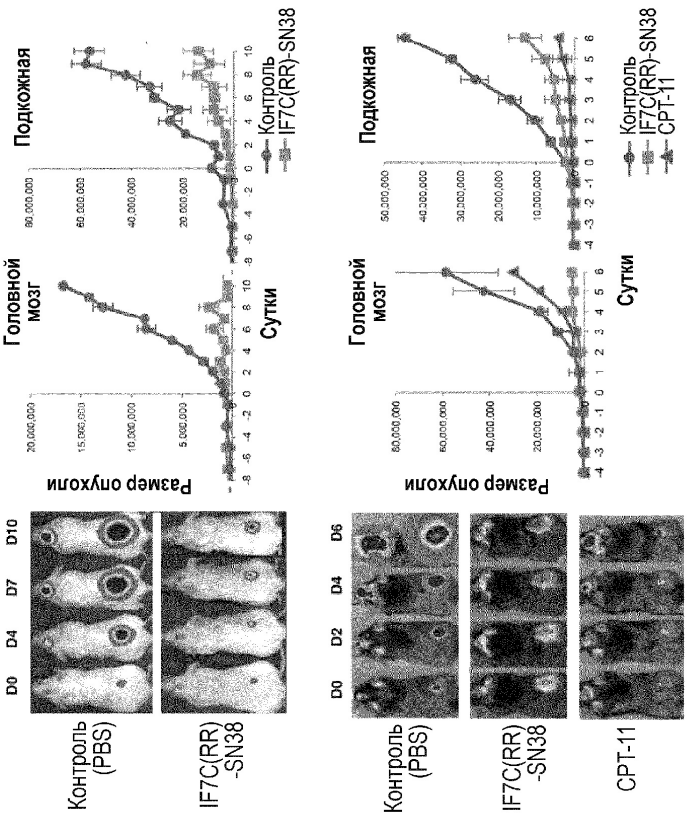


планки; 40 мкм

ФИГ.3

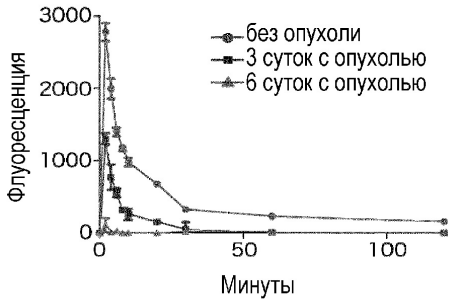


2

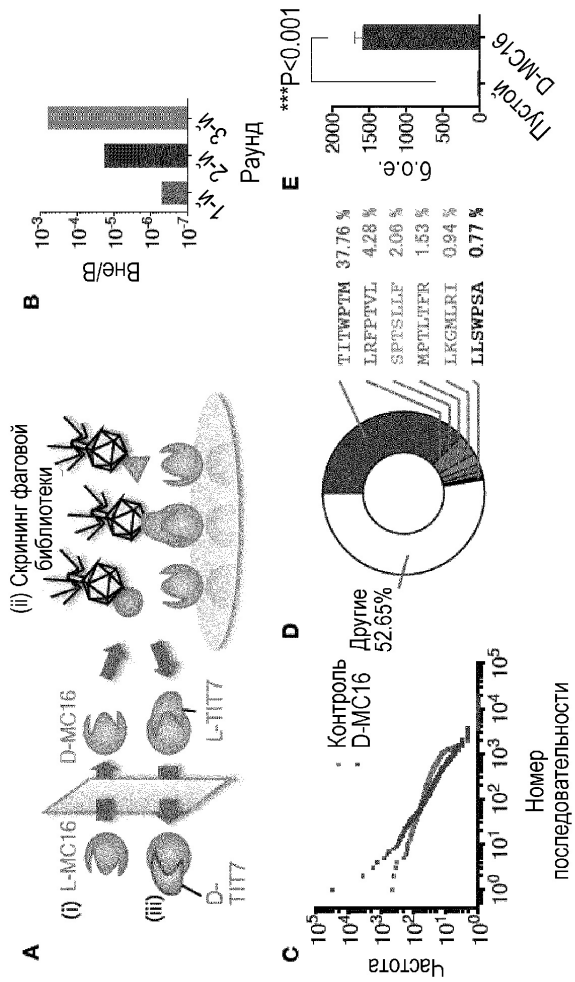

Подкожная
Головной мозг
Размер опухоли
Сутки
Контроль
IF7C(RR)-SN38
CPT-11
D0
D2
D4
D6
D7
D10
Контроль (PBS)
IF7C(RR) -SN38
CPT-11

ФИГ.4

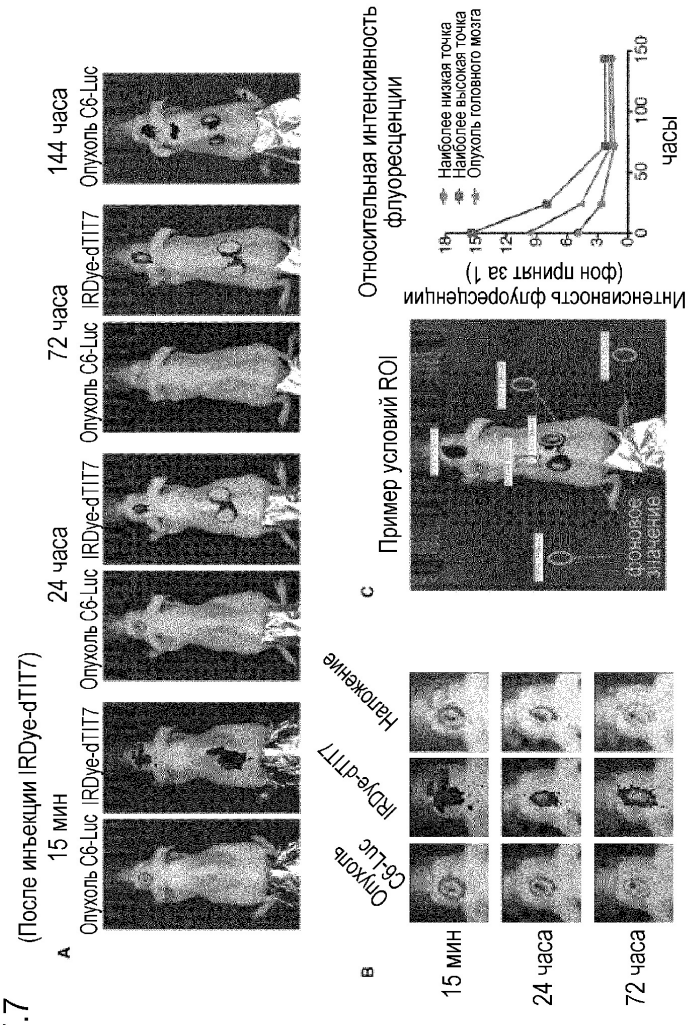
ФИГ.5


3000
2000
1000
0
Флуоресценция
0
50
100
Минуты
без опухоли
3 суток с опухолью
6 суток с опухолью

4


A
(i) L-MC16
D-MC16
(ii) Скрининг фаговой библиотеки
(iii)
D-TIT7
L-TIT7
B
Вне/В
Раунд
C
Частота
Контроль
D-MC16
Номер последовательности
D
Другие 52.65%
TITWPTM 37.76 %
LRPPTVL 4.28 %
SPTSLLF 2.06 %
MPTLTFR 1.53 %
LKGMLRI 0.94 %
LLSWPSA 0.77 %
E
***P<0.001
б.о.е.
Пустой
D-MC16

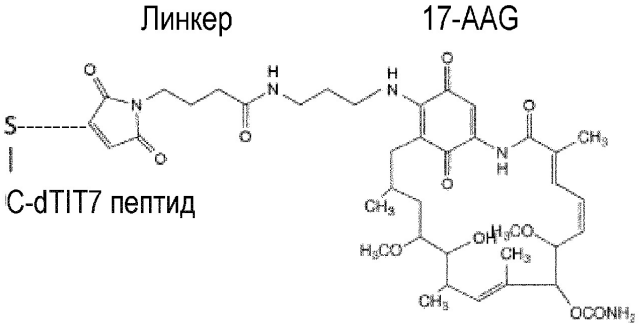
ФИГ.6


(После инъекции IRDye-dTIT7)
A
15 мин
24 часа
72 часа
144 часа
Опухоль C6-Luc
IRDye-dTIT7
B
Опухоль C6-Luc
IRDye-dTIT7
Наложение
15 мин
24 часа
72 часа
C
Пример условий ROI
фоновое значение
Относительная интенсивность флуоресценции
Наиболее низкая точка
Наиболее высокая точка
Опухоль головного мозга
Интенсивность флуоресценции (фон принят за 1)
часы

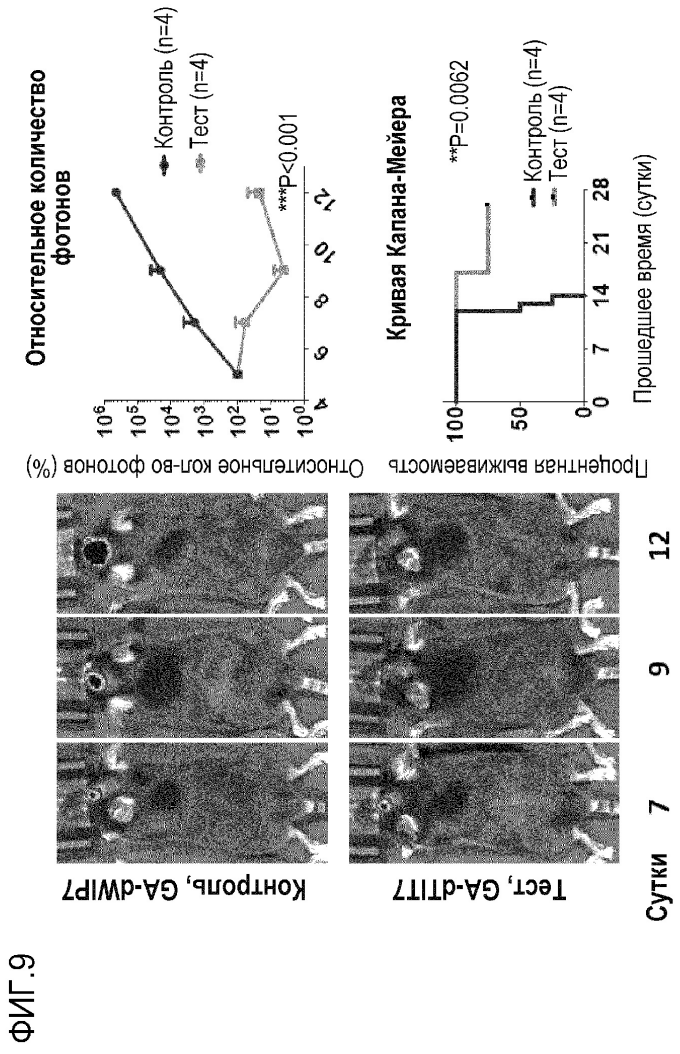
ФИГ.7

6

ФИГ.8

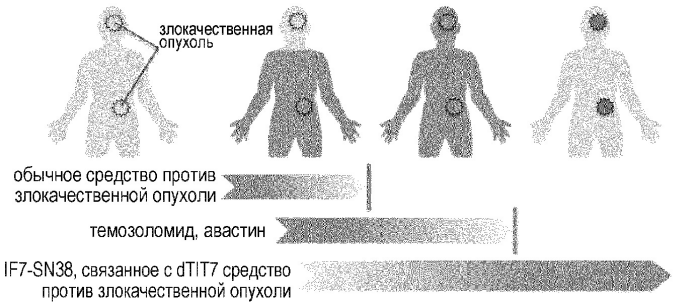


7

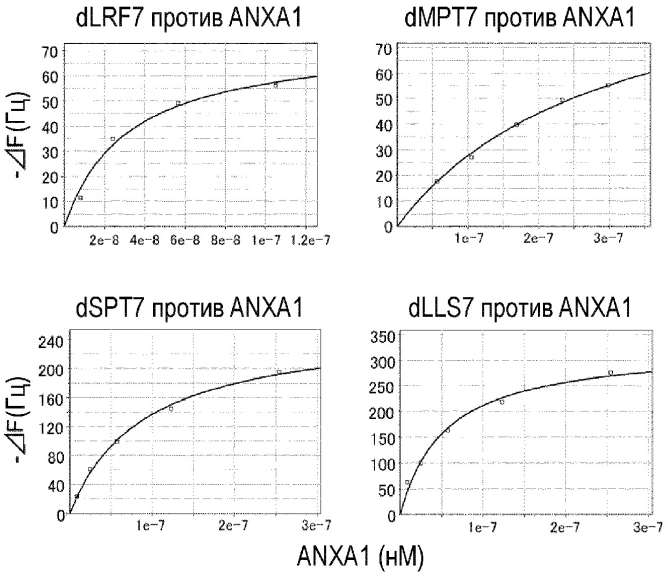

Относительное количество фотонов
Контроль (n=4)
Тест (n=4)
***P<0.001
Относительное кол-во фотонов (%)
Кривая Капана-Мейера
**P=0.0062
Контроль (n=4)
Тест (n=4)
Процентная выживаемость
Прошедшее время (сутки)
Контроль, GA-dWIP7
Тест, GA-dTIT7
Сутки 7 9 12

ФИГ.9

ФИГ.10


злокачественная опухоль
обычное средство против злокачественной опухоли
темозоломид, авастин
IF7-SN38, связанное с dTIT7 средство против злокачественной опухоли

ФИГ.11


dLRF7 против ANXA1
dMPT7 против ANXA1
dSPT7 против ANXA1
dLLS7 против ANXA1
-ΔF(Гц)
ANXA1 (нМ)

ФИГ.12

