

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 1 月 3 日(03.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/002836 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/08 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/066762
- (22) 国際出願日: 2013 年 6 月 18 日(18.06.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-141700 2012 年 6 月 25 日(25.06.2012) JP
- (71) 出願人: H O Y A 株式会社(HOYA CORPORATION) [JP/JP]; 〒1618525 東京都新宿区中落合 2 丁目 7 番 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 飯森 祐介(IIMORI, Yusuke); 〒1618525 東京都新宿区中落合 2 丁目 7 番 5 号 H O Y A 株式会社内 Tokyo (JP). 山形 瑞恵(YAMAGATA, Mizue); 〒1618525 東京都新宿区中落合 2 丁目 7 番 5 号 H O Y A 株式会社内 Tokyo (JP). 塩野 智隆(SHIONO, Toshitaka); 〒1618525 東京都新宿区中落合 2 丁目 7 番 5 号 H O Y A 株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: EGFR-BINDING PEPTIDE

(54) 発明の名称: E G F R 結合性ペプチド

(57) Abstract: Provided are: a substance capable of binding to an EGFR specifically with a high affinity; and a medicinal agent comprising the substance. A peptide which comprises at least the amino acid sequence represented by formula (1), (2) or (3) and is composed of 12 to 50 amino acid residues. X¹-His-X²-X³-Asp-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸-Trp-His (1) (In formula (1), X¹ represents Trp or Phe; X² represents Leu, Met, Ile or Val; X³ represents Ser, Ala, Thr, Gly, Asn, Asp, Glu, Arg or Lys; X⁴ represents Leu, Met, Ile, Val, Ala, Phe, Tyr, Trp, His or Cys; X⁵ represents Trp, Phe or Tyr; X⁶ represents Gln, Asn, Asp, Glu, Ala, Ser, Thr, Leu, Met, Lys or Arg; X⁷ represents Asn, Gln, Asp, Glu, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys or Arg; and X⁸ represents Ala, Gly, Ser, Thr, Asn, Val or Cys.) Phe-His-Asp-Trp-X¹¹-Pro-X¹²-X¹³-X¹⁴-X¹⁵-X¹⁶-X¹⁷ (2) (In formula (2), X¹¹ represents Leu, Met, Ile, Val, Ala, Phe, Tyr, Trp, His or Cys; X¹² represents Glu, Asp, Gln, Asn, Ala, Ser, Thr, Lys, Arg or His; X¹³ represents Val, Ala, Leu, Ile, Met, Thr, Cys or Asn; X¹⁴ represents Ser, Ala, Thr, Gly, Asn, Asp, Glu, Arg or Lys; X¹⁵ represents Pro, Val, Ile, Lys, Ala, Met, Trp, Tyr, Ser, Thr, Cys or Phe; X¹⁶ represents Pro, Val, Ile, Lys, Ala, Met, Trp, Tyr, Ser, Thr, Cys or Phe; and X¹⁷ represents Asp, Glu, Asn, Gln, Ala, Ser, Thr, Lys, Arg or His.) Leu-His-X²¹-Ser-X²²-Trp-Met-X²³-X²⁴-X²⁵-X²⁶-X²⁷ (3) (In formula (3), X²¹ represents Gln, Asn, Asp, Glu, Ala, Ser, Thr, Leu, Met, Lys or Arg; X²² represents Glu, Asp, Gln, Asn, Ala, Ser, Thr, Lys, Arg or His; X²³ represents Tyr, Phe, Trp, His, Leu, Met, Ile, Val, Cys or Ala; X²⁴ represents Val, Ala, Leu, Ile, Met, Thr, Cys or Asn; X²⁵ represents Asp, Glu, Asn, Gln, Ala, Ser, Thr, Lys, Arg or His; X²⁶ represents Ile, Val, Leu, Met, Ala, Phe, Tyr, Trp or Gly; and X²⁷ represents His, Tyr, Phe, Lys, Arg, Leu, Met or Ala.)

(57) 要約: E G F R に特異的かつ高親和性で結合する物質及びそれを含む医薬の提供。 少なくとも下記式 (1)、(2) 又は (3) で表されるアミノ酸配列を有するアミノ酸数 12 ~ 50 のペプチド。 X¹-His-X²-X³-Asp-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸-Trp-His (1) (式 (1) 中、X¹ は Trp 又は Phe を示し、X² は Leu、Met、Ile 又は Val を示し、X³ は Ser、Ala、Thr、Gly、Asn、Asp、Glu、Arg 又は Lys を示し、X⁴ は Leu、Met、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Trp、His 又は Cys を示し、X⁵ は Trp、Phe 又は Tyr を示し、X⁶ は Gln、Asn、Asp、Glu、Ala、Ser、Thr、Leu、Met、Lys 又は Arg を示し、X⁷ は Asn、Gln、Asp、Glu、Ser、Thr、Ala、Gly、Lys 又は Arg を示し、X⁸ は Ala、Gly、Ser、Thr、Asn、Val 又は Cys を示す。) Phe-His-Asp-Trp-X¹¹-Pro-X¹²-X¹³-X¹⁴-X¹⁵-X¹⁶-X¹⁷ (2) (式 (2) 中、X¹¹ は Leu、Met、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Trp、His 又は Cys を示し、X

[続葉有]

WO 2014/002836 A1



¹² は Glu 、 Asp 、 Gln 、 Asn 、 Ala 、 Ser 、 Thr 、 Lys 、 Arg 又は His を示し、 ^{X³} は Val、Ala、Leu、Ile、Met、Thr、Cys 又は Asn を示し、 ^{X¹⁴} は Ser、Ala、Thr、Gly、Asn、Asp、Glu、Arg 又は Lys を示し、 ^{X⁵} は Pro、Val、Ile、Lys、Ala、Met、Trp、Tyr、Ser、Thr、Cys 又は Phe を示し、 ^{X¹⁶} は Pro 、 Val 、 Ile 、 Lys 、 Ala 、 Met 、 Trp 、 Tyr 、 Ser 、 Thr 、 Cys 又は Phe を示し、 ^{X¹⁷} は Asp、Glu、Asn、Gln、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg 又は His を示す。) Leu-His-^{X²¹}-Ser-^{X²²}-Trp-Met-^{X²³}-^{X²⁴}-^{X²⁵}-^{X²⁶}-^{X²⁷} (3) (式 (3) 中、^{X²¹}は Gln、Asn、Asp、Glu、Ala、Ser、Thr、Leu、Met、Lys 又は Arg を示し、 ^{X²²}は Glu 、 Asp 、 Gln 、 Asn 、 Ala 、 Ser 、 Thr 、 Lys 、 Arg 又は His を示し、 ^{X²³} は Tyr、Phe、Trp、His、Leu、Met、Ile、Val、Cys 又は Ala を示し、 ^{X²⁴}は Val、Ala、Leu、Ile、Met、Thr、Cys 又は Asn を示し、 ^{X²⁵}は Asp、Glu、Asn、Gln、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg 又は His を示し、 ^{X²⁶}は Ile、Val、Leu、Met、Ala、Phe、Tyr、Trp 又は Gly を示し、 ^{X²⁷}は His、Tyr、Phe、Lys、Arg、Leu、Met 又は Ala を示す。)

明 細 書

発明の名称 : E G F R 結合性ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、上皮成長因子受容体 (E p i d e r m a l G r o w t h F a c t o r R e c e p t o r : E G F R) に特異的に結合するペプチド及びこれを含む医薬に関する。

背景技術

[0002] E G F R は、細胞の増殖及び成長を制御する上皮成長因子を認識し、シグナル伝達を行う受容体であり、細胞増殖、分化、移動などの細胞機能に重要な役割を担っている。E G F R のシグナルとしては細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制し、腫瘍細胞の運動性と血管新生を増長する。E G F R は腫瘍特異的であり、非小細胞肺癌 (N S C L C) や乳癌、頭頸部癌 (S C C H N) 、胃癌、大腸癌、食道癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、脾臓、卵巣癌を含むヒトの上皮組織の腫瘍において広い範囲で、その強発現が観察されている。

これらの発見により、癌治療において薬物と遺伝子の受容体を介したデリバリーシステムにとって重要なターゲットとして E G F R が位置づけられている。しかし、E G F R のリガンドである E G F は強い有糸分裂と血管新生力を有しており、それゆえ、E G F のような基質を探すことは重要である。容易に拡散するようなアドバンテージや低い免疫原性を持ち、遺伝子輸送ベクターを容易に取り込む能力を持ったリガンドペプチドは、放射性核種、サイトカイン、化学薬物、腫瘍に対する治療遺伝子を選択的にデリバリーするための標的部として研究されている。最近、ファージライブラリースクリーニングを利用してペプチドリガンドを取得したという研究結果が報告されている (非特許文献 1) 。

[0003] 一方、受容体タンパクの E G F R ファミリーメンバーは癌細胞の B e s t - c h a r a c t e r i z e d t a r g e t s の 1 つである。H E R 1、

E r b B 1として知られるEGFR、E r b B 2もしくはn e uとして知られるHER2、HER3 (E r b B 3)、HER4 (E r b B 4)を含むEGFファミリーは細胞生存、分化、増殖において重要である。特に、EGFRシグナルが増大すると、発癌性形質転換とアソシエートし、結果として自立した細胞生存、腫瘍侵襲、血管新生、転移が誘導される。EGFRの発現と強発現は多様な腫瘍タイプで報告されており、3分の1の上皮癌においてEGFRの発現レベルが高いことが知られており、EGFR強発現はしばしば予後不良と関連する。また、EGFRは癌の発生と発達に関係していることが知られているので、EGFRを標的とした化学療法薬の開発がなされている。EGFRの阻害剤の1つであるセツキシマブ (IMC-C225、アービタックス) は転移性大腸癌の治療薬としてFDAで認可されているモノクローナル抗体である。セツキシマブはキメラヒトマウス抗体であり、EGFRの細胞外ドメインを標的としている。セツキシマブはEGFRと本来のリガンドであるEGFやTGF- α よりも強い親和性で結合し、EGFRの結合を競合阻害し、活性を抑制する (非特許文献2、特許文献1)。他にヒト型抗EGFRモノクローナル抗体として、パニツムマブ (ベクティビックス (登録商標)) がある (特許文献2)。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第1996/040210号パンフレット

特許文献2：特許第4808412号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：The FASEB Journal, 2005;19, 1978-1985

非特許文献2：Journal of the National Cancer Institute, 2005; 97 (22), 1663-1670

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、既に報告されたEGFRのペプチドリガンドは、EGFRに対する結合性が不十分であり、また抗EGFR抗体については分子量が大きく、投与手段が限定される、副作用の発生等の問題がある。

[0007] 従って、本発明の課題は、EGFRに特異的かつ高親和性で結合する新たな物質及びそれを含む医薬を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] そこで本発明者は、ファージディスプレイ法を用いてEGFRに特異的に結合するペプチドを提示するファージを探索したところ、特定のアミノ酸配列を有するペプチドがリコンビナントヒトEGFRタンパク質に特異的に結合すること、及びこのペプチド又はその標識体を用いてEGFRを発現する細胞や組織を特異的に検出できることを見出した。さらに、該ペプチド又はその標識体がEGFRとEGFとの結合を競合的に阻害することから、該ペプチド又はその標識体は癌治療薬としても有用であることを見出し、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔19〕を提供するものである。

[0010] 〔1〕少なくとも下記式（1）、（2）又は（3）で表されるアミノ酸配列を有するアミノ酸数12～50のペプチド。

[0011] $X^1\text{-His-X}^2\text{-X}^3\text{-Asp-X}^4\text{-X}^5\text{-X}^6\text{-X}^7\text{-X}^8\text{-Trp-His}$ (1)

[0012] (式(1)中、 X^1 はTrp又はPheを示し、

X^2 はLeu、Met、Ile又はValを示し、

X^3 はSer、Ala、Thr、Gly、Asn、Asp、Glu、Arg又はLysを示し、

X^4 はLeu、Met、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Trp、His又はCysを示し、

X^5 はTrp、Phe又はTyrを示し、

X^6 はGln、Asn、Asp、Glu、Ala、Ser、Thr、Leu、Met、Lys又はArgを示し、

、

X^7 はAsn、Gln、Asp、Glu、Ser、Thr、Ala、Gly、Lys又はArgを示し、

X^8 はAla、Gly、Ser、Thr、Asn、Val又はCysを示す)

[0013] $\text{Phe-His-Asp-Trp-X}^{11}\text{-Pro-X}^{12}\text{-X}^{13}\text{-X}^{14}\text{-X}^{15}\text{-X}^{16}\text{-X}^{17}$ (2)

[0014] (式(2)中、X¹¹はLeu、Met、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Trp、His又Cysを示し、

X¹²はGlu、Asp、Gln、Asn、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示し、

X¹³はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Thr、Cys又はAsnを示し、

X¹⁴はSer、Ala、Thr、Gly、Asn、Asp、Glu、Arg又はLysを示し、

X¹⁵はPro、Val、Ile、Lys、Ala、Met、Trp、Tyr、Ser、Thr、Cys又はPheを示し、

X¹⁶はPro、Val、Ile、Lys、Ala、Met、Trp、Tyr、Ser、Thr、Cys又はPheを示し、

X¹⁷はAsp、Glu、Asn、Gln、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示す。)

[0015] Leu-His-X²¹-Ser-X²²-Trp-Met-X²³-X²⁴-X²⁵-X²⁶-X²⁷ (3)

[0016] (式(3)中、X²¹はGln、Asn、Asp、Glu、Ala、Ser、Thr、Leu、Met、Lys又はArgを示し、

X²² : Glu、Asp、Gln、Asn、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示し、

X²³ : Tyr、Phe、Trp、His、Leu、Met、Ile、Val、Cys又はAlaを示し、

X²⁴ : Val、Ala、Leu、Ile、Met、Thr、Cys又はAsnを示し、

X²⁵ : Asp、Glu、Asn、Gln、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示し、

X²⁶ : Ile、Val、Leu、Met、Ala、Phe、Tyr、Trp又はGlyを示し、

X²⁷ : His、Tyr、Phe、Lys、Arg、Leu、Met又はAlaを示す。)

[0017] [2] 式(1)中、X¹がTrp又はPheであり、X²がLeu、Met、Ile又はValであり、X³がSer、Ala、Thr、Gly又はAsnであり、X⁴がLeu、Met、Ile、Val又はAlaであり、X⁵がTrp又はPheであり、X⁶がGln、Asn又はAlaであり、X⁷がAsn、Gln又はAlaであり、X⁸がAla、Gly、Ser又はThrである[1]記載のペプチド。

[3] 式(1)中、X¹がTrp又はPheであり、X²がLeu、Met、Ile又はValであり、X³がSer又はAlaであり、X⁴がLeu又はAlaであり、X⁵がTrpであり、X⁶がGln又はAlaであり、X⁷がAsn又はAlaであり、X⁸がAlaである[1]記載のペプチド。

[4] 式(2)中、X¹¹がLeu、Met、Ile、Val又はAlaであり、X¹²がGlu、Asp、Gln、Asn又はAlaであり、X¹³がVal、Ala、Leu又はIleであり、X¹⁴がSer、Ala、

Thr、Gly又はAsnであり、X¹⁵がPro、Val、Ile又はAlaであり、X¹⁶がPro、Val、Ile又はAlaであり、X¹⁷がAsp、Glu、Asn、Gln又はAlaである〔1〕記載のペプチド。

〔5〕式（2）中、X¹¹がLeu又はAlaであり、X¹²がGlu又はAlaであり、X¹³がVal又はAlaであり、X¹⁴がSer又はAlaであり、X¹⁵がPro又はAlaであり、X¹⁶がPro又はAlaであり、X¹⁷がAsp又はAlaである〔1〕記載のペプチド。

〔6〕式（3）中、X²¹がGln、Asn又はAlaであり、X²²がGlu、Asp、Gln又はAlaであり、X²³がTyr、Phe、Trp、His又はAlaであり、X²⁴がVal、Ala、Leu又はIleであり、X²⁵がAsp、Glu、Asn、Gln又はAlaであり、X²⁶がIle、Val、Leu、Met又はAlaであり、X²⁷がHis、Tyr、Phe、Lys、Arg又はAlaである〔1〕記載のペプチド。

〔7〕式（3）中、X²¹がGln又はAlaであり、X²²がGlu又はAlaであり、X²³がTyr又はAlaであり、X²⁴がVal又はAlaであり、X²⁵がAsp又はAlaであり、X²⁶がIle又はAlaであり、X²⁷がHis又はAlaである〔1〕記載のペプチド。

〔8〕アミノ酸数の上限が30である〔1〕～〔7〕のいずれかに記載のペプチド。

〔9〕EGFR結合性を有する〔1〕～〔8〕のいずれかに記載のペプチド。

〔10〕〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を含有する医薬。

〔11〕〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を含有する癌細胞又は癌組織検出薬。

〔12〕〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を含有する癌診断薬。

〔13〕〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を含有する癌治療薬。

〔14〕癌細胞又は癌組織を検出するための〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体。

〔15〕 癌診断又は癌治療のための〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体。

〔16〕 癌細胞又は癌組織検出薬製造のための、〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体の使用。

〔17〕 癌診断薬又は癌治療薬製造のための、〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体の使用。

〔18〕 〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を使用することを特徴とする癌細胞又は癌組織の検出方法。

〔19〕 〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を使用することを特徴とする癌の診断又は治療方法。

発明の効果

[0018] 本発明のペプチドは、EGFRに特異的かつ強い結合性を有することから、このペプチド又はその標識体は、EGFRを発現する細胞又は組織、特に種々の癌細胞又は癌組織の検出薬、すなわち癌の診断薬として有用である。また、本発明のペプチドは、EGFRとEGFとの結合を競合的に阻害することから、EGFRを発現する癌治療薬として有用である。

図面の簡単な説明

[0019] [図1] D12ライブラリーでのパニング実験のアウトプット力価／インプット力価比を示す。

[図2] C7Cライブラリーでのパニング実験のアウトプット力価／インプット力価比を示す。

[図3] EGFR標的パニング3ラウンドで回収したファージが提示しているペプチド配列を示す。

[図4] I-1010、I-1012及びI-1015ファージの固相化タンパクに対する結合性試験結果を示す。

[図5] I-1010、I-1012及びI-1015ファージの固相化タンパクに対する結合性試験結果を示す。

[図6] I-1010ファージとペプチドPe p055又はペプチドPe p01

8との競合試験結果を示す。

[図7] I-1012ファージとペプチドPep056又はペプチドPep018との競合試験結果を示す。

[図8] I-1015ファージとペプチドPep057又はペプチドPep018との競合試験結果を示す。

[図9] I-1010アラニン置換ファージの提示ペプチド配列を示す。

[図10] I-1012アラニン置換ファージの提示ペプチド配列を示す。

[図11] I-1015アラニン置換ファージの提示ペプチド配列を示す。

[図12] I-1010アラニン置換ファージのrhEGFRに対する結合性試験結果を示す。

[図13] I-1012アラニン置換ファージのrhEGFRに対する結合性試験結果を示す。

[図14] I-1015アラニン置換ファージのrhEGFRに対する結合性試験結果を示す。

[図15] I-1010アミノ酸置換ファージの提示ペプチド配列を示す。

[図16] I-1010アミノ酸1個置換ファージのrhEGFRに対する結合性試験結果を示す。

[図17] I-1001アミノ酸2個置換ファージのrhEGFRに対する結合性試験結果を示す。

[図18] A-431細胞及びMCF7細胞のEGFR発現量（ウェスタンブロット）を示す。

[図19] A-431細胞に対するI-1010ファージの結合性試験結果を示す。

[図20] Pep055-FによるA-431細胞の染色性を示す。

[図21] Pep032-FによるA-431細胞の染色性を示す。

[図22] Pep055-FによるMCF7細胞の染色性を示す。

[図23] Pep032-FによるMCF7細胞の染色性を示す。

[図24] rhEGFとI-1010ファージとの競合試験結果を示す。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明のペプチドは、少なくとも下記式（１）、（２）又は（３）で表されるアミノ酸配列を有するアミノ酸数１２～５０のペプチドである。

[0021] X^1 -His- X^2 - X^3 -Asp- X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 -Trp-His (1)

Phe-His-Asp-Trp- X^{11} -Pro- X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} (2)

Leu-His- X^{21} -Ser- X^{22} -Trp-Met- X^{23} - X^{24} - X^{25} - X^{26} - X^{27} (3)

[0022] 上記式（１）中、 X^1 はTrp又はPheを示す。 X^2 はLeu、Met、Ile又はValを示す。 X^3 はSer、Ala、Thr、Gly、Asn、Asp、Glu、Arg又はLysを示すが、Ser、Ala、Thr、Gly又はAsnが好ましく、Ser又はAlaがより好ましい。 X^4 はLeu、Met、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Trp、His又はCysを示すが、Leu、Met、Ile、Val又はAlaが好ましく、Leu又はAlaがより好ましい。 X^5 はTrp、Phe又はTyrを示すが、Trp又はPheが好ましく、Trpがより好ましい。 X^6 はGln、Asn、Asp、Glu、Ala、Ser、Thr、Leu、Met、Lys又はArgを示すが、Gln、Asn又はAlaが好ましく、Gln又はAlaがより好ましい。 X^7 はAsn、Gln、Asp、Glu、Ser、Thr、Ala、Gly、Lys又はArgを示すが、Asn、Gln又はAlaが好ましく、Asn又はAlaがより好ましい。 X^8 はAla、Gly、Ser、Thr、Asn、Val又はCysを示すが、Ala、Gly、Ser又はThrが好ましく、Alaがより好ましい。

[0023] 式（１）のペプチドのうち、 X^1 がTrp又はPheであり、 X^2 がLeu、Met、Ile又はValであり、 X^3 がSer、Ala、Thr、Gly又はAsnであり、 X^4 がLeu、Met、Ile、Val又はAlaであり、 X^5 がTrp又はPheであり、 X^6 がGln、Asn又はAlaであり、 X^7 がAsn、Gln又はAlaであり、 X^8 がAla、Gly、Ser又はThrである、アミノ酸数１２～５０のペプチドが好ましい。

[0024] また、式（１）のペプチドのうち、 X^1 がTrp又はPheであり、 X^2 がLeu、Met、Ile又はValであり、 X^3 がSer又はAlaであり、 X^4 がLeu又はAlaであり、 X^5 がTrpであり、 X^6 がGln又はAlaであり、 X^7 がAsn又はAlaであり、 X^8 がAlaである、アミノ酸数１２～５０のペプチドがより好ましい。

[0025] 上記式（２）中、 X^{11} はLeu、Met、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Trp、His又はCysを示すが、Leu、Met、Ile、Val又はAlaが好ましく、Leu又はAlaがより好ま

しい。X¹²はGlu、Asp、Gln、Asn、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示すが、Glu、Asp、Gln、Asn又はAlaが好ましく、Glu又はAlaがより好ましい。X¹³はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Thr、Cys又はAsnを示すが、Val、Ala、Leu又はIleが好ましく、Val又はAlaがより好ましい。X¹⁴はSer、Ala、Thr、Gly、Asn、Asp、Glu、Arg又はLysを示すが、Ser、Ala、Thr、Gly又はAsnが好ましく、Ser又はAlaがより好ましい。X¹⁵はPro、Val、Ile、Lys、Ala、Met、Trp、Tyr、Ser、Thr、Cys又はPheを示すが、Pro、Val、Ile又はAlaが好ましく、Pro又はAlaがより好ましい。X¹⁶はPro、Val、Ile、Lys、Ala、Met、Trp、Tyr、Ser、Thr、Cys又はPheを示すが、Pro、Val、Ile又はAlaが好ましく、Pro又はAlaがより好ましい。X¹⁷はAsp、Glu、Asn、Gln、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示すが、Asp、Glu、Asn、Gln又はAlaが好ましく、Asp又はAlaがより好ましい。

[0026] 式(2)のペプチドのうち、X¹¹がLeu、Met、Ile、Val又はAlaであり、X¹²がGlu、Asp、Gln、Asn又はAlaであり、X¹³がVal、Ala、Leu又はIleであり、X¹⁴がSer、Ala、Thr、Gly又はAsnであり、X¹⁵がPro、Val、Ile又はAlaであり、X¹⁶がPro、Val、Ile又はAlaであり、X¹⁷がAsp、Glu、Asn、Gln又はAlaである、アミノ酸数12～50のペプチドが好ましい。

[0027] 式(2)のペプチドのうち、X¹¹がLeu又はAlaであり、X¹²がGlu又はAlaであり、X¹³がVal又はAlaであり、X¹⁴がSer又はAlaであり、X¹⁵がPro又はAlaであり、X¹⁶がPro又はAlaであり、X¹⁷がAsp又はAlaである、アミノ酸数12～50のペプチドがより好ましい。

[0028] 上記式(3)中、X²¹はGln、Asn、Asp、Glu、Ala、Ser、Thr、Leu、Met、Lys又はArgを示すが、Gln、Asn又はAlaが好ましく、Gln又はAlaがより好ましい。X²²はGlu、Asp、Gln、Asn、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示すが、Glu、Asp、Gln又はAlaが好ましく、Glu又はAlaがより好ましい。X²³はTyr、Phe、Trp、His、Leu、Met、Ile、Val、Cys又はAlaを示すが、Tyr、Phe、Trp、His又はAlaが好ましく、Tyr又はAlaがより好ましい。X²⁴はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Thr、Cys又はAsnを示すが、Val、Ala、Leu又はIleが好ましく、Val又は

Alaがより好ましい。X²⁵はAsp、Glu、Asn、Gln、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示すが、Asp、Glu、Asn、Gln又はAlaが好ましく、Asp又はAlaがより好ましい。X²⁶はIle、Val、Leu、Met、Ala、Phe、Tyr、Trp又はGlyを示すが、Ile、Val、Leu、Met又はAlaが好ましく、Ile又はAlaがより好ましい。X²⁷はHis、Tyr、Phe、Lys、Arg、Leu、Met又はAlaを示すが、His、Tyr、Phe、Lys、Arg又はAlaが好ましく、His又はAlaがより好ましい。

[0029] 式(3)のペプチドのうち、X²¹がGln、Asn又はAlaであり、X²²がGlu、Asp、Gln又はAlaであり、X²³がTyr、Phe、Trp、His又はAlaであり、X²⁴がVal、Ala、Leu又はIleであり、X²⁵がAsp、Glu、Asn、Gln又はAlaであり、X²⁶がIle、Val、Leu、Met又はAlaであり、X²⁷がHis、Tyr、Phe、Lys、Arg又はAlaであるアミノ酸数12～50のペプチド。

[0030] 式(3)のペプチドのうち、X²¹がGln又はAlaであり、X²²がGlu又はAlaであり、X²³がTyr又はAlaであり、X²⁴がVal又はAlaであり、X²⁵がAsp又はAlaであり、X²⁶がIle又はAlaであり、X²⁷がHis又はAlaである、アミノ酸数12～50のペプチドがより好ましい。

[0031] また、本発明ペプチドのアミノ酸数としては、12～50であるが、当該アミノ酸数の上限は40が好ましく、30がより好ましく、20がさらに好ましく、18が特に好ましい。なお、式(1)、(2)又は(3)のN末側又はC末側のいずれに任意のアミノ酸が付加していてもよい。

[0032] 本発明ペプチドのX¹～X⁸、X¹¹～X¹⁷及びX²¹～X²⁷の置換は、後記実施例記載の結合性試験結果、保存的置換及び半保存的置換であれば同様の活性を示すことに基づくものである。ここで典型的な保存的置換及び半保存的置換を表1に示す。

[0033]

[表1]

アミノ酸	保存的置換	半保存的置換
A(Ala)	G(Gly);S(Ser);T(Thr)	N(Asn);V(Val);C(Cys)
C(Cys)	A(Ala);V(Val);L(Leu)	M(Met);I(Ile);F(Phe);G(Gly)
D(Asp)	E(Glu);N(Asn);Q(Gln)	A(Ala);S(Ser);T(Thr);K(Lys);R(Arg);H(His)
E(Glu)	D(Asp);Q(Gln);N(Asn)	A(Ala);S(Ser);T(Thr);K(Lys);R(Arg);H(His)
F(Phe)	W(Trp);Y(Tyr);L(Leu);M(Met);H(His)	I(Ile);V(Val);A(Ala)
G(Gly)	A(Ala)	S(Ser);N(Asn);T(Thr);D(Asp);E(Glu);N(Asn);Q(Gln)
H(His)	Y(Tyr);F(Phe);K(Lys);R(Arg)	L(Leu);M(Met);A(Ala)
I(Ile)	V(Val);L(Leu);M(Met);A(Ala)	F(Phe);Y(Tyr);W(Trp);G(Gly)
K(Lys)	R(Arg);H(His)	D(Asp);E(Glu);N(Asn);Q(Gln);S(Ser);T(Thr);A(Ala)
L(Leu)	M(Met);I(Ile);V(Val);A(Ala)	F(Phe);Y(Tyr);W(Trp);H(His);C(Cys)
M(Met)	L(Leu);I(Ile);V(Val);A(Ala)	F(Phe);Y(Tyr);W(Trp);C(Cys)
N(Asn)	Q(Gln)	D(Asp);E(Glu);S(Ser);T(Thr);A(Ala);G(Gly);K(Lys);R(Arg)
P(Pro)	V(Val);I(Ile)	L(Leu);A(Ala);M(Met);W(Trp);Y(Tyr);S(Ser);T(Thr);C(Cys);F(Phe)
Q(Gln)	N(Asn)	D(Asp);E(Glu);A(Ala);S(Ser);T(Thr);L(Leu);M(Met);K(Lys);R(Arg)
R(Arg)	K(Lys);H(His)	N(Asn);Q(Gln);S(Ser);T(Thr);D(Asp);E(Glu);A(Ala)
S(Ser)	A(Ala);T(Thr);G(Gly);N(Asn)	D(Asp);E(Glu);R(Arg);K(Lys)
T(Thr)	A(Ala);S(Ser);G(Gly);N(Asn);V(Val)	D(Asp);E(Glu);R(Arg);K(Lys);I(Ile)
V(Val)	A(Ala);L(Leu);I(Ile)	M(Met);T(Thr);C(Cys);N(Asn)
W(Trp)	F(Phe);Y(Tyr);H(His)	L(Leu);M(Met);I(Ile);V(Val);C(Cys)
Y(Tyr)	F(Phe);W(Trp);H(His)	L(Leu);M(Met);I(Ile);V(Val);C(Cys)

[0034] 本発明のペプチドは、前記アミノ酸配列をコードするDNAを用いる組み換え技術によって製造することもできるが、有機合成化学的ペプチド合成法によって製造することができる。有機合成化学的ペプチド合成法は、一般的な官能基の保護、カルボキシル基の活性化、ペプチド結合の形成、保護基の脱保護の手段によって行われる。これらの反応は固相法で行うのが好ましい。

[0035] 本発明のペプチドのうち、配列番号2、4及び7で示されるペプチド（1-1010、1-1012及び1-1015）は、ランダムなペプチド配列を提示させたファージライブラリーからファージディスプレイ法によってEGFRと結合性を有するペプチドをスクリーニングすることにより選択することができる。ファージディスプレイ法に用いられるファージとしてはD12が好ましい。ファージライブラリーからEGFRと強く結合するものを選

択するには、ファージ集団をEGFRとインキュベートし、EGFRに結合しなかったファージを洗い流した後に、結合したファージを回収する。回収したファージがどのような配列のペプチドを提示しているかは、ファージゲノムの該当部分をシーケンスすればよい。EGFRとペプチドの相互作用がそれほど強いものではない場合には、弱い結合力を持つファージがバックグラウンドとしてつきまってしまう。そこで、結合→洗浄→回収の一連の流れの後に、再度大腸菌に感染させ、二次ライブラリーを調製し、このライブラリーを用いて再度一連の操作を繰り返すパニング操作を行う。パニングを繰り返していくことによって得られるライブラリーの中には、EGFRに高い結合能力を持ったファージの数が増えてくる。このようにして、目的とするEGFRと強い結合性を有するファージが選択できる。

[0036] 本発明のペプチドは、EGFRに特異的に結合する。従って、本発明のペプチド又はその標識体は、EGFR又はEGFRを発現している細胞若しくは組織を検出するための試薬として有用である。ここで本発明のペプチドの標識体としては、EGFRに結合したペプチドを検出し得る標識体であればよく、放射性同位体、アフィニティー標識（例えば、ビオチン、アビジン等）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン等）、常磁性原子等が挙げられる。これらの標識体のうち、蛍光標識やポジトロン核種による標識は、例えば大腸癌等のEGFRが発現している癌細胞又は癌組織を検出するうえでより好ましい。

[0037] 本発明のペプチドの標識体は、EGFRが発現している癌診断、例えば早期癌診断に有用である。例えば、癌組織の存在の有無の確認を目的とした診断においては、対象部位に例えば上記蛍光標識ペプチドを散布又は注射などの手段により接触させた後、洗浄処理により余剰な蛍光成分を除去した後、該当部位に励起光を照射し、蛍光染色された組織の有無を肉眼的又は顕微鏡的に確認することができる。

より好ましい形態としては、本発明の蛍光標識ペプチドを蛍光造影剤とし

て内視鏡による癌診断に用いることである、例えば、蛍光標識ペプチドを経内視鏡的に散布などの手段により組織に接触させた後、洗浄処理を行い、内視鏡光源により励起光を該当部に照射し、蛍光染色された組織の有無を内視鏡的に確認すればよい。これにより早期癌の発見診断に使用可能となるばかりではなく、通常内視鏡的に病変と疑われる部位を染色し、拡大蛍光観察をすることにより蛍光の有無による病変部位と非病変部位の境界を判別することにも使用可能となる。内視鏡の種類は特に限定されないが、内視鏡光源としてフルオレセインのための励起光を照射できる蛍光内視鏡又は、加えて拡大能を有する共焦点内視鏡が好ましい。

また、修飾する蛍光色素はフルオレセインだけではなく、たとえばシアニン系化合物など励起波長の異なる蛍光色素を用いてもよい。蛍光剤としてインドシアニングリーンなどのシアニン系化合物を用いた場合、フルオレセインと比較して励起波長がさらに長波長側にシフトするため、より深部の病変の確認に有効である。またポジトロン核種を本発明ペプチドに修飾させた場合、PETやSPECTなどにより検出可能となる。また、ガドリニウムを本発明ペプチドに修飾させた場合、MRIにより検出可能である。これにより主に消化器などといった経内視鏡的に到達可能な部位の癌のみならず、全身の癌病変において、本発明ペプチドが利用可能となる。

[0038] また、本発明ペプチド又はその標識体はEGFRとEGFとの結合を競合的に阻害することから、上記のような癌細胞検出、癌診断だけでなく、癌の治療にも用いることができる。

[0039] 本発明ペプチドが検出、診断又は治療可能な細胞又は組織としては、EGFRを発現している細胞又は組織であればよく、例えば癌細胞又は癌組織、具体的には、非小細胞肺癌、乳癌、頭頸部癌（SCCHN）、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌等が挙げられる。

[0040] 本発明のペプチド又はその標識体を癌検出薬、癌診断薬、癌治療薬として用いる場合、本発明ペプチド又はその標識体はそのまま用いることもできるが、薬学的に許容される担体とともに各種投与形態に適した組成物とするこ

とができる。該組成物としては、注射用剤、散布用剤、経口投与用剤、経直腸用剤等が挙げられる。薬学的に許容される担体としては、水、生理食塩水、各種緩衝剤、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤等が挙げられる。

[0041] 本発明のペプチド又はその標識体を癌治療薬として用いる場合の投与量は、症状、体重等によっても異なるが、通常成人1日あたり0.1mg~1000mgが好ましい。

実施例

[0042] 次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0043] 実施例1（ファージディスプレイ）

[手順]

1. パニング実験ーラウンド1

96wellプレートに5 μ g/mLのRecombinant human IgG₁ Fc (rhIgG₁, R&D Systems)、Recombinant human EGFR/Fc Chimera (rhEGFR, R&D Systems)を個別に200 μ Lずつ添加し(1 μ g/well)、4℃、一晩、静置インキュベートした(プレートへの固相化)。ウェル内の非固相タンパクを除去し、Blocking buffer (5mg/mL BSA (牛血清アルブミン) / TBS (50mM Tris-HCl / 150mM NaCl))を300 μ L/well添加し、37℃、1時間、静置インキュベートし、その後、0.1%TBST (0.1% Tween 20 / TBS) 200 μ L/wellで3回洗浄した。

rhIgG₁固相化ウェルに0.1%TBSTを100 μ L添加し、D12ファージライブラリー(1 $\times$ 10¹³PFU/mL)、C7Cファージライブラリー(2 $\times$ 10¹³PFU/mL)をそれぞれ10 μ L添加した。ここで、rhEGFR固相化ウェルには、乾燥防止のため0.1%TBSTを200 μ L添加した。

*PFU: plaque forming units (プラーク形成単

位)

[0044] ペプチド提示ファージライブラリー (NEW ENGLAND BioLabs Inc.) は、2種類利用し、D12ライブラリーは、12残基の直線状ランダムペプチドを提示しており、 2.7×10^9 種の異なるペプチド配列を持つファージライブラリーである。C7Cライブラリーは、7残基の環状ランダムペプチドを提示しており、 1.2×10^9 種の異なるペプチド配列を持つファージライブラリーである。

[0045] 室温、1時間、シーソーを用いて振とうインキュベートし、rhEGFRのFc部位に結合すると予想されるペプチド提示ファージ（以下ファージと略す）を除去する目的で、固相化したrhIgG₁に結合させた後、ファージ溶液を除去し、0.1%TBST 200 μ L/wellで10回洗浄した。1mg/mL BSA/0.2M Glycine-HCl (pH2.2) 100 μ L添加し、室温、10分、振とうインキュベートしファージを溶出させた。溶出液を回収し、回収溶液に1M Tris-HCl (pH9.1) を15 μ L添加することで中和した。回収した溶出液の一部を用いてファージの力価を測定した。

[0046] 2. 回収ファージの増幅

1の操作で得られたファージ溶出液をLB20mL中で対数増殖中のER2738菌 [F' lacI^q Δ (lacZ) M15 proA⁺B⁺zzf:Tn10 (Tet^R) / fhuA2 supE thi Δ (lac-proAB) Δ (hsdMS-mcrB) 5 (r_k⁻m_k⁻McrBC⁻)] に感染させ、振とう培養機を用いて、37℃で激しく攪拌しながら、4時間30分インキュベートした。ファージ感染菌培養液を50mL遠心チューブに移し、上記サンプルを高速冷却遠心機を用いて、4℃、10分、8,900 $\times$ gで遠心した。遠心後、ER2738菌を除去する目的で、上清を新しいチューブに回収した。回収ファージ溶液に3.6mL (1/5量) のPEG/NaCl (20% Polyethylene glycol 6,000、2.5M NaCl) 溶液を添加し、ミキサーでよく攪拌して、4℃、16時間、

インキュベートして、ファージを沈殿させた。沈殿したファージを回収するために、高速冷却遠心機で4℃、10分、8,900×gで遠心して、上清を除去した。上清を完全除去する目的で、もう一度遠心し、上清を除去した。沈殿ファージに、氷冷TBS 1 mLを加え、懸濁し、マイクロチューブに移した。ファージ懸濁液を、高速冷却遠心機を用いて、4℃、5分、16,000×gで遠心した。上清を別のチューブに回収し、懸濁されない残渣を取り除き、回収溶液に、200 μLのPEG/NaClを加えて、ミキサーで攪拌した。上記溶液を氷上、1時間、インキュベートしファージを沈殿させた。溶液を高速冷却遠心機で4℃、10分、16,000×g遠心してファージを沈殿させ上清を除去した。この遠心工程を再び行い、上清を完全に除去した。得られたファージ沈殿に、200 μLの0.02% NaN₃ (Wako) / TBSを加え、完全に懸濁させ、高速冷却遠心機で、4℃、5分、16,000×g、遠心し、上清を回収することで懸濁されなかった残渣を除去した。回収ファージ濃縮液の力価を測定した。

[0047] 3. パニング実験-ラウンド2、3

濃縮ファージ溶液を用いて、2、及び3回目のパニング実験を実施した。2回目のパニング実験において、1回目の操作と異なる点は添加ファージ量を 2×10^{11} PFU/well、洗浄液を0.3% TBST (0.3% Tween 20 / TBS) にしたことである。3回目のパニング実験では、1回目の操作と異なる点は添加ファージ量を 2×10^{11} PFU/well、洗浄液を0.5% TBST (0.5% Tween 20 / TBS) にしたことである。

[0048] 4. 力価測定

LB 3 mL内でER2738菌を対数増殖期 (OD600 ; ~0.5) となるまで培養し、ER2738培養液200 μLに、必要濃度となるよう希釈したファージ液を10 μL添加した。この混合溶液をミキサーでよく攪拌し、室温、5分間インキュベートした後、溶解したトッパガー溶液4 mLと混合させ、LB / IPTG / Xgalプレート上に播種した。

ファージ感染大腸菌播種プレートを37℃、16時間、インキュベートし

た後、得られた青色プラークの数をカウントした。ファージ希釈倍率を用いて、ファージ数を算出した（カウントプラーク数×希釈倍率／10 μL）。

[0049] [結果]

ファージライブラリーを用いた実験のインプット力価（標的分子に加えたファージ力価）とアウトプット力価（洗浄後の標的分子から溶出されたファージ力価）の比の値の変化について、D12ライブラリーの結果を図1に、C7Cライブラリーの結果を図2に示す。

D12ライブラリーを利用した、rhEGFR標的パニング実験を3ラウンドまで進めた結果、アウトプット力価／インプット力価比を比較したところ、3ラウンドは2ラウンドの130倍程度の増加が観察された。したがって、rhEGFR特異結合性を示すファージがセレクションされたことが予想された。

C7Cライブラリーを利用した、rhEGFR標的パニング実験も3ラウンドまで進めたが、アウトプット力価／インプット力価比の増加は観察されなかった。

[0050] 実施例2（シーケンス解析）

[手順]

D12ライブラリーを用いたパニング実験の3ラウンドで得られたファージを、常法（Phage Display A Laboratory Manual, Cole Spring Harbor Laboratory Press, 2001）に従いクローン化し、ファージの提示ペプチド部分の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、提示ペプチド領域から96残基下流に位置する塩基配列の相補鎖に相当するプライマー〔−96 g l l l シーケンシングプライマー（5′ −^HCCCTCATAGTTAGCGTAACG − 3′）（配列番号1）、S1259A、NEB〕を用いて、ダイデオキシターミネイト法により決定した。反応産物の泳動とデータ解析には、キャピラリーシーケンサーを用いた。

[0051] [結果]

決定した塩基配列から予想される提示ペプチド配列を図3に示す。

この中で、得られた1-1010ファージの提示するペプチド配列（配列番号2）は、3ラウンドで調べた15個のクローンの中に同じ配列を持つクローンが6個であった（40%）。また、1-1012ファージ（配列番号4）と1-1015ファージ（配列番号7）は2クローンが得られた（13.3%）。1-1011ファージ（配列番号3）、1-1013ファージ（配列番号5）、1-1014ファージ（配列番号6）、1-1016ファージ（配列番号8）、1-1017ファージ（配列番号9）は各1クローンしか得られなかった。

したがって、パニングの回数が進むにつれ、1-1010ファージ、1-1012ファージ、及び1-1015ファージがセレクションされていることが明らかとなった。特定のファージクローンがセレクションされている理由として、そのファージクローンが標的分子に対し強い結合性を示していることが挙げられる。

[0052] 実施例3（ファージ結合性試験（タンパク固相化条件-1））

[手順]

標的タンパクであるrhEGFRとrhEGFRに標識されたFc部位であるrhIgG₁、標準タンパクとしてBSAを1 μ g/wellになるように96ウェルマイクロプレートに添加し、4℃で一晩放置することで固相化した。タンパク溶液を除去し、Blocking bufferを300 μ l添加し、37℃で1時間インキュベートすることでウェルをブロッキングした。Blocking bufferを除去後、洗浄液0.5%TBST 200 μ lでウェルを3回洗浄し、最後に0.5%TBSTを100 μ l添加した。上記ウェルに増幅ファージ液（1-1010、1-1012、1-1015ファージ、及びM13KE（ペプチド非提示ファージ））を1 $\times$ 10¹⁰PFUになるように添加し、ピペティングにより混合した。反応は、室温で1時間、穏やかに振とうさせた。反応液を除去し、0.5%TBST 200 μ lでウェルを10回洗浄後、0.2M Glycine-HCl

(pH 2.2) をウェルに 100 μ l 添加し、ピペティングで攪拌した後、室温下で 10 分間穏やかに振とうさせた。溶出液をウェルからマイクロチューブへ回収し、1M Tris-HCl (pH 9.1) を 15 μ l 添加することで中和し、標的結合ファージ液を得た。回収したファージの結合能は、力価測定により行った。

[0053] [結果]

I-1010、I-1012、I-1015 を用いた固相化法による結合性試験のインプット力価／アウトプット力価比を図 4 に示す。

I-1010 ファージの rhEGFR への結合性は、Fc 部である rhIgG₁ より 1665 倍高く、標準タンパクである BSA よりも 3809 倍高いことが明らかとなった。

I-1012 ファージの rhEGFR への結合性は、Fc 部である rhIgG₁ より 3420 倍高く、標準タンパクである BSA よりも 3095 倍高いことが明らかとなった。

I-1015 ファージの rhEGFR の結合性は、Fc 部である rhIgG₁ より 19018 倍高く、標準タンパクである BSA よりも 13964 倍高いことが明らかとなった。

M13KE ファージでは、固相化したタンパク間に結合性の差は見られず、どれも低い値であった。

[0054] 図 4 の結果から I-1010、I-1012、及び I-1015 ファージは、タンパク固相化条件において rhEGFR に特異的に結合することが明らかとなった。

また、I-1010 ファージと M13KE ファージの rhEGFR への結合性を比較すると、I-1010 ファージの方が 52235 倍高い事が明らかとなった。また、M13KE ファージと比較して rhEGFR に対する結合は I-1012 ファージでは 16301 倍、I-1015 ファージでは 86592 倍高かった。この結果より、I-1010、I-1012、及び I-1015 ファージの提示するペプチド配列が rhEGFR との結合に関与

していることが示された。

[0055] 実施例4（ファージ結合性試験（タンパク固相化条件-2））

[手順]

標的タンパクである rhEGFR、EGFRと同じ ErbBファミリーに属するHER2タンパクとして Recombinant human ErbB2（rhErbB2、PROSPEC）、細胞外タンパクの1つである IGF-1Rタンパクとして Recombinant human IGF-1R, CF（rhIGF-1R、R&D Systems）を $1\mu\text{g}/\text{well}$ になるように96ウェルマイクロプレートに添加し、4℃で一晩放置することで固相化した。タンパク溶液を除去し、Blocking bufferを $300\mu\text{l}$ 添加し、37℃で1時間インキュベートすることでウェルをブロッキングした。Blocking bufferを除去後、洗浄液 0.5%TBST $200\mu\text{l}$ でウェルを3回洗浄し、最後に0.5%TBSTを $100\mu\text{l}$ 添加した。上記ウェルに増幅ファージ液（I-1010、I-1012、I-1015ファージ、及びM13KE（ペプチド非提示ファージ））を $1\times 10^{10}\text{PFU}$ になるように添加し、ピペティングにより混合した。反応は、室温で1時間、穏やかに振とうさせた。反応液を除去し、0.5%TBST $200\mu\text{l}$ でウェルを10回洗浄後、0.2M Glycine-HCl（pH2.2）をウェルに $100\mu\text{l}$ 添加し、ピペティングで攪拌した後、室温下で10分間穏やかに振とうさせた。溶出液をウェルからマイクロチューブへ回収し、1M Tris-HCl（pH9.1）を $15\mu\text{l}$ 添加することで中和し、標的結合ファージ液を得た。回収したファージの結合能は、力価測定により行った。

[0056] [結果]

I-1010、I-1012、及びI-1015ファージを用いた固相化法による結合性試験のインプット力価／アウトプット力価比を図5に示す。比較としてのM13KEファージの結果も図5に示す。

I-1010ファージの rhEGFR への結合性は、 rhErbB2 より

1764倍高く、rhIGF-1Rよりも2827倍高いことが明らかとなった。

I-1012ファージのrhEGFRへの結合性は、rhErB2より1581倍高く、rhIGF-1Rよりも4345倍高いことが明らかとなった。

I-1015ファージのrhEGFRへの結合性は、rhErB2より4745倍高く、rhIGF-1Rよりも7708倍高いことが明らかとなった。

M13KEファージでは、固相化したタンパク間に結合性の差は見られず、どれも低い値であった。

[0057] 図5の結果からI-1010、I-1012、及びI-1015ファージは、タンパク固相化条件においてrhEGFRに特異的に結合することが明らかとなった。

また、I-1010ファージとM13KEファージのrhEGFRへの結合性を比較すると、I-1010ファージの方が34439倍高い事が明らかとなった。また、M13KEファージと比較してrhEGFRに対する結合はI-1012ファージでは13934倍、I-1015ファージは30806倍高かった。この結果より、I-1010、I-1012、及びI-1015ファージの提示するペプチド配列がrhEGFRとの結合に関与していることが示された。

[0058] 実施例5（競合試験）

[手順]

標的タンパクrhEGFRを1 μ g/wellになるように96ウェルマイクロプレートに添加し、4℃で一晩放置することで固相化した。タンパク溶液を除去し、Blocking bufferを300 μ l添加し、37℃で1時間インキュベートすることでウェルをブロッキングした。Blocking bufferを除去後、洗浄液0.5%TBST 200 μ lでウェルを3回洗浄し、最後に0.5%TBSTを100 μ l添加した。上記

ウェルに I-1010 増幅ファージ液を 1×10^{10} PFU になるように添加し、次に、I-1010 ファージ提示ペプチド（配列番号 2）を人工的に合成した合成ペプチド P e p 0 5 5（純度 89%，HPLC グレード，北海道システムサイエンス）を各濃度に、r h E G F R との結合には無関係な合成ペプチド P e p 0 1 8（GAASRTYLHELI：配列番号 10）（純度 90%＜，HPLC グレード，A n y G e n，K o r e a）を各濃度になるように添加し、ピペティングで混合した。どちらも添加せず、I-1010 ファージのみの反応をコントロールとした。I-1010 ファージペプチド同様に、I-101012 ファージ提示ペプチドの合成ペプチド（配列番号 4）P e p 0 5 6（純度 86.7%，HPLC グレード，北海道システムサイエンス）、I-101015 ファージ提示ペプチドの合成ペプチド（配列番号 7）P e p 0 5 7（純度 83.7%＜，HPLC グレード，北海道システムサイエンス）も用いた。反応は、室温で 1 時間、穏やかに振とうさせた。反応液を除去し、0.5% T B S T 200 μ l でウェルを 10 回洗浄した。その後、0.2 M G l y c i n e - H C l（pH 2.2）をウェルに 100 μ l 添加し、ピペティングで攪拌した後、室温下で 10 分間穏やかに振とうさせた。溶出液をウェルからマイクロチューブへ回収し、1 M T r i s - H C l（pH 9.1）を 15 μ l 添加することで中和し、標的結合ファージ液を得た。回収したファージの結合能は、力価測定により行った。

[0059] [結果]

I-1010 ファージと P e p 0 5 5 の競合試験のインプット力価／アウトプット力価比の値の変化、及び I-1010 ファージと P e p 0 1 8 の結果を図 6 に示す。

図 6 からわかるように、I-1010 ファージのインプット力価／アウトプット力価比が P e p 0 5 5 を 1 μ M 添加したときを境に右肩下がりに落ちており、I-1010 ファージの r h E G F R への結合を濃度依存的に阻害していることが明らかとなった。しかし、P e p 0 1 8 を添加した場合の I-1010 ファージのインプット力価／アウトプット力価比は、P e p 0 1

8を100 μ Mの濃度で添加しても高い値を保っている。

Pep018は、I-1010ファージとEGFRの結合に全く関与しないため高濃度でもI-1010ファージのインプット力価／アウトプット力価比の低下が見られなかったが、I-1010ファージの提示するペプチド配列を持つ合成ペプチドPep055は、濃度依存的にI-1010ファージとEGFRの結合を阻害していることが明らかとなった。この結果から、I-1010ファージの提示するペプチドはペプチド単体であっても、I-1010ファージがrhEGFRに結合するのと同じ部位に結合していると考えられる。

[0060] 同様に、図7、図8で示される結果より、I-1012、及びI-1015ファージが提示するペプチド配列を持つ合成ペプチドPep056、及びPep057も各ファージのEGFRとの結合を阻害していることが明らかとなった。したがって、I-1012、及びI-1015ファージの提示するペプチドはペプチド単体であっても、各ファージがEGFRに結合するのと同じ部位に結合していると考えられる。

[0061] 実施例6（アラニン置換ファージ作製）

[手順]

1. 部位特異的変異誘発

KOD-Plus-Mutagenesis kit (SMK-101、TOYOBO) を用いて、M13KEファージのペプチド提示部分のアミノ酸をアラニンに置換したファージの作製を行った。提示ペプチド配列のヌクレオチド配列に所望の変異を含むオリゴヌクレオチドプライマーを受託合成した（日本遺伝子研究所）。合成プライマーは、HPLCにて精製した、脱塩オリゴヌクレオチドである。今回合成したプライマーは、長さ18～34bpであり、GC含量が50～60%となるよう設計した。今回使用したKOD-Plus-Mutagenesis Kitでは、PCR産物のセルフライゲーションと同時にリン酸化を行うことができるので、プライマーのリン酸化はしていない。鋳型プラスミドDNAはI-1010、I-101

2、及び1-1015ファージ感染ER2738菌より、QIAGEN Plasmid kit (QIAGEN) を用いて精製した。

鋳型プラスミドDNA、プライマー、dNTPs、KOD-plusを用いて、[94℃、2分] → {[98℃、10秒] → [68℃、7.5分]} × 8サイクル → [4℃、Hold] 条件でPCRを実施した。PCR反応はサーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice、TAKARA) を利用した。PCR反応条件は増幅サイズを基に設定した。

DpnI処理により鋳型プラスミドの消化を行ない、T4 Polynucleotide Kinase処理によりPCR産物のセルフライゲーションを行った。

[0062] 2. 形質転換

XL-1 Blueコンピテント細胞を氷上で溶解した。60 μLのXL-1 Blueコンピテント細胞に対し、Self-ligation処理済み溶液を15 μL添加し、混合した。氷上、30分間、インキュベートした後、42℃、90秒間、ヒートブロック上でインキュベートし、氷上で2分間、インキュベートした。15 mLコニカルチューブ内で、ER2738菌のO/Nカルチャー100 μLに、上記XL-1 Blue菌を1 μL添加し、混合した。15 mLコニカルチューブ内に、XL-1 Blue菌を74 μL入れた。上記それぞれのサンプルに、トップアガーを4 mL添加し、ボルテックスで混合した。上記大腸菌サンプルをLB/IPTG/Xgalプレート上に播種し、37℃、16時間、インキュベートした。

[0063] 3. 変異体のシーケンス解析

得られたLB/IPTG/Xgalプレート上の青プラークを、常法に (Phage Display A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) に従いクローン化し、ファージの提示ペプチド部分の塩基配列を決定した。

[0064] [結果]

I-1010ファージについては、図9に示す配列番号11～21のアラニン置換ファージを得た。

同様に、I-1012ファージについては図10に示す配列番号22～33のアラニン置換ファージ、I-1015ファージについては図11に示す配列番号34～45のアラニン置換ファージを得た。

[0065] 実施例7（アラニン置換ファージの結合性試験）

[手順]

標的タンパク rhEGFRを $1\mu\text{g}/\text{well}$ になるように96ウェルマイクロプレートに添加し、 4°C で一晩放置することで固相化した。タンパク溶液を除去し、Blocking bufferを $300\mu\text{l}$ 添加し、 37°C で1時間インキュベートすることでウェルをブロッキングした。Blocking bufferを除去後、洗浄液0.5%TBST $200\mu\text{l}$ でウェルを3回洗浄し、最後に0.5%TBSTを $100\mu\text{l}$ 添加した。上記ウェルに増幅ファージ液（I-1010、I-1012、及びI-1015ファージ又は実施例6で作製したアラニン置換ファージ）を $1\times 10^{10}\text{PFU}$ になるように添加し、ピペッティングにより混合した。反応は、室温で1時間、穏やかに振とうさせた。反応液を除去し、0.5%TBST $200\mu\text{l}$ でウェルを10回洗浄した後、0.2M Glycine-HCl (pH 2.2) をウェルに $100\mu\text{l}$ 添加し、ピペッティングで攪拌した後、室温下で10分穏やかに振とうさせた。溶出液をウェルからマイクロチューブへ回収し、1M Tris-HCl (pH 9.1) を $15\mu\text{l}$ 添加することで中和し、標的結合ファージ液を得た。回収したファージの結合能は、力価測定により行った。

[0066] [結果]

アラニン置換ファージの結合性試験のインプット力価／アウトプット力価比の値の変化をI-1010ファージについては図12に、I-1012ファージについては図13に、I-1015ファージについては図14に示す

。

図12から分かるように、I-1010ファージに比べ結合性が低下したファージは7種存在し、1、7、11番目のW (Trp)、2、12番目のH (His)、3番目のL (Leu)、5番目のD (Asp)をアラニン (Ala)に置換したファージである。

特に、I-1010ファージが提示しているペプチドの1、7番目のW (Trp)、2番目のH (His)、3番目のL (Leu)をアラニン (Ala)で置換したファージの結合性が顕著に低下した。

上記結果より、I-1010ファージとEGFRとの結合に寄与すると考えられるアミノ酸は、1、7、11番目のW、2、12番目のH、3番目のL、5番目のDであることが明らかとなった。

その中でも、特にrhEGFRとの結合に関与していると考えられるアミノ酸は、1、7番目のW、2番目のH、3番目のLであった。

[0067] 次に、図13よりI-1012ファージに比べ結合性が低下したファージは5種存在し、1番目のF (Phe)、2番目のH (His)、3番目のD (Asp)、4番目のW (Trp)、6番目のP (Pro)をアラニンに置換したファージである。したがって、I-1012ファージとrhEGFRとの結合に寄与すると考えられるアミノ酸は、1番目のF、2番目のH、3番目のD、4番目のW、6番目のPであることが明らかとなった。

その中でも、特にrhEGFRとの結合に関与していると考えられるアミノ酸は、1番目のF、2番目のH、4番目のWであった。

[0068] また、図14よりI-1015ファージに比べ結合性が低下したファージは5種存在し、1番目のL (Leu)、2番目のH (His)、4番目のS (Ser)、6番目のW (Trp)、7番目のM (Met)をアラニンに置換したファージである。特に、I-1015ファージが提示しているペプチドの4番目のS、6番目のWをアラニンで置換したファージの結合性が顕著に低下した。

上記結果より、I-1015ファージとrhEGFRとの結合に寄与する

と考えられるアミノ酸は、1番目のL、2番目のH、4番目のS、6番目のW、7番目のMであることが明らかとなった。

その中でも、特にrhEGFRとの結合に関与していると考えられるアミノ酸は、4番目のS、6番目のWであった。

[0069] 実施例8（アミノ酸置換ファージ作製）

〔作業手順〕

実施例6と同様の手順により、M13KEファージのペプチド提示部分のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したミュータントファージの作製を行った。以下、アラニンスキャンの作業手順を参照とする。

[0070] 〔結果〕

図15に示すペプチドを提示したI-1010アミノ酸置換ファージ（配列番号46～53）を得た。

[0071] 実施例9（アミノ酸置換ファージの結合性試験）

〔手順〕

標的タンパクrhEGFRを $1\mu\text{g}/\text{well}$ になるように96ウェルマイクロプレートに添加し、 4°C で一晩放置することで固相化した。タンパク溶液を除去し、Blocking buffer ($5\text{mg}/\text{mL}$ BSA/TBS)を $300\mu\text{l}$ 添加し、 37°C で1時間インキュベートすることでウェルをブロッキングした。Blocking bufferを除去後、洗浄液 $0.5\%\text{TBST}$ ($0.5\%\text{Tween } 20/\text{TBS}$) $200\mu\text{l}$ でウェルを3回洗浄し、最後に $0.5\%\text{TBST}$ を $100\mu\text{l}$ 添加した。上記ウェルに増幅ファージ液を $1\times 10^{10}\text{PFU}$ になるように添加し、ピペッティングにより混合した。反応は、室温で1時間、穏やかに振とうさせた。反応液を除去し、 $0.5\%\text{TBST}$ $200\mu\text{l}$ でウェルを10回洗浄した後、 0.2M Glycine-HCl ($\text{pH } 2.2$)をウェルに $100\mu\text{l}$ 添加し、ピペッティングで攪拌した後、室温下で10分穏やかに振とうさせた。溶出液をウェルからマイクロチューブへ回収し、 1M Tris-HCl ($\text{pH } 9.1$)を $15\mu\text{l}$ 添加することで中和し、標的結合ファージ液を得た。

回収したファージの結合能は、力価測定により行った。

[0072] [結果]

アミノ酸 1 個置換ファージの結果

アミノ酸 1 個置換ファージの結合性試験のインプット力価とアウトプット力価の比の値の変化を図 1 6 に示す。

I-1010 ファージの結合性に比べ等倍から 1/10 倍程度の結合性を示すファージは、1 番目の W を F に、3 番目の L を M (Met)、I (Ile)、V (Val)、7 番目の W を F、Y (Tyr) に置換した場合 (配列番号 46~51) の 6 種類存在した。

[0073] アミノ酸 2 個置換ファージの結果

図 1 2 のアラニン置換ファージの結合性および、図 1 6 のアミノ酸 1 個置換ファージの結合性試験の結果から、I-1010 ファージの結合性と比較して変化の低かったアミノ酸残基について、2 か所同時に置換を実施した。

アミノ酸 2 個置換ファージの結合性試験のインプット力価とアウトプット力価の比の値の変化を図 1 7 に示す。

今回実施したアミノ酸 2 個置換ファージは、1 番目の W を F に 8 番目の Q を A に置換したファージ (W1F/Q8A、配列番号 52) と、3 番目の L を M に 8 番目の Q を A に置換したファージ (L3M/Q8A、配列番号 53) であるが、いずれも I-1010 ファージの結合性と比較して等倍から 1/10 倍の結合性を示す結果であった。

[0074] 実施例 10 (ウェスタンブロット)

ヒト類表皮癌由来 A-431 細胞 (DS ファーマバイオメディカル) とヒト乳腺癌由来 MCF7 細胞 (DS ファーマバイオメディカル) を用いて、ウェスタンブロット法により EGFR 発現量を評価した。

その結果、各細胞の EGFR 発現量をウェスタンブロットで評価した結果、A-431 細胞で高発現していることが明らかとなった (図 1 8)。

[0075] 実施例 11 (結合性試験 (in vitro))

実施例 10 より、EGFR タンパクの発現が認められた A-431 細胞株

を標的として、I-1010ファージの結合性試験を実施した。

[0076] [手順]

6ウェル培養プレートにA-431細胞を 40×10^4 cells/wellで播種し、37℃、5%CO₂条件で一晩培養した。プレートを4℃で30分間インキュベートした後、各ウェルの培地を除去し、1%BSA/PBS 1 mLで2回洗浄処理を行った。I-1010ファージとM13KEファージを力価 1×10^{10} PFUとなるように10%FBS培地（増殖培地）1 mLに希釈し、各ウェルに添加し、4℃で60分間インキュベートした。反応後、反応液を除去し、1%BSA/PBS 1 mLで10回洗浄処理を行い、非結合のファージを除去した。0.05%トリプシン/0.53 mM EDTA溶液を100 μ l添加し、37℃で10分程度インキュベートし、増殖培地を900 μ l添加し、回収ファージ液とした。各回収ファージ液の力価を測定した。

[0077] [結果]

図19に回収細胞数を考慮した各ファージのインプット力価とアウトプット力価の比を示す。I-1010ファージの力価比はM13KEファージと比較して45倍高かった。

以上の結果より、I-1010ファージは遺伝子組み換えEGFRタンパクだけでなく、細胞が発現するEGFRに対しても結合性を示した。

[0078] 実施例12 (In vitroイメージング)

[手順]

ガラスボトムディッシュにA-431細胞を 20×10^4 Cells/Dish、MCF7細胞は 75×10^4 Cells/Dish になるように播種し、37℃、CO₂条件下で24時間培養した。各種細胞を明示した時間培養後にEGFを100 ng/mLとなるよう添加し、6日間培養した。その後、ディッシュの培養液を除去し、37℃の増殖培地1000 μ Lで10回洗浄した。ペプチドのN末端にアミノカプロン酸リンカーを連結させて、連結されたリンカーの反対側にFITCを標識したペプチド (Pe p 055-F

、P e p 0 3 2 - F (Y L P L W R L S E S H M (E G F R と の 結 合 に 無 関 係 の ペ プ チ ド) : 配 列 番 号 5 4)) (純 度 8 0 . 6 % , H P L C グ レード , A n y G e n , K o r e a) を 増 殖 培 地 で 1 0 0 μ M に 調 製 し , 1 m L 添 加 し て 3 7 $^{\circ}$ C で 1 時 間 イ ン キ ュ ベー ト し た 。 染 色 液 を 除 去 し , 3 7 $^{\circ}$ C の 増 殖 培 地 1 m L で 3 回 洗 浄 し , 最 後 に 培 地 を 1 m L 添 加 し た 。 観 察 は , 共 焦 点 顕 微 鏡 (L e i c a S P 2) を 用 い , 励 起 光 の レー ザー 波 長 は 4 8 8 n m を 照 射 し 蛍 光 観 察 を 行 っ た 。

[0079] [結果]

図 2 0 に 共 焦 点 顕 微 鏡 で 観 察 し た , P e p 0 5 5 - F の A - 4 3 1 細 胞 の 染 色 性 を 示 す 。 A - 4 3 1 細 胞 の 細 胞 質 が 染 色 さ れ て い る こ と が 観 察 さ れ た 。 核 は 染 色 さ れ て い な い 。

図 2 1 に 共 焦 点 顕 微 鏡 で 観 察 し た , P e p 0 3 2 - F の A - 4 3 1 細 胞 の 染 色 性 を 示 す 。 コ ン ト ロール ペ プ チ ド は A - 4 3 1 細 胞 を ほ と ん ど 染 色 し て い な い 。

図 2 2 に 共 焦 点 顕 微 鏡 で 観 察 し た , P e p 0 5 5 - F の M C F 7 細 胞 の 染 色 性 、 及 び 、 図 2 3 に 共 焦 点 顕 微 鏡 で 観 察 し た , P e p 0 3 2 - F の M C F 7 細 胞 の 染 色 性 を 示 す 。

両 ペ プ チ ド と も に , M C F 7 細 胞 を ほ と ん ど 染 色 し な か っ た 。

上 記 結 果 よ り , A - 4 3 1 細 胞 で 見 ら れ た P e p 0 5 5 - F に よ る ド ッ ト 状 の 染 色 は , A - 4 3 1 細 胞 が 発 現 す る E G F R に よ る も の で あ る と 考 え ら れ , P e p 0 5 5 - F は 細 胞 が 発 現 す る E G F R に 結 合 し て い る と 考 え ら れ る 。

[0080] 実施例 1 3 (R e c o m b i n a n t h u m a n E G F と I - 1 0 1 0 フ ァー ジ の 競 合 試 験)

[手順]

標 的 タ ン パ ク r h E G F R を 1 μ g / w e l l に な る よ う に 9 6 ウ ェ ル マ イ ク ロ プ レー ト に 添 加 し , 4 $^{\circ}$ C で 一 晩 放 置 す る こ と で 固 相 化 し た 。 タ ン パ ク 溶 液 を 除 去 し , B l o c k i n g b u f f e r を 3 0 0 μ l 添 加 し , 3 7

℃で1時間インキュベートすることでウェルをブロッキングした。Blocking bufferを除去後、洗浄液0.5%TBST 200 μ lでウェルを3回洗浄した。0.5%TBSTで各濃度に希釈したEGFRのリガンドタンパクであるRecombinant human EGF (rhEGF、Invitrogen)を100 μ l添加し、室温で1時間穏やかに振とうさせた。上記ウェルにI-1010ファージ増幅液を 1×10^{10} PFUになるように添加し、ピペッティングにより混合した。反応は、室温で15分間穏やかに振とうさせた。反応液を除去し、0.5%TBST 200 μ lでウェルを10回洗浄した後、0.2M Glycine-HCl (pH 2.2)をウェルに100 μ l添加し、ピペッティングで攪拌した後、室温下で10分間穏やかに振とうさせた。溶出液をウェルからマイクロチューブへ回収し、1M Tris-HCl (pH 9.1)を15 μ l添加することで中和し、標的結合ファージ液を得た。回収したファージの結合能は、力価測定により行った。

[0081] [結果]

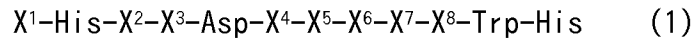
rhEGFとI-1010ファージの競合試験のインプット力価／アウトプット力価比の値の変化を図24に示す。

rhEGFを添加した場合、添加濃度が増加するにつれ、I-1010ファージのrhEGFRへの結合性が減少した。

上記結果より、I-1010ファージの結合性がrhEGFの添加濃度依存的に減少していることから、rhEGFがI-1010ファージのrhEGFRへの結合を阻害している事が明らかとなった。つまり、I-1010ファージはEGFのEGFRへの結合を阻害できると考えられ、I-1010ファージの提示するペプチドはEGFの阻害剤になりうる。

請求の範囲

[請求項1] 少なくとも下記式（１）、（２）又は（３）で表されるアミノ酸配列を有するアミノ酸数１２～５０のペプチド。



（式（１）中、 X^1 はTrp又はPheを示し、

X^2 はLeu、Met、Ile又はValを示し、

X^3 はSer、Ala、Thr、Gly、Asn、Asp、Glu、Arg又はLysを示し、

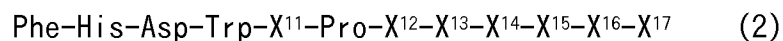
X^4 はLeu、Met、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Trp、His又はCysを示し、

X^5 はTrp、Phe又はTyrを示し、

X^6 はGln、Asn、Asp、Glu、Ala、Ser、Thr、Leu、Met、Lys又はArgを示し、

X^7 はAsn、Gln、Asp、Glu、Ser、Thr、Ala、Gly、Lys又はArgを示し、

X^8 はAla、Gly、Ser、Thr、Asn、Val又はCysを示す。）



（式（２）中、 X^{11} はLeu、Met、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Trp、His又はCysを示し、

X^{12} はGlu、Asp、Gln、Asn、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示し、

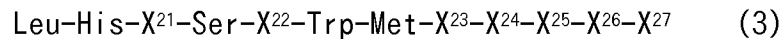
X^{13} はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Thr、Cys又はAsnを示し、

X^{14} はSer、Ala、Thr、Gly、Asn、Asp、Glu、Arg又はLysを示し、

X^{15} はPro、Val、Ile、Lys、Ala、Met、Trp、Tyr、Ser、Thr、Cys又はPheを示し、

X^{16} はPro、Val、Ile、Lys、Ala、Met、Trp、Tyr、Ser、Thr、Cys又はPheを示し、

X^{17} はAsp、Glu、Asn、Gln、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示す。）



(式(3)中、 X^{21} はGln、Asn、Asp、Glu、Ala、Ser、Thr、Leu、Met、Lys又はArgを示し、

X^{22} はGlu、Asp、Gln、Asn、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示し、

X^{23} はTyr、Phe、Trp、His、Leu、Met、Ile、Val、Cys又はAlaを示し、

X^{24} はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Thr、Cys又はAsnを示し、

X^{25} はAsp、Glu、Asn、Gln、Ala、Ser、Thr、Lys、Arg又はHisを示し、

X^{26} はIle、Val、Leu、Met、Ala、Phe、Tyr、Trp又はGlyを示し、

X^{27} はHis、Tyr、Phe、Lys、Arg、Leu、Met又はAlaを示す。)

[請求項2] 式(1)中、 X^1 がTrp又はPheであり、 X^2 がLeu、Met、Ile又はValであり、 X^3 がSer、Ala、Thr、Gly又はAsnであり、 X^4 がLeu、Met、Ile、Val又はAlaであり、 X^5 がTrp又はPheであり、 X^6 がGln、Asn又はAlaであり、 X^7 がAsn、Gln又はAlaであり、 X^8 がAla、Gly、Ser又はThrである請求項1記載のペプチド。

[請求項3] 式(1)中、 X^1 がTrp又はPheであり、 X^2 がLeu、Met、Ile又はValであり、 X^3 がSer又はAlaであり、 X^4 がLeu又はAlaであり、 X^5 がTrpであり、 X^6 がGln又はAlaであり、 X^7 がAsn又はAlaであり、 X^8 がAlaである請求項1記載のペプチド。

[請求項4] 式(2)中、 X^{11} がLeu、Met、Ile、Val又はAlaであり、 X^{12} がGlu、Asp、Gln、Asn又はAlaであり、 X^{13} がVal、Ala、Leu又はIleであり、 X^{14} がSer、Ala、Thr、Gly又はAsnであり、 X^{15} がPro、Val、Ile又はAlaであり、 X^{16} がPro、Val、Ile又はAlaであり、 X^{17} がAsp、Glu、Asn、Gln又はAlaである請求項1記載のペプチド。

[請求項5] 式(2)中、 X^{11} がLeu又はAlaであり、 X^{12} がGlu又はAlaであり、 X^{13} がVal又はAlaであり、 X^{14} がSer又はAlaであり、 X^{15} がPro又はAlaであ

り、X¹⁶がPro又はAlaであり、X¹⁷がAsp又はAlaである請求項1記載のペプチド。

[請求項6] 式(3)中、X²¹がGln、Asn又はAlaであり、X²²がGlu、Asp、Gln又はAlaであり、X²³がTyr、Phe、Trp、His又はAlaであり、X²⁴がVal、Ala、Leu又はIleであり、X²⁵がAsp、Glu、Asn、Gln又はAlaであり、X²⁶がIle、Val、Leu、Met又はAlaであり、X²⁷がHis、Tyr、Phe、Lys、Arg又はAlaである請求項1記載のペプチド。

[請求項7] 式(3)中、X²¹がGln又はAlaであり、X²²がGlu又はAlaであり、X²³がTyr又はAlaであり、X²⁴がVal又はAlaであり、X²⁵がAsp又はAlaであり、X²⁶がIle又はAlaであり、X²⁷がHis又はAlaである請求項1記載のペプチド。

[請求項8] アミノ酸数の上限が30である請求項1～7のいずれかに記載のペプチド。

[請求項9] EGF R結合性を有する請求項1～8のいずれかに記載のペプチド。

[請求項10] 請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を含有する医薬。

[請求項11] 請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を含有する癌細胞又は癌組織検出薬。

[請求項12] 請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を含有する癌診断薬。

[請求項13] 請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を含有する癌治療薬。

[請求項14] 癌細胞又は癌組織を検出するための請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体。

[請求項15] 癌診断又は癌治療のための請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体。

[請求項16] 癌細胞又は癌組織検出薬製造のための、請求項1～9のいずれかに

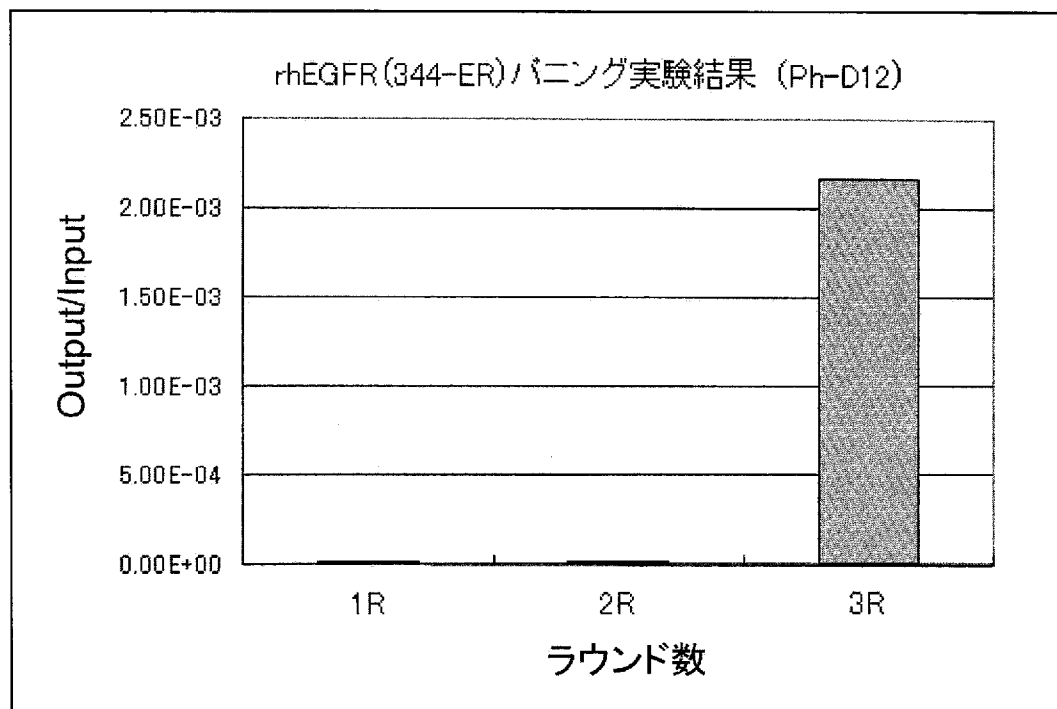
記載のペプチド又はその標識体の使用。

[請求項17] 癌診断薬又は癌治療薬製造のための、請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体の使用。

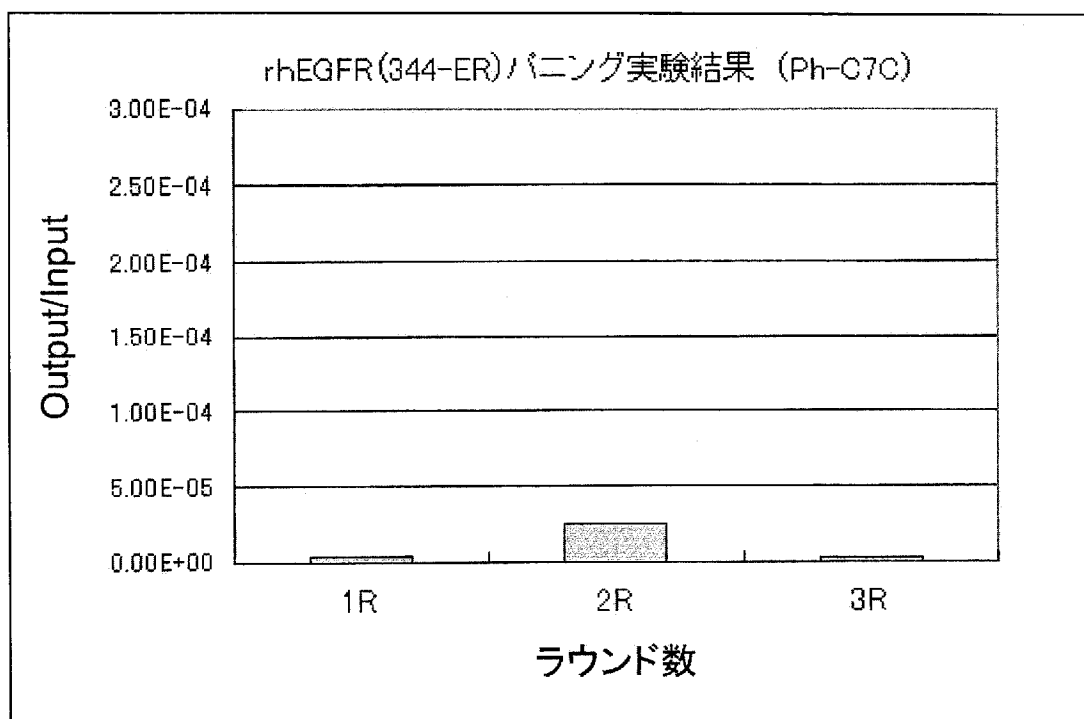
[請求項18] 請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を使用することを特徴とする癌細胞又は癌組織の検出方法。

[請求項19] 請求項1～9のいずれかに記載のペプチド又はその標識体を使用することを特徴とする癌の診断又は治療方法。

[図1]



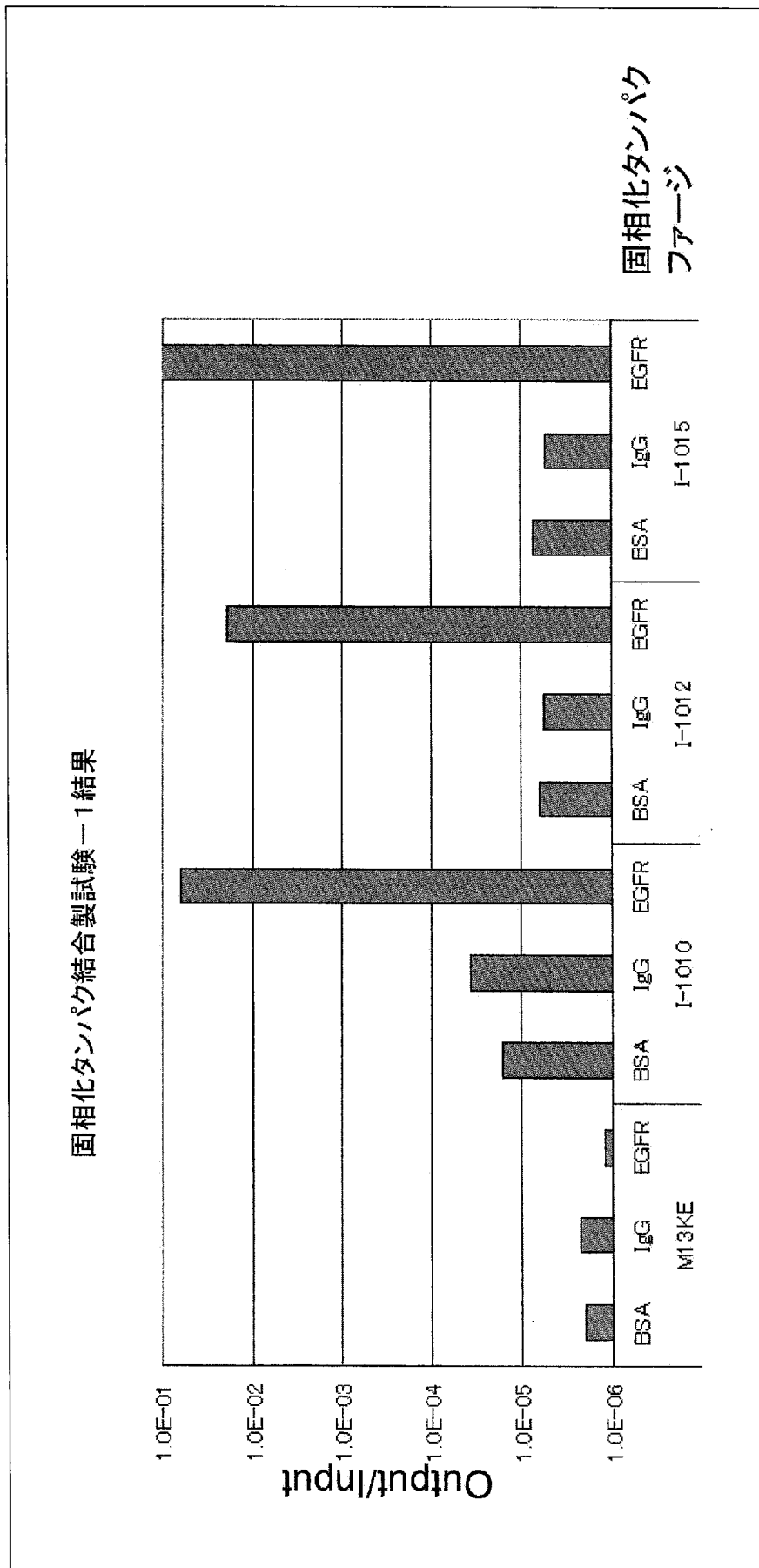
[図2]



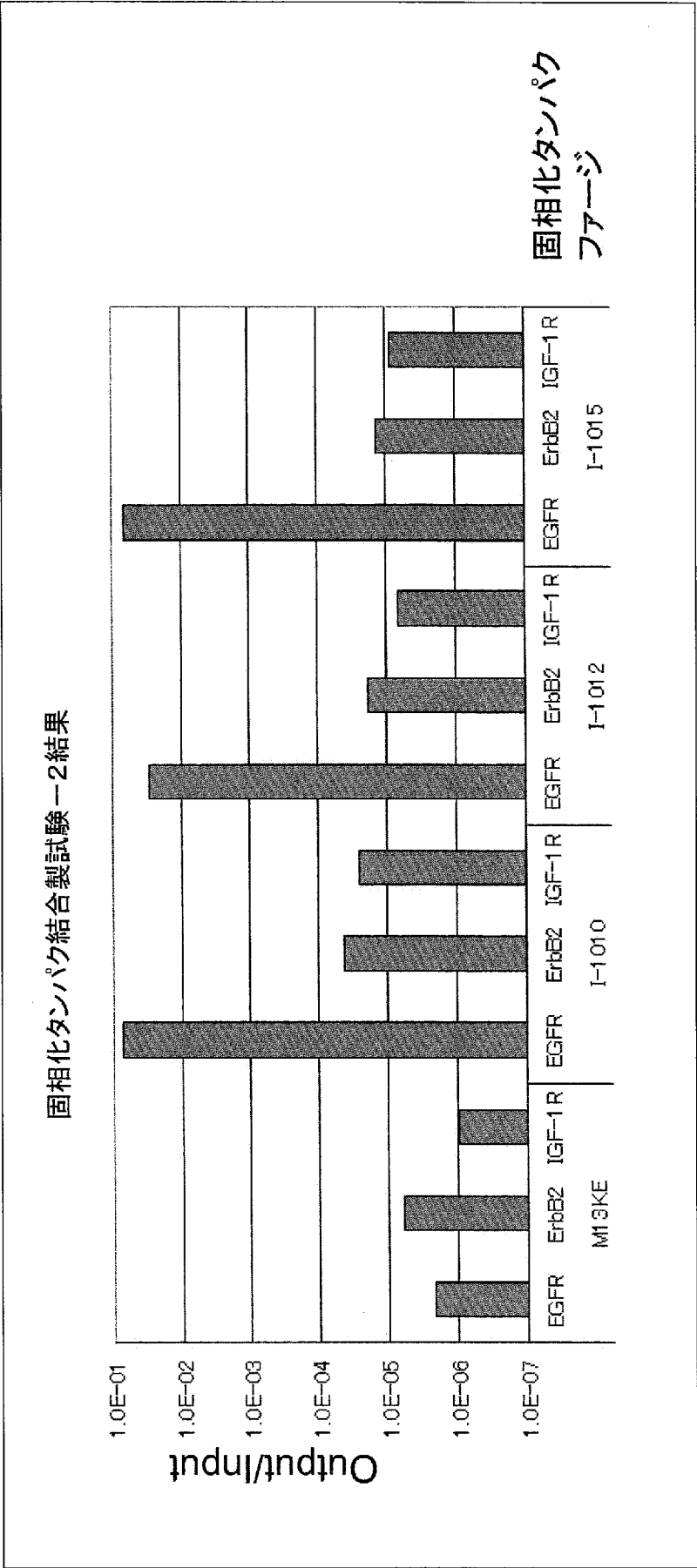
[図3]

I-1010	WHLSDLWQNAWH	(配列番号2)
I-1011	TAMPVWAMERHR	(配列番号3)
I-1012	FHDWLPEVSPPD	(配列番号4)
I-1013	QVTSIYHMYMLN	(配列番号5)
I-1014	KPTYMDLIPGSL	(配列番号6)
I-1015	LHQSEWMYVDIH	(配列番号7)
I-1016	FHRWSPEIDTEM	(配列番号8)
I-1017	LVSTHAATVLLS	(配列番号9)

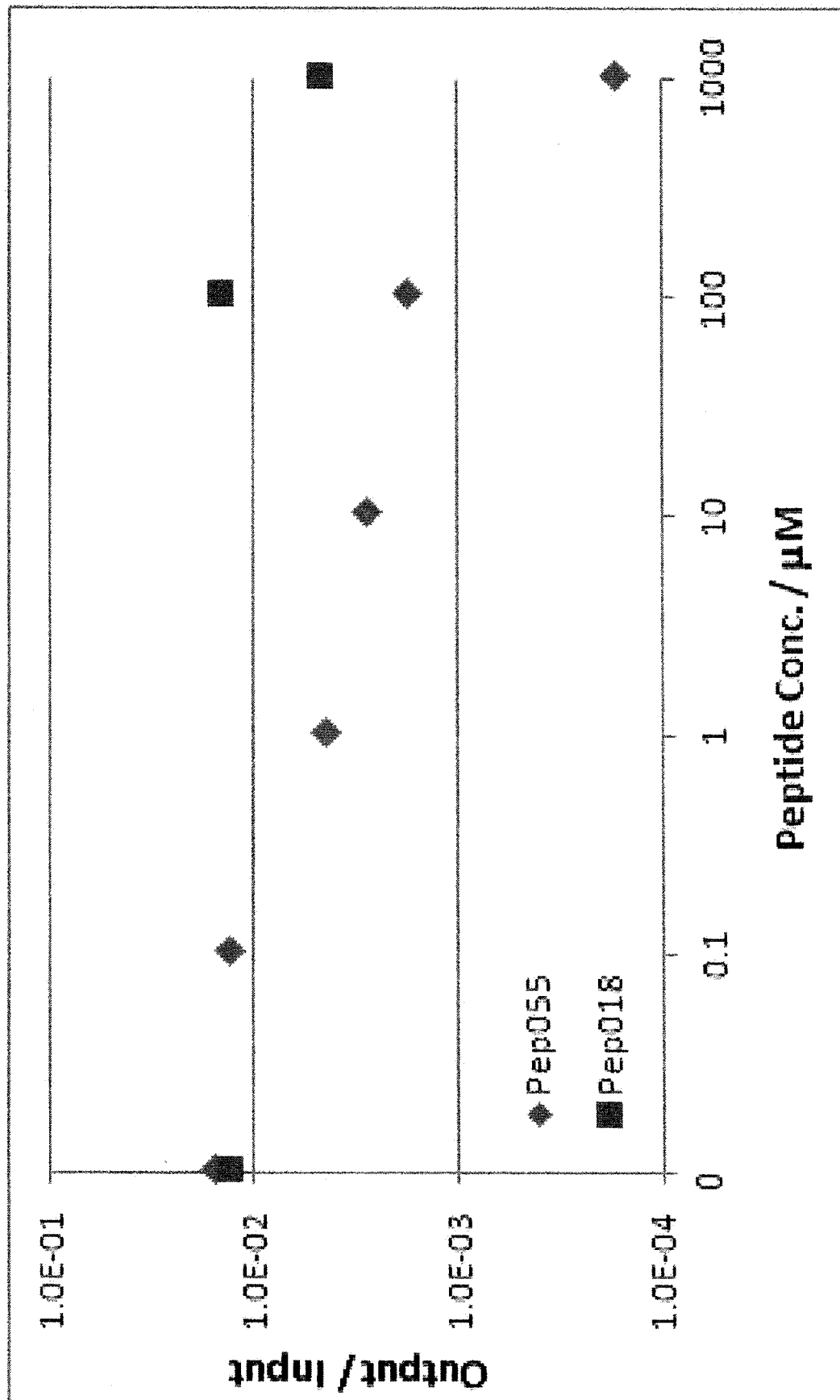
[図4]



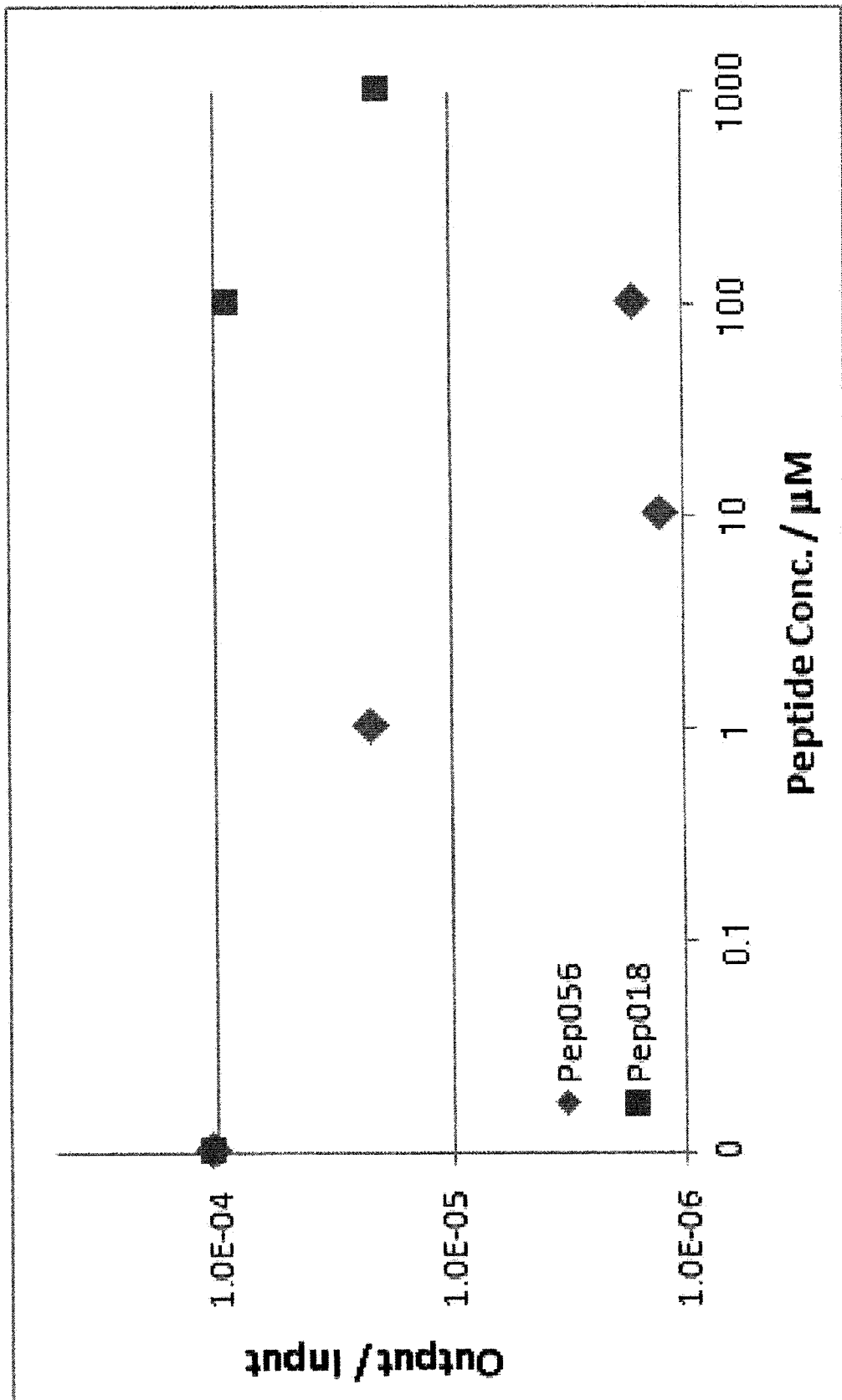
[図5]



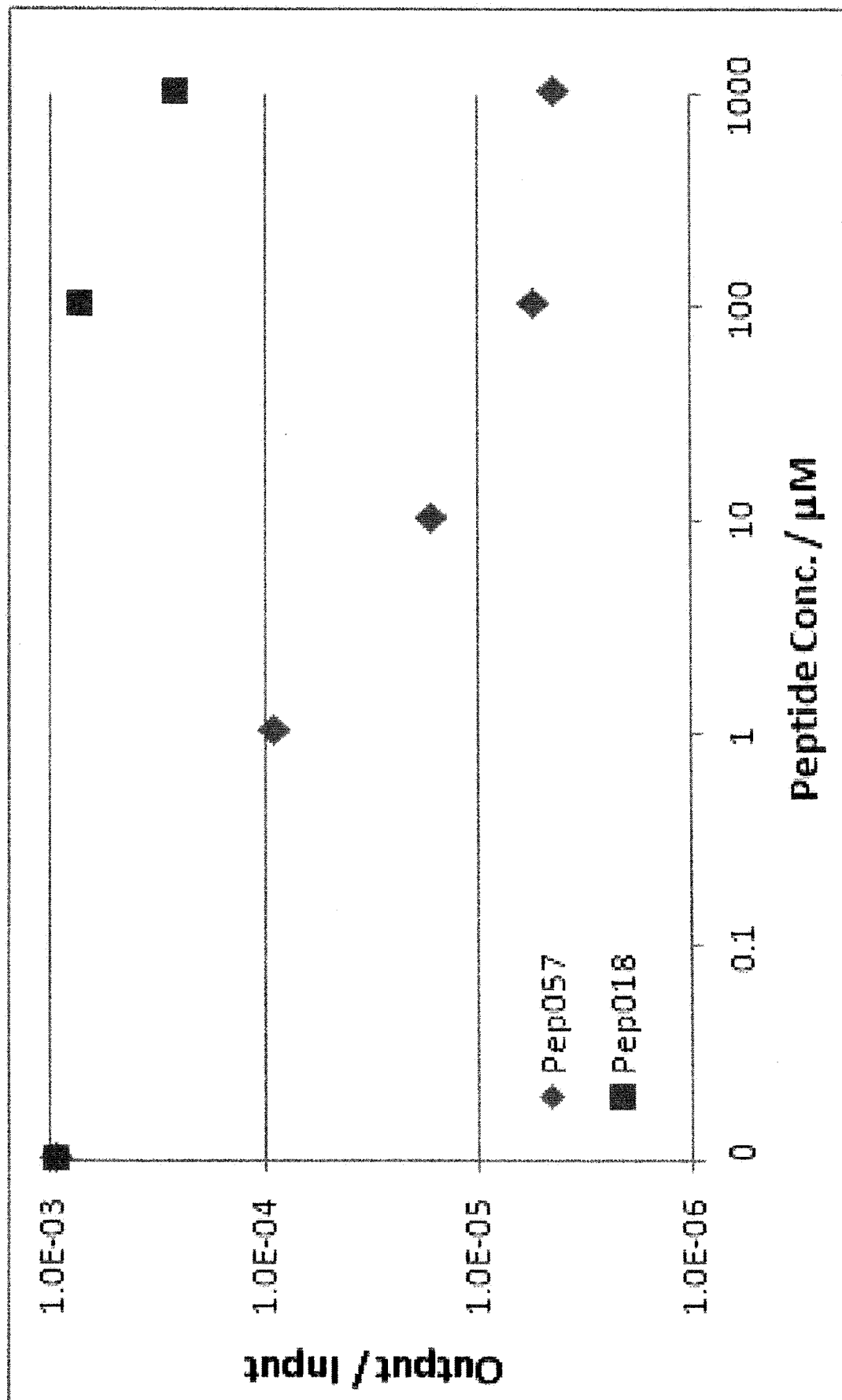
[図6]



[図7]



[図8]



[図9]

I-1010_W1A	AHLSDLWQNAWH	(配列番号11)
I-1010_H2A	WALS DLWQNAWH	(配列番号12)
I-1010_L3A	WHASDLWQNAWH	(配列番号13)
I-1010_S4A	WHLADLWQNAWH	(配列番号14)
I-1010_D5A	WHL SALWQNAWH	(配列番号15)
I-1010_L6A	WHLSDAWQNAWH	(配列番号16)
I-1010_W7A	WHLSDLAQNAWH	(配列番号17)
I-1010_Q8A	WHLSDLWANAWH	(配列番号18)
I-1010_N9A	WHLSDLWQAAWH	(配列番号19)
I-1010_W11A	WHLSDLWQNAAH	(配列番号20)
I-1010_H12A	WHLSDLWQNAWA	(配列番号21)

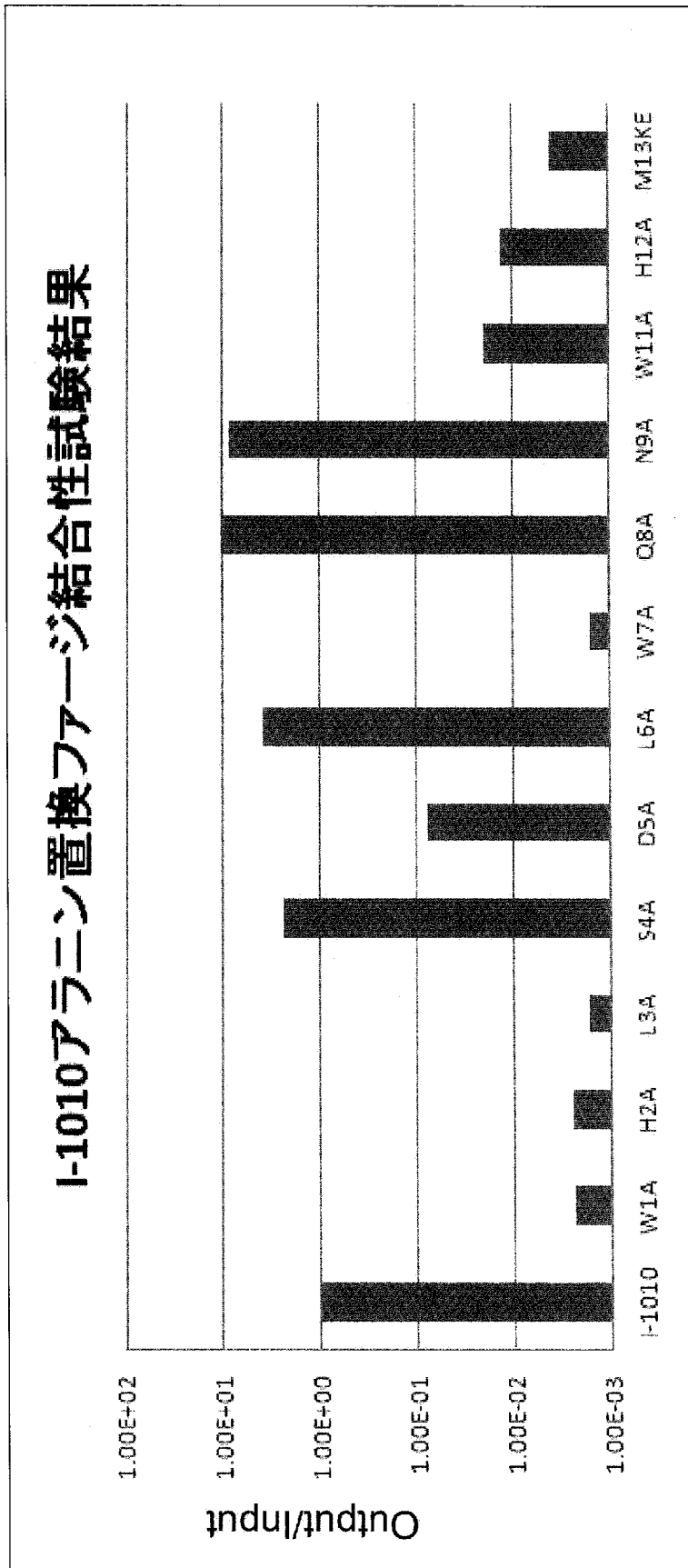
[図10]

I-1012_F1A	AHDWLPEVSPPD	(配列番号22)
I-1012_H2A	FADWLPEVSPPD	(配列番号23)
I-1012_D3A	FHAWLPEVSPPD	(配列番号24)
I-1012_W4A	FHDALPEVSPPD	(配列番号25)
I-1012_L5A	FHDWAP EVSPPD	(配列番号26)
I-1012_P6A	FHDWLAEVSPPD	(配列番号27)
I-1012_E7A	FHDWLPAVSPPD	(配列番号28)
I-1012_V8A	FHDWLPEASPPD	(配列番号29)
I-1012_S9A	FHDWLPEVAPPD	(配列番号30)
I-1012_P10A	FHDWLPEVSAPD	(配列番号31)
I-1012_P11A	FHDWLPEVSPAD	(配列番号32)
I-1012_D12A	FHDWLPEVSPPA	(配列番号33)

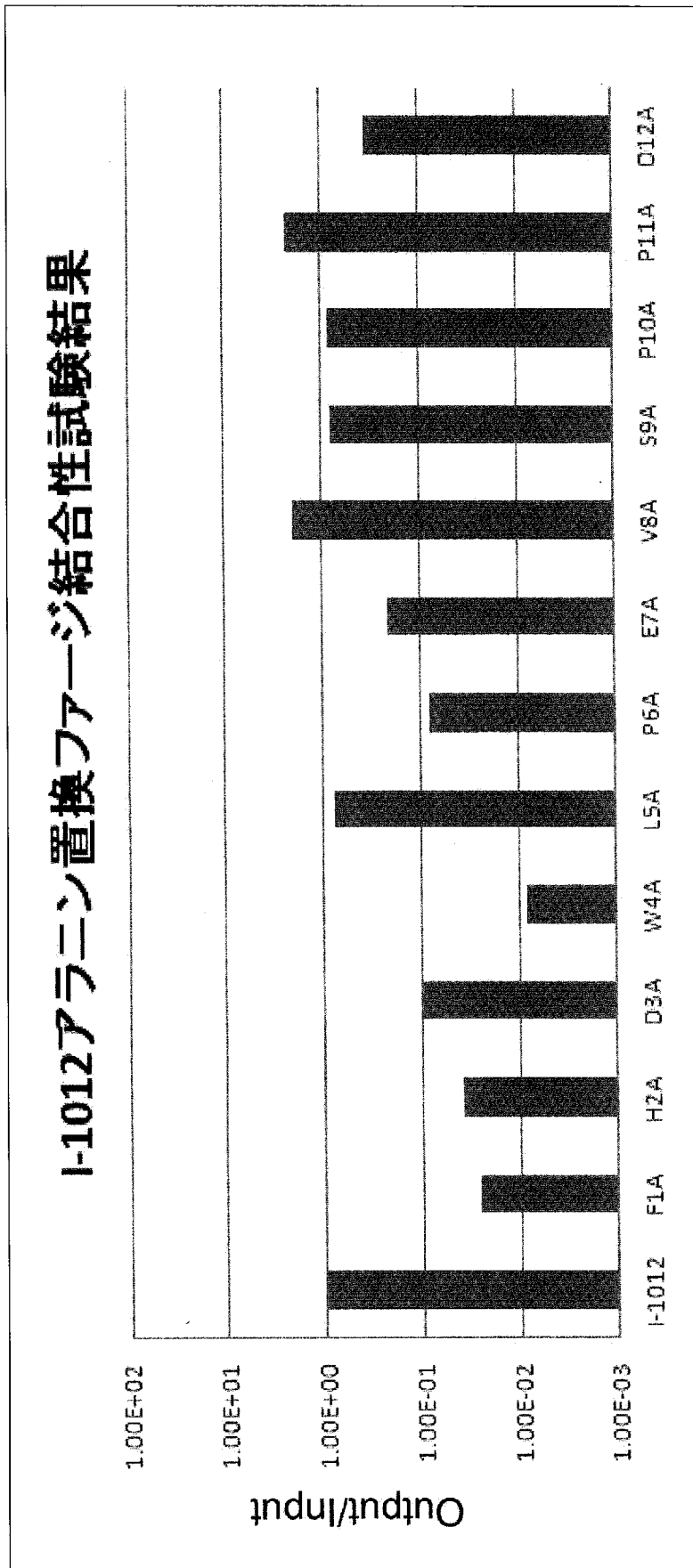
[図11]

I-1015_L1A	AHQSEWMYVDIH	(配列番号34)
I-1015_H2A	LAQSEWMYVDIH	(配列番号35)
I-1015_Q3A	LHASEWMYVDIH	(配列番号36)
I-1015_S4A	LHQAEWMYVDIH	(配列番号37)
I-1015_E5A	LHQSAWMYVDIH	(配列番号38)
I-1015_W6A	LHQSEAMYVDIH	(配列番号39)
I-1015_M7A	LHQSEWAYVDIH	(配列番号40)
I-1015_Y8A	LHQSEWMAVDIH	(配列番号41)
I-1015_V9A	LHQSEWMYADIH	(配列番号42)
I-1015_D10A	LHQSEWMYVAIH	(配列番号43)
I-1015_I11A	LHQSEWMYVDAH	(配列番号44)
I-1015_H12A	LHQSEWMYVDIA	(配列番号45)

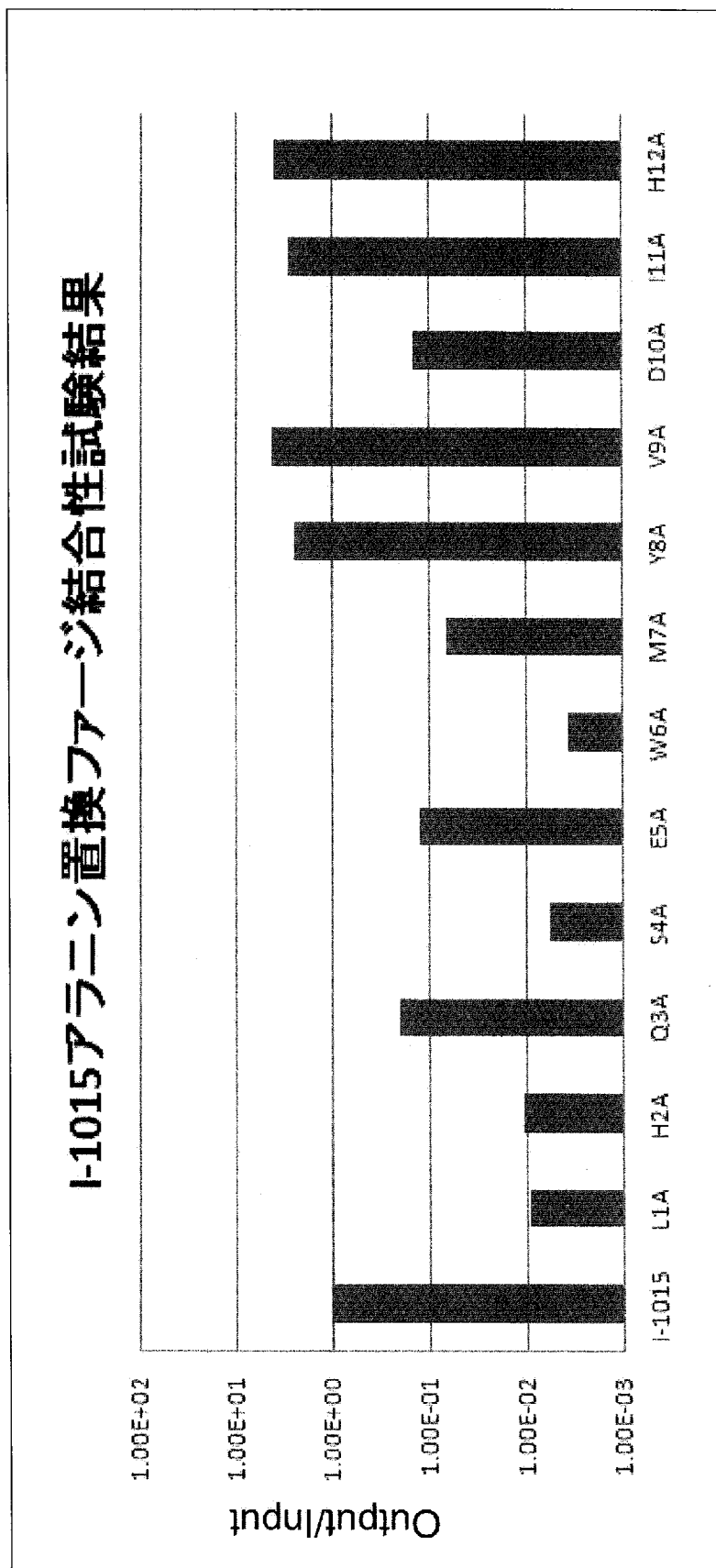
[図12]



[図13]



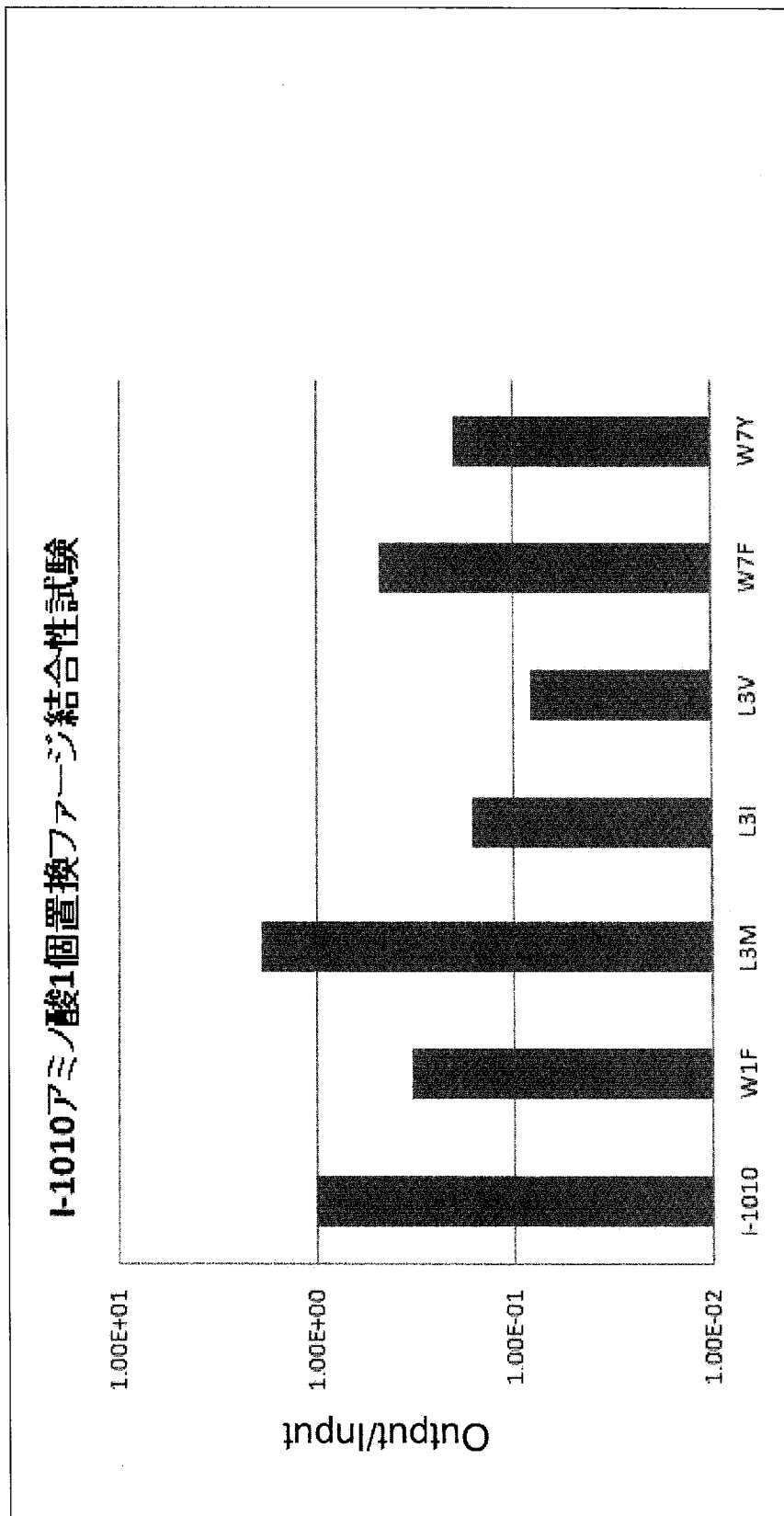
[図14]



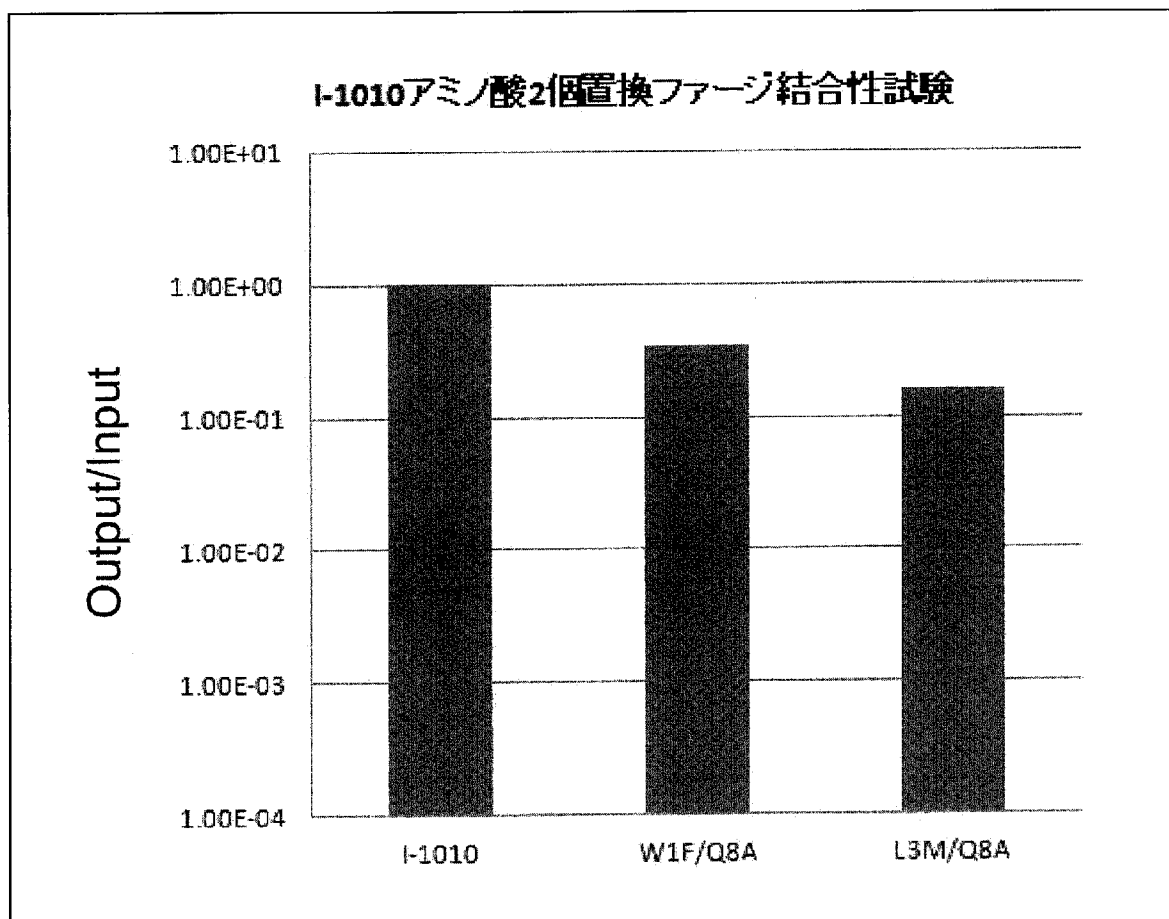
[図15]

I-1010_W1F	FHLSDLWQNAWH	(配列番号46)
I-1010_L3M	WHMSDLWQNAWH	(配列番号47)
I-1010_L3I	WHISDLWQNAWH	(配列番号48)
I-1010_L3V	WHVSDLWQNAWH	(配列番号49)
I-1010_W7F	WHLSDLFQNAWH	(配列番号50)
I-1010_W7Y	WHLSDLYQNAWH	(配列番号51)
I-1010_W1F/Q8A	FHLSDLWANAWH	(配列番号52)
I-1010_L3M/Q8A	WHMSDLWANAWH	(配列番号53)

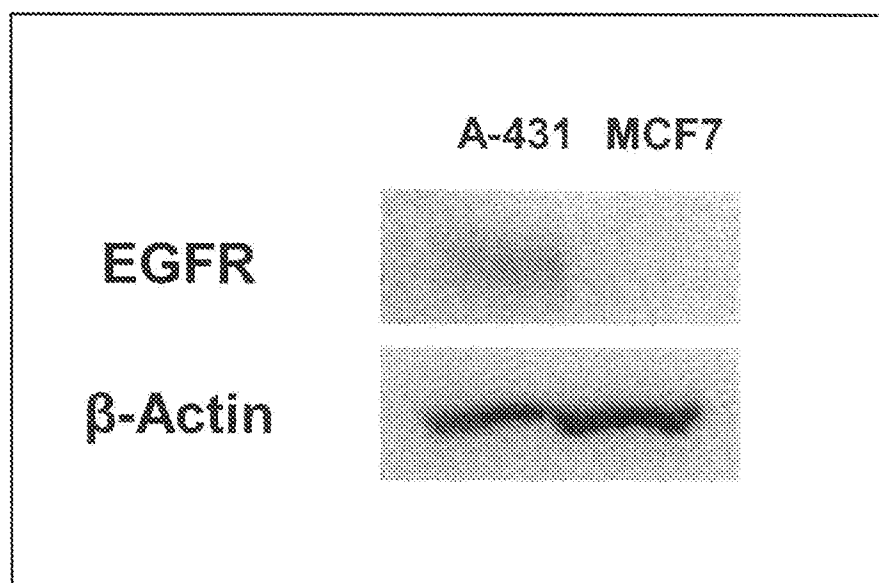
[図16]



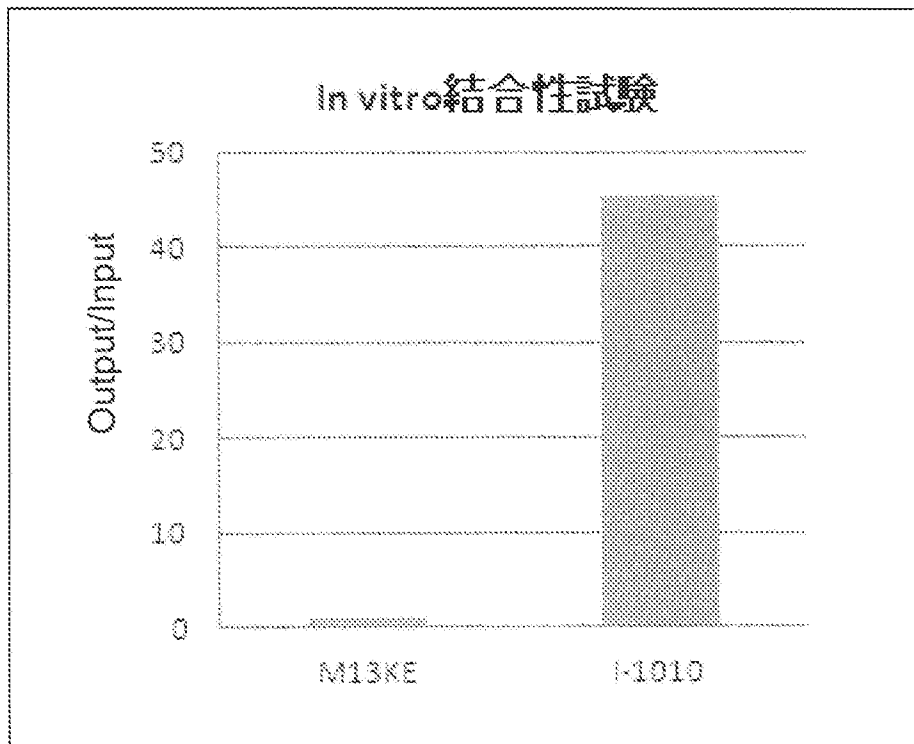
[図17]



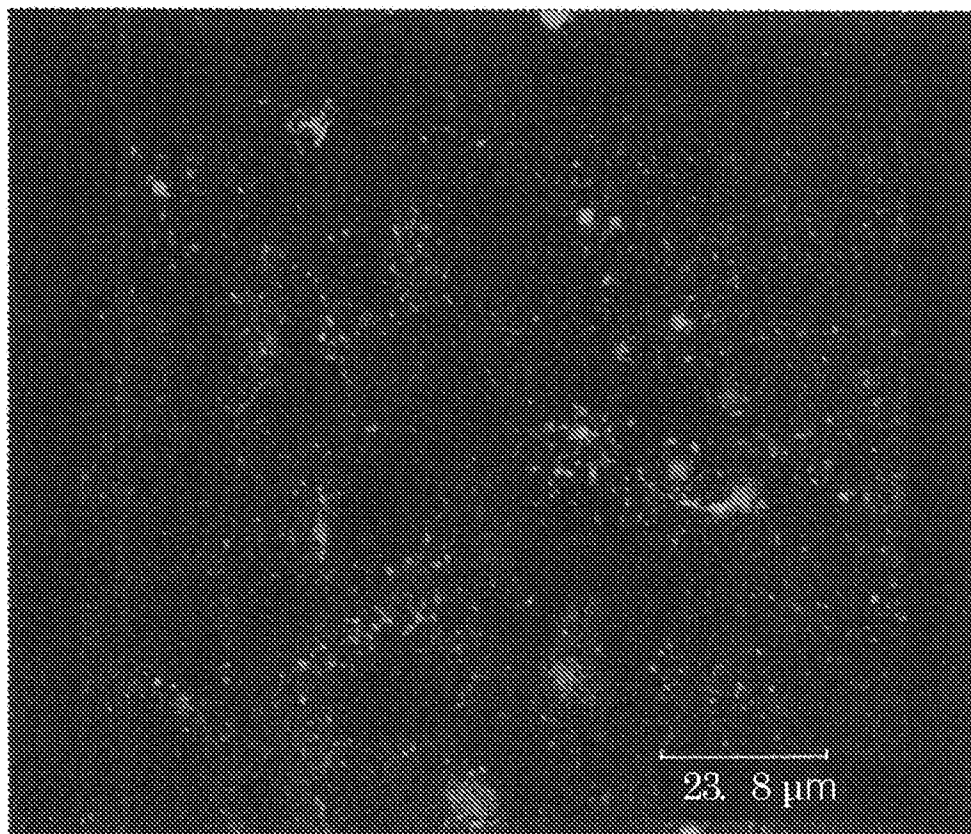
[図18]



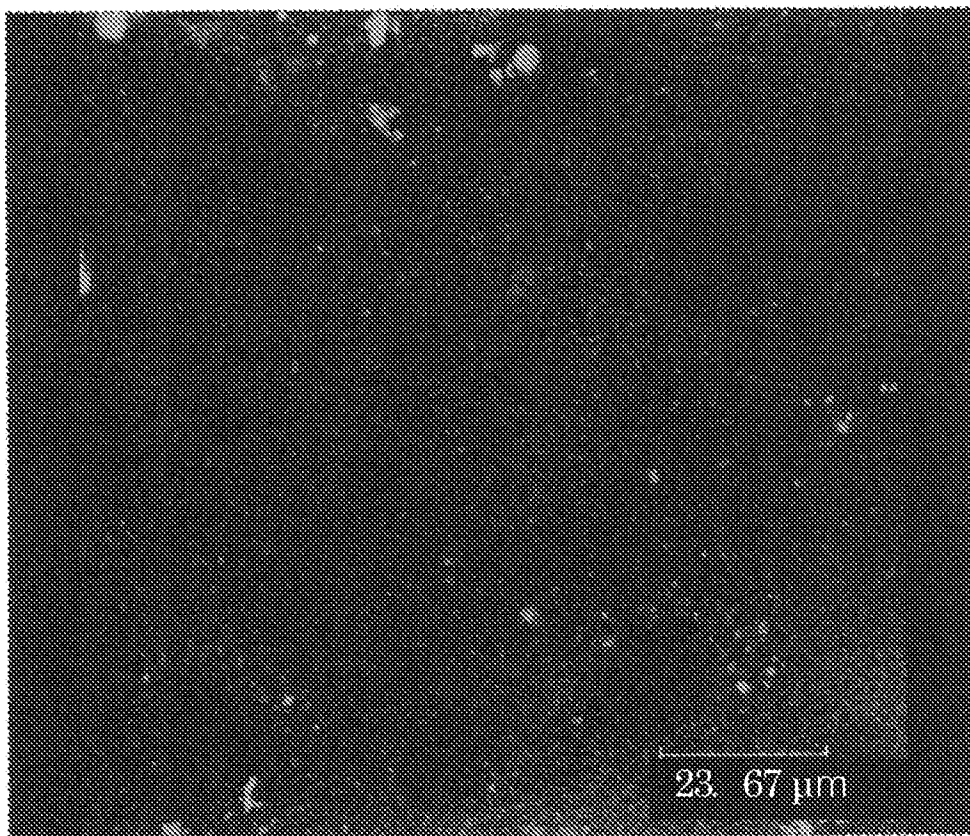
[図19]



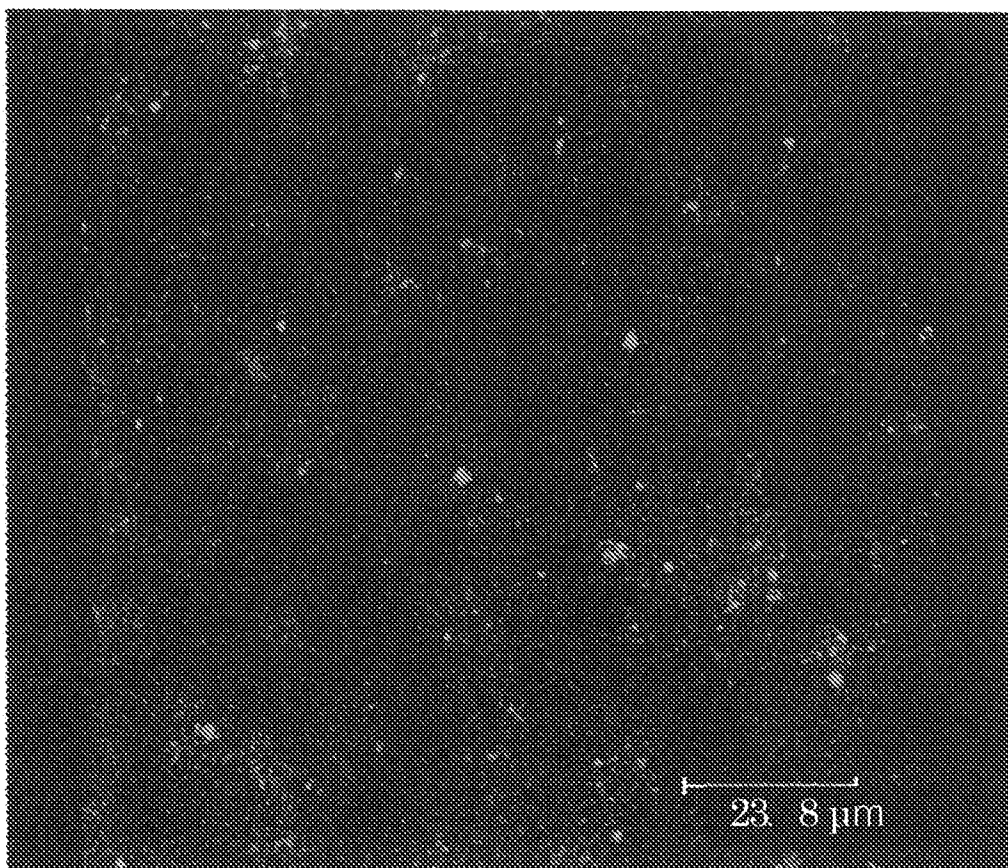
[図20]



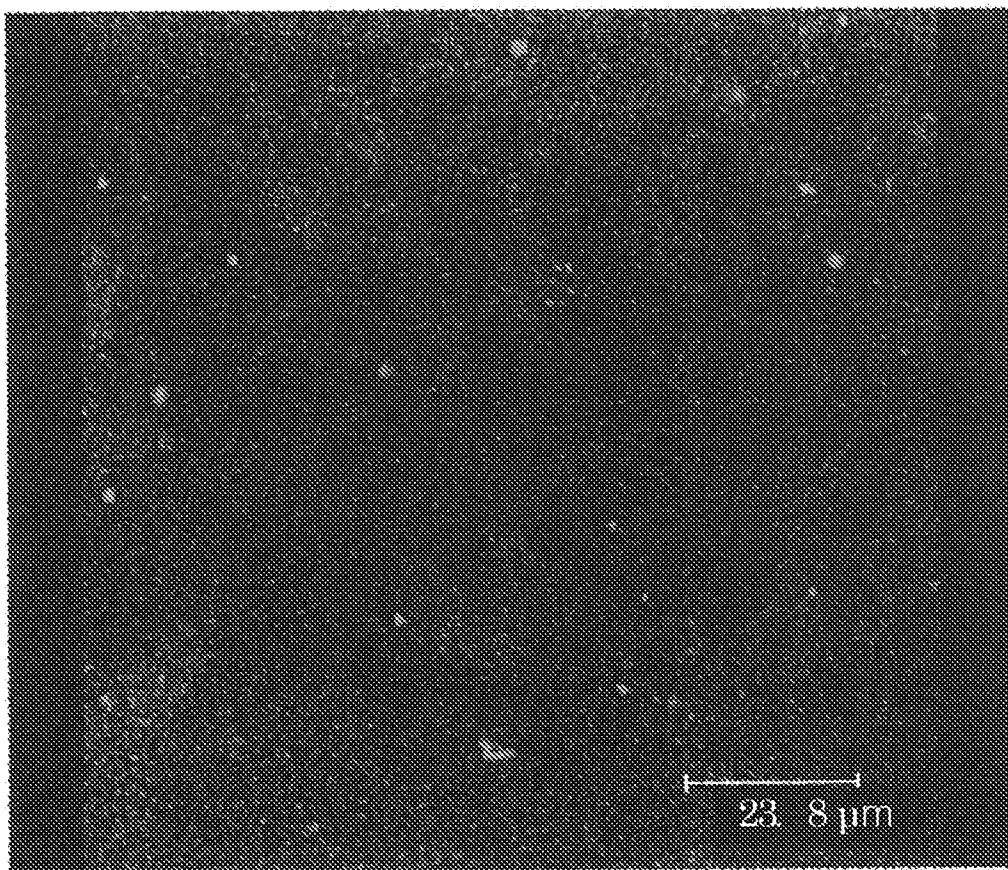
[図21]



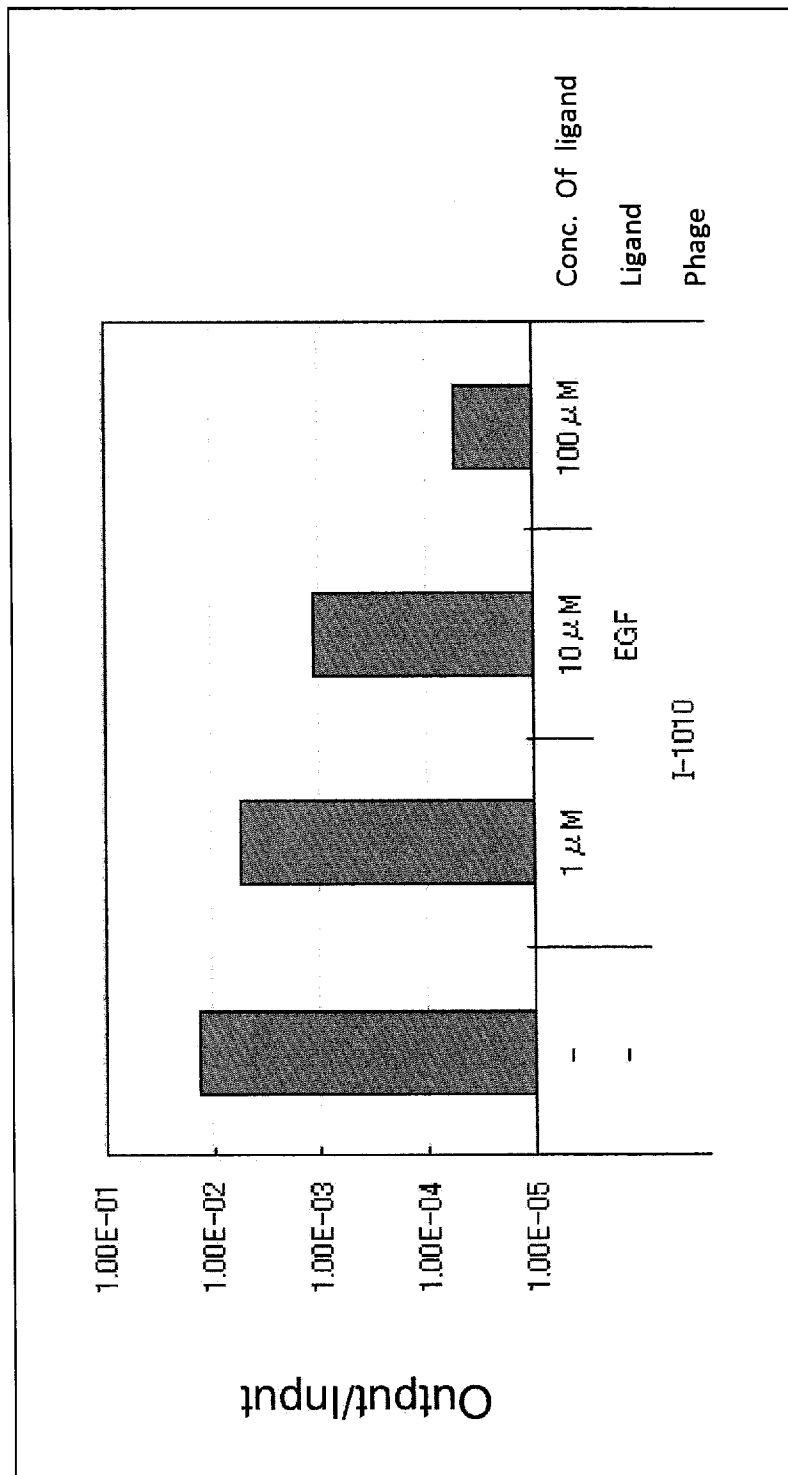
[図22]



[図23]



[図24]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/08(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K7/08, A61K38/00, A61P35/00, C07K14/00, G01N33/574, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), BIOSIS (STN), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI Z., et al., Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics, FASEB J., 2005.12, Vol.19, No.14, p.1978-1985	1-18
X	ABOURBEH G., et al., PolyIC GE11 Polyplex Inhibits EGFR-Overexpressing Tumors, IUBMB Life, 2012.04, Vol.64, No.4, p.324-330	1-18
X	JEONG M.H., et al., In vivo and in vitro evaluation of Cy5.5 conjugated epidermal growth factor receptor binding peptide, Nucl. Med. Biol., 2012.03.14, Vol.39, No.6, p.805-812, Epub edition	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 September, 2013 (02.09.13)

Date of mailing of the international search report
10 September, 2013 (10.09.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066762

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAMZEH-MIVEHROUD M., et al., Identification of new peptide ligands for epidermal growth factor receptor using phage display and computationally modeling their mode of binding, Chem. Biol. Drug Des., Vol.79, No.3, 2012.03, p.246-259	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066762

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 19 pertains to method for treatment of the human body by surgery or therapy, or diagnostic method for the same and thus relates to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

In claims 1-18, three peptides represented by formulae (1), (2) and (3), respectively, are described.

However, these peptides are not homologous with one another, and therefore share no common structure, i.e., no common important structural element.

The peptide skeleton is common among all of peptide molecules. Therefore, the peptide skeleton cannot be regarded as an important structural element.

Consequently, it cannot be considered that the three peptides share any common important structural element or have the same or corresponding technical feature.

(Continued to extra sheet)

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066762

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

- (Invention 1) Parts of claims 1-18: a peptide represented by formula (1), a composition containing the peptide, a use of peptide, and others.
- (Invention 2) Parts of claims 1-18: a peptide represented by formula (2), a composition containing the peptide, a use of peptide, and others.
- (Invention 3) Parts of claims 1-18: a peptide represented by formula (3), a composition containing the peptide, a use of peptide, and others.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K7/08(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K7/08, A61K38/00, A61P35/00, C07K14/00, G01N33/574, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), BIOSIS (STN), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX (STN), CAplus (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	LI Z., et al., Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics, FASEB J., 2005.12, Vol.19, No.14, p.1978-1985	1-18
X	ABOURBEH G., et al., PolyIC GE11 Polyplex Inhibits EGFR-Overexpressing Tumors, IUBMB Life, 2012.04, Vol.64, No.4, p.324-330	1-18

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 2 . 0 9 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 9 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小金井 悟

4 N

3 9 6 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JEONG M.H., et al., In vivo and in vitro evaluation of Cy5.5 conjugated epidermal growth factor receptor binding peptide, Nucl. Med. Biol., 2012.03.14, Vol.39, No.6, p.805-812, Epub 版	1-18
X	HAMZEH-MIVEHROUD M., et al., Identification of new peptide ligands for epidermal growth factor receptor using phage display and computationally modeling their mode of binding, Chem. Biol. Drug Des., Vol.79, No.3, 2012.03, p.246-259	1-18

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 19 は、人の身体の手術あるいは治療による処置又は診断方法であり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1～18には、式(1)、(2)又は(3)で表される3個のペプチドが記載されている。しかし、これらのペプチドは互いに相同性がないから、共通の構造、即ち、重要な構造要素を共有していない。ペプチド骨格は、全てのペプチド分子で共有しているので、重要な構造要素であるとは認められない。よって、3個のペプチド分子は、重要な構造要素を共有しておらず、同一の又は対応する技術的特徴を持っているとはみなされない。

(発明1) 請求項1～18の一部：式(1)で表されるペプチド、その含有組成物、使用等。

(発明2) 請求項1～18の一部：式(2)で表されるペプチド、その含有組成物、使用等。

(発明3) 請求項1～18の一部：式(3)で表されるペプチド、その含有組成物、使用等。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。